

## 알코올 및 휘발성 유기산류가 뽕나무버섯의 균사속 생산에 미치는 영향

홍재식 · 김명곤 · 이재홍 · 김형무\*  
전북대학교 식품공학과 · \*농생물학과

### Alcohols and Volatile Organic Acids as Stimulants of Rhizomorph Production by *Armillaria mellea*

Jai-Sik Hong, Myung-Kon Kim, Jai-Hong Lee and Hyung-Moo Kim\*

Department of Food Science & Technology and

\*Department of Agricultural Biology, Chonbuk National University, Chonju 560-756, Korea

**ABSTRACT:** To investigate symbiotic relationship of "Chunma (*Gastrodia elata*) and the rhizomorph of *Armillaria mellea*, volatile organic acids and alcoholic compounds which were considered to be contained in *Gastrodia elata* were tested to determine stimulatory effects on rhizomorph growth on a chemically defined medium. Also, volatile organic acids were isolated from *Gastrodia elata* and analyzed by gas chromatography. The growth of rhizomorph was stimulated by the presence of alcohols and volatile organic acids, but acetic acid and methanol were ineffective. In the presence of valeric acid and ethanol, *Armillaria mellea* produced abundant rhizomorph at concentrations of 0.1 and 1%, respectively. Ethanol and valeric acid supplemented at regular intervals of 3 days as lower concentrations in the medium stimulated the growth of *Armillaria mellea*. The concentrations of ethanol and valeric acid as low as 0.01% added 3 days intervals for 15 days were more effective than initial concentrations of 0.1 and 1% in stimulating rhizomorph development of *Armillaria mellea*. Eight kinds of volatile organic acids were identified and quantified by gas chromatography. The major compounds were n-propionic, valeric, iso-caproic and caproic acids, and the minor compounds were iso-butyric, butyric, iso-valeric and heptanoic acids. Valeric acid was the most abundant among them.

**KEYWORDS:** *Armillaria mellea*, Rhizomorph, Alcohols, Volatile organic acids.

뽕나무버섯균 *Armillaria mellea*은 활엽수에 사물 또는 활물기생하는 목재부후균으로서 세계적으로 널리 분포되어 있으며 삼림에 막대한 피해를 주는 뽕나무근부후균으로 유명하다(이 등, 1985). 뽕나무버섯균은 다른 담자균과는 달리 균사속을 형성할 수 있는 특성을 가지고 있으며(Watling, 1982), 난과식물에 속하는 "천마" *Gastrodia elata*와 공생하고 있는 것이 Kusano(1911)에 의하여 밝혀져 그 동안 인공재배가 불가능한 것으로 알려졌던 천마의 인공재배 가능성이 Lee(1982)에 의하여 시사된 바 있다. 잎과 뿌리가 없는 천마는 뽕나무버섯균의 균사속으로부터 영양분을 공급받아 생육하는 것으로 알려져

있어(Zhang 등, 1980) 천마의 인공재배를 위해서는 천마와 공생하고 있는 뽕나무버섯균에 대한 체계적인 연구가 절실히 요망되고 있다. 뽕나무버섯균은 일반적으로 peptone, yeast extract나 각종 식물체 추출물과 같은 복합기질들이 함유된 영양원이 풍부한 배지(홍 등, 1987; Kuraish, 1954)나 PDA, 맥아즙배지에서는 균사속이 잘 형성되나 영양원이 불충분한 제한배지 상태에서는 균사는 생육하지만 균사속을 전혀 형성하지 못하는 것으로 알려져 있다(최 등, 1983; Weinhold, 1963). 제한된 환경하에서 뽕나무버섯균의 균사속 생육촉진 효과에 대한 연구는 그리 많지 않지만 Pentland(1967)는 뽕나무버

