

최 · 종
연구보고서

진흙버섯 품종별 기능성물질분석, 효과연구
및 인공재배 기질의 다양화

Study on Functional analysis, effects and
Diversifying Artificial Media of Phellinus spp.

주 관 연구 기 관
경 북 대 학 교
협 동 연구 기 관
경 북 농 업 기 술 원

농 립 부

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “진흙버섯 품종별 기능성물질분석, 효과연구 및
인공재배 기질의 다양화” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2005년 10월 14일

주관연구기관명 : 경 북 대 학 교

총괄연구책임자 : 박 승 춘

세부연구책임자 : 박 승 춘

연 구 원 : 배 재 성

연 구 원 : 상 지 강

연 구 원 : 최 재 영

연 구 원 : 황 미 현

협동연구기관명 : 경북농업기술원

협동연구책임자 : 최 성 국

연 구 원 : 조 우 식

요 약 문

I. 제 목

진흙버섯 품종별 기능성물질분석, 효과연구 및 인공재배 기질의 다양화

II. 연구개발의 목적 및 필요성

국내에서 진흙버섯(상황버섯)에 대한 연구는 특정 품종 *Phellinus linteus*와 *Phellinus baumii*에 대한 연구에 치중하여 다양한 품종개발이 이루어지지 않고 있다. 진흙버섯은 전 세계적으로 300여종이 존재하고 있으나 우리나라에는 6~8종 정도가 존재한다. 그 종류로는 목질진흙버섯(*Phellinus linteus*), 마른진흙버섯(*Phellinus gilvus*), 말뚝진흙버섯(*Phellinus ignarius*), 장수진흙버섯(장수상황버섯)(*Phellinus baumii*), 낙엽송층버섯(*Phellinus pini*), 찰진흙버섯(*Phellinus robustus*), 검은진흙버섯(*Phellinus nigricans*) 등이 있으며 맛과 향이 없는 것이 공통된 특징이다. 이 중에서 가장 연구가 많이 된 진흙버섯은 목질진흙버섯(*Phellinus linteus*)이며, 가장 많이 유통되고 있는 버섯은 장수진흙버섯(*Phellinus baumii*)이다.

그러나, 약용버섯인 *Phellinus linteus*와 *Phellinus baumii*는 대부분 재배기간이 길고 재배방법이 까다로운 곳이 특징이다. 약용버섯의 상업적 재배는 재배사 및 재배 환경의 조절을 위한 시설 등이 필요하므로 상당한 자본력이 있어야 한다. 또한 다른 한편으로는 노동력 수요의 상당 부분을 차지하고 있는 수확 및 선별 작업을 기계화하기 어렵기 때문에 그만큼 노동 집약적이라는 특성을 가지고 있다. 이들 품종은 동남아시아, 중국 및 북한산이 싼 가격으로 무수히 침투하여 들어오는 형태로 국내산 *Phellinus linteus*와 *Phellinus baumii* 가격이 떨어지고 유통이 어려운 실정이다.

진흙버섯은 국내에서 오랫동안 사용하여 온 버섯으로 안전성이 확보된 재료로

국내에서 버섯 연구는 상당한 수준으로 이미 기능에 대한 효과가 입증되어 항암 치료의 대체의학 혹은 보조치료제로써 개발이 되어있다. 진흙버섯은 뽕나무 등 활엽수의 고목에 자생하는 다년생 약용버섯으로 인공 대량배양이 극히 어려워 균사체로도 이용을 하고 있다. 그러나 최근에는 많은 지원과제로 인공재배방법의 연구가 활발하게 진행이 되고 있다. 산업화를 시키기 위해서는 재배기간이 긴 진흙버섯은 산업화에 어려움이 있으므로 새로운 품종인 *Phellinus gilvus*에 대한 “진흙버섯 품종별 기능성물질분석, 효과연구 및 인공재배 기질의 다양화”에 대한 연구를 시도하였다.

현재 진흙버섯 3종류의 품종 *Phellinus baumii*(장수상황) 및 *Phellinus linteus*(고려상황)가 품종 등록되어 농가에서 재배되고 유통되고 있다. 그러나 중국산등이 들어오면서 산업화하기가 어려운 단계에 봉착하여 2001년에 품종 등록한 마른진흙버섯(황금상황)(*Phellinus gilvus*)을 대상으로 각종 원목 및 톱밥(느릅나무, 참나무 등)으로 재배실험을 수행하여 농민에게 기술이전하고 그 추출물의 효과분석을 실시하여 산업화를 이루고자 하는 것이 본 연구의 목적이다.

Ⅲ. 연구개발 내용 및 범위

진흙버섯은 국내에서 오랫동안 사용하여 온 버섯으로 안전성이 확보된 재료이다. 국내에서 버섯 연구는 상당한 수준에 도달하고 있으며 기능에 대한 효과 입증되고 있다. 또한, 국내에서는 항암치료의 대체의학 혹은 보조치료제로써 개발이 되어있다. 그러나 목질진흙버섯은 뽕나무 등 활엽수의 고목에 자생하는 다년생 품종으로 인공적으로 대량배양이 극히 어려워 균사체나 균사덩이를 이용하고 있기도 하다. 최근에는 인공재배방법에 대한 연구가 이루어져 대량생산이 가능하다. 산업화를 위해서는 원료로서 고가인 것은 사실이다. 따라서 목질진흙버섯 3종류의 품종 *Phellinus baumi*와 *Phellinus linteus*의 새로운 품종인 *Phellinus gilvus*가 2001년 품종 등록되어 농가에서 재배되고 있다. 현재 재배되고 있는 기질은 참나무 원목으로 원목의 생산 단가를 낮추기 위하여 *Phellinus gilvus*을 대상으로 각종 원목 및 톱밥으로 재배실험을 수행하였다.

본 연구개발은 마른진흙버섯을 위한 기능성 분석과 진흙버섯으로부터 추출한 다당류의 약리활성 물질의 분리 및 동정의 협동과제로 구성되어 있으며, 수행한 주요 연구내용 및 범위를 요약하면 다음과 같다.

세부과제 : 진흙버섯 품종별 기능성 물질분석 및 효과연구

구 분	연구 개발 목표	연구개발 내용 및 범위
1차 년도 (2002)	- 버섯 처리별 및 추출법에 따른 항암 효능을 비교 연구 (주관연구기관)	-진흙버섯 품종별(<i>Phellinus baumii</i> , <i>Phellinus linteus</i> , <i>Phellinus gilvus</i>) 및 처리별 항암활성 및 추출된 추출물(단백다당체)과 현재 사용 중인 항암제에 대한 항암활성의 비교 - <i>Phellinus gilvus</i> 로부터 단백다당체 추출 조건의 설정
2차 년도 (2003)	- 버섯처리별 기능성 물질의 분석비교 및 효과에 대한 연구 (주관연구기관)	-마른진흙버섯(<i>Phellinus gilvus</i>) 처리별 기능성물질의 비교 분석연구를 실시 -마른진흙버섯(<i>Phellinus gilvus</i>)로부터 단백다당체의 추출 및 분석 -마른진흙버섯(<i>Phellinus gilvus</i>)로부터 단백다당체의 추출물과 기존의 항암제에 대한 상호작용에 대한 연구를 실시하여 상호작용을 비교 연구. -마른진흙버섯(<i>Phellinus gilvus</i>)로부터 단백다당체의 추출물에 대한 독성시험 -마른진흙버섯(<i>Phellinus gilvus</i>)로부터 단백다당체의 추출물을 이용한 기능성제품을 위한 기초연구
3차 년도 (2004)	-항암활성 버섯에 대한 제제별 항암활성의 비교와 시제품의 제작 (주관연구기관)	-마른진흙버섯(<i>Phellinus gilvus</i>)로부터 단백다당체의 추출물을 이용한 기능성제품 연구 -마른진흙버섯(<i>Phellinus gilvus</i>)로부터 단백다당체의 추출물을 이용한 기능성제품의 항암활성의 비교 -마른진흙버섯(<i>Phellinus gilvus</i>)로부터 단백다당체의 추출물을 이용한 기능성제품의 안정성시험

협동과제: 진흙버섯 품종별 인공재배 기질의 다양화

구 분	연구 개발 목표	연구개발 내용 및 범위
1차 년도 (2002)	-목질진흙버섯류 재배기질 가능성 연구 (협동연구기관)	-현재 품종 등록되어 국내 재배중인 장수상황(<i>Phellinus baumii</i>), 고려상황(<i>Phellinus linteus</i>), 마른상황(<i>Phellinus gilvus</i>) 3종의 톱밥재배가능성 조사 -1년차에는 재배기질의 크기, 이화학성분, 살균방법(100℃ 상압살균, 121℃ 고압살균)과 3개 품종별 종균접종량에 따른 균사발육상태 등 기질의 사용가능성 조사
2차 년도 (2003)	-톱밥인공배지에서의 목 질진흙버섯류 자실체생 육조건 구명 (협동연구기관)	-최적 배지 후보균을 대상으로 톱밥인공배지의 자실체생육에 적합한 습도, 온도, 환기, 복토 재료 등의 최적조건 조사 -내열성비닐봉지, 내열성 P.P병 등을 이용한 상 업적 대량생산에 가장 유리한 용기의 크기 및 재질 연구 -균사배양이 완료된 배지를 목질진흙버섯재배사 내에 비치하여 버섯발생 및 성장에 가장 적합 한 온도, 습도 조건을 조사하며, 또한 복토재료 처리 등에 따른 병발생정도 조사 -톱밥배지 종류 및 배지크기(1 kg, 2 kg등)에 따른 버섯생산량 및 품질(발생량, 갓직경, 갓두 께, 개체중 등)을 조사하여 최적 인공배지를 선발 -장수상황(<i>Phellinus baumii</i>), 고려상황(<i>Phellinus linteus</i>), 마른상황(<i>Phellinus gilvus</i>) 3종의 품종에 대해 톱밥재배에 적합한 품종 비교
3차 년도 (2004)	-톱밥인공배지 이용 목 질진흙버섯 농가실증재 배시험(협동연구기관)	-농가 재배 시 적용가능성을 조사 -실증시험을 실시하여 시제품의 제작 -다년생 품종에 대한 버섯생산량 및 품질의 조사

IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

제 1 절 연구개발 결과

진흙버섯 품종별 자실체의 기능성물질 분석 및 그 효과 연구 특히 약리활성에 대한 비교 하였다. 특히, 재배와 약리활성 등 유기적인 연구과제의 수행으로 진행이 되었다. 본 연구는 제1세부과제에서는 진흙버섯품종별 기능성 물질에 의한 생리활성 특히 항암효과에 대한 비교를 수행하였다. 이러한 목적 달성을 위하여 마른진흙버섯의 추출법에 대한 연구를 실시하였다. 여기에서 추출된 다당류를 항암활성 연구팀에 제공하여 항암활성 및 상처치유 능력에 대한 효능 검정도 더불어 실시하였다.

1. 제 1 세부과제: 진흙버섯 품종별 기능성물질분석 및 효과연구

가. 진흙버섯 품종별 *Phellinus linteus*, *Phellinus baumii* 그리고 *Phellinus gilvus*에 대한 형태학적 차이, 일반성분 및 무기성분을 조사하였다. 전자현미경 사진에서 *Phellinus gilvus*와 *Phellinus linteus*는 비슷한 형태를 보여주고 있다. 원소 함량의 구성비에서는 세 종류의 버섯이 모두 유사함을 보여주었다. 일반성분을 분석 비교 시 수분의 함량은 *Phellinus baumii*가 가장 높았으며 *Phellinus gilvus*의 수분 함량은 10% 이내로 낮은 경향을 보여주었다. 식이섬유는 약 30% 이상을 함유하고 있으나 vitamin C 및 단백질의 함량은 높지 않았다. 원소분석에서 Ca의 경우 세 종류의 진흙버섯에서 *Phellinus baumii*가 가장 높은 Ca 함량을 보여주었으나 통계적 유의성은 없었다. 그러나, 원소조성 및 일반성분 비교에서는 *Phellinus linteus*, *Phellinus baumii* 그리고 *Phellinus gilvus*의 큰 차이점이 나타나지 않았다.

나. *Phellinus gilvus*(PGE), *Phellinus linteus*(PLE) 그리고 *Phellinus*

baumii(PBE)의 열수추출물에 대하여 SRB법과 MTT법으로 종양세포주 (Sarcoma 180과 P388)를 이용하여 항암활성을 비교, 평가하였다. 종양세포주는 PGE, PLE, PBE(7.5, 15, and 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 그리고 Doxorubicin(DOX) (0.001-10 mM)으로 처리되었다. 그 결과 DOX, PGE 그리고 PLE는 종양세포주에 대하여 농도 의존적으로 억제하는 결과를 보였지만, PBE는 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서만 억제되는 항암활성을 보여주었다. 결론적으로, 이 연구에서 사용된 PGE, PLE 및 PBE는 Sarcoma 180과 P388에 항암활성을 보여주었다. PLE는 sarcoma 180 종양세포에 가장 효과가 뛰어났으나($P < 0.05$), SRB법에서는 PGE가 P388에 대해 가장 큰 항암활성을 나타내었다($P < 0.05$).

다. 진흙버섯류는 열수추출물이 항암활성을 갖고 있다. 그러나 최적화조건에 대하여 알려진 바 없다. 본 연구에서는 *Phellinus gilvus*에 대한 반응표면분석법을 사용하여 추출 시 최적화 조건을 구하여 항암물질 추출에 미치는 변수간의 상호작용을 조사하였다. 추출시간은(8, 10, and 12 h, X1), 추출온도(80, 90, and 100 $^{\circ}\text{C}$, X2), 그리고, 추출량은(water to sample ratios)(W/S)(10, 20, and 30 ml/g, X3)으로 중심합성구획법으로 설정하였다. 변수로는 anti-tumor activity(Y1), total sugar(Y2), 그리고, reducing sugar(Y3). 예비실험 결과 이 모델의 신뢰계수는 Y1, Y2, 그리고 Y3은 0.9578($P < 0.01$), 0.9276($P < 0.01$), 그리고, 0.9832($P < 0.001$)였다. 그 결과 최적추출조건은 anti-tumor activity, total sugar, 그리고, reducing sugar에 대하여 10.40 h, 98.2 $^{\circ}\text{C}$, 그리고, 22.9 ml/g로 각각 설정되었다.

라. 국내에서 흔하게 구할 수 있는 5 종류의 원목과 톱밥 재배를 동시에 수행하여 일반성분을 비교하였다. 마른진흙버섯의 nitrogen 구성성분은 아카시아를 제외하고는 원목보다는 톱밥에서 hydrogen 구성비가 높은 것으로 나타났다. 그 중에서 아카시아원목보다는 톱밥에서 자란 마른진흙버섯의 자실체에서 hydrogen의 함량의 높은 것으로 나타났다. Carbon에 대한 원소 구성비를 비교하였다. 사과나무톱밥에서 톱밥에서 자란 마른진흙버섯을 제외하고는 탄소

의 함량비가 낮게 혹은 비슷한 수준으로 나타났다. 총당은 사과나무 톱밥에서 재배한 진흙버섯의 총당량이 가장 높으며, 환원당은 역시 사과나무 톱밥에서 재배한 진흙버섯의 환원당이 가장 높게 나왔다. DPPH assay와 Xanthine oxidase assay를 측정한 결과 뽕나무 톱밥, 참나무 톱밥, 아카시아 원목, 느릅나무 원목에서 재배한 진흙버섯이 항산화능력이 높게 나왔다. 당 단백질은 각 처리별 차이를 보이지 않았다. 항암활성의 비교 결과 고농도에서 Sarcoma 180에 대해서는 70~80%의 항암활성을 보였고, P388D1에서는 90~95%의 항암활성을 보여 각각의 처리별은 큰 차이 없이 고농도에서 높은 항암활성을 보였다.

마. 항암제의 부작용을 감소시키기 위하여 본 연구에서는 *Phellinus gilvus* 추출물과 항암제인 doxorubicin의 병용투여를 실시하여 항암보조제의 가능성을 조사하였다. 항암활성은 SRB and MTT assay로 P388과 Sarcoma 180 세포주를 이용하였다. 그 결과 PGE의 병용투여로 Doxorubicin의 항암활성은 크게 증가를 하였으며 PGE와 병용투여 시 Doxorubicin의 용량을 감소시킬 수 있는 결과를 얻었다.

바. *Phellinus gilvus*(PGE)에 대한 경구 급성독성을 알아보기 위하여 male과 female SD rats에서 실시하였다. 투여 용량은 0, 500, 1,000, 2,000 그리고 5,000 mg/kg 으로 각각 분류하였다. 경구투여 후 임상증상, 체중변화, 사료 및 음수소비량을 1회 경구투여 후 각 용량군에서 비교하였다. 실험 기간인 14일 동안 체중변화는 차이가 없었으며 한 마리도 죽지 않았다. 이 시험 결과, 급성경구독성의 LD₅₀는 5000 mg/kg 이상으로 안전한 물질로 나타났다.

사. 일반적으로 리포폴리사카라이드는 호흡기에 염증이 생기면 백혈구 수가 증가하게 된다. 그러나 열수 추출물로 전처리한 후, LPS를 투여한 실험군, 대조군보다도 백혈구의 수가 오히려 감소하였다. 따라서 진흙버섯 자실체의 열수 추출물은 백혈구의 수를 감소시킴으로, 급성 호흡기 염증 억제 효과가 우수함을 알 수 있다. LPS로 처리한 랫드의 기관지 액에서 TNF- α 와 IL-1 β 가 유의성

있는 증가를 보여주었다. IL-1 β 의 농도는 실험군 1에서 대조군보다 3배 정도 증가하였고, 실험군 2에서는 대조군보다 1.7배 정도 증가하여, 본 발명의 진흙버섯 자실체의 열수 추출물이 염증반응을 효과적으로 억제함을 알 수 있다.

아. 참나무 원목과 톱밥에서 에탄올 함량에 따른 추출물에서 항암활성을 모두 용량 의존적인 결과를 보여주었으나 에탄올 함량에 따른 모든 추출물에서도 참나무원목 재배보다 참나무톱밥에서 더 높은 항암활성을 보여주었다. 항암활성을 처리별 항암활성을 비교하고자 참나무 원목에서 열수추출물, 20%, 40%, 60% 그리고 80%의 에탄올 추출물에 대한 항암활성(IC₅₀) 결과 148, 99, 83, 75 그리고 24 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 수치를 보여주었으며 참나무 톱밥에서는 63, 32, 24, 20 그리고 18 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 IC₅₀ 값을 보여주었다. 이상의 결과로부터 톱밥에서 속성으로 채배되는 마른진흙버섯의 자실체를 에탄올로 추출한 추출물에 대하여 항암활성 등을 비롯한 다양한 생리활성이 검증될 경우 동물약품 원료로서 가능성이 기대된다.

자. 면역기능을 조절하는 활성을 가진 물질을 찾으려는 노력은 in vitro 활성과 in vivo 활성 그리고 스크리닝 작업으로 나눌 수 있는데, B 세포의 증식을 특이적으로 유도하는 LPS와 T 세포의 증식을 유도하는 Con A를 BALB/c 마우스의 비장세포 배양액에 처리하여 림프구 세포의 증식을 조사한 결과. PB, PG, PL는 LPS 혹은 Con A의 mitogen이 없는 control 비장세포 배양에서도 증식 반응 유도하여 그 자체가 mitogenic activity를 갖고 있음을 보여주었다. Mitomycin C를 처리하여 대사활성을 없앤 DBA 마우스의 비장세포와 무처리한 BALB/c 마우스의 비장세포를 섞어주었을 때 진흙버섯추출물인 PL, PB, PG의 경우에는 responder 세포들만 있는 경우에도 세포증식을 유도하여 혼합 백혈구 반응을 항진하지는 않았다. 거식세포로는 SD rat의 복강에서 얻은 복강 거식세포와 Abelson murine leukemia virus가 감염되어 종양화된 BALB/c 마우스 유래 거식세포주인 RAW264.7을 사용하였다. 진흙버섯 추출액을 8, 16, 32 및 64 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 처리하고 24시간 배양 후 측정된 fluorescent bead 탐식능

활성 결과 PG > PB > PL의 순으로 거식세포 기능을 항진하는 효능이 관찰되었다. RAW264.7을 사용하는 시험법에서도복강유래 거식세포에서 얻은 결과와 보다 유사한 결과를 얻어 거식세포 활성유도 정도의 순서가 일치하였다.

2. 제 1 협동과제 : 진흙버섯(상황) 품종별 인공재배기질 다양화연구

가. 균주는 기 확보되어 있는 것과 장수상황, 고려상황 2 품종은 육성기관인 농촌진흥청 응용미생물학과와 논공농산에서 분양을 받고, 경북농업기술원에서 자체 개발된 품종인 마른상황버섯을 1차 년도에 기 확보 하였으며 현재 고려상황, 장수상황, 마른진흙버섯은 경북농업기술원 시험포장에 재식되어 관리되고 있다.

나. 자실체의 형태 및 담자포자의 미세구조는 *Phellinus gilvus*(품종명: 황금, 일반명: 마른진흙버섯)는 관공의 모양은 원형이고, 관공수는 mm당 8-9이며, 크기는 0.05 mm이다. 담자포자는 난형으로 크기는 $3.3 \times 2.5 \mu\text{m}$ 이다. *Phellinus baumii*(품종명: 장수상황)는 관공의 모양은 원형이고, 관공수는 mm당 7~8이며, 크기는 0.07 mm이다. 담자포자는 난형으로 크기는 $3.3 \times 2.5 \mu\text{m}$ 이다. *Phellinus linteus*(품종명: 고려상황)는 관공의 모양은 원형이고, 관공수는 mm당 8~9이며, 크기는 0.08 mm이다. 담자포자는 난형으로 크기는 $4.0 \times 3.3 \mu\text{m}$ 이다. *Phellinus gilvus*(품종명: 황금, 일반명: 마른진흙버섯), *Phellinus baumii*(품종명 : 장수상황), *Phellinus linteus*(품종명 : 고려상황) 진흙버섯류 3종의 현미경적 구조를 조사한 결과 3종간 유사하나, 미세한 차이를 보였다.

다. 마른진흙버섯(*Phellinus gilvus*)에 대한 특허출원은 “마른진흙버섯의 원목인공재배법”이 전부이다. 따라서 본 연구에서 수행중인 마른진흙버섯의 톱밥을 이용한 인공재배법에 대한 우선권을 갖기 위해서 “톱밥을 포함하는 마른진흙버섯 배양용 배지 및 상기배지를 이용하여 마른진흙버섯을 인공 재배하는 방법”이란 명칭으로 특허를 출원하였다.

- 라. 배지재료의 이화학적 분석, 버섯균주별 생육특성을 위하여 배지재료로 사용한 참나무톱밥, 뽕나무톱밥, 느릅나무톱밥, 아카시아나무톱밥, 사과나무톱밥 등 5종의 화학적 특성을 조사한 결과 T-C는 참나무톱밥이 53%, 뽕나무톱밥 55%, 느릅나무톱밥 50%, 아카시아나무톱밥 51%, 사과나무톱밥 54%로 나무종류 간에는 비슷하였고, pH는 참나무톱밥 5.9, 뽕나무톱밥 6.4, 느릅나무톱밥 6.8, 아카시아나무톱밥 5.8, 사과나무톱밥 5.3으로 참나무톱밥, 사과나무톱밥은 약산성을 나타내었고, 뽕나무톱밥과 느릅나무톱밥은 상대적으로 중성을 나타내었다.
- 마. 마른진흙버섯의 인공재배 시 나무종류별 원목배지 및 톱밥배지의 재배 가능성을 구명하기 위해 참나무, 뽕나무, 느릅나무, 아카시아나무, 사과나무 5종의 톱밥 및 원목을 이용해 균사배양 상태를 조사하였다. 5종 원목배지는 각 처리별 배양완성일수는 54~63일로, 5종의 톱밥배지 각 처리별 배양완성 일수는 27~33일보다 약 2배정도 소요되는 경향이였다.
- 바. 톱밥인공배지에서 진흙버섯 자실체 생육조건 구명을 위하여 참나무, 뽕나무, 느릅나무, 아카시아나무, 사과나무 5종의 톱밥 및 원목을 이용해 마른진흙버섯의 인공재배 가능성을 조사한 결과, 자실체발생 특성은 배양이 완성된 배지의 내열성 polypropylene bag을 제거하고 관수로 버섯발생을 유도한 후 버섯원기가 형성되는 초발이 소요 일수는 5종류의 원목배지에서는 처리별로 12~15일이었으며, 5종의 톱밥배지에서는 11~14일로 원목배지와 톱밥배지가 비슷하였다. 자실체 생육특성은 건물중이 참나무원목배지에서 63g, 참나무톱밥배지 75g, 느릅나무원목배지 10g, 느릅나무톱밥배지 33g, 사과나무원목배지 46g, 사과나무톱밥배지 54g 등으로 각 수종별로 원목을 이용한 인공재배보다 톱밥이용재배가 수량성이 높고, 5종 나무 종류 중에서는 참나무원목배지 및 참나무톱밥배지가 다른 수종보다 수량성이 높음을 알 수 있다. 마른진흙버섯의 균사생장과 자실체형성은 다른 진흙버섯 균에 비해 상당히 용이한 편이다.
- 사. 진흙버섯(장수상황)에 자실체에 발생한 푸른곰팡이 병을 분리하여 균학적 특성 조사결과 *Penicillium citrinum*으로 동정하였으며, 이병의 방제를 위해

진흙버섯류 재배시 복토재로 쇄석을 처리 시험을 한 결과 마른진흙버섯의 경우 푸른곰팡이 발병률이 생육초기에 복토재를 모래, 마사토를 사용한 곳에서는 3~5%로 장수상황의 10%에 비해 낮았으며, 복토재를 쇄석을 처리한 곳에서는 푸른곰팡이 병이 발생치 않았다. 복토재료의 이화학특성 분석결과 pH의 경우 쇄석 8.4로 강알칼리성을 나타내었으며, 마사토 7.5, 모래 6.1로 나타났다. 중금속의 경우 쇄석에서 Mn, Fe가 검출되었을 뿐 Pb, As등 기타 중금속은 3 종류의 복토재료에서 검출되지 않았다.

아. 농가실증시험은 고령군 성산면, 의성군 안계면, 안동시 풍산읍에서 실시되었다. 지역마다 자실체 구량성에서 차이를 보여주었다. 의성군에서는 5종 나무 종류 중에서는 참나무원목배지 및 참나무톱밥배지가 다른 수종보다 수량성이 높음을 알 수 있다. 안동시에서는 5종 나무 종류 중에서는 뽕나무와 참나무배지가 다른 수종보다 수량성이 높음을 알 수 있다.

제 3 절 활용에 대한 건의

1. 버섯 농가의 품종 다양성 재배에 활용.
2. 버섯 농가에 대량 재배 생산 기술의 이전
3. 다양한 생리활성이 밝혀져 기능성원료 혹은 식품의 원료로 개발
4. 논문으로 결과 발표하여 버섯 농가 이용 확대
5. 산업화를 위한 효능 결과 활용
6. 산업화를 위한 안전성 시험의 기초 자료로 이용
7. 재배 기술이전 버섯 농가에 실시
8. 마른진흙버섯 추출물인 다당류를 이용한 음료의 개발
9. 마른진흙버섯 추출물인 다당류를 동물백신 개발에 활용
- 10.(주)여러분의 천년초를 비롯한 기존업체에서 제품 생산

SUMMARY

I. TITLE

Diversified artificial media for cultivation, functional analysis, and effect of *Phellinus* spp.

I. OBJECTIVE AND NECESSITY

The number of mushrooms on Earth is estimated at 140,000, yet maybe only 10%(approximately 14,000 named species) are known(Kirk et al., 2001). For millennia, mushrooms have been valued by humankind as an edible and medical resource. *Phellinus* spp. is known approximately 220 species and is found mainly in tropical America and Africa(Dai et al., 1998). In Korea, it is distributed into 7 species and commonly referred to as Sanghwang. *Phellinus* spp. is a fungus belonging to the Hymenochaetaceae basidiomycetes(Jung et al., 1994). Many kinds of *Phellinus* spp.(e.g. *Phellinus linteus*, *Phellinus igniarius*, *Phellinus pini*, and *Phellinus hartigii*, etc.) are known and they have a variety of medicinal effects(Lee et al., 1996; Rew et al., 2000). Among them, *Phellinus linteus* and *Phellinus baumii* were approved for application as a functional food by Korea Food and Drug Administration(KFDA, 2003) but *Phellinus gilvus* is not get an approval. *Phellinus linteus* and *Phellinus baumii* has been well known as one of the most popular medicinal mushrooms due to its high antitumor activity(Ikekawa et al., 1968; Han et al., 1999) and safety of acute oral toxicity test(Han et al., 2000).

Phellinus gilvus also has notable biological activities such as antitumor

activity, free radical scavenging activity, and proliferation activity of the human fibroblast cells. It, however, did not report about the difference of composition, mineral contents, anti-cancer activity, anti-oxidant activity with those of *Phellinus linteus* and *Phellinus baumii*. It also did not report about the difference safety of acute oral toxicity test. Furthermore, it is cheaper than the other *Phellinus* spp. because of very short growth period to harvest fruit body within 3 months unlike the other *Phellinus* spp.. Therefore, it has a possibility which can be developed as a functional food and livestock for industrial application in future. Therefore, the present study is aimed to investigate various biological activities of *Phellinus gilvus* extracts for development functional food, food, beverage and biological products. In addition, we optimized the artificial cultivation of *Phellinus gilvus* by using various kinds of tree and their sawdust. As the result, the cultivation on these sawdusts were successful in mass production of the mushroom.

III. RESULTS OF THE STUDY

1. The purpose of this project is to compare the morphology, general composition, elemental composition and mineral contents of *Phellinus linteus*, *Phellinus baumii* and *Phellinus gilvus*. In the scanning electron microscopy, *Phellinus gilvus* and *Phellinus linteus* had a similar shape. In the elemental composition, all of the three *Phellinus* spp. showed similar percent for the analyzed components. In the general composition, the water content of *Phellinus linteus*, *Phellinus baumii* and *Phellinus gilvus* were 13%, 15% and 10%, respectively. The dietary fiber of three *Phellinus* spp. showed more than 30%. The range of vitamin C and protein content was 1.5~2.1% and 3.63~3.73%, respectively. In mineral analysis, *Phellinus baumii* of the three *Phellinus* spp. has the highest calcium

concentration(1,135 ppm). From the above results, *Phellinus linteus*, *Phellinus baumii* and *Phellinus gilvus* did not show any differences in the general composition and elemental composition.

2. This present study was undertaken to investigate comparative antitumor activity of water extracts of *Phellinus gilvus*(PGE), *Phellinus linteus*(PLE), and *Phellinus baumii*(PBE) in vitro. The anti-tumor activity in the present study was evaluated by sulforhodamine B(SRB) and microtetrazolium(MTT) assay in terms of cell survival level. The tumor cells(sarcoma 180 and P388) were treated with PGE, PLE, and PBE(7.5, 15, and 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$) and Doxorubicin(DOX)(0.001~10 mM). The results showed that DOX, PGE, and PLE inhibited proliferation showing a dose-dependent manner against both tumor cells. However, PBE was inhibited by the only 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ in both cells proliferation. In conclusion, all of PGE, PLE, and PBE used in this study have shown anti-tumor activity against both sarcoma 180 and P388. Among them, PLE was the most effective in anti-tumor activity against sarcoma 180($P < 0.05$) and PGE was against P388 in SRB assay. PLE, however, was against P388($P < 0.05$) in MTT assay.
3. Extracts of many *Phellinus* spp. by hot water have anti-tumor activity but little is known regarding the optimum condition for hot water extraction for the antitumor activity of the *Phellinus gilvus*. Therefore, in the present study, response surface methodology(RSM) was applied to predict the optimal extraction for *Phellinus gilvus* using hot water. To monitor the effect of the extraction times(8, 10, and 12 h, X1), temperatures(80, 90, and 100°C, X2), and water to sample ratios(W/S)(10, 20, and 30 ml/g , X3), a central composite design was used. The dependent variables are anti-tumor activity(Y1), total sugar(Y2), and reducing sugar(Y3). In hot water

extraction under pre-established conditions, the correlation coefficients(R^2) of the models for Y1, Y2, and Y3 were 0.9578($P < 0.01$), 0.9276($P < 0.01$), and 0.9832($P < 0.001$), respectively. As a result, the optimum water extraction conditions for anti-tumor activity, total sugar, and reducing sugar have been predicted for each variable as being 10.40 h, 98.2°C, and 22.9 ml/g, respectively.

4. In the study, we compared *Phellinus gilvus* grown on the 5 type trees and sawdusts on general composition, total carbohydrate, reducing sugar, anti-oxidant activity and anti-tumor activity. Among them, *Phellinus gilvus* grown on the tree have more nitrogen than that sawdusts except Acasia tree. Hydrogen also was similar results shown in nitrogen. However, in the case of Carbon, all treated *Phellinus gilvus* showed similar results. In the case of total carbohydrate, *Phellinus gilvus* grown on Apple tree sawdust had the highest total carbohydrate among *Phellinus gilvus* grown on various trees and sawdusts. In the DPPH assay and Xanthine oxidase assay, *Phellinus gilvus* grown on Mulberry sawdust, Oak sawdust, Acasia sawdust, and Acaric tree showed strong anti-oxidant activity.
5. To reduce of side effects induced by anti-cancer drugs in body, we examined the possibility of *Phellinus gilvus* extract(PGE) as an adjuvant of anti-cancer drug. The work was used by SRB and MTT assay in the P388 and Sarcoma 180 cell lines. As the result, anti-cancer activity of Doxorubicin(Dox) was increased by the combination with PGE. The study strongly suggested that PGE may use as an adjuvant of anti-cancer drug, doxorubicin.
6. This study was carried out to investigate the acute oral toxicity of a crude

extract derived from fruitbody of PGE using male and female SD rats. Groups consisted of five male and female rats were treated with a single dose of the test substance intragastrically at 0, 500, 1,000, 2,000, and 5,000 mg/kg, respectively. Clinical signs, body weight change, and food and water consumption change were observed for 14 days after administration. No mortality or abnormal clinical signs in animals were shown during the observation period at the dose used in this study. Also there was no difference in net body weight gain, water and food consumption or gross pathological findings at terminal sacrifice among the groups of rat treated with different doses of the test substance. The results suggested that acute oral toxicity of PGE in rats is very low at the conditions employed in this study and LD₅₀ of PGE was estimated to be over 5,000 mg/ml in both sexes of rats.

7. Compared to saline-challenged rats, rats exposed to 50 µg intratracheal lipopolysaccharide showed an increase of total white cells (from 0.3×10^6 to 2.4×10^6), neutrophils (from 0.09×10^6 to 1.8×10^6), the levels of tumor necrosis factor (TNF)-α (from 200 pg/ml to 1,200 pg/ml), and interleukin (IL)-1β (from 220 pg/ml to 650 pg/ml) in the bronchial lavage fluid. However, after pretreatment with extracts of *Phellinus gilvus* and *Phellinus baumii*, the total white cells, neutrophils, and the level of IL-1α in lipopolysaccharide-challenged rats were similar to those in saline-challenged rats, except for TNF-β. The results indicate that extracts of *Phellinus gilvus* and *Phellinus baumii* may be useful in preventing acute pulmonary inflammation in human diseases.

8. The purpose of this study is to examine the elemental compositions, antioxidant and antitumor activity of water, 20%, 40%, 60%, and 80%

ethanol extracts obtained from the fruitbody of *Phellinus gilvus*. In electron donating ability test, the strong activities more than 70% were observed in 80 $\mu\text{g/ml}$ of 20%, 40%, 60% and 80% ethanol extracts from the fruitbody of *Phellinus gilvus* grown in oak tree and oak sawdust. The antitumor activity was evaluated by sulforhodamine B(SRB) in terms of cell survival level. The tumor cells(sarcoma 180) were treated with various ethanol extracts(water, 20, 40, 60 and 80%). The results showed that all extracts inhibited proliferation showing a dose-dependent manner against tumor cells.

9. The comparison of potent immunomodulating activities of polysaccharides isolated from *Phellinus* spp., *Phellinus linteus*(PL), *Phellinus baumii*(PB) and *Phellinus gilvus*(PG), on cellular immunity were investigated in the present study. The results showed that all three kinds of *Phellinus* spp. could stimulate the proliferation of murine splenocytes, and PG has more powerful stimulating activity than other *Phellinus* spp.. Furthermore, PL and PB significantly increased the proliferation of the mixed splenocytes in a concentration response manner, and the stimulating effect of PL was significantly higher than that of PB at all concentration used in the present study, but no stimulating effect was found with addition of PG. The phagocytosis of both peritoneal macrophage and RAW264.7 cells were also increased in the presence of PG, PB or PL, and the stimulating activity of PG was higher than that of PB or PL at all concentration tested.
10. In the research on the diversification of cultivation nature of *Phellinus* spp., *Phellinus baumii* and *Phellinus linteus* were obtained from Department of Applied microbiology, Rural Development Administration. and Non-gong agricultural products company. *Phellinus gilvus* was

obtained in the first year of our research. *Phellinus baumii*, *Phellinus linteus*, and *Phellinus gilvus* are now cultivating and managed in the cultivation farm of Gyung-sangbuk Do Agricultural Technology Administration. These mushrooms were compared by the morphology in the electric microscope. Microscopic analysis was performed on *Phellinus gilvus*, *Phellinus baumii*, and *Phellinus linteus*, they were similar but showed a little differences. Shape of fruitbody and fine structure of basidiospore was investigated. 1) *Phellinus gilvus*, Hymenial pores are 8~9 pores per 1 mm, round shape and their size is 0.05 mm. Basidiospore is egg-shaped and its size $3.3 \times 2.5 \mu\text{m}$. 2) *Phellinus baumii*, Hymenial pores are 7~8 pores per 1 mm, round shape, their size is 0.07 mm. Basidiospore is egg-shaped and its size is $3.3 \sim \times 2.5 \mu\text{m}$. 3) *Phellinus linteus*, Hymenial pores are 8~9 pores per 1 mm, round shape, their size is 0.08 mm. Basidiospore is egg-shaped and its size is $4.0 \sim \times 3.3 \mu\text{m}$.

11. Present experiments were conducted to determine the possibility of artificial culture with oak sawdust block of *Phellinus gilvus* mushroom, Mycelial growth in sawdust(Oak 90 + rice bran 10, V/V) after 25 days. It took 12 days to make fruitbody from burying of sawdust block to pinhead formation. The fruitbodies produced the total fresh weight 577 g(dried weight 97 g) in a block.
12. Physico-chemical analysis of medium resources, Natural property investigation on each strains : Chemical investigation showed us almost similar value of T-C percentage which was 53% T-C of oak sawdust, 55% of mulberry sawdust, 50% of elm sawdust, 51% of acacia sawdust, 54% of apple tree sawdust, and their pH value which was 5.9 of oak sawdust, 6.4 of sawdust, 6.8 of elm sawdust, 5.8 of acacia sawdust and

5.3 of apple tree sawdust. It is weak acidity for oak sawdust, apple tree sawdust, neutrality for mulberry sawdust and elm sawdust. To study for the possibility of artificial cultivation of *Phellinus gilvus*, we investigated *Phellinus gilvus* mycelium cultivation status with 5 kinds of sawdust or material lumber. It took 2-times longer period of 54~63 days on cultivation with material lumber than 27~33 days on cultivation with sawdust until completing mycelial growth.

13. The present study was carried out to investigate the preventive effect of *Penicillium citrium* by backfill(sand and granite). The result showed that the use of granite was 3~5% infection of *Phellinus citrium*. However, the broken stones showed no infection of this fungus. The chemical properties of broken stone was pH 8.4, showing alkalinity. The sand and granite were pH 6.1 and pH 7.5, respectively. These did not have heavy metals such as Mn, Fe, Pb and As.

