



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

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

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



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

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

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

석사학위논문

버섯균사체 액체배양액을 이용한  
양식어류 사료첨가제로서의  
이용가능성



제주대학교 대학원

해양생물공학과

김민주

2006년 12월

버섯균사체 액체배양액을 이용한  
양식어류 사료첨가제로서의  
이용가능성

指導教授 許文洙

金 旻 周

이 論文을 理學 碩士學位 論文으로 提出함

2006年 12月

金 旻 周의 理學 碩士學位 論文을 認准함

審査委員長 전 유 진 (인)

委 員 송 춘 복 (인)

委 員 허 문 수 (인)

濟州大學校 大學院

2006年 12月

The Feed Additives Development of Cultured  
Fishes Using Mycelium Cultural Extracts

Min-Ju Kim

(Supervised by professor Moon-Soo Heo)



A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL OF  
THE REQUIREMENT FOR THE DEGREE OF  
MASTER OF SCIENCE

DEPARTMENT OF MARINE BIOTECHNOLOGY  
GRADUATE SCHOOL  
CHEJU NATIONAL UNIVERSITY

2006. 12

# 목 차

목 차 .....	1
List of Figures .....	4
List of Tables .....	6
I. 서 론 .....	7
II. 버섯 균사체 추출물에 의한 항균활성, 항산화 활성 및 세포독성 검증 .....	10
1. Abstract .....	10
2. 재료 및 방법 .....	11
1) 사용시료 .....	11
2) 플라스크배양 및 Carboy 배양 .....	11
3) 추출물의 조제 .....	12
4) 사용균주 및 배지 .....	13
5) 항균활성측정 .....	13
6) DPPH radical 소거 활성 측정 .....	14
7) Cell viability assay (MTT) .....	14
3. 결과 및 고찰 .....	15
1) 항균활성측정 .....	15
2) DPPH radical 소거 활성 측정 .....	18
3) Cell viability assay (MTT) .....	20
III. 버섯균사체 배양액에 의한 양식넙치의 생리적 반응 및 성장 .....	22
1. Abstract .....	22
2. 재료 및 방법 .....	23
1) 사용시료 .....	23

2) 플라스크배양 및 Carboy 배양 .....	24
3) 실험어 및 사육수조 .....	24
4) 실험용 사료 제작 및 투여 방법 .....	25
5) 성장도조사 및 채혈방법 .....	25
6) Glutamic oxalacetic transaminase (GPT) 측정 .....	26
7) 인위감염에 의한 생존율 .....	26
<b>3. 결과 및 고찰 .....</b>	<b>27</b>
1) 성장도 조사 .....	27
2) Glutamic pyruvic transaminase (GPT) 조사 .....	30
3) 인위감염에 의한 생존율 .....	32
<b>IV. 현장 적용 실험을 통한 버섯균사체 배양액에 의한 양식     넙치의 면역 활성화효과 .....</b>	<b>34</b>
<b>1. Abstract .....</b>	<b>34</b>
<b>2. 재료 및 방법 .....</b>	<b>35</b>
1) 사용시료 .....	35
2) 플라스크배양 및 Carboy 배양 .....	36
3) 실험어 및 사육수조 .....	36
4) 성장도조사, 채혈방법 및 혈액학적 성분 분석 .....	37
5) 혈청 라이소자임 활성화 조사 .....	37
6) 백혈구 활성화 .....	38
7) 인위감염에 의한 생존율 .....	38
<b>3. 결과 및 고찰 .....</b>	<b>39</b>
1) 성장도 조사 .....	39
2) 혈액의 성분 분석 .....	42
3) 라이소자임 활성화 .....	45

4) 식세포 활성 산소 측정 .....	47
5) 공격 실험 .....	49
V. 요약 .....	51
VI. 참고문헌 .....	54



## List of Figure

- Fig. 1. Electron donating activities of extracts from mushroom mycelium mixed cultured in synthesis and natural medium.
- Fig. 2. Cell Viability assay (MTT) of the liquid culture extracts of mushroom mixed mycelium.
- Fig. 3. Changes of the weight gain in the juvenile olive flounder, *Paralichthys olivaceus* fed a commercial diet supplemented with 10% mycelium mixed culture broth for 12 weeks.
- Fig. 4. Changes of the body length in the juvenile olive flounder, *Paralichthys olivaceus* fed a commercial diet supplemented with 10% mycelium mixed culture broth for 12 weeks.
- Fig. 5. Mean accumulated specific feeding rate in Groups A, B, C and D in different duration of experiment on the induction GPT in liver tissue of olive flounder.
- Fig. 6. Cumulative mortality (%) of flounder after 18-day feeding incremental levels after challenge with *Vibrio anguillarum* (n=30).
- Fig. 7. Changes of the weight gain in the juvenile olive flounder, *Paralichthys olivaceus* fed a commercial diet supplemented with 1% mycelium culture broth for 12 weeks.



**Fig. 8. Changes of the body length in the juvenile olive flounder, *Paralichthys olivaceus* fed a commercial diet supplemented with 1% myceilum culture broth for 12 weeks.**

**Fig. 9. Lasozyme activity in the serum from the olive flounder, *Paralichthys olivaceus* fed on myceilum culture broth supplemented feeds for 12 weeks.**

**Fig. 10. NBT reduction of phagocytes in the head kidney of the olive flounder, *Paralichthys olivaceus* fed on myceilum culture broth supplemented feeds for 12 weeks.**

**Fig. 11. Cumulative mortality (%) of flounder after 15-day feeding incremental levels after challenge with *V. anguillarum* (n=16).**

## **List of Tables**

- Table 1. The mushroom mycelium mixed cultured used for the tests of antibacterial, antioxidant activities and cell viability assay**
- Table 2. List of strains and media used for antibacterial experiments**
- Table 3. Antibacterial activities of the liquid mixed culture extracts of mushroom mycelium**
- Table 4. Antibiotics resistance of *Vibrio* sp. and fishes disease bacteria**
- Table 5. The mushroom mycelium mixed cultured used for the tests of physiological response**
- Table 6. The mushroom mycelium mixed cultured used for the tests of physiological response**
- Table 7. Blood chemistry of juvenile flounder fed on mycelium mixed culture broth supplemented feeds**

## 1. 서 론

현재 까지 어류 양식장에서 발생하는 질병에 대한 치료방법으로는 항생제의 사용에 의한 치료가 가장 많이 이루어지고 있으나, 항생제의 오남용으로 인한 내성균의 출현 및 주변의 수질 오염 등의 문제로 인해서 항생제의 사용은 한계에 이르고 있다 (Aoki, 1992; Anderson, 1992).

이와 같은 문제에 대처하기 위해서 많은 방안의 제시되고 있으며, 그 중 백신과 면역 증강 물질 개발이 대부분을 차지하고 있다. 백신의 경우 한 종류의 질병에만 특이적으로 작용하고 처리 방법에 의한 어류의 스트레스 발생 등 고비용, 저효율의 (Paterson *et al.*, 1992; Sakai, 1999) 문제점을 안고 있다.

면역 증강 물질의 경우 특정 질병에 대한 방어능력이 아닌 어류의 자체 방어능력을 증강시킴으로써 다양한 질병에 대처할 수 있다는 특이성을 갖고 있으며, 현재 bacterial, fungal components, plant extracts, animal 등 다양한 생물로부터 추출되어진 천연물들을 이용한 많은 연구가 진행되고 있다. 이와 같은 연구결과, 이런 물질들이 어류의 전염성 질병에 대한 방어능력 향상에 기여한다는 연구도 보고되어진 바 있다 (Engstad *et al.*, 1992; Sakai, 1999).

버섯은 예전부터 식용뿐만 아니라 약재로도 사용되어져 오고 있으며, 최근에는 버섯의 새로운 특성이 밝혀지면서 버섯에 대한 관심이 더욱 고조되고 있다. 버섯은 당질, 단백질, 비타민 및 무기질과 같은 영양소들을 골고루 함유하고 있으며 항세균, 항진균 및 항암효과를 나타내는 유용한 성분들을 가지고 있어, 이에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다 (Ikekawa *et al.*, 1969; Kupka *et al.*, 1979; Midaland *et al.*, 1982; Ebihara and Minamishima, 1984). 특히 식품의 부패 및 변질을 일으키거나 사람에게 식중독을 유발시키는 병원성 세균에 대한 항균 활성에 관한 연구가 이루어지고 있다 (Song, 2002).

본 연구에서는 약용버섯으로 잘 알려진 상황버섯, 운지버섯, 그리고 꽃송이 버섯을 실험재료로 사용하였으며, 상황버섯은 항암 및 면역증강효과 등의 약리활성을 나타내는 물질인  $\beta$ -glucan 성 다당류를 다량으로 포함하고 있는 것으로 알려

져 있다. 이러한  $\beta$ -glucan 성분은 신체의 면역능력을 강화 시켜주는 작용을 하고 체액성 및 세포성 면역반응을 증가시킨다는 연구결과가 (Kim *et al.*, 1996) 보고 되었으며, 현재에는 건강보조제로서 많이 사용되고 있다.

운지버섯은 Protein-bound polysaccharide 라는 단백 다당류인 Polysaccharide-K (krestin)가 함유되어 있으며 그 중에서 glucose, mannose 등이 주종을 이루는 5종의 당과 Asparagine, Glutamic acid 및 Leucine 등이 주종을 이루는 15종의 아미노산으로 구성된 proteoglycan (Tsukagoshi, 1974; Mau, 2001) 및 스테로이드 (Kim, 1978) 등이 보고 되었고 이 성분들은 항바이러스, 항세균 및 항암효과 (Dong, 1996) 를 나타낸다는 연구보고가 있다.

꽃송이 버섯은 1-3- $\beta$ -D-glucan의 함량이 다른 버섯에 비하여 훨씬 높아 항암 및 면역증가 효과가 큰 식용버섯으로 알려지면서 (Harada *et al.*, 2002a, 2002b) 현재 꽃송이 버섯을 이용한 항암 및 항산화에 관한 많은 연구가 진행되고 있다.

미생물들의 경우 혼합 배양으로 인한 혼합된 미생물들 사이의 기질 경쟁 작용에 의해서 기존 성분들의 증가뿐만 아니라, 신 물질의 분비를 통해서 각종 효율 증대가 있을 것으로 사료되어지기 때문에, 본 연구에서는 버섯의 단독 배양뿐만 아니라 혼합 배양을 통한 효율 개선 가능성을 검토 하고자 하였다.

제주지역을 중심으로 대량 생산되고 있는 감귤은 한방약이나 생약의 원료로 사용되고 있으며, 기능성이나 약효 성분이 많이 함유되어 있는 과일이다. 이러한 감귤은 현재 건강식품의 소재로서 그 소비량도 증가 추세에 있다. 이러한 감귤에는 다량의 비타민 C와 flavonoid, limonoid 및 carotenoid (Hwang *et al.*, 1995)등이 함유되어 있으며, 이들의 생리 활성으로 항알러지성, 항염성, 항바이러스성, 항산화성 및 항암성 등이 알려지고 있다 (Eun *et al.*, 1981; Oshiba *et al.*, 1981; Kim *et al.*, 1990; Jang *et al.*, 1977; Cho, 1995; Choa, 2001). 이러한 감귤을 이용하여 친환경적이고 경제적으로 저렴한 항생제 및 항산화제의 개발이 가능할 것으로 사료된다.

많은 연구를 통해서 버섯 자실체가 균사체보다 수많은 유용한 물질을 함유하는 것으로 알려져 있으며 이 유용한 물질을 얻기 위해서 대량배양 방법과 배양 배지에 대한 연구를 진행하고 있는 실정이다.

천연 감귤 배지를 이용한 액체배양에서 단독 배양과 혼합배양을 한 후 생물

접촉등의 방법으로 항균활성을 갖는 항생제대체 물질과 면역증강물질을 함유한 사료첨가제의 개발로 친환경 저비용, 고품질의 제품개발을 목표로 한다.

본 연구에서는 총 3영역으로 논하고자 한다.

첫 번째는 다양한 약효 성분이 많이 함유된 감귤 농축액을 배양 배지로 하여 버섯 균사체가 액체 배양된 배양 추출물과 일반 합성 배지에서 배양된 버섯 균사체 배양 추출물을 이용하여 *in vitro* 에서 항균활성, 항산화 및 항암효과를 비교 조사하였다.

두 번째로, 버섯 균사체 배양액을 이용하여 양식어류에 대한 생리적 반응, 성장 및 세균 공격성 실험 등을 비교 조사하여 양식 산업에 관련된 생리학적 기초 연구를 제공하고자 한다.

마지막으로, 위 연구 결과를 바탕으로 현장 적용 실험을 통해 첨가사료의 가능성과 첨가사료의 효과를 면역학적으로 평가한 후, 경제적이고 친환경적인 양식넙치 사료첨가제로서의 이용가능성을 확인 하였다.

## II. 버섯 균사체 추출물에 의한 항균활성, 항산화 활성 및 세포독성 검정

### 1. Abstract

In this study, we have investigated the antibacterial, antioxidant, and antitumor activities on mycelium cultural extract from mushroom. Mushroom mycelium was grown in a synthetic liquid media such as PD broth and YM broth as well as citrus extracts.

In antibacterial activity, the best result was achieved when mycelium cultural extract mixed the *Phellinus linteus* and *Coriolus versicolor* was incubated on YM broth. On the other hand, mushroom mycelium on citrus extracts showed better activity than that on PD broth.

We have also tested the antioxidant activity at concentration up to 10 mg/mL of mycelium cultural extract. The more it is in high concentration, the more the activity increases. The higher antioxidant activity was observed on PD broth containing the *Phellinus linteus* and *Coriolus versicolor* mycelium as well as citrus extract containing *Phellinus linteus* and *Coriolus versicolor* mycelium. The complex culture extracts obtained from the synthetic medium and citrus extract medium showed 10-89% of the 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical scavenger activity.

The antitumor activity of mycelium cultural extract was examined by using MTT assay on A549 cells. Mushroom mycelium on citrus extract showed interestingly higher antitumor activity than mushroom mycelium on synthetic liquid medium.

## 2.재료 및 방법

### 1) 사용시료

실험에 사용된 총 5종류의 버섯균사체 액체 배양액 시료는 제주도내에 있는 (주) 대우 환경에서 보관중인 버섯 균사체 균주를 사용하였다 (Table 1).

균주보관은 4℃ 냉장실에 20 ml 시험관에 Potato Dextrose Agar (PDA; Difco. Co. USA). YM (Dextrose 1%, Peptone 0.5%, Malt extract 0.3%, Yeast extract 0.3%, Agar 1.8%) Slant로 보관하면서 필요할 때마다 같은 배지의 8.5 mm 평판배양기에 이식하여 확대 배양을 하였다. 그리고 균사체 직경이 5 cm이상 자랐을 때 균사체가 가장자리에서 Cork borer (5 mm)로 떼어서 접종하였다.

