

최 종  
연구보고서

꽃송이버섯 단기 대량생산 체계 확립 및  
효소처리를 통한 면역물질 활성화 연구

Studies on Short-term Mass Cultivation and Immune Substance  
Activity by Enzyme Treatment of *Sparassis crispa*

주관연구기관  
하나바이오텍(주)

협동연구기관  
농진청 한국농전 특작과  
충남대학교 약학대학

농 립 부

# 제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “꽃송이버섯 단기 대량생산 체계 확립 및 효소처리를 통한  
면역물질 활성화 연구” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2004 년 10 월

주관연구기관명 : 하나바이오텍(주)

총괄연구책임자 : 남 정 우 CIO

연 구 원 : 고 인 수 CMO

연 구 원 : 선 병 식

협동연구기관명 : 농진청 한국농전

협동연구책임자 : 장 현 유 교수

협동연구기관명 : 충남대 약학대학

협동연구책임자 : 정 경 수 교수

# 요 약 문

## I. 연구제목

꽃송이버섯 단기 대량생산 체계 확립 및

효소처리를 통한 면역물질 활성화 연구

## II. 연구개발의 목적 및 필요성

꽃송이버섯이 단순히 식용버섯으로서의 한계를 넘어 암을 이기는 신비의 약용버섯으로서의 가치를 인정받고 관심을 대상이 된 것은 약용버섯 으로서는 뒤늦은 20세기 말에서야 일본에서 인공재배에 성공하고 동경대 약학대 야도마에(宿前利郎) 명예교수와 오노(大野尙仁)교수의 꽃송이버섯 베타글루칸의 규명과 항암 면역활성에 대한 연구의 결과라고 할 수 있다. 특히 2003년 10월 제61회 일본 암학회총회에서 말기암 환자 14명을 대상으로 한 임상실험에서 9명이 완치에 가까운 증상개선 및 상태호전을 보였다는 결과가 발표(Immuno modulating Activity of a beta-Glucan Preparation, SCG, Extracted from a Culinary Medicinal Mushroom, *Sparassis crispa* Wulf.:

Fr.,and Application to Cancer Patients; International Journal of Medicinal Mushrooms 2003)되면서 꽃송이버섯 함유 베타(1-3)글루칸은 일본에서 항암 면역요법의 새로운 천연물질로 각광을 받게 되었다. 이러한 연구성과에 힘입어 최근 기존의 미나헬스(ミナヘルス) 외에도 미쓰와코교(ミツワ興業), 유니치카(ユニチカ), (주)오비켄(応微研), 야마토킨가쿠(大和菌學研究所) 등 10여개의 대기업과 연구소들이 꽃송이버섯 연구 및 생산, 제품 판매에 참여하여 시장이 활성화되고 있다.

우리나라의 경우 꽃송이버섯에 대한 연구와 재배는 거의 초보적인 수준에 머물러 있는 상황이다. 특히 40%가 넘는 베타글루칸의 함량과 일본에서의 시장 활성화에 따라 여러 농가와 연구소에서 재배 시도가 이루어졌지만 하였지만, 기초연구의 한계와 대량생산 단계에서의 낙후된 시설과 오염문제로 실패해 온 것이 사실이다.

최근 전국 버섯농가의 60%가 경매에 들어가 있다는 안타까운 현실과 암환자가 하루에도 170여명이 사망하고 있는 사실을 고려 할 때, 본 연구가 농가의 새로운 소득원 창출과 암환자들에게 새로운 희망으로서 자리매김하기를 기대한다.

### Ⅲ. 연구개발 내용 및 범위

우리나라의 경우, 약용버섯에 대한 연구는 상황버섯을 중심으로 꾸준히 이루어져 왔지만, 재배에서부터 약리활성 물질의 추출 및 동물임상까지 보다 체계적인 연구는 많지 않았던 것으로 판단되며, 특히 연구결과가 산업에 적용되어 제품화까지 이루어진 사례가 드물다는 사실이 아쉬웠다. 본 연구는 단순히 이론적인 연구에 머물지 않고 산업화에 초점을 맞추어 이루어 졌으며, 따라서 우량 균주의 확보부터 배양, 재배 및 물질추출 기술의 확립, 면역물질 탐색과 제품개발까지 비교적 일관성있게 연구하였다. 크게 나누어보면 우량균주의 확보와 배양, 배지제조 및 생육기술의 확보 등 대량생산 기술에 대한 연구, 신뢰성이 담보되는 제품화를 위한 면역활성 물질의 탐색과 항암 면역활성 연구 그리고 시장에서 차별화된 건강기능식품을 개발하기 위한 제품화라는 3가지 방향으로 추진되었다. 결과적으로 연구를 마치면서 대량 인공재배시스템을 구축하고 항암 효능을 검증한 제품까지 개발하는 등 어느정도의 성과가 있었지만, 2년이라는 짧은 기간 동안 너무 광범위한 연구 및 실증실험과 제품화까지 추진되다 보니 보다 짜임새있는 연구가 이루어지지 못한 한계가 있음을 밝혀둔다.

# SUMMARY

## I. Title

### **Studies on Short-term Mass Cultivation and Immune Substance Activity by Enzyme Treatment of *Sparassis crispa***

## II. Necessity of research development and Purpose

Later in 20th century Prof. Yadomae and Prof. Ohno, of Tokyo University of pharmacy and life, Japan, studied *Sparassis crispa*, the artificially cultivated medicinal mushroom for its anti-cancer effects. Clinical trials showed that oral administration of *Sparassis crispa* powder to fourteen last stage cancer patients showed notable improvements in nine patients.

The results (Immuno modulating Activity of a  $\beta$ -Glucan Preparation, SCG, Extracted from a Culinary Medicinal Mushroom, *Sparassis crispa* Wulf.:Fr., and Application to Cancer Patients; International Journal of Medicinal Mushrooms 2003) were published at Japanese cancer conference general meeting (2003, October, 61th), and so *Sparassis crispa* containing  $\beta$ -(1-3)-glucan is spotlighted as a new natural material used in anticancer immunotherapy in Japan. About 10 large enterprise and research institutes like Mitsuwakogyo

(ミツワ興業), Yunichika(ユニチカ), Obiken Co., Ltd(応微研), Yamatokingaku(大和菌學研究所) etc. participate in research, output and product sale of *Sparassis crispain* addition to already existing Minahealth(ミナヘルス).

In Korea study on *Sparassis crispais* almost at its primary level. Artificial cultivation was tried out in several mushroom cultivation farms and research institutes.

About 170 cancer patients are dying per day because of the lack of proper drug for the treatment. This study expects that new hope to cancer patients and also creates new income source to mushroom farmers.

### III. Contents and range of research development

In Korea, although study on medicinal mushroom has grown steadily with the use of *Phellinus* sp., by artificial cultivation for the extraction of pharmacologically active substance and animal test were conducted to judge their toxic levels. The project not only focuses on theoretical study, but also pays more importance for the industrial production through the collection of superior fungal strains, growth, development of artificial cultivation methods, product extraction methods, search for pharmacologically active substances and its mass production.

The present study focuses on three aspects. First is the collection of superior fungal strain, development of synthetic media, favorable conditions for mass cultivation. Second is the search for pharmacologically active substances, anti-cancer agents and third is the development of different health related food products.

In this study, we developed artificial cultivation system and verified the product activity in anticancer effect at preliminary level. Now we were focusing to carry out the study in wide range to make the product. The study is in progress.



# CONTENTS

## **Chapter 1. General introduction**

- Section 1. Necessity of research development (12)
- Section 2. Contents and purpose of research development (19)
- Section 3. System of research development (20)
- Section 4. References (21)

## **Chapter 2. Collection of superior strain**

- Section 1. Fungal collection (24)
- Section 2. Molecular biological identification (27)
- Section 3. Selection of superior strain (31)

## **Chapter 3. Mass cultivation system**

- Section 1. Introduction (36)
- Section 2. Materials and Methods (40)
- Section 3. Results and Discussion (42)
- Section 4. Conclusion (68)
- Section 5. References (70)

## **Chapter 4. Rate of production by cultivation methods**

- Section 1. Introduction (74)
- Section 2. Materials and Methods (76)
- Section 3. Results and Discussion (78)
- Section 4. Summary (83)
- Section 5. References (84)

## **Chapter 5. Analysis of component and content**

- Section 1. Materials and Methods (85)
- Section 2. Analysis of general component (85)
- Section 3. Results and Discussion (88)
- Section 4. Conclusion (96)

## **Chapter 6. Enzyme treatment of polysaccharide and immune-activity**

- Section 1. Introduction (97)
- Section 2. Materials and Methods (99)
- Section 3. Results and Discussion (103)
- Section 4. Results (111)
- Section 5. References (112)

## **Chapter 7. Animal test by oral administration of *Sparassis crispa* powder**

- Section 1. Introduction (116)
- Section 2. Abstract (118)
- Section 3. Test and solvent substance (120)
- Section 4. Materials and Methods (121)
- Section 5. Results (128)
- Section 6. Discussion and Conclusion (138)

## **Chapter 8. Anticancer immune-activity of polysaccharide and pharmacological research**

- Section 1. Introduction (141)
- Section 2. Materials and Methods (145)
- Section 3. Results and Discussion (151)
- Section 4. Results (157)
- Section 5. References (159)
- Section 6. Pictures (164)

## **Chapter 9. Research development product and application**

- Section 1. Main production of research development (175)
- Section 2. Production development and sale (186)
- Section 3. Recommendations of further study (190)

# 목 차

## 제 1 장 총론

- 제1절 연구개발의 필요성 (12)
- 제2절 연구개발의 목표 및 내용 (19)
- 제3절 연구개발 추진체계 (20)
- 제4절 참고문헌 (21)

## 제 2 장 꽃송이버섯 우량균주의 확보

- 제1절 균주의 확보 (24)
- 제2절 유전자분석을 통한 동정분류 (27)
- 제3절 우량균주의 선발 (31)

## 제 3 장 꽃송이버섯 톱밥재배 대량생산체계 확립

- 제1절 서언 (36)
- 제2절 재료 및 방법 (40)
- 제3절 결과 및 고찰 (42)
- 제4절 결론 (68)
- 제5절 참고문헌 (70)

## 제 4 장 꽃송이버섯 재배방법별 생산수율 확립

- 제1절 서언 (74)
- 제2절 재료 및 방법 (76)
- 제3절 결과 및 고찰 (78)
- 제4절 적요 (83)
- 제5절 참고문헌 (84)

## 제 5 장 꽃송이버섯 성분 및 함량분석

- 제1절 재료 및 방법 (85)
- 제2절 일반성분 분석 (85)
- 제3절 결과 및 고찰 (88)
- 제4절 결론 (96)

**제 6 장 꽃송이버섯 다당체의 효소처리 및 면역활성에 관한 연구**

- 제1절 서론 (97)
- 제2절 재료 및 방법 (99)
- 제3절 결과 및 고찰 (103)
- 제4절 결론 (111)
- 제5절 참고문헌 (112)

**제 7 장 꽃송이버섯 분말의 경구투여 동물실험**

- 제1절 연구개요 (116)
- 제2절 요약 (118)
- 제3절 시험물질 및 용매물질 (120)
- 제4절 재료 및 방법 (121)
- 제5절 결과 (128)
- 제6절 고찰 및 결론 (138)

**제 8 장 꽃송이버섯 다당체의 다당체의 항암면역활성과 약리작용 규명**

- 제1절 서론 (141)
- 제2절 실험재료 및 방법 (145)
- 제3절 결과 및 고찰 (151)
- 제4절 결론 (157)
- 제5절 참고문헌 (159)
- 제6절 관련사진 (164)

**제 9 장 연구개발 성과 및 활용**

- 제1절 연구개발의 주요성과 (175)
- 제2절 제품개발 및 판매 (186)
- 제3절 향후 연구개발 계획 건의사항 (190)

# 제1장 총론

## 제1절 연구개발의 필요성

### 1. 개발 대상 기술의 필요성

#### 가. 기술적 측면

꽃송이버섯은 한국, 일본, 중국, 북미, 유럽, 오스트레일리아 등에 분포하며 씹는 맛이 좋고 송이버섯과 같은 향이 나는 버섯으로, 주로 가을에 소나무, 솔송나무, 잣나무 등 침엽수의 뿌리 부근땅위나 그루터기 위에 발생한다.

꽃송이버섯 대량생산 기술은 일본에서 성공하였으나 국내에서는 극히 초보 단계에 있다. 일본 사이타마현 구마가야농고 후쿠시마(福島隆一)가 1997년에 톱밥(침엽수) 병재배방법을 개발하여 독창적인 연구성으로 높은 평가를 받게 되었고, 일본 과학기술진흥사업단에서는 1998년도 '독창적 연구성과 육성사업'으로 "꽃송이버섯의 경제적 실용화 재배방법 및 일반 기호품과 유용식품의 시작(詩作)"을 채택하여 본격적인 연구가 진행되면서 1999년 3월 대량생산이 가능해졌다.

#### 나. 경제, 산업적 측면

꽃송이버섯은 자실체 건조 100g당 43.6g의  $\beta$ -글루칸이 함유되어 있어, 그 동안 재배 되어 온 버섯중 비교적 베타글루칸 성분이 가장 많이 들어 있다고 알려진 신령버섯(아가리쿠스)보다 3배 이상 높다. 특히 꽃송이버섯의 성분과 효능은

일본 동경약학대학의 연구그룹에서 연구결과를 발표하면서 NHK 등 매스컴에서 반향을 일으킨 후 다양한 건강기능 식품이 개발되어 판매 되고 있으며 국내에도 2000년 ‘베타원쓰리“라는 제품이 수입되어 모백화점에서 고가로 판매된 사례가 있다.

#### **다. 사회, 문화적 측면**

2001년 11월 22일 한국의 "암 환자 현황 발표"에 의하면 2000년 신규 암 환자는 101,781명이었다. 이것은 하루 400명이 죽음 예비 판정을 받는 것과 같습니다. 현재 우리나라는 하루에 170명의 암 환자가 죽어가고 있는데 이것은 하루 교통사고 사망자 27명의 7배에 달하는 수치이다. 암 환자 1인 당 평균 치료비는 수 천만원이고 전체 암 환자의 1년간 치료비용이 20조원에 달하고 있다. 20조원의 돈을 쏟아 부은 암 환자들은 5년 이내에 대부분 죽었으며, 평균 생존기간은 2년 남짓이었고, 말기 암 환자는 평균 6개월 이내에 사망하였다고 한다. 이러한 사회비용을 줄이는 방법 중의 하나가 버섯추출 베타글루칸을 이용한 암예방 및 면역요법의 적용이 필요하다고 판단된다. 베타글루칸이 신체의 면역력을 높여주는 천연 물질로서 암 및 고혈압, 당뇨병 등을 다스리는 것으로 높이 평가받고 있어 웰빙시대의 건강식품으로 관심이 집중될 것으로 기대한다.

## 2. 개발 대상기술의 중요성 및 국내·외 관련기술의 현황

### 가. 개발 대상기술의 중요성

#### 1) 베타글루칸이 40%대 함유된 경이적인 버섯

버섯의 항암작용은 이미 잘 알려져 있고, 베타( $\beta$ )-글루칸이 그 활성화에 크게 관여하고 있는 것은 많은 연구자에 의하여 발표되어 왔다. 그런데 꽃송이버섯은 대량생산과 더불어 정밀한 성분분석과 그 성분을 이용한 한 한암 작용과 약리활성 연구의 결과가 발표되어 일약 약용버섯으로 탈바꿈하게 되었다. 1998년 4월에 발표된 성분분석에서 건조 상태의 꽃송이버섯에 베타글루칸이 43.6%(100g 중 43.6g이나 포함되어 있다는 사실은 경이적인 결과이다.

#### 2) 항암 면역력이 입증되고 있는 꽃송이버섯의 $\beta(1 \cdot 3)$ 글루칸

다당류의 일종인 베타글루칸은 인간의 정상적인 세포조직의 면역기능을 활성화시켜 암세포의 증식과 재발을 억제하고 면역세포의 기능을 활발하게 한다. 1999년 3월 일본 도쿠시마에서 개최된 일본약학회에서  $\square\square$ 도쿄약과대학 야도마에(宿前利郎) 교수와 오노(大野 尚仁) 조교수가 꽃송이버섯  $\beta$ -글루칸의 구조와 활성  $\square\square$ 이라는 보고를 통해 꽃송이버섯 베타 글루칸의 구조와 마우스를 대상으로 한 항암작용 실험결과를 발표하였다. 이 실험결과에 의하면 놀랍게도 시험구에 따라서는 100% 치료율이라는 경이적인 결과가 나온 사례도 있다.

## 나. 국내·외 관련기술의 현황과 문제점

### 1) 일본에서의 꽃송이버섯 인공재배 및 제품화 동향

인공재배초기 일본에서는 꽃송이버섯의 자실체는 후쿠시마(福島隆一)가 기술 지도하고있는 (주)미나헬스(ミナヘルス)의 군마현(群馬), 니이카타현(新潟)과 일본 塚越食菌研究所의 츠카코시(塚越伸行) 사장이 기술지도하고 있는 사이타마현(埼玉)의 3개소에서만 병재배 방법으로 생산되고 있었다. 그러나 2003년 제 61회 일본암학회 총회에서 동경대약학대 오노교수의 꽃송이버섯의 말기암 환자 대상 임상사례가 발표되면서 항암효능에 대한 신뢰가 높아졌고, 이로 인해 최근에는 기존의 미나헬스 외에도 미쯔와코교 (ミツワ 興業), 유니치카(ユニチカ), (주)오비켄(応微研), 야마토킨가쿠(大和菌學研究所) 등 10여개의 대기업과 연구소들이 꽃송이버섯 연구 및 생산, 제품판매에 참여하여 시장이 커가고 있다. 특히 최근에는 유니치카가 TV광고까지 동원하여 홍보를 하면서 초기 베타원쓰리 외에 10여종의 제품이 개발되어 약 3-4만엔 대에 경쟁적으로 판매되고 있으며, 일본 내의 꽃송이버섯 자실체 생산량은 건조기준 월 1.5톤 수준인 것으로 파악되고 있다.

유럽의 경우 야생 꽃송이버섯은 그 희소성으로 고가의 고급요리 재료로 이용되고 있으며 미국의 식용버섯 대량 생산회사인 Fungi Perfecti ltd.에서 2001년에 꽃송이버섯 인공재배에 성공했다는 설이 있었으나 확인되지 않고 있다.



## 2) 꽃송이버섯 관련 국·내외 상품화 기술 현황

식용이었던 꽃송이버섯이 일본에서 인공재배 성공과 더불어 항암작용과 약리활성화 연구도 완성되어 이미 양산체제에 들어섰고, 하나비라타케-G, 白幻鳳凰, 山珊瑚, 白松華 등 건강기능식품(Figure 1)이 생산되어 고가(30-35만엔)로 시판되고 있다. 국내에는 현대종합상사에서 초기 제품인 1·1·3를 수입하여 국내 현대백화점, 갤러리아 백화점에서 69만원에 판매한 사례가 있으나 제품화된 사례는 전혀 없고, 중국의 동국식용균 유한공사에서 인터넷 상에 야생 건조 꽃송이버섯을 판매한다는 홍보를 하고 있는 정도이다.

< Figure 1. 일본에서 판매중인 꽃송이버섯 가공제품 >

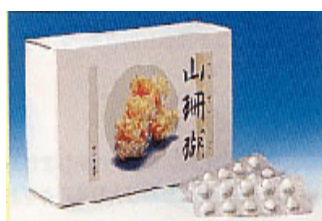


(ミツワ興業: 越後花びら茸)





ミナヘルス: ヘルスビジョン 花びらたけ/ ハナヒラタケG/ ハナヒラタケ P-プラン)



(楽天: 山珊瑚)

(大和菌學研究所: 白松華)



(尾瀬食菌: ハナヒラタケ グルカノンZ/ 花卉茸エキス)

### 3) 초기수준에 머물고 있는 국내 꽃송이버섯의 연구 및 인공재배

국내의 경우 꽃송이버섯에 관한 연구는 미미하여 동국대 응용생물학과와 전남대 임학과에서 연구한 3건의 연구논문이 있으나, 원론적이고 이론적인 수준에 머물고 있으며,

일본에서의 인공재배 성공 및 고가의 약용버섯이라는 점 때문에 국내에서도 천안, 용인, 홍천 문경 등 여러 곳에서 인공재배 시도가 이루어지고 있으나 성과가 미미하거나 대량 인공재배에 실패한 것으로 확인되고 있다.

## 제2절 연구개발의 목표 및 내용

### 1. 기술개발의 최종 목표

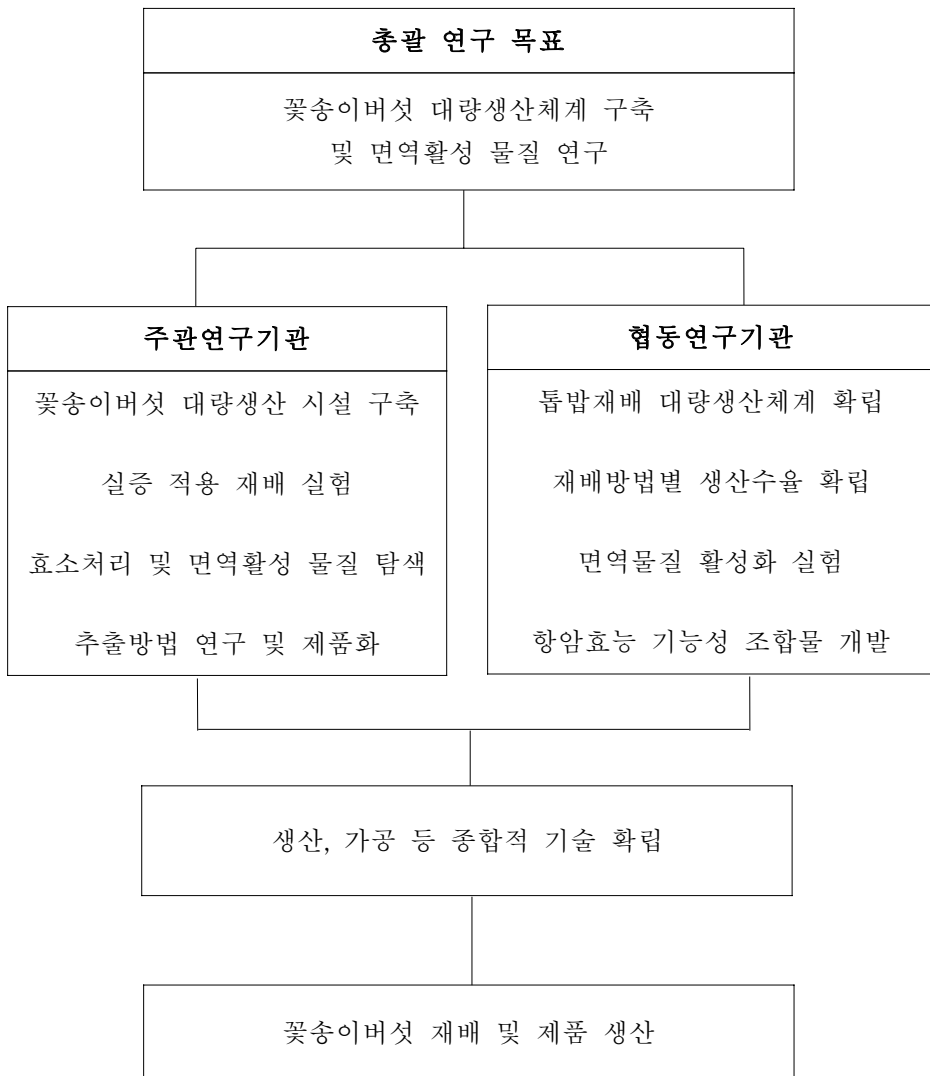
#### 가. 기술개발 목표

꽃송이버섯의 우량균주를 확보, 배양하며 자실체 및 균사체의 대량 인공 재배 기술을 확립한 후, 농가에 기술을 적극 지도하여 소득증대에 기여하고, 또한 효소처리, 나노처리 등을 통하여 이들이 가지고 있는 면역 활성물질을 최적화시킨 물질소재를 개발하여 기능성식품(항암)으로의 상품화를 목적으로 한다.

#### 나. 주요 기술개발 목표 및 내용

주요목표	주요내용
꽃송이버섯 대량생산 체계 확립	- 꽃송이버섯 우량균주 확보 - 꽃송이버섯 대량인공재배 기술 확보 - 꽃송이버섯 현장 적용 실증
면역활성 물질탐색 및 약리활성 검증	- 꽃송이버섯 베타글루칸 함량분석 - 꽃송이버섯 경구투여 동물실험 - 꽃송이버섯 효소처리 및 동물실험 - 꽃송이버섯 기능성조합물 개발 추진
제품화 및 판매	- 생버섯 및 건조버섯 제품화 추진 - 추출기술 개발 및 제품화 추진 - 국내 판매 및 수출

### 제3절 연구개발 추진체계



## 제4절 참고문헌

- 꽃송이버섯 재배기술, 장현유, 2001
- 암을 이기는 신비의 약용버섯 꽃송이버섯, 정신세계사, 2000
- 꽃송이버섯의 가능성, 고자와 히로키, 2002
- 베타글루칸의 매력, 야도마에, 동양의학사
- 21세기 기대의 항암버섯 꽃송이버섯, 나카지마 미츠오, 동양의학사
- 꽃송이버섯의 군사생장을 위한 최적요인, 심재욱외 7, 제26권 1호,1998
- 꽃송이버섯(*Sparassis crispa*)의 리보솜DNA; 김지연, 동국대, 2000
- 꽃송이버섯 군사생장 최적화를 위한 배지조성 및 배양조건에 관한 연구, 오득실, 2003
- Immunomodulating Activity of a beta-Glucan Preparation, SCG, Extracted from a Culinary Medicinal Mushroom, *Sparassis crispa* Wulf.:Fr., and Application to Cancer Patients; Naohito Ohno, Sachiko Nameda, Toshie Harada, Noriko N. Miura, Yoshiyuki Adachi, Mitsuhiro Nakajima, Kenshi Yoshida, Omotesando Yoshida, Toshiro Yadomae, International Journal of Medicinal Mushrooms 2003, Volume5 Issue 4
- Antibody to soluble 1,3/1,6-beta-D-glucan, SCG in sera of naive

**DBA/2 mice;**

Harada T, Nagi Miura N, Adachi Y, Nakajima M, Yadomae T, Ohno N., Biol Pharm Bull. 2003 Aug; 26(8):1225-8.

- **Enhanced Cytokine Synthesis of Leukocytes by a beta-Glucan Preparation, SCG, Extracted from a Medicinal Mushroom, *Sparassis crispa*;** achiko Nameda; Toshie Harada; Noriko N. Miura; Yoshiyuki Adachi; Toshiro Yadomae; Mitsuhiro Nakajima; Naohito Ohno, Immunopharmacology and Immunotoxicology, 10/01/2003

- **IFN-gamma induction by SCG, 1,3-beta-D-glucan from *Sparassis crispa*, in DBA/2 mice in vitro;** Harada T, Miura N, Adachi Y, Nakajima M, Yadomae T, Ohno

J Interferon Cytokine Res. 2002 Dec;22(12):1227-39.

- **Antitumor Activity and Hematopoietic Response of a beta-Glucan Extracted from an Edible and Medicinal Mushroom *Sparassis crispa* Wulf.: Fr. (Aphyllorphoromycetideae),** Naohito Ohno, Toshie Harada, Shinya Masuzawa, Noriko N.

Miura, Yoshiyuki Adachi, Toshiro Yadomae, Mitsuhiro Nakajima,

International Journal of Medicinal Mushrooms 2002, Volume4 Issue1

- **Effect of SCG, 1,3-beta-D-glucan from *Sparassis crispa* on the hematopoietic response in cyclophosphamide induced leukopenic mice;**

Harada T, Miura N, Adachi Y, Nakajima M, Yadomae T, Ohno N., Biol Pharm Bull. 2002 Jul;25(7):931-9.

- **Antitumor 1,3-beta-glucan from cultured fruit body of *Sparassis crispa*;** Ohno N, Miura NN, Nakajima M, Yadomae T., Biol Pharm Bull. 2000

Jul;23(7):866-72



## 제2장 꽃송이버섯 우량 균주의 확보

### 제1절 균주의 확보

#### 1. 국내외 균주의 확보

##### 가. 국내 보관 균주의 확보

하나바이오텍에서 기존에 확보하여 실험재배에 성공한 균주(Figure 1; HBSC-1) 외에 한국농업전문학교에서 관리하던 균주를 포함하여 한국, 일본, 중국, 미국, 화란 등 총 6종의 꽃송이버섯 균주를 확보하여 본 실험 및 연구에 사용하였다.

< Figure 1. 2002년 6월 국내최초 실험 인공재배 꽃송이버섯 >



## 나. 외국 균주의 확보

2004년 6월 CBS와 ATCC로부터 11종의 꽃송이버섯 균주를 확보하여 PDA배지를 이용하여 균사확적이 완료된 후 보관하였고(Table 1), 2004년 12월 현재 분자생물학적 분류를 위한 유전자 분석을 하고 있으며, 육종을 위한 계대배양과 균사의 생장 및 밀도테스트를 진행 중에 있다.

< Table 1. 외국에서 분양받은 균주 목록 >

No	Species	Culture Code	Geology	Collected
1	<i>Sparassis brevipes</i>	CBS 717.83	Czechoslovakia	1983.12
2	<i>Sparassis crispa</i>	CBS 308.31	Germany	1931.07
3	<i>Sparassis crispa</i>	CBS 408.71	“	1971.05
4	<i>Sparassis crispa</i>	CBS 143.75	Netherlands	1974.09
5	<i>Sparassis crispa</i>	CBS 830.91	Netherlands	1991.10
6	<i>Sparassis crispa</i>	CBS 716.94	Netherlands	1994.12
7	<i>Sparassis laminosa</i>	CBS 470.48	“	1948.11
8	<i>Sparassis ranosa</i>	CBS 423.51	Germany	1951.09
9	<i>Sparassis crispa</i>	ATCC 34491	Germany	-
10	<i>Sparassis crispa</i>	ATCC 34975	France	-
11	<i>Sparassis crispa</i>	ATCC 38048	West Germany	-

#### 다. 국내 야생 균주의 확보

2004년 8월 경기도 연천소재 고대산에서 야생 꽃송이버섯(Figure 2)을 채집하여 PDA배지를 이용하여 균사활착이 완료된 후 보관하였고, 2004년 12월 현재 육종을 위한 계대배양과 균사의 생장 및 밀도테스트를 진행 중에 있다.

