

박사학위논문

구름버섯 균사체 배양액 추출물의
생리활성 및 약용버섯 균사체의 배양특성

제주대학교 대학원

생명과학과

김택

2008년 12월

구름버섯 균사체 배양액 추출물의 생리활성
및 약용버섯균사체의 배양 특성

지도교수 : 오 덕 철

김 택

이 논문을 이학박사학위 논문으로 제출함

2008년 12월

김 택의 이학박사학위 논문을 인준함

심사위원장 _____

위 원 _____

위 원 _____

위 원 _____

위 원 _____

제주대학교 대학원

2008년 12월

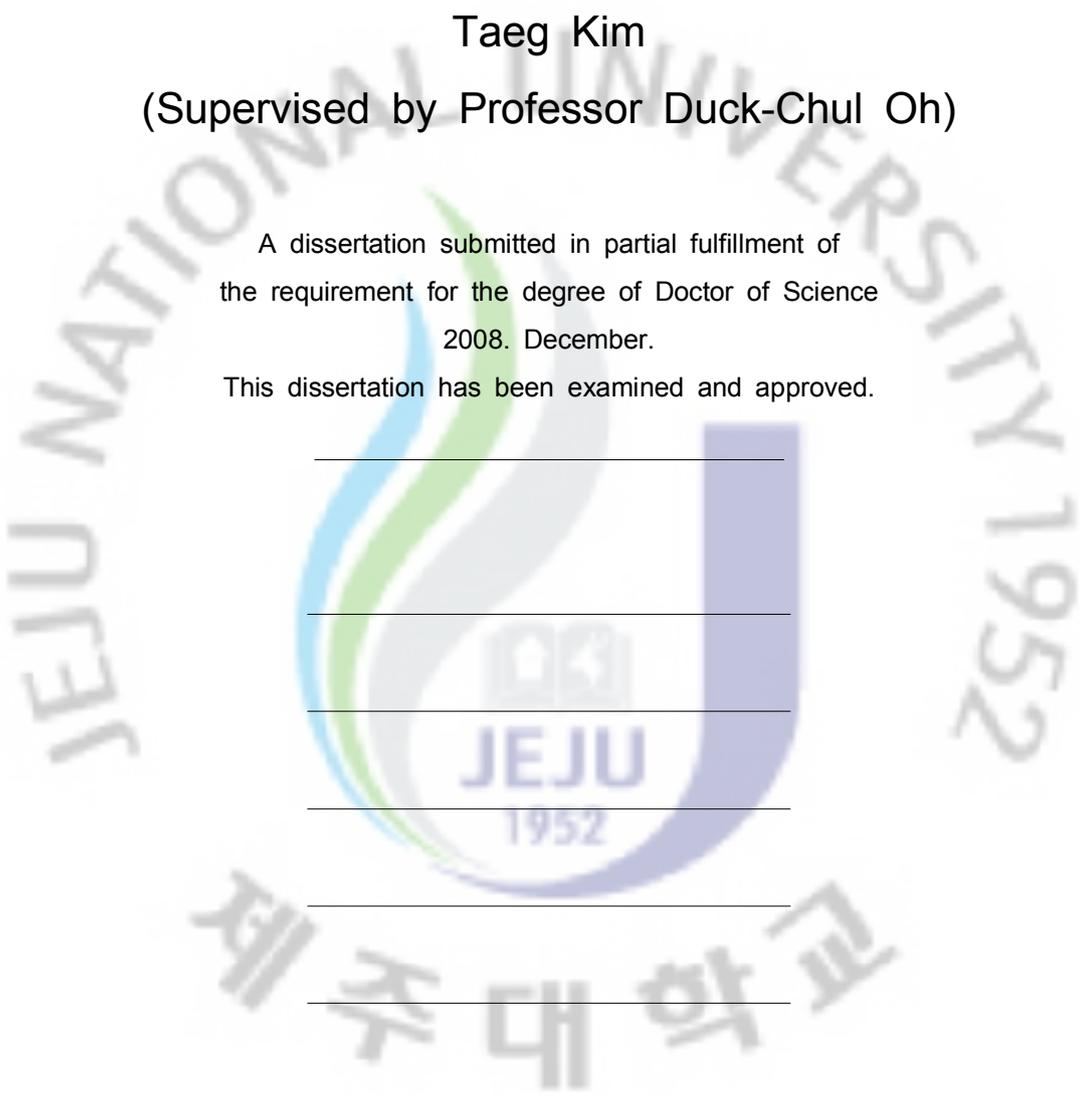
**Bioactivity of *Coriolus versicolor* Mycelium Culture
Extract and Culture Characteristics of Medicinal
Mushroom Mycelia**

Taeg Kim

(Supervised by Professor Duck-Chul Oh)

A dissertation submitted in partial fulfillment of
the requirement for the degree of Doctor of Science
2008. December.

This dissertation has been examined and approved.



DEPARTMENT OF LIFE SCIENCE
GRADUATE SCHOOL
CHEJU NATIONAL UNIVERSITY

목 차

List of Tables	iv
List of Figures	v
Abstract	ix
종합서론	1
제1장 감귤농축액배지에서 배양한 버섯균사체 배양액의 항산화 및 항균활성	6
1.1. 서론	6
1.2. 재료 및 방법	7
1.2.1. 사용 균종	7
1.2.2. 사용 배지	7
1.2.3. 배양방법 및 활성측정	7
1) 평판 배양	7
2) 액체 배양	9
3) 발효조 배양	9
4) 균사체의 건조중량	9
5) 추출물의 조제	9
6) 항균 활성 측정	9
7) 항산화 활성 측정	10
8) Superoxide radical(O_2^-) 소거 활성 측정	10
1.3. 결과 및 고찰	12
1.3.1. 버섯 균사체의 성장특성	12
1.3.2. 버섯 균사체 배양액의 항균활성	14
1.3.3. 항산화 활성 측정	17
1.3.4. Superoxide radical(O_2^-) 소거 활성	20
1.4. 요약	22
제2장 구름버섯균사체 배양추출물의 생리활성 및 분리정제	23
제1절 구름버섯균사체 배양추출물의 생리활성	23

2.1.1. 서론	23
2.1.2. 재료 및 방법	25
1) 감귤농축액과 YM배지에서의 구름버섯 균사체 배양	25
2) 발효조를 이용한 구름버섯균사체 배양 및 배양추출물의 제조	25
3) 암세포 배양 및 배양배지	25
4) 니트로사민 생성억제효과 측정	26
5) 암세포 생육저해능 측정	26
6) 항균력 측정	27
2.1.3. 결과 및 고찰	28
1) YM배지와 감귤농축액배지에서 구름버섯 균사체 성장 비교	28
2) 구름버섯 배양추출물의 아질산 제거 효과	30
3) 구름버섯 배양추출물에 의한 암세포 생육 저해 효과	32
4) 버섯 배양추출물에 의한 항균활성	34
5) 버섯 배양추출물에 의한 항생제 내성균에 대한 항균 활성	36
2.1.4. 요약	39
제2절 항균활성물질 분리정제	40
2.2.1. 서론	40
2.2.2. 재료 및 방법	42
1) 시험균주 배양	42
2) 항균 활성 측정	42
3) 항균 물질의 분리 및 정제	42
4) HPLC 분석	42
2.2.3. 결과 및 고찰	44
1) 다제내성균주에 대한 항균 활성	44
2) 항균 물질의 분리 및 정제	44
2.2.4. 요약	50
제3장 수종 약용 버섯균사체의 배양특성 및 혼합배양 특성	51
3.1. 서론	51
3.2. 재료 및 방법	53

3.2.1. 평판 배양	53
3.2.2. 액체 배양	53
3.2.3. 균총의 신장직경	53
3.2.4. 균사체의 건조중량	53
3.2.5. 세포의 다당체 함량	53
3.2.6. 영양 요구성	54
1) 탄소원	54
2) 질소원	54
3) 무기염류	54
4) 배양기간	54
3.3. 결과 및 고찰	55
3.3.1. 균사 생육환경 조건	55
1) 최적 온도	55
2) pH	55
3) 영양요구성	58
4) 배양 기간	73
3.3.2. 혼합배양의 배양적 특성	77
1) 혼합 배양의 적정 접종량	77
2) 감귤 농축액 농도별 균체량 변화	77
3) 탄소원 첨가 효과	80
4) 통기 조건	80
5) 교반 속도 영향	85
3.4 요약	86
종합고찰	87
참고문헌	90
종합요약	99

List of Tables

Table 1-1. List of fungal species used in this study	8
Table 1-2. Antibacterial activities of the extract of YM media on fish pathogenic bacteria after cultivation of different fungal speceis	15
Table 1-3. Antibacterial activities of the extract of citrus media on fish pathogenic bacteria after cultivation of different fungal speceis	16
Table 2-1. Antibacterial activities of the mycelial culture extracts of <i>Coriolus versicolor</i> , <i>Phellinus linteus</i> , and <i>Hericium erinaceus</i> against Korean isolates of livestock diarrhea-causing bacteria	35
Table 2-2. Antibacterial activities of the mycelial culture extracts of <i>Coriolus versicolor</i> , <i>Phellinus linteus</i> , and <i>Hericium erinaceus</i> against antibiotic resistant bacterial strains	37
Table 2-3. Antibacterial activities of the ethyl acetate extract of <i>Coriolus versicolor</i> liquid cultures grown in 10% citrus medium against antibiotic resistant bacterial strains.	46

List of Figures

Figure 1-1. Effect of media on the mycelial growth and exo-polysaccharide formation of different fungal species. 3.2.3.	13
Figure 1-2. Electron donating activity of YM media after cultivation of different fungal speceis	18
Figure 1-3. Electron donating activitiy of the extract of citrus media after cultivation of different fungal speceis	19
Figure 1-4. SOD-like activity of the extract of YM and citrus media after cultivation of different fungal speceis	21
Figure 2-1. Comparison of the mycelial growth of <i>Coriolus versicolor</i> in the YM medium and the citrus medium.	29
Figure 2-2. Comparison of nitrite scavenging activity of <i>Coriolus versicolor</i> culture extracts obtained from the YM medium and the citrus extract medium.	31
Figure 2-3. Inhibition of cancer cell growth by <i>Coriolus versicolor</i> culture extracts obtained from the YM medium and the citrus medium.	33
Figure 2-4. Antibacterial activities of the mycelial culture extracts of <i>Coriolus versicolor</i> , <i>Phellinus linteus</i> and <i>Hericium erinaceus</i> against	

Korean isolates of livestock diarrhea-causing bacteria and antibiotic resistant bacterial strains.	38
Figure 2-5. Procedure for extraction and purification of antibiotic substance from the <i>Coriolus versicolor</i> mycelial liquid cultures grown in 12% citrus medium.	43
Figure 2-6. Antibacterial activities of the ethyl acetate extract of the mycelial liquid cultures of <i>Coriolus versicolor</i> grown in 12% citrus medium against Korean isolates of antibiotic resistant bacterial strains.	47
Figure 2-7. Antibacterial activities of each fraction eluted from the silica gel column.	48
Figure 2-8. HPLC analysis of the most active fraction from the Silica Gel 60 column for evaluating the degree of purification.	49
Figure 3-1. Effect of temperature on mycelial growth of different fungal species.	56
Figure 3-2. Effect of pH on mycelial growth of different fungal species.	57
Figure 3-3. Effect of various carbon sources on the mycelial growth of <i>Coriolus versicolor</i> , <i>Agaricus blazei</i> and <i>Cordyceps militaris</i>	60
Figure 3-4. Effect of various carbon sources on the mycelial growth of <i>Phellinus linteus</i> , <i>Inonotus obliquus</i> and <i>Sparassis crispa</i>	61

Figure 3-5. Effect of various carbon sources on the mycelial growth of <i>Ganoderma lucidium</i> , <i>Hericium erinacium</i> and <i>Lentinus edodes</i>	62
Figure 3-6. Effect of various nitrogen sources on the mycelial growth of <i>Coriolus versicolor</i> , <i>Agaricus blazei</i> and <i>Cordyceps militaris</i>	66
Figure 3-7. Effect of various nitrogen sources on the mycelial growth of <i>Phellinus linteus</i> , <i>Inonotus obliquus</i> and <i>Sparassis crispa</i>	66
Figure 3-8. Effect of various nitrogen sources on the mycelial growth of <i>Ganoderma lucidium</i> , <i>Hericium erinacium</i> and <i>Lentinus edodes</i>	67
Figure 3-9. Effect of various mineral salt on the mycelial growth of <i>Coriolus versicolor</i> , <i>Agaricus blazei</i> and <i>Cordyceps militaris</i>	70
Figure 3-10. Effect of various mineral salt on the mycelial growth of <i>Phellinus linteus</i> , <i>Inonotus obliquus</i> and <i>Sparassis crispa</i>	71
Figure 3-11. Effect of various mineral salt on the mycelial growth of <i>Ganoderma lucidium</i> , <i>Hericium erinacium</i> and <i>Lentinus edodes</i>	72
Figure 3-12. Effect of culture period on mycelial growth of different fungal species.	75
Figure 3-13. Effect of media on the mycelial growth and exo-polysaccharide of different fungal species.	76
Figure 3-14. Effect of mycelial growth of <i>Coriolus versicolor</i> and <i>Phellinus</i>	

<i>linteus</i> mixed culture in inoculate of 5L jar fermenter.	78
Figure 3-15. Effect of inoculum amount on mycelial growth of <i>Coriolus versicolor</i> and <i>Phellinus linteus</i> mixed culture in 5L jar fermenter.	79
Figure 3-16. Effect of citrus extract concentrate on the mycelial growth of <i>Coriolus versicolor</i> and <i>Phellinus linteus</i> mixed culture in 5L jar fermenter.	81
Figure 3-17. Effect of various carbon sources additive on the mycelial growth of <i>Coriolus versicolor</i> and <i>Phellinus linteus</i> in 5L jar fermenter.	82
Figure 3-18. Effect of aeration rate on mycelial growth of <i>Coriolus versicolor</i> and <i>Phellinus linteus</i> in 5L jar fermenter.	83
Figure 3-19. Effect of agitation speed on mycelial growth of <i>Coriolus versicolor</i> and <i>Phellinus linteus</i> in 5L jar fermenter.	84

Abstract

Species of the mushroom mycelium were grown in a defined synthetic liquid medium (YM) and dilute citrus extracts for culture characteristics, antioxidant activity, antibacterial activity, superoxide radical scavenging activity.

Coriolus versicolor, *Lentinus edodes*, *Cordyceps militaris*, *Agaricus blazei*, followed by fast growth and *Sparassis crispa* was the late for 15 days.

After culture weight of dried cells was *Lentinus edodes*, *Ganoderma lucidum*, *Coriolus versicolor*, and exo-polysaccharide was formed by *Lentinus edodes*, *Hericium erinacium*, *Coriolus versicolor*, *Cordyceps militaris*.

The antibacterial activity of the culture extracts obtained from the YM medium was *Sparassis crispa* > *Coriolus versicolor* > *Phellinus linteus* > *Agaricus blazei* > *Hericium erinacium* and the culture extracts obtained from the dilute citrus extracts medium was got similar results.

The culture extracts obtained from the *Sparassis crispa* showed 80% of the DPPH radical scavenger activity in 1mg/mL and all culture extracts showed 40% of the DPPH radical scavenger activity over 5mg/mL. Also culture extracts obtained from the *Sparassis crispa* showed over 70% of the enzyme activity by superoxide radical scavenging activity. Overall culture extracts showed BHA, synthetic anti oxidizing agent, higher than the enzyme activity.

Coriolus versicolor was grown in a defined YM medium and citrus extracts, and the culture extracts were examined for antioxidant activity, nitrite scavenging activity, and *in vitro* anticancer activity against HeLa (female cervix adenocarcinoma), PC-3 (male prostate adenocarcinoma), HepG2 (human hepatoblastoma) and A-549 (male lung carcinoma) cells. Whereas the

culture extracts obtained from the YM medium and the un-inoculated citrus extract showed 60 and 22% of the DPPH radical scavenger activity, the culture extracts obtained from the citrus medium exhibited antioxidant activity up to 89%. The nitrite scavenging activity of the culture extracts obtained from the citrus medium and the YM medium, and the un-inoculated citrus extract at pH 1.2 were up to 67, 55, and 34%, respectively. the culture extract obtained from the YM medium inhibited the growth of HeLa, PC-3, HepG2, and A-549 up to 66, 23, 18, 10% at 48 hr of incubation, respectively; however, the culture extract obtained from the citrus medium inhibited the growth of HeLa, PC-3, HepG2, and A-549 up to 75, 82, 55, and 82%, respectively. As a negative control, the un-inoculated dilute citrus extract was examined in the same way and inhibited the growth of HeLa, PC-3, and HepG2 cells 20, 6, and 15% at 48 hr of incubation, respectively; the inhibition of A-549 cell growth was negligible. These results clearly showed that the fermentation of *Coriolus versicolor* in the dilute citrus extracts rather than in the defined YM medium significantly enhanced the anticancer activity, antioxidant activity, and nitrite scavenging activity.

The ethyl acetate extracts from the liquid cultures of *Coriolus versicolor*, *Phellinus linteus*, and *Hericium erinaceus* showed significant antibacterial activities against *E. coli* K88, *E. coli* K99, *E. coli* 987P, and *Salmonella typhimurium* 14058 which are known to cause bacterial diarrhea in Korean house pigs and chicken. Of these extracts, *Coriolus versicolor* extract showed the highest antibacterial activity. In addition, these extracts also showed significant growth inhibition against *Staphylococcus aureus* CARM3230 and *E. coli* CARM1381 which are known as kanamycin and ampicillin-resistant strains, with the highest activity by the *Coriolus versicolor* extract. These results showed that the mushrooms extracts could be developed as a livestock feed additives that can replace or, at least, reduce the intensive use of commercial antibiotics, and also could be a good source for the

development of a new antibacterial agent.

The liquid culture extract of *Coriolus versicolor* grown on citrus medium was prepared by directly boiling the whole culture broth on day 7 of the growth and then removal of mycelial debris through filtration. This extract was further extracted with equal volume of ethyl acetate (1:1, v/v). The ethyl acetate extracts showed significant antibacterial activities against *Staphylococcus aureus* CCARM3230 and *Pseudomonas aeruginosa* CCARM2171, which are resistant to several antibiotics. The most active fraction was eluted from a silica gel column with a mixture of dichloromethane and methanol (9:1, v/v) and the purity of this active substance was confirmed by HPLC analysis. The results suggest that the purified active substance could be a good source for the development of a new antimicrobial agent, especially for the treatment of antibiotic resistant bacteria.

The optimal culture condition of *Phellinus linteus*, *Cordyceps militaris*, *Coriolus versicolor*, *Sparassis crispa*, *Agaricus blazei*, *Inonotus obliquus*, *Lentinus edodes*, *Hericium erinacium*, *Ganoderma lucidium* showed about 25°C, pH 4.5~6.5. Manitol, mannose, sucrose, soluble starch, maltose, glucose has been as a variety of carbon source and yeast extract, malt extract has been used to nitrogen source, mostly K₂HPO₄ was used as a mineral source. *Lentinus edodes* has been used to CaCl₂ for mineral source.

Mixing culture condition of *Phellinus linteus* and *Coriolus versicolor* showed that after 3 days of cultured respectively and the rate of mixing 1:2 have been high level of growth and production of exo-polysaccharides.

The antibacterial activity of the culture extracts obtained from the YM medium and the mixing culture extracts obtained from the dilute citrus extracts medium were similar results.

서 론

버섯은 주로 죽은 나무나 유기질을 함유한 기질에 생육하면서 다양한 세포의 효소를 분비하여 필요한 영양분을 조달하는 고등균류로서 자연에는 수많은 식용 가능한 버섯이 생육하고 있고(성 등, 1998), 자연 생태계의 유기물 분해자로서 중요한 역할을 할 뿐만 아니라 예로부터 인류 생활과는 밀접한 관계를 유지해 오고 있다(Chang, 1999).

버섯중의 생리 활성 물질에 관한 연구로는 항균 및 항바이러스, 항종양, 항변이원성, 혈압강하, 혈당강하, 항혈전, 신경계 작용 및 항염증등의 활성물질등이 보고되었다(Mizuno, 1992).

버섯의 항균활성물질에 관한 연구로는 Kavanagh *et al.*(1949)이 낙엽버섯의 일종인 *Marasmius conigenum*으로부터 그람양성균에 대해 강한 항균활성을 보이는 marasmic acid A, B, C를 분리한 이래 현재까지 약 100여종 이상의 항생물질이 보고되었으며, *Marasmius scorodoni*의 scorodonin(Anke *et al.*, 1980)과 *Aleurodiscus roseus*의 marasin(Cambie *et al.*, 1963)이 각각 방선균, 세균, 곰팡이 및 효모에 대하여 광범위한 활성을 가지는 것으로 보고되어 있다. 뽕나무버섯(*Armillaria mellea*)으로부터 melleolide(Midland *et al.*, 1982), 흰구멍버섯(*Poria medullaepanis*)으로부터 pereniporins A, B(Kida *et al.*, 1986), 구름버섯류의 일종인 *Coriolus consors*와 *Coriolus versicolor*에서 coriolin(Kupka *et al.*, 1979), 변테기동충하초(*Cordyceps militaris*)에서 cordycepin(Iinuma *et al.*, 1983), 노루궁뎅이버섯(*Hericium erinaceus*)에서 chlorinated orcinol 유도체(Okamoto *et al.*, 1993), 표고버섯(*Lentinus edodes*)추출물의 항균활성(Kim *et al.*, 2003)등이 보고된 바 있다.

버섯중 항암성분에 관한 연구로는 다당체 또는 단백질 다당체의 항암효과에 대한 연구가 주로 이루어지고 있는데 항암 성분에 관한 연구는 Roland *et al.*(1960)이 *Calvatia gigantea*로부터 분리한 calvacine의 항암효과를 보고함으로써 본격적으로 시작되었다. 버섯균사체의 항종양 단백질다당류는 일반적인 화학요법제와는 달리 정상 세포에 독작용을 나타내지 않을 뿐만 아니라 오히려 면역기능을 강화

함으로써 항암력을 발휘하는 것으로 알려져 있다. 그 대표적인 예로 구름버섯의 배양균사체와 표고의 자실체에서 분리한 성분은 항체 생성능력 및 지연성 과민 반응 능력을 회복시키며(Nomoto *et al.*, 1975), 세포매개성 면역반응을 촉진시키는 등의 면역활성이 입증되어 항종양제로 널리 사용되고 있다.

버섯균사체의 액체배양은 저비용으로 균일한 품질의 균사체를 대량생산할 수 있으며, 이로부터 유용물질의 추출, 분리가 간편하여 고부가가치의 생리활성물질의 생산이 가능하다고 보고되었다(Gento, 1979; Humfeld, 1948). 버섯균사체 추출물 중 생리활성을 나타내는 성분으로는 주로 항생물질과 같은 저분자의 활성물질과 다당류 또는 단백질다당류 등의 고분자 물질로 대별된다. 특히, 고분자물질의 경우, 그 활성정도는 고분자물질의 평균분자량, 구조 및 용해도 등에 따라 차이가 있으며, 이들 성분 중에서도 대표적인 것이 β -D-glucan(Mizuno *et al.*, 1982)으로 난치병인 암 등에 효과가 있음이 알려져 있다.

구름버섯(운지버섯)은 protein-bound polysaccharide라는 polysaccharide-K(krestin)가 함유되어 있으며 그 중에서 glucose, mannose 등의 주종을 이루는 5종의 당과 Asp, Glu 및 Leu등이 주종을 이루는 15종의 아미노산으로 구성된 proteoglycan(Tsukagoshi and Ohashi, 1974; Mauet *et al.*, 2001) 및 스테로이드등이 보고(Kim, 1978) 되었고 이 성분들은 항바이러스, 항세균 및 항암효과를 나타냈다는 연구가 보고 되었다.

버섯으로부터 단백질다당체는 표고버섯(*Lentinus edodes*)의 lentinan(Chihara *et al.*, 1970), 구름버섯(*Coriolus versicolor*)의 krestin(Tsukagoshi and Ohashi, 1974), 치마버섯(*Schizophyllum commune*)의 schizophyllan(Komatsu *et al.*, 1969) 및 목질진흙버섯(*Phellinus linteus*)의 mesima(Song *et al.*, 1995) 등이 있으며 잎새버섯(*Grifola frondosa*)의 D-grifolan(Ohno, *et al.*, 1984)과 같은 다당체가 있으며, 현재 항암 및 면역요법제 등으로 널리 사용되어지고 있다. 이 중에서 종양 저지율은 표고버섯이 80.7%, 구름버섯이 77.5%, 영지버섯이 64.9%이며, 목질진흙버섯(상황버섯)이 96.7%로 가장 높다고 보고되었다(Shibata *et al.*, 1968). 이러한 항암효능을 나타내는 항암활성 다당류의 구조는 Mizuno *et al.*(1982)에 의하여 β -(1-6)-glucosyl의 분지를 가진 β -(1,3)-D-glucan임이 밝혀졌다. 평균분자량은 50-200만 dalton이고, 비선광도는 $[\alpha]_D +80 \sim 20^\circ$ 인데, 분자량, 분지도

및 수용성의 정도 등이 항암활성에 영향을 미치는 것으로 알려지고 있다(Sone *et al.*, 1985). 이와 같은 항암활성 다당류를 얻는 방법에는 고체배양에 의해 생산된 버섯자실체로부터 유기용매를 이용하여 추출하여 얻는 방법(Usui *et al.*, 1981)과 액체배양에 의해 배양된 균사체나 배양여액으로부터 유용물질을 추출, 분리하여 얻는 방법(현 등, 1990)이 있다.

지금까지 버섯 균사체에 대한 액체배양은 Humfeld(1948)가 *Agaricus campestris*를 사용하여 최초로 시도한 이래 Humfeld 와 Sugihara(1952)에 의해 *Agaricus campestris* 액체 배양시 영양 요구성 및 배양방법 등에 관한 연구가 있었으며, Moustafa(1959)가 역시 *Agaricus campestris*의 액체배양에서의 생육 조건을 검토하였다. 그 후 Litchfield *et al.*(1963)이 *Morchella*속을 이용한 액체배양에 있어서 균사체의 생육에 미치는 영향인자에 관한 연구를 보고하였으며, Mizuno *et al.*(1982)이 *Ganoderma applanatum*을 액체배양하여 얻은 균사체로부터 항종양 활성이 강한 다당류를 분리하고 이들 다당류의 구조를 결정하였다. 버섯류의 액체배양은 일정한 조건하에서 배양이 가능하여 균일한 균사체 및 배양액을 얻을 수 있어 원하는 유용물질의 획득이 매우 간단하다는 장점을 갖고 있다(강 과 천, 1988). 또한 식량자원으로서의 균사체 이용(Moustafa, 1960), 버섯 자실체 생산을 위한 종균(liquid spawn)으로서의 사용(Dijkstra *et al.*, 1972) 및 유용물질(비타민, 효소, 핵산, 수용성 다당, 항생물질 등)의 생산(Gentao *et al.*, 1979) 등 산업적 응용에 목적을 연구되고 있다. 국내의 경우는 버섯류의 액체배양 관련 연구로서 박 등(1979)이 표고버섯을 대상으로 액체배양을 실시한 이래, 심(1981)과 강 등(1981)이 각각 구름버섯 및 영지버섯의 액체배양에 관한 연구를 수행하였고, 그 후 정 등(1990)과 이 등(1990)이 영지의 액체배양을 행하여 얻은 균사체로부터 유용물질을 분리라고 그 효능에 대해 실험하였다.

구름버섯(*Coriolus versicolor*)은 구멍장이버섯과에 속하는 버섯으로, 형태학적으로 균모는 얇고 단단한 가죽질이며 반원형이고, 침엽수나 활엽수의 고목에 군생하는 일년생이며 한국, 일본, 중국을 포함한 아시아 및 유럽과 북아메리카등 주로 북반구의 산악지대에 자생하고 있다(Lee, 1993). 구름버섯은 일명 운지버섯이라고도 불리며 전통적으로 건강보조식품이나 민간치료약으로 이용되었으며, 구름버섯의 일반성분은 수분 5.62%, 단백질 4.20%, 탄수화물 65.09%, 섬유질

23.24%, 회분 6.37%, 지방질 1.10%을 함유하고 있다 (Mau *et al.*, 2001). 구름버섯의 특수성분인 핵산과 아미노산, 다당류, 스테로이드 등이 보고되었고, (Cui and Chisti, 2003; Yokokawa, 1980) 구름버섯 균사체 배양액에서 추출한 단백당체의 화학성분은 다당체 42.2%, 단백질 10.5%라 하였다(Lee *et al.*, 1992).

목질진흙버섯(*Phellinus linteus*)은 한방에서 상황버섯 이라고도 불리며 민주름버섯목(*Aphyllporales*), 소나무비늘버섯과(*Hymenochaetaceae*), 진흙버섯속(*Phellinus*)에 속하는 균으로 다년생이며 활엽수, 특히 뽕나무, 산벚나무 등의 입목이나 고목위에 단생하는 목재백색 부후를 일으키는 버섯으로 향암 버섯으로 널리 알려져 있다(박 등, 1999). *Phellinus linteus* 와 *Phellinus igniarius*가 *Phellinus*속의 균종 중에서도 매우 강력한 종양저지율을 나타내는데, 이들의 자실체 추출물이 각각 96.7% 및 87.4%의 높은 항암활성을 나타내는 것으로 보고되었다(Ikekawa *et al.*, 1986; Shibata *et al.*, 1968). 이들 버섯 균사체 추출물에 대해서도 항종양작용, 면역조절 효과 및 임상실험에 의한 안정성이 입증되었으며(Lee *et al.*, 1996; Jong *et al.*, 1991) 각종 산업적인 측면에서의 응용연구가 활발하게 진행되기에 이르렀다.