본 실험에서는 기본 배지로 PDA, YM 를 사용하였고, 천연배지로는 감귤농축액을 구입하여 증류수에 10% (v/v) 정도를 첨가한 후, 각각 배양하여 항균활성, 항산화 등의 실험에 사용하였다.

실험에 사용한 감귤 농축액은 제주도 남제주군 한남리 소재 제주도 지방개발공사에서 생산하여 시판 중인 제주 감귤 희석액 (62 brix)을 구입하여 살균 증류수로 12% 되게 희석하여 4℃에 보관하면서 실험에 사용하였다. 희석감귤 농축액의 pH는 3.7이었다.

### 2) 플라스크배양 및 Carboy 배양

기본 실험배지는 Potato Dextrose Broth (Difco. Co. USA)와 YM 배지를 사용하였다. 배지는 300 ml 삼각 flask 에 100 ml 씩 분주하여 121℃, 20분 동안 고압 멸균하였다. 공시균주 접종원을 Cork borer (5 mm)로 5개씩 떼어서 접종하였다. 배양은 120 rpm의 회전수에 온도는 24~30℃ 사이에서 회전진탕 배양기에서 균에 따라 7일에서 15일까지 배양하였다.

본 배양의 영양원으로 복합배지 (PD broth, YM broth)와 감귤농축액 첨가 배지를 사용하였는데 대량 배양에 흔히 사용되는 방법인 carboy 배양방법을 이용하였

으며, 감귤농축액배지 (10%)는 2 L의 병에 증류수를 첨가한 후, 감귤농축액의 농도 10% (v/v)로 배지를 조제하여 121°C에서 30분간 가압 살균하여 배지를 조제하였으며, 접종원은 균질기로 균질화한 후 2% 접종비로 무균적으로 접종하였다. 25 ± 1°C의 항온시설에서 통기량 0.2 vvm (volume of air added to liquid volume per minute)으로 7~10일간 통기 배양하였다.

**Table 1. The mushroom mycelium mixed cultured used for the tests of antibacterial, antioxidant activities cell viability assay**

Name of mushroom		Part used
Korean name	Scientific name	
Sanghwang + Eunji	<i>Phellinus linteus</i> + <i>Coriolus versicolor</i> (10% citrus extract media)	Mycelium
Sanghwang + Eunji	<i>Phellinus linteus</i> + <i>Coriolus versicolor</i> (PD broth)	Mycelium
Sanghwang + Eunji	<i>Phellinus linteus</i> + <i>Coriolus versicolor</i> (10% citrus extract filtration)	Mycelium
Sanghwang + Eunji	<i>Phellinus linteus</i> + <i>Coriolus versicolor</i> (YM broth)	Mycelium
Sanghwang + Eunji + Kkotsongi	<i>Phellinus linteus</i> + <i>Coriolus versicolor</i> + <i>Sparassia crispa</i> (10% citrus extract media)	Mycelium

### 3) 추출물의 조제

배양이 완료된 배양물을 121°C에서 60분간 고압추출한 후 4000 Xg에서 10분간 원심분리 (union 32R Plus, Hanil) 한 후, filter paper (Whatman NO. 2)로 여과하였다. 배양 균사체를 제거한 후 여액에 ethanol 를 3배 첨가하고, 강력하게 교반하여 4°C의 저온에서 24시간 방치한 후, 4000 Xg에서 30분간 원심 분리하여 상등액과 침전물로 분리한 후, 상등액을 회전감압농축기로 농축 및 동결건조한 후, -70°C의 deep freezer 에 보관하면서 각 실험에 사용하였다.



#### 4) 사용균주 및 배지

항균활성 실험에 사용된 균주와 실험에 사용한 배지는 Table 2과 같이 도내 양식장에서 질병에 걸린 양식넙치로부터 분리, 동정된 그람 양성균 3종과 유전자은행 (KCTC)에서 분양받은 그람음성균 9종을 선정하여 사용하였으며, 균주의 생육을 위해서 Tryptic soy broth (TSB, Difco)을 사용하여 20시간 배양하여 사용하였다.

**Table 2. List of strains and media used for antibacterial experiments**

	Strain	Media
<b>Gram negative bacteria</b>	<i>Vibrio harvey</i> KCTC 2717	<b>Tryptic soy broth (TSB, Difco)</b>
	<i>Vibrio mimicus</i> KCTC 2732	
	<i>Vibrio alginolyticus</i> KCTC 2472	
	<i>Vibrio vulnificus</i> KCTC 2959	
	<i>Vibrio parahaemolyticus</i> KCTC 2471	
	<i>Vibrio campbelli</i> KCTC 2716	
	<i>Vibrio anguillarum</i> KCTC 2711	
	<i>Vibrio pelagius</i> KCTC 2732	
	<i>Edwardsiella tarda</i> KCTC 12267	
<b>Gram positive bacteria</b>	<i>Streptococcus sp</i> (Wild type)	
	<i>Streptococcus parauberis</i> (Wild type)	
	<i>Streptococcus iniae</i> (Wild type)	

#### 5) 항균활성측정

버섯균사체의 항균활성측정은 paper disk agar diffusion 법에 따라 시험균주를 24시간 배양한 후, Macfaland No. 0.5인 농도로 제작된 균 현탁액을 생리식염수에 희석법을 이용하여 10배 희석 후, Muller Hinton agar plate 에 100  $\mu$ l를 골고루 도말 한 후, 버섯균사체 분말 10 mg과 20 mg을 멸균증류수 1 ml에 녹여 paper disc (ADVANTEC F0424695, 8 mm)당 1,000  $\mu$ g과 2,000  $\mu$ g되게 동일하게 처리한 disk 를 균액이 도말 된 배지 위에 올려놓고 4°C에서 30분간 방치한 후, 각각의 균주 배양 온도에 맞추어서 24시간 배양하여 disk 주위의 생육 저해환 생성유무로 확인하였다.

## 6) DPPH radical 소거 활성 측정

버섯균사체 추출용액의 DPPH radical 소거 활성 측정은 DPPH 법 (Bios, M. S, 1958)을 이용하여 시료의 라디칼 소거능을 측정 하였으며, 이 방법은 1,1-diphenyl-2-picryl hydrazyl (DPPH)에 대한 전자공여능 효과 EDA (Electron Donating Ability)로 추출물에 대한 환원력을 측정하는 방법이다.

버섯 균사체 추출용액은 0.1 mg/ml, 0.5 mg/ml 그리고 1 mg/ml 농도의 버섯 균사체 추출용액 각각 1 ml를 취하여 150  $\mu$ M DPPH 용액 2 ml에 가하여 vortex 로 균일하게 혼합한 다음 실온에서 30분간 방치한 후 525 nm의 흡광도를 측정하였다. 대조구로는 0.05 mg/ml 농도인 BHA (butylated hydroxyanisole)의 합성 항산화제도 같은 방법에 의하여 실험하였다.

## 7) Cell viability assay (MTT)

세포독성검정에 사용된 세포주인 A549 인체 폐암세포는 생명공학연구소 (KRIBB, Daejeon, Korea)에서 분양 받았으며, RPMI-1640배지 (Gibco BRL, Grand Island, NY, USA)와 10%의 우태아혈청 (fetal bovine serum, FBS, Gibco BRL)과 1%의 penicillin-streptomycin (Gibco BRL)등이 포함된 배지를 사용하여 배양하였다. 세포를 96 well plate에  $2.5 \times 10^5$  cells/well 농도로 100  $\mu$ l/well씩 접종하고, 37 $^{\circ}$ C, 5% CO<sub>2</sub>로 조정된 CO<sub>2</sub>항온기 (Forma Co. USA)에서 4일 동안 배양 완료 후에 Well 당 MTT reagent (2 mg/ml)용액 100  $\mu$ l/well를 첨가하고 동 배양조건에서 4시간 배양 후에 앞의 배양액을 버리고, Dimethylsulfoxide (DMSO, Amresco)를 200  $\mu$ l/well plate 분주하여 well 에 생성된 짙은 청색의 결정체인 formazann 을 모두 녹인 후에 ELISA reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)로 540 nm 에서 흡광도를 측정하였다. 3번의 측정값을 평균값과 표준 오차를 분석하여 그래프로 나타내었다.

### 3. 결과 및 고찰

#### 1) 항균활성측정

버섯균사체 배양액을 이용하여 병원성 세균 및 어류질병세균에 대한 항균활성을 조사한 결과 Table 3.과 같이 대부분의 시료에서 항균활성이 있는 것으로 나타났다. 일반 합성배지 경우 YM broth 에서 배양한 상황버섯과 운지버섯 균사체 배양 추출물의 가장 높은 항균활성을 나타내었으며, PD broth 에서 배양된 상황버섯과 운지버섯 균사체 배양 추출물의 경우는 다른 버섯 배양 추출물에 비해 가장 낮은 항균활성을 나타내었다. 반면 10% citrus extract media 에서 배양한 상황버섯과 운지버섯 균사체 배양 추출물의 10% citrus extract media 에서 배양한 상황버섯, 운지버섯과 꽃송이 버섯 균사체 배양 추출물 보다 전반적으로 높은 항균활성을 나타내었으며, 10% citrus extract filtration 에서 배양한 상황버섯과 운지버섯 균사체 배양 추출물은 10% citrus extract media 에서 배양한 상황버섯과 운지버섯 균사체 배양 추출물과 거의 비슷한 항균활성 효과를 나타내었다.

감귤 추출물에서 배양한 버섯 추출물의 경우에 감귤에 flavonoid, phenolics 등의 물질이 버섯균사체 배양 시에 항균물질 생성에 영향을 주는 것으로 사료된다.

감귤에 주요 성분인 flavonoid, phenolics 은 Cho *et al.*, (1997)가 하귤, 삼보감, 이에감, 지각등이 *Bacillus licheniformis* ATCC 8845에서 높은 항균활성 뿐만 아니라 높은 flavonoid 함량을 나타내고 있음과 일치하는 결과를 나타낸 것으로 flavonoid 의 항균능력이 뛰어난을 확인시켜 주고 있다(Oh *et al.* 2003). 페놀 성분의 함량이 높은 종류가 식중독에 관계된 균에 대해 항균성을 나타낸다는 보고가 있으며 (Oh *et al.*, 2003), 식물성 페놀성분이 항균에 작용한다는 Lee *et al.*, (1994)의 보고와도 상당히 일치하는 경향이 있음을 알 수 있다. 이러한 결과를 종합해 볼 때 감귤 추출물에서 배양한 버섯 추출물의 경우 합성 배지와 거의 비슷한 항균 활성을 나타냈으며, 일부 약제 disk 처리구와 비슷한 수준의 항균 활성능 (Table 4)을 보여 주는 것으로서 기존 항생제를 대체하여 사용할 수 있는 가능성이 있고, 감귤 추출물 배양액 또한 기존의 값비싼 합성배지를 대체 할 수 있는 가능성이 있는 것으로 사료된다.

Table 3. Antibacterial activities of the liquid mixed culture extracts of mushroom mycelium

Strain	Inhibition zone (mm)									
	Cocentration(mg/ml)									
	A		B		C		D		E	
	10 mg	20 mg	10 mg	20 mg	10 mg	20 mg	10 mg	20 mg	10 mg	20 mg
<i>V. harvey</i>	16	18	11	20	14	21	18	23	0	12
<i>V. mimicus</i>	8	10	0	8	9	11	10	12	8	8
<i>V. alginolyticus</i>	0	10	0	10	0	10	0	11	0	0
<i>V. vulnificus</i>	0	10	0	10	9	15	12	18	8	10
<i>V. parahaemolyticus</i>	12	16	8	9	11	17	14	19	9	10
<i>V. campbelli</i>	8	8	8	8	9	11	10	16	8	8
<i>V. anguillarum</i>	9	13	8	10	10	12	11	15	8	11
<i>V. pelagius</i>	9	13	0	0	9	13	12	16	8	10
<i>E. tarda</i>	11	13	0	10	10	15	11	14	8	10
<i>Streptococcus sp.</i>	0	12	0	0	0	13	12	19	0	0
<i>S. iniae</i>	0	15	0	0	0	14	14	20	0	0
<i>S. parauberis</i>	0	13	0	0	0	13	9	17	0	9

Cells were grown on MHA plate for 24h at 26, 37°C after 10 mg, 20 mg each of mushroom liquid cultures was absorbed into paper disc (8 mm in diameter) and then the diameter (mm) of the growth inhibition zone was measured. Each value represents the average of three independent experiments.

A: *Coriolus versicolor* + *Phellinus linteus* (10% citrus extract media)

B: *Coriolus versicolor* + *Phellinus linteus* (PD broth)

C: *Coriolus versicolor* + *Phellinus linteus* (10% citrus extract filtration)

D: *Coriolus versicolor* + *Phellinus linteus* (YM broth)

E: *Coriolus versicolor* + *Phellinus linteus* + *Sparassia crispa* (10% citrus extract media)

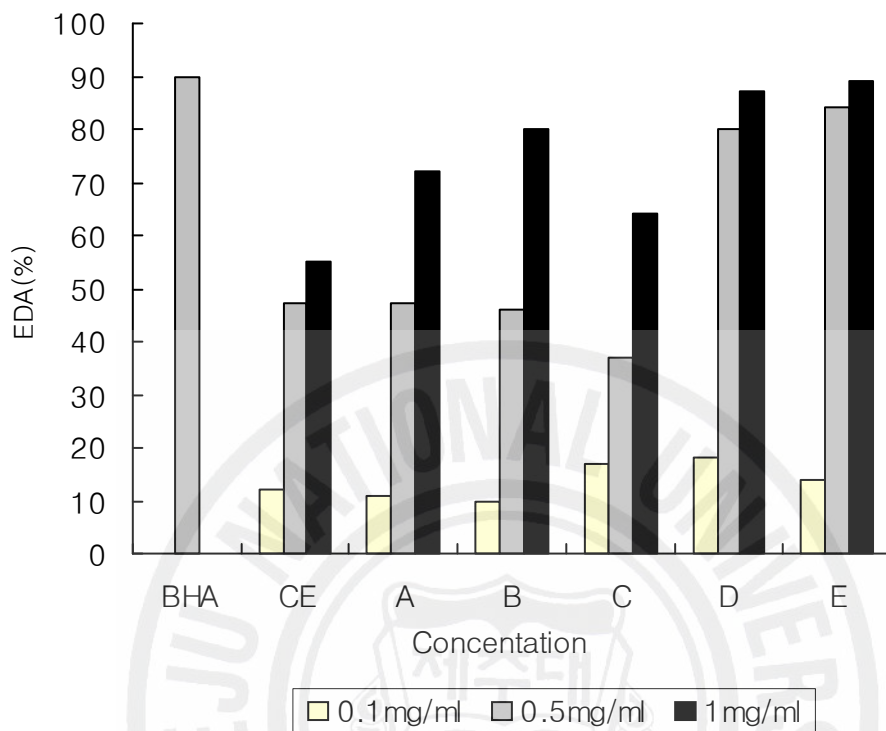
Table 4. Antibiotics resistance of *Vibrio* sp. and fishes disease bacteria

Strain	Inhibition zone (mm)						
	Penicillin	Erythromycin	Neomycin	Kanamycin	Chloamphenicol	Nalidixic acid	Tetracycline
<i>Streptococcus</i> sp.	22	23	25	21	27	30	25
<i>E. tarda</i>	20	30	23	18	22	30	18
<i>V. pelagius</i>	35	30	24	19	20	30	20
<i>V. campbelli</i>	35	25	25	22	25	28	25
<i>V. alginolyticus</i>	20	21	20	19	24	30	25
<i>V. parahaemolyticus</i>	18	20	19	19	25	28	30
<i>V. mimicus</i>	20	22	24	20	25	31	32
<i>V. anguillarum</i>	15	22	20	21	28	30	30
<i>V. harvey</i>	20	24	21	20	30	27	32
<i>V. vulnificus</i>	18	20	20	16	26	26	24

P, penicillin; E, erythromycin; N, neomycin; K, kanamycin; C, chloramphenicol; NA, nalidixic acid; T, tetracycline. Each value represents the average of three independent experiments.

