[UCI]I804:24011-200000237579

2009年 2月

博士學位論文

백영고 버섯의 최적 배양 및 생물활성에 관한 연구

朝 鮮 大 學 校 大 學 院

化 學 工 學 科

南 亨 根

백영고 버섯의 최적 배양 및 생물활성에 관한 연구

A Study on the Optimal Culture and Biological Activities of Pleurotus nebrodensis Inzenga

2009 年 *2* 月 *25* 日

朝 鮮 大 學 校 大 學 院

化 學 工 學 科

南 亨 根

백영고 버섯의 최적 배양 및 생물활성에 관한 연구

指導敎授 車 月 石

이 論文을 工學博士學位 申請 論文으로 提出함.

2008 年 *10* 月 日

朝 鮮 大 學 校 大 學 院

化 學 工 學 科

南 亨 根

南亨根의 博士學位論文을 認准함

委員長	서울大學校	敎授	劉 永 濟	印
委　員	全南大學校	敎授	朴 暾 熙	印
委　員	朝鮮大學校	敎授	權 圭 赫	印
委　員	朝鮮大學校	敎授	金 瑄 日	印
委　員	朝鮮大學校	敎授	車 月 石	印

*2008*年 *12* 月　　日

朝 鮮 大 學 校　大 學 院

목 차

List of Tables ····· iv
List of Figures ····· v
Abstract ····· xi

제 *I* 장. 서론 ····· 1

I-1. 배경 ····· 1
I-2. 느타리속(*Pleurotus* spp) 버섯의 생산 ····· 5
I-3. 느타리속 (*Pleurotus* spp)의 약리적 특징 ····· 8

제 *II* 장. *Flask* 액체 배양
····· 16
II-1. 연구 배경 ····· 16
II-2. 재료 및 방법 ····· 18
II-3. 결과 및 고찰 ····· 23
II-3-1. 온도 영향 ····· 23
II-3-2. 배양시간 및 접종량 영향 ····· 25
II-3-3. pH 영향 ····· 27
II-3-4. Surface aeration 영향 ····· 29
II-3-5. Shaking speed 영향 ····· 31
II-3-6. 탄소원 영향 ····· 33
II-3-7. 질소원 영향 ····· 37
II-3-8. 무기염류 영향 ····· 42

II-4. 결 론 ····· 47

제 *III* 장. *Jar fermentor* 및 *Air bubble bioreactor* 액체 배양 ····· 48

III-1. 연구 배경 ····· 48
III-2. 재료 및 방법 ····· 50
III-3. 결과 및 고찰 ····· 53
III-3-1. Jar fermentor의 agitation speed 영향 ····· 53
III-3-2. Jar fermentor의 aeration 영향 ····· 55
III-3-3. Jar fermentor에서 최적배양 ····· 57
III-3-4. Air bubble bioreactor의 aeration 영향 ····· 60
III-3-4. Air bubble bioreactor에서 최적배양 ····· 62
III-4. 결 론 ····· 64

제 *IV* 장. 생물활성에 관한 연구 ····· 66

IV-1. 연구 배경 ····· 66
IV-2. 재료 및 방법 ····· 69
IV-3. 결과 및 고찰 ····· 85
IV-3-1. 백영고 버섯 추출물의 미네랄, 아미노산 및 비타민 함량 ····· 85
IV-3-2. *In vitro*에서 백영고 버섯 추출물의 항산화 효과 ····· 90
IV-3-3. *In vivo*에서 백영고 버섯 추출물의 항산화 효과 ····· 95
IV-3-4. 백영고 버섯 추출물의 항암효과 ····· 102
IV-3-5. 백영고 버섯 추출물의 아질산 제거효과 ····· 124
IV-4. 결론 ····· 131

제 *V* 장. 종합결론 및 제언
..... 133
참고문헌 136

List of Tables

Table 1-1. Medicinal effects of *P. nebrodensis* Inzenga ····· 11

Table 1-2. The effect of polysaccharides extracted from anti-tumor against "Sarcoma 180" solid cancer ····· 12

Table 2-1. Effects of carbon sources on *P. nebrodensis* Inzenga mycelial growth and exo-polysaccharide production with flask culture ····· 35

Table 2-2. Effects of nitrogen sources on *P. nebrodensis* Inzenga mycelial growth and exo-polysaccharide production with flask culture ····· 39

Table 2-3. Effects of mineral sources on *P. nebrodensis* Inzenga mycelial growth and exo-polysaccharide production with flask culture ····· 44

Table 4-1. Operating conditions for the analysis of amino acid by HPLC ····· 71

Table 4-2. Experimental design for in vivo test for 2 weeks ····· 76

Table 4-3. Mineral contents of *P. nebrodensis* Inzenga ····· 87

Table 4-4. Contents of free amino acids and total amino acids in *P. nebrodensis* Inzenga ····· 88

Table 4-5. Vitamin contents of *P. nebrodensis* Inzenga ····· 89

Table 4-6. Summary of cytotoxic effect of *P. nebrodensis* Inzenga extract using hot water and methanol ····· 123

List of Figures

Fig. 1-1. *P. nebrodensis* Inzenga (fruiting body) ····· 4

Fig. 1-2. Possible immune mechanism : β-D-glucan biological response modifier (BRM) ····· 13

Fig. 1-3. Primary molecular diagram of mushroom β-D-glucan ····· 14

Fig. 1-4. Molecular model of the right-handed triple spiral helix of antitumor active beta-D-glucan ····· 15

Fig. 2-1. Experimental procedure in this study ····· 22

Fig. 2-2. Effect of temperature on the mycelial growth of *P. nebrodensis* Inzenga on YMGA medium ····· 24

Fig. 2-3. Effects of inoculum age and inoculum volume on *P. nebrodensis* Inzenga mycelial growth and exo-polysaccharide production for 5 days ····· 26

Fig. 2-4. Effect of initial pH on *P. nebrodensis* Inzenga mycelial growth and exo-polysaccharide production ····· 28

Fig. 2-5. Effect of surface aeration on *P. nebrodensis* Inzenga mycelial growth and exo-polysaccharide production with flask culture ····· 30

Fig. 2-6. Effect of shaking speed on *P. nebrodensis* Inzenga mycelial growth and exo-polysaccharide production with flask culture at 25℃ ····· 32

Fig. 2-7. Effect of glucose concentration on *P. nebrodensis* Inzenga mycelial growth and exo-polysaccharide production with flask

culture ····· 36

Fig. 2-8. Effect of polypeptone concentration on *P. nebrodensis* Inzenga mycelial growth and exo-polysaccharide production with flask culture ····· 40

Fig. 2-9. Effect of yeast extract concentration on *P. nebrodensis* Inzenga mycelial growth and exo-polysaccharide production with flask culture containing polypetone ····· 41

Fig. 2-10. Effect of K_2HPO_4 concentration on *P. nebrodensis* Inzenga mycelial growth and exo-polysaccharide production with flask culture ····· 45

Fig.2-11. Effect of $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ concentration on *P. nebrodensis* Inzenga mycelial growth and exo-polysaccharide production with flask culture ····· 46

Fig. 3-1. Effect of agitation speed on *P. nebrodensis* Inzenga mycelial growth and Exo-polysaccharide production with jar fermentor ····· 54

Fig. 3-2. Effect of aeration rate on *P. nebrodensis* Inzenga mycelial growth and exo-polysaccharide production with jar fermentor ····· 56

Fig. 3-3. Changes of *P. nebrodensis* Inzenga mycelial growth and exo-polysaccharide production in jar fermentor under optimum and basal conditions of culture and media ····· 59

Fig. 3-4. Effect of aeration on mycelial growth and exo-polysaccharide production in the air bubble bioreactor ····· 61

Fig. 3-5. Changes of *P. nebrodensis* Inzenga mycelial growth

and exo-polysaccharide production in air bubble bioreactor under optimum and basal conditions of culture and media 63

Fig. 4-1. Preparation of tissue homogenate and enzyme solution from rat liver 74

Fig. 4-2. Standard curve of superoxide dismutase 81

Fig. 4-3. Effects of *P. nebrodensis* Inzenga extract concentrations on the DPPH scavenging rate 91

Fig. 4-4. Effects of *P. nebrodensis* Inzenga extract concentrations on the superoxide anion radical scavenging rate 92

Fig. 4-5. Effect of reaction time of *P. nebrodensis* Inzenga extracts on the linoleic acid scavenging rate 93

Fig. 4-6. Effects of *P. nebrodensis* Inzenga extract concentrations on the inhibition of nitric oxide production 94

Fig. 4-7. Effects of decoctions prepared from *P. nebrodensis* Inzenga on liver glutathione concentration after chronic ethanol intake for 14 days in rats 97

Fig. 4-8. Effect of the decoctions prepared from the *P. nebrodensis* Inzenga on the GSH-peroxidase activity of the liver after chronic ethanol intake during 14 days in rat 98

Fig. 4-9. Effects of *P. nebrodensis* Inzenga decoctions on liver catalase activity after chronic ethanol intake for 14 days in rat 99

Fig. 4-10. Effects of *P. nebrodensis* Inzenga decoctions on the alcohol dehydrogenase activity of liver after chronic ethanol intake for 14 days in rat 100

Fig. 4-11. Effects of *P. nebrodensis* Inzenga decoctions extract on the acetaldehyde dehydrogenase activity of liver after chronic ethanol intake for 14 days in rat. ····· 101
Fig. 4-12. The cytotoxic effects of hot water and methanol extracts from *P. nebrodensis* Inzenga fruit body on the viabilities of Law 264.7 cell ····· 107
Fig. 4-13. The cytotoxic effects of hot water and methanol extracts from *P. nebrodensis* Inzenga fruit body on the viabilities of HEL299 cell ····· 108
Fig. 4-14. The cytotoxic effects of hot water and methanol extracts from *P. nebrodensis* Inzenga mycelia on the viabilities of HeLa cell ····· 109
Fig. 4-15. The cytotoxic effects of hot water and methanol extracts from *P. nebrodensis* Inzenga mycelia on the viabilities of SK-HEP-1 cell ····· 110
Fig. 4-16. The cytotoxic effects of hot water and methanol extracts from *P. nebrodensis* Inzenga mycelia on the viabilities of HO-1 cell ····· 111
Fig. 4-17. The cytotoxic effects of hot water and methanol extracts from *P. nebrodensis* Inzenga mycelia on the viabilities of PLC/RF/5 cell. ····· 112
Fig. 4-18. The cytotoxic effects of hot water and methanol extracts from *P. nebrodensis* Inzenga mycelia on the viabilities of Hep3B cell ····· 113
Fig. 4-19. The cytotoxic effects of hot water and methanol extracts from *P. nebrodensis* Inzenga mycelia on the viabilities of

SNU354 cell ····· 114
Fig. 4-20. The cytotoxic effects of hot water and methanol extracts from *P. nebrodensis* Inzenga mycelia on the viabilities of SNU185 cell ····· 115
Fig. 4-21. The cytotoxic effects of hot water and methanol extracts from *P. nebrodensis* Inzenga on the viabilities of SNU185 . cell ····· 116
Fig. 4-22. The cytotoxic effects of hot water and methanol extracts from *P. nebrodensis* Inzenga on the viabilities of SNU354 cell ····· 117
Fig. 4-23. The cytotoxic effects of hot water and methanol extracts from *P. nebrodensis* Inzenga on the viabilities of Hep3B cell ····· 118
Fig. 4-24. The cytotoxic effects of hot water and methanol extracts from *P. nebrodensis* Inzenga on the viabilities of PLC/RF/5 cell ····· 119
Fig. 4-25. The cytotoxic effects of hot water and methanol extracts from *P. nebrodensis* Inzenga on the viabilities of HO-1 cell ····· 120
Fig. 3-26. The cytotoxic effects of hot water and methanol extracts from *P. nebrodensis* Inzenga on the viabilities of SK-HEP-1 cell ····· 121
Fig. 4-27. The cytotoxic effects of hot water and methanol extracts from *P. nebrodensis* Inzenga on the viabilities of HeLa cell ····· 122
Fig. 4-28. Effect of solvents on nitrite scavenging ratio ····· 127

Fig. 4-29. Effect of pH on nitrite scavenging ratio ····· 128
Fig. 4-30. Effect of extract concentration of fruit body on nitrite scavenging ratio (pH 1.5) ····· 129
Fig. 4-31. Effect of extract concentration of mycelia on nitrite scavenging ratio (pH 1.5) ····· 130

ABSTRACT

A Study on the Optimal Culture and Biological Activies of Pleurotus nebrodensis Inzenga

Hyung-Gun Nam
Advisor : Prof. Wol-Suk Cha Ph.D.
Department of Chemical Engineering,
Graduate School of Chosun University

The purposes of this study were to determine the optimal culture conditions for mycelial growth and exo-polysaccharide production in liquid culture and test the biological activities of *Pleurotus nebrodensis* Inzenga.

The optimal temperature and pH for mycelial growth and exo-polysaccharide production were 25℃ and a range of 6.5 to 7.0, respectively. The optimal inoculum age and volume percent were 7 days and 5%(w/v), respectively. Among the various carbon sources tested, glucose was the best carbon source. The maximum mycelial growth and exo-polysaccharide production were obtained when glucose concentration was 5%. The best nitrogen sources were polypeptone and yeast extract, respectively. Especially, in the case of the mixture of polypeptone (0.8%) and yeast extract (1.0%), the exo-polysaccharide production was higher than that of sole polypeptone or yeast extract. K_2HPO_4 0.12% (w/v) and $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.12% (w/v) were the most effective inorganic salts for mycelial growth and exo-polysaccharide production.

Using optimum culture conditions in flask, the exo-polysaccharide production after 10 days of culture with a jar fermentor containing the optimized medium were 3.85 g/L, which was 1.5 fold higher than that of basal conditions. Using optimum culture conditions in flasks, the effects of aeration on mycelial growth and exo-polysaccharide production were investigated in 5L air bubble bioreactor. When 1.0-2.0vvm of aeration was used, the maximum exo-polysaccharide production after 12 days of culture was obtained 3.32 g/L, which was 1.7 fold higher than that of basal conditions.

To investigate the antioxidant activities of *P. nebrodensis* Inzenga extracts, the DPPH scavenging rate, superoxide anion radical scavenging rate, linoleic acid scavenging rate, and nitric oxide production were determined *in vitro*. When the fruit body extract concentration was increased from 150 ug/mL to 1000 ug/mL, the DPPH scavenging rate was increased from 8.2% to 42.3%. However, it was not increased more than 1200 ug/mL. The linoleic acid scavenging rate of the fruit body extract was increased from 48% to 82% when the incubation time was increased from 6 hr to 22 hr. However, the incubation time was increased from 27 hr to 56 hr, it was decreased by 62%, which was a few higher than that of BHT. When the fruit body extract concentration was increased from 31 ug/mL to 63 ug/mL, the inhibition of nitric oxide production increased from 9.6% to 31%.

The effects of decoctions prepared from *P. nebrodensis* Inzenga fruit body (PNIFB) on glutathione production, glutathione peroxidase, catalase, alcohol dehydrogenase, and acetaldehyde dehydrogenase activities in rat liver after chronic ethanol intake for 14 days were studied. When the decoctions

prepared from PNIFB was added, the glutathione concentration was 13.5 uM/g of liver, which was about 2.2 fold higher than that of control. The activities of GSH-peroxidase, catalase, and alcohol dehydrogenase by adding the decoctions prepared from PNIFB were 4.1 U/ mg of protein, 121.3 KU/ mg of protein, and 2.1 mU/ mg of protein, respectively, which were similar to those of control. In the case of acetaldehyde dehydrogenase activity, it was 9.0 mU/ mg of protein, which about 80% was increased when compared to control

In order to compare the hot water and methanol extract of *P. nebrodensis* Inzenga on the antitumor activities, various cancer cells were examined. The hot water extract concentration was increased from 125 ug/mL to 500 ug/mL the viability of Law 264.7 cell was decreased by about 60%. On the other hand, in the case of methanol extract, when it was increased from 63 ug/mL to 500 ug/mL the viability of Law 264.7 cell was decreased by about 45%. When the methanol extract concentration was increased from 250 ug/mL to 500 ug/mL, the viability of HEL299 cell was decreased by about 87%. On the other hand, in the case of the hot water extract, when it was increased from 63 ug/mL to 500 ug/mL, the viability of HEL299 cell was decreased by about 38%.

For selecting the best extract solvents on the nitrite scavenging ratio, various solvents were used. When the diethyl ether extract of PNIFB was used, the maximum nitrite scavenging ratio was obtained, 28.1%. The maximum nitrite scavenging ratio was 40.1% when pH of PNIFB extract was 1.5. However, when pH of extract of PNIFB was increased from 3.0 to 6.0, it was decreased from 34.2% to 2.3%. In the case of PNIM, it was also affected by high pH.

제 I 장. 서 론

I-1. 배경

과학 기술발달과 더불어 다양한 생물 자원중 “대형진균” 혹은 “버섯균”등의 균류 생물은 식품, 제약, 농업, 임업, 등 다양한 분양에서 중요한 연구 및 개발 대상으로 주목 받고 있다. 통계에 의하면 대형진균은 약 1만여 종으로 추정되고 있지만 그 중에서 직접 이용 가능한 종은 약 500종으로 보고되었다. 또한 배양 분석, 추출, 검증기술 등의 발달에 의한 인공 재배법이 개발되어 약리, 생리활성, 식품등을 위한 버섯의 성분들이 밝혀짐에 따라 버섯의 이용 개발이 급속하게 이루어지고 있다. 버섯은 이미 고대로부터 식용으로 뿐만 아니라 약용으로 사용되어져 왔다. 700여년의 중국문명에서 버섯은 기능성 의약으로 중요한 역할을 하여 왔으며 고대로부터 목이버섯은 중요한 식품으로 사용되어 왔다. 張仲景(2세기～3세기초), 華佗(109～207)등의 중국의 명의들에 의해 고대의 의학적 지식을 기록된 책으로 알려진 신농본초경에는 영지버섯류 6가지가 나열되어 있고 그 효능에 대하여 자세히 기술하고 있다. 기원전 109년의 漢武帝시대에는 궁중에 9개의 대가 달린 영지버섯이 나와서 대소동이 일어났고 축하의 시를 헌상하였다는 이야기가 전하여 오는 것으로 미루어보아 이미 기원전부터 영지버섯은 불로초로서 인식되었고 약용으로 사용하였던 것으로 보인다. 일본의 경우 홋가이도에 살았던 아이누아족들은 오래 전부터 화상, 열상, 통증의 치료에 *Lycoperdon* spp.(말불버섯)을 사용하였고 위통을 치료하기 위하여 *Fomitopsis officinalis*를 달여서 음용하였던 것으로 알려져 있다. 아메리카인디언들도 *Lycoperdon*, *Calvatia* 및 *Geastrum* spp.를 의료용으로 사용하였고 *Lycoperdon* spp.를 지혈제로 사용하였다. 유럽의 경우에 Pliny(A.D.23～78)는 그의 저서에 여러 버섯종(당시에는 mushroom 또는 Agaricum이라고 일반명으로 명명하였으며 약리효과

및 음용법에 대해서 기술하고 있고, 로마황제 네오 시대의 군의관이었던 Dioscorides는 Agaric(오늘날에는 *Fomitopsis officinalis*로 생각됨)을 지혈제로서 뿐 만 아니라 신장질환, 천식, 월경불순등 여러 질병치료에 사용하였다. 우리나라에서도 오래 전부터 여러 버섯이 약용으로 사용되어져 왔던 것으로 생각된다. 또한 버섯은 칼로리(calories), 나트륨(sodium), 지방(fat), 그리고 콜레스테롤(cholesterol)이 낮은 반면, 단백질(proteins), 탄수화물(carbohydrates), 섬유(fiber), 비타민(vitamins), 그리고 무기질(minerals) 등이 풍부한 영양학적 특성을 지녀 매우 좋은 건강식품으로 각광받고 있다[1-2]. 예로부터 버섯은 한방에서 자양강장, 소자, 혈중지질강하, 거담, 관상동맥의 혈류량 증대, 혈압강하 등의 약리효과와 면역증강 효과가 있는 것으로 알려져 왔다. 버섯류에 관한 연구는 중국, 일본 및 한국에서 활발히 이루어지고 있으며 일본의 경우 기능성 식품으로 표고버섯 균사체 추출물이 이미 일반화되어있다. 또한, 1992년 *Agaricus blzei* 자실체로부터 추출한 고분자 다당체가 암세포 증식 억제뿐만 아니라, 류머티스관절염이나 만성기관지염, 위염처럼 면역기능 약화가 원인인 모든 질병에 효능이 있다고 알려지면서 그 활용방안에 대한 연구가 큰 진전을 보이고 있으며, 최근 기능성 식품으로 상품화 되었다[3, 57].

버섯의 성분 중 면역증강작용을 나타내는 것은 다당체이며, 일반적으로 베타-1,3 glucan의 골격에 베타-1,6 glucan의 가지 구조를 갖는 단일물질임에도 불구하고 생태기능에 다양한 효과를 나타내는 것으로 알려져 있다[4]. 버섯으로부터 세포의 다당류(exo-polysaccharide)에 관한 최근의 연구들은 생물학적 활성등에 대하여 보고되었다[5]. 예를 들면 *Lentinus edodes*의 Lentinan[6], *Schizophyllum commune*의 Schizophyllan[7], 그리고 *Coriolus Versicolor*의 Krestin[8] 등과 같은 버섯 추출물들로부터 생산된 여러 항암성 물질들이 현재 상업적으로 이용되고 있다. 지난 수십년 동안 버섯의 인공생산은 급속도로 증

가하였고, 버섯의 생산과 소비는 아시아 특히, 중국, 일본 및 한국에서 주로 이루어지고 있다. 이러한 상황에도 불구하고 버섯의 고체배양을 위한 생리적(physiological), 환경적(environmental) 배양조건에 대한 연구가 광범위하게 이루어지지 않았기 때문에 버섯 생산성의 향상은 다소 제한적인 상황에 놓여있다[9-14]. 특히 백영고(*Pleurotus nebrodensis* Inzenga) 버섯은(Fig. 1) 많은 단백질을 함유하고 있으며, 특히 다당류(polysacchrides)가 면역계(Immune System)를 강화시키는 효능을 가지고 있는 것으로 알려져 있다[24, 58-60]. 그러나 백영고의 영양학적·약리적 효능이 매우 우수한 것으로 기대되지만, 느타리속의 다른 버섯에 대한 많은 연구에 비하여 국내·외적으로 매우 드문 실정이다.

따라서 본 연구에서는 첫째, flask 액체배양을 이용하여 백영고의 균사체 대량생산 및 세포외 다당류 생성에 미치는 영양요구성 및 배양조건의 최적화를 검토하였다. 둘째, flask 최적 배양조건을 이용하여 jar fermentor 및 air bubble bioreactor에서 scale up을 하였다. 셋째, 백영고버섯의 자실체 및 균사체의 추출물를 이용하여 항산화, 항암, 및 아질산소거능을 테스트 하였다.

Fig. 1-1. *P. nebrodensis* Inzenga (fruiting body).

I-2. 느타리속 (*Pleurotus spp*) 버섯의 생산

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[25]. 이 버섯의 생산은 1986년과 1990년 사이에 4배로 증가하였고 현재 년간 일백만톤 정도로 추산되고 있다[26]. 1996년에 중국의 경우 약 70만톤 정도 생산하고 있고, 미국에서는 양송이버섯(*Agaricus bisporous*)다음으로 많이 생산되고 있다. 1995년에 미국의 *Pleurotus osteatus* 생산은 880만톤 정도 생산되었는데 이는 1994년도의 94%정도 증가한 것이다[27]. *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[15-17]. 느타리속의 야생종들 가운데 *Pleurotus eryngii*의 경제적 중요성은 많이 인식되고 있는데, 그 자실체의 맛과 향기의 특성은 다른 느타리속의 버섯보다 뛰어난 것으로 평가되고 있다[28]. Mau등[29]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*)균류이다. 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 *A. bisporous*의 경우와 비교하였을 때 비교적 단순한 특징을 지니고 있다[30]. *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 지역 농업부산물중에서 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[31, 32]. 지질은 급속하게 사상균(mold)이 무성하게 자라 결국 부패와 호기성 분해를 가져오게 된다. Silage생산은 Silanikove 등[32]에 의하여 연구가 이루어졌는데, 이러한 물질은 수확 후 9개월까지 상업적 *pleurotus* 생산을 위해 사용될 수 있다.

2. 액체배양

Pleurotus spp는 fungal protein, 종균(spawn) 또는 향기성분의 생산을 위하여 액체배양을 통하여 균사배양을 할 수 있다. Hadar과 Cohen- Arazi[33]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[34]. 액체배양에 의해 생산된 균사체는 매우 적은 정도의 향미성분을 가지고 있어 이러한 기술은 여전히 중요한 과제가 되고 있다[35]. 사실 Belinky 등[36]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[37]은 *P. pulmonarius*의 균사체 균질액(homogenate)에 의해 linoleic acid가 13-hydroperoxylinoleate와 1-octan-3-ol로 전환된다고 보고하였다.

I-3. 느타리속 *(Pleurotus spp)*의 약리적 특징

버섯추출물들은 향균성(antibacterial), 혈액학적(hematological), 항바이러스(antiviral), 항암성(antitumor), 고혈압과 간보호 효과를 가지고 있는 것으로 보고되어 있다[38, 39]. *Pleurotus* spp는 약리학적 특징을 지니고 있어 한방에서 많이 애용되어 왔고 잘 알려진 약용버섯이다[40]. Waser와 Weis[39]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[41]. Table. 1-1은 여러 종류의 *Pleurotus* spp의 약리학적 효과들을 나타낸 것이다.

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*-180에 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[82]은 항종양성 다당류를 형성하는 담자균류를 계통적으로 정리하여 보고하였다(Table. 1-2). 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 직

접 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. 1-2)[18]. 담자균 다당류는 T세포를 부활시켜 흉선 의존성 면역반응을 회복한다고 되어있다. 이에 대하여 *Corynebacterium*의 다당류나 BCG는 *macrophage*를 활성화하여 세균의 endotoxin이나 lipopolysacchatide(LPS)는 B세포를 부활시키는 작용을 가지고 있다[18]. 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 어느정도 잘 알려져 있다[83]. 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. 1-4). 수용액중에는 right-handed 삼중나선구조를 갖는 것으로 알려져 있다. 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[83].

Table 1-1. Medicinal effect of *Pleurotus* spp [42-56].

Medicinal effect	Fungus	Substance
Antibiotic	*Pleurotus* spp	Mycelia Popysaccharide
Antibacterial	*P. ostreatus* *Pleurotus* spp	Beta-D-Glucan (pleuran) -
Antiviral	*Pleurotus* spp *P. citrinopileatus* *P. ostreatus*	- Polysaccharide Ubiquitin-like protein
Immunomodulating	*P. ostreatus*	Glucan
Antitumor	*P. ostreatus* *P. ostreatus* *Pleurotus* spp *Pleurotus* spp *P. ostreatus* *P. ostreatus* *P. ostreatus*	Glycopeptides Mushroom grown on corncobs - - Mushroom Lectin Beta-D-Glucan (pleuran)
Antiinflamimatory	*Pleurotus* spp	-
Anicholesterolic	*P. eryngii* *P. ostreatus* *P. cornucopiae* *P. ostreatus*	Lovastatin Mushroom Lovastatin Mushroom
Hemagglutination	*P. cornucopiae*	Lectin
Antioxidant	*P. ostreatus*	Beta-D-Glucan (pleuran)

Table 1-2. The effect of polysaccharides extracted from anti-tumor against "Sarcoma 180" solid cancer[42-56].

Strains	Tumor impediment rate (%)	Complete disappearance rate of tumor (viability No/ treatment No)
Ganoderma applanatum	64.9	5/10
Coriolus versicolor	77.5	4/8
Coriolus hirsutus	65.0	2/10
Trametes gibbosa	49.2	1/10
Lenzites betulina	23.9	0/8
Daedaleopsis tricolor	70.2	4/7
Fomitopsis cytisina	44.2	3/10
Leucofomes ulmarius	44.8	0/7
Hirschioporus fuscoviolaceus	45.5	1/10
Coriolus pubescens	59.5	0/10
Favolus alveolarius	71.9	0/10
Fomes fomentarius	5.7	2/8
Fomitopsis pinicola	51.2	3/9
Ganoderma tsugae	77.8	2/10
Piptoporus betulinus	49.2	0/7
Trametes dickinsii	80.1	0/8
Phellinus hartigii	67.9	1/9
Phellinus igniarius	87.4	6/9
Phellinus linteus	96.7	7/8
Lentinus edodes	80.7	6/10
Flammulina velutipes	81.1	3/10
Pleurotus ostreatus	75.3	5/10
Pleurotus spodoleucus	72.3	0/8
Tricholoma matsutake	91.8	5/9
Pholiota nameko	86.5	3/10
Agaricus bisporus	2.7	0/10
Auricularia auricula-judae	42.6	0/9

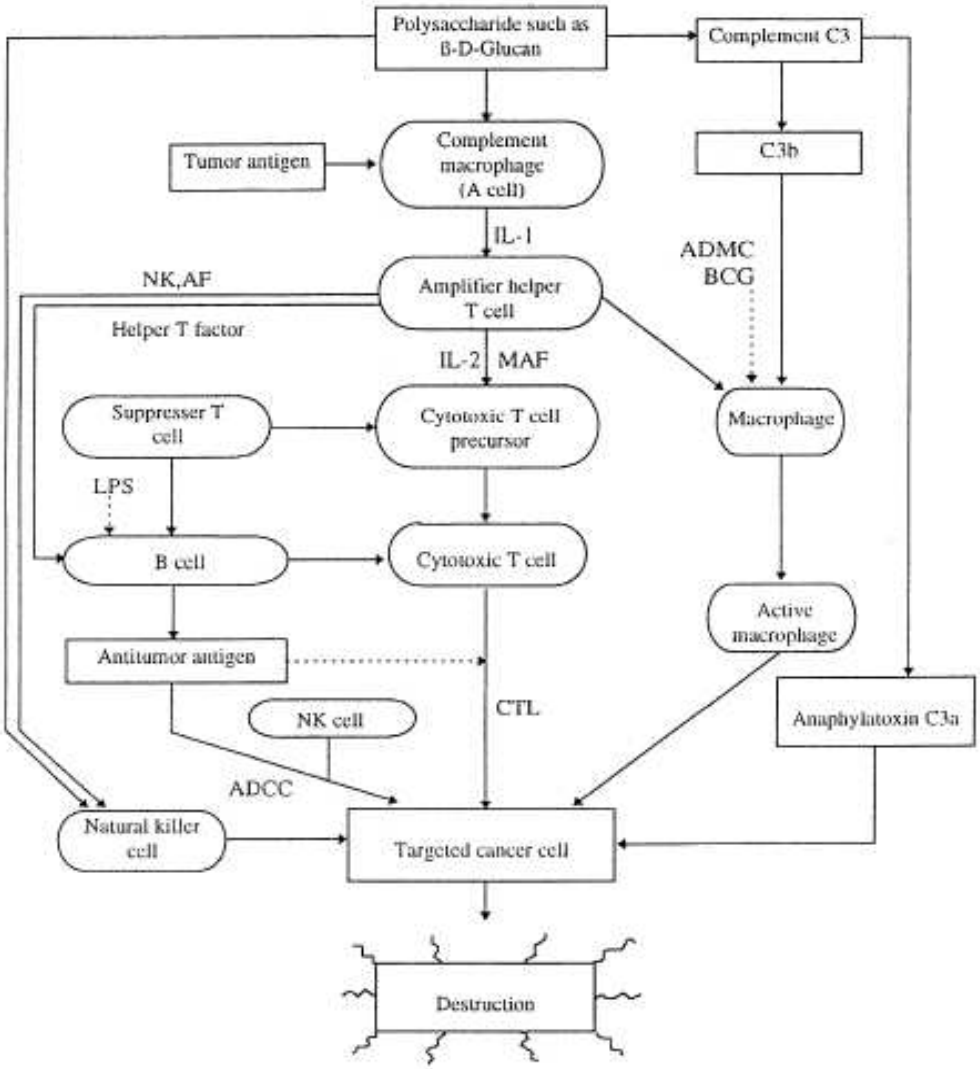

Fig. 1-2. Possible immune mechanism: β-D-glucan biological response modifier (BRM) [18].

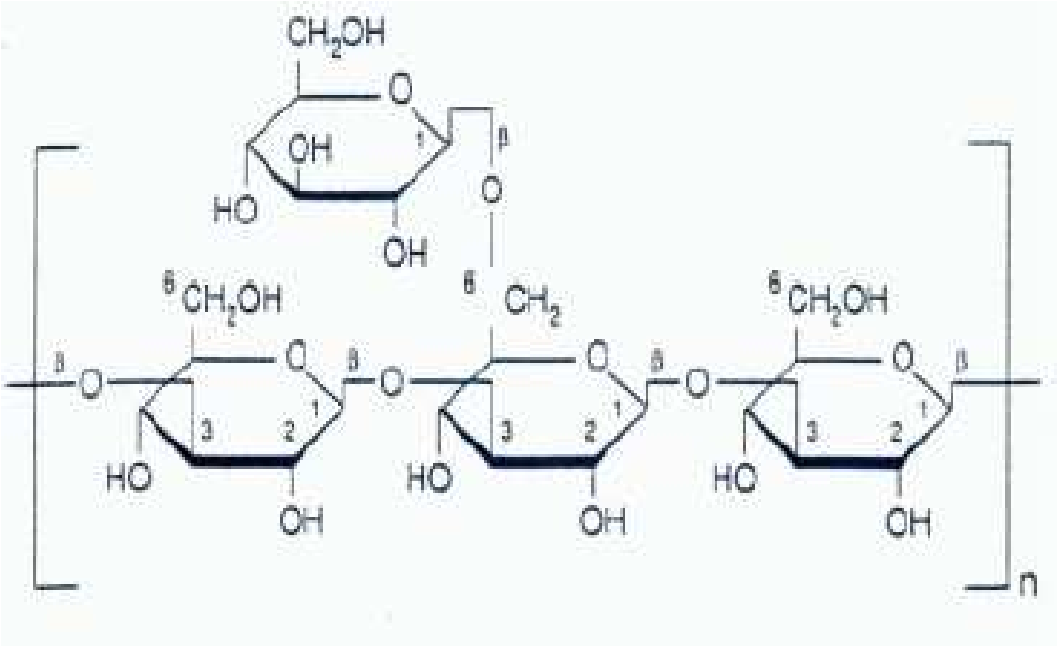

Fig. 1-3. Primary molecular diagram of mushroom beta-D-glucan [83].

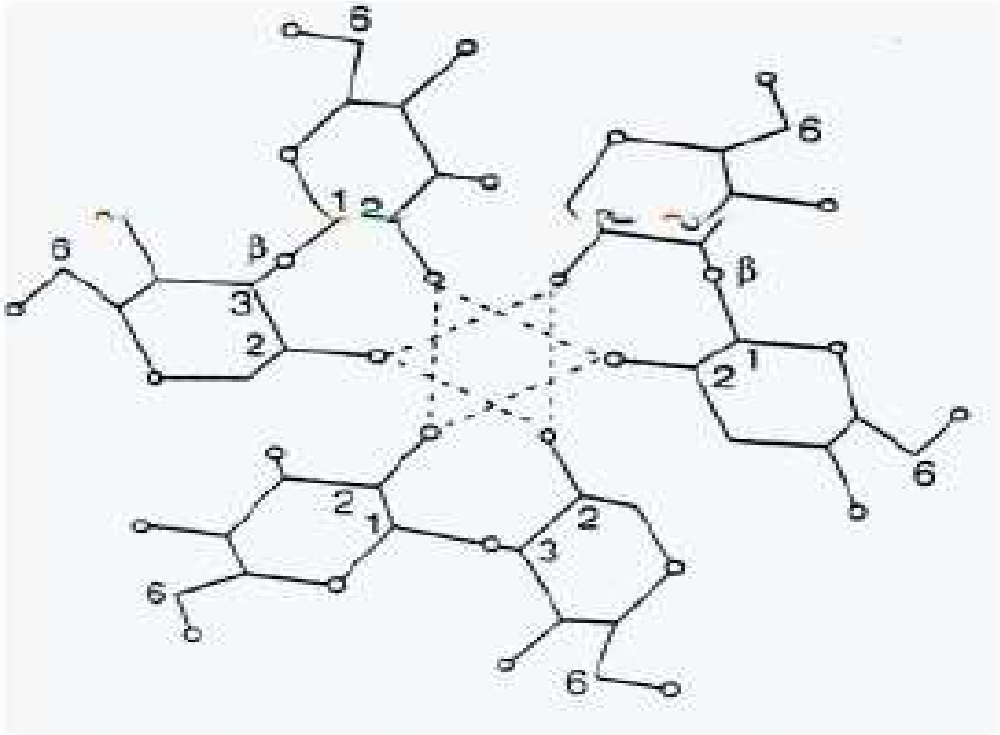

Fig. 1-4 Molecular model of the right-handed triple spiral helix of antitumor-active-beta-D-glucan (Schizophyllan) [84].

