

최 종
연구보고서

고부가 가치 창출을 위한 기능성 버섯의 개발 및
이용연구

Development and utilization functional mushrooms
for the high value-added

농업과학기술원

농 립 부

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “고부가 가치 창출을 위한 기능성 버섯의 개발 및 이용연구” 과제
(세부과제 “기능성 균주 육성 및 인공재배기술개발”, “버섯류의 유효성분의 기능성
연구를 통한 생물소재화”, “면역조절기능 물질 분리 및 화학구조 구명”, “고부가가치성
버섯균사체의 대량생산연구”, “무리우산버섯 및 말굽버섯의 개발 및 이용 연구”, 위탁
과제 “버섯중의 ACE저해물질 탐색 및 개발”, “버섯류 천연항산화물질 분석 및 활성물
질 분리·동정 연구”)의 최종보고서로 제출합니다.

2004 년 8 월 29 일

주관연구기관명 : 농업과학기술원

총괄연구책임자 : 유 창 현

세부연구책임자 : 박 정 식

연 구 원 : 유 영 복

연 구 원 : 전 창 성

연 구 원 : 공 원 식

연 구 원 : 정 중 친

연 구 원 : 장 갑 열

연 구 원 : 조 용 현

연 구 원 : 석 순 자

협동연구기관명 : (주) 한국신약

협동연구책임자 : 이 찬 복

협동연구기관명 : 영남대학교

협동연구책임자 : 이 재 성

협동연구기관명 : 전남대학교

협동연구책임자 : 황 태 익

위탁연구기관명 : 배재대학교

위탁연구책임자 : 이 중 수

위탁연구기관명 : 건국대학교

위탁연구책임자 : 정 일 민

요 약 문

I. 제 목

고부가 가치 창출을 위한 기능성 버섯의 개발 및 이용연구

세부1 : 기능성 우수 균주 육성 및 인공 재배 기술 개발

세부2 : 유효성분의 기능성 연구를 통한 생물 소재화

- 버섯으로부터 혈전증 치료 물질의 개발 및 기능성 제품 생산 연구

위탁1 : 버섯으로부터 고혈압예방을 위한 안지오텐신 전환효소(ACE) 저해물질의 개발 및 기능성 제품 생산 연구

위탁2 : 버섯류 천연 항산화물질 분석 및 활성물질 분리·동정 연구

협동1 : 버섯류의 면역조절기능 물질의 탐색 및 이용 연구

협동2 : 고부가 가치성 버섯 균사체의 대량 생산 연구

협동3 : 무리우산버섯 및 말굽버섯의 개발 및 이용 연구

II. 연구개발의 목적 및 필요성

1. 연구개발 목표와 내용

버섯류의 면역 조절물질 탐색 및 특성검정을 통하여 기능성이 우수한 균주를 육성하고, 자실체와 균사체의 대량생산 방법 개발로 신기능 면역조절제의 개발 및 식품 소재화.

2. 연구개발의 필요성

1) 기술적 측면

- 지금까지 버섯류의 생체방어 및 생체기능 조절물질이 알려짐.
- 버섯류에서 기능성물질인 lentinan, schizophyllum, PSK 등 생리활성물질이 개발·이용되고 있으나 국내에서는 시작단계로 미흡한 상태임.
- 기능성 버섯류의 품종 다양화를 위해 균주수집 및 육종을 위한 새로운 육종기술 개발이 요구되고 있음.
- 중국에서는 약용으로 사용하는 버섯의 종류가 200여 종이 넘으며, 선진국에서는 한방재료로 이용하고 있음

2) 경제·산업적 측면

- 국내에서 자생하고 있는 1,500여 종의 버섯 중 약 1% 정도만 식용 또는 건강음료로 이용되고 있는 실정임.
- 버섯류의 신기능 면역조절물질 및 기능에 대한 탐색 및 이용으로 국내소비의증대 뿐만아니라 수출 품목으로 개발하여 버섯 산업의 활성화에 도움이 될 것임.
- 국내 재배 품종의 다양화로 농가소득 증대에 크게 기여할 것임.

3) 사회·문화적 측면

- 최근 식생활의 서구화로 각종 성인병이 증가하고 있고 그에 따라서 국민들의건강에 대한 관심이 고조되고 있음.
- 시판되고 있는 기능성 식품들의 대부분이 고가이므로 값싸게 먹을 수 있는 기능성 버섯 제품의 개발이 절실히 필요함.
- 버섯류의 기능성에 관한 종합적인 연구의 일환으로 면역조절기능에 대한 명확한 자료를 제공함으로써 버섯제품에 대한 홍보자료로 이용함.
- 약용버섯류의 품목 다양화로 고령화된 유희노동력의 활용이 가능.

III. 연구개발 내용 및 범위

구분	연구개발 목표	연구개발 내용 및 범위
1차 년도 (2001)	○ 기능성 우수 균주 육성 및 인공 재배 기술 개발	<ul style="list-style-type: none"> - 기능성버섯 균주 수집 : 장수버섯, 잎새버섯, 비늘버섯, 차가버섯 - rDNA 분석에 의한 종 구분 - 기능성 버섯류의 단포자분리 교배 - 균주별 최적배지 선발 - 균주별 배양적 특성 조사 - 자실체 형성 조건 조사
	○ 버섯류의 유효성분 및 기능성 탐색	<ul style="list-style-type: none"> - 혈전 등 치료제의 탐색 - 유용성분의 분리정제 및 약리효능조사 - ACE 저해활성물질의 탐색(위탁1:배재대) <ul style="list-style-type: none"> · 각종 버섯의 화학 성분 조사 · ACE저해 물질의 탐색 · 각종 단백질 분해 효소 처리에 의한 ACE 저해 물질의 생산 - 각종 항산화활성 검정법을 비교 검토하여 고허산화활성 버섯류 선발(위탁2:건국대) <ul style="list-style-type: none"> · 검정방법 : NBT법, DPPH법, TBA법, FI-CL법, ESR법 이용
	○ 면역조절 물질의 탐색 및 특성 구명	<ul style="list-style-type: none"> - 면역조절물질 생산균주의 탐색 및 특성조사 - 면역조절기능 생물활성 검색방법 확립 - 활성물질의 화학적 특성 조사
	○ 균사체 대량생산 기술개발	<ul style="list-style-type: none"> - 균사체 대량생산 배지 선발 <ul style="list-style-type: none"> · pH에 따른 생산성 · 빛의 유무에 따른 생산성 · 계면활성제의 종류에 따른 생산성 · 계면활성제의 농도에 따른 생산성
	○ 무리우산버섯과 말굽버섯의 생리적 특성 파악	<ul style="list-style-type: none"> - 공시균의 생리적 특성 파악 <ul style="list-style-type: none"> · 무리우산버섯균의 균사생장특성 규명 · 무리우산버섯균의 목질셀룰로오스 분해특성 규명 · 말굽버섯균의 균사생장특성 규명 · 말굽버섯균의 목질셀룰로오스의 분해특성 규명 - 기능성물질의 분리정제 <ul style="list-style-type: none"> · 수집계통별 미지의 기능성 물질의 분리정제 · 기능성 검정

구 분	연구 개발 목표	연구개발 내용 및 범위
2차 년도 (2002)	○ 기능성 우수균주 육성 및 인공 재배 기술 개발	<ul style="list-style-type: none"> - PCR에 의한 계통간 유연관계 분석 - 단핵 교배주의 배양 및 재배특성 조사 - 교배육성 균주 선발을 위한 기능성 관련 표지형질 개발 - 톱밥수증 및 배지재료에 대한 생산력검정
	○ 버섯류 유효성분의 특성 조사	<ul style="list-style-type: none"> - 유용성분의 화학적 특성 - ACE저해물질의 기능성발현조사(위탁1:배재대) <ul style="list-style-type: none"> · 버섯 ACE저해 물질의 분리 및 정제 · 버섯 ACE저해 물질의 물리 화학적 특성 조사 · 버섯 ACE저해 물질의 기능성 발현 조사-동물 실험 - 항산화활성 물질 추출 및 분리(위탁2:건국대) <ul style="list-style-type: none"> · 천연항산화 활성물질 추출 및 분리 추출 및 분리과정의 각 분획별로 활성검정(검정방법) : NBT법, DPPH법, TBA법, FI-CL법, ESR법 이용 · 분리·정제된 활성물질인 항산화제의 구조 결정 · 순수 분리·정제된 물질의 이화학적 특성 조사 (용해성, Rf, 발색반응 등) · 활성물질의 기기분석(UV, IR, ¹H-¹³C-NMR, GC-MS) 등의 화학기기를 이용하여 얻은 스펙트럼을 분석함으로써 화학구조를 결정 · HPLC, GC에 의한 물질의 순도 확인
	○ 면역조절 물질의 기능성 조사	<ul style="list-style-type: none"> - 면역조절물질의 화학적 구조 해석 - 활성물질의 약리활성 대사 기작
	○ 균사체 대량 생산 기술 개발	<ul style="list-style-type: none"> - 5L 실험실용 bioreactor 배양조건 확립 <ul style="list-style-type: none"> · 최적 생산성 산소농도 확립 · 교반조건 확립 · 접종원 농도 구명
	○ 무리우산버섯과 말굽버섯의 대량증식법 개발 및 기능성 물질의 분리	<ul style="list-style-type: none"> - 공시균의 균사체 및 자실체 대량증식법 개발 <ul style="list-style-type: none"> · 무리우산버섯의 균사체 대량증식법 개발 · 무리우산버섯의 자실체 대량증식법 개발 · 말굽버섯의 균사체 대량증식법 개발 · 말굽버섯의 자실체 인공재배 가능성 타진 - 기능성 물질의 분리정제, 항암성 확인 <ul style="list-style-type: none"> · 기능성 물질의 기능의 대사기전확인(동물실험) · 기능성 물질의 분자구조 확인

구분	연구 개발 목표	연구개발 내용 및 범위
3차 년도 (2003)	○ 기능성 우수 균주 육성 및 인공 재배 기술 개발	<ul style="list-style-type: none"> - 생산력 검정에 의한 품종 선발 - 기능성 우수균주 선발 및 등록 - 생산력 검정 - 농가 확대재배 시험
	○ 유효성분을 이용한 생물 소 재화	<ul style="list-style-type: none"> - 약리효능에 따른 전 임상 시험 - 유효성분의 대량정제법 체계화 - 생물소재화: 식품 및 의약품 소재화 - ACE 저해물질(위탁1:배재대) <ul style="list-style-type: none"> · 버섯 ACE저해 물질을 함유한 기능성 건강 식품(음료, 주류등)의 제조 및 특성 조사 · 버섯 ACE저해 물질을 함유한 의약품(또는 의약 보조제)의 제조 및 특성 조사 · 제조된 기능성 버섯 제품의 독성 및 안전성 검토 · 기능성 버섯제품의 대량 생산 방법 검토 - 항산화활성 물질(위탁2:건국대) <ul style="list-style-type: none"> · 분리·정제된 활성물질의 효과 확인 및 기존의 항산화제와 효과 비교시험 · 천연항산화제로서의 도출을 위한 검사 · 분리·정제 물질의 체내 흡수 및 대사작용 연구 · 분리·정제된 물질과 기존 항산화제와의 이화학적 특성 비교 · 비교대상 항산화제 :tocopherol, BHT, BHA · 정제된 물질을 이용하여 항산화효과검정 · 실험방법 : 실험동물 산화 모델 시스템을 이용(Sparague-Dawley계 수컷 흰쥐) · 조사항목 : 조직의 항산화능력분석
	○ 면역기능 조절제의 개발	<ul style="list-style-type: none"> - 활성물질의 전 임상시험 - 활성물질의 대량정제법 체계화 - 제제화
	○ 균사체 대량생산 기술 개발	<ul style="list-style-type: none"> - 산업적 규모의 bioreactor 조건 확립 · 산업화 조건 산소공급 및 용존산소량 확립 · 산업화 조건 배지멸균 및 접종방법 확립
	○ 무리우산버섯과 말굽버섯의 기능성물질의 대량생산과 이용성 실증연구	<ul style="list-style-type: none"> - 공시균 대량증식 실연 · 무리우산버섯 병재배법의 실연 및 작업성 분석 · 말굽버섯의 자실체 인공재배법 개발 - 기능성물질의 대량생산과 이용성 실증연구 · 기능성 식품과 의약품 원료공급 시스템 기술연구와 상품화 가능성 확인 및 제시 · 기능성물질의 대량생산시스템 완료 · 기능성 물질 분리정제과정의 단순화 및 표준화

IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

세부1 : 기능성 우수 균주 육성 및 인공 재배 기술 개발

1. 기능성균주(장수버섯, 잎새버섯, 비늘버섯, 차가버섯) 수집 및 유연관계 분석
 - 장수버섯 19, 잎새버섯 35, 비늘버섯 41, 차가버섯 12균주 수집
 - URP primer에 의한 핵산지문법, ITS sequencing 수행 균주간 유연관계 분석
 - 대표종에 대한 ITS sequence를 GenBank에 등록
2. 기능성버섯 균주의 인공재배법 개발
 - PDA, MCM, YM, MEA배지에서 버섯 종류별 균주별 최적배지 선별 및 배양적 특성 조사
 - 톱밥수종별 균사생장량 조사와 병재배 및 포트재배를 통한 자실체 형성 조건을 조사하여 재배법을 개발
 - 버섯종류별 병배배법, 포트재배법, 상자재배법, 원목재배법을 개발하였음.
3. 기능성버섯 품종육성
 - 장수버섯 68개 단핵균주, 비늘버섯 184개 단핵균주 육성, 잎새버섯 28개 단핵균주 육성
 - 버섯 종류별 단핵균주를 분리하여 단핵균주간 교배 및 Di-mono 교배를 통한 이핵균주를 육성하였음.
 - 기능성 버섯으로 비늘버섯, 잎새버섯, 장수버섯 각 1균주를 선별함
 - 농가 확대재배시험 중임
 - 그 외 맛버섯과 띠비늘버섯의 재배가능성이 검토됨
 - 교배주 및 육성품종의 DNA finger printing으로 pattern 분석
4. 기능성관련 표지형질개발
 - 항산화 활성 검정법 비교검토
 - 비늘버섯의 생육단계별 SOD 활성비교
 - 비늘버섯 자실체에서 cDNA library 작성
 - 항산화와 관련된 SOD 유전자 분리
(Mn-SOD, Fe-SOD gene을 cloning)
5. 활용에 대한 건의
 - 비늘버섯, 잎새버섯, 장수버섯 선별균주는 품종심의회를 거쳐 각 1 품종 등록 예정

세부2 : 유효성분의 기능성 연구를 통한 생물 소재화

- 버섯으로부터 혈전증 치료 물질의 개발 및 기능성 제품 생산 연구

농업과학기술원에서 분양받은 52종의 시료버섯 가운데 차가버섯(*Inonotus obliquus*) ASI 74006 균사체의 에탄올 추출물이 가장 높은 혈소판 응집 저해 활성(81.2%)을 보여 우수시료로 선발하였다. 이 혈소판 응집 저해물질을 유기용매 분획, 한외여과, Sephadex G-10 컬럼 크로마토그래피와 역상 HPLC 등으로 정제한 결과 314 Da의 분자량을 가진 peptide이었다. 차가버섯 ASI 74006 에탄올 추출물을 이용하여 항혈전 음료를 개발한 결과 맛과 향이 우수하면서 혈소판 응집 저해 활성이 고형분 mg 당 25%을 갖는, 항혈전 효능이 비교적 우수한 제품을 개발하였다. 또한, 이들은 세포 독성이나 돌연변이성 및 부작용등이 없었고 저장 중 침전물 생성 등 제품의 품질에도 문제가 없었다.

본 과제 수행을 통하여 얻은 결과들은 고부가가치의 새로운 기능성 버섯식품개발 분야에 크게 활용 되어 이들 산업의 활성화에 크게 기여할 것이다. 또한 항혈전 버섯제품 생산 방법은 건강식품이나 식품의약품 관련 회사에 기술이전 시켜 이들의 산업화를 유도한다.

위탁1 : 버섯으로부터 고혈압예방을 위한 안지오텐신 전환효소(ACE) 저해물질의 개발 및 기능성 제품 생산 연구

농업과학기술원에서 분양받은 52종의 시료버섯은 7.1~56.5%의 조단백질과 0.2~4.4%의 조지방, 30.3~86.6%의 탄수화물을 각각 함유하고 있었고 이 가운데 비늘버섯(*Pholiota adiposa*) ASI 24012 자실체의 물추출물이 가장 높은 ACE 저해활성(IC50:0.45mg)을 보여 우수시료로 선발하였다. 이 ACE 저해물질을 한외여과, Sephadex G-25 컬럼크로마토그래피와 역상 HPLC 등으로 정제한 결과 414 Da의 분자량을 가진 pentapeptide이었고 ACE를 경쟁적으로 저해하였다. 비늘버섯 ASI 24012의 extracts를 이용하여 항고혈압성 음료와 주류를 개발한 결과 맛과 향이 우수하면서 ACE저해활성이 각각 12%, 78.3%로 항고혈압 활성이 비교적 우수한 제품을 개발하였다. 또한, 이들은 세포 독성이나 돌연변이성 및 부작용등이 없었고 저장 중 침전물 생성 등 제품의 품질에도 문제가 없었다.

본 과제 수행을 통하여 얻은 결과들은 고부가가치의 새로운 기능성 버섯식품개발 분야에 크게 활용 되어 이들 산업의 활성화에 크게 기여할 것이다. 항고혈압 버섯제품 생산 방법을 특허 출원하여 등록한 후 이들을 건강식품이나 식품의약품 관련 회사에 기술이전 시키며 Peptide J 등의 국제 학술지에 주요 내용들을 발표한다.

위탁2 : 버섯류 천연 항산화물질 분석 및 활성물질 분리·동정 연구

1. 각종 항산화활성 검정법을 비교 검토하여 고 항산화활성 버섯류 검정 및 선발

- 1) SOD 실험에서는 포토벨라(26.83%)가 가장 높은 억제율을 보였으며, M-2(21.1%)> 새송이(20.93%)> 23(19) (20.26%)> M-1(20.28%) 순으로 억제율이 높았고, M-16을 포함한 19품종에서는 억제율이 없는 것으로 나타났다.
- 2) POD 실험에서는 74007(30.09%)이 가장 높은 억제율을 보였으며, 9010(18.75%)> 17001(14.93%)> 17003(13.22%)> 9006(12.99%) 순으로 억제율이 높았고, 170-1을 포함한 54개 품종에서는 억제율이 없는 것으로 나타났다.

- 3) DPPH 실험에서는 F-J(80.51%)이 가장 높은 억제율을 보였으며, 9010(64.38%)> 9006(59.17%)> DE-E(57.56%)> 9009(53.49%) 순으로 억제율이 높았고, 이 품종들을 포함한 총19개 품종에서는 40%이상의 높은 억제율을 보였으나, 74013을 포함한 15품종에서는 10%이하의 낮은 억제율을 보였다.
- 4) TBA 실험에서는 새송이(67.5%)가 가장 높은 억제율을 보였으며, 23(19) (67.38%)> 5019(65.54%)> 17016(56.83%)> VI(56.73%) 순으로 억제율이 높았고, 이 품종을 포함한 총16품종에서 40%이상의 높은 억제율을 보였으나, 9025를 포함한 10품종에서는 10% 이하의 낮은 억제율을 보였다.
- 6) Electron Spin Resonance (ESR) 방법에 의한 항산화 활성 검정 결과, 이전 실험에서 높은 활성을 나타낸 그룹과 낮은 활성을 나타낸 그룹의 평균적인 signal intensities는 standard의 Mn^{2+} peak intensity와 비교하였을 때, 각각 0.25 와 0.83 times를 보였다.

2. 항산화활성 물질 추출 및 분리·정제된 활성물질인 항산화제의 구조결정

- 1) 비늘버섯(24027: *Pholiota adiposa*)은 Hexen, EtOAc, MeOH의 용매를 사용하여 물질을 분리하였다. 분리된 물질들을 IR, MS, 1H NMR, ^{13}C NMR 분석 결과 (1) 1-Linoleic-2-olein, (2) stigmasterol, (3) 1,4-glucopyranosyl-1',4'-glucopyranosyl-1",4"-glucopyranoside, (4) 2',3'-diphosphoryl-1'-propanoxy- β -D-glucopyranoside, (5) 1-linoleio-3-olein, (6) 1-(N, N, N-trimethyl ethyl amino phosphoryl) 2,3-dilinolein ion, (7) Glycerol phosphate로 동정되어졌다.

3. 분리·정제된 활성물질의 효과 확인 및 기존의 항산화제와 효과 비교 시험

1) *In vitro* 에서의 활성물질 효과 평가

- ① P383 murine leukemia cell을 이용한 성장 억제 효과 (IC_{50})에서는 1-linleio-2-olein 가 $41\mu g/ml$ 을 나타내어 가장 높은 효과를 보였으며, stigmasterol은 $50\mu g/ml$ 을 보였다.
- ② 라디칼 소거능(RC_{50}) 활성측정에서 1-linleio-2-olein이 $2.2\mu g/ml$ 로 매우 높은 억제력을 보였다. 그리고 stigmasterol, Glycerol triphosphate, 1-(N,N,N-trimethyl ethyl amino phosphoryl) 2,3-dilinolein ion는 각각 17.5, 49, $48\mu g/ml$ 를 나타내었다.
- ③ H_2O_2 처리에 의한 세포생존을 조사에서는 stigmasterol의 농도와 배양시간이 증가함에 따라 과산화수소에 의한 산화스트레스를 강력하게 억제하였다.

2) *In vivo* 에서의 활성효과 검정

- ① 버섯 추출물 투여에서 체중증가가 보였으며, 기존에 항산화제로 알려진 비타민E와 비교하였을 때 유의적인 차이는 나타나지 않았다.
- ② GCT 활성과 GPT 활성에서 stigmasterol 투여군이 다른 처리 구에 비해 현저히 낮은 활성을 보여 stigmasterol이 알콜에 의한 간 손상에 대해 보호 작용을 하는 것을 알 수 있었다. 그러나 γ -GTP, total cholesterol, HDL, LDL.에서는 처리 간 유의차가 나타나지 않았다.
- ③ 간, 뇌, 이자에서 측정된 MDA 함량은 각 실험군들간에 유의적인 차이가 나타나지는 않았다. 하지만 간과 뇌에서 알콜 투여군에 비해서 강력한 항산화제로 알려진 비타민 E 투여군과 버섯 추출물 투여군이 비슷한 수준으로 MDA 함량 감소시켰다.
- ④ GST 활성도측정결과, 비타민 E 투여군 ($308.40 \pm 51.49 \mu mol/min/mg$ protein) > stigmasterol 투여군($279.91 \pm 30.04 \mu mol/min/mg$ protein) > 생리식염수 투여군

(250.22±24.28 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ protein) > 버섯 조추물 투여군(199.22±22.90 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ protein) > 알콜 투여군(194.51±24.73 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ protein) 순으로 나타났다. 또한 stigmasterol 은 알콜에 비해서 유의적 차이는 없지만 높은 활성을 나타내어 알콜에 의해 감소된 GST 활성도를 어느 정도 정상화시키는 것으로 나타났다.

협동1 : 버섯류의 면역조절기능 물질의 탐색 및 이용 연구

1 연구 개발 결과

- 가. 면역 조절기능 생물활성 검색을 위한 마우스 strain 및 시료 농도에 따른 면역 반응성 조사 결과 교잡군(Hybrid) BDF₁이, 시료 농도는 25 $\mu\text{g}/\text{mg}$ 농도로 72시간 배양 조건이 최적의 상태임을 알았다.
- 나. 면역 조절 물질 생산 균주 선발을 위한 104종의 공시균주의 열수 추출물의 B 임과 구 항체능 조사 결과 24007과 74006의 조 다당체의 생물학적 활성능이 매우 강하게 나타났다.
- 다. 24007과 74006의 MTT세포 독성 결과 대장암 세포주(HT1080)과 자궁경부암 세포주(HeLa)에 대해 농도 의존적으로 세포의 증식을 억제하지만, 대장암 세포주(SW480)에는 효과가 없는 것으로 보아 특정 세포이 선택적으로 작용하는 것으로 판단된다.
- 라. 24007의 암세포주의 apoptosis 유도능을 검색한 결과 DNA의 degradation이 일어나는 것을 확인 하였다.
- 마. RT-PCR을 통한 MMPs 의 mRNA 발현량 조사에서 24007 처리군이 MMP의 발현량이 적은 것으로 보아 24007 추출물이 단백 분해를 통하여 암세포의 전이나 침윤을 억제 할 것으로 추측된다.
- 바. SDS-PAGE를 이용한 74006의 추출물의 분자량은 대략 30-32KDa이다.
- 사. 74006 조 다당을 이용한 항 당노 및 비만 억제 실험에서 처리군이 미 처리군에 비해 몸무게는 20%, 혈당은 40% 억제 효과가 있다.
- 아. 24007, 74006 균사체의 조 다당 구성 성분의 대부분은 glucose이며, 그 외 glucosamine, galactose, mannose 등으로 구성되어 있다.
- 자. 74006의 독성시험 결과 LD₅₀값이 2,000mg/kg이상으로 독성이 없는 것으로 확인 하였다.

2. 연구 개발 결과의 활용 계획

버섯 유래 다당체(polysaccharide)의 면역 기능 강화 항암제와 관련된 제품은 1980년대 중반 일본에서 표고버섯, 구름버섯 등에서 생산된 제품이 출시되어 성장해 왔고, 한국 신약의 상황버섯이 국내에서 개발 전문의약품으로 출시되고 있다. 그러나 항암 면역 활성이 뛰어난다고 알려진 차가 버섯 유래의 항암 면역 치료제 개발 연구는 전혀 이루어지지 않고 있었다. 이에 착안 농림부 연구 과제를 수행하여 차가 버섯 균사체 순수 배양에 의해서 얻어진 단백 다당체 성분으로 인체의 면역 기능을 활성화 시킴으로서 부작용이 전혀 없으면서도 각종 암 특히 대장암을 치료 할 수 있는 항암 면역 치료제 또는 항암 면역 보조제로 광 범위하게 활용할 예정이다.

협동2 : 교부가 가치성 버섯 균사체의 대량 생산 연구

1. 연구개발 결과

- 1) 본 연구에 사용된 균주는 장수버섯(*Fomitella fraxinea* 4균주), 비늘버섯(*Pholiota adiposa* 4균주), 차가버섯(*Inonotus obliquus* 4균주), 잎새버섯(*Grifola frondosa* 5균주)으로 총 17균주에서 균사체 최적 생산 조건을 탐색하였으며 기능성이 우수하고 균사체 생장이 좋은 균주를 선발하였다. 선발된 균주는 장수버섯 ASI 17017, 비늘버섯 ASI 24027, ASI 24012, 차가버섯 ASI 74006, 잎새버섯 ASI 9025이었다.
- 2) 각 균별 균사체 최적 생산 조건은 아래와 같다.
 - (1) 장수버섯의 최적 배지조성은 Malt extract 1%, Yeast extract 0.6%, Glucose 1%, 무기염류(KH_2PO_4 1g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1g, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 10mg, $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 7mg, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 4mg, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 1mg /L)이며, 최적 pH 7, 최적 온도는 25°C이었다.
 - (2) 비늘버섯의 최적 배지조성은 Malt extract 1%, Yeast extract 1%, Glucose 1%, 무기염류(KH_2PO_4 1g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1g, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 10mg, $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 7mg, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 4mg, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 1mg /L)이며, 최적 pH 6, 최적 온도는 25°C이었다.
 - (3) 차가버섯의 최적 배지조성은 Malt extract 1%, Yeast extract 2%, Glucose 1%, 무기염류(KH_2PO_4 1g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1g, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 10mg, $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 7mg, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 4mg, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 1mg /L)이며, 최적 pH 10, 최적 온도는 25°C이었다.
 - (4) 잎새버섯의 최적배지 조성은 Malt extract 1%, Glucose 1%, 무기염류(KH_2PO_4 1g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1g, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 10mg, $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 7mg, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 4mg, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 1mg /L)이며, 최적 pH 7, 최적 온도는 25°C이었다.
- 3) 10L fermenter를 이용하여 균사체 대량 생산 조건을 탐색한 결과는 아래와 같다.
 - (1) 균주에 대한 최적 접종량은 장수버섯 ASI 17017과 차가버섯 ASI 74006의 경우 접종원 8%를 접종하였을때 생산성이 높았고 비늘버섯 ASI 24027는 5%, ASI 24012와 잎새버섯 ASI 9025는 접종원10%를 접종하였을 때 균사체 생산성이 우수하였다.
 - (2) 균사체 배양을 위한 최적 교반조건은 비늘버섯 ASI 24012, 장수버섯 ASI 17017은 120rpm, 비늘버섯 ASI 24027과 잎새버섯 ASI 9025 150rpm의 교반속도에서 균사체 생산량이 높았고, 차가버섯 ASI 74006은 교반속도가 높아짐에 따라 생산량이 증가하였다.
 - (3) 균사체 배양을 위한 최적 통기량은 비늘버섯 ASI 24027, ASI 24012, 차가버섯 ASI 74006, 잎새버섯 ASI 9025의 경우는 1.5vvm에서 높은 생산성을 보인 반면 장수버섯 ASI 17017은 2vvm의 조건에서 균사체 생산량이 높았다.
 - (4) 각종 배양기의 최적 멸균시간은 배양기에 관계없이 20분 이상에서는 오염되지 않았다.
 - (5) 배양기 종류별 생산성에서는 대표적으로 장수버섯 ASI 17017를 사용하여 실험한 결과 Air lift type fermenter가 13.5g/L로 균사체 생산성이 가장 높았다.
- 4) 산업화 조건에서의 균사체 생산성을 탐색한 결과는 아래와 같다.
 - (1) 산업용 배지의 조성을 달리하여 각 균주별 균사체 생산량을 조사하였다. 비늘버섯

ASI 24027과 잎새버섯 ASI 9025는 대두박B(대두박 0.5%, Glucose 2%)배지에서, 장수버섯 ASI 17017, 차가버섯 ASI 74006은 대두박A(대두박 0.5%, Glucose 2%, Yeast extract 0.5%)배지에서 각각 균사체 생산성이 가장 높았다.

- (2) 무기염류 첨가 유무에 따른 생산성을 조사한 결과 4균주 모두 무기염류를 첨가하여 배양하였을 때 균사체 생산성이 우수하였다.
- (3) 접종방법에 따른 균사체 생산성을 조사한 결과 장수버섯(ASI 17017)을 제외한 세 균주(ASI 24027, ASI 74006, ASI 9025)는 접종방법 Procedure 2에서 좋은 성장을 보인 반면 장수버섯(ASI 17017)은 접종방법 Procedure 1에서 균사체 생산성이 높았다.
- (4) 천연배지와 화학배지의 비교배양에서 화학배지로 제조한 배지보다 산업용 천연배지로 제조한 배지에서 균사체의 생산량이 비슷하거나 높았다.
- (5) 200L 종균 배양기(working volume : 150L)를 이용한 상업적 균사체 생산시험에서는 장수버섯 ASI 17017은 675g(7일)의 건조균사체를, 비늘버섯 ASI 24027은 570g(10일), 차가버섯 ASI 74006은 390g(10일), 그리고 잎새버섯 ASI 9025는 615g(10일)의 건조균사체를 생산하였다.

2. 활용에 대한 건의

본 연구를 통하여 얻어진 자료들은 고부가가치성 버섯 균사체의 대량 생산을 위한 기본 자료로서 활용될 수 있다. 또한, 값비싼 화학배지보다 값싼 산업용 배지를 이용하여 균사체의 생산량을 조사하고 생산조건을 확립하였으므로 버섯 종균용 균사체 배양이나 균사체 대량 생산 기술에도 활용될 수 있을 것이다. 특히 대규모 기업 단위가 아닌 소규모 가내공업 또는 농장단위에서 균사체를 대량 배양하고자 할 때 오염에 대한 위험부담이 적으므로 200리터 규모의 배양 탱크를 권장한다.

협동3 : 무리우산버섯 및 말굽버섯의 개발 및 이용 연구

1. 연구개발 결과

가. 말굽버섯의 인공재배기술 개발

1) 말굽버섯균의 배양특성 규명

말굽버섯균의 배양특성을 조사하여 자실체 생산 및 균사체 생산에 미치는 영향에 대해 분석한 결과 최적 고체함성배지는 YMPG 배지의 균사생장이 가장 양호하였고 최적 액체함성배지로는 czapek dox 배지에서 균사 생육이 가장 우수하였으나, Synthetic과 MCM 배지는 저조하였다. 그리고 최적 고체(툽밥) 배지로는 상수리나무와 아까시나무 툽밥이 선발되었고 미송에서는 생장이 현저히 저조하였다. 균사 생장 최적 온도는 30℃이며, 15~30℃의 온도 범위에서 생육을 보였으며, 배지 산도는 pH 4.0에서 양호한 균사생육을 보였다. 최적 영양원으로 탄소원에는 lactose이였으며, 질소원으로는 glutamic acid를 첨가한 배지에서 가장 양호한 균사생육을 보였다.

2) 말굽버섯의 재배특성 규명

말굽버섯균의 배양기간에 따른 초발이 소요일수를 조사한 결과 배양기간을 90~120일로 하는 것이 가장 좋게 나타났다. 배양기간을 60일로 했을 경우 당년에는 자실체가 발이되지 않았고 그 다음해에 자실체가 발이 되는 것으로 나타났다. 이는 60일 배양 후 재내부로의 침투율이 32.4% 밖에 되지 않으므로 매몰 후 균사가 목재를 부후시켜 발이에 필요한 에너

지를 저장하는데 시간이 필요한 것으로 사료된다. 그리고 배양기간을 150일로 했을 경우에는 초발이 소요일수가 가장 짧았지만 배양기간이 길므로 발이되는데 걸리는 총기간은 191일로 90일배양한 것보다 23일이나 늦어지므로 부적합한 것으로 사료된다.

3) 말굽버섯균의 부후특성 규명

말굽버섯균의 목재부후 특성을 조사하기 위하여 부후 전·후의 중량감소율, WEC 추출물 변화율을 비교한 바, 중량감소율은 소나무는 12.5~25.6%, 상수리나무는 15.4~24.3%의 중량감소율을 보고하였다. 배양기간이 40일이었던 공시균주의 중량감소율과 비교했을 때, 공시균주의 목재 부후 능력이 우수한 것으로 사료된다. WEC 추출물은 부후 전에 12.98%의 추출을 보이고, 부후 후에는 15.22%의 추출물을 얻었다. 이는 말굽버섯균이 톱밥과 미강에 있는 탄수화물, 탄닌, 배당체 등을 이용한 양보다 말굽버섯균이 공기중의 수분과 양분을 이용하여 생성한 또 다른 물질이 많은 것으로 사료된다. 목재부후의 미시형태적 특징을 관찰한 결과 백색부후균의 부후형태인 세포벽의 침식과 박벽화 등이 관찰되었다.

나. 무리우산버섯의 인공재배기술 개발

1) 무리우산버섯균의 배양특성 규명

무리우산버섯균의 배양적 특성을 조사하여 자실체 생산 및 균사체 생산에 미치는 영향에 대해 분석한 결과 최적 합성배지로는 액체 합성배지의 경우 glucose pepton에서 균사 생장이 가장 좋았으며, 고체 합성배지의 경우 MYPA배지에서 가장 빠른 생장을 보였고, 최적 톱밥배지로는 상수리톱밥이 가장 좋은 생장을 보인 반면 미송에서는 아주 약한 균사밀도를 보였다. 균사 성장 최적 온도는 25℃이며, 최적 산도는 pH 5.5~6.0에서 가장 좋은 생장을 보였다. 최적 영양원으로 탄소원에는 다당류인 inulin이었으며, 질소원으로는 무기태 질소원인 sodium nitrate였으며 다른 질소원들은 생장이 저조하였다.

2) 무리우산버섯의 재배특성 규명

우리에게 잘 알려진 무리우산버섯의 인공재배가능성을 타진하기 위하여 균의 일반적인 특성과 재배를 위한 목재부후균의 버섯재배에 필요한 미강첨가, 균굵기, 온도, 수분 등을 일반적으로 적용하여 실시하여 일부 발이는 확인하였으나 자실체 생산 조건을 구명하지 못하였다. 추측하건데 무리우산 버섯이 발이 되어 성장하기까지는 영양조건, 온도, 습도 등의 환경조건, 산도, 광 등의 특별한 조건을 요하는 것으로 사료된다.

액체배양 및 고체배양에는 문제가 없어 일반적인 특성의 실험을 기초하여, 수종별, 첨가물별, 균굵기, 온·습도, 배양기간 등의 조건을 달리하여 발이하였으나 만족할만한 결과를 얻지 못하였다. 너무 어려워 함평군 소재 나비랑버섯연구소(윤대령), 함평천치버섯연구소(박준호), 전남산림환경연구소(오득실)등에 실험을 의뢰하여 팽이버섯 배지와 새송이버섯 배지에 접종하여 일부는 현지에서 일부는 학교로 가져와 시도하여보았다. 성공하지 못하여서 광의 조사량, 습도자극, 온도자극, CO₂자극, 침수 등의 충격을 주어 발생을 시도하여 보았으나 성공하지 못하였다.

다시 균주를 분양받아 실패한 것을 참고하여 계속하여 본 균의 인공재배를 성공하여 버섯학회지에 발표하겠다.

3) 무리우산버섯균의 부후특성 규명

무리우산버섯균의 해부학적 특성을 조사한 결과 광학현미경과 주사형 전자현미경으로 줄참나무 변재의 부후를 관찰한 바 목섬유의 세포벽에서 박벽화 현상이 관찰 되었다. 균사의 밀도는 도관과 방사유세포에 높게 나타났고, 일부 목섬유에서도 균사의 밀도가 높게 나타났

다. 또한 도판 내에 균사의 밀도가 높게 나타남에도 불구하고 목섬유와 유세포에 비해 분해가 거의 이루어지지 않았다. 이는 무리우산버섯균에 의한 줄참나무 변재의 부후 형태는, 세포벽 내강에서 중간층으로 점진적으로 분해하는 전형적인 동시 분해형 백색부후 형태를 보여주고 있다. Agar-block test에 의한 dry weight에서 5.9%의 감소율을 보였으며, 톱밥배지의 pH의 변화는 6.07에서 4.31로 배지를 산성화 시켰으며, 온수추출 결과 중량이 감소하였다. 이는 무리우산버섯균이 전형적인 백색부후균의 특징을 가지고 있음을 보여준 것이다.

다. 무리우산과 말굽버섯의 기능성 연구

1) 다당체의 분리정제

무리우산버섯과 말굽버섯의 다당체를 열수 추출후 이온크로마토그래피 친화성크로마토그래피 gelfiltration등을 통하여 분리정제하였다. 이 분리된 분획의 흡광도와 IR 스펙트럼을 이용하여 베타 1-3결합의 다당체이며 260nm흡광대역을 볼때 단백다당체임을 확인함

2) 기능성 확인

무리우산버섯과 말굽버섯의 추출 정제된 분획을 이용하여 in vitro 와 in vivo에서 항암효과를 조사하였다. 그결과 비교약물과 동등하거나 약간 우수하다고 생각되는 분획을 확인할 수 있어서 향후 이의 이용 가능성이 강력히 시사되었다.

2. 연구개발결과의 활용 방안 및 건의

가. 말굽버섯과 무리우산 버섯의 배양특성

본 연구의 결과는 무리우산버섯과 말굽버섯의 이화학적 특징을 규명하고자 연구하였으며, 이러한 결과 균사체 및 자실체를 인공재배하기 위한 기초 자료로 활용되고자 한다.

나. 말굽버섯과 무리우산버섯의 재배기술 개발

본 연구의 결과는 무리우산버섯과 말굽버섯의 자실체 형성의 가능성을 제시하였으며, 이러한 결과에 대한 활용 방안은 다음과 같다.

(1) 개발된 재배기술 농가 교육

- 버섯 재배에 관련된 교재 및 월간지에 기술내용 수록.

(2) 개발된 기술의 응용

- 기존의 도내 종균 생산 공장, 병버섯 재배 공장에 기술을 보급함으로써 저 투자, 고 생산성 유도.
- 저가 배지를 도내 농가에 보급함으로써 농가의 고 소득원으로써 활용.
- 기능성 식·약품으로 개발될 경우 대량 생산체계를 이용하여 대량으로 공급 가능.

다. 말굽버섯과 무리우산버섯의 부후특성 규명

본 연구의 결과는 무리우산버섯과 말굽버섯의 현미경적 부후 특징에 관하여 연구하였으며, 이러한 결과 버섯재배에 있어 영양원 및 목질 섬유소의 역할을 규명하여 버섯균의 부후 특성에 알맞은 배지 조성에 도움이 되기 위한 기초 자료로 활용되고자 한다.

SUMMARY

I. Title

Development and Utilization of Functional Mushroom for the High Value-Added

Item1: Development of functional superior strains and artificial cultivation methods

Item2: Development of New Antithrombotic Substance from Mushroom and Production of Functional Food

Consigned Item1: Development of New Antihypertensive Angiotensin I-Converting Enzyme Inhibitor from Mushroom and Production of Functional Food

Consigned Item2: Selection of mushrooms with high antioxidative potentials and isolation and identification of physiologically activate chemicals

Cooperative Item1: Investigation and utilization of an immunomodulator on mushroom

Cooperative Item2: Mycelial Mass Culture of Valuable Functional Mushrooms

Cooperative Item3: Development and Utilization of Functional Mushroom, *Fomes Fomentarius* and *Kuehneromyces mutabilis*.

II. Objective and Significance

1. Objective

Mushrooms have rapidly increased in production and consumption recently. They have been restricted only several edible and medicinal mushrooms. It is now demanded to establish new income mushroom crops by development of functional superior strains and artificial cultivation methods. Mushrooms have not only values of food but also multiple function. These experiments and results will go far toward contributing to increase farmers' income by promoting mushroom consumption.

2. Importance of Research

1) Technical Aspect

The value of mushroom has been limited to edible uses, but as a variety of functionality of mushroom has recently been highlighted, it is used as a material for health food or a medicinal stuff. Particularly, many studies on immunological enhancement and anti-cancer activity of polysaccharide, among various components of mushroom, have been reported by various research teams. Such functionality of mushroom should be established through a method for measuring bioactivity which is exactly in conformity with the in vivo accommodative function on the basis of the technology for isolating useful components purely and analyzing them. By searching for pharmacological efficacies of mushroom and further identifying the exact pharmacological mechanism thereof and characteristics of useful components thereof,

the subject study will be applicable to development of various foods and drugs.

2) Economic and Industrial Aspect

As search for new functional immunomodulator of mushroom and the new function is made and such immunomodulator is used, importance is attached to the pharmacological functionality as well as the edible value of mushroom. Therefore, domestic consumption of mushroom is increased and further mushroom is regarded as a major export item so that the mushroom farming industry will be activated. Also, as varieties of multi-functional mushrooms are developed and popularized, mushroom products will be diversified beyond current consumer's insufficient choice of mushroom products due to varieties limited to some edible and medicinal mushroom to have an effect on promotion of consumption of mushroom foods.

3) Social and Cultural Aspect

As people have been recently more and more interested in health, functional foods for prevention adult diseases and aging are being commercialized. However, the fact is that the pharmacological functionality of such functional foods is not studied by a systematic and scientific approach. It will be required to conduct the subject study in order to provide the data for ensuring excellence of mushroom foods and preventing misuse of new functional mushroom products by setting standards for health of the people and further providing standards for exact pharmacological efficacies of functional foods to be researched and developed in the future, particularly mushroom.

III. Scope and Contents

Item1: Development of functional superior strains and artificial cultivation methods

1. Strains collection and analysis of phylogenetic relationships
 - Discrimination of species based on ITS rDNA analysis
 - Analysis of phylogenetic relationships by PCR fingerprinting
2. Establishment of artificial cultivation methods
 - Selection of optimum media
 - Investigation into cultural characteristics
 - Productivity test of several kinds of sawdust and substrate
 - Conditions for mushroom formation
 - Investigation into the best cultivation methods
3. Development of new functional mushroom strains
 - Isolation of monokaryons and mated hybrids
 - Investigation into cultural and cultivation characteristics of mated strains
 - Analysis of DNA band patterns on developed strains
 - Selection of excellent strains and registration
 - Productivity test of selected strains
 - Field test of selected strains
4. Isolation of marker gene related to functional characters.
 - Isolation of marker gene related to functional characters

Item2: Development of New Antithrombotic Substance from Mushroom and Production of Functional Food

Several extracts of mushroom were prepared and investigated its fibrinolytic activity and platelet aggregation inhibitory activity. Platelet aggregation inhibitor from the selected mushroom was purified by solvent extraction, ultrafiltration, Sephadex G-10 filtration and RP-HPLC and then investigated its characteristics. New antithrombotic mushroom drink was prepared and characterized.

Consigned Item1: Development of New Antihypertensive Angiotensin I – Converting Enzyme Inhibitor from Mushroom and Production of Functional Food

Chemical components of mushrooms were investigated. After preparation of several extracts of mushrooms, antihypertensive ACE inhibitory activities of its extracts were investigated and selected excellent mushroom. ACE inhibitor from the selected mushroom was purified by ultrafiltration, Sephadex G-25 filtration and RP-HPLC and then investigated its characteristics. New antihypertensive mushroom drink and wine were prepared and characterized.

Consigned Item2: Selection of mushrooms with high antioxidative potentials and isolation and identification of physiologically activate chemicals

- 1) Evaluation and selection of mushrooms with high antioxidative activity using various methods at *in vitro*
- 2) Extraction, isolation and identification of antioxidative substances from a selected mushroom
- 3) Comparison of antioxidative activity on identified and purified antioxidative compound from mushrooms *in vitro* and *in vivo*
 - (1) Comparison of antioxidative activities *in vitro*
 - (2) Comparison of antioxidative activities *in vivo*

Cooperative Item1: Investigation and utilization of an immunomodulator on mushroom

1. To search an immunomodulator and identify characteristics thereof
 - 1) To search for a strain to produce an immunomodulator and investigate into characteristics thereof
 - 2) To establish a method for screening the bioactivity with an immunomodulating function
 - 3) To investigate into chemical characteristics of the active material
2. To investigate into functionality of the immunomodulator
 - 1) Analysis of chemical structure of the immunomodulator
 - 2) Study on mechanism of the pharmacological activity metabolim of the active material
3. To search an immunomodulator of mushroom and research on the use thereof
 - 1) Preclinical study on the active material
 - 2) Systematization of a method for refining the active material on a large scale
 - 3) Forumaltion

Cooperative Item2: Mycelial Mass Culture of Valuable Functional Mushrooms

1. Media selection for optimal mycelia production
 - Optimal media composition
 - Mycelial productivity according to pH
 - Mycelial productivity according to light condition
2. Establishment of culturing conditions with 10L bioreactor

- Mycelial productivity according to inoculum ratio
 - Mycelial productivity according to agitation
 - Mycelial productivity according to aeration level
3. Investigation of culturing conditions in industrial scale
 - The optimal sterilization condition of medium
 - Establishment of pre-culturing method
 - Verification of mycelial productivity in industrial scale

Cooperative Item3: Development and Utilization of Functional Mushroom, *Fomes Fomentarius* and *Kuehneromyces mutabilis*

1. Physiological characteristics of *Fomes Fomentarius* and *Kuehneromyces mutabilis*
2. Artificial cultivation and isolation of functional product on *Fomes Fomentarius* and *Kuehneromyces mutabilis*
3. Mass production and utilization of functional product on *Fomes Fomentarius* and *Kuehneromyces mutabilis*

IV. Major Results and the Suggestion for application

Item1: Development of functional superior strains and artificial cultivation methods

1. Strains collection and analysis of phylogenetic relationships

- 1) Nineteen strains of *Fomitella fraxinea*, 35 strains of *Grifola frondosa*, 41 strains of *Pholiota* spp., 12 strains of *Inonotus obliquus* were collected and examined.
- 2) To classify species, the internal transcribed spacer regions (ITS) of the ribosomal DNA (rDNA) repeats were amplified using polymerase chain reaction (PCR) and then sequenced. According to the analysis of ITS sequences, *Pholiota* spp. were classified into five clusters. Their spacer regions were 644~700 nucleotides in length. The reciprocal homologies of each ITS region among these strains were ranged from 49.6~99.9%. *Fomitella fraxinea* were amplified 592 and 595 nucleotides in length (GenBank AY251308). *Grifola frondosa* were 616 and 626 nucleotides in length (GenBank AY251307). The reciprocal homologies of each ITS region among these strains were in the range of 94 to 99.7%. *Inonotus* spp. 9 strains were compared and were classified into five clusters. The spacer regions of them were 687~758 nucleotides in length. The reciprocal homologies of each ITS region among these strains were in the range of 71.2~99.7%.
- 3) URP primers of 20-mer derived from repetitive sequence of rice were used to assess genetic relationships. According to the analysis URP-RAPD, 17 strains of *Fomitella fraxinea* were classified into several clusters. Genetic similarities based on RAPD was 77 to 100%. *Grifola frondosa* were classified into several clusters. Genetic similarities based on RAPD were 77 to 100%. Five URP primers produced strain-specific PCR polymorphic bands showed that 8 *Inonotus* strains are genetically clustered into four clusters by UPGMA cluster analysis. The similarity coefficient among *Inonotus* strains were in the range of 45~100%. Our results from the analysis of ITS sequences and RAPD suggest that there are more than two species including *Inonotus hispidus* and *I. obliquus* in our strains. These polymorphic DNA profiles could be useful not only to discriminate a new developed dikaryons from parental monokaryons but also to identify collected wild strains.

2. Establishment of artificial cultivation methods

- 1) Cultural characteristics were investigated into collected strains. They were tested on the four different media (PDA, MCM, YM, MEA) and sawdust (Alder, Oak, Pine, Poplar). There was a little variation according to the media and sawdust. Most strains showed white colonies, but some strains were brown. Mycelial growth length differed according to the strains. *Pholiota* species seemed to be better on PDA and poplar sawdust although *Grifola frondosa* were better on MEA.

2) They were induced for fruitbodies production in the 850 ml bottle or 1000 ml plastic film bag filled with different sawdust, on short log and/or sometimes in the plastic box size 40 x 40 cm² with cotton waste according to mushroom species. Their fruitbody productivity and morphological characteristics were measured.

3. Development of new functional mushroom strains

- 1) Their own spores were collected and germinated for monokaryotic strains. Dikaryons were produced by mono-mono and di-mon mating. The sexuality of tested mushrooms were tetrapolarity. Several hundreds dikaryotic strains were developed by mono-mono crossing within and between parental monokaryons populations. They were cultivated in the bottle and showed a big variation in their fruitbody yield. Some of them showed higher productivity and better shapes than parental strains.
- 2) Finally, one mated strain in each mushroom was selected through several cultivation trials. For the confirmation of their characteristics, they are cultivated in the farm. After field test, they will be referred to the responsible inquiry commission in the end of the year.
- 3) Also, they were confirmed as new developed dikaryons by DNA fingerprinting.

4. Isolation of marker gene related to functional characters

- 1) Antioxidant enzyme, superoxide dismutase (SOD) were investigated in order to select medicinal mushroom containing high SOD activity in *Pholiota* spp.
- 2) The SOD activity in mycelia extracts of collected strains by using NBT method ranged from 11.5% to 37.9%. The selected strains, above 30% of SOD activity, were ASI 24009, 24013, 24015, 24017, 24018 and 24028. All of them were classified a same group (group A) according to the result of ITS sequence data. Genetic similarities of A group ranged 96~99.1%. All strains tested showed only MnSOD activities, as no band disappeared when the gel were incubated in the presence of cyanide and hydrogen peroxide.
- 3) MnSOD gene was cloned and sequenced through cDNA library from fruitbody.

5. Suggestion for application

This study was carried out to develop new functional mushrooms. Each developed strain will be referred to the responsible inquiry commission for cultivar registration in the end of the year after field test.

Item2: Development of New Antithrombotic Substance from Mushroom and Production of Functional Food

Among 52 sample mushrooms, the ethanol extracts of *Inontue obliquus* ASI 74006 mycelia had potential plate inhibitory activity of 81.2%. After the purification of the plate aggregation inhibitor, an active fraction with 91.6% of inhibitory activity was obtained. The purified plate aggregation inhibitor was a novel peptide with 314 Da of molecular weight. Antithrombotic mushroom drink was also prepared and characterized. All data obtained from this study will be useful in functional food or drug industry.

Consigned Item1: Development of New Antihypertensive Angiotensin I –Converting Enzyme Inhibitor from Mushroom and Production of Functional Food

Sample mushrooms(52 species) contained crude proteins of 7.1~56.5%, crude lipid 0.2~4.4% and carbohydrate of 30.3~86.6%. Among 52 samples, the water extracts of *Pholiota adiposa* ASI 24012 fruiting body had potential ACE inhibitory activity of 66%. After the purification of the ACE inhibitor, an active fraction with an IC₅₀ of 0.44mg was obtained. The purified ACE inhibitor was a novel pentapeptide with 414 Da of molecular weight. Antihypertensive mushroom drink and wine were also prepared and characterized. All data obtained from this study will be useful in functional food industry.

Consigned Item2: Selection of mushrooms with high antioxidative potentials and isolation and identification of physiologically activate chemicals

- 1) Evaluation and selection of mushrooms with high antioxidative activity using various methods at *in vitro*
 - (1) On average, *Pholiota* spp.collected strains were the highest antioxidative activity (21.96 %), and lowest it on *Inonotus obliquus* collected strains (10.88 %) among collected 80 mushroom strains. Also, ASI *Agaricus brunnescens* only showed an inhibitory effect above 30 %. Antioxidative activity was generally distributed from 10 % to 20 % on 38 mushroom strains including the ASI 24004.
 - (2) SOD activity was the highest inhibition on ASI *Agaricus brunnescens* (26.83 %), and also *Pholiota* spp.collected strains (10.67 %) were showed to the highest inhibitory effect on average.
 - (3) The ASI 74007 (30.09 %) showed the higher inhibition percentage for POD activity, while POD activity was showed to non-inhibitory effect for 55 strains.

- (4) DPPH activity generally represented higher inhibition than SOD and POD methods. The ASI F-J (80.51 %) showed the highest inhibition percentage, and then 5 strains including the ASI 74013 showed inhibitory effect below 10 %. Also, it was widely showed to inhibition of both 30% to 50% (37 strains) and 10% to 30% (32 strains).
- (5) TBA value was the highest inhibitory effect on ASI *Pleurotus eryngii* (67.5 %), and 12 strains including the ASI 24005 represented inhibition of above 50 %. *Pholiota* spp. collected strains (42.94 %) showed the higher inhibition compared to other collected mushrooms, and then there were showed to lower inhibition on ASI *Grifola frondosa* collected strains (8.92 %).
- (6) Regarding the electron spin resonance (ESR) method, the higher and lower groups had signal intensities of 0.25 and 0.83 times the Mn^{2+} standard on average, respectively.
- 2) Extraction, isolation and identification of antioxidative substances from a selected mushroom
- (1) *Pholiota adiposa* (24027) was extracted by using several solvents as Hexen, EtOAc, MeOH at room temperature and isolated compounds was identified by analysis of IR, MS, 1H NMR and ^{13}C NMR. According to these results, compounds was identified to 7 compounds. The results were follows; (1) 1-Linoleic-2-olein, (2) stigmasterol, (3) 1,4-glucopyranosyl-1',4'-glucopyranosyl-1'',4''-glucopyranoside, (4) 2',3'-diphosphoryl-1' -propanoxy- β -D-glucopyranoside, (5) 1-linoleio-3-olein, (6) 1-(N,N,N-trimethyl ethyl amino phosphoryl) 2,3-dilinolein ion, (7) Glycerol phosphate.
- 3) Comparison of antioxidative activity on identified and purified antioxidative compound from mushrooms *in vitro* and *in vivo*
- (1) Comparison of antioxidative activities *in vitro*
- ① In inhibitory effects on growth of P383 murine leukemia cell (IC_{50}), 1-linleio-2-olein and stigmasterol had higher inhibitory effects on $41\mu g/ml$ and $50\mu g/ml$.
- ② In evaluation of scavenging radical (RC_{50}), the results were follows : 1-linleio-2-olein ($2.2\mu g/ml$) > stigmasterol ($17.5\mu g/ml$) > 1-(N,N,N-trimethyl ethyl amino phosphoryl) 2,3-dilinolein ion ($48\mu g/ml$) > Glyceryl triphosphate ($49\mu g/ml$)
- ③ With cell viability by H_2O_2 , the higher stigmasterol's concentration and longer culture time, the greater the inhibitory effect on oxidative stress.
- (2) Comparison of antioxidative activities *in vivo*
- ① In experiment weight gain decreased significantly in the treatment of ethanol compared with saline solution-treated. But there was not significant on weight gain in the treatment of mushroom extract compared with the treatment of ethanol.
- ② In the treatment of stigmasterol, GOT and GTP had lower activation on serum. However, γ -GTP, total cholesterol, HDL and LDL on serum, there were not

affected by the doses of rice extract and ethanol used in this study.

- ③ The MDA levels in liver, brain and pancreas tissue were decreased to a certain extents in the treatment of mushroom extract compared with treatment of ethanol.
- ④ The decreased liver GST activities induced by ethanol treatment were somehow restored by administration of stigmasterol.

Cooperative Item1: Investigation and utilization of an immunomodulator on mushroom

1. Results of Study

- 1) As a result of investigating into the mouse strain for screening the bioactivity with an immunomodulating function and the immune reactivity depending upon a specimen concentration, it was known that BDF1, the hybrid group had the optimum culturing conditions that the specimen concentration was 25 μ g/mg and the culturing time was 72 hours.
- 2) As a result of investigating into the antibody activity of B Lymphocyte of the hydrothermal extract from 104 kinds of experimental strains for selecting strains to produce an immunomodulator, the bioactivity of crude polysaccharide of 24007 and 74006 was revealed to be very strong.
- 3) As a result of conducting a toxicity test on MTT cell of 24007 and 74006, it inhibited cell's proliferation concentration-dependently in the colon cancer cell strain (HT1080) and the cervical cancer cell strain (HeLa), but it had no effect on the colon cancer cell strain (SW480). In view of this result, it is thought that it acts selectively on specific cells.
- 4) As a result of screening the apoptosis inducing activity of the cancer cell strain of 24007, it was identified that degradation of DNA took place.
- 5) In view of the fact that as a result of investigating into the expression amount of mRNA of MMPs through RT-PCR, the expression amount of MMP was small in the 24007 treatment group, it is conjectured that the 24007 extract would inhibit metastasis or infiltration of the cancer cell through protein decomposition.
- 6) The molecular weight of the 74006 extract using SDS-PAGE was about 30~32KDa.
- 7) In the antidiabetic and obesity-inhibiting experiment using crude polysaccharide of 74006, in the treatment group, it had an effect to inhibit the weight and the blood glucose by 20% and 40%, respectively, in comparison with the untreated group.
- 8) Most of crude polysaccharide of mycelium of 24007 and 74006 was composed of glucose, and additional constituents thereof were glucosamine, galactose, mannose and others.
- 9) As a result of conducting a toxicity test on 74006, it was identified that the LD50 value was over 2,000mg/kg so that it had no toxicity.

2. Application of the Results

As a product related to an immunologic functionenhancing anti-cancer drug using polysaccharide derived from mushroom, products using Shiitake mushroom and *Trametes versicolor* were introduced in Japan in 1980's, and since then, such product market has grown steadily. In Korea, products produced by Han Kook Sin Yak using *Phellinus linteus* are available on the market as an ethical drug developed in Korea. However, a study on development of an anti-cancer immunotherapeutic agent derived from *Inonotus obliqua* which is known as a material having an excellent anti-cancer immunoactivity has not been conducted at all. In this situation, the study project sponsored by Ministry of Agriculture and Forestry will be performed for the purpose of developing and using extensively an anti-cancer immunotherapeutic agent or an anti-cancer immuno-juvantiafor treating various cancers, particularly colon cancer without any side effect, which will be produced by using protein polysaccharide obtained from pure culture of mycelium of *Inonotus obliqua*, which activates the in vivo immunologic function.

Cooperative Item2: Mycelial Mass Culture of Valuable Functional Mushrooms

1. Results

- 1) Out of 17 strains(4 strains of *Fomitella fraxinea*, 4 strains of *Pholiota adiposa*, 4 strains of *Inonotus obliquus* and 5 strains of *Grifola frondosa*) examined five strains, *Fomitella fraxinea* (ASI 17017), *Pholiota adiposa* (ASI 24027, 24012), *Inonotus obliquus* (ASI 74006), *Grifola frondosa* (ASI 9025), were selected for investigation.
- 2) Optimal conditions for mycelial productivity
 - (1) *Fomitella fraxinea* - Malt extract 1%, Yeast extract 0.6%, Glucose 1%, pH 7, mineral (KH_2PO_4 1g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1g, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 10mg, $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 7mg, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 4mg, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 1mg /L) and 25°C
 - (2) *Pholiota adiposa* - Malt extract 1%, Yeast extract 1%, Glucose 1%, pH 6, mineral (KH_2PO_4 1g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1g, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 10mg, $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 7mg, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 4mg, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 1mg /L) and 25°C
 - (3) *Inonotus obliquus* - Malt extract 1%, Yeast extract 2%, Glucose 1%, pH 10, mineral (KH_2PO_4 1g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1g, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 10mg, $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 7mg, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 4mg, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 1mg /L) and 25°C
 - (4) *Grifola frondosa* - Malt extract 1%, Glucose 1%, pH 7, mineral (KH_2PO_4 1g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1g, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 10mg, $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 7mg, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 4mg, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 1mg /L) and 25°C

3) The conditions for mycelial production in large scale

- (1) Optimal inoculum ratio was 8% for *Fomitella fraxinea* (ASI 17017) and *Inonotus obliquus* (ASI 74006). In case of *Pholiota adiposa* (ASI 24012) and *Grifola frondosa* (ASI 9025) was 10% inoculum showed highest productivity while *Pholiota adiposa* (ASI 24027) required 5% inoculum for maximum productivity.
- (2) Agitation speed of 120 rpm was optimal for *Pholiota adiposa* (ASI 24012) and *Fomitella fraxinea* (ASI 17017) while *Pholiota adiposa* (ASI 24027) and *Grifola frondosa* (ASI 9025) grow well in agitation of 150 rpm. But *Inonotus obliquus* (ASI 74006) showed good mycelial productivity in higher agitation rate.
- (3) Mycelial productivity of *Fomitella fraxinea* (ASI 17017) was optimal with aeration rate of 2vvm but other strains (ASI 24012, ASI 24027, ASI 74006, ASI 9025) grew best with 1.5vvm aeration.
- (4) At least 20 minute at 121°C of sterilization was required.
- (5) Mycelial productivity by various types of fermenter was investigated with *Fomitella fraxinea* ASI 17017. The highest productivity (13.5g/L) was achieved by Air lift fermenter.

4) Mycelial production in industrial scale

- (1) Mycelial productivity was investigated with commercial media materials. *Pholiota adiposa* (ASI 24027) and *Grifola frondosa* (ASI 9025) grew well in soybean cake B medium (soybean cake 0.5%, glucose 2%). The mycelial production of *Fomitella fraxinea* (ASI 17017) and *Inonotus obliquus* (ASI 74006) was good with soybean cake A medium (soybean cake 0.5%, glucose 2%, yeast extract 0.5%).
- (2) All the strains showed higher productivity when minerals were added to commercial media.
- (3) The optimal pre-culturing method for *Inonotus obliquus* (ASI 74006), *Pholiota adiposa* (ASI 24027) and *Grifola frondosa* (ASI 9025) was Procedure 2 while *Fomitella fraxinea* (ASI 17017) was Procedure 1.
- (4) Mycelial productivities of chemical media and commercial media were compared. Higher activity, in general, was achieved with commercial media.
- (5) The commercial production test by use of mushroom spawn fermenter (working volume : 150L) resulted in 675g of dried mycelium of *Fomitella fraxinea* ASI 17017 in 7days, 570g of dried mycelium of *Pholiota adiposa* ASI 24027 in 10days, 390g of dried mycelium of *Inonotus obliquus* ASI 74006 in 10days and 615g of dried mycelium of *Grifola frondosa* ASI 9025 in 10days.

2. A Suggestion for application

The data obtained in this study could be applied for commercial production of medicinal mycelia. The 200 liter capacity culture vessel is handy, simple and less risky against the contamination problem compared to large scale tank used in large industries.

Cooperative Item3: Development and Utilization of Functional Mushroom, *Fomes Fomentarius* and *Kuehneromyces mutabilis*

The study was carried out for the hypha culture and artificial cultivation technique for the *Fomes Fomentarius* and *Kuehneromyces mutabilis*. The appropriate conditions were revealed for the characteristics of culture for mushroom's hyphae such as pH, the concentrate of carbohydrate, the kinds and concentrates of nitrogens, and temperature for culture. The characteristics for artificial culture of the mushroom were revealed.

Then, the artificial culture was performed to get fruit bodies as shown in the text of this article. The functionality of *Fomes Fomentarius* and *Kuehneromyces mutabilis* was studied. The polysaccharides of *Fomes Fomentarius* and *Kuehneromyces mutabilis* were extracted and purified by various chromatographies. The anti-cancer effect from separated and refined fraction was confirmed by in vitro and in vivo experiments. As a result of the experiment, it is confirmed that the separated and refined fraction has similar or better component than PS-K(anti-cancer medicine) that is already on the market

CONTENTS

Chapter 1. Outline of the report on development of research	29
Chapter 2. Status of research in Korea and other countries	33
Chapter 3. Contents and products of the development of research	34
Item1: Development of functional superior strains and artificial cultivation methods -----	35
Item2: Development of New Antithrombotic Substance from Mushroom and Production of Functional Food -----	93
Consigned Item1: Development of New Antihypertensive Angiotensin I -Converting Enzyme Inhibitor from Mushroom and Production of Functional Food--	103
Consigned Item2: Selection of mushrooms with high antioxidative potentials and isolation and identification of physiologically activate chemicals----	119
Cooperative Item1: Investigation and utilization of an immunomodulator on mushroom-----	175
* Attached sheet 1. <u>Toxicity test of <i>Inonotus obliquus</i></u> -----	199
Cooperative Item2: Mycelial Mass Culture of Valuable Functional Mushrooms-	229
Cooperative Item3: Development and Utilization of Functional Mushroom, <i>Fomes</i> <i>Fomentarius</i> and <i>Kuehneromyces mutabilis</i> -----	261
Chapter 4. Achievements and contributions of the studies to the related fields	303
Chapter 5. Plans for the applications of the research	314
Chapter 6. Informations on scientific techniques at other countries	318

목 차

제 1 장	연구개발과제의 개요-----	29
제 2 장	국내외 기술개발 현황-----	33
제 3 장	연구개발수행 내용 및 결과-----	35
세부1 :	기능성 우수 균주 육성 및 인공 재배 기술 개발-----	35
세부2 :	유효성분의 기능성 연구를 통한 생물 소재화 - 버섯으로부터 혈전증 치료 물질의 개발 및 기능성 제품 생산 연구 -----	93
위탁1 :	버섯으로부터 고혈압예방을 위한 안지오텐신 전환효소(ACE) 저해 물질의 개발 및 기능성 제품 생산 연구-----	103
위탁2 :	버섯류 천연 항산화물질 분석 및 활성물질 분리·동정 연구---	119
협동1 :	버섯류의 면역조절기능 물질의 탐색 및 이용 연구-----	175
* 별 첨	<u>1. 차가 버섯 단핵 투여 독성 시험 자료</u> -----	199
협동2 :	고부가 가치성 버섯 균사체의 대량 생산 연구-----	229
협동3 :	무리우산버섯 및 말굽버섯의 개발 및 이용 연구-----	261
제 4 장	목표달성도 및 관련분야에의 기여도-----	303
제 5 장	연구개발결과의 활용계획-----	314
제 6 장	연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보-----	318

제 1 장 연구개발과제의 개요

제 1 절 연구개발의 목적

버섯류의 면역 조절물질 탐색 및 특성검정을 통하여 기능성이 우수한 균주를 육성하고, 자실체와 균사체의 대량생산 방법 개발로 신기능 면역조절제의 개발 및 식품 소재화.

제 2 절 연구개발의 필요성

1. 기술적 측면

- 지금까지 버섯류의 생체방어 및 생체기능 조절물질이 알려짐.
- 버섯류에서 기능성물질인 lentinan, schizophyllum, PSK 등 생리활성물질이 개발·이용되고 있으나 국내에서는 시작단계로 미흡한 상태임.
- 기능성 버섯류의 품종 다양화를 위해 균주수집 및 육종을 위한 새로운 육종기술 개발이 요구되고 있음.
- 중국에서는 약용으로 사용하는 버섯의 종류가 200여 종이 넘으며, 선진국에서는 한방재료로 이용하고 있음.

2. 경제·산업적 측면

- 국내에서 자생하고 있는 1,500여 종의 버섯 중 약 1% 정도만 식용 또는 건강음료로 이용되고 있는 실정임.
- 버섯류의 신기능 면역조절물질 및 기능에 대한 탐색 및 이용으로 국내소비의 증대 뿐만아니라 수출 품목으로 개발하여 버섯 산업의 활성화에 도움이 될 것임.
- 국내 재배 품종의 다양화로 농가소득 증대에 크게 기여할 것임.

3. 사회·문화적 측면

- 최근 식생활의 서구화로 각종 성인병이 증가하고 있고 그에 따라서 국민들의 건강에 대한 관심이 고조되고 있음.
- 시판되고 있는 기능성 식품들의 대부분이 고가이므로 값싸게 먹을 수 있는 기능성 버섯 제품의 개발이 절실히 필요함.
- 버섯류의 기능성에 관한 종합적인 연구의 일환으로 면역조절기능에 대한 명확한 자료를 제공함으로써 버섯제품에 대한 홍보자료로 이용함.
- 약용버섯류의 품목 다양화로 고령화된 유희노동력의 활용이 가능.

제 3 절 연구개발의 범위

구분	연구 개발 목표	연구개발 내용 및 범위
1차 년도 (2001)	○ 기능성 우수 균주 육성 및 인공 재배 기술 개발	<ul style="list-style-type: none"> - 기능성버섯 균주 수집 : 장수버섯, 잎새버섯, 비늘버섯, 차가버섯 - rDNA 분석에 의한 종 구분 - 기능성 버섯류의 단포자분리 교배 - 균주별 최적배지 선발 - 균주별 배양적 특성 조사 - 자실체 형성 조건 조사
	○ 버섯류의 유효성분 및 기능성 탐색	<ul style="list-style-type: none"> - 혈전 등 치료제의 탐색 - 유용성분의 분리정제 및 약리효능조사 - ACE 저해활성물질의 탐색(위탁1:배재대) <ul style="list-style-type: none"> · 각종 버섯의 화학 성분 조사 · ACE저해 물질의 탐색 · 각종 단백질 분해 효소 처리에 의한 ACE 저해 물질의 생산 - 각종 항산화활성 검정법을 비교 검토하여 고효산화활성 버섯류 선발(위탁2:건국대) <ul style="list-style-type: none"> · 검정방법 : NBT법, DPPH법, TBA법, FI-CL법, ESR법 이용
	○ 면역조절 물질의 탐색 및 특성 구명	<ul style="list-style-type: none"> - 면역조절물질 생산균주의 탐색 및 특성조사 - 면역조절기능 생물활성 검색방법 확립 - 활성물질의 화학적 특성 조사
	○ 균사체 대량생산 기술개발	<ul style="list-style-type: none"> - 균사체 대량생산 배지 선발 <ul style="list-style-type: none"> · pH에 따른 생산성 · 빛의 유무에 따른 생산성 · 계면활성제의 종류에 따른 생산성 · 계면활성제의 농도에 따른 생산성
	○ 무리우산버섯과 말굽버섯의 생리적 특성 파악	<ul style="list-style-type: none"> - 공시균의 생리적 특성 파악 <ul style="list-style-type: none"> · 무리우산버섯균의 균사생장특성 규명 · 무리우산버섯균의 목질셀룰로오스 분해특성 규명 · 말굽버섯균의 균사생장특성 규명 · 말굽버섯균의 목질셀룰로오스의 분해특성 규명 - 기능성물질의 분리정제 <ul style="list-style-type: none"> · 수집계통별 미지의 기능성 물질의 분리정제 · 기능성 검정

구 분	연구개발 목표	연구개발 내용 및 범위
2차 년도 (2002)	○ 기능성 우수균주 육성 및 인공 재배 기술 개발	<ul style="list-style-type: none"> - PCR에 의한 계통간 유연관계 분석 - 단핵 교배주의 배양 및 재배특성 조사 - 교배육성 균주 선발을 위한 기능성 관련 표지형질 개발 - 톱밥수종 및 배지재료에 대한 생산력검정
	○ 버섯류 유효성분의 특성 조사	<ul style="list-style-type: none"> - 유용성분의 화학적 특성 - ACE저해물질의 기능성발현조사(위탁1:배재대) <ul style="list-style-type: none"> · 버섯 ACE저해 물질의 분리 및 정제 · 버섯 ACE저해 물질의 물리 화학적 특성 조사 · 버섯 ACE저해 물질의 기능성 발현 조사-동물 실험 - 항산화활성 물질 추출 및 분리(위탁2:건국대) <ul style="list-style-type: none"> · 천연항산화 활성물질 추출 및 분리 추출 및 분리과정의 각 분획별로 활성검정(검정방법) : NBT법, DPPH법, TBA법, FI-CL법, ESR법 이용 · 분리·정제된 활성물질인 항산화제의 구조 결정 · 순수 분리·정제된 물질의 이화학적 특성 조사 (용해성, Rf, 발색반응 등) · 활성물질의 기기분석(UV, IR, ¹H·¹³C-NMR, GC-MS) 등의 화학기기를 이용하여 얻은 스펙트럼을 분석함으로써 화학구조를 결정 · HPLC, GC에 의한 물질의 순도 확인
	○ 면역조절 물질의 기능성 조사	<ul style="list-style-type: none"> - 면역조절물질의 화학적 구조 해석 - 활성물질의 약리활성 대사 기작
	○ 균사체 대량 생산 기술 개발	<ul style="list-style-type: none"> - 5L 실험실용 bioreactor 배양조건 확립 · 최적 생산성 산소농도 확립 · 교반조건 확립 · 접종원 농도 구명
	○ 무리우산버섯과 말굽버섯의 대량증식법 개발 및 기능성 물질의 분리	<ul style="list-style-type: none"> - 공시균의 균사체 및 자실체 대량증식법 개발 · 무리우산버섯의 균사체 대량증식법 개발 · 무리우산버섯의 자실체 대량증식법 개발 · 말굽버섯의 균사체 대량증식법 개발 · 말굽버섯의 자실체 인공재배 가능성 타진 - 기능성 물질의 분리정제, 항암성 확인 · 기능성 물질의 기능의 대사기전확인(동물실험) · 기능성 물질의 분자구조 확인

구분	연구개발 목표	연구개발 내용 및 범위
3차 년도 (2003)	○ 기능성 우수 균주 육성 및 인공 재배 기술 개발	<ul style="list-style-type: none"> - 생산력 검정에 의한 품종 선발 - 기능성 우수균주 선발 및 등록 - 생산력 검정 - 농가 확대재배 시험
	○ 유효성분을 이용한 생물 소 재화	<ul style="list-style-type: none"> - 약리효능에 따른 전 임상 시험 - 유효성분의 대량정제법 체계화 - 생물소재화: 식품 및 의약품 소재화 - ACE 저해물질(위탁1:배재대) <ul style="list-style-type: none"> · 버섯 ACE저해 물질을 함유한 기능성 건강 식품(음료, 주류등)의 제조 및 특성 조사 · 버섯 ACE저해 물질을 함유한 의약품(또는 의약 보조제)의 제조 및 특성 조사 · 제조된 기능성 버섯 제품의 독성 및 안전성 검토 · 기능성 버섯제품의 대량 생산 방법 검토 - 항산화활성 물질(위탁2:건국대) <ul style="list-style-type: none"> · 분리·정제된 활성물질의 효과 확인 및 기존의 항산화제와 효과 비교시험 · 천연항산화제로서의 도출을 위한 검사 · 분리·정제 물질의 체내 흡수 및 대사작용 연구 · 분리·정제된 물질과 기존 항산화제와의 이화학적 특성 비교 · 비교대상 항산화제 :tocopherol, BHT, BHA · 정제된 물질을 이용하여 항산화효과검정 · 실험방법 : 실험동물 산화 모델 시스템을 이용(Sparague-Dawley계 수컷 흰쥐) · 조사항목 : 조직의 항산화능력분석
	○ 면역기능 조절제의 개발	<ul style="list-style-type: none"> - 활성물질의 전 임상시험 - 활성물질의 대량정제법 체계화 - 제제화
	○ 균사체 대량생산 기술 개발	<ul style="list-style-type: none"> - 산업적 규모의 bioreactor 조건 확립 · 산업화 조건 산소공급 및 용존산소량 확립 · 산업화 조건 배지멸균 및 접종방법 확립
	○ 무리우산버섯과 말굽버섯의 기능성물질의 대량생산과 이용성 실증연구	<ul style="list-style-type: none"> - 공시균 대량증식 실연 · 무리우산버섯 병재배법의 실연 및 작업성 분석 · 말굽버섯의 자실체 인공재배법 개발 - 기능성물질의 대량생산과 이용성 실증연구 · 기능성 식품과 의약품 원료공급 시스템 기술연구와 상품화 가능성 확인 및 제시 · 기능성물질의 대량생산시스템 완료 · 기능성 물질 분리정제과정의 단순화 및 표준화

제 2 장 국내외 기술개발 현황

- 영지버섯과 상황버섯 등 몇 종의 약용버섯으로부터 면역효과 등에 관한 연구가 이루어졌으며 이들의 유효성분 및 이화학적 특성에 관한 연구가 진행되고있음.
- 산업적으로 재배되고 있는 버섯은 식용버섯이 주종을 이루고 있으며 약용버섯에 대한 재배 및 육종에 대해서는 연구가 미흡한 실정임.
- 약용버섯자원으로 장수버섯, 잎새버섯, 비늘버섯, 차가버섯 등의 연구가 미흡하며, 말굽버섯 및 무리우산버섯의 기능성 물질 및 재배법에 관한 연구는 전무한 실정임.
- 최근 미국의 국립암센터에서는 버섯류의 다당체에 대한 D/B화를 통해 그들의 생물활성에 대하여 체계적인 연구를 진행하고 있음.
- 유용 버섯류에 대한 기능성 버섯 제품의 대량생산을 위한 체계적이고 과학적인 연구가 되어 있지 않음.
- 기능성버섯 제품생산의 원료로는 자실체와 균사체를 이용할 수 있음.
- 버섯류에서 얻어진 추출물을 비롯한 기능성 물질의 특성에 대한 연구가 부족하며, 문헌에 의존하고 있어 생물활성에 관한 과학적인 판단기준이 없음.

여 백

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

세부1 : 기능성 우수 균주 육성 및 인공 재배 기술 개발

제 1 절 기능성버섯 균주 수집 및 유연관계

1. 연구수행 방법

가. 공시 균주

시험에 이용된 비늘버섯 균주는 농업과학기술원 응용미생물과에 보존중인 것과 본 과제를 수행하기 위해 수집한 45개 균주를 PDA 배지에서 4℃에 보존하며 필요할 때 증식하여 사용하였다.

Table 1. The number of mushroom strains used in this experiment

버섯명	학명	수집균주수	비고
잎새버섯	<i>Grifola frondosa</i>	36(35)	오염(9028)
장수버섯	<i>Fomitella fraxinea</i>	20(19)	사멸(17019)
비늘버섯	<i>Poliota adiposa</i>	12	
	<i>Poliota squarrosa</i>	8	
	<i>Poliota nameko</i>	7(6)	오염(24036)
	<i>Poliota sp.</i>	3(2)	오염(24008)
	<i>Poliota carbonaria</i>	3(2)	오염(24032)
	<i>Poliota malicola</i>	2	
	<i>Poliota highlandensis</i>	2	
	<i>Poliota aurivella</i>	2	
	<i>Poliota lucifera</i>	2	
	<i>Poliota aggericola</i>	1	
	<i>Poliota terrestris</i>	1	
	<i>Poliota flammans</i>	1(0)	사멸(24026)
	<i>Poliota squarosa-adiposa</i>	1	
	소계		45(41)
차가버섯	<i>Inonotus obliquus</i>	8(7)	오염(74012)
	<i>Inonotus micadoi</i>	3	시루뻨버섯
	<i>Inonotus hispida</i>	2	시루뻨버섯
	소계		13(12)

나. 배지

균사의 형태적 관찰에는 PDA 배지를 사용하였으며 각 균주로부터 DNA를 분리하기 위하여 PDB 배지를 250ml 삼각플라스크에 50ml 씩 분주하여 2주간 배양한 뒤 균사체를 수거하였다.

다. DNA 분리

Genomic DNA는 Graham(Graham, 1994)의 방식을 변형하여 사용하였다. 동결 건조된 균사체는 유발에서 마쇄한 후 각 균주별로 균사체 100mg을 2ml tube에 넣고 1ml의 CTAB buffer(2% CTAB(w/v), 100mM Tris-Cl pH 8.0, 20mM EDTA pH 8.0, 1.4M NaCl)를 첨가한 후 vortexing하고 60℃에서 40분간 water bath에서 반응을 시킨다. 이것을 원심분리(12,000rpm, 10min, room temperature)를 실시하고 상등액을 새 tube로 옮긴 후 5 μ l의 Rnase를 첨가한 후 효소반응(37℃, 40min)을 시킨다. 이어 상등액을 같은 양의

Phenol/CHCl₃/Isoamyl alcohol을 집어 넣고 tapping을 하면서 섞어준 후 잠깐 정치했다가 다시 tapping을 하면서 섞은 후 잠깐 정치한다. 다시 원심분리(12,000rpm, 5min, room temperature)를 시킨 후 상등액을 다시 새로운 tube로 옮긴 후 동량의 CHCl₃/Isoamyl alcohol을 집어 넣고 tapping을 하면서 섞어준 후 잠깐 정치했다가 다시 tapping을 하면서 섞은 후 잠깐 정치한다. 다시 원심분리(12,000rpm, 5min, room temperature)를 한 후 상등액을 새로운 tube에 옮기고 상등액의 1/10량의 NaOAc(CH₃COONa, 3M, pH5.2)를 첨가한 후 총량의 2.5배 볼륨의 100% Ethyl alcohol을 첨가한다. 침전(-70℃, 1hr at Deep freezer or Overnight at -20℃)을 시킨 후 원심분리(12,000rpm, 10min, 4℃)를 실시한 후 상등액을 건어내 버리고 70% Ethyl alcohol 1ml를 첨가하고 pellet이 떨어질 정도로 tapping을 한 후 원심분리(12,000rpm, 1min, 4℃)를 한다. 상등액을 건어내 버리고 vacuum drying(5min)을 실시한 후 50μl의 TE buffer로 녹여 DNA량을 측정하고 사용하였다.

라. rDNA의 증폭과 ITS sequencing

ITS I · II region 의 PCR증폭은 ITS 1 과 ITS 4(Primer ITS 1 : 5'-TCC GTA GGT GAA CCT GCG G-3', ITS 4 : 5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3') 두개의 primer를 이용하여 증폭을 하였고 automatic DNA synthesizer (Applied Biosystems Model/9600)를 이용하여 합성을 하였다. PCR-amplified fragments는 pGEM T-easy vector (Promega)를 이용하여 복제하였다. ITS region을 sequencing한 결과를 DNA Star(Lasergene system for sequence analysis)를 이용하여 유연관계를 분석하였다. 각각의 균주의 ITS region sequence들은 CLUSTAL W(Thompson *et al.*, 1994)를 이용하여 정렬하고 Phylogenic tree를 얻었다.

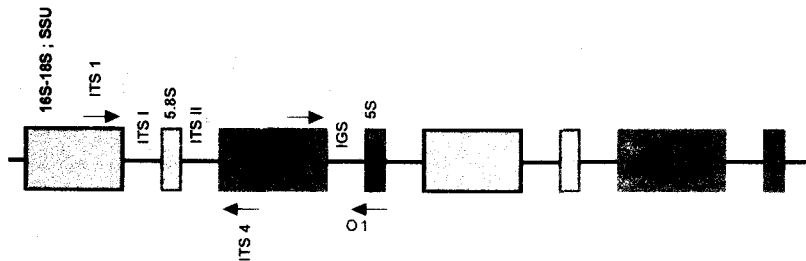


Fig. 1. Primer sites used in amplification of the ITS in the repetitive rDNA gene

To amplify the ITS region, the following two oligonucleotides were synthesized and used nuclear ITS.

ITS 1 : 5'-TCC GTA GGT GAA CCT GCG G-3'

ITS 4 : 5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3'

마. RAPD를 이용한 유연관계 분석

Genomic DNA extraction은 Graham(Graham, 1994)의 방법을 간단하게 변형하여 사용하였다. PCR을 위해 사용된 primer는 SRILS Uniprimer Kit(20mer)를 구입하여 사용하였고, DNA증폭을 위한 PCR stock은 반응액 총량을 20μl 기준으로 하여 template DNA 200ng과 primer 50ng, MgCl₂ 2.5mM, dNTP 0.2mM, Taq DNA polymerase 1unit(Promega)로 맞추어 멸균수를 첨가하였다.

PCR 조건은 94℃에서 5분간 preheating시킨 다음, 94℃에서 1분간 denaturation, 55℃에서 1분간 annealing, 72℃에서 2분 동안 extension을 1 cycle로 하여 총 35cycle을 돌린 후 72℃에서 10분 간 post extension 후 4℃로 유지하였다. PCR 산물은 1.8% agarose gel에서 100v로 전개한 후 ethidium bromide에서 10분간 염색하여, UV transilluminator lamp 상에서 밴드를 관찰하였다.

RAPD를 이용한 각 균주간 유연관계분석은 균주간 유사도를 근거로 UPGMA(unweighted paired group methods with arithmetic average)법을 이용하여 군(cluster) 분석하였다. 또한 유사도와 dendrogram의 작성은 NTSYSpc program ver. 2.02j를 이용하였다.

2. 연구내용 및 결과

가. 비늘버섯

1) 형태적 특성 검정

Table 2. Collected strains

Strain No. (ASI)	Scientific name	Geographical origins	Strain No. (ASI)	Scientific name	Geographical origins
24001	<i>P. adiposa</i>	Korea	24024	<i>P. adiposa</i>	Korea
24002	<i>P. squarrosa</i>	Korea	24025	<i>P. squarrosa</i>	Korea
24003	<i>P. adiposa</i>	Korea	24026	<i>P. flammans</i>	Korea
24004	<i>P. adiposa</i>	Korea	24027	<i>P. adiposa</i>	Korea
24005	<i>P. squarrosa</i>	Korea	24028	<i>P. aurivella</i>	Korea
24006	<i>P. squarrosa</i>	Korea	24029	<i>P. adiposa</i>	Korea
24007	<i>P. squarrosa</i>	Korea	24030	<i>P. adiposa</i>	Korea
24008	<i>P. sp</i>	Korea	24031	<i>P. aurivella</i>	Korea
24009	<i>P. squarrosa</i>	Korea	24032	<i>P. carbonaria</i>	Korea
24010	<i>P. adiposa</i>	Korea	24033	<i>P. carbonaria</i>	Korea
24011	<i>P. carbonaria</i>	Korea	24034	<i>P. lucifera</i>	Korea
24012	<i>P. adiposa</i>	Korea	24035	<i>P. lucifera</i>	Korea
24013	<i>P. adiposa</i>	Korea	24036	<i>P. nameko</i>	Korea
24014	<i>P. malicola</i>	U.S.A	24037	<i>P. nameko</i>	Korea
24015	<i>P. malicola</i>	U.S.A	24038	<i>P. squarrosa</i>	Korea
24016	<i>P. aggericola</i>	U.S.A	24039	<i>P. squarrosa</i>	Korea
24017	<i>P. terrestris</i>	Korea	24040	<i>P. squarrosa-adiposa</i>	Korea
24018	<i>P. adiposa</i>	Korea	5008	<i>P. nameko</i>	Japan
24019	<i>P. sp</i>	Korea	5010	<i>P. nameko</i>	Japan
24020	<i>P. highlandensis</i>	Korea	5011	<i>P. nameko</i>	Japan
24021	<i>P. highlandensis</i>	Korea	5019	<i>P. nameko</i>	Korea
24022	<i>P. adiposa</i>	Korea	5020	<i>P. nameko</i>	China
24023	<i>P. sp</i>	Korea			

가) 비늘버섯종의 특징

(1) 검은비늘버섯 *Pholiota adiposa* (Fr.) Kummer

갓의 크기는 3~8cm로 반구형이나 후에는 반반구형~편평형으로 되며, 표면은 중앙부가

황갈색이고, 주변부는 옅은 황갈색을 띠며, 낙성의 인피가 부착 되어 있고, 습할 때는 점성이 현저하다. 주름살은 완전불은 주름살이고, 다소 뻣뻣하며, 옅은 황백색이나 포자가 성숙하면 점차 갈색으로 변한다.

대의 크기는 4~12cm×5~12mm이고, 上下의 굵기가 같으며, 속이 차 있거나 비어 있는 것도 있고, 표면은 황갈색의 인피가 턱받이 부분까지 덮혀 있으며, 담황색의 막질 턱받이는 조기탈락성이다.

포자문은 적갈색이고, 포자의 크기는 6.5~8.5×3.5~4μm로 타원형이며 발아공이 있고, 시스티디아의 크기는 20~47.5×5~12.5mm이다.

식용가능성: 식용(활엽수 톱밥을 이용한 인공재배 가능함.)

발생시기 및 장소: 봄~가을에 활엽수의 그루터기에서 총생한다.

(2) 띠비늘버섯 *Pholiota squarrosa*(Pers.ex Fr.) Kummer

갓은 크기가 30-110mm로 초기모양은 유구형이나 후에 반반구형-편평형으로 되고, 표면에는 약간 점성이 있으며, 직립돌기상 인편이 중앙부에 밀포 되어 있으며, 비교적 영존성이고 돌기는 담황갈색-황토황갈색이고, 조직은 황백색으로 육질형이며, 무미무취이다.

주름살은 대에 완전불은 주름살로 뻣뻣하며, 유백색이나, 후에 쇠녹빛갈색으로 되며, 종종 밝은 쇠녹빛색으로 물들기도 한다.

대의 크기가 50-80mm×5-10mm로 상하 굵기가 비슷하고, 하반부에는 황갈색의 직립 또는 반전된 크고 거친 돌기상 인편이 있으며, 기부쪽은 점차 쇠녹빛 갈색으로 되며, 바탕색은 담황색이며, 턱받이는 섬유상이나, 쉽게 탈락한다.

포자문은 적갈색이며, 포자는 크기가 4-5.5×3-3.5μm로 모양은 타원형-난형이며, 표면은 평활하고, 발아공은 분명하지 않으며, 측·날시스티디아의 크기는 25-50×5-15μm이며, 모양은 방추형-곤봉형이다.

식용가능성: 식용

발생시기 및 장소: 여름-가을에 광엽수위 고목에 다수 무리져 발생한다.

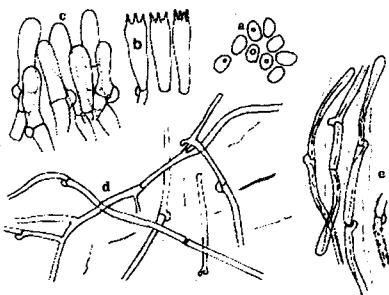


Fig. *Pholiota nameko*
a - gills b - basidia c - cheilocystidia

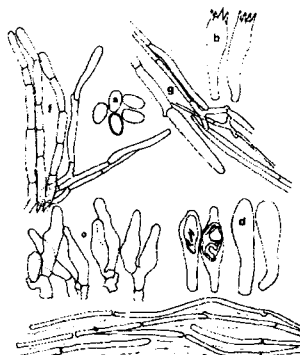


Fig. *Pholiota adiposa*
a - gills b - basidia c - cheilocystidia

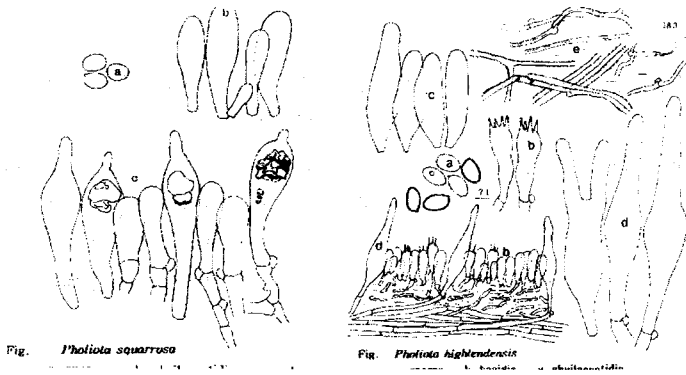


Fig. 2. Morphology of *Pholiota* spp. by microscope.

나) 비늘버섯속 균사의 형태 관찰

배양균사의 특성에서 비늘버섯속의 균사는 PDA배지에서 보통 3주내에 다 자랐으며, 공중균사는 솜털형이거나 거의 없는 상태로 배지표면에 밀착하여 나타나고, 흰색-담황색을 띠며, 표면에 분질물을 형성한다.

현미경적인 미세구조 관찰의 특성 결과 후벽포자나 분절포자가 모든 균주에서 나타났으며, 대부분의 균사에서 clamp가 나타났다.

Table 3. Temporary identification based on morphology

공시균주	학명	한국명	수집 년도	도입 및 수집지역	수집 장소	중간확인결과
24004	<i>Pholiota adiposa</i>	검은비늘버섯	1990	한국	여기산 3126	<i>Pholiota adiposa</i>
24010	<i>Pholiota adiposa</i>	검은비늘버섯	1994	한국	팔달산 1214	<i>Pholiota adiposa</i>
24012	<i>Pholiota adiposa</i>	검은비늘버섯	1995	한국	여기산 9410	<i>Pholiota adiposa</i>
24013	<i>Pholiota adiposa</i>	검은비늘버섯	1995	한국	여기산 93010	<i>Pholiota adiposa</i>
24015	<i>Pholiota malicola</i>	비늘버섯속	1995	미국	MW59	<i>Pholiota adiposa</i>
24018	<i>Pholiota adiposa</i>	검은비늘버섯	1995	한국	양산 1861	<i>Pholiota adiposa</i>
24022	<i>Pholiota adiposa</i>	검은비늘버섯	1995	한국	치악산	<i>Pholiota adiposa</i>
24024	<i>Pholiota adiposa</i>	검은비늘버섯	1995	한국	광교산 3101	<i>Pholiota adiposa</i>
24014	<i>Pholiota malicola</i>	비늘버섯속	1995	미국	MW58	<i>Pholiota aggericola</i>
24016	<i>Pholiota aggericola</i>	비늘버섯속	1986	미국	WC19	<i>Pholiota aggericola</i>
24021	<i>Pholiota highlandensis</i>	재비늘버섯	1995	한국	치악산	<i>Pholiota</i> sp.
24011	<i>Pholiota carbonaria</i>	재비늘버섯	1985	한국	국내 1018	<i>Pholiota squarrosa</i>
24020	<i>Pholiota highlandensis</i>	재비늘버섯	1995	한국	서울 1012	<i>Pholiota squarrosa</i>

2) 분자생물학적 유연관계분석

가) PCR증폭에 의한 rDNA의 다형성 비교

수집균주간의 유전적 연관관계를 알아보기 위하여 PCR증폭에 의한 rDNA의 비교에 의한 계통간의 유연관계를 조사하고 실험결과에 따라 분류를 실시하였다.

전체 43계통의 수집균주를 이용하여 실험을 실시하였고 internal transcribed spacer regions(ITS)는 PCR을 이용하여 증폭하여 증폭된 산물에 대하여 Sequencing을 실시하였다. ITS분석에 따라 5개의 group으로 나눌 수 있었고, 각각의 염기서열을 분석한 결과 682~739bp의 염기서열을 결정하였다. 이 실험의 결과에 따른 유전적 유사도는 49.6~99.9%의 범위를 보였다.

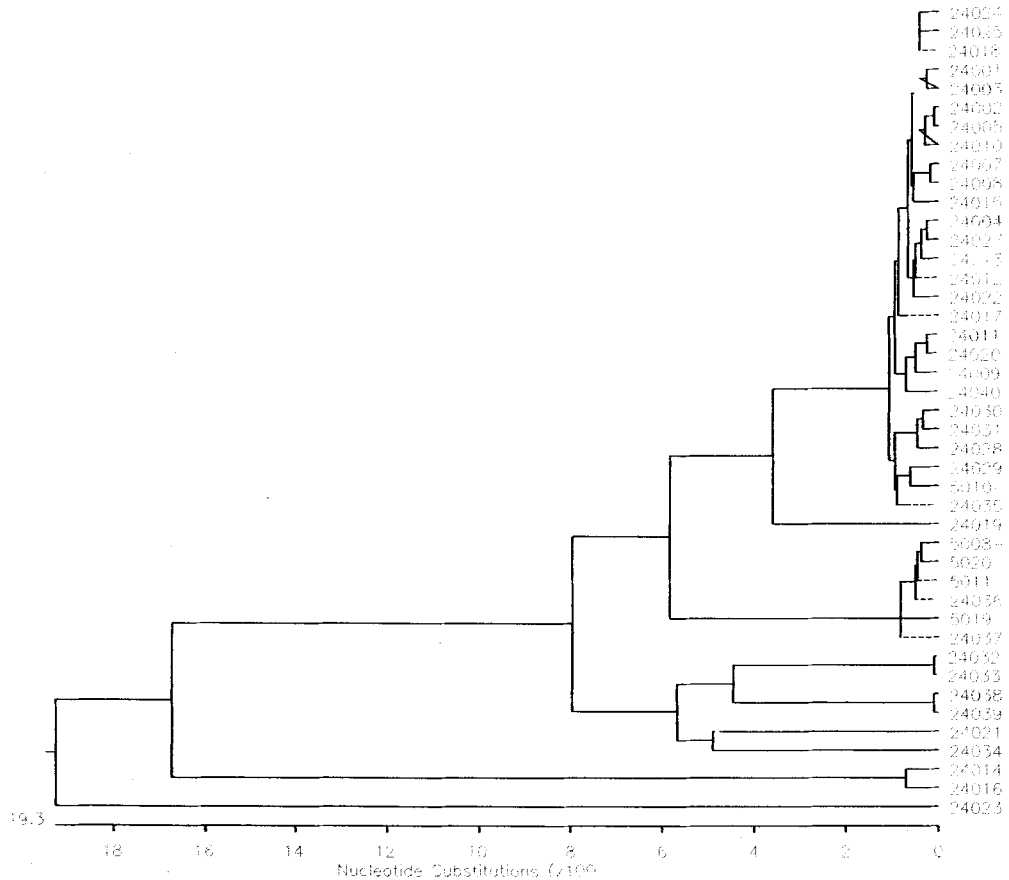


Fig. 3. Dendrogram of phylogenetic relationship of *Pholiota* spp. based on ITS I + II region of rDNA

A group 내의 유전적 유사도는 95.3~100%를 보였고 이것은 group 내의 높은 유사도를 보여준다고 볼 수 있다. 따라서 A group 을 ITS에 의해서 종을 구분할 수 없거나 같은 종으로 볼 수 있다고 할 수 있다. Group C의 유사도는 98.8~99.9%의 유사도를 보여 아주 높은 group내의 유사도를 보였다. 이 또한 위의 A group 의 결과와 같은 해석을 할 수 있다. Group D 내부의 유사도는 76.3~99.9%의 유사도를 보였고 이는 다른 group과는 먼 유사도를 보였으나 같은 group 내에서는 비교적 높은 유사도를 보였다. Group E의 경우는

97.6%의 유전적 유사도를 보여 같은 종으로 판단되며, 다른 group 과는 아주 먼 유전적 유사도를 보이고 있으며 염기 수에서도 차이가 많이 남을 확인 할 수 있다. Group A와 B 간의 유사도는 52.9%의 유사도를 보여 두 group간에는 유사도가 먼 것을 확인하였다. 가장 먼 경우는 Group A와 group E와의 관계는 49.6%의 유사도를 보였다.

실험에 사용한 균주 중 24027(Genbank. AY251300), 24032(Genbank. AY251301), 24038(Genbank. AY251302), 24040(Genbank. AY251303), 24036(Genbank. AY251304), 24028(Genbank. AY251305), 24034(Genbank. AY251306) 은 미국국립생물정보센터(NCBI)에 등록하였다.

ITS를 이용한 *Pholiota* spp.의 수집균주에 관한 유연관계분석 결과를 바탕으로 유전적인 유사도를 확인할 수 있었고 그에 따라 종간의 구분을 할 수 있었다.

Table 4. ITS sequence information

<i>Pholiota adiposa</i> (ASI24027 / 683bp)
TCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTATTGAATGAACCTGGGTATGATTGTTGCTGGCCCATCTGGGCA TGTGCACGTCTGCCATCTTTATCTCTCCACCTGTGCACATATTGTAGGTCTGGAATAAATTTCTGGGGTAACTCAGTAGTGGGGAATGCTGCTGCAAAGCGGCTTTGCCTGTAATTTTCAGATCTATGTTTTTCATATACACCATAAAAATGTAACAGAATGTAATAATGGGTCTTGTACCTATAAACTATATACAACCTTTCAGCAACGGATCTCTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTGGCGCTCCTTGGTATTCCGAGGAGCATGCCTGTTTGAGTGTCATTAAATTCTCAATCTTATTAGCTTTTGTTAATTAAGACTTGGATGTGGGGGGAAAATTTTTTGAAGGTTTCTCGCGAGCCTTCTCCCCTAAAATGCATTAGCTGGTCGCTCGCGCGAACTGTCTATTGGTGTGATAATATCTACGCCATTGACTAACTGCCATAGTAGCACCGCTTCTAATCGTCTTCGGACAATATATGACAATTTGACCTCAAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGA
<i>P. lucifera</i> (ASI24034 / 700bp)
TCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTATTGAATGAACCTGGTGTGGTTGTAGCTGGCCCTCTCGTCGGGGGCATGTGCACACCCGCCATCTTTATCTCTCCACCTGTGCACATCTTGTAGACCTGGATAGACTTTCCGAGGCAACTCGGTCCGGGAGGACTGCTGTGCGTCACTGCCGGCTTTCCTTGCATATCTAGGCCTATGTTTTTCATATACCCCATAGTATGTAACAGAATGTATCATTGGGCCTCGTGCCTATAAACTATATACAACCTTTCAGCAACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTGGCGCTCCTTGGTATTCCGAGGAGCATGCCTGTTTGAGTGTCATTAAATTCTCAACCTTACCAGCTTTTTCGAGTTTCGGTAATGGCTTGGATGTGGGGGTTTTGTGCCGGCTTCCTAGTGAAGTCAGCTCCCCTTAAATGTATTAGCCGGTGCCCTTTGTGGACTGTCTATTGTGTGATAATTATCTACGCCGTGGACTTCTGCTTTGAATAGGTGCACTGCTTCTAACCGTCTGTTTCATTCCGACAATACTTGACAATTTGACCTCAAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGA

P. nameko (ASI24036 / 695bp)

TCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTATTGAATAAAAACCTTGGTTGGATTGT
TGCTGGCCTGAATGAGGGCATGTGCACATCTGCCATCTTTATCTTTCCACCTGTG
CACACTTTGTAGGTCTGGGATTAACCTTTCTGAGGTCAACTCAGTTTTGAGGACT
GCTGTTAGCAATAATGGCTTTCCCTGTCTTTCCAGATCTATGTTTTTCATATACAC
CATAAAAATGTAATAGAATGTGTTAATAAGCCTTGTGCTTATAAACTATATACA
ACTTTCAGCAACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCG
ATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTT
GCGCTCCTTGGTATTCCGAGGAGCATGCCTGTTGAGTGTCAATTAATTTATCAAT
CTTTGCAGCTTTTGTGTTAAAGACTTGGATGTGGGGGTTTTATTGAGGCTTT
TCGGAGTGTCTCCCTAAAATGTATTAGCTAGTTGCTCGTGCGGACTTGTCTAT
TGGTGTGATAATTATCTACGCCATGGACAGACTGCCATTAAGTAGCACTGCTTCT
AATCGTCTTTACTGGACAACCTTATGACAATTTGACCTCAAATCAGGTAGGACTA
CCCGCTGAACCTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGA

P. squarrosa (ASI24038 / 701bp)

TCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTATTGAATGAACCTTGGCATGATTGTAG
CTGGTCCCTTCGAGGGCATGTGCACATCTGTCATCTTTATCTTTCCACCTGTGCAC
CAATTGTAGGTCTAAAAAATTTCCCGGAGACACTCGGGGGAGCATGGGGCGTTG
CTGCGTGTTACCACCAGCTTGCCCTGCATTTTCTAGATCTATGTTTTACATACAC
CATAAAATGTAATAGAATGTTATTATTGGGCTTTTATTGCCTATAAACTATATA
CAACTTTCAGCAACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATG
CGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACC
TTGCGCTCCTTGGTATTCCGAGGAGCATGCCTGTTGAGTGTCAATTAATTTCTCA
ACCTTATCAGCTTTTGTGATAATGGCTTGGATGTGGGGGTTTTATTGCTGGCTTC
TAACGAGGTTGGCTCCCCTTAAATACATTAGCTGGTTGCCTTGTGCAGACATGTC
TATTGGTGTGATAATTATCTACGCTGTGGACTTTCTGCCAGTATTTAGCACCGCT
TCTAACTGTCTGTTAACTTGGACAACATATGACAATTTGACCTCAAATCAGGTAG
GACTACCGCTGAACCTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGA

P. squarrosa-adiposa (ASI24040 / 683bp)

TCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTATTGAATGAACCTTGGTATGATTGTTG
CTGGCCCATCTGGGCATGTGCACGTCTGCCATCTTTATCTCTCCACCTGTGCACAT
ATTGTAGGTCTGGAATAAATTTCTGGGGCAACTCAGTAGTGGGGAATGCTGCTGC
GAAGCAGCTTTGCCTGTAATTTAGATCTATGTTTTTCATATACACCATAAAAATG
TAACAGAATGTAATAATGGGTCTTGTACCTATAAACTATATACAACCTTTCAGCA
ACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAAT
GTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTGCCTCCTT
GGTATTCCGAGGAGCATGCCTGTTTGTGAGTGTCAATTAATTTCTCAATCTTATTAGC
TTTTGTTAATAAAGACTTGGATGTGGGGGGGAAAATTTTTTGAAGGTTTCTCGCG
AGCCTTCTCCCCTAAAATGCATTAGCTGGTCGCTCGCGCGAACTGTCTATTGGTGT
GATAATTATCTACGCCATGGACTAACTGCCATAGTAGCACTGCTTCTAATCGTCT
TCGGACAATTTATGACAATTTGACCTCAAATCAGGTAGGACTACCGCTGAACCT
AAGCATATCAATAAGCGGAGGA

P. carbonaria (ASI24032 / 696bp)
 TCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTATTGAATGAACTTGGCGTGGTTGTTG
 CTGGTCCCTCTCGGGGGCATGTGCACACCCGTCATCTTTATCTTTCCACCTGTGCAC
 GTTTTGTAGGTCCAAAAAATTTTCCGAGGCAACTCGTTTTAGGGGACTGGCGTT
 CGTACTGTGCGCTTTCCCTGGATTTTAGGCCATGTTTTCACATACACCATAACA
 ATGTAATAGAATGTTATTAATGGGCTTTATTGCCTATAAACTATATACAACCTT
 CAGCAACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAA
 GTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTGCGC
 TCCTTGGTATTCCGAGGAGCATGCCTGTTTGAGTGTCAATAAATTCTCAACCTTA
 TTAGCTTTTGCTGATAATGGCTTGGATGTGGGGGTTAATTTGCTGGCTTCTTCAT
 GAGATCAGCTCCCCTTAAATGCATTAGCTGGTTGCCTTGTGCAGACTTGTCTATT
 GGTGTGATAATTATCTACGCCGTGGTCAGTCTGCCTGTCTTTAGCACCGCTTCTAA
 CTGTCTGTTTACTCGGACACTTTATGACAATTTGACCTCAAATCAGGTAGGACTA
 CCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGA

P. aurivella (ASI24028 / 683bp)
 TCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTATTGAATGAACTTGGTATGATTGTTG
 CTGGCCCCTCTGGGCATGTGCACGTCTGCCATCTTTATCTCTCCACCTGTGCACAT
 ATTGTAGGTCTGGAATAAATTTCTGAGGCCACTCAGTAGTGGGGAATGCTGCTGC
 GAAGTGGCTTTGCCTGTAATTTTCAGATCTATGTTTCCATATACACCATAAAAATG
 TAACAGAATGTATTCATGGGTCTTGTACCTATAAACTATATACAACCTTTCAGCAA
 CGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATG
 TGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATTTTGAACGCACCTTGCCTCCTTG
 GTATTCCGAGGAGCATGCCTGTTTGAGTGTCAATAAATTCTCAATCTTATTAGCT
 TTTGTTAATTAAGACTTGGATGTGGGGGGAAATTTTTTTGAAGGTTTCTCGCGA
 GCCTTCTCCCCTAAAATGCATTAGCTGGTGCCTCGCGCGAACTGTCTATTGGTGTG
 ATAATTATCTACGCCATTGACTAACTGCCATAGTAGCACCGCTTCTAATCGTCTT
 CGGACAATATATGACAATTTGACCTCAAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTA
 AGCATATCAATAAGCGGAGGA

나) RAPD를 이용한 유연관계 분석

M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 M 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 M 33 34 35 36 37 38 39 40 41 42 M



Fig. 4. RAPD fingerprinting of *Poliota* spp.
 M : Marker. 1 : 24001 2 : 24002 3 : 24003 4 : 24004 5 : 24005 6 : 24007 7 : 24008 8 : 24009 9 : 24010 10 : 24012 11 :
 24013 12 : 24014 13 : 24015 14 : 24016 15 : 24017 16 : 24018 17 : 24019 18 : 24020 19 : 24021 20 : 24022 21 : 24023 22 :
 24024 23 : 24025 24 : 24027 25 : 24028 26 : 24029 27 : 24030 28 : 24031 29 : 24032 30 : 24033 31 : 24034 32 : 24035 33 :
 24036 34 : 24037 35 : 24038 36 : 24039 37 : 24040 38 : 5008 39 : 5010 40 : 5011 41 : 5019 42 : 5020

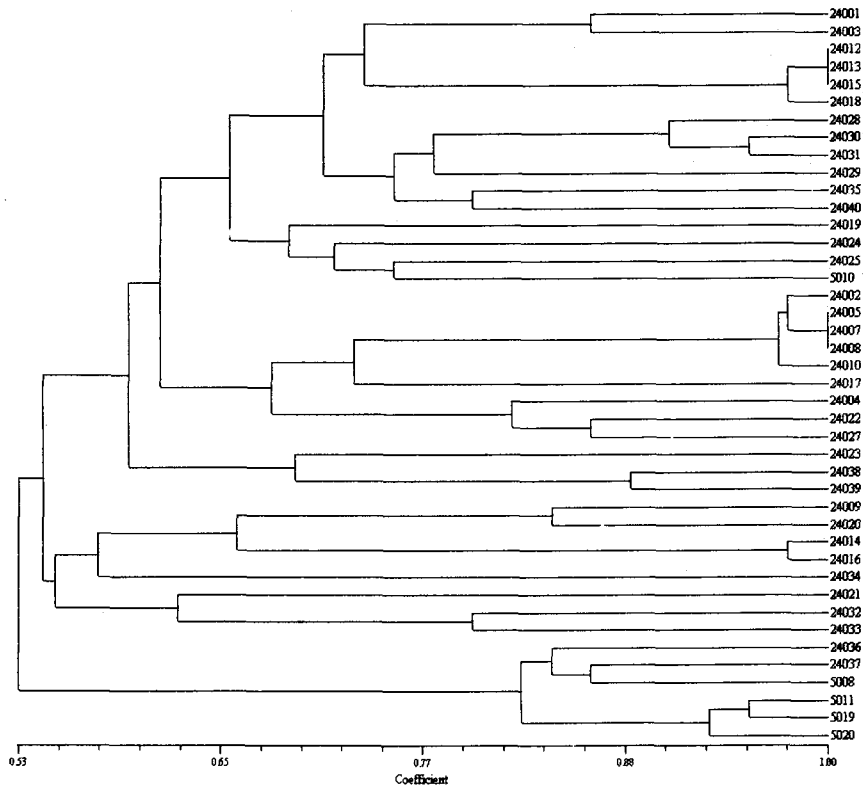


Fig. 5. Dendrogram of similarity based on RAPD analysis with five random primers of *Poliota* spp.

