creative commons

COMMONS DEED

저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:

저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.

비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.

변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 이용허락규약(Legal Code)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

Disclaimer

dCollection

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

[UCI]I804:24011-200000266019

2017년 2월
석사학위논문

배지의 아미노산 첨가가 꽃송이버섯 균사체 성장과 γ-aminobutyric acid (GABA) 생산에 미치는 영향

조 선 대 학 교 대 학 원

화 학 공 학 과

조 한 교

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

배지의 아미노산 첨가가 꽃송이버섯 균사체 성장과 γ-aminobutyric acid (GABA) 생산에 미치는 영향

Effect of amino acid addition in culture media on the mycelial growth and γ-aminobutyric acid (GABA) production of *Sparassis latifolia*

2017년 2월 24일

조 선 대 학 교 대 학 원

화 학 공 학 과

조 한 교

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

배지의 아미노산 첨가가 꽃송이버섯 균사체 성장과 γ-aminobutyric acid (GABA) 생산에 미치는 영향

지 도 교 수 신 현 재

이 논문을 공학 석사학위신청 논문으로 제출함

2 0 1 6 년 1 0 월

조 선 대 학 교 대 학 원

화 학 공 학 과

조 한 교

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

조한교의 석사학위논문을 인준함

위원장 조선대학교 교 수 이중헌 (인)

위 원 조선대학교 교 수 이재욱 (인)

위 원 조선대학교 교 수 신현재 (인)

2 0 1 6 년 1 1 월

조 선 대 학 교 대 학 원

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

Contents

List of Tables ····· **III**

List of Figures ····· **IV**

ABSTRACT ····· **V**

제1장 서론 ····· **1**

1. 연구의 배경 ····· 1

가. γ-Aminobutyric acid (GABA) ····· 1

나. 균류(Fungi)와 GABA Metabolism ····· 4

다. Biofortification ····· 9

라. 꽃송이버섯(*Sparassis latifolia*) ····· 10

마. 연구동향 ····· 13

2. 연구의 목적 및 구성 ····· 19

가. 연구의 목적 ····· 19

나. 연구의 구성 ····· 20

제2장 아미노산이 꽃송이버섯 생장과 GABA 생산에 미치는 영향 ··· **22**

1. 재료 및 방법 ····· 22

가. 꽃송이버섯 균사체 배양 ····· 22

나. GABA 분석 및 β-glucan 측정 ····· 25

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

2. 실험결과 및 토의 ····· 30
가. 균사체 전배양 - 고체배양 ····· 30
나. 꽃송이버섯 생장에 아미노산이 미치는 영향 ····· 33
다. GABA 생산에 아미노산이 미치는 영향 ····· 37
라. β-Glucan 함량에 아미노산이 미치는 영향 ····· 47

제3장 결론 ····· 50

References ····· 52

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

List of Tables

Table 1. Health effects and major ingredients in edible mushrooms ····· 12

Table 2. GABA enriched foods and its GABA content ····· 16

Table 3. Bioactive compounds from *S. latifolia* and their physiological activities ····· 18

Table 4. HPLC conditions for GABA analysis ····· 26

Table 5. Effect of temperature and pH for the growth of *S. latifolia* mycelia ····· 32

Table 6. Effect of amino acids on GABA production of *S. latifolia* mycelia ····· 42

Table 7. Summary of GABA content in edible mushrooms ····· 43

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

List of Figures

Figure 1. GABA synthesis from glutamic acid by glutamic acid decarboxylase (GAD). ····· 3

Figure 2. GABA metabolism in fungi. ····· 7

Figure 3. Five types of putrescine degradation pathway. ····· 8

Figure 4. Morphology of *S. latifolia*. (A) Fruiting body and (B) mycelia. ····· 11

Figure 5. Experimental design of this study. ····· 21

Figure 6. Inoculated location of agar plate with different amino acids. ····· 24

Figure 7. Calibration curve and peak for GABA determination using HPLC. ····· 27

Figure 8. Time course of mycelial growth of *S. latifolia* (JF02-06) on agar plate. ····· 31

Figure 9. Effect of amino acids on mycelial growth in PDB media. ····· 35

Figure 10. Statistical analysis of mycelial growth using one-way ANOVA with Duncan's multiple test range. ····· 36

Figure 11. HPLC chromatograms of mycelial extracts of glutamic acid group. ····· 38

Figure 12. HPLC chromatograms of mycelial extracts of ornithine group. ····· 39

Figure 13. Effect of amino acids on GABA production from *S. latifolia* mycelia. ··· 40

Figure 14. Statistical analysis of GABA content using one-way ANOVA with Duncan's multiple test range. ····· 41

Figure 15. Two types of GABA pathway from ornithine. ····· 46

Figure 16. Effect of amino acids on β-glucan production from *S. latifolia* mycelia. ····· 48

Figure 17. Statistical analysis of β-glucan content using one-way ANOVA. ····· 49

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

ABSTRACT

Effect of amino acid addition in culture media on the mycelial growth and γ-aminobutyric acid (GABA) production of *Sparassis latifolia*

Jo, Han-Gyo

Advisor: Prof. Hyun-Jae Shin, Ph.D.

Department of Chemical Engineering

Graduate School of Chosun University

Sparassis latifolia (formerly known as *S. crispa*) is a culinary-medicinal mushroom that has recently become popular in Korea, China, and Japan. *S. latifolia* is a good source of food and nutraceuticals, or dietary supplements, due to its rich flavor compounds and β-glucan content. Researches have particularly been done of the effect of β-glucan on anti-cancer and immuno-modulation effects using mice models and human trials. While, some researches are doing on the effect of brain function including neuro-protective effect of mushroom β-glucan. Thus it would be good for this mushroom to have much nutrients such as γ-aminobutyric acid (GABA) as well as β-glucan. Biofortification is agricultural technology which can enhance some nutritions in crops. Most of all, supplying the fertilized soil or media nutrients to mushrooms is the most safe and effective way of biofortification. GABA, a non-essential and free amino acid, is one of the functional compounds. It helps increasing the cognitive function and improving the insomnia. Mushrooms have the GABA metabolism and it is related to TCA cycles which is an essential for growth. In this study, the enhancement of growth and GABA production in a medicinal and edible mushroom mycelia, *S. latifolia*, was hypothesized and amino acids were added as biofortification factors.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

S. latifolia mycelia (JF02-06) was provided by Jeonnam Forest Research Institute (Naju, Korea). To biofortify mushroom with two amino acids, one major approach can be used. Mycelia were pre-incubated on agar plate. Experiment for effect of amino acids was conducted with liquid media. Amino acid free medium was potato dextrose broth (PDB). Amino acids added were L-glutamic acid (PDBG media) and L-ornithine (PDBO media). The range of amino acids is 0.6-2.2% (w/v) and PDB media was used as negative control. The mycelial growth was measured by diameter of mycelia of solid media and dried weight of mycelia for liquid media. GABA and β-glucan content of dried mycelia were measured. GABA was extracted from dried mycelia with 0.1 N HCl and the extracts were freeze-dried. Freeze-dried extracts were derivatized with 1,4-dinitrofluorobenzen (DNFB). GABA was analyzed with HPLC equipped with a C_{18} column and gredient elution of mobile phase. β-Glucan content was measured using an assay kit from Megazyme. All results of this study were statistically analyzed using IBM SPSS Statistics version 23. The results were as follows:

1) The statistical analysis was conducted one-way ANOVA, and the result was $F(10)=3.672$, $p<0.01$. The growth of mycelia was determined to be 0.9±0.00 g/L in PDB media. And in PDBG and PDBO were 2.2±0.16 g/L and 1.93±0.34 g/L, respectively.

2) The statistical analysis was conducted one-way ANOVA, and the result was $F(10)=20.183$, $p<0.001$. The GABA content was 21.3±0.9 mg/100 g in PDB media. In PDBG 1.4% media, it was 115.4±30.2 mg/100 g and it was the best of all. However, the PDBO media was not effective to increasing the GABA content in mycelia.

3) The statistical analysis was conducted one-way ANOVA, and the result was $F(10)=0.823$, $p>0.05$. Amino acids have no effect on change of β-glucan content of mycelia. The β-glucan content were 39.7±1.4 mg/100 mg in PDB media, 34.4±0.2 mg/100 mg in PDBG 2.0% media and 35.2±9.2 mg/100 mg in PDBO 1.4% media.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

Addition of glutamic acid and ornithine positively affected the growth of *S. latifolia* mycelia and glutamic acid also positively affected the GABA production in mycelia. The key enzyme in GABA biosynthesis is glutamic acid decarboxylase (GAD) in GABA-shunt, a short GABA metabolism. So it seems that the glutamic acid is de-carboxylated into GABA by GAD through the GABA-shunt. No degradation of GABA was observed in the addition of glutamic acid. More metabolism study should be done to elucidate the GABA-shunt of *S. latifolia*. The results of this study can be applied to other mushrooms production, and the biofortification-based approach can be a valuable asset in mushroom industry.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

제1장 서론

1. 연구의 배경

가. γ-Aminobutyric acid (GABA)

γ-Aminobutyric acid (GABA)는 비단백성 아미노산에 속하는 자유아미노산(free amino acid)으로 4개의 탄소로 구성되어 있고, glutamic acid decarboxylase (GAD) enzyme에 의해 L-glutamate의 탈탄산 반응으로 CO_2와 함께 생성된다. 이 반응은 pyridoxal-5'-phosphate (PLP) dependent 경로에 해당되는 것으로 알려져 있다(Fig. 1).[1] 비타민 B_6 (Vit B_6)의 active form인 PLP는 아미노산, 글루코스, 지질 metabolism의 많은 효소 반응의 coenzyme으로 작용하며, 실제로 GABA는 비타민 B_6 결핍을 겪고 있는 어린이들에 대한 연구를 진행하면서 발견되었는데 아이들이 섭취했던 가열한 우유를 분석한 결과 비타민 B_6가 파괴된 것으로 밝혀졌다.[2]

포유류의 중추신경계(central nervous system, CNS)에서 발견되는 GABA는 초창기 포유류의 두뇌에서는 해마와 피질에 주요한 자극을 주어 글루탐산 시냅스가 성장할 때까지 두뇌의 많은 부위의 주요 자극물질의 역할을 하므로 자극성신경전달물질로 작용한다. 그러나 성숙한 포유류의 두뇌에서는 억제성 신경전달물질로 작용한다는 것이 밝혀졌다.[3] 억제성 신경전달물질은 과도하게 흥분된 신경을 억제시켜 정상상태의 신경수준으로 낮추는 또 다른 신경전달물질로 급격하게 GABA의 농도가 감소하게 되면 역으로 발작이나 경련 등의 신경성 질환이 발생하게 된다.[4] 포유류의 CNS에서 GABA가 필수적인 아미노산임이 밝혀진 이래로 최근까지 고혈압, 뇌혈류 개선, 치매예방에 대한 다양한 효과가 입증되었다.[5] GABA는 CNS 뿐만 아니라 말초신경계(peripheral nervous system, PNS) 및 내분비 계를 포함한 비 신경성 조직에도 분포하는데, polyamine의 조절, 면역반응, 세포의 발생과 증식을 조절하는 내분비(endocrine)와 외분비(exocrine) 기능의 조절 등에 관여하는 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다.[6] 이러한 기능이 불면증 완화에 도움이 된다는 임상실험이 소개되면서 수면 유도 음료 시장에서 새롭게 각광받고 있다.[7,40] 그 외에도 신경안정, 우울증 완화, 인지기능 개선 등 여러 효능을 가지고 있어 건강보조 식품, 기능성 식품, 음료, 드링크 등의 분야에서 많이 적용되고 있는 물질이다.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

그에 앞서 GABA는 식물과 미생물 대사 생성물로써 가장 먼저 발견되었고 알려져 왔다. 포유류의 CNS에서 GABA는 억제성 신경전달물질로 작용하고, 식물에서는 그 역할이 정확히 밝혀진 바가 없으나 외부 환경에 대한 반응 산물로 작용한다고 알려져 있다. 외부 환경의 높은 염분, 병원균, 가뭄, 산성토양, 극한기온 등의 자극이 주어지면 그에 대한 반응으로 세포내외의 양이온(H^+) 농도를 변화시켜 식물체가 생존할 수 있도록 해주며, 동시에 GABA의 축적이 급격하게 이루어진다. 식물의 GABA metabolism은 GABA-shunt라고 하는 짧은 경로로 일어나는데, GABA의 합성에 관여된 효소는 GAD로 세포질 내에 존재하는 내재성 효소이며, 칼슘이 붙는 전령자 단백질(messanger protein)인 calcium/calmodulin (Ca^{2+}/CaM)이라는 독특한 결합영역을 가진다.[8-10]

반면에 균류의 GABA는 그 역할이 정의되지 않았으며 GABA 합성을 주도하는 GAD도 식물의 GAD와 차이점이 존재한다. 균류의 GABA에 대해 밝혀진 몇 가지 내용 중 가장 핵심적인 내용은 균류에서 GABA가 측정 가능한 농도로 축적되는 시기는 포자가 발아하는 시기라는 것이다.[11,13] 왜 그 시기에 GABA가 축적이 되고, 축적되는 원인이나 목적에 대한 것은 아직까지 연구된 바가 없지만, 분명한 것은 포자가 발아할 때 GABA가 축적된다는 것이며, 이는 균사체의 GABA의 축적 가능성을 의미하는 것이라 볼 수 있다.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

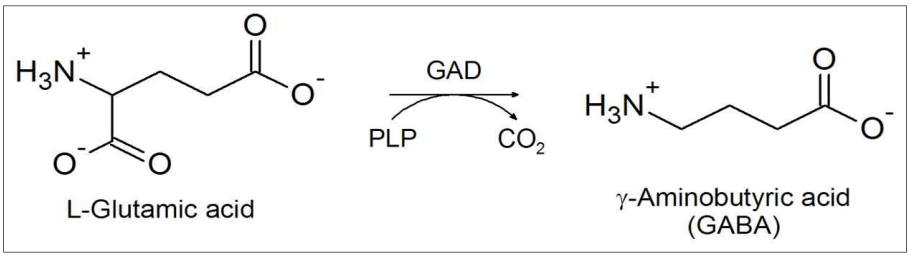

Figure 1. GABA synthesis from glutamic acid by glutamic acid decarboxylase (GAD).

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

나. 균류(Fungi)와 GABA Metabolism

GABA metabolism은 아미노산 대사인 nitrogen metabolism으로부터 GABA가 생성되며 생성된 GABA는 호흡 대사인 carbon metabolism을 통해 분해된다. GABA 생합성의 주된 반응을 일으키는 GAD는 식물, 미생물, 균류에 공통으로 존재하지만, 반면 식물 GAD는 carboxyl기 말단에 calmodulin과 결합하는 부위를 가지고 있다. 식물 GAD는 calmodulin과 Ca^{2+}가 결합한 활성 상태에서 GABA를 생성하는 반면, 미생물과 균류의 GAD는 별다른 작용 없이 PLP에 의존하여 GABA를 생산해낸다.[12] 균류에는 진핵생물의 시스템에 상응하는 metabolism이 존재하며 상대적으로 잘 보존되는 경향이 있기 때문에 이러한 metabolism을 연구하는데 있어 훌륭한 모델이 될 수 있다.

