

백강균의 자실체 생산 및
생리활성물질 이용기술 개발

Production of Synnemata of *Beauveria*
bassiana and the utilization
of its bioactive compounds

연구기관

중앙대학교

고려대학교

농림부

제 출 문

농림부 장관귀하

본 보고서를 “백강균의 자실체생산 및 생리활성물질 이용기술 개발에 관한 연구”
과제 (협동과제 “백강균 자실체생산 및 배양의 최적화 에 관한 연구”)의 최종보고서로
제출합니다.

2003년 7월 26일

주관연구기관명 : 중앙대학교

총괄연구책임자 : 이 찬

세부연구책임자 : 이 찬

연 구 원 : 배송환

연 구 원 : 조승룡

연 구 원 : 이석원

연 구 원 : 송혁환

연 구 원 : 강호식

협동연구기관명 : 고려대학교

협동연구책임자 : 윤철식

요 약 문

I. 제 목

백강균의 자실체생산 및 생리활성물질 이용기술 개발

II. 연구개발의 목적 및 필요성

본 연구에서는 백강균으로부터 자실체 생산기술확립과 기능성 생리활성물질의 탐색, 가치평가, 이용기술 개발을 통하여 국가보유 유용미생물자원 경제가치를 증대시키고자 한다. 그리고 지속 가능한 이용기술 확보, 대외경쟁력 향상, 관련 산업군 창출에 의한 농가소득 향상, 관련학문, 기술 산업의 저변확대 및 기반을 강화시킨다. 이를 위하여 세계적으로도 전혀 연구가 되어있지 않는 백강균의 대중화 및 실용화를 위해서 자실체의 대량생산에 적합한 경제적인 배지를 개발하며, 또한 생산기간의 단축을 위하여 생육에 필요한 조건을 구명하고자 하였다. 그리고 백강균에서만 특이적으로 생산되는 생리활성물질의 탐색, 분리·정제 및 특성분석 기술을 개발하고자 한다.

III. 연구개발 내용 및 범위

주관연구기관은 백강균의 생리활성 탐색 및 기능성 소재개발을 연구의 내용으로 한다.

백강균의 생리활성 탐색을 위하여 균사체 및 자실체를 열수, 냉수, 산/알카리 용액, 유기용매(ethanol, ethylacetate, chloroform) 등으로 추출한후, 추출온도, 추출시간 및 추출횟수 등의 추출조건별로 항암성, 항고혈압 활성, 항보체 활성 및 면역조절 기능을 검색한다. 이상의 추출조건과 방법을 사용하여 최대 생리활성을 보이는 획분을 선정한다. 생리활성물질의 추출 및 정제를 위하여 최대 생리활성을 보이는 추출물을 대상으로 생리활성물질의 최적 추출조건과 정제용의 조건을 동시에 검토, 확립한다. 그리고 추출물의 정성분석과 정량분석을 통하여 활성본체(다당류, 단백질, polyphenol 등)를 분석한다. Column chromatography, HPLC, electrophoresis를 이용하여 활성물질을 정제하고 순도를 물질에 따라 HPLC, 전기영동 및 초원심분리에 의하여 검정한다.

생리활성 물질을 함유한 획분을 이용한 건강 식품소재로의 활용을 위하여 생리활

성 물질의 규명 후 식품소재로 개발을 위한 모델 식품을 결정한다. 그리고 모델 식품의 formular를 결정하고 모델 식품의 생리적 효과를 확인한다. 생리활성이 보유했던 회분을 이용하여 기능성 식품 소재로의 활용을 위해 다양한 소재로의 활용성을 비교하여 최적의 소재 응용 방법을 확립한다.

협동연구기관에서는 백강균의 자실체 대량생산에 적합한 경제적 배지 성분의 선발을 위하여 저렴하고 구입하기가 용이한 곡물류나 농산 폐기물을 중심으로 기본 배지 성분을 결정하고 백강균의 자실체 생산과 생리활성에 미치는 영향을 검토하여 탄소원과 최적농도를 선정한다. 각종 곡물류나 농산 폐기물(각종 곡물의 박으로 커피박, 옥수수박, 미강 등)을 이용한 질소원을 농도별로 첨가하여 질소원과 최적농도를 선정하고 무기질의 종류와 최적농도를 결정한다.

자실체 생성의 최적 조건을 설정하기 위하여 통기량, 온도, 수분, 빛이 자실체 생산에 미치는 영향을 검토한다. 효과적인 종균 생산을 위하여 자실체 형성에 적합한 종균생산 방법을 결정하며 특히 무성포자의 접종에 의한 자실체 형성, 액체배양에서 생산된 균사체 접종에 의한 자실체 형성량을 검토한 후 이를 종균으로 사용했을 때 자실체의 생산성을 비교 검토 한다.

IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

동결건조된 백강균의 균사체 및 자실체의 화학적 그리고 생리활적 활성을 살펴보았다. 동결건조된 백강균 자실체는 주로 탄수화물(49.86%), 단백질(11.36%) 그리고 수분(30.64%)으로 구성되어 있으며 낮은 함량의 회분과 지방(4.76%)을 함유하고 있었다. 탄수화물은 주로 mannose(52.3%), galactose(31.5%), glucose (13.2%)와 rhamnose (3%)로 구성되어 있으며 미량의 arabinose, xylose 그리고 fructose가 발견되었다. 자실체의 주요 구성 아미노산들은 glutamic acid, glycine, aspartic acid, arginine, threonine, alanine, valine, leucine, lysine이었으며 그들의 함량은 각각 30.42, 25.22, 17.17, 15.12, 12.65, 15.23, 12.47, 11.47, 14.24 그리고 17.17 mg/g 이었다. 자실체의 여러 추출물중 열수 추출물은 대조구와 비교하여 67%의 항보체활성을 나타내었으며 에틸아세테이트 추출물(17%)과 메탄올 추출물도(15%) 약간의 활성을 나타내었다. 열수추출물은 55초의 혈액응고지연시간을 나타내어 강한 혈액응고 활성을 나타내었으며 이 분획은 강한 장관면역활성을 나타내는 것으로 조사되었다. 메탄올 추출물은 25%의 TPA-induced superoxide (O_2^-) generation 저해

활성을 나타내었으며 열수추출물(18%)과 에틸아세테이트 추출물(10%)에서 약한 활성을 나타내었다. 이 결과들은 백강균의 자실체가 여러 가지 생리활성을 나타내는 물질을 함유하고 있으며, 이들 특성은 자실체의 활용에 유용한 지표로 활용될 수 있다.

백강균 자실체의 열수추출물에 면역증강 활성 측정을 위하여 Mitogen활성과 Macrophage 활성능을 측정하였다. 열수추출물은 Mitogen 활성에 있어 positive control로 사용한 LPS(1mg/ml)에 약 80%의 활성을 나타내었고 Macrophage의 활성은 positive control과 거의 비슷한 활성을 나타내었다. 면역활성물질의 정제를 위해 ion exchange chromatography 와 HPLC를 이용하여 정제하였다. ion exchange chromatography로 부분정제된 활성획분의 활성 본체를 확인한 결과 neutral sugar와 uronic acid sugar의 함량이 96.16%와 3.84%를 함유하고 protein은 함유하지 않은 것으로 알 수 있었고 구성당을 분석한 결과 mannose, galactose와 glucose가 대부분을 차지하고 약간의 rannose, arabinose와 xylose로 구성되어 있는 활성물질임을 확인할 수 있었다. 정제된 면역활성물질은 HPLC를 통하여 분자량이 250,000 Da임을 확인하였다.

백강균 자실체를 국수, 제빵 및 음료에 활용하기 위하여 여러 가지 기능성 모델 식품을 제조하고 그 특성을 조사하였다. 밀가루에 백강균 자실체를 각각 1.0%, 3.0% 및 5.0%로 첨가한 복합분으로 건면을 제조하였다. 이렇게 제조한 건면을 끓는 물에 삶아 조리한 면을 조리면으로 명칭하였다. 백강균 자실체를 첨가한 건면과 조리면을 대조구와 비교하여 색도를 측정하였다. 백강균 자실체를 첨가한 건면을 조리하여 조리시간에 따른 조리면의 중량, 부피, 수분흡수율, 탁도 그리고 조직감을 측정된 결과는 다음과 같다. 자실체 첨가 건면과 조리면의 색도는 대조구와 비교하여 큰 차이를 나타내지 않았다. 1% 와 3% 첨가한 조리면의 중량, 부피, 수분흡수율과 탁도는 대조구와 비교하여 유의적 차이를 나타내지 않았다. 건면의 조직감은 5% 첨가군에서 대조구에 비해 파쇄력이 감소하였다. 조리면의 chewiness값은 1% 첨가 조리면에서 대조구와 차이를 나타내지 않았고, hardness는 5% 군에서 대조구보다 증가하였다.

백강균의 자실체를 첨가한 제빵의 가공 특성을 연구하였다. 자실체를 동결건조한 후 분쇄하여 시료의 색도를 측정하였고, 밀가루에 백강균 자실체를 각각 1.0%, 3.0% 및 5.0%로 첨가한 복합분을 제조하고 대조구로 백강균 자실체를 첨가하지 않은 100% 밀가루로 제조한 제빵을 대조구로 명칭하였다. 또한 밀가루에 대한 자

실체 시료의 첨가농도를 밀가루 대비 각각 0.25%, 0.5%, 1.0%로 하여 빵을 제조하여 색도 측정, 제빵 특성 그리고 조직감을 측정하였다. 자실체 분말의 색도를 측정한 결과 L값은 83.12, a값은 -0.24 그리고 b 값은 19.21이었다. 자실체 첨가 빵을 제조하여 색도를 측정한 결과 자실체 첨가농도가 증가함에 따라 대조구에 비해 L값은 약간 감소를 a와 b는 약간 감소하였다. 자실체 분말을 첨가한 자실체 첨가 빵의 비용적은 대조구와 별 차이를 나타내지 않아 제빵 적성에 적합한 결과를 나타내었다. 백강균 자실체를 첨가시켜 제조한 빵의 경도를 측정한 결과 대조구의 경도는 1.232kgf이었으며, 자실체 첨가 농도에 상관없이 대조구와 큰 차이를 나타내지 않았다.

백강균 자실체 추출물을 첨가한 음료를 제조시 추출액을 5%, 10%, 15%, 20% 및 25%를 각각 첨가시 음료의 갈색도는 추출물의 첨가농도가 증가할수록 커졌으며 또한 추출물의 첨가농도가 증가할수록 음료의 pH도 증가하였다. 음료의 명도는 추출물의 첨가농도가 증가할수록 감소하였으며 음료의 황색도는 증가하였다.

음료의 색은 추출액 15%, 20% 및 25%를 첨가한 경우 가장 우수하였으나 5%와 10%를 첨가한 경우 색이 열게 나타나 선호도가 떨어지는 것으로 나타났다. 음료의 맛은 추출액 15%에서 가장 높게 선호도가 높았으며 5% 첨가시에는 자실체의 맛을 느끼기가 어려웠고 25% 첨가시에는 너무 맛이 강하여 선호도가 낮았다. 향은 추출액 15%에서 가장 선호도가 높았으며 20%와 25%에서도 선호도가 양호하였다. 전체적인 기호도에 있어서 추출액 15%에서 가장 높은 선호도를 보여 음료제조시 이와같은 농도에서 음료를 제조하는 것이 바람직할 것으로 판단되었다.

백강균 자실체 추출물을 첨가한 음료의 저장중 추출물의 첨가농도와 저장온도에 상관없이 저장기간이 늘어날수록 음료의 pH는 감소하였으며 5℃에서 저장한 음료보다 30℃서 저장한 음료의 pH가 더 감소하였다. 음료의 갈색도는 추출물의 첨가농도와 저장온도에 상관없이 저장기간이 길어짐에 따라서 증가하였다. 음료의 색도에 있어서 저장기간과 저장온도에 상관없이 음료의 L, a b값은 차이를 나타내지 않았다.

백강균 균사체를 생산하기 위한 탄소원으로서 겉보리, 현미 및 백미를 사용하여 백강균 균사체의 생산여부를 알아본 결과, 탄소원으로서 겉보리와 현미가 적합하였으며, 특히 겉보리:번데기 분말과 현미:번데기 분말 비율이 90:10인 조건에서 균사체가 가장 많이 생산되는 결과를 나타내었다. 그리고 맥주박, 대두박 및 난황분말을 질소원으로 사용했을 때, 질소원 종류와 상관없이 백강균 균사체의 생산증가에

아무런 영향을 주지 못하는 것으로 나타났다. 백강균 균사체 생산시 현미와 번데기 분말과 겉보리와 번데기 분말의 최적비율인 90:10에서 무기염류는 영향을 미치지 않았다.

자실체 생산시 겉보리와 백미에서는 자실체가 전혀 생성되지 않았고 현미에서만 자실체가 생산되는 결과를 나타내었다. 따라서 백강균 자실체의 생산에 적합한 탄소원은 현미로 밝혀졌다. 맥주박과 대두박을 질소원으로 사용했을시 자실체 생산 증가에 전혀 영향을 주지 못한 반면에, 난황분말을 사용했을때는 자실체와 배지의 총무게는 감소하였으나 자실체 자체의 생산량은 증가하였다. 무기염류는 종류에 관계없이 백강균 자실체의 생산에 전혀 영향을 미치지 않은 결과를 나타내었다. 공기 유입량이 많으면 자실체를 형성하지 못하고 공기유입량이 많지 않을때 자실체를 형성하는 결과를 나타내었다. 20℃ 배양하에서만 자실체를 생산하였고 20℃를 제외한 온도에서는 자실체 생산이 전혀 안되고 균사체만 생산되는 결과를 나타내었다. 버섯 배양병에 배양된 자실체를 분리 동결건조한 후, 각각의 무게를 측정하여 본 결과 수분함량이 60%일 때 가장 많은 자실체를 생산하였고 80%일 때 자실체 생산이 가장 적었으며 90%의 수분함량에서는 자실체를 형성하지 않았다.

본 연구에서는 백강균이 동의보감에서 만병통치약이라는 것과 동충하초의 불완전 세대라는 점에 착안을 두어 자실체 즉 버섯 형성에 관한 연구를 한 결과, 세계최초로 백강균으로부터 버섯형성을 성공하여 특허출원하였다. 그리고 백강균의 균사체 및 자실체의 생리활성을 규명하고 백강균을 응용시킬 수 있는 기능성식품을 제조하여 그 특성을 살펴보았다. 이번 연구결과로 160년 이상 베일에 감춰졌던 백강균의 자실체 생산에 을 규명할 수 있게 되어 학문적으로도 큰 의미가 있다고 할 수 있다. 또한 백강균으로부터 동충하초를 대량생산할 수 가능성을 마련하게 되어 국내 농가의 소득향상에도 큰 기여를 할 수 있을 뿐만 아니라 자실체로부터 생리활성물질을 이용하여 신약개발도 가능하게 되었다.

백강균으로부터 동충하초 생산기술을 확립하여 부존자원이 절대적으로 부족한 우리나라의 곤충병원성곰팡이 자원화를 유도하며, 또한 자실체로부터 신기능 활성물질을 구명함으로써 식품소재, 의약품소재로 활용할 뿐만 아니라 새로운 동충하초를 개발할 수 있는 유용한 정보를 제공해야 한다. 또한 유용한 약리활성을 갖는 백강균 자실체의 재배기술을 응용하여 대단위 농가재배가 가능토록 유도하여 버섯류 재배 농가의 소득증대를 위해 활용되어야 한다.

SUMMARY

(영문 요약문)

I. Title

Production of Synnemata of *Beauveria bassiana* and the utilization of its bioactive compounds

II. The purpose of the study

B. bassiana-infected larva of silk worm, so called "Baeggang Jam" was used as drug to treat stroke in Korea. Despite to its beneficial features, little study has been done on production of synnemata, which possibly include healthful chemical ingredients. As a result, physiological activity of synnemata was still unknown.

Recently, we developed artificial media for mass production of synnemata of *B. bassiana*, providing an opportunity for further pharmacological examination. In addition, it is necessary to examine kinds and yields of physiologically active substances present in artificially-cultured synnemata prior to its commercial use. The present study was involved in characterizing chemical compositions, their amounts and physiological activity of artificially - cultured synnemata of *B. bassiana*.

III. The contents of study

The study on the biological activities of *Beauveria bassiana* and development of functional bioactive substance were performed at Chung-Ang university. For this purpose, mycelia and synnemata of *Beauveria bassiana* were extracted with hot water, acid and base, ethanol, ethylacetate and chloroform.

The extract of *Beauveria bassiana* synnemata contains some healthful chemical ingredients and it could provide beneficial physiological activities. To prove its biological activity, anti-complementary activity, anti-coagulant activity intestinal immune system modulating activity, inhibition activity (25%) on the

TPA-induced superoxide (O_2^-) generation and other biological activities were tested with the extract of *Beauveria bassiana* synnemata

From this extracts the most bioactive fraction was selected and the proper methods for the purification including column chromatography, HPLC, electrophoresis and ultracentrifuge were investigated.

The active fractions were used to develop functional foods and several model formulars were applied to test the possibility of its use in baking, beverage, and noodles.

The production optimization of *Beauveria bassiana* synnemata was studied at Korea University. Various carbon and nitrogen sources were screened among cheap grains for preparation of the media and its amount was optimized to produce synnemeta. Furthermore, the effect of aeration, temperature, moisture, and illumination were examined for the maximization of synnemata produciton and seed production. On the basis of this results, optimum media was developed and the culture conditions were stabilized for the mass production of synnemata.

IV. The results

Chemical properties and physiological activities of the freeze-dried synnemata of *Beauveria bassiana* were examined. The proximate analysis exhibited that the synnemata consisted mainly of carbohydrate (49.86%), protein (11.36%) and moisture content of 30.64%. It contained a low content of crude ash (4.76%) and fat (3.38%). The carbohydrate was composed mainly of mannose (52.3 %), galactose (31.5%) glucose (13.2%) and rhamnose (3%). Trace amount of arabinose, xylose and fructose were present. Major amino acids in the synnemata were glutamic acid, glycine, aspartic acid, argine, threonine, alanine, valine, leucine, lysine and as partic acid with amount of 30.42, 25.22, 17.17, 15.12, 12.65, 15.23, 12.47, 11.47, 14.24, and 17.17 mg/g, respectively.

Among extracts from the synnemata, the hot-water extract showed 6.7% of anti-complementary activity compared to that of positive control, followed by ethylacetate extract (17%) and methanol extract (15%). It also contributed to anti-coagulant activity with 55 sec of coagulating time. This fraction exhibited

the most potent intestinal immune system modulating activity. The methanol extract revealed the highest inhibition activity (25%) on the TPA-induced superoxide(O_2^-) generation, followed by hot-water extract(18%) and ethylacetate extract(10%).

To analyze bioactive substances from hot-water extract immune system modulating activity such as mitogen activating activity and macrophage activating activity were measured. The fraction exhibited about 80% of mitogen activating activity compared to its positive control, LPS(1mg/ml) and it showed almost same active in macrophage activating activity.

The active substances exhibiting immune system modulating activity were purified from hot water extract by using ion exchange chromatography and gelfiltration on HPLC. Chemical composition of active fraction were analysed after ion exchange chromatography. This compound was polysaccharide composed of neutral sugar and uronic acid sugar exhibiting its content as 96.16% and 3.84%, respectively. The polycarbohydrases were consisted mainly of mannose, galactose and glucose and trace amount of ramnose and arabinose were detected. The purified polysaccharide exhibited its molecular mass about 250,000 Da by using gelfiltration on HPLC.

Dry-noodle were made with wheat flour which was mixed with synnemata of *Beauveria bassiana* flour at the level of 1.0%, 3.0% and 5.0%. No significant colour difference was found between dry-noodle made with the mixture flour with synnemata at 1% and 3% and dry-noodle made with 100% wheat flour. Similar results were found in the case of cooked-noodle. In the same way, no differences were found in weight, volume, ratio of water absorption, and turbidity of soup after addition of synnemata of *Beauveria bassiana* flour to cooked-noodle at 1%, 3%. Breaking force of dry-noodle with 5% of synnemata of *Beauveria bassiana* flour was lower than that of 100% wheat flour noodle. Hardness of cooked-noodle blended with synnemata of *Beauveria bassiana* flour at 5% was higher than that of 100% wheat flour noodle.

No differences were found in whiteness between bread with synnemata of *Beauveria bassiana* flour at 1%, 3% and 100% wheat flour bread, but whiteness

of 5% of synnemata bread was lower than that of 100% wheat bread. The yellowness of bread with synnemata was higher than that of 100% wheat flour bread at level of 1%, 3% and 5% addition. The hardness of bread blended with synnemata of *Beauveria bassiana* flour at 1% was lower than that of 100% wheat flour bread, but that of 3% and 5% addition decreased hardness compared to that of 100% wheat flour bread.

Hot water extract was added to beverage model to test its application. Brownness increased as the concentration of extract increased to 25% and pH and yellowness also increase in this range of addition. On the contrary, whiteness decreased by the addition of synnemata extract to model beverage. Preference on colour was maximum at 15%, 20% and 25% of extract. The addition of extract at 15% exhibited maximum preference on taste and flavor. From the result 15% addition of hot water extract reveals as the optimum level in its use for beverage. This beverage could be stored at 5°C without change of L, a- and b-value.

Unhulled barley and brown barley were selected as carbon sources for the production of *Beauveria bassiana* mycelia, and maximum production was found at the ratio of unhulled barley: A chrysalis powder or brown barley: chrysalis powder as 90:10. beer dregs, soybeen dregs and yolk powder did not increase the production of mycelia. At this ratio of 90:10 inorganic salts had no effect on the formation of mycelia.

Brown barley was identified as a sole carbon source for the formation of synnemata of *Beauveria bassiana*. Maximum production was found at the ratio of brown barley: chrysalis powder as 90 : 10. yolk powder could be used as a nirtogen source instead of chrysalis powder. Inorganic salt exhibited no effects. Aeration was critical factor for the production of synnemata. In culture bottle the formation of synnemata was observed only at low concentration of oxygen. Optimum temperature and moisture content was determined as at 20°C and 90 %, respectively.

The production of spore on brown barley media was tested at different moisture content between 50 and 90%. Optimum moisture content was

determined as 70% and 4.08×10^8 of spore were found at this level. However, maximum production of synnemata was observed at 60% of moisture and 4.01×10^8 of spore inoculation. 3.5 g of synnemata was produced in this condition. Addition of 8 % of bran the yield of synnemata increased to 4.5g

The data shown in the present study indicated that the extract of *Beauveria bassiana* synnemata contains some healthful chemical ingredients and it could provide beneficial physiological activities. These features of the synnemata should draw attention from food industry as well as other industrial fields.