CONTENTS

Chapter 1. Summary of project	29
Section 1. Objective, necessity	29
Section 2. Contents and scope	31
Chapter 2. Status of technical development inside and outside of nation	35
Section 1. Status of the related techniques	35
Section 2. The related research and problems and status of technical level expected in nation after this project	43
Chapter 3. Functional material analysis and effects of <i>Phellinus spp.</i> 47	
Section 1. Introduction	47
Section 2. Materials and Methods	54
1. Comparison on the morphology, general composition, elemental and mineral contents of <i>Phellinus linteus</i> , <i>Phellinus baumii</i> and <i>Phellinus</i> <i>gilvus</i>	54
2. Comparative antitumor activity of water extracts from fruiting body of <i>Phellinus linteus</i> , <i>Phellinus baumii</i> and <i>Phellinus gilvus</i>	56
3. Comparative anti-tumor activity and anti-oxidant activity of water extracts from fruiting body of <i>Phellinus gilvus</i>	58
4. Optimization for anti-tumor activity, glycoprotein for extraction in vitro of hot water extract from the fruiting body of <i>Phellinus gilvus</i>	60
5. Comparison of biological activities and compositions from the fruiting body of <i>Phellinus gilvus</i> treated by various trees	62
6. Interaction of <i>Phellinus gilvus</i> extract and anti-cancer activity	65
7. Toxicity of extract derived from fruiting body of <i>Phellinus gilvus</i> in Rats	65

8. Study for functional food by extracts of <i>Phellinus gilvus</i> and <i>Phellinus baumii</i> in the rats induced by pulmonary inflammation	66
9. Study for functional food by extracts of <i>Phellinus</i> spp.(Immunomodulating activity of polysaccharides)	67
10. Anti-tumor activity and protective effects of <i>Phellinus gilvus</i> extract against liver induced in laboratory animals	68
11. Composition of <i>Phellinus gilvus</i> hot extracts and its related functional foods	70
12. Safety test(mutagenic activity) of <i>Pellinus gilvus</i> extracts	71
13. Stability for development of functional food	73
Section 3. Results and Discussion	75
1. Comparison on the morphology, general composition, elemental and mineral contents of <i>Phellinus linteus</i> , <i>Phellinus baumii</i> and <i>Phellinus gilvus</i>	75
2. Comparative antitumor activity of water extracts from fruiting body of <i>Phellinus linteus</i> , <i>Phellinus baumii</i> and <i>Phellinus. gilvus</i>	81
3. Comparative anti-tumor activity and anti-oxidant activity of water extracts from fruiting body of <i>Phellinus gilvus</i>	92
4. Optimization for anti-tumor activity, glycoprotein for extraction in vitro of hot water extract from the fruiting body of <i>Phellinus gilvus</i>	97
5. Comparison of biological activities and compositions from the fruiting body of <i>Phellinus gilvus</i> treated by various trees	107
6. Interaction of <i>Phellinus gilvus</i> extract and anti-cancer activity	115
7. Toxicity of extract derived from fruiting body of <i>Phellinus gilvus</i> in Rats	123
8. Study for functional food by extracts of <i>Phellinus gilvus</i> and <i>Phellinus baumii</i> in the rats induced by pulmonary inflammation	130
9. Study for functional food by extracts of <i>Phellinus</i> spp.(Immunomodulating	

activity of polysaccharides)	133
10. Anti-tumor activity and protective effects of <i>Phellinus gilvus</i> extract against liver induced in laboratory animals	138
11. Composition of <i>Phellinus gilvus</i> hot extracts and its related functional foods	146
12. Safety test(mutagenic activity) of <i>Pellinus gilvus</i> extracts	148
13. Stability for development of functional food	154
Chapter 4. Diversification of artificial cultivation media of <i>Phellinus spp.</i>	156
Section 1. Introduction	156
Section 2. Materials and methods	157
1. Strains	157
2. Culture of mycelium	157
3. Optimal culture temperature	158
4. Materials	158
5. Analysis of media	159
6. Preparation of media	159
7. Production of fruitbody	159
8. The inhibition of <i>Penicillium citrinum</i> infection	160
9. Application in mushroom farm	161
Section 3. Results and discussion	161
1. Formation of fruitbody	161
2. Characterization of <i>Phellinus spp.</i> grown on various media and culture temperature	162
3. Chemical property of culture media	163
4. The growth of mycelium in various sawdusts treatment	164
5. The characterization of fruitbody	165

6. The growth of mycelium in various sawdusts treatment	167
7. The characterization of fruitbody	168
8. The inhibition of <i>Penicillium citrinum</i> infection & Examination of the effect by backfill(sand and granites)	170
9. Morphology of fruitbody and microstructure of spores	173
10. Verification in mushroom farm.....	177
Chapter 5. Research goals and contribution in the related field	182
Section 1. General plan for the project	182
Section 2. Accomplishment of research goal	183
Chapter 6. Application plan of the results in the project	187
Section 1. Application fields and plans	187
Section 2. Plans for distribution, industrialization, and transfer of technology	187
Section 3. Additional plans for technical development	187
Section 4. Application of the results of the project	188
Chapter 7. Overseas scientific information and technology collected during the research	194
Chapter 8. References	197

목 차

제 출 문	1
요 약 문	2
SUMMARY	13
CONTENTS	21
목 차	25
제 1 장 연구개발과제의 개요	29
제 1 절 연구개발의 목적, 필요성 및 범위	29
제 2 절. 연구개발 내용 및 범위	31
제 2 장 국내외 기술개발 현황	35
제 1 절 국내·외 관련 기술현황	35
제 2 절 국내·외 관련 연구내용 및 문제점과 본 연구종료 후 기대되는 국내기술 상황	43
제 3 장. 진흙버섯 품종별 기능성물질분석 및 효과 연구	47
제 1 절 서 설	47
제 2 절 재료 및 방법	54
1. <i>Phellinus linteus</i> , <i>Phellinus baumii</i> 및 <i>Phellinus gilvus</i> 의 형태, 일반성분, 원소분석 및 무기성분 함량의 비교	54
2. 진흙버섯 품종별(<i>Phellinus linteus</i> , <i>Phellinus baumii</i> 및 <i>Phellinus gilvus</i>)의 자실체 열수추출물의 항암효과 및 항암제에 대한 활성의 비교	56
3. <i>Phellinus gilvus</i> 자실체의 추출물에 대한 항암활성 및 항산화	58
4. 진흙버섯 자실체의 단백다당체 추출 조건의 최적화 및 단백다당체의 추출 및 분석	60

5. 마른진흙버섯(<i>Phellinus gilvus</i>) 처리별 기능성물질 비교 분석 연구 및 단백질당체의 추출 및 분석	62
6. 마른진흙버섯(<i>Phellinus gilvus</i>)으로부터 단백질당체의 추출물과 기존의 항암제에 대한 상호작용	65
7. 마른진흙버섯(<i>Phellinus gilvus</i>)로부터 추출한 단백질당체의 독성시험 ·	65
8. <i>Phellinus gilvus</i> 로부터 단백질당체를 이용한 기능성제품을 위한 기초연구 ·	66
9. <i>Pellinus baumii</i> , <i>Pellinus gilvus</i> , 그리고 <i>Phellinus Linteus</i> 로부터 단백질당체를 이용한 기능성제품 연구(단백질당체 추출물에 대한 면역활성 비교)	67
10. <i>Phellinus gilvus</i> 로부터 열수 단백질당체 추출물을 이용한 기능성제품의 항암활성 비교 및 사염화탄소에 의한 간 보호 효과.....	68
11. <i>Phellinus gilvus</i> 자실체로부터 단백질당체를 이용한 기능성제품의 안정성 및 유효성분을 함유하는 조성물	70
12. <i>Pellinus gilvus</i> 자실체 단백질당체 추출물에 대한 안전성시험(돌연변이시험 및 항돌연변이시험)	71
13. 진흙버섯 자실체를 이용한 건강기능성 시제품의 개발	73
제 3 절 결과 및 고찰	75
1. <i>Phellinus linteus</i> , <i>Phellinus baumii</i> 및 <i>Phellinus gilvus</i> 의 형태, 일반성분, 원소분석 및 무기성분 함량의 비교	75
2. 진흙버섯 품종별(<i>Phellinus linteus</i> , <i>Phellinus baumii</i> 및 <i>Phellinus gilvus</i>)의 자실체 열수추출물의 항암효과 및 항암제에 대한 활성의 비교	81
3. <i>Phellinus gilvus</i> 자실체의 추출물에 대한 항암활성 및 항산화	92
4. 진흙버섯 자실체의 단백질당체 추출 조건의 최적화 및 단백질당체의 추출 및 분석	97
5. 마른진흙버섯(<i>Phellinus gilvus</i>) 처리별 기능성물질 비교 분석 연구 및 단백질당체의 추출 및 분석	107

6. 마른진흙버섯(<i>Phellinus gilvus</i>)으로부터 단백다당체의 추출물과 기존의 항암제에 대한 상호작용	115
7. 마른진흙버섯(<i>Phellinus gilvus</i>)로부터 추출한 단백다당체의 독성시험 ...	123
8. <i>Phellinus gilvus</i> 로부터 단백다당체를 이용한 기능성제품을 위한 기초연구	133
9. <i>Pellinus baumii</i> , <i>Pellinus gilvus</i> , 그리고 <i>Phellinus Linteus</i> 로부터 단백다당체를 이용한 기능성제품 연구(단백다당체 추출물에 대한 면역활성 비교)	138
10. <i>Phellinus gilvus</i> 로부터 열수 단백다당체 추출물을 이용한 기능성제품의 항암활성 비교 및 사염화탄소에 의한 간 보호 효과.....	138
11. <i>Phellinus gilvus</i> 자실체로부터 단백다당체를 이용한 기능성제품의 안정성 및 유효성분을 함유하는 조성물	146
12. <i>Pellinus gilvus</i> 자실체 단백다당체 추출물에 대한 안전성시험(돌연변이시험 및 항돌연변이시험)	148
13. 진흙버섯 자실체를 이용한 건강기능성 제품의 개발	154
제 4 장 진흙버섯 품종별 인공재배기질 다양화	156
제 1 절 서설	156
제 2 절 재료 및 방법	157
1. 균주	157
2. 균사배양	157
3. 최적배양온도	158
4. 공시재료	158
5. 재료의 성분분석	159
6. 배지조제	159
7. 자실체형성	159
8. 복토재 쇄석처리에 의한 진흙버섯류 푸른곰팡이병(<i>Penicillium citrinum</i>) 방제효과 시험	160

9. 농가실증시험	161
제 3 절 결과 및 고찰	161
1. 자실체형성	161
2. 상황버섯 균주별 배지종류 및 온도처리에 따른 군사 생장 특성	162
3. 배지재료의 이화학적	163
4. 톱밥배지 처리별 군사생장	164
5. 자실체발생 특성	165
6. 톱밥배지 처리별 군사생장 비교	167
7. 자실체 발생 특성	168
8. 복토재 쇄석처리에 의한 진흙버섯류 푸른곰팡이병(<i>Penicillium citrinum</i>) 방 제효과 시험	170
9. 자실체의 형태 및 담자포자의 미세구조	173
10. 농가실증시험	177
제 5 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도	182
제 1 절 총괄추진계획표	182
제 2 절 연구개발 목표의 달성도	183
제 6 장 연구개발결과의 활용계획	187
제 1 절 활용 분야 및 활용 방안	187
제 2 절 현장보급방안, 산업화 계획방안 및 기술이전 방안	187
제 3 절 추가 기술개발 방안	187
제 4 절 연구개발결과의 활용	188
제 7 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보	194
제 8 장 참고문헌	197

제 1 장 연구개발과제의 개요

제 1 절 연구개발의 목적, 필요성 및 범위

국민들의 식생활이 변화하였다. 경제성장에 힘입어 소득수준이 선진국에 들어감에 따라 육류 중심의 서양식으로 바뀌었다. 이러한 음식 섭취의 변화로 성인병 질환이 최근에 크게 증가하였다. 대도시를 중심으로 자연식 식품의 수요가 최근 몇 년간 급증하였다. 자연식 식품 중 버섯의 생산과 소비가 크게 증가하고 있고, 식용뿐만 아니라 건강보조식품 내지는 약용으로서의 관심이 갈수록 증대되고 있다.

버섯은 우유와 함께 완전식품으로 좁은 의미의 식량으로 간주되고 다양한 미량원소와 미네랄 성분들로 인해서 독특한 맛과 향을 지닌 고급식품이다. 버섯은 열량이 적어서 체중 증가와 같은 부작용이 전혀 없는 식품이다. 따라서 지방과 단백질 식품의 과다섭취로 인한 고혈압, 비만, 당뇨 등의 우려가 커질수록 버섯의 소비는 증가하며, 이에 대한 수요는 앞으로도 상당 기간 증가할 것으로 보인다.

버섯은 먹는 농산물에 속하기는 하지만 버섯의 약리적 효과가 부분적으로 밝혀지면서 건강식이나 영양식의 범위를 벗어난 약용작물로서의 관심이 높아지고 있다. 뿐만 아니라 버섯의 생산은 種菌, 즉 육안으로는 식별이 곤란한 균으로부터 시작되기 때문에 종자로부터 시작되는 농산물 생산과는 다르다. 이처럼 버섯산업은 식량을 생산·공급하는 일반적인 농업과 상당한 차이가 있기 때문에, 버섯산업의 특징을 정리하는 것은 버섯산업에 대한 접근의 출발이라고 할 수 있다.

버섯은 크게 식용버섯, 약용버섯 그리고 독버섯으로 구분한다. 그 중 식용버섯으로는 송이버섯, 금버섯, 달걀버섯, 개암버섯, 잣버섯, 느타리버섯, 능이버섯, 못버섯, 뽕나무버섯, 덕다리버섯, 노란띠버섯, 검은비늘버섯, 쓴송이, 꽃송이버섯, 처

너버섯, 배젓버섯 그리고 민자주방망이버섯 등이 있으며 약용버섯으로는 영지버섯, 동충하초, 신령버섯, 구름버섯, 저령, 말굽버섯, 잎새버섯, 목질진흙버섯, 흰목이 그리고 복령 등이 있다. 약용버섯 중 진흙버섯은 소화기암(위암, 식도암, 십이지장암, 결장암, 직장암), 간암, 암절제, 수술 후 화학요법 병용에 의한 면역기능의 향진, 자궁출혈 및 대하, 월경불순, 장출혈, 오장 및 위장기능 활성화 및 해독작용이 있는 것으로 알려져 있다.

진흙버섯은 전 세계적으로 300여종이 존재하고 있으나 우리나라에는 6~8종 정도가 존재한다고 한다. 그 종류로는 목질 진흙버섯(*Phellinus linteus*), 마른 진흙버섯(*Phellinus gilvus*), 말뚝 진흙버섯(*Phellinus ignarius*), 장수 진흙버섯(*Phellinus baumii*), 낙엽송 버섯(*Phellinus pini*), 진흙버섯(*Phellinus robustus*), 검은 진흙버섯(*Phellinus nigricans*) 등이 있으며 맛과 향이 없는 것이 특징이다. 이 중에서 가장 연구가 많이 된 진흙버섯은 목질 진흙버섯(*Phellinus linteus*)이며, 메시마는 버섯의 일종인 목질진흙버섯(학술용어) 혹은 상황(생약명)으로 불리는 *Phellinus linteus*의 자실체로부터 얻은 순수한 균사체를 대량으로 배양하고 이를 추출 정제하는 과정에서 얻어진 단백다당체를 성분으로 한 항암 면역기능 증강제이다. 1976년 일본 동경 국립암연구 센터의 Chihara 박사 등의 연구팀에 의해 상황의 열수 추출물이 sarcoma 180 고형암의 성장을 고도로 억제한다는 것이 밝혀졌다(단백질·핵산·효소, 59권 p155-157). 국내에서 가장 많이 유통되고 있는 버섯은 장수 진흙버섯(*Phellinus baumii*)이다.

그러나 버섯은 아직까지 종류와 품종이 아직 밝혀지지 않은 것이 훨씬 더 많으며 일부 사물기생 버섯(양송이, 표고, 느타리, 영지, 팽이, 만가닥, 버들송이, 목이, 잎새버섯 등)의 재배방법은 밝혀져서 상업적 재배가 가능하다. 능이, 송이, 짜리버섯과 같은 생물기생버섯은 아직까지 재배법이 밝혀지지 않아 채취에 의존하고 있다. 따라서 이들의 생산(채취)량은 기후조건에 따라서 매년 큰 차이를 보이고 있다. 따라서 약용버섯은 대부분 재배기간이 길고 재배방법이 까다로운 곳이 특징이다. 약용버섯의 상업적 재배는 재배사 및 재배 환경의 조절을 위한 시설

등이 필요하므로 상당한 자본력이 있어야 한다. 또한 다른 한편으로는 노동력 수요의 상당 부분을 차지하고 있는 수확 및 선별 작업을 기계화하기 어렵기 때문에 그만큼 노동 집약적이라는 특성을 가지고 있다.

진흙버섯은 국내에서 오랫동안 사용하여 온 버섯으로 안전성이 확보된 재료이고 국내에서 버섯 연구는 상당한 수준으로 기능에 대한 효과 입증하여 항암치료의 대체의학 혹은 보조치료제로써 개발이 가능한 소재이다. 현재 목질진흙버섯 3종류의 품종 *Phellinus baumii* 및 *Phellinus linteus*가 품종 등록 농가에서 재배되고 유통되고 있다. 그러나 중국산이 들어오면서 산업화하기가 어려운 단계에 봉착하여 2001년에 품종 등록한 마른진흙버섯(*Phellinus gilvus*)을 대상으로 각종 원목 및 톱밥(느릅나무, 참나무 등)으로 재배실험을 수행하여 농민에게 기술이전하고 그 추출물의 효과분석을 실시하여 산업화를 이루고자 하는 것이 본 연구의 목적이다.

진흙버섯은 국내에서 오랫동안 사용하여 온 버섯으로 안전성이 확보된 재료로 국내에서 버섯 연구는 상당한 수준으로 이미 기능에 대한 효과 입증되어 항암치료의 대체의학 혹은 보조치료제로써 개발이 되어있다. 진흙버섯은 뽕나무 등 활엽수의 고목에 자생하는 다년생 약용버섯으로 인공 대량배양이 극히 어려워 균사체로 이용을 하고 있다. 그러나 최근에는 많은 지원과제로 인공재배방법의 연구가 활발하게 진행이 되고 있다. 그러나 산업화를 시키기 위해서는 재배기간이 긴 진흙버섯은 산업화에 어려움이 있으므로 새로운 품종인 *Phellinus gilvus*에 대한 “진흙버섯 품종별 기능성물질분석, 효과연구 및 인공재배 기질의 다양화”에 대한 연구를 시도하였다.

제 2 절. 연구개발 내용 및 범위

본 연구개발은 현재 약용버섯으로 가장 각광을 받고 있는 진흙버섯류인 *Phellinus baumii*와 *Phellinus linteus*를 대체할 *Phellinus gilvus*의 품종에 대한

농가이전 기술의 확립과 효과면에서 3 종류의 버섯에 대한 차이점을 구명하고자 하였다. 수행한 주요 연구내용 및 범위를 요약하면 다음과 같다.

세부과제 : 진흙버섯 품종별 기능성물질분석 및 효과연구

구 분	연구 개발 목표	연구개발 내용 및 범위
1차 년도 (2002)	- 버섯 처리별 및 추출법에 따른 항암 효능을 비교 연구 (주관연구기관)	<ol style="list-style-type: none"> 1. 진흙버섯 품종별(<i>Phellinus baumii</i>, <i>Phellinus linteus</i>, <i>Phellinus gilvus</i>) 및 처리별 항암활성 및 추출된 추출물(단백다당체)과 현재 사용 중인 항암제에 대한 항암활성의 비교 2. <i>Phellinus gilvus</i>추출물의 항암활성 3. <i>Phellinus gilvus</i>로부터 단백질다당체 추출 조건의 설정
2차 년도 (2003)	- 버섯처리별 기능성물질의 분석비교 및 효과에 대한 연구 (주관연구기관)	<ol style="list-style-type: none"> 1. 마른진흙버섯(<i>Phellinus gilvus</i>) 처리별 기능성물질의 비교 분석연구를 실시 2. 마른진흙버섯(<i>Phellinus gilvus</i>)로부터 단백질다당체의 추출 및 분석 3. 마른진흙버섯(<i>Phellinus gilvus</i>)로부터 단백질다당체의 추출물과 기존의 항암제에 대한 상호작용에 대한 연구를 실시하여 상호작용을 비교 연구. 4. 마른진흙버섯(<i>Phellinus gilvus</i>)로부터 단백질다당체의 추출물에 대한 독성시험 5. 마른진흙버섯(<i>Phellinus gilvus</i>)로부터 단백질다당체의 추출물을 이용한 기능성 제품을 위한 기초연구

3차 년도 (2004)	-항암활성 버섯에 대한 제제별 항암활성의 비교와 시제품의 제작 (주관연구기관)	6. 마른진흙버섯(<i>Phellinus gilvus</i>)로부터 단 백다당체의 추출물을 이용한 기능성제품 연구 5. 마른진흙버섯(<i>Phellinus gilvus</i>)로부터 단 백다당체의 추출물을 이용한 기능성제품 의 항암활성의 비교 6. 마른진흙버섯(<i>Phellinus gilvus</i>)로부터 단 백다당체의 추출물을 이용한 기능성제품 의 안정성시험
-----------------	--	--

협동과제 : 진흙버섯 품종별 인공재배 기질의 다양화

구 분	연구 개발 목표	연구개발 내용 및 범위
1차 년도 (2002)	- 진흙버섯류 재배기질 가능성 연구 (협동연구기관)	1. 진흙버섯류로 현재 품종 등록되어 국내 재 배중인 장수상황(<i>Phellinus baumii</i>), 고려 상황(<i>Phellinus linteus</i>), 마른상황 (<i>Phellinus gilvus</i>) 3종의 톱밥재배가능성 조사 2. 균주는 확보되어 있는 것과 장수상황, 고려상황 2품종은 육성기관인 농촌진흥청 응용미생물과와 논공농산에서 분양을 받 고, 경북농업기술원 자체 개발된 품종인 마른상황 사용하여 1년차에는 재배기질의 크기, 이화학성분, 살균방법(100℃ 상압살 균, 121℃ 고압살균)과 3개 품종별 종균접 종량에 따른 균사발육상태 등 기질의 사 용가능성 조사함. 방법으로는 톱밥배지의 경우 함수율이 65% 정도로 수분조절을 하 여 배양용기에 투입 후, 살균과정을 거쳐 배지온도를 20℃ 이하로 냉각 후 습도 6

		0~70%, 온도(15, 20, 25, 30, 35℃) 별로 배양과정을 거친다.
2차 년도 (2003)	- 톱밥인공배지에서 의 진흙버섯류 자실체 생육조건 구명 (협동연구기관)	<ol style="list-style-type: none"> 1. 최적 배지 후보군을 대상으로 톱밥인공배지의 자실체 생육에 적합한 습도, 온도, 환기, 복토 재료 등의 최적조건 조사 2. 내열성비닐봉지, 내열성 P.P병 등을 이용한 상업적 대량생산에 가장 유리한 용기의 크기 및 재질 연구 3. 군사배양이 완료된 배지를 마른진흙버섯 재배사내에 비치하여 버섯발생 및 성장에 가장 적합한 온도, 습도 조건을 조사하며, 또한 복토재료 처리 등에 따른 병발생 정도 조사 4. 톱밥배지 종류 및 배지크기(1, 2 kg 등)에 따른 버섯생산량 및 품질(발생량, 갓직경, 갓두께, 개체중 등)을 조사하여 최적 인공배지를 선발 6. 장수상황(<i>Phellinus baumii</i>), 고려상황(<i>Phellinus linteus</i>), 마른상황(<i>Phellinus gilvus</i>) 3종의 품종에 대해 톱밥재배에 적합한 품종 비교
3차 년도 (2004)	- 톱밥인공배지 이용 마른진흙버섯 농가실증 재배시험 (협동연구기관)	<ol style="list-style-type: none"> 1. 2년차 내용에서 확인된 톱밥인공배지에서 마른진흙버섯의 자실체 생육조건을 바탕으로 실제 농가 재배 시 적용가능성을 조사 2. 실증시험을 실시하여 시제품의 제작 3. 다년생 품종에 대한 버섯생산량 및 품질의 조사

제 2 장 국내외 기술개발 현황

제 1 절 국내·외 관련 기술현황

1. 진흙버섯의 생물활성에 대한 연구

우리나라에 분포하는 버섯류는 현재 약 970여 종이 기록되어있고 이중 약 20여 종 이상이 재배되고 있으며 그들은 대부분 식품 혹은 기능성 식품(Functional food)으로 사용되고 있다. 전 세계적으로는 약 20,000여 종의 버섯류가 알려져 있으며 그 중 식용으로 개발 가능한 것은 약 2,000여 종이다. 버섯류는 자연 생태계의 유기물 순환에 중요한 역할을 하고 있을 뿐만 아니라 예로부터 인류 생활과는 밀접한 관계를 맺고 있고 우리나라에서는 신라 시대부터 채취, 이용되었다고 한다.

일반적으로 식품의 경우 영양분에 공급에 의한 자양기능, 사람으로 하여금 식욕을 자극하는 기능, 그리고 인체의 건강 상태를 조절하는 조절기능의 3가지 기능이 있다. 버섯류도 또한 그들의 영양적 가치에 의한 1차적 기능과 기호성에 따른 2차적 기능을 지니며, 식용 후 인체 내의 다양한 생체조절기능에 작용하는 3차적 기능을 지닌다. 최근 버섯류는 이와 같은 식품적 3가지 멀티기능을 지니는 종류가 많은 연구자에 의해 밝혀지면서 중요한 식품개발소재(기능성식품) 및 약품개발소재 등의 중요한 생물자원으로 다루어지고 있다. 버섯류의 다양한 기능성이 많은 연구자에 의해 연구되면서 버섯 산업은 발전중이다.

1960년 이전의 버섯 산업은 주로 자연으로부터 버섯을 채취하여 식용으로 이용하는 단계였으며 이 후 버섯의 재배법이 다양하게 개발되어 식용 버섯이 대량으로 재배되는 방법의 개발되어 정착하였다. 그 결과 버섯의 다양한 개발과 정착 단계로 발전하였다. 이 시기는 주로 식용 버섯을 중심으로 재배법이 확립되었고

소비의 증가로 단순 재배법에 의한 양산 체제화가 이루어진 시기이다. 버섯에 대한 선호도는 식품 위주의 단순 기능인 맛과 모양에 치중되어 있었다.

크게 보면 1990년 이전은 다양한 품종 개발과 기능성이 중시되어 식용 및 약용버섯류로 구분되어 재배법이 개발 정착되는 용도 위주의 재배가 이루어졌다. 이로 인하여 새로운 재배법의 개발과 품종수의 증대로 이어졌다. 다양한 기능은 버섯이 단순히 맛과 모양이 같은 단순 기능만을 지닌 버섯에서 새로운 기호식품 혹은 건강보조식품으로 인식되는 단계로 발전하는데 역할을 담당하였다. 버섯에 대한 소비자의 인식이 약용 및 기호식품으로 확대되면서 1990년 이후에 버섯류는 새로운 바이오산업 소재로써 기능성식품 및 의약품개발에 필요한 생물자원으로 대두되었다. 버섯류의 다양한 기능성이 연구 보고 되면서 미래의 버섯 산업은 다기능의 버섯 품종이 대두될 것으로 사료되며, 1990년 이전의 농업 중심에서 이루어진 버섯 재배가 기능성을 고려한 품질 안정 생산라인, 재배에서 가공까지 일원화된 처리시설, 그리고 고기능성 버섯류 기능성식품 혹은 의약품 소재의 대량 생산 체계화를 이룬 생물 산업화로 발전될 것이다.

버섯류의 성분을 보면 유리당류는 버섯에 많이 포함되어 있으며 다양한 기능성을 지니고 있다. 주로 저칼로리 식품의 탄수화물로 주로 맛과 관련되어 있는 trehalose, mannitol 및 arabitol과 같이 장에서 흡수가 거의 이루어지지 않는 주로 분자량이 낮은 당류들이며 또한 식이섬유(dietary fiber)로 β -glucan, heteroglycan등의 비소화성 다당류 등이다. 그 중 trehalose는 다량으로 버섯에 함유되어 있고 버섯 자체의 생리적 기능과 감미도도 높아 설탕의 약 45% 정도이다. 버섯의 성분의 조성은 단백질의 변성을 예방하고 식품의 신선도를 유지시켜 주는 역할을 한다. 버섯에 포함된 유리당류는 충치 예방 및 DNA 보호 작용이 알려져 있다. 최근에는 면류 혹은 냉동식품 등에도 많이 이용을 하고 있으며 수요가 급증하는 추세이다. 이 중 Mannitol은 당뇨병 환자에 적합한 성분으로 감미도가 60 ~ 70% 정도로 충치 예방과 인슐린의 분비를 촉진시켜주는 기능성을 갖는다. 버섯류의 단백질은 대부분이 인체 내에서 필요로 하는 아미노산으로 구성되어 있고 비단백 부분보다 순단백의 함량이 높은 고단백성이다. 아미노산은 함량

의 차이는 있으나 aspartic acid를 비롯한 16종의 아미노산을 함유하고 있으며 특히 glutamic acid의 함량이 높은 정미 성분이 다량 함유되어 있다. 필수 아미노산인 라이신도 다량 함유하고 있어 좋은 영양 공급원이라 할 수 있다.

식품원으로 섭취되거나 체내에서 합성되는 지질은 에너지를 저장하는 원료로 각종 생물활성 물질로의 전환을 하는데 중요한 역할을 한다. 이러한 지질은 체내의 세포막을 구성하는 구성 성분으로 인지질, 당지질 등으로 이루어진다. 지방산은 포화지방산과 불포화지방산으로 나눌 수 있는데 분포 비율은 일정한 비율(4~10:1)로 존재해야 한다. 불포화 지방산의 섭취 부족이 되면 지방산 결핍이 발생한다. 버섯류의 지방산 조성은 주 성분으로 불포화 지방산인 리놀린산(linoleic acid, C18:2)이 다량 함유되어 있다. 지질은 인간의 정상적인 생명현상 유지를 위해 필수 영양소로서, 특히 지질 중에 다가의 불포화지방산이 결핍되면 성장 지연, 신장 손상, 지방간, 피부염 등의 질병이 유발된다. 따라서 불포화 지방산인 리놀린산을 다량 함유하고 있는 버섯류는 체내에서 필요로 하는 지질의 좋은 공급원으로 식품적 가치가 높음을 알 수 있으며, 리놀린산의 항산화효과가 최근 보고 되면서 버섯류가 성인병 예방의 건강보조식품으로 좋은 소재임을 증명하고 있다. 버섯류는 또한 빛이나 열에 의해 비타민 D로 전환되는 ergostreol(100~800 mg/100 g 건물중)이 보통 다량으로 들어 있으며 비타민 B1, B2 및 niacin 등이 함유되어 있다.

비타민 B2의 경우 주요 식용버섯류 100 g 건물 중에 0.2~0.5 mg 정도로 다량 함유되어 있다. 그러나 비타민 C의 경우 매우 소량이 존재한다. 비타민 B군은 인체 내에서 당 대사에 관여하는 필수 영양소이며 비타민 D의 경우 인산 및 석회의 신진 대사 조절 작용을 하는 필수 영양소로 결핍되면 골연화증을 유발한다.

양송이의 경우 비타민 B 복합체인 folic acid를 함유하고 있는데 이는 결핍시 빈혈을 유발하는 중요한 영양소이다. 이처럼 버섯류는 생체 내에서 중요한 작용을 담당하는 비타민류를 다량 함유하고 있어 다른 식품들과 함께 중요한 식품 소재원이라 할 수가 있다. 버섯류는 높은 함량의 저칼로리 탄수화물과 고단백성의 식품으로 최근 건강보조식품 등으로 다루어진다.

버섯류의 약리적기능, 즉 생물활성은 항생물질로 1945년에 낙엽버섯 (*Marasmius conigenus*)에서 marasmic acid가 보고된 이래 지금까지 약 180 여종 이상이 보고 되었다. 항생물질 외에도 버섯류는 균사 및 자실체에서 혈당강하물질, 콜레스테롤 감소물질, 항혈전물질(혈소판 응집 저해물질), 항염증물질, 신경보호물질, 렉틴 등 다양한 생체기능 조절물질들이 있다. 또한 버섯으로부터 분리된 β -D-glucan류의 항종양작용이 보고 되었으며 최근 새로운 항암면역요법제로서 이용될 수 있는 버섯 다당류에 대한 연구가 많이 이루어지고 있다, 담자균이 생산하는 생리활성물질(기능성물질)중 다당류는 숙주 매개성 면역 증강활성을 지니고 세포 독성이 적어 생물반응조절제(Biological Response Modifiers, BRMs)로 각광 받고 있다. 이와 같이 버섯류로부터 면역조절작용에 대한 효능과 새로운 생물반응조절제로서 개발 가능성이 시사되면서 새로운 버섯류로부터 기능성 다당류를 탐색하기 위하여 많은 연구가 이루어지고 있다.

2. 진흙버섯과 함암작용

진흙버섯류에 대한 생리활성에 관한 연구는 *Phellinus linteus*를 중심으로 함암효과에 대한 동물실험의 결과가 발표되면서 주목을 받아왔다. 따라서 진흙버섯에 대한 연구동향을 보면 일본에서 먼저 이 버섯에 대한 연구가 시작되었다. 진흙버섯의 함암작용에 대한 연구는 Ikekwa(1968), Shibata 등(1968), Okuda 등(1973), Nomoto(1975) 등이 함암 및 면역활성 효과에 대하여 보고하였다. 국내의 경우에는 Oh 등(1992), Chang 등(1993), 송 등(1994), Chung 등(1994), 정(1994), 고 등(1995), Han 등(1995), Song 등(1995), Lee 등(1996 a, b), 배 등(1996), Kim 등(1996), 송 등(1998)이 진흙버섯의 직접적인 함암효과 또는 함암작용에 중요한 역할을 할 것으로 추측되는 버섯추출물의 면역계활성에 관련한 연구결과를 발표 하였으며 송 등(1997)은 진흙버섯의 인공적인 자실체 유도방법에 관한 보고를 한 바 있다.

이러한 함암활성은 버섯류의 β -glucan은 직접적으로 암세포에 대한 세포 독성에 의한 것 보다는 면역 활성을 통하여 함암작용을 하는 것으로 보고 되면서 면

역체계의 증강을 통하여 이루어진다. 인체 내의 면역체계는 몸을 유지하는 하나의 방어 체계로 외부 및 내부의 이물질에 대한 인식과 공격을 통해 체계를 유지해 나가려 한다. 면역조절작용에 대한 연구가 많이 이루어지고 있다. 대체로 버섯류에 포함된 항암면역 조절제는 다른 약리적 작용기작을 약간 보이나 일반적으로 유사하다. 대표적인 면역조절제로 lentinan는 표고(*Lentinus edodes*)에서 분리된 것으로 면역 방어에 체계 중 면역조절인자인 T 임파구, macrophage 및 보체를 활성화시켜 생체의 면역학적 활성을 증가시킨다.

그러나 대부분은 진흙버섯의 자실체에 대한 연구가 아니라 균사체를 대량배양하여 연구한 결과이다. 이는 진흙버섯의 재배기간이 길어 산업적 접근 시 생산원가의 상승으로 이어져 고가로 유통되는 결과를 보여준다. 최근에 송 등(1997)이 자실체에 대한 연구를 보고한 바 있다.

그러나 최근에 *Phellinus linteus* 대신에 *Phellinus baumii*가 대량으로 재배되면서 단위면적당 생산량이 급증하였다. 따라서 2000년 이후 well being 추세에 힘입어 진흙버섯을 이용한 다양한 제품이 생산되었으며 2004년에 *Phellinus linteus*와 *Phellinus baumii*가 식약청에서 식품 부원료로 승인이 남으로써 이용이 증가되었다.

3. 버섯류의 기능성 제품(건강보조식품)의 개발현황

건강식품은 보건복지부 산하의 식품의약품안전청에서 버섯가공식품을 비롯한 약 20여 품목 군으로 분류하고 이들의 전체 매출액은 1999년 기준 약 8,730억원으로, 이중 버섯 가공식품은 220억원 규모이다. 우리나라를 비롯한 중국, 일본 등지에서 새로운 기능성 버섯류의 탐색 및 연구가 계속 진행이 되고 있으며 우리나라는 영지버섯, 동충하초, 운지버섯, 상황 및 신령버섯 등의 약용균류가 주로 건강보조식품으로 연구되고 있다. 연도별 변화를 보면 1995년에서 1999년에 우리나라의 건강식품 매출은 1997년과 1998년에 감소되었다가 1999년에 증가하는 경향을 보였다. 이는 경기의 불황시기(IMF)에 의한 급격한 감소 현상으로 나타났으며 우리나라의 건강보조식품의 시장은 점진적으로 확대되는 추세이다. 1995년과

1996년의 매출 결과 수입 제품이 증가되는 경향을 보였다. 버섯가공식품의 경우는 1999년의 경우 총매출액 대비 약 3% 정도의 시장 점유율을 보였으나 버섯가공식품군의 연도별 매출액 증감률이 1998년 140억원에 비해 약 54.9% 증가된 220억원 규모로 신장되었다.

특허출원 된 내용을 보면 종근당에서 출원한 “영지버섯 균사체 배양액으로부터 고분자 물질의 생산방법 및 그 용도” 앤씨바이오텍(주)에서 출원한 “버섯균사체를 이용한 가축 및 해수어, 담수어, 대하의 기능성 사료 제조 방법 및 첨가물질” 또한 “항암성분을 함유한 약차 제조 방법” 등 많은 특허출원이 급증하고 있다.

특히 특허출원의 내용 중 체내의 콜레스테롤 함량을 낮추어 줌으로 체중 조절에 효율성을 높일 수 있는 건강 다이어트 보조식품으로 일부 사용되고 있을 뿐만 아니라 그들의 섭취 시 외부로부터 침입한 이물질(세균, 곰팡이 등)과 내부에 잔재하는 이물질(암세포 등)에 대한 생체방어작용, 동맥경화와 같은 성인병 유발 원인을 제거할 수 있는 항혈전작용 및 혈당 강하작용, 그리고 항종양작용 등의 약리적 특성을 지니고 있어 새로운 건강식품소재로 주목 받고 있다.

2003년 6월에 등록된 특허 목록으로 한달에 약 10여개 이상이 버섯 기능성 관련 특허가 등록되고 있다고 한다. 식품의 기능성 향상 연구의 일환으로 버섯 균사체 배양물을 이용한 기능성 쌀에 관한 특허가 주류를 이루고 있으며 전통 한방요법에 버섯 추출물을 가미함으로써 기존 효능의 상승효과를 볼 수 있는 제품 개발이 이루어지고 있다. 그 외 된장, 간장 등의 식품에 버섯자실체 및 균사체 추출물을 가미하여 고부가가치성을 지닌 기능성 식품 제품으로 개발하고 있다. 그 외 버섯 균사체 및 자실체의 추출물을 주원료로 하는 건강보조식품 드링크 류 개발 및 버섯류의 생리활성물질 생산방법 개발을 통한 의약품 소재화 연구 개발이 이루어지고 있다.