< Figure 2. 2004년 8월 채집된 야생 꽃송이버섯 사진 >



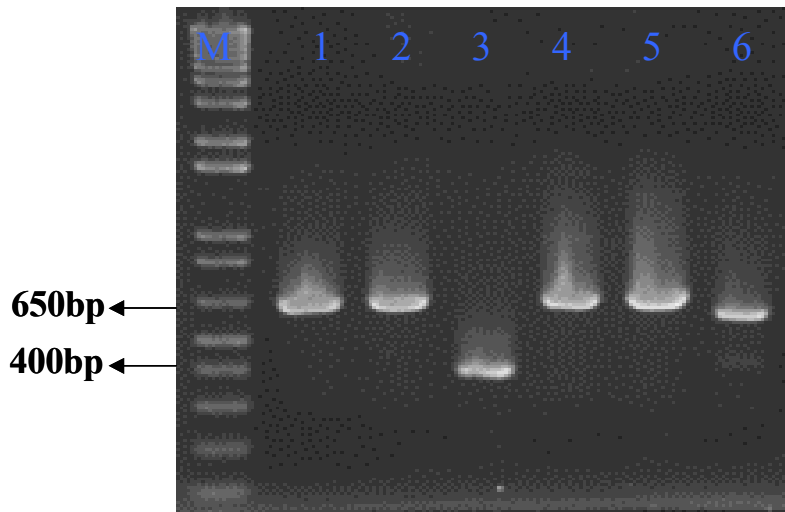
## 제2절 유전자 분석을 통한 동정분류

### 1. ITS regions PCR 및 Sequencing

#### 가. ITS regions PCR

기 확보 6개 균주에 대하여 ITS regions PCR을 실시(Figure 3)하였다.

< Figure 3. ITS regions PCR 결과 >



M: 1kb marker

1: HBSC1(한국) 2: HBSC2(화란) 3: HBSC3(미국)

4: HBSC4(일본) 5: HBSC5(한국) 6: HBSC6(중국)

#### 나. Sequencing & NCBI blst 확인

HBSC1-6의 6개 균주의 PCR 결과를 마크로젠에 의뢰하여 Sequencing을 실시한 후 NCBI에서 blast 확인 결과, HBSC 1, 2, 3, 4, 6은 꽃송이버섯(*Sparassis crispa*)으로 확인되었고, HBSC 5는 확인이 불가능하여 탈락시켰다.

< Figure 4. HBSC-1의 Sequence(644bp) 결과 >

```
TCCGTAGGTGAACCTGCGGAAAGGATCATTATTTCGAGTTGAGAAGCGA  
GTTTGTAGCTGGCCTTCTCGGAGGCATCGTGCACGCCCTGCCCGTCCCA  
TATCATACCTGTGAACTTTTTGGTAGGCGGGTTTGTGTTCGGCCTCGAA  
AGGGGTCGACCGGCCCTCCGGCCGTCTTTATATACACACCATACGAGTC  
TTTAGAATGTTTGTGCGTCTCGACGCATCTTATATATAACTTTCAGCG  
ACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAACGCGATA  
AGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCA  
CCTNGCGTCCTCGGTATTCCGAGGAGCATGCCTGTTTGAGTGTCATGA  
AATTATCAACCCCTCCTCCTTCATCGGCGGTGGGGCTTGGACTTGGAGG  
CTTTGCGGGCTTTTAACGAGTCGGCTCCTCTCAAATGCATTAGCTCGAA  
CCCCTGCGGATCGGCCGTCGGTGTGATATAATGTCTACGTCGTGGTCGT  
GAGCGTCGGATCGGCTTCTAATGGTCCCCTTTCGGAGGCGGAATTTGAA  
CTTGTGACCTCAAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAAGCATATC  
AATAAGCGGAGGA
```

\* 밑줄 친 염기서열은 본 실험에 사용한 primer(ITS1 and ITS4)

#### 다. NCBI result of BLAST

< Figure 5. HBSC-1의 Sequence(644bp) 결과 >

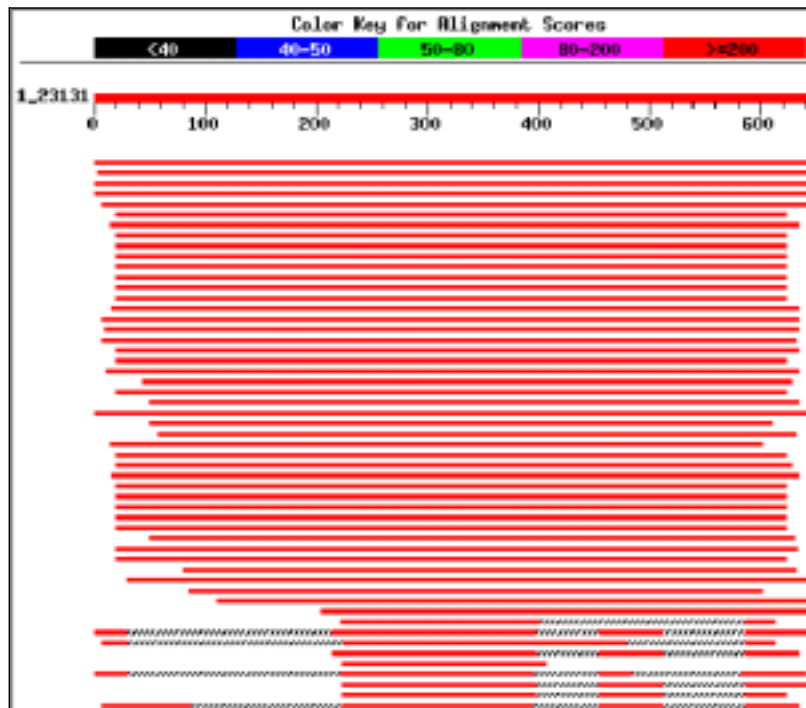
BLASTN 2.2.6 [Apr-09-2003]

Reference: Altschul, Stephen F., Thomas L. Madden, Alejandro A. Schaffer, Jinghui Zhang, Zheng Zhang, Webb Miller, and David J. Lipman (1997)

"Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs", *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402.

RID: 1054540745-016013-13845 Query=(644 letters)

Database: All GenBank+EMBL+DDBJ+PDB sequences (but no EST, STS, GSS, or phase 0, 1 or 2 HTGS sequences) 1,791,795 sequences; 8,349,298,724 total letters



Sequences producing significant alignments:			Score	E
			(bits)	Value
gi 23477235 gb AF308851.1	<i>Sparassis crispa</i> strain DGSc4 in...	1239	0.0	
gi 23477233 gb AF308849.1	<i>Sparassis crispa</i> strain DGSc2 in...	1239	0.0	
gi 23477234 gb AF308850.1	<i>Sparassis crispa</i> strain PRI245 i...	1231	0.0	
gi 23477232 gb AF308848.1	<i>Sparassis crispa</i> strain DGSc1 in...	1223	0.0	
gi 29150736 gb AY218423.1	<i>Sparassis crispa</i> strain YCD2145/...	1189	0.0	
gi 27261448 gb AY156947.1	<i>Sparassis crispa</i> strain ASI 1500...	1170	0.0	
gi 29150749 gb AY218436.1	<i>Sparassis crispa</i> strain HKAS1572..	1164	0.0	
gi 27261445 gb AY156944.1	<i>Sparassis crispa</i> strain ASI 1500...	1162	0.0	
gi 27261443 gb AY156942.1	<i>Sparassis crispa</i> strain ASI 1500...	1162	0.0	
gi 27261442 gb AY156941.1	<i>Sparassis crispa</i> strain ASI 1500...	1162	0.0	
gi 27261441 gb AY156940.1	<i>Sparassis crispa</i> strain ASI 1500...	1162	0.0	
gi 27261440 gb AY156939.1	<i>Sparassis crispa</i> strain ASI 1500...	1162	0.0	
gi 27261447 gb AY156946.1	<i>Sparassis crispa</i> strain ASI 1500...	1154	0.0	
gi 27261446 gb AY156945.1	<i>Sparassis crispa</i> strain ASI 1500...	1154	0.0	
gi 29150751 gb AY218438.1	<i>Sparassis crispa</i> strain HKAS1747..	1122	0.0	
gi 29150747 gb AY218434.1	<i>Sparassis crispa</i> strain HMAS3027..	1118	0.0	
gi 29150746 gb AY218433.1	<i>Sparassis crispa</i> strain HMAS3026..	1112	0.0	
gi 29150756 gb AY218443.1	<i>Sparassis radicata</i> strain UBC-F1..	1092	0.0	
gi 19070317 gb AF345816.1	<i>Coprinus citereus</i> KACC49396 inte.	1082	0.0	
gi 27261449 gb AY156948.1	<i>Sparassis crispa</i> strain ASI 1500...	076	0.0	
gi 29150758 gb AY218445.1	<i>Sparassis crispa</i> strain TENN4457..	1067	0.0	
gi 29150757 gb AY218444.1	<i>Sparassis radicata</i> strain TENN45...	1067	0.0	
gi 29150759 gb AY218446.1	<i>Sparassis radicata</i> strain TENN56...	1061	0.0	
gi 27261436 gb AY156935.1	<i>Sparassis crispa</i> strain ASI 1500...	1061	0.0	
gi 23477236 gb AF308852.1	<i>Sparassis crispa</i> strain CBS 830.....	1047	0.0	
gi 29150737 gb AY218424.1	<i>Sparassis crispa</i> strain YCD2470/...	1037	0.0	
gi 29150750 gb AY218437.1	<i>Sparassis crispa</i> strain HKAS3236...	1027	0.0	
gi 29150762 gb AY218449.1	<i>Sparassis radicata</i> strain TENN50.....	1019	0.0	
gi 27261438 gb AY156937.1	<i>Sparassis crispa</i> strain ASI 1500.....	1011	0.0	
gi 29150753 gb AY218440.1	<i>Sparassis crispa</i> strain RB9/6/87.....	997	0.0	
gi 27261439 gb AY156938.1	<i>Sparassis crispa</i> strain ASI 1500.....	993	0.0	
gi 27261434 gb AY156933.1	<i>Sparassis crispa</i> strain ASI 1500.....	989	0.0	
gi 27261437 gb AY156936.1	<i>Sparassis crispa</i> strain ASI 1500.....	985	0.0	
gi 27261435 gb AY156934.1	<i>Sparassis crispa</i> strain ASI 1500.....	985	0.0	
gi 29150763 gb AY218450.1	<i>Sparassis radicata</i> strain TENN52....	977	0.0	
gi 27261450 gb AY156949.1	<i>Sparassis crispa</i> strain ASI 1500.....	977	0.0	
gi 29150744 gb AY218431.1	<i>Sparassis crispa</i> strain BMS2857/.....	975	0.0	
gi 29150748 gb AY218435.1	<i>Sparassis crispa</i> strain HMAS6059...	969	0.0	
gi 27261444 gb AY156943.1	<i>Sparassis crispa</i> strain ASI 1500.....	969	0.0	
gi 29150740 gb AY218427.1	<i>Sparassis crispa</i> strain MBUH-PIR...	959	0.0	
gi 29150755 gb AY218442.1	<i>Sparassis crispa</i> strain MBUH-DOR.	868	0.0	
gi 29150738 gb AY218425.1	<i>Sparassis crispa</i> strain YCD2637/.....	846	0.0	
gi 29150739 gb AY218426.1	<i>Sparassis crispa</i> strain MBUH-SAV...	753	0.0	

Alignments

### 제3절 우량 균주의 선발

#### 1. 최적 배지의 선정

배지종류별 HBSC-1의 군사생장을 조사한 결과, HAM 배지에 Dextrin을 0.5%를 첨가한 경우와 MYG 배지에 Mannose를 1.0% 첨가한 경우에 군사생장이 가장 좋았고, MCM 배지에서는 대체로 군사생장이 좋지 않았다.

< Table 2. 배지종류별 균주생장 실험결과 >

(단위 : mm)

배지 첨가물	HAM			MYG			PIN			LEM			CVM			MCM		
	a	b	c	a	b	c	a	b	c	a	b	c	a	b	c	a	b	c
Dextrn	38.6	39.6	36.6	36.8	35.6	33.2	28.0	31.8	27.0	21.2	26.2	25.0	21.6	19.2	21.8	1.6	15.0	15.0
Mannose	33.0	38.4	37.0	32.2	34.4	39.0	25.6	28.8	29.4	17.0	22.0	24.6	19.0	16.5	14.4	18.2	22.4	23.4
Sucrose	28.8	28.8	30.6	37.2	35.4	33.2	24.2	20.0	22.6	16.6	16.4	18.8	12.6	14.8	17.4	2.8	23.0	10.0

a: 0.2%, b: 0.5%, c: 1.0%/ 군사 배양기간 : 25일



## 2. 선발된 HAM, MYG 배지를 이용한 군사생장 및 밀도 테스트

선발된 HAM, MYG 배지를 이용한 군사생장에서는 HBSC-1, HBSC-3 및 HBSC-6의 군사생장과 밀도가 우수하였다.

< Table 3. 군주별 생장 및 밀도테스트 결과 >

(단위 : mm)

군주 배지	HBSC-1	HBSC-2	HBSC-3	HBSC-4	HBSC-5	HBSC-6
MYG-c	32.3	21.7	33.7	21.8	22.9	<b>37.6</b>
	++++	++	+++	++	++	++++
HAM-b	<b>32.7</b>	27.0	<b>36.3</b>	29.0	27.3	17.1
	++++	+++	+++	++	+++	++

\* 군사 배양기간 : 25일

## 3. 군주별 시험관 컬럼테스트

시험관을 이용하여 톱밥 고체배지에 대한 군사생장 및 밀도를 조사한 결과 HBSC-1 군주가 군사생장, 밀도 측정에서 우수한 결과를 보였다.

< Table 4. 군주별 컬럼테스트 결과 >

(단위 : mm)

군주	HBSC-1	HBSC-2	HBSC-3	HBSC-4	HBSC-5	HBSC-6
생 장	<b>73.0</b>	71.3	67.6	63.6	-	68.3
밀 도	++++	++++	++++	+++	-	++

\* 군사 배양기간 : 60일

#### 4. 대량생산을 위한 HBSC-1 균주의 고체배지 배양실험

선발된 HBSC-1 균주의 생산성(푸른곰팡이 오염과 긴 배양기간)을 개선하기 위해 2 Type의 고체배지를 제조후 배양기간과 배양로스를 측정된 결과, 배양기간을 15일 단축(62일→47일)하는 획기적인 배지조성 방법을 파악하게 되었고, 꽃송이버섯 배양 최대의 관건인 배지의 푸른곰팡이 오염율도 45%에서 10%대로 감소되어 대폭적인 생산증대가 가능하게 되었다.

##### 가. A-Type 배지의 생산성 실증배양 결과

A-Type의 평균 배양로스는 45.9%이고 평균 배양일수는 62일 이었다.

No	입병수량(병)	배양로스	잔량	로스율(%)	배양일수
1	1,027	368	704	34.3	62
2	1,262	829	433	65.7	65
3	1,490	944	546	63.4	59
4	1,520	586	934	38.6	67
5	1,545	417	1,128	26.9	59
합계	6,844	3,144	3,745	평균 45.9	평균 62

나. B-Type 배지의 생산성 실증배양 결과

B-Type의 평균 배양로스는 10.2%이고, 평균 배양일수는 47일 이었다.

접종일	입병수량(병)	배양로스	잔량	로스율(%)	배양일수
2003-3-8	1,312	72	1,240	5.5	46
2003-3-9	1,311	248	1,063	18.9	47
2003-3-13	1,337	73	1,264	5.5	45
2003-3-16	1,329	285	1,044	21.4	50
2003-3-19	1,443	8	1,435	0.6	48
합계	6,732	686	6,046	평균 10.2	평균 47

\* 배양로스는 접종후 2주내의 오염 등에 의한 로스이고,  
배양일수는 접종일부터 발이전 원기형성까지의 일수임.





## 제1절 서언

꽃송이버섯의 학명은 *Sparassis crispa* Wulf. ex Fr.으로 일본명은 하나비라타케(ハナヒラタケ), 영명은 cauliflower mushroom 또는 crested sparassis, 프랑스명은 Clavaire crepue, Morille des pins, Sparassis crepue, Crete de coq, 독일명은 Feisterling digal, 중국어명은 수구심(綉球蕈)으로 불린다.

분류학적 위치는 진균문(Eumycota), 담자균아문(Basidiomycotina), 진정담자균강(Eubasidiomycetes), 모균아강(Hymenomycetidae), 민주름버섯목(Aphyllphorales), 꽃송이버섯과(Sparassidaceae)에 속하는 근주심재갈색부후균으로 꽃양배추모양의 버섯이며, 꽃송이버섯속에 속하는 다른 종(혹은 변종)으로는 *Sparassis crispa* var. *laminosa* (= *Merisma spathulatum*, *Sparassis brevipes*, *Sparassis laminosa*, *Sparassis simplex*, *Sparassis spathulata*, *Sparassis nemecii*)가 있다.

꽃송이버섯은 한국, 일본, 중국, 북아메리카, 유럽, 오스트레일리아 등에 분

포하며 씹는 맛이 좋고 송이버섯과 같은 향이 나는 버섯이다. 주로 가을에 소나무, 솔송나무, 잣나무등 침엽수의 뿌리 부근 땅위나 그루터기 위에 단생하는 근주심재 갈색부후성 버섯이다. 특히 꽃송이버섯 건조 100g당 43.6g의 베타글루칸이 함유되어있어, 그 동안 재배되어온 버섯 중 비교적 베타글루칸

-36-

성분이 많이 들어있다고 알려진 신령버섯(아기리쿠스)보다 3배이상 높다. 베타글루칸이란 면역력을 높여주는 핵심 성분으로써 신체의 면역체계를 바로잡아 암 및 고혈압, 당뇨병 등을 다스리는 것으로 높이 평가받아 관심이 집중되고 있다. 또한 꽃송이버섯은 일본 동경 약학대학의 연구그룹에서 발표하여 NHK등 매스미디어에서 반향을 일으킨 후 건강보조식품으로 판매되고 있으며 국내에도 수입하여 고가로 판매되고 있는 실정이다.

꽃송이버섯은 무독성이어서 식약청에 식품 주원료로 등록된 버섯이다. β-glucan 연구의 일인자인 동경대 약학대 야도마에(宿前利郎) 교수의 베타글루칸 연구 및 각종 학회 발표로 꽃송이의 항암 면역활성 효능이 밝혀진 이후, 각종 동물과 임상실험에서 그 효능이 검증되어 일본에서는 암환자들에게 대체 면역요법으로 선풍적인 인기를 끌고 있다. 현재 일본 생산농장 공급가가 건조 1kg당 80-90만원을 호가하고 있으며, 꽃송이버섯 분말을 10-20% 혼합한 과립 및 캡슐제품이 건강보조식품으로 개발되어 1개월분에 30-35만원에 판매되고 있다.

한편, 대량 재배에 성공한 하나바이오텍의 꽃송이버섯 성분을 분석한 결과, 항암 면역강화 유효물질인 베타글루칸 함량이 전년 21.2%에서 36.6%로 대폭 강화되어 향후 항암 면역활성 물질소재의 개발에 대한 기대를 낳고 있으며, 한국한의학연구원 마진열 박사팀의 꽃송이버섯의 항암효능에 대한 동물(마우

-37-

스) 실험 결과, 유효물질의 추출에 의한 주사실험이 아닌 단순 분말의 4주간 경구투여에 의한 실험에서 종양 저지율이 75%이상으로 밝혀져, 하루에 162명이나 암으로 사망하고 있는 국내 현실에 비추어 볼 때 암환자와 면역학 분야에 청신호가 될 것으로 기대하고 있다. 한국농업전문학교와 하나바이오텍의 기술지도하에 생산된 꽃송이버섯은 초기 건조버섯, 분말가공, 고농축 분말 캡슐제품 등 3가지 형태로 제품화하여 「HBSC-1」이라는 브랜드로 판매 전담 회사인 (주)하나팜리드를 통해 시판하고 있다. 또한 하나바이오텍은 일본 히로시마 소재 아르코인터내셔널(대표 原田智幸; 토모유키 하라다)과 1차로 건조 꽃송이버섯을 연간 110만 달러(한화 약 13억원) 규모의 수출계약을 체결하였고, 이바라키현 소재 정화약품과도 수출을 위한 협의를 진행하면서 동시에 생산시설의 확충을 서두르고 있다.

특히 이번 연구결과는 배지원가를 20% 절감하고 배양기간을 15일 단축(62일→47일)하는 획기적인 배지조성 방법을 개발하였고, 이에 따라 배지 오염율도 45%에서 10%대로 감소되어 대폭적인 생산증대가 가능하게 되었으며, 향

후 꽃송이버섯 재배농가에 획기적인 소득원으로 역할을 할 것으로 기대된다.

이러한 꽃송이버섯의 자실체 생산에 대한 인공재배는 한국농업전문학교와 하나바이오텍은 농림부 지원 연구과제를 수행하면서 아래 사진과 같이 병재배, 봉지재배, 원목재배의 대량생산 체계를 갖추는데 성공하고 상품화를 하였으며

-38-



(대량생산체계)



(분말 상품)



(건조 상품)

일본에 수출길을 열었다. 꽃송이버섯은 인공재배가 어려워 국내 여러 버섯농가와 연구소에서 톱밥 병재배를 시도했으나 성과가 미미하였고, 대량재배 체계를 갖추고 생육에 들어간 것은 국내에서 이번이 처음이다.



## 제2절 재료 및 방법

### 1. 꽃송이버섯의 균사 최적배양조건 구명을 위한 합성과 천연배지 시험

가. 균주별 꽃송이버섯의 온도에 따른 균사생장은 온도를 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40℃로 구분하여 균사생장을 조사하였다.

나. 균주별 꽃송이버섯의 산도에 따른 균사생장은 pH를 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10으로 배지의 산도를 조절하여 균사생장을 조사하였다.

다. 균주별 꽃송이버섯의 합성배지 종류에 따른 균사체 생장은 PDA와 9종을 제조하여 균사생장을 조사하였다.

라. 선발된 꽃송이버섯 균주의 종합미네랄 첨가에 따른 균사생장은 일본에서 수입한 종합미네랄을 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9%로 조제하여 배지에 혼합한 후 균사생장을 조사하였다.

마. 선발된 꽃송이버섯 균주의 비오틴 첨가에 따른 균사생장은 비오틴을 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9%로 조제하여 여과 멸균하여 살균 후 배

지에 첨가하여 균사생장을 조사하였다.

바. 선발된 꽃송이버섯 균주의 티아민 첨가에 따른 균사생장은 티아민을 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9%로 조제하여 여과 멸균하여 살균 후 배지에 첨가한 후 균사생장을 조사하였다.

-40-

사. 선발된 꽃송이버섯 균주의 fructose 첨가에 따른 균사체 생장은 fructose를 1, 2, 3, 4%로 조제하여 배지에 첨가한 후 균사생장을 조사하였다.

아. 선발된 꽃송이버섯 균주의 낙엽송 톱밥 추출물 첨가에 따른 균사생장은 낙엽송 톱밥 추출물을 1, 2, 3, 4%로 조제하여 배지에 첨가한 후 균사생장을 조사하였다.

자. 선발된 꽃송이버섯 균주의 종균에 따른 균사생장은 곡립, 톱밥, 액체종균을 조제하여 균사생장을 조사하였다.

## 2. 꽃송이버섯의 균사체 최적 배양조건과 자실체 생산 구명을 위한

### 수종별 톱밥배지 시험

가. 꽃송이버섯의 톱밥 수종별 톱밥배지(낙엽송, 참나무, 포플러, 미송)에 따른 균사생장 및 밀도를 시험관에서 3일마다 측정하였다.

## 제3절 결과 및 고찰

### 1. 꽃송이버섯 재배 기초기술

최근 버섯이 주목받기 시작하면서 식물·동물의 뒤를 잇는 균류에 대한 재평가의 시대가 도래 했다고 말할 수 있다. 일본에서는 약 3,000종의 버섯이 보고되어 있지만 그 가운데 식용으로 사용이 가능한 것은 약 300종이며 시장에서는 이중 25종류만이 유통되고 있다.

일상생활에서는 표고버섯·송이버섯·팽이버섯(팽나무·버드나무 따위의 줄기에 나는 버섯)·나도팽나무버섯(담자균류에 속하는 버섯)등이 오랫동안 이용되어왔다. 더욱이 잎새버섯은 인공재배의 성공으로 급속히 소비가 증가되고 있고 근래에 들어서는 브라질산 신령버섯(아가리쿠스)가 매스컴에 빈번히 등장하면서 버섯의 붐이 일고 있다.

버섯은 여름에서 가을에 걸쳐 산에서 채취할 수 있는, 말하자면 산이 주는 선물이라고 할 수 있다. 산에 오르는 자만이 볼 수 있고 먹을 수 있는 자연의

보석과도 같다. “저 버섯을 한번더 보고 싶다. 또 먹고 싶다”라는 꿈을 가지고 많은 사람들이 버섯재배에 도전해왔다. 말하자면 신비의 버섯에 대한 도전이었던 셈이다. 버섯은 식물이 가진 엽록체가 없으므로 태양광선을 에너지원으로 스스로 영양분을 만들어 생육할 수 없다. 그래서 버섯은 죽은 식물 등에

-42-

기생하면서 그것으로부터 영양분을 섭취하여 생육하는 것이다. 이러한 사실이 인공재배를 어렵게 만든 원인일지는 모른다. 버섯에 대한 것은 버섯에게 직접 물어보지 않고서는 알 수 없다.

그 중에서도 꽃송이버섯은 인공재배가 어려운 것으로 알려져 왔지만 드디어 재배에 성공하게 되었다. 버섯류에 항균작용이 있다는 사실이 알려지고 꽃송이버섯의 성분을 조사하는 과정에서 상상도 못할 만큼 베타글루칸이 많이 함유되었다는 사실을 발견하게 된 것이다. 그리고 최근의 연구에서 면역력을 높이고 암을 방지하는 성분은 베타(1→3)D 글루칸이라고 해명되었다.

자실체는 하얀 꽃모양으로 10~25cm×10~25cm 크기의 꽃양배추형이고 관상용으로 가치가 있으며 솔송나무, 전나무, 소나무 등 침엽수의 그루터기나 죽은 수목 등의 뿌리에 발생하며 드물게는 너도밤나무, 메밀жат나무 같은 활엽수에서도 발견된다. 꽃송이버섯의 색은 전체적으로 담황색 또는 흰색이고 두께는 1mm정도로 평평하며 갓 둘레는 물결모양이며 표면은 백색에서 담황색이다.

항종양효과(합암작용)의 최대 열쇠를 쥐고 있는 성분은 베타글루칸이다, 씹는 감촉과 향이 독특하고 등산 애호가 사이에는 ‘신비의 버섯’이라고 일컬어질 정도로 유명하다. 꽃송이버섯은 꽃송이버섯과의 버섯으로 자실체는 관상용의 형태를 하고 있으며 세계에 1과 1속 2종이 보고되어있으며 일본에서는

-43-

1종만이 알려져 있다. 영어명은 cauliflower mushroom이다. 먹으면 씹는 맛이 좋은 풍미로 은은하게 송이버섯 같은 향이 나서 사람들에게 인기가 있다. 다만 야생에서 주로 8~9월에 발생하는 버섯으로 비교적 자주 발견되는 버섯이 아니기 때문에 이른바 신비의 버섯이라고도 한다. 비슷한 모양의 독버섯이 따로 없기 때문에 쉽게 꽃송이버섯을 알아낼 수 있다는 점 때문에 안심하고 먹을 수 있다. 북미에서는 낙엽송이나 소나무의 묘목에 꽃송이버섯이 생기면 수목은 갈색이 되고 결국 부패하기 시작한다. 게다가 그 수목의 섬유소와 리그닌을 분해하면서 2차 대사산물로 꽃송이버섯이 필요로 하는 각종 영양소를 흡수 이용한다.

꽃송이버섯을 자연으로부터 채취하는 데는 양적으로 한계가 있기 때문에 당연히 인공재배를 하게 된다. 그러나 야생버섯을 그렇게 간단히 인공재배가 되는 것은 아니다. 우선 야생 꽃송이버섯을 채취하여 균을 분리하여야 하는데 조직분리 방법은 꽃송이버섯의 밑 등 부분 즉 균핵부분에 조직이 있어 그 부분을 이용하는데 세균(bacteria)에 오염(contamination)이 잘 되므로 분리할

배지에 항생제를 첨가한 배지를 만들어 사용하여야 한다. 포자분리 방법은 자실체 조직의 일부분을 잘라 미리 만들어 놓은 페트리디쉬 뚜껑에 테이프로 붙여 포자를 낙하시키는 방법을 이용한다.

재배지의 성분이나 온도, 습도, 햇빛, 통기성 등의 자연조건과 각종의 푸른

-44-

곰팡이 등이 오염되어 수없이 시행착오를 겪지 않으면 안 된다. 꽃송이버섯은 참나무에서 자라는 *Sparassis laminosa*와는 달리 소나무, 잎갈나무 근부에서 송진의 보호를 받으며 자라기 때문에 인공재배 시에는 그만큼 생장이 느리고 병해충을 포함한 주변 환경에 민감하여 재배가 까다롭다. 다양한 연구결과에 따르면 균사배양을 위한 최적 조건은 비교적 자세하게 밝혀져 있으나 자실체를 만들어내기가 어렵고, 그것은 배지 조성의 영향을 많이 받는다. 다만, 그동안 연구된 꽃송이버섯 재배 방법을 종합해 보면 다음과 같다.

