

Antimicrobial Effect of the Submerged Culture of *Sparassis crispa* in Soybean Curd Whey

Eun Ji Lee¹, Ji-Eun Kim^{1,3}, Min-Ju Park¹, Dong-Cheol Park⁴, Sam-Pin Lee^{1,2*}

¹Department of Food Science and Technology, Keimyung University, Daegu 704-701, Korea

²The Center for Traditional Microorganism Resource (TMR), Keimyung University, Daegu 704-701, Korea

³World Bio Tech. Co., Ltd., Sangju 742-912, Korea

⁴Department of Hotel Cuisine and Food Service Management, Gimcheon University, Gimcheon 704-704, Korea

순물을 이용한 꽃송이 버섯 균사체 배양액의 항균활성 평가

이은지¹ · 김지은^{1,3} · 박민주¹ · 박동철⁴ · 이삼빈^{1,2*}

¹계명대학교 식품가공학과, ²계명대학교 TMR 센터, ³(주)월드바이오텍,

⁴김천대학교 호텔조리외식경영학과

Abstract

Sparassis crispa was cultivated using soybean curd whey, and its antimicrobial activities were examined against those of eight microorganisms that were foodborne pathogens or food-poisoning bacteria. The culture broth of soybean curd whey was superior in mycelium content (17.76 g/L) to that of the defined culture broth, and the β -glucan content was about 10.64 percent (w/w). The antimicrobial activities of the culture broth were confirmed against those of *B. cereus*, *St. aureus*, *L. monocytogenes* and *S. typhimurium* using the paper disk method. The antimicrobial activity was also maintained after the heat treatment and alcalase treatment. The filtrate with less than 3 kDa M.W. also showed the antimicrobial activity against four strains: *B. cereus*, *St. aureus*, *L. monocytogenes* and *S. typhimurium*. The minimum inhibitory concentration (MIC) was about 1.26 mg/mL in the *B. cereus* and 12.6 mg/mL in the *St. aureus* and *L. monocytogenes*. The *S. typhimurium* showed a MIC of 62.8 mg/mL. Thus, the culture of *Sparassis crispa* using soybean curd whey provides a thermally stable antimicrobial agent that can be used as a natural preservative in the biofood industry.

Key words : *Sparassis crispa*, soybean curd whey, filtrate, antimicrobial activity, MIC

서 론

버섯은 곰팡이의 일종으로 탄수화물, 단백질, 지질, 무기질 및 비타민 등이 풍부하여 영양적으로 우수하며 독특한 향을 함유하고 있어 오랫동안 식용 소재로 이용되고 있다(1). 일반적으로 식용 및 약용으로 섭취하고 있는 버섯의 자실체 부분은 독특한 향과 질감을 가지고 있고 β -glucan을 포함한 생리활성물질이 다량 함유되어 있다고 보고되고 있다(2). 또한 식용 및 약용 버섯은 항산화(3), 항암(4), 혈당

강하(5), 콜레스테롤 저하 효과(6) 등이 보고되어 다양한 기능성 소재로 활용되고 있다.

꽃송이 버섯(*Sparassis crispa*)은 한국, 일본, 중국, 북미, 유럽, 호주 등에 분포하는 식용 버섯으로 자실체는 주로 여름부터 가을까지 살아있는 나무의 뿌리근처 줄기나 그루터기에 뭉쳐서 양배추처럼 발생한다. 꽃송이 버섯이 β -glucan을 다량 함유하고 있는 것이 알려지면서 인공재배 및 기능성물질 추출에 관한 연구가 활발히 진행되고 있다(7). 또한 꽃송이 버섯은 β -1,3-glucan의 함량이 다른 버섯에 비해 월등히 높아 항암 효과(8)가 있는 것으로 입증되어 식용뿐만 아니라 약용으로도 인정받고 있다. 특히 sparassol (methyl-2-hydroxy-4 methoxy-6-methyl-benzoate)과 같은 향

*Corresponding author. E-mail : splee@kmu.ac.kr
Phone : 82-53-580-5554, Fax : 82-53-580-5729

균성 대사물질(antifungal metabolite)을 생산하는 것으로 알려지고 있으며, sparassol은 인간의 질병 치료제와 염병의 방제용으로 연구되고 있다(9).

버섯은 우수한 기능성 성분을 함유하고 있어서 자실체뿐만 아니라 액체배양을 통한 균사체로도 식용 가능하여 식품의 기능성 및 의약품 소재화하는 다양한 활용 방안이 제시되고 있다(10). 버섯의 자실체를 얻기 위해서는 배양기간이 오랜 시간 소요되며, 무균화된 배양 시설과 공간이 필요하다. 최근 대부분의 버섯 종균은 액체배지에 함유된 영양성분을 이용한 생물전환을 통해서 다양한 생리활성 물질을 포함하는 균사체 배양이 가능하게 되었다(11). 그러나 꽃송이 버섯 종균을 이용한 액체배양을 다른 버섯에 비해서 생육조건이 까다롭기 때문에 액체배양에 대한 연구가 미비한 실정이다(12). 또한 버섯 균사체를 포함한 액체 배양물은 배지의 영양성분 조성 및 배양조건에 따라 항균 및 항산화 활성을 가지는 다양한 대사산물을 얻을 수 있다(13,14).

버섯의 균사체와 유용성분 포함하는 액체 배양물을 대량으로 단기간에 생산하기 위해서는 배지 성분의 최적화 및 경제성이 있는 원료들의 사용이 요구된다. 버섯의 액체배양을 위한 영양성분으로 corn steep liquor, yeast extract, peptone 등의 부산물 유래 탄소원과 고가의 질소원 등을 사용되고 있다(15). 액체 배양에 사용되는 원료 배지에 대한 대체소재로 두부 생산 시에 부산물로 얻어지는 순물을 사용할 수 있다. Cheun 등(16)은 순물을 버섯 액체 배양 배지로 활용하여 6종의 버섯의 액체배양물을 생산하였을 때 동충하초 균주가 최적 균주로 선발되었고 순물 버섯 배양액을 첨가하여 연 두부 제조 시 기존 두부와 비교하여 품질 특성의 큰 변화 없이 저장기간의 연장효과를 보였다는 연구 결과를 보고하였다.

순물은 일반적인 두부 제조 시 단백질 응고물의 압착 공정에서 나오는 부산물로 전체 물 첨가량의 약 50% 정도가 발생된다(17). 순물에는 콩의 불용성 섬유질과 일부 응고된 고분자 단백질 외에 수용성 영양성분 물질이 포함되어 있고, 두부 응고에 사용되고 남은 소량의 응고제 성분을 함유하고 있다. 특히, 고형분 함량은 2-3%로서 이 중 단백질 등의 질소화합물은 약 16%, 당류는 약 53% 정도이며(18), isoflavone, saponin 및 oligosaccharides 등의 기능성 물질이 함유되어 있는 것으로 알려져 있다(19).

최근 식품의 안전성 및 식품첨가물에 대한 소비자의 관심이 크게 증가하면서 식품의 저장성 향상을 위한 천연항균제의 개발이 절실히 요구되고 있다. 따라서 화학적 합성품이 아닌 식용식물이나 생약 등의 천연물로부터 천연식품 보존제를 개발하려는 연구가 진행되어 왔다(12). 현재까지 *Escherichia coli*, *Staphylococcus pyogenes*, *Salmonella*, *Yersinia*, *Clostridium* sp. 등 유해균이 생산하는 enterotoxin은 구토와 설사를 유발하는 위장장애를 일으키는 식중독 원인균으로 밝혀지고 있다. 식품에 오염된 미량의 식중독

균은 건강한 사람에게는 건강상의 문제를 야기하지 않지만, 면역체계가 약한 어린이, 노인, 환자 또는 임산부의 경우에 심각한 위험을 초래할 가능성이 있다(20).

