

GOVP1200134253

635.8  
L2937

최종  
연구보고서

19

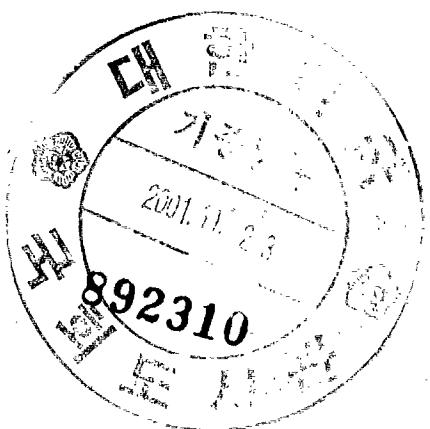
## 국내 자생 노루궁뎅이 버섯의 우량계통선발 및 실용화 재배법 개발

The development of practical cultivation and  
superior selection of *Hericium erinaceum* strain in Korea

연 구 기 관  
고 려 대 학 교

협동연구기관  
강 원 대 학 교

농 림 부



## 최종보고서

1998년도 농림기술개발사업에 의하여 완료한 “국내 자생 노루궁뎅이 버섯의 우량계통선발 및 실용화, 재배법 개발”에 관한 연구의 최종보고서를 별첨과 같이 체출합니다.

첨 부 : 1. 최종보고서 10부  
2. 최종보고서 디스켓 1매

2001. 10.

주관연구기관 : 고려대학교

총괄연구책임자 : 박원목 (인)

주관연구기관장 :

농림부장관 귀하

## 제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “국내 자생 노루궁뎅이 벼섯의 우량계통선발 및 실용화 재배법 개발” 과제의 최종보고서를 제출합니다.

2001. 10.

주관연구기관명 : 고려대학교  
총괄연구책임자 : 박 원 목  
연구원 : 박 상 호  
연구원 : 고 한 규  
연구원 : 박 혁 구  
연구원 : 이 왕 열  
연구원 : 김 동 명  
협동연구기관명 : 강원대학교  
협동연구책임자 : 윤 관 상  
연구원 : 류 효 릴  
연구원 : 손 경 덕

## 요 약 문

### I. 제 목

국내 자생 노루궁뎅이 버섯의 우량계통선발  
및 실용화 재배법 개발

### II. 연구개발의 목적 및 중요성

노루궁뎅이버섯(*Hericium erinaceum*)은 우리나라 및 중국등 온대지방에 광범위하게 분포되어 있는 담자균강에 속하는 버섯으로, 가을에 활엽수의 고사목에 발생하며, 옛부터 식용 및 약용으로 이용되어왔다. 중국에서는 후두균(猴頭菌, monkey head mushroom)이라고 하며 일본에서는 Yamabushitake로 불려지고 있다.

과거에는 깊은산에서 채집을 주로 하였으나 1980년대에 들어서 상하이 농업과학원에서 인공재배를 성공한 이래 중국 및 일본에서는 원목재배, 병재배 및 봉지재배로 대량재배를 시도하고 있다. 이와 같이 본 버섯은 인공재배 역사가 길지 않으므로 세계적으로 재배면적 및 생산량이 매우 적다. Kawagishi(1996)는 노루궁뎅이버섯에서 nerve growth factor(NGF)를 추출하여 치매치료로의 이용 가능성을 보고하였고, Mizuno(1992)는 항암효과가 높은 다당체를 보고하였다. 버섯은 여러 가지 생리활성 물질을 가지고 있으므로 식용 뿐만 아니라 건강식품으로 각광을 받고 있다. 본 버섯에는 nerve growth factor를 함유하고 있으므로 노인성 치매현상을 예방할 수 있다는 보고가 일본과 유럽에서 발표되고 있다. 이렇듯 노루궁뎅이버섯은 식용자원 뿐만아니라 특히 최근에 자실체 및 균사에서 신경생장 촉진제 및 항암제등 생리활성물질이 풍부히 함유되어 있는 것이 밝혀져 이를 이

용한 노인성 치매치료의 여러 가지 중요한 생약성분 및 건강식품이 개발될 가능성이 크다. 따라서 앞으로 사회문제가 될 노인의 치매방지에 중요한 기능을 할 것으로 사료된다. 이와 같이 노루궁뎅이버섯은 건강증진 생약 재료로의 이용 가능성도 높다. 따라서 장래성이 큰 고소득 작목으로 전망되므로 농민에게 보급할 재배 기술개발이 매우 필요하다.

따라서 본 버섯의 수요는 매우 높을 전망이므로 본 버섯의 재배를 농가에 보급하면 소득증대사업으로 가능성이 높고, 수입 대체 효과가 크다. 특히 우리나라 고유균주를 개발하므로써 앞으로 문제가 될 국제적인 외국종균 사용허가(royalty)문제도 야기시키지 않고 외국으로 수출할 수 있다고 사료되므로 본 버섯의 국내 자생균주의 인공 재배법을 개발하여 농민에게 보급이 시급히 요구되고 있다.

특히 21세기의 중점사업의 하나로서 뇌과학(腦科學)이 부각되고 있다. 이는 앞으로 노인성 치매현상에 대비하고자 하며 생약개발에 중요소재로 각광을 받고 있다. 특히, 노루궁뎅이버섯은 뇌발달에 중요한 영향을 미치는 nerve growth factor(NGF)가 풍부히 들어있어 뇌기능의 감퇴방지 및 뇌발달에 중요한 생리활성물질의 공급원으로 인식되어 단순한 식품의 범위를 넘어 생리활성물질의 자원으로 수요가 많으리라고 예상된다. 따라서 노루궁뎅이버섯은 고부가 농산물로 발전되어 농민의 소득증대에 기여하리라고 전망된다.

### **III. 연구개발 내용 및 범위**

고부가가치를 창출할 수 있는 노루궁뎅이버섯의 재배기술의 개발과 재배환경의 규명으로 노루궁뎅이버섯의 대량 인공재배법을 개발하여 식용으로 뿐만 아니라 생약의 자원으로 활용케하여 농민의 고소득작물로의 발전을 목표로 한다.

본 연구과제의 개발 내용 및 범위는 아래와 같다.

1. 우량균주의 선발 : 국내의 자생 노루궁뎅이버섯을 여러지역에서 수집하여 조작배양을 통하여 순수분리된 균주를 확보하고 외국의 균주 및 국내 균주를 확보한다. 또한 농촌진흥청 용용미생물과 및 국내 관련 연구소에서도 균주를 입수한다. 이들간의 수량을 조사 비교하여 다수확 고품질의 계통을 선발한다.

입수균주에 대하여 균주를 확보, 보존하며 그들의 생리적특성, 수량 및 품질을 비교하여 우량균주로 선발한다. 또한 *Hericium spp.*을 외국의 균주 센터로부터 수집하여 이들의 재배 가능성을 조사하며, 국내균주와 외국균주의 유전자원을 확보하여 우량균주선발의 대상으로 사용한다.

2. 기초 생리적 특성 조사 : 채집 분리된 노루궁뎅이버섯의 기초 생리학적 특성을 조사하기 위하여 배양온도, 최적 pH, C/N율, 영양원별로 각 균주의 생장을 비교 실험한다. 노루궁뎅이의 균사생장에 관한 영양원 실험결과 및 생리적 특성의 결과를 토대로 종균제조와 대량생산을 위한 기초자료를 제공한다.

3. 분자생물학적 방법에 의한 균주계통 분류 : 최근에는 형태적 분류의 한계를 보완하는 여러 가지 방법이 소개되고 있다. 순수 분리된 각 노루궁뎅이 균주

별로 이들간의 유연관계를 분자생물학적인 방법으로 균주간 계통을 분석한다. 최근에는 PCR반응으로 증폭된 DNA 길이 차이에 의해 유전적 다형성을 검출하는 방법으로 random primer를 사용하는 RAPD(Randomly Amplified Polymorphic DNAs)법과 유전자 지문(DNA fingerprinting)법이나, RFLP(Chiu *et al.*, 1993)법 등 절차가 간단하고 소량의 DNA만을 사용하므로 시간과 경제성에서 우수하기에 세균, 식물, 곰팡이에서 다형성을 밝히는데 이용되고 있다(Welsh and Mclelland, 1990; Williams *et al.*, 1990). 본 연구는 균류를 포함한 진핵생물의 리보솜 RNA 유전자(리보솜 DNA)의 전사단위는 18S, 5.8S, 28S의 순으로 되어 있으며, 그 18S, 5.8S, 28S rDNA는 차례로 2개의 internal transcribed spacer(ITS)로 분리 연결되어 있다.

따라서 본 연구는 노루궁뎅이속에 속하는 버섯들의 ITS 영역을 sequencing하여 이들의 공통된 부위를 찾아 ITS 부위의 sequence 차이를 비교분석하여 계통분류를 완성시키며, *Hericium* 속만을 동정 할 수 있는 새로운 Primer의 개발을 통해 노루궁뎅이 동정 기법을 완성시킨다.

4. 기능성물질 탐색시험 : 최근에 일본과 유럽에서 본 버섯의 균사와 자실체에서 생리활성물질중 특히 노인성 차매를 방지할 수 있고, 두뇌발달을 촉진하는 nerve growth factor(NGF)가 풍부히 함유되어 있다는 것이 밝혀지고 이들 NGF를 추출하여 특허를 출원하는등 본 버섯이 생약물질의 자원으로 중요시 되고 있다. 본 연구는 노루궁뎅이버섯의 생리활성물질을 균사체와 자실체로부터 분리하며 생리활성물질의 높은 수율을 얻을 수 있는 배양조건을 알아내며 그들의 생리화학적인 성질을 알아보고자 하였다. 노루궁뎅이버섯의 기능성 물질을 탐색하여

비교 분석하여 각 기능성 관련 물질의 분석을 위하여 활성물질을 추출할 조건을 확립하여 이들 활성물질을 대량 추출하여 약리적 시험을 실시한다.

5. 대량 생산 체계 확립 : 종균제조의 배양기간이 짧고, 활착이 빠르고, 퇴화가 잘되지 않는 종균재료의 선발과 이들간의 혼합율을 조정하여 실용성이 높은 종균제조법을 확립하며 농업 및 임업의 부산물중 가격이 저렴하며 구입이 용이하며 계속 공급이 가능한 재료를 선발하여 이들의 처리방안을 개발하여 노루궁뎅이버섯의 생장에 알맞는 기질로 제조한다. 즉 톱밥의 종류, 벗집, 왕겨, 사탕수수박, 올무박 등 기타 농가부산물에 따른 다수확기질을 선발한다. 실험실에서 얻은 시험성적을 기초로 새로운 재배법을 확립하고, 실제 농가에서 재배법으로 농가실증시험을 실시하여 농가에게 보급상의 문제점을 검토한다.

## IV. 연구개발결과 및 활용에 대한 건의

### 1. 우량균주 선발

본 연구에는 총 18개 균주를 사용하였다. 국내 야생균주는 7개 균주로써 오대산과 용문산에서 채집 및 분리한 균주로 *Hericium erinaceum* KU-1, KU-2, KU-3, KU-7, KU-8, KU-9, KU-10이고, Centraalbureau voor Schimmelcultures, Baarn, The Netherlands(CBS)에서 4개 균주 *H. abietis*, *H. alpestre*, *H. americanum*, *H. erinaceus*를 구입하였고, National Institute of Agricultural Science and Technology(NIAST)에서 3개 균주 *H. erinaceum* 48001, 48002, 48006, 또한 American Type Culture Collection, Rockvil,

MD(ATCC)에서 *H. laciniatum* 1개 균주를, Institute of Microbiology Seoul National University(IMSNU)에서 *H. coralloides* 1 개 균주를, 산림조합중앙회 임산미생물사업소에서 *H. erinaceum* F01, F02 균주(Malaysia에서 수집)를 분양 받았다. 총 18균주에 대한 생산력 검정 결과, *Hericium erinaceum* KU-8의 균주가 가장 생산량이 높게 평가되었다. 기존의 노루궁뎅이 병재배의 회수량이 배지량에 대해 20%내외로 보고되었지만 본 실험에서는 30-40%내외의 증수효과를 보여주었다. 기존에 보고되어진 노루궁뎅이 계통보다 수량이 높은 *Hericium erinaceum* KU-8의 균주가 우량계통으로 선발되었다.

## 2. 생리학적 특성

본 실험은 노루궁뎅이(*Hericium erinaceum* KU-1)의 균사생장에 관한 생리학적 영양원 실험으로 대량의 균사체 수확을 위한 배양기 조성을 밟히며 기초 생리 조건을 확립하고자 실시하였다. 최적온도는 25°C이며 pH 4에서 160.5mg으로 가장 건물중이 높았고 탄소원 중 glucose, sucrose, galactose, mannose 순으로 균사생장 및 균사밀도가 우수하였다. 무기태질소원으로는 ammonium acetate 30mM에서 가장 균사생장이 양호하였다. 아미노산 중 arginine 15mM에서 우수하였다. C/N을 200에서 35.9mm로 균사생장의 최대치를 보였다. 이 새로운 배지와 기존배지간의 한천배지상에서 균사생장을 비교한 결과, 우수한 균사생장과 균사밀도를 나타냈다. 또한 노루궁뎅이의 조직배양에서도 우수하였다. 상술한 실험의 결과를 토대로 새로운 합성배지를 조제할 수 있었다. 따라서 노루궁뎅이버섯 균사 배양의 최적인 새로운 배지개발을 하였으며 조성은 다음과 같다.

새로운 배지의 조성은 glucose 18.02g, arginine 3.613g, ammonium acetate

2.313g, CaCl<sub>2</sub> 0.33g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 8.5g, MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 2.0g, FeSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 0.02g, ZnSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 0.02g, MnSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 0.02g, water 1 liter이었다.

### 3. 분자 생물학적 분류

고등균류를 포함한 진핵생물의 리보솜 RNA유전자(리보솜 DNA)의 전사단위는 18S, 5.8S, 28S의 순으로 되어 있으며, 그 18S, 5.8S, 28S rDNA는 차례로 2개의 internal transcribed spacer(ITS)로 분리 연결되어 있다. 본 연구에서는 분자생물학적인 계통분류의 방법인 internal transcribed spacer(ITS) 부위의 sequence를 비교함으로써 노루궁뎅이의 유전적 근연성을 조사분석하여 계통분류를 하였으며, ITS 영역을 sequencing 하여 염기서열 비교 분석하여 이들의 공통된 부위를 찾아 새로운 동정용 probe의 유전 마커를 개발하였고, 이러한 마커를 노루궁뎅이속 버섯의 동정에 이용할 수 있었다. 각각의 균주는 ITS 1과 ITS 4의 primer를 이용하여 증폭한 결과 543 base pairs로 확인되었으며, 이를 이용하여 phylogenetic tree로 각 균주간의 유연관계를 비교 분석할 수 있었으며, *Hericium* 속의 염기서열을 GenBank에 등록하였다. GenBank에서 노루궁뎅이와 다른 곰팡이간의 ITS 염기서열을 분석하여 새로운 Her 1, Her 2의 primer를 제작하여 PCR한 결과 Her 1과 Her 2의 primer에 의해 402 base pairs를 확인하였다. 따라서 노루궁뎅이 버섯속에만 특이적으로 생성되는 band를 확인할 수 있었으며, 새로운 노루궁뎅이 버섯속의 동정용 PCR primer Her1과 Her2를 개발하였다.

#### 4. 기능성물질 분석

노루궁뎅이버섯 KU-1 균주는 균사체 생장 및 항균활성물질 생산에 가장 우수한 탄소원으로 Glucose와 fructose 1%가 선발되었고, 질소원으로 ammonium acetate와 NaNO<sub>3</sub>가 우수한 생산량을 보였다. 균사체와 배양여액으로부터 추출한 활성물질은 박층크로마토그래피(TLC)에 의해 분획되었고 EtOAc : Chloroform : MeOH(10:5:10)의 전개용매를 사용하여 Rf값 0.5-0.9부근에서 페놀 유사물질과 Rf값이 0.1-0.2 부근에 지방산 유래물질을 확인하였다. TLC 평판에 PDA를 얇게 도말후 *Escherichia coli* ATCC 8378, *Bacillus subtilis* NIHJPIC 219P, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Microsporum gypseum*, *Aspergillus niger* ATCC 10404, *Candida albicans* ATCC 10231의 포자를 분사접종 후 항균 활성을 측정하였다. 그 결과 *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 생장이 가장 많이 억제되었다. 새로운 항생물질 P1-P3과 F1-F3가 병원성 세균과 곰팡이에 항미생물효과를 보여주었고, 백색분말로 분리정제 된 pH3 분획의 활성물질과 항생물질 P3(4-chloro-3,5-dimethoxybenzaldehyde)의 *Staphylococcus aureus* ATCC 6538에 대한 최소억제농도는 각각 5.3-6.0 $\mu$ g/ml와 1.7-2.0 $\mu$ g/ml로 나타났다. 항종양 효과를 알아보기위해 당단백체 분획물들을 노루궁뎅이의 균사체 배양액과 자실체로부터 열수 및 에탄올로 각각 추출하여 얻었다. 분획물은 DEAE Sephadex A-25컬럼 크로마토그래피와 Sephadex G-200 젤 여과 크로마토그램으로 더 정제하였는데 이 물질은 22.73%의 다당체와 30.30%의 단백질로 구성되어 있음을 확인하였다. 아스파르트산과 글루탐산을 포함한 14가지의 아미노산은 단백질의 가수분해물임을 확인할 수 있었다. 화학적 분석과 핵자기공명분석(NMR) 자료로부터 가장 활성이 높은 분획물로 분획물 D를 찾아내었고 그것은 14개의 아미노

산으로 구성된 단백질배당체와 글루코우스, 푸코우스, 갈락토우스, 자일로오스를 함유한 (1→6)- $\beta$ -D-글루칸의 당단백다당체로 구성되었다고 결론을 내릴 수 있었다. 자실체로부터 정제된 당단백 분획물 D는 고형암 Sarcoma 180 세포에 감염된 ICR마우스에 각각 투여하여 20mg과 50mg/kg/day에서 각각 75%와 65%의 종양억제효과를 얻을 수 있었다. 반면, 배양균사체로부터 얻어진 당단백 분획물 D는 20mg/kg/day로 투여시 57.8%의 종양억제효과를 보여주었다.

한편 노루궁뎅이를 재배한 텁밥배지에서 몇몇 추출용액을 이용하여  $\alpha$ -galactosidase를 추출하였다. 종류수에서 가장 경제적이며 효과적이었다. 효소의 적정 산도는 6.0이었으며 온도는 55°C이었다. 유기용매에 대해 대부분 안정하였으며 가수분해에서 melibiose가 분해되어 glucose로 유리되었다. 따라서 기능성물질을 탐색한 결과, 소화효소의  $\alpha$ -galactosidase를 노루궁뎅이 폐톱밥에서 높은 수율로 추출함으로써, 폐자원 재활용의 의미에서 매우 의의가 높은 결과를 도출하였으며, 노루궁뎅이버섯에서 항세균성, 항진균성 물질을 추출 분리 정제하였고, 항암물질을 분리 정제하여 항암효과를 검정하였다.

## 5. 대량 생산 체계

본 실험은 노루궁뎅이 속간 인공재배에 의한 자실체의 수량 비교를 통해 대량 재배시에 가장 적합한 우량균주를 선발하고자 실시하였다. 농가부산물이 균사생장에 미치는 영향을 알아보기 위한 실험에서 *H. coralloides*, *H. erinaceum* KU-8, *H. erinaceum* F01, *H. erinaceum* 48006 균주들은 한약찌꺼기에서, *H. alpestre*, *H. laciniatum*, *H. erinaceus*(CBS) 균주들에서는 보리가루, *H.*

*americanum*은 콩가루, *H. abietis*는 배추가루에서 각각 균사생장이 우수하였다. 균사생장에 적절한 첨가물을 알아보기 위한 실험에서는 Palmitic acid, Olive oil, Control에서 우수한 균사생장을 보여주었고, *Hericium* 속간의 초발이 소요일과 수확량의 비교에서 초발이 소요일은 *H. erinaceum* KU-8이 35일로 가장 빨랐으며, 또한 1차 수확량에서도 *H. erinaceum* KU-8이 146.0g으로 가장 우수하였고, 총수확량 비교에서도 392.5g으로 가장 우수하였다. 이는 기존 노루궁뎅이버섯의 배지당 자실체 회수율이 20%내외로 보고된 것보다 10-20%이상의 증수효과를 보여주었다.

## 6. 농가 실증 시험

상기 실험 결과를 토대로 실제 재배농가에서 노루궁뎅이버섯의 실증시험을 실시하였다. 기존의 버섯을 재배하는 농가를 대상으로 노루궁뎅이버섯 농가실증시험은 3개소에서 이루어졌으며, 일반 농가에서 노루궁뎅이의 재배법 보급에 따른 문제점 및 의견을 수렴하였다. 한편 콘테이너를 재배사로 이용하여 저렴한 비용과 간단한 방법의 간이식으로 노루궁뎅이버섯을 재배하였으며 이에 따른 노루궁뎅이버섯의 재배방법을 폭넓게 적용하였다. 그 결과, 노루궁뎅이버섯 재배에서 *H. erinaceum* KU-8의 균주가 우수한 성적을 보였으며 봉지재배시 면자각 40% + 톱밥 40%의 혼합배지에서 결과가 우수하였고, 영양원에서 옥수수 10% + 미강 10%의 혼합 영양원이 우수한 결과를 보여주었다. 또한 노루궁뎅이 버섯의 병재 배에는 배양병을 눕혀서 재배하는 것이 우수한 품질의 노루궁뎅이 생산에 유리할 것이라 생각되었다.

농가 실증 시험에 참여한 재배자들은 한결같이 노루궁뎅이버섯의 재배에 대해 까다롭지 않은 재배조건에 대해 만족스러워 하였으며, 자실체 수확량에서도 기타 다른 버섯보다 생산량이 높게 평가되었다. 따라서 노루궁뎅이버섯 우량균주 *H. erinaceum* KU-8의 계통선발과 재배기술이 개발됨에 따라 기존의 버섯의 대체 작목으로 각광 받을 수 있음을 기대할 수 있었다.

## V. 활용방안

- 1) 일반소비자들에게 본 버섯의 NGF가 치매방지 및 두뇌발달의 효과가 있음을 홍보하여 소비를 촉진케하며, 아울러 국민 건강 증진에 도움을 주도록 한다.
- 2) 제약회사들이 이 버섯을 원료로 하여 치매억제제 및 두뇌발달촉진제와 관련되는 여러 가지 건강식품을 제조도록 한다.
- 3) 본 버섯은 중국 및 일본에서 고가의 상품이므로 수출작목으로 발전시킨다.
- 4) 이와 같이 활용 전망이 밝은 사업이므로 노루궁뎅이버섯의 재배방법을 개발하여 농촌지도소 및 독농가를 통하여 농민에게 보급하여 농촌소득증대사업으로 발전시킨다.

## Summary

*Hericium erinaceum* is one of the edible mushrooms widely distributed in Korea, Japan and China. The mushroom, extraction with hot water or brew in hot water, is considered as a health drink. The polysaccharides in the fruiting body of *Hericium erinaceum* may have beneficial effects on stomach and cancer, due to their influence on immune improvement of function. Moreover, *Hericium erinaceum* is anticipated that the phenol analogous compounds inducing the synthesis of nerve growth factor(NGF) might have protective effect in Alzheimer's disease.

In this project, we investigated the physiological characteristics, molecular biological identification, functional substance assay and mass cultivation system of *Hericium* spp..

The results obtained are summarized as follows :

## **1. Collection of *Hericium* spp.**

In this study, we selected eighteen strains of *Hericium* spp. *Hericium erinaceum* KU-1, KU-2, KU-3, KU-7, KU-8, KU-9 and KU-10 were collected on Ohdae and Yongmun mountain located in Kangwon-do. *H. abietis*, *H. alpestre*, *H. americanum*, and *H. erinaceus* were supplied by Centraalbureau voor Schimmelcultures, Baarn, the Netherlands(CBS). *H. erinaceum* 48001, 48002, and 48006 were obtained from National Institute of Agricultural Science and Technology(NIAST). *H. laciniatum* from American Type Culture Collection, Rockvil, MD(ATCC). *H. coralloides* from Institute of Microbiology Seoul National University(IMSNU). *H. erinaceum* F01 and F02 were obtained from National Forestry Cooperatives Federation. These fungi were subcultured at 25°C incubator on MEA(Malt extract 20g, Peptone 1g, Glucose 20g, agar 20g, D.W 1liter).

## 2. Physiological characteristics

*Hericium erinaceum* KU-1 grew well at pH 4 and 25°C respectively. Glucose and sucrose were favorable carbon sources for mycelial growth. As nitrogen sources, ammonium acetate and arginine enhanced mycelial growth. The optimal C/N ratio was 200. Based on the results, the following recipe is suggested to synthetic medium for the mycelial growth: glucose 18.02g, arginine 2.613g, ammonium acetate 2.313g,  $\text{CaCl}_2$  0.33g,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  8.5g,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  2.0g,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.02g,  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.02g,  $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.02g, water 1 liter. This medium was superior for the mycelial growth to other conventional media such as Yeast malt extract agar(YMA), Park medium, Potato dextrose agar(PDA), Malt extract agar(MEA), Czapek-dox agar(CDA), Macaya-lizano medium(MLM) and Yeast extract agar(YEA). Also, tissue culture of *H. erinaceum* was better in synthetic medium. This new synthetic medium is designated as Ko medium.

### **3. Molecular biological identification**

To verify phylogenetic site of the *Hericium* genus, rDNA sequencing was analyzed. ITS1, 5.8S and ITS2 of strains of the *Hericium* spp. also were sequenced with an ITS1 and ITS4 primers. Complete ITS region of the *Hericium* was amplified by PCR with ITS 1,4 primers and size of the region was 543 base pairs. Partial ITS region of the *Hericium* was amplified by PCR with Her 1, 2 primers and size of the region was 402 base pairs. The alignment analysis of these sequences with other sequences enrolled in GenBank showed that the *Hericium* might have its own order group which are different from the *Aphyllophorales* of the *Basidiomycetes* because they formed separate and distinguishable groups with a few family included in the *Hericiales* in phylogenetic tree. By distinctive ITS sequences of *H. erinaceum*, the genus-specific primers, Her1 and Her2, could distinguish all the provided *Hericium* from other fungi. PCR reaction of strains of the *Hericium* by the primer resulted in production of 402 base pairs, but the band did not appear in other fungi that are genetically close to the *Hericium*.

Subsequently, when sequences of Her primers were blasted with ITS sequences of fungi enrolled in Genbank, there were sequences same to Her primers at 5' and 3' terminal regions of ITS sequences of *H. erinaceum*, *H. coralloides*, *H. alpestre*, *H. americanum*, and *H. abietis*. ITS sequences of *Thanatephorus cucumeris* and *Rhizoctonia solani* were homologous with Her 1 primer less than 72.7% and Her 2 primer less than 57.1%. But other except above referred species almost did not have a homology with Her primers.

#### 4. Functional substance assay

Mycelium of *H. erinaceum* KU-1 was cultured in liquid (HL medium) and solid medium (Ko medium) at pH4 in 28°C. 1.0% glucose or fructose was the most favorable carbon source, and 0.2% ammonium acetate or NaNO<sub>3</sub> was an excellent nitrogen source for mycelial growth as well as production of antibiotic active compounds. The active compounds in extracts from both mycelium and culture filtrate, were separated by TLC. Using the developing solvent of EtOAc : Chloroform : MeOH (10:5:10) on

the TLC, phenol-like substances appeared at Rf values of 0.5~0.9, and fatty acid-like substances appeared at Rf values of 0.1~0.2. The TLC plates were covered by a thin layer of PDA. The suspensions 3 species of bacteria of 3 species fungi which were *Escherichia coli* ATCC 8379, *Bacillus subtilis* NIHJ PIC 219P, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Apergillus niger* ATCC 10404, *Candida albicans* ATCC 10231 and *Microsporium gypseum*, were spray-inoculated on the plates for the bioassay of antimicrobial activity. The growth of *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 was mostly inhibited. Purified novel compounds P1 to P3 and F1 to F4 were found to exhibit the antimicrobial effects against pathogenic bacteria and fungi. Minimal inhibitory concentration (MIC) of pH3 fraction and its purified compound P3 (4-chloro-3,5-dimethoxylbenzaldehyde) against *Staphylococcus aureus* ATCC6538 were 5.3~6.0  $\mu\text{g}/\text{ml}$  and 1.7~2.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ , respectively. To find antitumor components, the protein-bound polysaccharide fractions were obtained by extracting with hot water and precipitating with ethanol from the fruiting bodies and the mycelia of *H. erinaceum* KU-1. This fraction was further

purified by DEAE Sephadex A-25 column chromatography and Sephadex G-200 gel filtration chromatography. It was identified that the fraction contains 22.73% of polysaccharide and 30.30% of protein. Fourteen amino acids including aspartic and glutamic acids, were identified in the hydrolysates of the protein moiety. From chemical analysis and NMR data, it was fraction "D" that was the most active. It was comprised of protein moiety which contained 14 amino acids and a protein-bound polysaccharide moiety of (1→6)- $\beta$ -D-glucan which consisted of glucose, fructose, galactose and xylose. The fraction "D" purified from the fruiting bodies showed 75% and 65% inhibition of tumor growth against sarcoma 180 implanted in ICR mice at doses 20 mg and 50mg/kg/day, respectively. The fraction "D" of the mycelia also showed 57.8% inhibition of tumor growth at dose of 20mg/kg /day.

On the other hand,  $\alpha$ -galactosidase from *Hericium erinaceum*-grown in saw dust was extracted by several extraction buffer. Distilled water effectively extracted the active enzyme. Optimum pH for this enzyme was 6.0 and optimum

temperature was 55°C. Of the 10% solvent tested, the activity of this enzyme maintained 90% against control. The treatment of methanol, ethanol, acetone and isopropanol did not substantially affect enzyme activity. Subsequently, this enzyme was relatively solvent-resistant. The hydrolysis rate of p-nitrophenyl- $\alpha$ -D-Gal(PNP- $\alpha$ -D-Gal) was implying an  $\alpha$ -anomer activity and melibiose was also considerably hydrolyzed.

## 5. Mass cultivation system

This study was carried out to find the condition for mycelial growth and the fruiting body formation of *Hericium* spp. Also, the effect of the addition of agricultural wastes for spawn production was studied. Most agricultural by-products were proved to be stimulative for the mycelial growth. Those results were as follows: *H. coralloides*, *H. erinaceum* KU-8, *H. erinaceum* F01 and *H. erinaceum* 48006 were stimulative by chinese medicine sludge, *H. alpestre*, *H. laciniatum* and *H. erinaceus*(CBS) by barely bran, *H. amerinaceum* by soybean power and *H. abietis* by chinese cabbage for mycelial growth.

And, the optimal material of additives for the mycelial growth were Palmitic acid, Olive Oil and a white birch saw-dust. The periods taken from inoculation to formation of pinhead was 35 days and from pinhead formation to harvest was 26 days for *H. erinaceum* KU-8. In the case of first harvest, *H. erinaceum* KU-8 was 146.0g, while *H. coralloides* was 89.6g. On the other hand, *H. abietis*, *H. alpestre*, *H. laciniatum*, F02 didn't form pinhead formation nor fruiting body.

## 6. Practical cultivation at mushroom-farm

On the basis of this study, *H. erinaceum* KU-8 was the best isolate for practical cultivation at mushroom-farm. For practical cultivation, there were 3 mushroom-farms. The excellent medium was in the mixture of cotton hull 40%+saw dust 40%, and the corn 10%+rice bran 10%. We knew new cultivation method which was the horizontal cultivation of bottle. This method was very effectively in growing of *H. erinaceum*.

## **Contents**

<b>Chapter 1. General introduction .....</b>	28
Section 1. Necessity of research development .....	28
Section 2. Contents and purpose of research development .....	32
Section 3. System of research development .....	35
Section 4. Expectants .....	36
Section 5. Practical device .....	37
<b>Chapter 2. Fungal collection .....</b>	39
Section 1. Introduction .....	39
Section 2. Materials and Methods .....	41
1. Fungal collection .....	41
2. Cultivation .....	44
3. Microscopical observation .....	44
Section 3. Results and Discussion .....	44
1. Fungal collection .....	44
2. Microscopical observation .....	46
References .....	47
<b>Chapter 3. Physiological characteristics .....</b>	49
Section 1. Introduction .....	49
Section 2. Materials and Methods .....	50
1. Temperature and pH .....	50
2. Nutrition source .....	51
3. Comparison of media .....	53
4. Tissue culture .....	54

5. Chemicals .....	54
Section 3. Results and Discussion .....	54
1. Temperature and pH .....	54
2. Nutrition source .....	56
3. Comparison of media .....	67
4. Tissue culture .....	67
References .....	72
 <b>Chapter 4. Molecular biological identification .....</b>	 75
Section 1. Introduction .....	75
Section 2. Materials and Methods .....	78
1. Genomic DNA preparation .....	78
2. Primer selection .....	80
3. Sequences Analysis .....	83
Section 3. Results and Discussion .....	85
1. PCR with ITS primers .....	85
2. PCR with Her primers .....	87
3. Phylogenetic tree .....	87
References .....	100
 <b>Chapter 5. Functional substance assay .....</b>	 103
Section 1. Introduction .....	103
Section 2. Materials and Methods .....	105
1. Antimicrobial substance .....	105
2. Antitumor activity .....	109
3. $\alpha$ -galactosidase activity .....	119
Section 3. Results and Discussion .....	121
1. Antimicrobial substance .....	121

2. Antitumor activity .....	135
3. $\alpha$ -galactosidase activity .....	159
References .....	169
<b>Chapter 6. Mass cultivation system .....</b>	<b>173</b>
Section 1. Introduction .....	173
Section 2. Materials and Methods .....	174
1. Strains .....	174
2. Media .....	175
3. Temperature .....	175
4. Mycelial growth in various substrates .....	177
5. Fruiting body production .....	177
Section 3. Results and Discussion .....	178
1. Effect of Media .....	178
2. Temperature .....	178
3. Mycelial growth in various substrates .....	181
4. Fruiting body production .....	185
References .....	188
<b>Chapter 7. Practical cultivation at mushroom-farm .....</b>	<b>190</b>
Section 1. Introduction .....	190
Section 2. Materials and Methods .....	190
1. Mr. Lee's mushroom farm .....	190
2. Mr. Bae's mushroom farm .....	191
3. Mr. Jeung's mushroom farm .....	191
4. Container cultivation .....	192
Section 3. Results and Discussion .....	193

## 목 차

<b>제 1 장 총 론</b>	28
제 1 절 연구개발의 필요성	28
제 2 절 연구개발의 목표 및 내용	32
제 3 절 연구개발 추진체계	35
제 4 절 기대효과	36
제 5 절 활용방안	37
<b>제 2 장 균주 확보</b>	39
제 1 절 서론	39
제 2 절 재료 및 방법	41
1. 균주 확보	41
2. 배양	44
3. 현미경 관찰	44
제 3 절 결과 및 고찰	44
1. 균주 확보	44
2. 현미경 관찰	46
참고문헌	47
<b>제 3 장 생리학적 특성</b>	49
제 1 절 서론	49
제 2 절 재료 및 방법	50
1. 온도 및 pH	50
2. 영양원	51
3. 배양기별 비교	53
4. 조직배양	54

5. 시약 .....	54
제 3 절 결과 및 고찰 .....	54
1. 온도 및 pH .....	54
2. 영양원 .....	56
3. 새로운 배양기의 비교 .....	67
4. 조직배양 .....	67
참고문헌 .....	72
 제 4 장 문자 생물학적 분류 .....	75
제 1 절 서론 .....	75
제 2 절 재료 및 방법 .....	78
1. Genomic DNA의 분리 및 정제 .....	78
2. Primer 선발 .....	80
3. 계통분석 .....	83
제 3 절 결과 및 고찰 .....	85
1. ITS primer를 이용한 PCR .....	85
2. Her primer를 이용한 PCR .....	87
3. Phylogenetic tree .....	87
참고문헌 .....	100
 제 5 장 기능성물질 분석 .....	103
제 1 절 서론 .....	103
제 2 절 재료 및 방법 .....	105
1. 항세균성 물질 .....	105
2. 항종양 활성 .....	109
3. $\alpha$ -galactosidase 특성 .....	119
제 3 절 결과 및 고찰 .....	121

1. 항세균성 물질	121
2. 항종양 활성	135
3. $\alpha$ -galactosidase 특성	159
참고문헌	169
<b>제 6 장 대량 생산 체계</b>	<b>173</b>
제 1 절 서론	173
제 2 절 재료 및 방법	174
1. 균주	174
2. 배양기	175
3. 온도실험	175
4. 첨가물별 균사생장	177
5. 자실체 생산성	177
제 3 절 결과 및 고찰	178
1. 복합배지의 영향	178
2. 온도실험	178
3. 첨가물별 균사생장	181
4. 자실체 생산성	185
참고문헌	188
<b>제 7 장 농가 실증 시험</b>	<b>190</b>
제 1 절 서론	190
제 2 절 재료 및 방법	190
1. 이영욱씨 택	190
2. 배근철씨 택	191
3. 정덕균씨 택	191
4. 콘테이너 간이식 재배	192
제 3 절 결과 및 고찰	193

# 제 1 장 총 론

## 제 1 절 연구개발의 필요성

노루궁뎅이버섯(*Hericium erinaceum*)은 우리나라 및 중국등 온대지방에 광범위하게 분포되어 있는 담자균강에 속하는 버섯으로, 가을에 활엽수의 고사목에 발생하며, 옛부터 식용 및 약용으로 이용되어 왔다. 버섯모양이 흰색이며 수염모양으로 늘어진 것이 마치 노루궁뎅이를 뒤에서 본것과 같다고 하여 우리 선조들이 노루궁뎅이버섯이라고 불렀다. 중국에서는 후두균(猴頭菌, monkey head mushroom)이라고 하며 일본에서는 Yamabushitake로 불려지고 있다. 본 버섯은 식용자원뿐만 아니라 특히 최근에 자실체 및 균사에서 신경생장촉진제 및 항암제등 생리활성물질이 풍부히 함유되어 있는 것이 밝혀져 이를 이용한 노인성 치매치료의 여러 가지의 중요한 생약성분 및 건강식품이 개발될 가능성이 크다. 따라서 장래성이 큰 고소득 작목으로 전망되므로 농민에게 보급할 재배 기술개발이 매우 필요하다.

### 1. 연구개발의 필요성

가. 기술적측면 : 본 버섯은 깊은산에서 채집을 주로 하였으나 1980년대에 들어서 상하이 농업과학원에서 인공재배를 성공한 이래 중국 및 일본에서는 원목재배, 병재배 및 봉지재배로 대량재배를 시도하고 있다. 이와 같이 본버섯의 인공재배 역사가 길지 않으므로 세계적으로 재배면적 및 생산량이 매우 적다. 우리나라에서는 1996년 농촌진흥청 응용미생물과에서 재배의 기초방안을 수립하였다. 그러나 농민에게 보급하지 못하고 있는 실정이다. 본 버섯을 실용화하기 위해서

는 다음과 같은 기초연구가 필수적이다.

1) 우량 다수확균주의 선발 2) 인공재배의 기질개발 3) 종균제조법 4) 재배환경의 규명등 안정다수확의 기술이 시급히 요구되고 있다.

**나. 경제, 산업적 측면 :** 본 버섯은 고급튀김요리로 버섯전문 식당에서 고가로 팔리고 있다. 국내산은 가을에 강원도에서 야생으로 채취하여 시장에서 판매가 되기는 하지만 그 채취량이 매우 적어서 가격이 형성되지 못하여 1kg당 30만원 이상으로서 송이버섯보다도 더 비싸며, 구하기도 어렵다. 따라서 국내 소비의 전량이 중국에서 건조된 상태로 수입되고 있다.

우리나라 버섯산업은 그 폐쇄성이 매우 강하며 새로운 버섯의 재배법이 농민에게는 보급이 매우 더디며 일부 약삭빠른 자들이 일본등에서 기술을 도입하여 폭리를 취한다. 특히 약용버섯은 국내의 검증도 거치지 않고 항암 효과등의 효능을 과장 광고하여 소비자를 손해보게 한다. 현재 상황버섯, 아가리쿠스버섯등 항암 효과가 있다는 버섯이 1 kg당 100만원 이상씩 매우 고가로 팔린다. 그러나 그 재배기술은 농민에게 보급을 시키지 않고 특정인만의 비법으로되어 전체적인 농민에게는 혜택이 없고 소비자만 턱없이 비싼 값으로 구입하는 실정이다. 이와 같은 예는 생산초기의 영지버섯과 펭이버섯에서도 동일한 현상을 보였다.

Kawagishi(1996)는 노루궁뎅이버섯에서 nerve growth factor(NGF)를 추출하여 치매치료의 이용 가능성을 보고하였고, Mizuno(1992)는 항암효과가 높은 다당체를 보고하였다. 이와 같이 노루궁뎅이버섯은 건강 증진생약 재료로의 이용 가능성이 높다.

따라서 본 버섯의 수요는 매우 높을 전망이므로 본 버섯의 재배를 농가에 보급

하면 소득증대사업으로 가능성이 높고, 수입 대체 효과가 크다. 특히 우리나라 고유균주를 개발하므로서 앞으로 문제가 될 국제적인 외국종균 사용허가(royalty)문제도 야기시키지 않고 외국으로 수출할 수 있다고 사료되므로 본버섯의 국내자생균주의 인공 재배법을 개발하여 농민에게 보급이 시급히 요구되고 있다.

다. 사회, 문화적 측면 : 버섯은 여러 가지 생리활성 물질을 가지고 있으므로 식용 뿐만 아니라 건강식품으로 각광을 받고 있다. 본 버섯에는 nerve growth factor를 함유하고 있으므로 노인성 치매현상을 예방할수 있다는 보고가 일본과 유럽에서 발표되고 있다. 따라서 앞으로 사회문제가 될 노인의 치매방지에 중요한 기능을 할 것으로 사료된다.

특히 버섯재배산업은 미취업 노동인력을 농업으로 유치하기가 바람직하다. 그러나 일반 밭 혹은 논농사는 넓은 토지가 필요하며, 육체적인 단순작업이 요구되므로 도시생활에 적응되었던 많은 사람에게는 농사란 쉽지 않다. 그러나 노루궁뎅이버섯은 적은 재배사내에서 육체노동보다는 첨예한 기술을 요구하므로 퇴직자 혹은 정년자도 무리없이 재배할 수 있으므로 귀농을 원하는 퇴직자나 농민에게 적합한 작물로 전망이 좋다.

## 2. 국내·외 관련기술의 현황과 문제점

노루궁뎅이버섯은 우리나라에서는 옛부터 삼산에서 채취하여 식용 및 약용으로 사용되었고, 중국에서도 자연채취에 의존하였으나 상하이 농업과학원에서 본버섯의 인공재배법을 1980년대에 개발하여 그 재배면적이 증가하고 있으며 재배기질

도 다양하게 개발하고 있다. 즉, 톱밥, 사탕수수박, 목화씨껍질 및 벼집의 사용가능을 보고하였고, 일본의 Mizuno는 원목재배 뿐만 아니라, 병재배와 봉지재배도 가능한 것을 보고하였다. 우리나라에서는 농촌진흥청 응용미생물과에서 인공재배의 기초실험과 가능성을 밝혔다. 그러나 아직도 본 벼섯의 다수확 재배법의 개발이 더욱 요구되며 아직 농가에 보급이 저조하다. 현단계에서의 기술적인 문제점은 우리실정에 적합하며 저렴하고, 벼섯생산량이 많은 기질의 제조법과 노루궁뎅이벼섯의 생산에 적합한 재배환경의 규명이며, 아울러 대수확 균주의 선발이다. 본 연구실에서 지난 3년에 걸친 우리나라 노루궁뎅이벼섯 국내균주의 수집과 수집균주를 바탕으로 영양생리학적 연구를 실시하여 생장환경에 관한 기초조사를 하였다. 이와같은 실험실내의 결과를 기본으로 우리나라 실정에 맞는 기질개발과 재배방법의 규명을 하여 기술개발을 시도하고자 한다. 또한 Kawagishi(1996)는 노루궁뎅이벼섯에서 nerve growth factor(NGF)를 추출하여 치매치료로의 이용 가능성을 보고하였고, Mizuno(1992)는 항암효과가 높은 다당체를 보고하였다. 이와 같이 노루궁뎅이벼섯은 건강 증진생약 재료로의 이용 가능성도 높으며 국내자생 균주로부터 새로운 생리활성 물질을 탐색과 구조를 규명하고자 하며 국내나 외국에서도 아직까지 노루궁뎅이의 분자생물학적인 계통분류와 노루궁뎅이 속간만을 동정할 수 있는 probe개발이 되어있지 않기에 본 실험을 통하여 새로운 동정기법을 개발하고자 하였다.