균류의 GABA metabolism 연구는 Schmit and Brody (1975)와 Christensen and Schmit (1980)에 의해 최초로 수행되었으며, *Neurospora crassa* 균주의 발아 중 GABA 축적에 대한 증거를 발견하면서 시작되었다.[13-14] 이후 *Aspergillus niger*를 모델로 사용하여 GABA 대사와 관련된 효소와 expression gene을 발견하였으며, 이후 *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus oryzae*, *Fusarium graminearum* 등 많은 균주들의 GABA metabolism이 연구되었다.[15,103] 2010년에는 정상 산소 상태에서 저산소 상태로의 전이가 일어남에 따라 GABA-shunt 효소들의 과잉 발현이 수반되며, GAD가 조절 metabolism에 관여한다는 것이 밝혀졌다.[16]

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

A. Polyamine synthesis and degradation metabolism

GABA 이전의 경로에는 arginine, ornithine, polyamine 등이 존재하며 일반적으로 일어나는 대사보다는 외부 환경의 스트레스에 의해 촉진되는 대사이다.[17] 균류의 polyamine은 아직 그 역할이 명확하게 밝혀지지 않았고 유효한 정보가 존재하나 몇 가지 균류에 한정되어 있다.[18] 식물에서는 arginase에 의해 arginine으로부터 ornithine이 합성되지만 균류에는 arginase가 존재하지 않기 때문에 polyamine은 오직 orginine으로부터만 생성된다. Ornithine decarboxylase (ODC)에 의한 ornithine의 decarboxylation으로부터 diamine인 putrescine이 생성되며 putrescine은 여러 경로를 통하여 γ-acetamidobutyric acid로 전환된다. 그 경로는 5가지로 알려져 있으며 어떤 경로로 putrescine이 분해되는지에 대한 정확한 발견은 아직 보고되어 있지 않다(Fig. 3). 일반적으로 식물에서 putrescine은 γ-acetamidobutyric acid 외에도 spermidine과 spermine으로 전환될 수 있으나 균류에서는 매우 한정적인 종에서만 일어나는 metabolism이며, 특히 spermidine에서 spermine으로 전환시키는 enzyme을 발현하는 gene은 Saccharomycotine class에서만 발견된다.[19-20]

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

B. GABA degradation and TCA cycle

GABA 이후의 경로에는 tricarboxylic acid cycle (TCA cycle)이 존재하며 이화작용이 일어난다. TCA cycle은 고리형태의 대사과정으로 pyruvate에서 시작된 대사가 oxaloacetate까지 도달하여 다시 순환하는 구조이다. TCA cycle 중 일반적인 대사라면 α-ketoglutarate에서 succinate로 곧바로 전환되어야 하지만 α-ketoglutarate가 glutamate로 전환되어 GABA와 succinic semialdehyde를 거쳐 succinate로 전환되고, 다시 TCA cycle의 succinate로 들어가는 GABA-shunt가 존재한다. 보고에 의하면 TCA cycle 중 8-10%는 GABA-shunt를 거쳐가는 것으로 확인되는 만큼 GABA metabolism은 생물체의 성장과도 밀접한 관련이 있다.[21]

GABA-shunt의 첫 번째 관여 효소는 GAD이며, 두 번째 관여 효소는 GABA transamiase (GABA-T)로 α-ketoglutarate를 glutamate로 전환시킬 뿐만 아니라 GABA를 succinic semialdehyde로 전환하는 역할도 한다. 세 번째 관여 효소는 succinic semialdehyde dehydrogenase (SSADH)로 이 효소를 통하여 다시 TCA cycle로 들어간다. GABA는 TCA cycle로 들어가는 경로 또한 2가지로 나뉜다. 첫 번째 경로는 GABA-T와 SSADH 2개의 효소에 의해 TCA cycle로 들어가는 경로로 GABA가 succinic semialdehyde로 전환되었다가 SSADH에 의해 succinic acid로 전환되어 TCA cycle로 들어가며, 또 다른 경로는 GABA가 α-ketoglutarate로 곧바로 전환되어 TCA cycle로 들어가는 경로이다. 이러한 GABA-shunt는 TCA cycle의 효율적인 대사 속도를 방해하는 것처럼 보이지만 NADH 또는 ATP의 전체적인 변화가 없는 또 다른 cycle일 뿐이다.

Collection @ chosun

Collection @ chosun

조선대학교 CHOSUN UNIVERSITY

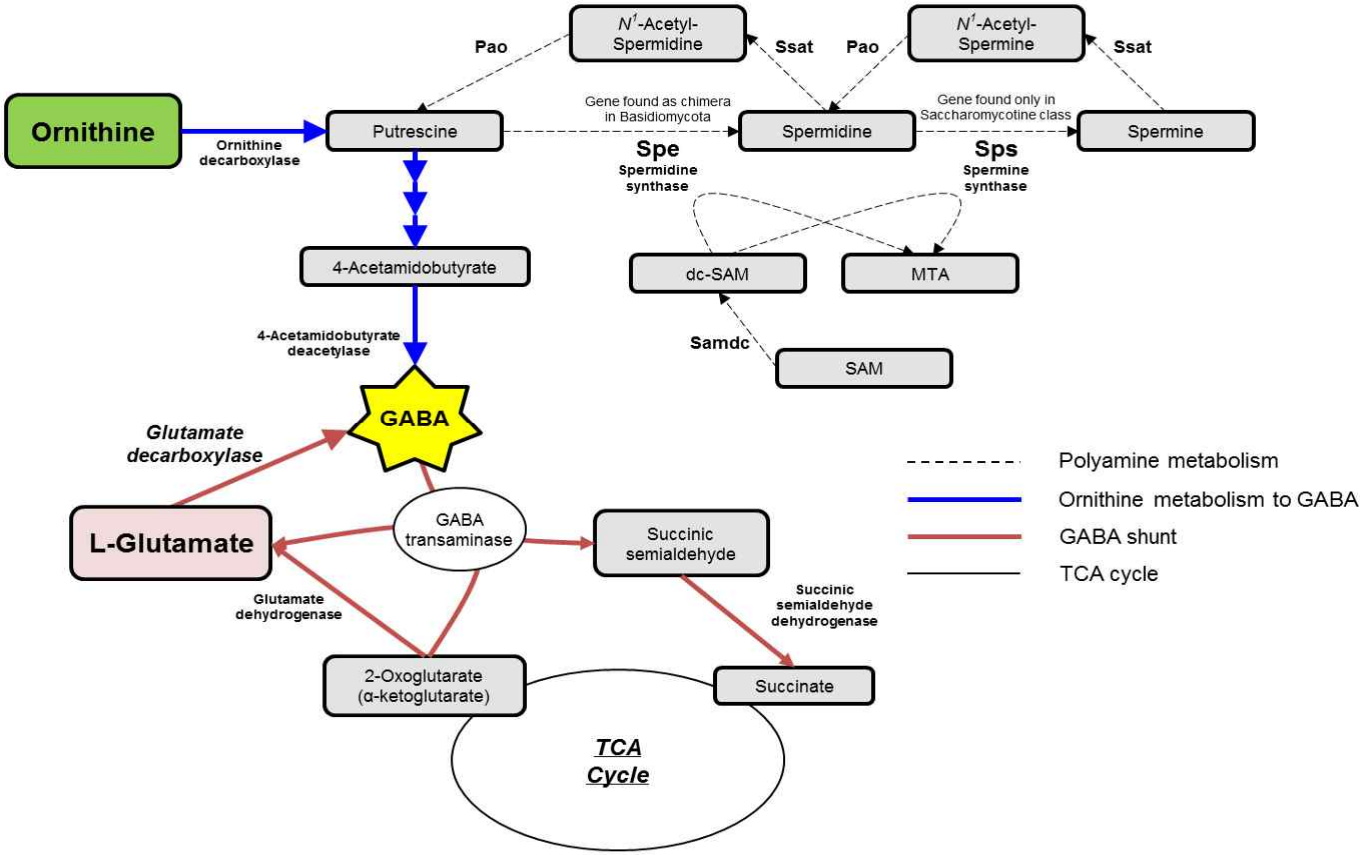

Figure 2. GABA metabolism in fungi.

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

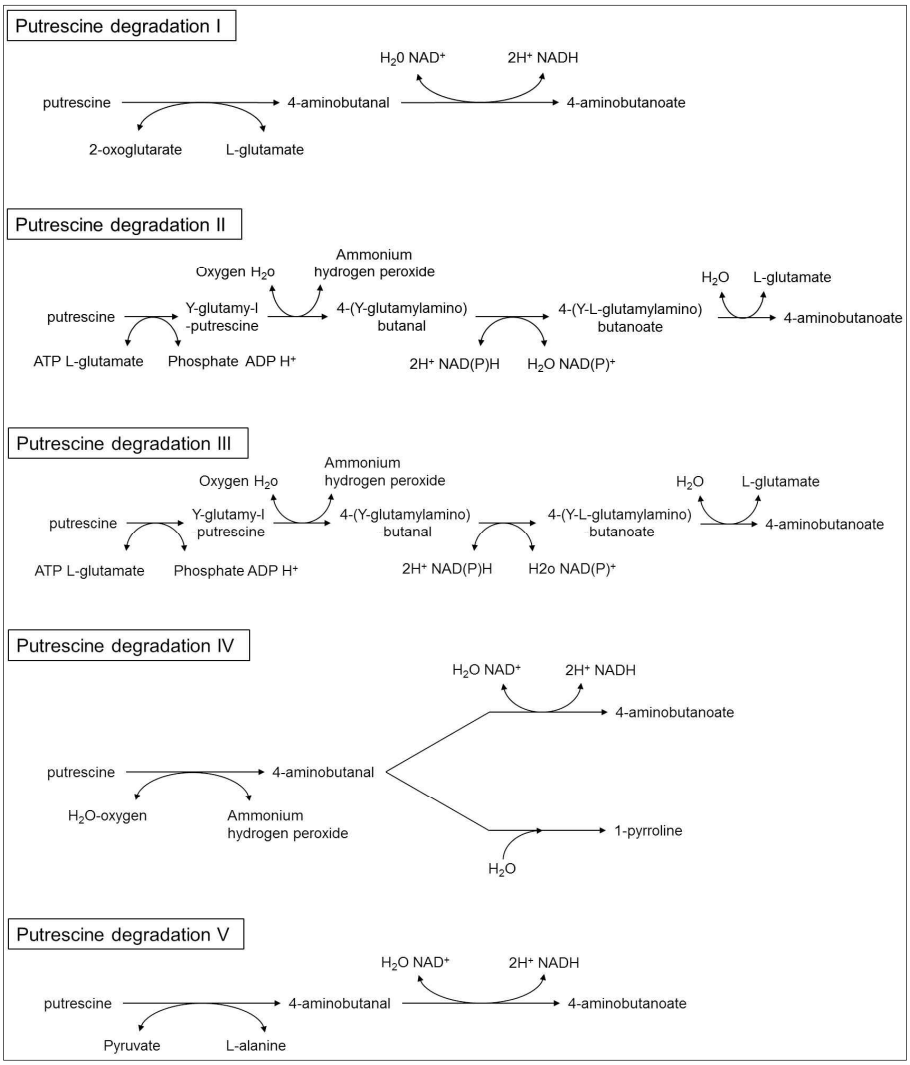

Figure 3. Five types of putrescine degradation pathway.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

다. Biofortification

식품에 필수 미네랄과 건강 보조 물질들을 식품에 첨가하는 것을 영양강화(fortification)라 한다. 그리스어로 “bios”는 “life”를 의미하며 라틴어로 “fortificare”는 “make strong”을 의미한다. 두 단어를 합성하여 생물영양강화(biofortification)라는 단어가 만들어졌다. 이는 산업화 사회로 인한 영양 불균형을 해소하고 건강을 증진시키려는 목적으로 생겨난 정책의 일환으로 볼 수 있다.[22] 필수 영양분이 부족해진 가공된 곡류를 섭취하는 지역의 사람들에게 영양결핍이 나타나기 쉬우며 그로 인한 질병에 걸릴 확률이 높고 상대적으로 위험에 많이 노출되어 있다. 따라서 biofortification의 목적 성분은 주로 철분(iron), 비타민(vitamine), 아미노산(amino acids), 칼슘(calcium)이 차지하고 있으며 벼와 옥수수, 밀과 같은 곡물이 주요 대상 식품이다.[23]

대사공학을 이용하여 유전적인 요인을 조작하는 genetically modified organisms (GMO)도 biofortification 기술에 해당되지만 GMO는 현재까지 많은 논란을 낳고 있다. 따라서 전통적인 농업기술을 그대로 사용하되 식물체가 스스로 목적으로 하는 영양소를 합성하여 고농도로 축적할 수 있게 하는 전통 육종법 기술이 선호되고 있다.[24] 이와 같은 방법에는 목적 영양소가 합성될 수 있는 조건의 비료를 사용하여 작물을 재배하거나 온도, 습도, 광도 등 환경적인 요인을 조작하여 작물을 재배하는 방법이 있다. 비료에 첨가되는 물질에는 미네랄과 비타민, 아미노산이 사용되고 있는데 이들은 식물체의 대사과정에서 보조 인자 또는 전구체로 작용하는 중요한 역할을 맡고 있으며, 결핍될 경우 작물의 질병이 유발되기도 한다.

하지만 이러한 노력에 비해 단순히 필수 영양소를 제공하는 목적으로 소비되고 있는 작물이 대부분이다.[25] 식물에서 합성되는 안토시아닌(anthocyanin)과 플라보노이드(flavonoid), 멜라토닌(melatonin), 뇌기능을 증진시켜줄 수 있는 GABA 등은 필수 영양소는 아니지만 기능성 물질로서 사람의 건강을 위하여 무척 중요하다. 기본적으로 필수 영양소를 제공하면서 건강 증진 효과가 있는 기능성이 추가된 건강보조제로서의 작물이 많이 개발되고 있고 수요 또한 증가하고 있다.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

라. 꽃송이버섯(*Sparassis latifolia*)

꽃송이버섯(*Sparassis latifolia* 혹은 *S. crispa*)은 담자균문, 주름균아문, 주름균강, 구멍장이버섯목, 꽃송이버섯과, 꽃송이버섯속으로 자실체는 백색-밤색으로 꽃양배추 형상을 지닌 버섯이다.[26] 주로 여름철에 발생하며 산림에서 쉽게 발견되지 않는 버섯으로 알려져 있다. 탄수화물이 전체 영양성분의 70%를 이루고 있고, 이 중 탄수화물의 절반 이상이 베타글루칸(β-glucan) 성분이며, 그 외에 글리코겐(glycogen), 키토산(chitosan), 에르고스테롤(ergosterol), 트레할로스(trehalos) 등 다양한 성분이 포함되어 있다.[27] 꽃송이버섯의 베타글루칸 함량은 다른 버섯들에 비해 상당히 높은 편으로 (약 43.6%) 면역활성 촉진 및 항암활성에 대한 연구들이 보고되어 있다.[28-30,72]

꽃송이버섯의 일반성분을 분석한 연구에 따르면 건조 자실체 100 g 기준 자유아미노산의 함량은 3,224 mg/100 g으로 다른 버섯(양송이버섯 3,785 mg, 소나무잔나비버섯 68.67 mg, 상황 2378.3 mg, 민자주방망이버섯 220.86 mg)들에 비해 비교적 다량의 자유아미노산을 함유하고 있는 것으로 보고되었다.[31-35] 비타민의 경우에도 다른 버섯들보다 훨씬 많은 양의 비타민을 포함하고 있어 이를 이용한 의약품, 건강기능성 식품을 개발하고자하는 시도가 있었고, 이와 동시에 식용·약용으로써 가치가 높게 평가되었으며, 인공 재배법에 대한 연구 또한 꾸준히 진행되었다.[36-39]

최근에는 각종 TV 광고와 프로그램에서 소개되면서 소비자들에게 일반적으로 알려진 팽이버섯, 느타리버섯, 표고버섯 등과 함께 식용 버섯으로 인식되고 있다. 2016년 7월에는 전북농업기술원(전북농기원)에서 꽃송이버섯 '너울'이 신품종임을 인정받아 국립산림품종 관리센터로부터 신품종 권리 및 종균 지적재산권 보호를 받는 '신품종 보호'를 확정 받았다. 기존의 재배 방법대로 꽃송이버섯을 재배하게 되면 균 접종부터 수확까지의 기간이 120일로 길고, 재배 기간이 길어짐에 따라 여러 가지 변수가 생겨 재배에 어려움을 겪었지만, 재배기간을 90일로 줄인 '너울'이 보급되면 꽃송이버섯의 공급과 수요의 양이 증가할 것으로 예상된다.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

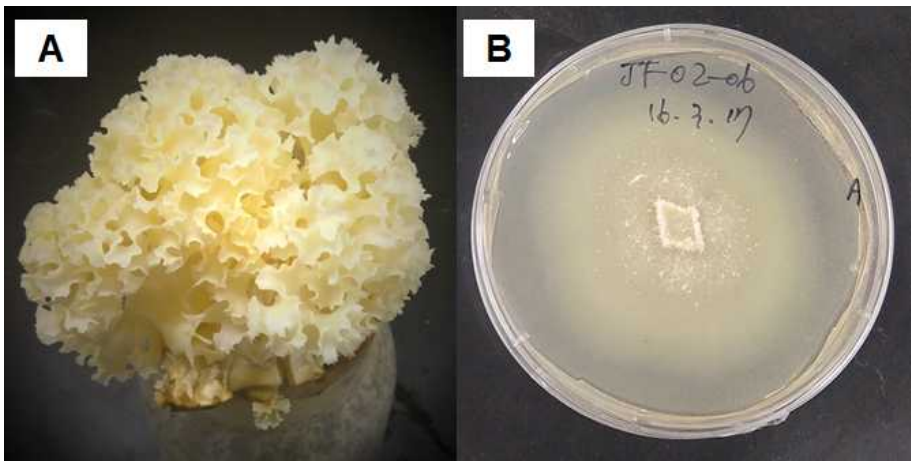

Figure 4. Morphology of *S. latifolia*. (A) Fruiting body and (B) mycelia.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

Table 1. Health effects and major ingredients in edible mushrooms

약효	버섯명	주요성분
항종양작용	양송이, 목이, 팽이, 잎새, 노루궁뎅이, 차가, 표고, 느타리, 흰목이, 영지, 신령, 꽃송이버섯	β-Glucan, heteroglycan, RNA복합체
면역증강 (조절)작용	양송이, 저령, 팽이, 잔나비걸상, 영지, 잎새, 노루궁뎅이, 차가, 표고, 치마, 흰목이, 상황, 동충하초, 꽃송이버섯	Polysaccharide, β-Glucan, heteroglycan
항혈전작용	표고, 영지, 잎새, 양송이, 신령, 차가버섯	Lentinan, 5'-AMP, 5'-GMP
강신장	양송이, 저령, 영지, 표고, 구름버섯	-

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

마. 연구동향

A. GABA의 효과

최근 과도한 업무, 육아, 전자기기의 수면 방해 등으로 수면 장애를 앓고 있는 인구가 늘어남에 따라 사람들의 관심이 증폭하고 있으며, 음료 시장에서는 수면 유도 제품들이 전 세계적으로 출시되고 있다. GABA의 잠에 대한 효과와 경구 섭취 후 혈관의 GABA 수치를 조사한 연구에 따르면, GABA 섭취가 잠에 드는데 걸리는 시간을 단축하였고 총 비 rapid eye movement (REM) 수면 시간을 증가시켰다는 결과와 GABA를 섭취한 피험자들 스스로도 잠에 대해 효과가 있음을 느꼈다고 하였다.[7,40] 이는 혈관 속 GABA 농도와 연관이 있으며, 잠의 초기 단계에서 굉장한 영향을 미치는 것으로 제시되었다.