RAPD를 이용한 비늘버섯 속(*Poliota* spp.)의 유연관계를 본 결과 24012, 24013, 24015는 높은 유연관계를 보이고 있고, 24005와 24007, 24008도 또한 높은 유연관계를 보이고 있다. 그리고 5010의 경우는 ITS I · II 영역의 염기서열 분석의 결과와 유사하게 5011, 5019 그리고 5020과는 유전적으로 유연관계가 먼 결과를 보이고 있다.

나. 장수버섯

1) 균주수집

본시험에 사용된 균주는 농업과학기술원에서 1992년부터 수집되어온 균주들로 대부분 중부지방의 아카시이나마에서 수집된 것들이 대부분이고 17020균주는 생명공학연구원에서 외국도입균을 분양받아 사용하였다. 그 형태적 특징 등은 다음 절에서 설명하기로 한다.

Table 5. Collected strains

균주번호(ASI)	수집년도	수집국	수집지역	비고
17001	1992	한국	원주	
17002	1993	한국	북한산	
17003	1994	한국	서울	
17004	1995	한국	시흥	
17005	1995	한국	상주	
17006	1995	한국	광교산	
17007	1995	한국	포천	
17008	1995	한국	수원	
17009	1995	한국	광교	
17010	1995	한국	안동대	
17011	1995	한국	수원	
17012	1995	한국	수원	
17013	1995	한국	수원	
17014	1995	한국	수원	
17015	1995	한국	수원	
17016	1996	한국	제주 (영실)	
17017	1997	한국	경기 광교산	
17018	1997	한국	수원 여기산	
17019	1996	한국	전남 백양사	사별
17020	2001	한국	생명공학연구소	

2) 분자생물학적 유연관계 분석

가) ITS I · II 영역의 염기서열 분석

장수버섯속(*Fomitella spp.*)의 19개의 수집균주를 이용하여 계통간 유전적 유연관계에 관한 실험을 실시하였다. ASI 17014와 ASI 17020은 계통간의 염기서열을 비교한 결과 염기수에서 많은 차이를 내고 있으며 상동성 또한 나머지의 균주와는 아주 먼 유연관계를 보여 같은 종이 아닌 것으로 판단된다. 수집균주 중 나머지 17개 균주를 비교한 결과 592~595bp의 염기서열을 보였고 계통간에는 98.7~100%의 유사도를 나타내고 있어 모두 같은 종으로 판단된다. 실험에 사용된 계통 중 17012는 미국국립생물정보센터(NCBI)에 등록(GenBank AY251308). 하였다.

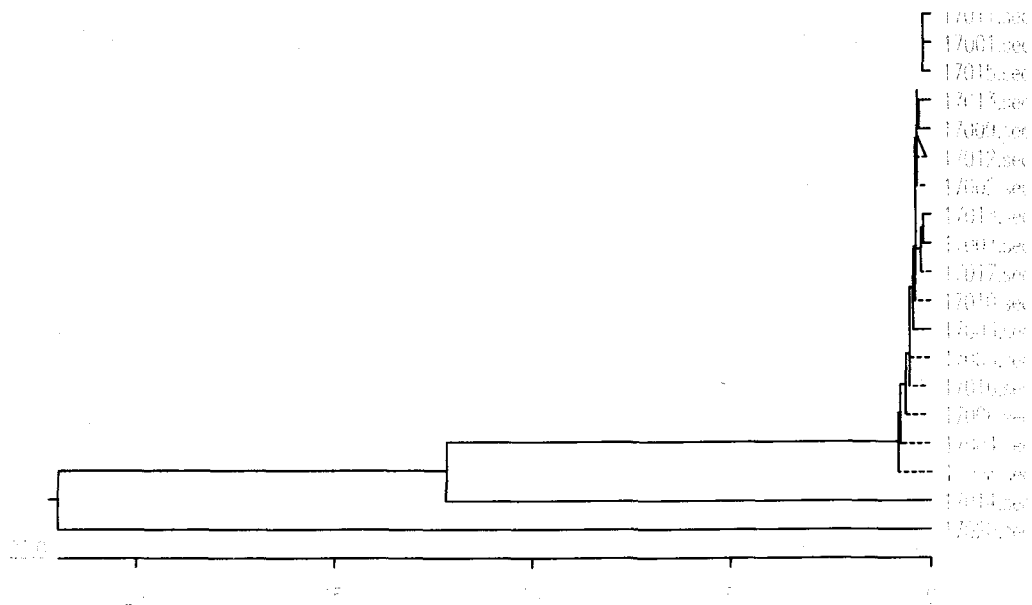


Fig. 6. Dendrogram of phylogenic relationship of *Fomitella* spp. based on ITS I + II region of rDNA

Table 6. ITS sequence information

<i>Fomitella fraxinea</i> (ASI17012 / 634bp)
TCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTATCGAGTTTTGAAAGGGGTTGTAGCT
GGCCTTCGAGGCATGTGCACGCCCCGCTCAATCCACTCTACACCTGTGCACTTAC
TGTGGGTTTCGGAGGTGAAGCGTGCTTTCGCTCGCGGATCTAACGGGCCCCGCTTT
TACTACAAACACTTTAAAGTAAACGAACGTGTATCGCGATGTAACGCATCTATAT
ACAACTTTCAGCAACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAA
TGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCA
CCTTGCGCTCCTTGGTATTCCGAGGAGCATGCCTGTTTGAGTGTCATGAAATTCTC
AACCTACCGGTCTTTGCGGATCGGTAAGGCTTGGACTTGGAGGCTTGTCCGCCCGT
GTGGTCGACTCCTCTCAAATGCATTAGCCTGGTTCCTTGCGGAICGGCTCTCGGTG
TGATAATTGTCTACGCCGCGACCGTGAAGCGTTTGGCTGGCTTCTAACCGTCTCGA
TGGAGACAACCTTCTGACCTCTGACCTCAAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTT
AAGCATATCAATAAGCGGAGGA

나) RAPD를 이용한 유연관계 분석

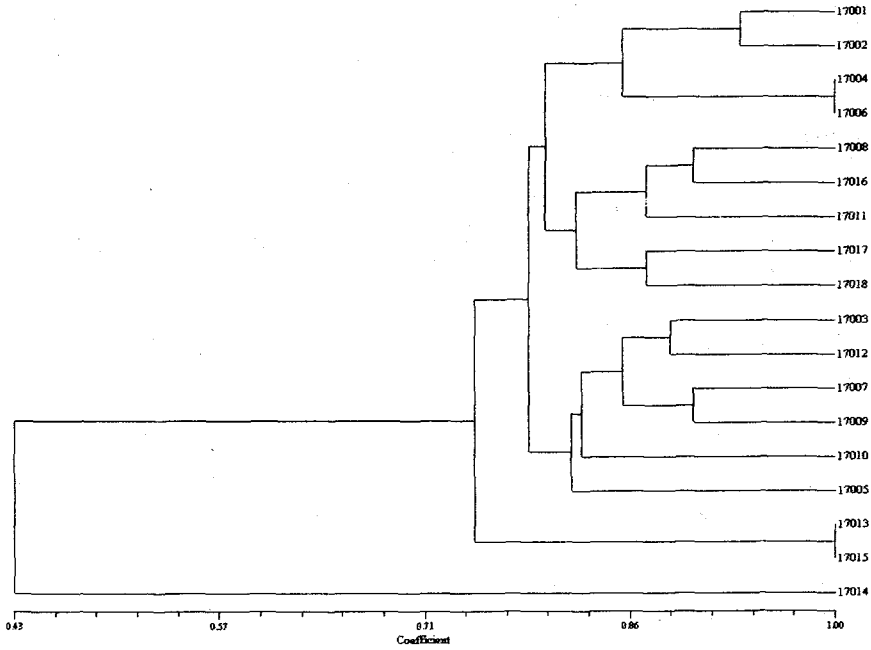


Fig. Dendrogram of similarity based on RAPD analysis with five random primers of *Fomitella flaxinea*

장수버섯 속(*Fomitella*)의 유연관계를 본 결과 17004와 17006 그리고 17013과 17015는 유전적으로 높은 유사도를 보이고 있다. 그러나 17014의 경우는 유전적으로 유사도가 아주 낮은 결과를 보이고 있다. 전체적으로 약 75%에서 100%까지 유전적 유사도를 나타내고 있다.

다. 잎새버섯

1) 공시 균주

본 시험에 사용된 균주는 잎새버섯1호를 비롯하여 한국 자생종으로는 ASI 9013과 9022번이고 나머지는 대개 일본 및 중국, 미국 등에서 도입된 균주들이며, ASI 9035와 9036은 생명공학연구원을 통하여 도입된 균주이다.

Table 7. Collected strains

균주번호 (ASI)	수집년도	수집국	수집지역	균주번호 (ASI)	수집년도	수집국	수집지역
9001	1973	일본	임시	9019	1994	일본	
9002	1982	일본	야생	9020	1994	미국	
9003	1982	일본	발효연구소	9021	1993	미국	
9004	1982	일본	발효연수소	9022	1995	한국	오대산
9005	1982	일본	동경	9023	1995	일본	
9006	1984	일본	잎새버섯1호	9024	1995	한국	한농버섯
9007	1984	일본	삼산업	9025	1997	일본	호구도95호
9008	1984	일본		9026	1997	일본	지바현야
9009	1984	일본		9027	1998	중국	과학원
9010	1985	일본	임시13호	9028	1998	중국	
9011	1986	일본	북해도	9029	1999	일본	군마현
9012	1986	미국		9030	1999	중국	
9013	1987	한국	양주군	9031	2000	일본	
9014	1989	일본		9032	2000	일본	
9015	1990	일본	오사카	9033	2000	일본	
9016	1991	일본	호구도	9034	2000	일본	임협미생물
9017	1994	중국		9035	2001	한국	생명공학연구소
9018	1994	일본		9036	2002	한국	생명공학연구소

2) 분자생물학적 유연관계 분석

가) ITS I II 영역의 염기서열 분석

잎새버섯속의 35계통의 수집균주를 이용하여 각 계통간 유전적 유연관계를 조사하기 위하여 ITS를 이용하였다. 실험에 사용된 계통 중 9006은 미국국립생물정보센터(NCBI)에 등록(GenBank AY251307). 하였다.. 실험에 사용된 계통들은 616~626bp의 염기서열을 나타내었고 94.6~99.7%의 유전적 유사도를 보였다. 이 실험에 의해 ITS의 염기서열에 의한 수집균주의 종의구분 뿐만 아니라 새롭게 육성되는 계통의 유전적 다형성을 검정하는데도 ;유용할 것으로 판단된다.

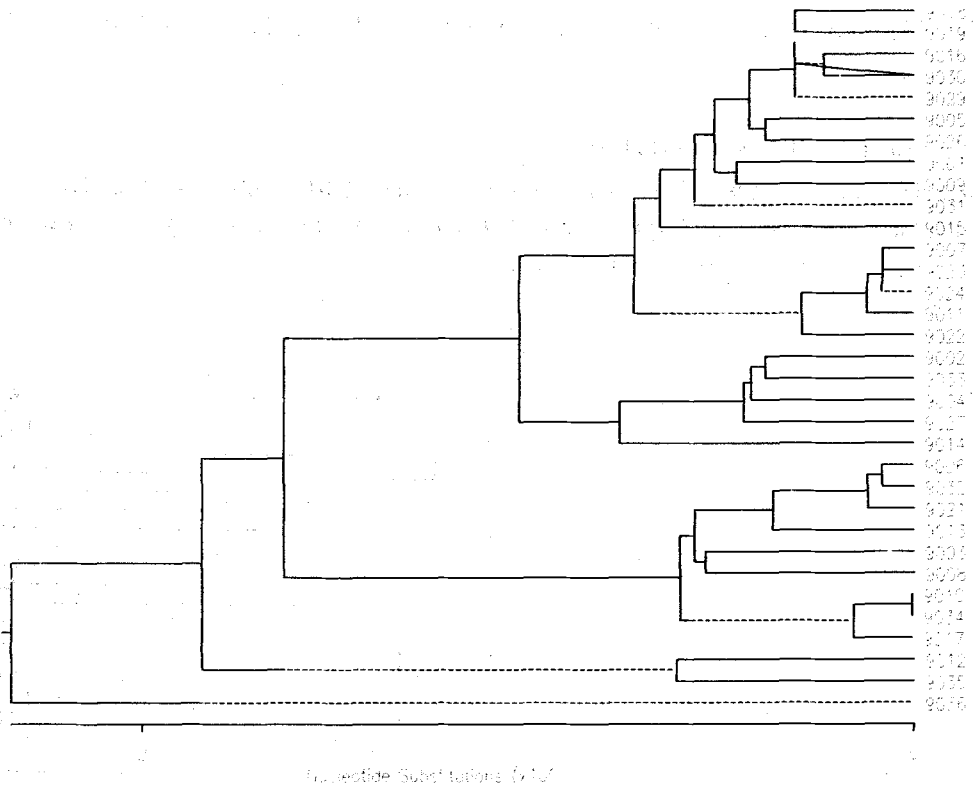


Fig. 8. Dendrogram of phylogenetic relationship of *Grifola* spp. based on ITS I + II region of rDNA

Table 8. ITS sequence information

<i>Grifola frondosa</i> (AS19006 / 656bp)
TCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTAACGAGTTCAGAAAAGGGTTGTCGCT
GGCCTCAA AATTCGGGGCATGTGCACACCCTGCTCATCCACTCTCACACCTGTGCA
CTTTCTGTAGGTTCGGTTCGGGATCGGGTCCCTCGCGGGGTCGGGTCTGCGCCTTC
CTATGTACAATCACAAACGCTTCAGTATTCAGAATGTCATCGCGATAATTA AAA
CGCATCTTATACAACTTCAGCAACGGATCTCTGGCTCTCGCATCGATGAAGAA
CGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAAT
CTTTGAACGCACCTTGCCTCCTTGGTATTCGAGGAGCATGCCTGTTTGAGTGT
CATGGAATTCTCAACCCACACGTCCTTGTGACGTGGACGGGCTTGGACTTTGGAG
GTTTCTGCCGGCCCCCTATTCGGGTCGGCTCCTCTGGAATGCATTAGCTCCATCCC
TTGCGGATCGGCTCTCGGTGTGATAATTGTCTACGCCGCGGTCGTTGAAGCCTCGG
TCGGGAGAGCTTATAATCGTCCCTTCGGGACAATCGAATATGACATCTGACCTCA
AATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACCTAAGCATATCAATAAGCGGAGGA

잎새버섯속의 35계통의 수집균주를 이용하여 각 계통간 유전적 유연관계를 조사하기 위하여 ITS를 이용하였다. 실험에 사용된 계통 중 9006은 미국국립생물정보센터(NCBI)에 등록(GenBank AY251307) 하였다. 실험에 사용된 계통들은 616-626bp의 염기서열을 나타내었고 94.6-99.7%의 유전적 유사도를 보였다. 이 실험에 의해 ITS의 염기서열에 의한 수집균

주의 종의구분 뿐만 아니라 새롭게 육성되는 계통의 유전적 다형성을 검정하는데도 ;유용할 것으로 판단된다.

나) RAPD를 이용한 유연관계 분석

RAPD에 의한 잎새버섯속(*Grifola* spp.)의 다형성을 URP primer(#. 1,2,3,4,5)를 이용하여 비교하였다. 유전적 유사도는 63%에서 100%의 범위를 보이고 있고 이러한 변이를 이용하여 각 균주간 다형성을 비교 하였다.

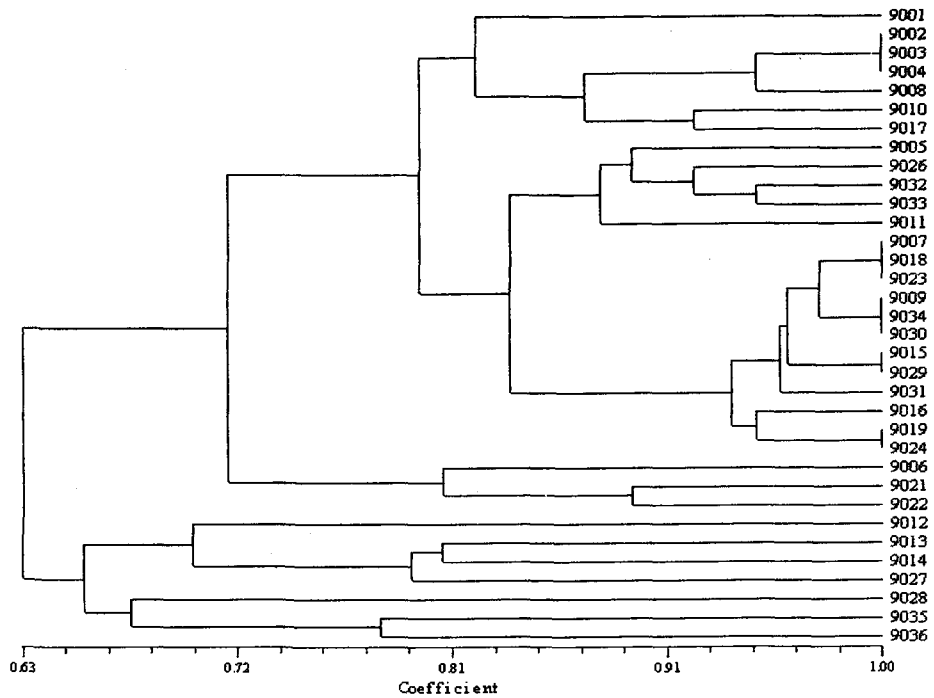


Fig. 9. Dendrogram of similarity based on RAPD analysis with five random primers of *Grifola* spp.

M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 M 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32

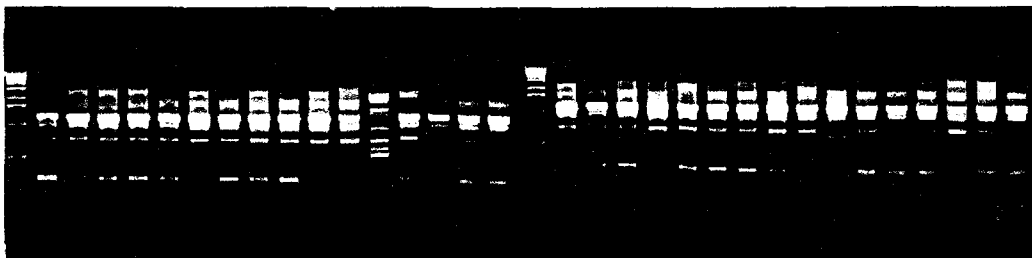


Fig. 10. DNA pattern of *Grifola* spp. primed URP primer(# 1)

라. 차가버섯

1) 공시 균주

본 시험에 사용된 균주는 *Inonotus* 속에 속하는 13개의 균주를 사용하였는데 차가버섯은 ASI74006부터 74013까지로 그 중 ASI 74010 등 외국 도입균은 차가버섯의 표준균주로 사용키 위하여 도입되었다.

Table 9. Collected strains

균주번호(ASI)	학명	국명	수집년도	수집국	수집지역	비고
74001	<i>Inonotus micadoi</i>	시루뻔버섯	1990	한국	수원	
74002	<i>Inonotus micadoi</i>	시루뻔버섯	1991	한국	해남	
74003	<i>Inonotus micadoi</i>	시루뻔버섯	1989	한국	농진청	
74004	<i>Inonotus hispida</i>	시루뻔버섯	1997	소련		
74005	<i>Inonotus xeranticus</i>	기와층버섯	1995	한국	희망사	
74006	<i>Inonotus obliquus</i>	차가버섯	2001			
74007	<i>Inonotus obliquus</i>	차가버섯	2001			
74008	<i>Inonotus obliquus</i>	차가버섯	2001			
74009	<i>Inonotus obliquus</i>	차가버섯	2001			
74010	<i>Inonotus obliquus</i>	차가버섯	2001	CBS 314.39		
74011	<i>Inonotus obliquus</i>	차가버섯	2001	DSM 8659		
74012	<i>Inonotus obliquus</i>	차가버섯	2001	NCWRF 298C		사멸
74013	<i>Inonotus obliquus</i>	차가버섯	2001			

2) 분자생물학적 유연관계 분석

나) ITS I II 영역의 염기서열 분석

차가버섯속의 수집균주 9계통을 이용하여 ITS를 유연관계분석에 사용하였다. 균주별 ITS는 687~758bp로 이루어져 있고 각 균주간의 유전적 유사도는 71.2~99.7%를 나타내었다. ASI 74005의 경우는 유전적인 유사도가 매우 낮은 것으로 보아 *Inonotus* 속이 아닌 균주로 판단된다. 나머지 groupA, B, C, D는 group내에서 유전적 유사도가 서로 유사하게 나타나고 있어 같은 종으로 구분이 되며 group간에서는 상동성의 차이가 나는 것으로 보아 다른 종으로 구분할 수 있다. 이 실험의 결과로 종간의 구분에 ITS를 이용하는 것은 실용적인 방법이 될 것으로 판단된다. 실험에 사용된 계통 중 74005(GenBank AY251309), 74010(GenBank AY251310)은 미국국립생물정보센터(NCBI)에 등록 하였다.

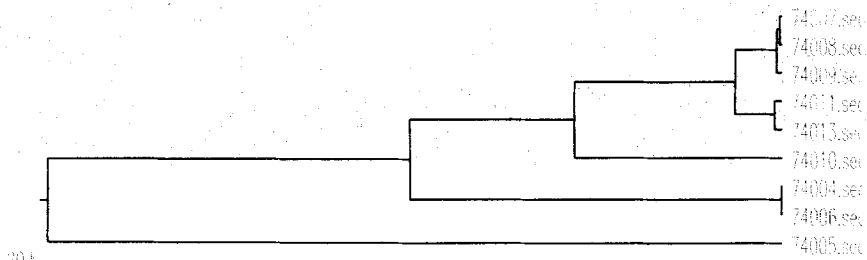


Fig. 11. Dendrogram of phylogenetic relationship of *Inonotus* spp. based on ITS I + II region of rDNA

Table 10. ITS sequence information

<i>Inonotus hispida</i> (ASI74005/726bp)	
TCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTACTGAGGTTACCGGGGCGAGTTTGC	
GGGATGCTATTGCTGGCGCTCTCTCGGGGTGCATGTGCATGGCTCTCCTTCTCGT	
CTTCGTTCCCTTCTATCAACCCCTGTGCACTATAATAGGATTAGAGCGAAGCGCGG	
CAGTTAAGGATTTAGCCTAGTAGTTGTGGGTCCGCCCGCAACGAAAGGTTAATCT	
TGACGCGTGGTACCTCGAACTCCTTGATATTACAAACCACTATTTATGTCTTGTC	
AGAATGTTTCAGTCCCTCGTTGGACGCTAAATAAAAATACAACCTTCAACAACGGAT	
CTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAAT	
TGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTGCGCCCTTTTTCGGA	
AGGGCACGCCTGTTTGGAGTGTGATGTTTCATCTCAATCCAACAGCTTTGCGGCTGA	
CTTGGATTGGATTTGGGAGTCTGCTGGCCCTTCTTGGGTCCGGCTCTCCTTGAATA	
TATGAGTGAGCATCTGGCTTGGCTTGCCTAATGTGATAGCTTCATCATTGGCGGGC	
CTTGCCTAACGGGCTTGCTTCCGAACCGTCTTCTCAACGGAGACAAATCATCATT	
GACAATTTGACCTCAAATCAGGTGGGACTACCCGCTGAACTTAAGCATATCAAT	
AAGCGGAGGA	
<i>Inonotus obliquus</i> (ASI74010/741bp)	
TCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTATCGAATTTTGAAGGCGAAAGGTCTG	
TGCTGGTGCAGAAACGCGCATGTGCACGGCTTTTCGTGATCAAATCCAATCAACC	
CCCTGTGCACCTAAAGAGTCGGAGGTCAGTAGCCTCTGTAATCGAACTGCTTGTA	
GTATGTCCGCAGACAGAAGAGAGCTCTTCGGGGAGGGAGGTGAAAGCTTTTGGCT	
AATTTATAGACACCTATTGTTTGTATGTGAATGTAATGCTCCTTGTGGGCGAT	
AATGAAATACAACCTTCAACAACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACG	
CAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCT	
TTGAACGCACCTTGCGCCCTTGGTATTCCGAGGGGCATGCCTGTTTGGAGTGCA	
TGTTAATCTCAAATCACTTGTCTATTCTTGACCGAATGGAGTAGTGGTTTGGACT	
TGGAGGTCTTTGCTGGCCCGGGCGGTTTGATTGCCCTTGGTTTGTGCGGCTCCTCTC	
AAATGCATTAGCTGGACTTTGGTTCGCGTTTACGGTGTAATAATATTCGTTTCAC	
TAAGACGCTTGCCTAGACGGTCTGCTTCTAATCGTCCTTAAGTTGGACAAGGATC	
CGTGAGTGGCCTTTCTTGACACCTTTGACCTCAAATCAGGTAGGATTACCCGCTG	
AACTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGA	

나) RAPD를 이용한 유연관계 분석

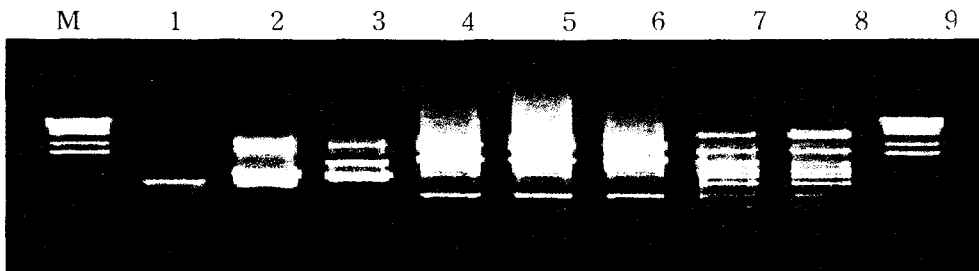


Fig. 12. PCR profiles of *Inonotus* spp. generated by primers URP 3

M : Marker(1kb) 1 : 74004 2 : 74005 3 : 74006 4 : 74007 5 : 74008 6 : 74009
7 : 74011 8 : 74013

차가버섯속의 수집균주 8균주를 이용하여 RAPD(URP primer #1,2,3,4,5)를 실시하였다

각 균주간 45~100%의 유전적 유사도를 보였으며, 특히, ASI 74007, 74008, 74009의 경우는 100% 동일한 밴드양상을 보여 같은 종으로 판단이 된다. RAPD를 이용하여 *Inonotus* spp의 다형성을 비교하는 것은 유전적 유연관계를 연구하는데 유용한 방법으로 판단된다.

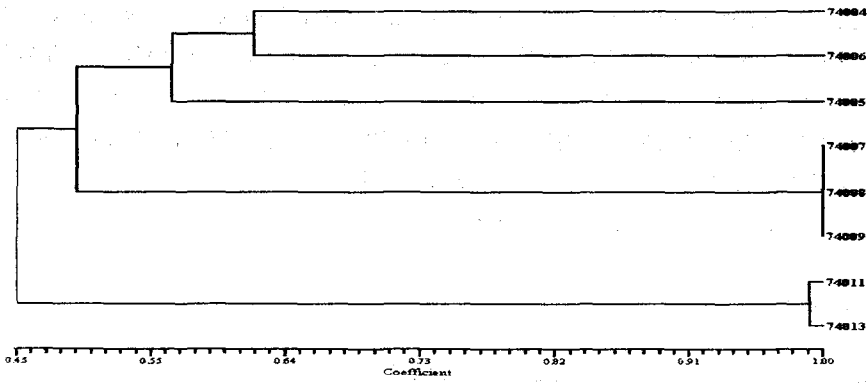


Fig. 13. Dendrogram of similarity based on RAPD analysis with five random primers of *Inonotus* spp.

제 2 절 기능성버섯의 재배법 개발

1. 연구수행 방법

가. 배지

균사생장특성을 조사하기 위하여 공시균주별로 PDA배지에서 배양한 균사체를 직경 5mm의 cork borer로 일정하게 절단하여 버섯완전배지(Mushroom Complete Medium;MCM), 감자배지(Potato Dextrose Agar;PDA), 맥아추출배지(Malt Extract Agar;MEA), YMA배지(Yeast Malt extract Agar)의 4개 배지를 표1과 같은 조성으로 제조한 후 121℃에서 15분간 살균한 후 사용하였고 MCM, PDA, MEA, YMA배지(직경 9cm) 증상에 접종한 후 실온의 암상태에서 배양하였다. 배양 후 7일째에 균사생장 직경을 조사하였으며 균총의 특성은 14일째에 조사하였다. 각 배지의 조성은 표와 같다.

Table 11. Media components

Ingredient	Medium (g/L)*			
	PDA	MCM	MEA	YMA
MgSO ₄ · 7H ₂ O	-	0.5	-	-
KH ₂ PO ₄	-	0.46	-	-
K ₂ HPO ₄	-	1.0	-	-
Peptone	-	2.0	5.0	5.0
Yeast extract	-	2.0	-	3.0
Malt extract	-	-	20.0	3.0
Dextrose	-	20.0	-	10.0
PDA (Difco)	39.0	-	-	-
Agar	-	20.0	20.0	20.0

* MCM;Mushroom Complete Medium, PDA;Potato Dextrose Agar, MEA;Malt Extract Agar, YMA;Yeast Malt extract Agar

툽밥수중에 따른 균사생장속도조사를 위한 툽밥배지의 조성은 포플러, 참나무, 미송, 오리나무의 툽밥 80%와 미강 20%를 혼합하고 수분을 약 65%로 조절한 후 20cm 테스트 튜브(직경 3cm)에 15cm 까지 채운 뒤 121℃에서 40분간 살균 후 사용하였다. 각 균주별로 접종을 하고 23~25℃ 배양실에서 암상태로 배양하면서 일주일 단위로 생장 속도를 측정하였다.

나. 배양 조건 및 자실체 생산

공시균주별로 PDA배지에서 배양한 균사체를 버섯별로 적절한 툽밥을 사용하여 툽밥 80%와 미강 20%를 혼합하고 수분을 약 65%로 조절한 후 삼각플라스크에 담아 균을 접종하고 23~25℃ 배양실에서 암상태로 배양하여 완전히 자란 후 접종원으로 사용하였다. 자실체 생산은 버섯 종류에 따라 병재배, 원목재배, 상자재배, 비닐포트재배를 수행하였다.

2. 연구내용 및 결과

가. 비늘버섯

1) 균주 특성 조사

가) 균사생장 특성 조사

45개의 비늘버섯 균주를 PDA, MCM, YMA, MEA 배지에 접종하여 25℃ 항온기에서 배양한 후 7일과 14일째 균사생장 직경을 조사한 결과 각 배지의 균주별 균사 생장은 균주와 배지에 따라 다양한 변이를 나타내었다(Table ?). 배양 후 7일째에 4개 배지의 평균 성장길이 가장 긴 균주는 ASI 24014로서 56.60mm의 성장길이를 보였고, 다음으로는 ASI 24001로서 54.48mm의 성장 길이를 나타내었다. 이 기간 동안 가장 저조한 균사생장 길이를 나타낸 균주는 9.65mm의 성장 길이를 보인 ASI 24038이었고, 이어 ASI 24039(10mm), 24023(17.0mm), 24021(18.93mm) 순이었다. 14일 동안 배양한 후의 균사생장 길이를 보면 ASI 24001과 24014가 87mm로 가장 길게 생장을 하였고 ASI 24038균주가 가장 저조한 생장(16.98mm)을 나타내었다. 균총의 색은 대부분 백색을 띄었고, ASI 24021(갈색), 24023(황갈색)을 나타내었다. 비늘버섯의 경우 4개의 배지간 균사 성장길이를 비교한 결과, PDA배지가 가장 균사생장이 좋았고, MEA, MCM, YMA의 순으로 균사생장이 좋았다. 각각의 균주들은 균주간에 균사 생장의 차이가 크지만, 같은 균주의 경우에 배지간에 약간의 차이를 보이며 생장을 하는 결과를 보였다. 이는 균주의 생육은 배지보다는 균주간 특성에 기인한다는 것을 알 수 있다.

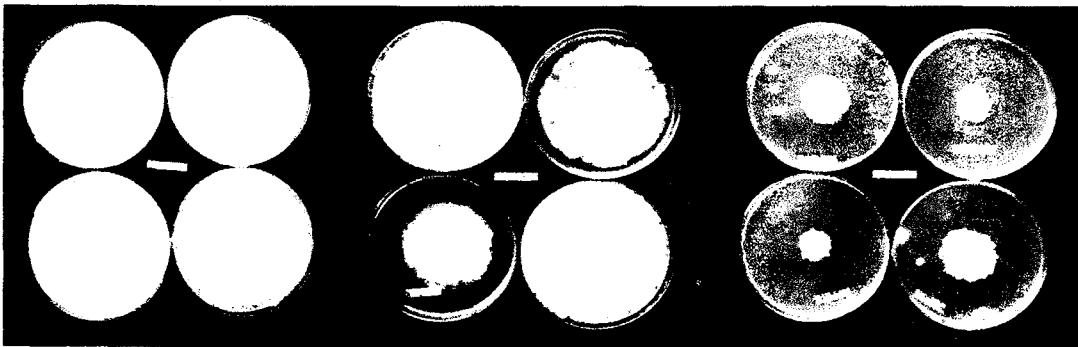


Fig. 15. Comparison of Culture characteristics among *Pholiota* strains on different media
They are arranged in clockwise rotation with PDA, YM, MEA and MCM from upper left

Table 12. Cultural characteristics of *Poliota* spp.

비늘버섯 균주번호	균사생장길이 (mm/7일)					균사생장길이 (mm/14일)					균총 특성
	PDA	MCM	YM	MEA	평균	PDA	MCM	YM	MEA	평균	
24001	60.3	56.3	50.0	51.3	54.48	87.0	87.0	87.0	87.0	87.00	백색
24002	39.7	43.3	39.0	42.0	41.00	78.7	72.0	56.3	64.3	67.83	백색
24003	50.3	44.7	35.7	41.0	42.92	87.0	84.3	42.0	69.7	70.75	백색
24004	43.7	47.0	38.7	42.7	43.02	69.7	74.3	47.7	68.3	65.00	백색
24005	44.3	41.0	38.0	41.3	41.15	80.3	74.0	63.3	65.3	70.72	백색
24006	35.7	34.7	27.0	33.3	32.67	71.7	51.0	35.3	53.7	52.92	백색
24007	48.3	40.7	37.0	42.0	42.00	81.7	69.7	58.0	64.7	68.53	백색
24009	40.3	34.3	29.3	33.0	34.23	78.3	49.7	38.0	51.3	54.33	백색
24010	43.7	42.3	38.0	42.7	41.67	80.0	71.3	58.3	67.0	69.15	백색
24011	38.0	36.7	32.7	32.3	34.92	72.0	47.3	39.0	58.0	54.08	백색
24012	46.0	48.0	41.0	40.7	43.92	87.0	75.3	54.7	80.7	74.42	백색
24013	42.0	44.7	38.3	42.3	41.83	73.3	71.5	52.3	80.0	69.28	백색
24014	63.7	49.3	54.7	58.7	56.60	87.0	87.0	87.0	87.0	87.00	백색
24015	47.3	45.3	38.7	42.3	43.40	79.3	75.0	52.7	81.0	72.00	백색
24016	56.3	49.0	52.0	55.7	53.25	87.0	85.3	87.0	87.0	86.58	백색
24017	47.7	58.0	53.3	58.3	54.33	87.0	87.0	82.7	87.0	85.92	백색
24018	48.7	45.7	38.3	43.7	44.10	83.3	73.3	52.7	83.7	73.25	백색
24019	59.0	38.0	51.3	61.7	52.50	87.0	60.3	87.0	87.0	80.33	백색
24020	32.3	28.3	21.3	28.7	27.65	59.7	46.7	29.7	59.3	48.85	백색
24021	20.0	14.7	15.0	26.0	18.93	30.0	20.7	19.0	34.7	26.10	갈색, s
24022	40.7	43.3	35.7	39.3	39.75	69.3	71.3	60.0	77.0	69.40	백색
24023	19.3	19.7	10.3	18.7	17.00	46.3	32.0	16.7	47.7	35.67	황갈색
24024	48.7	40.7	40.3	43.7	43.35	86.3	73.7	76.0	84.7	80.17	백색, s
24025	45.7	40.3	39.0	42.7	41.92	82.7	65.3	67.0	81.7	74.17	백색
24027	42.7	49.0	42.7	41.0	43.85	70.0	82.7	64.0	76.7	73.35	백색
24028	44.7	35.7	39.3	37.0	39.17	82.7	67.0	63.0	74.7	71.85	백색
24029	43.3	43.0	36.0	45.3	41.90	79.3	74.3	46.0	87.0	71.65	백색
24030	22.7	24.7	24.7	24.3	24.10	48.7	51.0	42.7	51.3	48.42	백색
24031	27.3	21.0	25.7	26.0	25.00	50.0	53.0	42.3	61.0	51.58	백색
24033	56.7	40.0	33.0	44.3	43.50	87.0	77.7	53.0	68.3	71.50	백색
24034	23.7	18.7	18.3	23.0	20.93	45.0	20.3	29.7	38.3	33.33	백색
24035	41.7	36.7	36.0	45.0	39.85	79.3	71.0	62.7	74.0	71.75	백색
24037	37.3	36.7	39.0	38.3	37.83	77.3	58.0	63.0	71.3	67.40	백색
24038	13.0	8.0	8.3	9.3	9.65	23.3	13.0	14.3	17.3	16.98	백색, s
24039	12.0	8.0	8.0	12.0	10.00	22.7	14.7	17.0	18.0	18.10	백색, s
24040	24.7	30.3	29.7	31.7	29.10	43.0	56.7	54.7	60.0	53.60	백색
5008	45.7	40.0	71.7	56.0	53.35	81.7	68.0	87.0	81.3	79.50	백색
5010	23.7	24.3	25.3	28.0	25.32	45.7	47.0	41.7	52.0	46.60	백색
5011	31.7	39.7	32.0	32.0	33.85	57.7	70.3	55.3	68.3	62.90	백색
5019	58.3	43.0	53.3	60.3	53.73	87.0	75.0	85.0	87.0	83.50	백색
5020	35.0	30.0	61.7	36.0	40.67	66.7	53.7	71.0	70.0	65.35	백색
평균	40.14	36.95	36.08	38.87	38.01	70.21	62.40	54.68	67.42	63.68	

Table 13. Grouping according to different colony morphology

Group		Growth length (mm)*		Strains No. in this group
		7days	14days	
A	A1	46 ± 4.9	80 ± 6.4	24001, 24003, 24004, 24010, 24012, 24013, 24018, 24022, 24024, 24027, 24015, 24008, 24002, 24005, 24007, 24025, 24017
	A2	34 ± 7.0	63 ± 15.6	24011, 24020, 24009, 24040
	A3	32 ± 11.6	60 ± 19.3	24030, 24028, 24031
	A4	36 ± 10.9	68 ± 19.4	24029, 24035, 5010
B		39	87	24019
C		42 ± 10.7	74 ± 11.8	5008, 5011, 5019, 5020, 24036, 24037
D	D1	57	87	24033
	D2	13 ± 0.7	23 ± 0.5	24038, 24039
	D3	20	30	24021
	D4	24	45	24034
E		60 ± 5.2	87 ± 0.0	24014, 24016

* Growth length : Mean s.d.

나) 톱밥수종에 따른 균사생장량 조사

Table 14. Mycelial growth length according to sawdust kinds(mm/28days)

구분	균주번호	포플러	참나무	미송	오리나무
비늘버섯	5019	8.5	8.3	9.4	8.1
	24011	7.2	6.2	6.7	6.3
	24014	8.6	8.6	7.5	8.9
	24021	3.8	3.3	4.0	3.5
	24027	7.5	7.0	7.5	7.1
평균		7.1	6.7	7.0	6.8
잎새버섯	9006	9.2	8.0	7.7	8.8
	9010	7.7	8.7	8.2	9.4
	9021	7.1	9.2	9.1	10.1
	9025	6.3	8.9	9.0	9.6
	9034	5.9	7.5	7.0	8.0
평균		7.2	8.4	8.2	9.2
장수버섯	17001	12.5	11.5	10.6	11.3
	17003	12.8	11.0	11.0	11.6
	17007	11.8	10.3	10.9	11.2
	17012	13.0	10.8	11.5	12.5
	17017	13.0	11.6	11.9	12.4
평균		12.6	11.0	11.2	11.8
차가버섯	74006	5.1	4.6	5.7	5.1
	74008	8.0	7.7	8.6	9.3
	74009	6.9	7.8	10.2	9.4
	74011	9.8	10.3	10.9	11.3
	74013	6.7	8.0	8.3	9.9
평균		7.3	7.7	8.8	9.0

비늘 버섯속의 5개 균주(ASI 5019, 24011, 24014, 24021, 24027)를 이용하여 톱밥수종(포플러, 참나무, 미송, 오리나무)에 따른 공시균주의 균사생장을 비교한 결과 4가지 톱밥 모두에

서 양호한 균주생장을 보였다. ASI 5019의 경우 미송에서 가장 높은 균사생장(9.4mm)을 보였고, 오리나무에서 가장 저조한 균사생장(8.1mm)을 보여 약 1.3mm의 차이를 보였다. 각각의 균주에서 톱밥수종에 따른 약간의 균사생장의 차이를 보이고 있으며, 전체적 평균훁을 비교하면 포플러와 미송에서 가장 빠른 균사생장속도를 보이고, 참나무와 오리나무에서 약간 저조한 균사생장속도를 나타내었다.

앞새 버섯속의 경우, 톱밥수종별 전체평균 균사생장속도를 비교한 결과 오리나무에서 가장 빠른 균사생장속도(9.2mm)를 보이고 있으며, 다음으로 참나무 미송 그리고 포플러의 순이었다. 가장 느린 균사생장속도를 보인 포플러톱밥에서의 균사생장속도(7.2mm)는 오리나무와는 2mm의 차이를 보였다. ASI 9006의 경우에는 특이하게 포플러에서 가장 빠른 균사생장속도를 보이고 다음으로 오리나무에서 빠른 균사생장속도를 보였다.

장수버섯의 경우는 포플러 톱밥에서 가장 빠른 균사생장속도(12.6mm)를 보였고 다음으로 오리나무(11.8mm), 미송(11.2mm), 참나무(11.0mm) 순이었다.

차가버섯의 경우는 오리나무(9.0mm), 미송(8.8mm), 참나무(7.7mm), 포플러(7.3mm)의 순으로 균사생장 속도를 나타내었다.

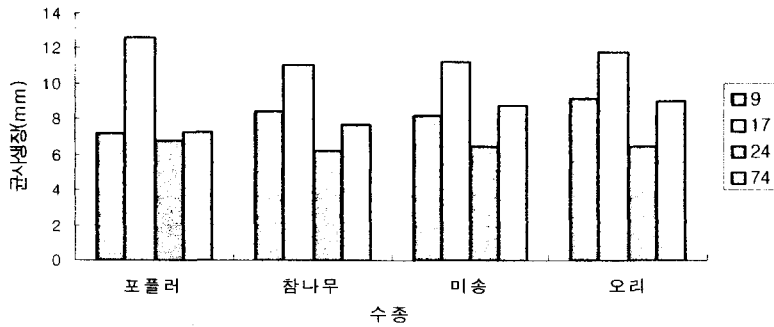


Fig. 15. Mycelial growth length according to sawdust kinds

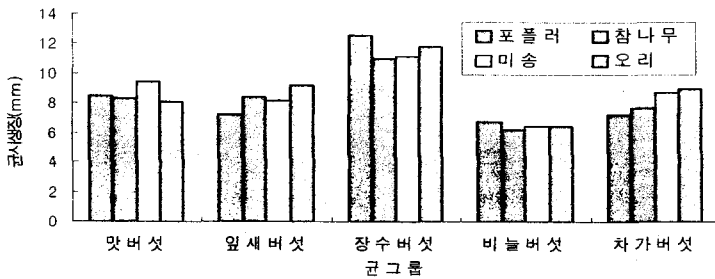


Fig. 16. Optimum sawdust kinds to mushroom species

다) 비늘버섯 대량재배법

Table 15. Fruitbody characters of *Pholiota* spp.

균주번호 (ASI)	갓(mm)				대(mm)		개체수	병당수량 (g/850cc)
	색깔	형태	크기	두께	길이	직경		
24001	적황색	우산형	65	5	81	9	11	87
24002	적황색	우산형	48	6	95	16	2	32
24004	적황색	우산형	43	8	70	10	13	78
24005	적황색	우산형	47	9	126	15	1	31
24006	진갈색	평반형	36	4	60	17	5	55
24007	적황색	우산형	73	12	110	16	2	64
24008	적황색	우산형	33	7	65	13	1	12
24009	진갈색	평반형	45	4	95	11	6	79
24010	적황색	우산형	40	6	76	9	7	46
24012	적황색	우산형	35	5	90	7	20	117
24013	적황색	우산형	29	3	79	9	21	92
24015	적황색	우산형	43	3	78	8	14	111
24017	적황색	우산형	37	3	75	9	12	65
24018	적황색	우산형	37	3	80	5	27	110
24020	연황색	우산형	55	5	85	10	11	118
24024	적황색	우산형	28	4	68	7	14	41
24025	연황색	우산형	75	10	60	16	2	62
24027	적황색	우산형	43	3	78	8	22	127
24028	황색	우산형	60	7	78	15	5	70
24029	적황색	우산형	38	6	45	11	9	65
24035	연황색	우산형	32	3	60	10	9	42

비늘버섯 수집균주에는 여러 종이 혼재되어 있어 인공재배로 병재배를 수행한 결과 자실체 발생이 안되는 균주가 많았으며, 발생된 종은 주로 *adiposa* 계통이었다.

자실체 수량으로 보아 ASI 24012, 24020, 24027 등이 높게 나타났으나 협동과제수행에서 기능성이 높다고 선발된 ASI24012를 중심으로 대량재배 시험을 수행하였다.

ASI24012의 병재배에서는 그림에서와 같이 안정된 생산성을 나타내어 개체수가 37개까지 발생되고 수량은 120g 정도를 나타내었다.

배지재료를 폐면으로 하여 상자재배를 실시한 결과 45*45 크기에서 폐면 6kg을 넣어 23℃에서 15일 배양 후 발생시킨 결과 5일만에 초발이 되었으며 3주기에 걸쳐 2400g을 수확할 수 있었다.

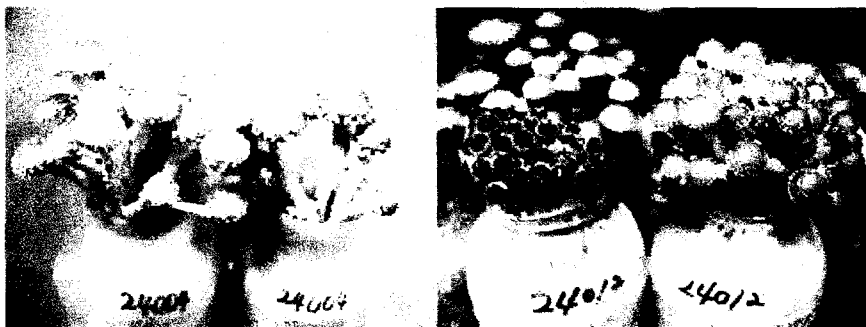


Fig. 17. Fruitbody in the bottle cultivation

Table 16. Yield of ASI 24012 according to the stages in cotton waste box cultivation

처리	초발이 소요일수	균사밀도	수량(g/상자)				비고
			1주기	2주기	3주기	계	
15℃	21	+ -	1300	900	300	2500	생장이 늦음
18℃	20	+ -	1500	650	200	2350	
평균	21	+ -	1400	775	250	2425	

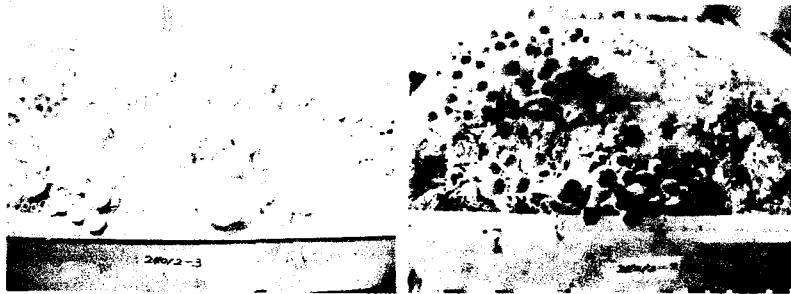


Fig. 18. Yield of ASI 24012 according to the stages (1st flush and 3rd flush) in cotton waste box cultivation

비늘버섯의 인공재배법을 개선하고자 병재배에서는 팽이재배와 같이 권지를 씌워서 대의 신장을 도모하였다. 발이초기에 권지를 씌워서 키운 결과 대는 약 20mm 정도 신장되었으나 전체적으로 개체수가 감소되는 결과를 가져왔다. 따라서 비늘버섯 병재배에서는 개체수가 많은 균주를 선발하여 맛이 개선되기 전에 수확하는 것이 유리할 것으로 생각되었다.



Fig. 19. Effect of paper enveloping to extend fruitbody height.

폐면상자재배에서는 공시균주에 따라 ASI 24004, 24022와 같은 균주는 초기에 수량이 많았으나 24024균주는 후주기 수량이 높은 양상을 보여 균주에 따른 차이가 심했다. 그러나 평균적으로 발생 11일째에 1주기를 나타내었고, 1주기에 전체 수량의 54%를 생산하였다. 상자재배에서 후주기의 생산력 저하를 방지하기 위해서는 24024와 같은 후주기 생산력이 높은 균주를 선발할 필요가 있으며 수확시 배지가 묻어나는 단점을 보완할 필요가 있다.

Table 17. Yield of *P. adiposa* according to the stages in cotton waste box cultivation

균주 번호	종명	1주기		2주기		3주기		총수량 (g/상자)
		날짜	수확량(g)	날짜	수확량(g)	날짜	수확량(g)	
24001	<i>P. adiposa</i>	4/26	923	5/11	795	5/28	700	2418
24002	<i>P. adiposa</i>	4/28	1307	5/15	1016			2323
24003	<i>P. adiposa</i>	4/26	1461	5/12	1068	5/31	305	2834
24004	<i>P. adiposa</i>	4/28	1890	5/20	856			2746
24005	<i>P. adiposa</i>	4/28	1241	5/15	465	5/31	447	2153
24008	<i>P. adiposa</i>	4/28	1261	5/17	1376			2637
24010	<i>P. adiposa</i>	4/28	356	5/17	931			1287
24012	<i>P. adiposa</i>	4/28	1377	5/17	571			1948
24013	<i>P. adiposa</i>	4/28	977	5/18	568			1545
24015	<i>P. adiposa</i>	5/4	1080	5/29	151			1231
24017	<i>P. adiposa</i>	4/26	1077	5/12	904			1981
24018	<i>P. adiposa</i>	4/28	1453	5/20	578			2031
24022	<i>P. adiposa</i>	4/28	1983	5/15	841			
24024	<i>P. adiposa</i>	4/26	1065	5/11	881	5/28	1139	3085
24025	<i>P. adiposa</i>	4/28	1140	5/15	778	5/31	507	
24027	<i>P. adiposa</i>	4/26	981	5/11	1101	5/29	500	2582
24041	<i>P. adiposa</i>	4/28	800	5/18	554			1354
평균		4/27	1198	5/16	790	5/29	600	2200
비율		11일	54.50%	30일	35.90%	43일	27.20%	

Table 18. Comparison between bottle cultivation and cotton waste box cultivation

특징	병재배	폐면상자재배
배양일수	25일	15일
수확일수	15-20일	45-50일(3주기)
병당 수량	85.7g/병	2500g/상자(3주기)
장단점	기계화, 수확 용이, 회전을 빠름	1-2 주기후 급격한 수량저하, 수확시 배지 묻어남

라) 새로운 종 개발 가능성

○ *Pholiota nameko* : 맛버섯은 현재 일본에서는 아주 대중적인 버섯으로 알려져 있으나 국내에서는 보급이 안되고 있다. 시험된 균주 중에서 ASI 5017 균주가 자실체의 형태 및 수량면에서 양호하였다. 맛버섯은 특히 잣에 점액성 물질이 있어 소비자 기호가 떨어지므로 이를 줄일 수 있는 조리법이 개발된다면 충분히 국내에서도 생산이 가능할 것으로 생각된다.



Table 19. Fruitbody characters of *Pholiota naeko*

균주번호	갓직경 (mm)	갓두께 (mm)	대직경 (mm)	대길이 (mm)	개체중 (g)	수량 (g/850ml)
5017	35	6	8	65	6	64
5015	33	9	9	56	7	47
5019	29	5	8	62	4	42
5018	31	8	7	52	4	35
5007	29	4	7	50	4	20
5021	32	6	8	33	3	14

○ *Pholiota squarrosa* : 띠비늘버섯은 검은 비늘버섯보다갓의 육질이 두터우며 대가 강한 특징을 보인다, 또한 상자재배에서도 검은비늘버섯과 대등한 수량을 보여 검은비늘버섯과 함께 병 및 상자재배의 인공재배가 가능할 것으로 생각된다.



Table 20. Yield of *P. squarrosa* according to the stages in cotton waste box cultivation

균주 번호	종명	1주기		2주기		3주기		총수량 (g/상자)
		날짜	수확량(g)	날짜	수확량(g)	날짜	수확량(g)	
24006	<i>P. squarrosa</i>	4/30	1467	5/20	716			2183
24009	<i>P. squarrosa</i>	4/30	209	5/4	269	5/13	528	1006
24011	<i>P. squarrosa</i>	4/30	231	5/11	156	5/15	238	625
24020	<i>P. squarrosa</i>	4/30	1083	5/20	922			2005
24028	<i>P.sp</i>	4/28	337	5/25	446			783
24029	<i>P.sp</i>	4/30	757	5/20	921			1678

나. 장수버섯

1) 균사생장 특성 조사

장수버섯의 균주별 배양 특성을 조사한 결과 대부분의 균주는 PDA에서 좋은 성장을 나타냈으며 거의 모든 균주가 백색균총을 나타내었으나 ASI 17014는 연갈색을 17020은 진갈색을 나타내어 앞절의 유연관계 분석을 뒷받침해 주는 것으로 사료되었다.

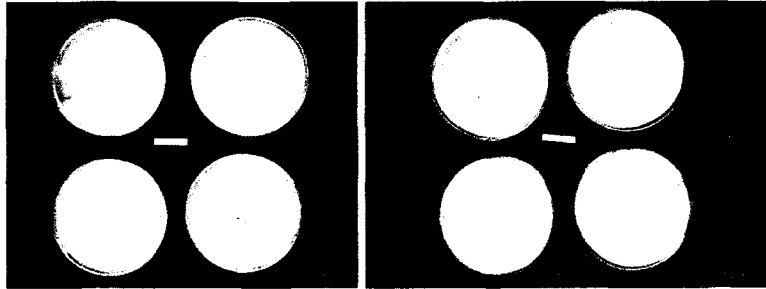


Fig. 20. Comparison of Culture characteristics among *Fomitella fraxinea* strains on different media (arranged in clockwise rotation with PDA, MCM, YM, and MEA)

Table 21. Cultural characteristics of *Fomitella fraxinea* strains

장수버섯 균주번호	균사생장길이 (mm/7일)					균사생장길이 (mm/14일)					균총 특성
	PDA	MCM	YM	MEA	평균	PDA	MCM	YM	MEA	평균	
17001	59.3	43.0	43.0	50.7	49.00	87.0	84.7	87.0	87.0	86.42	백색
17002	56.7	40.7	44.0	53.0	48.60	83.0	78.3	84.3	87.0	83.15	백색
17003	72.0	52.7	54.3	64.3	60.83	87.0	87.0	87.0	87.0	87.00	백색, a
17004	50.0	39.0	37.3	47.7	43.50	80.3	76.3	87.0	80.0	80.90	백색
17005	59.0	43.3	42.7	51.7	49.17	87.0	87.0	87.0	83.7	86.17	백색, a
17006	45.3	37.0	35.3	44.7	40.58	87.0	75.7	76.0	86.7	81.35	백색
17007	63.3	51.0	50.0	58.3	55.65	87.0	87.0	87.0	87.0	87.00	백색, a
17008	66.7	51.3	49.7	64.3	58.00	87.0	87.0	87.0	87.0	87.00	백색
17009	61.0	44.7	42.3	56.7	51.17	87.0	87.0	87.0	87.0	87.00	백색
17010	70.0	46.0	50.3	67.3	58.40	87.0	87.0	87.0	87.0	87.00	백색
17011	74.3	52.7	50.3	67.0	61.08	87.0	87.0	87.0	87.0	87.00	백색
17012	69.3	57.3	51.3	61.3	59.80	87.0	87.0	87.0	87.0	87.00	백색, a
17013	62.3	87.0	85.0	62.7	74.25	87.0	87.0	87.0	87.0	87.00	백색
17014	87.0	48.0	44.0	87.0	66.50	87.0	87.0	87.0	87.0	87.00	연갈색
17015	66.7	51.0	52.3	63.7	58.42	86.7	87.0	87.0	87.0	86.92	백색, a
17016	65.7	44.3	46.0	57.0	53.25	87.0	87.0	87.0	87.0	87.00	백색, a
17017	58.0	46.7	49.7	56.7	52.77	87.0	87.0	87.0	87.0	87.00	백색
17018	56.3	51.3	38.3	53.3	49.80	87.0	87.0	87.0	87.0	87.00	백색, a
17020	60.7	52.0	45.0	43.7	50.35	86.0	87.0	83.0	74.0	82.50	진갈색
평균	63.35	49.42	47.94	58.48	54.80	86.37	85.26	86.07	85.76	85.86	

2) 장수버섯 대량재배법

장수버섯 수집균주의 병재배는 1차년도에 편각형을 보인 ASI17017을 중심으로 종균병에 참나무톱밥(700g)을 사용하여 25℃에서 30일간 배양 후 발생시켰다. 처리온도는 25℃ 이상을 유지하고 초기습도는 95%이상으로 하여 1주일 뒤에는 모든 병이 균사가 재부상되었으나 수평으로 재배할 시는 자실체간 맞닿으면서 서로 붙고 생육에 지장을 주었다. 따라서 박스를 세워서 A형으로 관리한 결과 60일 배양에 병당 3-4개의 개체가 뭉쳐서 발생되어 자실체의 크기는 147*120mm 내외로 이전처리와 유사하였으나 두께는 1차년도에 4-35mm이던 것이 50mm이상으로 두껍게 성장하는 것을 볼 수 있었다.

비닐포트재배에서도 A형재배법을 사용하였으며 2kg 배지에서 평균 14개의 자실체가 형성되었으며 개체당 무게는 약 45g으로 발생이 잘 되어 병재배를 대체할 수 있는 재배법으로 개발하였다.

원목단목재배법은 참나무 원목을 약20cm 크기로 절단후 신문지로 싸서 내열성 비닐봉지에 담아 살균 후 접종하여 25℃에서 45일간 배양하였으며 95%, 27℃에서 매몰법에 의하여 발생처리하였다. 자실체의 발생은 20일 이상 소요되었는데 이는 원목의 배양기간이 다소 적었기 때문이거나 겨울재배에서 인공적으로 온습도를 조절한 상태였기 때문일 것으로 생각되었으며 균주에 따라서 자실체의 발생형태는 큰 차이가 있었다.

Table 22. Comparison of fruiting condition

처리온도(℃)	습도(%)	발생형태	개체수량(g/개)	비고
20-25	90-95	1개 단생	39	수평재배
25-30	95-	3-4개 뭉침	50	



Fig. 21. Comparison between horizontal and A type of cultivation method



Fig. 22. Fruitbody formation of plastic bag cultivation method



Fig. 23. Fruitlet formation of log cultivation method

이상의 재배법을 요약하면 아래의 표와 같다.

Table 23. Comparison of cultivation method

특징	병재배	봉지재배	원목재배
배양일수	30일	45일	45
수확일수	45일	45-50일	60일(매몰식)
장단점	대가 없어 수확힘듦 영지에 비하여 수량 적음, A형 재배	자실체가 편평형이므로 A형 재배가 바람직	아카시아원목과의 비교시험 필요(당년 수확)

장수버섯 원목재배법은 처음에 겨울재배를 수행하였으나 계절이 맞지 않아서 온도에 맞추어 여름재배를 하는 것이 바람직하고 배양기간을 늘려 60일 배양으로 발이일수를 15일로 줄일 수 있었다. 또한 매몰재배가 자실체에 흠이 많이 묻고 품질이 나쁘기 때문에 선반에 얹어서 재배하였다. 대부분의 균주가 아카시아나무에서 수집되었기 때문에 참나무와 비교 시험을 수행하였다. 아카시아원목에서는 버섯의 발생이 늦었으며 수량도 떨어지는 것을 알 수 있었다.



Fig. 24. Comparison between oak and acacia log cultivation method

Table 23. Comparison between oak and acacia log cultivation method

균주 번호	원목종류	원목당 수량(g)	자실체 갯수	원목당 건조중	개체 건조중	개체당 무게	가로 (mm)	세로 (mm)	두께 (mm)
17003	참나무	36.3	7	6.0	6.0	21.0	115.0	68.0	3.0
17003	아카시아	30.5	2	7.0	7.0	30.5	108.5	59.0	6.0
17006	참나무	87.7	30	26.2	9.6	60.0	138.0	74.0	7.0
17006	아카시아	58.0	10	10.0	5.0	33.0	89.5	50.5	8.0
17017	참나무	54.2	18	15.2	10.1	59.5	112.5	67.5	4.0
17017	아카시아	34.3	5	7.7	4.6	27.0	111.0	66.0	5.0
170-23	참나무	85.6	18	25.3	11.2	103.0	158.5	90.0	6.5
170-23	아카시아	24.7	3	4.7	4.7	24.7	85.3	49.3	5.7
170-24	참나무	55.3	12	16.2	8.1	37.0	94.0	65.7	9.3
170-24	아카시아	15.0	2	2.5	2.5	15.0	70.5	43.5	6.0
170-51	참나무	51.1	15	14.2	9.5	52.0	129.0	59.5	7.5
170-51	아카시아	64.8	30	11.9	5.2	45.3	105.3	63.3	8.7

다. 잎새버섯

1) 균사생장 특성 조사

잎새버섯의 균주별 배양 특성을 조사한 결과 대부분의 균주는 모든 공시배지에서 생장이 다소 늦은 편이며 MEA배지에서 다소 좋은 성장을 보였다. 모든 균주가 백색균총을 나타내며 대부분 배지에 깔리면서 자라서 공중균사가 많지 않은 특징을 보였다.

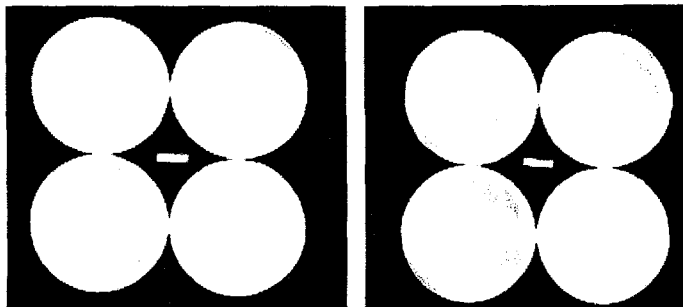


Fig. 25. Comparison of Culture characteristics among *Grifola frondosa* strains on different media They are arranged in clockwise rotation with PDA, MCM, YM, and MEA

Table 24. Cultural characteristics of *Grifola frondosa* strains

잎새버섯 균주번호	균사생장길이 (mm/7일)					균사생장길이 (mm/14일)					균총특성
	PDA	MCM	YM	MEA	평균	PDA	MCM	YM	MEA	평균	
9001	37.3	18.7	24.7	47.3	32.00	65.3	40.0	47.0	71.7	56.00	백색
9002	49.3	14.0	26.0	44.3	33.40	70.0	34.3	53.3	75.0	58.15	백색
9003	57.0	15.3	23.7	51.3	36.83	78.7	37.0	56.7	87.0	64.85	백색
9004	45.7	16.3	25.7	46.7	33.60	67.7	37.0	54.0	75.0	58.42	백색
9005	48.7	16.7	29.0	48.3	35.67	76.0	36.0	51.0	74.0	59.25	백색
9006	41.0	19.0	29.7	48.3	34.50	67.3	38.7	53.0	84.0	60.75	백색
9007	38.3	16.0	31.0	46.0	32.83	73.0	37.7	62.7	77.3	62.67	백색
9008	47.0	15.7	23.3	48.3	33.58	70.3	37.7	51.3	79.7	59.75	백색
9009	39.3	17.7	26.3	44.3	31.90	67.3	38.7	59.3	82.7	62.00	백색
9010	36.7	20.0	32.3	47.0	34.00	64.7	39.3	57.7	86.3	62.00	백색
9011	35.0	18.0	22.3	43.3	29.65	63.0	41.7	50.3	72.3	56.83	백색
9012	43.3	17.7	17.3	46.0	31.07	73.3	37.3	49.0	80.0	59.90	백색
9013	36.7	19.7	29.7	44.3	32.60	73.3	45.3	71.0	87.0	69.15	백색
9014	22.3	10.7	15.7	31.0	19.93	56.3	22.3	32.0	70.0	45.15	백색
9015	34.7	18.0	29.7	46.7	32.27	68.0	41.3	62.0	79.3	62.65	백색
9016	34.7	20.0	27.3	46.0	32.00	65.0	40.7	59.7	78.7	61.02	백색
9017	38.0	20.3	28.3	46.7	33.33	60.3	40.7	58.0	79.3	59.58	백색
9018	35.3	17.3	25.7	44.0	30.57	67.3	41.3	58.3	77.0	60.98	백색
9019	41.3	21.0	26.7	47.7	34.17	69.3	45.3	58.3	77.0	62.48	백색
9020	25.0	19.7	22.0	55.7	30.60	55.0	42.0	59.0	87.0	60.75	백색
9021	33.7	9.0	22.0	48.3	28.25	54.3	25.7	47.3	76.7	51.00	백색
9022	45.0	25.3	28.0	45.7	36.00	72.7	47.0	61.0	80.0	65.17	백색
9023	36.0	18.3	31.7	47.7	33.42	67.7	38.0	65.0	78.7	62.35	백색
9024	40.3	18.3	30.0	43.7	33.08	70.0	42.7	63.3	78.7	63.67	백색
9025	30.0	14.0	22.7	37.0	25.93	54.3	29.0	45.7	65.0	48.50	백색
9026	33.0	11.7	20.3	34.3	24.82	68.3	27.0	51.3	68.0	53.65	백색
9027	41.0	16.7	28.3	47.3	33.33	65.0	39.7	62.0	84.7	62.85	백색
9029	35.3	18.3	26.0	42.7	30.57	65.7	38.7	57.0	72.7	58.52	백색
9030	43.7	18.3	28.3	44.3	33.65	69.7	42.7	61.0	79.0	63.10	백색
9031	41.0	18.3	26.7	45.3	32.83	70.7	40.0	53.0	80.0	60.92	백색
9032	41.0	20.3	28.3	41.3	32.73	56.3	43.7	48.0	76.3	56.08	백색
9033	34.3	5.0	8.7	33.3	20.32	69.3	7.0	19.7	55.3	37.83	백색
9034	41.0	20.0	27.3	45.7	33.50	71.0	42.3	58.3	75.7	61.83	백색
9035	43.3	29.0	43.0	62.7	44.50	76.0	59.0	77.3	87.0	74.83	백색
9036	43.3	11.7	21.0	57.0	33.25	77.7	24.3	59.0	87.0	62.00	백색
평균	39.10	17.31	25.96	45.65	32.02	67.42	37.75	55.21	77.86	59.56	

2) 잎새버섯 대량재배법

잎새버섯의 대량재배를 위해 참나무톱밥에 접종 후 25일간 배양한 경우는 발생처리 후 버섯이 발생되지 않았다. 잎새버섯은 배양 후 후숙이 필요한 것으로 판단되어 45일간 배양함으로써 정상적인 버섯을 얻을 수 있었다.

선발된 ASI9021 균주는 잎새1호에 비하여 자실체 형태가 넓고 색깔도 진하여 우수한 것으로 판단되었다. 이 균주를 대량재배 시험균주로 사용하였다..

Table 25. Fruitbody characteristics of *Grifola frondosa* strain ASI9021

균주번호(ASI)	병당수량(g/850ml)	자실체 특성
9021	148	자실체 잎이 크고, 색이 진함
앞새1호(9006)	119	자실체 잎이 작고, 가지를 많이 침.



Fig. 25. Bottle cultivation of ASI 9021

앞새버섯의 병재배에서는 후숙이 필요하다는 점과 함께 발생처리시 균굽기 후 바로 뚜껑을 벗겼을 때는 건조피해가 생겨 발이일자가 늦어졌다. 따라서 발생처리시에는 환기관리가 무엇보다도 중요한데 이러한 단점을 줄이고 발생하는 표면적을 늘리기 위하여 봉지재배법을 채용하였다. 봉지재배시에도 초기에 완전히 원기가 형성될 때까지는 가급적 뚜껑을 제거하지 않거나 봉지의 윗부분을 길게 남기어 건조피해를 막는 것이 재배성공의 관건이라고 할 수 있다.

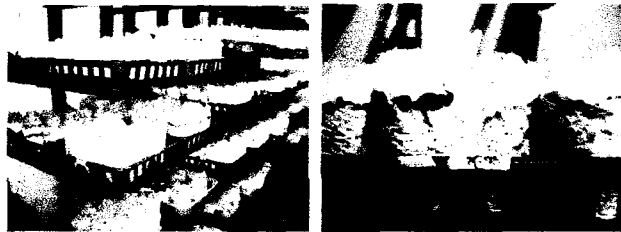


Fig. 26. Plastic bag cultivation of *Grifola frondosa*

라. 차가버섯

1) 균사생장 특성 조사

차가버섯속의 균주별 배양특성을 조사한 결과 종에 따라 균사생장이 빠른 균주도 있었으나 대부분 아주 늦은 성장을 보였으며 잘 자라는 배지 종류도 종에 따른 차이가 있었다.

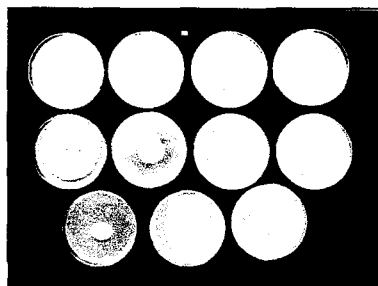


Fig. 26. Colony shapes of *Inonotus* spp.

Table 26. Cultural characteristics of *Inonotus* spp.

차가버섯 균주번호	균사생장길이 (mm/7일)					균사생장길이 (mm/14일)					균종 특성
	PDA	MCM	YM	MEA	평균	PDA	MCM	YM	MEA	평균	
74001	55.0	29.3	36.0	48.7	42.25	87.0	46.3	76.0	84.0	73.33	백색
74002	57.7	27.3	38.3	45.7	42.25	87.0	45.7	82.7	83.0	74.60	백색
74003	18.0	17.7	17.3	18.7	17.93	42.0	36.0	33.3	38.0	37.33	황색
74004	15.0	17.0	13.7	16.7	15.60	41.0	32.7	30.3	41.0	36.25	황색
74005	35.3	32.0	38.7	35.7	35.42	58.3	53.0	64.0	58.0	58.33	황색
74006	20.3	16.7	16.0	26.7	19.93	39.0	30.3	29.0	48.7	36.75	황색
74007	23.7			27.3	25.50	48.3			38.0	43.15	백색
74008	12.3	27.3	26.7	29.3	23.90	30.7	46.7	42.7	52.3	43.10	황색
74009	18.7	21.3	20.0	23.7	20.93	42.3	37.3	35.3	42.0	39.23	백색
74010	9.3	20.0	13.3	11.7	13.57	18.0	33.7	24.0	42.3	29.50	백색
74011	18.0	27.7	25.0	29.0	24.93	25.0	49.7	50.7	51.7	44.27	백색
74013	12.0	19.0	15.0	20.0	16.50	27.7	34.7	31.0	36.3	32.42	갈색
평균	24.61	23.21	23.64	27.77	24.89	45.52	40.55	45.36	51.27	45.69	

2) 차가버섯 자실체 발생

차가버섯균주를 대상으로 병재배와 포트재배를 실시하였으나 다른 모든 균주에서는 자실체 발생이 되지 않았으며, 단지 *Inonotus hispidus*인 ASI 74004만이 병 및 포트에서 진한 갈색의 작은 다수의 자실체를 형성하였다.

그러나 실내실험에서는 사례상에서 ASI 74007균주가 균사체가 뭉치고 pore를 형성하는 것으로 보아 재배조건을 조절함으로써 자실체 발생이 가능할 것으로 사료되었다. 그러나 본 과제의 목표가 차가버섯은 자실체를 생산하고자 하는 것이 아니고 배양균사체를 이용하는 목적이므로 제2협동과제에서 연구될 것이다.

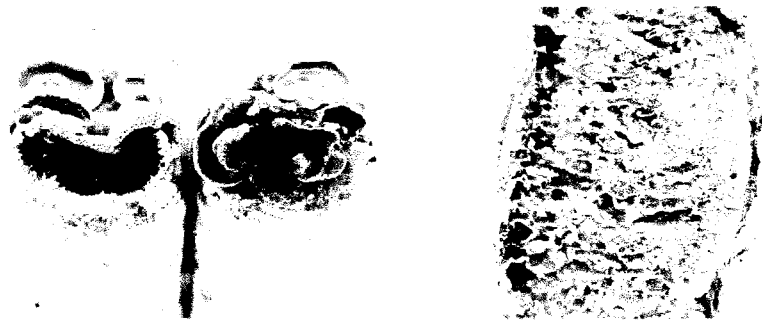


Fig. 27. Bottle and plastic bag cultivation of ASI 74004

제 3 절 기능성버섯 품종육성

1. 연구수행 방법

가. 육성모본의 선발 및 단핵균주 분리

교배모본의 선발을 위해 수집보존 중인 균주를 재배하여 자실체를 발생시킨 후, 자실체로부터 포자를 받아 현탁 희석하여 단포자를 분리한 후 받아시켜 단핵균주를 얻었다. 단포자분리는 증류수에 연속적으로 희석하여 버섯완전배지 (MCM)가 든 평판배지에 약 1×10^4 개/ml를 도포하여 25℃에서 3~6일간 배양한 후 각각의 균총을 현미경으로 관찰하여 clamp가 없는 단핵균주를 새로운 PDA(Potato Dextrose Agar)배지로 옮겨 다음 시험에 사용하였다. 한편 단핵균주 균사체 특성조사는 각각의 단핵균주를 새로운 PDA배지로 옮겨 25℃에서 7일간 배양한 후 균사생장량을 측정하여 일평균 균사생장 속도를 비교하였다.

나. 교배형 결정 및 교배 이핵주의 특성 조사

교배는 두 개 단핵 균주를 같은 사례의 PDA 배지에 10mm 정도 띄워 접종 한 다음, 25℃에서 7~12일간 배양하였다. 배양후 양 균사가 마주치는 지점에서 균사를 떼어내어 현미경으로 clamp의 존재를 확인하고, 7일 후 균총의 양끝에서 다시 확인하여 clamp가 있는 것을 교배가 된 것으로 간주하였다. 교배형 결정은 Eger(1978)의 교배형 결정법을 사용하였다. 또한 각 균주의 화학성 균주집단에서 대표적인 단핵균주를 선발하여 선발된 4개 단핵균주를 교호로 교배하여 교배형 인자를 확인 하였다. 2핵균주로 확인된 교배균주를 850ml 병에서 재배하여 자실체 특성을 조사하였다. 재배법은 각 버섯에 맞게 새로이 개발된 병재배법에 따라 재배되었으며 버섯 특성에 맞게 여러가지 특성을 조사하였다.

2. 연구내용 및 결과

가. 비늘버섯

1) 모본선발

품종육성에 있어 가장 중요한 과정이 모본 선발이다. 우수한 유전적 소질을 가진 모본을 선발하여야 하며 우리가 육종 목표로 하는 형질을 가진 계통을 선발하여 교배모본으로 사용해야만 소정의 목표를 이룰 수 있다. 비늘버섯은 항산화 효과, 항혈전효과, 고혈압저해 효과 등 많은 기능성을 갖고 있으나 현재로서는 이를 모두 검정하여 모본을 선발하기는 현실적으로 어렵다. 따라서 본 과제에서는 형태적으로 우수하면서 다음 절에서 설명되는 항산화성이 높은 ASI 24024를 교배모본으로 선정하였다.



Fig. 28. Fruitbody morphology of *P. adiposa* strains

Table 27. Fruitbody characteristics of *P. adiposa* strains

균주 번호	갓색깔	대색깔	갓직경 (mm)	대직경 (mm)	대길이 (mm)	개체수	수량 (g/850ml)	비고
24001	진황	연황	20-40	5-7	70	14	57	인피
24002	진황	연황	25-37	4-7	80	8	42	인피
24003	진황	연황	20-30	4-6	70	15	43	인피
24004	진황	연황	20-35	4-10	95	24	78	인피
24005	진황	연황	23-40	7-12	68	4	19	인피
24007	진황	연황	25-45	10-12	75	5	27	인피
24008	진황	연황	27-37	4-7	85	6	34	인피
24010	진황	연황	25-40	6-12	75	7	33	인피
24012	진황	연황	25-45	5-10	100	22	36	인피, 고사
24013	진황	연황	20-40	5-10	90	16	46	인피, 고사
24017	진황	연황	20-40	6-10	90	16	46	인피, 갓납작
24018	진황	연황	20-35	5-8	80	20	49	인피
24022	진황	연황	30-50	10	80	19	71	인피, 갓볼록
24024	진황	연황	20-50	4-10	100	15	69	인피
24025	진황	연황	40-50	7	70	8	40	인피
24027	진황	연황	20-30	4-5	100	20	82	인피

2) 단핵균주 육성 및 교배형 결정

포자발아에 의하여 얻은 단핵균주는 균주간 교배육종을 하기 위하여 먼저 교배형을 결정하여야 한다. 비늘버섯 ASI 24024균주의 20개 단포자 발아균사를 상호 대치배양하고 clamp connection 형성여부에 따라 교배형을 결정하였다. 두 균주가 만난 중앙부의 균사를 현미경으로 검경하여 clamp connection 형성여부를 조사한 결과 표와 같이 4개의 교배형으로 구분되었다. 따라서 비늘버섯은 4극성으로 A_1B_1 , A_1B_2 , A_2B_1 , A_2B_2 의 교배형이 존재하며, 화합성 단핵균주간에 균사융합이 일어나 2핵균사가 되어 clamp connection이 형성된 것은 $A_1A_2B_1B_2$ 형으로 자실체가 형성된다. 교배육종은 이와 같이 유전적 형질이 조금씩 다르지만 교배가 가능한 화합성 단핵균주간에 육성된 균주들의 균사생장, 자실체 수량 등의 특성을 비교하여 우량한 균주를 선발하게 된다.

Table 28. Mating type decision of ASI 24024 monokaryons

Mating type	A_1B_1			A_1B_2			A_2B_1			A_2B_2		
	1	2	7	4	10	14	3	15	20	6	9	18
A_1B_1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
	2	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
	7	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
A_1B_2	4	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-
	10	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-
	14	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-
A_2B_1	3	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-
	15	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-
	20	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-
A_2B_2	6	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
	9	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
	18	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-

* : + ; clamp formation, - ; none clamp formation

3) 이핵교배균주 육성

비늘버섯 수집균주로부터 분리된 각각의 단핵균주는 균총의 특성을 조사한 뒤 식물의 자가교배(selfing)에 해당하는 균주내 교배를 ASI 24024에서 수행하여 48개 이핵균주를 육성하였으며, 수집균주의 수량특성과 자실체의 형태적 특성이 우수한 균주의 단핵균주간 교배를 실시하여 24004*24001 교배조합으로부터 131개 이핵균주를 육성하였다.

또 다른 균주의 육성방법은 이핵균주와 단핵균주간의 교배인 Di-mono 교배법으로 이핵균주의 두 개의 핵 중 단핵균주의 핵과 화합성이 있는 핵이 융합되는 교배법이다. 모두 40개의 이핵균주로부터 17개 균주가 교배되어 60개의 교배균주를 확보하였으며 이들의 분석을 통해 양친의 유전력을 평가할 수 있을 것으로 생각된다.

Table 29. The number of developed strains

버섯명	구분	균주 번호	단핵 균주수	버섯명	구분	균주 번호	육성 이핵 균주수
비늘 버섯	수집균주	24001	26	비늘 버섯	균주내 교배 (F1)	24024	48
		24002	8				
		24004	13				
		24007	34		선발균주간 교배 (Mo-Mo)	24004*24001	131
		24008	29				
		24010	13				
		24017	7				
		24022	4		Di-Mono 교배	17수 집균주 *24024mono	60
		24024	23				
		24025	27				
24027	20						

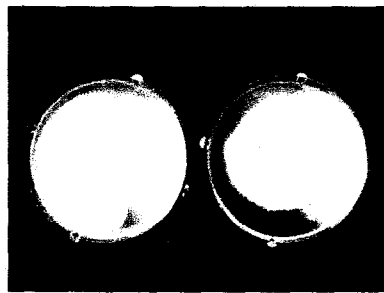


Fig. 29. Di-Mono crossing

Di-mono 교배를 확인한 결과 예상과는 달리 교배에 사용된 각각의 tester에서 A2B2 교배형인 24024-6 균주가 교배능력이 높은 것으로 나타났다. 이는 그 단핵균주 자체의 교배조합능력이 높은 이유일 수도 있으나 이 균주의 군사활력이 낮아서 교배친인 이핵주의 군사가 덮혀 잘못된 결과를 보여 주었을 수도 있다. 이는 추후 다시 검토되어야 할 것이다.

Di-mono 교배로 육성된 자실체의 형태는 교배모본에 따라 변이가 크게 나타났으며 대개의 경우 그다지 바람직하지 않은 형태를 보였다.

Table 30. Confirmation of clamp connection in di-mono mating

이핵 균주번호	A1B1			A2B1	A1B2	A2B2	A?B?	
	24024-1	24024-2	24024-7	24024-3	24024-4	24024-6	24024-5	24024-8
24001	-	-	-	-	-	+	-	-
24003	+	-	-	-	-	+	-	-
24004	-	-	-	-	-	+	-	-
24007	-	-	-	-	-	+	-	-
24012	-	-	-	-	-	+	-	-
24014	-	-	+	-	-	-	+	-
24015	-	-	-	-	-	+	-	-
24016	-	-	-	-	+	-	-	-
24017	-	-	-	-	-	+	-	-
24018	-	-	-	-	-	+	-	-
24019	-	-	+	-	-	+	-	-
24022	-	-	-	-	-	+	+	-
24024	-	-	-	-	-	+	+	-
24025	-	-	-	-	-	+	+	-
24028	-	-	+	-	-	-	+	-
24029	-	-	-	-	+	-	-	-
24034	-	-	+	-	-	-	-	-
24035	-	-	+	-	+	-	-	-
24037	-	-	-	-	-	+	-	-

-: 클램프 없음, +: 클램프 있음



Fig. 30. Fruitbody morphology of dikaryons derived from Di-Mono crossing

ASI 24024 균주내 교배로 육성된 균주는 모두 48균주로 이는 작물의 selfing에 해당한다고 할 수 있다. 버섯은 그 자체가 이형접합체로 볼 수 있기 때문에 균주내 교배는 자식 열세 등으로 그다지 바람직하지 않을 것으로 예상된다. 그러나 Kong(1997)의 보고에서 팽이버섯의 경우는 균주내 교배로 새로운 우수한 품종을 육성할 수 있다고 하였다. 본 실험에 시도 대개의 경우는 열악한 특성을 보였으나 그림과 같은 몇 개 교배이핵주에서는 모본보다 우수한 특성을 보여주었다. 따라서 이와 같은 교배법은 균주간 교배로 목적인 특성을 갖춘 이핵균주를 육성한 후에 여타의 재배양적형질을 개량하기 위한 육종법으로 고려될 수 있을 것이다.



Fig. 31. Fruitbody morphology of dikaryons derived from intra-crossing

선발균주간 교배로 24004 단핵균주와 24001 단핵균주간 교배로 131균주를 육성하여 특성을 조사한 결과 24004-11*24001-10 균주가 수량이 월등히 높고 개체수가 많으나 갓형태가 좋지 않아 24004-12*24001-10을 선발하였다. 이 균주는 갓이 두껍고 재반 특성이 우수하여 최종 육성균주로 선발되었다. 본 실험결과에서도 알 수 있듯이 균주간 교배는 모본보다 훨씬 우수한 균주를 육성할 수 있는 방법으로 교배육종법의 기본이 된다고 생각한다.

Table 31. Fruitbody characteristics of dikaryons derived from mono-mono crossing

교배조합	수량 (g/1000ml)	개체수 (개)	갓너비 (mm)	갓두께 (mm)	대길이 (mm)	대직경 (mm)
24004-11*24001-10	183	58	29	4	80	5
24004-2*24001-11	164	38	33	5	70	7
24004-11*24001-11	162	29	30	3	80	5
24004-12*24001-10	160	30	45	7	65	8
24004-9*24001-15	156	18	43	6	50	6
24004-2*24001-10	152	22	32	6	70	9
24004-3*24001-10	151	31	39	7	70	8
24004-3*24001-14	149	28	30	4	70	6
24004-6*24001-10	149	18	35	6	65	9
24004-9*24001-11	147	57	28	4	58	6
24004-4*24001-10	145	19	37	5	70	9
24004-1*24001-10	144	40	27	4	78	8
24004-9*24001-16	142	33	30	3	75	6
24004-9*24001-5	141	32	26	5	63	7
24004-6*24001-12	21	2	34	6	70	9
24004-4*24001-24	12	4	30	2	28	4
24001	57	14	40	5	70	7
24004	78	24	35	5	95	10



Fig. 32. Fruitbody morphology of dikaryons derived from inter-crossing

4) 생산력 검정시험 및 교배균주 확인

선발균주의 생산력 검정을 병체배병 850ml에서 실시한 결과 대조품종인 24041에 비하여 월등히 높은 수량을 나타내었고 형태적으로도 우수하여 농가실증시험에 들어가기 위하여 접종원을 배양 중이다. 농가실증시험은 충북도원에 협조를 얻어 수행하고자 한다.

Table 32. Productivity test of developed dikaryon

균주번호	병당수량(g/850ml)	자실체 특성	비고
24004-12*24001-10	118	갓이 두껍고 발이수 크기 적당	농가실증(충북도원)
24041(대조)	85	갓이 크고, 개체수 적음.	금봉이버섯



Fig. 33. Productivity test of developed dikaryon

교배균주를 PCR fingerprinting으로 확인하기 위하여 3가지 URP primer를 사용하였다. 육성된 교배이핵주는 양친과는 다른 밴드패턴을 나타내었으며 대조품종인 24041과도 다른 양상을 보였다.

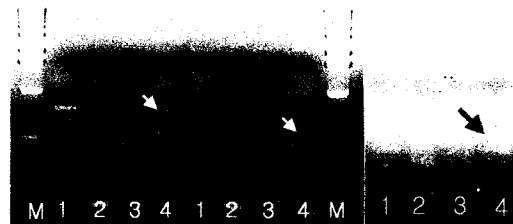


Fig. 34. Confirmation of developed dikaryon by PCR amplification using URP2, URP9 and URP10 primers.

Lane M:Marker, 1. 24041, 2. 24004-12, 3. 24001-10, 4. 24012*24024-6

나. 장수버섯

1) 모본선발

장수버섯 수집균주에 대하여 육종모본을 선발하기 위하여 A형 병재배법으로 특성을 검정한 결과 균주에 따라 다양한 형태를 나타내었으며, ASI 17011의 경우에는 백색자실체를 보이는 경우도 있었다. 조사균주 중 ASI 17006이 가장 수량이 높고 건조중도 많아 모본으로 선발되었으며, 그밖에 17006, 17007, 17017을 수량 및 자실체 형태 등을 참고하여 육종모본으로 선발하였다.

Table 33. Fruitbody characteristics of *F. fraxinea* collected strains

균주번호	수량 (g/1000ml)	건조후 중 량(g/850ml)	개체 평균중량	가로	세로	두께
17001	32.0	6.0	3.0	66	65	6
17002	42.0	8.0	4.0	66	35	7
17004	71.5	10.5	10.5	88	64	12
17006	85.3	13.3	10.0	104	65	6
17007	26.0	6.0	6.0	70	60	5
17009	39.0	7.7	4.6	92	74	5
17010	55.8	9.0	9.0	83	72	8
17011	62.0	9.0	9.0	108	70	6
17013	31.0	5.0	5.0	70	65	4
17021	54.7	8.7	6.5	96	65	6
17022	74.3	11.8	11.8	85	65	7
17023	70.7	11.0	8.3	98	70	8
17024	47.8	8.0	8.0	112	84	7

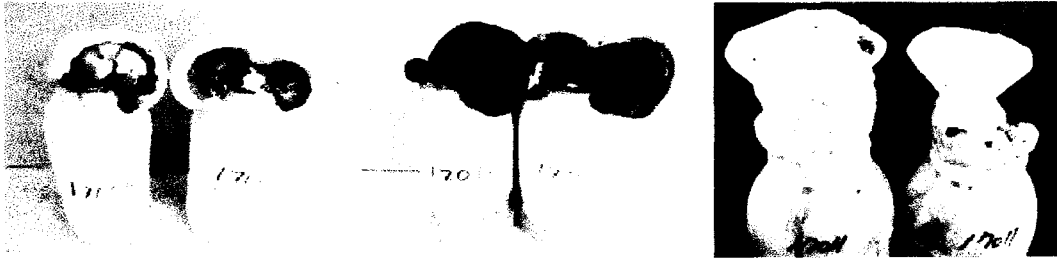


Fig. 35. Fruitbody shapes of *F. fraxinea* collected strains

2) 단핵균주 및 교배 이핵균주 육성

선발된 균주로부터 단포자를 분리하여 각 균주로부터 10개의 단핵균주를 분리하고 이들을 교배하여 이핵균주를 육성하였다. 교배방법은 비늘버섯에서와 같이 mono-mono 교배법으로 38개 이핵균주를 di-mono교배법으로 16개 이핵균주를 육성하였다.

이들 교배 이핵균주는 다시 자실체의 특성을 검정한 뒤 같은 과정을 거쳐 새로운 단핵균주를 육성하고 그 중 5개 단핵균주를 선발하여 수집이핵균주 중 ASI 17017의 단핵균주 5개와 재교배하여 자실체의 수량성이 높고 형태가 좋은 균주를 육성하고자 하였다.

Table 33. The number of *F. fraxinea* monokaryons

버섯명	구분	균주번호	단핵 균주수
장수 버섯	수집균주	17004	10
		17006	10
		17007	10
		17017	27
	교배균주 (F1)	170-7	35
		170-12	15
		170-19	11
		170-51	7
	육성균주 (F2)	F1교배 이핵균주수	53

선발균주의 단핵균주간 교배에 의해 육성된 이핵균주는 균주간 차이가 크지 않았으며 형태적으로도 고르게 나타났다. 따라서 육성균주 중에서 170-7, 170-9, 170-12 균주가 다음 교배를 위하여 선발되었으며, di-mono교배법으로 육성된 균주 중에는 170-51을 선발하였다.

Table 34. Characteristics of fruitbody on dikaryons mated between monokaryons

Strain	Combination	Pileus(mm)		Yield (g/850ml)
		Length (longxshort)	Thickness	
170-1	17004-2x17006-5	122.3x92.5	7.3-22.8	24.9 ±6.6
170-4	17004-4x17006-1	143.4x125.1	5.5-26.2	35.9 ±2.6
170-6	17004-5x17006-1	132.8x110.9	5.9-20.3	27.1 ±4.1
170-7	17004-5x17006-6	124.4x107.0	4.5-24.4	22.8 ±3.8
170-8	17004-6x17006-6	127.9x103.5	6.7-22.0	25.1 ±3.8
170-9	17004-10x17006-4	114.3x90.6	9.6-26.0	24.3 ±5.1
170-11	17004-3x17007-5	150.7x119.6	5.3-28.6	32.8 ±1.3
170-13	17004-4x17007-4	131.9x110.5	5.9-26.5	31.1 ±1.3
170-14	17004-4x17007-8	137.1x106.8	4.9-28.3	27.5 ±3.3
170-15	17004-7x17007-3	133.3x114.7	5.7-18.4	26.1 ±2.4
170-19	17006-1x17007-5	147.5x123.1	4.4-22.1	29.6 ±2.3
170-20	17006-1x17007-6	138.3x115.5	5.3-21.1	24.1 ±5.9
170-21	17006-1x17007-7	147.0x131.0	4.3-21.3	28.6 ±6.1
170-23	17006-2x17007-5	119.8x94.4	6.4-25.6	24.4 ±6.2
170-24	17006-2x17007-6	122.3x98.9	5.8-25.9	20.8 ±2.8
170-33	17006-8x17007-3	127.8x99.8	3.8-18.5	22.1 ±3.2
170-34	17006-8x17007-8	133.8x99.6	5.7-19.3	24.5 ±5.6
170-35	17006-8x17007-9	141.1x104.9	5.7-29.6	26.1 ±2.6
17004	Parents	81.2x39.2	5.6-35.5	25.8 ±6.6
17006	Parents	124.5x97.0	5.8-29.3	27.7 ±3.7
17007	Parents	111.1x84.3	5.0-20.4	28.9 ±4.5

Table. 35. Characteristics of fruitbody of Di-mono mating strains of *F. fraxinea*

Strain	Combination	Pileus(mm)		Yield (g/850ml)
		Length (longxshort)	Thickness	
170-51	17007x17006-8	138.9x119.4	7.0-34.4	24.5 ±1.3
170-52	17008x17006-1	142.4x113.1	5.3-28.9	29.3 ±3.6
170-53	17009x17006-1	144.7x121.8	5.3-26.8	23.3 ±2.5
170-54	17009x17006-6	121.1x98.2	6.0-24.0	24.0 ±3.7
170-55	17009x17006-6	132.0x96.8	4.9-25.8	31.0 ±3.5
170-56	17010x17006-4	126.0x101.3	6.3-24.7	23.0 ±3.2
170-57	17010x17007-5	136.9x108.1	5.5-27.9	29.0 ±2.8
170-58	17010x17007-4	136.9x108.1	5.5-26.6	28.9 ±4.2
170-60	17012x17007-8	108.3x91.4	6.4-21.0	16.9 ±2.7
170-61	17012x17007-3	138.3x113.4	4.4-20.4	25.2 ±5.9
170-62	17012x17007-5	130.9x100.8	5.0-22.8	23.8 ±3.3
170-63	17013x17007-6	124.7x101.3	5.3-22.4	24.7 ±5.3
170-64	17013x17007-7	147.1x108.5	6.4-26.6	27.4 ±2.2
170-66	17013x17007-5	141.0x107.0	4.8-26.6	33.5 ±1.5
17004	Parents	81.2x39.2	5.6-35.5	25.8 ±6.6
17006	Parents	124.5x97.0	5.8-29.3	27.7 ±3.7
17007	Parents	111.1x84.3	5.0-20.4	28.9 ±4.5



Fig. 36. Fruitbody shapes of developed dikaryons

장수버섯 균주 중 자실체의 형태와 수량이 높았던 17017로부터 다시 5개의 단핵균주를 선발하고, 교배육성된 균주 중 170-7, 170-12, 170-19, 170-51에서부터 각각 자실체에서 포자를 받아 단핵균주를 육성 17017의 단핵균주와 교배하여 이핵균주를 육성하였다.

Table. 36. Entry number of monokaryons used in mating of *F. fraxinea*

ASI17017 단핵균주(P)	육성균주의 단핵균주(F1)	비고
c-1(17017-1) c-2(17017-2) c-3(17017-3) c-4(17017-4) c-6(17017-6)	A-1(170-7-1) A-2(170-7-3) A-3(170-7-6) A-4(170-7-7) A-5(170-7-8)	P*F1 또는 F1간에 교호로 교배 실시, clamp 형성하고, 균사생장이 빠른 균주 선발
	B-1(170-51-1) B-2(170-51-2) B-4(170-51-4) B-5(170-51-5) B-6(170-51-6)	
	D-1(170-19-1) D-2(170-19-2) D-4(170-19-4) D-5(170-19-5) D-6(170-19-6)	
	E-2(170-12-2) E-4(170-12-4) E-6(170-12-6) E-7(170-12-7) E-8(170-12-8)	

새로이 육성된 이핵균주는 모본으로 쓰였던 균주나 이전에 육성된 이핵균주보다 수량면에서 훨씬 떨어지는 것들도 있었으나 A-5*B-4와 A-3*D-2는 수량이 높았다. 이들 중 A-5*B-4는 수량이 가장 높았으나 형태가 불균일하여 A-3*D-2를 최종선발하였다.

Table. 37. Characteristics of fruitbody by P*F1 or F1*F1 mating of *F. fraxinea*

균주번호	수량 (g/1000ml)	건조후 중량 (g/1000ml)	개체 평균중량	가로	세로	두께
A-5*B-4	160.3	22.8	15.2	119	75	8
A-3*D-2	136.0	15.7	11.8	148	83	6
A-3*E-6	119.3	15.7	4.7	110	68	5
D-1*E-8	107.5	14.3	14.3	141	87	6
A-4*D-6	105.0	16.0	9.1	105	102	5
A-5*C-2	104.8	16.8	8.4	90	70	5
E-6*E-7	95.3	13.5	9.0	109	80	5
E-2*C-6	37.5	5.5	5.5	74	58	5
C-4*D-4	28.0	5.0	3.3	58	34	9
C-3*E-8	23.0	3.0	3.0	72	44	4
170-57	122.5	15.5	15.5	118	85	8
170-15	103.5	13.8	13.8	82	72	8
170-58	98.0	14.0	14.0	85	65	9
170-53	93.3	13.7	10.3	134	98	60
170-5	89.5	13.0	13.0	114	95	5
170-6	85.5	13.0	8.7	120	75	12
170-51	81.3	13.3	6.7	115	76	7



Fig. 37. Fruitbody shapes of developed dikaryons

3) 생산력 검정시험 및 교배균주 확인

선발된 A-3*D-2 균주는 생산력 검정시험에서 대조로 사용한 수집균주 ASI17006 보다 높은 수량을 보였는데 주로 갓이 두껍기 때문인 것으로 생각된다. 이들에 대한 농가실증은 수요가 불확실하기 때문에 농가에서 실험하기를 꺼리므로 농과원 생산력실험으로 마치고자 한다. 이런 이유로 장수버섯의 보급은 무엇보다도 우선 적극적인 홍보가 필요하며 영지와 의 차별성을 나타낼 필요가 있다.

Table 38. Productivity test of developed dikaryon

균주번호	병당 생증량 (g/1000ml)	건조증량	자실체 특성	비고
A-3*D-2	104	14.0	갓이 두껍다.	(170-7-6)*(170-19-2)
17006(대조)	80	12.7		농가실증 생략



Fig. 38. Productivity test of developed dikaryon

교배균주를 PCR fingerprinting으로 확인하기 위하여 3가지 URP primer를 사용하였다. 육성된 교배이핵주는 양친과는 다른 밴드패턴을 나타내었으나 URP10에서는 차이가 없었다.



Fig. 39. Confirmation of developed dikaryon by PCR amplification using URP4, URP9 and URP10 primers. Lane M:Marker, 1:17017, 2:170-7, 3:170-19, 4:170-51, 5:A-5*B-4, 6:A-3*D-2

다. 잎새버섯

1) 모본선발

잎새버섯 모본을 선발하기 위하여 병재배를 실시한 결과 대체적으로 낮은 수량상태를 보였다. 이는 초기 발이시에 균상표면이 건조피해를 입은 것으로 생각된다. 또한 잎새버섯은 자실체의 특성을 조사하기 위한 기준이 설정되어 있지 않아 이를 위한 표준화가 필요하다. 품종심의시에 본 실험에서 정해진 조사기준을 중심으로 표준조사방법을 결정하여 발표할 예정이다. 여기서는 발생처리시 비교적 건조피해가 적었던 ASI 9021을 교배모본으로 선정하였다.

Table 39. Fruitbody characteristics of *G. frondosa* collected strains

균주번호	무게 (g/850ml)	가로(mm)	세로(mm)	표면색,	단면형태	비고
9002	14	95	70	갈색 3	1	
9003	26	75	60	갈색 4	1	
9006	19	68	45	갈색 3	2	잎새1호
9009	40	93	85	갈색 1	1	
9010	47	80	53	갈색 2	3	
9011	121	125	100	갈색 2	1	상급
9015	109	145	87	갈색 1	3	
9016	88	130	90	갈색 1	1	
9017	47	110	90	연갈색 1	2	
9018	50	85	65	진갈색 3	1	
9019	46	117	85	연갈색 4	3	
9020	35	90	75	갈색 2	2	
9021	95	140	105	연갈색 2	3	상급
9023	88	160	100	갈색 2	3	
9024	61	80	52	진갈색 2	1	
9025	73	121	70	연갈색 1	1	
9029	98	121	90	갈색 2	3	상급
9030	104	105	80	갈색 2	2	상급
9031	75	123	102	갈색 2	3	
9033	54	88	75	유백색 3	1	
9034	35	106	65	유백색 1	1	
9035	16	73	46	진갈색 3	3	

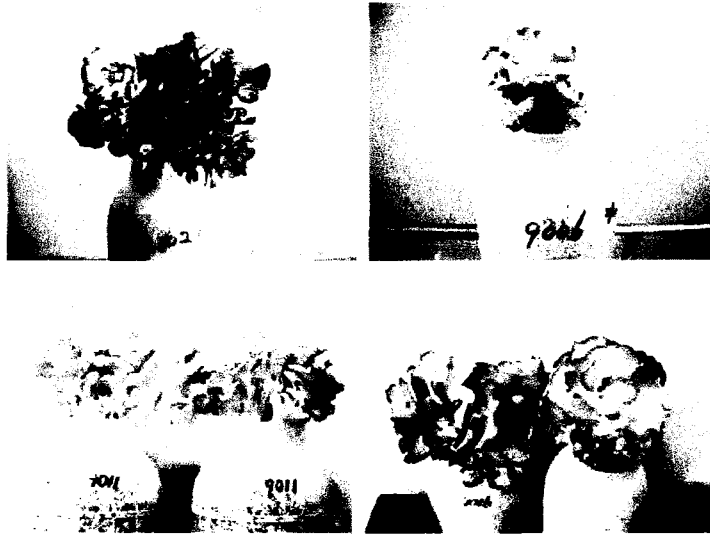


Fig. 40. Fruitbody shapes of *G. frondosa* collected strains

2) 단핵균주 및 교배 이핵균주 육성

앞새버섯의 포자발아를 수차례 수행하였으나 매번 발아가 되지 않아 표에서와 같이 포자를 받자마자 바로 발아시켜 10일만에 28균주를 얻을 수 있었다. 앞새버섯의 포자 발아는 시험결과와 같이 다른 버섯에 비해서 매우 낮은 편이며, 포자 발아에 대한 보고로는 주로 민주름버섯의 경우 힘든 것으로 되어 있다. 이들 단핵균주를 이용하여 Di-mono와 mono-mono 교배로 이핵균주를 육성하였다.