섯균 배양지 *Aureobasidium pullulans*가 오염되었을 때 균사속이 잘 형성되고 있는 것을 발견하고 *A. pullulans*의 배양물 중 어떤 성분에 의해서 이런 촉진효과가 있을 것으로 추정하고 배양물을 분석한 결과 ethanol의 영향임을 확인한 바 있다. 또한, 각종 식물체의 대사산물들이 뿔나무버섯균의 균사속 생육촉진 효과도 보고된 바 있는데 Cheo(1982)는 tannic acid와 gallic acid가, Weinhold 등(1962)은 indole-3-acetic acid와 목재추출물 등이, Garraway (1970)는 o-amino-benzoic acid와 p-amino-benzoic acid가 균사속의 발달을 촉진시킨다고 하였다. Moody 등(1972)은 coconut, corn, cotton seed, olive 등과 같은 천연 식물유지류와 propionic acid, butyric acid, valeric acid와 같은 휘발성 유기산, 불포화지방산류 및 tween compounds 등에 의한 생육촉진효과를 보고한 바 있다.

천마와 공생하는 뿔나무버섯균은 천마와 먼거리에 있을 때에도 정확하게 천마가 있는 쪽을 향하여 뻗어가는 것을 관찰할 수 있는데 이런 현상은 천마 중에 함유되어 있는 어떤 저분자량의 휘발성 유인 물질이 뿔나무버섯균의 균사속을 유도하지 않을까 생각되어 저분자량의 휘발성물질로 예상되는 휘발성 유기산류와 알코올류를 중심으로 이들의 균사속 생육촉진효과를 검토하였으며, 천마 중에 함유된 휘발성 유기산들의 존재를 확인하였기에 보고하는 바이다.

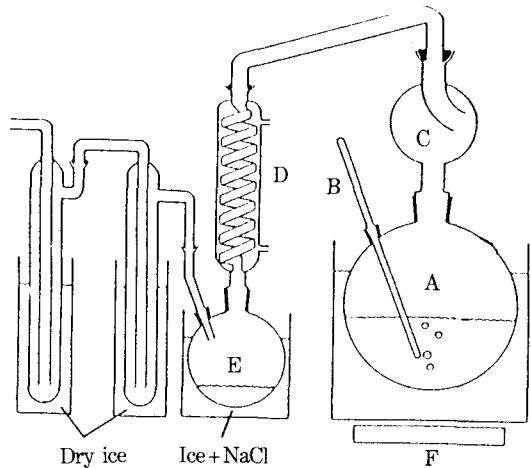
## 材料 및 方法

### 공시 균주

전북대학교 식품공학과 미생물실에서 분리 보관 중인 *Armillaria mellea*를 공시 균주로 사용하였다.

### 배지의 조제

보관용 배지는 2.5% malt extract(Difco)와 2% agar를 함유한 배지를 pH 6.0으로 하여 사용하였고, 배양용 배지는 glucose 5g,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1.75g,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.75g, L-asparagine 2g, thiamine · HCl 1mg, agar 20g, D.W. 1000 ml의 Weinhold(1963) 배지를 기본배지로 사용하였으며, 배지의 pH를 5.8로 조정 한 후 시험관(φ 3 cm×20 cm)에 30 ml씩 분주하여 1.2 kg/cm<sup>2</sup>의 압력에서 15분간 살균한 후 사면시켰다.



**Fig. 1.** Distillation apparatus used to isolate volatiles

A: 3 litter flask, B: thermometer, C: Wagner tube  
D: condenser, E: cold trap, F: heater

### 배양 방법

malt extract 배지에서 10일간 배양한 후 뿔나무버섯균을 배양용 배지에 이식하여 7일간 배양한 균사를 5×5 mm되게 잘라 배지에 접종하고 3일간 균사를 활착시킨 후 실험에 사용하였다. 전 실험을 통하여 배양온도는 27°C로 하였으며 생육도는 균사속의 colony 직경을 측정하였다.