최근 국내 상황버섯 관련 특허를 살펴보면 “상황버섯 균사체를 이용한 된장 및 고추장의 제조 방법, 2003-0016670”으로 내용은 상황버섯 균사체를 이용한 된장 및 고추장의 제조방법에 관한 것으로서, 더욱 상세하게는 상황버섯의 균사체를 증자된 콩에 배양하여 항암 효과가 매우 뛰어난 된장 및 고추장을 제공함에

있는 것이다. 전술한 본 발명의 특징은, 품종이 우수한 양질의 콩을 선별하여 정화된 깨끗한 물로 세척하는 단계; 세척된 콩을 80℃의 온수에 담그고, 2시간 동안 침지시켜 콩을 불리는 단계; 불려진 콩을 탱크에 투입하여 함께 주입된 물을 끓이거나 고열의 스팀을 부여하여 20분간 삶아서 콩을 팽화(膨化)시키는 증자단계; 삶아진 콩에 물기를 제거한 후 탄산칼슘을 고르게 투여하여 콩의 수분함유량이 50%를 유지되도록 하고, 수소이온농도(pH)가 6.5정도를 유지되도록 하여 약산성으로 조절하는 콩의 수분 및 산도의 조절단계; 수분 및 산도가 적절하게 조절된 콩을 1.5기압과 130℃를 유지하는 압력탱크 내부에 투입하여 1시간 30분간 압력과 열을 가하여 각종 유해세균들을 멸균시키는 단계; 멸균된 콩을 식혀서 냉각시키는 단계; 증자되어 팽화된 콩을 접종실에 투입하여 액상의 상황버섯 균사체를 고르게 분무하여 종균을 접종하는 단계; 종균이 접종된 콩을 배양실의 온도가 22~25℃를 유지한 상태에서 15일간 배양하여 콩을 발효시키는 단계; 발효된 콩을 소금물에 담그어 1~3개월 숙성(aging)시키는 단계에 의하여 된장이 완성됨을 특징으로 하는 상황버섯 균사체를 이용한 된장의 제조방법에 의하여 달성될 수 있는 것이다. 치료약에 대한 개발 특허로 “아프리카산 상황버섯 추출물을 함유하는 바이러스 질환예방 및 치료용 조성물, 2003-0011239”로 항바이러스 활성을 나타내는 아프리카산 상황버섯(*Phellinus* spp(Berk). Pilat) 추출물을 함유하는 조성물에 관한 것이다. 본 발명에 따른 아프리카산 상황버섯 추출물은 우수한 항바이러스 활성을 나타내어, 바이러스 질환의 예방 및 치료에 효과적이고 안전한 의약품 및 건강기능식품으로 이용할 수 있다.

기능성을 부가하여 재배에 대한 특허로는 “감귤류를 함유한 고행배지에서 상황버섯의 배양 방법, 2003-0005554”로 본 발명은 무농약 재배 금귤을 함유한 고행배지에서 상황버섯의 대량 배양방법에 관한 것으로 더욱 상세하게는 비닐하우스에서 무농약 재배로 생산한 금귤을 함유한 배지에 상황버섯종균을 접종하여 단기간에 대량의 상황버섯균사체와 자실체를 생산하는 방법에 관한 것이다. 즉, 비닐하우스에서 무농약 재배로 생산한 금귤을 배지로 이용하여 내열성용기에 주입한 후 미생물의 오염을 방지하고 산소의 유입이 가능한 내열성 마개로 봉한 후 121℃에서 15분에서 45분간 멸균한 후 상황버섯종균을 접종하여 약 30~90일간의

증식배양으로 대량의 상황버섯균사체와 자실체를 생산하여 이를 대량공급 하고자 하는 것이다. 따라서 면역기능 강화 및 항암작용이 있는 것으로 수많은 연구를 통해 밝혀져 있는 상황버섯균사체와 자실체를 안정성이 보장된 비닐온실에서 무농약 재배를 한 금굴의 고품배지와 농축액을 액상배지로 조성하여 대량 증식하는 것이 가능하게 된다.

기능성 특성을 이용한 음료 개발로는 “상황버섯 식혜 및 그 제조 방법, 2002-0088249”으로 본 발명은 상황버섯 식혜 및 그 제조방법에 관한 것으로, 상황버섯을 물에 넣고 다려서 우려내는 단계와 상황버섯을 우려낸 물에 쌀, 또는 찹쌀을 넣어 팽윤시켜서 증기로 찌는 고두밥 제조단계와 고두밥을 물에 풀고 엿기름을 넣어서 24시간 삭힌 다음 설탕이나 꿀을 넣고 끓여서 식히는 단계로 이루어지는 상황버섯 식혜와 그 제조방법이다.

그 외에도 산업적 가치가 있는 특허로는 “상황버섯이 첨가된 상황버섯 냉면육수와 상황버섯국수육수의 제조 방법 및 상황버섯 냉면육수와 상황버섯국수육수. 2004-0033315”, “자연산 상황버섯, 녹차, 정향, 영실 추출물의 추출 방법 및 그 혼합 추출물을 사용한 미백 화장품의 제조 방법, 2002-0072451”, “에탄올 추출물을 함유하는 향산화용 금사상황버섯 조성물, 2002-0065239”, “상황버섯 박 그리고 활성탄을 이용한 닭과 돼지사료 첨가제, 2002-0062180”, “상황버섯 추출물의 나노입자를 함유하는 화장료 조성물, 2002-0063300”, “상황버섯균사가 배양된 곡물 제조 방법. 2004-0003486”, “상황버섯 추출물을 함유하는 가축의 유방염질환 치료용약학적 조성물” 등이 알려져 있으나 상품화되어 성공된 것은 화장품의 원료가 전부이며 나머지의 기술도 상품화는 가능하나 기술의 우선권을 주장하기에는 무리가 있는 것으로 사료된다.

일반적인 식품 개발에서는 경남 진주시 미천면에서 상황버섯을 대량으로 생산하고 있는 버섯들이 3형제는 상황버섯 추출액을 이용해 “상황버섯라면”을 출시하여 성공을 거둔바 있다.

제 2 절 국내·외 관련 연구내용 및 문제점과 본 연구 종료 후 기대되는 국내기술 상황

1. 진흙버섯을 포함한 버섯류의 기능성 제품 개발 산업 전망

농림기술과제의 경우 1994년에서 2000년까지 6년 동안 총 연구수행 과제 중 버섯 관련 과제가 28건이었으며 그중 9건 만이 기능성 관련 연구인 반면, 최근 2000년부터 2003년까지 3년 동안 총 연구수행 과제 628건 중 버섯관련 과제가 24건이었으며 그중 9건이 기능성 관련 연구 과제이었다. 과제를 살펴보면 “식이버섯 자실체 및 균사체를 이용한 가공제품개발”, “버섯류의 부가가치 제고를 위한 가공식품의 개발”, “영지버섯을 이용한 침출주 개발연구”, “생물공학을 이용한 아가리쿠스 버섯의 대량생산기술 및 가공제품개발”, “유용버섯 자원의 발굴과 대량재배기술 개발”, “표고버섯을 이용한 가공제품 개발 및 산업화 방안 연구”, “유용버섯 *L. tuber-regium*의 개발 및 이용 연구”, “버섯균사체를 이용한 기능성 간장 및 된장 생산기술 개발”, “한방 처방을 이용한 약용버섯의 기능성 식품 개발연구”, “고부가가치 창출을 위한 기능성 버섯의 개발 및 이용연구”, “혈당강하와 치매예방 기능을 가진 버섯배양 곡물 개발 및 가공제품화”, “젖산균 및 버섯 종균을 이용한 고기능성 동치미 개발”, “버섯 균사체를 이용한 천연 CLA의 생산 및 이용”, “팽이 및 만가다버섯의 식품 소재화 및 고품질제품 다양화기술 개발”, “버섯균사체 액체배양을 이용한 고부가 천연향료 생산”, “목질진흙버섯(*Phellinus linteus*)의 상품화 개발 연구”, “버섯균사체 액체배양추출물로부터 혈당강하 소재 개발”, “버섯 자실체로부터 β -글루칸 분리정제기술 및 기능성 가공제품 개발” 등 농림부에서는 버섯류에 대한 다양한 기능성 연구 및 제품 개발을 위하여 많은 연구비를 지원하였다. 2001년까지 버섯에 관련되어 연구된 과제를 보면 주로 약용버섯인 영지버섯을 이용한 주류 개발, 버섯 균사체를 이용한 기능성 장류 개발, 그리고 한방 처방에 약용버섯 이용성 검토 등이 연구 수행되었다.

최근에 수행하고 있는 농림기술개발과제는 기능성에 초점을 맞추어 좀 더 세

분화된 기전을 바탕으로 연구되고 있으며 다양한 버섯 종류로부터 혈당강하와 치매예방 기능, 천연 CLA의 생산 및 이용 연구, 고기능성 동치미 개발 연구, 고부가 천연향료 생산 연구, 혈당강하 소재 개발 연구, β -글루칸 분리정제기술 및 기능성 가공제품 개발 연구 등 다양한 기능성 제품 개발이 이루어지고 있다. 보건복지부에서도 연구과제의 경향을 보면 “버섯 자실체 및 균사체의 기능성 물질 검색 및 이를 이용한 기능성 식품 개발”, “동충하초버섯의 대량생산 및 기능성 물질 이용 기술 개발”, “액체배양을 통한 송이버섯 균사체 및 생리활성물질 대량생산 공정 개발”, “생약재 및 버섯류의 히아루론산 분해 억제 및 항산화 작용에 관한 연구”, “차가버섯을 이용한 기능성 식품소재개발”, “버섯의 항암성분 제품화기술개발”, “항암물질 검색 및 인공 배양기술 개발”, “느타리버섯 균사체 배양물로부터 숙취해소 및 혈중 알코올 농도 감소 물질의 분리 및 작용기작 구명” 같은 연구 개발 동향을 보이고 있어 버섯 기능성 제품 개발 전망을 밝게 한다. 이러한 사실은 버섯의 기능성 관련 연구에 대한 관심이 증가하고 있음을 간접적으로 시사하고 있으며 수행 과제 대부분이 제품 개발에 중점을 두고 있어 21세기에는 국내에 다양한 버섯가공식품 혹은 의약품이 개발되어 제품화 될 전망이다.

국내 제약업계에서는 다양한 상품이 출시 판매되고 있다. 국내 제약업계에서 판매되고 있는 버섯가공식품 혹은 의약품은 약 27개 제품으로, 건강보조식품 중 드링크 류가 18종으로 가장 많았다. 버섯 종류는 동충하초가 가장 많이 이용되고 있으며, 그 다음 영지버섯, 운지버섯, 신령버섯, 그리고 상황 순으로 이용되고 있다.

특히, 운지버섯과 상황의 경우 전문의약품으로 개발 판매되고 있었으며, 버섯류의 생리활성 기능 중 항암면역조절기능을 지닌 물질을 추출하여 항암 치료 보조제로 시판되고 있다. 영지버섯은 오래전부터 전래된 약용균류로써 그 주성분이 다당류(polysaccharides), 쓴맛을 내는 고미성분인 triterpenoids, protein, adenosine, 핵산(RNA)등이다. 영지버섯의 약리 성분의 다양성과 함께 생물활성 역시 다양하다. 영지버섯에 함유된 adenosine의 경우 무통성 효과(진통효과, Analgesic) 및 혈소판응집저해작용(Platelet aggregation inhibitor)을 하며, triterpenoid 계통의 화합물은 ganoderic acids A에서 Z를 포함한 약 30 여종이

자실체 및 균사체로부터 분리 보고 되어 그들 각각에 대한 약리 효능에 대하여 보고가 되었다. Triterpenoid 계통의 화합물은 간보호작용(Antihepatotoxic), histamine-release inhibitor, 콜레스테롤 감소작용(Hypocholesterolemic), 혈당저하 작용(Hypoglycemic), 혈압저하작용(Hypotensive)등의 여러 가지 생물 조절 기능을 지닌다. 영지버섯은 이처럼 다양한 약리 효능이 보고 되면서 건강보조식품으로 다루어지고 있으며 우리나라의 경우 식품 공전에 등록이 되어 기능성 음료 등으로 폭 넓게 사용되고 있다. 이 외에 동충하초, 상황 등은 오래전부터 알려져 온 약용 균류이지만 최근 생리활성 연구가 급진적으로 이루어져 새로운 기능성 버섯류로 대두되고 있다.

버섯류는 새로운 생체반응조절제(Biological Response Modifier, BRM)의 개발 소재원으로 미국, 일본 등의 선진국에서 많은 연구가 이루어지고 있으며, 그중 가장 주목받고 있는 버섯류의 성분으로서는 β -glucan 등의 다당류로 이미 의약품으로 표고에서 Lentinan, 구름버섯(*Coriolus versicolor*)에서 PSK 등이 시판되고 있다. 이들 외에 면역조절기능을 지니는 heteroglycan, galactan 등이 최근에 보고되고 있으며, 신령버섯(*Agaricus blazei*)의 자실체, 상황버섯(*Phellinus* spp.)의 균사체, 장수버섯(*Fomitella fraxinea*)의 자실체로부터 면역촉진 효과가 있는 galactan류, heteroglycan류 등이 보고 되었다. 또한, 자생하는 버섯류를 수집하여 노화 방지와 관련성이 있는 항산화물질, 소염성 항균물질 등이 보고 되고 있다.

지금까지는 상황버섯이 암세포를 억제하는 효과뿐만 아니라 당뇨병, 관절염 치료에 효과가 있는 것으로 알려지면서 환자들이 많이 찾았다. 따라서 상품 개발과 기전연구를 병행하여 특허를 획득하는 것이 중요한 것으로 생각된다.

2. 기술도입의 타당성

우리나라에서 이용되는 약용버섯의 경쟁력은 사실상 어려운 실정이다. 현재 진흙버섯은 산업적으로 이용하는 경우 대부분 수입하여 이용을 하고 있다. 이러한 이유는 중국, 인도, 필리핀, 러시아 등지에서 야생으로 재배되는 버섯이 특별한 장치 없이 자연산으로 재배되고 있다. 그러나 국내에서는 많은 시설비가 들어

가고 인건비 등이 들어가기 때문에 생산원가가 높아지는 경향이 있다.

따라서 본 연구에서 마른진흙버섯은 2001년 농업기술원에서 품종 등록하여 농가로 기술이전이 되었다. 이 품종은 기존의 진흙버섯(*Phellinus linteus*, *Phellinus baumii*) 보다 마른진흙버섯(*Phellinus gilvus*)은 단위면적당 생산량이 우수하고 재배기간이 속성으로 재배되는 특성을 지니고 있어 수입되는 진흙버섯과 가격의 경쟁이 가능할 것으로 생각된다.

제 3 장. 진흙버섯 품종별 기능성물질분석 및 효과 연구

제 1 절 서 설

버섯류는 고등균류 중 담자균류에 속하며 여러 생리활성물질을 함유하고 있어 약재로 사용하고 있으며 현재는 의약품으로의 연구도 활발하게 진행이 되고 있다 (Jong 등, 1992; Mizuno 등, 1989; Mizuno 등, 1993). 그 중에서도 상황버섯이라고 알려진 진흙버섯이 최근에 식품의약품안전청으로부터 식품으로 사용이 허가되었다. 진흙버섯은 전 세계적으로 약 220종이 알려져 있으나 한국에는 7종이 분포하고 있는 것으로 알려져 있다(정 등, 1994). 고등균류 중 버섯은 고대로부터 식용 및 약용 등으로 널리 이용되고 있으며 여러 생리활성물질을 함유하고 있어 현재는 의약품으로의 연구도 활발하게 진행이 되고 있다(Sarr 등, 1991). 지구상에 버섯은 약 140,000개가 분포하는 것으로 예측되며 그들 중 약 10% 만이 종의 이름이 지어졌고 그 중 약 700종이 약리학적 활성이 있는 것으로 알려져 있다 (Chang, 1999; Wasser 등, 1999 Reshetnikov 등, 2001).

최근 *Phellinus linteus*와 *Phellinus baumii*는 기능성식품으로 한국식품의약품안전청(Korea Food and Drug Administration)에서 허가가 났다(KFDA, 2003; 박 등, 1999). *Phellinus linteus*의 열수추출물은 anti-tumor polysaccharides를 함유하고 있으며, 이 다당류(polysaccharide)는 항암과 면역활성작용이 있는 것으로 알려져 있다(Wasser 등, 1999; Tzianabos 등, 2000; Reshetnikov 등, 2001; Shon 등, 2003; Han 등, 1999; Kim 등, 1996; Song 등, 1995; 송 등, 1998; Sasaki 등, 1971; Chihara 등, 1982; Franz 등, 1989; Hirase 등, 1976; Li 등, 2004; Yu 등, 1998; Yu 등, 1999). 자실체 및 액체배지로부터 다당체를 추출하기 위해서는 다양한 방법이 있다(Mizuno 등, 1999). 동양의학에서 열수추출 방법은 오랫동안 사용

하여 온 방법이다. 그러나 항암활성을 위한 optimal water extraction condition에 대한 방법은 보고 되지 않았다. *Phellinus linteus*의 열수추출물은 높은 항암활성 (Ikekawa 등, 1968; Han 등, 1999; Yu 등, 1999)을 보여주었고 그 밖의 다양한 생리학적 활성(Song 등, 1995; Lee 등, 1996; Dai 등, 1998)을 갖고 있다. *Phellinus baumii*는 항암 및 항산화작용(Dai 등, 1998)이 보고 되어 있으며 열수추출물이 민간요법으로 사용되고 있다. 현재 시중에 유통 중인 진흙버섯은 분류학적으로는 담자균아문(Basidiomycotina), 민주름버섯목(Aphyllphorales), 소나무비늘버섯과(Hymenochaetaceae), 진흙버섯속(*Phellinus* spp.)에 속하는 백색부후균으로 목질진흙버섯(*Phellinus linteus*), 말뚝진흙버섯(*Phellinus igniarius*), 찰진흙버섯(*Phellinus robustus*), 낙엽송진흙버섯(*Phellinus pini*) 등이 주로 많이 연구되어 왔다(정 등, 1994; Kirk 등, 2001; Jung 등, 1997; Dombrovs'ka 등, 1998; Kruger 등, 1976; Hwang 등, 2004). 그러나 종들 간의 형태가 유사하여 종 동정에 어려움을 가지고 있다. 지금까지 *Phellinus gilvus*에 대한 형태학적, 일반성분 그리고 무기성분 대한 연구가 없어 본 실험에서는 시중에 높은 가격으로 유통되고 있는 *Phellinus baumii* 및 *Phellinus linteus*와 비교하여 기초 자료를 얻고자 하였다.

진흙버섯 중 *Phellinus linteus*의 항종양 효과는 각종 문헌과 연구에서 입증되고 있으며 현재 그 이용은 점차 증가하고 있으며(Ikekawa 등, 1968; Cho 등, 2002) 특히 *Phellinus linteus*의 균사체 배양물에서 면역활성이 뛰어난 것을 보고하였다. 자연산과 인공 재배된 *Phellinus linteus* 사이에 면역활성에 대하여 비교 실험한 결과 차이가 없는 것으로 나타났다(Han 등, 1999; Lee 등, 1996; Song 등, 1995). *Phellinus baumii*는 *Phellinus linteus*와 같은 종으로 분류하는 학자도 있으나 한국에서 재배되는 두 종에 대한 외견상의 차이는 *Phellinus baumii*가 노란색을 갖고 있는 것으로 나타났다. 현재 *Phellinus linteus*와 *Phellinus baumii*의 재배기간은 2년 혹은 3년 동안 재배되어 시중으로 유통이 되고 있으며 주로 참나무 혹은 뽕나무의 원목을 이용하여 재배되는 것으로 알려져 있다. 이러한 긴 재배기간과 원목의 부담은 진흙버섯의 가격 상승으로 나타나 제품의 가격이 높아져 산업체에서는 다양한 상품 개발의 문제점으로 나타나고 있다. 최근에는 화학제품

을 동물에 사용하는 규제가 점차 강해지고 있어 대량생산이 가능한 *Phellinus gilvus*가 기능성 동물 사료개발의 유용한 소재 중 하나가 되어 고가의 진흙버섯을 저가로 낮추어 향후 기능성 식품 및 기능성 동물사료로 이용이 가능하게 해 줄 것으로 기대하고 있다(Lim 등, 2004; Lim 등, 2005).

마른진흙버섯은 경북농업기술원에서 2001년에 품종 등록한 진흙버섯으로 3개월에 자실체의 수확이 가능한 품종으로 항암효과는 *Phellinus linteus*와 큰 차이가 없는 것으로 알려져 있다(Hwang 등, 2003; Hwang 등, 2000; Jang 등, 2004). 따라서 응용분야의 하나로 고가의 진흙버섯을 저가로 낮추어 기능성식품의 다양화 및 동물약품시장에서 응용이 가능한 제품 출시를 기대하고 있다. 특히 동물약품에서는 열수추출 방법 대신에 다양한 에탄올을 이용한 추출을 할 경우 더 많은 생리활성을 포함할 수 있어 항산화 및 항암활성을 기준으로 하여 각각에 대한 최적의 자실체 추출용 에탄올 농도를 본 연구에서 실시하였다.

국내에서 *Phellinus gilvus*는 당뇨병, 항암, 해독작용이 있는 것으로 알려져 있고 사용하여 왔다. *Phellinus gilvus*는 3달 정도면 자실체가 형성되는 속성재배로 인공 대량재배가 가능한 것으로 알려져 있다. 1차 년도의 마른진흙버섯에 대한 단백질단백체의 추출조건의 설정을 하였다. 기존의 방법은 가용성 고형분을 조건으로 해서 최적의 추출조건을 설정하였지만 본 연구에서는 최적의 항암활성과 총당을 중심으로 하여 *Phellinus gilvus*로부터 단백질단백체 추출 조건의 설정하였다. 이러한 연구는 식물자원을 이용한 식품 및 의약품의 소재화 연구는 물질탐색을 위한 물질과학, 효능평가를 위한 의약학 효율성과 경제성을 고려한 공정 공학의 협력이 유기적으로 연결될 때 상승효과를 달성할 수가 있다. 따라서 본 연구에서는 진흙버섯의 식품 소재화를 목적으로 유효성분 추출 기술개발을 위하여 버섯 추출물의 특성 및 반응표면 분석에 의한 최적 추출 조건을 설정하고자 하였다.

국내에서 버섯 재배의 기술은 상당한 발전이 있었다. 버섯의 인공적인 재배법으

로는 골목재배법과 톱밥재배법이 있다. 표고버섯은 골목재배로 많은 생산량이 있었으나, 최근 버섯재배의 기계화가 추진되어 톱밥배지를 이용한 재배가 늘어나고 있다. 버섯재배에 이용되는 톱밥의 용도는 버섯종균의 제조와 실제 버섯재배 배지로 이용하는 두 가지가 있으며, 대표적인 톱밥재배 버섯으로는 표고, 느타리, 팽이, 영지, 뽕나무버섯, 맛버섯(나메코), 잎새버섯 등이 있다. 산업화를 위한 버섯의 재배는 고가의 참나무가 원목 구입에 대한 부담감이 버섯 농가에 경제적으로 상당한 압박이 있을 것으로 생각된다. 원목을 제재할 때 굵기와 제재목의 치수에 따라 다르지만 10% 내외의 톱밥이 발생한다. 이와 같이 발생하는 톱밥량은 1994년에 총 725,000 m³로 그 중 침엽수 톱밥이 627,000 m³, 활엽수 톱밥 98,000 m³로 활엽수 톱밥이 전체의 14%를 차지하고 있다. 이전에는 용도가 없어 대부분 땀감으로 이용되던 톱밥이 최근에는 용도가 많이 개발되어 공급이 수요를 따라가지 못하고 있는 실정이다.

오랫동안 항암제의 개발로 우수한 암 치료율이 향상된 것은 주지의 사실이다. 암세포의 제거에 초점을 맞춘 항암치료법은 그 부작용이 매우 심각하여 환자의 질을 크게 저하시킨다. 이러한 화학요법제가 다른 약물과 비교하여 갖는 중요한 특성은 유효농도에서 심각한 부작용을 들 수가 있다. 대부분의 항암제 부작용으로는 조혈기능의 억제, 메스꺼움, 구토, 점막궤양 및 탈모증 등이 있다. 이러한 부작용들은 화학요법제들이 암세포와 활발하게 자라는 정상세포에 구별 없이 작용하기 때문이다. 암은 아직도 그 발생기전이 불명확하여 난치 시도되고 있으며, 본 연구에서는 기존의 항암제인 doxorubicin(Dox)과 마른진흙버섯 자실체 추출물을 이용하여 두 물질을 혼합하여 투여 시 항암작용의 상호작용에 대한 연구를 실시하여 항암보조제의 가능성에 대한 연구를 실시하였다.

Phellinus linteus, *Phellinus igniarius*, *Phellinus pini*, 그리고 *Phellinus hartigii*는 다양한 생리활성작용이 있는 것으로 알려져 있다(Lee 등, 1996; Rew 등, 2000; 정 등, 1994; Kirk 등, 2001; Jung 등, 1997; Dombrows'ka 등, 1998; Kruger 등, 1976). 그들 가운데 *Phellinus linteus*는 국내에서 가장 많이 애용하는

약용버섯이다. 그 이유는 강력한 항암활성이 이미 많이 보고 되어 있기 때문이다 (Ikekawa 등, 1968; Han 등, 1999). 그리고 급성독성 및 안전성 시험이 확보되어 있다. 마른진흙버섯 또한 강력한 항암활성이 있는 것으로 본 연구에서 확인이 되었으나 마른진흙버섯은 아직 승인이 나지를 않았다. 그러므로 초기에 독성검사를 실시하여 독성유무를 확인하고자 급성독성을 실시하였다. 본 연구에서는 수컷과 암컷 rat를 이용하여 급성독성을 실시하였다. 여기에서 이상이 없으면 향후 GLP 시스템에서 독성검사가 이루어질 것으로 생각이 되며 많은 자금이 투입되어야 할 것으로 생각되었다.

진흙버섯에 대한 기능성제품의 개발로 유망한 분야가 호흡기 질병이다. 진흙버섯류의 추출물에 대한 몇 가지 관심이 있는 보고가 있다. 이 종류의 버섯 추출물에 대한 항암활성(Kim 등, 1996; Han 등 1999), 항산화작용 그리고 항간염작용이 보고되어(Ajith & Janardhanan, 2002). 이러한 결과로부터 진흙버섯류의 면역활성작용은 호흡기의 면역활성에 영향을 줄 것으로 생각된다. 호흡기질병은 산업국가에서 가장 흔한 질병으로 어른보다는 아이에게서 더 큰 문제를 야기한다 (Sears, 1997). Pulmonary neutrophilia는 천식(asthma), 만성호흡기폐질환(chronic obstructive pulmonary disease) 그리고 성인 호흡기질환에서 발견이 된다(Spond 등 2001). Neutrophils의 생성과 활성화는 tumor necrosis factor(TNF)- α 와 interleukin(IL)-1의 생성을 촉진하고 호흡기 질환의 매개체로 작용한다.

*Phellinus gilvus*는 속성 재배가 가능하지만 아직 그 효능에 대한 보고가 절대 부족한 상태이다. 그러므로 본 연구에서는 *Phellinus gilvus*와 *Phellinus baumii*가 pulmonary neutrophilia와 TNF- α 와 IL-1의 생성을 억제하는지에 대한 효과를 조사하였다.

면역기능저하를 유발하는 요인들, 즉 흡연, 음주, 약물복용, 영양부족, 바이러스나 세균성 질환 등과 같은 외인적 요소들과 노령 또는 유전등과 같은 내인적 요소들과 그 작용기전에 대하여는 많은 연구가 지속되어 왔다. 하지만 저하된 면역기능을 향진하려는 연구들은 상대적으로 부족하였는데 흡연 등의 외인적 요소

에 의한 면역기능저하는 이를 차단함으로써 회복할 수 있지만 유전적 요인, 노령 등에 따른 체질적 요인에 의해 발생한 경우에는 그 요인을 규명하기가 쉽지 않아 현대의학적 치료법이 확립되어있지 않으며 알레르기 등의 경우 일단 발병할 경우 평생 지속하는 난치성 질환의 경우에는 항히스타민제 투약과 같은 대증요법만이 확립되어 있어 이를 체질의 개념에서 접근하려는 시도가 건강기능성 식품에서 시도되고 있다(Ji 등, 2003).

면역기능개선을 위한 물질을 찾아내려는 노력은 외국에서는 주로 1970년대 이후 시작되어 주로 천연물의 고분자 분획성분으로부터 항암활성, 항보체활성 및 임파구 분열유도 등의 면역조절활성이 있는 *Lentinan*, *Shizophyllan*, *Krestin* 등의 β -glucan 계열의 다당류를 주성분으로 개발 상품화되었다(Kim 등, 2004; Kim 등, 2004). 이러한 분야는 일본을 중심으로 발달되어 왔으며 최근에는 미국 및 유럽에서도 관심이 높아지고 있다(Ajith 등, 2002; Atsumi 등, 1990; Withers 등, 1991). 미국을 중심으로 서구의 면역증강제에 대한 연구는 펩타이드나 단백질계열의 면역증강제 개발에 상대적으로 집중되어있다. 흉선의 epithelial cell은 흉선 세포의 성숙에 필요한 호르몬 인자들을 분비하는데 그 중 하나인 thymosin $\alpha 1$ 은 인체의 중요한 면역활성물질로 stem cell을 자극하여 T임파구의 성숙을 촉진하고 Tc cell, Th cell의 수를 증가시키고 NK 세포의 수와 활성을 증가시키며 다양한 cytokine의 분비를 유도한다고 알려져 있다. 송아지 흉선에서 추출정제한 thymomodulin은 면역조절제로 시판되어 사용된다. 이외에도 디펩타이드인 Bestatin, Pidotimod 등도 면역증강효과가 높은 것으로 알려져 있다. 국내에서도 천연물 유래의 면역증강제 개발은 많은 노력을 기울이고 있는 분야이며, 현재 상품화되어 있는 성분도 상당히 많아 Copolang(광동제약), Licovek(광동제약), β -Immunan(일양약품), 이뮤넥스(씨트리), 및 이뮤노(코오롱제약) 등을 예로 들 수 있다. 이러한 약리활성을 가지는 천연물유래의 다당류들은 host-defense activity와 macrophage activity를 촉진함으로써 면역증강이나 항종양 활성을 나타낸다고 평가된다. 하지만 임상적으로 효과가 인정되는 약물은 실제로 소수에 불과하고 현재도 많은 개발의 가능성이 남아있다.

국내에서 고부가가치의 하나인 진흙버섯은 항암효능, 항당뇨 효능을 비롯한 여러 가지 효능으로 인체에 유익한 식품으로 알려져 있다. 그러나 현재 국내에서 재배가 되고 식품으로 이용이 되는 *Phellinus linteus*와 *Phellinus baumii*는 이미 항암활성에 관한 많은 보고가 이루어져 왔다. *Phellinus gilvus*에 대한 항암효과는 알려져 있지 않았으나 최근에 본 실험실에서 제공하여 준 *Phellinus gilvus*의 자실체 추출물로 항암효과 시험을 실시하여 좋은 연구결과를 보여주었다(Bae 등). 항암효과 외에 *Phellinus linteus*와 *Phellinus baumii*가 간 보호하는 효과도 알려져 있으나 *Phellinus gilvus*에 대한 간 보호 효과는 알려져 있지 않다.

본 연구는 마른진흙버섯 자실체의 열수 추출물 및 이를 유효성분으로 함유하는 조성물에 관한 상품화연구이다. 현대인들은 산업의 발달로 대기오염, 알레르기원(동물의 털, 꽃가루 등), 흡연 등으로 인한 알레르기성 기관지 질환에 노출되어 있으며, 감기, 후두염, 급성 후두개염, 세기관지염, 폐렴, 천식, 편도선염 등과 같은 호흡기 질환은 선진국에서 가장 빈번하게 발생하는 질환중 하나로 성인보다는 어린아이에게서 많이 발생된다는 보고가 있다(Sears, 1997). 이러한 호흡기 질환은 특히 대기 환경오염이 심각한 지역에서 발생빈도가 높다. 예로부터 버섯은 항암, 항산화, 콜레스테롤 저하, 혈압강하, 면역강화, 종양저지, 자궁출혈, 월경불순 등의 치료에 효과가 좋은 것으로 알려져 왔다. 최근 들어서 버섯을 인공 재배하거나, 자연 상태에서 성장한 버섯의 추출물을 이용한 건강식품, 화장품 및 의약품 등이 많이 개발되고 있다(Pyo 등, 1999; Kondo 등, 2005; Jung 등, 2003).

본 연구는 시험계획서에 따라서 진흙버섯에 정보화 분석을 서론과 연구개발부분에 포함을 시켜 정리를 하고 구체적인 연구결과는 다음과 같다. 즉, 진흙버섯 품종별(*Phellinus baumii*, *Phellinus linteus*, *Phellinus gilvus*) 및 처리별 항암활성 및 추출된 추출물(단백다당체)과 현재 사용 중인 항암제에 대한 항암활성을 비교하였다. *Phellinus gilvus*로부터 단백질다당체 추출조건을 설정하였으며 2차 년도에는 진흙버섯(*Phellinus gilvus*) 처리별 기능성물질의 비교 분석 연구를 실시하였다. 마른진흙버섯(*Phellinus gilvus*)으로부터 단백질다당체의 추출하고 및 기능

성 분석을 하였다. 또한 단백다당체의 추출물과 기존의 항암제에 대한 상호작용에 대한 연구를 실시하여 상호작용을 비교하였다. 마른진흙버섯(*Phellinus gilvus*)으로부터 단백다당체의 추출물에 대한 독성시험을 처음 보고하였으며, 마른진흙버섯(*Phellinus gilvus*)으로부터 단백다당체의 추출물을 이용한 기능성제품을 위한 기초연구를 다양한 생리활성의 관점에서 실시하였다. 마른진흙버섯(*Phellinus gilvus*)으로부터 단백다당체의 추출물을 이용한 기능성제품 연구는 3차 년도에 동물실험을 중심으로 마른진흙버섯(*Phellinus gilvus*)으로부터 단백다당체의 추출물을 이용한 기능성제품의 항암활성의 비교하였으며 마른진흙버섯(*Phellinus gilvus*)으로부터 단백다당체의 추출물을 이용한 기능성제품의 안전성 시험 및 시제품 제작을 실시하였다.

제 2 절 재료 및 방법

1. *Phellinus linteus*, *Phellinus baumii* 및 *Phellinus gilvus*의 형태, 일반성분, 원소분석 및 무기성분 함량의 비교

가. 진흙버섯류의 준비

본 실험에 사용한 품종별 진흙버섯류 즉, *Phellinus linteus*와 *Phellinus baumii*는 안동 하회마을에서 판매되고 있는 뽕나무에서 원목 재배된 3년생 진흙버섯을 공급받아 이용하였으며 *Phellinus gilvus*는 한국유전자은행에서 분양받은 균주(KCTC6653)를 경상북도 농업기술원에서 5 개월 동안 톱밥으로 숙성 재배된 버섯(조 등, 2002)으로 이것들에 대한 원소분석을 비교하고자 각 버섯의 수분의 함량을 10% 미만으로 건조하여 분쇄한 후 성분 분석용으로 사용하였다.

나. 일반성분 분석

세 종류의 진흙버섯에 대한 일반성분은 A.O.A.C.법(Official Method of Analysis, 1980)으로 분석하였다. 시료의 조섬유는 산 및 알칼리 분해법을 이용하여 조섬유 분석 장치(Fibertec System, Sweden)로 측정하였다. 수분은 적외선 수분측정기(Kett, FD-240, Japan)로 3회 측정하였고, 조단백질의 함량은 Kijeltec-1035(Auto Sampler System, Sweden)를 사용하여 켈달법으로 총질소 함량을 구한 후 단백질 계수 6.25를 곱하여 산출하였다. 조지방 그리고 조회분은 A.O.A.C.법에 따라 측정하였다(Official Method of Analysis, 1980). 식이섬유는 건조분말에 α -amylase를 가하여 끓는 물에서 15분 가열처리 후 0.2 N 염산(pH 1.5)을 가하고 펩신을 처리하여 40°C에서 6시간 가수분해하였다. 효소처리 후 수산화나트륨을 가하여 중화한 후 판크레아틴(Sigma, P8096)을 가하여 40°C에서 1시간 진탕하였다. 분해가 끝난 반응액에 95% 에탄올을 가하여 1시간 동안 정치시켰다. 정치동안 생성된 불용성 침전물을 3,000 rpm에서 20분간 원심 분리하여 총 식이섬유를 분리하였다. 침전물을 증류수에 용해한 후 3,000 rpm에서 원심 분리하여 침전물을 100°C에서 건조하여 불용성식이섬유(insoluble dietary fiber)로 하고, 상층액에는 95% 에탄올을 가하여 1시간동안 재정치시켜 형성된 침전물을 원심 분리한 후 건조하여 가용성 식이섬유(soluble dietary fiber)로 하였고 불용성 및 가용성 식이섬유소의 합계를 총 식이섬유(total dietary fiber)량으로 하였다.

다. 원소분석

세 종류의 진흙버섯에 대한 원소 분석비를 비교하고자 건조된 진흙버섯을 분쇄기로 분말화하여 각각의 진흙버섯 분말로부터 3 군데에서 1 g를 각각 취해 경북대학교 공동실습관으로부터 Elemental Analyzer(FISON, EA 1110)를 지원받아 carbon(C), oxygen(O), hydrogen(H), 그리고 nitrogen(N)을 정량분석하여 비교하였다(Harper 등, 2001).

라. 무기성분의 분석

세 종류의 진흙버섯에 대한 무기성분의 비교·분석을 위하여 한국기초과학지원연구원 대구분소로부터 분석·지원을 받았다. 분석방법은 건식법으로 전 처리 과정은 진흙버섯을 건조분말로 만든 다음 각각의 시료 0.2~0.3 g를 Teflon vessel 용기에 취하여 HNO₃(고순도, Merck사 GR Grade) 5 ml을 가한 후 마개를 연 상태로 100~150℃에서 가열하였다. 이 과정을 통해 산을 완전히 날려 보낸 다음 여기에 다시 HNO₃ 3 ml과 HCl 0.5 ml을 취하여 마개를 닫고 가압상태로 100℃ 부근에서 하루 정도 가열하였다. 용기를 완전히 식힌 다음 마개를 열고 시료가 완전히 산에 녹은 것을 확인한 다음 마개를 연 상태에서 산이 1 ml 정도 남을 때까지 다시 가열하였다. 증류수로 희석(×100)하여 ICP 분석기(Jobin-Yvon, JY 38 Plus, France)를 이용해 ICP-AES으로 calcium(Ca), magnesium(Mg), zinc(Zn), copper(Cu), ferrous(Fe) 그리고 phosphorus(P)를 각각 비교 분석하였다.

마. 통계처리

세 종류의 진흙버섯에 대한 일반성분, 무기성분 및 원소분석에 대한 통계학적 유의성은 SAS package(SAS Ver. 6.12, SAS Institute, 1996)을 이용한 analysis of variance(ANOVA) 혹은 Student t-test를 이용하여 P < 0.05 이하의 유의성만을 통계학적 차이로 인정하였다.

2. 진흙버섯 품종별(*Phellinus linteus*, *Phellinus baumii* 및 *Phellinus gilvus*)의 자실체 열수추출물의 항암효과, 항암성분 및 항암제에 대한 활성의 비교

가. 진흙버섯의 준비

본 실험에 사용한 *Phellinus linteus* 와 *Phellinus baumii*는 뽕나무에서 재배된 3년생을 공급 받아 이용하였으며 *Phellinus gilvus*는 3개월 동안 톱밥배지에

서 속성 재배된 것으로 경상북도 농업기술원에서 공급 받아 사용하였다. 각각의 진흙버섯에 대한 항암활성을 비교하고자 각각의 자실체를 건조하여 분쇄한 후 증류수와 1:30의 비율로 혼합하여 100℃와 7시간 동안 추출하고 80℃에서 감압농축하였다. *Phellinus linteus* 열수추출물(PLE), *Phellinus baumii* 열수추출물(PBE) 및 *Phellinus gilvus* 열수추출물(PGE)은 0.22 μm membrane filter(Millipore Corp., USA)에 여과한 후 여과물은 glucose를 기준으로 한 anthrone 법(Bucci 등, 2003)에 따라 총당을 측정하여 농도를 결정하였다. 여과물의 최고 농도는 rotating vacuum evaporator(modulspin31, Biotron, Korea)를 이용하여 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 제조하고 이를 Phosphate Buffer Saline(PBS)에 각각 희석하여 15 및 7.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 를 제조하였다. 항암제인 독소루비신(DOX)(Adriamycin, Ildong Pharm., Korea)도 PBS에 희석하여 10, 1, 0.1, 0.01, 및 0.001 μM 농도로 제조하여 실험 전까지 4℃에 보관하였다.