Table 40. Germination rete of *G. frondosa* collected strains

처리	균주번호(ASI)에 따른 발아율(25℃, %)		
	9006	9021	단핵균주수
저장 포자	0	0	
포자낙하후 즉시	0	0.02	28

앞새버섯 이핵균주를 육성하기 위하여 Di-mono 교배를 실시하였다. ASI 9021 단핵균주와 30개 이핵균주를 교배하여 62개 균주를 육성하여 이들의 수량성과 자실체 특징을 모본들과 비교해 본 결과 g210-31, g218-9, g210-9 등의 균주가 우수하였다. 그러나 그림에서 보는 바와 같이 g218-9는 자실체가 밑으로 처지는 형태였으며, g210-9는 자실체가 작은 단념이 있어 최종적으로 g210-31을 선발하였다.

한편 9021의 단핵균주간 균내교배를 실시한 결과는 그림에서와 같이 색택은 진한 균주를 얻을 수 있었으나 수량등은 모본에 미치지 못하여 제외하였다.

○ mono-mono 교배 - 191 균주 :

g189, g146, g156 선발 (진한갈색)

Table 41. Characteristics of fruitbody on dikaryons mated between monokaryon and dikaryons

균주번호	교배조합	무게(g)	가로(mm)	세로(mm)	표면색	단면 형태	비고
g210-04	9021-10*9004	82	106	97	갈색 2	3	
g210-09	9021-10*9009	106	115	100	갈색 1	1	앞 작다
g210-15	9021-10*9015	89	127	115	연회색 2	1	
g210-16	9021-10*9016	91	138	95	연갈색 2	1	
g210-22	9021-10*9022	92	115	99	연갈색 3	3	색 연하고 두꺼움
g210-24	9021-10*9024	78	95	75	연갈색 2	3	
g210-25	9021-10*9025	90	130	95	유백색 2	2	깨끗함
g210-30	9021-10*9030	94	120	88	갈색 1	2	
g210-31	9021-10*9031	100	120	100	갈색 3	2	상급
g210-34	9021-10*9034	104	115	105	갈색 1	3	갓끝이 들림
g218-09	9021-8*9009	107	138	110	갈색 2	3	중심형
g218-10	9021-8*9010	73	100	70	갈색 4	2	
g218-11	9021-8*9011	83	105	100	갈색 2	1	
g218-24	9021-8*9024	88	133	94	진갈색 2	1	진함
g218-33	9021-8*9033	72	100	100	점진갈색 2	3	상급
모본	9011	121	125	100	갈색 2	1	상급
	9015	109	145	87	갈색 1	3	발이 많음
	9016	88	130	90	갈색 1	1	
	9021	95	140	105	연갈색 2	3	갓끝 불규칙
	9023	88	160	100	갈색 2	3	
	9025	73	121	70	연갈색 1	1	
	9029	98	121	90	갈색 2	3	엽 넓고 돌기
	9030	104	105	80	갈색 2	2	상급
	9031	75	123	102	갈색 2	3	

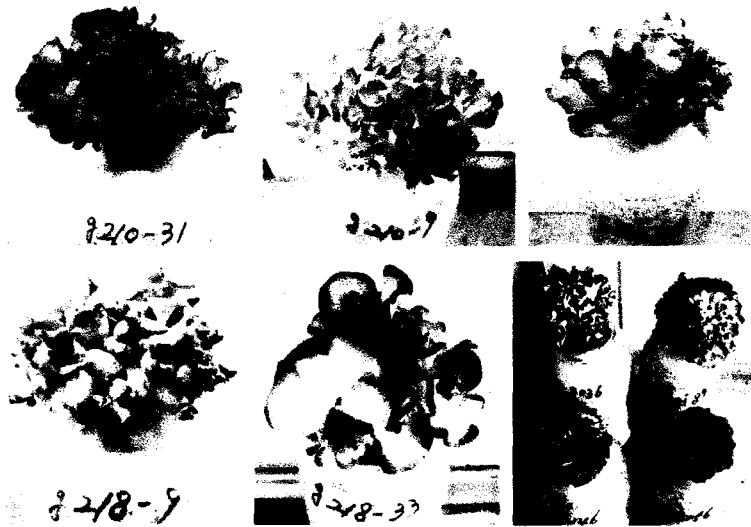


Fig. 41. Fruitbody shapes of developed dikaryons by di-mono and intra-mating

3) 생산력 검정시험 및 교배균주 확인

육성 선발된 g210-31균주를 앞새1호와 함께 생산력 검정을 수행한 결과 선발균주의 수량이 높고 버섯의 형태가 원형으로 갓이 넓은 편이고 색택이 진하여 품질이 좋았다. 따라서 이균을 증식하여 강원도원의 협조를 받아 농가실증시험을 거친 후 품종심의회에 등록할 예정이다.

Table 42. Productivity test of developed dikaryon

균주번호	병당 수량 (g/1000ml)	자실체 특성	비고
g210-31	94	버섯의 형태가 원형으로 갓이 넓은 편이고 색택이 진함.	9021-10*9031 농가실증(강원도원)
9006(대조)	80	색이 다소 연함	앞새1호



Fig. 42. Productivity test on developed dikaryon of *G. frondosa*

교배균주를 PCR fingerprinting으로 확인하기 위하여 3가지 URP primer를 사용하였다.

육성된 교배이핵주는 양친과는 다른 밴드패턴을 나타내어 육성된 균주가 다른 이핵균주와는 유전적 구성이 다르다는 것을 알 수 있었다.



Fig. 43. Confirmation of developed dikaryon by PCR amplification using URP4, URP9 and URP10 primers. Lane M:Marker, 1.9006, 2.9021, 3.9021-10, 4.9031, 5.g210-31

제 4 절 기능성 관련 표지형질

1. 연구수행 방법

가. 비늘버섯 속의 항산화 활성검정

1) SOD(Superoxide dismutase) 활성검정을 위한 조효소 추출과 활성검정

균사체 또는 자실체를 powder 상태로 만든 후 약 200mg을 평량하여 Microtube에 담은 후 400mg의 polyvinylpolypyrrolidone(PVP)와 2ml의 extraction buffer를 혼합한다. 15,000rpm으로 원심 분리 후 상층액을 Sephadex G-25를 이용하여 추출액을 회수(SOD 회수)한다. Bradford reagent를 이용하여 단백질 정량한 후 Enzyme activity를 검정하였다.

Extraction buffer(1M Dibasic potassium phosphate 61.6ml, 1M Monobasic potassium phosphate 38.5ml, 0.5M EDTA 10ml)를 혼합 후 0.01M Sodium ascorbate (L-Ascorbic acid sodium salt)로 1L까지 make up 하였다.

SOD 활성은 Nitro Blue Tetrazolium(NBT)환원법(Bayer *et al.*, 1987)을 이용하였다. 3ml의 assay buffer를 test tube에 넣고 60 μ l의 샘플의 단백질을 넣고, 30 μ l의 riboflavin을 넣고 알루미늄호일로 씌운 박스 안에서 7분간 실온에서 빛에 반응을 시킨다. 반응 후 blank의 흡광도를 spectrophotometer를 이용하여 517nm에서 잰다.

< SOD활성을 나타내는 공식 >

$$\text{SOD activity(\%)} = (1 - A/B) \times 100$$

A : sample의 흡광도

B : blank의 흡광도

2) DPPH와 TBA 활성 검정

수집된 비늘버섯속 각각의 수소공여능의 정도는 Yoshida 등 (1989)의 방법을 이용하여 측정하였다. DPPH 용액을 만들기 위해 1,1-diphenyl-2-picryl hydrazyl (DPPH) 30mg을 ethanol 200ml에 용해시킨 후, 증류수 200ml를 가한다. 대조군으로는 50% ethanol을 사용하였고 DPPH용액의 흡광도를 2.0으로 조절하였다. 80% methanol에 용해한 1%시료용액 0.25ml와 DPPH용액 2.5 ml를 혼합하여 실온에서 1분간 방울시킨 후, 517nm에서 흡광도를 측정하여 항산화 활성을 검정하였다.

TBA(Thiobarbituric acid)법은 lipid에 대한 malondialdehyde 생성 억제효과가 linoleic acid 기질 산패 억제 정도의 효과로 검정을 하였다. 기질용액의 제조는 0.1M potassium phosphate buffer(pH 7.0)와 ethanol을 4:1로 혼합한 용매에 linoleic acid를 첨가하여 0.03M 이 되도록 만들었다. 기질용액 20ml에 0.1M potassium phosphate buffer(pH 7.0) 19.2ml와 1%의 각 시료액 0.8ml를 첨가한 후, 40 $^{\circ}$ C 항온수조에서 100rpm으로 24시간 동안 진탕하여 실험에 사용하였다. TBA는 Wong 등(1981)의 방법을 변형하여 다음과 같이 측정하였다. 반응액 2.0ml씩을 시험관에 넣고 여기에 35% trichloroacetic acid(TCA) 1.0ml와 0.75% TBA 시약 2.0ml를 가한 다음 시험관 진탕기로 30초 동안 진탕하여 균질화 시킨 후, 95 $^{\circ}$ C 항온수조에서 40분 동안 반응·발색시켰다. 반응이 끝난 후 실온에서 냉각시켜 acetic acid 1.0ml, chloroform 2.0ml를 넣고, 시험관 진탕기로 다시 진탕시킨 후 3,000rpm에서 5분 동안 원심분리를 한다. 그 상등액의 흡광도를 532 nm에서 측정하여 TBA가로 하였으며, 대조군의 TBA가와 비교하여 유지에 대한 산화 억제효과를 측정하였다.

3) ESR (Electron Spin Resonance) spectrometer를 이용한 SOD활성 검정

가) 시료준비

냉동건조된 버섯시료를 곱게 마쇄한 후 2g씩 평량하여 100ml 삼각플라스크에 담고 80% MeOH 40ml를 첨가한다. 이어 Shaking incubator chamber(air-bath) 또는 Water bath에서 약 100rpm의 속도로 24시간(실온) 동안 shaking한다. 이것을 라벨링된 100ml 삼각플라스크에 필터페이퍼(Whatman 2)를 이용하여 거른 후 감압농축기에서 농축을 한다.

나) SOD 활성검정

JES-TE 200 ESR SPECTROMETER를 이용하여 SOD의 활성을 측정한다. ESR 조건은 다음과 같다. Magnetic field, 337.100±5 mT; power, 5.00 mW; modulation frequency, 100kHz; frequency, 9.422GHz; amplitude, 5.0×100; sweep time, 1min; time constant, 0.1sec. 모든 시약은 Tris-buffer에 녹여 사용한다. 1회 반응시에 0.05M Tris-buffer(pH 7.0), 1N NaOH, 2mM HPX(Hypoxanthine), 0.5unit XOD(Xanthine Oxydase), 0.67M DMPO(5,5-dimethyl-1-pyrroline N-oxide)를 순서에 맞게 섞은 후 flat quartz cell을 이용하여 측정한다. 시그날의 높이는 기기 자체 프로그램을 이용하여 측정하고 시그날의 비는 Mn peak를 스탠더드로 사용하여 계산한다.

나. Superoxide Dismutase 분리 및 유전자 cloning

1) Mn-SOD 분리

SOD의 활성을 Beauchamp와 Fridovich에 의해 제안된 방법에 의해 Non-denaturing polyacrylamide 위에서 검정을 하였다. SOD활성은 superoxide anion에 의한 NBT환원의 저해를 푸른색 배경(reduced NBT) 위에 투명한 밴드의 형태로 나타낸다. CuZn-SOD 활성은 H₂O₂ 와 cyanide 모두에 반응하고 반대로 Mn-SOD는 둘 모두에 민감하지 않다. Cu-Zn SOD와 Mn-SOD는 각각 5mM KCN과 3mM H₂O₂를 이용하여 각각을 분리하였다. Bovine erythrocytes (Sigma)에서 정제한 Cuzn-SOD와 *E. coli* (Sigma)에서 정제한 Mn-SOD를 control로 사용하였다.

Incubation solution(0.1mM EDTA, 0.033mM Riboflavin, 0.245mM NBT, 17mM TEMED in 80ml of 0.1M potassium-phosphate(pH 7.8))을 사용하였으며 처리는 Gel incubation(암흑 상태로 incubation solution에 30분)한 후 Gel을 0.1M potassium-phosphate(pH 7.8)에 1mM EDTA 넣고 광을 조사하는 상태로 30분간 방치하였다.

2) SOD gene cloning

가) 아미노산 염기분석

기존의 알려진 SOD유전자(Rice, Potato, Cassva 등)의 sequences 중에서 conserved region을 확인하고 primer를 제작하였다. 아래의 primer를 이용하여 PCR을 실시하여 band를 확인하였고 이를 sequencing 하였다.

Table 43. Degenerate primer sequences used in this study

Primer name	Sequences
SOD2A	5'-CAYCAYGGNAARCA YCA-3'
SOD2B	5'-CAYCAYGAYAARCA YCA-3'
SOD2C	5'-AARCA YCAYAA YACNTAYGT-3'
SOD2D	5'-AARCA YCAYCARACNTAYGT-3'
SOD3FA	5'-TTYGGNTCNGGNTGGRCNTGG-3'
SOD3FB	5'-TTYGGNAGYGGNTGGRCNTGG-3'
SOD3RA	5'-CCANCCNGANCCRAA-3'
SOD3RB	5'-CCANCCRCTNCCRAA-3'
SOD4A	5'-TARTANGCRTGYTCCCANACRTC-3'
SOD4B	5'-RTARTANGCRTHYTCCCA-3'
MSN2	5'-AARCA YCAYCARACNTAYGT-3'
MSC1	5'-ARRTARTANGCRTGYTCCCA-3'

Abbreviations:R(A,G), Y(A,C), N(A,G,C,T)

PCR Condition	RT-PCR Condition
94°C 5분	50°C 30'
(94°C 2분, 40°C 2분, 72°C 2분) 4cycles	95°C 15'
(94°C 2분, 45°C 2분, 72°C 2분) 30cycles,	94°C 5'
72°C 10분	(94°C 2', 45°C 2', 72°C 2') 30cycles
4°C hold	72°C 10'
	4°C hold

나) Sequencing and sequencing analysis

DNA Autosequencer(Applied Biosystems Model 3100)을 이용하여 Sequencing을 실시 하였고 DNA star Seqman II를 이용하여 sequence를 분석하였다.

다) Construction and screening of a cDNA library

Total RNA 추출을 위해서 Tri-regent(MRC사 제품)를 이용하였고, mRNA 추출을 위해서 QIAGEN Oligotex mRNA Extraction Kit 이용하였다. 비늘버섯 ASI. 24027를 사용하여 아래의 과정(Sambrook *et al.* 2001)으로 cDNA library를 작성하였다.

Total RNA Isolation → mRNA Isolation → First-Strand Synthesis → cDNA Amplification by LD PCR → Proteinase K Digestion → *Sfi* Digestion → cDNA size fractionation by CHROMA SPINTM-400 → Ligation of cDNA to Vector → Titering the Unamplified Library → Determining the Percentage of Recombinant Clones → Library Amplification → Titering the Amplified Library

위의 과정을 거쳐 작성된 cDNA library를 이용하여 Mn-SOD 특이 프라이머를 이용하여 cDNA단편을 증폭하였고 이것을 다시 pGEM T-easy vector (Promega)로 subcloning 하였다.

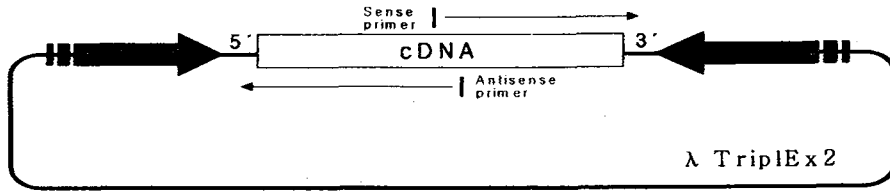


Table 44. Degenerate primer sequences used in this study

Primer name	Sequences
5'PCR primer	5'-AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT-3'
CDSIII/3'PCR primer	5'-ATTCTAGAGGCCGAGGCGGCCGACATG-d(T) ₃₀ N ₋₁ N-3'
MSN2	5'-AARCAYCAYCARACNTAYGT-3'
MSC1	5'-ARRTARTANGCRTGYTCCCA-3'

2. 연구결과

가. 비늘버섯속의 항산화 활성검정

비늘버섯속의 검은비늘버섯에 속하는 균주에 대하여 가능성이 높은 균주를 선발하기 위하여 항산화능을 측정하였다. 항산화능을 측정하는 방법들 중 NBT법, ESR법, DPPH법 및 TBA법을 비교해 본 결과 방법에 따라 항산화능이 높은 균주와 낮은 균주에 차이가 있었다. 따라서 SOD 효소 활성을 기준으로 NBT법과 ESR법으로 모두 낮은 값을 보이는 균주를 항산화능이 낮은 것으로 판단하였다. 특히 ASI 24001균주는 모든 측정방법에서 고르게 낮은 값을 보여 항산화능이 낮은 대표균주로, ASI 24004는 고르게 높은 값을 나타내어 항산화능이 높은 균주로 볼 수 있었다. 따라서 이 두균주를 앞으로의 교배육성의 모본으로 결정하였다. 두 균주간 교배 결과는 앞절에서 설명하였다.

Table 45. Antioxidant activity test on *Pholiota* spp. fruitbody.

(단위 : %)

조사항목 Entry No.	SOD(NBT)	SOD(ESR)	DPPH	TBA	평균억제율
24001	17.0	40.6	5.9	41.7	26.3
24002	26.9	60.1	7.4	68.9	40.8
24003	19.8	45.7	7.7	71.1	36.1
24004	28.7	55.7	4.9	87.8	44.3
24007	23.2	57.5	7.4	9.8	24.5
24008	24.4	53.3	3.9	20.9	25.6
24010	25.8	59.3	8.7	32.2	31.5
24012	22.8	54.4	4.7	39.4	30.3
24013	21.9	52.0	8.8	73.3	39.0
24015	20.3	48.4	5.0	96.6	42.6
24017	26.2	54.2	4.3	92.2	44.2
24018	29.4	47.9	3.7	69.3	37.6
24022	26.9	56.4	6.4	68.9	39.7
24024	21.0	48.1	5.7	86.5	40.3
24025	25.6	53.9	3.5	36.7	29.9
24027	27.3	46.9	5.8	70.6	37.7

이들 균주에 대하여 자실체 발생단계별로 SOD 활성을 측정된 결과 균주간에 다소의 차이는 있었으나 발이 초기에 가장 높은 값을 보였으며 자실체가 성숙할 때까지 계속 낮아지다가 노화되면서 다시 약간 높아지는 것을 볼 수 있었다. 이와 같은 결과는 SOD가 환경 스트레스에 반응한다는 기존 보고와 비교해 볼 때 버섯의 발이 초기가 가장 환경에 민감한 시기라는 것을 추정해 볼 수 있었다.

Table 46. SOD activity according to the developmental stages on fruitbody (단위 : %)

생육단계 Entry No.	발이 초기	어린 자실체	성숙 자실체	노화 자실체	평균
24001	37.5	35.5	34.9	38.8	36.7
24002	41.1	40.2	34.7	35.4	37.8
24003	44.6	37.8	34.1	39.3	38.8
24004	44.1	33.7	27.2	34.7	34.9
24007	38.1	25.6	26.3	34.0	31.0
24008	31.2	27.3	21.9	27.0	26.8
24010	43.0	29.9	23.0	27.2	30.8
24012	39.7	33.1	26.6	31.6	32.8
24013	40.6	34.8	30.5	31.2	34.3
24015	37.4	33.2	30.3	36.5	34.4
24017	34.0	29.0	25.9	27.1	29.0
24018	29.1	27.6	20.9	21.8	24.9
24022	41.0	41.0	25.6	33.9	35.4
24024	45.6	40.9	36.9	36.6	40.0
24025	41.3	35.3	34.5	38.0	37.3
24027	34.2	30.9	25.7	29.8	30.2
평균	38.8	33.4	28.6	32.6	

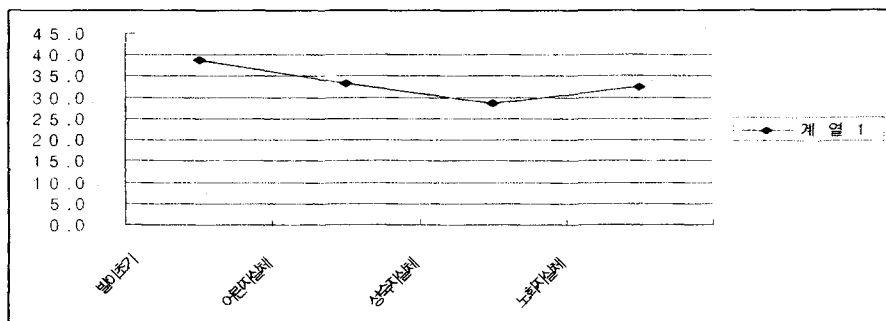


Fig. 44. SOD activity according to the developmental stages

나. 비늘버섯 속내의 SOD 분리와 유전자 cloning

1) Mn SOD 분리 및 확인

비늘버섯에 주로 존재하는 SOD의 종류를 파악하기 위하여 SOD의 활성을 Beauchamp와 Fridovich에 의해 제안된 방법에 의해 Non-denaturing polyacrylamide 위에서 검정을 하였다. SOD 효소 중 CuZn-SOD 활성은 H_2O_2 와 cyanide 모두에 반응하고 반대로 Mn-SOD는 둘 모두에 민감하지 않다. 따라서 Cu-Zn SOD와 Mn-SOD를 각각 5mM KCN과 3mM H_2O_2 를 이용하여 각각을 분리한 결과 KCN의 처리에 의해 marker로 사용한 Cu-Zn SOD band가 사라졌지만 다른 band들은 그대로 남아 있음을 볼 수 있다. 따라서 Cu-Zn SOD band가 아님을 확인하였고, Mn-SOD를 marker로 사용한 경우에는 marker와 시료의 band들이 모두 남아 있음을 확인하였다. H_2O_2 를 처리한 경우(data not shown)에서도 같은 결과를 보이고 있다. 따라서, 여기에 나타난 band들은 Mn-SOD밴드임을 확인하였다.

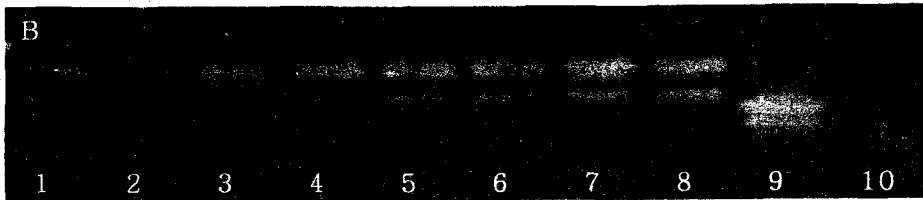


Fig. 45. Native PAGE of SOD proteins stained for SOD activity. A is KCN-, B is KCN +, The lane order is 24002, 24008, 24009, 24013, 24015, 24017, 24018, 24028, MnSOD, CuZnSOD from 1 to 10, respectively.

2) Sequencing and sequencing analysis

육성 균주의 기능성을 선별하기 위한 표지형질로 항산화효소인 SOD를 선택하여 MnSOD임을 확인하였으므로 SOD 유전자에 대한 연구가 필수적이다. 기존의 알려진 SOD 유전자(Rice, Potato, Cassva 등)의 sequences 중에서 conserved region을 확인하고 primer를 제작하였다. 제작된 primer를 이용하여 RNA로부터 PCR로 증폭하여 band를 확인하였고 (data 생략) 이를 sequencing 하였다. Sequencing 결과는 DNA star Seqman II를 이용하여 분석하였다. 이 정보를 바탕으로 새로운 primer를 설계한 후, genomic DNA에서 제작한 primer를 이용하여 증폭한 유전자 단편을 다시 sequencing한 결과 약 530bp의 염기서열을 가진 Mn-SOD gene을 cloning 하였다. 그리고 RT-PCR을 실시한 결과에서는 507bp의 염기서열을 가진 Fe-SOD gene도 cloning되었다.

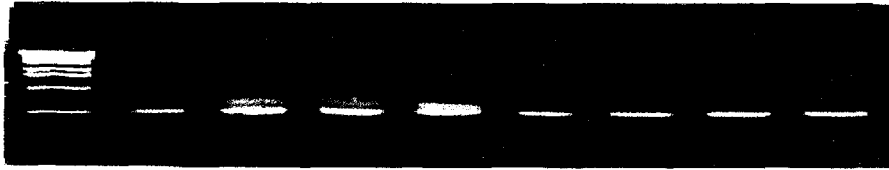


Fig. 46. PCR product resulting from SOD PCR using several primer pairs



Fig. 47. PCR product resulting from RT-PCR using several primer pairs

```
GATCTCAACAGCCAGCCAAAATGTCCAACACTCTTCCTCCCCTCCCCTACGCTTAT
GATGCCCTTGTGCCTTATATCTCTGAGGAGATCATGACTCTCCATCATAACCAAGC
ACCATCAGACATATGTCAACGCCTTGAATGCGGCTGAGGCTTCGTACGCGAAGGC
TTCCACCCCAAGGAGCGCATTGCTCTCCAGGCTGCTCTCAAGTTTAACGGAGGA
GGGCACATCAACCATTCTCTTTTTTGGAAAGAAgCCTCGCTCCCCTCCGCTGCTGTCA
ACAAGGGTACTGGTGGTGTCTCAAGGACGGTCTCTCAAGTCCGCTATCGAAAA
GTACTTCGGAACTCTCGAAAATCTGCAGAAGCAATTCAACGCCACCACCGCTGCT
ATCCAGGGGTCTGGATGGGGATGGCTCGGAGTTAACCCAGCACCAAGGCGCTCG
AAATTACGACCACTGCTAACCAGGATCCCCTCTGTCCCACGCCCCAGTTATTGGC
GTTGATGTCTGGGAGCGCGCCTTCTACCTCCAATACAAGAACGTCAAGGCTGACT
ATCTCACTGCGATTTGGAACGTCATCAACTTCGAGGAAGCGGAGGCGCGCTACCT
TGAGGCTGTTGGCGGCTCTAAGCTCTGAATGTGCTAACCGTGTTGAAAGTAAAT
AACATAAAATGATGTACTTTTTTCAGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
```

Fig. 48. DNA sequence of Mn SOD gene derived from cDNA of *P. adiposa* fruitbody

이상의 sequence 정보는 영지버섯의 Mn-SOD의 아미노산 서열과는 homology를 보였으나, nucleotide 서열상으로는 homology를 보이지 않았다. 이는 유전자의 기능은 같으나 염기 서열이 다름을 나타내는 것으로, 이것은 비늘버섯은 기존에 밝혀진 Mn-SOD와는 다른 염기 서열을 가진 Mn-SOD를 가진다는 것을 나타내는 것이라 할 수 있다. 이상의 결과는 다소 보완하여 GenBank에 등록할 예정이며 이 정보를 이용하여 Northern 분석이나 Western 분석에 의하여 유용한 발현 정보를 얻을 수 있을 것으로 사료된다.

제 5 절 References

- Bannister, J. V., W. Bannister, and H. G. Rotilio. 1987. Aspects of the structure, function and applications of superoxide dismutase. *CRC Crit. Rev. Biochem.* 161:559-566.
- Belinky, P. A. *et al.* 2002. Manganese-containing superoxide dismutase from the white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*: its function, expression and gene structure. *Enzyme and microbial technology.* 31:754-764.
- Beyer, W.F. Jr. and I. Fridovich. 1987. Assaying for superoxide dismutase activity: some large consequences of minor changes in conditions. *Anal. Biochem.* 161:559-566
- Cho, N. S. *et al.* 2002. Changes in phenol oxidases and superoxide dismutase during fruit-body formation of *Pleurotus* on sawdust culture. *Mycoscience.* 43:267-270.
- Chung, I. M., K. H. Kim and J. K. Ahn. 1998. Screening Korean medicinal and food plants with antioxidant activity. *J. Korean Medicinal Crop Sci.* 6:311-322
- Chung, I. M., K. H. Kim and J. K. Ahn, H. Y. Chi and J. O. Lee. 2000. Screening for antioxidative activity in soybean local cultivars in Korea. *Korean J. Crop Science.* 45:328-334
- Chung, K. S. 1982. Studies on constituents and culture of the higher fungi of Korea(II). *Kor. J. Mycol.* 10(1):33-39.
- Cutler, R. G. 1984. Antioxidants, aging, and longevity. 6:371-423. In W. A. Pryor (ed.) *Free radicals in biology.* Academic press, Orlando, FL.
- Finkelstein, E., Rosen, G. M and Rauckman, E. J. 1980. Spin trapping. Kinetics of the reaction of superoxide and hydroxyl radicals with nitrones. *J. am. chem. soc.* 102:4994-4999.
- Graham, G. C. 1994. A simplified method for the preparation of fungal genomic DNA for PCR and RAPD analysis. *Biotech.* 16(1):49-50.
- Jacobsson, S. 1989. Studies on *Pholiota* in culture. *Mycotaxon.* 36:95-145.
- Jeong, J. H., Kwon, E. S. and Roe, J. H. 2001. Isolation and Characterization of the *sod2* Gene Encoding a Putative Mitochondrial Manganese Superoxide Dismutase in *Schizosaccharomyces pombe*. *The Journal of Microbiology.* 39:37-41.
- Koide, T. *et al.* 2000. Determination of superoxide scavenging activity of a sample containing xanthine oxidase inhibitor by ESR spin trapping. *The Japna society for analytical chemistry.* 16:1029-1032.
- Lee, G. Y. 1988. Colored Korean mushrooms. *Academy publishing co., ltd.* Seoul. Kor.
- Pan, S. M. and Yau, Y. Y. 1991. The isozymes of superoxide dismutase in rice. *Bot. Bull. Academia Sinica.* 32:253-258.
- Park, P. J., Je, J. Y. and Kim, S. K. 2003. Free radical scavenging activity of chitoooligosaccharides by electron spin resonance spectrometry. 51:4624-4627
- Yang, J. H., Lin, H. C. and Mau, J. L. 2002. Antioxidant properties of several commercial mushrooms. *Food Chemistry.* 77:229-235.
- Yun, J. H., Koh, Y. S. and Kim, S. J. 2002. Molecular Cloning of the Superoxide Dismutase Gene from *Orientia tsutsugamushi*, the Causative Agent of Scrub Typhus. *The Journal of Microbiology.* 40:151-155.

세부2 : 유효성분의 기능성 연구를 통한 생물 소재화 - 버섯으로부터 혈전증 치료 물질의 개발 및 기능성 제품 생산 연구 -

1. 버섯류로부터 혈소판 응집억제 물질과 혈전 용해물질의 탐색

1) 용매별 추출 수율

시료버섯 55종에 대하여 물과 70%의 에탄올 및 메탄올을 용매로 사용하여 추출 수율을 조사한 결과(Table 1) 대체로 물 추출물이 다른 두 유기용매 추출보다 수율이 높았다. 물 추출 시 추출수율은 비늘버섯 중 ASI 24027균주의 자실체가 68%로 가장 높았고 그 다음은 차가버섯(ASI 74012)의 자실체에서 57%, 잎새버섯(ASI 9006과 9012)의 자실체에서 각각 45%이었다, 그리고 메탄올 추출 시는 장수버섯중 ASI 17001균주의 자실체가 41%의 최고 수율을 보였다(Table 1).

추출수율을 70%이상 높이기 위하여 앞으로 추가 연구가 필요할 것으로 생각되며 또한 일반적으로 식용에는 물 추출물이 유리하고 가공 제품 개발 시는 유효성분의 추출과 농축이 유리한 에탄올 추출물이 더 적합할 것으로 판단되었다.

2) 혈소판 응집억제 활성

농업과학기술원에서 분양 받은 52종의 버섯 중 비늘버섯(*Pholiota* spp.) 18균주, 차가버섯(*Inonotus obliquus*) 2균주, 망태버섯(*Dictyophora indusiata*) 2균주, 장수버섯(*Fomitella fraxinea*) 9균주, 잎새버섯(*Grifola frondosa*) 9균주 등 40주의 자실체와 꽃송이버섯(*Sparassis crispa*) 4균주, 차가버섯 ASI 74006부터 74013까지 7균주, 신령버섯(*Agaricus blazei*) 1균주 등의 균사체에 대한 물 추출물과 에탄올 추출물들에 대하여 human platelets rich plasma를 이용한 ADP 유도 혈소판 응집의 억제 활성을 조사하였다. (Table 2)

그 결과 에탄올 추출물에서 차가버섯 (ASI 74006) 균사체가 81.2%로 가장 높은 억제활성을 보였으며 그 다음은 장수버섯에서는 ASI 17006과 ASI 17010 균주가 각각 55.1%와 54.0%로 비교적 높은 억제활성을 보였다. 물 추출 시에는 비늘버섯류 중 ASI 24004균주의 자실체에서 51.5%로, 잎새버섯에서는 ASI 9014 자실체의 물 추출물이 37.2%이었다.

이 상의 결과를 종합하여 볼 때 혈전증 예방을 위한 제품 개발에 에탄올에서 제일 높은 활성을 보인 차가버섯 ASI 74006를 최종 선정하였고 추출최적조건을 조사한 결과 추출온도 80℃, 추출시간 12시간 이었다.

Table 1. Yield of various extract from mushrooms

(%)

Mushrooms ^{a)}	ASI No	Water extract	Ethanol extract	Methanol extract
<i>Pholiota adiposa</i> ^{b)}	24001	54	30	30
	24002	52	24	26
	24004	66	36	42
	24005	52	28	28
	24007	50	26	28
	24008	56	32	32
	24010	54	30	32
	24012	64	32	30
	24017	64	32	42
	24018	64	30	36
	24022	58	26	38
	24024	60	32	36
	24027	6 ^{c)}	34	32
	5019	54	28	36
	500110	62	30	31
	500457	60	32	31
	500461	63	28	29
500462	59	32	30	
<i>Inonotus obliquus</i>	74006	50	20	21
	74007	42	24	24
	74008	34	18	17
	74009	49	22	16
	74011	48	21	20
	74012	57	9	20
	74013	51	38	34
	Ru	55	30	42
Ca	52	25	28	
<i>Sparassis crispa</i>	15006	36	17	20
	150010	28	19	21
	150011	28	11	11
	150016	26	12	8
<i>Dictyophora echinovolvata</i>	DE-E ^{c)}	35	13	16
	DE-F	36	29	31
<i>Agaricus blazei</i>	1174	13	8	9
<i>Grifola frondosa</i>	9006	45	20	7
	9009	34	24	16
	9010	44	40	41
	9011	34	40	18
	9012	45	43	29
	9014	43	35	37
	9017	43	37	40
	9021	44	41	39
	9025	37	40	38
<i>Fomitella fraxinea</i>	17001	27	39	41
	17003	31	35	30
	17004	16	22	31
	17005	35	26	35
	17006	20	17	28
	17009	29	30	36
	17010	32	38	25
	17012	26	31	26
	17017	24	25	27

^{a)}Mushrooms collected from National Institute of Agricultural Science and Technology in Korea.

^{b)}Most of mushrooms was experimented using fruit bodies, except *S. crispa* ASI M-1, M-2, M-9, M-10, *I. obliquus* ASI 74006 ~ 74013 and *A. blazei* ASI 1174 using the mycelia.

^{c)}E : egg, F: fruiting body

Table 2. Platelet aggregation inhibitory of the extracts from mushrooms (%)

Mushrooms ^a	ASI ^b No.	Water ^c extract	Ethanol extract
<i>Pholiota adiposa</i>	24001	24.3	nd
	24002	4.2	nd
	24004	51.1	nd
	24005	nd	31.3
	24007	43.3	17.7
	24008	nd	nd
	24010	9.1	nd
	24012	nd	9.1
	24017	20.2	nd
	24018	31.9	19.2
	24022	nd	nd
	24024	nd	7.7
	24027	12.0	nd
	5019	nd	21.3
	500110	nd	nd
	500457	nd	nd
500461	nd	nd	
500462	nd	nd	
<i>Grifola frondosa</i>	9006	20.1	nd
	9009	31.5	nd
	9010	2.0	nd
	9011	19.9	47.9
	9012	25.9	nd
	9014	37.2	nd
	9017	25.9	nd
	9021	19.9	35.6
	9025	25.7	nd
<i>Agaricus blazei</i>	1174	14.7	nd
<i>Inonotus obliquus</i>	Ru	nd	nd
	Ca	20.5	nd
	74006	26.2	81.2
	74007	nd	8.0
	74008	nd	nd
	74009	nd	nd
	74011	nd	nd
	74012	37.2	nd
74013	42.2	nd	
<i>Fomitella fraxinea</i>	17001	nd	nd
	17003	nd	72.0
	17004	8.3	nd
	17005	6.7	49.9
	17006	nd	55.1
	17009	nd	40.0
	17010	nd	54.0
	17012	6.7	5.1
17017	nd	51.8	
<i>Sparassis crispa</i>	150006	nd	nd
	150010	10.5	52.8
	150010	26.1	nd
	150016	nd	nd
<i>Dictyophora iOusiata^e</i>	DE-E	nd	nd
	DE-F	nd	nd

^a Mushrooms collected from National Institute of Agricultural Science and Technology in Korea. Its fruiting bodies were used in this study, except *S. crispa* ASI 15006, 150010, 150011, 150016, *I. obliquus* ASI 74006~74013 and *A. blazei* ASI 1174 which were used as mycelia.

^b ASI ; Agricultural Science Institute

^c Extraction conditions : 40 time water, ethanol, 30°C. 12 hr

^d nd ; not determined

^e E ; egg, F ; fruiting body

3) 혈전 용해활성

Fayek 등 (1980)의 fibrin을 이용한 분광분석법으로 시료버섯 추출물들의 혈전용해활성을 조사한 결과 (Table 3), 신령버섯 ASI 1174균주의 균사체가 에탄올 추출물에서 9.6 unit로 가장 활성이 높았다. 그리고 비늘버섯과 차가버섯은 물 추출물에서만 2 unit 내외의 매우 낮은 활성을 보였을 뿐 그 밖의 다른 시료버섯 추출물에서는 혈전용해활성이 없었다.

비록 대부분의 버섯추출물에서 혈전용해활성을 보이지 않았지만 신령버섯 ASI 1174 균사체는 혈전용해물질을 갖고 있으므로 혈전증 예방을 위한 제품 제조 시 부원료로는 충분한 산업적 가치가 있을 것으로 생각된다.

2. *Inonotus obliquus* ASI 74006이 생성하는 혈소판 응집 억제 물질의 정제 및 특성

1) 혈소판 응집억제물질의 정제

차가버섯(ASI 74006)이 생성하는 혈소판응집 저해물질은 유기 용매 분획 (Table 4), 한외여과(5000M.W cut-off), SephadexG-10 컬럼크로마토그래피, prep용과 분석용 역상 HPLC 등으로 정제하여 혈소판 응집 저해활성이 91.6%인 고순도의 혈소판 응집 저해물질을 얻었다. (그림 1, 2, 3)

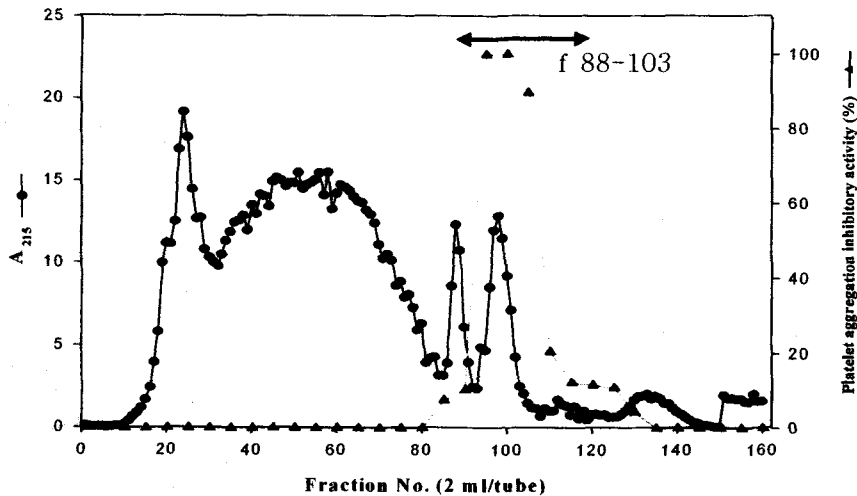


Figure 1. Chromatography on Sephadex G-10 of active fraction from 5KD-cut off filtrates

Table 3. Fibrinolytic activities of the extracts from mushrooms (unit)

Mushrooms ^a	ASI ^b No.	Water extract	Ethanol extract
<i>Pholiota adiposa</i>	24001	0.6	nd ^d
	24002	1.3	nd
	24004	1.3	nd
	24005	1.3	nd
	24007	1.2	nd
	24008	1.6	nd
	24010	1.8	nd
	24012	1.1	nd
	24017	0.8	nd
	24018	1.2	nd
	24022	1.0	nd
	24024	0.9	nd
	24027	0.8	nd
	5019	0.9	nd
	500110	nd	nd
	500457	nd	nd
500461	nd	nd	
500462	nd	nd	
<i>Grifola frondosa</i>	9006	nd	3.6
	9009	nd	nd
	9010	nd	nd
	9011	nd	1.2
	9012	nd	nd
	9014	nd	2.7
	9017	nd	nd
	9021	nd	1.9
9025	nd	0.4	
<i>Agaricus blazei</i>	1174	2.0	9.6
<i>Inonotus obliquus</i>	Ru	0.9	nd
	Ca	nd	nd
	74006	0.9	nd
	74007	0.6	0.2
	74008	0.9	nd
	74009	1.8	nd
	74011	0.6	nd
	74012	0.6	nd
74013	0.5	0.4	
<i>Fomitella fraxinea</i>	17001	nd	nd
	17003	nd	nd
	17004	nd	1.8
	17005	nd	1.0
	17006	nd	1.4
	17009	nd	nd
	17010	nd	0.3
	17012	nd	nd
17017	nd	0.8	
<i>Sparassis crispa</i>	150006	1.0	nd
	150010	0.9	0.4
	150010	0.7	0.3
	150016	0.4	nd
<i>Dictyophora iOusiata</i> ^e	DE-E	1.7	nd
	DE-F	nd	nd

^a Mushrooms collected from National Institute of Agricultural Science and Technology in Korea. Its fruiting bodies were used in this study, except *S. crispa* ASI 15006, 150010, 150011, 150016, *I. obliquus* ASI 74006~74013 and *A. blazei* ASI 1174 which were used as mycelia.

^b ASI ; Agricultural Science Institute

^c Extraction conditions ; 40 time water, ethanol, 30°C. 12 hr

^d nd ; not determined

^e E ; egg, F ; fruiting body

Table 4. Platelet aggregation inhibitory activity of each solvent fraction from mycelium extracts of *Inonotus obliquus* (ASI 74006)

Fraction	Hexane	Chloroform	Ethyl acetate	Buthanol	Water
Platelet aggregation inhibitory activity (%)	N.D*	N.D	13	93	N.D

N.D* not determined

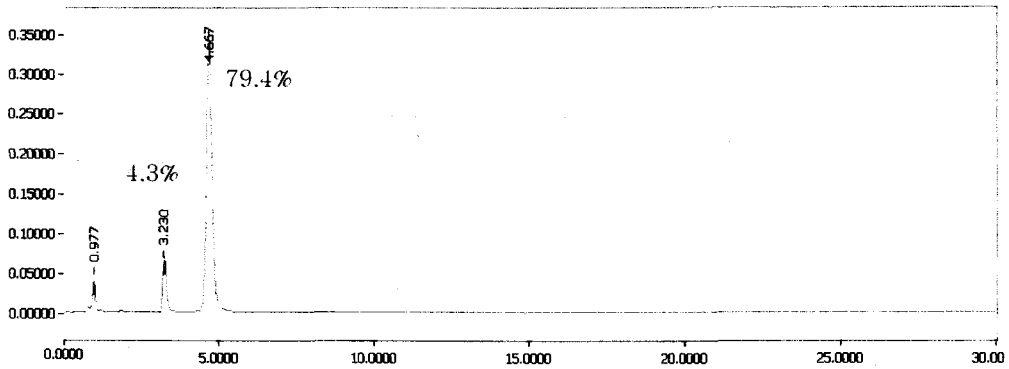


Figure 2. HPLC chromatogram of fraction from Sephadex G-10 column chromatography

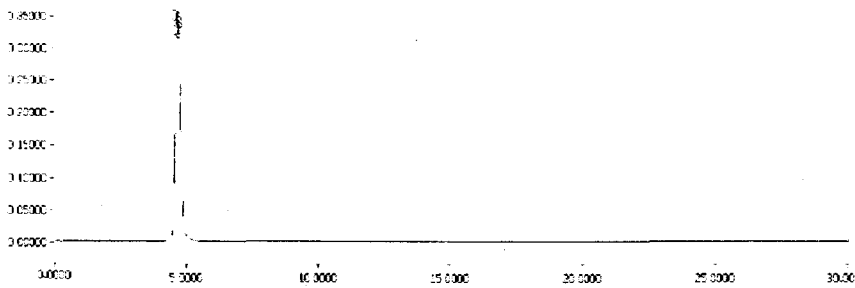


Figure3.RP-HPLC of the purified platelet aggregation inhibitor

2) 혈소판 응집 저해물질의 특성

Inonotus obliquus ASI 74006이 생성하는 정제된 혈소판 응집 저해물질의 분자량을 MALDI-MS 분석법 등으로 측정한 결과 314 Da 분자량을 가진 Trp-Gly-Cys 서열의 tripeptide 물질이었다. (그림 4)

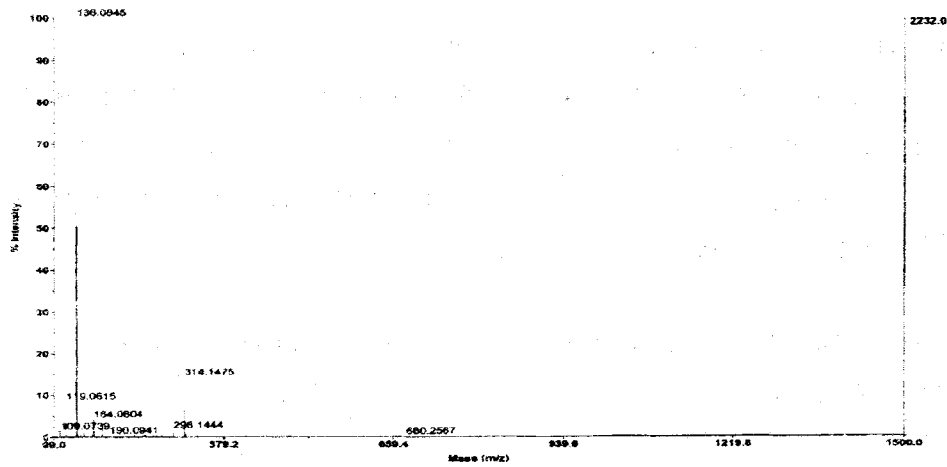


Figure 4. LC-Mass spectrometer of the purified platelet aggregation inhibitor

3. 정제된 혈소판 응집저해 물질의 항혈전 작용

Dimino등의 Mouse antithrombotic assay을 이용하여 차가버섯(ASI 74006)이 생산하는 혈소판 응집 저해물질의 항혈전 효과를 조사한 결과 표5와 같이 20 mg/kg의 투여시 약 83%의 혈소판 응집 저해 효과를 보여 본 실험의 차가버섯 ASI 74006이 생성 하는 혈소판 응집 저해물질은 In vivo에서 항혈전 효과가 우수함을 확인 할 수 있었다.

Table 5 . Inhibitory effect of purified platelet aggregation inhibitor on collagen/epinephrine-induced thrombotic death^a

Sample	Dosage(mg/kg)	Treated group died/total	% inhibition
Control (saline)	0	8/8	-
WGC	20	1/6	83.3

^aSample was administered orally one hour prior to the thrombotic challenge.
Die: the number of animals that died during the study. Total: the number of animals that were used in the study.

4. 혈전증 예방용 차가버섯 음료의 제조 및 특성

1, 2차에 걸쳐 50ml 용량의 파우치 형태의 차가버섯 음료를 제조하여 기호도와 혈소판 응집저해 활성을 조사한 후 문제점을 보완하여 표 6와 같은 조성을 가진 항혈전성 차가버섯 음료를 제조하였다.

이들의 물리화학적 특성을 조사한 결과 표 7와 같이 pH는 4.10, 잔당을 16.5 brix이었고 미황색의 음료 이었다. 또한 기호도는 차가버섯향이 나고 단맛이 적으며 20대부터 50대까지의 패널 모두가 대체적으로 우수하다고 판정하였으며(그림 5), 혈소판 응집저해 활성은 제품 고형분 mg 당 25% 이었다. 또한 제품에 대하여 돌연변이 유발성과 기타 세포독성 등을 상법에 따라 조사한 결과 제조 40일 현재까지 이들 활성이 없고 침전물도 생성되지 않았으며 맛과 향에도 변화가 없었다.(data not shown)

Table 6. Formula of antihypertensive drink made by extracts of *Inonotus obliquus* (Unit : mg)

Composition	Contents	Composition	Contents
<i>Inonotus obliquus</i> Ext. (Moisture : 70.8%)	300	Taulin	100
<i>Schisandra chinensis</i> Ext. (Moisture : 70.9%)	500	GMT-SOD	100
Vitamin B2	1.2	Fructose	4000
Vitamin B6	2.0	Sucrose	7000
Nicotinamide	6.6	Na-alginate	20
Folic acid	0.4	β -CD	150
Citric acid	70	Volume	50ml
Na-citrate	0.7		

Table 7. Physiochemical properties of *Inonotus obliquus* drink

pH	Bx(°)	Turbidity (A ₆₆₀)	colorness (A ₄₃₀)	Hunter's color value		
				L(lightness)	a(redness)	b(yellowness)
4.10	16.5	81.3	1.17	+ 1.28	-2.10	+ 32.40

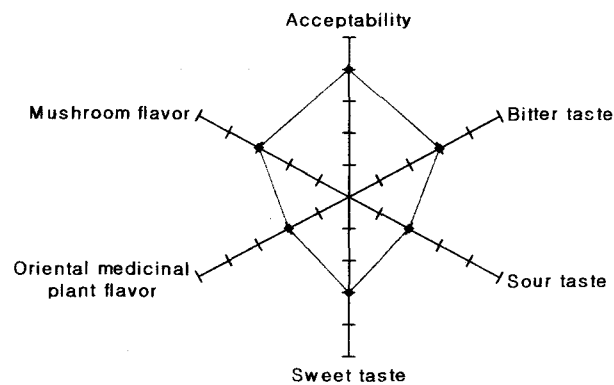


Figure5. Sensory evaluation of antithrombotic drink made by *Inonotus obliquus*

참고문헌

1. 이대형, 김재호, 공원식, 유영복, 박정식, 유창현, 이종수. 2003. 버섯으로부터 항고혈압성 안지오텐신 전환효소 저해제의 탐색, 한국 균학회지. 31: 148-154.
2. Bron, G. V. R. 1962. Aggregation of blood platelets by adenosine diphosphate and its reversal. *Nature(Lond.)*. 194: 927-929
3. Choi, N. S., Seo, S. Y. and Kim, S. H. 1999. Screening of mushrooms having fibrinolytic activity. *Kor. J. Food Sci. Technol.*, 31: 553-557.
4. Choi, S. H. Y. J. Lee, and K. H. Shin, 1995. Inhibition effects of amitriptyline, sertraline and chlorpromazine on the thrombin-induced aggregation of platelets. *Kor. J. of Pharma*. 31: 299-311
5. Chiang, T. M. A. Rinaldy, and A. H. Kang, 1997. Cloning, Characterization, and Functional Studies of a Nonintegrin Platelet Receptor for Type I Collagen *J. Clin. Invest.* 100: 514-521
6. Derksen, A. and P. Cohen, 1975. Patterns of fatty acid release from endogenous substrates by human platelet homogenates and membranes. *J. Bio. Chem.* 250: 9342-9347
7. Erkel, G. and Anke, T. 1992. Antibiotics from Basidiomycetes XLI, clavicornic acid, A novel inhibitor of reverse transcriptase from *Clavicornia pyxidate*. *J. Antibiotics* 45: 29-37.
8. Fayek, K. I. and El-Sayed, S. T. 1980. Purification and properties of fibrinolytic enzyme from *B. subtilis*. *Zeit. Fun. Allgem. Mikrobiol.* 20: 357-382.
9. Hawiger, J., L. F. Brass, and E. Salzman, 1994. in *Hemostasis and Thrombosis : Base Principles and Clinical Practice* (Colman, R. W. and J. Hirsh, V. J. Marder, and E. Salzman, eds. 3rd Ed., (J. Blippincott, Philadelphia) pp. 603-627 .
10. Hwang, Y. J. G. W. Noh, and S. H. Kim, 2003. Effect of *Inonotus Obliquosextracts* on proliferation and caspase-3 activity in human gastro-intestinal cancer cell lines. *Kor. Nutr. Soci.* 36: 18-23
11. Ichinohe, T. H. Takayama, Y. Ezumi, S. Yanagi, H. Yamamura, and M. Okuma, 1995. Cyclic AMP-insensitive Activation of *c-Src* and *Syk* Protein-tyrosine Kinases through Platelet Membrane Glycoprotein VI *J. Biol. Chem.* 270: 28029-28036.
12. Kabir, Y., Kimura, S. and Tamura, T. 1998. Dietary effect of *Ganoderma lucidum*: Mushroom on blood pressure and lipid levels in spontaneously hypertensive rats(SHR). *J. Nutr. Sci. Vitaminol* 34: 433-438.
13. Kiho, T., Hui, J. Yamane, A. and Ukai. S. 1993. Polysaccharides in fungi. XXXII. Hypoglycemic activity and chemical properties of a polysaccharide from the cultural mycelium of *Cordyceps sinensis*. *Biol. Pharm. Bull.* 16: 1291-1293.
14. Kroll, M. H. and R. Sullivan, 1998. in *Thrombosis and Hemorrhage*, Localzo, J., and Schafer, A. I., eds. 2ndEd. (Williams & Wilkins, Baltimore) pp. 261-291.

15. Kahn, M. L. Y. Zheng, W. Huang, V. Bigornia, D. Zeng, S. Moff, R. V. Farese, C. Tam, and S. R. Coghlin, 1998. A dual thrombin receptor system for platelet activation. *Nature* 394: 690-694
16. Kumari, R. M. P. Singh, P. Seth, and M. Dikshit, 1998. Inhibition of platelet aggregation by a protein factor present in rat peripheral polymorphonuclear leukocyte supernatant. *Thromosis Research* 91: 75-82
17. Lee, S. R. J. H. Park, K. J. Choi, and N. D. Kim, 1997. Inhibition effects of ginsenoside Rg3 on platelet aggregation and its mechanism of action. *Kor. J. Ginseng Sci.* 21: 132-1
18. Liu, J. J. J. R. Chen, C. J. Bradley, B. Xie, C. I. Johnston, and B. F. Buxton, 1994. Autologous neutrophil derived supernatant inhibit endothelium dependent relaxation in human coronary bypass graft. *Cardiovasc Res.* 28: 1353-1359
19. Marks D, Marks A. and Smith C. 1996. Basic medical biochemistry. Williams and Wikins. Baltimore. Pp 157.
20. Mizuno, T., Kinoshit, T. Zhung C., Ito, H., and Mayuzumi, Y. 1995. Antitumor-activity heteroglycans from niohshimeji, *Tricholoma giganteum*. *Food Reviews International* 59: 563-567.
21. Muller, W. E. G., Weiler, B. E., Charubala, R., W. and Schroder, H. c. 1990. Cordycepin analogues of 2'5'-oligoadenylate inhibitor human immunodeficiency virus infection via inhibition of reverse transcriptase *Biochem.* 30: 2027-2033.
22. Mustard, J. F. and M. A. Packham, 1970. Factors influencing platelet function : adhesion, release, and aggregation. *Pharmacol. Rev.* 22: 97-187
23. Qian, Z. Y. P. Jolles, D. Migiliore-Samour, A. M. Fiat, 1995. Isolation and characterization of sheeplactoferrin, an inhibitor of platelet aggregation and comparison with human lactoferrin. *Biochim. Biophys. Acta.* 1243: 25-32
24. Santoro, S. A. and M. M. Zutter, 1995. *Thromb. Haemostasis* 74: 813-821.
25. Tandon, N. N. U. Kralisz, and G. A. Jamieson, 1989. Identification of glycoprotein IV (CD36) as a primary receptor for platelet-collagen adhesion *J. Biol. Chem.* 264: 7576-7583
26. Yang, H. C., Song, C. H. and Kweon, M. H. 1996. Mycelial new material. In *Food Functional Technology*. Pp 187- 189, Hanlim, Seoul.
27. Diminno, G, Silver, M. 1983. Mouse antithrombotic assay: a simple method for the evaluation of antithrombotic agents in vivo. Potentiation of antithrombotic activity by ethyl alcohol. *J of Pharmacology & Experimental therapeutics*, 255: 57-60

위탁1 : 버섯으로부터 고혈압예방을 위한 안지오텐신 전환효소(ACE) 저해물질의 개발 및 기능성 제품 생산 연구

1. 항고혈압활성을 가진 버섯의 선별 및 ACE 저해물질의 추출최적조건

1) 시료 버섯의 일반성분

시료버섯에 대한 일반성분 중 생리기능성에 관련된 조단백질, 탄수화물 및 조지방 함량을 측정된 결과는 Table 1과 같다. 조단백질 함량은 0.6%~56.5%로 버섯마다 다양하였으며 특히 잎새버섯 중 ASI 9006 균주의 자실체는 단백질 함량이 56.5%로 가장 높았다. 조지방 함량은 모든 시료 버섯에서 0.2%~2.4%로 비교적 적게 함유되어 있었다. 그리고 탄수화물 함량은 22.5%~86.6%로 일반 성분의 대부분을 차지하였으며 특히 비늘 버섯 ASI 24002 자실체가 86.6%로 가장 많이 함유하고 있었다.

2) 용매별 추출 수율

시료버섯 55종에 대하여 물과 70%의 에탄올 및 메탄올을 용매로 사용하여 추출 수율을 조사한 결과(Table 2) 대체로 물 추출물이 다른 두 유기용매 추출보다 수율이 높았다. 물 추출시 추출수율은 비늘 버섯 중 ASI 24027균주의 자실체가 68%로 가장 높았고 그 다음은 차가버섯(ASI 74012)의 자실체에서 57%, 잎새버섯(ASI 9006과 9012)의 자실체에서 각각 45%이었다, 그리고 메탄올 추출 시는 장수버섯중 ASI 17001균주의 자실체가 41%의 최고 수율을 보였다.

추출수율을 70%이상 높이기 위하여 앞으로 추가 연구가 필요할 것으로 생각되며 또한 일반적으로 식용에는 물 추출물이 유리하고 가공 제품 개발 시는 유효성분의 추출과 농축이 유리한 에탄올 추출물이 더 적합할 것으로 판단되었다.

Table 1. Chemical composition of various mushrooms

Mushrooms ^{a)}	ASI No	Crude protein (%)	Crude lipids (%)	Carbo- hydrate ^{b)} (%)
<i>Pholiota adiposa</i> ^{c)}	24001	9.4	1.8	83.2
	24002	7.1	1.3	86.6
	24004	13.9	1.4	83.4
	24005	10.2	1.9	83.4
	24007	7.6	1.9	83.2
	24008	9.8	1.5	83.4
	24010	8.0	1.5	84.4
	24012	15.9	1.0	78.3
	24017	13.6	1.2	79.3
	24018	13.3	1.2	79.0
	24022	14.6	1.3	77.5
	24024	8.4	1.5	82.7
	24027	12.0	1.3	79.2
	5019	10.4	0.7	83.8
	500110	16.6	2.2	69.5
	500457	17.3	2.5	70.2
	500461	25.7	2.3	60.3
500462	22.9	2.4	67.1	
<i>Inonotus obliquus</i>	74006	35.5	0.9	39.3
	74007	27.7	0.4	50.6
	74008	26.0	0.6	79.8
	74009	44.3	0.51	41.7
	74011	39.0	0.3	42.6
	74012	38.0	0.45	48.0
	74013	28.0	2.2	41.4
	Ru	40.1	2.8	45.1
	Ca	41.9	0.2	42.1
<i>Sparassis crispa</i>	15006	28.8	0.7	56.1
	150010	34.7	0.6	44.5
	150011	35.2	4.0	47.9
	150016	28.0	0.5	49.2
<i>Dictyophora echinovolvata</i>	DE-E ^{d)}	37.6	3.1	46.5
	DE-F	29.2	2.9	55.2
<i>Agaricus bazei</i>	1174	31.7	3.1	54.5
<i>Grifola frondosa</i>	9006	56.5	2.1	35.6
	9009	55.0	4.4	30.3
	9010	32.9	1.1	60.8
	9011	42.1	1.3	51.2
	9012	44.0	1.0	47.4
	9014	34.6	1.8	59.6
	9017	20.3	0.9	68.3
	9021	19.0	1.2	67.8
	9025	35.7	3.1	46.8
<i>Fomitella fraxinea</i>	17001	23.3	0.9	56.9
	17003	31.1	0.7	49.8
	17004	26.7	0.7	58.0
	17005	28.2	1.0	54.0
	17006	29.8	0.9	52.9
	17009	43.0	0.6	33.6
	17010	31.5	0.5	53.4
	17012	26.9	0.3	58.8
	17017	27.9	0.9	55.3

Mushrooms collected from National Institute of Agricultural Science and Technology in Korea.

Carbohydrate contents described as [(Total dried solid content) - (Crude protein content + Crude ash content + Crude lipids content)]

Most of mushrooms was experimented using fruit bodies, except *S. crispa* ASI M-1, M-2, M-9, M-10, *I. obliquus* ASI 74006 ~ 74013 and *A. blazei* ASI 1174 using the mycelia.

E : egg, F: fruiting body

Table 2. Yield of various extract from mushrooms

		(%)		
Mushrooms ^{a)}	ASI No	Water extract	Ethanol extract	Methanol extract
<i>Pholiota adiposa</i> . ^{b)}	24001	54	30	30
	24002	52	24	26
	24004	66	36	42
	24005	52	28	28
	24007	50	26	28
	24008	56	32	32
	24010	54	30	32
	24012	64	32	30
	24017	64	32	42
	24018	64	30	36
	24022	58	26	38
	24024	60	32	36
	24027	68	34	32
	5019	54	28	36
	500110	62	30	31
	500457	60	32	31
	500461	63	28	29
500462	59	32	30	
<i>Inonotus obliquus</i>	74006	50	20	21
	74007	42	24	24
	74008	34	18	17
	74009	49	22	16
	74011	48	21	20
	74012	57	9	20
	74013	51	38	34
	Ru	55	30	42
	Ca	52	25	28
<i>Sparassis crispa</i>	15006	36	17	20
	150010	28	19	21
	150011	28	11	11
	150016	26	12	8
<i>Dictyophora echinovolvata</i>	DE-E ^{c)}	35	13	16
	DE-F	36	29	31
<i>Agaricus blazei</i>	1174	13	8	9
<i>Grifola frondosa</i>	9006	45	20	7
	9009	34	24	16
	9010	44	40	41
	9011	34	40	18
	9012	45	43	29
	9014	43	35	37
	9017	43	37	40
	9021	44	41	39
	9025	37	40	38
<i>Fomitella fraxinea</i>	17001	27	39	41
	17003	31	35	30
	17004	16	22	31
	17005	35	26	35
	17006	20	17	28
	17009	29	30	36
	17010	32	38	25
	17012	26	31	26
	17017	24	25	27

^{a)}Mushrooms collected from National Institute of Agricultural Science and Technology in Korea.

^{b)}Most of mushrooms was experimented using fruit bodies, except *S. crispa* ASI M-1, M-2, M-9, M-10, *I. obliquus* ASI 74006 ~ 74013 and *A. blazei* ASI 1174 using the mycelia.

^{c)}E : egg, F: fruiting body

3) ACE 저해활성

시료버섯에 대한 각각의 추출물들의 ACE 저해활성을 측정 한 결과 Table 3과 같이 물 추출물에서는 비늘버섯 중 ASI 24012 균주의 자실체가 66%(IC₅₀ : 0.25 mg)로 가장 우수하였고 그 다음은 잎새버섯(ASI 9021)의 자실체가 61%(IC₅₀ : 0.28 mg)이었다. 한편 에탄올 및 메탄올 추출물에서는 신령버섯(ASI 1174)의 균사체가 각각 58.0%(IC₅₀ : 0.36 mg)와 59.6%(IC₅₀ : 0.42 mg)의 ACE저해 활성을 나타냈다. 그러나 장수 버섯은 모든 추출물에서 ACE 저해활성이 매우 낮았다. 이와 같은 비늘버섯(ASI 24012)자실체 물 추출물의 ACE 저해활성은 왕송이버섯 자실체의 물 추출물(61.3%)(Lee *et al.*, 2003)과 *G. frondsae*(58.7%), *C. versicolor*(37.7%), *P. coccinea*(37.5%)의 물 추출물들보다 더 높았다(Choi *et al.*, 2001).

한편, 버섯중의 ACE 저해물질의 추출용매로는 대체적으로 물이 적합한 것으로 추정되었으나 신령 버섯 ASI 1174 균주의 균사체 경우 에탄올 추출이 더 좋았다. 이와 같이 물 추출물에서 다른 용매 추출물보다 ACE 저해활성이 높은 것은 지금까지 ACE 저해활성을 나타내는 물질로 알려진 것은 대부분이 peptide나 단백질 가수분해물이고 (Rhyu *et al.* 1996, Choi *et al.* 2001) 따라서 이들이 물로 용출되었기 때문인 것으로 생각되며 이 결과는 Aiko 등(Aiko *et al.*, 1986)의 영지버섯의 실험 결과와 유사하였다.

4) 단백질 분해효소 처리가 ACE 저해 활성에 미치는 영향

지금까지 알려진 ACE 저해 펩타이드들의 일부는 각종 단백질의 가수분해물에 의해 생성되어 보고 되었다(Rhyu *et al.* 1996). 따라서 ACE 저해 활성을 가진 peptide를 대량생산하기 위해 시료 버섯의 물 추출물에 대한 단백질분해효소처리 효과를 조사한 결과(Table 3), 비늘 버섯의 경우 단백질분해효소를 처리한 시료의 ACE 저해활성이 단백질 분해효소를 처리하지 않은 물 추출물보다 오히려 낮았다. 그러나 꽃송이 버섯 ASI M-9, ASI M-10 균사체의 pepsin 가수분해물에서 각각 57%와 61%의 비교적 높은 ACE 저해 활성을 보였고 꽃송이 버섯 ASI M-16 균사체의 경우는 trypsin 가수분해물에서 53%의 ACE 저해활성을 보였다. 잎새버섯은 pepsin을 처리한 모든 시료에서 ACE 저해활성이 무처리에 비하여 약간 높아졌고 trypsin을 처리한 시료에서는 비슷하거나 약간 감소하였다. 그러나 장수 버섯은 단백질분해효소처리 효과가 없었다.

대체적으로 모든 버섯에서 단백질 분해효소를 처리한 가수분해물이 대조구인 단백질분해효소를 처리하지 않은 물 추출물보다 ACE 저해활성이 높았는데, 이는 각종 곡류와 두류의 물 추출물에 pepsin을 처리했을 때 ACE 저해활성이 없던 멥쌀, 현미, 찹쌀, 보리, 수수, 밀, 옥수수 등의 추출물에서 ACE 저해활성을 보였다는 류 등(Rhyu *et al.* 1996)의 보고와 담수어 단백질의 단백질 분해효소 가수분해물에서 ACE 저해 효과가 높게 나타났다는 김 등(김 등, 1996)의 보고와 같이 단백질 분해효소가 물 추출 시 추출된 단백질이나 일부 올리고 펩타이드들을 가수분해시켜서 ACE 저해 활성을 갖는 peptide를 생성하였기 때문인 것으로 생각된다.

Table 3. ACE inhibitory activity of the various extract from mushrooms and effect of protease treatment on water extracts. (%)

Mushrooms	ASI No	Water extract				Ethanol extract	Methanol extract
		Control	Pepsin ^{a)}	Trypsin	Protease N		
<i>Pholiota adiposa</i>	24001	40.3	37.6	24.1	35.7	32.8	10.6
	24002	58.0	44.4	41.8	39.1	18.1	N.D
	24004	56.3	50.3	48.4	36.7	18.6	N.D
	24005	54.4	42.2	43.3	35.8	30.3	11.3
	24007	54.4	46.6	43.0	40.0	20.4	6.5
	24008	61.8	47.2	45.1	39.9	27.4	N.D
	24010	50.9	39.9	40.0	35.3	18.0	13.2
	24012	66.0	57.6	61.0	50.8	24.9	24.1
	24017	63.7	47.9	43.8	40.0	26.5	38.1
	24018	63.0	25.8	52.7	36.3	16.6	8.8
	24022	59.6	61.4	42.4	13.3	12.7	14.2
	24024	61.4	53.7	44.4	19.0	14.0	10.0
	24027	61.0	61.0	51.9	37.1	9.2	9.3
	5019	22.5	37.8	22.3	N.D	N.D ^{b)}	N.D
	500110	16.4	52.6	19.6	15.5	N.D	N.D
	500457	21.0	54.0	26.2	14.4	N.D	N.D
500461	13.7	47.8	30.8	11.3	10.9	N.D	
500462	1.5	49.3	39.0	36.4	N.D	N.D	
<i>Inonotus obliquus</i>	74006	16.4	40.6	36.3	13.5	15.0	14.0
	74007	13.9	24.9	32.9	25.3	17.7	22.1
	74008	1.3	25.3	37.7	2.0	9.5	26.5
	74009	18.5	24.9	44.2	28.4	5.4	33.4
	74011	N.D	5.6	19.4	34.0	19.9	20.8
	74012	40.7	40.2	54.5	38.7	21.5	47.8
	74013	23.0	35.1	24.5	26.5	10.0	15.8
	Ru	14.0	31.9	24.5	30.1	17.0	36.6
	Ca	17.3	23.8	30.7	23.3	10.5	21.8
	<i>Sparassis crispa</i>	15006	19.3	50.9	42.4	37.2	3.6
150010		2.5	57.0	27.2	38.0	10.0	15.8
150011		32.6	60.9	52.6	50.3	23.6	30.1
150016		43.2	48.6	53.2	32.9	9.0	16.0
<i>Dictyophora echinovolvata</i>	DE-E	43.7	50.1	44.8	30.7	23.7	35.3
	DE-F	34.4	20.2	38.3	23.4	1.0	10.0
<i>Agaricus blazei</i>	1174	9.1	48.0	36.4	30.8	58.0	59.6
<i>Grifola frondosa</i>	9006	48.8	57.4	44.2	N.D	13.4	2.5
	9009	44.7	60.0	40.8	22.5	15.7	N.D
	9010	48.2	57.8	49.8	N.D	13.3	8.0
	9011	48.8	58.4	51.3	40.9	6.8	3.2
	9012	58.3	63.4	53.1	37.4	32.0	20.4
	9014	40.1	58.4	49.6	7.5	14.6	4.4
	9017	47.0	56.1	45.1	21.2	5.9	10.0
	9021	61.0	62.9	58.5	37.0	23.1	21.0
	9025	47.6	53.8	45.9	29.9	57.7	25.9
<i>Fomitella fraxinea</i>	17001	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D
	17003	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D
	17004	39.2	26.9	39.6	N.D	N.D	N.D
	17005	24.6	11.2	18.0	N.D	N.D	N.D
	17009	28.7	13.3	26.7	N.D	N.D	N.D
	17010	15.9	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D
	17012	20.4	12.7	14.9	N.D	N.D	N.D
	17017	23.7	11.2	24.5	N.D	N.D	N.D

^aPepsin, trypsin and protease N were treated on water extracts as described in material and methods

^bND ; not determined

5) ACE 저해 물질의 추출 최적조건

가장 ACE 저해 활성이 강하였던 비늘 버섯 ASI 24012 자실체로부터 ACE 저해물질을 대량으로 얻기 위해 추출 최적조건을 검토한 결과 추출온도는 30℃가 제일 좋았고 1시간 추출 시 제일 높은 ACE 저해 활성을 보였으며 추출 시간이 길어짐에 따라 거의 변화가 없었다 (Figure 1.). 따라서 ACE 저해제 추출 최적 조건은 비늘 버섯 자실체의 동결건조 분말을 물에 1:40으로 현탁 시킨 후 30℃에서 1시간 추출하는 것이며 이때 ACE 저해활성이 67.6% (IC₅₀ : 0.20 mg)이었다.

이러한 결과는 이 등(이 등, 2003)이 보고한 왕송이 버섯을 물로 30℃에서 3시간 추출하였을 때 ACE 저해물질의 추출 효율이 높았다는 결과와 일치하는 것으로 이들 ACE 저해물질들이 비교적 분자량이 작은 peptide 물질이므로 3시간 이내의 짧은 시간에 대부분 추출되는 것으로 추정된다.

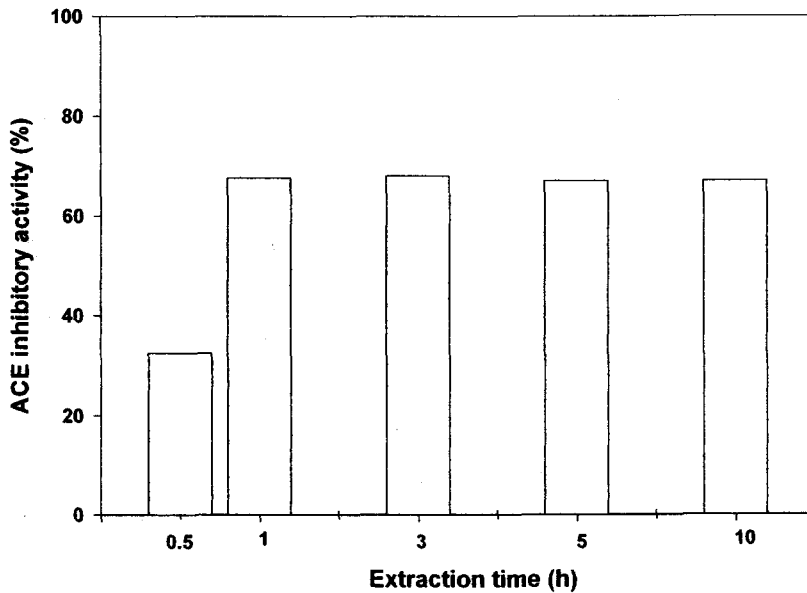


Figure 1. Effect of extraction time on the ACE inhibitory activity of extracts from *Pholiota* spp. ASI 24012 fruiting body

2. *Pholiota adiposa* ASI 24012가 생성하는 ACE 저해물질의 정제 및 특성

1) ACE 저해물질의 정제

비늘버섯(ASI 24012)이 생성하는 항고혈압성 ACE 저해물질을 한외여과(5000M.W cut-off), SephadexG-25 컬럼크로마토그래피, prep용과 분석용 역상 HPLC 등으로 정제하여 항고혈압활성 (ACE저해활성)이 IC₅₀, 0.044mg인 고순도의 ACE저해물질을 얻었다.(그림 2, 3, 4)

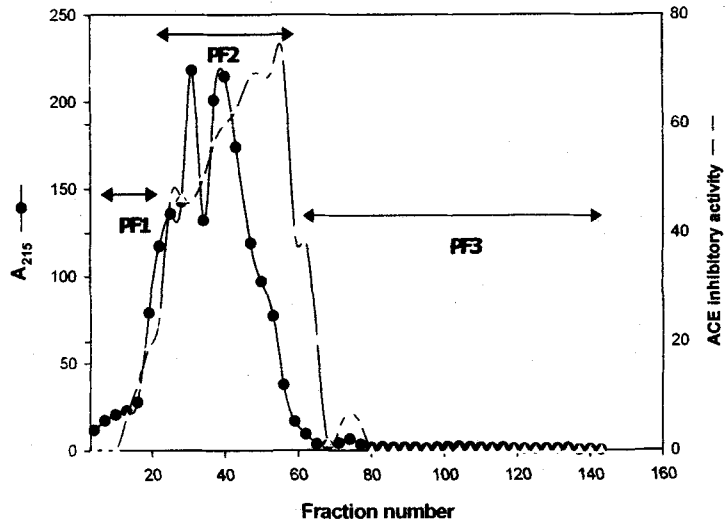


Figure 2. Chromatography on Sephadex G-25 of fraction from 5KD-cut off

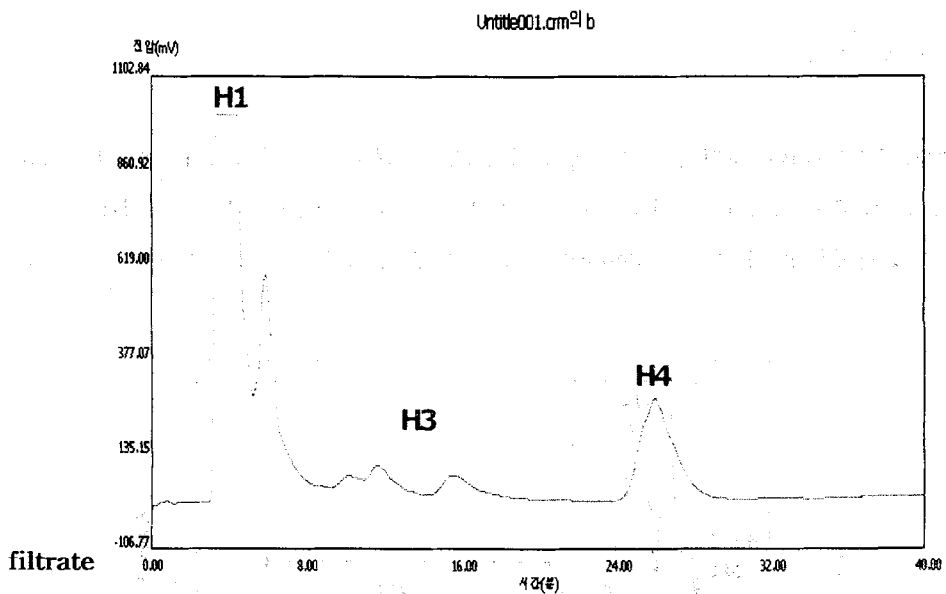


Figure 3. HPLC chromatogram of GF2 from Sephadex G-25 column chromatography

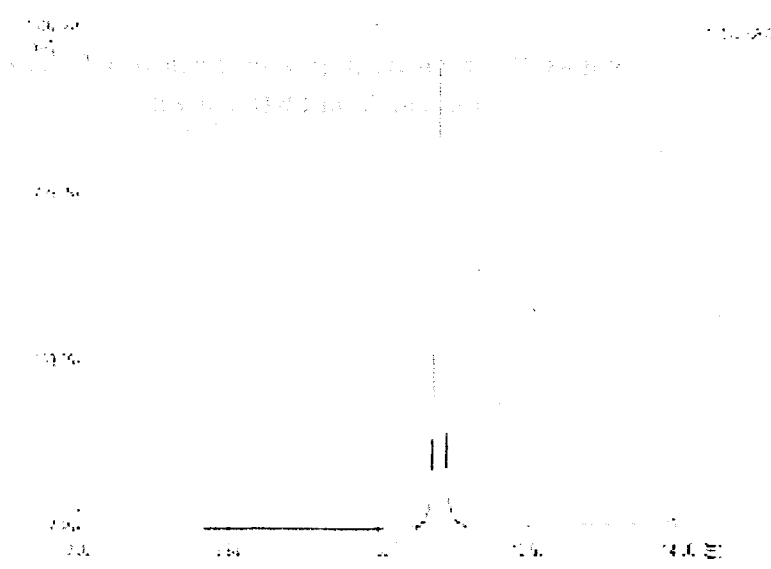


Figure 4. Reverse-phase HPLC chromatogram of the purified ACE inhibitor

2) ACE 저해물질의 특성

Pholiota adiposa ASI 24012가 생성하는 정제된 ACE 저해물질의 분자량을 MALDI-MS 분석법 등으로 측정한 결과 414 Da의 Pentapeptide 이었고 (그림 5) 이의 아미노산 sequence는 Gly-Gln-Gly-Gly-Pro 이었다.

또한 ACE에 대한 *Pholiota adiposa*의 ACE 저해물의 저해양식을 조사한 결과 그림 6과 같이 경쟁적 저해 양상을 보였다.

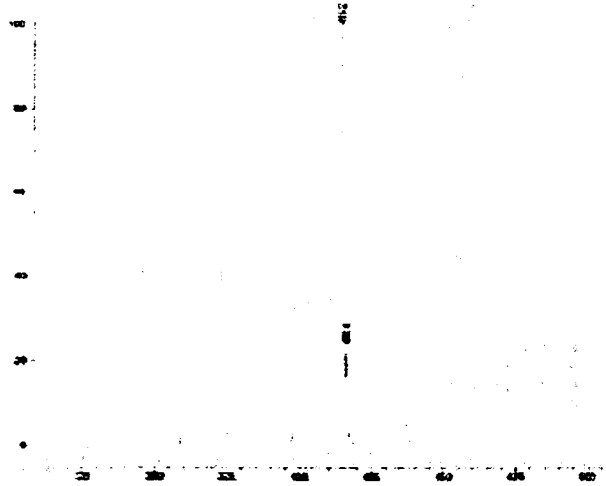


Figure 5. MALDI-MS spectrum of the purified ACE inhibitor

Figure 6. Lineweaver-Burk plot of ACE activity in the of the purified inhibitor

3) ACE 저해물질의 본태성 고혈압쥐에 대한 항고혈압 효과

Pholiota adiposa ASI 24012가 생성하는 ACE저해물질의 본태성 고혈압쥐(Spontaneous

hypertensive rat ; SHR)에 대한 항고혈압활성을 조사한 결과 그림 7과 같이 ACE 저해물질을 1mg/kg 경구 투여시 대조구인 시판 항고혈압 약물 captopril과 비슷한 패턴으로 투여 30분~1시간에 혈압강하 효과를 관찰할 수 있었고 이는 비늘버섯 ACE저해물질이 in vivo에서도 항고혈압 효과가 우수함을 의미하는 것으로 사료된다.

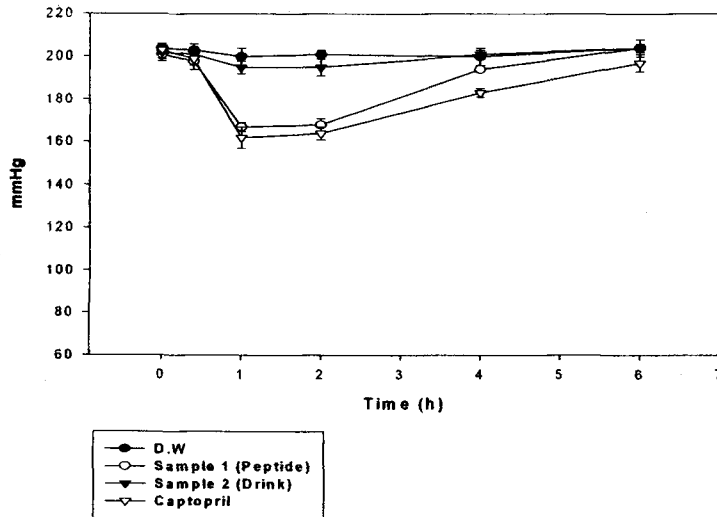


Figure 7. Effect of orally administered the ACE inhibitor from Pholiota adiposa on blood pressure in SHR

3. 고혈압 예방용 비늘버섯 제품의 제조 및 특성

1) 음료의 제조 및 특성

1, 2차에 걸쳐 50ml 용량의 파우치 형태의 음료를 제조하여 기호도와 항고혈압활성을 조사한 후 문제점을 보완하여 표 4와 같은 조성을 가진 항고혈압성 비늘버섯 음료를 제조하였다.

이들의 물리화학적 특성을 조사한 결과 표 5와 같이 pH는 4.21, 잔당을 17.5 brix이었고 황색이 짙은 음료 이었다. 또한 기호도는 비늘버섯향이 나고 단맛이 적으며 20대부터 50대까지의 패널 모두가 대체적으로 우수하다고 판정하였으며(그림 8), 항고혈압활성으로 ACE 저해활성은 제품 고형분 mg 당 12% 이었다. 또한 제품에 대하여 들연변이 유발성과 기타 세포독성 등을 상법에 따라 조사한 결과 제조 40일 현재까지 이들 활성이 없고 침전물도 생성되지 않았으며 맛과 향에도 변화가 없었다.(data not shown)

Table 4. Formula of antihypertensive drink made by extracts of *Pholiota adiposa*

(Unit : mg)

Composition	Contents	Composition	Contents
<i>Pholiota adiposa</i> Ext. (Moisture : 70.9%)	2500	Na-citrate	0.6
<i>Crataegi fructus</i> Ext. (Moisture : 70.9%)	1000	Taulin	100
<i>Lycium chinese</i> Mill Ext. (Moisture : 70.9%)	500	GMT-SOD	200
Vitamin B ₂	1.2	Fructose	4000
Vitamin B ₆	2.0	Sucrose	7000
Nicotinamide	6.6	Na-alginate	20
Folic acid	0.4	β-CD	250
Citric acid	60	Volume	50ml

Table 5. Physiochemical properties of *Pholiota adiposa* drink

pH	Bx(°)	Turbidity (A ₆₆₀)	colorness (A ₄₃₀)	Hunter's color value		
				L(lightness)	a(redness)	b(yellowness)
4.21	17.5	45.1	1.87	-32.89	+ 15.2	+ 31.40

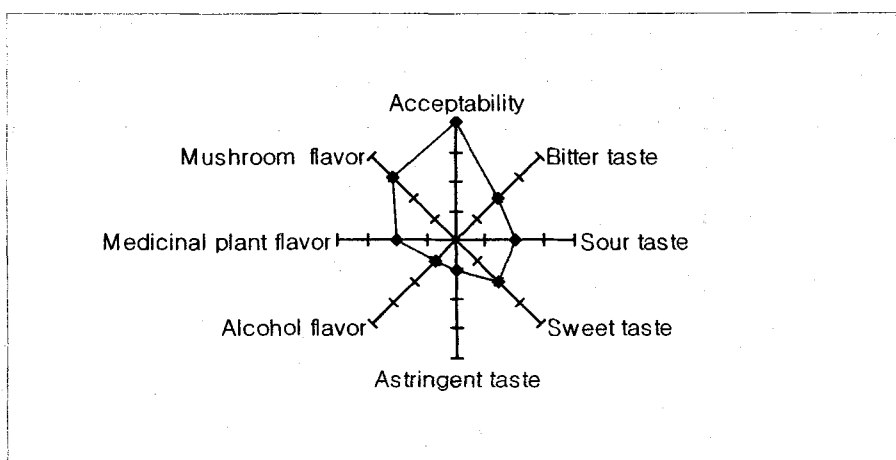


Figure 8. Sensory evaluation of antihypertensive drink made by *Pholiota adiposa*

2) 향고혈압성 민속주의 제조 및 특성

향고혈압 활성을 가진 비늘버섯 민속주를 제조하기 위해 비늘버섯(ASI 24012) 자실체 분말을 각각 0.1%, 0.5%, 1.0%씩 덧밥에 첨가하여 상법으로 민속주를 제조한 후 이들의 특성을 조사한 결과 표 6과 같이 비늘버섯의 첨가는 민속의 에탄올 생성에 영향을 주지 않았다.(에탄올 생성량: 16.0%~16.5%, 대조구: 16.6%)

Table 6. Effects of addition amount of *Pholiota adiposa*. on alcohol fermentation

Addition amount (%)	Ethanol (%)	pH	Total acid (%)	Volatile acid (%)
0.1 (PS-1)	16.2	3.91	0.24	0.010
0.5 (PS-1)	16.0	3.99	0.25	0.006
1.0 (PS-1)	16.5	3.99	0.27	0.012
Control	16.6	3.87	0.32	0.016

※ 5% koji were added into each mash and fermented for 5 days at 25℃

또한 관능검사를 실시한 결과 그림 9와 같이 0.1%의 비늘버섯 자실체 분말을 첨가하여 제조한 민속주가 제일 높은 기호도를 보였다.

비늘버섯 민속주는 78.3%의 향고혈압성 ACE저해활성을 보여 필자 등이 이미 연구개발한 영지버섯 민속주(63.4%)와 동충하초 민속주(67.3%)들보다도 높았다.

한편, 대량생산을 위한 제조공정을 조사한 결과 최적 발효 조건은 발효제(입국) 5.0%, *S. cerevisiae*, 25℃, 5일 발효 이었고 (이미 개발된 약용버섯 민속주들보다 발효제 첨가량을 5~10%절감, 발효일수도 10일 단축) 기타 제조 공정은 기존 민속주 제조 공정과 동일하였다.

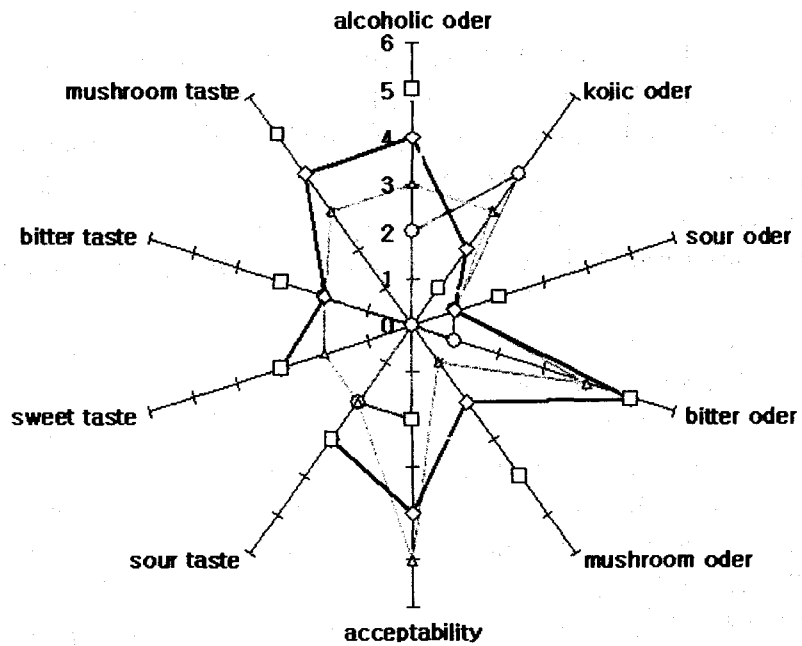


Figure 9. The QDA profile for taste and flavor of *Pholiota adiposa* traditional rice wine prepared by addition of different amount of *Pholiota adiposa* fruiting body.

◇ control △ PS-1 ○ PS-2 □ PS-3 : Same as Table 6.

참고문헌

1. 성재모, 유영복, 차동열. 2000. Mushroom science. 교학사(서울, Korea)
2. 이우주. 2001. 약리학강의. 의학문화사(서울, Korea) p 447-465
3. 조영제, 안봉전, 최청. 1993. 한국산 녹차로부터 분리한 Flavan-3-ol 화합물의 Angiotensin converting enzyme 저해효과. 한국식품과학회지. 25: 238-242
4. 김태진, 윤호동, 이두석, 장영순, 서상복, 염도민. 1996. 담수어 열수추출물 및 효소가수 분해물의 Angiotensin I converting enzyme 저해작용. 한국식품영양과학회지. 25: 871-877
5. 도정룡, 김선봉, 박영호, 김동수. 1993. 기호음료 성분의 Angiotensin 전환효소 저해작용. 한국식품과학회지. 25: 456-460
6. A.O.A.C. (1995). Official methods of Analysis. 15th Edition, Edited by Kenneth Helrich, Association of Official Analysis Chemist, Virginia, U.S.A
7. Aiko, Morigiwa, Katsuaki, K., Yoshinori, F., and Nobuo. I. (1986). Angiotensin converting enzyme inhibitory triterpenes from *Ganoderma lucidum*. Chem. Pharm. Bull. 34(7): 3025-3028
8. Ariyoshi Y, (1993) Angiotensin converting enzyme inhibitors derived from food protein. Trend in Food Science and Technol. 4:139-44
9. Choi, H. S., Cho, H. Y., Yang, H. C., Ra, K. S. and Suh, H. J. (2001). Angiotensin I-converting enzyme inhibitor from *Grifola frondosa*. Food Research International. 34: 177-182
10. Cushman, D. W., Cheung, H. S., Sabo, E. F. and Ondetti, M. A. (1977). Design of potent competitive inhibitors of angiotensin converting enzyme: carboxyalkanoyl and mercaptoalkanoyl amino acid. Biochemistry. 16: 54-84
11. Ferreira, S.H., Bartelt, D. C. and L. J. Greene, (1970) Isolation of bradykinin-potentiating peptide from *Bothrops jararaca* venom. Biochemistry. 9: 2583-2592
12. Hara, Y., Matsuzaki, T. and Suzuki, T. (1987). Angiotensin I converting enzyme inhibiting activity of tea components. Nippon Shokuhin Kogyo Gakkashi, 61: 803-807
13. Kabir, Y., Kimura, S. and Tamura, T. (1998). Dietary effect of *Ganoderma lucidum*: Mushroom on blood pressure and lipid levels in spontaneously hypertensive rats(SHR). J. Nutr. Sci. Vitaminol. 34: 433-438
14. Kameda, K., Takaku, T., Okuda, H. and Kimura, Y. (1987). Inhibitory effects of various flavonoids isolated from leaves of persimmon on angiotensin converting enzyme activity. J. Natural Products. 50: 680-683
15. Kim, Y. S., Suh, H. J. Chung, S. H., Kim Y. S. and Lee, S. D. (1996) Functionality and inhibitory effect of soybean hydrolysate on Angiotensin converting enzyme. Korea J. Food & Nutrition. 9(2): 167-175
16. Kohama, Y., Matsumoto, S., Oka, H., Teramoto, T., Okabe, M. and Mimura, T. (1988). Isolation of angiotensin-converting enzyme inhibitor from tuna muscle.

Biochem. Biophys. Res. Com. 155: 332-337

17. Lee, D. H., Gong, W. S., Yoo, Y. B, Park, J. J., Yoo, C. H. and J. S. Lee, (2003) Screening of antihypertensive angiotensin I-converting enzyme inhibitor from mushrooms. Korea J Mycol. 31: 148-154
18. Lee, D. H., Kim, J. H., Park J. S., Yoo, C. H. and J. S. Lee, (2004) Isolation and characterization of a novel angiotensin I- converting enzyme inhibitory peptide derived from the Edible Mushroom *Tricholoma giganteum*. J. Peptides. 4: 621-627.
19. Matsubara, Y., Kumamoto, H., Iizuka, Y., Murakami, T., Okamoto, K., Miyake, H. and Yokoi K. (1985). Structure and hypotensive effect of flavonoid glycosides in citrus unshiu peelings. Agric. Biol. Chem. 49: 909
20. Miyoshi, S., Ishikawa, H., Kaneko, T., Fukui, F., Tanaka, H. and S. Maruyama, (1991) Structures and activity of angiotensin-converting enzyme inhibitors in an -Zein hydrolysate. Agric Biol Chem. 55:1313-8
21. Morigiwa, A., Kitabatake, A., Fujimoto, Y. and N. Ikekawa, (1986) Angiotensin converting enzyme-inhibitory triterpenes from *G. lucidum*. Chem Pharm Bull. 34: 3025-8
22. Okamoto, A., Hanagata, H., Matsumoto, E., Kawamura, Y., Koizumi, Y. and Yanagida, F. (1995). Angiotensin I converting enzyme inhibitory activities of various fermented foods, Biosci. Biotech. Biochem. 59: 1147-1152
23. Ondetti, M. A., Rubin, B. and Cushman, D. W. (1997). Design of specific inhibitors of angiotensin. Science. 196: 441-444
24. Rhyu, M. R., Nam, Y. J. and Lee, H. Y. (1996). Screening of angiotensin I-converting enzyme inhibitors in cereals and legumes. Food & Biotechnol. 5: 334-337
25. Saito, Y., Wanezaki, K., Kawato, A. and S. Imayasu, (1994) Structure and activity of angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides from sake and sake lees. Biosci Biotech Biochem. 58:1767-71
26. Saito, Y., Nakamura, K., Kawato, A. and Imayasu, S. (1992). Angiotensin I converting enzyme inhibitors in sake and its by-products. Nippon Nogeikagaku Kaishi, 66: 1081-1087
27. Sugiyama, K., Takada, K., Egawa, M., Yamamoto, I., Onzuka, H. and K. Oba, (1991) Hypertensive effect of fish protein hydrolysate. Nippon Nogeikagaku Kaishi.65: 35-41
28. Sun, H. J., Cho, S. J., Whang, J. H., Lee, H. and H. C. Yang, (1997) Characterization of angiotensin converting enzyme inhibitor from squid hydrolysate. Foods and Biotechnology. 6: 122-8

여 백

위탁2 : 버섯류 천연 항산화물질 분석 및 활성물질 분리·동정 연구

제 1 절 고 항산화 활성 버섯류 선별 및 활성물질 분리·동정 연구

1. 서언

최근 들어 인간은 free radicals로 야기되는 암과 노화에 대한 대책방안을 마련하기 위해 생리활성물질인 천연 항산화 물질의 개발에 많은 관심을 보이고 있다(Cutler, 1984). 노약자, 환자, 음주·흡연자 또는 정상인이더라도 오염물질이나 환경오염에 의해 인체의 방어능력이 약화된 경우 활성산소와의 균형이 깨져서 인체가 손상을 받는 피해를 입게 된다. 따라서 최근의 연구는 superoxide radicals에 의해 유도되는 질병 치료와 항암제로 인한 정상세포의 파괴를 보호하는 것으로서, 주로 식품과 의약품에 천연 항산화 물질을 적용하는데 그 주안점을 두고 있다.

산화작용은 생체 내에서 에너지 공급을 위한 생화학적 반응으로 끊임없이 계속 일어나며 이 과정에서 발생하는 활성산소 및 상당량의 free radical은 생체 내 제거기작에 의해 대부분 소멸 된다. 하지만 조직의 방어능을 초월하여 소거되지 않은 활성 산소종은 체내의 항산화제와 pro-oxidants의 불균형으로 인해 산화 스트레스를 야기하여 성인병이라 불리는 류마티스 관절염, 심장병, 파킨슨시병, 신경계 질환, 암 및 노화 등의 체내 각종 질병의 원인이 되고 있다. 활성 산소종은 superoxide radical (O_2^-), hydroxy radical (OH^\cdot), singlet oxygen (1O_2), 및 hydrogen peroxide (H_2O_2) 등이 보고 되어지고 있다 (Halliwell, 1987; Ames, 1983; Hewitt 등, 1990; Price and Hendry, 1991; McCord and Fridovich, 1969; Bracco 등, 1991).

McCord and Fridovich (1969)은 박테리아에서부터 인간에 이르기까지 모든 호흡을 하는 세포에서 존재하는 효소 항산화제인 SOD (superoxide dismutase)를 처음으로 보고하였는데, 이는 superoxide free radicals이 분자상의 산소와 과산화수소 ($2O_2^- + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$)로 변환되는 것을 촉매하면서 활성 자리에 산화환원 금속을 가지는 금속단백질로서, 이 효소의 활성은 O_2^- 와 H_2O_2 의 농도에 의해 결정 되어지는 특이성을 갖고 있다. 일반적으로 O_2^- 와 SOD 활성 측정은 cytochrome C, nitroblue tetrazolium(NBT), epinephrine, 및 ascorbic acid 방법 등에 의해 분석 되어왔지만, 활성산소의 소거능을 살펴보는 실험은 활성산소의 반감기(half-life)가 매우 짧기 때문에 분석하기가 매우 어려운 점이 있다. 하지만, 최근에는 ESR (electron spin resonance) spectrometry를 이용하여 좀더 간편하고 안정적인 방법으로 $-OH$, $-OOH$ 및 O_2^- 의 분석이 가능해 졌다.

SOD는 Cu/Zn-SOD, Mn-SOD, 및 Fe-SOD의 3가지 종류가 있는데, 그 활성 자리에는 촉매적 보결 금속(catalytic prosthetic metal)의 특징을 갖고 있다 (Harbour 등, 1974; Janzen 등, 1978; shannon and Mulchi, 1974; Kim and Lee, 1992). 특히 고등식물에서는 주로 Cu/Zn-SOD가 세포질과 색소체에 존재하며, cyanide와 H_2O_2 에 의해 저해됨으로써 가장 뛰어난 활성을 보이며, 이런 SOD의 활성은 다양한 환경적, 화학적 자극에 의해 반응이 증

가 한다고 알려져 있으며, 체내의 활성산소를 제거하는 효소계 항산화제는 SOD 이외에도 catalase (CAT), ascorbate peroxide (APOX), dehydroascorbate reductase (DHAR), inonodehydroacobate reductase (MDHAR), 및 glutathione reductase (GR) 등이 보고 되어진다 (Bannister 등, 1987; Alscher and Hess, 1993).

반면, TBA (thiobarbituric acid)법은 지질과산화의 정도를 측정하기 위해 가장 보편적으로 이용하는 방법으로, 간단하고 섬세하여 널리 이용된다(Park, 1995) TBA는 2차적인 지질과산화 생성물인 malonaldehyde (MA)를 측정하는 것으로서, malonaldehyde는 제일 먼저 TBA와 반응을 하고, 최대 흡광도 532 nm에서 붉은 색원체를 형성한다. 항산화 활성은 TBA 반응물질의 저해가로 표현된다. 최근, 활성산소의 해 작용에 대한 연구 결과와 인식의 증가로 인해, 세계 여러 국가에서 식품 및 농산품등에서의 천연 항산화 성분의 발견과 개발에 많은 연구를 투자하고 있는 실정이다. 일반적으로 항산화제는 *tert*-butylated hydroxyanisole (BHA) and *tert*-butylated hydroxytoluene (BHT)와 같은 합성항산화제와 α -tocopherol, L-ascorbic acid, vitamin C, carotenoids, flavonoids, 및 tannins과 같은 천연 항산화제로 구분한다. 특히 BHT and BHA는 적은 경비에도 불구하고 높은 항산화효과를 보여 식품류에서 항산화제로 널리 이용되고 있다(Barnes, 1975; Lee 등, 1995; Stich; 1991).

식품이나 농산물 등에서의 항산화 효과는 SOD, POD ($H_2O_2 + AH_2 \rightarrow 2H_2O + A$), DPPH(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl: purple convert yellow), Rhodan iron method ($ROOH + Fe^{2+} \rightarrow ROH + HO + Fe^{3+}$) 및 ESR(DMPO + $O_2 \rightarrow DMPO-OOH$ or $DMPO-O^{\cdot}$) 등의 다양한 방법에 의해서 측정될 수 있다 (Koide 등, 2000; Tomohiro 등, 1994; Yagi, 1976).

농산물에서의 항산화효과는 여러 연구에서 보고 되어져 왔는데, 정 등 (2000; 2001)은 저장기간이 길어질수록 콩에서의 SOD, DPPH 및 TBA등의 항산화 활성이 저하된다고 보고 하였고, 또한 중금속의 증가는 벼에 있어 SOD 와 POD의 활성을 증가 시킨다고 보고하였다. 또한, 오존에 대한 저항성을 갖는 벼 품종은 높은 SOD 및 POD 활성을 갖는다고 보고 하였다.

한국에는 약 1,000여종의 버섯종이 보고 되는데, 최근 건강에 대한 관심의 증가는 기능성 버섯류에 대한 요구 및 소비의 증가를 보이고 있다. 버섯은 혈압조절, 혈중 cholesterol 저하 등의 각종 성인병 및 각종 암과 같은 난치병의 예방 및 치료에 있어 효과 있다는 것이 이미 여러 차례 보고 되어 왔다 (Hara 등, 1991; Ohmori 등, 1988; Suzuki and Oshima, 1976; Lin 등, 1974; Komatsu 등, 1963).

본 연구는 이전의 연구에서 버섯의 항산화활성 평가에 대한 자료가 부족한데 기인하여 80개의 교배·수집된 버섯으로부터 건강기능성 특히 항산화 활성 관련 물질의 탐색 및 항산화 활성을 평가하기 위하여 수행 하였다. 항산화 활성 검정을 위하여는 SOD, POD, DPPH 및 TBA법에 의하여 *in vitro* 상태에서 측정하였으며, 본 연구의 결과를 바탕으로 선발된 버섯계통의 항산화 활성 평가는 ESR법에 의해 실험한 후 비교 분석하였다. 또한 최종 선발된 버섯으로부터 물질 추출 및 분리 동정된 물질의 항산화 활성 검정은 실험용 mouse를 이

용한 *in vivo* 상태에서 serum(혈청)의 glutamic oxaloacetic transaminase(GOT), glutamic pyruvic transaminase(GPT) 및 γ - glutamyl transpeptidase(γ -GTP) 활성도, 총콜레스테롤, high density lipoprotein(HDL), low density lipoprotein (LDL) 및 간, 뇌, 이자 등의 조직으로부터 지질과산화 등을 측정하였다.

2. 연구방법 및 내용

가. 각종 항산화활성 검정법을 비교 검토하여 고 항산화활성 버섯류 검정 및 선발

1) 항산화 활성 유전자원 평가

가) 공시품종: 장수버섯(*Fomitella* sp)을 포함하는 80종의 수집·교배된 계통

나) SOD와 POD의 활성검정

(1) SOD와 POD의 활성검정을 위한 조효소 추출

SOD와 POD의 항산화 활성 검정을 측정하기 위해 버섯류(자실체와 균사체)를 저온진공 냉동 건조기에서 건조시켰다. 건조시료를 분쇄 (40-mesh)한 후, 시료 0.2 g과 효소추출 완충 용액 (pH 7.0, 100 mM phosphate, 10 mM ascorbate, 5 mM EDTA) 2 ml를 유발에 넣은 후, 곱게 갈아서 얻은 조추출액을 15,000 rpm으로 10분간 1회 원심분리 하였다. 원심 분리하여 얻은 상등액을 탈염완충용액 (50 mM phosphate, pH 7.0, 0.2 mM EDTA)으로 평형시킨 후, Sephadex G-25 column을 이용하여 탈염시킨 다음 효소활성 검정용액을 사용하였다 (그림 1).