GABA는 수면 개선 효과뿐만 아니라 기억력과 인지능력 개선에도 효과가 있는 것으로 확인되었다. 800 mg의 GABA와 placebo를 섭취한 그룹을 대상으로 자극을 받았을 때 행동 변화에 대한 시간 간격을 조사하였고, GABA를 섭취한 그룹에서 행동을 변화시키는데 걸리는 시간이 단축된 것을 확인하였다(reaction times (RTs) in GABA group: 806 ms; placebo group: 1000 ms).[41] 또한 GABA는 섭취 후 30분까지 스트레스를 받는 환경에 노출되었을 때 그 정도를 완화시켜주고 기분을 호전시켜 준다고 보고되었다.[42] 이 외에도 26.4 mg의 GABA가 함유 된 쌀 배아를 매일 경구 투여하는 것이 신경 장애의 치료에 효과적이라는 것이 입증되기도 하였다.[43]

2016년 6월 Biological Psychiatry Journal에 전두엽 피질의 GABA 농도와 나이의 상관관계에 대한 연구 결과가 보고되었다.[44] 평균 73세 94명의 노인을 대상으로 magnetic resonance spectroscopy (MRS)를 이용하여 뇌의 전두엽과 후두엽 피질의 중심 부분 GABA 농도를 실시간으로 측정하였고, 인지기능 평가에 있어 Montreal Cognitive Assessment를 실시하였다. 결과는 전두엽과 후두엽 피질에서 모두 나이가 감소함에 따라 GABA의 농도가 감소하였고, 특히 전두엽의 GABA 농도 감소가 유의하게 감소하였다. 또한 인지기능 평가에 있어 나이가 감소함에 따라 인지기능 평가도가 낮게 측정되었다. 이는 뇌중 GABA의 농도가 인지기능에 영향을 주는 것으로 평가되며 앞서 언급한 인지기능 개선과 동일한 효과임을 보여준다.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

B. 미생물을 이용한 GABA 생산

유산균은 기본적으로 GABA를 생산하는 gene을 보유하고 있는데 이는 유해 미생물을 자라지 못하게 하여 음식물의 부패를 방지해주고 인간의 장에서는 probiotics로 작용한다. 이러한 GABA 생산성이 높은 유산균 균주를 다양한 재료로부터 스크리닝하는 연구가 이루어졌고, 분리된 유산균을 이용한 GABA 생산은 배지에 glutamate나 monosodium glutamate (MSG)를 첨가하였을 때 90% 이상 전환율을 보여주고 있다.[45-48] 또한 균을 이용할 경우 GABA production 뿐만 아니라 균의 생장에 대한 영향도 고려해야 하므로 pH, 온도, 시간, 배지 첨가물 등을 고려해야 한다.

하지만 분리된 균주는 안정성 면에서 취약한 단점을 가지고 있기 때문에 현재는 유산균 외에도 *Escherichia coli*를 이용하여 GABA를 쉽게 생산할 수 있는 공정이 확립되어 있다. 일반적으로 *E. coli*의 plasmid에 GAD 발현 유전자를 추가하여 glutamate를 GABA로 전환시키는데, 최근에는 GABA shunt와 관련된 서로 다른 위치에 존재하는 유전자를 co-localization 기술을 이용하여 단기간에 효과적으로 GABA 생산을 할 수 있는 재조합 균주가 개발되었다.[49]

유산균을 이용하여 GABA를 생산할 시에는 GABA를 단일 물질로 분리할 수 있으며 대량으로 제조할 수 있기에 저렴한 가격대의 GABA를 생산할 수 있다. 또한 목적에 따라 GABA 함유량을 조절하여 제품 생산이 가능하며, 제품의 형태도 액상과 분말 형태로 생산이 가능하다는 장점이 있다. 수입에 의존하고 있는 기능성 식품소재를 국산화 하고 대량으로 생산하려는 노력들이 한계를 극복할 수 있는 좋은 기회가 될 것으로 기대되고 있다.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

C. 식품의 GABA 함량 증대

GABA는 의학 및 제약 분야에서 광범위하게 연구되어 왔지만, 식품 분야에서는 제품의 GABA 수준 및 생합성 및 생리적 기능의 최적화에 대해 중점을 둔 연구들이 주를 이루고 있다.[50] GABA 연구는 주로 식물을 대상으로 이루어졌으며 식물 GABA는 감자로부터 처음 추출되었고 토마토, 브로콜리 등과 같은 많은 식물에 자연적으로 존재하고 있다. 하지만 하루 섭취하는 식품의 종류나 양에 비해 그 양이 상대적으로 낮기 때문에 효과가 나타날 수 있는 농도까지 GABA가 증대된 식품이 필요하다.

지금까지 식품의 GABA 함량 증대에 대해 보고된 연구는 Table 2에 정리되어 있다. 식물에서의 GABA 함량의 최대치는 500 mg/kg 정도로 확인되었고, 그 보다 높은 양의 GABA는 주로 발효 식품에서 나타나며, 특히 발효 유제품에서 주로 발견된다. 최근 발표된 연구에서는 *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*로 발효시킨 yogurt에서는 GABA가 검출되지 않았으나 *Streptococcus thermophilus* APC151 균주를 이용하여 발효한 yogurt의 GABA 함량은 2000 mg/kg로 확인되었다. 유산균을 일반 배지에서 배양했을 때와 GABA 생산량이 다르게 나타나는 것은 식품에 첨가된 다른 영양성분들의 유산균에 대한 생장 저해 효과로 사료되며, 식품에 첨가되는 균주들은 모두 식용 가능한 안전한 균주임이 밝혀져야 한다는 보완점이 있다. 이러한 이유로 발효식품 이외에도 chocolate, potato snacks, cereal quinoa flakes 등 가공식품의 형태로 정제된 GABA를 첨가하여 제품으로 만든 사례도 존재한다.

식물 자체의 GABA 함량을 증대시키는 연구는 현재까지 녹차, 곡물, 버섯 등 다양한 품종이 연구되었고 곡류의 경우에 GABA 함량의 증대가 가장 효과적임이 밝혀졌다. 녹차의 경우 혐기 처리를 이용하여 차 잎의 GABA 함량을 높이며, 콩의 경우 물에 담금질하여 불리면 GABA의 함량이 높아진다는 보고가 있다.[51-52]

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

Table 2. GABA enriched foods and its GABA content

GABA-enriched foods	GABA content[mg/kg]	References
Chocolate	2800	[53]
Yogurt	2000	[54]
Potato snacks	1700	[55]
Whole wheat and soya sourdough	1000	[56]
Buckwheat	632.3	[57]
Fruit juice	579	[58]
White tea	505	[59]
Wholemeal wheat sourdough	258.7	[60]
White rice	220	[61]
Germinated waxy hull-less barley	143	[62]
Meat	100	[63]
Cereal quinoa flakes	90	[64]

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

D. 꽃송이버섯 연구동향

꽃송이버섯에 대한 연구는 2000년대 초반부터 이루어졌고, 인공재배법에 대한 연구는 마무리 단계이며, 기능성 물질과 효능에 대한 연구는 아직 개발 단계에 있다고 볼 수 있다. 지금까지 밝혀진 꽃송이버섯의 생리활성 물질과 효능에 대해 정리하였다(Table 3).

꽃송이버섯의 생리활성에 대한 연구는 주로 ethanol 추출물 또는 열수추출물을 대상으로 이루어졌으며, 항암(anti-cancer), 항염(anti-inflammatory), 항균(anti-microbiotic), 항콜레스테롤(anti-cholestrol) 효과가 있는 것으로 확인되었다. 주요 생리활성 물질은 β-glucan으로 단백다당체(proteoglucan)에 해당하는 물질이다. 버섯의 β-glucan은 β-1,3-D-glucan 구조로 존재하며 β-glucan은 대식세포(macrophage)를 활성화시켜 T세포에서 cytokine의 분비를 유도하여 면역계를 강화시키는 물질로 알려져 있다.[65] 항암효과 이외에도 항염효과에 대해서도 보고되었는데, IκB-α의 활성증가에 의해 NF-κB의 활성이 감소하였고, 활성이 억제된 NF-κB가 핵 내부로 이동하려는 것이 저해되어 iNOS 유전자 발현에 영향을 미침을 확인하였다. 추출물 이외에도 섬유소를 분해하는 효소(fibrinolytic protease)의 항혈전 활성 및 alkaliphilic esterase의 활성 등도 보고되었다. 2016년 꽃송이버섯으로부터 분리한 렉틴에 대해 보고가 되었는데, 분리된 렉틴이 미생물의 표면과 상호작용하여 항균 활성을 나타낸다고 하였다.

꽃송이버섯 자체 powder에 대한 연구에 따르면, 당뇨병 모델 마우스에 꽃송이버섯을 급여하였을 때 외상 치유(wound healing)에 대한 효과로 대식세포와 섬유아세포의 이동, 콜라겐 재생 및 상피형성율이 증가함이 보고되었다. 꽃송이버섯에 다량으로 포함되어 있는 β-1,3-D-glucan과 더불어 페놀성 화합물(phenolic compound) 등 다양한 성분이 함유되어 있는데, 다른 약용 버섯에 비해 그중 benzoic acid 계열의 성분이 많이 함유된 것으로 보고되었다.[66]

다양한 생리활성 물질에 대한 효능연구가 이루어져야 하며, 효능과 더불어 각각의 물질에 대한 규명이 필요하다. 유기용매 추출과 물 추출 등 용매에 따른 추출물의 효과도 확인되어야 할 것이며, 산업화 하였을 시 물질을 추출함에 있어서 안전한 추출 방법에 대한 연구도 함께 이루어져야 할 것으로 사료된다.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

Table 3. Bioactive compounds from *S. latifolia* and their physiological activities

No.	Bioactive compounds	Effects	References
1	Lectin	Antibacterial activity	[67]
2	Water extract	Neuro-protective activity	[68]
3	Fibrinolytic protease (wulfase)	Antithrombotic activity	[69]
4	Fermentation broth with soluble β-glucan	Immunofacillitation	[70]
5	Extract	Hypocholesterolemic activity	[71]
6	Ethanol extract	Anti-cancer activity	[72]
7	Methanol extract	Anti-inflammatory activity	[73]
8	Alkaliphilic esterase	-	[74]
9	Whole mushroom powder	Wound healing activity	[75]

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

2. 연구의 목적 및 구성

가. 연구의 목적

식물의 GABA 증진에 대한 방법에 대한 연구는 꾸준히 진행되어 왔으며 국내 기업에서는 GABA 증진 백미, GABA가 함유된 식품을 출시한 바가 있다. 농·식품 산업에서의 이러한 변화는 인지기능의 장애와 관련된 질병을 앓는 인구가 점차 늘어남에 따라 국민의 뇌 건강 보호 차원에서 이루어진 것이라고 볼 수 있다. 하루에 신체에서 GABA를 필요로 하는 양은 적게는 500 mg에서 많게는 3000 mg으로 자연계 식품을 섭취할 경우 하루 필요량을 충족시킬 수 없다. 따라서 자연계 식품에서 GABA를 증진시킬 수 있는 방법이 필요하며, 다행히도 작물의 영양 공급원에 glutamic acid를 첨가하거나 작물 재배의 마지막 단계에 단기간의 가혹조건을 주게 되면 GABA가 증진되는 것으로 알려져 있다.[76-78]

버섯의 생활환은 영양세대인 균사(mycelia)와 번식세대인 자실체(fruiting body)로 크게 나뉠 수 있는데, 자실체와 마찬가지로 균사체 또한 여러 생리활성 물질을 함유하고 있고 배양용기 내에서 안정적으로 생산이 가능한 장점이 있다. 실제로 자실체를 생산하기까지 소비되는 인력, 시간, 에너지 등을 고려하면 균사체로부터 유용물질을 생산하는 방법은 대단히 효율적인 방법이라 할 수 있다. 또한 버섯자원을 이용한 연구와 개발은 국내외적으로 꾸준히 이루어지고 있으나 아직 그 단계는 초기단계에 불과하기 때문에 더욱 많은 관심을 필요로 하고 있다.

지금까지 균류의 GABA metabolism과 관련된 연구 결과는 *Trichoderma atroviride*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Fusarium fujikuroi*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus oryzae* 등 일부 한정된 종에서만 이루어져 있으며 꽃송이버섯의 GABA metabolism에 대한 연구는 보고되어 있지 않다. 일부 버섯의 아미노산 함량에 대한 연구 결과에서 꽃송이버섯의 GABA 함량을 확인할 수 있으며, 이는 꽃송이버섯에 GABA metabolism이 존재한다는 것을 의미한다고 볼 수 있다.

본 연구에서는 생물체의 변화를 유도하지 않으면서 생리활성 물질을 증대시키는 자연적이고 안전하며 환경 친화적인 biofortification 방법을 사용하고자 꽃송이버섯의 배양 배지에 아미노산을 첨가하였고, 그에 따른 균사의 생장과 GABA 함량에 대한 효과를 확인하고자 한다.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

나. 연구의 구성

본 연구는 아미노산을 첨가한 배지에서의 꽃송이버섯 균사체의 배양 특성에 대한 연구로 균사체의 생장과 GABA 함량 그리고 β-glucan에 미치는 영향을 조사하였다.

꽃송이버섯 균사체의 배양은 전배양과 본배양으로 이루어졌으며, 전배양은 고체배지에서 본배양은 액체배지에서 실행하였다. 전배양은 아미노산을 첨가하지 않은 배지를 사용하였고, 본배양은 아미노산을 첨가하지 않은 배지와 아미노산을 첨가한 배지를 사용하여 아미노산의 효과를 확인하였다.

전배양의 균사 생장은 균사가 성장한 균사 선단까지의 지름을 측정하였으며, 본배양의 균사 생장은 배지를 여과시키고 남은 균사체를 건조하여 중량을 측정하였다.

균사체 내의 GABA 함량은 건조된 균사체를 사용하였으며, 0.1 N HCl에 침지시켜 GABA를 추출 후 DNFB를 사용하여 derivatization 하였다. HPLC 장비를 이용하여 derivatization 한 시료의 GABA를 분석하였다.

균사체 내의 β-glucan 함량은 Megazyme 사의 Yeast and Mushroom β-glucan assay kit를 이용하여 측정하였다. β-glucan 역시 건조된 균사체를 사용하였으며, 모든 실험의 결과는 IBM SPSS Statistics version 23을 사용하여 유의성을 검증하였다.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

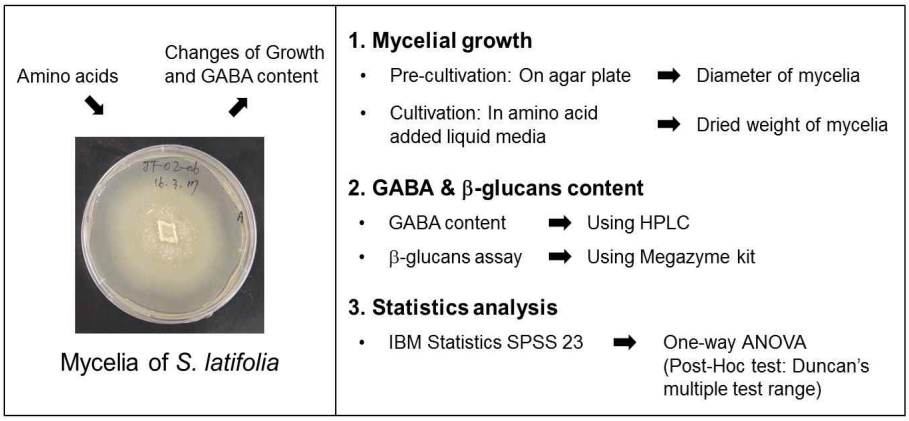

Figure 5. Experimental design of this study.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

제2장 아미노산이 꽃송이버섯 생장과 GABA 생산에 미치는 영향

1. 재료 및 방법

가. 꽃송이버섯 균사체 배양

A. 공시균주

본 연구에서 사용한 꽃송이버섯 균주는 전남산림자원연구소가 채집 및 선발한 JF02-06 균주로, PDA 배지에 계대하여 분양받아 사용하였다.