나. 세포배양

본 실험에서 사용된 sarcoma 180과 P388D1의 두 개의 확립된 마우스 유래 종양 세포주로 한국세포주은행(KOREAN CELL LINE BANK)에서 분양 받았다. 종양세포주의 배양 및 유지를 위한 배지는 RPMI 1640을 이용하였으며 fetal bovine serum(FBS) 10%를 첨가하고, penicillin과 streptomycin이 각각 10,000 units/ml 와 10 mg/ml 섞인 배양액으로 tissue culture flask 25cm²를 사용하여 37℃, 5% CO₂ 세포배양기에서 배양하였다.

다. β -glucan의 함량 측정

진흙버섯 품종별 자실체 열수추출물에 대한 글루칸의 함량 측정은 BGSTAR kit(Wako pure chemical industries, Ltd.)를 이용하여 측정하였다. 시료는 100 mg을 취하여 베타글루칸이 없는 증류수 15 ml에 넣고 격렬히 혼돈 후 6,000 rpm에서 30분간 원심 분리하여 측정하였다. 측정법은 Endpoint 방법으로 하였다.

라. 세포성장 실험

두 마우스 유래 종양 세포에 대한 PLE, PBE, PGE 및 양성대조군 DOX의 세포성장 정도는 sulforhodamine(SRB) B(Kim 등, 1996)와 microtetrazolium(MTT) assay(Mosmann 등, 1983)을 약간 변형하여 다음과 같이 시행하였다. 우선 SRB법은 두 종양세포수가 각 well당 1만개가 되도록 96-well plate에 접종한 후 24시간 동안 배양하고 각 시험물질을 접종하여 48시간 동안 추가 배양하였다. 각 종양세포에 50% trichloroacetic acid(TCA)를 추가하여 4℃ 및 2시간 동안 고정을 실시하였고, 증류수에 5회 수세하여 고정액을 제거하였다. 종양세포에 0.4% sulforhodamine B(SIGMA)를 이용하여 30분 동안 실온에 염색을 실시한 후 Tris base(10 mM, pH 10.5)를 추가하여 생존한 종양세포에만 염색된 염색액을 녹여내었다. MTT법은 well당 세포 수 5천 개가 되도록 접종하고 SRB법과는 달리 배양 전에 미리 각 시험물질을 접종하였다. 접종 후 4일 동안 배양을 실시하였다. 배양이 종료된 후 3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide(MTT, SIGMA, USA) 용액을 well 당 50 μ l씩 가하여 4시간 동안 더 배양하였고, 배양이 끝난 후 각 well에서 주의 깊게 배지를 제거하였다. 다음은 DMSO(dimethylsulphoxide) 을 well 당 150 μ l를 가하여 formazan crystal을 녹여내었다. SRB 및 MTT법에서 염색된 cell plate 들은 microplate reader(VERSAmAX™, Molecular Devices, USA)를 이용하여 490 nm에서 그 흡광도를 측정하였다. 종양 세포들에 대한 시험물질의 효과를 평가하기 위하여 세포수의 측정은 시험물질을 처치한 well의 흡광도를 시험물질을 처치하지 않은 음성대조군 well의 흡광도로 나누어 %로 나타내었다. 통계분석은 SAS statistical package(release 8.1 SAS Institute Inc., Cary, North Carolina, USA)를 이용하여 ANOVA를 실시하고 그 유의 수준은 $P < 0.05$ 로 하였다.

3. *Phellinus gilvus* 자실체의 추출물에 대한 항암활성 및 항산화

가 항산화의 측정

항산화능력으로 1,1-diphenyl-2-picryl hydrazyl(DPPH)에 대한 환원력으로 측정하였다. 각 시료 4 ml(1,000 µg/ml)에 1.5x10⁴ M의 DPPH 용액(absolute methanol에 용해) 1 ml를 가하고, 10초간 진탕한 후 실온에서 30분 동안 방치한 다음 520 nm에서 흡광도(UV-spectrophotometer, Beckmann)를 측정하였다. 전자공여능은 100-(시료 첨가구의 흡광도/시료 무첨가군의 흡광도) x 100으로 나타내었다.

나 항암활성의 측정

본 실험에서 사용된 암세포주인 sarcoma 180을 마우스 유래 종양 세포주로 한국세포주은행(KOREAN CELL LINE BANK)에서 분양 받았다. 종양세포주의 배양 및 유지를 위한 배지는 RPMI 1640을 이용하였으며 fetal bovine serum(FBS) 10%를 첨가하고, penicillin과 streptomycin을 100 units/ml 와 100 mg/ml의 농도가 되게 배양액에 첨가하였다. 암세포는 tissue culture flask 25 cm²를 사용하여 37°C에서 5% CO₂ 세포배양기에서 배양하였다. 양성대조군 DOX의 세포성장 정도는 sulforhodamine B(SRB)(Kim 등, 1996)를 변형하여 시행하였다. SRB법은 두 종양세포수가 각 well당 10⁴개가 되도록 96-well plate에 접종한 후 24시간 동안 배양하고 각 시험물질을 접종하여 48시간 동안 추가 배양하였다. 각 종양세포에 50% trichloroacetic acid(TCA)를 추가하여 4°C 및 2시간 동안 고정을 실시하였고, 증류수에 5회 수세하여 고정액을 제거하였다. 종양세포에 0.4% sulforhodamine B(SIGMA)를 이용하여 30분 동안 실온에 염색을 실시한 후 Tris base(10 mM, pH 10.5)를 추가하여 생존한 종양세포에만 염색된 염색액을 녹여 제거하였다. SRB법에서 염색된 cell plate 들은 microplate reader(VERSAmax™, Molecular Devices, USA)를 이용하여 490 nm에서 그 흡광도를 측정하였다. 종양 세포들에 대한 시험물질의 효과를 평가하기 위하여 세포수의 측정은 시험물질을 처치한 well의 흡광도를 시험물질을 처치하지 않은 음성대조군 well의 흡광도로 나누어 %로 나타내었다. 통계분석은 SAS statistical package(release 8.1 SAS Institute Inc., Cary, North Carolina, USA)를 이용하여

ANOVA를 실시하고 그 유의 수준은 $P < 0.05$ 로 하였다.

4. 진흙버섯 자실체의 단백다당체 추출 조건의 최적화 및 단백다당체의 추출 및 분석

가. 추출조건의 최적화를 위한 중심합성계획

진흙버섯 자실체의 열수 추출물은 반응표면분석법(response surface methodology, RSM)을 이용하여 최적의 추출조건의 예측과 추출물의 이화학적 특성을 모니터링 하였다. 추출조건의 최적화를 위한 실험계획은 중심합성계획법(central composite design)에 의하여 설계하였고, 반응표면분석 회귀분석을 위해서는 SAS(statistical analysis system) 프로그램을 사용하였다(Montgomery 등, 1997; Mead 등, 1975; Haaland 등, 1989). 중심합성계획에 의한 독립변수(X_i)의 실험계획은 추출공정에서 중요한 변수로 고려되는 인자, 즉 추출시간(X_1), 추출온도(X_2) 및 추출부피(X_3)를 -1, 0, 1의 3단계로 부호화하여 중심합성계획에 따라 16구로 설정하여 추출실험을 실시하였다. 추출시간(X_1)은 8, 10, 12시간, 추출온도(X_2)는 80, 90, 100℃ 및 추출부피(X_3)는 10, 20, 30 ml/g 으로 구성하였다. 또한 이들 요인변수에 의해 영향을 받는 종속변수(Y_n)는 추출물의 품질인자로서 항암 활성(Y_1), 총당(Y_2) 및 환원당(Y_3)으로 하였으며, 이들은 3회 반복 측정하여 그 평균값을 회귀분석에 사용하였다. 진흙버섯 자실체의 열수추출을 최적화하기 위한 중심합성계획은 Table 4-1.에 나타내었다.

Table 4-1. Central Composite Experimental Design for the three Independent Variables

Run	Time(hr) (X1)	Temperature(°C) (X2)	W/S(ml/g) (X3)
1	8(-1)	80(-1)	10(-1)
2	12(1)	80(-1)	10(-1)
3	8(-1)	100(1)	10(-1)
4	12(1)	100(1)	10(-1)
5	8(-1)	80(-1)	30(1)
6	12(1)	80(-1)	30(1)
7	8(-1)	100(1)	30(1)
8	12(1)	100(1)	30(1)
9	8(-1)	90(0)	20(0)
10	12(1)	90(0)	20(0)
11	10(0)	80(-1)	20(0)
12	10(0)	100(1)	20(0)
13	10(0)	90(0)	10(-1)
14	10(0)	90(0)	30(1)
15	10(0)	90(0)	20(0)
16	10(0)	90(0)	20(0)

나. 진흙버섯 자실체의 열수 추출물의 제조

진흙버섯의 자실체를 1-2 cm의 크기로 절편한 다음, 흐르는 물에 세척하여 불순물을 제거하였다. 절편된 진흙버섯 자실체는 중심합성계획에 따른 조건에 따라 열수추출 순환법으로 추출하였으며 예를 들면 다음과 같다. 절편된 진흙버섯 자실체 100 g에 2 ℓ의 증류수를 첨가하여(진흙버섯 자실체 : 증류수 = 1 : 20), 열수 추출 순환법으로 추출하였다. 열수 추출 순환법은 증류수가 2 ℓ에서 0.5 ℓ로 증류

되면 다시 순환하여 2 ℓ가 되게 하는 방법으로, 추출조건에 따라 총 8시간 동안 90℃에서 열수 추출을 하였다. 상기 얻어진 열수 추출액은 1,500 x g, 20분 동안 원심 분리하여 상층액을 얻었다. 얻어진 상층액을 60℃에서 감압농축한 후, 동결 건조 하여 진흙버섯 자실체의 열수 추출물을 얻었다.

다. 진흙버섯 자실체의 열수 추출물의 항암활성, 총당 및 환원당 측정

진흙버섯 자실체의 열수 추출물의 성분변화를 알아보기 위하여, 항암활성, 총당 및 환원당의 함량을 측정하였다. 진흙버섯 성분에 항암활성이 있음은 이미 공지된 사실로서, 진흙버섯 추출물의 항암활성이 높으면 유효성분의 함량도 높다고 판단할 수 있으므로, 진흙버섯 성분의 대표적 활성으로써 항암활성을 측정하였다. 마찬가지로, 진흙버섯의 유효성분의 함량을 반영하는 기준으로 총당, 환원당, 항암활성의 함량을 측정하여 유효성분의 함량이 가장 높은 최적의 추출조건을 결정하였다.

라. Analysis of regression

항암물질 생산을 위한 최적화를 위하여 예비실험을 기초로 반응표면분석법을 이용하였다. 중심합성계획에 의하여 18개의 추출조건을 설계하여 나타내었다. 모든 실험의 결과는 SAS(SAS Institute Inc., Cary, NC)를 이용하여 분석하였다. 2차 회귀방정식은 다음과 같다. Anti-tumor activity(Y1), total sugar(Y2), 그리고 reducing sugar(Y3). 각 모델의 반응 Yn는 다음과 같다.

$$Y_n = b_0 + b_1X_1 + b_2X_2 + b_3X_3 + b_{11}X_1^2 + b_{12}X_1X_2 + b_{22}X_2^2 + b_{13}X_1X_3 + b_{23}X_2X_3 + b_{33}X_3^2$$

5. 마른진흙버섯(*Phellinus gilvus*) 처리별 기능성물질 비교 분석 연구 및 단백다당체의 추출 및 분석

가. 시료의 제조

*Phellinus linteus*와 *Phellinus baumii*는 안동 하회마을에서 판매되고 있는 뽕나무에서 원목 재배된 3년생 진흙버섯을 공급받아 이용하였으며 *Phellinus gilvus*는 한국유전자은행에서 분양받은 균주(KCTC6653)를 경상북도 농업기술원에서 5개월 동안 톱밥으로 속성 재배된 버섯으로 열수추출방법에 따라 진흙버섯 추출물을 준비하였다.

나. 원소분석

세 종류의 진흙버섯에 대한 원소분석비를 비교하고자 건조된 진흙버섯을 분쇄기로 분말화하여 각각의 진흙버섯 분말로부터 3 군데에서 1 g을 각각 취해 경북대학교 공동실습관에서 Elemental Analyzer(FISON, EA 1110)를 지원받아 carbon(C), hydrogen(H), 그리고 nitrogen(N)을 정량 분석하여 비교하였다.

다. 추출법

진흙버섯 품종별 추출은 기존의 단백다당체 추출법을 변환하여 추출하였다. 즉, 3종류의 진흙버섯은 크기를 1~2 cm로 세절한 후 homogenizer를 이용하여 과립크기로 만들었다. 과립형태로 된 진흙버섯을 1:20의 비율로 증류수를 순환추출기에 넣고 12 시간 동안 추출을 실시하였음. 추출되어 나온 추출물은 Watmann paper를 이용하여 필터를 한 후 6,000 rpm에서 30분 동안 원심분리를 하고 진공농축기를 이용하여 60℃에서 10배로 감압농축을 하여 시료를 준비하였다. 감압농축된 시료는 냉장고에 보관하면서 항암활성을 측정하였다.

라. 총당 측정

총당은 글루코스를 표준물질로 하여 안트론 방법(Anthrone method)으로

측정하였다. 상기 실시 예에서 제조한 진흙버섯 열수 추출물 200 μ l를 안트론 시약(0.1 g 안트로/76% 황산) 1 ml와 혼합하였다. 혼합물을 12분 동안 가열하고, 분광광도계로 620 nm에서 흡광도를 측정하였다.

마. 환원당 측정

환원당은 글루코스를 표준 물질으로 하여 DNS(dinitrosalicylic acid) 분석으로 측정하였다. 상기 실시 예에서 제조한 진흙버섯 열수 추출물 500 μ l를 DNS 시약 0.5 ml와 혼합하였다. 혼합물을 5분 동안 가열하고, 분광광도계로 575 nm에서 흡광도를 측정하였다.

바. DPPH 시험

DPPH assay는 물질의 free radical scavenging activity를 측정하는 방법이다. Standard로 ascorbic acid를 사용했다. 진흙버섯 10 가지 처리물의 열수추출물을 당량을 기준으로 10 mM acetate buffer로 150 μ g/ml, 200 μ g/ml로 희석한 후, 희석 추출물 : 95% ethanol : DPPH를 1: 1: 0.5비율로 반응시켰다. 실온에서 20분 간 반응 후 분광광도계로 517 nm에서 흡광도를 측정하였다.

사. Xanthine oxidase assay

Xanthine oxidase assay는 시험물질의 free radical 의 생성억제능력을 평가한다. Standard로 ascorbic acid를 사용했다. 진흙버섯 10 가지 처리물을 당량 기준으로 250 μ g/ml로 0.1 mM PBS를 이용하여 희석한다. Xanthine 100 μ l, 시험물질 100 μ l, 그리고 buffer와 Xanthine oxidase의 양을 조절하여 총 2 ml로 조정한다. 분광광도계 295 nm에서 3분간 활성을 측정하였다.

아. 단백질량 측정

BCA assay는 단백질에 의해 Cu^{2+} 가 Cu^+ 로 환원되어 청록색에서 보라색으로의 변화를 관찰한다. Standard는 BSA(Bovine serum albumin)를 사용했다. 진흙버섯 10가지 처리물 추출물을 D.W로 1/10희석한다. BCA working sol. : sample을 8:1의 비율로 혼합 후 37°C에서 30분간 반응시킨다. 분광광도계 562 nm에서 흡광도 측정하였다.

자. 항암활성측정

항암활성은 MTT(Microculture Tetrazolium)법과 SRB(Sulforhodamine B) 법에 의하여 수행되었다.

6. 마른진흙버섯(*Phellinus gilvus*)으로부터 단백다당체의 추출물과 기존의 항암제에 대한 상호작용

앞의 연구에서 기술한 MTT법과 SRB법을 이용하여 doxorubicin과 마른진흙버섯의 열수 추출물에 대한 상호작용을 조사하였다.

7. 마른진흙버섯(*Phellinus gilvus*)로부터 추출한 다당체의 독성시험

가. 실험동물

본 실험에 사용한 동물은 수컷 25마리 암컷 25마리 총 50마리의 4주령의 Sprague-Dawley rat를 이용하였다. 실험동물실은 실내온도가 23 ± 3 °C, 상대습도는 $50 \pm 10\%$, 공기순환은 13~17 times/hr, 조명은 300 Lux로 noise: <50 db로 실험전 10일 동안 순화기간을 가졌다. Rat는 polycarbonate cage(28 cm x 42 cm x 18 cm)에서 사육하였으며 사료는 Samtako Bio Korea에서 구입하였다. 멸균된 물은 자유 급수시켰다.

나. 시험물질의 준비(PGE)

경북농업기술원에서 마른진흙버섯의 자실체를 공급받았으며 이 자실체는 참나 무토평에서 속성으로 재배된 것이다(Jo 등, 2002).

다. 실험설계

총 수컷 25 마리 그리고 암컷 25 마리 랫트를 10 개 group으로 나누었다. 그래서 각 그룹은 5마리로 구성이 되었다. 그룹의 용량으로 PGE를 경구 투여하는 그룹은 5,000 mg/kg , 2,000 mg/kg 으로 존데를 이용하여 위내투여를 하였다. 위내 투여 후 clinical signs을 12시간 동안 관찰하고 14일 동안 치사여부를 관찰하였다. Body weight, 사료량 그리고 음수량을 PGE 투여 후 매일 측정을 하였다. 시험 마지막 날 5 mg/kg of ketamine HCl로 근육주사를 한 후에 부검을 실시하여 조직의 병리여부를 관찰하였다. 장기의 관찰은 heart, lung, liver, stomach, intestine, kidney, adrenal gland, spleen, ovary 혹은 testicle을 관찰하였다. Body weight, Food, 그리고 water consumption changes는 ANOVA(Dunnett's test)를 SAS program(version 8.1)을 이용하여 분석하였다. 통계학적 차이는 $P < 0.05$ 수준에서 유의성 유무를 판단하였다.

8. *Phellinus gilvus*로부터 단백다당체를 이용한 기능성제품을 위한 기초연구 (랫드에서 진흙버섯 자실체의 열수 추출물이 급성 호흡기 염증 반응 억제에 미치는 효과)

가. 백혈구 수 측정

24 마리의 스프라-돌리(Sprague-Dawley) 랫트를 3개의 그룹으로 나누어, 대조군은 생리적 식염수를, 실험군1은 50 μ g의 LPS(lipopolysaccharide)를, 실험군 2는 상기에서 보고한 방법에 따라서 열수추출물을 제조하였다. 진흙버섯 자실체의

열수 추출물을 투여한 후 50 μg 의 LPS를 랫트의 기관지에 투여하여, 기관지 삼출액에서 백혈구 수를 측정하였다(Kwon 등, 2004). 백혈구의 수는 급성 호흡기 염증 반응 시 지표가 된다.

나. 사이토킨 측정

24 마리의 스프라-돌리(Sprague-Dawley) 랫트를 3개의 그룹으로 나누어, 대조군은 생리적 식염수를, 실험군 1은 50 μg 의 LPS(lipopolysaccharide)를, 실험군 2는 상기 실시예에서 제조한 진흙버섯 자실체의 열수 추출물을 투여한 후 50 μg 의 LPS를 랫트의 기관지에 투여하여, 기관지 삼출액에서 염증매개인자로서 사이토킨인 Tissue Necrotic Factor(TNF)- α 와 Interleukin(IL)-1 β 의 억제 정도를 측정하였다(Kwon 등, 2004). 회수된 기관지액은 10분 동안 4°C에서 350 g로 원심분리한 후, 상층액을 측정 전까지 -20°C에 보관하였으며, 사이토킨(TNF- α 와 IL-1 β)의 변화를 효소결합면역흡수분석법 키트(Enzyme-linked immunosorbent assay kits)로 측정하였다.

9. *Pellinus Baumii*, *Pellinus gilvus*, 그리고 *Phellinus Linteus*로부터 단백질 다당체를 이용한 기능성제품 연구(단백다당체 추출물에 대한 면역활성 비교)

가. 동물 및 세포주

비장세포분리에 사용한 BALB/c 마우스와 DBA/2 마우스는 안전성평가연구소 독성유전체연구팀(대전광역시 유성구 장동)으로부터 분양받았으며 거식세포분리에 사용한 SD 랫드는 오리엔트(주)(서울특별시 금천구 가산동)에서 구입하였다. 거식세포주의 일종인 RAW264.7은 한국세포주은행(서울특별시 종로구 연건동)으로부터 분양받았다.

나. 세포배양

비장세포의 배양은 RPMI 1640 배지(10% fetal bovine serum, 2 mM L-glutamine, 100 units/ml penicillin, 0.1 mg/ml streptomycin, 50 μ M 2-mercaptoethanol, 1 mM HEPES 포함)를 사용하였으며 거식세포배양에 사용된 RPMI 1640 배지에는 2-mercaptoethanol을 첨가되지 않았다. RAW264.7 세포는 5% 이산화탄소와 포화 수증기를 함유한 37°C 배양기 내에서 배양하고, 매 2-3일마다 세포농도가 1×10^5 cells/ml이 넘지 않도록 계대배양을 해주었다.

다. 복강유래 거식세포를 이용한 거식세포 기능시험

Peritoneal macrophage의 분리 : 랫드를 CO₂를 이용하여 안락사 시킨 후 복부의 가죽을 열고 복막을 70% 이소프로필 알콜로 소독하였다. Cold PBS 20 ml을 주사기로 랫드의 복강에 주사했다. 5분간 복부를 마사지한 후 주사기로 복강에서 PBS를 회수하여 1,200 rpm에서 원심 분리하여 macrophage를 얻었다. 얻어진 macrophage를 RPMI 1640 medium에 5×10^5 cells/ml로 맞추고 정해진 농도의 시험물질을 처리하고 12-well plate 안에서 배양하였다. 24시간 동안 배양 후 세포를 걷어 원심세척한 후 1 μ m blue-green FluoroSpheres가 0.03% 들어있는 medium에서 75분간 incubation 한 후 PBS로 1번 원심세척하였다. 세척 후 얻은 세포현탁액을 flow cytometry를 사용하여 FL1(green fluorescence)으로 분석하였다.

라. RAW264.7 세포를 이용한 거식세포 기능시험

RAW264.7 세포를 RPMI 1640 medium에 5×10^4 cells/ml로 맞추고 정해진 농도의 시험물질을 처리하고 6-well plate 안에서 배양하였다. 24시간 동안 배양 후 세포를 걷어 원심 분리하여 세척한 후 1 μ m blue-green FluoroSpheres가 0.03% 들어있는 medium에서 75분간 incubation 한 후 PBS로 1번 원심 세척하였다. 세척 후 얻은 세포현탁액을 flow cytometry를 사용하여 FL1(green

fluorescence)으로 분석하였다.

10. *Phellinus gilvus*로부터 열수 단백질 추출물을 이용한 기능성제품의 항암활성 비교 및 사염화탄소에 의한 간 보호 효과

가. 항암효능연구

3주령 웅성 ICR 마우스를 (주)오리엔트로부터 구입하여 1 주간 동물사육실에서 적응시킨 후 실험에 사용하였고 Sarcoma 180 세포주(한국세포주은행)를 RPMI 배지에서 배양 한 후 이식한 암 동물 모델이 이용되었다. ICR 마우스의 옆구리 부분의 털을 깎은 후 10^6 개의 암세포를 이식하고 7일 후 육안으로 보아 뚜렷한 종양형성이 보일 때 마른진흙버섯 추출물을 6일간 경구투여 하였다. 7일째 부검하여 암세포의 직경과 무게를 측정하였다.

나. 간 보호 효과

수컷 Sprague-Dawley(체중 250 ± 20)는 한국 샘타코(SAMTAKO, 오산)로부터 구입하였으며, 구입 후 7일간 순화시킨 후 실험에 사용하였다. 실험동물의 사육은 온도 23 ± 2 °C, 습도 40~60%, 명암주기 12시간 조건에서 실시하였다. 사료는 실험동물용 펠렛사료를 자유 급식시켰다. 실험군은 총 45마리로 3개 군으로 군당 15마리씩 배치하였다. 정상군(n=15), 대조군(n=15), 처치군(n=15)로 구성하였다. 대조군과 처치군은 사염화탄소는 식물성 oil에 1:1로 혼합하여 kg당 2 ml 씩 I.P.로 주입하였으며 처치군은 마른진흙버섯 추출액을 사염화탄소 투여전 일주일부터 매일 100 mg/kg 의 용량으로 경구투여 하였다. 사염화탄소 투여 후 1일에 5마리씩 3일간 부검하여 간의 형태를 비교하였으며 아울러 혈액화학치를 비교하였다.

Table 10-1. Treatment method of experimental group

	Day	Treatment
정상군(NC) (n=15)	1	Basal diet
	2	Basal diet
	3	Basal diet
대조군(B) (n=15)	1(B-1)	Basal diet + CCl ₄
	2(B-2)	Basal diet + CCl ₄
	3(B-3)	Basal diet + CCl ₄
처리군(C) (n=15)	1(C-1)	Basal diet + Extract + CCl ₄
	2(C-2)	Basal diet + Extract + CCl ₄
	3(C-3)	Basal diet + Extract + CCl ₄

11. *Phellinus gilvus* 자실체로부터 단백다당체를 이용한 기능성제품의 안정성 및 유효성분을 함유하는 조성물

가. 마른진흙버섯 자실체의 열수 단백다당체 추출물의 제조

본 연구에서 사용한 마른 진흙버섯은 경상북도 농업기술원에서 속성으로 재배한 자실체를 공급받아 사용하였다. 마른진흙버섯의 자실체를 1~2 cm의 크기로 절편한 다음, 흐르는 물에 세척하여 불순물을 제거하였다. 절편된 마른진흙버섯 자실체 100 g에 2ℓ의 증류수를 첨가하여(마른진흙버섯 자실체 : 증류수 = 1 : 20), 열수 추출 순환법으로 추출하였다. 열수 추출 순환법은 증류수가 2ℓ에서 0.5ℓ로 증류되면 다시 순환하여 2ℓ가 되게 하는 방법으로, 총 8시간 동안 열수 추출을 하였다. 추출온도는 최초 60℃부터 시작하여 30분 간격으로 10℃ 증가시켜 2시간 30분 동안 100℃가 되게 하였다. 이 과정을 3회 반복하였다. 상기 얻어진 열수 추출액은 1,500 rpm 20분동안 원심 분리하여 상층액을 얻었다. 얻어진 상층액을 60℃에서 감압농축한 후, 동결건조 하여 마른진흙버섯 자실체의 열수 추출물을 얻었다.

나. 효소액의 제조

랫트(Wister, 웅성 300g)를 하룻밤 절식시키고 치사한 후 십이지장을 제외한 소장관 전체를 적출하고 얼음에 냉각한 후 생리 식염수로 2회 세척하였다. 상기 소장관을 반으로 갈라 소장관 안쪽을 슬라이드글라스(slide glass)로 긁어서 점막층을 모은 후 10배량의 10 mM 인산 완충액(pH 7.0)을 가하고, 여기에 0.5% 트리톤 X-100(triton X-100)을 첨가하여 초음파 처리한 후 20,000 rpm, 30분간 원심분리 하였다. 원심분리하여 얻은 상등액을 조효소액으로 사용하였다.

다. 말타아제와 수크라아제의 효소 활성 측정

0.1 M 인산완충용액(pH 7.0), 2 mM 말타아제 또는 2 mM 수크로스 0.1 ml, 효소액 0.1 ml 및 상기 실시예에서 제조한 마른진흙버섯 자실체의 열수 추출물 0.1 ml를 첨가하여 37°C에서 40분간 배양한 후 90°C 수욕상에서 10분간 처리한 다음 2000 xg, 10분간 원심분리 하였다. 상기 원심 분리하여 얻은 상등액 0.1 ml에 OPD(O-phenylenediamine) 용액 0.75 ml를 넣고 30분간 37°C에서 배양한 후, 0.1 N 염산 0.5 ml를 넣고 492 nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조군으로는 증류수를 사용하였다.

라. α-아밀라아제의 효소 활성 측정

0.1 M 인산 완충액(pH 7.0) 0.35 ml, 1% 스타치 에이저(starch azure) 0.35 ml, 효소액 0.1 ml 및 상기 실시 예에서 제조한 마른진흙버섯 자실체의 열수 추출물 0.2 ml를 넣고 37°C에서 1시간 배양한 후 0.1 N 염산 0.5 ml를 넣고 원심분리한 후 620 nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조군으로는 증류수를 사용하였다.

12. *Pellinus gilvus* 자실체 단백질 추출물에 대한 안전성시험(돌연변이 시험 및 항돌연변이시험)

가. 돌연변이원성 실험

마른진흙버섯에서 추출한 다당류를 농도별로 첨가한 다당류의 돌연변이원성 실험은 *S. typhimurium*의 변이주인 TA98, TA100 및 TA 1535를 이용하여 Ames test를 개량한 preincubation법으로 실시하였다. 시험에 사용한 균주는(주) 바이오톡스텍에서 분양을 받았다. 대사활성화 시키지 않은 경우의 시험은 standard plate incorporation test로, 대사활성화 시키는 경우에는 pouring 하기 전에 30분간 예비 배양하는 preincubation test로 시행하였다. 즉, 건열멸균 시킨 glass cap tube에 각각의 시료를 50 $\mu\text{g}/\text{plate}$ 씩 가하고 여기에 전 배양시킨 배양 균액 100 μl 를 가한 다음 0.2 M sodium phosphate buffer(pH 7.4)로 전체량이 700 μl 가 되도록 하였다. 이것을 37°C에서 20분간 진탕배양 한 다음 histidine/biotin이 첨가된 top agar(45°C)를 2 ml씩 가하여 잘 혼합한 후 미리 조제해 놓은 minimal glucose agar plate 상에 도말하고 평판 고정시켜 37°C에서 48시간 배양하여 생긴 복귀돌연변이(his revertant colony)수를 측정하여 돌연변이성의 유무를 판정하였다. 대사활성화 시키는 경우에는 시험관에 S9 mix 0.5 ml, 시료용액 0.1 ml과 nutrient broth에서 12시간 배양시킨 균배양액 0.1 ml을 넣어 가볍게 vortex하였다. 대사 활성화시키는 경우에는 30분간 37°C에서 예비 배양 한 다음, histidine/biotin이 첨가된 top agar plate 상에 부어 평판 응고시켰다. 37°C에서 48시간 배양한 후 revertant colony를 계수하였다. 돌연변이 유발성의 판정은 용매대조군의 2배 이상이면서 용량의존성을 갖는 경우를 양성으로 하였다.

나. 항돌연변이성 실험

Ames test를 개량한 preincubation 법에 따라 항돌연변이원성 실험을 실시하였고, 실험에 사용한 변이 물질은 AF와 SA을 사용하였다. 건열멸균시킨 glass cap tube에 시료의 추출물을 각각 50 μl 씩 첨가하였다. 간접 변이원인 경우 10% S 9 mix를 250 μl 씩 첨가하였다. 여기에 전 배양시킨 균액을 100 μl 씩 주입한 후에 0.2 M sodium phosphate buffer를 가하여 최종부피가 700 μl 가 되도록 하였다. 이것을 37°C에서 20분간 진탕배양 한 다음 상기의 돌연변이원성 실험과 같

은 방법으로 실험하여 생성된 복귀돌연변이 수를 측정하여 항돌연변이성 유무를 판정하였다. 마른진흙버섯 추출물물과 변이원 물질의 농도는 예비실험을 통하여 결정하였으며, 항돌연변이 활성은 변이원물질의 활성에 대한 시료의 억제율 (inhibition, %)로 나타내었다. 그림에서 나타낸 억제율은 3회 반복실험을 실시하여 평균치를 나타낸 것이다.

$$\text{Inhibition(\%)} = [(M-S1)/(M-S0)] \times 100$$

M: 돌연변이 물질만 존재할 경우의 복귀 돌연변이 수

S0: 자연 복귀 돌연변이 수

S1: 시료를 참가하였을 때의 복귀 돌연변이 수

13. 진흙버섯 자실체를 이용한 건강기능성 제품의 개발

마른진흙버섯 기능성 음료 개발을 (주)여러분의 천년초에서 3가지 기본 형태로 제조를 하였다.

가. 1차 음료 제조를 일반 음료에 사용되는 기본 recipe를 기준으로 하여 마른진흙버섯 추출액과 천년초 열매 추출액의 첨가량을 달리한 3가지 샘플을 만들었다. 마른진흙버섯 추출액과 천년초 열매 추출액은 각각 20배 량의 증류수를 가하여 끓기 시작한 후 4시간 동안 가열하여 추출하였으며, 추출이 끝난 후에는 와트만 여과지 No. 2 로 여과하였다. 실제 공장에서의 생산성 향상 측면에서 배합비를 결정한 후에는 한꺼번에 추출하는 것이 제안되었다.

나. 2차 음료 제조는 재료는 1차와 동일하고 마른진흙버섯과 천년초 열매 추출물의 첨가량을 1:1 비율로 하여 영양학적인 측면을 강조하였다. 한편, 향과 맛을 개선하기 위해서 배와 사과 농축액을 첨가하였다.

다. 3차 음료 제조는 마른진흙버섯과 천년초 열매추출액의 비율을 천년초를 강조

하여 만들었다. 먼저 마른진흙버섯추출액을 최적화된 방법으로 추출을 하고
그 다음에 천년초 열매를 추출하는 방법으로 만들었다.

제 3 절 결과 및 고찰

1. *Phellinus linteus*, *Phellinus baumii* 및 *Phellinus gilvus*의 형태, 일반성분, 원소분석 및 무기성분 함량의 비교

산업동물의 생산에 있어서 동물용 약품 사용을 억제하는 정부의 정책에 따라 축산농가들은 기능성사료에 많은 관심을 나타내고 있다. 기능성사료의 개발에 대한 후보 원료로 안전성이 확보된 진흙버섯류의 이용은 매우 유리할 것으로 생각된다. 그 이유로는 진흙버섯에 대한 생리활성작용으로 면역활성(Lee 등, 1996; Song 등, 1995, Kim 등, 2004; Hwang 등, 2003; Kim 등, 2003 Kim 등, 2001), 항암작용(Ikekawa 등, 1968; Han 등, 1999; Kawagishi 등, 1989; Kim 등, 2001;), 항암제 해독작용(Ajith 등, 2002), 항산화작용(Ajith 등, 2002; Ajith 등, 2001), 항돌연변이작용(Shon 등, 2001) 이외에도 소화력을 증진시키는(Jung 등, 1992) 등의 많은 보고가 있기 때문이다.

진흙버섯의 종류는 227종이 보고 되었으나 국내에서는 현재 마른진흙버섯(*Phellinus gilvus*), 말뚝진흙버섯(*Phellinus ignarius*), 찰진흙버섯(*Phellinus robustus*), 목질 진흙버섯(*Phellinus linteus*), 진흙버섯(*Phellinus baumi*), 검은 진흙 버섯(*Phellinus nigricans*) 그리고 낙엽송버섯(*Phellinus pini*)이 주로 서식하는 것으로 알려져 있다(정 등, 1994). 이 중 *Phellinus linteus*와 *Phellinus baumii*는 같은 종이라고 주장하는 보고가 있다. 그러나 현재 시중에 유통되고 있는 형태를 보면 외견상 약간의 차이가 인정되고 있다. 그러나 이 두 종류의 진흙버섯은 kg당 단가가 매우 고가이므로 사람도 이용하기 어려운 상황이므로 동물사료의 개발에 어려움이 있다.

이러한 이유로 인하여 대량생산을 위한 균사체의 배양이 이루어지고 있으며 균사체 배양에서 추출되어 의약품으로 승인되어 현재 시중에 유통되고 있다(Jo 등, 1999). 진흙버섯의 균사체와 자실체에 대한 여러 가지 비교 자료는 없지만 항암활성에 대한 비교를 보면 자실체가 60% 그리고 균사체가 40%의 항암활성을 보여주고 있다. 그러나 일반적으로 버섯농가에서 수확되는 진흙버섯류의 산업적

이용과 보관에 있어서 자실체의 이용은 균사체의 이용보다 유리할 수가 있다. 진흙버섯류에 대한 자실체의 안전성은 이미 많은 사람이 이용하여 안전성이 확보된 것으로 알려져 있다. 2003년 2월 26일에 식품의약품안전청에서 *Phellinus baumii*와 *Phellinus linteus*를 식품으로 사용 허가를 인정하여 주었다. 따라서 이 두 종류의 진흙버섯에 대한 이용은 급증할 것으로 생각이 된다. 따라서 향후 진흙버섯류를 이용한 면역활성 증강물질이 포함된 동물사료 그리고 기능성식품의 개발을 위한 대량의 품종개발이 절실히 요구되는 시점이다. 그러나 이들 진흙버섯에 대한 기초적인 자료가 부족한 실정이다.

가. 자실체의 형태 비교

본 실험에 사용된 진흙버섯류는 육안적으로 관찰시 *Phellinus linteus*와 *Phellinus baumii* 사이에 형태학적으로 뚜렷한 차이점은 발견할 수가 없었다. 그러나 이것들과 *Phellinus gilvus* 사이에는 상당한 외관상 차이점을 보여주고 있다(Fig. 1-1.). 형태적 차이점을 상세하게 구명하기 위하여 SEM(Hitachi, S-4300, Japan)사진을 비교한 *Phellinus gilvus*와 *Phellinus linteus*는 비슷한 조직학적인 형태를 보여주고 있으나 육안적으로는 *Phellinus gilvus*의 균개는 코르크질이며 편반구형 내지 패각형으로 보통 복와상으로 겹치나며 상하가 서로 연결되어 있고, 두께는 3~6 x 5~10 cm이며 회갈색 내지 수갈색이고 분모가 밀생하며 거칠고 조잡하며, 가장자리는 얇고 예리하며 색이 옅었다. 육은 수황색 내지 수갈색이었으며 균관은 여러 층으로 길이가 1~5 mm이고, 관공면은 황갈색 내지 갈색이며, 관공은 원형 내지 다각형이었다. 포자는 구형에 가깝고 광활하며 무색이었다. 강모는 비교적 많으며 송곳모양이고 갈색이다. *Phellinus gilvus*는 *Phellinus linteus*와 *Phellinus baumii* 종의 진흙버섯과는 차이를 보였다.

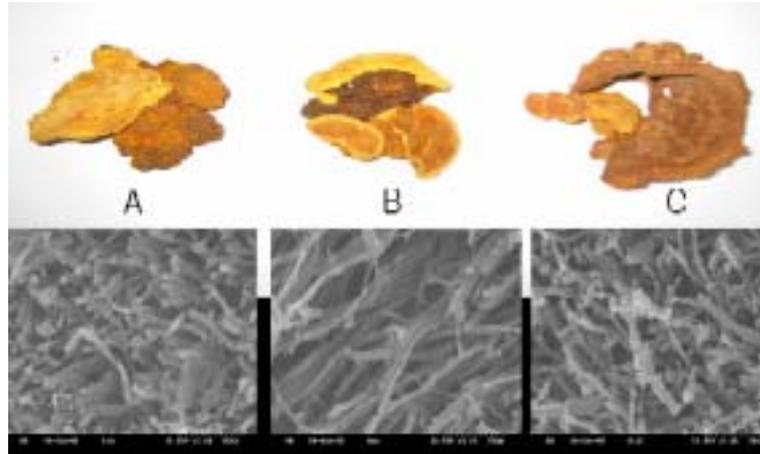


Fig. 1-1. Comparison of morphological photography and scan electromicroscopy(SEM, x15,000) in *Phellinus linteus*(A), *Phelliuns baumii*(B) and *Phellinus gilvus*(C).