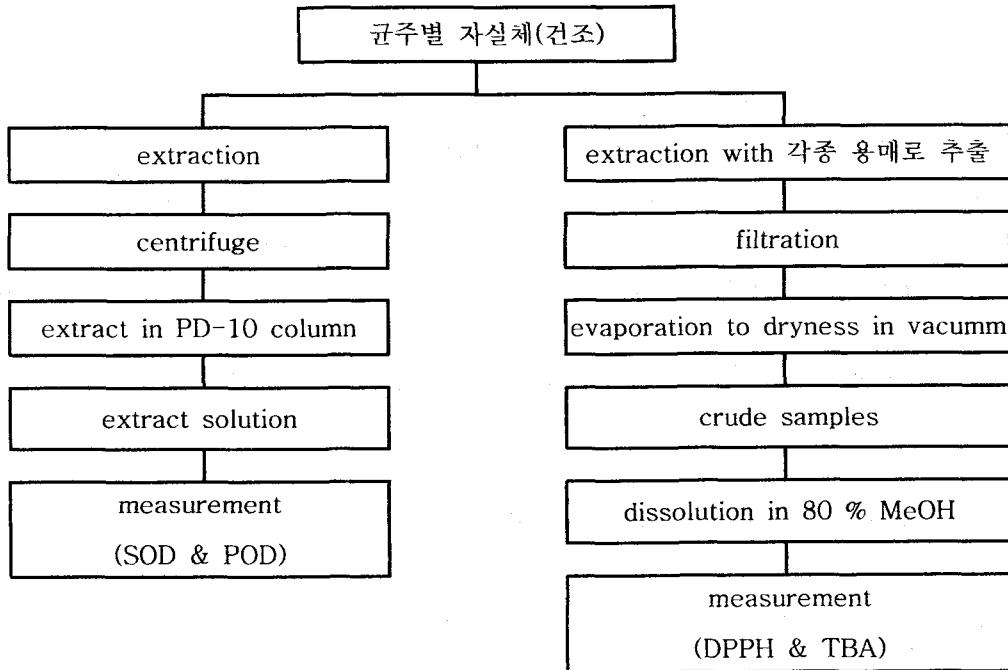


그림 1. SOD, POD, DPPH 및 TBA를 이용한 항산화 검정 모식도

(2) Superoxide dismutase (SOD) 활성검정

위에서 추출한 조효소 60 μ l과 assay buffer 3.0 ml 및 riboflavin 30 μ l을 혼합하여 25°C의 온도 및 광조절 식물성장상의 광원 (20-W Sylvania Groiux 형광등)에서 7분간 균일하게 조사시켰다. SOD의 활성은 NBT (nitro blue tetrazolium) 환원법 (Beyer 등, 1987)에 의하여 흡광도 560 nm에서 측정하였고, 항산화 활성 정도는 NBT (Asada 등, 1974)의 환원 저해율로 표시하였으며, 다음의 계산식을 이용하였다.

$$\text{항산화 활성 (\%)} = (1 - A / B) \times 100$$

A : 시료의 흡광도

B : 대조구의 흡광도

(3) Peroxidase (POD) 활성검정

POD의 활성은 Raa (1971)의 방법에 의하여 측정하였다. Sodium phosphate buffer (pH 7.0) 7.9 ml, 0.3% 과산화수소수 0.5 ml 및 1% *o*-phenylenediamine 0.5 ml와 위에서 준비한 조효소 0.1 ml를 혼합하여 반응액을 9 ml가 되도록 하였다. 조효소의 첨가에 의하여 반응이 개시되었으며, 이를 5분간 반응시킨 다음 반응정지액 (NaH₂SO₃) 1 ml를 첨가하여 반응을 정지시키고 실온에 30분간 방치 후, 430 nm에서 UV로 흡광도를 측정하였다.

$$\text{항산화 활성 (\%)} = (1 - A / B) \times 100$$

A : 시료의 흡광도

B : 대조구의 흡광도

다) DPPH와 TBA 활성 검정

(1) 1,1-diphenyl-2-picryl hydrazyl (DPPH)법

수소공여능의 정도는 Yoshida 등 (1989)의 방법을 이용하여 측정하였다. 1,1-diphenyl-2-picryl hydrazyl (DPPH) 30 mg을 ethanol 200 ml에 용해시킨 후, 증류수 200 ml를 가하여 DPPH solution을 만들었으며, 50% ethanol을 대조군으로 하여 DPPH solution의 흡광도를 2.0으로 조절하였다. DPPH 용액 2.5 ml와 80% methanol에 용해한 1% 시료용액 0.25 ml을 혼합하여 1분간 반응시킨 후, 517 nm에서 흡광도를 측정하여 항산화 활성을 검정하였다.

$$\text{항산화 활성 (\%)} = (1 - A / B) \times 100$$

A : 시료의 흡광도

B : 대조구의 흡광도

(2) Thiobarbituric acid (TBA)법

(가) 기질용액과 반응액의 조제 : Lipid에 대한 malondialdehyde 생성 억제효과는 linoleic acid 기질에 대한 산패 억제 효과로 조사하였다. 즉 0.1 M potassium phosphate buffer (pH 7.0)와 ethanol을 4:1로 혼합한 용매에 0.03 M이 되도록 linoleic acid를 첨가하여 기질용액으로 사용하였다. 기질용액 20 ml에 0.1 M potassium phosphate buffer (pH 7.0) 19.2 ml와 1%의 각 시료액 0.8 ml를 첨가한 후, 40°C 항온수조에서 100 rpm으로 24시간 동안 진탕하여 다음과 같이 TBA를 측정하였다.

(나) Thiobarbituric acid (TBA)가 측정 : TBA는 thiobarbituric acid를 이용한 Wong 등 (1981)의 방법을 참고하여 다음과 같이 측정하였다. 경시적 반응액 2.0 ml씩을 시험관에 취하고 여기에 35% trichloroacetic acid (TCA) 1.0 ml와 0.75% TBA 시약 2.0 ml를 가한 다음 시험관 진탕기로 30초 동안 진탕하여 균질화 시킨 후, 95°C 항온수조에서 40분 동안 반응·발색시켰다. 반응이 끝난 후, 실온까지 냉각시켜 acetic acid 1.0 ml, chloroform 2.0 ml를 가하고, 시험관 진탕기로 다시 진탕시킨 후 3,000 rpm에서 5분 동안 원심분리를 하였고, 그 상등액의 흡광도를 532 nm에서 측정하여 이를 TBA가로 하였으며, 대조군의 TBA가와 비교하여 유지에 대한 산화 억제효과를 측정하였다.

$$\text{항산화 활성 (\%)} = (1 - A / B) \times 100$$

A : 시료의 흡광도

B : 대조구의 흡광도

라) ESR을 이용한 SOD 활성의 측정

(1) 공시품종: 고 항산화 활성 group (ASI *Agaricus brunnescens*를 포함하는 5계통)과 저 항산화 활성 group(ASI 740(C)를 포함한 5계통)

(2) ESR을 이용한 SOD 활성의 측정 : SOD 활성은 JES_RE1X ESR spectrometer (JEOL Co., Ltd, Tokyo, Japan)로 측정하였다. Hypoxanthine-xanthine oxidase system으로부터 발생된 $O_2^{\cdot -}$ radical은 DMPO에 의해서 포집하였고, hypoxanthin (2 mM) 50 μ l와 DMPO (9.2 M) 20 μ l 그리고 소거제 또는 SOD 50 μ l로 혼합하였다. 그 다음 반응 혼합물을 균등하여 cell에 옮기고, ESR signal을 45초 후부터 측정하였다. ESR signal의 intensity는 국제 표준으로 이용되는 대조구의 Mn^{2+} 의 peak intensity에 대한 시료의 signal peak intensity의 비율로 조정하였다 (표 3).

표 3. ESR의 instrumental condition

항 목	단 위
Frequency	9.42 GHz,
Instrumental parameters	
Microwave power	8 mW
Modulation width	0.2 mT
Sweep time	2 min

항산화 활성 (times) =

$$\text{Relative signal intensity} = \frac{\text{DMPO height of standard}}{\text{Mn}^{2+} \text{ height of standard}} : 1 = \frac{\text{DMPO height of samples}}{\text{Mn}^{2+} \text{ height of standard}} : X$$

마) 통계처리

수행된 모든 활성 검정은 3반복으로 수행하였으며 통계분석은 모든 데이터를 SAS(Statistical Analysis System; SAS 1986) 프로그램으로 최소유의차(Least Significant Difference, LSD) 검정을 한 후 선발 하였다.

표 4. 고 향산화 버섯 시료 List

No. (건국대)	List no.	No. (건국대)	List no.	No. (건국대)	List no.	No. (건국대)	List no.
KKU-1	4074	KKU-21	5019	KKU-41	170-57	KKU-61	74013
KKU-2	VI	KKU-22	170-1	KKU-42	170-59	KKU-62	9006
KKU-3	24024	KKU-23	170-4	KKU-43	170-66	KKU-63	9009
KKU-4	포토벨라	KKU-24	170-11	KKU-44	차가(리)	KKU-64	9010
KKU-5	23(19)	KKU-25	170-12	KKU-45	차가(캐)	KKU-65	9011
KKU-6	17016	KKU-26	170-14	KKU-46	17001	KKU-66	9012
KKU-7	새송이	KKU-27	170-15	KKU-47	17003	KKU-67	9014
KKU-8	4065	KKU-28	170-19	KKU-48	17004	KKU-68	9017
KKU-9	24005	KKU-29	170-20	KKU-49	17005	KKU-69	9021
KKU-10	24012	KKU-30	170-21	KKU-50	17006	KKU-70	9025
KKU-11	24008	KKU-31	170-22	KKU-51	17009	KKU-71	DE-E
KKU-12	24001	KKU-32	170-28	KKU-52	17010	KKU-72	DE-F
KKU-13	24004	KKU-33	170-29	KKU-53	17012	KKU-73	F-J
KKU-14	24027	KKU-34	170-31	KKU-54	17017	KKU-74	F-K
KKU-15	24018	KKU-35	170-34	KKU-55	74006	KKU-75	M-A
KKU-16	24017	KKU-36	170-38	KKU-56	74007	KKU-76	M-1
KKU-17	24002	KKU-37	170-51	KKU-57	74008	KKU-77	M-2
KKU-18	24022	KKU-38	170-53	KKU-58	74009	KKU-78	M-9
KKU-19	24007	KKU-39	170-55	KKU-59	74011	KKU-79	M-10
KKU-20	24010	KKU-40	170-56	KKU-60	74012	KKU-80	M-16

●. 7001~17017 : 장수버섯 수집균주

●. 170-1~170-66 : 장수버섯 교배이핵균주

●. 9006~9025 : 잎새버섯 수집균주

●. 기타 : 차가버섯(F-J, M-1, 74006, DE-E 포함한 19시료)

나. 항산화활성 물질 추출 및 분리·정제된 활성물질인 항산화제의 구조결정

1) 물질 분리를 위한 추출

가) 공시 품종: 항산화 활성 시험결과 항산화 활성이 높게 나타난 비늘버섯(24027: *Pholiota adiposa*)

나) 추출 과정

수집된 비늘버섯(24027: *Pholiota adiposa*)은 먼저 동결건조를 시킨 후 분쇄(40-mesh)하였다. 분쇄된 비늘버섯의 양은 최종 0.3 kg 이었으며, 추출 용매 조건은 Hexane : EtOAc : MeOH = 1 : 1 : 1로 실온 조건 하에서 1일 동안 추출하였으며, 3회 반복하였다. 추출물은 감압농축기와 동결건조기를 사용하여 solvent를 제거한 후 동결 건조 하였다.

2) 물질의 분리 및 동정

가) 물질의 분리

위의 방법으로 얻어진 추출물(11.5g)은 column chromatography(Silica gel 60; 70-230 mesh, Merck)를 사용하여 분리하였으며, 이때 사용된 용매는 *n*-hexane, *n*-hexane-EtOAc, EtOAc, EtOAc-MeOH 순으로 극성이 점차 높아지도록 사용하였으며, 최종적으로 MeOH 를 사용하였다.

TLC는 두께가 0.5mm인 Silica gel plate(Merck) 이용하여 수행하였다. spot은 먼저 254~366nm의 UV 광으로 확인하였으며, 후에 1% vanillin이 첨가된 sulfuric acid(ethanol solution)가 들어 있는 chamber에 담가 확인하였다.

나) 물질의 동정

EI-MS(Electron Ionization Mass spectra)는 JEOL JMS-600w spectrometer를 사용하여 측정하였다. IR spectra(Infra-Red spectra)는 Thermo Mattson 60AR spectrophotometer를 사용하여 고체상태인 것은 KBr을, 액체상태인 것은 Chloroform을 사용하거나 용매를 사용하지 않고 측정하였다. ¹H NMR spectra(Nuclear Magnetic Resonance spectra)는 Bruker Avance DRX-500MHz를 사용하여 측정하였으며, ¹³C NMR spectra는 125 MHz에서 측정하였다.

다. 분리·정제된 활성물질의 효과 확인 및 기존의 항산화제와 효과 비교 시험

1) *In vitro* 에서의 활성 효과 검증

가) P383 murine leukemia cell을 이용한 성장 억제 효과 (IC₅₀)

버섯에서 분리·정제된 물질의 세포 성장억제효과를 측정하기 위하여 버섯에서 분리·정제된 1-Linoleio-2-olein, stigmasterol, 1-(N, N, N-trimethyl ethyl amino phosphoryl) 2, 3-dilinolein ion, glyceryl phosphate, 1, 4-glucopyranosyl-1', 4'-glucopyranosyl-1'', 4''-glucopyranoside, 2', 3'- diphosphoryl-1'-propanoxy-β-D-glucopyranoside, 1-linoleio-3-olein 등 비늘버섯에서 분리·정제된 7가지 물질을 사용하여 세포의 50% 생존율(IC₅₀)을 검정하였다.

50% 세포생존율 (IC₅₀) 조사를 위하여 P383 murine leukemia cell 세포를 사용하였으며, 5% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS)과 Kanamycin (5.3 mL/L)이 처리된

RPMI 1640 배지 (Nissui)에서 37°C, 5% CO₂의 환경의 배양기에서 배양하였다.

세포 생존률 측정은 MTT assay 법에 따랐으며, 세포를 96-well plate 3×10³ cells/well 의 농도로 분주하였다. 분주 24시간 후 각 분리·정제된 물질은 DMSO (dimethylsulfoxide) 에 녹인 후 배지에 0.1µg/ml, 0.3µg/ml, 1µg/ml, 3µg/ml, 10µg/ml, 30µg/ml, 100µg/ml 씩 넣어 48시간 동안 배양 한 후, 20 µl MTT (5% in PBS)를 각 well에 넣고 4시간 동안 배양한다. 각 각의 well에 10% SDS-0.01N HCl 100µl를 첨가하고, 550 nm에서 microplate reader (MPR A4i, Tosoh)를 이용하여 세포 성장을 50%억제하는 각 물질의 농도를 계산하였다.

나) 라디칼 소거능(RC₅₀) 활성측정

비늘버섯(*Pholiota adiposa*)에서 분리·정제된 물질의 radical 소거효과를 측정하기 위하여 Blois 법(1951)을 적용하여 버섯에서 분리·정제된 1-Linoleio-2-olein, stigmasterol, 1-(N,N,N-trimethyl ethyl amino phosphoryl) 2,3-dilinolein ion, glyceryl phosphate과, 기존의 항산화제로 알려진 BHT를 비교하였다. 1.5×10⁻⁴M DPPH(Sigma Aldrich) 메탄올 용액 5mL에 여러 농도의 시료 메탄올 용액 1mL에 첨가하고 섞은 다음 30분간 실온에서 방치 후 517nm에서 흡광도를 측정하였다. 시료의 환원력의 크기는 라디칼 소거활성(scavenging activity, RC₅₀)으로 표시 하며, RC₅₀은 DPPH의 농도가 1/2로 감소하는데 필요한 시료의 양 (µg)으로 나타내었다.

다) H₂O₂처리에 의한 세포생존율 조사

사용된 시료는 버섯에서 분리·동정된 물질인 stigmasterol을 사용하였다. 시험에 사용된 세포는 H2IE를 사용하였으며, H₂O₂처리를 하여 세포의 생존율을 조사하였다. 이 세포는 10% fetal bovine serum(FBS)와 penicillin-streptomycin을 함유한 DMEM (Gibco-BRL, USA) 배지에서 37°C, 5% CO₂의 환경의 배양기에서 배양하였다. 세포가 plate 표면에 80% 정도 자라면 0.25% trypsin을 처리하여 계대배양하였으며 실험 시에는 일정수의 세포를 사용하였다.

세포 생존률 측정은 MTT assay 법에 따랐으며, 세포를 96-well plate 5×10⁴ cells/well 의 농도로 분주하였다. 분주 24시간 후 각 버섯에서 분리·정제된 stigmasterol이 들어 있는 배지를 1µg/ml, 2.5µg/ml, 5µg/ml, 7.5µg/ml, 10µg/ml, 25µg/ml, 50µg/ml, 75µg/ml, 100µg/ml 씩 넣어 배양 한 후, 1mM의 H₂O₂에 1시간 동안 노출 시킨 다음, MTT assay를 시행하여 세포의 생존률을 조사하였다. 즉, 배양시간 별로 수합한 plate에 MTT(2mg/mL)용액을 50µl 씩 첨가하여 CO₂배양기에서 4시간 동안 배양시켜 formazan을 형성시킨 뒤, 상청액을 제거한 후 각 well에 100% DMSO 150µl 를 첨가하여 이를 plate shaker에서 20분간 진탕시킨 다음 ELISA reader로 540nm에서 흡광도를 측정하였다.

각각의 조건에서 3차례에 걸쳐 측정된 흡광도를 평균으로 산출하여 대조군의 흡광도 평균으로 나누어 각각의 조건에서의 생존률을 구하였다.

$$\text{조건별 생존률(\%)} = \text{각조건별 평균 흡광도/대조군의 평균 흡광도} \times 100$$

2) *In vivo* 에서의 활성 효과 검증

가) 실험 재료 준비

2003년도 농업생명공학원에서 재배한 버섯 80 계통 중 비늘버섯(*Pholiota adiposa*)에서 추출한 조추출물과 동정된 물질 중 *in vitro* 활성 검증에서 우수한 활성을 보인 stigmasterol을 사용하였다. 또한, 비교 물질로서 생리식염수, 40% EtOH, 40% EtOH에 용해된 비타민 E를 사용하였다.

나) 실험동물의 사육 및 처리

실험에 사용된 동물은 4주령 된 ICR 계통의 웅성 흰쥐(삼육실험동물연구소, 오산)이며, 실험에 사용하기 전까지 명암주기가 자연채광인 사육장에서 사육하였다. 사육기간 동안 물과 사료는 자유롭게 섭취하도록 하였다 (그림 2, 3).

1주일간 사육장에서 기본식으로 적응시킨 실험동물을 각각 12마리씩 6군으로 나누었다. 제1군(생리식염수 투여군-C)은 체중 20g당 0.32ml의 생리식염수를, 제2군(EtOH 투여군-E)은 체중 20g당 0.32ml의 40% 에탄올을, 제3군(비타민 투여군-VE)은 체중 20g당 2mg의 비타민 E(40% 에탄올에 용해)를, 제4군(버섯 조추출물 투여군-2E)은 체중 20g당 2mg의 버섯 추출물(40% 에탄올에 용해)을, 제5군(stigmasterol투여군-ME)은 체중 20g당 2mg의 stigmasterol(40% 에탄올에 용해)을 각각 2주간 매일 일정한 시각에 경구투여용 주사기(준대)를 사용하여 경구 투여하고, 일정한 기간마다 몸무게를 조사하였다 (그림 4, 5).

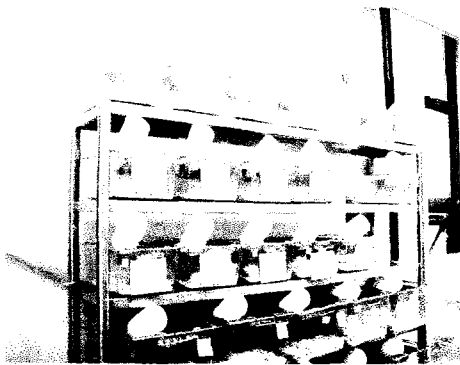


그림 2. 실험 동물 사육장 모습

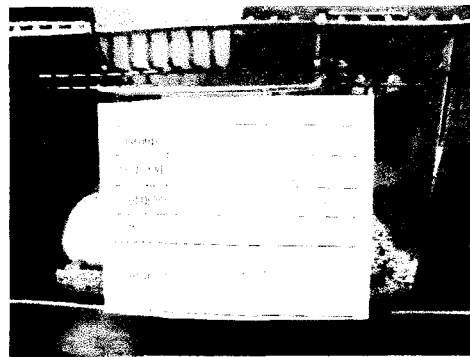


그림 3. 실험동물 케이지 모습



그림 4. 경구 투여 하는 모습

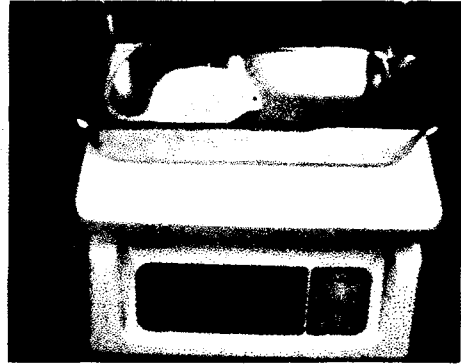


그림 5. 실험동물 무게측정 모습

다) 시료수집

(1) 혈액

실험동물을 25% urethan(0.2ml/40g mice weight)으로 복강 주사하여 마취시킨 후, 주사기를 이용하여 심장 천자하여 혈액을 채취하였다 (그림 6). 채취한 혈액 일부를 상온에 15분 정도 방치한 후 13,000rpm에서 30초간 원심 분리하여 혈청을 분리한 후 -70℃에서 보관하였다.



그림 6. 실험 동물 마취 및 혈액 채취하는 모습

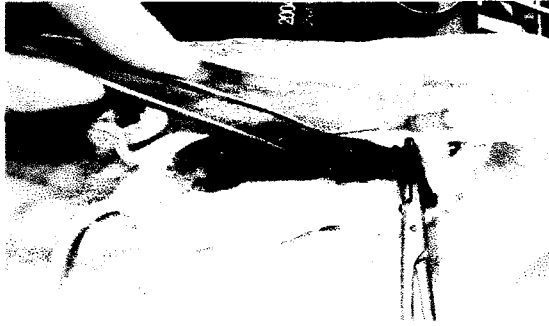


그림 7. 간문맥에 PBS 주입하는 모습

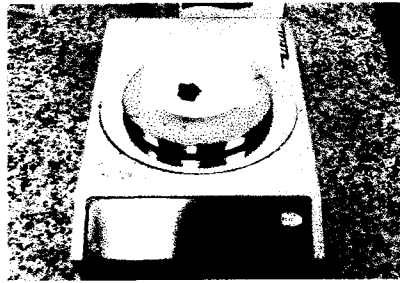


그림 8. 적출한 간과 간 무게 측정하는 모습

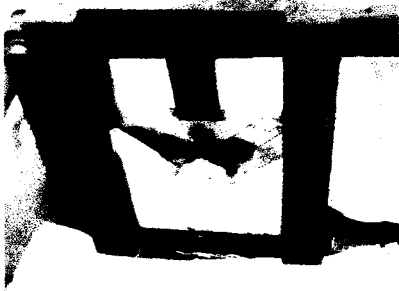


그림 9. 단두 처리 후 뇌 적출하는 모습

(2) 조직

조직은 10ml 용 주사기로 차가운 phosphate buffered-saline(PBS, pH 7.4)을 간문맥을 통하여 주입함으로써 간 조직 내의 혈액을 제거한 후, 간 조직과 이자를 적출하여 차가운 PBS에 담가 잔여혈액을 제거하였다 (그림 7, 8). 간과 이자를 적출 한 후 실험동물을 단두 처리하여 뇌를 적출하였다 (그림 9). 적출한 간, 이자, 뇌에 50mM sodium phosphate buffer 용액(PB, pH 7.4)을 10배(w/v) 가하고 균질화 한 후 초음파 세포막 분쇄기로 세포막을 파괴하였다. 이 균질액을 일정량씩 분주하여 실험에 사용하기 전까지 -70°C 에서 보관하였다.

라) 시료 분석

(1) 체중측정 및 간(liver) 무게 측정

체중은 매일 일정한 시간에 측정하였다. 간은 적출한 후 여과지로 잔여혈액과 수분을 제거한 후에 무게를 측정하였다.

(2) 혈액 생화학적 지표

Serum(혈청)의 glutamic oxaloacetic transaminase(GOT), glutamic pyruvic transaminase(GPT) 활성도는 Reitman-Frankel법을 이용한 kit(아산제약)로, γ -glutamyl transpeptidase(γ -GTP) 활성도는 5-아미노살리신산법을 이용한 kit(아산제약)로 측정하였다. serum(혈청)의 총콜레스테롤, high density lipoprotein(HDL), low density lipoprotein (LDL) 등의 지질 성분 분석은 효소법을 이용한 kit(아산제약)을 이용하여 측정하였다.

(3) 조직의 지질과산화 수준 측정

간, 뇌, 이자 조직 중의 지질과산화물 수준은 thiobarbituric acid를 이용한 Buege와 Aust의 방법(1977)을 응용하여 측정한 malondialdehyde(MDA) 함량 측정으로 산출하였다. 간단히 기술하면, 시료 100 μ l에 17.5% trichloroacetic acid(TCA)와 0.65% thiobarbituric acid(TBA)용액을 각각 300 μ l씩 첨가하여 잘 혼합하고 100 $^{\circ}$ C에서 15분간 반응시킨 후, 상온에서 냉각시킨다. 냉각시킨 시료에 70% TCA 용액 300 μ l 첨가하여 20분간 상온에 방치시키고 3,000 rpm에서 10분간 원심 분리한 상층액을 취하여 532nm에서 흡광도를 표준 곡선을 이용하여 MDA함량을 구하였다. 시료의 단백질 함량은 Bradford법(1976)으로 측정하였다. 즉, 시료 2 μ l를 취해 증류수 798 μ l와 bradford reagent 200 μ l를 가하고 15분간 반응시킨 후, 595nm에서 흡광도를 측정하고 bovine serum albumin을 이용하여 구한 standard curve에 대입하여 단백질 함량을 산출하였다.

(4) 간 조직 중의 항산화 효소 활성도 측정

Glutathione S-transferase(GST)의 활성은 Warholm등(1984)의 방법을 이용하여 측정하였다. 일정량의 간 조직 분쇄액을 9,000 \times g에서 15분간 원심 분리하고 상층액을 100,000 \times g에서 다시 1시간 원심 분리하여 얻은 상층액을 GST 분석을 위한 효소원으로 사용하였다. 반응 조성액은 다음과 같다. 0.1M sodium phosphate buffer (1mM EDTA 함유, pH 6.5) 850 μ l, 20mM GSH(증류수에 용해) 50 μ l, 20mM CDNB(95% ethanol에 용해) 50 μ l에 효소원 50 μ l를 첨가하여 실온에서 반응을 시작한 후 340nm파장에서 30초 간격으로 3분간 흡광도를 측정하고 분자흡광계수를 9.6mM $^{-1}$ cm $^{-1}$ 로 환산하여 계산하였다. 이 시료의 단백질 함량은 Bradford법(1976)으로 측정하였다.

(5) 통계처리

모든 실험 결과들은 SAS(Statistical Analysis System; SAS 1986) 프로그램을 이용하여 계산하였으며, 모든 실험군의 결과치는 평균치(mean)±표준오차(S.E)로 표기하였다. 각 군간의 평균치 통계적 유의성은 $p < 0.05$ 수준에서 LSD(Least Significant Difference)에 의해 검정하였다.

3. 연구결과

가. 각종 항산화활성 검정법을 비교 검토하여 고 항산화활성 버섯류 선발

1) 항산화 활성 유전자원 평가

80개의 수집·교배된 버섯계통은 SOD, POD, DPPH 및 TBA에 의해 항산화 활성을 평가 및 선발 하였고, 선발된 버섯 계통에 대하여는 ESR에 의한 항산화활성 검정을 실시하였다. 전체적으로 DPPH와 TBA에 의한 항산화 검정이 SOD와 POD에 의한 검정방법보다 높은 항산화 능력을 나타내었으며, 4개의 검정방법에 의한 평균 항산화 활성은 포토벨라 계통이 평균 30.95%로 가장 높은 억제율을 보였으며, F-J(28.5%) > 24012(26.86%) > 24010(26.27%) > 24008(26.02%) 순으로 높은 항산화 활성을 보였다. 각각의 검정 방법에 따라서는, SOD 활성검정은 포토벨라(26.83%) > M-2(21.1%) > 새송이(20.93%) > 23(19) (20.26%) > M-1(20.28%) 순으로 높은 활성을 보였으며, M-16을 포함한 19계통에서는 항산화 활성이 낮아 대조구와 비교해서 억제율이 없는 것으로 나타났다. POD 활성 검정에서는 74007(30.09%)이 가장 높은 억제율을 보였으며, 9010(18.75%) > 17001(14.93%) > 17003(13.22%) > 9006 (12.99%) 순으로 높은 활성을 보였다. 특히 POD검정에서는 170-1을 포함한 54개 계통에서 대조구에 대해 억제율이 없는 것으로 나타났다.

DPPH에 의한 자유 radical의 소거능력을 보는 실험에서는 F-J(80.51%)이 가장 높은 활성을 보였으며, 9010(64.38%) > 9006(59.17%) > DE-E(57.56%) > 9009(53.49%) 순으로 억제율이 높았고, 이 계통들을 포함한 총19개 계통에서는 40%이상의 높은 억제율을 보인 반면, 74013을 포함한 15계통에서는 10%이하의 낮은 억제율을 보였다. 또한 TBA에 의한 지질 과산화물을 보는 실험에서는 새송이(67.5%) > 23(19) (67.38%) > 5019(65.54%) > 17016(56.83%) > VI(56.73%) 순으로 높은 억제율을 보였으며, 9025를 포함한 10계통에서는 10%이하의 낮은 억제율을 보였다.

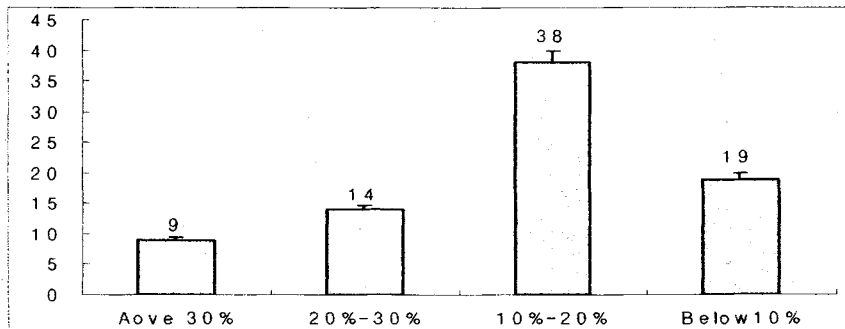


그림 10. SOD, POD, DPPH 및 TBA에 의한 80개의 수집·교배된 버섯계통의 분포

표 5. 고 항산화 버섯 항산화 실험결과

Strain No.	SOD	POD	DPPH	TBA	평균억제율	수율(%)
		-inhibition(%)-				
1	11.26	-	4.17	49.90	16.33	-
2	10.63	-	7.74	56.73	18.77	-
3	18.83	-	2.85	41.04	15.68	-
4	26.83	-	40.35	56.63	30.95	-
5	20.26	-	4.93	67.38	23.14	-
6	14.38	-	14.42	56.83	21.41	-
7	20.93	-	11.19	67.50	24.90	-
8	2.86	-	18.27	46.01	16.78	-
9	8.7	-	28.18	50.29	21.79	-
10	11.30	-	44.58	51.56	26.86	-
11	9.35	-	42.18	52.57	26.02	-
12	11.17	-	53.04	37.16	25.34	-
13	10.34	-	28.91	35.61	18.72	-
14	18.13	-	23.85	46.56	22.13	-
15	16.58	-	46.41	38.14	25.28	-
16	11.98	-	23.01	32.51	16.88	-
17	11.63	-	28.88	14.88	13.85	-
18	6.75	-	22.82	52.18	20.44	-
19	1.65	-	25.79	52.21	19.91	-
20	10.41	-	43.02	51.66	26.27	-
21	5.72	-	32.68	65.54	25.99	-
22	1.02	5.39	21.25	20.58	12.75	2.27
23	1.82	4.14	36.45	35.62	19.83	3.31
24	-	-	38.03	32.19	17.90	3.94
25	4.26	-	25.65	16.49	11.60	3.95
26	4.22	-	27.28	26.17	14.42	5.45
27	1.27	-	34.92	32.25	17.94	4.93
28	1.05	6.9	29.58	29.18	17.21	5.51
29	3.34	0.38	31.26	25.99	16.33	4.31
30	-	6.62	31.61	28.94	16.91	4.94
31	4.79	6.67	29.70	22.62	15.95	4.40
32	6.52	-	32.74	20.64	14.98	5.77
33	2.87	10.58	35.25	22.86	18.21	4.30
34	-	-	29.78	20.04	12.85	5.19

Strain No.	SOD	POD	DPPH	TBA	평균억제율	수율(%)
-inhibition(%)-						
35	-	-	28.72	27.62	14.21	4.09
36	-	-	35.44	10.77	11.60	4.03
37	-	0.68	38.33	35.26	18.74	5.02
38	0.87	0.25	30.79	25.15	15.01	5.38
39	-	-	39.64	29.66	17.79	6.02
40	2.33	-	29.92	37.49	17.93	2.06
41	6.46	-	25.21	34.36	16.79	6.04
42	-	-	44.52	28.82	18.73	5.85
43	-	-	26.88	24.79	14.53	7.32
44	-	-	10.65	10.26	5.56	12.82
45	15.43	-	24.57	12.22	13.05	11.79
46	14.31	14.93	29.48	27.34	21.52	6.03
47	12.95	13.22	34.91	27.94	22.25	6.46
48	4.36	7.32	32.55	26.57	17.70	4.61
49	5.64	12.5	31.89	26.39	19.11	3.87
50	1.64	-	28.73	25.56	15.18	4.19
51	-	-	38.68	21.78	15.62	5.56
52	2.1	-	37.70	27.05	17.91	5.84
53	-	-	45.09	22.72	17.18	6.18
54	-	-	22.84	20.11	10.74	6.4
55	6.22	3.02	29.83	17.99	15.55	10.58
56	5.41	30.09	33.53	16.79	21.46	10.64
57	0.04	-	13.30	15.22	7.99	8.19
58	3.03	-	10.85	7.28	5.29	7.07
59	3.39	7.14	36.66	16.19	15.84	8.92
60	6.66	-	11.27	17.51	10.30	7.91
61	4.27	-	7.75	15.10	8.37	16.83
62	5.12	12.19	59.17	8.54	21.56	7.26
63	6.97	-	53.49	15.30	19.63	5.92
64	2.92	18.75	64.38	-	22.00	5.34
65	3.6	-	44.09	11.98	15.44	7.54
66	-	3.41	41.95	0.18	13.64	6.89
67	3.33	6.67	35.01	-	11.25	6.85
68	11.87	-	46.95	24.79	20.90	6.91

Strain No.	SOD	POD	DPPH	TBA	평균억제율	수율(%)
			-inhibition(%)-			
69	5.44	7.27	34.38	10.02	14.92	5.72
70	0.28	2.92	34.38	9.43	12.42	6.23
71	0.67	-	37.56	29.18	21.85	6.08
72	0.59	-	46.49	18.56	16.52	15.12
73	-	-	80.51	32.15	28.50	9.93
74	-	4.35	39.55	29.60	19.12	7.20
75	-	8.07	44.76	25.80	19.66	4.55
76	20.08	-	30.04	3.44	13.74	7.51
77	11.11	-	14.00	-	8.78	7.58
78	12.71	-	11.74	-	6.73	8.18
79	-	-	49.80	24.44	19.02	5.07
80	-	1.61	25.41	-	6.90	5.09
LSD	6.90	15.67	7.08	10.41	2.96	0.41

표 6. 수집·교배된 버섯계통에 따른 항산화 활성

	SOD	POD	DPPH	TBA	Mean
			----- Inhibition (%) -----		
<i>Pholiota spp.</i> collected strains	10.67	-	34.22	42.94	21.96
<i>Fomitella fraxinea</i> mated dikaryons	1.86	1.89	31.95	26.70	15.60
<i>Inonotus obliquus</i> collected strains	4.94	4.47	19.82	14.28	10.88
<i>Fomitella fraxinea</i> collected strains	5.54	4.80	31.63	28.23	17.55
<i>Grifola frondosa</i> collected strains	4.39	5.69	45.98	8.92	16.24
Other collected strains	9.58	0.78	29.00	34.11	18.37
Mean	5.28	2.52	27.51	22.17	14.37
LSD(0.05)	3.52	1.50	3.46	4.48	7.87

2) 선발된 계통의 ESR 측정

SOD, POD, DPPH 및 TBA에 의한 실험결과를 바탕으로 각각 항산화 활성이 높고 낮은 5계통씩 선발하여 ESR을 이용한 항산화 활성을 비교하였다.

항산화 활성이 높은 그룹은 ASI *Agaricus brunnescens*, ASI F-J, ASI 24012, ASI 24010 and ASI 24008 이었고 낮은 그룹은 ASI 740 (C), ASI 74009, ASI M-9, and ASI

M-16 and ASI 74013 이었다. 선발된 계통 중 항산화활성이 높은 그룹은 대조구에 비해 signal intensity (0.25 times)가 낮게 보였고, 특히 ASI 24010 계통은 가장 낮은 signal intensity (0.12 times)를 보였다. 또한 항산화 활성이 낮은 그룹은 평균 signal intensity가 0.83 times 이었으며, 특히 ASI 740 (C) 는 가장 큰 signal intensity (1.26 times)를 보였다 (그림 11).

ESR spectra에 있어, 신호 강도(signal intensity)는 항산화 활성이 정도를 의미하는 것으로서, peak의 신호가 낮다는 것은 대조구에 비해 높은 항산화 활성을 갖고 있다는 것을 의미한다. 특히 ESR은 추출된 시료의 색소나 기타 다른 물질들에 의한 간섭효과를 배제하는 방법으로서 본 실험에서 선발된 버섯계통이 항산화 활성이 높다는 것을 의미하는 것으로 SOD, POD DPPH 및 TBA에 의한 선발 방법의 타당성을 입증 하게 되는 것이다. 또한, ESR에 의한 결과는 DPPH ($r^2 = -0.58^{**}$) 와 TBA ($r^2 = -0.44^*$)의 결과와 상관관계를 보였다. 특히 본 실험에서 SOD 와 POD의 결과와는 유의적인 상관을 보이지 않았지만, ESR의 측정이 SOD의 활성을 측정하는 실험이므로 앞으로 이들 실험과의 상관에 대한 관찰이 요구 되어진다.

표 7. 선발된 버섯 계통의 ESR에 의한 항산화 활성

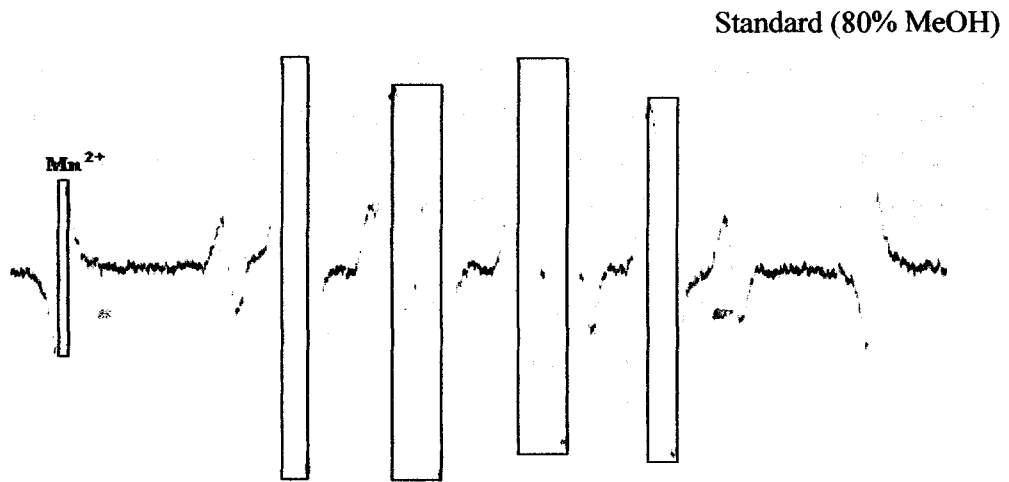
Highergroup	RSI ^a (times) ^b	Lowergroup	RSI (times)
ASI <i>Agaricus brunnescens</i>	0.58	ASI 740(C)	1.26
ASI F-J	0.22	ASI 74009	1.05
ASI 24012	0.15	ASI M-9	0.69
ASI 24010	0.12	ASI M-16	0.20
ASI 24008	0.14	ASI 74013	1.05
Mean	0.25	Mean	0.83

a: relative signal peak intensity of samples against peak of Mn²⁺ used as a standard (80 % MeOH)

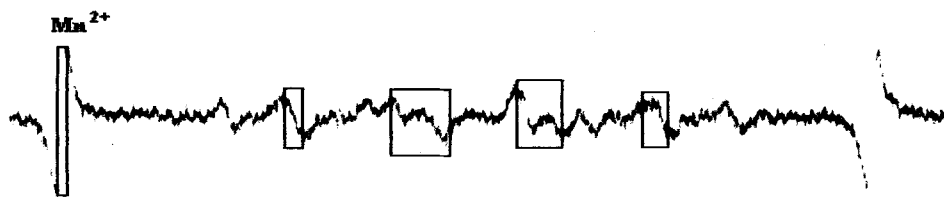
b: (1) = same peak height compared to Mn²⁺ signal intensity of standard

b: (below 1) = weaker signal intensity than Mn²⁺ signal intensity of standard

b: (over 1) = stronger signal intensity than Mn²⁺ signal intensity of standard



Higher group (ASI 24010)



Lower group [ASI 740 (C)]

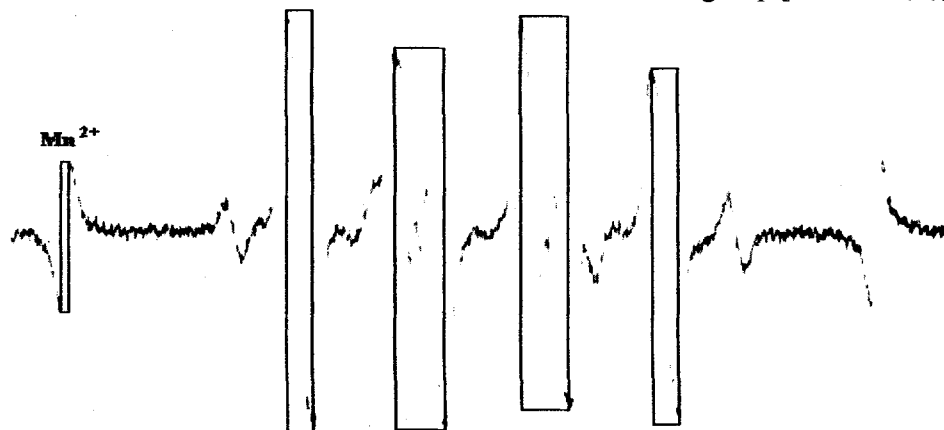


그림 11. 선발된 버섯 계통의 ESR spectra

나. 항산화활성 물질 추출 및 분리 · 정제된 활성물질인 항산화제의 구조결정

1) 물질 분리 및 동정

비늘버섯(*Pholiota adiposa*) 0.3Kg을 이용한 물질의 분리에서 사용된 용매는 Hexane, EtOAc, MeOH로서 점차 극성이 높아지도록 사용하였다. Silica gel column chromatography에서 분리된 물질은 총 7가지였으며, 분리된 물질은 prep TLC와 ODS column chromatography를 이용하여 정제되었다 (그림 12).

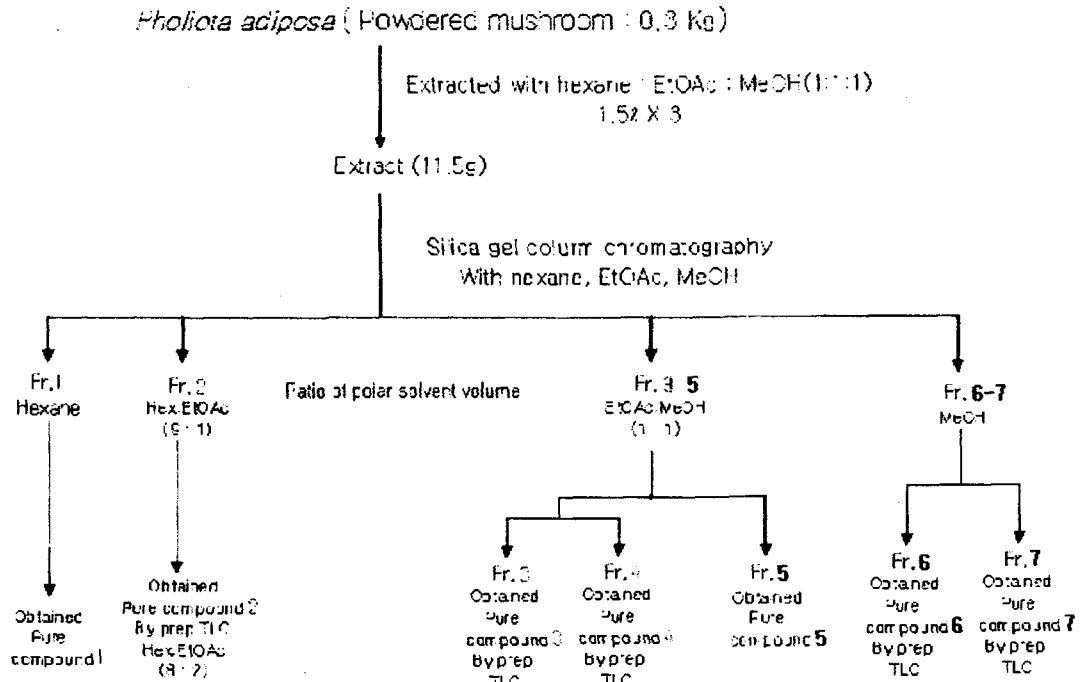


그림 12. 버섯을 물질 분리 모식도

가) 1-Linoleic-2-olein

Compound 1은 용매조건이 n-hexane인 fraction 1 에서 분리되어졌다 (그림 12). 분리되어진 compound는 TLC 후에 methylene chloride와 methanol을 이용하여 Silica gel column chromatogram에서 정제하였다. Compound 1은 노란색의 물질로 20mg이 수집되었고 (그림 14), Rf 값은 0.73(Hex:EtOAc=8:2)이었다. 또한 EI/MS 결과 peak는 618[m/z]에서 나타났다(그림). 그리고 FAB/MS 결과에서는 [M+H]⁺이온 peak는 619에서 나타났다 (그림 15). 이 결과들에서 compound 1의 분자량은 619로 결정되었다. IR 분석결과 3492, 2926, 1744, 1461, 1164, 724 cm⁻¹에서 밴드가 나타났고, 이것들은 hydroxyl, ketone, double bonds group을 나타내었다 (그림 16). ¹H-NMR에서는 δ 5.33 (multiplet), vinylic proton을 나타내는 δ 5.30(t, J=1.5Hz), δ 4.30 과 δ 4.28(J=4.2), δ 4.15와 4.13(J=5.9Hz)가 나타났다 (그림 17). ¹³C NMR에서 탄소를 나타내는 39개의 signal이 관찰되었으며, δ 196.29에서 나타난 signal은 두 개의 carbonyl group을 나타내었다. δ 131.02-128.06에서 관찰된 signal은 이중결합을 나타내었고, δ 76.97, 69.06, 62.26에서 나타난 signal은 산소와 결합된 hydroxyl carbon, methylene carbon을 나타낸다. δ 38.90-22.84에서 나타난 signal은 다른 여러 탄소를 의미하였다 (그림 18). 이 결과들을 종합하여 compound 1은 1-Linoleic-2-olein으로 동정되었다 (그림 13).

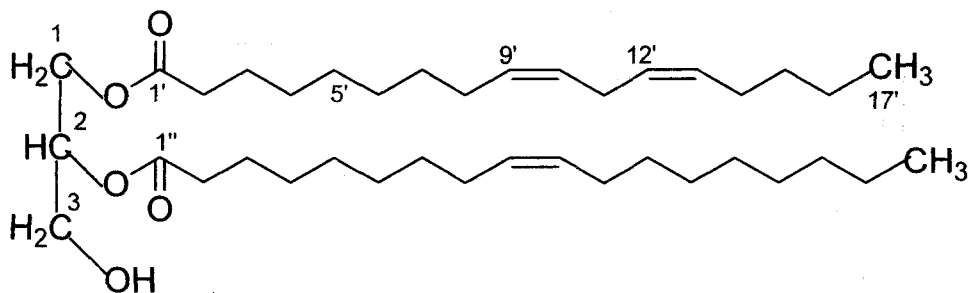


그림 13. 1-Linoleic-2-olein의 구조식

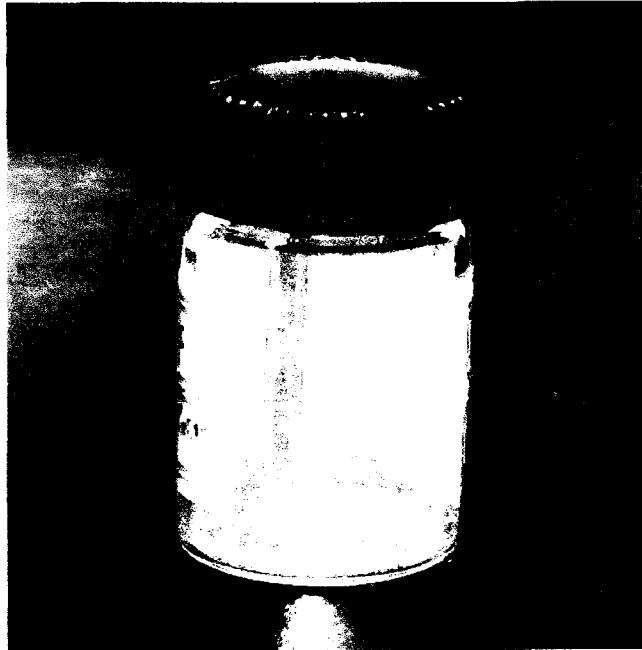


그림 14. 1-Linoleic-2-olein의 결정체

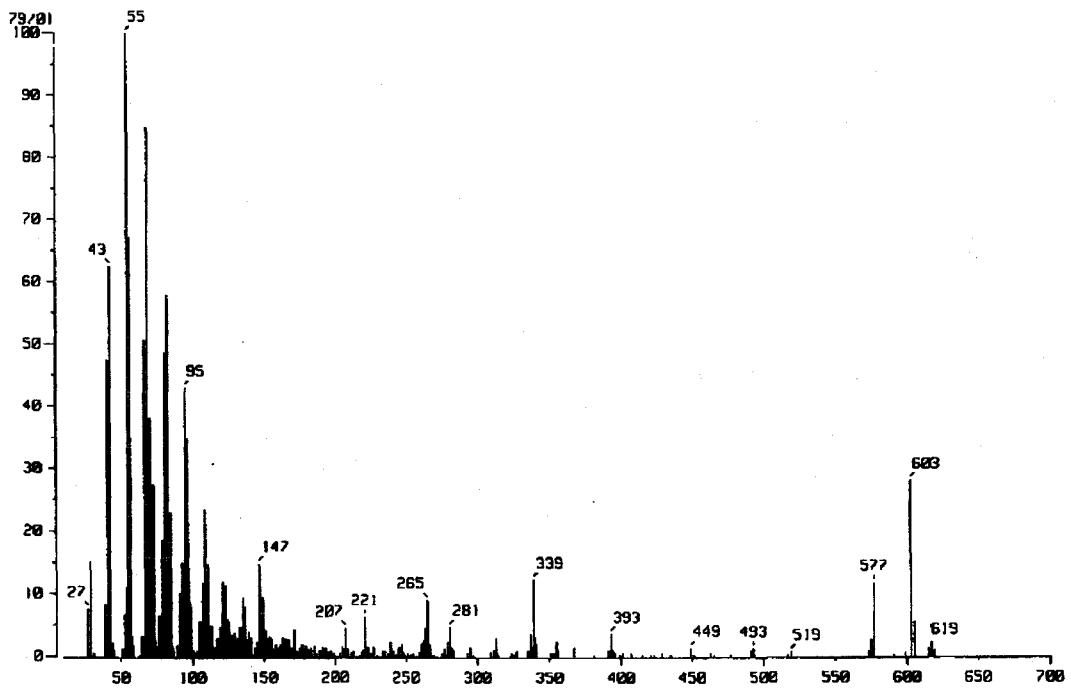


그림 15. 1-Linoleic-2-olein의 MS spectrum

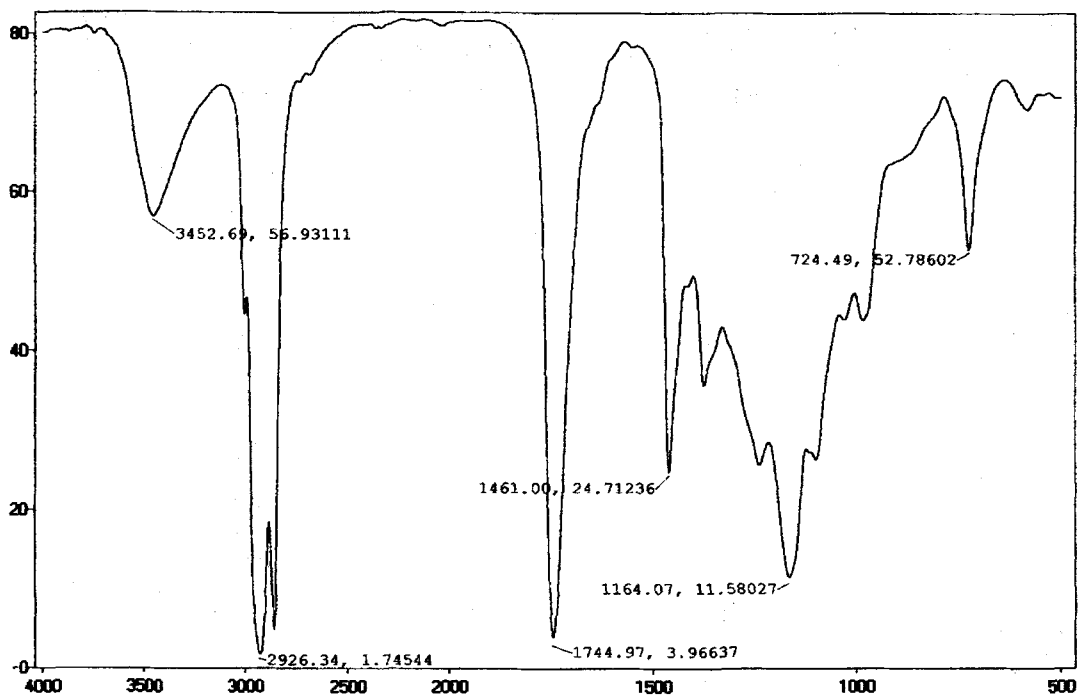


그림 16. 1-Linoleic-2-olein의 IR spectrum

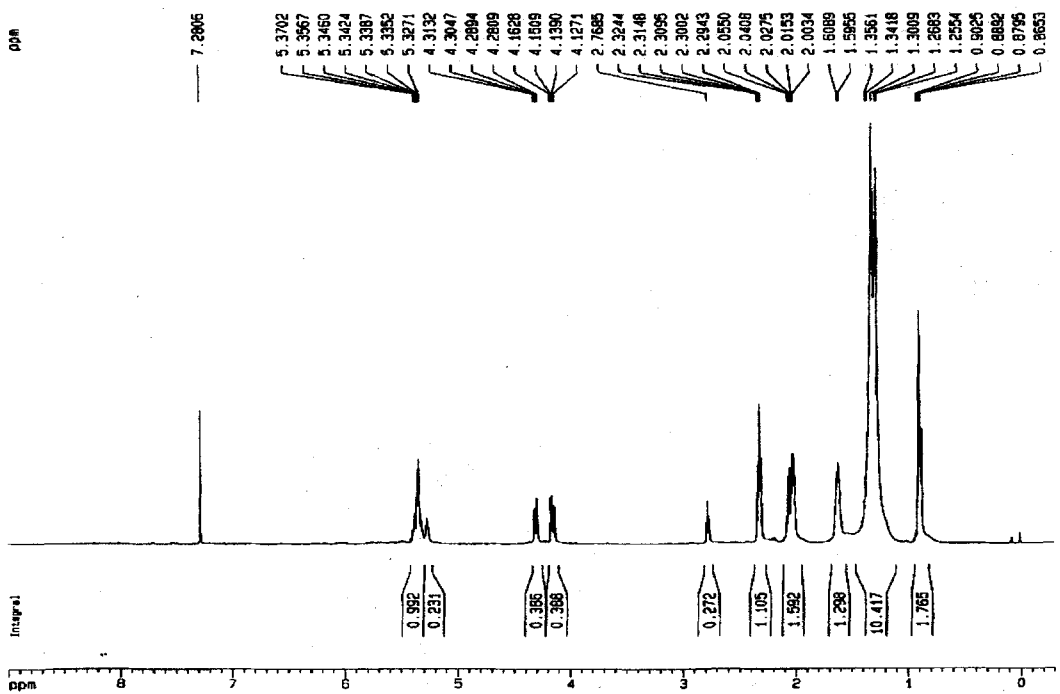


그림 17. 1-Linoleic-2-olein의 ¹H-NMR spectrum

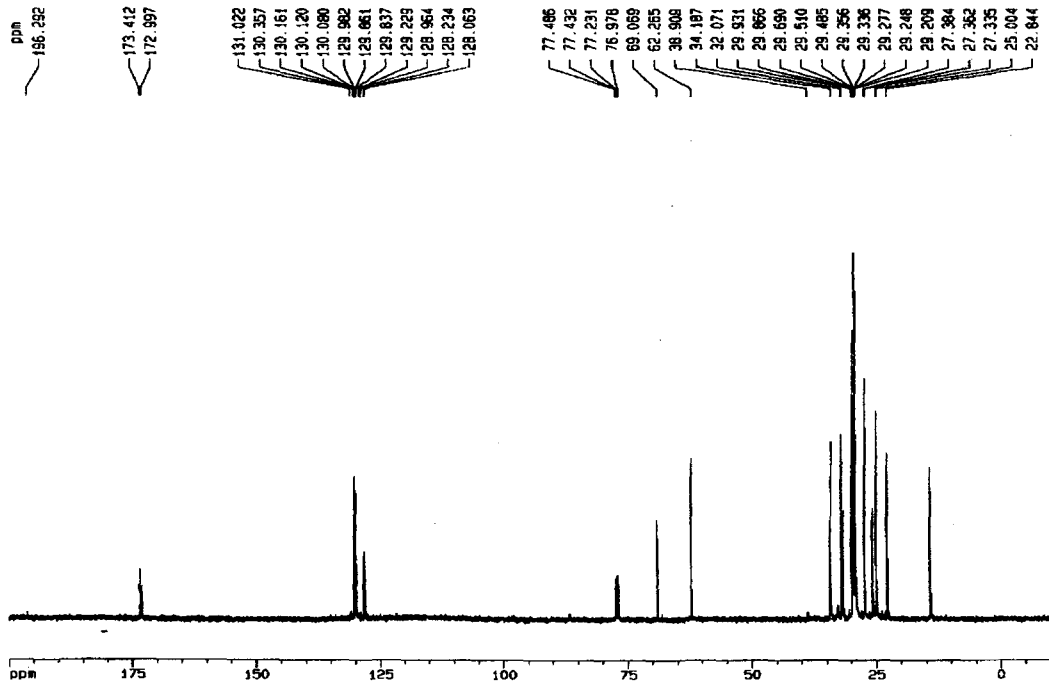


그림 18. 1-Linoleic-2-olein의 ^{13}C -NMR spectrum

나) Stigmasterol

Compound 2는 용매조건이 hexane:EtOAc=9:1인 fraction 2에서 분리되었으며 (그림 12), 색이 없는 needle shaped crystal 형태를 가지고 있었으며 (그림 20), 분리되어진 총량은 50mg였고, Rf 값은 0.38(CHCl_3 :MeOH=9.5:0.5)였다. 또한 compound 2의 분자량은 MS 결과 412[M] $^+$ 으로 결정되었다 (그림 21). IR spectrum에서 3,430, 1,653, 1,459, 1,373, 1,035 cm^{-1} 에서 밴드가 나타났으며, 3,430 cm^{-1} 에서 hydroxyl group이 나타났다 (그림 22). compound 2의 IR, ^1H , ^{13}C NMR 결과 이 compound 2는 stigmasterol로 동정되었다 (그림 23, 24, 19).

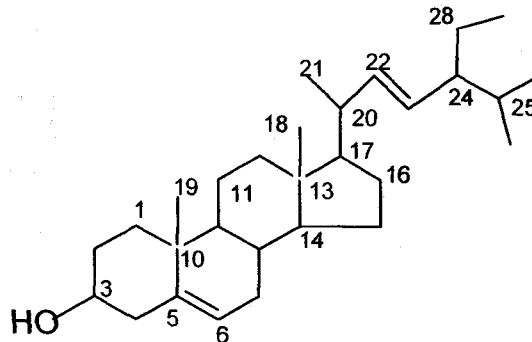


그림 19. Stigmasterol의 구조식

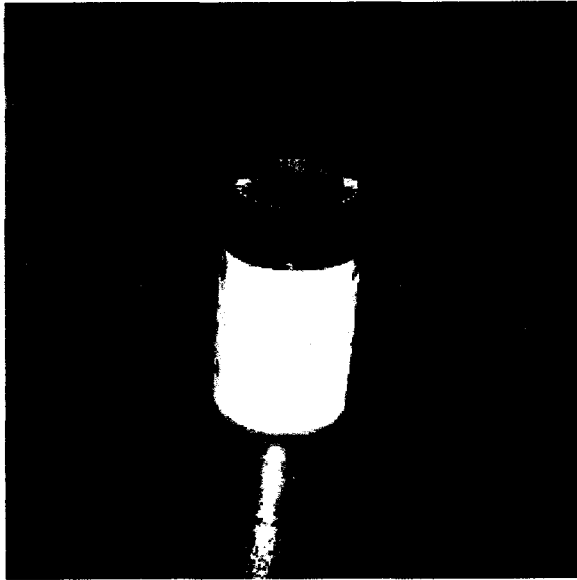


그림 20. Stigmasterol의 결정체

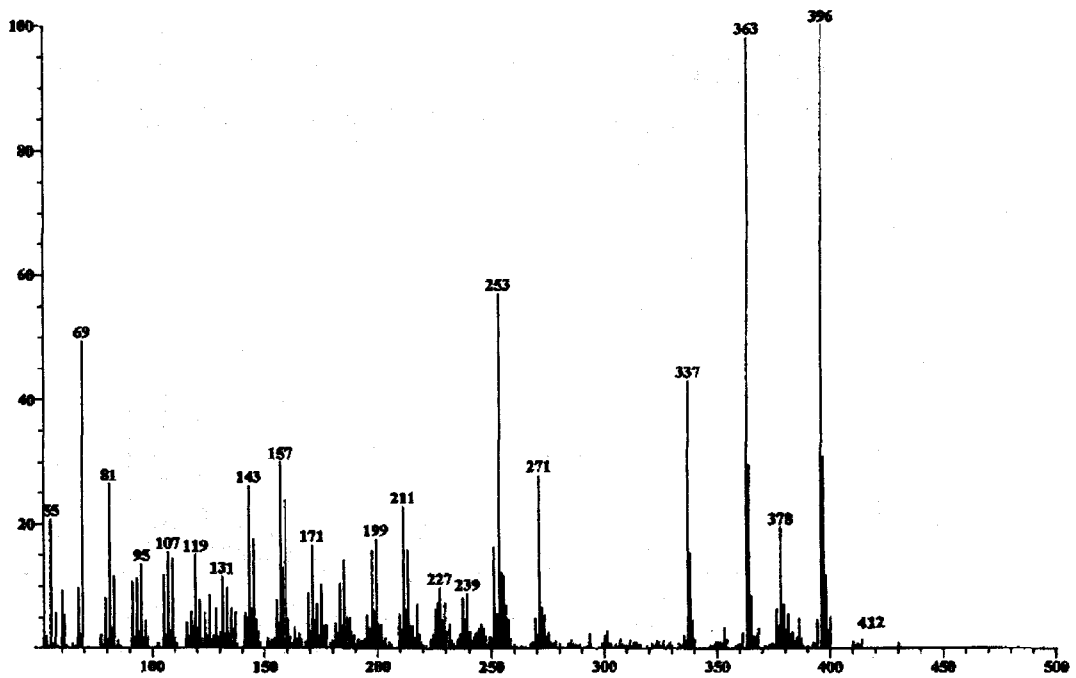


그림 21. Stigmasterol의 MS spectrum

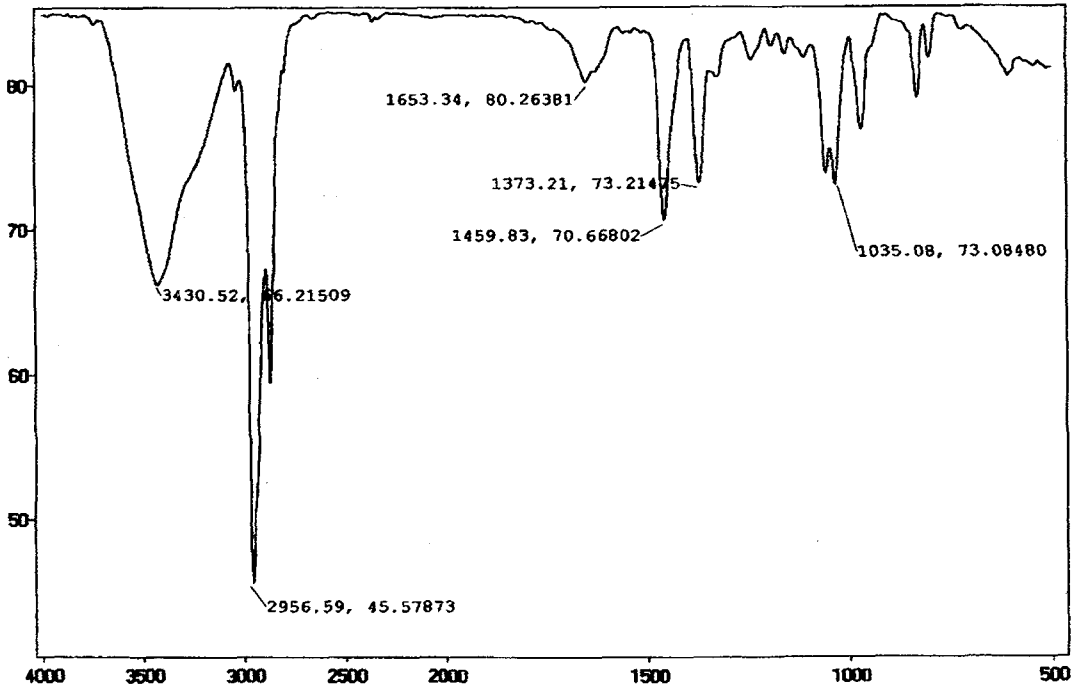


그림 22. Stigmasterol의 IR spectrum

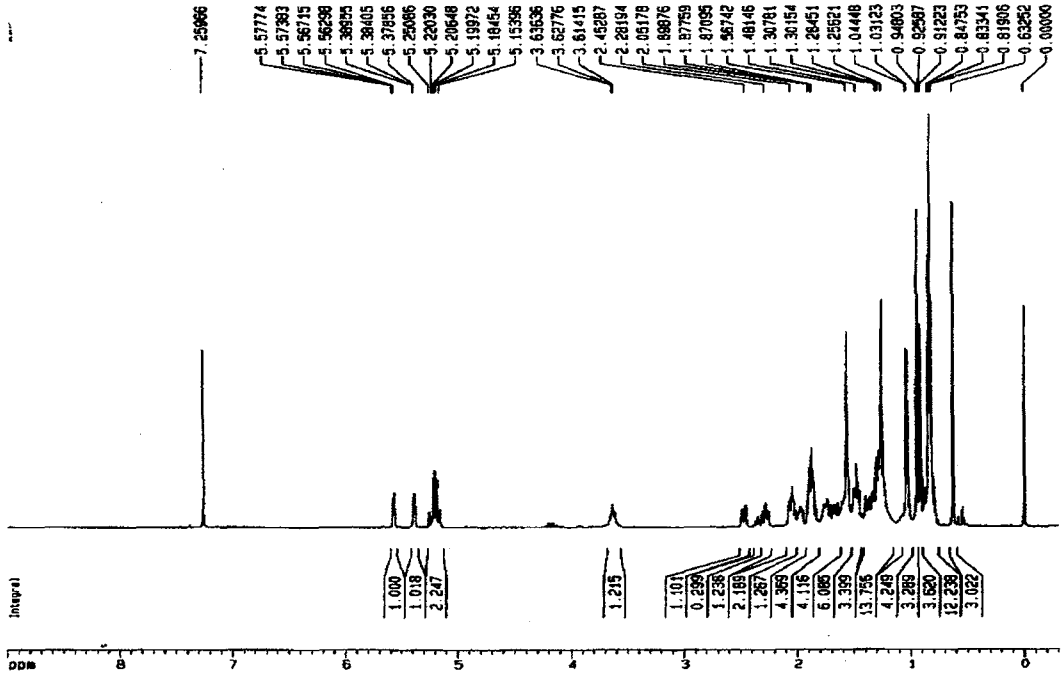


그림 23. Stigmasterol의 ¹H NMR spectrum

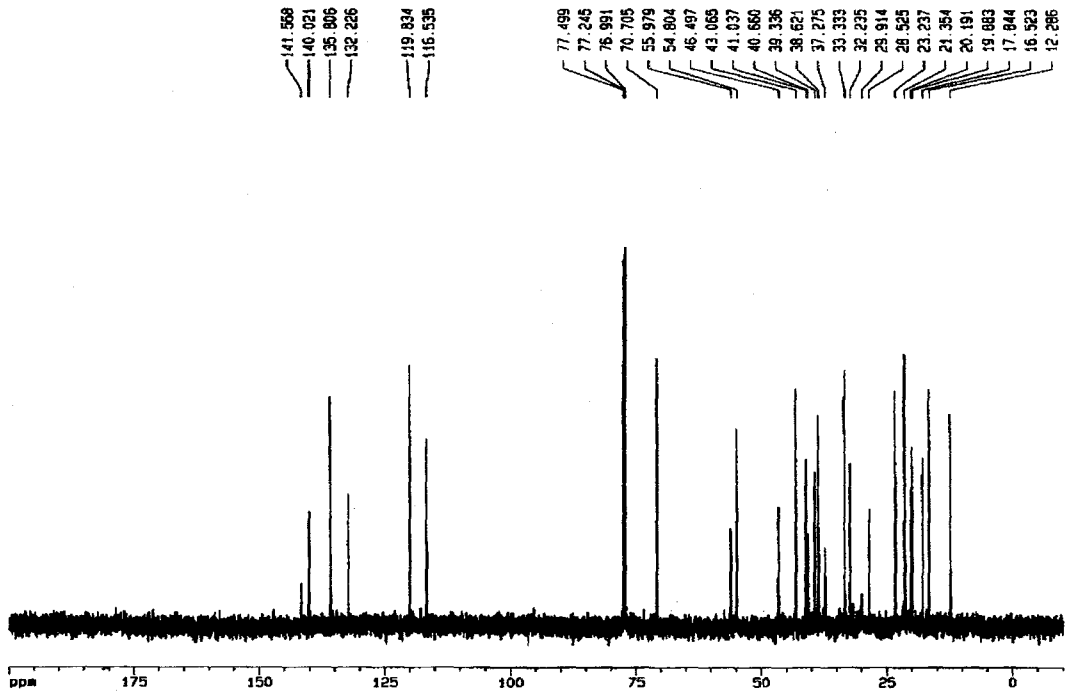


그림 24. Stigmasterol의 ^{13}C NMR spectrum

다) 1,4-gluco-pyranosyl-1', 4'-gluco-pyranosyl-1'', 4''-gluco-pyranoside

Compound 3은 용매조건이 EtOAc:MeOH=1:1인 fraction 3에서 분리되어졌다 (그림 12). 분리되어진 물질은 Lichroprep RP-18(ODS silica gel)을 이용하여 정제 하였다.

Compound 3은 노란색 액상물질로 50mg이 분리되어졌다 (그림 26). EI/MS 결과 504[m/z]에서 peak가 나타났으며 (그림 27), FAB/MS에서는 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 이온 peak는 505[m/z]에서 나타났다. 이 결과들에서 compound 3은 분자량은 504로 결정되었다. compound 3의 IR spectrum에서 밴드는 3,492, 2,926, 1,744, 1,461, 1,164, 724 cm^{-1} 에서 나타났으며, 이것은 hydroxyl, ketone, double bonds group을 나타내었다 (그림 28). ^1H NMR결과에서는 δ 5.33 (multiplet), δ 5.30 (t, $J=1.5\text{Hz}$), δ 4.30과 4.28($J=4.2$), δ 4.15와 δ 4.13 ($J=5.9\text{Hz}$)에서 vinylic proton들이 나타났다. 그리고 δ 0.88 ($J=6.6\text{Hz}$)에서 두 개의 methyl기를 나타내는 하나의 proton triplet이 나타났다. 또한 δ 2.70-1.26에서 나타난 나머지 signal들은 methylene과 methane proton들을 나타내었다 (그림 29). ^{13}C NMR 결과에서 39개의 carbon이 나타났으며, δ 196.29에서 나타난 signal은 두개의 carbonyl group을 의미하였다. 또한, δ 131.02-128.06에서 나타난 signal은 이중결합을 의미하였고, δ 76.97, 69.06, 62.26에서는 산소와 결합된 hydroxyl carbon, methylene carbon을 의미하였다. δ 38.90-22.84에서 나머지 carbon들이 나타났다 (그림 30). 이 결과들을 종합하여 compound 3은 1, 4-gluco-pyranosyl-1', 4'-gluco-pyranosyl-1'', 4''-gluco-pyranoside로 동정되었다 (그림 25).

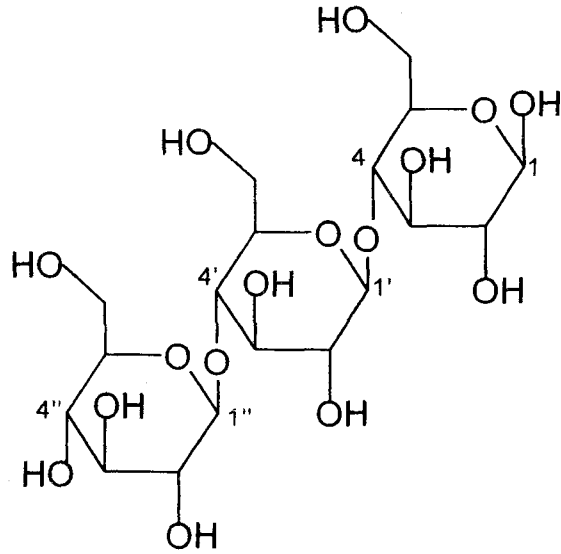


그림 25. 1, 4-gluco-pyranosyl-1', 4'-gluco-pyranosyl-1'', 4''-gluco-pyranoside의 구조식

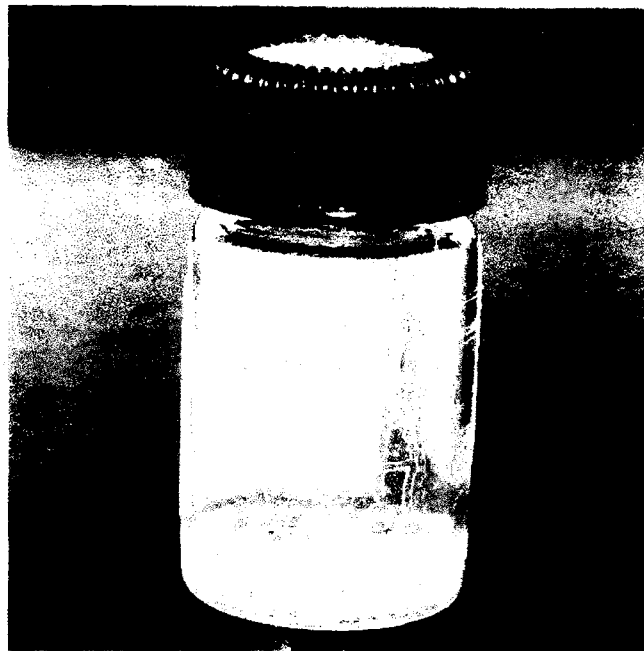


그림 26. 1,4-gluco-pyranosyl-1', 4'-gluco-pyranosyl-1'', 4''-gluco-pyranoside의 결정체

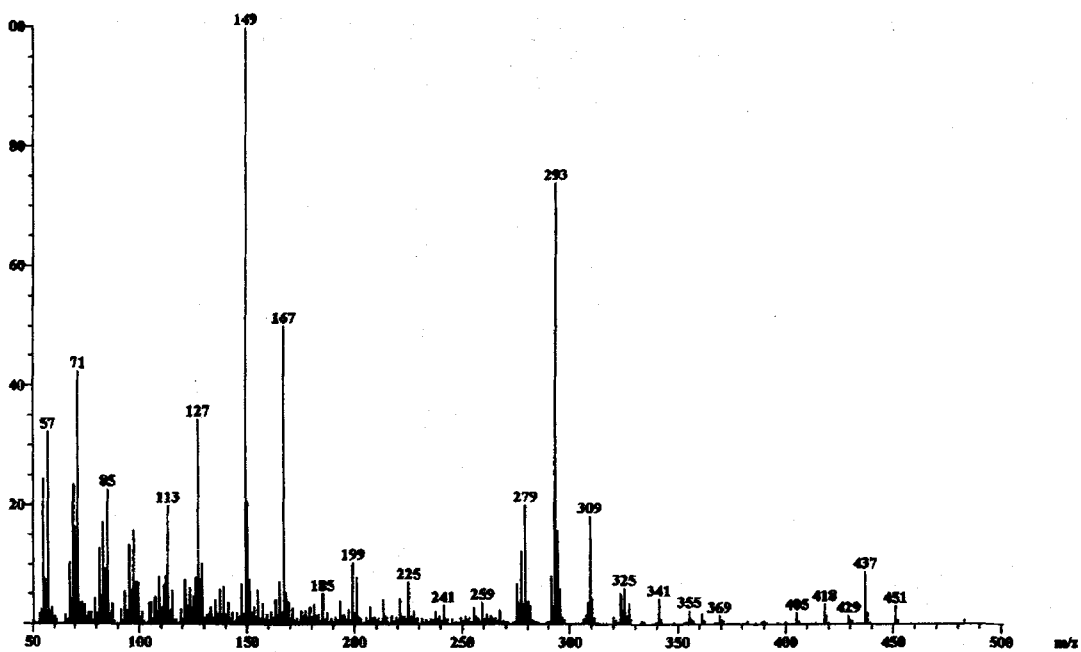


그림 27. 1, 4-gluco-1', 4''-glucopyranoside의 MS spectrum

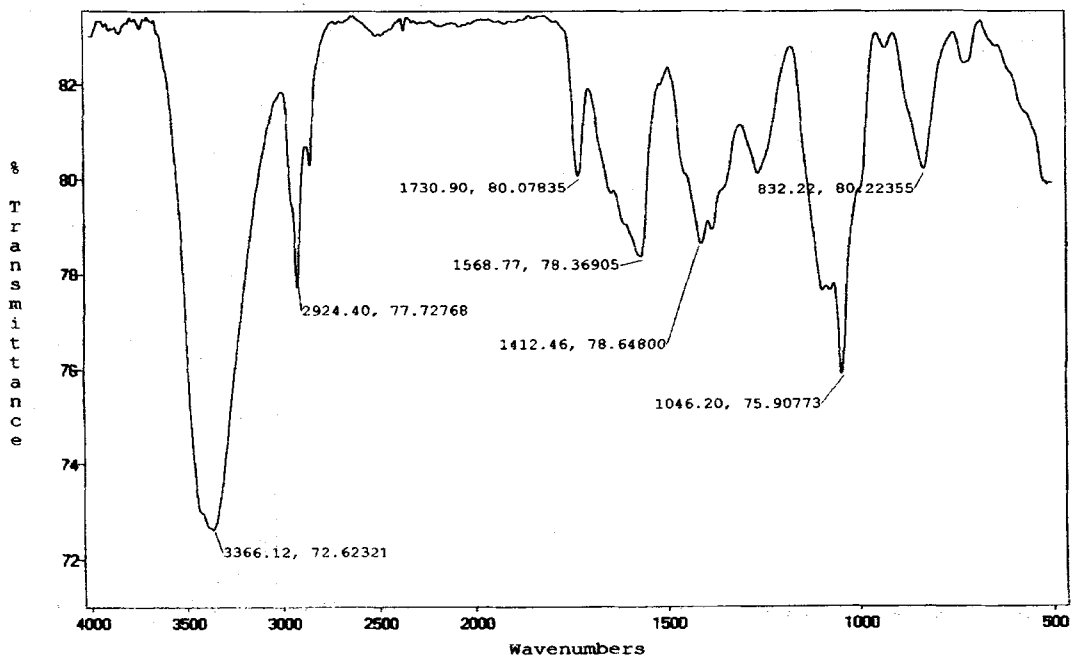


그림 28. 1,4-gluco-1', 4''-glucopyranoside의 IR spectrum

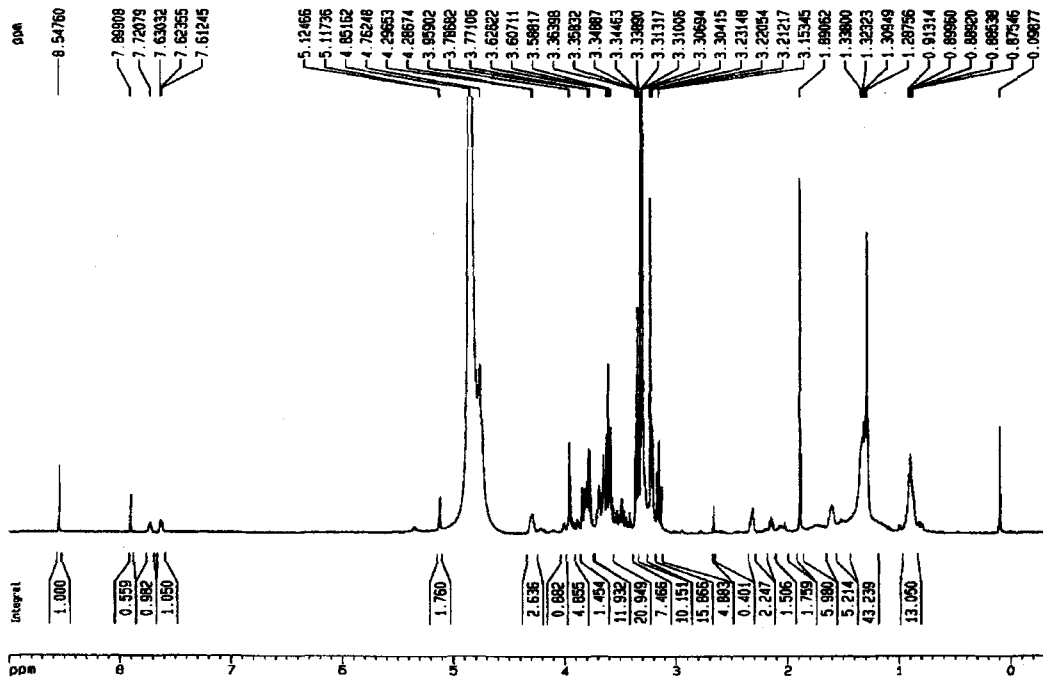


그림 29. 1,4-glucopyranosyl-1',4'-glucopyranosyl-1'',4''-glucopyranoside의 ^1H NMR spectrum

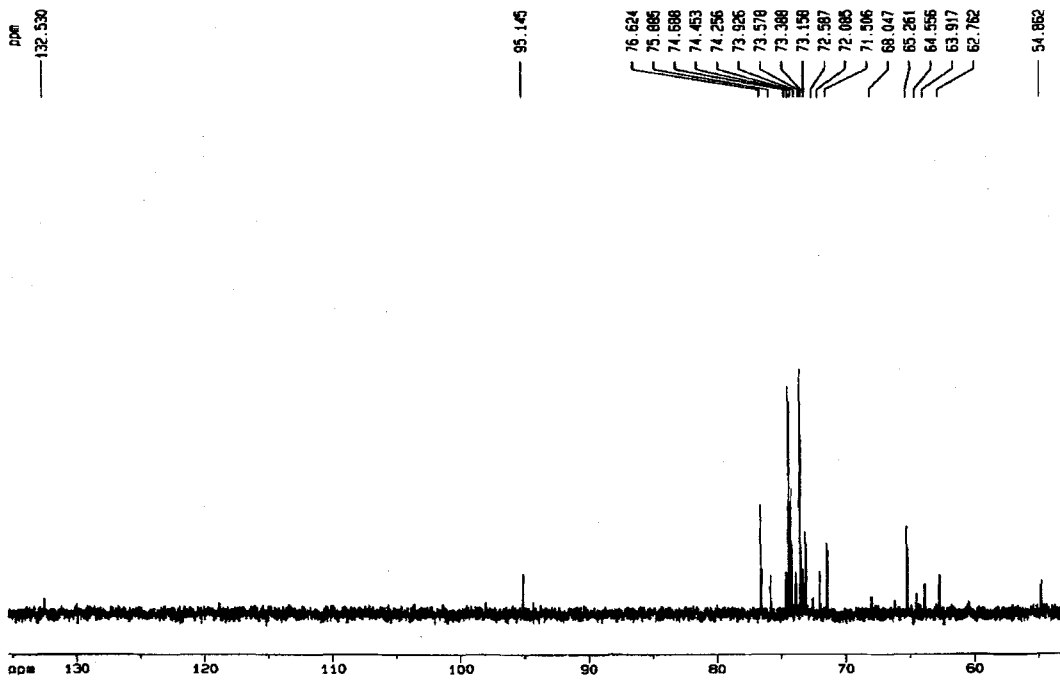


그림 30. 1,4-glucopyranosyl-1',4'-glucopyranosyl-1'',4''-glucopyranoside의 ^{13}C NMR spectrum

라) 2', 3'-diphosphoryl-1'-propanoxy-β-D-glucopyranoside

Compound 4는 용매조건이 EtOAc:MeOH=1:1인 fraction 4에서 분리되어졌다 (그림 12). 분리되어진 물질은 Lichrorep RP-18(ODS silica gel)을 이용하여 정제 하였다.

Compound 4은 노란색의 점성 큰 물질로 20mg이 분리 되어졌다 (그림 32). EI/MS 결과 414[m/z]에서 peak가 나타났으며 (그림 33), FAB/MS에서는 [M+H]⁺이온 peak는 415[m/z]에서 나타났다. 이 결과들에서 compound 3은 분자량은 414로 결정되었다. IR spectrum에서 밴드는 3,492, 2,926, 1,744, 1,461, 1,164, 724 cm⁻¹에서 나타났으며, 이것은 hydroxyl, ketone, double bonds를 나타내었다 (그림 34). ¹H NMR spectrum에서는 δ 5.33 (multiplet), δ 5.30 (t, J=1.5Hz), δ 4.30과 4.28(J=4.2), δ 4.15와 δ 4.13 (J=5.9Hz)에서 vinylic proton들이 나타났다. 그리고 δ 0.88 (J=6.6Hz)에서 두 개의 methyl기를 나타내는 하나의 proton triplet이 나타났다. 또한 δ 2.70-1.26에서 나타난 나머지 signal들은 methylene과 methane proton들을 나타내었다 (그림 35). ¹³C NMR spectrum에서 39개의 carbon이 나타났으며, δ 196.29에서 나타난 signal은 두개의 carbonyl group을 의미하였다. 또한, δ 131.02-128.06에서 나타난 signal은 이중결합을 의미하였고, δ 76.97, 69.06, 62.26에서는 산소와 결합된 hydroxyl carbon, methylene carbon을 의미하였다. δ 38.90-22.84에서 나머지 carbon들이 나타났다 (그림 36). 이 결과들을 종합하여 compound 4는 2',3'-diphosphoryl-1'-propanoxy-β-D-glucopyranoside 로 동정되었다 (그림 31).

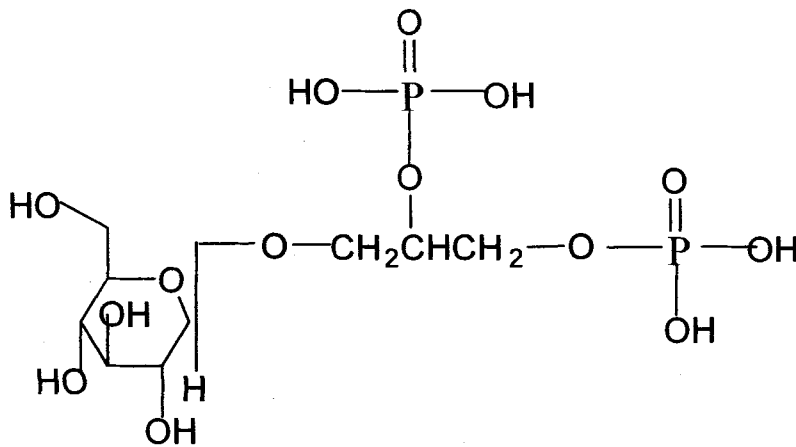


그림 31. 2', 3'-diphosphoryl-1'-propanoxy-β-D-glucopyranoside의 구조식



그림 32. 2',3'-diphosphoryl-1'-propanoxy- β -D-glucopyranoside의 결정체

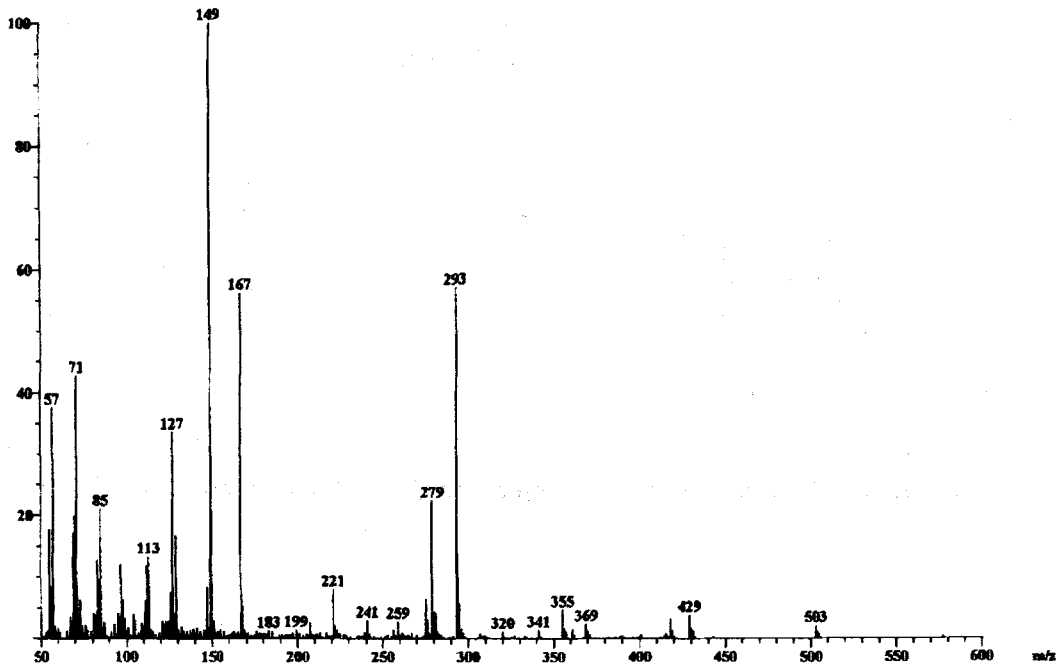


그림 33. 2', 3'-diphosphoryl-1'-propanoxy β -D-glucopyranoside의 MS spectrum

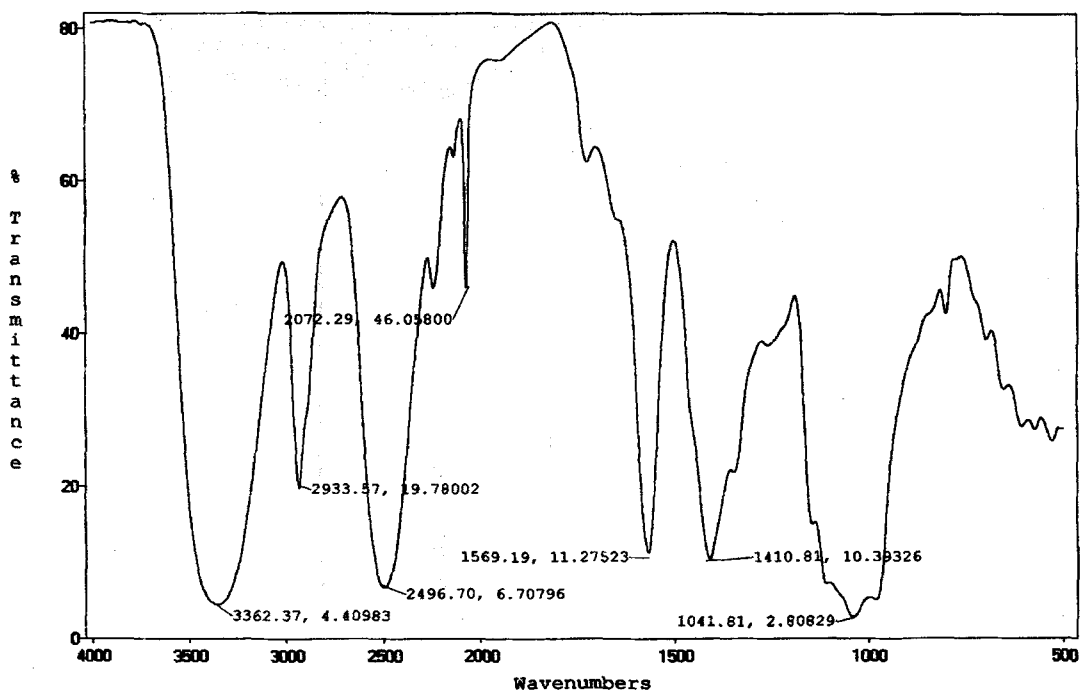


그림 34. 2', 3'-diphosphoryl-1'-propanoxy- β -D-glucopyranoside의 IR spectrum

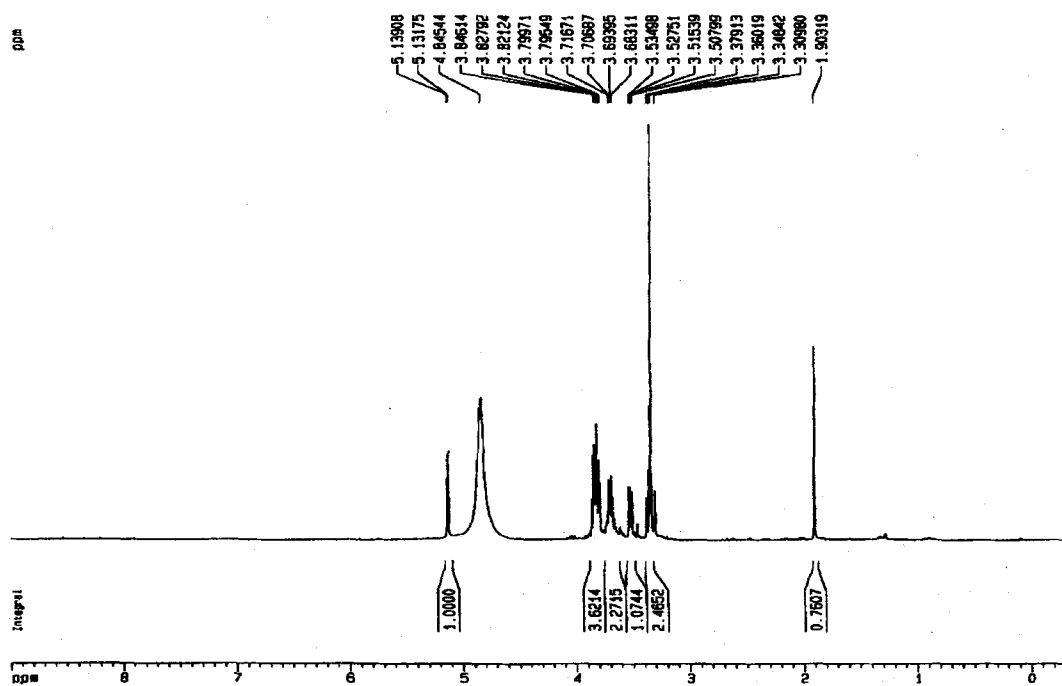


그림 35. 2', 3'-diphosphoryl-1'-propanoxy- β -D-glucopyranoside의 ^1H NMR spectrum

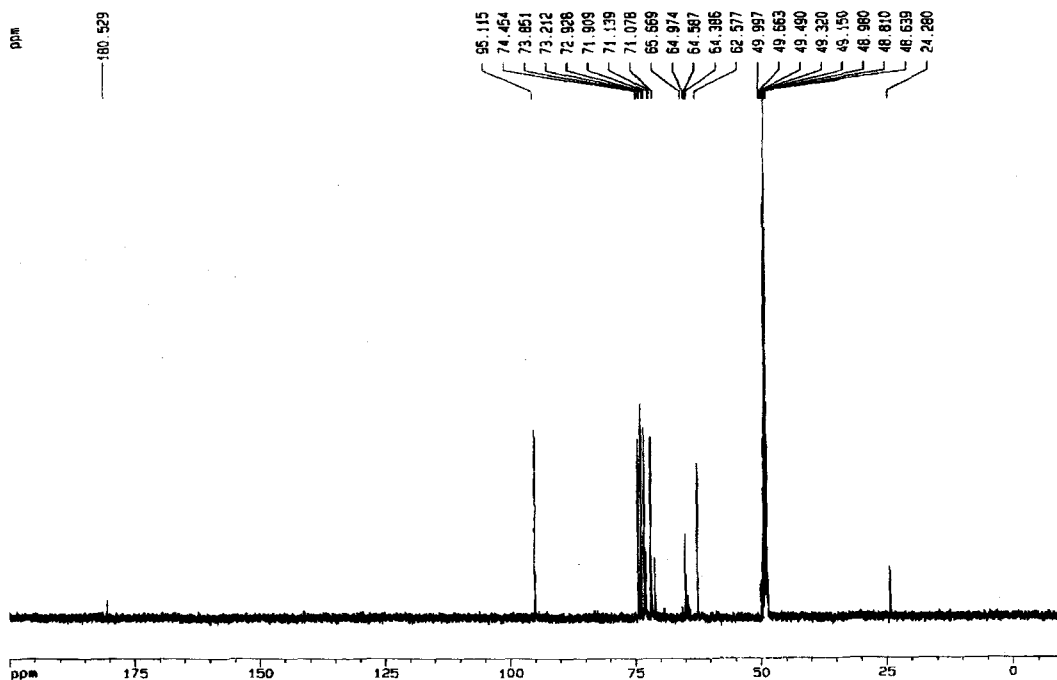


그림 36. 2',3'-diphosphoryl-1'-propanoxy- β -D-glucopyranoside의 ^{13}C NMR spectrum

마) 1-linoleio-3-olein

Compound 5는 용매조건이 EtOAc:MeOH=1:1인 fraction 5에서 분리되어졌다 (그림 12). 분리되어진 물질은 물과 methanol을 이용하여 Lichroprep RP-18(ODS silica gel)에서 정제되어 30mg이 획득되었다 (그림 37). EI/MS 결과 618[m/z]에서 peak가 나타났으며, FAB/MS에서는 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 이온 peak는 619[m/z]에서 나타났다. 이 결과들에서 compound 3은 분자량은 618로 결정되었다 (그림 38). Compound 5의 IR spectrum에서 밴드는 3,492, 2,926, 1,744, 1,461, 1,164, 724 cm^{-1} 에서 나타났으며, 이것은 hydroxyl, ketone, double bonds group을 나타내었다 (그림 39). ^1H NMR결과에서는 δ 5.33 (multiplet), δ 5.30 (t, $J=1.5\text{Hz}$), δ 4.30과 4.28($J=4.2$), δ 4.15와 δ 4.13 ($J=5.9\text{Hz}$)에서 vinylic proton들이 나타났다. 그리고 δ 0.88 ($J=6.6\text{Hz}$)에서 두 개의 methyl기를 나타내는 하나의 proton triplet이 나타났다. 또한 δ 2.70-1.26에서 나타난 나머지 signal들은 methylene과 methane proton들을 나타내었다 (그림 40). ^{13}C NMR 결과에서 39개의 carbon이 나타났으며, δ 196.29에서 나타난 signal은 두 개의 carbonyl group을 의미하였다. 또한, δ 131.02-128.06에서 나타난 signal은 이중결합을 의미하였고, δ 76.97, 69.06, 62.26에서는 산소와 결합된 hydroxyl carbon, methylene carbon을 의미하였다. δ 38.90-22.84에서 나머지 carbon들이 나타났다 (그림 41). 이 결과들을 종합하였을 때 compound 5는 1-linoleio-3-olein으로 동정되었다 (그림 37).

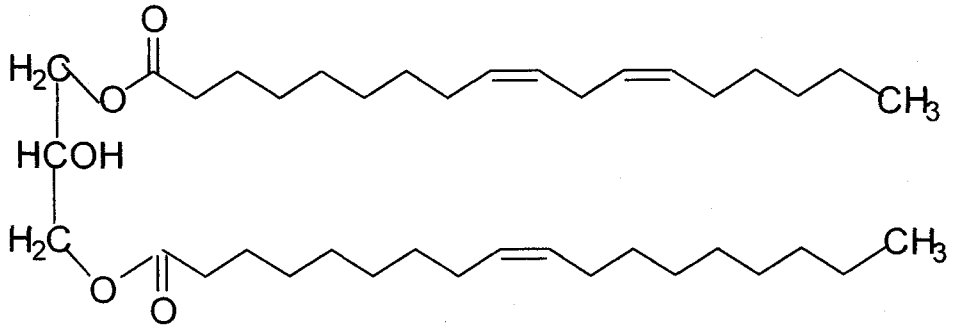


그림 37. 1-linoleio-3-olein의 구조식

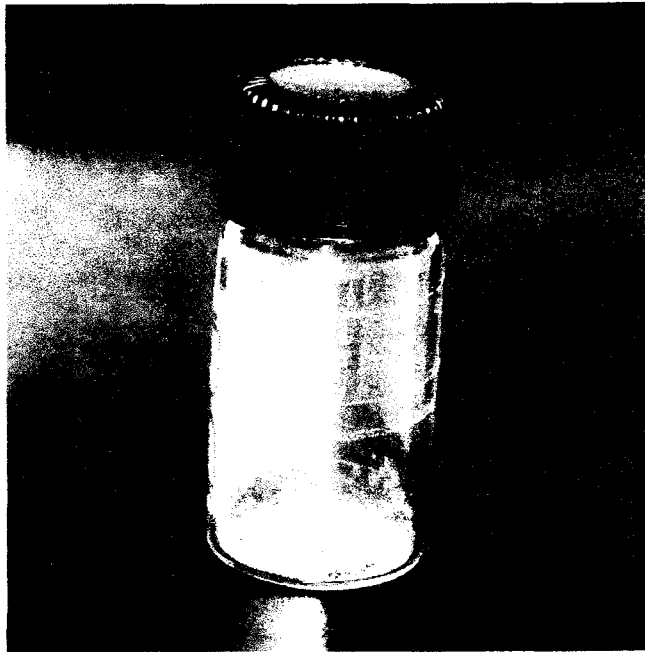


그림 38. 1-linoleio-3-olein의 결정체

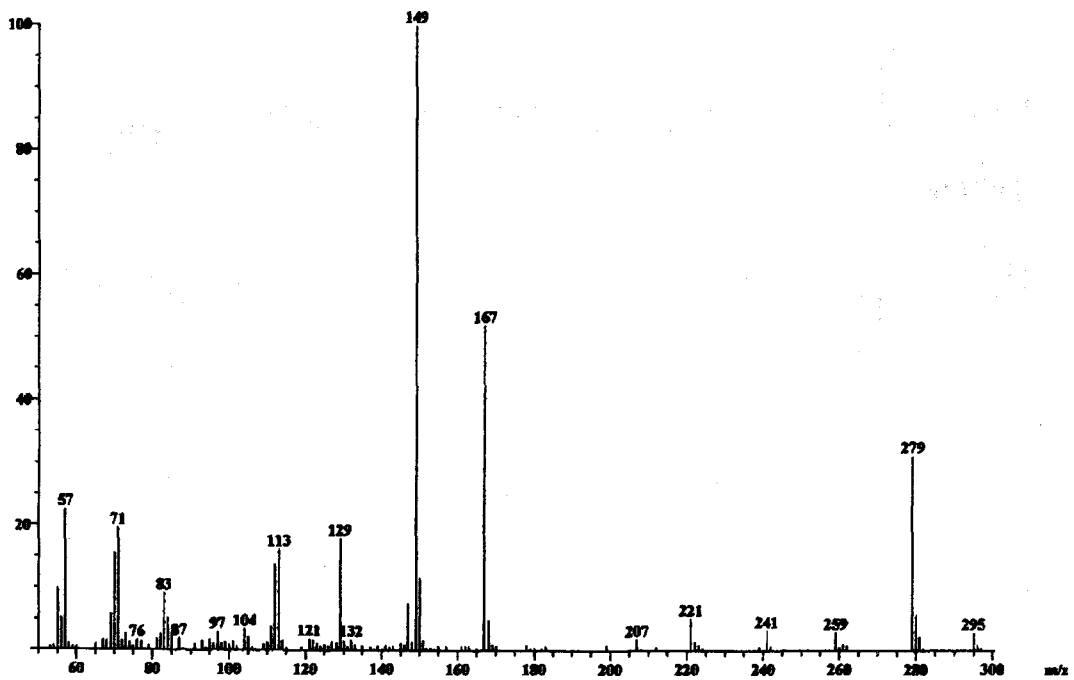


그림 39. 1-linoleio-3-olein의 MS spectrum

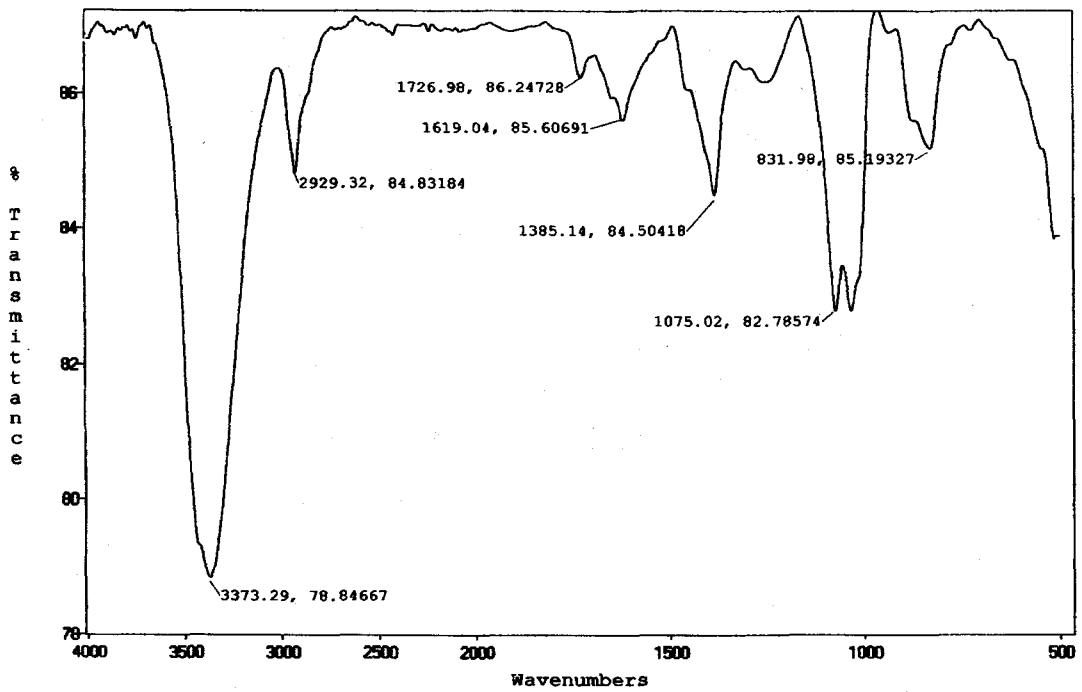


그림 40. 1-linoleio-3-olein의 IR spectrum

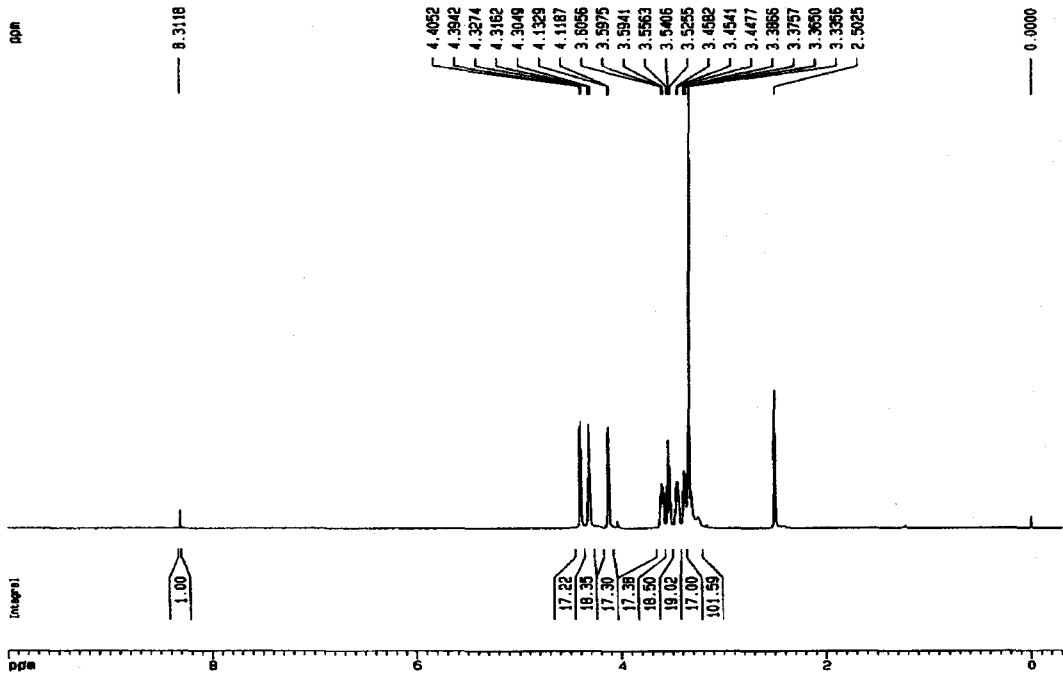


그림 41. 1-linoleio-3-olein의 ^1H NMR spectrum

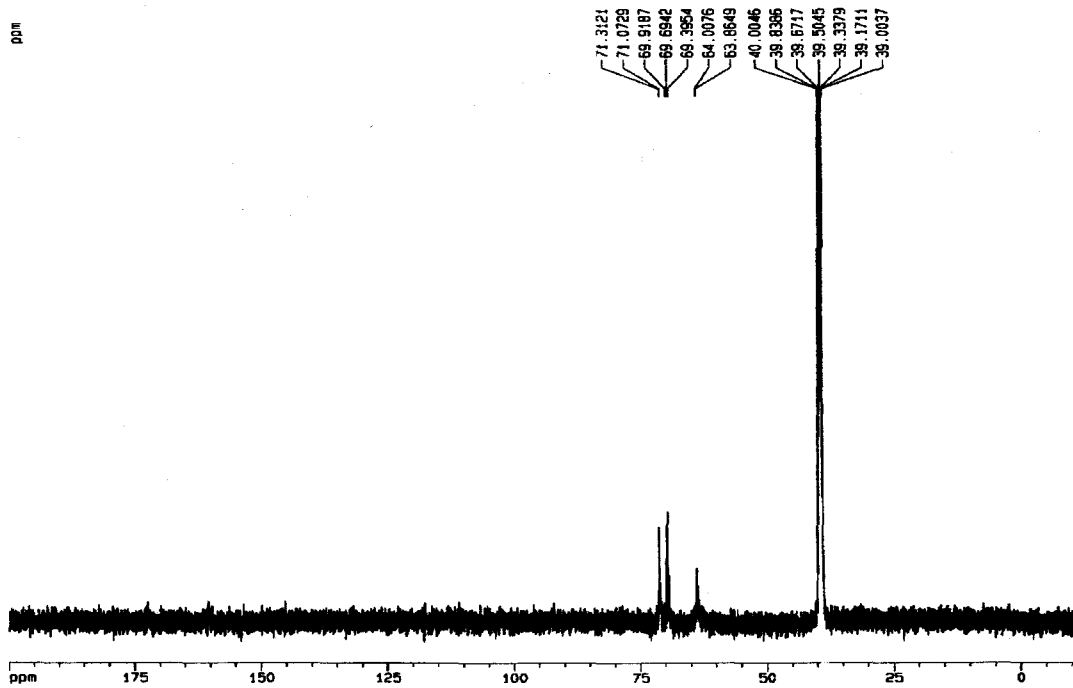


그림 42. 1-linoleio-3-olein의 ^{13}C NMR spectrum

바) 1-(N,N,N-trimethyl ethyl amino phosphoryl) 2,3-dilinoleinon,glycerylphosphate

Compound 6은 용매조건이 methanol인 fraction 6에서 분리되어졌다. 분리되어진 물질은 불과 methanol을 이용하여 Lichrorep RP-18(ODS silica gel)에서 순수한 compound 6를 정제 하였다 (그림 12).