### 알코올 및 휘발성 유기산의 첨가

각종 알코올 및 휘발성 유기산은 제균용 filter (Millipore)를 이용하여 제균한 후 3일간 활착시킨 배양물의 하단부에 0~4.0%(v/v)되게 첨가하였다 (이 때 colony에 직접 닿지않도록 주의한다). 알코올과 휘발성 유기산류는 휘발성이 강하여 시간이 경과할수록 점점 손실되기 때문에 일시적으로 첨가하는 것보다 경시적으로 첨가했을 때의 효과가 더 클 것으로 생각되어 3일 간격으로 0.01과 0.05%(v/v)되게 첨가하였다.

### 천마의 유기산 분석용 시료

분석에 사용한 천마 *Gastrodia elata*는 전북 익산 군 여산의 천마재배농장에서 1989년 5월에 구입하여 건조보관한 것과 1989년 10월에 구입한 생시료를 분석에 사용하였다.

### 휘발성 유기산의 분리 및 분석

생시료 100g 또는 건조시료 100g을 1.5l의 증류수와 함께 warring blender로 3분간 마쇄한 다음

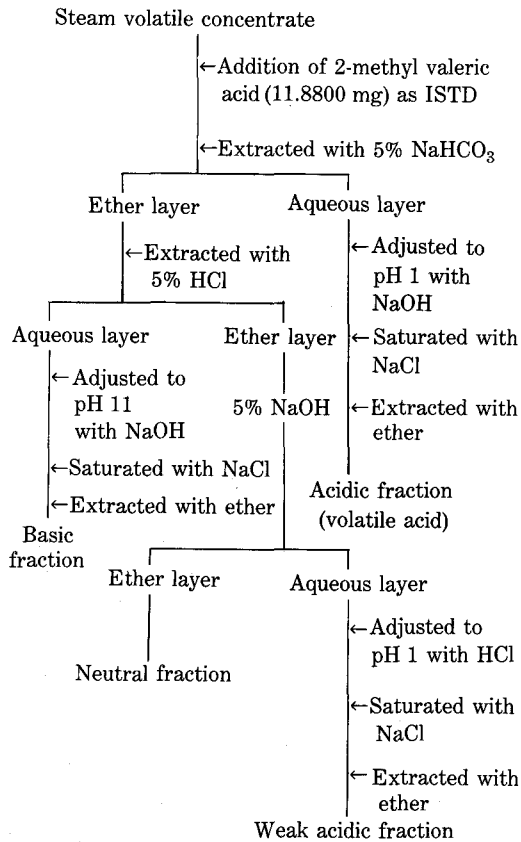


Fig. 2. Fractionation of steam volatile concentrate obtained from *Gastrodia elata*

Shibamoto(1983)의 방법에 따라 Fig. 1과 같은 장치를 이용하여 3l의 둥근바닥 flask에 넣고 상압하에서 2시간 동안 수증기 증류를 하였다. 이 때 냉각수의 온도는 -1℃를 유지하였고 포집액은 NaCl+얼음으로 냉각하였다. 얻어진 약 1l의 증류액을 NaCl로 포화시킨 다음 diethyl ether(500 ml×3회)로 추출한 후 감압농축시켜 Fig. 2에서와 같은 방법으로 산성분획을 얻었다. 산성분획은 무수황산나트륨으로 탈수 후 감압농축시켜 Schlenk 등(1960)의 방법에 따라 diazomethane으로 methyl ester화한 후 GC 분석시료로 하였으며 각 성분은 내부표준법에 의하여 정량하였다.