B. 접종원 배양

꽃송이버섯 균체 분리 및 배양 시에는 clean bench (HB-402SM, HANBAEK, Korea)에서 진행하였으며 배지는 Potato dextrose broth/agar (PDB/PDA, BD, England)를 사용하였다. 국내·외의 꽃송이버섯 균사 생장의 최적 조건에 대한 연구 결과를 토대로 진균류 기본 배양 배지인 PDA 배지를 이용하여 꽃송이버섯 균주를 배양하였다.

기본 균주 보관 배지는 PDA 배지를 사용하였고, 25±1°C incubator (JSSI-300CL, JSR, Korea)에서 암배양하였다. 균사의 면적이 petri-dish 전체 면적의 90-95% 정도가 되었을 때 실험 배지에 계대하여 사용하였고, 분리된 원균은 4°C에 보관하며 3-4개월마다 새로운 PDA에 계대하였다.

C. 아미노산 첨가 배지 제조

PDB 배지를 control로 하여 ornithine (PDBO)과 glutamic acid (PDBG) 두 가지의 아미노산을 0.6, 1.0, 1.4, 1.8, 2.2% (w/v)가 되도록 첨가하였다. 첨가한 아미노산 glutamic acid와 ornithine은 reagent grade (Sigma aldrich, USA)를 사용하였다. 만들어진 배지 PDB, PDBO, PDBG를 300 mL의 삼각플라스크에 100 mL 씩 넣고 121°C에서 15 min 동안 autoclave (HB-506, HANBAEK, Korea)로 가압멸균하여 균 접종에 사용하였다.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

D. 균체배양

미리 배양된 PDA 배지상의 균사를 액체배지에 접종하기 위해 mess를 이용하여 agar plate 중앙으로부터 같은 거리에 위치한 gel을 8 mm×8 mm 크기로 세절하였고, 이후 핀셋으로 떼어내어 멸균된 액체배지 표면에 접종하였다(Fig. 6). 3일 동안 정치 배양으로 25°C incubator에서 암배양하고 3일 후 동일 조건에서 100 rpm으로 shaking하며 배양하였다. 배양 중 플라스크 내면에 부착하는 균사는 배양액으로 떨어뜨리며 배양하였다.

E. 균사 생장 및 균체량 측정

Agar 고체배지에서의 균사 생장은 petri-dish 중앙에 균사체를 접종하고 동일 간격의 일 수 마다 균사 선단부를 표시하였다. 수직으로 교차하는 지름의 길이를 측정하여 평균값을 생장 길이로 하였고 배양일 수에 따라 신장한 양을 기록하였다.

액체배지에서의 균체량은 배양이 모두 종료된 후 측정하였다. 미리 무게를 측정한 여과지를 여과장치에 놓은 다음 배양액 전량을 넣고 여과하였다. 여과액은 받아서 −20°C에 보관하면서 다음 분석에 사용하였다. 남은 균체는 여과지와 함께 80°C의 dry oven (AT-S13, ISUZU, Japan)에 넣어 건조 후 중량을 측정하였고, 미리 측정한 여과지의 무게를 제외하여 균체 건조중량으로 하였다.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

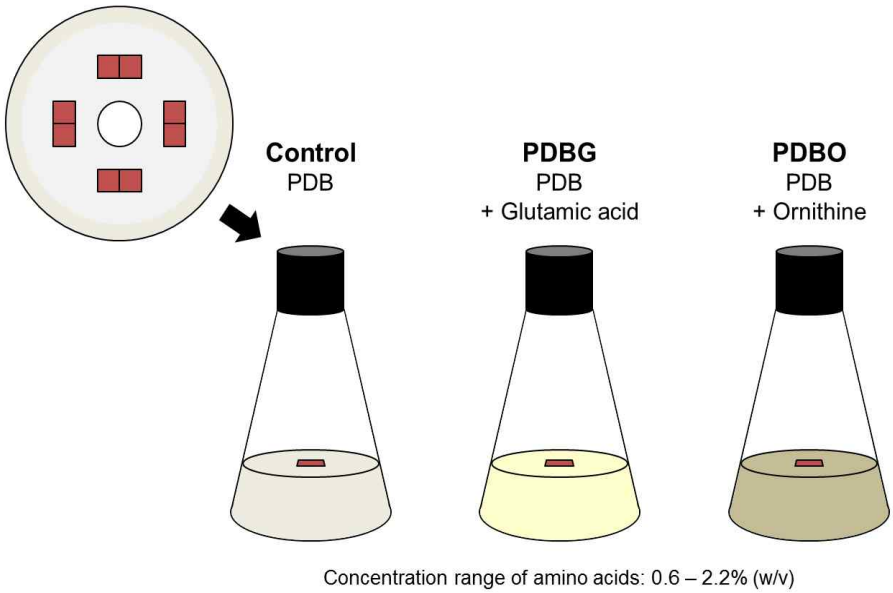

Figure 6. Inoculated location of agar plate with different amino acids.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

나. GABA 분석 및 β-glucan 측정

A. 시료 전처리

균사체는 건조 중량을 측정한 후 막자사발로 분쇄하여 사용하였고, powder는 모아 4°C에 보관하며 다음 분석에 사용하였다.

균사체 powder에 10배 부피의 0.1 N HCl을 넣어 24시간 동안 rotary shaker에서 추출하였고, 추출액은 0.45 μm filter로 여과 후 −120°C의 freeze dryer (FDCE-12003, OPERON, Korea)로 동결건조하여 시료로 사용하였다.

B. DNFB를 이용한 pre-column derivatization

GABA 및 아미노산 검출을 위해 DNFB를 사용하여 pre-column derivatization을 하였다. DNFB solution은 acetonitrile에 10 mg/mL (w/v)로 희석하여 4°C에 보관하며 사용하였다.

Derivatization은 1.5 mL EP tube에서 진행하였으며, 균사체 추출물 180 μL, 100 μL DNFB solution, 100 μL $NaHCO_3$ (0.5 M, pH 9.0), 20 μL DW를 넣고 vortexing하여 60 °C heating block에서 60분 동안 암반응 시켰다. 반응이 끝난 후 실온으로 냉각하여 400 μL KH_2PO_4 (0.01 M, pH 7.0)를 넣고 vortexing 하였으며, 15분 동안 빛을 차단시켜 반응하였다. GABA standard solution도 동일한 방법으로 derivatization 하였다.

C. High performance liquid chromatography (HPLC)

GABA 분석은 HPLC를 이용하여 측정하였으며 Li *et al.* (2016)의 방법을 변형하여 진행하였다.[82] HPLC는 Shimadzu LC-20 series (Pump: LC-20AD, Degassor: DGU-20A$_{5R}$, Column oven: CTO-20A, UV/VIS detector: SPD-20A, Japan)로 구성되었으며 분석 조건은 Table 2와 같다. GABA standard solution은 0.0001-0.125 mg/mL 범위의 표준용액을 조제하여 사용하였다. Derivatization 시킨 반응액은 0.45 μm filter로 여과하여 분석에 사용하였다.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

Table 4. HPLC conditions for GABA analysis

HPLC equipment	Shimadzu LC-20 series						
Mobile phase	(A) 5 mM CH_3COONa (pH 5.7):THF=95:5 (v/v) (B) 0.05% TFA in 80% Methanol						
Column	Shim-pack GIS, ODS (250×4.6 mm, 5.0 μm particle size)						
Gradient program	Time [min]	0.01	35.00	90	100	102	110
	Sol A	90	70	0	0	90	90
	Sol B	10	30	100	100	10	10
Oven temperature	35℃						
UV wavelength	360 nm						
Injection volume	20 μL						
Flow rate	1.0 mL/min						

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

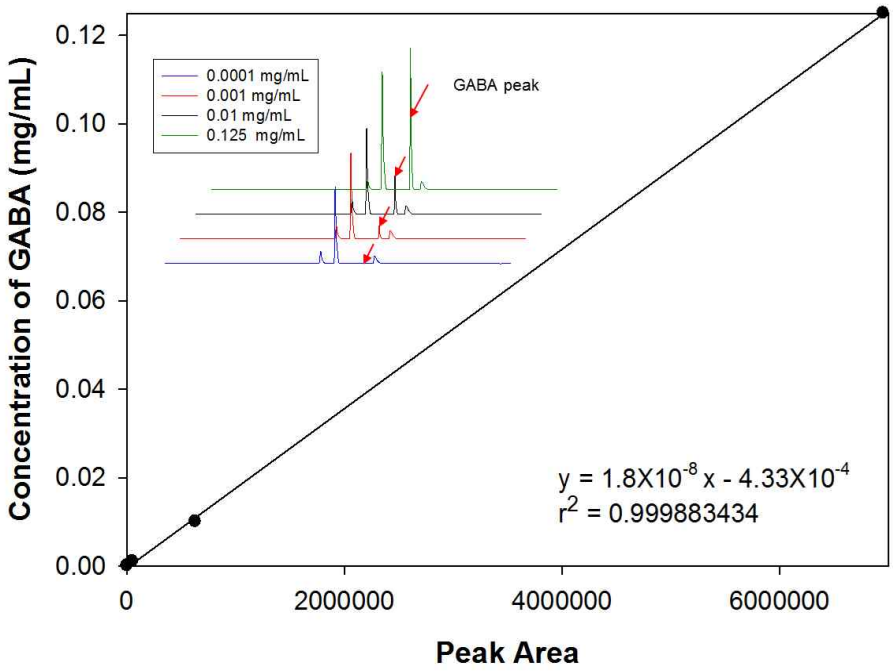

Figure 7. Calibration curve and peak for GABA determination using HPLC.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

D. β-glucan 정량

β-glucan 정량은 Yeast and Mushroom β-glucan assay kit (Megazyme)를 사용하여 측정하였다. Kit는 total glucan과 α-glucan, D-glucose, sucrose, free D-glucose를 측정하여 Megazyme 사에서 제공하는 β-glucan 함량 계산 프로그램 (K-YBGL_0501_CALC1.xls)에 대입하여 각각 함량 (mg/100 mg) 값으로 계산하였다.

1) Total glucan assay - D-glucose, sucrose, free D-glucose

100 mg의 샘플을 glass tube에 넣고 37% HCl 1.5 mL를 첨가 후 vortexing 하였다. 30°C 항온조에서 45분간 반응하며 반응 중간 15분마다 vortexing 하였다. 10 mL의 3차 증류수를 가하고 tube 뚜껑을 느슨하게 하여 100°C 항온조에서 5분간 방치하였다. 뚜껑을 닫고 2시간 동안 반응하고 tube를 꺼내어 상온까지 식힌 후 10 mL의 2 N KOH를 넣고 vortexing 하였다. 여기에 0.2 M sodium acetate buffer (pH 5.0)를 더하여 100 mL 부피플라스크로 부피를 맞춘 후 1500 ×g, 10분 원심분리하여 상등액을 얻었다. 상등액 0.1 mL에 exo-1,3-β-glucanase (20 U/mL) + β-glucosidase (4 U/mL) 0.1 mL를 넣고 40°C 항온조에서 60분간 반응 후 GOPOD (glucose oxidase/peroxidase mixture) 3.0 mL를 넣고 40°C 항온조에서 20분간 반응시켰다. 510 nm 파장에서 흡광도를 측정하여 total glucan 함량의 계산에 사용하였다.

2) α-glucan, D-glucose, sucrose, free D-glucose assay

100 mg의 샘플을 glass tube 에 넣고 2 N KOH 2 mL를 첨가 후 ice bucket 에 tube를 꽂아 교반기 (Select BioProducts, SBS300-D-2)에 놓고 20분간 교반하였다. 이후 8 mL의 1.2 M sodium acetate buffer (pH 3.8)를 첨가 후 곧바로 0.2 mL의 amyloglucosidase (1630 U/mL) + invertase (500 U/mL)를 넣고 vortexing 하여 40°C 항온조에서 30분간 반응을 진행하였다. 곧바로 1500 ×g, 10분 원심분리하여 상등액을 얻었다. 상등액 0.1 mL 에 0.1 mL 의 sodium acetate buffer (200 mM, pH 5.0)와 3.0 mL 의 GOPOD를 넣고 40°C 항온조에서 20분간 반응시킨 후 510 nm 파장에서 흡광도를 측정하여 α-glucan 함량의 계산에 사용하였다.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

E. 통계처리

균사체 생장량, GABA 함량, β-glucan 함량 등 모든 결과는 3회 이상 반복 실험을 통하여 평균값과 표준편차를 계산하였다. 실험결과는 IBM SPSS Statistics version 23을 이용하여 통계분석을 실시하였으며, 일원분산분석법(one-way ANOVA)과 사후검정(Duncan's multiple range test)을 통하여 group간의 유의적 차이를 검정하였다. ANOVA 검정에서 유의성이 확인되지 않은 결과는 사후검정을 실시하지 않았다. 모든 결과의 분석은 신뢰도 95% 구간에서 실시되었다.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

2. 실험결과 및 토의

가. 균사체 전배양 - 고체배양

버섯 농가에서 일어나는 버섯의 질병 발생은 품질저하를 유발시키고 생산량을 감소시키며, 질병의 원인을 찾지 못할 시에는 폐농을 초래하기도 한다. 따라서 우량 균주의 선발은 버섯 산업에 있어 의미가 크다고 할 수 있다. JF02-06 균주는 전라남도산림자원연구소에서 채집하여 분리한 꽃송이버섯 균사로 우량균주로 선발된 공시균주 중 하나이다. 버섯의 질병을 일으키는 원인 중 *Trichoderma* spp.가 가장 심각한 원인으로 손꼽히고 있는데, 가장 위험한 *Trichoderma harzianum*에 대해 여러 연구가 이루어졌다.[83-85] *T. harzianum*과 JF02-06과 함께 분리된 다른 균주들의 대치배양 결과 JF02-06은 다른 균주들에 비해 월등하게 *T. harzianum*에 저항성을 갖는 것으로 나타났다.[86] 따라서 본 연구에서는 1차적으로 우수한 균주를 사용하기로 하였고, JF02-06 균주를 분양받아 실험을 진행하였다.

국내의 꽃송이버섯 연구는 1989년부터 시작되었으며, 초기 10년 동안은 배양 특성 및 최적조건과 대량배양 조건에 대해 연구가 이루어졌다. 여기서 최적조건이라 함은 고체 배지에서 균사 선단의 지름, 액체배양 시 균사체의 건조 중량, 자실체의 중량 등을 기준으로 가장 우수한 결과를 얻은 배양조건을 뜻한다. 꽃송이버섯 균사의 고체배지 배양 연구 결과를 살펴보면 25°C 항온, 암배양, 초기 pH 5±1의 평균 배양조건을 가지며 동일 조건에서 배양한 꽃송이버섯의 균사 선단 지름은 20일 배양, 지름 5.3 cm인 것으로 확인되었다(Table 5).

