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

[UCI]I804:24011-200000236155

2008年 2月

碩士學位論文

아위버섯 균사체 심부배양 특성 및 기능성 연구

朝 鮮 大 學 校 大 學 院

化 學 工 學 科

林 煥 熙

아위버섯 균사체 심부배양 특성 및 기능성 연구

Submerged Culture Characterization of Mycelium and Functional Searching of *Pleurotus ferulae*

2008年 2月 25日

朝 鮮 大 學 校 大 學 院

化 學 工 學 科

林 煥 熙

아위버섯 균사체 심부배양 특성 및 기능성 연구

指 導 敎 授　車 月 石

이 論文을 工學碩士學位 申請 論文으로 提出함.

2007年　10月　　日

朝 鮮 大 學 校 大 學 院

化 學 工 學 科

林 煥 熙

林煥熙의 碩士學位 論文을 認准함

委員長　朝鮮大學校　敎 授　金 瑄 日　　印

委　員　朝鮮大學校　敎 授　李 重 憲　　印

委　員　朝鮮大學校　敎 授　車 月 石　　印

2007年 12月　日

朝 鮮 大 學 校 大 學 院

목 차

ABSTRACT ····· viii

Ⅰ. 서론 ····· 1

Ⅱ. 문헌연구 ····· 5

Ⅱ-1. 느타리속 버섯의 생산 ····· 5

Ⅱ-1-1. 고체배양 ····· 5

Ⅱ-1-2. 액체배양 ····· 7

Ⅱ-2. 균사체 생산 ····· 8

Ⅱ-2-1. 산소공급조건 ····· 9

Ⅱ-2-2. Pellet형과 filamentous형 균사체 비증식 속도 ··· 9

Ⅱ-3. 항종양성 다당류 ····· 12

Ⅱ-4. 느타리속 버섯의 약리적 특성 ····· 19

Ⅲ. 아위버섯 균사체 심부배양 ····· 21

Ⅲ-1. 재료 및 방법 ····· 21

Ⅲ-1-1. 균주 및 보관 ····· 21

Ⅲ-1-2. 배지선발 ····· 21

Ⅲ-1-3. 접종원 ····· 23

Ⅲ-1-4. Flask 배양 ····· 23

Ⅲ-1-5. 영양요구성 ····· 25

Ⅲ-1-6. Jar-fermentation ····· 25

Ⅲ-1-7. 분석방법 ····· 26

Ⅲ-2. 결과 및 고찰 ····· 28
Ⅲ-2-1. 균주선발 ····· 28
Ⅲ-2-2. 기본배지 선발 ····· 30
Ⅲ-2-3. 온도의 영향 ····· 32
Ⅲ-2-4. 접종원의 배양일수 및 접종량의 영향 ····· 34
Ⅲ-2-5. 초기의 pH의 영향 ····· 36
Ⅲ-2-6. Surface aeration의 영향 ····· 38
Ⅲ-2-7. Shaking speed의 영향 ····· 40
Ⅲ-2-8. 영양요구성 ····· 42
Ⅲ-2-8-1. 탄소원이 균사생장에 미치는 영향 ····· 42
Ⅲ-2-8-2. 질소원이 균사생장에 미치는 영향 ····· 46
Ⅲ-2-9. Jar-fermentation ····· 51
Ⅲ-2-9-1. Agitation speed의 영향 ····· 51
Ⅲ-2-9-2. Aeration의 영향 ····· 53
Ⅲ-2-9-3. 최적 배양조건하에서의 회분식 배양 ····· 55
Ⅲ-2-9-4. 최적 배지하에서의 회분식 배양 ····· 57

Ⅳ. 아위버섯 기능성 연구 ····· 59
Ⅳ-1. 재료 및 방법 ····· 59
Ⅳ-1-1. 추출물 제조 ····· 59
Ⅳ-1-2. 항암성 실험 ····· 59
Ⅳ-1-3. 면역계작용 실험 ····· 60
Ⅳ-1-4. 항산화 실험 ····· 61
Ⅳ-2. 결과 및 고찰 ····· 63
Ⅳ-2-1. 항암성 기능 ····· 63

Ⅳ-2-2. 면역계작용 기능 ····· 66
Ⅳ-2-3. 항산화 기능 ····· 69

Ⅴ. 결론 ····· 71

참고문헌 ····· 74

List of Tables

Table 1. Cell specific growth rate of *Lentinus edodes* mycelium. ···· 10

Table 2. Anti-tumor activity of basidiomycetes. ····· 15

Table 3. Medicinal effects of *Pleurotus spp.* ····· 20

Table 4. Composition of various synthetic and semi-synthetic media tested. ····· 22

Table 5. Composition of the mycelial growth of various *P. ferulae* on media(PDA). ····· 29

Table 6. Mycelial growth of Ferule mushroom (F-2) on various synthetic and semi-synthetic media. ····· 31

Table 7. Effects of carbon sources on *P. ferulae* growth and exo-polysaccharide production with flask culture. ····· 44

Table 8. Effects of nitrogen sources on *P. ferulae* growth and exo-polysaccharide production with flask culture. ····· 48

List of Figures

Fig. 1. *Pleurotus ferulae* (fruiting body) ····· 4

Fig. 2. Possible immune mechanism: β-D-glucan biological response modifier (BRM) ····· 16

Fig. 3. Primary molecular diagram of mushroom beta-D-glucan. ····· 17

Fig. 4. Molecular model of the right-handed triple spiral helix of antitumor-active-beta-D-glucan (Schizophyllan). ····· 18

Fig. 5. Experimental procedure in this study. ····· 27

Fig. 6. Effect of temperature on the mycelial growth of *P. ferulae* on MYPA medium. ····· 33

Fig. 7. Effects of inoculum age and inoculum volume on *P. ferulae* growth and exo-polysaccharide production. ····· 35

Fig. 8. Effect of initial pH on *P. ferulae* mycelial growth and exo-polysaccharide production. ····· 37

Fig. 9. Effect of surface aeration on *P. ferulae* mycelial growth and exo-polysaccharide production with flask culture. ····· 39

Fig. 10. Effect of shaking speed on *P. ferulae* mycelial growth and exo-polysaccharide production with flask culture at 25℃ and initial pH 6.5. ····· 41

Fig. 11. Effect of glucose concentration on *P. ferulae* growth and exo-polysaccharide production with flask culture. ····· 45

Fig. 12. Effect of polypeptone concentration on *P. ferulae* growth and exo-polysaccharide production with flask culture. ····· 49

Fig. 13. Effect of yeast extract concentration on *P. ferulae* growth and

exo-polysaccharide production with flask culture. ····· 50

Fig. 14. Effect of agitation speed on *P. ferulae* growth and exo-polysaccharide production with jar fermentation at 25℃, pH 6.5 and 0.5 vvm. ····· 52

Fig. 15. Effect of aeration rate on *P. ferulae* growth and exo-polysaccharide production with jar fermentation at 25℃, pH 6.5 and 200 rpm. ····· 54

Fig. 16. Changes of *P. ferulae*, exo-polysaccharide, and glucose concentration with jar fermentation at 25℃, pH 6.5, 1.5 vvm, and 200 rpm. ····· 56

Fig. 17. Changes of *P. ferulae*, exo-polysaccharide, and glucose concentration with jar fermentation under optimal media composition (glucose 5%, polypeptone 1%, yeast extract 0.8%, K_2HPO_4 0.12% and $MgSO_4 \cdot 7H_20$ 0.12%, w/v). ····· 58

Fig. 18. Effects of water extracts of *P. ferulae* fruit body on cytotoxicity of cultured human cancer cells. The cells viability were measured by MTT reduction test. Values are mean±SD, n=5 ····· 64

Fig. 19. Effects of water extracts of *P. ferulae* mycelium on cytotoxicity of cultured human cancer cells. The cells viability were measured by MTT reduction test. Values are mean±SD, n=5 ····· 65

Fig. 20. Photograph of Con-A activated mouse splenocytes which treated with water extract of *P. ferulae* mycelium. Water extract of *P. ferulae* mycelium and Con-A were added to cell

culture media and 2 days later mouse splenocytes were measured by MTT reduction test. Values are mean±SD, n=5. 67

Fig. 21. Photograph of Con-A activated mouse splenocytes which treated with ethanol extract of *P. ferulae* fruit bodies. Ethanol extract of *P. ferulae* fruit bodies and Con-A were added to cell culture media and 2 days later mouse splenocytes were photographed under inverted microscope. 68

Fig. 22. The effect of complex abstracted from the *P. ferulae* on peroxidation of membrane lipid of mice. After separation of microsome, the abstract of the mushroom is diluted with 2mM of hydrogen peroxide and with a use of TBA, TBARS is measured and the result is expressed in the percentage. Mean standard deviation, number of population = 5. 70

ABSTRACT

Submerged Culture Characterization of Mycelium and Functional Searching of *Pleurotus ferulae*

by Hwan-Hee Lim
Advisor : Prof. Wol-Suk Cha Ph.D.
Department of Chemical Engineering,
Graduate School of Chosun University

This study examines features and functions of mycelial submerged culture of *Pleurotus ferulae*. Its four strains (F-1, F-2, F-3 and F-4) collected domestically are publicly announced to select good strains and the best strain, F-2, is selected as its mycelial grows fast and density is good.

The strain of *P. ferulae* selected shows the best growth in MYPA medium and as the growth is the best at 25℃, it is demonstrated that the optimal temperature us 25 ℃ and optimal acid degree is pH 6.5.

The optimal culture volume at the flask culture is 50mL at the 300ml flask , and shaking speed is 150 rpm. This study examines optimal cultural conditions for mycelial growth and production of exo-polysaccharide, and finds that the effective culture days and innoculation amount of the optimal innoculation source are seven days and 5% innoculation(w/v).

The factor of nutritial need is one of prerequisites for production of matter containing microbes and effective components. However, as there are few studies on the factor of nutritial need for mycelial growth of *P. ferulae* and exo-polysaccharide, this study begins batch culture to examine the factor. As a result, the optimal growth medium should be made of 5% of glucose (w/v)

for carbon source, 1.0% of polypeptone (w/v) and 0.8% of yeast extract(w/v). The optimal agitation speed and ventilation of 5 L jar fermentation are 200rpm and 1.5vvm. When this study conducts a batch culture under the optimal culture condition designed from the flask with 25℃ of temperature, pH 6.5, 200rpm of agitation speed, and 1.5 vvm of ventilation amount for 12 days, at the tenth days of the culture, it obtains the largest hypha of 10.01 g/L and 3.94 g/L of exo-polysaccharide, and the production of the exo-polysaccharide is closely related to hypha growth, which indicates a multiplicative interlocking. As fruit body and complex of the mycelium has more toxicity to the cell line of lung cancer rather than that of uterine cancer, the complex abstracted contains ani-carcinogenic materials and MTT can be effectively used for search of its functionality.

Water extracts from the fruit body of *P. ferulae* controls muliplication of the spleen cells even at the 200 times-diluted concentration and the complex abstracted from the mycelium controls multiplication of the spleen cells even at the 300 times-diluted concentration. Water extracts from the fruit body of *P. ferulae* controls production of TBA responsive matter by hydrogen peroxide at the 200 times-diluted concentration, and the complex abstracted from the mycelium controls it even at the 400 times-diluted concentration.

However, the result obtained through this study is not sufficient to develop effective processing for production of mycelial growth and exo-polysaccharide. Therefore, for mass production of mycelium and exo-polysaccharide, we need further studies on features of exo-polysaccharide produced from the mycelium, optimization of culture conditions, preparation and design of proper effector. And it is demonstrated that the complex abstracted from the *P. ferulae* has greater toxicity to the lung cancer cells and remarkably increases toxicity to lung cancer and uterine cancer cells. As the *P. ferulae* is edible and its complex abstracted is thought to have low toxicity, the complex can be used

as a material to enhance anti-cancer action and for more scientific and organized studies, the effective matter from the *P. ferulae* should be separated and refined to identify its active mechanism and secure stability through research on toxicity.

Ⅰ. 서 론

고등균류인 버섯은 지구상에서 14,000 여종이 분포된 것으로 추정되고 있으며 약 700 여종이 중요한 약리적특성들을 가지고 있는 것으로 알려져 있다. 우리나라에서 조사된 야생버섯은 1,000 여종으로 식용버섯이 300 여종, 약용버섯이 50 여종으로 밝혀졌으며 이중 인공재배에 성공하여 재배되고 있는 식용버섯은 느타리, 표고, 양송이, 팽이, 새송이 등 11 여종이며, 약용버섯은 영지, 복령 등 몇 종에 불과한 실정인데 이웃나라인 일본의 경우 20 여종, 중국의 30 여종에 비하면 매우 부족한 실정이다. 버섯은 오래전부터 맛과 영양이 풍부한 식품으로 그리고 약용 등의 목적으로 사용하여 왔고, 버섯 중의 당, 유기산, 지방산, 아미노산, 핵산 등은 영양성분 및 단백질 자원으로서 뿐만 아니라 식품의 texture 및 향미를 높이는 성분으로서, 일부 스테롤, 지방산, 단백질, 핵산, 비타민, 효소류, 무기염류 등은 생체의 생리조절 물질로서 연구되고 있고, 일반적으로 지질이 적고 양질의 단백질 및 핵산이 풍부하며 특히 vitamin D의 전구체인 ergostrol을 함유하고 있어 어린이와 임산부, 뼈의 노화가 시작되는 중년이후의 사람들에게 유용하다고 보고하였다[1-2]. 영지, 운지 그리고 표고 등 자실체의 건조물을 분말로 한 것, 또는 자실체나 이들의 균사체 배양물을 물 또는 물과 에탄올의 혼합액으로 추출하여 얻은 성분을 식용에 적합하도록 가공한 것을 주원료로 하여 섭취가 용이하도록 액상, 페이스트상, 분말, 과립, 캡슐 등으로 가공한 버섯제품들이 개발되고 있으며 최근 버섯추출물의 유효성분을 나노기술을 응용한 기능성 화장품 개발에 관한 연구가 활발히 진행되고 있는 상황이다.

버섯은 calories, sodium, fat, cholesterol 함량이 적고 protein, carbohydrate, fiber, vitamin, 그리고 mineral 등이 풍부하여 dietary

food로 손색이 없고, 암, 중풍, 뇌졸중, 고혈압, 심장병 등의 성인병, 해독, 진정, 빈혈, 지혈, 건위, 이뇨, 강심 등의 생리적병, 결핵, 항균, 소염 등의 세균성 질병에도 효과가 있는 것으로 알려져 있다[3]. 버섯의 약리작용은 β-glucan이 그 활성에 크게 관여한다는 사실은 많은 연구에 의해서 밝혀졌는데 다당체(polysaccharide)의 일종인 β-glucan은 세포조직의 면역기능을 활성화시켜 암세포의 증식과 재발을 억제하고 면역세포의 기능을 활발하게 하는 인터루킨(interleukin), 인터페론(interferon)의 생성을 촉진시키는 것으로 보고되어 있다[4]. 실제로 버섯의 균사체 및 자실체 추출물의 sarcoma 180에 대한 종양의 억제율을 조사한 결과 *Tricholoma matsutake* 91.8%, *Phellinus linteus* 96.7%, *Pholiota nameko* 86.5% 등의 종양억제 효과가 있는 것으로 나타났다[5].

일본에서 버섯으로부터 개발된 항암제는 *Lentinus edodes* 의 자실체로부터 추출한 Lentinan은 분자량이 약 50만으로 위암치료제로 사용되고 있으며, *Schizophyllum commune*의 균사체 배양액으로부터 생산된 Schizophyllan(SPG)는 분자량이 약 45만으로 자궁암의 치료제로서 사용되고 있으며, *Coriolus versicolor*의 균사체에서 추출한 Krestin(PSK)은 분자량이 10만으로 소화기관, 폐, 그리고 유방암의 치료제로서 사용되고 있다. 또한 국내의 경우 1997년 이후로 한국신약에서 *Phellinus linteus* 의 균사체의 열수추출물로부터 Meshima, 동신제약에서 구름버섯으로부터 코프랑이라는 항암제가 개발된 이후로 여러 버섯으로부터 유효한 약리성분을 탐색하려는 연구가 활발히 진행되고 있다[6].

New millenium 시대에 들어 인간 GENOM의 유전자 수가 무려 2만 4천 ~ 4만으로 알려지면서 생명공학의 시대가 급진적으로 가속화되고 있다. 이에 따라 생명 공학은 인간 생활 여러 분야에서 해야 할 일이 많아졌고 그 중 농업 생명공학 기술에 커다란 역할을 하지 않으면 안 되게 되어있

다. 또한, WTO출범, UR협상 체결 등 급속히 변해 가는 국제농업 환경변화에 따라 우리나라의 농산물분야도 생존을 위한 경쟁력 제고가 절실해졌다[7-8]. 그러나 우리나라에서 자생하고 있는 900여종의 버섯 중 식용을 위하여 대량으로 인공 재배되고 있는 것은 주로 양송이, 느타리, 팽이, 표고 등에 한정되어 있고 실질적으로 이용되고 있는 약용버섯도 영지, 상황, 복령 등 몇 종에 지나지 않는다. 반면, 중국이나 일본 등은 버섯의 약재화, 식용화를 위한 연구와 기술 개발이 대규모로 급속히 이루어지고 있어 우리나라에서도 신기능성 소재화 할 수 있는 새로운 버섯의 발굴과 이를 이용할 수 있는 기술개발이 절실하다[9-14].