따라서 본 연구는 두부 제조 시에 부산물로서 생산되는 순물을 배지로 이용하여 꽃송이 버섯 종균의 액체배양을 통해서 버섯 균사체를 생산하고, 항균물질 및 β -glucan 생산을 최적화하였으며, 꽃송이 버섯 배양액 및 분획물의 그람 음성 및 그람 양성 식중독균에 대한 항균력을 평가하였다. 또한, 꽃송이 버섯 액체배양물의 항균물질에 대한 열, 효소 처리에 대한 안정성을 평가함으로써 천연 항균제로 활용할 수 있는 기본 자료를 제공하고자 한다.

재료 및 방법

재 료

순물은 두원 식품(Gimcheon, Korea)에서 공급받아 사용하였으며, sucrose, glucose soluble starch, K_2HPO_4 , $MgSO_4$ 는 덕산 화학(Ansan, Korea) 제품을 구입하여 사용하였다. 대두 분말은 천호식품(Daegu, Korea)에서 구입하여 밀봉한 후 암소에서 보관하여 사용하였고, 항균 실험에 사용한 filter paper는 Advantec사(Tokyo, Japan) 제품을 구입하여 사용하였다.

사용 균주

본 시험에 사용한 균주는 농촌진흥청에서 분양 받은 꽃송이 버섯(*Sparassis crispa* Wulf. ex Fr)으로 Potato Dextrose Agar(PDA; Difco. Co. Maryland, USA) 배지에 접종하여 25°C, pH 5.1±0.2, 암 조건에서 20일 이상 배양하여 사용하였다.

순물의 성분 분석

순물의 수분, 조단백질, 조지방 함량은 AOAC법(21)에 따라 정량하였다. 수분은 상압가열건조법, 조단백질은 단백질 자동 분석기(Buchi 339, Buchi Labortechnik AG, Flawil, Switzerland)를 사용하여 질소함량을 측정하였으며, 조지방은 Soxhlet 추출법을 이용하였고 무기질 분석을 위해 시료의 전처리로 시료 5 g을 회화하여 유기물을 제거한 뒤 HCl 1 mL과 증류수 5 mL를 넣고 용해하여 100 mL 메스플라스크에 정량하였다. 정용한 액을 inductively coupled plasma atomic emission spectrometer (ICP, ELAN 9000, Perkin Elmer Inc., CA, USA)로 무기원소를 정성 정량하였다. ICP 분석 조건으로 plasma power는 1.3 kw, nebulizer gas flow는 0.8 L/min, Plasma gas flow 15 L/min, Auxiliary gas flow 0.2 L/min로 흘러주며 분석하였다.

꽃송이 버섯 균사체 배양

꽃송이 버섯을 액체 배양하기 위한 제한 배지의 조성은

로 Yang의 방법(22)을 변형하여 사용하였다. Sucrose 1%(w/v), soluble starch 0.5%(w/v), soybean flour 0.2%(w/v), K_2HPO_4 0.05%(w/v), $MgSO_4$ 0.05%(w/v)를 혼합하여 사용하였고, 순물 배지는 순물 중량 대비 glucose를 2%(w/v) 첨가하여 사용하였다. 배지는 121°C에서 30분 동안 멸균하여 5 L jar fermentor (Fermentec Co. Ltd., Cheongwon, Korea)에서 배양하였다. PDA 배지에 배양된 꽃송이 버섯 종균을 가로×세로(3×3 cm)로 절개하여 potato dextrose broth 100 mL에 첨가한 후 homogenizer (10,000 rpm, 3 min)로 균질화하여 첨가하였다. 배양 조건으로 온도는 25°C, 공기 주입량은 1 vvm, 회전 속도는 300 rpm으로 하여 10일 동안 배양하여 이화학적 분석 및 항균 활성을 평가하였다.

pH 및 산도 측정

pH는 배양액 10 mL을 취하여 pH meter (Digital pH meter 420A+, Thermo Orion, Beverly, MA, USA)를 이용하여 측정하였다. 적정 산도는 pH meter를 이용하여 배양액의 pH가 8.3에 도달할 때 까지 0.1 N-NaOH로 적정하고 그 소비량을 tartaric acid 함량(% , v/v)으로 환산하여 나타내었다.

당도 및 고형분 함량 측정

당도는 전자당도계(0~93 °Brix)를 이용해 배양액의 당도를 측정하였다. 고형분 함량은 적외선 수분측정기 (FD-720, Kett Electric Laboratory, Tokyo, Japan)를 이용하여 배양액 5 mL에 함유된 수분을 건조한 후 남아있는 고형분의 무게를 측정하여 나타내었다.

균사체 및 다당류 함량 측정

꽃송이 버섯 균사 배양액에 함유된 균사체와 세포의 다당체 함량을 측정하기 위해 배양액 200 mL씩 취하여 원심분리기를 이용하여 원심분리(750g, 20 min)하여 침전물과 상등액으로 분리하였다. 침전물은 균사체 성분으로 증류수로 2회 세척하여 동결 건조하여 무게를 측정하였고, 상등액에 함유된 세포의 다당체를 분리하기 위하여 차가운 isopropyl alcohol을 배양액 대비 2 volume 첨가하여 4°C에서 overnight하였다. Isopropyl alcohol에 침전된 다당체는 원심분리(750g, 20 min)하여 회수하여 동결 건조하여 무게를 측정하였다.

수용성 단백질과 타이로신 함량 측정

꽃송이 버섯 배양액의 수용성 단백질 함량 측정은 Protein assay kit(SMART™ BCA, Intron Biotechnology INC., Sungnam, Korea)를 이용하여 측정하였으며 bovine serum albumin (BSA)을 표준물질로 하여 환산하여 계산하였다. 배양액에서 생산된 peptide 함량을 측정하기 위하여 folin phenol 시약을 이용하여 tyrosine 함량을 측정하였다(23). 꽃송이 버섯 배양액을 원심분리(1,500g, 20 min)하여 얻어

낸 상등액 0.7 mL에 0.44 M TCA(trichloroacetic acid) 0.7 mL를 첨가하여 37°C에서 30분간 반응시킨 다음 1,500g에서 10분간 원심분리하여 침전물을 제거하였다. 회수된 상등액 1 mL에 0.55 M Na_2CO_3 2.5 mL와 phenol reagent 0.5 mL를 첨가하고 37°C 항온수조에서 30분간 반응시켜 흡광도를 spectrophotometer (UNION Kontron Co., Ltd., Milano, Italy)로 660 nm에서 측정하였다.

환원당 측정

환원당 함량은 DNS (dinitrosalicylic acid)법에 의해 측정하였다(24). 꽃송이 버섯 배양액을 원심분리(1,500g, 20 min)하여 얻어낸 상등액을 희석한 시료 1 mL에 DNS 시약 3 mL을 가하고, 100°C에서 5분간 발색시킨 다음, 실온의 암소에서 40분간 냉각 후 550 nm에서 흡광도를 측정하였다. 환원당 함량은 glucose를 표준물질로 하여 표준곡선을 작성하여 구하였다.