#### 가. 균주별 꽃송이버섯의 온도에 따른 균사생장

꽃송이는 고온성이어서 25~30℃의 무균상태에서 균사생장은 잘되나 높은 온도일수록 병해균의 오염이 높아진다. 특히 이 꽃송이 균주는 섬유소 분해력이 약하여 균사의 초기생육이 느려 오염이 잘되므로 배양온도는 비교적 낮은 온도인 20~22℃에서 배양하여야 자실체 발이가 원활히 이루어짐을 확인하였다. 궁극적으로 자실체 발생이 주목적이므로 균사생장 속도가 다소 늦더라도

20~22℃를 적용해야 하는 점이 특징이다. (표1)

(표1) 균주별 꽃송이버섯의 온도에 따른 균사생장

균주 (KNAC)	온도(℃)/mm/12일							
	5	10	15	20	25	30	35	40
8001	0	2	4	19	23	25	16	0
8002	0	3	6	21	28	27	17	0
8003	0	2	7	22	30	31	21	2
8004	0	6	16	30	38	36	21	2

온도가 상승하면 효소반응도 활발해 지며 따라서 성장속도는 빨라지는데 일반적으로 20~30℃사이에서 최고치에 달한다. 이것이 최적온도이다. 더욱 온도가 상승하면 성장속도는 급격히 저하해 35~40℃에서 생장은 정지한다. 이것이 최고온도이다. 온도에 대한 효소반응과 성장과의 관계를 살펴보면 각 효소의 최적 활성온도는 서로 다르다. 효소 외에 세포내의 물리 화학적 상태도 온도에 따라 변화한다. 고온의 조건에서는 호흡이 증진하고 소비되는 물질량의 합성량을 상향하는 경우도 있다. 이때 생성된 에너지는 헛되게 방출된다. 또 어떤 온도가 지속적으로 시간이 길어지

면 세포내의 전상태의 처음과 나중에 다르게 된다. 원형질 유동을 예로 들면 온도를 높였을 때 단시간은 유동속도가 증가하지만 나중에는 감소하는 경우도 있다. 재배에 있어서는 최적온도보다 낮은 실온하에서 배양하는 것이 보통이다. 그 이유중 한가지는 군사호흡에 의해 발생하는 열이

-46-

배양기내에서는 외부환경보다 2~3℃ 고온 상태가 되며 다른 이유로는 고온에서 배양하면 군사 생장은 증대하지만 과도한 호흡증진에 의해 영양분의 소비도 커져 군사체내에 저장물질을 축적하기가 어려워지게 되기 때문이다.

온도는 원기가 형성되는 발이와 버섯의 성장에도 많은 영향을 미친다. 원기형성 및 성장에 적합한 온도는 군사생장에 적합한 온도와 다른 것이 보통이다. 일반적으로 군사생장에 필요한 온도보다 낮은 온도가 적합하다. 이와 같은 현상은 조균류나 자낭균의 포자형성, 자낭각 형성 등에서도 나타난다. 실제로 온도를 제어한 재배에 있어서는 원기형성 및 그 성장단계에서 군사 성장단계보다 몇도 낮은 온도에서 된다.

원기형성의 최적온도는 군사배양 온도에 관계되어 결정되는 것은 아니다. 예를 들면 팽이버섯의 군사를 어떤 특정 온도에서 배양하여도 발이 적온은 10~15℃인 것이다. 또한 이 온도가 어느 정도 지속됨에 따라 세포는 버섯형성에 필요한 분화를 준비 할 수 있게 됨을 알 수 있다. 버섯



원기형성의 유도에 필요한 저온의 시간은 15℃에서 12시간 이내 10℃에서 48시간 이내 정도이다. 원기형성이 어떤 특정 온도의 자극에 의해 유도된다는 사실은 송이와 같은 균근균의 경우에서도 찾아 볼 수 있다.

-47-

#### 나. 균주별 꽃송이버섯의 pH에 따른 균사생장

꽃송이는 약산성인 pH 5에서 생장이 가장 빠르다. 균사는 물을 매체로 해서 영양기질과 접하여 영양을 균사체 표면에 있는 용액으로부터 흡수한다. 여기서 용액의 물리화학적 상태는 균사생활에 많은 변형을 준다. 그 요인 중의 하나가 pH이다. pH란 용액의 수소이온농도의 표시로서 1에서 14의 지수로 나타낸다. 수용액 중에서  $H_2O$ 는  $H^+ + OH^-$ 로 분리된다. 상온에 있어서  $\langle H^+ \rangle \langle OH^- \rangle = 10^{-14}$  < >는 이온 농도를 나타낸다.

pH 영향의 용액 중 금속이온 상태를 결정한다는 것이다. 예를 들면 Mg 이나 P이온은 낮은 pH일 때는 용액 중에 개별적으로 녹아 있지만 pH가 높을 때는 집합하여 불용성의 염으로 된다. Fe, Ca, Zn도 마찬가지로 높은 pH에서 불용성의 염이 된다. 균사는 물에 녹지 않는 염을 이용할 수 없기 때문에 배지의 pH가 높아지면 무기양분 결핍에 빠지기 쉽다. 배지의 pH가 낮으면 세포막의 양이온 투과성이 나빠지며, pH가 높으면 음이온 투과성이 나빠진다. 따라서 균이 요구하는 물질 종류와 양에 따라 이

들을 흡수하는데 최적의 pH가 정해진다. 또한 배지 pH는 균사세포내 pH에 영향을 주며 효소활성은 pH에 의해 변하기 때문에 그 결과로서 배지 pH는 세포내 대사에 영향을 주는 것이 된다.

균사는 성장함에 따라서 용액 중에서 영양물질을 흡수하기도 하고 용액

-48-

중으로 불필요한 폐기물을 분비하기도 한다. 그 때문에 배지성분이 변하며 따라서 pH도 변화한다. 예를 들면 질소원으로 암모늄염을 첨가해 주면 암모늄 이온이 균사에 의해 흡수되기 때문에 용액은 산성화 한다. 한편, 초산소다를 염기성으로 변화시킨다. 또한 균사내에서 생성되는 유기산이 축적, 용액중으로 분비되면 pH는 저하한다. 반대로 아미노산이 탈아미노 작용을 받아 암모니아가 생성되어 균사외로 분비되면 용액의 pH는 상승한다. 일반적으로 배지중의 탄수화물이 비교적 많이 존재하면 배양 중에 용액은 서서히 산성 측으로 기울어지며, 반대로 펩톤과 같은 유기질소가 비교적 많은 경우는 용액의 pH는 상승해 간다. (표 2)

(표2) 균주별 꽃송이버섯의 pH에 따른 균사생장

균주 (KNAC)	pH/mm/12일							
	3	4	5	6	7	8	9	10
8001	11	23	29	25	21	18	10	3
8002	16	25	31	27	23	16	8	2
8003	15	28	33	31	24	15	4	3
8004	20	35	41	38	35	31	12	8

꽃송이버섯은 MEF배지에서 가장 잘 자란다. 다음은 MES, MEI, YMF, YMM, YMT, YMB, YMI, MEA, PDA순으로 잘 자랐다.

꽃송이버섯에 대한 중요한 영양원을 보면 탄소원, 질소원, 무기염류, 발육인자가 필요하다. 탄소원의 사용농도는 최적 1~5%이고 천연배지의

-49-

경우에 맥아추출물 (malt extract) 또는 효모 추출물(yeast extract)이 사용되며 또한 사탕무우전즙, 옥수수전즙, 가용성 전분등이 이용될 때도 있다. 꽃송이버섯은 맥아추출물(malt extract), 대두분, 펩톤(peptone),  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{MgSO}_4$ ,  $\text{FeCl}_3$ 를 함유하는 배지에서 잘 자란다.

#### 다. 균주별 꽃송이버섯의 합성배지 종류에 따른 균사생장

균사생육에 적당한 질소농도는 0.03~0.06%이다. 꽃송이버섯은 펩톤, 아미노산류, 요소가 좋은 질소원이다. 암모니아염은 좋지만 초산염 및 아초산염은 이용되지 않는다(표 3).

(표3) 균주별 꽃송이버섯의 합성배지 종류에 따른 균사생장

균주 (KNAC)	배지종류/mm/12일									
	PDA	MEA	MEF	MEI	YMM	YMB	YMT	YMF	YMI	MES
8001	29	32	37	34	31	36	35	30	34	35
8002	31	33	40	32	35	37	32	36	34	38
8003	33	36	43	40	36	39	35	34	36	46
8004	41	51	69	60	54	52	53	58	51	62

**라. 선발된 꽃송이버섯 균주의 종합미네랄 첨가에 따른 균사생장**

꽃송이버섯은 종합미네랄을 0.2% 첨가 하였을 때 균사생장이 가장 좋았고, 0.2%보다 많거나 적을 경우 균사생장이 약해진다. 꽃송이버섯의 생육에는 무기염류(minerals)로서 P, K, N, S등이 비교적 다량(약 100~

-50-

500mg/)으로 요구되며 그 외에도 미량원소로서 Fe, Zn, Cu, Mo, Co, Mn, Cl등이 필요하다(표 4).

(표4) 선발된 꽃송이버섯 균주의 종합미네랄 첨가에 따른 균사생장

균주 (KNAC)	종합미네랄 함량(%)/mm/12일									
	0	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6	0.7	0.8	0.9
8004	69	72	75	73	73	71	70	69	67	68

**마. 선발된 꽃송이버섯 균주의 비오틴 첨가에 따른 균사생장**

꽃송이버섯은 비오틴을 0.1% 첨가시 균사생장이 가장 좋았고 이보다 많거나 적을 경우 균사생장이 약해진다. 꽃송이버섯의 생육에는 탄소원, 질소원, 무기 염류 외에 발육인자(growth factor)라고 하는 비타민류와 그밖의 복잡한 구조를 갖는 유기물질을 미량 필요로 한다. 버섯류에 공통된 필수 발육인자는 thiamine(비타민B1)으로 항상 0.01~0.1mg/ℓ의 량을 첨가한다. 치아민 이외에는 L-아스코르빈산, 니코틴산, 비오틴(biotin), 파라아미안식향산, 엽산, 판토텐산 (pantothenic acid), 비타민B6, B12 등을 첨가하는 경우도 있다. 배지로 펩톤 (peptone), 맥아추출물(malt extract), 효모추출물

(yeast extract), 야체의 전즙 등을 사용한 경우는 필요한 발육인자가 충분히 들어있다고 생각해도 좋겠다(표 5).

(표5) 선발된 꽃송이버섯 균주의 비오틴 첨가에 따른 균사생장

균주 (KNAC)	비오틴 함량(%) / mm / 12일									
	0	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6	0.7	0.8	0.9
8004	75	89	86	87	84	83	85	84	82	81

**바. 선발된 꽃송이버섯 균주의 티아민 첨가에 따른 균사생장**

꽃송이버섯은 티아민을 0.1% 첨가시 균사생장이 가장 좋았고 이보다 많거나 적을 경우 균사생장이 약해진다(표 6).

(표6) 선발된 꽃송이버섯 균주의 티아민 첨가에 따른 균사생장

균주 (KNAC)	티아민 함량(%) / mm / 12일									
	0	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6	0.7	0.8	0.9
8004	75	93	86	86	85	82	81	83	80	82

**사. 선발된 꽃송이버섯 균주의 fructose 첨가에 따른 균사생장**

꽃송이버섯은 Fructose을 2% 첨가시 균사생장이 가장 좋았고 이보다 많거나 적을 경우 균사생장이 약해진다(표 7).

(표7) 선발된 꽃송이버섯 균주의 fructose 첨가에 따른 균사생장

균주 (KNAC)	Fructose 함량(%)/mm/12일				
	0	1	2	3	4
8004	75	89	94	73	64

**아. 선발된 꽃송이버섯 균주의 낙엽송톱밥 추출물 첨가에 따른 군사생장**

꽃송이버섯은 낙엽송 톱밥 추출물을 1% 첨가시 군사생장이 가장 좋았고 이보다 많거나 적을 경우 군사생장이 약해진다(표 8).

-52-

버섯은 각기 다른 기질(재료)을 갖게 되는데 양송이는 원래 말뚝과 밀짚에서 성장하는 버섯으로 벚짚은 질소함량이 0.65% 정도이고 말뚝은 1.8% 정도 되므로 탄소와 질소의 비율이 약17:1로 비교적 높은 질소원을 요구한다. 그에 반해 표고와 느타리는 원래 나무에서 성장하는 버섯으로 나무의 질소함량은 0.03-1% 정도로 탄소와 질소의 비율이 350-500:1로 질소원의 비율이 낮다. 이러한 차이는 대사과정에서 탄수화물의 이용량에 차이를 갖기 때문이다. 버섯을 연구하는 초기에는 이러한 차이를 연구하여 버섯의 특성을 연구했지만 탄소원과 질소원의 차이에 의해서 발효하는 배지의 화학적 성질이나 물리적 성질이 변하기 때문에 단적으로 탄소와 질소의 비율만으로 버섯의 성장과 수율의 관계를 증명하기가 어렵다. 다시 말하면 탄소와 질소의 비율을 다르게 하여 발효를 하면 배지의 pH, 미생물의 종류와 수 발효배지의 통기성 등이 다르기 때문에 단지 탄소와 질소의 비율이 직접적으로 버섯재배에 영향을 미치는 것은 아니다.

(표8) 선발된 꽃송이버섯 균주의 낙엽송 톱밥 추출물 첨가에 따른 균사생장

균주 (KNAC)	낙엽송 톱밥 추출물 함량(%)/mm/12일				
	0	1	2	3	4
8004	94	98	94	91	83

-53-

#### 자. 선발된 꽃송이버섯 균주의 종균에 따른 균사생장

꽃송이버섯의 종균은 곡립종균이 생장이 가장 좋고 톱밥종균, 액체종균 순이었다(표 9).

(표9) 선발된 꽃송이버섯 균주의 종균에 따른 균사생장

균주 (KNAC)	종균 종류/mm/12일/칼럼		
	곡립	톱밥	액체
8004	83	71	52

#### 차. 꽃송이버섯의 톱밥 수종별 톱밥배지에 따른 균사체 생장 및 밀도

꽃송이버섯의 톱밥 수종별 톱밥배지에 따른 균사체 생장 및 밀도는 낙엽송 톱밥이 가장 좋고 다음은 참나무, 미송, 포플러 순이었다.

목재는 화학적 조성이 수종에 따라 매우 다르기 때문에 화학적 조성을 체계화하기 위하여 추출물을 부성분, 세포벽물질을 주성분으로 크게 구분하는데, 세포벽 물질을 구성하고 있는 성분은 셀룰로스, 헤미셀룰로스, 리그닌 이라 할 수 있다.

(표10) 꽃송이버섯의 톱밥 수종별 톱밥배지에 따른 균사체 생장 및 밀도

구분	균사생장 및 밀도/mm/12일			
	낙엽송	참나무	포플러	미송
균사생장	83	76	71	75
균사밀도	++++	+++	++	+++

## 2. 꽃송이버섯 종균준비

꽃송이버섯은 밑 등 부분, 즉 균핵 부분에 조직이 있어 그 부분에서 조직을 분리한다. 이 때, 세균에 오염이 잘 되므로 항생제를 첨가한 배지를 만들어 분리한 조직을 배양한다. 포자분리 방법은 자실체 조직의 일부분을 잘라 미리 만들어 놓은 페트리디쉬 뚜껑에 테이프로 붙여 포자를 낙하시켜 배양한다. 꽃송이버섯은 세균성갈반병 등의 세균에는 상당히 강한 내성을 나타내지만 푸른곰팡이에는 매우 약하다는 특이한 성질을 갖고 있다.

### 가. 배지의 준비

재배하는 버섯이나 야생하는 버섯으로부터 균주를 수집하는 방법은 크게 포자발아, 조직분리, 균사체분리가 있다. 야외에서 채취한 자실체의 포자발아나 조직분리는 세균의 오염이 심하여 버섯균의 분리가 어렵기 때문에 배지에 항생제를 첨가하여 사용한다.

항생제로는 클로람페니콜, 테트라사이클린, 스토렙토마이신, 앰피실린등을 사



용하며 클로람페니콜 사용 시 5mg/ml농도로 알코올에 녹여 여과 후 살균된 배지 200ml당 항생제용액 2ml씩 넣고 제조한다. 테트라사이클린은 50% 알코올에 녹이고 스트렙토마이신이나 앰피실린은 멸균수에 녹여 제조한다.

## 나. 포자분리

포자를 채취하기 위해서는 먼저 앞서 유리접시(샤레)에 원형 유산지를 넣고

-55-

그 위에 포자채취에 알맞도록 굽힌 철사를 넣은 다음 140℃에서 3~4시간 동안 건열살균을 한다.

포자채취는 건진하고 성숙한 버섯을 선택하여 무균상 내에서 대를 자른 다음 주름살 부분이 유리접시의 샤레 바닥 쪽을 향하게 철사위에 가볍게 올려 놓고 공기의 유동을 방지하기 위하여 뚜껑을 덮는다. 버섯을 넣은 샤레는 온도가 15~20℃이고 주위가 청결한 곳에 6~15시간 동안 포자를 낙하 시킨 후 버섯을 제거하고 4℃ 냉장고에 보관한다.

포자 발아는 버섯 자실체의 포자를 무균적으로 채취하여 다량의 포자를 멸균수에 섞은 포자현탁액을 0.2~0.3ml씩 배지에 접종한 후 25℃온도를 유지해 주면 약 7일후에 포자가 발아된 균사체를 얻을 수 있다.

포자 발아율을 높이기 위하여 양송이의 경우는 접종한 포자 부근에 양송이 종균을 넣고 샤레를 밀봉하여 엎어두면 양송이 균사에서 나오는 대사산물이 포자발아를 촉진시킨다.

#### 다. 조직분리

고등균류인 버섯류는 대부분 자실체의 조직일부를 이식하면 쉽게 균사를 얻을 수 있다. 즉 버섯은 균사체가 변하여 생긴 기관이기 때문이다.

조직분리를 하기 위해서는 버섯종류별로 알맞은 배지가 들어 있는 시험관을 준비하고 버섯은 가능 한한 어리고 신선한 것을 준비한다. 무균상태에서 버섯

-56-

을 쪼개어 갓과 대가 연결되어 육질이 두꺼운 부분을 살균된 면도날로 속의 내부조직을 사방 약 1×3mm크기로 절단한 다음 멸균된 백금으로 시험관내 배지 중심부에 가볍게 눌러 놓는다. 조직을 이식한 시험관은 20~25℃의 항온기에 넣고 균사가 2~3cm 정도 성장하면 가장 잘 자란 것을 골라 새로운 시험관에 이식 배양하여 사용한다.

저장용 균주는 배지에 70~80%정도 균사가 성장되었을 때 솜마개 부분을 유산지로 싼후 4℃의 냉암소에 보관하여 사용한다.

### 3. 꽃송이 배지살균 요령

살균은 배지 내 미생물의 멸균, 균사저해물질의 제거와 배지를 연화시켜 버섯균이 쉽게 양분을 흡수할 수 있게 하기 위한 것으로 주로 증기에 의한 상압(98℃)살균과 고압살균방법을 사용한다.

<고압살균과 상압살균비교>

구분	입병량		가열 시간	스 팀			연료 소비량 (L)	연료 1L당 배지량	배지 수분 증감
	병수	고형율		온도	압력 kg/cm <sup>2</sup>	발생량 kg			
고압	1,783	48.5	3.4	121℃	1.18	125	30.8	28.2Kg	-11.9g
상압	1,152	45.5	6.4	98℃	0	637	66.8	8.9Kg	+ 10.7g

상압살균은 기계가격이 싸지만 연료비가 많이 든다. 고압 살균 시 가마내 온

-57-

도와 압력은 가마내 잔존 공기에 따라 달라지므로 완전한 탈기와 살균 후 흡입공기에 의한 고온성 세균의 감염에 유의하여야 한다. 살균 후 가마내 음압에 의한 오염을 방지하기 위해 Clean Air SYSTEM을 설치할 수 있다. 이 장치는 방랭실의 수증기방출을 줄여 세균의 오염율을 미연에 방지할 수도 있다.

완전한 멸균을 위해서는 스팀보일러의 용량이 가마크기에 맞아야 하며, 습한 증기의 물방울이 기수분리기에서 제거되고, 건조스팀만이 가마에 공급되도록 해야 한다. 특히 배관의 굵기가 필요한 스팀양이 통과되도록 유의한다. 탈기가 매우 중요하므로 탈기배관은 흡기보다 배관의 굵기가 커야한다. 뜸들이기가 끝난 후 반드시 소비기를 하고 대배기를 하여야 배지표면의 건조를 막을 수 있다. 또한 응축수의 배수가 잘 되도록 해야 완전한 살균이 되며, 살균 후 병을 꺼낼 때 병에 전연 물기가 없어야 한다. 물기가 있으면 세균오염이 염려되기 때문이다.

액체배지가 아니고 톱밥배지에서는 톱밥의 단열특성 때문에 멸균 저해요인이 생길수있으므로 120℃에서 1시간 유지하여도 내열성이 강한 균( *B. subtilis*, *B. stearothermophilus*, *CL. sporogenes* 등)들이 살아남을 수가 있음으로 멸균 저해 요인들, 즉 톱밥의 저장(흙의 혼합방지)에 따른 배지의 균분포량, 배지의 수분부족, 배지의 지방산이나 염기종류와 농도, 완전한 탈기, 습증기공급에 만전을 기하여야 한다. 120℃에서의 장시간 살균시 배지의

-58-

탄수화물의 탈수나 축합에 의한 카라멜화, 단백질의 변화나 열에 약한 비타민류의 파괴를 염려할 수 있으나 배지의 가열처리 후 화학적 성분의 변화를 조사하고 균사 성장에 미치는 악영향을 실험한 결과 120℃에서 90분간도 별다른 문제가 없는 것으로 판명되었다. 아미노산중 시스틴등이나 비타민 B<sub>1</sub>(티아민)은 50%이상 감소되었으나 잔존 성분으로도 균사생장에는 지장이 없었다.

방랭과정은 살균이 완료된 후 75℃정도까지 예냉 시킨 후 집중할 때까지 병내 배지온도가 17℃가 되도록 냉각시키는 과정이다. 방랭시간이 보통15시간 정도 되므로 그 동안에 병내 고온공기가 저온 화 되면서 공기부피가 감소하고 병 내외의 온도차 때문에 방랭실 공기가 병속으로 많이 흡입되므로 이때 방랭실공기의 오염도는 심각한 피해를 줄 수 있다. 살균 완료 후 배지가 100℃에서 20℃로 될 때까지 배지용적의 약 50%의 방랭실 공기가 흡입된다는

것을 잊지 말아야 한다. 병내 온도가 18℃이상의 고온이 될 때 접촉하면 세균 및 거미줄곰팡이나 푸른곰팡이등의 잡균이 번식되기 쉬어져 접촉 후에 피해가 나타난다. 방랭실은 살균 후 배지를 꺼내기 전에 바닥을 락스등으로 깨끗히 청소하고 소독해두어야 한다. 방랭초기는 예냉 과정으로 급 외기 처리 유닛에 의한 외기도입과 급배기처리를 하는 것이 좋다.

-59-

최근 살균가마에 Cooling Air SYSTEM을 설치할 경우에는 급배외기처리 유닛 설비를 생략하고 있다.

방랭 중에 병속 공기부피감소와 큰 온도차로 흡입공기에 의해 가장 오염이 되기 쉬우므로 방랭실은 항상 저온, 건조, 공기 필터링, 청소, 소독, 양압유지와 자외선등 설치로 청정도를 유지해야 한다. 살균완료 후 살균 가마 문을 열 때의 수증기와 고온공기를 짧은 시간에 밖으로 배출하기 위해 방랭실 공기량의 10배정도 되는 급외배기처리 유닛을 설치하고, 양압유지용 외기처리유닛도 설치한다. 저온유지를 위해서 냉동설비는 물론 분진을 남기지 않고, 수분이 적은 살균제로 살균소독도 해야 한다.

#### 4. 꽃송이 배지준비 및 배양

낙엽송과 활엽수(졸참, 단풍, 너도밤나무, 자작, 밤나무, 호도나무 등) 톱밥

을 1:1~3:1로 혼합하고 여기에 활성탄 (중량비 0.5~3.0%), 활성칼슘(중량비 0.01~0.5%)과 미강이나 밀기울 등의 영양제를 첨가한다. 배지 수분은 65%로 한다. 혼합된 배지를 110°C, 1.2기압에서 300분간 살균한 후에 꽃송이버섯 종균을 접종한다.

톱밥 제조 시에 사용되는 톱날에는 보통 녹 방지를 위해 석유 등의 기름을 뿌리는데, 꽃송이버섯은 톱밥에 남아있는 미량의 기름기에도 반응할 정도로

-60-

민감하므로 톱밥을 사용하기 전에 찌서 불순물을 씻어내면 꽃송이버섯 채취의 안정성이 증가한다.

그러나 이 방법은 비용이 많이 들고 균사생장에 유효한 물질도 제거될 수 있으므로 효율성이 떨어진다. 최근의 연구에서는 톱밥을 찌는 대신에 배지에 활성탄을 일정량 첨가하여 꽃송이버섯 성장 저해물질을 흡착시키고, 또한 꽃송이버섯 균사가 성장하면서 배출하는 노폐물을 배지로부터 제거한다.

종균배양실은 20~30°C까지 임의로 온도조절이 가능하도록 항온장치 및 에어컨을 설치해야 하고 습도는 70%이하로 조절해야 한다. 종균배양실은 버섯 종류별 배양 최적온도인 25~30°C가 유지되도록 하고 외부온도의 영향을 줄이기 위하여 단열을 잘하며 쥐등과 같은 유해동물의 침입을 완전히 차단할 수 있도록 시설되어야 한다. 배양실 내에는 종균병을 넣을 수 있는 선반을 설치하는데 가능한 한 온도 변화를 줄이기 위해 나무로

만든 선반이 바람직하다. 선반과 선반사이의 높이는 종균병을 넣고 윗부분에 7~10cm 정도 공간을 주어 공기 유통을 도모해야 한다.

배양실은 배양용 종균을 넣기 전 청소 및 무균실 소독과 동일한 방법으로 약제소독을 하여야 한다. 온도가 높은 배양실에 배양용 종균을 넣을 때는 병과 병사이를 5~10mm정도 띄어 놓아 고온피해가 없도록 한다. 배양실은 종균의 종류및버섯의 품종별로 구분지어 섞이지 않도록 하여야

-61-

함은 물론 접종일자별로 분리하여 놓아야 한다. 종균의 배양기간은 버섯 균사종류에 따라 다르지만 약 20~30일 정도에 버섯균사가 배지 전체에 완전히 생육하게 된다. 배양중 균사생장이 부진하거나 오염된 종균을 조기에 선별하여 고압살균 후 폐기한다.

일반적으로 접종원이라 하는 것은 새로운 배지에 옮겨놓을 균주를 말하지만 종균 제조시에는 원균으로 부터 직접 많은 량의 종균을 제조할 수 없기 때문에 중간단계로서 증식용 종균을 만들게 되며 이것을 접종원이라고 부른다.

접종원은 재료 및 제조과정이 종균과 동일하나 다른 점은 원균을 새로 증식하여 균사상태가 정상적인 것만 골라서 1개의 원균으로 2~3병의 접종원을 만들며 접종원을 이용하여 종균을 제조할 수 있다. 배양이 완료된 것은 접종원 검정을 마친 후 사용하여야 하며 검정방법은 시험관 배지

상에 접종원을 조금씩 떼어놓고 25℃와 45℃에서 3~5일간 배양하여 잡균유무를 검사하며 잡균이 없는 것만 사용하여야 한다.

톱밥종균은 곡립종균과 달리 배양 중에 흔들기 작업을 할 수 없어 온도가 높을 경우 상부에 균사가 먼저 자란부분이 노화되기 쉬우므로 적온이 유지되도록 한다. 온도를 정온상태로 유지하여 온도 변화에 의한 응결수가 형성되지 않게 할 것, 실내 습도는 70% 이하로 낮게 관리하여 잡균발

-62-

생을 줄일 것, 가끔 신선한 공기 주입으로 균사생장이 좋게 할 것, 실내는 어둡게 관리하여 원기형성이 되지 않도록 할 것, 배양실에 종균이 없을 때는 소독 및 청소를 철저히 할 것, 접종 후 4~7일째부터 잡균 선별에 철저를 기할 것, 배양이 완료된 종균은 바로 저장실로 옮길 것 등으로 위와같이 작업관리를 잘 하였을 때 접종 후 25~30일이 경과되면 종균은 배양이 거의 완료된다.

액체종균은 균사체 형태가 둥글둥글하게 자라기 때문에 접종원을 균질기로 잘게 부수어 거의 액체상태로 접종하여야 펠렛이 적고 활착율이 높아진다.

곡립 종균제조용 곡립은 벌레가 먹거나 변질되지 않고 찰기가 적으며 잘 영근것을 선별하여 사용한다. 곡립 종균제조는 밀을 1차물에 세척 후 이물질을 제거하고 끓는 물에 침지하거나 수증기로 찌서 수분함량을 품



종의 특성에 따라 대략 45~50%로 조절한다. 곡립의 적정 수분함량 간이 측정방법으로는 밀을 횡으로 절단하였을 때 중앙부분의 1~2mm정도가 백색 원형으로 남아있고 주위는 수분과 열이 침투하여 익은 상태로 되었을 때를 기준하면 된다. 밀의 수분조절시 수분증가 비율보다는 곡립의 용적증가비율이 훨씬커서 40%이상 늘어난다. 곡립의 수분함량이 지나치게 많으면 표피가 파괴되고 전분이 노출되어 균덩이가 형성되며 빨리 노화되

-63-

므로 수분함량조절에 특히 주의해야 한다. 만일 곡립배지가 과습상태가 되었을 경우에는 석고( $\text{CaSO}_4$ )의 첨가량을 늘리는 것이 좋다. 수분조절이 끝난 밀을 선풍기 등을 이용하여 유리수분을 제거한 후 곡립의 결착을 방지하여 물리적 성질을 개선하는 석고를 배지무게의 0.6~2%를 첨가한다. 배지의 pH가 6.2~6.8에서 균사생장이 양호하므로 산도조절을 위하여 탄산석회( $\text{CaSO}_4$ )를 석고량의 1/2정도 첨가한다. 석고와 탄산칼슘은 각각 평량후 덩어리 없이 먼저 잘 혼합한 후 밀배지에 섞어 배합한다. 종균병은 1000cc 링겔병을 미리 세척하여 내부에 물이 없도록 하고 병에 넣은 양은 무게가 454g(1파운드)이상 이어야 하며 용적으로는 배지의 수분함량에 따라 다르나 750~800cc 정도로 한다. 배지를 넣은후 병의 입구는 깨끗이 닦고 솜마개는 이등품 이상의 솜을 사용하여 손으로 잡고 들었을 때 빠지지 않을 정도로 단단히 한다. 톱밥배지는 톱밥과 미강으로 느타리,

만가닥버섯, 팽이버섯은 포플러톱밥, 표고, 영지, 목이버섯등은 참나무톱밥에 미강을 10~20%정도 혼합하나 약간씩 다르다. 이때 사용하는 톱밥은 3~5mm체로 쳐서 거친 것을 제거 하여야 한다. 톱밥을 체로치지 않으면 덩어리와 거친 부스러기 때문에 재료혼합이 균일하지 않아서 기계화가 곤란하며 미강은 1.5mm의 고운체로 부스러진 싸래기를 제거하여 사용하므로써 잡균발생을 줄일 수 있다. 이와 같이 준비된 톱밥과 미강의

-64-

배합 비율은 톱밥량에 대해서 용량비로 10~20%의 미강을 혼합하며 미강이 다소 오래된 것을 사용할때 생성된 유기산을 pH를 높여 중화하기 위하여 탄산칼슘을 건조 톱밥중량의 0.2~0.5%를 첨가하지만 일반적인 톱밥종균 제조시는 사용하지 않아도 무방하다. 종균 제조시 재료의 배합과정은 먼저 마른톱밥과 미강을 일정용기로 잘 혼합하여 배지재료와 섞은 후 물을 뿌리면서 몇 차례 뒤집어 수분이 63~65% 조절한다.