새로운 식량자원의 개발 및 유용물질 생산연구의 일환으로 사상균(filamentous fungi)류, 특히 버섯류의 이용에 대한 연구가 큰 관심의 대상이 되고 있다 (Smith *et al.*, 1980; Wainwright *et al.*, 1992). 이와 같은 버섯균의 생육특성을 이용하여 액체배양을 할 경우, 배지의 조성 및 생육조건에 따라 항균활성 및 항산화력을 갖는 다양한 대사산물을 얻을 수 있다. 즉, 버섯균은 배지에 함유된 성분을 다양한 기능성을 갖는 물질로 생물 전환할 수 있거나, 배지에 함유된 특수한 기능을 갖는 2차 대사산물 자체도 배양액으로 유입시킬 수도 있다.

대부분의 생물에 의한 바이오매스 및 물질 생산은 계절의 제한을 받지만 이와 같은 버섯균 배양물의 생산은 계절에 영향을 받지 않고, 값싸게 대량생산이 가능하여 원료공급이 용이하고, 산업화가 쉽다는 특징을 가지고 있다.

기능성 식품 및 의약품 소재로 크게 주목받고 있는 버섯은 기호성이 높을 뿐만 아니라 심장병, 고지혈증, 뇌졸중 등의 성인병에 대한 예방과 항암효과 및 면역증강 효과가 보고되고 있고 버섯 자실체보다 대량으로 생산이 용이한 균사체 및 이들이 분비해내는 세포외 기능성 물질의 이용에 더 많은 관심을 갖게 되었

다(Kim *et al.*, 2001; Muraoka *et al.*, 2000). 또한 버섯 균사체는 자실체와 유사한 항암작용, 체지방감소, 혈중 콜레스테롤저하 작용 및 면역증강 활성 등이 있는 것으로 알려져 있으나, 균사체의 생리 활성과 액체배양 등의 연구는 미흡한 실정이다.

본 연구는 버섯균사체의 배양을 위한 액체배지로서 제주에서 용이하게 구할 수 있는 감귤농축액을 이용하여 배양한 후 이 배양액으로부터 항균활성, 항산화 활성, 항암활성을 시판용 배지에서 배양한 추출물과 비교 하여, 감귤농축액이 버섯균사체를 대량생산하기위한 액체배양에 효과적 이용 여부를 조사하였다.

또한 구름버섯균사체의 배양추출물이 항생제 내성균주에 대한 항균활성을 확인 후 분리 정제하여 향후 새로운 항균활성물질의 개발을 위한 기초 자료를 제공하고자 하였고, 약용버섯으로 알려져 있는 수종의 버섯균사체의 배양특성을 조사하여 항균활성, 항산화 활성 등이 뛰어난 구름버섯균사체와 목질진흙버섯균사체를 혼합배양 하여 버섯균사체의 혼합배양을 위한 기초 자료를 제공하고자 하였다.

제1장 감귤농축액배지에서 배양한 버섯균사체 배양액의 항산화 및 항균활성

1.1. 서론

균류는 전 세계적으로 50,000여종을 넘고 있으며 이 가운데서 담자균에 속하는 버섯은 전 세계적으로 약 2,000여종으로 알려져 있다(Chang, 1999). 일반적으로 버섯류의 식품적 기능은 영양적 가치에 의한 1차적 기능과 기호성에 따른 2차적 기능, 식용 후 인체 내의 다양한 조절기능에 관여하는 3차 기능으로 나눌 수 있는데 최근 이러한 기능을 이용하기 위해 많은 연구가 진행 중에 있다(이 등, 2002).

제주지역을 중심으로 대량 생산 되고 있는 온주 밀감은 매년 생산량이 급증하고 있으나, 재배여건에 따른 지역적 제한 때문에 감귤에 대한 연구가 다른 분야에 비해 매우 미흡하다. 이로 인해 감귤을 원료로 하는 가공제품의 생산에 관심을 기울이고 있고, 용도개발을 통한 고부가치 제품을 생산하려는 노력을 하고 있다(Lee *et al.*, 2003).

본 연구는 액체배양을 위한 배지로서 감귤농축액을 이용하여 버섯균사체를 배양한 후 이 배양액으로부터 항균활성, 항산화 활성, 항암활성을 일반화학배지에서 배양한 추출물과 비교 하여, 감귤농축액이 버섯균사체를 대량생산하기위한 액체배양에 효과적 이용 여부를 조사하였다.

1.2. 재료 및 방법

1.2.1. 사용균종

본 실험에 사용한 균종은 목질진흙버섯(*Phellinus linteus*), 번데기동충하초(*Cordyceps militaris*), 구름버섯(*Coriolus versicolor*), 꽃송이버섯(*Sparassis crispa*), 신령버섯(*Agaricus blazei*), 차가버섯(*Inonotus obliquus*), 표고버섯(*Lentinus edodes*), 노루궁뎅이버섯(*Hericium erinacium*), 영지버섯(*Ganoderma lucidium*)의 9종이었다(Table 1-1). 균주는 20 mL 시험관으로 PDA(potato dextrose agar) 및 YM agar(Dextrose 1%, Peptone 0.5%, Malt extract 0.3%, Yeast extract 0.3%, Agar 1.8%)에서 사면배양 후 4℃로 보관하면서 필요할 때마다 같은 배지의 8.5 mm 평판배양기에 이식하여 증균 배양을 하였다. 그리고 균사체 직경이 5 cm 이상 자랐을 때 균사체 가장자리에서 cork borer (내경 6mm)로 떼어서 계대배양 하였다.

1.2.2. 사용배지

본 실험에서는 합성배지로 PDA, YM agar를 사용하였고, 천연배지로 감귤농축액 배지를 사용하였는데 사용한 감귤 농축액은 제주도 서귀포시 소재 제주도 지방개발공사에서 생산하여 시판중인 감귤 농축액(62 brix)을 구입한 후 멸균 증류수로 10%(멸균 증류수 : 감귤농축액 = 9:1)가 되게 희석하여 4℃에 보관하면서 실험에 사용하였다. 10%로 희석한 감귤 농축액의 pH는 3.7이었다.

1.2.3. 시험방법

1) 배양방법 및 활성 측정

온도 및 pH 실험에는 PDA 및 YM agar 평판배지의 중앙에 점종원으로 사용할 균사의 선단을 내경 6 mm의 cork borer로 취하여 접종하였으며, 온도별 성장 실험을 제외하고는 28±1℃의 항온배양기에서 암 배양하였다.

Table 1-1. List of fungal species used in this study

Species	Korean name
<i>Phellinus linteus</i> KCTC 6190	목질진흙버섯
<i>Ganoderma lucidum</i> KCTC 6366	영지버섯
<i>nonotus obliquus</i> KCTC 26152	차가버섯
<i>Sparassis crispa</i> IUM 00201	꽃송이버섯
<i>Hericium erinacium</i> IUM 00217	노루궁뎅이버섯
<i>Coriolus versicolor</i> KCTC 6365	구름버섯
<i>Lentinus edode</i> IUM 00095	표고버섯
<i>Agaricus blazei</i> IUM 00103	신령버섯
<i>Cordyceps militaris</i> KACC 40659	번데기동충하초

2) 액체배양

액체배양은 YM agar 와 PDA 조성 중 agar가 제거된 성분의 액체배지를 사용하였으며 300 mL 삼각 flask에 100 mL씩 분주하여 고압 멸균하였다.

공시균주 균사체를 cork borer (내경 6mm)로 5개씩 떼어서 접종 후 진탕 배양기에서 120rpm, 28±1℃으로 배양하였다. 배양기간은 꽃송이버섯 균사체는 15일간 배양하였고 나머지 버섯 균사체는 7일간 배양하였다.

3) 발효조 배양

발효조배양은 5L 발효조(BEST Korea Fermentor Co, Korea.)에 전 배양된 종균을 5%로 접종하여 30±1 ℃, working volume 3L로 하였고, 공기의 주입속도는 0.5~1.0(vvm) 및 교반속도는 100~400rpm으로 8일간 배양을 실시하였다. pH는 1N HCl과 1N NaOH를 사용하여 조절하였다. 배지는 PDA와 YM agar, 감귤농축액 배지(멸균 증류수 : 감귤 농축액 = 9:1)를 사용하였다.

4) 균사체의 건조중량

배양된 균사체 현탁액을 Whatman paper 2(110 mm)로 걸러 균사체와 배양액을 분리한 다음 균체에 잔류하는 배지성분을 제거하기 위하여 증류수로 충분히 세척한 후 60℃의 항온기에서 24시간 건조하여 건조균체량(g/L)로 환산하여 나타내었다.

5) 추출물의 조제

배양액을 여과하여 여과액과 균사체를 분리한 다음 균사체는 제거하고 여과액을 모아 감압 농축기로 1/10로 농축한 후 3배량의 ethanol을 가하여 4 ℃에서 24시간 방치하였다. 생성된 침전물을 8,000rpm에서 30분간 원심분리로 수거한 뒤 증류수로 2회 세척한 후 회전감압농축기로 농축 후 동결 건조하여 -70 ℃의 deep freezer에 보관하면서 각 실험에 사용하였다.

6) 항균활성측정

항균활성은 조제된 버섯균사체 배양액 추출물 분말 10mg을 멸균증류수 1mL에

용해한 후, membrane filter(0.45 μm)로 여과한 것을 항생 물질 검정용 paper disc (ADVANTEC, USA)에 각각 100 μL 씩 흡습시킨 후 40 $^{\circ}\text{C}$ 로 조절된 건조기에서 30분 동안 충분히 건조시킨 다음 항균활성을 측정하였다. 항균활성 실험에 사용된 공시균주는 어류에 병원성을 나타내는 그람 음성균 9종, 그람 양성균 3종이었다. 이들 균주들은 각각의 최적 배지와 성장 최적 조건에서 전 배양한 후, muller hinton agar plate (Difco Co., USA)에 100 μL 를 골고루 도말한 후, 제작한 버섯 균사체 배양액이 함유된 disc를 올려놓고, 각각의 균주 배양 온도에 맞추어서 24시간 배양한 다음 생육 저지환을 측정하였다.

7) 항산화 활성 측정

9종류의 버섯균사체 배양액의 항산화 활성은 DPPH 법으로 측정하였다(Blois, 1958). DPPH는 항산화성 물질로부터 전자, 수소를 받아 불가역적으로 안정한 분자를 형성하므로, 전자공여능(electron donating ability)으로부터 항산화 활성을 추정할 수 있다. 전자공여능은 150 μM DPPH 용액 2 mL와 균사체 추출용액 1 mL를 혼합한 후, 상온에서 30분간 반응시킨 후, 525 nm의 흡광도차로 측정하였다. 시판되는 항산화제인 BHA(butylated hydroxyanisole)와 BHT(butylated hydroxytoluene)를 대조구로 사용하였다.

8) Superoxide radical (O_2^-) 소거 활성 측정

Superoxide radical 소거활성능은 알칼리 상태에서 pyrogallol의 자동산화에 의한 발색을 이용한 방법에 따라 측정하였다(Marklund, 1984).

본 실험에서 사용된 시료는 동결 건조된 추출물을 증류수에 10 mg/mL의 농도로 희석된 것을 사용하였으며, 측정방법은 50 mM phosphate buffer 2.61 mL, 3 mM pyrogallol 90 μL 를 첨가하여 30초 간격으로 3분간 spectrophotometer (Hanson OPRON-3000, Korea)에서 standard를 측정한 후, 추출물들의 시료들은 50 mM phosphate buffer (pH 8.24) 2.61 mL와 시료 50 μL , 3 mM pyrogallol 90 μL 를 첨가하여 325 nm에서 30초 간격으로 6분간 측정하였으며, superoxide radical 소거활성 값은 다음과 같은 식에 의해서 나타내었다.

Superoxide radical scavenging activity(%)= (a-b)/a×100

a = standard의 반응전과 반응후의 흡광도 차이

b = sample의 반응전과 반응후의 흡광도 차이



1.3. 결과 및 고찰

1.3.1. 버섯 균사체의 성장특성

9종류의 버섯을 YM 및 감귤농축액배지에서 각각 배양한 특성은 Fig.1-1에 나타났다. 버섯균사체의 배양속도는 구름버섯, 표고버섯, 번데기동충하초, 신령버섯 순으로 약 4-7일만에 배양이 완료되었으며, 꽃송이버섯은 배양일수가 15일이 소요되었다. 특히, 표고버섯균사체는 YM배지보다 감귤농축액 배지에서 성장이 우수 하였다.

배양 후 건조 균체량을 측정한 결과 다른 균에 비해 표고버섯, 영지버섯, 구름버섯등에서 상대적으로 높은 건조균체량을 형성하였고 세포외 다당체 형성에서는 표고버섯, 노루궁뎅이버섯, 구름버섯, 번데기동충하초 등의 순으로 형성되었는데 이는 감귤농축액 배지를 잘 이용하여 균사체의 대사가 활발히 이루어지는 것으로 사료된다.

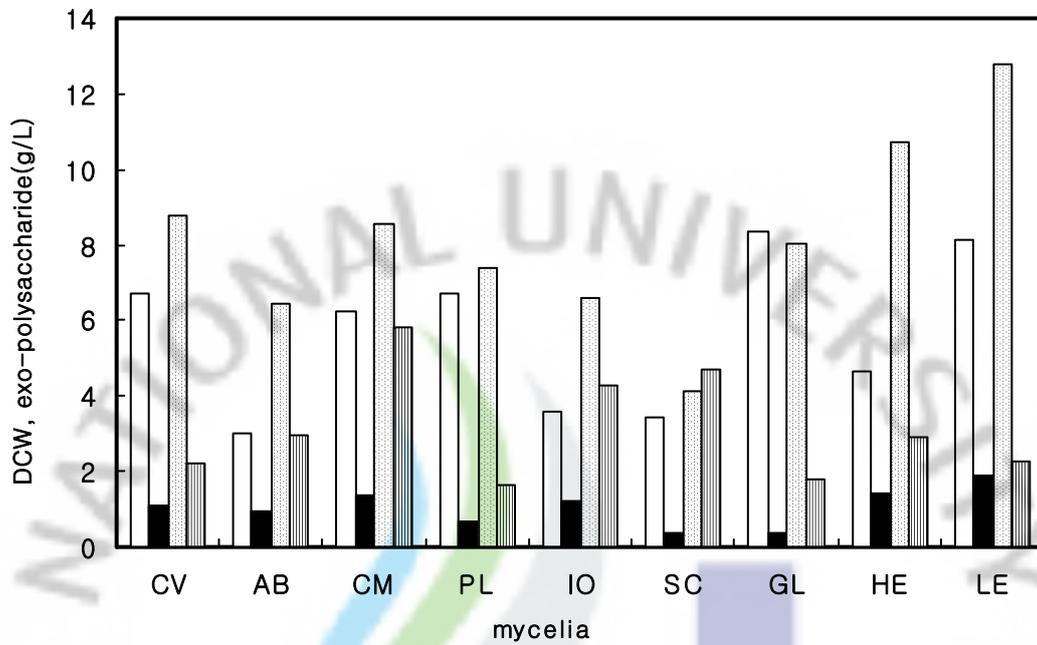


Fig. 1-1. Effect of media on the mycelial growth and exo-polysaccharide formation of different fungal species.

DCW, dried cell weight; CV, *Coriolus versicolor*; AB, *Agaricus blazei*; CM, *Cordyceps militaris*; PL, *Phellinus linteus*; IO, *Inonotus obliquus*; SC, *Sparassis crispa*; GL, *Ganoderma lucidium*; HE, *Hericium erinacium*; LE, *Lentinus edodes*.

□, synthesis medium mycelial weight(g/L); ■, synthesis medium exo-polysaccharide(g/L); ▨, citrus extract medium mycelial cell weight(g/L); ▩, citrus extract medium exo-polysaccharide(g/L).

1.3.2. 버섯균사체 배양액의 항균활성

YM broth 및 감귤농축액 배지를 이용하여 배양된 균사체를 제거한 배양액을 사용하여 어류질병 원인세균에 대한 항균활성을 조사한 결과 Table 1-2, 1-3과 같이 대부분의 시료에서 항균활성이 있는 것으로 나타났다. Table 1-2에서와 같이 일반화학배지 균사체 배양액에서의 항균활성은 꽃송이버섯, 구름버섯, 목질진흠버섯, 신령버섯, 노루궁뎅이버섯 순으로 높은 활성을 나타내었으며, 어류 병원성 균주에 대한 항균활성은 꽃송이버섯, 구름버섯 배양액에서 높은 활성을 보였으며, *Vibrio pelagius*와 *Edwardsiella tarda*에 대한 감수성은 꽃송이버섯과 구름버섯에서 가장 높은 활성을 보였다. 또한 그람양성세균에 대한 항균활성 실험에서는 꽃송이버섯, 구름버섯, 목질진흠버섯 배양액에서 다른 실험구와 비교 해보았을 때 비교적 높은 감수성을 보였다.

반면 감귤농축 첨가배지에서 배양된 배양액의 항균활성은 Table 1-3에 나타내었다. YM배지와 거의 유사한 결과를 얻을 수 있었는데, 전체적인 항균활성을 비교해 보았을 때, 항균활성이 조금 증가한 결과를 얻을 수 있었다. 감귤농축배지의 경우, 감귤의 유리된 유기산, 유리당 및 무기질 등이 다량으로 함유됨으로 인하여 균사체 대수증식에 영향을 주어 항균활성을 나타내는 물질이 다량 생성되는 것으로 사료된다.

이러한 결과를 종합해 볼 때 꽃송이버섯과 구름버섯 배양액은 어류 병원성 세균에 대한 항균활성이 가장 높게 나타난 것을 볼 수 있었다 (Table.1-2). 이는 시판되는 항생제와 거의 비슷한 수준의 생육저지환을 보여 주는 것으로서 이러한 결과는 기존 항생제를 대체하여 어류 양식장에서 사료 첨가제로 사용할 수 있는 가능성이 있고, 특히 꽃송이버섯 배양액인 경우 그 가능성이 매우 높은 것으로 사료된다. 또한 천연배지로 사용된 감귤농축액 배지 또한 버섯균사체의 대량 배양에 있어서 시판되는 화학배지보다 항균활성이 높게 나타나고 있으므로, 기존의 화학배지를 대체할 수 있을 것으로 사료된다.

Table 1-2. Antibacterial activities of the extract of YM media on fish pathogenic bacteria after cultivation of different fungal species

Fungi ^{a)}	PL	CV	CM	AB	IO	HE	GL	LE	SC										
Bacteria	Antibacterial activities in different concentration(mg/ml) of extract																		
	10	20	10	20	10	20	10	20	10	20	10	20	10	20	10	20			
<i>Vibrio harvey</i>	+	+	++	+++	+	++	++	+++	-	+	+	++	+	+	+	+	++	+++	
<i>V. mimicus</i>	+	+	+	++	-	+	+	++	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+++	+++
<i>V. alginolyticus</i>	+	++	+	+	-	+	+	+	-	-	+	++	+	+	+	+	+	++	+++
<i>V. vulnificus</i>	+	++	++	++	+	+	+	++	+	+	+	++	-	+	+	+	+	++	+++
<i>V. parahaemolyticus</i>	++	++	++	+++	+	+	+	++	+	+	+	+	++	-	+	+	+	++	+++
<i>V. campbelli</i>	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+++	+++
<i>V. anguillarum</i>	+	++	++	++	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+++	+++
<i>V. pelagius</i>	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+++	+++
<i>Edwardsiella tarda</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	++	++
<i>Streptococcus sp.</i>	+	++	+	++	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	++	++
<i>S. iniae</i>	-	+	-	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	++
<i>S. parauberis</i>	-	+	+	+	+	+	-	-	+	++	-	-	-	+	-	-	+	++	++

^{a)} PL, *Phellinus linteus*; CV, *Coriolus versicolor*; CM, *Cordyceps militaris*; AB, *Agaricus blazei*; IO, *Inonotus obliquus*; HE, *Hericum erinacium*; GL, *Ganoderma lucidum*; LE, *Lentinus edodes*; SC, *Sparassis crispa*.

-, inhibition diameter is bellow 6 mm; +, 6~12 mm; ++, 13~19 mm; +++, above 20 mm.

Table 1-3. Antibacterial activities of the extract of citrus media on fish pathogenic bacteria after cultivation of different fungal species

Fungi ^{a)}	PL	CV	CM	AB	IO	HE	GL	LE	SC										
Bacteria	antibacterial activities in different concentration(mg/ml) of extract																		
	10	20	10	20	10	20	10	20	10	20	10	20	10	20	10	20	10	20	
<i>Vibrio harvey</i>	+	++	+	++	+	++	+	++	+	++	+	++	+	++	+	++	+	++	+++
<i>V. mimicus</i>	+	++	+	++	+	++	+	++	+	++	+	++	+	++	+	++	+	++	+++
<i>V. alginolyticus</i>	+	++	+	++	+	++	+	++	+	++	+	++	+	++	+	++	+	++	++
<i>V. vulnificus</i>	+	++	+	++	-	+	+	+	+	++	+	++	+	++	+	++	+	++	++
<i>V. parahaemolyticus</i>	++	++	++	++	-	-	+	+	+	+	+	++	+	+	+	++	++	++	+++
<i>V. campbelli</i>	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	++	+	+	+	++	+++	+++	
<i>V. anguillarum</i>	++	++	+	++	+	+	+	++	+	++	+	++	+	++	+	++	++	++	+++
<i>V. pelagius</i>	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	+	++	
<i>Edwardsiella tarda</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	++	
<i>Streptococcus sp.</i>	++	++	+	+	+	+	+	+	+	+	+	++	-	-	+	+	++	+++	
<i>S. iniae</i>	-	+	+	++	+	+	-	-	+	+	-	-	-	+	-	+	++	++	
<i>S. parauberis</i>	-	+	+	+	+	+	-	-	+	++	-	-	+	-	-	-	+	-	

^{a)} PL, *Phellinus linteus*; CV, *Coriolus versicolor*; CM, *Cordyceps militaris*; AB, *Agaricus blazei*; IO, *Inonotus obliquus*; HE, *Hericium erinacium*; GL, *Ganoderma lucidum*; LE, *Lentinus edodes*; SC, *Sparassis crispa*.

-, below 6 mm; +, 6~12 mm; ++, 13~19 mm; +++, above 20 mm.

1.3.3. 항산화 활성 측정

항산화물질의 가장 특징적인 역할은 oxidative free radical과 반응하여 산화력을 억제시키는데 있다. DPPH법은 tocopherol, ascorbate, flavonoid 화합물, 방향족 아민류, maillard형 갈변 생성물질, peptide 등의 항산화 활성을 나타내는 생리활성 물질에 의해 환원됨으로서 짙은 자색이 탈색되는 정도에 따라 항산화 효과를 전자공여능으로 측정하는 방법으로 항산화제 탐색에 일반적으로 이용되는 방법으로 알려져 있다 (Blois, 1958). 감귤농축액배지에서 배양한 버섯균사체 배양추출물과 YM배지에서 배양한 버섯균사체 배양액에 의한 항산화 효과를 DPPH에 의한 전자공여능 소거작용을 측정하여 Fig. 1-2, 1-3에 나타내었다. 대부분의 버섯 배양액에서 농도가 높아질수록 항산화력이 증가하였으며, 특히 꽃송이버섯 배양액인 경우에 1mg/mL의 낮은 농도에서도 80%에 가까운 radical 소거 활성을 보였으며, 이러한 결과는 시판되는 항산화제인 BHA와 비교할 시 비슷한 결과를 나타내는 것으로서 천연항산화제의 사용가능성을 있을 것으로 사료된다. 모든 버섯 배양액에서 5 mg/mL이상의 농도에서는 40% 이상의 radical 소거 활성능이 관찰되었으며, 감귤농축배양액에서 영지버섯, 번데기동충하초 배양액의 radical 소거 활성능이 증가한 것을 확인할 수 있었으며, 다른 균사체 배양액에서는 감소하는 양상을 나타내었다 (Fig.1-2, 1-3). 이러한 결과는 현재 문제가 되고 있는 합성항산화제의 안전성, 가격, 항산화 활성에 대한 천연 항산화제의 개발 가능성이 있으며, 이와 밀접하게 관련되어 있는 질환의 발병을 예방 또는 치료할 수 있는 생리활성 물질로서 작용할 가능성이 높을 것으로 사료된다.

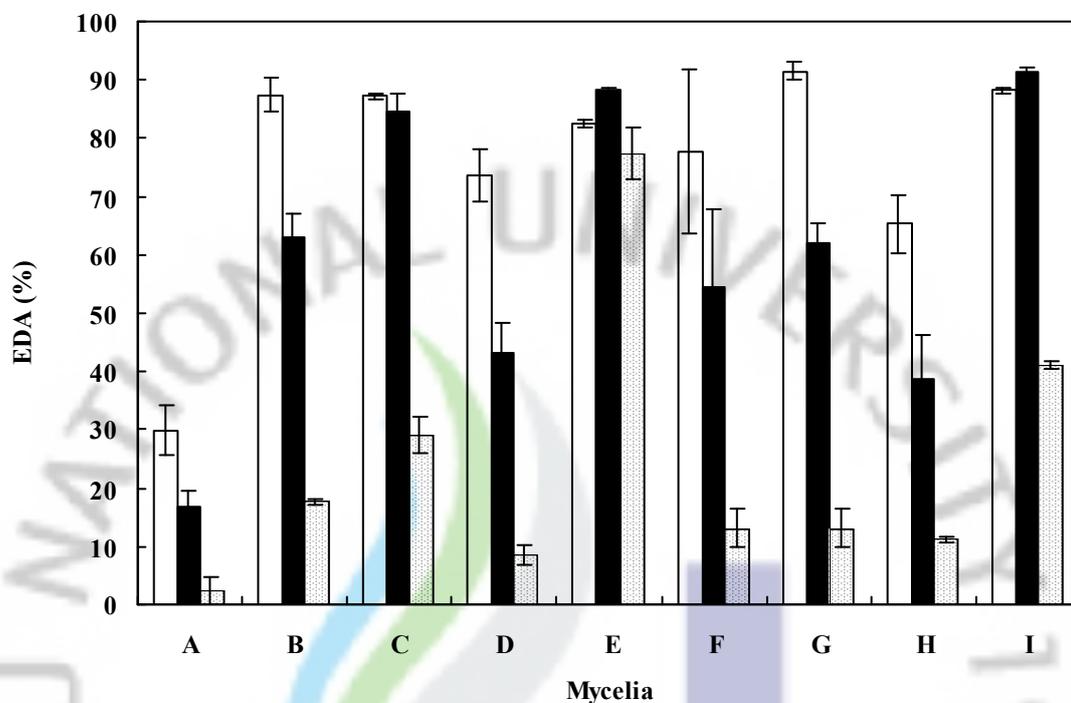


Fig. 1-2. Electron donating activity(EDA) of the extract of YM media after cultivation of different fungal species

A, *Ganoderma lucidum*; B, *Hericium erinacium*; C, *Lentinus edodes*; D, *Inonotus obliquus*; E, *Sparassis crispa*; F, *Agaricus blazei*; G, *Cordyceps militaris*; H, *Coriolus versicolor*; I, *Phellinus linteus*.

□, 10 mg/mL; ■, 5 mg/mL; ▨, 1 mg/mL.

Each value represents the average of three independent experiments.

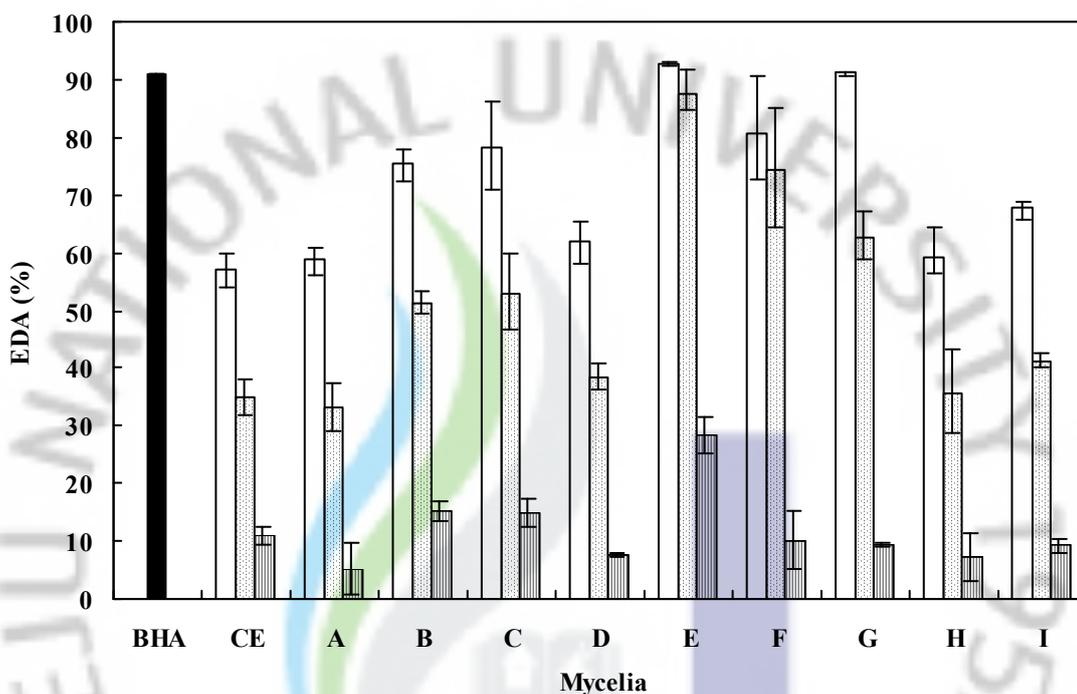


Fig. 1-3. Electron donating activity(EDA) of the extract of citrus media after cultivation of different fungal species.