휘발성 유기산의 분석

휘발성 유기산의 분석을 위한 GC는 Hewlett-Packard 5880A GC terminal을 사용하였다. Column은 SE-54 fused silica capillary(30 m×0.32 mm I.D.)를 사용하였고 column의 온도는 50℃에서 230℃까지

Table I. Effect of alcohols in different concentrations on rhizomorph production by *Armillaria mellea*

Concentrations (% v/v)	Length (mm) at 14 days			
	Ethanol	Methanol	n-Propanol	n-Butanol
0	<10	<10	<10	<10
0.01	28	<10	49	44
0.05	40	<10	55	54
0.1	51	<10	37	68
0.5	62	<10	32	44
1.0	70	<10	28	27
2.5	25	<10	13	12
4.0	<10	<10	<10	<10

5℃/min로 높인 후 35분간 230℃로 유지하였다. detector는 FID를 사용하였고 detector 및 injector의 온도는 250℃로 하였다. Carrier gas는 1 ml/min의 N<sub>2</sub> gas를 사용하였고 시료는 split mode(split ratio=90 : 1)로 주입하였다. 각 성분은 표준품의 머무름시간의 비교에 의해 확인하였다.

結果 및 考察

각종 알코올이 뽕나무버섯의 균사속 생육에 미치는 영향

각종 알코올류가 뽕나무버섯균사속의 생육에 미치는 영향을 살펴보기 위하여 농도를 0~4.0%(v/v) 되게 배지에 첨가하여 본 결과는 Table I과 같다. 14일 배양시 ethanol, n-propanol, n-butanol에서 균사속 생육촉진효과를 보였는데 ethanol은 1% 첨가시 70 mm의 생육도를 보여 가장 효과가 좋았으며, 그 다음으로는 n-butanol, n-propanol의 순이었다. 그러나 methanol은 균사속의 생육에 전혀 효과를 보이지 않았으며 오히려 저해하는 경향이였다. Weinhold(1963)는 뽕나무버섯의 균사속 생육촉진 물질로서 각종 알코올을 실험한 결과 ethanol, n-propanol, n-butanol 등이 효과적이었고 acetaldehyde와 potassium acetate에서는 효과가 비교적 적었으며 가장 효과가 큰 것으로는 ethanol과 n-butanol이 10.8 mM 농도에서 우수하였다는 보고와는 대체로

**Table II.** Effect of monocarboxylic acids in different concentrations on rhizomorph production by *Armillaria mellea*

Monocarboxylic acids	Length (mm) at 14 days							
	Concentrations of supplements (% v/v)							
	0	0.01	0.05	0.1	0.5	1.0	2.5	4.0
Acetic acid	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10
Propionic acid	<10	19	43	55	27	12	<10	<10
Butyric acid	<10	20	52	65	62	20	<10	<10
Valeric acid	<10	17	48	70	34	10	<10	<10
Caproic acid	<10	21	38	47	55	30	<10	<10
Heptanoic acid	<10	24	33	55	47	14	<10	<10

**Table III.** Effect of alcohols and monocarboxylic acids supplements at intervals of three days on rhizomorph production by *Armillaria mellea*

Supplements	Conc. (% v/v)	Length (mm) of rhizomorph		
		5 days	10 days	15 days
Control	0	<10	<10	<10
Alcohols				
Ethanol	0.01	<10	61	85
	0.05	<10	40	78
n-Propanol	0.01	<10	52	68
	0.05	<10	36	62
n-Butanol	0.01	<10	54	77
	0.05	<10	49	71
Monocarboxylic acids				
n-Propionic acid	0.01	<10	58	72
	0.05	<10	49	69
n-Butyric acid	0.01	<10	62	75
	0.05	<10	58	69
n-Valeric acid	0.01	<10	67	80
	0.05	<10	58	74

유사한 경향을 보였으나 n-butanol이 ethanol보다 약간 효과가 컸던 점에서는 차이를 보이고 있다.

