

과제구분	기본연구	수행시기		전반기	
중장기 Code	A	RIMS Code		PJ003676	
연구과제 및 세부과제		연구분야(Code)	수행기간	연구실	책임자
버섯 배지재료 개발 연구		버섯 LS 0201	'08~'12	농산물이용시험장	박영학
3) 차신고버섯 배지재료 및 활용기술 개발		"	'09	"	이광재
색인용어	차신고버섯, 생산성, 배지, 유용물질, 추출방법, 생리활성				

ABSTRACT

This study was carried out to develop substrate for cultivation of *Agrocybe chaxingu*(Dasan), and elucidate the optimum extraction method and its biological activities. The period of primordial occurrence was 17~19days when grown in substrate mixed with sawdust, cotton seed hulls and wheat bran at the rate of 4:4:2, and the period of harvesting was 6~8days. The yield and number of fruit body (1.5kg bag) were superior to traditional substrate about 10%, 18%, respectively. Ergosterol reduced the production of nitric oxide about 40 percent at a concentration of 10ug/mL in Raw264.7 cell line, and also inhibited the α -glucosidase activity. Ergosterol was more effectively extracted when 70% methanol and dichloromethane were used for extraction, and the ratio of recovery was 0.108%.

1. 연구목표

차신고버섯 (*Agrocybe chaxingu* Huang)은 벗짚버섯 (*Agrocybe*)속에 속하는 목재부후균으로 차(茶)나무 고사목에서 발생하고 국내에는 자생하지 않으며, 문헌에 의하면 맛이 좋고 여러가지 아미노산과 무기물질을 함유하고 있으며 이뇨작용 및 비장과 위를 돕고 눈을 밝게 하는 등 의약적 가치가 높은 것으로 알려져 있다.

차신고버섯 재배를 위한 배지재료는 주로 미송톱밥과 밀기울을 7:3의 비율로 혼합하여 사용하고 있으며, 벗짚버섯속에 속하는 유사종인 버들송이버섯(*A. aegerita*)의 재배배지로도 미송톱밥과 밀기울을 사용하고, 이외에 면자각, 미강, 옥수수피, 콩가루, 콩깻묵, 미강, 건비지 등 다양한 재료를 사용한 재배가 시도되고 있다.

버섯의 유용 성분 및 기능성에 관한 연구는 1980년대부터 약용버섯 유래의 항암활성물질인 다당체 (polysaccharide)를 중심으로 수행되었고, 항암활성, 항산화, 면역, 항바이러스, 간염치료물질 등 다양한 물질 및 활성이 규명되고 있으며, 차신고버섯은 항암, 항당뇨, 골다공증 및 항산화 활성을 가지고 있는 것으로 보고된 바 있다.

국내 버섯산업은 재배품종 단순 및 출하시기 집중으로 인해 버섯재배농가의 경영난은 점점 심각해지는 실정으로 이러한 몇몇 품종의 재배 집중으로 인한 홍수출하 및 가격하락을

방지하기 위해 재배품종의 다양화가 요구되고 있다. 이에 강원도에서는 버섯재배품종의 다양화를 위한 새로운 버섯품종의 개발을 위해 기호도가 높은 새로운 버섯품목인 차신고버섯 신품종 ‘진향, 다산’을 육성한 바 있으며 이와 더불어 자실체로부터 유용물질인 다당체 및 ergosterol을 분리하여 이들의 항암, 항산화, 항당뇨 등 기능성을 구명한 바 있으나, 수량 증대를 위한 배지개발 및 신개발 육성품종의 유용물질 추출방법, 기능성에 대한 연구는 미흡한 바, 본 연구는 차신고버섯 생산비 절감을 위한 배지재료 및 혼합비 구명과 유용물질 추출조건 확립 및 활성검정을 위해 수행되었다.