베타글루칸 함량 측정

꽃송이 버섯 균사체 배양액을 동결건조 시킨 분말 100 mg을 정량 하여 Megazyme kit (K-BGLU, Megazyme International Ireland, Co. Wicklow, Ireland)를 이용하여 베타글루칸 함량을 측정하였다(25). 총 글루칸 함량은 시료 100 mg에 37% hydrochloric acid를 1.5 mL 첨가한 후, 30°C에서 45분간 반응시켰다. 반응액에 증류수 10 mL을 첨가하여 100°C에서 2시간 동안 가열한 다음, 2 M KOH 10 mL과 200 mM sodium acetate buffer (pH 5.0)를 이용하여 100 mL까지 부피를 조정하였다. 1,500xg에서 10분간 원심분리한 후 회수한 상등액 중 0.1 mL을 취하여 β -glucosidase 0.1 mL을 가하여 40°C에서 60분 동안 반응시켰다. 반응이 끝난 후 GOPOD 시약 3 mL을 첨가하여 40°C에서 20분 동안 반응 후 510 nm에서 흡광도를 측정하였다. 알파글루칸 함량은 시료 100 mg에 2 M KOH 2 mL을 첨가하여 20분간 냉각상태에서 반응시킨 다음, 1.2 mM sodium acetate buffer (pH 3.8) 8 mL과 amyloglucosidase (1,630 U/mL) 0.2 mL을 첨가하여 40°C에서 30분간 반응 시켰다. 1,500g에서 10분간 원심 분리하여 얻은 상등액 중 0.1 mL을 취하고, 여기에 GOPOD 시약 3 mL을 첨가하여 40°C에서 20분 동안 반응하였다. 반응액의 흡광도를 510 nm에서 측정하였으며, 총 글루칸과 알파 글루칸 함량의 차이를 베타글루칸 함량으로 계산하였다.

항균 활성 검색

꽃송이 버섯 배양액의 항균활성 측정을 위해 배양액을 원심분리(750g, 20 min)하고 여과한 후 여과액을 rotary vacuum evaporator (R-3000, Buchi Labortechnik AG, Flawil, Switzerland)로 농축하여 실험에 사용하였다. 항균활성 실험에 사용된 균주는 Gram 양성균 4종, Gram 음성균 4종으

로 Gram 양성균으로는 *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mutans*, *Listeria monocytogenes*, Gram 음성균으로는 *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Vibrio parahaemolyticus*를 사용하였다. 각각의 균들을 Nutrient Broth (NB; Difco Laboratories Inc., Detroit, MI, USA), Tryptic Soy Broth (TSB; Difco Laboratories Inc.), Brain Heart Infusion (BHI; Difco Laboratories Inc.) 배지에 1 백금이를 접종하여 37°C 항온배양기에서 3회 계대배양 후 0.5 McFarland 표준 탁도 (1.5×10^8 CFU/mL)로 균수를 조절한 뒤 실험에 사용하였다.

디스크 확산법

꽃송이 버섯 배양액의 항균 활성 검색을 disc diffusion method(26)을 사용하여 측정하였다. 식중독균 배양액 (O.D.₆₀₀=0.132) 150 µL를 spreader로 nutrient agar, tryptic soy agar, brain heart infusion agar plate의 표면에 균질하게 도말한 후, 멸균된 paper disc (8 mm diameter)를 올려놓는다. Paper disc에 시료 50 µL를 천천히 분주하여 37°C에서 24시간 동안 배양하여 paper disc 주위에 생긴 저해 환의 크기를 비교하여 항균활성을 측정하였다.

열처리와 한외여과

열처리에 따른 항균 활성 차이를 평가하기 위해 꽃송이 버섯 배양액을 1 mL 취하여 85°C에서 15분 또는 100°C에서 5분 동안 열처리하여 열처리 전, 후의 항균 활성을 디스크 확산법을 이용하여 비교하였다. 분자량에 따른 항균 활성의 차이를 평가하기 위해 한외여과를 실시하였다. Ultrafiltration cell (Amicon Co, Beverly, MA, USA)을 사용하여 한외여과 하였으며, ultrafiltration membrane은 YM-3, YM-10 (MWCO; 3,000 and 10,000, Amicon Co.)을 사용하여 fraction하여 항균활성을 비교 실험하였다.

미세희석법을 이용한 최소 저해 농도(MIC)

꽃송이 버섯 배양액의 항균 활성 최소 저해 농도 (Minimum Inhibitory Concentration, MIC) 분석은 Mann의 방법(27)을 변형하여 측정하였다. 배양액을 rotary vacuum evaporator로 농축하여 농도별로 시료를 제조하였다. 시료액 200 µL와 탁도(turbidity)를 맞춘 식중독균 배양액 (O.D.₆₀₀=0.132) 200 µL을 순차적으로 첨가한 뒤 37°C에서 24시간 동안 배양하여 96-well plate를 이용해 600 nm에서 탁도를 측정하였다. 24시간 후의 혼합액의 탁도를 측정하여 균의 생장이 나타나지 않는 최소 농도를 MIC로 결정하였다.

효소 처리에 따른 항균 활성 변화

단백질 분해 효소 처리에 따른 꽃송이 버섯 균사체 배양액의 항균 활성을 비교하였다. 실험에 사용한 단백질 분해

효소는 상업적으로 판매되는 *Bacillus licheniformis* 유래 alcalase 2.4 L FG 효소(Novo Nordisk, Bagsvaerd, Denmark)를 사용하였다. 효소 처리는 배양액에 0.1%(v/v)의 농도로 처리하여 50°C에서 30분간 처리하였다. 효소 반응을 정지시킨 후 배양액의 항균 활성을 디스크 확산법으로 확인하였고 SEC를 이용하여 분자량 변화를 확인하였다.

통계처리

실험 결과는 평균값과 표준편차로 나타내었으며, 통계처리는 SPSS (statistical package for social science, 20.0, SPSS Inc., Chicago, IL, USA)를 이용하여 one-way ANOVA 분석을 실시한 후 Duncan's multiple range test로 유의성을 $p < 0.05$ 수준에서 검증하였다.

결과 및 고찰

제한 배지와 순물을 이용한 꽃송이 버섯 균사체 배양액의 이화학적 특성

배지로 사용한 순물의 탄수화물, 단백질, 지방 및 무기질 함량에 대한 분석결과는 Table 1과 같다. 순물의 pH는 5.7, 산도 0.12%, 당도는 3.28 °Brix로 나타났으며(data not shown), 탄수화물 2%, 단백질 1% 및 다양한 무기물을 포함하는데 그 중 칼륨의 함량이 107.97 mg/100 mL로 가장 높았고, 다음 칼슘(25.08 mg/100 mL), 마그네슘(13.65 mg/100 mL) 순으로 높게 나타났다. Cheong 등(28)은 꽃송이 버섯 액체 배양 시 적합한 온도는 25°C, pH 5.0~6.0의 범위에서 균사 생장이 양호하였다는 보고하였으며, 적절한 pH 및 다양한 영양 성분을 포함한 순물은 꽃송이 버섯의 액체 배양하기에 적합한 영양 배지라고 판단되었다.