A, *Ganoderma lucidum*; B, *Hericium erinacium*; C, *Lentinus edodes*; D, *Inonotus obliquus*; E, *Sparassis crispa*; F, *Agaricus blazei*; G, *Cordyceps militaris*; H, *Coriolus ersicolor*; I, *Phellinus linteus*; CE, Citrus medium; BHA, butylated hydroxyanisole.

□, 10 mg/mL; ▤, 5 mg/mL; ▨, 1 mg/mL.

Each value represents the average of three independent experiments.

1.3.4 Superoxide radical (O_2^-) 소거활성

Pyrogallol은 수용액에서 자동산화가 빠르게 일어나는데 여기에는 superoxide가 관여한다고 알려져 있다. 그러므로 SOD (superoxide dismutase)나 SOD 유사활성물질이 존재하는 경우 이의 자동산화가 억제될 수 있고, 이 억제되는 정도를 비교하여 실험대상의 물질의 효능을 비교한 결과는 Fig. 4에 나타내었다. 항균활성, radical 소거활성의 결과와 마찬가지로 superoxide radical 소거능 역시 꽃송이버섯 배양액에서 70% 이상의 높은 효소활성을 보였다. 또한 노루궁뎅이 버섯, 표고버섯, 번데기동충하초, 꽃송이버섯, 목질진흙버섯 배양액은 BHA 보다도 높은 효소활성이 관찰되었으며, 대부분이 YM 배양액에서 높은 활성을 보였으며, 감귤농축배양액에서는 차가버섯 배양 추출물에서 높은 효소활성이 관찰되었다.

Superoxide radical은 호기적 대사기관에서 여러 가지 생화학적 반응으로 생성되며, 주로 세포막 지질의 불포화 지방산과 반응하여 지질 과산화물을 생성하므로 세포손상을 초래한다고 알려져 있다. 생체는 이러한 지질 과산화에 대한 반응 체계로서 SOD에 의하여 superoxide radical을 H_2O_2 로 바꾸며, 다시 H_2O_2 는 catalase와 glutathion peroxidase의 작용에 의해 H_2O 로 환원되므로 이들 효소계의 반응에 의해서 free radical로부터 생체를 보호할 수 있다 (Marklund, 1984). 실제로 일본의 Niwa *et al.*, (1987)은 새로운 산화 방지제를 발굴하고 임상실험을 통하여 효능을 평가하고 식품을 개발하여 상품화하였고, 이들의 활성산소의 시발 물질이라고 할 수 있는 superoxide anion을 scavenging 함으로써 생체에 실질적으로 상해를 유발하는 hydroxyl radical과 과산화수소의 생성을 억제하여 유용한 생리활성을 나타낸다고 보고하였다. 이는 산화 방지제의 일종으로 SOD와 작용 기작은 다르지만 인체 내에서의 역할이 유사하여 통상적으로 SOD 유사활성 물질이라고 불린다.

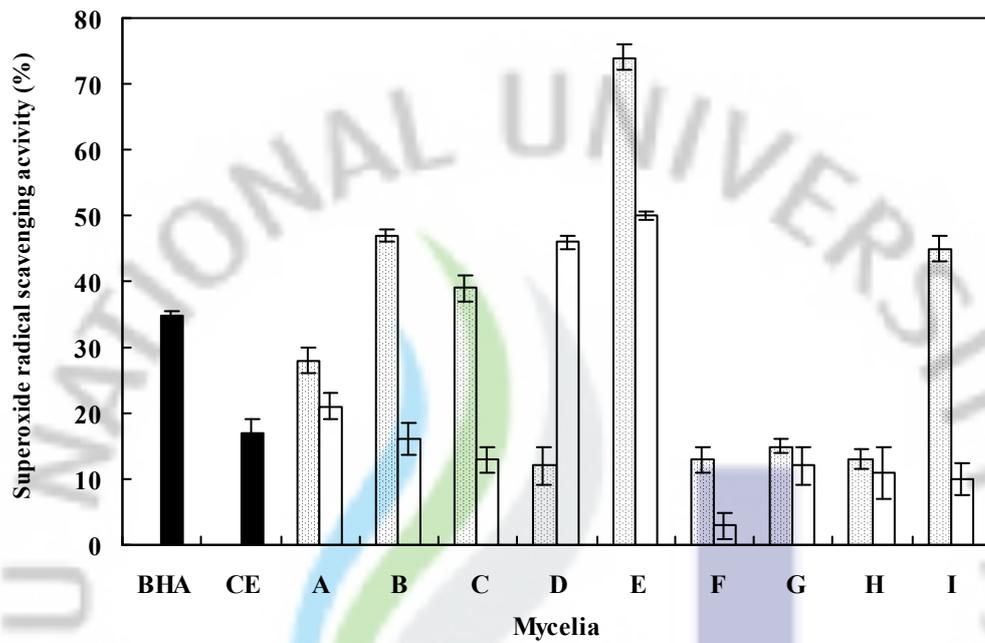


Fig. 1-4. SOD-like activity of the extract of YM and citrus media after cultivation of different fungal species.

A, *Ganoderma lucidum*; B, *Hericium erinacium*; C, *Lentinus edodes*; D, *Inonotus obliquus*; E, *Sparassis crispa*; F, *Agaricus blazei*; G, *Cordyceps militaris*; H, *Coriolus ersicolor*; I, *Phellinus linteus*; BHA, butylated hydroxyanisole; CE, Citrus medium.

▨, Culture broth of the YM media; □, Culture broth of the citrus medium.

Each value represents the average of three independent experiments.

1.4 요약

YM 배지 및 감귤농축액배지로 액체 배양된 버섯균주 9종류의 배양특성을 확인하기 위해 YM 배지와 감귤농축액에서 8-10일간 배양한 결과 버섯균사체에 따라 배양속도가 달랐으며 균사체의 배양속도는 구름버섯, 표고버섯, 번데기동충하초, 신령버섯 순으로 배양일수 약 4-7일 정도로 빨랐으며, 꽃송이버섯은 배양일수가 15일이 소요되었다.

배양 후 건조균체량을 측정한 결과 다른 균에 비해 표고버섯, 영지버섯, 구름버섯에서 상대적으로 높은 건조균체량을 나타냈고 세포의 다당체 형성에서는 표고버섯, 노루궁뎅이버섯, 구름버섯, 번데기동충하초 순으로 보였다.

또한, YM배지 및 감귤농축액배지로부터 배양된 버섯균사체 배양액에서 버섯 균사체를 제거한 배양액을 사용하여 어류 병원성 세균에 대한 항균활성을 조사한 결과 대부분의 버섯 배양액에서 항균활성이 있는 것으로 나타났다. YM 배양액의 항균활성은 꽃송이버섯, 구름버섯, 목질진흙버섯, 신령버섯, 노루궁뎅이버섯 순으로 높은 활성을 나타내었으며, 반면 감귤농축액 배양액에서의 항균활성은 일반 화학배지에서와 거의 유사한 결과를 얻을 수 있었는데, 전체적인 항균활성을 비교해 보았을 때, 항균활성이 조금 증가한 양상의 결과를 얻을 수 있었다. DPPH 전자공여능을 이용한 항산화 활성은 모든 버섯 배양액의 농도가 높아질수록 항산화력이 증가하였으며, 특히 꽃송이 버섯 배양액인 경우에 1 mg/mL의 농도에서도 80%에 가까운 radical 소거 활성을 보였으며, 모든 실험구에서 5 mg/mL 이상의 농도에서는 40% 이상의 라디칼 소거 활성능을 보였다. Superoxide radical 소거능 역시 꽃송이버섯 배양액에서 70% 이상의 높은 효소활성을 보였다. 전반적으로 모든 버섯 배양액은 시판되는 항산화제인 BHA보다 높은 효소활성을 보였다.

이러한 결과를 종합해 볼 때 기존의 항생제와 항산화제를 대체 할 수 있는 천연 항산화제로의 개발가능성을 확인 할 수 있었고, 배지로 사용된 감귤농축액은 버섯 균사체의 액체 배양에 있어서 기존의 화학배지를 대체 할 수 있을 것으로 사료된다.

제2장 구름버섯균사체 배양추출물의 생리활성 및 분리정제

제1절 구름버섯균사체 배양 추출물의 생리활성

2.1.1. 서론

버섯균에 함유된 유효성분 중 항암성분에 대한 연구는 Roland *et al.*(1960)에 의해 *Calvatia gigantea* 로부터 calvacin을 분리함으로써 시작되어, 향미성분과 약리효과 때문에 식용 및 약용으로 알려진 버섯류들에 대한 항암효과 연구가 최근에 활발히 진행되고 있다(Lee *et al.*, 1992). 이 중 *Letinus edodes*(Fuji *et al.*, 1978; Lee *et al.*, 1990), *Coriolus versicolor*(Park *et al.*, 1989), *Lepiota procera* (Kim *et al.*, 1989), *Grifola frondosa* (Mizuno *et al.*, 1986), *Lyophyllum ulmarium*(Kazune *et al.*, 1990), *Ganderma applantantum*(Usui *et al.*, 1983) 등으로부터 얻은 유효성분중 항암효과를 나타내는 것이 단백 다당체라고 알려져 있다. 이들 단백다당체는 종양에 대한 생체고유의 방어력을 높여줌으로서 간접적으로 종양세포를 저지하고, 암세포나 병균을 직접 사멸시키는 대식세포의 수를 증가시킨다고 보고하였다(Fuji *et al.*, 1978). 이런 항암기전은 세포면역반응의 촉진에 기인한 것으로 비경구 투여, 특히 복강내 주사시 유효하지만 경구투여시에는 효력이 없었다고 보고되었다(Chihara *et al.*, 1970; Shim *et al.*, 1981). 이에 비해 구름버섯의 단백다당체는 경구투여를 하여도 항암효과가 유효한 결과를 얻었다고 보고되었다(Park *et al.*, 1977). 또한, 한국산 담자균류중 구름버섯, 느타리버섯, 표고버섯, 메꽃버섯, 만년버섯 등의 자실체에서 추출한 항암성분 중에서 가장 항암효과가 높은 것은 구름버섯이라고 보고하였다(Shim, 1981).

버섯은 다양한 약리작용이 밝혀지면서 항균활성물질에 관한 연구들이 많이 보고되어 왔다. Kavanagh *et al.*(1945)이 낙엽버섯의 일종인 *Marasmius conigenum*으로부터 그람양성균에 대한 강한 항균활성을 보이는 marasmic acid A, B, C를 분리한 이래 현재까지 약 100여종 이상의 항생물질이 보고되었다.

가축의 질병 유발 세균은 가축사료 등에 의해 장내로 유입되어 장내 미생물에 영향을 주어 사료효율 저하, 증체율 감소, 출하일령 지연 등으로 인한 경제적 손

실로 이어져 축산농가에 막대한 피해를 주는 것으로 알려져 있다 (Lee *et al.*, 1997).

구름버섯은 봄부터 가을에 걸쳐 활엽수의 썩은 줄기나 가지에 군생하고 전 세계적으로 분포하여 생육시기와 장소에 구애받지 않고 쉽게 채취가 가능하며 민간요법에 이용되어온 약용버섯이다. 한편, 제주지역을 중심으로 대량 생산 되고 있는 온주 밀감은 매년 생산량이 급증하고 있으나, 재배여건에 따른 지역적 제한 때문에 감귤에 대한 연구가 다른 분야에 비해 매우 미흡하다. 이로 인해 감귤을 원료로 하는 가공제품의 생산에 관심을 기울이고 있고, 용도개발을 통한 고부가치 제품을 생산하려는 노력을 하고 있다(Song *et al.*, 1998).

본 연구에서는 유리당, 유기산, 무기질 등이 다량 함유된 감귤농축액을 배양배지로 하여 구름버섯 균사체를 액체 배양한 배양추출물과 YM배지에서 배양한 구름버섯 배양추출물을 이용하여 *in vitro*에서 다양한 암세포에 대한 항암효과 항산화 효과를 비교 조사하였다. 또한 구름버섯, 목질진흙버섯, 노루궁뎅이버섯의 균사체 배양액의 ethyl acetate 추출물의 가축질병 병원미생물균주와 kanamycin 과 ampicillin 내성균주에 대한 항균활성을 평가하였다.

2.1.2. 재료 및 방법

1) 감귤농축액과 YM배지에서의 구름버섯 균사체 배양

평판배지의 구름버섯 균사체를 YM배지에 접종하고 30℃에서 4일간 진탕 배양한 종균 10 mL씩을 각각 100 mL의 YM배지와 감귤농축액 배지(멸균증류수 : 감귤농축액 = 9:1)에 접종하여 30℃에서 6일간 진탕배양(150 rpm, Vision Scientific Co. Korea)하면서 균사체 생장을 비교하였다. 균사체 생장은 배양 후 Whatman filter paper #4로 여과한 후 80℃에서 24시간 건조하여 건조중량을 측정하였다.

2) 발효조를 이용한 구름버섯균사체 배양 및 배양추출물의 제조

평판배지의 구름버섯 균사체를 상기의 YM배지에 접종하고 30℃에서 3일간 배양한 종균을 homogenizer로 균질화 하여 7 L jar fermentor(Hanil Co. Korea)를 이용하여 working volume 4 L의 YM배지와 감귤농축액에 각각 접종량이 10% (v/v)되게 접종하여 통기량 1 vvm으로 30℃에서 7일간 배양하였다. 배양완료 후 발효조의 온도를 100℃로 조정하여 3시간 동안 열처리하여 추출한 다음 filter paper(Whatman No.2)로 여과하여 그 여액을 구름버섯 배양추출물로 하여 실험에 사용하였다.

대조구로 이용된 목질진흙버섯, 노루궁뎅이버섯의 균사체 배양도 상기의 방법으로 배양 후 추출하였고, 배양하지 않은 감귤농축액도 상기와 동일한 조건으로 열처리 한 후 여과하여 실험에 사용하였다.

3) 암세포 및 배양배지

실험에 사용된 암세포는 HeLa(female cervix adeno carcinoma), PC-3(male prostate adeno carcinoma), A-549(male lung carcinoma), HepG2(human hepatoblastoma)세포를 원자력 병원 세포생물학연구소로부터 분양받아 액체질소에 보관하면서 실험에 사용하였으며, 세포배양은 T-75 flask(TPP, Switzerland)

로 37°C, 5% CO₂ incubator(NUAIRE Co, USA)에서 배양하였다. 배지는 2 mg/mL sodium bicarbonate(Sigma, USA), 10% Fetal bovine serum(FBS, Gibco, USA)과 1% penicillin-streptomycin을 첨가한 RPMI1640(Gibco, USA) 배지를 사용하였다.

4) 니트로사민 생성억제효과 측정

발암성인 니트로사민의 체내생성에 있어서 가장 직접적인 생성인자가 아질산으로서 이들 아질산을 효과적으로 제거하는 것이 니트로사민 생성억제에 직결되므로 각 배양추출물 시료의 아질산염 소거능을 Lee *et al.*(2003)의 방법에 준하여 측정하였다. 즉, 1 mM NaNO₂ 용액 2 mL에 각 추출물 용액 1 mL을 첨가하고, 여기에 0.1 N HCl 및 0.2 M Sodium citrate용액을 사용하여 반응용액의 pH를 각각 1.2, 3.0 및 6.0으로 조정한 다음 반응용액의 최종 부피를 10 mL로 하였다. 이를 37°C에서 1시간 반응시킨 다음 반응액을 각각 1 mL씩 취하고 여기에 2% acetic acid 5 mL, Griess 시약(30% acetic acid에 각각 조제한 1% sulfanylic acid와 1% naphthylamine을 1:1 비율로 혼합한 것, 사용하기 직전에 조제) 0.4 mL를 가하여 잘 혼합시켜 15분간 실온에 방치시킨 후 흡광도를 520 nm에서 측정하여 잔존하는 아질산염량을 구하였다. 대조구는 Griess 시약 대신 증류수를 0.4 mL를 가하여 측정하였으며, 아질산염 소거능은 $100 - [(시료첨가군의 흡광도 - 시료의 흡광도 / 무첨가군의 흡광도 - 시료의 흡광도) \times 100]$ 으로 나타내었다.

5) 암세포 생육저해능 측정

배양한 각 암세포를 96 well plate에 1.5×10^4 cells/well로 100 μ L를 배양을 하고 24시간 후 버섯배양추출물을 각 농도(1, 5, 10, 20, 40, 60, 80, 100 μ L/mL) 별로 처리하여 습도는 95%, 온도는 37°C를 유지하면서 48시간 동안 5% CO₂ incubator에서 배양하였다.

MTT(3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide)를 이용한 Cell viability assay는 배양종료 2시간 전에 빛을 차광하고 cell proliferation

assay solution(CellTiter 96[®] AQueous Cell Proliferation Assay. Promega Co. USA)을 20 mL/well 을 처리하고, 흡광도를 ELISA reader로 490 nm 에서 측정하여 대조군의 흡광도와 비교하여 세포 증식율을 백분율로 환산하였다.

6) 항균력 측정

버섯 균사체 배양 추출물의 항균력시험용 평판배지는 mueller hinton(Difco, USA)배지를 사용하였고 한천배지확산법(disc plate method)으로 측정하였으며 (Pidcock *et al.*, 1990) 직경이 8 mm인 paper disc를 사용하였다. 시험균주는 국립수의과학검역원에서 분양 받은 돼지의 설사 유발균인 *Escherichia coli* K88, *E. coli* K99, *E. coli* 987P와 양계의 설사 유발균인 *Salmonella typhimurium* 1405P 균주를 대상으로 하였으며, 항생제 내성균주는 kanamycin과 ampicillin에 내성을 갖는 *Staphylococcus aureus* CARM3230와 *E. coli* CARM1381 균주를 서울여자대학교 항생제내성균주은행에서 분양받아 사용하였다.

2.1.3. 결과 및 고찰

1) YM배지와 감귤농축액배지에서 구름버섯 균사체 성장 비교

YM배지와 감귤농축액 배지에서 구름버섯 균사체의 생육을 비교한 결과를 Fig. 2-1에 나타내었다.

YM배지의 경우, 배양 4일째 균사체 건조량이 5 g/L로 최대성장을 보였으며, 구름버섯 균사체 증식에 반비례적으로 최종 pH는 감소하는 경향을 보이며, 생장율이 최적일 때 최종 pH는 4.4 이었다. 정지기에 도달되었을 때, 최종 pH가 증가하였다. 이런 결과로 인해 구름버섯 균사체 증식은 배지의 pH에 상당히 의존적임을 알 수 있었다.

감귤농축액 배지의 경우, 감귤에서 유리된 유기산의 영향으로 pH가 약산성으로 구름버섯 균사체 증식의 유도기가 YM배지의 유도기 보다 길었다. 이는 구름버섯이 pH에 대한 내성을 유지하는 것으로 사료된다. 그러나 배양시간이 지남에 따라 감귤 농축액의 낮은 pH에서도 구름버섯의 증식이 YM배지와 유사한 증식을 이루어짐을 알 수 있었고, 배양 5일째 균사체 건조량이 7 g/L로 최대성장을 보였다. 이러한 결과를 바탕으로 구름버섯 균사체를 발효조에서 대량 배양하여 균사체 배양추출물을 제조하여 실험에 사용하였다.

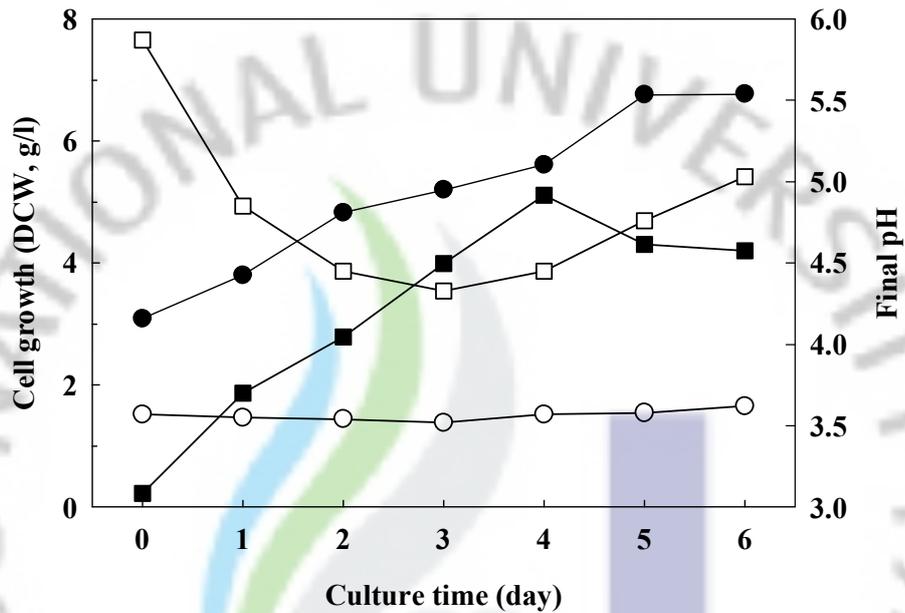


Fig. 2-1. Comparison of the cell growth of *Coriolus versicolor* on the YM medium and the citrus medium.

●, Cell growth of *Coriolus versicolor* in the citrus medium; ○, Final pH of the citrus medium; ■, Cell growth of *Coriolus versicolor* in the YM medium; □, Final pH of the YM medium.

2) 구름버섯 배양추출물의 아질산 제거 효과

구름버섯 배양추출물의 아질산 제거능에 대한 결과를 Fig. 2-2에 나타내었다. Extract-I, II, III에 대한 pH 별 (pH 1.2, 3, 6) 아질산염 제거능은 pH가 낮을수록 효과적이며, 항산화 활성과 같은 결과로 감귤농축액에서 배양한 구름버섯 추출물이, 감귤농축액 자체 또는 YM배지에서 배양한 추출물 보다 아질산 제거능이 가장 우수함을 보였다. pH 1.2에서 Extract-I, II, 그리고 III에 의한 아질산염 제거능은 각각 67%, 55%, 34% 였다. 니트로사민의 전구물질인 아질산염과 아민이 식품내에 널리 존재하고 있으므로 이들을 함유하고 있는 식품물을 동시에 섭취했을 때 니트로사민이 생성될 가능성이 있다. 특히, 니트로사민은 산성 pH에서 용이하게 생성되고 그 생성 최적 pH가 인체의 위의 pH 조건과 유사하므로 인체의 위내에서 니트로사민의 생성이 매우 높다. Fig. 3의 결과에서 배양추출물의 아질산 제거능이 pH 1.2에서 가장 효과적으로 제거하였으므로 생체 내에서 아질산 제거능이 아주 효율적으로 작용할 것으로 사료된다. 아질산 제거능이 우수한 배양추출물을 아질산염과 아민이 존재할 수 있는 생체식품 및 가공식품과 함께 섭취하면 니트로사민에 의한 암의 발생을 예방하는 데 도움을 줄 수 있을 것으로 사료된다.

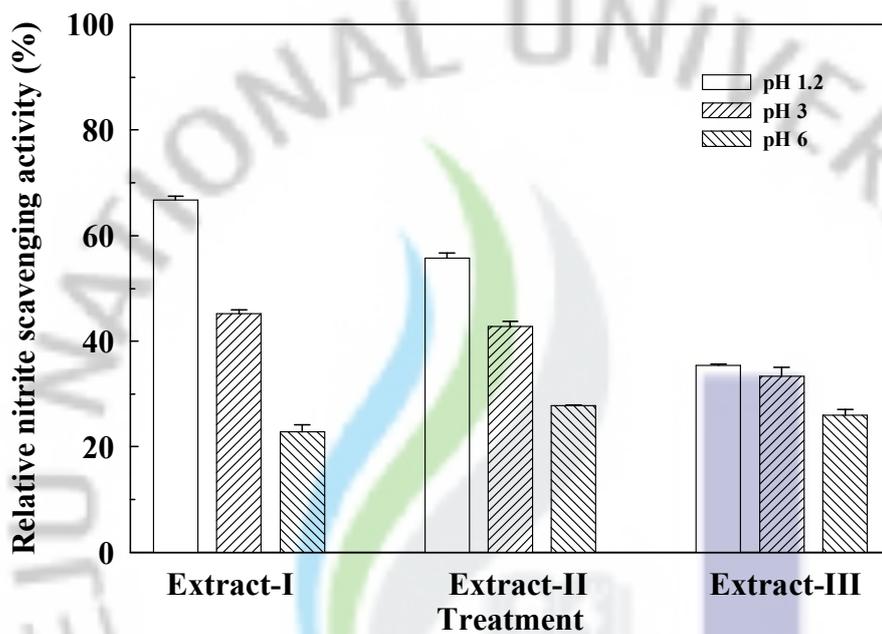


Fig. 2-2. Comparison of nitrite scavenging activity of *Coriolus versicolor* culture extracts obtained from the YM medium and the citrus extract medium.

Extract-I is the *Coriolus versicolor* culture extract obtained from the citrus medium, Extract-II is the *Coriolus versicolor* culture extract obtained from the YM medium, and Extract-III is the un-inoculated citrus medium.

3) 구름버섯 배양추출물에 의한 암세포 생육 저해 효과

감귤농축액 배지에서 배양한 구름버섯 배양추출물(Extract-I)과 YM배지에서 배양한 구름버섯 배양추출물(Extract-II), 그리고 접종하지 않은 감귤농축액(Extract-III)을 농도별로 HeLa cell (자궁암세포), PC-3 cell (전립선암세포), HepG2 cell (간암세포)와 A-549 cell (폐암세포) 배양액에 처리하여 48시간 배양한 후 암세포에 대한 생육 저해 효과를 Fig. 2-3에 나타내었다.

Extract-I은 모든 암세포의 생육을 현저히 저해하였고, 저해양상이 각각의 암세포마다 약간의 상이성을 보였다. Extract-I의 처리농도가 100 $\mu\text{L}/\text{mL}$ 일 때, HeLa 세포, PC-3 세포, HepG2 세포, A-549 세포의 생육 저해율은 각각 75%, 82%, 45%, 82%이었다. Extract-I에 의한 각 암세포의 생육저해를 일으키는 초기 처리농도와 IC_{50} 은 암세포마다 상이한 결과를 나타내었다.

HeLa cell의 생육저해를 일으키는 초기농도와 IC_{50} 은 10 $\mu\text{L}/\text{mL}$ 와 30 $\mu\text{L}/\text{mL}$ 이었고, PC-3 cell의 경우는 40 $\mu\text{L}/\text{mL}$ 와 70 $\mu\text{L}/\text{mL}$ 이었고, HepG2 cell은 20 $\mu\text{L}/\text{mL}$ 와 75 $\mu\text{L}/\text{mL}$ 이었으며, A-549 cell은 20 $\mu\text{L}/\text{mL}$ 와 40 $\mu\text{L}/\text{mL}$ 이었다. 따라서, Extract-I에 의한 항암효과는 HeLa cell, A-549 cell, PC-3 cell, HepG3 cell 순으로 항암활성이 높게 나타남을 알 수 있었다. 한편, YM배지에서 배양한 구름버섯 배양추출물(Extract-II)은 4 종류의 암세포 중에서 HeLa cell에 대해서만 현저한 생육저해를 나타내었다.

생육저해를 일으키는 초기농도와 IC_{50} 은 40 $\mu\text{L}/\text{mL}$ 와 70 $\mu\text{L}/\text{mL}$ 이었고, 생육저해율은 66 %이었다. 접종하지 않은 희석 감귤농축액인 Extract-III의 암세포 생육저해는 4종류의 암세포에서 거의 일어나지 않았다.