본 연구에서 연구하고자 하는 버섯은 아위버섯(*Pleurotus ferulae*)으로 분류학적으로 느타리버섯과(Pleurotaceae), 느타리버섯속(*Pleurotus*)에 속하며 건조한 초원에서 아위(阿魏)라고 하는 약용식물에 기생 혹은 부생하는 버섯이다(Fig. 1). 자실체는 단생하거나 군생에 가깝다. 갓 길이는 직경 5~15cm이며, 무게는 150~300g정도이다. 처음에는 납작한 반구형이지만 점차 넓게 펼쳐지다가, 마침내 밑 부분이 오목해지거나 부채꼴이 된다. 표면은 매끄러우며, 어릴 때는 갈색을 띠지만 후에는 오백색(汚白色)으로 변한다. 육질은 흰색이며 비교적 두텁다. 균습(버섯 살)은 이어져 자라고 다소 촘촘하며, 흰색을 띠며 후에 담황색이 된다. 어느 시기에 균병(팡이자루)에서 교차되어 그물무늬가 된다. 균병은 치우쳐 자라거나 중간에 자라며, 안의 포자는 백색부터 오백색에 이른다. 포자는 흰색에 가까우며 매끄럽다. 갓의 모양은 원형, 장타원형, 타원형으로 비교적 단조로운 편이다. 크기는 12~14㎛ × 5~6㎛이다. 1983년 중국 연구원들이 신강(新疆)의 야생 아위버섯에서 균을 채취하여 인공재배에 성공한 버섯이다. 따라서 본 연구에서는 아위버섯 균사체 심부배양 특성 및 기능성에 관하여 검토하였다.

Fig 1. *Pleurotus ferulae* (fruiting body)

Ⅱ. 문헌연구

Ⅱ-1. 느타리속(*Pleurotus* spp) 버섯의 생산

Ⅱ-1-1. 고체배양

*Pleurotus osteatus*는 맛있고 영양학적 가치가 높은 식용버섯으로 “Oyster mushroom", 또는 ” Hiratlke"로써 잘 알려져 있다. *Pleurotus osteatus*는 세계에서 가장 많이 재배되고 있는 버섯들에 속한다[15]. 이 버섯의 생산은 1986년과 1990년 사이에 4배로 증가하였고 현재 년간 일백만톤 정도로 추산되고 있다[16]. 1996년에 중국의 경우 약 70만톤 정도 생산하고 있고, 미국에서는 양송이 버섯(*Agaricus bisporous*)다음으로 많이 생산되고 있다. 1995년에 미국의 *Pleurotus osteatus* 생산은 880만톤 정도 생산되었는데 이는 1994년도의 94%정도 증가한 것이다[17]. *Pleurotus osteatus*는 칼로리(calories), 나트륨(sodium), 지방(fat), 그리고 콜레스테롤(cholesterols)이 낮은 반면, 단백질(proteins), 탄수화물(carbohydrates), 섬유(fiber), 비타민(vitamins), 그리고 무기질(minerals) 등이 풍부하여 좋은 건강식품으로 평가되고 있다.

느타리속의 야생종들 가운데 *Pleurotus eryngii*의 경제적 중요성은 많이 인식되고 있는데, 그 자실체의 맛과 향기의 특성은 다른 느타리속의 버섯보다 뛰어난 것으로 평가되고 있다[18]. Mau등[19]은 *Pleurotus eryngii*에 함유된 향기성분에 관하여 조사하였는데 그들 대부분은 휘발성(volatiles) 및 미각 성분인 것으로 보고하였다.

Pleurotus spp는 Cotton Stalks, 밀/볏 짚, 그리고 톱밥 등과 같은 기질이 함유된 lignin과 Cellulose에서 재배되는 사물기생(*saprophytic*)균

류이다. 이러한 기질을 이용하기 위해서는 *peoxidases, laccases, cellulases, hemicellulases,* 및 *xylanases*와 같은 효소들을 분비하여야 하는데, *Pleurotus* spp는 이러한 효소들을 분비하는 특성을 지니고 있다. *Pleurotus* spp의 이점 중의 하나는 퇴비화(composting)와 Casing layer가 필요없이 lignocellulosic 기질에서 재배할 수 있다는 점이다. 이러한 담자균류(*basidomycetes*)의 상업적 생산기술은 잘 개발되었으며 가장 상업적으로 재배되고 있는 버섯인 *A. bisporous*의 경우와 비교하였을 때 비교적 단순한 특징을 지니고 있다[20]. *Pleurotus* spp는 화학적 또는 생물학적 전처리 없이 효율적으로 lignocellulose를 분해할 수 있기 때문에 다양한 lignocellulose계 부산물들을 이용 및 재활용할 수 있다. *Pleurotus* spp의 기질로서 연구되어진 농업부산물로는 coffee pulp, flax shive, corn cob, sugareane bagasse 및 rice hulls등이 있다.

Cotton은 세계적으로 중요한 작물중의 하나이며 지역농업 부산물 중에서 가장 많이 발생하고 있다. 버섯재배를 위한 기질로서 cotton stalks를 사용하는데 가장 큰 장애물은 보관상의 문제점이다. 이들은 밀짚(wheat straw)의 0.4 – 1.4%와 비교하였을 때, 2 – 4%의 수용성 탄수화물을 함유하고 있고, 수분함량이 매우 높기 때문이다[21]. 지질은 급속하게 사상균(mold)이 무성하게 자라 결국 부패와 호기성 분해를 가져오게 된다. Silage생산은 Silanikove 등[22]에 의하여 연구가 이루어졌는데, 이러한 물질은 수확 후 9개월까지 상업적 *pleurotus* 생산을 위해 사용될 수 있다.

II-1-2. 액체배양

Pleurotus spp는 fungal protein, 종균(spawn) 또는 향기성분의 생산을 위하여 액체배양을 통하여 균사배양을 할 수 있다. Hadar과 Cohen-Arazi[23]는 cotton straw에서 생산된 *P. ostreatus* 자실체와 액체배양에서 생산된 균사체의 화학적 성분을 조사하였다. 자실체와 균사체의 총 단백질, 아미노산, 지방산 등의 조성은 거의 유사한 것으로 나타났다.

식용버섯의 자실체들은 특유의 향미 및 향기성질로 잘 알려져 있다. 식용버섯 양미 성분 중의 휘발성 화합물 중에 1-octan-3-ol은 버섯 특유의 향미를 나타내는 주요한 화합물이라고 알려져 있다[24]. 액체배양에 의해 생산된 균사체는 매우 적은 정도의 향미성분을 가지고 있어 이러한 기술은 여전히 중요한 과제가 되고 있다[25]. 사실 Belinky 등[26]은 *P. pulmonarius*의 액체배양에서 성장배지에 Soybean flour와 Soybean oil을 첨가하여 자실체에서 생산된 1-octan-3-ol 함유량보다 유사 내지 더 높은 정도의 1-octan-3-ol 생성을 증가시켰다. *Lipoxygenase*는 불포화지방산(주로 linoleic acid)의 hydroperoxides의 형성을 통하여 향미 성분의 생합성에 주요한 효소로 간주되고 있다. Assaf등[27]은 *P. pulmonarius*의 균사체 균질액(homogenate)에 의해 linoleic acid가 13-hydroperoxylinoleate와 1-octan-3-ol로 전환된다고 보고하였다.

II-2 균사체 생산

버섯의 식품학적 가치는 맛뿐만 아니라, 아미노산, 당, 비타민 등을 풍부하게 함유한 건강식품으로 평가되고 있으며 버섯 균사체의 심부배양도 식품이나 사료를 목적으로 한 것[28-30], 배양 균사체의 비타민이나 질소함량[31, 32] 등의 성분, 그리고 원료비의 절감을 위한 폐자원의 이용[32-34]등에 관하여 많은 검토가 이루어진 바가 있다. 또한 버섯류에는 세균, 곰팡이, 효모 및 방선균 등과 같이 생리활성물질 생산균의 탐색대상이 되고 있어 여러 종의 항생물질[35,36], 항암물질[37,38], 효소[39] 및 기타 여러 가지 물질[40,41]등이 보고된 바가 있다. 따라서, 심부배양에 의한 유용물질 생산을 위한 버섯 균사체의 배양은 급속도로 이루어지고 있기 때문에 배양공학 측면에서의 버섯 균사체 대량 생산에 미치는 여러 배양조건 등에 관하여 조사하고자 한다.

II-2-1 산소공급조건[42]

각종 미생물 배양에 있어서 배지조성과 산소공급조건이 미생물 증식에 커다란 영향을 미치듯이 균사체의 심부배양에서도 산소공급조건에 따라 균사체 생장에 영향을 미친다. 심부배양을 할 경우 균사체 생장에 필요한 영양원의 경우에 산소공급조건이 필수적인데 물에 대한 산소의 용해도는 10^{-3}이하로 매우 낮기 때문에 배양기간 동안에는 산소가 배지에 용해되도록 공급하여야한다. 산소용해속도와 액중에서의 이동속도가 극히 낮기 때문에 산소공급이 기포에서 세포내로 산소공급이 원활히 이루어져야 할 필요성이 대두된다. 이러한 산소공급을 원활하게 하기 위한 수단으로 배

양액의 강제교반 또는 강제통기가 이용되며 이 조작에 들어가는 동력은 큰 것으로 산소공급도 버섯 균사체의 심부배양에 있어서 없어서는 안 될 중요한 환경인자가 된다. 산소공급 조건의 바로메이터로서 배지의 산소흡수속도(k_d)인데, k_d는 대기압의 공기보다 단위체적당의 배지에서의 단위시간당 들어가는 산소량으로 진탕배양의 경우 배양액량과 진탕속도에 의해 영향을 받으며, 통기교반의 경우 k_d의 측정에 아류산소다법이 많이 쓰이고 있다. 산소공급이 과잉상태가 되면 공급과잉에 따른 생장저해효과가 나타나며 버섯 균사체 배양에 있어서 최적 k_d값은 버섯 종에 따라 다른 것으로 조사되고 있다.

II-2-2 Pellet형과 filamentous형 균사체 비증식 속도

버섯과 같이 세포가 개개로 분리, 연결되어 균사(mycelia)를 형성하는 미생물을 액체배양하면 대부분의 경우 균사체가 덩어리 상태로 되어 증식되는데 배양조건에 따라 구형(Pellet)과 섬유상(filamentous)형태로 증식된다. 섬유상 세포가 Pellet을 형성할 때의 증식은 증식속도가 세포량의 세제곱으로 비례한다고 제안했다[41].

심부배양에 있어서 균사체의 증식속도에 영향을 미치는 인자로서 균사체 증식형태(Pellet 또는 filamentous)와 산소공급조건을 고려할 수 있다. Table. 1에서 보는 바와 같이 Pellet으로 증식하는 균사체보다 섬유상 증식 균사체의 세포비증식속도(cell specific growth rate, μ, g/g·hr)가 높게 나타나고 있다. 따라서 Pellet형태로 증식하게 된 균사체에서도 균질화(homogenation)하게 되면 균사가 분산상태가 되어 세포비성장속도(μ)는 증가하게 된다.

Table 1. Cell specific growth rate of *Lentinus edodes* mycelium.

Cultivation time (hr)	Cell specific growth rate(μ, hr^{-1})		
	Homogenate of filamentous type mycelium	Homogenate of Pellet type mycelium	Pellet type mycelium
24	15.8×10^{-2}	9.7×10^{-2}	1.0×10^{-2}
48	14.0×10^{-2}	8.1×10^{-2}	1.0×10^{-2}

결국 균질화에 의해 산소공급 측면에서 균사생육에 양호한 환경이 조성되어 증식이 빨라지게 되는 것으로 나타났는데 즉, 균사체 배양에 있어 Pellet 형태로 배양하였을 때 균사생장에 불리한 환경이 발생하는데 다시 말하면 균사의 내부에 기질의 농도분포가 존재하여 중심부근에서 기질 부족 부분이 생기기 때문이다.

Pellet형 균사체 내의 물질이동 식

$$\frac{6CsD}{R^2\rho Q}$$

Cs : 배지중의 기질 농도(mg/mL)

D : 기질 확산계수 (mm^2/min)

R : Pellet형 균사체의 반경(mm)

ρ : Pellet형 균사체의 밀도(mg/mm^2)

Q : 호흡속도계수(mgO_2/mg cell min) 이다.

이 식을 Table. 1 의 표고의 균사체에 관해서 계산하여 보면 산소, 포도당, 질소원 등의 기질 중에서 산소가 연속적으로 기질로 전환되고 있음을 알 수 있다. 따라서 심부배양에 있어서 균사체의 형태는 Humfeld 등[42]의 초기연구에서도 보고 된 바 있다. 또한 Pellet형 균사체의 내부와 외부에서의 기질 이동의 차이 등에 따라 생육조건의 차이가 발생할 수 있지만, 균사체 전체가 배지에 접하여 있는 상태로 생육하여온 섬유상 균사체는 기질 이동 속도의 일정함을 유지하여 균사체 생육이 양호함을 알 수 있다. Table. 1 에서 보는 바와 같이 Pellet형 균사체를 균질화 하였을

때의 세포비생장속도(μ)를 조사하여 보면 Pellet형 균사체를 균질화하여 얻어진 균사체의 μ는 섬유상 균사체보다 작다. 결론적으로 버섯 균사체의 대량생산을 위해서는 가급적 Pellet을 형성하지 않는 상태에서 배양하는 것이 바람직함을 알 수 있으며, 이에 대한 연구는 균사를 형성하여 생장하는 다른 미생물의 배양학적 측면에서의 연구와 더불어 현재 이에 관한 연구가 계속 추진되고 있다.

II-3 항종양성 다당류

담자균이 생성하는 항생물질에는 항균성이나 항암성을 가지고 있는 것이 많은 것이 하나의 특징이다. 담자균류의 제암성 물질에 관해 가장 많이 연구된 것은 다당류이다. 원숭이안장버섯과 진흙버섯과의 열수추출물이 흰쥐의 *Sarcoma-180*에 유효한 것으로 나타나 담자균류 유래 다당류의 연구는 활발히 진행되어 왔다. 구름버섯(*Coriolus versicolor*)의 Psk, 표고버섯(*Lentinus edodes*)의 Lentinan, 치마버섯(*Schizophyllum commune*)의 Schizophyllan, 잎새버섯류와 영지버섯류의 다당류들은 폭넓게 연구되어왔으며, 이중 Psk와 Lentinan은 일본에서 실용화되고 있다. 柳進 등[43]은 항종양성 다당류를 형성하는 담자균류를 계통적으로 정리하여 보고하였다(Table. 2). 그러나 대부분의 다당류는 화학적인 검토에서 끝나고 항종양 활성에 관해서는 연구가 많이 이루어지지 않는 상태이다.

이러한 다당류의 효과는 면역 부활작용에 의한다고 한다. 면역을 담당하는 세포는 주로 림파구와 *Macrophage*이다. 림파구에서는 B-cell과

T-cell이 있으며 B세포는 골수에서 항체를 생산하고 체액성 면역의 주체가 된다. T세포는 흉선에서 연유되어 면역응답에 관여하는 Helper -T로 직접 암세포를 공격하는 Kill-T등 여러 종류가 있어 세포성 면역의 주체이다. *Macrophage*는 이물질을 세포내로 들어가게 처리하는 활동이 있다. 이러한 세포는 서로 유기적으로 암세포에 대하여 면역시스템을 활성화시키고 있다(Fig. 2)[44].

담자균 다당류는 T세포를 부활시켜 흉선 의존성 면역반응을 회복한다고 되어있다. 이에 대하여 *Corynebacterium* 균의 다당류나 BCG는 *macrophage*를 활성화하여 세균의 endotoxin이나 lipopolysacchatide(LPS)는 B세포를 부활시키는 작용을 가지고 있다[44].

Psk 및 lentinan에 관해서는 많은 동물실험이 이루어져 왔으나 Krestin은 경구투여에서도 유효하고 독성은 낮은 것으로 나타났다. 항종양 스펙톨은 잘 알려져 있어 이물성이 높은 암, 예를 들면 이식암에 극소 X-ray 조사로 이물화된 암에 유효하나 자가암이나 동계암에는 효과가 낮은 결점을 가지고 있으며 어떤 다른 화학요법제와 병용할 경우 효과가 크다.

이러한 것은 액체성 항체 생성에 암상태에서의 세포성 면역의 저하방지에 유효하나, Lentinan은 helper-T로 세포 부활물질이며, Psk는 T세포 부활이외의 기능은 약하기 때문에 직접 암세포를 공격하는 활성은 낮다. 담자균의 다당류는 자실체에서 추출뿐만 아니라 배양균사체에서도 추출되는 것으로도 대량생산이 가능하다. 담자균에서 생성하는 당단백질 중에는 Suppressor-T세포를 부활하는 것도 있다. 이 경우는 역으로 과잉된 면역 반응을 억제하는 것으로 알레르기 질환에 적용이 검토되고 있다. 담자균 다당의 구조와 활성과의 상관관계는 어느 정도 잘 알려져 있다[45].