제 *II* 장. *Flask* 액체 배양

II-1. 연구배경

버섯은 식료음료중심으로 기능성식품의 개발이 급속도로 진행되고 있는 현실에서 고부가 기능성식품의 검색 및 제품화 소비자의 선택적 구매요구를 충족시키는 능동적인 태도가 될것이며 건강식품의 개발소재로 활용하기 위하여 다양한 식품의 기능성에 대한 관심이 높아지고 있다. 천연식품의 일종인 버섯은 자실체를 가진 고등식물로서 옛날부터 부작용이 없는 저칼로이 식품으로서 영양적인 측면과 의약품으로서 효능을 가진 wholesome food로 인식되어 소비량이 날로 증가하는 추세이다. 버섯은 분류학상으로 균류계중에서 진균류에 위치하며 대부분 담자균류에 속하나 일부는 자낭균류 그리고 드물게는 점균류 중에서도 보여 진다. 이러한 버섯은 미세하고 살같은 균사로 되어있으며 수많은 균사의 집합체를 균사체라고 하고 이들이 모여 자실체를 형성 한다. 이 들 버섯류들은 향미성분과 약리효과 때문에 식용 및 약용으로 이용되며 최근 들어 *Lentinus edodes, Coriolus versicolor, Lepiota procer, Grifola frondosa, Lyophyllum ultrarium, Ganoderma applanatum*등으로부터 얻은 단백다당체가 항암효과가 있다고 보고 되고 있으며, *Coriolus versicolor*의 단백다당체는 면역 증강제 (상품명: Kresrin)로, *Lentinus edodes*의 단백 다당체는 위암치료제 (상품명: Lentinan)로 알려진 이래 많은 연구가 이루어지고 있다[33-38]. 특히 백영고 버섯의 기원은 중국의 Xinjiang Autonomous지역에서 Gobi사막에서 서식하였다고 보고 되었다. 이 버섯은 건조한 기후에 잘 적응한 식물이고, 색은 흰색이며 자실체는 두꺼운 구조와 층을 이루고 있다. 오래전부터 중국에서

Western Paradise White *Garnoderma*라고 불러졌다. 특히 모양은 전통적인 중국의 *Ganoderma*종와 비슷하고, 중국의 Food Examination Center에 따르면 단백질이 약 14%, 비타민 C, D, 그리고 E는 다른 버섯보다 아주 높은 것으로 보고 되고 있다 [23]. 이러한 많은 연구는 액체배양보다는 고체 인공배지에서 버섯을 배양을 하는데 많은 노력을 기울려 왔다. 특히 고체배양은 많은 노동력과 시간을 소비하므로 액체배양에 의한 발효조 내에서의 균사체 배양을 통한 효율적인 생산이 바람직하다[15,16]. 또한, 액체 배양은 곰팡이에 의한 오염발생의 위험이 덜하고 조밀한 공간과 짧은 시간에 균사체 대량 생산의 이점을 가지고 있다[17]. 그동안 많은 연구자들이 여러종의 버섯으로부터 균사체 생산과 생리활성물질(세포외 다당류)을 생산하기 위한 최적 액체배양 조건을 얻기 위하여 많은 연구가 있었음에도 불구하고 백영고 버섯의 액체배양을 위한 영양요구성(nutritional equirement) 및 배양조건에 대하여 광범위하게 이루어지지 않은 상황에 있다 [18-22]. 따라서 본 연구에서는 flask 액체배양으로부터 백영고버섯의 균사체 대량생산 및 세포외 다당류 생성에 미치는 영양요구성 및 배양조건의 최적화를 검토하였다.

II-2. 재료 및 방법

1. 균주 및 보존

본 연구에서 사용한 균주는 백영고(*Pleurotus nebrodensis* Inzenga) 버섯으로 충남 가야 백송 종균배양소에서 분양받아 사용하였으며, patoto dextrose agar(PDA)배지에서 25℃, 7일간 배양한 후 4℃에서 보존하였고, 2주마다 계대배양하면서 실험에 사용하였다.

2. 접종원

접종원의 준비는 고체배양의 경우, 냉장보관하던 균주를 YMGA배지(malt extract 10 g/L, glucose 4 g/L, yeast extract 4 g/L and agar 20 g/L)의 중앙부에 5mm cork borer로 절취한 mycelium disk를 접종하여 25±1℃의 항온기에서 배양한 후 실험에 사용하였으며, 액체배양의 경우는 300 mL 플라스크에 50 mL의 기본배지(YMG : glucose 20 g/L, yeast extract 3 g/L, malt extract 3 g/L, KH_2PO_4 1 g/L and $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5 g/L)를 121℃, 15분간 고압멸균한 후 5mm cork borer로 mycelium disk 4 - 5개를 절취하여 접종한 후 25℃, 8일간 진탕배양한 다음, 배양액을 균질기로 무균적으로 30 sec 동안 균질화하여 접종원으로 사용하였다.

3. Flask 배양 조건

백영고버섯의 균사생육에 가장 좋은 최적 온도를 조사하기 위하여 YMGA

배지를 조제하여 121℃에서 15분간 고압멸균하고, petri-dish에 20 mL 씩 분주하여 굳힌 다음, 접종원을 접종하고 20, 25, 30℃의 온도 범위로 조절된 항온기에서 10일간 배양하면서 균사의 생육 정도를 하루 간격으로 조사하였다. 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 배양액의 강제교반 또는 강제통기가 이용되며 이 조작에 들어가는 동력은 큰 것으로 산소공급도 버섯 균사체의 심부배양에 있어서 없어서는 안될 중요한 환경인자가 된다. 또한 산소공급이 과잉상태가 되면 공급과잉에 따른 생장저해효과가 나타난다. 따라서 백영고버섯의 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 6.5 -

7.0로 조절한 다음 121℃, 15분간 고압멸균한 후, 무균적으로 균질화된 접종원을 25±1℃, 100 rpm으로 8일간 진탕배양하였다.

4. 영양요구성

Flask에서 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. 최적 무기염류의 선발 및 농도를 조사하기 위하여 $MgSO_4$ 외 8종의 무기염류를 최적 탄소원과 질소원으로 선발된 glucose 5.0%(w/v), poly- peptone 1.0%(w/v), 그리고 yeast extract 0.8%(w/v)인 배지에 0.15% 씩 달리하여 조제한 다음 pH를 6.5로 조절하여 300 mL 삼각플라스크에 50 mL씩 분주하여 121℃, 150 rpm으로 12일간 진탕배양 하였고, 선발된 최적 무기 염류의 농도에따른 영향을 조사하기 위하여 최적 무기염류의 농도를 0.02 - 0.3 %(w/v)씩 달리하여 무기염류 선발 실험조건과 같은 방법으로 균사

생장과 세포외 다당류 생산을 조사하였다.

5. 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[85]. 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. 기질중의 glucose 정량은 DNS (di-nitrosalicyclic acid)법에 준하여 정량하였다(Fig. 2-1)[86].

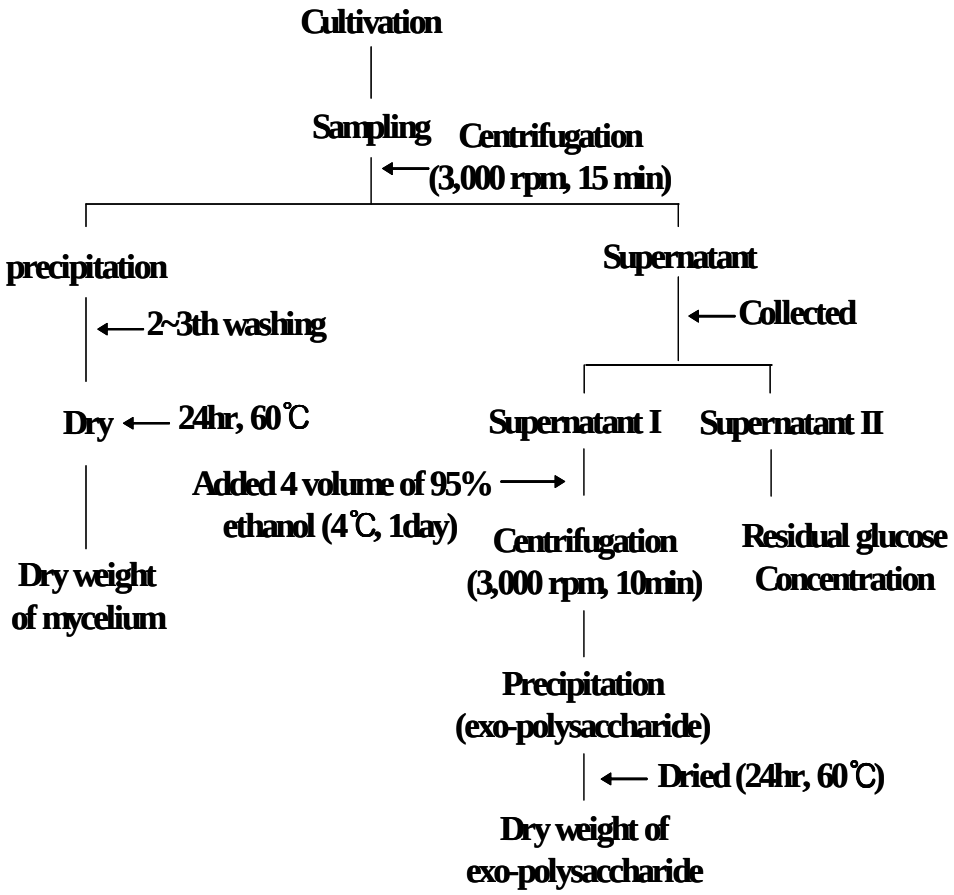

Fig. 2-1. Experimental procedure in this study.

II-3. 결과 및 고찰

II-3-1. 온도 영향

백영고 버섯 균사체의 균사생육에 적합한 최적 배양온도를 검토하기 위하여 20, 25, 및 30 ℃에서 실험을 진행 하였다. 배양 결과는 Fig. 2-2에 나타 내었다. 20℃ 이하와 30℃이상에서는 백영고버섯 균사체 생육이 급속히 저하되는 것을 알 수 있으며, 25℃에서 균사생육이 가장 양호하였다. 그러므로 최적 배양온도는 25℃로 결정 하였다. 이러한 결과는 같은 느타리속인 *Pleurotus eryngii*는 25℃, *Pleurotus ostreatus*와 *Pleurotus fiorida*는 30℃인 보고[87]와 *Fomitella fraxinea*(Fr)는 25 - 30℃라는 보고[88], *Lentinus lepideus*는 25℃라는 보고[89], 그리고 *Naematoloma Sublateritium*(Fr.)는 25℃라는 보고[90]와 거의 유사한 결과임을 알 수 있고, *Phellinus igniarius*[91]와 *Ganoderma lucidum*[92]은 최적 배양온도가 30℃라는 보고와는 상반된 경향을 보여주고 있어 버섯 종류마다 최적 배양온도는 다소 차이가 있는 것으로 나타났다.

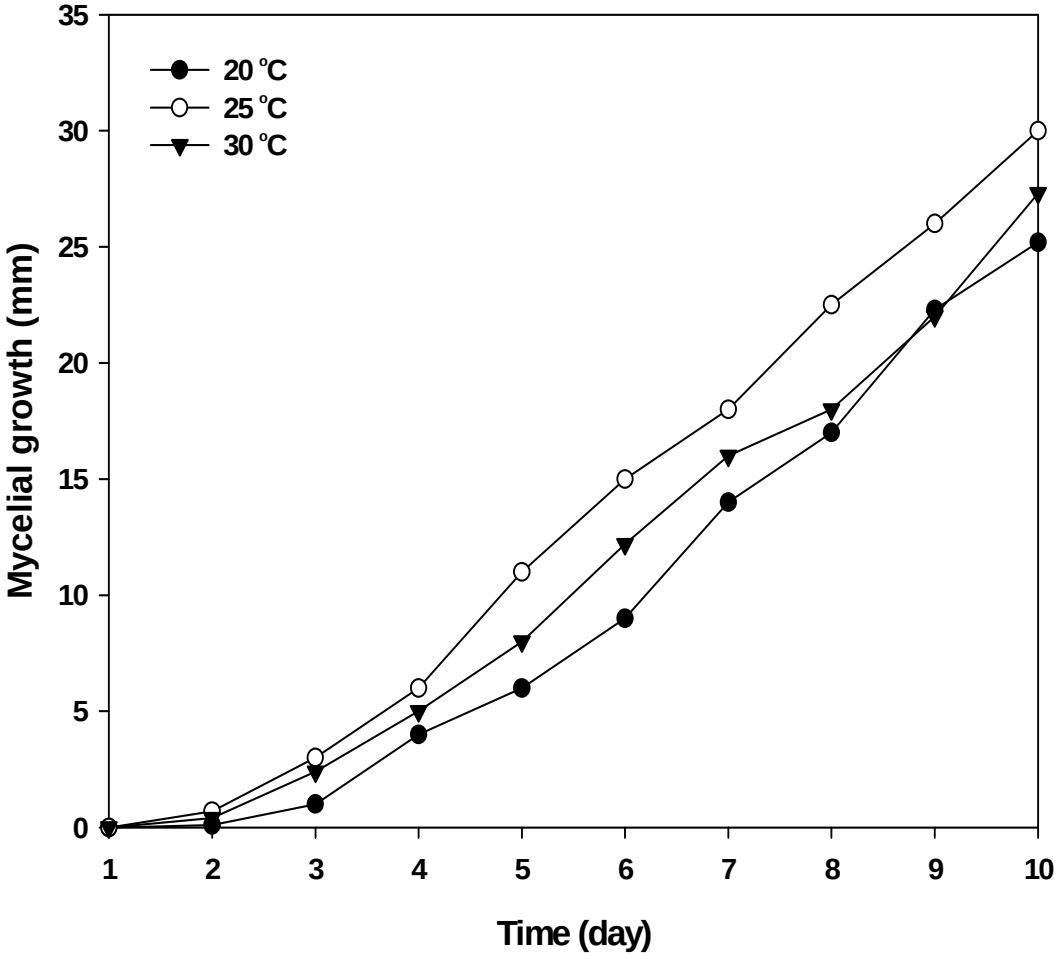

Fig. 2-2. Effect of temperature on the mycelial growth of *P. nebrodensis* Inzenga on YMGA medium

II-3-2. 배양시간 및 접종량 영향

접종원(inoculum)의 배양기간 및 접종량의 최적화를 통하여 균사 배양기간 동안의 변이(varience)를 최소화하고자 접종원의 배양기간과 접종량에 따른 균사생장과 세포외 다당류 생산의 특성을 조사하였다. 그 결과를 Fig. 2-3에 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 백영고버섯 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.

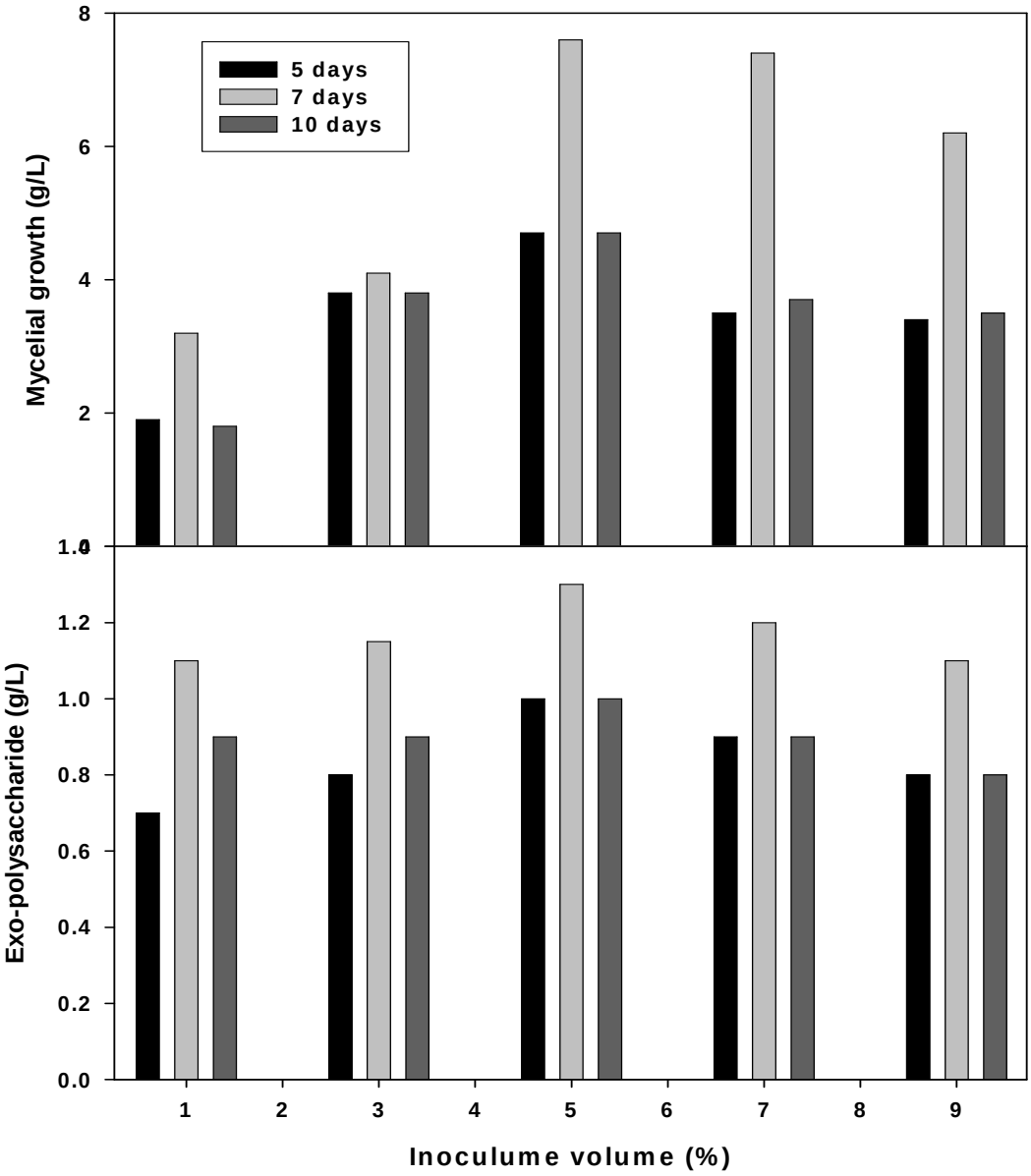

Fig. 2-3. Effects of inoculum age and volume on *P. nebrodensis* Inzenga mycelial growth and exo-polysaccharide production.

II-3-3. pH 영향

백영고 버섯 균사체의 균사생장에 최적 pH를 규명하기 위해 실험한 결과는 Fig 2-4에 나타 냈다. 초기 pH 6.0 이상의 범위에서 균사생장과 세포외 다당류 생산이 양호한 것으로 나타났으며, 초기 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, 초기 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, 백영고버섯 균사체의 최적 초기 pH는 6.5 - 7.0임을 알 수 있다. 버섯에 따른 최적 pH 범위는 *Lentinus lepideus*의 최적 초기 pH는 4.2이며 pH 5.0이상에서는 균사생장이 모두 정지되었다는 보고[93], *Formitella fraxined*[94]는 6.0, *Ganoderma lucidum*[92]는 5.0, *Pleurotus ostreatus*[95]는 6.2 - 6.5, *Lentinus edoes*[96]은 4.0 - 4.5, *Poria cocos*[97]은 4.0, *Phelinus edoes*[98]는 4.2, *Pleurotus eryngii*[99]는 6.0인 것으로 보고하였는데, 이러한 경향은 다소 차이는 있지만 담자균류의 균사생장 최적 pH의 범위에 대하여 Wolport[100]가 pH 4.0 - 7.0이라는 보고와 거의 일치한다는 경향임을 알 수 있다.

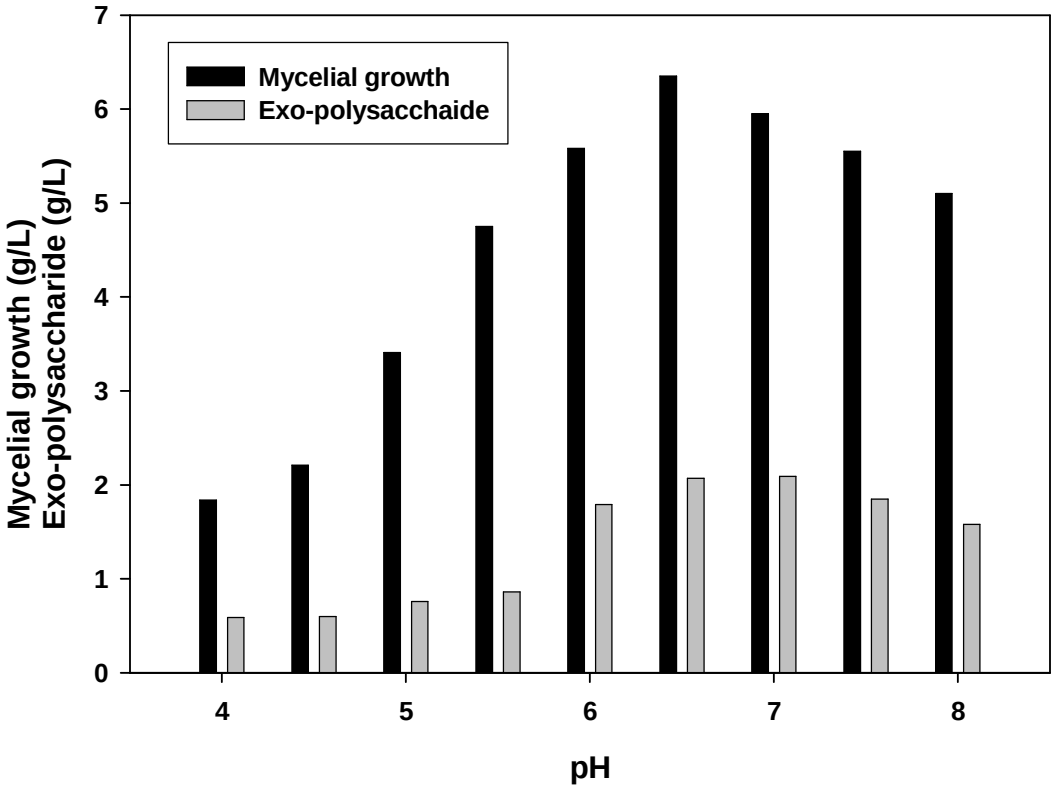

Fig. 2-4. Effect of initial pH on *P. nebrodensis Inzenga* mycelial growth and exo-polysaccharide production

II-3-4. Surface areation 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 2-5에서 나타낸 바와 같이 배양부피가 작을수록 산소공급이 원활하여 균사생장과 세포외 다당류 생산이 훨씬 향상되고 있음을 알 수 있으며, 최대 균사생장(6.69 g/L)과 세포외 다당류 생산(1.91 g/L)을 보인 배양 부피는 50 mL 이었다. 이러한 결과는 백영고 버섯 균사체의 균사생장과 세포외 다당류 생산을 위해서는 산소의 용해하는 속도와 액중에서의 이동속도가 원활하도록 적절한 배양부피를 유지하여 주는 것이 더욱 효과적임을 알 수 있다.

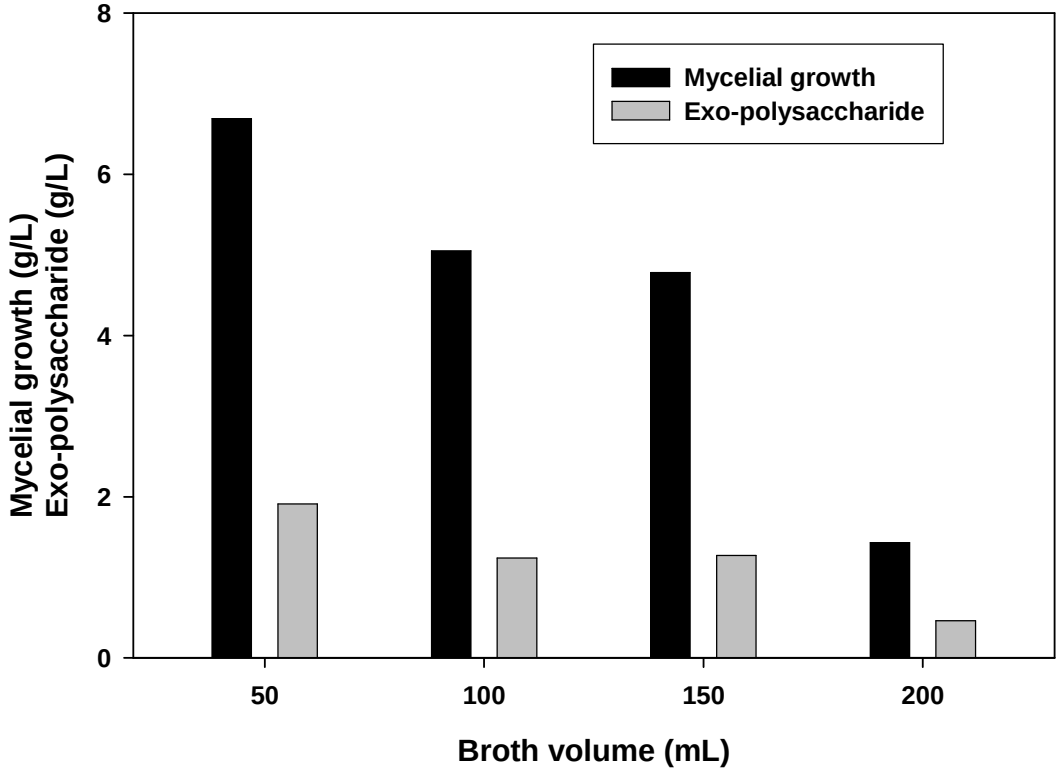

Fig. 2-5. Effect of surface aeration on *P. nebrodensis* Inzenga mycelial growth and exo-polysaccharide production with flask culture

II-3-5. Shaking speed 영향

배양액 내의 점성(viscosity)는 배양기간 동안의 균사생장과 더불어 세포외 다당류 생산물 등의 배양액 내의 축적으로 인하여 증가하게 된다. 따라서 물질전달을 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. 2-6에서 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.

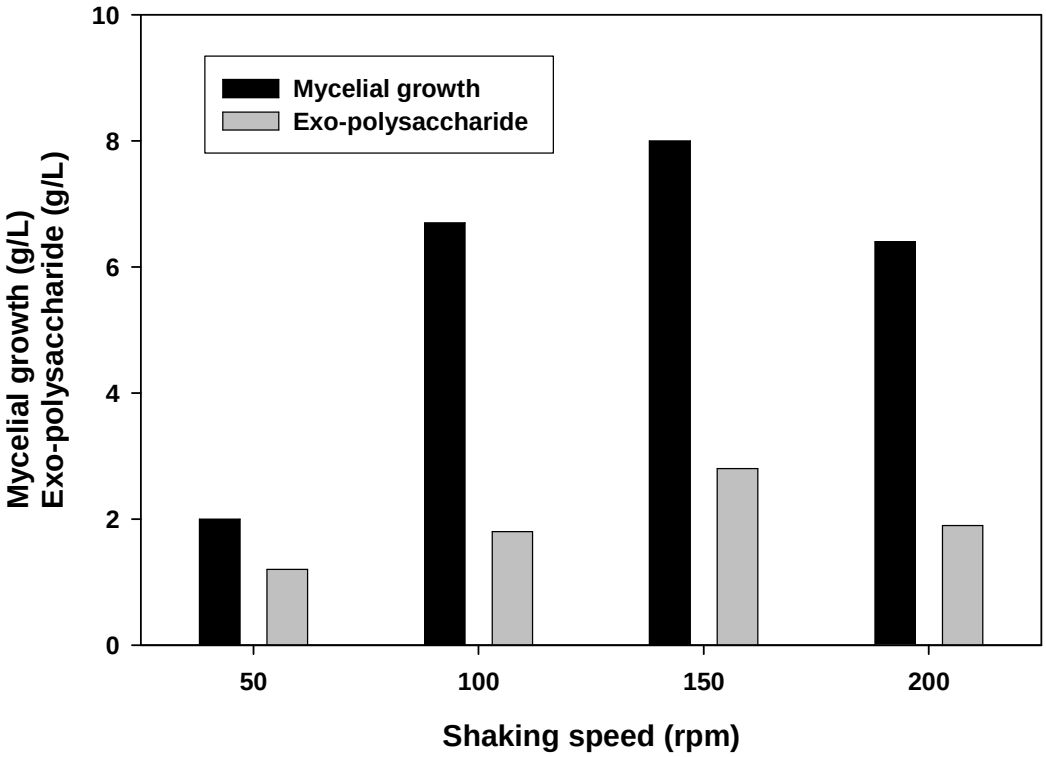

Fig. 2-6. Effect of shaking speed on *P. nebrodensis Inzenga* mycelial growth and exo-polysaccharide production with flask culture at 25℃ and initial pH 6.5-7.0

II-3-6. 탄소원 영향

탄소원은 균류에 있어서 탄수화물, 단백질, 지질, 핵산 등의 합성과 에너지 공급원으로서 균주의 생장에 필수적인 영양원이다. 백영고 버섯 균사체의 생장에 미치는 10종의 탄소원을 각각 2%(w/v)로 첨가하여 실험을 진행 하였다. Table 2-1에 나타낸것과 같이, 균사생장은 glucose(6.48 g/L) 첨가구에서 가장 양호하였고, fructose(5.68 g/L)와 maltose(5.27 g/L), mannose (4.59 g/L) 순으로 양호하였으며 arabinose(2.25 g/L)로 무첨가구보다 매우 적은 균사생장을 보였다. 세포외 다당류 생산에 있어서는 glucose(2.64 g/L) 첨가구에서 가장 우수하였고, fructose(1.39 g/L), maltose(1.20g/L)순으로 비교적 양호하였지만 다른 첨가구에서의 세포외 다당류 생산은 무첨가구에서의 세포의 다당류보다 저조한 세포외 다당류 생산을 보였다. 이러한 결과는 *Lentinus edoes*[101]를 액체배양하였을 때 glucose가 가장 양호하였다는 보고와 *Poria cocos*[102]의 최적 탄소원이 glucose라는 것을 보고한 결과와 일치하는 경향이었다. 또한, 백영고 버섯 균사체의 세포외 다당류 생산 경향은 균사생장과 더불어 증가하고 있는데 이는 탄소원이 세포외 다당류 생산수율을 향상시키는데 중요한 역할을 하고 있음을 알 수 있다. Park등[104]은 양호한 균사생장이 protein-bound 다당류 생산과 일정한 관계를 가지고 있다는 보고와 일치하는 경향임을 알 수 있다. 최적 탄소원으로 선발된 glucose의 농도에 따른 균사생장과 세포외 다당류생산에 미치는 영향을 조사한 결과 (Fig. 2-7) 백영고버섯 균사체의 최대 균사생장과 세포외 다당류 생산은 glucose 5%(w/v) 첨가구에서 얻어졌으며, 5%(w/v) 농도 이상 또는 이하의 첨가구에서는 균사생장과 세포외 다당류 생산은 저조한 것으로 나타났다. 이러한 결과는 Miko등[105]이 *Schizophyllum commune*의 균사 배양에 있어서 5%(w/v) glucose 농도이상 또는 이하로 첨가하였을 때 균사생장과

L-malic acid 생산이 저해하는 효과를 나타낸다는 보고와 일치함을 알 수 있다. 따라서 균사생장과 세포외 다당류 생산을 위한 농도는 5%임을 알 수 있다.

Table 2-1. Effects of carbon sources on *P. nebrodensis* Inzenga mycelial growth and exo-polysaccharide production with flask culture.

Carbon source	Mycelial dry weight (g/L)	Exo-polysaccharide (g/L)	Specific production (g/L/g/L)
Control	2.89	0.77	0.27
Glucose	6.48	2.64	0.40
Mannose	4.59	1.20	0.26
Galactose	2.96	0.59	0.20
Fructose	5.68	1.39	0.25
Arabinose	2.25	0.64	0.27
Xylose	3.54	0.72	0.20
Maltose	5.27	1.29	0.24
Lactose	3.01	0.60	0.20
Sucrose	3.05	0.53	0.17
Manitol	3.62	0.56	0.15

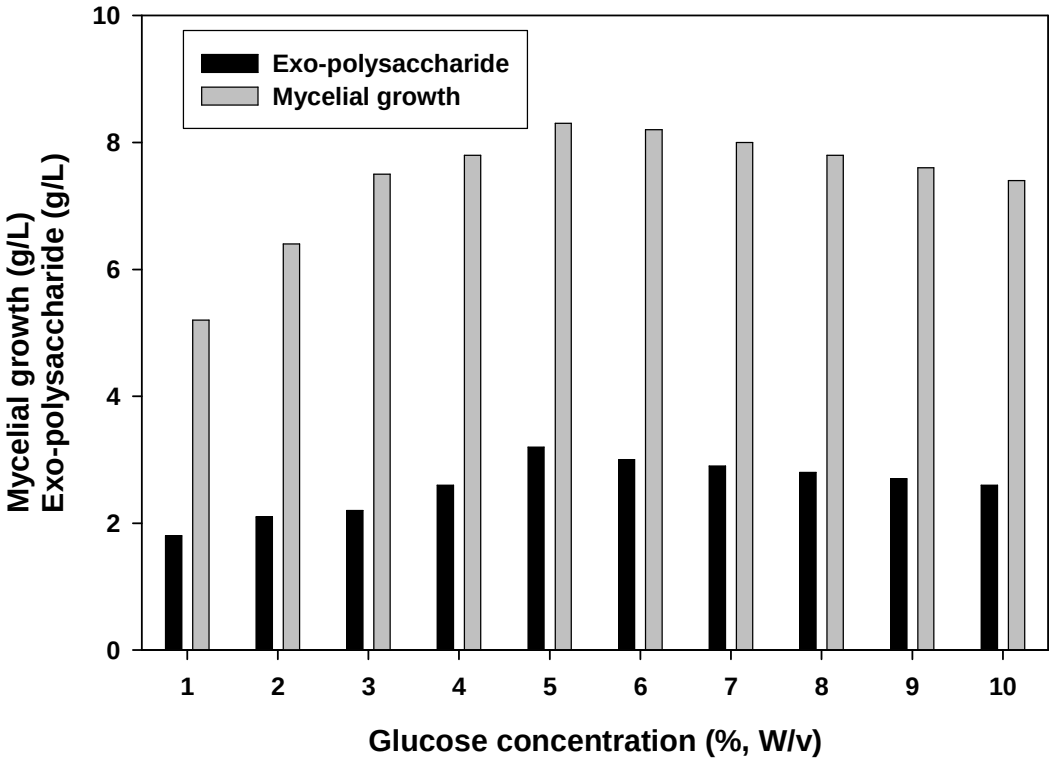

Fig. 2-7. Effect of glucose concentration on *P. nebrodensis* Inzenga mycelial growth and exo-polysaccharide production with flask culture.

II-3-7. 질소원 영향

질소원은 세포질을 구성하고 있는 주요 성분의 합성에 필수적인 영양원으로 본 연구에서 질소원이 백영고 버섯의 균사생장 및 세포외 다당류생산에 미치는 영향을 조사하기 위하여 최적 탄소원인 glucose를 5%(w/v)로 첨가된 배지에 유기태 질소원 및 무기태 질소원 등 12종을 첨가하여 조사하였다. 배양 결과는 Table 2-2에 나타 내었다. 유기태 질소원인 polypeptone과 yeast extract 첨가구에서 가장 양호한 균사생장과 세포외 다당류 생산을 보였으며, 다른 유기태 질소원인 tryptone, peptone, malt extract와 첨가구에서는 다소 억제되는 현상이었다. 무기태 질소원의 경우 유기태 질소원 첨가구에서 보다도 상대적으로 저조한 생산수율을 보이고 있으며, 대체적으로 버섯 균사생장에는 암모니아태 질소가 질산태 질소보다 유리하다는 보고[105, 106]와 비교하였을 때 백영고 버섯 균사체의 경우와 유사한 경향임을 알 수 있다. 그러나 *Ganoderma lucidum* 의경우는 무기질소원을 사용 할 경우 균사생장과 세포외 다당류 생산은 유기질소원과 거의 비슷한 결과가 나타났다 [18]. 또한 *Cordyceps militaris* 배양에서는 corn steep powder이 가장 효과적인 질소원이였다 [40]. *Fomitopsis pinicola* 의 경우는 yeast extract 와 malt extract이 함유한 배지에서 높은 균사생장과 세포외 다당류 생산이 나타났다 [81].

균사생장과 세포외 다당류 생산에 최적 polypeptone 농도를 조사하기 위하여 polypeptone 농도를 0.2에서 2%(w/v)씩 달리하여 glucose 5%(w/v)가 함유된 배지에 첨가하여 조사 하였다. 배양 결과 Fig. 2-8에 나타 내었다. Polypeptone 1.0%(w/v) 첨가구에서 최대 균사생장 및 세포외 다당류 생산을 나타냈다. 균사생장과 세포외 다당류 생산은 polypeptone 첨가 농도가 1.0%까지 증가하였지만, 1.0%(w/v)이상의 고농도에서는 억제되는 경향이었다. Yeast

extract의 농도에 따른 균사생장과 세포외 다당류 생산에 미치는 영향을 조사하고자 yeast extract의 농도를 0.1 - 1.0%(w/v)까지 달리하여 glucose 5.0%(w/v)와 polypeptone 1.0%(w/v)가 함유된 배지에 첨가하여 조사하였다. Fig. 2-9에서 보는 바와 같이 균사생장과 세포외 다당류 생산은 polypeptone 1.0%(w/v)만 첨가된 경우보다 0.8%(w/v)의 yeast extract을 혼합하여 첨가되었을 때의 균사생장과 세포외 다당류 생산은 훨씬 더 향상된 생산수율을 보였다. 따라서 최적 질소원인 polypeptone과 yeast extract의 최적 첨가농도는 각각 1.0%(w/v)와 0.8%(w/v)임을 알 수 있다. 이러한 혼합 질소원의 효과는 *Fomitopsis pinicola*의 경우와 거의 비슷한 결과가 얻어졌다 [81].