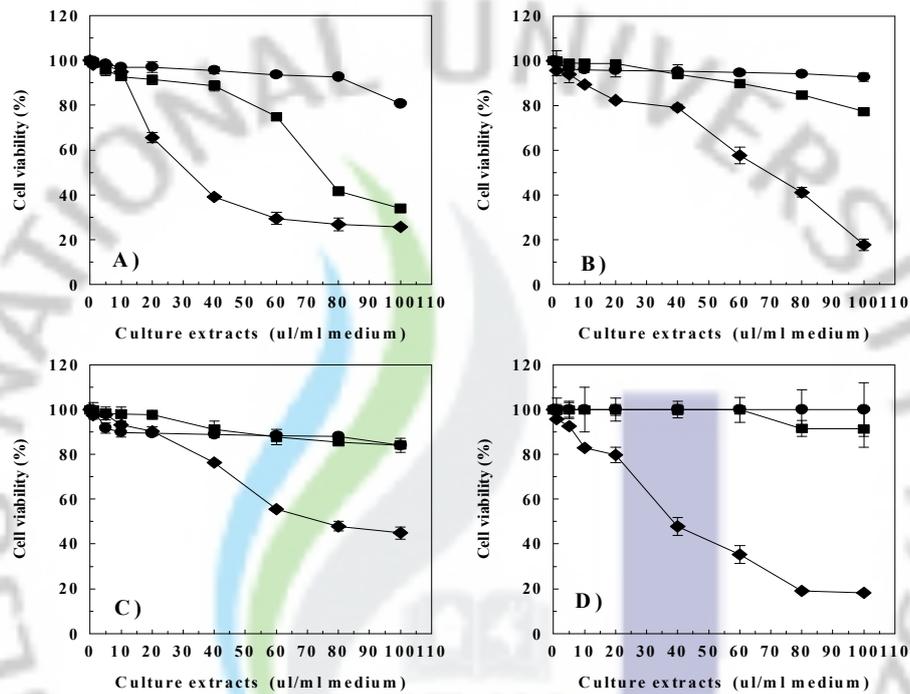


Fig. 2-3. Inhibition of cancer cell growth by *Coriolus versicolor* culture extracts obtained from the YM medium and the citrus medium.

●, the un-inoculated citrus medium (Extract-III); ■, the *coriolus versicolor* culture extract (Extract-II) obtained from the YM medium; ◆, the *coriolus versicolor* culture extract (Extract-I) obtained from the citrus medium.

4) 버섯 배양추출물에 의한 항균활성

각 버섯의 균사체 배양액으로부터 얻어진 ethyl acetate 추출물의 양은 구름버섯의 경우 1,550 mg, 목질진흙버섯의 경우 610 mg, 노루궁뎅이버섯의 경우 760 mg으로, 목질진흙버섯이나 노루궁뎅이버섯에 비해 구름버섯 균사체 배양 추출물이 2배정도 높게 나타났다. 이들 추출물을 살균 증류수에 녹여 disc 당 10 mg 되게 동일하게 처리하여 항균 실험에 사용하였다. 가축 설사유발 병원균을 대상으로 실험하였고 항균실험의 대조군으로서는 기존 항생제인 ampicillin과 kanamycin을 disc 당 12.5 µg되게 처리하였으며, 항생제 내성 균주에 대한 항균 실험에서는 각 각 disc 당 25 µg되게 처리하였다. 한천배지 확산법을 이용하여 4종의 가축 설사유발 병원균을 대상으로 항균활성을 검색한 결과를 Table 2-1과 Fig. 2-3의 (A)와 (B)에 나타내었다. 목질진흙버섯 및 노루궁뎅이버섯 균사체 배양 추출물은 가축 설사 유발 병원균에 대해 유사한 생육저지능을 나타낸 반면 구름버섯 추출물을 첨가한 균에서는 높은 수치의 항균활성을 나타내었다. 이는, Kim *et al.*(2003)이 보고한 표고버섯 자실체의 물 및 에탄올 추출물의 일반 병원성 세균인 *S. aureus*, *E. coli*, *S. typhimurium*에 대한 항균활성(추출물 43.1 mg/disc) 결과에 비해 높은 항균활성을 보여주었으며(Table 2-1), Choi *et al.*(2003)과 Lee *et al.*(2003)이 보고한 오배자 및 소목유래의 추출물에 대한 항균활성의 효과와 유사한 경향을 보였다. 이러한 결과는 이들 세 가지 버섯류의 모두 기존 항생제를 대체하여 가축사료 첨가제로 사용할 수 있는 가능성이 있고, 특히, 구름버섯 배양 추출물의 경우 그 가능성이 높은 것으로 사료된다.

Table 2-1. Antibacterial activities of the mycelial culture extracts of *Coriolus versicolor*, *Phellinus linteus*, and *Hericium erinaceus* against Korean isolates of livestock diarrhea-causing bacteria

Strains	Inhibition zone(mm) ^{a)}		
	<i>Coriolus versicolor</i>	<i>Phellinus linteus</i>	<i>Hericium erinaceus</i>
<i>Escherichia coli</i> K88	16	11	10
<i>Escherichia coli</i> K99	14	10	10
<i>Escherichiacoli</i> 987P	15	12	11
<i>Salmonella typhimurium</i> 1405P	13	10	10

^{a)} Cells were grown on LB plates for 24 h at 37°C after 10 mg each of ethyl acetate extract of mushroom liquid cultures was absorbed into paper disc(8 mm in diameter) and then the diameter(mm) of the growth inhibition zone was measured. The values were the mean of triplicates.

5) 버섯 배양추출물에 의한 항생제 내성균에 대한 항균활성

버섯 배양 추출물의 항생제 내성균에 대한 항균활성을 검색한 결과를 Table 2-2와 Fig.2-3의 (C)와 (D)에 나타내었다. 기존 항생제인 ampicillin과 kanamycin (12.5 µg/disc)에 대해 항생제 내성 균주인 *Staphylococcus aureus* CARM3230와 *E. coli* CARM1381는 생육저해를 받지 않은 반면, 상황, 노루궁뎅이버섯, 구름버섯 균사체 배양 추출물 모두 현저한 항균 활성을 나타냈으며, 특히, 구름버섯 배양 추출물의 경우, 가축 실사 유발 세균에 대한 경우와 마찬가지로 가장 높은 항균 활성을 보였다. 이러한 결과는, 이들 버섯류로부터 항생제 내성균을 억제할 수 있는 신규 항균성 물질의 발견 가능성을 보여 주며 특히, 항생물질의 남용으로 인해 기존 항생물질의 처리에 의해 제어되지 않는 다제내성 균의 출현빈도가 외국에 비해 월등히 높은 우리나라의 현실에서 매우 의미 있는 연구결과라 사료된다.

Table 2-2. Antibacterial activities of the mycelial culture extracts of *Coriolus versicolor*, *Phellinus linteus*, and *Hericium erinaceus* against antibiotic resistant bacterial strains

Strains	Inhibition zone (mm) ^{a)}				
	<i>Coriolus versicolor</i>	<i>Phellinus linteus</i>	<i>Hericium erinaceus</i>	Ampicillin	Kanamycin
<i>Escherichia coli</i> CARM1381	16	12	11	0	0
<i>Staphylococcus aureus</i> CARM3230	18	13	12	0	0

^{a)} Cells were grown on LB plates for 24 h at 37°C after 10 mg each of ethyl acetate extract of mushroom liquid cultures was absorbed into paper disc(8 mm in diameter) and then the diameter(mm) of the growth inhibition zone was measured. The values were the mean of triplicates. Kanamycin and ampicillin(12.5 µg per disc) were used as references.

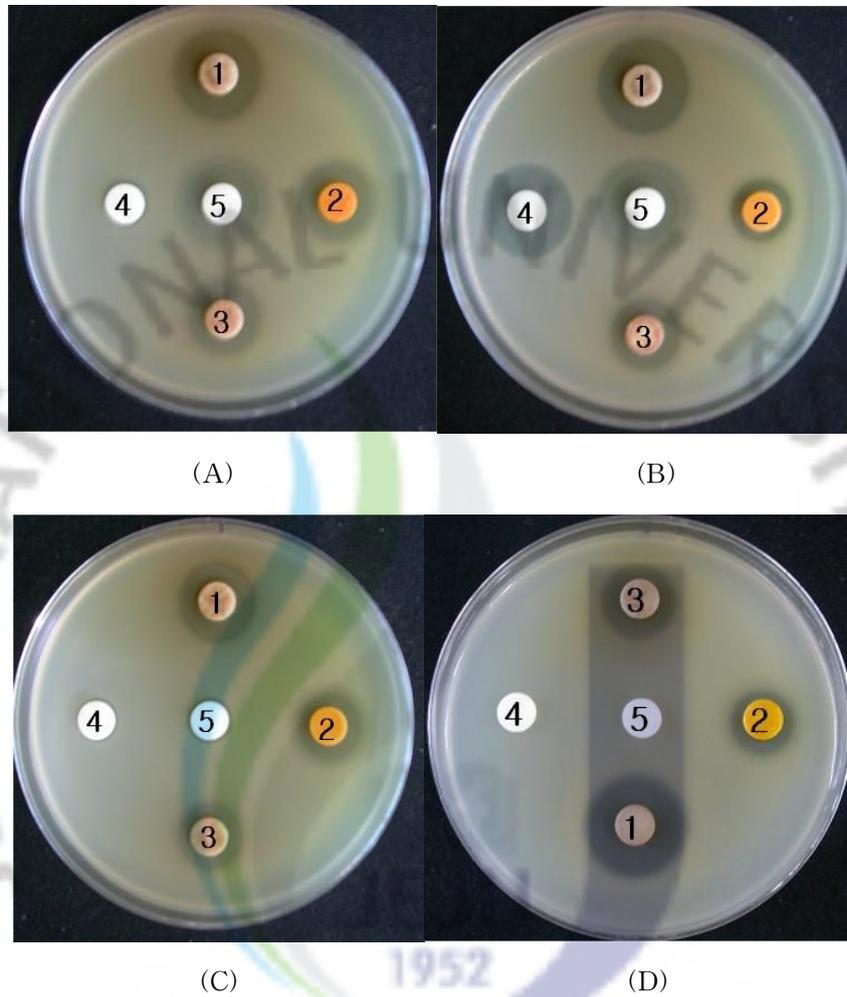


Fig. 2-4. Antibacterial activities of the mycelial culture extracts of *Coriolus versicolor*, *Phellinus linteus*, and *Hericium erinaceus* against Korean isolates of livestock diarrhea-causing bacteria and antibiotic resistant bacterial strains. (A), *E. coli* K88; (B), *S. typhimurium*; (C), *E. coli* CARM1381; (D), *S. aureus*. CARM3230.

1, *Coriolus versicolor*; 2, *Hericium erinaceus*; 3, *Phellinus linteus*; 4, ampicillin; 5, kanamycin.

2.1.4. 요약

감귤농축액배지 또는 YM배지에서 구름버섯을 배양했을 때 보다 감귤농축액에 구름버섯을 배양하였을 때 그 배양추출물의 아질산 제거능 및 항암효과가 현저히 상승하는 결과를 나타냄을 알 수 있었다. 이는 희석 감귤농축액에 구름버섯을 배양하는 동안에 균사체외에서 감귤농축액에 함유 되어 있던 물질이 생물전환(bioconversion)되었거나 균사체내에 새로운 대사산물이 축적되었거나 기존 활성물질의 생합성이 더욱 증가하여 축적된 결과일 것으로 사료된다.

구름버섯, 목질진흙버섯, 노루궁뎅이버섯의 균사체 배양액의 ethyl acetate 추출물이 돼지와 가금류의 설사 유발 세균류인 *E. coli* K88, *E. coli* K99, *E. coli* 987P와 *S. typhimurium* 1405P 균주에 대하여 항균활성을 보였으며, 특히 구름버섯 추출물은 가장 높은 항균활성을 보였다. 한편, kanamycin과 ampicillin에 대해 내성을 보이는 *S. aureus* CARM3230과 *E. coli* CARM1381 균주에 대해서도 세가지 버섯 배양 추출물 모두 항균활성을 보였으며, 특히, 구름버섯 추출물은 가장 높은 항균활성을 보였다. 이는, 이들 버섯 균사체 배양 추출물이 기존 항생제 대체용으로 가축 사료에 첨가제로 사용될 수 있다는 가능성을 보였으며, 또한 이들 버섯류로부터 항생제 내성균을 억제할 수 있는 신규 항생물질의 탐색을 위한 기초자료로서 활용될 수 있으리라 사료된다.

제2절 항균활성물질 분리정제

2.2.1. 서론

1930년대 페니실린이 발견되어 여러 세균, 특히 포도상구균(*Staphylococcus aureus*)에 높은 항균력을 보여 세균감염 치료에 지대한 역할을 했으나, 항생제 내성으로 효력이 곧 사라지게 되었다. 메티실린이 도입되면서 포도상구균 감염증의 치료에 크게 기여해 왔으나, 1961년 영국에서 메티실린 내성 포도상구균(methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, MRSA)이 처음 보고되었고, 1970년대 호주에서 MRSA에 의한 집단발생이 보고된 이후 전 세계적으로 계속 발생하고 있다(Lockley *et al.*, 1982; Crowford, 1995). Gram 양성 구균인 *S. aureus*는 수술부위의 감염, 폐렴 등 병원 내 감염을 일으키는 균으로 알려져 있으며, 장염을 일으키고 다발성 장 궤양과 천공을 초래하며(Francis, 1995; Han *et al.*, 1999), 피부연조직 감염증, 골관절염, 폐렴, 균혈증 등 중증 감염증을 일으키는 병원체이고, Gram 음성 간균인 *Pseudomonas aeruginosa*는 눈 조직의 염증을 일으키는 가장 일반적인 병원균으로 피부, 뼈, 눈, 귀, 요도관, 심장 등의 질병의 원인이며, 특히 면역력이 약화되어 있는 환자에게 치명적이다(Kielhofner *et al.*, 1992). 특히, MRSA는 methicillin 뿐 만 아니라 cephalosporin, ampicillin, kanamycin, oxacillin 등 다양한 항생제에 내성을 나타내고, *Pseudomonas aeruginosa* 등 많은 병원균도 여러 항생제에 복합적인 항생제 내성을 보이는 것으로 보고되고 있어 이들에 감염되면 질병유발율과 사망률이 높은 편이며(Cohen *et al.*, 1991; Troillet *et al.*, 1997), 우리나라에서도 1980년대부터 여러 병원에서 MRSA 발생이 보고되고 왔고, 최근에는 여러 항생제에 내성을 보이는 균주들의 출현빈도가 증가하고 있어, 이들 다제내성균들을 제어할 새로운 항생제의 개발이 시급한 사회적 관심사로 대두되고 있는 실정이다. 내성균 출현 문제와 함께 위장장애, 피부 발진, 독성 등 기존 항생제의 부작용 또한 심각한 문제가 되고 있어, 기존 항생물질과 같은 효과를 가지며 인체에 대해 무해한 항균물질을 천연물로부터 개발하기 위한 연구가 활발히 진행되고 있다.

버섯의 항균성(Vogel *et al.*, 1974), 항암효과(Ikekawa *et al.*, 1969) 및 효소(Eun *et al.*, 1989; Impoolsup *et al.*, 1982) 등에 대한 연구가 활발해지면서 버섯

유래 생리활성물질에 대한 관심도가 높아지고 있다.

본 연구에서는 감귤 농축액을 배지로 배양한 구름버섯 균사체 배양액의 ethyl acetate 추출물이 복합 항생제 내성균주인 *P. aeruginosa* CCARM2171에도 현저한 항균활성이 있음을 확인하여, *S. aureus* CCARM3230에 대한 항균활성과 비교하고, 그 활성물질을 정제하였다.



2.2.2. 재료 및 방법

1) 시험 균주 및 배양

시험균주는 kanamycin과 ampicillin에 내성을 갖는 *Staphylococcus aureus* CCARM3230과 cefotaxime, gentamycin, norfloxacin, piperacillin등에 내성을 갖는 *Pseudomonas aeruginosa* CCARM2171 균주를 서울여자대학교 항생제내성균주은행에서 분양받아 사용하였다.

2) 항균활성측정

항균력 시험은 Difco사의 mueller hinton(Detroit Michigan, USA) 평판배지에 시험균액을 직접 도말하고, 디스크 확산법(disc plate method)으로 측정하였다.

3) 항균물질의 분리 및 정제

항균활성 물질을 정제하기 위해, dichloromethane(DCM)에 녹인 Ethyl acetate(EA) 추출물을 Merck Silica Gel 60(particle size: 0.063-0.2 mm)이 충전된 glass column(2.5×15 cm)에 올리고, column의 두 배 부피의 DCM, DCM:Methanol(9:1, 8:2, 6:4, 1:9, v/v)로 순차적으로 용출한 다음 Methanol (100%), EA(100%)로 용출하였다(Fig. 2-5). 얻어진 각 분획물을 회전감압농축기로 농축하고 동결건조 한 후, 동량의 건조 분획물을 10% Dimethylsulfoxide (DMSO)에 각각 녹여 *S. aureus* CARM3230 균주에 대해 디스크 당 10 mg되게 처리하여 디스크 확산법으로 항균활성을 비교하였다.

4) HPLC 분석

항균활성이 있는 각 분획물을 HPLC로 분석하여 분획별 활성물질을 확인하여 정제 여부를 확인하였다. 각 활성 분획물을 methanol에 녹이고 0.45 μm syringe filter로 여과한 후, Luna 5 μL silica column(250×4.6 mm, Phenomenex, USA)이 장착된 HPLC(P680 HPLC system, Dionex CO, USA)를 이용하여 10 μL를 injection하여 1.0 mL/min 속도로 acetonitrile/methanol(6:4, v/v) 용매로 20분간 isocratic mode로 용출하면서, ELSD(Evaporative Light Scattering Detector, Alltech, USA) 검출기로 Drift tube temperature 90°C, gas flow 2 L/min 조건에서 분석하였다.

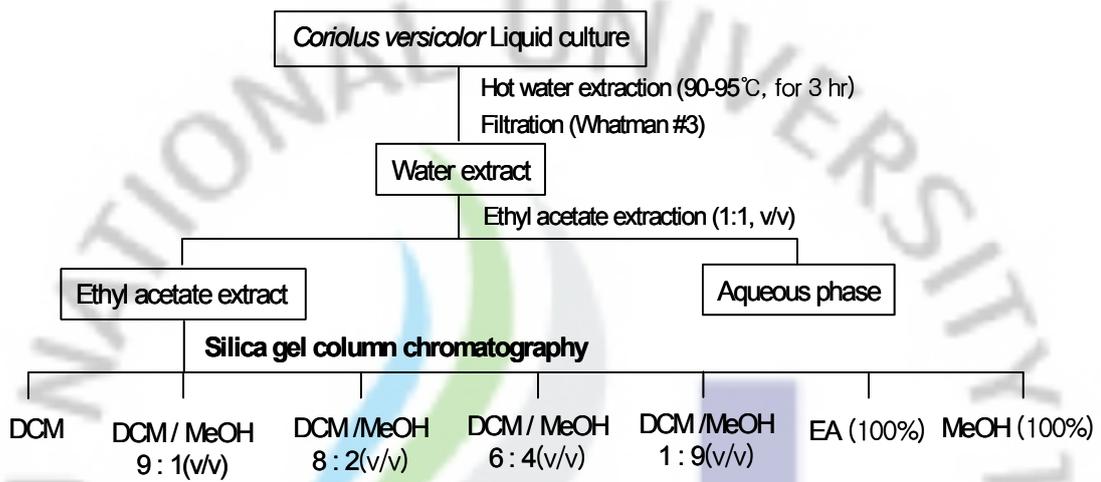


Fig. 2-5. Procedure for extraction and purification of antibiotic substance from the *Coriolus versicolor* mycelial liquid cultures grown in 10% citrus medium.

2.2.3. 결과 및 고찰

1) 다제내성균주에 대한 항균활성

감귤농축액을 배지로 하여 구름버섯 균사체를 배양한 후 배양추출물로부터 얻어진 ethyl acetate 추출물의 다제내성균주(multidrug resistant bacteria)에 대한 항균활성을 디스크 확산법으로 측정하였다. Fig. 2-4과 Table. 2-3에 나타난 바와 같이, 항균실험의 대조군으로서 기존 항생제인 ampicillin과 kanamycin(12.5 µg/disc)에 대해 항생제 내성 균주인 *S. aureus* CARM3230와 *P. aeruginosa* CCARM217 모두 생육저해를 받지 않은 반면, 추출물을 디스크 당 12.5 mg으로 처리하였을 때, *P. aeruginosa* CCARM2171는 평균 12 mm(Fig. 2-4)의 생육저해를 보였으며, *S. aureus* CCARM3230에 대해서는 17 mm의 증식 저해를 보여(Fig. 2-4), 구름버섯 균사체 배양액의 ethyl acetate 추출물이 시험 균주 모두에서 현저한 항균활성을 보였다. 이러한 결과는 표고버섯 자실체의 물 및 에탄올 추출물의 일반 병원성 세균인 *S. aureus*, *E. coli*, *S. typhimurium*,에 대한 항균활성(추출물 43.1 mg/disc)결과에 비해 높은 항균 활성이 있는 것으로 나타났다(Kupka *et al.*, 1979). 그러나, Lee *et al.*, (2005)이 보고한 감초의 CHCl₃과 hexane 추출물 2 mg/disc이 methicillin 내성균인 MRSA균주에 13-16 mm의 생육저해를 나타낸 결과보다는 약간 낮은 활성을 보였으며, Park *et al.*, (2001)이 보고한 복분자 추출물(10 mg/disc)이 16.6 mm의 생육저해를 나타낸 결과와 오배자(Choi, 2003) 및 소목유래(Lee, 2003)의 추출물에 대한 항균활성의 효과와는 유사한 경향을 보였다.

2) 항균물질의 분리 및 정제

감귤농축액에서 배양한 구름버섯 균사체 배양액으로부터 항생제 내성균에 대한 항균활성물질의 분리 및 정제 과정을 Fig. 2-5에 나타냈다. 균사체 배양액의 열수 추출물에 동일 부피의 ethyl acetate로 처리하여 얻어진 추출물을 Silica Gel 60 column chromatography로 분획하고 각 분획물에 대해 디스크 확산법 (10 mg/disc)으로 *S. aureus* CARM3230 균주에 대한 항균활성을 측정한 결과, DCM 분획물과 MeOH 분획물, EA 분획물에서는 항균활성이 보이지 않았으나,

DCM:MeOH(9:1, v/v)의 용매조건으로 용출한 분획물의 항균활성이 14.5 mm로 다른 분획물과 비교했을 때 가장 높았다. DCM:MeOH(8:2, v/v)의 용매로 용출된 분획물의 항균 효과는 4 mm로 약했으며, 6:4(v/v)인 경우는 1.5 mm로 미약하였고, 1:9(v/v)의 용매 분획물에는 항균활성을 보이지 않았다(Fig. 2-6).

항균활성이 가장 높은 DCM:MeOH(9:1, v/v) 분획물의 정제도를 알아보기 위해 HPLC 시스템으로 분석한 결과, 조정제물인 EA 추출물에서는 retention time이 각각 3.879 (peak a), 4.267 (peak b)에서 두 개의 major peaks가 검출되었다(Fig. 2-8). 그러나 EA 추출물을 silica gel chromatography로 분획하고 각 분획물 중 항균활성이 가장 높았던 DCM:MeOH(9:1, v/v) 분획물에서는 retention time이 3.703분에서 단일 피크로 검출되었다(Fig. 2-7). 결과적으로 두 개의 주요 물질 중 항균활성 물질이 3.703분에서 단일 피크로 검출되는 (a) peak의 물질이며, 이 활성물질이 높은 순도로 정제되었음을 보였다(Fig. 2-7).

S. aureus CCARM3230은 ampicillin, kanamycin, oxacillin, methicillin에, *P. aeruginosa* CCARM2171은 ampicillin, kanamycin, cefotaxime, gentamycin, norfloxacin, piperacillin 등의 항생제에 대해 복합적인 내성을 보이는 복합 내성 균주들로서, 본 추출물이 이들 다제내성 균주들에 대해 현저한 항균 활성을 보인 것은 새로운 항균물질로서의 가능성을 보여주는 것으로 사료되었다.

P. aeruginosa CCARM2171 과 *S. aureus* CCARM3230 균주 모두에서 현저한 항균활성을 나타낸 것은 본 추출물의 활성물질이 광범위 항균 스펙트럼을 갖는 신규의 항생물질로 개발될 수 있는 가능성을 보였다. 이러한 결과는, 특히, 항생물질의 남용으로 인해 기존 항생물질에 대해 내성 및 다제내성균의 출현빈도가 외국에 비해 월등히 높은 우리나라의 현실에서 매우 의미 있는 연구결과라 사료된다.

Table 2-3. Antibacterial activities of the ethyl acetate extract of *Coriolus versicolor* liquid cultures grown in 10% citrus medium against antibiotic resistant bacterial strains.

Strains	Inhibition zone(mm) ^{a)}		
	Ethyl acetate extract of <i>Coriolus versicolor</i>	Ampicillin	Kanamycin
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> CCARM2171	12	0	0
<i>Staphylococcus aureus</i> CARM3230	17	0	0

^{a)} Cells were grown on MH plates for 24 h at 37°C after the ethyl acetate extract of *Coriolus versicolor* liquid cultures was absorbed into paper disc(12.5 mg/8 mm disc) and then the diameter(mm) of the growth inhibition zone was measured. Kanamycin and ampicillin(12.5 µg/disc) were used as references. The values were the mean of triplicates.

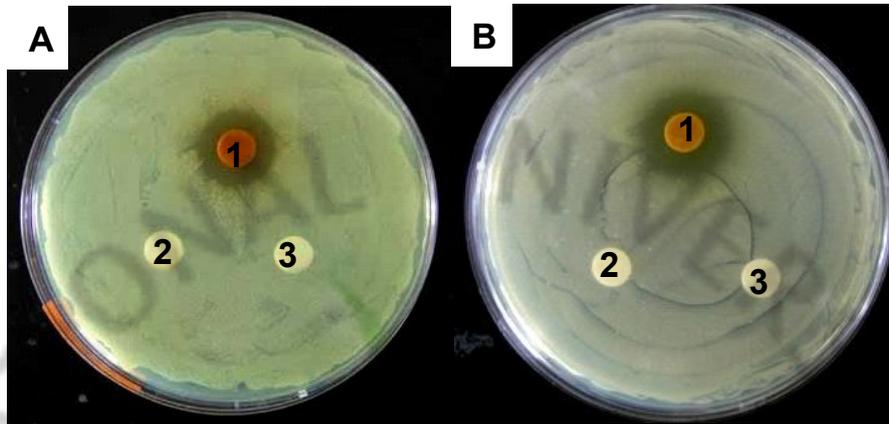


Fig. 2-6. Antibacterial activities of the ethyl acetate extract of the mycelial liquid cultures of *Coriolus versicolor* grown in 10% citrus medium against Korean isolates of antibiotic resistant bacterial strains.

(A) *P. aeruginosa* CCARM2171; (B) *S. aureus* CCARM3230.

1, ethyl acetate extract of *Coriolus versicolor* (12.5 mg/disc); 2, ampicillin (12.5 μ g/disc); 3, kanamycin (12.5 μ g/disc).

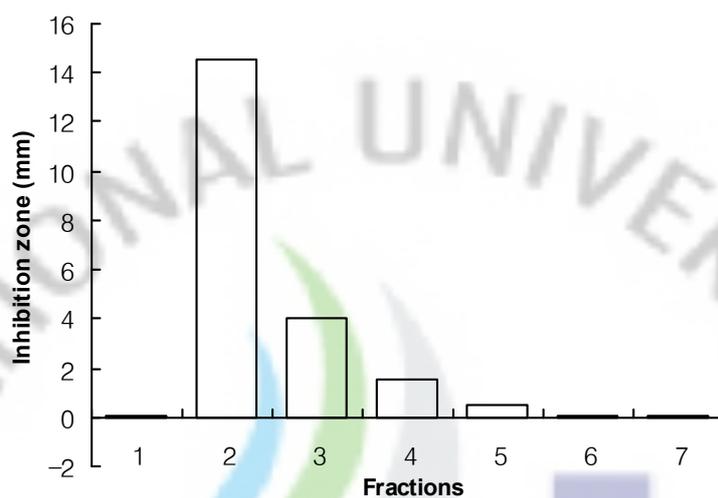


Fig. 2-7. Antibacterial activities of each fraction eluted from the silica gel column.

The ethyl acetate extracts of the *Coriolus versicolor* mycelial liquid cultures grown in 10% citrus medium were dissolved in dichloromethane, applied to Silica Gel 60 column, and eluted with mixtures of solvents: 1, dichloromethane(DCM); 2, DCM/methanol(MeOH)(9:1, v/v); 3, DCM/MeOH(8:2, v/v); 4, DCM/MeOH(6:4, v/v); 5, DCM/MeOH(1:9, v/v); 6, MeOH(100%); 7, ethyl acetate(100%). The antibacterial activity of each fraction was determined by measuring the inhibition zones created on the growth of *S. aureus* CCARM3230.

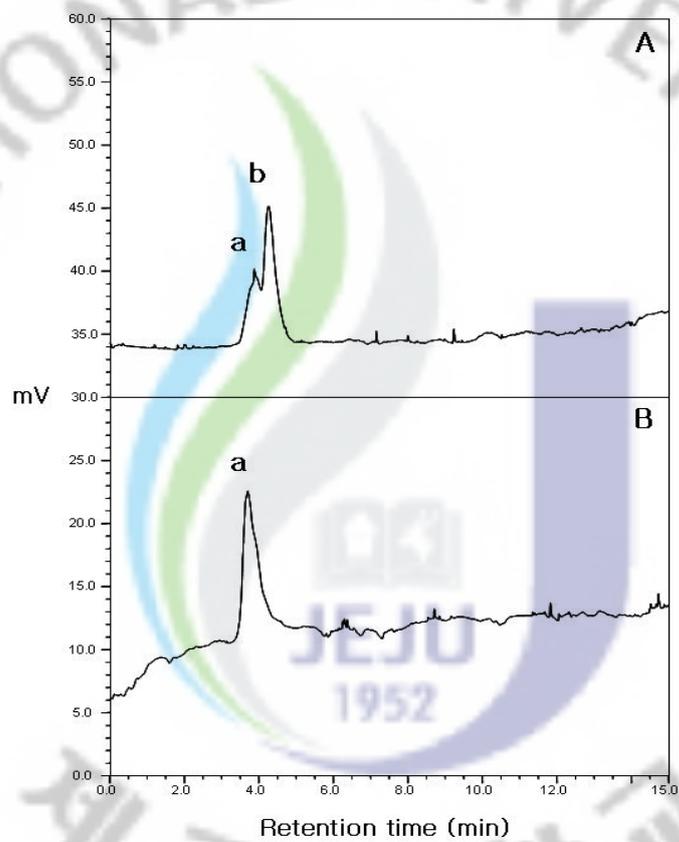


Fig. 2-8. HPLC analysis of the most active fraction from the Silica Gel 60 column for evaluating the degree of purification.