일반적으로 활성이 높은 다당류는 수용성으로써 가수분해로 D-glucose만 생성하는 중성 homoglucan이다. 화학구조는 β-(1,3)-D-glucan이 주체로 하여 2-12 glucosyl 잔기당 1개의 β-(1-6)의 분자를 가지고 있다(Fig. 3). 수용액중에는 right-handed 삼중나선구조를 갖는 것으로 알려져 있다(Fig. 4). 분자량은 10^4 - 10^6이 필요하고 이 분자량 이하에서는 삼중쇄의 분율이 줄어 활성이 저하되는 것으로 알려져 있다.

활성이 높은 수용성 D-glucan의 함량은 적어서 양적으로 많은 알칼리 가용의 β-D-glucan을 화학구조에 따라 활성의 발현이나 개선이 시도되고 있다. 예를 들면 복령의 pachymane은 활성이 없는 β-D-glucan이나 이것을 화학수식된 hydroxyethyl-pachyman 스미스 분해로 β-(1,6) 분자를 제거한 Pachymaran 효소와 가열처리된 U-pachyman은 활성이 있는 것으로 나타났고, 목이버섯의 고분기형 저활성 Curdlan에도 측쇄를 polyol화 하는데서 활성이 현저하게 증가한다. 활성이 없는 직쇄형 Cudlan에도 carboxymethyl화 되어 CM-curdlan으로 변환되면 활성이 증가하게 되는 것으로 알려져 있다[45].

Table 2. Anti-tumor activity of basidiomycetes.

Mushroom	Extract	Inhibition (%)
Auricularia auricula-judae	Hot water	42.6
Ganoderma appalanatum	Hot water	64.9
G. tsegae	Hot water, NaOH	77.8
Phellinus linteus	Hot water	96.7
P. igniarius	Hot water	87.4
Coriolus versicolor	Hot water	77.5
C. hirsutus	Hot water	65.0
C. pubescens	Hot water	59.5
Daedaleopsis tricolor	Hot water	70.2
Fomes fomentarius	Hot water	5.7
F. pinicola	Hot water	51.2
Hirshioporus fusco-violaceus	Hot water	45.5
Lenzites betulina	Hot water	23.9
Piptoporus betulinus	Hot water	49.2
Piptotorus betulinus	NaOH	72.4
Trametes gibbosa	Hot water	49.2
T. dickinsii	Water	80.1
Flammulina velutipes	Hot water	81.1
Lentinus edodos	Hot water	80.7
Pholiota nameko	Hot water	86.5
Pleurotus ostreatus	Hot water	75.3
P. spodoleucus	Hot water	72.3
Schizophyllum commune	Medium	100.0
Tricholoma matsutake	Hot water	91.8

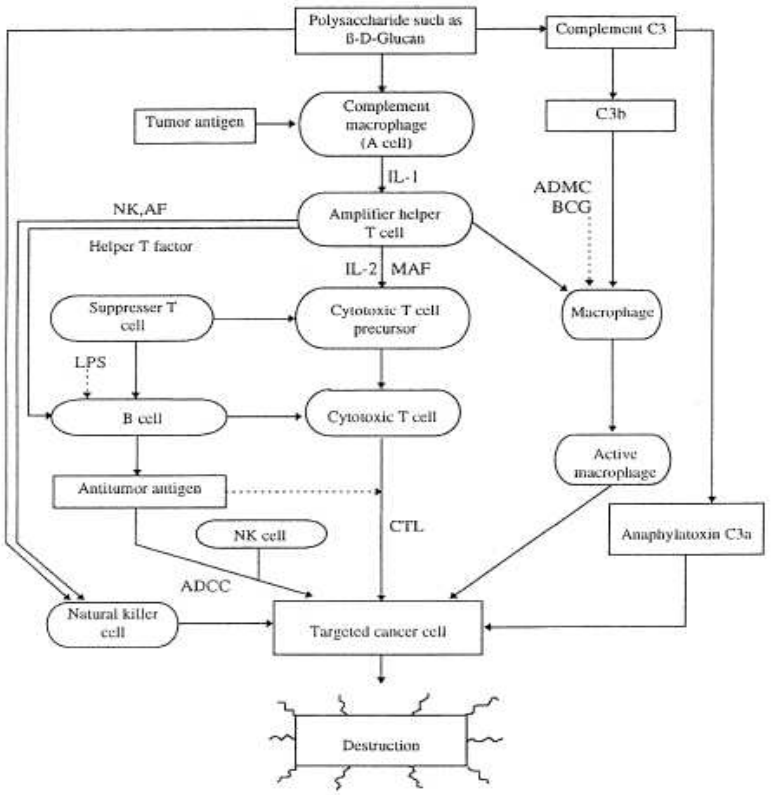


Fig. 2. Possible immune mechanism: β-D-glucan biological response modifier (BRM) [44].

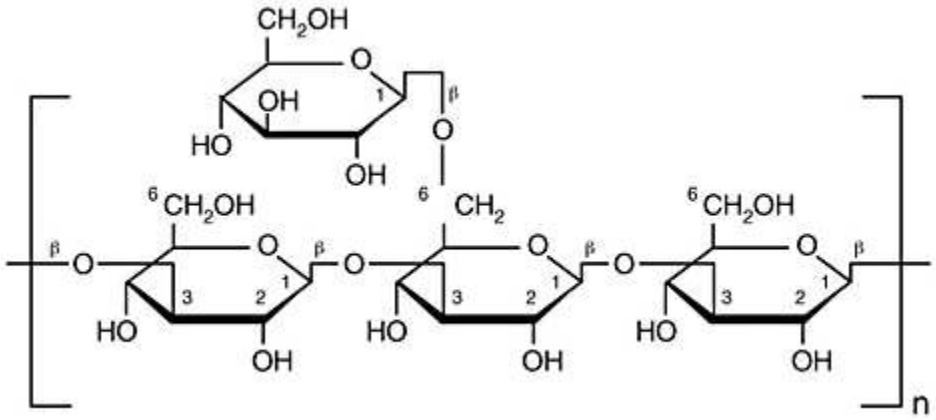


Fig. 3. Primary molecular diagram of mushroom beta-D-glucan [45].

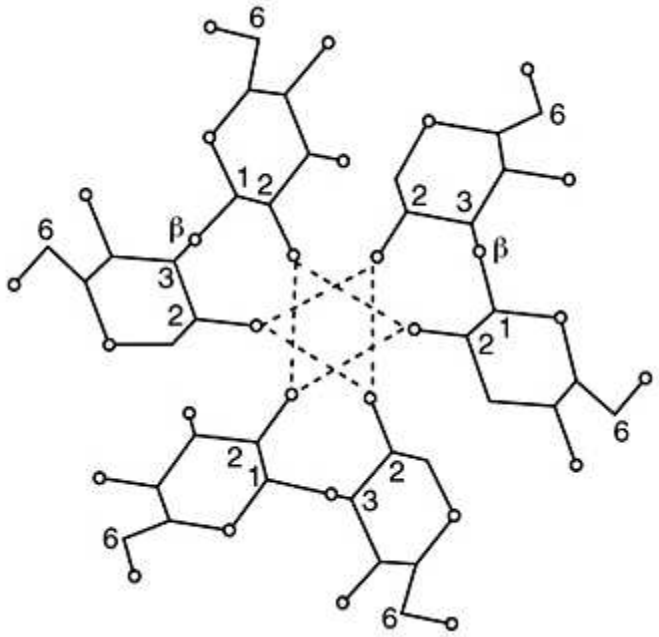


Fig. 4. Molecular model of the right-handed triple spiral helix of antitumor-active-beta-D-glucan (Schizophyllan) [46].

II-4. 느타리속(*Pleurotus* spp) 버섯의 약리적 특징

버섯추출물들은 항균성(antibacterial), 혈액학적(hematological), 항바이러스(antiviral), 항암성(antitumor), 고혈압과 간보호 효과를 가지고 있는 것으로 보고되어 있다[47,48]. *Pleurotus* spp는 약리학적 특징을 지니고 있어 한방에서 많이 애용되어 왔고 잘 알려진 약용버섯이다[49]. Waser와 Weis[48]는 고등 담자균류(즉 버섯)로부터 약용으로 사용이 가능한 물질을 분리 및 동정하였다. 지난 수십년동안 *Pleurotus* spp를 비롯한 담자균류의 자실체로부터 많은 성분들이 분리되었고 약리학적 특성을 가지고 있는 점으로 나타났다[50]. Table 3 은 여러 종류의 *Pleurotus* spp 의 약리학적 효과들을 나타낸 것이다.

Table 3. Medicinal effects of *Pleurotus spp.*

Medicinal effect	Fungus	Substance	References
Antibiotic	*Pleurotus*	Mycelia	[51]
		Polysaccharide	[52]
Antibacterial	*P.ostreatus*	β-D-Glucan(pleuran)	[53]
	Pleurotus spp	-	[54]
Antiviral	*Pleurotus spp*	-	[55]
	P. citrinopileatus	Polysaccharide	[56,57]
	P. ostreatus	Ubiquitin-like protein	[58]
Immunomodulating	*P. ostreatus*	Glucan	[59,60]
Antitumor	*P. ostreatus*	Glycopeptides	[61]
	P. ostreatus	Mushroom grown on corncobs	[62]
	Pleurotus spp	-	[63]
	Pleurotus spp	-	[64]
	P. ostreatus	Mushroom	[65]
	P. ostreatus	Lectim	[66]
	P. ostreatus	β-D-Glucan(pleuran)	[65]
Antiinflammatory	*Pleurotus spp*	-	[67]
Anticholesterolic	*P. eryngii*	Lovastatin	[68]
	P. ostreatus	Mushrrom	[69]
	P. cornucopiae	Lovastatin	[70]
	P. ostreatus	Mushroom	[71,72]
Hemagglutination	*P. cornucopiae*	Lectin	[73]
Antioxidant	*P. ostreatus*	β-D-Glucan(pleuran)	[65]

Ⅲ. 아위버섯 균사체 심부배양

Ⅲ-1. 재료 및 방법

Ⅲ-1-1. 균주 및 보관

본 연구에 사용한 균주는 아위(Pleurotus ferulae)버섯으로 국내에서 수집된 F-4와 자실체 조직분리를 통해 얻은 F-1, 그리고 중국에서 수집된 F-2, F-3을 사용하였으며, Patoto dextrose agar(PDA)배지에서 25℃, 7일간 배양한 후 4℃에서 보존하였고, 2주마다 계대배양하면서 실험에 사용하였다.

Ⅲ-1-2. 배지선발

공시균주(F-1, F-2, F-3, F-4)의 최적 배지를 선발하기 위하여 MCM, MYPA, ME, PDA, YM, YMPG, YMG를 Table 4 와 같이 조제하였다.

Table 4. Composition of various synthetic and semi-synthetic media tested.

Nutrition reagent	Medium						
	MCM	MYPA	PDA	ME	YM	YMPG	YMG
Fresh Potato			200.0				
K_2HPO_4	1.0						
KH_2PO_4	0.46					2.0	
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.5					1.0	
Glucose	20.0				10.0	10.0	4.0
Maltose							
Dextrose			20.0				
Thiamine HCl						1.0	
DL-Asparagine						1.0	
Peptone	2.0	1.0		5.0	5.0	2.0	
Malt extract		30.0		20.0	3.0	10.0	10.0
Yeast extract	2.0	2.0			3.0	2.0	4.0
Agar	20.0	20.0	20.0	20.0	20.0	20.0	15.0

MCM: mushroom complete media, MYPA: malt-yest-peptone agar, PDA: potato dextrose agar, ME: malt extract agar, YM: yeast-malt agar, YMPG: yeast- malt-peptone-glucose agar, YMG: yeast-malt-glucose agar.

Table 4 와 같이 혼합된 배지는 15분간 살균(121℃, 1.2 kg/㎠) 후 petri dish 에 20 ㎖씩 분주한 후, 공시균(F-1, F-2, F-3, F-4)을 접종하여 25±1℃ 항온기에서 10일간 배양하면서 균사생장 정도를 측정하여 최적 배지를 선발하였다.

III-1-3. 접종원

접종원의 준비는 고체배양의 경우, 냉장보관 하던 균주를 MYPA배지 (peptone 1.0 g/L, malt extract 30.0 g/L, yeast extract 2.0 g/L and agar 20.0 g/L)의 중앙부에 5mm cork borer로 절취한 mycelium disk를 접종하여 25±1℃의 항온기에서 배양한 후 실험에 사용하였으며, 액체배양의 경우는 250 mL 플라스크에 50 mL의 potato dextrose broth(PDB)를 조제하여 121℃, 15분간 고압멸균한 후 평판배양 된 아위버섯 균사체를 5mm cork borer로 mycelium disk 4 - 5개를 절취하여 접종한 후 25℃, 8일간 배양한 다음, 배양액을 균질기로 균질화 하여 접종원으로 사용하였다.

III-1-4. Flask 배양

아위버섯의 균사생육에 가장 좋은 최적 온도를 조사하기 위하여 MYPA 배지를 조제하여 121℃에서 15분간 고압멸균하고, petri-dish에 20 mL 씩

분주하여 굳힌 다음, 접종원을 접종하고 15, 20, 25, 30, 35℃의 온도 범위로 조절된 항온기에서 10일간 배양하면서 균사의 생육 정도를 하루 간격으로 조사하였다.

아위버섯의 균사생장에 관한 접종원의 배양일수와 접종량에 따른 영향을 조사하기 위하여 300 mL 삼각플라스크에 기본배지를 50 mL씩 분주하여, 121℃에서 15분간 고압멸균 한 후, 미리 준비된 접종원을 각각 1, 3, 5, 7, 10%(v/v)로 달리하여 접종하여 25±1℃, 100rpm의 조건하에서 shaking incubator에서 5 – 10일 동안 배양하여 균사생장과 세포외다당류 생산을 조사하였다.

균사체 생장 최적 초기 pH를 조사하기 위하여 기본배지를 300 mL 삼각플라스크에 50 mL씩 분주하여 1N-HCl과 1N-NaOH로 초기 pH를 4.0 – 8.0 범위로 달리하여 조절한 다음, 121℃, 15분간 고압멸균하여 무균적으로 균질화된 접종원을 5%(v/v) 접종하여 25±1℃, 100rpm으로 8일간 진탕배양 하였다.

체적에 따른 공기의 영향을 조사하기 위하여 300 mL 삼각플라스크에 기본배지를 50 – 200 mL 씩 달리하여 pH를 6.5로 조절한 다음 121℃, 15분간 고압멸균한 후, 무균적으로 균질화된 접종원을 25±1℃, 100 rpm으로 8일간 진탕배양하였다.

Shaking Incubator에서 균사체 최적 성장의 회전수를 조사하기 위하여 300 mL 삼각플라스크에 50 mL의 기본배지를 pH를 6.0으로 조절한 다음 121℃, 15분간 고압멸균한 후, 접종원을 25±1℃로 7일간 50 ~ 200 rpm으로 회전수를 달리하여 배양하였다.

III-1-5. 영양요구성

탄소원에 따른 균사체 생장과 세포외 다당류 생산을 조사하기 위하여 glucose외 9종의 당류를 각각 2%(w/v)씩 첨가하고 배지의 pH를 6.5로 조절한 다음 300 mL 삼각풀라스크에 50 mL씩 분주하여 121℃에서 15분간 고압멸균한 후, 접종원을 5%(w/v)로 접종하여 25±1℃, 150 rpm으로 12일간 진탕배양하였고, 선발된 최적 탄소원의 농도에 따른 영향을 조사하기 위하여 각각 1 - 10%(w/v)씩 달리하여 탄소원 선발실험과 같은 방법으로 조사하였다.

최적 탄소원인 glucose를 5%(w/v) 첨가된 기본배지에 yeast extract외 11종의 질소원을 0.6% 씩 달리하여 조제하고 pH를 6.5로 조절한 다음 300 mL 삼각풀라스크에 50 mL씩 분주하여 121℃, 15분간 고압멸균한 후 접종원을 5%(w/v)로 접종하여 25±1℃, 150 rpm을 12일간 진탕배양 하였고, 선발된 최적 질소원 농도에 따른 균사생장과 세포외 다당류 생산에 미치는 영향을 조사하기 위하여 최적 질소원의 농도를 각각 0.2 - 2.0%(w/v)씩 달리하여 질소원 선발 실험 조건과 같은 방법으로 조사하였다.

III-1-6. Jar-fermintation

발효조 배양에서 발효조는 5 L 용량(working volume 2 L)의 Jar fer- memter(Kobiotech, Korea)로써 자동온도조절기, 교반속도 조절기, 용존산소농도(DO)센서 및 pH센서를 부착하고 있다. 산소의 공급은 공기 압축기를 이용하여 여과 필터를 거쳐 발효기 안으로 유입되게 하였

으며, 배양 시 발생하는 거품을 제거하기 위하여 Silicon 소포제를 사용하였다. 유량(areation)은 0.5 vvm과 1.5 vvm으로 달리하여 areation에 따른 균사생장과 세포외 다당류 생산을 조사하였고 교반속도는 100, 200, 300 rpm으로 변화를 주면서 교반속도에 따른 영향을 조사하였다.