CONTENTS

Chapter I. Introduction	27
Chapter II. Development of Related Technology	33
Chapter III. Contents and Procedure of Study	37
Section I. Biological activities and purification of active compounds from <i>Beauveria bassiana</i>	37
1. Introduction	37
2. Material and Methods	37
A. Biological activities of <i>Beauveria bassiana</i>	37
B. Measurement of the biological activities	37
1) Anti-coagulation activity	37
2) Inhibition of Superoxide anion radical generation	38
3) Anti-complementary activity	38
4) Intestinal immuno-modulating activity	38
5) Macrophage activating activity	39
6) Lymph vessel activating activity	39
7) SRB assay	39
C. Purification of immuno-stimulation substance of synnemata	39
1) Extraction methods	39
2) Compositional Analysis	40
3) Analysis of component sugar	40
4) Immuno-stimulating activity	41
5) Purification of immuno-stimulation polysaccharide	41

3. Result and discussion	43
A. Biological activities of mycelia and synnemata	43
1) Compositional analysis of mycelia and synnemata	44
2) Mineral analysis of synnemata	44
3) Amino acid analysis of synnemata	44
4) Component sugar of synnemata	44
B. Biological activities	44
1) Biological activities according to extract conditions	44
2) Anti-coagulation activity	45
3) Inhibition of superoxide anion radical generation	46
4) Intestinal immuno-modulating activity	47
5) Anti-complementary activity	48
6) Macrophage activating activity	50
7) Immuno-stimulating activity	50
8) SRB assay	52
C. Purification of immuno-stimulation substance from synnemata	52
1) Anion exchange chromatography	52
2) Degree of purity	55
3) Gel filtration chromatography	57
4) Characteristics of purified immuno-stimulating compound	59
Section II. Mycelia and synnemata of <i>Beauveria bassiana</i> as food ingredients ..	63
1. Introduction	63
2. Material and Methods	63
A. Bread with mycelia and synnemata	63
1) Compositional Analysis	63
2) Measuring of Color in Mycelia and synnemata	63
3) Preparation of mixture power	63
4) Test in bread	64

5) Color value	64
6) Characteristic on bread making	64
7) Hardness of bread	64
B. Study on noodle with mycelia and synnemata	65
1) Compositional Analysis	65
2) Preparation of mixture power	65
3) Preparation of dried-noodle and cooked-noodle	65
4) Color of dried-noodle and cooked-noodle	65
5) Characteristic on Cooking of dry-noodle	66
6) Texture of noodle	67
C. Study on beverage with extract of synnemata	68
1) Material	68
2) Preparation of beverage with extract of synnemata	68
3) pH	68
4) Degree of sugar	68
5) Total sugar	68
6) Browning index	69
7) Measurement of color	69
8) Sensory evaluation	69
9) Statistical analysis	69
3. Result and discussion	69
A. Bread with mycelia	69
1) Compositional analysis	69
2) Color of mycelia powder	70
3) Physical characteristics of kneading	70
4) Color of bread with mycelia	71
5) Characteristics of bread	72
6) Hardness of bread	73
B. Noodle with mycelia	74
1) Color of dried-noodle	74

2) Color of cooked-noodle	74
3) Test of noodle with mycelia	75
4) Texture of noodle with mycelia	77
C. Bread with synnemata	79
1) Compositional analysis	79
2) Color of synnemata powder	79
3) Color of bread	79
4) Characteristics of bread	80
5) Hardness of bread	81
D. Noodle with synnemata	81
1) Compositional analysis	81
2) Color of noodle with synnemata	82
3) Test of noodle with synnemata	83
4) Texture of noodle with synnemata	84
E. Preparation of beverage with extract of synnemata	85
1) Quality of synnemata extract	85
2) Quality of beverage with synnemata	86
3) Sensary evaluation	87
4) Storage of beverage with synnemata	88

Section III. Optimization of culture and synnemata production of *Beauveria bassiana* 91

1. Introduction	91
2. Material and Methods	91
A. Selection of media for maximum production	91
1) Effect of carbon source	91
2) Effect of nitrogen source	92
3) Effect of inorganic salts	92
B. Optimization of culture conditions for maximum production	92

1) Aeration	92
2) Effect of temperature	92
3) Effect of moisture	92
4) Illumination	93
C. Optimization of inoculation for maximum production	93
1) Inoculation with asexual spore	93
2) Inoculation with asexual spore from produced by liquid culture	93
3. Result and discussion	93
A. Selection of culture media for maximum production of mycelia	93
1) Effect of carbon source	93
2) Effect of nitrogen source	94
3) Effect of inorganic salts	94
B. Selection of culture media for maximum production of synnemata	95
1) Effect of carbon source	95
2) Effect of nitrogen source	95
3) Effect of inorganic salts	95
4) Optimum temperature of culture	96
C. Optimization of culture condition for maximum production of synnemata	96
1) Aeration	96
2) Optimum temperature	97
3) Optimum level of moisture	98
4) Illumination	98
5) Media optimization for maximum production of synnemata	99
D. Optimization of inoculation for maximum production	99
1) Inoculation with asexual spore	99
2) Inoculation with asexual spore from produced by liquid culture	103
Section IV. Outcome of study	104
Chepter IV. Achievements/Contributions	107

Chapter V. Applications of the result	111
Chapter VI. Recent international Information in this field	113
Chapter VII. References	115

목 차

제 1 장 연구개발과제의 개요	27
제 2장. 국내·외 관련기술의 현황	33
제 3 장. 연구개발 수행내용 및 결과	37
제 1 절. 백강균의 생리활성 탐색 및 정제	37
1. 서론	37
2. 재료 및 방법	37
가. 백강균의 생리활성 탐색	37
나. 생리활성 측정 방법	37
1) 혈액 반응고	37
2) 유리 라디칼 생성 억제	38
3) 항보체활성	38
4) 장관면역 활성 측정	38
5) 대식세포 활성 측정	39
6) 임파구 활성 측정	39
7) 세포 독성 평가 (SRB assay)	39
다. 백강균 자실체의 면역활성물질의 검색 및 정제	39
1) 면역활성화물질의 추출	39
2) 일반 성분 분석	40
3) 구성당 분석	40
4) 면역증강 활성 측정	41
5) 면역 활성화 다당의 분리 및 정제	41
3. 결과 및 고찰	43
가. 백강균 자실체 및 균사체의 일반분석	43
1) 백강균 자실체 및 균사체의 일반성분분석	44
2) 자실체의 무기질 조성	44
3) 자실체 아미노산 조성	44

4) 자실체 구성당 조성	44
나. 생리활성	44
1) 추출조건별 생리활성(Ethanol, Methanol, Hot water extraction) 탐색	44
2) 혈액 항 응고 활성측정	45
3) 유리 라디칼 생성 억제	46
4) 장관면역 활성 측정	47
5) 항보체 활성	48
6) 대식세포 활성 측정	50
7) 면역활성 측정	50
8) 세포 독성 평가 (SRB assay)	52
다. 생리활성물질 추출 및 정제과정 연구	52
1) Anion exchange chromatography	52
2) 면역 활성 분획의 순도 확인	55
3) Gel filtration chromatography	57
4) 정제된 immuno-stimulating 물질의 특성분석	59
제 2 절. 백강균 균사체 및 자실체의 식품 소재화	63
1. 서론	63
2. 재료 및 방법	63
가. 자실체 및 균사체 첨가에 따른 제빵 실험	63
1) 일반성분분석	63
2) 자실체 및 균사체 분말의 색도	63
3) 복합분의 제조	63
4) 제빵시험	64
5) 색도측정	64
6) 제빵특성	64
7) 조직감의 측정	64
나. 자실체 및 균사체첨가에 따른 제면실험	65
1) 일반성분분석	65
2) 복합분의 제조	65
3) 백강균 균사체, 자실체-건면 및 조리면의 제조	65
4) 백강균 균사체와 자실체-건면 및 조리면의 색도의 색도측정	65
5) 백강균 -건면의 조리시험	66

6) 조직감의 측정	67
다. 자실체 분말을 이용한 음료제조와 품질특성	68
1) 재료	68
2) 음료제조	68
3) pH	68
4) 당도	68
5) 총당	68
6) 갈색도	69
7) 색도 측정	69
8) 관능검사	69
9) 통계적 분석	69
3. 결과 및 토의	69
가. 균사체 첨가 제빵실험	69
1) 일반성분분석	69
2) 균사체 분말의 색도	70
3) Mixograph에 의한 반죽의 물리적 성질의 측정	70
4) 빵의 색도	71
5) 제빵특성	72
6) 빵의 조직감	73
나. 균사체 첨가에 따른 제면실험	74
1) 백강균 균사체-건면의 색도	74
2) 백강균 균사체-조리면의 색도	74
3) 백강균 균사체-면의 조리특성	75
4) 백강균 균사체-면의 조직감	77
다. 자실체 첨가에 따른 제빵 실험	79
1) 일반성분분석	79
2) 자실체 분말의 색도	79
3) 빵의 색도	79
4) 제빵특성	80
5) 빵의 조직감	81
라. 자실체 첨가에 따른 제면실험	81
1) 일반성분분석	81
2) 백강균 자실체-면의 색도	82
3) 백강균 자실체-면의 조리특성	83

4) 백강균 자실체-면의 조직감	84
마. 백강균 자실체 추출물을 이용한 음료개발	85
1) 백강균 자실체 추출액의 품질특성	85
2) 음료의 품질특성	86
3) 음료의 관능검사	87
4) 음료의 저장실험	87
제 3절. 백강균 자실체 생산 및 배양의 최적화	91
1. 서론	91
2. 재료 및 방법	91
가. 백강균의 자실체 대량생산에 적합한 경제적 배지 성분의 선발	91
1) 탄소원의 영향	91
2) 질소원의 영향	92
3) 무기질의 영향	92
나. 백강균의 자실체 대량생산에 적합한 경제적 배양 조건의 확립	92
1) 호기조건에 따른 검토	92
2) 온도의 영향	92
3) 수분함량의 영향	92
4) 빛에 의한 영향	93
다. 효과적인 종균 생산방법 선정	93
1) 무성포자의 접종에 의한 자실체 형성	93
2) 액체배양에서 생산된 균사체 접종에 의한 자실체 형성	93
3. 결과 및 토의	93
가. 백강균의 균사체 대량생산에 적합한 경제적 배지선발	93
1) 균사체 생산에 적합한 탄소원의 선정	93
2) 균사체 생산에 적합한 질소원의 선정	94
3) 균사체 생산에 적합한 무기염류원의 선정	94
나. 백강균의 자실체 대량생산에 적합한 경제적 배지선발	95
1) 자실체 생산에 적합한 탄소원의 선정	95
2) 자실체 생산에 적합한 질소원의 선정	95
3) 자실체 생산에 적합한 무기염류원의 선정	95
4) 자실체 생산에 적합한 배양온도의 선정	96

다. 백강균의 자실체 대량생산에 적합한 경제적 배양조건의 확립	96
1) 자실체 형성에 필요한 최적의 호기적 조건 확립	96
2) 자실체 형성에 필요한 최적의 온도 조건 확립	97
3) 자실체 형성에 필요한 최적의 수분함량 조건 확립	98
4) 자실체 형성에 필요한 최적의 조사조건 확립	98
5) 백강균의 자실체 대량생산에 적합한 경제적 배지조건 확립	99
라. 효과적인 종균 생산방법 선정	99
1) 무성포자의 접종에 의한 자실체 형성	99
2) 액체배양에서 생산된 균사체 접종에 의한 자실체 형성	103
제 4절. 연구성과	104
제 4 장. 목표달성도 및 관련분야에의 기여도	107
제 5 장 연구개발결과의 활용계획	111
제 6 장. 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보	113
제 7 장. 참고문헌	115

제 1 장 연구개발과제의 개요

제 1 절. 연구개발의 목표

1. 연구개발 목표와 내용

백강균으로부터 자실체 생산기술확립과 기능성 생리활성물질의 탐색, 가치평가, 이용기술 개발을 통하여 국가보유 유용미생물자원 경제가치를 증대시킨다. 그리고 지속 가능한 이용기술확보, 대외경쟁력 향상, 관련 산업군 창출에 의한 농가소득 향상, 관련학문, 기술 산업의 저변확대 및 기반을 강화시킨다.

주요 연구개발 목표와 내용을 연구기관별로 요약하면 다음과 같다.

가. 백강균의 생리활성 탐색 및 기능성 소재개발

1) 백강균의 생리활성 탐색

가) 백강균 균사체 또는 자실체의 생리활성 물질을 탐색한다. 이를 위하여 균사체 및 자실체를 열수, 냉수, 산/알카리 용액, 유기용매(ethanol, ethylacetate, chloroform) 등으로 추출한 후, 추출온도, 추출시간 및 추출횟수 등의 추출조건별로 항암성, 항고혈압 활성, 항보체 활성 및 면역조절 기능을 검색한다.

나) 불용성 획분의 활성을 상기와 동일하게 추출조건별로 검색한다.

다) 이상의 추출조건과 방법을 사용하여 최대 생리활성을 보이는 획분을 선정한다.

2) 생리활성물질의 추출 및 정제

가) 최대 생리활성을 보이는 추출물을 대상으로 생리활성물질의 최적 추출조건과 정제용의 조건을 동시에 검토, 확립한다.

나) 추출물의 정성분석과 정량분석을 통하여 활성본체(다당류, 단백질, polyphenol 등)를 분석한다.

다) Column chromatography, HPLC, electrophoresis를 이용하여 활성물질을 정제하고 순도를 물질에 따라 HPLC, 전기영동 및 초원심분리에 의하여 검정한다.

- 3) 생리활성 물질을 함유한 획분을 이용한 건강 식품소재로의 활용
 - 가) 생리활성 물질의 규명 후 식품소재로 개발을 위한 모델 식품을 결정한다
 - 나) 모델 식품의 formular를 결정하고 모델 식품의 생리적 효과를 확인한다.

- 4) 균사체 및 자실체의 식품 소재화
 - 가) 균사체 첨가에 따른 제빵 및 제면 소재로의 활용을 제빵 및 제면 특성을 farinograph, extensograph 및 texture analyser에 의해 측정 후 기능성 소재로 활용 정도를 비교한다.
 - 나) 자실체 첨가에 따른 제빵 및 제면 특성을 상기의 방법으로 측정 비교한다

- 5) 생리활성 분획의 기능성식품 소재화

생리활성이 보유한 획분을 이용하여 기능성 식품 소재로의 활용을 위해 다양한 소재로의 활용성을 비교하여 최적의 소재 응용 방법을 확립한다.

나. 백강균 자실체 생산 및 배양의 최적화

- 1) 백강균의 자실체 대량생산에 적합한 경제적 배지 선발
 - 가) 뛰어난 생리활성을 지닌 균일지라도 생산에 고비용이 소요시 경쟁력을 상실하므로 경제적인 배지를 선별하는 것은 매우 중요한 의미를 가진다.
 - 나) 저렴하고 구입하기가 용이한 곡물류를 중심으로 기본배지 성분을 결정한다.
 - 다) 무기염류, 질소원 등의 자실체 형성에 미치는 영향을 조사하여 적절한 영양원을 규명한다.

- 2) 자실체 형성에 필요한 조건확립
 - 가) 보다 신속한 자실체 형성을 유도하여 대량생산 및 생산비 절감을 위해서는 자실체형성에 필요한 최적조건을 구명해야 한다.
 - 나) 동충하초의 자실체형성에는 배지성분 뿐만 아니라 온도, 수분함량, 광주건의 최적화가 필수적이다. 따라서 신속한 자실체 형성에 필요한 온도, 수분함량, 광주건을 밝힌다.

3) 효과적인 종균 생산방법 선정

가) 아래와 같은 형태의 종균을 생산하여 자실체형성에 적합한 종균생산 방법을 결정하고 그배양방법을 선정한다.

무성포자의 접종에 의한 자실체형성

액체배양에서 생산된 균사체 접종에 의한 자실체형성

2. 연구개발의 필요성

동충하초를 포함하는 곤충병원성곰팡이는 전세계적으로 약 100속 750여종이 분포하는 것으로 알려져 있다(Kobayashi 등 1983, Samson 등 1988). 그 중 완전세대사를 형성하며 자낭균류(Ascomycetes)에 속하는 곤충병원성곰팡이로는 *Cordyceps*속, *Shimizuomyces*속, *Torrubiella*속 등 3속이 알려져 있지만 동충하초라고 할 수 있는 대표적인 속은 *Cordyceps*속이다(Kobayashi, 1982). *Cordyceps*속에는 현재 전세계적으로 300여종이 분포하는 것으로 알려져 있으며, 백강균(*Beauveria bassiana*), 녹강균(*Metarhizium anisopliae*)같은 불완전균강(*Deuteromycetes*)에 속하는 대부분의 곤충병원성곰팡이가 *Cordyceps*속의 불완전세대로 알려져 있다.

자실체를 형성하는 일부 *Cordyceps*속 동충하초와 불완전균류인 백강잠(*Beauveria bassiana*)은 중국, 한국, 일본 등에서 예로부터 훌륭한 한방제로 이용되어 왔다(Jianzhe 등, 1989). 대표적인 종으로는 *C. sinensis*인데 박쥐나방의 유충을 기주로 자실체를 형성하며 중국에서만 발견된다. 이 밖에도 *C. militaris*, *C. martialis*, *C. ophioglossoides*, *C. soborifera*, *C. hawkesii*, *Tolypocladium* sp., *B. bassiana*등이 약용으로 이용되고 있다(Cunningham 등, 1950). 최근에는 생명공학의 발달로 이러한 한방제로부터 생리활성물질 탐색에 관한 연구가 수행되고 있으며, 일부 연구에서 항암효과 등 다양한 생리활성을 나타내는 nucleoside 유도체인 Cordycepin(3'-deoxyadenosin)의 이화학적 특성이 구명되었다(Cunningham 등, 1950, 1951 Hubbel 등 1985). 또한 *C. sinensis*로부터 D-mannitol, stearic acid, mycose, ergosterol, uracil, adenine, adenosine이 확인되었고 *C. cicadae*로부터 sarcoma 180의 성장을 억제하는 다당류인 galactomannan이 분리되었다. 이 외에도 *C. ophioglossoides*로부터도 항암 활성이 있는 다당류가 분리되었다(Ohmori 등 1986). 이 같이 *Cordyceps*속 동충하초에 관한 연구는 일부 수행이 되었지만 동의보감에서 항암제, 중풍치료제, 항생제, 강장제로 특효가 있다고 전하는 백강잠(*B.*

bassiana)에 대한 연구는 전무한 실정이다.

본 연구진은 백강균이 동의보감에서 만병통치약이라는 것과 동충하초의 불완전세대라는 점에 착안을 두어 자실체 즉 버섯 형성에 관한 연구를 수행해 왔다. 그 결과, 세계최초로 백강균으로 부터 자실체 형성방법을 개발하는데 성공하여 특허출원하였다. 백강균은 1835년에 바시(Bassi)에 의해서 동충하초를 포함하는 곤충병원성곰팡이 중 가장 먼저 발견된 이래 지금까지 전세계에서 많은 연구가 진행되고 있지만 아무도 백강균의 완전세대, 즉 동충하초를 밝혀내지 못한 곰팡이이다. 이번 연구결과로 160년 이상 베일에 감춰졌던 백강균의 비밀을 완전히 풀 수 있는 계기가 되어 학문적으로도 큰 성과라고 할 수 있다. 또한 백강균으로부터 동충하초를 대량생산할 수 가능성을 마련하게 되어 국내 농가의 소득향상에도 큰 기여를 할 수 있을 뿐만 아니라 자실체로부터 생리활성물질을 이용하여 신약개발도 가능하리라 확신한다.

상대적으로 좁은 국토면적과 빈약한 부존자원을 지닌 우리나라에서는 세계적인 개방화 흐름에 적극적으로 대응할 수 있는 신자원의 개발이 국가 경쟁력을 극대화시키는 최선의 방안이다. 이 같은 측면에서 국내 자생의 유용곰팡이자원을 탐색, 발굴하여 자원화 시키는 기술 개발의 중요성이 강조가 되고 있다. 특히 현재 국내 외에서 연구가 전무한 백강균의 자실체 형성 및 유용물질의 분리, 정제, 특성분석, 대량생산을 통하여 국내 동충하초자원의 부가가치를 증대하는 기술의 개발이 필요하다. 본 연구를 통하여 유용곰팡이자원의 국가보유능력을 확대하여 대외경쟁력을 강화하고, 동충하초관련 신기술 개발을 통하여 관련산업과 학문의 기반을 확대하고자 한다.

가. 기술적 측면

- 1) 세계적으로도 전혀 연구가 되어있지 않는 백강균의 대중화 및 실용화를 위해서는 자실체의 대량생산에 적합한 경제적인 배지를 개발하며, 또한 생산기간의 단축을 위하여 생육에 필요한 조건구명 필요함.
- 2) 동충하초는 종마다 다양한 생리활성물질을 분비한다. 그러므로 백강균의 자실체에서만 특이적으로 생산되는 생리활성물질의 탐색, 분리·정제 및 특성분석 기술 개발 필요함.

나. 경제·산업적 측면

- 1) 세계 100대 기업 중 15%가 신약개발 관련회사가 차지한다. 따라서 21C는 미생물 유래 유용물질을 이용한 신규 의약 및 산업용 소재 개발을 위하여 자국의 미생물 자원의 보호 및 이용기술획득, 기반강화 필요함
- 2) 동충하초이용 신기술 관련 산업 활성화 도출 움직임
- 3) 관련 물질특허, 제조특허 등 산업재산권 확보로 선진국의 특허장벽 극복 필요
- 4) 토착 곰팡이자원 활용 및 부가가치 증대로 국가경쟁력 향상 필요성 증대

다. 사회·문화적 측면

- 1) 청정관련 기술개발로 그린라운드(GR)에 효과적 대응이 필요함
- 2) 한국 고유 곰팡이자원 발굴, 이용으로 세계화에 능동적으로 대처할 필요성이 확대
- 3) 토착 한방제인 백강잠의 이용기술 개발로 국민 정서에 부응하는 과학기술 개발

제 2장. 국내 · 외 관련기술의 현황

제 1 절. 국외연구동향

1950년 Cunningham등에 의하여 *Cordyceps militaris*에서 Cordycepin (3'-deoxyadenosin)이라는 nucleoside 유도체를 분리하는데 성공하였다. Cordycepin의 생리활성기능은 DNA와 RNA합성을 저해하고, 세포 분화를 촉진하며, 세포의 cytoskeleton의 분포를 변화시키는 것으로 알려졌다(Plagemann 등 1971). 그리고 protein kinase 활성을 저해하며(Glazer 등, 1977), 방광암, 대장암, 폐암과 fibrosarcoma에 대한 항암효과가 보고되었다. 또한, 감염을 억제하고, type I HIV의 reverse transcriptase activity를 억제하며(Montefiori 등 1989, Muller 등 1991), nucleic acid의 methylation을 저해하는 것으로 알려졌다(Novar 등 1980).

그 외에도 *C. sinensis*로부터 D-mannitol, stearic acid, mycose, ergosterol, uracil, adenine, adenosine이 확인되었으며, *C. cicadae*, 와 *C. ophioglossoides*로부터 sarcoma 180의 성장을 억제하고 항암력을 보이는 다당류가 분리된 바 있다(Ukai 등, 1983, Yamada, 1984). 1989년에 Shiao 등은 *C. sinensis*의 자실체로부터 fatty acid compositions, adenosine, ergosteryl- β -D-glucopyranoside, 22-dihydroergosteryl- D-glucopyranoside 등의 생리활성 관련물질을 보고하였다.

이와 같이 선진 각국에서는 동충하초 유래 생리활성물질의 중요성을 인식하여 다양한 동충하초로부터 새로운 생리활성물질을 찾기 위하여 많은 노력을 기울인 결과, *Tolypocladium*속 곤충병원성곰팡이로부터 cyclosporin이라는 면역억제제를 개발하여 전세계적으로 큰 각광을 받고 있다(Borel 등, 1976)

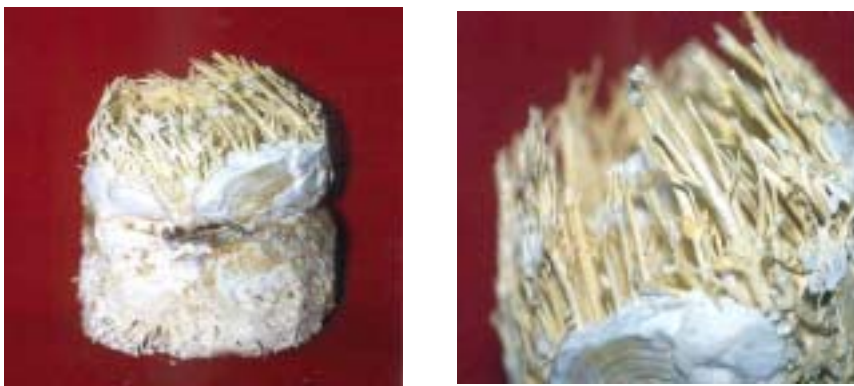
제 2절 국내 연구동향

곤충병원성 곰팡이의 분류 전문가 및 지원 부족으로 국내 곤충병원성 곰팡이자원 정보 및 분류체계 미흡하다(성재모, 1996)

현재 농가에서 생산하고 있는 동충하초는 번데기동충하초(*C. militaris*)와 누에 동충하초(*P. tenuipes*)에만 국한되어있으며 고가인 관계로 대중화가 되어있지 못

하다. 그리고 생리활성물질에 관한 연구는 누에동충하초(*P. tenuipes*)가 면역력 증강, 항피로, 항노쇠 및 항암작용 등이 있음을 확인하였으나 구체적인 선도물질은 규명되지 않고 있다.