2. 재료 및 방법

가. 공시균주 및 종균제조

본 시험에 사용된 균주는 강원도농업기술원에서 육성한 ‘다산’ 차신고버섯 균주로 PDA 배지에 계대배양하며 사용하였다. 접종원은 포플라톱밥과 미강을 8:2의 비율로 혼합하여 수분을 65%내외로 조절한 후 삼각플라스크에 채워 넣고 다진 후 121℃에서 60분간 살균하였다. 살균한 배지를 무균작업대에서 상온으로 식히고 미리 균주를 접종하여 만들어 놓은 배양이 완료된 PDA 평판배지를 접종한 후 25℃에서 25일 동안 배양하여 접종원으로 사용하였으며, 종균은 포플라톱밥과 미강을 8:2의 비율로 혼합하여 수분을 65% 내외로 조절한 후 850cc 폴리프로필렌 내열성 병(P.P.병)에 충전하고 121℃에서 90분간 살균하여 냉각시킨 후 삼각플라스크에서 배양 완료된 균사체를 850cc병당 10~15g을 접종하고 25±1℃에서 25일 동안 배양하여 종균으로 사용하였다.

나. 배지재료 및 혼합율

배지재료 및 혼합비 구명을 위해 톱밥, 밀기울 등 4가지 재료를 아래와 같이 혼합하여 사용하였다.

표 1. 배지재료 및 혼합비율(%)

구 분	관 행	배지1	배지2	배지3
톱 밥	70	40	35	20
면 자 각	-	40	35	70
밀 기 울	30	20	20	10
옥수수피	-	-	10	-

다. 배지별 재배특성 검정

850ml 플라스틱 병에 종류별 배지(관행~배지3)를 넣고 121℃에서 90분간 멸균하여 종균을 접종 후 25℃ 배양실에서 배양하면서 배양소요일수를 조사하였다. 배양이 완료된 병은 균굽기를 실시한 후 생육실로 이동하여 자실체 발이를 유도하여 초발이 소요일수를 조사하였으며 자실체 발이 후 수확적기에 버섯을 수확하여 수량 등 재배특성을 조사하였다.

라. 유용물질 추출 및 수율 측정

마쇄한 차신고버섯 건조시료 100g 을 취하여 0~100%의 methanol (MeOH) 100mL이 담겨 있는 erlenmeyer flask에 넣고 120 rpm의 진탕기에서 6시간씩 3회 반복 추출하고 1시간동안 sonication 하였다. 추출물을 여과지 (No.2, Whatman)가 깔려있는 Buchner funnel을 통과시켜 잔재물을 제거한 후 rotary vacuum evaporator (EYELA N-21NS)를 이용하여 40°C에서 완전 농축하고, flask 내의 건조물을 d-water를 이용하여 용해시킨 다음 동결건조기 (ILSHIN Lab Co. Ltd.)를 이용하여 건조하여 수율을 계산하였다. Ergosterol 수율은, 동결건조 시료 0.5g에 5mL의 hexane, dichloromethane, ethyl acetate, butanol을 각각 넣고 1시간동안 sonication하여 여과지 (No.2, Whatman)를 통과시켜 잔재물을 제거한 후, vacuum rotary evaporator로 감압 농축하여 각각의 분획물을 재용해하고 0.2 um membrane filter로 여과 후 GC/MS로 ergosterol 함량을 분석하여 수율을 측정하였다.

표 2. GC/MS 분석조건

GC	CP-3800 Varian
Column temperature	VF-5 MS 0.25 mm x 30 m capillary column
Oven temperature	200oC, 10 min → (20oC min-1) 280oC, 15 min
Injector temperature	250oC
MS	1200L Quadrupole, Varian
Ionization voltage	70 eV
Carrier gas	He (1 mL min-1)

마. Ergosterol 생리활성 검정

1) α -glucosidase 저해활성

10mg/mL 농도의 치곤 추출물과 0.15U/mL α -glucosidase 효소액 50 μ L 및 0.2M Potassium phosphate buffer (pH 6.8) 360 μ L를 혼합하여 405 nm에서 흡광도를 측정한다. 실온에서 5분간 preincubation 하고 5mM pNPG (4-nitrophenyl- α -D-glucopyranoside) 50 μ L를 가하여 실온에서 10분간 더 반응시킨 뒤 동일한 파장에서 흡광도를 측정하였고, 흡광도의 변화로부터 효소 저해활성을 계산하였다(14).