2.2.4. 요약

구름버섯 균사체를 감귤농축액에서 7일간 배양한 배양액을 열수 추출한 후 균사체 잔사를 제거하고, 동량의 ethyl acetate (v/v)로 추출하였다. 추출물을 10% DMSO에 녹여 디스크 확산법으로 MRSA 균주인 *S. aureus* CCARM3230와 *P. aeruginosa* CCARM2171에 균사체추출물을 12.5 mg/disc로 처리하여 항균활성을 조사한 결과, *S. aureus* CCARM3230에 대해서는 17 mm, *P. aeruginosa* CCARM2171에 대해서는 12 mm의 생육저지환을 보였다. 본 추출물을 silica gel chromatography로 분획하고 각 분획물에 대해 디스크 확산법(10 mg/disc)으로 *S. aureus* CCARM3230 균주에 대한 항균활성을 측정된 결과, DCM:MeOH (9:1, v/v)의 용매조건으로 용출한 분획물의 항균활성이 14.5 mm로 다른 분획물과 비교했을 때 가장 높았으며, 활성물질이 높은 순도의 단일 물질로 정제되었음을 HPLC 시스템으로 확인하였다. *P. aeruginosa* CCARM2171과 *S. aureus* CCARM3230 균주 모두에서 현저한 항균활성을 나타낸 것은 감귤농축액으로 배양한 구름버섯 균사체 배양 추출물의 활성물질이 광범위 항균 스펙트럼을 갖는 신규의 항생물질로 개발될 수 있는 가능성을 보여주는 것으로 사료되었다.

제3장 수종 약용 버섯균사체의 배양특성 및 혼합배양 특성

3.1 서론

구름버섯 (*Coriolus versicolor*)은 일명 운지버섯이라고도 불리며 전통적으로 건강보조식품이나 민간치료약으로 이용되었으며, 구름버섯의 일반성분은 수분 5.62%, 단백질 4.20%, 탄수화물 65.09%, 섬유질 23.24%, 회분 6.37%, 지방질 1.10%을 함유하고 있다(Mau *et al.*, 2001). 구름버섯의 특수성분인 핵산과 아미노산, 다당류, 스테로이드 등이 보고되었고(Cui *et al.*, 2003; Yokokawa, 1980). 구름버섯 균사체 액체배양액에서 추출한 단백다당체의 구성성분은 다당체 42.2%, 단백질 10.5%라 하였다(Lee *et al.*, 1992).

영지(*Ganoderma lucidum*)은 다공균과 불로초속에 속하는 담자균으로서 항균, 항바이러스, 콜레스테롤 저하, 혈압강하, 항혈전, 면역증강 및 항종양작용등을 나타내는 약효성분이 보고되었고(Jang, 1992), 표고(*Lentinus edodes*)에서는 hypocholesterol성 물질인 lentinacin과 항암성 물질인 lentinan을 생성하며 polyene 계의 항균활성, 항바이러스 작용이 있는 물질이 알려져 있다(Chihara *et al.*, 1971).

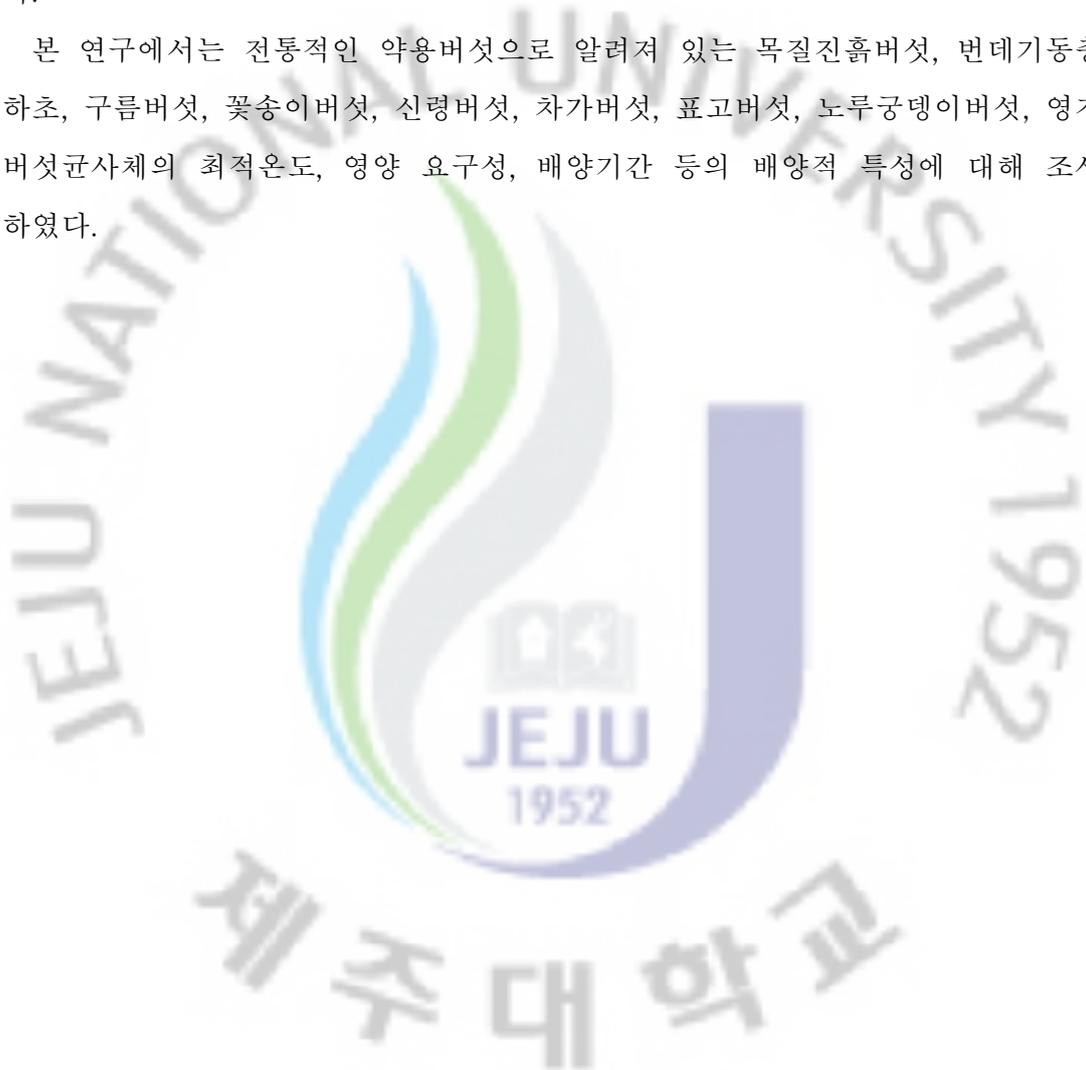
표고버섯(*Lentinus edodes*)의 약리효과는 자실체뿐만 아니라 액체배양액에서도 여러 효능을 가지는 물질이 보고되었는데 자실체 및 배양액에 존재하는 다당체가 종양에 대한 생체고유의 방어력을 높여줌으로써 간접적으로 종양세포의 증식을 저해하거나(Chihara, 1985), 암세포나 병원성균을 직접사멸시키는 역할을 하는 대식세포의 수를 증가시키는 작용한다는 보고가 있다(Takehara, 1975).

목질진흙버섯으로 알려진 *P. linteus*와 *P. igniarius*가 *Phellinus*속의 균종중에서도 매우 강력한 종양저지율을 나타내는데, 이들의 자실체 추출물이 각각 96.7% 및 87.4%의 높은 항암능을 나타내는 것으로 보고되어 있다(Ikekawa, *et al.*, 1986; Shibata *et al.*, 1968).

그 외 박 등(1999)은 노루궁뎅이버섯(*Hericium erinacium*)의 약효가 신체의 면역기능을 강화시키고 위궤양, 십이지장 궤양, 만성장염 및 위암, 식도암의 치료

에도 효과적이라 보고 하였고, 차가버섯(*Inonotus obliquus*)은 다른 약용버섯과 마찬가지로 항종양 활성을 나타내는 다당체를 많이 함유하고 있고(kahlos *et al.*, 2002), 꽃송이버섯(*Sparassis crispa*)에 많이 함유된 성분이 활성화 된 백혈구의 수를 증가시킴으로써 세포조직의 면역기능이 향상되어 항암효과, 혈당량을 조절 함으로써 항당료, 혈압조절 작용 등의 효과(Ohno *et al.*, 2002; 2003)가 알려져있다.

본 연구에서는 전통적인 약용버섯으로 알려져 있는 목질진흠버섯, 번데기동충하초, 구름버섯, 꽃송이버섯, 신령버섯, 차가버섯, 표고버섯, 노루궁뎅이버섯, 영지버섯균사체의 최적온도, 영양 요구성, 배양기간 등의 배양적 특성에 대해 조사하였다.



3.2. 재료 및 방법

3.2.1. 평판 배양

온도 및 pH 실험에는 PDA 및 YM agar 평판의 중앙에 접종원으로 사용할 균사의 선단을 내경 6mm의 cork borer로 취하여 접종하였으며, 온도 실험을 제외하고 28±1℃의 항온배양기에서 암 배양하였다.

3.2.2. 액체배양

각각의 액체배지는 300 mL 삼각 flask에 100 mL씩 분주하여 고압 멸균하였다. 공시균주 균사체를 Cork borer(6mm)로 5개씩 떼어서 접종하였다. 배양은 120rpm의 회전수에 온도는 20~35 ℃사이에서 진탕배양을 하였으며, 실험 배양균에 따라 7일에서 15일까지 배양하였다.

3.2.3. 균총의 신장직경

적정온도 및 pH실험에서 일정 기간 배양 후 접종된 균사절편의 중심의 직교하는 수직선과 수평선을 평판배지인 페트리디쉬의 밑면에 유성펜으로 종축과 횡축의 직경을 24시간 단위로 측정하여 두 값을 평균하여 균총의 신장직경(mm/day)을 조사하였다.

3.2.4. 균사체의 건조중량

배양된 균사체 현탁액을 Whatman paper 2 (110mm)로 걸러 균사체와 배양액을 분리한 다음 균체에 잔류하는 배지성분을 제거하기 위하여 증류수로 충분히 세척한 후 60℃의 항온기에서 24시간 건조하여 건조균체량 (g/L)으로 환산하여 나타내었다.

3.2.5. 세포의 다당체 함량

배양액을 여과하여 여과액과 균사체를 분리한 다음 균사체는 버리고 여과액을 모아 감압 농축기로 1/10로 농축한 후 3배량의 ethanol을 가하여 4℃에서 24시간 방치하였다. 생성된 침전물을 8,000 rpm에서 30분간 원심분리로 수거한 뒤 증류

수로 2회 세척한 후 동결 건조하여 세포의 다당체 (g/L)를 얻었다

3.2.6. 영양 요구성

1) 탄소원

9 균주의 균사생장에 적합한 탄소원을 선발하기 위하여 YM medium를 기본배지로 하여 glucose와 9종의 탄소원을 각각 2% (W/V) 농도로 첨가하여 배지를 조제하였다.

2) 질소원

균사생장에 적합한 질소원을 선발하기 위하여 YM medium를 기본배지로 하여 yeast extract 외 12종의 유기·무기질소원을 각각 0.5% (W/V) 농도로 첨가하여 배지를 조제하였다.

3) 무기염류

균사생장에 적합한 무기염류를 선발하기 위하여 YM medium를 기본배지로 하여 K_2HPO_4 와 7종의 무기염류를 각각 0.1% (W/V) 농도로 첨가하여 배지를 조제하였다.

4) 배양기간

배양온도 27°C, 교반속도 200 rpm, 접종량 5%로 하였고 250 mL 삼각플라스크에 배지액량 100 mL로 하여 배양하였으며 초기 pH는 조절하지 않고 10일간 배양을 실시하였다.

3.3 결 과 및 고찰

3.3.1. 균사생육환경조건

1) 최적온도

9균주의 균사생장에 미치는 온도의 영향을 조사한 결과(Fig. 3-1), 구름버섯은 25℃ 전후의 조건에서 배양이 완료되었고, 신령버섯과 노루궁뎅이버섯, 꽃송이버섯은 20~25℃에서 균사생장이 우수하였으며, 목질진흠버섯과 영지버섯, 표고버섯은 25~30℃에서 균사의 생장이 우수하였다. 또한 번데기동충하초와 차가버섯은 25℃에서 균사생장이 우수하게 나타났다. 대체적으로 25℃ 전후에서 균사의 생장이 우수하게 나타났으며 20~30℃ 정도의 조건에서 균사생장이 가능하였다. 이는 대부분의 버섯류 생육 최적온도가 25~30℃ 범위로 알려진 것과 잘 일치 하였다.

2) pH

초기 pH의 영향을 조사한 결과, 표고버섯은 pH 4의 산성조건에서 균사생장이 우수하였고, pH 5의 약산성조건에서는 구름버섯, 꽃송이버섯, 영지버섯, 노루궁뎅이버섯이 균사생장이 우수하였으며, pH 6이상에서는 신령버섯, 번데기동충하초, 차가버섯에서 균사생장이 우수하였다. pH 7 정도의 중성조건에서는 상황버섯이 균사생장이 우수하였다. 전체적으로 pH 4.5~6.5의 넓은 약산성의 범위에서 균사생장이 우수하였고(Fig. 3-2), 번데기동충하초 균사체만이 pH 6 이상의 조건에서 균사의 성장속도가 차이를 보였는데 이는 pH 6.0~8.0에서 균사 생장이 양호하다는 보고(성 등, 2002)와 일치하였다.

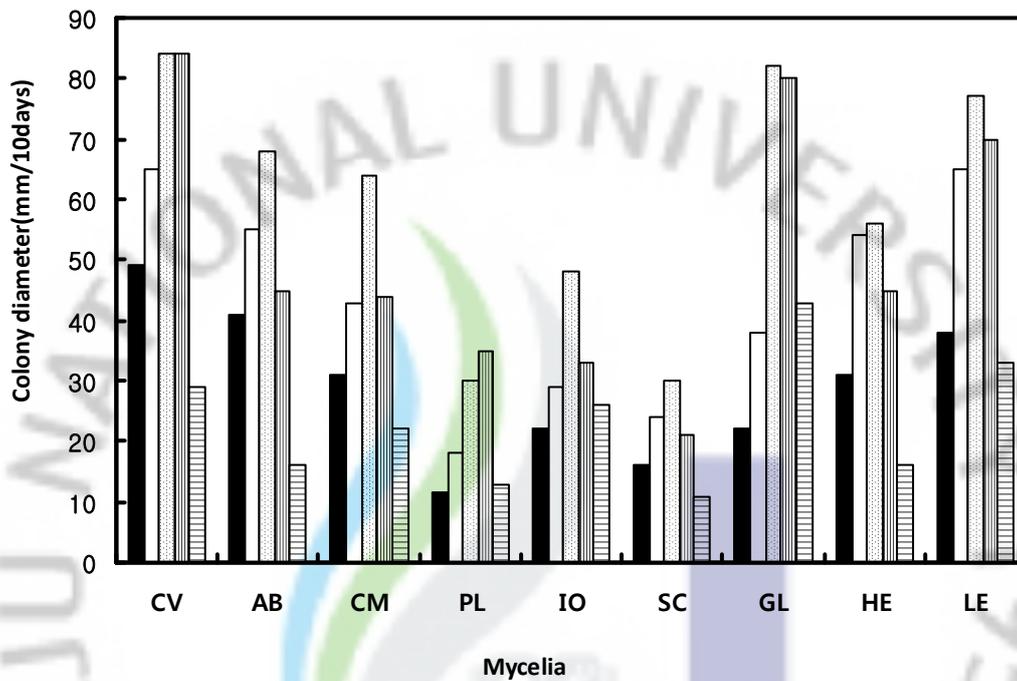


Fig. 3-1. Effect of temperature on mycelial growth of different fungal species. CV, *Coriolus versicolor*; AB, *Agaricus blazei*; CM, *Cordyceps militaris*; PL, *Phellinus linteus*; IO, *nonotus obliquus*; SC, *Sparassis crispa*; GL, *Ganoderma lucidium*; HE, *Hericium erinacium*; LE, *Lentinus edodes*; ■, 15°C; □, 20°C; ▨, 25°C; ▩, 30°C; ▪, 35°C.

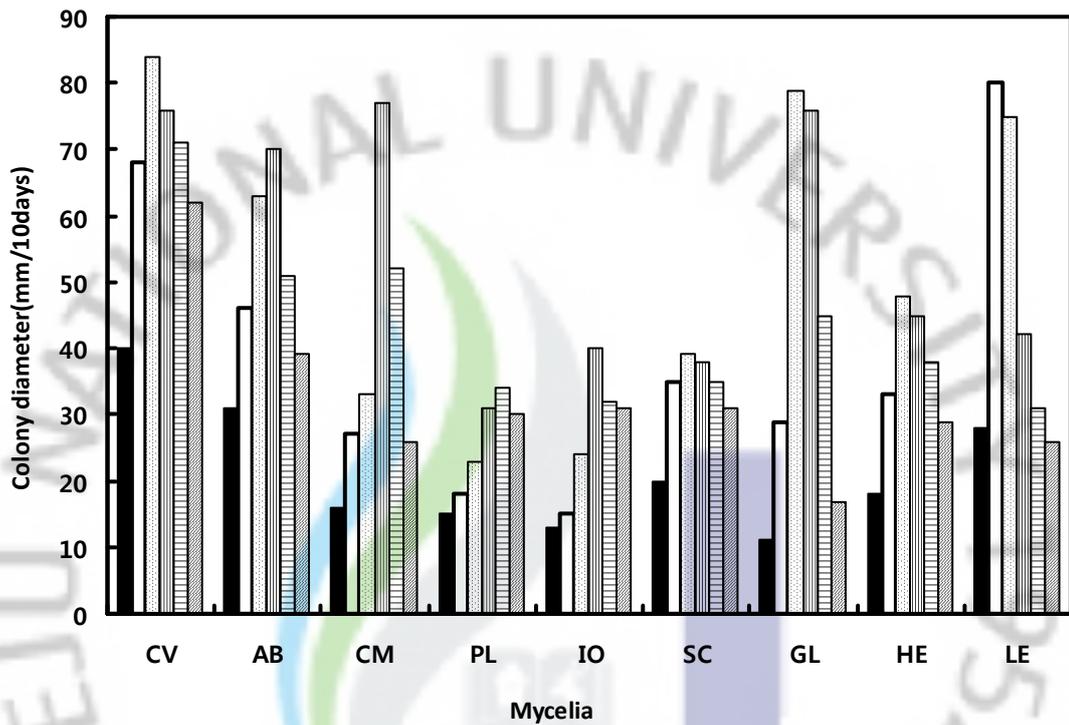


Fig. 3-2. Effect of pH on mycelial growth of different fungal species.
 CV, *Coriolus versicolor*; AB, *Agaricus blazei*; CM, *Cordyceps militaris*; PL, *Phellinus linteus*; IO, *nonotus obliquus*; SC, *Sparassis crispa*; GL, *Ganoderma lucidium*; HE, *Hericium erinacium*; LE, *Lentinus edodes*; ■, pH 3; □, pH 4; ▨, pH 5; ▩, pH 6; ▪, pH 7; ▫, pH 8.

3) 영양요구성

가) 탄소원

탄소원은 세포구성성분의 50%를 차지하고 있어 균사체 증식에 있어서 구성 성분이 될 뿐만 아니라 증식에 필요한 에너지원으로 작용하므로 각 균주에 대한 적정탄소원을 규명하여 배양의 효율을 높일 수 있을 것이다.

각 탄소원에 대한 9균주의 균사생장에 미치는 영향을 조사한 결과 Fig.3-3, Fig. 3-4, Fig. 3-5과 같았다.

구름버섯의 경우 mannitol을 첨가한 배지에서 균체량이 가장 우수하였다. 그리고 galactose, xylose에서 비교적 높은 균체량이 형성되었고 그 외의 탄소원에서도 균사생장에는 비교적 우수하였으며, 세포외 다당체 생성에서는 soluble starch에서 비교적 높은 세포외 다당체를 형성하였다.

신령버섯에서는 mannose가 가장 높은 균체량이 형성되었고, fructose, glucose에서도 비교적 높은 균체량이 형성된 반면, sucrose, maltose에서는 균사생장이 낮게 나타났다. 세포외다당체 형성은 glucose, galactose, soluble starch에서 우수하였다.

번데기동충하초에서는 sucrose가 가장 높은 균체량을 형성되었고 glucose, soluble starch에서 높은 균체량이 형성된 반면, mannitol, fructose에서는 탄소원 첨가 효과가 나타나지 않았다. 세포외 다당체 형성은 soluble starch, xylose에서 우수하였고, 다른 균에 비해 세포외 다당체 형성도 우수하게 나타났다.

목질진흙버섯의 경우 soluble starch에서 가장 높은 균체량이 형성되었고, xylose, maltose에서 비교적 높은 균체량을 형성되었고, 전체적으로 탄소원 첨가 효과가 있다. 세포외 다당체 형성에서도 soluble starch에서 다당체형성이 우수하였다.

차가버섯의 경우 maltose에서 가장 높은 균체량이 형성되었고, sucrose, mannitol에서 비교적 높은 균체량을 형성되었다. 그리고 세포외 다당체 형성에서는 maltose, fructose에서 다당체 형성이 우수하였다.

꽃송이버섯에서는 mannitol에서 가장 높은 균체량이 형성되었고, maltose, fructose, xylose에서 비교적 높은 균체량을 형성되었고, 세포외 다당체 형성에서

도 mannitol에서 가장 높은 세포외 다당체가 형성되었다. 정 등(2008)에 의하면, 꽃송이버섯은 dextrin, starch, mannitol등의 다당류는 잘 이용하지 못한다는 보고와는 차이가 있었다. 이는 배양방법의 차이, 공시균주의 특성에 기인한 것으로 사료된다.

영지버섯의 경우 soluble starch에서 가장 높은 균체량이 형성되었고, mannose, maltose에서도 비교적 높은 균체량을 형성되었고, 세포외 다당체 형성에서도 soluble starch, mannose, glucose에서 높은 세포외 다당체가 형성되었다.

노루궁뎅이버섯의 경우 glucose에서 가장 높은 균체량이 형성되었고, xylose, mannose에서 비교적 높은 균체량을 형성하였고, 세포외 다당체 형성에서는 xylose, fructose에서 높은 세포외 다당체가 형성되었다.

표고버섯의 경우 mannitol에서 가장 높은 균체량이 형성되었고, soluble starch, glucose에서 비교적 높은 균체량이 형성되었으며, galactose에서 세포외 다당체 형성이 가장 우수하였다.

9종류의 버섯균사체의 탄소원을 조사한 결과 버섯의 종류에 따라 균사 생장에 적합한 탄소원의 종류가 상이하어 적정탄소원이 규명되어야 배양효율이 증대되리라 사료된다.

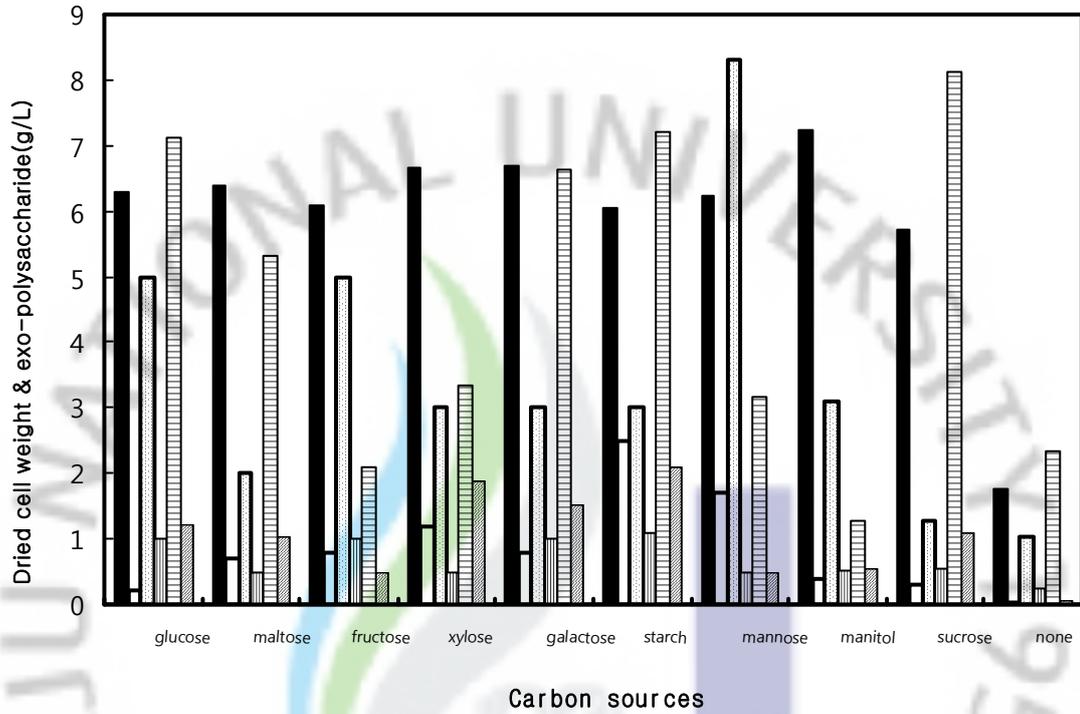


Fig. 3-3. Effect of various carbon sources on the mycelial growth of *Coriolus versicolor*, *Agaricus blazei* and *Cordyceps militaris*.

■, *Coriolus versicolor*(dried cell weight); □, *Coriolus versicolor*(exo-polysaccharide);
 ▨, *Agaricus blazei*dried cell weight); ▩, *Agaricus blazei*(exo-polysaccharide),
 ▤, *Cordyceps militaris*(dried cell weight); ▥, *Cordyceps militaris*(exo-polysaccharide).

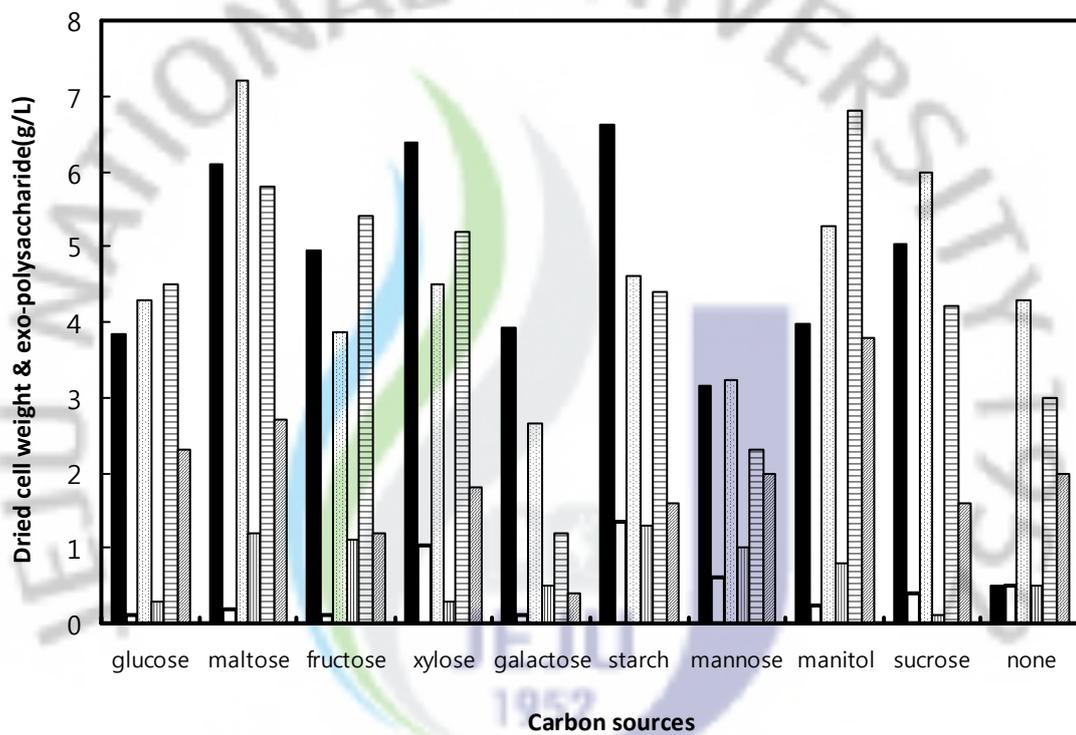


Fig. 3-4. Effect of various carbon sources on the mycelial growth of *Phellinus linteus*, *Inonotus obliquus* and *Sparassis crispa*.