### 3. 앞으로 전망

국가의 21세기의 중점사업의 하나로서 뇌과학(腦科學)이 부각되고 있다. 이는 앞으로 노인성 치매현상에 대비하고자 하며, 또한 computer의 개발에 뇌의 원리

의 응용이 새롭게 대두되기 때문이다. 벼섯류는 여러 가지 생리활성물질을 포함하고 있으므로, 생약개발에 중요소재로 각광을 받고 있다. 특히, 노루궁뎅이벼섯은 뇌발달에 중요한 영향을 미치는 nerve growth factor(NGF)가 풍부히 들어있어 뇌기능의 감퇴방지 및 뇌발달에 중요한 생리활성물질의 공급원으로 인식되어 노루궁뎅이벼섯은 단순한 식품의 범위를 넘어 생리활성물질의 자원으로 수요가 많으리라고 예상된다. 따라서 노루궁뎅이벼섯은 고부가 농산물로 발전되어 농민의 소득증대에 기여하리라고 전망된다.

## 제 2 절 연구개발의 목표 및 내용

### 1. 연구개발 목표와 내용

고부가가치를 창출할 수 있는 노루궁뎅이벼섯의 재배기술의 개발과 재배환경의 규명으로 노루궁뎅이벼섯의 인공대량재배법을 개발하여 식용으로 뿐만 아니라 생약의 자원으로 활용케하여 농민의 고소득작물로의 발전을 목표로 한다.

본 연구과제의 개발 내용은 아래와 같다.

가. 다수성 우량균주의 선발 : 본 연구실에는 4년 간에 걸쳐 강원도 오대산일대에서 수집한 6개균주와 외국균주 1개균주등 7개외에 농촌진흥청 응용미생물과에서 분양받은 3개의 균주등 총 10개 균주를 보유하고 있다. 또한 지속적인 균주 수집을 통해 이들간의 수량을 조사 비교하여 다수확 고품질의 계통을 선발한다.

나. 생리적 특성 조사 : 채집분리된 노루궁뎅이의 생리학적 특성을 조사하기 위하여 각 영양원별로 각 균주의 생장을 비교 실험한다. 이를 생리적 특성의 결

과를 토대로 종균제조시 사용할 최적 균주를 선별 활용한다.

**다. 분자생물학적 방법에 의한 균주분석과 비교실험** : 순수분리된 각 노루궁뎅이 균주별로 이들간의 유연관계를 분자생물학적인 방법인 ITS 영역을 sequencing하여 염기서열 분석으로 계통분류를 조사하며 이들의 공통된 부위를 찾아 새로운 동정용 probe의 유전 마커를 개발한다. 이러한 마커를 노루궁뎅이 속 벼섯의 동정에 이용한다.

**라. 기능성물질 탐색 및 생리활성물질 추출 분석시험** : 노루궁뎅이의 기능성 물질을 탐색하여 비교 분석한다. 각 기능성 관련 물질의 분석을 위하여 활성물질을 추출할 조건을 확립하여, 정제된 물질을 사용하여 항미생물성 효과 및 항종양의 물질을 탐색하고 구조분석을 하며 이들 활성물질을 대량 추출하여 약리적 시험을 실시한다.

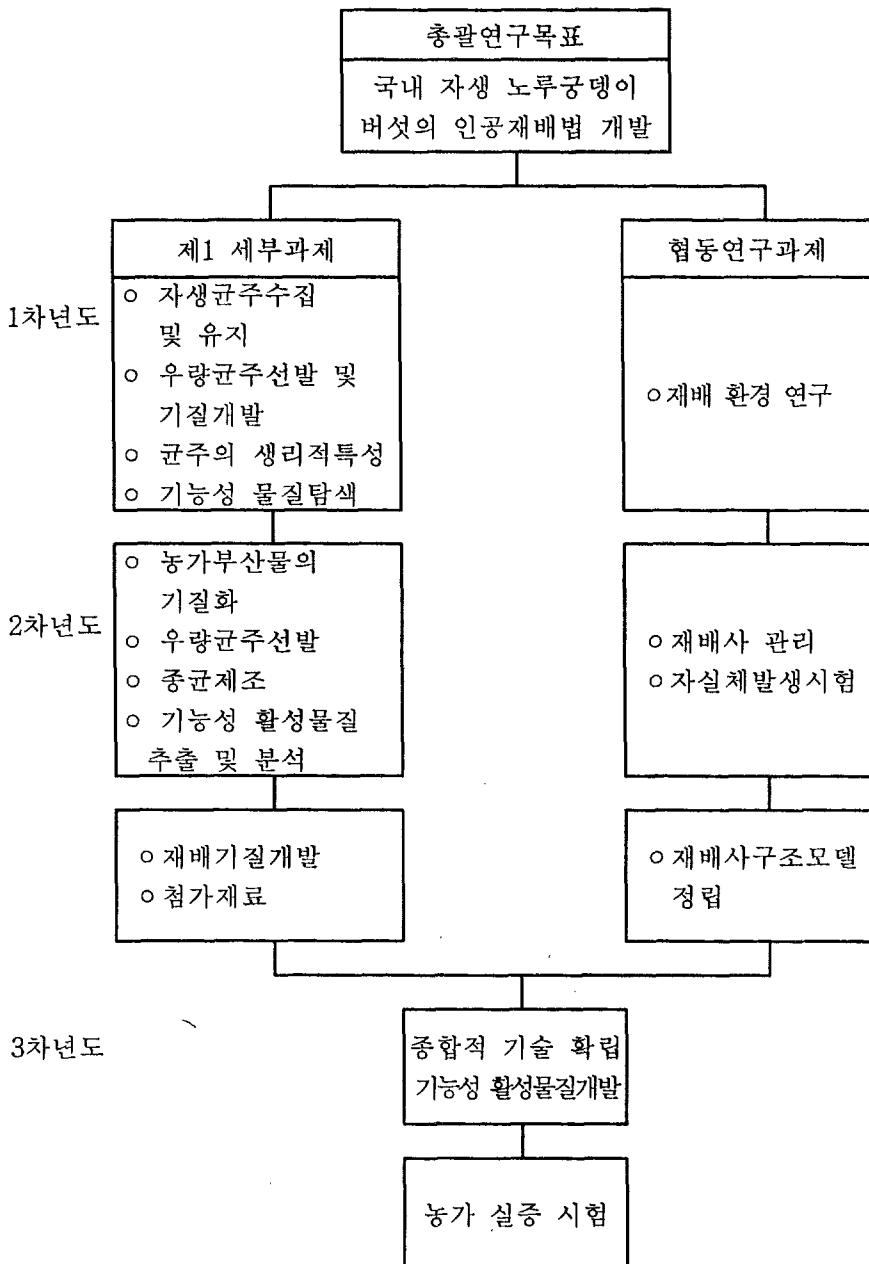
**마. 기질 개발 및 종균 제조** : 농업 및 임업의 부산물중 가격이 저렴하며 구입이 용이하며 계속 공급이 가능한 재료를 선발하여 이들의 처리방안을 개발하여 노루궁뎅이벼섯의 생장에 알맞는 기질로 제조한다. 즉 툽밥 종류별, 벗집, 면자각, 배추가루, 한약찌꺼기, 미강 등 기타 농가부산물에 따른 기질 개발을 통해 다수확기질로 만든다. 또한 배양기간이 짧고, 활착이 빠르고, 퇴화가 잘되지 않는 종균재료의 선발과 이들간의 혼합율을 조정하여 실용성이 높은 종균제조법을 확립 한다.

바. 재배조건 규명 : 실제 버섯재배를 하고 있는 농가를 참여시킨 현장에서 대량 실증실험을 진행하면서 병재배 및 봉지재배의 장단점을 조사하고 최적다수화의 방법을 밝히며, 군사활착기간의 최적온도와 습도, 그리고 자실체 생성기의 최적온도와 습도, 환기방식 및 수확적기를 규명한다.

## 2. 연차별 연구개발 목표와 내용

구 분	연구개발 목표	연구개발 내용 및 범위
1차년도	1. 다수화 우량균주선발 2. 생리적 특성조사 3. 기능성 물질탐색	1. 국내외 균주수집 2. 균주 순수분리 및 보관유지 3. 균주의 영양생리규명 4. 균주별 문자적 비교시험 5. 우수균주선발 6. 기능성 물질탐색시험 7. 첨가재료시험
2차년도	1. 기질개발 2. 재배환경규명 3. 버섯수확량 및 품질조사 4. 다수화재배방식규명 5. 노루궁뎅이 동정 기법개발 6. 기능활성물질 추출 및 분석	1. 종균제조 2. 농가부산물의 기질화방안 3. 기능성 활성물질 추출 및 분석 4. 균주별 버섯 수확량 및 품질 비교 5. 재배사구조 모델 정립 6. 군사 활착시 온도 및 습도 7. 문자적 특성을 이용한 새로운 동정기법 개발
3차년도	1. 종합적 기술확립 2. 대량생산체계확립 3. 농가실증시험 4. 기능성 활성물질의 구조분석	1. 자실체발생시 관리 및 환경관리 2. 1, 2년차에 걸친 연구 결과를 종합하여 단일화된 종합기술확립 3. 대량생산체계로 종합기술의 실증시험 4. 농가에서 생산 실증시험 5. 기능성 활성물질의 적용 및 구조분석

### 제 3 절 연구개발 추진체계



## 제 4 절 기대효과

### 1. 기술적 측면

노루궁뎅이버섯을 아직까지 자연에서 채취하여 왔고, 최근에 농촌진흥청 산하의 연구기관에서 재배연구를 수행중에 있으므로 아직도 농민에 의한 재배는 거의 없다시피한 실정이다. 본 연구 수행으로 다수학 우량균주가 선발될 것이며, 생리학적 특성과 재배환경을 밝혀 노루궁뎅이버섯의 대량 인공재배법이 확립될 것이다. 이와 같은 기술은 농민에게 널리 보급하여 농가 소득원으로 발전시킬 것이다.

### 2. 경제·산업적 측면

노루궁뎅이버섯은 향기가 좋고, 특특한 맛을 가지고 있어 고가의 식품으로 버섯전문식당에서만 튀김으로 판매되고 있다. 국내생산은 가을철에 자생 노루궁뎅이버섯을 채취하여 생버섯으로 판매되고 있으나 이는 인공재배가 아니므로 판매량이 매우 적고 값이 비싸서 1kg에 30만원 이상하는 송이버섯 보다도 더 비싸며 구하기도 매우 어렵다. 현재 국내 소비량의 전부를 중국에서 고가로 수입하고 있는 실정이다.

본 버섯의 생리학적 효과는 최근에 밝혀져 가고 있으므로 아직 일반화되어 있지 않으므로 생산량도 적고 수요도 많지 않다. 그러나 최근에 일본과 유럽에서 본버섯의 생리활성물질중 특히 노인성 치매를 방지할 수 있고 두뇌발달을 촉진하는 nerve growth factor(NGF)가 풍부히 함유되어 있다는 것이 밝혀지고 이들 NGF를 추출하여 특허를 출원하는등 본 버섯이 생약물질의 자원으로 중요시 되고 있다. 따라서 노루궁뎅이버섯은 먹기만 하여도 치매의 예방효과가 있고 두뇌발달

효과를 홍보한다면 일반소비자의 식품으로의 수요와 건강식품의 원료로의 소비가 급증할것이 예상된다.

따라서 노루궁뎅이버섯 재배법을 개발하여 농민에게 보급한다면, 농민 고소득작목으로 가능성이 있고, 아울러 수입대체 효과가 크리라고 예상된다. 당면한 문제는 생산가를 낮추며 단위면적당 다수확을 얻는 것이다. 따라서 가격이 저렴한 농가부산물을 활용하여 고가의 노루궁뎅이버섯을 다수확을 얻을수 있도록 하였으며, 개발된 노루궁뎅이버섯의 재배기술을 농민에게 넓게 보급하면 농민경제에 많은 도움이 될 것으로 예상된다.

## 제 5 절 활용방안

1. 일반소비자들에게 본 버섯의 NGF가 치매방지 및 두뇌발달의 효과가 있음을 홍보하여 소비를 촉진케하며, 아울러 국민 건강 증진에 도움을 주도록 한다.
2. 제약회사들이 본 버섯을 원료로 하여 치매방지제 및 두뇌발달촉진제와 관련되는 여러가지 건강보조식품의 개발에 기초 연구자료를 제공한다.
3. 본 버섯은 중국 및 일본에서 고가의 상품이므로 수출작목으로 발전시킨다.
4. 확보된 노루궁뎅이버섯 균주의 유전자원을 체계적으로 보존 관리하며 자원개발의 기초자료로 활용한다.
5. 이와 같이 활용 전망이 밝은 사업이므로 노루궁뎅이버섯의 재배방법을 개발

하여 농촌지도소 및 독농가를 통하여 농민에게 보급하여 농촌소득 증대사업으로  
발전시킨다.

6. 노루궁뎅이버섯에 대한 생리활성 물질의 탐색으로 의약 및 제약사업의 산업  
적 이용에 관한 방안을 도출한다.

## 제 2 장 균주 확보

### 제 1 절 서론

노루궁뎅이 [*Hericium erinaceum* (Bull.: Fr.) Per.] 는 분류학적으로 담자균강, 민주름목, 노루궁뎅이과에 속하는 식용버섯이다. 오래전부터 식용 및 약용버섯으로 이용되어 왔으며 가을철 활엽수의 고목이나 생목에서 발생하는 버섯으로 중국에서는 후두균(猴頭菌), 영명으로 Monkeyhead mushroom 이라고 칭하고 있으며 일본에서는 Yamabushitake로 불려지고 있다(차 등, 1989 ; Chang and Miles, 1989).

버섯의 자실체는 10~25cm로 초기에는 난형, 반구형이나 점차 성장하면서 향지 성의 수많은 수염모양(spines)의 긴 돌기(2~6cm)가 생기며, 완전히 성장하면 길이가 10~25cm, 폭이 10~25cm가 되고 윗면에는 짧은 털이 밀포되어 전체가 백색이나 후에 담황색, 옅은 황토색으로 조직이 유연하며 무색이고 포자도 색택이 무색이며 반원형의 형태로 편평하고 6~7 $\mu$ m정도의 크기이다(김 등, 1990).

최근에 일본과 유럽에서 본 버섯의 균사와 자실체에서 생리활성물질중 특히 노인성 치매를 방지할 수 있고 두뇌발달을 촉진하는 nerve growth factor(NGF)가 풍부히 함유되어 있다는 것이 밝혀지고 이들 NGF를 추출하여 특허를 출원하는 등 본버섯이 생약물질의 자원으로 중요시 되고 있다(Aronone et al., 1994 ; Kuwahara et al., 1990 ; Kimura et al., 1991 ; Kuwahara et al., 1992). Yang et al.(1989)은 *H. erinaceum*의 약효가 신체의 면역체계를 강화시키고 위궤양, 심이지장궤양, 만성장염 및 위암, 식도암의 치료에도 효과적이라고 보고하였다. Ahn(1992)은 한국산 약용 버섯을 조사하면서 *H. erinaceum*이 항암 및 면역기능

을 촉진시키며 임상치료에서 위궤양, 만성위염, 신경쇠약, 소화불량, 신체허약, 만성위축성위염, 위암, 식도암에 효능을 보고하였다. 또한 Mizuno(1995)는 노루궁뎅이가 고급요리 및 건강증진식품으로 손색이 없으며 의학적으로도 매우 잠재성이 높은 벼섯이라고 기술하였다. Kawagishi *et al.*(1996)은 노루궁뎅이에서 생리활성물질을 추출하여 구조를 밝혀냈으며 그 물질은 nerve growth factor(NGF)로 중추 신경 재생과 치매 치료제로써의 이용가능성을 보고하였다.

본 연구로서 지금까지 확보한 균주 수는 직접 채취한 7균주, 국내에서 분양 받은 5 균주, 외국에서 분양 받은 6균주로 하여 총 18종의 균주를 확보하였다. 국내 균주에 대한 우량 균주 선발실험을 통하여 외국균주와의 자실체 재배조건, 수량, 품질, 재배조건등의 결과를 비교 분석한 토대로 우량균주를 선발하고자 하였다. 국내에서 수집한 균주는 오대산, 용문산, 농업과학기술원, 산림조합중앙회에서 직접 채취 및 분양받아서 총 12개의 균주를 확보하였으며 외국에서 6균주를 도입하였다. 지속적인 계대배양 및 자실체를 발이시켰으며 균사 길이 생장이 빠르고 자실체도 많이 생산하면서 병에 강한 균주를 선발하였다. 야생 수집균주의 명칭은 *Hericium erinaceum* KU-1, KU-2, KU-3, KU-7, KU-8, KU-9, KU-10으로 명명되었다.

앞으로 세계화 추세는 국제식물신품종보호연맹(UPOV)의 협약으로 우리나라가 UPOV에 가입되면 품종보호대상식물의 연차적으로 확대하여 가입 후 10년부터는 품종보호대상이 모든 식물로 확대될 것으로 예상된다. 품종보호대상작물을 확대 지정하기 위해서는 품종개발의 국제 경쟁력, 농가에 미치는 영향, 신품종개발 촉진효과 및 농작물 생산 및 수출 등 국내외 관계를 고려하여야 하며 유전자원의 보호 등도 검토되어져야 한다. 이러한 현실적인 대책과 상황에 부응하기 위해

서 보다 자국의 고유 품종을 육성 보호함으로써 우수한 육종재료 및 유전자원의 확보차원에서 매우 의미가 깊다.

## 제 2 절 재료 및 방법

### 1. 균주 확보

#### 가. 국내 야생균주 입수

국내 야생균주는 총 7개 균주가 채집되어 보관중에 있으며 실험 목적 및 방법에 알맞게 배양시켜 사용하였다. 1997년 9월 오대산에서 채집한 노루궁뎅이버섯을 조직배양 및 동정하였으며(Fig. 2-1), 1998년 10월 오대산과 용문산에서 새로 이 채집, 동정한 노루궁뎅이버섯도 분리 동정하였다. (Table 2-1)

#### 나. 국내 보관균주 입수

국내 보관균주 입수는 총 6개 균주로 농업과학기술원 응용미생물과로부터 3개 균주 *Hericium erinaceum* 48001, *H. erinaceum* 48002, *H. erinaceum* 48006을 분양받았으며, 산림조합중앙회 임산미생물사업소에서 *H. erinaceum* F01, *H. erinaceum* F02 2개 균주를, Institute of Microbiology Seoul National University(IMSNU)에서 *H. coralloides* 1 개 균주를 분양받았다. (Table 2-1)

#### 다. 외국 입수균주

외국으로부터 분양되어진 균주는 총 5개 균주로써 외국 균주 보존소에 의뢰하여 노루궁뎅이속의 균주를 구입하였다. Centraalbureau voor Schimmelcultures,



Fig. 2-1. The sporophore of *Hericium erinaceum* in the field located in Odae-mountain, Kangwon-Do, Korea.

Table 2-1. *Hericium* spp. list in this study.

No.	Species	Origin of geology	Culture Code <sup>A</sup>
1	<i>Hericium erinaceum</i>	Korea	KU-1
2	<i>Hericium erinaceum</i>	Korea	KU-2
3	<i>Hericium erinaceum</i>	Korea	KU-3
4	<i>Hericium erinaceum</i>	Korea	KU-7
5	<i>Hericium erinaceum</i>	Korea	KU-8
6	<i>Hericium erinaceum</i>	Korea	KU-9
7	<i>Hericium erinaceum</i>	Korea	KU-10
8	<i>Hericium erinaceum</i>	Korea	NIAST 48001
9	<i>Hericium erinaceum</i>	Korea	NIAST 48002
10	<i>Hericium erinaceum</i>	Korea	NIAST 48006
11	<i>Hericium erinaceum</i>	Malaysia	NFCF F01
12	<i>Hericium erinaceum</i>	Malaysia	NFCF F02
13	<i>Hericium abietis</i>	U.S.A	CBS 243.48
14	<i>Hericium alpestre</i>	Switzerland	CBS 539.90
15	<i>Hericium americanum</i>	U.S.A	CBS 493.63
16	<i>Hericium coralloides</i>	Austria	IMSNU 31007
17	<i>Hericium erinaceus</i>	France	CBS 485.95
18	<i>Hericium laciniatum</i>	Canada	ATCC 52480

<sup>A</sup>KU = Korea university

CBS = Centraalbureau voor Schimmelcultures, Baarn, The Netherlands

IMSNU = Institute of Microbiology Seoul National University

ATCC = American Type Culture Collection, Rockville, MD

NIAST = National Institute of Agricultural Science and Technology

NFCF = National Forestry Cooperatives Federation

Baarn, The Netherlands(CBS)에서 4개 균주 *Hericium abietis*, *H. alpestre*, *H. americanum*, *H. erinaceus*를 구입하였고, American Type Culture Collection, Rockvil, MD(ATCC)에서 *H. laciniatum* 1개 균주를 분양받았다. (Table 2-1)

## 2. 배양

보관배지는 PDA배지를 이용하여 25°C 항온기에서 군사활착이 완료된 후 4°C로 보관하였다. 실험목적에 따라서 Malt extract 2%, agar 2%의 MEA배지에 배양하였으며 종균제조시 참나무 텁밥 80%, 미강 20%의 텁밥배지를 이용하였다.

## 3. 현미경 관찰

### 가. 군사 분리

입수된 균주는 한천배지에서 자란 개개의 군사를 광학현미경을 통하여 담자균류의 대표적 특징인 꺽쇠(clamp connection)를 관찰하였으며 생장 형태를 조사하였다.

### 나. 자실체 관찰

분리한 균주를 참나무 텁밥배지(참나무톱밥 80%, 미강 2%)에 접종하여 수확한 자실체를 관찰하였고 살균한 샤알레 위에서 포자지문법으로 분리하여 형태를 광학현미경으로 관찰하였다.

## 제 3 절 결과 및 고찰

### 1. 균주 확보

국내 야생균주는 총 7개 균주가 채집되었으며, 1997년 9월 오대산에서 채집한

노루궁뎅이버섯을 조직배양 및 동정하여 *Hericium erinaceum* KU-1, KU-2, KU-3으로 명명하였고(Fig. 2-1), 1998년 10월 오대산과 용문산에서 새로이 채집, 동정한 노루궁뎅이버섯을 *Hericium erinaceum* KU-7, KU-8, KU-9, KU-10으로 명명하였다. (Table 2-1)

국내 보관균주 입수는 총 6개 균주로 농업과학기술원 응용미생물과로부터 3개 균주 *Hericium erinaceum* 48001, *H. erinaceum* 48002, *H. erinaceum* 48006을 분양받았으며, 산림조합중앙회 임산미생물사업소에서 *H. erinaceum* F01, *H. erinaceum* F02 2개 균주를, Institute of Microbiology Seoul National University(IMSNU)에서 *H. coralloides* 1 개 균주를 분양받았다. 산림조합중앙회에서 보관하고 있던 2개 균주는 원산지가 말레이시아라는 정보를 얻었다. 외국으로부터 분양되어진 균주는 총 5개 균주로써 외국 균주 보존소에 의뢰하여 노루궁뎅이속의 균주를 구입하였다. Centraalbureau voor Schimmelcultures, Baarn, The Netherlands(CBS)에서 4개 균주 *Hericium abietis*, *H. alpestre*, *H. americanum*, *H. erinaceus*를 구입하였고, American Type Culture Collection, Rockvil, MD(ATCC)에서 *H. laciniatum* 1개 균주를 분양받았다. Table 2-1에서 보는바와 같이 지역적인 유래를 살펴보면 국내산 노루궁뎅이버섯 균주는 10개이었으며, 외국산은 8개 균주로 확인 되었다.

입수된 균주중 *H. erinaceum*의 strain은 13종 확보되었으며 *Hericium* spp.에 속한 종은 *Hericium abietis*, *H. alpestre*, *H. americanum*, *H. laciniatum*, *H. coralloides*로 5개 균주가 확보되었다. 추후 계통분류 및 *Hericium*-specific primer의 동정기법에도 유용하게 사용될 수 있었다.

## 2. 현미경 관찰

입수된 균주는 한천배지에서 자란 개개의 균사를 광학현미경을 통하여 담자균류의 대표적특징인 꺽쇠(clamp connection)를 *Hericium* spp.의 모든 균주에서 발견할 수 있었다. 분리한 균주를 참나무 텁밥배지(참나무톱밥 80%, 미강 20%)에 접종하여 수확한 자실체를 관찰한 결과, 대부분의 균주에서 자실체 모양을 관찰할 수 있었으나, *H. alpestre*, *H. laciniatum*, *H. erinaceum* F02의 균주에서는 자실체를 관찰할 수 없었다. 평판배지에서는 대체적으로 균사생장이 이루어지고 있었으나 자실체의 유도가 이루어지지 않았다. 또한 특이하게도 *Hericium abietis*의 경우 4°C의 저온에서 3개월정도 장기간 저장시에 자실체가 형성되는 현상을 관찰하였다. 낮은 온도에서만 자실체가 유도되었지만 경제적 효율성은 낮게 평가되었다. 본 실험의 결과를 바탕으로 대량재배의 기초자료로 이용될 수 있었다.

## 참고문헌

- Ahn, D. K. 1992. Medicinal fungi in Korea. *Kor. J. Mycol.* 20:154-165.
- Aronone, A., R. Cardillo., G. Nasini and O. V. de Pava. 1994. Secondary mold metabolites:Part 46. Hericines A-C and erinapyrone C, new metabolites produced by the fungus *Hericium erinaceus*. *J. Nat. Prod.* 57:602-606.
- Chang, S. H. and P. G. Miles. 1989. Edible Mushroom and Their Cultivation. CRC Press. pp. 120, 307-312.
- Kawagishi, H., A. Shimada., R. Shirai., K. Okamoto., F. Ojima., H. Sakamoto., Y. Ishiguro and S. Furukawa. 1994. Erinacines A, B and C, strong stimulators of nerve growth factor(NGF)-synthesis, from the mycelia of *Hericium erinaceum*. *Tetrahedron Letters* 35:1569-1572.
- Kawagishi, H., Shimata, A., Hosokawa, S., Mori, H., Sakamoto, H., Ishiguro, Y., Sakemi, S., Bodner, J., Kojima, N. and Furukawa, S. 1996. Erinacines E, F and G, stimulators of Nerve Growth Factor (NGF)-synthesis, from the mycelia of *Hericium erinaceum*. *Tetrahedron Lett.*, 37: 7399-7402.
- Kawagishi, H., Shimada, A., Shizuki, K., Mori, H., Okamoto, K., Sakamoto, H. and Furukawa, S. 1996. Erinacine D, A stimulator of NGF-synthesis, from the mycelia of *Hericium erinaceum*. *Heterocyclic Communications* 2:51-54
- Kimura, Y., Nishibe, M., Nakajimak, H., Hamasaki, T., Shimada, A., Tsuneda, A. and Shimatsu, N. 1991. Hericerin, a new pollen growth inhibitor from the mushroom *Hericium erinaceum*. *Mol. Plant Microbe Interactions, Agric. Biol. Chm.*, 55(10):2673-2675.
- Kuwahara, S., Morihiro, E., Nemoto, A. and Hiramatsu, A. 1992. Synthesis and absolute configuration of a cytotoxic fatty acid isolated from the

mushroom *Hericium erinaceum*. *Biosci. Biotech. Biochem.*, 56(9): 1417-1419.

Mizuno, T., T. Wasa., H. Ito., C. Suzuki and N. Ukai. 1992. Antitumor-active Polysaccharides isolated from the fruiting body of *Hericium erinaceum*, an edible and medicinal mushroom called *yamabushitake* or *houtou*. *Biosci. Biotech. Biochem.* 56:347-348.

Mizuno, T. 1995. Yamabushitake, *Hericium erinaceum*: Bioactive substances and medicinal utilization. *Food Reviews International* 11:173-178.

Yang, Q. Y. and S. C. Jong. 1989. Medicinal mushrooms in China. *Mush Sci.* 12(part1):631-643.

차동열, 유창현, 김광포. 1989. 최신 버섯재배기술. 상록사. 수원. pp 378-389.

김삼순, 김양섭. 1990. 한국산버섯도감. 유풍출판사. 서울. p 263.

## 제 3 장 생리학적 특성

### 제 1 절 서론

버섯은 종속영양 생물에 속하기 때문에 각종 영양원을 균사체 외부에서 흡수하여 생장하여야 한다. 그러므로 버섯을 재배하는데 적절한 영양원의 선택과 그 영양원의 구성성분이 무엇으로 되어 있는가에 따라서 버섯의 생산에 밀접한 영향을 미칠 수 밖에 없다. 또한 균주와 배지의 조건이 적합하다고 하여도 외부의 물리화학적 환경조건이 버섯의 생육에 중대한 피해를 가져 올 수 있다. 따라서 버섯의 생장은 탄소원, 질소원등 여러 가지 복합적인 영양조건과 온도, 습도, pH, C/N율등과 같이 배양에 알맞은 환경조건을 조사하여 균주에 알맞은 생리적인 특성을 규명해야 한다.

여러 버섯의 균사생장에 요구되는 영양생리를 밝히는데 Fraser and Fujikawa(1958)는 양송이에서 아미노산 종류에 따라 버섯생장의 촉진효과를 보고하였으며 Song *et al.*(1987)은 *Lentinus edodes*에서 aspartic acid가 최적이라고 보고하였다. 또한 Park *et al.*(1995)은 *Pleurotus* spp.는 starch, dextrin에서 균사생장이 최대치를 보였다고 발표하였고, 잣버섯(*Lentinus lepideus*)의 경우 액체배양시 최적 탄소원으로써 galactose에서 가장 많은 균사체를 얻었으며 복합 질소원중 peptone이 우수하였다고 보고하였다(김 등, 1994). Aronone *et al.*(1994)은 *H. erinaceum*의 균사를 수확하기 위하여 corn barn 또는 MPGA(malt extract peptone glucose agar)배지를 이용하였다고 보고하였다. 이와같이 버섯의 종류에 따라 영양원의 요구조건이 다르다.

한편 느타리 균사생장은 약산성(pH 5.5~6.5)을 선호하는 반면

*Flammulina velutipes*은 pH 4.0~8.0이며 Park et al.(1992)은 *Lentinus edodes*의 최적산도가 4.0~4.5이라고 보고하였고, Sohi et al.(1989)은 *Pleurotus* species의 균사생장 최적온도를 측정한 바, *P. sajor-caju*, *P. ostreatus*, *P. sapidus*, *P. florida*은 25~30°C가 최적온도이었다. 또한 Chi et al.(1996)은 *Phellinus linteus*의 최적온도도 이들과 동일하게 보고하였다. 이와같이 버섯의 종류에 따라 선호하는 영양원이나 환경적인 조건이 서로 상이한 결과를 보여주고 있다.

본 실험에서는 노루궁뎅이버섯의 온도, 산도, C/N율과 각종 영양원의 요구조건을 알아보기 위한 생리적 특성을 조사하였다.

## 제 2 절 재료 및 방법

### 1. 온도 및 pH

#### 가. 온도

Petri dish(90mm)내의 PDA배지에 균사(직경 8mm)를 접종 후 4°C, 15°C, 25°C, 37°C의 배양기에서 20일동안 배양한 후 colony 반경의 균사생장길이와 균사밀도를 측정하였다.

#### 나. pH

Potato dextrose broth(PDB)배지를 멸균전에 1N HCl과 1N NaOH로 pH를 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9로 교정후 250ml 삼각플라스크에 100ml씩 분주한 후 균사(직경 8mm)를 접종하였다. 25°C의 진탕배양기에서 15일동안 배양한 후 filter paper(Whatman No. 2)로 걸러서 균사체를 수확하여 80°C dry oven에서 24시간

동안 건조시킨 다음 각각의 균체무게를 측정하였다.

## 2. 영양원

### 가. 탄소원 선발

기본배지는 Park배지(Table 3-1)를 이용하였다. 질소원을 ammonium nitrate로 하고, starch를 제거 후 탄소원을 salicin, lactose, glycerol, D-ribose, D-mannose, arabinose, cellobiose, D-maltose, D-xylose, adonitol, D-fructose, D-galactose, D-glucose, mannitol, sucrose, D-sorbitol, dextrin, starch의 18종을 각각 100mM 씩 첨가하였고 산도는 phosphate buffer를 이용하여 pH 4.5로 조정하였으며 20일 간 배양 후 균사생장 및 균사밀도를 측정하였다.

### 나. 무기태질소원 선발

기본배지에 탄소원을 glucose로 하고 arginine과 ammonium tartrate를 제거 후 질소원을 ammonium acetate, ammonium oxalate, ammonium phosphate, ammonium molybdate, ammonium bicarbonate, ammonium nitrate, ammonium sulfate, ammonium tartrate, sodium nitrate, potassium nitrate, urea의 11종의 무기태질소원을 각각 20mM 첨가하였고 산도는 phosphate buffer를 이용하여 pH 4.5로 조정하였다. 10일간 배양 후 균사생장 및 균사밀도를 측정하였다. 가장 생장이 우수하여 선발된 질소원의 농도를 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40mM로 조절한 후 동일한 방법으로 균사를 배양, 측정하여 최적농도를 알아보았다.

Table 3-1. Composition of Park medium.

Chemicals	Amounts(g)
Starch	15.0
CaCO <sub>3</sub>	0.314
Arginine	3.484
Ammonium tartrate	3.06
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	8.766
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1.584
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	1.5
FeSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0.02
ZnSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0.03
MnSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0.02
Agar	20.0
Water	1 liter

#### 다. 아미노산원 선발

기본배지에 탄소원을 glucose로 하고 arginine과 ammonium tartrate를 제거 후 아미노산을 DL-phenylalanine, L-valine, DL-leucine, L-proline, DL-tryptophan, DL-threonine, L-cysteine, DL-alanine, glycine, L-asparagine, L-aspartic acid, L-serine, L-arginine, L-glutamine의 14종의 아미노산을 각각 20mM 첨가하였고 pH는 phosphate buffer를 이용하여 pH 4.5로 교정하였다. 10일간 배양 후 균사생장 및 균사밀도를 측정하였다. 가장 생장이 우수하여 선발된 질소원의 농도를 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40mM로 조절한 후 동일한 방법으로 균사를 배양, 측정하여 최적농도를 알아보았다.

#### 라. C/N율

기본배지에서 질소원을 ammonium acetate로 고정하고 탄소원 glucose의 함량을 조절하여 C/N율을 10, 50, 100, 200, 400, 800로 조정 후 20일간 배양하여 균사생장 및 균사밀도를 기록하였다.

### 3. 배양기별 비교

상기 실험으로 가장 우수하였던 영양원과 배양조건을 조합하여 새로운 배양기를 만들었다. 이 새로운 배양기와 기존 배지인 YMA(Yeast malt extract agar), Park medium, PDA, MEA(Malt extract agar), CDA(Czapek-dox agar), MLM(Macaya-Lizano medium), YEA(Yeast extract agar)에 균사를 접종하여 10일간 배양한 후 균사생장 및 균사밀도를 배양기별로 비교하였다.

#### 4. 조직 배양

오대산에서 채집하여 분리, 동정한 *Hericium erinaceum* KU-7, 8, 9의 조직을 멸균된 칼로 가로, 세로, 높이 2mm의 크기로 자른 후, MEA배지(Malt extract agar), PDA배지(Potato dextrose agar), Ko배지에 각각 옮겨 놓고, 25°C 항온기에 서 10일간 배양하여 균사생장과 균사밀도를 측정하였으며 배양기별로 비교하였다.

#### 5. 시약

Soluble starch, ammonium tartrate 및 arginine 등의 기본적인 시약들은 Sigma Chemical Co. 제품을 사용하였고, 그밖의 시약은 일급이상의 분석용 시약을 사용하였다.

### 제 3 절 결과 및 고찰

#### 1. 온도 및 pH

4°C에서 자란 균사의 길이는 1.2mm였고, 15°C에서는 17.8mm, 25°C는 37.5mm, 37°C는 4.7mm로써 25°C에서 가장 잘 자랐다(Fig. 3-1). 균사밀도는 15°C와 37°C에서 자란 균사의 밀도가 25°C의 균사밀도보다 치밀하게 나타났다.

Sohi *et al.*(1989)은 *Pleurotus* species의 균사생장 최적온도를 측정한 바, *P. sajor-caju*, *P. ostreatus*, *P. sapidus*, *P. florida*은 25~30°C가 최적온도이었다. 또한 Chi *et al.*(1996)은 *Phellinus linteus*의 최적온도도 이들과 동일하게 보고하였다. 본 실험에서 *H. erinaceum*의 균사생장 최적

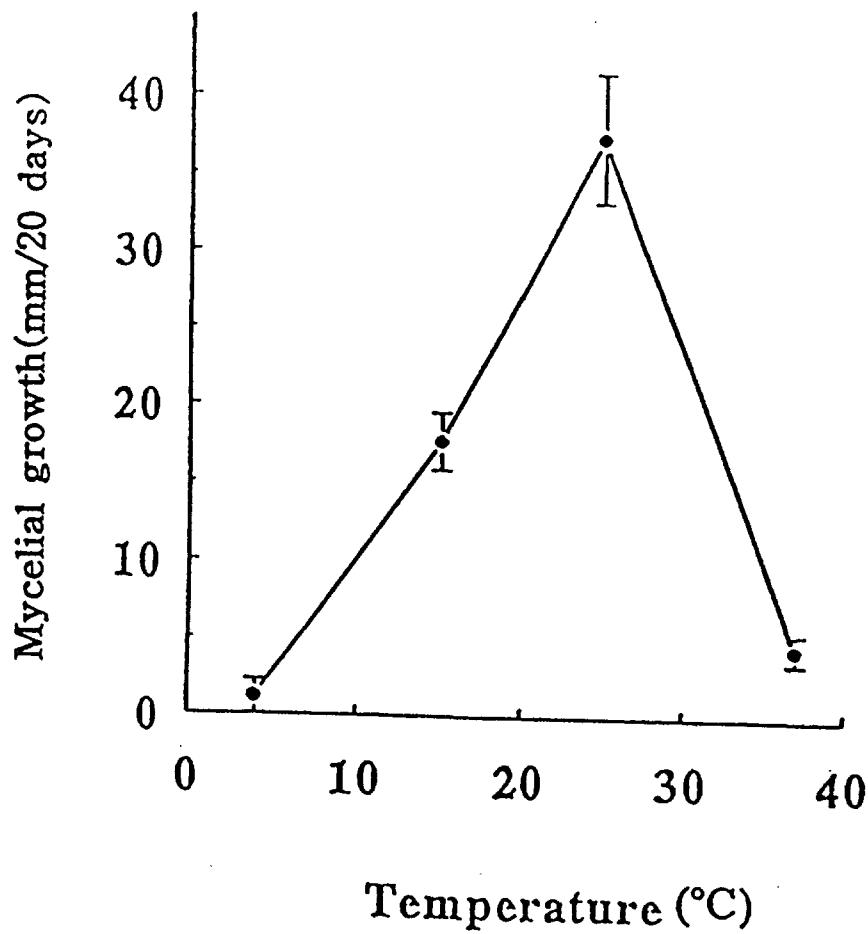


Fig. 3-1. Mycelial growth of *Hericium erinaceum* on potato dextrose agar at different temperature.

Vertical bars indicate standard deviations of means.

온도는 25°C 이었고, 4°C 와 37°C 에서 생장한 균사는 균사밀도에서 오히려 치밀하게 생장하였지만 균사생장은 극히 낮았다. 균주에 따라 최적온도는 다를수 있지만 노루궁뎅이 균사생장의 최적온도도 이들과 유사하였다. 이들은 공통으로 자연에서 자실체를 가을에 형성하는 버섯이므로 균사생육적온이 유사한 것으로 사료된다.

산도에 관한 실험은 pH 4에서 균사의 건물중이 160.5mg 으로 가장 높았고 이보다 산도가 높거나 낮은 처리구에서는 균사의 생육이 감소하였다(Fig. 3-2). 배양기의 산도는 pH 4에서 최대치의 건물중을 얻을 수 있었고, pH 3도 다음으로 많은 건물중을 수확할 수 있었다. 그러나 pH 5보다 산도가 높아지면 건물중은 낮아졌다. 이는 Chang and Miles(1989)은 노루궁뎅이 균사가 pH 2.4~5.4 범위를 선호하며 최적산도가 pH가 4라는 보고와 동일하였다. 따라서 *H. erinaceum* 균사는 산성을 선호하는 것으로 나타났고, 균사생장에 약산성(pH 5.5~6.5)을 선호하는 느타리와는 다른 결과를 보였고 *Flammulina velutipes*은 pH 4.0~8.0이며 Park et al.(1992)은 *Lentinus edodes*의 최적산도가 4.0~4.5이라고 보고하여 일반적으로 버섯은 산성배지에서 잘 자라는 것으로 나타났다.

## 2. 영양원

### 가. 탄소원 선발

18종의 탄소원 중 균사생장 및 균사밀도가 D-glucose(36.7mm), sucrose(30.8mm), D-galactose(29.0mm), D-mannose(28.5mm) 및 adonitol (28.0mm) 순으로 우수하였고, 그 외 13종의 탄소원에서는 이들보다 균사생장이

저조하였다(Table 3-2). *H. erinaceum*의 균사생장에 영향을 미치는 탄소원 중 D-glucose, sucrose, D-galactose, D-mannose, adonitol, arabinose의 순서로 균사생장이 양호하였지만, 균사밀도에서는 D-galactose, arabinose에서 낮았다. starch, dextrin의 다당류에서는 저조한 균사생장을 보였다. Kawagishi *et al.*(1996)은 노루궁뎅이 균사체를 얻기 위해 glucose, starch 및 corn steep liquor를 이용하였으며, Yoshida *et al.*(1996)은 glucose와 yeast extract를 이용하였다. 또한 Aronone *et al.*(1994)은 *H. erinaceum*의 균사를 수확하기 위하여 corn barn 또는 MPG(malt extract peptone glucose agar)배지를 이용하였다고 보고하였다. 따라서 노루궁뎅이 균사생장에 단당류인 glucose가 유용하다는 결과와 유사하였다. *Pleurotus spp.*는 starch, dextrin에서 균사생장이 최대치를 보고한 Park *et al.*(1995)의 결과와는 상이하였고, *P. ostreatus*에서 mannitol이 가장 우수한 균사생장을 보이는 최적탄소원이라는 Hong(1978)의 보고와도 다르다. 한편 *Auricularia spp.*는 균사생장에서 glucose, fructose, galactose가 최적 탄소원이라고 Quimio(1982)는 보고하였다. 이와같이 버섯 종류에 따라 선호하는 탄소원이 다르다.

#### 나. 무기태질소원 선발 및 농도결정

11종의 질소원 중 균사생장이 ammonium acetate, ammonium tartrate, ammonium sulfate의 순으로 우수하였다. ammonium acetate에서 균사생장의 길이는 35.0mm였으며, 다음으로는 ammonium tartrate에서 16.4mm였다(Table 3-3). 또한 ammonium acetate의 농도별 균사생장은 30mM에서 34.4mm로 가장

균사생장이 양호하였고 5, 10, 15, 20, 25, 35, 40mM은 각각 21.0, 23.0, 23.0, 28.4, 29.8, 30.4, 30.6mm로 30mM의 균사생장보다 낮았지만 대체적으로 ammonium acetate의 첨가는 균사생장이 우수하였다(Fig. 3-3). 무기 질소원에서는 ammonium acetate, ammonium tartrate, ammonium sulfate로 각각 35.0, 16.4, 14.1mm로 ammonium acetate에서 가장 속히 자랐다. 이는 ammonium acetate에서 자란 것이 ammonium tartrate에서 자란 것 보다 2배 이상 빨랐다. ammonium acetate의 최적농도를 알아본 결과 30mM에서 최대치를 보여주었지만 다른 농도에서도 대체적으로 균사생육이 우수하였다. 그러나 Song *et al.*(1987)은 표고의 균사생장이 ammonium acetate에서는 전혀 자라지 않았다는 보고와 Park *et al.*(1995)도 *P. ostreatus*의 균사생장이 실험한 질소원들 중 가장 미미한 생장을 보였다고 보고하였다. 이렇듯 노루궁뎅이는 ammonium acetate에서 다른 종류의 베섯과는 달리 매우 우수하였다. 한편 Kawagishi *et al.*(1994)은 노루궁뎅이 균사체를 얻기 위해 SGC medium(glucose starch corn steep liquor)을 이용하였는데 질소원으로 corn steep liquor이 이용되었고, Yoshida *et al.*(1996)은 yeast extract를 이용하였고, 또한 Aronone *et al.*(1994)은 peptone을 이용하여 균사체를 수확하였다고 보고하였다. 본 실험에서는 yeast에서 가장 균사생장이 저조하였다.