그 동안 본 연구진은 수년간 동충하초를 포함하는 토착 곤충병원성 곰팡이를 수집하여 지금까지 300여균주를 확보하였다. 그 중에서는 국내 미기록 곤충병원성곰팡이 8종을발견하여 학회에 보고한 바도 있다(Yoon 등 1998a, 1998b, 1998c, 1999a, 1999b). 또한 곤충병원성 곰팡이를 이용한 해충방제에 관한 특허들을 보유하고 있다(윤철식 등, 1997a, 1997b).



<백강균 자실체 사진>

또한 본 연구진은 백강균이 동의보감에서 만병통치약이라는 것과 동충하초의 불완전세대라는 점에 착안을 두어 자실체 즉 버섯 형성에 관한 연구를 한 결과, 세계최초로 백강균으로부터 버섯형성을 성공하여 특허출원하였다. 이러한 결과는 학문적으로도 큰 성과라고 할 수 있다. 왜냐하면 백강균은 1835년에 바시(Bassi)에 의해서 동충하초를 포함하는 곤충병원성곰팡이 중 가장 먼저 발견된 이래 지금까지 전세계에서 많은 연구가 진행되고 있지만 아무도 백강균의 완전세대, 즉 동충하초를 밝혀내지 못한 곰팡이이다. 이번 연구결과로 160년 이상 베일에 감춰졌던 백강균의 비밀을 완전히 풀 수 있는 계기가 되어 학문적으로도 큰 의미가 있다고 할 수 있다. 또한 백강균으로부터 동충하초를 대량생산할 수 가능성을 마련하게 되어 국내 농가의 소득향상에도 큰 기여를

할 수 있을 뿐만 아니라 자실체로부터 생리활성물질을 이용하여 신약개발도 가능하게 되었다.

본 연구분야는 세계적으로 이제 막 새롭게 시작되는 분야이므로 타 분야에 비해 발전 가능성이 상대적으로 매우 높다. 그리고 21C는 생명공학이 차지하는 비중이 점차 크질 것이기 때문에 미생물유래 신기능성 물질 탐색 및 이용과 건강에 관련된 보조식품에 관한 수요가 증대될 것으로 예상되고 있다.

제 3 장. 연구개발 수행내용 및 결과

제 1 절. 백강균의 생리활성 탐색 및 정제

1. 서론

백강균 자실체 및 균사체의 생리활성 물질 추출조건 확립하고 추출조건별로 항암성, 항고혈압활성, 항보체 활성 및 면역조적 기능을 검생하고 최대 생리활성을 보이는 획분을 선정한다.

선정된 최대 생리활성을 보이는 추출물의 정제조건 확립하여 추출물의 정성분석과 정량분석을 통하여 활성분체(다당류, 단백질, polyphenol 등)를 분석하고 Column chromatography, HPLC, electrophoresis를 이용하여 활성물질을 정제, 분석하고 순도를 HPLC, 전기영동 등으로 물질의 종류에 따라 검정한다.

2. 재료 및 방법

가. 백강균의 생리활성 탐색

백강균 균사체 또는 자실체의 생리활성 물질을 탐색한다. 균사체 및 자실체를 열수, 냉수, 산/알카리 용액, 유기용매(ethanol, ethylacetate, chloroform) 등으로 추출한 후, 추출온도, 추출시간 및 추출횟수 등의 추출조건별로 생리활성 검색한다.

나. 생리활성 측정 방법

1) 혈액 응고

Thrombin time (TT) : 공통경로에 기인하는 활성측정법
시료를 1000 μ g/ml로 혈장(platelet poor plasma)에 용해한 시료용액 150 μ l를 37 $^{\circ}$ C, 3분간 예열하고 37 $^{\circ}$ C에서 예열된 TT 진단시약 150 μ l를 첨가한다. Blood coagulation analyzer를 이용하여 응고시간 측정

2) 유리 라디칼 생성 억제

HL 60 세포 배양후 배양된 세포를 회수하고 cold PBS로 세포를 세척한다. 원심 분리 (1,000rpm, 4°C, 10분)하여 세포를 회수하고 세포 (1X10⁵ cells/ml)를 96-well plate의 well에 분주한다. 시료를 첨가한 후 37°C에서 2시간 반응하고 최종 농도가 1.2mM이 되도록 H₂O₂를 첨가한다. 37°C에서 24시간 배양 후 MTT (5mg/ml)를 각각의 well에 10 μ l씩 첨가하고 Lysis buffer를 첨가하여 overnight 반응시킨 후 570nm에서 흡광도를 측정한다.

3) 항보체활성

NHS (50 μ l), GVB²⁺ (50 μ l) 그리고 Sample (50 μ l)을 혼합한 후 37°C, 30분 배양하고 GVB²⁺를 350 μ l 첨가한다. 10~160배 연속희석 후 GVB²⁺ 750 μ l 다시 첨가하고 EA cell (10 cell/ml) 250 μ l를 가한다. 37°C, 한시간 배양 후 PBS 2.5ml로 반응정지하고 원심분리 (2600rpm, 10분, 4°C)한다. 상등액을 회수하여 흡광도를 측정한다.(412nm)

4) 장관면역 활성 측정

가) Peyers patch 세포현탁액 조제

나) 시료와 Peyer's patch 세포와의 반응

2 x 10⁶ cells/ml의 숫자로 RPMI 1640-FBS 용액에 조정하고 96-well plate의 각각의 well에 180 μ l씩 분주한다. 20 μ l의 적당히 희석된 sample을 첨가하고 CO₂, 배양기에서 5일간 배양.

다) 골수세포 현탁액의 조제

라) 골수세포와 나)의 배양액을 반응시키고 2.5 x 10⁵ cells/ml의 세포를 96-well plate well에 100 μ l씩 분주하고 나)의 배양액과 RPMI 1640-FBS 용액을 50 μ l씩 각각 첨가한다. 5% CO₂, 95%air의 배양기에서 37°C로 6일간 배양하고 골수 세포 증식도를 측정한다

5) 대식세포 활성 측정

가) Mouse 에 5% Thioglycollate를 주사하여 3일 방치 후 복수에서 대식세포를 회수한다.

나) 대식세포를 1x10⁶ cell/ml로 희석하여 96 well plate에 200 μ l씩 분주한 후 5%

CO₂ 배양기에서 2시간 incubation.

- 다) 배지를 털어내어 버리고 washing 후에 sample 20 μ l와 배지 180 μ l를 5% CO₂ 배양기에서 하루동안 incubation.
- 라) 합성기질인 p-Nitrophenyl phosphate를 사용하여 활성화를 O.D 405nm에서 측정한다.

6) 임파구 활성 측정

- 가) 6주령의 ICR mouse에서 비장을 적출하여 비장세포를 회수한다.
- 나) 5 \times 10⁶ cell/ml 로 희석하여 90 μ l와 sample 10 μ l씩 96 well plate에 분주하다.
- 다) 5% CO₂ incubator에서 3일간 배양하여 비장세포의 증식도를 측정한다.

7) 세포 독성 평가 (SRB assay)

암세포 [인체 결장암세포 (DLD I human colon cancer cell), 인체 폐암세포 (LXFL529 human lung cancer cell)] 를 96 well plate에 well당 1~2 \times 10⁴ cell/mL가 되도록 seeding하고 24시간 배양한 후 세포가 plate에 부착되면 시료 추출물 100 μ L(1, 1 \times 10⁻², 1 \times 10⁻⁴, 1 \times 10⁻⁶, 1 \times 10⁻⁸mg/ml로 희석)를 첨가한 후 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ incubator에서 배양하였다. 이때 대조군에는 세포와 시료 대신 멸균수를 첨가하였다. 배양 48시간 후에 배지를 제거한 후 PBS로 한번 씻은 후 50% trichloroacetic acid (TCA)를 첨가하고 증류수로 5번 씻은 후 실온에서 건조시킨 후 0.4% Sulforhodamine B (SRB) 100 μ L를 첨가하여 30분 동안 염색시켰다. 다음 1% acetic acid로 5번 씻은 후 0.01 M tris base를 150 μ L를 첨가한 후 590 nm에서 흡광도를 측정하였다.

다. 백강균 자실체의 면역활성물질의 검색 및 정제

1) 면역활성화물질의 추출

백강균 자실체를 Hot-water extract하여 동결건조한후 동결건조한 분말을 1mg/로 saline에 녹여 사용하였다.

2) 일반 성분 분석

총당 함량은 galactose를 표준물질로 하여 phenol-sulfuric acid 법(22)으로 산성당 함량은 D-galacturonic acid를 표준물질로 하여 m-hydroxydiphenyl 법(18)으로, 단백질 함량은 bovine albumin을 표준 물질로 하여 bradford 법으로 각각 정량 분석하였다.

3) 구성당 분석

다당 시료를 2M trifluoroacetic acid로 121°C에서 1.5시간 가수분해시켜서 중성당 (aldose)과 산성당(aldonic acid)으로 전환시킨후 NaBH₄를 이용하여 각각 alditol 및 aldonic acid로 환원시켰다. 이렇게 생성된 alditol은 acetic anhydride를 이용하여 alditol acetate 유도체로 전환시키고 gas chromatography로 구성당을 분석하였다. GC의 분석 조건은 Table 1에 나타난 바와 같으며 표준 구성당들의 retention time 과 비교하여 시료중의 구성당을 분석하였다. 구성당의 mol%는 peak의 면적비와 각 구성당의 alditol acetate 유도체의 분자량으로부터 계산하였다.

Analytical conditions of gas chromatography for component sugars	
Apparatus	GC M600D (Young-Lin Co. Ltd., Korea)
Detector	Flame ionization detector (Young-Lin Co. Ltd., Korea)
Column	SP-2380 capillary column I(Supelco USA)
Column size	0.25mm × 30m × 0.2μl film thickness
Oven temp.	60°C (1min)→220°C (12min)→250°C (15min)
Injector temp.	250°C
Detector temp.	250°C
Carrier gas	N ₂ (1.5μl/min)
Intergrator	D520B Intergrator (Young-Lin Co. Ltd., Korea)

4) 면역증강 활성 측정

가) Mitogen 활성 측정 (Splenic lymphocyte proliferation)

ICR mouse에서 비장을 적출하여 lymphocyte를 획득한 후 적혈구를 제거하고 RPMI 1640으로 2~3회 세척하여 세포수를 5×10^6 cell/ml이 되도록 조정하였다. 이때 얻어진 세포 부유액은 96 well plate에 $90 \mu\text{l}$ 씩 분주하고 $10 \mu\text{l}$ 의 시료용액을 첨가하여 37°C , 5% CO_2 incubator에서 72시간 배양하였으며 그 증식 정도를 MTT(RPMI 1640 with 10% FBS) 방법을 통하여 mitogen 활성화능을 측정하였다. MTT법은 각 well에 MTT용액을 첨가하여 5시간 배양 후, 형성된 MTT formazan의 양을 microplate reader(Molecular Devices, USA)를 이용하여 570nm에서 흡광도를 측정하였다.

나) Macrophage 활성화능 측정 (Macrophage lysosomal enzyme activity)

6~8주령의 ICR mouse의 복강에 5% thioglycollate medium을 2.5ml 주사한 후 72~96시간 내에 유도된 복강 macrophage를 회수하여 RPMI 1640으로 2~3회 세척하고 세포수를 1×10^6 cell/ml로 조정하여 96well plate에 $200 \mu\text{l}$ 씩 분주하였다. 이들은 37°C , 5% CO_2 incubator에서 2시간 배양하여 macrophage monolayer를 형성시키고 각 well에 시료를 첨가하여 24시간 배양 하였다. 활성화된 macrophage monolayer는 RPMI 1640으로 세척한 후, Triton X-100을 가하여 세포막을 용해한다. 유리된 lysosomal phosphatase를 기질인 p-NPP와 반응시킨 후 microplate reader를 이용하여 405nm에서 흡광도를 측정하였다.

5) 면역 활성화 다당의 분리 및 정제

가) Anion exchange chromatography

Hot-water extract방법으로 추출된 분말을 증류수에 녹인 후, 증류수로 평형화된 DEAE- Sepharose FF에 흡착시킨 후 증류수, 0.05, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 1.0, 2.0M의 NaCl 로써 단계적으로 용출시켰다. 이때 얻어진 각 회분은 농축 및 투석후 동결 건조를 행하여 1개의 비흡착분(a fraction)과 8개의 흡착분(b~i fractions)을 얻었다.

나) Gel chromatography

Anion exchange chromatography의 정제 시료중 면역활성을 나타내면서 정제과정 이 더 필요한 b와 e fraction을 대상으로 Gel chromatography를 시행하였다. 증류수로 평형화된 Superdex G-200 column을 사용하여 각 fraction을 b-1, -2, 과 e-1, -2, -3으로 분리한 후 농축 및 동결건조하여 이후의 실험에 사용하였다.

다) HPLC에 의한 순도 확인, 정제 및 분자량 측정

Anion exchange chromatography의 활성획분의 순도를 확인하기 위하여 다음과 같은 분석조건으로 HPLC(high performance liquid chromatography)를 행하고 활성획분 중 양이 적고 단 2개의 peak만 보이는 h fraction을 HPLC 과정을 통해 정제하였다. 분자량 측정시에는 표준 pullulan series (P800, 400, 200, 100, 50, 20, 10 및 5)를 이용하여 각각의 retention time을 구한 후, 분자량에 대한 Kav값을 산출하여 얻은 표준 곡선으로부터 환산하여 결정하였다.

Analytical condition of HPLC	
Apparatus	HPLC-9500(Young-Lin Co. Ltd., Korea)
Detector	Refractive Index (RI, Waters, USA)
Column	Shodex GS520+GS320+GS220 Packed Column (Asahi Chemical Industry Co. Ltd., Japan)
Column size	Φ7.6×300mm
Flow rate	0.5ml/min
Eluent	0.2 M NaCl
Intergrator	Autochro data module (Young-Lin Co. Ltd., Korea)
Injcetion vol.	10μl

3. 결과 및 고찰

가. 백강균 자실체 및 균사체의 일반분석

백강균 자실체는 주로 탄수화물(49.86%)과 단백질(11.36%)로 구성되어 있으며 30.64%의 수분함량을 나타내었다. 자실체는 낮은 함량의 조희분(4.76%)을 나타내었으며 3.38%의 조지방을 함유하였다. 탄수화물은 mannose(52.3%), galactose(31.5%), glucose(13.2%) and rhamnose(3%) 등의 단당류로 구성되어 있으며 이외에도 적은 함량의 arabinose, xylose와 fructose가 분석되었다. 일반성분분석에서 백강균의 균사체는 다른 동충하초인 *C. militaris*와는 다른 함량을 나타내었으며 *C. militaris*의 균사체는 주로 glucose로 주요 당이 구성되었다.(Song 등 1998, Yu, 등 2001)

아미노산 분석에서는 백강균의 자실체와 균사체는 *C. militaris*의 구성성분과 또 다름을 나타내었다. Methionine과 lysine이 *C. militaris*의 자실체에 다량 함유되어 있는 반면(Yu, 등 2001) glutamic acid가 백강균의(*B. bassiana*) 주된 구성 아미노산 이었다. Glutamic acid, glycine, aspartic acid, arginine, threonine, alanine, valine, leucine, lysine 과 aspartic acid의 함량은 각각 30.42, 25.22, 17.17, 15.12, 12.65, 15.23, 12.47, 11.47, 14.24, 그리고 17.17 mg/g 이었다.

1) 백강균 자실체 및 균사체의 일반성분분석

백강균 자실체 및 균사체의 일반성분분석					
시료	수분	조지방	조단백	조희분	탄수화물
균사체 (동결건조)	2.4	16.00	8.49	4.86	68.25
자실체	30.64	3.38	11.36	4.76	49.86

2) 자실체의 무기질 조성

자실체의 무기질 조성						
시료	Mn	Cu	Zn	Fe	K	Ca
백강균	0.936	0.877	7.590	9.510	486.4	204.1

3) 자실체 아미노산 조성

자실체 아미노산 조성									
아미노산	Asp	Glu	Cys	His	Ser	Gly	Arg	Thr	Ala
함량 (mg/g)	17.17	30.42	11.25	4.85	10.30	25.22	15.12	12.65	15.23
아미노산	Tyr	Met	Val	Trp	Phe	Ile	Leu	Lys	
함량 (mg/g)	3.62	9.86	12.47	1.28	8.64	8.27	11.47	14.24	

4) 자실체 구성당 조성

자실체 구성당 조성								
구성당(mol%)	Ara	Xyl	Rha	Fuc	Man	Gal	Glc	
백강균	trace	trace	3.0	trace	52.3	31.5	13.2	

나. 생리활성

1) 추출조건별 생리활성(Ethanol, Methanol, Hot water extraction) 탐색

백강균의 균사체 및 자실체를 에틸아세테이드, 메탄올, 열수 등을 사용하여 극성

이 증가되는 순으로 순차적인 추출을 하여 그 생리활성을 측정하였다. 항보체활성, 장관면역활성, Superoxide anion 저해활성, 항혈액응고, 혈압강하효과 등을 측정한 결과가 표에 요약되어 있다. 표에서처럼 자실체화 균사체의 추출물은 비슷한 생리활성을 나타내었다. 조사된 생리활성 중 백강균 자실체 및 균사체의 열수추출물은 높은 항혈액응고 효과를 나타내었으며, 열수추출물이 항보체활성 및 장관면역활성을 약하게 나타내었다.

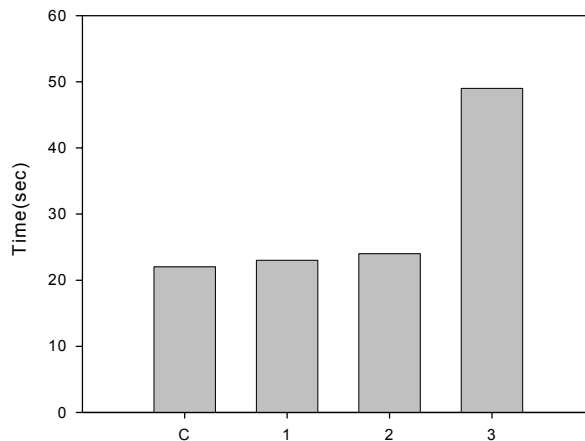
생리활성 요약		(표준물질 대비 증가효과%)	
생리활성탐색	자실체	균사체	
항보체 활성	열수추출물 활성 (30%)	열수추출물 활성 (20%)	
장관면역활성	메탄올(5%), 열수추출물(15%)	메탄올 (5%), 열수추출물 (10%)	
Superoxide anion 저해활성	무효과	무효과	
항혈액응고	열수추출물 (100%)	열수추출물 (150%)	
혈압강하 효과	무효과	무효과	

2) 혈액 항 응고 활성측정

시료를 1000 μ g/ml로 혈장(platelet poor plasma)에 용해한 시료용액 150 μ l를 37 $^{\circ}$ C, 3분간 예열하고 37 $^{\circ}$ C에서 예열된 TT 진단시약 150 μ l를 첨가하였다. Blood coagulation analyzer를 이용하여 응고시간 측정하여 에탄올과 메탄올추출에 의한 방법 보다 열수 추출에 의한 방법으로 혈액 응고 지연시간이 오래 걸린다는 것을 그림을 통해서 알 수 있다.

혈액응고는 체내에서 mortality and disability, leading to cerebral hemorrhage, myocardial infarction, peripheral ischemia, arteriosclerosis, 그리고 pulmonary embolism 등의 여러 가지 질환을 일으키는 주된 요인이다. (Hirsh, J. and V. Fuster. 1994.) 최근 몇 년동안 혈액응고를 방지하는 약품을 개발하기 위한 연구가 집중적으로 이루어 졌다. 이 같은 연구에서 혈액응고시간을 PTT 방법으로 측정하

며 생리적 식염수를 control로 사용하였다. 위의 결과에서처럼 자실체의 열수추출물이 혈액항응고 활성을 나타내었으며(coagulating time of 55 sec) 이 결과는 혈액항응고 성분이 백강균 자실체 성분에 포함되어 있다는 것을 의미한다. 최근에 새로운 혈액항응고 성분인 bassiatin이 배양된 백강균 액에서 발견되었으며(Kagamizono 등 1995), 이 성분의 존재 여부가 혈액항응고 작용의 주된요인이라 판단된다.

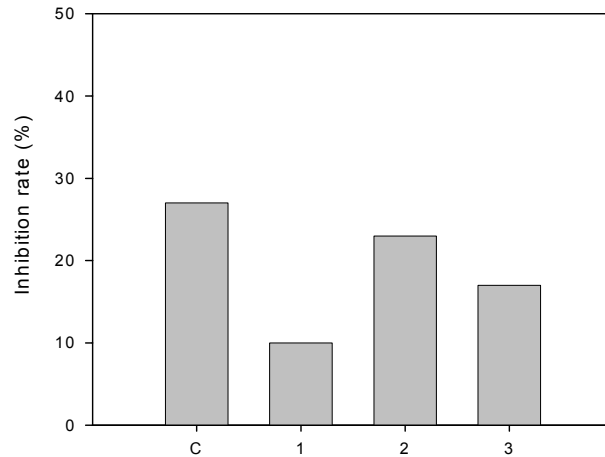


Anti-coagulant activity (C: negative control, 1: Ethylacetate fraction, 2: Methanol fraction, 3: Hot-water fraction)

3) 유리 라디칼 생성 억제

12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA)-type tumor promoters 가 superoxide(O_2^-) 발생에 의해서 피부세포와 leukocytes 내에서 유도되어 진다(Perchellet 등 1995). Superoxide(O_2^-)는 활성형 산소의 가장 기본적인 형태이며(B ores, 등 1996, Fernandez 등 2001), 이 것의 존재는 암세포에서 산화적 스트레스가 유발시키는 여러 가지 질환의 원인이 된다. 최근 연구에서 O_2^- 발생을 억제하는 연구가 여러 질병을 예방하는 차원에서 진행되고 있다. 이 연구에서 여러 가지 추출물중 메탄올 추출물이 가장 높은 TPA-induced superoxide (O_2^-) 발생을 억제하는 능력을 나타내었다. 그리고 열수추출물은 약간 낮은 활성을 나타내었으며(18%) 에틸아세테이트 추출물은 10%의 억제능력을 나타내었다. 28% 정도의 억제능력은 positive control과 같은 수준으로서 상당히 높은 활성을 나타냄을 의미한

다.그러므로 메탄올 추출물의 TPA-유도된 라디칼 형성 저해 활성은 계속연구를 진행하여 그 응용가능성을 확인할 가치가 있다고 판단된다.