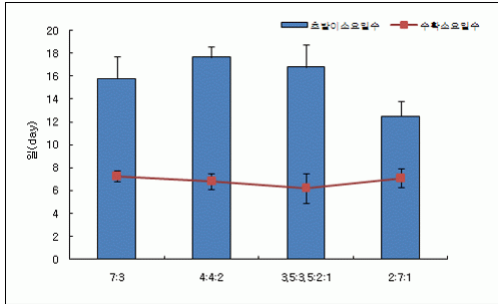
2) Nitric oxide 생성량 측정

NO 생성은 Raw 264.7 세포를 24 well plate에서 12시간동안 배양한 후 LPS (100 ng/mL) 처리 1시간 전에 차신고버섯 추출물을 처리하였다. 추출물 처리 12시간 후 상등액 100 μ L와 동일한 양의 Griess reagent (1% sulfanilamide in 5% phosphoric acid and 0.1% naphthylethylenediamine dihydrochloride)를 혼합하여 실온에서 10분동안 반응시킨 뒤 microplate reader를 이용하여 540nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준곡선은 NaNO₂를 농도 별로 희석하여 사용하였으며, 측정된 흡광도 값을 표준곡선에 대입하여 생성된 NO의 양을 정량하였다.

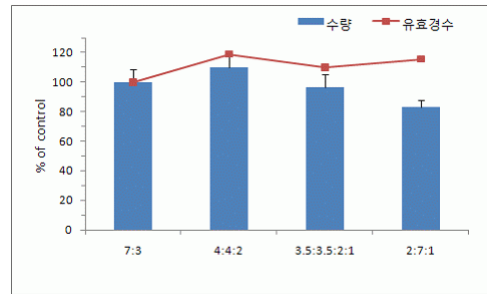
3. 결과 및 고찰

<시험 1> 차신고버섯 배지재료 개발

가. 배지별 재배특성



배지별 생육특성



배지별 수량특성

나. 배지별 생육사진



7:3(관행)

4:4:2

3.5:3.5:2:1

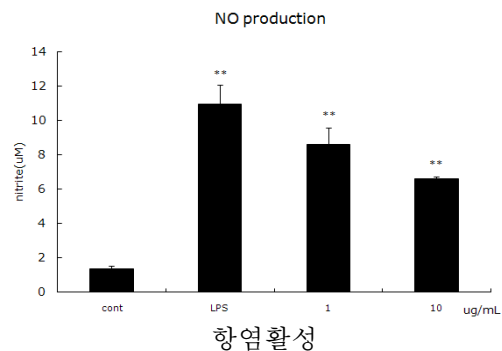
2:7:1

<시험 2> 차신고버섯 유용물질 활용 기술 개발

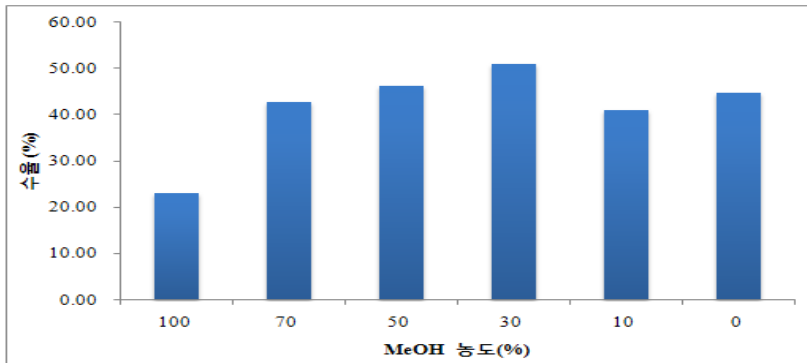
가. Ergosterol 생리활성 검정

구분	처리농도	저해율(%)
Ergosterol	1mg/mL	25.2±2.3
	0.1mg/mL	23.6±3.1
Acarbose	1mg/ml	23.2±1.8

α -glucosidase 억제활성



나. 메탄올 농도별 조추출물 수율



다. 용매별 ergosterol 추출량 및 수율(%)

	hexane	dichloromethane	ethyl acetate	butanol
추출량(mg/kg)	1216.7	2526.8	1711.2	1350.2
수율(%)	0.12	0.25	0.17	0.14