*Phellinus gilvus*는 *Phellinus baumii*와 *Phellinus linteus*와 다르게 재배기간이 1/4 정도 밖에 되지 않으나 항암활성은 *Phellinus linteus*와 비교할 때 큰 차이가 없는 것으로 알려져 있다(Ikekawa 등, 1968). 본 실험에서 *Phellinus linteus*와 *Phellinus baumii* 사이에 형태학적으로 뚜렷한 차이점은 발견할 수가 없었으나 이들은 *Phellinus gilvus* 과는 외관상 상당한 차이점을 보여주고 있다. 그러나 전자현미경 사진에서는 오히려 *Phellinus gilvus*와 *Phellinus linteus*는 비슷한 형태를 보여주고 있다. 따라서 외관상 형태로 진흙버섯류의 종을 구분한다는 것은 소비자의 혼란을 가져올 수가 있다. 5 개월 동안 숙성 재배된 *Phellinus gilvus*와 3 년에 걸쳐 재배된 *Phellinus linteus*와 *Phellinus baumii*의 원소 함량의 구성비는 Table 1-1.에서 보여주는 것처럼 carbon이 45.3~46.8%, oxygen은 40.1~42.0%, hydrogen은 5.3~5.5% 그리고 nitrogen은 0.8~1.2% 등으로 차이점은 발견되지 않았으며 주성분이 탄수화물로 이루어져 있는 것으로 생각된다(Alphons 등, 1998).

나. 원소분석

5개월 동안 경북농업기술원에서 톱밥으로 재배(조 등, 2002)된 *Phellinus gilvus*와 3년에 걸쳐 재배된 *Phellinus linteus*와 *Phellinus baumii*의 원소 함량의 구성비를 비교하여 그 결과를 Table 1-1.에 나타내었다. Table 1-1.에서 보여주는 것처럼 품종별 진흙버섯에 대한 자실체의 원소함량은 carbon이 45.3~46.8%, oxygen은 40.1~42.0%, hydrogen은 5.3%~5.5% 그리고 nitrogen은 0.8~1.2% 등으로 차이점은 발견되지 않았다. 또한 모든 진흙버섯의 품종에서 sulfur는 분석되지 않았다. *Phellinus linteus*, *Phellinus baumii* 그리고 *Phellinus gilvus*의 일반성분을 분석 비교한 결과, 수분 함량은 *Phellinus baumii*가 가장 높았으며 *Phellinus gilvus*의 수분 함량은 10% 이내로 낮은 경향을 보여주었다. 수분 함량이 낮은 *Phellinus gilvus* 버섯의 자실체는 앞의 2 종에 대한 버섯과 다르게 유통 및 저장 시에 다른 미생물이 서식하는 것을 어렵게 만드는 것으로 생각이 된다. 진흙버섯의 전체적인 일반성분을 보면 식이섭유는 약 30% 이상을 함유하고 있으나 vitamin C 및 단백질의 함량은 높지 않은 것으로 나타났다. 따라서 기능성 동물사료로 개발할 경우에는 영양분을 보충하여 사료로 개발되어야 할 것으로 생각이 든다. 한편 당분(sugar)은 세 종 모두에서 발견되지 않아서 당뇨병 환자를 위한 기능성 음료의 후보 소재로 활용이 가능할 것으로 사료된다(최 등, 1996; Choi 등, 2004; Hwang 등, 2005; Ishihara 등, 2005; Hong 등, 1999).

Table 1-1. Comparison of the elemental composition in *Phellinus linteus*, *Phellinus baumii* and *Phellinus gilvus*

Species	Carbon(%)	Hydrogen(%)	Nitrogen(%)	Oxygen(%)	Sulfur(%)
<i>Phellinus linteus</i>	46.8±0.30	5.50±0.01	0.8±0.23	42.0±0.83	ND
<i>Phellinus baumii</i>	45.3±1.63	5.30±0.13	1.0±0.01	40.1±0.67	ND
<i>Phellinus gilvus</i>	45.6±0.77	5.50±0.05	1.2±0.04	40.3±0.49	ND

ND: not detected.

다. 일반성분 분석

Phellinus linteus, *Phellinus baumii*, 그리고 *Phellinus gilvus*의 일반성분을 분석한 결과는 Table 1-2와 같다. *Phellinus gilvus* 수분의 함량은 10%로 가장 적은 수분의 함량을 나타내었으며 총식이섬유는 29에서 33%를 보여주어 품종 간에 차이점을 보여주지 않았다. 또한 조회분, 단백질, 비타민 C 등 모든 함량 비교에서 뚜렷한 차이점을 보이지는 않았다.

Table 1-2. Comparison of chemical composition of *Phellinus linteus*, *Phellinus baumii*, and *Phellinus gilvus*

Items(%)	<i>Phellinus linteus</i>	<i>Phellinus baumii</i>	<i>Phellinus gilvus</i>
Fat	0.23±0.01	0.27±0.02	0.22±0.01
Total dietary fiber	33.0±10.0	29.0±11.0	31.2±12.2
Total sugars	0	0	0
Moisture	13.2±1.23	15.3±2.34	10.2±1.32
Ash	1.12±0.01	1.13±0.01	1.00±0.01
Protein(% N x 6.25)	3.63±0.21	4.32±0.22	3.73±0.32
Vitamin C	1.52±0.23	2.1±0.12	1.5±0.14

라. 무기성분 분석

진흙버섯의 품종별의 원소분석 및 일반조성의 분석시 차이점을 발견할 수가 없어 이들에 대한 무기 성분의 분석을 실시하여 Fig. 1-2에 나타내었다. Ca의 경우 세 종류의 진흙버섯에서 872 ppm(*Phellinus linteus*), 863 ppm(*Phellinus gilvus*) 그리고 1,135 ppm(*Phellinus baumii*)를 나타내어 *Phellinus baumii*가 가장 높은 Ca 함량을 보였으나 통계적 유의성은 없었다. Mg의 경우는 *Phellinus gilvus*(1,639 ppm)가 다른 두 진흙버섯보다 낮은 함량을 보여주었다(P < 0.05). 그러나 P의 함량은 *Phellinus linteus*(506 ppm)가 가장 낮은 함량을 보여주었다(P < 0.05). 이들 3 종류의 진흙버섯은 원소분석과 일반분석과는 다르게 무기원

소 성분에는 차이점을 보여주었다. 세 종류의 진흙버섯의 품종별의 원소분석에서 Ca의 경우 세 종류의 진흙버섯에서 *Phellinus baumii*가 가장 높은 Ca 함량을 보여주었다. Mg의 경우는 *Phellinus gilvus*(1,639 ppm)가 다른 두 진흙버섯보다 낮은 함량을 보여주었다($P < 0.05$). 그러나 P의 함량은 *Phellinus linteus*(506 ppm)가 가장 낮은 함량을 보여주었다($P < 0.05$). 이들 3 종류의 진흙버섯은 무기원소 성분에서 차이점을 보여주고 있다. 이러한 차이점은 세 종류의 버섯에 대한 재배 기간, 생육환경 및 재배방법에 따라 함량 조건 차로 생각될 수도 있으므로, 같은 조건과 같은 재배기간에서의 비교 실험 등이 다각도로 진행이 되어야 할 것으로 생각이 든다.

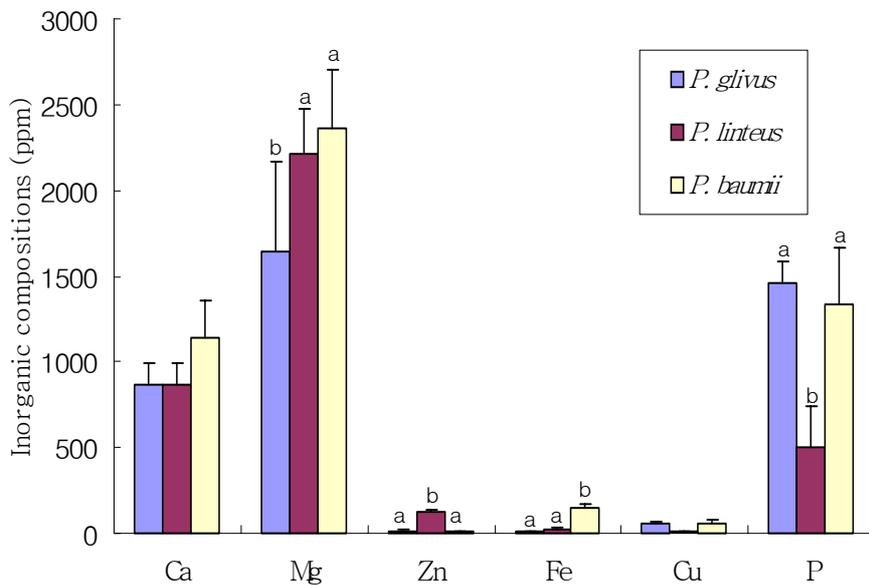


Fig. 1-2. Comparison of inorganic compositions in *Phellinus gilvus*, *Phellinus linteus* and *Phellinus baumii*. Data are Mean \pm SD for two replicates. Superscripts(a,b) are significantly different($P < 0.05$).

이상의 결과에서 *Phellinus linteus*, *Phellinus baumii* 그리고 *Phellinus gilvus*의 원소조성 및 일반성분의 비교에서는 큰 차이점이 나타나지 않아 *Phellinus gilvus*의 대량생산이 이루어질 경우에 진흙버섯에 대한 자실체의 산업화와 기능성 면역활성 동물사료개발이 가속화되어 질 것으로 생각이 된다.

2. 진흙버섯 품종별(*Phellinus linteus*, *Phellinus baumii* 및 *Phellinus gilvus*)의 자실체 열수추출물의 항암효과 및 항암제에 대한 활성의 비교

한국에서는 상황버섯이라 불리는 진흙버섯은 총 227종이 보고 되었으나 국내에서는 현재 마른진흙버섯(*Phellinus gilvus*), 말뚝진흙버섯(*Phellinus ignarius*), 찰진흙버섯(*Phellinus robustus*), 목질진흙버섯(*Phellinus linteus*), 장수진흙버섯(*Phellinus baumii*), 검은진흙버섯(*Phellinus nigricans*) 그리고 낙엽송버섯

(*Phellinus pini*)이 주로 서식하는 것으로 알려져 있다. 이 중 *Phellinus linteus*와 *Phellinus baumii*는 긴 재배기간과 원목재배의 비용문제로 kg당 200만원에서 400만원으로 많은 사람이 이용하기에는 힘든 가격이다. 그러나 *Phellinus gilvus*는 *Phellinus baumii*와 *Phellinus linteus*와는 다르게 2001년 경북농업기술원에서 톱밥을 이용한 인공재배에 성공함에 따라 3내지 4개월 만에 자실체의 수확이 가능한 품종이다.

가. 독소루비신(DOX)의 세포성장억제

Sarcoma 180 과 P388에 대하여 독소루비신(DOX)에 대한 세포성장정도는 SRB법에서 0.001 μM (100, 97%), 0.01 μM (98, 91%), 0.1 μM (73, 68%), 1 μM (34, 32%) 10 μM (12, 29%) 이었으며(Fig. 2-1.), MTT법에서는 0.001 μM (93, 87%), 0.01 μM (90, 83%), 0.1 μM (53, 40%), 1 μM (16, 12%) 10 μM (10, 4%) 이었다(Fig. 2-2.). DOX에 대한 IC_{50} 의 비교 결과에서도 두 종양세포의 억제 정도는 MTT법에 의한 결과가 SRB법에 의한 결과보다 세포성장억제정도가 높은 것으로 나타났다(Table 2-1.).

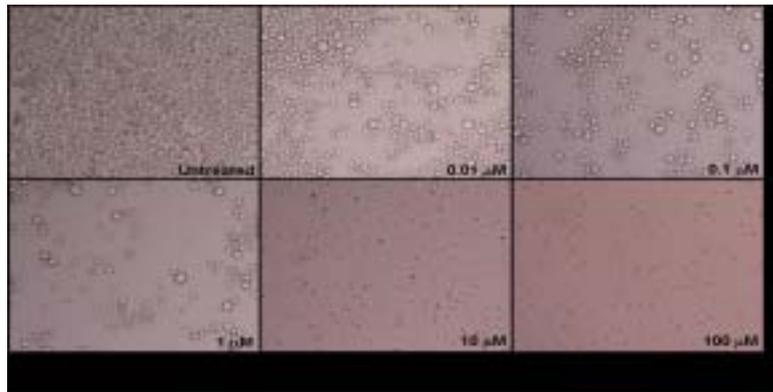
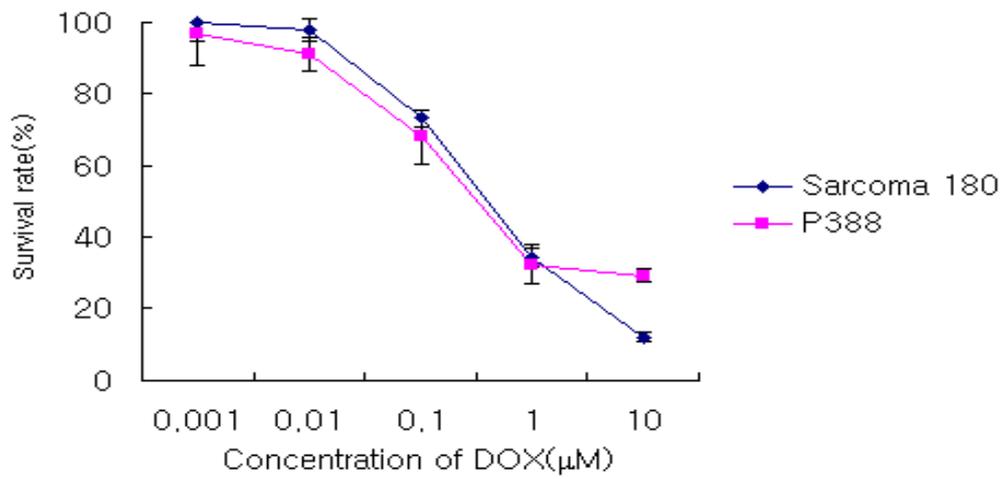


Fig. 2-1. Sarcoma 180 and P388 cells were cultured in RPMI 1640 medium containing 10% FBS in 96-well plates and treated with DOX(0.001-10 μM). Cell survival rates were determined by SRB assay. Data points are the mean of triplicate DOX(error bars, SD).

Table 2-1. Cytotoxicities of *Phellinus gilvus* extract(PGE), *Phellinus linteus* extract(PLE), *Phellinus baumii* extract(PBE), and doxorubicin(DOX) against Sarcoma 180 and P388

Cytotoxicity(IC ₅₀)	SRB		MTT	
	Sarcoma 180	P388	Sarcoma 180	P388
DOX(μ m)	0.92	0.87	0.63	0.37
PGE(mg/ml)	4.99	7.39	3.72	2.54
PLE(mg/ml)	3.04	9.06	3.13	1.98
PBE(mg/ml)	3.29	10.4	3.10	4.46

나. β -glucan 측정

BGSTAR kit는 1-3- β -glucan만 특이적으로 진단하는 kit로 β -glucan의 함량을 2회 반복하여 측정하였다. 측정된 결과 PGE에서 베타글루칸이 다른 두 종에 비하여 높은 함량을 보여주었다(Table 2-2.). 그러나 항암활성은 진흙버섯 품종에 따라 다르게 나타나므로 1-3- β -glucan에만 의존하는 것은 아닌 것으로 생각된다.

Table 2-2. Analysis of *Phellinus gilvus* extract(PGE), *Phellinus linteus* extract(PLE), *Phellinus baumii* extract(PBE)

Phellinus spp.	β-glucan(mg/kg), n=2	
PGE	3.99	3.39
PLE	1.04	2.06
PBE	2.29	3.42

다. PGE, PLE 및 PBE의 세포성장억제

SRB법에서 PGE, PLE 및 PBE의 sarcoma 180 에 대한 세포성장정도는 7.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 89, 87 및 100%, 15 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 87, 81 및 100% 그리고 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 68, 46 및 49% 이었다. 그리고 P388에 대해서는 7.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 88, 92 및 100%, 15 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 83, 82 및 100% 그리고 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 76, 82 및 89% 이었다.

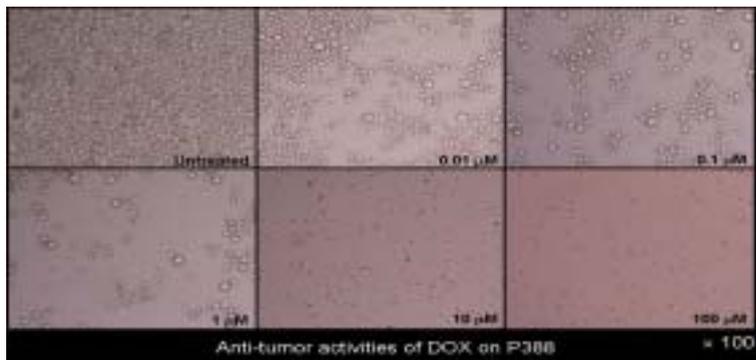
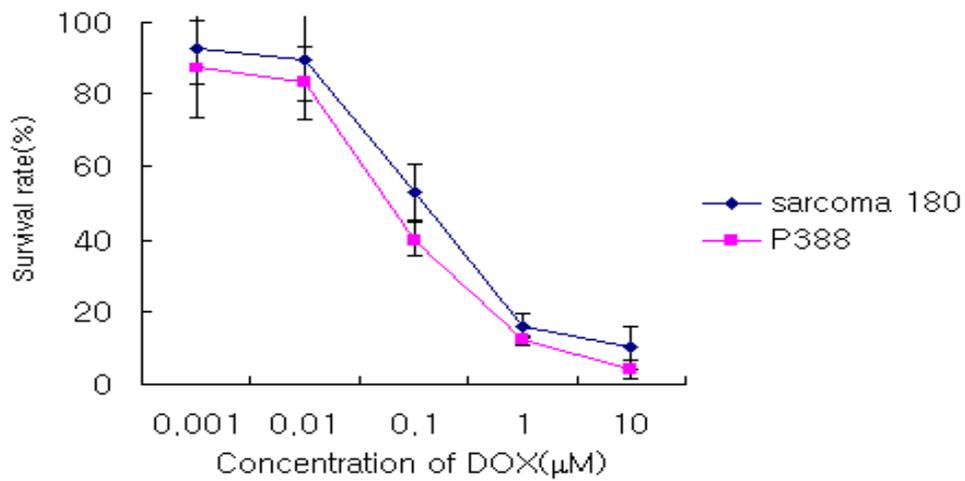


Fig. 2-2. Sarcoma 180 and P388 cells were cultured in RPMI 1640 medium containing 10% FBS in 96-well plates and treated with DOX(0.001~10 μ M). Cell survival rates were determined by MTT assay. Data points are the mean of triplicate DOX(error bars, SD).

종양세포 sarcoma 180에서 PGE와 PLE는 30 μ g/ml 농도뿐만 아니라 7.5 μ g/ml 및 15 μ g/ml 농도에서도 세포성장억제정도를 보였지만 PBE는 30 μ g/ml 농도에서만 세포성장억제를 나타내었다. 즉 전체의 농도에서 PLE와 PGE는 sarcoma 180에 대해 대조군에 비해 유의성 있는 세포저지효과를 보였으며, 농도 30 μ g/ml에

서는 PBE도 대조군에 비해 유의성 있는 것으로 나타났다($P < 0.05$). 전체적으로 SRB법을 이용한 sarcoma 180에 대해서는 PLE가 가장 유의성 있는 세포저지효과를 보였다(Fig. 2-3., 2-4. 및 2-5.).

종양세포 P388에 대한 SRB법의 결과는 sarcoma 180에 대한 결과와 비슷하였다. 즉 PGE와 PLE는 30 $\mu\text{g/ml}$ 농도뿐만 아니라 7.5 $\mu\text{g/ml}$ 및 15 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서도 세포성장억제정도를 보였지만 PBE는 30 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서만 세포성장억제를 나타내었다. 전체의 농도에서 PLE와 PGE는 P388에 대해 대조군에 비해 유의성 있는 세포저지효과를 보였으며, 농도 30 $\mu\text{g/ml}$ 에서는 PBE도 대조군에 비해 유의성 있는 것으로 나타났다. 그러나 전체적으로 SRB법을 이용한 P388에 대해서는 PGE가 가장 유의성 있는 세포성장저지효과를 보였다($P < 0.05$)(Fig. 2-3., 2-4. 및 2-5.).

MTT법에서 PGE, PLE 및 PBE의 sarcoma 180에 대한 세포성장정도는 7.5 $\mu\text{g/ml}$ 에서 84, 74 및 100%, 15 $\mu\text{g/ml}$ 에서 86, 75 및 80% 그리고 30 $\mu\text{g/ml}$ 에서 55, 47 및 51% 이었다. 그리고 P388에 대해서는 7.5 $\mu\text{g/ml}$ 에서 92, 86 및 100%, 15 $\mu\text{g/ml}$ 에서 70, 41 및 100% 그리고 30 $\mu\text{g/ml}$ 에서 35, 21 및 68% 이었다.

위의 두 세포성장 억제 실험의 결과에서 모든 *Phellinus* 류는 농도와 종양세포에 따라 다소의 차이는 있으나 모두 항암효과를 보였으며, 특히 *Phellinus gilvus*의 열수추출물 PGE(IC_{50} , 7.39 $\mu\text{g/ml}$)이 SRB법으로 측정할 경우 P388 종양세포에 대해서 PLE(IC_{50} , 9.06 $\mu\text{g/ml}$)와 PBE(IC_{50} , 10.4 $\mu\text{g/ml}$)보다 좋은 효과를 보였다. 그러나 Sarcoma 180에 대해서는 PLE의 IC_{50} 은 3.04 $\mu\text{g/ml}$ 으로 PGE의 IC_{50} 은 4.99 $\mu\text{g/ml}$ 그리고 PBE의 IC_{50} 은 3.29 $\mu\text{g/ml}$ 으로 항암효과가 우수한 경향을 보였다. MTT법으로 측정시 Sarcoma 180과 P388에 대한 IC_{50} 에 대한 비교시 PGE는 3.72 $\mu\text{g/ml}$ 와 2.54 $\mu\text{g/ml}$, PLE는 3.13 $\mu\text{g/ml}$ 와 1.98 $\mu\text{g/ml}$, PBE는 3.10 $\mu\text{g/ml}$ 와 4.46 $\mu\text{g/ml}$ 의 수치를 보여주었다. 따라서 같은 농도에서의 두 종양세포의 억제정도는 DOX의 결과와 마찬가지로 MTT법에 의한 결과가 SRB법에 의한 결과보다 좀 더 세포성장 억제정도가 높은 것으로 나타났다.

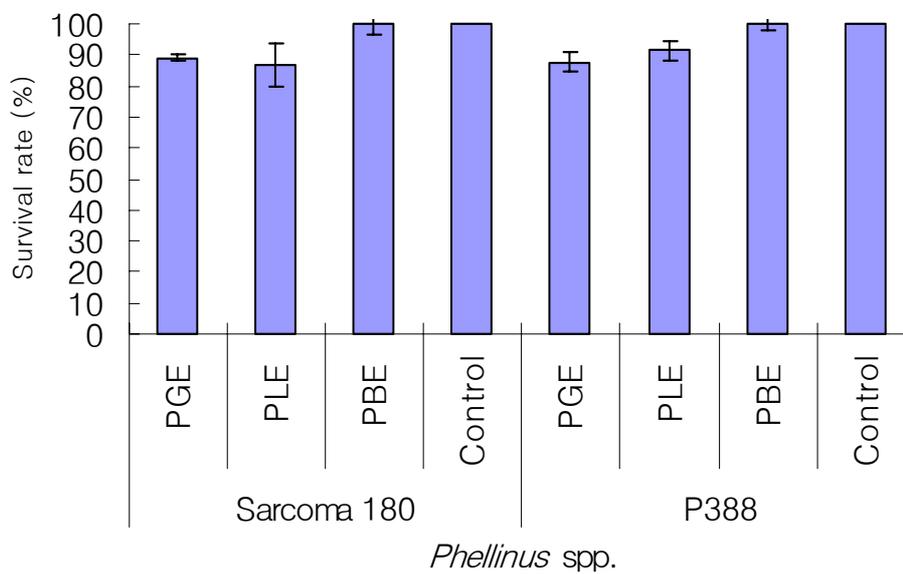


Fig. 2-3. Sarcoma 180 and P388 cells were cultured in RPMI 1640 medium containing 10% FBS in 96-well plates and treated with 7.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of PGE, PLE, and PBE. Cell survival rates were determined by SRB assay. Data bars are the mean of triplicate PGE, PLE, and PBE(error bars, SD).

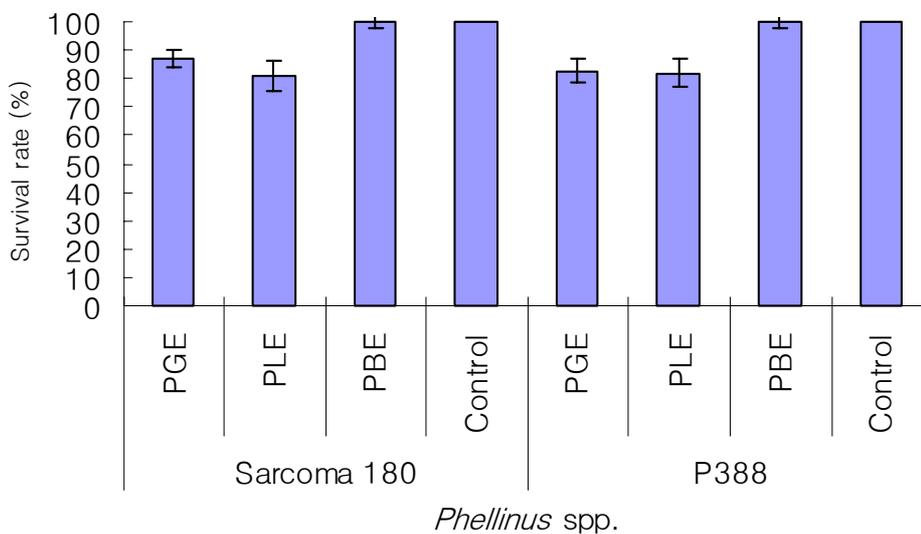
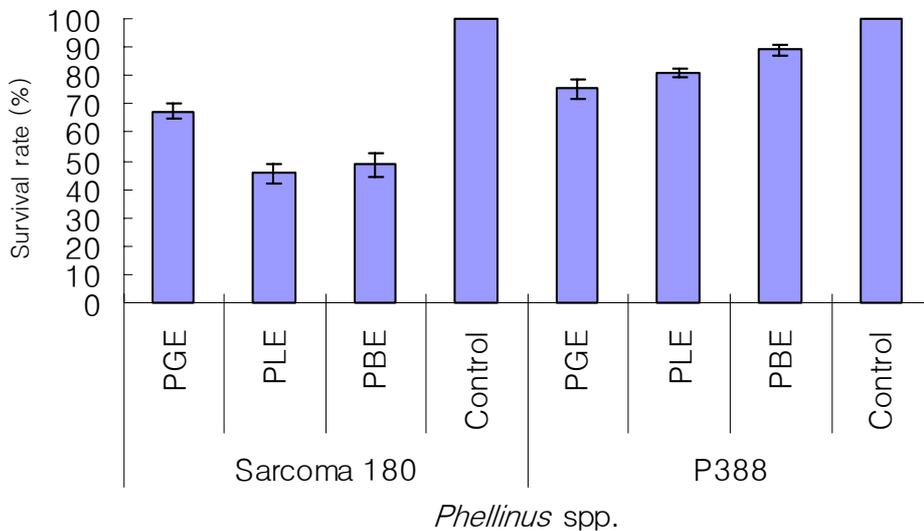


Fig. 2-4. Sarcoma 180 and P388 cells were cultured in RPMI 1640 medium containing 10% FBS in 96-well plates and treated with 15 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of PGE, PLE, and PBE. Cell survival rates were determined by SRB assay. Data points are the mean of triplicate PGE, PLE, and PBE (error bars, SD).



Phellinus spp.

Fig. 2-5. Sarcoma 180 and P388 cells were cultured in RPMI 1640 medium containing 10% FBS in 96-well plates and treated with 30 $\mu\text{g/ml}$ of PGE, PLE, and PBE. Cell survival rates were determined by SRB assay. Data points are the mean of triplicate PGE, PLE, and PBE(error bars, SD).

종양세포 Sarcoma 180에서 PGE와 PLE는 30 $\mu\text{g/ml}$ 농도뿐만 아니라 7.5 $\mu\text{g/ml}$ 및 15 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서도 세포성장 억제정도를 보였지만 PBE는 7.5 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서는 세포억제를 나타내지 않았다. 즉 농도 7.5 $\mu\text{g/ml}$ 제외한 나머지 농도에서는 PLE, PGE 및 PGE 모두가 sarcoma 180에 대해 대조군에 비해 유의성 있는 세포저지 효과를 보였으며, 전체적으로 MTT법을 이용한 sarcoma 180에 대해서도 SRB법의 결과와 같이 PLE가 가장 유의성 있는 세포저지효과를 보였다($P < 0.05$)(Fig. 2-5., 2-6. 및 2-7.).

P388 종양세포에서는 PGE와 PLE가 7.5 $\mu\text{g/ml}$ 및 15 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 세포성장 억제를 보였지만 PBE는 30 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 세포성장 억제를 나타내었다. 농도 15 및 30 $\mu\text{g/ml}$ 에서 PLE와 PGE는 P388에 대해 대조군에 비해 유의성 있는 세포저지효과를 보였으며, 전체적으로 MTT법을 이용한 P388에 대해서는 SRB법

의 결과와는 달리 PLE가 가장 유의성 있는 세포저지효과를 보였다($P < 0.05$)(Fig. 2-5., 2-6. 및 2-7.).

각종 진흙버섯에 대한 생리활성작용으로는 *Phellinus linteus*로부터 분리된 다당체의 면역활성(Song 등, 1995; Lee 등, 1996)과 항암작용(Ikekawa 등, 1968; Han 등, 1999; Cho 등, 2002; Bae 등, 2003), *Phellinusrimosus*의 항암제 해독작용(Ajith 등, 2002)과 항산화작용(Ajith 등, 2001; Ajith 등, 2002), *Phellinus ignarius*의 항돌연변이작용(Shon 등, 2001)이 최근에 보도되고 있다.

본 실험은 *Phellinus gilvus*, *Phellinus linteus* 및 *Phellinus baumii*의 열수추출물을 마우스 유래 육종 종양인 Sarcoma 180과 백혈종양인 P388에서 SRB와 MTT 법을 이용하여 항암활성검정을 실시하였다. SRB법에서 *Phellinus linteus*의 열수추출물(PLE)은 sarcoma 180에 대해 대조군에 비해 가장 뚜렷한 세포저지효과를 보였으며, *Phellinus gilvus*의 열수추출물(PGE)는 P388에 대해 대조군에 비해 뚜렷한 세포저지효과를 나타내었다. 또 MTT법에서 PLE는 P388에 대해 대조군에 비해 가장 뚜렷한 세포저지효과를 보였다. 본 실험에서도 항암활성이 있는 것으로 널리 알려진 *Phellinus linteus*(Han 등, 1999)의 항암효과가 좋은 것으로 나타났으며 고농도의 당을 포함한 PLE의 항암효과가 가장 높은 것으로 보아 이는 그 열수추출물에 포함된 다당체의 생리활성 때문이라는 연구(Ikekawa 등, 1968 Cho 등, 2002)를 뒷받침한다. 그러나 저농도인 7.5와 15 $\mu\text{g/ml}$ 에서는 PGE와 비슷한 항암활성이 나타내었고 뿐만 아니라 PGE는 P388에 대해서는 고농도에서도 PLE보다 더 우세한 항암효과를 보였다. 따라서 톱밥의 배지에서 속성으로 재배가 가능한 PGE가 가격대비측면에서 PLE보다 산업적 가치가 더 크다고 할 수 있다. 그리고 고농도에서의 PGE와 PLE의 항암활성은 항암제인 독소루비신 0.5 μM 에 해당하는 항암활성과 비슷한 효과를 가졌으며 그들의 급성독성실험 결과에서도 그 안전성이 인정 되었다(Han 등, 2001; Bae 등, 2003).

SRB와 MTT법에 의한 항암활성 결과가 세 종류의 버섯 추출물에서 비슷하나 같은 농도에서의 두 종양세포의 억제 정도는 MTT법에 의한 결과가 SRB법에 의한 결과보다 세포성장 억제정도가 높은 것으로 나타났다. 이러한 이유는 SRB법은 세포단백질을 염색하여 증식 정도를 알 수 있는 방법(Kim 등, 1996)이지만

MTT법은 살아있는 세포에서만 일어나는 formazan의 세포대사과정으로 생존한 세포의 수를 가늠할 수 있는 방법(Mosmann 등, 1983)으로 SRB법이 MTT방법보다 세포수와 흡광도의 관계에서 더 민감한 결과로 생각이 된다(Skehan 등, 1990; Keepers 등 1991).

이상의 결과를 종합하면 PLE의 항암활성이 가장 좋은 결과로 나타났지만 PGE의 항암활성도 상당히 좋은 것으로 나타났다. 특히 PBE와는 비슷한 항암활성을 보여주었다. 따라서 기존의 고가의 *Phellinus linteus*와 *Phellinus baumii*보다 *Phellinus gilvus*의 대량생산이 이루어질 경우에 가격의 저렴화로 기능성식품과 면역활성 첨가제로의 산업화가 가속화 될 것으로 생각이 된다.

3. *Phellinus gilvus* 자실체의 추출물에 대한 항암활성 및 항산화

통계분석은 SAS statistical package(release 8.1 SAS Institute Inc., Cary, North Carolina, USA)를 이용하여 ANOVA를 실시하고 그 유의 수준은 $P < 0.05$ 로 하였다. 참나무 원목과 톱밥으로 재배된 마른진흙버섯의 자실체의 원소 함량의 구성비를 비교하여 그 결과를 Table 3-1.에 나타내었다. Table 3-1.에서 보여주는 것처럼 참나무 원목과 톱밥에서 재배된 자실체의 원소함량은 carbon이 47.3와 46.6%, hydrogen이 5.01~5.17% 그리고 nitrogen은 1.12~1.46% 등으로 통계학적 유의성은 차이가 없었다. 또한 시험한 진흙버섯의 자실체에서 sulfur는 분석되지 않았다.

Table 3-1. Comparison of elemental compositions of the fruiting body of *Phellinus gilvus* grown on oak tree and oak sawdust.

Composition(%)	Oak	Sawdust
Nitrogen	1.12±0.08	1.46±0.21
Carbon	47.3±0.04	46.6±0.55
Hydrogen	5.01±0.02	5.17±0.02

The value are mean±SD. Statistical analysis was performed by student's t-test.

전자공여능 활성에 대한 실험결과는 Fig. 3-1.에 나타내었다. 톱밥에서 채배된 자실체에서 전자공여능에 대한 활성의 차이는 나타나지 않았으나 농도에 따라 전자 공여능의 활성이 증가함을 보여주었다. 추출용매를 비교시 40%와 60% 에탄올에서 가장 좋은 활성을 보여주었다.

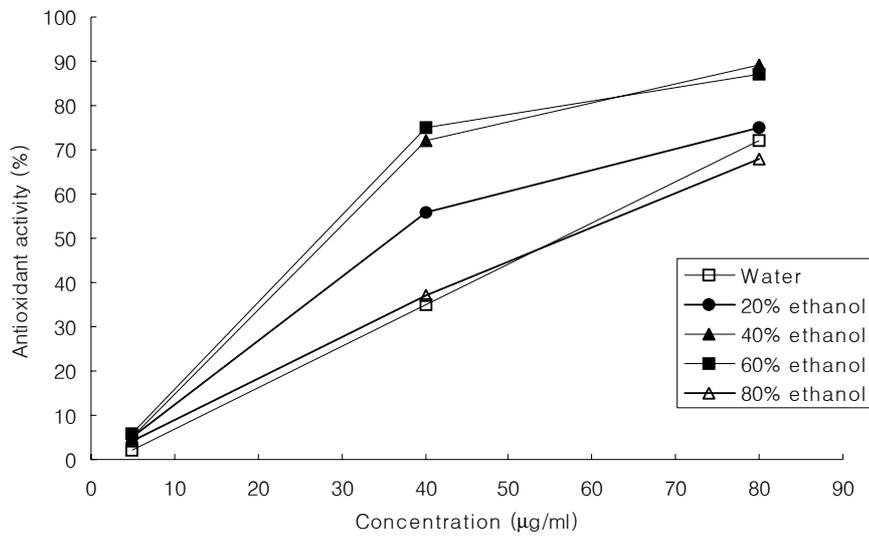


Fig. 3-1. Electron donating ability of various ethanol extracts obtained from the fruiting body of *Phellinus gilvus*

열수추출 외에 참나무 원목과 톱밥에서 에탄올 함량에 따른 추출물에서 항암 활성을 Fig. 3-2와 Table 3-2에 나타내었다. 참나무 원목과 톱밥에서 자란 자실체에서 추출한 추출물은 모두 용량-의존적인 결과를 보여주었으며 에탄올 함량에 따른 모든 추출물에서도 참나무 원목 재배보다 참나무 톱밥에서 더 높은 항암활성을 보여주었다(Fig. 3-2).

Table 3-2. Comparative cytotoxicity(mean±SE) of the extracts(PGE) obtained from fruiting body grown in the oak tree and oak sawdust culture

Extract solvent	IC ₅₀ ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	
	Oak tree	Oak sawdust
Hot water	148±22	63±8*
20% ethanol	99±11	32±4*
40% ethanol	83±4	24±2*
60% ethanol	75±3	20±1*
80% ethanol	24±1	18±1

*; IC₅₀ of PGE was compared between oak tree and sawdust by Student's t-test(P < 0.05). The value are mean±SD.

Fig. 3-2.로부터 항암활성을 처리별 항암활성을 비교하고자 참나무 원목에서 열수추출, 20%, 40%, 60% 그리고 80%의 에탄올 추출물에 대한 항암활성(IC₅₀) 결과 148, 99, 83, 75 그리고 24 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 수치를 보여주었으며 참나무 톱밥에서는 63, 32, 24, 20 그리고 18 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 IC₅₀ 값을 보여주었다. 이러한 결과로 참나무 원목 보다는 톱밥에서 재배된 마른진흙버섯이 항암성분이 증가되는 결과로 나타났다. 에탄올이 함유된 추출용매에 추출되는 것으로 보아 항암활성을 나타내는 성분은 β -글루칸은 아닌 것으로 추측이 되며 단백다당체 혹은 다당체 이외의 물질일 가능성이 높은 것으로 생각되었다(Ajith 등, 2002; Atsumi 등, 1990; Withers 등, 1991; 조수목, 2001). 이상의 결과로부터 톱밥에서 숙성으로 재배되는 마른진흙버섯의 자실체를 에탄올로 추출한 추출물에 대하여 항암활성 등을 비롯한 다양한 생리활성이 검증될 경우 동물약품 원료로서 가능성이 기대된다.