■, *Phellinus linteus*(dried cell weight); □, *Phellinus linteus*(exo-polysaccharide);
 ▨, *Inonotus obliquus*(dried cell weight); ▩, *Inonotus obliquus*(exo-polysaccharide);
 ▤, *Sparassis crispa*(dried cell weight); ▥, *Sparassis crispa*(exo-polysaccharide).

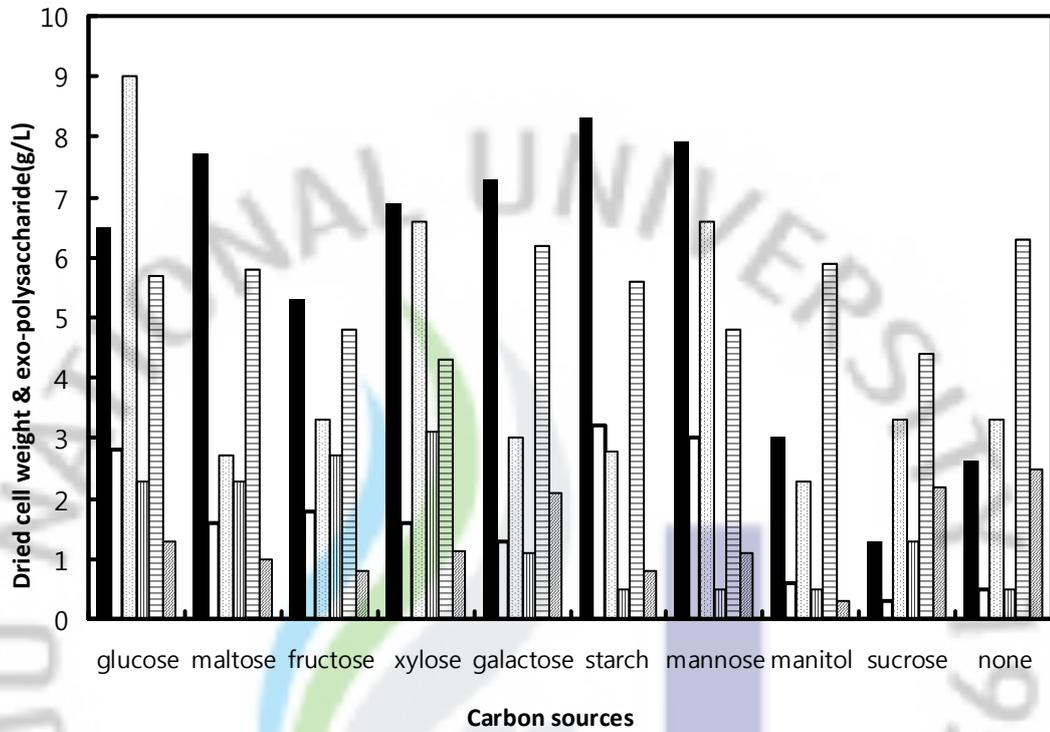


Fig. 3-5. Effect of various carbon sources on the mycelial growth of *Ganoderma lucidum*, *Hericium erinacium*, *Lentinus edodes*.

■ *Ganoderma lucidum*(dried cell weight); □ *Ganoderma lucidum*(exo-polysaccharide);
 ▤, *Hericium erinacium*(dried cell weight); ▥, *Hericium erinacium*(exo-polysaccharide);
 ▧, *Lentinus edodes*(dried cell weight); ▨, *Lentinus edodes*(exo-polysaccharide).

나) 질소원

9 균주에 대하여 질소원의 영향을 검토하기 위해 선발된 YM medium의 질소원인 yeast extract 대신에 9종의 질소원을 0.5%씩 첨가하여 실험을 수행한 결과는 Fig. 3-6, Fig. 3-7, Fig. 3-8과 같다.

구름버섯의 경우 yeast extract을 첨가한 배지에서 균사량이 가장 우수하였다. 그리고 soytone, malt extract에서 비교적 높은 균체량이 형성되었고 무기태질소에 비해 유기태질소에서 균사생장에는 비교적 우수하였으며, 세포외 다당체 생성에서는 soytone에서 비교적 높은 세포외 다당체를 형성하였다.

신령버섯에서는 soytone가 가장 높은 균체량이 형성되었고, trytone, yeast extract에서도 비교적 높은 균체량이 형성되었다. 세포외 다당체 형성은 trytone에서 다른 질소원보다 조금 우수하였으나 전체적으로 질소원이 세포외 다당체 형성에는 큰 영향이 미치지 않는 것으로 보인다.

번테기동충하초에서는 yeast extract가 가장 높은 균체량을 형성되었고 malt extract에서 비교적 균체량이 형성되었고, 세포외 다당체 형성은 malt extract, peptone에서 우수하였다.

목질진흙버섯의 경우 malt extract 에서 가장 높은 균체량이 형성되었고, yeast extract에서 비교적 높은 균체량을 형성되었고, 세포외 다당체 형성에서도 peptone에서 다당체 형성이 가장 우수하였다.

차가버섯은 yeast extract가 가장 높은 균체량이 형성되었고, malt extract에서 비교적 높은 균체량을 형성되었다. 그리고 세포외 다당체 형성에서는 yeast extract에서 다당체 형성이 우수하였다.

꽃송이버섯은 malt extract에서 가장 높은 균체량이 형성되었고, yeast extract, peptone에서 비교적 높은 균체량을 형성되었고, 세포외 다당체 형성에서도 yeast extract에서 가장 높은 세포외 다당체가 형성되었다.

영지버섯은 yeast extract에서 가장 높은 균체량이 형성되었고, trytone, malt extract에서도 비교적 높은 균체량을 형성되었고, 세포외 다당체 형성에서도 yeast extract, urea 에서 높은 세포외 다당체가 형성되었다.

노루궁뎅이버섯은 yeast extract에서 가장 높은 균체량이 형성되었고, soytone,

trytone에서 비교적 높은 균체량을 형성하였고, 세포의 다당체 형성에서도 yeast extract에서 높은 세포의 다당체가 형성되었다.

표고버섯의 경우 malt extract에서 가장 높은 균체량이 형성되었고, peptone, yeast extract에서 비교적 높은 균체량이 형성되었으며, yeast extract에서 세포의 다당체 형성이 가장 우수하였다.



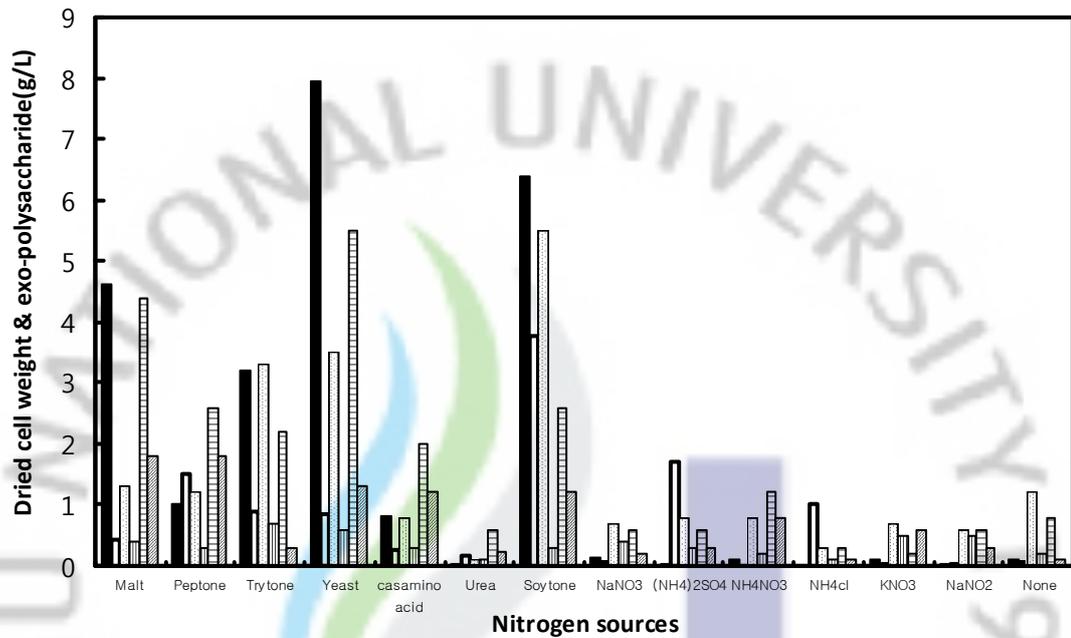


Fig. 3-6. Effect of various nitrogen sources on the mycelial growth of *Coriolus versicolor*, *Agaricus blazei* and *Cordyceps militaris*.

■, *Coriolus versicolor*(dried cell weight); □, *Coriolus versicolor*(exo-polysaccharide);
 ▨, *Agaricus blazei*(dried cell weight); ▩, *Agaricus blazei*(exo-polysaccharide);
 ▤, *Cordyceps militaris*(dried cell weight); ▥, *Cordyceps militaris*(exo-polysaccharide).

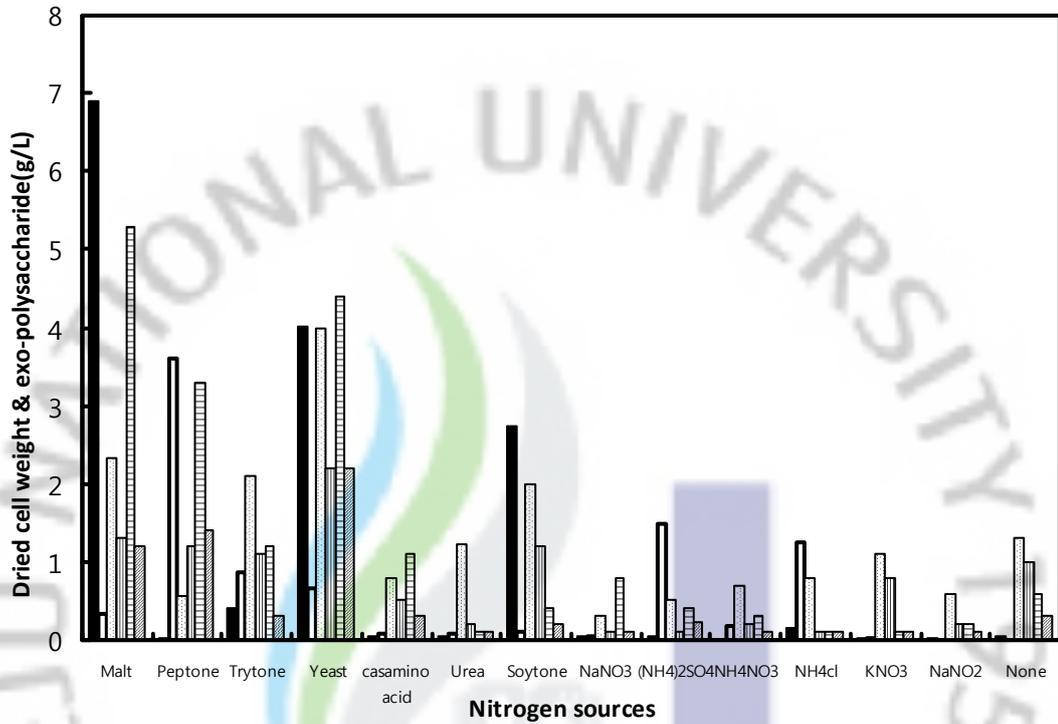


Fig. 3-7. Effect of various nitrogen sources on the mycelial growth of *Phellinus linteus*, *Inonotus obliquus* and *Sparassis crispa*.

■, *Phellinus linteus*(dried cell weight); □, *Phellinus linteus*(exo-polysaccharide);
 ▤, *Inonotus obliquus*(dried cell weight); ▥, *Inonotus obliquus*(exo-polysaccharide);
 ▧, *Sparassis crispa*(dried cell weight); ▨, *Sparassis crispa*(exo-polysaccharide).

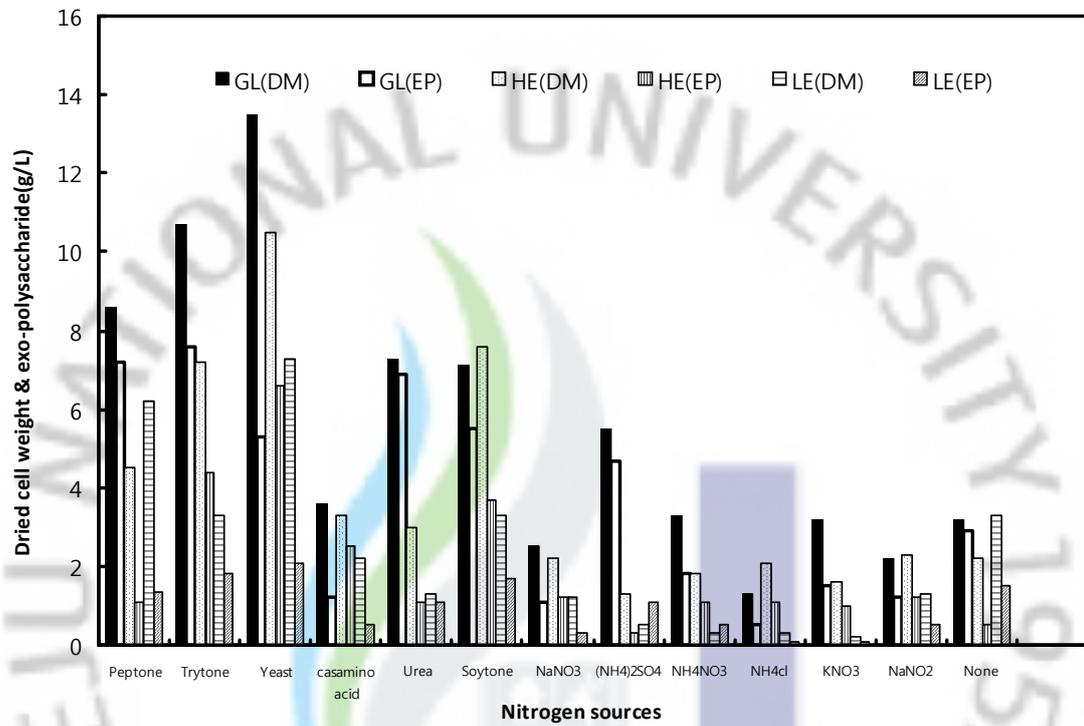


Fig. 3-8. Effect of various nitrogen sources on the mycelial growth of *Ganoderma lucidum*, *Hericium erinacium*, *Lentinus edodes*.

■ *Ganoderma lucidum*(dried cell weight); □ *Ganoderma lucidum*(exo-polysaccharide);
 ▨, *Hericium erinacium*(dried cell weight); ▩, *Hericium erinacium*(exo-polysaccharide);
 ▤, *Lentinus edodes*(dried cell weight); ▥, *Lentinus edodes*(exo-polysaccharide).

다) 무기염류

무기염류가 균체성장 및 세포의 다당체 생성에 미치는 영향을 검토하기 위하여 YM medium에서 KH_2PO_4 와 7종의 무기염류를 각각 0.1%씩 첨가하여 균체량 및 세포의 다당체를 측정 한 결과 Fig. 3-9, Fig 3-10, Fig. 3-11과 같았다.

구름버섯은 CaCl_2 을 첨가한 배지에서 균체량이 가장 우수하였다. 그리고 MgSO_4 , K_2HPO_4 에서 비교적 높은 균체량이 형성되었고, 세포의 다당체 생성에서는 K_2HPO_4 에서 비교적 높은 세포의 다당체를 형성하였다.

신령버섯에서는 K_2HPO_4 가 가장 높은 균체량이 형성되었고, MgSO_4 , FeSO_4 , KH_2PO_4 에서도 비교적 높은 균체량이 형성되었다. 세포의 다당체 형성은 MnSO_4 에서 가장 우수하였다.

번데기동충하초에서는 MgSO_4 가 가장 높은 균체량을 형성되었고 CaCl_2 에서 비교적 균체량이 형성되었고, 세포의 다당체 형성은 MgSO_4 에서 우수하였다.

목질진흙버섯은 KH_2PO_4 에서 가장 높은 균체량이 형성되었고, MgSO_4 에서 비교적 높은 균체량을 형성되었고, 세포의 다당체 형성에서는 FeSO_4 에서 다당체 형성이 가장 우수하였다.

차가버섯은 K_2HPO_4 가 가장 높은 균체량이 형성되었고, MgSO_4 에서 비교적 높은 균체량을 형성되었다. 그리고 세포의 다당체 형성에서는 K_2HPO_4 에서 다당체 형성이 우수하였다.

꽃송이버섯은 K_2HPO_4 에서 가장 높은 균체량이 형성되었고, KH_2PO_4 에서 비교적 높은 균체량을 형성되었고, 세포의 다당체 형성에서도 K_2HPO_4 에서 가장 높은 세포의 다당체가 형성되었다.

영지버섯은 KH_2PO_4 에서 가장 높은 균체량이 형성되었고, K_2HPO_4 , CuSO_4 에서도 비교적 높은 균체량을 형성되었고, 세포의 다당체 형성에서도 KH_2PO_4 , K_2HPO_4 에서 높은 세포의 다당체가 형성되었다.

노루궁뎅이버섯은 CaCl_2 에서 가장 높은 균체량이 형성되었고, K_2HPO_4 , MgSO_4 에서 비교적 높은 균체량을 형성하였고, 세포의 다당체 형성에서도 CaCl_2 , KH_2PO_4 에서 높은 세포의 다당체가 형성되었다.

표고버섯의 경우 CaCl_2 에서 가장 높은 균체량이 형성되었고, K_2HPO_4 에서 비교

적 높은 균체량이 형성되었으며, K_2HPO_4 에서 세포외 다당체 형성이 가장 우수하였다.



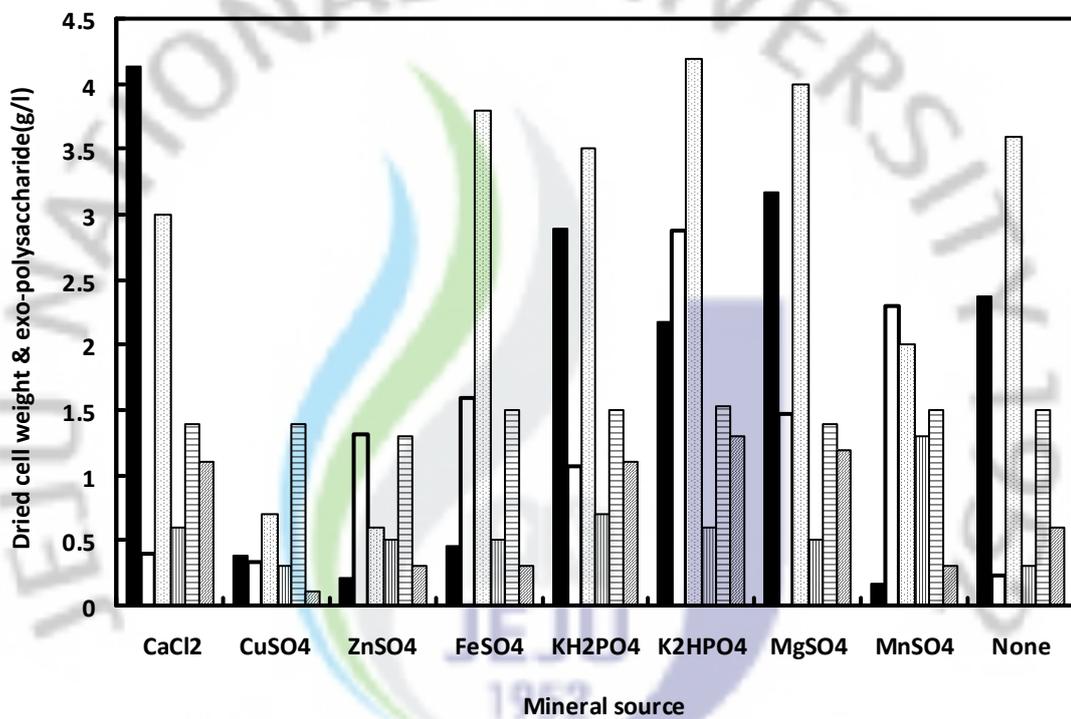


Fig. 3-9. Effect of mineral salt on mycelial growth of *Coriolus versicolor*, *Agaricus blazei* and *Cordyceps militaris*.

■ *Coriolus versicolor*(dried cell weight); □ *Coriolus versicolor*(exo-polysaccharide);
 ▨, *Agaricus blazei*(dried cell weight); ▩, *Agaricus blazei*(exo-polysaccharide);
 ▤, *Cordyceps militaris*(dried cell weight); ▥, *Cordyceps militaris*(exo-polysaccharide).

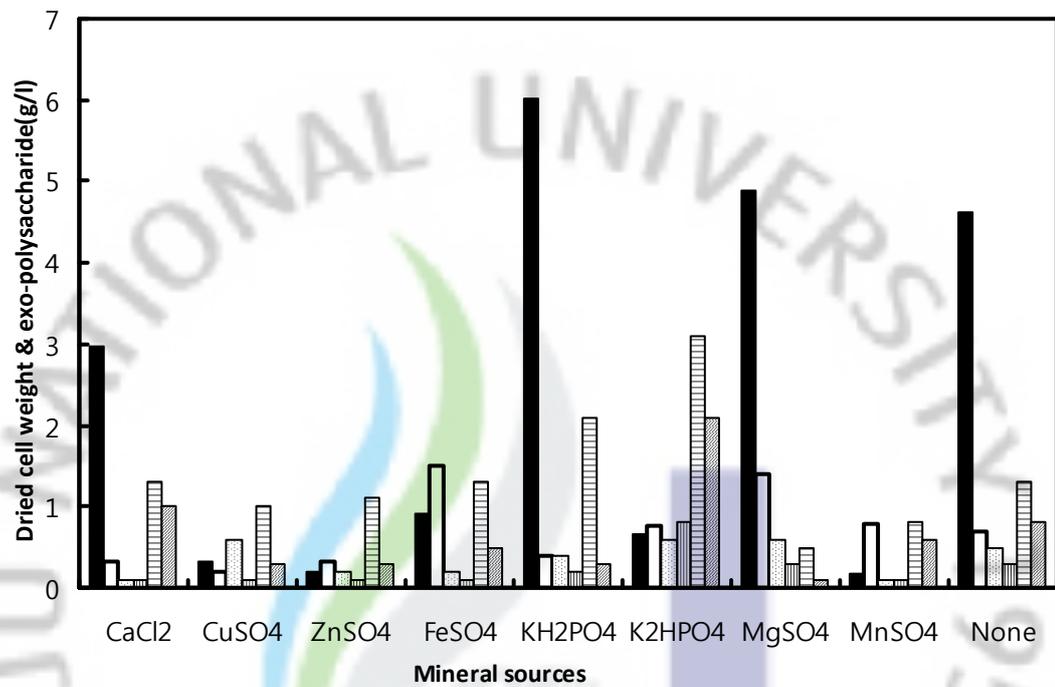


Fig. 3-10. Effect of mineral salt on mycelial growth of *Phellinus linteus*, *Inonotus obliquus* and *Sparassis crispa*.

■, *Phellinus linteus*(dried cell weight); □, *Phellinus linteus*(exo-polysaccharide);
 ▨, *Inonotus obliquus*(dried cell weight); ▩, *Inonotus obliquus*(exo-polysaccharide);
 ▤, *Sparassis crispa*(dried cell weight); ▥, *Sparassis crispa*(exo-polysaccharide).

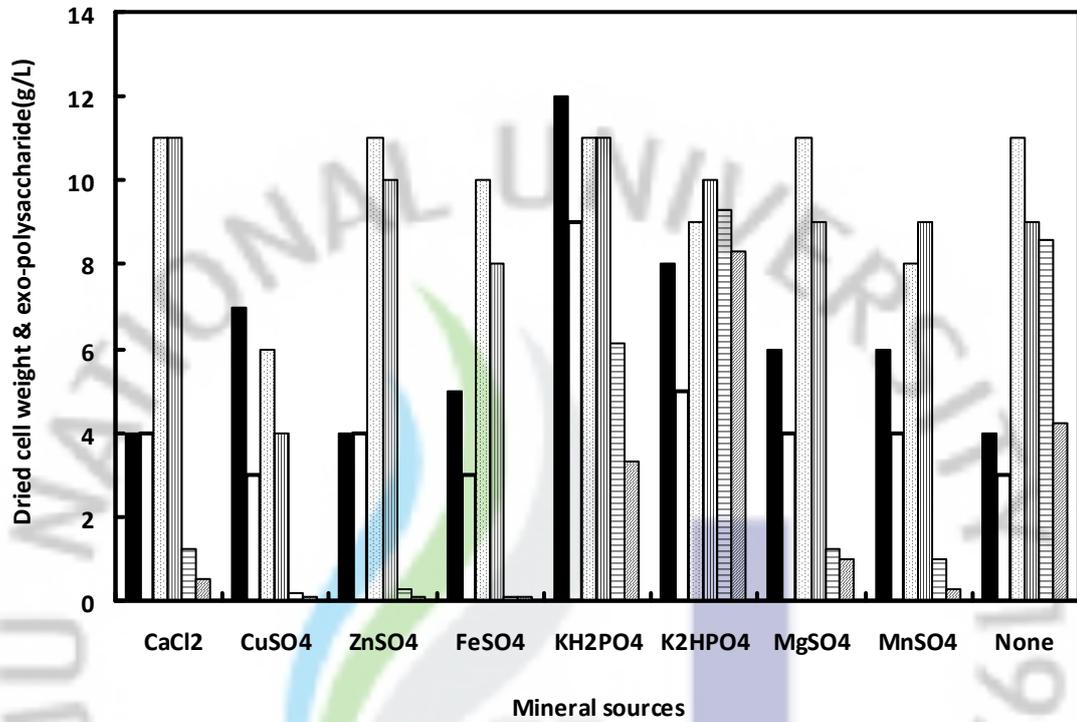


Fig. 3-11. Effect of mineral salt on mycelial growth of *Ganoderma lucidum*, *Hericium erinacium* and *Lentinus edodes*.

■ *Ganoderma lucidum*(dried cell weight); □ *Ganoderma lucidum*(exo-polysaccharide);
 ▨, *Hericium erinacium*(dried cell weight); ▩, *Hericium erinacium*(exo-polysaccharide);
 ▤, *Lentinus edodes*(dried cell weight); ▥, *Lentinus edodes*(exo-polysaccharide).

4) 배양기간

각각의 버섯균주는 배양온도 27℃, 교반속도 200rpm, 접종량 5%로 하였고 250mL 삼각플라스크에 배지액량 100 mL로 하여 배양하였으며 초기 pH는 조절하지 않고 실험을 실시하였다. 배지조건은 YM medium에 각각 균주에 적정조성을 하여 배양실험을 실시하였다.(Fig. 3-12)(Fig. 3-13)

구름버섯의 경우 지속적인 성장이 이루어지다가 4일 전후로 일시적 균체량의 증가가 둔화되다가 5일 이후에 지속적인 성장을 이루어 배양 8일경에 균체량이 6.0g에 정체를 이루었으며 이후에는 자가분해기로 이어졌다. 그리고 세포외 다당체 형성도 배양 8-9일경에 1.13g으로 가장 많이 생성하였다.

신령버섯의 경우 초기부터 지속적인 성장이 이루어지면서 배양 9일경에 균체량이 6.8g으로 배양 정점이 이루어지고 이후에는 균체량이 감소하였다. 세포외 다당체는 0.9g 이었다.

번데기동충하초는 배양 2일경부터 급격히 균체량이 급속하게 급증하였다가 배양 7-8일경에 균체량이 6.5g으로 배양정점에 이루어지고, 다른 균에 비해 배양속도가 빨리 이루어졌다. 세포외 다당체는 1.3g이었다.

목질진흙버섯은 배양 5일까지 지속적 성장이 되었다가 배양 5일경부터 급격히 균체량이 증가하였다가 배양 8일경부터 균사체의 성장이 조금씩 증가하였다가 배양 10-12일경에 정체를 이루었다. 그리고 세포외 다당체는 배양 10-12일경에 가장 많이 형성하였다.

차가버섯은 배양속도가 다른 버섯균주에 비해 균사생장이 느린 버섯균주로 배양 3일부터 균체량의 증가가 조금씩 증가하다가 배양 10-11일경에 배양정점이 이루어졌고, 세포외 다당체는 1.2g을 형성하였다.

꽃송이버섯은 배양속도가 매우 느린 버섯균주로 배양이 점진적으로 증가하면서 배양 정점은 17일경이 되었으며 균체량 3.2g이 되었고, 세포외 다당체는 0.3g으로 세포외 다당체 형성도 낮게 나타났다.

영지버섯은 배양 2일째부터 급격히 균체량이 증가하다가 배양 4일부터 점진적으로 균체량이 증가하다가 배양 7일경에 균체량이 8.5g으로 정점에 이루어졌고, 그 이후에 균체량의 감소가 이루어졌다. 세포외 다당체는 0.36g이었다.

노루궁뎅이버섯은 배양이 전체적으로 9일경까지 지속적인 배양이 이루어졌으며 균체량 4.8g이 정점을 이루었다. 세포외 다당체는 1.4g이었다.