## 2) DPPH radical 소거 활성 측정

항산화활성을 측정하기 위한 DPPH radical 소거활성 측정결과는 Fig. 1과 같다. 농도에 따른 흡광도를 비교한 결과 Fig. 1에 나타낸 것과 같이 각 시료의 농도가 높아질수록 항산화력이 증가하였으며, 특히 YM broth 에서 배양한 상황버섯과 운지버섯 균사체 배양 추출물, PD broth 에서 배양한 상황버섯과 운지버섯 균사체 배양 추출물과 10% citrus extract media 에서 배양한 상황버섯, 운지버섯과 꽃송이 버섯 균사체 배양 추출물에서 1 mg/ml 일때 80% 이상의 radical 소거 활성을 보였다. 10% citrus extract filtration 에서 배양한 상황버섯과 운지버섯 균사체 배양 추출물은 0.5 mg/ml의 농도에서 항산화 활성이 가장 높게 나타났으며, 1 mg/ml의 경우에는 10% citrus extract media 에서 배양한 상황버섯과 운지버섯 균사체 배양 추출물과 PD broth 에서 배양한 상황버섯과 운지버섯 균사체 배양 추출물의 경우 90%에 가까운 소거 활성을 보였다.



**Fig. 1. Electron donating activities of extracts from mushroom mycelium mixed cultured in synthesis and natural medium.**

A: *Coriolus versicolor* + *Phellinus linteus* (10% citrus extract media)

B: *Coriolus versicolor* + *Phellinus linteus* (PD broth)

C: *Coriolus versicolor* + *Phellinus linteus* (10% citrus extract filtration)

D: *Coriolus versicolor* + *Phellinus linteus* (YM broth)

E: *Coriolus versicolor* + *Phellinus linteus* + *Sparassia crista* (10% citrus extract media)

BHA : Butylated hydroxyanisole

CE : Citrus extract (Negative control)

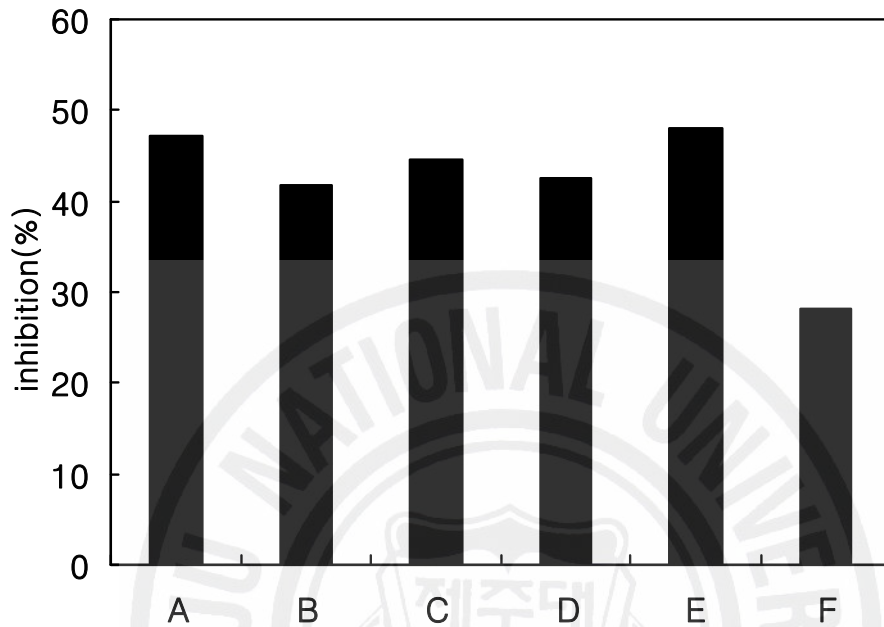
Each value represents the average of three independent experiments.

### 3) Cell viability assay (MTT)

MTT 정량분석법을 이용하여, 버섯추출물에 대한 세포독성 검색의 결과 (Fig. 2)에서 볼 수 있듯이 10% citrus extract 만을 첨가한 경우보다 모두 높은 항암활성을 나타냈으며, 대체적으로 40%이상의 항암활성을 나타냈다. 특히 10% citrus extract media 에서 배양한 상황버섯과 운지버섯 균사체 배양 추출물과 10% citrus extract media 에서 배양한 상황버섯, 운지버섯과 꽃송이 버섯 균사체 배양 추출물에서 가장 좋은 활성을 나타냈다.

감귤 농축액을 첨가하여 배양한 버섯균사체가 합성배지에서 배양한 버섯균사체 보다 모두 높은 항암 억제활성을 나타냈는데 이것은 Lee *et al.*, (2003)의 결과에서도 일반 합성배지에서 운지 버섯을 배양했을 때 보다 감귤 희석 농축액에서 배양했을 때 항산화 효과, 아질산소거능 및 항암효과가 현저히 상승하다는 결과 보고와도 상당히 일치하는 경향이 있음을 알 수 있다.





**Fig. 2. Cell Viability assay (MTT) of the liquid culture extracts of mushroom mixed mycelium**

A: *Coriolus versicolor* + *Phellinus linteus* (10% citrus extract media)

B: *Coriolus versicolor* + *Phellinus linteus* (PD broth)

C: *Coriolus versicolor* + *Phellinus linteus* (10% citrus extract filtration)

D: *Coriolus versicolor* + *Phellinus linteus* (YM broth)

E: *Coriolus versicolor* + *Phellinus linteus* + *Sparassia crispa* (10% citrus extract media)

F: 10% Citrus

Each value represents the average of three independent experiments.

### Ⅲ. 버섯균사체 배양액에 의한 양식넙치의 생리적 반응 및 성장

#### 1. Abstract

We have investigated the effects of mushroom mycelium cultural extract on growth, hematology, and disease resistance against *Vibrio anguillarum* in olive flounder, *Paralichthys olivaceus*. Fish were fed the diet supplemented with *Phellinus linteus* mycelium cultural extract, *Coriolus versicolor* mycelium cultural extract, and mycelium cultural extract containing the *Phellinus linteus* and *Coriolus versicolor* for 12 weeks individually.

In the effect of the growth, the body weight and length gain in the group, which fed with mushroom mycelium cultural extract, were significantly higher than that in the control.

The administration of mushroom mycelium cultural extract also resulted in reduction of Glutamic pyruvic transaminase (GPT).

The Cumulative mortality (%) after an artificial challenge with  $7 \times 10^5$  CFU of *Vibrio anguillarum* per fish was higher than the control. Furthermore, mycelium cultural extract containing the *Phellinus linteus* and *Coriolus versicolor* exhibited better result relative to *Phellinus linteus* mycelium or *Coriolus versicolor* mycelium respectively.

## 2. 재료 및 방법

### 1) 사용시료

실험에 사용된 버섯균사체 액체 배양액 시료는 제주도내에 하이드에 제주생물 자원 산업화 지원센터에 소재한 (주) 대우 환경에서 보관중인 버섯 균사체 균주를 사용하였다 .

균주보관은 4℃ 냉장실에 20 ml 시험관에 Potato Dextrose Agar (PDA; Difco. Co. USA). YM (Dextrose 1%, Peptone 0.5%, Malt extract 0.3%, Yeast extract 0.3%, Agar 1.8%) Slant 로 보관하면서 필요할 때마다 같은 배지의 8.5 mm 평판배양기에 이식하여 확대 배양을 하였다. 그리고 균사체 직경이 5 cm 이상 자랐을 때 균사체가 가장자리에서 Cork borer (5 mm)로 떼어서 접종하였다.

실험에 사용된 버섯균사체 액체 배양액은 복합배양된 상황버섯과 운지버섯 (*Phellinus linteus*, *Coriolus versicolor* ) 균사체 혼합 배양액을 각각 합성 배지 상에서 단일 배양된 상황버섯 균사체 (*Phellinus linteus*)배양액와 운지버섯 균사체 (*Coriolus versicolor*)배양액 총 3종류의 버섯 균사체 배양액을 사용하였다. (Table 5)

Table 5. The mushroom mycelium mixed cultured used for the tests of physiological response

Name of mushroom		Part used
Korean name	Scientific name	
Sanghwang + Eunji	<i>Phellinus linteus</i> + <i>Coriolus versicolor</i>	Mycelium
Sanghwang	<i>Phellinus linteus</i>	Mycelium
Eunji	<i>Coriolus versicolor</i>	Mycelium

## 2) 플라스크배양 및 Carboy 배양

기본 실험배지는 Potato Dextrose Broth (Difco. Co. USA)와 YM 배지를 사용하였다. 배지는 300 ml 삼각 flask 에 100 ml 씩 분주하여 121°C, 20분 도안 고압 멸균하였다. 공시균주 접종원을 Cork borer (5 mm)로 5개씩 떼어서 접종하였다. 배양은 120 rpm의 회전수에 온도는 24~30°C 사이에서 회전진탕 배양기에서 균에 따라 7일에서 15일까지 배양하였다. 본 배양의 영양원으로 감귤농축액 첨가 배지를 사용하였는데 대량 배양에 흔히 사용되는 방법인 carboy 배양방법을 이용하였으며, 감귤농축액배지 (10%)는 2 L의 병에 증류수를 첨가한 후, 감귤농축액의 농도 10% (v/v)로 배지를 조제하여 121°C에서 30분간 가압 살균하여 배지를 조제하였으며, 접종원은 균질기로 균질화한 후 2% 접종비로 무균적으로 접종하였다. 25 ± 1°C의 항온시설에서 통기량 0.2 vvm (volume of air added to liquid volume per minute)으로 7~10일간 통기 배양하였다. 배양액을 바로 실험에 사용하였다.

## 3) 실험어 및 사육수조

본 실험에 사용된 실험어는 제주도내 소재 육상 수조식 종묘 배양장에서 분양받은 평균 어체중 5.79 g, 전장 7.7 cm 인 넙치 (*Paralichthys olivaceus*) 480미를 차량을 이용하여 운반 한 후, 90 cm × 60 cm × 1 m 크기의 사각수조에 ( 500 ℓ 용량 ) 사육 수량은 1일 20회 환수시켰으며, 수조 4개에 각각 실험구 120마리씩 수용하였다.

실험어는 사육수조 내에서 일주일 동안 적응을 시킨 후, 세균성 질병이나 기생충에 의한 감염유무를 확인하여 질병에 감염되지 않은 건강한 치어를 본 연구의 실험구 및 대조구로 사용하였다. 또한 사육수의 환경적인 측면을 고려하여 10일마다 사육수를 교환해 주었으며, 실험기간 중의 해수 온도는 19±0.5°C 이었으며, 총 실험기간은 2005년 10월 21일부터 2월 12일 까지 총 12주 실험 하였다.

#### 4) 실험용 사료 제작 및 투여 방법

사료 제작을 위하여 시판되는 넙치용 배합사료 (조단백질 50%, 조지방 10%, 조섬유 5%, 조회분 15%, 인 1%, 칼슘 0.9%, Daehanfeed, KOREA)에 3종류의 버섯균사체 배양액을 각각 10% 첨가한 후, 건조기를 사용하여 40℃에서 사료를 건조시킨 후, 완전히 건조된 상태에서 밀봉하여 4℃ 냉장보관 하면서 사료로서 사용하였다. 또한 대조구로 사용된 사료인 경우에는 버섯균사체 배양액을 첨가하지 않은 일반 시중에서 판매되는 (Daehanfeed, KOREA)를 사용하였다. 제작한 사료는 매일 2회(AM 9h, PM 9h) 12주 동안 투여하였다.

#### 5) 성장도조사 및 채혈 방법

실험어의 어체중 측정은 실험 시작 후 2주마다 측정을 하는데 측정 24시간 전에 절식하였다. 측정방법은 각 실험구에서 무작위로 25마리를 선발하여 실험어 전체 무게를 측정하여 증중량을 구하였고, 실험어의 전장은 각각의 개체의 전장을 확인한 후, 평균을 내었다.

간수치 측정을 위한 채혈 방법으로는 채혈 24시간 전부터 절식을 시킨 후, 마취제를 사용하지 않고 각 실험구에서 무작위로 10마리를 선발한 후, 1 ml 주사기를 사용하여 넙치의 미부정맥에서 1 ml 채혈하였다. 채취된 혈액은 4℃에서 2시간 보관 후에 4℃ 원심분리기를 이용하여 3000 rpm에서 혈청을 분리하였다. 분리된 혈청은 간수치 측정을 위해 실험에 사용하였으며, 남은 시료의 경우 -70℃에서 따로 보관하였다.

## 6) Glutamic pyruvic transaminase (GPT) 측정

Glutamic pyruvic transaminase (GPT) 는 Reitman-Franke 1 (1957) 방법을 사용하여 시중에 시판중인 GOT, GPT 측정 kit (Asan. Co. KOREA)를 사용하여 넙치 혈액 내 간 수치의 변화를 측정하였다. 시험관에 기질액 0.1 ml를 넣고 37°C에서 5분간 방치한 후 혈청 0.2 ml를 넣고 잘 혼합하여 37°C에서 GPT 는 60분간 방치한 후, 정색시액 1.0 ml를 넣고 실온에서 20분간 방치하여 0.4 N NaOH 용액 10 ml를 넣고 잘 혼합한 후, 실온에서 10분간 방치하여 60분 이내에 505 nm에서 흡광도로 측정되었으며, 대조구로 사용된 시료는 일반 증류수를 사용하였다. 측정값은 표준곡선용 시약을 이용하여 표준곡선을 그려준 후, 각 시료가 첨가된 곡선의 그래프의 차를 이용하여 간수치를 계산하였다.