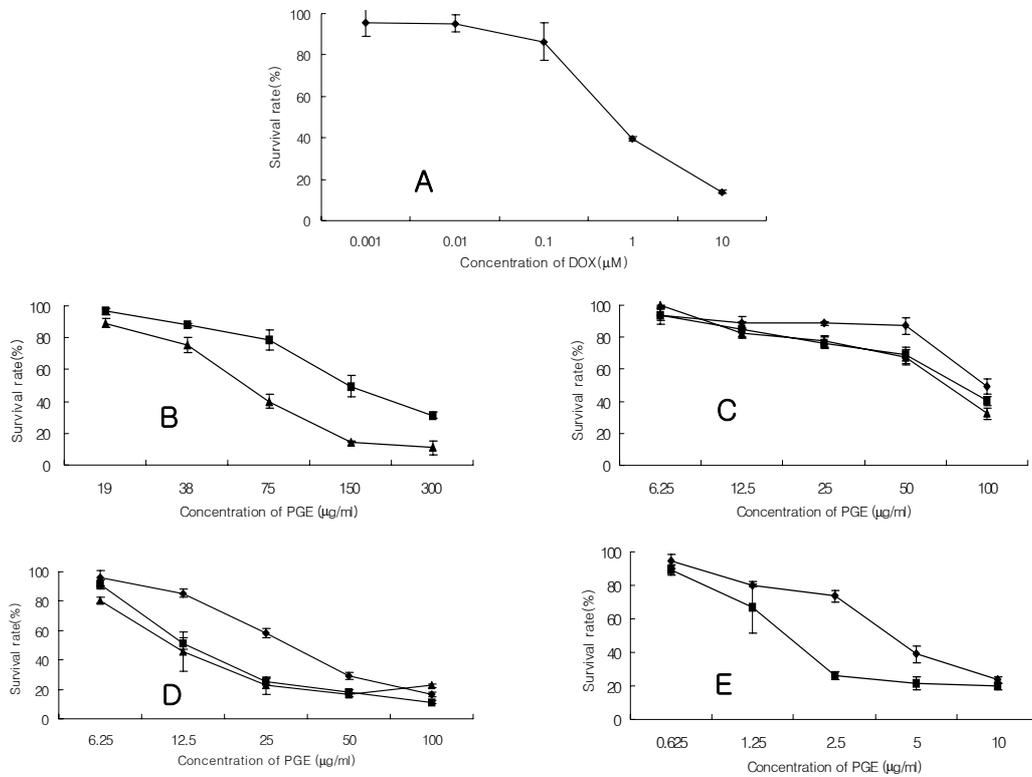


Fig. 3-2. Cytotoxicity of various ethanol extracts obtained from the fruiting body of *Phellinus gilvus* grown in oak tree and sawdust. A(doxorubicin), B (■: hot water extract of fruiting body grown in oak tree, ▲: hot fruiting body grown in oak sawdust), C(▲: 60% ethanol extract of fruiting body grown in oak tree, ■: 40% ethanol extract of fruiting body grown in oak tree, ◆: 20% ethanol extract of fruiting body grown in oak tree), D(▲: 60% ethanol extract of fruiting body grown in oak sawdust, ■: 40% ethanol extract of fruiting body grown in oak sawdust, ◆: 20% ethanol extract of fruiting body grown in oak sawdust), and E(◆: 80% ethanol extract of fruiting body grown in oak tree, ■: 80% ethanol extract of fruiting body grown in oak sawdust).

4. 진흙버섯 자실체의 단백다당체 추출 조건의 최적화 및 단백다당체의 추출 및 분석

품종별 열수 추출시 품종별 버섯과 물을 1:30의 비율로 하여 5시간 동안 추출 하면서 가용성 고형분의 함량을 비교하였다. 그 결과 *Phellinus gilvus*(▲)와 *Phellinus linteus*(◆)의 경우는 물이 끓은 후 3시간 이후에는 일정한 함량을 나타내었다. 그러나 *Phellinus baumii*(■)의 경우는 2시간 이후에 일정한 가용성 함량을 보여주었다.

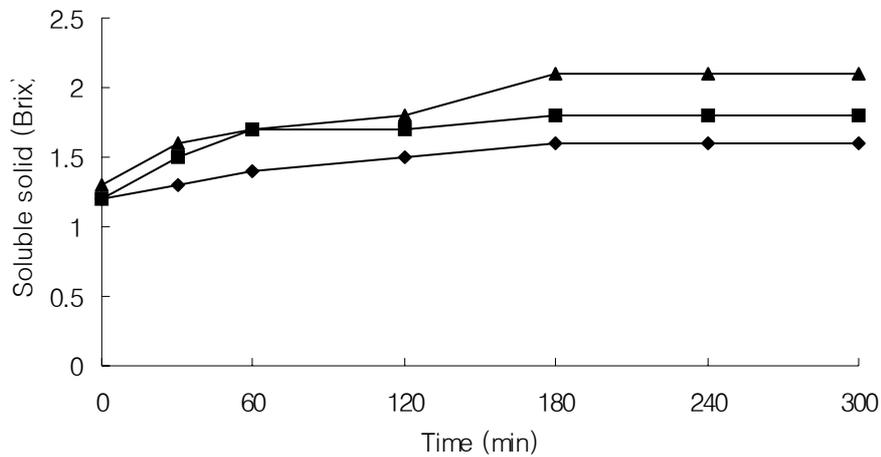


Fig. 4-1. Changes of soluble solids extracted from *Phellinus gilvus*, *Phellinus linteus* and *Phellinus baumii* during water extraction.

마른진흙버섯의 최적추출조건을 설정하기 위하여 기존의 방법과 다른 항암활성을 기준으로 최적의 조건을 설정하였다. 항암활성은 앞에서 설명한 SRB법으로 수행하였다. 그 결과를 Table 4-1.에 나타내었다. 마른진흙버섯과 물을 1:10, 1:20, 1:30으로 추출한 추출할 경우 1:30의 비율로 추출한 경우 가장 좋은 항암활성을 보여 추출의 조건을 최소한 1:30으로 2회 이상을 추출하는 것이 좋은 것으로 생

각되었다. 또한 추출 온도별 조건에 따라서 항암활성을 측정한 결과 100℃에서 6 시간 동안 추출 시 가장 좋은 항암활성을 보여주었다.

Table 4-1. Anticancer activity by SRB assay in the extraction time and temperature,

		survival rate(%)					
추출온도(℃)	추출시간(h.)	Sarcoma 180			P388		
		1:10	1:20	1:30	1:10	1:20	1:30
80	6	41.5	41.1	24.6	70.8	39.0	30.6
	8	39.5	35.4	20.7	67.8	39.1	29.6
	10	50.5	33.1	22.7	77.3	44.6	27.8
	12	44.8	32.1	22.1	58.8	39.3	26.8
	13	50.5	36.1	20.3	57.5	40.4	25.8
90	6	45.3	33.0	28.4	72.3	47.6	31.3
	8	41.3	32.7	18.7	56.8	36.8	25.5
	10	38.0	33.7	21.7	52.8	41.0	25.4
	12	36.5	28	15.8	52.8	44.4	28.2
	13	43.6	31.1	16.0	51.5	46.0	28.5
100	6	26.3	16.1	8.8	47.3	30.5	24.9
	8	28.3	10.3	13.3	58.0	25.2	24.9
	10	21.3	10.8	9.1	39.8	28.1	24.8
	12	22.3	7.9	8.9	35.0	24.1	23.7
	13	28.8	8.5	7.3	36.3	22.4	23.9

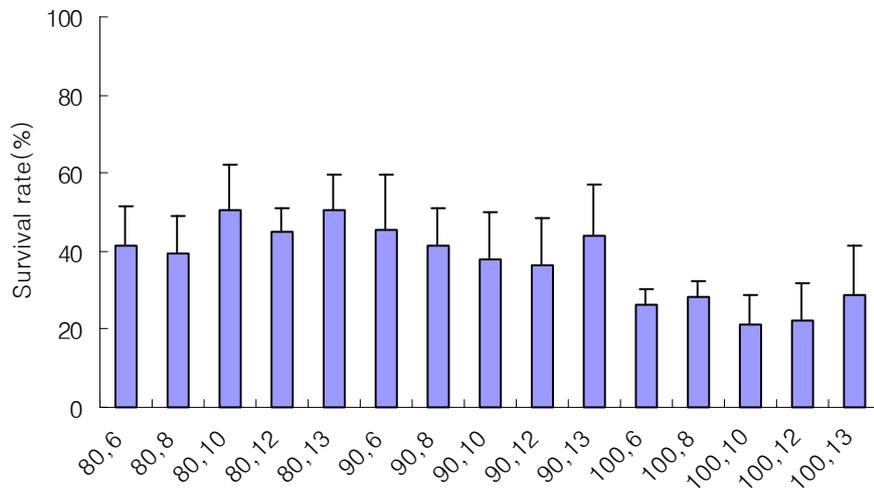


Fig. 4-2. Survival rate(%) of optimal extraction(1:10) time and temperature in Sarcoma 180.

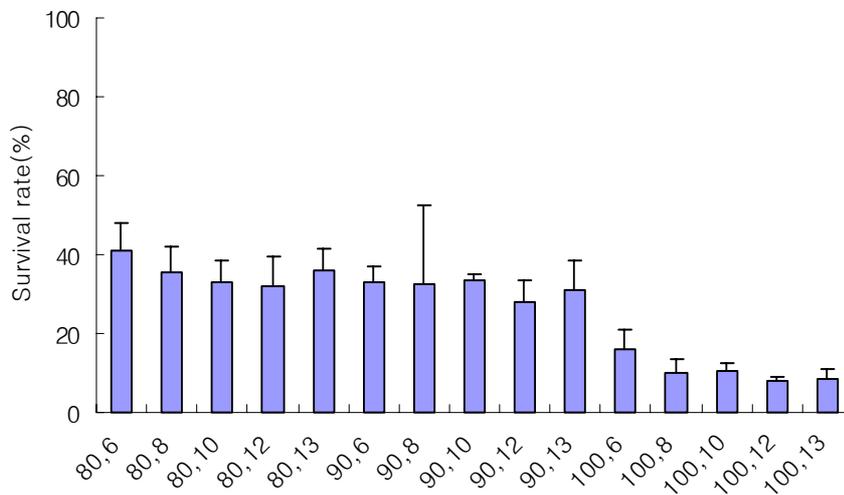


Fig. 4-3. Survival rate(%) of optimal extraction(1:20) time and temperature in Sarcoma 180.

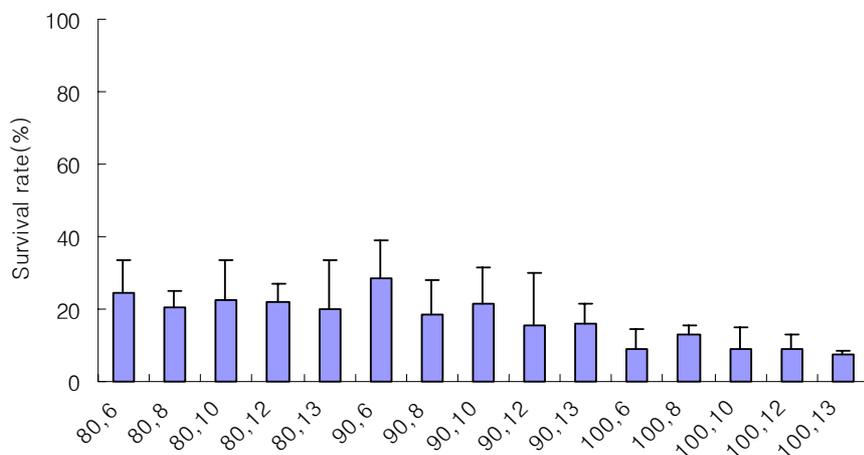


Fig. 4-4. Survival rate(%) of optimal extraction(1:30) time and temperature in Sarcoma 180.

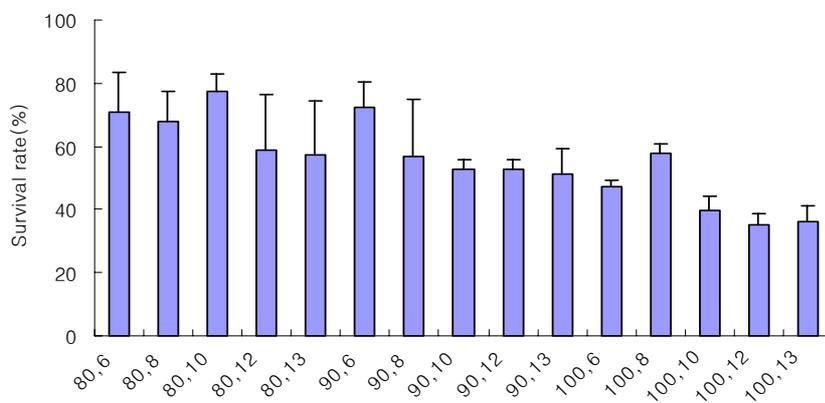


Fig. 4-5. Survival rate(%) of optimal extraction(1:10) time and temperature in P388.

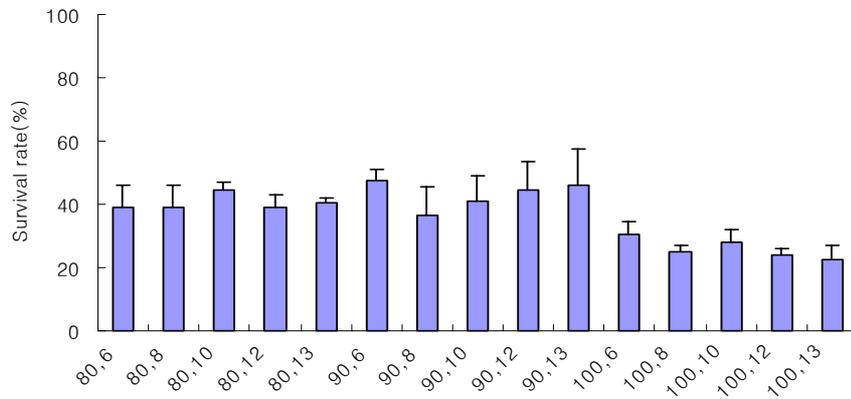


Fig. 4-6. Survival rate(%) of optimal extraction(1:20) time and temperature in P388.

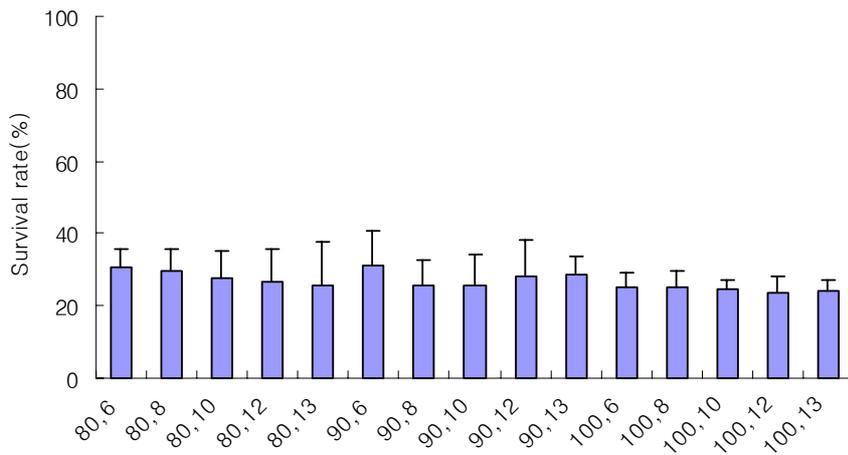


Fig. 4-7. Survival rate(%) of optimal extraction(1:30) time and temperature in P388.

또한 최적의 추출조건 실험을 총당, 환원당 및 단백질량을 비교로 추출온도, 추출시간 등을 조건으로 하여 실험을 진행하였다. 그 결과를 Table 4-2에 나타

내었다.

Table 4-2. Selection of optimal extraction based on total carbohydrate, reduced glucose and protein.

추출온도 (°C)	추출 시간 (h.)	총당(mg/ml)			환원당(ppm)			단백질(µg/ml)		
		1:10	1:20	1:30	1:10	1:20	1:30	1:10	1:20	1:30
80	6	0.73	0.58	0.42	378.3	406.4	483.0	490.3	556.4	567.7
	7	0.92	0.68	0.40	382.9	419.8	519.7	517.0	568.2	595.7
	8	0.67	0.72	0.46	352.2	397.6	429.7	540.9	510.5	625.2
	9	0.89	0.76	0.45	389.1	428.7	536.3	541.9	584.0	642.9
	10	0.81	0.76	0.48	388.3	384.2	543.0	545.0	583.5	628.5
	11	0.72	0.82	0.48	382.2	466.4	709.7	546.8	611.1	605.7
	12	0.76	0.86	0.50	394.5	477.6	496.3	544.5	617.5	670.9
	13	1.01	0.90	0.54	355.2	515.3	773.0	549.6	623.7	687.4
90	6	0.47	0.70	0.48	426.8	430.9	816.3	557.6	610.7	730.7
	7	0.72	0.86	0.55	432.2	457.6	753.0	588.0	568.9	738.9
	8	0.80	0.90	0.63	462.2	486.4	709.7	588.8	643.6	760.1
	9	0.86	0.90	0.75	470.6	430.9	883.0	606.3	609.4	796.1
	10	1.00	1.16	0.99	455.2	508.7	746.3	669.7	629.4	751.3
	11	0.99	1.02	0.80	488.3	544.2	1060	645.7	660.4	830.7
	12	1.29	1.14	1.04	506.8	539.8	906.3	666.5	639.0	853.0
	13	1.29	1.22	1.21	549.1	517.6	973.0	674.4	679.3	801.7
100	6	1.47	1.16	1.62	476.8	575.3	1003	825.1	1045	1674
	7	1.11	1.24	1.23	487.5	608.7	1110	809.1	997.4	1487
	8	1.29	1.96	1.59	494.5	793.1	983.0	685.9	1356	1575
	9	1.82	2.00	1.50	473.7	773.1	1233	925.0	1319	1579
	10	2.02	1.84	1.59	529.8	693.1	1230	901.0	1206	1708
	11	1.88	1.98	1.35	549.1	664.2	1256	885.5	1055	1849
	12	3.07	2.52	1.71	422.2	1030	1220	1136	1451	1921
	13	2.59	2.86	2.10	526.0	853.1	1623	1029	1322	1945

Table 4-2.에서 보여주는 것처럼 총당의 함량을 추출온도로 보면 100°C에서 추출할 때 당이 가장 많이 추출되는 것을 보여주고 있다. 추출비율로 계산하면 총당의 경우는 1:20의 비율이 가장 우수한 것으로 나타났다. 그러나 환원당의 경우는 100°C에서 1:30이 가장 효율이 좋은 것으로 생각되었다. 당단백질의 개념에서 단백질의 양을 측정한 결과 100°C에서 1:30에서 추출이 잘되는 것으로 나타났

다. 항암활성, 총당 및 환원당의 측정 결과는 Table 4-3에 나타내었다.

Table 4-3. Surface Response for Antitumor Activity, Total Sugar, and Reducing Sugar

Run	Y ₁ , % a	Y ₂ , mg/ml b	Y ₃ , ppm c
1	60.5	0.67	352.2
2	55.2	0.76	394.5
3	71.7	1.29	494.5
4	77.7	3.07	422.2
5	80.0	0.46	429.7
6	77.9	0.50	496.3
7	86.7	1.59	983.0
8	91.1	1.71	1220
9	67.3	0.90	486.4
10	72.0	1.14	539.8
11	66.9	0.76	384.2
12	89.2	1.84	693.1
13	62.0	1.00	455.2
14	78.3	0.99	746.3
15	66.3	1.16	508.7
16	66.3	1.16	508.7
Total Model	** d	**	***
Linear	***	**	***
Quadratic	*	NS	NS
Crossproduct	NS	NS	**
F-Ratio	15.13	8.54	39.05
Time	NS	NS	NS
Temperature	**	**	***
S/S	**	NS	***

a Anti-tumor activity according to hot water extraction conditions of *Phellinus gilvus* against sarcoma 180. b The quantity of total sugar in each set of water extraction from *Phellinus gilvus*. The quantity of reducing sugar

in each set of water extraction from *Phellinus gilvus*. d, ***significant at $P < 0.001$; **, significant at $P < 0.01$; *significant at $P < 0.05$; NS, not significant.

Table 4-3.에 나타난 바와 같이, 항암활성은 추출온도와 추출부피에서 유의성이 나타났으며($P < 0.01$), 총당은 추출온도에서 유의성이 나타났다($P < 0.01$). 또한, 환원당은 추출온도와 추출부피에서 유의성이 나타났다($P < 0.001$). 따라서, 추출온도와 추출부피가 반응요인에 유의한 영향을 끼치고 있음을 알 수 있다. 측정된 항암활성, 총당 및 환원당의 평균값을 이용하여 표면반응곡선에 대한 회귀분석을 수행하였다. 회귀분석 결과는 Table 4-4.에 나타내었고, 최적의 추출반응 조건은 Table 4-5.에 나타내었다.

Table 4-4. Response surface model for extraction of anti-tumor activity, total carbohydrate, and reducing sugar from *Phellinus gilvus*.

	2차 반응식	회귀계수(R ²)	유의성
항암활성(Y1, %)	$Y1 = 639.535^{**} - 5.5775X1 - 13.5985X2 + 2.4615X3 - 0.2125X12 + 0.11125X1X2 + 0.0755X2^2 + 0.01X1X3 - 0.01725X2X3 - 0.0035X3^2$	0.9578	0.0018
총당(Y2, μg/ml)	$Y2 = 20.10856 - 0.508892X1 - 0.478961X2 + 0.180609X3 - 0.007974X12 + 0.011063X1X2 + 0.002481X2^2 - 0.010688X1X3 - 0.000738X2X3 - 0.000569X3^2$	0.9276	0.0084
환원당(Y3, ppm)	$Y3 = 2908.373276 - 4.151293X1 - 40.662466X2 - 158.673603^{***}X3 - 2.62931X12 + 0.34875X1X2 + 0.150328X2^2 + 2.085X1X3 + 1.383750^{***}X2 X3 + 0.771328X3^2$	0.9832	0.0001

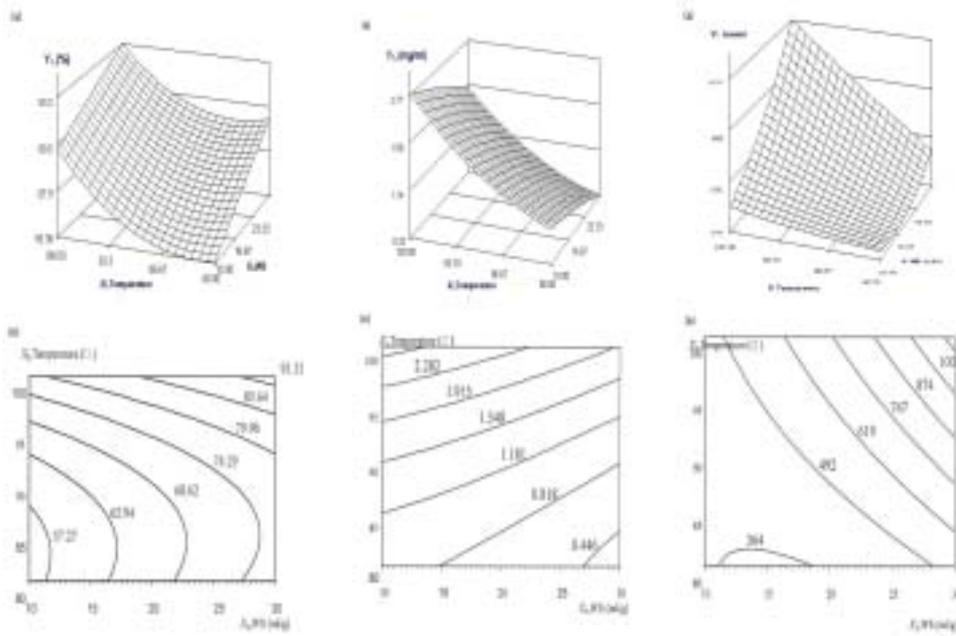
Table 4-4.에 나타난 바와 같이, 항암활성의 회귀계수는 0.9578로, 추출시간이 적을수록($P < 0.01$), 추출온도가 낮을수록($P < 0.05$) 항암활성은 저하되었다. 그러나 총당의 회귀계수는 0.9276으로, 추출조건에 대하여 유의성이 인정되지 않았다. 또한, 환원당의 회귀계수는 0.9832로, 추출부피가 클수록($P < 0.01$) 환원당의 농도가 저하되었다. 반응표면분석법은 그래프로서 최적화를 이루는 한 방법으로, 등고선도를 이용하여 최적조건을 결정할 수 있다. 그러나 각 반응변수들의 반응

표면은 정확하게 일치하지 않으므로 적절한 제한조건을 필요로 한다 (Montgomery 등, 1997; Mead 등, 1975; Haaland 등, 1989). 따라서 주어진 실험 조건 내에서 예비실험을 통해 얻어진 결과를 바탕으로 제한영역을 설정하고, 각 조건이 일치하는 지역을 중첩되는 등고선도(contour map)로 구하였다. 진흙버섯 자실체의 열수 추출물의 최적의 추출조건은 Table 4-5.에 나타내었다.

Table 4-5. Predicted levels of extraction conditions for the maximum responses of variables by ridge analysis.

Responses	Time (hr)	Temperature (°C)	S/S (ml/g)	Maximum	Morphology
Antitumor Activity (Y ₁ , %)	10.24	99.46	23.00	85.5	saddle point
Total Sugar (Y ₂ , mg/ml)	10.70	99.13	17.90	2.08	saddle point
Reducing Sugar (Y ₃ , ppm)	10.27	96.11	27.80	890.6	saddle point

또한, Table 4-6., 4-7., 4-8.에 나타난 바와 같이, 항암활성에 대한 진흙버섯 자실체의 열수 추출물의 최적 조건은 추출시간 10.24시간, 추출온도 99.46°C, 추출부피 23.00 ml/g 이며, 85.5%에서 최대반응이 나타났다. 총당에 대한 진흙버섯 자실체의 열수 추출물의 최적의 조건은 추출시간 10.70시간, 추출온도 99.13°C, 추출부피 17.90 ml/g 이며, 2.08 mg/ml의 농도에서 최대반응이 나타났다. 환원당에 대한 진흙버섯 자실체의 열수 추출의 최적 조건은 추출시간 10.27시간, 추출온도 96.11°C, 추출부피 27.80 ml/g 이며, 890.6 ppm에서 최대반응이 나타났다. 따라서 본 발명의 진흙버섯 자실체의 열수 추출물의 최적의 추출조건은 항암활성, 총당 및 환원당을 기준으로 할 경우 추출시간 10-11시간, 추출온도 96~100°C, 추출부피 17~28 ml/g 로 결정할 수 있다.



도1

도2

도3

Fig. 4-6-도-1. Response surface(up) and contour map(down) for the effects of water extraction conditions on the antitumor activity of extracts from *Phellinus gilvus*.

Fig. 4-7-도-2. Response surface(up) and contour map(down) for the effects of water extraction conditions on the total sugar of extracts from *Phellinus gilvus*.

Fig. 4-8-도-3. Response surface(up) and contour map(down) for the effects of water extraction conditions on reducing sugar of extracts from *Phellinus gilvus*.

5. 마른진흙버섯(*Phellinus gilvus*) 처리별 기능성물질 비교 분석 연구 및 단백다당체의 추출 및 분석

가. 원소분석

국내에서 흔하게 구할 수 있는 5 종류의 원목과 원목의 폐자재로 나올수 있는 톱밥을 이용하여 원목과 톱밥재배를 동시에 수행하여 일반성분을 비교하였다. Fig. 5-1.은 마른진흙버섯의 nitrogen 구성성분비를 비교하였다. 그 결과 아카시아를 제외하고는 원목보다는 톱밥에서 hydrogen 구성비가 높은 것으로 나타났다. 그 중에서 아카시아원목보다는 톱밥에서 자란 마른진흙버섯의 자실체에서 hydrogen의 함량의 높은 것으로 나타났다. Fig. 5-2.는 carbon에 대한 원소 구성비를 비교하였다. 그 결과 hydrogen과는 다르게 사과나무톱밥에서 톱밥에서 자란 마른진흙버섯을 제외하고는 탄소의 함량비가 낮게 혹은 비슷한 수준으로 나타났다. Hydrogen을 비교하였을 경우에는 아카시아와 느릅나무 톱밥에서 재배된 마른진흙버섯이 높은 hydrogen 함량을 보여주었다.

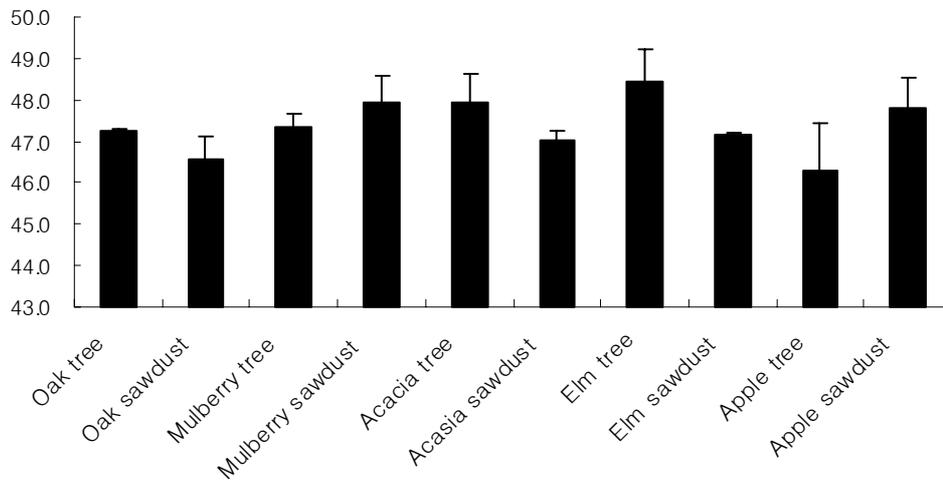


Fig. 5-1. Comparisons of nitrogen of *Phellinus gilvus* grown on the various tree and sawdust

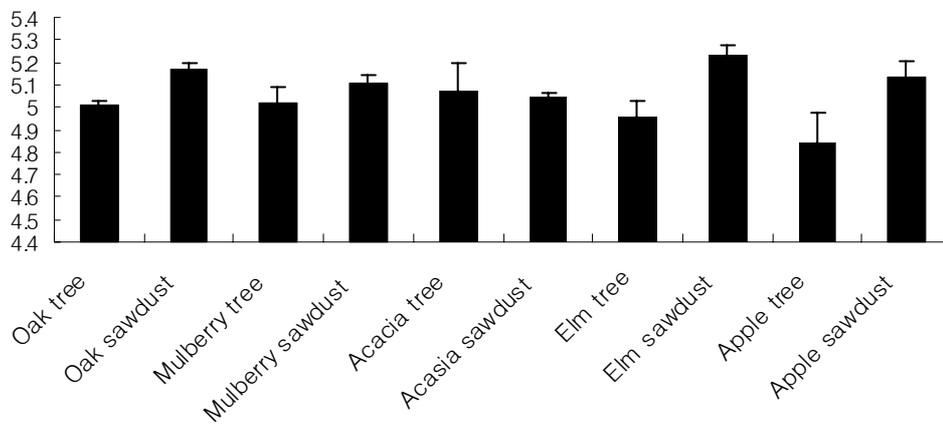


Fig. 5-2. Comparisons of carbon of *Phellinus gilvus* grown on the various tree and sawdust

나. 총당 측정

Fig. 5-3.은 총당량을 Glucose를 표준물질로 하여 안트론 방법(Anthrone method)으로 측정하였다. 사과나무 톱밥에서 재배한 진흙버섯의 총당량이 가장 높으며 사과나무 원목, 참나무 원목에서 재배한 진흙버섯에서도 높은 당량을 나타내었고 아카시아원목, 느릅나무 원목에서 낮은 당량을 보였다. 전체적으로 원목 재배보다 톱밥재배가 당의 함유가 높은 것으로 나타났다.

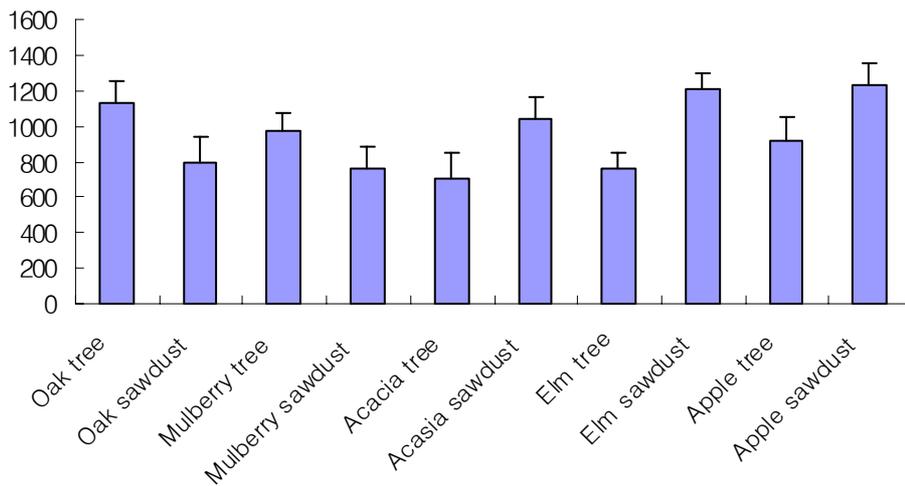


Fig. 5-3. Total carbohydrate of *Phellinus gilvus* grown on the various tree and sawdust

다. 환원당 측정

환원당은 총당 및 다당체를 기준으로 추출법을 수행 시 비교적 쉬운 indicator

로 운영할 수가 있다. Glucose를 표준물질로 하여 DNS(dinitrosalicylic acid) 분석으로 측정하였다.(Miller 등, 1959) 그 결과를 Fig. 5-4.에 나타내었다. 사과나무 톱밥에서 재배한 진흙버섯의 환원당이 가장 높게 나왔으며 아카시아 원목, 느티나무 원목에서 재배한 진흙버섯에서 낮게 측정되었다.

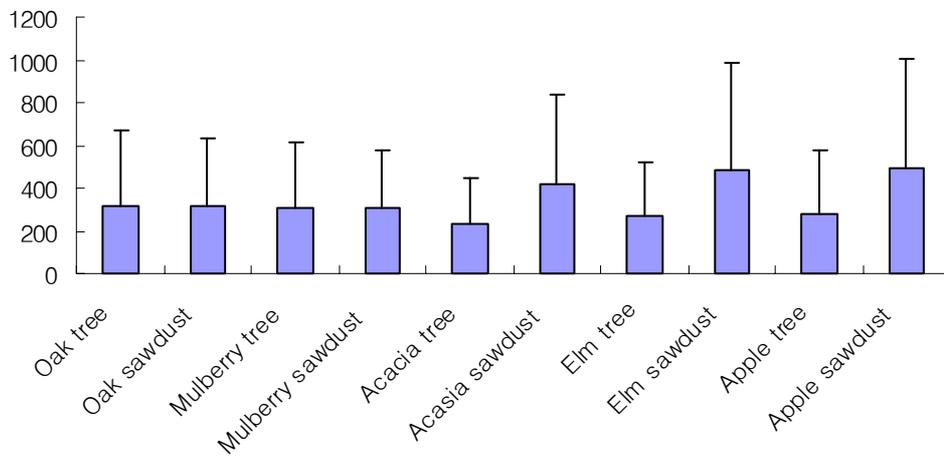


Fig. 5-4. Reducing sugar of *Phellinus gilvus* grown on the various tree and sawdust

라. DPPH assay

항산화능은 DPPH assay와 Xanthine oxidase assay를 이용하여 측정하였다. 먼저 DOOP assay 결과를 Fig. 5-5.에 나타내었다. DPPH assay에서 뽕나무 톱밥, 참나무 톱밥, 아카시아 원목, 느티나무 원목에서 재배한 진흙버섯이 항산화능력이 높게 나왔다.

마. Xanthine oxidase assay

Xanthine oxidase assay 결과를 Fig. 5-6에 나타내었다. 참나무 톱밥, 느티나무 원목에서 높은 항산화능력이 측정되었으나 유의성은 인정할 수가 없었다. 모든 종류 원목에서 비슷한 항산화작용을 보여주었다. 따라서 항산화제의 기능성을 초점으로 마른 진흙버섯을 재배 시 다양한 원목 이용이 가능한 것으로 나타났다.

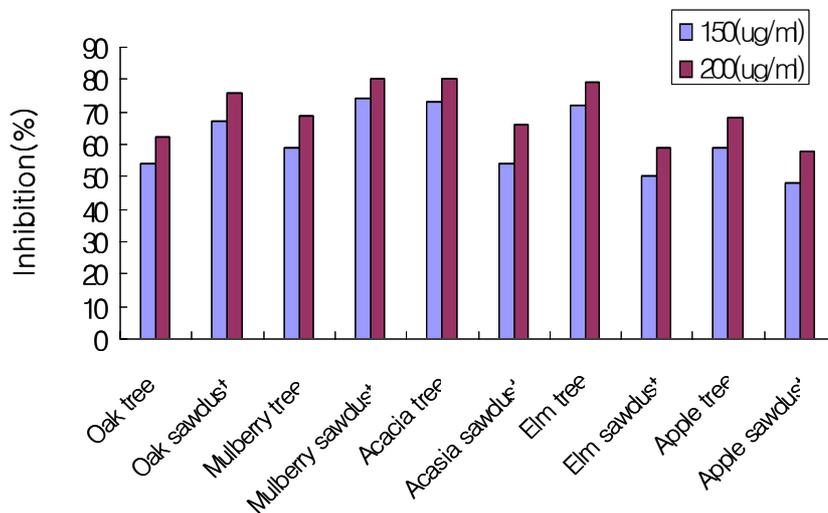


Fig. 5-5. Inhibition(%) of *Phellinus gilvus* grown on the various tree and sawdust

바. 단백질함량

진흙버섯류에서 당단백은 중요한 성분으로 이 성분을 분석하기 위하여 BCA assay를 이용하여 단백질량을 측정하였다. 결과는 Fig. 5-7에 나타내었다. 분석결

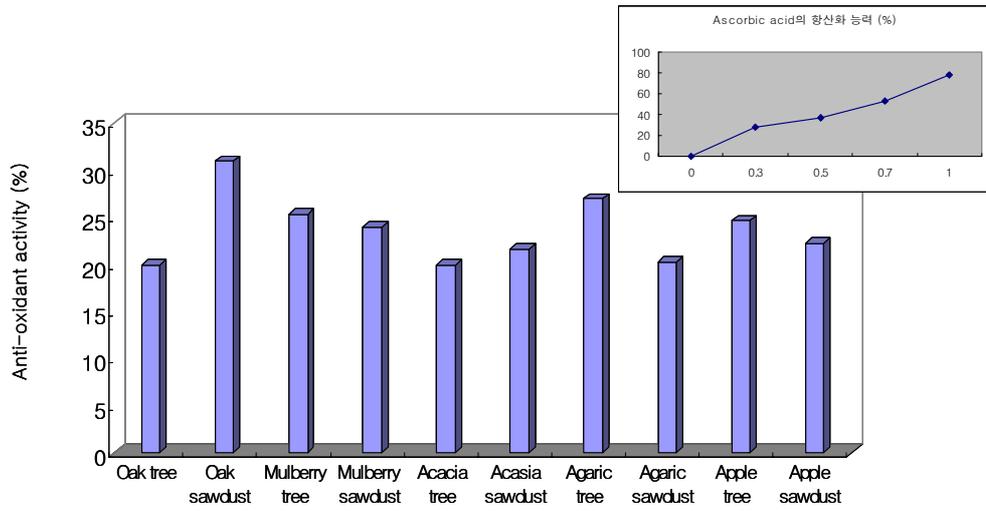


Fig. 5-6. Xanthine oxidase Inhibition(%) of *Phellinus gilvus* grown on the various tree and sawdust

과 각 처리군에서 단백질량에 있어서 큰 차이는 보이지 않았다.