#### 다. 아미노산 선발 및 농도결정

14종의 아미노산 중 균사생장이 arginine(25.6mm), valine(16.0mm), glutamine(14.3mm)의 순으로 우수하였고, 다른 아미노산에서는 균사생장이 느렸

Table 3-2. Mycelial growth of *Hericium erinaceum* on different carbon sources in a basic medium(Park medium).

Carbohydrate (0.1M)	Radius of colony(mm)	Density of mycelium
Control	14.2±1.7 <sup>a</sup>	<sup>b</sup> +
Cellobiose	6.8±2.7	 ++
D-Sorbitol	11.5±3.5	 +
Dextrin <sup>c</sup>	13.0±2.9	 +
Salicin	16.0±0.8	 ++
D-Xylose	17.0±2.6	 ++
D-Ribose	17.0±1.7	 +++
Glycerol	17.7±1.2	 +
Lactose	18.8±3.8	 +
Starch <sup>c</sup>	19.3±2.7	 +
D-Maltose	21.3±1.8	 ++
D-Fructose	24.3±3.7	 ++
Arabinose	25.3±2.5	 +
Mannitol	25.4±2.4	 +
Adonitol	28.0±2.9	 +
D-Mannose	28.5±3.5	 +++
D-Galactose	29.0±2.1	 ++
Sucrose	30.8±2.5	 +++
D-Glucose	36.7±3.5	 +++

Density of mycelium; +: thin, ++: medium, +++: thick.

<sup>a</sup>;± SD of 5 replicates, <sup>b</sup>;Dunkun grouping, <sup>c</sup>;15g/liter.

Culture was carried out at 25°C for 20 days.

Table 3-3. Mycelial growth of *Hericium erinaceum* on different nitrogen sources in a basic medium(Park medium).

Nitrogen(20mM)	Radius of colony(mm)	Density of mycelium
Control	0.3±0.3 <sup>a</sup>	<sup>b</sup> +
Sodium nitrate	0	+ +
Ammonium molybdate	0.3±0.1	+ +
Ammonium nitrate	3.9±1.1	+ +
Potassium nitrate	4.5±0.8	++
Urea	8.2±1.9	+ +
Ammonium bicarbonate	10.3±2.5	++
Ammonium oxalate	11.0±1.8	+ +
Ammonium phosphate	13.9±1.1	+ +
Ammonium sulfate	14.1±3.5	++
Ammonium tartrate	16.4±3.1	++
Ammonium acetate	35.0±2.8	+++

Density of mycelium; +: thin, ++: medium, +++: thick.

<sup>a</sup>; ± SD of 5 replicates, <sup>b</sup>;Dunkun grouping.

Culture was carried out at 25°C for 20 days.

균사생장이 양호하였고 5, 10, 15, 20, 25, 35, 40mM은 각각 21.0, 23.0, 23.0, 28.4, 29.8, 30.4, 30.6mm로 30mM의 균사생장보다 낮았지만 대체적으로 ammonium acetate의 침가는 균사생장이 우수하였다(Fig. 3-3). 무기 질소원에서는 ammonium acetate, ammonium tartrate, ammonium sulfate로 각각 35.0, 16.4, 14.1mm로 ammonium acetate에서 가장 속히 자랐다. 이는 ammonium acetate에서 자란 것이 ammonium tartrate에서 자란 것 보다 2배 이상 빨랐다. ammonium acetate의 최적농도를 알아본 결과 30mM에서 최대치를 보여주었지만 다른 농도에서도 대체적으로 균사생육이 우수하였다. 그러나 Song *et al.*(1987)은 표고의 균사생장이 ammonium acetate에서는 전혀 자라지 않았다는 보고와 Park *et al.*(1995)도 *P. ostreatus*의 균사생장이 실험한 질소원들 중 가장 미미한 생장을 보였다고 보고하였다. 이렇듯 노루궁뎅이는 ammonium acetate에서 다른 종류의 비섯과는 달리 매우 우수하였다. 한편 Kawagishi *et al.*(1994)은 노루궁뎅이 균사체를 얻기위해 SGC medium(glucose starch corn steep liquor)을 이용하였는데 질소원으로 corn steep liquor이 이용되었고, Yoshida *et al.*(1996)은 yeast extract를 이용하였고, 또한 Aronone *et al.*(1994)은 peptone을 이용하여 균사체를 수확하였다고 보고하였다. 본 실험에서는 yeast에서 가장 균사생장이 저조하였다.

#### 나. 아미노산 선발 및 농도결정

14종의 아미노산 중 균사생장이 arginine(25.6mm), valine(16.0mm), glutamine(14.3mm)의 순으로 우수하였고, 다른 아미노산에서는 균사생장이 느렸

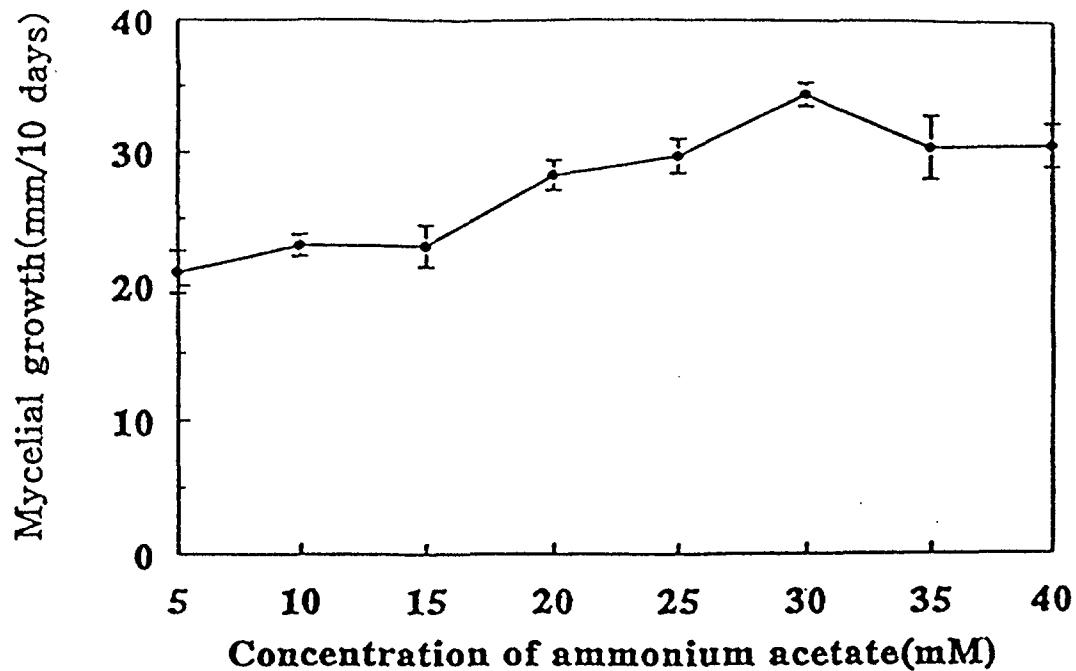


Fig. 3-3. Mycelial growth of *Hericium erinaceum* on different concentration of ammonium acetate.

Vertical bars indicate standard deviations of means.

다(Table 3-4). arginine의 농도를 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40mM로 하여 배양 하였을 때 각각 27.0, 26.6, 31.4, 22.8, 15.7, 12.4, 1.4mm로 균사생장을 하였다. arginine의 농도가 증가하면서 균사생장은 감소하였다. arginine의 균사생장 최적 농도는 15mM이었다(Fig. 3-4). 질소는 단백질 합성과 핵산의 주요 구성 성분 등 필수적인 영양원이다. *H. erinaceum*은 아미노산 중 arginine, valine, glutamine 순으로 균사생장 길이가 25.6, 16.0, 14.3mm이며 arginine에서는 valine보다도 2배정도로 균사생장 및 밀도가 월등하게 나았다. arginine의 최적 농도는 15mM 이었다. 이보다 고농도시 pH가 높아져 노루궁뎅이 균사생장이 부진하였다. arginine은 Park *et al.*(1995)의 *P. ostreatus*와 *P. sajor-caju*에서도 최적 질소원인 것과 일치하였다. Eger *et al.*(1974)은 느타리의 균사생육에 asparagine이 적합하다는 보고와 Song *et al.*(1987)은 *Lentinus edodes*에서 aspartic acid가 최적이라는 보고와는 상이하였다.

#### 라. C/N ratio

C/N을 200에서 35.9mm로 균사생장의 최대치를 보였으며 이보다 높거나 낮으면 균사생장이 느렸다(Fig. 3-5). C/N율에 대한 결과는 C/N을 200에서 균사생장 및 밀도가 최대를 보였고 다음으로 100도 우수하였다. 일반적으로 복제부후균은 최적 C/N율이 100 이상인 것과 일치된다. 그리고 Leathman(1985)은 vegetative growth와 reproductive growth간에는 C/N ratio가 다르고 사용되어진 탄소원 및 질소원에 따라서 C/N ratio가 달라질 수 있다고 하였다. 따라서 본 실험은 균사생장만을 관찰하였으므로 자체 형성에서도 동일한지 여부는 검토하여야 한다고 사료된다.

Table 3-4. Mycelial growth of *Hericium erinaceum* on different amino acids in a basic medium(Park medium).

Amino acid(20mM)	Radius of colony(mm)		Density of mycelium
Control	0.3±0.3 <sup>a</sup>	<sup>b</sup>	+
L-Cysteine	0		
DL-Tryptophan	0		
DL-Threonine	1.5±0.1	/	+
L-Proline	4.0±1.7	/	+
DL-Phenylalanine	6.9±1.1	/	+
DL-Alanine	7.9±3.5	/	+
L-Aspartic acid	9.8±3.4	/	++
L-Serine	10.2±2.5	/	++
L-Asparagine	10.4±2.4	/	+
DL-Leucine	11.8±3.5	/	++
Glycine	13.8±2.0	/	+++
L-Glutamine	14.3±2.4	/	+++
L-Valine	16.0±3.0	/	++
L-Arginine	25.6±2.0	/	+++

Density of mycelium; +: thin, ++: medium, +++: thick.

<sup>a</sup>;± SD of 5 replicates, <sup>b</sup>;Dunkun grouping.

Culture was carried out at 25°C for 20 days.

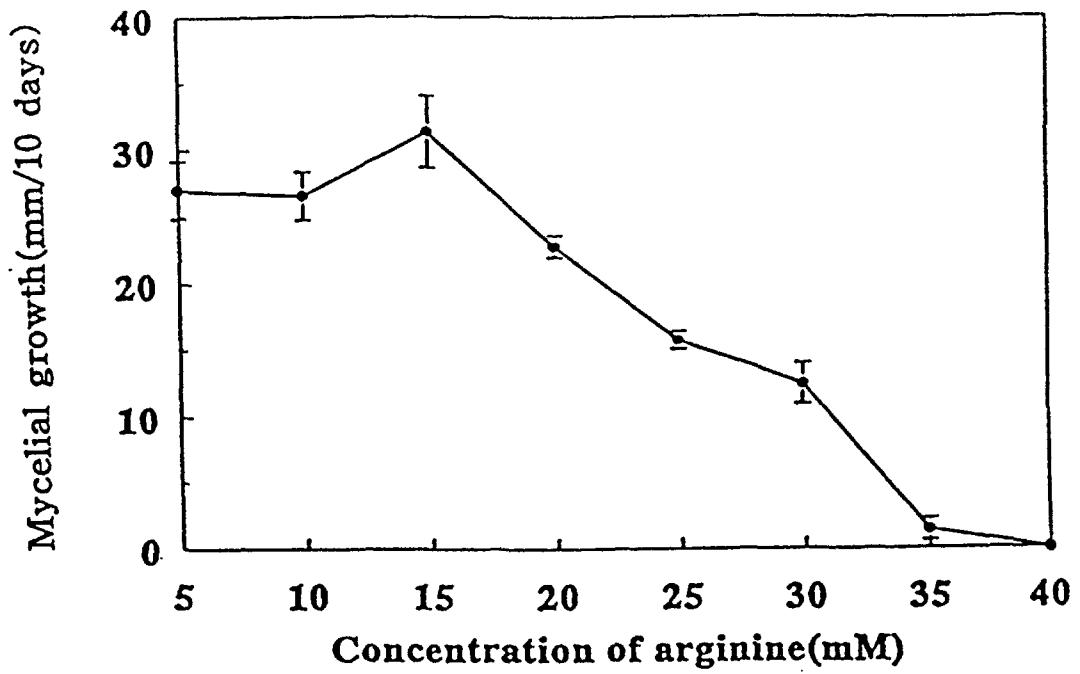


Fig. 3-4. Mycelial growth of *Hericium erinaceum* on different concentration of L-arginine.  
Vertical bars indicate standard deviations of means.

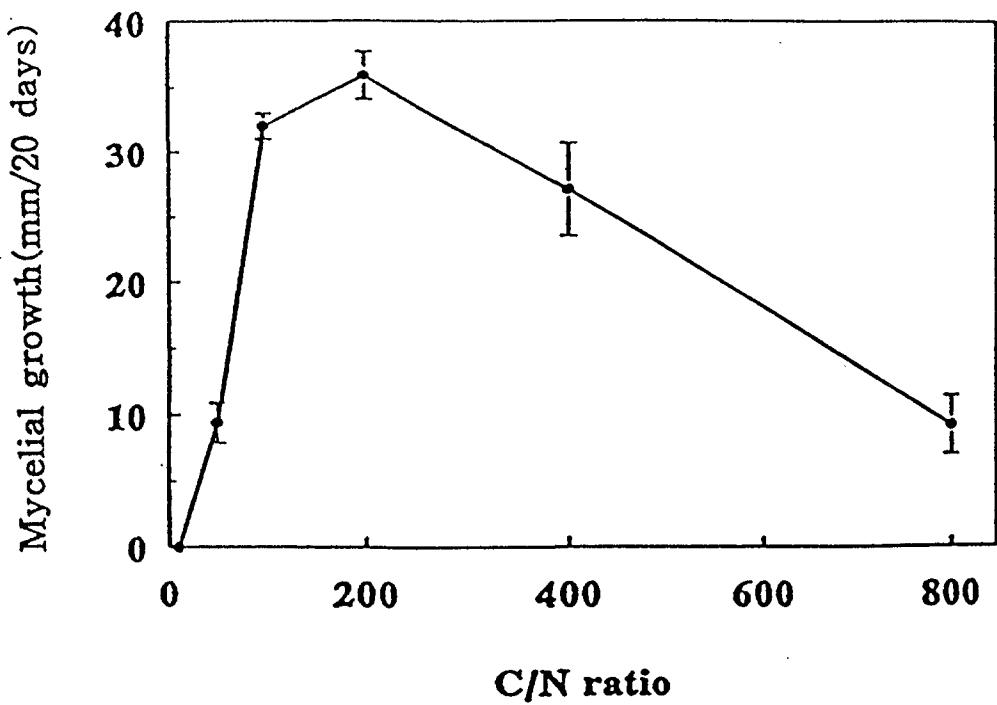


Fig. 3-5. Mycelial growth of *Hericium erinaceum* on different C/N ratio.  
Vertical bars indicate standard deviations of means.

### 3. 새로운 배양기의 비교

상술한 실험의 결과를 토대로 각 실험에서 가장 우수하였던 요인들을 종합하여 Table 3-5와 같은 새로운 합성배지를 조제할 수 있었고, 이를 Ko배지라 명명하였다. 이 Ko배지와 기존 한천배지상에서 10일간 균사배양 후 생장을 비교한 결과 Ko배지에서 33.1mm이었고 Yeast malt extract agar(YMA)배지는 25.6mm, Park 배지는 18.4mm 순으로 Ko배지에서 가장 우수한 균사생장과 균사밀도를 나타냈다(Fig. 3-6).

### 4. 조직배양

*H. erinaceum* KU-7, 8, 9 세균주의 자실체를 3종의 배양기에 조직배양하여 배양기별 균사생장을 비교하였다. *H. erinaceum* KU-7의 경우 Ko 배지에서 25.3mm, MEA배지에서 3.4mm, PDA배지는 13.5mm이었고, *H. erinaceum* KU-8은 각각의 배지에서 16.6, 3.1, 4.7mm이었으며 *H. erinaceum* KU-9는 25.3, 4.7, 10.7mm로 모두 Ko배지에서 균사생장과 균사밀도가 가장 우수하였다(Fig. 3-7, Table 3-6). 이는 야생에서 노루궁뎅이를 수집하여 보관배지 및 증식배지로 기존의 PDA배지를 대치시킬 수 있으며 앞으로 대량의 균사체를 얻기위해서는 Ko 배지가 매우 유용할 것이라 생각되었다.

Table 3-5. Composition of a synthetic medium(Ko medium) for mycelial growth of *Hericium erinaceum*.

Chemicals	Amounts(g)
Glucose	18.02
Arginine	2.613
Ammonium acetate	2.313
CaCl <sub>2</sub>	0.33
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	8.5
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	2.0
FeSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0.02
ZnSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0.02
MnSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0.02
Agar	20.0
Water	1 liter

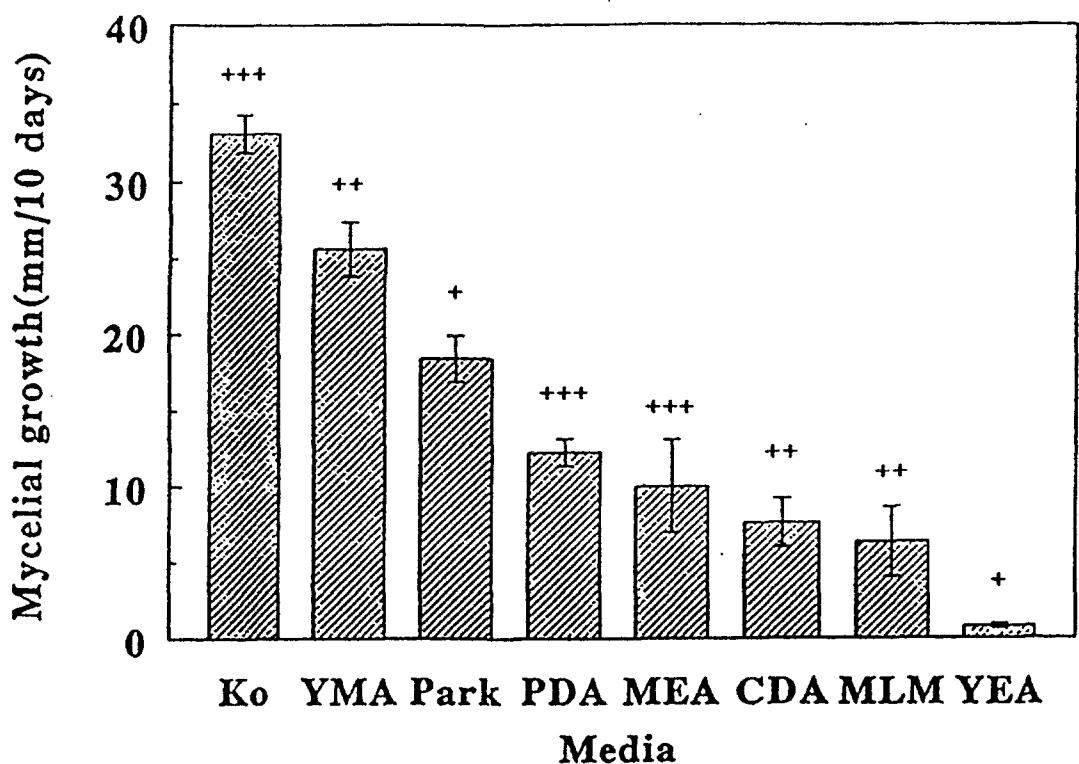


Fig. 3-6. Comparison of mycelial growth of *Hericium erinaceum* on different media.  
 Ko;Ko medium, YMA;Yeast malt extract agar, Park;Park medium,  
 PDA;Potato dextrose agar, MEA;Malt extract agar, CDA;Czapecck-dox  
 agar, MLM;Macaya-lizano medium, YEA;Yeast extract agar.  
 Mycelial density; +:thin, ++:medium, +++:thick.  
 Vertical bars indicate standard deviations of means.

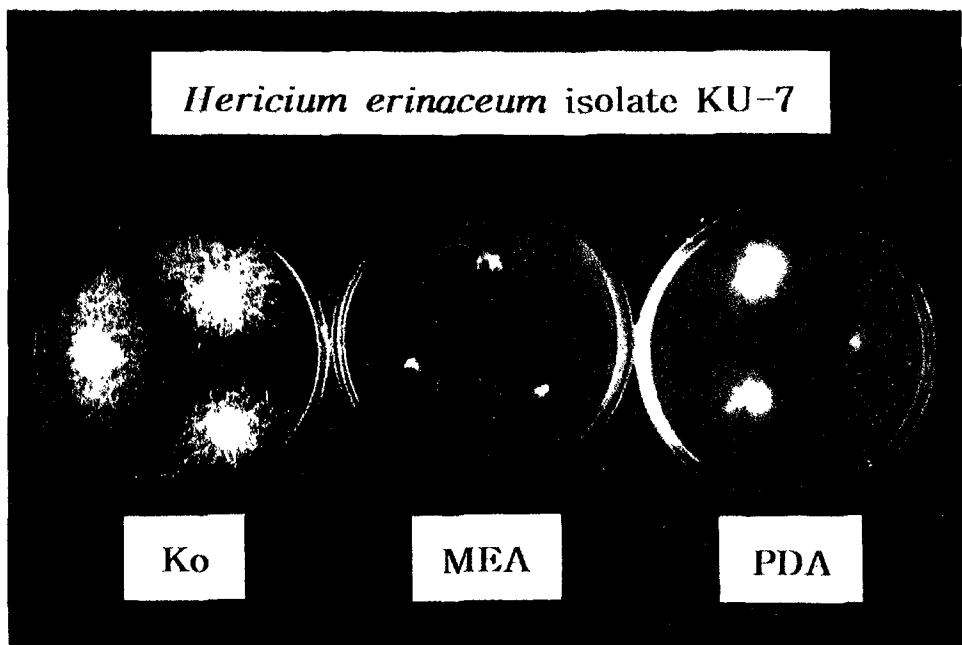


Fig. 3-7. Comparison of mycelial growth from tissue culture  
on different media(20 days old).

Ko;Ko medium, MEA;Malt extract agar,  
PDA;Potato dextrose agar.

Table 3-6. Comparison of mycelial growth of *Hericium erinaceum* from tissue culture on different media(10 days old).

Media	Radius of mycelial growth(mm)				Average
	<i>H. erinaceum</i> isolate KU-7	<i>H. erinaceum</i> isolate KU-8	<i>H. erinaceum</i> isolate KU-9		
Ko	25.3±3.2 <sup>a</sup>	16.6±2.8	15.6±2.4		19.1
MEA	3.4±1.7	3.1±1.4	4.7±3.0		3.7
PDA	13.5±4.5	4.7±1.9	10.7±3.3		9.6

Ko ; Ko medium, MEA ; Malt extract agar,  
 PDA ; Potato dextrose agar. <sup>a</sup>;±SD of 15 replicates.

## 참고문헌

- Ahn, D. K. 1992. Medicinal fungi in Korea. *Kor. J. Mycol.* 20:154-165.
- Aronone, A., R. Cardillo., G. Nasini and O. V. de Pava. 1994. Secondary mold metabolites:Part 46. Hericines A-C and erinapyrone C, new metabolites produced by the fungus *Hericium erinaceus*. *J. Nat. Prod.* 57:602-606.
- Chang, S. H. and P. G. Miles. 1989. Edible Mushroom and Their Cultivation. CRC Press. pp. 120, 307-312.
- Chi, J. H., T. M. Ha., Y. H. Kim and Y. D. Rho. 1996. Studies on the main factors affecting the mycelial growth of *Phellinus linteus*. *Kor. J. Mycol.* 24:214-222.
- Dawson, W. M. 1978. The use of cattle slurry as a mushroom compost material. *Mush. Sci.* 10:105-113.
- Eger, G., Gottward, H. D. and Netzer, U. V. 1974. The action of light and other factors on sporophore initiation in *Pleurotus ostreatus*. *Mush. Sci.* 9(part1):575-583.
- Flack, R. 1917. Über die Waldkultur des austernpilzes auf Laubholzstübben. *Z. Forest-Jagdwes.* 49:159-165.
- Fraser, I. M. and Fujikawa, B. S. 1958. The growth promoting effect of several amino acids on the common cultivated mushroom. *A. bisporus*. *Mycologia* 50:538-549.
- Hong, J. S. 1978. Studies on the physio-chemical properties and the cultivation of oyster mushroom(*Pleurotus ostreatus*). *J. Korean Agricultural Chemical Society* 21:150-184.
- Kawagishi, H., A. Shimada., R. Shirai, K. Okamoto., F. Ojima, H. Sakamoto., Y. Ishiguro and S. Furukawa. 1994. Erinacines A, B and C, strong stimulators

of nerve growth factor(NGF)-synthesis, from the mycelia of *Hericium erinaceum*. *Tetrahedron Letters* 35:1569-1572.

Kawagishi, H., A. Shimada., K. Shizuki., H. Mori., K. Okamoto., H. Sakamoto and S. Furukawa. 1996. Erinacine D, A stimulator of NGF-synthesis, from the mycelia of *Hericium erinaceum*. *Heterocyclic Communications* 2:51-54.

Khanna-Paud Garcha H. S. 1981. Introducing the cultivation of *Pleurotus florida* in the plants of india. *Mush . Sci.* 11:655-665

Kim, H. K., Park, J. S., Kim, Y. S., Cha, D. Y and Park, Y. H. 1989. Studies on artificial cultivation of *Agrocybe aegerita*(Brig) using pine sawdust substrate. *Kor. J. Mycol.* 17:124-131.

Leathman, G. F. 1985. Growth and development of *Lentinus edodes* on a chemical defined medium in "Developmental biology of higher fungi" Eds. D. Moore, L. A. Casselton, D. A. Wood and J. C. Frankland. Cambridge University press. pp. 403-427.

Liu, C. Y. 1981. Technique of cultivation of monkeyhead mushroom. *Edible Fungi*. no. 4, 33.

Martinez-Carrera P. 1989. Simple technology to cultivate *Pleurotus* on coffee pulp in the tropics. *Mush Sci.* 12:169-178

Mizuno, T., T. Wasa., H. Ito., C. Suzuki and N. Ukai. 1992. Antitumor-active Polysaccharides isolated from the fruiting body of *Hericium erinaceum*, an edible and medicinal mushroom called *yamabushitake* or *houtou*. *Biosci. Biotech. Biochem.* 56:347-348.

Mizuno, T. 1995. Yamabushitake, *Hericium erinaceum*: Bioactive substances and medicinal utilization. *Food Reviews International* 11:173-178.

Park, W. M., C. H. Song and J. W. Hyeon. 1992. Nutritional physiology and improvement of substrate of *Lentinus edodes*. *Kor. J. Mycol.* 20:77-82.

Park, W. M., G. H. Kim, and J. W. Hyeon. 1995. New synthetic medium for growth of mycelium of *Pleurotus* species. *Kor. J. Mycol.* 23:275-283.

Quimio, T. H. 1982. Physiological consideration of *Auricularia* spp. in "Tropical Mushrooms, Biological Nature and Cultivation Method" Eds. S. T.

Chang and T. H. Quimio. The Chinese University Press. Hong Kong. pp. 397-408.

Sohi, H. S. and R. C. Upadhyay. 1989. Effect of temperature on mycelial growth of *Pleurotus* species and their yield performance on selected substrates. *Mush. Sci.* 12(Part 2):49-56.

Song, C. H., K. Y. Cho and N. G. Nair. 1987. A synthetic medium for the production of submerged cultures of *Lentinus edodes*. *Mycologia* 76:866-876.

Yang, Q. Y. and S. C. Jong. 1989. Medicinal mushrooms in China. *Mush. Sci.* 12(part1):631-643.

Yoshida, H., H. Sasaki., S. Fujimoto and T. Sugahara. 1996. The chemical components in the vegetative mycelia of Basidiomycotina. *Trans. Mycol. Soc. Japan* 37:51-56.

김한경, 박정식, 차동열, 김양섭, 문병주. 1994. 잣버섯 인공 배양에 관한 연구(1)-군사 배양 조건에 관하여-. 한균지 22:145-152.

송치현, 이창호, 허태린, 안장혁, 양한철. 1993. 팽나무버섯 자실체 생산을 위한 기질개발. 한균지 21:212-216.

이상선. 1991. 전통적인 버섯배지에서 사용되는 미강의 역할. 한균지 19:47-53.

조우식, 윤영석, 박선도, 최부술. 1995. 제지부산물을 이용한 느타리버섯 자실체형 성용 염가 배지 개발. 한균지 23:197-201.

차동열, 유창현, 김광포. 1989. 최신 버섯재배기술. 상록사. 수원. pp 378-389.

## 제 4 장 분자 생물학적 분류

### 제 1 절 서론

전통적으로 버섯의 계통 분류에 형태적인 특징으로 색깔, 크기, 자실체모양, 자실체 생산과 균사 생장에 대한 온도를 참고로 하였다(Park *et al.*, 1997). 이러한 분류는 주로 형태적인 것들과 자생지에서 조사한 것들을 근거한 것인데, 최근에는 형태적 분류의 한계를 보완하는 여러 가지 방법이 소개되고 있다. 단백질의 전기 영동적 패턴 양상(Kawamura & Goto, 1980)이나 여러 효소들의 활성도, 특히 동위효소(isozyme)분석(Zervakis *et al.*, 1992; Damaj *et al.*, 1993; Fukuda & Tokimoto, 1991)과 같은 생화학적 기법들이 주로 이용되었다. 그러나 단백질의 전기영동 분석은 그 밴드수가 너무 많아 각 균주에 대한 분명한 분화를 제공해 주지 못하고(Lee *et al.*, 1997), 배지조건, 배양시기, 온도변화 등의 요인에 의해 실험결과가 다르게 나타날 수 있기에(Song *et al.*, 1996), 현재 균 분류에 주로 사용되고 있는 방법 중의 하나로 genomic DNA에서 제한효소 부위의 유무에 의해 개체간 유연관계를 밝히는 RFLP 기술이 최근에 확립되었고, DNA sequence를 증폭시키는 Polymerase Chain Reaction(PCR) 방법이 소개되었고(Khush *et al.*, 1991), PCR 방법은 동물, 식물, 미생물의 집단연구, 계통연구, 분류 등의 연구에 자주 사용되고 있다(Terashima *et al.*, 1998). 그리고 곰팡이에서 PCR이 계통 분류와 집단연구를 위해 이용되었는데(Brunns' *et al.*, 1990; Forster *et al.*, 1990; Illingworth *et al.*, 1991), Saiki(1998)가 PCR 기법을 이용하여  $\beta$ -globin의 genomic sequences를 증폭할 수 있다는 등의 연구가 보고된 후 유전자 지도 작성, 식물병원체의 신속한 동정, cDNA의 증폭을 통한 mRNA 탐색 및 발현등 생

명과학 관련 분야에서 폭넓게 이용되고 있다(Park *et al.*, 1997). 최근에는 PCR 반응으로 증폭된 DNA 길이 차이에 의해 유전적 다형성을 검출하는 방법으로 random primer를 사용하는 RAPD(Randomly Amplified Polymorphic DNAs)법은 유전자 지문(DNA fingerprinting)법이나, RFLP(Chiu *et al.*, 1993)법과는 달리 실험 절차가 간단하고 소량의 DNA만을 사용하므로 시간과 경제성에서 RFLP보다 뛰어나(Lee *et al.*, 1997) 세균, 식물, 곤충에서 다형성을 밝히는데 이용되고 있다(Welsh and Mclelland, 1990; Williams *et al.*, 1990). 특히 Williams 등(1990)이 AP-PCR에 의해 증폭된 DNA 단편들을 유전자 표지인자(DNA markers)로 사용 할 수 있다고 보고하였고, Lee *et al.*, (1997)은 한국의 대표적인 표고 품종에 대한 RAPD를 실시하여 품종간의 구분이 가능한 pattern을 보여주었다. 교배형을 결정하는데 이 방법이 대치접종과 같은 고전적인 방법보다 시간이 많이 절약되며 PCR분석에 의한 교배형 결정을 다른 자낭균류들에도 응용할수 있을 것이라고 하였다.

지난 10년 동안 담자균강 특히 버섯과 식물병원균류에 대하여 생리학적인 배양 분류나 분자생물학적인 유전정보를 이용한 계통분류에 의거한 제3의 분류방법이 발달되어 왔다. 이러한 다양한 분자생물학적인 시도중에서도 리보솜 RNA 유전자의 염기서열에 근거한 계통분류가 가장 유력한 분류방법으로 간주되었다. 균류를 포함한 진핵생물의 리보솜 RNA 유전자(리보솜 DNA)의 전사단위는 18S, 5.8S, 28S의 순으로 되어 있으며, 그 18S, 5.8S, 28S rDNA는 차례로 2개의 internal transcribed spacer(ITS)로 분리 연결되어 있다. 초기에는 5.8S 부위에 대한 sequences의 비교가 분류의 근거로 주로 이용되었지만 (Hori and Osawa, 1986; Robert *et al.*, 1995; Ko *et al.*, 1997), 이 부위는 염기수가 120개 전후로 길

이가 상당히 짧고, 매우 보존적인 부위이기 때문에 관련된 종들 사이에서는 거의 동일한 sequences를 나타내므로 이를 상호간의 구별을 위한 분류에서는 사용될 수 없는 난점이 있었다. 실험시약 및 방법의 발달과 실험기기의 첨단화로 염기서열을 결정하는데 드는 시간과 노력이 감소됨으로 말미암아, Nishida와 Sugiyama(1993)는 *Taphrina*속, *Saitoella*속 그리고 다른 고등균류 사이에서의 계통분석에 18S rDNA 염기서열을 이용하였고, Hendriks 등(1991)은 의학적으로 중요한 *Candida*속내의 계통분석에, Swann과 Taylor(1993)는 담자균류의 분류에 18S의 부분염기서열을 결정하여 분류의 지표로 사용하였다. 18S 및 28S rDNA는 통계적으로 신뢰성이 있는 정보를 가지고 있으며, 염기보존이 높은 부분, 중간 정도의 부분, 변이가 심한 부분이 공존하므로 계통분화를 논하는데 적합한 수단으로 취급되었다. Annette 등(1996)은 *Suillus* sensu lato 종으로 인식된 38종을 포함한 47개 분리군으로부터 ITS 염기서열을 분석하여 계통발생학적 분류체계를 결정하였고, Bae 등(1996)은 ITS2 부위의 염기서열에 의해 느타리버섯 종간의 관계를 규명했으며, Moncalvo 등(1995)은 ITS 부위와 25S rDNA 염기서열에서 *Ganoderma*속을, Daniel 등(1996)은 *Morchella esculenta*와 *Morchella conica*의 비교에 ITS 부위를 이용하였다. O'Donnell(1992)은 다양한 지역으로부터 분리된 *Fusarium sambucinum*의 86군주에 대한 ITS sequence를 비교함으로써 종특이적인 probe를 개발하였고, Morton 등(1995)은 *Verticillium alboatrum*과 *Verticillium dahliae*의 ITS sequence를 결정하여 이 결과를 토대로 probe의 개발에까지 연결시키고자 하였다. 이상과 같은 일련의 보고에서 저자들은 한결같이 ITS를 유용한 계통분류의 수단으로 간주하고 있을 뿐만 아니라, 속 및 종 수준의 신속동정에 적합한 probe의 개발 가능성을 강하게 시사하였다. ITS는 가운데

의 5.8S를 포함하여 500bp 정도로, 그 염기서열을 결정하기가 간편하고 시간적인 제약을 덜 받기 때문에 다수의 균종을 대상으로 하는 분류학적 연구에 적합하며, 그 문자진화속도가 빨라 염기서열의 다양성을 요구하는 종, 속의 분류에 적합하다. 더구나, 보존성이 높은 5.8S 부위를 포함하고 있으므로 ITS 부위와의 각각의 비교가 가능하며, 이러한 풍부한 정보량과 간편성으로 동일 속내의 종간 및 속간의 유연관계의 연구에 유용한 수단이 되어왔다.

본 연구에서는 분자생물학적인 계통분류의 방법인 internal transcribed spacer(ITS) 부위의 sequence를 비교함으로써 노루궁뎅이의 유전적 근연성을 조사분석하여 계통분류를 하였으며, ITS 영역을 sequencing 하여 염기서열 분석으로 조사하여 이들의 공통된 부위를 찾아 새로운 동정용 probe의 유전 마커를 개발하고, 이러한 마커를 노루궁뎅이속 버섯의 동정에 이용하기 위함이다.

## 제 2 절 재료 및 방법

### 1. Genomic DNA의 분리 및 정제

각 균주들의 genomic DNA의 분리를 위해서는 사용된 균주는 Table 4-1에서 보는 바와 같고, 아래와 같은 방법으로 Genomic DNA를 분리 및 정제하였다.

PDA 배지에서 배양한 신선한 mycelium을 대략 100mg정도 취한 후 액체 질소를 넣고 마쇄한 후 1ml의 DNA lysis buffer(50mM Tris-HCl; pH 7.2, 50mM EDTA; pH 7.2, 3% sodium dodecyl sulfate and 1% 2-mercaptoethanol)를 첨가하여 2ml tube에 옮기고, water bath(65°C)에서 1시간(5분마다 inverting)동안 정 치하였다. 그 후 Chloroform 1ml을 넣고 몇 번 inverting 시킨 후 상온에서 원심 분리(14000g, 15min)한 후 상등액을 1.5ml tube에 옮기고 3M sodium acetate를

Table 4-1. *Hericium* spp. list in this study

No.	Species	Origin of geology	Culture Code <sup>A</sup>
1	<i>Hericium erinaceum</i>	Korea	KU-1
2	<i>Hericium erinaceum</i>	Korea	KU-8
3	<i>Hericium erinaceum</i>	Korea	KU-9
4	<i>Hericium erinaceum</i>	Korea	NIAST 48001
5	<i>Hericium erinaceum</i>	Korea	NIAST 48002
6	<i>Hericium erinaceum</i>	Korea	NIAST 48006
7	<i>Hericium erinaceum</i>	Malaysia	NFCF F01
8	<i>Hericium erinaceum</i>	Malaysia	NFCF F02
9	<i>Hericium abietis</i>	U.S.A	CBS 243.48
10	<i>Hericium alpestre</i>	Switzerland	CBS 539.90
11	<i>Hericium americanum</i>	U.S.A	CBS 493.63
12	<i>Hericium coralloides</i>	Austria	IMSNU 31007
13	<i>Hericium erinaceus</i>	France	CBS 485.95

<sup>A</sup>KU = Korea university

CBS = Centraalbureau voor Schimmelcultures, Baarn, The Netherlands

IMSNU = Institute of Microbiology Seoul National University

ATCC = American Type Culture Collection, Rockville, MD

NIAST = National Institute of Agricultural Science and Technology

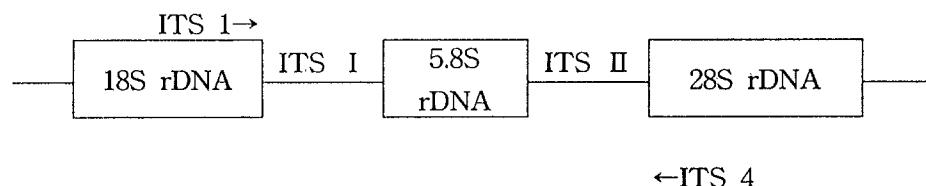
NFCF = National Forestry Cooperatives Federation

상등액의 0.1volume 첨가하고, 동일량의 isopropanol을 첨가하여 혼탁시킨 후 상온에서 원심분리(14000g, 5min) 하였고, 상등액을 따른 후 pellet을 70%(ice-cold) ethanol로 세척하고 원심분리 한 후 상등액을 버리고 pellet에서 ethanol이 완전히 제거될 때까지 전조시킨 후 50 $\mu$ l TE buffer(10mM Tris-HCl; pH 8.0; 0.1mM EDTA; pH 8.0)에 DNA를 녹여 사용하였다. 이렇게 분리한 genomic DNA(50 $\mu$ l)의 정제를 위해 2 $\mu$ l(10mg/ml) RNase를 첨가하여 37°C에서 1시간 정치하였다(가끔 inverting). 400 $\mu$ l 3차 중류수와, 동일량의 PCI를 첨가하여 반응시킨 후 상등액을 얻은 양만큼 CI를 첨가하고 원심분리하여 상등액을 버리고 2.5배의 70% ethanol을 첨가하여 -70°C에서 20분 down 시킨 후 원심분리(상온에서 10분)하여 pellet을 TE buffer 50 $\mu$ l에 녹인다. 1% agarose gel을 이용하여 전기영동한 후, 0.5 $\mu$ l/ml ethidium bromide(EtBr)로 염색한 다음 UV transilluminator에서 관찰하였다.

## 2. Primer 선발

### 가. ITS primer 제조

노루궁뎅이버섯 rDNA의 18S와 28S 사이의 ITS를 증폭하고자 primer는 White 등(1990)이 제시한 ITS 1,4를 사용하였다.



#### ¶. *Hericium* specific primer 제조

*Hericium* spp. specific primer를 제조하기 위해서 NCBI(<http://www.NCBI.nlm.nih.gov>)에 등록된 다른 곰팡이의 ITS sequence와 *H. abietis*, *H. americanum*, *H. alpestre*, *H. coralloides*, *H. erinaceum*의 ITS sequence를 비교하여 ITS I의 5' terminal에 인접된 부분에서 22mer와 ITS II의 3' terminal 부분에 21mer의 *Hericium* spp. specific primer를 개발하였으며(Table 4-2), 전자를 Her 1 primer, 후자를 Her 2 primer로 명명하였다. 또한 *Thanatephorus cucumeris*의 ITS sequences는 Her1 primer 72.7%, Her2 primer 57.1% 이하의 유사도를 보여주었고, Table 4-2에 나타난 것을 제외한 다른 곰팡이에서는 Her primer와 유사도를 찾지 못하였다. 본 실험실에서 사용한 primer는 Table 4-3와 같다.

Table 4-3. Primer used for generation and sequencing of the PCR products.

Primer	Sequence( 5' → 3' )	Source
ITS 1	TCCGTAGGTGAACCTGCGG	White <i>et al.</i> , 1990
ITS 4	TCCTCCGCTTATTGATATGC	White <i>et al.</i> , 1990
Her 1	GAAAGGAGTTGTTGCTGGCCTG	This study
Her 2	TTCCCGAGGGAGCACCGGCAA	This study

#### ¶. Polymerase chain reaction에 의한 rDNA 단편의 증폭

PCR 반응액은 총량을 50 $\mu$ l 기준으로 template DNA(50ng) 1 $\mu$ l, primer 50pmol 2 $\mu$ l, 10X buffer 5 $\mu$ l, dNTP(200  $\mu$ M) 4 $\mu$ l, Taq polymerase(TaKaRa Co.) 0.2 $\mu$ l, 멸균수 35.8 $\mu$ l를 첨가하여, Perkin Elmer Co.의 DNA Thermal cycle을 이

Table 4-2. Sequence homology of Her primers and ITS sequences derived from fungi enrolled in GenBank produced by advanced 2.0 blast program existed in NCBI(<http://www.NCBI.nlm.nih.gov>).

Species	Her1 primer Homology (22mer)	Her2 primer Homology (21mer)
<i>Agaricus bisporus</i>	homology not found	12/21(57.1%)
<i>Hericium abietis</i>	22/22(100.0%)	21/21(100.0%)
<i>Hericium alpestre</i>	22/22(100.0%)	21/21(100.0%)
<i>Hericium americanum</i>	22/22(100.0%)	21/21(100.0%)
<i>Hericium coralloides</i>	22/22(100.0%)	21/21(100.0%)
<i>Hericium erinaceum</i>	22/22(100.0%)	21/21(100.0%)
<i>Pleurotus ostreatus</i>	17/22(77.3%)	homology not found
<i>Thanatephorus cucumeris</i>	16/22(72.7%)	12/21(57.1%)
<i>Trichosporon mucoides</i>	homology not found	12/21(57.1%)

용하여 PCR을 수행하였다. PCR 반응조건은 initial denaturation step(3min, at 95°C), denaturation step(30sec, at 95°C), annealing step(1min, at 55°C), extension step(1min 30sec, at 72°C)으로 35cycle 반응을 시키고, post extension step(10min, at 72°C)후에 4°C에 보관하였다.

PCR product를 1% agarose gel을 이용하여 전기영동한 후 0.5μl/ml ethidium bromide(EtBr)로 염색한 다음 UV transilluminator에서 관찰하였다. 또한 PCR product의 정제을 위해서 Qiagen PCR purification system(QIAquick PCR Purification Kit Protocol p.18)을 사용하여 전기영동으로 관찰하였다. 정제된 DNA fragment를 TaKaRa사에 의뢰하여 autosequencing하였다.