## 7) 인위감염에 의한 생존율

3종의 버섯균사체 배양액 첨가 사료의 투여가 넙치의 항병력에 미치는 영향을 조사하기 위하여 해산어류는 물론 갑각류와 패류에까지 침투하여 병을 일으키는 독성이 강한 그람음성 세균인 *Vibrio anguillarum* (KCCM 2711)을 이용하여 공격 실험을 하였다. 실험에 사용된 균주인 *Vibrio anguillarum* (KCCM 2711)은 한국 미생물 보존센터 (Korean Culture Center of Microorganisms, KCCM)에서 분양받아 Nutrient Agar (Difco. USA)을 사용하여 3반복 계대하여 26°C 배양하였으며,  $7 \times 10^5$  cfu/ml의 농도가 되도록 0.85% 멸균 생리식염수에 현탁한 후, 공격 실험용액으로 사용하였다.

공격실험은 사료투여 12주 후에 실시하였으며 대조군을 비롯하여 총 4개의 실험구에서 각각 무작위로 30마리씩 선정하여 1 ml 주사기를 이용하여 각 마리당 100  $\mu$ l씩 복강주사 한 후 18일 동안 누적 폐사율을 조사하였다.

### 3. 결과 및 고찰

#### 1) 성장도 조사

버섯균사체 배양액을 사료첨가제로서 사용하여, 어체중 및 성장률의 변화가 있었는지를 조사한 결과 실험 개시 후 4주까지는 Fig. 3에서 볼 수 있듯이 대조구와 실험구에서의 체중 변화는 유의차가 없었으나, 4주 이후부터 대조구와 실험구의 어체중 증가 차이가 확연히 나타나기 시작했다. 어체중인 경우에 10주 까지 버섯균사체 배양액 첨가 사료를 투여한 결과에서는 상황버섯과 운지버섯 균사체 혼합 배양액을 첨가한 그룹이 상황버섯 균사체 배양액과 운지버섯 균사체 배양액을 첨가한 그룹에 비해 5% 정도 높은 체중 증가율을 보였고, 균사체 배양액이 첨가되지 않은 대조구에 비해 약 20% 정도의 어체중의 증가를 보였다. 최종적으로 12주에는, 상황버섯과 운지버섯 균사체 혼합배양액은 대조구에 비해 12% 높은 어체중의 증가를 보였으나, 상황버섯 균사체 배양액과 운지버섯 균사체 배양액은 대조구에 비해 약 20%에 높은 어체중 증가를 보였으며, 또한 혼합 배양액 첨가보다 단독 배양액 첨가사료가 7%정도의 체중 증가율을 나타냈다. 대조구와의 어체중 비교 실험 결과 최종적으로 버섯균사체 배양액을 첨가한 실험구에서 약 12~20% 정도의 어체중의 증가를 확인할 수가 있었으며, 버섯균사체를 혼합배양 했을 시 보다 단독으로 배양한 후, 사료첨가제로 만들어진 사료인 경우에 대조구와 비교해 보았을 때 10%이상의 어체중의 변화가 있었다. 또한 어체의 전장인 경우에 실험개시부터 4주까지는 Fig. 4에서와 같이 대조구와 실험구에서의 어체 전장은 비슷한 양상을 보였지만, 사료 투여 후 4주 이후부터 대조구와 실험구의 전장에 차이를 보이면서 최종적으로 12주후의 전장을 비교해 보았을 때 약 15%정도의 전장의 차이를 보였다. 어체 전장인 경우 버섯균사체 배양액의 첨가된 사료를 투여한 3개의 실험구와 버섯균사체 배양액이 첨가되지 않은 대조구와의 전장의 차이는 4주 이후부터 확연히 차이를 보였으나, 최종적으로 실험이 끝난 후, 3개의 실험구의 유의성을 확인해보면 혼합 배양된 버섯균사체 배양액 첨가 사료 투여가 단독 배양된 버섯균사체 배양액 첨가 사료 보다 약 2% 정도의 유의차를 확인 할 수가 있었다.

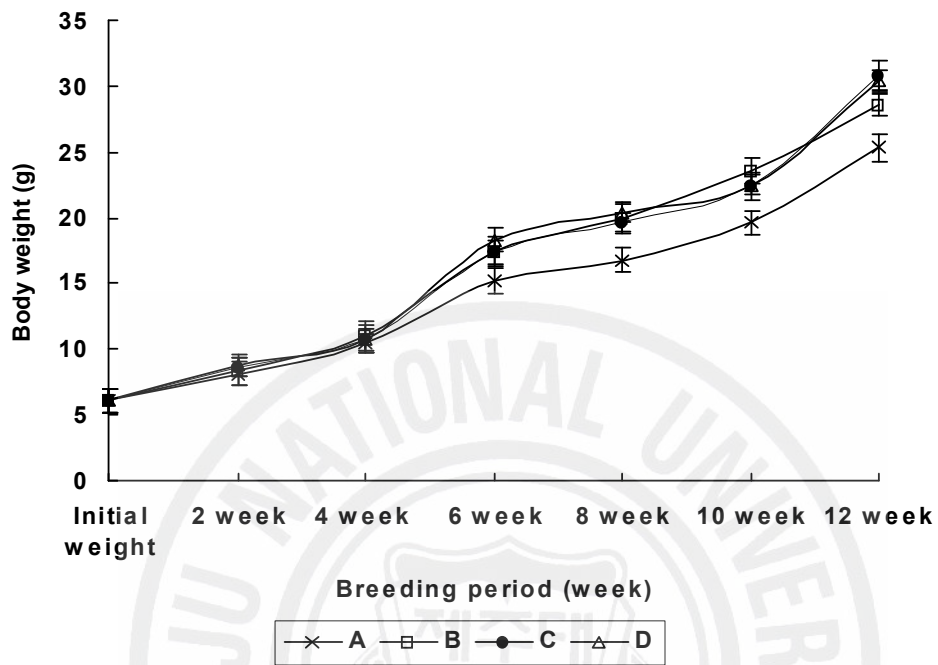


Fig. 3. Changes of the weight gain in the juvenile olive flounder, *Paralichthys olivaceus* fed a commercial diet supplemented with 10% mycelium mixed culture broth for 12 weeks. A, Basal diet; B, *Coriolus versicolor* + *Phellinus lintrus*; C, *Phellinus lintrus*; D, *Coriolus versicolor*



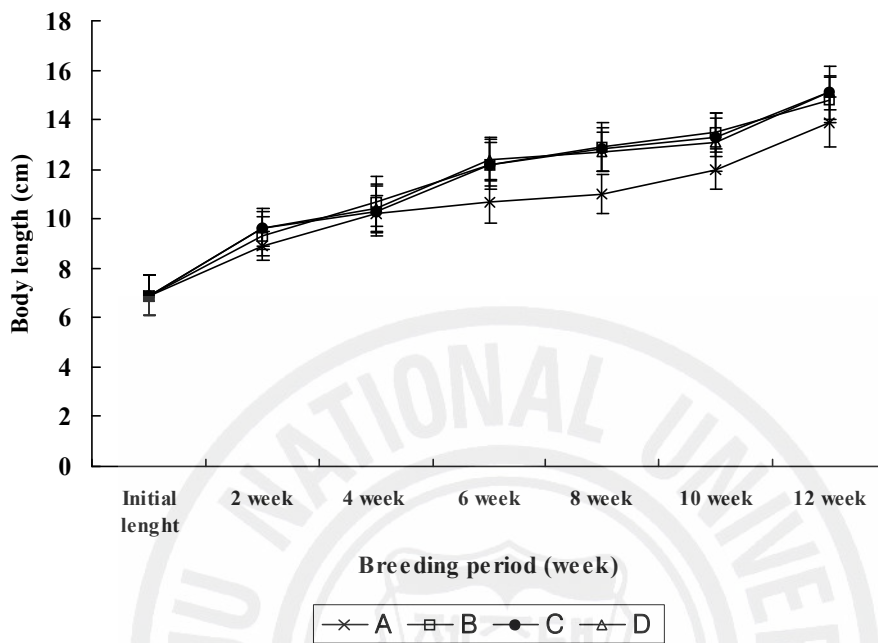
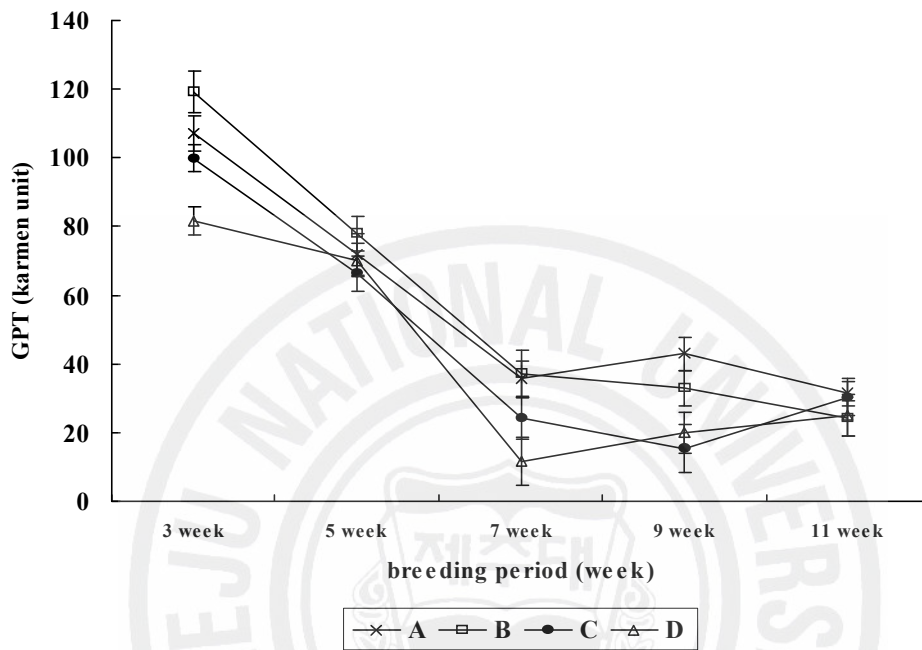


Fig. 4. Changes of the body length in the juvenile olive flounder, *Paralichthys olivaceus* fed a commercial diet supplemented with 10% mycelium mixed culture broth for 12 weeks. A, Basal diet; B, *Coriolus versicolor* + *Phellinus lintrus*; C, *Phellinus lintrus*; D, *Coriolus versicolor*

## 2. Glutamic pyruvic transaminase (GPT) 조사

GPT (ALT)는 아미노산 합성 효소로서 간과 특정장기가 손상되면 이러한 효소가 세포 외로 유출되어 이 효소의 수치가 상승하게 된다. 넙치 혈액 내 GPT에 대한 버섯균사체 배양액 첨가에 따른 영향을 조사한 결과를 Fig. 5에 나타내었다. 본 연구에서 GPT의 수치는 Fig. 5에서와 같이 실험 시작 3주일 때 모든 실험구에서 가장 높은 수치인 120 Karamen unit를 나타내어 실험구와 대조구와의 비교가 어려웠다. 이는 초기 사육수조내의 적응기간 및 환경적인 스트레스에 의한 이유라고 사료되며, 점차 배양기간이 길어질수록 실험구 및 대조구의 Karamen unit가 정상치에 가까워지는 것을 볼 수 있었으며, 균사체 배양액 첨가 사료를 투여한 실험구에서는 7주 이후부터 GPT 수치가 대조구와 비교했을 때 낮아지는 양상을 보였으며, 9주 이후부터는 대조구에 비해 Karamen unit의 수치가 현격히 낮아지고 있는 것을 확인 할 수가 있었다. 이러한 결과는 버섯 균사체 배양액내의 유용한 다당류와 같은 2차대사산물이 면역기능에 작용을 하여 간기능의 향상을 가져왔다고 사료되며, 앞으로 어떠한 생리활성 물질이 작용에 의해서 간기능을 향상시켰는지는 연구가 지속되어야 할 것이다.



**Fig. 5. Mean accumulated specific feeding rate in Groups A, B, C and D in different duration of experiment on the induction GPT in liver tissue of olive flounder.**  
 A, Basal diet; B, *Phellinus lintrus*; C, *Coriolus versicolor*; D, *Coriolus versicolor* + *Phellinus lintrus*

### 3) 인위감염에 의한 생존율

버섯균사체 배양액 첨가사료를 12주 동안 투여한 질병이 없는 건강한 넙치에 어류 병원성 세균인 *Vibrio anguillarum*을 인위 감염 시킨 후 18일 동안의 누적 폐사율을 조사하였다. (Fig. 6) 그 결과 상황버섯과 운지버섯 균사체 혼합배양액을 첨가한 실험구에서 균사체 배양액을 첨가하지 않은 대조구에 비해 약 40% 정도의 상대생존율이 차이가 나타나는 것을 확인 할 수가 있었으며, 상황버섯균사체 배양액과 운지버섯균사체 배양액이 각각 첨가된 사료를 투여한 실험구에서는 대조구에 비해 약 20% 정도의 상대생존율의 차이를 보였다. 넙치 폐사는 인위 감염 시켜서 24시간이 지난 후부터 나타났으며, 특히 5일부터 폐사율이 급격히 증가함을 보였다. 또한 대조구에서는 실험 9일째 100%의 폐사율을 보였으며, 상황버섯과 운지버섯 균사체 배양액 첨가구, 상황버섯 및 운지버섯 균사체 배양액 단독 처리구에서는 9일부터 더 이상의 폐사가 더 이상 나타나지 않았다.

lysozyme은 많은 어류에 정균 효과가 있다고 보고(Grinde, 1989)되고 있으며, Robertsen *et al.*, (1994)에 의하면 lysozyme의 활성도는 식작용 및 전신 백혈구의 살균 작용과 상응하게 일어난다고 보고 하였고, 버섯 균사체 배양에서 생성되어지는 2차 대사산물에 의해서 라이소자임의 활성능이든지 식세포의 활성화에 영향을 주어 높은 생존율을 보인 것으로 사료되어지며, 앞으로 버섯균사체 배양액의 적절한 농도 및 적절한 투여 기간등과 성분 분석 등 같은 연구가 깊이 있게 이루어진다면, 사료첨가제로서의 충분한 가능성이 있다고 사료된다.