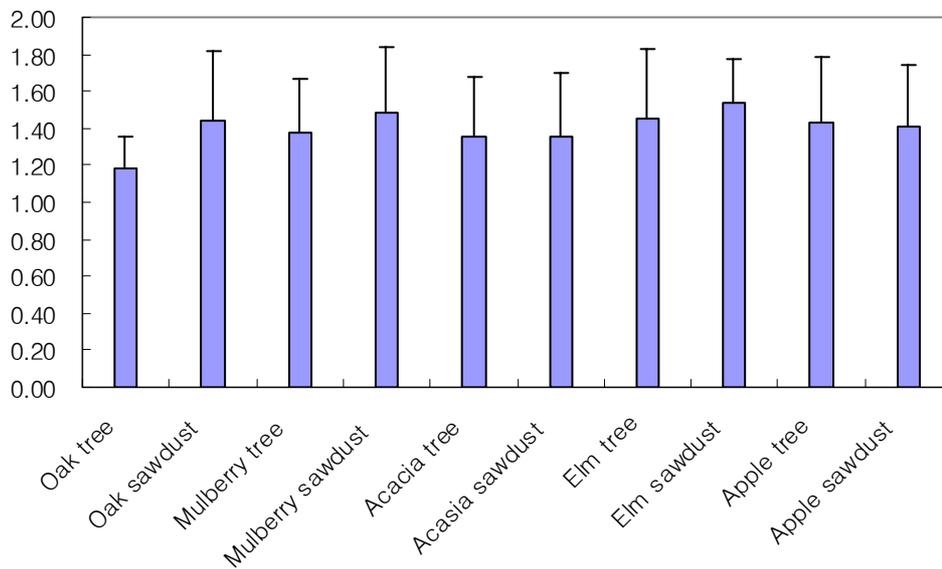


Fig. 5-7. Protein concentration(mg/ml) of *Phellinus gilvus* grown on the various tree and sawdust

사. 마른진흙버섯 처리별(*Phellinus gilvus*) 항암활성비교

항암활성은 쥐의 육종 180 암세포주(murine sarcoma 180 cells)에서 SRB(sulforhodamine B) 방법으로 측정하였다. 96 well plate의 각 well에 1×10^4 의 세포가 포함된 180 μ l의 RPMI 1640 배지(페니실린 10,000 units/ml, 스트렙토마이신 10 mg/ml 및 10% FBS)를 가하여 37°C, 5% CO₂ 가스 존재 하에서 24시간 배양하였다. 상기 실시 예에서 제조한 진흙버섯 열수 추출물을 PBS로 희석하여 5가지 농도로 만들고 각각 20 μ l씩 배지에 가하여 48시간 더 배양하였다. 배양이 종료된 후 50 μ l의 차가운 50% TCA(trichloroacetic acid)를 위에서부터 천천히 가해 주고 잠시 기다린 후 냉장고로 옮겨 1시간 동안 충분히 고정시키고, 고정이 끝난 후에는 증류수로 5회 이상 세척하여 0.4% SRB 용액 100 μ l를 가하여 상온에서 30분 이상 염색하였다. 염색이 끝난 후 1% 아세트산으로 5회 세척하여 잘 건조시키고, 150 μ l의 10 μ M 완충 안 된 Tris 용액으로 SRB 염료를 잘 녹여내어 96 웰 플레이트용 microstate reader로 490 nm의 범위에서 흡광도를 측정하였다.

진흙버섯 처리별 추출물을 5개 농도로 하여 SRB법으로 P388D1에 대해서 항암활성을 측정하였다. 그 결과를 Fig. 5-8.과 Fig. 5-9.에 처리별 추출물의 IC₅₀으로 나타내었다. 저농도에서 각 암세포주에 대해 진흙버섯의 각 처리별 추출물의 항암활성은 큰 차이를 보이지 않았다. 고농도에서 sarcoma 180에 대해서는 70~80%의 항암활성을 보였고, P388D1에서는 90~95%의 항암활성을 보여 각각의 처리물에 있어 고농도에서 높은 항암활성을 보였다.

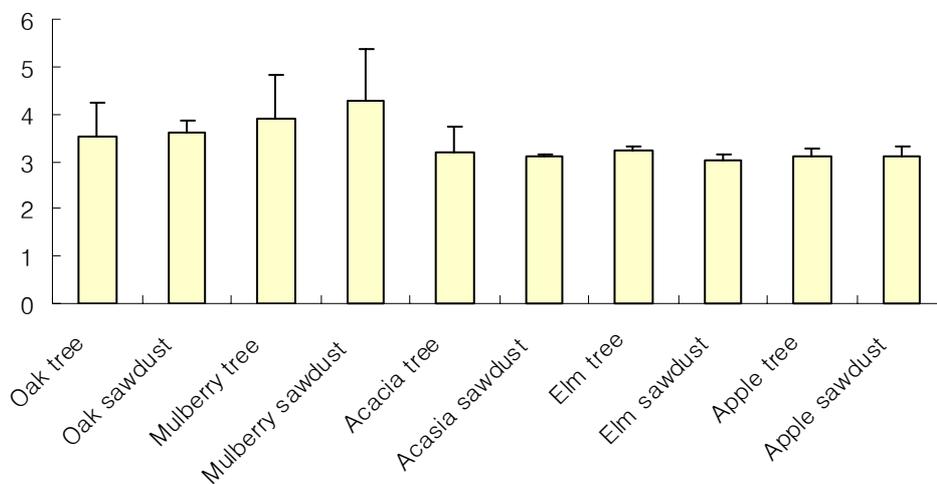


Fig. 5-8. Anti-cancer activity against P388 cell line of *Phellinus gilvus* grown on the various tree and sawdust.

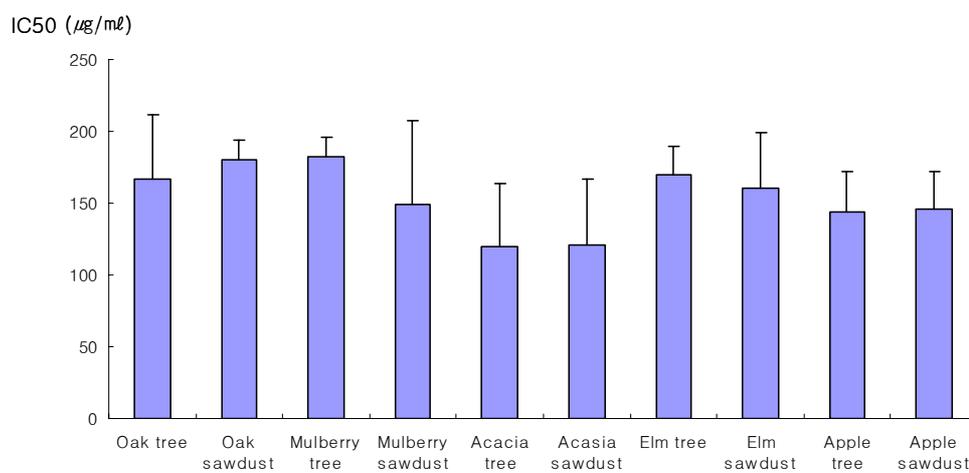


Fig. 5-9. Anti-cancer activity against P388 cell line of *Phellinus gilvus* grown on the various tree and sawdust.

6. 마른진흙버섯(*Phellinus gilvus*)으로부터 단백다당체의 추출물과 기존의 항암제에 대한 상호작용

기존 항암제와의 병용시 항암활성은 위에 기술한 SRB법으로 측정하였다. 세포주 P388에 대한 기존 항암제인 doxorubicin(Dox)과 마른 진흙버섯 자실체 추출물 단독의 항암활성을 SRB 법으로 알아보았다. 그 결과 Fig. 6-1.과 6-2.에 나타난 것처럼 dox $IC_{50} = 0.1 \mu\text{m}$, *Phellinus gilvus* 1 = $75 \mu\text{g/ml}$ 로 나타나 이 농도를 1로 하여 실험하였다.

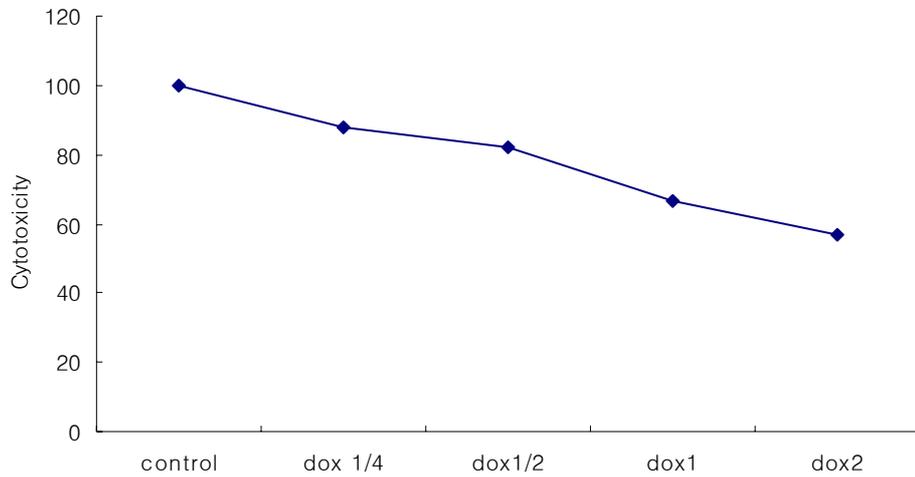


Fig. 6-1. Cytotoxicity of doxorubicin against P388 cell line.

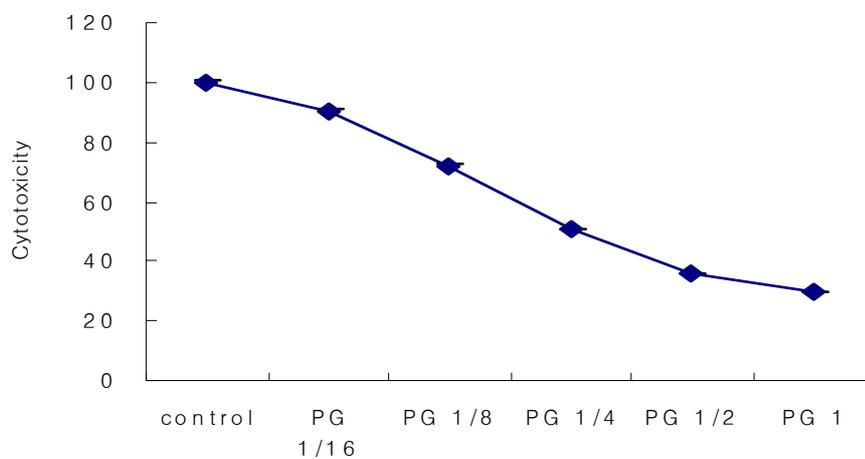


Fig. 6-2. Cytotoxicity and *Phellinus gilvus* extract against P388 cell line.

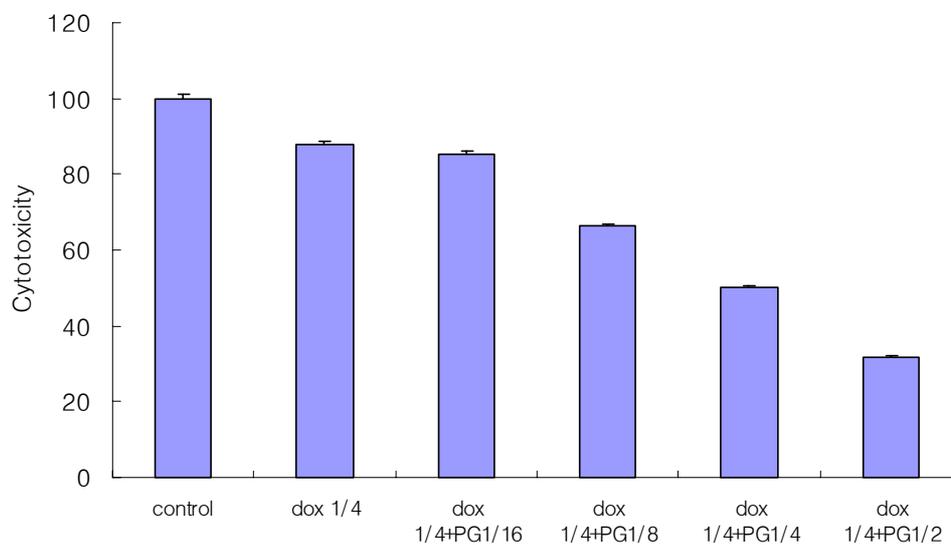


Fig. 6-3. Anti-tumor activity of doxorubicin in combination with *Phellinus gilvus* extract against P388 cell line.

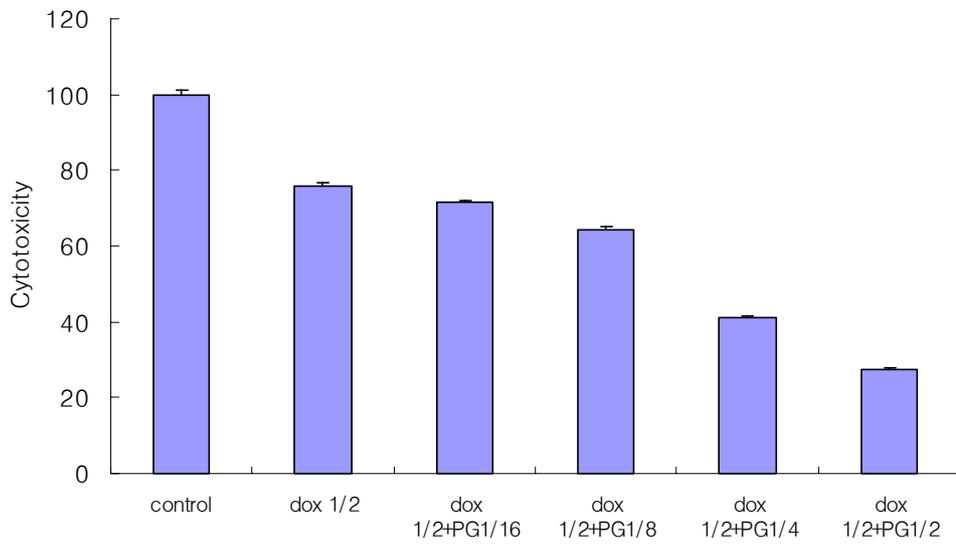


Fig. 6-4. Anti-tumor activity of doxorubicin in combination with *Phellinus gilvus* extract against P388 cell line.

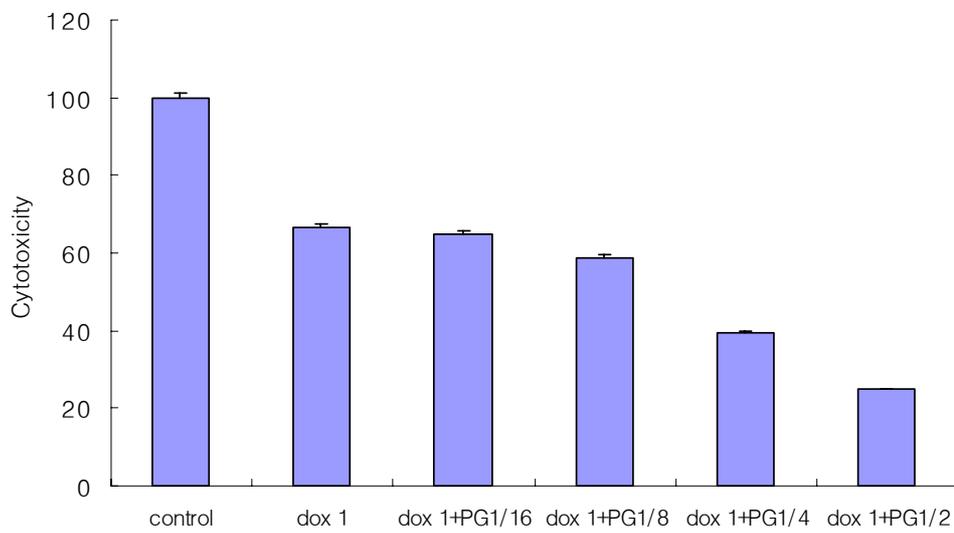


Fig. 6-5. Anti-tumor activity of doxorubicin in combination with *Phellinus gilvus* extract against P388 cell line.

마른진흙버섯의 추출물이 dox의 IC₅₀ 농도 1, 1/2 그리고 1/4에서 항암활성을 측정 한 결과 dox의 항암 활성에는 영향을 미치지 않고 있다. dox 1/2 농도에서 PG의 농도가 증가할 수록 항암활성은 증가하는 것을 보여주었다. dox 1/2 + PG 1/8은 dox 1가 유사한 20% 정도의 항암활성을 보여주었다. 이러한 결과로부터 PG는 dox의 항암활성을 상가시키는 작용을 보여준다. dox1/2 + PG1/4의 합제에서는 dox1 보다 항암활성이 더 높게 나타났다. 따라서 PG의 사용은 항암제에서 항암제의 부작용을 낮추어주고 독성을 억제시켜 증 가능성을 보여주고 있다. 그러나 dox 1과 PG 1/2의 합제와 dox 1/2과 PG 1/2의 항암활성은 서로 비슷한 수치를 보여주고 있다. 이에 대한 연구는 더욱 보완이 요구된다(Fig. 6-3., 6-4. and 6-5.). Fig. 6-3., 6-4., 6-5.는 dox 1, dox 1/2 그리고 dox 1/4에서 각각 억제정도를 보면 40%, 20%, 그리고 10% 정도의 증식억제를 보여주었다. 이 결과로부터 PG는 dox의 항암작용에 최소한 길항작용은 일어나지 않는 것으로 나타났다. Fig. 6-7.에서 6-12.에서 보여주는 것처럼 Sarcoma 180을 이용할 때에도 dox 1의 효과는 dox 1/2 + PGE 1/2로 같은 효과를 보여주고 있다. 이 연구결과 PGE는 dox의 용량을 감소시킬 수 있는 상가작용을 보여주었다.

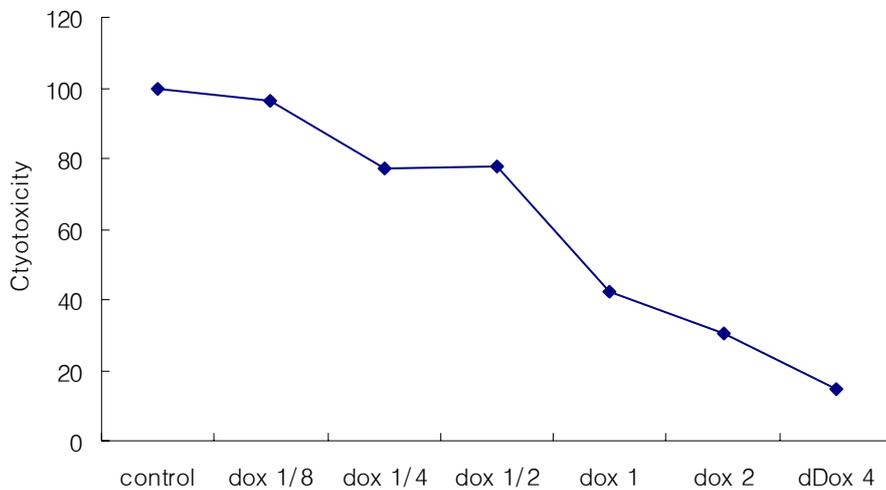


Fig. 6-6. Cytotoxicity of doxorubicin against Sarcoma 180.

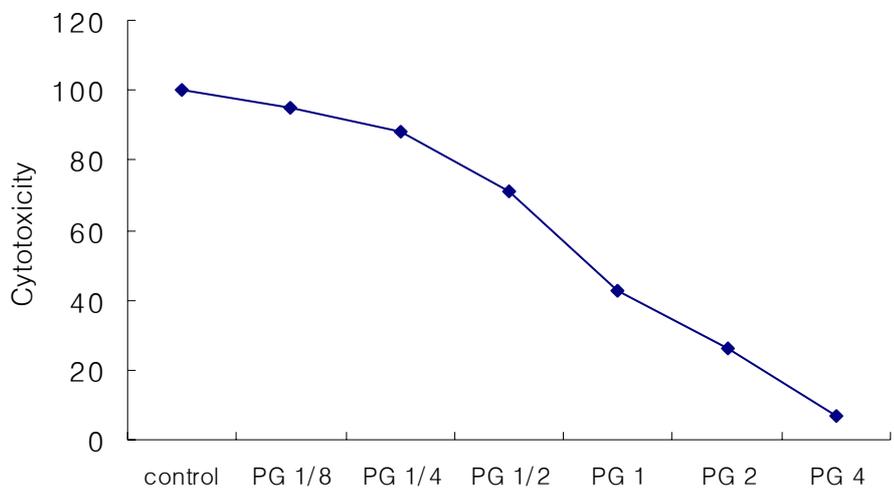


Fig. 6-7. Cytotoxicity of *Phellinus gilvus* extracts against Sarcoma 180.

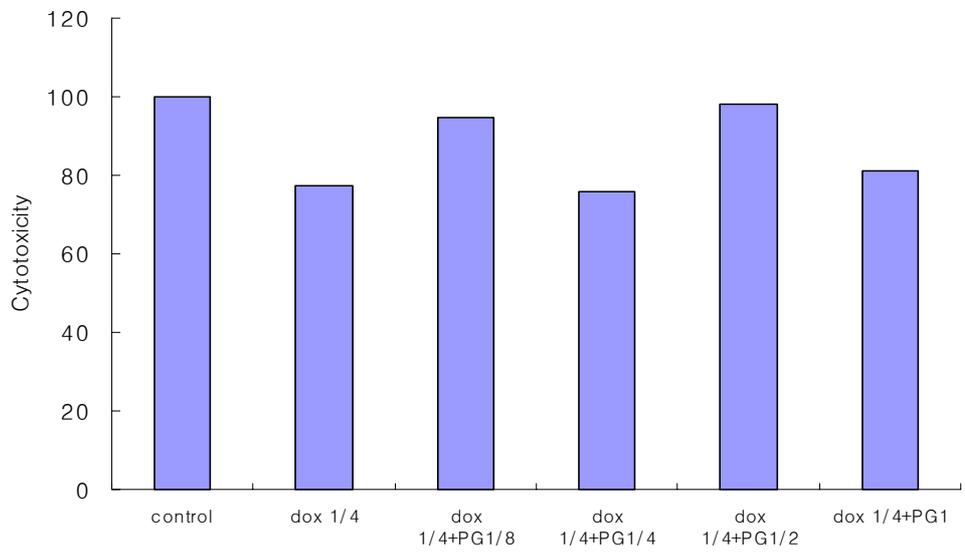


Fig. 6-8. Anti-tumor activity of dox 1/4 in combination with doxorubicin(dox) extracts.

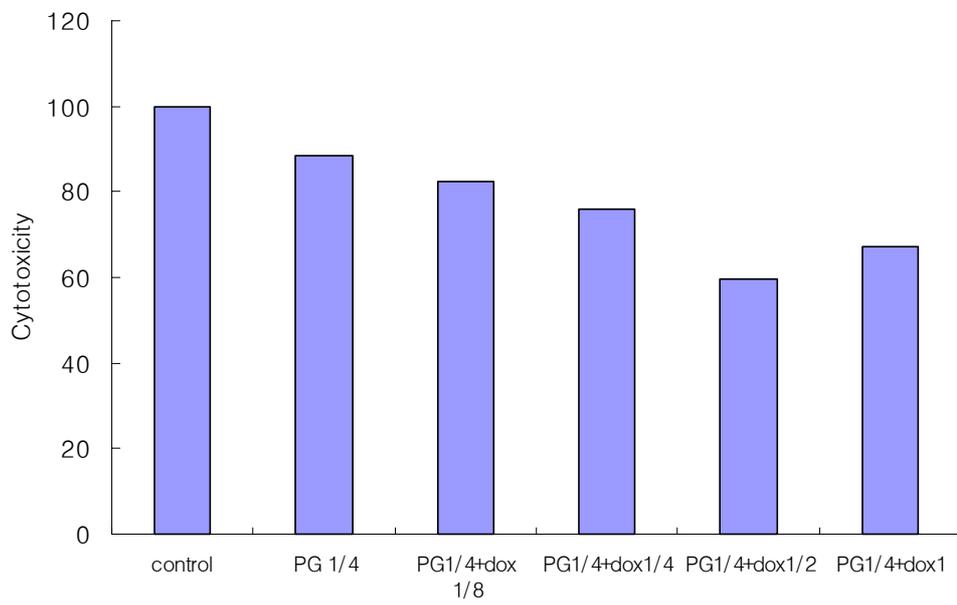


Fig. 6-9. Anti-tumor activity of PG 1/4 in combination with doxorubicin(dox) extracts.

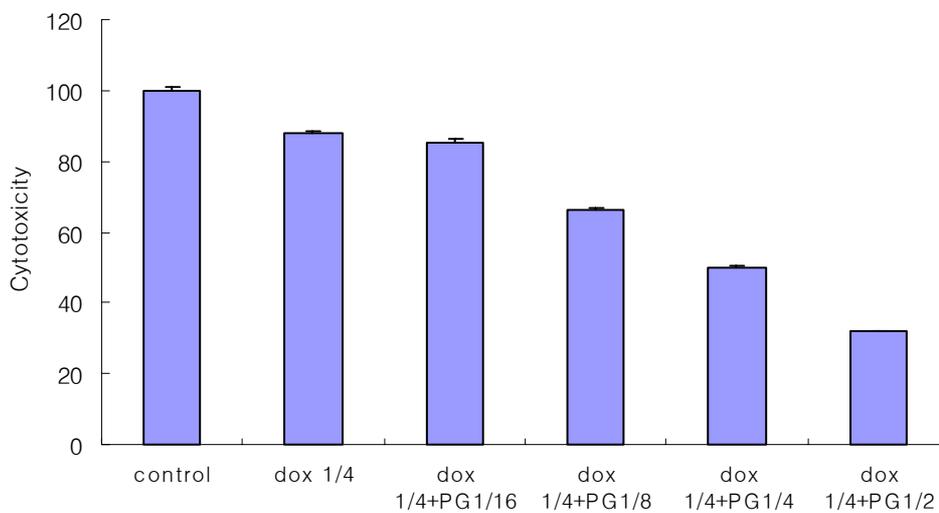


Fig. 6-10. Anti-tumor activity of dox1/4 in combination with *Phellinus gilvus*(PG) extracts against Sarcoma 180.

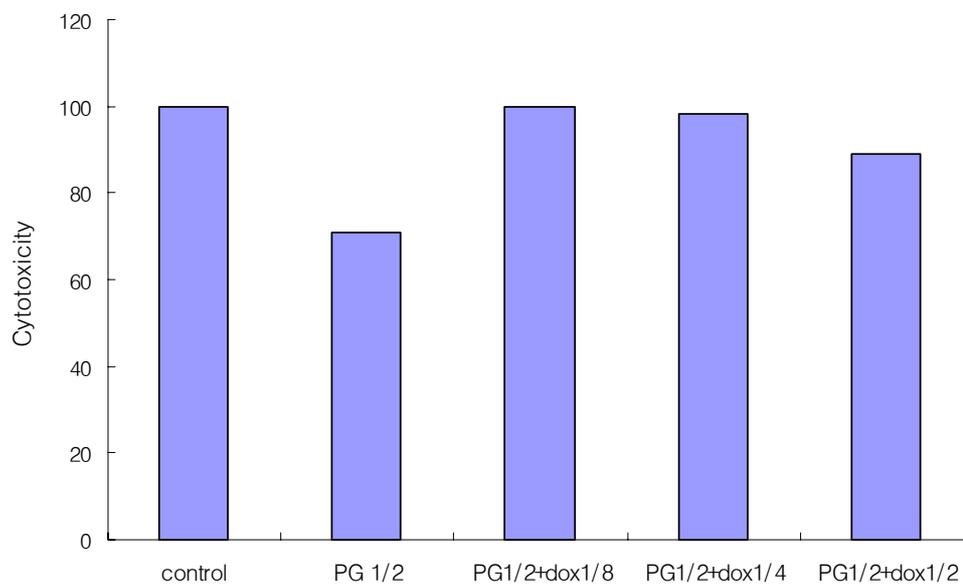


Fig. 6-11. Anti-tumor activity of PG1/2 in combination with *Phellinus gilvus*(PG) extracts against Sarcoma 180.

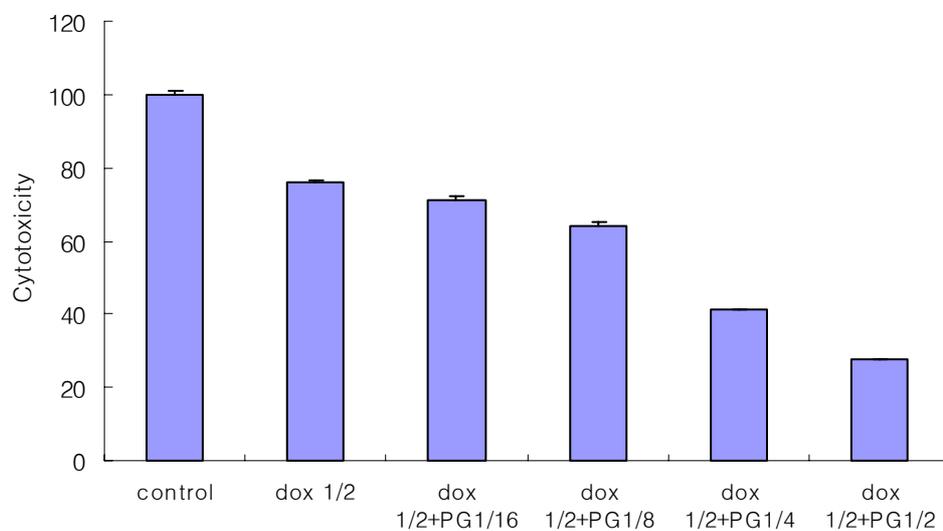


Fig. 6-12. Anti-tumor activity of dox1/2 in combination with *Phellinus gilvus*(PG) extracts against Sarcoma 180.

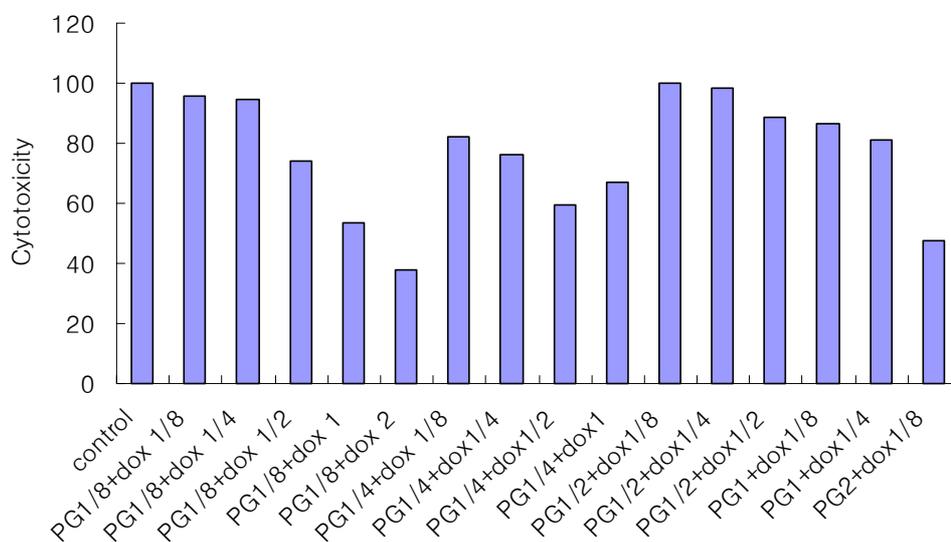


Fig. 6-13. Anti-tumor activity of PG-dox combination against Sarcoma 180.

PG 1/8 + dox 2와 PG 2 + dox 1/8의 병용투여로 암세포 증식은 37%와 47%로 비슷한 효과를 보여주어 dox의 효과를 높여주는 결과로 나타났다(Fig. 6-13.). 그러나 dox의 농도에 의해 항암활성이 증가되는 결과를 보여 PG는 항암보조요법으로 가치가 있을 것으로 생각된다.

7. 마른진흙버섯(*Phellinus gilvus*)로부터 추출한 다당체의 독성시험

가. 치사율 및 임상증상

Table 7-1.과 7-2.에 나타난 것처럼 14일 동안 가장 높은 용량에서도 죽은 쥐는 한 마리도 없었으며 LD₅₀ 는 5,000 mg/kg 이상인 것으로 나타났다.

나. 체중의 변화

PGE 투여 후 14일 동안 체중의 변화를 관찰한 결과 대조군과 통계학적 유의성을 관찰할 수가 없었다(Table 7-3.).

다. 사료소비량 및 음수량

사료 및 음수소비량을 14일 동안 관찰하였다. 평균 사료소비량은 5,000 mg/kg 에서 암컷과 수컷에서 초기에 약간 감소하였다. 중간 용량인 2,000 mg/kg 이하에서 용량에 관계없이 감소하였다. 그러나 통계적인 차이는 없었다. 음수소비량도 암컷과 수컷에서 차이점은 발견할 수가 없었다(Table 7-4., 7-5.).

라. 육안적 소견(Gross pathological findings)

실험이 종료되는 14일째 모든 rat를 도살하여 heart, lung, liver, stomach, intestine, kidney, adrenal gland, spleen, ovary, testis를 육안적으로 관찰한 결과 병리학적인 소견은 관찰할 수가 없었다(Table 7-6.).

Table 7-1. Mortality of male and female rats orally treated with PGE

Sex	Dose (mg/kg)	Day 0	Day 1	Day 2	Day 3	Day 4	Day 5	Day 6	Day 7	Day 8	Day 9	Day 10	Day 11	Day 12	Day 13	Day 14
Male	0	*0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
	500	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
	1,000	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
	2,000	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
	5,000	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
Female	0	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
	500	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
	1,000	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
	2,000	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
	5,000	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5

Table 7-2. Abnormal clinical signs in rats orally treated with PGE

Sex	Dose(mg/kg)	observations	Range
Male	0	Appears normal	Day0-Day14
	500	Appears normal	Day0-Day14
	1,000	Appears normal	Day0-Day14
	2,000	Appears normal	Day0-Day14
	5,000	Appears normal	Day0-Day14
Female	0	Appears normal	Day0-Day14
	500	Appears normal	Day0-Day14
	1,000	Appears normal	Day0-Day14
	2,000	Appears normal	Day0-Day14
	5,000	Appears normal	Day0-Day14

Table 7-3. Body weight of rats orally treated with PGE(mean)

Sex	Dose (mg/kg)	Day 0	Day 1	Day 2	Day 3	Day 4	Day 5	Day 6	Day 7	Day 8	Day 9	Day 10	Day 11	Day 12	Day 13	Day 14
Male	0	132	147	154	165	174	182	190	196	205	213	223	232	232	243	248
	500	134	149	1597	170	180	189	196	202	212	218	228	238	241	250	260
	1,000	134	149	159	167	179	187	196	202	209	216	223	231	237	242	255
	2,000	134	147	157	167	177	185	193	201	208	216	224	231	236	243	248
	5,000	134	149	156	166	175	183	191	199	206	215	224	230	237	244	248
Female	0	114	125	131	136	144	156	151	154	157	161	165	169	172	177	179
	500	111	123	129	136	142	146	149	153	154	157	159	162	166	167	173
	1,000	111	123	131	137	143	147	153	153	158	162	166	172	173	178	180
	2,000	114	125	131	136	141	146	151	153	158	162	164	169	170	174	178
	5,000	111	125	131	135	142	148	151	154	158	163	166	169	169	174	178

Table 7-4. Food consumption of rats orally treated with PGE(300g-g of residual in cage/the number of animals per groups)

Sex	Dose (mg/kg)	Day 1	Day 2	Day 3	Day 4	Day 5	Day 6	Day 7	Day 8	Day 9	Day 10	Day 11	Day 12	Day 13	Day 14
Male	0	20.2	16.3	20.3	16	19.7	18.9	19.2	20.3	19.3	21.7	18.9	21.6	20.3	22.2
	500	21	17.3	21.3	16.3	22.1	20.8	19.5	22	18.9	21.2	19.9	22.1	21.1	22.3
	1,000	20.5	17.9	20.2	17.2	20.3	19.3	20.2	19.5	18.3	19.8	18.5	20.4	18.5	20.7
	2,000	19.8	16.9	20.5	17.1	20.2	19.7	20.9	19.9	19.5	21.6	19	21.3	21	21.3
	5,000	15.5	16.9	20.2	14.7	20.8	19.5	19.8	20.7	19.8	22.2	18.4	22.8	21	21.2
Female	0	17.4	13.2	15.2	12.1	16.4	15.2	14.4	15.2	14.8	15.5	13.5	14.1	16.3	16.2
	500	16.9	13.7	16.7	13	15.4	14.7	14	13.6	12.7	13.8	11.6	15	13.3	14.5
	1,000	15.4	14.7	16.6	13.3	17	15.6	14.1	14	14.6	14.7	13.4	14.9	15.7	16.4
	2,000	16.3	13.5	16	12.9	15.8	16.3	14.6	14.9	14.2	14.4	13.9	15.7	15.7	16
	5,000	17.2	14.6	16.9	13.6	17.1	15.7	15.3	15.4	14.6	15.9	12.1	15.3	14	15

Table 7-5. Water consumption of rats orally treated with PGE(480ml/ml of residual in cage / the number of animals per groups)

Sex	Dose (mg/kg)	Day 1	Day 2	Day 3	Day 4	Day 5	Day 6	Day 7	Day 8	Day 9	Day 10	Day 11	Day 12	Day 13	Day 14
Male	0	32	22	30	25	27	27	24	27	30	32	27	27	28	28
	500	38	24	36	27	31	29	28	31	31	39	32	34	34	32
	1,000	31	24	28	25	27	27	26	25	27	31	27	28	28	28
	2,000	34	26	31	27	33	26	30	29	27	35	29	28	27	28
	5,000	30	26	31	28	25	25	35	25	29	31	23	30	26	28
Female	0	30	23	26	24	26	24	23	25	29	32	24	25	28	28
	500	30	24	29	25	27	27	26	25	27	31	27	28	28	28
	1,000	28	24	26	21	24	22	18	19	23	26	20	22	23	24
	2,000	26	22	27	23	25	29	22	26	28	28	26	28	27	28
	5,000	30	22	26	24	24	21	21	20	22	25	20	20	21	24

* Pathological finding incidences / the number of animals per group

Table 7-6. Gross pathological findings of rats orally treated with PGE

Sex	Dose(mg/kg)	Pathological findings	Frequency
Male	0	No gross findings	0/5*
	500	No gross findings	0/5
	1,000	No gross findings	0/5
	2,000	No gross findings	0/5
	5,000	No gross findings	0/5
Female	0	No gross findings	0/5
	500	No gross findings	0/5
	1,000	No gross findings	0/5
	2,000	No gross findings	0/5
	5,000	No gross findings	0/5

8. *Phellinus gilvus*로부터 단백다당체를 이용한 기능성제품을 위한 기초연구(랫드에서 진흙버섯 자실체의 열수 추출물이 급성 호흡기 염증 반응 억제에 미치는 효과)

일반적으로 리포폴리사카라이드는 사람 또는 동물에서 염증반응을 일으켜 여러 질병의 원인이 되며, 호흡기에 염증이 생기면 백혈구 수가 증가하게 된다. Table 8-1.에 나타난 바와 같이, LPS를 투여한 실험군1에서 총백혈구의 수는 생리적 식염수를 투여한 대조군에 비하여 8배 증가하였다. 그러나 진흙버섯 자실체의 열수 추출물로 전처리한 후, LPS를 투여한 실험군2에서는 대조군보다도 백혈구의 수가 오히려 감소하였다. 또한, 중호성 백혈구 수에 있어서도 총 백혈구 수와 같은 양상의 결과를 보여주었다. 따라서 진흙버섯 자실체의 열수 추출물은 백혈구의 수를 감소시킴으로, 급성 호흡기 염증 억제 효과가 우수함을 알 수 있다.

Table 8-1. Total of white cells and neutrophils in bronchial lavage fluid after saline-challenge(Control), extracts of *Phellinus gilvus*(PGE) and *Phellinus baumii*(PBE) pretreatment prior to lipopolysaccharide-challenge, and lipopolysaccharide-challenge(LPS).