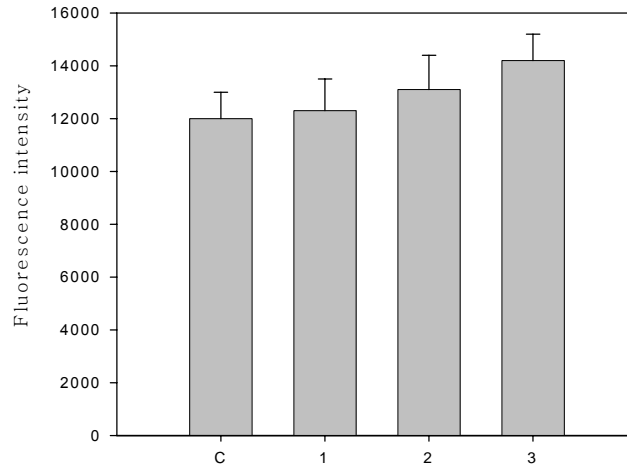


Inhibition of Superoxide anion radical generation(%) (C: positive control, 1: Ethylacetate fraction, 2: Methanol fraction, 3: Hot-water fraction)

4) 장관면역 활성 측정

여러 가지 추출물 붕 열수 추출물이 가장 강력한 장관면역 조절 활성을 나타내었으며 메탄올 추출물과 에틸아세테이트 추출물은 이보다 약한 활성을 나타 내었다. 이들 추출 시스템으로 활성물질이 추출될 수 있었으며 세가지 방법이 모두 효과가 있는 것으로 나타났다. 이는 면역활성을 조절할 수 있는 물질이 다양하게 포함되었거나 그 물질이 세가지 방법에 의하여 다 추출될 수 있음을 의미한다. The gut-associated lymphoreticular tissues (GALT) 는 IgA response를 포함한 장관에서의 방어 시스템에서 중요한 역할을 한다. (James, S. P. and M. Zeitz. 1994.) 장관에 포함되어 있는 Peyer's patches 들은 IgA 생산의 기점으로 알려져 있다. 그러므로 Peyer's patches를 포함한 장관면역활성은 mucosa의 방어 시스템 뿐만 아니라알러지와 자동면역 질병을 억제하는 systemic inflammation을 조절하는 중요한 역할은 한다. 몇몇 연구에서 *Atractylodes lancea* 추출물과 (Yu, 등 1998) *C. militaris* 자실체가 (Yu 등 2001) *in vitro*상에서 장관면역을 조절함이 보고되었다. 이 활성은 T cells(in Peyer's patches)을 활성화해서 hematopoietic growth factor의 분비를 촉진하기 때문이다.

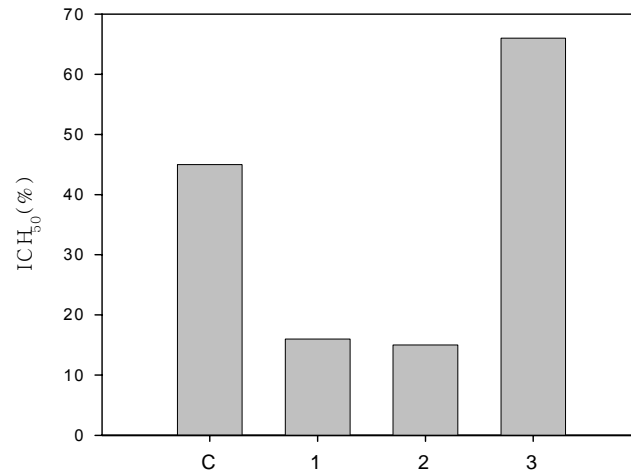
본 연구에서 나타난 것처럼 백강균의 자실체 추출물 또한 장관면역활성을 증진시키고 있다. 그러므로 백강균 자실체는 biomedicine으로서 활용할 가치가 있다고 판단된다. 이를 위하여 지속적인 연구가 필요하다.



Intestinal immuno modulating activity (C: Positive control, 1: Ethylacetate fraction, 2: Methanol fraction, 3: Hot-water fraction)

5) 항보체 활성화

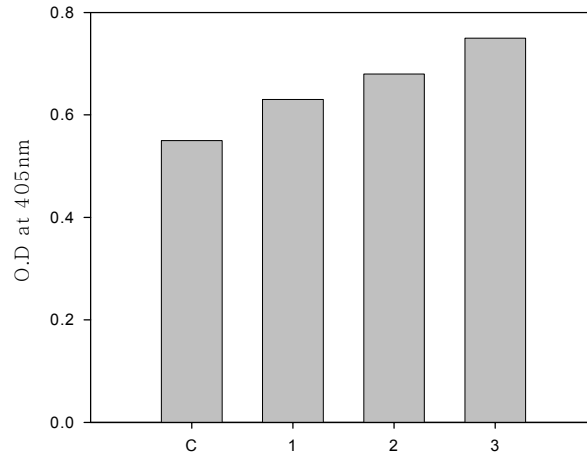
항보체 활성화는 그림에서 보는 결과와 같이 control이 약 45%의 활성을 나타내었고, 메탄올과 에탄올 추출물에서는 control 보다 적은 활성도를 나타내었고, 열수 추출물에서 약 65%가 넘는 활성을 나타내었다. 여러 가지 추출물에서의 항보체 활성이 the complement fixation test 와 ICH_{50} 으로서의 활성으로 조사되었다. 추출물 중 열수추출물이 가장 높은 활성을 나타내었으며(67%), 에틸아세테이트 추출물과 메탄올 추출물은 각각 17%와 15%의 낮은 활성을 나타내었다.



Anti-complementary activity (C: positive control, 1: Ethylacetate fraction, 2: Methanol fraction, 3: Hot-water fraction)

이 항보체활성은 여러 가지 관점에서 중요성을 나타내고 있다. 항보체 시스템은 기본적으로 Ag-Ab반응의 중재자로서의 역할을 하며, 여러 가지 생체 방어 시스템에서 중요한 역할을 하기 때문이다. 그리고 면역 반응의 조절 및 면역물질의 유도에 관련된 여러 가지 연구가 보고 되고 있으며, 항보체 활성화는 마크로파지의 활성화 및 임파구의 활성화[Nelson, R. A. 1953.], the localization and retention of antigens in germinal centers, B cell의 형성(Klaus 와 Humphrey. 1977), 세포간 협력 cyclical antibody 생산 (Waldmann와 Lachma 1975)등에 직접적인 영향을 미치는 것으로 알려져 있다.

6) 대식세포 활성 측정

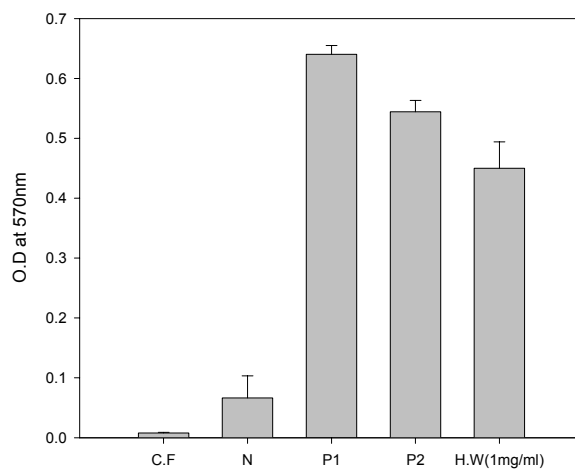


Macrophage phsophatase activity (C: positive control, 1: Hot-water fraction 10µl/ml, 2: Hot-water fraction 50µl/ml 3: Hot-water fraction 100µl/ml)

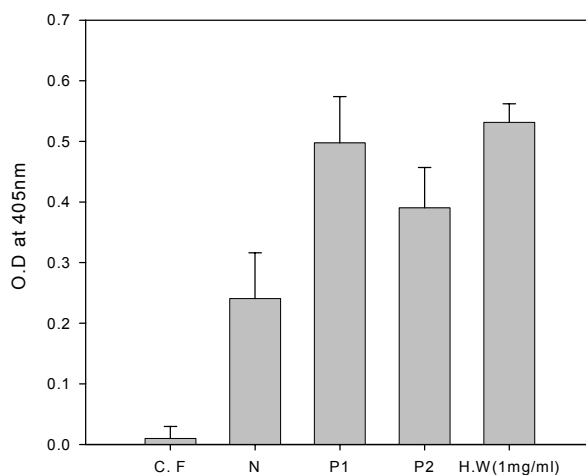
열수 추출을 한 백강균의 활성물질은 대식세포를 활성화 시키는 것으로 나타났다. 각 농도에 비례하여 활성이 높아지는 결과를 얻었다.

7) 면역활성 측정

백강균 자실체에 존재하는 면역증강 활성능을 검토하기 위해 열수 추출 (Hot-Water extract) 부분을 Mitogen 활성과 Macrophage 활성화능을 측정하였다. 그 결과 열수 추출물 1mg/ml의 농도에서 positive control인 LPS (Lippolysaccharide)와 유사한 정도의 활성이 관찰되었다.



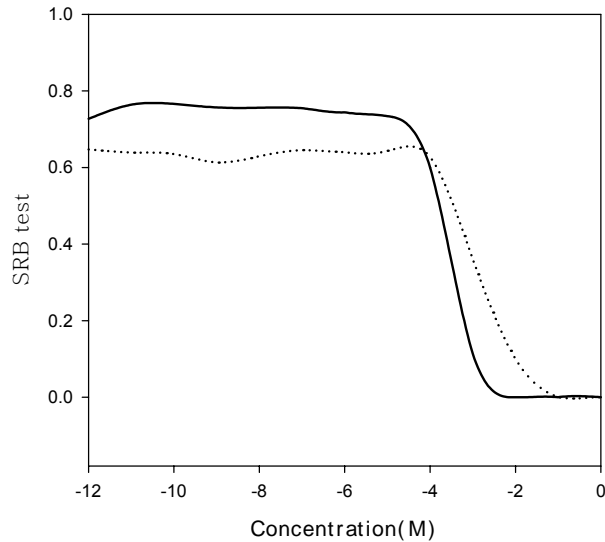
Mitogenic activity of Hot-water extract obtained from Synnemata of *Beauveria bassiana* (C.F: Cell free, N: Negative control, Saline, P1: Positive control, LPS 1mg/ml, P2: Positive control, LPS 0.1mg/ml)



Macrophage phosphatase activity of Hot-water extract obtained from Synnemata of *Beauveria bassiana* (C.F: Cell free, N: Negative control, Saline, P1: Positive control, LPS 1mg/ml, P2: Positive control, LPS 0.1mg/ml)

8) 세포 독성 평가 (SRB assay)

암세포 [인체 결장암세포 (DLD-1 human colon cancer cell), 인체 폐암세포 (LXFL529 human lung cancer cell)]를 열수추출물에 노출시킨 결과 1×10^{-4} mg/ml의 농도에서 암세포의 생장이 저해되는 결과를 얻을 수 있었다.



Cytotoxicity of Hot-water Extract from *B. bassiana*

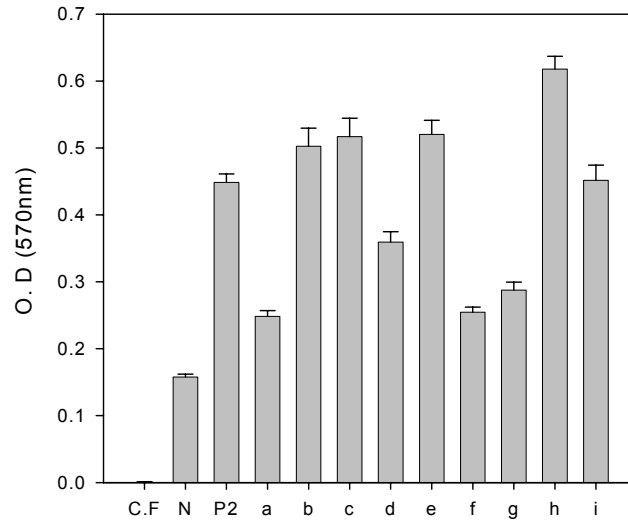
(— LXFL529, ···· DLD-1)

다. 생리활성물질 추출 및 정제과정 연구

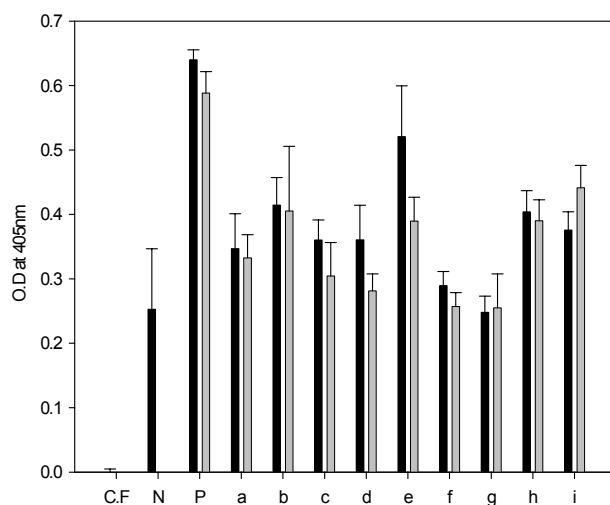
1) Anion exchange chromatography

백강균 자실체를 Hot-water extract 처리 한 부분을 DEAE-Sephrose FF⁻로 anion exchange chromatography를 행한 결과, 비흡착 1개 획분(a)과 8개의 흡착획분(b~i)을 얻을 수 있었고, 이 획분들로 mitogen 활성 및 macrophage 활성을 측정 한 결과 b, c, e, h 및 i에서 활성을 보였으며, macrophage의 활성은 b, e, h 및 i에서 높은 활성을 나타내었다. 또한 각 획분들의 화학조성을 조사한 결과 활성 획분 중 b, h에서는 낮은 산성당의 함량을 나타내었다. 또한 면역활성을 보이는 획분의 구성당분석을 실시하였다. 그중 b 획분은 mannose와 glucose가 82%를 넘게 차이 하고 있었고, i 획분의 경우 xylose, mannose, glucose와 galactose가 대부분을 차

지하고 있었다.



Mitogenic activity of the polysaccharide fractions obtained by anion exchange chromatography using DEAE-Sephrose FF⁻ of Hot-Water extract (C.F: cell free, N: negative control, saline, P2: positive control, LPS 0.1mg/ml, a~i: fractions)



Macrophage phosphatase activity of the polysaccharide fractions obtained by anion exchange chromatography using DEAE-Sepharose FF⁻ (C.F: cell free, N: negative control, saline, P: positive control, LPS, a~i: fractions ; black bars: 0.1mg/ml, gray bars: 0.01mg/ml)

Chemical compositions of the polysaccharide fractions obtained by anion exchange chromatography using DEAE-Sepharos FF⁻ (%)

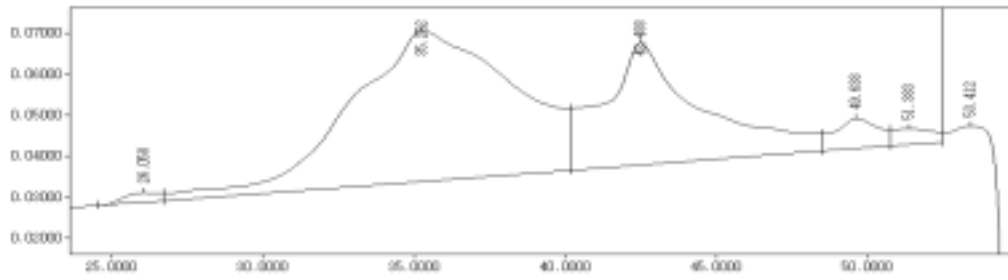
Chemical composition	a	b	c	d	e	f	g	h	i
Neural sugar	98.16	97.96	94.39	83.97	82.38	83.69	85.98	96.16	84.94
Uronic acid sugar	1.84	2.04	5.61	16.03	17.62	16.31	14.02	3.84	15.06
Protain	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Analysis of componenet neutral sugar of immun-stimulation				
frations	(mol%)			
Component neutal sugar	b	e	h	i
Ramnose	0.51	3.30	2.26	0.00
Fucose	0.23	1.32	0.00	6.68
Arabinose	5.04	15.08	8.04	0.00
Xylose	1.20	4.08	4.55	11.42
Mannose	42.33	27.48	34.70	20.82
Glucose	10.69	6.08	11.82	34.36
Galactose	40.01	42.66	38.64	26.67

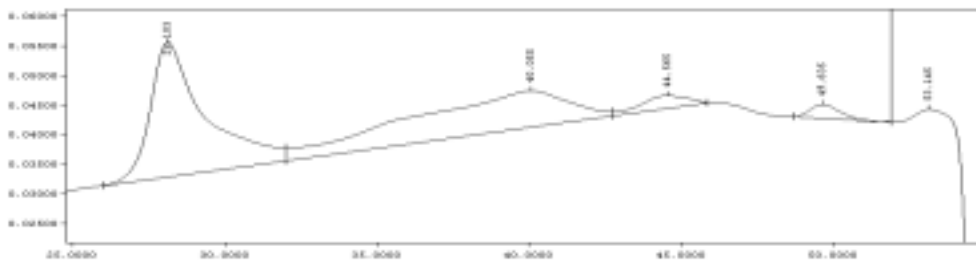
2) 면역 활성 분획의 순도 확인

활성을 보이는 b, e, h 및 i 분획의 순도를 확인하기 위하여 Asahaipak GS-520, GS-320과 GS-220 column을 차례로 연결하여 HPLC를 수행하였다. b 분획의 경우 20,800 Da에서 5,000이하의 물질이 혼합되어 있었고, e 분획의 경우 340,000에서 5,000이하의 다양한 분자량을 가진 물질이 혼합되어 있었다. 이 두 분획의 경우 Superdex 200을 이용하여 다음의 정제 과정을 실시하였다. h 분획의 경우 2개의 peak로 h-1과 h-2 분획으로 HPLC를 이용하여 정제를 시도하였고, i 분획의 경우 저분자량을 가진 하나의 peak로 정제 되었음을 확인할 수 있었다.

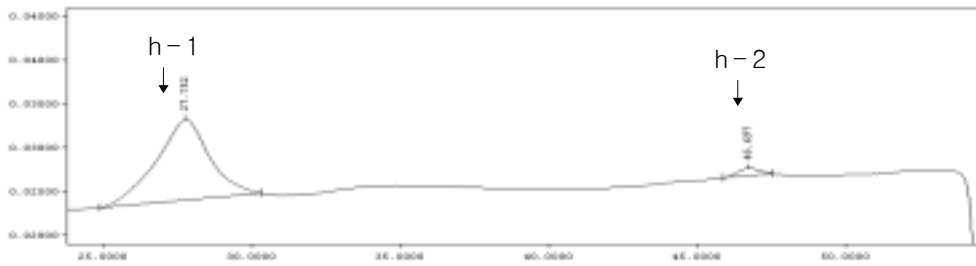
< b fraction >



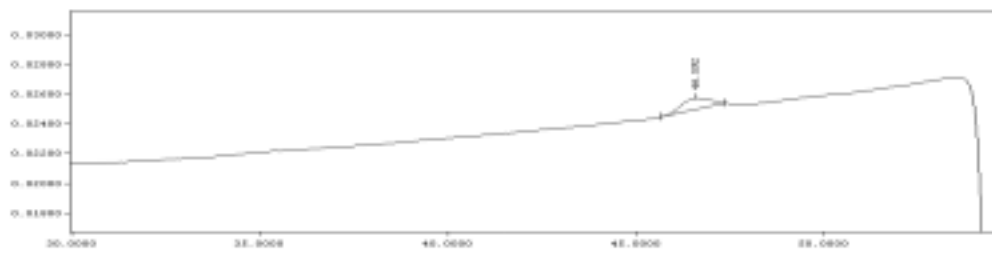
< e fraction >



< h fraction >



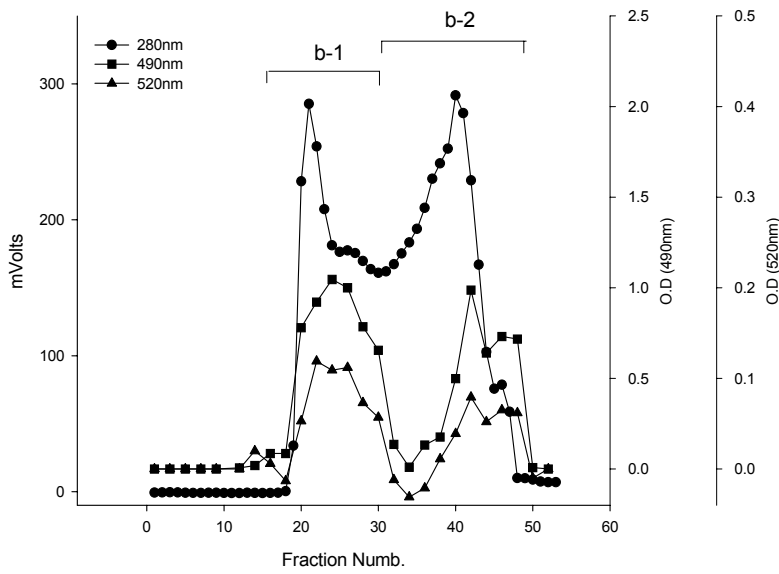
< i fraction >



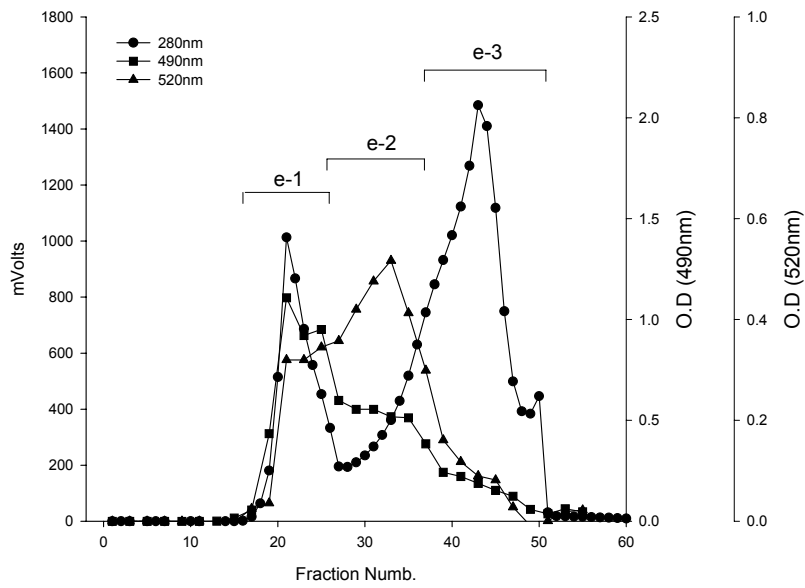
HPLC chromatographs of the immuno-stimulating fraction, b, e, h, and i from Synnemata of *Beauveria bassiana*

3) Gel filtration chromatography

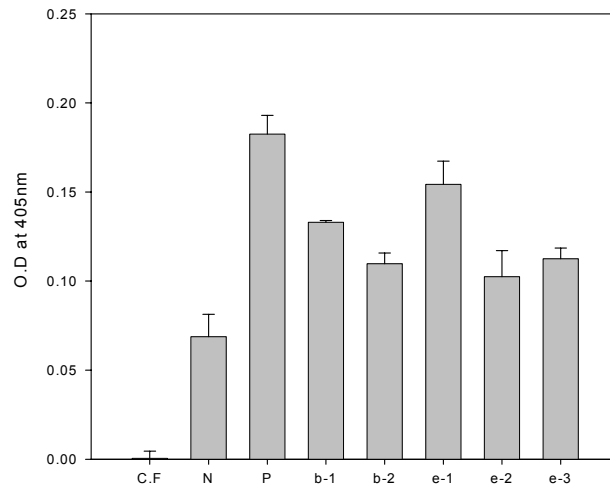
Anion exchange chromatography 정제과정 중 높은 활성을 보였던. b, e, h 및 i 분획 중 많은 물질을 함유한 b와 e 분획을 Superdex 200의 resin을 사용하여 분리하였다. b 분획의 경우 fraction들의 총당량의 peak와 산성당량의 peak가 어느 정도 일치하여 두 개의 분획(b-1, -2)으로 분리하였다. 그러나 e 분획의 경우 두 개의 peak가 일치하지 않는 결과를 보여 3개의 분획(e-1, -2, -3)으로 분리하여 각 분획의 면역활성을 측정하였다. Macrophage phosphatase activity에서는 b-1과 e-1인 고분자 회분에서 보다 높은 활성을 나타내었고, mitogenic activity는 농도가 1mg/ml에서 e-2를 제외한 모든 분획에서 활성을 나타내었고, 0.1mg/ml에서는 e-1에서 상대적으로 높은 활성을 나타내었다.