### 3. 계통분석

분자생물학적인 유전정보를 이용한 계통분류 중에서 리보솜 RNA 유전자의 염기서열에 근거한 계통분류를 알아보기에 앞서, 다른 곰팡이 종들과 노루궁뎅이의 유연관계를 알아보고자 GenBank에 등록된 다른 곰팡이들의 sequence를 이용하여 PC/Gene Sequences Analysis Program(Version 6.6, IntelliGenetics, Inc.)과 DNASTAR software package(Madison, WI, USA)를 이용하여 alignment한 후 phylogenetic tree를 작성하였고, *Hericium* spp.의 ITS I -5.8S-ITS II 부위의 sequence를 비교해 multiple alignment를 시행한 후 이 결과를 이용하여 sequence를 분석하여 phylogenetic tree를 작성하였다.

본 연구에서 rDNA sequences의 GenBank 등록 number와 geographic origin, alignment sequence에 사용된 곰팡이 종들은 Table 4-4와 같다.

Table 4-4. List of species used to alignment sequences, geographic origin and GenBank accession numbers of their rDNA sequences.

Order	family	species	Sequence Region	GenBank accession #
Agaricales	Tricholomataceae	<i>Lentinula ursinus</i>	18S	AF026580
Hericiales	Gloeocystidiellaceae	<i>Laxitextum bicolor</i>	18S	AF026605
		<i>Gloeocystidiellum lacosantha</i>	18S	AF026602
	Claviciporaceae	<i>Claviciporina pygidata</i>	18S	AF026601
	Auriscalpiaceae	<i>Auriscalpium vulgare</i>	18S	AF026581
	Hericaceae	<i>Hericium ramosissimum</i>	18S	AF026577
		<i>Hericium coralloides</i>	18S	AF171093
		<i>Hericium erinaceum</i>	18S	AF146778
	Lentiniellaceae	<i>Lentinellus lateritius</i>	18S	AF026596
		<i>Lentinellus omphalodes</i>	18S	AF026579
Hymenochaetales	Hymenochaetaceae	<i>Inonotus hispidus</i>	18S	AF026584
		<i>Coltricia perennis</i>	18S	AF026583
Ponales	Coniolaceae	<i>Heterobasidion annosum</i>	18S	AF026576
Stereales	Contibaciaceae	<i>Dendroctonus sulphurellum</i>	18S	AF026604
	Meruliaceae	<i>Phanerochaete chrysoporum</i>	18S	AF026593
		<i>Phlebia radiata</i>	18S	AF026606
Agaricales	Tricholomataceae	<i>Flammulina velutipes</i>	ITS	AF079581
		<i>Lentinula edodes</i>	ITS	X63130
Cantharellales	Clavariaceae	<i>Multiclavula vernalis</i>	ITS	U66439
		<i>Multiclavula corynoides</i>	ITS	U66440
Ganodermatales	Ganodermataceae	<i>Ganoderma adspersum</i>	ITS	AJ006685
Hericiales	Claviciporaceae	<i>Claviciporona taxiphila</i>	ITS	U50099
	Hericaceae	<i>Hericium erinaceum</i>	ITS	this work
		<i>Hericium coralloides</i>	ITS	this work
		<i>Hericium americanum</i>	ITS	This work
		<i>Hericium abietis</i>	ITS	this work
		<i>Hericium alpestre</i>	ITS	this work
		<i>Hericium lanuginosum</i>	ITS	this work
	Auriscalpiaceae	<i>Arthelia auriscalpium</i>	ITS	U66428
Hymenochaetales	Hymenochaetaceae	<i>Phellinus heringii</i>	ITS	AF093574
		<i>Phellinus chrysopoma</i>	ITS	AF055370
		<i>Inonotus seranicus</i>	ITS	AF110724
Ponales	Coniolaceae	<i>Loetiporus sulphureus</i>	ITS	AF068926
		<i>Tyromyces chioneus</i>	ITS	AJ006676
		<i>Spongipellis sphaeus</i>	ITS	AJ006671
		<i>Skeletocutis kuehneri</i>	ITS	AJ006678
		<i>Skeletocutis amorphia</i>	ITS	AJ006677
		<i>Spongipellis delectans</i>	ITS	AJ006670
		<i>Postia sericeomollis</i>	ITS	AJ006667
		<i>Postia balsamea</i>	ITS	AJ006666
		<i>Oligoporus rennyi</i>	ITS	AJ006668
		<i>Trichapium laricinum</i>	ITS	U63471
		<i>Trichapium biforme</i>	ITS	U63476
		<i>Heterobasidion araucariae</i>	ITS	X70028

### 제 3 절 결과 및 고찰

#### 1. ITS primer를 이용한 PCR

고등균류를 포함한 진핵생물의 리보솜 RNA 유전자(리보솜 DNA)의 전사단위는 18S, 5.8S, 28S의 순으로 되어 있으며, 그 18S, 5.8S, 28S rDNA는 차례로 2개의 internal transcribed spacer(ITS)로 분리 연결되어 있다. 초기에는 5.8S 부위에 대한 sequences의 비교가 분류의 근거로 주로 이용되었으며(Hori and Osawa, 1986; Robert *et al.*, 1995; Ko *et al.*, 1997), Nishida와 Sugiyama(1993)은 *Taphrina*속, *Saitoella*속 그리고 다른 고등균류사이에서의 계통분석에 18S rDNA 염기서열을 이용하였다. 이렇듯 버섯의 유연관계 분석으로 Park 등(1999 a, b), Bae 등(1996) 불로초(*Ganoderma* spp.), 먹물버섯(*Corprinus* spp.) 및 느타리버섯(*Pleurotus* sp.), Chung 등(1999) *Phellinus*속에 대하여 ITS 부위의 염기서열을 분석함으로 종간 유연관계를 분석하였다. 또한 Annette 등(1996)은 *Suillus* sensu lato 종으로 인식된 38종을 포함한 47개 분리군으로부터 ITS 염기서열을 분석하여 계통발생적 분류체계를 결정하였고, Moncalvo 등(1995)은 ITS 부위와 25S rDNA 염기서열에서 *Ganoderma*속을, Daniel 등(1996)은 *Morchella esculenta*와 *Morchella conica*의 비교에 ITS 부위를 이용하였다.

*Hericium* spp.의 ITS 부위의 비교를 위해서 ITS 1,4 primer로 PCR을 하였고, ITS 부위의 크기는 543 base pair였다(Fig 4-1). 한편 Choi 등(2000)은 Entomopathogenic Fungi의 유연관계를 조사하면서 rDNA의 ITS 부위를 primer ITS 1과 ITS 4를 사용하여 PCR에 의해 중폭한 결과 중폭된 산물이 500bp 크기라고 보고한 결과와 유사하였고, ITS는 가운데의 5.8S를 포함하여 500bp 정도로, 그 염기서열을 결정하기가 간편하고 시간적인 제약을 덜 받기 때문에 다수의 균종을 대상으로 하는 분류학적 연구에 적합하며, 그 문자진화속도가 빨라 염기

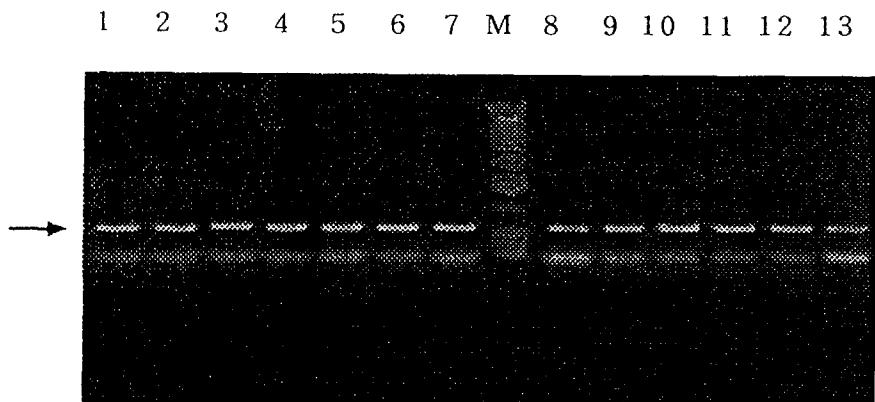


Fig. 4-1. Amplification of the *Hericium* by PCR reactions with ITS primer. ITS regions of all the provided *Hericium* were amplified with ITS primer. The PCR products had sizes of 543 base pair. All the PCR products was electrophoresed in 1% agarose gel; lane1(*H. abietis*);lane2(*H.alpestre*);lane3(*H. americanum*);lane4(*H. coralloides*) ;lane5(*H. erinaceus*); lane6(F01); lane7(F02);lane8(48001) ;lane9(48002) ; lane10(48006) ; lane11(KU-1) ; lane12(KU-8) ; lane13(KU-9) ; M stands for 1Kb marker. → ; 543bp.

서열의 다양성을 요구하는 종, 속의 분류에 적합하였다.

## 2. Her primer를 이용한 PCR

전통적으로 사용되는 버섯분류는 형태적 특징, 색깔, 크기, 자실체모양 등을 이용하였으나, 이런 전통적인 방법이 가질수 있는 신속·정확성의 문제점을 보완하기 위한 하나의 방법으로 노루궁뎅이의 종특이적인 probe를 개발하고자 하였다. O'Donnell(1992)은 다양한 지역으로부터 분리된 *Fusarium sambucinum*의 86균주 대한 ITS sequence를 비교함으로써 종특이적인 probe를 개발하였고, Morton 등(1995)은 *Verticillium alboatrum*과 *Verticillium dahliae*의 ITS sequence를 결정하여 이 결과를 토대로 probe의 개발에까지 연결시키고자 하였다. 이상과 같은 보고에서 볼 때 ITS를 유용한 계통분류의 수단으로 간주하고 있을 뿐만 아니라, 속 및 종 수준의 신속동정에 적합한 probe의 개발 가능성을 보여주었다. *Hericium*의 부분적인 ITS 부위는 primer Her 1과 Her 2로 PCR을 수행하였고, 그 부위의 크기는 402 base pair였다(Fig. 4-2). 또한 *Hericium* spp.와 18S의 높은 유사성을 가지는 곰팡이, 여러 가지 식용버섯의 genomic DNA를 Her primer와 ITS primer를 이용하여 PCR 증폭을 수행한 결과, ITS primer를 이용한 PCR에서는 모든 곰팡이에서 band가 나타났으나, Her primer를 사용했을 경우에는 *Hericium* spp.에서만 band가 확인되었다(Fig. 4-3, 4-4, Table 4-5). 따라서 Her 1,2 primer는 *Hericium* 속에만 특이적인 probe라는 결과를 보여주었고, Her primer를 이용하면 노루궁뎅이버섯 속의 신속동정에 유용할 것으로 사료된다.

## 3. Phylogenetic tree

노루궁뎅이와 다른 곰팡이의 유연관계를 알아보기 위해서 GenBank에 등록된

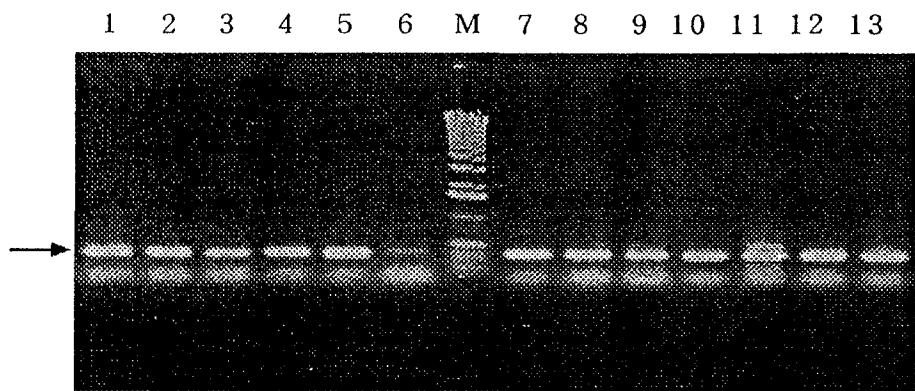


Fig. 4-2. Amplification of the *Hericum* by PCR reactions Her primers. Small ITS regions of all the provided *Hericium* were amplified with Her primers. The PCR products had size of 402 base pairs. All the PCR products was electrophoresed in 1% agarose gel.;lane1(*H. abietis*);lane2 (*H.alpestre*);lane3(*H. americanum*);lane4(*H. coralloides*);lane5(*H. erinaceus*);lane6(F01);lane7(F02);lane8(48001);lane9(48002);lane10(48006);lane11 (KU-1);lane12(KU-8);lane13(KU-9).

M stands for 1kb marker. → ; 402bp.

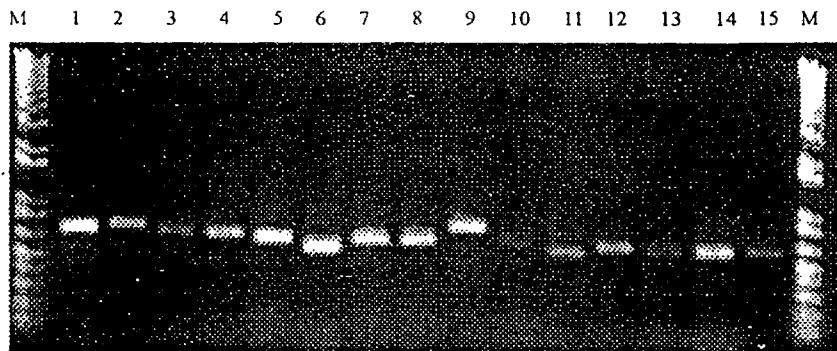


Fig. 4-3. Amplification of ITS regions of all the provided fungi except the *Hericium* by PCR reaction with ITS primers.

Complete ITS regions of all the provided fungi were amplified with ITS1,4 primers. All the PCR product were eletrophoresed in 1% agarose gel: lane 1, 1Kb ladder marker, lane2, ITS of *Lentinula edodes* ; lane3, ITS of *Flammulina velutipes* ; lane4, ITS of *Agaricus bisporus* ; lane5, ITS of *Thanatephorus cucumeris* ; lane6, ITS of *Clavicorona pyxidata* ; lane7, ITS of *Stereum hirsutum* ; lane8, ITS of *Echino japonicum* ; lane9, ITS of *Inonotus weirii* ; lane10, ITS of *Gloeocystidiellum porosum* ; lane11, ITS of *Auriscalpium vulgare* ; lane12, ITS of *Pleurotus ostreatus* ; lane13, ITS of *Phlebia radiata*, lane14, ITS of *Mucronella calva* ; lane15, ITS of *Mucronella aggregata* ; lane6, 1Kb ladder marker.

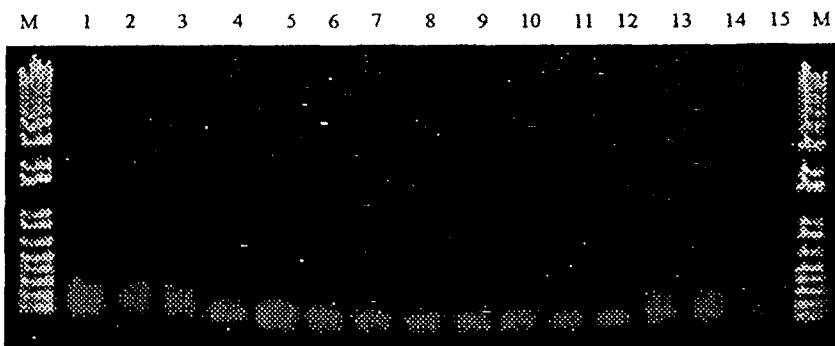


Fig. 4-4. Amplification of partial ITS regions of all the provided fungi except the *Hericium* by PCR reaction with Her primers. Any partial ITS regions did not appear in PCR reaction with genomic DNA of all the other fungi except *Hericiums*. All the PCR product were eletrophoresed in 1% agarose gel: lane 1, 1Kb ladder marker, lane2, Her product of *Lentinula edodes*; lane3, Her product of *Flammulina velutipes*; lane4, Her product of *Agaricus bisporus*; lane5, Her product of *Thanatephorus cucumeris*; lane6, Her product of *Clavicornia pyxidata*; lane7, Her product of *Stereum hirsutum*; lane8, Her product of *Echino japonicum*; lane9, Her product of *Inonotus weirii*; lane10, Her product of *Gloeocystidiellum porosum*; lane11, Her product of *Auriscalpium vulgare*; lane12, Her product of *Pleurotus ostreatus*; lane13, Her product of *Phlebia radiata*; lane14, Her product of *Mucronella calva*; lane15, Her product of *Mucronella aggregata*; lane6, 1Kb ladder marker.

Table 4-5. The *Hericium*, fungi having high homology of 18S and edible mushrooms tested in polymerase chain reaction(PCR) amplification using two pairs of PCR primers.

Taxonomy		Species	Culture Code <sup>A</sup>	location of geology	PCR amplification with	
order	family				ITS1+4	Her1+2
agancales	tricholomataceae	<i>Lentinula edodes</i>	KCTC 6733	U.S.A	+	-
		<i>Flammulina velutipes</i>	KCTC 6367	Japan	+	-
	Agaricaceae	<i>Agaricus bisporus</i>	ATCC48085	U.S.A	+	-
ceratobasidiales	ceratobasidiaceae	<i>Thanatephorus cucumeris</i>	KCCM11323	Japan	+	-
herciales	gloeocystidiellaceae	<i>Gloeocystidium porosum</i>	KCTC 6754	Nebraska	+	-
		<i>Hericiaceae-Hericium<sup>B</sup></i>				
		<i>Hericium erinaceum</i>	KU-3	Korea	+	+
		<i>Hericium erinaceum</i>	F01	Malaysia	+	+
		<i>Hericium erinaceum</i>	NIAST 48001	Korea	+	+
		<i>Hericium erinaceum</i>	NIAST 48006	Korea	+	+
		<i>Hericium erinaceum</i>	CBS 485.95	France	+	+
		<i>H.abietis</i>	CBS 243.48	U.S.A	+	+
		<i>H.alpestre</i>	CBS 539.90	Switzerland	+	+
		<i>H.americanum</i>	CBS 493.63	U.S.A	+	+
hymenochaetales	Hericiaec-Mucronella <sup>C</sup>	<i>Mucronella aggregata</i>	ATCC 20641	U.S.A	+	-
		<i>Mucronella calva</i>	ATCC 24983	U.S.A	+	-
	claviciporaceae	<i>Clavicorona pyxidata</i>	KCTC16042	Finland	+	-
porales	auriscalpiaceae	<i>Auriscalpium vulgare</i>	ATCC76707	U.S.A	+	-
	hymenochaetaceae	<i>Inonotus weirii</i>	KCTC6646	U.S.A	+	-
		<i>Coriolus azureus</i>	KCTC 16000	Australia	+	-
	leminaceae	<i>Pleurotus ostreatus</i>	KCTC 6359	U.S.A	+	-
	stereaceae	<i>Stereum hirsutum</i>	KCTC 6819	Austria	+	-
sterakes	Echinodontiaceae	<i>Echinodictyon japonicum</i>	IMSNU 31004	Japan	+	-
	Meruliacae	<i>Phlebia radiata</i>	KCTC6759	Germany	+	-
		<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	KCCM34740	U.S.A	+	-

<sup>A</sup>ATCC = American Type Culture Collection, Rockville,MD ; KCTC=Korean Collection for Type Cultures;

CBS=Centraalbureau voor Schimmelcultures, Baarn, The Netherlands;

KCCM=Korea Culture Center of Microorganism;

IMSNU=Institute of Microbiology Seoul National University;

B and C stand for family and genus together

sequence를 이용하여 PC/Gene Sequences Analysis Program(Version 6.6, IntelliGenetics, Inc.)과 DNASTAR software package(Madison, WI, USA)를 이용하여 alignment한 후 phylogenetic tree를 작성하였다(Fig. 4-5).

*Hericiaceae*에 80%이상의 ITS sequence 유사도를 나타내는 Families는 *Auriscalpiacae*(*Arrhenia auriscalpium*), *Coriolaceae*(*oligoporus rennyi*, *postia balsamea*, *skeletacutis amorphula*, *tyromyces chioneus*, *laetiporus sulphureus*)였다. 또한 *Hericiales*에 속하는 Family는 *Auriscalpiacae*였고, *Hericium*의 ITS sequence 비교에서 *Hericium*은 genus-specific sequences를 가지고, 이것은 *Hericium*의 특이적인 그룹을 형성하였다. 그리고 *Hericium* spp.의 ITS1-5.8S-ITS2 부위를 sequencing 하여 그 염기서열을 비교하여 phylogenetic tree를 작성하였다(Fig. 4-6, 4-7). ITS1-5.8S-ITS2의 염기서열은 진화속도가 빠르므로 부분염기서열의 비교에 의한 속, 종의 유연관계의 해석에 유용하기 때문에 ITS1-5.8S-ITS2의 염기서열을 대상으로 계통분석도를 살펴보았다. 계통도에서 보는 바와 같이 크게 3개의 cluster로 나누어졌다. 첫 번째 cluster는 자연에서 순수분리한 균주인 KU-8, KU-1, KU-9와, 농업과학기술원 응용미생물과에서 분양받은 균주인 *H. erinaceum* 48001, *H. erinaceum* 48002, *H. erinaceum* 48006 이 두 번째 cluster는 외국에서 분양받은 균주인 *H. abietis*, *H. americanum*, *H. coralloides*, *H. erinaceus*이 세 번째 cluster는 외국에서 분양받은 균주 *H. alpestre*와 산림조합중앙회 임산미생물사업소에서 분양받은 *H. erinaceum* F01, *H. erinaceum* F02 균주들이 cluster를 형성하였다. 이 실험의 결과에서 나타난 계통도에서 보는바와 같이 국내종과 외국종은 계통관계가 떨어져 있으므로 유연관계가 먼 종이라는 것을 보여주었다.

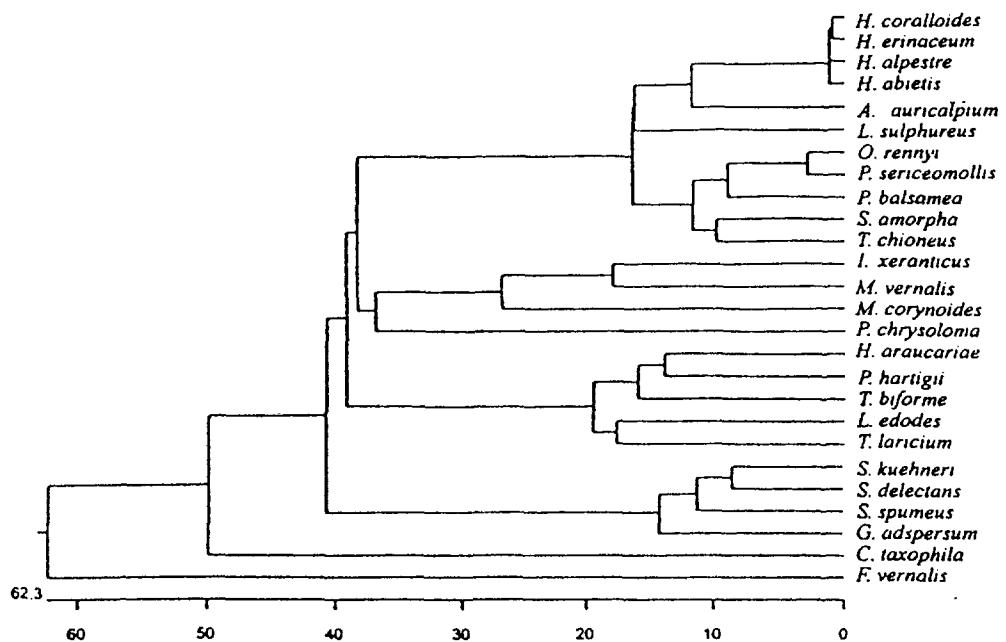


Fig. 4-5. Phylogram demonstrating relationship of *Hericium* and other species representing each geneses by alignment of nucleotides sequences from the ITS rDNA.

T C C G T A G G T G A A C C T G C G G A A G G A T C A T T A A T G A A T T G A A A G G A G T T G T Majorit				
10	20	30	40	50
1 T C C G T A G G T G A A C C T G C G G A A G G A T C A T T A A T G A A T T G A A A G G A G T T G T ABI.SEQ				
1 T C C G T A G G T G A A C C T G C G G A A G G A T C A T T A . T G A A T T G A A A G . G T T G T ALP.SEQ				
1 T C C G T A G G T G A A C C T G C G G A A G G A T C A T T A A T G A A T T G A A A G G A G T T G T AME.SEQ				
1 T C C G T A G G T G A A C C T G C G G A A G G A T C A T T A A T G A A T T G A A A G G A G T T G T COR.SEQ				
1 T C C G T A G G T G A A C C T G C G G A A G G A T C A T T A A T G A A T T G A A A G G A G T T G T ERI.SEQ				
1 T C C G T A G G T G A A C C T . C G G A A G G A T . . . T A A . . . A . T T G . A A G G A . . T G F01.SEQ				
1 T C C G T A G G T G A A C C T G C G G - - - . T . T . . . . T . G . A A G G A . . T G F02.SEQ				
1 T C C G T A G G T G A A C C T G C G G A A G G A T C A T T A A T G A A T T G A A A G G A G T T G T 481.SEQ				
1 T C C G T A G G T G A A C C T G C G G A A G G A T C A T T A A T G A A T T G A A A G G A G T T G T 482.SEQ				
1 T C C G T A G G T G A A C C T G C G G A A G G A T C A T T A A T G A A T T G A A A G G A G T T G T 486.SEQ				
1 T C C G T A G G T G A A C C T G C G G A A G G A T C A T T A A T G A A T T G A A A G G A G T T G T K8.SEQ				
1 T C C G T A G G T G A A C C T G C G G A A G G A T C A T T A A T G A A T T G A A A G G A G T T G T K9.SEQ				
1 T C C G T A G G T G A A C C T G C G G A A G G A T C A T T A A T G A A T T G A A A G G A G T T G T K1 .SEQ				
T G C T G G C C T G A A A C C C A - G G C A T G T G C A C G C T C C A A T C T C A T C C A T C T T A Majorit				
60	70	80	90	100
51 T G C T G G C . T G A A A C C C A - G G C A T G T G C A C G C T C C A A T C T C A T C C A T C T T A ABI.SEQ				
51 T G C T G G C C T . . A - C C - - G G C A T G T G C A C G C . . . . A T C T C A T C C A T C T T A ALP.SEQ				
51 T G C T G G C C T G A A A C C C A . G G C A T G T G C A C G C T C C A A T C T C A T C C A T C T T A AME.SEQ				
-43 T G C T G G C C T G A A A C C C A - G G C A T G T G C A C G C T C C A A T C T C A T C C A T C T T A COR.SEQ				
51 T G C T G G C C T G A A A C C C A - G G C A T G T G C A C G C T C C A A T C T C A T C C A T C T T A ERI.SEQ				
51 T G . T G G C C T . A A A . C C A . G . - A . G . G . A . G . T . C A A T . T . A . C C A T . T T A F01.SEQ				
47 - G C . . G G C C T G . - - C . C A - - - - - T . C A C . C T C . A . T . . . . T . C A . . T T . F02.SEQ				
51 T G C T G G C C T . A A A C C C A - G G C A T G T G C A C G C T C C A A T C T C A T C C A T C T T A 481.SEQ				
51 T G C T G G C C T G A A A C C C A . G G C A T G T G C A C G C T C - A A T C T C A T C C A T C T T A 482.SEQ				
51 T G C T G G C C T G A A A C C C A - G G C A T G T G C A C G C T C C A A T C T C A T C C A T C T T A 486.SEQ				
51 T G C T G G C C T G A A A C C C A - G G C A T G T G C A C G C T C C A A T C T C A T C C A T C T T A K8.SEQ				
51 T G C T G G C C T G A A A C C C A - G G C A T G T G C A C G C T C C A A T C T C A T C C A T C T T A K9.SEQ				
51 T G C T G G C C T G A A A C C C A - G G C A T G T G C A C G C T C C A A T C T C A T C C A T C T T A K1 .SEQ				
C A C C T G T G C A C C C T T G C G T G G G T C C G T C G G C T T T G C G G G T C G A T G G G C T T G Majorit				
110	120	130	140	150
100 C A C C T G T G C A C C C T T G C G T G G G T C C G T C G G C T T T G C G G G T . G A . G G G C T T G ABI.SEQ				
97 C A C C T G T G C A C C . T T G C G T G G G T C . G T . G G C T T T G C G G . C . . . G . C T T G ALP.SEQ				
101 C A C C T G T G C A C C C T T G C G T G G G T C C G T C G G C T T T G C G G G T C G A . G G G C T T G AME.SEQ				
92 C A C C T G T G C A C C C T T G C G T G G G T C C G T C G G C T T T G C G G G T C G A . G G G C T T G COR.SEQ				
100 C A C C T G T G C A C C C T T G C G T G G G T C C G T C G G C T T T G C G G G T C G A . G G G C T T G ERI.SEQ				
100 . . C C T G - G C . . C C T T G . G - G G G T . C G T . G G C T T T G C . G . . G A . G G G . . T G F01.SEQ				
87 C A . . . G . . . C . . . T G . G T G . G T . C G - C G . . . T T G . G . . G . . G G G C T T F02.SEQ				
100 C A C C T G T G C A C C . T T G C G T G G G T C C G T C G G C T T T G C G G G T C G A T G G G C T T G 481.SEQ				
99 C A C - T G T G C A C C C T T G . G T G G G T C C G T C G G C T T T G C G G G T C G A T G G G C T T G 482.SEQ				
100 C A C C T G T G C A C C C T T G C G T G G G T C C G T C G G C T T T G C G G G T C G A T G G G C T T G 486.SEQ				
100 C A C C T G T G C A C C C T T G C G T G G G T C C G T C G G C T T T G C G G G T C G A T G G G C T T G K8.SEQ				
100 C A C C T G T G C A C C C T T G C G T G G G T C C G T C G G C T T T G C G G G T C G A T G G G C T T G K9.SEQ				
100 C A C C T G T G C A C C C T T G C G T G G G T C C G T C G G C T T T G C G G G T C G A T G G G C T T G K1 .SEQ				

Fig. 4-6. Comparison of nucleotide sequences alignment of *Hericium* spp.

Abbreviation : ABI; *H. abietis*, ALP; *H. alpestre*, AME; *H. americanum*, COR; *H. coralloides*, ERI; *H. erinaceus*, F01; *H. erinaceum* F01, F02; *H. erinaceum* F02, 481; *H. erinaceum* 48001, 482; *H. erinaceum* 48002, 486; *H. erinaceum* 48006, K1; *H. erinaceum* KU-1, K8; *H. erinaceum* KU-8, K9; *H. erinaceum* KU-9.

CGT - TTT CATA AAC TCT TAT GT TAC AGA AT GT CATA AT -- GCT AT Majorit				
160	170	180	190	200
150 CGT - TTT CATA AAC TCT TAT GT TAC AGA AT GT CATA AT -- GCT AT ABI.SEQ				
147 CGT - TTT CATA AAC TCT TAT GT TAC AGA AT GT C - TA AT -- GCT AT ALP.SEQ				
151 CGT - TTT CATA AAC TCT TAT GT TAC AGA AT GT CATA AT -- GCT AT AME.SEQ				
142 CGT - TTT CATA AAC TCT TAT GT TAC AGA AT GT CATA AT -- GCT AT COR.SEQ				
150 CGT - TTT CATA AAC TCT TAT GT TAC AGA AT GT CATA AT -- GCT AT ERI.SEQ				
148 .GT . TTT - A - AAC T . TTA . G . A . G . AAC A . AA . GT . A . . . A . - G . T A . F01.SEQ				
136 .G . -TT . .A . AAC C . TT . -GT . T . - - .AGA AT GT CATA .T . .G CT AT F02.SEQ				
150 CGT - TTT CATA AAC TCT TAT GT TAC AGA AT GT CATA AT -- GCT AT 481.SEQ				
148 CGT - TTT CATA AAC TCT TAT GT TAC AGA AT GT CATA AT -- GCT AT 482.SEQ				
150 CGT - TTT CATA AAC TCT TAT GT TAC AGA AT GT CATA AT -- GCT AT 486.SEQ				
150 CGT - TTT CATA AAC TCT TAT GT TAC AGA AT GT CATA AT -- GCT AT K8.SEQ				
150 CGT - TTT CATA AAC TCT TAT GT TAC AGA AT GT CATA AT -- GCT AT K9.SEQ				
150 CGT - TTT CATA AAC TCT TAT GT TAC AGA AT GT CATA AT -- GCT AT K1.SEQ				
AAA - CGC AT CTT ATA CA ACT TT CA AC CA AC GG AT CT CT TGG CT CT CGC ATC Majorit				
210	220	230	240	250
197 AAA - CGC AT CTT ATA CA ACT TT CA AC CA AC GG AT CT CT TGG CT CT CGC ATC ABI.SEQ				
194 AAA . CGC AT CTT ATA CA ACT TT CA AC CA AC GG AT CT CT TGG CT CT CGC ATC ALP.SEQ				
198 AAA - CGC AT CTT ATA CA ACT TT CA AC CA AC GG AT CT CT TGG CT CT CGC ATC AME.SEQ				
189 AAA - CGC AT CTT ATA CA ACT TT CA AC CA AC GG AT CT CT TGG CT CT CGC ATC COR.SEQ				
197 AAA - CGC AT CTT ATA CA ACT TT CA AC CA AC GG AT CT CT TGG CT CT CGC ATC ERI.SEQ				
195 .AA . -G . AT . TTA - AC . A . TTT . AAC AA . GG AT . T . TT GG . T . T . G . A . . F01.SEQ				
182 AA . -C . -T . . TATA CA ACT TT CA . CA AC GG AT CT CT TGG CT CT CGC ATC F02.SEQ				
197 AAA - CGC AT CTT ATA CA ACT TT CA AC CA AC GG AT CT CT TGG CT CT CGC ATC 481.SEQ				
195 AAA - CGC AT CTT ATA CA ACT TT CA AC CA AC GG AT CT CT TGG CT CT CGC ATC 482.SEQ				
197 AAA - CGC AT CTT ATA CA ACT TT CA AC CA AC GG AT CT CT TGG CT CT CGC ATC 486.SEQ				
197 AAA - CGC AT CTT ATA CA ACT TT CA AC CA AC GG AT CT CT TGG CT CT CGC ATC K8.SEQ				
197 AAA - CGC AT CTT ATA CA ACT TT CA AC CA AC GG AT CT CT TGG CT CT CGC ATC K9.SEQ				
197 AAA - CGC AT CTT ATA CA ACT TT CA AC CA AC GG AT CT CT TGG CT CT CGC ATC K1.SEQ				
GAT GAAG AAC CGC AGC GAA AT GC GATA AGT AA AT GT GAA TT GC AGA AT TC AG Majorit				
260	270	280	290	300
246 GAT GAAG AAC CGC AGC GAA AT GC GATA AGT AA AT GT GAA TT GC AGA AT TC AG ABI.SEQ				
244 GAT GAAG AAC CGC AGC GAA AT GC GATA AGT AA AT GT GAA TT GC AGA AT TC AG ALP.SEQ				
247 GAT GAAG AAC CGC AGC GAA AT GC GATA AGT AA AT GT GAA TT GC AGA AT TC AG AME.SEQ				
238 GAT GAAG AAC CGC AGC GAA AT GC GATA AGT AA AT GT GAA TT GC AGA AT TC AG COR.SEQ				
246 GAT GAAG AAC CGC AGC GAA AT GC GATA AGT AA AT GT GAA TT GC AGA AT TC AG ERI.SEQ				
243 GA . -AA . .CA . .GA . .A . AA . .A . .A . .AA . .A . .TGC A . AA . TCA . F01.SEQ				
232 GAT GAAG AAC CGC AGC GAA AT GC GATA AGT AA AT GT GAA TT GC AGA AT TC AG F02.SEQ				
246 GAT GAAG AAC CGC AGC GAA AT GC GATA AGT AA AT GT GAA TT GC AGA AT TC AG 481.SEQ				
244 GAT GAAG AAC CGC AGC GAA AT GC GATA AGT AA AT GT GAA TT GC AGA AT TC AG 482.SEQ				
246 GAT GAAG AAC CGC AGC GAA AT GC GATA AGT AA AT GT GAA TT GC AGA AT TC AG 486.SEQ				
246 GAT GAAG AAC CGC AGC GAA AT GC GATA AGT AA AT GT GAA TT GC AGA AT TC AG K8.SEQ				
246 GAT GAAG AAC CGC AGC GAA AT GC GATA AGT AA AT GT GAA TT GC AGA AT TC AG K9.SEQ				
246 GAT GAAG AAC CGC AGC GAA AT GC GATA AGT AA AT GT GAA TT GC AGA AT TC AG K1.SEQ				

Fig. 4-6. Continued.

T G A A T C A T C G A A T C T T T G A A C G C A C C T T G C G C C C C T T G G T A T T C C G A G G G Majorit				
310	320	330	340	350
296 T G A A T C A T C G A A T C T T T G A A C G C A C C T T G C G C C C C T T G G T A T T C C G A G G G ABI.SEQ	294 T G A A T C A T C G A A T C T T T G A A C G C A C C T T G C G C C C C T T G G T A T T C C G A G G G ALP.SEQ	297 T G A A T C A T C G A A T C T T T G A A C G C A C C T T G C G C C C C T T G G T A T T C C G A G G G AME.SEQ	288 T G A A T C A T C G A A T C T T T G A A C G C A C C T T G C G C C C C T T G G T A T T C C G A G G G COR.SEQ	296 T G A A T C A T C G A A T C T T T G A A C G C A C C T T G C G C C C C T T G G T A T T C C G A G G G ERI.SEQ
292 . . . A . . G . A . . T T T G . A . G C . C . T G . G C C C C T T G G . A . T . C G A . G G F01.SEQ	282 T G A A T C A T C G A A T C T T T G A A C G C A C C T T G C G C . C C T T G G T A T T C C G A G G G . F02.SEQ	296 T G A A T C A T C G A A T C T T T G A A C G C A C C T T G C G C C C C T T G G T A T T C C G A G G G 481.SEQ	294 T G A A T C A T C G A A T C T T T G A A C G C A C C T T G C G C C C C T T G G T A T T C C G A G G G 482.SEQ	296 T G A A T C A T C G A A T C T T T G A A C G C A C C T T G C G C C C C T T G G T A T T C C G A G G G 486.SEQ
296 T G A A T C A T C G A A T C T T T G A A C G C A C C T T G C G C C C C T T G G T A T T C C G A G G G K8.SEQ	296 T G A A T C A T C G A A T C T T T G A A C G C A C C T T G C G C C C C T T G G T A T T C C G A G G G K9.SEQ	296 T G A A T C A T C G A A T C T T T G A A C G C A C C T T G C G C C C C T T G G T A T T C C G A G G G K1 .SEQ		
G C A C G C C T G T T C G A G T G T C G T G A A A A T T C T C A A C T C A A T C C T C T T G T T - A T Majorit				
360	370	380	390	400
346 G C A C G C C T G T T C G A G T G T C G T G A A A A T T C T C A A C T C A A T C C T C T T G T T - A T ABI.SEQ	344 G C A C G C C T G T T . G A G T G T C G T G A A A A T T C T C A A C T C . A T C . T . T T G T T - A . ALP.SEQ	347 G C A C G C C T G T T C G A G T G T C G T G A A A A T T C T C A A C T C A A T C C T C T T G T . - A T AME.SEQ	338 G C A C G C C T G T T C G A G T G T C G T G A A A A T T C T C A A C T C A A T C C T C T T G T . - A T COR.SEQ	346 G C A C G C C T G T T C G A G T G T C G T G A A A A T T C T C A A C T C A A T C C T C T T G T . - A T ERI.SEQ
342 G . A . G C C . G . T . G A . . A A A . T . T C A A . T C . A . . C T . T T G . T . A . F01.SEQ	332 G C A . G C C T G T T . G A G T . T C . T G . A A A T T C T C A A C . . . . C T - T T . T T . A T F02.SEQ	346 G C A C G C C T G T T C G A G T G T C G T G A A A A T T C T C A A C T C A A T C C T C T T G T T - A T 481.SEQ	344 G C A C G C C T G T T C G A G T G T C G T G A A A A T T C T C A A C T C A A T C C T C T T G T T - A T 482.SEQ	346 G C A C G C C T G T T C G A G T G T C G T G A A A A T T C T C A A C T C A A T C C T C T T G T T - A T 486.SEQ
346 G C A C G C C T G T T C G A G T G T C G T G A A A A T T C T C A A C T C A A T C C T C T T G T T - A T K8.SEQ	346 G C A C G C C T G T T C G A G T G T C G T G A A A A T T C T C A A C T C A A T C C T C T T G T T - A T K9.SEQ	346 G C A C G C C T G T T C G A G T G T C G T G A A A A T T C T C A A C T C A A T C C T C T T G T T - A T K1 .SEQ		
S A G A G G G G C T G G G C T T G G A C T T G G A G G G T C T T G C C G G T - G C T C C C T C G G G A A Majorit				
410	420	430	440	450
395 G A G A G G G G C T G G G C T T G G A C T T G G A G G G T C T T G . C G G T . G C T C C C T C G G G A A ABI.SEQ	394 . A . A . G G . T G G G C T T G G A C T T G G A G G G - C T T G C C G G . . . . . C . . . . A ALP.SEQ	396 G A G A G G G G C T G G G C T T G G A C T T G G A G G G T C T T G C C C G G T - G C T C C C T C G G G A A AME.SEQ	387 G A G A G G G G C T G G G C T T G G A C T T G G A G G G T C T T G C C C G G T - G C T C C C T C G G G A A COR.SEQ	395 G A G A G G G G C T G G G C T T G G A C T T G G A G G G T C T T G C C C G G T - G C T C C C T C G G G A A ERI.SEQ
392 . A . A G G G - T G G G . T T G G A . G T . T T G . C G G . . G - T . C C T . G G G A A F01.SEQ	381 G A . . . . . G G C T T G G A C T T G G A G G G T C . T G C C G G . . . . . C . T - - G . A F02.SEQ	395 G A G A G G G G C T G G G C T T G G A C T T G G A G G G T C T T G C C C G G T - G C T C C C T C G G G A A 481.SEQ	393 G A G A G G G G C T G G G C T T G G A C T T G G A G G G T C T T G C C C G G T - G C T C C C T C G G G A A 482.SEQ	395 G A G A G G G G C T G G G C T T G G A C T T G G A G G G T C T T G C C C G G T - G C T C C C T C G G G A A 486.SEQ
395 G A G A G G G G C T G G G C T T G G A C T T G G A G G G T C T T G C C C G G T - G C T C C C T C G G G A A K8.SEQ	395 G A G A G G G G C T G G G C T T G G A C T T G G A G G G T C T T G C C C G G T - G C T C C C T C G G G A A K9.SEQ	395 G A G A G G G G C T G G G C T T G G A C T T G G A G G G T C T T G C C C G G T - G C T C C C T C G G G A A K1 .SEQ		

Fig. 4-6. Continued.