본 배양에 앞서 PDA 고체배지에서 균사를 전배양하였으며(Fig. 8), 선행 연구 결과를 바탕으로 평균 배양조건 25°C 항온, 암배양, 초기 pH 5±1을 사용하여 배양하였다. 5~10일 간격으로 균사가 뻗어나간 부분을 유성펜으로 체크하며 지름을 측정하였고, 배양 결과 25일 5.1±0.2 cm, 37일 6.2±0.3 cm의 생장을 보이는 것으로 확인되었다. 이에 28일 배양일에 액체배지에 접종하여 본 실험을 진행하였다.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

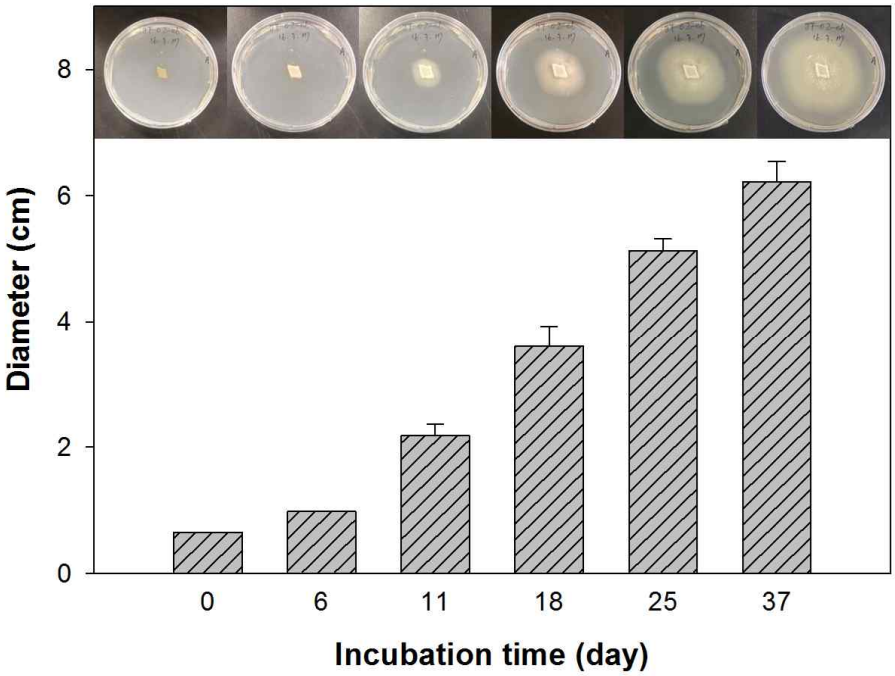

Figure 8. Time course of mycelial growth of *S. latifolia* (JF02-06) on agar plate. Data is mean±standard deviation (SD). Values with different superscripts are significantly different ($p<0.05$).

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

Table 5. Effect of temperature and pH for the growth of *S. latifolia* mycelia

No.	Temperature	Initial pH	Diameter of mycelia	References
1	25℃	4	18.8 mm/15 days	[87]
2	25-30℃	5	41 mm/12 days	[88]
3	25℃	5	77 mm/28 days	[89]
4	25℃	4	50 mm/20 days	[90]
5	23℃	6	61 mm/20 days	[91]
6	25℃	-	68.8 mm/28 days	[92]
7	25℃	5	50 mm/15 days	[93]
8	25℃	6	57 mm/28 days	[94]
Average	**25℃**	**5**	**53.0 mm/20 days**	

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

나. 꽃송이버섯 생장에 아미노산이 미치는 영향

식물이나 균류의 인공 배양에 있어서 가장 중요한 것이 영양원 간의 균형이며, 배지의 영양원 농도뿐만 아니라 영양원 상호간의 양적인 비율도 중요하다. 그러나 너무 많은 영양원의 공급이 균사의 생장이나 자실체의 발생을 저해하는 경우도 있으며, 특히 다량의 질소원과 C/N율의 불균형은 버섯 생장에 방해 요소가 될 수 있다. 이러한 이유로 영양소를 정확히 알고 있는 합성배지보다는 영양소의 정확한 함량을 알지 못하는 자연배지의 사용이 선호되고 있다. 균류의 일반적인 배양 배지로는 PDB가 사용되고 있으며 가장 기본적인 배지로 알려져 있다. 본 연구에서는 균사의 생장에 아미노산이 미치는 영향에 대해 확인하고자 하였고, 아미노산을 첨가하지 않은 PDB 배지와 glutamic acid를 첨가한 PDBG 배지, ornithine을 첨가한 PDBO 배지에 JF02-06 균주를 접종하여 배양하였다.

총 21일 배양 후 균사체의 건조 중량을 측정하여 생장을 확인하였고(Fig. 9) one-way ANOVA ($F(10)=3.672$, $p<0.01$)를 수행한 결과 PDB 배지에서의 생장량은 0.9±0.00 g/L로 가장 낮은 생장량을 보였고, PDBG 1.4% 배지와 PDBO 1.4% 배지에서 각각 2.2±0.16 g/L, 1.93±0.34 g/L로 우수한 생장을 보였다. 전반적으로 아미노산을 첨가한 배지에서 아미노산을 첨가하지 않은 배지보다 높은 생장량이 관측되었으며 PDBG 1.4% 배지의 생장량은 PDB 배지의 2.4배, PDBO 1.4% 배지의 생장량은 PDB 배지의 2.1배였다. Glutamic acid를 첨가한 배지와 ornithine을 첨가한 배지는 모두 첨가하지 않은 배지보다 효과적이었으나 두 개의 아미노산에 대한 효과의 차이는 없는 것으로 확인되었다.

꽃송이버섯 균사의 액체배양에 대한 연구 결과에 따르면 Seo *et al.* (2005)은 질소원으로 glutamic acid를 사용하였을 시 균사 생장율은 증가하나 그 밀집도가 낮아진다고 하였고, Cheong *et al.* (2008)은 glutamic acid가 생장에 영향을 주는 것으로 보이나 다른 질소원에 비해 미미한 것으로 확인되었다고 보고하였다.[91,89,95-96,107] 다른 균류의 경우에도 glutamic acid를 질소원으로 사용할 시에는 성장도가 증가하며 glucose의 사용량이 다른 아미노산을 사용하였을 때에 비해 급격하게 증가한다고 보고되었고, 본 연구 결과와 동일한 효과임을 확인할 수 있었다.[97]

영양 요구성은 동일한 종류의 버섯이라도 그 균주에 따라서 탄소원, 질소원, 무기 염류 및 비타민 등에 따라 차이가 난다. 탄소원과 질소원의 종류 및 C/N율이

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

꽃송이버섯에 미치는 영향에 대한 보고에 따르면 질소원으로 glycine, glutamine, glutamic acid 등을 사용하였을 때 효과적인 성장을 함을 확인하였다.[98] Glutamine과 glutamic acid는 동일한 아미노산 계열 군에 속하며, 서로 구조가 바뀌어 변형 될 수 있는 아미노산으로 동일한 효과를 보인 것으로 사료된다. 아미노산, 퓨린, 피리미딘, 비타민 등은 미생물의 생장인자로 작용하며 아미노산의 경우 α-아미노산만이 생물체를 구성하는 성분이 된다. 따라서 α-아미노산은 구성아미노산 또는 필수 아미노산으로 불리며 중요하게 여겨지고 있다. Glutamic acid와 ornithine은 α-아미노산으로 아미노산의 이러한 성질이 균사의 생장에 영향을 미쳤을 것으로 판단된다.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

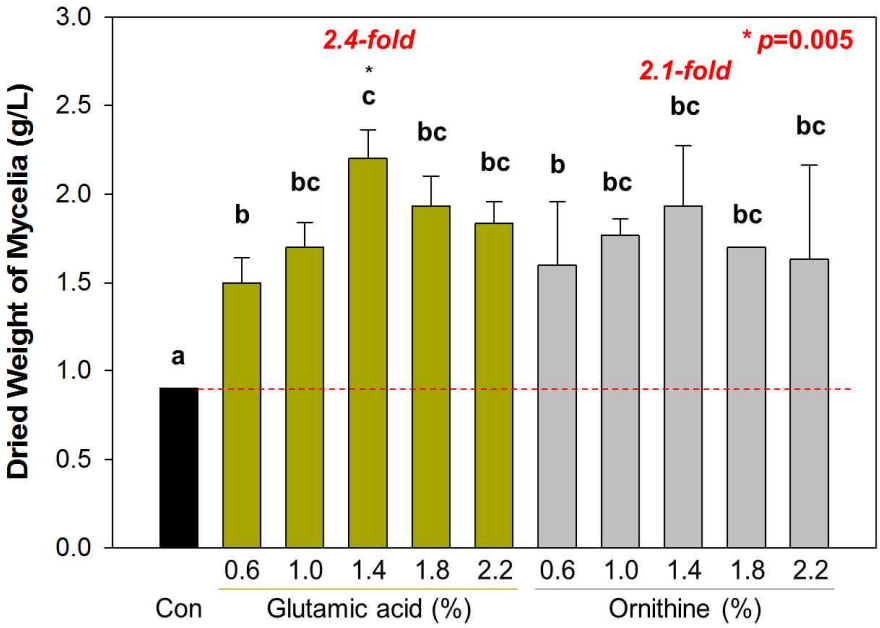

Figure 9. Effect of amino acids on mycelial growth in PDB media. Data is mean±standard deviation (SD) of three times experiments. a-c values in the same column not sharing a common superscript are significantly different by Duncan's multiple range test ($p<0.05$).

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

ANOVA

Growth

	제곱합	자유도	평균제곱	F	유의확률
집단-간	3.227	10	0.323	3.672	0.005
집단-내	1.933	22	0.088		
전체	5.160	32			

Growth

Duncan[a]

		유의수준 = 0.05에 대한 부분집합		
Groups	N	1	2	3
PDB	3	0.9000		
PDBG0.6	3		1.5000	
PDBO0.6	3		1.6000	
PDBO2.2	3		1.6333	1.6333
PDBG1.0	3		1.7000	1.7000
PDBO1.8	3		1.7000	1.7000
PDBO1.0	3		1.7667	1.7667
PDBG2.2	3		1.8333	1.8333
PDBG1.8	3		1.9333	1.9333
PDBO1.4	3		1.9333	1.9333
PDBG1.4	3			2.2000
유의확률		1.000	0.135	0.053

동질적 부분집합에 있는 집단에 대한 평균이 표시됩니다.
a. 조화평균 표본크기 3.000을(를) 사용합니다.

Figure 10. Statistical analysis of mycelial growth using one-way ANOVA with Duncan's multiple test range.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

다. GABA 생산에 아미노산이 미치는 영향

생물체에는 구성 아미노산 외에도 유리 아미노산도 존재하며 각각의 유리 아미노산들은 생명 유지에 있어 중요한 역할을 한다. GABA도 그 중에 하나이며 실제로 GABA 분해 경로는 생물체의 생장과 관련된 대사인 TCA cycle과 연결되어 있다. 앞서 확인한 아미노산의 균사 생장에 대한 긍정적인 영향은 GABA의 생성, 분해와 연관성이 있을 것이라 판단하였고, 균사체의 GABA 함량을 관찰하였다.

아미노산 첨가 배지에서 배양된 꽃송이버섯의 GABA 함량 분석 후 one-way ANOVA ($F(10)=20.183$, $p<0.001$)를 수행한 결과 균사체의 건조 중량 당으로 계산하였을 때 PDB 배지에서의 GABA 함량은 21.3±0.9 mg/100 g으로 가장 낮은 GABA 함량을 보였고, PDBG 1.4% 배지에서 115.4±30.2 mg/100 g으로 가장 우수한 GABA 함량을 보였다. 반면에 PDBO 배지의 경우 PDBO 1.0% 배지에서 41.6±6 mg/100 g으로 PDB 배지와 비교하였을 때 유의적인 차이가 없었으며, GABA 함량 증대에 대한 효과는 없는 것으로 확인되었다.

버섯 균사체에 대한 GABA 농도는 Chen et al. (2012)의 선행 연구 결과를 참고하였다.[99] 균사체의 GABA 함량을 확인한 결과 *Hypsizigus marmoreus* (white) 125 mg/100 g, *Agrocybe cylindracea* 123 mg/100 g으로 본 연구의 PDBG 1.4% 배지에서의 GABA 함유량 보다는 높았으며, *Cordyceps militaris* (strain cm5) 69 mg/100 g, *Ganoderma lucidum* 7 mg/100 g으로 GABA를 소량 함유한 균사체도 확인되었다. 국내 버섯의 GABA 함유량을 확인한 연구에서는 식용 버섯 중 *Agaricus bisporus*는 79 mg/ 100 g, *Lentinus edodes*는 27 mg/100 g으로 국내의 버섯의 GABA 함량은 다소 낮은 것으로 확인되었다.

식물과 곰팡이에서 GABA 합성은 산성 pH와 관련되어 있는데, 이는 pH 조절 mechanism에 의해 세포질 산성화를 조절하기 때문이며, 산성 조건 하에서의 성장 중에 일어난다. Glutamic acid는 물에 수화되면 산성을 띄게 된다. 따라서 본 연구에서 배지에 첨가된 glutamic acid는 초기 pH에 상관없이 꽃송이버섯 균사체의 pH 조절 mechanism인 GABA 합성 metabolism에 영향을 미친 것으로 사료된다.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

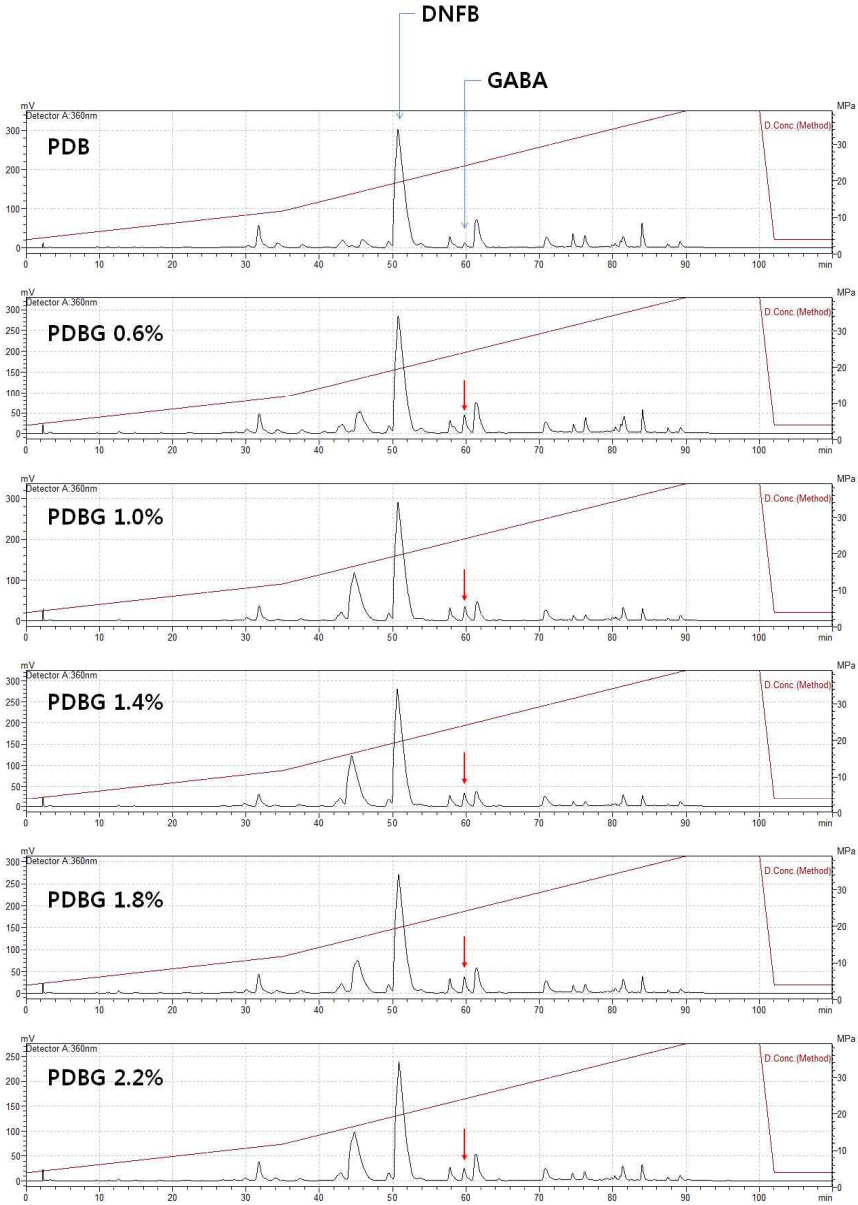

Figure 11. HPLC chromatograms of mycelial extracts of glutamic acid group.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