Compound 6는 노란색의 점성이 큰 물질로 100mg이 획득되었다 (그림 44). EI/MS 결과 782[m/z]에서 peak가 나타났으며 (그림 45), FAB/MS에서는 [M+H]⁺이온 peak는 783[m/z]에서 나타났다. 이 결과들에서 compound 6은 분자량은 782로 결정되었다. compound 3의 IR, ¹H, ¹³C NMR 결과 이 compound 6는 1-(N, N, N-trimethyl ethyl amino phosphoryl) 2,3-dilinoleinon로 동정되었다 (그림 46, 47, 48, 43).

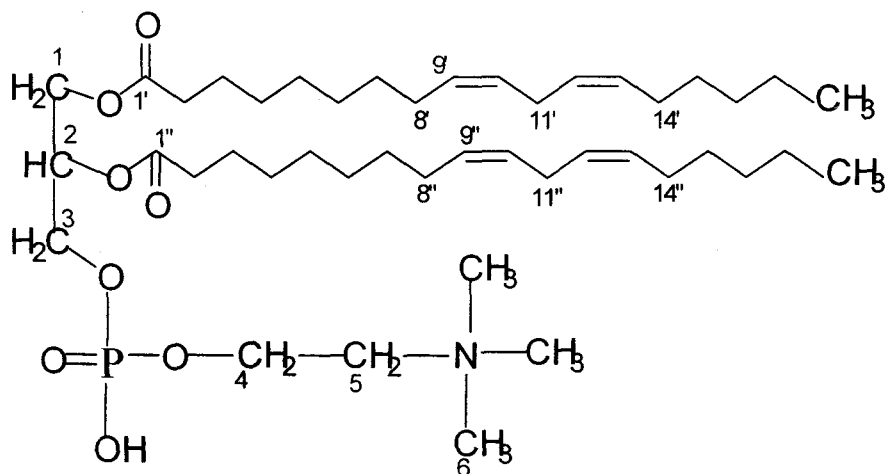


그림 43. 1-(N, N, N-trimethyl ethyl amino phosphoryl) 2,3-dilinoleinon,glyceryl phosphate의 구조식

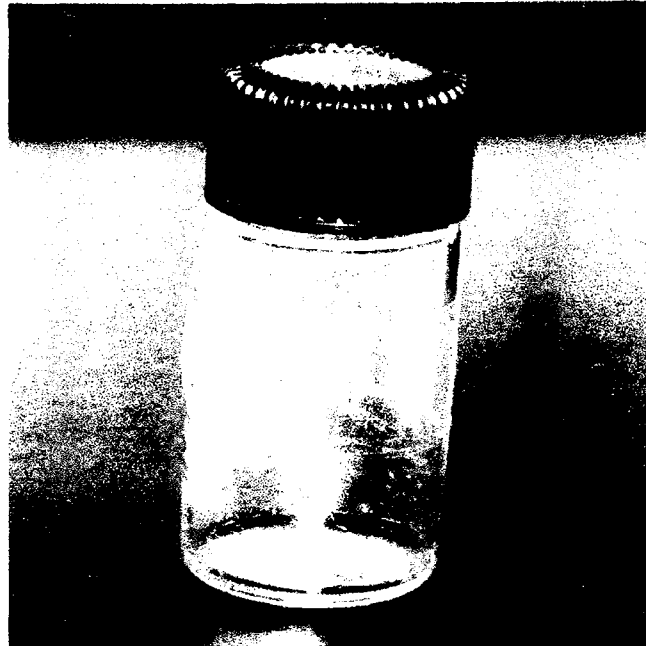


그림 44. 1-(N, N, N-trimethyl ethyl amino phosphoryl) 2,3-dilinoleinon,glyceryl phosphate의 결정체

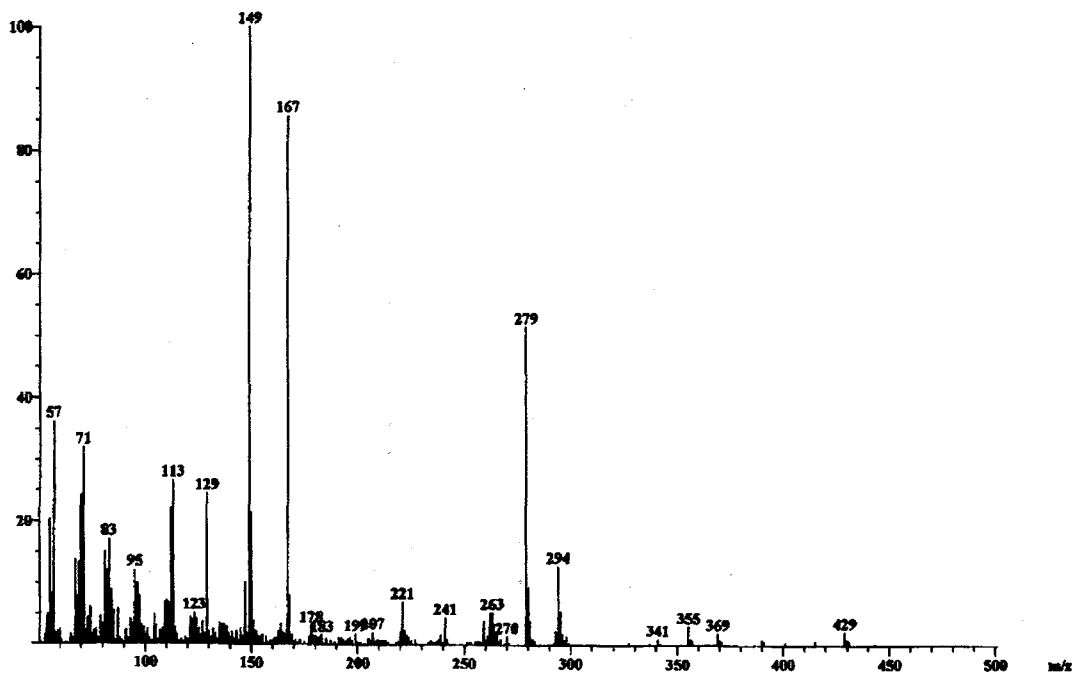


그림 45. 1-(N, N, N-trimethyl ethyl amino phosphoryl) 2,3-dilinoleinon,glyceryl phosphate의 MS spectrum

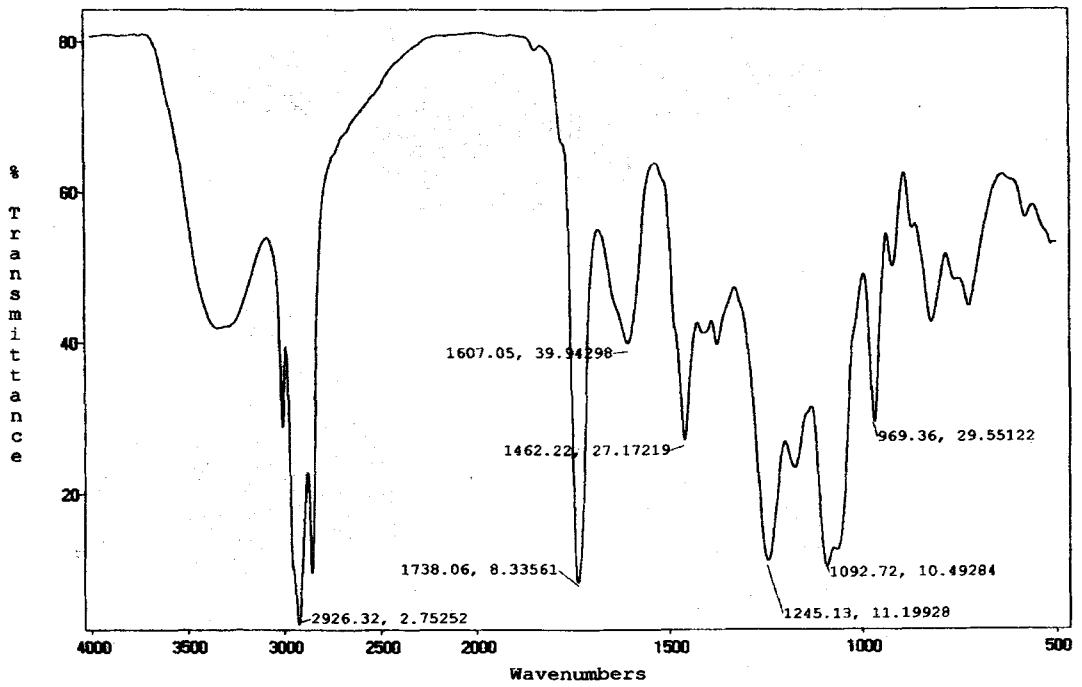


그림 46. 1-(N, N, N-trimethyl ethyl amino phosphoryl) 2,3-dilinoleinon, glyceryl phosphate의 IR spectrum

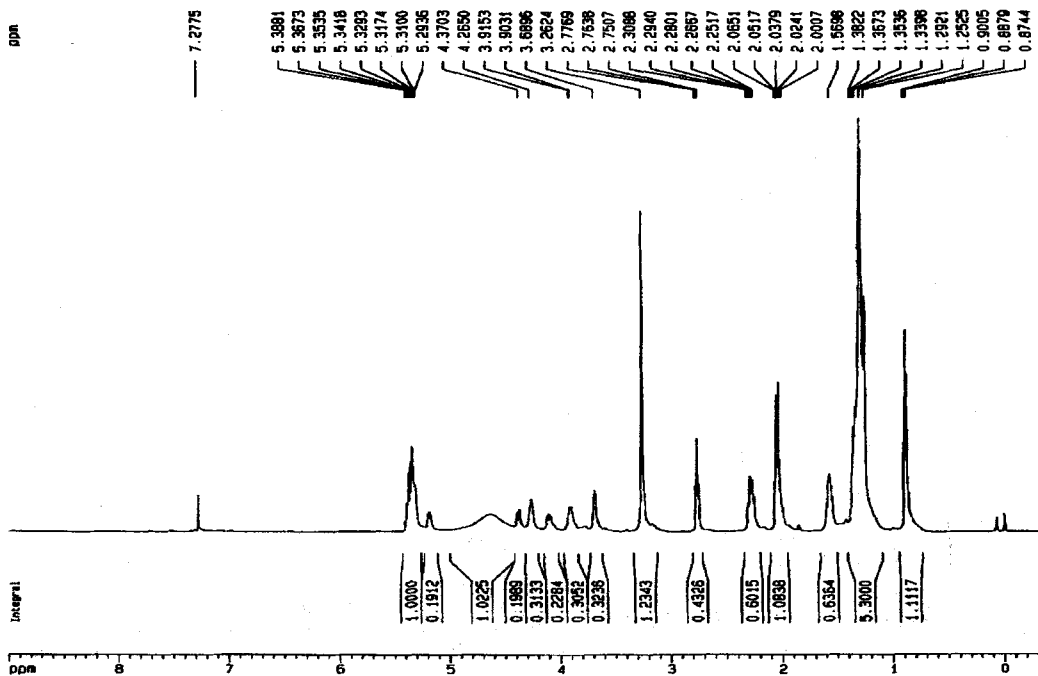


그림 47. 1-(N, N, N-trimethyl ethyl amino phosphoryl) 2,3-dilinoleinon, glyceryl phosphate의 ¹H NMR spectrum

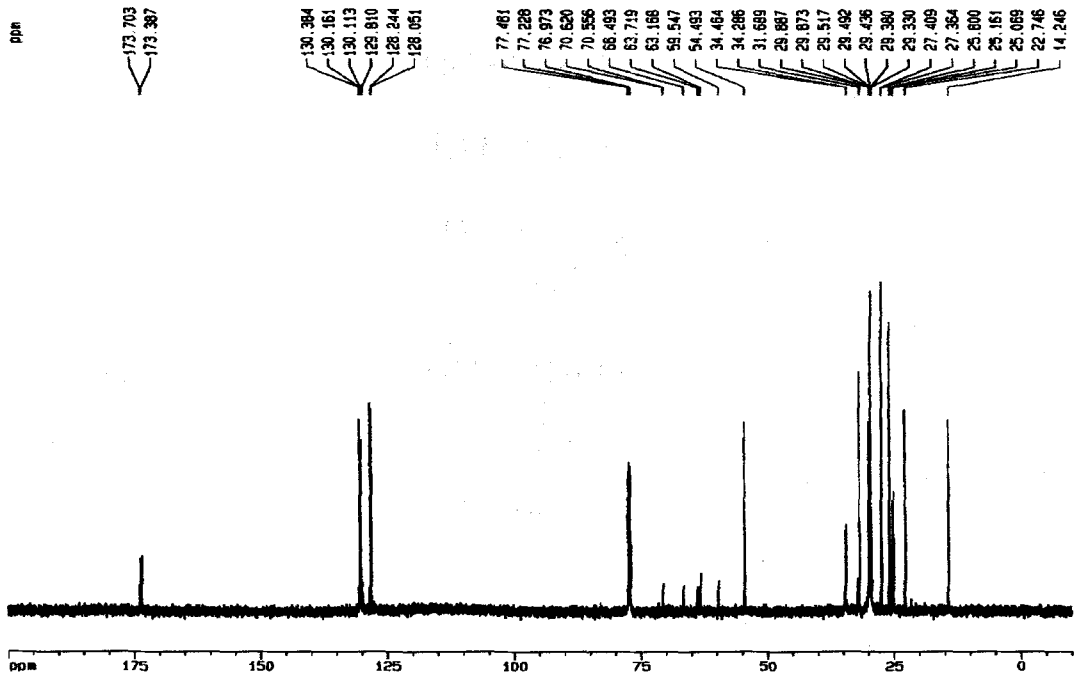


그림 48. 1-(N, N, N-trimethyl ethyl amino phosphoryl) 2,3-dilinolein, glyceryl phosphate의 ^{13}C NMR spectrum

사) Glycerol phosphate

Compound 7은 용매조건이 methanol인 fraction 7에서 분리되어졌다. 분리되어진 물질은 물과 methanol을 이용하여 Lichroprep RP-18(ODS silica gel)에서 순수한 compound 7을 정제 하였다 (그림 12).

Compound 7는 결정화된 고체물질로 20mg이 획득되었다 (그림 50). EI/MS 결과 172[m/z]에서 peak가 나타났으며 (그림 51), FAB/MS에서는 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 이온 peak는 173[m/z]에서 나타났다. 이 결과들에서 compound 3은 분자량은 172로 결정되었다. compound 3의 IR, ^1H , ^{13}C NMR 결과 이 compound 7은 **glycerol phosphate**로 동정되었다 (그림 52, 53, 54, 49).

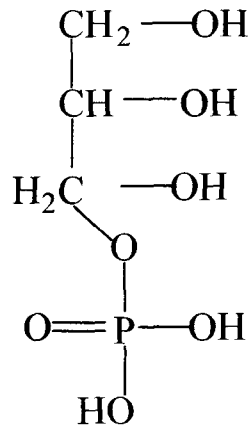


그림 49. Glycerol phosphate의 구조식



그림 50. Glycerol phosphate의 결정체

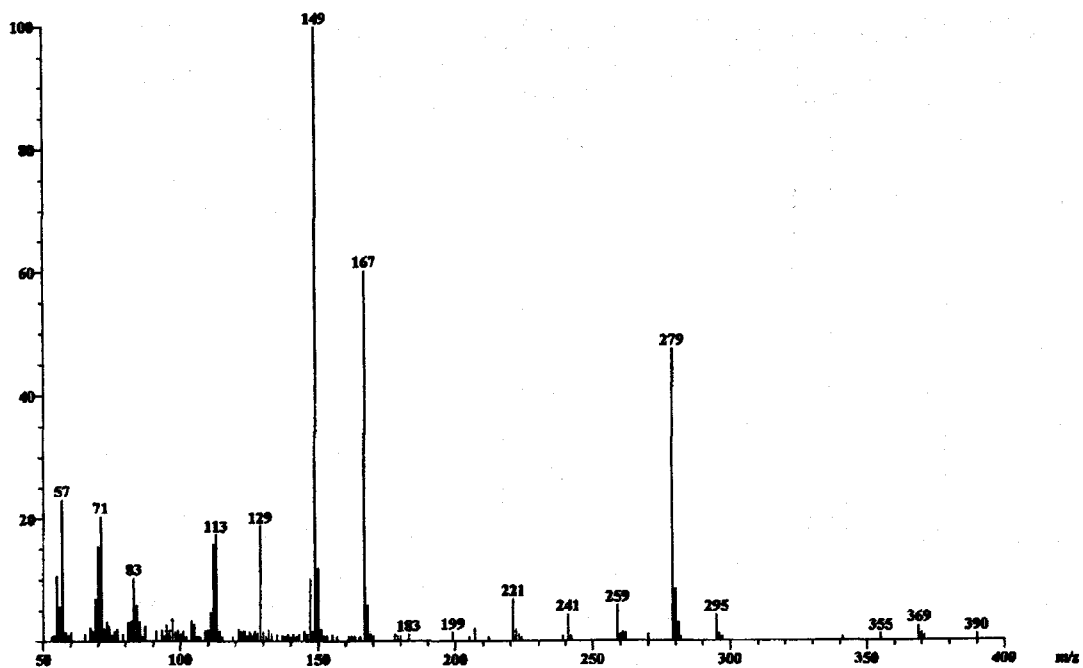


그림 51. Glycerol phosphate의 MS spectrum

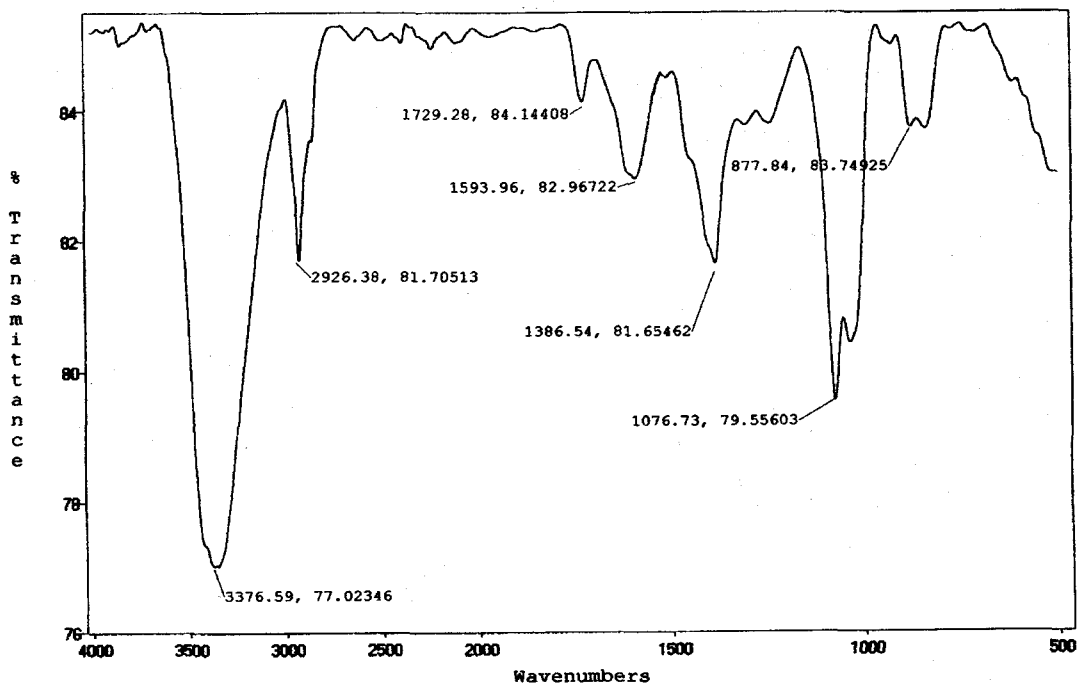


그림 52. Glycerol phosphate의 IR spectrum

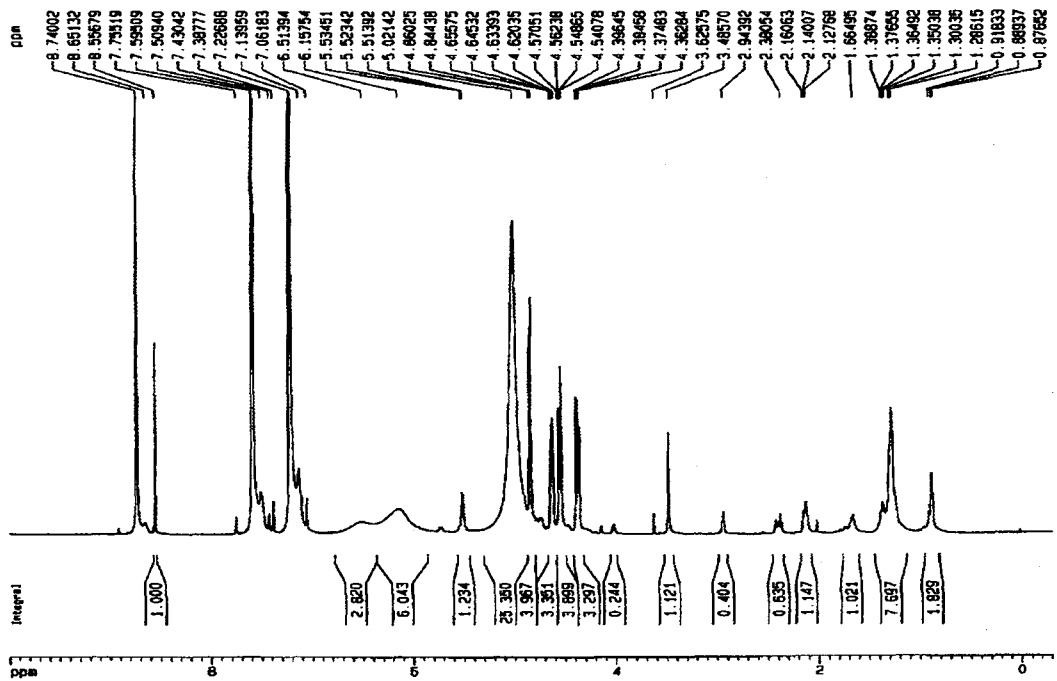


그림 53. Glycerol phosphate의 ^1H NMR spectrum

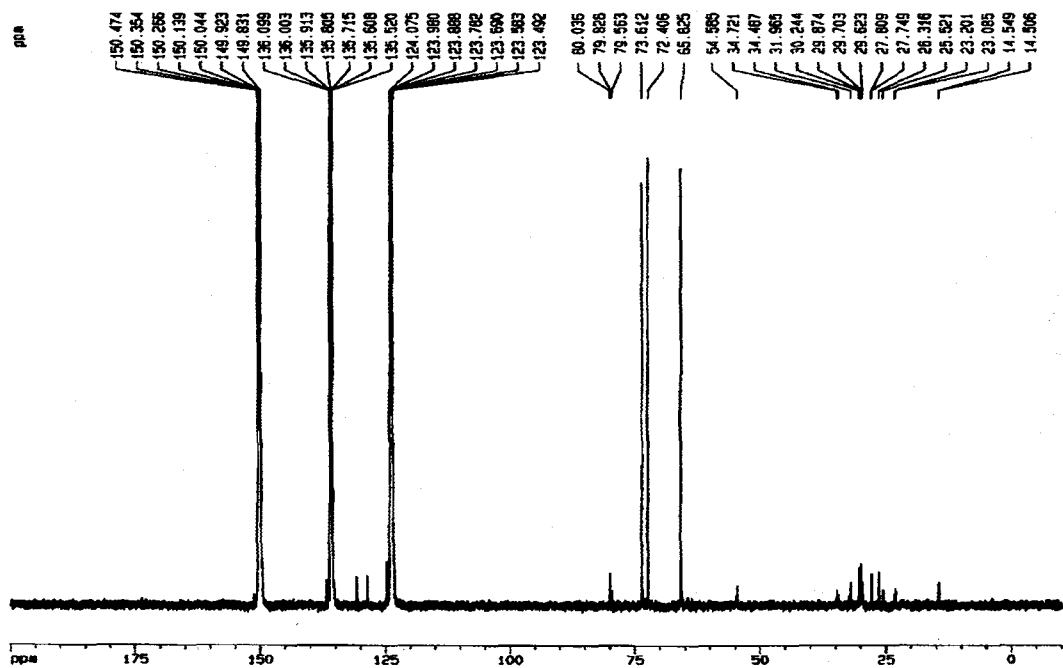


그림 54. Glycerol phosphate의 ^{13}C NMR spectrum

다. 분리·정제된 활성물질의 효과 확인 및 기존의 항산화제와 효과 비교 시험

1) *In vitro*에서의 활성 효과 검정

가) P383 murine leukemia cell을 이용한 성장 억제 효과 (IC_{50})

P383 murine leukemia cell을 이용한 성장 억제 효과 (IC_{50})에서는 1-linleio-2-olein가 $41\mu\text{g}/\text{ml}$ 을 나타내어 가장 높은 효과를 보였다. 또한 stigmasterol은 $50\mu\text{g}/\text{ml}$ 을 보였으며, 1-(N,N,N-trimethyl ethyl amino phosphoryl) 2,3-dilinolein ion, Glyceryl triphosphate, 1,4-glucoopyranosyl-1', 4'-glucoopyranosyl-1'',4''-glucoopyranoside, 2',3'-diphosphoryl-1'-propanoxy- β -D-glucoopyranoside, 1-linoleio-3-olein은 $100\mu\text{g}/\text{ml}$ 이상으로 매우 낮은 억제 효과를 보였다 (표 8).

표 8. P383 murine leukumia cell을 이용한 동정된 물질들의 50% 성장 억제 효과 (IC_{50})

Compounds	IC_{50} ($\mu\text{g}/\text{ml}$)
1-linleio-2-olein	41
Stigmasterol	50
1-(N,N,N-trimethyl ethyl amino phosphoryl) 2,3-dilinolein ion	>100
Glyceryl triphosphate	>100
1,4-glucoopyranosyl-1',4'-glucoopyranosyl-1'',4''-glucoopyranoside	>100
2',3'-diphosphoryl-1'-propanoxy- β -D-glucoopyranoside	>100
1-linoleio-3-olein	>100

나) 라디칼 소거능 (RC_{50}) 활성측정

라디칼 소거능 (RC_{50}) 활성측정에서, 1-linleio-2-olein의 경우 $2.2\mu\text{g}/\text{ml}$ 을 나타내어 분리·정제된 다른 3가지 물질들에 비해 높은 활성도를 나타내었다. 또한 stigmasterol의 경우 $17.5\mu\text{g}/\text{ml}$ 를 나타내었으며, Glyceryl triphosphate,과 1-(N,N,N-trimethyl ethyl amino phosphoryl) 2,3-dilinolein ion의 경우에는 $49\mu\text{g}/\text{ml}$ 과 $48\mu\text{g}/\text{ml}$ 을 나타내어 다른 앞의 두 물질에 비해 낮은 활성을 보였다 (그림 55).

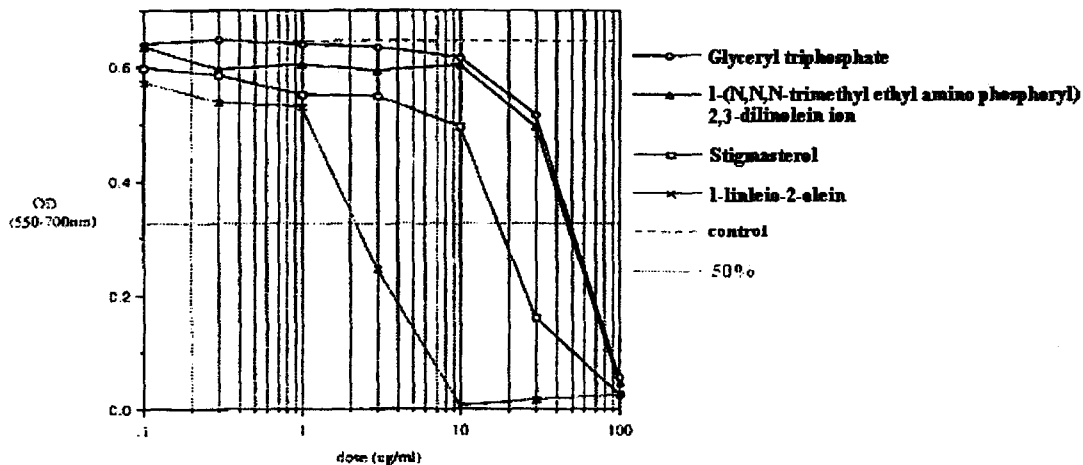


그림 55. 버섯에서 분리·정제된 물질과 BHT의 라디칼 소거 활성 (RC₅₀)

다) H₂O₂처리에 의한 세포생존을 조사

버섯에서 분리·정제되어진 stigmasterol을 농도와 처리시간을 달리하여 H₂O₂처리된 세포의 생존율을 조사한 결과, 그림 56과 같이 농도가 증가함에 따라 각각의 처리시간에 상관없이 과산화수소 처리되어진 세포의 생존율을 증가시킬 수 있었으며, 또한 배양시간이 길게 늘어남에 따라서도 과산화수소에 의한 산화스트레스를 강력하게 억제하였다 (그림 56).

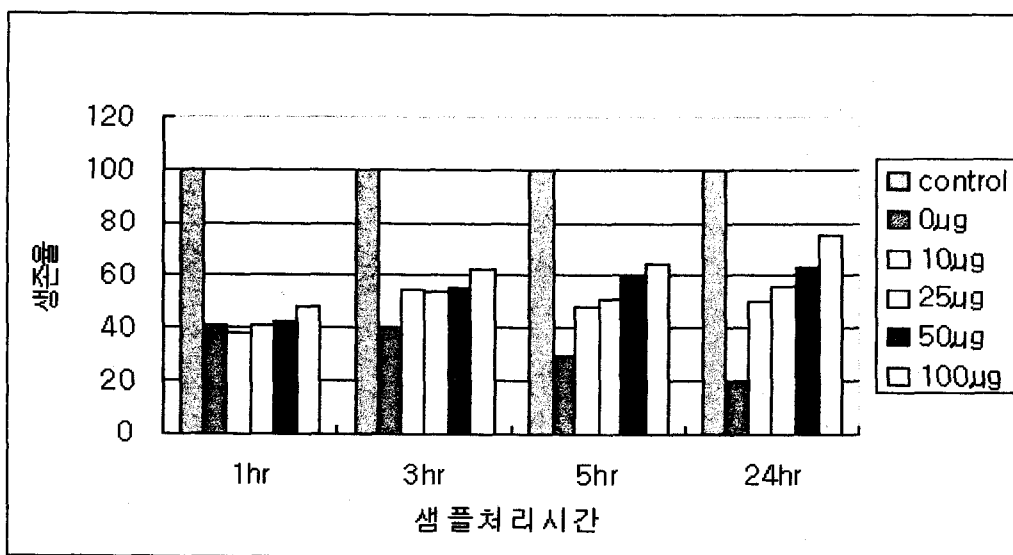


그림 56. 버섯에서 분리·동정된 stigmasterol에 의한 H₂O₂처리된 세포의 생존을 조사

2) In vivo에서의 활성 효과 검증

가) 체중측정 및 간(liver) 무게 측정

2주간의 사육기간 동안 각 실험군 간의 체중변화와 간 무게의 변화는 표 9와 같다. 각

실험군 간의 체중은 일일 체중변화(g/day), 간 무게 변화는 절대적 무게(g)와 체중에 대한 상대적 무게비율(%)로 표시하였다.

체중변화에 있어서는 생리식염수 투여군이 가장 많이 체중이 증가하였고, 알콜을 투여한 군과 버섯추출물과 알콜을 동시 투여한 군에서는 체중 증가가 적었고, stigmasterol을 투여한 군에서는 감소하는 경향이 관찰되었다. 산화스트레스에 대한 저항성이 강한 것으로 알려져 있는 비타민 E를 투여한 군에서도 알콜로 인한 실험동물의 억제에 영향을 미치지 못하는 듯하였다. 그러나 조추출물은 비록 유의적인 차이는 없었지만 비타민 E를 투여한 군보다도 체중이 증가한 것이 나타났다. 알콜은 실험동물의 성장을 억제하는데, 이것으로 미루어 보아 본 실험에서 사용한 버섯조추출물은 성장억제에 대해서 어느 정도 영향을 끼치는 것으로 짐작할 수 있다.

간의 절대적 무게와 상대적 무게는 유사한 양상을 나타냈으며, 각 실험군들 간에 유의적인 차이를 보이지 않았다. 알콜의 과량 섭취 시 지방간 및 간장의 섬유화로 간이 비대해 지는데, 본 실험에서는 그다지 영향을 받지 않은 것으로 사료된다.

표 9. 체중 및 간 무게의 변화

Group	Body weight changes(g/day) ¹⁾	Absolute liver weights(g)	Relative liver weights(%) ²⁾
C ³⁾	0.32±0.04 ^a	1.58±0.08 ^a	4.60±0.19 ^a
E ⁴⁾	0.06±0.05 ^{bc}	1.40±0.07 ^a	4.54±0.19 ^a
VE ⁵⁾	0.04±0.05 ^{bc}	1.37±0.08 ^a	4.59±0.26 ^a
2E ⁶⁾	0.16±0.04 ^b	1.56±0.10 ^a	4.84±0.28 ^a
ME ⁸⁾	-0.04±0.05 ^b	1.51±0.09 ^a	5.08±0.26 ^a

1) [final body weight(g) - initial body weight(g)] / 14 days

2) [liver weight(g) / body weight (g)] * 100

3) C : 생리식염수 투여군

4) E : 40% EtOH 투여군

5) VE : 40% EtOH 에 용해된 비타민 E 투여군

6) 2E : 40% EtOH 에 용해된 버섯 조추출물 투여군

7) ME : 40% EtOH 에 용해된 stigmasterol 투여군

나) 혈액 생화학적 지표

버섯 추출물을 2주간 경구 투여한 흰쥐의 혈액중의 GOT, GPT, γ -GTP, 총콜레스테롤, HDL 콜레스테롤 및 LDL 콜레스테롤을 측정한 결과는 표 10, 11과 같다.

간 손상을 예측하는 지표로 Glutamic oxaloacetic transaminase(GOT), Glutamic

pyruvic transaminase(GPT), γ -glutamyl transpeptidase(γ -GTP) 등의 효소들이 이용되고 있다. 이 효소들은 손상된 간 조직으로부터 혈액 중으로 방출되므로 혈액 중에서의 활성이 높게 측정된다. GOT 활성과 GPT 활성에서 알콜 투여군에 비해서 stigmasterol 투여군이 유의적으로 낮은 활성을 보였다. 따라서 stigmasterol은 알콜에 의한 간손상을 보호하는 것으로 사료된다. γ -GTP 활성은 각 실험군 간에 유의적인 차이를 보이지 않았다.

혈액 내의 HDL 콜레스테롤은 유익한 콜레스테롤로, 콜레스테롤을 조직이나 세포체에서 간으로 옮길 때에 콜레스테롤 수준을 낮추는데 중요한 역할을 한다. 본 연구에서 혈중 총콜레스테롤, HDL 콜레스테롤, LDL 콜레스테롤 농도는 알콜 투여군과 알콜과 버섯 추출물 병용 투여군이 별다른 차이를 보이지 않았다.

표 10. 혈중 GOT, GPT, γ -GTP 측정

Group	GOT ¹⁾	GPT ²⁾	γ -GTP ³⁾
	Karmen unit	Karmen unit	mUnit/ml
C	172.92±9.66 ^a	33.51±2.67 ^{ab}	18.90±4.14 ^a
E	159.61±10.39 ^{ab}	34.86±2.81 ^{ab}	14.81±2.50 ^a
VE	171.21±13.40 ^a	35.53±2.66 ^a	16.85±3.02 ^a
2E	165.72±11.40 ^{ab}	33.35±1.80 ^{ab}	16.06±3.84 ^a
ME	121.98±10.57 ^c	29.24±2.21 ^{ab}	12.90±2.39 ^a

1) glutamic axaloacetic transaminase

2) glutamic pyruvic transaminase

3) γ -glutamyl transpeptidase

표 11. 혈중 Total cholesterol, HDL, LDL

Group	TC ¹⁾	HDL ²⁾	LDL ³⁾
	mg/dl	mg/dl	mg/dl
C	164.29±7.65 ^a	21.46±2.95 ^a	139.10±7.86 ^a
E	145.76±7.41 ^{ab}	19.43±1.92 ^a	123.36±6.01 ^{ab}
VE	138.56±6.00 ^b	16.69±2.70 ^a	116.41±7.34 ^b
2E	145.44±6.35 ^{ab}	16.38±1.82 ^a	126.66±4.49 ^{ab}
ME	165.05±7.47 ^a	17.42±2.86 ^a	143.18±6.32 ^a

1) total cholesterol

2) high density lipoprotein cholesterol

3) low density lipoprotein cholesterol

다) 조직의 지질과산화 수준 측정

지질과산화는 노화, 동맥경화증, 당뇨병, 관절염, 알츠하이머병과 같은 여러 가지 질병들을 일으키는 산화스트레스와 관련이 있다. 지질 과산화에 의한 조직의 손상은 다불포화지방산으로부터 과산화물이 생성되는 과정에서 자유 라디칼이 발생하면서 시작된다. 다가불포화지방산의 산화는 allylic hydrogen을 분리하고 산소분자를 삽입시킨다. 이 과정에서 lipid free radical은 산소와 쉽게 반응하여 peroxy radical을 형성한다. Peroxy radical은 auto-oxidation chain reaction에서 다른 lipid와 반응하여, lipid hydroperoxide(LOOH)를 축적하고 계속하여 lipid free radical을 생성한다. 생성된 lipid peroxides는 생체막을 손상시킨다. 이러한 지질과산화를 측정하기 위해 가장 널리 사용하는 방법은 malondialdehyde (MDA)의 농도를 측정하는 것이다. MDA는 thiobarbituric acid(TBA) test를 통하여 측정한다.

간, 뇌, 이자에서 측정한 MDA 함량은 각 실험군들간에 유의적인 차이를 나타내지는 못했다. 그러나 간과 뇌에서 알콜 투여군에 비해 비타민 E 투여군과 버섯 추출물 투여군에서 MDA 함량을 다소 감소시키는 경향을 보였다. 강력한 항산화제로 알려진 비타민 E 와 비슷한 수준으로 MDA 함량을 감소시키는 것으로 보아, 버섯 추출물이 MDA 수준을 정상화시키지는 못하지만, 지질과산화를 어느 정도 억제시키는 경향이 있다고 생각된다 (표 12).

표 12. 조직(간, 뇌, 이자)에서 MDA(Malondialdehyde)

Group	Liver	Brain	Pancreas
	μmol/mg protein		
C	0.54±0.03 ^a	3.10±0.07 ^a	1.10±0.11 ^a
E	0.52±0.04 ^a	3.22±0.14 ^a	1.47±0.42 ^a
VE	0.49±0.06 ^a	2.87±0.15 ^a	1.10±0.14 ^a
2E	0.46±0.04 ^a	2.76±0.20 ^a	1.25±0.17 ^a
ME	0.48±0.04 ^a	2.88±0.30 ^a	1.38±0.14 ^a

라) 간 조직 중의 항산화 효소 활성도 측정

간 조직에서 측정한 Glutathion S-transgerase(GST) 활성도는 비타민 E 투여군(308.40±51.49 μmol/min/mg protein), stigmasterol 투여군(279.91±30.04 μmol/min/mg protein), 생리식염수 투여군(250.22±24.28 μmol/min/mg protein), 버섯 추출물 투여군(199.22±22.90 μmol/min/mg protein), 알콜 투여군은(194.51±24.73 μmol/min/mg protein) 순이었다. Stigmasterol 투여군이 유의적으로 차이는 없었지만 알콜

투여군에 비해 높은 활성을 나타내었다 (그림 57).

GST는 세포 내로 유입되는 약물들이 대사되는 과정에 생성되는 활성산소종과 친전자성 생체 이 물질들에 GSH를 포함시켜 독성물질을 해독하는 작용을 하는 생체내 효소이다. 따라서 본 실험에서 사용한 버섯 추출물은 에탄올에 의해 감소된 GST 활성도를 어느 정도 정상화시키는 것으로 생각된다.

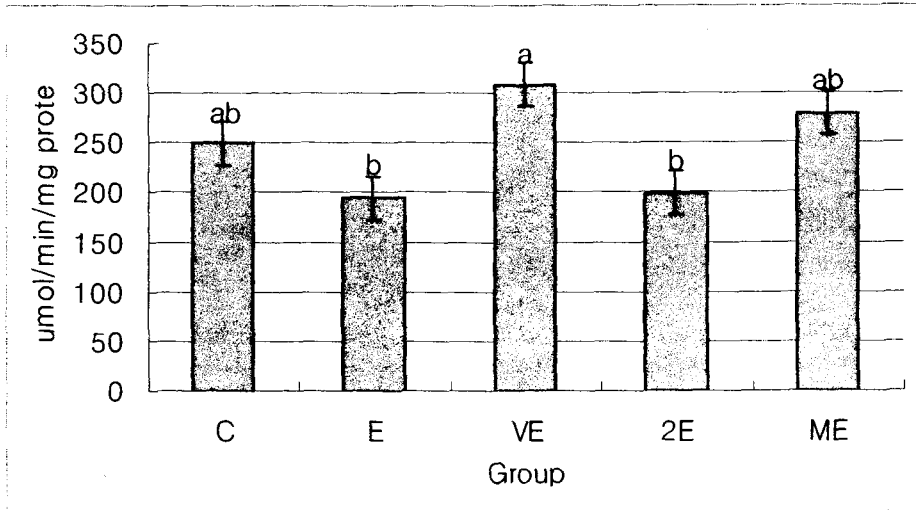


그림 57. 간 조직에서 GST(Glutathion S-transferase) 활성도 측정

4. 결과요약

가. 각종 항산화활성 검정법을 비교 검토하여 고 항산화활성 버섯류 선발

- 1) SOD 실험에서는 포토벨라(26.83%)가 가장 높은 억제율을 보였으며, M-2(21.1%) > 새송이(20.93%) > 23(19) (20.26%) > M-1(20.28%) 순으로 억제율이 높았고, M-16을 포함한 19품종에서는 억제율이 없는 것으로 나타났다.
- 2) POD 실험에서는 74007(30.09%)이 가장 높은 억제율을 보였으며, 9010(18.75%) > 17001(14.93%) > 17003(13.22%) > 9006(12.99%) 순으로 억제율이 높았고, 170-1을 포함한 54개 품종에서는 억제율이 없는 것으로 나타났다.
- 3) DPPH 실험에서는 F-J(80.51%)이 가장 높은 억제율을 보였으며, 9010(64.38%) > 9006(59.17%) > DE-E(57.56%) > 9009(53.49%) 순으로 억제율이 높았고, 이 품종들을 포함한 총19개 품종에서는 40%이상의 높은 억제율을 보였으나, 74013을 포함한 15품종에서는 10%이하의 낮은 억제율을 보였다.
- 4) TBA 실험에서는 새송이(67.5%)가 가장 높은 억제율을 보였으며, 23(19) (67.38%) > 5019(65.54%) > 17016(56.83%) > VI(56.73%) 순으로 억제율이 높았고, 이 품종을 포함한 총16품종에서 40%이상의 높은 억제율을 보였으나, 9025를 포함한 10품종에서는 10% 이하의 낮은 억제율을 보였다.
- 6) Electron Spin Resonance (ESR) 방법에 의한 항산화 활성 검정 결과, 이전 실험에서

높은 활성을 나타낸 그룹과 낮은 활성을 나타낸 그룹의 평균적인 signal intensities는 0.25 와 0.83(Mn^{2+} standard) 이었다.

나. 항산화활성 물질 추출 및 분리·정제된 활성물질인 항산화제의 구조결정

- 1) 비늘버섯(24027: *Pholiota adiposa*)은 Hexen, EtOAc, MeOH의 용매를 사용하여 물질을 분리하였다. 분리된 물질들을 IR, MS, 1H NMR, ^{13}C NMR 분석 결과 (1) 1-Linoleic-2-olein, (2) stigmasterol, (3) 1,4-glucofuranosyl-1',4'-glucofuranosyl-1",4"-glucofuranoside, (4) 2',3'-diphosphoryl-1'-propanoxy- β -D-glucofuranoside, (5) 1-linoleic-3-olein, (6) 1-(N, N, N-trimethyl ethyl amino phosphoryl) 2,3-dilinolein ion, (7) Glycerol phosphate로 동정되어졌다.

다. 분리·정제된 활성물질의 효과 확인 및 기존의 항산화제와 효과 비교 시험

1) *In vitro* 에서의 활성물질 효과 평가

- ① P383 murine leukemia cell을 이용한 성장 억제 효과 (IC_{50})에서는 1-linoleic-2-olein 가 $41\mu g/ml$ 을 나타내어 가장 높은 효과를 보였으며, stigmasterol은 $50\mu g/ml$ 을 보였다.
- ② 라디칼 소거능(RC_{50}) 활성측정에서 1-linoleic-2-olein이 $2.2\mu g/ml$ 로 매우 높은 억제력을 보였다. 그리고 stigmasterol, Glycerol triphosphate, 1-(N,N,N-trimethyl ethyl amino phosphoryl) 2,3-dilinolein ion는 각각 17.5, 49, $48\mu g/ml$ 를 나타내었다.
- ③ H_2O_2 처리에 의한 세포생존을 조사에서는 stigmasterol의 농도와 배양시간이 증가함에 따라 산화스트레스에 의한 산화스트레스를 강력하게 억제하였다.

2) *In vitro* 에서의 활성효과 검증

- ① 버섯 추출물 투여에서 체중증가가 보였으며, 기존에 항산화제로 알려진 비타민E와 비교하였을 때 유의적인 차이는 나타나지 않았다.
- ② GOT 활성과 GPT 활성에서 stigmasterol 투여군이 다른 처리 구에 비해 현저히 낮은 활성을 보여 stigmasterol이 알콜에 의한 간 손상에 대해 보호 작용을 하는 것을 알 수 있었다. 그러나 γ -GTP, total cholesterol, HDL, LDL.에서는 처리 간 유의차가 나타나지 않았다.
- ③ 간, 뇌, 이자에서 측정된 MDA 함량은 각 실험군들간에 유의적인 차이가 나타나지는 않았다. 하지만 간과 뇌에서 알콜 투여군에 비해서 강력한 항산화제로 알려진 비타민 E 투여군과 버섯 추출물 투여군이 비슷한 수준으로 MDA 함량 감소시켰다.
- ④ GST 활성도측정결과, 비타민 E 투여군 ($308.40\pm 51.49 \mu mol/min/mg$ protein) > stigmasterol 투여군($279.91\pm 30.04 \mu mol/min/mg$ protein) > 생리식염수 투여군 ($250.22\pm 24.28 \mu mol/min/mg$ protein) > 버섯 조추물 투여군($199.22\pm 22.90 \mu mol/min/mg$ protein) > 알콜 투여군($194.51\pm 24.73 \mu mol/min/mg$ protein) 순으로 나타났다. 또한 stigmasterol 은 알콜에 비해서 유의적 차이는 없지만 높은 활성을 나타내어 알콜에 의해 감소된 GST 활성도를 어느 정도 정상화시키는 것으로 나타났다.

참고문헌

1. Alscher, R.G. and Hess, J.L. Antioxidants in higher plants. CRC Press. Boca. Raton FL. Pp. 136-174 (1993)
2. Ames, B.N. Dietary carcinogens and anticarcinogens. *Science* 221: 1256-1263 (1983)
3. Avissar N., Whitin J.C., Allen P.Z., Wagner D.D., Liegey P. and Cohen H.J. Plasma selenium-dependent glutathione peroxidase. Cell of origin and secretion. *J. Biol. Chem.* 264: 15850-15855 (1989)
4. Bannister, J.V., Bannister, W. and Rotilio, H.G. Aspects of the structure, function and applications of superoxide dismutase. *CRC Crit. Rev. Biochem.* 22: 111-180 (1987)
5. Beyer, W.E. Jr. and Fridovich, I. Assaying for superoxide dismutase activity: some large consequences of minor changes in conditions. *Anal. Biochem.* 161: 559-566 (1987)
6. Bracco, F., Scarpa, M., Rigo, A. and Battistin, L. Determination of superoxide dismutase activity by the polarographic method of catalytic currents in the cerebrospinal fluid of aging brain and neurologic degenerative disease. *Proc. Soc. Exp. Bio. Med.* 196: 36-41 (1991)
7. Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry.* 72: 248-254 (1976)
8. Branen, A.L. Toxicology and biochemistry of butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 52: 59-63 (1975)
9. Buege J.A. and Aust S.D. Microsomal lipid peroxidation. *Method in Enzymol.* 10: 281 (1977)
10. Chung, I.M., Kim, C.S., Lee, S.J. and Kim, S.H. The survival growth response and SOD, POD activity of rice cultivars grown on Pb concentration soils. *J. Agricultural resources development* 23: 15-24 (2001)
11. Chung, I.M., Kim, K.H. and Kang, B.H. Change of SOD, POD activity and stomata resistance for ozone on rice (*Oryza sativa* L.). *Korean J. Environmental Agriculture* 19: 160-165 (2000)
12. Cutler, R.G. Antioxidants aging, and longevity. In W. A. Pryor (ed.) *Free Radicals in Biology.* Academic Press. 6: 371-423 (1984)
13. Dass, H.C. and Weaver, G.M. Modification of ozone damage to *Phaseolus vulgaris* by antioxidants: thiols and sulfhydryl reagents. *Can. J. Plant Sci.* 48: 569-574 (1968)
14. Halliwell, B. Oxidants and human disease: some new concepts. *FASEB J.* 1: 358-364 (1987)
15. Hara, C., Kumazawa, Y., Inagak, K., Kaneko, M., Kiho, T. and Ukai, S. Mitogenic

- and colony-stimulating factor-inducing activities of polysaccharide fractions from the fruit bodies of dictyophora indusiata. FISCH. Chem. Pharm. Bull. 39: 1615-1616 (1991)
16. Harbour, J.R., Chow, V. and Bolton, J.R. An electron spin resonance study of the spin adducts of OH and HO₂ radicals with nitrons in the ultraviolet photolysis of aqueous hydrogen peroxide solutions. Can. J. Chem. 52: 3549-3553 (1974)
 17. Hewitt, N., Kok, G. and Fall, R. Hydroperoxide in plants exposed to ozone mediates air pollution damage to alkene emitters. Nature 344: 56-58 (1990)
 18. Hiramatsu, M. and Kohno, M. Determination of superoxide dismutase activity by electronspin resonance spectrometry using the spin trap method. JEOL NEWS 23: 7-9 (1987)
 19. Janzen, E.G., Nutter, D.E. and Davis, E.D. On spin trapping hydroxyl and hydroperoxyl radicals. Can. J. Chem. 56: 2237-2242 (1978)
 20. Kang, K.H. and Kwon, H.J. Possible oxidation promoting activity of plant extracts with reported antioxidant activities. Food Sci. Biotechnol. 8: 97-102 (1999)
 21. Kim, C.R. and Kim, K.H. Physiochemical quality and gram negative bacteria in refrigerated chicken legs treated with trisodium phosphate and acetic acid. Food Sci. Biotechnol. 9: 218-221 (2000)
 22. Kim, J.D., Yu, B.P., McCarter, R.J.M., Lee, S.Y. and Herlihy, J. T. Exercise and diet modulate cardiac lipid peroxidation and antioxidant defenses. Free Radical Biology & Medicine 20: 83-88 (1995)
 23. Kim, M.H. and Lee, S.W. Resistance functions of woody landscape plants to air pollutants (I)-SOD activity. J. K. For. Soc. 81: 164-176 (1992)
 24. Koide, T., Noda, H., Liu, W., Ogata, T. and Kamada, H. Determination of superoxide scavenging activity of a sample containing xanthine oxidase inhibitor by ESR spin trapping. Analytical Sciences 16: 1029-1032 (2000)
 25. Komatsu, J., Terekawa, H., Nakanishi, K. and Watanabe, Y. Flammulina velutipes with antitumor activities. J. Antibiot., Ser. A. 16: 139-143 (1963)
 26. Lee, Y., Haward, L.R. and Villalon, B. Flavonoids and antioxidants activity of fresh pepper (*Capsicum annuum*) cultivars. J. Food Sci. 3:473-476 (1995)
 27. Lee, J.W., Do, J. H. and Shim, K. H. Antioxidant activity of the water soluble browning reaction products isolated from Korean red ginseng 1. DPPH radical and hydrogen peroxide scavenging. J. Ginseng Res. 23: 176-181 (1999)
 28. Lee, J.C. and Lim, K.T. Effects of cactus and ginger extracts as dietary antioxidants on reative oxidant and plasma lipid level. Food Sci. Biotechnol. 9: 83-88 (2000)
 29. Lee, S.J., Chung, I.M., Ahn, J.K., Lee, S.K., Kim, S.H. and Yoo, N.H. Variation in antioxidant activity of soybean (*Glycine max* L.) varieties with crop year and

- duration of storage time. *Food Sci. Biotechnol.* 11: 649-653 (2002)
30. Lin, J.Y., Lin, Y.J., Chen, C.C., Wu, H.L., Shi, G.Y. and Jeng, T.W. Cardiotoxic protein from edible mushrooms. *Nature* 252: 235-237 (1974)
 31. McCord, J.M and Fridovich, I. Superoxide dismutase. *J. Biol. Chem.* 244: 6049-6055 (1969)
 32. Mitsuta, K., Mizuta, Y., Kohno, M., Hiramatsu, M. and Mori, A. The application of ESR spin-trapping technique to the evaluation of SOD-like activity of biological substances. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* 63: 187-191 (1990)
 33. Ohmori, T., Tamura, K., Wakaiki, A., Kawanishi, G., Tsuru, S., Yadomae, T. and Nomoto, K. Dissociation of a glucan fraction (CO¹) from protein-bound polysaccharide of cordyceps ophioglossoides and analysis of its antitumor effect. *Chem. Pharm. Bull.* 36: 4512-4518 (1988)
 34. Price, A. and Hendry, A. Iron-catalysed oxygen radical formation and its possible contribution to drought damage in nine native grasses and three cereals. *Plant Cell Environ.* 14: 477-484 (1991)
 35. Raa, J. Indole-3-acetic acid levels and the role of indole-3-acetic acid oxidase in normal root and club-root of cabbage. *Plant physiol.* 25: 130-134 (1971)
 36. Renis M., Calabrese V., Calderone R.A., Barcellona M.L. and Rizza V. Nuclear DNA strand breaks during ethanol-induced oxidative stress in rat brain. *FEBS Lett.* 390: 153-156 (1996)
 37. Roh, J.S., Sun, W.S., Oh, S.U., Lee, J.I., Oh, W.T. and Kim, J.H. In vitro antioxidant activity of safflower (*Carthamus tinctorius* L.) seeds. *Food Sci. Biotechnol.* 8: 88-92 (1999)
 38. Ryu, B.H. Inhibition of human low density lipoprotein oxidation by extracts from *Rhus verniciflua* Strokes. *Food Sci. Biotechnol.* 9: 204-208 (2000)
 39. SAS Institute, Inc. SAS User's Guide. Statistical Analysis Systems Institute, Cary, NC, USA (1996)
 40. Schlorff E.C., Husain K. and Somani S.M. Dose-and time-dependent effects of ethanol on plasma antioxidant system in rat. *Alcohol.* 17: 97-105 (1999)
 41. Shannon, J.G. and Mulchi, C.L. Ozone damage to wheat varieties at anthesis. *Crop Sci.* 14: 335-337 (1974)
 42. Stich, H.F. the beneficial and hazardous effects of simple phenolic compounds. *Mutat. Res.* 259: 307-324 (1991)
 43. Suzuki, S. and Oshima, S. Influence of shiitake (*Lentinus edodes*) on human serum cholesterol. *Mushroom Sci.* 9: 463-467 (1976)

44. Tomohiro, T., Kitatani, F. and Yagi, A. A simple screening method for antioxidants and isolation of several antioxidants produced by murine bacteria from fish and shellfish. *Biol. Biotech. Biochem.* 58: 1780-1782 (1994)
45. Warholm M., Guthenberg C., Bahr C.V. and Mannervik B. 1984. Glutathione transferase from human liver. *Method in Enzymol.* 113: 499-504 (1984)
46. Weiss, S.J., King, G.W. and LoBuglio, A.F. Evidence for hydroxyl radical generation by human monocytes. *J. Clin. Invest.* 60: 370-374 (1977)
47. Wong, S.F., Holliwell, B., Richmond, R. and Skowronek, W.R. The role of hyaluronic acid induced by metal ions and ascorbic acid. *J. Inorganic Biochem.* 14: 127-134 (1981)
48. Yagi, K. A simple fluoremetric assay for lipid peroxide in blood plasma. *Biochem. Med.* 15: 212-216 (1976)
49. Yokozawa, T., Lee, K.I., Kashiwagi, H., Cho, E.J. and Chung, H.Y. Antioxidant activity of herbal teas available on the Korean market. *J. Food Sci. Nutr.* 4: 92-96 (1999)
50. Yosida, T., Mori, K., Hatano, T., Okumura, T., Ushara, I., Komagoe, K., Fujita, Y. and Okuda, T. Studies on inhibition mechanism of auto-oxidation by tannins and related polyphenols on 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl radical. *Chem. Pharm. Bull.* 37: 1919-1923 (1989)

여 백

협동1 : 버섯류의 면역조절기능 물질의 탐색 및 이용 연구

I. 버섯류 면역 조절 기능물질의 탐색이용 연구

1) 면역 조절 기능 생물 활성 검색 방법

가. 마우스의 strain 및 시료의 농도에 따른 면역 반응성의 조사

각각의 종(strain)의 마우스(5~6주령, female)를 이용하여 titrated cell들을 48 well에 500ul씩 분주한 뒤 titrated cell 만이 처리된 군(NA), 생리 식염수 군(VH), B-lymphocyte 에 대한 mitogen으로 이용되는 LPS(Lipopolysaccharide)를 처리한 LPS군 25ug/ml의 농도로 처리하여 10% CO₂, 7% O₂, 83% N₂의 혼합가스로 약 5psi의 압력의 stain-less tissue culture chamber를 8~10 rocks/min의 속도로 교반시키며 37℃, 5% CO₂ 배양기에서 72시간동안 배양하였다. Trinitrophenyl-heptenated sRBC에 대한 AFC는 Jerne plaque forming assay를 변형하여 시행하여 활성 지표로 사용하였다.

그 결과 계통별 B 임파구 활성측정에서 교잡군(Hybrid) BDF1의 경우가 가장 우수하게 나타났으며, (Fig 1)이 결과를 토대로 BDF1을 실험에 이용하였다.

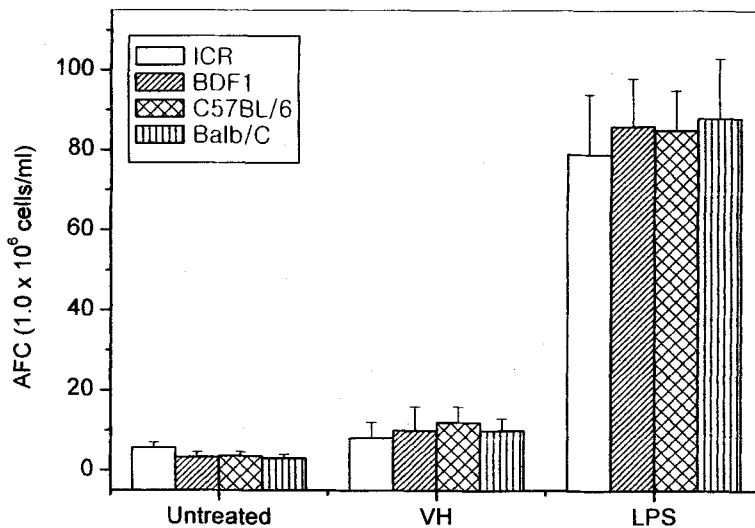


Fig 1. B-Lymphocyte stimulating effects of response to sRBC in various mice strains.

또한 배양 시간 및 sample 처리 농도를 결정하기 위하여 예비실험을 수행하였다. 그 결과 72시간 배양에서 최적의 상태가 나타남을 알 수 있었으며, (Fig 2) sample의 처리 농도에 서도 25ug/ml 의 농도에서 경제적인 활성 실험을 수행 할 수 있음을 알 수 있었다. (Fig 3)

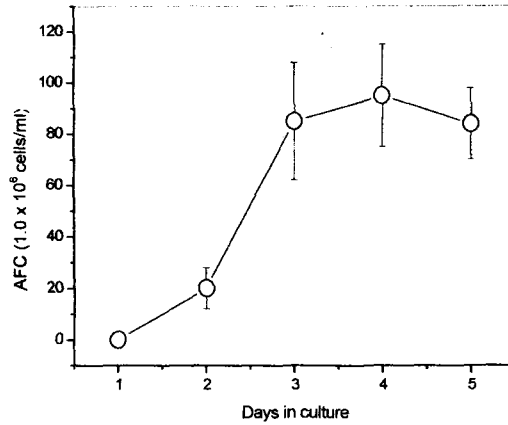


Fig 2. B-Lymphocyte stimulating effects of response B cell culture times.

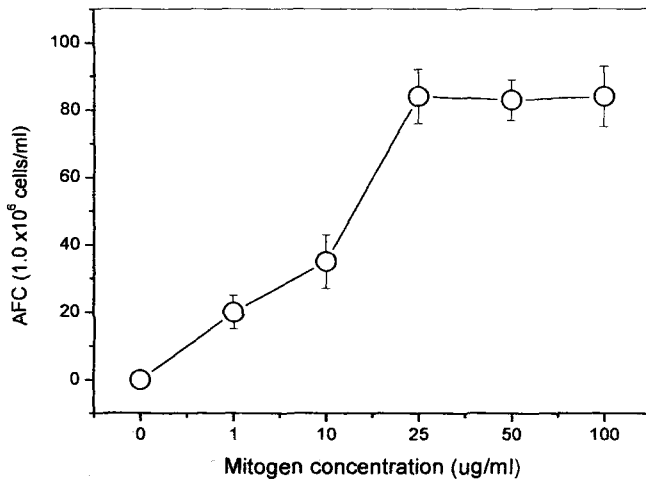


Fig. 3. Response of normal mouse spleen cell suspensions to sRBC in various mitogen (LPS) concentrations.

나. 면역조절 물질 생산 균주의 탐색 및 특성 조사

총 13종의 버섯 자실체로부터 얻어진 열수 추출 조 다당의 건조 수율의 경우 약 3%~45% 정도로 나타났으며, 이들의 조 다당을 약물로 하여 B 임파구의 항체 형성능을 조사한 결과 비늘버섯 자실체 ASI 24002 및 ASI 24007의 조 다당체의 생물학적 활성능이 매우 강하게 나타나는 결과를 확인하였다. 그 외 *Lyophilium decaster*와 *Clitocybe nebularius*가 비교적 강한 활성을 보였음을 확인하였다. (Fig 4, Table 1)

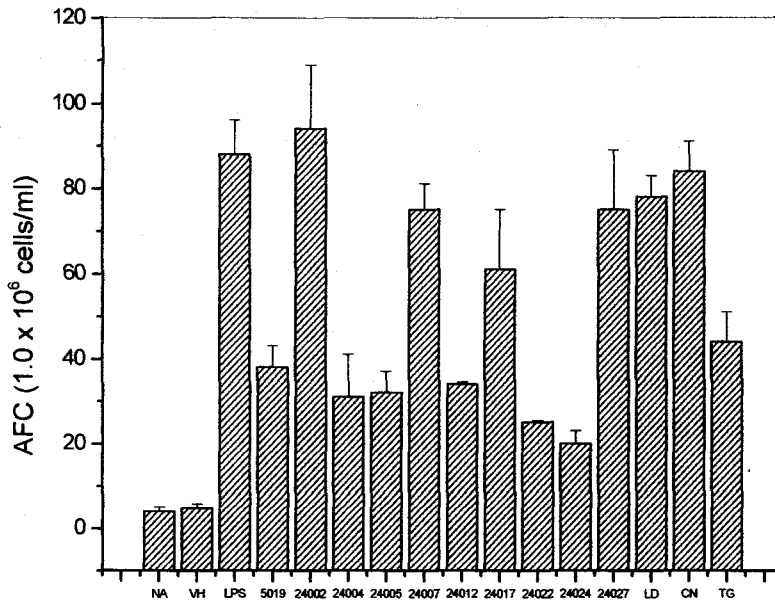


Fig. 4. Immuno-stimulating activity of hot-water extracts from various mushrooms
 LD: *Lyophillum decaster*, CN : *Clitocybe nebularius*, TG : *Tricholoma giganteum*

Mushroom	Yield (mg/g)
ASI 5019	329
ASI 24002	127
ASI 24004	292
ASI 24005	233
ASI 24007	446
ASI 24012	275
ASI 24017	27
ASI 24022	255
ASI 24024	185
ASI 24027	298
<i>Lyophillum decaster</i>	203
<i>Clitocybe nebularius</i>	65
<i>Tricholoma giganteum</i>	158

Table 1. Yields of hot-water extract from various mushrooms

이와 같은 실험 결과를 바탕으로 약 104종의 공시균주의 열수 추출 조 다당의 B 임파구 면

역 활성 조절물질에 대한 스크리닝을 수행하였으며, 사용 배지에 따른 차이점을 알아보기 위하여 각기 다른 종류의 배지 (PDA, YM)를 이용하여 배양한 균주를 추출하여 실험에 이용하였다. 그 결과 PDA 배지에서 배양한 균사체로 부터 조 다당체와 YM 배지에서 배양한 균사체의 조 다당체의 B 임파구 항체 형성능에서 다소 차이를 보였다. 이 결과 성장조건의 차이에 의하여 면역 활성 조절물질의 생산에 영향을 줄 수 있을 것으로 추측된다. (Fig 5) 또한 여러 공시 균주들 중에서 비늘 버섯류의 B 임파구 항체 형성능이 우수한 것으로 판명하였으며, B 임파구 항체 형성능이 우수한 균주 중 비늘버섯 균주 24007의 경우 PDA 배지 및 YM 배지에서의 항체 형성능 효과가 우수하였으나, 24017의 경우 YM 배지의 항체 형성능이 우수하였으나 편차가 심하였다.

다른 버섯 균주의 B 임파구 항체 형성능이 positive control에 비하여 대부분 약하게 나타나는 것을 알 수 있었으나, 일부 균사체 추출 조 다당 특히 후보 균주인 차가 74006의 경우에는 우수한 항체 형성능을 보였다. (Fig 5,6)

따라서, 본 연구팀에서는 B 임파구 활성이 우수하고, 결과적 편차가 적은 균주인 비늘버섯 후보균주 24007과 차가버섯 후보균주 74006을 선별하게 되었다.

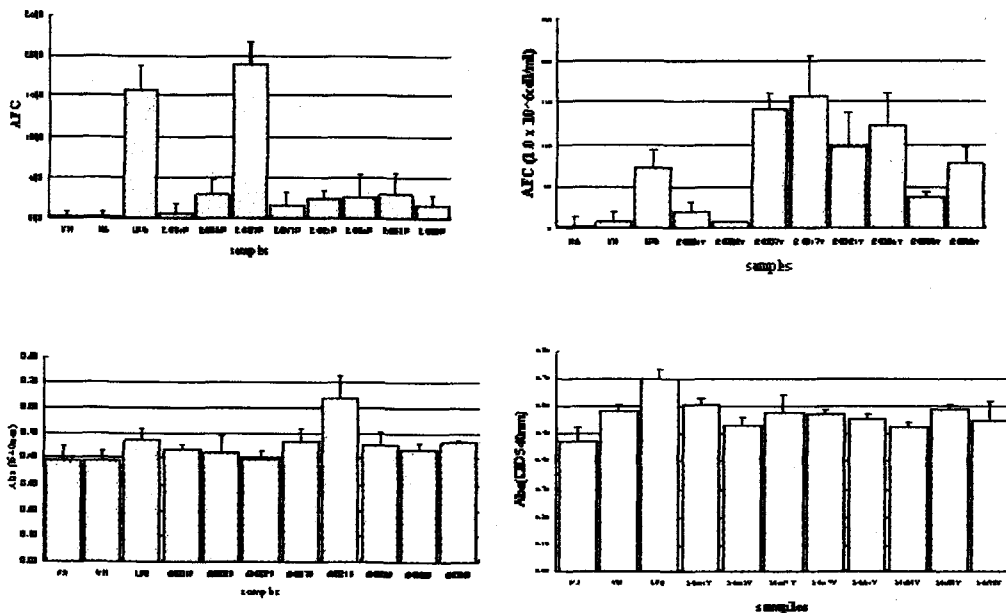


Fig 5. Plaque forming cell assay activity of hot-water extraction from spawn mushrooms.

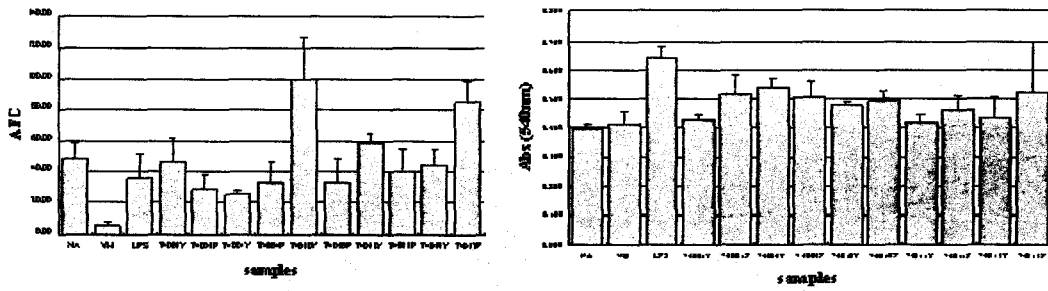


Fig 6. Finally PFC assay and HAS assay result of hot-water extract.

배양된 차가 버섯 균사체 및 비늘 버섯 균사체 추출 단백 다당체의 수용성 형태 및 비늘 버섯 자실체 추출 단백 다당체를 이용한 B 세포 면역 활성 평가를 수행하였다. 본 실험은 생후 4주령이 된 마우스 BDF₁의 비장을 무균적으로 적출을 한 후 세포 배양액에 녹여 5 X 10⁶ cells/ml의 세포수로 48well plate에서 추출 다당체를 생리 식염수에 녹여 10mg/ml의 농도로 처리한 후 약 72시간동안 37도 CO₂ 배양기에서 5기압의 기압을 주어 무균적으로 배양한 후 실험에 사용하였다. 그 결과 균사체보다는 자실체 추출물에서 약간의 높은 B세포 면역 증강 효과를 보이는 것으로 나타났으며 이는 배양 균사체 보다 자실체의 단백 다당체 유효 성분이 좀 더 많을 것으로 추정된다.

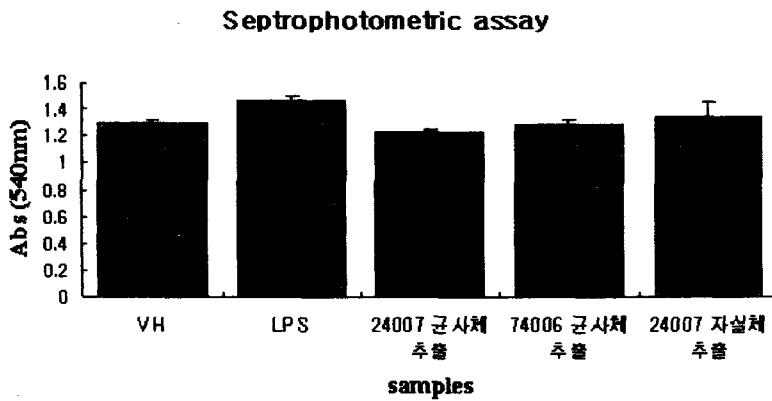
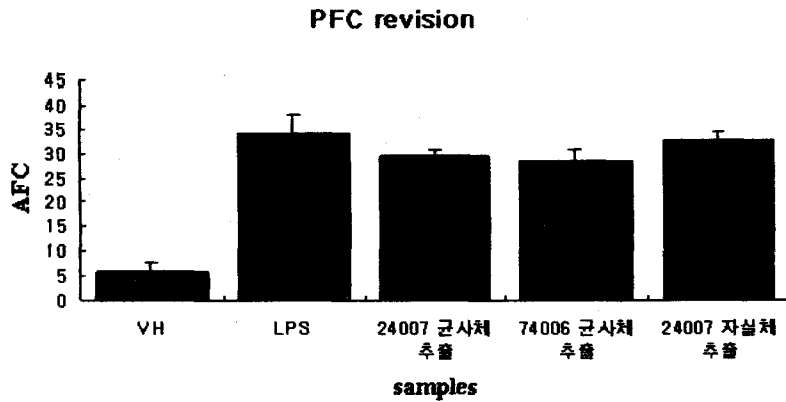


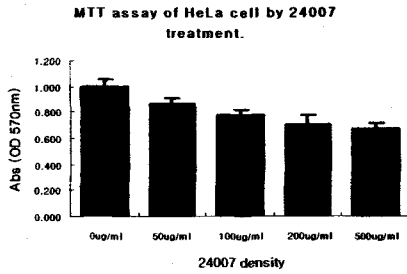
Fig 14. 비늘버섯 및 차가 버섯의 균사체 추출물과 비늘버섯의 자실체 추출물의 B 세포 면역 활성화도 측정.

VH: 생리 식염수, LPS: positive control, 24007: 비늘 버섯, 74006: 차가 버섯

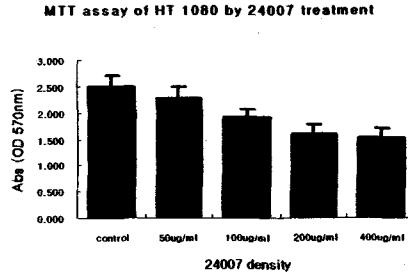
다. 비늘 버섯 균사체 추출물 (24007)의 항암 활성 평가

1. Animal cell cyto-toxicity and proliferation assay by 24007 protein polysaccharide complex treatment.

A.



B.



C.

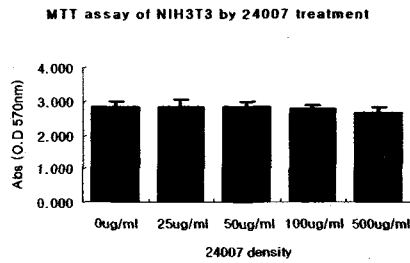


Fig 9. Cell proliferation assay of cancer and fibroblast cell line by 24007 extractor dose-dependent treatment. A and B is human cancer cell line and C is mouse fibroblast cell line.

MTT 세포 독성 실험 결과 대장암 세포주(HT1080)과 자궁 경부암 세포주(HeLa)에 대하여 농도 의존적으로 세포의 증식을 억제하고 정상세포에 대하여는 독성이 없는 것을 확인하였다. 그러나 SW 480 type의 대장암 세포주에 대해서는 우리가 기대했던 효과는 보이지 않았다. 이는 특정 암 세포주에 대해서만 선택적으로 작용하는 것으로 사료된다.

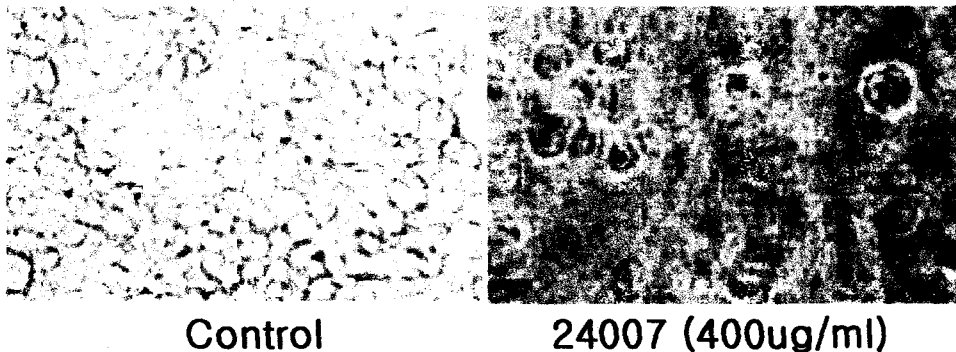


Fig 10. Effect of *Pholiota squarrosa* hot water extract on 100Φ dish of HeLa cells(×400)

또한 HeLa 세포주의 경우에는 100Φ dish에서 배양을 시켜 본 결과 72hr정도 배양을 할 경우에는 많은 양의 세포가 죽어서 뜨는 것을 확인 할 수 있었고, 실제로 세포를 현미경으로 확인 하였을 경우에도 정상세포보다 세포의 숫자나 모양이 틀린 것을 확인 할 수 있었다. (Fig 10) 이는 비늘버섯 후보균주 24007의 추출물이 암 세포주의 정상적인 성장 및 분화를 방해하거나 암 세포에 직접적인 작용으로 인해 세포 독성을 나타냄을 간접적으로 의미하는 것이라 사료된다. 이와 같은 결과를 토대로 볼 때 비늘버섯 열수 추출물이 암 세포주에 직접적인 독성을 나타낼 수 있다는 사실을 알 수 있었다.

2. 비늘버섯 24007의 열수 추출물에 의한 암세포주의 apoptosis 유도 활성 능 검색

대장암 세포 주 HT1080세포를 G-DEX™ Genomic DNA Extraction Kit (intron bio)를 사용하여 암세포주의 apoptosis 유도능을 검색한 결과 chromosomal DNA는 비늘버섯 추출물을 처리한 것에서 약간의 끌리는 것을 볼 수 있는데 이것은 DNA의 degradation이 일어나기 시작하여 apoptosis로 시작되는 단계로 가는 것으로 추측된다.(Fig 11.)

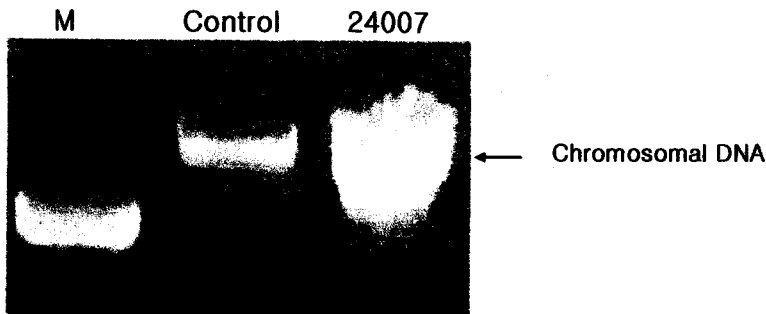


Fig 11. DNA fragmentation assay of HT1080 by 24007 hot water extract treatment.

이 결과로 추론해 보면 비늘 버섯 추출물의 경우 암 세포주에서 세포 사멸(apoptosis)를 유도 할 수 있으며, 암 세포에 특이적인 독성을 보임으로서 암 세포의 성장을 억제 할 수 있는 약물이라 사료된다.

3. 비늘버섯 추출물의 암 전이 효소의 발현 억제 능 조사.

세포는 인체 내에서 어느 정도 성장을 하게 되면 다른 부위로 전이 및 침윤이 일어난다. 전이가 일어나기 위해서는 암 세포내에서 Matrix metalloproteinase(MMPs)라는 단백질을 발현시키고, 이 MMP가 혈관내피세포를 붕괴 암세포의 침투 부착 할 수 있게 한다.

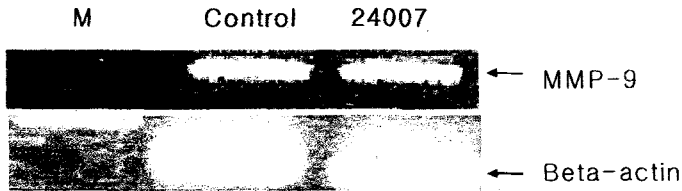


Fig 12. RT-PCR result of HT 1080 by 24007 extract treatment.

RT-PCR을 수행한 결과 MMP-9의 경우에는 24007 추출물을 처리한 것이 MMP-9의 mRNA의 발현양이 적음을 알 수 있었다. 이는 세포외에서 24007 추출물이 세포와 반응하여 signal을 세포내로 주어서 MMP의 mRNA의 발현양을 조절한 것으로 보아 24007 추출물이 소량의 단백분해를 통하여 암세포의 전이나 침윤에 직접적인 역할을 하는 것으로 추측된다.(Fig 12.13)

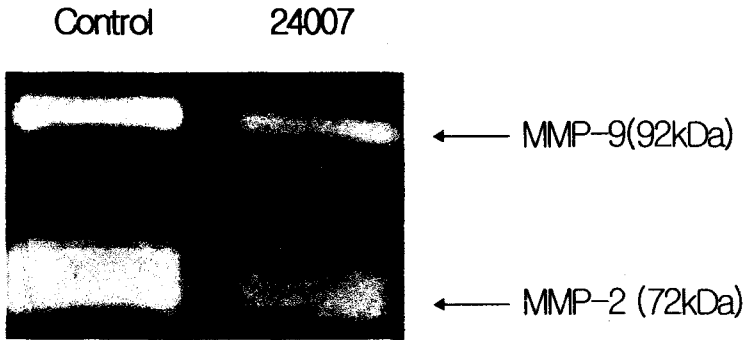


Fig 13. Effect of 24007 hot water extract (400ug/ml) on MMPs activities in HT1080 cells

라. 차가 버섯 74006 열수 추출물의 항암 활성도 측정

1. 세포주에 따른 세포 독성 검사.

각각의 세포주를 96-well plate에 1000cells/well/200ul의 세포수로 각각의 농도에 따라 8well씩 도포하였고, 5% CO₂ 37℃ 배양기에서 약 48hr동안 배양하였다. 배양 후 각각의 농도에 따라 24007 열수 추출물을 처리한 후 24hr뒤에 배지를 모두 제거하였다. 그리고 serum이 없는 DMEM 배지에 MTT를 0.5mg/ml의 농도로 각각의 well에다가 200ul씩 처리한 후 3~4시간동안 5% CO₂ 37℃ 배양기에서 배양하였다. 배양 후 배지를 모두 제거한 후 DMSO로 100ul/well로 세포를 녹인 후 ELISA reader로 570nm의 흡광도에서 각각의 O.D값을 측정한 후 수치화 하였다.

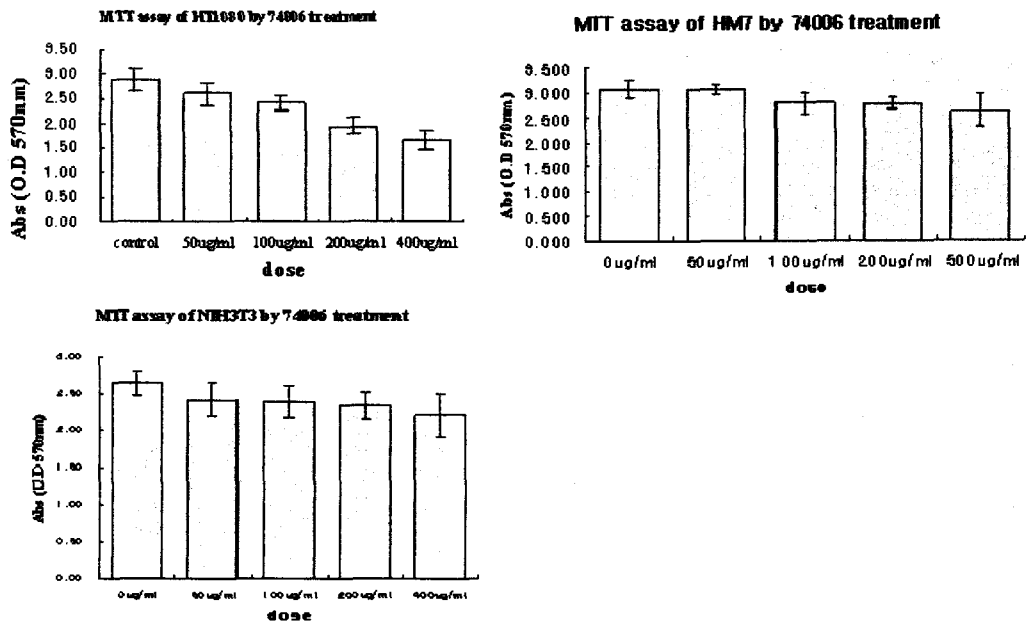


Fig 15. Cell proliferation assay of cancer and fibroblast cell line by 24007 extractor dose-dependent treatment. A and B is human cancer cell line and C is mouse fibroblast cell line.

차가 버섯 추출물의 각각의 세포에 대한 proliferation을 확인해 본 결과 각각의 세포주에 대해서는 농도 의존적으로 감소하는 것으로 확인되었다. 이는 비늘버섯과 유사한 기전으로 세포주의 proliferation에 영향을 주는 것으로 추측된다.

2. 차가버섯 추출물의 세포 사멸 유도 활성 검색

Control 100ug/ml 200ug/ml 400ug/ml



← Chromosomal DNA

Fig 16. DNA fragmentation assay of HT1080 by 74006 extract treatment.

apoptosis의 초기의 세포 상태는 chromosomal DNA가 random하게 잘리는 과정에서부터 발생 하므로 그에 근거하여 chromosomal DNA를 추출하여 확인 하여 본 결과 큰 영향이 없었다. 그러나 400ug/ml의 농도에서는 끌리는 정도가 심한 것으로 보아 약간의 necrosis를 유도시킨 것으로 추측된다.

3. RT-PCR을 이용한 단백 분해 효소 (MMPs) 발현능 검색

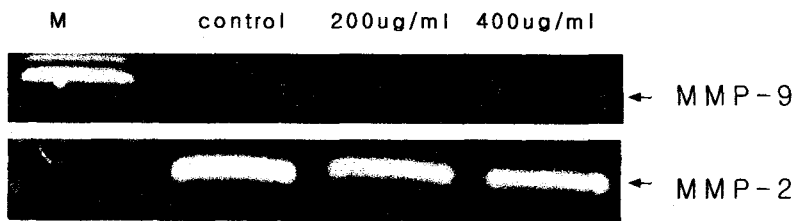


Fig 17. RT-PCR of HT1080 by 74006 extract treatment.

최근 보고에는 버섯에서 추출한 단백 다당체에 의하여 MMPs의 발현 및 MMPs 자체의 단백성분을 분해하거나 inactivation 시키는 보고가 늘어 나고 있다. 따라서 본 실험도 그것과 유사한 효과를 기대하여 수행하였으나 농도에 별 차이는 발견하지 못했다.

4. SDS-PAGE를 이용한 차가 버섯 추출물 분자량 측정

SDS-PAGE는 일반적으로 단백질의 분자량 측정 및 단백질의 특성에 따른 분리등 최근 각광받고 있는 proteomics에 많이 이용되는 측정법이다. 특히 단백질의 크기에 따라 단백질의 발현 정도나 단백질의 크기, 항체를 이용한 western blot을 이용하여 많은 세포내 신호 전달 체계 연구에 이용되는 기술로서 많이 수행되어지는 방법 중 하나이다. 본 실험은 이러한 이론을 바탕으로 하여 차가 버섯 조 다당체의 대략적인 크기를 확인해 본 결과 약 30~32kDa의 대략 적인 분자 크기를 확인 할 수 있었다.

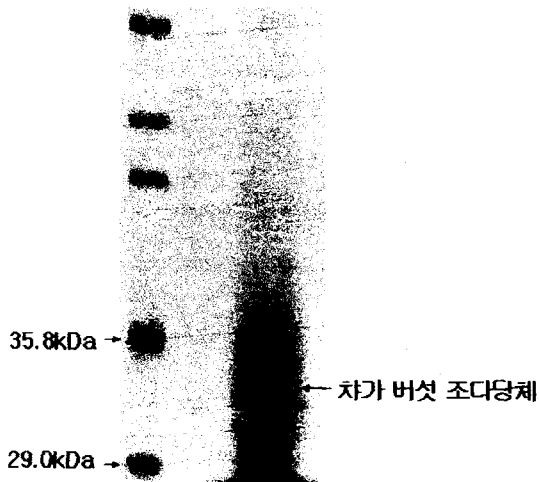


Fig 18. SDS-PAGE gel을 이용한 차가 버섯 조 다당체 분자량 측정.

5. 차가 버섯을 이용한 항 당뇨 및 비만 억제 효과.

차가 버섯 추출물의 항 당뇨 억제 효과에 대한 활성 측정 방법으로 비만 모델인 ob/ob nick out mice를 이용한 실험을 수행하였다. 차가 버섯 균사체 열수 추출물을 soluble 형태로 실험실 내에서 제조한 후 생리 식염수에 100mg/ml의 농도로 맞추어 최종 농도 200ug/kg의 농도로 ob/ob mice에 매일 1회 약 30일 동안 주사하였다. 그 결과 비만 당뇨 모델인 ob/ob mice의 몸무게 편차가 약 20% 정도 나타나는 것으로 확인되었고, 이는 고도 비만을 어느정도 억제 시킬 수 있는 효과를 확인 할 수 있었다. 또한 Glucose analyzer를 이용한 혈당 측정에서 약 40%의 혈당 억제 효과를 확인하였다. (Fig 19,20)

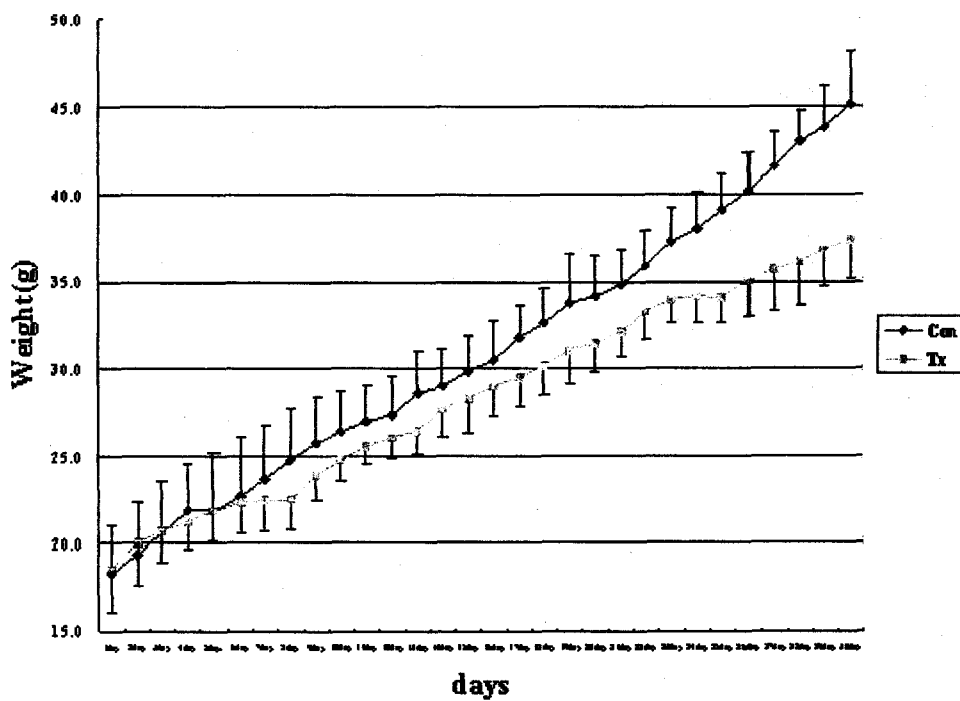


Fig 19. Diabets Mellitus model mouse (ob/ob mouse) body weight of chaga hot-water extract.

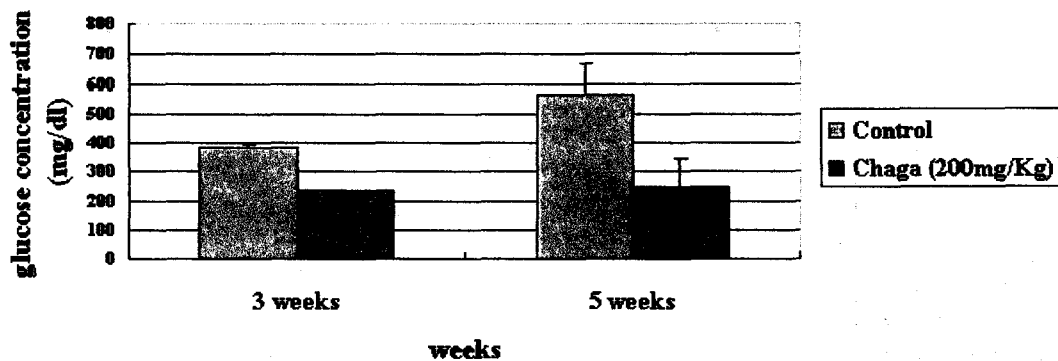


Fig 20. Diabet model mouse blood glucose analysis.

마. 차가버섯 (74006)의 제제화 연구

1. 비늘버섯(24007)과 차가버섯(74006)의 구성 당 분석

비늘버섯(24007), 차가버섯(74006)조 다당 시료에 2M trifluoroacetic acid(TFA)를 첨가하여 100℃에서 4시간(중성당), 6N HCl을 넣고 100℃에서 4시간(아미노당) 동안 각각 가수분해 시킨 후 감압 증류하여 가수 분해된 다당 분해물을 정량적 분석을 위해 ion exclusion HPLC를 이용 분석한 결과 비늘버섯(24007)는 조 다당 중 당성분이 22%를 차지하고 그중 주성분은 glucose이며, 차가버섯(74006)의 주성분 또한 glucose이다. 따라서 비늘버섯(24007), 차가버섯(74006)의 다당 성분이 면역 증강활성을 나타냈다는 것을 알 수 있었다.

sugar/samples	74006	24007
fucose	0.000	0.000
galactosamine	0.001	0.000
glucosamine	0.004	0.010
galactose	0.015	0.011
glucose	0.084	0.203
mannose	0.010	0.000
Total	0.114	0.223

Table. 2. 비늘, 차가버섯의 구성 당 조성

2. 활성물질의 대량 추출법

추출용매별 엑스함량시험; 대량추출조건을 확립하기 위해 차가버섯 균사체를 100%, 80%, 60% 물로 2시간 동안 환류추출(3회 반복)후, 여과하고 각 시료를 농축하여 Ex.함량 및 α-Methyl glucose의 함량을 측정한 결과 차가버섯 균사체 물 추출물의 경우, 수성엑스(T.S.로써)의 함량이 6.8%이고, g당 표준물질인 α-Methyl glucose의 양이 평균 50.3mg/g, 80% 물 추출물은 34.8mg/g, 60% 물 추출물은 27.5mg/g이었다. 이상의 결과 대량 추출 시 용매의 선정은 100% 물로 추출하는 것이 가장 유리 할 것으로 판단된다.

물(농도)	100%	80%	60%
수성엑스함량(T.S., %)	6.8	6.4	5.5
α -Methyl glucose함량 (mg/g-건조)	50.3	34.8	27.5

Table 3. 차가버섯 균사체를 각각 100, 80, 60% 물로 추출했을 때 엑스의 함량 및 α -Methyl glucose의 함량

차가버섯 균사체의 제제화를 위한 대량 추출 대량 추출방법의 연구를 위해 본사가 보유하고 있는 산업용 추출탱크(0.2ton)에서 추출용매별 엑스함량시험결과 얻은 조건대로 10배의 물로 차가버섯 균사체를 각 10kg 씩 2번에 걸쳐 교반하면서 100℃에서 대량추출을 실시하였다. 실시결과 74006의 수성엑스는 0.57kg과 0.59kg이었다. 추출효율은 평균 85% 수준으로 좋은 편이었다.

3. 차가버섯의 정제 제조방법

정제의 조성; 대량추출공정을 통해 얻은 74006의 수성엑스를 T.S. 70%가 되도록 농축한 후 74006(T.S.)로써 45mg(혼합시에 첨가되는 수성엑스함량은 45mg이 넘지만 제제를 만드는 공정상의 건조과정을 거치면서 감량이 된다)이 되도록 300mg의 정제 제조를 목표로 table 4 에서와 같이 정제를 만들었다. 많이 사용되는 유당(lactose)과 전분 주부형제로 하고 콩 단백질과 콩 flavonoids와 활택제로써 Mg stearate를 사용하여 각 부형제의 함량을 다르게 해 4가지의 제제를 만들었다 (Table 4.)

성분함량 mg (정제300mg중)	A type	B type	C type	D type
엑스 (T.S로서)	45	45	45	45
콩단백질	27	27	27	27
콩flavonoids	0.15	0.15	0.15	0.15
유당	164.85	154.85	144.85	134.85
전분	60	70	80	90
Mg stearate	3	3	3	3

Table 4. 차가버섯 균사체를 이용하여 만든 4가지 정제의 조성

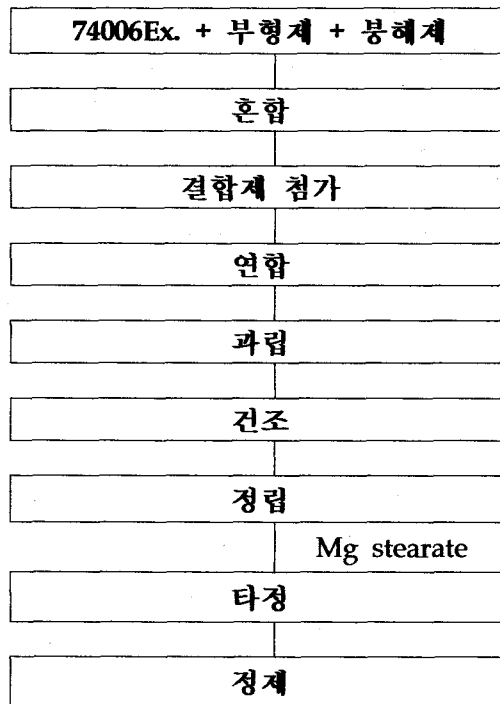
-정제; 표 3에서와 같이 정제에 대한 일반시험결과 A, B type은 경도가 떨어졌고 C D는 경도가 와 붕해 시간이 비교적 양호하여 C, D type 중 하나의 제제방법을 선정해도 별 문제는 없을 것이다.

정제600mg중	A type	B type	C type	D type
붕해도	32'20"	26'1"	24'3"	23'7"
함량시험 mg/1정 (α -Methyl glucose)	3.5	3.3	3.4	3.5
중량편차(%)	9.7	11.8	12.6	8.7
경도(kg)	4.2	4.6	5.75	6.0
성상	미색	미색	미색	미색

Table 5. 차가버섯 균사체 수성 엑스를 이용하여 만든 정제의 제제일반시험.

-정제의 제조 방법; Scheme 1에서와 같이 습식과립압축법을 응용하여 table 4 의 조성별로 정제를 만들었다. 74006 수성엑스를 직타법을 배제하고 먼저 습식과립을 만든 후 건조, 정립하여 타정하는 방법을 이용하였다.

Scheme 1. 74006 수성 엑스를 이용하여 만든 정제의 제조방법



4. 차가 버섯 정제의 성적서

시험항목	시험 기준	시험 결과	판 정
성상	갈색의 분말 발효성 특이치	적 합	적 합
함량시험	α -Methyl-D(+)-glucoside으 로써 1.0g中 50.5mg이상	76.8mg	적 합
건조감량	7.0%이하(105℃, 4時間)	5.6%	적 합
미생물시험	1)세균 : 3,000개/g 이하	300개	적 합
	2) 대장균 : 불검출	불검출	
중금속시험	20 ppm 이하 (Pb)	적 합	적 합
As	1.5mg/kg 이하	적 합	적 합
저장방법	기밀 보관	적 합	적 합

Table 6. 차가버섯 균사체 원료인 수성엑스분말의 성적서

결론

본 연구 과제를 수행함에 있어서 여러 가지 다양한 연구 기법 및 접근 방법을 통한 버섯류의 열수 추출 다당체를 확보하였고, 이를 통한 면역 활성화 능 실험 및 항암 활성화 실험, 혈당 강하 및 고도 비만 억제등 다양한 식품 및 의약품 소재로서의 가능성을 알아 볼 수 있었던 것이 중요하였다. 이러한 실험적 기술적 경험을 바탕으로 다음과 같은 결론을 얻을 수 있었다.

첫째, 면역 조절기능 생물활성 검색을 위한 마우스 strain 및 시료 농도에 따른 면역 반응성 조사 결과 교잡균(Hybrid) BDF₁이, 시료 농도는 25 μ g/mg 농도로 72시간 배양 조건이 최적의 상태임을 알았다.

둘째, 면역 조절 물질 생산 균주 선발을 위한 104종의 공시균주의 열수 추출물의 B 임파구 항체 능 조사 결과 균사체중 비늘버섯 24007과 차가버섯 74006의 조 다당체의 생물학적 활성능이 매우 강하게 나타났다.

셋째, 24007과 74006의 MTT법을 이용한 세포 독성 결과 대장암 세포주(HT1080)과 자궁 경부암 세포주(HeLa)에 대해 농도 의존적으로 세포의 증식을 억제하지만, 대장암 세포주(SW480)에는 효과가 없는 것으로 보아 특정 세포이 선택적으로 작용하는 것으로 판단되었다.

넷째, 24007 및 74006의 암세포주의 세포사멸 유도능을 검색한 결과 DNA의 fragmentation이 일어나는 것을 확인 하였고, 이는 세포 내에서 약물에 의한 세포 사멸 유도를 확인 할 수 있었다.

다섯째, RT-PCR을 통한 MMPs 의 mRNA 발현량 조사에서 24007 처리군이 MMP의 발현량이 적은 것으로 보아 24007 추출물이 단백 분해효소의 발현을 억제시킴으로서 암 세포의 invasion이나 metastasis를 억제 하여 암세포의 전이나 침윤을 억제 할 것으로 추측된다.