**각종 휘발성 유기산이 뿔나무버섯의 균사속 생육에 미치는 영향**

각종 휘발성 유기산류가 뿔나무버섯의 균사속 생육에 미치는 영향을 살펴보기 위하여 그 농도를 0~4.0%(v/v)되게 배지에 첨가하여 본 결과는 Table

II와 같다. Acetic acid를 제외한 n-propionic acid, n-butyric acid, n-valeric acid, n-caproic acid와 n-heptanoic acid 등이 0.01~1% 범위의 농도에서 균사속 생육에 효과를 보였으며, 이 중 가장 양호한 것은 valeric acid 0.1%이었다. 이는 본 실험에서 확인한 천마 중에 함유된 휘발성 유기산 중 가장 많은 함량을 보인 분석결과와 좋은 상관성을 보이고 있다. Moody 등(1972)은 천연에 존재하고 있는 휘발성 유기산 중 acetic acid를 제외한 propionic acid, butyric acid, valeric acid 등에서 좋은 효과를 관찰한 바 있는데 이 때, valeric acid 0.5g/l의 농도에서 가장 양호한 결과를 얻었다는 보고와는 유사한 경향이었다.

**각종 알코올 및 유기산의 경시적 첨가의 영향**

알코올류와 휘발성 유기산류는 휘발성이 강하여 시간이 경과할수록 점점 함량이 감소되기 때문에 일시에 첨가해 주는 것보다 일정한 간격으로 첨가했을 때 그 촉진효과가 클 것으로 사료되어 3일 간격으로 0.01%와 0.05%(v/v)되게 첨가하여 본 결과는 Table III과 같다. 일시적으로 첨가했을 때 보다는 경시적으로 첨가했을 때 훨씬 낮은 농도에서도 양호한 촉진효과를 관찰할 수 있었는데 모든 실험 구에서 0.01%가 0.05% 보다는 약간 우수한 경향이 었다. 이들 중 ethanol과 valeric acid 0.01%의 농도에서 각각 85 mm와 80 mm를 보여 가장 양호함을 알 수 있었다. Pentland(1967)는 ethanol의 뿔나무버섯 균사속의 유도효과를 관찰한 결과 일시에 500~700 ppm의 농도로 첨가하는 것보다 50 ppm씩 1일 간격으로 첨가했을 때 탁월한 유도효과를 관

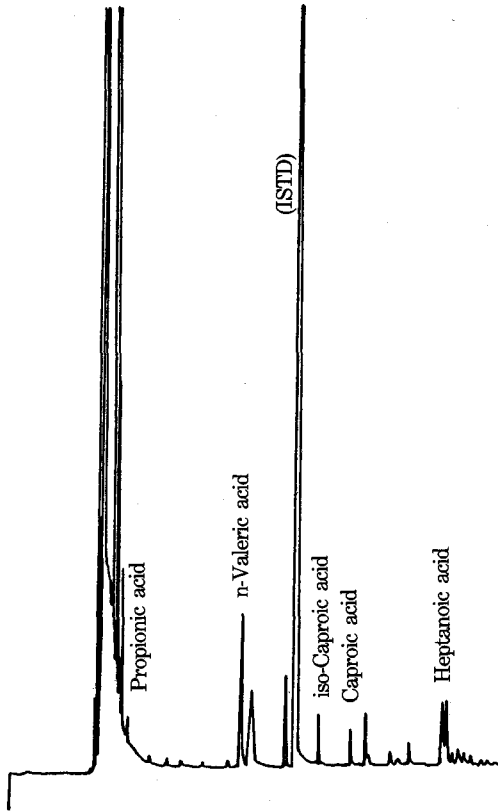


Fig. 3. Gas chromatogram of volatile acid methyl esters from fresh "Chunma" (*Gastrodia elata*)