Gel filtration chromatography of b fraction on the column of Superdex 200

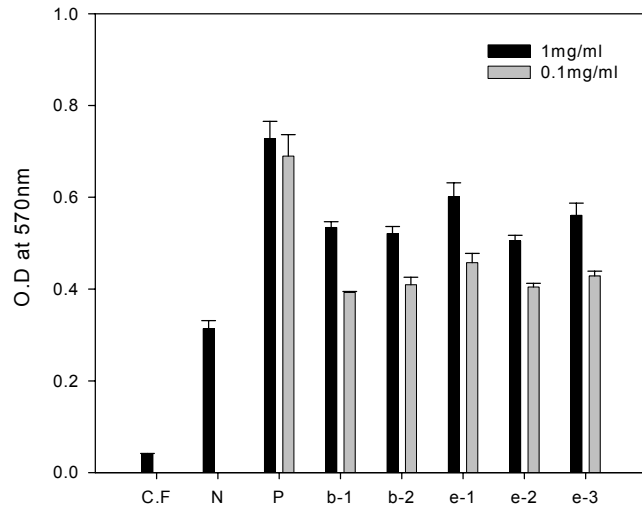


Gel filtration chromatography of e fraction on the column of Superdex 200



Macrophage phosphatase activity of the fractions obtained by Gel filtration chromatography using Superdex 200 (C.F: cell free, N: negative control, saline,

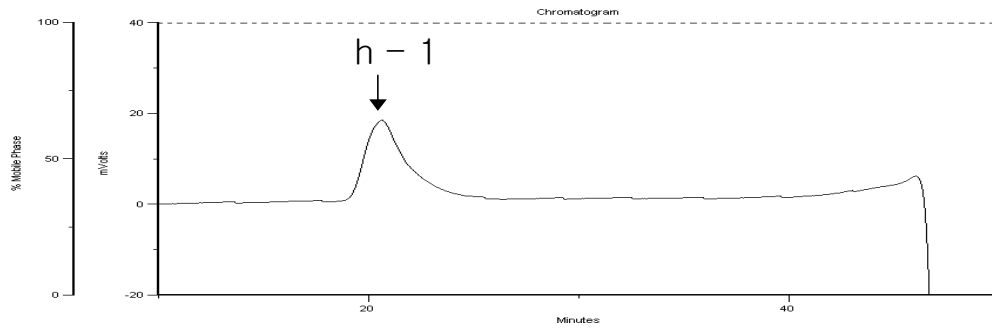
P: positive control, LPS, 0.1mg/ml)



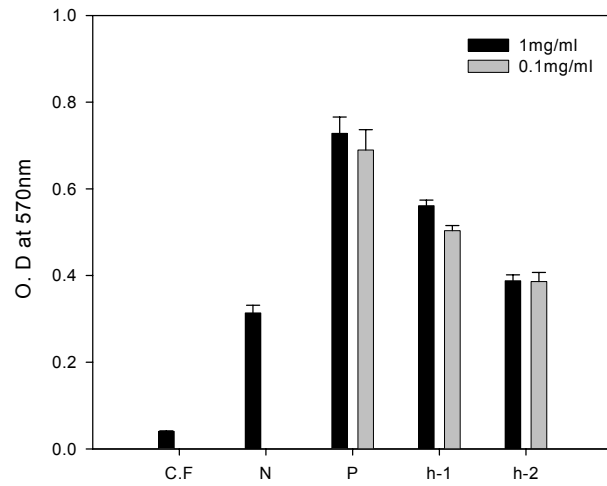
Mitogenic activity of the fractions obtained by gel filtration chromatography using Superdex-200 (C.F: cell free, N: negative control, saline, P: positive control, LPS)

4) 정제된 immuno-stimulating 물질의 특성분석

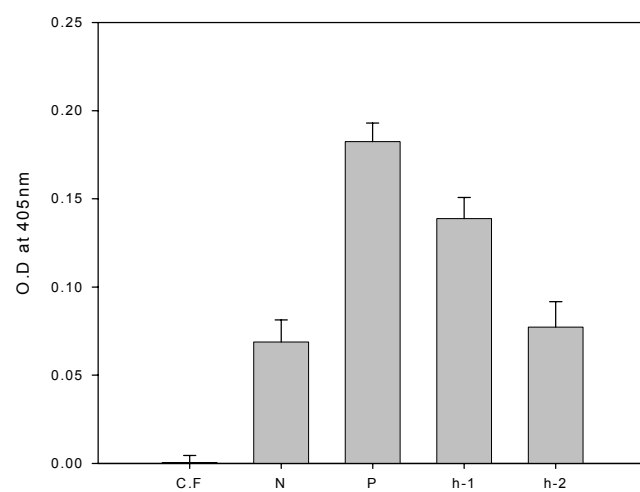
정제된 분획의 면역활성을 확인한 결과 h-1분획에서 공통적으로 면역활성을 나타내었고 h-2는 면역활성을 나타내지 않았다. 정제된 물질의 분자량을 측정하기 위해 표준물질로서 pullulan series를 사용하여 표준곡선을 작성하고 그 분자량을 측정한 결과 h-1은 250,000 Da 그리고 ion exchange chromatography에 의해 정제된 i는 550 Da의 분자량을 가진 물질임을 확인할 수 있었다.



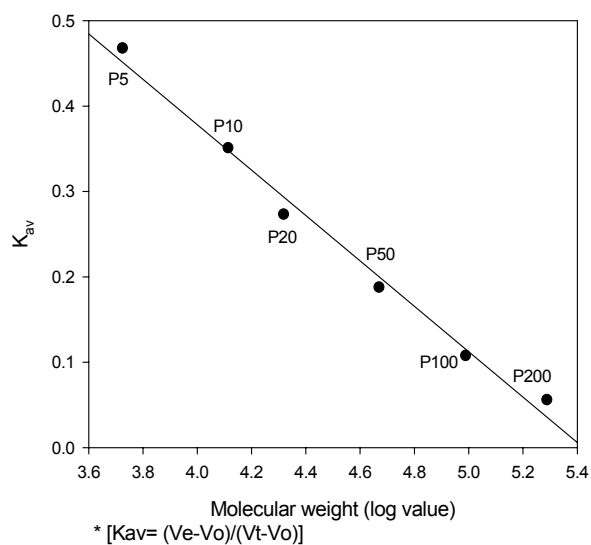
The immuno-stimulating of the purified h-1 fraction



Mitogenic activity of the fractions obtained by HPLC of h fraction (C.F: cell free, N: negative control, saline, P: positive control)



Macrophage phosphatase activity of the fractions obtained by HPLC of h fraction (C.F: cell free, N: negative control, saline, P: positive control, LPS, 0.1mg/ml)



Standard curve for molecular weight determination for HPLC [Ve: Time(min) of Sample, Vo: Time(min) of P800, Vt: Time of D.W]

Determination of Molecular weight of the immuno-stimulating purified h-1 and i fractions

Fraction Numb.	Time(min)	Kav	M.W (log value)	M.W
h-1	27.752	0.0062	5.3986	250,000 Da
i	46.592	0.7129	2.7410	550 Da

제 2 절. 백강균 균사체 및 자실체의 식품 소재화

1. 서론

균사체를 식품소재로 첨가한 제빵 및 제면의 조제를 위한 복합분의 물리적 성질을 mixograph와 extensograph 를 이용하여 측정하고 균사체 첨가에 따른 제빵의 품질특성은 색도비교, 빵의 용적 비교, texture analyzer에 의한 압착 실험을 통한 조직감의 비교 및 관능검사를 통해 결정하고 균사체 첨가에 따른 제면의 건면과 조리면의 품질특성에 대해 조사한다.

자실체 첨가 제빵 품질특성은 색도비교, 빵의 용적 비교, texture analyzer에 의한 압착 실험을 통한 조직감의 비교 및 관능검사를 통해 결정하고 자실체 첨가에 따른 건면을 제조하여 색도, 조리시험 및 과쇄력 시험을 통해 건면의 품질특성을 결정하고 자실체-조리면의 압착시험을 통해 조리면의 품질특성에 대해 결정한다.

자실체 분말을 첨가한 음료를 제조하여 pH, 당도, 총당, 갈색도등을 측정하고 관능검사를 통한 통계적 분석을 통해 품질특성을 결정한다.

2. 재료 및 방법

가. 자실체 및 균사체 첨가에 따른 제빵 실험

1) 일반성분분석

밀가루의 수분, 회분 및 조섬유의 함량은 A.O.A.C.법에 의해 측정하였으며, 조단백질과 조지방은 각각 microkjeldahl과 Soxhlet법으로 측정하였다.

2) 자실체 및 균사체 분말의 색도

자실체를 동결건조시킨 후, 분쇄하여 50mesh를 통과한 시료의 색도를 측정하였다.

3) 복합분의 제조

복합분은 밀가루에 백강균 자실체 및 균사체를 각각 1.0%, 3.0% 및 5.0%로 첨가하여 제조하였다. 한편 백강균 자실체를 첨가하지 않은 100% 밀가루를 대조구로 명칭하였으며, 백강균 자실체를 첨가시킨 복합분을 백강균 자실체-복합분으로 표

시하였다.

4) 제빵시험

제빵시험은 AACC method를 일부 수정하여 실시하였으며 제빵원료의 배합비율은 표에 나타내었다. 백강균 시료를 동결건조한 후, 분쇄하여 50mesh를 통과한 시료를 복합분의 원료로 사용하였다. 또한 밀가루에 대한 백강균 시료의 첨가농도를 밀가루 대비 각각 0.25%, 0.5% 및 1.0%로 하여 제빵시험을 하였다. 한편, 밀가루만으로 제조한 빵을 대조구로 하였으며 백강균 자실체 및 균사체 분말을 첨가한 빵을 백강균 자실체 및 균사체빵으로 명칭하였다. 제빵시험은 3회 반복하여 실시하였다.

5) 색도측정

빵의 색도는 빵을 1cm의 두께로 절단한 후, 절단된 빵의 중앙부분을 색차계(Color difference meter, TCA-SW, Japan)를 이용하여 L, a 및 b값으로 나타내었다. 한편 백강균 자실체 및 균사체빵의 표준색은 100% 밀가루로 제조된 빵을 사용하였다.

6) 제빵특성

빵의 용적(loaf volume)은 빵을 실온에서 2시간 동안 방냉시킨후, 종자치환법(rapeseed displacement method)을 일부 수정하여 측정하였다. 한편 빵의 비용적(specific loaf volume)은 flour 1g이 차지하는 빵의 부피(ml)와 빵 1g이 차지하는 빵의 부피(ml)로 나타내었다.

7) 조직감의 측정

빵의 압착(compression)시험은 texture analyzer(TA-Stable Micro Systems, UK)를 사용하여 측정하였다. 즉 빵을 1cm의 두께로 절단하여 texture analyzer의 테이블에 올려놓고 30%의 변형이 일어나도록 2회 반복압착(two bite compression)하여 측정하였다. 이때 사용된 탐침은 직경 2.5cm의 압착탐침이었으며, 탐침속도는 1.0mm/sec이었다.

나. 자실체 및 균사체첨가에 따른 제면실험

1) 일반성분분석

밀가루의 수분, 회분 및 조섬유의 함량은 A.O.A.C.법에 의해 측정하였으며, 조단백질과 조지방은 각각 microkjeldahl과 Soxhlet법으로 측정하였다.

2) 복합분의 제조

복합분은 밀가루에 백강균 자실체 및 균사체를 각각 0.25%, 0.5% 및 1.0%로 첨가하여 제조하였다. 한편 백강균 자실체를 첨가하지 않은 100% 밀가루를 대조구로 명칭하였으며, 백강균을 첨가시킨 복합분을 백강균 자실체 및 균사체 복합분으로 표시하였다.

3) 백강균 균사체, 자실체-건면 및 조리면의 제조

백강균 균사체 및 자실체를 첨가시킨 건면은 복합분 500g에 3.0% 소금물 150 ml를 가하여 반죽기 <현대면기 (주)> 로 반죽하여 제면기 <현대면기 (주)> 의 롤로간격을 1.5mm로 조절한 상태에서 반죽을 7회 반복하여 롤링하여 면대를 형성하고, 형성된 면대를 겹겹이 포개어 밀봉된 상태로 7℃ 냉장고에서 15시간 동안 숙성시켰다. 숙성시킨 면대를 2회 반복하여 롤링한 후, 두께 1.5mm × 폭 3.0mm의 크기로 제조하였으며, 생면을 25℃, 상대습도 50%의 항온항습조(상우과학)에서 24시간 건조하여 제조하였다. 백강균 자실체를 첨가하지 않고 밀가루만으로 제조한 건면을 대조구로 하였으며, 백강균을 첨가하여 제조한 건면을 백강균-건면으로 명칭하였다. 한편 백강균-건면을 끓는 물에 삶아 조리한 면을 백강균-조리면으로 명칭하였으며, 밀가루만으로 제조한 건면을 끓는 물에 삶아 조리한 면을 대조구로 하였다.

4) 백강균 균사체와 자실체-건면 및 조리면의 색도의 색도측정

백강균 건면과 조리면의 색도는 건면과, 조리면을 실내에서 건조한 후 분쇄하여 100mesh 표준체를 통한 시료를 색차계를 이용하여 L, a 및 b 값으로 나타내었다. 한편 백강균 건면과 백강균 조리면의 표준색은 각각의 대조구를 사용하였다.

5) 백강균 -건면의 조리시험

가) 최적조리시간의 측정

최적조리시간 측정을 위해 끓는 물에 백강균 자실체-건면을 넣고 끓이면서 30초 간격으로 조리면을 채취한 후, 상온의 물로 냉각시켜 제조하였다. 냉각된 조리면을 유리판 사이에 놓고, 눌러서 하얀 심이 완전히 없어지는 시간을 최적조리시간으로 하였다.

나) 백강균 조리면의 중량측정

백강균 건면 50 g을 1000mm의 끓는 증류수에 넣고 10분간 삶은 후 냉수로 30초간 냉각하여 백강균 -조리면을 제조하였으며, 이 백강균 자실체-조리면 표면의 수분을 제거한 후 중량을 측정하였다.

다) 백강균 조리면의 부피

백강균 조리면의 표면수분을 제거한 후, 일정량의 물을 채운 실린더에 넣어 증가하는 물의 부피로서 계산하였다.

라) 백강균 조리면의 수분흡수율

백강균 조리면의 수분흡수율은 다음식에 의해 구하였다.

$$\text{수분흡수율(\%)} = \frac{\text{조리면의 중량} - \text{건면의 중량}}{\text{건면의 중량}} \times 100$$

마) 국물의 탁도

국물의 탁도는 백강균 조리면을 건져낸후 그 국물에 증류수를 보충하여 1000mm로 조절한 다음, UV/Vis-spectrophotometer(Beckman DU-65, USA)를 사용하여 675nm에서 측정한 흡광도로 표시하였다.

6) 조직감의 측정

가) 백강균 건면의 파쇄력 시험

백강균 건면의 파쇄력(breaking force)은 texture analyzer(TA-Stable Micro Systems, UK)를 사용하여 측정하였다. 이때 사용된 탐침은 칼날형이었으며, 탐침 속도는 1mm/sec이었다. 파쇄력의 정도는 백강균 건면이 파쇄되는데 가해지는 힘 (gf)으로 나타내었다. 파쇄력시험에 사용된 백강균 건면은 두께 1.0mm, 폭 2.0mm이었으며, 파쇄력은 10회 반복한 평균값으로 표시하였다.

나) 백강균 조리면의 압착시험

백강균 조리면의 압착시험은 texture analyzer(TA-Stable Micro Systems, UK)를 사용하여 측정하였다. 즉, 백강균 조리면 1가닥을 texture analyzer의 테이블에 올려놓고 조리면의 표면으로부터 전체 두께의 60% 변형(strain)이 일어나도록 2회 반복압착하여 springiness, cohesiveness, chewiness, gumminess, adhesiveness 및 hardness를 측정하였다. 이때 사용된 탐침은 직경 5.0mm의 원통형 압착탐침이었으며, 탐침속도는 1.0mm/sec이었다. 한편, 압착시험용 백강균 자실체-조리면은 백강균 자실체-건면을 최적조리시간 동안 삶은 후, 냉수로 30초간 냉각시키고 표면의 수분을 제거하여 제조하였다. 압착시험은 10회 반복하여 평균값으로 표시하였다. 백강균 조리면의 springiness, cohesiveness, chewiness, gumminess, adhesiveness 및 hardness는 다음 식에 의해 구하였다.

$$\text{Springiness} = \frac{\text{Probe reversal 2} - \text{Start area 2}}{\text{Probe reversal 1} - \text{Start area 1}}$$

$$\text{Cohesiveness} = \frac{\text{Area 2}}{\text{Area 1}}$$

$$\text{Chewiness} = \text{Gumminess} \times \text{Springiness}$$

Gumminess = Hardness × Cohesiveness

Adhesiveness = Area 3(negative area)

Hardness = The force value corresponding to the first major peak

다. 자실체 분말을 이용한 음료제조와 품질특성

1) 재료

음료실험에 사용된 시료는 50mesh를 통과한 백강균 자실체 분말을 사용하였다.

2) 음료제조

백강균 자실체 음료는 삼각플라스크에 증류수 1000mL를 가하고 자실체 25g를 혼합하여 110℃에서 1시간 가열한 다음 냉각하여 Whatman No. 4 여과지로 여과하여 추출액을 얻었다. 음료는 증류수 100mL에 대해 설탕 4.5%, 구연산 0.05%, 아스콜빈산 0.05%를 첨가하고 여기에 추출액을 일정비율(5%, 10%, 15%, 20%, 25%)로 첨가하여 100에서 20분간 가열·살균한 후 제조하였으며, 음료의 안정성 검사를 위하여 각각 5℃와 30℃에서 30일간 저장하면서 안정성 검사를 실시하였다.

3) pH

pH는 시료 10mL를 취해 pH meter를 사용하여 측정하였다.

4) 당도

당도계를 사용하여 측정하였으며 Brix로 나타내었다.

5) 총당

당의 정량은 Phenol-H₂SO₄법을 사용하였고, 즉 시료 1mL에 5% 페놀용액 1mL를 가하고 황산 5mL를 가하여 발색시킨 다음 490nm에서 글루코오스를 표준물질로 비색정량하였다.

6) 갈색도

음료의 갈색도는 분광광도계(Spectrophotometer, 420nm)를 사용하여 측정하였다.

7) 색도 측정

색도는 색차계(Color difference meter, TCA-SW, Japan)로 측정하여 L, a 및 b값으로 나타내었다.

8) 관능검사

음료의 관능검사는 색, 맛, 향 및 전반적인 기호도에 대하여 10명의 관능검사원이 3회 반복하여 실시하였으며 5점 평점법(1 : 아주 나쁨, 2 : 나쁨, 3 : 보통, 4 : 좋음, 5 : 아주 좋음)으로 조사하였다.

9) 통계적 분석

SAS(Statistical Analysis System) 통계 package를 사용하여 분산 분석 및 Duncan 다범위 검증(Duncan's multiple test)을 실시하였다.

3. 결과 및 토의

가. 균사체 첨가 제빵실험

1) 일반성분분석

실험에 사용된 밀가루의 일반성분분석 결과는 다음과 같다. 밀가루의 수분함량은 13.7%이었으며, 조단백질의 함량은 14.1%, 조지방함량 1.0%, 회분함량 0.61% 및 조섬유함량 0.2%이었다.

일반성분분석	
Constituent	Contents(%)
Moisture	13.7
Crude protein*	14.1
Crude lipid	1.0
Ash	0.61
Crude fiber	0.2

2) 균사체 분말의 색도

균사체 분말의 색도를 측정한 결과는 위의표와 같다. 탄소원으로 현미와 결보리를 배지원료로 사용하였을 때, 번데기의 첨가농도가 클수록 L값이 크게 감소하는 경향을 보이는 반면에 a값과 b값은 증가하는 경향을 나타내었다.

균사체 분말의 색도								
		현미 : 번데기			결보리 번데기			
		100:0*						
		90:10	80:20	70:30	90:10	80:20	70:30	
Hunter's color value	L	97.03	57.17	54.54	47.48	57.07	56.75	54.45
	a	-0.20	1.60	2.50	3.03	2.65	2.85	2.90
	b	1.90	13.94	16.34	16.92	14.07	15.53	16.22

L: lightness, a: redness, b: yellowness (*:used as reference)

3) Mixograph에 의한 반죽의 물리적 성질의 측정

밀가루에 백강균 균사체 분말을 첨가하여 제조한 복합분 반죽의 물리적 성질은 mixograph를 이용하여 측정하였으며 그 결과는 다음과 같다

물리적 성질	100:0*	brown barley			unhulled barley		
		97:3	94:6	91:9	97:3	96:4	91:1
Water absorption(%)	62.0	61.5	61.0	60.7	61.5	61.0	60.7
Mixing Time(min)	3.1	2.9	2.8	2.5	3.0	3.2	2.5
Peak height (unit)	7.9	7.7	7.6	7.5	7.6	7.6	7.6
Acending angle (°)	36	39	37	40	31	28	36
Descending angle (°)	8	8	11	20	8	12	14
Mixing Tolerance (unit)	7.1	5.8	5.3	2.7	8.4	5.0	4.0
Height after 7min (unit)	7.0	6.6	6.0	4.9	6.5	6.1	5.5

(*: used as reference)

4) 빵의 색도

균사체 빵의 색도는 100% 밀가루로 제조된 빵의 색도를 기준으로 하여 비교하였다. 탄소원으로 현미를 사용한 백강균 균사체를 첨가한 빵의 색도는 대조구에 비해 L, a 및 b값이 큰 차이를 보였으며, 균사체의 첨가농도가 증가할수록 대조구에 비해 L값은 감소, a와 b값은 증가하는 결과를 나타내었다. 또한 탄소원으로 겉보리를 사용한 백강균 균사체를 첨가한 빵의 색도도 균사체의 첨가농도가 증가할수록 대조구에 비해 L값은 감소, a와 b값은 증가하는 결과를 나타내었다. 이러한 결과는 균사체 분말자체의 L값이 표준백색시료에 비해 크게 작았고, a와 b값이 표준백색시료에 비해 크게 증가했기 때문에 균사체 빵의 색도가 균사체 분말자체의 색도에 크게 영향을 받는 것으로 나타났다.

빵의 색도		Mixing ratio (wheat flour : mycelia)						
		100:0*	brown barley			unhulled barley		
			97:3	94:6	91:1	97:3	94:6	91:1
Hunter's color value	L	77.92	74.09	69.49	60.63	75.80	72.70	70.60
	a	-1.81	0.03	2.01	2.86	0.12	1.21	2.48
	b	10.79	14.21	18.46	19.59	14.69	15.74	18.27

L: lightness, a: redness, b: yellowness (*:used as reference)

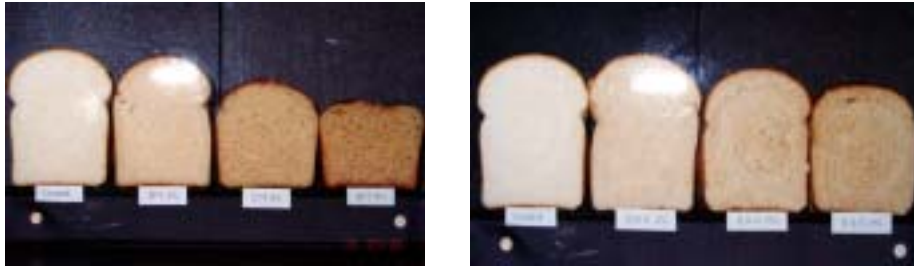
5) 제빵특성

제빵 특성		Mixing ratio (wheat flour : mycelia)						
		100:0*	brown barley			unhulled barley		
			97:3	94:6	91:1	97:3	94:6	91:1
Loaf volume(ml)		740.0	706.7	548.3	501.7	718.3	698.3	643.3
Loaf weight (g)		157.3	159.0	161.9	156.6	166.3	167.1	169.1
Specific loaf volume	ml/g flour	7.40	7.07	5.48	5.02	7.18	6.90	6.43
	ml/g bread	4.70	4.44	3.39	3.20	4.32	4.18	3.08

(*: used as reference)

육안으로 빵의 용적을 판별할 때, 탄소원으로 현미를 사용한 빵의 경우에 백강균 균사체 3% 첨가한 시료의 빵크기는 대조구와 별 차이를 인식할 수 없었으나, 6% 와 9%를 첨가한 시료의 빵의 크기는 대조구에 비해 크게 차이를 보여 제빵적성에 있어서 적합하지 않은 것으로 판단되었다. 한편 탄소원으로 겉보리를 사용한 빵의

경우에 백강균 균사체 3%와 6% 첨가한 시료의 빵크기는 대조구와 별 차이를 보이지 않았으나, 9%를 첨가한 시료의 빵의 크기는 대조구에 비해 크게 차이를 나타내어 제빵적성에 적합하지 않은 것으로 나타났다.