Table 2-2. Effects of nitrogen sources on *P. nebrodensis Inzenga* mycelial growth and exo-polysaccharide production with flask culture.

Nitrogen source	Mycelial dry weight (g/L)	Exo-polysaccharide (g/L)	Specific production (g/L/g/L)
Control	1.14	0.49	0.43
$Ca(NO_3)_2$	2.20	0.81	0.37
$NaNO_3$	0.01	N.D.	-
$(NH_4)_2SO_4$	0.75	N.D.	-
NH_4NO_3	0.71	N.D.	-
$NH_4H_2PO_4$	3.68	1.07	0.29
$(NH_4)_2HPO4$	3.01	1.02	0.33
KNO_3	1.09	0.36	0.33
Malt extract	2.22	1.44	0.65
Peptone	3.04	1.59	0.52
Tryptone	4.65	1.79	0.38
Yeast extract	6.19	2.45	0.40
Polypeptone	6.84	3.55	0.51

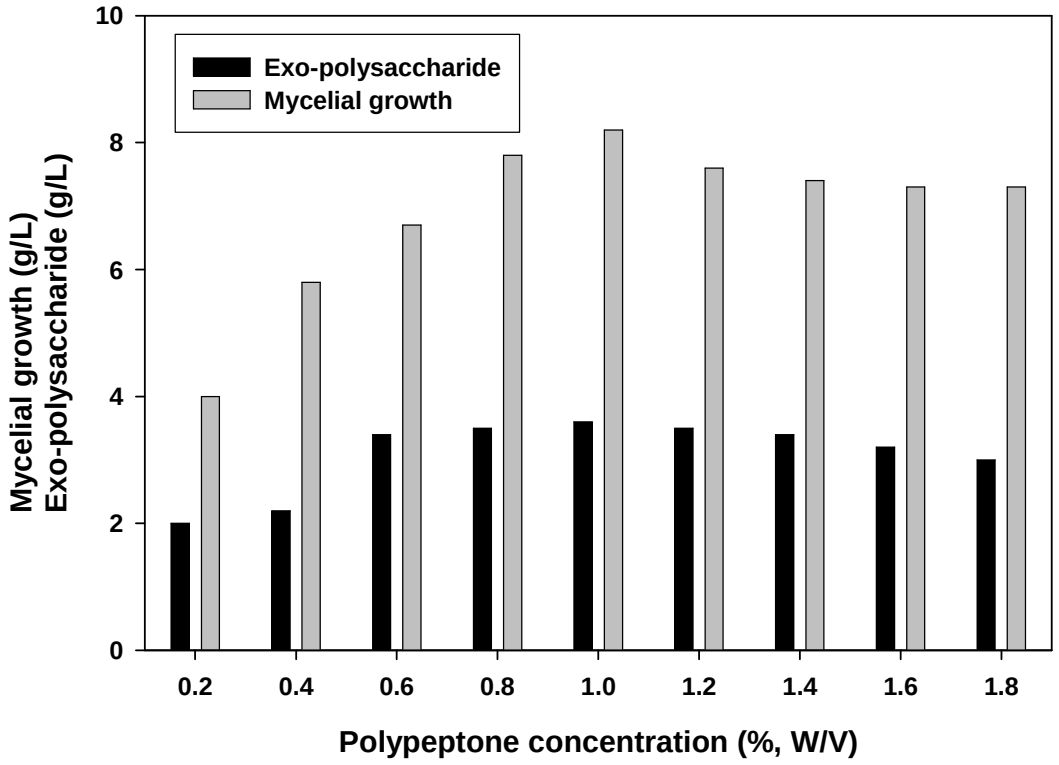

Fig. 2-8. Effect of polypeptone concentration on *P. nebrodensis* Inzenga mycelial growth and exo-polysaccharide production with flask culture.

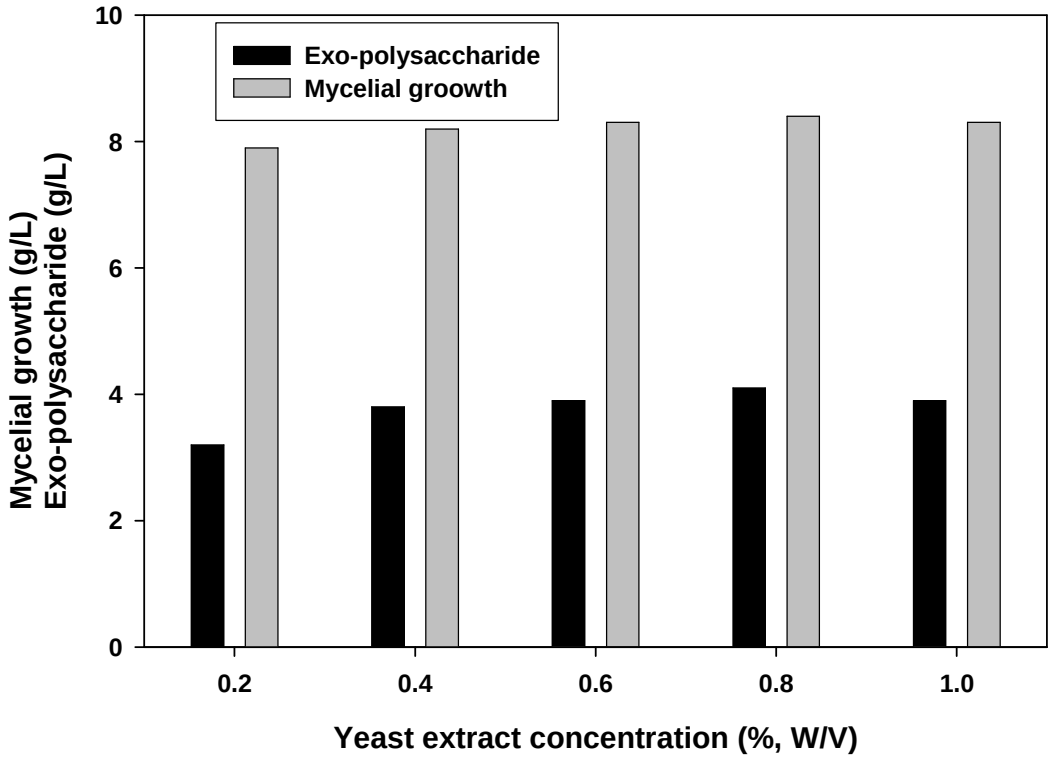

Fig. 2-9. Effect of yeast extract concentration on *P. nebrodensis* Inzenga mycelial growth and exo-polysaccharide production with flask culture containing 1% of polypeptone.

II-3-8. 무기염류 영향

균사생장과 세포외 다당류생산에 관한 무기염류의 영향을 조사하기 위하여 glucose 5%(w/v), polypeptone 1.0%(w/v), yeast extract 0.8%(w/v)가 함유된 배지에 9종의 무기염류를 각각 0.15%(w/v)씩 첨가하여 조사하였다. 그 결과 Table 3-3에서 보는 바와 같이 6종의 무기염류는 백영고 버섯 균사생장에 효과적이었고 그 중에서도 K_2HPO_4와 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 첨가구에서 균사생장과 세포외 다당류 생산이 가장 우수하였다. 이러한 결과는 Chen과 Liy[107]가 *Aspergillus japonicus*의 효소생산에 있어서 K_2HPO_4와 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$의 첨가가 효과적이었음을 보고한 결과와 유사한 경향임을 알 수 있다. 또한 buffering reagent로 작용하는 PO_4^{3-}, 세포구조를 형성하는 K^+, 그리고 균류의 세포벽의 생합성 및 이온 투과성에 영향을 미치는 Mg^{2+}의 효과에 의하여 균사생장과 세포외 다당류 생산수율을 향상시킨 것으로 사료된다. 최적 무기염류로 선발된 K_2HPO_4의 첨가농도에 따른 영향을 조사하고자 glucose 5%(w/v), polypeptone 1.0% (w/v), yeast extract 0.8%(w/v)가 함유된 배지에 0.02 - 0.3%(w/v)씩 첨가하여 조사한 결과 Fig. 2-10에서와 같이 0.12%(w/v)농도의 K_2HPO_4 첨가구에서 최대 균사생장(12.9 g/L)과 세포외 다당류 생산(4.15 g/L)을 보였다.

또한 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$의 첨가에 의해 따른 균사생장과 세포외 다당류 생산을 조사하기 위하여 glucose 5%(w/v), polypeptone 1.0%(w/v), yeast extract 0.8%(w/v), K_2HPO_4 0.12 %(w/v)가 함유된 배지에 0.02 - 0.3%(w/v)씩 첨가하여 조사한 결과 Fig. 2-11에서와 같이 균사생장은 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 첨가에 따른 수율증가 효과는 나타내지 않았지만, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.12%(w/v) 농도가 첨가된 시험군에서의 세포의 다당류 생산의 수율은 K_2HPO_4의 첨가 농도에 따른 실험결과에서 나타난 세포외 다당류 생산보다 향상된 수율을 보였다.

따라서 백영고버섯 균사체의 균사생장과 세포외 다당류의 생산을 위한 최적 무기염류인 K_2HPO_4와 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$의 최적 첨가농도는 똑같이 0.12%(w/v)임을 알 수 있다. 이러한 결과은 *F. pinicola*에서 결과와 거의 비슷한 결과가 얻어졌다. 그러나 *L. subnudus* and *S. commune* 배양에 Mg^{2+}, K^{+}, 와 Ca^{2+}을 첨가 할경우 균사성장을 촉진한다고 하였고, *Pellinus sp.*, 경우는 KH_2PO_4 와 $CaCl_2$이 균사성장에 가장 효과적이다고 보고 하였다 [28]. 또한 Kim등은 *Agaricus blazei*의 배양시 $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, KH_2PO_4, $MnSO_4 \cdot 5H_2O$, 또는 $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$을 첨가 할때 높은 균사성장과 세포외 다당류의 생산이 얻어졌고 특히 $MnSO_4 \cdot 5H_2O$ 0.05%을 첨가 할때 균사성장과 세포외 다당류의 생산은 약 10% 증가 하였다고 보고 하였다 [82].

Table 2-3. Effects of mineral sources on *P. nebrodensis* Inzenga mycelial growth and exo-polysaccharide production with flask culture.

Mineral source	Mycelial dry weight (g/L)	Exo-polysaccharide (g/L)	Specific production (g/L/g/L)
Control(none)	7.15	1.90	0.27
$MgSO_4$	6.84	2.51	0.37
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	7.30	0.54	0.07
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	0.16	N.D.	-
$MgCl_2$	8.57	1.48	0.17
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	9.69	3.34	0.34
Na_2HPO_4	7.32	1.27	0.17
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	6.64	1.02	0.15
K_2HPO_4	10.92	3.75	0.34
KH_2PO_4	8.31	2.64	0.32

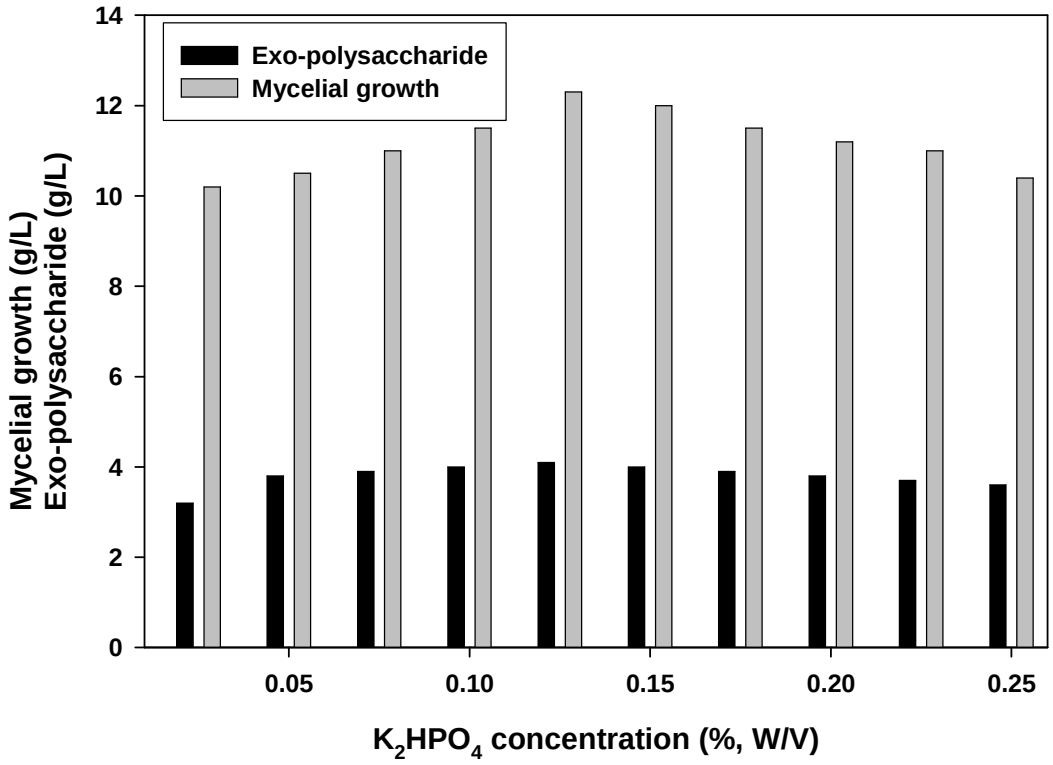

Fig. 2-10. Effect of K_2HPO_4 concentration on *P. nebrodensis* Inzenga mycelial growth and exo-polysaccharide production with flask culture.

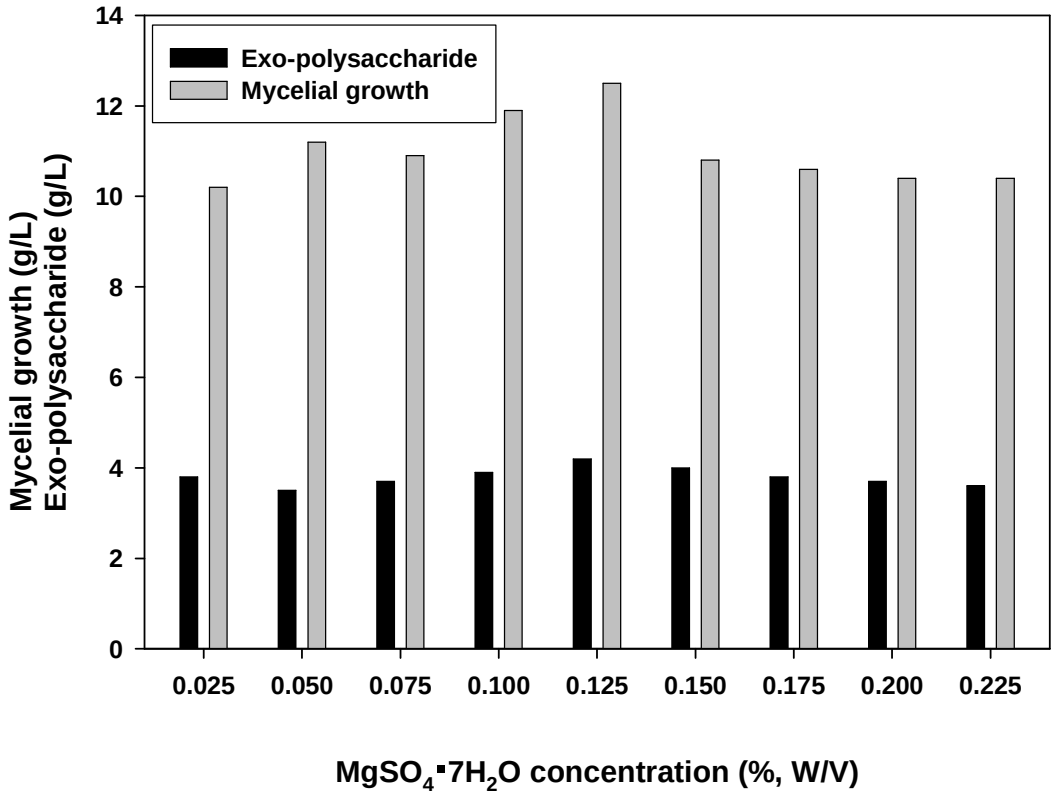

Fig. 2-11. Effect of $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ concentration on *P. nebrodensis* Inzenga mycelial growth and exo-polysaccharide production with flask culture.

II-4. 결론

본 연구는 백영고버섯의 액체배양로부터 균사체 대량생산 및 세포외 다당류 생성에 미치는 배양조건의 최적화를 flask에서 검토하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 배양온도 20℃ 이하와 30℃이상에서는 백영고버섯 균사체 생육이 급속히 저하되는 것을 알 수 있으며, 25℃에서 균사생육이 가장 양호하였다. 접종량 5%(w/v)로 시험한 군들은 최대 균사생장과 세포외 다당류 생산을 나타냈으며, 초기 pH 7.0에서 균사생장은 5.95 g/L이지만 세포외 다당류 생산은 2.09 g/L로 최대 생산량을 보였다.

2. 여러 탄소원중에서 균사생장에 대하여 단당류인 glucose(6.48 g/L) 첨가구에서 가장 양호하였고, 세포외 다당류 생산에 있어서는 glucose(2.64 g/L) 첨가구에서 가장 우수하였다. 유기태 질소원인 polypeptone과 yeast extract 첨가구에서 가장 양호한 균사생장과 세포외 다당류 생산을 보였다. 특히 Polypeptone 1.0%(w/v) 와 yeast extract 0.8%(w/v)의 혼합 질소원인경우는 단독 질소원보다도 균사생장과 세포외 다당류 생산이 증가 하였다. 6종의 무기염류는 백영고 버섯 균사생장에 효과적이었고 그 중에서도 K_2HPO_4 0.12%, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.12% 첨가구에서 균사생장과 세포외 다당류 생산이 가장 우수하였다.

제 *III* 장. *Jar fermentor* 및 *Air bubble bioreactor* 배양

III-1. 서론

버섯의 식품학적 가치는 맛뿐만 아니라, 아미노산, 당, 비타민 등을 풍부하게 함유한 건강식품으로 평가되고 있으며 버섯 균사체의 심부배양도 식품이나 사료를 목적으로 한 것[65-67], 배양 균사체의 비타민이나 질소함량[68, 69] 등의 성분, 그리고 원료비의 절감을 위한 폐자원의 이용[69-71]등에 관하여 많은 검토가 이루어진 바가 있다. 또한 버섯류에는 세균, 곰팡이, 효모 및 방선균 등과 같이 생리활성물질 생산균의 탐색대상이 되고 있어 여러 종의 항생물질[72,73], 항암물질[74,75], 효소[76] 및 기타 여러 가지 물질[77,78]등이 보고 되었다. 따라서, 심부배양에 의한 유용물질 생산을 위한 버섯 균사체의 배양이 시도되고 있으나 배양공학 측면에서의 버섯 균사체 대량 생산 및 세포외다당류에 미치는 여러 배양조건 등에 관한 연구는 아직 부족 한 상태이다.

Stirred tank bioreactor 시스템은 aerobic bioprocessing을 위한 가장 전형적인 bioreactor이다. 대부분의 버섯 균사체 심부 배양은 선단력 (shear stress)이 있는 bioreactor에서 진행 되고 있다. 이러한 선단력 (shear stress)은 균사체 형성, production formation 및 product yield등을 영향을 주고 있다. 특히 mechanical power가 많이 필요로 하고 있어 경제적으로 문제가 될 수 있고 운전이 복잡하다. 또한 구조가 복잡하여 maintenance가 아주 어렵다. 그러나 선단력 (shear stress)이 없는 air-bubble reactor은 bioreactor 구조 및

maintenance가 아주 간단하여 경제적으로 아주 유용하게 사용되고 있으며 및 scale-up 하기 쉽다. 그러나 이러한 air-bubble reactor은 산소 공급이 기존의 bioreactor (stirred tank bioreactor)보다도 일반적으로 낮아 areation에 대한 최적 배양조건이 필요하다.

따라서 본 연구는 flask 최적 배양조건을 이용하여 jar fermentor 및 air bubble bioreactor에서 scale up을 하기 위해 jar fermentor에서의 agetiaion speed 및 aeration 그리고 air-bubble reactor에서 aeration을 검토 하였다.

III-2. 재료 및 방법

1. 균주 및 보존

본 연구에서 사용한 균주는 백영고(*Pleurotus nebrodensis* Inzenga) 버섯으로 충남 가야 백송 종균배양소에서 분양받아 사용하였으며, patoto dextrose agar(PDA)배지에서 25℃, 7일간 배양한 후 4℃에서 보존하였고, 2주마다 계대배양하면서 실험에 사용하였다.

2. 접종원

접종원의 준비는 고체배양의 경우, 냉장보관하던 균주를 YMGA배지(malt extract 10 g/L, glucose 4 g/L, yeast extract 4 g/L and agar 20 g/L)의 중앙부에 5mm cork borer로 절취한 mycelium disk를 접종하여 25±1℃의 항온기에서 배양한 후 실험에 사용하였으며, 액체배양의 경우는 300 mL 플라스크에 50 mL의 기본배지(YMG : glucose 20 g/L, yeast extract 3 g/L, malt extract 3 g/L, KH_2PO_4 1 g/L and $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5 g/L)를 121℃, 15분간 고압멸균한 후 5mm cork borer로 mycelium disk 4 - 5개를 절취하여 접종한 후 25℃, 8일간 진탕배양한 다음, 배양액을 균질기로 무균적으로 30 sec 동안 균질화하여 접종원으로 사용하였다. 종균 배양액 10%을 Jar fermentor 및 bubble bioreactor에 접종하여 균사체 및 세포외 다당류를 검토 하였다.

3. 분석방법

분석방법은 제 2장과 동일함

4. Jar fermentor 배양

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

5. Air bubble bioreactor 배양

Air bubble bioreactor을 이용한 배양은 working volume 3 L가 함유한 5 L 용량의 Reactor로써 자동온도조절기, 용존산소농도(DO)센서 및 pH센서를 부착하고 있다. 산소의 공급은 공기 압축기를 이용하여 여과 필터를 거쳐 발효기 안으로 유입되게 하였으며, 배양시 발생하는 거품을 제거하기 위하여 Silicon 소포제를 사용하였다. 유량(areation)은 0.5 vvm과 3.0 vvm으로 달리하여 areation에 따른 균사생장과 세포외 다당류 생산을 조하였다. Air lift bioreactor

배양에 사용한 배지는 flask 배양에서 영양요구성 실험을 통하여 얻어진 최적 배지를 사용하였고, 조업 온도와 pH는 각각 25℃, 7.0로 하여 배양기간 동안 일정하게 유지되도록 조절하였고 배양기간은 8 - 12일간 배양하여 균사생장과 세포외 다당류 생산을 조사하였다.

III-3. 결과 및 고찰

III-3-1. Jar fermentor의 agitation speed 영향

Flask culture에서의 영양 요구성 실험 결과 얻어진 최적배지(glucose 5%(w/v), polypeptone 1.0%(w/v), yeast extract 0.8%(w/v), K_2HPO_4 0.12 %(w/v) 및 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.12 %(w/v))가 함유한 working volume 2.0 L를 5 L jar fermintatior에서 agitation speed을 검토 하였다. 백영고 버섯의 균사생장과 세포외 다당류 생산에 관한 agitation speed의 영향은 100 - 300 rpm으로 달리하여 조사하였다. 배양온도, pH 및 aeration은 각각 25℃, 7.0 그리고 0.5 vvm으로 배양기간 동안 일정하게 유지되도록 조절하였다. 결과는 Fig. 3-1에 나타 내었다. 100-300 rpm agitation speed하에서 배양기간 동안의 균사생장과 세포외 다당류 생산에 관한 것으로 결과에서 보는 바와 같이 agitation speed는 균사생장과 세포외 다당류 생산에 영향을 미치고 있음을 알 수 있다. Agitation speed가 200 rpm이상까지 증가시켜 주었을 때 균사생장과 세포외 다당류 생산을 감소하고 있음을 알 수 있다. 이러한 결과는 agitation speed가 증가할수록 impeller에 의한 강한 shear stress가 발생하여 발효조 내의 균사에 손상을 입혀 균사생장과 세포에 다당류 생산에 부정적인 영향을 끼쳤기 때문인 것으로 사료된다. 최대 균사생장과 세포외 다당류 생산은 150 rpm의 agitation speed 조건하에서 얻어졌으며 그 생산량은 배양 9일후 각각 8.5 g/L와 3.10 g/L로 나타났다. 따라서 최적 agitation speed는 150 rpm으로 나타 났다..

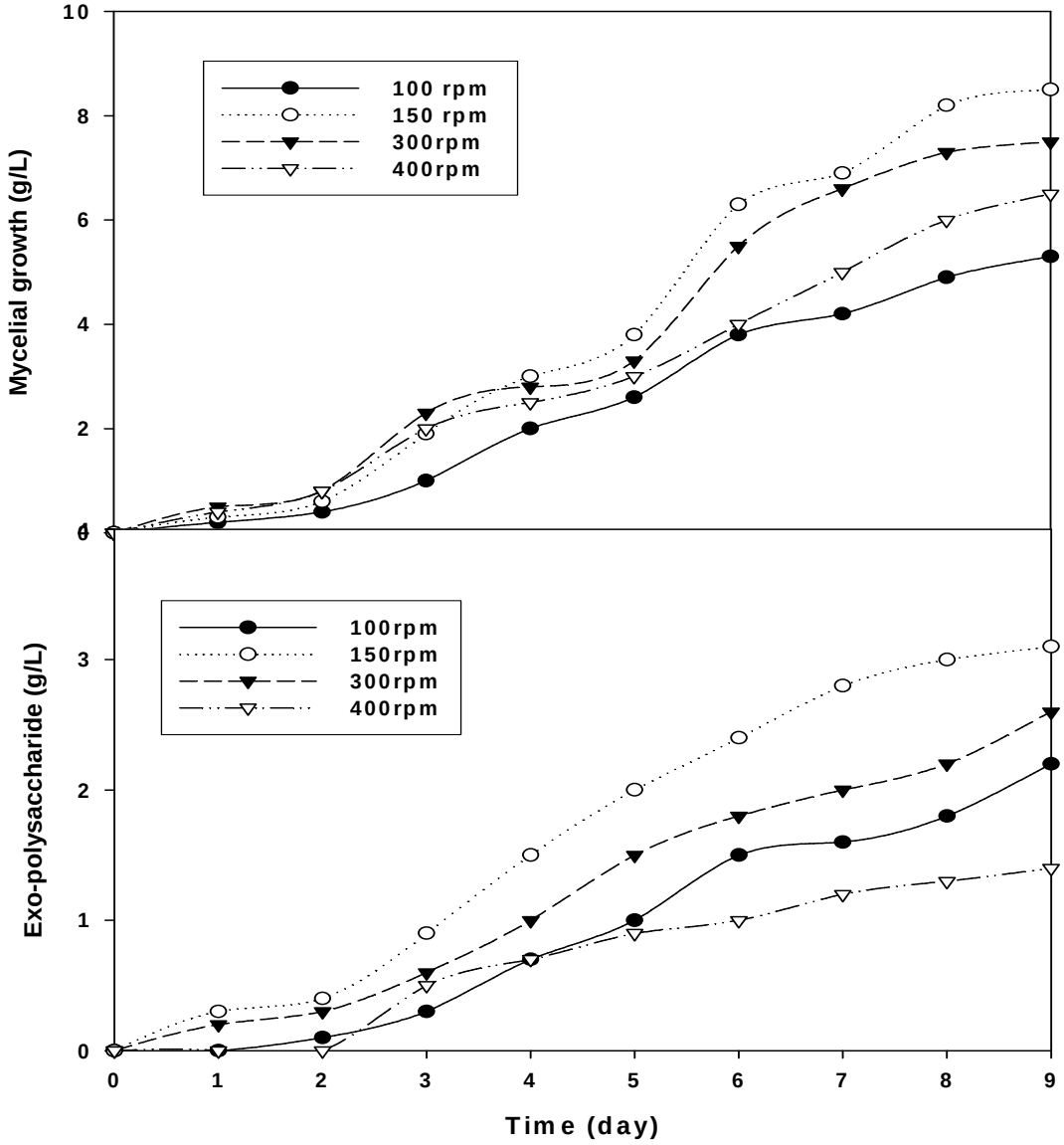

Fig. 3-1. Effect of agetation rate on *P. nebrodensis* Inzenga mycelial growth and exo-polysaccharide production in the jar fermentor.

III-3-2. Jar fermentor의 aeration 영향

Jar fermenter에서의 aeration에 따른 균사생장과 세포외 다당류생산에 미치는 영향을 조사하기 위하여 aeration을 각각 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 vvm으로 하여 실험을 하였다. 배양은 Flask culture에서의 영양 요구성 실험에서 얻어진 최적 배지 (glucose 5%(w/v), polypeptone 1.0%(w/v), yeast extract 0.8%(w/v), K_2HPO_4 0.12 %(w/v) 및 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.12 %(w/v)) 2.0 L를 5 L jar fermentor에 사입후 배양 온도 25℃, agitation speed 150 rpm에서 9일동안 하였다. 배양 결과는 Fig. 3-2에 나타 내었다. Aeration이 0.5vvm에서 1.0vvm으로 증가 할 경우 배양 9일후 균사성장도 증가 하였다. 그러나 1.5 vvm으로 증가 할 경우 감소 하였다. 또한, 세포외 다당류 생산도 aeration이 0.5vvm에서 1.0vvm으로 증가 할 경우 함께 증가 하였다. 그러나 1.5 vvm으로 증가 할 경우 감소 하였다. 그러므로 최적 aeration은 1.0으로 결정 했다. 이러한 결과는 aeration 공급이 증가할수록 배양액 내의 산소전달속도가 증가하여 백영고버섯의 균사생장에 유리한 환경을 조성하게 되어 결국 균사생장과 세포외 다당류 생산의 수율의 영향에 미친 것으로 사료된다.

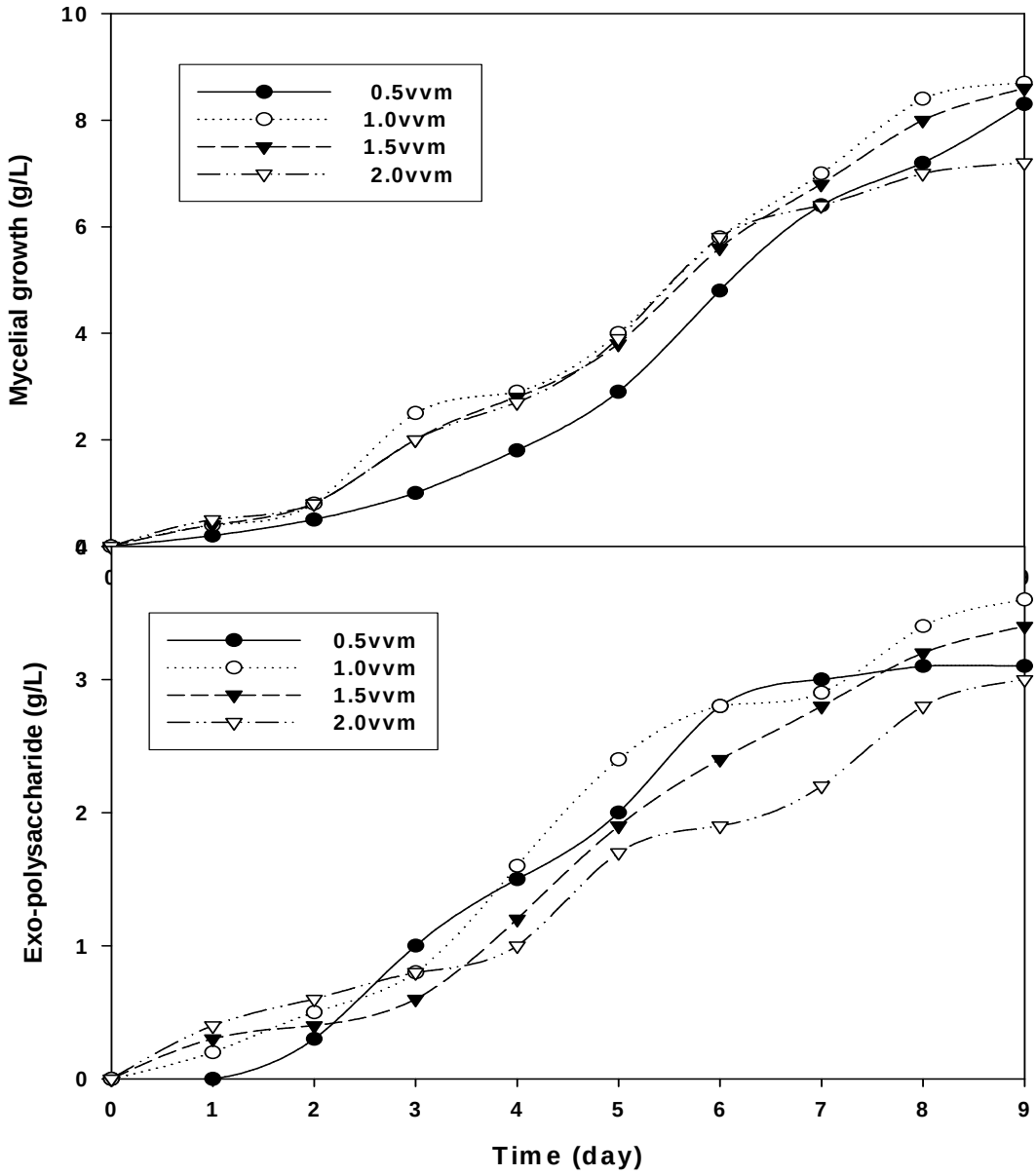

Fig. 3-2. Effect of aeration on *P. nebrodensis* Inzenga mycelial growth and exo-polysaccharide production in the jar fermentor.

III-3-3. Jar fermentor에서 최적배양

Basal culture conditions와 optimum culture conditions을 비교하기 위해 배양시간에 따른 균사생장, 세포외 다당류 생산, pH, 그리고 기질인 glucose 소비량을 조사하였다. Fig. 3-3은 배양시간에 따른 백영고버섯의 균사생장과 세포외 다당류 생산 및 잔존 glucose 농도의 변화를 나타낸 것이다. Basal culture conditions에서 배양 할 경우 균사 성장은 배양시간 증가와 함께 증가 하였다. 특히 배양 4일까지는 optimum culture conditions와 비교할 때 거의 비슷하게 성장 하였다. 그러나 배양 6일후부터는 optimum culture conditions보다 감소하였다. pH는 배양 일후부터 감소하기 시작하여 배양 3일후에서부터 배양 10일까지 6.4 - 6.6의 범위였다. 그러나 배양 11일부터 증가하기 시작하여 배양 12일후에는 7.2까지 상승 했다. Glucose는 배양시간 증가와 함께 서서히 소비가 증가하여 배양 12일후 약 27g/L가 소비되었다. 세포외 다당류 생산은 배양 시간 6일까지 함께 증가 하였다. 그러나 배양 7일후부터는 더 이상 증가 하지 않했고, 세포외 다당류 최대 생산은 배양 6일후 2.5g/L이 얻어졌다.

그러나 Optimum culture conditions에서 배양할 경우 균사생장은 배양시간 4일 이후부터 균사생장이 급격히 이루어져 배양시간 10일 경에 최대 균사생장(10.24 g/L)을 보인 다음 그 이후 균사생장이 증가 하지 않했다. pH는 배양 초기에 7.0에서 배양 2일에 6.4로 감소하기 시작하여 배양 전기간동안 6,3 - 6,5로 유지 했다. Glucose 소비는 배양시간 5일까지 급격히 증가하였다. 그러나 배양 6일부터는 서서히 증가하여 배양 12일후 약 46g/L가 소비되었다. 세포외 다당류 생산은 배양 증가와 함께 증가 하여 배양 10일째 최대 생산량(3.85 g/L)을 보인다음 그 이후에 균사생장의 억제됨에 따라 세포외 다당류 생산도 저하되었다. 이 결과는 Basal culture conditions보다 1.5배 증가 하였다. 백영고버섯

균사체의 균사생장은 급격히 증가하기 시작하는 시점에서 배지내의 기질인 glucose의 이용도 급격히 증가하고 있으며, 배양기간 동안 배지 내의 glucose 농도는 50g/L에서 4g/L로 감소하였다. 이러한 결과는 백영고 버섯의 세포외 다당류 생산 방식이 증식 연동형 방식인 것으로 판단되는데, 이에 대한 보다 많은 연구가 필요한 것을 사료된다.