표고버섯은 배양 4일경부터 급격히 균체량이 증가하다가 배양 9일경에 균체량이 8.3g으로 정점을 이루었고, 세포외 다당체는 1.9g으로 다른 버섯균주에 비해 다당체 형성이 높았다.



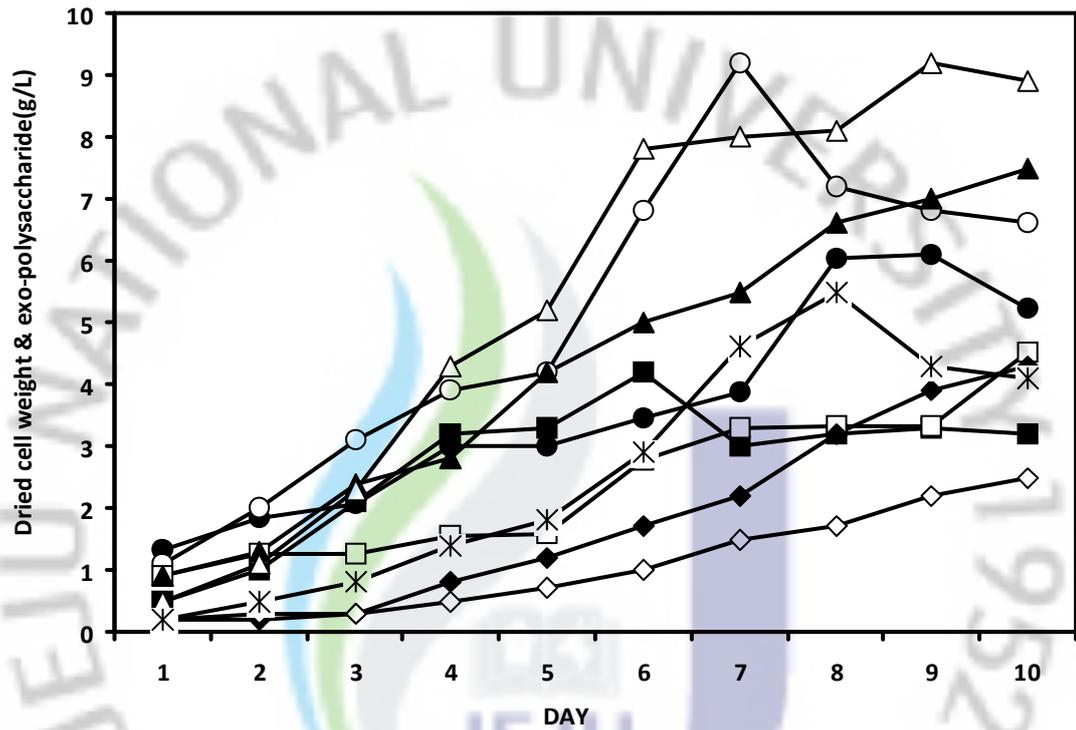


Fig. 3-12. Effect of culture period on mycelial growth of different fungal species.

●, *Coriolus versicolor*; ○, *Agaricus blazei*; ■, *Cordyceps militaris*; □, *Phellinus linteus*; ◆, *nonotus obliquus*; ◇, *Sparassis crispa*; ▲, *Ganoderma lucidium*; △ *Hericium erinacium*; *, *Lentinus edodes*.

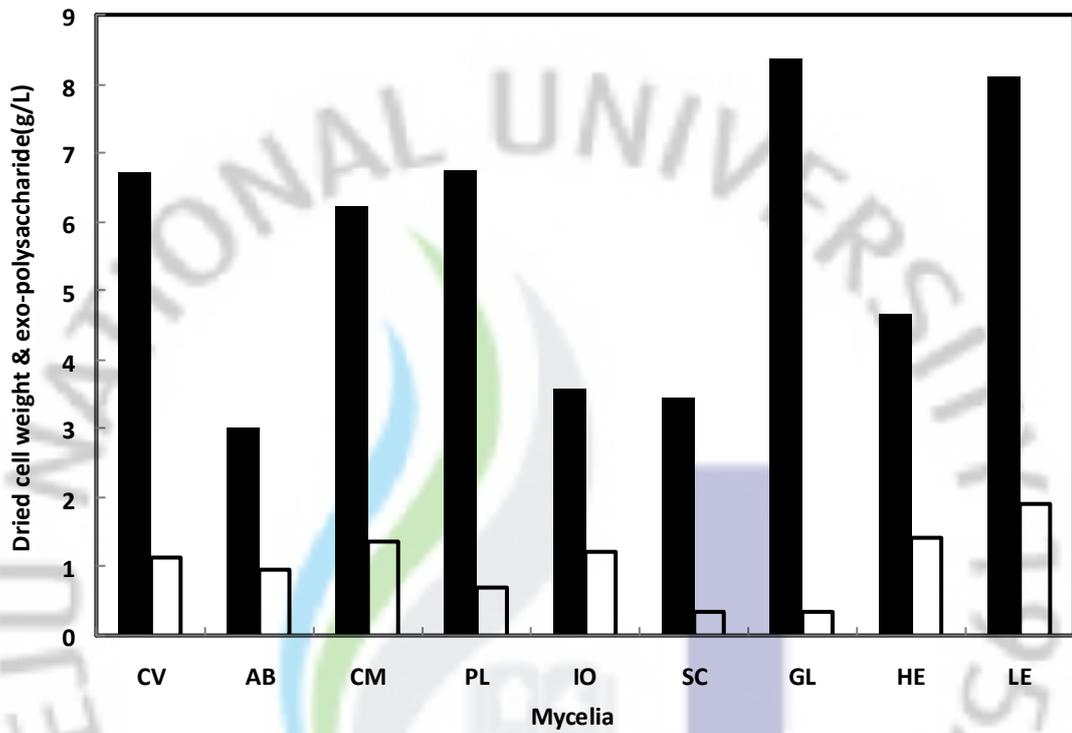


Fig 3-13. Effect of media on the mycelial growth and exo-polysaccharide of different fungal species.

CV, *Coriolus versicolor*; AB, *Agaricus blazei*; CM, *Cordyceps militaris*; PL, *Phellinus linteus*; IO, *nonotus obliquus*; SC, *Sparassis crispa*; GL, *Ganoderma lucidium*; HE, *Hericium erinacium*; LE, *Lentinus edodes*.

■, dried cell weight; □, exo-polysaccharide.

3.3.2. 혼합배양의 배양적 특성

1) 혼합 배양의 적정 접종량

5L jar fermentor를 이용한 배양 시 혼합 접종 방법을 확인하기 위해 배지액량 2L의 멸균된 배지에 일정비율로 동시에 구름버섯과 목질진흙버섯의 종균을 접종한 후 배양하는 방법과 접종원을 각각 1L의 멸균된 배지에 구름버섯과 목질진흙버섯을 접종하여 3일 배양한 후 두 배지를 혼합하여 배양하는 실험을 실시한 결과, 균체량과 세포외 다당체에서는 큰 차이가 없었다(Fig 3-14).

구름버섯과 목질진흙버섯의 배양적 특성을 조사하기 위해 초기 접종비에 의한 건조균체량과 세포외 다당체(g/L) 생산에 미치는 영향을 조사한 결과 (Fig. 3-15), 구름버섯과 목질진흙버섯의 적정혼합 접종비로 1:2의 비율에서 균체량이 높게 형성 되어 적정 혼합비는 구름버섯 과 목질진흙버섯을 각각 1:2 비율로 하였다. 구름버섯과 목질진흙버섯의 생육성장속도는 같은 조건에서 구름버섯균사체가 목질진흙버섯균사체의 2배 속도로 성장이 이루어지므로 초기 접종량을 동일하게 하면 목질진흙버섯균사체가 성장하기 전에 구름버섯균사체가 대수생장기에 이르러 두 균의 생물적 접촉 기회가 감소하므로 초기 접종량을 상항버섯균사체와 구름버섯균사체의 비율을 2:1로 비율로 정하였고, 전체적으로 단일배양 보다 혼합배양이 균체량이 높게 형성되었다.

2) 감귤농축액 농도별 균체량 변화

산업용 배지로 감귤농축액의 적정 배지 농도를 확인한 결과, 감귤농축액의 농도일수록 증가할수록 균체량과 세포외다당체의 형성이 높게 형성되었으나 지고 있으나 감귤농축액 20%이상에서는 배양과정에서 감귤농축액의 이용도가 낮아 과잉 배지 투여로 생산비에도 영향이 발생하여 적정 농도로는 10~15% 정도로 확인하였다.(Fig. 3-16)

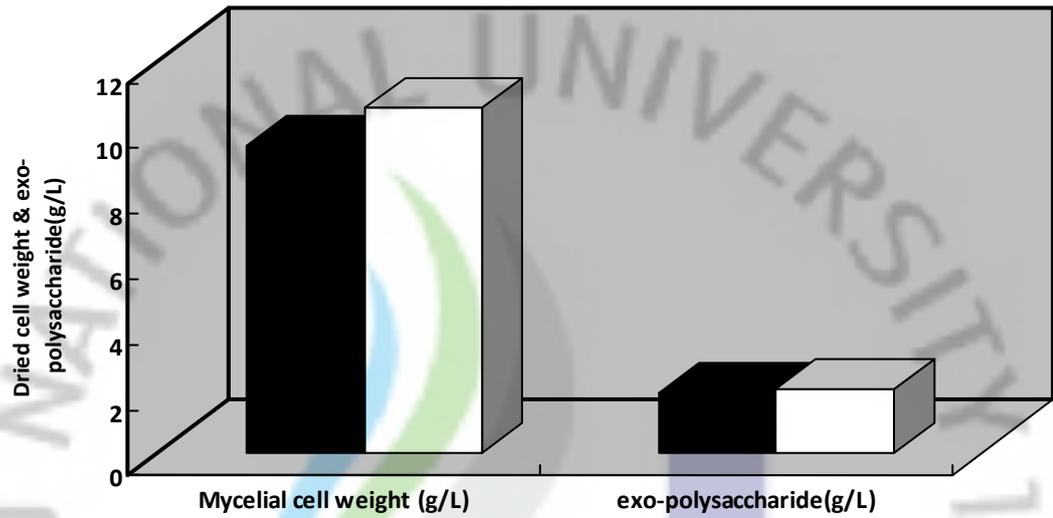


Fig.3-14. Effect of mycelial growth of mixed culture(*Coriolus versicolor* and *Phellinus linteus*) in inoculate(initial or 3day after) of 5L jar fermenter.

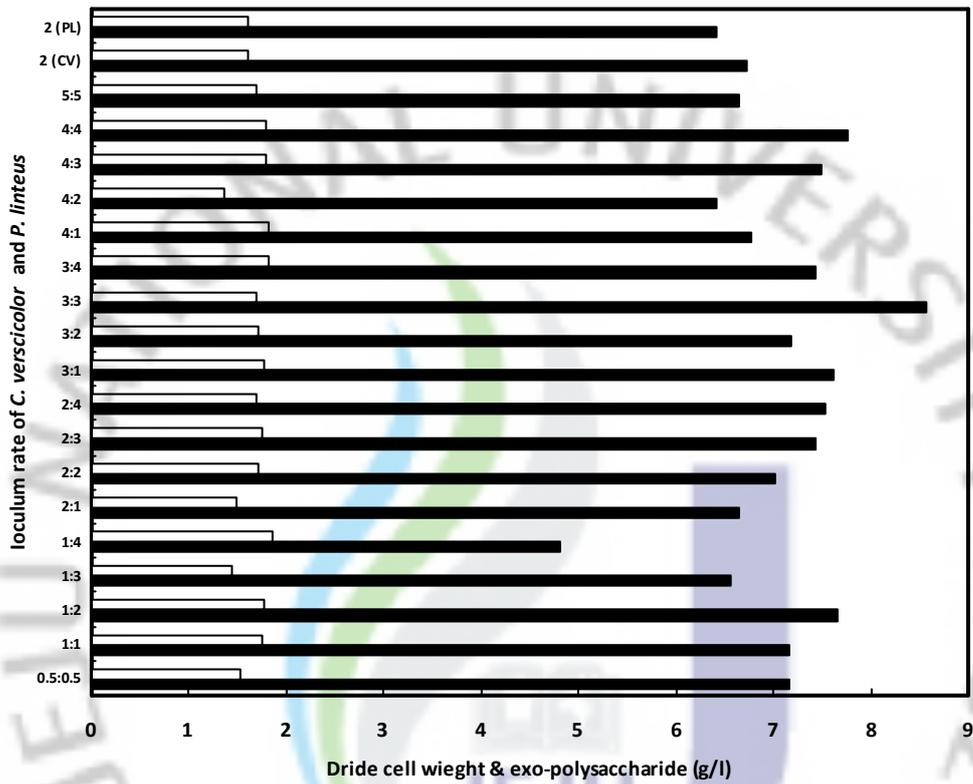


Fig. 3-15 Effect of inoculum amount on mycelial growth of mixed culture (*Coriolus versicolor* and *Phellinus linteus*) in 5L jar fermenter.

■, mycelial cell weight; □, exo-polysaccharide.

3) 탄소원 첨가 효과

건조균체량 및 세포외 다당체의 형성과 생산가격의 조율을 위해 기본배지인 감귤농축액(10%)에 산업적으로 이용이 가능한 탄소원으로 쉽게 구입이 가능한 물엿, 올리고당, 포도당, 황백당을 일정한 비율로 첨가하여 배양실험을 한 결과, 황백당이 다른 첨가물보다 높은 건조균체량 및 세포외 다당체를 형성하였고, 첨가농도가 증가할수록 건조균체량 및 세포외 다당체가 증가하였다. 황백당 10%를 첨가한 실험구에서 산업용 배지를 첨가하지 않은 감귤농축액(10%) 사용한 대조구에 비해 균체량 생산이 50%정도 증가되었다 (Fig. 3-17).

4) 통기 조건

균류를 생물반응기에서 배양할 경우 높은 agitation와 aeration은 심한 wall growth를 유발하는 것으로 보고 되고 있다. 따라서 이러한 wall growth를 방지하기 위하여 균류의 경우 일반적으로 낮은 rpm에서 배양하는 것으로 보고 되고 있다. Fig. 3-18 에서는 0.5~2.5 vvm의 조건에서 통기실험을 실시하였다. 낮은 통기량에서 균체의 형성이 점점 증가하다가 2.0 vvm에서 가장 높은 균체형성을 이루었다. 그러나 2.0 vvm으로 통기할 경우 배양과정에서 수분손실이나 기포의 발생으로 인한 오염 등의 문제점이 대두되었다.

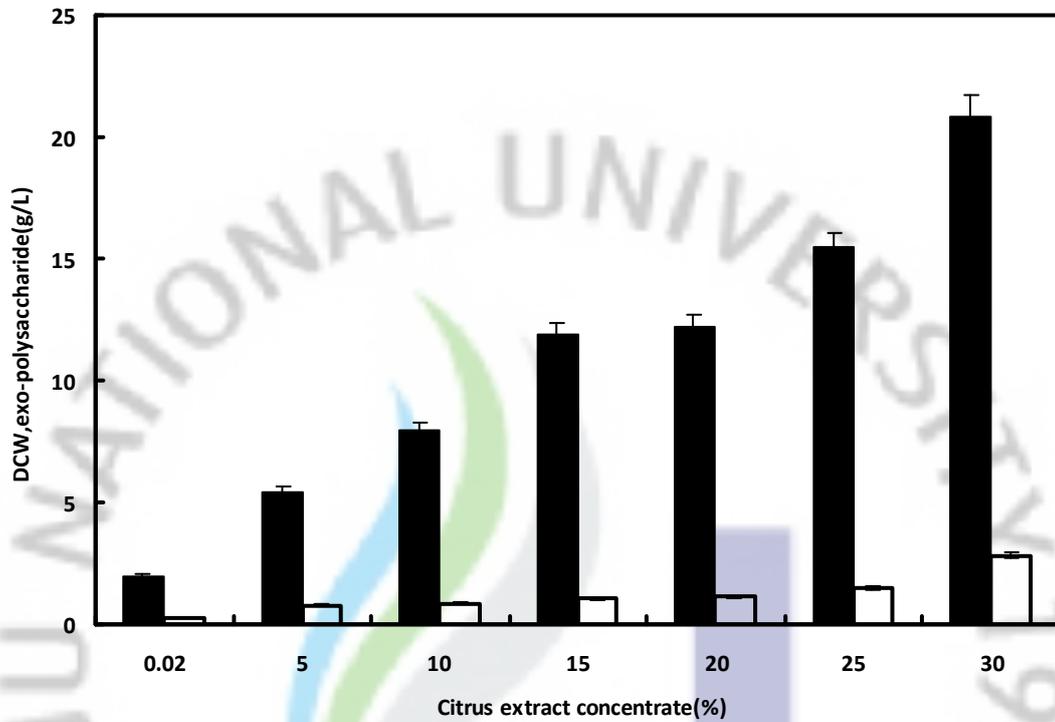


Fig 3-16. Effect of citrus extract concentrate on the mycelial growth of mixed culture (*Coriolus versicolor* and *Phellinus linteus*) in 5L jar fermenter.

■, mycelial cell weight; □, exo-polysaccharide.

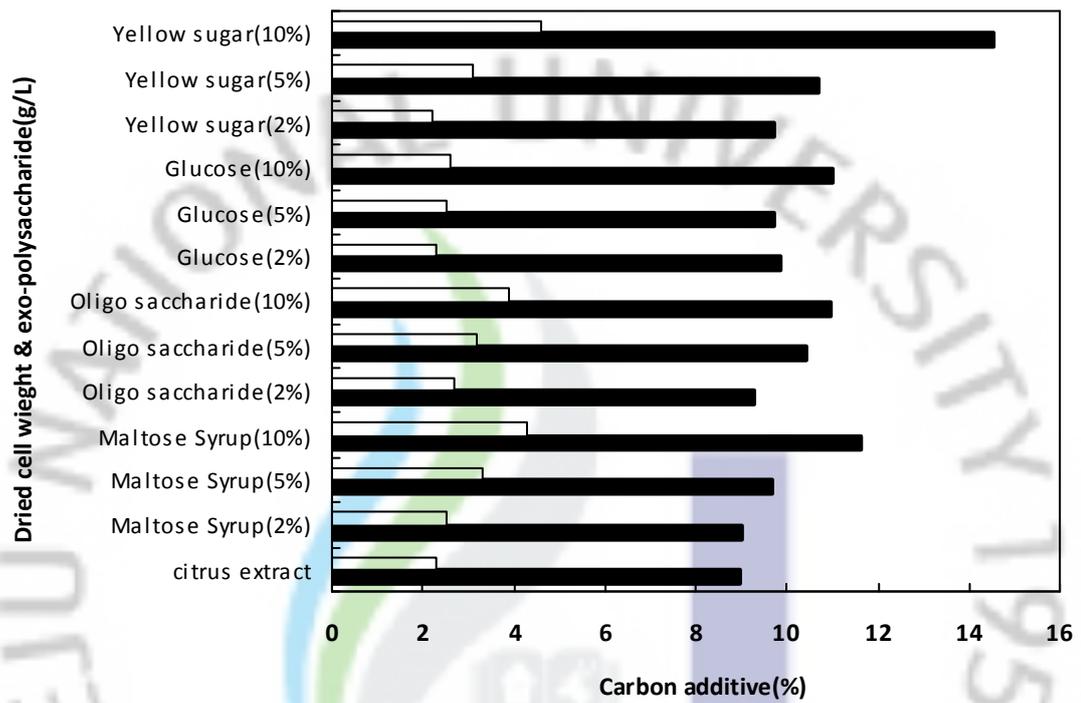


Fig. 3-17. Effect of various carbon sources additive on the mycelial growth of *Coriolus versicolor* and *Phellinus linteus* in 5L jar fermentor.

■, mycelial cell weight; □, exo-polysaccharide.

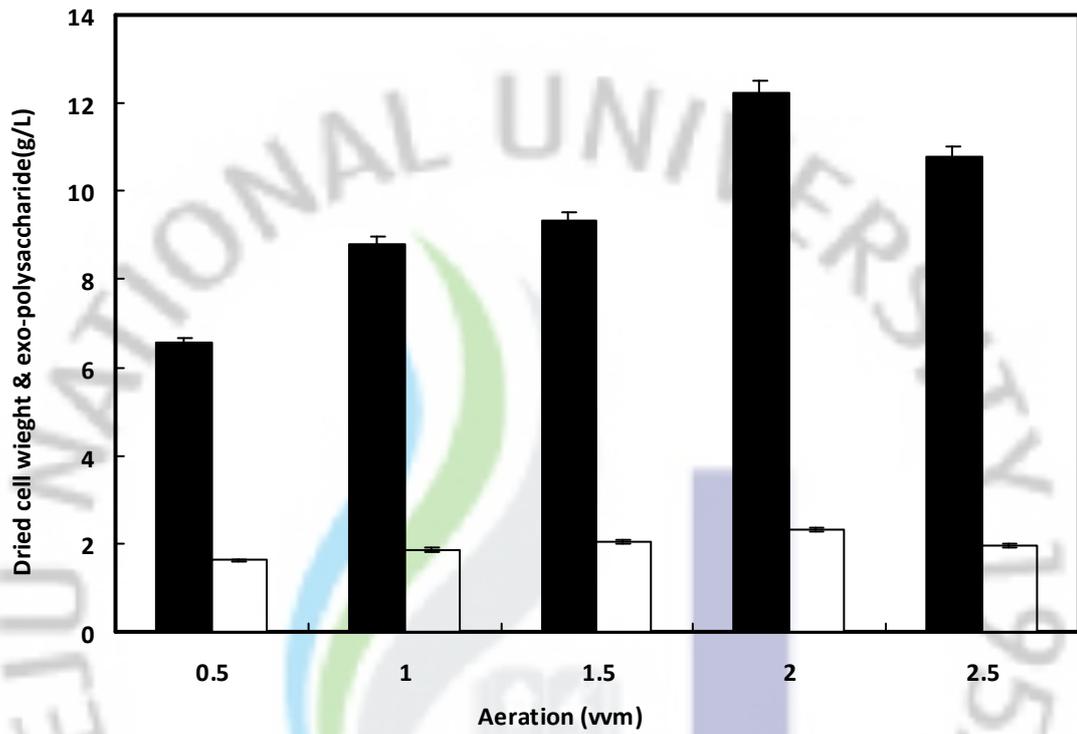


Fig. 3-18 Effect of aeration rate on mycelial growth of *Coriarius versicolor* and *Phellinus linteus* in 5L jar fermenter.

■, mycelial cell weight; □, exo-polysaccharide.

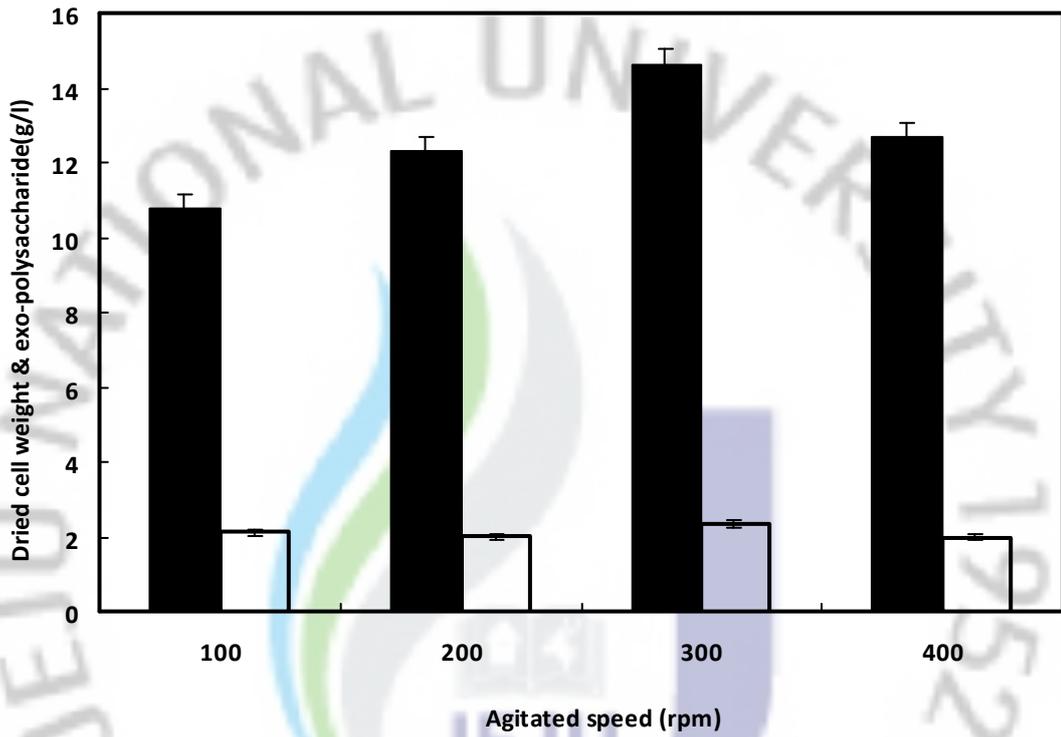


Fig. 3-19. Effect of agitation speed on mycelial growth of *Coriarius versicolor* and *Phellinus linteus* in 5L jar fermenter.

■, mycelial cell weight; □, exo-polysaccharide.

5) 교반 속도 영향

Fig. 3-19는 배양기의 교반기 회전속도에 따른 건조균체량 및 세포의 다당체의 변화를 확인한 결과 가장 높은 건조균체량 형성은 300rpm일 때에 얻어졌다. 그러나 세포의 다당체의 형성에서는 큰 변화는 없었다.



3.4. 요약

약용버섯으로 알려져 있는 상황버섯, 번데기동충하초, 구름버섯, 꽃송이버섯, 신령버섯, 차가버섯, 표고버섯, 노루궁뎅이버섯, 영지버섯균 9종류의 버섯균사체의 최적온도는 대체적으로 25℃ 전후에서 균사의 생장이 우수하게 나타났으며 20~30℃ 정도의 조건에서 균사생장이 가능하였다

초기 pH의 영향을 조사한 결과 전체적으로 pH 4.5~6.5의 넓은 약산성의 범위에서 균사생장이 우수하였고, 번데기동충하초만이 pH 6 이상의 조건에서 균사의 성장속도가 차이가 났다.

탄소원은 구름버섯의 경우 mannitol를 잘 이용하였고, 신령버섯은 mannose가 번데기동충하초는 sucrose가, 목질진흙버섯, 영지버섯의 경우 soluble starch가 차가버섯의 경우 maltose이 꽃송이버섯, 표고버섯에서는 manitol이 노루궁뎅이버섯에서는 glucose가 쉽게 탄소원으로 이용되었다.

질소원으로써 보편적으로 yeast extract, malt extract를, 무기염의 경우 K_2HPO_4 를 주로 이용하였고, 표고버섯의 경우 $CaCl_2$ 의 이용성이 높았다.

각각의 버섯 균사체를 배양한 결과 동충하초가 가장 빠른 성장을 보였으며 꽃송이버섯이 가장 늦게 배양되었다. 구름버섯과 목질진흙버섯의 경우 비슷한 성장곡선을 보였다.

혼합배양 조건으로 배양과정에서 적정 혼합 시기는 3일 배양하여 혼합한 처리구에서 높은 세포외 다당체가 형성하였고 혼합 점중비로 1:2의 비율과 3:3, 4:4에서 높은 균체량을 형성하였다.

배양중에 새로운 배지를 첨가한 처리구가 조금 높은 세포외 다당체를 형성되었다.

배양 중 통기조건은 통기량이 증가할수록 점점 증가하다가 2.0 vvm에서 가장 높은 균체형성을 이루었다. 교반속도도 가장 높은 건조균체량 형성은 300 rpm일 때에 얻어졌다. 그러나 세포외 다당체의 형성에서는 큰 변화는 없었다.

종합고찰

본 연구에서는 전통적인 약용버섯으로 알려져 있는 목질진흠버섯, 번데기동충하초, 구름버섯, 꽃송이버섯, 신령버섯, 차가버섯, 표고버섯, 노루궁뎅이버섯, 영지균사체를 감귤농축액을 배양기질로 하여 버섯균사체를 배양한 후 이 배양액으로부터 항균활성, 항산화 활성, 항암활성을 일반적인 배지에서 배양한 추출물과 비교 하여, 감귤농축액이 버섯균사체의 액체배양에 효과적 이용 여부를 조사하였다.

감귤농축액 배지로부터 액체 배양된 버섯균주 9종류의 배양적 특성은 버섯균사체에 따라 구름버섯, 표고버섯, 번데기동충하초, 신령버섯 순으로 배양이 완료되어 영양 요구성이 비슷하였고, 꽃송이버섯이 가장 늦게 배양이 완료되어 꽃송이버섯이 복잡한 영양요구 균주로 사료된다.

배양 후 건조균체량을 측정한 결과 다른 균에 비해 표고버섯, 영지버섯, 구름버섯에서 상대적으로 많은 균체량을 형성하였는데 이는 감귤농축액을 잘 이용하여 세포 성장이 원활히 이루어진 것으로 사료된다.

한편, 세포외 다당체 형성에서는 표고버섯, 노루궁뎅이버섯, 구름버섯, 번데기동충하초의 순으로 형성되었다.