Cut loaves prepared from wheat flour-mycelia of *Beauveria bassiana*

6) 빵의 조직감

백강균 균사체를 첨가시켜 제조한 빵의 경도(hardness)를 측정된 결과를 표에 나타내었다. 대조구의 경도는 1.232 kg_f이었으며, 탄소원으로 현미를 사용한 백강균 균사체 3% 첨가한 빵의 경도가 대조구에 비해 감소하였고, 6%와 9%를 첨가한 빵의 경도는 대조구에 비해 크게 증가하였다. 한편 탄소원으로 걸보리를 사용한 백강균 균사체 3%, 6% 및 9%를 첨가한 빵의 경도는 모두 대조구에 비해 감소하는 결과를 나타내었다.

빵의 조직감							
Mixing ratio (wheat flour : mycelia)							
	100:0*	brown barley			unhulled barley		
		97:3	94:6	91:1	97:3	94:6	91:1
Hardness (kg _f)	1.232 ±0.044 ^c	0.897 ±0.039 ^d	1.949 ±0.141 ^b	2.654 ±0.331 ^a	0.783 ±0.054 ^d	0.696 ±0.018 ^d	0.777 ±0.089 ^d

(*: used as reference)

나. 균사체 첨가에 따른 제면실험

1) 백강균 균사체-건면의 색도

		백강균 균사체 - 건면의 색도						
		Mixing ratio (wheat flour : mycelia)						
		100:0*	brown barley			unhulled barley		
97:3	94:6		91:1	97:3	94:6	91:1		
Hunter's color value	L	62.69	60.13	61.10	59.34	62.72	58.57	54.21
	a	-0.11	0.38	0.80	0.77	1.04	0.99	0.94
	b	4.21	4.58	6.37	7.30	5.62	5.78	6.07

L: lightness, a: redness, b: yellowness (*:used as reference)

대조구-건면에 비해 탄소원으로 현미와 겉보리를 사용한 백강균 균사체-건면 모두 첨가농도에 관계없이 대조구에 비해 L값이 모두 감소하였고, a값과 b값은 모두 증가하였다. 또한 탄소원으로 현미와 겉보리를 사용한 백강균 균사체-건면에 있어 첨가농도가 증가함에 따라서 L값은 감소하고, a값과 b값은 모두 감소하였다.

2) 백강균 균사체-조리면의 색도

백강균 균사체-조리면의 색도를 측정 한 결과는 다음표에 나타내었으며, 대조구-조리면의 색도를 기준으로 하여 비교하였다. 대조구-조리면에 비해 탄소원으로 현미와 겉보리를 사용한 백강균 균사체-건면 모두 첨가농도에 관계없이 대조구에 비해 L값이 모두 감소하였고, a값과 b값은 모두 증가하였다. 또한 탄소원으로 현미와 겉보리를 사용한 백강균 균사체-건면에 있어 첨가농도가 증가함에 따라서 L값은 감소하고, a값과 b값은 모두 감소하였다.

백강균 균사체 - 조리면의 색도								
		Mixing ratio (wheat flour : mycelia)						
		100:0*	brown barley			unhulled barley		
			97:3	94:6	91:1	97:3	94:6	91:1
Hunter's	L	60.95	59.46	57.65	57.60	59.86	53.30	52.77
color	a	-0.48	0.69	1.25	1.65	0.94	1.29	1.94
value	b	5.86	9.71	10.13	10.63	6.86	8.30	9.62

L: lightness, a: redness, b: yellowness (*:used as reference)

3) 백강균 균사체-면의 조리특성

백강균 균사체를 밀가루 무게의 3%, 6% 및 9%를 각각 첨가시켜 제조한 백강균 균사체-건면의 최적조리시간, 조리면의 중량, 부피, 수분흡수율 및 조리후 국물의 탁도를 조사한 결과는 다음과 같다.

백강균 균사체-면의 조리특성								
		Mixing ratio (wheat flour : mycelia)						
		100:0*	brown barley			unhulled barley		
			97:3	94:6	91:1	97:3	94:6	91:1
Cooking time(min)		10.0	8.3	7.3	7.3	9.3	9.0	8.3
Weight (g)		118.0	116.4	119.2	125.2	120.0	127.6	125.6
Volume (ml)		100	100	104	110	110	112	110
Water absorption (%)		136.0	132.8	138.4	150.4	140.0	155.2	151.2
Turbidity of soup (A _{675nm})		58.8	52.5	56.1	62.8	62.1	74.4	67.2

(*:used as reference)

가) 최적조리시간

대조구 건면의 최적조리시간은 10분으로 나타났으며, 탄소원으로 현미와 겉보리를 사용한 백강균 균사체-건면 모두 첨가농도에 관계없이 대조구에 비해 조리시간이 감소되는 결과를 나타내었다. 또한 탄소원으로 현미를 사용한 백강균 균사체-건면과 겉보리를 사용한 백강균 균사체-건면의 경우, 첨가농도가 증가할수록 최적조리시간이 감소하는 결과를 나타내었다. 따라서 백강균 균사체는 면의 최적조리시간의 감소에 크게 영향을 미치는 결과를 보여주었다.

나) 조리면의 중량

대조구-조리면의 중량은 118.0g이었으며, 탄소원으로 현미를 사용한 백강균 균사체를 3% 첨가한 건면을 제외하고는 백강균 균사체를 첨가한 조리면의 중량이 대조구-조리면에 비해 증가하였다. 또한 탄소원으로 현미를 사용한 백강균 균사체-조리면과 겉보리를 사용한 백강균 균사체-조리면의 경우, 첨가농도가 증가할수록 조리면의 중량이 증가하는 결과를 나타내었다.

다) 조리면의 부피

대조구-건면의 조리후 면의 부피는 100ml이었으며, 백강균 균사체-조리면의 부피는 백강균 균사체의 첨가농도에 관계없이 대조구에 비해 모두 증가하는 값을 나타내었다. 또한 탄소원으로 현미를 사용한 백강균 균사체-조리면과 겉보리를 사용한 백강균 균사체-조리면의 경우, 첨가농도가 증가할수록 조리면의 부피가 증가하는 결과를 나타내었다.

라) 조리면의 수분흡수율

대조구-조리면의 수분흡수율은 136.0%이었으며, 탄소원으로 현미를 사용한 백강균 균사체를 3% 첨가한 건면을 제외하고는 백강균 균사체를 첨가한 조리면의 수분흡수율이 대조구-조리면에 비해 증가하였다

마) 국물의 탁도

대조구-조리면의 국물의 탁도는 58.8로 나타났다. 탄소원으로 현미를 사용한 백강균 균사체를 3%와 6%를 첨가한 조리면의 경우는 대조구-조리면에 비해 국물의 탁도가 감소하였고, 9%를 첨가한 조리면의 경우는 대조구-조리면에 비해 국물의

탁도가 증가하였다. 한편 탄소원으로 겉보리를 사용한 백강균 균사체를 3%, 6% 및 9%를 첨가한 조리면 모두 대조구-조리면의 국물의 탁도값보다 증가하는 결과를 나타내었다. 이것은 탄소원으로 현미를 사용한 백강균 균사체를 첨가한 조리면보다 탄소원으로 겉보리를 사용한 백강균 균사체를 첨가한 조리면에서 물에 용출되는 성분이 적게 나타났음을 보여주었다.

4) 백강균 균사체-면의 조직감

가) 백강균 균사체-건면의 조직감

백강균 균사체-건면의 조직감(breaking force)을 측정된 결과는 위의 표에 나타내었다. 대조구-건면의 파쇄력은 335.4g_f로 나타났으며, 탄소원으로 현미를 사용한 백강균 균사체를 첨가한 건면의 파쇄력은 백강균 균사체의 첨가농도에 관계없이 모두 대조구-건면보다 작게 나타났다. 또한 탄소원으로 현미를 사용한 백강균 균사체의 첨가농도의 증가에 따라서 백강균 균사체의 파쇄력이 감소하는 경향을 나타내었다. 한편 탄소원으로 겉보리를 사용한 백강균 균사체를 첨가한 건면의 경우, 백강균 균사체의 첨가농도 3% 건면의 파쇄력이 대조구-건면에 비해 작은 값을 나타낸 반면에, 6%와 9%를 첨가한 건면의 파쇄력은 대조구-건면의 파쇄력과 큰 차이를 보이지 않아 제면 적성에 가장 적합한 것으로 나타났다.

백강균 균사체-건면의 조직감							
Mixing ratio (wheat flour : mycelia)							
	100:0*	brown barley			unhulled barley		
		97:3	94:6	91:1	97:3	94:6	91:1
Breaking force (unit:g _f)	1.232 ±0.044 ^c	0.897 ±0.039 ^d	1.949 ±0.141 ^b	2.654 ±0.331 ^a	0.783 ±0.054 ^d	0.696 ±0.018 ^d	0.777 ±0.089 ^d

^{a-d}Superscriptive letters in a column indicate significant difference at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range comparison. (*:used as reference)

나) 백강균 균사체-조리면의 조직감

Texture analyzer를 이용한 2회 반복 압착시험에 의해 측정된 백강균 균사체-조리면의 조직감을 표에 나타내었다. 대조구-조리면의 springiness값은 0.962이었으며, 탄소원으로 현미를 사용한 백강균 균사체를 첨가한 조리면의 springiness값은 백강균 균사체의 첨가농도에 관계없이 대조구-조리면에 비해 작은 값을 나타내었다. 한편 탄소원으로 겉보리를 사용한 백강균 균사체를 3%와 6%를 각각 첨가하여 제조한 조리면의 springiness값은 대조구-조리면과 큰 차이를 나타내지 않아 조리면의 제면적성에 적합하였다. 대조구-조리면의 chewiness값은 1.162로 나타났으며, 탄소원으로 현미를 사용한 백강균 균사체를 첨가한 조리면과 탄소원으로 겉보리를 사용한 백강균 균사체를 첨가한 조리면의 chewiness값이 대조구-조리면의 chewiness값과 큰 차이를 보이지 않았다. 또한 대조구-조리면의 hardness값은 2.199로 나타났으며, 탄소원으로 현미를 사용한 백강균 균사체를 첨가한 조리면과 탄소원으로 겉보리를 사용한 백강균 균사체를 첨가한 조리면의 hardness값이 대조구-조리면의 hardness값 보다 크게 나타났다.

백강균 균사체-조리면의 조직감							
Texture parameters	Mixing ratio (wheat flour : mycelia)						
	100:0*	brown barley			unhulled barley		
		97:3	94:6	91:1	97:3	94:6	91:1
Springiness	0.962 ±0.019	0.930 ±0.034	0.891 ±0.044	0.904 ±0.069	0.953 ±0.040	0.953 ±0.015	0.922 ±0.056
Chewiness	1.162 ±0.205	1.223 ±0.161	1.083 ±0.160	1.048 ±0.077	1.245 ±0.110	1.131 ±0.164	1.293 ±0.122
Cohesiveness	0.547 ±0.036	0.527 ±0.029	0.477 ±0.033	0.489 ±0.011	0.549 ±0.028	0.511 ±0.022	0.507 ±0.038
Gumminess	1.208 ±0.215	1.312 ±0.140	1.214 ±0.156	1.159 ±0.036	1.309 ±0.126	1.188 ±0.181	1.401 ±0.055
Adhesiveness	-0.047 ±0.034	-0.067 ±0.052	-0.042 ±0.011	-0.027 ±0.015	-0.049 ±0.032	-0.031 ±0.015	-0.048 ±0.016
Hardness (gf)	2.199 ±0.310	2.486 ±0.159	2.537 ±0.204	2.373 ±0.055	2.380 ±0.165	2.323 ±0.315	2.770 ±0.141

(*:used as reference)

다. 자실체 첨가에 따른 제빵 실험

1) 일반성분분석

본 실험에 사용된 밀가루의 일반성분분석 결과를 표에 나타내었다. 밀가루의 수분 함량은 13.7%이었으며, 조단백질의 함량은 14.1%, 조지방함량 1.0%, 회분함량 0.61% 및 조섬유함량 0.2%이었다.

일반성분분석	
Constituent	Contents(%)
Moisture	13.7
Crude protein*	14.1
Crude lipid	1.0
Ash	0.61
Crude fiber	0.2

2) 자실체 분말의 색도

자실체 분말의 색도를 측정한 결과를 표에 나타내었다. 자실체의 첨가농도가 증가할수록 대조구에 비해 L값은 약간 감소하였고, a와 b값은 약간 증가하였다.

자실체 분말의 색도		
Color of Stromata		
Hunter's color value	L	83.12
	a	-0.24
	b	19.21

3) 빵의 색도

자실체 빵의 색도를 측정한 결과를 표에 나타내었으며, 자실체 빵의 색도는 100%

밀가루로 제조된 빵의 색도를 기준으로 하여 비교하였다. 자실체 첨가농도가 증가함에 따라 대조구에 비해 L값은 약간 감소, a와 b값은 약간 증가하는 결과를 나타내었다. 이러한 결과는 자실체 분말자체의 L값이 표준백색시료에 비해 작았고, a와 b값이 표준백색시료에 비해 증가했기 때문에 자실체 빵의 색도가 자실체 분말의 색도에 영향을 받는 것으로 나타났다.

빵의 색도		Mixing ratio (wheat flour : Stromata)			
		100:0*	99:1	97:3	95:5
Hunter's color value	L	75.03	71.78	70.20	58.91
	a	-1.78	-1.33	-1.16	-0.74
	b	12.37	13.45	14.83	14.29

(*:used as reference)

4) 제빵특성

자실체 분말을 0.25%, 0.5% 및 1.0%를 첨가한 자실체-빵의 비용적은 대조구와 별 차이를 나타내지 않아 제빵적성에 적합한 결과를 나타내었다.

제빵 특성		Mixing ratio (wheat flour : Stromata)			
		100:0*	99:1	97:3	95:5
Loaf volume (ml)		840.0	895.0	789.0	645.0
Loaf weight (g)		179.1	177.0	177.3	179.7
Specific loaf volume	ml/g flour	7.43	7.92	7.17	5.86
	ml/g bread	4.69	5.06	4.45	3.59

(*:used as reference)

5) 빵의 조직감

백강균 자실체를 첨가시켜 제조한 빵의 경도(hardness)를 측정하였다. 대조구의 경도는 1.232 kg_f이었으며, 자실체 첨가 농도에 상관없이 대조구와 큰 차이를 나타내지 않았다.

빵의 조직감				
	Mixing ratio (wheat flour : Stromata)			
	100:0*	99:1	97:3	95:5
Hardness (N)	1.15	0.97	1.42	1.85

(*:used as reference)

라. 자실체 첨가에 따른 제면실험

1) 일반성분분석

본 실험에 사용된 밀가루의 일반성분분석 결과는 아래의 표에 나타내었다. 밀가루의 수분함량은 13.2%이었으며, 조단백질 함량 9.8%, 조지방 함량 1.1%, 회분함량 0.7 및 조섬유함량 0.2%로 나타났다.

일반성분분석	
Constituent	Contents(%)
Moisture	13.2
Crude protein*	9.8
Crude lipid	1.1
Ash	0.7
Crude fiber	0.2

2) 백강균 자실체-면의 색도

가) 백강균 자실체-건면의 색도

백강균 자실체-건면의 색도를 측정된 결과는 아래 표로 나타내었으며, 대조구-건면의 색도를 기준으로 하여 비교하였다. 대조구-건면에 비해 백강균 자실체-건면 모두 첨가농도에 관계없이 대조구에 비해 L값이 감소하였고, a와 b값은 증가하였다.

		Mixing ratio (wheat flour : Stromata)			
		100:0*	99:1	97:3	95:5
Hunter's color value	L	93.54	91.25	90.65	90.37
	a	-0.41	-0.36	-0.24	-0.21
	b	7.76	13.63	12.13	13.82

L: lightness, a: redness, b: yellowness (*: used as reference)

나) 백강균 자실체-조리면의 색도

		Mixing ratio (wheat flour : Stromata)			
		100:0*	99:1	97:3	95:5
Hunter's color value	L	95.71	93.71	94.52	94.27
	a	-0.70	-0.52	-0.41	-0.48
	b	6.74	10.45	8.96	10.28

L: lightness, a: redness, b: yellowness (*: used as reference)

백강균 자실체-조리면의 색도를 측정된 결과를 표에 나타내었으며, 대조구-조리면

의 색도를 기준으로 하여 비교하였다. 대조구-조리면에 비해 백강균 자실체-건면 모두 첨가농도에 관계없이 대조구에 비해 L값이 감소하였고, a와 b값은 증가하였다.

3) 백강균 자실체-면의 조리특성

백강균 자실체를 밀가루 무게의 1%, 3% 및 5%를 각각 첨가시켜 제조한 백강균 자실체-건면의 최적조리시간, 조리면의 중량, 부피, 수분흡수율 및 조리후 국물의 탁도를 조사한 결과를 표에 나타내었다.

	백강균 자실체-면의 조리특성			
	Mixing ratio (wheat flour : Stromata)			
	100:0*	99:1	97:3	95:5
Cooking time (min)	13.0	13.5	14.0	14.0
Weight (g)	115.0	110.5	115.0	106.0
Volume (ml)	100	100	99.5	94.5
Water absorption (%)	130.1	121.5	130.5	111.6
Turbidity of soup (A_{675nm})	59.0	71.1	73.5	66.4

(*: used as reference)

가) 최적조리시간

대조구 건면의 최적조리시간은 13분으로 나타났으며, 백강균 자실체-건면은 첨가농도에 관계없이 대조구와 큰 차이를 나타내지 않았다.

나) 조리면의 중량

대조구-조리면의 중량은 115.0g이었으며, 백강균 자실체를 1%와 3%를 첨가한 조리면의 중량은 첨가농도에 관계없이 대조구와 큰 차이를 나타내지 않았으나, 5%를 첨가한 조리면은 중량이 감소하였다.

다) 조리면의 부피

대조구-건면의 조리후 면의 부피는 100ml이었으며, 백강균 자실체를 1%와 3%를 첨가한 조리면의 부피는 첨가농도에 관계없이 대조구와 큰 차이를 나타내지 않았으나, 5%를 첨가한 조리면은 부피가 감소하였다.

라) 조리면의 수분흡수율

대조구-조리면의 수분흡수율은 130.1%이었으며, 백강균 자실체를 1%와 3%를 첨가한 조리면의 수분흡수율은 첨가농도에 상관없이 대조구와 큰 차이를 나타내지 않았으나, 5%를 첨가한 조리면은 수분흡수율이 감소하였다.

마) 국물의 탁도

대조구-조리면의 국물의 탁도는 59.0으로 나타났다. 백강균 자실체를 첨가한 조리면의 국물의 탁도는 대조구에 비해 증가하였다.

4) 백강균 자실체-면의 조직감

가) 백강균 자실체-건면의 조직감

백강균 자실체-건면의 조직감(breaking force)을 측정된 결과를 표에 나타내었다. 대조구-건면의 파쇄력은 326.8gf로 나타났으며, 백강균 자실체를 1%와 3%를 첨가한 건면의 파쇄력은 대조구에 비해 증가한 반면, 5%를 첨가한 건면의 파쇄력은 대조구에 비해 감소하였다.

백강균 자실체 -건면의 조직감				
Mixing ratio (wheat flour : Stromata)				
	100:0*	99:1	97:3	95:5
Breaking force (unit : gf)	326.8±45.2	352.3±50.1	365.4±66.0	315.9±48.8

(* : used as reference)

나) 백강균 자실체-조리면의 조직감

Texture analyzer를 이용한 2회 반복 압착시험에 의해 측정된 백강균 자실체-조리면의 조직감을 표에 나타내었다. 대조구-조리면의 springiness는 0.94이었으며, 백강균 자실체를 첨가한 조리면의 springiness값은 백강균 자실체의 첨가농도에 관계없이 대조구-조리면과 큰 차이를 나타내지 않았다. 대조구-조리면의 chewiness값은 1.62로 나타났으며, 백강균 자실체를 1% 첨가한 조리면은 대조구와 차이를 보이지 않았으나, 3%와 5%를 첨가한 조리면은 대조구에 비해 감소하였다. 대조구-조리면의 cohesiveness값은 0.5로 나타났으며, 백강균 자실체의 첨가농도에 관계없이 대조구-조리면과 큰 차이를 나타내지 않았다. 또한 대조구-조리면의 hardness값은 3.43으로 나타났으며, 백강균 자실체를 1%, 3%를 첨가한 조리면의 hardness값이 대조구-조리면 보다 작게 나타났으나, 5%를 첨가한 조리면의 hardness값은 대조구 보다 증가하였다.

백강균 자실체 -조리면의 조직감				
Texture parameters	Mixing ratio (wheat flour : Stromata)			
	100:0*	99:1	97:3	95:5
Springiness	0.94	0.93	0.90	0.90
Chewiness	1.62	1.59	1.32	1.48
Cohesiveness	0.50	0.50	0.46	0.46
Gumminess	1.71	1.70	1.47	1.65
Adhesiveness	-0.25	-0.25	-0.42	-0.45
Hardness (N)	3.43	3.37	3.17	3.56

(*: used as reference)

마. 백강균 자실체 추출물을 이용한 음료개발

1) 백강균 자실체 추출액의 품질특성

증류수 40에 대해 자실체 분말 1을 첨가하여 추출한 추출액의 품질특성은 다음표

와 같다

백강균 자실체 추출액의 품질특성		
당도 (Brix)	1.5	
pH	5.81	
총당 (%)	0.4	
Hunter's color value	L	28.69
	a	-0.22
	b	4.39

2) 음료의 품질특성

추출액을 5%, 10%, 15%, 20% 및 25%를 각각 첨가하여 제조한 음료의 품질특성은 다음 표와 같다.

음료의 갈색도는 추출물의 첨가농도가 증가할수록 커졌으며 또한 추출물의 첨가농도가 증가할수록 음료의 pH도 증가하였다. 이것은 백강균 자실체 추출액 자체의 갈색도와 pH에 의해 크게 영향을 받고 있음을 보여주고 있다. 음료의 명도는 추출물의 첨가농도가 증가할수록 감소하였으며 음료의 황색도는 증가하였다.

음료의 품질 특성						
Extracts	5%	10%	15%	20%	25%	
Browning index	0.056	0.110	0.175	0.245	0.309	
pH	3.05	3.16	3.18	3.46	3.58	
Hunter's color value	L	32.22	32.19	31.89	31.73	30.78
	a	-0.41	-0.43	-0.44	-0.41	-0.53
	b	-0.51	-0.24	-0.05	0.21	0.55

3) 음료의 관능검사

음료의 색, 맛, 향 및 전체적인 기호도를 측정한 결과를 다음 표에 나타내었다. 음료의 색은 추출액 15%, 20% 및 25%를 첨가한 경우 가장 우수하였으나 5%와 10%를 첨가한 경우 색이 옅게 나타나 선호도가 떨어지는 것으로 나타났다. 음료의 맛은 추출액 15%에서 가장 높게 선호도가 높았으며 5% 첨가시에는 자실체의 맛을 느끼기가 어려웠고 25% 첨가시에는 너무 맛이 강하여 선호도가 낮았다. 향은 추출액 15%에서 가장 선호도가 높았으며 20%와 25%에서도 선호도가 양호하였다. 전체적인 기호도에 있어서 추출액 15%에서 가장 높은 선호도를 보여 음료제조시 이와같은 농도에서 음료를 제조하는 것이 바람직할 것으로 판단되었다.