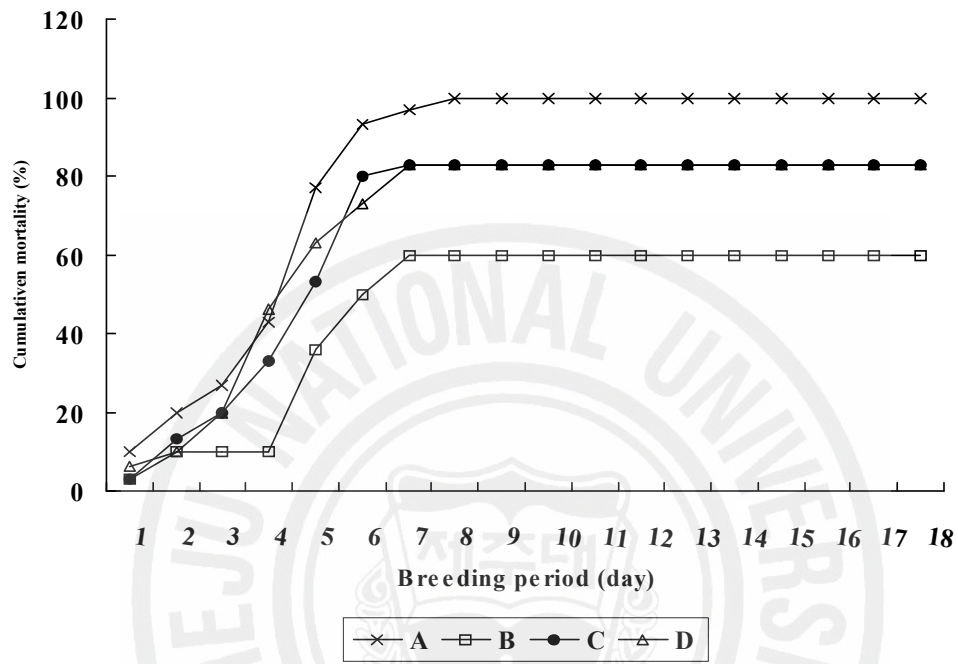


Fig. 6. Cumulative mortality (%) of flounder after 18-day feeding incremental levels after challenge with *V. anguillarum* (n=30).

A, Basal diet; B, *Coriolus versicolor* + *Phellinus lintrus*; C, *Phellinus lintrus*; D, *Coriolus versicolor*.

## IV. 현장 적용 실험을 통한 버섯균사체 배양액에 의한 양식넙치의 면역 활성화효과

### 1. Abstract

We have investigated the effects of mushroom mycelium mixed cultural extract on the immune responses of olive flounder, *Paralichthys olivaceus*. The mixed culture extracts were evaluated for the growth, hematology, lysozyme activity, leukocyte phagocytic activity, and disease resistance against *Vibrio anguillarum*.

In the effect of the growth, the body weight and length gain in the group, which fed with mushroom mycelium mixed cultural extract, were the body weight 52 g and length gain 2.1cm higher than that in the control. For the hematology, the administration of mushroom mycelium mixed cultural extract resulted in increase of glucose. However, there was no distinct differences in GOT (glutamic oxaloacetic transaminase), GPT (glutamic pyruvic transaminase), TG, TP, and LDH (lactate dehydrogenase) among each group.

The activities of Lysozyme were 80% higher in the experimental groups than in the control. The activities of Leucocyte were 66% higher in the experimental groups than in the control. Although lysozyme activity and leucocyte activity showed somewhat decrease after 12 weeks, these activities were still higher than in the control.

The Cumulative mortality (%) after an artificial challenge with  $7 \times 10^8$  CFU of *Vibrio anguillarum* per fish was 25% higher in the experimental groups than the control.

## 2.재료 및 방법

### 1) 사용시료

실험에 사용된 버섯균사체 액체 배양액 시료는 제주도내에 소재한 (주) 대우 환경에서 일반 합성배지에서 상에서 액상으로 복합 배양된 상황버섯과 운지버섯 (*Phellinus linteus*, *Coriolus versicolor*) 균사체 혼합배양액을 사용하였다. (Table 6 )

균주보관은 4℃ 냉장실에 20 ml 시험관에 Potato Dextrose Agar (PDA; Difco. Co. USA). YM (Dextrose 1%, Peptone 0.5%, Malt extract 0.3%, Yeast extract 0.3%, Agar 1.8%) Slant로 보관하면서 필요할 때마다 같은 배지의 8.5 mm 평판배양기에 이식하여 확대 배양을 하였다. 그리고 균사체 직경이 5 cm 이상 자랐을 때 균사체 가장자리에서 Cork borer (5 mm)로 떼어서 접종하였다.

Table 6. The mushroom mycelium mixed cultured used for the tests of physiological response

Name of mushroom		Part used
Korean name	Scientific name	
Sanghwang + Eunji	<i>Phellinus linteus</i> + <i>Coriolus versicolor</i>	Mycelium

## 2) 플라스크배양 및 Carboy 배양

기본 실험배지는 Potato Dextrose Broth (Difco. Co. USA)와 YM 배지를 사용하였다. 배지는 300 ml 삼각 flask 에 100 ml씩 분주하여 121°C, 20분 도안 고압 멸균하였다. 공시균주 접종원을 Cork borer (5 mm)로 5개씩 떼어서 접종하였다. 배양은 120 rpm의 회전수에 온도는 24~30°C 사이에서 회전진탕 배양기에서 균에 따라 7일에서 15일까지 배양하였다. 본 배양의 영양원으로 감귤농축액 첨가 배지를 사용하였는데 대량 배양에 흔히 사용되는 방법인 carboy 배양방법을 이용하였으며, 감귤농축액배지 (10%)는 2 L의 병에 증류수를 첨가한 후, 감귤농축액의 농도 10% (v/v)로 배지를 조제하여 121°C에서 30분간 가압 살균하여 배지를 조제하였으며, 접종원은 균질기로 균질화한 후 2% 접종비로 무균적으로 접종하였다. 25 ± 1°C의 항온시설에서 통기량 0.2 vvm (volume of air added to liquid volume per minute)으로 7~10일간 통기 배양하였다. 배양액을 바로 실험에 사용하였다.

## 3) 실험어 및 사육수조

본 실험에 사용된 실험어는 제주도내 소재 육상 수조식 배양장에서 육성되어진 평균 어체중 116 ± 20 g, 전장 22 ± 1.2 cm인 넙치 (*Paralichthys olivaceus*)를, 콘크리트 수조 (11m, 1.2톤)에서 4500마리씩 무작위 배치하였다.

각 실험 수조는 유수식으로 유수량은 시간당 7회전 되도록 하였으며, 성장함에 따라 시간당 10회전으로 조절하였다.

넙치의 생리를 안정화시키기 위하여 양식 전 기간 동안 검은색 차광망을 설치하였다.

실험기간 중의 해수 온도는 18±1.5°C, 염분은 30‰~32.6‰이었고 용존산소 (DO)는 6~7.25 이었으며, 사료 제작을 위하여 생사료 ( 전갱이, 정어리, 고등어 등의 소형잡어)에 복합 상황버섯과 운지버섯 균사체 배양액을 각각 1% 첨가한 후, 제작한 사료를 격일로 2회 (AM 8h, PM 5h) 12주 동안 투여하였다. 대조구의 경우 생사료만을 투여하였다.

총 실험기간은 2006년 8월14일부터 11월 14일 까지 총 14주 실험 하였다.



#### 4) 성장도조사, 채혈방법 및 혈액학적 성분 분석

실험어의 어체중 측정은 실험 시작 후 3주마다 측정을 하는데 측정 24시간 전에 절식하였다. 측정방법은 각 실험구에서 무작위로 12마리를 선발하여 실험어 전체 무게를 측정하여 증중량을 구하였고, 실험어의 전장은 각각의 개체의 전장을 확인한 후, 평균을 측정하였다.

간수치 측정을 위한 채혈 방법으로는 채혈 24시간 전부터 절식을 시킨 후, 마취제를 사용하지 않고 각 실험구에서 무작위로 10마리를 선발한 후, 1 ml 주사기를 사용하여 넙치의 미부정맥에서 1 ml 채혈하였다. 채취된 혈액은 4°C에서 2시간 보관 후에 4°C 원심분리기를 이용하여 3000 rpm에서 혈청을 분리하였다. 분리된 혈청은 간수치 측정을 위해 실험에 사용하였으며, 남은 시료의 경우 -60°C 에서 따로 보관하였다. 혈청 중의 성분 에 대해서는 9가지 항목을 조사하였는데, Glutamic pyruvic transaminase (GPT), Glutamic oxalacetic transaminase (GOT), Total protein, LDH, Glucose 그리고 TG 의 성분 조사는 혈액자동분석기를 이용하여 측정하였다

#### 5) 혈청 라이소자임 활성 조사

Parry *et al.*,(1965)의 turbidimetric method 을 이용하여 측정 하였다. 0.066M Phosphate buffer (pH6.2)에 부유시킨 *Micrococcus lysodeikticus* (0.2 mg/ml) 부유액 950  $\mu$ l와 미부 혈관에서 채혈한 혈액 유래의 혈청 50  $\mu$ l를 혼합하여 25°C에 30초 와 4분 30초의 흡광도의 변화를 530 nm서 측정하여 분당의 0.001의 흡광도 감소치를 라이소자임의 활성 1단위로 표시하였다,

## 6) 백혈구 활성화

넙치의 신장에서 두신을 분리한 후에 L-15 medium (2% fetal calf serum (FCS), 1% penicillin/streptomycin 및 0.2% heparin)과 함께 nylon mesh 에 통과 시켜서 세포 현탁액을 준비하였다. 54% percoll 에 중층 시킨 후, 450 Xg에서 30분간 원심 분리 하였다.

0.1% tryphan blue 로 분리된 백혈구의 viability 를 확인 한 후에  $2 \times 10^6$  cell/ml 농도로 조정하여 96 well tissue culture plate 에 분주하고 18°C에서 2시간 부착시켜 상정액을 제거한 후 3회 세척하여 식세포를 준비하였다. 식세포가 부착된 well 에 FCS 로 옅소닌화(opsonin) zymosan 을 nitroblue tetrazolium (NBT) 용액에 현탁시킨 부유액을 100  $\mu$ l씩 첨가하고 18°C에서 30분간 반응시킨 다음 100% methanol로 세포를 고정시켰다. 2M KOH 용액 120  $\mu$ l와 dimethyl sulphoxide (DMSO) 140  $\mu$ l를 각 well 에 첨가한 후 630 nm에서 흡광도를 측정하였다. 2M KOH 와 DMSO 혼합액을 blank 로 사용하였다.

## 7) 인위감염에 의한 생존율

3종의 버섯균사체 배양액 첨가 사료의 투여가 넙치의 항병력에 미치는 영향을 조사하기 위하여 해산어류는 물론 갑각류와 패류에까지 침투하여 병을 일으키는 독성이 강한 그람음성 세균인 *Vibrio anguillarum* 을 이용하여 공격실험을 하였다. 실험에 사용된 균주인 *Vibrio anguillarum* (KCCM 2711)은 한국 미생물 보존센터 (Korean Culture Center of Microorganisms, KCCM)에서 분양받아 Nutrient Agar (Difco. Co. USA)을 사용하여 3반복 계대하여 26°C 배양하였으며,  $7 \times 10^5$  cfu/ml의 농도가 되도록 0.85% 멸균 생리식염수에 현탁한 후, 공격 실험용액으로 사용하였다. 공격실험은 사료투여 12주 후에 실시하였으며 대조군을 비롯하여 총 4개의 실험구에서 각각 무작위로 16마리씩 선정하여 1 ml 주사기를 이용하여 각 마리당 100  $\mu$ l 씩 복강주사 한 후 15일 동안 누적 폐사율을 조사하였다.

### 3. 결과 및 고찰

#### 1) 성장도 조사

버섯균사체 배양액 첨가 사료 투여가 넙치의 성장에 미치는 영향을 조사하기 위해 12주 동안 넙치에게 공급한 결과 실험 개시 후 3주 동안은 아무런 유의차가 없었으나, Fig. 7에서 볼 수 있듯이 6주 이후부터 대조구와 실험구의 어체중 증가 차이가 나타나기 시작했다.

어체중의 경우에 9주부터 복합 배양된 상황버섯과 운지버섯 균사체 배양액 첨가 사료를 투여한 실험 그룹이 버섯균사체 배양액을 첨가하지 않은 실험구 보다 약 30 g 정도 높은 체중 증가를 나타냈다. 대조구와의 어체중 비교 실험 결과 최종적으로 12주 후에는 복합 배양된 상황버섯과 운지버섯 균사체 배양액을 첨가한 실험구에서 대조구 보다 약 52 g 정도의 더 높은 어체중 증가를 확인 할 수가 있었다.

또한 어체의 전장인 경우에 실험 개시부터 3주까지는 Fig. 8에서와 같이 대조구와 복합 배양된 상황버섯과 운지버섯 균사체 배양액을 첨가한 실험구에서의 어체 전장은 비슷한 양상을 보여지만, 사료 투여 후 4주 이후부터 대조구와 복합 배양된 상황버섯과 운지버섯 균사체 배양액을 첨가한 실험구의 전장에 차이를 보이면서 최종적으로 12주 후의 전장을 비교해 보았을 때 약 2.1 cm 정도의 전장의 차이를 보였다.

Won *et al.*,(2004)은 7주 동안 4가지 농도가 다른  $\beta$ -1,3/1,6-linked glucan 을 첨가한 사료를 투여한 결과 실험구가 대조구에 비해 대체적으로 높거나 유의차가 없었다고 보고하였다. 이러한 결과는 버섯 균사체의 2차 대사산물로서 많이 함유되어 있는 수용성인  $\beta$ -glucan 과 같은 다당류의 성분에 의해 어체의 면역기능 향상 및 림프구의 활성을 강화시켜 양식넙치의 성장에 영향을 미치는 것으로 사료된다.