발효조 배양에 사용한 배지는 flask 배양에서 영양요구성 실험을 통하여 얻어진 최적 배지를 사용하였고, 조업 온도와 pH는 각각 25℃, 6.5로 하여 배양기간 동안 일정하게 유지되도록 조절하였고 배양기간은 8 – 12일간 배양하여 균사생장과 세포외 다당류 생산을 조사하였다.

III-1-7. 분석방법

고체배지에서 균사생장 측정은 접종된 균사절편의 중심을 직교하는 수직선과 수평선을 평판배지인 petri-dish의 밑면에 유성펜으로 그렸으며, 하루 간격으로 배양이 완료될 때까지 종축과 횡축의 직경을 측정한 후 두 값을 평균하여 균사의 생장 직경을 측정하였다[74].

액체배양에서의 건조 균체량은 배양액을 3,000 rpm에서 15분간 원심분리하여 침전된 균사체를 2 – 3회에 걸쳐서 수세한 다음, 60℃에서 24시간 건조하고 deciccator에서 항량이 될 때가지 방치하여 건조중량을 측정하였고, 상등액은 4배의 95% ethanol을 첨가하여 4℃에서 하루 동안 방치한 후 침전된 세포외 다당류를 3,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 분리한 다음 60℃에서 하루 동안 건조하여 desiccator에서 항량이 될 때까지 방치하여 건조중량을 측정하였다(Fig. 5)[75].

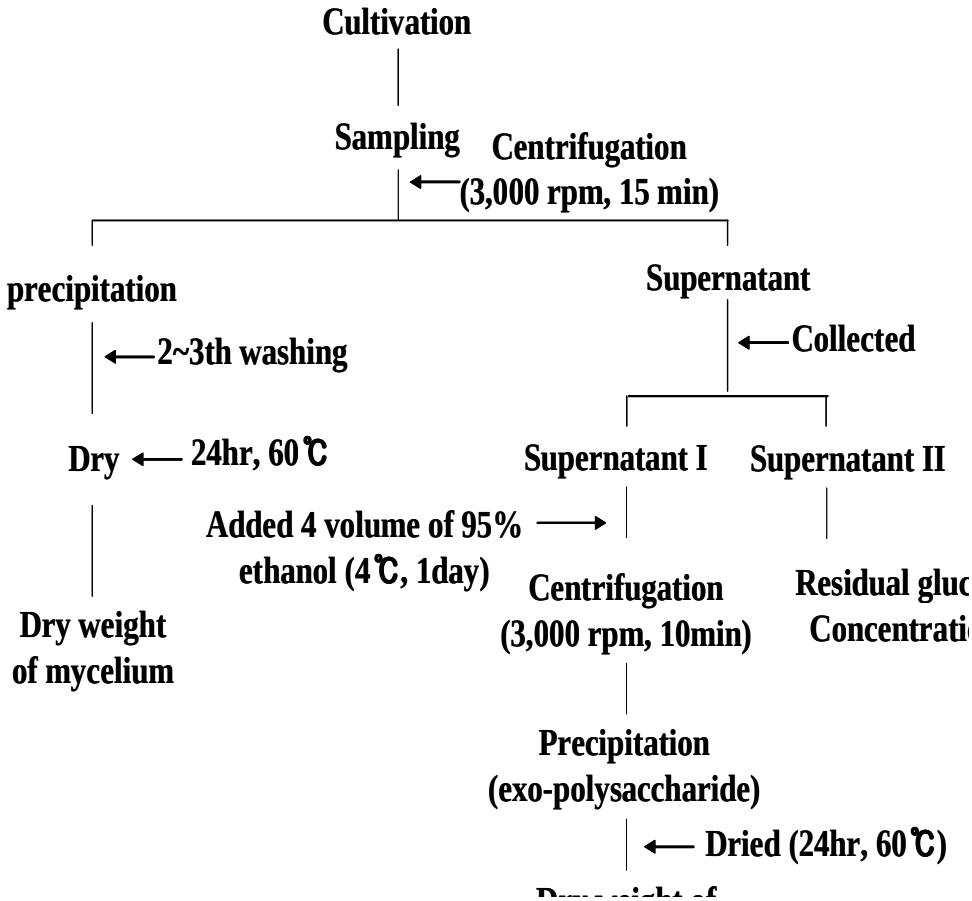


Fig. 5. Experimental procedure in this study.

III-2. 결과 및 고찰

III-2-1. 균주 선발

공시한 4개의 균주 중 균사생장이 우수한 균주를 선발하기 위하여 PDA배지에서 균사생장 분포도를 조사한 결과 Table 5 와 같았다.

F-2 균주가 가장 빨리 자랐고 균사밀도도 높았다. F-3 균주의 경우 균사생육이 F-2 균주와 비슷하였으나 균사밀도가 낮고 공중균사 생성이 많았다. F-1, F-4 균주의 경우에는 균사생장이 너무 저조하였다. 따라서 본 연구에서는 F-2 균주를 선발하여 사용하였다.

Table 5. Composition of the mycelial growth of various *P. ferulae* on media(PDA).

Strain of ferule / Mushroom / Growth Characteristic	F-1	F-2	F-3	F-4
Mycelial growth** (mm/10day)	23±3.9	69±3.9	68±3.9	22±3.9
Mycelial density***	+++	+++	++	+++

* Four strains of Ferule mushroom was collected, subcultured and named as F-1, F-2, F-3 and F-4.

** Mycelial growth was checked 10 days after inoculation and expressed as average and standard deviation.

*** Mycelial density was examined with naked eyes and expressed as + (thin), ++ (moderate) and +++ (compact).

III-2-2. 기본배지 선발

아위버섯균의 균사생육에 가장 좋은 기본배지를 선발하기 위하여 Table 4 와 같은 7종의 공시배지를 이용하여 균사생육 및 밀도를 조사하였으며, 그 결과는 Table 6 과 같다.

공시한 7종의 배지 중 MYPA에서 84.0±2.4 (mm/10day)로 가장 빠르게 생장하였으며 균사밀도 또한 높았다. 반면에 ME배지에서는 MYPA 배지와 생장속도가 비슷하였으나 균사밀도 면에서는 많은 차이를 보였다. 그 외에도 MCM, YMPG에서도 균사생장을 빨랐으나 균사밀도가 낮았으며, YM, YMG, PDA에서는 균사생장속도가 느렸고 균사밀도 또한 낮았다. 이 실험으로 아위버섯균에 적합한 합성배지는 MYPA 배지임을 알 수 있었다.

Table 6. Mycelial growth of Ferule mushroom (F-2) on various synthetic and semi-synthetic media.

Growth Characteristic** \ Media*	MCM	MYPA	PDA	ME	YM	YMPG	YMG
Mycelial growth (mm/10day)	81.2±1.3	84.0±2.4	64.7±3.9	84.0±2.2	61.5±0.2	80.3±1.4	74.2±1.9
Mycelial density	+	+++	++	++	+++	++	++

* Refer to Table 4.

** Refer to the footnotes of Table 5.

III-2-3. 온도의 영향

아위버섯 균사체의 균사생육에 적합한 최적 배양온도를 검토한 결과는 Fig. 6에서 보는 바와 같이 20℃ 이하와 30℃이상에서는 균사체 생육이 급속히 저하하는 경향을 보였으며, 25℃에서 균사생육이 가장 양호하여 최적 배양온도는 25℃임을 알 수 있다.

이러한 결과는 같은 느타리속인 *Pleurotus eryngii*는 25℃, *Pleurotus ostreatus*와 *Pleurotus fiorida*는 30℃인 보고[76]와 *Fomitella fraxinea*(Fr)는 25 - 30℃라는 보고[77], *Lentinus lepideus*는 25℃라는 보고[78], 그리고 *Naematoloma Sublateritium*(Fr.)는 25℃라는 보고[79]와 거의 유사한 결과임을 알 수 있고, *Phellinus igniarius*[80]와 *Ganoderma lucidum*[81]은 최적 배양온도가 30℃라는 보고와는 상반된 경향을 보여주고 있어 버섯 종류마다 최적 배양온도는 다소 차이가 있는 것으로 나타났다.

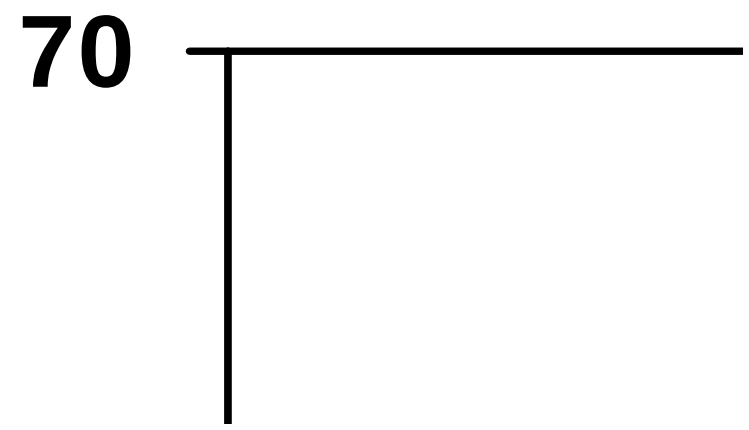


Fig. 6. Effect of temperature on the mycelial growth of *P. ferulae* on MYPA medium.

III-2-4. 접종원의 배양일수 및 접종량의 영향

접종원(inoculum)의 배양기간 및 접종량의 최적화를 통하여 균사 배양기간 동안의 변이(varience)를 최소화하고자 접종원의 배양기간과 접종량에 Efms 균사생장과 세포외 다당류 생산의 특성을 조사하였다.

그 결과를 Fig. 7에 나타내었다. 결과에서 보는 바와 같이 접종원의 배양기간과 접종량에 따라 균사생장과 세포외 다당류 생산에 영향을 미치고 있음을 알 수 있다. 10일 동안 배양한 접종원을 1 - 10%(w/v) 접종량으로 배양한 시험군은 5일과 7일간 배양한 접종원 시험군의 균사생장보다 저조하였는데 이는 접종원의 균사체가 사멸기(dying phase)상태에 있었고, 배양 환경이 급속히 악화되었기 때문에 균사생장과 세포외 다당류 생산이 급격히 저하된 것으로 사료된다.

전체적으로 5%(w/v)의 접종량으로 시험한 군들은 최대 균사생장과 세포외 다당류 생산을 나타냈으며, 5%(w/v) 이상 또는 이하의 접종량 시험군들의 균사생장과 세포에 다당류 생산은 다소 저조한 것으로 나타났다. 접종량이 증가 할수록 균사생장과 세포외 다당류 생산이 증가하지 않는 이유는 분명하지 않지만, 배지내의 영양분을 이용하는데 있어서 다소 제한을 받게 되어 균사생장이 저조하게 된 것으로 사료된다.

이상의 결과에서 아위버섯 균사체의 균사생장과 세포외 다당류 생산을 위한 최적 접종원의 조건은 7일간 배양한 균사체를 5%(w/v)의 접종량으로 접종하는 것이 가장 효과적인 것으로 나타나 이후의 실험에서는 7일간 배양한 균사체를 5%(w/v)의 접종량으로 접종하여 실험을 수행하였다.

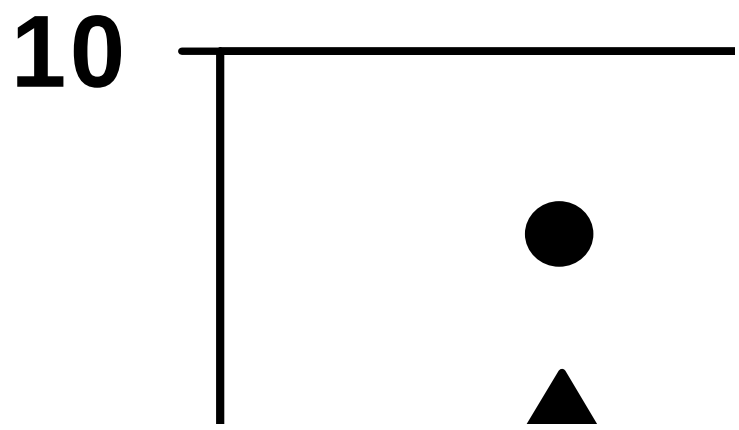


Fig. 7. Effects of inoculum age and inoculum volume on *P. ferulae* growth and exo-polysaccharide production.

III-2-5. 초기의 pH의 영향

아위버섯 균사체의 균사생장에 최적 pH를 규명하기 위해 실험한 결과는 Fig. 8 에서 보는 바와 같이 pH 6.0 이상의 범위에서 균사생장과 세포외 다당류 생산이 양호한 것으로 나타났으며, pH 4.0 – 5.5 범위에서는 균사생장과 세포외 다당류 생산은 다소 억제되는 경향이었다.

초기 pH 6.5에서 균사생장과 세포외 다당류 생산은 각각 6.35 g/L 와 2.07 g/L이었고, pH 7.0에서 균사생장은 5.95 g/L이지만 세포외 다당류 생산은 2.09 g/L 로 최대 생산량을 보였다. 그러나 균사생장과 세포외 다당류 생산 측면에서 검토하였을 때, 아위버섯 균사체의 최적 초기 pH는 6.5임을 알 수 있다.

버섯에 따른 최적 pH범위는 *Lentinus lepideus*의 최적 초기 pH는 4.2이며 pH 5.0이상에서는 균사생장이 모두 정지되었다는 보고[82], *Formitella fraxinea*[83]는 6.0, *Ganoderma lucidum*[81]는 5.0, *Pleurotus ostreatus*[84]는 6.2 – 6.5, *Lentinus edoes*[85]은 4.0 – 4.5, *Poria cocos*[86]은 4.0, *Phelinus edoes*[87]는 4.2, *Pleurotus eryngii*[88]는 6.0인 것으로 보고하였는데, 이러한 경향은 다소 차이는 있지만 담자균류의 균사생장 최적 pH의 범위에 대하여 Wolport[89]가 pH 4.0 – 7.0이라는 보고와 거의 일치한다는 경향임을 알 수 있다.

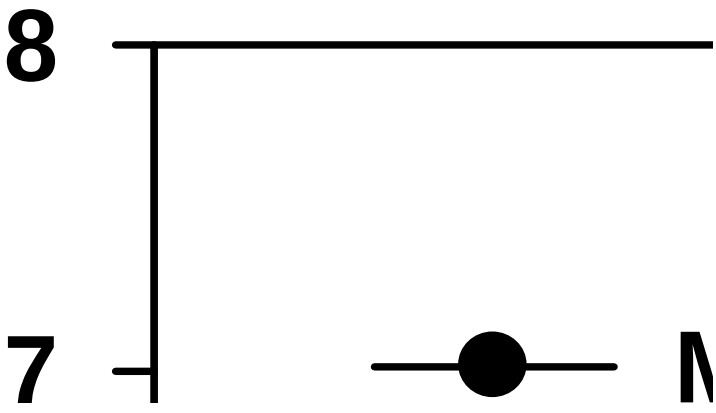


Fig. 8. Effect of initial pH on *P. ferulae* mycelial growth and exo-polysaccharide production.

III-2-6. Surface aeration의 영향

액체배양에 있어서 배지조성과 함께 산소공급조건이 균사생장을 크게 좌우하는 인자인데, 산소의 용해도는 물에 대하여 10^{-3}이하로 극피 낮아 배양기간 중에는 공기가 배지에 용해되도록 공급해야 하는데, 이는 산소의 용해하는 속도와 액중에서의 이동속도가 극히 낮기 때문에 산소공급이 기포에서 세포내에로 산소공급단계가 좋아야 하기 때문이다.

배양부피에 따른 균사생장과 세포외 다당류 생산에 관한 결과는 Fig. 9에서 나타낸 바와 같이 배양부피가 작을수록 산소공급이 원활하여 균사생장과 세포외 다당류 생산이 훨씬 향상되고 있음을 알 수 있으며, 최대균사생장(6.69 g/L)과 세포외 다당류 생산(1.91 g/L)을 보인 배양부피는 50 mL 이었다.

이러한 결과는 아위버섯 균사체의 균사생장과 세포외 다당류 생산을 위해서는 산소의 용해하는 속도와 액중에서의 이동속도가 원활하도록 적절한 배양부피를 유지하여 주는 것이 더욱 효과적임을 알 수 있다.

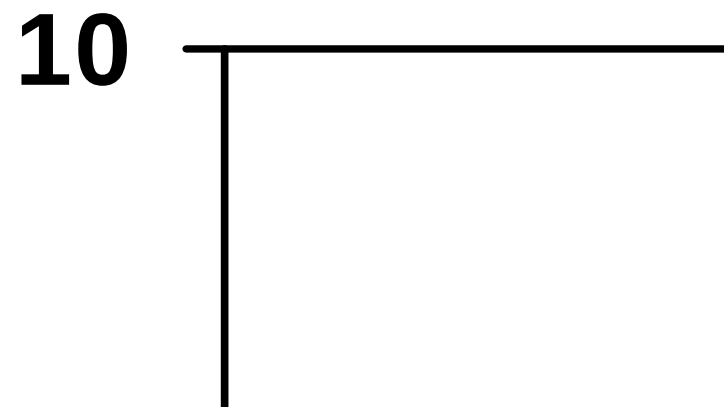


Fig. 9. Effect of surface aeration on *P. ferulae* mycelial growth and exo-polysaccharide production with flask culture.