종균접종에서 배지에 균사가 만연되기까지는 47일 이상이 필요하며 온도는 23~26°C, 상대습도는 70%로 유지한다. 균사 활착이 완료되면 약 10일간 온도를 26~28°C로 올리면 크기가 작거나 불량한 원기는 도태되고 큰 원기만 남게 되는데 이 때 균사 세포 내에 글리코겐을 축적한다.

## 5. 꽃송이 발이유도 및 생육

꽃송이 발이유도를 위해서는 배양온도를 14~18℃로 내려 5일간 유지한다. 발이시 환경은 전기(재생균사 생길 때까지)와 후기로 나눠 관리한다. 기간은 발이전기 4~5일, 발이후기5~6일로 하고 온도는 14-18℃로 전반기는 높게, 후반기는 낮게 한다. 습도는 60-95%로 전반기는 충분한 가습을 하고 후반기는 건습 교차 관리를 한다. 환기는 CO<sub>2</sub> 2000 ppm이하(2시간에 10분 환기)로 조절한다. 광은 후반기에 낮에만 200-500 Lux 정도면 충분하다.

-65-

유평PE시트(습도85%)나 신문지(습도95%)로 피복(9-10일간)할 수 있으나, 병을 거꾸로 하여 발이 시키는 것이 과잉수 제거 및 낙화균 오염 등 때문에 좋다. 발이가 되면 즉시 병을 원위치 시킨다.

생육온도는 22~25℃, 습도는 82%로 하고 15~30일간 유지하여, 자실체가 성장한 후에 수확한다.

## 6. 수확 및 포장, 탈병

균급기 후 16일경부터 2-4일 동안 수확(120-150g/병)하며 유통중 세균이나 재생균사에 의해 변질이 되지 않도록 유의한다.

톱밥을 이용한 병재배에 있어 850cm<sup>3</sup> PP병을 기준으로 볼 때 꽃송이버섯이 수확되기까지는 접종해서부터 약 69일이 소요된다. 균사배양기간이 47일(후배양 10~15일 포함), 발이유기기간 8~10일, 자실체생육기간 9~11일 정도가

소요된다.

꽃송이버섯은 환경에 매우 예민하게 반응하므로 배지재료나 배지조성, 후배양기간, 발이유기방법, 생육환경조건 등에 의해 품질이 향상될 수 있다. 이들 요인 중 한가지라도 소홀할 경우 품질이 현저하게 떨어지게 되는데, 발생불량 상태를 초래하여 어린 자실체로 생을 마감하게 된다.

버섯의 수확은 다른 버섯과 마찬가지로 기계화되어 있지 않아 수작업에 의

-66-

존해야만 하는데, 자실체의 부착이 비교적 약하여 잘 떨어진다.

수확이 끝난 폐상 병은 가급적 빠른 시간 안에 재배사 밖으로 끄집어내고 즉시 탈병작업에 들어가는 것이 가장 좋다. 탈병은 실외인 경우 가능한 한 바람이 적은 날에 하는 것이 바람직하며, 동계에는 배지가 얼어붙어 탈병 시 병이 깨지므로 폐상 즉시 탈병 시키고 그렇지 못한 경우에는 반드시 실내나 비닐하우스 내에 쌓아 두고 탈병작업에 임해야 한다. 탈병이 끝난 공병은 상자에 거꾸로 담아 이물질이나 빗물 등이 병 속에 고이지 않도록 하고, 병의 수명과 투명도의 연장을 위해 직사광선을 받지 않는 음지에 두고 보관한다. 세균이나 곰팡이에 오염된 폐상병은 따로 모아 탈병하고 반드시 물로 세척한 뒤 사용하는 것이 좋다. 특히 곰팡이에 오염된 것은 탈병시 많은 포자가 비산되므로 물축이기를 한 뒤 탈병하는 것도 좋은 방법이 될 것이다.

## 제4절 결론

꽃송이버섯에 베타글루칸 성분이 많아 이 버섯에 관심을 갖는 자가 많다. 모든 버섯에는 베타 글루칸 성분이 함유되어 있지만 특히 이 버섯이 많이 함유되어 있다는 특징이 있을 뿐이다. 이제는 이 버섯을 인공적으로 대량생산하는 방법을 개발하였다. 침엽수가 기주체인 이 버섯은 국내에서도 8~9월에 발견되는 버섯이며, 한국, 일본, 중국, 북아메리카, 유럽, 오스트레일리아 등에 분포하고 씹는 맛이 좋고 송이버섯과 같은 향이 나는 버섯이다. 주로 가을에 소나무, 솔송나무, 잣나무등 침엽수의 뿌리 부근 땅위나 그루터기 위에 단생하는 근주심재 갈색부후성 버섯이다. 특히 꽃송이버섯 건조 100g당 43.6g의 베타글루칸이 함유되어있어, 그 동안 재배되어온 버섯 중 비교적 베타글루칸

성분이 많이 들어있다고 알려진 신령버섯(아기리쿠스)보다 3배이상 높다. 베타글루칸이란 면역력을 높여주는 핵심 성분으로써 신체의 면역체계를 바로잡아 암 및 고혈압, 당뇨병 등을 다스리는 것으로 높이 평가받아 관심이 집중되고 있다. 또한 꽃송이버섯은 일본 동경 약학대학의 연구그룹에서 발표하여 NHK등 매스미디어에서 반향을 일으킨 후 건강보조식품으로 판매되고 있으며 국내에도 수입하여 고가로 판매되고 있는 실정이다.

-68-

꽃송이버섯은 현재 일본에서 농장공급가격 기준으로 kg당 100만원정도 이며 소비자가는 200만원선에서 거래되는 고가 상품이다. 이제 강력한 면역강화 기능을 가진 고소득 작물인 꽃송이버섯의 인공재배 방법이 우리나라에서 개발됨에 따라 이전의 상황버섯과 같은 전철을 밟지 않으려면 우선 꽃송이버섯을 유사종(혹은 변종)인 *Sparassis laminosa*와 명확히 구별해야 한다. *Sparassis crispa* 는 균사의 세포벽 두께가 얇은것은 2 $\mu$ m 에서 두꺼운 것은 10  $\mu$ m 까지 다양한 반면 *Sparassis laminosa*는 2 ~ 7  $\mu$ m로 균사의 세포벽이 얇다. 외관상으로는 *Sparassis crispa*의 자실체가 꽃양배추와 더 유사하고 끝부분이 구불구불하다. 먹어보면 *Sparassis crispa*의 조직이 더 부드럽고 맛이 좋다.

## 제5절 참고문헌

- 꽃송이버섯 재배기술, 장현유, 2001
- 꽃송이버섯의 균사생장을 위한 최적 요인, 심재욱, 1998
- 꽃송이버섯의 인공재배법, 하나바이오텍, 2002
- 꽃송이버섯의 가능성, 고자와 히로키, 2002
- Arita, I., Teratani, A., and Shione, Y., The optimal and critical temperatures for growth of *Pholiota adiposa*, *Rept. Tottori Mycol. Inst.*, (Japan), 18, 107, 1980.
- Bano, Z. and Rajarathnam, S., *Pleurotus* mushroom as a nutritious food, in *Tropical Mushrooms - Biological Nature and Cultivated Methods*, Chang, S. T. and Quimio, T. H., Eds., The Chinese University Press,

Hong Kong, 363, 1982.

- Bano, Z., Bhagya, S., and Srinivasan, K. S., Essential amino acid composition and proximate analysis of the mushrooms *Pleurotus eous* and *P. florida*, *Mushroom Newslett. Tropics*, 1(3), 6, 1981.

- Bold, H., Alexopoulos, C. J., and Delevoryas, T., *Morphology of Plants and Fungi*, 5th ed., Harper, New York, 1986.

-70-

- Cooney, D. G. and Emerson, R., *Thermophilic Fungi - An account of Their Biology, Activities and Classification*, Freeman and Company, San Francisco, 1964.

- Ikekawa, T., Nakanishi, M., Vehara, N., Chihara, G., and Fukuoka, F., Antitumor action of some basidiomycetes especially *Phellinus linteus*, Gann., 59, 155, 1968

- Komatsu, N., Okubo, S., Kikmoto, S., Kimura, K., Saito, G., and Sakai, S., Host-mediated antitumor action of Schizophyllan a glucan produced by *Schizophyllum commune*, Gann., 6, 137, 1969

- Lambert, E. B. and Davix, A. C., Distribution of oxygen and carbon dioxide in mushroom compost heaps as affecting microbial thermogenesis, acidity and moisture therein, *J. Agric. Res.*, 48, 251, 1934.



- Li, G. S. F. and Chang, S. T., Nutritive value of *Volvariella volvacea*, in *Tropical Mushrooms - Biological Nature and Cultivation Methods*, Chang, S. T. and Quimio, T. H., Eds., The Chinese University Press, Hong Kong, 199, 1982.

- Li, G. S. F. and Chang, S. T., The nucleic acid content of some edible mushrooms, *European J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 15, 237, 1982

-71-

- Waksman, S. A. and Allen, M., Comparative rate of decomposition of composted manure and spent mushroom soil, *Soil Sci.*, 34, 189, 1932.

Waksman, S. A. and Cordon, T. C., Thermophilic decomposition of plant residues in composts by pure and mixed cultures of microorganisms, *Soil Sci.*, 47, 217, 1939.

- Waksman, S. A. and McGrath, J., Preliminary study of chemical processes involved in the decomposition of manure by *Agaricus campestris*, *Am. J. Bot.*, 18, 573, 1931.

- Waksman, S. A. and Nissen, W., On the nutrition of the cultivated mushroom, *Agaricus campestris* and the chemical changes brought about by this organism in the manure compost, *Am. J. Bot.*, 19, 514, 1932

- Waksman, S. A. and Reneger, C., Artificial manure for mushroom

production, *Mycologia*, 26, 38, 1934.

- Waksman, S. A., Cordon, T. C., and Hulpoi, N., Influence of temperature upon the microbiological population and decomposition

processes in composts of stable manure, *Soil Sci.*, 47, 83, 1939.

- Waksman, S. A., Umbreit, W. W., and Cordon, T. C., Thermophilic actinomycetes and fungi in soils China, Mushroom *Soil Sci.*, 47, 37, 1939.

-72-

## 제4장 꽃송이버섯 재배방법별 생산수율 확립

**Effect of Yields on the Different Cultivation methods of *Sparassis crispa***

**Abstract** : The yields and the biological efficiency of *Sparassis crispa* in the case of the bottle cultivation was 98g/850ml, 40.6% and in pot cultivation was 294g/2,500g, 39.7% respectively. On the primordial formation the case of no removing inoculation spawn was well introduced, and the mushroom's yield and biological efficiency was to be high. The results in the use of the logs for *Sparassis crispa* 's cultural media were to be fine in Japanese lark, oak, alder, accacia, poplar, pine in oder. And

in Japanese lark, the yield of the mushrooms were 364g per 1 log, biological efficiency was 23.1%, the period requirements for primordium was 139 days, day required for colonization after inoculation was 128 days, day required for fruitingbody development after inoculation was 144 days, and the mushroom's individual weight was 109g..

---

KEYWORDS : Cultivation, *Sparassis crispa*, Yield

---

-73-

## 제1절 서언

신비의 버섯으로 불리는 꽃송이버섯은 8월경 고온 기에 일시적으로 발생하였다가 말라서 없어지는 일년생 버섯이다. 목질진흠버섯류처럼 다년생이 아니기 때문에 손쉽게 야생 버섯을 구할 수가 없다. 그래서 인공대량생산체계가 필요하다. 꽃송이 버섯균을 사용하여 열 추출법으로 461mg이나 되는 베타(1→3)이 추출되고 또한 각종방법으로 추출해도 대량의 베타(1→3)를 얻을 수 있다고 보고한다.

꽃송이의 베타글루칸 함유량이 100g 중 43.6g, 신령버섯(아가리쿠스)에 11.3g 함유되어 3배 이상이며, 송이버섯에는 15~20g, 영지버섯에는 8~15g, 기와버섯에는 7~12g이라는 보고가 있다. 글루칸이라고 하면 대표적인 것이 아미노스, 글루코젠, 텍스트린, 셀룰로오스 등이다. 글루칸은 크게 알파와 베

타로 나뉘며 전분이나 텍스트린 등은 알파글루칸이다.

한편 베타글루칸쪽은 몇가지 종류가 있어서 베타(1→4), 베타(1→6), 베타(1→3)등이 있다. 베타(1→4)글루칸이란 셀룰로오스를 말하는 것이다. 자연계에 있는 균류에는 항암작용이 별로 없는 베타(1→6)글루칸도 많다. 그런데 항암작용이 있는 것이 베타글루칸 중 어느형인가하면 그것이 베타(1→3)D 글루칸이라는 것이 최근의 연구에서 확실해졌다. 1999년 3월 31일부터 3일간 일본

-74-

도쿠시마에서 개최된 일본약학회에서 꽃송이버섯이 처음으로 학회에 데뷔하였고, ‘꽃송이버섯유래의 β-글루칸의 구조와 활성’이 도쿄약과대학 야도마에도시로 연구팀에 의해 발표되었다. 1998년 12월부터 마우스실험에 의한 항암작용을 조사한 결과에 의하면 꽃송이버섯의 β-글루칸은 6분기의 β(1→3)D 글루칸이라는 것이 해명되었다.

이러한 항암효과가 현저한 꽃송이버섯의 재배방법별 최적 환경에 매우 예민하게 반응하므로 배지재료나 배지조성, 후배양기간, 발이유기방법, 생육환경조건 등에 의해 품질이 향상될 수 있다. 이들 요인 중 한가지라도 소홀할 경우 품질이 현저하게 떨어지게 되는데, 발생불량상태를 초래하여 어린 자실체로 생을 마감하게 된다. 특히 종균의 경우 액체종균은 버섯중 가장 까다로운 특성을 지니고 있어 그 성질을 밝히고자 본 연구를 수행하였다.

## 제2절 재료 및 방법

### 1. 공시균주 및 접종원

한국농업전문학교에 보존중인 KNAC8004(*Sparassis crispa*)를 MEF(Malt Extract Fructose)배지에 25℃, pH 5.0, 종합미네랄 0.2%, 비오틴 0.1%을 첨가하고 18일간 배양하였다. 250ml 삼각 flask에 낙엽송 톱밥과 쌀겨를 80 : 20(V/V)으로 혼합한 후 pH 5.0, 종합미네랄 0.2%, 비오틴 0.1%, fructose 2%, 수분 70%를 첨가하여 고압살균한 다음 상기 MEF에서 배양한 균사를 접종하고 이를 다시 25일간 배양하여 각 처리간의 접종원으로 사용하였다. 액체종균은 MEF(Malt Extract Fructose)배지를 사용하였으며 특히 꽃송이 액체종균은 균사의 형태가 펠렛형으로 자라므로 이를 분사형으로 제조하기 위하여 균질기로 15,000 rpm으로 5분간 갈았으며 균질후 접종하여도 액체배양 탱크에

서의 폭기가 약하면 다시 붙어 펠렛으로 되는 점을 방지하기 위하여 폭기를 가장 강하게 실시하였다.

## 2. 재배방법 및 조사항목

재배방법은 원목과 용기(병), 봉지재배로 하였으며 군사배양온도는  $23\pm 3^{\circ}\text{C}$ , 원기 자실체 발생유도는  $10\pm 3^{\circ}\text{C}$ , 상대습도는  $90\pm 5\%$ 로 하였다. 배양 완성일수

-76-

는 종균을 접종한 날로부터 군사가 배지 전면에 만연되었을 때까지의 일수, 초발이 소요일수는 배양 완성 일로부터 원기가 형성된 날까지의 일수, 생육 소요일수는 초발이로부터 수확한 날까지의 일수로 표시하였다. 생물학적 효율 (biological efficiency)은 배지 건조중량에 대한 버섯의 생체중을 백분율로 표시하였다. 병재배(850ml)와 봉지재배는 낙엽송톱밥과 밀기울을 80 : 20(V/V)으로 혼합하고 pH 5.0, 종합미네랄 0.2%, 비오틴 0.1%, fructose 2%, 수분 70%를 첨가하여 혼합 충전 후  $121^{\circ}\text{C}$ 에서 60분간 고압살균하여 접종하고 군사가 완전히 다 자란 다음 발이시켜 1주기의 수량, 회수율, 초발이 소요일수, 배양완성일, 개체중을 조사하였다.

## 3. 발이유기 방법에 따른 자실체 수량비교

병재배는 2가지 발이유기 방법을 사용하였다. 팽이버섯 병(瓶) 재배시 사용하는 균류기 기계로 배지의 상단부를 균일하게 긁은 것과 배양 후 균류기를 하지 않은 것을 비교하여 1주기만의 수량과 초발이 소요일수를 조사하였다.

-77-

### 제3절 결과 및 고찰

#### 1. 재배방법에 따른 수량

꽃송이버섯의 톱밥 병재배와 봉지재배시 재배방법에 따른 수량성과의 관계를 조사한 결과, 수량은 병재배로 재배하였을 때 98g/850ml로 봉지재배로 재배하였을 때 294g/2500ml보다 낮았으나 회수율은 850ml병에 재배하였을 때 40.6%로 pot재배의 39.7%보다 높았다. 배양완성일은 병재배가 46일, pot 재배가 57일이었으며, 초발이 소요일수는 병재배가 55일, pot재배가 70일로서 발이유기 기간이 9~13일이 소요되어 병재배보다는 pot재배가 배양완성과 초발이 소요일수는 배지량이 많기 때문에 기간이 오래 소요되었다. 균사 집중 후 자실체가 완성되어 수확하기까지의 기간은 병재배가 62일, pot재배가 77일로

서 원기가 자실체로 완성되는데 7일 소요되었다. 개체중은 봉지재배 방법이 129g으로 병재배 방법의 98g보다 많았다. 1주기의 버섯을 수확하고 2주기의 버섯이 발생되기까지의 주기간의 기간은 병재배가 17일, pot재배가 18일 소요되었다 (표 1).

-78-

Table 1. Effect of the different cultivation method on yields of *S. crista*

Cultivation methods	Yields (g)	BE (%)	DCI (days)	DPI (days)	DFD (days)	DCC (days)	IW (g)
Bottle(850ml)	98	40.6	46	55	62	17	98
Pot(2500ml)	294	39.7	57	70	77	18	129

BE : Biological efficiency(flesh mushrooms / dry substrate)×100 = %

DCI : Day required for colonization after inoculation

DPI : Day required for primordial formation after inoculation

DFD : Day required for fruitingbody development after inoculation

DCC : Day required for cropping cycle

IW : Individual weight

## 2. 발이유기 방법에 따른 수량

공시균이 배양 완성된 후 균굽기를 한 것과 하지 않은 것의 처리로 발이유기 시켰을 때의 초발이 소요일수와 생물적 효율, 수량을 조사한 결과 균굽기



한 것은 초발이 소요일수가 55일로서 균꺾기를 하지 않는 것 52일에 비해 3일이 늦었으며 개체중은 처음 발이 될때는 여러개이나 성장하면서 균꺾기를 실시한 것과 실시하지 않은 것 모두 한 개로 합하여지므로 1병당 수량과 개체중이 동일하다. 또한 수량은 균꺾기를 한 것은 98g인 것에 비해 하지 않은 것은 92g으로서 균꺾기를 실시하므로써 약간 증수되었으나 균꺾기하는 노동력이 소요되는 단점을 절감하는 효과가 있다. 따라서 생물학적 효율(B.E)도 균꺾기한 것이 39.7%, 균꺾기 안한 것 37.3%로 균꺾기를하는것이 수량이 높

-79-

음을 확인하였다. 버섯의 톱밥재배시 반드시 균꺾기를 실시하는 대표적인 버섯이 팽나무버섯으로서 균일한 발이와 자실체 형성 촉진효과가 있는 것으로 알려져 있으나 꽃송이버섯은 버섯 대(stem)가 없어 발이가 여러 군데에서 되면 오히려 상품성이 떨어지므로 1개의 개체로 발이를 유기시켜야 하는데 이를 위해서 균꺾기를 하지 않는 것이 효과적이다. 버섯 1주기 수확 후 다시 버섯이 발생하기까지의 기간은 14~17일이 소요되었다(표 2).

Table 2. The comparison of yields according to removing method of inoculation spawn after colonization

Methods of inoculation	Yields (g)	BE (%)	DCI (days)	DPI (days)	DFD (days)	DCC (days)	IW (g)
RI	98	39.7	46	55	62	17	98
NRI	92	37.3	46	52	58	14	92

RI : Removing inoculation spawn after colonization

NRI : No removing inoculation spawn after colonization

BE : Biological efficiency(flesh mushrooms / dry substrate)×100 = %

DCI : Day required for colonization after inoculation

DPI : Day required for primordial formation after inoculation

DFD : Day required for fruitingbody development after inoculation

DCC : Day required for cropping cycle

IW : Individual weight

-80-

### 3. 원목의 수종에 따른 수량

원목 수종에 따른 초발이 소요일수, 개체중, 수량을 조사한 결과, 낙엽송은 생물학적 효율(BE)은 23.1%, 배양완성기간 128일, 원기형성 소요기간 139일, 자실체 형성소요기간 144일, 1주기 소요기간 12일, 개체중 109g으로 참나무, 오리나무, 포플러, 아카시아, 소나무에 비하여 생물적 효율이 가장 높았다. 생물적 효율은 소나무가 5.3%로 가장 낮고 배양완성기간도 145일로 가장 많이 소요되었다. 원목재배에 있어서 1주기 버섯 수확 후 다시 자실체가 발현하기까지의 기간은 8일~16일이 소요되었다(표 3).

낙엽송은 상록 침엽교목으로 줄기가 통직하며 가을에 단풍이 노랗게 물들어 낙엽이 지며 잎은 길이 1.5~3.5cm, 넓이 1.0~1.2mm로 짧은 가지에서는 10여개씩 뭉쳐난다. 꽃은 5월에 피고 짧은 가지 끝에 1개씩 달리며 구과는 위로 향

하고 길이 1.5~3.5cm이며 9월에 성숙하고 수고 30m, 직경 1m까지 자란다. 해변을 제외한 온대지역의 토심이 깊고 비옥한 적윤지로 안개가 자주 끼는 북향 또는 북서향에서 왕성한 성장을 하는 꽃송이 버섯재배에 적당한 수종이다.

-81-

Table 3. Effect of yields on the different wood log in *S. crispa*

Log wood	Yields (g/1 log/1 year)	BE (%)	DCI (days)	DPI (days)	DFD (days)	DCC (days)	IW (g)
Japanese lark	364	23.1	128	139	144	12	109
Oak	369	22.8	135	143	148	14	101
Alder	165	10.3	121	134	139	11	82
Poplar	108	6.8	119	124	130	8	73
Accacia	154	9.6	123	137	146	12	93
Pine	84	5.3	134	145	152	16	61

\* Length and diameter of wood log : 20cm x 13~15cm

BE : Biological efficiency(flesh mushrooms / dry substrate)×100 = %

DCI : Day required for colonization after inoculation

DPI : Day required for primordial formation after inoculation

DFD : Day required for fruitingbody development after inoculation

DCC : Day required for cropping cycle

IW : Individual weight

## 제4절 적요

꽃송이버섯의 재배방법에 따른 수량은 병재배로 재배하였을 때 356g/850ml  
으로, 봉지(pot)재배하였을 때의 810g/2500ml보다 더 높았다. 그러나 회수율은  
병(850ml)에 재배하였을 때 147.8%로 봉지(pot)에 재배하였을 때의 114.3%보  
다 높았다. 발이 유기시 균굽기는 하지 않은 것이 좋았으며 특히 병마개를 막  
아둔 상태에서 발이 시키는 방법이 수량도 가장 많고 생물적 효율도 높았다.  
꽃송이버섯의 원목재배 수종은 참나무, 오리나무, 포플러, 아카시아 원목 순으  
로 좋았다. 참나무원목은 수량이 1195.5g/0.1m<sup>3</sup>, 생물학적 효율이 17.3%, 초발  
이 소요일수는 69일, 개체중은 143g 이었다.

## 제5절 참고문헌

- Chen , Guo-Liang, 1992. studies on the cultivation and on the medicinal efficacy of *Hericium ernaseus*. Translation. The edible Fungi research institute of the Shanghai Academy of Agricultural Science, China.
- Huguang, p. 1992. High yield and quality cultivation of *Hericium ernaseus* under new technology(sic.), Edible Fungi of China, Vol:II, No, 40:40-43; No. 5:29-30
- Ying, Jianzhe, 1987. Icones of medicinal fungi. Science press, Beijing
- Stamets. P. 1993. Growing gourmet and medicinal mushrooms, pp. 387-394.

## 제5장 꽃송이버섯 성분 및 함량 분석

### 제1절 재료 및 방법

본 실험에 사용한 꽃송이버섯은 하나바이오텍(주)에서 재배한 것을 입수하였다. 꽃송이버섯의 추출은 열수 추출을 하였으며 실험에 따라 에탄올 침전을 실시하였다.

### 제2절 일반성분 분석

#### 1. $\beta$ -Glucan 함량 분석

꽃송이버섯의 정제 방법에 따른 글루칸의 함량을 비교하기 위해 꽃송이버섯과 열수 추출물, 열수 추출 후 에탄올 침전물 등으로 추출하여  $\beta$ -Glucan 함량을 분석하였다. 특히, 특허출원중인 "나노나이프를 이용한 저온추출법에 의한 꽃송이버섯의 베타글루칸 추출법"을 이용하였다.

## 2. 당 분석

꽃송이버섯의 당을 분석하기 위하여 샘플을 열수 추출 후 에탄올 침전을 실시하였으며 세종대학교 탄수화물 연구소에 의뢰하여 BIO-LC를 통해 측정하였다.

## 3. 구성아미노산 분석

꽃송이버섯의 구성아미노산을 분석하기 위하여 꽃송이버섯과 꽃송이버섯 열수 추출 후 에탄올 침전물을 가지고 구성아미노산을 분석하였다.

실험은 한국기초과학지원연구원 부산지소에서 하였으며 자동 아미노산 분석기를 이용하여 분석하였다.

## 4. Protein 함량 분석

꽃송이버섯 추출물의 protein 함량을 분석하기 위하여 Brad-ford 방법을 이용하여 분석하였다.

## 5. C-NMR 분석

서울대학교 천연물과학연구소에서 300MHz 로 C-NMR 분석하였다.

## 6. H-NMR 분석

서울대학교 천연물과학연구소에서 300MHz로 H-NMR 분석하였다.

## 7. IR 분석

서울대학교 천연물과학연구소에서 IR-200으로 분석하였다.

## 8. M.W

꽃송이버섯 추출물의 분자량을 알아보기 위하여 HPLC-GPC를 이용하여 분석하였고, standard curve는 분자량을 알고 있는 hyaluronic acid를 이용하여 측정하였다.



### 제3절 결과 및 고찰

#### 1. $\beta$ -Glucan 함량 분석

꽃송이버섯 생버섯을 특허제법으로 열수 추출한 후, 초음파소 세포벽을 파쇄한 후, 동결건조한 분말의 베타글루칸 함량은 79.11%, 꽃송이버섯을 열수로 추출한 상등액은 약 38%, 상등액을 에탄올 추출물은 약 40%, 추출 후 침전물은 63% 정도의  $\beta$ -Glucan 함량을 나타내었다.

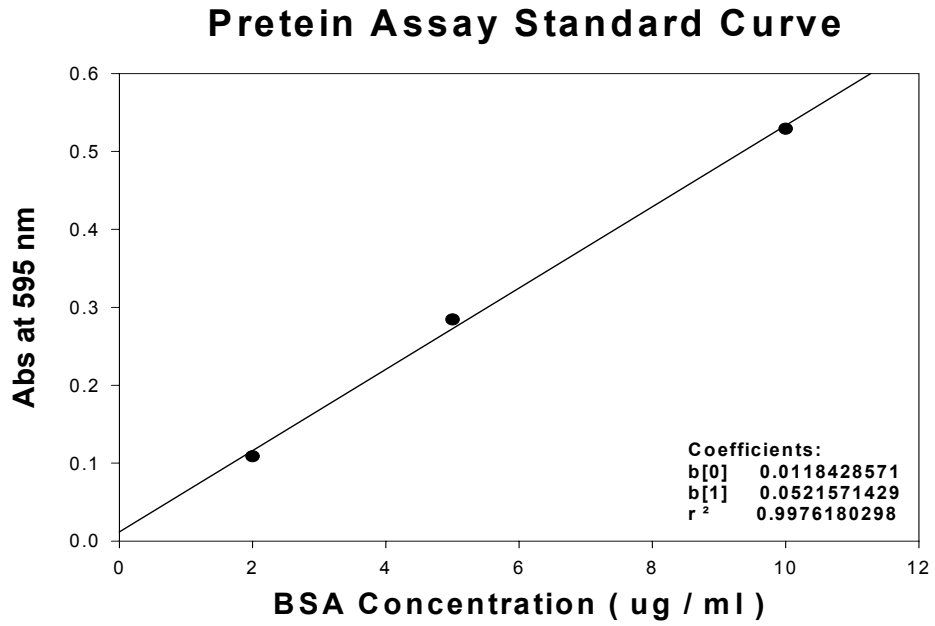
<표 1.> 꽃송이버섯 추출별  $\beta$ -Glucan 함량분석

샘플명	Total Glucan	$\alpha$ -Glucan	$\beta$ -Glucan	비고
1) 꽃송이버섯 추출 상등액	45.39 %	7.61 %	38.32 %	
2) 꽃송이버섯 상등액 농축액	45.89 %	7.57 %	62.94 %	
3) 꽃송이버섯 추출 pellet	65.29 %	2.35 %	잘못된 계산식 %	
4) 꽃송이버섯 1차 열수추출 후, 동결건조 분말	79.52 %	1.69 %	79.11 %	특허출원
5) 꽃송이버섯 1차 추출 투석 후 에탄올 침전	60.04 %	20.54 %	39.5 %	
6) 꽃송이버섯 2차 추출 투석 후 에탄올 침전	53.83 %	19.27 %	34.56 %	
7) 꽃송이버섯 고분자 투석 후 에탄올 침전	68.55 %	1.92 %	66.63 %	

\* 4)를 제외한 모든 시료는 건조버섯이며, 4)의 경우는 생버섯을 특허제법으로 추출한 후, 초음파로 세포벽을 파쇄한 경우의 데이터임.