	G T C G G G C T C C C T C T T G A A T G C A T G A G T G G A T C C C C T T T G T A G G G T T T G C C C T Majorit				
	460	470	480	490	500
445	G T C G G G C T C C C T C T T G A A T G C A T G A G T G G A T C C C C T T T G T A G G G T T T G C C C T ABI.SEQ				
439	. T C G G G C T C C C T C T T G A A T G C A T G A G T G G . . . C C T T T - G T A G G G T . . . C C . T ALP.SEQ				
445	G T C G G G C T C C C T C T T G A A T G C A T G A G T G G A T C C C C T T T G T A G G G T T T G C C C T AME.SEQ				
436	G T C G G G C T C C C T C T T G A A T G C A T G A G T G G A T C C C C T T T G T A G G G T T T G C C C T COR.SEQ				
444	G T C G G G C T C C C T C T T G A A T G C A T G A G T G G A T C C C C T T T G T A G G G T T T G C C C T ERI.SEQ				
440	. . . G G . T . C T . T T G A A . G . A . G A . . . G G A . . . C C . T T T G . A . G G . T T G . C C . F01.SEQ				
417	G T C G G G C T C C C T C T . . A A T G C A T . A G T G . . . C . T T . . . A G - - - . G C - . T F02.SEQ				
444	G T C G G G C T C C C T C T T G A A T G C A T G A G T G G A T C C C C T T T G T A G G G T T T G C C C T 481.SEQ				
442	G T C G G G C T C C C T C T T G A A T G C A T G A G T G G A T C C C C T T T G T A G G G T T T G C C C T 482.SEQ				
444	G T C G G G C T C C C T C T T G A A T G C A T G A G T G G A T C C C C T T T G T A G G G T T T G C C C T 486.SEQ				
444	G T C G G G C T C C C T C T T G A A T G C A T G A G T G G A T C C C C T T T G T A G G G T T T G C C C T K8.SEQ				
444	G T C G G G C T C C C T C T T G A A T G C A T G A G T G G A T C C C C T T T G T A G G G T T T G C C C T K9.SEQ				
444	G T C G G G C T C C C T C T T G A A T G C A T G A G T G G A T C C C C T T T G T A G G G T T T G C C C T K1 .SEQ				
	T G G T G T G A T A A T T A T C T A C G C C G C G G G T A - G C C T T G C G - - - T T - - - G - G T Majorit				
	510	520	530	540	550
495	T G G T G T G A T A A T T A T C T A C G C C . C G G G T A - G C C T T G C G - - - T T - - - G - G T ABI.SEQ				
487	T G G T G T G A T A A T T . T C T A C G C C G . . . G G T . . . G C C T T G C G . . . T T . . . G - G T ALP.SEQ				
495	T G G T G T G A T A A T T A T C T A C G C C G C . G G T A - G C C T T G C G - - - T T - - - G - G T AME.SEQ				
486	T G G T G T G A T A A T T A T C T A C G C C G C . G G T A - G C C T T G C G - - - T T - - - G - G T COR.SEQ				
494	T G G T G T G A T A A T T A T C T A C G C . G C G G G T A - G C C T T G C G - - - T T - - - G - G T ERI.SEQ				
490	T G G . . . A . . . A . T A . . . T A . . . C C . . . G G G . A . . . C C . T G . G . . . . . . G . . . F01.SEQ				
462	. . . G . G T G A T A A T T A T C T . C G . . . G C - - - T . . . G - - - . . . G . . . T T . . . G . G T F02.SEQ				
494	T G G T G T G A T A A T T A T C T A C G C C G C G G G T A - G C C T T G C G - - - T T - - - G - G T 481.SEQ				
492	T G G T G T G A T A A T T A T C T A C G C C G C G G G T A - G C C T T G C G - - - T T - - - G - G T 482.SEQ				
494	T G G T G T G A T A A T T A T C T A C G C C G C G G G T A - G C C T T G C G - - - T T - - - G - G T 486.SEQ				
494	T G G T G T G A T A A T T A T C T A C G C C G C G G G T A - G C C T T G C G - - - T T - - - G - G T K8.SEQ				
494	T G G T G T G A T A A T T A T C T A C G C C G C G G G T A - G C C T T G C G - - - T T - - - G - G T K9.SEQ				
494	T G G T G T G A T A A T T A T C T A C G C C G C G G G T A - G C C T T G C G - - - T T - - - G - G T K1 .SEQ				
	- C T G C T T C T A A C C G T C T T C - - - G G A C A A C T T T C A T C T C A A C T - T G A C C Majorit				
	560	570	580	590	600
537	- - C T G C T T C . A A C C G T C . T C - - - G G A C A A C T T T C A T C T C A A C T - T G A C C ABI.SEQ				
536	- . C T G C T T C T A A C C G T C T T . . . . . G A C A A . T T . . . A T - - A A C T - T G A C C ALP.SEQ				
537	- - C T G C T T C T A A C C G T C T T C - - - G G A C A A C T T T C A T C T C A A C T - T G A C C AME.SEQ				
528	- - C T G C T T C T A A C C G T C . T C - - - G G A C A A C T T T C A T C T C A A C T - T G A C C COR.SEQ				
536	- - C T G C T T C T A A C C G T C T T C - - - G G A C A A C T T T C A T C T C A A C T - T G A C C ERI.SEQ				
532	- - . T G . T T . T A A C C G . C . T . . . . . G G A C A A C T T T C A T C T C A A C T - T G A C C F01.SEQ				
506	- - . G C T T C T A A C C G T C T T C - - - G G A C A A . T T C - - - T . A A C T . T G A . C F02.SEQ				
536	- - C T G C T T C T A A C C G T C T T C - - - G G A C A A C T T T C A T C T C A A C T - T G A C C 481.SEQ				
534	- - C T G C T T C T A A C C G T C T T C - - - G G A C A A C T T T C A T C T C A A C T - T G A C C 482.SEQ				
536	- - C T G C T T C T A A C C G T C T T C - - - G G A C A A C T T T C A T C T C A A C T - T G A C C 486.SEQ				
536	- - C T G C T T C T A A C C G T C T T C - - - G G A C A A C T T T C A T C T C A A C T - T G A C C K8.SEQ				
536	- - C T G C T T C T A A C C G T C T T C - - - G G A C A A C T T T C A T C T C A A C T - T G A C C K9.SEQ				
536	- - C T G C T T C T A A C C G T C T T C - - - G G A C A A C T T T C A T C T C A A C T - T G A C C K1 .SEQ				

Fig. 4-6. Continued.

TCGAATCAGGGCGGGACTXXXXXXGXXXXXXX			Majorit	
	610	620	630	
580	TCGAATCAGGGCGGGACT.....G			ABI.SEQ
584	TC.AATCAGGGCGGGACT.....G			ALP.SEQ
580	TCGAATCAG			AME.SEQ
571	TCG			COR.SEQ
579	TCGAATCAGGGCGGGACT.....G			ERI.SEQ
576	TCGAATCAGGGCGGGACT.....G.....			F01.SEQ
549	TC.AATCAGG...GGACT....G			F02.SEQ
579	TCGAATCAGGG			481.SEQ
579	TCGAATCAGGGCGGGACT.....G..			482.SEQ
579	TCGAATCAGGC			486.SEQ
579	TCGAATCAGGC			K8.SEQ
579	TCGAATCAG.G.C.G.A-----G..			K9.SEQ
				K1 .SEQ

Fig. 4-6. Continued.

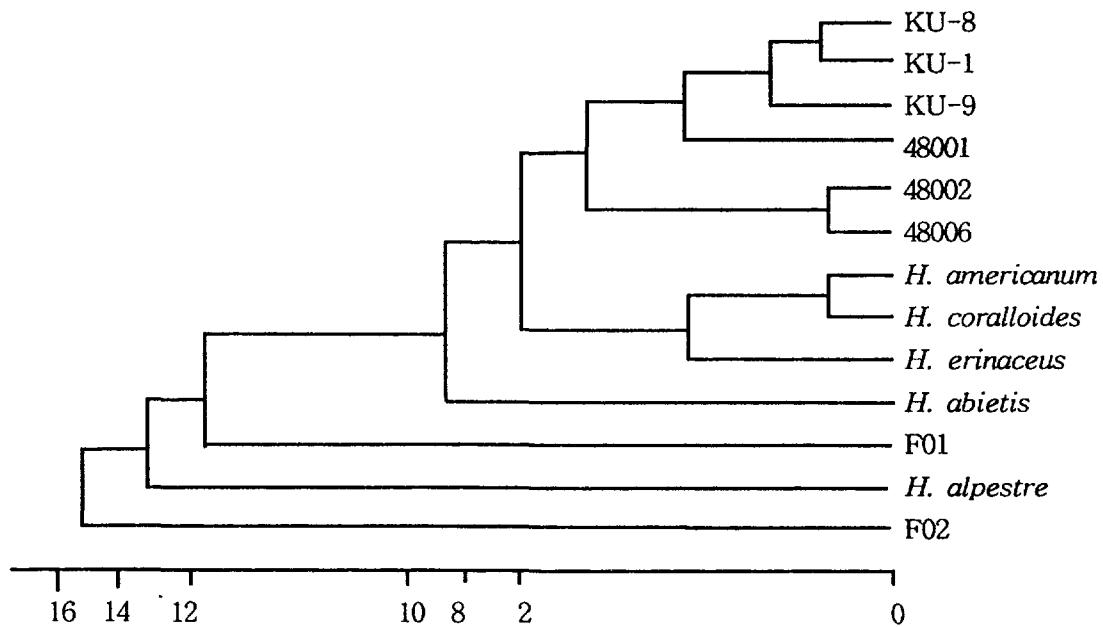


Fig. 4-7. The phylogenetic tree based on 5.8S rDNA and ITS1, ITS2 sequences of the genus *Hericium* spp. by PC/Gene Sequences Analysis Program(Version 6.6, IntelliGenetics, Inc.)와 DNASTAR software package(Madison, WI, USA).

## 참고문헌

- Annette, K., Li, Y., Szaro, T., Bruns, T. D. 1996. Internal transcribed spacer sequences from 38 recognized species of *Suillus* sensu lato: Phylogenetic and taxonomic implications. *Mycologia* 88(5): 776-785.
- Bae, S. C., Seong, K. Y., Lee, S. W., Go, S. J., Eun M. Y. and Rhee, I. K. 1996. Phylogenetic relationships among *Pleurotus* species inferred from sequence data of PCR amplified ITS II region in ribosomal DNA. *Kor. J. Mycol.* 24: 155-165.
- Brunns, T. D., Fofel, R. and Taylor, J. W. 1990. Amplification and sequencing of DNA from fungi herbarium specimens. *Mycologia* 82: 175-184.
- Damaj, M., Jabaji-Hare, S. H. and Charesst, P. M. 1993. Isozyme variation and genetic relatedness in binucleate *Rhizoctonia* species. *Phytopathology* 83: 864-871.
- Daniel, W., Munch, J. C., Botton, B. and Buscot, F. 1996. DNA polymorphism in Morels: Complete sequences of the Internal Transcribed Spacer of genes coding for rRNA in *Morchella esculenta*(yellow morel) and *Morchella conica*(black morel). *Appl. Env. Microbiol.* 62: 3541-3543.
- Forster, H., Coffey, M. D., Elwood, H. and Sogin, M. L. 1990. Sequence analysis of the small subunit ribosomal RNAs of three zoosporic fungi and implications for fungal evolution. *Mycologia* 82: 306-312.
- Fukuda, M. and Tokimoto, K. 1991: Variation of isozyme patterns in the natural population of *Lentinus edodes*. *Proc. Jpn. Acad.* 67: 43-47.
- Hendriks, L., Goris, A., Peer, Y. V., Neer, J., Vancanneyt, M., Kersters, K., Hennebert, G. L. and Wachter, R. 1991. Phylogenetic analysis of five medically important *Candida* species as deduced on the basis of small ribosomal subunit RNA sequences. *J. Gen. Microbiol.* 137: 1223-1230.

Hori, H. and Osawa. 1986. Evolutionary change in 5S rRNA secondary structure and a phylogenetic tree of 352 5S rRNA species. *Biosystem* 19: 163-172.

Illingworth, C. A., Andrews, J. H., Bibeau, C. and Sogin, M. L. 1991. Phylogenetic placement of *Athelia bombacina*, *Aureobasidium pullulans* inferred from sequence comparisons of small subunit RNAs. *Experimental Mycology* 15: 65-75.

Kawamura, N. and M. Goto. 1980. Biochemical characteristics of the isolates of shiitake mushroom (*Lentinus edodes*). Report of the Tottori Mycological Institute. 18: 217-224.

Khush, R. S., Morgan, L., Becker, E. and Wach, M. 1991. A genetic linkage map for *Agaricus bisporus*. In genetic and breeding of *Agaricus*. pp 73-80. Edited by L.J.L.D. Van Griensven. Pudoc. Wageningen, Netherlands.

Ko, K. S., Hong, S. G., Jung, H. S. 1997. Phylogenetic study of *Trichaptum* inferred from nuclear ribosomal DNA sequences. *J. Microbiol.* 35(2); 79-86.

Lee, T. S., Bak, W. C., Kang, H. D. Kim, S. K., Byun, B. H., Yi, C. K., Lee, W. K. and Min, D. S. 1997. Classification of Korea *Lentinus edodes* strains by Random Amplified Polymorphic DNA(RAPD) marker. *Kor. J. Mycol.* 25(3): 219-225.

Moncalvo, J. M., Wang, H. H. and Hseu, R. S. 1995. Phylogenetic relationships in *Ganoderma* inferred from the internal transcribed spaces and 25S ribosomal DNA sequences. *Mycologia* 87: 223-238.

Morton, A., Carder J. H. and Barbara, D. G. 1995. Sequences of the internal transcribed spaers of the ribosomal RNA genes and relationships between isolates of *Verticillium alboatrum* and *V. dahliae*. *Plant Pathology* 44: 183-190.

Nishida, J. and Sugiyama, J. 1993. Phylogenetic relationships among *Taphrina*, *Saitoella*, and other highter fungi. *Mol. Biol. Evol.* 10: 431-436.

O'Donnell, K. 1992. Ribosomal DNA internal transcribed spacers are highly divergent in the phytopathogenic ascomycete *Fusarium sambucinum*. *Curr Genet* 22: 213-220

Park, W. M., Ko, H. G., Park, R. J., Hong, K. S. and Kim, G. H. 1997: Differentiation of *Lentinus edodes* Isolates in Korea by Isozyme Polymorphisms and Random Amplified Polymorphic DNA(RAPD) Analysis. *Kor. J. Mycol.* 25(3): 176-190.

Robert, M., Prillinger, H., IbI, M. and Himmller, G. 1995. Sequences of ribosomal genes and internal transcribed spacers move three plant parasitic fungi, *Eremonium ashbyi*, *Ashbya gossypii* and *Nematospora coryli*, toward *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 41: 31-42

Song, Y. J., Jeong, M. J., Kim, B. G. and Rho, Y. D. 1996. Genetic variability of *Pleurotus ostreatus* monospore isolates by Random Amplified Polymorphic DNA Analysis. *Kor. J. Mycology* 24: 186-205.

Swann, E. and Taylor, J. W. 1993. Higher taxa of Basidiomycetes: An 18S rRNA gene perspective. *Mycologia* 85: 923-936.

Terashima, K., Kawashima, Y., Cha, J. Y. and Miura, K. 1998. Identification of *Armillaria* species from Hokkaido by analysis of the intergenic spacer(IGS) region of ribosomal DNA using PCR-RFLP. *Mycoscience* 39: 179-183.

Welsh, J. J. and Mclelland, M. 1990. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primerw. *Nucleic Acids Research*. 18: 7213-7218.

White, T. J., Burns, T., Lee, S. and Taylor, J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. Eds., M. A. Innis, D. H. Gelfand, J. J. Sninsky, and T. J. White. Academic press, San Diego, California. p 482.

Zervakis, G., Sourdis, J. and Balis, C. 1992: Genetic variability and systematics of eleven *Pleurotus* species based on isozyme analysis. *Mycol. Res.* 98: 329-341.

## 제 5 장 기능성물질 분석

### 제 1 절 서론

노루궁뎅이버섯은 생리학적 효과가 최근에 밝혀져 가고 있으나 아직 일반화되어 있지 않으므로 생산량도 적고 수요도 많지 않다. 최근에 일본과 유럽에서 본 버섯의 균사와 자실체에서 생리활성물질중 특히 노인성 치매를 방지할 수 있고 두뇌발달을 촉진하는 nerve growth factor(NGF)가 풍부히 함유되어 있다는 것이 밝혀지고 이를 NGF를 추출하여 특히를 출원하는등 본 버섯이 생약물질의 자원으로 중요시 되고 있다(Aronone *et al.*, 1994 ; Kuwahara *et al.*, 1990 ; Kimura *et al.*, 1991 ; Kuwahara *et al.*, 1992). Yang *et al.*(1989)은 *H. erinaceum*의 약효가 신체의 면역체계를 강화시키고 위궤양, 십이지장궤양, 만성장염 및 위암, 식도암의 치료에도 효과적이라고 보고하였다. Ahn(1992)은 한국산 약용 버섯을 조사하면서 *H. erinaceum*이 항암 및 면역기능을 촉진시키며 임상치료에서 위궤양, 만성위염, 신경쇠약, 소화불량, 신체허약, 만성위축성위염, 위암, 식도암에 효능을 보고하였다.

Mizuno *et al.*(1992)은 원목재배, 병재배, 봉지재배를 *H. erinaceum*에 적용시켜 재배하였으며 이를 자실체에서 항종양에 효과가 있는 다당류를 보고하였다. 또한 Mizuno(1995)는 노루궁뎅이가 고급요리 및 건강증진식품으로 손색이 없으며 의학적으로도 매우 잠재성이 높은 버섯이라고 기술하였다. Kawagishi *et al.*(1996)은 노루궁뎅이에서 생리활성물질을 추출하여 구조를 밝혀냈으며 그 물질은 nerve growth factor(NGF)로 중추 신경 재생과 치매 치료제로써의 이용가능성을 보고하였다. 또한 생리활성물질로 hercenones, erinacines, polypeptides, fatty acids,

polysaccharides, lectins, phenols, hericerins 등을 함유하고 있으며 phenolics와 fatty acids가 HeLa cells에 cytotoxicity를 지니고 있음을 보고하였으며 (Kuwahara *et al.*, 1992) 세균과 곰팡이에 항미생물성 물질을 보고하였다(Anke, 1977 ; Kuwahara *et al.*, 1992).

따라서 본 연구는 노루궁뎅이버섯의 생리활성물질을 균사체와 자실체로부터 분리 하며 생리활성물질의 높은 수율을 얻을 수 있는 배양조건을 알아내며 그들의 생리 화학적인 성질을 알아보자 하였다.

한편 버섯의 인공재배에 사용되는 물질로서는 cellulose, hemicellulose, lignin을 함유한 원목, 톱밥, 벗짚, 보릿짚 등 농·임산 부산물이 이용된다. 이와 같은 재료를 이용하여 양송이, 표고, 느타리, 영지 등 많은 종류의 버섯이 농가에서 재배되고 있다. 진균은 합성 및 천연배지에서 자라면 세포 밖으로 효소를 분비하여 고분자 물질을 저분자물질로 분해하여 이들을 흡수하여 생존한다. 버섯은 고등균류로써 여러 종류의 protease, lipase, cellulase, hemicellulase, cellulase, laccase, lignin peroxidase, manganese peroxidase 등을 분비하는 것으로 알려져 있다 (Arora and Gill 2000; Ball and Jackson 1995; Sethuraman *et al.*, 1998). 따라서 이들이 분비하는 효소의 성질이나 특성을 연구하는 것은 생리 생화학적 특성뿐만 아니라 공업적으로 유용한 효소를 얻는데 매우 중요하다. 농가에서는 버섯을 재배하고 남은 톱밥은 대부분 비료로 사용하거나 폐기처분하고 있다. 따라서 이와 같은 톱밥을 이용하여 유용한 효소를 추출함은 자원의 재생뿐만 아니라 신규 효소의 분리 차원에서 매우 흥미로운 사항이다. Galactosidase는 nitrophenyl-D-galactoside, melibiose, raffinose, stachyose 등과 같은 oligosaccharide 및 galactomannan과 같은 고분자 탄수화물에 붙어있는 galactose

를 가수분해한다(Bahl and Agrawal 1969). Galactosidase는 galctose가  $\alpha$ - 혹은  $\beta$ -형태로 결합되어 있는 상태에 따라  $\alpha$ -galactosidase, 혹은  $\beta$ -galactosidase로 분류하며 이들은 beet sugar 와 milk 가공과정에 사용된다 (Benno et al., 1987; Kotwal et al., 1998; Somiari and Balog 1995; Xiao et al, 2000).

따라서 본 연구는 버섯을 재배하는 톱밥으로부터 유용한 효소를 탐색하던 과정 *H. erinaceum*을 재배하였던 톱밥배지에서 공업적으로 유용한  $\alpha$ -galactosidase를 추출하였고, 화학적인 특성을 조사하였다. 폐자원의 재활용 측면에서 매우 의미가 있는 접근법이라 사료된다.

## 제 2 절 재료 및 방법

### 1. 항세균성 물질

#### 가. 균주 및 배양

실험 균주는 *H. erinaceum* KU-1을 이용하였다. 배양은 Ko medium을 이용하였다. 고체배지 조성은 glucose 18.02g, arginine 2.613g, ammonium acetate 2.313g, CaCl<sub>2</sub> 0.33g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 8.5g, MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 2.0g, FeSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 0.02g, ZnSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 0.02g, MnSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 0.02g, agar 18.0g과 중류수 1리터 pH는 4.5-5.0이고 28°C에서 배양하였다. 항미생물 물질 생산을 위해 1리터 삼각프라스 크에 HL medium(Kim et al., 2000)을 이용하였다. 액체배지 조성은 glucose 50.0g, yeast extract 10.0g, peptone 10.0g, MnSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 0.05g, FeSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 0.02g, ZnSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 0.004g, CaCl<sub>2</sub> 0.3g, NaNO<sub>3</sub> 0.87g, MnCl<sub>2</sub> · 4H<sub>2</sub>O 0.007g, CuSO<sub>4</sub> · 5H<sub>2</sub>O 0.001g을 넣었다. 1%의 탄소원을 glucose, mannitol, starch,

glycerol, mannose, fructose와 0.2%의 질소원 peptone, ammonium acetate, NaNO<sub>3</sub>, KNO<sub>3</sub>, NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, arginine으로 대치하여 배양하였다. 자실체 생산을 위하여 참나무에 미강 30%을 800ml 용량의 배양병에 담아 1.2기압 121℃에서 1시간 살균 후 접종원을 접종하여 균사배양이 완료되었을 때 16±1℃ 배양실에서 습도 90%내외로 하여 자실체를 형성하였다.

#### 나. 자실체 및 균사의 추출

자실체 300g을 5-6배의 MeOH을 넣고 마쇄하였고 80% MeOH을 2번씩 24시간동안 추출하였다. 추출액은 vacuum evaporator를 이용하여 건조시킨 후 다음 실험을 위해 보관하였다. 균사체는 다양한 영양원에서 배양된 배양액을 여과하고 균사체는 ethyl acetate로 두 번 세척하였다. 여과액은 0.12M phosphate buffer로 pH 3, 5, 7, 9로 조절하였으며, ethyl acetate에 녹여진 것은 40℃로 증발시켰다. 추출 및 분리과정은 Fig. 5-1의 방법으로 진행하였다.

#### 다. antimicrobial activities bioassay

추출액에 대한 antimicrobial activities를 알아보기 위하여 serial dilution assay 와 plate diffusion assay(Heubrger *et al.*, 1940)를 실시하였다. LB배지(NaCl 10g, tryptone 10g, yeast extract 5g, agar 16g, 증류수 1리터)를 이용하여 3종류의 세균 *Escherichia coli* ATCC 8378, *Bacillus subtilis* NIHJPIC 219P, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538을 배지에 도말하였으며 paper disk에 10-12 µg/ml의 추출액을 묻혀 배지위에 올려서 37℃ 항온기에서 24시간 배양 후 저지원의 지름을 측정하여 antimicrobial activities를 조사하였다. 또한 antifungal

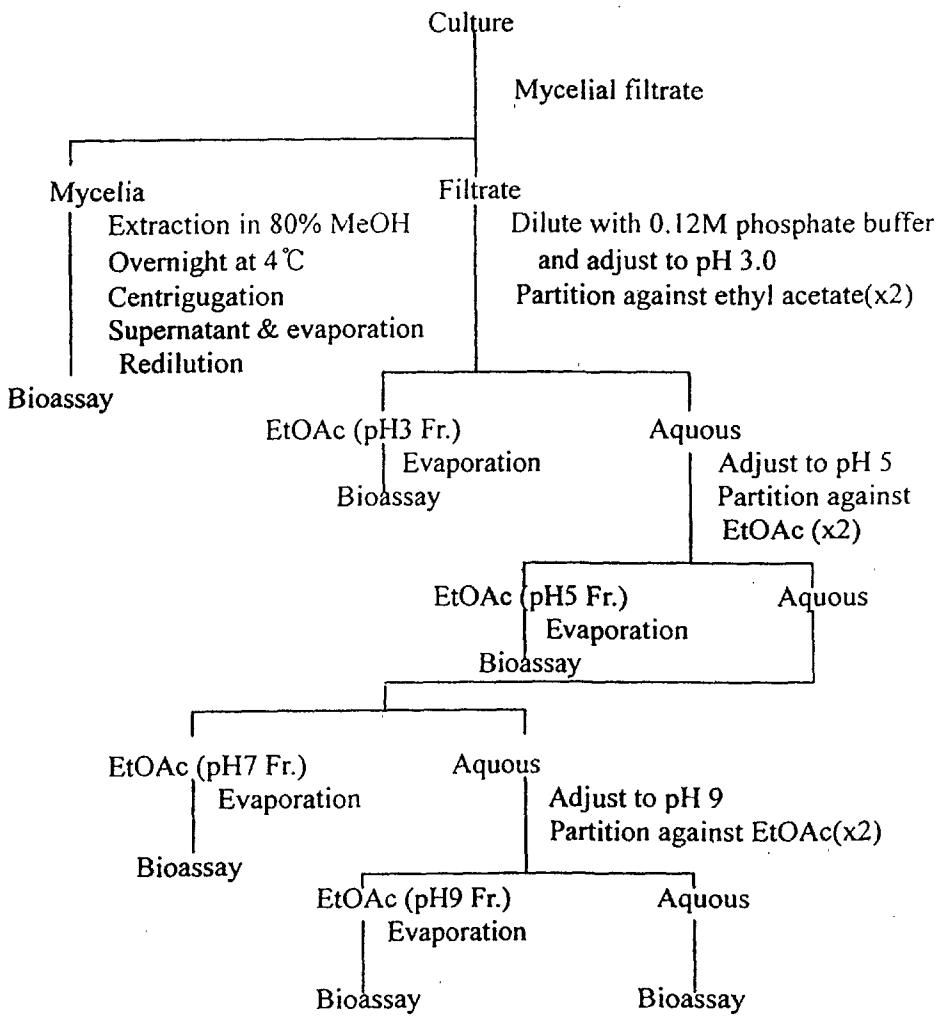


Fig. 5-1. Schematic extraction of antimicrobial substances from liquid culture.

activities를 조사하기 위해서 *Microsporum gypseum*, *Aspergillus niger* ATCC 10404, *Candida albicans* ATCC 10231의 포자( $2 \times 10^7$ CFU/ml)를 도말하여 disk plate assay의 방법으로 측정하였으며 TLC plate 위에 추출액을 옮겨 전개후 PDA배지로 도포하였으며, 각각 곰팡이 포자의 혼탁액을 분사하여 배양후 clean zone의 범위를 측정하여 antifungal activities를 조사하였다.

#### 라. Spectrophotometric Analysis 및 pH3 fraction 생리 화학적 특성

배양액 1,250ml과 750g 자실체, 500g 균사체를 냉동건조후 농축하였으며 98% MeOH 10ml로 녹였다. pH3 fraction의 Rf는 0.5-0.9와 0.1-0.2의 activity bands를 이용하여 MIC(Minimum Inhibitory Concentration)과 MBC(Minimum Bacteriocidal Concentration)로 측정하였다.

#### 마. pH3 분획의 물질 추출

silicagel 60(Merck 300g ; cyclohexane/EtOAc 7:3)을 이용하여 flash chromatography로 처리하여 pH3 분획을 얻었고 MPLC(Labomatic MPLC, column 250×25mm, silica gel 60 ; Merck, 25-40 $\mu$ m, cyclohexane/EtOAc 8:2, flow rat 10ml/min, 7-10bar)로 정제하였다. Rf 수위가 0.5-0.9(1.45g; tr=39-43min)와 0.1-0.2(219; tr=8-10min)에서 수확하였다.

HPLC(Shiseido HPLC system, 201nm detection, column 250×25mm, flow rate 5ml/min, 40-60bar)를 이용하여 Rf 0.5-0.9의 P1(tr=42-43min) 329mg, P2(tr=57-63min) 512mg, P3(tr=72-89min) 32mg, Rf 0.1-0.2의 F1(t=10min) 12mg, F2(tr=13-19min) 62mg, F3(t=24min) 37mg, F4(tr=27-30min) 14mg을 얻

었다.

#### 바. 구조분석

구조는 spectroscopy로 결정하였고 Mass spectra는 Jeol SX102, NMR spectra, Bruker ARX-500, IR spectra를 이용하였고, optimal rotation은 Perkin Elmer 1541 polarimeter를 이용하였으며 녹는점은 Kofler apparatus, IR과 UV spectra는 Perkin Elmer 177과 Jasco Uvide 510 spectrophotometer를 이용하였고, NMR spectra는 Bruker AC 250L spectrometer를 250.1MHz  $^1\text{H}$ 과 62.9MHz  $^{12}\text{C}$ 를 이용하였고 flash column chromatography는 Merk silicagel(0.04–0.06mm), TLC는 Merk HF<sub>254</sub>나 RP-18 F<sub>254</sub> silicagel을 이용하였다.

## 2. 항종양 활성

#### 가. 추출 및 분리

*H. erinaceum* KU-1의 건조한 자실체 77g을 마쇄하여 8시간동안 항온수조에서 추출하여 400ml의 hot water에 넣은 다음 중발 시킨 후 4배 96% 에탄올에서 4°C로 over night 후 20°C 8,000rpm으로 원심분리하였으며 동결건조하여 4°C 7일 간 투석하였다. protein-bound 다당류는 향기와 맛이 없는 짙은 갈색가루 1.2g을 얻었다. Fig 5-2에 도식하였다.

#### 나. 정제 및 분석

##### 1) DEAE Sephadex A-25 column Chromatography

DEAE Sephadex A-25 resin은 0.01M borate buffer(pH8.7) 95ml/hr, fraction 을 625nm로 측정하여 95mg을 얻었고, 0.01M-1.5M gradient borate buffer으로

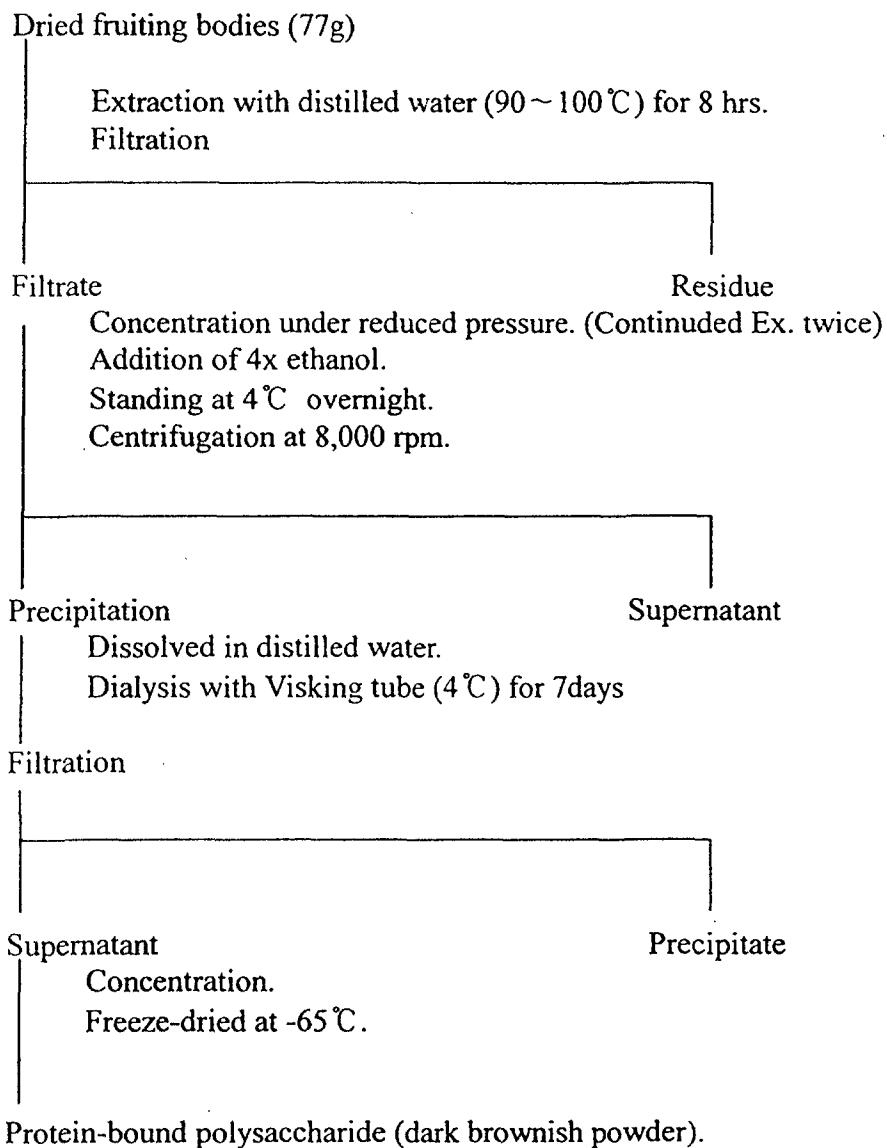


Fig. 5-2. Preparation of the protein-bound polysaccharide from the fruiting bodies.

811mg의 갈색 가루를 얻었다(Fig. 5-3).

### 2) Sephadex G-200 Gel Filtration Chromatography

Sephadex G-200을 0.01M sodium phosphate buffer로 세척후 0.3M NaCl로 끓인 후 column  $2.8 \times 7\text{cm}$ 에 충진하였다. flow rate 26ml/hr이었고, 625nm에서 측정하였다. Fr. A; 4.88g, Fr. B; 95mg, Fr. C; 811mg, Fr. D; 488mg을 얻었으며 Fig 5-3에 과정을 도식하였다.

### 3) Fraction D의 화학적 분석

*H. erianceum* KU-1 Fraction D의 화학적 분석을 위해 Molish test, Iodine test, Anthrone test, Ninhydrin test, Lowry Folin test, Biuret test를 하였다.

### 4) Fraction D의 당류 assay

Total Polysaccharide contents는 glucose를 표준당으로 이용하여 Anthrone method으로 진행하였다. Monosaccharide analysis는 2mg 추출물을 2% anhydrous HCL-methanol 2ml에 녹였으며 산화를 방지하기 위해  $\text{N}_2$  gas로 충진하였다. Methanolysis는  $80 \pm 5^\circ\text{C}$ 에서 20시간 처리하였다. 여과물은 2N NaOH로 중화시켜  $-65^\circ\text{C}$ 에서 4시간 증발하였다. 1ml pyridine을 녹이고 trimethylsilylation을 위해 0.2ml hexamethyln disilazane과 trimethyl chlorosilane을 넣어 혼들었다. gas liquid chromatography(Pye Unicam GLC)로 Table 5-1의 조건으로 분석하였다. Fig. 5-4에서는 단당류의 분석의 일련과정을 도식하였다.

### 5) Fraction D의 protein assay

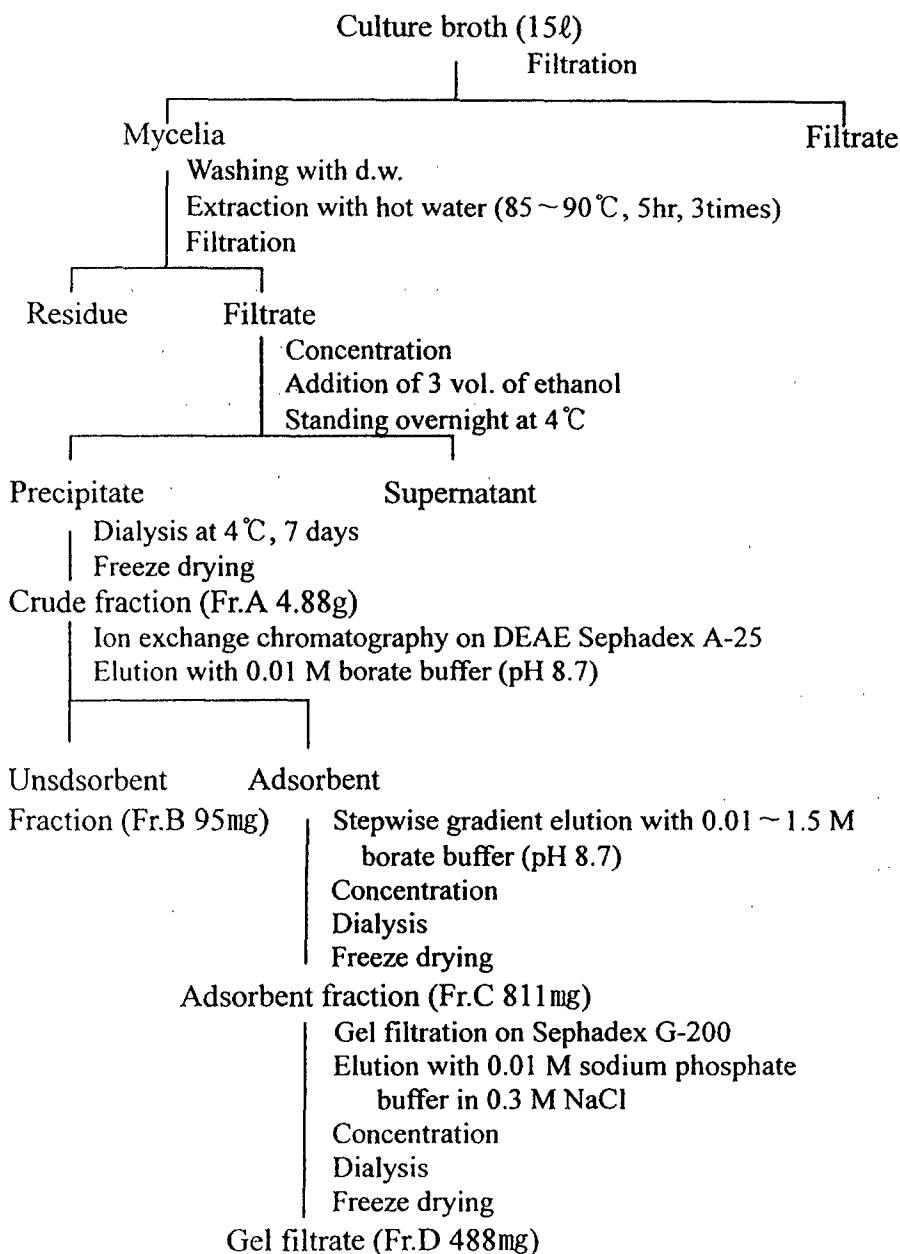


Fig. 5-3. Extraction and separation of polysaccharide fractions from the cultured mycelia.

Table 5-1. Measurement condition of G.L.C.(Pye Unicam).

Columns	AN amino acid : 9mm $\phi$ x550mm B amino acid : 9mm $\phi$ x100mm
Ion Exchange Resin	AN : Hitachi Custom Ion Exchange Resin No. 2613 B : Hitachi Custom Ion Exchange Resin No. 2611
Buffer Flow Rate	Buffer : 60ml/hr Ninhydrin Reagent : 30ml/hr
Column Temp.	55 °C
Reaction Bath Temp.	100 °C
Photometer	Measuring wavelength : 440 and 570nm

Assay material (2.0 mg)

Mixing with 2 ml of 3% HCl-MeOH  
Substituting air in the ampule with N<sub>2</sub> and sealing  
Methanolysis at 80±5°C for 20 hrs  
Filtration

Methanolysate

Evaporation in reduced pressure  
Dissolving in 1 ml of pyridine  
Trimethylsilylation with 0.2 ml of TMCS and 0.2 ml of HMDS

TMS-monosaccharides

G.L.C. analysis

Fig. 5-4. Procedure of monosaccharide analysis.

Fraction D의 단백질을 알아보기 위해 Lowry-Folin method로 albumin을 표준 단백질로 하여 750nm에서 알아보았다. 아미노산 분석을 위해 Fraction D를 6N-HCl 50ml에 녹였다. Hydrolysis는 110±5°C에서 20시간 하여 건조시킨 후 0.1N HCl과 0.2M sodium citrate buffer(pH2.2)의 10ml에 녹여 Table 5-2 조건에서 Hitachi amino acids autoanalyzer Model KLA-89로 분석하였고 Fig. 5-5의 과정으로 진행하였다.

#### 6) SDS-PAGE 전기영동

전기영동은 10% polyacrylamide slab gel(pH 7.0-9.5)에서 진행하였고 coomassie brilliant blue로 염색하여 band를 확인하였다. molecular weight marker로 phosphprylase b(94,000), alumin(67,000), ovalbumin(43,000), carbonic anhydrase(30,000), trypsin inhibitor(20,100),  $\alpha$ -lactalbumin(14,400)를 이용하였다.

#### 7) IR과 NMR 분석

IR 분석은 potassium bromide pellet과 JASCO grating infrared spectrophotometer A 102로 기록하였고, NMR은 JEOL GSX-400 spectrometer로 측정하였다. 시료는 0.3M NaOD의 0.5ml에 녹였다.

#### 다. 항종양 test

실험동물은 20-25g의 ICR strain(male) mice를 한국화학연구소에서 분양받았다. 복수암 세포 sarcoma 180 cells을 복막에 주입하였으며 암세포 처리 농도는  $1 \times 10^7$  cell/ml로 조절하였다. fraction A와 D를 10ml saline에 녹여 Fig. 5-6와 같

Table 5-2. Measurement condition of amino acid analyzer.

Column	1.5% OV-1 (80~100 mesh shimalite) 4mm ID x1.5m boronsilicate Glass column
Temperature	Column : 160°C Detector : 190°C Injector : 190°C
Flow rate	N <sub>2</sub> : 50ml/min. H <sub>2</sub> : 60ml/min. (0.8kg/cm <sup>2</sup> ) Air : 88ml/min. (1.2kg/cm <sup>2</sup> )

Assay material (2.0 mg)

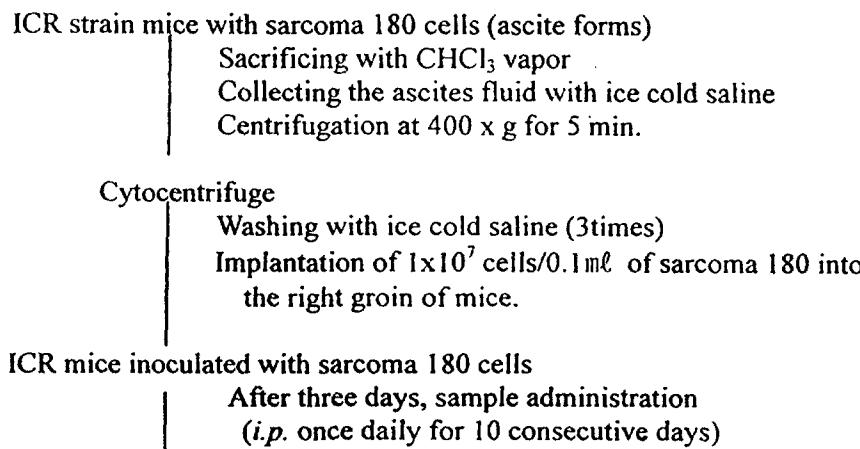
Mixing with 6N HCl  
Substituting air in the ampule with N<sub>2</sub> and sealing  
Hydrolysis at 110 ± 5 °C for 24hrs.  
Filtration

Hydrolysate

Evaporation in reduced pressure  
Dissolving in 0.1 N HCl  
Dilution with 0.2 M sodium citrate buffer (pH 2.2)

Amino acid analysate

Fig. 5-5. Procedure of amino acid analysis.



Control group	Test group	Test group	Test group	Test group
Physiological saline	10mg/kg/day	20mg/kg/day	50mg/kg/day	100mg/kg/day
10 days ( <i>i.p.</i> )				

Sacrificing 28 days after tumor implantation

Excising the tumors

Weighing solid tumors

Fig. 5-6. Procedure of antitumor test of each fractions on mice bearing sarcoma 180.

이 처리하였으며 tumor inhibition ratio(%)=Cw-Tw/Cw×100(Tw:처리구 종양무게 평균, Cw: 대조구 종양무게 평균)으로 측정하였다.

### 3. $\alpha$ -galactosidase 특성

#### 가. 시료준비

고려대학교 생명공학원에 보존중인 균주 노루궁뎅이버섯(*Hericium erinaceum* KU-8)은 Malt extract agar(MEA) 배지를 사용하여 배양하였다. MEA 배지의 조성은 증류수 1.0 liter 당 malt extract 20.0 g, peptone 1.0 g, glucose 20.0 g, yeast extract 1.0 g을 녹여 만들었다. 각 사용한 균주는 MEA에 10일간 배양하고, 250 ml 삼각 flask에 참나무 톱밥과 미강을 80 : 20 (v/v)으로 혼합한 후 70%의 수분을 첨가하여 고압 살균하였다. 이에 MEA에서 배양한 균사체를 접종하고 이를 다시 12일간 배양하여 접종원으로 사용하였다.

1,000ml 배양병에 참나무 톱밥과 미강을 80 : 20 (v/v)으로 혼합한 후 70%의 수분을 첨가하여 고압 살균하였다. 살균된 배지에 접종원을 접종하여 25°C 배양실에서 균사를 활착시킨 후  $16\pm1^\circ\text{C}$  밭이실에서 자실체를 유도하여 수확하였으며 배양병에 남아 있는 균사체와 폐톱밥을 이용하여 실험에 사용하였다.