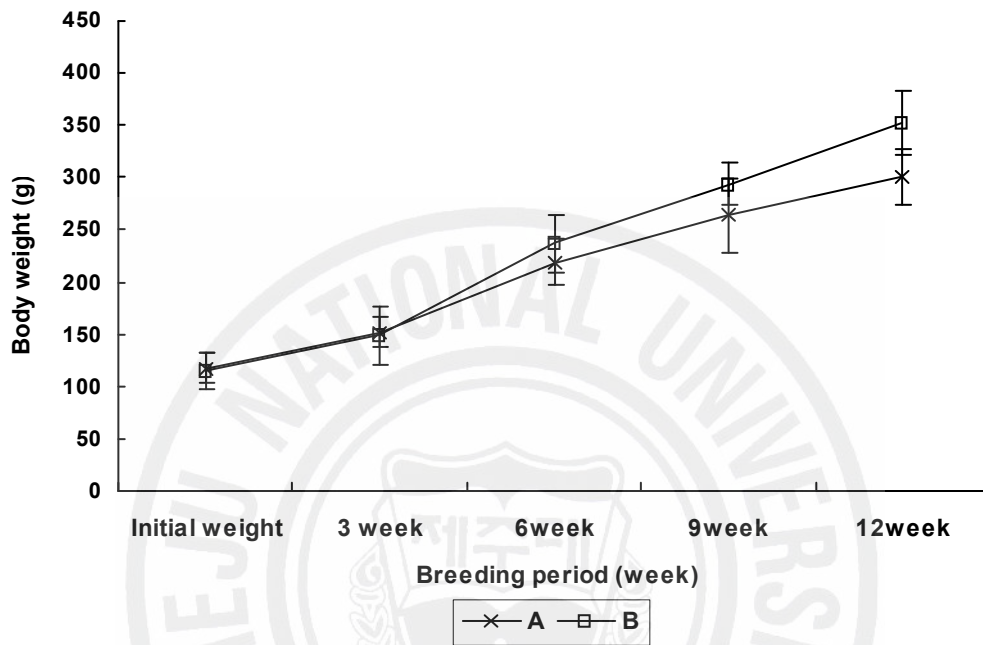


Fig. 7. Changes of the weight gain in the juvenile olive flounder, *Paralichthys olivaceus* fed a commercial diet supplemented with 1% mycelium culture broth for 12 weeks. A, Basal diet; B, *Coriolus versicolor* + *Phellinus lintrus*

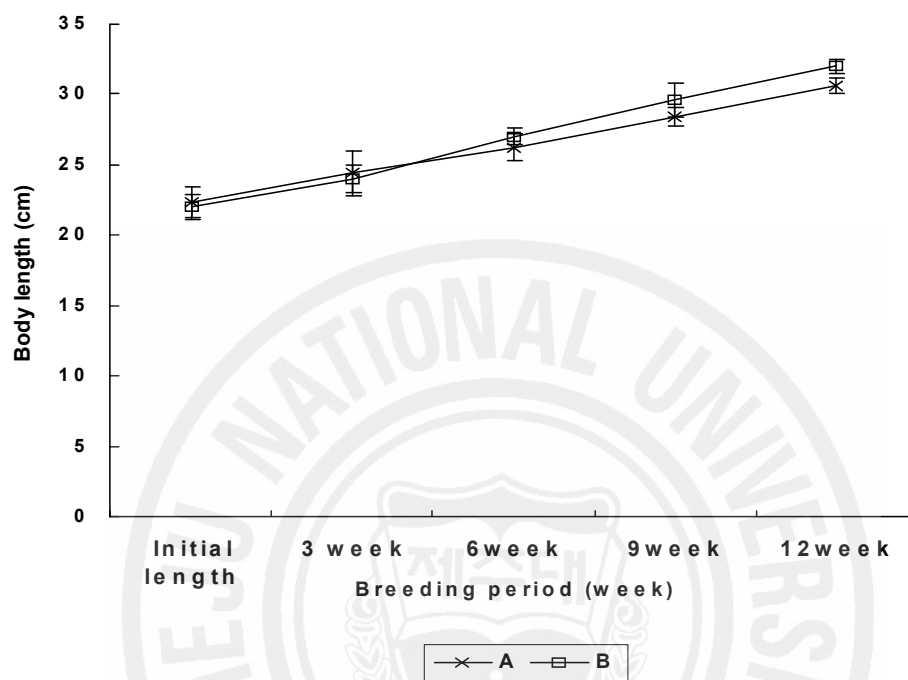


Fig. 8. Changes of the body length in the juvenile olive flounder, *Paralichthys olivaceus* fed a commercial diet supplemented with 1% mycelium culture broth for 12 weeks.

A, Basal diet; B, *Coriolus versicolor* + *Phellinus lintrus*;

## 2) 혈액의 성분 분석

버섯 균사체 배양액 첨가 사료 투여가 넙치의 생리 상태에 미치는 영향을 조사하기 위해 Glutamic pyruvic transaminase (GPT), Glutamic oxalacetic transaminase (GOT), Total protein, LDH, Glucose 그리고 TG 의 변화를 생리적 지표로 하여 조사하였다 (Table 7).

Total protein 의 경우 대조구와 복합 상황버섯과 운지버섯 균사체 배양액을 첨가한 실험구는 대체적으로 유사한 값을 나타냈다. 이는 세포의 항상성을 유지하는 역할을 하고 있는 혈청 내 단백질의 농도 변화가 없다는 것은 생리적으로 나쁜 영향을 주지 않은 것으로 사료된다.

Glucose 버섯 균사체를 첨가한 실험구가 유의적으로 대조구에 비해 높게 나타났으며, 9주에 가장 높은 값을 기록했지만 그 이후에 그 농도가 내려갔다. 혈액의 cortisol 과 glucose 농도는 생체의 2차 스트레스 지표 (Wedmeyer and Yasutake 1977)로 사용되어지고 있는데, 이런 glucose 농도의 증가는 버섯 균사체 배양액에 성분 중  $\beta$ -glucan 에 의한 반응으로 사료된다.  $\beta$ -glucan 은 효모, 사상균, 버섯등의 세포벽에 주요 구조 다당체로서 면역 자극 효과를 가지며 포유류의 저항성을 증가시킨다는 보고가 있으며 (Williams *et al.*, 1983), 어류의 경우에도 비특이적 면역능을 증가시킨다는 보고가 있다 (Robertsen *et al.*, 1994; Figueras *et al.*, 1997). 이처럼  $\beta$ -glucan 이 넙치의 면역 자극제로 작용했으며, 이로 인해서 스트레스 지표인 glucose 농도가 증가되어진 것으로 생각된다. 하지만 12주 후에 수치가 낮아졌는데, 이는 버섯 균사체 배양 추출물의 투여기간에 주요한 단서로 여겨지면 추후 더 많은 연구가 진행 되어야 할 것이다.

TG 는 triglyceride 라는 콜레스테롤, 인지질, 유리지방산과 같이 혈중 지질의 주체를 이루고 있으며 간장에 저장된 TG 는 에너지원으로서 이용되는데 본연구에서는 전체적으로 대조구와 실험구가 비슷한 수치를 나타내고 있다.

GOT (glutamic oxaloacetic transaminase) 란 생체의 여러 가지 장기 세포가운데 있는 효소로 몸의 중요 구성 요소인 아미노산을 형성하는 작용을 한다. GOT 는 장기의 세포가 파괴되면 대량으로 존재하고 이 효소가 특히 많은 곳은 심장, 간,

근육, 적혈구이다. 그러므로 이들 장기는 손상으로 혈청 GOT가 상승한다.

GPT (glutamic pyruvic transaminase)도 GOT와 마찬가지로 아미노산을 형성하는 효소로서 간과 특정장기가 손상되면 이러한 효소가 세포외로 유출되어 이 효소의 수치가 상승한다. 그리고 혈장 전이효소인 GPT의 활성은 오염물질에 의한 간, 심장 및 근육 등의 조직 손상의 지표로 이용되고 있으며 (SaKamoto and Yone, 1978; Shich, 1978; Smith and Ramos, 1980), 일반적으로 오염물질에 의해 증가하는 경향을 나타낸다 (Casillas and Ames, 1985; Rao *et al.*, 1990).

대조구와 실험구의 GOT 수치는 지속적으로 9주까지 수치가 낮아졌지만, 12주 부터는 다시 높아지긴 했으나 그 수치가 미미하여 거의 비슷한 수치를 나타냈고 처음 측정한 수치보다 모두 낮은 수치를 기록하였다.

GPT는 12주 까지 지속적으로 낮은 수치를 나타냈으며, 12주 부터는 대조구에 비해 실험구가 낮은 수치를 나타내었다. 실험구의 GOT와 GPT 수치가 대조구와 거의 비슷한 수치를 나타내는 것으로 보아 버섯 균사체 배양액을 첨가하여도 간의 기능의 손상이나 혈액 내의 생리 기능에 장애가 없는 것으로 사료된다.

LDH는 lactate dehydronase라는 당분해과정의 마지막 단계에 작용하는 효소의 이름이다. 이 LDH는 간, 근육, 골격, 뇌, 신장, 적혈구, 심장 등에 많이 분포하는 효소이기 때문에 이러한 장기에 염증이나 세포 파괴시 LDH가 올라갈 수 있다.

실험구의 경우 LDH는 12주 까지 지속적으로 낮은 수치를 나타냈지만 대조구의 경우 유의적인 것을 찾을 수가 없었다. 하지만 대조구와 실험구 둘다 처음 수치 보다 다 낮아지는 현상을 나타냈으며, 대조구와 실험구가 거의 비슷한 수치를 나타내는 거승로 보아 버섯 균사체 배양액을 첨가하여도 세포의 손상이나 혈액 내의 생리기능에 장애가 없는 것으로 생각된다.

**Table 7. Blood chemistry of juvenile flounder fed on mycelium mixed culture broth supplemented feeds**

		GLU(mg/DL)	GOT(U/L)	GPT(U/L)	TP(g/DL)	LDH(W.U)	TG(mg/DL)
0 week	A	45±7	60±6	45±9	3.22 ±0.29	589±48	645±39
	B	47±5	71±9	52±3	3.41±0.2	590.8±79	600±55
3 week	A	46±11	52±3	37±4	4.0±0.56	482.7±34	657±12
	B	52±7	58±7	40±8	4.1±0.89	520.9±70	645±76
6 week	A	48±6	45±9	27±8	5.6±0.27	520.9±21	592±76
	B	55±11	43±8	27±6	5.2±0.53	490.1±72	620±22
9 week	A	51±9	24±8	18±9	5.2±0.32	448.4±89	590±67
	B	60±9	26±3	20±5	5.4±01	470.9±55	612±10
12 week	A	53±3	32±7	14±9	5.9±0.6	400.9±92	642±78
	B	55±7	29±1	16±7	5.1±0.12	390±76	600±46

\*, significant difference from control, p<0.05.

A, Basal diet; B, *Coriolus versicolor* + *Phellinus lintrus*



### 3) 라이소자임 활성

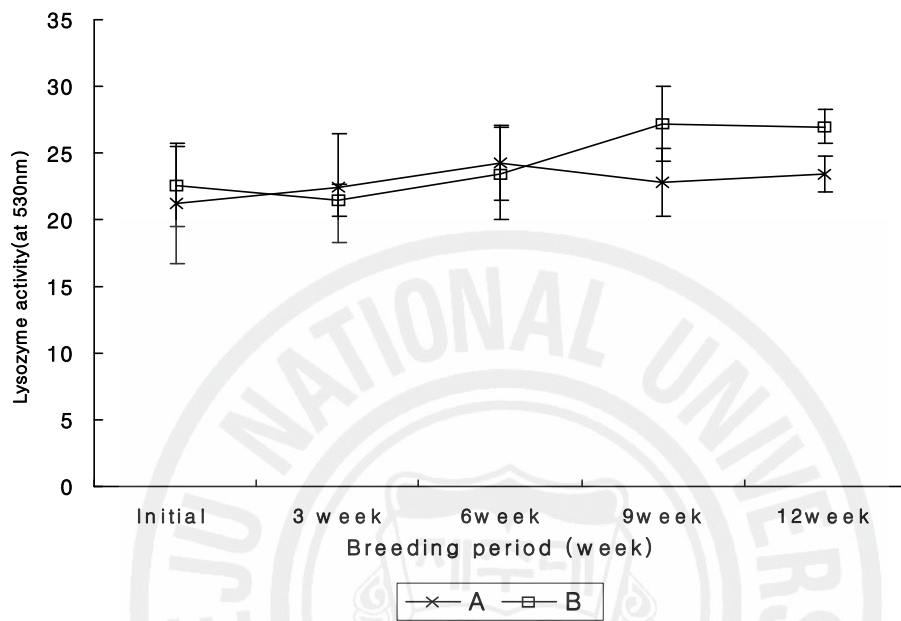
lysozyme 은 비특이적 방어기작들 중에 대표적인 것으로 자연계에 넓게 분포하는 효소로서, 이 효소는 peptidoglycan 이라는 세균의 세포벽 성분을 분해하는 작용을 가지고 있으며, 이외에도 읍소닌, 항바이러스, 항암작용등에도 관여를 하는 것으로서 보고되고 있다 (Jolles and Jolles, 1984).

머섯 균사체 혼합 배양액을 첨가 사료를 공급한 결과 6주까지는 대조구와 실험구의 거의 비슷한 값을 보였지만 9주와 12주에서는 대조구에 비해 높은 수치를 나타냈다. 실험구의 경우 지속적으로 증가하다가 12주에는 다소 낮아지는 경향을 보였지만 대조구에 비해 높은 수치를 나타냈다(Fig. 9).

이는 머섯 균사체 배양액 성분 중에  $\beta$ -glucan 성분에 의한 것으로 사료된다.  $\beta$ -glucan 경구투여는 주사에 의한 투여와 마찬가지로 많은 어종에서 lysozyme 의 활성이 증가 되었고 (Yoshida *et al.*, 1995; Baulny *et al.*, 1996), Won *et al.*,(2004) 은 7주 동안 4가지 농도가 다른  $\beta$ -1,3/1,6-linked glucan 을 첨가한 사료를 투여한 결과 6주까지는 lysozyme 증가 하다가 7주에서는 대조구와 비슷한 수치로 감소한다고 하였다. 또한 박 등 (1996)은 주사법으로 3일 간격으로  $\beta$ -glucan 을 2번 접종 하였을 때 1차 접종 보다 2차 접종 때 더 높은 lysozyme 활성을 보였다고 하였다. 잉어와 넙치에 5주간  $\beta$ -glucan 을 투여한 결과 박 등 (2001)도 lysozyme 활성이 증가하였다고 보고하였고, Yoshida *et al.* (1996)는 African catfish 에서는 투여 후 50일 까지도 lysozyme 활성이 높아다고 하였다.

이는 어종에 따라 어체내의  $\beta$ -glucan 을 배출하는 기간에 차이가 나며, 기간이 길어질수록 비특이적 면역계를 지속적으로 자극함으로써 lysozyme 의 활성을 증가시킨다고 사료된다.

체액성 면역계를 담당하고 있는 lysozyme 의 활성이 증가하는 것으로 보아 머섯 균사체 배양 추출물이 면역 기능 향상에 효과가 있을 것으로 사료된다.