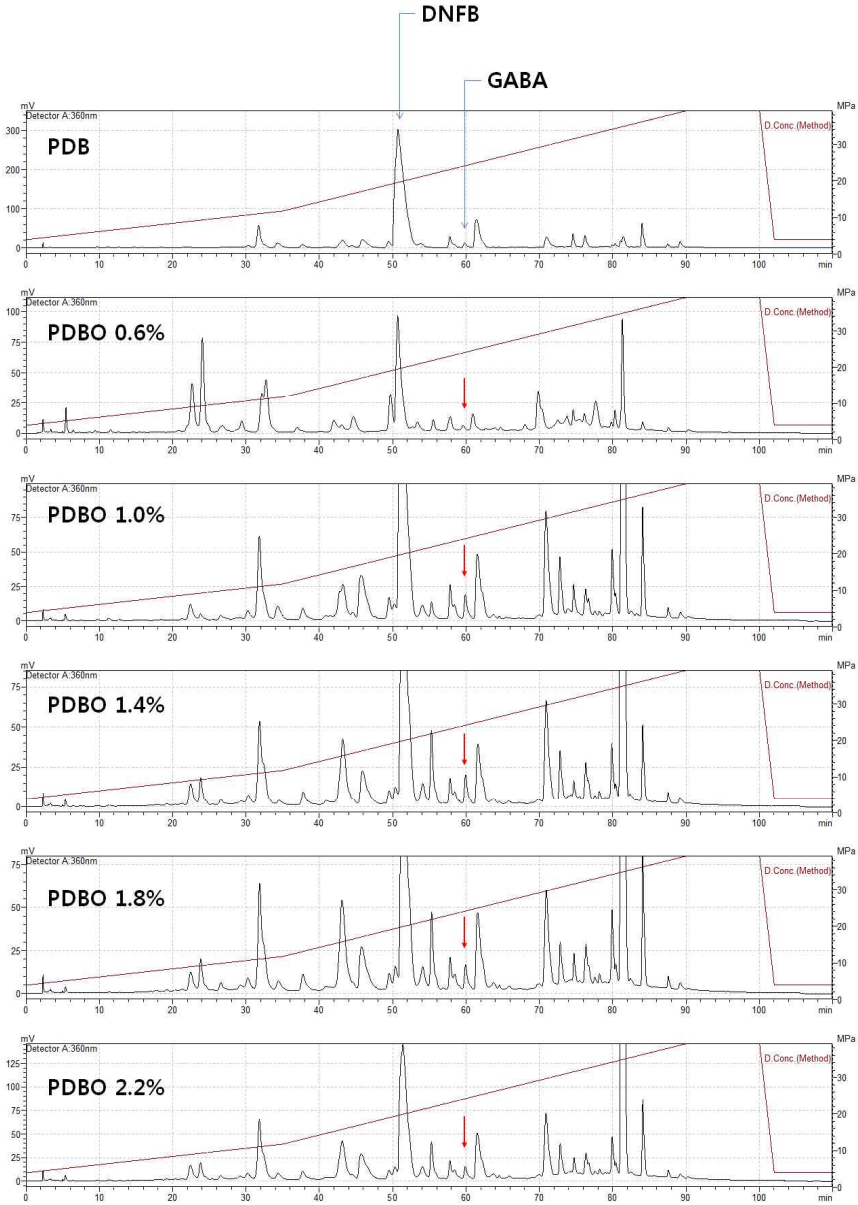

Figure 12. HPLC chromatograms of mycelial extracts of ornithine group.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

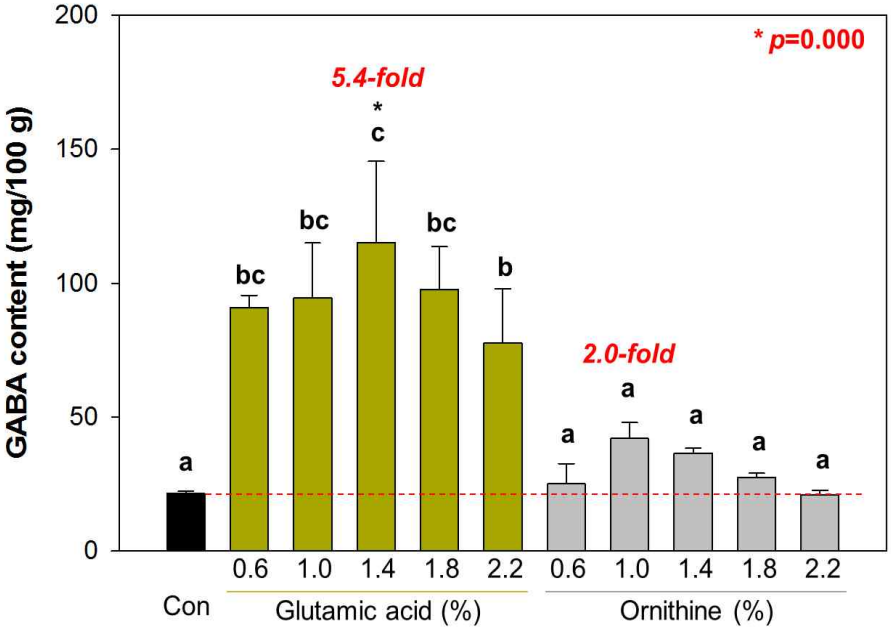

Figure 13. Effect of amino acids on GABA production from *S. latifolia* mycelia [mg/g dried weight]. Data is mean±standard deviation (SD) of three times experiments.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

ANOVA

GABA_Conc

	제곱합	자유도	평균제곱	F	유의확률
집단-간	39380.571	10	3938.057	20.220	0.000
집단-내	4284.747	22	194.761		
전체	43665.318	32			

GABA_Conc

Duncan[a]

		유의수준 = 0.05에 대한 부분집합		
Groups	N	1	2	3
PDBO2.2	3	20.6960		
PDB	3	21.3363		
PDBO0.6	3	25.1000		
PDBO1.8	3	27.5773		
PDBO1.4	3	36.3693		
PDBO1.0	3	41.6467		
PDBG2.2	3		77.4523	
PDBG0.6	3		90.6553	90.6553
PDBG1.0	3		94.5000	94.5000
PDBG1.8	3		97.7867	97.7867
PDBG1.4	3			115.4273
유의확률		0.117	0.115	0.057

동질적 부분집합에 있는 집단에 대한 평균이 표시됩니다.
a. 조화평균 표본크기 3.000을(를) 사용합니다.

Figure 14. Statistical analysis of GABA content using one-way ANOVA with Duncan's multiple test range.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

Table 6. Effect of amino acids on GABA production of *S. latifolia* mycelia

Groups	1	2	3	Average Content of GABA in dried mycelia [mg/100 g]
PDB	20.5	22.3	21.2	21.3±0.9
GLM0.6	95.6	86.4	90.0	90.7±4.7
GLM1.0	74.1	115.1	94.3	94.5±20.5
GLM1.4	85.1	145.5	115.7	115.4±30.2
GLM1.8	81.8	113.8	97.8	97.8±16
GLM2.2	56.7	98.1	77.6	77.5±20.7
ORN0.6	17.6	32.6	25.2	25.1±7.5
ORN1.0	35.9	47.9	41.1	41.6±6
ORN1.4	38.3	34.7	36.1	36.4±1.8
ORN1.8	25.9	29.0	27.8	27.6±1.6
ORN2.2	22.6	18.9	20.5	20.7±1.9

Data is mean±standard deviation (SD) of three times experiments.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

Table 7. Summary of GABA content in edible mushrooms

No.	Species	GABA content [mg/100 g]	References
1	*Hypsizigus marmoreus* (white)	125	[99]
2	*Agrocybe cylindracea*	123	[99]
3	*Coriolus versicolor*	116	[99]
4	***Sparassis latifolia***	**115**	**In this study**
5	*Hypsizigus marmoreus* (normal)	101	[99]
6	*Agaricus bisporus*	79	[66]
7	*Cordyceps militaris* (strain cm5)	69	[99]
8	*Lentinus edodes*	27	[66]
9	*Ganoderma lucidum*	7	[99]
10	*Pleurotus ostreatus*	7	[99]
11	*Pleurotus eryngii*	2	[66]

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

합성된 GABA는 GABA-T에 의해 분해되며 GABA의 분해는 TCA cycle과 연결되어 있다. GABA는 TCA cycle의 α-ketoglutarate에서 succinic acid로 전환되는 또 다른 경로에 위치해 있으며 이는 GABA shunt라고 불린다. 하지만 TCA cycle에서와는 달리 GABA-shunt는 NADH 또는 ATP의 net gain이 없어 GABA-shunt에 대한 생물학적 역할에 대해 많은 질문들이 남아있다.[101]

균류의 대표적인 종인 *Aspergillus niger*는 발효성 성장을 할 때 GABA의 축적이 일어난다는 보고가 있었다.[102] 그 후 GABA-shunt와 관련한 기관과 생화학적 metabolism이 있다는 것이 밝혀지면서 *A. niger*의 GABA-shunt에 대한 관심이 높아졌다.[15,103] 최근 *Magnaporthe oryzae*의 SSADH를 발현하는 gene (MoSSADH)이 규명되었고 mutants를 통해서 숙주식물체 표면에 뻗는 발아관 형성과 침투 생장, 일반적인 성장, 분생자 형성에 있어 가장 중요한 유전자임이 밝혀졌다.[104]

Ornithine이 GABA로 합성될 수 있는 경로는 명확하지는 않지만 두 가지 경로가 있다(Fig. 15). 첫 번째 경로는, ornithine의 decarboxylation으로 diamine의 한 종류인 putrescine이 합성되며 putrescine의 deamination으로 GABA aldehyde가 생성되고, 이는 GABA로 산화된다. 두 번째 경로는 δ-aminotransferase에 의해 glutamic-γ-semialdehyde로 전환된 후 dehydrogenase에 의해 glutamic acid로 산화된다. 전자의 경우 ODC의 활성이 높아짐에 따라 GABA 농도가 높아지면 ODC가 다시 안정화되기 때문에 GABA 농도의 증가에 한계가 있다. 후자의 경우 뇌의 synaptosome에서 일어나는 경로이고, GABA의 전구체로 ornithine이 사용될 수 있으며 δ-aminotransferase는 GABA에 의해 inhibition 된다. Fungi의 GABA 합성 경로는 후자보다는 전자에 해당하며 배양 시간이 지남에 따라 증가한 GABA 농도로 인해 ODC의 활성이 안정화되고 상대적으로 합성되었던 GABA의 분해 속도와 같아져 glutamic acid group보다 낮은 GABA 생성을 보였다고 할 수 있다.

균류는 외부에서 공급된 GABA를 흡수하지 않기 때문에 GABA가 축적되기 위해서는 가장 먼저 GABA의 원료가 되는 glutamic acid가 충분해야 한다. 그리고 외부의 환경이 변화할 시에는 그에 대응하여 생존할 수 있는 생리적인 부분들이 잘 발현되어야 한다. 본 연구의 GABA 함량에 변화에 대한 결과에 따르면 glutamic acid는 GABA 함량의 변화에 direct로 영향을 주는 것으로 확인되었으며, ornithine은 GABA의 함량에는 영향을 미치지 않지만 생장에는 도움이 되는 것으로 확인되었다. 따라서 추후 아미노산의 영향에 대해 추가적인 보충 실험이 행해져야 할 것으

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

로 판단되며, glutamic acid와 ornithine를 복합하여 배지에 첨가할 시 생장과 GABA 함량의 변화에 미치는 영향에 대해 평가할 필요가 있는 것으로 사료된다.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

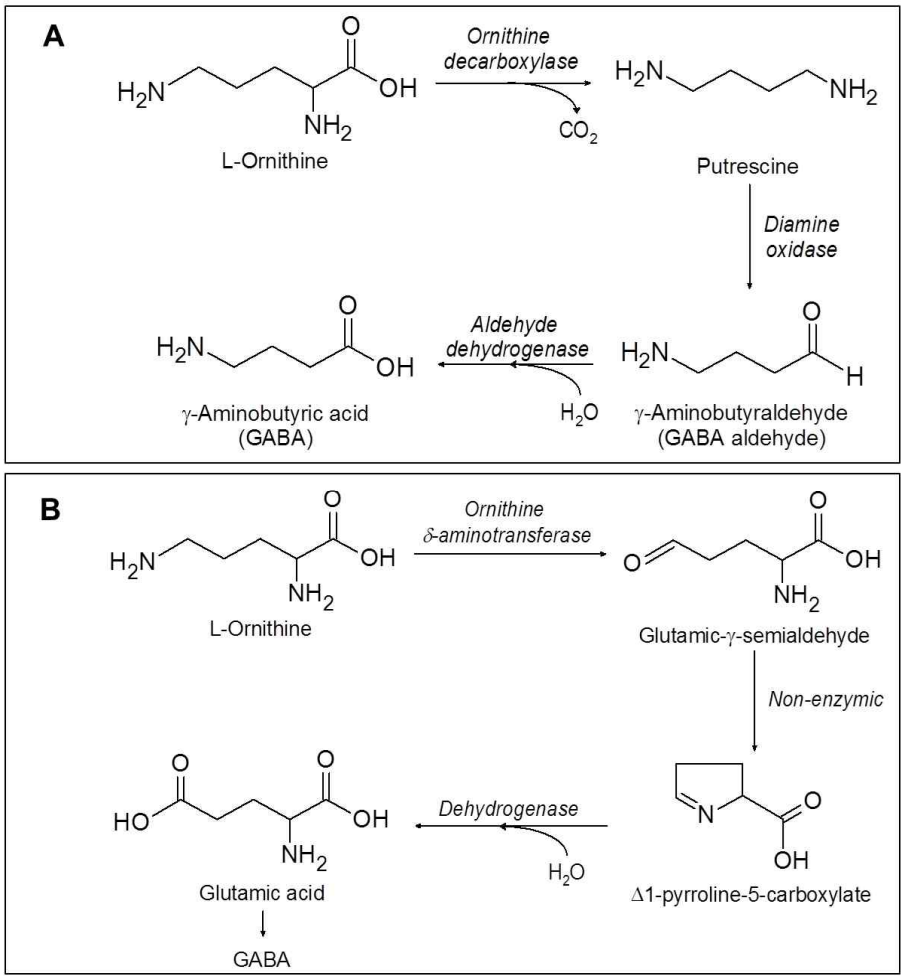

Figure 15. Two types of GABA pathway from ornithine. (A) conversion of ornithine to putrescine, (B) conversion of ornithine to glutamic acid.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

라. β-Glucan 함량에 아미노산이 미치는 영향

균사체의 β-Glucan 함량을 측정 후 one-way ANOVA ($F(10)=0.823$, $p>0.05$)를 수행한 결과 PDB 배지에서의 β-Glucan 함량과 아미노산 첨가배지에서의 β-Glucan 함량에는 유의적인 차이가 없었다(PDB 배지 39.7±1.4 mg/100 mg). 유의적인 차이는 없었으나 아미노산을 첨가하였을 때 약간 감소하는 경향을 보였다(PDBG 2.0% 34.4±0.2 mg/100 mg, PDBO 35.2±9.2 mg/100 mg).

식물 재배 시 엘리시터(elicitor)로 총칭되는 유도체 물질을 첨가하면 식물체 내의 방어와 관련된 유전자가 활성화되며 외부 환경의 급격한 변화에도 살아남을 수 있게 된다. 이러한 엘리시터를 사용하여 꽃송이버섯을 재배하면 β-glucan 함량을 증가시킬 수 있다는 연구 결과가 있지만, 제조 방법의 번거로움과 다소 높은 비용의 한계 때문에 실제로 농가에서 적용하기 힘든 부분이 존재한다.[105] 이러한 단점을 극복하기 위해 산업적으로 쉽게 사용되는 이스트를 첨가하여 β-glucan 함량 증진을 확인한 연구가 보고되기도 하였다.[106] 보고에 따르면 β-glucan 함량 증대에 가장 효과적인 이스트의 농도는 300 ppm인 것으로 확인되었다.