Table 1. Chemical component of soybean curd whey

Nutritional component	Content	
Carbohydrate	2 g / 100 mL (1%, %Nutrient Standard)	
Protein	1 g below / 100 mL (1%, %Nutrient Standard)	
Fat	0 g / 100 mL (0%, %Nutrient Standard)	
Mineral	Mg	13.65 mg / 100 mL
	Ca	25.08 mg / 100 mL
	K	107.94 mg / 100 mL
	Na	50.01 mg / 100 mL
	Mn	0.03 mg / 100 mL
	P	8.29 mg / 100 mL

제한 배지(Defined medium (DM), sucrose 1%, soluble starch 0.5%, soybean flour 0.2%, K₂HPO₄ 0.05%, MgSO₄ 0.05%)와 순물 배지(Soybean curd whey medium (SM),

glucose 2%)를 사용하여 5 L jar fermenter에서 10일 동안 배양한 꽃송이 버섯 균사체 배양액의 이화학적 특성을 분석한 결과는 Table 2와 같다. DM에서의 pH는 3.26으로 약산성, SM은 6.91로 중성으로 나타났고 당도에서 DM은 sucrose가 1% 첨가된 것이 배양 기간 중 소비되지 않아 1 °Brix로 나타났으며 SM은 배양 전 순물 자체의 3.28%와 glucose가 2% 첨가되어 약 5%의 당이 존재하였는데 배양 10일 후 3.4%의 당이 소비되어 1.84 °Brix만 잔존하는 것으로 나타나 꽃송이 버섯은 glucose를 이용하여 균사체를 증식하는 것으로 추측된다. 균사체 함량에서 DM은 3.45 g/L, SM은 17.76 g/L로 나타나 약 5배 이상 SM이 높은 것으로 나타났으며 세포의 다당체 함량 역시 약 3배 정도 SM (0.65 g/L)에서 높은 것으로 나타났다. Akihiro 등(29)은 꽃송이 버섯의 액체 배양 최적조건은 glucose 30 g/L, pH 5, 25~30°C로 균사체가 9.92 g/L로 생산된다고 보고하였는데 균사체 함량이 SM보다 낮은 것으로 나타났다. 또한, Jeong 등(30)은 꽃송이 버섯을 안정적으로 재배하고 대량 생산하기 위하여 봉지 재배기술을 개발하였을 때 균사 생육이 결로리당화배지에서 온도 25°C에서 pH 5~6 일 때 균사 생장이 양호하였다고 보고하고 있다. 꽃송이 버섯의 액체 배양 시 배지 구성에 따라 균사체의 성장 및 세포의 다당체의 생산이 매우 다른 것으로 나타났다.

Table 2. Chemical properties in culture broth of *S. crispa* grown in defined medium and soybean curd whey medium

	Defined medium (DM)	Soybean curd whey medium (SM)
pH	3.26±0.01	6.91±0.11
Acidity (%)	0.10±0.01	0.05±0.01
Sugar content (°Brix)	1.0±0.10	1.84±0.45
Mycelium content (g/L)	3.45±0.35	17.76±0.63
Exopolysaccharide content (g/L)	0.23±0.11	0.65±0.05
Soluble protein content (mg%)	65.27±14.85	511.85±9.54
Tyrosine content (mg%)	11.36±0.60	59.6±2.47
Reducing sugar content (mg%)	26.82±4.93	188.44±3.01
β-glucan content (% w/w)	4.98±0.14	10.64±1.25

[†]Culture was obtained by fermentation for 10 days; Values are mean±SD.

꽃송이 버섯이 효능을 나타내는 주된 성분은 버섯 속에 함유된 단백질 다당체 때문이라는 것이 입증되었으며, 꽃송이 버섯은 항암 작용을 하는 β-1,3-D-glucan 함량이 자실체의 43.6%로 신령 버섯의 약 3.7배에 이르는 것으로 분석되었다(30). 그러나 이런 꽃송이 버섯에서 얻을 수 있는 생리활성 효과를 지닌 β-glucan은 수요는 많지만, 자실체의 생산력이 일반적으로 매우 낮기 때문에 공급에 많은 어려움을 겪고 있다. 그 대안으로 현재 자실체에 비해 높은 생산력을 보이는 균사체 액체 배양이 유망한 대체 방법으로 떠오르고

있다. 본 실험에서 두 가지 조건에서 배양한 액체 배양물의 β-glucan 함량을 측정한 결과 DM은 4.98%(w/w), SM은 10.64%(w/w)로 SM에서 약 2배 정도 β-glucan 함량이 높은 것으로 확인되었다(Table 2). Choi(31)는 꽃송이 버섯 균사체를 알칼리 용매와 전자파 추출을 실시하였을 때 단백질 다당체 함량이 42.16 mg/g으로 보고하고 있어 본 실험에서 DM에서의 β-glucan 함량과 유사한 것으로 나타났다. 또한 수용성 단백질, 펩타이드 함량을 간접적으로 측정하는 타이로신 및 환원당 함량이 모두 DM보다 SM에서 높게 나타났다. 이는 액체배양 배지로 사용된 순물이 꽃송이 버섯의 생육에 적합하여 균사 증식 및 대사산물의 생산을 증가시킨 것으로 추측된다.

DM과 SM 배양액의 항균 활성을 측정한 결과, DM에서는 항균 활성이 나타나지 않았으나 SM에서는 항균 활성이 나타나 꽃송이 버섯의 균사 증식이 활발히 일어날 때 2차 대사산물인 항균 물질의 생산도 활발해지는 것으로 추측된다(data not shown). 순물은 두부 제조 시의 부산물로서 원료 대두유의 80~85%를 차지하고 무기질을 포함한 다양한 영양성분을 함유하고 있으나 대부분이 폐기된다(17). 이를 효과적으로 활용하고자 미생물 발효 배지로 이용할 목적으로 연구가 이루어지고 있으며 순물 배지를 사용하여 6종의 버섯 균주의 액체배양을 시도하여 최적 균주로 동충하초 (*Cordyceps militaris*) 균주 선발(16), 젖산균인 *Lactobacillus acidophilus*의 균체 생산(32), 광합성 세균 *Rhodospirillum rubrum*의 균체 생산(33) 등 다양한 미생물의 배지로 적합하다는 연구 결과가 발표되었다.

꽃송이 버섯 균사체 배양액의 항균 활성

순물 배지를 사용하여 배양한 꽃송이 버섯 균사체 배양액을 원심 분리한 상등액을 농축하여 농도에 따른 8종의 병원성 세균에 대해 항균 효과를 paper disc method로 측정된 결과는 Table 3 및 Fig. 1과 같다. 8종의 병원성 세균 중 *Str. mutans*, *E. coli*, *Ps. aeruginosa*, *V. parahaemolyticus*의 4종은 꽃송이 버섯 균사체 배양액에 의해 저해 활성이 나타나지 않았다. 저농도인 0.13 mg/disc에서도 저해 활성을 보이는 균주는 *B. cereus*였으며 농도 의존적으로 저해 활성이 높아지는 경향을 보였다. *S. typhimurium* 균주의 경우 3.14 mg/disc의 농도까지는 저해 활성을 보이지 않았으나 6.28 mg/disc 이상의 고농도에서는 저해 활성이 나타나는 것으로 확인되었다(Fig. 1). Lee 등(34)은 구름 버섯 균사체 추출물의 항균 활성을 조사한 결과 디스크 당 12.5 mg로 처리하였을 때 *St. aureus*의 균주에서 17 mm의 증식 저해를 보였고 보고하였고 Kim 등(35)은 감귤 농축액을 첨가한 배지와 일반 합성 배지 (PD broth)를 이용한 균사체 배양액의 항균 효과 평가에서 감귤 첨가 배지에서는 일반 합성 배지보다 항균 활성이 높은 것을 보고하였다. 이는 버섯 균사체 액체 배양에서 배지 구성에 따른 항균 활성의 차이가 있음을

의미하는 것으로, 본 연구에서 꽃송이 버섯 균사체를 제한 배지에서 배양하였을 때 항균 활성이 검출되는 것을 확인하였다. 순물 배지의 경우, 콩에서 유리된 유리 당, 유리 아미노산, 무기질 등의 영양분이 함유되어 있어 균사체 생육이 활발해지며 곰팡이 2차 대사산물인 항균물질도 다량 생성되는 것으로 추측된다.