III-2-7. Shaking speed의 영향

배양액 내의 점성(viscosity)는 배양기간 동안의 균사생장과 더불어 세포외 다당류 생산물 등의 배양액 내의 축적으로 인하여 증가하게 된다. 따라서 물질 전달을 용이하게 하기 위한 효율적인 혼합(mixing)은 균사생장과 세포외 다당류 생산 수율 향상을 증가시킬 수 있는 주요한 환경인자이다. 따라서 shaking speed에 따른 균사생장과 세포외 다당류 생산에 미치는 영향을 조사하였다. Shaking speed에 따른 균사생장과 세포외 다당류 생산에 대한 결과는 Fig. 10 에서 보는 바와 같이 최대 균사생장과 세포외 다당류 생산은 150 rpm의 shaking speed에서 얻어졌으며, shaking speed가 증가할수록 양호한 균사생장과 세포외 다당류 생산을 보였다. 이러한 결과는 shaking speed가 증가할수록 물질전달속도가 증가함에 따라 균사생장과 세포외 다당류 생산에 더욱 효과적임을 알 수 있다. 그러나 150 rpm 이상에서의 shaking speed는 균사생장과 세포외 다당류 생산은 100 rpm에서의 경우보다 다소 낮은 경향을 보였는데, 이는 배양액 내의 균사체에 증가된 shear stress가 작용하여 균사체의 손상으로 인한 것으로 사료된다. 따라서 flask culture에서의 최적 shaking speed는 150 rpm임을 알 수 있다.

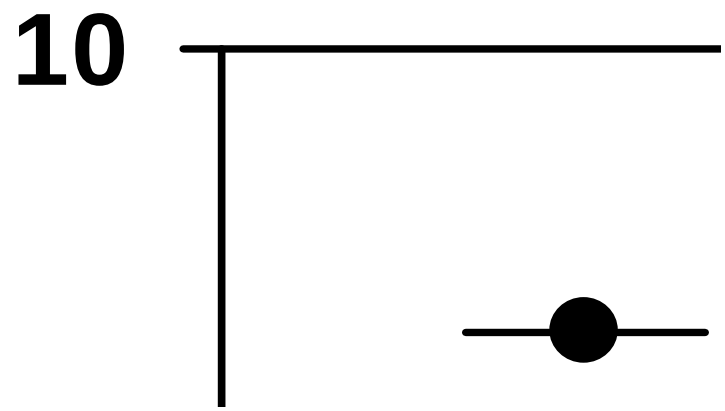


Fig. 10. Effect of shaking speed on *P. ferulae* mycelial growth and exo-polysaccharide production with flask culture at 25℃ and initial pH 6.5.

III-2-8. 영양요구성

III-2-8-1. 탄소원이 균사생장에 미치는 영향

기본배지에 10종의 탄소원들을 첨가하여 실험한 결과 그 중에서도 glucose, maltose, fructose, mannose 첨가구에서 균사생장과 세포외 다당류 생산에 효과적이었다(Table 7). 그 중에서도 glucose 첨가구에서 최대균사생장(6.85 g/L)와 세포외 다당류 생산(2.75 g/L)를 보였다. maltose, fructose, mannose 첨가구에서는 균사생장은 좋았으나 세포외 다당류 생산은 저조하였다. galactose, xylose, lactose, sucrose, manitol 첨가구에서는 균사생장 및 세포외 다당류 생산은 매우 저조하였다. *Flammulina velutips*의 균사생장에 glucose가 가장 효과적인 탄소원이라는 보고와 일치하는 경향이었다. 또한 세포외 다당류 생산 패턴은 균사생장과 관련된 증식연동형임을 알 수 있었다. 이러한 결과는 아위버섯에서 탄소원이 세포외 다당류 생산성을 제고하는데 중요한 인자임을 알 수 있으며 Park 등이 좋은 균사생장이 protein-bound 다당류 생산에 밀접한 관계가 있음을 이미 보고한 바가 있다.

균사생장과 세포외 다당류 생산에 관한 glucose 농도의 영향은 플라스크 배양에서 glucose 농도 1-10% (w/v)의 농도로 달리하여 조사하였다. Fig. 11 에서 보는 바와 같이 최대 균사생장과 세포외 다당류 생산은 glucose농도 5% (w/v) 첨가구에서 얻어졌다. glucose 농도 5% (w/v) 이상 또는 이하의 첨가구에서는 균사생장과 세포외 다당류 생산은 저조하였는데 이러한 결과는 Mikio 등이 *Schizophyllum commune*의 액체배양에서 glucose 농도 5% (w/v)이상의 농도에서는 균사생장과 L-malic acid 생산에 저애효과를 나타낸다는 보고와 일치하였다. 따라서 아위버섯

균사생장과 세포외 다당류 생산을 위한 최적 glucose 농도는 5% (w/v) 임을 알 수 있었다.

Table 7. Effects of carbon sources on *P. ferulae* growth and exo-polysaccharide production with flask culture.

Carbon source	Mycelial dry weight(g/L)	Exo-polysaccharide (g/L)
Control(none)	3.04±0.48	0.80±0.04
Glucose	6.83±1.24	2.75±0.13
Mannose	4..38±0.85	1.16±0.03
Galactose	2.82±0.32	0.57±0.02
Fructose	5.41±0.83	1.32±0.08
Arabinose	2.15±0.39	0.66±0.03
Xylose	3.40±0.64	0.72±0.05
Maltose	5.54±0.79	1.28±0.09
Lactose	2.87±0.47	0.58±0.02
Sucrose	2.91±0.32	0.51±0.03
Manitol	3.45±0.27	0.55±0.05

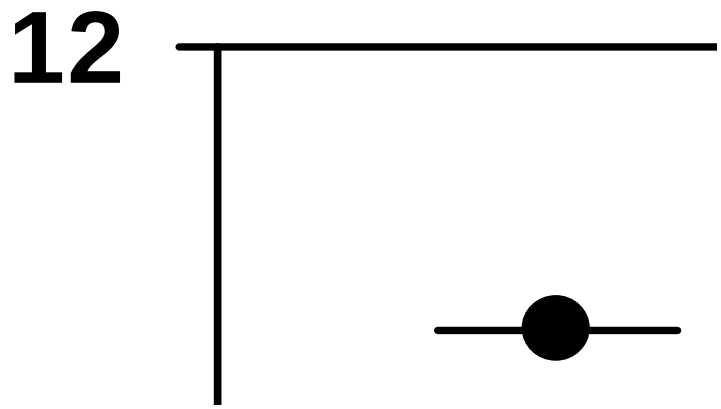


Fig. 11. Effect of glucose concentration on *P. ferulae* growth and exo-polysaccharide production with flask culture.

III-2-8-2. 질소원이 균사생장에 미치는 영향

균사생장과 세포외 다당류 생산에 관한 질소원의 영향을 조사하기 위하여 5% (w/v)의 glucose와 0.6% (w/v)의 12종의 다른 질소원을 각각 첨가한 50 mL의 기본배지를 함유한 300 mL 플라스크에서 회분식 배양을 수행하였다. Table 8 에서 보는 바와 같이 12종의 여러 가지 질소원 가운데, polypeptone과 yeast extract 첨가구에서 균사생장과 세포외 다당류 생산이 가장 양호하였다. 유기태 질소원인 peptone, malt extract, tryptone 첨가구에서는 균사생장과 세포외 다당류 생산에 덜 효과적이었다. 무기태 질소원의 경우 균사생장과 세포외 다당류 생산은 유기태 질소원의 경우보다 상대적으로 저조하였다. 질산태 이온을 함유한 배지에서의 저조한 균사생장은 균류에서 흔히 나타나는 현상과 일치하는 경향이었다. 이러한 결과로 보아 polypeptone과 yeast extract 에는 아위버섯 균사생장과 세포외 다당류 생산을 자극하는 주요한 성분을 함유하고 있는 것으로 사료된다.

질소원의 영향에서 얻어진 최적 질소원인 polypeptnoe과 yeast extract 의 농도에 따른 균사생장 및 세포외 다당류 생산에 미치는 영향에 관하여 조사하였다. 기본배지에 polypeptone의 농도를 각각 0.2-2.0% (w/v)로 달리하여 실험한 결과 Fig. 12 에서 보는 바와 같이 최대 균사생장 및 세포외 다당류 생산은 polypeptone 1.0% (w/v) 첨가구에서 얻어졌으며 polypeptone 농도 1.0%까지 균사생장과 세포외 다당류 생산은 증가하였으며 그 이상의 농도에서는 서서히 감소함을 알 수 있었다. 균사생장과 세포외 다당류 생산에 관한 yeast extract의 농도의 영향을 조사하기 위하여 glucose 5% (w/v), polypeptone 1.0% (w/v), yeast extract 농도를 각각 0-1%씩 달리하여 첨가하여 조사하였다. Fig

13 에서 보는 바와 같이 yeast extract 농도 0.8% 정도 첨가한 처리구에서 균사생장과 세포외 다당류 생산수율은 yeast extract 무첨가 처리구보다 훨씬 향상되었다. 그러므로 최적 polypeptone과 yeast extract 농도는 각각 1%와 0.8%이었다.

Table 8. Effects of nitrogen sources on *P. ferulae* growth and exo-polysaccharide production with flask culture.

Nitrogen source	Mycelial dry weight(g/L)	Exo-polysaccharide (g/L)
Control(none)	1.21±0.09	0.52±0.02
$Ca(NO_3)_2$	2.10±0.12	0.85±0.01
$NaNO_3$	0.01±0.0001	N.D.
$(NH_4)_2SO_4$	0.77±0.02	N.D.
NH_4NO_3	0.74±0.01	N.D.
$NH_4H_2PO_4$	3.80±0.35	1.02±0.05
$(NH_4)_2HPO_4$	3.12±0.27	0.98±0.02
KNO_3	1.04±0.07	0.35±0.01
Malt extract	2.34±0.15	1.52±0.08
Peptone	3.26±0.18	1.65±0.05
Tryptone	4.87±0.21	1.82±0.13
Yeast extract	6.52±0.32	2.53±0.21
Polypeptone	7.21±0.25	3.74±0.18

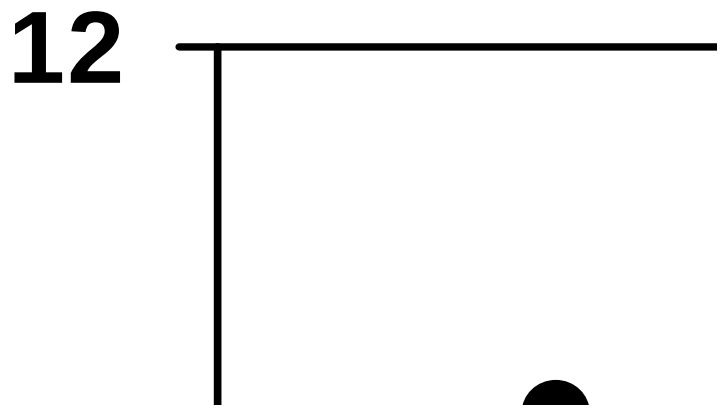


Fig. 12. Effect of polypeptone concentration on *P. ferulae* growth and exo-polysaccharide production with flask culture.

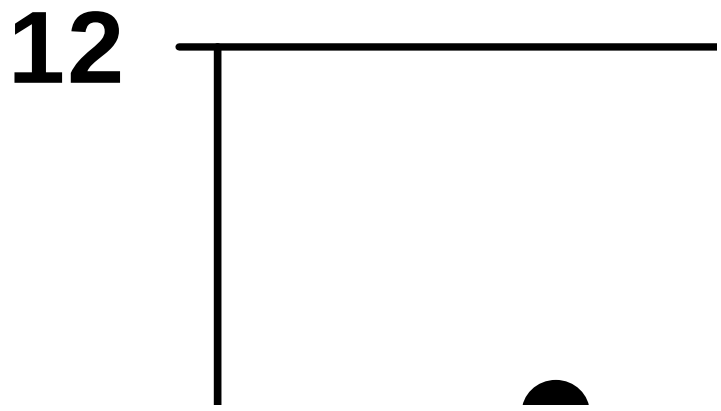


Fig. 13. Effect of yeast extract concentration on *P. ferulae* growth and exo-polysaccharide production with flask culture.

III-2-9. Jar-fermention

III-2-9-1. Agitation speed의 영향

균사생장 및 세포외 다당류 생산에 관한 agitation speed의 영향을 조사하기 위하여 다른 agitation speed 하에서 기본배지를 함유한 5 L jar fermenter에서 수행하였다. Aeration과 pH는 0.5 vvm과 6.5로 고정하였다. Fig. 14 는 각각 다른 agitation speed하에서 균사생장과 세포외 다당류 생산에 관한 time profile을 보여주는데 agitation speed에 따라 균사생장과 세포외 다당류 생산에 상당한 영향을 미치고 있음을 알 수 있었다. agitation speed가 200 rpm이상으로 조절하여 배양하였을 때 균사생장과 세포외 다당류 생산은 감소하였는데 이는 균사생장에 있어 negative 효과를 야기하는 impeller agitation에 의한 higher shear stress로 인한 것으로 사료된다. 최대 균사생장 및 세포외 다당류 생산은 200 rpm의 agitation speed 조건하에서 각각 7.21 g/L와 2.98 g/L이었다.

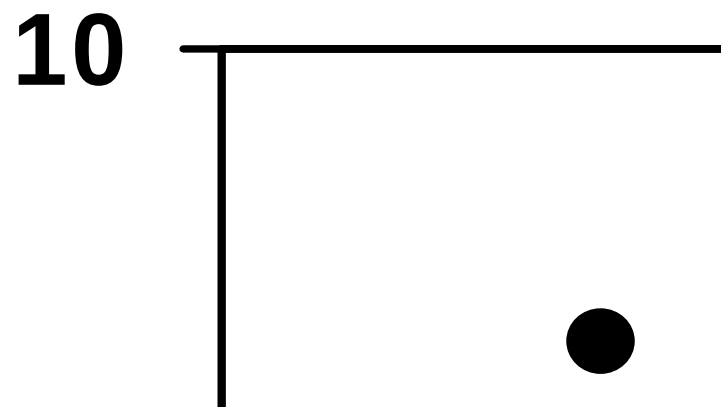


Fig. 14. Effect of agitation speed on *P. ferulae* growth and exo-polysaccharide production with jar fermentation at 25℃, pH 6.5 and 0.5 vvm.

III-2-9-2. Aeration의 영향

Fig. 15 는 0.5와 1.5 vvm의 aeration rate하에서 기본배지를 함유한 5 L jar fermenter에서 균사생장 및 세포외 다당류 생산에 관한 time profile을 보여준다. Agitation speed와 pH는 각각 200 rpm과 6.5로 조절하였다. 최대 균사생장(7.35 g/L)와 세포외 다당류 생산(3.54 g/L)은 1.5 vvm의 aeration rate으로 조절하여 배양하였을 때 얻어졌다. Aeration rate의 증가는 oxygen transfer rate의 증가로 인한 균사생장 및 세포외 다당류 생산을 향상시키는데 positive effect를 나타낸 것으로 사료된다.

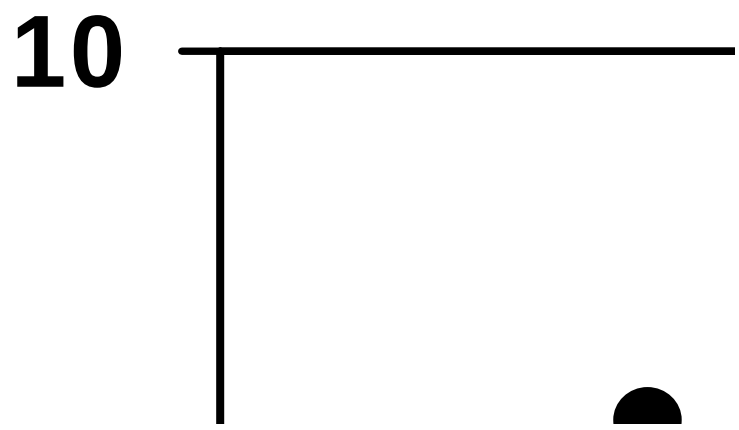


Fig. 15. Effect of aeration rate on *P. ferulae* growth and exo-polysaccharide production with jar fermentation at 25℃, pH 6.5 and 200 rpm.