## 2. Protein 분석

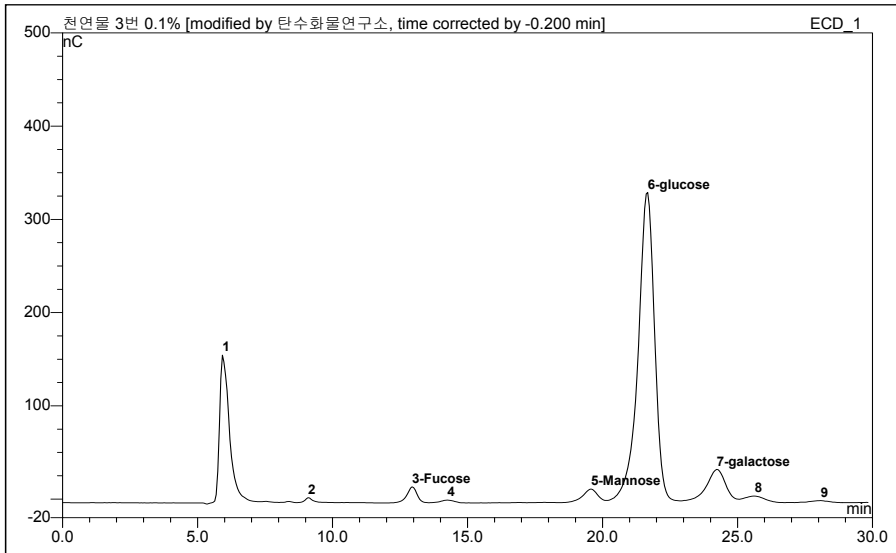
꽃송이버섯 추출물을 BSA standard curve에 대입한 결과 약 2.05%의 프로테인 함량이 측정되었다.



### 3. 구성 아미노산 분석

Aspartic acid	10.4	14.0
Threonine	4.8	5.6
Serine	5.5	6.9
Glutamic acid	11.9	13.6
Proline	4.3	2.5
Glycine	8.4	10.3
Alanine	10.0	13.2
Cystine	0.4	0.1
Valine	7.0	7.8
Methionine	1.2	0.7
Isoleucine	4.5	3.0
Leucine	8.0	9.3
Tyrosine	1.5	0.7
Phenylalanine	10.1	3.2
Histidine	2.2	1.1
Lysine	5.9	6.2
Arginine	3.7	1.8

4. 꽃송이버섯의 당분석 (꽃송이버섯 1차 추출후 에탄올 침전물 )

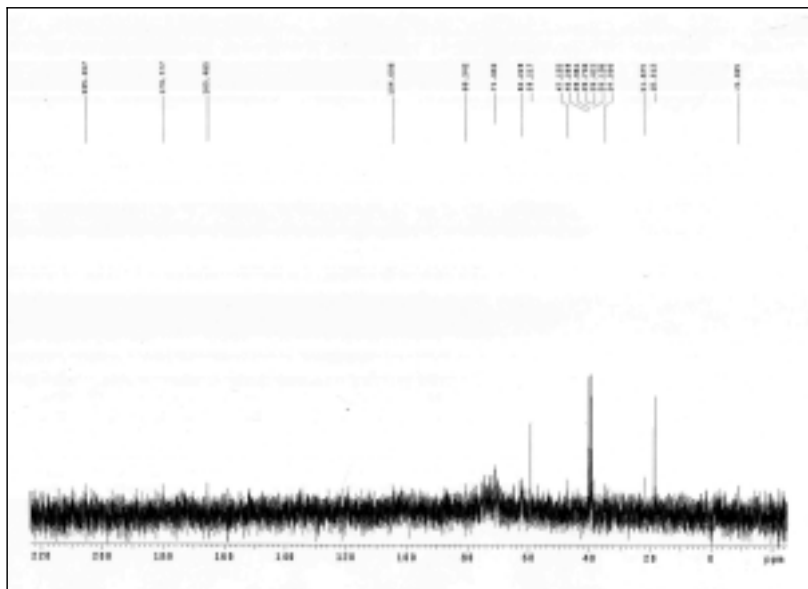


	Min		nC	nC*min	%		
1	5.92	n.a.	159.018	67.745	19.23	n.a.	BMB*
2	9.09	n.a.	5.290	1.969	0.56	n.a.	BM *
3	12.95	Fucose	17.177	7.657	2.17	0.0019	MB*
4	14.25	n.a.	2.887	1.615	0.46	n.a.	Rd
5	19.58	Mannose	14.070	8.982	2.55	0.0026	BM
6	21.67	glucose	331.456	234.765	66.63	0.0231	Mb
7	24.22	galactose	32.772	24.689	7.01	0.0064	bMb
8	25.64	n.a.	4.640	3.273	0.93	n.a.	bMB
9	28.08	n.a.	2.118	1.664	0.47	n.a.	BMB
Total			569.429	352.359	100.00	0.034	

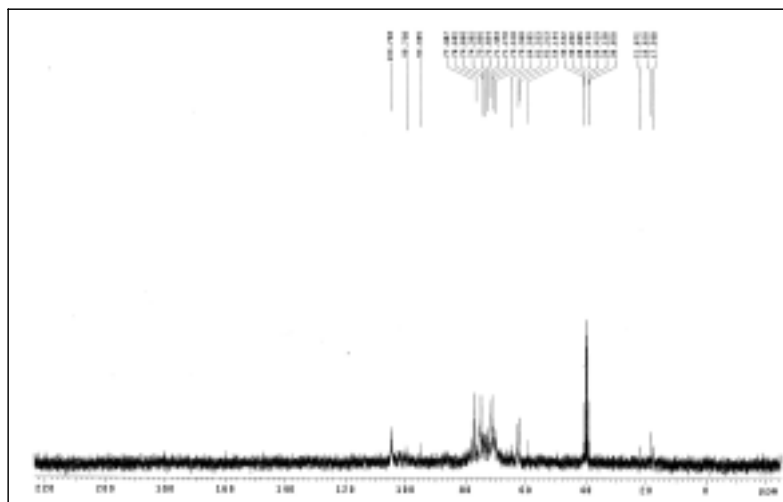
5	19.58	Mannose	7.64 %
6	21.67	glucose	67.9 %
7	24.22	galactose	18.8 %
<b>Total:</b>			100 %

## 5. C-NMR 분석

가. 꽃송이버섯 1차 추출후에 탄을 침전물

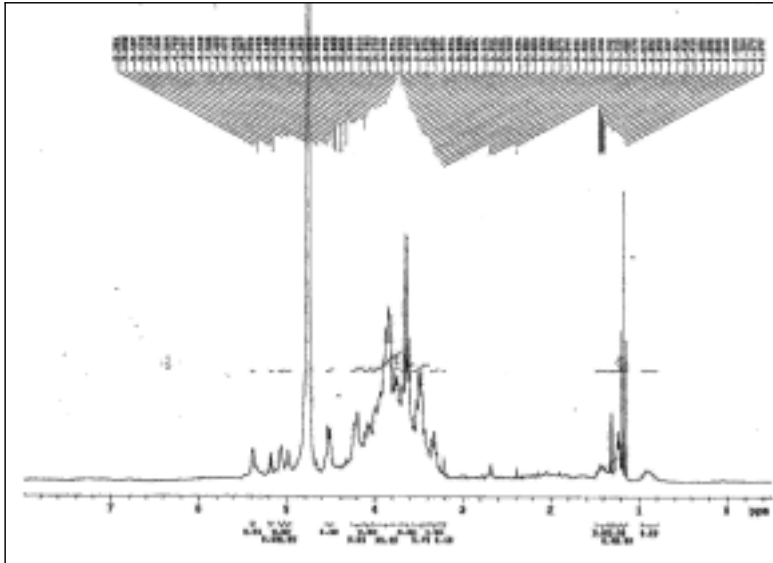


나. 꽃송이버섯 추출후 고분자에 탄을 침전물

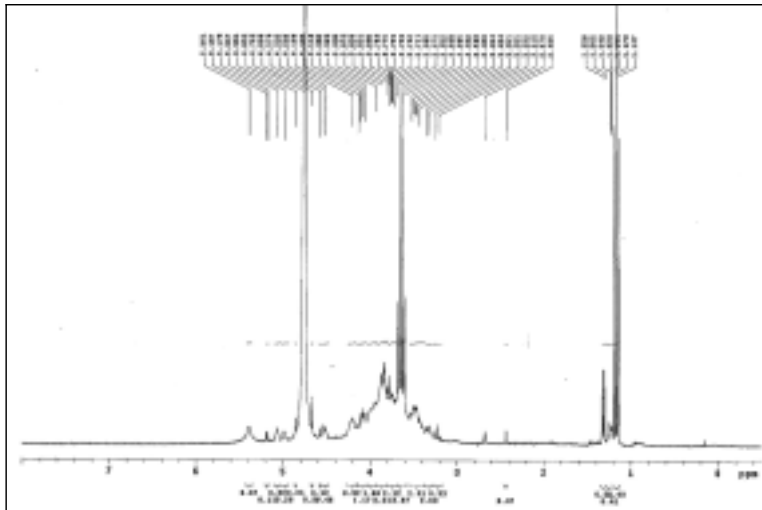


## 6. H-NMR 분석

가. 꽃송이버섯1차추출후에탄올침전물

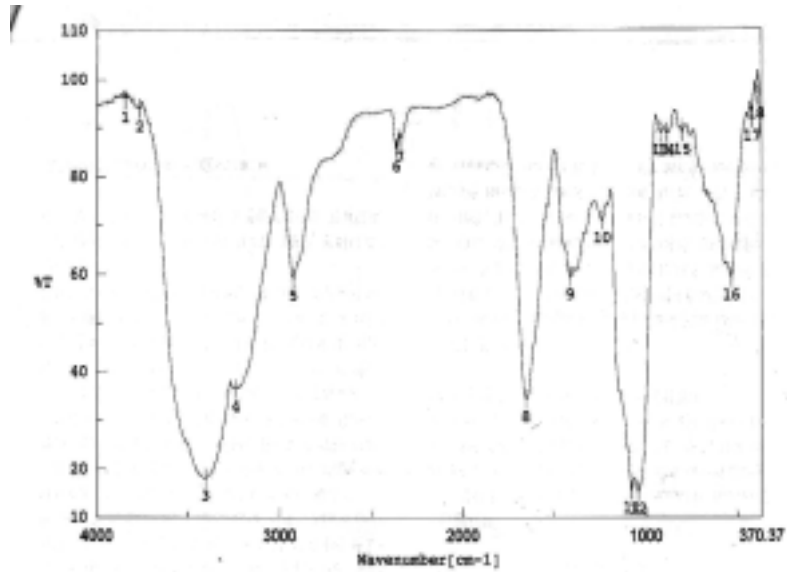


나. 꽃송이버섯고분자에탄올침전물

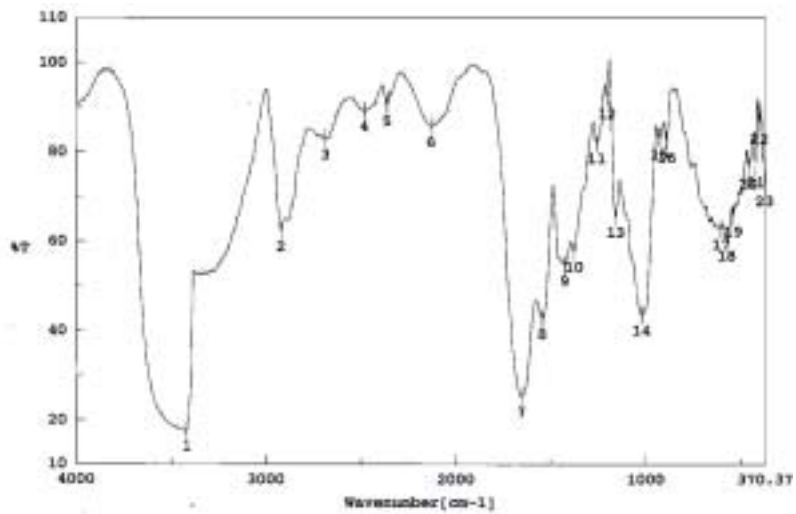


## 7. IR 분석

가. 꽃송이버섯1차추출후에탄올침전물

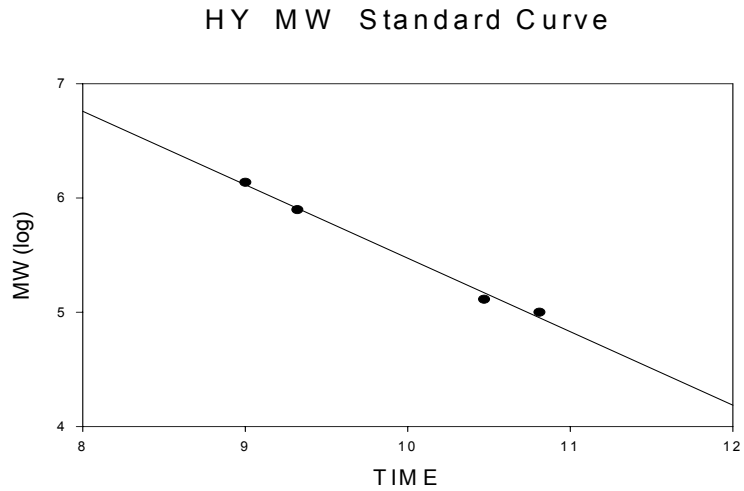


나. 꽃송이버섯고분자에탄올침전물



## 8. Molecular Weight 측정

꽃송이버섯 1차 추출물의 Retention Time은 9.63이며, 평균분자량은 510,000으로 측정되었다.



HY 100K	10.69	100,000	
HY 130K	10.47	130,000	
HY 790K	9.32	790,000	
HY 1390K	9.0	1,390,000	

HY 1390K	9.0	1,390,000	
----------	-----	-----------	--



## 제4절 결론

꽃송이버섯의 추출물은 베타글루칸이 약 40%정도를 가지고 있으나, 특허제법 (나노나이프를 이용한 저온추출법으로, 꽃송이버섯의 베타글루칸 추출법)의 이용 및 초음파를 이용할 경우의 꽃송이버섯의 베타글루칸 함량은 79%이었다.

평균분자량은 510,000이며 당분석을 통해 Fucose(5.58%), Mannose(7.64%), Glucose(67.9%), Galactose (18.8%) 의 함량을 가지며 glucose가 가장 많이 분포 함을 알 수 있었다.

또한, C-NMR, H-NMR, IR 분석을 통해 베타(1-3)글루칸을 확인할 수 있었으며, 단백질 함량은 2% 정도임을 알 수 있었다.

# 제6장 꽃송이버섯 다당체의 효소처리 및 면역활성에 관한 연구

## 제1절 서론

항암면역활성을 지닌 버섯들의 활성성분은 다당체(polysaccharide) 또는 단백다당체(protein-polysaccharide, proteoglycan, protein-bound polysaccharide)로 알려져 있다. 이들의 다당체 부분은 전적으로 포도당으로 이루어진 glucan 이거나 혹은 포도당을 주요 당으로 하되 mannose, galactose, xylose 등 여타 단당류가 끼어 있는 heteroglucan으로 되어 있기도 하다. 꽃송이버섯이나 표고버섯 등은 포도당만으로 이루어진 glucan을 갖는 대표적인 예이고 운지버섯 등은 단백질이 결합된 heteroglucan이 활성성분으로 알려진 대표적인 예이다. 꽃송이버섯이나 표고버섯의 glucan은 구성요소인 포도당의 결합 방식이 주로  $\beta$ 1 $\rightarrow$ 3 결합으로 되어 있어서 " $\beta$ 1 $\rightarrow$ 3 glucan" 또는 " $\beta$ -glucan"으로 불려지기도 한다.

이들  $\beta$ -glucan은 통상적으로 분자량이 수십만 내지 수백만에 이를 정도로 거대한 분자이기 때문에  $\beta$ 1 $\rightarrow$ 3-endoglucanase를 이용하여 적당한 크기로 절단할 경우 한 개의 거대한  $\beta$ -glucan 분자가 몇 개의 보다 작은  $\beta$ -glucan으로 나누어짐으로써 동일 중량의 시료가 몇배 증가된 mole 농도를 갖게 됨으로써 이에 따라 증가된 생리활성을 나타낼 수 있을 것으로 기대된다. 따라서 본 연구에서는 꽃송

이버섯 다당체 시료를  $\beta$ 1→3-endoglucanase로 처리하여 그 절단 효율을 확인 및 생리활성의 증가 여부를 확인코자 하였다.

## 제2절 재료 및 방법

### 1. 꽃송이버섯 추출물

신선한 꽃송이버섯 자실체에 3배량의 증류수를 가하고 균질화(homogenization)한 후 고압멸균기를 이용하여 110°C에서 90 분간 추출을 시행하였다. 이를 흡인여과하고 -70°C의 deep freezer에서 완전히 동결시킨 후 동결건조함으로써 건조분말 상태의 꽃송이버섯 열수추출물을 획득하였다.

### 2. 효소 및 기질

$\beta$ 1→3-endoglucanase로 잘 알려지고 널리 사용되고 있는 laminarinase (L-9259) 및 그 기질 laminarin(L-9634-1G, from *Laminaria digitata*)을 Sigma 사로부터 구입하여 사용하였다.

### 3. 효소처리 및 후처리

0.1M citrate buffer (pH 5.0)에 꽃송이버섯 다당체 및 laminarin을 17.7 mg/ml 농도로 용해시킨 후 시료 30mg 당 1 unit의 laminarinase (10 unit/ml in 0.1M citrate buffer, pH 5.0)를 가하여 37°C에서 반응시켰다. 사용한 laminarinase는

laminarin을 기질로 할 경우 pH 5.0, 37°C에서 1분간 1 mg의 환원당(포도당)을

-99-

생성시키는 것으로 알려져 있기 때문에 이러한 조건은 30분 만에 기질 모두를 포도당으로 환원시킬 수 있는 것으로 계산되었다. 효소를 가하고 정해진 시간 (0분, 1분, 10분, 30분, 60분, 90분) 마다 시료를 5 ml 씩 취해 내어 끓고 있는 수욕 상에서 10분간 가열, 반응을 종결시킨 후 투석막(Sigma, Molecular weight cut off: 12,000)에 넣고 증류수를 갈아가며 3일간 투석하였다. 투석 종결 후 내액의 중량을 측정하였으며 동결건조하여 무정형 분말상태의 효소처리 시료 획득하였다.

#### 4. 총당 및 환원당 분석

시료의 총당 함량 및 환원당 함량은 각각 anthrone 시약 및 DNS (dinitrosalicylic acid) 시약 (Miller, 1959)을 이용하여 보고된 방법에 따라 비색 정량하였다.

#### 5. 실험동물

약 4 주령의 SPF (specific pathogen free) ICR계 생쥐 및 BALB/c계 생쥐 암컷을 대한바이오링크로부터 구입하여, 1주일 이상 안정화시킨 후 실험에 사용하였다. 사료와 물은 제한 없이 공급하였고, 실온은  $22\pm 2$  °C, 습도는 50 %를 유지

하였으며 하루에 12 시간씩 조명을 시행하였다.

-100-

## 6. 세포 배양 배지

RPMI 1640 (Sigma, Missouri, USA) 분말배지를 주사용 증류수 (중외제약)에 용해시킨 후 1 M HEPES buffer 10 ml, sodium bicarbonate 2 g, penicillin-streptomycin solution (Sigma) 10 ml, 56°C에서 30 분간 열처리하여 보체를 불활성화 시킨 fetal bovine serum (Hyclon, Utah, USA) 10 % 등을 첨가하여 세포배양 배지로 사용하였다.

## 7. *in vitro* Lymphoblastogenesis 실험

시료의 *in vitro* 면역활성 중 lymphoblastogenesis 효과를 확인하기 위하여 이미 보고된 방법에 따라 BALB/c 마우스 비장 림프구를 분리, 배양하며 실험하였다. 즉, 실험동물의 비장을 적출하여 나일론 그물망 (Cell Strainer, Beckton-Dickinson)을 통과시켜 단세포로 분리한 후 세포배양 배지로 2회 세척하고 hemocytometer를 이용하여 계수한 후  $2 \times 10^6$  cell/ml로 희석하고, U-bottomed 96-well cultureplate (Beckton-Dickinson)에 100  $\mu$ l씩 분주한 후 농도를 달리한 시료 용액 100  $\mu$ l를 가하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 상태에서 48 시간 동안 배양하였다. 시료의 최종 농도는 50~200  $\mu$ g/ml이 되도록 하였다. 배양된 세포는 다음 항에 따라 유세포분석법으로 분석하여 *in vitro* lymphoblastogenesis 효과를

확인하였다.

-101-

## 8. 비장 백혈구의 유세포분석

시료를 가하고 배양한 비장 백혈구 현탁액을 취해 propidium iodide (PI, 최종 농도: 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )를 가하고, FACScalibur (Beckton-Dickinson) 유세포분석기(flow cytometer)를 이용하여 분석하였다. 즉, 자료 취합시 forward scatter (FSC)/side scatter (SSC) dot plot에서 FSC threshold를 설치하여 cell debris를 제거하고 세포 10,000개에 대한 자료를 취합하여 분석하였다. 자료분석에서는 forward scatter (FSC)/side scatter (SSC) dot plot에서 lymphocyte을 포함하는 gate을 설정하고 forward scatter (FSC)/fluorescence 3 (FL3) dot plot에서 FL3-음성 세포(viable cell)만을 포함하는 gate을 설정한 후 이들 두 gate을 모두 만족시키는 세포들만 FSC histogram에 나타내어 FSC 평균값을 분석하였고 또한 FSC 값이 상대적으로 큰 세포를 포함하도록 marker 1 (M1)을 설정하여 % M1을 구하였다.

### 제3절 결과 및 고찰

#### 1. 효소처리 꽃송이버섯 다당체의 수율 및 특성

신선한 꽃송이버섯 자실체로부터 제조한 열수추출물 및 laminarin을  $\beta$ 1 $\rightarrow$ 3-endoglucanase 활성을 갖는 laminarinase로 처리한 후 citrate buffer 및 저분자 물질을 제거하기 위하여 투석을 시행하고 동결건조하여 얻어진 효소처리 꽃송이버섯 다당체 및 효소처리 laminarin의 수득량, 수율 등은 Table 1에 나타낸

Table 1. 효소처리에 꽃송이버섯 다당체 및 laminarin 수율

처리 시간(분)	꽃송이버섯			laminarin		
	출발량 (mg)	수득량 (mg)	%수율	출발량 (mg)	수득량 (mg)	%수율
0	83.3	37.6	45.1	83.3	52.9	63.5
10	83.3	38.2	45.8	N.D.	N.D.	N.D.
30	83.3	39.7	47.6	83.3	44.9	53.9
60	83.3	38.6	46.3	N.D.	N.D.	N.D.
90	166.7	80.2	48.1	83.3	25.6	38.7

바와 같다.



효소를 가하고 즉시 끓여 효소작용을 차단한 후 동일한 과정을 거쳐 얻어진 laminarin 시료는 83.3 mg의 출발량 으로부터 52.9 mg (수율 63.5%)의 최종 결과물이 얻어졌다.

이처럼 효소의 작용을 즉시 차단하였음에도 불구하고 수율이 63.5%에 불과한 이유는 laminarin의 평균 분자량이 6,000 정도여서 투석 과정에서 상당량 제거되었기 때문으로 판단된다.

한편 효소와의 반응을 30분 및 90분 지속시킨 경우, 최종산물이 각각 44.9 mg (수율 53.9%) 및 25.6 mg (수율 38.7%)이 얻어져 laminarinase가 효과적으로 작용했음을 알 수 있었다.

그러나 꽃송이버섯 열수추출물에 laminarinase를 가하고 즉시 끓여 반응을 중지시킨 시료 즉 0분 처리 시료의 최종 결과물은 37.6 mg이 얻어져서 출발량 83.3 mg 대비 45.1%의 수율을 나타내었다. 꽃송이버섯 열수추출물의 경우 0분 처리 시료의 수율이 낮은 이유는 시료에 저분자 물질이 많이 포함되어 있기 때문으로 사료된다. 즉 제조 과정에서 알콜침전이나 투석과정이 전혀 없었고 열수추출물 그 자체를 동결건조시켜 얻어진 시료이므로 당연히 수용성 저분자 물질이 다량 포함되어 있을 것으로 보이며 따라서 투석 과정을 통해 이들이 제거됨으로써 수율이 현저히 낮아지는 것은 당연한 결과로 볼 수 있다. 그러나 90분까지 효소 처리를 하더라도 0분 처리와 비교할 때 수율의 감소가 전혀 나타나지

않은 점은 laminarin의 경우와 상이한 점이다.

이처럼 수율 감소가 일어나지 않은 이유는 2가지로 추정이 가능한데 첫째는, laminarinase가 꽃송이 다당체를 절단하지 못할 경우이고 둘째는 laminarinase가 꽃송이 다당체를 절단하더라도 분자량이 투석막을 빠져 나가지 못할 정도로 크게 절단하기 때문으로 생각할 수 있다. 이중 가능성이 높은 것은 둘째 경우로 보여진다. 그 이유는 버섯 다당체들의 평균분자량은 수십만 내지 간혹 백만을 넘는 경우도 있기 때문에 laminarinase로 분절 되더라도 그 크기가 laminarin의 경우 보다는 매우 클 것이기 때문이다. 또한 시료 용액들은 투석과정에서 용적이 상당히 증가되는 현상을 보이는데 이는 투석막 내부 물질이 삼투압을 나타내기 때문이다.

따라서 동일 중량의 시료라도 laminarinase 등의 효소 작용으로 절단될 경우 분자(절편)의 수가 증가되어 용적의 증가는 더욱 현저하게 나타날 것이다. 본 연구에서도 꽃송이 추출물의 경우 0분 처리 시료 5.0 ml이 투석 중 6.6 ml까지 약 1.3배 용적이 증가된 반면 30분 및 60분 처리 시료는 5 ml이 각각 8.2 ml 및 8.5 ml로 증가되어 1.6배 이상으로 증가되었다(자료 제시 생략). 이는 laminarinase가 효과적으로 작용했음을 뒷받침하고 있다. 이에 반해 laminarin의 경우에는 용적 증가가 관찰되지 않았는데 이는 laminarin이 꽃송이버섯 다당체와는 달리 분자량이 작은 절편으로 잘려져서 투석막을 빠져 나갔기 때문으로 추정된다. 한편 효소

처리 꽃송이 버섯 다당체 시료(별첨 Figure 1)는 그 용액을 진탕한 후 방치하면 거품이 수초 이내에 소멸되는 등 비처리 시료와 매우 상이한 물리적 특성을 지니고 있다. (별첨 Figure 2).

## 2. 효소처리 꽃송이 버섯 다당체의 환원당 함량

$\beta$ -glucan과 같은 다당체를 구성하는 포도당 분자들은 대부분 또 다른 포도당 분자와 앞뒤로 연결되어 있어서 free carbonyl group을 갖지 않게되고 따라서 단일 분자로서의 포도당과 달리 환원당으로 작용하지 못한다. 다만 긴 사슬 제일 앞쪽 끝에 존재하는 포도당은 free carbonyl group을 가지고 있어서 이들은 환원당으로의 기능을 나타내게 된다. 한편 laminarinase와 같은 $\beta$ 1 $\rightarrow$ 3-endoglucanase를 이용하여  $\beta$ -glucan 분자를 분해하면 긴 사슬의 중간 부분이 절단되어 결과적으로 새로운 환원당 부위가 생기게 된다. 따라서 이러한 환원당 함량을 분석하면  $\beta$ -glucan의 사슬 길이를 간접적으로 추정할 수 있고 laminarinase 등의  $\beta$ 1 $\rightarrow$ 3-endoglucanase가 성공적으로 작용하였는지를 평가할 수도 있다.

이러한 맥락에서 본 연구자는 laminarinase로 처리한 꽃송이버섯 다당체 및 laminarin 중의 환원당 함량을 DNS 시약을 이용, 포도당을 표준당으로하여 비색정량법으로 정량하였다. 그 결과, Table 2에 나타낸 바와 같이, laminarin은 환원당 함량이 0분 처리 시료의 경우 1.24%에서 30분 및 60분 처리시 각각 1.41%

Table 2. Contents of reducing sugars of laminarinase-treated polysaccharide of *Sparacia crispa* and laminarin .

Treatment (min)	Polysaccharide of <i>S. crispa</i>		Laminarin	
	Reducing sugar (%) <sup>a</sup>	% Increase of reducing sugar <sup>b</sup>	Reducin g sugar (%)	% Increase of reducing sugar
0	3.22	-	1.24	-
10	3.26	4.6	N.D.	N.D.
30	3.35	7.4	1.41	13.9
60	3.67	17.8	N.D.	N.D.
90	3.80	21.9	1.96	58.1

a: The content of reducing sugars was determined according to Miller (1959) by colorimetric method using dinitrosalicylic acid (DNS) reagent.

b: % Increase in reducing sugar was calculated according to the following equation.

$$\% \text{ Increase} = (\text{RSCt} - \text{RSCu}) / \text{RSCc} \times 100$$

where RSCt and RSCc, respectively, is the % reducing sugar content of the treated sample and that of untreated sample.