음료의 관능검사					
Extracts	5%	10%	15%	20%	25%
Color	2.6 ^c	3.2 ^b	3.9 ^a	3.8 ^a	3.7 ^a
Taste	2.7 ^c	3.5 ^b	4.1 ^a	3.7 ^b	2.2 ^d
Flavor	2.3 ^c	3.2 ^b	3.9 ^a	3.4 ^b	3.1 ^b
Overall acceptance	2.3 ^c	3.4 ^b	4.1 ^a	3.6 ^b	2.2 ^c

^{a-d}Superscriptive letters in a column indicate significant difference at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range comparison.

4) 음료의 저장실험

가) pH의 변화

음료의 저장중 추출물의 첨가농도와 저장온도에 상관없이 저장기간이 늘어날수록 음료의 pH는 감소하였으며 5℃에서 저장한 음료보다 30℃서 저장한 음료의 pH가 더 감소하였다.

pH의 변화 (5℃)						
Extracts	Storage (Days)					
	0	5	15	20	25	30
5%	3.05	2.87	2.76	2.74	2.71	2.70
10%	3.16	3.02	2.86	2.83	2.81	2.82
15%	3.28	3.13	2.99	2.98	2.95	2.94
20%	3.46	3.35	3.12	3.12	3.10	3.09
25%	3.58	3.42	3.24	3.23	3.20	3.20

pH의 변화 (30℃)						
Extracts	Storage (Days)					
	0	5	15	20	25	30
5%	3.05	3.01	2.97	2.96	2.95	2.95
10%	3.16	3.14	3.11	3.09	3.08	3.07
15%	3.28	3.25	3.23	3.21	3.19	3.17
20%	3.46	3.41	3.38	3.35	3.35	3.32
25%	3.58	2.50	3.47	3.47	3.45	3.45

나) 갈색도의 변화

음료의 갈색도는 추출물의 첨가농도와 저장온도에 상관없이 저장기간이 길어짐에 따라서 증가하였다

갈색도의 변화 (5℃)						
Extracts	Storage (Days)					
	0	5	15	20	25	30
5%	0.056	0.057	0.057	0.061	0.062	0.061
10%	0.110	0.112	0.115	0.117	0.116	0.118
15%	0.175	0.174	0.177	0.174	0.178	0.176
20%	0.245	0.244	0.249	0.248	0.251	0.257
25%	0.309	0.311	0.312	0.311	0.314	0.315

갈색도의 변화 (30℃)						
Extracts	Storage (Days)					
	0	5	15	20	25	30
5%	0.056	0.059	0.062	0.065	0.067	0.067
10%	0.110	0.112	0.112	0.114	0.116	0.117
15%	0.175	0.175	0.177	0.179	0.181	0.181
20%	0.245	0.247	0.247	0.246	0.248	0.248
25%	0.309	0.308	0.312	0.314	0.315	0.314

다) 색도의 변화

음료의 색도에 있어서 저장기간과 저장온도에 상관없이 음료의 L, a b값은 차이를 나타내지 않았다.

색도의 변화 (5℃)						
Storage (Days)	Hunter's color value	Extracts				
		5%	10%	15%	20%	25%
0	L	32.22	32.19	31.89	31.73	31.78
	a	-0.41	-0.43	-0.44	-0.41	-0.53
	b	-0.51	-0.24	-0.55	0.21	0.56
15	L	32.12	32.33	32.04	31.92	32.09
	a	-0.35	-0.39	-0.42	-0.42	-0.42
	b	-0.64	-0.46	-0.34	-0.23	0.01
30	L	32.16	31.94	31.88	31.77	31.65
	a	-0.40	-0.43	-0.44	-0.49	-0.50
	b	-0.53	-0.31	-0.08	0.19	0.37

색도의 변화 (30℃)						
Storage (Days)	Hunter's color value	Extracts				
		5%	10%	15%	20%	25%
0	L	32.22	32.19	31.89	31.73	31.78
	a	-0.41	-0.43	-0.44	-0.41	-0.53
	b	-0.51	-0.24	-0.55	0.21	0.56
15	L	32.20	32.01	31.97	31.85	32.06
	a	-0.40	-0.41	-0.45	-0.49	-0.50
	b	-0.55	-0.51	-0.25	-0.17	0.15
30	L	32.11	32.22	32.16	31.89	31.83
	a	-0.43	-0.47	-0.55	-0.59	-0.63
	b	-0.46	-0.16	0.15	0.50	0.80

제 3 절. 백강균 자실체 생산 및 배양의 최적화

1. 서론

백강균의 자실체 대량생산에 적합한 경제적 배지선발을 위해 탄소원과 질소원의 최적농도를 첨가한후 자실체 생산에 미치는 영향을 검토하고 무기질 종류에 따른 자실체 생산에 미치는 영향을 검토하고 저렴하고 높은 생리활성을 갖는 자실체의 대량생산에 적합한 배지 성분의 선정의 기초자료를 조사한다.

백강균의 자실체 대량생산을 위한 공기 유입량, 온도, 수분함량, 빛에 의한 영향을 검토함으로써 높은 생리활성을 갖는 자실체의 대량생산에 적합한 생산조건을 조사한다.

자실체 대량생산을 위한 종균제조방법 확립하기 위해 쌀겨, 밀기울, 효모추출물 등을 농도별로 첨가하고 수분함량을 조절하여 살균한 후 이를 항온 조건에서 고체 배양하여 얻은 무성포자를 종균으로 사용했을 때의 자실체 생산성을 검토하고 액체 배지의 탄소원, 질소원 등의 배지성분을 검토하여 최적의 조건에서 배양하여 얻은 균사체를 종균으로 사용했을 때의 생산성 비교 검토하여 대량생산에 적합한 생산조건을 조사한다.

2. 재료 및 방법

가. 백강균의 자실체 대량생산에 적합한 경제적 배지 성분의 선발

- 저렴하고 구입하기가 용이한 곡물류나 농산 폐기물을 중심으로 기본배지 성분을 결정함.

1) 탄소원의 영향

기본 배지 성분에 각종 곡물류나 농산 폐기물(각종 곡물의 박이나 미강유 등의 각종 유지류를 이용한 탄소원을 농도별로 첨가하여 백강균의 자실체 생산과 생리활성에 미치는 영향을 검토하여 탄소원과 최적농도를 선정함.

2) 질소원의 영향

기본 배지 성분에 선정된 탄소원을 최적농도로 첨가한 후 각종 곡물류나 농산 폐기물(각종 곡물의 박으로 커피박, 옥수수박, 미강 등)을 이용한 질소원을 농도별로 첨가하여 백강균의 자실체 생산과 생리활성에 미치는 영향을 검토하여 질소원과 최적 농도를 선정함.

3) 무기질의 영향

기본 배지 성분에 선정된 탄소원과 질소원을 최적농도로 첨가한 후 여러 가지 무기질을 농도별로 첨가하여 백강균의 자실체 생산과 생리활성에 미치는 영향을 검토함으로써 무기질과 최적농도를 선정함.

이상의 배지 성분에 대한 백강균의 자실체 생산과 생리활성에 미치는 영향을 검토하여 얻은 결과를 종합하여 저렴하고 높은 생리활성을 갖는 자실체의 대량생산에 적합한 배지성분의 조건을 확립함.

나. 백강균의 자실체 대량생산에 적합한 경제적 배양 조건의 확립

● 자실체형성에 필요한 최적조건 구명

1) 호기조건에 따른 검토

대량배양에서 배양 시 공기 유입량이 자실체 생산에 큰 영향을 미치고 생리활성을 나타내는 물질의 생산도 공기 유입량에 비례하여 증가한다는 보고가 있으므로 통기량을 일정하게 조절하여 통기량이 자실체 생산에 미치는 영향을 검토

2) 온도의 영향

선정된 호기조건하에서 생육 시 온도는 자실체의 생산과 밀접한 관계가 있으므로 10℃에서부터 25℃까지 온도를 조절하여 각각의 온도에서 백강균의 자실체 생산에 미치는 온도의 영향을 검토

3) 수분함량의 영향

백강균의 자실체 대량생산에서 수분함량은 자실체와 생리활성 물질의 생산에 중요한 요인으로 작용하고 있으므로 수분함량을 50%에서부터 90%까지 조절하여 각

각의 수분함량에서 백강균의 자실체 생산에 미치는 영향을 검토

4) 빛에 의한 영향

배양 시 비추어지는 빛의 양에 따라 자실체의 생산에 커다란 영향을 주므로 일정한 조도로 조절하여 각각의 빛조건에서 자실체의 대량생산에 미치는 영향을 검토 이상의 배양 조건에 대한 백강균의 자실체 생산에 미치는 영향을 검토하여 얻은 결과를 종합하여 자실체의 가장 신속한 생산 조건을 확립함.

다. 효과적인 종균 생산방법 선정

● 자실체 형성에 적합한 종균생산 방법을 결정

1) 무성포자의 접종에 의한 자실체 형성

쌀겨, 밀기울, 효모추출물등을 농도별로 첨가하고 수분함량을 조절한 후 800cc polypropylene bottle에 충전하여 121℃에서 1시간 살균된 배지를 완전히 식힌 후 균사를 접종하여 일정 온도하에서 배양일수에 따라 생산된 무성포자의 수를 검토한 후 이를 종균으로 사용했을 때 자실체의 생산성을 검토 함.

2) 액체배양에서 생산된 균사체 접종에 의한 자실체 형성

기본 배지 성분에서 균사체 배양에 적합한 탄소원, 질소원 등의 배지성분을 검토한 후 최적의 배지성분과 배양조건하에서 배양일수에 따른 균사체의 형성량을 검토한 후 이를 종균으로 사용했을 때 자실체의 생산성을 비교 검토 함.

3. 결과 및 토의

가. 백강균의 균사체 대량생산에 적합한 경제적 배지선발

1) 균사체 생산에 적합한 탄소원의 선정

탄소원으로서 겉보리, 현미 및 백미를 사용하여 백강균 균사체의 생산여부를 알아본 결과, 탄소원으로서 겉보리와 현미가 적합하였으며, 특히 겉보리:번데기 분말과 현미: 번데기 분말 비율이 90:10인 조건에서 균사체가 가장 많이 생산되는 결과를

나타내었다.

탄소원 종류	균사체 무게	
현미 : 번데기	90:10	54.3g
	80:20	68.9g
	73:30	68.1g
겉보리 : 번데기	90:10	59.6g
	80:20	66.4g
	70:30	70.2g

2) 균사체 생산에 적합한 질소원의 선정

표에 나타난 바와 같이 맥주박, 대두박 및 난황분말을 질소원으로 사용했을 때, 질소원 종류와 상관없이 백강균 균사체의 생산증가에 아무런 영향을 주지 못하는 것으로 나타났다.

질소원의 종류	자실체와 배지의 총무게
맥주박	57.3g
대두박	57.5g
난황분말	53.7g

3) 균사체 생산에 적합한 무기염류원의 선정

백강균 균사체 생산에 적합한 현미와 번데기 분말의 비율 90:10일 때와 겉보리와 번데기 분말의 비율 90:10일때가 균사체 생산량이 가장 많았기 때문에 현미와 번데기 분말과 겉보리와 번데기 분말의 비율을 90:10으로 정하여 이에 무기염류원으로서 KH_2PO_4 , K_2HPO_4 , CoSO_4 , ZnSO_4 , CaSO_4 , MgSO_4 , CaCl_2 및 MnCl_2 를 사용하여 백강균 균사체의 생산여부를 알아보았다. 무기염류는 종류에 관계없이 백강균

균사체의 생산에 전혀 영향을 미치지 않은 결과를 나타내었다.

질소원의 종류	균사체와 배지의 총무게
현미 + 맥주박	59.7g
현미 + 대두박	57.2g
현미 + 난황분말	58.5g
겉보리 + 맥주박	66.4g
겉보리 + 대두박	63.5g
겉보리 + 난황분말	64.0g

나. 백강균의 자실체 대량생산에 적합한 경제적 배지선발

1) 자실체 생산에 적합한 탄소원의 선정

탄소원으로서 겉보리, 현미 및 백미를 사용하여 백강균 자실체의 생산여부를 알아본 결과, 겉보리와 백미에서는 자실체가 전혀 생성되지 않았고 현미에서만 자실체가 생산되는 결과를 나타내었다. 따라서 백강균 자실체의 생산에 적합한 탄소원은 현미로 밝혀졌다.

2) 자실체 생산에 적합한 질소원의 선정

백강균 자실체 생산에 적합한 현미와 번데기 분말의 비율 90:10일 때 자실체 생산량이 가장 많았기 때문에 현미와 번데기 분말의 비율을 90:10으로 정하여 이에 질소원으로서 맥주박, 대두박 및 난황분말을 첨가하여 백강균 자실체의 생산여부를 알아보았다. 맥주박과 대두박을 질소원으로 사용했을시에는 자실체 생산 증가에 전혀 영향을 주지 못한 반면에, 난황분말을 사용했을때는 자실체와 배지의 총무게는 감소하였으나 자실체 자체의 생산량은 증가하였다.

3) 자실체 생산에 적합한 무기염류원의 선정

백강균 자실체 생산에 적합한 현미와 번데기 분말의 비율 90:10일 때 자실체 생산

량이 가장 많았기 때문에 현미와 번데기 분말의 비율을 90:10으로 정하여 이에 무기염류원으로서 KH_2PO_4 , K_2HPO_4 , CoSO_4 , ZnSO_4 , CaSO_4 , MgSO_4 , CaCl_2 및 MnCl_2 를 사용하여 백강균 자실체의 생산여부를 알아본 결과, 무기염류는 종류에 관계없이 백강균 자실체의 생산에 전혀 영향을 미치지 않은 결과를 나타내었다.

4) 자실체 생산에 적합한 배양온도의 선정

배양온도를 각각 10℃, 15℃, 20℃, 25℃ 및 30℃로 정하여 온도별 자실체 생산에 적합한 배양온도를 결정하였다. 10℃, 15℃, 25℃ 및 30℃에서 자실체는 생산이 전혀 안되고 균사체만 생산되는 결과를 나타내었다. 한편 20℃에서 배양할 경우, 자실체가 생산되는 결과를 나타내었다.

배양온도(℃)	자실체의 생산여부
10	생산안됨
15	생산안됨
20	생산됨
25	생산안됨
30	생산안됨

다. 백강균의 자실체 대량생산에 적합한 경제적 배양조건의 확립

1) 자실체 형성에 필요한 최적의 호기적 조건 확립

버섯배양병의 뚜껑을 이용하여 공기 유입량을 조절하여 실험한 결과, 공기유입량이 많으면 자실체를 형성하지 못하고 공기유입량이 많지 않을때 자실체를 형성하는 결과를 나타내었다.

자실체 형성에 필요한 최적의 호기적 조건 확립

뚜껑을 열고 배양한 경우

뚜껑을 닫고 배양한 경우



2) 자실체 형성에 필요한 최적의 온도 조건 확립

온도별 실험결과, 20℃ 배양하에서만 자실체를 생산하였고 20℃를 제외한 온도에서는 자실체 생산이 전혀 안되고 균사체만 생산되는 결과를 나타내었다.

자실체 형성에 필요한 최적의 온도

배양온도(℃)	자실체의 생산여부
10	생산안됨
15	생산안됨
20	생산됨
25	생산안됨
30	생산안됨

3) 자실체 형성에 필요한 최적의 수분함량 조건 확립

버섯 배양병에 배양된 자실체를 분리 동결 건조한 후, 각각의 무게를 측정하여 본 결과 수분함량이 60%일 때 가장 많은 자실체를 생산하였고 80%일 때 자실체 생산이 가장 적었으며 90%의 수분함량에서는 자실체를 형성하지 않았다.

자실체 형성에 필요한 최적의 수분함량					
수분함량(%)	자실체 무게(g)	반복 수			평균
		1반복	2반복	3반복	
50	6.920	4.508	5.236	5.555	
60	26.006	25.575	25.004	25.528	
70	8.084	7.636	6.185	7.302	
80	5.864	5.959	6.678	6.167	
90	자실체 생산 안됨				

4) 자실체 형성에 필요한 최적의 조사조건 확립

최적의 조사조건을 찾기 위하여 접종된 버섯 배양병에 각각 3000 lux, 6000 lux 및 9000 lux를 조사하여 배양된 자실체를 분리 동결 건조한 후, 각각의 무게를 측정하여 본 결과 조사량이 3000 lux일 때 가장 많은 자실체를 생산하였으며 0 lux일 때는 자실체를 형성하지 못하였다.

자실체 형성에 필요한 최적의 조사량					
조사량(lux)	자실체 무게(g)	반복 수			평균
		1반복	2반복	3반복	
9,000		2.8	3.0	3.2	3.000
6,000		4.1	4.8	4.7	4.533
3,000		26.006	25.575	25.004	25.528
0		자실체 형성 안됨			

5) 백강균의 자실체 대량생산에 적합한 경제적 배지조건 확립

이상의 배양 조건에 대한 백강균의 자실체 대량생산에 적합한 생산조건은 배지내 수분함량은 60%이며 공기유입량이 많지 않도록 배양병의 뚜껑을 닫고 20℃에서 배양한다. 또한 3,000 lux정도의 조사량이 최적임을 알 수 있었다.

백강균의 자실체 대량생산에 적합한 경제적 배지조건	
최적 조건	
공기 유입량	밀폐
온도	20℃
수분함량	60%
조사량	3,000 lux

라. 효과적인 종균 생산방법 선정

1) 무성포자의 접종에 의한 자실체 형성

각각의 250ml 삼각플라스크에 수분함량 50%에서 90%까지의 현미 20g 배지에 포자 현탁액 2×10^8 conidia/ml을 접종하여 25℃에서 7일간 배양한 다음 100ml의 멸

균수를 첨가한 후 shaking 하여 포자수를 측정한 결과 현미배지의 수분함량 70% 일 때 가장 많은 포자수를 생산하였지만 이를 평균으로 사용하여 자실체 생산성을 비교한 결과 무성포자 생산배지의 수분함량이 60%일 때 가장 많은 자실체를 생산하였다.



수분함량(%)	50	60	70	80	90
포자수(/ml)	3.57×10^8	4.01×10^8	4.08×10^8	1.97×10^8	1.65×10^8
자실체 생산량(g)	2.2	3.5	2.6	1.8	1.8

앞의 실험결과인 수분함량 60%의 현미 20g 배지에 쌀겨 및 밀기울을 2%에서 10%까지 첨가한 경우 쌀겨를 8% 첨가하였을 때 가장 많은 포자수를 얻을 수 있었으며 밀기울의 경우 오히려 포자수가 감소하였다. 반면에 이를 평균으로 사용하였을 때 밀기울을 8% 첨가하였을 때 자실체 생산량이 가장 많음을 알 수 있었다.



첨가량(%)	2	4	6	8	10	
쌀겨	포자수	2.30×10^8	2.64×10^8	2.96×10^8	5.86×10^8	1.69×10^8
	자실체 생산량	2.9	3.2	2.8	3.6	4.1
밀기울	포자수	1.95×10^8	1.75×10^8	3.27×10^8	3.87×10^8	3.68×10^8
	자실체 생산량	4.0	2.6	3.1	4.5	3.1

또한 쌀겨와 밀기울의 비율을 전체배지의 10%로 정하고 혼합하였을때의 경우 전

체적으로 쌀겨와 밀기울을 단독으로 사용하였을 때와 큰 차이를 보이지 않았다.



쌀겨 : 밀기울	7:3	5:5	3:7
포자수(/ml)	3.0×10^8	2.53×10^8	3.9×10^8
자실체 생산량(g)	3.6	4.1	-

마지막으로 수분 60%의 현미 20g 배지에 효모추출물을 첨가하였을 때 포자수는 감소하였으나 자실체 생산량은 큰 차이가 없었다.



쌀겨 : 효모추출물	5:1	2:1	1:1
포자수(/ml)	1.17×10^8	2.73×10^8	1.46×10^8
자실체 생산량(g)	3.6	3.0	2.7

결과적으로 무성포자의 수를 검토한 후 이를 평균으로 사용했을 때 자실체의 생산성을 검토한 결과 무성포자의 생산량은 수분함량 60%의 현미 20g에 쌀겨를 8% 첨가하였을 때 가장 많았으나 이를 평균으로 사용하였을 때 쌀겨 대신 밀기울을 8% 첨가하였을 때 가장 많은 자실체를 얻을 수 있었다.

2) 액체배양에서 생산된 균사체 접종에 의한 자실체 형성

각각의 250ml 삼각플라스크에 100ml의 Potato Dextrose Broth에 포자현탁액 2×10^8 conidia/ml을 접종하여 25°C에서 10일간 배양한 다음 배양일수에 따른 균사체의 형성량을 검토한 후 이를 평균으로 사용했을 때 자실체의 생산성을 비교 검토한 결과 균사체량에 따라 자실체 생산량이 비례한다는 것을 알 수 있었으며 무성포자에 의한 자실체 생산량보다는 액체배양에서 생산된 균사체 접종에 의한 자실체 형성량이 많다는 것을 알 수 있었다.

배양일	균사체 생산량 (g)	자실체 생산량 (g)
3일	0.4808	18.5
4일	0.4150	18.0
5일	0.7289	22.3
6일	0.6567	21.0
7일	0.7084	24.6
8일	0.8908	25.0
9일	0.8521	23.9
10일	0.9671	24.7

제 4 절. 연구성과

1. 특허(국내)

윤철식, 박현수, 이찬. 백강균의 균생자체로부터 분생자병속을 형성하는 방법, 출원번호 10-2002-0080367 출원일 : 2002.12.16

2. 국제학술지 논문발표

CS. Yoon, K.W. Yoo, H.W. Song, H.S. Park, and C. Lee. Chemical properties and physical activities of synnemata of *Beauveria bassiana*. J. Microbiol. Biotechnol.13(1), 125-133 (2003, 2)

3. 국내학술지 논문발표

배송환, 이찬, 이석원, 윤철식, 정수현, 백강균 자실체의 첨가가 제면적성에 미치는 영향, Korean J. Food. & Nutr. 16(2), 158~164 (2003)

배송환, 이찬, 이석원, 윤철식, 정수현, 백강균 자실체 첨가가 제빵적성에 미치는 영향, Korean J. Food & Nutr. (in preparation)

4. 국제 학술대회 포스터 발표.

Kwang-Won Yu, Hyung-Ju Suh, Song-Hwan Bae, Chan Lee, SunHyun Kim and Cheol-Sik Yoon, Chemical properties and physiological activities of stromata of *Beauveria bassiana*, Abstracts 14-8(11th World Congress of Food Science and Technology) 2001.

Effect of synnemata of *Beauveria bassiana* Flour on the Properties of Noodle and the Baking Qualities of Bread. 2003 IFT annual meeting. USA Abstract 19115

마. 국내 학술대회 포스터 발표

1) 백강균 자실체 첨가 제면제조 및 가공특성. 2002년도 한국식품과학회 제 69회 학술총회 일시 : 2002. 10. 24-26. P3-48

2) 백강균 자실체 첨가 제빵 가공 특성. 2002년도 한국식품과학회 제 69회 학술총회 2002. 10. 24-26. P3-49

바. 연구결과 및 업적 홍보사항

1) 한국경제신문(벤처/중기) 게재일:2001-10-29

자연산 '백강균 동충하초' 대량생산방법 나왔다

자연상태로만 존재하는 것으로 알려졌던 "백강균(Beauveria bassiana)동충하초"를 대량 생산하는 방법이 국내 연구진에 의해 개발됐다. 백강균 동충하초는 지난 1835년 이탈리아의 보베리아 바시아나에 의해 실체가 규명된 곤충병원성 곰팡이로 허준의 동의보감 등에서는 약리효과가 탁월한 약재로 소개되고 있다.