여섯째, SDS-PAGE를 이용한 74006의 추출물의 분자량은 대략 30-32KDa이다.

일곱째, 74006 조 다당을 이용한 항 당뇨 및 비만 억제 실험에서 처리군이 비 처리군에 비해 몸무게는 20%, 혈당은 40% 억제 효과가 있다.

여덟째, 24007, 74006 균사체의 조 다당 구성 성분의 대부분은 glucose이며, 그 외 glucosamine, galactose, mannose 등으로 구성되어 있다.

마지막으로 74006의 독성시험 결과 LD₅₀값이 2,000mg/kg이상으로 독성이 없는 것으로 확인 하였다.

고찰

항암 활성에 대한 개괄적인 작용 기작은 Fig 21과 같이 암 세포내 핵(Nucleus) 속의 Central Dogma에서 유전물질인 DNA로부터 mRNA로 전사(transcription)되는 과정에서 MMPs의 유전자에 비늘, 차가버섯의 열수 추출 다당체가 세포 외부의 어떠한 수용체로부터 세포 고유의 신호 전달 체계(signal transduction)를 통하여 전사 억제 신호를 전달받아 MMPs의 유전자가 발현이 되지 않도록 유도 하였고, 또한 cell membrane 밖으로 해리되어 나온 MMPs에 직접적으로 작용함으로써 MMP의 생성을 억제하여 암세포의 전이 및 성장을 억제하고, 나아가 세포에 직접적인 독성을 나타내는 결과를 얻었다. 그러나 어떠한 cell membrane상의 수용체(receptor)에서의 다당체와 반응으로 인한 신호 전달 과정은 아직 밝히지 못하였다. 이를 위해서는 좀더 다양한 방법적 연구를 통하여 접근해 갈 필요가 있을 것으로 사료된다.

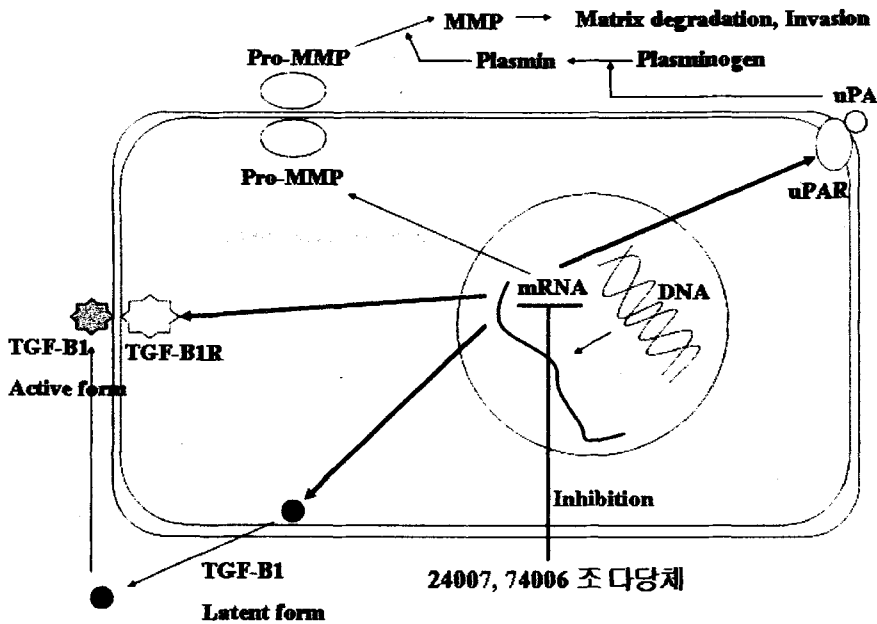


Fig 21. Putative mechanism of 24007 and 74006 hot-water extract suppression of tumor invasion capacity through inhibition of some invasion-related factors.

그리고 차가 버섯의 항 당뇨 효과의 경우 비만 동물 모델인 ob/ob mouse는 mouse 내에 leptin의 부족으로 인한 비만을 유도 하는 모델로서 차가 추출 다당체의 경우 고도 비만을 치료하기 위해 leptin를 투여하는데 차가 추출물의 경우 이와 유사한 효과를 보이는 것으로 추측되었다. 또한 혈당 강하 및 뇨당 강하를 유도하였고, 혈액속의 인슐린 저항성을 완화시키는 것으로 보아 새로운 식품 소재로 활용이 가능할 것이라 사료된다. 이를 바탕으로 기존에 알려진 버섯류의 의약품 및 기능성 식품의 다변화에 기여 할 것으로 확신한다.

참 고 문 헌

1. Gately, S., Twardowski, P., Stack, M.S., Cundiff, D.L., Grella, D., Cstellino, F.S., Enghild, J., Kwaan, H.C., Lee, F., Kramer, R.A., Volpert, O., Bouck, N., Soff, G.A., 1997. The mechanism of cancer-mediated conversion of plasminogen to the angiogenesis inhibitor angiostatin. *Proceedings of the National Academy of Sciences (USA)* 94, 10868-10872.
2. Good, D.J., Polverini, P.J., Rastinejad, F., Le Beau, M.M., Lemons, R.S., Frazier, W.A., Bouck, N.P., 1990. A tumor suppressor-dependent inhibitor of angiogenesis is immunologically and functionally indistinguishable from a fragment of thrombospondin. *Proceedings of the National Academy of Sciences (USA)* 87, 6624-6628.
3. Han, S.B., Lee, C.W., Jeon, Y.J., Hong, N.D., Yoo, I.D., Yang, K.H., Kim, H.M., 1999. The inhibitory effect of polysaccharides from *Phellinus linteus* on tumor growth and metastasis. *Immunopharmacology* 41, 157-164.
4. Ingber, D., Fujita, T., Kishimoto, S., Sudo, K., Kanamaru, T., Brem, H., Folkman, J., 1990. Synthetic analogues of fumagillin that inhibit angiogenesis and suppress tumor growth. *Nature* 348, 555-557.
5. Kim, H.M., Han, S.B., Oh, G.T., Kim, Y.H., Hong, D.H., Hong, N.D., Yoo, I.D., 1996. Stimulation of humoral and cell mediated immunity by polysaccharide from mushroom *Phellinus linteus*. *International Journal of Immunopharmacology* 18, 295-303.
6. Kim, M.S., Lee, Y.M., Moon, E.J., Kim, S.E., Lee, J.J., Kim, K.W., 2000. Anti-angiogenic activity of torilin, a sesquiterpene compound from *Torilis japonica*. *International Journal of Cancer* 87, 269-275.
7. Kim, D.H., Yang, B.K., Jeong, S.C., Park, J.B., Cho, S.P., Das, S., Yun, J.W., Song, C.H., 2001. Production of a hypoglycemic, extracellular polysaccharide from the submerged culture of the mushroom *Phellinus linteus*. *Biotechnology Letters* 23, 513-517.
8. Lee, S.K., Mbwambo, Z.H., Chung, H., Luyengi, L., Gamez, E.J., Mehta, R.G., Kinghorn, A.D., Pezzuto, J.M., 1998. Evaluation of the antioxidant potential of natural products. *Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening* 1, 35-46.

9. Lim, K.T., Hu, C., Kitts, D.D., 2001. Antioxidant activity of a *Rhus verniciflua* Stokes ethanol extract. *Food Chemistry and Toxicology* 39, 229-237.
10. Mashino, T., Takigawa, Y., Saito, N., Wong, L.Q., Mochizuki, M., 2000. Antioxidant activity and xanthine oxidase inhibition activity of reductic acid: ascorbic acid analogue. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters* 10, 2783-2785.
11. McCord, J.M., Fridovich, I., 1968. The reduction of cytochrome C by milk xanthine oxidase. *Journal of Biological Chemistry* 243, 5753-5760.
12. Muller, G., Behrens, J., Nussbaumer, U., Bohlen, P., Birchmeier, W., 1987. Inhibitory action of transforming growth factor beta on endothelial cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences (USA)* 84, 5600-5604.
13. Park, J., Lee, B.R., Jin, L.H., Kim, C.K., Choi, K.S., Bahn, J.H., Lee, K.S., Kwon, H.Y., Chang, H.W., Baek, N.I., Lee, E.H., Kang, J.H., Cho, S.W., Choi, S.Y., 2001. The stimulatory effect of *Ganoderma lucidum* and *Phellinus linteus* on the antioxidant enzyme catalase. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology* 34, 144-149.
14. Reiter, R.J., 1995. Oxidative processes and antioxidative defense mechanism in the aging brain. *FASEB Journal* 9, 526-533.
15. Sasaki, T., Fukai, N., Mann, K., Gohring, W., Olsen, B.R., Timpl, R., 1998.
16. Bock, K., Duus, J.Ø., Norman, B., Pedersen, S., 1991. Assignment of structures to oligosaccharides produced by enzyme degradation of a b-D-glucan from barley by ¹H and ¹³C-NMR spectroscopy. *Carbohydr. Res.* 211, 219.233.
17. Bohn, J.A., BeMiller, J.N., 1995. (1,3)-b-D-glucans as biological response modifiers: a review of structure-functional activity relationships. *Carbohydr. Polym.* 28, 3.14.
18. Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248.254.
19. Chihara, G., Himuri, J., Maeda, Y.Y., Arai, Y., Fukuoka, F., 1970. Fraction and purification of the polysaccharides with marked antitumor activity, especially, lentinan, from *Lentinus edodes* (Berk)SING. *Cancer Res.* 30, 2776.2781.

20. Dai, Y.C., Xu, M.Q., 1998. Studies on the medicinal polypore, *Phellinus baumii*, and its kin, *P. linteus*. *Mycotaxon* 67, 191.200.
21. Dais, P., Perlin, A.S., 1982. High-field ^{13}C -NMR spectroscopy of β -D-glucans, amylopectin, and glycogen. *Carbohydr. Res.* 100, 103. 116.
22. Ensley, H.E., Tobias, B., Pretus, H.A., McNamee, R.B., Jones, E.L., Browder, I.W., Williams, D.L., 1994. NMR spectral analysis of a water-insoluble (1,3)- β -D-glucan isolated from *Saccharomyces cerevisiae*. *Carbohydr. Res.* 258, 307.331.
23. Hamuro, J., Rollinghoff, M., Wagner, H., 1978. β -(1,3)Glucanmediated augmentation of alloreactive murine cytotoxic T-lymphocytes in vivo. *Cancer Res.* 38, 3080.3085.
24. Kim GY, Park HS, Nam BH, Lee SJ, Lee JD. Purification and characterization of acidic proteo-heteroglycan from the fruiting body of *Phellinus linteus*. In: Berk JD, Curtis MA, editors. *Teng Biores Technol*, vol. 87; 2003. In press.
25. Gorman A, McGowan A. Cotter TG. Role of peroxide and superoxide anion during tumour cell apoptosis. *FEBS Lett* 1997;404:27- 33.
26. Chihara G. Preclinical evaluation of lentinan in animal models. *Adv Exp Med Biol* 1983;166:189-97.
27. Chihara G. Immunopharmacology of lentinan and the glucans. *Rev Immunol Immunopharmacol* 1984;4:48- 96.
28. Furue H. Biological characteristics and clinical effect of sizofilan (SPG). *Drugs Today* 1987;23:335- 46.
29. Matsuo T, Arika T, Mitani M, Komatsu N. Pharmacological and toxicological studies of a new antitumor polysaccharide, schizophyllan. *Arzneim Forsch Drug Res* 1982;32:647- 56.
30. Arika T, Amemiya K, Matsuo T, Kato T. Experimental antitumor activity of schizophyllan. *Proc 13th Int Congr Chemotherapy* 1983;238:53- 8.
31. Adachi Y, Ohno N, Yadomae T. Inhibitory effect of beta-glucans on zymosan-mediated hydrogen peroxide production by murine peritoneal macrophages in vitro. *Biol Pharm Bull* 1993;16:462- 7.

32. Zhang J, Tang Q, Zimmerman-Kordmann M, Reutter W, Fan H. Activation of B lymphocytes by GLIS, a bioactive proteoglycan from *Ganoderma lucidum*. *Life Sci* 2002;71:623- 38.

33. Renzo LD, Yefenof E, Klein E. The function of human NK cells is enhanced by h-glucan, a ligand of CD3 (CD11b/CD18). *Eur J Immunol* 1991;21:1755- 8.
Structure, function and tissue forms of the C-terminal globular domain of collagen XVII containing the angiogenesis inhibitor endostatin. *EMBO Journal* 17, 4249-4256.

* 별첨

1. 차가 버섯 단핵 투여 독성 시험 자료

- 끝 -

(주)바이오톡스텍
BIOTOXTECH

최종보고서

HS 74006의 마우스를 이용한
경구 단회투여 독성시험

Oral single dose toxicity study
of HS 74006 in mice

시험번호 : B04065

2004년 05월 29일

충청북도 청원군 오창면 양청리 686-2 오창과학산업단지 58-1 블록
㈜바이오톡스텍

최종보고서의 작성

시험제목 : HS 74006의 마우스를 이용한 경구 단회투여 독성시험

시험번호 : B04065

본 시험은 다음의 Good Laboratory Practice(GLP) 규정 및 시험기준을 준수하여 수행되었다.
또한 (주)바이오톡스텍의 표준작업수순서(SOP)에 준수하여 수행되었다.

■ Good Laboratory Practice

- 비임상시험관리기준(식품의약품안전청고시 제 2000-63호, 2000. 12. 11)

■ 시험기준

- 의약품등의 독성시험기준(식품의약품안전청고시 제 1999-61호, 1999. 12. 22)

본 시험은 승인된 시험계획서에 따라서 수행되었고, 이 보고서의 기술된 시험과정은 시험책임자의 책임 하에 수행되었으며, 보고서는 시험수행을 통해 얻어진 시험기초자료를 토대로 작성되었다.

(주)바이오톡스텍

시험책임자 이해영 _____

년 월 일

(주)바이오톡스텍

운영책임자 이종성 _____

년 월 일

시험실시의 개요

시험제목 : HS 74006의 마우스를 이용한 경구 단회투여 독성시험

시험번호 : B04065

1. 시험목적

마우스를 이용하여 HS 74006을 경구로 단회투여시 나타나는 독성을 평가하고
개략의 치사량을 구하기 위함이다.

2. GLP

이 시험의 모든 과정은 다음 GLP 규정을 준수하였다.

- 비임상시험관리기준(식품의약품안전청고시 제 2000-63 호, 2000. 12. 11)

3. 시험기준

이 시험은 다음 시험기준에 준수하여 실시하였다.

- 의약품등의 독성시험기준 (식품의약품안전청고시 제 1999-61 호, 1999. 12. 22)

4. 신뢰성보증

㈜바이오텍스텍 신뢰성보증업무담당자는 시험계획서의 점검 및 시험 중 점검을
수행하였으며, 시험기초자료를 토대로 보고서에 대한 점검을 수행하였다.

5. 시험의뢰자

명 칭 ㈜한국신약
주 소 충청남도 논산시 양촌면 중산리 805-15

6. 시험기관

명 칭 ㈜바이오텍스텍
주 소 충청북도 청원군 오창면 양청리 686-2 오창과학산업단지 58-1 블록

7. 시험시설

명 칭 ㈜바이오텍스텍
주 소 충청북도 청원군 오창면 양청리 686-2 오창과학산업단지 58-1 블록

8. 기록 및 자료의 보존

(1) 보존기간 : 시험종료 후 5년

(2) 보존자료

시험계획서 (초안 및 원본), 시험기초자료, 최종보고서 (초안 및 원본), 시험관련 기록문서 (GLP 관련서류, 통신연락 문서)

(3) 보존장소

(주)바이오텍스텍 자료보관실
충청북도 청원군 오창면 양청리 686-2 오창과학산업단지 58-1 블록

9. 시험일정

시험개시일	2004년 3월 30일
동물입수	2004년 3월 31일
검역·순화종료	2004년 4월 06일
군분리	2004년 4월 06일
실험개시일	2004년 4월 07일
투여	2004년 4월 07일
관찰기간	2004년 4월 07일 ~ 4월 21일
부검	2004년 4월 21일
실험종료일	2004년 4월 21일
최종보고서제출일	2004년 5월 29일
시험종료일	2004년 5월 29일

10. 업무 담당 및 시험종사자

시험책임자, 시험계획서 작성, 업무지시와 관리 및 최종보고서 작성
서민수, 이해영, 박철범

검역·순화기간 중의 일반증상관찰 및 체중측정
서민수, 안영은, 김영선

동물관리책임자 김갑호

시험물질의 조제 김은애

투여 안영은

일반증상관찰 및 체중측정 서민수, 안영은, 이선호

병리 박선희

목 차

	페이지
최종보고서의 작성	201
시험실시의 개요	202
신뢰성보증 확인서	204
I. 요약	206
II. 시험목적	207
III. 시험재료 및 방법	207
1. 시험물질	207
2. 시험물질의 조제	208
3. 사용동물 및 환경조건	208
4. 시험군구성	210
5. 투여	210
6. 관찰 및 검사	210
7. 자료의 통계처리	211
IV. 시험결과	212
1. 사망률	212
2. 일반증상	212
3. 체중변화	212
4. 육안적 부검소견	212
V. 고찰 및 결론	213
VI. Figures	214
Figure 1. Mean body weights of male ICR mice during 14 days	215
Figure 2. Mean body weights of female ICR mice during 14 days	215
VII. Tables	216
Table 1. Mortality (Group summary).....	217
Table 2. Clinical signs (Group summary)	218
Table 3. Change of body weight (Group summary)	219
Table 4. Necropsy findings (Group summary)	220
VIII. Appendices	222
Appendix 1. Clinical signs (Individual)	223
Appendix 2. Change of body weight (Individual)	224
Appendix 3. Necropsy findings (Individual)	225
Appendix 4. Result report of preliminary test	226
Appendix 5. Deviations from the protocol.....	227
Appendix 6. Certificate of analysis.....	228

I. 요약

본 시험은 마우스를 이용하여 HS 74006을 경구로 단회투여시 나타나는 독성을 평가하고 개략의 치사량을 구하기 위하여 시험물질을 0 (대조군) 및 2,000 mg/kg/5 mL의 용량으로 암·수 각각 5 마리씩 단회 경구투여 하였고, 투여 후 14일 동안의 일반증상, 사망률 및 체중변화와 부검시의 육안적 소견을 관찰하였다.

관찰기간동안 암·수 대조군과 시험물질투여군에서 투여에 기인한 사망례, 일반증상 및 체중변화는 관찰되지 않았다. 부검결과 특기할만한 육안적 이상소견은 관찰되지 않았다.

이상으로 HS 74006을 마우스에 경구 단회투여한 결과, 시험물질에 의한 독성은 인정되지 않았으며, 개략의 치사량은 암·수 각각 2,000 mg/kg 이상으로 판단된다.

II. 시험목적

암·수 마우스를 이용하여 HS 74006을 경구로 단회투여시 나타나는 독성을 평가하고 개략의 치사량을 구하기 위함이다.

III. 시험재료 및 방법

1. 시험물질

(1) 시험물질

- | | |
|---------------------------|--|
| ① 시험물질명 | HS 74006 |
| ② 로트번호 | 040116 |
| ③ 외관 및 색상 | 미색의 결정 |
| ④ pH | 약산성 |
| ⑤ 주성분 | HS 74006 의 polysaccharides |
| ⑥ 친화성 | Hydrophilic |
| ⑦ 안정성 | 안정 |
| ⑧ 보존조건 | 상온 |
| ⑨ 취급시 주의사항 | 없음 |
| ⑩ 제공자 | 명 칭 ㈜한국신약
주 소 충청남도 논산시 양촌면 중산리 805-15 |
| ⑪ 잔여시험물질의 처리 | 시험종료 후 반환하였다. |
| ⑫ Certificate of analysis | 시험의뢰자가 제공하였다. |

(2) 부형제

- | | |
|--------|--------|
| ① 물질명 | 주사용수 |
| ② 로트번호 | AAW4AB |
| ③ 보존조건 | 상온 |
| ④ 제조사 | ㈜중외제약 |

(3) 부형제의 선택이유

시험물질은 시험의뢰자가 제공한 정보에 hydrophilic 하여 주사용수를 선택하였다.

2. 시험물질의 조제

시험물질을 칭량 후 주사용수를 넣어 현탁시켜 조제하였다. 조제시 발열, 발색 등의 육안적인 변화는 관찰되지 않았다.

시험의뢰자와 협의하여 시험물질 조제액의 안정성 및 균질성 분석은 별도로 시행하지 않았다.

3. 사용동물 및 환경조건

(1) 사용동물

① 종 및 계통 마우스, ICR[Sam:TacHa(ICR)]

② 구입처 및 생산자

명 칭

㈜샘타코 BIO KOREA

주 소

경기도 오산시 서랑동 77-1

③ 시험계 선정이유

ICR 마우스는 단회 및 반복투여 독성시험 등의 안전성시험에 널리 사용되고 있으며 비교할 많은 시험기초자료가 축적되어 있어 선택하였다.

④ 투여시 주령 및 체중범위

6 주령, 수컷 28.9 ~ 29.9 g / 암컷 22.4 ~ 24.3 g

⑤ 반입동물의 개체번호표기법

입수시 체중측정 순으로 유성매직을 이용하여 개체식별법에 따라서 꼬리에 표기하였다(SOP/SGE/110 및 140).

⑥ 검역·순화방법 및 기간

7 일간의 검역·순화기간 중에 매일 1 회 일반증상 관찰을 실시하였다. 반입시 및 검역·순화기간 종료시 소동물용 저울 (CP4202S, Sartorius, Germany)로 체중을 측정하여 시험 실시에 적합한 건강한 동물을 선발하였다.

⑦ 군분리법

검역·순화기간을 종료시, 체중범위가 수컷은 28.1 ~ 31.9 g, 암컷은 22.8 ~ 25.1 g 범위내의 동물로 체중 증가량 및 일반증상에 이상이 없는 암·수 각 10 마리를 선별하여 사용하였다.

⑧ 잔여동물의 처리

잔여동물은 군분리 종료 후 pool 동물로 사용하였다.

⑨ 개체식별

군분리 종료 후 사육상자에는 개체식별카드 (시험번호, 군/투여량, 개체번호, 성별, 투여경로, 투여기간, 부검일 등 기재)를 부착하였고, 개체식별은 유성매직을 이용하여 개체식별법에 따라 꼬리에 표시하였다 (SOP/SGE/140).

(2) 환경조건

- ① 동물실명 A307
- ② 사육상자(종류 및 크기) 및 사육동물수
폴리카보네이트 사육상자 (260W×420L×180H (mm), 명진기기)에 5 마리씩 수용하였다.
- ③ 온도 22.1~24.1 ℃
- ④ 습도 (상대습도) 36.5~68.1 %
- ⑤ 환기회수 및 방식 10~15 회/시간, 전배기방식
- ⑥ 조명시간 및 명암주기 오전 7시~오후 7시 조명 (12 hr 정등/12 hr 소등)
- ⑦ 조도 150~300 Lux
- ⑧ 사육기재의 세척, 소독 및 교환회수 및 동물실 소독방법

사육상자, 급이기 및 급수병은 적응기간 종료 후 교환하였으며, 알칼리 계면활성제 (Ultra-Clean Neighbour-PC, ㈜이웃사랑) 500 배 수용액 및 계면활성제 (Ultra-Clean Neighbour-RM300, ㈜이웃사랑) 2,500 배 수용액을 사용하여 자동 세척기로 세척하였고, 고압증기 멸균하여 소독하였다.

동물실의 소독은 매일 작업종료 후 실시하였으며, 소독액은 10 일 간격으로 파콤-A (주성분 : Octyldecyl dimethyl ammonium chloride 200 배, 삼우메디안), 마이크로쿼트 (주성분 : Alkyldimethylbenzyl ammonium chloride 400 배, ECOLAB㈜) 및 브롬셉트 (주성분 : Di-decyl di-methyl ammonium bromide 300 배, 대성미생물연구소) 수용액을 교환하여 사용하였다.

(3) 사료 및 음수의 종류, 공급방법 및 분석

① 사료

사료는 퓨리나 실험용 쥐사료 5057 (㈜Agribands Purina Korea, 경기도 평택시 장당동 627)을 급이기에 넣어 자유섭취시켰다.

사료의 혼합물, 오염물질에 대한 분석은 사료공급업체로부터 사용사료의 로트에 대하여 Agribands Purina Korea Inc. Analysis Service of Central Laboratory (경기도 평택시 장당동 627)에 의뢰하여 실시한 분석성적서를 입수하여, ㈜바이오텍스텍에서 정한 허용기준치에 적합 여부를 확인하였다. 그 결과 허용기준치 범위 내에 속하였다.

② 음수

필터와 유수살균기를 이용하여 여과·살균된 정제수를 폴리카보네이트제 음수병(500 mL)에 넣어 자유섭취시켰다.

음수 중 혼합물, 오염물질에 대한 분석은 ㈜바이오텍스텍에서 지정한 장소에서 채수하여, 충청북도 보건환경연구원(충북 청주시 송정동 140-50)에 의뢰하여 「음료수수질기준 및 검사 등에 관한 규칙」(환경부령 제 122 호, 2002) 에 근거한 전항목에 대한 검사를 연 2 회, 6 개월마다 실시하였으며, 모든 검사항목에 있어서 환경부에서 정한 허용기준치 범위 내에서의 적합여부를 확인하였다. 그 결과 허용기준치 범위 내에 속하였다.

4. 시험군구성

(1) 군구성 및 개체번호

군	투여용량 (mg/kg)	투여액량 (mL/kg)	동물수 (개체번호)	
			수컷	암컷
G1 대조군	0	5	5 (1M01~1M05)	5 (1F01~1F05)
G2 시험물질투여군	2,000	5	5 (2M06~2M10)	5 (2F06~2F10)

(2) 투여량 설정이유

예비시험으로 수컷 2 마리에 2,000 mg/kg의 용량으로 투여한 결과, 사망례가 관찰되지 않았다 (Appendix 4). 따라서 투여용량은 2,000 mg/kg/5 mL의 용량의 단일 용량을 설정하였다.

대조군은 부형제인 주사용수를 투여하였다.

5. 투여

(1) 투여경로

경구투여

(2) 투여경로 선택이유

시험물질은 예상임상적용경로가 경구이므로 경구로 투여하였다.

(3) 투여방법

개체별 투여액량은 절식 후 체중을 기준으로 산출하였다. 시험물질 투여전 약 4시간동안 음수는 자유섭취시키면서 시험계를 절식시킨 후, 경구투여용 존데가 부착된 일회용 주사기 (1 mL)를 이용하여 위내에 단회 강제 경구투여하였고, 투여 2시간 후에 사료를 급여하였다.

6. 관찰 및 검사

(1) 일반증상

투여 당일은 투여 후 30분, 1, 2, 3, 4 및 6시간째 관찰하였고, 투여 다음날부터 14일째까지는 매일 1회씩 일반증상 및 동물의 사망 유·무를 관찰하였다.

(2) 체중측정

체중은 투여직전 (투여당일), 투여 후 3, 7 일째 및 부검당일에 측정하였다 (소동물용 저울, CP4202S, Sartorius, Germany).

(3) 부검

관찰기간 종료 후 생존동물에 대하여 부검을 실시하여 육안적 이상소견을 관찰하였다.

7. 자료의 통계처리

관찰기간에 측정한 체중과 산출한 체중 증가량을 정리하여 그 경향을 분석하였다.

IV. 시험결과

1. 사망률 (Table 1)

관찰기간동안 암·수 대조군 및 시험물질투여군에서 사망례는 관찰되지 않았다.

2. 일반증상 (Table 2 & Appendix 1)

관찰기간동안 암·수 대조군 및 시험물질투여군에서 특이한 증상은 관찰되지 않았다.

3. 체중변화 (Figure 1, 2 & Table 3 & Appendix 2)

관찰기간동안 암·수 시험물질투여군에서 대조군과 비교시 체중차이는 관찰되지 않았다.

4. 육안적 부검소견 (Table 4 & Appendix 3)

모든 생존동물의 부검결과 암·수 대조군 및 시험물질투여군에서 특기할 만한 육안소견은 관찰되지 않았다.

V. 고찰 및 결론

HS 74006에 대한 단회 경구 투여시의 안전성을 검토하고자 암·수 마우스를 이용하여 시험물질투여군에는 단일용량으로 2,000 mg/kg/5 mL을 투여하였다. 대조군에는 주사용수를 5 mL/kg로 투여하였다.

관찰기간동안 시험물질투여군에서 투여에 기인한 사망례 및 일반증상은 관찰되지 않았다.

체중변화에 있어서 대조군과 시험물질투여군간의 체중차이는 관찰되지 않았다.

부검시 시험물질투여에 기인한 것으로 판단되는 육안소견은 관찰되지 않았다.

이상으로 HS 74006을 마우스에 경구 단회투여한 결과, 시험물질에 의한 독성은 인정되지 않았으며, 개략의 치사량은 암·수 각각 2,000 mg/kg 이상으로 판단된다.

VI. Figures

Figure 1. Mean body weights of male ICR mice during 14 days

Figure 2. Mean body weights of female ICR mice during 14 days

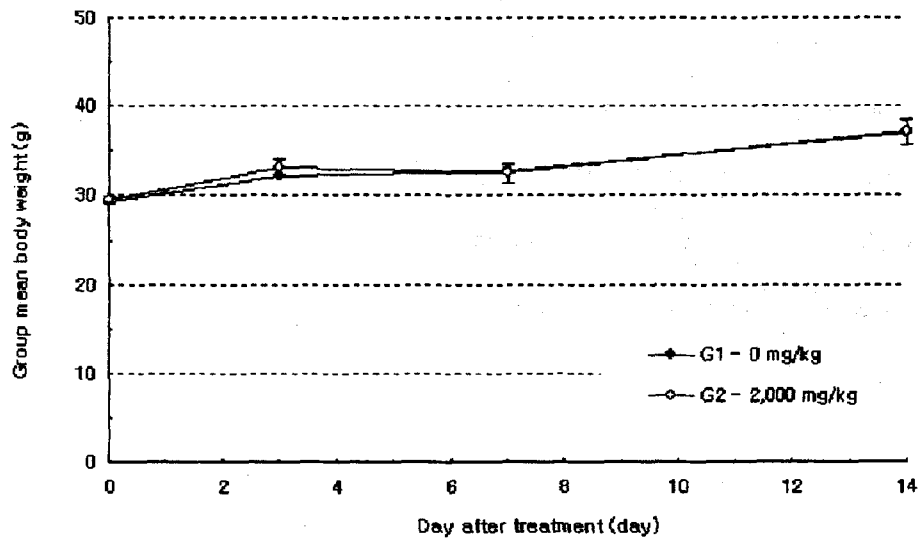


Figure 1. Mean body weights of male ICR mice during 14 days

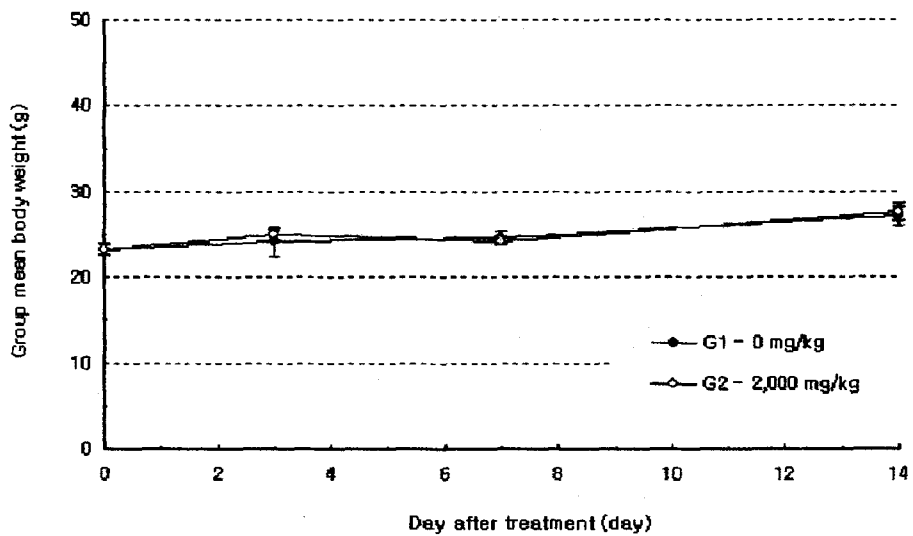


Figure 2. Mean body weights of female ICR mice during 14 days

VII. Tables

Table 1. Mortality (Group summary)

Table 2. Clinical signs (Group summary)

Table 3. Change of body weight (Group summary)

Table 4. Necropsy findings (Group summary)

Table 1. Mortality (Group summary)

Sex	Group / Dose (mg/kg)	No. of examined animals	Day after treatment														Mortality (dead/total)				
			0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13		14			
Male	G1 0	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0%	(0/5)
	G2 2,000	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0%	(0/5)
Female	G1 0	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0%	(0/5)
	G2 2,000	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0%	(0/5)

Table 2 Clinical signs (Group summary)

Sex	Group / Dose (mg/kg)	No. of animals	Signs	Hour (Day 0) after treatment						Day after treatment														
				Q5	1	2	3	4	6	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	
Male	G1 0	5	NAD	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	G2 2,000	5	NAD	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
Female	G1 0	5	NAD	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	G2 2,000	5	NAD	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5

NAD : No Abnormalities Detected

Table 3. Change of body weight (Group summary)

Sex	Group / Dose (mg/kg)		(g)			
			Day after treatment			
			0	3	7	14
Male	G1	Mean	29.28	32.28	32.74	37.00
		S.D.	0.33	0.62	0.70	0.81
		N	5	5	5	5
	G2	Mean	29.48	33.20	32.50	37.08
		S.D.	0.46	0.85	1.02	1.36
		N	5	5	5	5
Female	G1	Mean	23.27	24.15	24.70	27.12
		S.D.	0.89	1.65	0.87	1.04
		N	5	5	5	5
	G2	Mean	23.18	24.89	24.29	27.58
		S.D.	0.58	0.52	0.51	0.97
		N	5	5	5	5

Table 4. Necropsy findings (Group summary)

Organs	Sex	Male		Female	
	Group	G1	G2	G1	G2
	Dose (mg/kg)	0	2,000	0	2,000
	Number of examined animals	5	5	5	5
Abdominal cavity	No. of examined	5	5	5	5
	Not Remarkable	5	5	5	5
	Remarkable	0	0	0	0
Adrenal glands	No. of examined	5	5	5	5
	Not Remarkable	5	5	5	5
	Remarkable	0	0	0	0
Brain	No. of examined	5	5	5	5
	Not Remarkable	5	5	5	5
	Remarkable	0	0	0	0
Epididymides	No. of examined	5	5	-	-
	Not Remarkable	5	5	-	-
	Remarkable	0	0	-	-
Heart	No. of examined	5	5	5	5
	Not Remarkable	5	5	5	5
	Remarkable	0	0	0	0
Kidneys	No. of examined	5	5	5	5
	Not Remarkable	5	5	5	5
	Remarkable	0	0	0	0
Large Intestine	No. of examined	5	5	5	5
	Not Remarkable	5	5	5	5
	Remarkable	0	0	0	0
Liver	No. of examined	5	5	5	5
	Not Remarkable	5	5	5	5
	Remarkable	0	0	0	0
Lung	No. of examined	5	5	5	5
	Not Remarkable	5	5	5	5
	Remarkable	0	0	0	0
Lymphnode submandibular	No. of examined	5	5	5	5
	Not Remarkable	5	5	5	5
	Remarkable	0	0	0	0
Pancreas	No. of examined	5	5	5	5
	Not Remarkable	5	5	5	5
	Remarkable	0	0	0	0
Prostate	No. of examined	5	5	-	-
	Not Remarkable	5	5	-	-
	Remarkable	0	0	-	-
Salivary gland	No. of examined	5	5	5	5
	Not Remarkable	5	5	5	5
	Remarkable	0	0	0	0

Table 4 (Continued)

Organs	Sex	Male		Female	
	Group	G1	G2	G1	G2
	Dose (mg/kg)	0	2,000	0	2,000
	Number of examined animals	5	5	5	5
Seminal vesicle	No. of examined	5	5	-	-
	Not Remarkable	5	5	-	-
	Remarkable	0	0	-	-
Skin	No. of examined	5	5	5	5
	Not Remarkable	5	5	5	5
	Remarkable	0	0	0	0
Small intestine	No. of examined	5	5	5	5
	Not Remarkable	5	5	5	5
	Remarkable	0	0	0	0
Spleen	No. of examined	5	5	5	5
	Not Remarkable	5	5	5	5
	Remarkable	0	0	0	0
Stomach	No. of examined	5	5	5	5
	Not Remarkable	5	5	5	5
	Remarkable	0	0	0	0
Testes / Ovaries	No. of examined	5	5	5	5
	Not Remarkable	5	5	5	5
	Remarkable	0	0	0	0
Thoracic cavity	No. of examined	5	5	5	5
	Not Remarkable	5	5	5	5
	Remarkable	0	0	0	0
Thymus	No. of examined	5	5	5	5
	Not Remarkable	5	5	5	5
	Remarkable	0	0	0	0
Trachea	No. of examined	5	5	5	5
	Not Remarkable	5	5	5	5
	Remarkable	0	0	0	0
Urinary bladder	No. of examined	5	5	5	5
	Not Remarkable	5	5	5	5
	Remarkable	0	0	0	0
Uterus	No. of examined	-	-	5	5
	Not Remarkable	-	-	5	5
	Remarkable	-	-	0	0

VIII. Appendices

Appendix 1. Clinical signs (Individual)

Appendix 2. Change of body weight (Individual)

Appendix 3. Necropsy findings (Individual)

Appendix 4. Result report of preliminary test

Appendix 5. Deviations from the protocol

Appendix 6. Certificate of analysis

Appendix 1. Clinical signs (Individual)

Sex	Group / Dose (mg/kg)	Animal ID	Clinical sign	Hour (Day 0) after treatment						Day after treatment													
				Q5	1	2	3	4	6	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Male	G1 0	1M01		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		1M02		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		1M03		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		1M04		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		1M05		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	G2 2,000	2M06		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		2M07		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		2M08		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		2M09		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		2M10		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Female	G1 0	1F01		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
		1F02		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
		1F03		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
		1F04		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
		1F05		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	G2 2,000	2F06		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
		2F07		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
		2F08		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
		2F09		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
		2F10		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	

- : No abnormalities detected

Appendix 2 Change of body weight (Individual)

Sex	Group / Dose (mg/kg)	Animal ID	Day after treatment (g)				
			0	3	7	14	
Male	G1	1M01	29.63	32.88	33.52	36.65	
		1M02	29.06	31.49	31.66	35.94	
		1M03	29.63	32.78	33.17	37.85	
		1M04	28.91	32.46	32.76	37.77	
		1M05	29.19	31.77	32.61	36.80	
		Mean	29.28	32.28	32.74	37.00	
		S.D.	0.33	0.62	0.70	0.81	
		N	5	5	5	5	
		G2	2M06	29.89	33.70	33.26	38.68
			2M07	29.94	34.40	33.74	38.40
			2M08	29.00	32.74	32.19	36.44
			2M09	29.57	32.91	31.15	35.72
			2M10	29.01	32.28	32.14	36.17
		Mean	29.48	33.20	32.50	37.08	
		S.D.	0.46	0.85	1.02	1.36	
	N	5	5	5	5		
Female	G1	1F01	24.33	25.60	25.34	27.63	
		1F02	23.42	21.40	23.56	26.15	
		1F03	23.13	24.01	24.72	27.52	
		1F04	22.44	24.66	24.92	25.95	
		1F05	23.03	25.09	24.95	28.37	
		Mean	23.27	24.15	24.70	27.12	
		S.D.	0.69	1.65	0.67	1.04	
		N	5	5	5	5	
		G2	2F06	22.84	25.81	24.95	28.47
			2F07	24.12	24.99	24.30	28.14
			2F08	23.26	24.39	23.51	26.04
			2F09	23.04	24.82	24.32	27.25
			2F10	22.62	24.95	24.37	27.98
		Mean	23.18	24.99	24.29	27.58	
		S.D.	0.58	0.52	0.51	0.97	
	N	5	5	5	5		

Appendix 3 Necropsy findings (Individual)

Sex	Group / Dose (mg/kg)	Animal ID	Organs	Gross findings	Type of sacrifice
Male	G1 0	1M01	All	No gross findings	Scheduled (Day 14)
		1M02	All	No gross findings	Scheduled (Day 14)
		1M03	All	No gross findings	Scheduled (Day 14)
		1M04	All	No gross findings	Scheduled (Day 14)
		1M05	All	No gross findings	Scheduled (Day 14)
	G2 2,000	2M06	All	No gross findings	Scheduled (Day 14)
		2M07	All	No gross findings	Scheduled (Day 14)
		2M08	All	No gross findings	Scheduled (Day 14)
		2M09	All	No gross findings	Scheduled (Day 14)
		2M10	All	No gross findings	Scheduled (Day 14)
Female	G1 0	1F01	All	No gross findings	Scheduled (Day 14)
		1F02	All	No gross findings	Scheduled (Day 14)
		1F03	All	No gross findings	Scheduled (Day 14)
		1F04	All	No gross findings	Scheduled (Day 14)
		1F05	All	No gross findings	Scheduled (Day 14)
	G2 2,000	2F06	All	No gross findings	Scheduled (Day 14)
		2F07	All	No gross findings	Scheduled (Day 14)
		2F08	All	No gross findings	Scheduled (Day 14)
		2F09	All	No gross findings	Scheduled (Day 14)
		2F10	All	No gross findings	Scheduled (Day 14)

Appendix 4. Result report of preliminary test

시험번호	: B04065
시험제목	: HS 74006의 마우스를 이용한 경구 단회투여 독성시험
관찰기간	: 2004. 3. 31 ~ 2004. 4.06
시험장소	: A307

1. 시험목적

본시험에서의 투여용량을 결정하기 위하여 non-GLP 시험으로 수행함.

2. 시험내용

2.1 동물종, 계통, 성별, 주령, 마리수

Mouse, ICR, male, 6주령, 2 마리

2.2 투여용량

2,000 mg/kg/5 mL

2.3 투여방법

시험물질 투여전 약 4시간동안 음수는 자유섭취시키면서 시험계를 절식시킨 후, 경구투여용 존데가 부착된 일회용 주사기를 이용하여 위내에 단회 강제 경구투여하였고, 투여 후 약 2시간 후에 사료를 급여하였다.

3. 시험결과

3.1 사망례 : 없었음.

3.2 일반증상 : 시험물질 투여 후 특이한 일반증상은 관찰되지 않았음.

3.3 체중변화 : 정상적인 증가로 사료됨.

(g)

Dose	Animal ID	Day after treatment		
		0	1	2
2,000 mg/kg	PM01	30.59	31.05	32.71
	PM02	28.82	30.99	31.67

4. 결론

본시험 투여용량을 2,000 mg/kg/5 mL의 단일용량을 설정한다.

Appendix 5. Deviations from the protocol

1. 3월 30일 시험장소의 온도가 2시간 동안 24.1℃로 유지되어 시험계획서상의 온도조건 $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ 에서 벗어났다.
2. 3월 30일 시험장소의 상대습도가 공조기 점검으로 인하여 1시간 동안 36.5%로 유지되어 시험계획서상의 습도조건 40~60%에서 벗어났다.

상기 이탈사항은 시험의 완전성에는 영향이 없었다.

Appendix 6. Certificate of analysis

HS74006 성적서

Lot No. : 040116

시험항목	시험 기준	시험 결과	판 정
성상	갈색의 분말 발효성 목이치	적 합	적 합
함량시험	α -Methyl-D(+)-glucoside으 로써 1.0g中 50.5mg이상	76.8mg	적 합
건조감량	7.0%이하(105℃, 4時間)	5.6%	적 합
미생물시험	1)세균 : 3,000개/g 이하	300개	적 합
	2) 대장균 : 불검출	불검출	
중금속시험	20 ppm 이하 (Pb)	적 합	적 합
As	1.5mg/kg 이하	적 합	적 합
저장방법	기밀 보관	적 합	적 합
판정일자	2004. 5. 7	품질관리 책임자	판정결과



大韓民國 忠清南道 論山市 陽村面 中山里 805 - 15
(株) 韓 國 新 藥

협동2 : 고부가 가치성 버섯 균사체의 대량 생산 연구

제 1 절 연구 내용

1. 사용균주

본 연구에 사용된 균주는 장수버섯(*Fomitella fraxinea* ASI 17004, 17006, 17007, 17017 이상 4균주), 비늘버섯(*Pholiota adiposa* ASI 24018, 24020, 24027, 24111 이상 4균주), 차가버섯(*Inonotus obliquus* ASI 74006, 74009, 74010, 74013 이상 4균주), 잎새버섯(*Grifola frondosa* ASI 9006, 9013, 9019, 9022, 9034 이상 5균주)으로 농업과학기술원으로부터 분양받아 본 연구실에서 Potato Dextrose Agar(PDA)에 계대배양하면서 이용하였다.

2. 최적배양 조건 탐색

배양 최적조건의 모든 실험은 3반복실험 후 평균값으로 계산하였다.

가. 온도의 영향

각 균주별 온도에 따른 균사의 성장속도를 알아보기 위해 5mm cork borer를 이용하여 각 균주당 한 개씩의 colony를 PDA에 접종한 뒤 20℃, 25℃, 30℃에서 10일간 배양한 후 colony의 직경을 측정하였다.

나. 탄소원의 영향

각 균주별 성장 속도에 미치는 탄소원의 영향을 조사하기 위하여 5mm cork borer를 이용하여 각 균주당 한 개씩의 colony를 탄소원 (glucose, xylose, sucrose, starch)배지에 접종하였다. 최적온도로 판명된 25℃에서 일정기간 배양한 다음 colony의 직경을 측정하였으며, 균사체의 밀도는 육안으로 판정하였다.

다. 질소원의 영향

각 균주별 성장 속도에 미치는 질소원의 영향을 조사하기 위하여 5mm cork borer를 이용하여 각 균주당 한 개씩의 colony를 질소원(bacto-pepton, malt extract, yeast extract, pepton, ammomium nitrate, ammomium tatrte)배지에 접종하였다. 최적온도로 판명된 25℃에서 배양한 다음 colony의 직경과 밀도를 측정하였다.

라. 탄소원, 질소원의 비율

균사체 성장을 위한 탄소원과 질소원의 최적 배지조성 비율을 조사하기 위해 탄소원으로는 장수, 비늘, 차가, 잎새버섯 모두에서 생산성이 좋은 6탄당인 glucose와 질소원으로는

malt extract(MERCK Co.)를 선별하였다. Glucose 각 1, 2, 3, 5%에 glucose/malt extract 함량이 1, 5, 10, 20, 50, 100, 300이 되게 malt extract를 첨가하여 배지를 제조하였다. 그리고 5mm cork borer를 이용하여 배지조성 비율에 따른 배지에 각 균주당 한 개씩의 colony를 접종한 뒤 최적온도에서 10일간 배양하여 균사생장 속도를 관찰하였다.

마. 빛의 영향

최적온도와 배지조성을 연구 검토한 뒤 선별된 4종의 균주, 장수버섯 ASI 17017, 비늘버섯 ASI 24027, 차가버섯 ASI 74013, 잎새버섯 ASI 9013에 대하여 각각 암실과 빛을 조사한 조건하에서 균사 생장 속도를 측정하였다.

바. pH의 영향

pH에 따른 생산성을 알아보기 위하여 장수, 비늘, 차가, 잎새버섯 모두 Glucose, malt extract(MERCK Co.)를 조성비율이 1이되게 배지를 제조한 다음 0.1N NaOH와 HCl로 pH를 조절하였다. 그 다음 5mm cork borer를 이용하여 각 균주당 한 개씩의 colony를 각각의 pH로 조절된 배지에 접종한 뒤 최적온도인 25℃에서 10일간 배양하여 관찰하였다.

사. Yeast Extract의 영향

Yeast Extract 함량에 따른 균사 생장속도를 알아보기 위하여 장수, 비늘, 차가, 잎새버섯 모두 Glucose, Malt Extract(MERCK Co.)를 조성비율이 1이되게 배지를 제조한 다음 비늘버섯, 잎새버섯의 경우 pH 6, 장수버섯은 pH 8, 차가버섯은 pH 6과 pH 8로 조절하였다. 그리고 5mm cork borer를 이용하여 각 균주당 한 개씩의 colony를 yeast extract의 함량(0, 0.6, 1, 2, 5%)을 달리한 배지에 접종한 뒤 최적온도인 25℃에서 10일간 배양하여 관찰하였다.

아. 무기염류의 영향

무기염류에 따른 균사 생장속도를 알아보기 위하여 장수, 비늘, 차가, 잎새버섯 모두 Glucose, malt extract(MERCK Co.)를 조성비율이 1이되게 배지를 제조하고 yeast extract 0.4%, pH 6으로 조절하였다. 여기에 3종류의 무기염류를 첨가하여 배지를 제조한 다음 5mm cork borer를 이용하여 각 균주당 한 개씩의 colony를 접종한 뒤 최적온도인 25℃에서 10일간 배양하여 관찰하였다.

자. 배양기간중 균사체량 및 pH의 변화

배양기간중 균사체량 및 pH의 변화를 알아보기 위하여 각 균주의 탄소원, 질소원을 최적배지조성비율인 1:1로 배지를 제조하여 배양방법에 따라 정치배양과 진탕배양으로 실시하면서 각각 2~4일 간격으로 각 균주의 건조균사체량과 배양액 pH의 변화를 관찰하였다.

차. 제조회사별 Malt Extract의 균사생장성

선발된 4균주의 최적배지중 malt extract를 선발하였으며 특히 배지제조회사에 따라 균사 생장에 차이가 있는 것으로 확인이 되어 보고하는 바이다.

3. 균사체 대량생산 조건 탐색

가. 접종원의 접종량에 따른 생산성 조사

선별된 균사체를 flask에 진탕배양으로 전배양한 접종원을 Homogenizer로 균질화한 후 배지에 대한 접종원의 농도를 3, 5, 8, 10%씩 접종 후 120rpm, 25℃에서 배양하였다. 배양 2일째부터 2일간격으로 수거하여 pH와 건조균체량을 측정하였다.

1차적으로 균사체의 생장이 우수한 2개의 접종원 농도를 선별하여 2차실험을 실시하였다. 2차실험은 500ml flask에 300ml 배지를 넣고 각각의 접종원 농도를 접종하여 8일간 배양 후 건조균사체량을 측정하였다.

나. 교반조건에 따른 생산성 조사

교반 조건에 따른 균사체 생산성을 조사하기 위하여 10L Fermenter(B.E.MARUBISHI, MDL 1000)를 이용하였다. Fermenter의 교반조건은 120, 150, 200rpm이었으며 6일간 배양한 다음 균사체를 수거하여 증류수로 씻어낸 후 동결건조하여 건조균체량을 측정하였다.

다. 통기량에 따른 생산성 조사

Fermenter를 이용하여 배양할 경우 통기량에 따라서도 균사체의 생장이 크게 달라지므로 통기량을 달리하여 균사체 생산성을 조사하였다. 통기량은 0.6, 1.0, 1.5, 2.0vvm이었으며 각 조건별로 공급하여 배양한 다음 배양 6일에 균사체를 수거하여 증류수로 씻어낸 후 동결건조하여 건조균체량을 측정하였다.

라. 배지 멸균조건 조사

사용하는 배양기에 따라 멸균시간이 달라질 수 있다. 본 실험에 사용한 각종 배양기에 대하여 충분 멸균시간을 조사하였다. 사용한 배양기로는 10L Jar Fermenter(working volume:5L), Balloon type Fermenter(working volume:6L), Air Lift type Fermenter(working volume:5~6L)이었으며 멸균시간을 달리하여 멸균 후 배지의 오염유무

를 조사하였다.

마. 배양장치별 생산성 검토

배양 장치별 균사체 생산성을 조사하기 위하여 Jar fermenter(10 L), Air-sparging fermenter(13 L), Balloon type bioreactor(10 L)를 이용하였다. Jar fermenter는 10 L 배양기에 배지 5L를 넣어 멸균한 후 담자균을 접종하여 25℃, 120rpm에서 8일간 배양하였다. Air-sparging fermenter와 Balloon type bioreactor는 각각 배지 6 L, 5 L를 넣어 멸균한 후 담자균을 접종하여 25℃에서 멸균필터를 통한 air만을 공급하여 배양하였다. 배양일은 각각 6일, 8일이었다.

4. 산업적 배양의 생산성

가. 산업용 배지를 이용한 균사체 생산성

각 배지조성(Table 1)대로 300ml 플라스크에 100ml의 배지를 넣고 5mm cork borer를 이용하여 각 균주당 열개씩의 colony를 넣은 후 8~10일간 배양 후 70℃ dry oven에서 건조 후 균체량을 측정하였다.

Table 1. The medium composition of commercial media

Media	A	B	C	D
Wheat bran or Soy bean cake	0.5%	0.5%	0.5%	0.5%
Glucose	2%	2%	2%	2%
Yeast Extract	0.5%		0.5%	
Peptone			0.5%	0.5%

나. 무기염류 유무에 따른 생산성

각 균주별로 선발된 최적배지조성 200ml에 진탕배양중인 배양액을 균질화 시킨 후 균질액 20ml를 접종하였다. 7~8일 배양후 수거하여 70℃ dry oven에 2일 건조 후 건조균사체량을 측정하였다.

다. 예비배양 방법의 확립

각 균주별로 3가지 전배양조건(Table 2)으로 나누어 전배양한 후 10L Jar-fermenter를 이용하여 본배양하였다. 본배양이 된 배양액을 수거하여 균사체를 여과한 후 건조균체량을 측정하였다.

Table 2. Procedures for pre-culturing

	Process
Procedure 1	Plate culture → Shaking culture → Homogenizing → Main culture
Procedure 2	Plate culture → Shaking culture → Homogenizing → Shaking culture(2~3days) → Main culture
Procedure 3	Plate culture → Shaking culture → Homogenizing → Stationary culture(4~5days) → Main culture

라. 천연배지와 화학배지의 생산성비교

각 균주들의 최적 배양조건 상태에서 화학배지와 천연배지를 사용하여 10L Jar-fermenter에 배양, 수거 후 40℃ 순환식 열풍건조기를 사용하여 2일 건조시켜 건조균사체량을 측정하였다.

마. 상업적 균사체 생산시험

진탕배양상태의 각 균주를 15ℓ 폭기배양기에서 25℃, 폭기압력 0.1 kgf/cm²의 조건에서 5~6일정도 배양시킨후 150ℓ 폭기형 탱크에서 본배양을 실시하였다(25℃, 폭기압력 1.2 kgf/cm²). 균주별로 7~10일 배양후 수거하여 40℃ 순환식 열풍건조기를 사용하여 2일 건조 후 건조균사체량을 측정하였다.

5. 데이터분석

모든 실험자료의 통계처리를 위하여 SPSS windows 10.0 program을 이용하여 유의성을 검증하였다. 모든 데이터는 95% 신뢰도범위에서 표현되었다.

제 2 절 연구 결과

1. 최적배양 조건 탐색

가. 온도의 영향

각 공시 균주의 균사체에 대한 최적 온도를 조사하기 위하여 PDA에 균사를 접종한 후 20℃, 25℃, 30℃의 항온기에서 균사를 배양하고 균사생장 길이를 측정하였다(Fig. 1).

실험에 이용된 균주의 대부분이 25℃에서 균사 생장이 가장 양호한 것으로 나타났다. 잎새버섯의 경우 균주에 따라 20℃에서 최적온도를 나타내는 것도 있었으나 25℃의 결과와 유의성은 없었으며 30℃에서는 균사의 생장이 저조하였다.

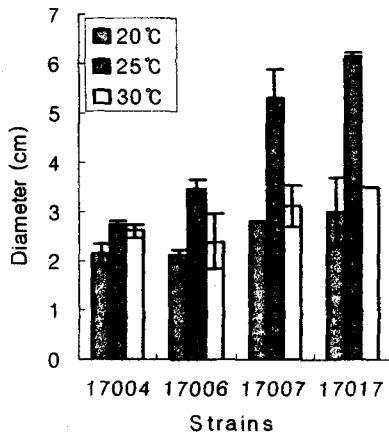


Fig. 1. Mycelial productivity according to the temperature(*Fomitella fraxinea*).

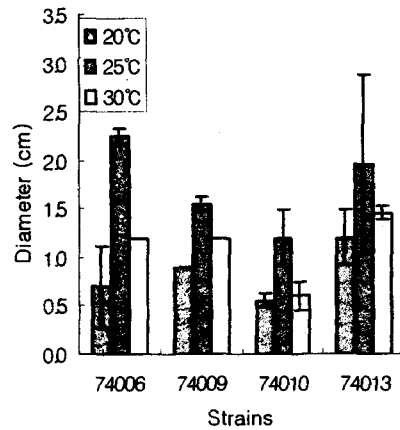


Fig. 2. Mycelial productivity according to the temperature(*Inonotus obliquus*).

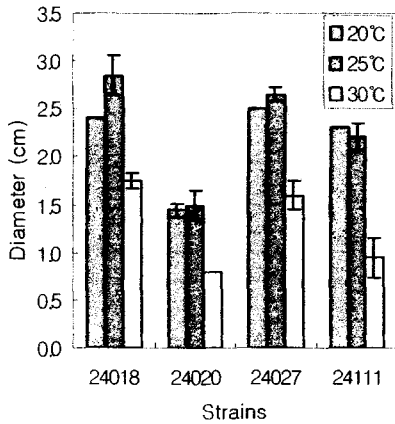


Fig. 3. Mycelial productivity according to the temperature(*Pholiota adiposa*).

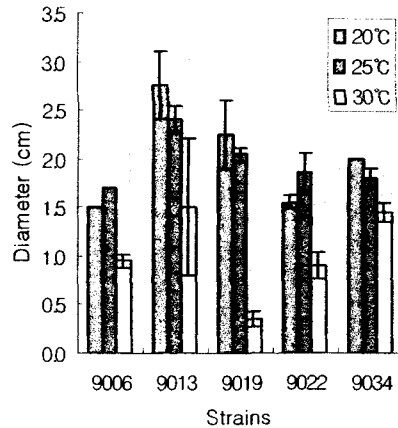


Fig. 4. Mycelial productivity according to the temperature(*Grifola frondosa*).

나. 탄소원의 영향

각 균주의 성장속도에 영향을 미치는 탄소원의 종류별 실험을 실시한 결과는 Fig. 5~8과 같다. 장수버섯의 경우 glucose를 첨가한 배지에서 균사의 성장속도와 밀도가 가장 우수하였으며, starch를 탄소원으로 하였을 경우 성장속도는 양호하였으나 균사의 밀도가 glucose에 비하여 떨어졌다. 한편, sucrose와 xylose을 탄소원으로 하였을 경우 성장속도와 균사의 밀도가 다른 탄소원에 비하여 다소 떨어졌다. 장 등⁽⁷⁾이 장수버섯의 배양적 특성 연구에서 탄소원으로 glucose배지가 가장 양호하였으며 sucrose배지보다 균사생장량에서 월등히 우수하였다고 보고한 결과와 유사한 것으로 나타났다.

차가버섯의 경우 다른 균주에 비하여 성장속도가 늦었으나 ASI 74009는 다소 양호하였다. Glucose와 starch를 첨가한 배지가 sucrose와 xylose에 비하여 균사의 성장속도와 밀도가 더 나은 것으로 나타났다.

비늘버섯의 경우 이용된 4균주 모두 각 탄소원을 첨가한 배지에서 성장속도와 밀도가 비슷하게 나타났다.

앞새버섯의 경우 glucose를 첨가한 배지에서 균사의 성장속도와 밀도가 가장 우수하였으며, starch, xylose, sucrose 순으로 나타났다. 이것은 정 등⁽²⁰⁾이 유청을 기본배지로 하여 앞새버섯의 균사체를 배양하였을 때, 탄소원으로 2% starch를 첨가하였을 때가 다른 탄소원을 첨가하였을 때보다 균사생장이 1.3배 정도 증가하였다는 보고와 상이한 결과로서, 이는 사용 배지 조성 및 균주계통간의 차이에 기인한 것으로 판단된다.

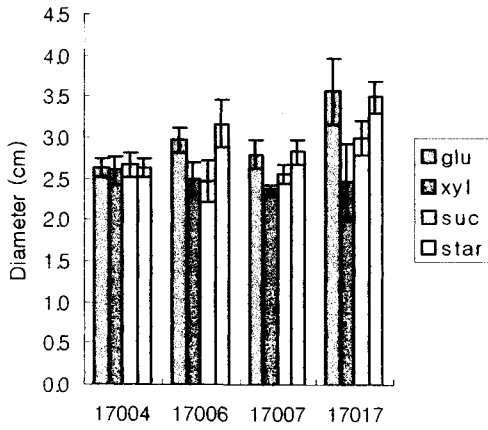


Fig. 5. Mycelial productivity according to carbon source(*Fomitella fraxinea*).

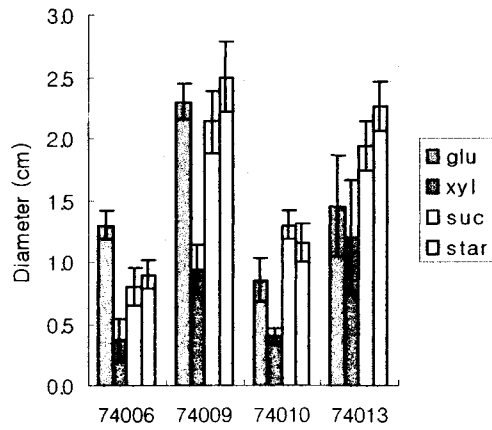


Fig. 6. Mycelial productivity according to carbon source(*Inonotus obliquus*).

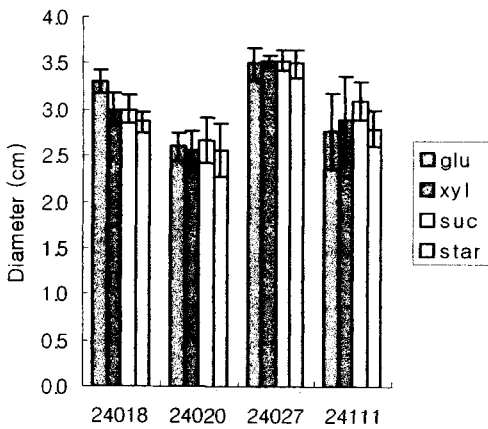


Fig. 7. Mycelial productivity according to carbon source(*Pholiota adiposa*).

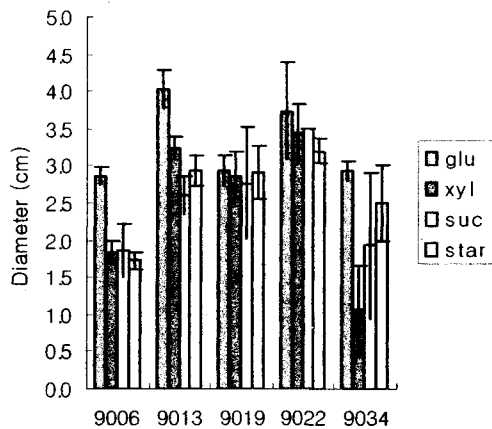


Fig. 8. Mycelial productivity according to carbon source(*Grifola frondosa*).

다. 질소원의 영향

각각의 질소원들을 1%씩 첨가한 배지에 접종한 후 배양하여 질소원의 영향을 조사한 결과는 Fig. 9~10과 같다. 표에 나타난 바와 같이 모든 균주가 무기 질소원보다는 유기 질소원을 첨가한 배지에서 균사의 성장속도 및 밀도가 우수하였으며 특히, malt extract가 가장 좋은 질소원으로 나타났다.

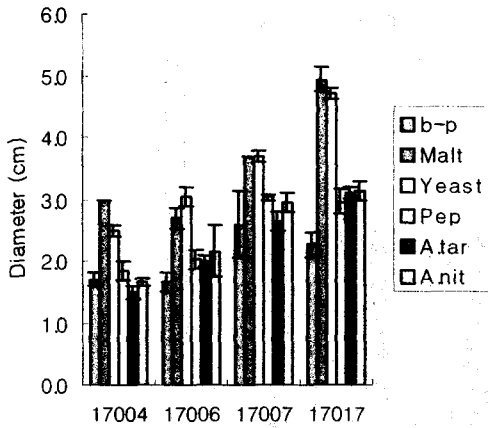


Fig. 9. Mycelial productivity according to nitrogen source(*Fomitella fraxinea*).

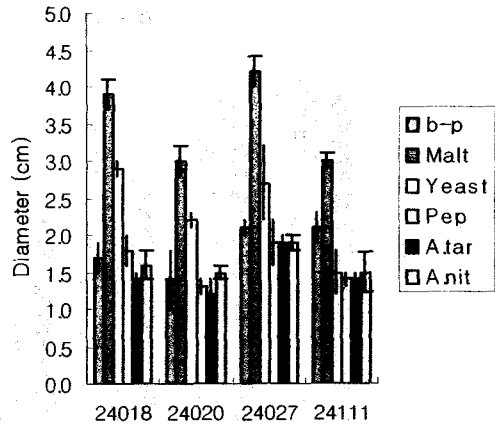


Fig. 10. Mycelial productivity according to nitrogen source(*Pholiota adiposa*).

라. 탄소원, 질소원의 비율

각 균주의 탄소원 및 질소원의 최적화 실험에서 균사 생장이 양호한 것으로 나타난 glucose와 malt Extract를 이용하여 배지조성 비율에 따른 균사 성장 속도와 밀도를 조사하였다. 즉, 탄소원인 Glucose 1, 2, 3, 5%에 glucose/malt extract 비율이 1, 5, 10, 20, 50, 100, 300이 되게 질소원인 malt extract를 첨가하여 배지를 만들고 접종, 배양하여 균사 성장 속도를 측정하였다. 그 결과 장수, 비늘, 차가, 잎새버섯의 대부분이 glucose 1%, glucose/malt extract 비율이 1인 경우에 균사생장이 가장 좋은 것으로 나타났다.

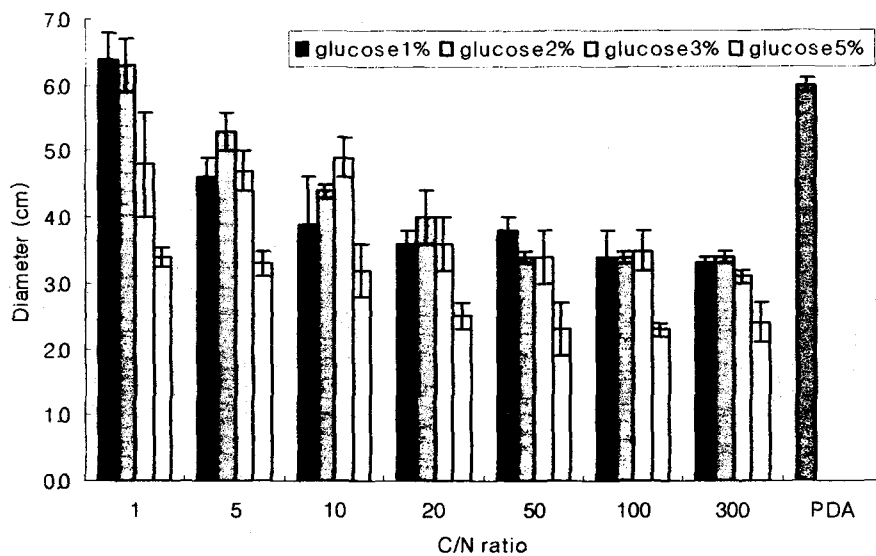


Fig. 11. Mycelial productivity according to carbon source and nitrogen source ratio (*Fomitella fraxinea* ASI 17017).

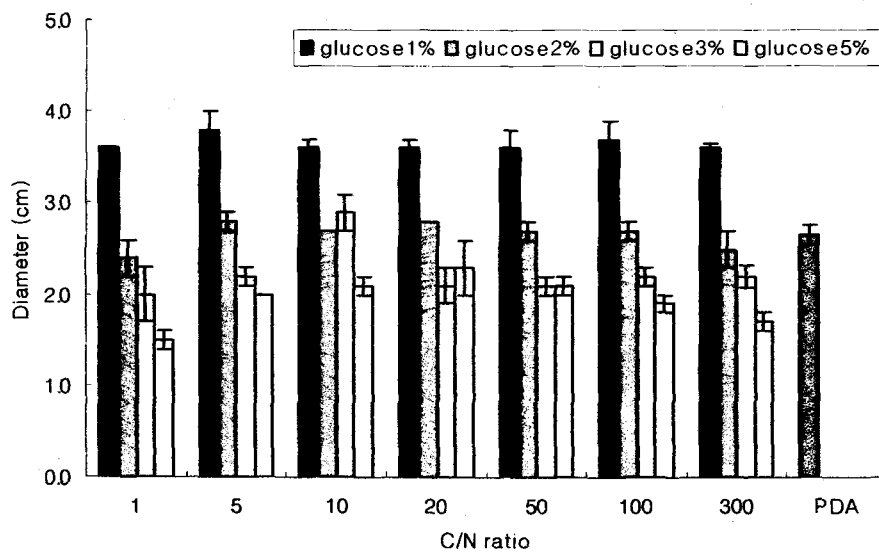


Fig. 12. Mycelial productivity according to carbon source and nitrogen source ratio (*Pholiota adiposa* ASI 24027).

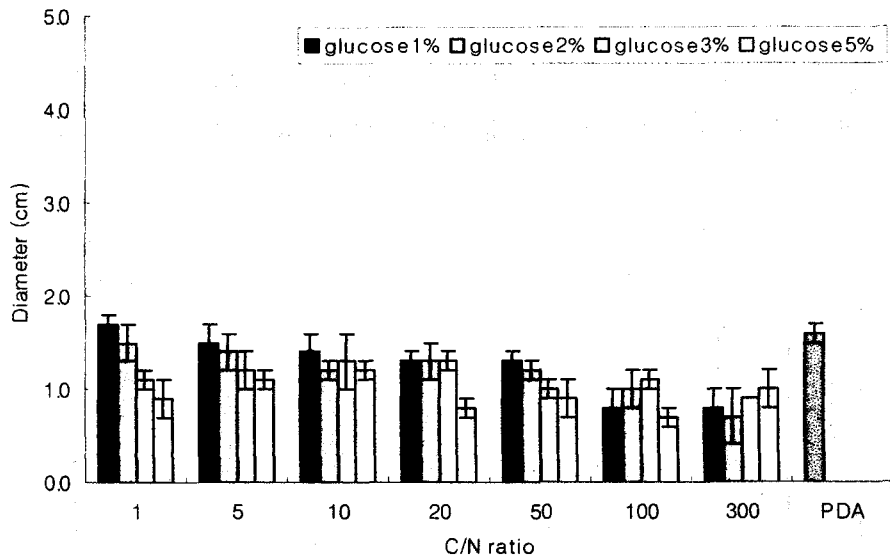


Fig. 13. Mycelial productivity according to carbon source and nitrogen source ratio(*Inonotus obliquus* ASI 74013).

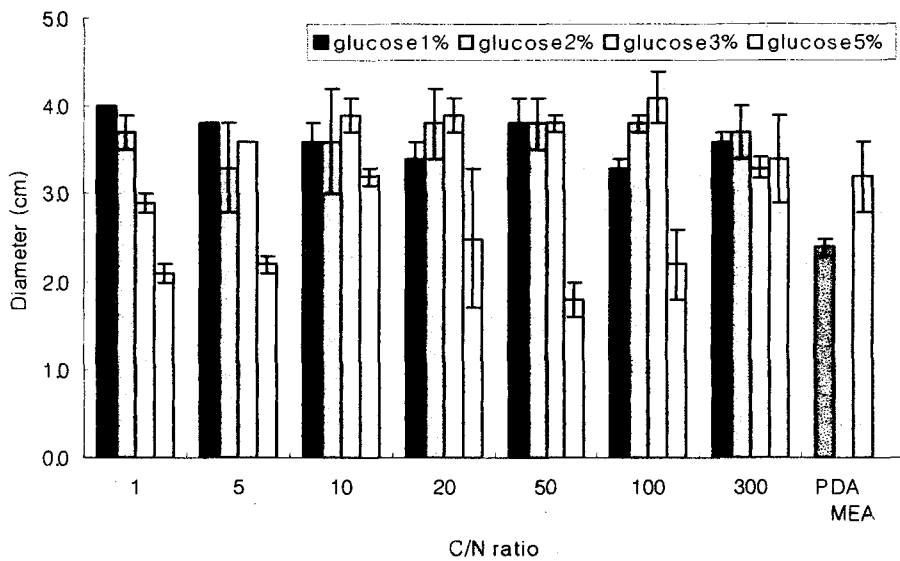


Fig. 14. Mycelial productivity according to carbon source and nitrogen source ratio(*Grifola frondosa* ASI 9013).

마. 빛의 영향

빛의 유무에 따른 균사 성장속도를 조사해본 결과 차가버섯을 제외하고는 어두운 곳에서 조금 더 잘 자라는 결과를 보여주고 있으나 유의적인 차이는 없는 것으로 나타났다.

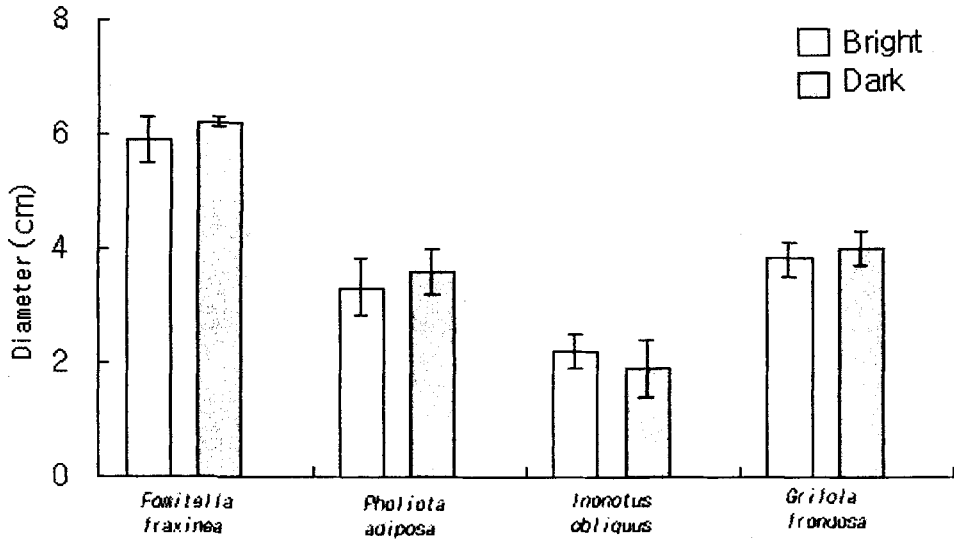


Fig. 15. Mycelial productivity under bright and dark condition.

바. pH의 영향

각각의 배지를 HCl과 NaOH로 pH 4~10으로 조절한 후 균사체를 배양하여 pH에 따른 균사성장속도를 조사하였다. 그 결과, 장수버섯은 pH 6~10까지 모두 양호하였으며 장 등⁽⁷⁾의 실험에서 pH 6.0이 장수버섯의 최적배양 pH였다는 보고와 유사한 결과를 보였다.

비늘버섯은 대부분의 pH에서 생장이 좋았으며 차가버섯은 pH 4에서는 균사생장이 저조한 반면에 pH 6~10까지는 균사생장이 양호하였다. 잎새버섯은 pH 6, 7에서 균사성장속도가 가장 좋았으며 pH 9이상에서는 균사생장이 저조한 것으로 나타났다.

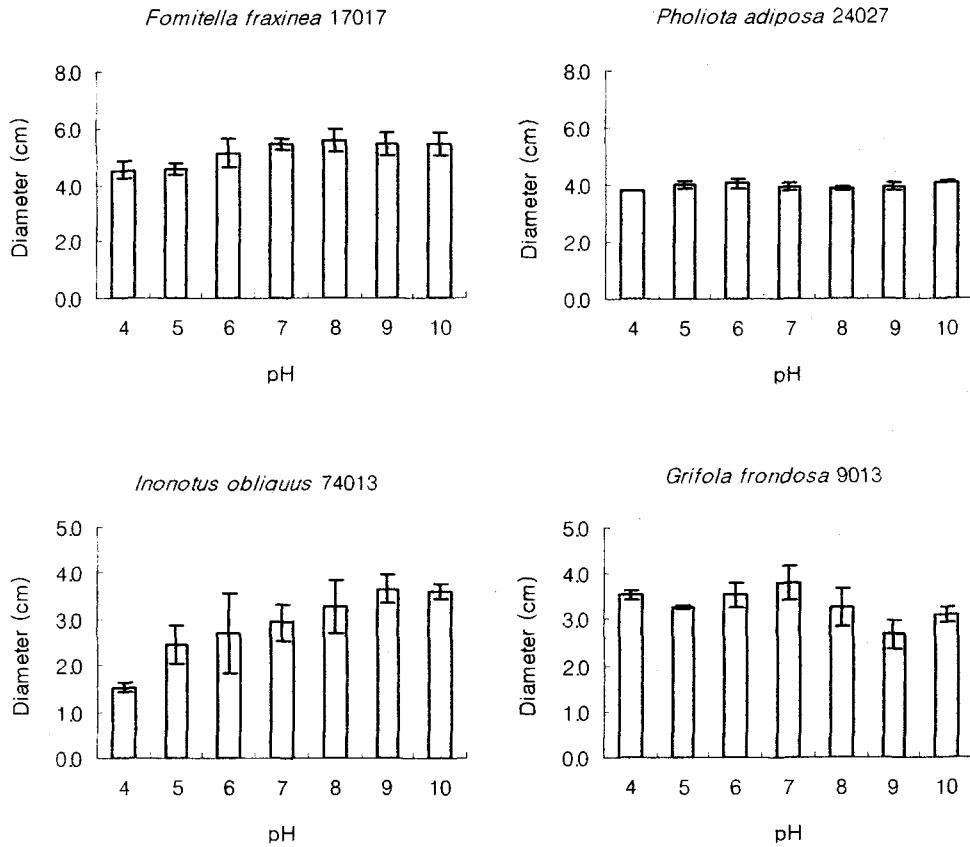


Fig. 16. Mycelial productivity according to the pH.

사. Yeast extract의 영향

Glucose, malt extract(MERCK Co.)를 조성비율이 1이 되게 배지를 조성하고 각각의 균주에 맞는 pH로 조절한 뒤 yeast extract의 함량에 따른 균사 성장 정도를 측정하였다. 그 결과 장수버섯은 yeast extract가 0~2%일때가 생장이 좋았고, 비늘버섯은 1%까지 생장이 양호하였다. 또한, 차가버섯의 경우 pH 6에서는 2%의 농도에서 균사의 생장이 가장 양호한 반면에 pH 8에서는 yeast extract의 영향을 받지 않았다. 잎새버섯은 yeast extract를 첨가하지 않았을 때가 첨가한 경우보다 균사 성장속도가 좋은 것으로 나타났다.

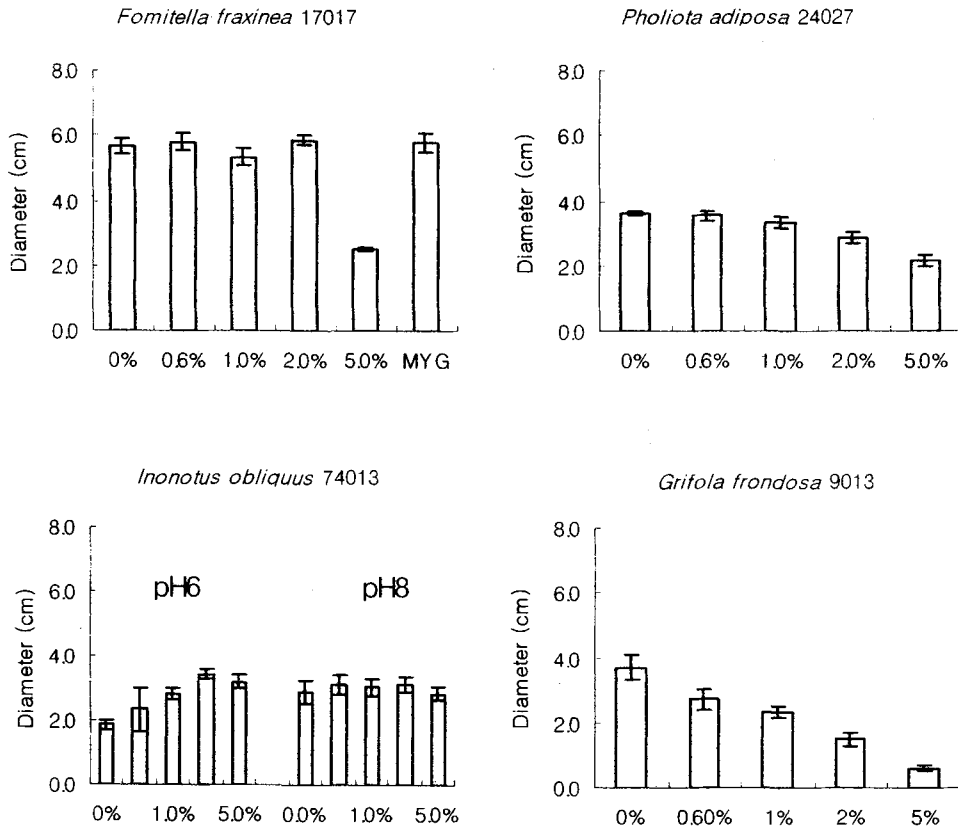


Fig. 17. Mycelial productivity according to the amount of yeast extract.

아. 무기염류의 영향

균사 생장에 미치는 무기염류의 영향은 Fig. 18과 같다. 실험에 이용된 모든 균들은 무기염류를 함유한 medium(2)에서 우수한 성장 속도를 보이는 것으로 나타났다.

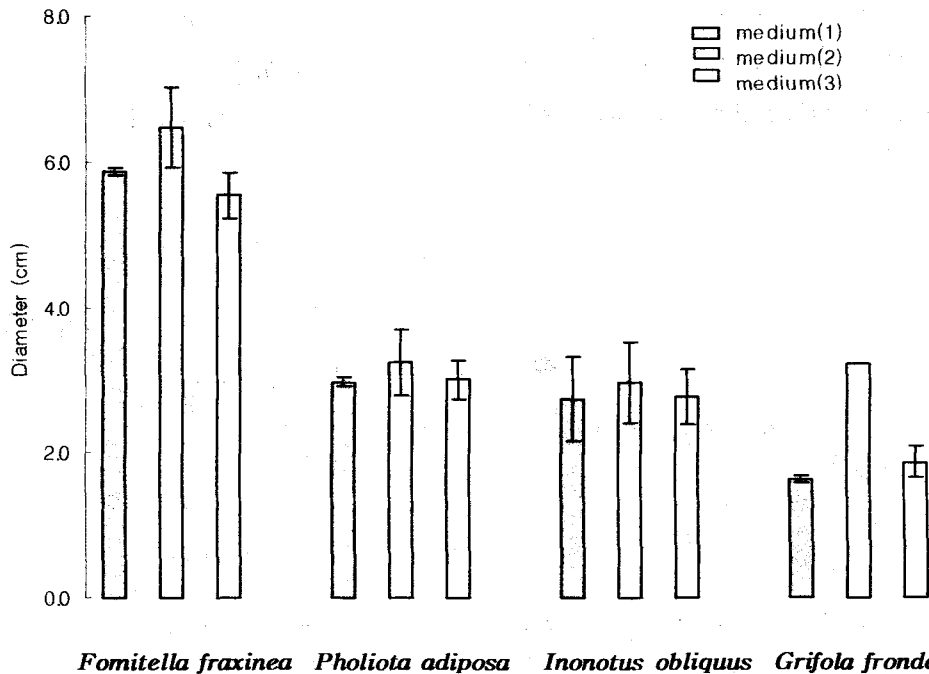


Fig. 18. Mycelial productivity according to the composition of mineral.

- medium(1) ; KH_2PO_4 0.46g, K_2HPO_4 1g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5g /L
- medium(2) ; KH_2PO_4 1g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1g, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 10mg,
 $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 7mg, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 4mg, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 1mg /L
- medium(3) ; Kirk's salt 10ml, KH_2PO_4 0.46g, K_2HPO_4 1g,
 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5g /L

자. 배양기간중 균사체량 및 pH의 변화

각 버섯균 별로 가장 생장속도가 좋은 균주를 하나씩 선정하여 최적 배양 조건에 맞는 액체 배지에 접종, 배양하여 배양기간별 건조균사체량 및 pH를 측정하였다.

장수버섯 ASI 17017의 건조 균사체량은 정치배양에서는 배양일수가 진행될수록 증가함을 보여주었으나 진탕배양에서는 배양 10일째 최대 생산량을 나타내었다. 이때 pH는 배양 방법에 따라서는 차이가 없었으며 배양 10일째까지는 pH 5와 6사이로 나타나다가 그 이후부터는 상승하는 것으로 나타났다.

비늘버섯 ASI 24027의 경우 건조 균사체량은 정치배양과 진탕배양에 따라 큰 차이가 없었으며 진탕배양의 경우 배양 16일째 최대 생산량을 나타내었다. 이때 pH변화는 4.5 정도인 것으로 확인 되었으며 배양방법에 따른 pH의 변화는 크게 차이가 없었다.

차가버섯 ASI 74013의 경우 정치배양이 진탕배양에 비하여 건조 균사체량은 많이 생산되어 배양 16일째 최대 생산량을 나타내었으며 진탕배양의 경우 배양 12일째 최대 생산량을 나타내어 정치배양에 비해 조금 빨리 최대 생산량에 도달함을 보여주었다. 이때 pH변화는 5~6정도이었으며 배양방법에 따른 pH의 변화는 비슷한 변화 형태를 나타내었다.

앞새버섯 ASI 9013의 경우 건조 균사체량은 실시한 4군주중 가장 늦은 배양 24일째 최대 생산량에 도달하였으나 플라스크당 가장 많은 양인 약 0.3g을 생산하였다. 이때 pH는 4 부근이었으며 배양방법에 따른 pH의 변화는 비슷한 변화 형태를 나타내었다.

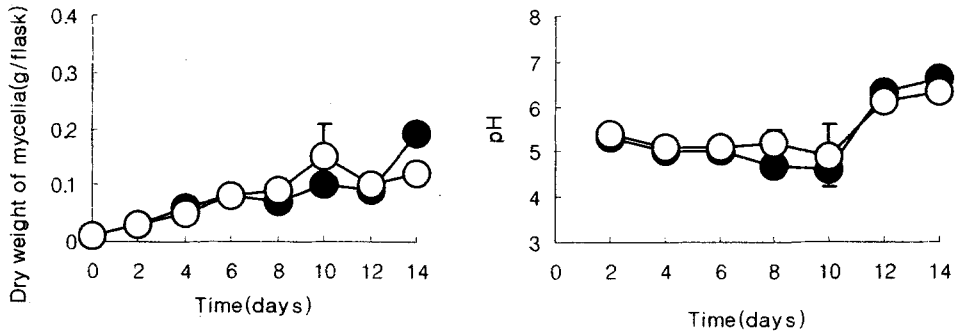


Fig. 19. The change of dry weight and pH in culturing process(ASI 17017).
 -●- : standing culture -○- : shaking culture

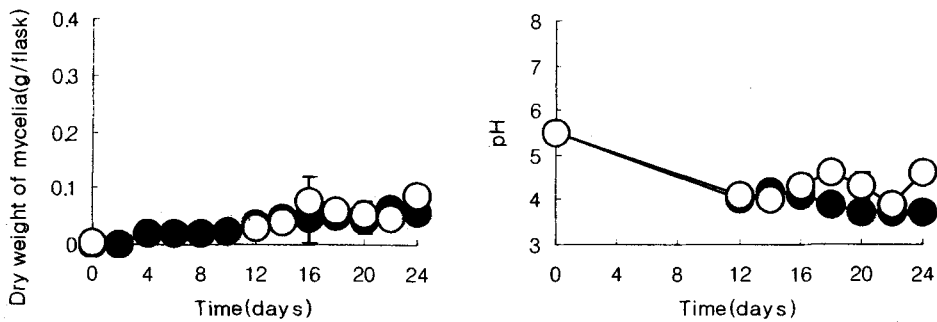


Fig. 20. The change of dry weight and pH in culturing process(ASI 24027).
 -●- : standing culture -○- : shaking culture

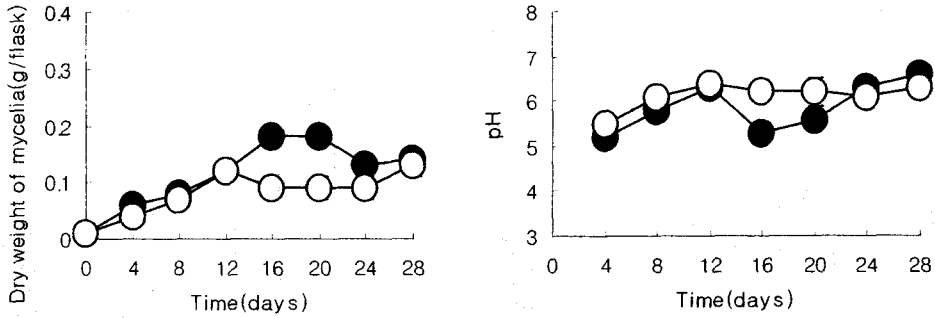


Fig. 21. The change of dry weight and pH in culturing process(ASI 74013).

-●- : standing culture -○- : shaking culture

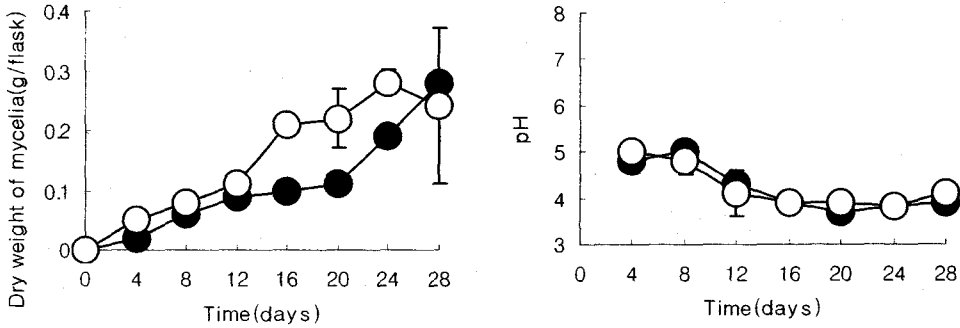


Fig. 22. The change of dry weight and pH in culturing process(ASI 9013).

-●- : standing culture -○- : shaking culture

차. 제조회사별 Malt Extract의 균사생장성

같은 malt extract라고 하더라도 제조 회사가 다른 제품일 경우 균사 생장에 차이가 있음을 관찰하였으므로 4개의 균주를 대상으로 malt extract의 제조회사별로 배지를 제조하여 실험을 실시하였다. 그 결과, 장수버섯 ASI 17017은 Difco co. 제품보다 Merck co. 제품이 균사생장면에서 150% 향상되었으며 다른 균주의 경우도 비슷한 결과를 나타내었다. 균사의 밀도면에서는 4균주 모두 높았다.

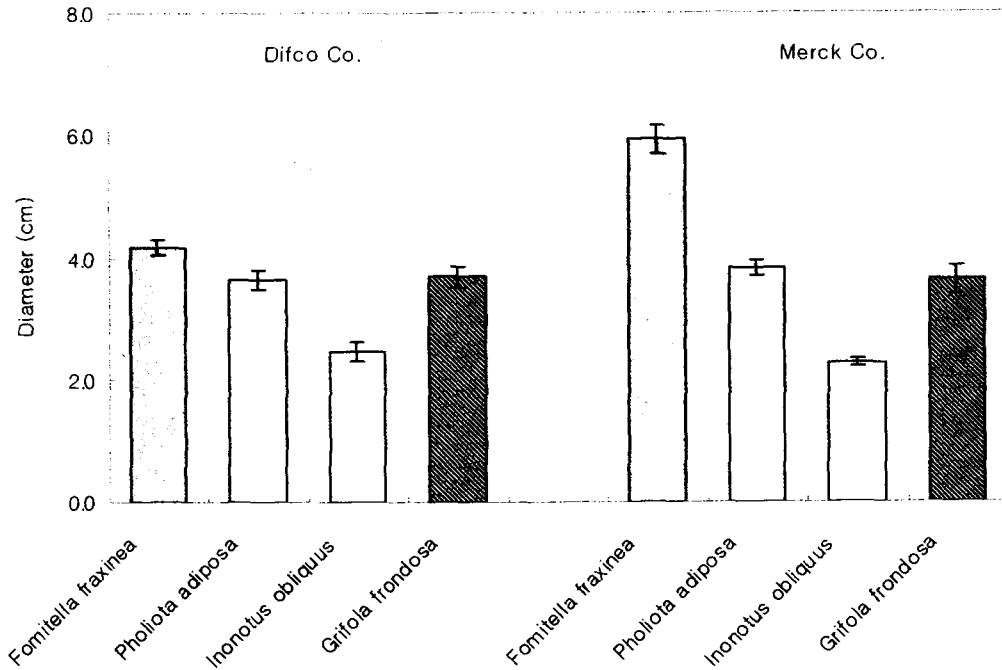


Fig. 23. Mycelial productivity according to malt extracts procured from different producers.

2. 균사체 대량생산 조건 탐색

가. 접종원의 접종량에 따른 생산성 조사

접종원의 접종량에 따른 균사체 생산성을 조사하기 위하여 각 균별로 선발한 4개의 균주를 진탕 배양하였다. 1차실험은 50ml배지에 3, 5, 8, 10%의 비율로 접종한 뒤 120rpm, 25°C의 조건에서 배양하여 배양기간별 pH와 균사체 함량을 측정하였다. 2차실험(확인배양)은 1차 실험에서 2가지 조건을 선발하여 더 큰 용량에서 위와 동일한 조건에서 실험을 실시하여 최종 접종원 비율을 조사하였다.

그 결과, 비늘버섯의 경우, ASI 24027은 접종량 5%와 8%에서 건조균사체량이 가장 높았으며 2차실험에서 확인배양을 한 결과 접종량 비율이 5%일때가 균사체의 생산량이 가장 높은 것으로 나타났다. ASI 24012의 경우 접종량 8%와 10%가 건조균사체량이 가장 높았으며, 2차실험에서 확인배양을 통해 접종량 비율 10%에서 균사체의 생산량이 가장 높은 것으로 나타났다.

장수버섯 ASI 17017와 차가버섯 ASI 74006의 경우, 두 균주 모두 1차실험에 접종량 5%와 8%가 균사체 생산성이 가장 좋았으며 확인배양을 거쳐 접종량 농도 8%가 가장 우수한 생산성을 보이는 것으로 나타났다.

잎새버섯 ASI 9025의 경우 10일째에는 8%가, 14일째에는 10%를 접종하였을 때 균사체 생산성이 좋았고, 두 농도로 확인배양 결과 10%에서 좀 더 좋은 결과를 보여주었다.

배양기간별 pH는 비늘버섯 ASI 24027, 24012와 차가버섯 ASI 74006의 경우 초기에는 큰 변화가 없다가 배양 10일째부터 급격히 상승하였다. 반면에 장수버섯 ASI 17017은 배양 4일째 급격히 감소하여 그 이후에는 큰 변화를 나타내지 않았다. 잎새버섯 ASI 9025는 4~6일째 급속히 감소했고 10일째에는 거의 pH 3근처를 기록하였다.

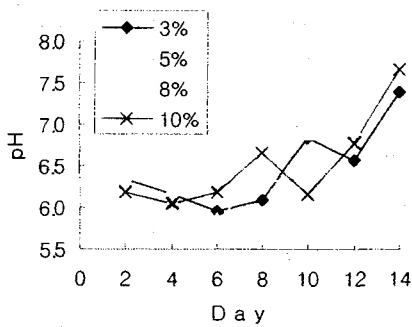


Fig. 24. pH change in culturing process according to inoculum ratio(ASI 24027).

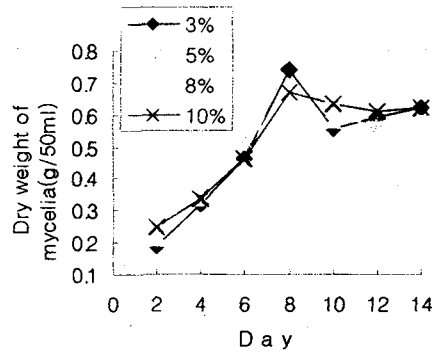


Fig. 25. Mycelial productivity in culturing process according to inoculum ratio(ASI 24027).

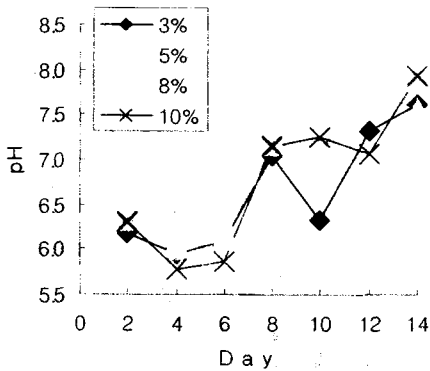


Fig. 26. pH change in culturing process according to inoculum ratio(ASI 24012).

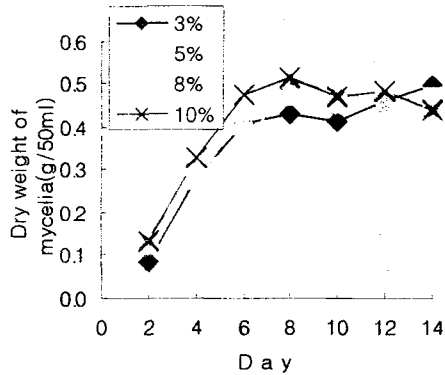


Fig. 27. Mycelial productivity in culturing process according to inoculum ratio(ASI 24012).

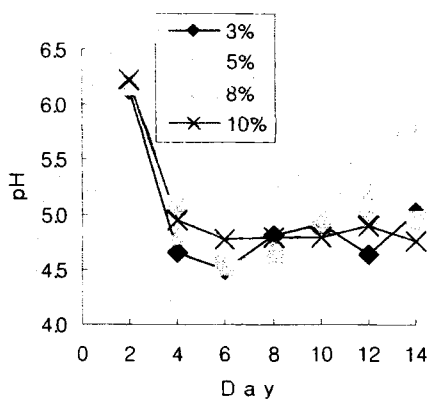


Fig. 28. pH change in culturing process according to inoculum ratio(ASI 17017).

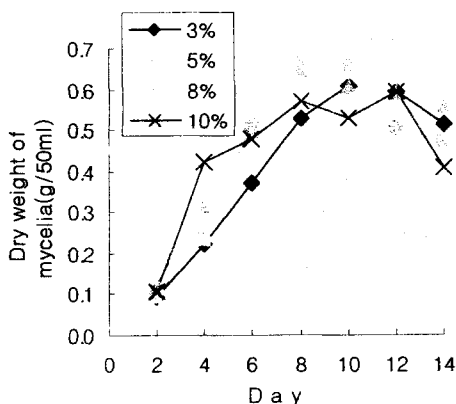


Fig. 29. Mycelial productivity in culturing process according to inoculum ratio(ASI 17017).

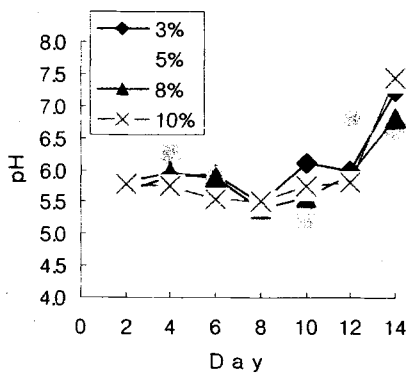


Fig. 30. pH change in culturing process according to inoculum ratio(ASI 74006).

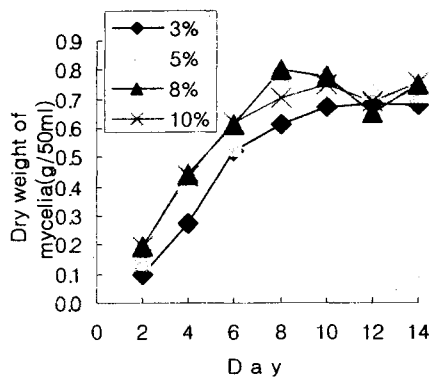


Fig. 31. Mycelial productivity in culturing process according to inoculum ratio(ASI 74006).

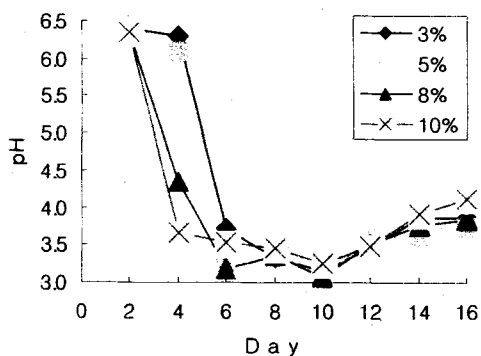


Fig. 32. pH change in culturing process according to inoculum ratio(ASI 9025).

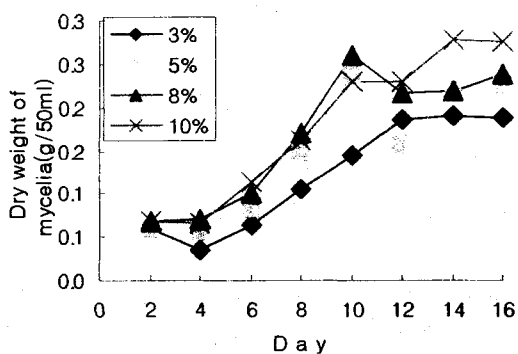


Fig. 33. Mycelial productivity in culturing process according to inoculum ratio(ASI 9025).

나. 교반조건에 따른 생산성 조사

각 균주별 교반조건에 따른 생산성을 조사하기 위하여 10L Fermenter를 이용하여 교반 속도별로 균사체 생산성을 측정하였다.

비늘버섯 ASI 24012는 교반속도별로 근소한 차이를 보였으며 120rpm에서 많은 균사체 함량을 나타내었다. 반면, ASI 24027은 150rpm에서 가장 많은 균사체량을 생산하는 것으로 나타났다.

장수버섯 ASI 17017은 120rpm에서 가장 높은 균사체량을 생산하였고, 차가버섯 ASI 74006은 교반속도가 높아질수록 균사체 생산성이 높아짐을 확인하였다.

앞새버섯 ASI 9025은 150rpm과 200rpm에서 거의 비슷한 생산성을 보였으나 150rpm에서 약간 더 좋은 결과를 보여주었다.

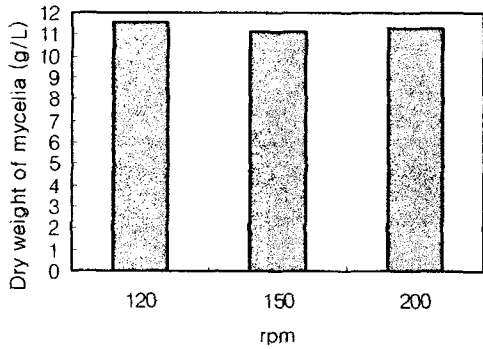


Fig. 34. Mycelial productivity according to the rpm of agitation in ASI 24012.

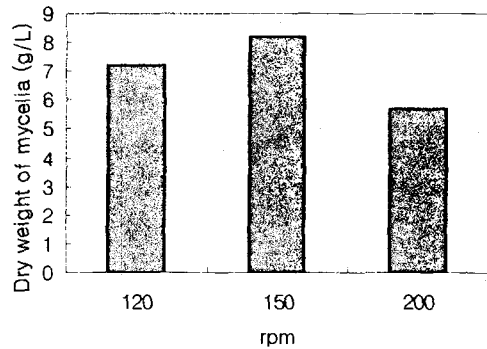


Fig. 35. Mycelial productivity according to the rpm of agitation in ASI 24027.

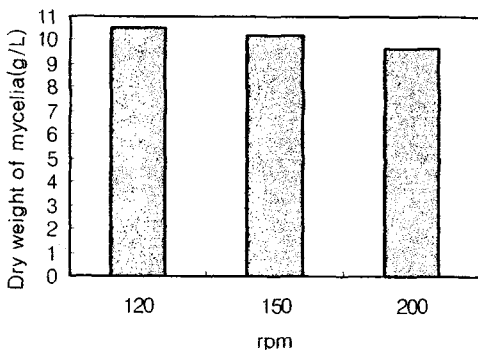


Fig. 36. Mycelial productivity according to the rpm of agitation in ASI 17017.

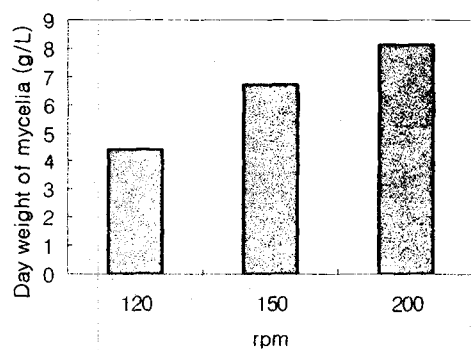


Fig. 37. Mycelial productivity according to the rpm of agitation in ASI 74006.

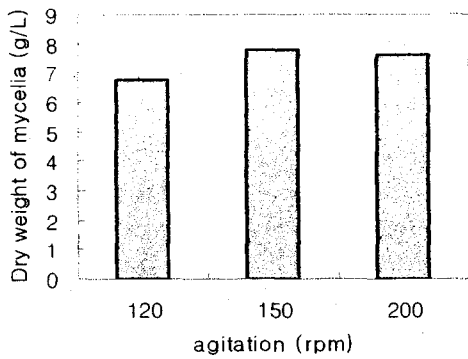


Fig. 38. Mycelial productivity according to the rpm of agitation in ASI 9025.

다. 통기량에 따른 생산성 조사

통기량에 따른 균사체 생산성을 조사한 결과는 Fig. 39~43과 같다. 각 균주별로 10L Fermenter를 이용하였으며 0.6, 0.8, 1.0, 1.5, 2.0vvm으로 공기공급량을 달리하여 균사체 생산성을 조사하였다. 비늘버섯 ASI 24012와 ASI 24027, 차가버섯 ASI 74006 그리고 잎새버섯 ASI 9025는 1.5vvm에서 균사체 생산이 가장 높았으며 장수버섯 ASI 17017은 1.5vvm과 2.0vvm에서 균사체 생산량이 높았다.

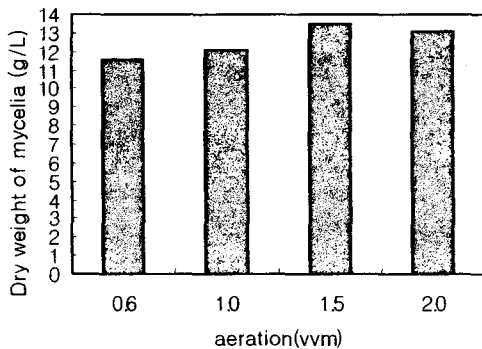


Fig. 39. Mycelial productivity according to the aeration level in ASI 24012.

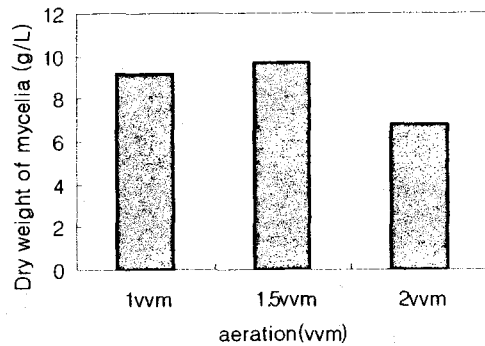


Fig. 40. Mycelial productivity according to the aeration level in ASI 24027.