-106-

및 1.96%로 증가하였다. 이는 0분 처리 시료의 환원당 비율 1.24%에 비해 각각 13.9% 및 58.1% 증가한 것을 의미한다. 한편 꽃송이버섯의 경우 0분 처리 시료의 환원당 함량이 3.22%로 나타난 것은 laminarin에 비해 분지가 많아 사슬의 제일 앞부분에 존재하는 포도당의 비율이 상대적으로 높음을 암시하고 있다. 한편 laminarinase 처리에 의해 환원당 비율이 90분 처리 시료의 경우 최고 3.80%까지 높아졌지만 0분 처리 시료의 환원당 비율에 비해 21.9% 증가에 불과하였다.

이는 laminarin 보다는 꽃송이 다당체가 많은 가지를 가지고 있어서

laminarinase의 접근에 방해를 주고 있거나 또는 다른 이유로 laminarinase에 저항하기 때문으로 보여진다. 따라서 꽃송이버섯 다당체를 보다 효과적으로 분절할 수 있는 다른 방법의 개발이 절실히 요구되고 있다.

### 3. 효소처리 꽃송이버섯 다당체의 in vivo 면역활성

꽃송이버섯 다당체 (효소처리 및 비처리 시료)를 ICR 마우스 복강에 4일간 매일 1회 복강 주사한 후 다음날 실험동물을 희생시켜 체중, 비장 중량을 측정하고 적출한 비장을 단세포로 분리하여 유세포분석기로 분석하였다.

그 결과 Table 3에 나타낸 바와 같이 실험동물의 체중은 실험군 간에  $p < 0.05$  수준에서 통계적 유의차가 없었으나 비장 중량은 효소처리 시료 투여군에 있어 고농도는 물론 저농도 투여군에서도 모두 대조군에 비해 유의적으로 증가하였다. 비장 중량의 증가는 투여한 물질이 일단 면역계에 작용함으로써 얻어진 결과이기 때문에 효소 처리 시료가 면역계에 강력한 효과를 나타냄을 말해주고 있다.

한편 효소 비처리 시료 투여군에서는 고농도 (200 mg/kg) 투여군만 대조군과 유의적인 차이를 보였다. 이러한 차이는 앞의 두 항에서 살핀 바와 같이 laminarinase에 의해 분절된 꽃송이버섯 다당체가 효소 처리하지 않은 다당체 시료 보다 면역활성이 뛰어난을 입증하는 결과이다.

한편 비장내 백혈구들을 분리하여 유세포분석기로 분석한 결과에서 이들 두

Table 3. *in vivo* Immunostimulatory activities of laminarinase-treated polysaccharide fraction of *Sparacia crispa* in ICR mice.

stimulant	dose (mg/kg, ip)	No. of mice	body weight (g)	spleen weight (mg)	SI	FSC <sup>a</sup> of the splenocytes
control	-	10	24.14±0.95 <sup>b</sup>	114.5±19.8	-	313.60±5.56
SCE <sup>c</sup>	100	7	24.79±0.84	144.9±21.3**	1.27	325.52±4.48*
	200	8	24.09±1.56	142.7±17.4**	1.25	330.74±6.56*
SC <sup>d</sup>	100	8	24.60±1.54	128.8±27.7	1.12	327.66±8.02*
	200	8	24.21±0.62	157.3±17.4***	1.37	330.77±4.68*

a: FSC = forward scatter. FSC value was flow cytometrically analyzed using a FACSCalibur flow cytometer.

b: mean± S.D.

c: SCE = Enzyme (laminarinase)-treated hot water extract of *Sparacia crispa*.

d: SC = hot water extract of *Sparacia crispa*.

\*, \*\*, \*\*\*: respectively, significant at p<0.05, p<0.01, and p<0.001.

시료 모두가 세포직경을 대변하는 FSC 값을 유의적으로 증가시켰다.

#### 4. 효소처리 꽃송이버섯 다당체의 *in vitro* 면역활성

효소처리 및 비처리 꽃송이버섯 다당체의 면역활성을 비교확인하기 위하여 BALB/c 마우스 비장 백혈구에 시료를 가하고 48시간 배양 후 유세포 분석법으로 비장 백혈구의 FSC 값과 Lymphoblast 비율을 분석하였다. 그 결과 Table 4에 나타낸 바와 같이 laminarinase처리 꽃송이버섯 다당체는 100 및 200 µg/ml 농도에서 전체 비장 백혈구의 FSC 값을 유의적(p<0.05)으로 증가시켰으나 비처

리 시료는 유의적인 증가를 가져 오지 않았다. lymphoblast 비율을 나타내는

%M1 값도 효소 처리 시료 (200  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )에서만 유의적인 증가를 나타내었다.

Table 4. *in vitro* Lymphblastogenic effect of laminarinase-treated polysaccharide of *Sparacia crispa*

stimulant	conc. ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	FSC <sup>a</sup>	% M1 (lymphoblasts)
control	-	287.43 $\pm$ 4.67 <sup>b</sup>	10.87 $\pm$ 1.47
SC <sup>c</sup>	50	286.99 $\pm$ 0.55	11.41 $\pm$ 0.30
	100	291.64 $\pm$ 4.47	11.98 $\pm$ 1.45
	200	288.02 $\pm$ 1.60	10.58 $\pm$ 0.47
SCE <sup>d</sup>	50	289.33 $\pm$ 2.05	11.25 $\pm$ 0.08
	100	296.30 $\pm$ 3.61*	12.83 $\pm$ 1.08
	200	300.76 $\pm$ 0.67**	13.86 $\pm$ 0.12**

a: FSC = forward scatter

b: mean $\pm$  S.D.

c: SC = hot water extract of *Sparacia crispa*.

d: SCE = enzyme (laminarinase)-treated hot water extract of *Sparacia crispa*.

\*, \*\*: respectively, significant at  $p < 0.05$ , and  $p < 0.01$ .

## 제4절 결론

1. 꽃송이버섯 다당체를  $\beta$ 1 $\rightarrow$ 3-endoglucanase의 일종인 laminarinase로 부분 분절하여 환원당 함량을 21.9% 증가 시킬 수 있었다.
2. laminarinase로 처리한 꽃송이버섯 다당체는 *in vitro* lymphoblastogenesis 효과 및 *in vivo* 비장 중량 증가 효과 등에서 비처리 시료보다 면역활성이 높았다.
3. 꽃송이버섯 다당체의 항암면역활성을 보다 증강시킬 수 있는 보다 저렴하고 효과적인 수단의 개발이 절실히 요구되었다.



## 제5절 참고문헌

- 1). Miller, G.L., Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal Chem.*, **31**: 426 (1959).
- 2) Read, SM, Currie, G, and Bacic, A., Analysis of the structural heterogeneity of laminarin by electrospray-ionisation-mass spectroscopy. *Carbohydr. Res.*, **281**: 187 (1996).
- 3) Chihara, G., Hamuro, J., Maeda, Y. Y., Arai, Y. and Fukuoka, F., Fraction of the polysaccharides with marked antitumor activity, especially lentinan, from *Lentinus edodes* (an edible mushroom). *Cancer Res.*, **30**, 2776 (1970).
- 4) Tsukagoshi, S. and Ohashi, F., Protein bound polysaccharide preparation, PS-K, effective against mouse sarcoma 180 and rat ascites hepatoma by oral use. *Gann.* **65**, 557 (1974).
- 5) Tsukagoshi, S. Hashimoto, Y., Fujii, G., Kobayashi, H. Nomoto, K. and Orita, K.: Krestin (PSK). *Cancer Treat. Rev.* **11**, 131 (1984).

6) Chung, K. S., Kim, S. B. and Chung, S. H., Immunoactivities of the Protein-polysacchrides of the Tips of the Growing Carpophores of

-112-

*Ganoderma lucidum*. *Yakhak Hoeji*, **41**, 105 (1997).

7) Chung, K. S. and Kim, J. H.: Antitumor and immunomodulatory activity of *Lycoperdon pedicellatum*. *Yakhak Hoeji*, **44**, 463 (2000).

8) Oh, J. Y. and Chung, K. S.: Flow Cytometrical Analysis of the Antitumor and Immunomodulatory Activities of GLB-A and GLB-B, the Protein-polysaccharide Fractions of the Growing Tips of *Ganoderma lucidum*. *Yakhak Hoeji*, **42**, 487 (1998).

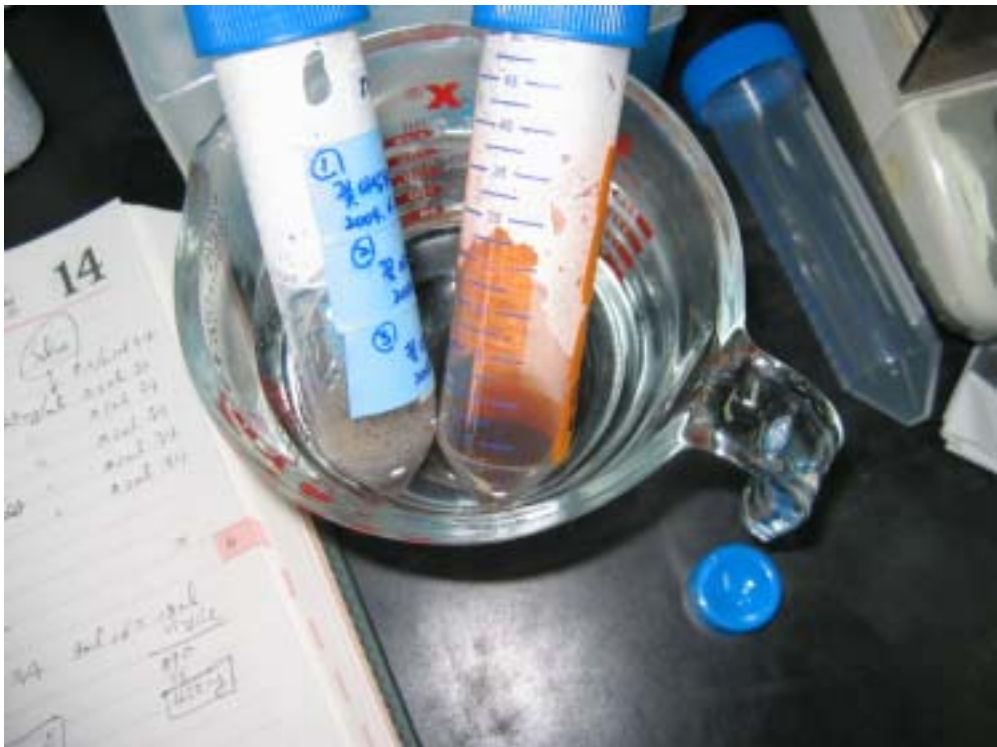
9) Ormerod, M. G. (ed.), "*Flow cytometry : A Practical Approach*", pp 75~76, IRL press, Oxford (1990).



Figure 1. Laminarinase-treated and untreated polysaccharides of *Sparacia crisper*.



Figure 2. Laminarinase-treated (right) and untreated (left) polysaccharide of *Sparacia crispera* solutions. The laminarinase-untreated sample shows lots of bubbles when shaken, while the bubbles of the laminase-treated sample disappeared in seconds.



## 제7장 꽃송이버섯 분말의 경구투여 동물실험

### 제1절 연구개요

1. 시험제목 : C<sub>57</sub>BL Mouse에 있어 시험물질 꽃송이버섯의 항암효능에 관한

연구

2. 시험번호 : 2003-01(A)

3. 시험목적 : 꽃송이버섯에 대한 암 증식 억제효과에 대한 정보를 얻기 위하여

본 시험을 실시하였다.

#### 3. 시험일정

가. 동물입수일 : 2003년 04월 07일

나. 검역·순화기간 : 2003년 04월 07일~2003년 04월 14일

다. 투여일 : 2003년 04월 15일

라. 실험종료일 : 2003년 05월 12일

마. 최종보고서 제출일 : 2003년 06월 10일

#### 4. 시험의뢰자

가. 명 칭 : 하나바이오텍(주)

나. 소재지 : 경기도 파주시 탄현면 성동리 75-1

다. 대표자 : 최 승 오

라. 의뢰책임자 : 고 인 수

마. 연락처 : Tel; (031) 946-9140

#### 5. 시험기관

가. 명 칭 : 한국한의학연구원

나. 소재지 : 서울시 강남구 청담동 129-11

다. 원 장 : 고 병 희

라. 연구책임자 : 마 진 열

## 제2절 요약

시험물질 꽃송이버섯 분말의 항암 효과를 조사하기 위하여 C57BL 마우스 수컷에 암세포주 0.1cc( $10^6$ cells)를 등배부에 접종 후, 0, 10, 100 및 1000mg/kg/day의 용량으로 각각 7마리씩 4주간 연속 경구 투여하고 사망률, 일반증상, 체중변화, 혈구검사, 생화학검사, 부검소견, 장기 및 암세포의 무게 변화를 관찰하였다. 이와 같이 시험한 결과는 다음과 같다.

- (1) 시험기간 중 사망동물은 N. C군에서 3례, P.C군 2례, T1군 2례, T3군에서는 2례가 각각 사망동물로 관찰되었다.
- (2) 생존 동물 중, 시험물질 투여와 관련된 일반증상은 나타나지 않았으며, 암세포 덩어리에 의한 빈혈(N.C군 100%, P.C군 80%, T1군 0%, T2군 40% 및 T3군 0%) 및 활동력감소(N.C군 100%, P.C군 80% 및 T2군 40%)가 육안으로 관찰되었다.
- (3) 체중변화에서는 꽃송이버섯 투여에 의한 변화가 관찰되지 않았으며 암세포 증식에 의한 체중변화는 N.C군에서 투여 2, 3주차에 유의성 있게 증가하였다.
- (4) 혈구검사는 음성 대조군에 비해 꽃송이버섯 모든 투여군에서 RBC, Hb, HCT 및 PLT가 통계적으로 유의성 있게 증가되었다.
- (5) C57BL Mouse에 암세포 피하 접종시 AST( $p < 0.01$ ), ALT( $p < 0.05$ ),



BUN( $p < 0.05$ ) 및 T. Cholesterol( $p < 0.01$ ) 량이 대조군에 비해 유의성 있게 증가하였으며, ALP는 감소( $p < 0.05$ )하였다. 이에 꽃송이버섯(10mg/kg/day 이상) 4주 연속 경구투여 시, 정상치에 가까워진 것을 알 수 있었다.

(6) 부검소견에서는 시험물질 꽃송이버섯에 의한 어떠한 소견도 관찰되지 않았다.

(7) 비장 및 암세포의 무게 변화는 암세포 투여 N.C군에서 유의성 있게 증가하였으나, 꽃송이버섯 10mg/kg/day 이상 투여 시, 감소하는 경향을 보였다.

이상의 실험 결과에서, 수컷 C57BL Mouse에 암 세포주 0.1cc( $10^6$  cells) 접종 후, 꽃송이버섯 분말을 4주간 연속 경구 투여시, 시험물질이 조혈작용 및 혈액생화학 변화에 영향을 미쳐 암 증식 억제작용에 일정부분 관여하여 시험기간 중, 사망률을 저하시킨 것으로 생각된다. 또한, Mouse 수컷에 4주간 연속 경구 투여시, 꽃송이버섯이 생체내에서 안전한 물질로 작용하는 것으로 사료된다.

### 제3절 시험물질 및 용매물질

#### 1. 시험물질

가. 명 칭 : 꽃송이버섯

나. 시험기관내 코드번호 : 2003-01

다. 로트번호 : 01-A

라. 입 수 일 : 2003년 03월 20일

마. 입 수 량 : 300 g

바. 외관 및 정상 : 유백색 분말

사. 보관조건 : 실온보관

아. 공 급 자 : 하나바이오텍

#### 2. 용매물질

가. 명 칭 : 주사용 증류수

나. 로트번호 : 없음

다. 공 급 자 : 중외제약 주식회사

## 제4절 재료 및 방법

### 1. 시험계

가. 종 및 계통 : C<sub>57</sub>BL Mouse

나. 공급원 : 샘타코 실험동물센터 (경기도 오산시 서량동 77-1)

다. 시험계의 선택이유

C57BL Mouse는 암 실험에 적당한 실험동물로서, 항암효과 동물시험에 널리 사용되고 있다. 본 계통의 Mouse는 풍부한 시험기초 자료가 축적되어 있어서, 시험결과의 해석 및 평가 시에 이러한 자료를 이용하는 것이 가능하다.

라. 주령 및 체중범위

▶ 수컷 . 입수시 주령 : 4주령

. 입수시 동물수 : 50마리

. 입수시 체중 : 16.3 ~ 18.9 g

. 투여개시시 주령 : 5주령

. 투여개시시 동물수 : 42마리

. 투여개시시 체중 : 19.2 ~ 23.4 g

-121-

#### 마. 검역 및 순화

동물입수 시에 외관을 육안으로 검사한 후, 7일간 시험을 실시하는 동물실에서 순화시키면서 일반증상을 관찰하여 건강한 동물만을 시험에 제공하였다.

## 2. 사육환경

### 가. 환경조건

본 시험은 온도  $23\pm 3^{\circ}\text{C}$ , 상대습도  $50\pm 10\%$ , 조명시간 12시간 (오전 8시~오후 8시), 환기횟수 10~20회/hr. 및 조도 150~300 Lux로 설정된 한국한의학연구원 동물실험실에서 실시되었다.

### 나. 사육환경 모니터링

시험기간 중 동물실들의 온습도는 향온 향습기에 의하여 24시간 가동 가동되었으며, 조도 등의 환경조건은 정기적으로 측정되었다. 환경측정의 결과, 시험에 영향을 미칠 것으로 사료되는 변동은 없었다.

### 다. 사육상자, 사육밀도 및 사육상자의 식별

순화, 검역기간 및 전체 시험기간 동안 5마리씩 Mouse용 Poly Cage

에 수용하였다. 시험기간 중 사육상자는 시험번호 및 동물번호를 기입한 개체식별카드를 붙여 식별하였다.

-122-

## 라. 사료 및 물 급여

### 1) 사료의 급여방법

사료는 실험동물용 분말사료(제일사료 주식회사)를 자유 섭취시켰다. 본 시험에 영향을 미칠만한 요인은 발견되지 않았다.

### 2) 물의 급여방법

물은 수돗물을 자유 섭취시켰으며 시험에 영향을 미치는 요인은 발견되지 않았다.

## 3. 투여량 및 시험군의 구성

### 가. 투여량 설정

본 시험물질의 투여량은 실험 의뢰자로부터 제공받은 용량을 설정하였으며 2개의 용량군을 추가였다. 또한, 양성 대조군으로 일본산 꽃송이버섯을 100mg/kg으로 하였다. 투여 Volume은 10ml/kg로 경구투여 하였다.

나. 시험군의 구성, 투여농도 및 용량

Group	Sex	Animal of number	AD Volume (ml/kg)	Dose(mg/kg)
C <sup>1)</sup>	Male	1 ~ 7	10	0
N.C <sup>2)</sup>	Male	8 ~ 14	10	0
P.C <sup>3)</sup>	Male	15 ~ 21	10	100
T1 <sup>4)</sup>	Male	22 ~ 28	10	10
T2 <sup>5)</sup>	Male	29 ~ 35	10	100
T3 <sup>6)</sup>	Male	36 ~ 42	10	1000

<sup>1)</sup>Control group, <sup>2)</sup>Negative control group, <sup>3)</sup>Positive control group(Japan of Sparassis crispa administration 100mg/kg), <sup>4)</sup>Sparassis crispa administration 10mg/kg group, <sup>5)</sup>Sparassis crispa administration 100mg/kg group. <sup>6)</sup>Sparassis crispa administration 1,000mg/kg group

다. 군분리 및 동물식별

동물의 군분리는 다음과 같이 실시하였다. 우선, 순화기간 중 건강하다고 판정된 동물의 체중을 측정한 후 2g 간격으로 구분하여 각각의 평균체중에 가까운 동물들을 42마리씩을 선택하였다. 이렇게 선택된 42마리를 각 군에 7

마리씩 균등한 체중으로 분배되도록 순위화한 체중과 난수를 이용한 무작위 방법으로 분배하였다. 동물의 개체식 별은 피모 색소 마킹법 및 개체 식별카드 표시법으로 실시하였다.

-124-

#### 4. 암세포의 접종

피부암 주입(Injection)은 세포주 0.1cc( $10^6$  cells)를 C<sub>57</sub>BL Mouse 등배부에 접종하였다. 세포주(Cell line) 공급은 미국 MD Anderson 암센터 I.J. Fiddler 박사가 제공하였으며 암세포주는 B16BL6 melanoma cell line을 사용하였다.

#### 5. 시험물질의 투여

가. 투여액의 조제법 시험물질 꽃송이버섯 분말 1g에 주사용 증류수 10mL을 첨가하여 고농도 (T3)군으로 사용하였으며 나머지군은 주사용 멸균증류수를 단계별로 희석하여 시험물질로 사용하였다.

나. 투여경로 및 투여방법 경구 투여용 금속제 존테와 주사관을 이용하여 위내에 강제 경구투여하였다.

다. 투여경로 선택이유 사람에게 적용되는 투여경로로써 경구투여를 선택하였다.

라. 투여횟수 및 투여기간 1일/1회, 투여기간 오전에 개체별로 투여하였다.

마. 투여액량 계산 매주 1회 측정된 체중을 기준으로, 각각의 군별 투여량에

맞게 투여량을 산출하였다.

-125-

## 6. 관찰 및 검사항목

### 가. 일반증상 및 사망동물의 관찰

투여 익일부터 27일까지는 1일 1회 일반증상의 변화, 독성증상 및 사망동물의 유무를 관찰하였다.

### 나. 체중측정

시험에 사용된 모든 동물에 대하여 투여개시전과 투여후 매주 1회 체중을 측정하였다.

### 다. 부검소견 관찰

투여 27일째에 모든 생존동물을 Ether 마취하에서 개복한 후에 후대정맥에서 채혈하였다. 그후 복대동맥을 절단하여 방혈치사시킨 후 육안으로 내부 장기를 관찰하였다.

### 라 혈액(구) 검사

혈액학적 검사는 WBC, RBC, HGB, HCT, MCHC(Mean Corpuscular Hemoglobin Concentration), MCH(Mean Corpuscular Hemoglobin), MCV(Mean Corpuscular Volume), PLT, LY(Lymphocyte), GY



(Granulocyte) 를 EDTA-2K로 처리 후, 자동측정 장치(JT Counter, Coulter Co., Miami, USA)를 이용하여 측정하였다.

-126-

#### 마. 혈액 생화학적 변화

생화학적 분석은 혈구 분석 후, 분리관을 이용하여 냉장고속원심 분리기 (Avanti 30, Beckman Co., USA)를 사용하여 5000 rpm에 10분간 원심 분리 하였다. 분리된 혈장은 deep freezer(-70℃)에 보관하여 생화학 분석기(Advia 1650, Jeol Co., Japan)를 사용하여 GOT(Glutamic Oxaloacetic Transaminase), GPT(Glutamic pyruvic transaminase), Glucose, ALP(Alkaline phosphate), BUN(Blood urea nitrogen), T. cholesterol의 혈액 생화학적 검사를 실시하였다.

#### 7. 통계학적 방법

음성 대조군과 투여군 사이의 통계학적 유의 차는 Student's t-test에 의해 평균과 표준편차를 구하고 통계처리( $p < 0.05$ ,  $p < 0.01$ ) 하였다.

## 제5절 결과

### 1. 사망동물

시험물질 꽃송이버섯의 독성에 의한 사망동물은 관찰되지 않았으며, 피하 암세포 증식에 의한 사망동물은 N.C군 3례, P.C군 2례, T1군 1례 및 T3군 2례가 각각 나타났다.

**Table 1. Mortality Rate(Experimental; Sparassis crispa AD)**

Group \ Mortality	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27
Con <sup>1)</sup>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
N.C <sup>2)</sup>	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1
P.C <sup>3)</sup>	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0
T <sub>1</sub> <sup>4)</sup>	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
T <sub>2</sub> <sup>5)</sup>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
T <sub>3</sub> <sup>6)</sup>	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1

<sup>1)</sup>Control group, <sup>2)</sup>Negative control group, <sup>3)</sup>Positive control group(Japan of

Sparassis crispa administration 100mg/kg), <sup>4)</sup>Sparassis crispa administration 10mg/kg group, <sup>5)</sup>Sparassis crispa administration 100mg/kg group. <sup>6)</sup>Sparassis crispa administration 1,000mg/kg group

## 2. 일반증상 (Table 2)

본 시험에서 시험물질 꽃송이버섯은 어떠한 독성증상도 관찰되지 않았으며, 암세포 증식에 의한 빈혈 및 활동력 감소가 관찰되었다.

**Table 2. Clinical finding in Sparassis crispa-administered Mouse.**

Sex	Male						
	Group	C	N.C	P.C	T1	T2	T3
Dose(mg/kg)		0	0	100	10	100	1000
Normal		7	0	2	5	5	5
Abnormal		0	7	5	2	2	2
ANE		0	7	5	1	2	2
ACD		0	7	5	2	2	2

ANE; Anemia, ACD; Decreased Activity., C; Control Group, N.C;

Negative control group, P.C; Positive control group(Japan of Sparassis

crispa administration 100mg/kg), T1; Sparassis crispa administration 10mg

/kg group, T2; Sparassis crispa administration 100mg/kg group. T3;

Sparassis crispa administration 1,000mg/kg group.

-129-

### 3. 체중변화(Table 3)

체중의 변화는 투여 2주 후, 암세포 투여군(음성대조군)에서 증가하는 경향을 보였다. 이는 암세포 증식에 의한 체중의 변화이며, 꽃송이버섯 10mg/kg/day 경구 투여시 정상적인 체중 증가를 보였다.

**Table3. Body weight change of Mice orally treated with Sparassis crispa.**

a ; Values were expressed as mean,

b ; ±S.D., Statistically Significantly different from Negative Control group(\*p<0.05, \*\*p<0.01))

-130-

### 4. 혈구검사(Table 4)

혈구검사는 음성 대조군에 비해 꽃송이버섯 모든 투여군에서 RBC, Hb, HCT 및 혈소판이 통계적으로 유의성 있게 증가하였다.

**Table 4. Hematological values of male mice orally theated with**

Variable	\ Sex	Male					
	\ Group	C	N.C	P.C	T1	T2	T3
	\ Dose( mg/kg)	0	0	100	10	100	1000
	\ No. of animal	7	7	7	7	7	7
Administration (0days before)		21.55 <sup>a</sup> (1.42) <sup>b</sup>	21.0 (1.06)	21.45 (1.33)	21.51 (0.42)	21.5 (1.54)	21.64 (1.13)
Administration (1week)		22.87 (1.45)	22.91 (1.29)	22.45 (1.17)	22.64 (1.05)	22.14 (1.88)	21.52 (2.10)
Administration (2weeks)		23.34 (1.27)	24.08 (1.25)	22.88 (1.27)	22.52* (1.33)	22.62 (2.14)	22.54* (1.66)
Administration (3weeks)		24.97 (0.97)	26.06 (2.01)	23.85 (2.45)	24.88 (2.28)	24.35* (2.00)	23.42** (1.38)
Administration ( Aut <sup>c</sup> before)		24.25 (1.67)	26.95 (3.47)	26.3 (2.77)	23.78 (0.81)	23.82 (1.76)	23.36 (1.08)

**Sparassis crispa-administered.**

Tested	WBC	#LYM	#MO	#GR	RBC	HGB	HCT	MCV	MCH	MCHC	PLT
Unit	x1000	%	%	%	x10 <sup>6</sup>	g/dl	%	fl	pg	g/dl	x1000
<b>Group : C(0mg/kg/day)</b>											
Mean	2.64	85.3	6.04	8.65	8.73**	12.92**	41.77**	47.85**	14.82	30.97**	1235.7**
SD	0.68	6.36	1.66	5.86	0.31	0.28	0.95	1.89	0.34	0.9	57.4
<b>Group : N.C(0mg/kg/day)</b>											
Mean	30.73	78.25	9.2	12.55	3.00	4.65	17.37	58.7	15.45	26.45	425
SD	42.24	6.85	8.2	1.34	0.75	1.23	3.06	4.63	0.49	2.22	246.3
<b>Group : P.C(100mg/kg/day)</b>											
Mean	5.95	66.36	19	14.63	4.5	6.7	23.36	53	15.0	28.4	706
SD	3.53	4.70	8.1	5.95	1.96	2.79	8.82	7.6	1.77	1.58	469.3
<b>Group : T1(10mg/kg/day)</b>											
Mean	3.56	74.13	11.26	14.6	8.26**	12.21**	40.23**	48.65*	15.9	30.36*	1225*
SD	0.90	10.34	4.87	6.42	0.77	1.27	4.15	1.11	0.93	0.4	153.7
<b>Group : T2(100mg/kg/day)</b>											
Mean	4.52	77.02	11.42	11.55	7.5*	11.12**	36.24**	48.66**	15.14	30.64*	1034*
SD	2.23	15.18	7.01	8.25	1.77	2.36	7.31	2.19	0.9	0.43	356.7
<b>Group : T3(1000mg/kg/day)</b>											
Mean	3.3	78.56	11.18	10.26	8.32**	12.04**	39.84**	47.88**	15.16	30.24*	1386**
SD	1.81	14.63	5.3	9.88	0.74	1.10	3.25	1.24	0.62	1.25	135.5

All hematological values were measured at 4 Weeks treatment of *Sparassis crispa*.  
Statistically Significant different from Negative Control(\*P<0.05, \*\*P<0.01).

## 5. 혈액생화학 검사(Table 5)

혈청 중에 있는 각종 효소 활성을 측정하는 것은 독성물질 판단시 많은 정보를 제공하여 준다. 특히 실험동물의 설치류에 있어 세포내 손상은 사람의 손상 또는 생리적 변화와 유사한 경향을 예측 할 수 있다. 조직파괴에

의해 ALP, GOT(glutamic oxaloacetic transaminase) 및 LDH등이 증가하며 특히 GPT(glutamic pyruvic transaminase), OCT(orinithine carbamoyl transaminase), SDH (sorbitol dehydrogenase) 효소들이 간 손상에 증가한다. 따라서 간 및 신장의 독성 평가로서 AST(aspartate aminotransferase), ALT (alanine aminotransferase), ALP(alkaline Phosphate), BUN 및 T. cholesterol 량을 정량하였다.