**Fig. 9.** Lysozyme activity in the serum from the olive flounder, *Paralichthys olivaceus* fed on mycelium culture broth supplemented feeds for 12 weeks. A, Basal diet; B, *Coriolus versicolor* + *Phellinus lintrus*;

#### 4) 식세포 활성 산소 측정

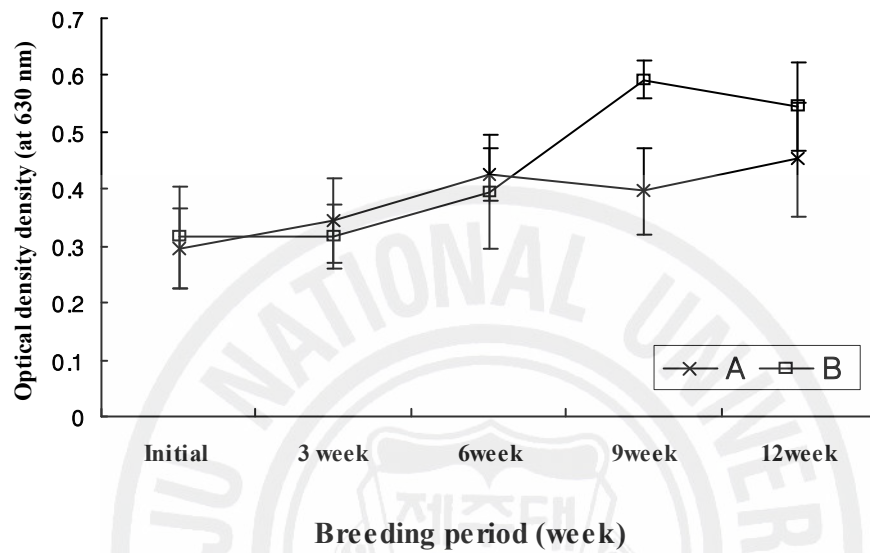
두신 식세포의 살균 작용의 지표로 널리 이용되고 있는  $O_2^-$  생성능의 조사하여 식세포 활성을 알아보았다. 식세포는 병원체가 침입하여 자극하면 활성산소 ( $O_2^-$ )와 같은 reactive oxygen species (ROS)를 생산하는데, 이 물질들이 강력한 살균 효과가 있는 것으로 알려져 있다 (Ellis, 1999).

상황버섯과 운지버섯 균사체 복합 배양액 첨가사료를 12주간 투여하면서 식세포의 활성 산소를 측정하였다. 그 결과 실험 시작 6주까지는 비슷한 값을 나타냈지만, 9주와 12주에서는 실험구가 대조구에 비해 높은 활성을 보여줬다. 특히 9주에서 실험구가 가장 좋은 활성을 나타냈고 12주에는 다소 낮아지는 활성을 나타냈지만 대조구에 비해 높은 활성을 나타냈다(Fig. 10).

12 주 후 활성이 낮아지는 현상은 버섯 균사체 혼합 배양물의 첨가사료에서의 투여시기에 관련하여 기초 자료로서 활용 할 수 있을 것으로 여겨지며, 추 후 더 많은 실험을 통해서 버섯 균사체 혼합 배양물의 첨가 농도와 시기에 관련된 연구가 진행 되어져야 할 것이다(Fig. 10).

첨가 사료를 투여한 실험구에서 식세포의 높은 활성이 나타난 것으로 보아 버섯 균사체 배양액에 함유되어 있는 생리활성물질 성분이 어류의 비특이적 세포성 면역기능 증강에 중요한 역할을 할 것으로 기대된다.

이와 유사한 결과로, Won *et al.*,(2004)은 7주 동안 4가지 농도가 다른  $\beta$ -1,3/1,6-linked glucan 을 첨가한 사료를 투여한 결과 0.05%와 0.1%첨가구에서 7주째 까지 다른 실험구에 비해 비교적 높은 활성을 나타냈으며, 박 등 (2001) 은  $\beta$ -glucan 첨가사료 투여기간 동안 마크로파아지와 호중구수는 투여기간에는 증간, 무투여기간에는 감소하는 경향을 보였지만, 재 투여 후에는 급격히 상승하여 높은 활성을 유지하였다고 보고 하였다. 또한 Baulny *et al.*,(1997)은 yeast glucan 을 35일간 경구 투여한 turbot 에서도 1일 째와 14일 째에 NBT 환원능이 유의 하게 향상된다고 하였다.



**Fig. 10. NBT reduction of phagocytes in the head kidney of the olive flounder, *Paralichthys olivaceus* fed on mycelium culture broth supplemented feeds for 12 weeks.**  
 A, Basal diet; B, *Coriolus versicolor* + *Phellinus lintrus*;

## 5) 공격 실험

버섯균사체 배양액 첨가사료를 12주 동안 투여한 질병이 없는 건강한 넙치에 어류 병원성 세균인 *Vibrio anguillarum* 을 인위 감염 시킨 후 15일 동안에 누적 폐사률을 조사하였다. (Fig. 6) 그 결과 복합 상황버섯과 운지버섯 균사체 배양액 첨가한 실험구에서 대조구보다 25% 높은 생존률을 나타냈으며, 항생제를 투여한 그룹에 비해서는 12.5% 높은 생존률을 나타냈다.

실험구의 경우 3일부터 폐사가 시작되어 6일까지 나타났고 그 이후에 폐사가 일어나지 않았다. 대조구와 항생제 첨가구에 경우 4일부터 폐사어가 나타났으면 7~8일 까지 폐사가 일어났다.

이러한 결과는 버섯균사체 배양액에 포함된 성분이 넙치의 비특이적 면역계 중 세포성 면역을 담당하는 식세포의 활성화와 체액성 면역계를 담당하는 라이소자임 활성화에 영향을 준 것으로 사료 된다. 일반적으로 면역증강물질로 잘 알려진  $\beta$ -glucan 과 같은 다당류의 성분이 버섯균 균사체의 2차 대사산물로서 많이 함유되어 있다는 연구결과가 있으며, 또한 이러한 성분이 경구투여로 장의 흡수도의 백혈구의 탐식능 (Itami *et al.*, 1996), 리소자임의 활성화 (Yoshida *et al.*, 1995; Baulny *et al.*, 1996), 화학발광의 증가 (Duncan and Klesius, 1996)와 백혈구의 유주능 (Duncan and Klesius, 1996) 및 활성산소의 생성 증가 (Yoshida *et al.*) 등과 같은 비특이적 방어인자의 활성을 증가시킨다는 보고가 있다. 체액성 면역계를 담당하는 식세포는 병원체가 침입하여 자극하면 활성산소 ( $O_2^-$ )와 같은 reactive oxygen species (ROS)를 생산하는데, 이 물질들은 강력한 살균 효과가 있는 것으로 알려져 있다(Ellis, 1999). 어류의 혈청중의 라이소자임은 세균 세포벽의 삼투압 작용에 손상을 주어 용균시키며, lysozyme 은 많은 어류에 정균 효과가 있다고 보고 (Grinde, 1980)되고 있으며, Kim *et al.*, (1992)은 넙치의 라이소자임이 *Micrococcus luteuse*, *Aeromonas hydrophila*, *Pseudomonas fluorescens*, *Streptococcus epidermis* 에 대해서 높은 정균 효과가 있으며, 실제 생체 내에서는 보체나 식세포 등과 협력하여 훨씬 높은 용균 효과를 보일 것이라고 하였다. 또한 Park *et al.*(1996)한국산 메기에  $\beta$ -glucan 을 접종하였을 때 라이소자임 활성이 높게 나타

난다고 하였다. 본 실험에서는 라이소자임의 활성능을 측정한 결과 대조구에 비해 수치가 높았으면 뿐만 아니라 백혈구의 활성 또한 대조구에 비해 높은 수치를 나타내어 공격실험과 일맥상통하는 결과를 나타내고 있다. 결론적으로 버섯균사체 배양액의 포함되어진  $\beta$ -glucan 과 같은 다당류가 라이소자임의 활성이라든지 식세포의 활성화에 영향을 주어 높은 생존율을 보인 것으로 사료되어지며, 앞으로 버섯균사체 배양액의 적절한 농도, 적절한 투여 기간 및 성분 분석등 같은 연구가 깊이 있게 이루어진다면, 사료첨가제로서의 충분한 이용 가능성이 있다고 사료된다.

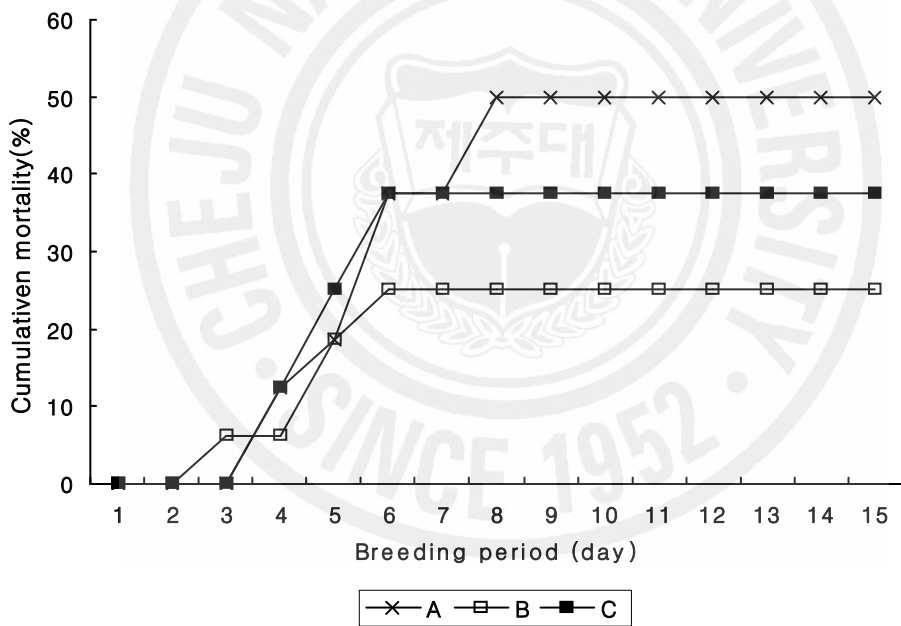


Fig. 11. Cumulative mortality (%) of flounder after 15-day feeding incremental levels after challenge with *V. anguillarum* (n=16).

A, Basal diet; B, *Coriolus versicolor* + *Phellinus lintrus*; C, Basal diet + Tetracycline

## V. 요약

본 연구는 항암, 항균, 항산화 활성이 뛰어나다고 보고되고 있는 버섯 균사체 2차 대사산물을 사료첨가제로서 이용 가능성을 확인하기 위하여 실험을 실시하였다.

첫 번째는 다양한 약효 성분이 많이 함유된 감귤 농축액을 배양 배지로 하여 버섯 균사체를 액체 배양한 배양 추출물과 일반 합성 배지에서 배양한 버섯 균사체 배양 추출물을 이용하여 *in vitro* 에서 항균활성, 항산화 및 항암효과를 비교 조사하였다.

이 실험에서는 5종류의 버섯균사체 배양액 추출물을 사용 하였다. 버섯균사체 배양액을 이용하여 병원성 세균 및 어류질병세균에 대한 항균활성을 조사한 결과 대부분의 시료에서 항균활성이 있는 것으로 나타났다.

일반 합성배지 경우 YM broth 에서 배양한 상황버섯과 운지버섯 균사체 배양 추출물의 가장 높은 항균활성을 나타내었으며,

반면 10% citrus extract media 에서 배양한 상황버섯과 운지버섯 균사체 배양 추출물의 10% citrus extract media 에서 배양한 상황버섯, 운지버섯과 꽃송이버섯 배양 추출물 보다 전반적으로 높은 항균활성을 나타내었으며, 10% citrus extract filtration 에서 배양한 상황버섯과 운지버섯 균사체 배양 추출물은 10% citrus extract media 에서 배양한 상황버섯과 운지버섯 균사체 배양 추출물과 거의 비슷한 항균활성 효과를 나타내었다.

항산화활성은 각 시료의 농도가 높아질수록 항산화력이 증가하였으며, 특히 YM broth 에서 배양한 상황버섯과 운지버섯 균사체 배양 추출물, PD broth 에서 배양한 상황버섯과 운지버섯 균사체 배양 추출물과 10% citrus extract media 에서 배양한 상황버섯, 운지버섯과 꽃송이버섯 균사체 배양 추출물에서 0.1 mg/ml 일 때 80% 이상의 radical 소거 활성을 보였으며, 이러한 결과는 일반 합성항산화제와 비교해 보았을 때 농도적인 면에서 차이를 보였지만, 본 연구에서는 분리, 정제 과정을 거치지 않은 Crude 한 시료를 사용했기 때문에 천연물질로서 이용가능성이 충분히 있다고 사료된다.

MTT 정량분석법을 이용하여, 세포독성 검색의 결과 10% citrus 만을 첨가한 경우보다 모두 높은 항암 억제활성을 나타냈으며, 대체적으로 40%이상의 항암 억제활성을 나타냈다. 특히 10% citrus extract media 에서 배양한 상황버섯과 운지버섯 균사체 배양 추출물과 10% citrus extract media 에서 배양한 상황버섯, 운지버섯과 꽃송이 버섯 균사체 배양 추출물에서 가장 좋은 활성을 나타냈다.

두 번째로, 버섯 균사체 배양액을 이용하여 양식어류에 대한 생리적 반응, 성장 및 세균 공격성 실험 등을 비교 조사하여 양식 산업에 있어서 생리학적 기초 자료로서 이용하기 위해 본 연구를 실시하였다.

일반 시중에서 판매중인 배합사료에 상황버섯 균사체와 운지버섯 균사체를 혼합배양한 배양액 1개와, 상황버섯 균사체와 운지버섯균사체를 각각 단독으로 배양한 배양액 2개로 총 3종류의 배양액을 가지고 배합사료와 혼합하여 12주 동안 넙치에게 급이 하여 성장률, GPT 측정 및 어류병원성 균주인 *V. anguillarum* 을 이용하여 공격 실험을 실시한 결과 대조구에 비해 균사체배양액이 첨가된 실험구에서 좋은 효과를 보였다.

성장률인 경우 대조구에 비해 실험구가 12~20% 가량 어체중이 증가와 어체의 평균 전장이 길어도 전체적으로 증가하는 양상을 나타내었다. 또한 10주에서는 운지버섯과 상황버섯 균사체 혼합 배양액을 첨가한 사료의 실험구가 다른 실험구에 비해 높은 체중을 나타냈다.

넙치의 간수치를 실험한 결과 GPT 측정 Karamen unit 수치가 사육기간이 지날수록 지속적으로 낮아졌으며, 실험구들 또한 대조구와 비교해보았을 때 전체적으로 수치가 낮은 것을 확인 할 수가 있었다. 인위적인 세균 공격실험의 경우 전체적으로 실험구가 대조구에 비해 20~40% 정도의 높은 생존율의 차이를 보였으며, 특히 혼합배양액을 첨가한 실험구의 경우 가장 높은 40%의 생존율을 나타냈다. 버섯균사체 배양액인 경우, 양식넙치의 성장에 영향을 주기 때문에, 사료첨가제로서 이 이용가능성이 매우 크다고 사료된다.