또한, YM배지 및 감귤농축액배지로부터 추출된 배양액을 사용하여 병원성세균 및 어류질병세균에 대한 항균활성을 조사한 결과 대부분의 시료에서 항균활성이 있는 것으로 나타났다. YM배지 균사체 배양액에서의 항균활성은 꽃송이버섯, 구름버섯, 목질진흠버섯, 신령버섯, 노루궁뎅이버섯 순으로 높은 활성을 나타내었으며, 반면 감귤농축액배지에서의 버섯균사체 배양액의 항균활성은 YM배지에서와 거의 유사한 결과를 얻을 수 있었는데, 전체적인 항균활성을 비교해 보았을 때, 항균활성이 조금 증가한 양상의 결과를 얻을 수 있었다.

항산화 활성 실험에서는 전 실험 처리구에서 농도가 높아질수록 항산화력이 증가하였으며, 특히 꽃송이버섯 배양액인 경우에 1 mg/mL의 농도에서도 80%에 가까운 radical 소거 활성을 보였으며, 모든 실험구에서 5 mg/mL 이상의 농도에서는 40% 이상의 radical 소거활성능이 관찰되었다.

Superoxide radical 소거능 역시 꽃송이버섯 배양액에서 70% 이상의 높은 효소활성을 보였다. 전반적으로 BHA보다 높은 효소활성이 관찰되었다. 이러한 결과를 종합해 볼 때 천연 항산화제로의 개발가능성을 확인 할 수 있었다.

구름균사체 배양기질로서 유리당, 유기산, 무기질 등이 다량 함유된 감귤농축액을 배양배지로 하여 구름버섯 균사체를 액체 배양한 배양추출물과 YM배지에서 배양한 구름버섯 배양추출물을 이용하여 *in vitro*에서 다양한 암세포에 대한 항암효과 항산화 효과를 비교 조사한 결과, 배양추출물의 아질산 제거능 및 항암효과가 현저히 상승하는 결과를 나타냄을 알 수 있었다. 이는 희석 감귤농축액에 구름버섯을 배양하는 동안에 균체외에서 감귤농축액에 함유 되어 있던 물질이 상기 활성이 보다 우수한 물질로 생물전환(bioconversion)되었거나 균사체내에 신규의 활성 대사산물이 축적되었거나 기존 활성물질의 생합성이 더욱 증가하여 축적된 결과일 것으로 사료된다.

구름버섯, 상황버섯, 노루궁뎅이버섯의 균사체 배양액의 ethyl acetate 추출물의 가축질병 병원미생물균주와 kanamycin과 ampicillin 내성균주에 대한 항균활성을 평가하였고 활성물질을 분리정제 하였다. 구름버섯, 상황버섯, 노루궁뎅이버섯의 균사체 배양액의 ethyl acetate 추출물이 돼지와 가금류의 설사 유발 세균류인 *E. coli* K88, *E. coli* K99, *E. coli* 987P와 *S. typhimurium* 14058 균주에 대하여 항균활성을 보였으며, 특히 구름버섯 추출물은 가장 높은 항균활성을 보였다. 한편, kanamycin과 ampicillin에 대해 내성을 보이는 *S. aureus* CARM3230과 *E. coli* CARM1381 균주에 대해서도 세 가지 버섯 배양 추출물 모두 항균활성을 보였으며, 특히, 구름버섯 추출물은 가장 높은 항균활성을 보였다. 이는 이들 버섯 균사체 배양 추출물이 기존 항생제 대체용으로 가축 사료에 첨가제로 사용될 수 있다는 가능성을 보였으며, 또한 이들 버섯류로부터 항생제 내성균을 억제할 수 있는 신규 항균성 물질의 탐색을 위한 기초자료로서 활용될 수 있을 것으로 사료되며, 활성물질이 높은 순도의 단일 물질로 정제되었음을 HPLC 시스템으로 확인하였다.

감귤농축액으로 배양한 구름버섯 균사체 배양추출물은 *P. aeruginosa* CCARM2171와 *S. aureus* CCARM3230 균주 모두에서 현저한 항균활성을 나타낸 것은 본 추출물의 활성물질이 광범위 항균 스펙트럼을 갖는 신규의 항생물질

로 개발될 수 있는 가능성을 보여주는 것으로 사료되었다.

9종류의 버섯균사체의 최적온도, 영양 요구성, 배양기간 등의 배양적 특성은 버섯균사체는 대체적으로 25℃ 전후에서 균사의 생장이 우수하게 나타났으며 20~30℃, pH 4.5~6.5의 약산성의 범위에서 균사생장이 우수하였고, 번데기동충하초 만이 pH 6조건에서 균사의 성장속도 빨랐는데 이는 곤충류를 기질로 하는 균주특성으로 사료된다.

탄소원은 구름버섯의 경우 mannitol를 잘 이용하였고, 신령버섯은 mannose가 번데기동충하초는 sucrose가, 목질진흙버섯, 영지버섯의 경우 soluble starch가 차가버섯의 경우 maltose이 꽃송이버섯, 표고버섯에서는 mannitol이 노루궁뎅이버섯의 경우 glucose가 쉽게 탄소원으로 이용되었다.

질소원으로써 보편적으로 yeast extract, malt extract를, 무기염의 경우 K_2HPO_4 를 주로 이용하였고, 표고버섯의 경우 $CaCl_2$ 의 이용성이 높았다.

구름버섯과 목질진흙버섯을 혼합배양시 적정 혼합 시기는 3일 배양하여 혼합한 처리구에서 높은 세포의 다당체가 형성하였고 혼합 접종비로 1:2의 비율에서 높은 균체량을 형성하였고, 배양중에 새로운 배지를 첨가한 처리구가 조금 높은 세포의 다당체를 형성되었다.

배양 중 통기조건은 통기량이 증가할수록 점점 증가 하다가 2.0 vvm에서 가장 높은 균체형성을 이루었다.

결론적으로 본 연구는 제주에서 대량으로 생산되며, 냉동보관에 의해 원료공급이 용이하고 유리당, 유기산, 무기질 등이 함유된 감귤농축액이 버섯 균사체 배양에 우수한 기질로 이용될 수 있음을 확인 하였다.

다내제성균주에 대해서 구름버섯 추출물의 높은 항균활성은 기존 항생제 대체용으로 사용될 수 있다는 가능성을 보였으며, 버섯류로부터 항생제 내성균을 억제할 수 있는 신규 항균성 물질의 탐색을 위한 기초자료로서 활용될 수 있을 것으로 사료되며, 향후 활성물질이 광범위 항균 스펙트럼을 갖는 신규의 항생물질로 개발될 수 있게 활성물질의 구조와 항균작용 기작 등의 연구가 이루어져야 할 것으로 사료된다.

참고문헌

- 강창을, 심미자, 최웅철, 이영남, 김병각(1981). 한국산 담자균류의 항암성분에 관한 연구, 14(2):p. 102.
- 강태수, 천병익(1988). Pleurotus ostreatus의 액체종균 생산에 관한 연구, 강원대학교 산업기술연구소 논문집, 8:13-14.
- 박완희, 이호득(1999). 한국약용버섯도감, 교학사, p442.
- 박동우, 심미자, 김병각(1979). 한국산 고등균류의 성분연구(XVII), 서울대학교 약학논문집, 4: 19-20.
- 배만중, 박무희, 이재성(1996). 고등균류 균사체의 면역조절 가능성에 관한 연구. 한국균학회, 24(2):142-148.
- 성재모, 유영복, 차동열(1998). 버섯학. 교학사, p3
- 심미자(1981). 한국산 고등균류의 성분 및 배양에 관한 연구, 한국균학회지, 9(2):49-60.
- 이준우, 정 훈, 정천희, 이권행(1990). 영지 균사체의 알칼리 추출물이 보체계와 망체계에 미치는 영향, 한국균학회지, 18(3):137-138.
- 정 훈, 이준우, 이권행(1990). 한국산 고등균류의 항보체활성 효과에 관한 연구, 한국균학회지, 18(3):145-146.
- 현진원, 최웅철, 김병각(1990). “한국고등균류의 성분 연구”, 한국균학회지, 18(2): 58-68.

- Anke, T., Kupka, J., Schramm, G. and Steglich, W.(1980). Antibiotics from Basidiomycetes X. Scorodonin, a new antibacterial and antifungal metabolites from *Marasmius scorodonius*(Fr.). *J. Antibiotics* 33(5): 463-467.
- Blois MS.(1958). Antioxidant determination by the use a stale free radical. *Nature* , 26:1199 - 1200.
- Cambie, R. C., Hirschberg, A., Jones, E. R. J. and Lowe, G.(1963). Chemistry of the Higher Fungi Part 14. Polyacetylenic metabolites from *Aleurodiscus roseus*. *J. Chem. Soc.*, 4120-4130.
- Chang, S. T.(1999). Global impact of edible and medicinal mushrooms on human welfare in the 21st century: non-green revolution, *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 1:1-7.
- Chihara, G.,Hamuro, J., Maeda, Y. Y., Arai, Y. and Fukuoka, F.(1970). Faction of the polysaccharides with marked antitumor activity, especially lentinan, from *Lentinus edodes*(an edible mushroom). *Cancer Res*, 30:p. 2776.
- Choi, I. I.(2003). Antimicrobial activity of *Rhus javanica* extracts against animal husbandry disease-related bacteria. *J. Kor. Soc. Food Sci*, 32: 214-1220.
- Cohen, S. H., Morita, M. M. and Bradford, M.(1991). A seven-year experience with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Am. J. Med*, 91: 233-237.
- Crowford, J. J.(1995). New light on the transmissibility of viral hepatitis in dental practice and its control. *JADA*, 91: 829-835.

- Cui J, Chisti Y.(2003). Polysaccharopeptide of *Coriolus versicolor* physiological activity, uses and production. *Biotechnology Advances*, 21:109-122.
- Dijkstra, F. I J., Scheffers, W. A., and Wiken, T. O.(1972). Submerged Growth of ultivated Mushroom(*Agaricus bisporus*), *Antonie van leeuwenho*, 38:331-339.
- Dok MA.(1964.) A conspectus of the families of Aphyllophorales. *Persoonia*, 3:199-324.
- Eun, J. S., Yang, J. H., Cho, D. Y., Lee, T. K. and Park, L. H.(1989). Studies on higher fungi in Korea(2). Proteolytic enzyme of *Agaricus bisporus* Sing. *J. Kor. Pharm. Sci*, 19: 9-14.
- Francis, A. W.(1995). *Staphylococcus aureus*(including toxic shock syndrome) In: Mandell Douglas and Bennetts Principles and Infections Disease, 4: 1754-1755.
- Gentao, L., Tiantong, B., Xinyi, N., Shuzhen, L. and Zhenyu, S.(1979). Some Pharamacological Action of the Spores of *Ganoderma lucidium* and the Mycelium of *Ganoderma capense*(LLOYD) Teng Cultivated By Submerged Fermentation, *Chinese Medical Journal*, 92(7):p. 496.
- Han, S. J., Jung, P. M., Kim, H. G., Hwang, E. H. and Seong, I. W.(1999). Multiple intestinal ulcerations and perforations secondary to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* enteritis in infants, *J. Pediatr. Surg*, 34: 381-386.
- Humfeld, H. and Sugihara T, F.(1952). The Nutrient Requirements of *Agaricus*

campestris Grown in Submerged Culture, *Mycologia*, 44;p. 605.

Humfeld, H.(1948). The Production of Mushroom Mycelium(*Agaricus campestris*) in Submerged Culture, *Science*, 107:p. 373.

Inuma, H., Nakamura, H H., Naganawa, H., Masuda, T., Takano, S., Takeuchi, T., Umezawa, H., Iitaka, Y. and Obayashi, A.(1983). Basidalin, a new antibiotic from Basidiomycetes. *J. Antibiotics*, 36: 448-450.

Ikekawa T, Nakanishi M, Uehara N, Chihara G and Fukuoka F.(1986). Antitumor action of some basidiomycetes, especially *Phellinus linteus*. *Gann*, 59:155-157.

Ikekawa, T., Uehara, N., Maeda, Y., Nakamishi, M. and Fukuoka, F.(1969). Antitumor activity of aqueous extracts of some edible mushroom. *Cancer Res*, 29: 734-738.

Impoolsup, A., Bhumiralana, A. and Flegel, T.(1982). Isolation of alkaline and neutral proteases from *Aspergillus flavus* var *columnaris*, a soysauce koji mold. *Appl. Environ. Microbio*, 42: 619-625.

Jong, S. C., Birmingham, J. M. and Pai, S. H.(1991). Immunomodulatory substances of fungi origin. *J. Immunol. Immunopharmacol*, 11:115-122.

Kavanagh, F., Ilrvey, A. and Robbins, W. J.(1949). Antibiotic substances from Basidiomycetes IV. *Marasmius conigenus*. *Proc. Natl. Acad. Sci*, 35: 343-351.

Kida, T., Shibai, H. and Seto, H.(1986). Structure of new antibiotics,

- pereniporins A and B from a Basidiomycete. *J. Antibiotics*, 39: 613-615.
- Kielhofner, N., Atmar, R. L., Hanmill, R. J. and Musher, D. M.(1992). Life threatening *Pseudomonas aeruginosa* infections in patients with human immunodeficiency virus infection. *Clin. Infect. Dis*, 14: 403-411.
- Kim BK, Jang SY, Shim MJ. Studies on the higher fungi of Korea(VIII), sterols of *Coriolus versicolor*(Fr.). *Korean J Mycol*, 6: 1-4.
- Kim, Y. D., Kim, K. J. and Cho, D. B.(2003). Antimicrobial activity of *Lentinus edodes* extract. *Kor. J. Food Preservation*, 10: 89-93.
- Komatsu, N., Okubo, S., Likumoto, S., Kimura, K., Saito, G. and Sasaki, S.(1969). Host-mediated antitumor action of schizophyllan, a glucan produced by *Schizophyllum commune*. *Gann* 60:p. 137.
- Kupka, J., Anke, T., Oberwinkler, F., Sohramm, G. and Steglich, W.(1979). Antibiotics from Basidiomycetes VII Crinipellin, a new antibiotic from the basidiomycetes fungus *Crinipellis stipitaria* (Fr.), *Pat. J. Antibiotics*, 32: 130-135.
- Lee BW, Lee MS, Park KM, Kim CH, Ahn PU, Choi CU.(1992). Anticancer activities of the extract from the mycelia of *Coriolus versicolor*. *Korean J Appl Microbiol Biotechnol*, 20:311-315.
- Lee JY.(1993). Coloured Korean mushrooms. *Academy Book Co. Seoul*, p.241.
- Lee, J. H., Cho, S. M., Song, K. S., Han, S. B., Kim, H. M., Hong, N. D. and Yoo, IF. D.(1996). Immunostimulating activity and characterization of

polysaccharides from mycelium of *Phellinus linteus*. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 6:213-218.

Lee, J. W., Ji, Y. J., Yu, M. H., Im, H. G., Hwangbo, M. H. and Lee, I. S.(2005). Antimicrobial effect of extract of *Glycyrrhiza uralensis* on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Kor. J. Food Sci. Techno*, 37(3): 456-464.

Lee, S. J., Moon, S. H., Kim, T., Kim, J. Y., Seo, J. S., Kim, D. S., Kim, J., Kim, Y. J. and Park, Y. I.(2003). Anticancer and antioxidant activities of *Coriolus versicolor* culture extracts cultivated in the citrus extracts, *K. J. Microbiol. Biotechnol*, 31:242-249.

Lee, S. K.(2003). Antimicrobial activity of *Caesalpinia sappan* against animal husbandry disease. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol*, 31:242-249.

Litchfield, J. H., Overback, R. C and Davidson, R. S.(1963). Factors Affecting the Growth of Moral Mushroom Mycelium in Submerged culture, *Agricultural and Food Chemistry*, 11(2):158-160.

Lockley, R. M., Cohen, M. L., Quinn, T. C., Tompkins, L. S., Coyle, M. B., Kirigara, J. M. and Counts, G. W.(1982). Multiple antibiotic-resistant *Staphylococcus aureus*: Introduction Transmission and evolution of nosocomial infection. *Ann. Intern. Med*, 97:317-324.

Mau J.L. Lin H.C, Chen C.C.(2001). Non-volatile components of several medicinal mushrooms. *Food Research International*, 34:521-526.

Marklund S.(1984). Pyrogallol Autoxidation. CRC handbook of methods for

oxygen radical research. p. 243.

Midland, S. L., Izac, R. R., Wing, R. M., Zaki, A. I., Munnecke, D. E. and Sims, J. J.(1982). Melleolide, a new antibiotic from *Armillaria mella*. *Tetrahedron Lett*, 23:2515-2518.

Mizuno, T., Ushiyama, M., Usui, T., Arakawa, M., Shinkai, K. and Shimizu, M.(1982). Studies on the Host-mediated Antitumor Polysaccharide. Part VI. Fractionation, Isolation and Characterization of Antitumor Active β -D-Glucan from Mycelial Cells of *Ganoderma applanatum*, *Bull. Fac. Agr. Shizuoka Univ.*, 32:42-57.

Moustafa, A. M.(1960). Nutrition and Development of Mushroom Flavor in *Agaricus campestris* Mycelium, *Applied Microbiology*, 8:p. 64.

Moustafa, A. M.(1960). Nutrition and Development of Mushroom Flavor in *Agaricus campestris* Mycelium, *Applied Microbiology*, 8:59-63.

Ohno, N., Suzuki, I., Oikawa, S., Miyazaki, T., and Yadomae, T.(1984). Antitumor activity and structural characterization of glucans extracted from cultured fruit bodies of *Grifola frondosa*. *Chem. Pharm. Bull*, 32:p. 1142.

Okamoto, K. A., Shimada, R., Shirai, H., Sakamoto, S., Yoshida, F., Olima, Y., Ishiguro, T., Sakai. and Kawagishi, H.(1993). Antimicrobial chlorinated orcinol derivatives from mycelia of *Hericium erinaceum*. *Phytochemistry*, 34: 1445-1446.

Park, C. G., Bang, K. H., Lee, S. E., Cha, M. S., Seong, J. S., Park, S. U. and Seong, N. S.(2001). Antimicrobial effect of various medicinal herb on

Staphylococcus aureus. *Kor. J. Medicinal Crop. Sci*, 9: 251-258.

Park, J. W., Kim, T., Lim, D. J., Lee, H. B., Joo, Y. S. and Park, Y. I.(2004). Antibacterial activities of mushroom liquid culture extracts against livestock disease-causing bacteria and antibiotic resistant bacteria. *Kor. J. Micol*, 32: 145-147.

Piddock, L. J.(1990). Techniques used for the determination of antimicrobial resistance and sensitivity in bacteria. *J. Appl. Bactriol*, 68:307-318.

Shibata S, Nishikawa Y, Mei C. F, Fukuoka F and Nakanishim M.(1968). Antitumor studies on some extracts of basidiomycetes. *Gann*, 59:159-161.

Smith, J, E., Berry, D, R., Kristiansen, B.(1980). Fungal Biotechnology, *New York, Academic press*, p. 203.

Sone, Y., Okuda. R., Wada. A., Kishida. A and Misaki, A.(1985). Structures and Antitumor Activities of the Polysaccharides Isolated from Fruiting Body and Growing culture of Mycelium of *Ganoderma Lucidium*, *Agricultural Biological Chemistry*, 49(9):2642-2650.

Song, K. S., Cho, S. M., Lee, J. H., Kim, H. M., Han, S. B., KO, K. S., and Yoo, I. D.(1995). B-lymphocyte-stimulating polysaccharide from mushroom *Phellinus linteus*. *Chem. Pharm. Bull*, 43:p. 2105.

Troillet, N., Samore, M. H. and Carmeli, Y.(1997). Imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: risk factors and antibiotic susceptibility patterns. *Clin. Infect. Dis*, 25:1094-1098.

- Tsukagoshi, S. and Ohashi, F.(1974). Protein bound polysaccharide preparation, S-K, effective against mouse sacroma 180 and rat ascites hepatoma by oral use. *Gann*, 65:p. 557.
- Usui, T., Iwasaki, Y., Hayashi, K., Mizuno,T., Tanaka, M., Shinkai, K. and Arakawa, M.(1981). Antitumor Activity of Water-Soluble β -D-Glucan Elaborated by *Ganoderma applanatum*, *Agricultural biological chemistry*, 45(1):323-326.
- Vogel, F. S., Mcgarry, S. J., Kemyer, L. A. K. and Graham D. G.(1974). Bacteriological properties of a class of quinoid compound related to sporulation in the mushroom, *Agaricus bisporum*. *Am. J. Patho*, 76: 165-174.
- Wainwright, M.(1992). An Intruduction to Fungal biotechnology, *West Sussex, England, John Wiley and Son*, p.126-127
- William, C. G.(1989). Understanding Microbes, *New York, W.H.Freeman Co.*, p.354
- Yokokawa H.(1980). Fatty acid and sterol compositions in mushrooms of ten species of polyporaceae. *Phytochemistry* 19:2615-2618.
- Chang, S. T.(1999), Global impact of edible and medicinal mushrooms on human welfare in the 21st century: non-green revolution, *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 1:1-7.

종합 요약

수종 버섯균주의 배양적 특성을 확인하기 위해 YM배지와 감귤농축액에서 배양한 결과 구름버섯, 표고버섯, 번데기동충하초, 신령버섯순 으로 배양일수 약 4-7일 정도로 빨랐으며, 꽃송이버섯(*Sparassis crispa*)은 배양일수가 15일이 소요되었다.

배양 후 건조 균체량은 표고버섯, 영지버섯, 구름버섯에서 상대적으로 높은 건조 균체량을 형성하였고 세포외 다당체 형성에서는 표고버섯, 노루궁뎅이버섯, 구름버섯, 번데기동충하초의 순으로 형성되었다.

YM배지 균사체 배양 추출물에서의 항균활성은 꽃송이버섯, 구름버섯, 목질진흙버섯, 신령버섯, 노루궁뎅이버섯 순으로 높은 활성을 나타내었으며, 감귤농축액배지에서 버섯균사체 배양 추출물의 항균활성은 YM배지에서와 거의 유사한 결과를 얻을 수 있었는데, 전체적인 항균활성을 비교해 보았을 때, 항균활성이 조금 증가한 양상의 결과를 얻을 수 있었다.

DPPH 전자공여능을 이용한 항산화 활성 실험에서 꽃송이버섯 균사체배양 추출물인 경우에 1mg/mL의 농도에서도 80%에 가까운 radical 소거 활성을 보였으며, 모든 실험구에서 5mg/mL 이상의 농도에서는 40% 이상의 라디칼 소거활성능이 관찰되었다.

Superoxide radical 소거능 역시 꽃송이버섯 배양추출물에서 70% 이상의 높은 효소활성을 보여 전반적으로 배양추출물은 합성항산화제인 BHA보다 높은 효소활성이 관찰되었다.

구름버섯을 감귤농축액배지와 YM배지에서 각각 배양한 배양물을 열탕 추출하고 여과하여 얻어진 배양추출물과 버섯균주를 접종하지 않은 감귤농축액 자체에 대한 항산화 활성, 아질산 제거능, 항암활성을 조사 비교하였다. DPPH 전자공여를 이용한 항산화 활성은 감귤농축액배지에서 얻어진 배양추출물은 89%, YM배지에서 얻어진 배양추출물은 66%, 대조구로 사용된 버섯균주를 접종하지 않은 감귤농축액 자체는 22%의 항산화 활성을 나타내었다.

아질산 제거능은 배양액 모두 산성 조건일수록 증가하였으며, 감귤농축액에서 얻어진 배양추출물은 67%, YM배지에서 얻어진 배양추출물은 54%, 그리고 감귤농축액 자체는 34%의 아질산 제거능을 보였다.

HeLa (female cervix adenocarcinoma), PC-3 (male prostate adenocarcinoma), HepG2 (human hepatoblastoma) 및 A-549 (male lung carcinoma) cell에 대한 항암활성을 조사한 결과, 감귤농축액에서 얻어진 배양추출물은 각각의 암세포들에 대해서 순차적으로 75%, 82%, 55%, 그리고 82%의 높은 생육 저해 활성을 보였다. 반면에 YM배지에서 얻어진 배양추출물 HeLa cell에 대해서만 66%의 생육저해를 보였고, 감귤농축액 자체는 모든 암세포의 생육을 저해하지 않는 것으로 조사되었다. 따라서 구름버섯을 감귤농축액에 배양함으로써 YM배지에서 배양하거나 감귤농축액 자체 보다 항산화 활성과 항암활성을 현저히 증가시킬 수 있었다.

구름버섯, 목질진흙버섯, 노루궁뎅이버섯의 균사체 배양액의 ethyl acetate 추출물이 돼지와 가금류의 설사 유발 세균류인 *E. coli* K88, *E. coli* K99, *E. coli* 987P와 *S. typhimurium* 1405P 균주에 대하여 항균활성을 보였으며, 특히 구름버섯 추출물은 가장 높은 항균활성을 보였다. 한편, kanamycin과 ampicillin에 대해 내성을 보이는 *S. aureus* CARM3230과 *E. coli* CARM1381 균주에 대해서도 세가지 버섯 배양 추출물 모두 항균활성을 보였으며, 특히, 구름버섯 추출물은 가장 높은 항균활성을 보였다.

구름버섯 균사체를 감귤농축액에서 7일간 배양한 배양액을 열탕 추출한 후 균사체 잔사를 제거하고, 동량의 ethyl acetate(1:1, v/v)로 추출하였다. 추출물을 10% DMSO에 녹여 디스크 확산법으로 ampicillin, kanamycin, oxacillin, methicillin등에 내성을 갖는 MRSA 균주인 *S. aureus* CCARM3230과 ampicillin, kanamycin, cefotaxime, gentamycin, norfloxacin, piperacillin등의 항생체에 대해 복합적인 내성을 보이는 복합 내성 균주인 *P. aeruginosa* CCARM2171에 추출물 12.5 mg/disc로 처리하여 항균활성을 조사한 결과, *S. aureus* CCARM3230에 대해서는 17 mm, *P. aeruginosa* CCARM2171에 대해서는 12 mm의 생육저지환을 보였다. 이 추출물을 silica gel chromatography로 분획하고 각 분획물에 대해 디스크 확산법(10 mg/disc)으로 *S. aureus* CARM3230 균주에 대한 항균활성을 측정된 결과, dichloromethane:methanol(9:1, v/v)의 용매조건으로 용출한 분획물의 항균활성이 14.5 mm로 다른 분획물과 비교했을 때 가장 높았으며, 활성물질이 높은 순도의 단일 물질로 정제되었음을 HPLC 시스템으로 확인하였다.

다제내성 균주들에 대해 현저한 항균 활성을 보이고, 특히, Gram 음성균인 *P. aeruginosa* CCARM2171과 Gram 양성균인 *S. aureus* CCARM3230 균주 모두에서 현저한 항균활성을 나타냈다.

본 연구에 사용된 9종류의 버섯균사체의 최적온도는 대체적으로 pH 4.5~6.5, 25℃ 전후에서 균사의 생장이 우수하게 나타났다. 탄소원은 manitol, mannose, sucrose, soluble starch, maltose, glucose 등 다양하게 이용 되었다. 질소원으로서는 보편적으로 yeast extract, malt extract를, 무기염의 경우 K_2HPO_4 를 주로 이용하였고, 표고버섯의 경우 $CaCl_2$ 의 이용성이 높았다.

혼합배양 조건으로 배양과정에서 적정 혼합 시기는 3일 배양하여 혼합한 처리구에서 높은 세포외 다당체가 형성하였고 혼합 접종비로 1:2의 비율에서 높은 균체량을 형성하였다.



감사의 글

1997년 겨울! 공부를 하고 싶다는 마음에 무턱대고 미생물학 실험실을 찾은 저를 흔쾌히 받아주시고 지금까지 부족함을 나무라지 않고 인내와 자애로 학위과정을 마칠 수 있도록 이끌어 주신 오덕철 지도교수님께 머리 숙여 감사드립니다. 또한 이제껏 마음속에만 담아 두었던 교수님에 대한 고마움을 학위과정을 마치는 지금에야 전함에 대한 용서를 빌고자 합니다. 보잘 것 없는 연구결과를 세심한 교정을 통해 학위논문으로 완성될 수 있도록 다듬어 주신 김세재 교수님, 해양과학대학 허문수 교수님, 순천대학교 강형일 교수님 그리고 해양수산자원연구소 강봉조 박사님께 감사드립니다. 학위과정 동안 생명과학의 각 분야에 대한 지식을 접할 수 있도록 배려해 주신 오문유 교수님, 이용필 교수님, 김원택 교수님, 김문홍 교수님, 이화자 교수님, 고석찬 교수님께도 감사드립니다.

미생물학 실험실에 처음 들어왔을 때 여러 가지 조언과 도움을 주었던 이동헌 박사를 비롯한 미생물학 실험실 여러 선후배님께 감사드리며, 해양과학대학 해양미생물학 실험실에서 여러 가지 실험을 함께 했던 후배들에게도 고마움을 전하고자 합니다.

석사과정에서의 만남을 인연으로 여러 가지 학위과정에 대한 조언을 해주신 카톨릭 대학교 박용일 교수님과 실험에 큰 도움을 준 박동수님께에도 감사의 뜻을 전합니다.

항상 믿어주시고 격려해주신 부모님과 장인, 장모님께 이제야 조그만 결실을 안겨 드리게 되었습니다.

끝으로 동반자이자 후원자인 사랑하는 아내와 두 아들 민석, 민범과 조그만 기쁨을 함께 하고자 합니다.

2008. 12.