Table 3. Antimicrobial activities of culture broth of *S. crispa* grown in soybean curd whey medium by disc diffusion method

Strains	Inhibition zone diameter (mm) ¹⁾					
	Concentration (mg/disc)					
	0.06	0.13	0.63	3.14	6.28	12.55
<i>B. cereus</i>	ND ²⁾	14.7±0.6 ^a	23.7±0.6 ^c	30.0±1.0 ^b	31.0±1.0 ^d	34.7±1.5 ^d
<i>St. aureus</i>	ND	ND	13.7±0.6 ^b	20.7±0.6 ^a	23.7±0.6 ^b	27.7±0.6 ^b
<i>Str. mutans</i>	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<i>L. monocytogenes</i>	ND	ND	11.7±0.6 ^a	21.0±1.0 ^b	26.0±1.0 ^c	30.3±1.5 ^c
<i>S. typhimurium</i>	ND	ND	ND	ND	11.7±0.6 ^a	14.7±0.6 ^a
<i>E. coli</i>	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<i>Ps. aeruginosa</i>	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<i>V. parahaemolyticus</i>	ND	ND	ND	ND	ND	ND

¹⁾Inhibition zone (mm) : Disk diameter (8 mm) was used; ²⁾ND: Not detected; Values are mean±SD; ^{a-e)}Means in a same column with different letters are significantly different by Duncan's multiple range test (p<0.05).

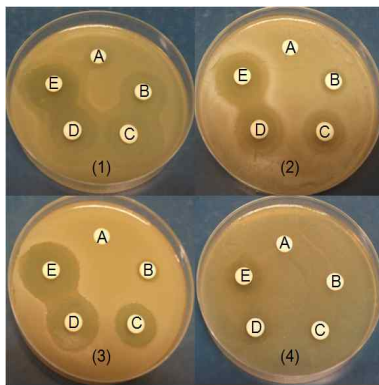


Fig. 1. Antimicrobial activities of culture broth of *S. crispa* grown in soybean curd whey medium by disc diffusion method.

Test strains (1) *B. cereus*, (2) *St. aureus*, (3) *L. monocytogenes*, (4) *S. typhimurium*. Concentration of *S. crispa* ; A : 0.13 mg/disc, B : 0.63 mg/disc, C : 3.14 mg/disc, D : 6.28 mg/disc, E : 12.55 mg/disc.

열처리에 따른 항균 활성

식품 저장성 향상을 위한 천연 항균물질 소재는 가공공정에서 열처리에 따른 안정성의 확보와 항균 활성유지가 요구된다. 따라서 버섯 배양액로부터 얻어진 항균활성물질의 열안정성은 천연물 유래 항균 활성 소재로 사용 시 매우 중요한 요인이 된다(36). 항균 활성 물질의 열안정성을 평가하기 위해 순물 배지에서 배양한 꽃송이 버섯 배양액을 85℃에서 15분간 열처리하여 항균 효과를 나타낸 결과는

Table 4와 같다. 열처리 후 저해 활성을 보인 균주는 4종류로 12.55 mg/disc의 농도에서 각각 *B. cereus* 32.7 mm, *St. aureus* 27.7 mm, *L. monocytogenes* 27.7 mm, *S. typhimurium* 8.7 mm로 나타났다. 특히 100℃에서 5분 동안 열처리하는 경우 유사한 저해 환 크기를 보이면서 항균활성이 유지되는 것으로 나타났다(Fig. 2). 따라서 꽃송이 균사체 배양액의 항균 물질은 열처리에 안정한 물질로 확인되었다.

Table 4. Antimicrobial activities after heating culture broth of *S. crispa* grown in soybean curd whey medium by disc diffusion method

Strains	Inhibition zone diameter (mm) ¹⁾ (mg/disc)			
	Heat treatment [Temperature(°C), Time (min)]			
	None	60, 30	85, 15	100, 5
<i>B. cereus</i>	34.7±1.5 ^b	36.0±1.0 ^b	32.7±0.6 ^a	32.7±0.6 ^a
<i>St. aureus</i>	27.7±0.6 ^b	27.7±0.6 ^b	25.3±0.6 ^a	27.7±1.0 ^b
<i>L. monocytogenes</i>	30.3±1.5 ^b	30.0±0.6 ^b	27.7±1.0 ^a	27.7±0.6 ^a
<i>S. typhimurium</i>	14.7±0.6 ^b	13.7±0.6 ^b	8.7±0.6 ^a	8.7±0.6 ^a

^{*}The concentration was 12.6 mg/disc; ¹⁾Inhibition zone (mm) : Disk diameter (8 mm) was used; Values are mean±SD; ^{a-e)}Means in a same row with different letters are significantly different by Duncan's multiple range test (p<0.05).

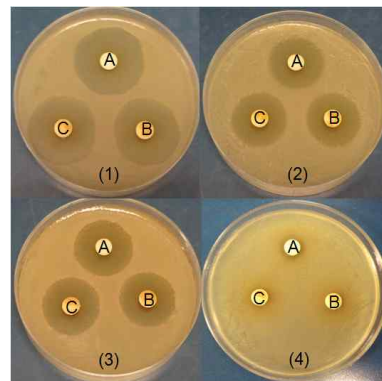


Fig. 2. Antimicrobial activities after heating culture broth of *S. crispa* grown in soybean curd whey medium by disc diffusion method.

Test strains (1) *B. cereus*, (2) *St. aureus*, (3) *L. monocytogenes*, (4) *S. typhimurium*. Concentration of *S. crispa* ; 12.6 mg/disc. Heat treatment ; A : 60℃, 30 min, B : 85℃, 15 min, C : 100℃, 5 min.

Mustafa 등(37)의 보고에 의하면 *Hygrophorus agathosmus* 와 *Suiluus collitinus* 균주를 60℃에서 30분간, 100℃에서 5분간 열처리하여 *St. aureus*와 *B. subtilis*에 대하여 항균활성을 측정할 결과, 항균 활성에 영향을 주지 않은 것으로 나타났다고 보고하여 본 실험과 유사한 것으로 나타났다. 버섯 유래 항균활성에 관여하는 성분으로 페놀화합물(38), triterpene(39), epicorazine(40)로 보고된 바 있으며, 열처리에 안정한 것으로 보아 꽃송이 버섯의 항균물질은 열에 안정한 유기화합물 구성된 것으로 사료된다. 맥아를 이용

한 꽃송이 버섯 액체배양물이 곰팡이 항균물질을 생산하며, 항균활성의 유효성분이 벤조산의 유도체인 sparassol로 보고한 바 있다(9).

효소 처리와 한외 여과 따른 항균 활성

상업적으로 판매되는 효소인 alcalase (protease)를 처리하였을 때 항균 활성의 변화를 관찰하였다. 꽃송이 배양액의 항균활성을 나타내는 저해 환의 크기를 비교하였을 때 효소 처리하지 않은 군과 효소 처리가 된 배양액에서 거의 변화가 없었다(Fig. 3). Table 5에서 나타내는 것처럼 효소 처리된 배양액의 항균활성은 오히려 약간의 높은 값을 보였지만 이는 측정에 의한 오차로 판단된다. 따라서 배양액이 효소처리에 의한 항균 활성이 유지되는 것으로 보아 활성성분이 단백질과 같은 고분자 물질 또는 펩타이드 물질로 구성되지 않은 것으로 판단된다.