#### 나. 효소추출

버섯을 재배한 톱밥배지는 homogenizer를 사용하여 15,000 rpm으로 10초간 2번 분쇄하였다. 분쇄한 톱밥 50 gram은 여러종류의 100 ml 추출액에 넣어 간간히 저어주면서 1 시간 동안 추출하였다. 이를 여러겹의 가제를 사용하여 톱밥을 비롯한 불용성 성분을 거른 후 여과액은 12,000 g로 25분간 원심분리하여 상동액을

효소활성 측정에 사용하였다. 사용한 추출액의 조성은 다음과 같다. 증류수 (Distilled water), 1% 식염수 (1.0% NaCl), 0.1 M phosphate buffer pH 7.4, 0.1 M phosphate buffer containing 10% glycerol, 0.5% Triton X-100, 0.1 M phosphate buffer pH 7.4 containing 0.25% Triton X-100을 이용하였다.

#### 다. 효소 분리

톱밥배지를 2배의 증류수를 넣어 추출한 후 추출물을 원심분리하여 고형물과 효소 추출액을 분리시켰다. 효소 추출액에 3배의 cold acetone을 넣고 4°C에서 6시간 동안 정치시켜 단백질을 침전시켰다. 침전한 단백질은 12,000 g로 25 분간 원심분리하여 상등액은 버리고 침전물은 회수하여 이를 다시 소량의 0.1 M phosphate buffer pH 7.4에 녹였다. 녹인 단백질은 양이온 교환수지 DE52가 충진된 column (18 × 5 cm)의 윗 부분에 loading하고 0.1 M phosphate buffer, pH 7.4로 용출시켰다. Resin에 부착된 단백질은 0.0 ~ 0.6 M NaCl이 담긴 phosphate buffer로 elution 시키고 fraction collector를 사용하여 2.6 ml 받았다. 각 fraction은 효소의 활성과 단백질 함량을 측정하였다.

#### 라. 효소활성 측정

효소활성을 위하여 5 mM *para*-nitrophenyl (PNP)- $\alpha$ -D-galactoside가 담긴 50 mM acetate buffer (pH 6.0) 0.5 ml를 준비하였다. 효소 반응은 효소액 20  $\mu\text{l}$ 를 반응액에 넣어 시작하였고 37°C에서 20분간 반응시켰으며 이를 0.4 M Glycine-NaOH buffer 2 ml를 넣어 중지 시켰다. 유리된 p-nitrophenol의 함량은 spectrophotometer를 이용하여 410 nm에서 흡광도를 측정하였다. 천연기질인

melibiose를 사용하였고, 반응액은 50 mM acetate buffer pH 6.0 이었으며 활성 측정은 이당류가 가수분해되어 생성된 glucose의 함량을 구하였다. 효소활성의 1 unit는 사용한 효소의 양에 의하여 1 분간 지질의 분해 산물을 측정하여 계산하였다.

#### 마. 온도, pH, 및 solvent의 영향

효소의 활성에 미치는 pH의 정도는 50 mM acetate buffer (pH 3.5-6.0), phosphate buffer (pH 6.0-7.5), glycine-NaOH buffer (pH 9-10)를 사용하였다. Solvent가 효소의 활성에 미치는 영향은 50 mM acetate buffer를 사용하였고 methanol, ethanol, acetone, 및 isopropanol을 이용하였다.

효소활성에 미치는 온도의 영향은 50 mM acetate buffer를 사용하여 각기 온도에서 20 분간 반응시켜 활성을 측정하였다.

#### 바. 단백질 정량

시료에 함유된 총 단백질 함량은 Bovine serum albumin을 표준 시료로 사용하여 Bradford 방법(1976)을 이용하여 측정하였다.

## 제 3 절 결과 및 고찰

### 1. 항세균성 물질

#### 가. 배지별 효과

접종 12일 후 질소원과 탄소원에서의 군사생장과 antimicrobial activity를 알아

보았다. 그 결과 탄소원에서 1% glucose와 fructose에서 우수한 결과를 보여주었다(Table 5-3). 또한 질소원에서 0.2% ammonium acetate와 NaNO<sub>3</sub>에서 우수한 균사생장과 antimicrobial activity를 보여주었다(Table 5-4). 결과로 넣지는 않았지만 탄소원을 7%와 1.4%탄소원을 이용하여 실험하였지만 antimicrobial activity의 변화에는 영향이 없었으며 탄소원 1%와 질소원 0.2%에 가장 효과가 높게 나타났다.

#### 나. antimicrobial activities bioassay

액체배지에서 배양된 pH fraction은 세균과 곰팡이의 생장을 억제하였다. 특히 pH3 fraction은 *Staphylococcus aureus* ATCC에서 효과가 가장 우수하였고 (Table 5-5, Fig. 5-7, 5-9), Ko 배지에서 추출된 TLC Rf 0.89에서도 관찰되었다. 액체배지에서 추출된 pH3 fraction은 TLC에서 세균에 대한 저지를 볼 수 있었다(Fig. 5-8). Rf 0.56과 0.91은 자실체에서 나온 추출물도 antimicrobial substances를 관찰하였다. MIC와 MBC test에서 phenol-like compounds(P1, P3)는 Rf 0.5-0.9로 2.0-4.3cm의 지름을 관찰하였고, fatty acid-like compounds(F1, F4)는 Rf 0.1-0.2로 1.2-1.8cm의 지름을 관찰하였다(Fig. 5-10, 5-11, 5-12). 또한 3가지 곰팡이도 동일한 방식으로 진행하였는데 *Microsporum gypseum*는 1.33cm *Aspergillus niger* ATCC 10404는 0.9cm, *Candida albicans* ATCC 10231는 1.43cm의 저지원을 형성하였다. pH3 fraction *Staphylococcus aureus* ATCC 6538의 항세균성 효과는 1:1-1:500의 희석에서 1.3-4.3cm의 저지를 나타냈다(Fig. 5-10). *Escherichia coli* ATCC 8378과 *Bacillus subtilis* NIHJPIC 219P에서 높은 효과를 보여주었다. 각각 1.2-3.2cm와 1-2.8cm의 저지를 보여주었다.

Table 5-3. Effects of carbon sources on mycelial growth and antimicrobial activity.

		carbon sources (1.0%)					
media		glucose	mannitol	starch	glycerol	mannose	fructose
mycelial growth (g)	Ko <sup>a</sup>	18.5	12.0	11.7	10.3	12.5	20.6
	HL	35.3	26.9	25.7	23.7	28.1	38.8
antimicrobial activity (cm)	Ko	2.8	1.8	1.7	1.5	1.9	3.3
	HL	3.8	2.9	2.5	1.9	2.4	4.7

a : Ko medium (one plate), HL : HL medium (one flask).

Table 5-4. Effects of nitrogen sources on mycelial growth and antimicrobial activity.

		Nitrogen sources (0.2%)					
media		peptone	ammonium acetate	NaNO <sub>3</sub>	KNO <sub>3</sub>	NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	arginine
mycelial growth (g)	Ko <sup>a</sup>	9.8	15.3	11.9	10.4	10.0	11.1
	HL	19.7	28.4	37.3	26.7	19.8	22.8
antimicrobial activity (cm)	Ko	1.7	4.2	3.8	2.4	1.6	2.5
	HL	1.5	3.5	4.5	2.1	1.8	1.5

a : Ko medium (one plate), HL : HL medium (one flask).

Table 5-5. Antimicrobial activity of pH3 in different dilution.

strains		dilution rate					
		1	1/10	1/50	1/100	1/500	Control <sup>a</sup>
bacteria	<i>S. aureus</i> ATCC 6538	4.3 <sup>b</sup>	2.4	1.9	1.5	1.3	0.7
	<i>B. subtilis</i> NIHJ PIC 219P	3.2	2.1	1.5	1.2	1.2	0.7
	<i>E. coli</i> ATCC 8378	2.8	1.5	1.2	0.9	1.1	0.7
	<i>A. niger</i> ATCC 10404	1.43	0.9	0.8	0.8	0.7	0.7
fungi	<i>M. gypseum</i>	1.33	0.8	0.7	0.7	0.7	0.7
	<i>C. albicans</i> ATCC 10231	0.9	0.8	0.7	0.7	0.7	0.7

a : Distilled water

b : Antimicrobial activity : Diameter (cm) of inhibition zone.

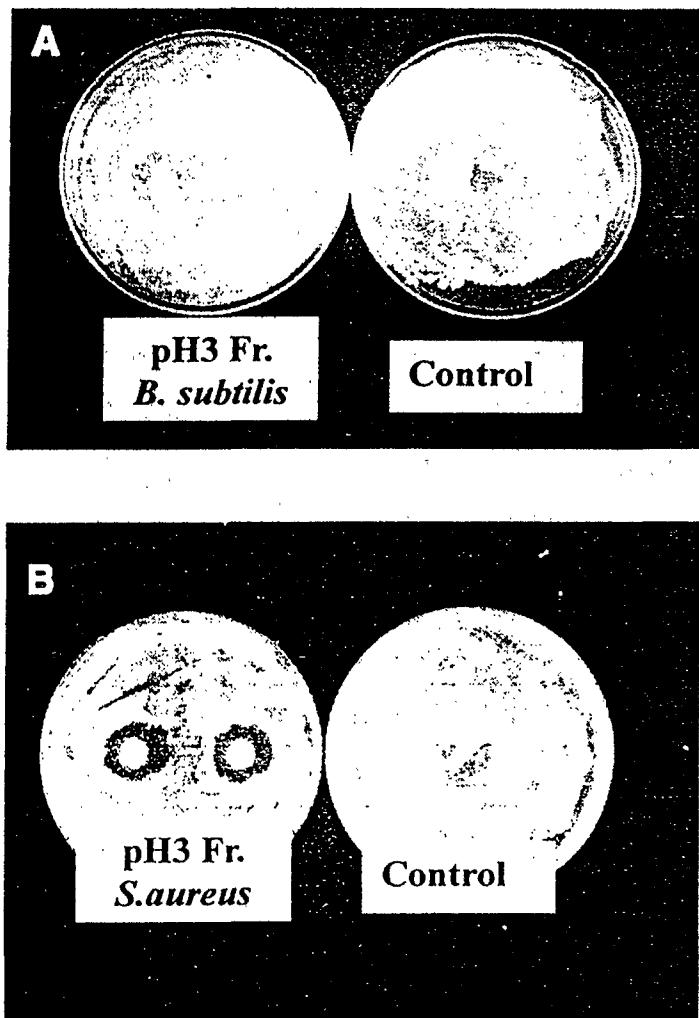


Fig. 5-7. Antimicrobial activity of plB fraction from KU-1 against *B. subtilis* NIHJPIC219P(A) · *S. aureus* ATCC 6538(B). Left: pH3 fr., Right: Blank(Control).

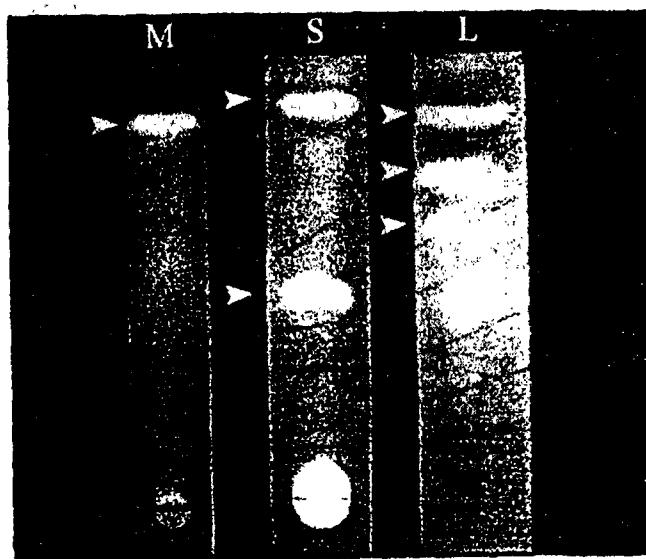


Fig. 5-8. The antimicrobial active bands of pH3 fraction from myclium of Ko medium, fruiting body of SR medium, and liquid culture of HL medium.

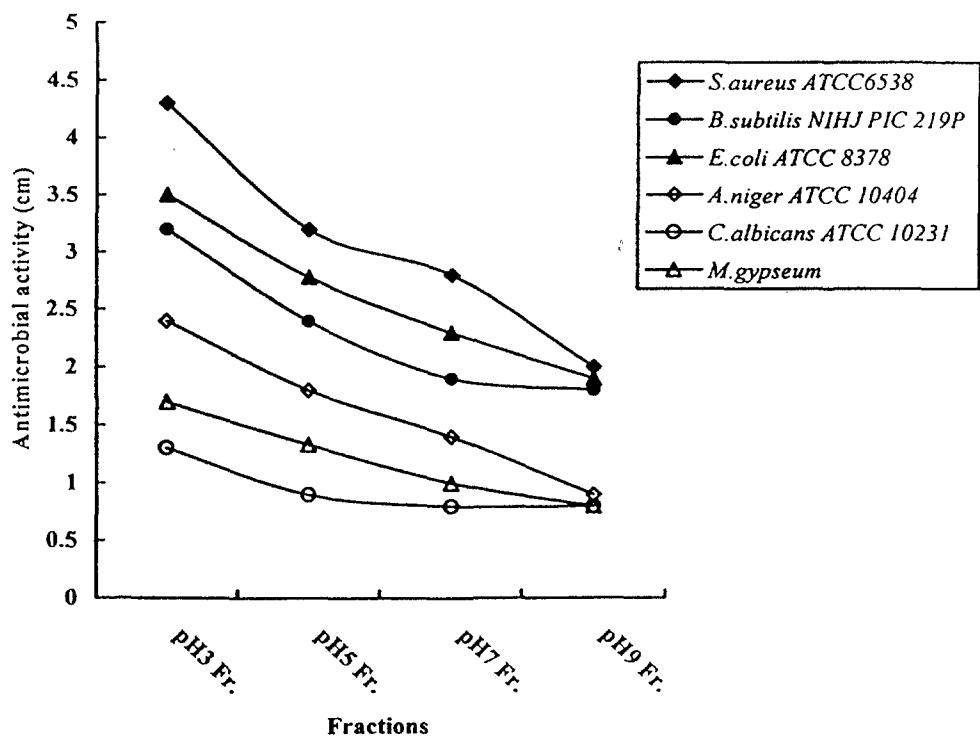


Fig. 5-9. Effects of pH on antifungal and antibacterial activities.

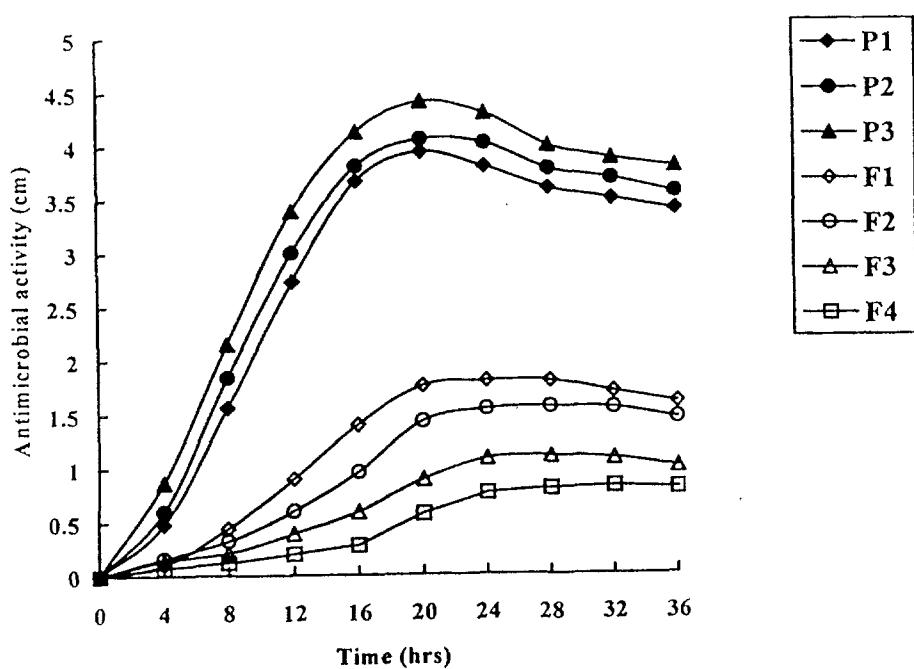


Fig. 5-10. Effects of antimicrobial compounds on th growth of *S. aureus* ATCC 6538.

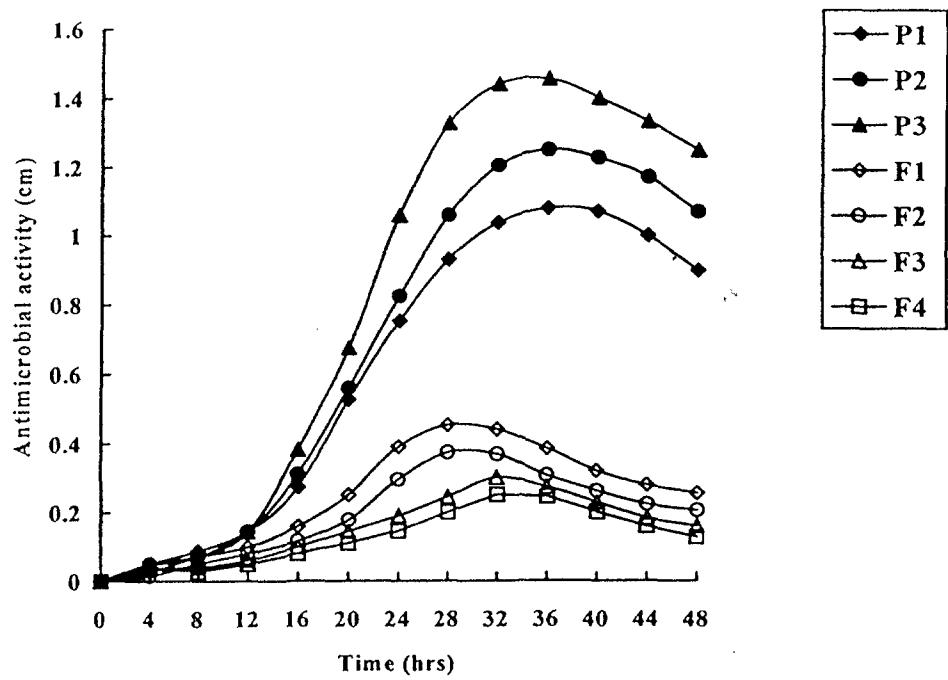
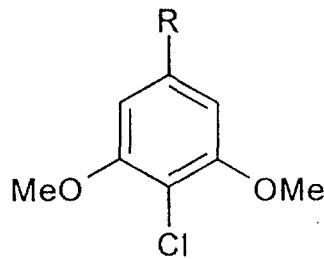
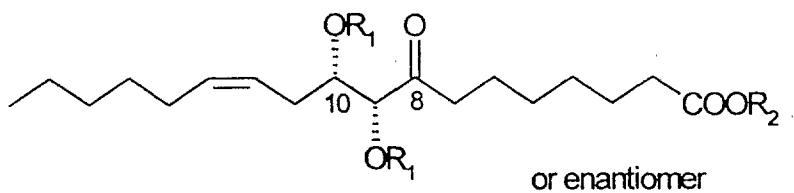


Fig. 5-11. Effects of antimicrobial compounds on th growth of *A. niger* ATCC 10404.



1. R = CH<sub>3</sub> (p-anisaldehyde)
2. R = CH<sub>2</sub>OH (4-chloro-3,5-dimethoxybenzyl alcohol)
3. R = CHO (4-chloro-3,5-dimethoxylbenzaldehyde)



	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	
1.	-H	-H	(9,10-dihydroxy-8-oxo-12-octadecenoic acid)
2.	-OAc	-H	(linoleic acid)
3.	-H	-CH <sub>3</sub>	(S-coriolic acid)
4.	-C(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	-H	(Elaidic acid)

Fig. 5-12. Structures of antimicrobial compounds. Top: 1=P1, 2=P2, 3=P3.  
Below: 1=F1, 2=F2, 3=F3, 4=F4.

(Fig. 5-7).

*Staphylococcus aureus* ATCC 6538은 P3에 매우 강력한 저지를 나타내었다 (Table 5-6). pH3 fraction은 353nm에서 흡광도를 보여주었으며 무색의 수용성 물질이었다. 유기용매와 silica gel column chromatography에 의해 정제량이 10-15mg/liter이었고 TLC로 전개되었을 때 6-8의 다른 물질의 band를 보여주었다(Table 5-7). 우수한 antimicrobial activity의 P1, P2, P3는 Rf가 0.5-0.9에서 band pattern을 보여주었으며, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538에 대한 pH3 fraction과 P3 compound의 MIC는 각각 5.3-6.0 $\mu$ g/ml, 1.7-2.0 $\mu$ g/ml이었다(Table 5-6).

#### 다. pH3 fraction의 분리

pH3 fraction(2.4g)은 MPLC에서 Rf값이 0.5-0.9(1.45g ; tr=39-43min)과 0.1-0.2(219mg ; tr=8-10min)이었고, HPLC의 Rf값은 0.5-0.9로 LiChroPrep Diol에 의해 P1은 329mg(tr=42-43min), P2는 512mg(tr=57-63min), P3은 32mg(tr=72-89min)이었고, HPLC LiChroGel PS1에 의해 Rf가 0.1-0.2에서 F1은 12mg(t=10min), F2는 62mg(tr=13-19min), F3은 37mg(tr=72-89min), F4는 14mg(tr=27-30min)을 얻었다(Fig 5-12, Table 5-6).

#### 라. pH3 fraction의 구조분석

Mass, NMR에 의한 EI-MS m/z(M<sup>+</sup>)으로 P1은 분자량이 186.0460이었으며 <sup>1</sup>H 와 <sup>13</sup>C NMR(CDCl<sub>3</sub>)은 δ 2.35(3H, s, Me-1), 3.88(6H, s, Ome), 6.42(2H, s, 2, 6), δ 21.9(Me-1), 56.2(Ome), 105.6(2.6), 107.5(4), 137.4(1), 155.7(3,5)로 나타났으며

Table 5-6. Antimicrobial activity of pH3 fraction and compound P3 measured by minimum inhibitory concentration.

	Strains	MIC ( $\mu\text{g/ml}$ )	
		pH3 fraction	P3 compound
Bacteria	<i>S. aureus</i> ATCC 6538	5.3~6.0	1.7~2.0
	<i>B. subtilis</i> NIHJ PIC 219P	$\geq 10.0$	$\geq 3.5$
	<i>E. coli</i> ATCC 8378	7.0~9.6	$\geq 2.0$
Fungi	<i>A. niger</i> ATCC 10404	23.0~24.5	5.0~7.2
	<i>M. gypseum</i>	54.3~63.0	$\geq 10.0$
	<i>C. albicans</i> ATCC 10231	195.0~202.0	$\geq 6.0$

Table 5-7. Physio-chemical properties of powder of pH3 fraction.

pH3 fraction		Physio-chemical properties
Crystal appearance		White powder
Solubility	Insoluble	MeOH, EtOAC, Hexane, BuOH
	Soluble	H <sub>2</sub> O, Acetone
Color reaction	Negative	Iodine, Ninhydrin
	Positive	Dragendorff's reagent
TLC (Silicagel 60F254)		Rf 0.1 ~ 0.2, Rf 0.5 ~ 0.9

IR(1464, 1595  $\text{cm}^{-1}$ )이었다. 이것은 이전에 합성이 되어졌으나 자연에서 얻어진 것은 이번이 최초였다(Fig 5-13). P2는 분자식이  $\text{C}_9\text{H}_{11}\text{O}_3\text{Cl}$ (m/z 202.0398)으로 P1과 유사했는데  $^1\text{H}$ 와  $^{13}\text{C}$  NMR( $\text{CDCl}_3$ )은  $\delta$  3.98(6H, s, Ome), 4.66(2H, s,  $\text{CH}_2$ -1), 660(2H, s, 2, 6)과  $\delta$  56.2(Ome), 65( $\text{CH}_2$ -1), 102.9(2.6), 109.5(4), 140.5(1), 156.0(3.5); IR V<sub>max</sub>  $\text{cm}^{-1}$ ; 1463, 1595, 3257으로 결과를 종합해 볼 때 4-chloro-3,5-dimethoxybenzyl alcohol이었다(Fig 5-14). P3 compound는  $\text{C}_9\text{H}_9\text{O}_3\text{Cl}$ (m/z 200.0217)으로  $^1\text{H}$ 와  $^{13}\text{C}$  NMR( $\text{CDCl}_3$ )은  $\delta$  3.98(6H, s, Ome), 7.12(2H, s, 2, 6), 9.93(1H, s, CHO)과  $^{13}\text{C}$  NMR( $\text{CDCl}_3$ )에서  $\delta$  56.6(Ome), 105.2(2,6), 117.8(4), 135.2(1), 156.7(3.5), 190.9(CHO); 4-chloro-3,5-dimethoxybenzaldehyde이었다(Fig 5-15).

F1은  $\text{MH}^+$  m/z; 329,  $\text{M}+\text{Na}^+$ :351,  $\text{M}+\text{K}^+$ :367으로 분자식이  $\text{C}_{18}\text{H}_{32}\text{O}_5$ 로 328.2244 이었다.  $^{13}\text{C}$  NMR( $\text{CDCl}_3$ )에서  $\delta$  210.52, 177.66, 134.22, 123.95, 77.91, 71.57, 37.68, 33.54, 32.28, 31.49, 29.24, 28.65  $\times$  2, 27.33, 24.38, 23.09, 22.55, 14.04로 나타났고 IR은 2개의 carbonyl기( $1700, 1680\text{cm}^{-1}$ )와 1개의 hydroxyl( $3400\text{cm}^{-1}$ )이었으며  $^1\text{H}$  NMR( $\text{CDCl}_3$ )은 Table 5-8, Fig 5-16에서 보여주고 있다. F2와 F3, F4는 Table 5-8, Fig 5-17 5-18, 5-19에 나타내었다.

## 2. 항종양 활성

### 가. 다당류 분리 및 추출

전조 자설체 77g에서 3.5g의 추출물을 얻었으며 3.95%의 수율이었다. 15리터의 액체배양 후 4.88g의 짙은 갈색 분말 Fr A를 얻었다. DEAE Sephadex A-25 column으로 저이온 buffer로 95mg Fr B와 고이온 buffer로 81mg Fr C를 얻었

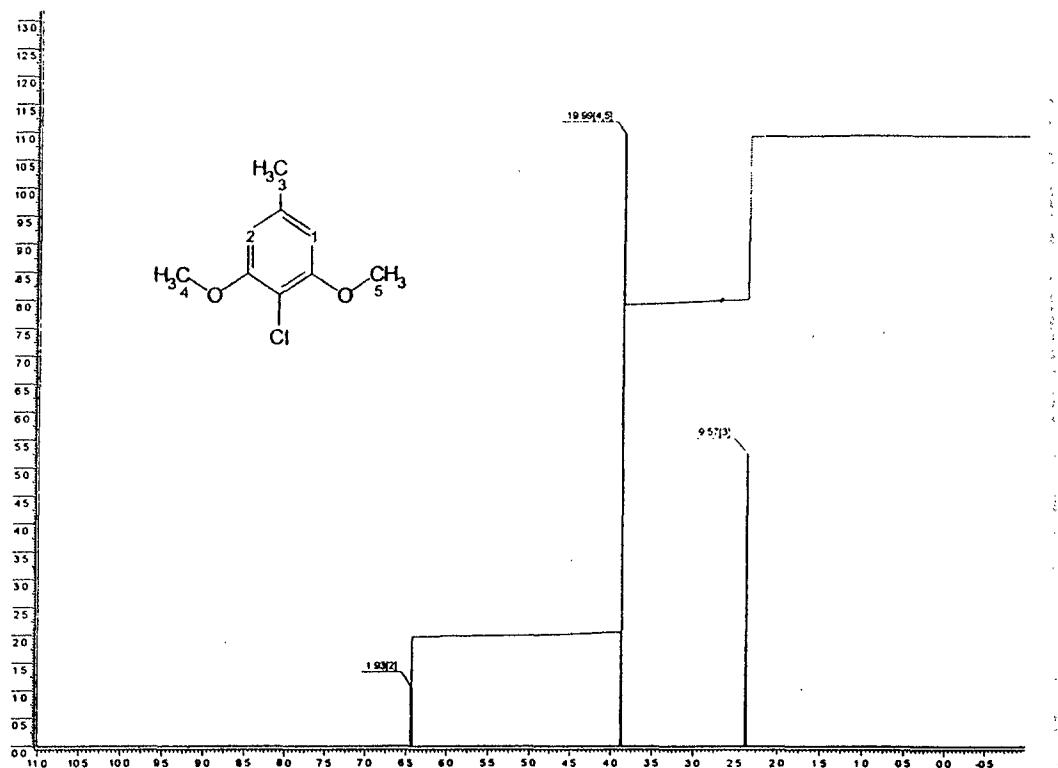


Fig. 5-13.  $^1\text{H}$ -Nuclear magnetic resonance spectrum and chemical structure of PI compound.

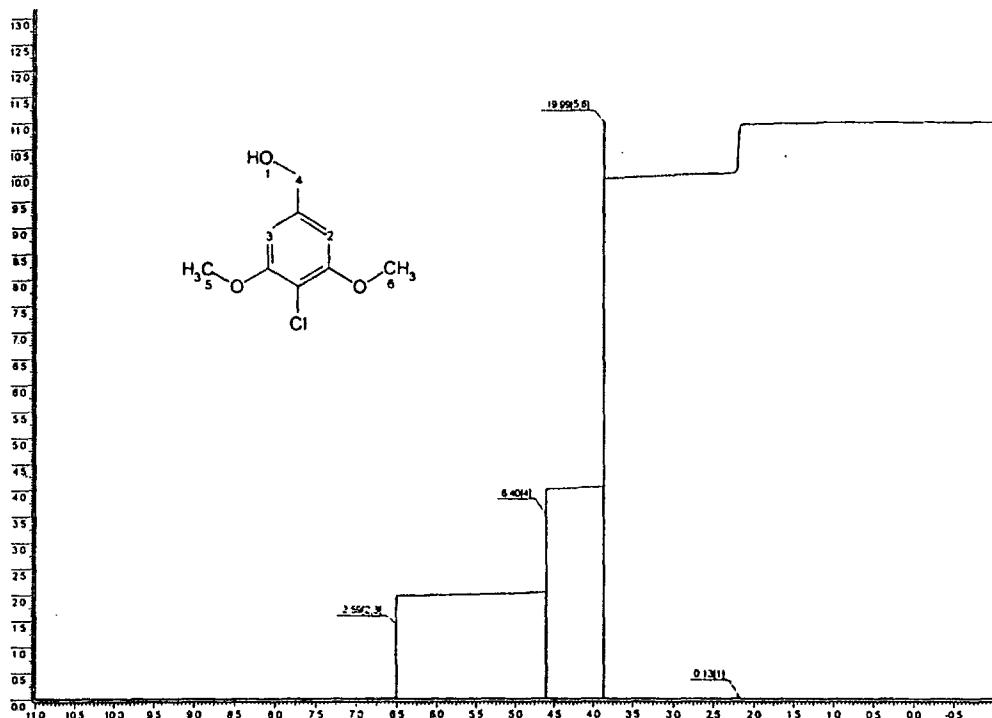


Fig. 5-14. <sup>1</sup>H-Nuclear magnetic resonance spectrum and chemical structure of P2 compound.

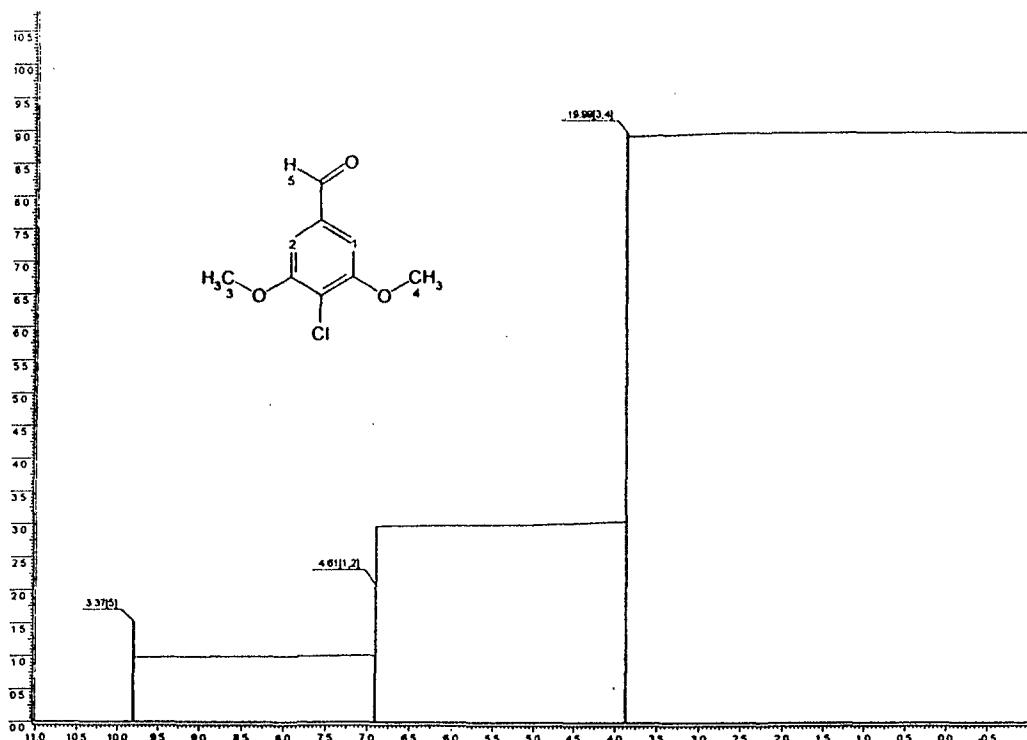


Fig. 5-15. <sup>1</sup>H-Nuclear magnetic resonance spectrum and chemical structure of P3 compound.

Table 5-8.  $^1\text{H}$  NMR assignments for compounds F1 - F4.

	ppm (multiplicity, J in Hz)			
	F1 ( $\text{CDCl}_3$ )	F2 ( $\text{CDCl}_3$ )	F3 ( $\text{CDCl}_3$ )	F4 ( $\text{CD}_3\text{OD}$ )
H-2	2.35 (t) (7.32)	2.34 (t) (7.33)	2.30 (t) (7.33)	2.27 (t) (7.33)
7	2.48 (ddd) (17.22, 8.70, 6.60)	2.45 (m)	2.48 (ddd) (17.12, 8.06, 6.60)	2.65 (dt) (2.20, 7.33)
	2.61 (ddd) (17.22, 8.06, 6.60)		2.59 (ddd) (17.12, 8.32, 6.60)	
9	4.09 (d) (1.46)	5.12 (d) (2.56)	4.09 (d) (2.57)	4.04 (d) (8.06)
10	3.99 (dt) (1.46, 6.96)	5.35 (dt) (2.56, 7.33)	3.98 (dt) (2.57, 7.33)	4.00 (ddd) (8.06, 7.33, 6.23)
11	2.44 (ddd) (7.33, 6.96, 1.46)	2.42 (dd) (7.33, 7.32)	2.45 (ddd) (7.33, 6.96, 1.46)	2.38 (ddd) (14.66, 7.33, 6.96)
				2.48 (m)
12	5.43 (dtt) (10.63, 7.33, 1.46)	5.27 (dtt) (10.63, 7.32, 1.46)	5.42 (dtt) (10.99, 7.33, 1.46)	5.44 (m)
13	5.60 (dtt) (10.63, 7.33, 1.46)	5.56 (dtt) (10.63, 7.32, 1.46)	5.59 (dtt) (10.99, 7.33, 1.46)	5.53 (m)
14	2.08 (ddt) (7.33, 1.46, 6.60)	2.02 (ddt) (7.32, 1.46, 6.96)	2.08 (ddt) (7.33, 1.46, 6.60)	2.06 (dt) (7.33, 6.96)
18	0.89 (t) (6.96)	0.89 (t) (6.96)	0.89 (t) (6.78)	0.90 (t) (6.96)
3,6	1.60-1.70 (m)	1.52-1.67 (m)	1.56-1.66 (m)	1.54-1.62 (m)
4,5	1.27-1.40 (m)	1.26-1.38 (m)	1.25-1.36 (m)	1.29-1.37 (m)
15-17				
Ac		2.03 (s)		
		2.21 (s)		
OCH <sub>3</sub>			3.67 (s)	
(-O) <sub>2</sub> C(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>				1.39 (s)
				1.41 (s)

\*These assignments were established by the decoupling and NOE difference experiments.

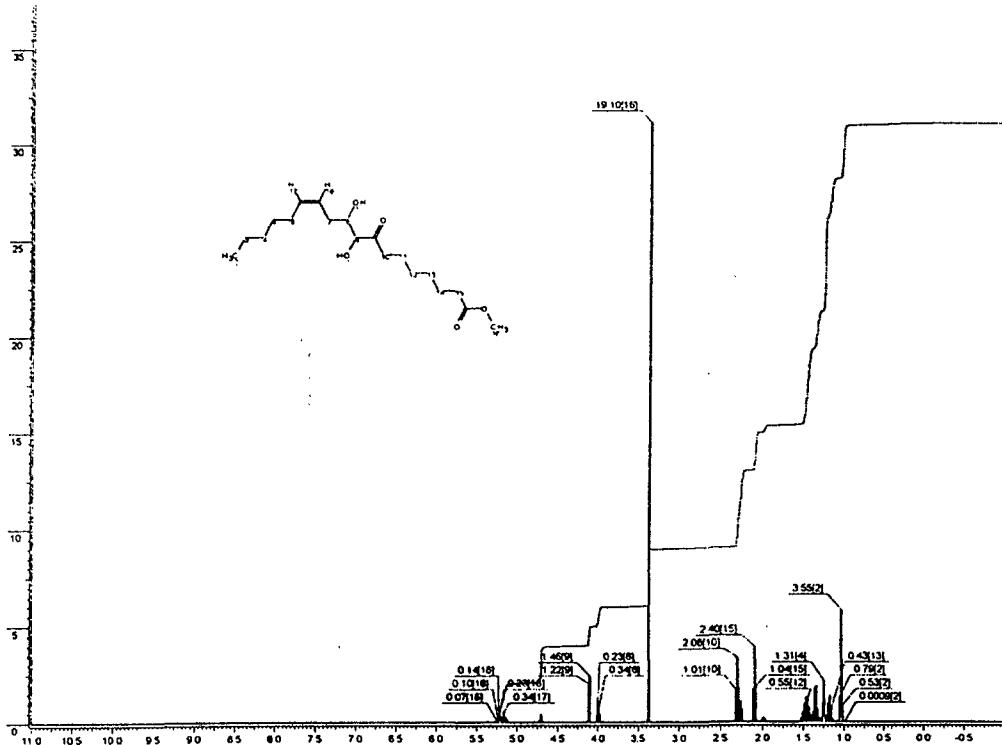


Fig. 5-16. <sup>1</sup>H-Nuclear magnetic resonance spectrum and chemical structure of F1 compound.

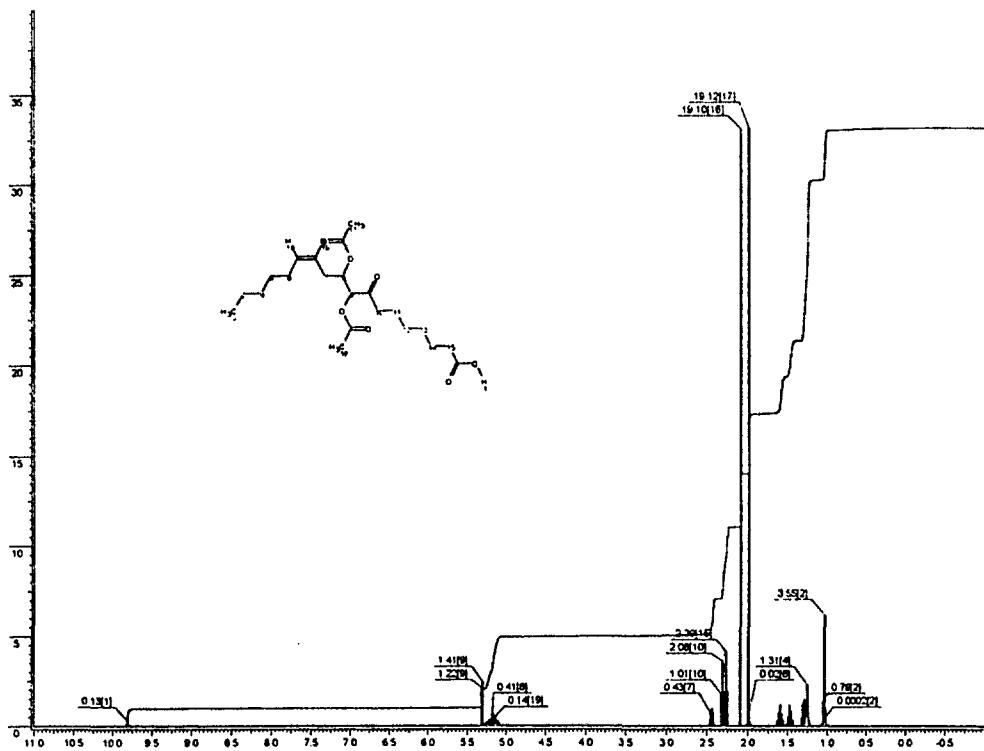


Fig. 5-17. <sup>1</sup>H-Nuclear magnetic resonance spectrum and chemical structure of F2 compound.

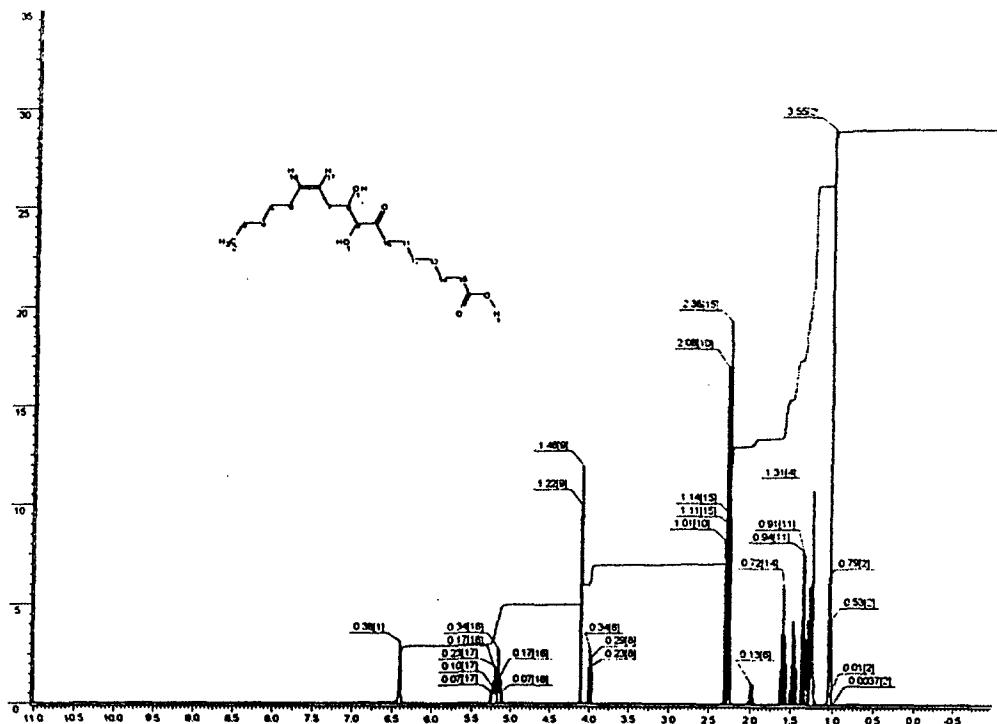


Fig. 5-18. <sup>1</sup>H-Nuclear magnetic resonance spectrum and chemical structure of F3 compound.