꽃송이버섯은 균사체의 고체배양 시 생장 속도가 굉장히 느리기 때문에 병원균이나 다른 곰팡이균의 감염에 매우 취약한 것으로 알려져 있다.[91,96,107-108] GABA 함량과 더불어 꽃송이버섯 균사체 연구가 드문 이유 중의 하나이다. 자실체 생산까지 굉장히 많은 시간이 소비되며 균사체만으로도 굉장히 많은 양의 β-glucan의 생산이 가능하기 때문에 대안으로 채택된 것이 꽃송이버섯 균사체의 액체 배양이다. 실제로 화학적인 돌연변이로 생성된 균주에서 2.5배의 β-glucan을 생산한다는 것을 확인한 연구가 보고되었다.[93,109]

버섯은 β-glucan 이외에도 다양한 생리활성 물질을 포함하고 있으며, 최근에는 버섯의 uridine이라는 물질이 신경세포의 분화를 촉진시킨다는 연구 결과가 발표되기도 하였다.[110] 꽃송이버섯 또한 여러 생리활성 물질을 다량 함유하고 있으며 동일한 효과의 실험을 통하여 신경세포의 분화를 촉진시킬 수 있는 가능성을 확인하였다.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

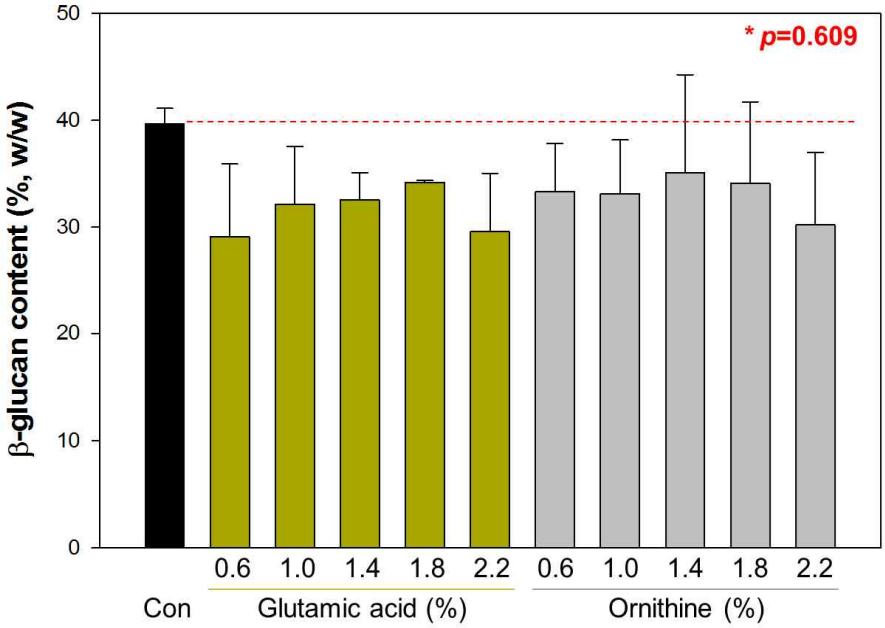

Figure 16. Effect of amino acids on β-glucan production from *S. latifolia mycelia*. Data is mean±standard deviation (SD) of three times experiments.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

ANOVA

Beta_glucan

	제곱합	자유도	평균제곱	F	유의확률
집단-간	258.741	10	25.874	0.822	0.612
집단-내	692.802	22	31.491		
전체	951.543	32			

Figure 17. Statistical analysis of β-glucan content using one-way ANOVA.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

제3장 결론

최근 식용과 약용버섯으로 각광을 받고 있는 꽃송이버섯(*Sparassis latifolia*, 혹은 *S. crispa*)은 베타-글루칸이 풍부하여 다양한 생리활성을 나타낸다고 알려져 있다. 베타글루칸의 기능 가운데 뇌세포를 보호하고 활성화하는 기능에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다. 꽃송이버섯에 다량 포함된 베타-글루칸과 더불어 뇌기능을 증진시킬 수 있는 영양성분이 보강된다면 약용버섯의 기능성이 더욱 증대되어 농가소득 증대와 국민 건강증진에 큰 기여를 할 것으로 판단된다. 본 연구에서는 농업에서 영양분 보강을 위한 방법으로 널리 사용되고 있는 biofortification 기술을 버섯 재배용 배지에 접목하여 버섯의 기능성을 증대하고자 한다. 본 연구의 대상이 되는 기능성 물질은 γ-aminobutyric acid (GABA)라는 비단백성 아미노산으로 인지기능과 불면증 완화에 효과적이다. 버섯은 이미 GABA metabolism을 가지고 있으며 GABA metabolism은 작물의 생장에 있어 필수적인 대사회로인 TCA cycle과 밀접해있다. 본 연구에서는 이러한 기술을 접목하여 예비실험으로 정한 두 가지 아미노산을 biofortification 요인으로 하여, 꽃송이버섯 균사체의 생장과 GABA 함량에 아미노산이 미치는 영향을 조사하였다.

꽃송이버섯 균사체는 전라남도 산림자원연구소에서 분양받은 JF02-06 균주를 사용하였다. 전배양은 균류의 배양에 가장 널리 사용되고 있는 potato dextrose agar (PDA)가 담긴 agar plate에서 진행하였고, 본배양은 PDB 배지를 기본으로 glutamic acid와 ornithine를 0.6-2.2% 첨가한 아미노산 첨가배지를 사용하여 진행하였다.

제조된 배지에서 꽃송이버섯 균사체를 배양하였고, 배양이 끝난 후 균사체는 여과지에 걸려 건조 중량을 측정하였다. 균사체의 생장량은 배양 배지 부피 당 건조된 균사체의 중량을 생장량으로 하였고, 건조된 균사체에서 0.1 N HCl을 이용하여 GABA를 추출하였으며, HPLC 장비를 이용하여 GABA 함량을 측정하였다. 건조된 균사체의 β-glucan 함량은 Megazyme 사의 Yeast and Mushroom β-glucan assay kit를 사용하여 측정하였다. 모든 실험 결과는 IBM SPSS Statistics 23버전 프로그램을 사용하여 통계적으로 유의성 검정을 실시하였다.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

1) One-way ANOVA ($F(10)=3.672$, $p<0.01$) 분석한 결과, 아미노산을 첨가한 배지에서의 균사체의 생장량은 PDB 배지(0.9±0.00 g/L)에 비해 모두 증가하였으며, glutamic acid와 ornithine을 1.4% 첨가한 배지에서 가장 높은 생장을 보였다(각각 2.2±0.16 g/L, 1.93±0.34 g/L).

2) One-way ANOVA ($F(10)=20.183$, $p<0.001$) 분석한 결과, PDB 배지에서의 GABA 함량은 21.3±0.9 mg/100 g이었고, PDBG 1.4% 배지에서 115.4±30.2 mg/100 g으로 PDB 배지와 유의적인 차이가 있었으며, 가장 우수한 GABA 함량이 확인되었다. 반면에 PDBO 배지의 경우 PDBO 1.0% 배지에서 41.6±6 mg/100 g으로 PDB 배지와 GABA 함량의 유의적인 차이가 없었다.

3) One-way ANOVA ($F(10)=0.823$, $p>0.05$) 분석한 결과, PDB 배지의 β-glucan 함량과 아미노산 첨가배지에서의 β-glucan 함량에는 유의적인 차이가 없었으며, 각각 PDB 39.7±1.4 mg/100 mg), PDBG 2.0% 34.4±0.2 mg/100 mg, PDBO 35.2±9.2 mg/100 mg의 β-glucan 함량이 확인되었다.

본 연구에서는 꽃송이버섯 균사 배양 시 아미노산을 첨가하였을 시 균사 생장이 촉진됨과 함께 GABA 함량이 증대되었고, β-glucan 함량에는 유의적인 효과가 없는 것을 확인하였다. 균사의 생장에는 glutamic acid와 ornithine 모두 효과가 있었으나, GABA 함량에 대해서는 glutamic acid의 첨가가 훨씬 효과적임을 확인하였다. 이는 꽃송이버섯 균사체의 GABA-shunt에 glutamic acid가 영향을 미친 것으로 사료된다. 생성된 GABA의 소멸과 다른 화합물의 신규 생성에 대해서는 아직 결과를 도출하지 못하였으므로, 이 부분에 대한 추가 연구가 필요하리라 사료된다.

본 연구의 결과는 다른 식용 버섯의 생산 process에 적용이 가능할 것으로 판단되며, 버섯의 기능성 증대에 있어서 아미노산을 요인으로 한 biofortification 기술을 접목한다면 위축되어 있는 버섯산업의 새로운 전환점이 될 수 있을 것으로 판단된다.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

References

[1] Zhang G and Bown AW. The rapid determination of γ-Aminobutyric acid. *Phytochemistry* 1997;44(6):1007-1009.

[2] Snyderman SE, Carretero R, Holt LEJ. Pyridoxine deficiency in the human being. *Fed. Proc.* 1950;9:371-373.

[3] Florey E. Ubereinen nervosen Hemmungsfaktor in Gehirn und Ruckenmark. *Naturwissenschaften* 1953;40:295–296.

[4] Shelp BJ, Bown AW, McLean MD. Metabolism and functions of gamma-aminobutyric acid. *Trends Plant Sci.* 1999;4:446-452.

[5] Lim SD and Kim KS. Effects and utilization of GABA. *Korean J. Dairy Sci. Technol.* 2009;27:45-51.

[6] 강태진, 오석흥. GABA의 생성과 이용. BioWave 2007;9(14):1-18.

[7] Yamatsu A, Yamashita Y, Pandharipande T, Maru I, Kim M. Effect of Oral γ-aminobutyric acid (GABA) Administration on Sleep and its Absorption in Humans. *Food Sci. Biotechnol.* 2016;25(2):547-551.

[8] Gill SS and Tuteja N. Polyamines and abiotic stress tolerance in plants. *Plant Signal Behav.* 2010;5:26-33.

[9] Mattoo AK, Minocha SC, Minocha R, Handa AK. Polyamines and cellular metabolism in plants: transgenic approaches reveal different responses to diamine putrescine versus higher polyamines spermidine and spermine. *Amino Acids* 2010;38:405-413.

[10] Alcazar R, Altabella T, Marco F, Bortolotti C, Reymond M, Koncz C, Carrasco P, Tiburico AF. Polyamines: molecules with regulatory functions in plant abiotic stress tolerance. *Planta.* 2010;231:1237-1249.

[11] Schmit JC and Brody S. *Neurospora crassa* conidial germination : role of endogenous amino acid pools. *J Bacteriol.* 1975;124:232-242.

[12] Ling V, Snedden WA, Shelp BJ, Assmann SM. Analysis of a Soluble Calmodulin

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

Binding Protein from Fava Bean Roots: Identification of Glutamate Decarboxylase as a Calmodulin-Activated Enzyme. *Plant Cell*. 1994;6:1135-1143.

[13] Schmit JC and Brody S. *Neurospora crassa* conidial germination : role of endogenous amino acid pools. *J Bacteriol*. 1975;124:232-242.

[14] Christensen RL and Schmit JC. Regulation and glutamic acid decarboxylase during *Neurospora crassa* conidial germination. *J Bacteriol*. 1980;144(3):983-990.

[15] Kumar S and Punekar NS. The metabolism of 4-aminobutyrate (GABA) in fungi. *Mycol. Res.* 1997;101:403-409.

[16] Masuo S, Terabayashi Y, Shimizu M, Fujii T, Kitazume T, Takaya N. Global gene expression analysis of *Aspergillus nidulans* reveals metabolic shift and transcription suppression under hypoxia. *Mol Genet Genomics*. 2010;284:415-424.

[17] Shelp BJ, Bozzo GG, Trobacher CP, Zarei A, Deyman KL, Brikis CJ. Hypothesis/review: Contribution of putrescine to 4-aminobutyrate (GABA) production in response to abiotic stress. *Plant Sci*. 2012;193-194:130-135.

[18] Laura VS and José RH. Stress and polyamine metabolism in fungi. *Front. Chem.* 2014;1(42):1-10.

[19] Suh SO, Blackwell M, Kurtzman CP, Lachance MA. Phylogenetics of *Saccharomycetales*, the ascomycete yeasts. *Mycologia* 2006;98:1006-1017.

[20] Pegg AE and Michael AJ. Spermine synthase. *Cell. Mol. Life Sci.* 2010;67(1):113–121.

[21] Balazs R, Machiyama Y, Hammond BJ, Julian T, Richter D. The operation of the γ-aminobutyrate bypath of the tricarboxylic acid cycle in the brain tissue *in vitro*. *Biochem J.* 1970;116:445-467.

[22] Mirmiran P, Golzarand M, Serra-Majem L, Azizi F. Iron, Iodine and Vitamin A in the Middle East; A Systematic Review of Deficiency and Food Fortification. *Iran J Public Health*. 2012;41:8-19.

[23] Fitzpatrick TB, Basset GJC, Borel P, Carrari F, DellaPenna D, Fraser PD,

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

Hellmann H, Osorio S, Rothan C, Valpuesta V, Caris-Veyrat C, Fernie AR. Vitamin Deficiencies in Humans: Can Plant Science Help? *Plant Cell* 2012;24:395-414.

[24] Kim EH, Lee KR, Kim JB, Roh KH, Kang HC, Kim HU. Metabolic engineering for biofortification of lipophilic antioxidants in plants. *J Plant Biotechnol* 2014;41:169-179.

[25] Newell-McGloughlin M. Nutritionally improved agricultural crops. *Plant Physiol* 2008;147:939-953.

[26] 이태수, 이지열. 2000. 한국 기록종 버섯 재정리 목록. 임업연구원 연구자료 제 163호. 87p.

[27] Oh DS, Kim HS, Shim BS, Wui AJ, Yoon BS, Kim KW, Wang SJ. Effect of mycelial culture of cauliflower mushroom (*Sparassis crispa*) using LED lighting operation. *J. Mushrooms* 2013;11(1): 24-31.

[28] Harada T, Miura NN, Adachi Y, Nakajima M, Yadomae T, Ohno N. IFN-γ Induction by SCG, 1,3-β-D-Glucan from *Sparassis crispa*, DBA/2 Mice *In Vitro*. *J Interferon Cytokine Res.* 2002;22:1227-1239.

[29] Ohno N, Miura NN, Nakajima M, Yadomae T. Antitumor 1,3-β-Glucan from Cultured Fruit Body of *Sparassis crispa*. *Biol. Pharm. Bull.* 2000;23:866-872.

[30] Choi MH, Han HK, Lee YJ, Jo HG, Shin HJ. *In vitro* anti-cancer activity of hydrophobic fractions of *Sparassis latifolia* extract using AGS, A529, and HepG2 cell lines. *J. Mushrooms* 2014;12(4):304-310.

[31] Kim HK, Han HS, Lee GD, Kim KH. Physiological Activities of Fresh *Pleurotus eryngii* Extracts. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 2005;34:439-445.

[32] Park HJ. 2001. Food Composition. National Rural Living Science Institute, R.D.A., Sangrok press, Seoul. 150-157p.

[33] Hong KH, Kim BY, Kim HK. Studies on the Biological Activity of *Pleurotus ferulea*. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 2004;33:791-796.

[34] Suzuki S and Oshima S. Influence of Shiitake (*Lentinus edodes*) on human serum

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

cholesterol. *Mushroom Sci*. 1976;9:463-467.

[35] Shin HJ, Oh DS, Lee HD, Kang HB, Lee CW, Cha WS. Analysis of Mineral, Amino Acid and Vitamin Contents of Fruiting Body of *Sparassis crispa*. *J Life Sci*. 2009;17(9):1290-1293.

[36] Chang HY and Choi SO. Characteristics of mycelial culture of *Sparassis crispa*. *J. Mushrooms* 2004;2(3):163-167.

[37] Kim JW, Cheon WJ, Chai KH, Kim DG, Son SH, Kim JG, Lim HJ. Optimization of Medium Composition for the Mycelial Growth of *Sparassis crispa*. *J. Life Sci.* 2012;22(2):200-208.

[38] Farooq MU, Chioza A, Ohga S. Vegetative Development of *Sparassis crispa* in Various Growth Conditions and Effect of Electric Pulse Simulation on Its Fruit Body Production. *Adv Microbiol* 2014;4(5):267-274.

[39] Wang SJ, Kim HS, Wi AJ, Yoon BS, Park WS, Park HH, Oh DS. Optimal Medium Composition of Cauliflower Mushroom (*Sparassis latifolia*) Cultivation Using Douglas Fir Wood Chip and Comparison of The β-glucan Contents of The Fruiting Body. *J. Korean Wood Sci. Technol.* 2014;42(4):428-438.

[40] Yamatsu A, Yamashita Y, Pandharipande T, Maru I, Kim M. Effect of Oral γ-aminobutyric acid (GABA) Administration on Sleep and its Absorption in Humans. *Food Sci. Biotechnol*. 2016;25(2):547-551.

[41] Steenbergen L, Sellaro R, Stock AK, Beste C, Colzato LS. γ-Aminobutyric acid (GABA) administration improves action selection processes: a randomised controlled trial. *Sci Rep*. 2015;5:12770.

[42] Yoto A, Murao S, Motoki M, Yokoyama Y, Horie N, Takeshima K, Masuda K, Kim M, Yokogoshi H. Oral intake of γ-aminobutyric acid affects mood and activities of central nervous system during stressed condition induced by mental tasks. *Amino Acids* 2012;43(3):1331-1337.

[43] Okada T, Sugishita T, Murakami T, Murai H, Saikusa T, Horino T, Onoda A, Kajmoto O, Takahashi R, Takahashi T. Effect of the defatted rice germ enriched

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

with GABA for sleeplessness depression, autonomic disorder by oral administration. *Food Sci. Technol. Res.* 2000;47(8):596-603.

[44] Porges EC, Woods AJ, Edden RAE, Puts NAJ, Harris AD, Chen H, Garcia AM, Seider TR, Lamb DG, Williamson JB, Cohen RA. Frontal Gamma-Aminobutyric Acid Concentrations Are Associated With Cognitive Performance in Older Adults. *Biological Psychiatry* 2016;In Press.

[45] Komatsuzaki N, Shima J, Kawamoto S, Momose H, Kimura T. Production of γ-aminobutyric acid (GABA) by *Lactobacillus paracasei* isolated from traditional fermented foods. *Food Microbiol* 2005;22(6):497-504.

[46] Cho YR, Chang JY, Chang HC. Production of γ-Aminobutyric Acid (GABA) by *Lactobacillus buchneri* Isolated from Kimchi and Its Neuroprotective Effect on Neuronal Cells. *J. Microbiol. Biotechnol.* 2007;17(1):104-109.