Table 5. Antimicrobial activities with enzyme treatment of culture broth of *S. crispa* grown in soybean curd whey medium by disc diffusion method

Strains	Inhibition zone diameter (mm) ¹⁾ (mg/disc)			
	Enzyme treatment [50°C, time (min)]			
	None	30	60	120
<i>B. cereus</i>	34.7±1.5 ^a	35.7±0.6 ^{ab}	37.3±0.6 ^b	34.3±1.5 ^a
<i>St. aureus</i>	27.7±0.6 ^a	30.7±0.6 ^b	30.0±0.6 ^b	30.0±0.6 ^b
<i>L. monocytogenes</i>	30.3±1.5 ^a	34.0±1.0 ^b	32.7±0.6 ^b	33.7±0.6 ^b
<i>S. typhimurium</i>	14.7±0.6 ^a	20.7±0.6 ^b	20.7±0.6 ^b	20.7±0.6 ^b

^aThe concentration was 12.6 mg/disc; ¹⁾Inhibition zone (mm) : Disk diameter (8 mm) was used; Values are mean±SD; ^{a-c}Means in a same row with different letters are significantly different by Duncan's multiple range test (p<0.05).

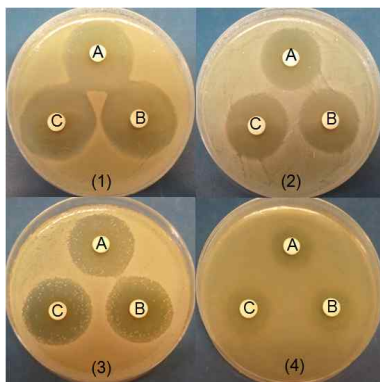


Fig. 3. Antimicrobial activities after enzyme treatment of culture broth of *S. crispa* grown in soybean curd whey medium by disc diffusion method.

Test strains (1) *B. cereus*, (2) *St. aureus*, (3) *L. monocytogenes*, (4) *S. typhimurium*. Concentration of *S. crispa* ; 12.6 mg/disc. Enzyme treatment ; 50°C, A : 30 min, B : 60 min, C : 120 min.

꽃송이 버섯 배양액의 항균 활성 물질을 평가하기 위해 ultrafiltration (UF) cell (3 kDa, 10 kDa cut-off)을 이용하여 한외 여과한 후 3 kDa 또는 10 kDa 이하의 분자량을 가지는 저분자 물질을 분리하여 항균 활성을 평가하였다(Table 6). UF를 통과한 3 kDa 이하 저분자 물질의 항균 활성은 그람 양성균인 *B. cereus*, *St. aureus*, *L. monocytogenes*는 각각 34.3 mm, 29.3 mm, 23.7 mm의 저해 환을 나타내면서 UF를 처리하지 않은 배양액과 동일한 항균효과를 보였다. *S. typhimurium* 경우는 다른 균보다 저해 환의 크기가 작게 나타나면서 16.7 mm를 보였다. 특히, UF 처리로 10 kDa 이하의 분자량을 갖는 여과액은 꽃송이 버섯 배양액과 동일한 항균효과를 보이는 것으로 나타났다. 따라서 꽃송이 버섯 배양액의 항균활성 물질은 분자량이 3 kDa 이하의 물질로 구성되어 있는 것으로 판단된다. 현재 미생물의 유래의 박테리오파지는 분자량 및 생리학적 특성에 따라 4개의 class로 분류할 수 있으며 대부분의 박테리오파지가 속하는 class II는 분자량이 13 kDa 이하로 작고 비교적 열에 안정한

Table 6. Antimicrobial activities with filtrate of culture broth of *S. crispa* grown in soybean curd whey medium by disc diffusion method

Strains	Inhibition zone diameter (mm) ¹⁾ (mg/disc)			
	Filtrate (3 kDa)		Filtrate (10 kDa)	
	Control	Filtrate (3 kDa)	Control	Filtrate (10 kDa)
<i>B. cereus</i>	35.7±0.6 ^{ab}	34.3±0.6 ^a	36.7±1.5 ^b	34.7±1.5 ^{ab}
<i>St. aureus</i>	29.0±1.0 ^a	29.3±0.6 ^a	29.7±0.6 ^a	29.0±1.0 ^a
<i>L. monocytogenes</i>	24.7±0.6 ^a	23.7±0.6 ^a	24.7±0.6 ^a	23.7±0.6 ^a
<i>S. typhimurium</i>	16.7±0.6 ^a	16.7±0.6 ^a	16.7±0.6 ^a	17.7±0.6 ^a

^aThe concentration was 12.6 mg/disc; ¹⁾Inhibition zone (mm) : Disk diameter (8 mm) was used; Values are mean±SD; ^{a-c}Means in a same row with different letters are significantly different by Duncan's multiple range test (p<0.05).

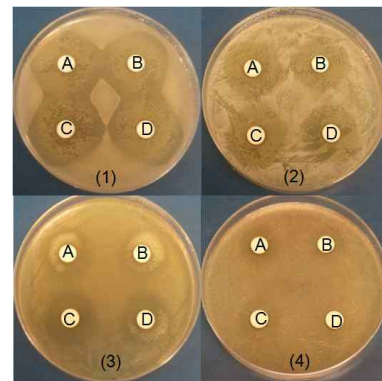


Fig. 4. Antimicrobial activities with filtrate of culture broth of *S. crispa* grown in soybean curd whey medium by disc diffusion method.

Test strains (1) *B. cereus*, (2) *St. aureus*, (3) *L. monocytogenes*, (4) *S. typhimurium*. Concentration of *S. crispa* ; 12.6 mg/disc. Filtration ; 3 kDa (A : Control, B : filtrate), 10 kDa (C : Control, D : filtrate).

것으로 보고되었다(41). 꽃송이 배양액 속에 함유된 항균 물질 역시 유해 균주에 따라 활성이 차이가 있기는 하지만 대체적으로 분자량이 작고 열에 안정한 것으로 나타났다.

미세희석법을 이용한 최소저해농도(MIC)

항균활성의 측정은 paper disc 또는 agar well 등의 agar diffusion법을 주로 사용한다. 그러나 대상물질의 항균활성 뿐만 아니라 paper disc 주위로 확산이 어렵다든가 확산의 속도가 다르면, 대상 물질의 paper disk diffusion 법으로 측정된 항균활성의 정도가 달라지기 때문에 추가적으로 미세희석법(microdilution method)을 이용하여 최소저해농도(MIC)를 확인하고자 하였다(42).