III-2-9-3. 최적 배양조건하에서의 회분식 배양

기본배지가 함유된 5 L jar fermenter 에서 배양된 균사생장과 세포외 다당류 농도를 측정하였고 그 결과는 Fig. 16 에 나타냈다. 아위버섯 균사는 12일간 최적 배양조건하에서 배양하였다. 회분식 배양을 위한 최적 배양조건은 온도 25℃, agitation speed 200 rpm, aeration rate 1.5 vvm, pH 6.5이다. Jar fermenter 배양에서 최대 균사생장은 배양 11일 후에 10.1 g/L이었고, 세포외 다당류 생산은 배양 10일 후에 3.94 g/L 이었다. 잔존 glucose 농도는 발효공정 동안 20 에서 4.5 g/L로 감소하였으며, Jar fermenter에서 얻어진 균사생장과 세포외 다당류 생산은 플라스크 배양에서 얻어진 결과보다 약간 증가하였음을 알 수 있었다. Jar fermenter에서의 배양기간동안 기질인 glucose가 감소함과 더불어 균사생장이 급격하게 이루어지고 있음을 알 수 있으며, 아위버섯에 의한 세포외 다당류 생산 pattern은 증식연동형임을 알 수 있었다.

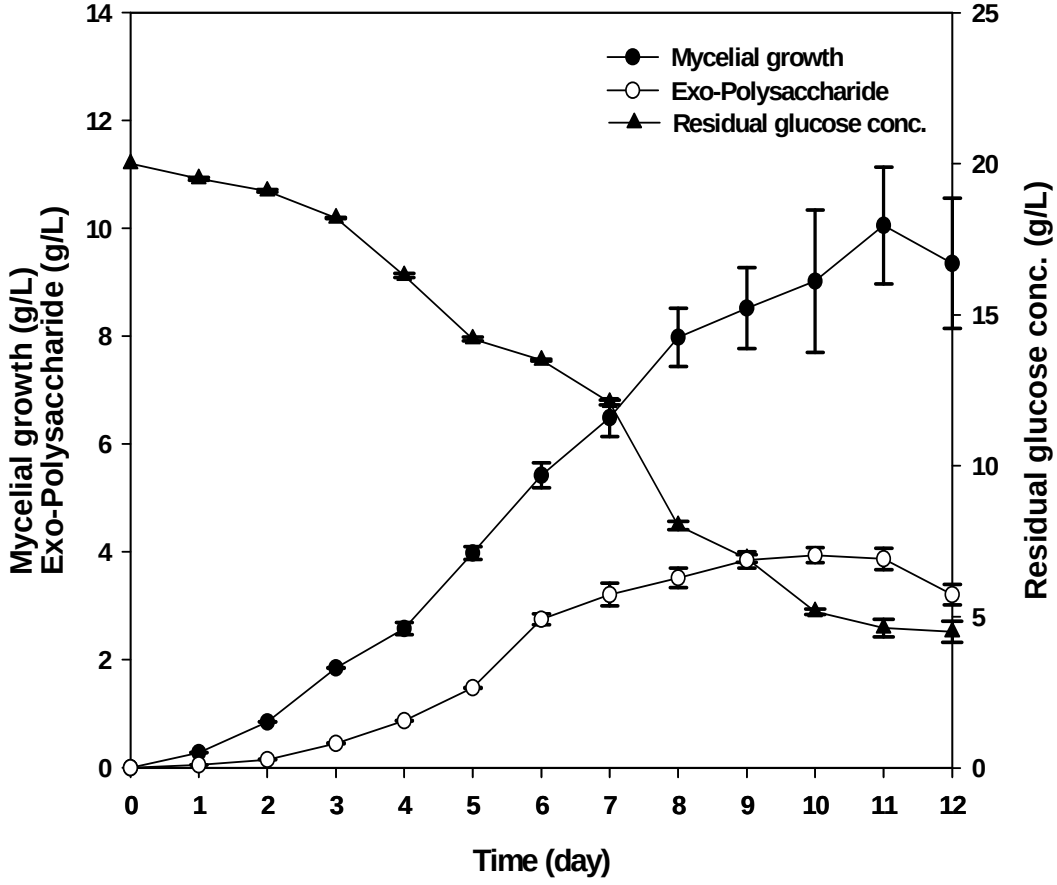


Fig. 16. Changes of *P. ferulae*, exo-polysaccharide, and glucose concentration with jar fermentation at 25℃, pH 6.5, 1.5 vvm, and 200 rpm.

III-2-9-4. 최적 배지하에서의 회분식 배양

플라스크 배양에서의 영양요구성 실험 결과 얻어진 최적 배지(glucose 5%, polypeptone 1%, yeast extract 0.8%, K_2HPO_4 0.12%, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.12%, w/v)를 이용하여 jar fermenter에서 12일간 배양을 실시하였고 배양조건은 온도 25℃, agitation speed 200 rpm, aeration rate 1.5 vvm, pH 6.5이었다. Fig. 17 은 잔존 glucose 농도, 균사생장, 세포외 다당류 생산의 time profile을 나타낸다. 최대 균사생장 및 세포외 다당류 생산은 배양 10일후에 각각 13.2 g/L와 4.95 g/L이었다. 아위버섯의 mycelial growth rate는 배양 4일째까지 급격하게 증가하였고 glucose 농도도 급격하게 감소하였으며 배양기간동안 50 g/L에서 23.8 g/L까지 감소하였다. 이러한 결과로 보아 세포외 다당류 생산은 균사생장과 더불어 증가하였으며 product formation은 균사생장과 밀접한 관계가 있음을 알 수 있었다.

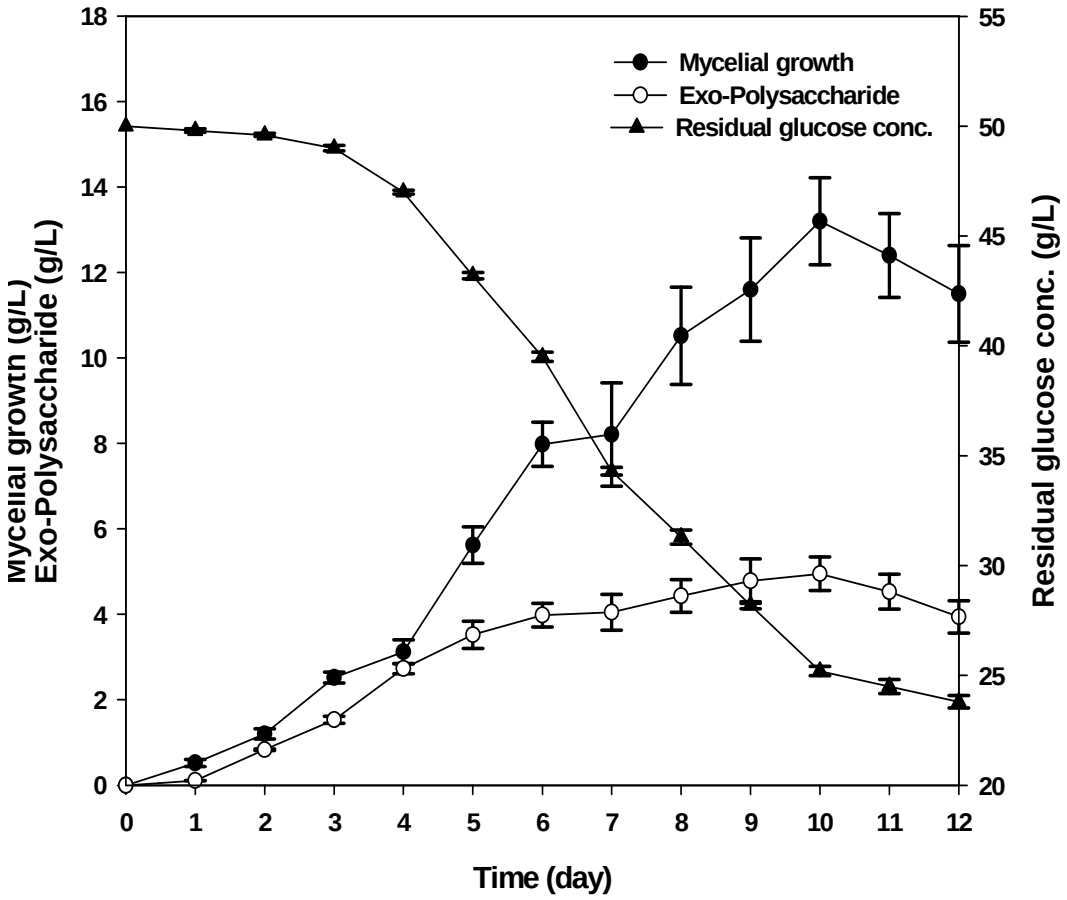


Fig. 17. Changes of *P. ferulae*, exo-polysaccharide, and glucose concentration with jar fermentation under optimal media composition (glucose 5%, polypeptone 1%, yeast extract 0.8%, K_2HPO_4 0.12% and $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.12%, w/v).

Ⅳ. 아위버섯 기능성 연구

Ⅳ-1. 재료 및 방법

Ⅳ-1-1. 추출물 제조

아위버섯의 균사체와 자실체분말을 각각 10 g를 계량하여 증류수 90 ml를 가하여 60분간 가열하여 4 ℃로 냉각 시킨 후 5000 xg로 10 분간 원심 분리하여 침전물을 제거한다.

상층액을 취하여 syringe filter(0.22 μm)를 통과시킨 후 항암성 및 면역계 작용물질 및 항산화 물질의 검색을 위한 열수 버섯추출물 시료로 이용하였다.

Ⅳ-1-2. 항암성 실험

항암 기능성물질은 암세포를 배양한 후 기능성물질을 첨가하여 배양함으로서 나타나는 배양 암세포에 대한 세포독성을 사립체 탈수소효소에 의해서 MTT가 formazan을 형성하는 반응원리에 의해서 formazan 형성량을 측정함으로서 검색하였다.

· 자궁암세포주 : HeLa cells

· 폐암세포주 : A549

각 세포주는 한국세포주 은행에서 분양받아 사용하였다.

자궁암세포와 폐암세포의 배양은 10% FBS, penicillin(100 U/ml), streptomycin(100 U/ml)및 nystatin(25 μg/ml)등을 함유한 RPMI1640 배지에서 CO_2 배양기로 37℃, 5% CO_2 조건에서 배양하였고, 3일마다 배양액을 교환해 주었으며 trypsin-EDTA을 이용하여 계대배양하였다.

배양한 각 암세포에 균사체 및 열수 추출물을 최종농도가 50, 100, 200, 400, 800배가 되게 배양액에 첨가하여 1일간 배양한 후 다시 같은 배양액을 교환하여 1일 더 배양한 후 생존 세포를 MTT법를 이용하여 측정하였다. MTT법은 시료가 처리된 배양세포에서 배양액을 제거하고 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromide(MTT)을 함유한 세포배양액을 첨가하여 4 시간동안 배양한 후 다시 배양액을 제거하고 HBSS로 3회 세척한 후 DMSO 200 μl을 첨가하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

Ⅳ-1-3. 면역계작용 실험

면역계 작용 기능성물질의 검색은 비장 임파구를 ConA에 의해서 자극하여 세포증식이 일어나는데, 면역계 작용물질에 의해서 임파구의 증식에 미치는 영향을 임파구 수를 MTT법에 의해서 측정하는 원리에 의해서 검색하였다.

· 실험동물 : ICR종 생쥐

· 비장세포 분리 : 생쥐를 ether로 마취한 후 희생시켜 전신을 70% 에

틸알콜로 소독한 후, 배를 절개하고 비장을 절제하여 냉각된 완충액(ion-free PBS)를 함유한 용기에 담고, 무균상태에서 비장을 유리판으로 잘게 부순다. 냉각된 저장액(0.8% ammonium chloride in 10 mM Tris-HCl, pH 7.4) 10 ml를 첨가하고 혼합하여 얼음에 3분간 세워놓는다. 4℃에서 1000 rpm으로 10분간 원심분리하여 상층액을 제거한 후, 냉각된 완충액(ion-free PBS) 10 ml를 첨가하고 혼합한다. 1000 rpm으로 10분간 원심분리를 시켜서 세포를 수집한다. 수집된 세포는 tryphan blue 염색하여 세포활성도(viability)검사를 하고, 세포수를 측정하였다.

· 비장세포 증식력 측정 : 수집된 비장세포는 10% fetal bovine serum, penicillin(100 U/ml), streptomycin(100 U/ml)및 nystatin(25 μg/ml) 등을 함유한 RPMI1640 배지에서 ConA와 버섯추출물을 첨가하여 2일간 배양한 후 MTT 법으로 세포수를 측정하였다.

수집된 비장세포를 세포배양액에 세포수가 $2x10^7$ 이 되게 세포배양액에 부유시킨 후, 세포배양용기(96 well plate, Nalgen)에 한 well에 비장세포($5x10^5$)를 첨가하고, ConA(50 μg/ml)과 버섯추출물(100-500배)를 첨가하여 2일간 배양한 후 MTT를 시행하였다.

Ⅳ-1-4. 항산화 실험

과산화수소에 의해서 막지질의 과산화가 유발되는데, 지질과산화 산물의 량을 TBA법으로 TBA 반응성물질의 량을 측정하여 감소량을 항산화

력으로 계산하여 검색하였다.

· 실험동물 : ICR 생쥐

· 실험방법 : 생쥐의 간을 절제하여 냉각된 5M sucrose를 함유한 50 mM 인산염완충액(pH 7,4)을 가하여 균질화 시킨 후 20,000 xg로 30분간 원심분리한 후 상층액을 취하여 다시 100,000 xg로 30분간 원심분리하여 침전물을 수집하였다. 침전물은 20배(w/v)의 50 mM 인산염완충액(pH 7,4)을 가하여 부유시킨 후 부유물 2 ml를 취하여 과산화수소를 2 mM이 되게 첨가하여 상온에서 30분간 방치한 후 TBA 시약 1.0 ㎖에 BHT을 최종농도가 0.01%가 되게 가하고 시료액 1.0 ㎖를 가하여 잘 혼합한 후 98 ℃로 15분간 가열하고 즉시 냉각시켜 1000 xg 로 15분간 원심분리하여 상층액을 취해 535 nm에서 흡광도를 측정하였다.

Ⅳ-2. 결과 및 고찰

Ⅳ-2-1. 항암성 기능

아위 버섯의 균사체 열수 추출물은 자궁암 세포주에서 50배 희석한 농도에서까지 세포독성이 나타났고, 폐암 세포주에 대해서는 100배 희석한 농도에서 독성이 나타났다. 아위 버섯의 자실체 열수 추출물은 자궁암 세포주에서 50배 희석한 농도에서까지 세포독성이 나타났고, 폐암 세포주에 대해서는 100배 희석한 농도에서 독성이 나타났다. 이상의 실험 결과 아위버섯 자실체 및 균사체 열수 추출물은 자궁암 세포보다 폐암 세포주에 대한 독성이 큰 것으로 나타나서 열수 추출물에 항암 기능성 물질이 함유되어있고 이의 기능성 검색에 MTT 법이 유용하게 이용될 수 있음을 보여 주고 있다(Fig. 18, 19).

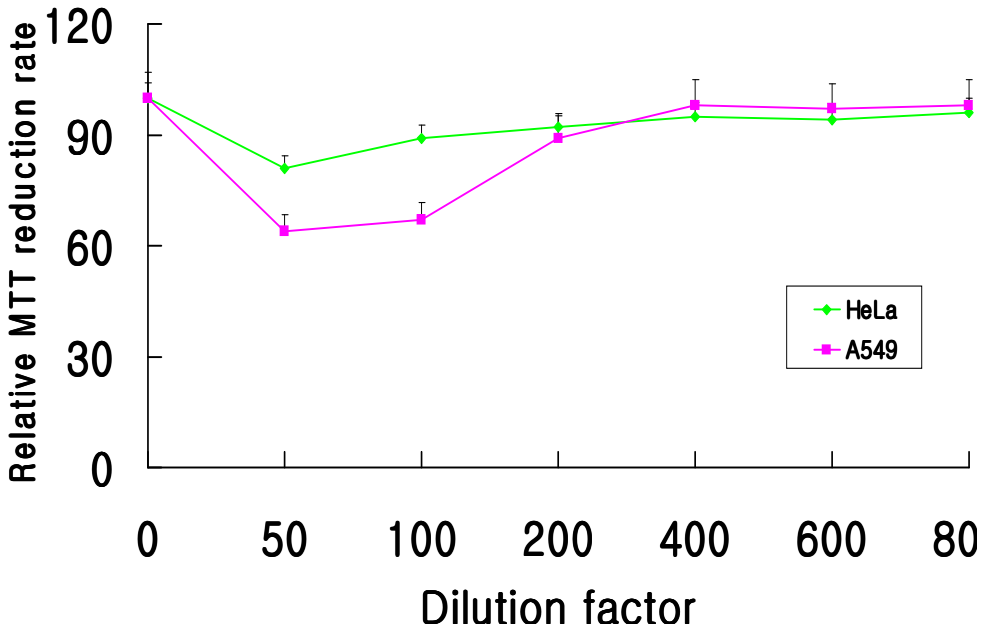


Fig. 18. Effects of water extracts of *P. ferulae* fruit body on cytotoxicity of cultured human cancer cells. The cells viability were measured by MTT reduction test. Values are mean±SD, n=5.