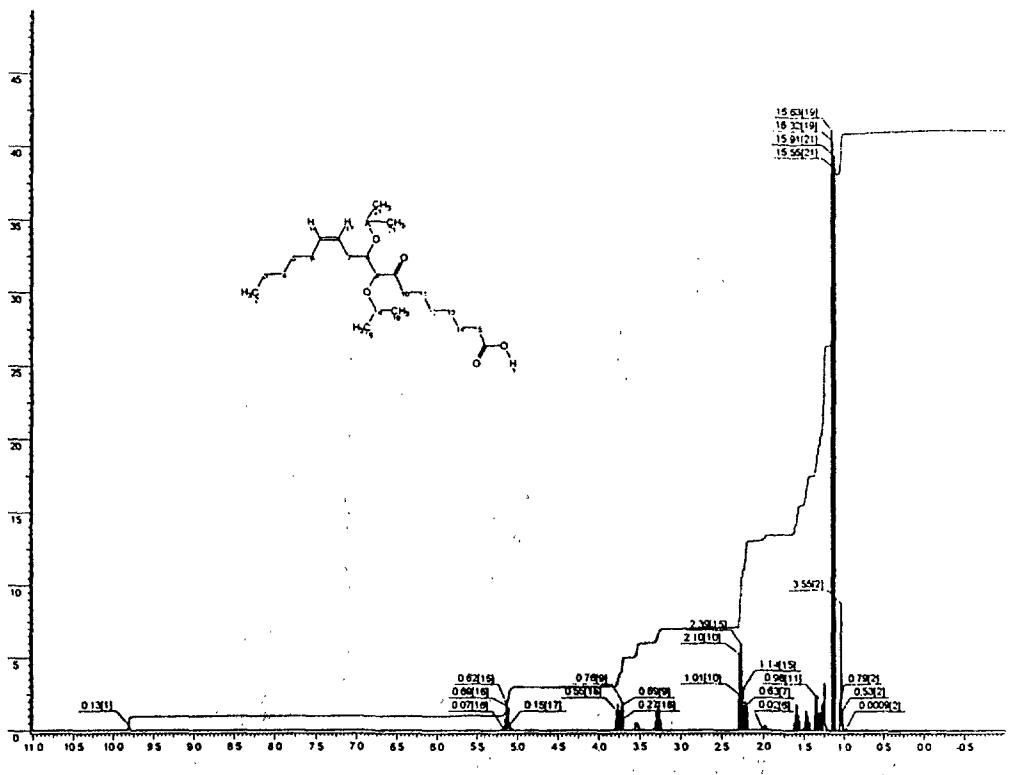


Fig. 5-19. <sup>1</sup>H-Nuclear magnetic resonance spectrum and chemical structure of F4 compound.

다. Sephadex G-200을 통과시킨 488mg의 Fr D는 옅은 갈색을 지닌 분말을 얻었으며, DEAE Sephadex A-25 column과 Sephadex G-200으로 분리되었다.(Fig. 5-3, Table 5-9, 5-10).

#### 나. 정제 및 분석

Fraction D의 화학적 분석은 Table 5-11과 같았으며 단백질과 다당류는 Table 5-10, 5-12와 같이 나타났다.

1) Fraction D의 polysaccharide 및 SDS-PAGE 전기영동  
anthrone test에 의해 Table 5-10, 5-12, 5-13, 5-14에서 보는 바와 같이 단당류를 알아냈다. 34%가 다당류로 구성되어 있으며 Table 5-12처럼 glucose, fructose, galactose, xylose등으로 구성되어 있으며, 단당류의 GLC 패턴은 Fig. 5-20과 같았다. Lowry-Folin test에서 단백질 함량은 40.2%이었고, 아미노산은 Table 5-15, Fig. 5-21에서 보는 바와 같이 14개 아미노산으로 구성된 결과가 나왔다. 그리고 SDS-PAGE 전기영동의 결과 85kDa의 분자량을 보여주고 있다 (Fig. 5-22).

Table 5-13. Contents protein of the antitumor fraction D after Lowry-Folin test at 750nm.

Division	Contents(%)
Total protein	40.2

#### 2) Spectral assay

Fig. 5-3, Table 5-10과 같이 fraction D의 분석을 통해 알았으며 높은 수율과 효과를 볼 수 있었다. IR에서 absorption band는  $913\text{cm}^{-1}$ 으로 glycan은  $\beta$ -glucan

Table 5-9. Effects of antitumor fractions from the fruiting bodies against sarcoma 180 in mice.

fractions <sup>a</sup>	No. of mice	average tumor size (cm <sup>3</sup> ) <sup>b</sup>	inhibition (%)	Complete regression	mortality <sup>c</sup>
control	14	43.0	0	0/14	11/14
Fr.A	5	20.3	52.8	0/5	3/5
Fr.B	10	25.6	40.5	0/10	4/10
Fr.C	10	8.9	79.3	5/10	2/10
Fr.D	10	0.4	99.1	8/10	0/10

<sup>a</sup>Dose, 10 mg/kg per day for 10 days.

<sup>b</sup>Three weeks after the tumor implantation.

<sup>c</sup>Six week after the tumor implantation.

Table 5-10. Properties of fractions from the fruiting bodies.

Fr.s	hexuronic acid (%, as GlcA)	protein (%)	sugar (%, as Glc)	component sugar <sup>a</sup>				[α]d <sup>25</sup> (in 5% NaOH ; degress)
				Glc	Fuc	Gal	Xyl	
Fr.A	2.3	3.6	16.0	100	11	4	5	+36.4
Fr.B	9.7	17.0	67.1	100	6	0	6	-23.7
Fr.C	2.4	67.1	31.5	100	27	16	26	-25.0
Fr.D	6.7	43.3	50.2	100	4	1	5	-23.0

<sup>a</sup> By GLC (see experimental)

Table 5-11. Result of various color reactions on th fraction D.

Method	Result
Molish test	purple (++)
Anthrone test	dark green (+)
Iodine test	negative (-)
Ninhydrine test	blue violet (+)
Ninhydrine test after acid hydrolysis	violet (++)
Lowry-Folin test	dark blue (+)
Biuret test	purple blue (+)

Table 5-12. Retention times of the TMS-monosaccharides by G.L.C.

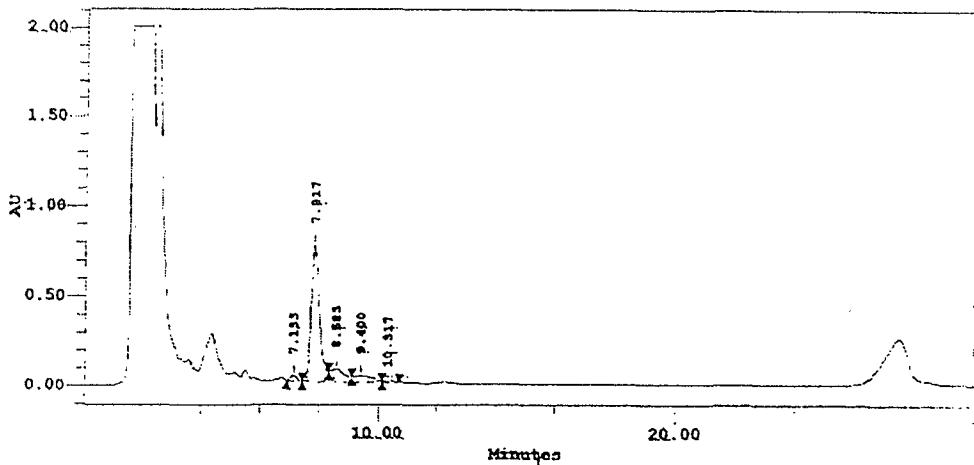
Monosaccharide	Retention time (min.)
Fucose	2.8
Xylose	3.2
Mannose	7.0
Fructose	7.8
Galactose	7.4
Glucose	9.6

Table 5-14. The contents of the polysaccharide and the monosaccharide of the fraction D.

Polysaccharide content (%)*	34.0
Monosaccharide content (%)**	
Glucose	25.3
Fucose	5.3
Galactose	54.4
Xylose	5.0

\* Percentage to the aqueous fraction D.

\*\* Percentage to the polysaccharide moiety of fraction D.



#### Peak Results

#	Name	Ret Time (min)	Area (uv*sec)	Height (uv)	Amount	Int Type
1		7.133	428463	29628		BB
2		7.817	14585200	759355		BV
3		8.583	2430383	72658		VV
4		9.400	1458702	35107		VV
5		10.317	265629	15322		VB

Fig. 5-20. G.L.C pattern of the monosaccharides from th antitumor fraction D.

Table 5-15. Contents of amino acids of the protein moiety of the antitumor fraction D.

Amino acid	Content (%)*	Amino acid	Content (%)*
Lycine	21.6	Methionine	2.9
Arginine	3.2	Alanine	10.4
Aspartic acid	13.6	Isoleucine	4.4
Treonine	8.6	Leucine	1.1
Serine	9.2	Tyrosine	2.9
Glutamic acid	8.2	Glycine	10.0
Cystein	3.9	Proline	trace

\* Percentage to the protein moiety.

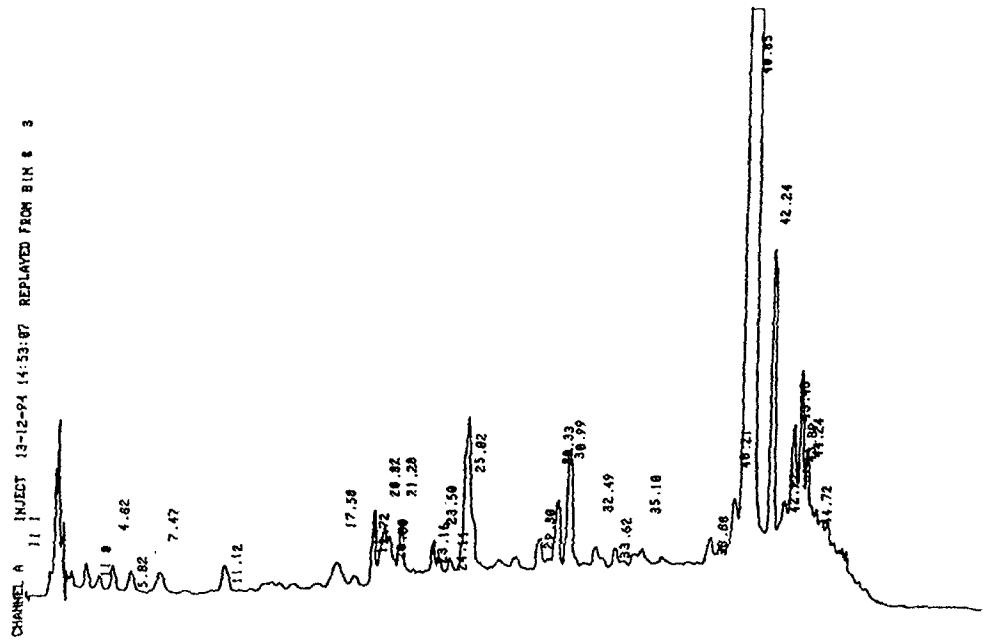


Fig. 5-21. Chromatogram of amino acids of the protein moiety from the antitumor fraction D.

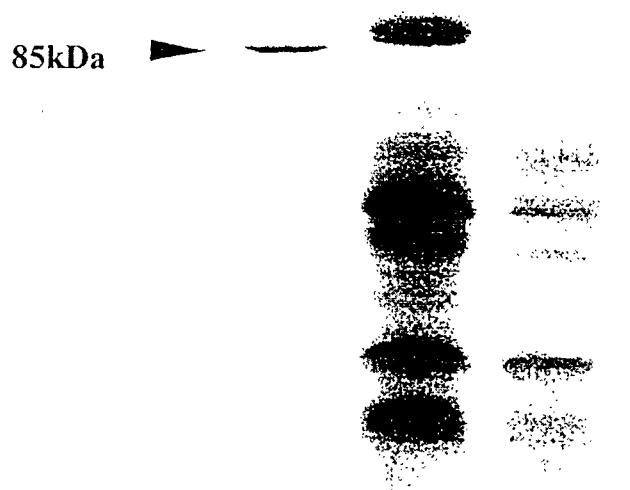


Fig. 5-22. SDS-PAGE analysis of purified protein from antitumor fraction D.  
Lane 1: purified protein(85kDa), Lane 2,3: molecular weight standards.

으로 제시되었다. (1→6)- $\beta$ -D-glucan은  $^1\text{H}$  NMR( $\text{CDCl}_3$ )에서  $\delta$  4.47(d,  $j$  7.48 Hz, H-1), 4.28(d,  $j$  10.07Hz, H-6a), 3.82(m, H-6b), 3.57(m, H-5), 3.40(m, H-3,4), 3.29(dd,  $j$  10.07 Hz, H-6a), 3.82(m, H-6b), 3.57(m, H-5), 3.40(m, H-3,4), 3.29(dd,  $j$  7.48 Hz, H-2)으로 나타났다. COSY는 Fig. 5-23에서 보여주고 있으며,  $^3\text{C}$  NMR은 Fig. 5-24처럼 결과가 도출되었다. 이런 결과는 fraction D는 glucan에 대한 (1→6)- $\beta$ -D-glucopyranosyl으로 methylation으로 생각되었으며, 1,5,6-tri-O-acetyl-2,3,4-tri-O-methylglucitol로써 89%; m/z 233, 189, 161, 117, 43이었다. 아미노산은 lycine, aspartic acid, alanine, glycine, treonine, glutamic acid, serine의 함량이 높게 나왔고, arginine, cysteine, methionine, isoleucine, tryosine, proline이 낮게 나왔다(Table 5-15, Fig. 5-21). 많은 단자균에서 분리된 항종양성 물질이 보고 되고 있다(Komatsu *et al.*, 1969 ; Chihara *et al.*, 1970 ; Bannai *et al.*, 1982 ; Chang *et al.*, 1989) 이들은 대부분 (1→3)- $\beta$ -D-glucan을 backbone을 가고 있는데 본 실험 결과에서도 유사한 결과를 보여주었다.

### 3) 항종양 test

복수암의 sarcoma 180에 대한 결과는 Table 5-16에서와 같이 결과가 나타났다. fraction D의 투여는 Fig. 5-25에서 보는 바와 같이 수명을 연장 시켜 주었다. 치료효과는 50mg/kg의 투여량이 높은 결과를 보여주었고 종양에 대한 생장 억제 효과를 볼 수 있었다. 이 결과는 Ahn(1992)이 한국산 약용 버섯을 조사하면서 *H. erinaceum*이 항암 및 면역기능을 촉진시키며 임상치료에서 위궤양, 만성위염, 신경쇠약, 소화불량, 신체허약, 만성위축성위염, 위암, 식도암에 효능을 보고한 바를 간접적으로 확인할 수 있었다.

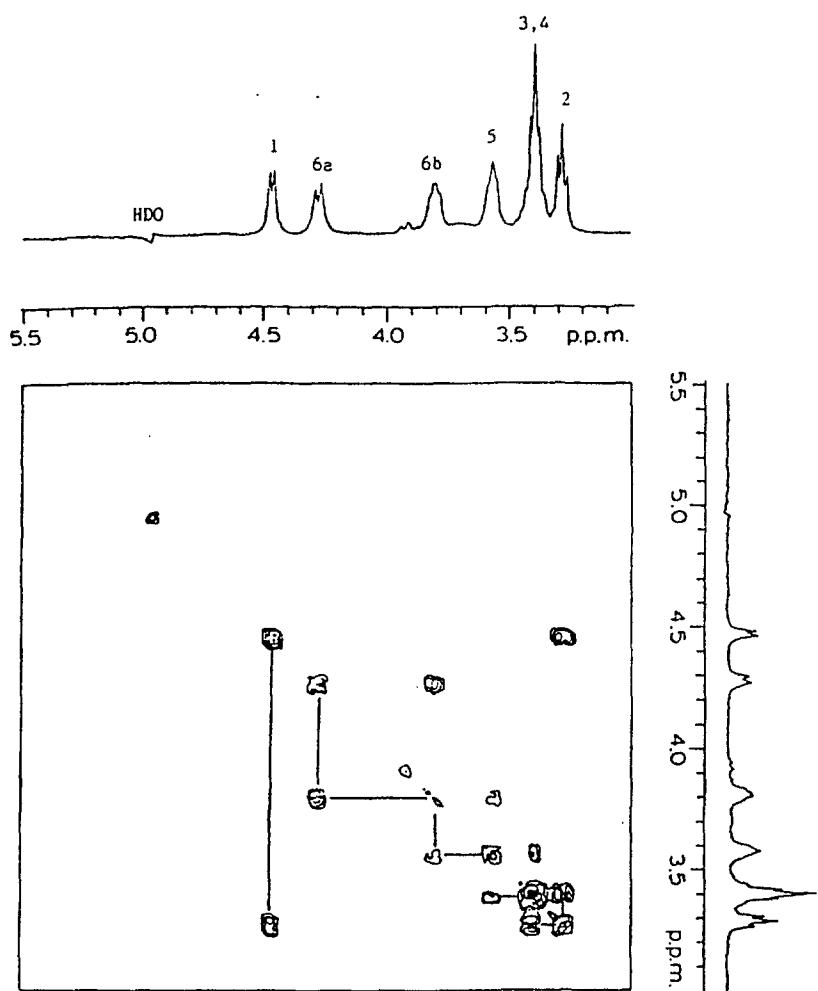


Fig. 5-23. Two-dimensional COSY spectrum of Fr. D. Lines connect signals from the D-glucosyl residues. A conventional 1D proton spectrum with signal assignments added is given.

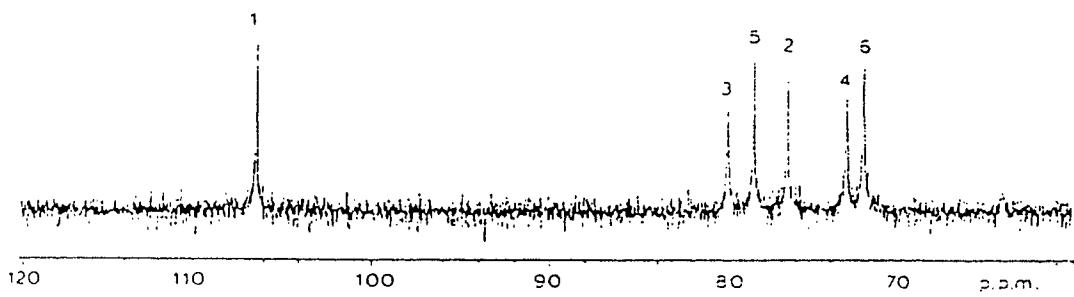


Fig. 5-24. <sup>13</sup>C-Nuclear magnetic resonance spectrum of Fr. D with signal assignments.

Table 5-16. Antitumor effects of the protein-bound polysaccharide fraction D from the fruiting bodies and th cultured mycelia on mice bearing sarcoma 180.

	Dose (mg/kg/day, i.p.)	No.of mice	Average tumor weight (g)	Inhibition ratio (%)	Complete regression
Control	Saline	10	2.20±0.53 <sup>c</sup>	-	-
Fruiting bodies <sup>a</sup>	20mg	10	0.77±0.49	75	5
	50mg	10	0.55±0.27	65	4
Control	Saline	9	4.82±1.39	-	-
Cultured mycelia <sup>b</sup>	20mg	9	2.03±0.63	5.8	1

a : mice (20 ~50g) were inoculated subcutaneously with sarcoma 180 ( $5\times10^5$  cell/mouse)

b : mice (18 ~22g) were inoculated subcutaneously with sarcoma 180 ( $1\times10^6$  cell/mouse)

c : values are means standard error

### Survival mice

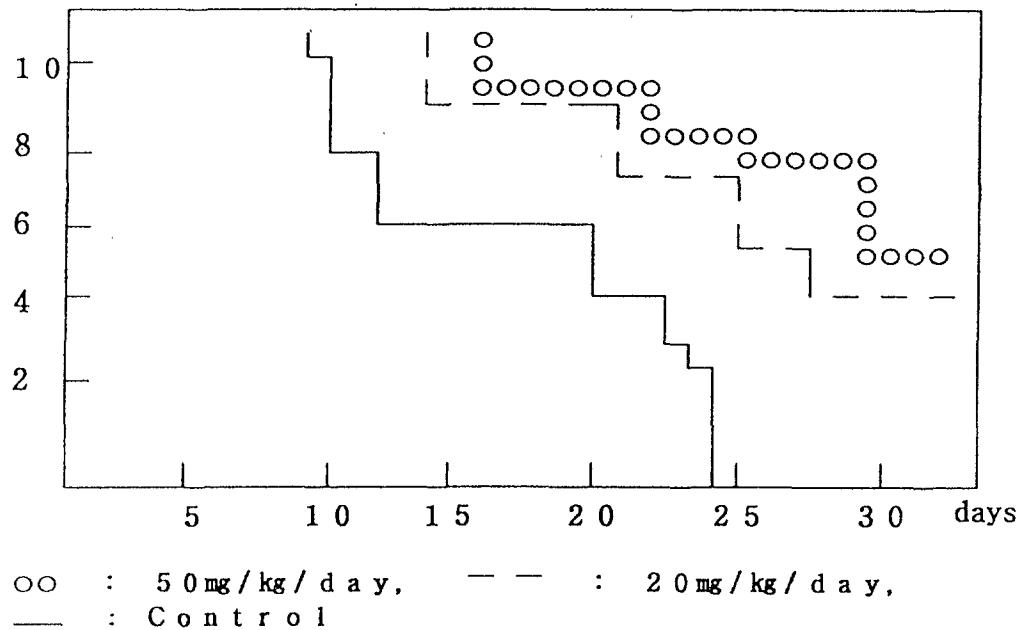


Fig. 5-25. Effects of the antitumor fraction D on the life span after intraperitoneal implantation of sarcoma 180 in mice.

### 3. $\alpha$ -galactosidase 특성

#### 가. $\alpha$ -galactosidase

노루궁뎅이버섯은 다른 여러 종류의 버섯과 같이 톱밥과 미강을 섞은 배지에서 잘 자랄 수 있고 또한 이 배지에서 자실체를 형성한다고 보고된 바 있다(장과 노 1999a,b). 이는 버섯의 영양사에서 중요한 의미를 지니는데, 버섯이 톱밥에서 자라기 위해서는 세포 밖으로 효소를 분비하여 cellulose, hemicellulose, lignin, 단백질 등의 고분자 물질을 분해하는 효소를 분비하고 이들 효소에 의하여 아미노산 및 sugar를 흡수 이용할 수 있기 때문이다. 따라서 본 실험은 세포 밖으로 분비되는 효소 중에서 glycosidase를 탐색한 바 glucosidase, galactosidase, mannosidase 등 여러 종류의 exo- 및 endo-glycosidase의 활성이 측정되었다. 이 중에서  $\alpha$ -galactosidase를 주로 연구하였는데 앞에서 언급한 바와 같이 이 효소는 공업적으로 매우 유용하게 사용되고 있기 때문이다.

#### 나. 효소추출

톱밥으로부터 효소를 추출하는데 효과적인 방법을 알아보기 위하여 여러 종류의 추출용매를 준비하였고 이를 이용하여 버섯을 키운 톱밥으로 부터 효소를 추출하였다. Table 5-17에서 보는 바와 같이  $\alpha$ -galactosidase효소는 중류수 혹은 buffer등으로 추출하는 것이 가장 좋게 나타났다. 그 밖의 detergent가 함유된 buffer 혹은 중류수를 사용하였을 때는 추출효과는 크게 변하지 않았다. 또한 이를 추출용매를 이용하여 추출하였을 경우 추출시간이 30 분 이상만 지나면 그 이상 경과하더라도 크게 효소 수율이 증가하거나 변하지 않았다. 균의 생장은 톱밥의 미세한 부분에서 이루어지기 때문에 효소를 중류수로 추출

Table 5-17. Extraction of  $\alpha$ -galactosidase from mushroom-grown in saw dust.

Extraction method	Enzyme activity (nmole/min/g sawdust)
Distilled water	430
1.0% NaCl	367
0.1 M phosphate buffer, pH 7.4	430
0.1 M phosphate buffer with 10% glycerol	302
0.5% Triton X-100	431
0.1 M phosphate buffer with 0.25% Triton X-100	414

하는 횟수에 따라 어느정도 효소가 용출되는가를 알아보았다. Fig. 5-26에서 보는 바와 같이 처음에 종류수로 추출하였을 때  $\alpha$ -galactosidase가 가장 많이 추출되었고 이 후 급격히 감소하여 2-5 회 연속 추출하더라도 더 이상의 효소활성도는 증가하지 않음을 알 수 있었다.

#### 다. 효소 분리 및 온도, pH, 및 solvent의 영향

추출한 효소의 이화학적 성질을 알아보기 위하여  $\alpha$ -galactosidase를 acetone 침전 및 이온교환수지 크로마토그래피법을 사용하여 분리 정제하였다. 분리한 효소가 pH 요인에 의하여 활성이 어떻게 변화되는지를 알아보기 위하여 여러 가지 조건 하에서 실험을 실시하였다.

50 mM acetate buffer (pH 4.0-6.5) 와 phosphate buffer (pH 6.0- 8.5)를 사용하여 실험한 바 최적 pH는 6.0 부근으로 나타났다(Fig. 5-27). 미생물인 세균과 진균에서 분리된  $\alpha$ -galactosidase는 많은 연구가 되어 있다. 따라서 이 효소의 최적 pH는 잘 연구가 되어 졌는데 대부분의 진균 효소는 pH 4.0-6.0이고 세균에서는 5.5-6.5 사이로 나타나 기존의 효소와 비슷한 범위인 것으로 추정되었다 (Manzanares et al., 1998; Xiao et al., 2000). 온도의 변화가 효소의 활성에 어떠한 영향을 미치는가를 알아보기 위하여 35°C에서 75°C까지 온도범위에서 효소의 활성을 측정하였다. 효소활성의 측정은 50 mM acetate buffer, pH 6.0에서 20 분간 효소와 기질을 반응시키고 활성을 측정하였다. Fig. 5-28에서 나타난 바와 같이 최적 온도는 55°C 부근으로 나타났다.

Solvent는 효소 공학에서 매우 중요하다. 많은 경우 기질을 녹일 때나 processing 과정 중에서 solvent를 사용하는데 효소가 solvent에 resistant하면 효

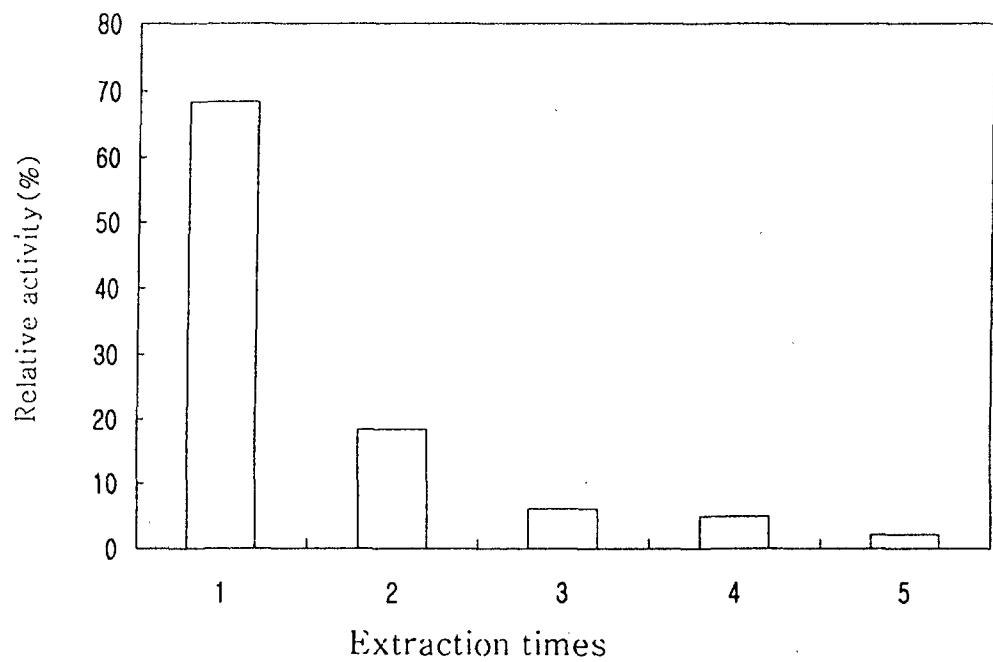


Fig. 5-26. Extraction of  $\alpha$ -galactosidase from saw dust.

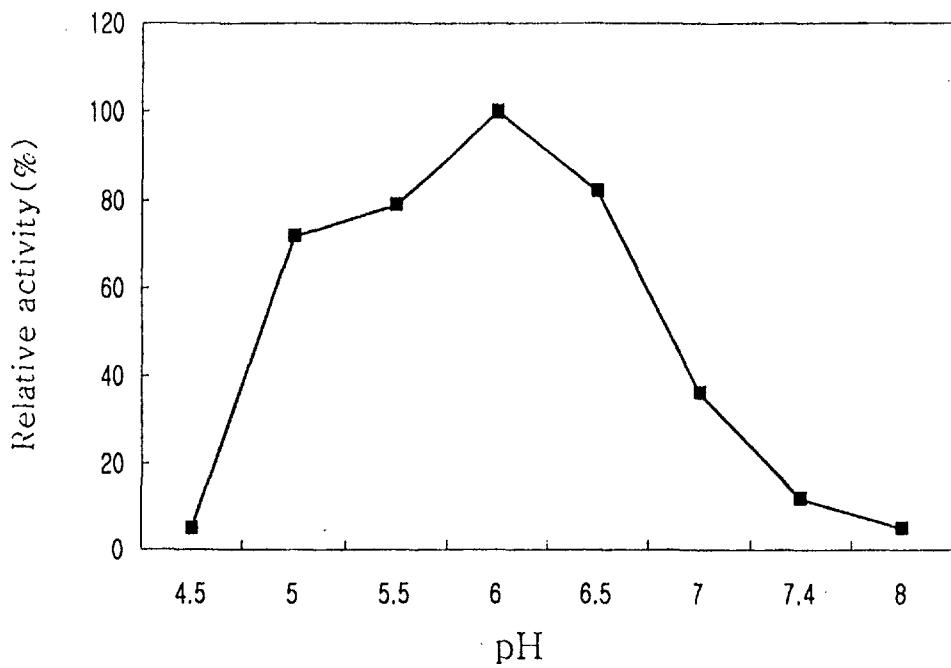


Fig. 5-27. Effect of pH on the activity of  $\alpha$ -galactosidase.

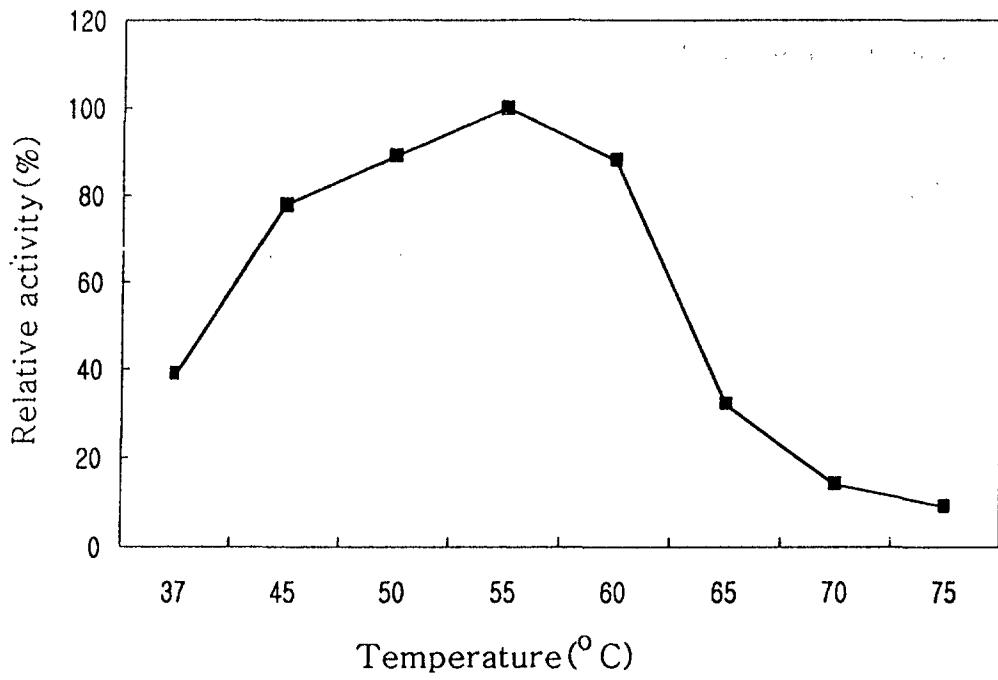


Fig. 5-28. Effect of temperature on the activity of  $\alpha$ -galactosidase.

소의 이용성이 매우 증가되기 때문이다. Fig. 5-29는 여러 종류의 solvent를 사용하였을 경우 이들이 효소의 활성에 미치는 영향을 나타낸 것이다. 보는 바와 같이 solvent를 10% 처리하였을 경우 활성의 대조구의 90%를 유지하였다. methanol, ethanol, acetone 등을 30% 처리하였을 경우 효소의 활성이 변하지 않았고 isopropanol의 경우 대조구에 비하여 약 40% 정도 활성이 유지되는 바 이 효소는 solvent에 resistant함을 알 수 있었다.

#### 바. 단백질 정량

지금까지 노루궁뎅이버섯에서 추출한 효소의 활성을 인공기질인 PNP-galactoside를 사용하여 실험하여 알아보았다. 자연계에는  $\alpha$ -galactose를 지니고 있는 이당류, 올리고당 및 다당류가 있다. stachyose, melibiose, raffinose 등은 galactose를 지니고 있는 올리고당인데 이중에서 melibiose를 사용하여 이 효소의 활성을 알아보았다. Fig. 5-30에서 보는 바와 같이 여러 효소농도에서 기질을 처리하고 60분간 처리하였을 경우 melibiose가 분해되어 glucose가 유리됨을 알 수 있었다.

노루궁뎅이버섯을 키운 톱밥배지로부터 공업적으로 유용한  $\alpha$ -galactosidase가 추출됨을 알았다. 많은 종류의 버섯들은 톱밥배지를 이용하고 자실체를 수확한 다음 이들 톱밥은 특별한 이용성이 없이 처분되거나 혹은 비료로서 사용되고 있다. 현재 각국에서는 폐자원을 이용하여 유용한 물질을 얻는것에 많은 노력을 기울여 왔고 또한 이들을 이용하는 기술을 개발하고 있는 중이다. 따라서 본 실험은 노루궁뎅이버섯을 병재배하여 자실체를 수확하고 남은 폐톱밥으로부터  $\alpha$ -galactosidase가 추출됨을 알아보았다.

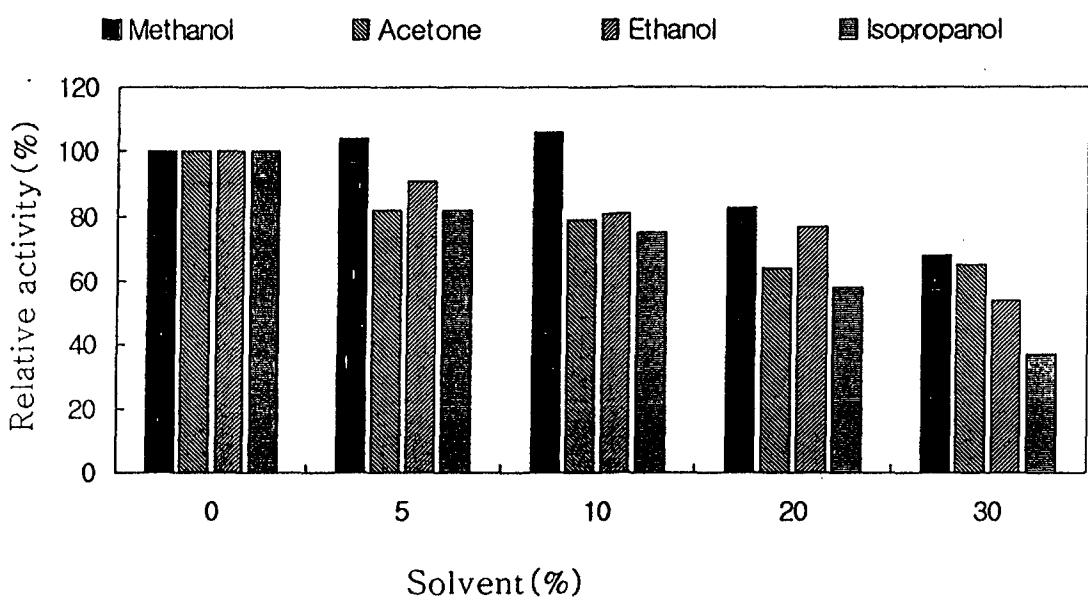


Fig. 5-29. Effect of solvent on the activity  $\alpha$ -galactosidase.

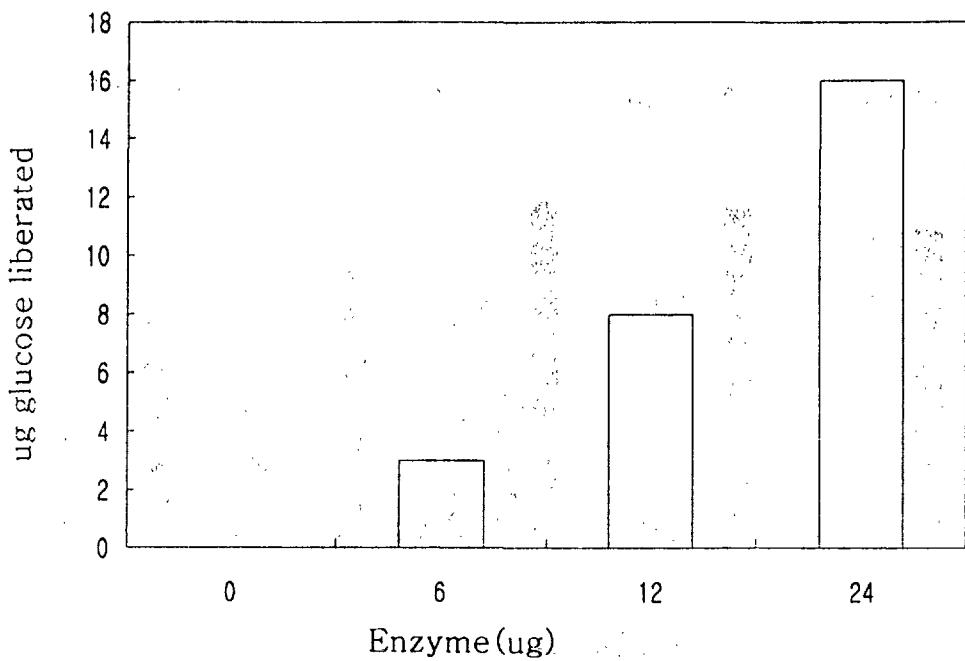


Fig. 5-30. Hydrolysis of melibiose by  $\alpha$ -galactosidase.

다른 종류의 노루궁뎅이버섯을 병재배하여 자실체를 수확하고 난 후, 균사체와 폐톱밥이 있는 시료에 물을 2 배로 가하여 앞에서 언급한 바와 같이 효소를 추출하였다. 다음의 Table 5-18은 이러한 실험결과를 나타내는데 추출액의 pH는 4.5 부근이었고, 다른 노루궁뎅이 균주에서도  $\alpha$ -galactosidase효소를 분비함을 알 수 있었다.

Table 5-18. Recovery of  $\alpha$ -galactosidase from spent sawdust substrate media.

Strain	pH	Enzyme activity (nmole/min/g media)
<i>H. erinaceum</i> KU-8	4.8	290
<i>H. erinaceum</i> KU-1	4.6	154

본 실험을 통하여 노루궁뎅이버섯은 공업적으로 유용한 효소인  $\alpha$ -galactosidase를 분비함을 알 수 있었다. 현재 많은 종류의 버섯들은 톱밥배지를 이용하여 농가에서 버섯을 재배한다. 따라서 이들 버섯 또한 glycosidase효소를 분비하는가를 연구하는 것은 연구해볼 가치가 있으며 앞서 추출한  $\alpha$ -galactosidase를 정제하여 이 효소의 성질을 규명함도 매우 중요할 것으로 사료된다.

## 참고문헌

- Anke, T. 1977. The striatins - new antibiotics from the *Basidiomycete Cyathus striatus* (Huds. ex Pers.) Wild. *J. Antibiotics*, No 3 : 221-225.
- Aronone, A., cardillo, R., Nasini, G. and de Pava, O. V. 1994. Secondary mold metabolites: Part 46. Hericines A-C and erinapyrone C, new emtabolites produced by th fungus *Hericium erinaceus*. *J. of Natural Products* 57: 602-606.
- Arora, D. S. and Gill, P. K. 2000. Laccase production by some white rot fungi under different nutritional conditions. *Bioresouce Technology*, 73, 283-285.
- Bahl, O. P. and Agrawal, K. M. L. 1969. Glycosidases of *Aspergillus niger*: Purification and characterization of  $\alpha$ - and  $\beta$ -galactosidase and  $\beta$ -N-acetylglucosaminidase. *J. Biol. Chem.* 244, 2970-2978.
- Ball, A. S. and Jackson, A. M. 1995. The recovery of ligocellulose-degrading enzymes from spent mushroom compost. *Bioresouce Technology* 54, 311-314.
- Bannai, S. and Ishii, T. 1982. Transport of cystine and cysteine and cell growth in cultured human diploid fibroblasts : Effect of glutamate and homocysteate. *J. Cell Physiol.* 112, 265-272.
- Benno, Y., Endo, K., Shiragami, N., Sayama, J. K. and Mitsuoka, T. 1987. Effects of raffinose intake on human fecal microflora. *Bifidobacteria Microflora* 6, 59-63.
- Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for quantification of microgram quantities of proteins utilizing the principle of protein dye binding. *Analytical Biochemistry* 72, 248-254.
- Chang, R. 1990. Future trends in cultivation of alternative mushroom. *Mushroom J.* 215, 422-423.
- Chang, S.T. and Miles P.G. 1992. Mushroom biology, a new discipline. *The Mycologist* 6, 64-65.
- Chihara, G., Hamura, J., aeda, Y.Y., Arai, Y., and Fukuoka, F. 1970. Fractionation and purification of the polysaccharides with marked antitumor activity from *Lentinus edodes*, *Cancr Res.* 30; 2776.

- Chiu, R. S. 1981. Growth conditions for *Hericium*. Edible fungi 24, 1-12.
- Cruz, R. and Park, Y. K. 1982. Production of fungal  $\alpha$ -galactosidase and its application to the hydrolysis of galacto-oligosaccharides in soybean milk. *Journal of Food Science* 47, 1973-1975.
- Cruz, R., Batistela, J. C., and Wosiacki, G. 1981. Microbial  $\alpha$ -galactosidase for soymilk processing. *Journal of Food Science*. 46, 1196-1200.
- Furlan, S. A., Schneider, A. L. S., Merkle, R., Carvalho-Jonas, M. F. and Jonas, R. 2000. Formulation of a lactose-free, low-cost culture medium for the production of  $\beta$ -galactosidase by *Kluyveromyces marxianus*. *Biotechnology Letters* 22, 589-593.
- Ganter, C., BOck, A., Buckel, P. and Mattes, R. 1988. Production of thermostable, recombinant  $\alpha$ -galactosidase suitable for raffinose elimination from sugar beet syrup. *Journal of Biotechnology* 8, 301-310.
- Gitzelman, R. and Auricchio, S. 1965. The handling of soya  $\alpha$ -galactosidase by a normal and a galactosemic child. *Pediatrics* 36, 231-235.
- Hatakka, A. 1994. Lignin modifying enzymes from selected white rot fungi: production and role in lignin degradation. FEMS Microbiology Review 13, 125-135.
- Hellendoorn, E. W. 1969. Intestinal effects following ingestion of beans. *Food Technology* 23, 795-800.
- Kawagishi, H. and Hori, H. 1991b. Chmical modification and NMR studes on a mushroom Lectin Ishnodrma rsinocum agglutinin (IRA). *Biochim. Biophys. Acta*. 1076: 173-177.
- Kawagishi, H. Shimada, A., Shirai, R., Okamoto, K, K., Ojima, F., Sakamoto, Ishiguro, H., Furukawa, Y. 1994, erinacines A, B and C, strong stimulators of nerve growth factor (NGF)-synthesis from the mycelia of *Hericium erinaceum*, *Tetrahedron Lett.* 35(10); 1569-1572.
- Kawagishi, H., A. Shimada, F. Ojima, K. Okamoto, . Sakamoth, Y. Ishiguro and S. Furukawa. 1994. Novel diterpenoids showing Nerve Growth Factor (NGF)-inducing activit from the mcelia of *Hericium erinaceum*. *Terupen Oyobi Seiyu Kagiku Ni Kansun To Yonkai Koen Yoshishu*. 37; 186-188.
- Kawagishi, H., Ando, M., Sakamoto, H., Satoshi, Y., Ojima, F. and Ukai, N. 1991a. Hericnones C, D and E, stimulators of Nerve Growth Factor

(NGF)-synthesis, from the mushroom *Hericium erinaceum*. *Tetrahedron Letters*, 32(35): 4561-4564.

Kawagishi, H., Shimata, A., Hosokawa, S., Mori, H., Sakamoto, H., Ishiguro, Y., Sakemi, S., Bodner, J., Kojima, N. and Furukawa, S. 1996. Erinacines E, F and G, stimulators of Nerve Growth Factor (NGF)-synthesis, from the mycelia of *Hericium erinaceum*. *Tetrahedron Lett.*, 37: 7399-7402.

Kawagishi, H., Shimata, A., Shirai, R., Okamoto, K., Ojima, F., Sakamoto, H., Ishiguro, Y. and Furukawa, S. 1994. Erinacines A, B and C, strong stimulators of Nerve Growth Factor (NGF)-synthesis from the mycelia of *Hericium erinaceum*. *Tetrahedron Lett.*, 35(10): 1567-1572.