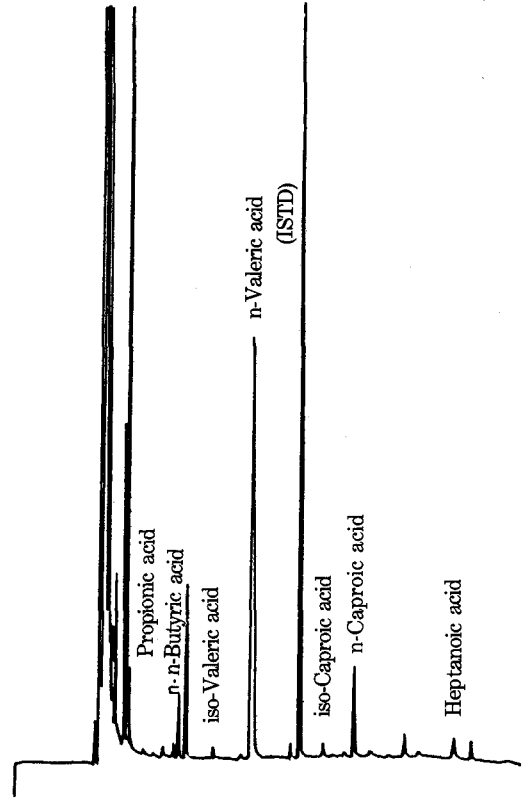


Fig. 4. Gas chromatogram of volatile methyl esters from air-dried "Chunma" (*Gastrodia elata*)

찰한 바 있는데 이는 본 연구와 유사한 경향이였다.

**천마 중의 휘발성 유기산의 정량**

저분자량의 휘발성 물질들에 의한 뽕나무버섯의 군사속 생육촉진효과가 인정되었기에 이들 휘발성 물질들의 천마내 존재 유무를 확인한 결과 알코올류는 그 함량이 극히 미량이기 때문에 확인이 어려웠고 천마 중의 휘발성 유기산류는 확인할 수 있었다. 생천마 및 건조한 천마로부터 얻어진 산성 분획의 휘발성 유기산을 정량하기 위하여 2-methyl valeric acid를 내부표준물질(ISTD)로 사용하여 GC chromatogram의 peak 면적으로부터 휘발성 유기산을 정량한 chromatogram은 Fig. 3 및 4와 같고 이들 결과를 정리하여 Table IV로 나타내었다. 천마에 존재하는 휘발성 유기산은 propionic, iso-butyric, butyric, valeric, iso-valeric, iso-caproic, caproic, heptanoic acid 등으로 나타났으며, 생시료와 건조

**Table IV.** Concentrations of volatile organic acids in the steam volatile concentrate of fresh and air-dried *Gastrodia elata*

Acids	Fresh <sup>1)</sup>	Air-dried <sup>2)</sup>
Propionic acid	21.6	92.7
iso-Butyric acid	t <sup>3)</sup>	t
Butyric acid	t	148.7
iso-Valeric acid	t	98.3
Valeric acid	248.9	994.4
iso-Caproic acid	38.9	92.3
Caproic acid	32.1	671.4
Heptanoic acid	t	307.4

1)  $\mu\text{g}/100\text{ g}$  fresh *G. elata*

2)  $\mu\text{g}/100\text{ g}$  of air-dried *G. elata*

3) Trace

보관시료 사이에 약간의 분포차이는 있지만 공히 valeric acid의 함량이 가장 높게 나타났다. 이때, 건조시료를 대비한 이유는 천마채취시기에 따라 냄새의 강도에서 큰 차이를 보였기 때문에 건조 냉동보관한 시료를 비교하였다. 일반적으로 천마의 생육초기에는 냄새가 강하며 뿔나무버섯균과 공생하면서 완전히 성숙하였을 때는 냄새가 약해지기 때문에 5월에 채취해 건조보관한 천마와 10월에 채취한 생천마의 분석결과에서 약간의 차이를 보이지 않았나 사료된다. 따라서 채취시기 및 생육단계에 따른 천마의 냄새성분 변화에 대한 연구는 앞으로 좀 더 세밀히 규명되어야 할 것으로 생각된다.

摘 要

천마와 뿔나무버섯의 공생관계를 검토해 보고자 천마 중에 존재할 것으로 추측되는 저분자의 휘발성 성분들로 알코올류와 휘발성 유기산들이 뿔나무버섯의 균사속 생육에 미치는 영향을 검토하였고 또한 천마 중에 함유된 휘발성 유기산의 존재를 GC로 확인하였다.