#### 가. 혈중 AST(aspartate aminotransferase) 측정

아스파르트산 아미노기 전달 효소(AST)는 간독성과 심장의 질환을 진단하는데 있어서 중요한 지표로 사용된다. 간 조직과피에 의해 관동맥이 지방질의 침착으로 폐쇄되면 국소적으로 심한 산소결핍이 되어 최종적으로는 심근이 국부적으로 변성하게 된다. 이 과정을 심근경색증(myocardial infarction)이라고 부르며 이와같은 상해로 많은 효소 중에서도 아미노기 전달효소가 손상된 심근세포로부터 유래되어 혈장내의 AST 양을 증가시킨다.

-132-

암세포를 접종한 C57 BL Mouse에 꽃송이버섯을 4주간 연속경구 투여시, AST 효소는 음성대조군에 비해 T1 및 T2군에서는  $P < 0.05$ 로, 고농도 군에서 감소하는 경향을 보였다.

#### 나. 혈중 ALT(Alanine aminotransferase) 측정

알라닌아미노기 전달효소(ALT)는 전염성간염(infection hepatitis)에 그 양이 증가되며 간 질환 때에는 AST의 활성도 높아진다.

그러므로 심장과 간장의 질환을 임상에서 진단하는데 있어서 ALT와 AST의 변화는 매우 중요시 된다. 시험물질 꽃송이버섯 4주간 경구 투여시 ALT 효소 변화는 음성대조군에 비해 감소하는 경향을 보였으며 T1군에서는 유의성( $p < 0.05$ ) 있게 감소하였다.

#### 다. GLU 측정

Glucose량의 변화는, 실험동물 Mouse에 암 증식시 대조군에 비해 증가하는 경향을 보였으나, 꽃송이버섯 4주간 연속경구 투여시 감소하였다. 그러나 이 변화는 정상 범위내의 수치이므로 임상적 의미는 없는 것으로 판단된다.

#### 라. 혈중 ALP 측정

ALP는 뼈, 간, 신장 등의 모든 조직에 존재하며 알콜로의 전이를

-133-

도와주는 역할을 한다. 실험동물의 주령에 따라 혈장 중의 수준이 저하하나 음식물 섭취 후 증가한다. 또한 Osteoblastic activity, 간 기능 부전, 담즙 흐름의 폐색 등으로 ALP 효소가 상승하며 영양상태가 나쁘면 감소한다. 대조군에 비해 암세포 투여군에서 감소하는 경향을 보였으며, 특히 음성대



조군에서는 그 감소의 폭이 크게 나타났다.

#### 마. 혈중 BUN 측정

BUN(Blood Urea Nitrogen)과 전해질은 신장 기능의 주요 지표물질로 알려져 있다. 암세포 투여 N.C군에서 유의성 있게 증가하였으며, 이에 시험물질 꽃송이버섯 4주간 연속 경구 투여시 증가된 BUN의량은 감소되었다.

#### 바. 혈중 T. Cholesterol 측정

혈장 cholesterol 수치는 간의 기능, 담의 기능 장의 흡수, 관상동맥 질환, 갑상선 기능과 adrenal 질환의 가능성을 높여주는 지표로 볼 수 있다. 암세포 투여 N.C군에서 유의성 있게 증가하였으며, 이에 시험물질 꽃송이버섯 4주간 연속 경구 투여시 증가된 T. Cholesterol의량은 유의성 있게 감소하였다.

**Table 5. Serum biochemical values of Mice orally Treated with Sparassis crispa.**

Variable	Sex	Male					
	Group	C	N.C	P.C	T1	T2	T3
	Dose(mg/kg)	0	0	100	10	100	1000
	No. of animal	7	4	5	6	7	5
AST(IU/L)		68.0*	920.5	724.8	302.0*	367.0*	410.8
	SD	(9.01)	(265)	(350)	(331)	(393)	(284)
ALT(IU/L)		17.85*	241.5	204.0	46.0*	51.66	56.4
	SD	(1.34)	(158)	(142)	(46)	(41)	(32)
GLU(mg/dL)		68.42	88.5	80.4	69.16	74.66	69.6
	SD	(46.68)	(35.67)	(44.95)	(27.6)	(26.03)	(33.5)
ALP(IU/dL)		61.71*	36.0	57.4	51.16	48.83	48.4
	SD	(24.45)	(3.65)	(44.33)	(8.99)	(11.6)	(8.29)
BUN(mg/dL)		16.85*	35.0	32.8	23.0	20.0	15.2*
	SD	(2.96)	(13.21)	(22.65)	(12.63)	(5.72)	(2.38)
T. cholesterol(mg/dL)		108.85**	165.5	156.4	116.6*	122.5*	130.8
	SD	(10.9)	(29.9)	(24.0)	(23.5)	(12.6)	(22.2)

Serum biochemical values at 4weeks after treatment of *Sparassis crispa*, a ;Values were expressed as mean, b ;±S.D., Statistically Significantly different from Negative Control group(\*p<0.05, \*\*p<0.01))

## 6. 부검소견(Table 6)

부검소견에서도 시험물질 꽃송이버섯 투여와 관련된 이상 소견은 나타나지 않았다.

**Table 6. Autopsy finding in Sparassis crispa-administered Mice.**

Sex	Male					
	C	N.C	P.C	T1	T2	T3
Group						
Dose(mg/kg)	0	0	100	10	100	1000
No. of animal	7	4	5	6	7	5
Normal	7	4	5	6	7	5
Abnormal	0	0	0	0	0	0

Autopsy finding at 4 Weeks treatment of Sparassis crispa., C; Control group, N.C; Negative control group, P.C; Positive control group(Japan of Sparassis crispa administration 100mg/kg), T1; Sparassis crispa administration 10mg/kg group, T2; Sparassis crispa administration 100mg/kg group, T3; Sparassis crispa administration 1,000mg/kg group.

**7. 장기 및 암 무게의 변화(Table 7)**

음성 대조군에서 비장 장기의 무게는 유의성( $p < 0.05$ ) 있게 증가하였으나, 꽃송이버섯(10mg/kg/day) 4주간 연속 경구 투여시 감소하였다.

또한 접종된 암세포 덩어리는 시험물질 투여시 유의성 있게 암세포 증식을 억제하는 경향을 보였다.

**Table 7. Relative organ weight of Mice orally treated with Sparassis crispa.**

Sex	Male						
	Group	C	N.C	P.C	T1	T2	T3
Dose(mg/kg)		0	0	100	10	100	1000
No. of animal		7	4	5	6	7	5
Body weight(g)		24.25 <sup>a</sup> (1.67) <sup>b</sup>	26.95 (3.47)	26.3 (2.77)	23.78 (0.81)	23.82 (1.76)	23.36 (1.08)
Mass(Cancer)		-	5.314 (3.32)	4.913 (4.05)	1.368* (2.01)	1.257** (1.13)	0.646* (0.51)
Spleen		0.077* (0.01)	0.204 (0.07)	0.156 (0.06)	0.090* (0.02)	0.152 (0.07)	0.089 (0.03)

Relative organ weight at 4weeks after treatment of Sparassis crispa, a ; Values were expressed as mean, b ;  $\pm$ S.D.,

Significantly different from Negative Control group(\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ )

## 제6절 고찰 및 결론

시험물질 꽃송이버섯 분말에 대한 항암 효과를 연구하기 위하여, C57BL Mouse 수컷에 각각 0, 10, 100 및 1000mg/kg/day의 용량으로 4주간 연속 경구투여하고 사망률, 일반증상, 체중의 변화, 혈구검사, 혈액생화학검사, 부검소견, 장기 무게 및 mass의 변화를 측정하여 항암 효과의 유·무를 판단하였다.

### 1. 분석 결과

가. 사망동물은 음성 대조군에서 암세포 접종후 19, 22 및 27일에 각각 1례씩 사망하였고 양성 대조군은 25 및 26일에 각각 1례씩 사망하였다.

꽃송이버섯 투여군 T1에서는 1례(25일), T3군은 2례(23, 27일)가 사망동물로 관찰되었다.

나. 꽃송이버섯 4주 연속 경구 투여시 어떠한 **일반독성 증상**도 나타나지 않았으며, 암세포 증식에 의한 빈혈 및 활동성 감소가 임상 관찰되었다.

다. **체중 변화**는 암세포 투여 2주 후, 암세포 투여군(음성대조군)에서 증가하는 경향을 보였다. 이는, 암세포 증식에 의한 체중의 변화이며 꽃송이버섯 10mg/kg/day 경구 투여시 정상적인 체중 증가가 나타났다.

라. **종양세포의 무게 변화**는 N.C군 5.314, P.C군 4.913, T1군 1.368, T2군 1.257 및 T3군 0.643g으로 각각 나타났다. 따라서, 꽃송이버섯 4주간 연속 경구투여시 생존동물의 종양 저지율은 P.C군 7.55, T1군 74.26%, T2군 76.35% 및 T3군 87.85%로 각각 나타났다.

위 결과로 보아 꽃송이버섯은 암세포 증식을 억제하는 것으로 생각할 수 있다.

마. **혈구검사는** 음성 대조군에 비해 꽃송이버섯 모든 투여군에서 RBC, Hb, HCT 및 혈소판이 통계적으로 유의성 있게 증가하였다. 이는, 암세포 접종후 Mass가 증식시 RBC, Hb, HCT, PLT등이 유의성 있게 감소하며, 이에 꽃송이버섯 10mg/kg/day 이상 4주간 투여시 일정부분 유의성있게 회복되었다.

특히, 혈액생화학적 검사는, 암세포 접종후 꽃송이버섯 투여군에서 간질환의 대표적 표적물질인 AST 및 ALT의 효소가 N.C군에 비해 유의성 (T1 및 T2군  $p<0.05$ ) 있게 감소하였다.

또한, 암세포 접종군은 대조군에 비해 BUN 및 T. Cholesterol량도 유의성 있게 증가하였으며, 꽃송이버섯을 4주간 연속 경구 투여시 그 량이 감소하는 것으로 나타났다.

ALP량은 암세포 접종군에서 감소하였다. 이것은 암세포 증식에 의한 실험동물의 영양상태가 악화된 것을 의미하며, 이에 꽃송이버섯 연속경구 투여시 ALP량은 증가하는 경향을 보였다.

바. 부검소견은, 꽃송이버섯 투여와 관련된 이상 소견은 관찰되지 않았으며 암세포 단독 접종군에서 비장의 무게 변화는 유의성( $p < 0.05$ ) 있게 증가하였다. 그러나, 꽃송이버섯( $10\text{mg/kg/day}$ ) 4주간 연속경구 투여시 그 증가된량은 감소하였다.

## 2. 결론

본 실험결과, B16BL6 melanoma cell을 C57BL Mouse에 접종시, 시험물질 꽃송이버섯이 암세포의 증식을 75%이상 억제하며, 시험동물의 악화된 영양상태를 일정부분 회복시키는 물질로 작용하는 것으로 사료된다.

## 제8장 꽃송이버섯 다당체의 항암 면역활성과 약리작용 규명

### 제1절 서론

담자균류(버섯류)의 항암성 다당체(단백다당체)들은 숙주의 면역기능을 활성화시켜 항암효과를 나타낼 뿐만 아니라 뚜렷한 부작용이 없어서 암의 치료에 의약품으로써 혹은 기능성 식품으로서 널리 사용될 수 있다<sup>1,2)</sup>. 의약품으로 개발되어 암의 치료에 사용되고 있는 실제 예로서 *Lentinus edodes* (표고버섯)의 lentinan<sup>3,4)</sup>, *Coriolus versicolor* (구름버섯, 운지)의 PS-K (Krestin)<sup>5,6)</sup> 및 Copolang<sup>7,8)</sup>, *Schizophyllum commune* (치마버섯)의 schizophyllan<sup>9,10)</sup>, *Phellinus linteus* (상황, 桑黃)의 균사배양 추출물(메시마-엑스)<sup>11-14)</sup> 등이 있으며 *Grifola frondosa* (잎새버섯)의 D-grifolan<sup>15-17)</sup>도 임상 실험 중에 있다. 이중 상황버섯은 오래전부터 귀한 약재로 사용되어 왔으며 그 항암효과 및 면역활성은 국내는 물론 일본, 태국 등 동남아시아, 나아가 미국 등지에까지 잘 알려져 있다. 한편 Ohno 등<sup>18)</sup>에 의해 꽃송이버섯(*Sparassis crispa*) 자실체로부터 분리한 1,3-beta-glucan의 항암효과 및 cyclophosphamide로 유발된 백혈구감소증 생쥐에서의 조혈기능 증강 효과가 보고됨으로써 꽃송이버섯은 식용버섯으로 뿐만



아니라 약용버섯으로 새로운 관심을 끌고 있다. 야생 꽃송이버섯은 한국, 일본, 중국 등은 물론, 북미, 유럽, 호주 등지에 자생하는 꽃양배추 모양의 풍미가 뛰어난 식용버섯으로 8-9월에 소나무, 잣나무, 전나무 등 침엽수의 뿌리부근 땅위나 그루터기에 발생한다. 그러나 야생 꽃송이버섯은 희귀하여 인공재배를 통하지 않고는 수요를 충족시킬 수 없을 뿐만 아니라 기능성 식품이나 의약품 등으로의 개발이 불가능하다. 최근 일본에 이어 국내 기업인 (주)하나바이오텍에 의해 꽃송이버섯 대량 인공 재배가 가능해 짐으로써 이를 주재료로 하는 다양한 기능성 식품의 개발이 길이 열리게 되었다. 본 연구에서는 국내에서 재배된 꽃송이버섯의 항암면역활성을 규명하고 나아가 꽃송이버섯 다당체를 포함하는 복합조성물의 개발을 시도하였다.

버섯류의 항암 효과를 확인하기 위해 가장 일반적으로 사용되어 온 방법은 ICR 마우스 피하에 Sarcoma 180 육종 암세포를  $1 \times 10^6$  개 정도 이식한 후 다음 날부터 매일 한 차례씩 시료를 복강주사하거나 경구투여하고 암이식 30일 경과 후에 실험동물을 희생시키고 종양을 적출하여 그 중량을 대조군과 비교함으로써 시료의 항암 효과를 확인하는 방법이다. 실제로 항암면역활성을 지닌 물질은 면역세포들을 활성화시켜 이들이 암세포를 공격함으로써 고형암의 크기가 작아지거나 심지어 완전 퇴화(complete regression) 되기도 한다. 그러나 이 방법을 사

용할 경우 이식된 Sarcoma 180 세포는 대조군의 경우 30일 정도 경과 후에는 실험동물 체중의 약 1/10~1/3에 달하는 거대한 종양으로 자라나게 되며 고행암과 정상 근육과의 구분이 용이치 않아 고행암(종양) 중량의 평가에 주관이 개입될 소지가 높다.

또한 실험에 30일 이상 소요되는 단점도 있다. 한편 sarcoma 180 암세포는 마우스 복강내에 이식할 경우 복수암(ascites tumor) 형태로 증식하여 평균 15-20일 정도 만에 실험동물을 사망케 한다. 그러나 항암효과를 지닌 시료를 투여할 경우 생존일수가 연장되기 때문에 시료 투여군과 대조군의 생존일수를 관찰하여 수명 연장 효과를 확인할 수 있다. 그러나 복강에 이식된 sarcoma 180 세포는 피하에 이식된 경우보다 증식 속도가 빠르며 따라서 항암면역활성을 지닌 버섯다당체들의 효과가 수명연장 효과로 나타나지 않는 경우가 흔히 있을 뿐만 아니라 생존동물을 50일까지 관찰해서 평균수명을 계산해야 하는 등 여러 가지 불편점이 따른다.

따라서 이러한 불편점을 개선한 실험방법의 창안이 절대적으로 요구되는 실정이다. 이에 본 연구자는 유세포분석법(flow cytometry)을 이용하여 ICR 마우스 복강에 이식한 Sarcoma 180 세포의 증식억제 효과를 객관적으로 명확히 판정할 수 있는 독창적인 방법을 창안하여 긴꼬리말불버섯 등의 항암효과를 확인 보고

한 바 있다<sup>19-22)</sup>. 즉 실험동물의 복강에 면역활성을 지닌 버섯 다당체 등을 주사할 경우 이에 반응하여 복강내에 백혈구들이 유입될 뿐만 아니라 활성화됨으로써 복강내에 이식한 sarcoma 180 암세포의 증식을 억제할 수 있다. 그러나 sarcoma 180 암세포와 복강유입세포 (peritoneal exudates cells = PEC)의 식별이 용이치 않기 때문에 sarcoma 180 세포수를 측정하기가 용이치 않고 따라서 주관의 개입소지가 매우 높다. 그러나 PEC 표면의 CD45 분자를 형광표지한 후 유세포 분석기(flowcytometer)로 분석하면 CD45 분자를 갖지 않는 sarcoma 180 세포를 PEC와 명확히 분별하여 계수할 수가 있다. 이외에도 유세포분석법을 이용하면 lymphocyte의 활성화 초기 과정에 나타나는 lymphoblast 생성 정도를 간편히 분석할 수 있다. 따라서 본 연구에서는 기존의 방법들 뿐만 아니라 유세포 분석법을 적극 활용하여 꽃송이버섯 및 복합물의 항암면역활성을 규명코자 하였다.

## 제2절 실험 재료 및 방법

### 1. 꽃송이버섯 및 기타 시료

본 연구에서 사용한 꽃송이버섯(*Sparassis crispa*)은 (주)하나바이오텍에서 재배한 신선한 자실체(Figure 1) 또는 열풍건조 자실체(Figure 2)를 제공받아 사용하였다. 이외에 상황버섯(*Phellinus linteus complex baumi*)은 충청남도 연기군 소재 농장에서 지면재배 방법으로 재배한 것(Figure 3)을 사용하였고, 잎새버섯(*Grifola frondosa*)은 시중에서 구입한 회갈색 잎새버섯(Figure 4)을 사용하였다. 한편 홍삼 추출물은 한국인삼공사에서 제조한 홍삼정골드를 사용하였고 벼메뚜기(*Oxya japonica*)는 북한산 벼메뚜기(Figure 5)를 시중에서 구입하여 사용하였다. 이들 시료들은 충남대학교 약학대학 미생물면역학 실험실에 증거표본으로 보존되어 있다.

### 2. 열수추출물 및 다당체 분획의 제조

신선한 버섯의 경우에는 약 3배량의 증류수를, 건조버섯의 경우에는 약 10배량의 증류수를 가하고 균질화(homogenization)한 후 고압멸균기를 이용하여 110°C에서 90 분간 추출을 시행하였다. 흡인여과 또는 원심분리하여 추출여액을 분리한 후 30-50ml씩 분주하여 -70°C에서 완전히 동결시키고 동결건조기(Eyela사)를 이용하여 동결건조함으로써 건조분말 상태의 버섯 열수추출물을 획득하였다

(Figure 6). 한편 꽃송이버섯의 경우에는 냉각시킨 열수추출액에 3배량의 95% 에탄올을 가하고 4℃에 방치하여 다당체 침전을 생성시켰으며 이를 4℃에서 2,800 RPM으로 원심분리하여 조다당체 침전을 분리하였다. 이를 소량의 증류수에 재용해시켜 투석막(Sigma, Molecular weight cut off: 12,000)에 넣고 증류수를 갈아가며 3일 이상 투석한 후 동결건조하여 미황색의 꽃송이버섯 다당체 분획을 획득하였다.

### 3. 실험동물

약 4 주령의 SPF (specific pathogen free) ICR계 생쥐 및 BALB/c계 생쥐 암컷을 대한바이오링크로부터 구입하여, 공조시설을 갖춘 충남대학교 약학대학 실험동물실내에서 1주일 이상 안정화시킨 후 실험에 사용하였다. 사료와 물은 제한 없이 공급하였고, 실온은 22±2 ℃, 습도는 50 %를 유지하였으며 하루에 12 시간 썬 조명을 시행하였다.

### 4. 암세포주

마우스 육종암 세포인 sarcoma 180 (ATCC catalog No. TIB66) 세포를 암세포주로 사용하되 ICR 마우스의 복강내에 계대 배양 중인 것을 사용하였다.

## 5. 세포 배양 배지

RPMI 1640 (Sigma, Missouri, USA) 분말배지를 주사용 증류수 (중외제약)에 용해시킨 후 1 M HEPES buffer (Sigma) 10 ml, sodium bicarbonate (Sigma, tissue culture grade) 2 g, penicillin-streptomycin solution (Sigma) 10 ml, 56°C 에서 30 분간 열처리하여 보체를 불활성화 시킨 fetal bovine serum (Hyclon, Utah, USA) 10 % 등을 첨가하여 세포배양 배지로 사용하였다.

## 6. 비장 림프구 분리 및 배양

시료의 면역활성을 확인하기 위하여 이미 보고한 방법에 따라 BALB/c 마우스 비장 림프구를 분리하여 배양하며 실험하였다. 즉, 실험동물의 비장을 적출하여 나일론 그물망 (Cell Strainer, Beckton-Dickinson)을 통과시켜 단세포로 분리한 후 세포배양 배지로 2회 세척하고 hemocytometer를 이용하여 계수한 후  $2 \times 10^6$  cell/ml로 희석하고, U-bottomed 96-well culture plate (Falcon)에 100  $\mu$ l씩 분주한 후 농도를 달리한 시료 용액 100  $\mu$ l를 가하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 상태에서 48 시간 동안 배양하였다. 시료의 최종 농도는 50~200  $\mu$ g/ml이 되도록 하였다.

## 7. 비장 lymphocyte의 유세포분석

시료를 가하고 배양한 비장 lymphocyte 현탁액을 FACS tube (Beckton-Dickinson)로 옮긴 후 분석직전에 propidium iodide (PI, 최종농도: 25  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )를 가하고, FACScalibur (Beckton-Dickinson) 유세포분석기(flow cytometer)로 이미 보고한 방법<sup>21, 22)</sup>에 따라 자료취합 및 분석을 시행하였다. 즉, 자료 취합시 forward scatter (FSC)/side scatter (SSC) dot plot에서 FSC threshold를 설치하여 cell debris를 제거하고 세포 10,000개에 대한 자료를 취합하여 분석하였다.

자료 분석에서는 forward scatter (FSC)/side scatter (SSC) dot plot에서 lymphocyte을 포함하는 gate을 설정하고 forward scatter (FSC)/fluorescence 3 (FL3) dot plot에서 FL3-음성 세포(viable cell)만을 포함하는 gate을 설정한 후 이들 두 gate을 모두 만족시키는 세포들만 FSC histogram에 나타내어 FSC 평균값을 분석하였고 또한 FSC 값이 상대적으로 큰 세포를 포함하도록 marker 1 (M1)을 설정하여 % M1을 구하였다(Figure 7). FSC 평균값으로부터 다음 공식에 따라 FSC 증가율 (% increase of FSC)을 산출하였다(공식 1).

$$\% \text{ increase of FSC} = (\text{FSCt} - \text{FSCc}) / \text{FSCc} \times 100 \text{ ----- (공식1)}$$

단 FSCt 및 FSCc는 각각 시료처리군 및 대조군의 FSC 평균값

## 8. sarcoma 180 암세포에 대한 *in vitro* 세포독성 실험

sarcoma 180 암세포에 대한 조합물의 직접 억제효과를 확인하기 위하여 sodium 3'-[1- [(phenylamino) -carbonyl] -3,4-tetrazolium]- bis (4-methoxy-6-nitro) benzene-sulfonic acid hydrate (XTT, Sigma) 시약을 이용한 비색법으로 실험하였다. XTT 용해 및 세포배양, 시료 용액 제조에는 공히 phenol red가 첨가되지 않은 RPMI1640 배지(GibcoBRL, USA)를 사용하되 10% fetal bovine serum를 첨가하여 사용하였으며 XTT를 1 mg/ml로 용해시킨 용액 5 ml과 에 1.25 mM N-methyl dibenzopyrazine methyl sulfate (PMS, Sigma) 용액(in phosphate buffered saline, PBS) 0.1 ml을 사용직전에 혼합하여 사용하였다. sarcoma 180 세포는 ICR 마우스 복강에 증식시킨 것을 회수하여 phenol red를 첨가하지 않은 RPMI1640 배지로 세척하고 같은 배지에  $5 \times 10^4$  cells/ml이 되도록 희석하여 flatt-bottomed 96-well culture plate에 100  $\mu$ l 씩 가하였다. 여기에 시료를 동량 가하고 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 상태에서 48 시간 동안 배양하였다. 여기에 XTT 시약 50  $\mu$ l 씩을 96-well culture plate에 각각 가한 후 다시 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 상태에서 4 시간 동안 배양하며 발색 정도를 육안으로 확인하고 ELISA reader (THERMOMax microplate reader, Molecular Devices, USA)를 이용하여 490 nm 및 650 nm에서의 흡광도를 측정, 490 nm에서의 흡광도에서 650 nm에서의 흡광도를 상쇄하여 흡광도치로 취하였다.



## 9. Sarcoma 180 복수 암세포 증식 억제 효과 실험

실험동물로는 실험군당 7~10 마리의 ICR 마우스를 사용하였으며 제1일부터 제6일까지 시료를 매일 1회 복강내에 주사하되 제4일에 sarcoma 180 암세포 ( $4 \times 10^5$  cells/mouse)를 복강내 이식하고 제8일에 실험동물을 희생시켜 복강내에 증식 중인 sarcoma 180 세포 및 PEC를 세척해 내었다. FITC-conjugated anti-mouse CD45 mAb (Sigma)를 사용하여 PEC를 형광표지하고 유세포분석기를 이용하여 이미 보고<sup>21, 22)</sup>한 바와 같이 sarcoma 180 cell를 분별계수함으로써 시료의 항암효과(복수암 증식 억제 효과)를 확인하였다.

## 10. 고형암 억제효과 실험

sarcoma 180 세포를  $1 \times 10^6$  cells/mouse로 실험동물 오른쪽 서혜부(groin) 피하에 이식하고 다음날부터 약물을 매일 1회 총 10회 복강 주사하였다. 암이식 30일 전후에 실험동물을 치사시킨 후 비장 및 고형암을 적출하고 그 중량을 측정하여 아래 공식에 따라 % 종양 저지율(% tumor inhibition ratio)을 산출하였다.

$$\% \text{ 종양 저지율} = (T_t - T_c) / T_c \times 100 \text{ ----- 공식 3}$$

(단,  $T_t$ 는 처치군의 평균 종양 중량,  $T_c$ 는 대조군의 평균 종양 중량)

## 제3절 결과 및 고찰

### 1. 버섯 열수추출물 및 다당체 시료의 성상

제조된 시료들(Figure 7)은 모두 무정형 동결건조 분말로서 이중 꽃송이버섯 다당체는 황백색 무정형 분말로, 열수추출물은 갈색 무정형 분말로 얻어졌다. 이들은 가온해야 용해되고 냉각시키면 젤에 가까운 점도를 나타내었다. 한편 상황버섯 열수추출물은 황갈색 무정형 분말로서 가온하지 않아도 물에 잘 녹고 점도도 높지 않았으며 잎새버섯 열수추출물은 진한 암갈색 무정형 분말로서, 다소 혼탁한 상태로 물에 쉽게 용해되었다. 그리고 벼메뚜기 추출물은 갈색 무정형 분말로서, 상온에서도 물에 잘 용해되었다.

### 2. lymphoblast 생성 자극 효과

조합물(composite) #16부터 #22까지는 비장 백혈구들에 대하여 현저한 면역활성을 발휘하였다. 즉 이들은 비장 백혈구의 FSC 값을 16 - 21% 정도나 증가시켰다(별첨 Figure 8). FSC값은 세포직경에 비례하는 수치이기 때문에 세포용적은 평균 1.5배-1.77배 증가했음을 알 수 있다. 한편 FSC 값이 상대적으로 큰 세포를 lymphoblast로 간주하여 그 비율(% lymphoblast)을 분석한 결과 이들 조합

물들은 lymphoblast 비율도 증가시켰음을 알 수 있다(별첨 Figure 9).

-151-

lymphoblast는 lymphocyte이 활성화되는 초기 과정에서 생성되며 lymphoblast의 증가는 곧 백혈구를 활성화 효과로 해석할 수 있다. 한편 이 두가지 분석치가 서로 유사한 경향을 보여주고 있어서 이들 조합물들의 *in vitro* 면역활성이 확실히 입증되고 있다. 이러한 결과를 근거로, 조합물 #18, #19, #22 및 새로운 조합물 (조합물 #22에서 벼메뚜기 추출물만을 뺀 조합) 등 4개 조합물을 대상으로 sarcoma 180 암세포에 대한 *in vitro* 세포독성 및 *in vivo* 항암실험을 진행하였다. 이들 조합물은 각각 조합물(composite) G4, G3, G2 및 G5라 칭하기로 한다. 이들 4개 조합물의 조성은 Table 1에 나타낸 바와 같다.

Table 1. % Composition of the *Sparassis crispa* composites

Composite	Red ginseng	<i>Oxya japonica</i>	<i>Phellinus linteus</i>	<i>Sparassis crispa</i>	<i>Grifola frondosa</i>
G2	10	10	10	20	50
G3	10	10	5	20	55
G4	10	10	0	40	40
G5	10	0	10	20	50

### 3. *in vitro* 암세포 저해 효과

별첨 Figure 10에 나타난 바와 같이 조합물 G2, G3, G4 및 G5는 1,000  $\mu\text{g}/\text{ml}$  농도에서 sarcoma 180 암세포에 대하여 현저한 세포독성을 발휘하였다. 특히 벼메뚜기 추출물을 함유하는 조합물인 G2, G3, G4는 그렇지 않은 조합물 G5 보다 모든 농도에서 sarcoma 180 암세포에 대해 보다 강한 세포독성을 나타내었다. 따라서 벼메뚜기 추출물을 포함하는 조합물의 sarcoma 180 암세포에 대한 직접 세포 독성이 이들 조합물의 *in vivo* 항암 효과에도 어느 정도 기여할 것이라 기대할 수 있다.

### 4. 복수암 증식 억제 효과

조합물 G2, G3, G4 및 G5의 *in vivo* 항암효과를 확인하기 위하여 ICR 마우스의 복강에 sarcoma 180 세포를 이식하기 전후에 이들 조합물(대조군에는 생리식염수)을 복강주사하고 암이식 4일 만에 유세포분석법(flow cytometry)으로 분석한 결과, 별첨 Figure 11 및 Table 2에 나타난 바와 같이 조합물 G3가 가장 우수한 항암효과를 나타내었다. 즉, 대조군의 sarcoma 180 세포수 평균값은 6,3016,948인데 비해 조합물 G3 투여군은 3,6794,089로, sarcoma 180의 증식이 41.6% 억제되

었고 PEC도 대조군이 1,341,838인데 비하여 조합물 G3투여군은 2,621,571로 2배 정도로 현저히 증가하였다. 나머지 조합들도 모두 PEC 증가 효과가 현저하였다.