[47] Li H, Qiu T, Huang G, Cao Y. Production of gamma-aminobutyric acid by *Lactobacillus brevis* NCL912 using fed-batch fermentation. *Microb. Cell Fact.* 2010;9:85.

[48] Tajabadi N, Ebrahimpour A, Baradaran A, Rahim RA, Mahyudin NA, Manap MYA, Bakar FA, Saari N. Optimization of γ-Aminobutyric Acid Production by *Lactobacillus plantarum* Taj-Apis362 from Honeybees. *Molecules* 2015;20:6654-6669.

[49] Pham VD, Somasundaram S, Park SJ, Lee SH, Hong SH. Co-Localization of GABA Shunt Enzymes for the Efficient Production of Gamma-Aminobutyric Acid via GABA Shunt Pathway in *Escherichia coli*. *J. Microbiol. Biotechnol.* 2016;26(4):710-716.

[50] Diana M, Quilez J, Rafecas M. Gamma-aminobutyric acid as a bioactive compound in foods: a review. *J. Funct. Foods* 2014;10:407−420.

[51] Tsushida T, Murai T, Omori M, Okamoto J. Production of a New Type Tea Containing a High Level of γ-Aminobutyric Acid. *J. Agri. Chem. Soc. Jap.* 1987;61(7): 817-822.

[52] Chung HJ, Jang SH, Cho HY, Lim ST. Effects of steeping and anaerobic

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

treatment on GABA (γ-aminobutyric acid) content in germinated waxy hull-less barley. *LWT-Food Sci Technol* 2009;42:1712-1716.

[53] Nakamura H, Takishima T, Kometani T, Yokogoshi H. Psychological stress-reducing effect of chocolate enriched with gamma-aminobutyric acid (GABA) in humans: Assessment of stress using heart rate variability and salivary chromogranin A. *Int. J. Food Sci. Nut.* 2009;60(5):106−113.

[54] Linares DM, O'Callaghan TF, O'Connor PM, Ross RP, Stanton C. *Streptococcus thermophilus* APC151 Strain Is Suitable for the Manufacture of Naturally GABA-Enriched Bioactive Yogurt. *Front. Microbiol.* 2016;7:1876.

[55] Nakamura K, Nara K, Noguchi T, Ohshiro T, Koga H. Contents of gamma-aminobutyric acid (GABA) in potatoes and processed potato products. *J. Jp. Soc. Food Sci. Technol.* 2006;53(9):514−517.

[56] Diana M, Tres A, Quílez J, Llombart M, Rafecas M. Spanish cheese screening and selection of lactic acid bacteria with high gamma-aminobutyric acid production *J. Food Sci. Technol.* 2014;56:351−355.

[57] Park N, Lee TK, Nguyen TTH, An EB, Kim NM, You YH, Park TS, Kim D. The effect of fermented buckwheat on producing l-carnitine- and γ-aminobutyric acid (GABA)-enriched designer eggs. *J Sci Food Agric* 2016;In Press.

[58] Tamura T, Noda M, Ozaki M, Maruyama M, Matoba Y, Kumagai T, Sugiyama M. Establishment of an efficient fermentation system of gamma-aminobutyric acid by a lactic acid bacterium, *Enterococcus avium* G-15, isolated from carrot leaves. *Bio. Pharm. Bull.* 2010;33(10):1673−1679.

[59] Zhao M, Ma Y, Wei ZZ, Yuan WX, Li YL, Zhang CH, Xue XT, Zhou HJ. Determination and comparison of γ-aminobutyric acid (GABA) content in pu-erh and other types of Chinese tea. *J. Agr. Food Chem.* 2011;59(8):3641−3648.

[60] Rizzello CG, Cassone A, Cagno RD, Gobbetti M. Synthesis of angiotensin I-converting enzyme (ACE)-Inhibitory peptides and γ-aminobutyric acid (GABA). *J. Agr. Food Chem.* 2008;56(16):6936−6943.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

[61] Mizuno H, Fukumori T, Liu K, Sasaki Y, Ochiai S. The influence of heating and humidifying by humidified air on GABA generation and quality in paddy. *J Jpn Soc Agric Mach*. 2012;74:226-233.

[62] Chung HJ, Jang SH, Cho HY, Lim ST. Effects of steeping and anaerobic treatment on GABA (gamma-aminobutyric acid) content in germinated waxy hull-less barley. *LWT-Food Sci Technol* 2009;42:1712−1716.

[63] Dai SF, Gao F, Xu XL, Zhang WH, Song SX, Zhou GH. Effects of dietary glutamine and gamma-aminobutyric acid on meat colour, pH, composition, and water-holding characteristic in broilers under cyclic heat stress. *Brit. Poul. Sci.* 2012;53:471−481.

[64] Joye IJ, Lamberts L, Brijs K, Delcour JA. *In situ* production of γ-aminobutyric acid in breakfast cereals. *Food Chem.* 2011;129:395−401.

[65] Lowry VK, Farnell MB, Ferro PJ, Swaggerty CL, Bahl A and Kogut MH (2005) Purified β-glucan as an abiotic feed additive up-regulates the innate immune response in immature chickens against *Salmonella enterica* serovar *Enteritidis*. *Int J Food Microbiol.* 98(3): 309-318.

[66] Kim MY, Seguin P, Ahn JK, Kim JJ, Chun SC, Kim EH, Seo SH, Kang EY, Kim SL, Park YJ. Phenolic compound concentration and antioxidant activities of edible and medicinal mushrooms from Korea, *J. Agr. Food Chem.* 2008;56:7265-7270.

[67] Chandrasekara G, Lee YC, Park H, Wu Y, Shin HJ. Antibacterial and Antifungal Activities of Lectin Extracted from Fruiting Bodies of the Korean Cauliflower Medicinal Mushroom, *Sparassis latifolia* (Agaricomycetes). *Int. J. Med. Mushrooms* 2016;18(4):291-299.

[68] Shuang H, Di W, Junrong Z, Mengyan D, Yingkun C, Yan L, Ning Z, Di W, Yi W. Mitochondria Related Pathway Is Essential for Polysaccharides Purified from *Sparassis crispa* Mediated Neuro-Protection against Glutamate-Induced Toxicity in Differentiated PC12 Cells. *Int. J. Mol. Sci.* 2016;17(2):133.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

[69] Choi JH, Lee HJ, Kim S. Purification and antithrombotic activity of wulfase, a fibrinolytic enzyme from the fruit bodies of the edible and medicinal mushroom *Sparassis crispa* Wulf. ex. Fr.. *App. Biochem. Microbiol.* 2016;52(6):608-614.

[70] Jo HG, Choi MH, Shin HJ. Preparation of fermentation broth of *Sparassis latifolia* containing soluble β-glucan using four *Lactobacillus* species. *J. Mushrooms* 2015;13(1):50-55.

[71] Hong KB, Hong SY, Park Y, Suh HJ, Joung EY, Kim BH, Bae SH. Hypocholesterolemic Effects of the Cauliflower Culinary-Medicinal Mushroom, *Sparassis crispa* (Higher Basidiomycetes), in Diet-Induced Hypercholesterolemic Rats. *Int. J. Med. Mushrooms* 2015;17(10):965-75.

[72] Choi MH, Han HK, Lee YJ, Jo HG, Shin HJ. *In vitro* anti-cancer activity of hydrophobic fractions of *Sparassis latifolia* extract using AGS, A529, and HepG2 cell lines. *J. Mushrooms* 2014;12(4):304-310.

[73] Choi WS, Shin PG, Yoo YB, Noh HJ, Kim GD. Anti-inflammatory effects of *Sparassis crispa* extracts. *J. Mushrooms* 2013;11(1):46-51.

[74] Chandrasekara G, Kim GJ, Shin HJ. Purification and characterisation of an alkaliphilic esterase from a culinary medicinal mushroom, *Sparassis crispa*. *Food Chem.* 2011;124:1376-1381.

[75] Kwon A, Qiu Z, Hashimoto M, Yamamoto K and Kimura T. Effects of medicinal mushroom (*Sparassis crispa*) on wound healing in streptozotocin-induced diabetic rats. *Am. J. Surg.* 2009;197:503-509.

[76] Xu JG and Hu QP. Changes in γ-aminobutyric acid content and related enzymes activities in Jindou 25 soybean (*Glycine max* L.) seeds during germination. *LWT-Food Sci Technol* 2014;55:341-346.

[77] Youn YS, Park JK, Jang HD, Rhee YW. Sequential hydration with anaerobic and heat treatment increases GABA (γ-aminobutyric acid) content in wheat. *Food Chem.* 2011;129:1631-1635.

[78] Cha MN, Jun HI, Song GS, Kim YS. The Effect of Germination Conditions on

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

GABA and the Nutritional Components of Barley. *Kor. J. Food Sci. Tech.* 2012;44(1):41-47.

[79] Wang SJ, Kim HS, Wi AJ, Yoon BS, Park WS, Park HH, Oh DS. Optimal Medium Composition of Cauliflower Mushroom (*Sparassis latifolia*) Cultivation Using Douglas Fir Wood Chip and Comparison of The β-glucan Contents of The Fruiting Body. *J. Korean Wood Sci. Technol.* 2014;42(4):428-438.

[80] Oh DS, Kim HS, Kim Y, Wi AJ, Yoon BS, Park WS, Park HH, Wang SJ. Characteristic of mycelial growth of cauliflower mushroom (*Sparassis latifolia*) using replacement culture with *Trichoderma* and rDNA analysis in genealogy of crossbreeding strain. *J. Mushrooms* 2014;12(1):41-51.

[81] Oh DS, Kim HS, Shim BS, Wui AJ, Yoon BS, Kim KW, Wang SJ. Effect of mycelial culture of cauliflower mushroom (*Sparassis crispa*) using LED lighting operation. *J. Mushrooms* 2013;11(1): 24-31.

[82] Li N, Liu Y, Zhao Y, Zheng X, Lu J, Liang Y. Simultaneous HPLC Determination of Amino Acids in Tea Infusion Coupled to Pre-column Derivatization with 2,4-Dinitrofluorobenzene. *Food Anal. Methods* 2016;9:1307-1314.

[83] Doyle O, Morris E, Clancy K. Trichoderma green mould-Update. *Irich, Mush. Rev.* 1991;3:13-17.

[84] Ospina-Giraldo MD, Royse DJ, Chen X, Romaine CP. Molecular Phylogenetic Analysis of Biological Control Strains of *Trichoderma harzianum* and Other Biotypes of *Trichoderma* spp. Associated with Mushroom Green Mould. *Phytopathol.* 1999;89:308-313.

[85] Seaby DA. Further observations on *Trichoderma*. Mushroom J. 1987;197:147-151.

[86] Oh DS, Kim HS, Kim Y, Wi AJ, Yoon BS, Park WS, Park HH, Wang SJ. Characteristic of mycelial growth of cauliflower mushroom (*Sparassis latifolia*) using replacement culture with *Trichoderma* and rDNA analysis in genealogy of crossbreeding strain. *J. Mushrooms* 2014;12(1):41-51.

[87] Shim JO, Son SG, Yoon SO, Lee YS, Lee TS, Lee SS, Lee KD, Lee MW. The

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

optimal Factors for the Mycelial Growth of *Sparassis crispa*. *Kor. J. Mycol.* 1998;26(1):39-46.

[88] Chang HY and Choi SO. Characteristics of mycelial culture of *Sparassis crispa*. *J. Mushrooms* 2004;2(3):163-167.

[89] Seo SY, Yoo YJ, Jung GT, Ryu J, Ko BR, Choi JS, Kim MK. Optimal condition for mycelial growth of *Sparassis crispa*. *J. Mushrooms* 2005;3(2):45-51.

[90] Heo BS, Lee KS, Lee YS. Cultural Conditions for the Mycelial Growth of *Sparassis crispa*. *Bull. Agr. College, Chonbuk Nat. Univ.* 2006;37(1):13-20.

[91] Cheong JC, Park JS, Hong IP, Seok SJ, Jhune CS, Lee CJ. Cultural Characteristics of Cauliflower Mushroom, *Sparassis crispa*. *Kor. J. Mycol.* 2008;36(1):16-21.

[92] Oh DS, Kim HS, Shim BS, Wui AJ, Yoon BS, Kim KW, Wang SJ. Effect of mycelial culture of cauliflower mushroom (*Sparassis crispa*) using LED lighting operation. *J. Mushrooms* 2013;11(1): 24-31.

[93] Kim SR, Kang HW, Ro HS. Generation and Evaluation of High β-Glucan Producing Mutant Strains of *Sparassis crispa*. *Mycobiology* 2013;41(3):159-163.

[94] Farooq MU, Chioza A, Ohga S. Vegetative Development of *Sparassis crispa* in Various Growth Conditions and Effect of Electric Pulse Simulation on Its Fruit Body Production. Adv Microbiol 2014;4(5):267-274.

[95] Seo SY, Yoo YJ, Jung GT, Ryu J, Ko BR, Choi JS, Kim MK. Optimal condition for mycelial growth of *Sparassis crispa*. *J. Mushrooms* 2005;3(2):45-51.

[96] Cheong JC, Park JS, Hong IP, Seok SJ, Jhune CS, Lee CJ. Cultural Characteristics of Cauliflower Mushroom, *Sparassis crispa*. *Kor. J. Mycol.* 2008;36(1):16-21.

[97] Chattaway FW and Toothill C. The Amino Acid Metabolism of *Microsporum canis*. *J. Gen. Microbiol.* 1962;28:721-732.

[98] Shim JO, Son SG, Yoon SO, Lee YS, Lee TS, Lee SS, Lee KD, Lee MW. The

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

optimal Factors for the Mycelial Growth of *Sparassis crispa*. *Kor. J. Mycol.* 1998;26(1):39-46.

[99] Chen SY, Ho KJ, Hsieh YJ, Wang LT, Mau JL. Contents of lovastatin, γ-aminobutyric acid and ergothioneine in mushroom fruiting bodies and mycelia. *LWT-Food Sci Technol* 2012;47:274-278.

[100] Kim MY, Chung IM, Lee SJ, Ahn JK, Kim EH, Kim MJ, Kim SL, Moon HI, Ro HM, Kang EY, Seo SH, Song HK. Comparison of free amino acid, carbohydrates concentrations in Korean edible and medicinal mushrooms. *Food Chem.* 2009;113:386-393.

[101] Mead O, Thynne E, Winterberg B, Solomon PS. Characterising the Role of GABA and Its Metabolism in the Wheat Pathogen *Stagonospora nodorum*. *PLOS One* 2013;8(11):e78368.

[102] Kubicek CP, Hampel W, Rohr M. Manganese deficiency lead to elevated amino acid pools in citric acid accumulating *Aspergillus niger*. *Arch Microbiol* 1979;123:73-79.

[103] Kumar S and Punekar NS. The metabolism of 4-aminobutyrate (GABA) in fungi. *Mycol. Res.* 1997;101:403-409.

[104] Guo M, Chen Y, Du Y, Dong Y, Guo W, Zhai S, Zhang H, Dong S, Zhang Z, Wang Y, Wang P, Zheng X. The bZIP transcription factor MoAP1 mediates the oxidative stress response and is critical for pathogenicity of the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae*. *PLOS Pathogens* 2011;7(2):e1001302.

[105] Park H, Ka KH, Ryu SR. Enhancement of β-Glucan Content in the Cultivation of Cauliflower Mushroom (*Sparassis latifolia*) by Elicitation. *Mycobiol.* 2014;42(1):41-45.

[106] Wang SJ, Kim HS, Wi AJ, Yoon BS, Park WS, Park HH, Oh DS. Optimal Medium Composition of Cauliflower Mushroom (*Sparassis latifolia*) Cultivation Using Douglas Fir Wood Chip and Comparison of The β-glucan Contents of The Fruiting Body. *J. Korean Wood Sci. Technol.* 2014;42(4):428-438.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

[107] Cheong JC, Park JS, Hong IP, Seok SJ, Jhune CS, Lee CJ. Cultural Characteristics of Cauliflower Mushroom, *Sparassis crispa*. *Kor. J. Mycol.* 2008;36(1):16-21.

[108] Shim JO, Son SG, Yoon SO, Lee YS, Lee TS, Lee SS, Lee KD, Lee MW. The optimal Factors for the Mycelial Growth of *Sparassis crispa*. *Kor. J. Mycol.* 1998;26(1):39-46.

[109] Kim SR, Kang HW, Ro HS. Generation and Evaluation of High β-Glucan Producing Mutant Strains of *Sparassis crispa*. *Mycobiol*. 2013;41(3):159-163.

[110] Phan CW, David P, Wong KH, Naidu M, Sabaratnam V. Uridine from *Pleurotus giganteus* and Its Neurite Outgrowth Stimulatory Effects with Underlying Mechanism. *PLOS One* 2015;10(11):e0143004.

Collection @ chosun