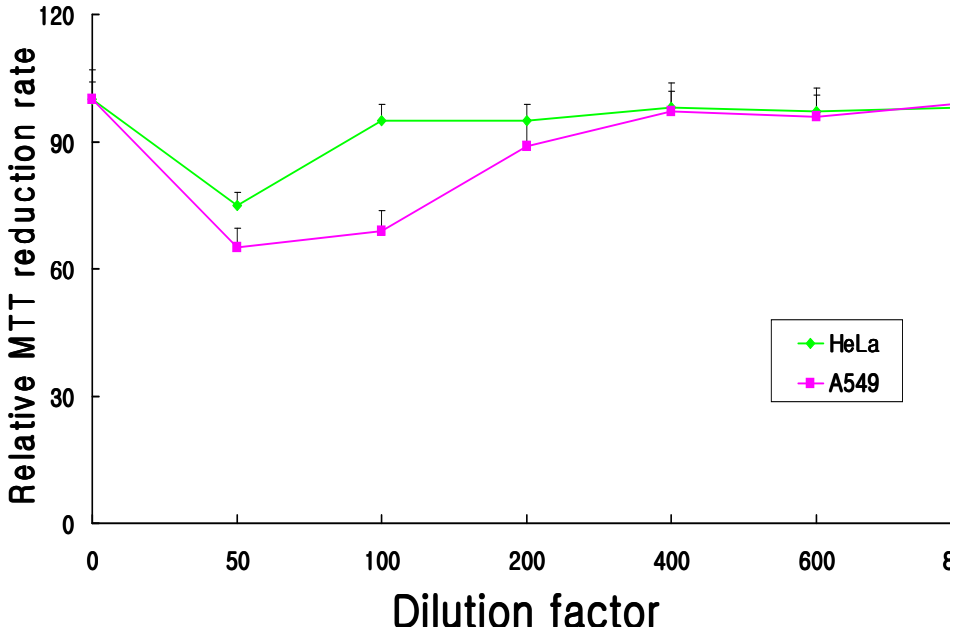


Fig. 19. Effects of water extracts of *P. ferulae* mycelium on cytotoxicity of cultured human cancer cells. The cells viability were measured by MTT reduction test. Values are mean±SD, n=5.

Ⅳ-2-2. 면역계작용 기능

아위 버섯 자실체 열수 추출물은 200 배 희석 농도에서까지 비장세포의 증식을 억제하였고, 균사체 추출물은 300 배 농도에서까지 비장세포의 증식을 억제하였다(Fig. 20, 21).

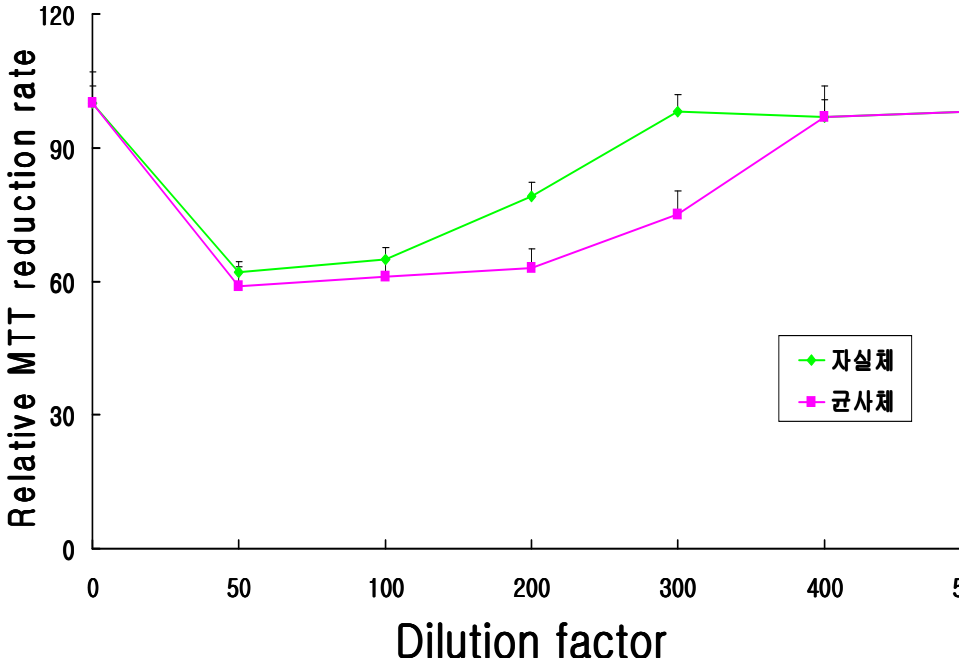
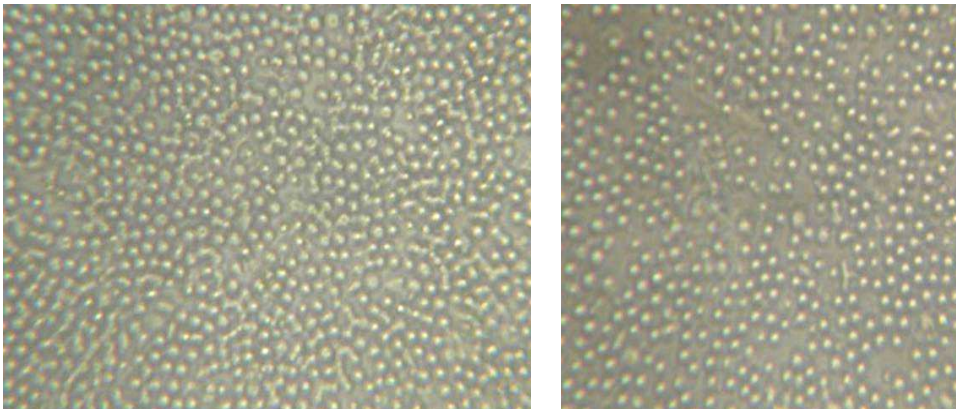


Fig. 20. Photograph of Con-A activated mouse splenocytes which treated with water extract of *P. ferulae* mycelium. Water extract of *P. ferulae* mycelium and Con-A were added to cell culture media and 2 days later mouse splenocytes were measured by MTT reduction test. Values are mean±SD, n=5.



Control

Ethanol extracts of *P. ferulae* fruit bodies (1 mg/ml)

Fig. 21. Photograph of Con-A activated mouse splenocytes which treated with ethanol extract of *P. ferulae* fruit bodies. Ethanol extract of *P. ferulae* fruit bodies and Con-A were added to cell culture media and 2 days later mouse splenocytes were photographed under inverted microscope.

Ⅳ-2-3. 항산화 기능

아위버섯의 자실체 열수 추출물은 200 배 농도까지, 균사체 열수 추출물은 400 배 농도에서까지 과산화수소에 의한 TBA반응성물질 생성량 억제효과가 나타났다(Fig. 22).

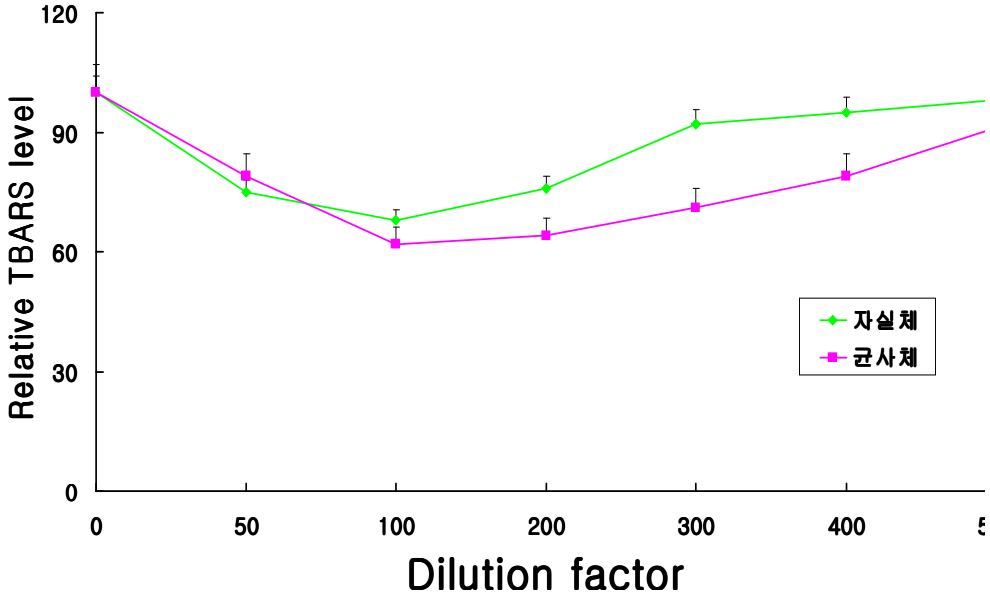


Fig. 22. The effect of complex abstracted from the *P. ferulae* on peroxidation of membrane lipid of mice. After separation of microsome, the abstract of the mushroom is diluted with 2mM of hydrogen peroxide and with a use of TBA, TBARS is measured and the result is expressed in the percentage. Mean standard deviation, number of population = 5.

Ⅴ. 결　론

아위버섯(*Pleurotus ferulae*)의 균사체 심부배양 특성 및 기능성에 대하여 조사하였다.

국내외에서 수집된 아위버섯 4균주(F-1, F-2, F-3, F-4)를 공시하여 우량 균주를 선발한 결과 균사생장이 빠르고 균사밀도가 좋은 F-2 균주를 선발하였다.

선발된 아위버섯균은 MYPA배지에서 균사생장이 가장 좋았으며, 25℃에서 균사생육이 가장 양호하여 최적 배양온도는 25℃임을 알 수 있었고 균사배양 최적 산도는 pH 6.5 이었다.

flask culture에서의 최적 배양부피는 300 mL flask에서 50 mL이었고, shaking speed는 150 rpm으로 나타났다. 아위버섯 균사체의 균사생장과 세포외 다당류 생산을 위한 최적 접종원의 조건을 조사한 결과, 최적 접종원의 배양일수와 접종량은 7일간 배양한 접종원을 5%(w/v)로 접종 시 가장 효과적인 것으로 나타났다.

영양 요구성 인자는 미생물 및 유효성분을 함유한 물질의 생산을 위한 선행조건 중의 하나이다. 그러나 아위버섯 균사체의 균사생장과 세포외 다당류 생산을 위한 영양 요구성 인자에 대한 연구는 매우 부족한 실정이어서 균사생장과 세포외 다당류 생산을 위한 영양 요구성 인자를 조사하기 위하여 회분식 배양을 실시하였다. 그 결과 최적 배지 조성은 탄소원으로는 glucose 5 %(w/v), 질소원으로는 polypeptone 1.0%(w/v)과 yeast

extract 0.8%(w/v)이었다.

5 L jar fermintation에서 최적 교반속도와 통기량은 각각 200 rpm과 1.5 vvm으로 조사되었다. 플라스크 배양에서 고안된 최적 배지 조성을 가지고 배양온도 25℃, pH 6.5, 교반속도 200 rpm 그리고 통기량 1.5 vvm에서 12일간 회분식 배양을 실시한 결과 배양시간 10일 경에 최대 균사 생장 10.01 g/L, 세포외 다당류 생산은 3.94 g/L의 생산수율을 보였으며, 아위버섯 균사체의 세포의 다당류 생산은 균사생장과 밀접한 관계가 있었으며 이는 증식 연동형임을 알 수 있었다.

아위버섯 자실체 및 균사체 열수 추출물은 자궁암 세포보다 폐암 세포주에 대한 독성이 큰 것으로 나타나서 열수 추출물에 항암 기능성 물질이 함유되어있고 이의 기능성 검색에 MTT 법이 유용하게 이용될 수 있음을 알 수 있었다.

아위 버섯 자실체 열수 추출물은 200 배 희석 농도에서까지 비장세포의 증식을 억제하였고, 균사체 추출물은 300 배 농도에서까지 비장세포의 증식을 억제하였다.

아위버섯의 자실체 열수 추출물은 200 배 농도까지, 균사체 열수 추출물은 400 배 농도에서까지 과산화수소에 의한 TBA반응성물질 생성량 억제효과가 나타났다.

그러나 본 연구에서 얻어진 결과는 아위버섯으로부터 균사생장과 세포외 다당류의 생산을 위한 효율적인 공정의 개발에 있어서 불충분한 점이

있다. 따라서 대규모의 균사체 및 세포외 다당류 생산을 위해서는 아위버섯 균사체로부터 생산되는 세포외 다당류의 특성, 배양조건의 최적화, 적절한 반응기의 구성 및 고안 등의 많은 연구가 필요한 것으로 사료된다. 또한, 아위버섯 추출물은 폐암세포에 독성이 크고, 자궁암 및 폐암 세포에 대한 세포독성을 현저히 증가시키는 작용이 있는 것으로 나타났다. 아위버섯이 식용버섯이기 때문에 추출물의 독성도 적을 것으로 생각되므로, 아위버섯 추출물은 항암 화학요법제의 항암작용을 증가시키는 제제로 바로 활용될 수 있을 것으로 생각되며, 보다 과학적이고 체계적인 연구를 위해서는 아위버섯 추출물의 유효물질을 분리, 정제하여 그 작용기전을 규명하고 독성연구를 통한 안정성을 확보하여야 할 것으로 사료된다.

참 고 문 헌

1. Nanba, H. and Kumoda, H., Potention of host-modiated antitutmor activity by orally administered mushroom(*Agaricus bisporous)* fruit bodies, *Chem. Pharm. Bull.*, 36(4), 1437 - 1444(1998).
2. Buswell, J. A. and Chang, S. T., Edible mushrooms : attributes and applications, In : Chang, S. T., Buswell, J. A. and Miles, P. G., (eds) Genetics and breeding of edible mushrooms, Gordong and Breach, Y-parc, Switzerland, 297-324(1993).
3. Rajarathnam, S., Shashireka, M. N. and Bano, Z., Biopotentialities of the Basidiomycetes, *Adv. Appl. Microbiol.*, 64, 1088-1117(1993).
4. Lee, J. H., *J. Microbiol Bitechnol.*, 20(3), 14-21(1994).
5. Kim, D. H., Yang, B. K., Jeong, S. C., Park, J. B., Cho, S. P., Das, S., Yun, J. W. and Song, C. H., Production of a hypoglycemic, extracellular polysaccharide from the submerged culture of the mushroom, *Phellinus linteus*, *Biotechnol. Lett.,* 23, 513-517(2001).
6. Chihara, G., Hamuno, T., Maeda, Y., Arai, Y. and Fukuoka, F., Fractionation and purification of the polysaccharides with marked antitumor activity, especially lentinan, from *Lentinus edodes* (Berk.) sing., an edible mushroom, *Cancer Res.,* 30, 2776-2781(1970).
7. Tabata, K., Itoh, W., Kojiama, T., Kawabate, S. and Maisaki, K.,

Ultrasonic degradation of Schizophyllam, an antitumor polysaccharide produced by *Schizophyllum commune* FRIES., *Carbohydr. Res.,* 89, 121-135(1981).

8. Ng, T. B., A review of research on the protein-bound polysaccharide (polysaccharopeptide, PSP) from the mushroom *Coriolus versicolor* (Basidiomycetes: Polyporaceae), *Gen. Pharm.,* 30, 1-4(1998).
9. Chen, A. W. and Miles, P. G., Cultivation of *Ganoderma bonsai*, In : Royse, D. J., (ed) Mushroom biology and mushroom products, *Proc. 2nd Int. Conf.*, University Park, Pa. Penn. State University Press, pp. 325-333(1996).
10. Angeli-Papa, J. and Eyme, J., Ultrastructural changes during development of *Agaricus bisporus* and *Agaricus sylvicola*. In : Chang, S. T. and Hayes, W. A., (eds) The biology and cultivation of edible mushrooms, Academic Press, New York, pp. 53-82(1978).
11. Kues, U., Life history and developmental processes in the Basidiomycetes *Coprinus cinereus*, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 64, 316-353(2000).
12. Scrase, R. J. and Eliott, T. J., Biology and technology of mushroom culture, In : Wood, B. J. B., (eds) Microbiology of fermented food, Vol 2, 2nd edn. Blackie, London, pp. 543-584(1998).
13. Chang, S. T. and Miles, P. G., Edible mushrooms and their cultivations, CRC Press Inc., Boca Raton, Florida(1989).

14. Stametes, P. and Chilton, J. S., The mushroom cultivator, Agarikon Press, Olympia, Washington(1983).
15. Chang S. T., *Int J. Med Mushroom*, 1, 1-7(1999).
16. Chang S. T., *Mushroom J. Trop.,* 11, 45-52(1991).
17. Wasser S. P., Weis A. L., *Int J. Med Mushroom*, 1, 351-370(1999).
18. Zadrazil F., Academic Press, New York, 521-524(1978).
19. Mau J. L., Lin Y. P., Chen P. T., Wu Y. H. and J. T. Peng, *J. Agric Food Chem.*, 46, 4587-4591(1998).
20. Wood D. A., and J. F. Smith, Wiley, New York, 309-343(1987).
21. Silanikove N. and D. Levanon, *J. Sci Food Agric.*, 38, 117-124(1987).
22. Silaikove N., Danai O. and D. Levanon, *Biol Wastes*, 25, 219-226(1988).
23. Hadar Y. and E. Cohen-Arazi, *Appl Environ Microbiol*, 51, 1352-1354(1986).
24. Fischer K. H. and W. Grosch, *Lebensm Wiss Technol*, 20, 233-236(1987).
25. Hadar Y. and C. G. Dosoretz, *Trends Food Sci Technol September*, 214-218(1991).
26. Belinky P. A., Masaphy S., Levanon D., Hadar Y. and C. G. dosoretz, *Appl Microbiol Biotechnol*, 40, 629-633(1994).
27. Assaf S., Hadar Y. and C. G. dosoretz, *J. Agric Food Chem*, 43, 2173-2178(1995).