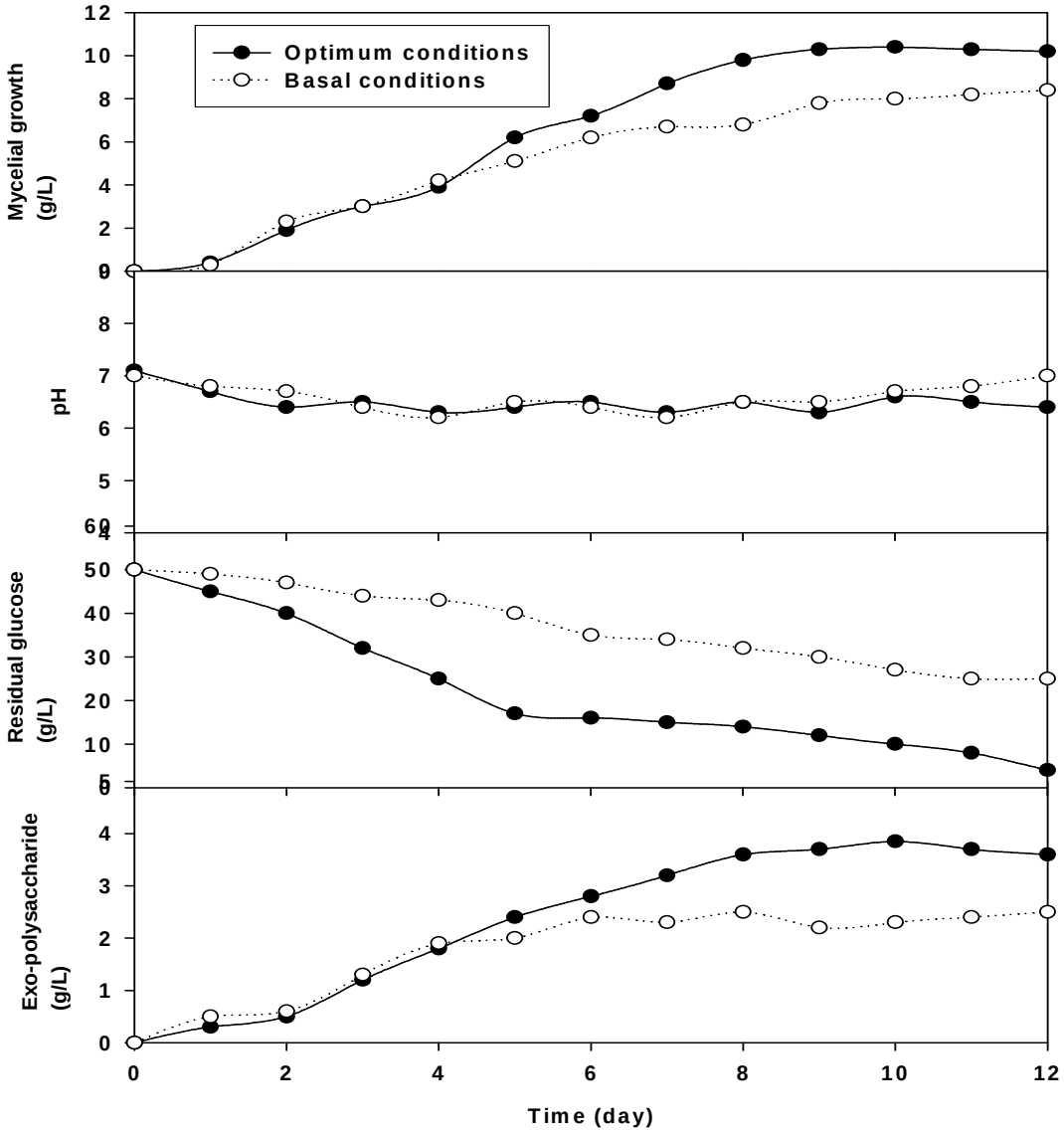

Fig. 3-3. Changes of *P. nebrodensis* Inzenga mycelial growth and exo-polysaccharide production in jar fermentor under optimum and basal conditions of culture and media.

III-3-4. Air Bubble bioreactor의 aeration 영향

Flask culture에서의 영양 요구성 실험 결과 얻어진 최적배지(glucose 5%(w/v), polypeptone 1.0%(w/v), yeast extract 0.8%(w/v), K_2HPO_4 0.12 %(w/v) 및 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.12 %(w/v)) 2.0 L를 3 L Air-Bubble bioreactor에 사압한 후 배양온도 25℃, pH 7.0에서 9일동안 그리고 aeration 변화 (0.5, 1.0, 2.0, 3.0 vvm) 에 따른 균사생장의 세포외 다당류 생산을 조사하였다. Aeration 변화에 따른 균사생장과 세포외 다당류 생산은 Fig. 3-4에 나타 냈다. 결과에서 보는 바와 같이 aeration 1.0-2.0vvm에서 균사생장이 배양시간 5일 이후부터 균사생장이 급격히 이루어져 배양시간 9일 경에 최대 균사생장(8.3 g/L)이 보였다. 그러나 aeration 2.0vv일때 세포외 다당류 생산은 배양시간 9일경에 2.60g/L으로 최대결과였다. 또한 접종후 배양일로부터 5일까지 비교적 낮은 통기량에서 균사생장이 활발하였지만, 7일정도를 기점으로 균사체의 생장속도가 비교적 1.0-2.0vvm 통기량에서 균사생장이 잘 되는 것으로 보아 균사 생장이 활발한 시점부터 최적 통기량이 요구 되는 것으로 판단된다.

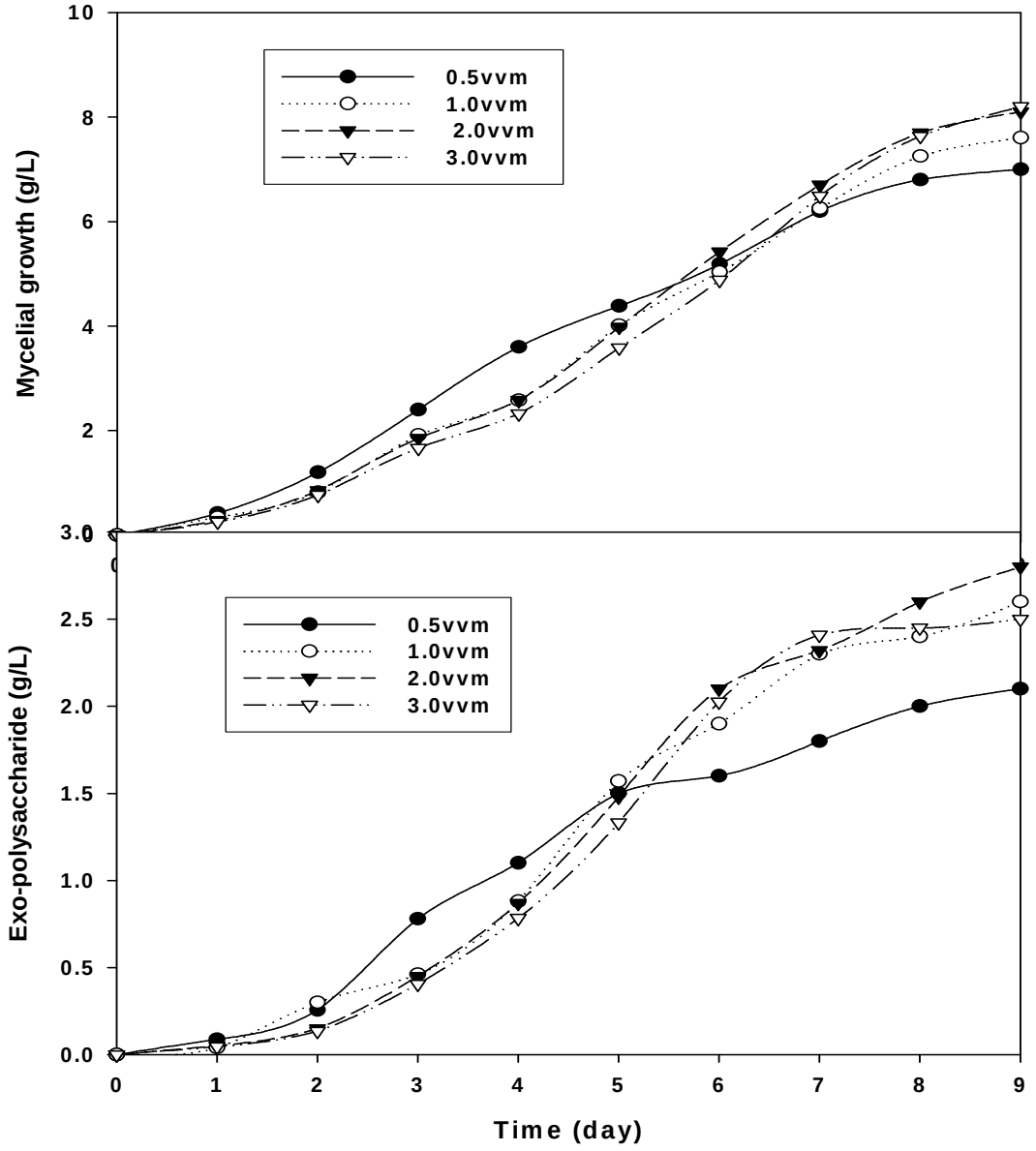

Fig. 3-4. Effect of aeration on *P. nebrodensis* Inzenga mycelial growth and exo-polysaccharide production in an air bubble bioreactor.

II-3-5. Air Bubble bioreactor에서 최적배양

Air bubble bioreactor에서 basal culture conditions와 optimum culture conditions을 비교하기 위해 배양시간에 따른 균사생장의 세포외 다당류 생산, pH, 그리고 기질인 glucose 소비량을 조사하였다. Fig. 3-5은 배양시간에 따른 백영고버섯의 균사생장과 세포외 다당류 생산 및 glucose 농도의 변화를 나타낸 것이다. Basal 배양 조건을 이용할 경우 균사 성장은 배양시간 증가와 함께 증가 하였다. 특히 배양 4일까지는 optimum culture conditions와 비교할 때 거의 비슷하게 성장 하였다. 그러나 배양 6일후부터는 optimum culture conditions보다 감소 하였다. pH는 배양 일후부터 감소하기 시작하여 배양 3일후에서부터 배양 10일까지 6.4-6.6였다. 그러나 배양 9일부터 증가하기 시작하여 배양 12일후에는 7.4까지 상승 했다. Glucose는 배양시간 증가와 함께 서서히 소비가 증가하여 배양 12일후 약 21g/L가 소비되었다. 세포외 다당류 생산은 배양 시간 10일까지 증가와 함께 증가 하였다. 그러나 배양 10일후부터는 더 이상 증가 하지 않했다. 세포외 다당류 최대 생산은 배양 10일후 2.1g/L이 얻어졌다. 그러나 Optimum culture conditions에서 배양 할경우 결과에서 보는 바와 같이 균사생장은 배양시간 증가와 함께 증가 하여 배양시간 12일 경에 최대 균사생장(8.2 g/L)이 보였고 그 이후는 증가 하지 않했다. pH는 배양 초기에 7.0에서 배양 3일에 6.4로 감소하기 시작하여 배양 전기간 동안 6,3-6,7로 유지 했다. Glucose는 배양시간 6일까지 급격히 소비가 증가하였다. 그러나 배양 7일부터는 서서히 소비가 증가하여 배양 12일후 약 36g/L가 소비되었다. 세포외 다당류 생산은 배양 증가와 함께 증가 하였다. 최대 세포외 다당류 생산은 배양 12일째 최대 생산량(3.3.2 g/L)이 얻어졌다. 이 결과는 basal conditions보다 약 1.7배 증가 하였다.

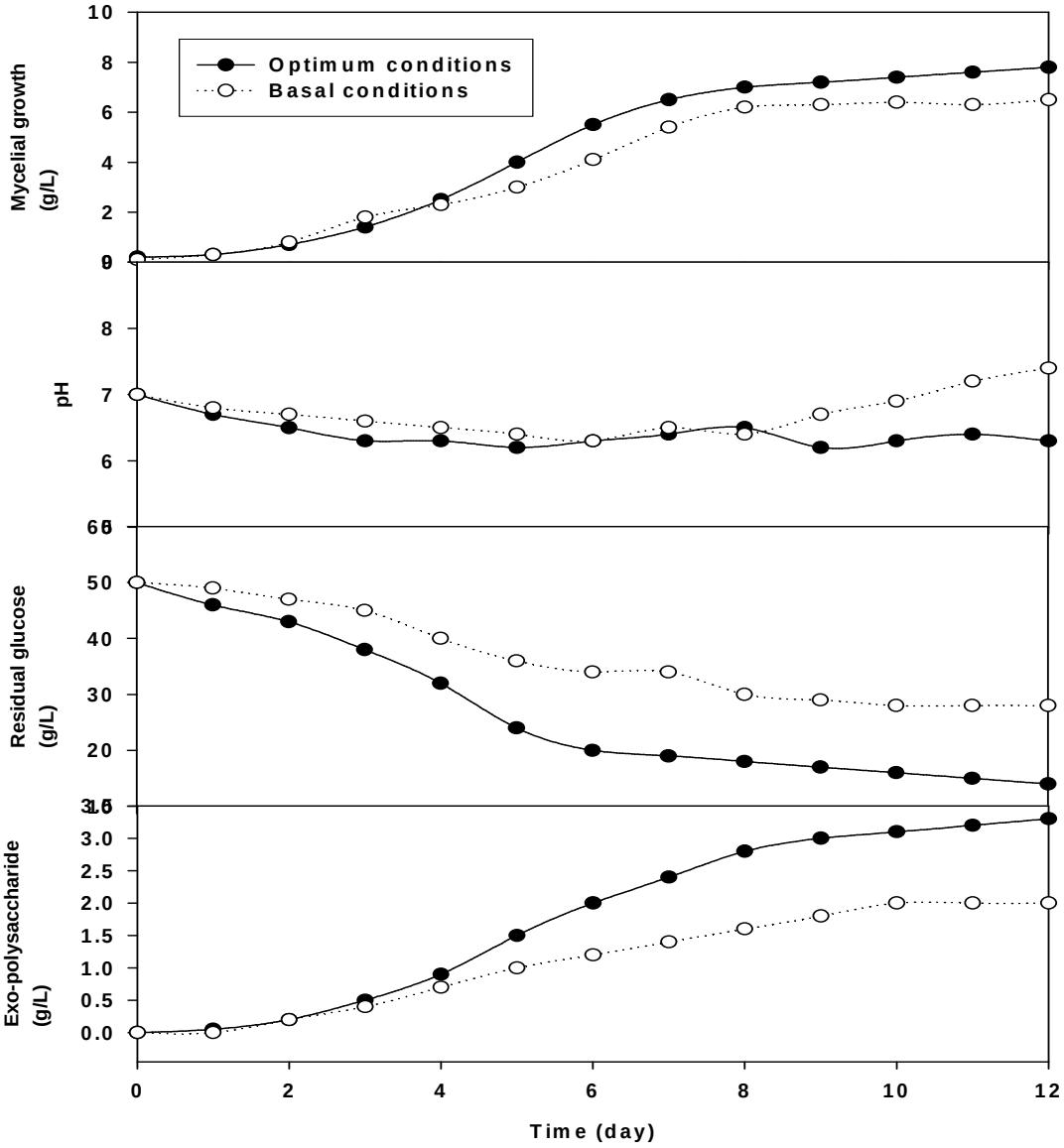

Fig. 3-5. Changes of *P. nebrodensis* Inzenga mycelial growth and exo-polysaccharide production in air bubble bioreactor under optimum and basal conditions of culture and media.

III-4. 결 론

본 연구는 백영고버섯의 액체 배양로부터 균사체 대량생산 및 세포외 다당류 생산을 위한 flask 최적배양 조건을 이용하여 jar fermentor와 air-buble bioreactor에서 scale up 하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. Jar fermentor의 최대 균사생장과 세포외 다당류 생산은 150 rpm의 agitation speed 조건하에서 얻어졌으며 그 생산량은 배양 9일후 각각 8.5 g/L와 3.10 g/L로 나타났다. Aeration경우는 0.5vvm에서 1.0vvm으로 증가 할 경우 배양 9일후 균사성장도 증가 하였다. 최적 배양조건을 이용하여 Jar fermentor에서 세포외 다당류 생산은 배양 10일째 최대 생산량(3.85 g/L)을 보인다음 그 이후에 균사생장의 억제됨에 따라 세포외 다당류 생산도 저하되었다. 이 결과는 Basal culture conditions보다 1.5배 증가 하였다.

2. Air-Buble Bioreactor에서 aeration 2.0vv일때 세포외 다당류 생산은 배양시간 9일경에 2.60g/L으로 최대결과 였다. 특히 optimum culture conditions에서 배양 할경우 균사생장은 배양시간 12일 경에 최대 균사생장(8.2 g/L)이 보였고 그 이후는 증가 하지 않했다. 최대 세포외 다당류 생산은 배양 12일째 최대 생산량(3.3.2 g/L)이 얻어졌다. 이 결과는 basal conditions보다 약 1.7배 증가 하였다.

그러나 본 연구에서 얻어진 결과는 백영고버섯으로부터 균사생장과 세포외 다당류의 생산을 위한 효율적인 공정의 개발에 있어서 불충분한 점이 있다. 따

라서 대규모의 균사체 및 세포외 다당류 생산을 위해서는 백영고버섯 균사체로부터 생산되는 세포외 다당류의 특성, 배양조건의 최적화, 적절한 반응기의 구성 및 고안 등의 많은 연구가 필요한 것으로 사료된다.

.

제 *IV* 장. 생물활성에 대한 연구

IV-1. 연구 배경

최근 국제무역기구 (WTO) 체제출범으로 우리 농산물도 세계시장에서 치열한 경쟁을 해야 하는 매우 절박한 상황에 처하게 되었으며, 농산물의 수입으로 인해 농촌의 경제가 위기에 처하게 되었다. 따라서 우리의 농업도 이와 같은 개방화와 국제경제상황에서 능동적으로 대처할 수 있는 부가가치가 높은 농산물을 다양하게 개발하고 상품화할 필요가 있다. 버섯은 전통적인 식품및 의약품으로 오래동안 사용되어왔다. 특히 담자균의 버섯은 영양, 의학 및 약효의특성이 많아 많은 연구가 진행되고 있다. 일본에서는 1977년에 구름버섯에서 추출된 PSK(polysaccha -ride Kureha, Krestin, 상표; 三共, 회사; 吳羽, 경구약)가 항암제로 사용되었다. 표고버섯에서 Lentinan이 항암효과와 면역 자극활성을 나타내는 것으로 보고되었으며, 1985년에는 咪の素라는 상표로 山之內제약과 森下제약에서 위암치료를 위한 주사약으로 판매가 되기 시작하였다 [79-81]. 치마버섯은 Schizophyllan이라는 다당체를 함유하고 있고, 이 물질이 제암, 세포면역증가 및 항생제로서 작용하는 것이 밝혀져 있다. 이는 1986년에 台糖이라는 이름으로 科硏제약에서 자궁암의 치료를 위한 주약으로 개발하였다. 한편 중국에서는 저령다당체 주사약과 표고다당체 타블렛이 개발되어 시판되고 있다. 복령에 있는 다당체인 pachyman이 백혈구감소증을 회복하는데 효과가 있고, 단백질결합 다당체인 Hll은 제암효과를 나타내었다 [108-111]. 팽이버섯으로부터 얻어진 산성 peptide인 profuramine은 항암제로서 실용화가 검토되고 있다. 이외에도 *Calvatia gigantea*로부터 Calvacin이 펩티드성 제암물질로 알려져 있

고 *Hericiem erinacius*로부터 *erinacin, Sparassis crispa*로부터 sparasin이 발견되어졌는데 이 역시 주목되고 있는 유용성 물질이다, 현재까지 버섯에서 여러 종류의 유용한 물질들이 보고되고 있으며[61-64], 600여종 이상의 버섯에 대하여 생물활성을 탐색한 결과 자실체 및 균사배양액에 유효성이 있다는 것이 입증되었다 [112-116]. 따라서 여러 버섯을 이용하여 이들 물질의 기능에 대해 보다 더 심도 있는 연구를 하고 이를 기반으로 한 새로운 생물제제의 개발이 필요하다.

본 연구에서 연구하고자 하는 버섯은 백영고(*Pleurotus nebrodensis* Inzenga)로 새송이버섯(*Pleurotus eryngii*)의 변이종으로서, 담자균류의 느타리버섯과(*Pleurotaceae*), 느타리버섯속(*Pleurotus*)에 속하는 버섯의 일종이다. 중국의 Chinese Food Examination Center의 보고에 따르면 백영고는 14.7%의 단백질을 함유되어 있다고 하였으며 [117-119], 특히 다당류(Polysacchrides)가 면역계(Immune System)를 강화시키는 효능을 가지고 있는 것으로 알려져 있다[24]. 또한, 백영고는 식용버섯 중에서 가장 육질이 풍부하고 송이의 맛과 향을 가지고 있어 다른 버섯에 비하여 식용가치가 높으면서도 생장주기가 짧으며, 생산량이 높고, 질이 좋아서 개발전망이 매우 높은 버섯이다 [120-122]. 그러나 백영고의 영양학적·약리적 효능이 매우 우수한 것으로 기대되지만, 느타리속의 다른 버섯에 대한 많은 연구에 비하여 국내·외적으로 매우 드문 실정이다.

그래서 본 연구는 백영고 버섯의 균사체 및 자실체 추출물을 이용하여 항산화, 항암 및 아질산소거능 등을 검토 하였다. 먼저 항산화 활성 측정 을 위해 *in vitro*에서 DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl scavenging Rates) 소거능, superoxide anion radical 소거능, Linoleic acid 과산화저해측정하였다. 간(liver)에서는 superoxide dismutase (SOD), glutathion (GSH), glutathione

peroxidase (GSH-px), alcohol dehydrogenase (ADH), catalase, alcohol dehydrogenase (ADH) 및 acetaldehyde dehydrogenase (ALDH)등을 측정하였다. 그리고 백영고버섯의 항암효과를 검토하기위해 간암세포인 SNU-354 (hepatocellular carcinoma, human), 폐암세포인 A549 (lung carcinoma, human), 자궁경부암세포인 HeLa (cervix carcinoma, human), 상피색소세포인 HO-1 (melanoma cells, human) 및 정상폐세포인 HEL299 (lung normal, human)등를 사용하였다. 또한 백영고버섯 자실체 및 균사체 추출물로부터 pH 변화에 따른 아질산소거율를 측정 하였다.

IV-2. 재료 및 방법

IV-2-1. 백영고버섯의 미네랄, 비타민, 및 아미노산 분석

1. 미네랄 분석

미네랄 분석은 백영고 시료를 습식분해법 [123]으로 분해하여 증류수로 정용하고 여과하여 검액으로 사용하였다. 각 성분의 정량은 원자흡광광도계(Varian Model SpectrAA-300A)을 사용하였으며 인의 정량은 molybdenum blue 흡광도법으로 비색정량하였다.

2. 아미노산 분석

유리아미노산 분석은 시료 10 g에 75% ethanol 20 ㎖를 가하고 이를 환류 냉각장치에 연결하여 80℃에서 40분간 가열한 뒤, 이를 Büchner funnel을 사용하여 여과 하였고 남은 고형물은 75% ethanol 50 ㎖로 3회 세척하여 다시 여과하였다. 위의 여과액을 vacuum evaporator로 감압건조하여 ethanol을 증발시키고 ethyl ether 50 ㎖로 3회에 걸쳐 재추출하였다. ether층을 회수하여 감압건조시켜 잔류의 ether를 제거한 후 0.2 M citrate buffer (pH 2.2)를 가하여 시료용액으로 사용하였다. 아미노산의 형광 유도체화를 위해 Edman's Reagent인 PITC(phenylisothiocyanate)를 사용하였으며, 이들 유도체를 분리하기 위해 3.9×300 ㎜ Pico-Tag column을 사용하여 Table 1과 같은 조건에서 분석하였다. 구성아미노산은 Pico-Tag 방법[124]에 의하여 시료 분말 1 g에 6 N-HCl 10 ㎖를 가한 후 N_2 gas로 충전시켜 밀봉하여 110±5℃에서 24시간 가수분해

시킨 다음 실온에서 냉각한 후 pH 2.2의 sodium citrate buffer 3 ㎖에 용해시켜 0.2 ㎛ millipore filter로 여과하였다. 이 여액을 200 ㎕를 취해 HPLC에 주입하여 Pico-Tag column을 이용하여 유리아미노산 분석과 같은 조건에서 분석하였다.

Table 3-1. Operating conditions for the analysis of amino acid by HPLC.

System: Waters 510 HPLC Pump × 2
Waters Gradient Controller
Waters 717 Automatic sampler
Waters 996 Photodiode Array Detector (PDA)

Column: Waters Pico · Tag® Column (3.9×300 mm, 4 μm)

Detector: Waters 996 Photodiode Array Detector (PDA), 254 nm

Data analysis: Millennium 32 chromatography manager

Injection volume: 200 uL

Mobile phase:

A: 140 mM sodium acetate (6% acetonitrile)

B: 60% acetonitrile

Gradient Table

Time	Flow	%A	%B
Initial	1.0	100	0
9.0	1.0	86	14
9.2	1.0	80	20
17.5	1.0	54	46
17.7	1.0	0	100
18.2	1.0	0	100
20.0	1.0	0	100
20.7	1.0	0	100
21.0	1.0	100	0
24.0	1.0	100	0
25.0	1.0	100	0

3. 비타민 분석

비타민 분석은 시료 1 g을 식품공전의 미량 영양성분 시험법[125]에 따라 처리하여 이 중 20 ㎕을 취해 HPLC (Waters 510)로 분석하였다. HPLC 분석조건은 C_{18} column (μBondapak C_{18}, 3.9×300 ㎜, 10 um)이며 유속은 solvent 30 mL/hr, ningydrin 20 mL/hr이고, 압력은 solvent 55 bar, ninhydrin 12bar이었다.

IV-2-2. 백영고버섯의 생물활성 분석

1.실험동물

in vivo 실험용 동물로는 Sprague/Dawley 계의 수컷 흰쥐를 구매하여 2 주일 이상 사육장 환경에 적응시킨 후 사용하였다. 사육장은 인공조명설비에 의하여 조명시간을 오전 7:00부터 오후 7:00까지 12시간으로 조절하며, 실내온도는 22±1 ℃, 습도는 60 % 내외로 유지하였고, 급수는 일반 상수도를 사용하였고 사료와 급수는 제한하지 않았다. 정상사료를 食餌하면서 사육한 후에 체중이 210-240g인 개체를 실험에 사용하였다.

2. 시약 및 기기

DMSO(dimethyl sulfoxide), DPPH(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl), glutathione, linoleic acid, methyl pyrazole, NAD(diphosphopyridine Nucleotide), NBT(nitro blue tetrazolium cloride monohydrate), sodium nitrite,

sodium azide, sodium pyrophosphate, dithiobis, trypan blue, pyrophosphate, ferrous-chloride, magnesium chloride, phosphoric acid, PMS(phenazine methosulfate), rotenone, semicarbazide-HCl 등은 SIGMA 제품, ammonium thiocyanate, acetaldehyde, formaldehyde, formamide, glutamine, hydrogen peroxide, MTT[3-(4,5-dimethyl thiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetra zoilum bromide], silymarin group, tanic acid, tricloroacetic acid, ammonium thiocyanate 등은 Aldrich 제품, RPMI-1640(Rosewell Park Memorial Institue-1640), DMEM(Dulbecco's modified eagle medium), BCS(bovine calf serum), Trypsin-EDTA 등은 JBI(Join Bio-Innovation, Korea) 제품, penicilin-streptomycin 은 Cambrex 제품, ethanol 은 J.T.Baker 제품, xanthine oxidase 는 Calbio 제품, isofurane 은 중외제약 제품을 사용하였다.

사용한 기기는 다음과 같았다. 원심분리기로는 High Speed Centrifuge (KONTRON, Model T-324, Italy), Ultra Centrifuge(KONTRON, Model T-2000, Italy), 조직마쇄용으로 Homogenizer(B · BRAUN, Model POTTER S, Germany), 용액시료의 냉동건조에는 Freeze-Dryer(LABCONCO, Model LYPH · LOCK 12, USA)와 Centra-Vac System (VISION, Model VS-802F, Korea), 흡광치측정용으로 UV-visible Spectrophotometer(SHIMADZU, Model Mini-1240, Japan), 건조시료의 분쇄에는 Pulverizer(RONG-TSONG IRON WORKERS, Taiwan), 용액시료의 농축에는 Rotary evaporator(TOKYO RIKAKIKAI Co., Model EYELA, Japan), 세포배양에는 CO_2 incubator (NUAIRE, USA) 및 Clean bench(Hansol SM, Korea) 등의 기기를 이용하였다.

3. *In vitro*에서의 항산화 활성 측정

1) DPPH 소거능

DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) 라디칼 소거능은 다음과 같은 방법에 따라 실시하였다. 1.5×10^{-4}M의 농도로 에탄올에 녹여 조제한 DPPH 반응액과 일정농도의 시료를 30㎕를 첨가해 최종 부피가 3㎖가 되게 혼합하고 3분 후에 517㎚에서 흡광도를 측정하여 소거능(%)을 산출하였다.

2) Superoxide anion radical 소거능

Superoxide anion radical 소거능은 다음과 같은 방법에 따라 실시하였다. 시료 500㎕, 0.1M Tris-HCl 완충액 (pH 8.5) 100uL, 100uM PMS 200uL, 500uM NBT 200uL 및 500μM NADH 400uL를 가해 560㎚에서 흡광도 측정하고 시료를 함유하지 않은 용매에 대한 소거율(%)로 결과를 나타내었다.

3) Linoleic acid 과산화저해

Linoleic acid 과산화저해률은 다음과 같은 방법에 따라 실시하였다. 25 ㎎/㎖ 농도의 시료용액 30uL, linoleic acid 400uL, phosphate buffer 800uL, 증류수 770uL를 가해 반응 혼합물을 만들어 40℃에서 자동산화를 유발하였다. 이 반응액 0.1㎖을 24시간 후 취해 0.1mL의 30% NH_4SCN 및 75% 에탄올 2.7mL와 혼합한 액에 2.45mg/mL 농도의 ferrous chloride 0.1mL을 가해 혼합하고 3분 후 500nm에서 흡광도 측정하여 용매를 사용한 대조군의 흡광도에 대한 저해율

(%)로서 항산화 효과를 나타내었다.

4. *In vivo*에서의 항산화작용 측정

1) 산화적 스트레스 유발 및 약재투여

Sprague-Dawley계 웅성 흰쥐를 2 주일간 예비 사육한 후, 알콜 단독투여군인 음성대조군(Negative Control), 강력한 항산화제인 silymarin (1g/kg body weight/day)투여군, 그리고 약재투여군 투여군 등으로 실험군으로 나누어, 모든 실험군에 2 주일 동안 매일 마리당 30 % 에탄올 3.0 mL을 경구투여하여 산화적 스트레스를 유발하였다(Table 4-2). 산화적 스트레스 유발과 동시에 실험군에는 시료추출액을 2 주일 동안 매일 1 회에 걸쳐 17:00-18:00 에 개체당 0.5mL씩 경구투여하였고, 대조군(Control)과 Silymarin 투여군에는 추출액 대신에 생리식염수(0.85 % NaCl)를 투여하였다.

Table 4-2. Experimental design for in vivo test for 2 weeks.

Exp. Groups	Ethanol	Administrations (with)
Control	Yes	No
Silymarin	Yes	Silymarin (1g/kg body weight/day)
Tests	Yes	Ext (0.8325 g mushroom/kg body wt/day)

*Ext 0.8325 => 0.8325g 의 버섯으로부터 추출된 전탕액 (decoction)을 말함

(1) 8주령 rats을 구매(무게 180±10 g), 2 주일 사육=> 체중이 210±20 정도가 됨, 200g으로 가정하고 실험을 진행함

(2) 알콜투여 : 참고문헌에는 40% 알콜로 되어 있었기에 첫날은 40% 투여함 그러나 쥐가 견디지 못함=> 30%로 수정하여 투여함.

(3) 실험에 사용된 버섯류의 적적량은 정해져 있지 않기 때문에 다른 버섯을 기준으로 함. 이를 쥐의 체중(200g)으로 환산하면 0.0333 g 이 됨, 이 량의 5배량을 투여하기로 함 => 0.0333 x 5 = 0.1665 g/ 200g body wt /day= 0.8325 g mushroom/kg body wt/day (논문에 서술하는 방식임: kg 체중당 투여량으로 기술) (동물실험에서는 짧은 기간에 효능을 검정하고자 적정량의 5-10배량을 투여하여 실험함).

2) 간장 적출 및 효소액 조제

간장(liver)은 0.9 %의 적출하여 식염수로 세척하여 여과지로 수분을 제거한 다음 -20 ℃의 냉동고에 보관하면서 사용하였으며, 조직 균질액 및 효소액 준비과정은 그림 4-1과 같았다. 간장(liver) 1.0g에 10.0mL의 0.1M phosphate buffer를 가한 다음 빙냉상태에서 마쇄하였다. 마쇄한 용액을 600xg로 15분간 원심분리하였으며, 상등액 1.0mL을 취하여 glutathion(GSH) 함량측정에 사용하였다. 나머지 9.0㎖을 8,000xg로 10분동안 재원심분리하여 얻은 침전물에 1.0mL의 50mM PBS(phosphate beffered saline, pH7.0)을 가하여 catalase 및 acetaaldehyde dehydrogenase(ALDH) 활성측정에 사용하였다. 상등액은 초원심분리(105,000xg, 60 min)하여 얻은 상등액을 SOD(Superoxide dismutase), GSH-peroxidase 및 ADH(alcohol dehydrogenase) 측정용 시료로 사용하였다. (Figure 3-1)

Collect Liver(1.0g) from Rats

-Add 10.0mL of 0.1M phosphate buffer
-Chop
-Homogenize (glass teflon homogenizer, cool conditions)
-*Centrifuge at 600×g for 15min*

Supernatant -(1.0mL)-> Enzyme solution for GSH Assay

Re-Centrifuge at 8,000×g for 10min

Supernatant

Precipitate

-1.0mL of 50mM PBS, pH7.0

catalase-, ALDH-assay

Re-Centrifuge(105,000×g,1 hr)

Supernatant : SOD-, GSH-px-, ADH-assay

Fig. 4-1. Preparation of tissue homogenate and enzyme solution from rat liver.

3) Glutathion 측정

GSH(glutathion)의 함량은 다음과 같은 방법에 따라 간(liver)조직의 분쇄액을 준비하여 측정하였다. 잘게 절개한 간에 5 배(w/v)의 50mM phosphate buffered saline (PBS, pH 7.0)을 가하고 homogenizer를 이용하여 균질화시켰다. 균질화한 액을 20 분간 원심분리(1,000×g, 4 °C)하여 상층액을 취하였다. Homogenate액에 0.1 % picric acid를 첨가한 다음, 3,000rpm에서 15 분간 원심분리하였다. 상층액을 취하여 0.2mM NADPH, 0.6mM DTNB, 5mM EDTA 및 glutathione reductase가 포함된 0.1M pot, phosphate buffer(pH 7.5)를 첨가하여 412nm에서 30 초 간격으로 3 분간 흡광치변화를 측정하였다.

4) Glutathione peroxidase (GSH-px) 활성 측정

GSH-px 활성은 다음과 같은 방법에 따라 측정하였다. 1×10^{-3}M Sodium azide와 1mM EDTA를 함유하는 0.1 Mpotassium phosphate buffer (pH 7.0) 500uL, 효소액 100uL, glutathione reductase (2.768U/mL) 100uL, 1×10^{-2}M glutathione 100uL을 혼합, 37 ℃에서 10분 동안 예비 배양한 후 이 반응액에 0.1% $NaHCO_3$에 녹인 1.5×10^{-3}M NADPH 100uL를 가해 1분간 그리고 1.5×10^{-3}M H_2O_2 100uL을 가한 후 다시 1분간 340㎚에서 흡광도를 측정하였다. 결과는 흡광도와 NADPH의 molecular extinction coefficient (E=6.22×106㎠)로부터 효소액과 blank의 1 분간의 NADPH 농도의 변화 (Δ[NADPH]/min)를 산출하고 이 효소액의 수치에서 blank의 수치와 glutathione peroxidase와 관련없는 인자에 의해 나타나는 Δ[NADPH]/min를 빼준 값을 다음의 식에 대입하여 glutathione peroxidase의 활성 (U/㎎ protein)을 산출하였다.

$U = 0.868(\Delta[NADPH]/[GSH0]) \times t) \times (Vi/Vs)$

Vi/Vs : 희석배수,

Vi : incubation volume,

Vs : initial sample volume,

GSH0 : glutathione의 초기 농도

5) 간장(Liver)의 Superoxide dismutase 활성 측정

75mM sodium xanthine 50uL와 10mM hydroxylamine hydrochloride 50uL, 원심분리한 조직 상등액 500uL, 그리고 증류수 200uL를 혼합한 후 37℃에서 10분간 예비 배양하였다. 여기에 xanthine oxidase (0.1U/mL) 200uL를 가하고 다시 37℃에서 20분간 배양한 다음 1 % sulfanilamide 1mL, 0.02 % N-(1-naphthyl) ethylenediamine 1mL를 가한 후 실온에서 20 분간 방치한 후 540㎚에서 흡광도를 측정하였다. 그리고 SOD standard에 대하여 동일한 과정을 행한 후 검량선을 얻었으며 이 검량선으로부터 총 SOD값을 구한 후, 이 값에서 Mn-SOD의 값을 뺀 것을 Cu,Zn-SOD로 하였다. 또한 Mn-SOD 활성은 반응액 중에서 증류수 대신에 4mM KCN을 가하는 것만을 달리하여 Cu,Zn-SOD와 같은 실험과정에 의해 분석하였고 얻어진 흡광도를 SOD standard 검량선 (그림 4-2)에 대입하여 활성(U/mg protein)을 나타내었다.