라. 메탄올 농도별 ergosterol 수율 및 최종수율

메탄올 농도	Ergosterol (mg/kg)	수율(%)	최종수율(%)
100%	3917.46	0.39	0.090
70%	2526.79	0.25	0.108
50%	2132.54	0.21	0.099
30%	839.23	0.08	0.043
10%	442.43	0.04	0.018
0%	ND	0.00	0.000

4. 적 요

<시험 1> 차신고버섯 배지재료 개발

- 톱밥, 면자각, 밀기울을 4:4:2로 혼합한 배지의 초발이소요일수는 17~19일로 대조구의 15~17일보다 다소 느렸으나, 수확소요일수는 6~8일로 관행배지(7~8일)와 유사하였으며, 수량 및 유효경수는 관행배지보다 각각 10%, 18% 더 우수하였음.
- 톱밥, 면자각, 밀기울, 옥수수피를 3.5 : 3.5 : 2 : 1로 혼합한 배지는 수량이 대조구 대비 96%로 다소 낮았으나 갯색이 진한 특성을 나타냈으며, 톱밥, 면자각, 밀기울을 2 : 7 : 1로 혼합한 배지는 수량성이 대조구 대비 83%로 낮았으나 초발이소요일수가 11~14일로 대조구에 비해 발이가 빠르며 유효경수가 많았음.

<시험 2> 차신고버섯 유용물질 활용 기술 개발

- 버섯내 유용물질 ergosterol을 대식세포에 처리 시 nitric oxide 생성을 40% 감소시켜 항염활성을 가지는 것으로 나타났으며, α-glucosidase 억제활성도 가지는 것으로 분석되었음.
- Ergosterol 추출을 위한 시료 수득율은 메탄올 30%에서 50.9%로 가장 높았으며, 50%, 0%, 70%, 10%순이었고, 100%에서 23.03%로 가장 낮음.
- 용매종류별 ergosterol 수율은 dichloromethane을 사용 시 건조시료 100g 당 253mg으로 가장 높았으며 ethyl acetate 171mg, butanol 135mg, hexane 122mg순으로 분석되었음.
- Ergosterol 최적 추출을 위한 최종 수율 비교결과, 조추출물 수율이 우수하였던 30% 메탄올 처리구는 ergosterol 수율이 낮아 0.04%정도 추출되었으며, 조추출물 수율이 양호하고 ergosterol 수율도 양호하였던 70%, 50% 메탄올 처리구가 최종 수율도 0.099~0.108%로 가장 우수하였음.

5. 인용문헌

- 강원도농업기술원 시험연구보고서. 2009.
- 경기도농업기술원 시험연구보고서. 2005.
- 농촌진흥청. 2004. 농업과학기술연구 조사분석기준
- 이광재 등. 2009. 차신고버섯(*Agrocybe chaxingu*)의 일반성분, 비타민 및 미네랄 함량분석. 한국식품저장유통학회지 16(4), 549-553
- 장현유, 김광포, 차동열. 1998. 버섯실험의 이론과 실제. 한국과학.
- 정종천 등. 2009. 벗짚버섯속 보존균주의 여름철 인공재배시 재배 및 형태적 특성. 한국버섯학회지 7 (1), 1-8.
- 정종천 등. 2008. 벗짚버섯속 ASI9003과 ASI9016의 배양 및 재배적 특성. 한국버섯학회지 6 (1), 13-19.
- Eum WS et al. *Agrocybe chaxingu* polysaccharide prevent inflammation through the inhibition of COX-2 and NO production. BMB reports 2009; 42(12): 794-799

6. 연구결과 활용

연도(연차)	활용구분	제 목
2009(1년차)	영농활용	○ 차신고버섯 병재배용 적정배지
	학술발표	○ 차신고버섯 배지재료별 생육특성

7. 연구원 편성

구 분	소 속	직 급	성 명	수행업무	참여연도
					'09
책임자	농산물이용시험장	농업연구사	이광재	과제총괄	○
공동연구자	"	농업연구관	김경희	시험분석 방향제시	○
"	"	농업연구사	박영학	생육 및 수량조사	○
"	"	"	임상현	성분분석	○
"	"	연구보조원	함헌주	유용물질 분석	○
"	"	"	박유화	기능성 분석	○
"	"	"	박민희	기능성 분석	○
"	"	"	정은경	생육특성조사	○
"	"	"	최승환	생육특성조사	○