8종의 병원성 세균에 대하여 꽃송이 버섯 균사체 배양액의 항균활성을 paper disc method로 측정한 결과, Gram 양성 균인 *B. cereus*, *St. aureus*, *L. monocytogenes*에서 저해 환이 나타났으며, Gram 음성균인 *S. typhimurium*에서 항균활성이 나타났다. 따라서 항균 활성을 보인 4종의 병원성 세균에 대한 꽃송이 버섯 배양액의 항균 활성 검색 실험을 미세희석법으로 수행하였고 그 결과는 Fig. 5와 나타내는 것과 같이 *B. cereus*, *St. aureus*, *L. monocytogenes*, *S. typhimurium*에 대한 꽃송이 버섯 배양액의 최소 생육 저지 농도가

26~62.8 mg/mL 범위인 것으로 나타났다(Fig. 5). Gram 양성균주 중 *B. cereus*에 대하여 가장 낮은 농도에서 항균 활성을 나타내면서 최소 생육농도 2.6 mg/mL이었다. 대표적인 식중독균인 *St. aureus*, *L. monocytogenes*의 최소 생육 저지 농도는 12.6 mg/mL이었으며, *S. typhimurium*는 62.8 mg/mL로 측정되었다. 따라서 꽃송이 버섯 배양액의 항균 효과를 확인하기 위해서 탁도에 영향을 미치지 않는 paper disc diffusion 분석법과 미세 희석법 등을 이용한 결과로서 식중독 gram 양성균으로 *B. cereus*, *St. aureus*, *L. monocytogenes* 균주와 gram 음성균에서는 *S. typhimurium* 균주에서 항균활성을 보였다. 특히 *B. cereus*균주에 대한 항균활성 효과가 가장 높은 것으로 나타났으며, 이는 고초균을 이용한 전통 콩 발효식품에서 *B. cereus*에 대한 오염을 방지하는 수단으로 꽃송이 버섯 배양액을 활용하는 것이 가능 할 것으로 사료되며, 다양한 육제품, 냉장식품 등에 천연 항균제로서 활용이 기대된다. 특히 꽃송이 버섯의 저분자 항균물질은 효소처리 및 열처리에 안정한 것으로 나타나 다양한 가공식품, 음료 제조, 등의 식품산업에 천연 항균제로서 활용이 기대된다.

결론적으로 꽃송이 버섯의 액체배양물로 부터 생성되는 항균물질의 활성은 배양액의 조성에 따라 차이가 있는 것으로 나타났으며, 이들 항균물질 성분의 생산증진을 통한 산업화 및 구조적 분석에 대한 추가적인 연구가 이루어지는 것이 요구된다.

Table 7. Minimum inhibitory concentration (MIC) of culture broth of *S. crispata* grown in soybean curd whey medium against pathogenic bacteria by micro dilution method

Strains	<i>Sparassis crispata</i>
<i>B. cereus</i>	2.6±0.1 ^a
<i>St. aureus</i>	12.6±0.2 ^b
<i>L. monocytogenes</i>	12.6±0.3 ^b
<i>S. typhimurium</i>	62.8±2.6 ^c

Minimum inhibitory concentration (MIC) as µg/mL of *S. crispata*. Values are mean±SD; ^{a-c}Means in a same column with different letters are significantly different by Duncan's multiple range test (p<0.05).

요 약

꽃송이 버섯 균사체 배양의 최적 조건을 확립하여 얻어진 꽃송이 버섯 균사체 배양액에 대한 항균활성을 검색하였다. 순물에 glucose 2%를 첨가하여 10일 배양한 꽃송이 버섯 배양액은 pH 6.91, 균사체 함량은 17.76 g/L로 나타났으나, 제한 배지에서 10일 배양 후 분석한 결과, pH 3.26, 균사체 함량은 3.45 g/L로 측정되었다. 또한 순물을 이용한 버섯 배양액의 수용성 단백질 함량은 511.85 mg%, 타이로신 59.6 mg%, 환원당 188.44 mg%이며, 베타글루칸 함량은 10.64%로 나타났다. 순물을 이용한 꽃송이 버섯 배양액의 항균활성 평가를 위해 8 종의 유해세균에 대한 꽃송이 버섯 균사체 배양액을 disk diffusion method로 항균효과를 검색하였다. *B. cereus*, *St. aureus*, *L. monocytogenes*, *S. typhimurium* 균주는 0.13 mg/disc에서 6.28 mg/disc의 범위에서 농도 의존적으로 활성이 나타났다. 배양액을 85°C에서 15분, 100°C에서 5분간 열처리 후에도 항균 활성에서 변화를 보이지 않았다. 또한 한외여과법을 이용하여 3 kDa 이하의 저분자 물질의 항균 활성을 측정된 결과, *B. cereus*는 34.3 mm, *St. aureus*는 29.3 mm, *L. monocytogenes*는 23.7 mm, *S. typhimurium*는 16.7 mm로 생육 억제 환을 보였다. 미세희석

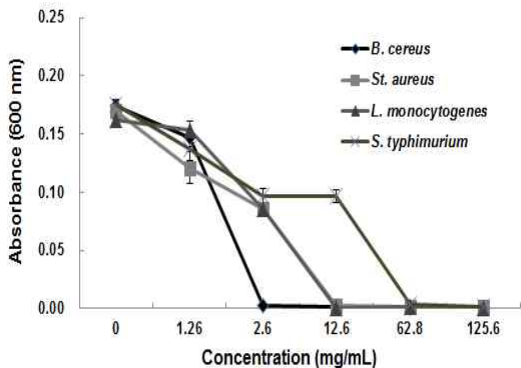


Fig. 5. Effect of concentration of *S. crispata* culture grown in soybean curd whey medium on antibacterial activities of Gram positive and Gram negative bacteria by micro dilution method.

Values are mean±SD; ^{a-c}Means in a same column with different letters are significantly different by Duncan's multiple range test (p<0.05).

법을 이용한 꽃송이 버섯의 항균물질의 최소저해농도 (MIC)는 *B. cereus* 2.6 mg/mL, *St. aureus*, *L. monocytogenes* 12.6 mg/mL, *S. typhimurium* 62.8 mg/mL인 것으로 나타났다. 꽃송이 버섯 배양액의 항균물질은 열과 단백질 분해효소 처리에 안정한 저분자 물질인 것으로 나타나 천연 항균 소재로서 산업적 활용이 기대된다.

감사의 글

본 연구는 지식경제부 지원 계명대학교 전통미생물자원 개발 및 산업화 연구센터와 교육과학기술부와 한국연구재단의 지역혁신인력양성사업으로 수행된 연구결과로 이에 감사드립니다.