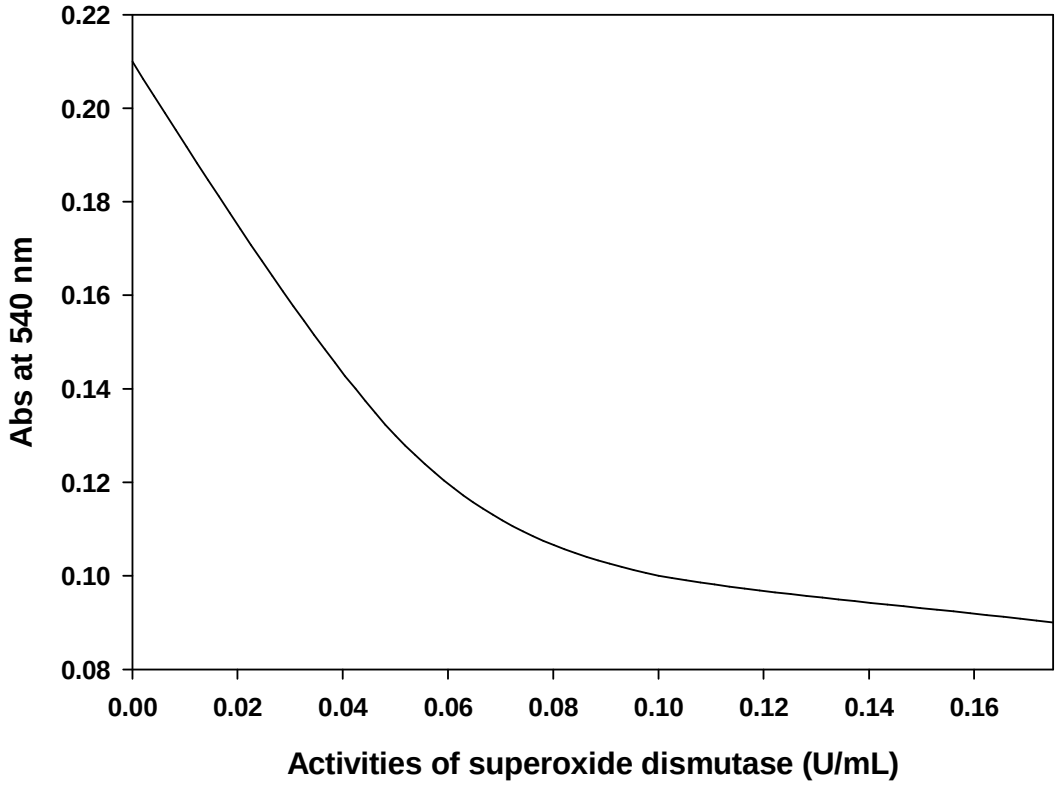

Fig. 4-2. Standard curve of superoxide dismutase.

6) 간장(Liver)의 catalase 활성 측정

Catalase 활성은 다음과 같은 방법에 따라 측정하였다. 0.1㎖의 원심분리한 상등액, 기질인 10.5mM H_2O_2 그리고 50mM potassium phosphate buffer (pH 7.0)를 합하여 3㎖이 되게 한 후 25℃에서 30 초 동안 반응시켰으며, 이 반응액을 240nm에서 H_2O_2의 흡광도 변화로 효소 활성을 측정하였고, 효소활성(k/mg protein)은 1분간 1μM H_2O_2를 분해시키는 데 요구되는 효소량으로 나타내었다.

7) 간장의 ADH 및 ALDH 활성 측정

ADH(alcohol dehydrogenase)와 ALDH(acetaldehyde dehydrogenase) 활성은 다음과 같은 방법에 따라 측정하였고, ADH측정방법은 0.2M ethanol 0.1mL, 0.5 M semicarbazide 0.02mL, 0.1M NAD (in 0.01M HCl) 0.02mL 및 0.1M Tris buffer (pH 8.5) 2.0mL를 혼합한 다음, 30 ℃에서로 온도를 조정하였다. 이 혼합액에 미리 준비된 효소액 0.1mL를 가하여 파장 340nm에서 1 분간의 흡광도변화를 측정하였으며, 생성된 NADH의 량을 활성으로 환산하였다.

ALDH활성은 다음 방법에 따라 측정하였다. 75mM phosphate buffer (pH8.8) 0.4mL에 증류수 70uL, 12mM NAD 70uL, 12mM magnesium chloride 70uL, 2.4mM 4-methyl pyrazole 70uL, 8mM rotenone(in MeOH) 2 uL를 혼합한 다음, 준비된 효소용액 0.1 mL을 첨가하였으며, 5mM acetaldehyde 0.1mL을 가하여 반응을 시작하였다. 반응은 30℃에서 시행하였고, 340㎚에서 1분간 흡광도 측정하여 생성된 NADH의 량을 활성으로 환산하였으며, 계산식은 다음과 같았다.

$$\text{units/mL} = \frac{(\Delta A340/\text{min}) \times (\text{reaction vol}) \times (\text{dilition factor})}{(\text{sample vol}) \times 6.22}$$

$$\text{Units/mg protein} = \frac{\text{Activity (units/mL)}}{\text{mg protein / mL of sample}}$$

(Note) 6.22 : millimolar extinction coefficient of NAD+ at 340nm

8) 단백질 정량

단백질함량은 검량표준곡선 작성을 위한 표준단백질로는 BSA(bovine serum albumin)를 사용하였다.

5. 버섯의 항암효과 측정

1) 세포주 및 세포 증식 배지

암세포주로는 간암세포인 SNU-354(hepatocellular carcinoma, human), 폐암세포인 A549(lung carcinoma, human), 자궁경부암세포인 HeLa(cervix carcinoma, human), 상피색소세포인 HO-1 (melanoma cells, human) 및 정상폐세포인 HEL299 (lung normal, human)를 사용하였다. 실험에 사용된 세포들 중 SNU-354, HeLa은 DMEM배지를 A549, AGS, HEL299는 RPMI1640배지에 10% heat-inactivated FBS(fetal bovin serum)를 첨가하여 배양하였다.

2) MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazoilum bromide) 활성 측정

버섯의 항암효과 측정은 MTT assay법을 사용 하였다. MTTassay법은 生세포내 미토콘드리아의 dehydrogenase에 의해 생성되는 파란색 formazan측정을 통해 세포의 증식이나 독성을 조사하는 방법으로, Monks 등35)의 방법에 준하여 실시하였다. 실험대상 세포의 농도를 4~5×10^4 cells/mL의 농도로 조절하여 24 well plate에 900 uL씩 첨가하여 24시간 동안 배양(37℃, 5% CO_2)시킨 후, 시료를 100 uL씩 첨가하여 48 시간동안 다시 배양하였다. 배양한 후 100 uL의 MTT(50 mg/mL)용액을 첨가하여 4 시간 동안 배양하여 formazan을 형성시킨 후, DMSO 900 uL를 첨가하여 formazan을 녹였으며, 각 well에서 100 uL씩 취하여 96 well plate에 옮긴 다음 540 nm에서 ELISA reader를 이용하여 흡광도를 측정하였다.

6. 버섯의 아질산 소거능 측정

각 배양 추출물 시료의 아질산 소거능은 다음과 같은 방법으로 측정 하였다. 1mM $NaNO_2$용액 2mL에 각 추출물 용액 1mL (60mg)을 첨가 하고 여기에 0.1NHCl 및 0.2M 구연산 완충용액을 사용하여 반응액의 pH를 각각 1.5, 3.0, 6.0, 및 7.5로 조정한 다음 반응용액의 최종부피를 10mL로 하였다. 이를 37℃에서 1시간 반응시킨다음 반응액을 각각 1mL 취하고 여기에 2% acetic acid 5ml, Griess시약 (30% acetic acid에 각각 조제한 1% sulfanylic acid와 1% naphthylamine를 1:1 비율로 혼합한것 사용하기 직전에 조제) 0.4mL를 가하여 잘 혼합시켜 15분간 실온에서 방치시틴후 흡광도를 520nm에서 측정하여 잔존하는 아질산염량을 구하였다. 대조구는 Griess시약 대신 증류수를 0.4mL를 가하여 측정하였으며 아질산소거능 (%)은 [100-[(시료첨가군의 흡광도-시료의 흡광도/무첨가군의 흡광도-시료의 흡광도)X 100]으로 나타 내었다.

IV-3. 결과 및 고찰

IV-3-1. 백영고버섯의 미네랄, 아미노산 및 비티민 함량

건조한 백영고 시료의 미네랄성분을 분석한 결과 Table 4-3와 같이 K, P, Mg, Na이 주성분을 이루었으며, 그 중 K가 1,61296 mg%으로 가장 많이 함유하고 있었고 다음으로 P (644.52 mg%), Mg (100.32 mg%), Na (97.84 mg%), Ca (13.80 mg%), Fe (4.77 mg%), Zn (4.32 mg%), Cu (0.88 mg%), Mn (0.55 mg%)의 순으로 분석되었다. 아위버섯(*Pleurotus ferulae*)의 성분을 분석한 Hong 등[126]의 Ca (12.2 mg%), P (900.1 mg%), Na (24.9 mg%), Mg (108 mg%), K (2377.4 mg%), Zn (5.6 mg%), Fe (3 mg%), Cu (0.8 mg%)인 결과와 비교할 때 Fe, Na의 함량은 백영고가 1.5배 높았으며 K, P의 함량은 아위버섯이 1.5배 정도 높게 나타났으며 Ca, Mg, Zn, Cu, Mn 등은 비슷한 함량을 나타냈다. 하지만 상황버섯(*Phellinus baumii*)[127]과 비교할 때 Na, Mg, K, P의 함량은 백영고가 1.5-7배 높았으며 애느타리(*Oyster mushroom*)[16]와 비교할 때 2-40배 이상 높은 함량을 나타냈다. 특히 Zn, Mn과 Fe의 함량이 다른 버섯에 비해 높은 함량을 보이는 것으로 보아 항산화, 항균활성도 뛰어날 것으로 생각된다[128]. 이는 백영고가 우수한 무기질 공급원으로서 건강기능성 식품으로 이용가치가 있다고 사료된다.

Table 4-4에서와 같이 유리아미노산의 함량은 필수아미노산이 314.31 mg%, 비필수아미노산이 345.55 mg%로서 모두 659.86 mg%인 것으로 측정되었으며, 이중 tryptophan이 93 mg%로 전체 유리아미노산 중에서 15%를 차지하는 것으로 나타났다. Tryptophan은 영양상 빠질 수 없는 필수아미노산의 하나로서 발육, 성장, 체중유지, 체지방유지, 혈구 성분 조성, 유즙분비 등에 중요한 역할

을 하는 아미노산이다[126]. 구성 총 아미노산의 함량은 1,326 mg%으로 측정되었으며, 이중에서 필수아미노산은 426 mg%으로 leucine (93 mg%), threonine (68 mg%), valine (67 mg%), phenylalanine (67 mg%), isoleucine (55 mg%), lysine (47 mg%)등의 함량이 비교적 높았다. 비필수아미노산은 900 mg%으로 glutamic acid (353 mg%), aspartic acid (104 mg%), arginine (89 mg%), alanine (78 mg%), serine (69 mg%)등의 함량이 높은 것으로 분석되었다. 이는 한국산 아가리쿠스 버섯(*Agaricus blazei*)의 비타민 함량과 비교할 때 유리아미노산의 총 함량은 백영고(*P. nebrodensis*)가 약 5배 더 높았으며 그 중 필수아미노산의 함량도 1.5배 더 많았다 [127].

Table 4-5은 백영고 버섯의 비타민 함량을 분석한 결과이다. 여러 비티민 중에서 vitamin E가 285.31 mg%으로 가장 많았다. 이는 소나무잔나비버섯(*Fomitopsis pinicola*) 275.76 mg%[20]보다 높았고, 아위버섯(*Pleurotus ferulae*) 316.88 mg%[128]보다 낮았다. 그 다음으로 vitamin C (14.8 mg%), niacin (2.63 mg%), vitamin B_6 (0.46 mg%), vitamin B_2 (0.43 mg%), biotin (0.267 mg%), vitamin B_1 (0.25 mg%), folic acid (0.069 mg%), vitamin D_3 (0.06 mg%), vitamin B_{12} (0.003 mg%) 순으로 비타민이 함유되었다. 비타민 총 함량은 304.28 mg%으로 애느타리(Oyster mushroom) 11.3mg%[129], 표고버섯(*Lentinus edodes*) 21.07 mg%[21]보다 높은 함량을 나타냈다. 특히 vitamin D_3 함량은 Lee[22]등의 연구결과와 비교할 때 표고버섯 (0.038 mg%), 양송이 (0.004 mg%), 영지 (0.014 mg%), 팽이버섯 (0.028 mg%)보다 높은 함량을 보였다. 이는 유아의 골격 형성에 도움이 되며 청소년기, 갱년기 여성들의 칼슘보충에 도움이 될 것으로 사료된다. 또한 niacin은 혈중콜레스테롤 수치 저하 및 알츠하이머병과 노화에 의한 뇌의 인식기능 저하를 막는 데 효과가 있다는 보고되었다[130].

Table 4-3. Mineral contents of *P. nebrodensis.*

Mineral element	*P. nebrodensis* (mg%*)
Ca	13.8
Fe	4.77
Zn	4.32
Mn	0.55
Cu	0.88
Mg	100.32
P	644.52
Na	97.84
K	1,612.96

mg%*: mg/100g·solid sample

Table 4-4. Contents of free and total amino acids.

Amino acids		Concentration (mg%)	
		Free	Total
Essential amino acid	Threonine	43.50	68
	Valine	47.10	67
	Methionine	14.01	25
	Isoleucine	50.06	55
	Leucine	2.19	93
	Phenylalanine	40.83	67
	Lysine	23.62	47
	Tryptophan	93.00	4
Total essential amino acids		314.31	426
Non-essential amino acid	Aspartic acid	6.72	104
	Glutamic acid	23.05	353
	Serine	7.59	69
	Glycine	21.69	57
	Histidine	28.45	22
	Arginine	4.84	89
	Alanine	64.84	78
	Proline	65.96	57
	Tyrosine	48.54	44
	Cystine	4.37	27
	Asparagine	23.71	ND*
	Glutamine	45.79	ND*
Total non-essential amino acids		345.55	900
Total		659.86	1,326

Table 4-5. Vitamin contents of *P. nebrodensis.*

Vitamin	*P. nebrodensis* (mg%*)
Vitamin A	ND*
Vitamin D_3	0.06
Vitamin E	285.31
Vitamin K_1	ND*
Vitamin B_1	0.25
Vitamin B_2	0.43
Vitamin B_6	0.46
Vitamin C	14.80
Niacin	2.63
Pantothenic acid	ND*
Biotin	0.267
Folic acid	0.069
Vitamin B_{12}	0.003

ND* not detected

mg%*: mg/100g·solid content

IV-3-2. *In vitro*에서 백영고버섯 추출물의 항산화 효과

백영고버섯 추출물(*Fomitopsis pinicola* extracts)을 *in vitro*에서 항산화 효과을 검토하기 위해 DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) 라디칼 소거능, Superoxide anion radical 소거능, Linoleic acid 과산화저해률 및 nitric oxide production등을 분석 하였다. DPPH 라디칼 소거능은 Fig. 4-3에 나타 내었다. 백영고버섯 자실체 extract의 농도가 250ug/mL에서 1000ug/mL로 증가 할 경우 DPPH 라디칼 소거능은 8.2%에서 42.3%로 증가 하였다. 그러나 1200ug/mL 이상의 경우는 DPPH 라디칼 소거능은 증가 하지 않했다. Figure 4-4은 Superoxide anion radical 소거능의 결과이다. Superoxide anion radical 소거능은 백영고버섯 자실체 extract의 농도가 300ug/mL이하의 경우는 거의 없었다. 그러나 500ug/mL에서 700ug/mL로 증가 할 경우 9.0%에서 14.2%로 증가 하였다. Figure 4-5은 Linoleic acid 과산화저해률 결과이다. Ascorbic acid을 사용할 경우 incubation 6시간에서 15시간 사이에서 Linoleic acid 과산화저해률은 크게 증가 했다. 백영고버섯 자실체가 사용될경우는 Linoleic acid 과산화저해률은 incubation 6시간에서 22시간으로 증가 할 경우 48%에서 82%로 증가 하였다. 그러나 incubation 27시간부터 감소 하기 시작 하여 incubation 56시간에서 62%로 감소 하였다. 이수치는 BHT보다 약간 높았다. Figure 4-6은 *P. nebrodensis* extract농도에 따른 nitric oxide 생산저해의 결과이다. 백영고버섯 자실체 extract의 농도가 31ug/mL에서 63ug/mL로 증가 할 경우 nitric oxide 생산저해은 9.6에서 31%로 증가 하였다. 그러나 백영고버섯 자실체 extract의 농도가 121ug/mL로 증가 할 경우 nitric oxide 생산저해는 증가 하지 않았다.

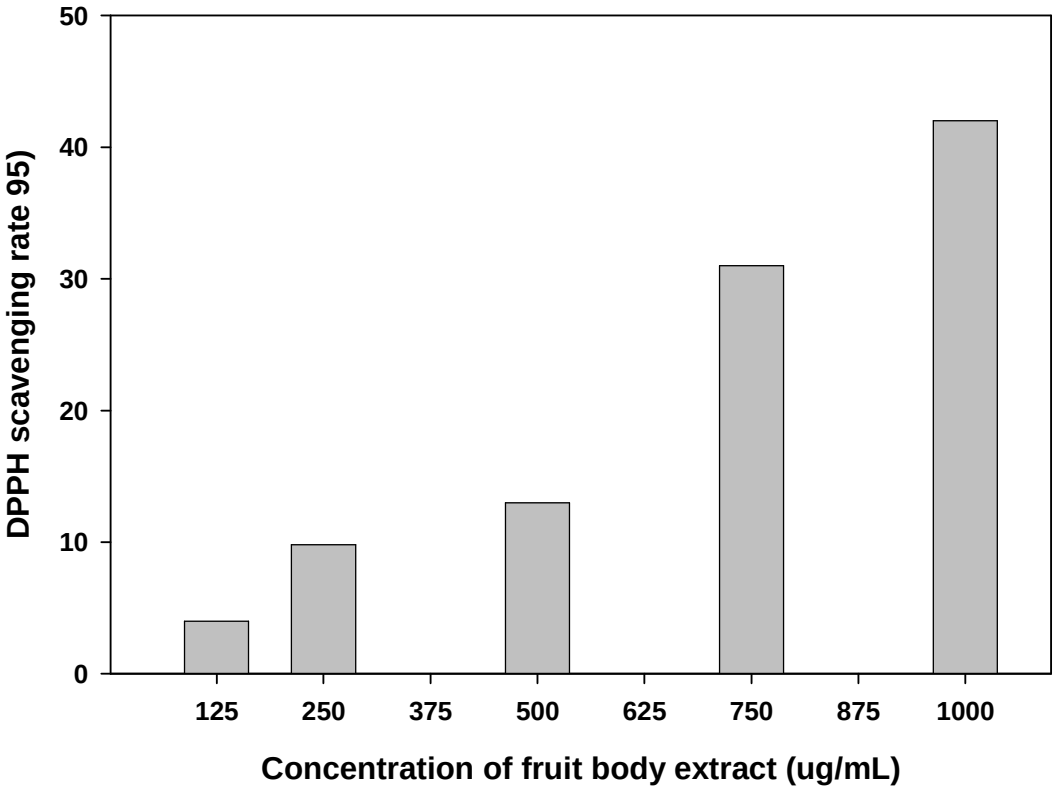

Fig. 4-3. Effects of *P. nebrodensis* Inzenga extract concentrations on the DPPH scavenging rate.

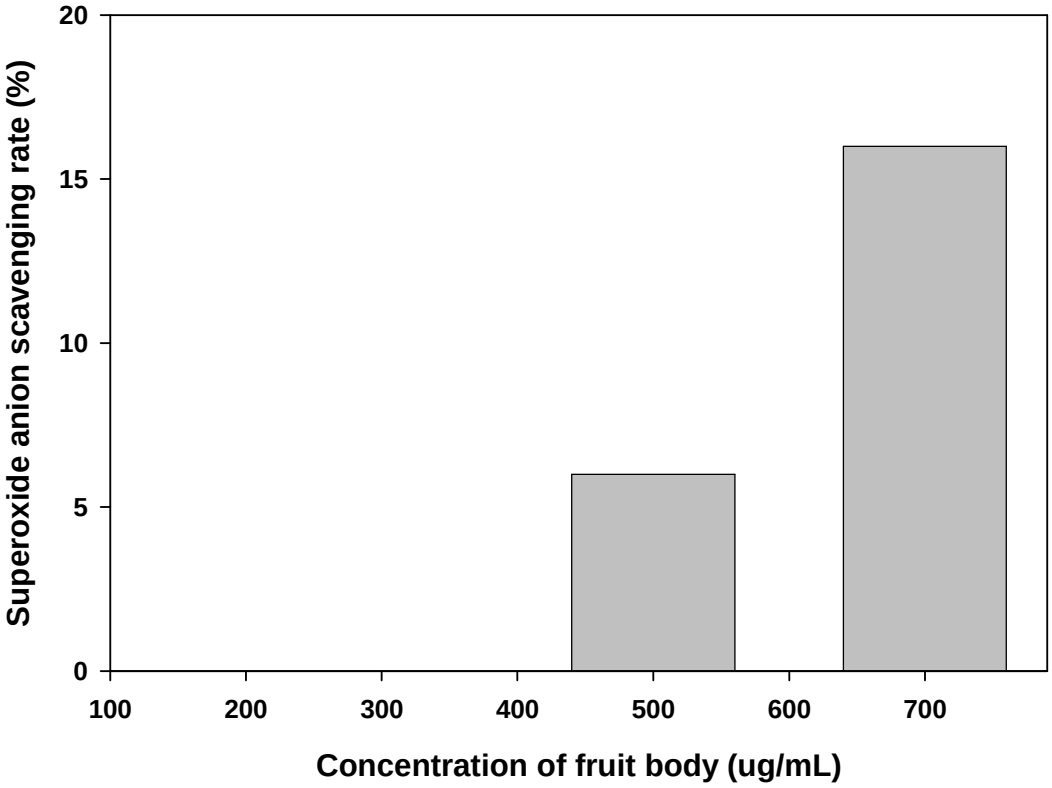

Fig. 4-4. Effects of *P. nebrodensis* Inzenga extract concentrations on the superoxide anion radical scavenging rate.

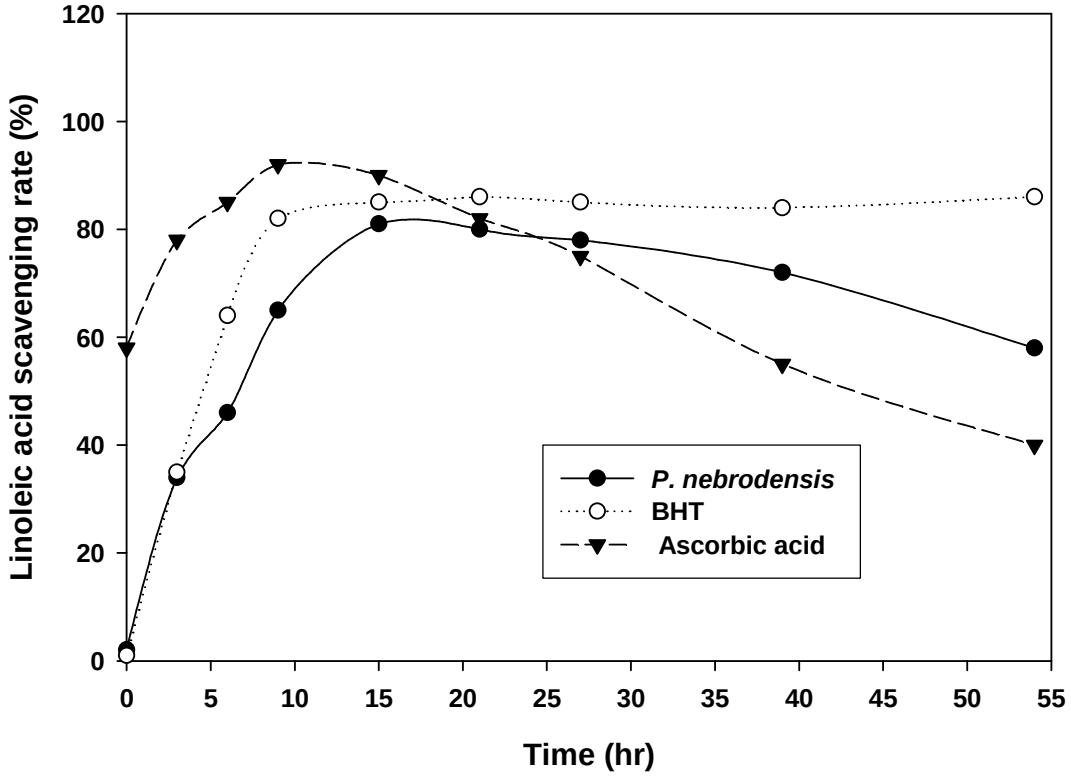

Fig. 4-5. Effect of reaction time of *P. nebrodensis* Inzenga extracts on the linoleic acid scavenging rate.

.

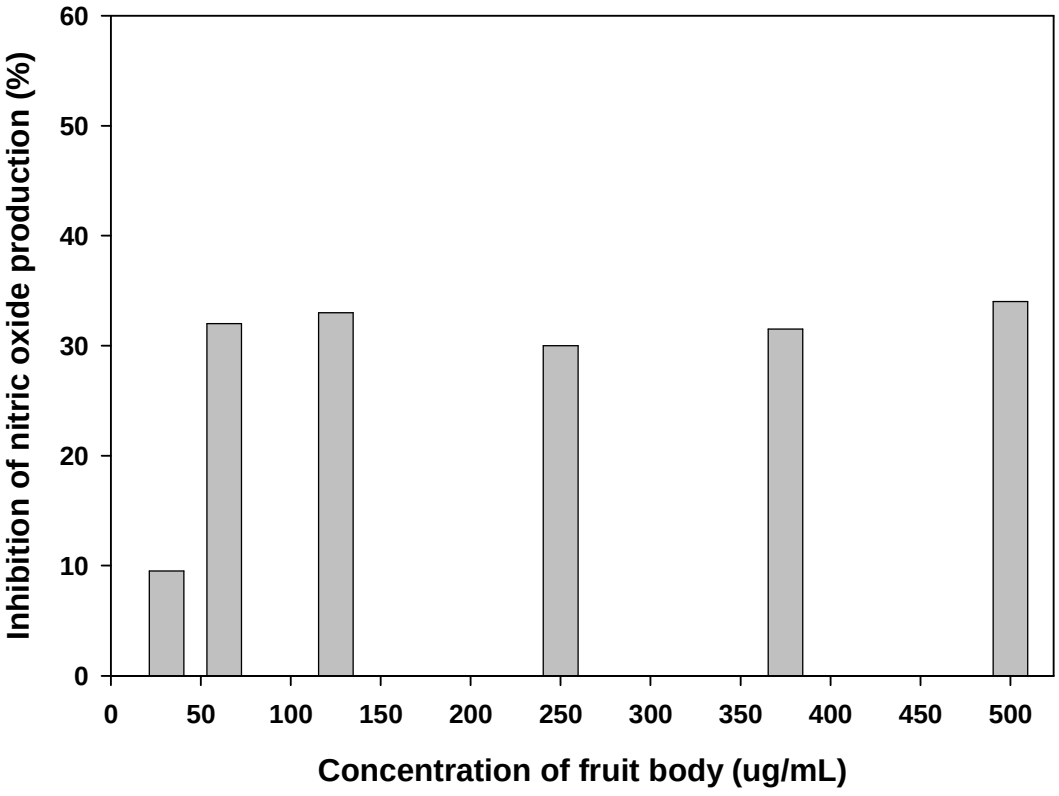

Fig. 4-6. Effects of extract concentrations of *P. nebrodensis* Inzenga on the inhibition of nitric oxide production.

IV-3-3. *In vivo*에서의 백영고버섯 추출물의 항산화 효과

간(liver)에서 백영고버섯추출물의 항산화 효과을 검토하기 위해 glutathione생산, glutathione peroxidase, catalase, alcohol dehydrogenase, 및 acetaldehyde dehydrogenase등의 활성 측정 하였다. Figure 4-7은 간(liver)에서의 glutathione 농도를 측정한 결과이다. 백영고버섯 추출물을 투여 할때 glutathione 농도는 13.5 uM/g of liver 였다. 이것은 대조군 (administered 3.0 mL of 30% ethanol)보다 약 2.2배 증가 하였다. 그러나 Silymarin (administered silymarin, 1g/kg of body weight/day)을 사용 한것보다 약간 감소 했다. Figure 4-8은 간(liver)에서의 GSH-peroxidase활성를 측정한 결과이다. 백영고버섯을 이용 할때 GSH-peroxidase 활성는 4.1 U/ protein (mg) 였다. 이것은 control (administered 3.0 mL of 30% ethanol)보다 약간 증가 하였다. 그리고 Silymarin (administered silymarin, 1g/kg of body weight/day)을 사용 한것과 비슷한 결과가 나타 났다. Figure 4-9은 간(liver)에서의 catalase 활성를 측정한 결과이다. 백영고버섯을 이용 할때 catalase 활성는 121.3 KU/ protein (mg) 였다. 이것은 control (administered 3.0 mL of 30% ethanol)보다 약간 증가 하였다. 그리고 Silymarin (administered silymarin, 1g/kg of body weight/day)을 사용 한것보다 감소한 결과가 나타 났다. 또한 물만 투여한 Normal보다 감소 하였다. 만성적인 에탄올 섭취 상태에서는 식이 섭취량이 저하되고 특정 영양소들의 흡수와 대사 장애에 기인된 저영양상태를 초래하게 되므로 에탄올이 간장에 미치는 영향은 섭취방법에 따라 매우 다양하다고 할 수 있다. 흡수된 에탄올은 우선 위장의 ADH에 의해 일부가 대사 되는데 이 효소는 만성적으로 알콜을 섭취하는 사람들에게서는 그 활성이 저해를 받으며 연령이 증가함에 따라 활성이 감소 된다. 흡수된 에탄올은 우선 위장의 ADH에 의

해서 일부가 대사되는데, 그 대사량은 남자의 경우 약 20%-30%, 여자의 경우는 10% 정도를 차지 한다. 간에서 에탄올 대사는 주로 NAD-linked enzyme즉, ADH와 acetaldehyde dehydrogenase (ALDH)에 의해서 이루어진다. 이들 효소는 각각 acetaldehyde와 acetate를 생성하며 acetate는 acetyl-CoA로 전환되어 TCA회로를 거쳐 에너지를 발생하거나 또는 콜레스테롤과 지방산을 합성하는데 이용된다. Figure 4-10은 간(liver)에서의 숙취해소효소 (alcohol dehydrogenase) 활성를 측정한 결과이다. 백영고버섯 추출물을 이용 할때 alcohol dehydrogenase 활성는 2.1 mU/ protein (mg) 였다. 이것은 control (administered 3.0 mL of 30% ethanol)와 거의 비슷한 결과가 나타났고. 그리고 Silymarin (administered silymarin, 1g/kg of body weight/day)을 사용 한 것보다 약 33%감소 했고. 또한 물만 투여한 Normal보다 약 42% 감소 하였다. Figure 4-11은 간(liver)에서의 acetaldehyde dehydrogenase 활성를 측정한 결과이다. 백영고버섯을 이용 할때 acetaldehyde dehydrogenase 활성는 9.0 mU/ protein (mg) 였다. 이것은 control (administered 3.0 mL of 30% ethanol)보다 80% 증가 하였고 그리고 silymarin (administered silymarin, 1g/kg of body weight/day)을 사용 한것보다 약 27% 감소 했고. 또한 물만 투여한 Normal보다 약 85% 증가 하였다.

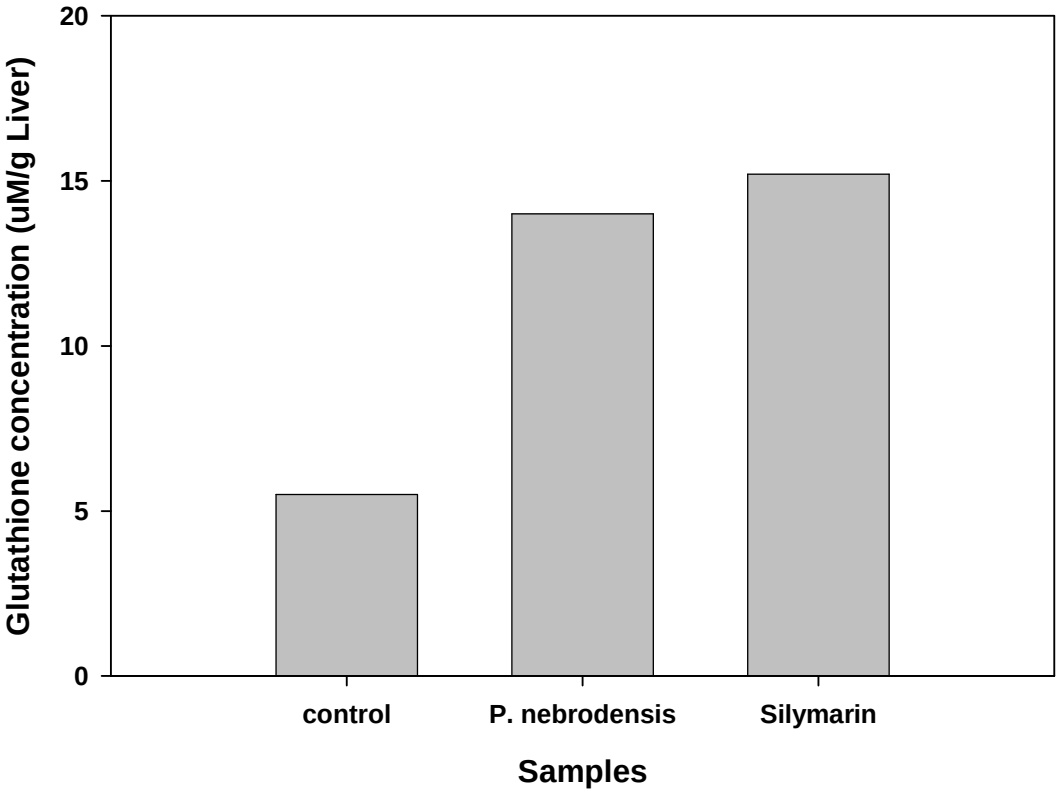

Fig. 4-7. Effects of decoctions prepared from *P. nebrodensis* Inzenga on liver glutathione concentration after chronic ethanol intake for 14 days in rats.

Control: administered 3.0 mL of ethanol (30%).

P. nebrodensis: extract prepared from *P. nebrodensis.*

Silymarin: administered silymarin (1g/kg of body weight/day).

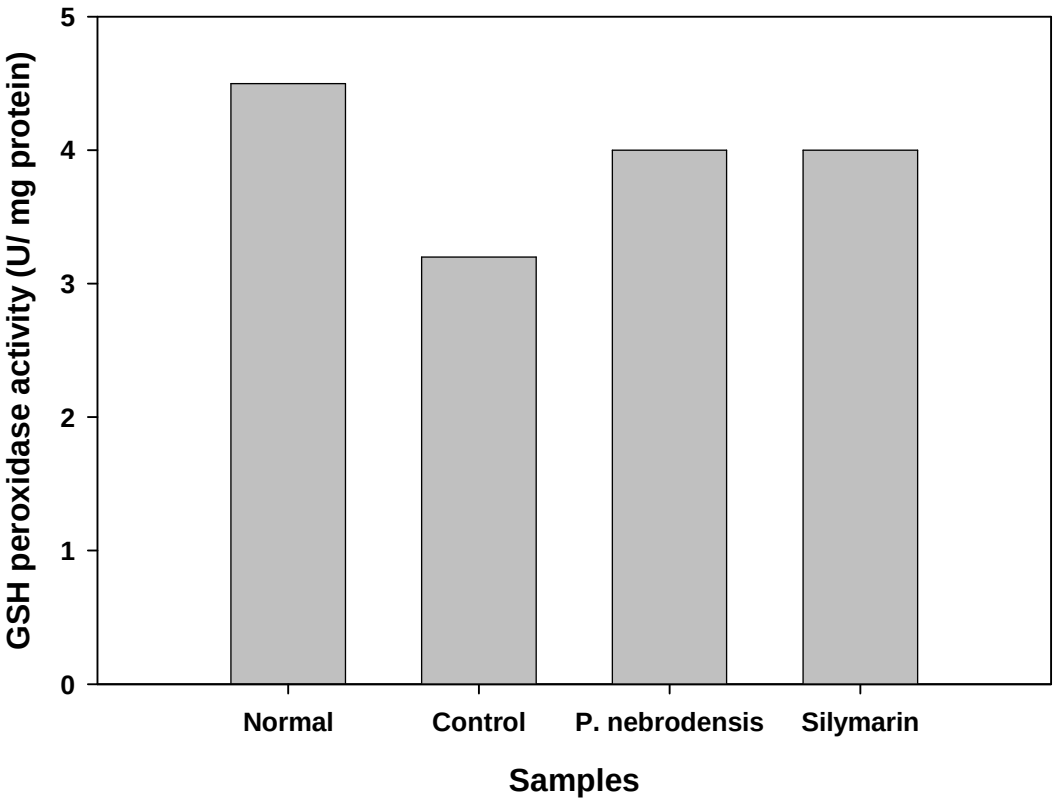

Fig. 4-8. Effect of the decoctions prepared from the *P. nebrodensis* Inzenga on the GSH-peroxidase activity of the liver after chronic ethanol intake during 14 days in rat.