-153-

## 5. sarcoma 180 고형암에 대한 항암효과

ICR 마우스의 오른쪽 서혜부(groin) 피하에 sarcoma 180 쥐육종암 세포를 실험동물 당  $1 \times 10^6$  cells을 이식한 후 다음날부터 시료를 일일 1회씩 10회 복강 주사하고 암이식 30일만에 실험동물을 희생시켜 비장과 고형암을 적출하여 중량을 측정하였다. 그 결과, Table 3에 나타낸 바와 같이 조합물 G3 고농도 (400mg/kg) 투여군에서 통계적으로 유의성 있는 항암효과가 관찰되었다. 즉 생리식염수 투여 대조군은 고형암 평균 중량이  $7.8 \pm 1.1\text{g}$ 이었으나 조합물 G3 고농도 투여군에서는  $4.2 \pm 0.7\text{g}$ 으로 46.2%의 억제효과를 나타내었다. 한편 투여 용량을 고농도 투여군에 비해 1/4로 낮춘 저농도 투여군에서는 18.6%의 억제율을 나타내었으나  $p < 0.05$  수준에서 통계적 유의성이 인정되지 않았다. 한편 체중 및 비장 중량은 통계적 유의성을 지닌 차이가 관찰되지 않았다.



**Table 2. Antitumor effect of the combinations against sarcoma 180 ascites tumor cells in ICR mice<sup>a</sup>**

Group	No. of mice	Sarcoma 180 cells <sup>b</sup>		PEC <sup>d</sup>	SI <sup>e</sup>
		Number	% inhibition <sup>c</sup>		
control	8	6,301±6,948 <sup>f</sup>	-	1,341±3,889	4.6±0.1
G2	8	5,576±3,889	11.5	3,715±1,415***	10.9±0.6***
G3	7	3,679±4,089	41.6	2,621±1,571*	10.7±1.1***
G4	8	4,253±2,645	32.5	3,483±1,254***	10.6±0.6***
G5	8	5,770±4,920	8.4	4,012±1,714***	5.1±0.3*

a : The samples were ip injected once daily for six days (days 0, 1, 2, 3, 4 and 5) and sarcoma 180 cells (4 x 10<sup>5</sup> cells/mouse) were ip implanted on day 4.a: FSC = forward scatter. FSC value was flow cytometrically analyzed using a FACSCalibur flow cytometer.

b : The cells in the peritoneum of a mouse were washed out on day 8 using 5 ml of 5 U/ml heparin-saline and then immunofluorescence-stained with FITC-conjugated anti-mouse CD45 mAb to distinguish the peritoneal exudate cells (PECs) from sarcoma 180 cells. Sarcoma 180 cells (FL-1-negative cells) and PECs were counted for 40 sec using a FACScalibur flow cytometer at the flow rate of 35  $\mu$ l/min.

c : % inhibition= {(CN - TN)/CN} x 100, where CN and TN, respectively, stands for the number of sarcoma 180 cells of the control group and the treated group.

d : The PECs (FL-1-positive cells) were counted as described in the text.

e : SI (spleen index) = Spleen weight in mg / Body weight in g.

f : each data stands for mean  $\pm$  S.D.

\*, \*\*, \*\*\*: respectively, significant at p<0.05, p<0.01, and p<0.001.

**Table 3. Antitumor Effect of the Combination G3 against Sarcoma 180 Solid Tumor in ICR Mouse.**

	dose (mg/ kg, ip)	n	body wt. (g)	spleen wt. (mg)	tumor wt. (g)	% tumor inhibition <sup>b</sup>
control	-	8	33.2±0.8 <sup>c</sup>	281.7±11.9	7.8±1.1	-
G3	400	8	31.0±0.9	273.0±18.7	4.2±0.7*	46.2
	100	8	30.1±1.6	270.0±36.1	6.4±1.1	18.6

a : The samples were ip injected once daily for 10 days starting 24 hr after the tumor implantation.

a: FSC = forward scatter

b : % inhibition=  $\{(Tc - TT)/TC\} \times 100$ , where TC and TT, respectively, stands for the mean of the tumor weight of the control group and the treated group.

c : each data stands for mean ± S.D.

\* : significant at  $p < 0.05$ .



## 제4절 결론

1. 꽃송이버섯, 상황버섯, 잎새버섯 등 버섯 추출물과 홍삼추출물 및 벼메뚜기 추출물 및 이들의 조합물 등 40여 개의 시료에 대한 면역활성을 유세포분석법으로 분석하여 그중 lymphoblast 생성 자극 효과가 우수한 조합물 5개를 선정된 후 이들 5개 조합물의 sarcoma 180 암세포에 대한 *in vitro* 세포독성과 *in vivo* 항암효과를 실험하여 가장 우수한 조합물 G3를 개발하였는 바, 조합물 G3의 특성과 항암면역활성은 다음과 같다.

- 조합물 G3는 꽃송이버섯 추출물 20%, 잎새버섯추출물 55%, 상황버섯추출물 5%,홍삼추출물 10%, 벼메뚜기추출물 10%로 구성되며 물에 잘 녹는 암갈색 무정형 분말이다.
- 조합물 G3는 BALB/c 마우스 비장 백혈구에 대하여 면역화성을 나타내어 lymphocyte 생성을 현저히 촉진하였다.
- 조합물 G3는 sarcoma 180 세포에 대하여 직접독성을 발휘하였다.
- 조합물 G3는 ICR 마우스 복강에 이식한 sarcoma 180 세포의 증식을 억제하였고 복강유입세포(peritoneal exudates cells)를 현저히 증가시켰다.

- 조합물 G3는 ICR 마우스의 피하에 이식한 sarcoma 180 고형암의 성장을 효과적으로 억제하여 46.2%의 종양 저지율을 나타내었다.

2. 따라서 꽃송이버섯추출물 등으로 이루어진 조합물 G3를 항암면역증강 기능성 식품 또는 의약품으로 개발할 수 있을 것으로 판단된다.

## 제5절 참고문헌

- 1) Hersh, E. M. and Taylor, C. W.: Immunotherapy by active immunization: Use of nonspecific stimulants and immunomodulators. pp. 613-626. In "*Biologic Therapy of Cancer*" by DeVita, Jr., V. T., Hellman, S., and Rosenberg, S. A. (Eds.). J. P. Lippincott, Philadelphia (1991).
- 2) Hobbs, C.: Medicinal Mushrooms. Interweave Press, Loveland, Colorado pp. 252. (1995).
- 3) Chihara, G., Hamuro, J., Maeda, Y. Y., Arai, Y. and Fukuoka, F., Fraction of the polysaccharides with marked antitumor activity, especially lentinan, from *Lentinus edodes* (an edible mushroom). *Cancer Res.*, **30**, 2776(1970).
- 4) Jeannin, J. F., Lagadec, P., Pelletier, H., Reisser, D., Olsson, N. O., Chihara, G., and Martin, F.: Regression induced by lentinan, of peritoneal carcinomatoses in a model of colon cancer in rat. *Int. J. Immunopharmacol.*, **10**, 855 (1988).
- 5) Tsukagoshi, S. and Ohashi, F., Protein bound polysaccharide preparation, PS-K, effective against mouse sarcoma 180 and rat ascites hepatoma by oral use. *Gann.* **65**, 557(1974).

- 6) Tsukagoshi, S. Hashimoto, Y., Fujii, G., Kobayashi, H. Nomoto, K. and Orita, K.: Krestin (PSK). *Cancer Treat. Rev.* **11**, 131(1984).
- 7) Moon, C.-K., Lee, S.-H., Mock, M.-S., and Kim, D.-O.: Antitumor Activity of the Polysaccharide-Fraction (Copolang) from *Coriolus versicolor* and its Effects on the Immune Function. *Yakhak Hoeji* **31**, 126(1987).
- 8) Jo, S.-K., Kim, S.-H., and Yoon, T.-K.: Effects of Copolang on Murine Immune Function and Antitumor Activity. *J. Kor. Cancer Assoc.* **19**, 95(1987).
- 9) Komatsu, N., Okubo, S., Likumoto, S., Kimura, K., Saito, G. and Sasaki, S., Host-mediated antitumor action of schizophyllan, a glucan produced by *Schizophyllum commune*. *Gann*, **60**, 137(1969).
- 10) Okamura, K., Suzuki, M., Chihara, T., Fujiwara, A., Fukuda, T., Goto, S., Ichinohe, K., Jimi, S., Kasamatsu, T., Kawai, N.: Clinical evaluation of schizophyllan combined with irradiation in patients with cervical cancer. A randomized controlled study. *Cancer* **58**, 865(1986).
- 11) Ikegawa, T., Nakanishi, Y., Uehara, N., Chigara, G. and Fukoka, F., Antitumor action of some basidiomycetes, especailly *Phellinus linteus*, *Gann*, **59**: 155(1968).

- 12) Chung, K. S. , Kim, S. S., Kim, H. S., Han, M. W. and Kim, B. K. : Antitumor activity of Kp, a protein-polysaccharide from the mycelial culture of *Phellinus linteus*. *Yakhak Hoeji* **38**, 158(1994).
- 13) Song, K. S., Cho, S. M., Lee, J. H., Kim, H. M., Han, S. B., Ko, K. S., and Yoo, I. D.: B-Lymphocyte-Stimulating Polysaccharide from Mushroom *Phellinus linteus*. *Chem. Pharm. Bull.* **43**, 2105(1995).
- 14) Chung, K. S., Kim, S. S., Kim, H. S., Kim, K. Y., Han, M. W., and Kim, B. K.: Effect of Kp, an antitumor Protein-polysaccharide from mycelial culture of *Phellinus linteus* on the humoral immune response of tumor-bearing ICR mice to sheep red blood cells. *Arch. Pharm. Res.* **16**, 336 (1993).
- 15) Ohno, N., Suzuki, Y., Sato, K., Oikawa, S. and Yadomae T.: Effect of Grifolan on the ascites form of Sacoma 180. *Chem. Pharm. Bull.* **35**, 2576(1987).
- 16) Adach, K., Nanba, H., and Kuroda, H.: Potentiation of host-mediated antitumor activity in mice by  $\beta$ -Glucan obtained from *Grifola frondosa* (Maitake) *Chem. Pharm. Bull.* **35**, 262(1987).
- 17) Ohno, N., Suzuki, I, Oikawa, S., Sato, K., Miyazaki, T., and Yadomae, T.:

Antitumor activity and structural characterization of glucans extracted from cultured fruit bodies of *Grifola frondosa*. *Chem. Pharm. Bull.* **32**, 1142(1984).

18) Ohno, N., Miura, N. N., Nakajima, M., and Yadomae, T.: Antitumor 1,3-beta-glucan from cultured fruit body of *Sparassis crispa*. *Biol. Pharm. Bull.* **23**, 866 (2000).

19) Chung, K. S. and Kim, J. H.: Antitumor and immunomodulatory activity of *Lycoperdon pedicellatum*. *Yakhak Hoeji*, **44**, 463(2000).

20) Oh, J. Y., Cho, K. J., Chung, S. H., Kim, J. H., Lillehoj, H. S. and Chung, K. S.: Activation of Macrophages by GLB, a Protein-polysaccharide of the Growing Tips of *Ganoderma lucidum*. *Yakhak Hoeji*, **42**, 302(1998).

21) Oh, J. Y. and Chung, K. S.: Flow Cytometrical Analysis of the Antitumor and Immunomodulatory Activities of GLB-A and GLB-B, the Protein-polysaccharide Fractions of the Growing Tips of *Ganoderma lucidum*. *Yakhak Hoeji*, **42**, 487(1998).

22) Chung, K. S. and Lee, J. S.: Antitumor and immunomodulatory activity of PVP, a protein-polysaccharide fraction prepared from a wild mushroom *Psathyrella velutina*. *Yakhak Hoeji*, **45**, 617 (2001).

23) Park, W. H., "Colored Illustrations of Korean Fungi", Kyo-Hak Pub.,

Seoul (1991).

24) Imazeki, R., Otani, Y. and Hongo, T., "Japanese Mushrooms", Yama-Kei  
Pub., Tokyo (1988).

25) Ormerod, M. G. (ed.), "*Flow cytometry : A Practical Approach*", pp 75~  
76, IRL press, Oxford (1990).

## 제6절 관련 사진

Figure 1 : 꽃송이버섯(*Sparacia crispa*) 신선 자실체





Figure 2. 꽃송이버섯(*Sparacia crispa*) 열풍건조 자실체



Figure 3. 상황버섯(*Phellinus linteus* complex *baumii*) 건조 자실체



Figure 4. 앞새버섯(*Grifola frondosa*) 건조 자실체



Figure 5. 건조 벼메뚜기(*Oxya japonica*)



Figure 6. 꽃송이버섯 다당체 동결건조 분말



Figure 7. Freeze-dried extracts of mushrooms and locusts..



Figure 8

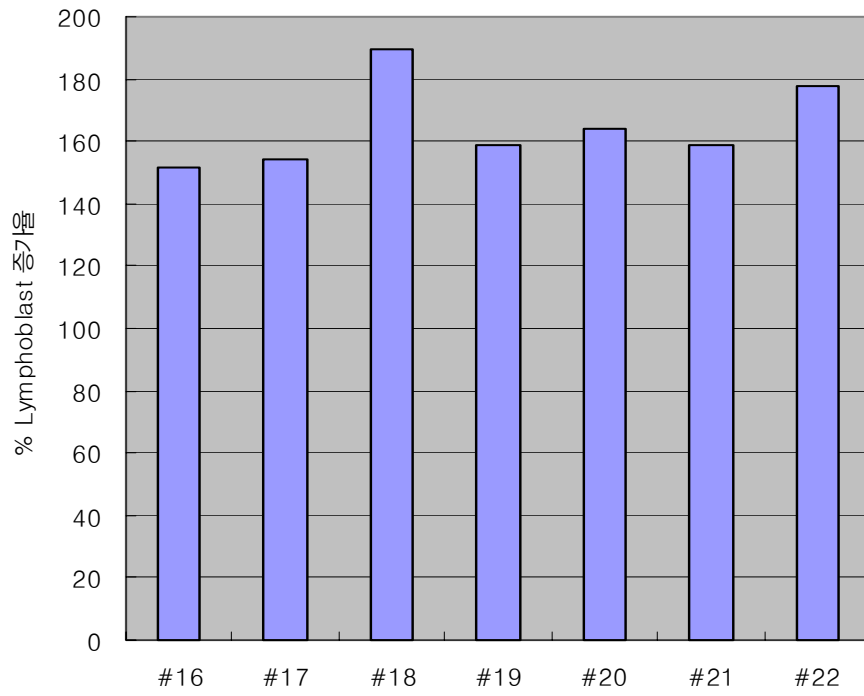


Figure 9

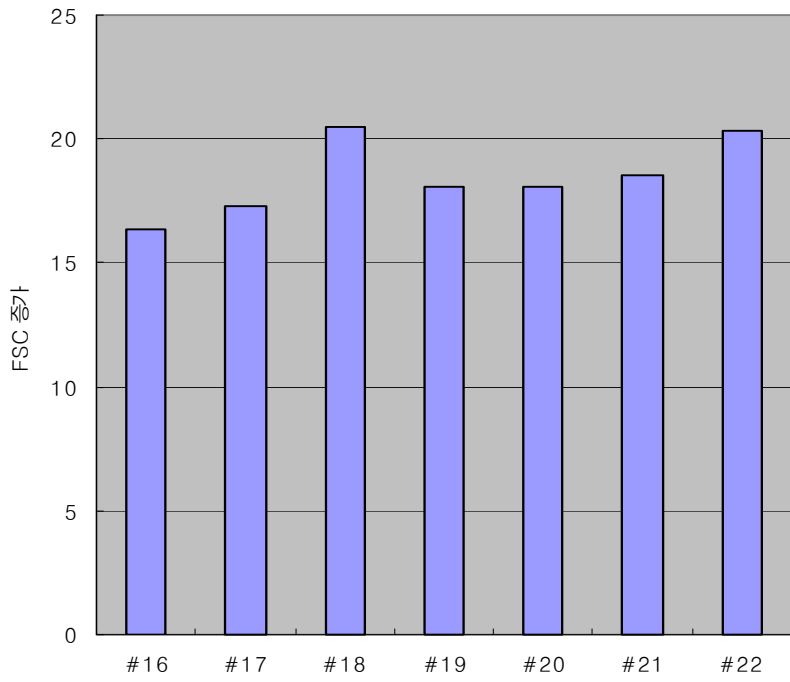




Figure 10

Antitumor and Immunostimulatory Activities of the Combinations in ICR Mice Implanted with S180 Ascites Tumors

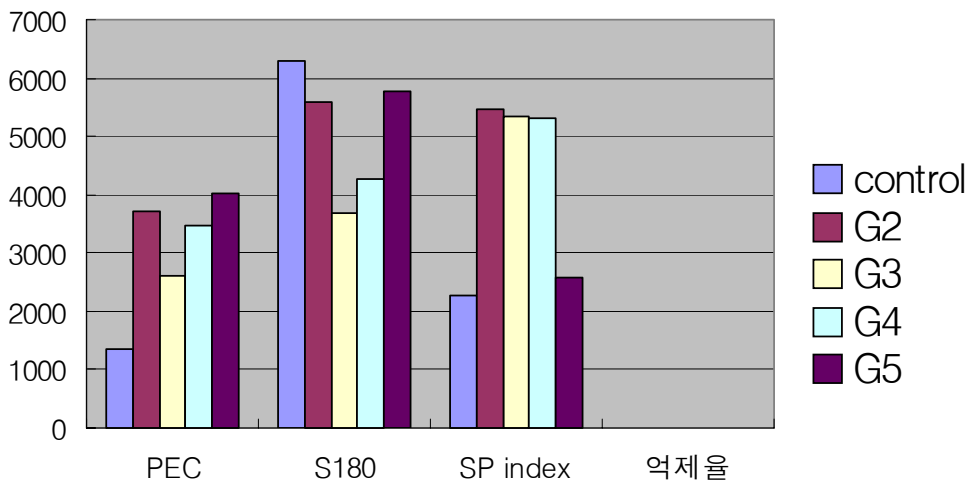
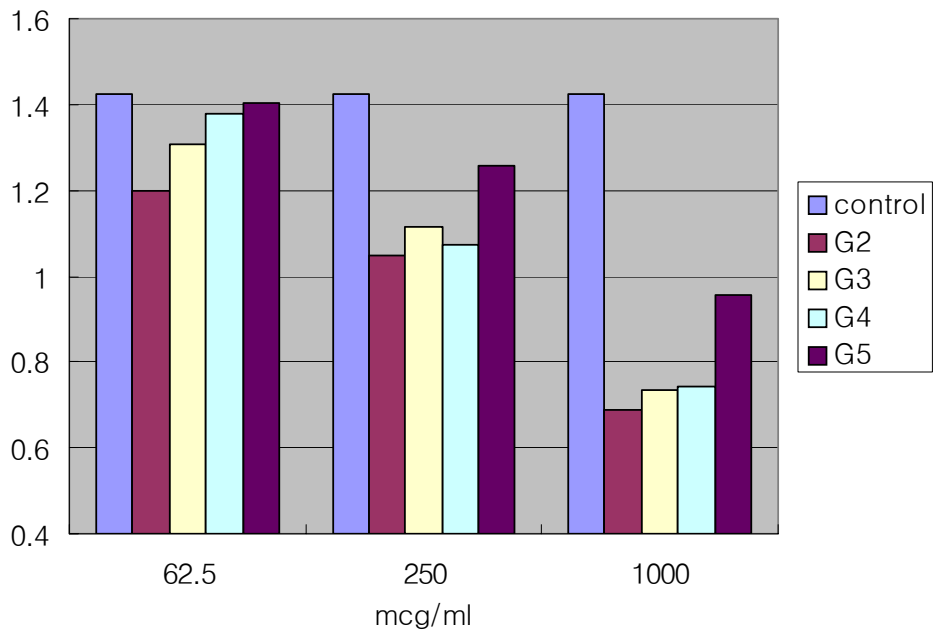


Figure 11



## 제9장 연구개발 성과 및 활용

### 제1장 연구개발의 주요성과

#### 1. 대량생산 시스템 구축

##### 가. 대량생산 시설 및 설비 도입

1년차 연구개발 결과 확립된 배양 및 재배기술을 바탕으로 입병, 살균, 접종부터 생육, 건조까지 완벽한 생산라인을 갖춘 자동시설 및 설비를 2004년 4월 경기도 연천에 구축, 5월부터 가동에 들어갔으며, 현재 일본의 월평균 총 생산량인 건조기준 1.5톤의 1/4인 350kg을 생산하고 있다.

##### 나. 생산시설 규모 및 주요 설비

###### 1) 생산시설 규모 (Figure 1)

- 건축 규모 : 대지 1480평, 건평 450평
- 생산 규모 : 1일 7000병 생산 설비

300,000병 동시 배양 및 생육 가능

월평균 건조버섯 350kg 생산 능력

< Figure 1. 생산시설 사진 >



(대량생산 시설 전경/ 크린룸 Air unit 및 냉각기 실외기/ 가습기)

2) 주요 설비 (Figure 2-3)

- 생산설비 : 혼합기, 자동입병기, 고압살균기, 자동접종기,  
자동탈병기, 풍건조기

< Figure 2. 주요설비 >



(혼합기, 입병기, 고압살균기, 자동입병기)

- 생산시설 및 실험실 (Figure 3)

클린룸 설비 : HEPA필터를 활용, 실내 양압 유지

자동환경조절 설비 (온도, 습도, CO<sub>2</sub>, 대류, 환기 등)

실험실 : 오토클레이브, 클린벤치, 인큐베이터, 현미경 등

< Figure 3. 생산시설 및 실험실 내부 >



다. 대량 생산 실증

1) 배양 (Figure 4)

< Figure 4. 꽃송이버섯 배지의 배양 >



2) 생육 (Figure 5)

< Figure 5. 꽃송이버섯의 생육 >





## 2. 면역활성 물질탐색 확인 및 베타글루칸 함량 개선

가. 배지조성 방법 및 배양, 생육기술의 확립을 통해 베타글루칸의 함량을 46.3%까지 개선함. (Figure 6)

< Figure 6. 꽃송이버섯 성분분석 성적서 >

	<b>Japan</b>	<b>Japan Food Research Laboratories</b> Authorized by the Japanese Government
	<b>Food</b>	
	<b>Research</b>	
	<b>Laboratories</b>	
<b>HEAD OFFICE</b> : 22-1 Motomachi-cho, Shibuya-Ku, Tokyo 151-0002		
<b>OSAKA BRANCH</b> : 3-1 Toyonaka-cho, Suita-shi, Osaka 564-0011		
<b>NAGOYA BRANCH</b> : 5-13 Otsu 4-chome, Naka-ku, Nagoya 460-0011		
<b>KYUSHU BRANCH</b> : 1-12 Shinagakuji-machi, Hakata-ku, Fukuoka 812-0034		
<b>TAMA LABORATORY</b> : 11-10 Nagayama 6-chome, Tama-shi, Tokyo 206-0020		
<b>CHITOSE LABORATORY</b> : 2-3 Bunkyo, Chitose-shi, Hokkaido 066-0052		
<b>ANALYSIS CERTIFICATE</b>		
		No. 104083403-002 1/1 September 6, 2004
<b>Requested by:</b>	Hanabiotech Co., Ltd. 450, Yuchon, Misan, Yeoncheon Kyonggi-Do Korea	
<b>Sample:</b>	Sparassis Crispa	
<b>Received:</b>	August 20, 2004	
This is to certify that the following result(s) have been obtained according to our analysis on the above-mentioned sample(s) submitted by the client.		
<b>RESULT</b>		
β-Glucan: .....		46.3 g/100 g
		
		Noriko Imaizumi Principal Investigator Japan Food Research Laboratories

나. 베타글루칸 성분분석 내용 (일본식품분석센터; 건조버섯 100g 기준)

분석통보일	배지 Type	β-glucan 함량	분석방법
2002-10-17	A	21.2g/100g	효소법
2003-4-3	A	26.2g/100g	"
2003-6-3	B	36.6g/100g	"
2004-9-6	B	46.3g/100g	"

### 3. 재배기술 확보 특허등록, 출원 및 기술지도

#### 가. 기술특허 등록 및 출원

##### 1) 특허 등록 (1건)

- 출원명 : 꽃송이버섯의 인공재배법 (2004.9; Figure 7)
- 등록번호 : 제0449947호

##### 2) 특허출원 (2건)

가) 발아현미 또는 장단콩을 포함한 발아콩을 이용한 꽃송이버섯

배지 제조방법 및 그 응용방법 (2003. 2. 8)

- 출원번호 : 10-2003-0010204 (장현유 교수 공동)

나) 나노나이프를 이용한 꽃송이버섯으로부터의 베타글루칸 추출법

- 출원번호 제10-2004-0062150호 (후림 공동)

< Figure 7. 하나바이오텍의 꽃송이버섯 재배특허증 >



**나. 꽃송이버섯 관련 기술지도 (2건)**

- 1) 경기도 강화소재 2개의 농가에 배지를 공급하면서 재배기술을 지도
- 2) 하나머쉬테크(2003년 7월), 두원바이오(2004년 11월)

**4. 판매, 마케팅 기반 구축 및 홍보**

**가. 종자 등록 및 친환경농산물 인증 확보**

- 1) 국립종자관리소에 품종생산판매신고 및 품종등록
  - 신고번호: 07-0017-2002-1 / 품종명칭 등록번호: 명칭 2002-1319
- 2) 국립농산물품질관리원 친환경농산물 인증 확보
  - 부문: 무농약농산물/ 인증번호 제10-26-3-12호

**나. 논문 발표 및 심포지엄 참여 (2건)**

- 1) 제3회 극동아시아 버섯 심포지엄 참여, 논문 발표
  - 2004. 9. 13 ~ 9. 17
  - Characteristics of mycelial culture of *Sparassis crispa*
- 2) 2004 버섯관련 농림기술설명회, 한국버섯학회 춘계 심포지엄 참여
  - 2004. 5. 14
  - 꽃송이버섯 대량 생산체계 및 항암 약리활성 연구

**다. 박람회 참여, 기술 및 제품 홍보 (4건)**

- 1) 제6회 한의학 국제박람회 (2004. 8. 26 - 8. 29)
- 2) 2004 농림과학기술대전 우수기술 전시회 (2004. 9. 16 - 9. 17)
- 3) 2004 서울건강식품박람회 (2004. 10. 14 - 10. 17)
- 4) 제1회 대한민국 지역혁신박람회 (2004. 11. 11 - 11. 14)

**라. 사업성과 언론 홍보**

- 1) 농진청, 꽃송이버섯 대량 인공재배 성공 공식보도 (2003. 6. 24)
  - 방송 뉴스(YTN) 및 신문, 전문지 27건 보도
- 2) 하나바이오텍 자체 언론 홍보 (방송 4건, 신문 잡지 25건)
  - MBC 6mm 세상탐험(2003. 7. 30), 고향은 지금(2003. 8. 3),  
KBS2 세상의 아침(2003. 9. 26), SBS 모닝와이드(2004. 12. 14)
  - 白宝璘(Hakuhrin) 개발, 수출 등 신문잡지 보도

**바. 암환자 공개체험 행사 참여**

- 1) 하나꽃송이버섯 베타(1-3)글루칸(白宝璘)이 암시민연대에 환자 공개체험 품목으로 선정되어 5명의 환자 대상 3개월 공개체험 실시 (2004.12.9-2005.3.9)
- 2) 암 국민연대도 2005년 초 실시예정

## 제2절 제품 개발 및 판매

### 1. 생버섯 제품화 및 판매



- 품명 : 하나꽃송이버섯 생물
- 판매단위 : 150g

## 2. 건조 버섯 제품화 판내



- 품명 : 하나꽃송이버섯 건조

- 판매단위 : 150g (50g\*3)

3. 추출특허 기술을 활용한 제품개발 판매



- 품명 : 하나꽃송이버섯 베타(1-3)글루칸 (白宝璘)

- 유형 : 꽃송이버섯 가공식품



- 제품개요 : 특허출원 기술인 "나노나이프를 이용한 저온추출법"을 적용하여 베타글루칸의 추출을 최대화하였으며, 2-3나노미터의 나이프를 추출시 사용하여 세포벽에 있는 베타글루칸의 입자를 미세화한 후, 급속 동결건조하여 인체내에서의 소화/흡수율 향상과 미량 영양소의 보존을 최대화.
- 내용량 : 수출용 200mg\*90캡슐\*2, 내수용 과립 40g\*2

## 제3장 향후 연구개발 계획 및 건의사항

### 1. 향후 연구개발 계획

#### 가. 건강기능성물질 인가 추진

- 꽃송이버섯 추출물(베타글루칸)의 기능성 공식 검증
- 식약청 신청 추진

#### 나. 건강기능식품 추가 개발

- 효소처리 제품 (세포벽 파괴 최적 효소 규명)
- 나노처리 제품 ( $10\mu\text{m}$  이하로 초미세화)

#### 다. 제품판매 활성화

- 미국 및 일본 수출 확대
- 국내시장 활성화를 위한 홍보활동

#### 마. 재배기술의 농가 이전 확대

## 2. 건의사항

### 가. 버섯추출 베타글루칸의 건강기능성물질 인가를 위한

#### 업체의 공동노력 및 관련기관의 지원

- 버섯가공식품은 내수시장에서 캡슐제품 제조 불가
- 소비자 섭취 편의성 고려시 과립, 분말제품의 한계

### 나. 농림기술과제 성과확산을 위한 개발제품의 판촉지원

- 중소기업의 제품개발후 판매에 애로 (자금, 마케팅 Tool)
- 일본은 대기업이 참여하여 TV광고 실시로 활성화 (유니치카)

### 다. 연구의 Flexibility 검토

- 연구내용의 조정 기회 부여
- : 2-3년 장기 프로젝트 진행시 당초 계획의 조정 사유 발생
- 연구내용 조정시 예산내 연구비의 전용 검토

## 주 의

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