28. Fitzpatrick, W. G., Esselen, W. G. and Weir, E., *J. Am. diet. Assoc.*, 22, 318 (1946).
29. Mousstafa, A. M., *Appl. Microbiol.*, 8, 62 (1960).
30. Falanghe, H., *Appl. Microbiol.*, 12, 330 (1964).
31. Humfeld, H., *Agr.* Yearbook, 242 (1950-1951).
32. Reusser, G., Spencer, G. T. and Sallans, A. R., *Appl. Microbiol.*, 6, 15 (1958).
33. Martin, A. M., Can. *J. Microbiol.*, 29, 108 (1983).
34. Martin, A. M. and Bailey, V. I., Can. Inst. *Food Sci. Technol.*, 18, 185 (1985).
35. Robins, W. J., Prog. Natl. *Acad. Sci.*, 33, 171 (1947).
36. Anchel, M., J. Am. *Chen. Soc.*, 74 (1558), 2943 (1952).
37. Lucas et at., *antibiotics Ann.*, 493 (1958-1959).
38. Roland, J. Fl, *Science*, 132, 1897 (1960).
39. Petterson, G., Cowling, E. B. and Porath, J., *J. Biochem. Biophys. Acta.*, 67, 1 (1963).
40. Falanghe, J., *Arch. biochem. Biophys.*, 96, 456 (1962).
41. Pan. S. C. and Frazier, W. R., *biotech. bioeng.*, 4, 303 (1963).
42. 박용환, 최신 버섯학, 한국버섯원균영농조합, pp. 270-271 (1997).
43. Bailey, J. E. and Ollis, D. F., Biochemical Engineering Fundamentals, pp. 368, McGraw-Hill Book Co., N.Y. (1977).
44. Lee, S. Y. and Kang, T. S., Production conditions and characterization of the exo-polymer produced by submerged cultivation of *Ganoderma lucidum*, *Kr. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.,* 24, 111-118(1996).

45. Kidd, P. M., The use of mushroom glucans and proteoglycans in cancer therapy, *Alternative Medicine Review,* 5, 4-27(2000).
46. Mizuno, T., The extraction and development of antitumor-activity polysaccharides from medicinal mushrooms in Japan, *Int. J. Med. Mushrooms,* 1, 9-29(1999).
47. Chang S. T. and P. G. Miles, CRC Press, Boca Raton(1989).
48. Wasser S. P. and A. L. Weis, *Crit Rev Immunol*, 19, 65-96(1999a).
49. Gunde-Cimerman N., *Int J. Med Mushroom*, 1, 69-80(1999).
50. K□es U. and Y. Liu, Appl Microbiol Biotechnol, 54, 141-152(2000).
51. Bianco Coletlo, M. A., Basidiomiceti in relazione all antibiosi. Nota Ⅱ. Attivita' antibiotica dei miceli e dei liquidi di coltura, *J. Batteriol. Virol. Immunol.,* 74, 267-274(1981).
52. Wang, W. S. and Wang, D. H., Enhancement of the resistance of tilapia and grass carp to experimental *Aeromontas hydrophila* and *Edwardsiella trada* infections by several polysaccharides, *Comp. Immunol. Microbiol. Infect Dis.,* 20, 261-270(1997).
53. Karacsonyi, S. and Kuniak, L, Polysaccharides of *Pleurotus ostreatus* : isolation and structure of pleuran, an alkali-insoluble beta-D-glucan., *Carbohydr. Polym.,* 24, 107-111(1994).
54. Noda, S., Antibiotic fungicide extracted from Basidiomycetes

culture (e.g. Shitake, *Flammulina velutips*, *Polyporus*, *Pleurotus*, etc.)., Jpn. Patent JP. 60190800, JP. 8445268(1998).

55. Noda, S., Preparation of an antiviral agent by deep culture Basidiomycetes, Jpn. Patent JP 60054324, JP 83162084(1998).

56. Zhang, L., Fei, S. and Zhang, Y., The influence of chemical modification on antiviral (CBS) activity of polysaccharide from *Pleurotu citrinopileatus*., Sheng Wu Hua Hsueh Zazhi, 10, 150-154(1994).

57. Zhang, L., Zhang, Y., Fei, S. and Liang, Z., The influence of sulfation on the conformation and biological activity of polysaccharide from *Pleurotus citrinopileatus*, Sheng Wu Hua Hsueh Yu Sheng Wu Wu Li Hsueh Pao, 26, 417-421(1994).

58. Wang, H. and Ng, T. B., Isolation of a novel ubiquitin-like protein from *Pleurotus ostereaus* mushroom with anti-human immuno-deficiency virus, translation-inhibitory and ribonuclease activities, *Biochem. Biophys. Res. Commun.,* 276, 587-593(2000).

59. Paulik, S., Svrcek, S., Huska, M., Moizisov, J., Duroves, A. and Benishek, Z., The effect of fungal and yeast glucan and levamisole on the level of the cellular immune response in vivo and leukocyte phagocytic activity in mice, *Vet. Med.,* 37, 675-685(1992).

60. Paulik, S., Svreck, S., Mojzisova, J., Durove, A., Benishek, Z.

and Huska, M., The immunomodulatory effect of the soluble fungal glucan (*Pleurotus ostreatus*) on delayed hypersensitivity and phagocytic ability of blood leukocytes in mice, *Zentrabl Vecterinaermed Reihe* B., 43, 129-135(1996).

61. Li, H., Zhang, L., Dong, L. and Cao, J., Preparation and immunologic competence of glycopeptides components from *Pleurotus ostreatus* fungi, Shandong Yike Daxue Hsuch Pao, 32, 343-346(1994).
62. Zusman, I., Reifen, R., Livni, O., Sminoff, P., Gukevich, P., Sandler, B., Nyska, A., Gal, R., Tendler, Y. and Madar, Z., Role of apoptosis, proliferating cell nuclear antigen and p53 protein in chemically induced colon cancer in rats fed corncob fiber treated with the fungus *Pleurotus ostreatus*, *Anticancer Res.,* 17, 2105-2113(1997).
63. Hidaka, H. and Ikegawa, T., Anti-cancer agents from edible mushrooms, Jpn. Patent JP48006766, B4 730228 showa(1998).
64. Suzuki, W. and Ikegawa, T., Anti-cancer substance emitanin, Jpn. Patent JP 53006494, 780120 showa(1998).
65. Bobek, P. and Galbavy, S., Effect of pleuran (beta-glucan from *Pleurotus ostreatus*) on the antioxidant status of the organism and on dimethylhydrazine-induced precancerous lesions in rat colon, *Br. J. Biomed. Sci.,* 58, 164-168(2001).
66. Bobek, P., Galbavy, S. and Ozdin, L., Effect of oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*) on pathological changes in

dimethylhydrazine- induced rat colon cancer, *Oncol. Rep.,* 5, 727-730(1998).

67. Noda, S., A preparation for kindey treatment possessing antiflammatory activity, obtained from Basidiomycetes, e.g. *Lentinus*, *Pleurotus*, *Flammulina*, and *Tricholoma*, Jpn Patent JP 61171428, JP 8511888(1998).

68. Gunde-Cimerman, N. and Cimerman, A., *Pleurotus* fruiting bodies contain the inhibitor of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase-lovastin, *Exp. Mycol.*, 19, 1-6(1995).

69. Opletal, L., Jahodar, L., Chabot, V., Zdansky, P., Lukes, J., Bratova, M., Solichova, D., Blunden, G., Dacke, C. G. and Patel, A., Evidence for the anti-hyperlipidaemic activity of the edible fungus *Pleurotus ostreatus*, *Br. Biomed. Sci.,* 54, 240-243(1997).

70. Krasnopolskaya, L. M., Makeeva, A. P., Lvova, N. A., Abramova, E. A. and Kodjima, E. V., Macromycetes - new producers of inhibitor of cholesterol biosynthesis lovastatin. In : *Proc. 6th Int. Mycol. Congr. IMC*, Jerusalem, p. 165(1998).

71. Bobek, P., Ozdin, L. and Kunial, I., Antioxidative effect of oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*) in hypocholesterolemic rat, *Pharmazie.,* 50, 441-442(1995).

72. Bobek, P., Ozdin, L. and Galbavy, S., Dose- and time-dependent hypocholesterolemic effect of oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*) in rats, *Nutrition,* 14,

282-286(1998).

73. Oguri, S., Ando, A. and Nagata, Y., A novel developmental stage specific lectin of the Basidiomycete *Pleurotus cornucopiae*, *J. Bacteriol.*, 178, 5692-5698(1996).

74. Gervais, P., Bensoussan, M. and Grajek, W., Water activity and water content : comparative effect on the growth of *Penicillium roquefortii* on a solid substance, *Appl. Microbiol. Biotechnol.,* 27, 389-392(1988).

75. Miller, G. L., Use of di-nitrosalicyclic acid reagent for determination of reducing sugar, *Anal. Chem.,* 35, 317-325(1959).

76. Zadrazil, F., The ecology and industrial production of *Pleurotus ostreatus*, *Pleurotus florida*, *Pleurotus cormucopiae* and *Pleurotus eryngii*, *Mushroom Sci.*, 9, 621-655 (1974).

77. Chang, H. Y., Cha, D. Y., Kang, A. S., Hong, I. P., King, K. P., Seok, S. J., Ryu, Y. J. and Sung, J. M., Cultural Characteristics of *Fomitella fraxinea* (Fr.) Imaz, *Kor. J. Mycol.*, 23, 238-245 (1995).

78. Kim, H. K., Park, J. S., Cha, D. Y., Kim, Y. S. and Moon, B. J., Study on the artificial cultivation of *Lentinus lepideus* (Fr. ex. Fr.), *Kor. J. Mycol.*, 22, 145-152 (1994).

79. Kang, A. S., Cha, D. Y., Hong, I. P., Chang, H. Y. and Yu, S. H., Studies of cultural condition on the mycelial vegetative growth in *Naematoloma sublateritium* (Fr.) Karst, *Kor. J. Mycol.,* 22, 153-159(1994).

80. Jung, I. C., Kim, S. H., Kwon, Y. I., Kim, S. Y., Lee, J. S., Park, S., Park, K. S. and Lee, J. S., Cultural condition for the mycelial growth of *Phellinus igniarius* on chemically defined medium and grains, *Kor. J. Mycol.*, 25, 133-142(1997).

81. Hong, J. S., Choi, Y. H. and Yun, S. E., Studies on the celluloytic enzymes produced by *Ganoderma lucidum* in synthetic media, *Kor. J. Mycol.,* 14, 121-130(1986).

82. Kim, H. K., Park, J. S., Cha, D. Y., Kim, Y. S. and Moon, B. J., Study on the artificial cultivation of *Lentinus lepideus* (Fr. ex Fr.) Fr.(I) -Investigation of mycelial growth conditions-, *Kor. J. Mycol.*, 22, 145-152(1994).

83. Chang, H. Y., Cha, D. Y., Kang, A. S., Hong, I. P., Kim, K. P., Seok, S. J., Ryu, Y. J. and Sung, J. M., Cultural characteristics of *Fomitella fraxinea* (Fr.) Imaz, *Kor. J. Mycol.*, 23, 238-245(1995).

84. Hashimoto, K. and Takahashi, Z., Studies on the growth of *Pleurotus ostreatus, Mush. Sci.*, IX, 585-593(1974).

85. Hong, J. S., Lee, K. S. and Choi, D. S., Studies on Basidiomycetes(1) on the mycelial growth of *Agaricus bitorguis* and *Pleurotus ostreatus, Kor. J. Mycol.*, 9, 19-24(1981).

86. Hong, I. P. and Lee, M. W., Studies on the cultural characteristics of *Poria cocos, Kor. J. Mycol.*, 18, 42-49(1990).

87. Chi, J. H., Ha, T. M., Kim, Y. H. and Rho, Y. D., Studies on

the main factors affecting the mycelial growth of *Phellinus linteus, Kor. J. Mycol.,* 24, 214-222(1996).

88. Kim. H. K., Cheong, J. C., Chang. H. Y., Kim, G. P., Cha, D. Y. and Moon. B. J., The artificial cultivation of *Pleurotus eryngii* (Ⅰ) -Investigation of Mycelial growth conditions-, *Kor. J. Mycol.*, 25, 305-310(1997).
89. Wol-port, F. S., Studies on the physiology of fungi. XⅦ. The growth of certain wood-destroying fungi in relation to the H-ion concentration of the media, *Ann. Misouri Bot. Garden*, 11-97(1924).
90. Ishikawa, H., Physiological and ecological studies on *Lentinus edodes*(Berk), *Sing. J. Agric. Lab.*, 8, 1-53(1967).
91. Kanayama, H., Adachi, N. and Togami, M., A new antitumor polysaccharide from the mycelia of *Poria cocos, Wolf. Chem. Pharm. Bull.*, 31, 1115-1118(1983).
92. Park, K. S., Park, S., Jung, I. C., Ha, H. C., Kim, S. H. and Lee, J. S., Production of protein-bound polysaccharides by solid state fermentation of *Coriolus versicolor*, *Kr. J. Mycol.,* 22, 184-189(1994).
93. Mikio, K., Keiichi, H., Shinichiro, S., Koujirou, M. and Kazumitsu, N., Application of bubble column fermentors to submerged culture of *Schizophyllum commure* for production L-malic acid, *J. Ferment. Bioeng.,* 84, 333-336(1997).
94. Garraway, M. O. and Evans, R. C., Nutrition as a basis for the study of fungi, John wiley and Sons, New York, pp.

71-221(1991).

95. Chen, W. C. and Liu, C. H., Production of β-fructofuranosidase by *Aspergillus juponicus*, *Enzyme Microbiol. Technol.,* 18, 153-160(1996).

감사의 글

부족함이 너무나 많은 이 작은 결실이 완성되기까지 학문적 지도는 물론 깊은 관심과 보살핌으로 지도하여 주신 차월석 교수님께 존경과 감사를 드립니다.
그리고 바쁘신 중에도 이 논문을 심사하고 지도하여 주신 신성의 교수님, 조병욱 교수님, 김선일 교수님, 권규혁 교수님, 송연호 교수님, 홍완해 교수님, 김정규 교수님, 이중헌 교수님께도 감사드립니다.

지난 가을부터 지금까지 실험, 논문작성, 발표 등 각종 도움을 주신 실험실의 정길록 선배님을 비롯한 실험실 학우 여러분과 항상 격려해 주신 이연탁 선배님, 남형근 박사님, 김현우, 신희준 에게도 고마움을 전합니다.

끝으로 오늘이 있기까지 어려운 여건 속에서도 용기를 주고 힘들어 할 때 항상 함께 해 주신 부모님, 할머니, 명희, 사현이와도 함께 이 작은 결실의 기쁨을 나누고자 합니다.

2007년 12월

임 환 희

저작물 이용 허락서

학 과	화학공학	학 번	20057101	과 정	석사
성 명	한글: 임환희 한문 : 林 煥 熙 영문 : Hwan-Hee Lim				
주 소	광주광역시 북구 두암3동 940번지 대주빌라 2-302				
연락처	E-MAIL : sky_hwanhee@hanmail.net				
논문제목	한글 : 아위버섯 균사체 심부배양 특성 및 기능성 연구 영문 : Submerged Culture Characterization of Mycelium and Functional Searching of Pleurotus ferulae				

본인이 저작한 위의 저작물에 대하여 다음과 같은 조건아래 조선대학교가 저작물을 이용할 수 있도록 허락하고 동의합니다.

- 다 음 -

1. 저작물의 DB구축 및 인터넷을 포함한 정보통신망에의 공개를 위한 저작물의 복제, 기억장치에의 저장, 전송 등을 허락함
2. 위의 목적을 위하여 필요한 범위 내에서의 편집·형식상의 변경을 허락함. 다만, 저작물의 내용변경은 금지함.
3. 배포·전송된 저작물의 영리적 목적을 위한 복제, 저장, 전송 등은 금지함.
4. 저작물에 대한 이용기간은 5년으로 하고, 기간종료 3개월 이내에 별도의 의사표시가 없을 경우에는 저작물의 이용기간을 계속 연장함.
5. 해당 저작물의 저작권을 타인에게 양도하거나 또는 출판을 허락을 하였을 경우에는 1개월 이내에 대학에 이를 통보함.
6. 조선대학교는 저작물의 이용허락 이후 해당 저작물로 인하여 발생하는 타인에 의한 권리 침해에 대하여 일체의 법적 책임을 지지 않음
7. 소속대학의 협정기관에 저작물의 제공 및 인터넷 등 정보통신망을 이용한 저작물의 전송·출력을 허락함.

2008 년 2 월 일

저작자: 임 환 희 (인)

조선대학교 총장 귀하