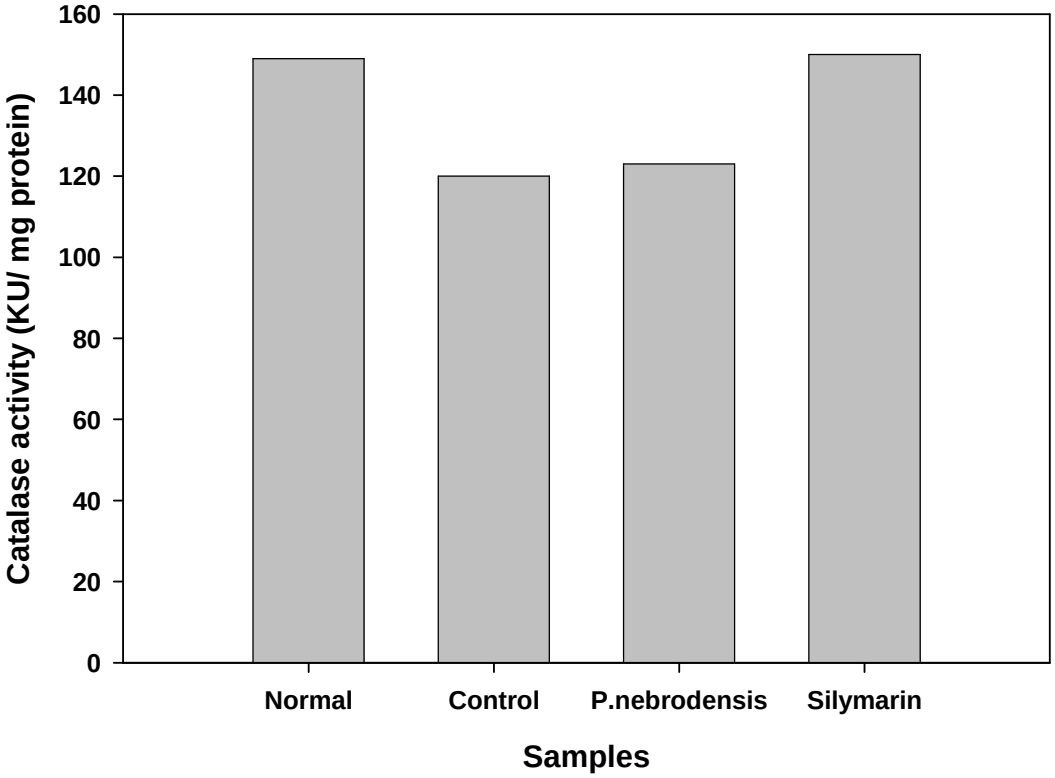

Fig. 4-9. Effects of *P. nebrodensis* Inzenga decoctions on catalase activity after chronic ethanol intake for 14 days in rat.

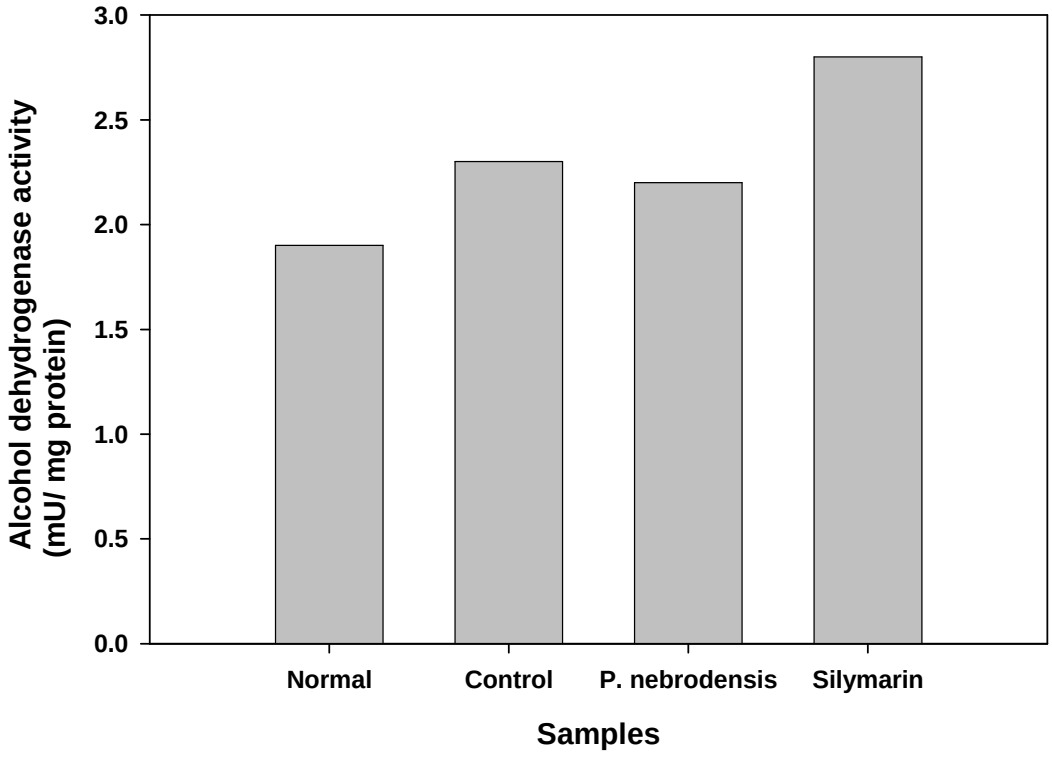

Fig. 4-10. Effects of *P. nebrodensis* Inzenga decoctions on the alcohol dehydrogenase activity of liver after chronic ethanol intake for 14 days in rat.

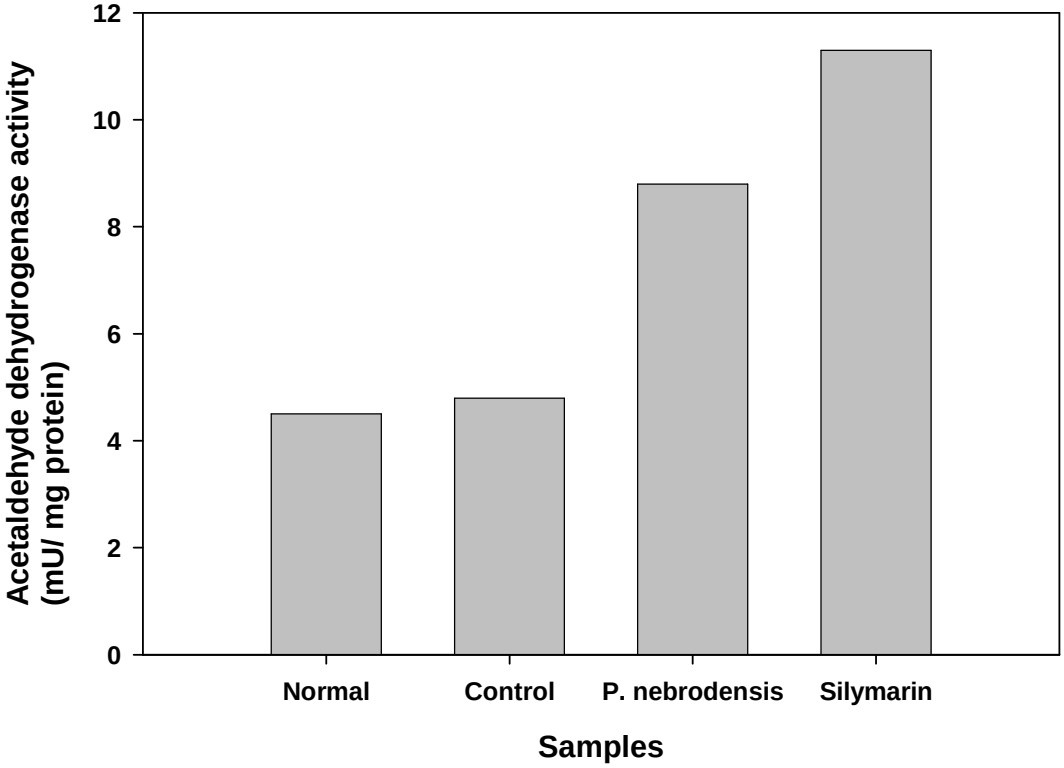

Fig. 4-11. Effects of *P. nebrodensis* decoctions Inzenga extract on the acetaldehyde dehydrogenase activity of liver after chronic ethanol intake for 14 days in rat.

III-3-4. 백영고버섯 추출물의 항암효과

SNU-354/185 (hepatocellular carcinoma, human), HeLa (cervix carcinoma, human), HO-1 (melanoma cell, human), SK-Hep 3B, Hep3B 그리고 PLC/RF/5 (liver cancer cells)등의 함세포을 사용 하여 백영고버섯 추출물의 항암 효과을 검토하기 위해 hot water 와methanol을 사용 하였다. Figure 4-12은 백영고 자실체 (fruit body)의 hot water extrct 와 methanol extract 농도에 따른 Law 264.7 cell 생존율을 나타낸 결과이다. hot water extrct 63ug/mL까지 사용할 경우 세포증식은 거의변화가 없었고 125 ug/mL에서부터 감소하기 시작하여 500 ug/mL에서는 약 60%까지 감소 하였다. 그러나 methanol extract을 사용 할 경우 Methanol extract 31 ug/mL까지는 거의 변화가 없었고 methanol extract 63 ug/mL 부터 감소하기 시작 하여 500 ug/L에서는 약 45%까지 감소 하였다. 이것은 hot water extrct 보다 33% 증가 했다. Figure 4-13은 백영고 자실체 (*P. nebrodensis* fruit body)의 hot water extrct 와 methanol extract 농도에 따른 정상폐세포 HEL299 (lung normal, human) 생존율을 나타낸 결과이다. Methanol extract을 사용 할 경우 methanol extract 125 ug/mL까지는 거의 변화가 없었고 methanol extract 250 ug/mL 부터 감소하기 시작 하여 500 ug/mL에서는 약 87%까지 감소 하였다. 그러나 hot water extrct 63ug/mL까지 사용할 경우 세포증식은 거의변화가 없었고 125 ug/mL에서부터 감소하기 시작하여 500 ug/mL에서는 약 38%까지 감소 하였다. 이 수치는 methanol extract 보다 약 44% 증가 했다. Figure 4-14은 백영고 균사체 (*P. nebrodensis* mycelia)의 hot water extrct 와 methanol extract 농도에 따른 자궁경부암세포 HeLa (human cervix carcinoma) 생존율을 나타낸 결과이다. Hot water extrct 1000ug/mL까지 사용할 경우 세포증식은 거의변화가 없었다. 그러

나 methanol extract을 사용 할 경우 methanol extract 10 ug/mL에서는 생존율이 63.2%까지 증식이 억제 되었고 그 이후 농도에서는 서서히 증가 하여 500ug/mL에서부터는 control와 거의 비슷한 결과가 나타내었다. Figure 4-15은 백영고 균사체 (*P. nebrodensis* mycelia)의 hot water extrct 와 methanol extract 농도에 따른 SK-HEP-1 생존율을 나타낸 결과이다. Hot water extrct 1000ug/mL까지 사용할 경우 세포증식은 거의변화가 없었다. 그러나 methanol extract을 사용 할 경우 methanol extract 10 ug/mL에서는 생존율이 85%까지 증식이 억제 되었고 그 이후 농도에서는 서서히 증가 하여 200ug/mL에서부터는 약 90%까지 생존율을 나타 내었다. Figure 4-16은 백영고 균사체 (*P. nebrodensis* mycelia)의 hot water extrct 와 methanol extract 농도에 따른 HO-1 cell 생존율을 나타낸 결과이다. Hot water extrct 10ug/mL에서 생존율은 121%까지 증가하였고 500ug/mL에서는 control와 거의 같은 증식 효과를 나타 내었다. 그러나 methanol extract을 사용 할 경우 모든 농도 (10-1000ug/mL)에서 증식율은 control와 거의 비슷한 효과를 나타 내었다. Figure 4-17은 백영고 균사체 (*P. nebrodensis* mycelia)의 hot water extrct 와 methanol extract 농도에 따른 PLC/RF/5 (Liver cancer cell) 생존율을 나타낸 결과이다. hot water extrct 와 methanol extract의 모든 농도 (10-1000ug/mL)에서 증식율은 control와 거의 비슷한 효과를 나타 내었다. Figure 4-18은 백영고 균사체 (*P. nebrodensis* mycelia)의 hot water extrct 와 methanol extract 농도에 따른 Hep3B (간암세포) 생존율을 나타낸 결과이다. Hot water extrct 100ug/ml까지는 control와 증식율이 거의 비슷하였다. 그러나 200 ug/mL부터는 증식율이 증가 하였다. 또한 methanol extract의 모든 농도 (10-1000ug/mL)에서 증식율은 control와 거의 비슷한 효과를 나타 내었다. Figure 4-19은 백영고 균사체 (*P. nebrodensis* mycelia)의 hot water extrct 와

methanol extract 농도에 따른 SNU354 cell 생존율을 나타낸 결과이다. Hot water extrct의 모든 농도에서 증식율은 control와 거의 비슷한 효과를 나타 내었다. 그러나 methanol extract 10ug/mL부터 증식이 증가 하여 200ug/mL에서는 120%까지 증가 하였다. 그리고 500ug/mL이후에서는 증가 하지 않했다. Figure 4-20은 백영고 균사체 (*P. nebrodensis* mycelia)의 hot water extrct 와 methanol extract 농도에 따른 SNU185 cell 생존율을 나타낸 결과이다. Hot water extrct의 농도가 10 ug/mL로 증가 할 경우 증식율은 control보다 약 30% 증가 했다. 그리고 10ug/mL에서 1000 ug/mL 범위에서는 생존율은 거의 증가 하지 않고 비슷 하였다. 그러나 methanol extract의 농도가 10ug/mL로 증가 할 경우 약 20% 증가 하였다. 그러나 100 ug/mL이상의 범위에서는 거의 일정 했다. Figure 4-21은 백영고 자실체 (*P. nebrodensis* fruit body)의 hot water extrct 와 methanol extract 농도에 따른 SNU185 cell 생존율을 나타낸 결과이다. Hot water extrct의 농도가 10 ug/mL로 증가 할 경우 증식율은 control보다 약 30% 증가 했다. 그러나 100ug/mL에서 1000 ug/mL로 증가할 경우 생존율은 130%에서 118%로 감소 하였다. 그러나 methanol extract의 농도가 200ug/mL에서는 생존율은 control와 거의 비슷했다. 그러나 500ug/mL에서 1000ug/mL로 증가 할 경우 생존율은 83%에서 70%로 감소 하였다. Figure 4-22은 백영고 자실체 (*P. nebrodensis* fruit body)의 hot water extrct 와 methanol extract 농도에 따른 SNU354 cell 생존율을 나타낸 결과이다. Hot water extrct의 농도가 10 ug/mL로 증가 할 경우 증식율은 control보다 약 30% 증가 했다. 그러나 10ug/mL에서 200 ug/mL 범위에서는 생존율은 거의 비슷했다. 또한 500 ug/mL 이상일 경우는 감소하였다. 그러나 methanol extract의 농도가 10ug/mL에서 생존율은 control보다 약간 증가 하였으나 100ug/mL에서 1000ug/mL로 증가 할 경우 생존율은 90에서 75%로 감소 하였

다. Figure 4-23은 백영고 자실체 (*P. nebrodensis* fruit body)의 Hot-water extrct 와 Methanol extract 농도에 따른 Hep3B cell 생존율을 나타낸 결과이다. Hot water extrct의 농도가 10 ug/mL로 증가 할 경우 증식율은 control보다 약 32% 증가 했다. 그러나 10ug/mL에서 200 ug/mL범위에서는 생존율은 거의 비슷했다. 또한 500 ug/mL이상일 경우는 감소하였다. 그러나 methanol extract의 농도가 10ug/mL에서 생존율은 control보다 약간 증가 하였으나 100ug/mL에서 1000ug/mL로 증가 할 경우 생존율은 88에서 70%로 감소 하였다. Figure 4-24은 백영고 자실체 (*P. nebrodensis* fruit body)의 hot water extrct 와 methanol extract 농도에 따른 PLC/RF/5 cell 생존율을 나타낸 결과이다. Hot water extrct의 농도가 100ug/mL로 증가 할 경우 증식율은 control 보다 약 20% 증가 했고 10ug/mL에서 200 ug/mL 범위에서는 생존율은 거의 비슷했다. 그러나 methanol extract의 농도가 10ug/mL에서 생존율은 control보다 약간 감소 하였으나 100ug/mL에서 1000ug/mL 범위에서는 생존율은 거의 일정 하였다. Figure 4-25은 백영고 자실체 (*P. nebrodensis* fruit body)의 hot water extrct 와 methanol extract 농도에 따른 HO-1 cell 생존율을 나타낸 결과이다. hot water extrct의 농도가 10ug/mL에서 1000 ug/mL로 증가 할 경우 증식율은 control와 거의 비슷 했다. 그러나 methanol extract의 농도가 10ug/mL에서 생존율은 control보다 약간 감소 하였으나 100ug/mL에서 1000ug/mL로 증가 할경우는 생존율은 89%에서 70%로 감소 하였다. Figure 4-26은 백영고 자실체 (*P. nebrodensis* fruit body)의 hot water extrct 와 methanol extract 농도에 따른 SK-HEP-1 cell 생존율을 나타낸 결과이다. Hot water extrct의 농도가 10ug/mL에서 100 ug/mL로 증가 할 경우 증식율은 control보다 약 20% 증가 했다. 그러나 methanol extract의 농도가 10ug/mL에서 생존율은 control보다 약간 감소 하였으나 100ug/mL에서 1000ug/mL 범위

에서는 생존율은 약 90%였다. Figure 4-27은 백영고 자실체 (*P. nebrodensis* fruit body)의 hot water extrct 와 methanol extract 농도에 따른 HeLa cell 생존율을 나타낸 결과이다. Hot water extrct의 농도가 10ug/mL에서 약간 감소했으나 100ug/mL에서 1000 ug/mL로 증가 할 경우 증식율은 control보다 약 25% 증가 했다. 그러나 methanol extract의 농도가 10ug/mL에서 생존율은 control보다 약간 27% 증가 하였으나 500ug/mL에서 1000ug/mL 범위에서는 생존율은 다시 감소하였다. 결과적으로 여러 암세포중에서 Low264.7, HEL299, HeLa, 및 SK-HEP-1은 백영고 버섯 추출물에 큰 효과가 있었다 (Table 4-6). 따라서 이러한 추출물을 이용해서 의약품생리활성에 관한 연구가 더 필요하다.

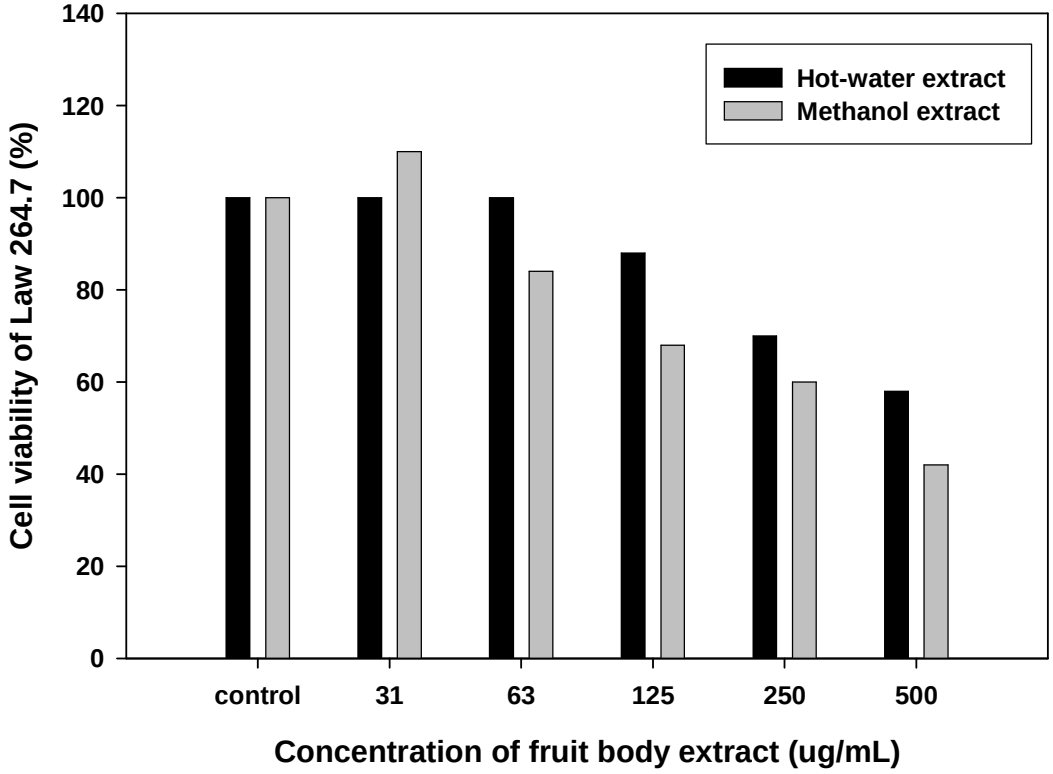

Fig. 4-12. The cytotoxic effects of hot water and methanol extracts from *P. nebrodensis* Inzenga fruit body on the viabilities of Law 264.7 cell.

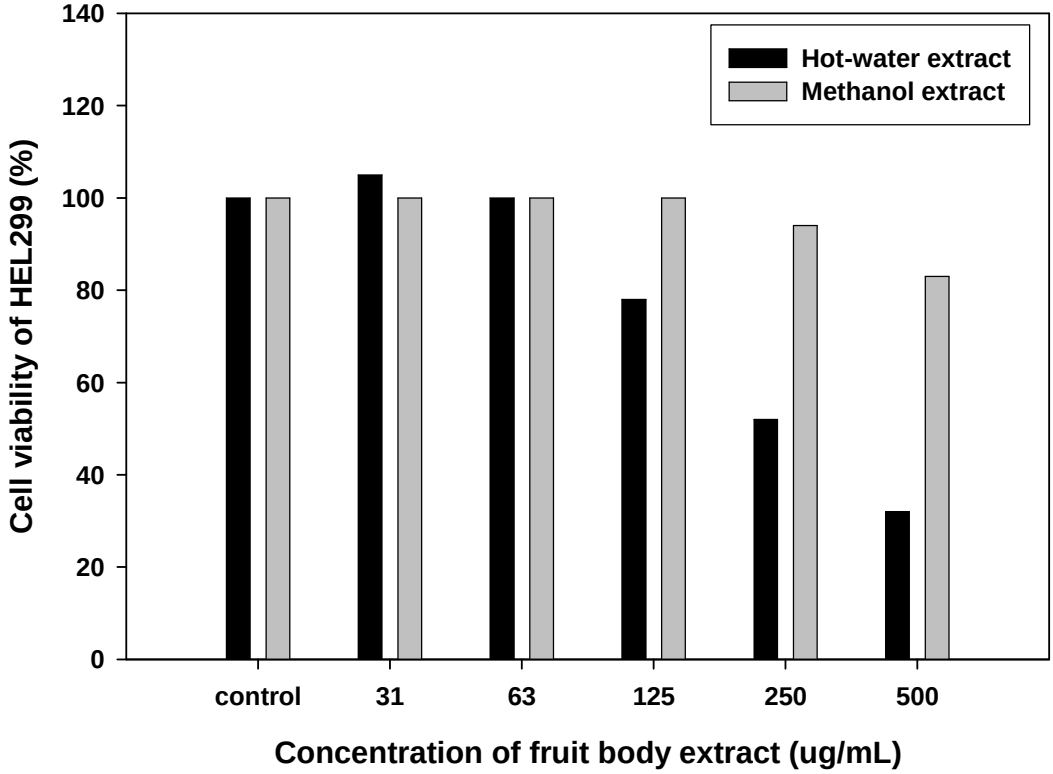

Fig. 4-13. The cytotoxic effects of hot water and methanol extracts from *P. nebrodensis* Inzenga fruit body on the viabilities of HEL299 cell.

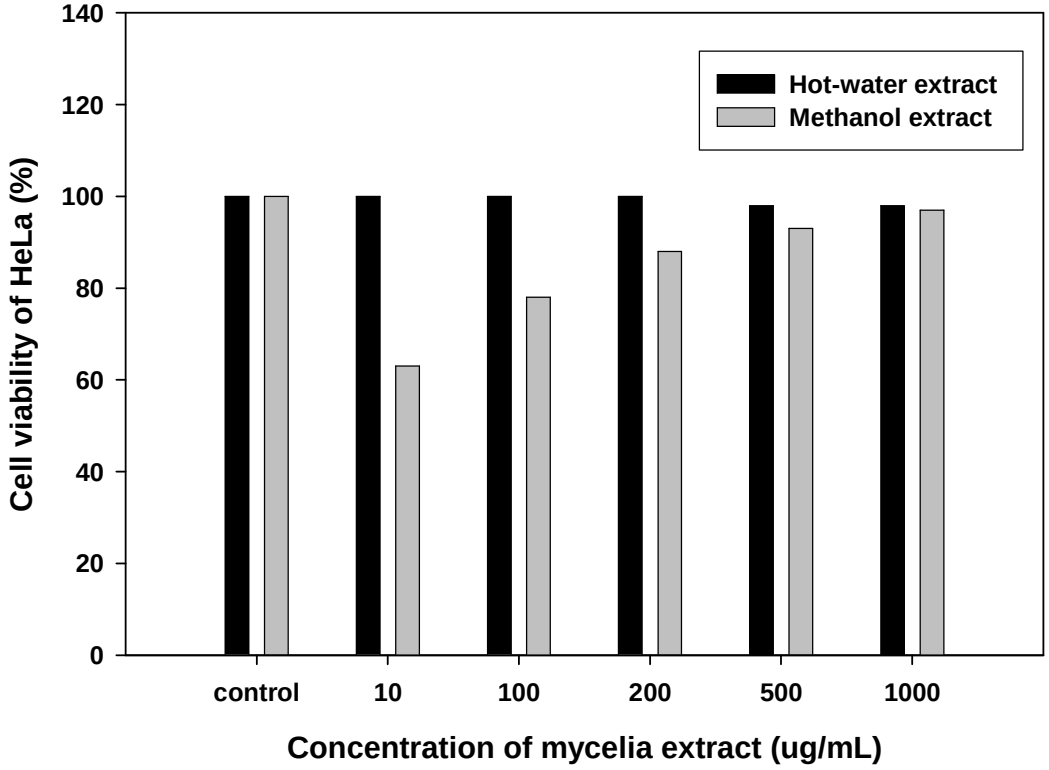

Fig. 4-14. The cytotoxic effects of hot water and methanol extracts from *P. nebrodensis* Inzenga mycelia on the viabilities of HeLa cell.

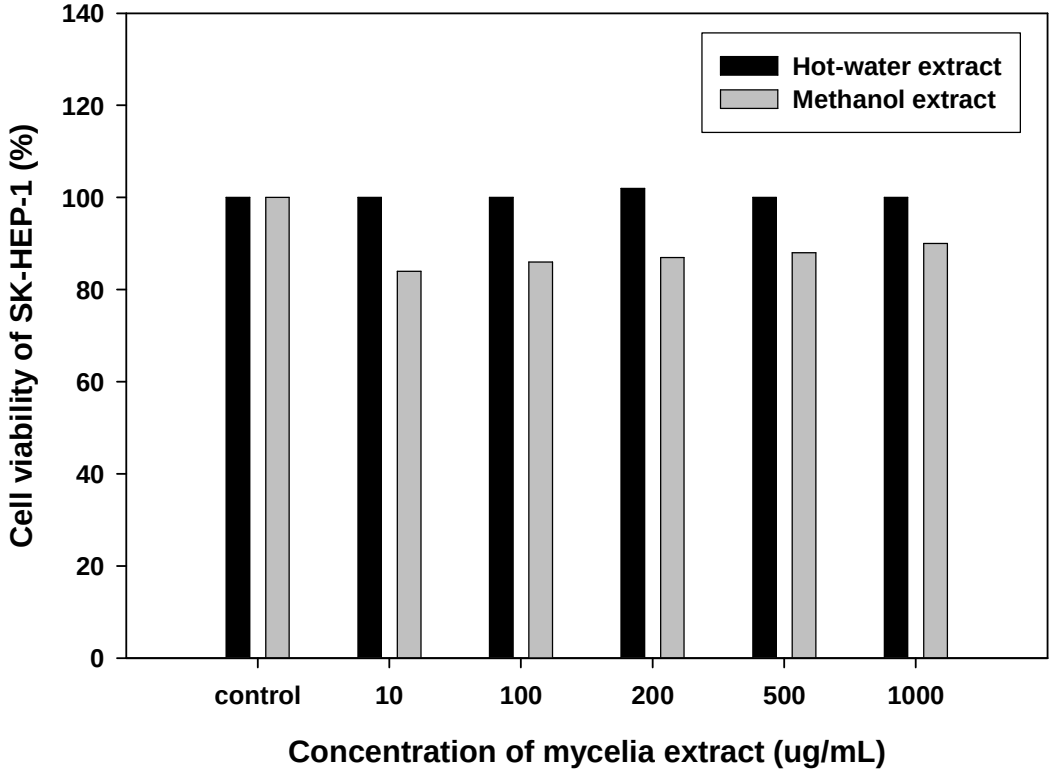

Fig. 4-15. The cytotoxic effects of hot water and methanol extracts from *P. nebrodensis* Inzenga mycelia on the viabilities of SK-HEP-1 cell.

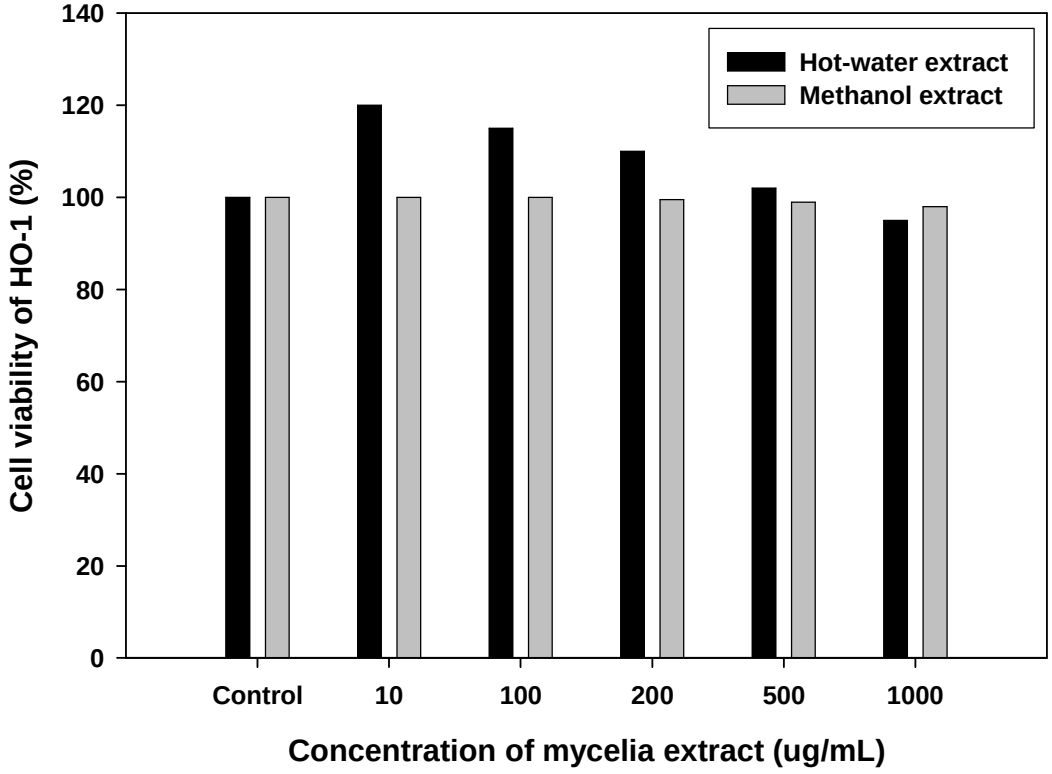

Fig. 4-16. The cytotoxic effects of hot water and methanol extracts from *P. nebrodensis* Inzenga mycelia on the viabilities of HO-1 cell.

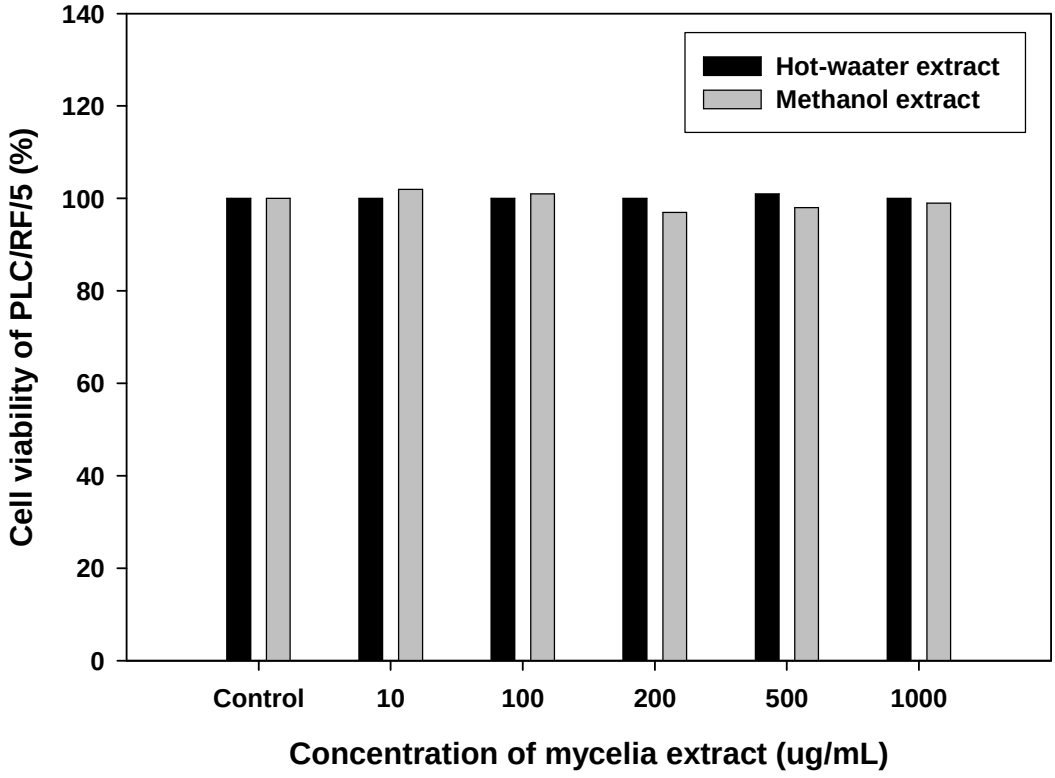

Fig. 4-17. The cytotoxic effects of hot water and methanol extracts from *P. nebrodensis* Inzenga mycelia on the viabilities of PLC/RF/5 cell.

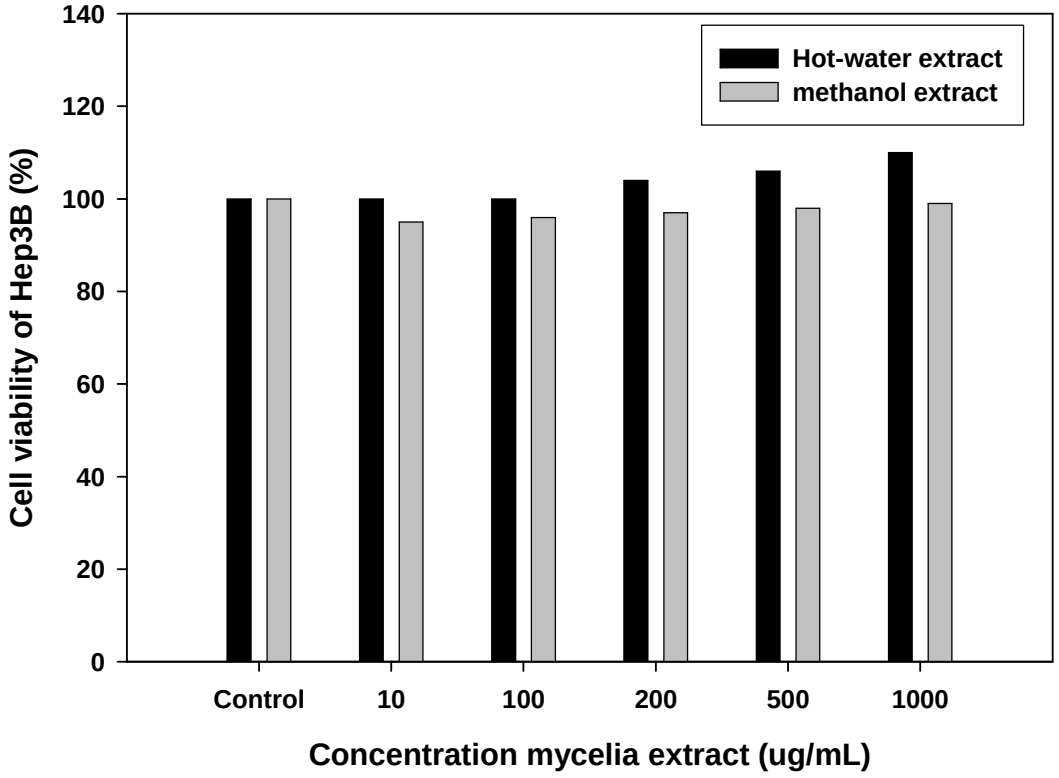

Fig. 4-18. The cytotoxic effects of hot water and methanol extracts from *P. nebrodensis* Inzenga mycelia on the viabilities of Hep3B cell.