미생물 연구기업인 마이코플러스(대표 윤철식 고려대학교수)는 "중앙대 이찬 교수와 공동으로 백강균 동충하초의 자실체(子實體)를 형성하는 균주의 성격을 처음으로 밝혀냄에 따라 백강균 동충하초를 인공적으로 대량 생산하는 길을 열었다"고 28일 발표했다. 또 "자실체의 성분을 분석한 결과 면역 활성화, 유해 미생물 억제,혈액 응고에 탁월한 효과를 지닌 것으로 나타났다"고 밝혔다.

윤철식 대표는 "국제학술지인 '마이크로바이올로지 및 바이오테크놀로지 저널'에 이 결과를 보고할 예정"이라며 "조만간 백강균 동충하초의 서식환경과 균주를 특허 출원할 계획"이라고 말했다.

윤 대표는 또 "영남대 의대 정희창 교수와 공동으로 백강균 동충하초의 임상실험 및 이를 이용한 신약개발을 추진키로 했다"고 덧붙였다. 그는 이어 "자라는 환경에 변화를 주면 백강균으로부터 다양한 약리작용을 가진 동충하초를 재배할 수 있다"며 "백강균 동충하초는 차세대 신약개발 물질로 활용할 수 있을 뿐 아니라 이의 수요가 크게 늘 경우 농가소득을 높이는 데도 도움을 줄 수 있다"고 말했다.

(02)928-5523~4

김태철 기자 synergy@hankyung.com

2) 매일경제 과학기술/정보통신 2001/12/03 11:04

마이코플러스, 백강 버섯 인공재배 성공

<장욱> 동의보감에서 당뇨 강하에 효과가 있는 것으로 알려진 백강균(균 사체)을 이용해 버섯을 인공으로 재배하는데 성공했다.

마이코플러스 (대표 윤철식 고려대교수)와 중앙대학교 이찬 교수 공동 연구팀은 농림부의 연구비를 지원받아 최초로 백강균의 자실체(버섯)를 형성하는 균주와 배지성분을 개발했다고 3일 밝혔다.

백강균은 1835년에 이태리 학자인 바시(Bassi)에 의해 동충하초를 포함하는 곤충병원성 곰팡이 중 가장 먼저 발견된 것으로 지금까지 전세계적으로 많은 연구가 진행되고 있지만 아직 자실체를 밝혀내지 못하고 있다. 연구팀은 나아가 자실체의 약리효과를 실험한 결과, 혈액항응고 활성이 기준치보다 1.5배의 효과를 보인다는 것과 이외에도 장관면역활성(장내 유해 미생물 죽이는 것), 항보체활성(전반적인 면역계 활성) 등의 생리 활성을 확인했다.

윤 교수는 "이번 연구 결과는 세계적으로도 지대한 관심의 대상이 되고 있다"며 "이는 150년 이상 베일에 감춰졌던 백강균의 비밀을 완전히 풀 수 있는 계기가 됐다는 점에서 학문적으로도 의미가 있다"고 설명했다.

그는 "나아가 백강균으로부터 새로운 버섯을 대량 생산할 수 있게 돼 신약 개발뿐만 아니라 농가가 소득을 높일 수 있는 계기도 아울러 마련하게 됐는데 이번 연의 또 다른 의미를 찾을 수 있다"고 덧붙였다.

마이코플러스는 앞으로 제품화를 위해 영남대학교 의대의 정희창 교수, 박종민 박사와 공동으로 임상실험과 신약개발을 식품회사인 닥터즈 메디코아(대표 김수경)와 전략적 제휴를 체결, 자실체를 상품화 추진 중에 있다.

제 4 장. 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

제 1 절. 연구개발목표의 달성도

구 분	평가의 착안점 및 달성도	
	착 안 사 항	달 성 도 (%)
1차년도(2000)	○자실체 생산여부	100
	○백강균 자실체 배지선정	100
	○생리활성물질 추출	100
	○생리활성 규명	100
	○식품 소재의 응용성	100

구 분	평가의 착안점 및 달성도	
	착 안 사 항	달 성 도 (%)
2차년도(2001)	○추출조건 및 방법확립 여부	100
	○생리활성 물질의 정제 여부	75
	○백강균 자실체 생산 조건	100
	○자실체 대량 생산 가능성	100
	○기능성 식품 소재화	100

구 분	평가의 착안점 및 척도	
	착 안 사 항	달 성 도 (%)
3차년도(2002)	○ 생리활성 물질의 정제 여부	100
	○ 생리활성물질의 특성 분석	100
	○ 기능성 식품의 소재화	100
	○ 자실체 대량생산의 공정 확립	100
	○ 자실체 대량생산을 위한	100
	중균제조방법 확립	

제 2 절. 기여도

본 연구에서는 백강균 동충하초의 생리활성 규명, 백강균 동충하초 대량생산방법 개발 및 기능성 식품소재로서의 활용성 조사 등의 연구과정을 수행하였다. 백강균의 균사체, 자실체 및 추출물은 면역 활성화, 유해 미생물 억제, 항보체 활성, 혈액 응고 등의 여러 가지 생리활성을 나타내었으며, 식품소재로서의 활용에 어려움이 없음을 밝혀 졌다.

백강균 동충하초는 지난 1835년 이탈리아의 보베리아 바시아나에 의해 실체가 규명된 곤충병원성 곰팡이로 허준의 동의보감 등에서는 약리효과가 탁월한 약재로 소개되고 있다. 이 연구에서 세계 최초로 백강균 동충하초의 자실체(子實體)를 형성하는 균주의 성격을 처음으로 밝혀냄에 따라 백강균 동충하초를 인공적으로 대량 생산하는 길을 열었으며 자라는 환경에 변화를 주면 백강균으로부터 다양한 약리작용을 가진 동충하초를 재배할 수 있음이 밝혀졌다. 이 결과로부터 백강균 동충하초는 차세대 신약개발 물질로 활용할 수 있을 뿐 아니라 이의 수요가 크게 늘 경우 농가소득을 높이는 데도 도움을 줄 수 있다. 이와 같은 연구 결과는 세계적으로도 지대한 관심의 대상이 되고 있으며 이는 150년 이상 베일에 감춰졌던 백강균의 비밀을 완전히 풀 수 있는 계기가 됐다는 점에서 학문적으로도 의미가 있다.

이 연구결과를 활용하고 제품화에 성공시 기업체 및 농가에 수익을 창출하며 관련산업에 학술적 및 산업적 정보를 제공하여 동중하초 분야에서 여러 가지 효과를 유도할 수 있다.

제 5 장. 연구개발결과의 활용계획

제 1 절. 기대효과 및 활용방안

1. 기대효과

- 국내토착 및 새로운 곰팡이소재인 백강균의 자실체 생산 및 활용 기술 확보
- 자실체를 이용한 유용물질 탐색, 분리, 정제, 특성분석 관련기술 확보
- 다양한 추출조건 별로 활성을 검색하는 기법의 도입
- 생리활성 물질의 신속간편 정량법 및 정제법의 도입
- 국내토착 유용 곰팡이자원의 발굴 및 자원화로 미생물자원의 경제적 가치 증대
- 백강균을 이용한 버섯 및 신약개발로 국내 농가 소득 증대뿐만 아니라 생명공학의 국가경쟁력 향상
- 국내 토착 동충하초자원 이용관련 새로운 산업군 창출 가능

2. 활용방안

백강균으로부터 동충하초 생산기술을 확립하여 부존자원이 절대적으로 부족한 우리나라의 곤충병원성곰팡이 자원화를 유도하며, 또한 자실체로부터 신기능 활성물질을 구명함으로써 식품소재, 의약품소재로 활용할 뿐만 아니라 새로운 동충하초를 개발할 수 있는 유용한 정보를 제공할 것이다. 또한 물질의 분리정제 기술, 구조확인 기술, 생리활성평가기술 등 다양한 기술도 산업체에서 이용할 수 있게 됨으로써 관련기업의 국제경쟁력을 향상시킬 수 있을 것이다. 또한 유용한 약리활성을 갖는 백강균 자실체의 재배기술을 응용하여 대단위 농가재배가 가능토록 유도하여 버섯류 재배 농가의 소득증대를 위해 활용할 것이다.

현재 대량생산을 위하여 농가와 재배 계약을 추진하고 있으며, 과제가 종료후 부터 10년동안 다양한 수익이 창출될 것으로 기대되고 있다.

제 6 장. 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

제 1 절. 동충하초의 국외 연구현황

Beauveria 와 *Cordyceps* 등의 곤충병원성 곰팡이들이 최근에 농작물의 병충해를 예방하기 위한 생약제로 개발되고 있다. 백강균과 유사한 종인 *Cordyceps* (Ascomycotina Pyrenomycetes Clavicipitales Clavicipitaceae) 은 자실체를 형성하는 곤충병원성 곰팡이로 알려져 있으며 우리가 흔히 동충하초라 부리는 자실체가 전통생약으로 사용되고 있다. 특히 *C. militaris* 는 세계여러곳에서 발견되고 개발되어져서 많은 연구자들의 관심의 대상이 되고 있다. 이 곰팡이의 생리활성 물질은 인간에게 다양한 약리효과를 나타내며 특히 glomerular mesangial cell proliferation 억제 (Zhao-Long 등 2000) 와 항암제 및 호르몬 조절 효과가 보고되고 있다 (Liu, 등 1997). 이 곰팡이의 생리활성 성분인 Cordycepin (3'-deoxyadenosine)은 DNA와 RNA 합성을 방해하며 (Cunningham 1950) fibrosarcoma 암세포에 대한 항암효과를 나타낸다(Hubbel 등 1985).

이에 반하여 백강균인 *Beauveria* 종은 *Cordyceps*의 불완전 세대로 알려져 있으며, 식물병원성 곤충에 대한 생물조절제로 사용되고 있다. *Beauveria bassiana* Vuillemin (Deuteromycotina: Hyphomycetes) 은 가장 흔하게 발견되는 곤충병원성 곰팡이이며, Lepidoptera (Phoofolo 등 2001) Hymenopterta (Harris 등 2000), Coleoptera (Mannion 2001) 등에 대하여 강력한 살충효과를 나타낸다. 쉬운 배양방법과 곤충에 대한 강한 살충작용으로 인하여 백강균 종은 병원성 곤충의 강력한 살충제로 사용되고 있다.

동충하초의 생리활성은 DNA와 RNA합성을 저해하고, 세포 분화를 촉진하며, 세포의 cytoskeleton의 분포를 변화시키는 cordycepin이 주요한 것으로 알려졌다 (Plagemann 등 1971). 그러나 이 물질은 protein kinase 활성 저해하며, 방광암, 대장암, 폐암과 fibrosarcoma에 대한 항암효과가 있는 것으로 알려졌다. 또한 감염을 억제하고, type I HIV의 reverse transcriptase activity를 억제하며(Montefiori 등 1989, Muller 등 1991), nucleic acid의 methylation을 저해하는 것으로 알려졌다.

최근에는 여러 동충하초에서 sarcoma 180의 성장을 억제하고 항암력을 보이는 다당류가 분리된 바 있다(Yamada, 1984). 그리고 *C. sinensis*의 자실체에서 fatty

acid compositions, adenosine, ergosteryl-D-glucopyranoside, 22-dihydroergosteryl-D-glucopyranoside 등의 생리활성 관련물질이 보고되고 있다.

중국 등에서는 다양한 형태의 동충하초가 식품첨가물 및 의약재료로 허가되었으며 동남아시아, 일본 등으로 수출이 되고 있다. 우리나라에서도 중국의 주요 수출 대상종의 하나가 되고 있다

제 2 절. 동충하초의 국내 연구현황

국내에서 전통적으로 백강균이 감염된 누에를 백강잠이라고 하는 전통적인 생약으로 이용이 되고 있으며 백강균이 가지고 있는 많은 잠재력에 대한 연구가 집중되고 있다. 그렇지만 실제로 생리작용을 나타내는 물질에 대한 규명이 아직 미흡한 실정이다.

곤충병원성 곰팡이의 분류 전문가 및 지원 부족으로 **국내 곤충병원성곰팡이자원 정보 및 분류체계 미흡**하며 현재 농가에서 생산하고있는 동충하초는 **번데기동충하초(*C. militaris*)와 누에동충하초(*P. tenuipes*)**에만 국한되어있다. 생리활성물질에 관한 연구는 누에동충하초(*P. tenuipes*)가 면역력 증강, 항피로, 항노쇠 및 항암작용 등이 있음을 확인하였으나 **구체적인 선도물질은 규명되지 않았다.**

최근 동충하초에 대한 국민의 관심이 증대되고 있으며 이를 계기로 동충하초를 재배하는 버섯농가의 수가 증가하고 동충하초의 종류가 다양해지고 있다.

제 7 장. 참고문헌

1. Borel, J.F., Feurer, C., Gubler, H.U. , Staelin, H. 1976 Biological effects of cyclosporin A: a new antilymphocytic agent. *Agents Acti ons*, 6:468.
2. B ores, G. M., F. P. HUGer, W. Petko, A. E. Mutilib, F. Camacho, D. K. Rush, D. E. Selk, V. Wolf, R. W. Kosley, L. Davis, and H. M. Vargas. 1996. Pharmacological evaluation of novel Alzheimer's disease therapeutics: Acetylcholinesterase inhibitors related to galanthamine. *J. Pharmacol . Exp. Ther.* 277: 728-738.
3. Chemnitiu, J. M., K. H. Haselmeye, B. D. Gonska, H. Kreuzer, and R. Zech. 1996. Indirect parasympathomimetic activity of metochlopramide: reversible inhibition of cholinesterase from human central nervous system and blood. *Pharmacol. Res.* 34: 65-72.
4. Coyle, J. T., D. L . Price, and M. R. Delong. 1983. Alzheimer's disease: a disorder of cortical cholinergic innervation. *Science* 219: 1184-1190.
5. Cunningham K. G., W. Manson, F.S. Spring and S.A. Hutchinson: Cordycepin, metabolic product isolated from cultures of *Cordyceps militaris* (Linn.) Link. *Nature.* 166, p.949. 1950.
6. Cunningham K. G., S.A. Hutchinson, W. Manson and F. S. Spring: Cordyce pin, a metabolic product from cultures of *Cordyceps militaris* (Linn.) Link. Part I . Isolation and characterization. *J. Chem. Soc.* 2299-2300. 1951.
7. Glazer RI, Kuo JF: Inhibition effects of cordycepin on cyclic nucleotide-depe ndent and cyclic nucleotide-independent protein kinases. *Bio*
8. Harris R . J., S. J. Harcourt, T. R. Glare, E. A. Rose, and T. J. Nel son. 2000. Susceptibility of *Vespula vulgaris* (Hymenoptera: vespidae) to generalist entomopathogenic fungi and their potential for wasp control. *J. Invertebr. Pathol.* 75: 251-258.
9. Hirsh, J. and V. Fuster. 1994. Guide to anticoagulant therapy Part I: Heparin. *Circulation* 83: 1449-1468. *chem Pharmacol* 26:1287-1290, 1977.
10. Hubbell HR, Pequignot EC, Willis DH, Lee C, Suhadolnik RJ: Differen tial

antiproliferative actions of 2', 5' oligo A trimer core and its cordycepin analogue on human tumor cells. *Int J Cancer* 36:389-394, 1985.

11. James, S. P. and M. Zeitz. 1994. Human gastrointestinal mucosal T cells, pp.275-285. *In* L. O. Pearay, M. Jiri, E. L. Michael, S. Warren, R. M. Jerry, and B. John (eds.), *Handbook of mucosal immunology*. Academic Press, London, England.

12. Jianzhe, Y., Xiaolan, M., Qiming, M., Yichen, Z. and Huaan, W.: Icons of medicinal fungi from China. Science Press. China. p.575, 1989.

13. Kagamizono T. , E. Nishino, K. Matsumoto, A. Kawashima, M. Kishimoto, N. Sakai, B. M. He, Z. X. Chen, T. Adachi, S. Morimoto and K. Hanada , 1995. Bassiatin, a new platelet aggregation inhibitor produced by *Beauveria bassiana* K-717. *J. of Antibiot.* 48:1407-1412.

14. Klaus, G. G. B. and J. H. Humphrey. 1977. The generation of memory cells. I. The role of C3 in the generation of B memory cells. *Immunol.* 33: 31-38.

15. Kobayasi, Y. and Shimizu, D.: Iconography of vegetable wasps and plant worms. Hoikusha Publishing Company Ltd. Osaka, p.280, 1983.

16. Kobayasi, Y.: Keys to the taxa of the genera *Cordyceps* and *Torrubiella*. *Trans. Mycol. Soc. Japan* 23:329-364, 1982.

Liu, J., S. Yang, X. Yang, Z. Chen, and J. Li. 1997. Anticarcinogenic effect and hormonal effect of *Cordyceps militaris* Link. *Chung Kuo Chung Yao Tsa Chih.* 22: 111-113.

17. Mannion C. M. , W. McLane, M. G. Klein, J. Moysenko, J. B. Oliver, and D. Cowan. 2001. Management of early-instar Japanese beetle (*Coleoptera: Searabaeidae*) in field-grown nursery crops. *J. Econ. Entomol.* 94: 1151-1161.

18. McGeer, P. L. and E. G. McGeer. 1995. Alzheimer's disease: Arthritis of the brain?. *Drug News Perspect* 8: 80-83.

19. Montefiori DC, Sobol RW Jr, Li SW, Reichenbach NL, Suhadolnik R J, Charubala R, Pfliderer W, Modliszewski A, Robinson WE Jr, Mitchill WM: Phosphorothioate and cordycepin analogues of 2',5'-oligoadenylate: Inhibition of human immunodeficiency type I reverse transcriptase and infection in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 7191-7194, 1989.

20. Muller WEG, Weiler BE, Charubala R, Pfliderer W, Lserman L. Sobol RW,

- Suhadolnik RJ, Schroder HC: Cordycepin analogues of 2',5'-oligo -adenylate inhibit human immunodeficiency virus infection via inhibition of reverse transcriptase . *Biochemistry* 30:2027-2033, 1991.
21. Nelson, R. A. 1953. The immune adherence phenomenon. An immunologically specific reaction between microorganism and erythrocytes leading to enhanced phagocytosis. *Science* 118: 733-735.
22. Novar Fernandez A, Leroy F: Inhibition of nucleic acid methylation by cordycepin. *J. Biol. Chem.* 255: 7380-7385, 1980.
23. Ohigashi, H., A. Murakami, Y. Nakamura, and K. Koshimizu. 1997. Anti-tumor promoters from edible Thai plants: Isolation cancer preventive potential, and action mechanism, pp. 188-193. *In* H. Ohigashi, T. Osawa, J. Terao, S. Watanabe, and T. Yoshikawa (eds.), *Food Factors for Cancer Prevention*. Springer, Tokyo, Japan.
24. Ohmori T, Tamura K, Tsuru S, Nomota K: Antitumor activity of protein-bound polysaccharide from *Cordyceps ophioglossoides* in mice. *Jpn. J. Cancer. Res.* 77:12 56-1263, 1986.
25. Perchellet, J. P., E. M. Perchellet, H. U. Gali, and X. M. Gao. 1995. Oxidative stress multistage skin carcinogenesis, pp. 145-180. *In* H. Mukhtar (ed.), *Skin Cancer: Mechanism and Human Relevance*. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA.
26. Plagemann FG, Erbe J: Effect of 3'-deoxyadenosine(cordycepin) and 2'-deoxyadenosine on nucleoside transport, macromolecular synthesis, and replication of cultured Novikoff hepatoma cells. *Arch Biochem Biophys* 144:401-412, 1971.
27. Phoofolo M. W., J. J. Obrycki, and L. C. Lewis. 2001. Quantitative assessment of biotic mortality factors of the European corn borer (*Lepidoptera: Crambidae*) in field corn. *J. Econ. Entomol.* 94: 617-22
28. Samson, R.A., Evans, H. C., and Latge, J.P.: Atlas of Entomopathogenic Fungi. Springer. Heidelberg. p.189, 1988.
29. Skehan, P., R. Storeng, D.A. Scudiero, A.Monks, J.McMahon, D.T. Visca, J.Warren, H.Bokesch, S.Kenny and M.R.Boyd: New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer drug screening. *J. Natl. Cancer Inst.* 82, 1107-1112, 1990.

30. Song, C. H., Y. J. Jeon, B. K. Yang, K. S. Ra, and J. M. Sung. 1998. The anti-complementary activity of exo-polymers produced from submerged mycelial cultures of higher fungi with particular reference to *Cordyceps militaris*. *J. Microbiol. Biotechnol.* 8: 536-539.
31. Waldmann, H. and P. J. Lachmann. 1975. The failure to show a necessary role for C3 in the *in vitro* antibody response. *Eur. J. Immunol.* 5: 185-192.
32. Yamada H: Structure and antitumor activity of an alkali-soluble polysaccharides from *Cordyceps ophioglossoides*. *Carbohydr. Res.* 125:107-115, 1984.
33. Yamada, H., H. Kiyohara, J. C. Cyong, Y. Kojima, Y. Kumazawa, and Y. Otsuka. 1984. Studies on polysaccharides from *Angelica acutiloba*. I. Fractionation and biological properties of polysaccharides. *Planta Med.* 50: 163-168.
34. Yoon, C.S., Yun, C.Y. Lee, G.H. and Yu. J.K. First record of the entomopathogenic fungus *Zoophthora radicans* on the green peach aphid *Myzus persicae* in Korea. *The Korean J. of Mycology* 26: 399-402. 1998a.
35. Yoon, C.S. Sung, G.H., Choi, B.R., Yoo, J.K. Lee. J.O. The aphid-attacking fungus *Pandora neoaphidis* (Remaudière & Hennebert) Humber the first observation and its host range in Korea. *The Korean J. of Mycology* 26: 407-410. 1998b.
36. Yoon, C.S. Sung, G.H. Lee, G.H. Park, H.S. and Lee, J.O. *Entomophthora planchoniana* Cornu (Zygomycetes: Entomophthoraceae), the first observed pathogen of the green peach aphid *Myzus persicae* in Korea. *The Korean J. of Mycology* 26: 403-406. 1998c.
37. Yoon, C.S. Sung, G.H. Park, H.S. and Lee. J.O. Two entomopathogenic *Conidiobolus* species, first observed on the aphids in Korea. *The Korean J. of Mycology* 27: 63-65. 1999a.
38. Yoon, C.S. Sung, G.H. Lee, S.H. and Lee. J.O. First record of the entomopathogenic fungus *Neozygites fresenii* on the aphid in Korea. *The Korean J. of Mycology* 27: 66-67. 1999b.
39. Yu, K.W., H.J. Suh, S.H. B., C.S. Lee, S.H. Kim and C.S. Yoon, 2001. Chemical properties and physiological activities of stromata of *Cordyceps militaris*. *J.*

Microbiol. Biotechnol. 11: 266-274.

40. Yu, K.W., H. Kiyohara, T. Matsumoto, H. C. Yang, and H. Yamada. 1998. Intestinal immune system modulation polysaccharides from rhizomes of *Atractylodes lancea* . *Planta Med.* 64:714-721.

41. Zhao-Long, W., W. Xiao-Xia, and C. Wei-Ying. 2000. Inhibitory effect of *Cordyceps* and *Cordyceps militaris* on human glomerular mesangial cell proliferation by native LDL. *Cell Biochem. Funct* . 18: 93-97.

42. 윤철식 이정운, 유재기, 이영 옥, 이상계, 문기혁, 성기호. 국내 누에나방에서 분리한 백강균 CS-1 균주 및 그 백강균을 이용한 배추 좀나방의 방제방법 대한민국 특허 출원 제1997-51035호. 1997.

43. 윤철식, 장현우, 김광 포, 홍인표, 차동열. 흰목이버섯균의 공생균인 하이폭실론 루비지노섬 ASI6046 균주 및 이를 이용한 흰목이버섯의 인공재배 방법, 대한민국 특허출원 제1997-61138 호. 1997.

주 의

1. 이 보고서는 농림부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.