Kimura, Y., Nishibe, M., Nakajimak, H., Hamasaki, T., Shimada, A., Tsuneda, A. and Shimatsu, N. 1991. Hericerin, a new pollen growth inhibitor from the mushroom *Hericium erinaceum*. *Mol. Plant Microbe Interactions, Agric. Biol. Chm.*, 55(10):2673-2675.

Komatsu, N., Okubo, S., Kikumoto, S., Kimura, K., Saito, G. and Sakai, S. 1969. host mediated antitumor action of schizophyllan, a glucan produced by *Schizophyllum commune*. *Gann*. 60 137.

Kotwal, S. M., Gote, M. M., Sainkar, S. R., Khan, M. I., and Khire, J. M. 1998. Production of  $\alpha$ -galactosidase by thermophilic fungus *Hemicola* sp. in solid-state fermentation and its application in soyamilk hydrolysis. *Process Biochemistry* 33, 337-343.

Kuwahara, S., Morihiko, E., Nemoto, A. and Hiramatsu, A. 1992. Synthesis and absolute configuration of a cytotoxic fatty acid isolated from the mushroom *Hericium erinaceum*. *Biosci. Biotech. Biochem.*, 56(9): 1417-1419.

Manzanares, P. de Graaff, L. H. and Visser, J. 1998. Characterization of galactosidases from *Aspergillus niger*: purification of a novel  $\alpha$ -galactosidase activity. *Enzyme and Microbial Technology* 22, 383-390.

Mizuno, T., S. Ohtahara, and J. Li, Bull. 1988, Mineral composition and germanium content of several medicinal mushrooms, *Fac. Ar. Shizuoka Univ.*, 38, 37-46.

Mizuno, T., T. Wasa., H. Ito., C. Suzuki and N. Ukai. 1992. Antitumoractive polysaccharides isolated from the fruiting body of *Hericium rinacium*, an edibl and medicinal mushroom called *yamabushitake* or *houtou*, *Biosci. Biotech. Biochem.* 56(2):347-348.

- Sethuraman, A., Akin, D. E. and Eriksson, K.-E. L. 1998. Plant-cell-wall-degrading enzymes produced by the white-rot fungus *Ceriporiopsis subvermispora*. *Biotechnology and Applied Biochemistry* 27, 37-47.
- Somiari, R. I. and Balog, E. 1995. Properties of an extracellular glycosidase of *Aspergillus niger* suitable for removal of oligosaccharides from cowpea meal. *Enzyme and Microbial Technology* 17, 311-316.
- Xiao, M., Tanaka, K., Qian, X. M., Yamamoto, K. and Kumagai, H. 2000. High-yield production and characterization of  $\alpha$ -galactosidase from *Bifidobacterium breve* grown on raffinose. *Biotechnology letters* 22, 747-751.
- 장현유, 노문기. 1999. 노루궁뎅이버섯의 재배방법에 따른 수량성. *한국균학회지*. 27, 249-251.
- 장현유, 노문기. 1999. 노루궁뎅이버섯의 종균배양적 특성. *한국균학회지*. 27, 252-255.

## 제 6 장 대량 생산 체계

### 제 1 절 서론

노루궁뎅이(*H. erinaceum*)는 분류학적으로 담자균강, 민주름목, 노루궁뎅이과에 속하는 버섯으로 오래전부터 식용버섯 및 약용버섯으로 이용되어 왔으며 가을철 활엽수의 고목이나 생목에서 발생하는 버섯이다.

Ahn(1992)은 한국산 약용버섯을 조사하면서 *H. erinaceum*이 항암 및 면역 기능을 촉진시키며 임상치료에서 위궤양, 만성위염, 신경쇠약, 만성위축성위염, 위암, 식도암에 효능을 보고하였다. 또한 Kawagishi 등(1994, 1996)은 노루궁뎅이에서 Nerve Growth Factor(NGF)의 생리활성물질을 추출하여 중추 신경 재생과 치매병의 치료제로써의 이용가능성을 보고하였다. 한편 1950년 말까지 노루궁뎅이는 야생에서 채집만 하여 이용하였으나 Liu(1981)가 인공재배를 최초로 시도하였으며, Mizuno 등(1992)은 원목재배, 병재배, 봉지재배를 실시하였고 자실체의 다당류가 항종양에 효과있으며 고급요리 및 건강증진 식품으로 각광을 받을 수 있으며 의학적으로도 매우 잠재성이 높은 버섯이라 기술하였다.

최근에 식용 및 약용버섯에 대하여 인공재배를 위한 기술개발 연구 및 균주 간 수확량 비교 실험이 활발하게 진행되고 있다. 특히 버섯 생산 단가를 낮추고 자원 재활용면에서 농산부산물의 이용에 초점이 모아지고 있다. 느타리속의 재배에 제지부산물을 이용하여 생산량이 증가하였고(조 등, 1995), 팽이버섯 재배에 사과가공부산물 및 계란껍질을 첨가하여 자실체의 수량이 증가하였고(조 등, 1996; 정 등 1995), Guoping Xiao(1996)은 *H. abietis*를 침엽수 텁밥에

배양 재배실험을 실시하였으며, Lee 등(1998)은 애느타리와 버들송이를 농가부산물인 콩비지, 쿨껍질, 한약찌꺼기 등을 이용하여 증수효과를 보고하였다. 이와 같이 다양한 농가부산물을 기질로 이용하여 인공재배에 좋은 결과가 나왔으므로 각각의 버섯에 적합한 부산물을 선택하여 인공재배를 수행하면 균사생장의 향상 및 수확량의 증수에도 좋은 결과를 보여줄 것으로 사료된다. 본 연구 수행으로 다수 확 우량균주가 선발될 것이며, 생리학적 특성과 재배환경의 규명으로 노루궁뎅이 버섯의 대량 인공재배법이 확립될 것이다. 이와 같은 기술은 농민에게 널리 보급하여 농가 소득원으로 발전시킬 것이다.

본 연구에서는 노루궁뎅이 속간 기초생리를 조사하였으며 각각의 균주들에 대하여 농가부산물 6종, Vegetable Oils 2종, Fatty acids 3종의 첨가물에 따른 균사생장을 알아보았고, 노루궁뎅이 속간 초발이 소요일, 수확량 비교를 통하여 대량 인공재배의 조건을 알아보기 위하여 실시하였다.

## 제 2 절 재료 및 방법

### 1. 균주

본 연구에는 총 9개 균주를 사용하였다. 오대산에서 채집 및 분리한 균주로 *Hericium erinaceum* KU-8과 Centraalbureau voor Schimmelcultures, Baarn, The Netherlands(CBS)에서 *H. abietis*, *H. alpestre*, *H. americanum*, *H. erinaceus* 균주를 이용하였고, 농업과학기술원에서 *H. erinaceum* 48006 균주를, American Type Culture Collection, Rockvil, MD(ATCC)에서 *H. laciniatum* 균주를, Institute of Microbiology Seoul National University(IMSNU)에서 *H.*

University(IMSNU)에서 *H. coralloides* 균주를, 산림조합중앙회 임산미생물사업소에서 *H. erinaceum* F01 균주(Malaysia에서 수집)를 분양받았다. 균주들은 기본배지인 MEA(Malt extract 20g, Peptone 1g, Glucose 20g, agar20g, D.W 1liter) 배지로 25°C에서 20일간 배양 후 4°C의 냉장고에 보존하면서 접종원으로 사용하였고, 2개월 간격으로 계대배양 하였다. 각시험의 접종원은 MEA 배지에 보관된 균사체를 cork borer(ϕ 11mm)로 plate에서 해당 시험배지에 접종하였다.

## 2. 배양기

다양한 배지를 이용하여 최적의 배양기를 찾기 위해 본 실험을 진행하였다. 이용된 배지로는 *Agrocybe cylindracea* medium(ACM), Czapek-Dox medium(CZM), *Coriolus versicolor* medium(CVM), Hamada medium(HAM), *Lentinus edodes* medium(LEM), mushroom complex medium(MCM), Malt Yeast glucose medium(MYG), Potato Dextrose Agar medium(PDA), *Phellinus ignarius* medium(PIM), Yeast extract malt extract medium(YM)에 접종하였다. 각 배지의 조성은 Table 6-1에 기술하였다. 접종후 25°C의 항온기에서 20일간 배양한 후 균사 생장을 측정하였다. 모든 실험은 5반복으로 실시하였다.

## 3. 온도실험

최적 온도를 알아보기 위한 실험에서는 MEA배지의 Petri dish(90 mm)내에 균사(ϕ 11mm)를 가운데 접종한 후 10°C, 15°C, 20°C, 25°C, 30°C, 37°C의 배양기에 서 20일 동안 배양한 후 colony직경을 측정하였다.

Table 6-1. The composition of the various media.

Component	Composition(g/l)									
	ACM*	CDM	CVM	LEM	MCM	MYG	PIM	YM	PDA	HAM
Glucose		30	20	20	20	4		10		20
Starch		20								
Peptone			4		2			5		
Soytone	4							3		
Malt extract						10	70	3		
Yeast extract	6		6	6	2	4	2	3		2
NaNO <sub>3</sub>		3								
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1	1	1	1	1					
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.46		0.46	0.46	0.46					
KCl		0.5								
FeSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O		0.01								
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5					
NaCl		0.5								
Hyponex									2	
Potato dextrose broth								24		
Agar	20	20	20	20	20	20	20	20	20	

\* : Abbreviation; ACM; *Agrocybe cylindracea* medium, CDM; Czapek-Dox medium, CVM; *Coriolus versicolor* medium, LEM; *Lentinus edodes* medium, MCM; mushroom complex medium, MYG; malt yeast glucose, PIM; *Phellinus ignarius* medium, YM; yeast extract malt extract medium, HAM; Hamaca medium, PDA; Potato dextrose medium.

#### 4. 첨가물별 균사생장

Coconut oil, cotton seed oil, oleic acid, olive oil, palmitic acid, 한약찌꺼기, 보리쌀, 배추가루, 계란껍질, 콩가루, 밀기울을 첨가하여 각 첨가제가 균사생장에 미치는 영향을 조사하였다. 이들의 영향을 알아보기 위하여 vegetable oil 2%, fatty acid 1%를 각각 참나무톱밥과 미강 혼합기질(v:v/8:2)에 첨가하였고, 다른 첨가물들은 톱밥:미강:첨가물(8:1:1)의 비율로 배지를 제조하여 시험판(Φ30 × 200mm)에 충진시키고 고압 살균기(121°C)에서 90분간 살균한후 공시 9개균주 모두를 각각 접종하고 25°C의 항온기에서 32일간 배양하면서 균사 생장을 측정하였다.

#### 5. 자실체 생산성

노루궁뎅이 자실체 수확량 조사를 위해 참나무톱밥과 미강을 8:2로 혼합하고 수분 함량을 65%내외로 조절한 후 내열성의 1100cc Polypropylene 병(PP)에 700~800g을 충진한 후 병의 중앙에 지름 23mm의 구멍을 뚫은 후 고압 증기살균기(121°C/ 1.2kg/cm<sup>2</sup>)에서 90분간 살균 후 냉각실로 옮겨서 냉각시킨 후 무균실에서 노루궁뎅이 균사가 자란 agar plate에서 내경 11mm cork borer를 이용하여 MEA 배지에서 20일간 배양한 균을 각각의 배양병에 5개씩 접종하였다. 접종 후 25°C의 항온기에서 균사가 배양병에 완전히 자랄때까지 배양하였다. 상대습도가 90~95%, 온도 15±2°C로 조절된 재배사로 옮겨 초발이가 이루어지는 시기와 자실체가 형성되어 수확하는 시기 및 수량을 조사하여 *Hericium*속간의 차이를 기록하였다.

### 제 3 절 결과 및 고찰

#### 1. 복합배지의 영향

선발된 9개 균주의 균사생장에 가장 좋은 복합배지를 선발하기 위하여 ACM, CDM, CVM, LEM, MCM, MYG, PIM, YM, PDA, HAM 배지를 이용하여 균사 생육을 조사하였고, 그 결과 *H. abietis*, *H. coralloides*, *H. erinaceus*(CBS), *H. laciniatum*, *H. erinaceum* F01, *H. erinaceum* 48006 균주들은 PIM, *H. alpestre*는 MYG, *H. erinaceum* KU-8은 CVM, *H. americanum*은 MYG, PIM에서 각각 균사생장이 우수하였다(Table 6-2). Aronone 등(1994)은 *H. erinaceus*의 균사를 수확하기 위하여 corn barn 또는 MPGA(malt extract, peptone, glucose, agar)배지를 이용하였다고 보고하였다. 노루궁뎅이는 Malt extract, Yeast extract가 첨가된 배양기에서 균사생장이 좋다는 것을 알 수 있었다.

#### 2. 온도실험

균사생장의 최적온도 규명을 위하여 MEA 배지를 이용하여 온도 조건을 다르게 하였을 때 온도가 균사생장에 미치는 영향을 조사하였다. *H. abietis*, *H. alpestre*, *H. erinaceum*, *H. erinaceum* K1008, *H. erinaceum* 48006 균주들은 25°C에서 최적의 균사생장을 보였고, *H. americanum*, *H. coralloides*, *H. laciniatum*, *H. erinaceum* F01 균주들은 30°C에서 가장 좋은 성장을 나타내었으며, 모든 균주가 37°C에서는 균사생장을 거의 하지 못하였다(Table 6-3). 따라서 *Hericium*속간에서도 최적온도의 차이가 있다는 것을 보여주었다. Sohi 등(1989)은 *Pleurotus* species의 균사생장 최적온도를 측정한 바에 의하면, *P. sajo-caju*, *P. ostreatus*, *P. sapidus*, *P. florida*은 25~30°C가 최적온도이었다. 또한 Chi 등

Table 6-2. Growth of mycelial of *Hericium* spp. on various media.

Species	Complex media									
	ACM	CVM	HAM	LEM	MCM	MYG	PDA	PIM	YM	CZM
<i>H. abietis</i>	12.6*	18.6	20.6	16.3	20.6	21.3	11.6	23.6	23.3	10
<i>H. alpestre</i>	39.6	51.3	36.3	44.6	45.3	62.6	34.6	55.3	51.3	15.3
<i>H. americanum</i>	50.0	57.3	69.6	61.3	70.3	72.3	30	72.3	65.6	20.3
<i>H. coralloides</i>	22.3	36.3	60.0	60.6	70.6	69.6	22.3	71.6	61.0	12.6
<i>H. erinaceus</i> (CBS)	30.3	47.6	46.3	53.3	64.6	51.3	64.6	67.3	53.3	22.6
<i>H. laciniatum</i>	17.3	13.3	17.0	26.3	23.3	14.3	16.3	33.0	20.3	8.6
<i>H. erinaceum</i> KU-8	25.3	46.6	11.6	34.6	7.3	31.0	9.6	43.6	25.0	6.0
<i>H. erinaceum</i> F01	30.6	51.6	19.0	49.0	22.0	33.0	15.0	57.6	30.0	6.0
<i>H. erinaceum</i> 48006	12.0	29.3	33.3	27.0	24.6	23.0	17.3	44.3	20.0	6.0

\* : Diameter of mycelial growth: mm

Table 6-3. The optimum temperature for mycelial growth of *Hericium* spp.

Species	Temperature(℃)					
	10	15	20	25	30	35
<i>H. abietis</i>	9.0*	11.0	16.0	22.0	13.0	7.0
<i>H. alpestre</i>	29.3	24.6	14.3	50.0	44.3	7.0
<i>H. americanum</i>	35.3	31.6	14.3	73.0	74.0	7.0
<i>H. coralloides</i>	36.0	24.3	41.0	72.0	79.0	7.0
<i>H. erinaceus</i> (CBS)	28.6	42.0	44.3	72.6	68.3	7.0
<i>H. laciniatum</i>	19.6	12.0	25.0	23.6	33.0	7.0
<i>H. erinaceum</i> KU-8	26.6	29.0	7.0	66.3	45.0	7.0
<i>H. erinaceum</i> F01	20.6	19.3	31.3	61.6	72.0	7.0
<i>H. erinaceum</i> 48006	27.0	27.3	10.0	70.6	64.6	7.0

\* : Diameter of mycelial growth: mm.

(1996)은 *Phellinus linteus*의 최적온도도 이들과 동일하게 보고하였다. 균주에 따라서 최적온도는 다를 수 있지만 노루궁뎅이 균사생장의 최적온도도 이들과 유사하였다.

### 3. 첨가물별 균사생장

참나무톱밥배지에 첨가물을 첨가하여 일반 배지와 균사 생장을 비교하였다. 농가부산물에서는 한약찌꺼기, 보리쌀, 콩가루, 배추가루에서 각각 균사생장이 우수하였다(Table 6-4).

Vegetable oil에서는 olive oil, fatty acid에서는 palmitic acid가 균사 생장이 좋았으나, *H. erinaceum* KU-8, *H. erinaceum* F01 두 균주는 Control에서 균사생장이 우수하였다(Table 6-5). 이 실험의 결과를 바탕으로 농가부산물, vegetable oil, fatty acid에서 선발된 균사 생장이 우수한 첨가물의 비교실험에서는 palmitic acid, olive oil, control에서 균사 생장이 가장 우수하였다(Table 6-6). 농가부산물이 균사생장에 미치는 영향을 알아보기 위한 실험에서 *H. coralloides*, *H. erinaceum* KU-8, *H. erinaceum* F01, *H. erinaceum* 48006 균주들은 한약찌꺼기에서, *H. alpestre*, *H. laciniatum*, *H. erinaceus*(CBS) 균주들에서는 보리가루, *H. americanum*은 콩가루, *H. abietis*는 배추가루에서 각각 균사생장이 우수하였다. 농가부산물을 이용한 느타리속의 재배에 관한 기질 개발실험으로 제지부산물(조 등, 1995), 팽이버섯 재배에 관한 사과가공부산물, 계란껍질의 자실체 영향실험(조 등, 1996: 정 등 1995), 산폐유를 이용한 버섯 균사체 생산 실험(정 등, 1996), Guoping Xiao(1996)은 *H. abietis*를 침엽수 텁밥에 배양 재배실험을 실시하였으며, 이 등(1998)은 애느타리와 버들송이를 농가부산물인 콩비지, 굴껍

Table 6-4. Comparison of mycelial growth of aricultural by-products of *Hericium* spp.

Species	Aricultural by-products						
	Control	Chinese medicine sludge	Barely bran	Soybean powder	Egg shell	Chinese cabbage	Wheat bran
<i>H. abietis</i>	42.0*	40.0	39.6	28.6	3.0	44.6	32.6
<i>H. alpestre</i>	50.6	55.6	65.3	61.3	40.6	48.0	49.0
<i>H. lacineitum</i>	52.6	62.0	64.3	63.0*	0	52.6	61.6
<i>H. americanum</i>	82.0	104.3	91.0	104.6	77.6	97.3	89.0
<i>H. coralloides</i>	67.6	86.3	63.6	84.6	58.6	75.6	75.0
<i>H. erinaceus</i> (CBS)	79.0	85.0	89.6	71.3	58.6	71.6	69.0
<i>H. erinaceum</i> KU-8	86.6	115.0	96.3	107.3	75.6	98.6	96.3
<i>H. erinaceum</i> F01	88.5	119.6	103.6	113.6	80.3	92.6	110.6
<i>H. erinaceum</i> 48006	72.3	96.0	74.0	95.0	71.3	70.6	68.6

\* : Diameter of mycelial growth: mm

Table 6-5. Comparison of mycelial growth of vegetable Oil and Fatty acid of *Hericium* spp.

Species	Vegetable oil			Fatty acid		
	Control	Coconut oil	Cotton seed oil	Olive oil	Palmitic acid	Oleic acid
<i>H. abietis</i>	42.0*	38.6	29.3	36.6	42.6	32.6
<i>H. alpestre</i>	50.6	43.3	49.3	52.0	52.6	47.3
<i>H. lacineitum</i>	52.6	41.3	53.3	54.0	51.0	48.3
<i>H. americanum</i>	82.0	67.3	80.0	89.0	81.0	78.0
<i>H. coralloides</i>	67.6	72.6	82.6	85.3	92.5	83.6
<i>H. erinaceus</i> (CBS)	79.0	66.3	71.6	75.6	86.3	70.3
<i>H. erinaceum</i> KU-8	86.6	59.3	63.6	69.3	82.6	63.3
<i>H. erinaceum</i> F01	88.5	66.6	87.3	80.0	86.3	84.0
<i>H. erinaceum</i> 48006	72.3	57.0	76.0	71.0	77.0	70.0

\* : Diameter of mycelial growth: mm

Table 6-6. Comparison of mycelial growth of vegetable Oil, Fatty acid and agricultural by-products on *Hericium* spp.

Species	Optimal substrates	Growth of Mycelia(Dia, mm)
<i>H. abietis</i>	Palmitic acid	60.3
<i>H. alpestre</i>	Palmitic acid	72.6
<i>H. lacineitum</i>	Olive oil	102.7
<i>H. americanum</i>	Olive oil	92.6
<i>H. coralloides</i>	Palmitic acid	98.6
<i>H. erinaceus</i> (CBS)	Palmitic acid	95.3
<i>H. erinaceum</i> KU-8	Control	97.3
<i>H. erinaceum</i> F01	Control	98.6
<i>H. erinaceum</i> 48006	Control	87.3

질, 한약찌꺼기 등을 이용하여 증수효과를 보고하였다. 다양한 농가부산물의 기질을 이용하여 인공재배시험을 실시하고 있다. 계란껍질의 첨가가 팽이버섯의 자실체 수량의 증대를 보여주고 있지만 노루궁뎅이의 균사생장에는 큰 영향을 미치지 못하였다.

#### 4. 자실체 생산성

초발이 소요일과 수확량 비교 실험에서 초발이 소요일은 *H. erinaceum* KU-8이 35일, 수확시기에서는 KU-8과 *H. americanum*이 61일로 각각 가장 좋았다. 1차 수확량에서는 146.0g으로 *H. erinaceum* KU-8이 가장 우수하였고, *H. coralloides* 균주가 89.6g으로 가장 저조하였다(Table 6-7). *H. abietis*, *H. alpestre*, *H. laciniatum* 균주는 동일한 재배조건에서 초발이 형성 및 자실체 형성이 이루어지지 않았다. vegetable oil, fatty acid를 첨가한 실험에서는 *H. abietis*, *H. alpestre*, *H. coralloides*, *H. erinaceus*(CBS), *H. erinaceum* K1008, *H. erinaceum* 48006 균주들은 Palmitic acid에서, *H. laciniatum*, *H. americanum* 균주에서는 olive oil에서, *H. erinaceum* F01은 cotton seed oil에서 각각 우수한 균사생장을 나타내었다. 농가부산물, vegetable oil, fatty acid의 결과를 바탕으로 최적 첨가물을 알아보기 위한 실험에서는 *H. abietis*, *H. alpestre*, *H. coralloides*, *H. erinaceus*(CBS) 균주들은 palmitic acid에서, *H. laciniatum*, *H. americanum* 균주들은 olive oil에서, *H. erinaceum* KU-8, *H. erinaceum* F01, *H. erinaceum* 48006 균주들은 control에서 우수한 균사생장을 보였다. 따라서 *Hericium*속에서도 서로 다른 첨가물을 이용한다는 것으로 나타났다. Hong(1978)은 느타리버섯의 텁밥배양에서 미강이 균사생장에 영향을 미치는 중요 영양원이

Table 6-7. The result of pinhead formation days and yield among *Hericium* spp.

Species	Pinhead formation (days)	1st yield running (days)	1st yield (g)	2nd yield running (days)	2nd yield (g)	3rd yield running (days)	3rd yield (g)	Total yield (g)
<i>H. abietis</i>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<i>H. alpestre</i>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<i>H. lacineitum</i>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<i>H. americanum</i>	41	61	132.5	103	60.0	139	42	234.5
<i>H. coralloides</i>	49	68	89.6	115	33.0	167	20.7	143.3
<i>H. erinaceus</i> (CBS)	42	65	123.3	142	46.5	ND	ND	169.8
<i>H. erinaceum</i> KU-8	35	61	146.0	130	128.0	138	118.5	392.5
<i>H. erinaceum</i> F01	44	67	145.7	115	48.5	ND	ND	194.2
<i>H. erinaceum</i> 48006	41	99	115	122	97	ND	ND	212.0

ND : No detection.

고, 미강의 첨가량은 20%가 적당한 농도라고 보고하였다(Lee 1991, 농촌진흥청 1994). 이외의 연구에서도 텁밥만을 기질로 사용한 배지는 균사의 생장이 불량한 것임을 알 수가 있었다(Go *et al.*, 1981, 1984). 조 등(1996)은 팽이버섯 재배에서 사과가공 부산물을 텁밥의 대체물로 사용하면 자실체의 수량이 증가되어 대체효과가 있음을 확인하였고, 정 등(1996)도 튀김용 산페유가 느타리버섯의 균사생장에 이용 될 수 있는 가능성을 제시하였다. 대부분 텁밥과 미강이 버섯 배지의 기질로 사용되고 있지만 여기에 첨가물을 첨가함으로써 초발이 소요일을 앞당기고, 수확량을 증가시킨다면 농가부산물 및 여러 가지 첨가물에 대한 활용방안은 적극 검토되어야 한다고 사료된다.

수확량을 비교해 보면 *H. erinaceum* KU-8이 1차, 2차, 3차 수확량이 우수하였고, 총 수확량 비교에는 *H. erinaceum* KU-8이 392.5g으로 가장 우수하였다. 초발이 및 자실체를 형성하지 못한 *H. abietis*, *H. alpestre*, *H. laciniatum* 균주들에 대해서는 영양생식에서 생식생장으로 전환되는 어떤 변화에 연구가 더 수행되어야 한다.

## 참고문헌

- Ahn, D. K. 1992. Medicinal fungi in Korea. *Kor. J. Mycol.* 20:154-165
- Aronone, A., Cardillo, R., Nasini, G. and de Pava, O. V. 1994. Secondary mold Metabolites: Part 46. Hericines A-C and Erinapyrone C, New metabolites produced by the Fungus *Hericium erinaceus*. *Journal of Natural Products* 57: 602-606.
- Chang, S. H. and P. G. Miles. 1989. Edible Mushroom and Their Cultivation. CRC Press. pp. 120, 307-312.
- Chi, J. H., Ha, T. M., Kim, Y. H. and Rho, Y. D. 1996. Studies on the Main Factors Affecting the Mycelial Growth of *Phellinus linteus*. *Kor. J. Mycol.* 24(3): 214-222.
- Guoping Xiao. 1996. Cultivation of *Hericium abietis* on conifer sawdust. *Can. J. Bot.* 75 : 1155-1157.
- Kawagishi, H., Shimada., R. Shirai., K. Okamoto., F. Ojima., H. Sakamoto., Y. Ishiguro and S. Furukawa. 1994. Erinacines A, B and C, strong stimulators of nerve growth factor(NGF)-systhesis; from the mycelia of *Hericium erinaceum*. *Tetrahedron Letters* 35:1569-1572.
- Kawagishi, H., Shimada., S. Hosokawa., H. Mori., H. Sakamoto., Y. Ishiguro., S. Sakemi., J. Bordner., N. Kojima and S. Furukawa. 1996. Erinacines E, F and G, stimulators of nerve growth factor(NGF)-systhesis, from the mycelia of *Hericium erinaceum*. *Tetrahedron Letters* 37:7399-7402.
- Liu, C.Y. 1981. Technique of cultivation of monkeyhead mushroom. *Edible fungi.* 4, 33
- Mi-Sun Kang et al. 2000. Studies on Mycelial Growth and Arificial Cultivation of *Pleurotus eryngii*. *Kor. J. Mycol.* 28(2) : 73-80.
- Sohi, H. S. and Upadhyay, R. C. 1989. Effect of Temperature on mycelial

growth of *Pleurotus* species and their yield Performance on selected substrates. *Mush. Sci.*12(Part 2): 49~56.

Suzuki-C, Mizuno-T, 1997, Cultivation of *Hericium erinaceum*. Food reviews international, 1997, 13 : 419-426.

Yoon-Hae, Lee. 1996. Development of cultivational technique of *Hericium erinaceum*. Report of Kyung-Ki, Agricultural Ministration. p870-873.

이희덕, 김용균, 김홍규, 한규홍, 문창식, 허일법. 1998. 농산부산물을 이용한 애느타리 및 버들송이의 배지재료 활용 효과. 한균지. 26(1):47-50

정종천, 김광포, 김한경, 김영호, 차동열, 정봉구. 1995. 계란껍질 첨가배지가 팽이버섯의 균사생장의 균사생장과 자실체에 미치는 영향. 한균지. 23(3): 226-231.

조우식, 윤영석, 박선도, 최부술. 1995. 제지 부산물을 이용한 느타리버섯 자실체 형성용 염가배지 개발. 한균지. 23(3):197-201.

조우식, 윤영석, 유영현, 박선도, 최부술. 1996. 사과가공부산물 첨가배지가 팽이버섯의 균사생장과 자실체에 미치는 영향. 한균지. 23(3):23-227.

차동열, 유창현, 김광포. 1989. 최신 버섯재배기술. 상록사. 수원. pp 378-389.

## 제 7 장 농가 실증 시험

### 제 1 절 서론

노루궁뎅이버섯의 재배에 대하여 실험실에서 얻은 시험성적을 기초로 하여 실제 농가에서 노루궁뎅이버섯 농가실증시험을 실시하였다. 일반 농가에서 노루궁뎅이의 재배법 보급에 따른 문제점을 검토하였으며, 기존의 버섯을 재배하는 농가를 대상으로 노루궁뎅이버섯 실증시험은 3개소에서 이루어졌다.

첫 번째 실증지는 경기도 양평군 개군면 석장리에 소재한 농가로써 실증에 참여한 이영옥씨는 느타리 병재배를 수년전부터 재배해온 경력을 소유한 버섯재배의 경험자이며, 두 번째 실증지는 강원도 춘천시 서면 방동리에 소재한 실증지로써 느타리 봉지재배를 하고 있는 배근철씨가 본 실험에 참여하였다. 또한 세 번째 실증지로써 경기도 포천군 군내면 직두리 소재의 포천버섯개발주식회사 사장인 정덕균씨도 노루궁뎅이버섯 실증시험을 실시하였다. 3개소에 실시되어진 노루궁뎅이버섯 실증재배 실험은 각각의 실증지의 시설 및 재배환경을 충분히 살폈으며 기존 다른 버섯 재배방식과 동일하게 재배하였다. 실증시험 재배자의 의견을 수렴하여 결과를 얻었다. 또한 콘테이너를 재배사로 이용하여 저렴한 비용과 간단한 방법의 간이식으로 노루궁뎅이버섯을 재배하였으며 이에 따른 노루궁뎅이버섯의 재배방법을 폭넓게 적용하였다.

### 제 2 절 재료 및 방법

#### 1. 이영옥씨 대

실증에 사용한 균주는 실험실에서 우량균주로 선발된 *H. erinaceus*(CBS), *H.*

*erinaceum* KU-8, *H. erinaceum* 48001 3품종으로 실증을 실시하였다. 재배지의 시설이 병재배에 적합한 시설을 보유한 관계로 느타리 병재배에 준하여 실험되었다. 병재배의 배양병(팽이병)은 850cc PP병을 품종당 각각 500병을 접종하였다. 기본배지는 참나무톱밥 80% + 미강 20%로 균사를 배양하였으며 균사활착이 완료된 후 16~18°C의 발아실에 이동하여 자실체를 유도하였다. 균사활착 소요일, 균사배양중 오염율, 초발이 소요일, 1차 자실체 수확량과, 자실체의 품질을 조사 기록하였다. 한편 실증시험 재배자의 의견도 참고하여 결과를 얻었다.

## 2. 배근철씨 택

본 실증지에서는 균주를 *H. erinaceum* KU-8로 하였다. 느타리 봉지재배를 과거부터 재배해온 농가이므로 봉지재배에 적합한 시설을 갖춘 관계로 노루궁뎅이의 봉지재배를 실시하였다. 재배방법은 농가재배사의 시설에 준하여 시행되었으며 재배온도는 특별하게 저온처리나 가온을 하지 않았다. 온도범위는 22-24°C, 습도는 80-90%가 유지되었으며 자연상태에서 처리하였다. 봉지에 담는 배지중량을 1kg, 2kg으로 하였으며 배지의 조성은 기본배지를 면자각 80%, 면자각 40% + 톱밥 40%, 톱밥 80%의 3가지로 하였고, 영양원은 옥수수 20%, 옥수수 10% + 미강 10%, 미강 20%의 3가지 영양원을 이용하여 재배하였다. 노루궁뎅이 재배시 재배자의 의견을 기록하였다.

## 3. 정덕균씨 택

실증에 사용한 균주는 실험실에서 우량균주로 선발된 *H. erinaceum* KU-8로 1, 2차로 나누어 실증을 실시하였다. 1차 시험에는 톱밥종균(참나무톱밥 80% + 미

강 20%)을 이용하여 1100cc PP병에 89병을 접종하였고, 2차 시험에는 액체종균(옥수수가루, Dextrose, Yeast Extract, D.W)을 사용하여 85병 접종하였다. 균사가 완전히 병의 밑부분까지 자라는 기간을 배양완료 기간으로 하여 배양완료 기간, 생육불량을 조사하였고, 배양이 완료되었을 때 16-18°C의 생육실로 옮겼다. 일반적으로 병재배를 하는 버섯은 생육실로 옮겨서 마개를 열고 자실체 형성을 유도하지만 노루궁뎅이버섯은 그 모양이 다른 버섯과 달리 향지성(向地性)으로 자라는 특징이 있기 때문에 이 점을 실증실험에 적용하기 위해서 발이가 끝나고 생육실로 병을 옮길 때 병을 재배상에 눌혀서 자실체 형성을 유도하였다. 노루궁뎅이버섯의 생육에 걸리는 기간과 자실체의 수확량을 조사하였고, 노루궁뎅이 재배시 재배자의 의견을 기록하였다.

#### 4. 콘테이너 간이식 재배

본 실험은 콘테이너를 재배사로 이용하여 가장 저렴하고 경제적인 방법으로 노루궁뎅이버섯의 실증재배를 실시하였다. 노루궁뎅이 균주는 국내 야생균주인 *H. erinaceum* KU-8로 실증을 실시하였다. 재배방법은 병재배 방법으로 실시하였으며 배양병은 1100cc PP병에 참나무톱밥 80% + 미강 20%로 배양기를 조제한 후, 접종원은 노루궁뎅이 균사가 자란 PDA의 균사절편을 이용하였으며, 또 다른 접종원은 PDB(potato dextrose broth)에 자란 액체종균을 접종하여 콘테이너 안에서 배양하였다. 균사가 자라는 기간을 비교 조사하였고, 이때 특별하게 배양온도 및 습도를 유지하지 않았다. 콘테이너 안의 온도와 습도로써 노루궁뎅이 균사를 활착시켰다. 그런 후에 자실체를 유도할 때도 저온처리나 다른 재배방법을 이용하지 않았다. 콘테이너 안에서 노루궁뎅이의 초발이를 유도하였으며 자실체로 생육

되어 가는 과정을 관찰 기록하였다.

### 제 3 절 결과 및 고찰

#### 1. 이영육씨 택

실증에 사용한 군주는 실험실에서 우량군주로 선발된 *H. erinaceus*(CBS), *H. erinaceum* KU-8, *H. erinaceum* 48001의 3품종으로 실증을 실시하였다. 재배지의 시설이 병재배에 적합한 시설을 보유한 관계로 느타리 병재배에 적용하여 실험되었다. 본 실증지에서는 느타리 병재배를 할 때 1차 수확을 한 후 배양병의 배지를 탈병하기 때문에 본 실험도 1차 수확량만을 가지고 결과를 도출하였다.

Table 6-8에서 보는바와 같이 대량 실증실험 결과 전체적으로 *H. erinaceum* KU-8의 품종이 우수하게 평가되었다. 군사활착 소요일이 25일로 *H. erinaceum*(CBS)보다 2일이 늦었지만 초발이는 2일 빨랐으며, 배양병당 1차 수확량도 135.8g으로 가장 우수한 결과가 나왔다. 외국에서 입수된 군주가 배양병당 1차 수확량이 가장 낮게 나왔다. 직접 실증에 참여한 재배자에 의견에 의하면 노루궁뎅이의 군사배양과 자실체 발이는 느타리재배 과정보다 쉽게 재배가 이루어 졌으나 발이된 자실체의 고유모양 형성 및 습도관리에서 애로사항을 지적하였다. 환기량을 높여주어야 고유의 자실체 수염모양을 형성하게 되며 습도관리에서 한순간 습도가 낮아지면 수확량과 품질이 급속도로 떨어졌다고 하였다. 또한 일부를 포장하여 가락동시장에서 호응도를 알아보았는데 아직까지 인지도가 떨어지며 요리방법의 부족으로 홍보도 쉽지 않았다고 하였다. 따라서 노루궁뎅이버섯의 홍보 및 요리연구에도 앞으로 연구가 지속되어야 할 것이라 의견을 제시하였다.

Table 6-8. The bottle cultivation of *Hericium* spp. in saw dust substrate.

Items	Strains of <i>Hericium</i> spp.		
	<i>H. erinaceum</i>	<i>H. erinaceum</i>	<i>H. erinaceus</i> (CBS)
	KU-8	48001	
Contamination (%)	1.2	2.6	4.8
Mycelial growth days	25	30	23
Pinhead formation days	6	12	8
Fruiting bodies yield(kg)	67.1	64.3	52.5
Yield per one bottle(g)	135.8	132.0	110.3

## 2. 배근칠씨 택

본 실증지에서는 균주를 *H. erinaceum* KU-8로 하였다. 느타리 봉지재배를 과거부터 재배해온 농가이므로 봉지재배에 적합한 시설을 갖춘 관계로 노루궁뎅이의 봉지재배를 실시하였다. 병재배시 1차 수확량만을 기록하였지만 봉지재배에서는 배지가 완전 소진될 때까지 지속적인 수확량으로 결과를 알아보았다. Table 6-9, 6-10에서 보는바와 같이 배지중량을 1kg, 2kg으로 하였으며 배지의 조성은 기본 배지를 면자각 80%, 면자각 40% + 톱밥 40%, 톱밥 80%의 3가지로 하였으며 영양원은 옥수수 20%, 옥수수 10% + 미강 10%, 미강 20%의 3가지 영양원을 이용하여 재배하였을 때 면자각 40% + 톱밥 40%의 혼합배지에서 결과가 우수하였고, 영양원에서도 옥수수 10% + 미강 10%의 혼합 영양원에서 우수한 결과를 보여주었다. 병재배에서는 1차 수확량으로 한정되었지만 봉지재배 경우, 1kg 배지에서 최대 520g을 수확하였으며 2kg 배지에서 최대 860g을 수확하였다. 단적으로 봉지재배를 할 경우 배지량을 1kg으로 만들어 배양하는 것이 더욱 효율적임을 알 수 있었다.

재배에 직접 참여한 재배자의 의견으로써 낮은 재배온도를 유지시켜주는 것이 결정적으로 좋은 수확량을 보장해 줄 수 있음을 알았으며 온도가 높은 여름철 시기를 피하여 재배하면 경영적인 측면에서 매우 유리할 것이라 판단하였다.

## 3. 정덕균씨 택

본 실증 시험은 현재까지 팽이버섯 및 느타리버섯을 병재배하고 있는 재배지로 써 노루궁뎅이버섯의 병재배를 실시하였다. 실증에 사용한 균주는 실험실에서 우량균주로 선발된 *H. erinaceum* KU-8로 농가 실증시험을 실시하였다.

Table 6-9. The polypropylene bag(1kg) cultivation of *Hericium erinaceum* in various substrates.

Basal media	Cotton hull 80%			Cotton hull 40% + saw dust 40%			Saw dust 80%		
Substrates	Corn 20%	Corn 10%+ rice bran10%	Rice bran 20%	Corn 20%	Corn 10%+ rice bran10%	Rice bran 20%	Corn 20%	Corn 10%+ rice bran10%	Rice bran 20%
Total yield (kg)	55.7	46.9	37.5	63.3	67.6	48.2	29.0	37.8	31.0
Yield per one bag(g)	420	430	410	450	520	460	330	370	340

Table 6-10. The polypropylene bag(2kg) cultivation of *Hericium erinaceum* in various substrates.

Basal media	Cotton hull 80%			Cotton hull 40% + saw dust 40%			Saw dust 80%		
	Corn 20%	Corn 10%+ rice bran10%	Rice bran 20%	Corn 20%	Corn 10%+ rice bran10%	Rice bran 20%	Corn 20%	Corn 10%+ rice bran10%	Rice bran 20%
Total yield (kg)	71.7	81.0	48.0	65.8	83.5	64.6	39.2	42.2	52.7
Yield per one bag(g)	750	860	560	720	850	690	560	700	750

1차 시험에서 배양완료기간은 25일 소요되었고, 생육실로 옮겨서 완전 생육까지의 기간은 5-7일, 접종 후 완전 생육까지 걸리는 기간은 30-32일 소요되었다. 노루궁뎅이버섯 자실체의 평균 수량은 120g이었다. 2차 실증시험에서 배양완료기간은 22일, 완전 생육기간은 5-7일, 접종 후 완전 생육까지 기간은 30-33일 소요되었다. 평균 수량은 140g이었다. 1, 2차 시험을 비교해 보면 톱밥종균을 이용한 1차 시험에는 발이 및 생육 불량이 4병 발생하였지만 2차 시험에서는 발생하지 않았고, 배양완료기간에서는 액체종균을 사용한 2차 시험에서 3일 빠른 결과를 보여주었지만, 접종 후 완전 생육까지 기간은 비슷하였다. 평균수량 비교에서는 2차 시험에서 20g 우수했다. 기존의 버섯을 재배하는 방법을 조금 변형하여 노루궁뎅이를 재배한 결과 자실체 모양이 자연 상태의 버섯과 유사하였다. 향후 노루궁뎅이 버섯의 병재배에는 병을 눕혀서 재배하는 것이 좋을 것이라 생각되었다.

노루궁뎅이버섯의 농가실증시험에 참여하였던 정덕균씨의 의견에 의하면 원균 관리와 접종원 제조시에 타 버섯류의 제조에 비해 어렵거나 까다로운 점은 없었으나, PDA배지상에서 균사가 완전히 성장하였는가와 액체 배지상에서 균사가 정상적으로 완전히 배양되었는가를 판단하기 어려웠다는 의견을 제시하였으며, PDA배지상에서는 느타리와 같은 확실한 균사생장을 보여주지 못하였지만 노루궁뎅이버섯 균사가 톱밥배지 배양시는 거의 느타리 균사활착 모양과 동일한 수준의 활력 및 배양 완료 기간을 나타내주었고, 각각의 배양병마다 배양 수준의 차이가 거의 없이 고르게 일정한 생장을 보여줌은 느타리보다 노루궁뎅이 균사 활착이 매우 양호하였다고 하였다. 또한 노루궁뎅이재배시 느타리와 같이 까다로운 환경조건의 요구없이도 양호하게 생장하는 것으로 나타났다. 앞으로 지속적인 재배 실험으로 정확한 육성방법을 규명하고 노루궁뎅이버섯의 대중적 홍보를 통

해 소비자의 구매력을 이끌어 내는 소비증진의 방법을 강구하여 주기를 희망하였다.

#### 4. 콘테이너 간이식 재배

일반적으로 병재배 버섯은 초기에 특별한 재배시설이 요구되고, 많은 시설비를 필요로 한다. 본 시험은 버섯을 재배할 수 있는 최소한의 시설 및 소자본으로 버섯을 재배할 수 있는 조건을 알아보기 위해 실시하였다. 간이식 재배를 위해서 콘테이너를 이용한 노루궁뎅이 재배를 실시하였는데 이는 버섯재배사의 설치 및 이동이 용이하고 경제적으로 노루궁뎅이버섯을 재배하기 위한 간이식 재배방법을 알아보기 위해 실시하였다.

본 시험에서는 *H. erinaceum* KU-8 균주와 1100cc PP병을 이용하여 톱밥배지에 균사절편 및 액체종균을 접종한 후 균사생장 및 초발이 소요일을 조사하였다. 접종 후 23일이 지나서 균사생장을 조사한 결과, 균사절편에서는 평균 11.92cm, 액체종균은 평균 8.13cm로 측정되었다. 초발이 소요일은 균사절편에서 38일, 액체종균에서 47일 이였다. 상대적으로 일반 재배사에서 관찰되는 초발이 소요일보다는 다소 늦었다. 자실체의 모양은 초발이가 정상적으로 형성되었지만 자실체로 생육되어 가는 도중에 충분한 습도의 부족으로 정상적인 노루궁뎅이버섯 모양을 갖추지 못하였다. 콘테이너를 이용한 간이식 버섯의 재배에서 노루궁뎅이버섯의 생육에 필요한 습도를 유지하여 준다면 일반 재배사에서 수확되는 정상적인 모양의 노루궁뎅이버섯 재배가 가능하다고 사료되었다.