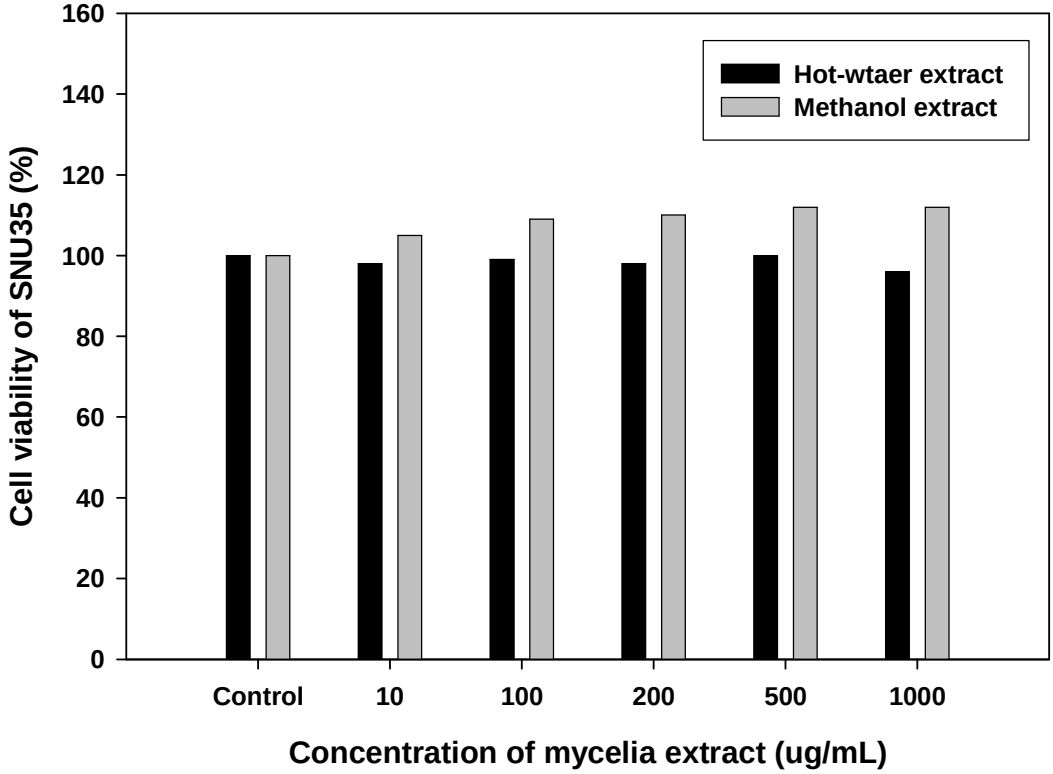

Fig. 4-19. The cytotoxic effects of hot water and methanol extracts from *P. nebrodensis* Inzenga mycelia on the viabilities of SNU354 cell.

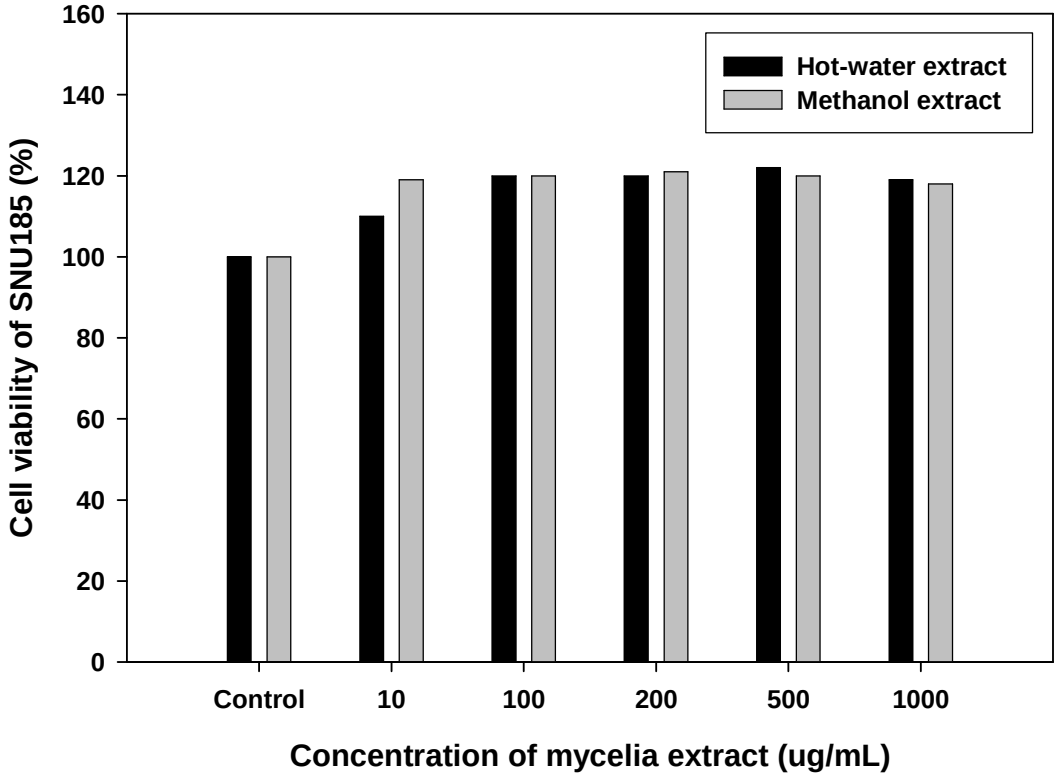

Fig. 4-20. The cytotoxic effects of hot water and methanol extracts from *P. nebrodensis* Inzenga mycelia on the viabilities of SNU185 cell.

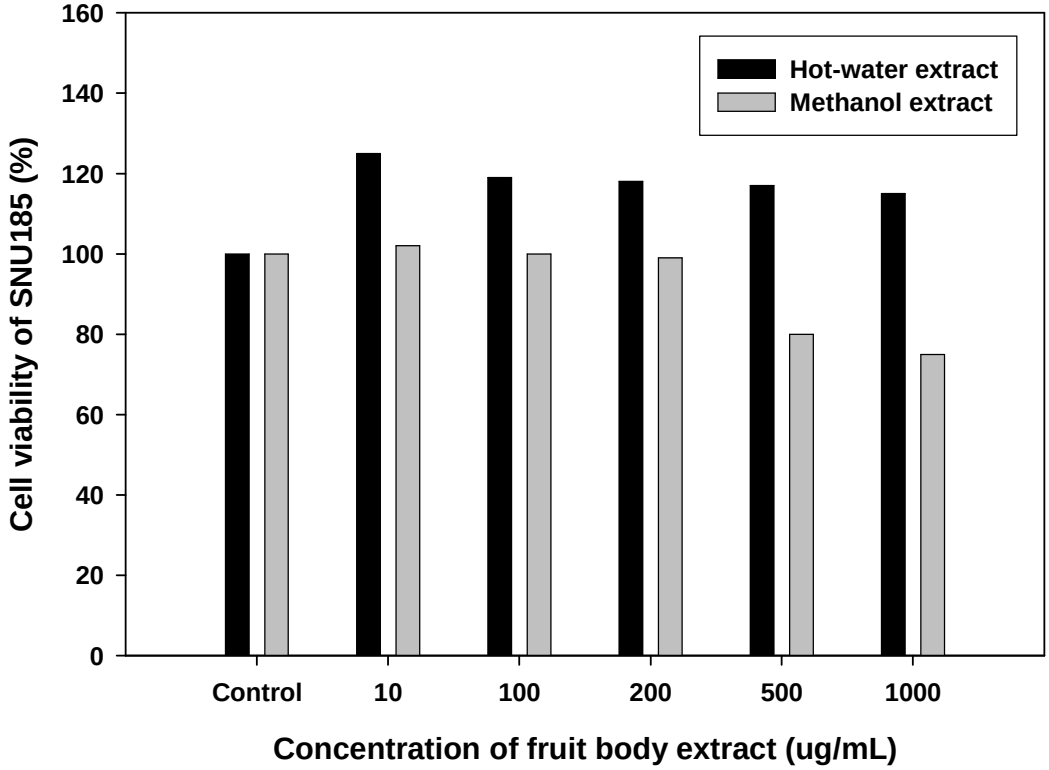

Fig. 4-21. The cytotoxic effects of hot water and methanol extracts from *P. nebrodensis* Inzenga on the viabilities of SNU185 cell.

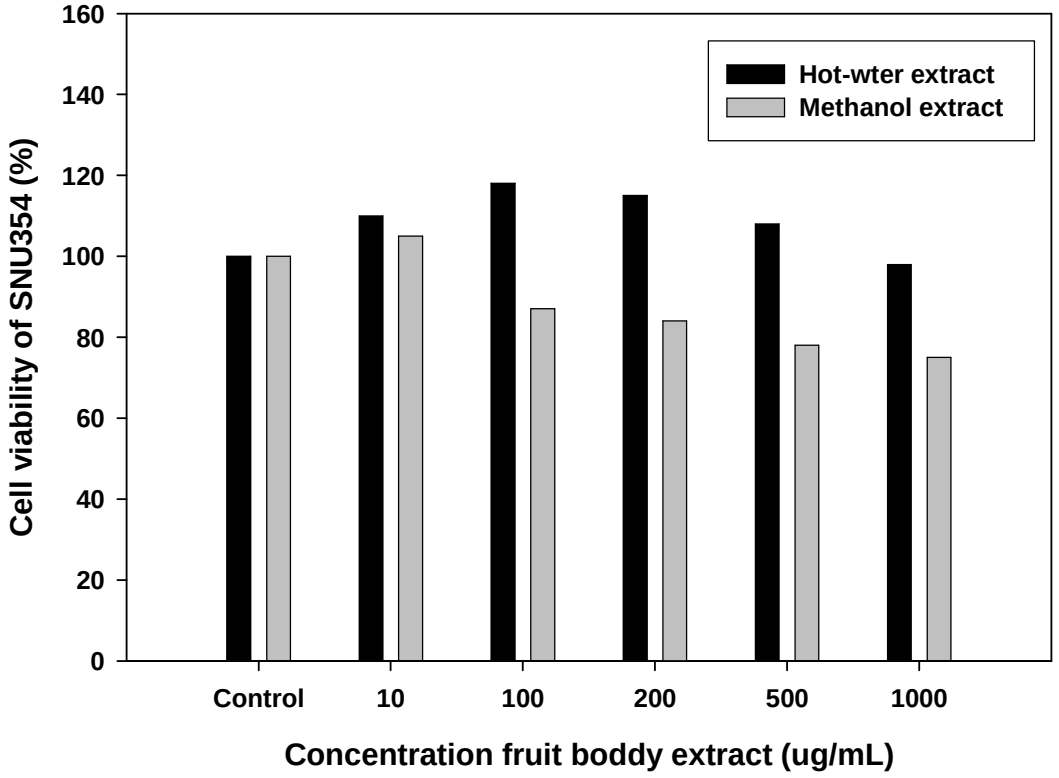

Fig. 4-22. The cytotoxic effects of hot water and methanol extracts from *P. nebrodensis* Inzenga on the viabilities of SNU354 cell.

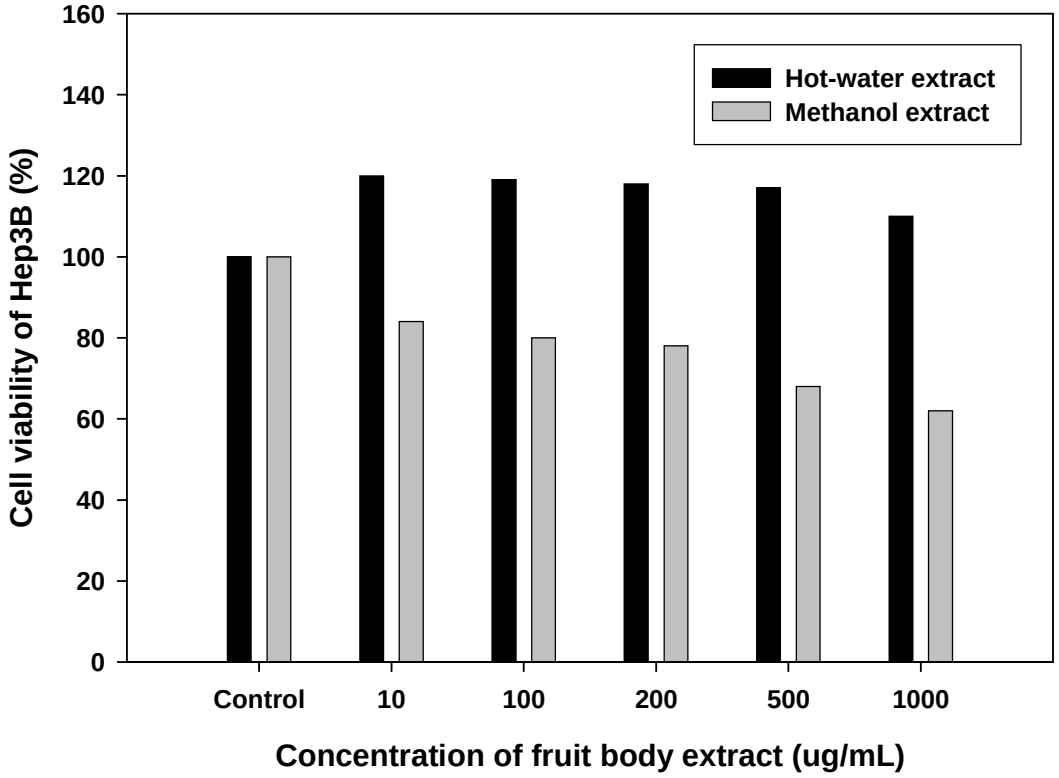

Fig. 4-23. The cytotoxic effects of hot water and methanol extracts from *P. nebrodensis* Inzenga on the viabilities of Hep3B cell.

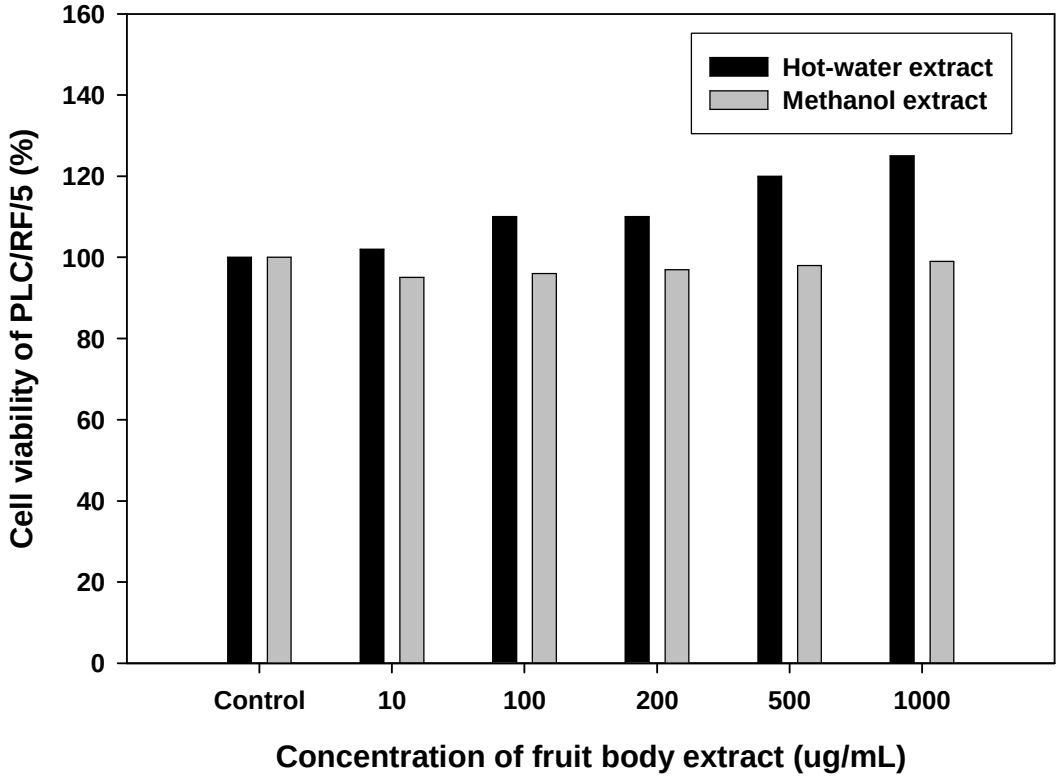

Fig. 4-24. The cytotoxic effects of hot water and methanol extracts from *P. nebrodensis* Inzenga on the viabilities of PLC/RF/5 cell.

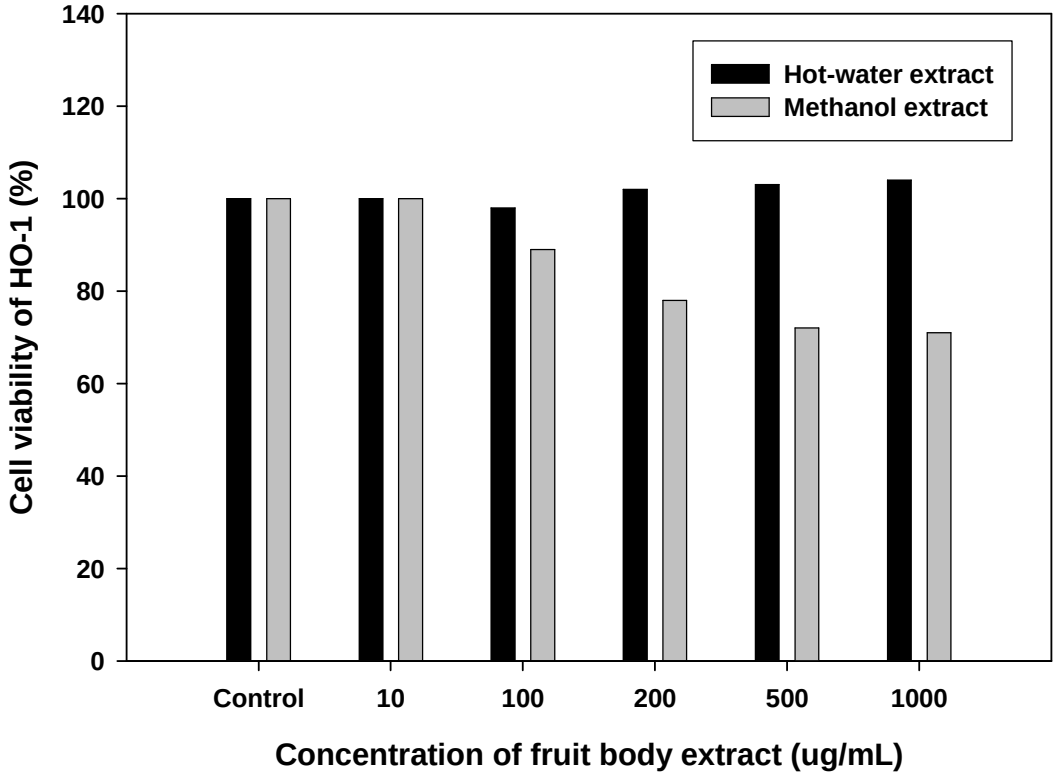

Fig. 4-25. The cytotoxic effects of hot water and methanol extracts from *P. nebrodensis* Inzenga on the viabilities of HO-1 cell.

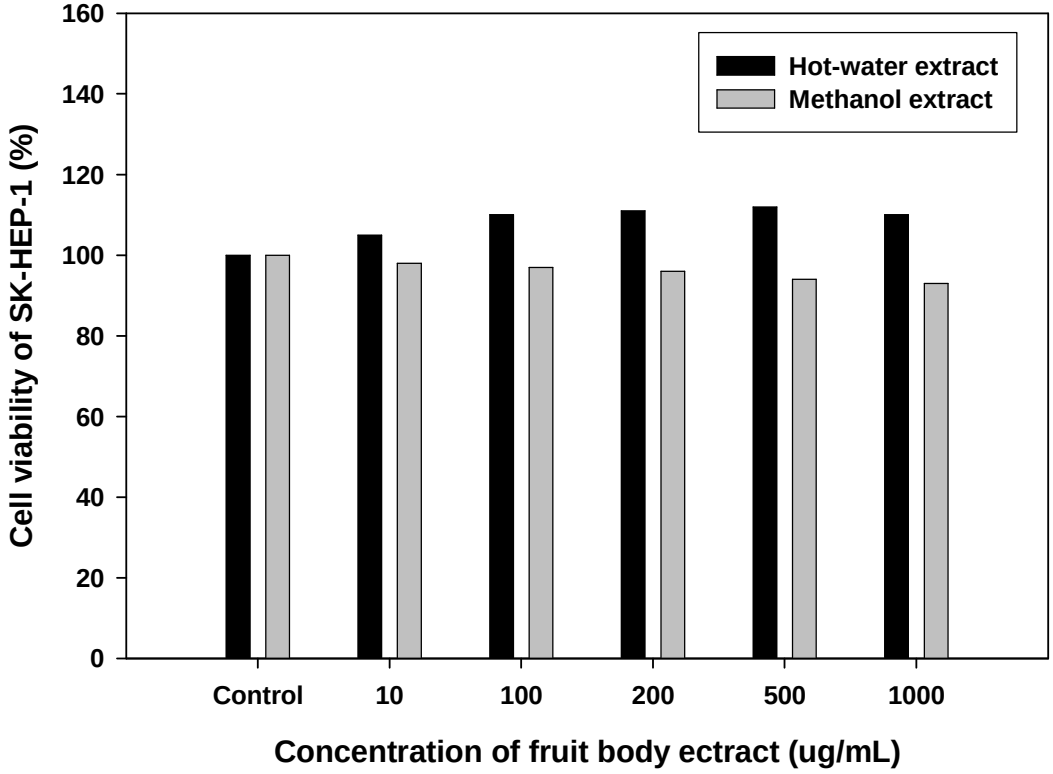

Fig. 4-26. The cytotoxic effects of hot water and methanol extracts from *P. nebrodensis* Inzenga on the viabilities of SK-HEP-1 cell.

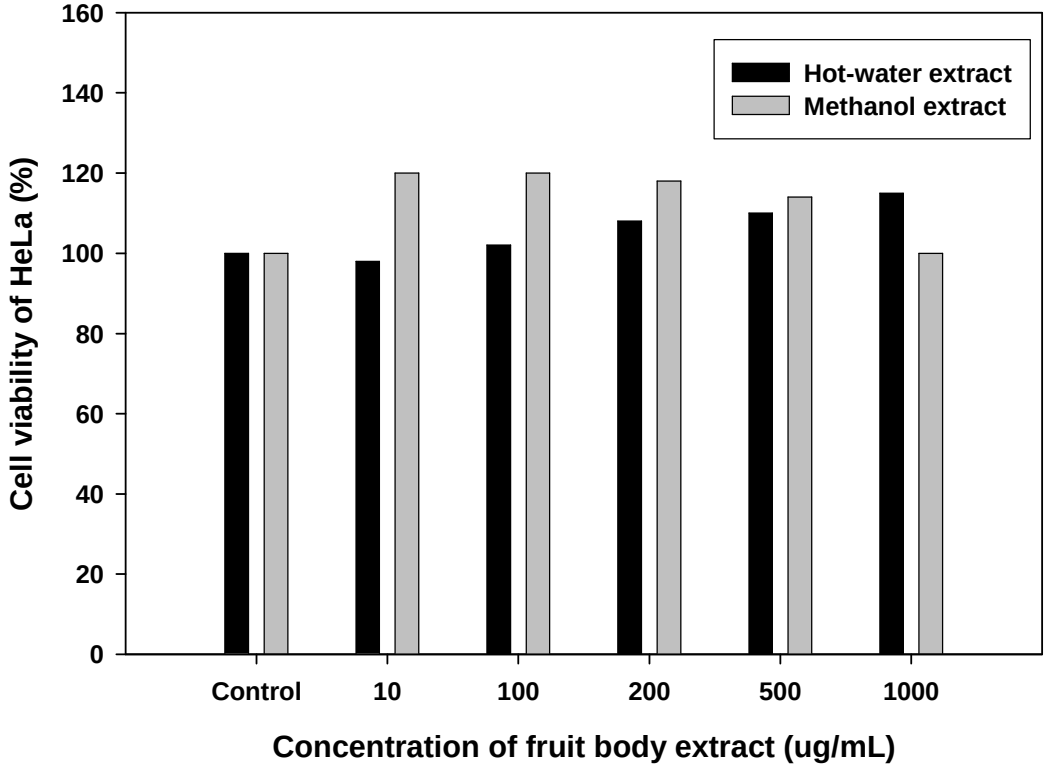

Fig. 4-27. The cytotoxic effects of hot-water and methanol extracts from *P. nebrodensis* Inzenga on the viabilities of HeLa cell.

Table 4-6. Summary of cytotoxic effect of *P. nebrodensis* Inzenga extract using hot water and methanol.

Cancer cells	Viability of cancer cells (%)			
	Hot-water extract		Methanol extract	
	Fruit body	Mycelia	Fruit body	Mycelia
Low264.7	60.3	100	45.4	89.2
HEL299	38.3	100	87.1	100
HeLa	92.3	100	100	63.2
SK-HEP-1	100	100	90.1	82.1
HO-1	100	100	70.3	100
PLC/RF/5	100	100	100	100
Hep3B	100	100	70.2	100
SNU354	100	100	75.1	100
SNU185	100	100	70.3	100

III-3-5. 백영고버섯 추출물의 아질산 제거효과

아질산염은 식육제품에 첨가되어 발색제 및 보존제로 이용되고 있으나 식품중에 존재하는 amine류와 반응하여 발암물질인 nitrosamine을 생성한다. 니트로사민 (nitrosamine)은 생체내 산화효소군에 의하여 alkonium ion (RCH^{2+})을 생성하는데 alkonium ion은 DNA를 알킬화함으로써 발암성을 나타 낸다. 따라서 니트로사민 (nitrosamine) 생성의 전구물질인 아질산염을 소거하거나 또는 분해하는것이 아주 중요하다. Figure 4-28은 백영고버섯의 자실체와 균사체의 추출용매에 따른 아질산소가능을 나타낸 결과이다. 백영고버섯의 자실체의 diethyl ether추출물 첨가구에서 28.1%의 아질산 소거능을 나타 냈다. Chloroform, ethylacetate, butanol추출물 첨가구의 경우에서는 각각 24.1%, 21.4%, 18.4%로 감소 하였다. 또한 증류수, 에탄올 및 메탄올 추출물 첨가구에서는 17-19%의 소거능을 나타 냈다. 그러나 전반적으로 백영고버섯 균사체의 경우는 자실체에 비교하여 아질산소거능은 거의 50% 감소 했다. Lee등은 아질산 소거능 측정결과 *Agrocybe cylindracea* 균사체의 diethyl ether추출물 첨가구에서 53.3%의 소거능 나타 냈다. 또한 배양액에서도 ethylacetate extract와 물 extract에서 각각 51.9%, 58.1%로 활성이 높게 나타 냈다. *Phellinus igniarius*경우는 diethyl ether추출물에서 51%의 활성이 나타났고 배양에서도 diethyl ether, chloroform, butanol, 물, 및 diethyl ether추출물 첨가구에서각각 67.4%, 64.9%, 55.1%, 54.1%로 높은 활성이 나타났는데 전반적으로 *Phellinus igniarius*추출물이 *Agrocybe cylindracea* 추출물보다 아질산소거능이 좋은 것으로 나타났다 [131]. Lee 등(1997)의 버섯류 추출물의 아질산소거작용에 대한 실험결과 *G.lucidum*의 diethyl ether추출물에서 68.3%, butanol추출물에서 44.4%, *A.bisporus*의 diethyl ether추출물에서 4.76%, butanol추출물에서 43.4%, *L.*

*edodes*의 diethyl ether추출물에서 3.5%의 결과를 보였고 butanol추출물에서 63.3%으로 나타낸 것으로 보고 되었다 [132]. Peter등은 아질산염은 그 자체가 지니는 독성 때문에 일정농도 이상 섭취하게되면 혈중 homoglobin이 산화 되어 methemoglobin을 형성하여 mrethmoglobinia등과 같은 각종 중독 증상을 일으킨다고 보고 했다 [133]. Figure 4-29은 백영고버섯의 자실체 및 균사체의 추출물 pH에대한 아질산소거능을 측정한 결과이다. 자실체 추출물 pH 1.5 강산조건에서 아질산제거 효과는 40.1%로 나타 났다. 자실체 추출물 pH가 3.0에서 6.0로 증가하면 아질산소거율은 34.2%에서 2.3%로 감소 하였다. 그리고 pH 7.5에서는 거의 없는 것으로 나타났다. 또한 백영고 버섯의 균사체 추출물의 경우도 자실체에 비해 아질산소거율이 낮지만 추출물 pH 1.5에서 가장 높았으며 pH가 증가 할수록 아질산소거율이 감소 하였다. Figure 4-30은 백영고버섯의 자실체의 추출물의 15mg, 30mg, 45mg, 및 60mg을 각각 첨가하여 pH 1.5에서 반응시간에따른 아질산염소거율를 조사한 결과이다. pH 1,5의 강산성 조건하에서는 모든 구간에서 반응시간이 증가 할수록 아질산연소거율이 크게 증가 하였다. 특히 반응 30분까지는 빠르게 아질산 소거율이 증가 하였다. 또한 반응 4시간후에 각농도에서 21.5%에서 48.3%의 아질산 소거율을 나타 냈다. Figure 4-31은 백영고버섯의 균사체의 추출물의 15mg, 30mg, 45mg, 및 60mg을 각각 첨가하여 pH 1.5에서 반응시간에따른 아질산염소거율를 조사한 결과이다. 자실체의 추출물보다는 아질산소거율이 전체적으로 감소 했지만 전채적으로 pH 1,5의 강산성 조건하에서는 모든 구간에서 반응시간이 증가 할수록 아질산연소거율이 증가 하였고. 반응 4시간후 15mg, 30mg, 45mg, 및 60mg의 첨가구에서 아질산 소거율은 10.2%, 14.3%, 18.6%, 및 23.9%으로 각각 나타났다. 이는 Maillard 반응생성물 [134], 야채및 해조 추출물 [36, 136], 결명자 추출물 [137], 유자 및 갈근 추출물 [138]에서 보고한 아질산염의 소거 효과와 약간의 차이는

있지만 강산성에서 우수한 것으로 나타났다. 또한 Chung 등[139]은 6종의 Herb 추출물에서 아질산 소거능을 측정 하였다. 물추출물의 아질산염소거직용은 pH 1.2에서 56.9-86.7%를 나타 내었고 그중 rosemary추출물의 효과가 가장 큰 것으로 측정 되었다. 아질산염 소가능은 pH가 증가함에 따라 점차 감소하여 pH 3.0과 3.6에서는 각각 35.9-51.7%, 16.2-20.9%로 나타났고 pH 4.2에서는 0-1.7%로 특히 appleemine와 thyme은 소거 죽용이 없는 것으로 나타났다. Methanol 추출물의 아질산소거능은 모든 Herb는 pH 1.2에서 효과가 뛰어나 88.9-90.7%의 높은 소거율이 보였으며 Herb간에 유사한 분해율이 보인 것으로 나타났다. pH 3.0에서는 소거능이 급격히 감소하여 47.3-64.2%로 나타 내었고 이러한 감소 경향은 pH가 증가함에 따라 더욱 두드러져 pH 3.6에서는 238.4-43.8%로 pH 1.2에서 나타난 효과의 50%이하의 소거율을 보였으며 pH 4.2에서 반응시킨 경우는 5.5-15.9%에 불과 하였다. Kang 등 [140]은 각종 페놀성 화합물의 농도를 0.1mM-6mM수용액으로 조제후 아질산염 소거율을 여러 pH조건하에서 측정한 결과 pH 1.2에서 가장 높게 나타 났고 pH 6.0에서 대부분 상실되엇다고 보고 하였다. Chung 등 [141]에 의하면 신선초, 케일, 당근, 녹즙,의 수용성 추출물아질산염 분해능을 측정한 결과 pH 1.2에서 가장 효과가 좋았고 pH 4.2와 6.0에서는 큰 차이가 없다고 하였다. Yoo등 [142]에 의하면 녹차 추출물의 수용성은 pH 1.2에서 90%의 아질산 소거능을 나타 내었고 methanol 추출물은 거의 100%에 가까운 활성을 나타 냈다고 하였다. 또한 Jin 등 [143]은 대추잎의 경우는 ethanol 추출물을 pH 1.2에서 반응 시킨 결과 1mg/ml의 낮은 농도에서도 40%이상 분해능을 나타 냈다고 보고 하였다.

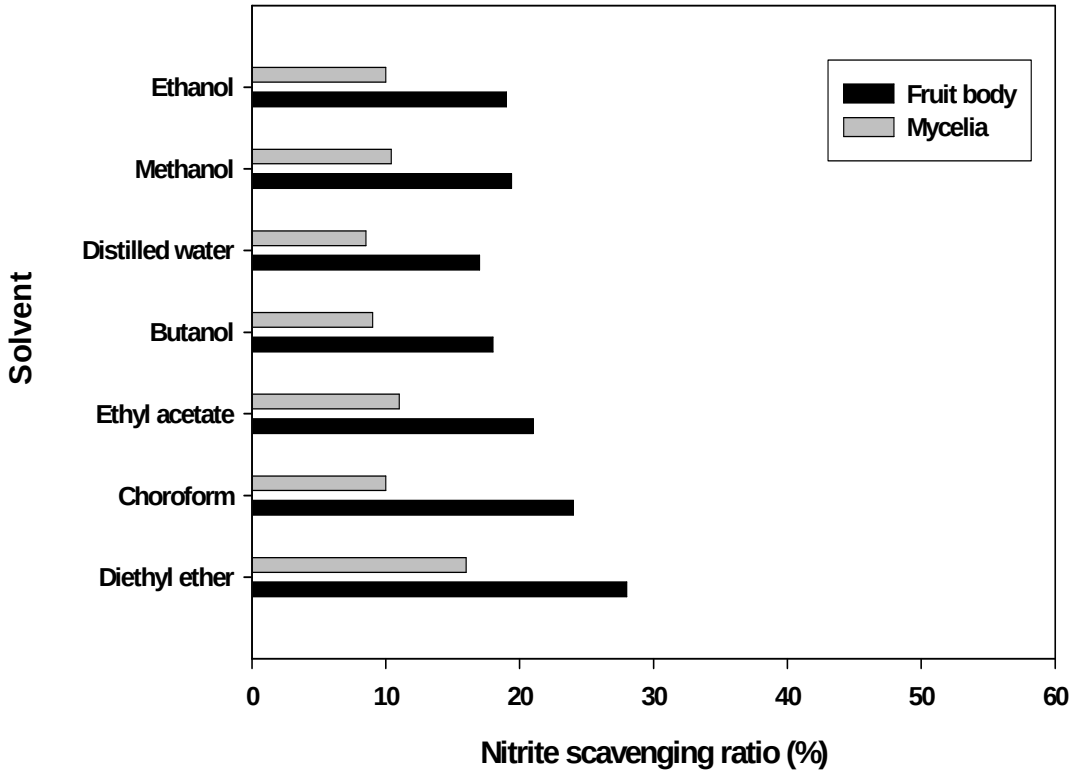

Fig. 4-28. Effect of solvents on nitrite scavenging ratio.

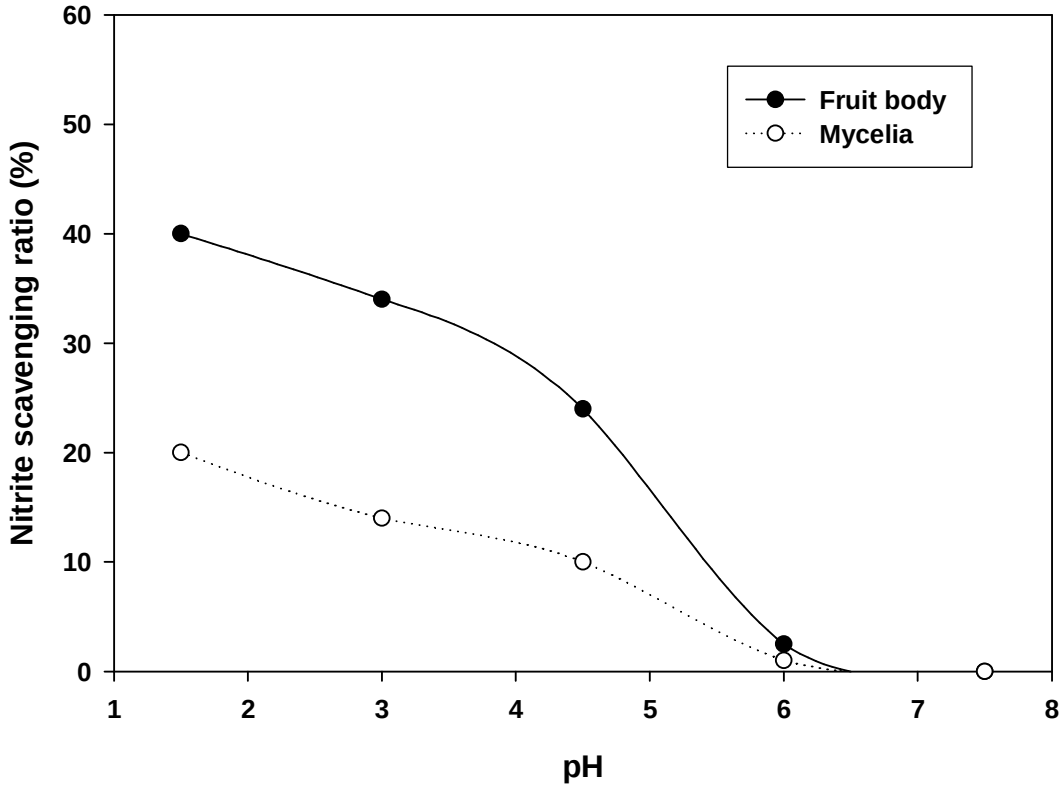

Fig. 4-29. Effect of pH of *P. nebrodensis* Inzenga extract on nitrite scavenging ratio.