세 번째로, 위 연구 결과를 바탕으로 현장 적용 실험을 통해 균사체 배양액 첨가사료의 가능성과 첨가사료의 효과를 면역학적으로 평가하여 경제적이고 친환경적인 양식넙치에 공급 할 수 있는 사료첨가제로서의 가능성을 알아보기 위해 수행하였다.



버섯균사체 배양액 첨가 사료 투여가 넙치의 성장에 미치는 영향을 조사하기 위해 12주 동안 넙치에게 공급한 결과 대조구와의 어체중 비교 실험 결과 최종적으로 12주 후에는 복합 배양된 상황버섯과 운지버섯 균사체 배양액을 첨가한 실험구에서 대조구 보다 약 52g 정도의 더 높은 어체중 증가를 확인 할 수가 있었다.

또한 어체의 전장인 경우에 12주 후의 전장을 비교해 보았을 때 약 2.1 cm 정도의 전장의 차이를 보였다.

버섯 균사체 배양액 첨가 사료 투여가 넙치의 생리 상태에 미치는 영향을 조사하기 위해 Glutamic pyruvic transaminase (GPT), Glutamic oxalacetic transaminase (GOT), Total protein, LDH, Glucose 그리고 TG 의 변화를 생리적 지표로 하여 조사하였다. 혈액분석인 경우 글루코스 수치에서 대조구에 비해 높게 나타났지만, 나머지 혈액분석 (GOT, GPT, TG, TP 와 LDH)은 대조구와 비슷한 수치를 나타내었다. 라이소자임 활성과 백혈구 활성도 대조구에 높은 활성을 나타냈다. 라이소자임 활성과 백혈구 활성의 경우 지속적인 증가를 보인 후, 12주후에는 다소 수치가 떨어지는 경향을 나타냈지만, 대조구에 비해 높은 수치였다.

## 참고문헌

- Anderson, D.P., 1992. Immunostimulants, adjuvants, and vaccine carriers in fish: applications to aquaculture. *Annu. Rev. Fish Dis.*, 2, 281-307.
- Aoki, T., 1992. Chemotherapy and drug resistance in fish farms in Japan. In: Shariff, M., Subasinghe, R.P., Arthur, J.R. (Eds.), *Diseases in Asian Aquaculture Vol. 1. Fish Health Section*. Asian Fisheries Society, Manila, Philippines, pp. 519-529.
- Ainsworth, A.J., 1994. A  $\beta$ -glucan inhibitable zymosan receptor on channel catfish neutrophils. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 41, 141-152.
- Baulny, M.O., C. Quentel, V. Foundier, F. Lamour and R.L. Gouvello. 1996. Effect of long term oral administration of  $\beta$ -glucan as an immunomodulant or an adjuvant on some non-specific parameters of the immune response of turbot *scophthalmus maximus*. *Dis Aquat. Org.* 26, 139-147.
- Castro, R., N. Couso, A. Obach. and J. Lamas, 1999. Effect of different  $\beta$ -glucans on the respiratory burst of turbot (*Psetta maxima*) and gilthead seabream (*Sparus aurata*) phagocytes. *Fish Shellfish Immunol.* 9, 529-541.
- Chen, D. and A.J. Ainsworth, 1992. Glucan administration potentiates immune defense mechanisms of channel catfish, *Ictalurus punctatus* Rafineque. *J. Fish Dis.* 15, 295-304.
- Duncan, P.L. and P.H. Klesius. 1996. Dietary immunomodulants enhance nonspecific immune responses in channel catfish but not resistance to *Edwardsiella ictaluri*. T.

Aquat Anim Health, 8, 241-248

Ebihara, K. and Y. Minamishima, 1984. Protective effect of biological response modifiers on murine cytomegalovirus infection. J .Virology, 51, 117.

Ellis, A.E. 1999. Immunity to bacteria in fish. Fish & Shellfish Immunol. 9, 291-308.

Engstad, R.E., B. Robertson and E. Frivold, 1992. Yeast glucan induces increase in activity of lysozyme and complement-mediated haemolytic activity in Atlantic salmon blood. Fish Shellfish Immunol. 2, 287-729.

Eun J.B, Y.M. Jung and G.J. Woo, 1996. Identification and determination of dietary fibers and flavonoids and peel of Korean Tangerine(*Citrus aurantium* var). Korean J Food Sci Technol 28(2), 371-377.

Figueras, A., M.M. Santare'm and B. Novoa, 1997. In vitro immunostimulation of turbot (*Scophthalmus maximus*) leukocytes with  $\beta$ -glucan and/or *Photobacterium damsela* bacterin. Fish Pathol. 32, 153-157.

Harada, T., N. Miura, Y. Adachi, M. Nakajima, T. Yadomae, and N. Ohno. 2002a. Effect of SCG, 1,3- $\beta$ -D-glucan from *Sparassis crispa* on the hematopoietic response in cyclophosphamide induced Leukopenic mice. Biol. pharm. bull. 25(7), 931-939.

Hyuk-Su Oh and W.B Park et al., 2003. Antimicrobial Activity of Extracts from Citrus Seeds. Korean J Culinary Research 9(4), 69-80.

Jolles, p. and J. Jolles, 1984. What is new in lysozyme research Always a model system, today as yesterday. Mol biachem. 63: 165-189. 1984

Kim B.k, S.Y. Jang and M.J. shim, 1978. Studies on the higher fungi of Korea (VIII), Sterols of *Coriolus versicolor* (Fr), Korean J Mycology 6, 1-4.

Kim, J. W., S.I. ParK and S.K. Chun, 1992 Purification and antibacterial effect of lysozyme from flounder, *Paralichthys olivaceus*. J. Fish Pathol 5, 87-92

Kupka, J., T. Anke and F. Oberwinkler, 1979. Antibiotics from Basidiomycetes. VII. Crinipellin, A New Antibiotic from the Basidiomycetous Fungus *Crinipellis stipitaria*(Fr.) Pat. J. Antibiotics 32(2), 130-135

Won K.M, S.M Kim and S.Ll Park., 2004 The Effects of  $\beta$ -1,3/1,6-linked Glucan in the Diet on Immune Responses of Olive Flounder, *Paralichthys olivaceus* by Oral Administration. J.Fish Pathol., 17(1), 29-38.

Lee B.W, M.S Lee , K.M Park , C.H Kim, P.U Ahn and C.U Choi, 1992. Anticancer activities of the extract from the mycelia of *Coriolus versicolor*. Korean J Appl Microbiol biotechnol 20, 311-315.

Midland, S.L., Izac, R.R., Wing, R.M., Zaki, A.I., Munnecke, D.E. and Sims, J.J. 1982. Melleolide, A New Antibiotic From *Armillari mellea*. *Tetrahedron Lett.* 23, 2515-2518

Mau JT. H.C Lin and C.C Chen, 2001. Non - volatile components of several medicinal mushrooms. Food Research International 3, 521-526.

Ng TB., 1998 A review of research on the protein bound polysaccharide (polysaccharopeptide, PSP) from the mushroom *Coriolus versicolor* (Basidiomycetes:

Polyporaceae). *Gen Pharmac* 30, 1-4.

Oshiba J, and M. Kato, (1981) : Nutritional Regulation, Depression of cardiac action by the isolated naringin, *Mukogawa Joshidaigaku Kiyō* 29; 1-8.

Paterson, W.D., W. Parker, M. Poy, and M.J Horne, 1992. Prevention of furunculosis using orally applied vaccines. In: Kimura, T. (Ed.), *Proceedings of the OJI International Symposium on Salmonid Diseases*. Hokkaido University Press, Japan, pp. 225-232.

Park. S. W., Y.G. Kim and D.L. Choi, 1996. Increase in phagocytic activity of peripheral neutrophil and lysozyme activity of blood serum in Korea catfish (*Silurus asotus*) intraperitoneally injected with  $\beta$ -glucan. *J. Fish Pathol.*, 9, 87-93.

Robertsen, B., R.E. Engstad and J.B. Jørgensen, 1994.  $\beta$ -glucans as immunostimulants in fish. In: Stolen, J.S., Fletcher, T.C. (Eds.), *Modulators of Fish Immune Responses*, vol. 1. SOS Publications, Fair Haven, NJ, pp. 83-99.

Sakai, M., 1999. Current research status of fish immunostimulants. *Aquaculture* 172, 63-92.

Song, C. H., K.S. Ra, B.K. Yang and Y.J. Jeon, 1998. Immuno - stimulating activity of *Phellinus linteus*. *Kor. j. Mycol.* 26(1), 86-90

Ikekawa, T., M. Nakanishi, N. Uehara, G. Chihara and F. Fukuoka : *Jpn. J.*, 1969. *Cancer Res.(Gann)*, 59, 155, 159(1968); *Cancer Res.* 29,734.

Tsukagoshi, s. and F. Ohashi, 1974. Protein-bound polysaccharide preparation, PS-K, effective against mouse sarcoma 180 and rat ascites hepatoma AII-13 by oral use. *Jpn. J. Cancer Res*, 65, 557-560.

wedemeyer, G.A. and W.T. Yasutake. 1977. Clinical methods for the effects of environmental stress on fish health. U.S. Fish and Wildlife Service Technical pp. 89

Williams, D.L., I.W. Browder, and N.R. Luzio, 1983. Immunotherapeutic modification of *Escherichia coli*-induced experimental peritonitis and bacteremia by glucan. *Surgery*, 93, 448-454

Won K. M., S. M. Kim and S. I. Park., 2004. The Effects of  $\beta$ -1,3/1,6-linked Glucan in the Diet on Immune Responses of Olive Flounder, *Paralichthys olivaceus* by Oral Administration. *J.Fish Pathol.*, 17(1), 29-38.

Yoshida, T., R. Kruger and V. Inglis, 1995. Aguroentation of non-specific in African catfish, *Clarias gariepinus* (Burchell), by the long-term oral administration of immunostimulants. *J. Fish Dis.*, 18, 195-198.

김창중, 정진모, 1990. Flavonoids 의 약리작용(I), *대한약학회지* 34, 348-364.

박성우, 김영길, 최동립, 1996.  $\beta$ -glucan 을 접종한 한국산 메기 (*Silurus asotus*)의 호중구와 리소자임 활성. *한국어병학회지* 9, 87-93.

이정희, 이서래, 1994. 식물성 식품 중 페놀성 물질의 몇 가지 생리활성, *한국식품과학회지* 26(3), 317-323.

장호남, 남경은, 허중화, 1977. 한국산 감귤과피의 효율적 이용에 관한 연구(2), *한국식품과학회지* 9(4), 252-254.

조용계, 1995. 운향과 식물 종자의 향산화성 물질에 향산화성 물질에 관한 연구, *한국음식문화 연구논총* 527-530.

좌승미, 2001. 감귤과피로부터 발암 promotion 억제 활성성분의 분리, 제주대학교 대학원 석사학위논문.

차재영, 조영수, 1997. 감귤류 플라보노이드의 생리기능 활성, 한국농화학회지 40(6), 122-128.

황혜정 윤광로, 1995. 한국산 감귤의 Carotenoid 계 색소, 한국 식품과학회지 27(6), 950-957.



## 감사의 글

제가 실험실 생활을 시작한지 벌써 5년이라는 시간이 흘렀습니다. 아무것도 모르고 그냥 미생물이 좋았고 미생물에 관해서 좀더 배우고 싶은 욕심에 들어 오게 됐던 미생물 실험실.

그때는 배지, 실험기구 눈에 보이는 모든 것이 저에게 신기하고 대단해 보였습니다.

5년 동안 실험실 생활을 하면서 가끔 힘든 일도 있었지만 그래도 저에게 너무 소중한 공간이었습니다.

이런 공간에서 항상 저를 지켜봐 주시고 이끌어주신 허문수 교수님 지도에 힘든 실험실 생활도 잘 버틸 수 있었고 이렇게 석사 졸업도 할 수 있었습니다.

허문수 교수님 정말 감사합니다.

바쁜신 와중에도 저의 논문을 심사해주신 전유진 교수님, 송춘복 교수님과 항상 저에게 많은 가르침을 주신 여인규 교수님, 이제희 교수님 정말 감사합니다.

제가 이렇게 졸업할 수 있도록 도와주시고 관심을 가져주신 진창남 과장님, 고대회 계장님, 양병규 선배님, 강철영 선배님, 문창하 선배님 감사드리며 실험에 많은 도움을 주신 영환오빠에게도 감사의 말씀을 전하며 항상 저랑 동고동락하면서 많은 조언과 관심을 아끼지 않았던 영진오빠, 용욱오빠, 만철오빠, 주상오빠, 태원오빠, 선경, 현식, 윤범, 봉근, 정호, 동민, 승헌이에게 정말 감사합니다. 또한 유전육종실험실원, 분자유전학실험실원, 해양자원이용공학 실험실원, 어류분자생리학 실험실원에게도 감사 드립니다.

해양수산자원연구소에서 일하는 동안 저에게 많은 가르침과 격려를 아끼지 않았던 강봉조연구사님께 깊은 감사를 드리며 해양수산자원연구소에서 저를 항상 도와준 친구 김희정과 해양수산자원연구소 모두 분들께 감사 드립니다.

2년 동안 석사 논문 쓰느라고 고생한 긴내, 선희, 미란에게도 감사의 말을 드리며 졸업 동기이자 학부생활을 알차게 만들어준 동기들인 상규오빠, 길남오빠, 태형오빠 그리고 학부생활 동안 저에게 많은 도움을 주신 문휴오빠, 수진오빠, 철홍오빠, 정환오빠, 맹진오빠, 경주오빠, 승홍오빠, 송헌오빠에게 감사 드립니다.

학부생활 동안 많이 싸우기도 했지만 기정, 수미 때문에 힘든 학교생활도 즐겁게 할 수 있었고, 이렇게 졸업까지 할 수 있었습니다. 어릴 때부터 저를 지켜봐 주고 제가 힘들 때마다 격려해준 은숙, 은실, 정열, 영내, 상아에게도 감사 드립니다.

저를 이 세상에 있게 해주시고 항상 말없이 이 딸을 지켜봐 주시고 잘 이끌어 주신 우리 아버지, 어머니 그리고 저에게 항상 많은 조언을 해주시고 아껴주신 우리 희경언니, 영선언니, 영아언니, 형부 정말 감사하고 사랑합니다.

이 논문은 저를 사랑해주시고 관심 가져 주신 모두 분들께 바칩니다.