각종 알코올류와 휘발성 유기산류 중 acetic acid와 methanol을 제외한 성분들은 뿔나무버섯의 균사속 생육을 촉진하였는데 이 중, 가장 큰 효과를 보인 것은 valeric acid와 ethanol이었으며 valeric acid는 0.1%(v/v)에서 ethanol은 1%(v/v) 수준의 농도에서 효과가 있었다. 이들 화합물들은 3일 간격으로 보충할 경우는 이 농도보다 훨씬 낮은 0.01%(v/v)에서 양호한 촉진효과를 볼 수 있었다. 또한 천마 중에 존재하는 휘발성 유기산류를 GC로 분석한 결과 propionic, iso-butyric, butyric, iso-valeric, valeric, iso-caproic, caproic 및 heptanoic acid 등이 함유되어 있음을 확인하였으며, 이들 중 가장 많은 함량을 차지하는 것은 valeric acid 이었다.

參考文獻

Cheo, P.C. (1982): Effect of tannic acid on rhizomorph production by *Armillaria mellea*, *Phytopathology*, **72**: 676-679.  
 Garraway, M.O. (1970): Rhizomorph initiation and growth in *Armillaria mellea* promoted by o-

amino-benzoic and *p*-amino-benzoic acids, *Phytopathology*, **60**: 861-865.  
 Kuraish, H. (1954): Studies in mycorrhizal fungi. Part III. Nutritional features of *Armillariae*. *Ecol. Rev.*, **13**: 263-269.  
 Kusano, S. (1911): *Gastrodia elata* and its symbiotic association with *Armillaria mellea*. *J. Agric. Coll. Tokyo.*, **4**: 1-66.  
 Lee, J.Y. (1982): The propagation of *Gastrodia elata* by using rhizomorph of *Armillaria mellea*. *Seoul Women's Univ. R.D.R.S.*, **7**: 39-45.  
 Moody, A.R. and Weinhold, A.R. (1972): Fatty acids and naturally mellea. *Phytopathology*, **62**: 264-267.  
 Pentland, G.D. (1967): Ethanol produced by *Aureobasidium pullulans* and its effect on the growth of *Armillaria mellea*. *Can. J. Microb.*, **13**: 1631-1639.  
 Schlenk, H. and Gellerman, J. (1960): Esterification of fatty acids with diazomethane on a small scale, *Anal. Chem.*, **32**: 1412-1414.  
 Shibamoto, T. (1983): Flavor, volatiles formed by heated milk, in the analysis and control of less desirable flavors in foods and beverage, ed. by Charalambous, G., Academic Press, New York, pp.241-265.  
 Watling, R. (1982): The genus *Armillaria*-nomenclature, typication, the identity of *Armillaria mellea* and species differentiation. *Trans. Brit. Mycol. Soc.*, **78**: 271-285.  
 Weinhold, A.R. (1963): Rhizomorph production by *Armillaria mellea* induced by ethanol and related compounds. *Science*, **142**: 1065-1066.  
 Weinhold, A.R., Hendrix, F.F. and Raabe, R.D. (1962): Stimulation of rhizomorph growth of *Armillaria mellea* by indole-3-acetic and figwood extract. *Phytopathology*, **52**: 757.  
 Zhang, W.J. and Li, B.F. (1980): The biological relationships of *Gastrodia elata* and *Armillaria mellea*. *Acta Botanica Sinica*, **22**: 57-62.  
 최미자, 이지열(1983) : 뿔나무버섯 균사체의 생리, 생태학적 연구. 한국균학회지 **11** : 79-84.  
 홍재식, 윤세익, 김명곤, 김영희, 소재돈(1987) : 뿔나무버섯균(*Armillaria mellea*)의 균사속 생산에 관한 연구. 농촌진흥청 농시논문집 : 81-88.  
 이지열, 홍순우(1985) : 한국동식물도감 제 28권 고등균류편(버섯류), 문교부.

Accepted for Publication 19 September 1990