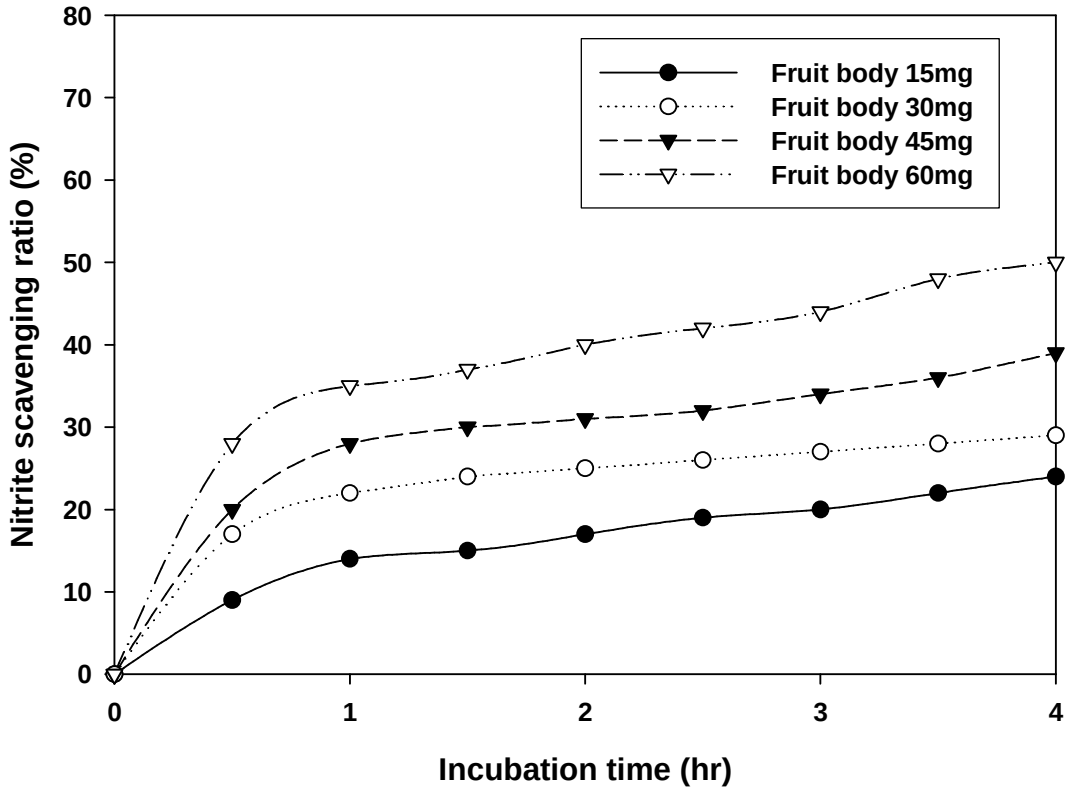

Fig. 4-30. Effect of extract concentration of fruit body on nitrite scavenging ratio (pH 1.5).

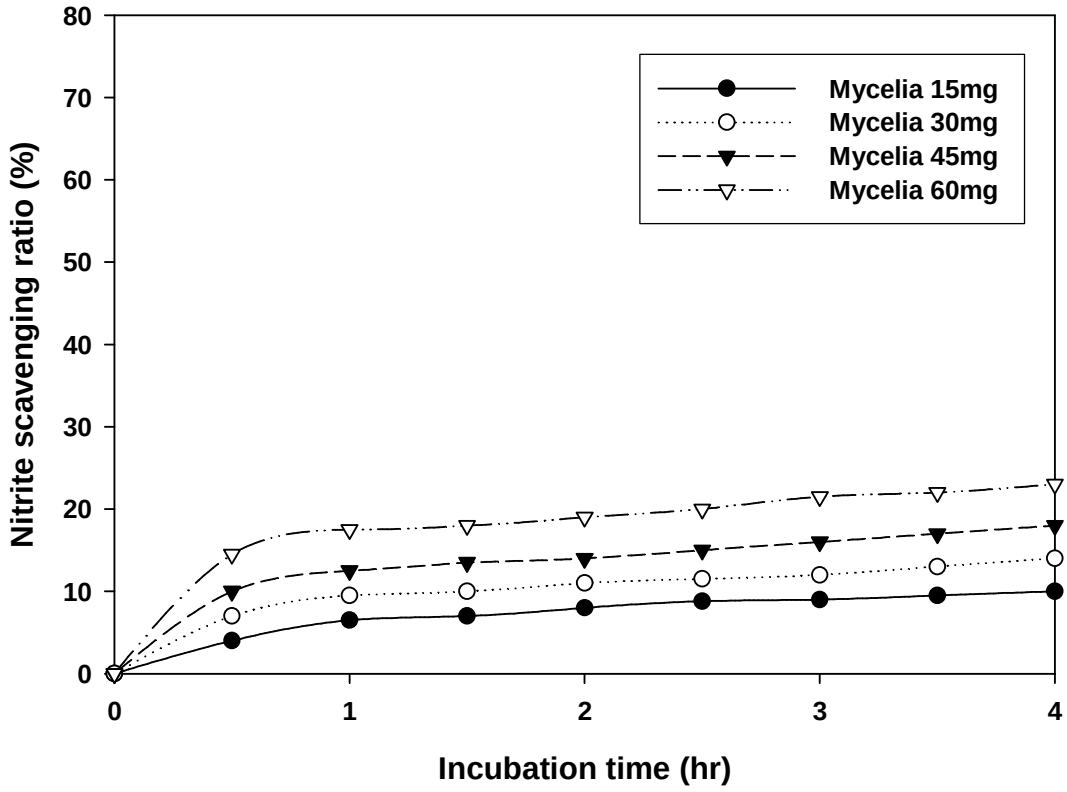

Fig. 4-31. Effect of extract concentration of mycelium on nitrite scavenging ratio (pH 1.5).

IV-4. 결론

본 연구는 백영고 버섯의 미네랄, 아미노산 및 비타민 함량을 조사하였고 또한 균사체 및 자실체의 추출물를 이용하여 항산화, 항암, 및 아질산제거 효과를 검토하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 미네랄성분은 K, P, Mg, Na가 주성분을 이루었으며 이 중 K가 1,612.96 ㎎%로 가장 많이 함유 하고 있었다. 유리아미노산중 glutamic acid가 353 ㎎%로 전체 구성아미노산의 26.6 %을 차지하였고 필수아미노산은 426 ㎎%이었다. 또한 vitamin E는 285.31 ㎎%로 높은 함량을 보였고 칼슘보충에 도움을 주는 vitamin D_3는 0.06 ㎎%로 다른 버섯에 비해 함량이 높았다.

2. 백영고버섯 자실체 extract의 농도가 250ug/mL에서 1000ug/mL로 증가할 경우 DPPH 라디칼 소거능은 8.2%에서 42.3%로 증가 하였고 superoxide anion radical 소거능은 500ug/mL에서 700ug/mL로 증가 할 경우 9.0%에서 14.2%로 증가 하였다. Linoleic acid 과산화저해률은 incubation 6시간에서 22시간으로 증가 할 경우 48%에서 82%로 증가 하였다. 이수치는 BHT보다 약간 높았다. extract의 농도가 31ug/mL에서 63ug/mL로 증가 할 경우 nitric oxide 생산저해은 9.6에서 31%로 증가 하였다. 백영고버섯 추출물을 투여 할때 glutathione 농도는 13.5 uM/g of liver 였다. 이것은 대조군 보다 약 2.2배 증가 하였다. Alcohol dehydrogenase 활성는 2.1 mU/ protein (mg) 였다. 이것은 control 와 거의 비슷한 결과가 나타났고 acetaldehyde dehydrogenase 활성는 9.0 mU/ protein (mg) 였다. 이것은 control 보다 80%증가 하였고 또한 물만 투여한 Normal보다 약 85% 증가 하였다.

4. 백영고 자실체 Hot-water extrct 125 ug/ml에서부터 감소하기 시작하여 500 ug/ml에서는 약 60%까지 감소 하였다. 그러나 Methanol extract을 사용할 경우 31 ug/ml까지는 거의 변화가 없었고 63 ug/ml 부터 감소하기 시작하여 500 ug/ml에서는 약 45%까지 감소 하였다. 이것은 Hot-water extrct 보다 33% 증가 했다. 백영고 자실체 Hot-water extrct 500 ug/ml에서는 약 38%까지 감소 하였다. 이 수치는 Methanol extract 보다 약 44% 증가 했다. 백영고 자실체 Hot-water extrct의 농도가 10 ug/ml로 증가 할 경우 SNU354 cell 증식율은 control보다 약 30% 증가 했다. 그러나 Methanol extract의 농도가 10ug/ml에서 생존율은 control보다 약간 증가 하였으나 100ug/ml에서 1000ug/ml로 증가 할 경우 생존율은 90에서 75%로 감소 하였다.

5. 백영고버섯의 자실체의 diethyl ether추출물 첨가구에서 28.1%의 아질산 소거능을 나타 냈다. Chloroform, ethylacetate, butanol추출물 첨가구의 경우에서는 각각 24.1%, 21.4%, 18.4%로 감소 하였다. 자실체 추출물 pH 1.5 강산조건에서 아질산제거 효과는 40.1%로 나타 났다. 자실체 추출물 pH가 3.0에서 6.0로 증가하면 아질산소거율은 34.2%에서 2.3%로 감소 하였다. 자실체의 추출물의 15mg, 30mg, 45mg, 및 60mg을 각각 첨가하여 pH 1.5에서 반응시간에 따른 아질산염소거율은 반응 30분까지는 빠르게 아질산 소거율이 증가 하였다. 또한 반응 4시간후에 각농도에서 21.5%에서 48.3%의 아질산 소거율을 나타 냈다.

제 *IV* 장. 종합 결론 및 제언

본 연구는 백영고 버섯의 액체 배양에서 균사체 생산 및 세포외 다당류 생성에 미치는 배지 및 배양조건을 검토하였고 이러한 최적 배양 조건을 이용하여 jar fermentor와 air bubble bioreactor에서 scale up을 하였고, 또한 균사체 및 자실체의 추출물을 이용하여 *in vitro* 및 *in vivo*에서 항산화, 항암 및 아질산 제거에 관한 연구를 수행한 결과 다음과 같이 결론을 얻었다

1. 배양온도 25℃에서 균사생육이 가장 양호하였고 접종량 5%(w/v)로 시험한 군들은 최대 균사생장과 세포외 다당류 생산을 나타냈으며, 특히 초기 pH 7.0에서 균사생장 및 세포외 다당류 생산은 가장 안정 하였다. 여러 탄소원중에서 균사생장 및 세포외 다당류 생산에 대하여 glucose 4-6% 첨가구에서 가장 양호하였고, 또한 유기태 질소원인 polypeptone과 yeast extract 첨가구에서 가장 양호한 균사생장과 세포외 다당류 생산을 보였다. 특히 Polypeptone 1.0%(w/v) 와 yeast extract 0.8%(w/v)의 혼합 질소원인경우는 단독 질소원보다도 균사생장과 세포외 다당류 생산이 증가 하였다. 여러 무기염류중에서 K_2HPO_4 0.12%, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.12%첨가구에서 균사생장과 세포외 다당류 생산이 가장 우수하였다. 영양요구성 인자는 미생물 및 유효성분을 함유한 물질의 생산을 위한 선행조건 중의 하나이다. 그러나 백영고 버섯 균사체의 균사생장과 세포외 다당류 생산을 위한 영양 요구성 인자에 대한 연구는 매우 부족한 실정이어서 균사생장과세포외 다당류 생산을 위한 영양 요구성 인자를 조사하기 위하여 회분식 배양을 실시하였다

2. Flask 최적 배양조건을 이용하여 jar fermentor에서 세포외 다당류 생산은 배양 10일째 최대 생산량을 보인다음 그 이후에 균사생장의 억제됨에 따라 세포외 다당류 생산도 저하되었다. 이 결과는 basal culture conditions보다 1.5배 증가 하였다. 또한 최적 배양조건을 이용하여 air buble bioreactor에서 optimum culture conditions에서 배양 할경우 균사생장은 배양시간 12일 경에 최대 균사생장이 보였고, 세포외 다당류 생산은 배양 12일째 최대 생산량이 얻어졌다. 이 결과는 basal conditions보다 약 1.7배 증가 하였다. 그러나 5 L Jar fermenter와 air-bubble bioreactor에서 백영고 버섯의 균사체 생산과 세포외 다당류 생산이 동일한 배지에서 배양함에도 불구하고 차이가 나는 것은 다른 미생물과는 달리 담자균으로서 다세포의 균사가 모여서 균사체를 이루어 5L jar fermenter에서는 균사체의 균사가 Impeller의 영향으로 분사되어 활발한 생성을 하였지만, air-bubble bioreactor에서는 균사가 모여서 배양기의 아래에 침체되는 현상이 발생되어 차이가 있는 것으로 판단되었다.

3. 백영고버섯 추출물의 미네랄성분은 K, P, Mg, Na가 주성분을 이루었으며 이 중 K가 가장 많이 함유 하고 있었다. 유리아미노산중 glutamic acid가 전체 구성아미노산의 26.6 %을 차지하였고 또한 vitamin E는 285.31 mg%로 높은 함량을 보였고 칼슘보충에 도움을 주는 vitamin D_3는 0.06 mg%로 다른 버섯에 비해 함량이 높았다. 백영고버섯 자실체 extract의 농도가 250ug/mL에서 1000ug/mL로 증가 할 경우 DPPH 라디칼 소거능은 8.2%에서 42.3%로 증가 하였고. Linoleic acid 과산화저해률은 incubation 6시간에서 22시간으로 증가 할 경우 48%에서 82%로 증가 하였다. 이수치는 BHT보다 약간 높았다. 백영고버섯 추출물을 투여 할때 glutathione 농도는 대조군 보다 약 2.2배 증가 하였다. Alcohol dehydrogenase 활성는 control 와 거의 비슷한 결과가 나타

났고 acetaldehyde dehydrogenase 활성는 control 보다 80%증가 하였고 또한 물만 투여한 Normal보다 약 85% 증가 하였다. 백영고 자실체 hot water extrct 500 ug/mL에서는 약 60%까지 감소 하였다. 그러나 methanol extract을 사용 할 경우 500 ug/mL에서는 약 45%까지 감소 하였다. 이것은 hot water extrct 보다 33% 증가 했다. 백영고 자실체 hot water extrct 500 ug/mL에서는 약 38%까지 감소 하였고 이 수치는 methanol extract 보다 약 44% 증가 했다. 백영고 자실체 hot water extrct의 농도가 10 ug/mL로 증가 할 경우 SNU354 cell 증식율은 control보다 약 30% 증가 했다. 그러나 methanol extract의 농도가 10ug/mL에서 생존율은 control보다 약간 증가 하였으나 100ug/mL에서 1000ug/mL로 증가 할 경우 생존율은 90에서 75%로 감소 하였다. 백영고버섯의 자실체의 diethyl ether추출물 첨가구에서 28.1%의 아질산 소거능을 나타 냈다. 자실체 추출물 pH 1.5 강산조건에서 아질산제거 효과는 40.1%로 나타 났다. 자실체의 추출물의 15mg, 30mg, 45mg, 및 60mg을 각각 첨가하여 pH 1.5에서 반응시간에 따른 아질산염소거율은 반응 30분까지는 빠르게 아질산 소거율이 증가 하였다. 또한 반응 4시간후에 각농도에서 21.5%에서 48.3%의 아질산 소거율을 나타 냈다. 이상의 결과은 백영고 버섯 추출물의 항산화 효과 있어 기능성 식품으로도 개발 가능하고 특히 여러 암세포중에서 Low264.7, HEL299, HeLa, 및 SK-HEP-1은 백영고 버섯에 큰 효과가 있어 의약품으로도 개발이 가능하다고 사료된다. 그리고 아질산 제거 효과가 있어 식료제품에 첨가되어 식품중에 존재하는 amine류와 반응하여 발암물질인 nitrosamine 생성을 막을수 있어 발색제 및 보존제로써 충분한 가치가 있다고 사료 된다. 또한 아질산염이 존재할 수 있는 가공식품과 함께 섭취할 경우 각종 중독증상 및 암발생과 같은 질병을 다소 예방할 수 있을것으로 사료 된다

참고문헌

1. 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).
2. Rajarathnam, S., Shashireka, M. N. and Bano, Z., Biopotentialities of the Basidiomycetes, *Adv. Appl. Microbiol.*, 64, 1088-1117(1993).
3. 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).
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. Samul, C., Production of mushroom mycelial of the submerged culture process, pp. 647 - 653, Industrial Microbiology, Reimhold Publishing, Lodon(1959).

16. Torev, A., *Mushroom Sci.*, 7, 585-589(1964).
17. Friel, M. T. and McLoughlin, A. J., Production of a liquid inoculum/spawn of *Agaricus bisporus*, *Biotechnol. Lett.,* 22, 351-354(2000).
18. 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).
19. Sung, J. M., Kim, C. H., Yang, K. J., Lee, H. K. and Kim, Y. S., Studies on distribution and utilization of *Cordyceps militaris* and *C. nutans*, *Kr. J. Micol.,* 21, 94-105(1993).
20. Lee, J. H., Cho, S. M., Kim, H. M., Hong, N. D. and Yoo, I. D., Immunostimulationg activity of polysaccharides from mycelia of *Phellinus linteus* grown under differnt culture conditions, *J. Microbiol. Biotecnol.,* 6, 52-55(1996).
21. Lee, S. Y., Kang, T. S. and Lee, M. C., Condition of exo-polysaccharide production from submerged mycelial culture of *Ganoderma lucidum* by using air-lift fermenter system, *Kr. J. Biotechnol. Bioeng.,* 13, 547-553(1998).
22. Choi, K. H., Development of a new synthetic medium composition for the submerged culture of *Phellinus linteus*, *Kr. J. Biotechnol. Bioeng.,* 14, 167-173(1999).
23. Huang, N., "Colored illustrations of macrofungi mushrooms of China", China Agricultural Press. Beijing, pp 23-29 (1998).
24. Huang, N., Colored illustrations of macrofungi mushrooms of China,

China Agricultural Press. Beijing(1998).

25. Chang S. T., *Int J. Med Mushroom*, 1, 1-7(1999).
26. Chang S. T., *Mushroom J. Trop.,* 11, 45-52(1991).
27. Wasser S. P., Weis A. L., *Int J. Med Mushroom*, 1, 351-370(1999).
28. Choi, D.B., Maeng, J.M, Ding, J. L., Cha, W.S., Exopolysaccharide Production and Mycelial Growth in an Air-Lift Bioreactor using *Fomitopsis pinicola.* J. Micro. Biotech. 17 (8), 1369-1378 (2007)

Zadrazil F., Academic Press, New York, 521-524(1978).

29. Mau J. L., Lin Y. P., Chen P. T., Wu Y. H. and J. T. Peng, *J. Agric Food Chem.*, 46, 4587-4591(1998).
30. Wood D. A., and J. F. Smith, Wiley, New York, 309-343(1987).
31. Silanikove N. and D. Levanon, *J. Sci Food Agric.*, 38, 117-124(1987).
32. Silaikove N., Danai O. and D. Levanon, *Biol Wastes*, 25, 219-226(1988).
33. Hadar Y. and E. Cohen-Arazi, *Appl Environ Microbiol*, 51, 1352-1354(1986).
34. Fischer K. H. and W. Grosch, *Lebensm Wiss Technol*, 20, 233-236(1987).
35. Hadar Y. and C. G. Dosoretz, *Trends Food Sci Technol September*, 214-218(1991).
36. Belinky P. A., Masaphy S., Levanon D., Hadar Y. and C. G. dosoretz, *Appl Microbiol Biotechnol*, 40, 629-633(1994).
37. Assaf S., Hadar Y. and C. G. dosoretz, *J. Agric Food Chem*, 43, 2173-2178(1995).
38. Chang S. T. and P. G. Miles, CRC Press, Boca Raton(1989).

39. Wasser S. P. and A. L. Weis, *Crit Rev Immunol*, 19, 65-96(1999a).
40. Gunde-Cimerman N., *Int J. Med Mushroom*, 1, 69-80(1999).
41. Kües U. and Y. Liu, Appl Microbiol Biotechnol, 54, 141-152(2000).
42. 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).
43. 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).
44. 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).
45. Noda, S., Antibiotic fungicide extracted from Basidiomycetes culture (e.g. Shitake, *Flammulina velutips*, *Polyporus*, *Pleurotus*, etc.)., Jpn. Patent JP. 60190800, JP. 8445268(1998).
46. Noda, S., Preparation of an antiviral agent by deep culture Basidiomycetes, Jpn. Patent JP 60054324, JP 83162084(1998).
47. 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).
48. 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).

49. 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).

50. 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).

51. 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).

52. 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).

53. 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).

54. Hidaka, H. and Ikegawa, T., Anti-cancer agents from edible mushrooms, Jpn. Patent JP48006766, B4 730228 showa(1998).

55. Suzuki, W. and Ikegawa, T., Anti-cancer substance emitanin, Jpn. Patent

JP 53006494, 780120 showa(1998).

56. 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).
57. 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).
58. 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).
59. 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).
60. 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).
61. 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).
62. Bobek, P., Ozdin, L. and Kunial, I., Antioxidative effect of oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*) in hypocholesterolemic rat, *Pharmazie.,*

50, 441-442(1995).

63. 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).
64. Oguri, S., Ando, A. and Nagata, Y., A novel developmental stage specific lectin of the Basidiomycete *Pleurotus cornucopiae*, *J. Bacteriol.*, 178, 5692-5698(1996).
65. Fitzpatrick, W. G., Esselen, W. G. and Weir, E., *J. Am. diet. Assoc.*, 22, 318 (1946).
66. Mousstafa, A. M., *Appl. Microbiol.*, 8, 62 (1960).
67. Falanghe, H., *Appl. Microbiol.*, 12, 330 (1964).
68. Humfeld, H., *Agr*. Yearbook, 242 (1950-1951).
69. Reusser, G., Spencer, G. T. and Sallans, A. R., *Appl. Microbiol.*, 6, 15 (1958).
70. Martin, A. M., Can. *J. Microbiol.*, 29, 108 (1983).
71. Martin, A. M. and Bailey, V. I., Can. Inst. *Food Sci. Technol.*, 18, 185 (1985).
72. Robins, W. J., Prog. Natl. *Acad. Sci.*, 33, 171 (1947).
73. Anchel, M., J. Am. *Chen. Soc.*, 74 (1558), 2943 (1952).
74. Lucas et at., *antibiotics Ann.*, 493 (1958-1959).
75. Roland, J. Fl, *Science*, 132, 1897 (1960).
76. Petterson, G., Cowling, E. B. and Porath, J., *J. Biochem. Biophys. Acta.*, 67, 1 (1963).
77. Falanghe, J., *Arch. biochem. Biophys.*, 96, 456 (1962).

78. Pan. S. C. and Frazier, W. R., *biotech. bioeng.*, 4, 303 (1963).

79. 박용환, 최신 버섯학, 한국버섯원균영농조합, pp. 270-271 (1997).

80. Bailey, J. E. and Ollis, D. F., Biochemical Engineering Fundamentals, pp. 368, McGraw-Hill Book Co., N.Y. (1977).

81. Humfeld et al., *Appl. Microbiol.*, 2, 170 (1954).

82. Kim, H. H., J. G. Na, Y. K. Chamg, G. T. Chun, S. J. Lee, and Y. H. Jeong. Optimization of submerged culture conditions fro mycelial growth and exopolysaccharide production by *Agaricus blazei. J. Microbiol. Biotechnol.* 14, 944-951 (2004).

83. Kidd, P. M., The use of mushroom glucans and proteoglycans in cancer therapy, *Alternative Medicine Review,* 5, 4-27(2000).

84. Mizuno, T., The extraction and development of antitumor-activity polysaccharides from medicinal mushrooms in Japan, *Int. J. Med. Mushrooms,* 1, 9-29(1999).

85. 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).

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

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

88. 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).

89. 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).
90. 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).
91. 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).
92. 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).
93. 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).
94. 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).
95. Hashimoto, K. and Takahashi, Z., Studies on the growth of *Pleurotus ostreatus, Mush. Sci.*, IX, 585-593(1974).
96. 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).

97. Hong, I. P. and Lee, M. W., Studies on the cultural characteristics of *Poria cocos, Kor. J. Mycol.*, 18, 42-49(1990).
98. 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).
99. 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).
100. 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).
101. Ishikawa, H., Physiological and ecological studies on *Lentinus edodes*(Berk), *Sing. J. Agric. Lab.*, 8, 1-53(1967).
102. 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).
103. Kim, J. M., Ra, K. S., Noh, D. O. and Suh, H. J., Optimization of submerged culture conditions for the production of angiotensin converting enzyme inhibitor from *Flammulina velutips*, *J, Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 29, 292-295(2002).
104. 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).

105. 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).

106. 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).

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

108. Kim, H. K., H. S. Han, G. D. Lee, and K. H. Kim, Physiological Activities of Fresh *Pleurotus eryngii* Extracts, *J. Korean. Soc. Food. Sci. Nutr.* 34, 439-445 (2005).

109. Hong, K. H., B. Y. Kim, and H. K. Kim, Studies on the Biological Activity of *Pleurotus ferulea*, *J. Korean. Soc. Food. Sci. Nutr.* 33, 791-796 (2004).

110. Kim, E. J., Y. J. Lee, H. K. Shin, and J. H. Yoon, A Study on the Mechanisms by Which the Aqueous Extract of *Inonotus obliquus* Induces Apoptosis and Inhibits Proliferation in HT-29 Human Colon Cancer Cells, *J. Korean. Soc. Food. Sci. Nutr.* 35, 516-523 (2006).

111. Hartwell, J. L., Plants used against cancer, *A. Survey. Lioyda.* 34, 386 (1971).

112. Suzuki, S. and Oshima. S., Influence of shiitake (*Lentinus edodes*) on human serum cholesterol, *Mushroom Sci.* 9, 463-467 (1976).

113. Hikino, H., C. KIanno, Mirin Y., and Hayashi, T,. Isolation and hypoglycemic activity of Ganoderans A and B, glycans of *Ganoderman lucidum* fruit bodies, *Planta. Med.* 51, 339-340 (1985).

114. Lee, J. W., Chung, C. H., Jeong, H. J. and Lee, K. H., Anticomplementary and antitumor activities IY-105, *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 18, 571-577 (1990).

115. Ventrurella, G., Typification of *Pleurotus nebrodensis*, *Mycotaxon.* 75, 229-231 (2000).

116. Guo, L. Q., J. Y. Lin, and Lin, J. F., Non-volatile components of several novel species of edible fungi in China, *Food chemistry.* 100, 643-649 (2007).

117. Choi, O. B., Cho, D. B. and Kim, .D. P., The components of cultivated *Poria cocos*, *Korean J. Food. Nutr.* 9, 438-440 (1996).

118. Woo, S. J. and Ryoo, S. S., Preparation method for atomic absorption spectrophotometry of food samples: Comparison of dry, wet and aqua-regia methods, *Korean J. Food. Sci. Technol.* 15, 225-230 (1983).

119. Waters Associates, *Official method of amino acid analysis*. In Amino acid analysis system of operators manual of the Waters Associates, p37, U.S.A (1983).

120. Food Code., Conduct laboratory testing according to specifications and test methods of the Food Code, p894-918, Korea Food & Drug Administration, Moon Yong Press, Seoul (2003).

121. Hong, K. H., B. Y. Kim, and H. K. Kim., Analysis of Nutritional Components in *Pleurotus ferulea*, 36, 563-567 (2004).

122. Shon, M. Y., K. I. Seo, S. Y. Choi, N. J. Sung, S. W. Lee, and S. K. Park., Chemical Compounds and Biological Activity of *Phellinus baumii*, *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 35, 524-529 (2006).

123. Lee, S. K., Yoo, Y. J. and C. S. Kim., Studies on the chemical components in *Ganoderma lucidum*, *Korean J. Food Sci. Technol.* 21, 890-894 (1994).

124. Lee, S. H., Kim, N. W., and Shin., S., Studies on the nutritional components of mushroom(*Sarcodon aspratus*), *Korean Journal of Food Preservation*. 10, 65-69 (2003).

125. Soda, K., Tanaka,H. and Esaki. N, Amino Acids, *Biotechnology*, Rehm, H. J. and Reed, G. eds. Vol. 3, p479, Verlag Chemie, D-6940 Weinheim, Germany (1983).

126. Lee, M. H., Lee,H. J., and Cho. ,I. S., Chemical Compositions of *Agaricus blazei Murill* Fruiting Bodies Cultivated in a Korean Local Farm, *J. Fd. Hyg. Safety*. 13, 94-98 (1998),.

127. Ding, J. L., Shin,H. J. and Cha.,W. S., Analysis of Amino Acid, Vitamins and Minerals of Fruiting Body of *Fomitopsis pinicola*, *Journal of Life Science.* 16, 1123-1126 (2006),.

128. Park, H. J., Food Composition, p150-157., National Rural Living Science Institute, R.D.A., Sangrok press, Seoul 2001).

129. Lee, J. S., R. M. Ahn, and H. S. Choi., Determinations of Ergocalciferol and Cholecalciferol in Mushrooms, *Korean J. Soc. Food. Sci.* 13, 173-178 (1997).

130. Seo, J. H., K. A. Chang, H. S. Kim, C. H. Park, S. H. Kim, M. J. Lee,

S. J. Jeong, S. H. Choi, J. C. Rah, J. W. Koo, E. M. Kim, Y. J. Xu, J. H. Choi, J. K. Shin, C. J. Huh, L. J. Kim, and Y. H. Suh, Effects of Nicotine on Aβ or CT_{105}-induced Toxicity, *Korean J. Brain society.* 1, 77-84 (2001).

131. Lee, H. W., Lee, D. W., Ha, H. C., Jung, I. C., and Lee, J. S., Antioxidant activities of the mycelium and culture broth of *Phellinus igniarius* and *Agrocybe cylindracea*, *Kor. J. Mycol.*, 30, 37-43 (2002).

132. 이 기동, 장 학길, 김 현구, 버섯의 황산화활성 및 아질산염 소거 작용, 한국식품학회지, 29(3): 432-436 (1997).

133. Peter F. S., The toxicology of nitrate, nitrite, and N-Nitroso compounds, *J. Sci. Food Agric.,* 52: 1761-1764 (1975).

134. Park, J. W. Biological actions of maillard reaction products derived from glucose-amino acids. Thesis of ph D. in National Fish. Univ. of pusan, 1987.

135. 김 동수, 안 방원, 염 동민, 이 동호, 김 선봉, 박 영호: 천연 식품성분에 의한 발암성 니트로사민 생성인자 분해작용(야채 추출물의 아질산염 분해작용), 한국수산학회지, 20(5), 463 (1987).

136. 김 선봉, 안 방원, 염 동민, 이 동호, 김 선봉, 박 영호: 천연 식품성분에 의한 발암성 니트로사민 생성인자 분해작용(해조 추출물의 아질산염 분해작용), 한국수산학회지, 20(5), 469 (1987).

137. 박 영범, 이 태기, 김 미경, 도 정용, 여 생규, 박 영호, 김 선봉: 결명자 추출물의 아질산 소거인자 특성, *Korean J. Food Sci. Technol.,* 27(1), 124 (1995).

138. 박 진우, 이 문조, 김 동수, 다른 소재의 기능성에 대한 연구 (유자와 칡

추출물의 항산화능 및 아질산염 소거 작용), 동의공업전문대학 논문집, 19집, 127 (1993).

139. 정 해정, 노 경림, Herb 추출물의 전자공여능, 항균활성 및 아질산염 소거능 검색, *Korean J. Food Sci.,* 16(4), 372-377 (2000).

140. Kang, Y. H., Park, Y. K. and Lee, G. D., The nitrite scavenging and electron donating ability of phenolic compounds. *Korean J. Food Sci. Technol.,* 28: 232-239 (1996).

141. Chung, S. Y., Kin, N. K. and Yoon S., Nitrite scavenging effect of methanol fraction obtained from green yellow vegetable juices. *J. Korean Soc., Food Sci. Natr.,* 28: 342-347 (1999).

142. Yoo. S. G., Yeum, D. M., Lee, D. H., Ahn, C. W., Kim, S. B. and Park, Y. H., The nitrite scavenging effects by component of green tea extracts, *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.,* 23: 287-292 (1994).

143. Jin. Q., Park, J. R., Kim, J. B. and Cha, M. H., Physiological activity of *Zizyphus jujuba* leaf extracts. *J. Korean Sco. Food Sci. Nutr.*, 28: 593-598 (1999).

감사의 글

多事多難 했던 2007년을 뒤로 하고 2008년 새해를 맞이하여 정말 뜻 깊은 일들로 가득하길 기원하면서 몇 글자를 적고자 합니다. 知天命을 앞두고 있는 나이에 博士論文을 쓴다는 것이 어느 누구보다도 感懷가 깊고 흐뭇함을 감출수가 없습니다. 博士論文을 마무리 하면서 저한테 힘이 되어 주신 모든 분들께 感謝의 글을 전하고자합니다

人間으로 태어나서 어느 한순간에 끝을 맺는다는 것은 정말 어려운 일 아닐까 생각합니다. 긴 터널을 통과하여 이제 끝을 맺는 시간에 이제 하나에 터널을 넘고 또 다른 터널을 기다리는 저의 마음은 너무나 값진 結實이 아닐 수 없습니다. 항상 곁에서 묵묵히 지켜준 아내 이현숙에게 감사하고 오직 자식걱정으로 一貫하신 父母님, 이번에 아버님께서 七旬을 맞이하여 더욱더 기쁩니다. 이렇게 기쁨을 함께 할 수 있다는 것이 모두가 父母님의 사랑이 있기 때문이라고 감히 말씀드릴 수가 있습니다. 또한 이번 論文을 끝까지 포기하지 않고 指導鞭撻 해주신 차월석 교수님, 유영제 교수님, 박돈희 교수님, 권규혁 교수님께 깊은 감사의 말씀을 드리고 싶습니다.

이제 學者로서 社會活動하면서 그 누구보다도 열심히 살아갈 것입니다. 자랑스러운 아버지로 그리고 남편으로서 최선을 다 하는 사람이 될 것입니다. 사랑스러운 우리 딸 대산이, 그리고 아들 대건이 항상 건강하고 튼튼하게 자랄 수 있게 간절히 祈禱합니다. 6형제 長男으로 태어나서 晩學을 한다는 것이 어렵고 힘들지만 곁에서 지켜봐준 우리 동생들 제수씨, 형래-최미연, 형권-최정애, 윤관-최애정, 윤선-김례미, 형기-정혜정 모두에게 感謝합니다. 앞으로도 더욱더 邁進하여 새로운 길에 挑戰하고 여기서 멈추지 않고 未來에 挑戰하는 人間으로 살아 갈수 있게 최선을 다 하겠습니다.

아울러 學部때부터 지금까지 指導鞭撻해주신 김선일 교수님, 조병욱 교수님, 김정규 교수님, 홍완해 교수님, 송연호 교수님 정말 고맙습니다. 앞으로 제가 社會에 還元되더라도 그 恩功은 모두 교수님께 돌리고 싶습니다.

박사과정동안 實驗室에서 열심히 實驗하면서 밤잠도 못자고 실험에 열중한 우리 이준한 선생, 그리고 中國에서 留學 와서 날마다 論文 쓰느라 餘念이 없는 우리 정길록 선생, 이제 막 大學院에 入學한 맹정무, 임환희 너무 고맙고 자랑스럽습니다. 앞으로도 제가 할 수 있는 일이 있다면 최선을 다하고 模範이 되는 사람으로 남아있겠습니다. 언제나 열심히 하면 좋은 結果, 좋은 일들이 항상 우리 곁에 있다는 것을 깨닫게 되었습니다.

오늘 感謝의 글을 적으면서 정말 눈물이 앞을 가립니다. 晩學이란 것이 이렇게 어렵고 힘들지만 모두의 사랑으로 보살펴주신 덕분에 祝福의 날을 맞게 되었던 것 같습니다. 앞으로도 계속 指導鞭撻해주시고 도와주십시오. 최선을 다하는 남 형근이가 될 것을 감히 약속드립니다.

감사합니다!

2009 년 2 월 일

남 형 근 올림

저작물 이용 허락서

학 과	화학공학	학 번		과 정	박 사
성 명	한글: 남 형근 한문 : 南亨根 영문 : Hyung-Geun Nam				
주 소	광주광역시 남구 월산2동 60-3번지				
연락처	E-MAIL : nambosss@hanmail.net				
논문제목	한글 : 백영고 버섯의 최적배양 및 생물활성에 관한 연구 영문 : A Study on the Optimal Culture and Biological Activities of *Pleurotus nebrodensis* Inzenga				

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.

2009 년 2 월 일

조선대학교 총장 귀하

저작자: 남 형 근 (인)