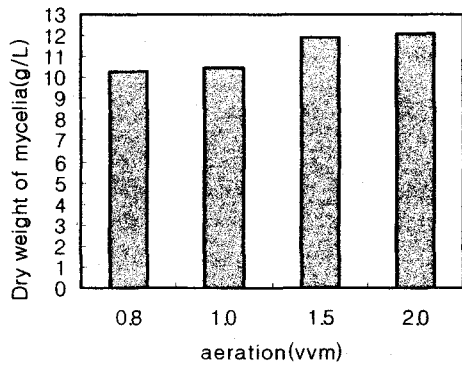


Fig. 41. Mycelial productivity according to the aeration level in ASI 17017.

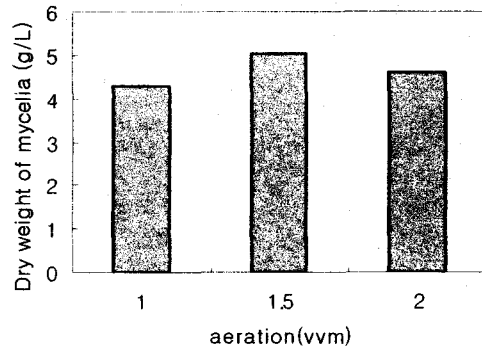


Fig. 42. Mycelial productivity according to the aeration level in ASI 74006.

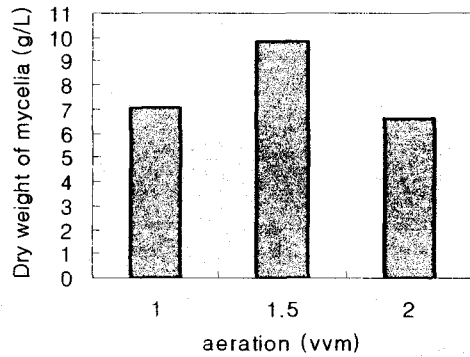


Fig. 43. Mycelial productivity according to the aeration level in ASI 9025.

라. 배지 멸균조건 조사

10L Fermenter(working volume : 5L)를 이용하여 멸균시간을 다르게 한 후 배지의 오염유무를 조사하였다. 그 결과 배양기에 관계없이 멸균시간 121℃에서 20분 이상에서는 배지가 오염되지 않았다. 그러나 30분 이상 멸균한 배지에서는 약간 구수하면서도 탄냄새가 났다. 배지의 적정 멸균시간은 20~25분이 가장 적당할 것으로 판단되었다.

Table 3. The required sterilization time at 121°C

Fermentor \ Time	10min	15min	20min	25min	30min	40min
Jar fermenter (5 l / 10 l)	under	under	proper	proper	over	over
Balloon type (6 l)	under	under	proper	proper	over	over
Air lift type (5~6 l / 13.5 l)	under	under	proper	proper	over	over

마. 배양장치별 생산성 검토

배양 장치별 균사체 생산성을 조사하기 위하여 Jar fermenter(10 L), Air-sparging fermenter(13 L), Balloon type bioreactor(10 L)를 이용하여 장수버섯 ASI 17017을 대표적으로 배양해본 결과 다른 배양기에서의 결과와 큰 차이를 보이지 않았지만 Air lift type fermenter에서 가장 균사체 생산성이 좋았다(Table 4).

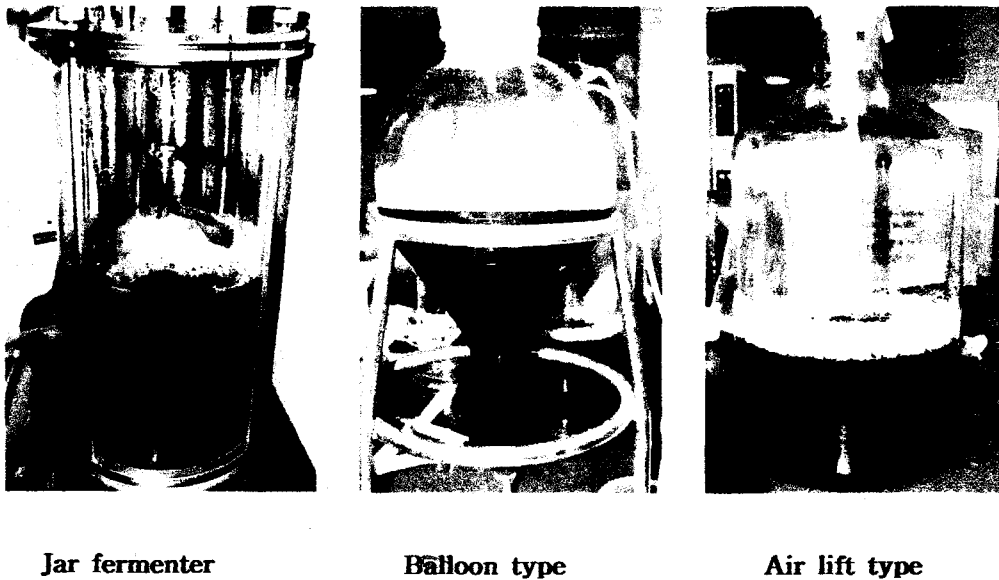


Fig. 44. Pictures of various fermenter.

Table 4. Mycelial productivity by various fermenters

	Jar fermenter	Air lift type fermenter	Balloon type fermenter
<i>Fomitella</i>			
<i>Fraxinea</i>	12.8g/L	13.5g/L	11.9g/L
ASI 17017			

3. 산업적 배양의 생산성

가. 산업용 배지를 이용한 균사체 생산성

천연배지 밀기울과 대두박을 이용하여 균사체 생산성을 조사한 결과는 Fig. 45-48과 같다. 대부분의 균주에서 밀기울을 첨가한 배지보다는 대두박을 첨가한 배지에서 균사체 생산성이 좋은 것으로 나타났다. 비늘버섯 ASI 24027과 잎새버섯 ASI 9025는 대두박 0.5%, glucose 2%일때가 균사체 생산성이 높았으며 장수버섯 ASI 17017은 대두박 0.5%, glucose 2%, yeast extract 0.5%일때가 균사체 생산성이 가장 높은 것으로 나타났다. 차가버섯 ASI 74006은 밀기울과 대두박 각각 0.5%, glucose 2%, yeast extract 0.5%일때가 균사체 생산성이 가장 높았다.

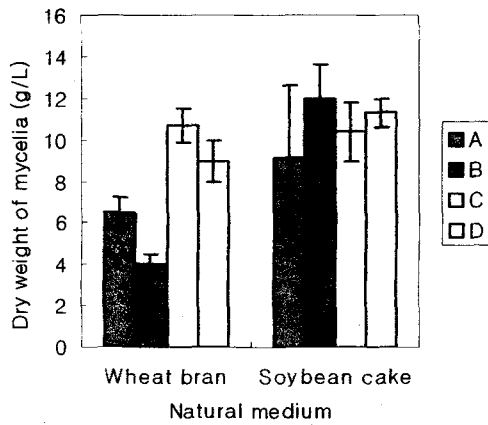


Fig. 45. Mycelial productivity of ASI 24027 according to commercial media composition.

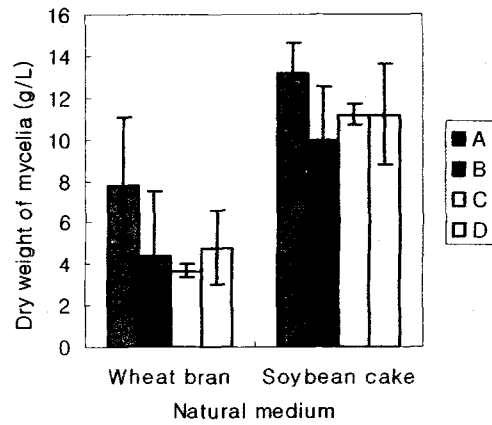


Fig. 46. Mycelial productivity of ASI 17017 according to commercial media composition.

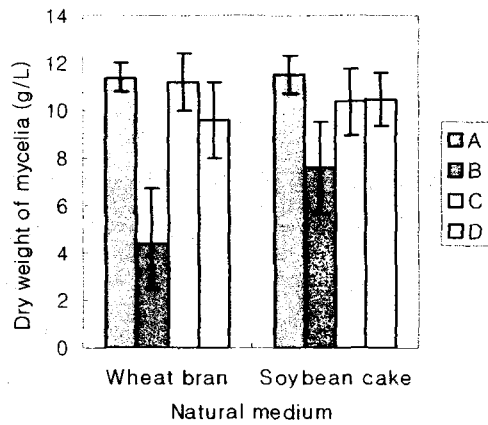


Fig. 47. Mycelial productivity of ASI 74006 according to commercial media composition.

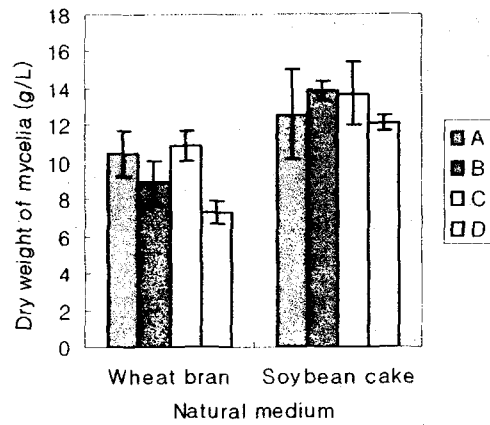


Fig. 48. Mycelial productivity of ASI 9025 according to commercial media composition.

나. 무기염류 유무에 따른 생산성

무기염류의 첨가유무에 따른 각 균주별 균사체 생산량을 조사한 결과, 비늘버섯 ASI 24027의 무기염류를 첨가한 배지가 약간 생산성이 높은 것으로 나타났으나 유의적 차이는 없었다. 반면에 장수버섯 ASI 17017의 경우는 무기염류를 첨가한 배지가 첨가하지 않은 배지보다 균사체 생산량이 아주 우수한 것으로 나타났으며, 차가버섯 ASI 74006과 잎새버섯 ASI 9025 역시 무기염류를 첨가한 배지가 균사체 생산량이 높았다.

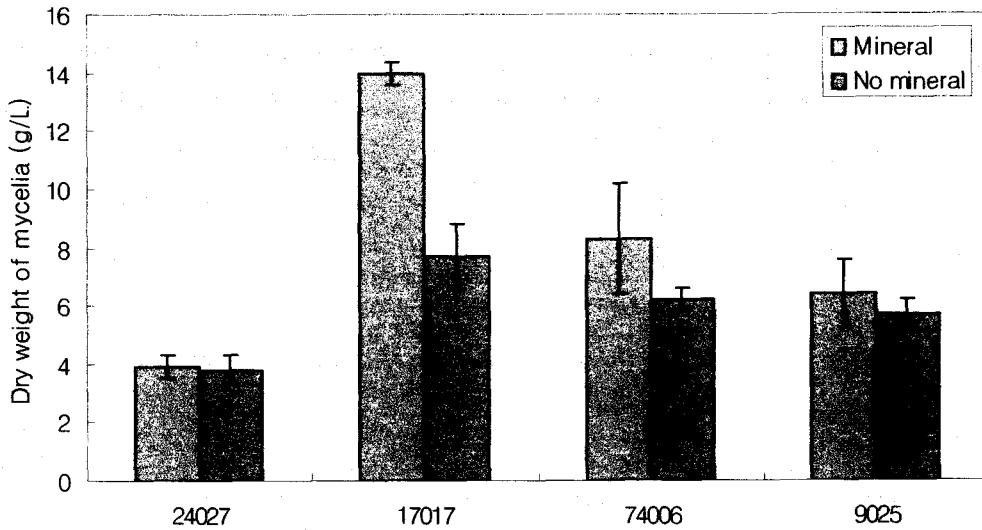


Fig. 49. Effect of minerals on mycelial productivity.

Mineral composition : KH_2PO_4 1g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1g, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 10mg,
 $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 7mg, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 4mg, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 1mg/L

다. 예비배양 방법의 확립

접종방법을 달리하여 각 균주별 균사체 생산량을 조사한 결과 장수버섯 ASI 17017은 방법1(plate배양→진탕배양→균질화→본배양)에서, 다른 균은 방법2(plate배양→진탕배양→균질화→진탕배양(2-3일)→본배양)로 배양하였을때가 균사체 생산량이 가장 높은 것으로 나타났다.

Table 5. Mycelial productivity according to the procedure of pre-culture

Strain	(g/L)		
	Procedure 1	Procedure 2	Procedure 3
<i>Pholiota adiposa</i> ASI 24027	6.2	6.6	4.6
<i>Fomitella fraxinea</i> ASI 17017	8.1	7.0	6.9
<i>Inonotus obliquus</i> ASI 74006	5.2	11.4	5.5
<i>Grifola frondosa</i> ASI 9025	6.9	7.9	5.4

라. 천연배지와 화학배지의 생산성비교

균사체 생산을 위하여 확립된 균사체 생산 조건과 산업용 배지의 최적 조건하에서 각 균주를 배양하여 균사체 생산량을 조사한 결과는 Table 6과 같다. 화학배지로 제조한 배지보다 산업용 천연배지로 제조한 배지에서 균사체의 생산량이 비슷하거나 높은 것을 확인할 수 있었다. 그러므로 균사체를 산업용으로 대량 배양하고자 할 경우 값비싼 화학배지보다 값싼 천연배지를 사용하는 것이 더 효율적일 것으로 판단된다.

Table 6. Mycelial productivity comparison between chemical medium and commercial medium

Strain	Chemical medium	Commercial medium
<i>Pholiota adiposa</i> ASI 24027	9.7	10
<i>Fomitella fraxinea</i> ASI 17017	12.1	12.5
<i>Inonotus obliquus</i> ASI 74006	8.1	15.6
<i>Grifola frondosa</i> ASI 9025	9.9	13.7

마. 상업적 균사체 생산시험

200L 폭기배양기(버섯 종균배양용, Fig. 50)를 이용하여 4가지 균주의 상업적 생산시험을 실시한 결과는 Table 7과 같다. 균사체의 생산성은 실험실 규모의 Jar fermenter보다는 낮은 것으로 나타났다. 그러나 200L 폭기배양기는 대형액체배양탱크보다 다루기 쉽고 오염에 의한 손실도 적다는 장점이 있으므로 균사체 대량생산에 이용하는 것이 유리하다고 판단된다.



Fig. 50. 200L mushroom spawn culture vessel.

Table 7. Commercial production trial of 4 mushroom strains by use of ordinary spawn culture vessel(working volume 150L)

Strain	Condition	Culture day	Temperature	Air pressure	Amount of mycelia
<i>Pholiota adiposa</i> ASI 24027		10 days	25°C	1.2 kgf/cm ²	570g
<i>Fomitella fraxinea</i> ASI 17017		7 days	25°C	1.2 kgf/cm ²	675g
<i>Inonotus obliquus</i> ASI 74006		10 days	25°C	1.2 kgf/cm ²	390g
<i>Grifola frondosa</i> ASI 9025		10 days	25°C	1.2 kgf/cm ²	615g

참고문헌

1. Kawagoe, M. Large-scale cultivation of mushroom mycelium by bubble column fermenters. *일본응용버섯학회지* 8, 1-11 (2000)
2. M-Rocha, F. J. *et al.* Growth characterizations of *P. ostreatus* in bioreactors. *Biotechnology Techniques* 13, 29-32 (1999)
3. Fukushima, Y. *et al.* Efficient production of mycelium of *L. edodes* by a continuous culture and the effect of lignin on growth. *J. Fermentation and Bioengineering* 76, 45-48 (1992)
4. Kwag, Sang-Deok *et al.* Studies on Constituents of Higher Fungi of Korea - Antitumor Components of the Cultured Mycelia of *Paxillus atrotomentosus*, *Korean Mycol* 20, 240-251 (1992)
5. Koh, Jong-Ho *et al.* Pharmacological Activities of the Mycelial Extract of Cultured *Cordyceps sinensis*, *Agric. Chem. Biotechnol.* 44(2), 77-83 (2001)
6. Park, Jong Pil *et al.* Effect of aeration rate on the mycelial morphology and *exo*-biopolymer production in *Cordyceps militaris*, *Process Biochemistry* 37 (2002)
7. Chang, Hyun-You, Cha, Dong-Yeul *et al.* Cultural Characteristics of *Fomitella fraxinea* (Fr.) Imaz., *The Korean Journal of Mycology*, 23(3), 238-245 (1995)
8. Sung, Jae-Mo *et al.* The Fruit-body Formation and Properties of *Pholiota* sp., *The Korean Journal of Mycology*, 26(2), 194-199 (1998)
9. Lee, Sang-Sun *et al.* Cultivation of *pholiota adiposa* by Use of Sawdusts and Agricultural By-product Substrates, *Mokchae Konghak*, 30(1), 72-78 (2002)
10. Lee, Dae-Hyung *et al.* F303 Extraction and Purification of Angiotensin converting Enzyme Inhibitor from *Pholiota adiposa*, *KSM News Letter*, 15(2), 79 (2002)
11. Park, Sang-Shin *et al.* Antioxidative Activity and Structural Analysis of Steroid Compound from *Fomitella fraxinea*, *The Korean Journal of Mycology* 29, 67-71 (2001)
12. Cho, Soo-Muk *et al.* Immuno-stimulation Polysaccharides from the Fruiting Bodies of *Fomitella fraxinea* (I), *The Korean Journal of Mycology* 23, 332-339 (1995)
13. Cho, Soo-Muk *et al.* A mannofucogalactan, fomitellan A, with mitogenic effect from fruit bodies of *Fomitella fraxinea* (Imaz.), *Carbohydrate Polymers* 37, 13-18

(1998)

14. Lee, Jong-Seok *et al.* Optimal Production and Characterization of Fibrinolytic from *Fomitella fraxinea* *Fomitella fraxinea* Mycelia, Kor. J. Microbiol. Biotechnol 30, 325-331 (2002)
15. Ham Seung-Si *et al.* Antimutagenic and Cytotoxic Effects of Ethanol Extract from the *inonotus obliquus*, J. Korean Soc. Food Sci. Nutr., 32(7), 1088-1094 (2003)
16. Ham Seung-Si *et al.* Antioxidant and Genotoxic Inhibition Activity of Ethanol Extract from the *inonotus obliquus*, J. Korean Soc. Food Sci. Nutr., 32(7), 1071-1075 (2003)
17. Song Hui-Sun *et al.* Downregulatory Effect of AGI-1120 (α -Glucosidase Inhibitor) and Chaga Mushroom (*inonotus obliquus*) on Cellular NF- κ B Activation and Their Antioxidant Activity, Kor. J. Pharmacogn, 35(1), 92-97 (2004)
18. Du wei *et al.* Study on the conditions of submerged culture of *Grifola frondosa*, Journal of Northwest Sci Tech University of Agriculture and Forestry 30, 110-114 (2002)
19. Lee, Bum-Chun *et al.* Biological activities of the polysaccharides produced from submerged culture of the edible Basidiomycete *Grifola Frondosa*, Enzyme and Microbial Technology 32, 574-581 (2003)
20. Chung, Kun-Sub, Koo, Young-Jo *et al.* Mycelial Growth of *Ganoderma lucidum* and *Grifola frondosa* in Milk Whey, Kor. J. Mycol., 19(1), 61-65 (1991)
21. 박애경, 송이버섯[*Tricholoma matsutake*]균사체 생산을 위한 액체배양조건의 최적화. 세종대학교 (1996)
22. 문희우, 느타리버섯균(*Pleurotus spp.*)의 액체종균 배양과 배양장치에 관한 연구. 강원대학교 (1997)
23. 박동수, 원형느타리버섯(*Pleurotus ostreatus*(Jacq. : Fr)Kummer) 액체종균의 배양적 특성 및 인공재배에 관한 연구= Studies on the cultural characteristics and artificial cultivation by liquid spawn of *Pleurotus ostreatus*(Jacq. : Fr)Kummer. 江原大學校大學院 (1998)
24. 김종래, 권호균, 전계택, 이계관, *Phellinus linteus* WI-001 균사체의 성장에 미치는 용존 산소농도의 영향 및 자동 조절방법 개발, Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol Vol. 28, No. 5, 285-290 (2000)

여 백

협동3 : 무리우산버섯 및 말굽버섯의 개발 및 이용 연구

말굽버섯의 인공재배 기술 개발

제 1 절 서 설

버섯은 저지방 고단백의 건강식품(Park *et al.*, 1978)으로 식량이 부족한 저개발국가에서는 단백질 공급원으로 중요한 역할을 하고 있다(차 등, 1989). 또한 버섯은 식품적 가치뿐만 아니라 의·약용적 가치 또한 큰 각광을 받고 있다. 또한 버섯이 단백질당체와 β -glucan 과 같은 기능성물질을 함유하고 있음을 보고하였고, 그 외에도 항암성분과 돌연변이 억제물질, 항산화 및 노화억제, 항균활성, 항콜레스테롤성, 항변이성, 고지혈증 개선 및 노인성 치매개선 등의 효과를 지닌 생리활성물질을 분리, 추출하고자하는 연구가 진행되고 있다. 이처럼 버섯은 그 인지도가 높아지고 수요도 급격히 증가하는 추세(Peberdy *et al.*, 1993)이나, 지금까지는 표고버섯(*Lentinula edodes*)과 느타리버섯(*Pleurotus ostreatus*)을 농가에서 주로 재배하였고, 최근에는 팽이버섯(*Flammulina velutipes*)등이 고급식품으로 인정받아 그 재배면적이 증가되고 있다(차 등, 1989). 그러나 아직도 식용으로 이용될 수 있는 많은 버섯들이 자연 상태에 방치되어 있음에도 불구하고(성 등, 1998), 이에 대한 연구는 미비한 상태이다. 따라서 버섯에 대한 보다 나은 연구를 위해서 야생버섯 균주의 수집이 절실히 요구되며, 이렇게 채집한 야생버섯을 기초로 식품과 의약품에 대한 새로운 자원으로써 그 가능성이 연구되어야 한다. 현재 목이, 버들송이, 잎새버섯, 목질진흙버섯, 잣버섯, 큰느타리버섯, 구름버섯 등의 야생버섯이 채취되어 인공재배의 가능성이 검토된 바 있다. 그러나 300여종의 국내 식용버섯에 비하면 이에 대한 연구는 극히 미비한 실정이다(Cha, 1981 ; 김한경 등, 1989 ; Cha, 1981 ; 송치현 등, 1997 ; 김한경 등, 1988 ; 김한경 등, 1997 ; 강미선 등, 2000 ; 조우식 등, 1998). 그러므로 식·약용버섯의 지속적인 공급을 위한 자연으로부터 채취가 제한적이므로, 인공재배의 연구가 필수적이다.

여러 야생버섯 중 일부 항암성을 인정받고 있는 말굽버섯(*Fomes Fomentarius*)은 민주름버섯목, 구멍장이버섯과에 속하며, 기원전 8000년 중석기 시대 유적에서 발굴됨으로써 가장 오래된 버섯으로 전해지고 있다. 말굽버섯은 봄부터 가을에 걸쳐 살아있는 활엽수나 고목에 발생하는 다년생이며, 목재를 대리석상으로 백색 부후시키는 버섯이다. 한국, 일본, 중국, 북아메리카, 필리핀, 인도네시아 등에 분포한다.

자실체는 대소 두가지 형이 있으며, 갓은 너비 5~30(50)cm, 두께 3~20cm로 말굽형에서 종형까지의 형태를 보인다. 표면은 회갈색~회황갈색 바탕에 동심상의 환문과 환구가 있고, 각피가 있으며, 조직은 황갈색이며 가죽질이다. 자실층인 회백색의 관공은 여러 층이며, 관공구는 원형이고 1mm에 3개가 있다. 포자는 16~18 \times 5~6 μ m로 장타원형이고, 표면은 평활하고, 포자문은 백색이다(박과 이, 1999).

이러한 말굽버섯에 대해서는 국내에서 단백질 분해 효소인 프로타아제에 관한 연구(노일협, 1984)와 생태·형태적 특징만이 일부 버섯도감을 통해 소개된 바 있다. 그러나 중국 <본초도감>에서는 말굽버섯의 성분은 다당류 fomentariol, fomant acic acid 및 saponin 등이다. 효능은 消積, 化痰, 抗癌 작용이 있다. 주된 치료는 음식 먹고 체한데, 식도암, 위암, 자궁암을 치료한다고 적고 있다.

이에 본 연구는 말굽버섯의 배양적·재배적 특징을 파악하여 앞으로 인공재배 가능성을 타진하고, 나아가 대량증식기술을 개발·보급함으로써 의약 및 국민건강 식품의 원료 제공 및 관련 산업의 활성화를 유도하고자 본 연구를 수행하였다.

제 2 절 연구수행 내용 및 방법

1. 말굽버섯균의 배양특성 규명

1) 공시균주

본 연구에 사용된 말굽버섯(*Fomes fomentarius*)은 전남대학교 삼림자원미생물학실험실에서 보관중인 균을 사용하였다. 공시균의 증식용 배지는 PDA(Potato dextrose agar)배지를 이용하였다.

2) 배지 종류와 조성

가. 합성배지

(1) 고체배지

말굽버섯균사의 최적배지를 선별하기 위해 표 1. 과 같이 조제하여 균사 성장량을 조사하였다. 합성배지는 각각의 조성별로 조제하여 멸균(121℃, 20분) 후 1회용 petri-dish(87×15mm)에 15ml 정도 분주하였다.

표 1. 고체배지 조성표

Nutrition reagent	Medium and Composition(g/l)							
	ME	MYPA	HA	YM	MCM	YMG	YMPG	Lilly
Potato								
K ₂ HPO ₄					1.0			
KH ₂ PO ₄					0.46		2.0	1.0
MgSO ₄ ·7H ₂ O					0.5		1.0	0.5
Glucose				10.0	20.0	4.0	10.0	
Maltose								10.0
Dextrose			20.0					
Thiamine HCl							1.0	
DL-Asparagine							1.0	2.0
Peptone	5.0	1.0		5.0	2.0		2.0	
Malt extract	20.0	30.0		3.0		10.0	10.0	
Yeast extract		2.0	2.0	3.0	2.0	4.0	2.0	
Agar	20.0	20.0	20.0	20.0	20.0	15.0	20.0	20.0

* MYPA : malt-yeast-peptone agar, MCM : mushroom complete media, ME : malt extract agar, YM : yeast-malt-glucose agar, YMG : yeast-malt-glucose agar, YMPG : yeast-malt-peptone-glucose agar, HA : hamada medium,

(2) 액체배지

말굽버섯균의 최적액체배지를 선별하기 위해 표 2. 와 같이 조제하여 균체량을 조사하였다. 합성배지는 각각의 조성별로 조제한 후 삼각플라스크(100ml)에 50ml씩 분주하고 멸균한 후 살균(121℃, 20분) 하였다.

표 2. 액체배지 조성표

Nutrition reagents	Medium and Composition(g/l)							
	Czapek Dox	Glucose pepton	Synthetic	Malt Yeast Extract	MCM	Hennergerg	Lilly	Glucose Tryptone
Sucrose	30.0							
KCl	0.5		0.01					
KNO ₃						2.0		
K ₂ HPO ₄	1.0		0.003					
KH ₂ PO ₄	1.0		1.0		0.05	1.0	1.0	
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.5		0.5		0.05	0.5	0.5	
MnSO ₄ ·5H ₂ O			0.03					
ZnSO ₄ ·7H ₂ O								
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0.01							
CuSO ₄ ·5H ₂ O			0.001					
(NH ₄) ₂ HPO ₄								
(NH ₄) ₆ MO ₇ O ₂₄			0.001					
CaCl ₂ ·2H ₂ O						0.1		
CaCl ₂								
NaNO ₃	3.0					2.0		
Glucose		10.0	20.0	10		50.0		5.0
Maltose							10.0	
Dextrose					2.0			
Thiamine HCl			0.01					
DL-Asparagine						2.0	2.0	
Peptone		10.0	5.0	5.0	0.2			
Malt extract		15.0						
Yeast extract		10.0		3.0	0.2			
Tryptone								10.0

* MCM (Mushroom Complete Medium)

나. 톱밥배지

말굽버섯균의 톱밥배지 배지 재료에 따른 배양적 특성을 조사하기 위하여 졸참나무 (*Quercus serrata*), 상수리나무 (*Quercus acutissima*), Corn-cob, 미송 (*Pseudotsuga douglasii*), 은백양 (*Populus alba*), 아까시나무 (*Robinia pseudoacacia*) 톱밥을 사용하였다. 톱밥과 미강(Rice-bran)을 10:2(w/w)로 혼합한 후 수분을 65%로 조절하여 시료를 조제하였다. 이렇게 조제된 시료를 시험관(D22mm×L200mm)에 31g씩 충전하여 일정하게(B.D., 0.23) 다진 후 면전을 하고 살균(121℃, 30분.)하였다.

3) 생리적 특성

(1) 최적 배양 온도

공시균의 최적 배양온도를 선정하기 위해 합성배지(PDA)에 한천배지(PDA)에 기재양된 공시균주의 균총을 cork borer로 떼어 접종하여 일정한 온도조건(15, 20, 25, 30, 35℃)에서 암배양한 후 균사생장량을 조사하였다.

(2) 최적 pH 선정

공시균의 균사배양용 배지의 최적 pH범위를 선정하기 위해 합성배지(PDB)에 1N HCl 과 1N NaOH를 첨가하여 일정한 pH조건(pH 4.0~7.0)으로 배지를 조제하였다. 한천배지 (PDA)에 기재양된 공시균주의 균총을 cork borer로 떼어 접종하여 항온기(25℃)에서 암배양한 후 균사생장량을 조사하였다.

(3) 최적 영양원 선발

탄소원(Glucose, Galactose, Lactose, Sucrose, Dextrin, Inulin) 및 질소원(Potassium nitrate, Ammonium tartrate, Urea, Glutamine acid, Asparatic acid, Sodium nitrate)을 최적 배지로 선발된 배지에 각각 0.1% 및 0.04% 첨가하여 공시균의 균사생장량을 조사하였다.

4) 균사생장량 측정

(1) 균체량 측정

공시균을 합성배지상에 접종 후 20일간 정치배양하여 여과(Whatman No. 2)하고 105℃로 24시간 건조하여 균사체의 무게를 구하였다.

(2) 균사생장도 측정

공시균을 배지에 접종 5일 후부터 2일 간격으로 조사하였다.

2. 말굽버섯균의 재배특성 규명

1) 접종원제조

접종원을 제조하기 위해 참나무류 톱밥에 미강을 20%(w/w)로 배합 후 수분을 65~70%로 조정하여 시료를 조제하였다. 이렇게 조제된 시료를 P.P병(1000ml)에 입봉(B.D. 0.21~0.23)하고 일정하게 다지고 나서 Air-filter가 부착된 Screwcap으로 마개를 한 후 살균(121℃, 60분) 처리하였다. 살균이 끝난 배지는 냉각(15℃) 후 톱밥배지에 기배양된 공시균을 접종하고 배양실(22±1℃)에서 30일간 배양하여 사용하였다.

2) 말굽버섯의 재배방법

늦가을에서 이듬해 물이 오르기 전에 15~20cm의 원목을 길이 20cm로 절단하여 수분 함량이 42~45% 정도 되게 건조시킨다. 이렇게 준비된 단목을 내열성 비닐봉지를 위에서 아래로 씌워 뒤집은 후, 여분의 비닐을 잡아당겨 원목과 비닐 사이의 공간이 많이 생기지 않도록 하여 종균 주입구 형성틀로 고정시켜 Air-filter가 부착된 Screwcap으로 막는다. 이렇게 조제된 배지를 살균(121℃, 40분)하여 기배양된 톱밥종균을 접종하여 배양실(20~23℃)에서 약 60일간 암배양 하였다. 배양이 완료된 배지는 토양에 매몰하여 재배하였다. 토양은 배수가 잘 되는 모래를 사용하여 지면을 편평하게 고른 다음 단목을 싸고 있는 비닐과 단목 표면의 접종원을 제거한 후 매몰 하였다. 자실체 발생시 고온(30℃)에서 계속적인 가습을 하여 발생작업을 하였다.

3) 말굽버섯의 재배특성

(1) 배양기간에 따른 자실체 초발이 소요일수 및 균사의 재내 침투율

말굽버섯의 배양 적기를 조사하기 위하여 미리 준비된 상수리나무 단목에 기배양된 톱밥 종균을 접종하여 배양실(20~23℃)에서 60일, 90일, 120일, 150일로 배양기간을 조절하여

배양하여 재배사내에 매몰하여 초발이 소요일수 및 초발이수, 균사의 재내부로의 침투율을 조사하였다.

3. 말굽버섯균의 부후특성 규명

(1) Weight loss의 측정

줄참나무 변체를 3×0.5×0.5cm로 조제하여 전건량을 측정한후 증류수에 6시간 이상 침전 시킨다. 침전된 시편을 30분간 살균(121℃, 1.2kg/cm²)한 후, 무리우산버섯균이 배양된 PDA 배지에 접종했다. 접종된 배지는 25±1℃로 조절된 배양실에서 40일간 배양 후 dry weight 감소율을 측정하였다. dry weight 감소율 L(%)은 다음 식에 의하여 산출하였다.

$$L(\%) = (S^* - W / S) \times 100\%$$

S* : 배양 전 전건무게(g), W : 배양 후 전건무게(g)

(2) Water Extract Content(WEC) 측정

추출은 온수추출법을 이용 했으며 방법은 각 시료 2g을 200ml 삼각플라스크에 넣고 증류수 100ml를 가한 다음 플라스크에 환류냉각기를 부착시켜 3시간동안 비등수조에서 처리하였다. 그 후 미리 측량된 glass filter(1 G3)로 내용물을 흡입 여과시키고 열수로 세척하여 105±3℃에서 항량이 될 때까지 건조하여 칭량하였다.

온수추출물의 양 H(%)는 다음 식에 의해서 산출하였다.

$$H(\%) = (S^* - W / S) \times 100\%$$

S* : 시료의 전건무게(g), W : 추출잔유물의 중량(g)

(3) 현미경적 특성

목편의 부후 형태와 분해 정도를 관찰하기 위해 시료를 2% glutaraldehyde (GA) + 2% paraformaldehyde (PA) 혼합고정액 (in 0.05M cacodylate buffer, pH 7.2)으로 처리한 후 동일 buffer로 세척한 다음 ethyl alcohol 계열로 탈수시킨다. 이어 ethyl alcohol과 xylene의 1:1 혼합액과 100% xylene으로 각각 처리하고 xylene과 paraffin의 1:1 혼합액에 처리 후 paraffin 원액으로 치환 시킨 다음 paraffin 블록을 만들어 microtome을 사용하여 15-20µm 두께의 절편을 제작한다. 절편은 1% safranin과 2% astra blue로 이중염색한 다음 광학현미경 관찰을 실시한다. 염색하지 않은 절편은 편광현미경 관찰에 사용한다. 주사형 전자현미경의 경우 2% GA + 2% PA 고정시킨 톱밥시료를 ethyl alcohol 계열 탈수를 실시한 다음 -20℃에서 1시간 냉동시킨 후 100% t-butyl alcohol로 치환한 다음 동결건조 시킨다. 이 시편을 ion sputter를 사용하여 gold coating하여 주사형 전자현미경 (Hitachi S-4000 SEM)을 사용하여 관찰한다. 투과형 전자현미경 관찰(TEM)은 LRW에 포매된 시편을 조제하여 Diamond knife를 사용하여 70~90nm (초박절편 두께의 색깔 : gold→silver) 두께의 초박절편을 제작한다. 이 절편을 1% KMnO₄(in sodium citrate)로 10분간 염색한 시편을 투과형 전자현미경으로 관찰한다.

4. 기능성물질의 추출과 정제

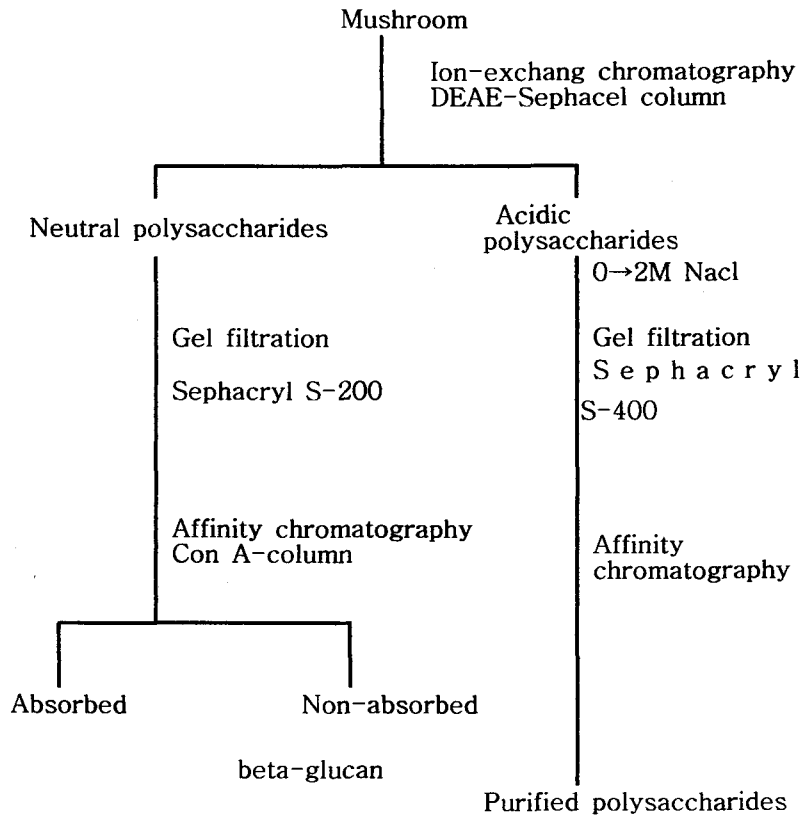


Fig.1. Flow diagram of separation of antitumor components from two mushroom.

다당체 및 단백다당체의 분리방법에 준하여 순수물질로 분리정제를 수행한다.

5kg정도의 버섯시료를 세척후 균질화하여 85C에서 5시간동안 3회 추출하고 농축한다. 농축후 95% 에탄올로 침전물을 얻고 7일정도 투석후 상청액을 원심하여 얻고 동결건조하며 불용성 추출잔사는 NaOH용액으로 추출감압농축 건조분말을 얻는다. 상기 추출물은 DEAE-cellulose anion exchange chromatography를 2M NaCl의 농도구배를 이용하여 분리하며 anthrone반응과 Lowry-follin반응을 이용하여 당질과 단백질의 분획을 확인한다. DEAE-cellulose anion exchange chromatography에서 얻어진 분획을 다시 Sepharose 4B등 gel filtration chromatography를 수행하여 분자량을 크기로 분리한다. 이렇게 분리된 분획은 Concanavalin A-Sepharose 4B 친화성chromatography를 수행하여 당질분획을 순수하게 분리정제한다.

5. 기능성 확인

기능성물질의 암세포에 대한 직접작용

- 1) In vitro 검정
- 2) In Vivo 검정법
- 3) 암세포 생존율(Survival Fraction, % cell survival)검정법

4) 동물 및 암세포

동물은 생후 8~10 주된 Balb/c 마우스의 숫컷을 사용하였다.

5) 암세포 배양

1주일에 1회씩 subculture를 행하고, 15~20회 subculture한 후에는 더 이상 사용하지 않았다.

- 배양배지

배지 ml 당 페니실린 100단위, 스트렙토마이신 100 mg 및 20% 우태아혈청이 함유된 RPMI-1640을 사용하였다.

- 암세포이식

배지 0.025 ml 당 1.5×10^6 개의 암세포를 A/J 마우스 다리의 gastrocnemius 근육의 피하에 주사한 뒤, 약 10일 후 암괴의 직경이 8-10 mm 될 때 실험에 사용하였다.

- In vivo 검정

이식된 암세포가 자라서 암괴의 직경이 8-10 mm(이식 후 약 10일)될 때, 개발한 항암제를 투여(복강내 주사, 꼬리정맥 주사 또는 근육주사)한 후 경시적으로, 즉 투여후 1일, 3일, 5일, 7일 등에 각각 다음과 같이 암괴를 적출하여 암세포 생존을 시험을 행하였다.

i) 무균적으로 종양을 적출하고, 가위로 세절하여, 0.00125% DNase와 0.25% 트립신이 든 RPMI-1640 배지내에서 실온에서 20분간 소화(digest) 시킨 뒤, 남아있는 트립신 활성을 20% 우태아혈청이 들어있는 RPMI-1640 으로 중화시키고 나서, 세포 부유액을 2겹의 거즈로 거른 뒤, 1회 더 세척하였다.

ii) trypan blue 에 염색되지 않은 세포를 계수하여, 배지 4ml 당 200개의 세포를 5% CO₂ 하에서, 37C에서 8일간 배양하였다.

iii) 선택된 클론을 95% 에탄올로 고정하고, 1% 크리스탈바이오렛(crystal violet)으로 염색을 한 뒤, 50개 이상의 세포를 가지고 있는 코로니수를 계수하였다.

6) Thymocyte의 mitogenicity 측정

Thymocyte의 증식을 Yadomae 등 (1979)의 방법에 따라 실시하였다.

7) 보체 대체 경로 (alternative complement pathway)의 활성화에 대한 작용

보체 대체 경로에 대한 작용을 알아보기 위해 Adachi 등 (1990)의 방법에 따라 실시하였다.

8) 기타 연구법

항암성에 관련된 cam, invasion assay의 수행

제 3 절 연구결과

1. 말굽버섯균의 배양특성 규명

1) 최적합성배지

공시균의 생육에 적합한 고체 합성배지는 YMPG 배지에서 군사생장이 가장 양호하였고 YMG, HA, MCM, MYPA 배지에서 비교적 군사생장이 양호하였으나, YM, Lilly, MCM, ME 배지에서는 군사생육이 저조하였다(그림 1). 최적 액체합성배지는 Czapek dox 배지에서 80mg/50ml으로 군사 생육이 가장 우수하였으며, Hennerberg, Lilly, Glucose pepton, Glucose tryptone배지 순으로 양호한 군사 생육을 보였다. Synthetic과 MCM 배지는 저조하였다(그림 2).

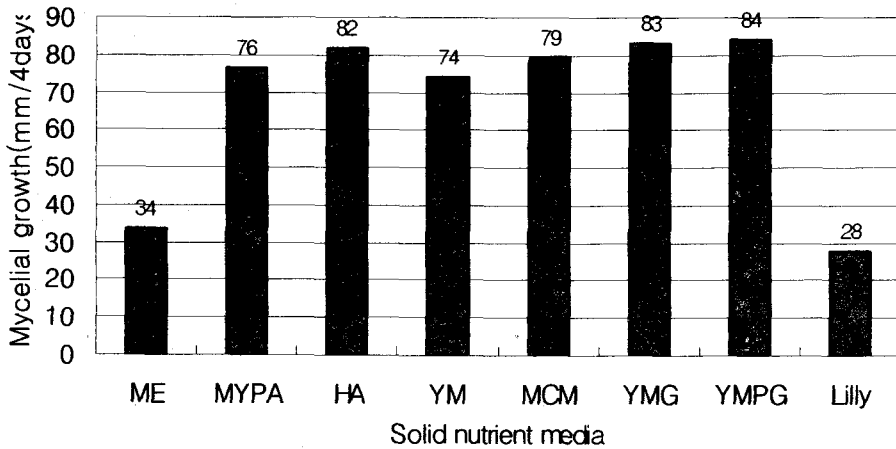


그림 1. 고체 합성배지에서 말굽버섯균사의 생장

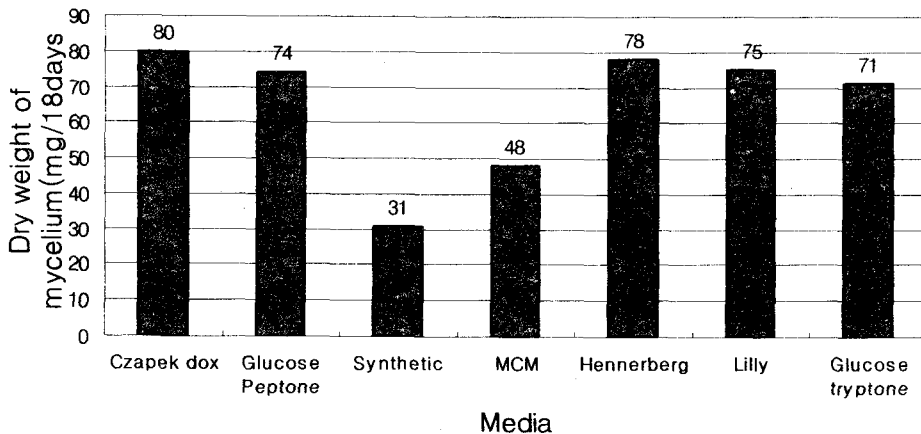


그림 2. 액체 합성배지에서 말굽버섯균사의 생장

2) 최적 고체(툽밥) 배지

최적 수종을 선발하기 위하여 실시한 실험 결과는 표 3. 과 같다. 상수리나무와 아까시나무 툽밥에서 좋은 생장을 보였으며 corn-cob, 줄참나무, 은백양 순으로 좋았다. 그러나 미송에서는 생장이 현저히 저조하였다.

표 3. 고체(툽밥)배지에서 말굽버섯 균사의 성장량

Sawdust* substrate	<i>Q.</i> <i>serrata</i>	<i>Q. acutissima</i>	corn cob	<i>P.</i> <i>Douglasii</i>	<i>P. alba</i>	<i>R.</i> <i>pseudoocacia</i>
Mycelial Growty	84±2	107±2	86±2	77±2	81±2	102±2

(mm/30days)

*Different species of sawdust substrates (80%, w/w, 10~20 mesh) were mixed with rice bran (20%, w/w) and tap water was added to keep the moisture content at 65%(w/v).

3) 최적 배양온도

말굽버섯균의 균사생육과 배양온도와의 관계를 조사하기 위하여 실시한 실험 결과 15~30℃에서 균사생육을 보였으며, 25℃(37mm/7days)에서 30℃(66mm/7days) 사이가 균사생육 적온으로 나타났으며 35℃에서는 생육이 정지하였다(그림 3). 이는 정인창 등(1997)이 보고한 말뚝진흙버섯(*Phellinus igniarius*)의 생육적온 조사에서, 적온 범위가 25~28℃이며, 35℃ 이상에서는 균사의 생장이 극히 저조하였음과 유사함을 보였다. 그리고 홍과 이(1990)에 의하면 북령의 균사생육 적온은 25~29℃이며, 23℃이하와 29℃이상의 배양온도에서는 균사생육이 저조함을 보고하였다. 개암버섯(강안석 등, 2001), 큰느타리버섯(강미선 등, 2002), 풍뎡이 동충하초(이재근 등, 2000) 등 대부분의 버섯의 균사적온이 25℃인데 비하여, 말굽버섯은 이보다 약간 높은 온도에서 적온을 보였다. 이 결과로 미루어 보아 말굽버섯을 고온성 버섯으로 분류할 수 있을 것으로 사료된다.

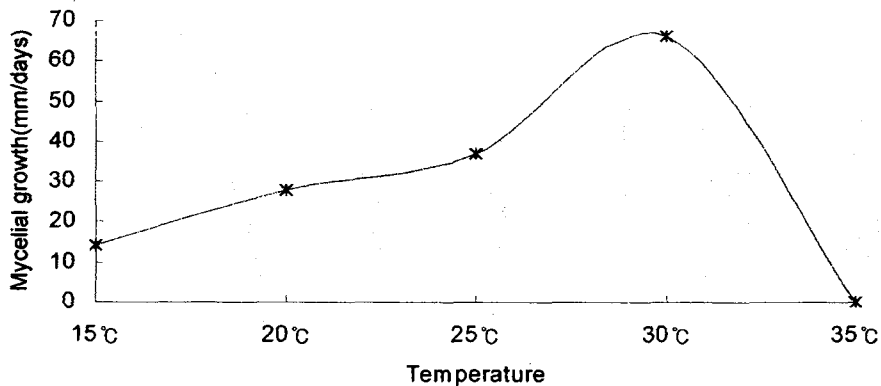


그림 3. 온도 변화에 따른 말굽버섯균사의 성장

4) 배지의 pH 범위

공시균주의 균사생육과 배지 pH와의 관계를 조사하기 위하여 실시한 실험 결과 그림 4에서와 같이 pH 4.0에서 균체량이 135mg/18days으로 가장 우수한 균사생육을 보였으며, 배지의 산도가 높아짐에 따라 균사생육이 저조하였다.

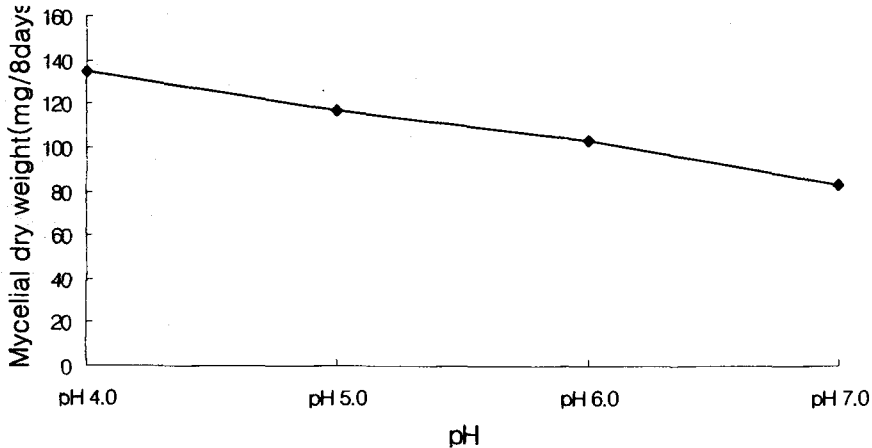


그림 4. 산도 변화에 따른 말굽버섯균사의 생장

5) 최적 영양원 선발

말굽버섯균의 균사생육과 영양원의 첨가와와의 관계를 조사하기 위하여 실험한 결과 탄소원은 그림 5와 같이 Inulin의 3종의 탄소원을 첨가한 배지에서 유사한 생육을 보였다. 질소원은 그림 6과 같이 lactose 첨가 배지에서 225mg/18days, galactose 첨가배지에서 213mg/18days의 균체량으로 우수한 균사생육을 보였다.

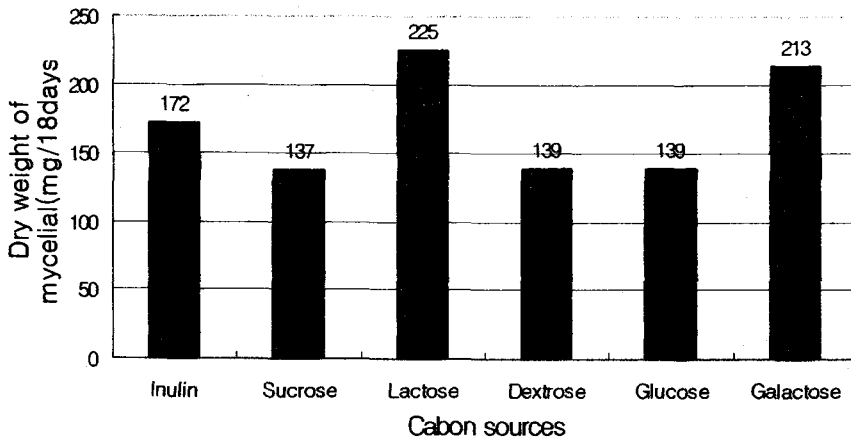


그림 5. 탄소원 첨가에 따른 말굽버섯균사의 생장

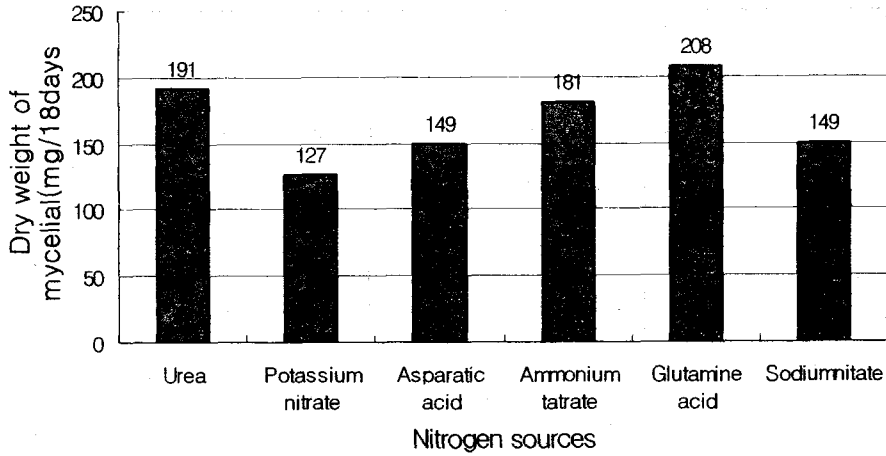


그림 6. 질소원 첨가에 따른 말굽버섯균사의 생장

2. 말굽버섯의 재배특성 규명

1) 배양기간에 따른 자실체 초발이 소요일수 및 균사의 재내 침투율

말굽버섯의 배양기간에 따른 초발이 소요일수를 조사한 결과 배양기간을 90~120일로 하는 것이 가장 좋게 나타났다. 배양기간을 60일로 했을 경우 당년에는 자실체가 발이 되지 않았고 그 다음해에 자실체가 발이 되는 것으로 나타났다. 이는 60일 배양 후 재내부로의 침투율이 32.4% 밖에 되지 않으므로 매몰 후 균사가 목재를 부후시켜 발이에 필요한 에너지를 저장하는데 시간이 필요한 것으로 사료된다. 그리고 배양기간을 150일로 했을 경우에는 초발이 소요일수가 가장 짧았지만 배양기간이 길어지므로 발이되는데 걸리는 총기간은 191일로 90일배양한 것보다 23일이나 늦어지므로 부적합한 것으로 사료된다(표 4, 그림 7).

표 4. 배양기간에 따른 말굽버섯 자실체 초발이 소요일수 및 균사의 재내 침투율

배양기간(일)	60	90	120	150
구분				
초발이소요일수(일)	*	78	54	41
초발이수(개)	0	1.3	2.5	3.1
균사의 재내부로의 침투율(%)	32.4	59.6	70.5	76.8

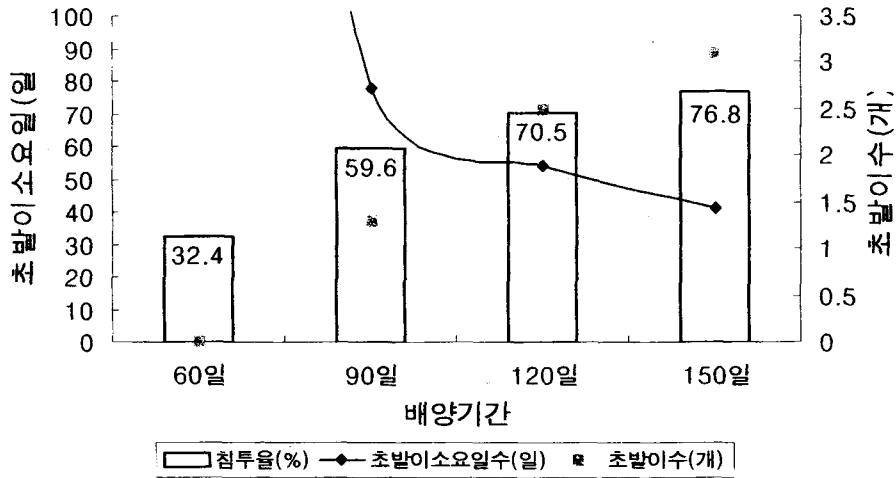
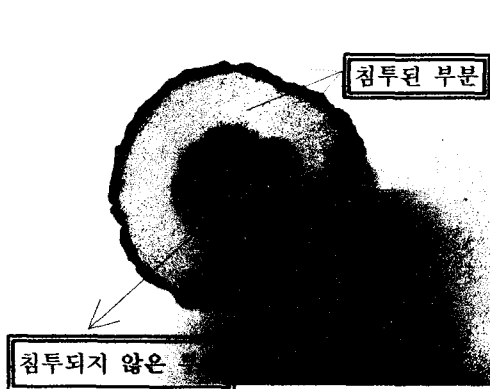


그림 7. 배양기간에 따른 말굽버섯 자실체 초발이 소요일수 및 균사의 재내 침투율

다음 사진 1은 90일 배양하여 초발이된 상수리나무 단목에서 말굽버섯균사가 76.8%의 침투율을 보인 것이며, 사진 2는 상수리나무 단목에서 말굽버섯이 초발이된 모습이다.



<사진 1. 말굽버섯균사가 상수리나무 단목에 침투한 모습 (90일 배양) >



<사진 2. 말굽버섯이 상수리나무 단목에서 발이된 모습 (90일 배양) >

다음 사진 3은 상수리나무 단목에서 90일 배양하여 매몰 후 1년이 지난 뒤의 말굽버섯균사가 100%의 침투율을 보인 것이며, 사진 4는 상수리나무 단목에서 90일 배양하여 매몰 후 1년이 지난뒤의 말굽버섯균의 자실체의 모습이다.



<사진 3. 말굽버섯균사가 상수리나무 단목에 침투한 모습 (90일 배양 후 1년 매물)>



<사진 4. 말굽버섯의 자실체 발생 후 1년이 지난 뒤 모습 (90일 배양)>

3. 말굽버섯균의 부후특성 규명

1) Weight loss 측정

말굽버섯균의 부후에 따른 중량감소율을 조사한 결과는 표 5와 같이 17.4%의 중량감소율을 보였다. 이광호(2002)는 갈색부후균인 *Coniophora puteana* 4균주를 이용하여 12주간 배양된 소나무재와 상수리나무재의 중량감소율을 조사하였는데, 균주별로 소나무는 12.5~25.6%, 상수리나무는 15.4~24.3%의 중량감소율을 보고하였다. 배양기간이 40일이었던 공시균주의 중량감소율과 비교했을 때, 공시균주의 목재 부후 능력이 우수한 것으로 사료된다.

표 5. 줄참나무에서 배양된 말굽버섯균사의 중량감소율

	Before rotting(mg)	After rotting(mg)	Weight loss(mg)	Percentage of weight loss(%)
<i>Q. serrata</i>	2,012	1,661	351	17.4%

2) WEC(Water Extract Content) 측정

말굽버섯균의 부후 전후 배지의 WEC를 조사한 결과 부후 전에 12.98%의 추출을 보이고, 부후 후에는 15.22%의 추출물을 얻었다. 이는 말굽버섯균이 톱밥과 미강이 있는 탄수화물, 탄닌, 배당체등을 이용한 양보다 말굽버섯균이 공기중의 수분과 양분을 이용하여 생성한 또 다른 물질이 많은 것으로 사료된다(표 6).

표 6. 졸참나무에서 말굽버섯균의 WEC 측정

Methods	Extraction(%)
Sawdust	12.98
<i>F. fomentarius</i> on the Sawdust	15.22

* *Q. serrata* of sawdust substrates (80%, w/w, 10~20 mesh) were mixed with rice bran(20%, w/w) and tap water was added to keep the moisture content at 65%(w/v).

3) 현미경적 특성

말굽버섯균에 의한 졸참나무 변재의 부후 형태는 목섬유 세포벽의 침식과 박벽화가 관찰되었다(그림 8. 1, 2). 균사의 밀도는 방사조직에서 높게 나타났고, 일부 목섬유에서도 높게 나타났다(그림 8. 3). 축방향유세포와 도관의 벽공이 심하게 부후되었고(그림 8. 4), 목섬유의 세포벽에서 침식 및 박벽화가 관찰되었다(그림 8. 5).

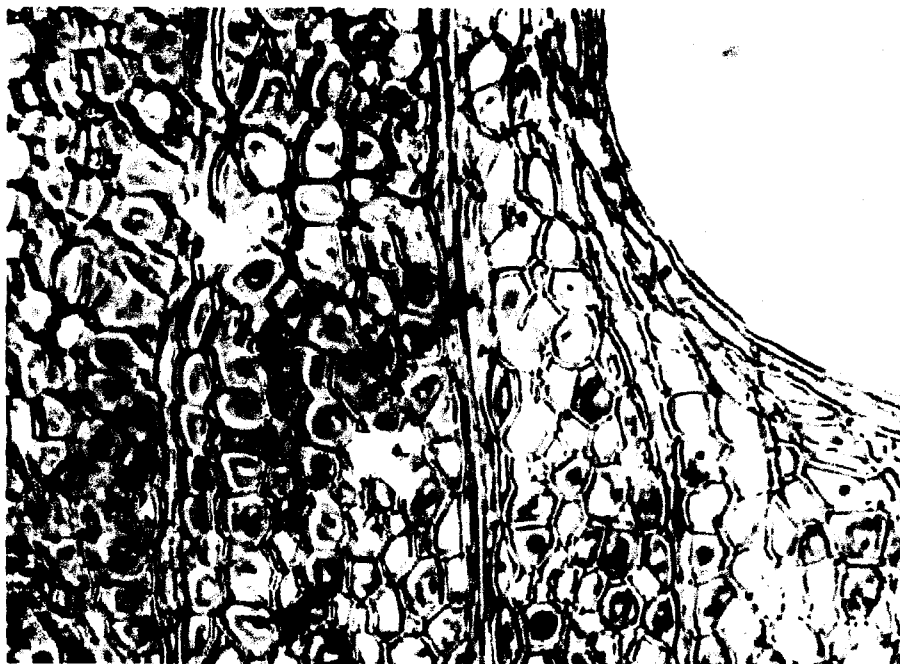


그림 8. 1. 말굽버섯균에 의한 졸참나무 변재의 분해. 목섬유의 박벽화 (arrow)와 침식 (arrow head).

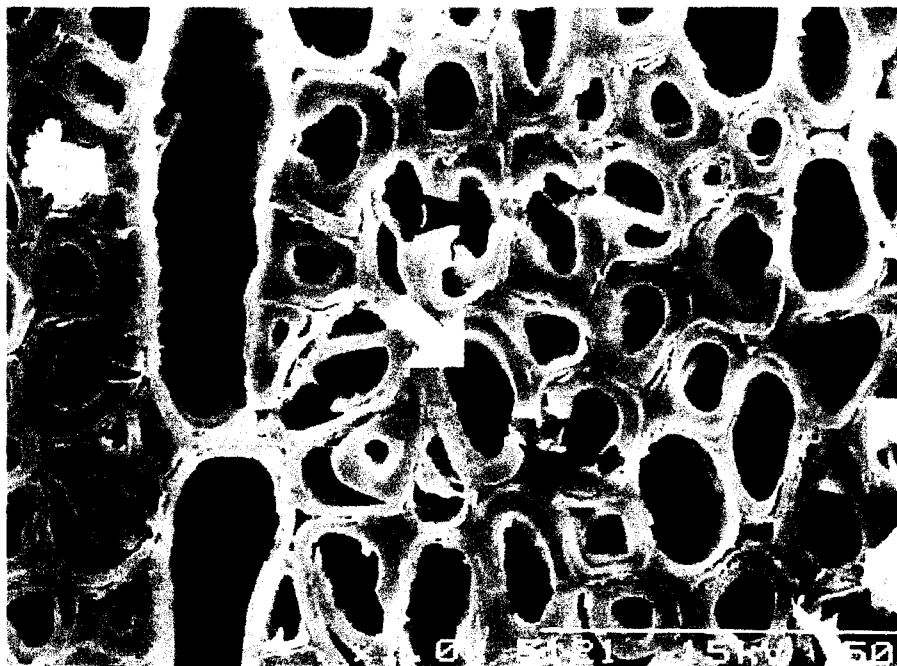


그림 8. 2. 말굽버섯균에 의한 줄참나무 변재의 박벽화 (arrow) 및 침식 (arrow head) (SEM 사진).

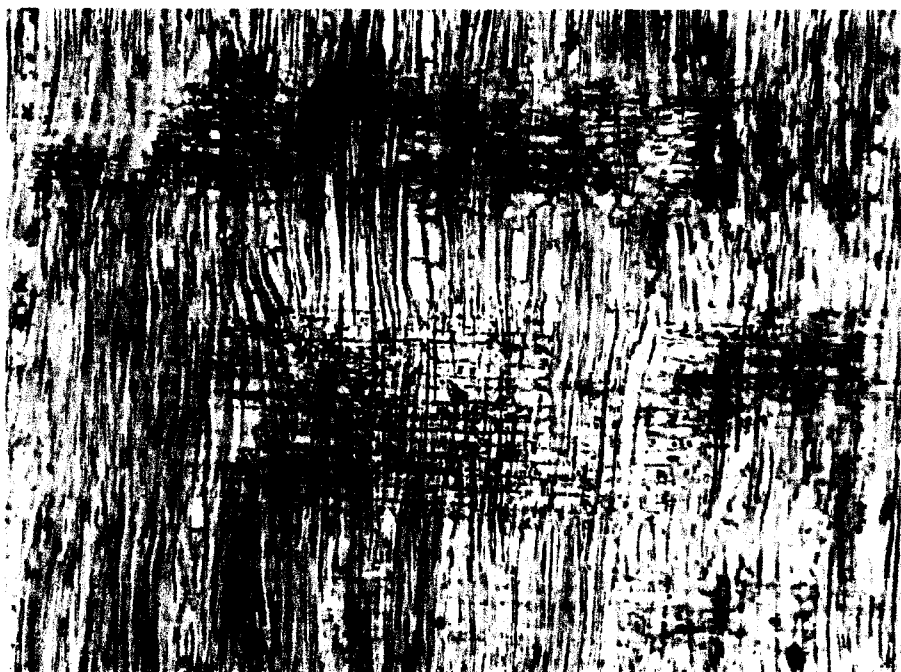


그림 8. 3. 말굽버섯균사의 줄참나무 변재 재 분포

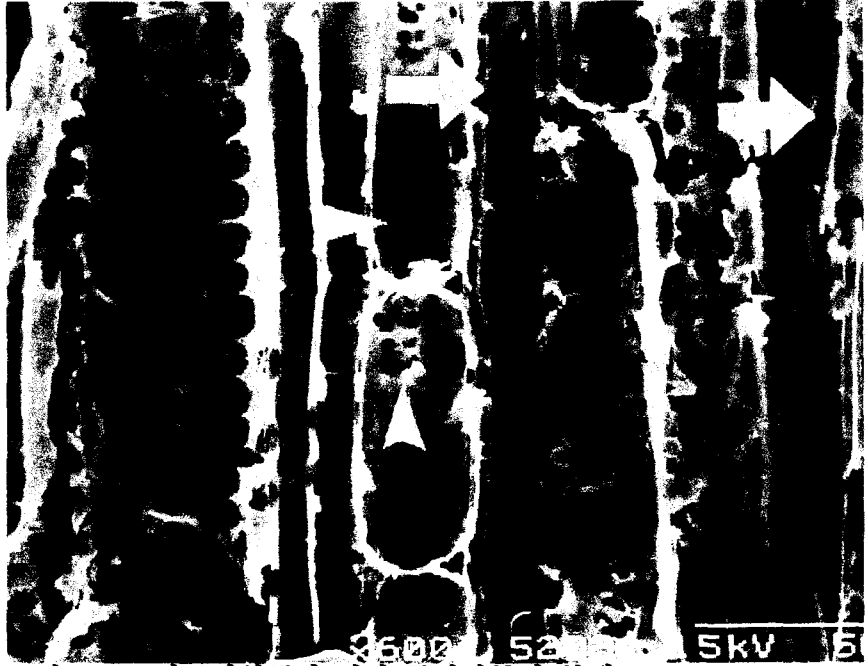


그림 8. 4. 말굽버섯균에 의한 졸참나무의 분해.
 목섬유 벽의 침식 (arrow), 도관 벽공 (black arrow head) 및 축
 방향 유세포의 분해 (White arrow head) (SEM 사진).

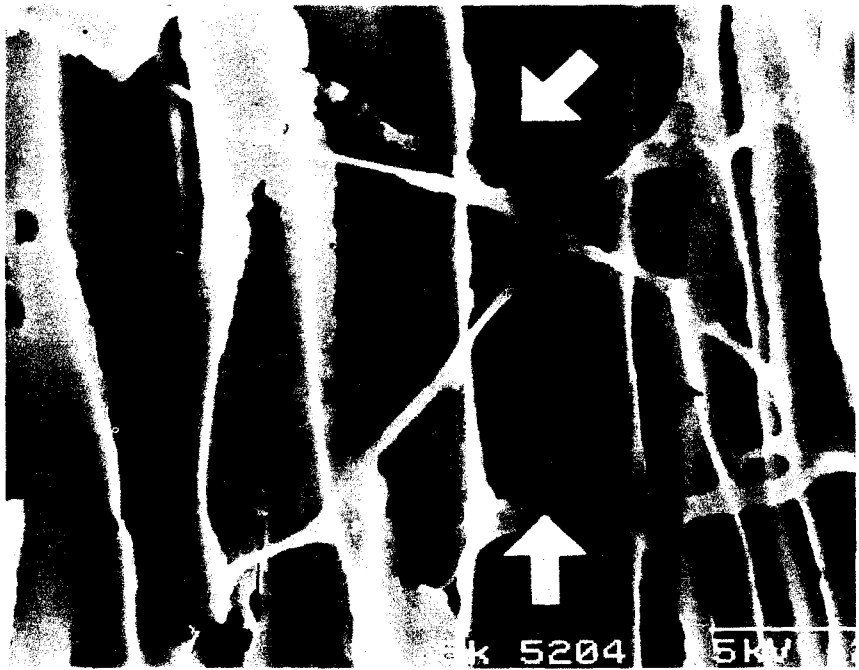


Fig. 8. 5. 말굽버섯균에 의한 졸참나무 목섬유의 침식 (arrow)
 및 박벽화 (arrow head).

제 4 절 요약

1. 말굽버섯균의 배양특성 규명

말굽버섯균의 배양특성을 조사하여 자실체 생산 및 균사체 생산에 미치는 영향에 대해 분석한 결과 최적 고체합성배지는 YMPG 배지의 균사생장이 가장 양호하였고 최적 액체합성 배지로는 czapek dox 배지에서 균사 생육이 가장 우수하였으나, Synthetic과 MCM 배지는 저조하였다. 그리고 최적 고체(툽밥) 배지로는 상수리나무와 아까시나무 툽밥이 선발되었고 미송에서는 생장이 현저히 저조하였다. 균사 성장 최적 온도는 30℃이며, 15~30℃의 온도 범위에서 생육을 보였으며, 배지 산도는 pH 4.0에서 양호한 균사생육을 보였다. 최적 영양원으로 탄소원에는 lactose이었으며, 질소원으로는 glutamic acid를 첨가한 배지에서 가장 양호한 균사생육을 보였다.

2. 말굽버섯의 재배특성 규명

말굽버섯균의 배양기간에 따른 초발이 소요일수를 조사한 결과 배양기간을 90~120일로 하는 것이 가장 좋게 나타났다. 배양기간을 60일로 했을 경우 당년에는 자실체가 발이 되지 않았고 그 다음해에 자실체가 발이 되는 것으로 나타났다. 이는 60일 배양 후 재내부로의 침투율이 32.4% 밖에 되지 않으므로 매몰 후 균사가 목재를 부후시켜 발이에 필요한 에너지를 저장하는데 시간이 필요한 것으로 사료된다. 그리고 배양기간을 150일로 했을 경우에는 초발이 소요일수가 가장 짧았지만 배양기간이 길므로 발이되는데 걸리는 총기간은 191일로 90일배양한 것보다 23일이나 늦어지므로 부적합한 것으로 사료된다.

3. 말굽버섯균의 부후특성 규명

말굽버섯균의 목재부후 특성을 조사하기 위하여 부후 전·후의 중량감소율, WEC 추출물 변화율을 비교한 바, 중량감소율은 소나무는 12.5~25.6%, 상수리나무는 15.4~24.3%의 중량감소율을 보고하였다. 배양기간이 40일이었던 공시균주의 중량감소율과 비교했을 때, 공시균주의 목재 부후 능력이 우수한 것으로 사료된다. WEC 추출물은 부후 전에 12.98%의 추출을 보이고, 부후 후에는 15.22%의 추출물을 얻었다. 이는 말굽버섯균이 툽밥과 미강에 있는 탄수화물, 탄닌, 배당체 등을 이용한 양보다 말굽버섯균이 공기중의 수분과 양분을 이용하여 생성한 또 다른 물질이 많은 것으로 사료된다. 목재부후의 미시형태적 특징을 관찰한 결과 백색부후균의 부후형태인 세포벽의 침식과 박벽화 등이 관찰되었다.

무리우산버섯의 인공재배기술 개발

제 1 절 서설

버섯은 고대로부터 인류생활과 밀접한 관계를 가지고 있으며 식용, 약용 등에 널리 이용되어 왔고 특히 최근에는 배양, 분석, 추출, 검증기술 등의 발달에 의한 인공재배법이 개발되어 약리, 생리활성, 식품 및 식품가공 등을 위한 버섯의 성분들이 속속히 밝혀짐에 따라 버섯의 이용과 개발이 급속하게 이루어지고 있다.

중국의 경우 약용으로 사용하는 버섯의 종류가 200여종이 넘으며 선진국에서는 한방재료와 같이 새로운 기능성 물질을 탐색하는데 온갖 노력을 기울이고 있다. 그러나 우리나라에서 자생하고 있는 900여종의 버섯 중 식용을 위하여 대량으로 인공 재배되고 있는 것은 주로 양송이, 느타리, 팽이, 표고 등에 한정되어 있고 실질적으로 이용되고 있는 약용버섯도 영지, 상황, 복령, 동충하초, 신령버섯 등 몇 종에 지나지 않는다. 반면, 중국이나 일본 등은 버섯의 약제화, 식용화를 위한 연구와 기술 개발이 대규모로 급속히 이루어지고 있어 우리나라에서도 신기능성 소재화 할 수 있는 새로운 버섯의 발굴과 이를 이용할 수 있는 기술개발이 절실하다.

야생버섯 중 식용 및 대중화가 가능한 무리우산버섯(*Kuehneromyces mutabilis*)은 주름버섯목, 독청버섯과, 무리우산버섯속에 속하며 발생시기는 봄부터 가을에 걸쳐 침엽수, 활엽수의 죽은 나무, 그루티기나 통나무 등에 속생하며, 전세계에 분포한다.

갓은 지름 3~6cm로 처음에는 평반구 형이나 후에 볼록편평형이 되고, 표면은 습하면 적황색~황갈색을 띠고 건조하면 황토색을 띤다. 주름살은 완전불은형 또는 내린형이며 뾰뾰하고 암갈색이다. 대는 3~8 × 0.3~1cm로 대 위쪽은 황갈색 분말이 있고 막질의 턱받이가 있으며, 그 아래쪽은 황갈색이나 점차 흑갈색이 되며 거친 인피가 있다. 포자는 6~7.5×3.4~5.5 μ m로 난형~아몬드형이며, 표면은 평활하고 발아공이 있고, 포자문은 흑갈색이다. 균사에는 부리상 돌기가 있다(박과 이, 1999).

이러한 무리우산버섯균에 대해서는 추출물을 이용한 influenza virus 실험(Mentel, R. *et al.*, 1994), 액체배양(Wissig, E. *et al.*, 1990; Pashenova, N.V. *et al.*, 1989), 부산물을 이용한 재배법(Schmidt, O. *et al.*, 1985; Reshetnikova, I.A. *et al.*, 1988), 현미경적 특징과 식물분해(Reshetnikova, I.A. *et al.*, 1986; Reshetnikova, I.A. *et al.*, 1990), 생물학적 특징과 구조(Reijnders, A.F.M., 1971; Stankiavichene, D.R. *et al.*, 1986), 균사배양과 형태상특징(Pashenova, N.V. *et al.*, 1989; Pashenova N.V. *et al.*, 1990), 자실체의 화학적 구성요소(Badalyan, S.M. *et al.*, 1997)등이 외국에서 보고되고 있으나, 아직까지는 국내에 소개되거나 연구가 수행된 적은 없다.

이에 본 연구는 무리우산버섯의 배양적·재배적 특징을 파악하여 앞으로 인공재배 가능성을 타진하고, 나아가 대량증식 기술을 개발·보급함으로써 의학 및 국민 건강식품의 원료 제공 및 관련 산업의 활성화를 유도하고자 본 연구를 수행하였다.

제 2 절 연구개발수행 내용 및 방법

1. 무리우산버섯균의 배양특성 규명

1) 공시균주

본 연구에 사용된 무리우산버섯균(*Kuehneromyces mutabilis*)은 농진청 농업과학기술원 응용미생물과에서 분양 받아 전남대학교 삼림자원미생물학실험실에서 계대 · 증식배양하였다. 공시균의 증식용 배지는 PDA(Potato dextrose agar)배지를 이용하였다.

2) 배지 종류와 조성

가. 합성배지

(1) 고체배지

무리우산버섯균의 최적배지를 선별하기 위해 표 1과 같이 조제하여 균사생장량을 조사하였다. 합성배지는 각각의 조성별로 조제하여 살균(121℃, 20분) 후 1회용 Petri-dish(87×15mm)에 15ml 정도 분주하였다.

(2) 액체배지

무리우산버섯균의 최적액체배지를 선별하기 위해 표 2와 같이 조제하여 균체량을 조사하였다. 합성배지는 각각의 조성별로 조제한 후 삼각플라스크(100ml)에 50ml씩 분주하고 멸균 후 살균(121℃, 20분) 하였다.

나. 톱밥배지

무리우산버섯균의 톱밥재배시 배지 재료에 따른 배양적 특성을 조사하기 위하여 졸참나무(*Quercus serrata*), 상수리나무(*Quercus acutissima*), Corn-cob, 미송(*Pseudotsuga douglasii*), 은백양(*Populus alba*), 아까시나무(*Robinia pseudoacacia*) 톱밥을 사용하였다. 톱밥과 미강(Rice-bran)을 10:2(w/w)로 혼합한 후 수분을 65%로 조절하여 시료를 조제하였다. 이렇게 조제된 시료를 시험관(D22mm×L200mm)에 31g씩 충전하여 일정하게(B.D., 0.23) 다진 후 멸균을 하고 살균(121℃, 30분)하였다.

3) 생리적 특성

(1) 최적 배양 온도

공시균의 최적 배양온도를 선정하기 위해 합성배지(PDA, PDB)에 한천배지(PDA)에 기배양된 공시균주의 균총을 cork borer로 떼어 접종하여 일정한 온도조건(15, 20, 25, 30, 35℃)에서 암배양한 후 균사생장량을 조사하였다.

(2) 최적 pH 선정

공시균의 균사배양용 배지의 최적 pH범위를 선정하기 위해 합성배지(PDA, PDB)에 1N HCl과 1N NaOH를 첨가하여 일정한 pH조건(pH 4.0~7.0)으로 배지를 조제하였다. 한천배지(PDA)에 기배양된 공시균주의 균총을 cork borer로 떼어 접종하여 항온기(25℃)에서 암배양 하여 균사생장량을 조사하였다.

(3) 탄소원 및 질소원

탄소원(Glucose, Galactose, Lactose, Sucrose, Dextrin, Inulin) 및 질소원(Potassium nitrate, Ammonium tartrate, Urea, Glutamine acid, Asparatic acid, Sodium nitrate)을 최적 배지로 선별된 배지에 각각 0.1% 및 0.04% 첨가하여 공시균의 균사생장량을 조사하였다.

4) 균사생장량 측정

(1) 균체량 측정

공시균을 합성배지상에 접종 후 20일간 정치배양하여 여과(Whatman No. 2)하고 105℃로 24시간 건조하여 균사체의 무게를 구하였다.

(2) 균사생장도 측정

공시균을 배지에 접종 5일 후부터 2일 간격으로 조사하였다.

2. 무리우산버섯의 재배특성 규명

1) 접종원제조

접종원을 제조하기 위해 합성배지(PDB)를 조제하여 삼각플라스크(500ml)에 250ml씩 분주하여 멸균(121℃, 20분)하였다. 이렇게 제조된 합성배지(표 8)에 공시균을 접종하여 10일간 진탕(150 rpm)배양하여 사용하였다.

2) 무리우산버섯의 재배방법

공시 톱밥배지(10mesh 이하)에 미강을 10, 15, 20%(w/w)로 배합 후 수분을 65~70%로 조정하여 시료를 조제하였다. 이렇게 조제된 시료를 P.P병(900cc)에 각 시험구별 입병(B.D. 0.21~0.23)하고 일정하게 다지고 나서 Air-filter가 부착된 Screwcap으로 마개를 한 후 Autoclavation(121℃, 60분) 처리하였다. 살균이 끝난 배지는 냉각(22℃) 후 톱밥배지에 액체 접종원을 25~30ml씩 분사하여 접종하고 배양실(22±1℃)에서 배양(25, 30일)하였다. 배양이 완료되었을 때 균기기를 하여 편발생 부위를 편평히 하였다. 균기기를 한 병들을 발이실(16±2℃)에 놓고 80~90%의 실내습도를 유지하였다.

3) 무리우산버섯의 재배특성

(1) 공시수종별 톱밥배지에 미강 첨가별 재배특성

공시 톱밥에 첨가물(미강, corn-cob)을 표 7과 같은 배합비 별로 배양하여 배양 완료 후 발이실(15±1℃)에서 발이 특성을 조사하였다.

표 7. 공시톱밥에 대한 첨가물 배합비

첨가 재료	첨가 비율(v/v)		
미 강	10	15	20
줄참,상수리,미송,포플러	80	75	70

(2) (1)과 같은 방법으로 하여 각 시료별 20병씩을 균꺾기를 하지 않고 발이를 시도하였다.

(3) 같은 방법으로 다른 기관에 의뢰하여 발이 및 생육을 시도하여 보았다.

여러 조건에서 발이 가능성을 타진하기 위하여 함평버섯연구소(전남 함평), 수풀나라(전남 함평), 본 대학 부속 장성연습림(전남 장성), 나주산림환경연구소(전남 나주)에 의뢰하여 배지와 재배 조건을 달리하여 재배실험을 하였다.

3. 무리우산버섯균의 부후특성 규명

(1) Weight loss의 측정

줄참나무 변재를 3×0.5×0.5cm로 조제하여 전건량을 측정후 증류수에 6시간 이상 침전시킨다. 침전된 시편을 30분간 살균(121℃, 1.2kg/cm²)한 후, 무리우산버섯균이 배양된 PDA 배지에 접종했다. 접종된 배지는 25±1℃로 조절된 배양실에서 40일간 배양 후 dry weight 감소율을 측정하였다. dry weight 감소율 L(%)은 다음 식에 의하여 산출하였다.

$$L(\%) = (S^* - W / S) \times 100\%$$

S* : 배양 전 전건무게(g), W : 배양 후 전건무게(g)

(2) Water Extract Content(WEC) 측정

추출은 온수추출법을 이용 했으며 방법은 각 시료 2g을 200ml 삼각플라스크에 넣고 증류수 100ml를 가한 다음 플라스크에 환류냉각기를 부착시켜 3시간동안 비등수조에서 처리하였다. 그 후 미리 측량된 glass filter(1 G3)로 내용물을 흡입 여과시키고 열수로 세척하여 105±3℃에서 항량이 될 때까지 건조하여 칭량하였다.

온수추출물의 양 H(%)는 다음 식에 의해서 산출하였다.

$$H(\%) = (S^* - W / S) \times 100\%$$

S* : 시료의 전건무게(g), W : 추출잔유물의 중량(g)

(3) 현미경적 특성

목편의 부후 형태와 분해 정도를 관찰하기 위해 시료를 2% glutaraldehyde (GA) + 2% paraformaldehyde (PA) 혼합고정액 (in 0.05M cacodylate buffer, pH 7.2)으로 처리한 후 동일 buffer로 세척한 다음 ethyl alcohol 계열로 탈수시킨다. 이어 ethyl alcohol과 xylene의 1:1 혼합액과 100% xylene으로 각각 처리하고 xylene과 paraffin의 1:1 혼합액에 처리 후 paraffin 원액으로 치환 시킨 다음 paraffin 블록을 만들어 microtome을 사용하여 15-20μm 두께의 절편을 제작한다. 절편은 1% safranin과 2% astra blue로 이중염색한 다음 광학현미경 관찰을 실시한다. 염색하지 않은 절편은 편광현미경 관찰에 사용한다. 주사형 전자현미경의 경우 2% GA + 2% PA 고정시킨 톱밥시료를 ethyl alcohol 계열 탈수를 실시한 다음 -20℃에서 1시간 냉동시킨 후 100% t-butyl alcohol로 치환한 다음 동결건조 시킨다. 이 시편을 ion sputter를 사용하여 gold coating하여 주사형 전자현미경 (Hitachi S-4000 SEM)을 사용하여 관찰한다. 투과형 전자현미경 관찰(TEM)은 LRW에 포매된 시편을 조제하여 Diamond knife를 사용하여 70~90nm (초박절편 두께의 색깔 : gold→silver) 두께의 초박절편을 제작한다. 이 절편을 1% KMnO₄(in sodium citrate)로 10분간 염색한 시편을 투과형 전자현미경으로 관찰한다.

제 3 절 연구결과

1. 무리우산버섯균의 배양특성 규명

1) 최적합성배지

최적 고체 합성배지를 선별하기 위하여 실험한 결과 YMG배지에서 71mm/8days로 가장 빠른 성장을 보였다. 반면 MCM, Lilly에서는 저조한 성장을 보였다. 균사밀도는 YM, ME, MCM이 가장 조밀하게 성장하였으며 Lilly에서 가장 낮은 밀도를 보여주었다(그림 9). 최적 액체 합성배지를 선별하기 위한 실험 결과는 glucose pepton에서 202mg/18days로 균사생육이 가장 양호하였다(그림 10). 이는 김 등(1988)에 의하면 glucose pepton 배지가 버들송이 (*Agrocybe cylindracea*) 균사생장에 적합하다고 보고한 것과 유사하나, Kang 등(1994)에 의하면 개암버섯(*Naematoloma sublateritium*)은 Semisynthetic media에서 균사생육이 적합하다고 보고하였으며, 차(1981)는 *Armillaria mellea*는 포플라 톱밥배지(M.S.D.S), *Auricularia auricula-judae*는 Modified Hamada 배지(M.H.S) 등이 양호하였다고 보고하였다. 이런 보고와 비교하여 볼 때 버섯 종에 따라 최적배지가 다를 수 있다. MCM과 Hennergerg 배지에서는 가장 저조한 생육을 보였으며 다른 배지들은 성장에 큰 유의차는 없었다.

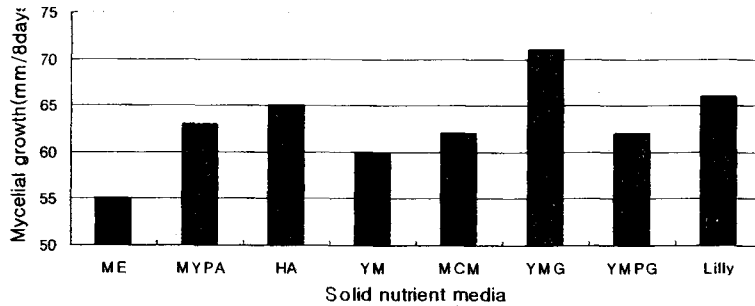


그림 9. 고체 합성배지에서 무리우산버섯균사의 성장

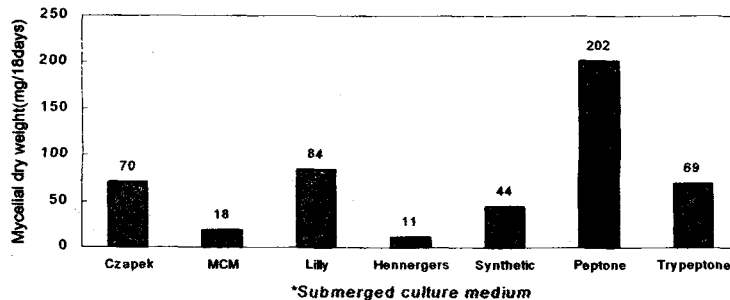


그림 10. 액체 합성배지에서 무리우산버섯균사의 성장

2) 최적 고체(톱밥) 배지

최적 톱밥수종을 선발하기 위하여 실시한 실험결과는 표 8과 같다. 상수리나무 톱밥이 82±2mm/30days로 가장 좋은 성장을 보였으며 졸참나무, 미송, 아까시나무, 은백양, corn-cob에서 균사가 가장 치밀하였다. 반면 미송에서는 아주 약한 균사밀도를 보였다.

표 8. 고체(톱밥)배지에서 무리우산버섯의 성장량

Sawdust* substrate	<i>Q. serrata</i>	<i>Q. acutissima</i>	<i>corn cob</i>	<i>P. Douglasii</i>	<i>P. alba</i>	<i>R. pseudoacaci</i> <i>a</i>
Mycelial Growth (mm/30days)	77±2	82±2	61±2	73±2	70±2	67±2

*Different species of sawdust substrates (80%, w/w, 10~20 mesh) were mixed with rice bran (20%, w/w) and tap water was added to keep the moisture content at 65%(w/v).

3) 최적 배양 온도

무리우산버섯균의 최적온도를 규명하기 위하여 실험을 실시한 결과 20~25℃에서 균사생장이 빠르고 균사밀도도 가장 높았으며, 30℃이상에서는 균사생장이 급속히 감소하였고 35℃이상에서는 균사생장이 정지되는 것을 알 수 있었다(그림 11). 이는 느타리버섯 등 일반 식용버섯의 균사생육 최적온도가 23℃내외 인 것과 유사한 경향을 보였다.(Hong, 1981)

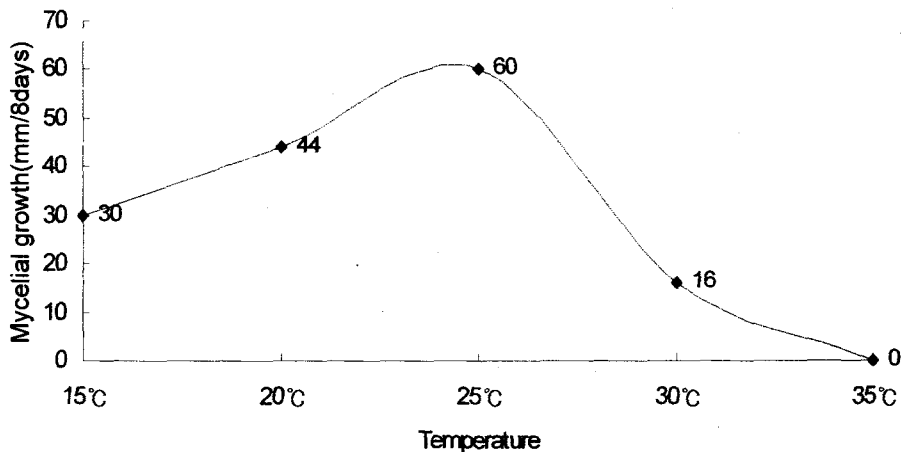


그림 11. 온도 변화에 따른 무리우산버섯 균사의 성장

4) 배지의 pH 범위

무리우산버섯균의 최적 pH 선발을 위하여 실험한 결과는 그림 12과 같이 pH 6.0에서는 균체량이 203mg/18days로 가장 많았으며 pH 6.0~7.0의 약알칼리에서는 급격히 감소하였다. 이는 무리우산버섯균은 알칼리성이나 중성보다는 약산성이나 산성에서 잘자라는 것으로 사료된다. 성장온도가 유사한 느타리버섯은 적정 pH가 6.2~6.5 (Hashimoto와 Takahashi,

1974)로써 벗짚재배나 폐면재배에서 산도조절 없이 재배가 가능하지만 무리우산버섯은 인공 재배의 배지제조 시 산도조절을 하여야 할 것으로 생각된다.

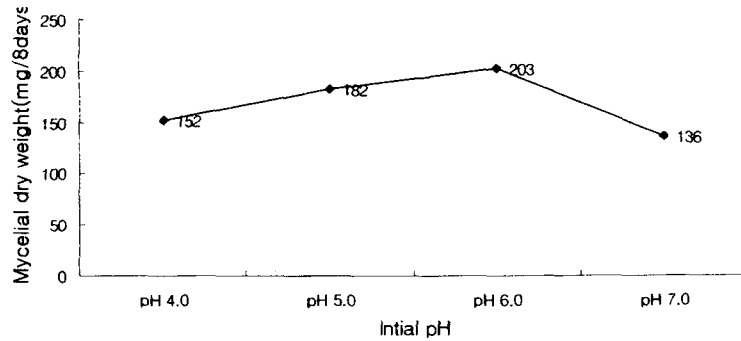


그림 12. 산도 변화에 따른 무리우산버섯균사의 생장

5) 최적 영양원 선발

무리우산버섯균의 균사생육을 위한 최적 탄소원, 질소원을 선발하기 위한 실험 결과 탄소원의 경우 그림 13에서 나타낸 바와 같이 다당류인 inulin에서 249mg/18days로 가장 양호하였으나 dextrin을 제외하고는 균사생육에 있어서 큰 차이는 없었다. 질소원의 경우는 그림 14에서 나타낸 바와 같이 무기태질소원으로는 sodium nitrate이 367mg/18days로 가장 양호한 것으로 나타났으며 다른 질소원에서는 균사생장에 큰 영향을 미치지 않았다.

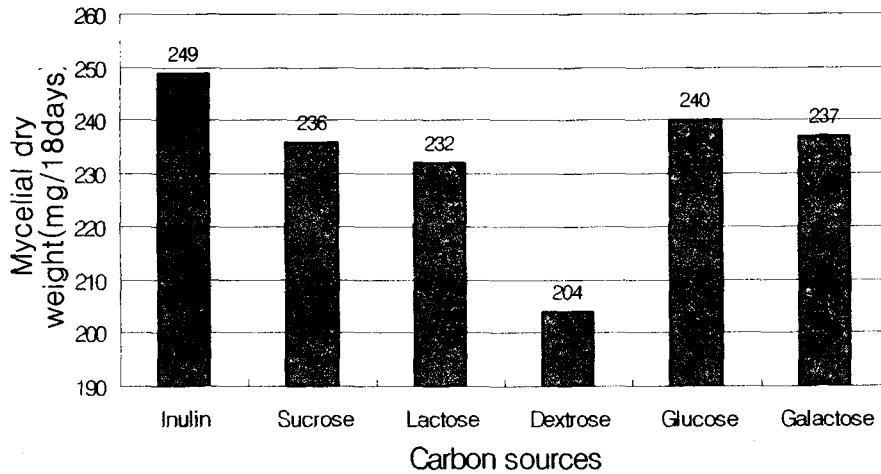


그림 13. 탄소원 첨가에 따른 무리우산버섯균사의 생장

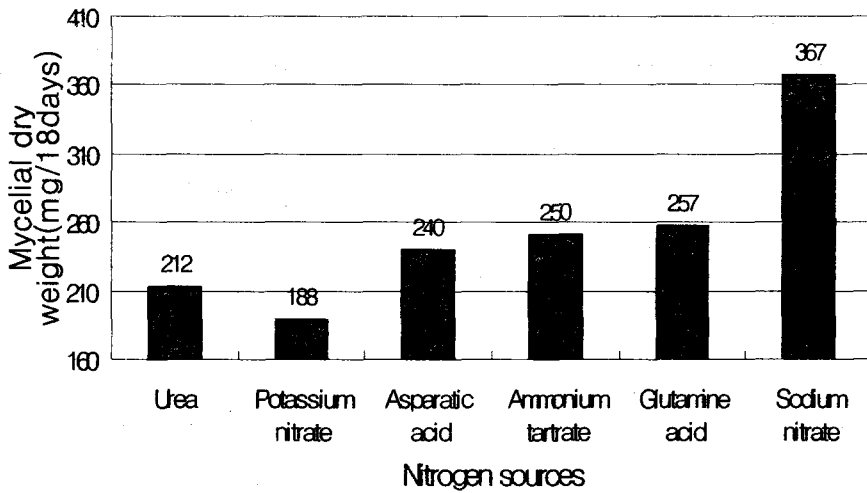


그림 14. 질소원 첨가에 따른 무리우산버섯균사의 생장

2. 무리우산버섯의 재배특성 규명

본 실험은 무리우산버섯의 인공재배 가능성을 타진하기 위해 무리우산버섯균의 특성을 기초로하여 여러 가지 방법으로 실험을 한 결과이다. 목재부후균인 무리우산버섯균의 발이 및 생장조건은 예상보다 문제가 많은 것으로 생각된다.

1) 수종별 발이

본 실험을 4회 반복실험을 하면서 배양일수, 균굽기 실시 등을 변화시키면서 실시하였다 (표 9). 일부 병에서 발이가 되었으나 생장하지 못하고 고사하여 발이 습도를 95~100% 조절하여도 생장하지 못하고 고사하였다. 또한 균굽기를 실시하지 않고 발이 작업을 실시하였으나 발이되지 않았다.

표 9. 수종별 첨가물별 발이

수종	미장(%)	수분(%)	균굽기	배양일수	발이정도	비고
줄참나무	10	65	○	25	*	
	20				*	
	30				**	1mm 정도 생장 후 고사
	10	65	×	30	*	
	20				*	

	30				*	
상수리나무	10	65	○	25	*	
	20				*	
	30				**	0.5mm생장 후 고사
	10	65	×	30	*	
	20				*	
	30				*	
미송	10	65	○	25	*	
	15				*	
	20				*	
	10	65	×	30	*	
	15				*	
	20				*	
포플러	10	65	○	25	*	
	15				**	1mm정도 생장 후 고사
	20				*	
	10	65	×	30	*	
	15				*	
	20				*	

발이정도 - *: 발이전혀안됨, **: 약간됨, ***: 상당히됨, ****: 전면이됨,
 균류기 - ○: 실시, ×:하지않음

무리우산버섯균의 일반적인 특성을 참작하여 본 실험을 4회 실시하면서 습도, 발이온도, 광 등의 많은 변화를 주면서 본 실험을 실시하였으나 자실체 생산에는 미치지 못하였다.

줄참나무와 상수리구의 첨가물 20% 구와 포플러 15% 구에서 약간 발이된 후 1mm정도 발이 후 성장하지 못하고 고사하였다. 그 후 실험에서 약간씩 발생된 것을 확인하고 발이 습도를 95~100%로 조절하였으나 역시 고사하였다. 이 결과로 미루어보아 배지의 문제, 재배 환경의 문제 등 많은 문제점들을 안고 있는 것으로 사료되다.

본 실험실에 계속된 실패로 다른 탈출구를 찾아보기 위해 함평군 소재 수플나라버섯사업소, 나비랑버섯연구소, 나주소재 산림환경연구소의 미생물연구소에 의뢰하여 발이 및 생산실험을 실시하였으나 모두 실패하고 말았다. 타부서 실험은 팽이버섯 배지와 새송이버섯배지에 접종하여 배지 중의 일부는 학교실험실에서 일부는 현장에서 시도하였으나 결과는 좋지않았다.

본 균이 목재부후균이기 때문에 쉽게 성공할 수 있으리라 생각했는데 예상이 빗나가고 말았다. 그러나 계속해서 원점부터 모든 부분을 검토해서 발이 및 생산에 성공시켜 버섯학회지에 발표할 것을 이 지면을 통해 약속한다.

3. 무리우산버섯균의 부후특성 규명

1) Weight loss 측정

무리우산버섯균이 배양된 졸참나무 시편을 이용하여 dry weight 감소율을 측정한 결과 감소량은 110mg으로 5.9%의 감소율을 보였다(표 10). 나무는 guaiacyl, syringyl 그리고 hydroxyl phenol group의 lignin monomers의 다른 비로 이루어져 있다(Serkmann & Ludiwig, 1971; Ander & Erikson, 1979). 또한 나무의 화학적 조성은 식물에 따라 다양하며, 식물의 성장 환경에 따라 다르다(이 등, 1995). 또한 백색부후균은 톱밥이나 원목에서 재배될 때 lignin 화합물과 상호반응을 일으킨다(Serkman & Ludiwig, 1971). 나무에 따라 lignocellulosic complex가 다양하기 때문에 균사가 침투하는 정도의 차이는 균이 분비하는 효소에 따라 다를 것이며, 이는 버섯의 균주와 수종이 서로 다르기 때문으로 생각된다.

표 10. 졸참나무에서 배양된 무리우산버섯균사의 중량감소율

	Before rotting(mg)	After rotting (mg)	Weight loss (mg)	Percentage of Weight loss(%)
<i>Q. serrata</i>	1,857	1,747	110	5.9

2) Water Extract Content(WEC) 측정

무리우산버섯균의 부후 전후 배지의 WEC를 조사한 결과 톱밥과 미강(4:1 w/w)의 경우 12.98%, 무리우산버섯균이 배양된 배지의 경우 8.56%로 나타났다(표 11). 이는 무리우산버섯균이 톱밥과 미강에 있는 탄수화물, tannin, 배당체 등을 이용한 것으로 보인다. 목재에 침투한 곰팡이 균사는 목재의 섬유와 섞여있어, 균사의 생장과 목섬유의 분해에 대한 연구는 많은 어려움이 있다. 이러한 면에서 균사의 생장을 나무의 dry weight로 측정하는 경우가 전통적인 방법으로 이용되었으며, 그 외 다른 방법이 제시되어져 왔다(Crawford & Sutherland, 1979; Hackett *et al.*, 1978). 본 실험에서는 균사가 성장하면서 소비하는 양을 측정하였으며 균사생장 전과 후의 추출량에 있어서 그 양이 줄어든 것으로 보아 미강과 톱밥에 함유되어 있는 물질을 이용하여 성장한 것으로 볼 수 있겠다.

표 11. 졸참나무에서 무리우산버섯균의 WEC 측정

Sawdust substrate*	Extraction(%)
Sawdust	12.98
<i>K. mutabilis</i> on the Sawdust	8.56

* *Q. serrata* of sawdust substrates (80%, w/w, 10~20 mesh) were mixed with rice bran(20%, w/w) and tap water was added to keep the moisture content at 65%(w/v).

3) 현미경적 특성

무리우산버섯균에 의한 줄참나무 목편의 경우 목섬유의 세포벽의 일부분이 침식되고 세포 내강에서 중간층으로 점차 얇아지는 박벽화 현상이 관찰되었다(그림 15. 1, 2). 백색부후균은 cellulose, hemicellulose 및 lignin을 모두 분해하기 때문에 이들 균에 의한 목재 세포벽의 분해 양식은 세포벽이 얇아지는 소위 박벽화 현상이 일어난다. 그러나 일부 백색부후균의 경우 lignin만으로 구성되어 있는 중간층만을 우선적으로 공격하는 선택적 분해형태를 나타내는 균도 있으나, 이 같은 경우는 소수에 불과하다(Blanchette, 1984; Eriksson *et al.*, 1990).

균사의 밀도는 주로 도관과 방사유세포에 높게 나타났고, 일부 목섬유에서도 균사의 밀도가 높게 나타난 바(그림 15. 3), 이는 방사조직이 원형질이나 전분립을 포함하고 있어서(Core *et al.*, 1979) 균사가 이것들을 이용하고 있기 때문인 것으로 사료된다. 도관 내에 균사의 밀도가 높게 나타남에도 불구하고 목섬유와 유세포에 비해 분해가 거의 이루어지지 않았다(그림 15. 1). 그러나 일부 부후가 심화된 세포에서는 도관 벽의 침식이 관찰되었고 목섬유 세포벽의 중간층이 분해되는 부분도 나타났다(그림 15. 4). 일반적으로 백색부후균은 도관 및 방사유조직에 많이 분포하며, 방사유조직은 미생물에 의해 쉽게 분해되지만 도관의 경우 부후 말기에도 거의 분해되지 않는 특징을 가지고 있다(Blanchette, 1998). 부후 초기 대단히 많은 양의 균사가 세포내강에서 관찰되지만 부후가 진행되면서 세포내강에 존재하는 균사의 수는 자가분해(autolyse)에 의해 감소하며, 균사의 이동은 부후 초기에는 벽공을 통해서 이동하며, 그 후 bore hole을 생성하여 이동한다.

식용버섯이 속하고 있는 담자균은 목재성분의 분해 양태에 따라 갈색부후균과 백색부후균으로 분류하는데 우리나라에서 재배되고 있는 대부분의 식용버섯 및 약용버섯 균들은 백색부후균에 속하는 것들이다. 갈색부후균이 목재 세포벽의 구성 요소 중 cellulose, hemicellulose를 분해하는 것과는 달리, 백색부후균은 다당류 성분 이외에 lignin을 분해하는 특징을 지니고 있다. 대부분의 백색부후균들은 침엽수재보다는 활엽수재를 선호하며, 그 이유는 침엽수재에 비해 hemicellulose양이 많아 영양원으로 쉽게 이용할 수 있으며, 침엽수재에 비해 lignin 함량이 적을 뿐만 아니라 침엽수재에 함유하고 있는 guaiacyl type의 리그닌에 비해 분해가 용이한 syringyl 타입의 lignin이 포함되어 있기 때문이다(Eriksson *et al.*, 1990; Highley, 1982).

따라서 본 연구 결과 무리우산버섯균에 의한 줄참나무 변재의 부후 형태는 세포벽 내강에서 중간층으로 점진적으로 분해하는 전형적인 동시분해형 백색부후 형태를 보여주고 있다.

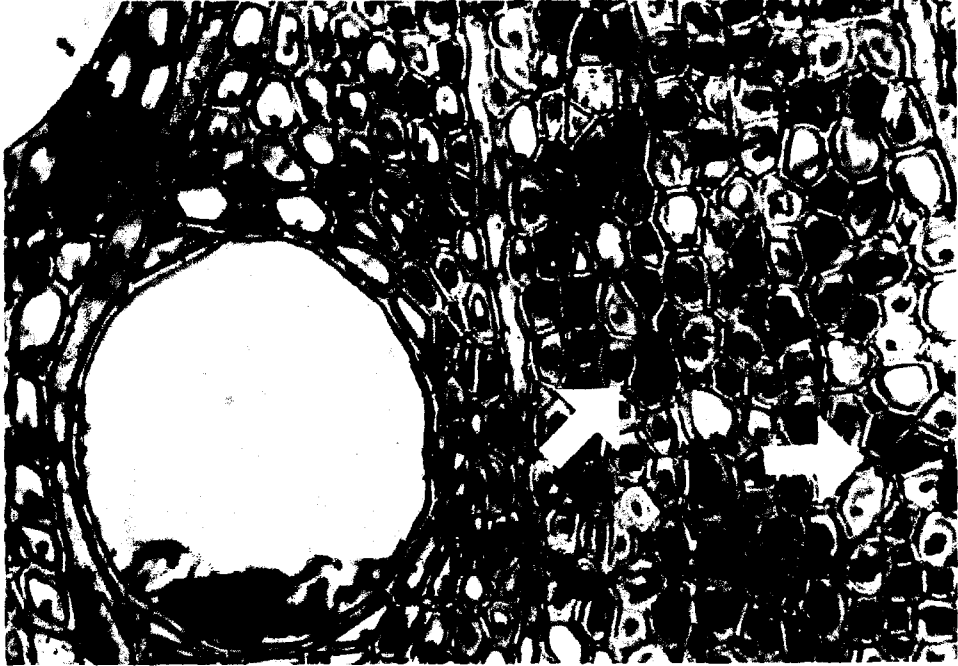


그림 15. 1. 무리우산버섯균에 의한 졸참나무 변재의 분해.
목섬유의 박벽화 (arrow)와 침식 (arrow head).