참고문헌

1. Wani BA, Bodha RH, Wani AH (2010) Nutritional and medicinal importance of mushrooms. *J Medicinal Plants Res*, 4, 2598-2604
2. Yu HE, Cho SM, Seo GS, Lee BS, Lee DH, Lee JS (2006) Screening of bioactive compounds from mushroom *Pholiota* sp. *Korean J Mycol*, 34, 15-21
3. Lee SK, Yoo YJ, Kim CS (1994) Studies on the chemical components in *Ganoderma lucidum*. *Korean J Food Sci Technol*, 21, 890-894
4. Lee YS, Kim JB, Shin SR, Kim NW (2006) Analysis of nutritional components of *Lepista nuda*. *Korean J Food Preserv*, 13, 375-381
5. Hong JS, Kim YH, Kim MK, Kim YS, Sohn HS (1989) Contents of free amino acids and total amino acids in *Agaricus bisporus*, *Pleurotus ostreatus* and *Lentinus edodes*. *Korean J Food Sci Technol*, 21, 58-62
6. Kim BK, Shin GG, Jeon BS, Cha JY (2001) Cholesterol-lowering effect of mushrooms powder in hyperlipidemic rats. *Korean J Food Sci Nutr*, 30, 510-515
7. Oh DS (2003) Studies on the optimal cultural media and conditions for mycelial growth of *Sparassis crispa* (wulf.) fr. MS Thesis, Chonnam National University, Gwangju, Korea
8. Harada T, Miura NN, Adachi Y, Nakajima M, Yadomae T, Ohno N (2002) Effect of SCG, 1,3-β-D-glucan from *Sparassis crispa* on the hematopoietic response in cyclophosphamide induced leukopenic mice. *Biol Pharm Bull*, 25, 931-939
9. Woodward S, Sultan HY, Barrett DK, Pearce RB (1993) Two new antifungal metabolites produced by *Sparassis crispa* in culture and in decayed trees. *J Gen Microbiol*, 139, 153-159
10. Jang MR, Seo JE, Lee JH, Chung MS, Kim GH (2010) Antibacterial action against food-borne pathogens by the volatile flavor of essential oil from *Chrysanthemum morifolium* flower. *Korean J Food Nutr*, 23, 154-161
11. Tang YJ, Zhu LW, Li HM, Li DS (2007) Submerged culture of mushrooms in bioreactors-challenges, current state-of-the art, and future prospects. *Food Technol Biotechnol*, 45, 221-229.
12. Kim SJ, Lim DK, Park CW, Cerbo RM, Hyung SW, Lee KK, Kim JO, Ha YL (2004) Inhibition of free radical-induced lipid oxidation by the extract from submerged-liquid culture of mushrooms in the medium containing mulberry tree powders. *Korean J Food Sci Nutr*, 33, 255-261
13. Manjunathan J, Kaviyaran V. Optimization of mycelia growth and antimicrobial activity of new edible mushroom, *Lentinus tuberregium*. Tamil Nadul, India. *Int J PharmTech Res*, 3, 497-504
14. Song TY, Yen GC (2002) Antioxidant properties of *Antrodia camphorata* in submerged culture. *J Agric Food Chem*, 50, 3322-3327
15. Lee JW, Baek SJ, Kim YS (2008) Submerged culture of *Phellinus linteus* for mass production of polysaccharide. *Mycobiology*, 36, 178-182
16. Cheun MK (2007) Submerged cultivation of soybean-curd whey using *Basidiomycetes* and added effect of culture broth on the quality characteristics of soft-soybean curd. Ph.D Dissertation, Kangwon National University, Chuncheon, Korea
17. Kim HY, Eom KY, Kim JS, Kim WJ (2005) Drying of isoflavone and oligosaccharides retentates separated by membrane filtrate from tofu sunmul. *Food Eng Prog*, 9, 81-87
18. Lee SM, Hwang IK (1997) Texture characteristics of soybean-curd prepared with different coagulants and composition of soybean-curd whey. *Korean J Food Sci*, 13, 78-85
19. Kim JS (1996) Current research trends on bioactive function of soybean. *Korean Soybean Digest*, 13, 17-24
20. Kim G, Choi KH (2006) Development of a Fiber-optic biosensor for the detection of *Listeria monocytogenes*. *J Biosystems Eng*, 2, 128-134
21. AOAC (2000) Official methods of analysis. 17th ed. Association of Official Analytical Chemists, Washington,

- DC, USA
22. Yang BK, Jeon YJ, Jeong SC, Kim DH, Ha JY, Yun JW, Shon DH, Go GI, Song CH (1999) Hepatoprotective effect of exo-polysaccharide produced from submerged mycelial culture of *Ganoderma lucidum* WK-003 by using industrial grade medium. *Korean J Mycol*, 27, 82-86
 23. Oh SM, Kim CS, Lee SP (2006) Characterization of the functional properties of soy milk cake fermented by *Bacillus* sp. *Food Sci Biotechnol*, 15, 704-709
 24. Luchsinger WW, Coonesky RA (1962) Reducing power by the dinitrosalicylic acid method. *Anal Biochem*, 4, 364-347
 25. Kim KJ (2010) Optimization for β -glucan extraction from *Sparassis crispa* using response surface methodology. MS Thesis, Hanyang University, Seoul, Korea
 26. Bauer AW, Kirby WM, Sherris JC, Turck M (1966) Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Am J Clin Pathol*, 45, 493-496
 27. Mann CM, Markham JL (1998) A new method for determining the minimum inhibitory concentration of essential oils. *J Appl Microbiol*, 84, 538-544
 28. Cheong JC, Park JS, Hong IP, Seok SJ, Jhune CS, Lee CJ (2008) Cultural characteristics of cauliflower mushroom, *Sparassis crispa*. *Korean J Mycol*, 36, 16-21
 29. Akihiro K, Fumihisa K, Godliving M, Yoshitoshi N (2006) Development of optimal culture method of *Sparassis crispa* mycelia and a new extraction method of antineoplastic constituent. *Biochem Eng J* 30, 109-113
 30. Jeong JS, Yu YJ, Seo SY, Yu YB (2011) Selection of suitable conditions of mycelial growth and materials of bag cultivation in *Sparassis crispa*. *J Mushroom Sci Prod*, 9, 80-83
 31. Choi MJ (2011) Extraction of protein bound polysaccharide from mycelium by submerged culture of *Sparassis crispa*. MS Thesis, Chon-Buk National University, Jeonju, Korea
 32. Chung SH, Suh HJ, Lee H (1997) Utilization of soybean curd whey as a medium for *Lactobacillus acidophilus* and acid-and bile-tolerance of cultured strains. *J Korean Soc Food Sci Nutr*, 26, 872-877
 33. Kang SO, Cho KD, Lim WJ, Cho HY, Yang HC (1993) Production of photosynthetic bacterial cells of *Rhodospirillum rubrum* P17 from soybean curd waste water. *Kor J Appl Microbiol Biotechnol*, 21, 622-627
 34. Lee JS, Kim T, Lee YH, Jin CM, Kim HG, Kim WJ, Oh DC, Park YI (2006) Antimicrobial activity of the *Coriolus versicolor* liquid culture extracts against antibiotic resistant bacteria and purification of active substrate. *Korean J Mycol*, 34, 92-97
 35. Kim MC, Kim MJ, Kim T, Park GT, Son HJ, Kim GY, Choi WB, Oh DC, Heo MS (2006) Comparison of antibacterial and antioxidant activities of mushroom mycelium culture extracts cultivated in the citrus extracts. *Korean J Biotechnol Bioeng*, 21, 72-78
 36. Chung KS, Kim JY, Kim YM (2003) Comparison of antibacterial activities of garlic juice and heat-treated garlic juice. *Korean J Food Sci*, 35, 540-543
 37. Mustafa Y, Fatma B (2006) Antimicrobial activities of fruit bodies and/or mycelial cultures of some mushroom isolates. *Pharm biol*, 44, 660-667
 38. Abah SE, Abah G (2010) Antimicrobial and antioxidant potentials of *Agaricus bisporus*. *Advances in Biological Res*, 4, 277-282.
 39. Al-Fatimi MA, Julich WD, Jansen R, Lindequist U (2006) Bioactive components of the traditionally used mushroom *Podaxis pistillaris*. *Advance Access Publication*, 30, 87-92
 40. Liu XT, Winkler AL, Schwan WR, Volk TJ, Rott MA, Monte A (2010) Antibacterial compounds from mushroom I: a lanostane-type triterpene and prenylphenol derivatives from *Jahnoporus hirtus* and *Albatrellus flettii* and their activities against *Bacillus cereus* and *Enterococcus faecalis*. *Planta Med*, 76, 182-185
 41. Hwang JY (2009) Development of anti-microbial agent from medicinal herbs and microorganisms for industrial application. MS Thesis, Andong National University, Gyungbuk, Korea
 42. Song JH (2009) Antimicrobial activity and composition of *Smilax china* extract. Ph.D Dissertation, Dong-A National University, Pusan, Korea