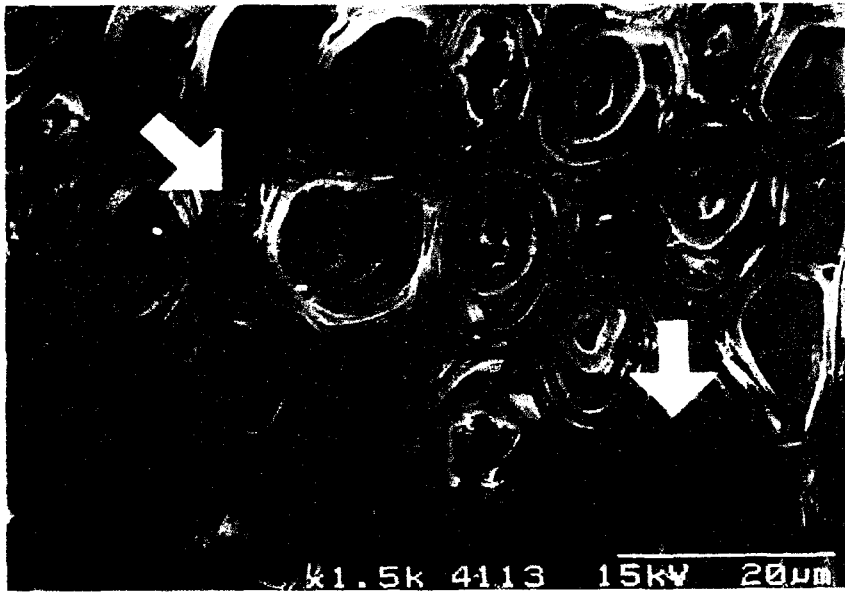


그림 15. 2. 무리우산버섯균에 의한 졸참나무 변재의 박벽화 (arrow) 및 침식 (arrow head) (SEM 사진).

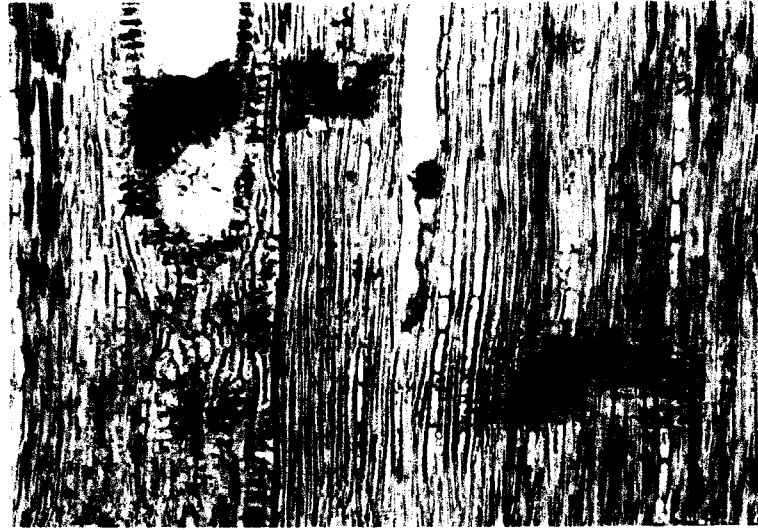


그림 15. 3. 무리우산버섯균의 졸참나무 변재 네 분포.

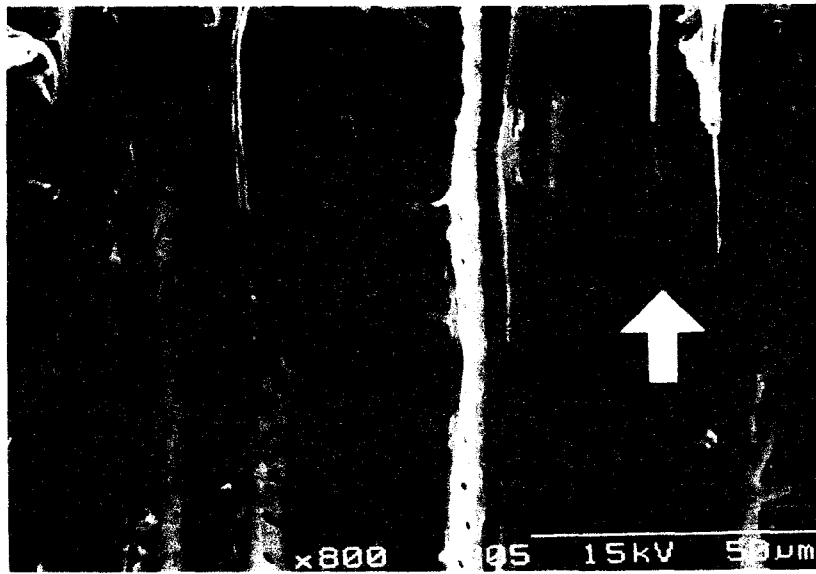


그림 15. 4. 무리우산버섯균에 의한 졸참나무 목섬유 벽의 분해 (arrow) 및 도관 벽의 침식 (arrow head) (SEM 사진).

제 4 절 요약

1. 무리우산버섯균의 배양특성 규명

무리우산버섯균의 배양적 특성을 조사하여 자실체 생산 및 균사체 생산에 미치는 영향에 대해 분석한 결과 최적 합성배지로는 액체 합성배지의 경우 glucose pepton에서 균사 생장이 가장 좋았으며, 고체 합성배지의 경우 MYPA배지에서 가장 빠른 성장을 보였고, 최적 톱밥배지로는 상수리톱밥이 가장 좋은 성장을 보인 반면 미송에서는 아주 약한 균사밀도를 보였다. 균사 성장 최적 온도는 25℃이며, 최적 산도는 pH 5.5~6.0에서 가장 좋은 성장을 보였다. 최적 영양원으로 탄소원에는 다당류인 inulin이었으며, 질소원으로는 무기태 질소원인 sodium nitrate였으며 다른 질소원들은 생장이 저조하였다.

2. 무리우산버섯의 재배특성 규명

우리에게 잘 알려진 무리우산버섯의 인공재배가능성을 타진하기위하여 균의 일반적인 특성과 재배를 위한 목재부후균의 버섯재배에 필요한 미강첨가, 균굽기, 온도, 수분 등을 일반적으로 적용하여 실시하여 일부 발이는 확인하였으나 자실체 생산 조건을 구명하지 못하였다. 추측하건데 무리우산 버섯이 발이되어 성장하기까지는 영양조건, 온도, 습도 등의 환경조건, 산도, 광 등의 특별한 조건을 요하는 것으로 사료된다.

액체배양 및 고체배양에는 문제가 없어 일반적인 특성의 실험을 기초하여, 수종별, 첨가물별, 균굽기, 온·습도, 배양기간 등의 조건을 달리하여 발이하였으나 만족할만한 결과를 얻지 못하였다. 너무 어려워 함평군 소재 나비랑버섯연구소(윤대령), 함평천치버섯연구소(박준호), 전남산림환경연구소(오득실)등에 실험을 의뢰하여 팽이버섯 배지와 새송이버섯 배지에 집중하여 일부는 현지에서 일부는 학교로 가져와 시도하여보았다. 성공하지 못하여서 광의 조사량, 습도자극, 온도자극, CO₂자극, 침수 등의 충격을 주어 발생을 시도하여 보았으나 성공하지 못하였다.

다시 균주를 분양받아 실패한 것을 참고하여 계속하여 본 균의 인공재배를 성공하여 버섯학회지에 발표하겠다.

3. 무리우산버섯균의 부후특성 규명

무리우산버섯균의 해부학적 특성을 조사한 결과 광학현미경과 주사형 전자현미경으로 줄참나무 변재의 부후를 관찰한 바 목섬유의 세포벽에서 박벽화 현상이 관찰 되었다. 균사의 밀도는 도관과 방사유세포에 높게 나타났고, 일부 목섬유에서도 균사의 밀도가 높게 나타났다. 또한 도관 내에 균사의 밀도가 높게 나타남에도 불구하고 목섬유와 유세포에 비해 분해가 거의 이루어지지 않았다. 이는 무리우산버섯균에 의한 줄참나무 변재의 부후 형태는, 세포벽 내강에서 중간층으로 점진적으로 분해하는 전형적인 동시 분해형 백색부후 형태를 보여주고 있다. Agar-block test에 의한 dry weight에서 5.9%의 감소율을 보였으며, 톱밥배지의 pH의 변화는 6.07에서 4.31로 배지를 산성화 시켰으며, 온수추출 결과 중량이 감소하였다. 이는 무리우산버섯균이 전형적인 백색부후균의 특징을 가지고 있음을 보여준 것이다.

무리우산버섯과 말굽버섯의 기능성연구

가. 연구개발수행 결과

1) 형태적관찰

무리우산버섯과 말굽버섯의 자실체는 상기 그림과 같다. 균사체는 무리우산과 말굽은 달라서 발효조에 배양할 때 교반속도와 배양시간에 따라서 다르기는 하지만 무리우산버섯은 등근입자형태로 성장하지만 말굽버섯은 균사체의 균사신장에 따라서 솜털과 같은 형태로 신장이 되었다. 무리우산과 말굽버섯의 균사체는 전술한 조건에 따라서 3일부터 5일 사이에 수확되었으며 즉시 배지를 여과하여 제거하고 세척하여 동결건조상태로 냉장저장상태로 보관하면서 이후 실험에 사용하였다.

2) 기능성분의 추출

버섯의 기능성은 다당체 성분이 가지고 있는 것으로 알려져있기 때문에 일반적으로 사용되는 당질의 추출방법에 의해서 추출하였는데 자실체는 1kg에 대하여 추출분말은 약 3g내외를 얻었으며 균사체는 100g당 5g정도 추출물을 얻었다. 이 추출물은 동결건조후 냉장저장하면서 증류수에 용해시켜 사용하였다.

3) 기능성분의 정제

무리우산과 말굽버섯의 추출물은 다당체 분리를 위하여 DEAE-Sephacel chromatography, Gelfiltration chromatography, Concanavalin A-affinity chromatography를 순서에 준하여 수행하였다.

- DEAE-Sephacel chromatography

가장먼저 수행한 분리정제 chromatography로서 2개의 큰 피크를 관찰할수 있었다 이는 anthrone반응의 결과로서 당질이 있다고 인정되는 분획을 모아서 표시한것이다. 각각의 버섯과 자실체 그리고 균사체는 모두 비슷한 패턴의 피크를 나타냈으며 버섯에 따라서 그리고 버섯의 자실체와 균사체의 상태에 따라서 양적인 차이는 있었다. 물 분획은 Fraction I 그리고 NaCl에서 용출된 분획은 Fraction II로 하여 각각을 다음의 chromatography에 적용하였다.

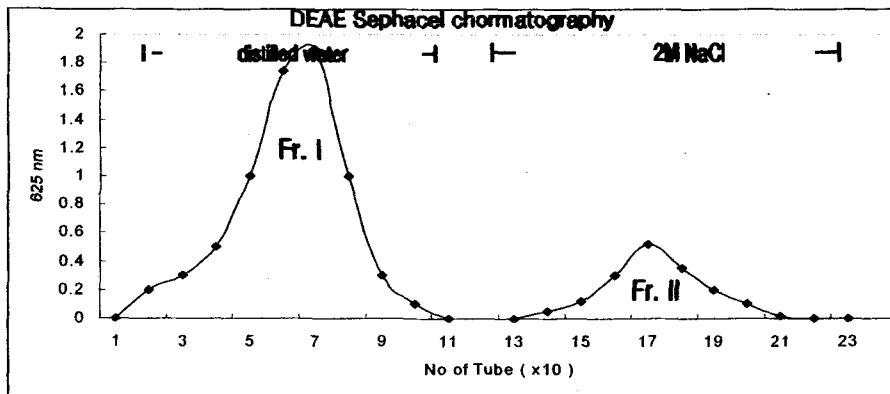


Fig.3. Elution pattern of DEAE-ion exchange chromatography for mushroom.

- Gelfiltration

상기 DEAE에서 얻어진 큰 피크의 분획을 Sepharose 4B column에 적용, 용출시켜서 분획 III과 IV를 얻었다. 확인방법은 anthrone법에 의한 당질의 검출에 의해서 수행하였으며 이 분획을 그림4에 표시하였다.

- 친화성 컬럼을 이용한 정제

Concavalin A-affinity chromatography를 이용하여 상기 분자량에 따라서 얻어진 분획을 정제하였다. 친화성컬럼에서 용출되는 처음분획과 흡착된 분획으로 표시된 피크부분을 이후 기능성 연구에 사용하였다. 또한 이분획은 알파와 베타 glucan으로 간주하였으며 여러 가지 화학적 성질을 구명하는 연구에도 사용하였다.

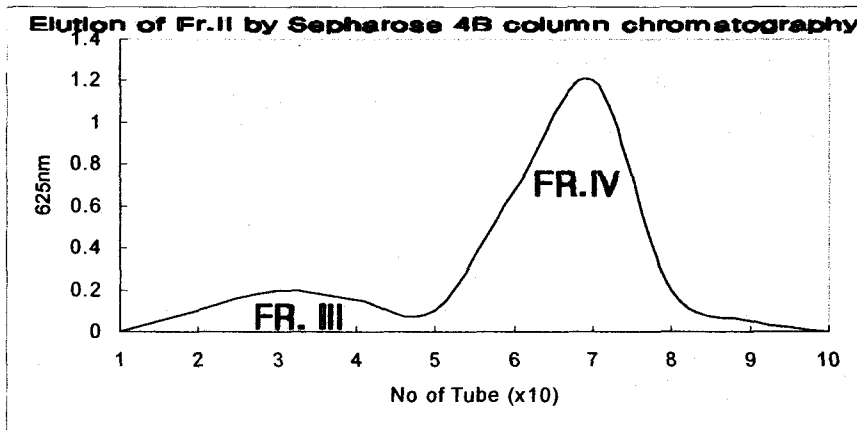


Fig.4 Elution pattern of gelfiltration chromatography for mushroom.

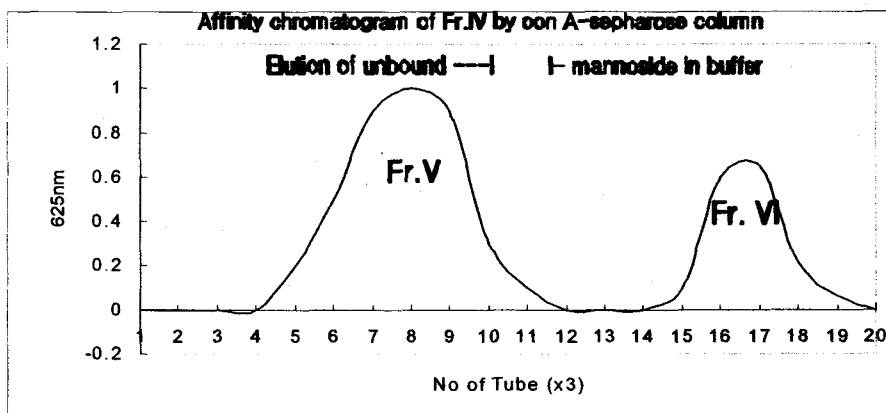


Fig.4 Elution pattern of concanavlin A-affinity chromatography for mushroom.

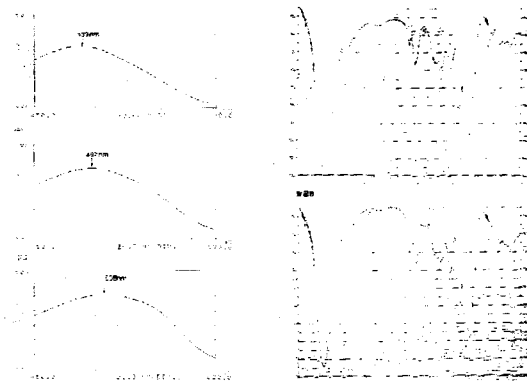


Fig.5. Spectrophotogram of UV and IR spectrum for fraction VI

상기 친화성 크로마토그래피에서 분리정제된 분획을 UV와 IR로 분석해보면 890cm⁻¹에서 높은 피크가 확인된 것을 알수있는데 이는 다당체의 link가 β결합 하고있음을 알수 있었으며 UV 스펙트럼에서 congo red 알칼리 용액에서 gel-forming 복합체를 형성하면서 장파장으로 이동함으로써 다당체 구조사 β1→3 결합하고 있음을 확인할 수가 있어서 이는 다른 연구자들의 결과와 일치된다고 하겠다

3) 분획의 기능성 검정

상기에서 분리된 각각의 분획을 사람 정상세포와 암세포 배양중 처리에 의해서 암세포 특이적 반응성을 조사하였다. 각각의 암세포와 정상세포를 24well plate에 배양하면서 분리된 분획을 1ug/ml에서 25ug/ml까지 처리한다음 MTT assay를 실시하였다. 대조구로서 시료대신 증류수 처리구와 PS-K를 사용하였다. 표 1에 표시한바와 같이 무리우산버섯은 ps-k와 비교하여 암세포를 고사시키는 비율은 낮은 반면에 말굽버섯의 경우에 몇가지 암세포에 대하여 고사시키는 능력이 더 양호함을 알수 있었다. 각각 버섯에서 자실체와 균사체를 똑같이 분리정제한 분획을 처리한바 약간의 차이를 보이기는 하였으나 대동소이한 결과를 보이고 있다 특히 말굽버섯의 균사체 추출분획에서 HeLa와 HepG2을 완전히 고사시켰는데 정상세포에는 이상이 없는 것이 관찰되어 이 분획이 유망성분을 가지고 있는 것으로 나타났다.

<표 1> 말굽버섯과 무리우산버섯의 암세포 반응특성조사

암세포주	Fractions (MTT assay, viability%)												
	대조구	말굽버섯						무리우산버섯					
		자실체			균사체			자실체			균사체		
	PS-K	Fr.IV	Fr.V	Fr.VI	Fr.IV	Fr.V	Fr.IV	Fr.IV	Fr. V	Fr.IV	Fr.IV	Fr.V	Fr.IV
Normal	78.5	89.6	78.0	89.0	82.5	100.0	100.0	65.2	88.2	98.2	76.2	32.2	82.3
SNU-C4	85.3	54.2	68.3	76.3	78.0	28.2	38.0	45.2	48.3	58.2	63.0	28.2	89.2
SNU-1	67.3	78.5	87.8	25.2	76.2	36.3	29.2	78.3	58.3	34.0	53.3	36.1	56.2
HT1376	12.1	81.3	42.2	52.4	58.1	18.1	35.3	65.0	25.2	28.0	28.2	24.2	38.2
ACHN	32.1	29.5	15.3	23.6	52.0	0.	26.2	72.3	28.2	12.2	63.1	12.2	15.2
H7822	81.2	20.2	13.6	11.5	46.2	52.0	1.5	69.5	43.2	25.2	28.2	45.5	43.6
HepG2	53.1	23.2	28.3	12.5	28.5	38.0	0	46.2	63.2	24.2	65.3	29.6	28.3
HeLa	43.1	53.0	12.5	8.2	58.2	27.2	0	78.2	28.2	62.3	52.2	11.5	78.2
NCI-H69	28.7	63.5	34.2	15.5	63.0	43.0	12.5	58.1	75.3	45.1	26.0	21.8	78.2
A498	31.5	48.0	65.4	28.7	35.2	28.2	11.2	69.2	25.2	52.3	42.1	34.2	76.5
SNU-C2a	8.7	58.2	50.0	68.4	42.0	18.3	9.3	92.0	54.2	62.2	36.3	24.4	68.1

* 상기표에 나타난 암세포외의 11종을 더 조사하였으며 대표적인 내용을 상기표에 나타냄.

- in vivo 조사

위의 표에서 나타난 결과의 분획을 마우스에 복수암을 유발시켜 생체에서 항암효과를 조사하였다. 약 12주된 마우스의 복강에 복수암세포 주입 5일전 pristane을 주사하고 복수암세포(SP2/0-Ag14)를 3백만cell/ml로 하여 접종하였다. 접종5일전부터 각각의 분획을 intubation하거나 복수암의 발병이 관찰되는 즉 복수가 차서 복부가 블록해지는 7일부터 분획의 투여를 계속하였다. 일반적으로 복수암을 유발시키면 2주전후하여 마우스는 사망하게 된다. 그러나 대조구로 사용한 PS-K는 평균 26일생존하였으며 무리우산버섯은 control보다 약간 생존기간이 길어졌으나 많이 증가하지는 않고 불과 2-4일정도였다. 그러나 말굽버섯의 경우 평균 27일이상이었고 30일생존도 20%정도 관찰되었다. 이는 기존의 시판되는 시약과 비교하여 손색이 없게 나타났고 오히려 생존율이 높게 나타나고 있다.

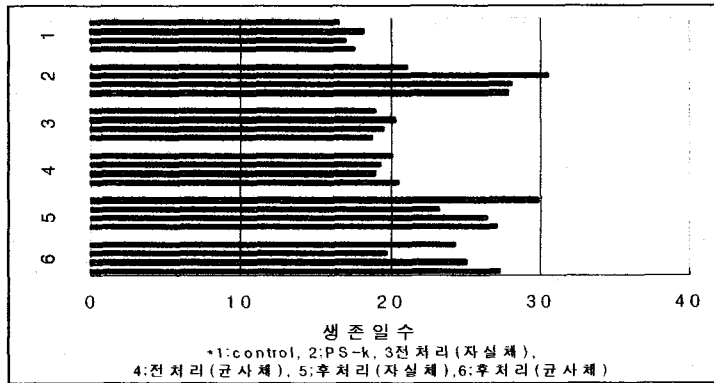


Fig. 6. 무리우산버섯의 in vivo 처리결과 마우스의 생존일수

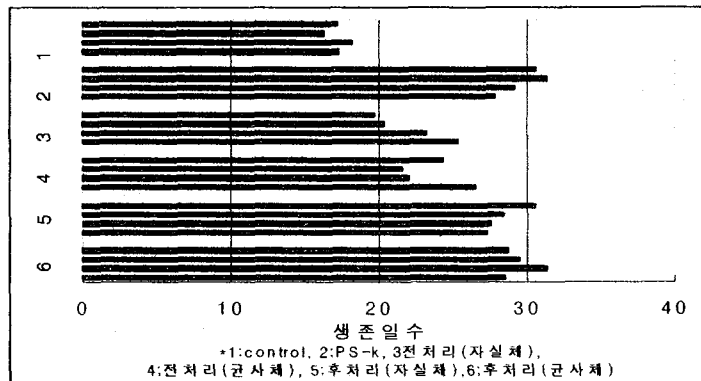


Fig. 6. 말굽버섯의 in vivo 처리결과 마우스의 생존일수

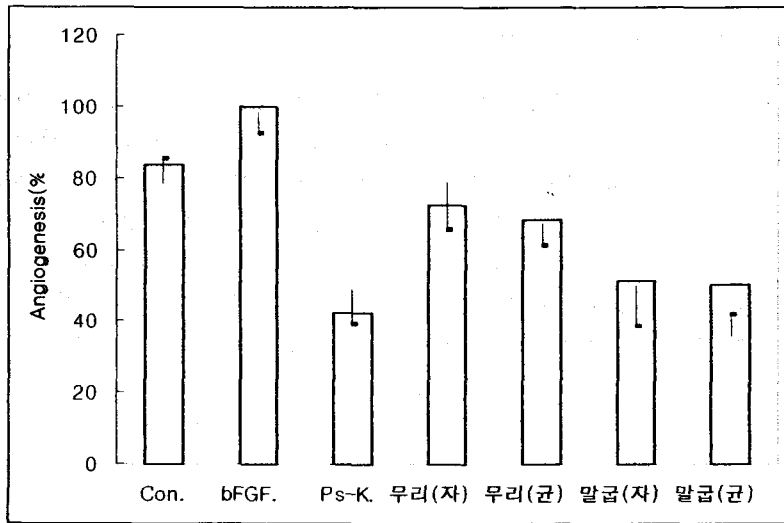


Fig. 7. 무리우산과 말굽버섯의 자실체와 균사체 추출분획을 이용한 angiogenesis 에서 혈관신생억제효과

- Angiogenesis 항암효과를 나타내는 결과를 해석하기 위해서는 혈관신생작용을 억제하거나 전이를 억제하는 경우 항암효과가 있는 것으로 판단하고 있다. 따라서 버섯 2종류의 전술한 결과에 따라서 가장 효과가 인정되는 분획을 유정란을 부화하면서 modified CAM을 수행하면서 혈관의 신장정도를 측정하였다. 그 결과 그림 7에서 보는 바와 같이 control보다 fibroblast growth factor를 처리하면 혈관이 더 신장되는 반면 시판되는 ps-k를 처리하였던바 약 50%이상 억제효과를 나타내고 있다. 그리고 무리우산버섯의 자실체와 균사체도 약간의 효과를 보이고 있으나 그리 큰 효과는 인정되지 않으나 말굽의 경우 자실체와 균사체 모두 양호한 효과를 나타내고 있다. 따라서 말굽버섯은 암세포 배양에서의 결과가 생체에서도 그대로 적용됨을 알수 있었으며 이후 항암제 또는 항암보조제로 사용가능함이 시사되었다고 할수 있다.

- IgG의 생성

각각의 버섯 분획을 처리한 마우스에서 혈중 IgG량을 면역측정법에 의해서 측정한다 표 2와 같다. 버섯의 각각 분획들은 면역에도 관계하고 있음을 알수 있었다.

<표2 > IgG 의 함량 비교

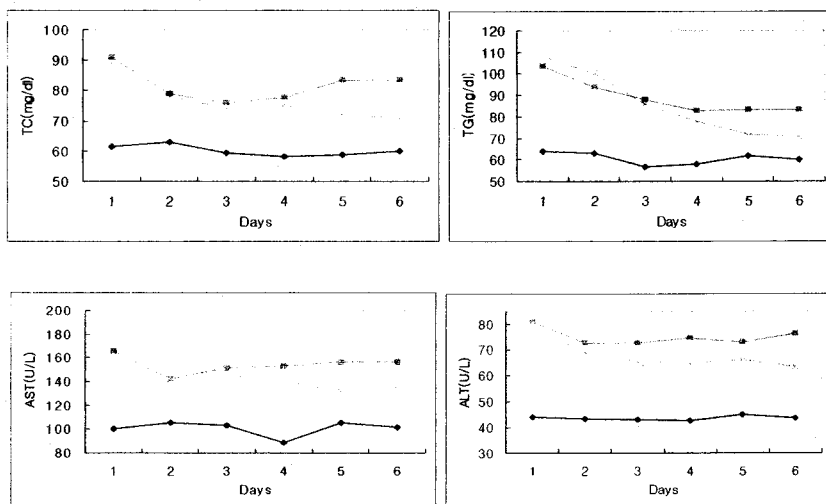
	균사체 분획											
	말굽버섯						무리우산버섯					
	자실체			균사체			자실체			균사체		
	Fr.4	Fr.5	Fr.6	Fr.4	Fr.5	Fr.6	Fr.4	Fr.5	Fr.6	Fr.4	Fr.5	Fr.6
IgG(%)	98.0±	96.3	98.7	107	118	123.5	97.2	88.6	90.5	101.3	97.2	100
normal	8.0	±6.5	±7.9	±3	±112	±7.8	±5.6	±11.4	±2.2	±8.2	±6.2	±8.9
100%												

- 보체대체경로, B세포와 T세포 활성화

말굽분획 6의 처리에 의해서 보체대체경로의 활성화는 대조구에 비하여 1.6배 활성화되었음이 관찰되었고 B세포 활성화가 발현되는 지표효소인 alkaline phosphatase의 활성을 측정 한바 1.4배 높아졌음을 확인하였다. 또한 T세포 활성화를 알아보기 위하여 세포의 크기를 현미경을 확실하게 관찰할 수가 있었으며 3H-thymidine uptake에 의해서 대조구에 비하여 1.8배이상 활성화됨을 관찰할수 있었다.

<표 3> T세포 활성화

Reagents	Dose ($\mu\text{g/ml}$)	^3H -thymidine uptake (cpm)	Stimulation index
control	-	1853 \pm 185	1.00
concanavalin A	3	8254 \pm 325	4.45
lipopolysacchride	50	4973 \pm 243	2.68
Fr. 5. (말굽)	100	2031 \pm 165	1.09
	200	2873 \pm 212	1.55
Fr. 6. (말굽)	100	1852 \pm 123	1.00
	200	2132 \pm 245	1.15



<그림 8> TC-총 콜레스테롤, TG-총글리세라이드, ALT, AST

◆--◆ control

■--■ EtOH처리

▲--▲, ||--|| EtOH처리후 버섯분획의 처리

- 무리우산버섯과 말굽버섯의 간기능에 미치는 영향

위의 그림 8은 각각 추출물을 rat를 에탄올로 전처리하여 급성 간중독증상을 유도한 다음 여기에 투여후 1주일간의 변화를 관찰하였음. 상기 결과는 알콜에 의한 급성중독의 버섯 추출물 처리효과가 인정되고 있는바 적어도 버섯추출물에 의해서 간에 장애가 발생하지 않는다는 증거를 확인할수 있었음. 특히 GOT, GPT의 감소가 관찰됨은 이를 증명하고 있음. 따라서 본 버섯은 처리에 의해서 생체에 장애를 주지 않고 있음을 알수 있다.

<표 4 >항산화 관련 효소 활성비교

	Alkaline phosphatase	Catalase	Superoxide dismutase	Glutathione peroxidase
	IU/dl	H ₂ O ₂ M/.mg protein/min	U/mg protein	uM NADPH/mg protein
Control	48.56±2.05	1.73±0.05	4.01±0.19	365.27±10.16
EtOH	85.36±1.78	3.08±0.12	8.14±0.20	207.12±15.32
무리 F.V	71.45±2.30	1.34±0.21	6.27±0.52	321.28±7.87
말굽 F.IV	57.21±3.12	1.28±0.19	7.02±0.43	285.32±6.78

- 암과 관련된 효소활성 및 superoxide anion 의 비교

아래의 표는 acid phosphatase의 정상과 암세포에서 변화와 초산소 이온방출효과이다.

<표 5> acid phosphatase의 정상과 암세포에서 변화

mouse	treatment	enzyme activity	stimulation indes
normal	control	0.87±0.02	1.00
	Frac. V	1.54±0.04	1.77
	Frac. VI	1.86±0.02	2.13
Tumour	control	0.93±0.12	1.00
	Frac. V.	1.23±0.21	1.32
	Frac. VI	1.97±0.08	2.12

<표 6 > superoxide anion방출에 미치는 추출물의 효과

mouse	treatment	SDA release	stimulation indes
normal	control	6.17±0.08	1.00
	Frac. V	7.51±0.04	1.22
	Frac. VI	8.16±0.02	1.32
Tumour	control	5.93±0.12	0.96
	Frac. V.	7.23±0.21	1.17
	Frac. VI	7.97±0.08	1.29

참고문헌

- Badalyan. SM., Mnatzakanian. VA., Arutunian. LS., Rapior. S., Doko. L., Jacob. M., Serrano. JJ., Andary., Chemical and pharmacological study of higher fungi. IV. Comparative investigations of the chemical composition from fruit bodies of five xylotrophic species (Agaricales S. L.) Mikologiya I Fitopatologiya [Mikol. Fitopatol.]. Vol. 31, no. 3, pp. 61-66.
- Blanchette, R.A. 1984, Screening wood decayed by white-rot fungi for preferential lignin degradation. Appl. Environ. Microbiology, 48, 647-653.
- Blanchette, R.A., J.R., J.I. Hedges and K. Weliky. 1998. Resistance of hardwood vessels to defradation by white rot Basidiomycetes. Can. J. Bot. 66: 1841-1847.
- Core, H.A., W.A. Cote, and A.C. Day. 1979. WOOD: Structure and identification, second edition. Syracuse University Pres, Syracuse, 90-128.
- Crawford, K.L. and Sutherland, J.B. 1979. The role of actinomycetes in the decomposition of lignocellulose. Gtalic. Microbiology 20: 143-151.
- Eriksson, K.-E.L., R.A. Blanchette and P. Ander. 1990. Microbial and enzymatic degradation of wood and wood components. Springer-Verlag, Berlin, 20-31.
- Highley, T.L. 1982, Influence of type and amount of lignin on decay by *Coriolus versicolor*. Can J. For. Res., 12, 435-438.
- Hong, J. C. Lee, K. S and Choi, D. S. 1981. Studies on Basidiomycetes(I) on the mycelial growth of *Agaricus bitorquis* and *Pleurotus ostreatus*. Kor. J. Mycol. 9(1): 19-24..
- Hong, J. C. Kim, J. M. Jeong, J. C. Lee, T. K. Kim D. H. Kim, M. K. and Lee, K. R. 1985. Conversion of fermented feed by Basidiomycetes. Kor. J. Mycology 13(3): 157-168.
- Humfeld, H. 1948. The production of mushroom mycelium(*Agaricus campestris*) in submerged culture. Science 107: 373.
- Kang, C. Y. Shim, M. J. Choi, E. C. Lee, Y. N. and Kim, B. K. 1980. Studies on antineoplastic components of Korean Basidiomycetes. Mycelial Culture and an antineoplastic component of *Ganoderma lucidum*. Korean Biochem. J. 14: 101-112.

- Kim, K. J. Shin, K. S. and Hong, S. W. 1986. Induction of Extracellular polyphenol oxidase from Two white-rot Fungi. *Kor. J. Myco.* 14(1): 43-47.
- Kim, S. W. 1979. A study on the Components of *Lentinus lepideus* Fr.(1); *Kor. F. Mycol.* 7(1): 9-11.
- Lembert, E. B. 1938. Principles and problems of mushroom culture. *Bot. Rev.* 4: 397-426.
- Litchfield, J. H. 1968. The production of Fungi in "Single cell protein" F. I. Mateles and S. R. Tannebaum (Ed). *Mit press Cambridge Massachusetts and London*: 309.
- Mentel R., Meinsen D., Pilgrim H., Herrmann B., Lindequist U., 1994. In vitro antiviral effect of extracts of *Kuehneromyces mutabilis* on influenza virus. *Die Pharmazie*, Nov, 49(11): 859-60.
- Park, Y. H., Kim Y. S. and Cha, D. Y. 1978. Investigation on Artificial Culture for New Edible Wild Mushroom. *Kor. J. Mycol.* 6: 25-28.
- Pashenova. NV., Reshetnikova. IA., 1989. Effect of medium pH on the mycelium growth of *Kuehneromyces mutabilis* Sing. et A. H. Smith in submerged cultures. *MYCL. PHYTOPATHOL*, vol. 23, no. 4, pp. 344-349.
- Pashenova. NV., Reshetnikova. IA., 1990. Peculiarities of *Kuehneromyces mutabilis* Sing. et A.H. Smith strain growth at various cultivation temperatures. *MYCOL. PHYTOPATHOL*, vol. 24, no. 6, pp. 558-563.
- Pebreedy, J. F., Hanifash, A. M. and Jia, J. H. 1993. New Perspectives on the Genetics of *Pleurotus*. In *Mushroom Biology and Mushroom Products*. pp 55-62. Edited by S. T. Chang, J. A. Buswell and S. W. Chiu. The Chinese University Press.
- Reijnders, A F M., 1971. The development of *Kuehneromyces mutabilis*(Agaricales). *Acta bot neer.* June. 20(2): 305-308.
- Reshetnikova. IA., Pashenova. NV., Chaika. MN., Chubatova. NV., 1988. The growth of *Kuehneromyces mutabilis* (FR.) Sing et A. H. Smith on sunflower husks. *Mikologiya I Fitopatologiya [MIKOL. FITOPATOL.]*, vol. 22, no. 1, pp. 28-32.
- Reshetnikova. IA., Pashenova. NV., Elkin. VV., Lyubavina. OV., 1990. Destruction of plant substrate by the fungus *Kuehneromyces mutabilis* Sing. et A. H. Smith. *Microbiology*. Mar. p. 642-646. ill.

- Schmidt, O., Kebernik, U., 1985. Investigations on the cultivation of edible mushrooms on wood waste. MATER. ORG., vol. 20, no. 3, pp. 157-170.
- Serkman, K.V. and Ludiwig, C.H. 1971. Lignin occurrence, formation, structure and reactions. Willey Interscience, Y.N. pg 835. see pp. 768-795.
- Stankeviciene. D., Urbonas. VA., 1986. Biochemical characteristics of the edible mushrooms of the Lithuanian SSR. 3. Content of Cu, Fe, J, Mn, Zn in the fruitbodies of *Armillariella cellea* (Fr.) Karst., *Kuehneromyces mutabilis* (Fr.) Sing. et Smith, *Macrolepiota procera* (Fr.) Sing., *Tricholoma portentosum* (Fr.) Quel. Darbai - Lietuvos TSR Mokslu Akademijos. Serija C = Trudy - Akademiia Nauk Litovskoi SSR. Seria V. v. 2 p. 95-100.
- Takama, F. Ishii H. and Muraki. S., 1984. Flavor Components in Japanese and Korean matsutake *Tricholoma matsutake*(S. Ito et Imai) Sing. and their Change during storage. Nippon. Shokuhin. Kogyo. gakkaiishi. 31:14.
- Wissig. E., Grabbe. K., 1990. Requirements for the growth of *Kuehneromyces mutabilis* in submerged cultures. Fourth International Mycology Congress, Regensburg (FRG), 28 Aug - 3 Sep. (World Meeting Number 903 0687).
- 강안석, 차동렬, 홍인표, 장현유, 유승현. 1994. 개암버섯의 균사생장에 영향을 미치는 배양조 학회지 22(2): 153-159.
- 김한경, 박정식, 김양섭, 차동렬, 박용환. 1988. 버들송이의 균사생장 조건에 관한 연구. 농시 논문집 30(3): 141-150.
- 성재모, 이재근, 박동수. 1998. 비늘버섯속균(*Pholiota* sp.)의 특징과 자실체 형성. 한국균학회 지. 26(2): 194-199.
- 이상선, 최경진. 1995. *Lepista nuda*의 고체배양. 한국균학회지. 23(2): 105-113.
- 차동렬. 1981. 야생 식용버섯의 인공재배 검토(II). 한국균학회지 9(3): 123-128.
- 차동렬, 유창현, 김광포. 1989. 최신 버섯 재배 기술. 사단법인 농진회.

여 백

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

세부1 : 기능성 우수 균주 육성 및 인공 재배 기술 개발

1. 연구개발목표의 달성도

구분	연구 개발 목표	연구개발목표 달성도
1차 년도 (2001)	<ul style="list-style-type: none"> - 기능성버섯 균주 수집 - rDNA 분석에 의한 종 구분 - 기능성 버섯류의 단포자분리 교배 - 균주별 최적배지 선발 - 균주별 배양적 특성 조사 - 자실체 형성 조건 조사 	<ul style="list-style-type: none"> - 장수버섯 19, 잎새버섯 35, 비늘버섯 41, 차가버섯 12균주 수집 - URP primer에 의한 핵산지문법 ITS sequencing 수행 종구분 - 장수버섯 68개 단핵균주, 53개 이핵균주 육성, 비늘버섯 10개 균주에서 184개 단핵균주 육성 - PDA, MCM, YM, MEA배지에서 버섯 종류별 균주별 최적배지 선발 및 배양적 특성 조사 - 톱밥수종별 균사생장량 조사와 병재배 및 포트재배를 통한 자실체 형성 조건을 조사하여 재배법을 개발
2차 년도 (2003)	<ul style="list-style-type: none"> - PCR에 의한 계통간 유연관계 분석 - 단핵 교배주의 배양 및 재배특성 조사 - 교배육성 균주선발을 위한 기능성관련 표지형질 개발 - 톱밥수종 및 배지재료에 대한 생산력검정 	<ul style="list-style-type: none"> - 수집균주에 대한 ITS sequence를 GenBank에 등록하였으며, 분자생물학적으로 균주간 유연관계 분석을 완료하였음. - 버섯 종류별 단핵균주를 분리하여 단핵균주간 교배 및 Di-mono 교배를 통한 이핵균주를 육성하였음. - 항산화와 관련된 SOD 유전자를 분리하여 그 특성을 조사 중임. - 전년도 수종시험결과에 따라 버섯종류별 병배법, 포트재배법, 상자재배법, 원목재배법을 개발하였음.
3차 년도 (2004)	<ul style="list-style-type: none"> - 생산력 검정에 의한 품종 선발 - 기능성 우수균주 선발 및 등록 - 생산력 검정 - 능가 확대재배 시험 	<ul style="list-style-type: none"> - 비늘버섯 톱밥 병재배법, 폐면 상자재배법 개발 - 잎새버섯 톱밥 병재배법, 봉지배법 개발 - 장수버섯 원목재배법, 톱밥 병재배법, 톱밥 봉지재배법 개발 - 장수버섯, 잎새버섯, 비늘버섯에서 각 1균주 최종 선발 능가 재배 중 - DNA fingerprinting에 의한 교배균주 확인 - 비늘버섯, 잎새버섯, 장수버섯 선발균주는 품종심의회를 거쳐 각 1 품종 등록 예정

2. 관련분야의 기술발전예의 기여도

- 기능성이 우수한 균주의 육성 및 인공대량 생산 기술 개발 보급으로 새로운 소득 작목 창출.
- 버섯의 식품적 가치외에 기능성 식품으로써 소비촉진 극대화로 버섯재배 농민의 소득증대에 크게 기여할 것임.
- 기능성 제품 개발로 국민 건강에 크게 기여할 뿐만아니라 외국산 관련 제품의 수입 억제효과가 기대됨.

3. 학문적 기여도

Analysis of Cultural Characteristics and Phylogenic Relationships of Collected Strains in *Pholiota* species. Mycobiology 31(4): 200-204

Phylogenic Relations of Genera *Inonotus* on the Basis of ITS Region Sequences and RAPD. KSM News Letter 14(2): 71

Cultural Characteristics and Phylogenic Relationships of Collected Strains in *Pholiota* spp. KSM News Letter 14(1): 71

Cultural Characteristic and Phylogenic relationship of collected strains in *Fomitella fraxinea*. KSM News Letter 15(1): 95

Phylogenic relationships and SOD (Superoxide dismutase) activity in *Pholiota* species. InCoMM2003 proceedings : 287

Development of a new strain and cultivation of *Fomitella fraxinea*. InCoMM2003 proceedings : 289

Cultural characteristics and phylogenic relationships of collected strains in *Grifola frondosa*. InCoMM2003 proceedings : 293

Cultural Characteristics and extracellular enzyme activities of a New medicinal mushroom, *Fomitella fraxinea*. ISMS Poster presentation

Strain selection and cultivation of a new functional mushroom, *Pholiota adiposa*. 3rd meeting for edible mushroom Poster presentation

세부2 : 유효성분의 기능성 연구를 통한 생물 소재화

- 버섯으로부터 혈전증 치료 물질의 개발 및 기능성 제품 생산 연구

본 과제 의 연구목표는 버섯의 각종 추출물을 제조하여 혈전용해 활성과 혈소판 응집억제 활성을 측정하여 우수버섯을 선발하는 것이다. 또한 선정버섯으로부터 혈전증 치료(예방)물질을 대량으로 추출한 후 이들을 분리, 정제하여 각종 특성을 조사하고 동물실험을 통하여 기능성 발현을 확인하며 이들을 이용하여 기능성 건강식품을 제조하고 이들의 기호도와 기능성, 독성 및 안전성 등을 조사하는 것이다.

이러한 목표를 달성하기 위하여 과제를 수행한 결과 우선 농업과학기술원에서 분양받은 52종의 시료버섯 가운데 차가버섯(*Inonotus obliquus*) ASI 74006 균사체의 에탄올 추출물이 가장 높은 혈소판 응집 억제 활성(81.2%)을 보여 우수시료로 선발 하였다. 이 혈소판 응집 저해물질을 유기용매 분획, 한외여과, Sephadex G-10 컬럼크로마토그래피와 역상 HPLC 등으로 정제한 결과 314 Da의 분자량을 가진 peptide이었다.

차가버섯ASI 74006 에탄올 추출물을 이용하여 항혈전 음료를 개발한 결과 맛과 향이 우수하면서 혈소판 응집저해 활성이 고형분 mg 당 25%를 갖는 항혈전 효능이 비교적 우수한 제품을 개발하였다. 또한, 이들은 세포 독성이나 돌연변이성 및 부작용등이 없었고 저장 중 침전물 생성 등 제품의 품질에도 문제가 없었다.

이들 연구내용들을 평가 착안점에 따라 평가해본 결과 혈전용해 물질과 혈소판 응집저해 물질의 탐색 및 대량생산으로부터 제품개발과 이들의 안전성 등에 이르기 까지 계획된 모든 실험들이 실시되어 우수한 결과들을 얻었다.

본 과제를 통하여 얻어진 결과들 중 특히 버섯 혈전 치료(예방)물질 생산, 정제 및 제품화 기술들은 식품의약이나 건강식품산업, 제약산업 등의 유사 제품 개발에 크게 기여할 것이다. 또한, 혈전 예방용 기능성 버섯 제품이 개발되므로 국민건강 증진과 더불어 이들의 국내 소비가 증대될 것이고 동시에 기능성 식품의 수입 억제 및 수입 대체 효과와 수출의 활성화를 기대할 수 있을 것이다.

위탁1 : 버섯으로부터 고혈압예방을 위한 안지오텐신 전환효소(ACE) 저해물질의 개발 및 기능성 제품 생산 연구

본 과제의 1년차 연구 목표는 항고혈압성 ACE 저해물질을 함유한 유용 버섯의 탐색으로 농업과학기술원에서 수집된 52종의 버섯류의 일반성분이 분석 되었고 또한 이들 버섯으로부터 ACE 저해물질을 탐색한 결과 최종적으로 *Pholiota adiposa* ASI 24012를 선발 하였으며 이들로부터 ACE 저해물질의 추출 최적조건으로 각종 용매와 온도, 처리시간 및 protease 처리 효과 등을 조사하여 최적화 시켰다. 또한 2년차에서는 ACE 저해물질의 정제와 특성을 통한 약리 기작 규명으로 한외여과와 Sephadex G-25 컬럼크로마토그래피, 역상 HPLC 등으로 비늘버섯에서 생성된 ACE 저해물질을 고 순도로 정제하여 이들의 특성을 조사하고 동물실험을 통하여 약리 효능을 검증하였다. 3년차에서는 항고혈압성 비늘버섯제품 개발이 연구 목표이며 이를 위해 비늘버섯 추출물을 이용하여 항고혈압성 비늘버섯 음료(파우치형태)와 민속주를 제조하였고 이들의 물리화학적 특성과 안전성 등이 조사 되었다.

이들 연차별 연구내용들을 평가 착안점에 따라 평가해본 결과 1년차에서 버섯의 화학성분 분석과 ACE 저해물질 탐색 및 대량생산 등이 이루어 졌으므로 계획은 100% 달성하였고 2년차와 3년차 역시 버섯ACE 저해물질의 분리와 정제 및 특성, SHR(본태성 쥐)을 이용한 ACE 저해물질의 기능성 재현 검증, 버섯 ACE 저해물질을 이용한 제품개발과 이들의 안정성 등 계획된 모든 실험들이 모두 실시되어 우수한 결과들을 얻었다.

본 과제를 통하여 얻어진 결과들 중 특히 버섯 ACE 저해물질 생산, 정제 및 제품화 기술들은 식품의약이나 건강식품산업, 제약산업 등의 유사 제품 개발에 크게 기여할 것이다. 또한, 고혈압 예방용 기능성 버섯 제품이 개발되므로 국민건강 증진과 더불어 이들의 국내 소비가 증대될 것이고 동시에 기능성 식품의 수입 억제 및 수입 대체 효과와 수출의 활성화를 기대할 수 있을 것이다. 버섯을 이용한 고부가가치의 가공 제품이 개발되므로 버섯 재배농가의 소득이 증대될 것이다.

한편, 본 과제 수행과 병행하여 시판되고 있는 버섯들을 대상으로 항고혈압 활성을 조사한 결과 왕송이 버섯(*Tricholoma giganteum*)이 가장 높은 ACE 저해 활성을 보였고 이들 ACE 저해물질을 정제하여 특성을 조사한 결과 tripeptide의 새로운 항고혈압성 물질임을 규명하여 보고한바있다. [Peptide J. 4:621(2004)]

위탁2 : 버섯류 천연 항산화물질 분석 및 활성물질 분리·동정 연구

제 1 절 1차년도

1. 연구개발 목표

구 분	연구개발목표	연구개발내용 및 범위
1차년도 (2000)	2 위탁과제 (고항산화활성 버섯류 선발)	<p>내용 : 각종 항산화활성 검정법을 비교 검토하여 고 항산화활성 버섯류 검정 및 선발</p> <p>1) NBT, POD, DPPH 및 TBA법에 의한 항산화활성 검정 및 선발</p> <ul style="list-style-type: none"> - 공시버섯: 장수버섯(<i>Fomitella</i> sp), 잎새버섯(<i>Grifola</i> sp), 비늘버섯(<i>Pholiota</i> sp), 차가버섯(<i>Inonotus</i> sp)를 포함한 80계통 - 검정방법 : NBT법: 활성산소소거능관련효소 측정 POD 법: 과산화수소 소거능 측정 DPPH 법: 자유라디칼 소거능 측정 TBA 법: 지질과산화억제활성 측정 - 시험구배치법: 난괴법 3반복 <p>2) 선발된 계통의 ESR 측정</p> <ul style="list-style-type: none"> - 공시버섯 : 고항산화 그룹 : ASI <i>Agaricus brunnescens</i>을 포함하는 5계통 저항산화 그룹 : ASI 740(C)를 포함한 5계통 - 검정방법 : ESR을 이용한 활성산소 소거능 측정

2. 연구평가의 착안점 및 달성도

구 분	평가의 착안점 및 척도	
	착 안 사 항	척 도 (점 수)
1차년도 (2000)	◎ 고항산화활성 버섯류 선발	100점

3. 관련분야 기술 발전에의 기여도

가. 고 항산화 활성 버섯류의 개발로 각종 고급가공식품을 생산하여 수출로 연결시킬 수 있는 가공 산업의 획기적인 발달을 할 수 있을 것으로 생각된다.

나. 식품 및 생체 내에서 생성되는 극미량의 과산화물질 분리 및 정량법 확립, 신속, 정확, 특이적으로 hydroperoxide(H₂O₂)를 분리, 정량하는 방법을 통해서 식품의 초기 산화안정도의 검증 및 생체 내에서의 관련 물질들이 각종 질병의 발병 mechanism을 규명하는데 크게 기여할 것으로 생각된다.

다. 점차 확대되어가고 있는 선진국과의 중견산업 경쟁에서 우위를 점할 수 는 바탕이 마련되며 이미 선진국에서 시작되고 있는 고 기능성 품종개발에 능동적으로 대처할 수 있을 것으로 생각된다.

제 2 절 2차년도

1. 연구개발 목표

구 분	연구개발목표	연구 개발 내용 및 범위
2차년도 (2001)	2 위탁과제 (강력한 항산화 활성을 갖는 항산화물질 분리)	<p>내용 : 항산화활성 물질 추출 및 분리·정제된 활성물질인 항산화제의 구조결정</p> <p>1) Open column chromatography (Slica and C₁₈) - 천연항산화 물질의 추출 및 분리·동정</p> <p>2) TLC, UV, IR, ¹H·¹³C-NMR, GC-MS - 순수 분리·정제된 물질의 이화학적 특성조사 (용해성, R_f, 발색반응 등) - 활성물질의 기기분석(UV, IR, ¹H·¹³C-NMR, GC-MS) 등의 화학기기를 이용하여 얻은 스펙트럼을 분석함으로써 화학 구조를 결정</p>

2. 연구평가의 착안점 및 달성도

구 분	평가의 착안점 및 척도	
	착 안 사 항	척 도 (점 수)
2차년도 (2001)	◎ 천연항산화활성 물질 추출, 분리 기술확립	100점

3. 관련분야 기술 발전에의 기여도

가. 버섯류가 함유하는 강력한 antioxidative activity를 갖는 항산화물질이 분리됨으로써, 이를 이용한 식품의 제품 산화안정성 향상에 크게 기여할 뿐만 아니라, 과산화물로 야기되는 각종 질병을 예방하는데 일익을 담당할 것으로 기대되고, 또한, 새로운 antioxidant의 screening법을 개발함으로써 천연에 존재하는 각 antioxidant의 검색에 이용할 수 있다..

나. 새로운 기능성 항산화제의 개발로 대부분 수입에 의존하고 있는 항산화제에 대한 수입대체 효과가 클 뿐만 아니라 수출상품으로서도 큰 역할을 할 것이다

제 3 절 3차년도

1. 연구개발 목표

구 분	연구개발목표	연구 개발 내용 및 범위
3차년도 (2002)	2 위탁과제 (분리 정제된 된 활성물질 효과확 인 및 이용성확 립)	<p>내용 : 분리·정제된 물질의 효과 확인 및 기존의 항산화제와 효과 비교 시험</p> <ul style="list-style-type: none"> - 천연항산화제로서의 도출을 위한 검사 - 분리·정제 물질의 체내 흡수 및 대사작용 연구 - 공시재료 : 분리·정제된 물질과 기존의 항산화제 - 정제된 물질을 이용하여 <i>in vitro</i>와 <i>in vivo</i>에서의 항산화효과 검정 - 실험방법 : <ul style="list-style-type: none"> ① <i>In vitro</i>: RC₅₀, IC₅₀, H₂O₂를 이용한 항산화 활성 검정 ④ <i>In vivo</i>: 체중 및 간의 무게 변화, MDA, total cholesterol, HDL, LDL, GOT, GPT, γ-GTP - 조사항목 : 항산화능력분석

2. 연구평가의 착안점 및 달성도

구 분	평가의 착안점 및 척도	
	착 안 사 항	척 도 (점 수)
3차년도 (2002)	◎ 천연항산화활성 물질 분리·정제 기술 및 이용성 확립	100점

* 척도(점수)의 합계는 각 년도 100임.

3. 관련분야 기술 발전에의 기여도

가. 고 항산화 활성 버섯류의 개발보급에 의하여 가공식품 및 건강식품용 등으로 다양화
된 형태로 유도 가능 하다.

나. 고 부가치 상품화로 버섯류 산업의 상업화 촉진으로 외국 버섯류 도입을 억제 할 수
있다.

다. 가능성이 강화된 버섯류 재배를 통한 안정된 농가소득 보장함으로써 농촌사회의 안
정화에 기여 할 수 있다.

라. 새로운 항산화제의 공급원인 생약을 활용함으로써 농가 수입증대에 기여하고,
ROS(reactive oxygen species) 관련 질환의 예방 및 개선법의 개발로 직·간접적인 의료비
를 절감 할 수 있을 것으로 생각된다.

마. 저장 또는 가공중의 산화작용을 억제하여 신선한 식품의 공급을 통한 국민 보건 향
상에 크게 기여할 것이다.

제 4 절 학문 발전에의 기여도

1. 공원식, 박정식, 지희연, 김승현, 한상준, 정일민. 2004. Evaluation and Selection of Antioxidative Activities among 80 Collected and Mated Mushroom Strains using SOD, POD, DPPH, TBA and ESR methods. 한국육종학회 춘계 학술발표회 제36권: P. 450-451.
2. Won-Sik Kong, Jung-Sik Park, Seung-Hyun Kim and Ill-Min Chung. 2004. Evaluation and Selection of Antioxidative Activities of 80 Collected and Mated Mushroom Strains Using SOD, POD, DPPH, TBA and ESR Methods. Food Sci. Biotechnol.(채택)
3. Won Sik Kong, Jung Sik Park and Ill Min Chung. 2004. Chemical Constituents from the Mushroom of *Pholiota adiposa* with Cytotoxicity. Toxicology Invitro(투고)

협동1 : 버섯류의 면역조절기능 물질의 탐색 및 이용 연구

본 연구 과제를 수행함에 있어서 여러 가지 다양한 연구 기법 및 접근 방법을 통한 버섯류의 열수 추출 다당체를 확보하였고, 이를 통한 면역 활성화 능 실험 및 항암 활성화 실험, 혈당 강하 및 고도 비만 억제등 다양한 식품 및 의약품 소재로서의 가능성을 알아 볼 수 있었던 것이 중요하였다. 이러한 실험적 기술적 경험을 바탕으로 다음과 같은 결론을 얻을 수 있었다.

첫째, 면역 조절기능 생물활성 검색을 위한 마우스 strain 및 시료 농도에 따른 면역 반응성 조사 결과 교잡군(Hybrid) BDF₁이, 시료 농도는 25 μ g/mg 농도로 72시간 배양 조건이 최적의 상태임을 알았다.

둘째, 면역 조절 물질 생산 균주 선발을 위한 104종의 공시균주의 열수 추출물의 B 임파구 항체 능 조사 결과 균사체중 비늘버섯 24007과 차가버섯 74006의 조 다당체의 생물학적 활성능이 매우 강하게 나타났다.

셋째, 24007과 74006의 MTT법을 이용한 세포 독성 결과 대장암 세포주(HT1080)과 자궁경부암 세포주(HeLa)에 대해 농도 의존적으로 세포의 증식을 억제하지만, 대장암 세포주(SW480)에는 효과가 없는 것으로 보아 특정 세포이 선택적으로 작용하는 것으로 판단되었다.

넷째, 24007 및 74006의 암세포주의 세포사멸 유도능을 검색한 결과 DNA의 fragmentation이 일어나는 것을 확인 하였고, 이는 세포 내에서 약물에 의한 세포 사멸 유도를 확인 할 수 있었다.

다섯째, RT-PCR을 통한 MMPs 의 mRNA 발현량 조사에서 24007 처리군이 MMP의 발현량이 적은 것으로 보아 24007 추출물이 단백 분해효소의 발현을 억제시킴으로서 암 세포의 invasion이나 metastasis를 억제 하여 암세포의 전이나 침윤을 억제 할 것으로 추측된다.

여섯째, SDS-PAGE를 이용한 74006의 추출물의 분자량은 대략 30-32KDa이다.

일곱째, 74006 조 다당을 이용한 항 당뇨 및 비만 억제 실험에서 처리군이 비 처리군에 비해 몸무게는 20%, 혈당은 40% 억제 효과가 있다.

여덟째, 24007, 74006 균사체의 조 다당 구성 성분의 대부분은 glucose이며, 그 외 glucosamine, galactose, mannose 등으로 구성되어 있다.

마지막으로 74006의 독성시험 결과 LD₅₀값이 2,000mg/kg이상으로 독성이 없는 것으로 확인 하였다.

협동2 : 고부가 가치성 버섯 균사체의 대량 생산 연구

년도	연구목표	달성도 (%)	관련분야 기여도
1차년도	-균사체 최적 배양 조건 확립 · 배지조성에 따른 생산성 · pH에 따른 생산성 · 빛의 유무에 따른 생산성	100 100 100	보통
2차년도	-5L 실험실용 bioreactor 배양조건 확립 · 접종원 농도에 따른 생산성 · 교반속도에 따른 생산성 · 산소농도에 따른 생산성	100 100 100	높음
3차년도	-산업적 규모의 bioreactor 생산조건 확립 · 산업화 배지멸균 및 예비배양방법 확립 · 산업화 배지 및 배양 조건의 생산성 검증	100 100	아주높음

협동3 : 무리우산버섯 및 말굽버섯의 개발 및 이용 연구

제 1 절 연구개발 목표 달성도

1. 말굽버섯의 인공재배기술 개발

- 1) 말굽버섯균의 배양특성 규명
- 2) 말굽버섯균의 재배특성 규명
- 3) 말굽버섯균의 부후특성 규명

2. 무리우산버섯의 인공재배기술 개발

- 1) 무리우산버섯균의 배양특성 규명
- 2) 무리우산버섯균의 재배특성 규명
- 3) 무리우산버섯균의 부후특성 규명

3. 기능성물질의 분리 및 기능성확인

- 1) 기능 다당체의 분리 정제 및 특성구명
- 2) 항암효과의 확인
- 3) 항암제 및 보조제로 이용가능성 확인

제 2 절 대외기여도

1. 학술분야

- 1) 윤대령, 2003, 무리우산버섯균의 배양적 특징과 목재 부후 특성. 전남대학교 임학과 석사 학위 논문 1-38.
- 2) 김유이, 2003, 말굽버섯균의 생리적 특징과 부후 특성. 전남대학교 임학과 석사학위 논문 1-31.

2. 연구 기술 분야

본 연구 결과 말굽버섯의 대량재배법은 장성에 있는 본 대학 부속 연습림에서 재배기술을 보급·생산 중이고, 본 대학 내에 있는 부속 연습림에서도 재배 중이다.

본 연구실에 균사체 대량생산을 위한 20L 발효조 5기 설치 운영 기반기술 보유하게 됨

제 5 장 연구개발결과의 활용계획

세부1 : 기능성 우수 균주 육성 및 인공 재배 기술 개발

1. 추가연구의 필요성

- 비늘버섯 톱밥 병재배법, 폐면 상자재배법, 잎새버섯 톱밥 병재배법, 봉지재배법, 장수버섯 원목재배법, 톱밥 병재배법, 봉지재배법이 개발되어 농가 재배작목의 확대를 가져왔으며 소득증대에 크게 기여할 수 있을 것으로 기대됨.
- 농가재배 후 소비단계에서 수요를 창출할 수 있는 연구가 더 보완되어야 할 것임

2. 타연구에의 응용

- 새로 개발된 기능성버섯의 대량재배가 가능해 짐에 따라 자실체를 이용한 기능성 식품 개발 연구와 신기능물질 신약의 개발에 응용될 수 있을 것임

3. 기업화 추진방안

- 기능성버섯의 병재배법이 개발됨으로써 수요를 확보할 수 있으면 현재 팽이버섯재배와 같은 대량생산체계가 가능할 것임.

세부2 : 유효성분의 기능성 연구를 통한 생물 소재화

- 버섯으로부터 혈전증 치료 물질의 개발 및 기능성 제품 생산 연구

본 과제를 통하여 얻어진 결과들을 우선 혈전증 예방을 위한 버섯 혈소판 응집 저해 물질의 탐색 및 개발 기술과 제품 생산 기술 등을 특허 출원하여 획득하고 이들을 식품, 의약품 산업체에 기술 이전할 계획이다. 또한, 본 연구를 통하여 얻어지는 결과들은 고부가가치의 기능성 식품과 의약품 산업 분야에 크게 활용될 것이고, 기능성이 우수한 약용식물자원의 산업화에 크게 활용될 것이다.

차가버섯의 다양한 재배방법 특히 자실체 생산방법이 연구 개발되어 대량생산이 되어야 하고 이들에 대한 각종 생리(약리) 기능성 물질의 탐색과 이용기술이 연구 개발되어야 한다.

위탁1 : 버섯으로부터 고혈압예방을 위한 안지오텐신 전환효소(ACE) 저해물질의 개발 및 기능성 제품 생산 연구

본 과제를 통하여 얻어진 결과들을 우선 고혈압 예방을 위한 버섯 ACE 저해 물질의 탐색 및 개발 기술과 제품 생산 기술 등을 특허 출원하여 획득하고 이들을 식품, 의약품 산업체에 기술 이전할 계획이다. 또한, 본 연구를 통하여 얻어지는 결과들은 고부가가치의 기능성 식품과 의약품 산업 분야에 크게 활용될 것이고, 기능성이 우수한 약용식물자원의 산업화에 크게 활용될 것이다.

우리 토종 버섯의 우수성 발굴과 고부가가치화를 위해 HMG-CoA reductase 저해물질(항동맥경화), Glutathione S-Transferase 활성(간기능 개선), 노화 억제 기능성 등의 좀 더 다양한 생리기능성의 탐색과 개발 및 응용 연구가 추가로 요구된다.

위탁2 : 버섯류 천연 항산화물질 분석 및 활성물질 분리·동정 연구

제 1 절 추가연구의 필요성

1. 기능성물질적인 측면

가. 각종 천연물 특히 식물이나 한약재에서는 많은 종류의 항산화 효과가 있는 물질이 확인되었고 상당수의 식물재료들은 수천년 동안 우리 인간이 먹어 왔기 때문에 안전성 면에서도 문제가 없을 것으로 보이는데 천연 항산화제가 폭넓게 상품화되지 않은 이유도 대사연구가 미흡하기 때문이다. 따라서 본 연구도 지난 3년간의 연구를 통하여 버섯 함유 항산화 활성물질 분석과 관련하여 *in vitro* 내에서의 항산화물질의 기능평가방법은 어느 정도 확립되었으나 *in vivo*를 통한 기능평가 확립과 false negative 와 false positive 현상을 방지하기 위해서 실험동물에 직접 투여하여 항산화물질이 인체대사에 어떠한 영향을 줄 것인지에 대한 쌀의 기능성물질에 대한 생체 내에서의 기능연구가 미흡하여 대사연구를 비롯한 기능평가 부분에서 추가 연구가 반드시 이루어져야 할 것으로 생각된다.

나. 항산화물질 대부분이 우리가 오랫동안 식용해 왔던 식재료로부터 추출하였으나 정제된 순수 물질로 식품에 첨가하는 경우 원래 식재료의 양으로 환산하면 상당히 많은 양이므로 이에 대한 독성이 검토되어야 할 것이며, 아울러 농축된 형태로 첨가 했을 때 첨가하는 식품 성분과의 반응도 면밀히 연구되어 안전성 등의 추가연구에서 반드시 검증되어야 할 것으로 생각된다.

제 2 절 타 연구에의 응용

1. 본 연구개발을 통해서 육성된 고 항산화 활성 계통들은 버섯을 기능성 식품소재로 이용하여 부가가치를 높이려는 것이 목적이기 때문에 버섯을 이용한 기능성식품개발연구에 이용될 수 있다.

2. 미래에는 식품의 1차 기능 (기호성), 2차 기능 (영양성), 3차 기능 (생체리듬 조절기능)을 고루 갖춘 식자재가 요구된다. 즉 식품의 design 시대와 더불어 국민 건강식품인 버섯이 생리활성이 높은 부가가치를 얻게 될 것이므로 식품산업에 응용 될 것이다.

3. 각종 기능성이 강화된 버섯이 다양하게 개발되어 식용되어 직접 이용하거나 늘어나는 가공용 버섯의 수요를 안정되게 충족할 수 있으며, 버섯 가공식품의 고급화가 이룩되고 수출산업으로 연결될 수도 있다.

4. 버섯의 이용분야를 확대하기 위한 다양한 특성을 가진 육종연구 소개로 이용될 수 있다.

제 3 절 기업화 추진방안

추가연구를 통해 고 항산화 활성 품종이 개발되면 지역농협이나 농업기술센터, 버섯 전문 생산단체 또는 유통회사에게 종균의 공급하여 특산단지의 조성 및 계약재배 하도록 유도할 예정이다.

협동1 : 버섯류의 면역조절기능 물질의 탐색 및 이용 연구

항암 활성에 대한 개괄적인 작용 기작은 Fig 21과 같이 암 세포내 핵(Nucleus) 속의 Central Dogma에서 유전물질인 DNA로부터 mRNA로 전사(transcription)되는 과정에서 MMPs의 유전자에 비늘, 차가버섯의 열수 추출 다당체가 세포 외부의 어떠한 수용체로부터 세포 고유의 신호 전달 체계(signal transduction)를 통하여 전사 억제 신호를 전달받아 MMPs의 유전자가 발현이 되지 않도록 유도 하였고, 또한 cell membrane 밖으로 헤리되어 나온 MMPs에 직접적으로 작용함으로써 MMP의 생성을 억제하여 암세포의 전이 및 성장을 억제하고, 나아가 세포에 직접적인 독성을 나타내는 결과를 얻었다. 그러나 어떠한 cell membrane상의 수용체(receptor)에서의 다당체와 반응으로 인한 신호 전달 과정은 아직 밝히지 못하였다. 이를 위해서는 좀더 다양한 방법적 연구를 통하여 접근해 갈 필요가 있을 것으로 사료된다.

그리고 차가 버섯의 항 당뇨 효과의 경우 비만 동물 모델인 ob/ob mouse는 mouse 내에 leptin의 부족으로 인한 비만을 유도 하는 모델로서 차가 추출 다당체의 경우 고도 비만을 치료하기 위해 leptin를 투여하는데 차가 추출물의 경우 이와 유사한 효과를 보이는 것으로 추측되었다. 또한 혈당 강하 및 뇨당 강하를 유도하였고, 혈액속의 인슐린 저항성을 완화시키는 것으로 보아 새로운 식품 소재로 활용이 가능할 것이라 사료된다. 이를 바탕으로 기존에 알려진 버섯류의 의약품 및 기능성 식품의 다변화에 기여 할 것으로 확신한다.

협동2 : 고부가 가치성 버섯 균사체의 대량 생산 연구

본 연구를 통하여 얻어진 자료들은 고부가가치성 버섯 균사체의 대량 생산을 위한 기초로서 활용될 수 있다. 또한, 값비싼 화학배지보다 값싼 천연배지를 이용하여 균사체의 생산량을 조사하고 생산조건을 확립하였으므로 버섯 종균용이나 균사체 대량 생산 기술에도 활용될 수 있을 것이다. 특히 200리터 규모의 폭기 배양기는 대형 탱크 발효기에 비하여 다루기 쉽고 오염에 의한 위험부담이 적은 기술이므로 여기에 상업적 배지를 활용한 산업적 생산을 구체화 할 계획이다. 이 부분에 관심을 갖고 있는 버섯 산업체와 공동으로 약용 균사체를 대량 배양하고 이를 이용한 가공제품의 산업화를 계속 추구할 계획이다.

협동3 : 무리우산버섯 및 말굽버섯의 개발 및 이용 연구

1. 말굽버섯과 무리우산 버섯의 배양특성

본 연구의 결과는 무리우산버섯과 말굽버섯의 이화학적 특징을 규명하고자 연구하였으며, 이러한 결과 균사체 및 자실체를 인공재배하기 위한 기초 자료로 활용되고자 한다.

2. 말굽버섯과 무리우산버섯의 재배기술 개발

본 연구의 결과는 무리우산버섯과 말굽버섯의 자실체 형성의 가능성을 제시하였으며, 이러한 결과에 대한 활용 방안은 다음과 같다.

(1) 개발된 재배기술 농가 교육

- 버섯 재배에 관련된 교재 및 월간지에 기술내용 수록.

(2) 개발된 기술의 응용

- 기존의 도내 종균 생산 공장, 병버섯 재배 공장에 기술을 보급함으로써 저 투자, 고 생산성 유도.
- 저가 배지를 도내 농가에 보급함으로써 농가의 고 소득원으로써 활용.
- 기능성 식·약품으로 개발될 경우 대량 생산체계를 이용하여 대량으로 공급 가능.

3. 말굽버섯과 무리우산버섯의 부후특성 규명

본 연구의 결과는 무리우산 버섯과 말굽버섯의 현미경적 부후 특징에 관하여 연구하였으며, 이러한 결과 버섯재배에 있어 영양원 및 목질 섬유소의 역할을 규명하여 버섯균의 부후 특성에 알맞은 배지 조성에 도움이 되기 위한 기초 자료로 활용되고자 한다.

4. 기능성물질의 이용

본 연구에서 구명된 물질과 기능성에 관한 특허 출원예정 및 기능성 식품으로 개발 (6개월 이내)가능함으로 산업체 이전예정

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

제 1 절 제2회 극동아시아 식용균 공동연구 세미나 참석

(2002년 9월 4일 ~ 2002년 9월 9일)

I. 출장목적 및 일정

1. 출장목적

제2차 극동아시아 식용균 공동연구 세미나 참석 논문발표

2. 출장일정

월 일	출발지	도착지	방문기관	업무수행내용	접촉 인물
'02. 9. 4	서울	일본	돗토리 학술회의장	현지도착, 학술회의 등록	일본 및 중국 식용균 연구 전문가 (Prof. Kitamoto, Prof. Morinaga 등)
'02. 9.5 ~6			돗토리 학술회의장	학술회의 공식 일정 및 발표	
'02. 9. 7			돗토리균심연 구소 기따무라 농장	일본 버섯연구현황 조사 팽이, 새송이 재배현장 방문	
'02. 9. 8			시장조사	버섯 유통제품 조사	
'02. 9. 9	일본	서울		귀 국	

II. 주요업무 수행사항 및 관련정보 분석

1. 극동아시아 식용균 공동연구 세미나 참석

가. 일시: 9월 4- 6일

나. 장소: 돗토리 현립문화회관

다. 참석인원: 약 90명

라. 발표내용 : 생략

마. 차기 극동아시아 식용균 공동연구 세미나 행사 협의

(1) 일시: 2004년

(2) 주최국: 한국

(3) 점진적으로 다른 아시아권 포함을 추진함

(4) 머쉬월드 제안서 제출

(4) 기타 상세한 내용은 추후 협의하기로 결정함

2. 일본 버섯산업 현황

버섯은 일본의 주요 특용임산물의 하나로 농산촌 지역의 귀중한 수입원일 뿐 아니라, 취업의 기회를 창출하는 등 지역 경제에 중요한 영향을 끼치고 있다. 그러나 요사이 일본의 지속적인 경기 침체와 더불어, 버섯 재배 인구의 노령화가 진행되고, 버섯의 가격이 낮아짐에 따라 채산성 악화가 심해지고 있다. 또한, 낮은 가격으로 무장한 수입산의 증가로 생산의 욕이 감퇴되고 생산자도 감소하는 문제가 나타나고 있다.

3. 버섯 및 미생물 산업발전을 위한 한·중·일 협력방법

(1) 동양권에서는 한국, 일본, 중국의 버섯산업이 가장 발달되어 있다. 기술적인 면에서 볼 때 일본이 우위에 있으며, 버섯의 인공재배 체계도 가장 먼저 갖추었다. 중국은 현재 세계에서 버섯생산량이 1위이며 소비 또한 1위로 다양한 종류의 식용버섯과 약용버섯을 이용하고 있다. 여기에는 많은 요인들이 작용하지만 넓은 국토로 인한 풍부한 자원이다. 일본의 기술과 중국의 풍부한 자원을 활용하기 위하여 많은 수의 버섯관련 연구원이나 상인들이 자주, 장기간 방문하여 교류할수 있는 기회를 가져야 한다.

(2) 정기적인 학술심포지엄이나 정기적인 교류에 의해 상호방문이나 유학 등 먼 장래를 위해 투자하여 중국 및 일본을 잘 아는 연구인력의 육성이 필요하다고 생각한다.

4. 방문기관 및 주요사업 내용

(1) 균심연구소

가. 연혁

균심연구소가 소속한 재단법인 일본버섯센터는 제2차 대전후의 혼란속에서 삼림자원의 유지활용에 따른 농산촌의 진흥 및 식용버섯에 의한 국민의 건강에 대한 공헌 등을 통하여 보편적 국민경제·복지의 향상을 도모함과 동시에 균류의 역할에 주목한 생명생태계의 지속을 목적으로 하여 1947년 그 전신인 전국표고보급회의 명칭으로 발족하였고, 1958년 4월에 농림대신의 인가를 얻어 재단법인으로서 개조하여 발족하였다. 균심연구소는 그 다음해인 1959년 설립된 이래로 오늘까지 균류에 관한 기초연구외에 버섯에 관계있는 많은 연구를 적극적으로 추진하여 자연순환계속에 있어서 버섯재배의 발전향상에 지대한 성과를 올림과 동시에 학술문화의 향상에도 기여하여 왔다.

나. 기구와 직원

소장, 부소장, 명예연구원 이외에 사무국에 7명, 연구부문에 21명, 전산실에 2명., 비상근 고문에 7명이 있다.

다. 주요연구과제

① 버섯류의 분류와 생태에 관한 연구 ② 세포학적 ③ 생리, 생화학적 ④ 생리활성 물질에 관한 연구 ⑤ 유전, 육종에 관한 기초연구 ⑥ 표고를 주로 하는 식용버섯류의 품종 개량 ⑦ 바이오테크놀로지 수법에 의한 품종개량 기술의 개발 ⑧ 유전자 자원의 수집과 균주의 보존법에 관한 연구 ⑨ 재배용 원목에 관한 연구 ⑩ 표고 기타 식용버섯류의 재배기술에 관한 연구 ⑪ 식용버섯류의 병해의 발생생태와 병제에 관한 연구 ⑫ 골목을 침범하는 해균의 분류와 생태에 관한 연구 ⑬ 골목 및 식용버섯류에 발생하는 해충의 생태와 방제에 관한 연구 ⑭ 표고의 건조에 관한 연구 ⑮ 버섯류 재배의 경영에 관한 연구. 그외 유통에 관한 연구 및 삼림의 외부경제에 관한 연구를 수행 중이다.

라. 기타

1981년 2월 4일 일본최초의 버섯류 품종등록 1호로 등록번호 제 96호인 균홍 135호를 비롯하여 표고버섯 22종, 털목이버섯 2종, 느타리버섯 3종, 버들송이 2종 등 총 30종을 개발 등록하였다. 균심연구소에서 개발된 품종은 돗토리의 종균육성장에서 생산하며, 농협을 통해 전국의 버섯재배자에게 공급한다. 또한 전문기술지도사가 전국 17개 지역에 주재하여 재배를 지도하고 있다.

(2) 북촌버섯원 (합비서 : T. 0551-5313410, 5313411)

북촌농장의 원균은 나가노 종균센터에서 가져 온다. 모든 종균은 자가배양하여 재배하며

아직까지 아무런 변이없이 사용할 만큼 기술이 축적되어 있다.

10년 전에는 노랑색종을 재배하였으나 근래에는 백색종을 선호하여 전 일본이 백색종을 재배하고 있다. 하루 입병량은 14,400병이었으나 지금은 12,200병으로 감산했다. 팽이의 시세는 100g에 30엔(약 294원)을 받는데 이 가격으로는 유지 경영이 어렵다고 한다. 그래서 새로운 버섯 종류를 찾게 되었고 100g에 80엔(약 784원)을 호가하는 큰느타리버섯을 재배하기 시작하였고 점점 재배량을 늘려가고 있는 중이다. 일본 소비자들의 취향도 팽이보다는 큰느타리버섯을 선호하는 추세라고 말하는 것으로 미루어 볼 때 시간이 흐를수록 팽이와 큰느타리의 재배비율이 역전되지 않을까 예상된다. 톱밥배지의 원료는 삼나무이고 팽이에는 쌀겨를, 큰느타리에는 밀기울을 첨가물로 사용하고 있다. 큰느타리의 종균도 나가노 종균센터에서 가져온다. 배양온도, 생육온도 등 기초재배기술은 나가노종균센터에서 배웠고 현지 환경에 따른 재배기술은 독학으로 계속 연구하며 습득하고 있다. 큰느타리 재배기술은 아직 확립되어 있지않아 책으로 기술된 것은 없고 센터 담당자에게 구두로 전수받았다. 그러나 그 기술이 매우 어려워 매월 생산량의 편차가 심하다.

팽이의 생산량은 750g 한 병에서 평균 215g의 고품질버섯을 생산하며 재배사도 공간의 효율성을 높이며 8단으로 재배하고 있었다. 큰느타리는 750g병에서 135g을 생산한다. 큰느타리는 한병에서 3-7개의 버섯이 고르게 자라는 것으로 좋은 품질이었다. 생산되는 버섯은 전량 오사카 공판장으로 출하하며 현재 이곳에 종사하는 직원의 수는 총 39명이다.

5. 일상생활정보

오카야마에서 관광버스로 약 3시간을 가서 돗토리에 도착했다. 가는 도중 처음 식사한 곳은 우동집인데 반찬이라고는 단무지 비슷하고 크기는 3분의 1 정도였다. 후에 이것도 안주는 경우가 많다는 것을 알고는 식문화는 우리나라가 훨씬 낫다고 생각되었다. 또한 타고 간 버스는 자리가 몹시 비좁았고 길도 우리나라에 비해 좁은 것으로 느껴졌다. 그래도 모든 것이 깨끗하고 안전한 운행을 하는 것을 보고 우리 운전습관을 바꾸어야 교통사고를 줄일 수 있겠다는 생각이 들었다. 이곳에서는 사구라고 부르는 모래언덕이 있는데 말이 모래언덕이지 실제로 가보면 사막의 일부를 떼어다 놓은 듯 모래벌판이 끝없이 펼쳐져 입이 떡 벌어진다. 게다가 수십미터 높이의 모래언덕을 그대로 달려 내려가면 새파란 바다와 함께 환상적인 해수욕장이 이어지니 여름철에 간다면 더할나위없이 좋을 것으로 보였다. 돗토리의 면적은 3,493km²이고, 인구는 약 62만명이다.

Ⅲ. 주요내용 요지 및 건의 사항

1. 주요내용 요지

유럽 및 미국 등지에서는 양송이 위주의 버섯연구가 주로 되어 있는 반면 동양권에서는 한국, 일본, 중국을 중심으로 다양한 버섯류를 이용하는 버섯산업이 발달되어 있다. 기술적인 면에서 볼 때 일본이 우위에 있으며, 버섯의 인공재배 체계도 가장 먼저 갖추었다. 중국은 현재 세계에서 버섯생산량이 1위이며 소비 또한 1위로 다양한 종류의 식용버섯과 약용버섯을 이용하고 있다. 여기에는 많은 요인들이 작용하지만 넓은국토로 인한 풍부한 자원이다. 다른나라에는 자원이 없어서도 연구할 수 없는 대상도 있다. 이번 극동아시아 식용균 공동연구 세미나에서는 각 나라에서 연구되고 있는 버섯유전자원 분야, 유전 및 육종, 버섯재배 기술, 약용버섯연구 기타 생화학 등에 대한 폭넓은 연구분야에 걸쳐 서로간에 뜻 깊은 토의가 이루어졌다. 2004년에 우리나라에서 제3회 극동아시아 식용균 공동연구 세미나가 열리

계획이지만 앞으로도 일본의 기술과 중국의 풍부한 자원을 활용하기 위하여 많은 수의 버섯 관련 연구원이나 상인들이 자주, 장기간 방문하여 교류할수 있는 기회를 가져야 한다.

2. 건의사항

정기적인 학술심포지엄이나 정기적인 교류에 의해 상호방문이나 유학 등 먼 장래를 위해 투자하여 중국과 일본의 풍부한 자원 및 연구내용을 받아들일 수 있도록 적극 지원해야 한다고 생각한다.

IV. 수집자료

1. 수집자료

가. 기술정보

(1) 최신 문헌

- 제2회 극동아시아 식용균 공동연구 세미나 proceedings
- The index of Korea-Japan mushroom names in Korea
- 맛있는 버섯과 독버섯
- Bailinggu Rengong Zaipi Yu Jiagong

나. 유전자원

- 버섯 : 큰노타리 1균주
팽이 1균주

제 2 절 제2차 국제약용버섯 학술회의 참가 발표

(2003년 7월 15일 - 2003년 7월 22일)

I. 출장목적 및 일정

1. 출장목적

제2차 국제약용버섯 학술회의에 참가하여 농림기술과제의 기능성버섯에 대한 연구발표 및 버섯의 기능성연구 현황조사

2. 출장일정

월 일	출발지	도착지	방문기관	업무수행내용	접촉 인물
'03. 7. 15	서울	방콕		숙박	아시아 및 구미 각 국가의 버섯 연구 전문가 (Prof. L. J. L. D. V. Griensven, Prof. Solomon P. Wasser 등)
'03. 7. 16	방콕	파타야		학술회의 등록	
'03. 7. 17 ~'03. 7. 19		파타야	"2003 Bio Thailand"	학술회의 공식 일정 및 발표	
'03. 7. 20	파타야	나툼팻콤,	휴일, 농장방문	태국 영지버섯재배농장 견학	
'03. 7. 21	나툼팻콤 (방콕)	칸차나부리	아람의 버섯 연구소	버섯 품종육성 교류 협 의 및 귀국 출발	
'03. 7. 22		서울		08:30 인천공항 도착	

II. 주요업무 수행사항 및 관련정보 분석

1. 제2차 국제약용버섯 학술회의 참가

가. 일시: 7월 16일 - 7월 19일

나. 장소: 태국 파타야 Royal cliff hotel

다. 참석인원: 약 1000 명

라. 학회주관기관 :

National Center for Genetics Engineering and Biotechnology (BIOTEC)

Natinoal Mushroom Center, Department of Agriculture

The Mushroom Researchers and Growers Society of Thailand

SVITA Foundation

마. 발표내용 : 생략

2. 국제적 기능성버섯 연구동향

학회에 발표된 내용의 경우에서도 많은 기능성 버섯들에 대한 연구가 활발히 진행됨을 알 수 있었다. 태국 Kasetsart대학에서 느타리 버섯의 균사체의 액체 배양 시 생성되는 셀룰로스가수분해 효소에 대한 분석표를 작성하여 발표하였다. 이 연구의 경우는 액체 배양 뿐만 아니라 느타리 재배 시에 생육주기별, 수확 후 주기별 버섯의 배지이용에 관한 자료로 연구 가치가 있는 것으로 판단된다. 즉, 생육단계별 셀룰로스가수분해 효소의 발생에 따른 효과적인 배지조성 및 투입을 가능하게 하여 경제적이고 효과적인 배지의 이용에 의한 생산의 극대화를 이룰 수 있게 하는 연구로 보여진다. 또한 표고에 관한 연구의 포스터의 경우 분자량이 높은 다당류의 정량을 위한 방법으로 수용성 추출물과 용매(에탄올)에 의한 추출물 두 가지의 방법 모두가 유효한 방법으로 소개 됐으며, 원목재배의 경우가 일반 배지에 의한 재배에서 경우보다 높은 고분자 다당류를 얻는데 유효한 재배 방법으로 소개가 되었

다. 그리고 태국의 북부에서 자생하는 버섯의 유연관계분석을 실시하고 새로운 유전자원의 특성을 소개한 내용도 있었다. 특히, 주목할 만한 포스터로는 파라솔 버섯에 대한 소개였다. 아직 국내에서는 알려져 있지 않은 버섯이라 여러 사람으로부터 주목을 받았는데, 새롭게 태국에서 식용버섯으로 재배되는 종으로 소개를 하였다. 재배에 성공한 파라솔 버섯과 비슷한 종들이 몇 가지 있으나 재배가 불가능하였으나 여기의 실험에서 고무나무 톱밥 또는 벧짚을 이용하여 병재배에 성공하여, 새로운 유전자원으로서 교배모본 또는 임성관련인자로서 사용할 수 있게 되었다는 보고를 하였다. 또한 눈에 띄는 대목은 각 지역의 특성에 맞는 배지의 개발이 이루어 졌다는 것이다. 국내에서는 참나무 톱밥을 이용한 재배가 대부분이나 태국의 경우 주위에서 흔히 얻을 수 있는 고무나무의 톱밥을 이용한다는 것이 흥미로웠다. 물론 버의 재배도 일년에 2-3모작의 형태로 이루어져 충분한 양의 벧짚도 공급이 가능하므로 벧짚을 이용한 재배도 활발하게 이루어지고 있음을 확인하였다. 그 밖에 열대 지방에서 많이 생산 되는 버섯들의 약용성분 향상을 위한 재배법의 개발과 특정 성분의 분리 그리고 생체 내에서의 성분의 효능에 관한 실험이 주로 소개가 되었다.

3. 기능성 버섯 개발의 전망과 발전 방안

기능성이 우수한 균주의 육성 및 인공대량 생산 기술 개발 보급으로 새로운 소득작목 창출이 전망되며, 버섯의 식품적 가치외에 기능성 식품으로써 소비촉진 극대화로 버섯재배 농민의 소득증대에 크게 기여할 것으로 보인다. 기능성 제품 개발로 국민 건강에 크게 기여할 뿐만아니라 외국산 관련 제품의 수입 억제효과가 기대된다. 따라서, 기능성 연구가 활발히 이루어지고 있는 일본, 유럽, 미국 등지로부터 기능성 물질의 대량탐색기법을 받아들여 버섯류에 잠재되어 있는 기능성 물질을 개발해야하고, 자원이 풍부한 중국 등지에서 유용한 균을 도입하기 위하여 지속적 교류 확대가 필요하다

4. 방문기관 및 주요사업 내용

(1) 아람의 버섯연구소

공식 행사를 마친 후 바로 방콕으로 향하는 버스를 타고 나툼팻콤 이라는 곳의 아람의 버섯연구소를 방문하였다. 개인이 운영하는 종균 회사인데도 불구하고 국왕이 방문할 정도로 그 곳의 사장님은 버섯에 대해 많은 공부를 한 것으로 보였다. 수십 가지 종류의 버섯종균을 판매하고 있었으며, 직접 재배를 하여 판매도 한다고 하였다. 특히 눈에 띄는 버섯은 목이버섯이었는데 형태로 보아 털목이 이면서 백색이었다. 아마도 변종인 것으로 생각되었으나 아쉽게도 귀국후 균분리에 실패하였다. 또 한가지는 치마버섯이다. 일반적으로 치마버섯은 육질이 질겨서 식용으로는 사용하지 않는 것으로 알려져 있으나 이곳에서는 아주 맛있는 버섯이라고 한다. 여러 종류의 버섯을 보유하고 판매한다는 것 뿐만 아니라 다양한 버섯가공품과 기념품을 개발하여 판매하고 있었다. 버섯을 멸치조림처럼 만든 것부터 버섯술, 버섯으로 만든 소스, 다양한 과자류 등등 수십 가지의 제품을 판매하고 있었다. 태국보다는 더 나은 시장 조건과 기술을 가지고 있는 국내 현실을 감안하면 정말 대단한 일이었다. 우리도 다양한 수요를 창출하여 판매시장을 넓히는 노력이 필요하리라 생각되었다.

(2) 차이야유 버섯농장

칸차나부리 지역의 차이야유 버섯농장을 마지막으로 방문을 하였다. 시골의 작은 버섯농장으로 앞서 방문한 아람의연구소와 재배방식은 비슷하였다. 아직 기계화가 이루어지지 않아 수작업을 많이 하는 것을 볼 수 있었다. 특이하게, 태국은 한국과는 달리 베지로 고무나무 톱밥을 이용한다는 것이다. 그리고 인공적으로 온도를 조절하는 시설을 갖추고 있지

않아 고온성의 버섯(전복느타리, 사철느타리, 왕송이, 버들송이, 영지 등)만을 재배하고 있었다. 이곳에서는 왕송이재배법이 특이해 보였는데 종균이 배양된 뒤에 땅에 30cm 깊이로 묻고 위에 복토를 두툼하게 한뒤 삿갓모양으로 덮어 둔 곳에서 버섯원기가 형성되고 있었다. 이곳이 복잡한 도심이 아니라서 어딜 가나 시골의 인심이 후하기는 마찬가지인 것 같다. 이름 모를 열대 과일들을 계속 내오던 안주인이 떠날 때는 비닐봉지 가득 싸주기 까지 하였다. 따뜻한 대우를 받고 좋은 추억을 간직하며 발길을 돌렸다.

5. 일상생활정보

태국은 첫인상으로 무척이나 깨끗한 나라라는 것이다. 엄청 덥고 후덥지근하였는데도 불구하고 우리나라보다 깨끗하였다. 태국은 3가지가 유명한데 첫째 남자가 여성화된 것, 알카자쇼가 대표적이다. 둘째, 음식이 상하지 않는다는 것과 셋째 물이 썩지 않는다는 것이다. 이 나라가 적도에 가까워서 원적외선의 영향을 받기 때문이라고 한다. 태국은 전체적으로 나라의 지대가 상당히 낮다고 한다. 따라서, 홍수에 의한 피해가 심한데 그런 피해를 막기 위해서 태국의 수도인 방콕의 공항은 그나마 지대가 제일 높은 지역으로 선정하였는데 그곳이 바로 돈무앙 공항이다. 태국은 지리적으로 북부산악지대, 북동부 고원지대, 중앙 평야지대, 동부해안지대, 남부해안지대, 서부 산악지역으로 나뉘어진다. 하나 하나가 모두 볼 만한 곳으로 알려져 있다. 태국의 날씨는 겨울(11-2월), 여름(3-5월), 우기(6-10월)로 나눌 수 있는데, 여름에 37-8도를 오르락 내리락 한다. 우리가 방문했던 시기는 우기여서 그나마 아주 더운 시기는 피한 날씨였으나 무척이나 무더웠다. 태국은 불교 국가이며 국민의 90% 이상이 불교신자이고, 남자들은 일생에 한번은 불교에 입문을 해야 한다고 한다. 태국의 지반은 석회암층이 대부분이라 지하수를 바로 마실 수가 없다. 따라서, 생수회사들이 아주 많다고 한다. 태국의 수도인 방콕의 주위에는 산이 없고 꾸미지 않은 자연스런 멋을 낸다. 태국의 여자들이 특히 인상 깊었는데 눈이 예쁘고 눈동자가 깊다. 대부분 쌍꺼풀이 있으며 하체가 길고 살찐 사람을 거의 볼 수가 없다. 하지만 코가 약간 낮다는게 흠이지만, 태국에선 생선요리를 할 때 한 번 튀긴 후 찌게종류를 끓여서 먹는다고 한다. 바로 먹으면 맛이 없다고 한다. 태국은 음식 문화가 발달되어 있다. 하지만 독특한 향을 내는 팍치라는 것은 어지간해선 먹을 수 없을 정도의 향을 낸다. 태국에는 특히 뱀이 많은데 우리나라처럼 뱀을 많이 먹지는 않는다고 한다. 단지 껍질을 이용하는 경우가 많다고 한다. 해마다 수천 명이 뱀에 물려 사망한다고 한다. 특히, 독특한 것은 전봇대가 사각이라는 것이다. 이것은 뱀이 전봇대 위로 올라가지 못하도록 만들었기 때문이라고 한다. 태국의 국왕은 국민들로부터 존경을 받는 인물이다. 특히 둘째 공주는 다음 대를 이을 수 있는 자격을 가질 정도로 능력을 인정 받았지만 행색은 수수하게 하고 다녀 국민들로부터 더더욱 신망을 받고 있다고 한다.

III. 주요내용 요약 및 건의 사항

1. 주요내용 요약

이 보고서는 2003년 7월 17-19일 태국의 파타야에서 열린 '국제 약용버섯 대회'와 '생물다양성과 생활성 물질에 대한 국제회의'에 참석하여 약용버섯과 기능성 식품에 대한 연구에 관한 국제적 연구동향을 보고한 것이다. 이 학술대회는 타일랜드 내의 가장 큰 생물기술 분야의 행사인 '바이오 타일랜드 2003'의 기획으로 진행되었다. 제 1회 바이오 타일랜드는 2001년 11월 방콕에서 개최, 20개국에서 800여명의 참가자가 학술 심포지움에 참가, 50여 개의 단체가 참가한 엑스포에는 4000여명의 관람객이 모였다. 2년 후인 2003년에 제 2회 바이오 타일랜드를 개최하게 되었으며, 동남아시아 지역의 바이오산업 발전 뿐만 아니라, 전 세계의 선진 연구 개발 기술 교류 그리고 학술 발전에 기여할 수 있기를 기대하고 있다. 약용

버섯 국제학회에서는 각 나라에서 연구되고 있는 약용버섯연구 이외에도 버섯유전자원 분야, 유전 및 육종, 버섯재배기술 기타 생화학 등에 대한 폭넓은 연구분야에 걸쳐 서로간에 뜻 깊은 토의가 이루어졌다. 2004년에 우리나라에서 제3회 극동아시아 식용균 공동연구 세미나가 열리 계획이지만 앞으로도 선진국가의 기술과 다른나라의 풍부한 자원을 활용하기 위하여 많은 수의 버섯관련 연구원이나 상인들이 자주, 장기간 방문하여 교류할수 있는 기회를 가져야 한다.

2. 건의사항

정기적인 학술심포지엄이나 정기적인 교류에 의해 상호방문이나 유학 등 먼 장래를 위해 투자하여 국제적인 자원의 이용 및 선진 연구내용을 받아들일 수 있도록 적극 지원해야 한다고 생각한다.

IV. 수집자료

1. 수집자료

가. 기술정보

(1) 최신 문헌

- Proceedings of medicinal mushroom and biodiversity and bioactive compounds

나. 유전자원

- 버섯 : 파라솔버섯 종균 (1균주)
 - 왕송이 1균주
 - 버들송이 1균주
 - 느타리 2균주

제 3 절 제16차 국제식용균 학술회의 참가 발표

(2004년 3월 13일 - 2004년 3월 20일)

I. 출장목적 및 일정

1. 출장목적

제16차 국제식용균 학술회의에 참가하여 식용 및 기능성버섯에 대한 연구발표와 버섯의 연구 현황조사

2. 출장일정

월 일	출발지	도착지	방문기관	업무수행내용	접촉 인물
'04. 3. 13	서울	미국 마이애미		숙박	각 국가의 버섯 연구 전문가 (Prof. M. Wach, Prof. J. Reitnauer 등)
'04. 3. 14 ~'04. 3. 17		마이애미	Fontainebleau Hilton	학술회의 공식 일정 및 발표	
'04. 3. 17 ~'04. 3. 18	마이애미	올랜드	Monterey 농장방문	미국 버섯재배농장 견학	
'04. 3. 19 ~'04. 3. 20	마이애미	서울	07:35 귀국 출발	17:05 인천공항 도착	

II. 주요업무 수행사항 및 관련정보 분석

1. 제16차 국제식용균 학술회의(제 17차 북미 버섯학회)

가. 일시: 2004년 3월 14일 - 3월 17일

나. 장소: 미국 마이애미 Fontainebleu Hilton Hotel

다. 참석인원: 약 300 명

라. 학회주관기관 :

International Society for Mushroom Science

American Mushroom Institute

Canadian Mushroom Growers Association

North American Mushroom Conference

마. 발표내용 : 생략

2. 국제 버섯 연구동향

이번 제 16차 국제 식용균 학술회의는 지난 2000년 네델란드에서 개최된 후 4년 주기로 미국 마이애미비치에서 제 17차 북미버섯학회와 연계하여 개최되었다. 버섯관련 최대의 행사인 관계로 참석인원 면으로나 발표내용, 그리고 NAMC Expo 등으로 성대하게 치루어졌으나 워낙 먼 곳이어서 인지 지난 대회보다 아시아 계의 참석이 줄은 감이 없지 않았다. 학회 내내 느꼈던 것도 마찬가지로 국제학회에서의 동양계 참여도가 적다는 것인데 이는 학문적으로 뒤지는 바가 없지 않겠으나 언어적 한계도 영향을 준 것이라 생각된다. 주로 토의가 영어권 연구자들간에 이루어졌는데, 대표적 group은 영국의 HRI 팀, 네델란드의

mushroom station 팀, 미국의 Pennsylvania 대학팀, 그리고 다국적 기업인 Sylan 연구팀이 주도를 하였다고 생각된다. 버섯에 대한 발표된 내용의 경우에서도 많은 기능성 버섯들에 대한 연구가 활발히 진행됨을 알 수 있었다. 기초발표를 한 Belman 교수는 양송이버섯에서 의학적 생리적으로 중요한 생물활성물질에 대한 발표를 하였는데 brown 계통이 셀레늄 함량이 높다고 하며, 기타 지역별, 재료별로 aromatic compound 등의 생물활성에 차이가 있다고 발표를 하였다. 또한 Dr. Chen은 주제발표에서 양송이버섯이 aromatase 와 steroid reductase activity에 대한 의학적 적용 및 평가에 대한 자료를 발표하였다.

특히 이번학회에서 눈에 띄는 것은 마켓팅분야가 아닌가 싶다. 기존 여러 버섯학회에서는 볼 수 없었던 유통 및 마켓팅분야가 폭넓게 발표되었는데 이는 이번 국제학회가 북미버섯학회와 연계되었기 때문이기도 하나 우리나라의 버섯학회도 좀더 이 부분을 확대해야 한다는 필요성을 느낄 수 있었다. 유전육종분야에서는 단연 서구의 연구가 앞선다는 것을 인정할 수 밖에 없었는데 주로 그 연구가 발생단계에 따른 유용유전자의 탐색 및 형질전환에 대한 연구로 HRI 의 Dr. Challen 팀과 sylan 연구팀의 발표가 인상적이었다. 또 하나 변화한 것이 2000년 15차 ISMS에서는 푸른곰팡이에 관한 연구가 많이 이루어져 2개 session에서 발표가 되었는데 이번에는 그 양이 많이 줄고 다양해졌으며, 특히 바이러스에 대한 연구가 눈에 띄었다. 그밖에 주의를 끈 주제로는 버섯재배후 배지를 이용하려는 SMS에 대한 연구와 환경문제에 적용하는 문제이다. 내가 관심이 있어서 이겼으나 앞으로 이 분야에 대하여는 연구할 과제가 많을 것으로 생각되었다.

3. 방문기관 및 주요사업 내용 - Monterey 농장

공식 행사를 마친 후 바로 차를 렌트하여 올랜도로 출발하였다. 버섯농장에서의 약속시간이 아침 9시였기에 하루 일찍 출발하여 근처에서 목기로 하고 mushroom 웹진팀과 함께 약 4시간을 운전하여 올랜도의 작은 motel(Comfort Inn & Suites)에 도착하였다. 숙소가 작은 호수에 면해 있어 그동안 묵었던 고급 Hilton hotel 보다도 더 마음에 들었다. 약속시간에 늦지 않기 위해 30분전에 도착하여 보니 이건 농장이라고 하기 보다는 대규모 공장으로 내가 상상한 이상이었다. Monterey 사는 1971년 1개 농장으로 출발했으나, 이미 국제적인 회사로 미 전역에 약 20개의 시설을 가지고 있는 북미 최고의 버섯회사라고 할 수 있었다. 개략적으로 보면 생버섯 생산으로 최대규모이며 일평균 500,000 pound 이상을 생산하며, 연 215백만 pound를 생산하는 가장 큰 규모의 생산회사라고 할 수 있으며, 11개의 농장과 5개 가공공장, 3개의 중견회사를 가지고 있다. 우선 이 농장에 들어서면서 놀란 것은 그 규모 뿐 아니라 바로 철저한 청결 및 소독에 대한 마인드이다. 물론 버섯을 재배하는 어느 곳이나 이 문제가 기본이기는 하나 대개 높은 사람은 무시하고 드나드는데 이곳에서는 누구나 그에 대하여 철저하다는 것을 알 수 있었다. 또 한가지는 직원에 대한 관리로서 안전요원들이 곳곳에 배치되어 있고 직원들이 일하는 데도 충분한 휴식공간과 시간을 줌으로써 높은 생산성을 올릴 수 있었다고 한다. 또 이를 알 수 있는 한 예가 느타리 재배사인데 이 곳은 포자가 해롭다고 방독마스크를 쓴 관리자 이외에는 누구도 출입을 금하고 있었다. 그래서인

지 소비자단체에서 가장 우수한 회사로 인정을 받았다는 플랭카드가 붙어 있었다. 각 과정을 둘러보면서 역시 그 규모가 대단하였는데 배치준비에만도 몇 대의 hopper 가 넓은 들판에서 작업을 하고 있었다. 거기에 약 10개 정도의 살균 발효실, 자동 콘베어에 의한 집중작업, 배양과정, 발생과정에 이르기까지 정말로 철저한 관리가 되고 있음을 알 수 있었다. 이곳에서는 백색 양송이 이외에 포토벨로도 생산하고 있었으며 앞에 말한 바와 같이 느타리 붕지 재배가 일부 수행되고 있었다. 이렇게 큰 규모의 버섯농장을 보고나면 으레 드는 생각이지만 좁은 국토의 국내 생산여건으로 볼 때 어떤 방법으로 국제적인 경쟁을 해 나가야 할지가 압담해지곤 한다. 우리로서는 천상 기술집약적인 자동 생산시스템으로 나아가야 할 것으로 생각되었다.

4. 일상생활정보

미국은 멀고 큰 나라인 것만은 사실인 모양이다. 가면서 뉴욕을 거쳐 갔는데 뉴욕에서도 3시간을 비행기로 갔고 총 비행시간 14시간 이상을 가야했다. 가는데 이틀, 오는데 이틀이 걸리는 셈이다. 마이애미에서는 비치에서 수영을 했는데 올 때 뉴욕은 폭설이 내렸다. 마이애미의 숙소인 호텔 근처에는 호텔만 죽 늘어서 있어 어느 곳에서나 흔히 볼 수 있는 편의점을 찾을 수 없었다. 물이라도 한병 사려면 택시를 타고 나와야 했다. 호텔에서는 security guard 가 구석구석 배치되어 외부인을 단속하고 있어 웬지 반감을 느끼게 하였다. 호텔 옆에 바로 산책로가 있고 해변이어서 많은 사람들이 조깅을 하는 것을 볼 수 있었다. 시내의 대도시가 다 그렇듯 지저분하였고, 다인종 사회를 실감할 수 있었다. 월마트에는 우리나라의 대형할인점과 비슷하기는 하나 훨씬 규모가 컸으며 다양하면서도 값싼 제품이 많았다. 그러나 싸구려라는 느낌에 선 듯 손이 가지는 않았다. 차이라면 약국이 크게 있고 우리나라에서는 비싼 것이 여기는 싸기에 몇 개 구입을 하였다. 음식도 크게 차이가 느껴지지 않았다. 주유소가 주로 셀프로 주유를 하게 되어 있는데 렌트한 차에다가 처음해보는 셀프 주유기라 한동안 애를 먹었다. 올랜도로 가는 길에는 유명한 유이버설 스튜디오, 디즈니랜드, 씨월드가 있었으나 바쁜 일정으로 한 군데도 볼 수 없었으며 그냥 스쳐지나가는 끝없이 펼쳐진 평원에 눈만 지쳐버렸다. 한가지 이상했던 것은 그 평원에 불이 났는데 전혀 아무도 신경을 쓰지 않는 것이었다. 한 동행친구가 이곳에서는 자연히 타다가 꺼지게 둔다고 하는데 맞는 말인지는 모르겠다.

Ⅲ. 주요내용 요약 및 건의 사항

1. 주요내용 요약

이 보고서는 2004년 3월 14일 - 3월 20일 미국의 마이애미에서 열린 제 16차 국제 식용균 학술회의와 제 17차 북미버섯학회에 참석하여 식용 및 약용버섯 연구에 관한 국제적 연구동향을 보고한 것이다. 이 학술대회는 국제적으로 가장 큰 버섯 학회라 할 수 있으며 15차 학술회의는 4년전 네델란드에서 열렸었다. 또한 NAMC Expo 가 함께 열려 버섯산업과 관련된 60여 업체에서 다양한 기기 및 볼거리를 제공하였다. 한국에서는 웹진인

Mushworld가 한 부스를 차지하고 “Oyster mushroom cultivation” 제목의 책자를 배포하며 그들의 활동을 홍보하였다. 학술회의는 총 14개 Session으로 진행되어 4일간 진행되었으며 전세계의 버섯관련 연구자들이 모여 의견을 교환하는 자리로서 손색이 없었다. 특히 버섯 재배, 유전육종, 품질, 병해충 등 다양한 분야와 NAMC에서의 마케팅분야가 총망라되어 바이오산업 발전 뿐만 아니라, 전 세계의 선진 연구 개발 기술 교류 그리고 학술 발전에 기여할 수 있기를 기대하고 있다. 올해 우리나라에서 제3회 극동아시아 식용균 공동연구 세미나가 열리 계획이지만 앞으로도 선진국의 기술과 다른나라의 풍부한 자원을 활용하기 위하여 많은 수의 버섯관련 연구원이나 상인들이 자주, 장기간 방문하여 교류할수 있는 기회를 가져야 한다.

2. 건의사항

정기적인 학술심포지엄이나 정기적인 교류에 의해 상호방문이나 유학 등 먼 장래를 위해 투자하여 국제적인 자원의 이용 및 선진 연구내용을 받아들일 수 있도록 적극 지원해야 한다고 생각한다.

IV. 수집자료

1. 수집자료

가. 기술정보

(1) 최신 문헌

- Science and Cultivation of edible and medicinal fungi
- Mushroom Science XVI

나. 유전자원

- 버섯 : 느타리버섯 (1균주)