Groups	Total cells(x10 ⁶)	Neutrophils(x10 ⁶)
Controla	0.30 ± 0.10*	0.09 ± 0.06*
PBEb	0.28 ± 0.14*	0.05 ± 0.03*
PGEc	0.20 ± 0.10*	0.04 ± 0.01*
LPSd	2.44 ± 0.39	1.82 ± 0.34

Data are expressed as mean ± SEM. aControl(n=6) was treated by saline. Extracts of *Phellinus baumii*(bPBE, n=6) or *Phellinus gilvus*(cPGE, n=6) were pretreated with 20 mg/kg body weight before 50 µg lipopolysaccharide-challenge. The rats were anesthetized and sacrificed 4 h later and then bronchial lavage fluids were collected. *P < 0.05 compared with LPS was significant.

TNF-α와 IL-1β는 염증반응의 시초로 neutrophil의 생성, platelet-activating factor

의 유도, 발열작용, 그리고 국소 혈류흐름의 감소등을 유발한다(Makristathis 등, 2002; Warren, 1990). 본 연구에서는 LPS로 처리한 랫드의 기관지액에서 TNF- α 와 IL-1 β 가 유의성있는 증가를 보여주었다(Table 8-2.). TNF- α 의 농도는 실험군1 및 실험군2에서 대조군보다 증가하여, 본 연구의 진흙버섯 자실체의 열수 추출물이 염증반응에 영향을 미치지 않음을 알 수 있다. 이때 측정 한계치는 TNF- α 는 12 pg/ml, IL-1 α 는 32 pg/ml 이었다. IL-1 β 는 급성 호흡기 염증 반응 시 지표가 된다(Spond 등. 2003). 측정 결과는 Table 8-2.에 나타내었다. 또한, IL-1 β 의 농도는 실험군1에서 대조군보다 3배 정도 증가하였고, 실험군2에서는 대조군보다 1.7배 정도 증가하여, 본 발명의 진흙버섯 자실체의 열수 추출물이 염증반응을 효과적으로 억제함을 알 수 있다.

Table 8-2. TNF- α and IL-1 β in bronchial lavage fluid after saline-challenge(Control), extracts of *Phellinus gilvus*(PGE) and *Phellinus baumii*(PBE) pretreatment prior to lipopolysaccharide-challenge, and lipopolysaccharide-challenge(LPS).

Groups	TNF- α (pg/ml)	IL-1 β (pg/ml)
Controla	200 \pm 180	220 \pm 98**
PBEb	1,360 \pm 120*	380 \pm 46**
PGEc	1,280 \pm 140*	340 \pm 64**
LPSd	1,180 \pm 140*	650 \pm 76*

Data are expressed as mean \pm SEM. aControl(n=6) was treated by saline. Extracts of *Phellinus baumii*(bPBE, n=6) or *Phellinus gilvus*(cPGE, n=6) were pretreated intraperitoneally with 20 mg/kg body weight before 50 μ g lipopolysaccharide-challenge. The rats were anesthetized and sacrificed 4 h later and then bronchial lavage fluids were collected. *P < 0.05 compared with Control was significant. **P < 0.05 compared with LPS was significant.

9. *Pellinus baumii*, *Pellinus gilvus*, 그리고 *Phellinus Linteus*로부터 단백당체를 이용한 기능성제품 연구(단백당체 추출물에 대한 면역활성 비교)

T 세포, B 세포와 함께 adaptive immunity에 중요한 역할을 수행하는 거식세포의 기능을 측정하는 방법으로 거식세포가 형광을 띄고 있는 bead를 얼마나 탐식할 수 있는지를 측정하여 시험물질이 거식세포의 탐식기능에 어떠한 영향을 주는지 측정하였다. 거식세포로는 SD rat의 복강에서 얻은 peritoneal 거식세포와 Abelson murine leukemia virus가 감염되어 종양화된 BALB/c 마우스 유래 거식세포주인 RAW264.7을 사용하였다. 복강유래 거식세포는 정상세포이므로 보다 정확한 정보를 얻을 수 있으나 랫드에서 분리하여야하는 번거러움과 시험군간의 차이가 발생하는 단점이 있어 마우스 거식세포주인 RAW264.7을 사용하는 방법으로 시험법을 변경하였다. 거식세포의 탐식능 활성은 세포 당 fluorescence를 flow cytometry를 이용하여 세포 당 평균 형광도로 표현하여 측정하였다. Fig. 9-1.과 9-2.은 복강유래 거식세포를 사용하여 측정한 진흙버섯 추출물들이 거식세포 기능에 미치는 영향을 조사한 시험결과이다. 시험물질을 배양액에 8, 16, 32 및 64 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 처리하고 24시간 배양 후 측정된 fluorescent bead 탐식능 활성 결과이다. 이 결과에서는 PG > PB > PL의 순으로 거식세포 기능을 향진하는 효능이 관찰되었다. RAW264.7을 사용하는 시험법으로 거식세포 탐식능에 미치는 영향을 조사한 결과들은 Fig. 9-3.과 9-4.에 표시하였다. 처리기간에 따른 변화를 살펴보기 위하여 PG, PB, PL을 32 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 24시간 및 48시간 동안 처리하고 RAW264.7 세포의 탐식능을 조사한 결과 48시간 배양한 결과가 랫드 복강유래 거식세포에서 얻은 결과와 보다 유사한 결과를 얻어 거식세포 활성유도 정도의 순서가 일치하였다.

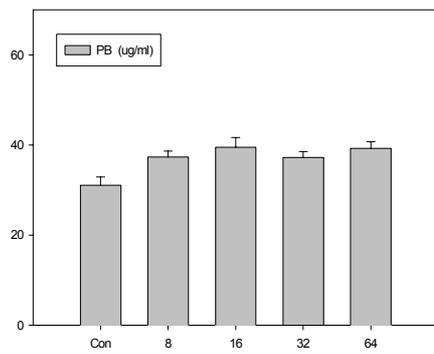
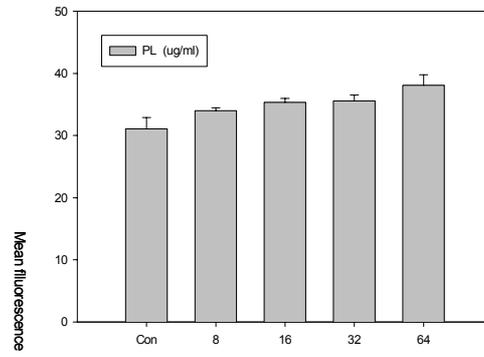
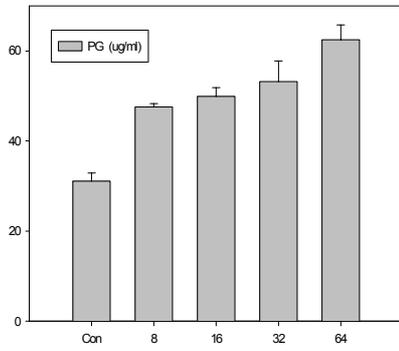


Fig. 9-1. Effects of polysaccharides isolated from *Phellinus* spp. (PG, PB and PL) on in vitro phagocytosis response of RAW264.7 cell lines.

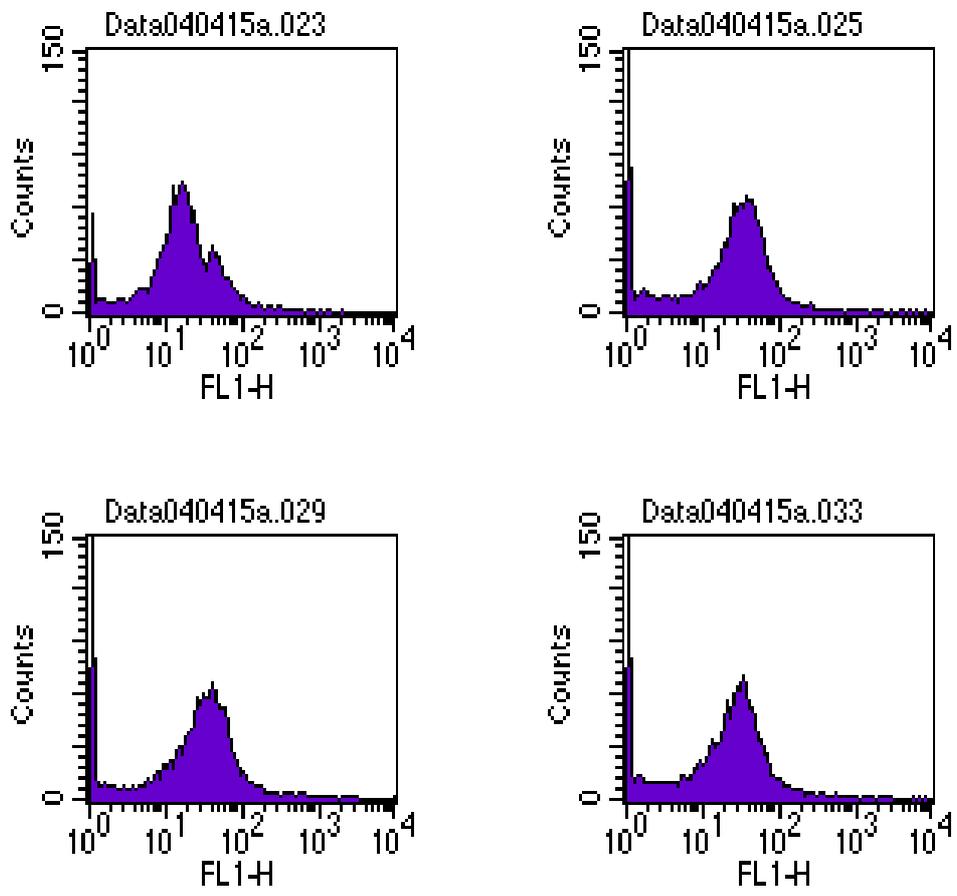
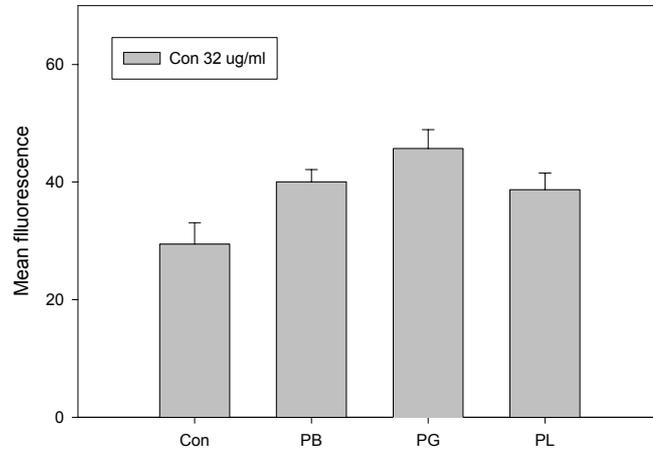
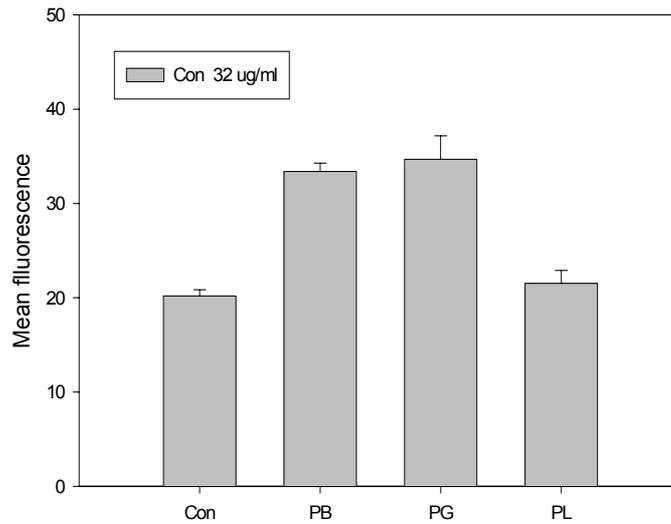


Fig. 9-2. Macrophage activity of RAW 264.7 cell treated 24h



24 시간 배양



48 시간 배양

Fig. 9-3. Effects of polysaccharides isolated from *Phellinus* spp.(PG, PB and PL) on in vitro phagocytosis response of RAW264.7 cell lines for 24 h and 48 h incubation.

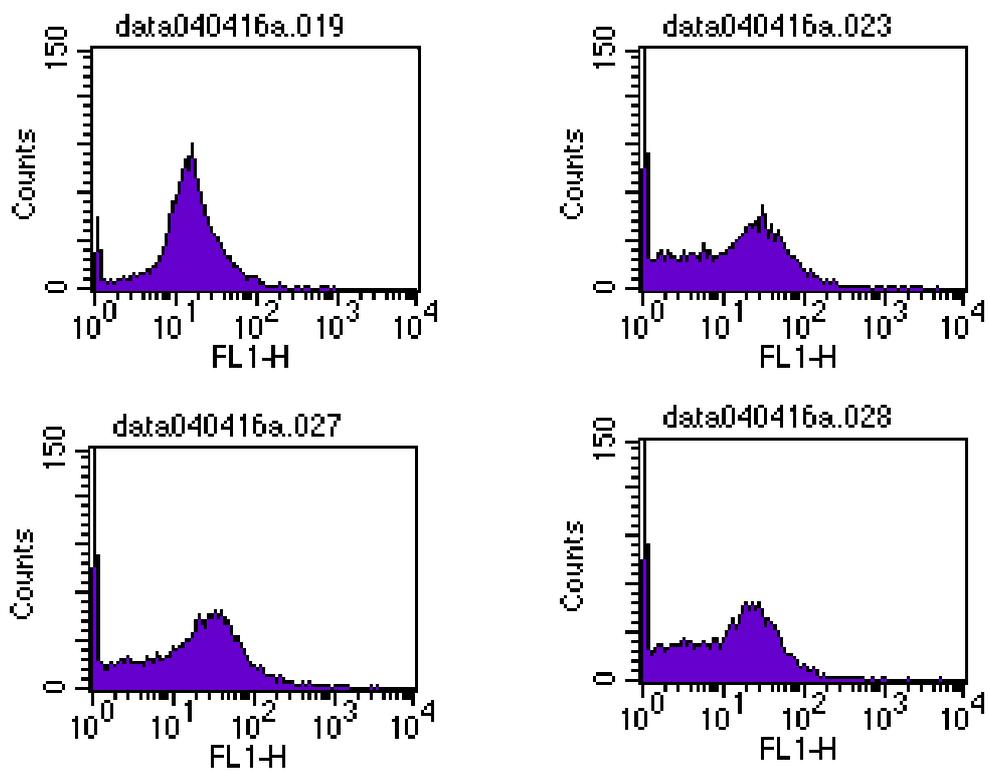


Fig. 9-4. Macrophage activity of RAW 264.7 cell treated 48h

10. *Phellinus gilvus*로부터 열수 단백질 추출물을 이용한 기능성제품의 항암 활성 비교 및 사염화탄소에 의한 간보호 효과

가. 마른진흙버섯 추출물의 종양 억제 효과

마른진흙버섯 자실체의 열수추출물은 Sarcoma 180 고형암을 이식한 마우스에 7일간 0.5(고형분) g/kg의 용량에서부터 항암 효능을 나타내어 종양의 크기를 37%까지 감소시켰다.

Table 10-1. Anti-tumor activity of *Phellinus gilvus* hot water extract in mice

Groups	No treatment	0.25 g/kg	0.5 g/kg	1.0 g/kg	2.0 g/kg
Weight of tumor(g)	3.2±0.4	3.1±0.3	2.3±0.4*	2.0±0.33*	1.60±0.2**

Mean±S.D.

*P < 0.05, **P < 0.01

나. 간보호효과

간독성에 대한 효과 검증을 위하여 사염화탄소를 이용하여 검증하는 동물모델을 많이 이용하여 왔다. 본 연구에서도 마른진흙버섯 추출물을 투여 후 사염화탄소로 간독성을 유도 시 간병변과 생화학치의 변화를 조사하였다.

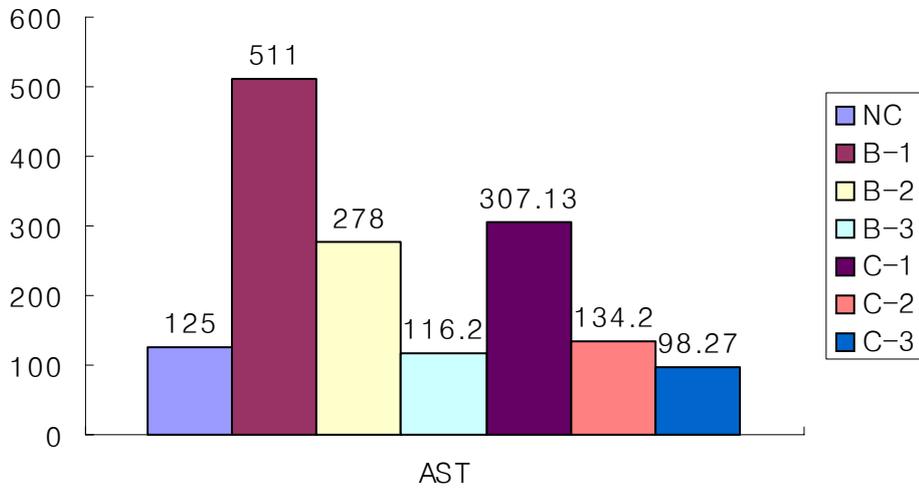


Fig. 10-1. Effect of *Phellinus gilvus* extract on AST in rats

AST(Aspartate aminotransferase)는 주로 간, 근육세포, 적혈구내에 존재하는 효소로 이들 세포의 괴사, 파괴에 의해 혈중으로 유출된다. 그러므로 혈중 AST 활성 증가는 간세포, 근육, 적혈구의 괴사, 파괴 정도를 반영한다. 증가시 예상되는 질환으로는 급.만성간염, 총담관 결석, 심근경색, 지방간, 간경변, 간세포암, 폐색성 황달, 근육 질환, 용혈성 질환 등이 있다. 위 그래프에서 정상군과 CCl₄를 투여하여 3일간 매일 관찰한 대조군인 B-1, B-2, B-3와, basal diet와 CCl₄에 PGE를 같이 투여하여 3일간 관찰한 C-1, C-2, C-3 실험군을 비교해 볼 수 있다. 대조군인 NC는 약 125 IU/dl의 수치를 나타내고 있다. B-1과 C-1을 비교하는 경우, C-1은 B-1에 비해 약 2배 정도 낮은 수치를 기록하고 있다. B-2와 C-2의 경우 역시 약 C-2가 B-2에 비해 약 2배 정도 더 낮은 AST 값을 나타내고 있는 것으로 보아 PGE가 간세포의 괴사나 파괴를 막음으로써 간보호에 일정한 역할을 하고 있음을 시사한다. B-3와 C-3의 경우에는 미약한 차이이긴 하나 역시 C-3가 더 낮은 AST 값을 나타내고 있다.

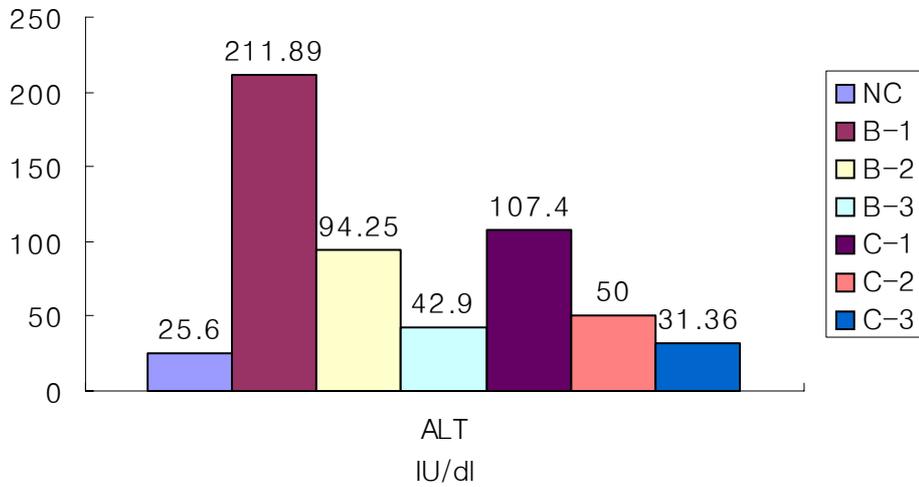


Fig. 10-2. Effect of *Phellinus gilvus* extract on ALT in rats

ALT(Alanine aminotransferase)는 주로 간세포내에 존재하는 효소로 간세포 괴사, 파괴로 인해 혈중으로 유출된다. 그러므로 ALT 활성 증가는 간세포 괴사, 파괴 정도를 반영한다. 증가시 예상되는 질환으로는 급.만성간염, 지방간, 폐색성 황달, 간경변, 간세포암 등이 있다. ALT 값 역시 B-1과 C-1, B-2와 C-2를 비교해 볼 때, PGE 투여군이 비투여군에 비해 약 절반정도의 값을 나타내고 있다. 3일째인 B-3와 C-3는 그 차이는 크지 않으나 C-3의 ALT수치가 더 낮게 나타나며, B-3의 경우는 기본적인 사료 외에 아무것도 투여하지 않은 대조군 NC에 비해 약 2배의 ALT수치를 나타내고 있다.

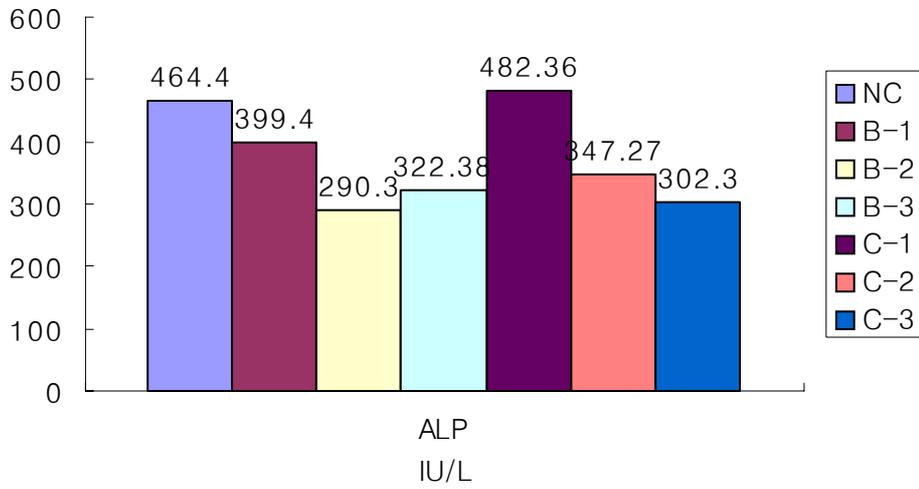


Fig. 10-3. Effect of *Phellinus gilvus* extract on ALT in rats

ALP는 신체 각 조직중에 존재하며 간, 신장, 소장, 골, 태반 등에 존재하여 담즙을 체시에 담즙중으로 배설되며 담즙으로의 배설장애와 담관내압항진에 의한 간에서의 생성증가에 의하여 혈중에서 증가되는 효소로, 간염 간경변증 등의 질환에서 진단 및 예후를 관찰할 수 있다(김 등, 1992년).

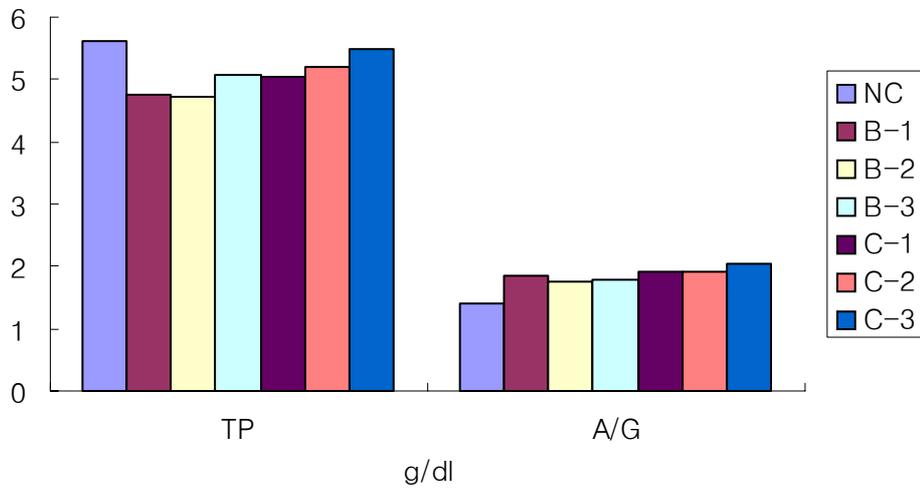


Fig. 10-4. Effect of *Phellinus gilvus* extract on TP and A/G in rats

TP(Total protein)는 혈청총단백으로써, 혈청 중의 100여종 단백질의 총합이며, 간 질환 시 알부민 등 간 단백질이 저하된다. 위 그래프에서 TP의 경우 PGE 비투여군인 B군에서 수치가 비교적 낮게 나타났으며, PGE 투여군인 C군에서는 C-1, C-2, C-3 순으로 날짜가 지날수록 TP 수치가 대조군인 NC의 수치와 비슷하게 회복되고 있다. A/G(Albumin/Globulin ratio)는 간 질환 시 알부민은 감소하고 면역 항체인 글로불린은 상승하게 된다.

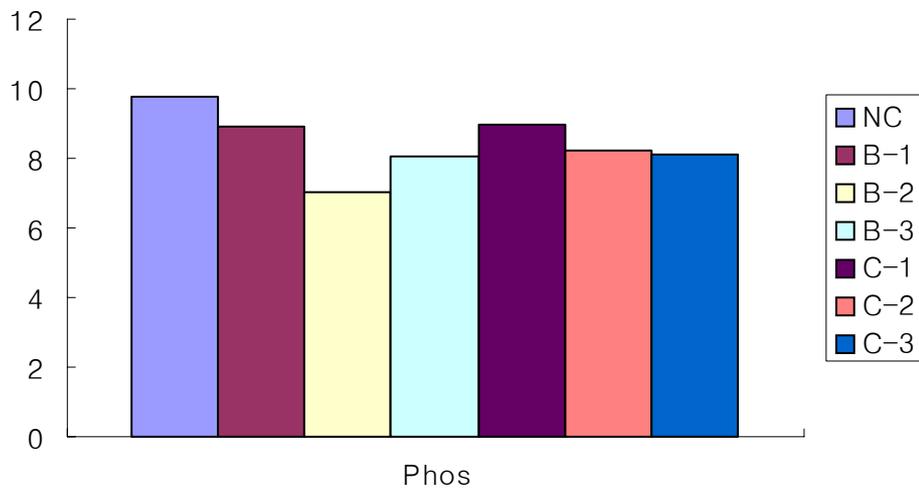


Fig. 10-5. Effect of *Phellinus gilvus* extract on P in rats

인(Phosphate)은 뼈의 근간이 되는 미네랄이며, 이 수치가 높다면 뼈가 용해되고 있다는 것을 나타낸다. PGE 비투여군 B 군에서는 2일째인 B-2에서 감소가 나타났으나, B-3에서는 다시 상승하였다. PGE 투여군인 C군에서는 근소한 차이는 있으나, 전체적으로 비슷한 수치를 나타내었다.

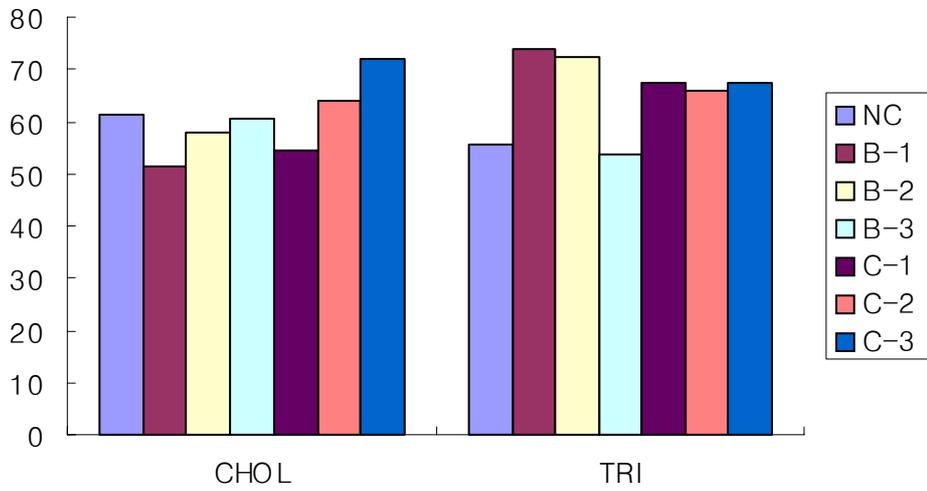


Fig. 10-6. Effect of *Phellinus gilvus* extract on CHOL and TRI in rats

고지질인 혈액 CHOL(Cholesterol)와 TRI(Triglyceride)의 군간 차이점을 관찰 할 수가 없었다.

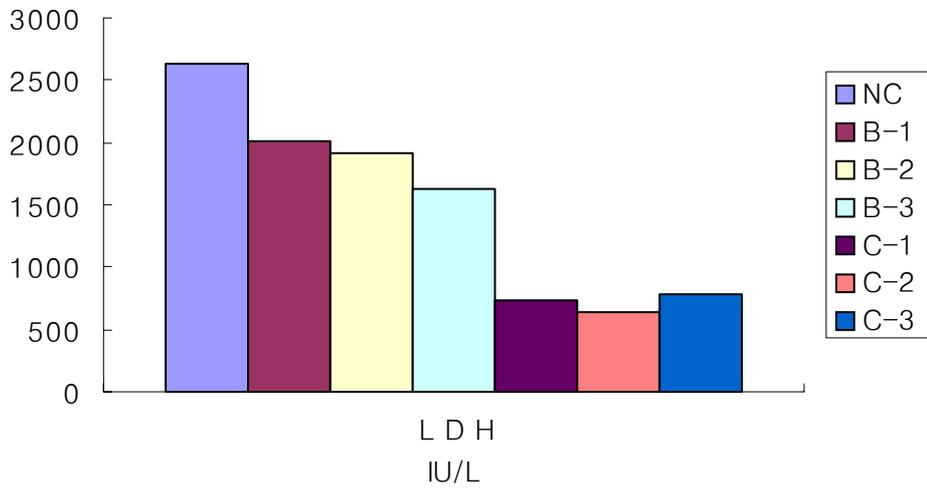


Fig. 10-7. Effect of *Phellinus gilvus* extract on LDH in rats

LDH(lactate dehydronase)는 간, 근육, 골격, 뇌, 신장, 적혈구, 심장 등에 많이 분포하는 효소이며, 이러한 장기에 염증이 있을 때에는 LDH 수치가 상승하게 된다. 위 그래프에서는 대조군인 NC가 가장 높은 LDH 수치를 기록하였고, PGE 비투여군인 B-1, B-2, B-3의 순서로 높은 수치가 나타났으며, PGE 투여군인 C-1, C-2, C-3의 경우는 NC 및 B 군에 비해 상당히 낮은 수치를 기록하였으며, C-1, C-2, C-3의 날짜에 따른 LDH 수치 차이는 미미하였다.

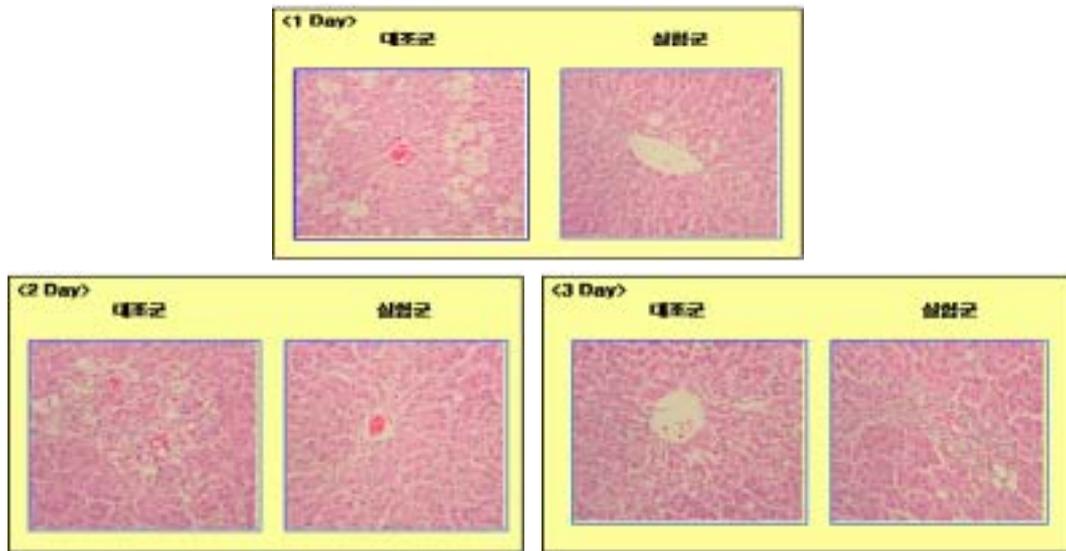


Fig. 10-8. Histopathological findings of the liver of rats treated with *Phellinus gilvus* extract and CCL4

CCl₄를 투여한 rats의 간세포는 팽윤되고, 공포 및 지방 변성을 보여 주었으며, 중심정맥 주변으로 간세포의 괴사가 관찰되었다(Fig. 10-8.). 또한, sinusoids의 구조가 변형되었고 다핵세포의 출현, 공포화, 괴사와 염증세포의 침윤이 나타났다. 부분적으로 간세포의 수복에 의한 섬유화가 진행되고 있었다. 반면 처치군 즉, 100 mg/kg의 마른진흙버섯 추출액에서는 가벼운 공포화 및 염증세포의 침윤만이 관찰되었다.

11. *Phellinus gilvus* 자실체로부터 단백다당체를 이용한 기능성제품의 안정성 및 유효성분을 함유하는 조성물

Table 11-1.에 나타난 바와 같이, 마른진흙버섯 자실체의 열수 추출물은 0.2 mg/ml의 농도에서 보다 2 mg/ml의 농도에서 효과적으로 말타아제, 수크라제 및 α -아밀라아제의 활성을 억제하였다. 따라서, 마른진흙버섯 자실체의 열수 추출물의 농도가 높을수록 α -글루코시다제의 활성을 더 효과적으로 억제함을 알 수 있으며, 이러한 α -글루코시다제의 활성을 억제하므로 당뇨병의 예방 및 치료에 유용하게 사용될 수 있다 (Atsumi 등, 1993).

Table 11-1. The inhibitory effect of *Phellinus gilvus* extract on enzyme activity related to diabetic melitus

	농도(mg/ml)	활성 억제 정도(%)		
		Maltase	Sucrase	Amylase
대조군	0	0	0	0
마른진흙버섯	0.2	7	87	32
추출물	2.0	63	98	52

Table 11-2.에서 보여주는 것처럼 마른진흙버섯 자실체의 열수 추출물을 배지에 0.5% 첨가한 경우, 대조군에 비하여 유산균 증식이 1.12배 증가하였으며 배지의 pH는 0.9 더 저하되었다. 또한, 본 발명의 마른진흙버섯 자실체의 열수 추출물을 배지에 1.0% 첨가한 경우에는 1.32배의 증식 효과를 나타내었으며 배지의 pH는 0.6 더 저하되었다.

Table 11-2. The growth effect of *Lactobacillus acidophilus* by *Phellinus gilvus* extract

	농도(%)	pH	증식정도
대조군	0	5.4	100
마른진흙버섯	0.5	4.5	112
추출물	1.0	4.8	132

본 연구의 유효성분인 마른진흙버섯 자실체의 열수 추출물은 급성호흡기 염증 발생을 억제하므로, 급성 호흡기 질환의 예방 및 치료에 유용한 의약품이나 기능성 식품으로 이용될 수 있다. 또한, 장내 유해효소인 α -글리코시다제의 활성을 억제하므로, 당뇨병의 예방 및 치료에 유용한 의약품이나 기능성 식품으로 이용될 수 있다 (Atsumi 등, 1993). 그리고 장내 유산균인 락토바실러스 액시도필러스의 증식을 촉진하므로, 장관내 유산균 증식에 유용한 유산균 증식제로도 이용될 수 있다.

이와 동시에 본 연구는 단백다당체에 대한 안정성시험을 조성물에 대한 제제로 안정화시켰다. 본 연구의 마른진흙버섯 자실체의 열수 단백다당체 추출물에 추가로 동일 또는 유사한 기능을 나타내는 유효성분을 1종 이상 함유하면 기능성을 뛰어나게 할 수 있다. 단백다당체의 안정성은 식염수, 멸균수, 링거액, 완충 식염수, 텍스트로즈 용액, 말토 텍스트린 용액, 글리세롤, 에탄올을 추가하면 더욱 더 안정화시킬 수 있으며 장기간 보관시에는 항산화제 및 계면활성제를 추가시키면 안정화시킬 수 있었다.

12. *Pellinus gilvus* 자실체 단백질 추출물에 대한 안전성시험(돌연변이시험 및 항돌연변이시험)

Table 12-1. Revertant colonies in the *S. typhimurium* reversion assay with hot water extract of *Phellinus* spp.

Test material	Dose	Number of colonies per plate	
		TA100	TA1535
Control	0	73± 25	27± 8
	1	86± 15	19± 3
<i>Phellinus gilvus</i> extract	2.5	75± 2	23± 2
	5	79± 4	32± 4
<i>Phellinus linteus</i> extract	1	90± 9	19± 5
	2.5	90± 16	21± 4
	5	88± 6	23± 4
<i>Phellinus baumii</i> extract	1	79± 13	20± 3
	2.5	78± 22	24± 3
	5	78± 16	19± 2

Table 12-2. Revertant colonies in the *S. typhimurium* TA 98 reversion assay with hot water extract of *Phellinus* spp.

Test article	S 9 mix	Dose	Number of colonies per plate
D.W.		0	44± 12
2-AF		1	48± 11
<i>Phellinus gilvus</i> extract		313	40± 11
		625	42± 13
		1250	46± 19
		2500	49± 16
		5000	42± 14
D.W.	+	0	48± 10
2-AF	+	1	243± 16
<i>Phellinus gilvus</i> extract	+	313	47± 13
	+	625	45± 14
	+	1,250	48± 13
	+	2,500	48± 14
	+	5,000	51± 12

2-AF, 2-amino fluride, was used as positive controls.

Values represent mean ± S.D. of revertant colonies per plate in two times with duplicate.

Table 12-3. Revertant colonies in the *S. typhimurium* TA 100 reversion assay with hot water extract of *Phellinus* spp.

Test article	S 9 mix	Dose	Number of colonies per plate
D.W.		0	145± 13
2-AF		1	142± 13
		313	140± 13
		625	141± 14
<i>Phellinus gilvus</i> extract		1,250	141± 12
		2,500	149± 14
		5,000	143± 14
D.W.	+	0	144± 16
2-AF	+	1	1,265± 112
	+	313	146± 16
	+	625	145± 14
<i>Phellinus gilvus</i> extract	+	1,250	143± 14
	+	2,500	144± 13
	+	5,000	147± 15

2-AF, 2-amino fluoride, was used as positive controls.

Values represent mean ± S.D. of revertant colonies per plate in two times with duplicate.

Table 12-4. Revertant colonies in the *S. typhimurium* reversion assay with hot water extract of *Phellinus* spp.

Test article	S 9 mix	Dose	Number of colonies per plate
D.W.		0	29± 2
SA		1	673± 7
		313	32± 3
		625	29± 5
<i>Phellinus gilvus</i> extract		1,250	31± 2
		2,500	31± 5
		5,000	33± 3
D.W.	+	0	33± 3
SA	+	1	676± 27
	+	313	30± 2
	+	625	31± 3
<i>Phellinus gilvus</i> extract	+	1,250	31± 3
	+	2,500	32± 4
	+	5,000	30± 3

SA, sodium azide was used as positive controls.

Values represent mean ± S.D. of revertant colonies per plate in two times with duplicate.

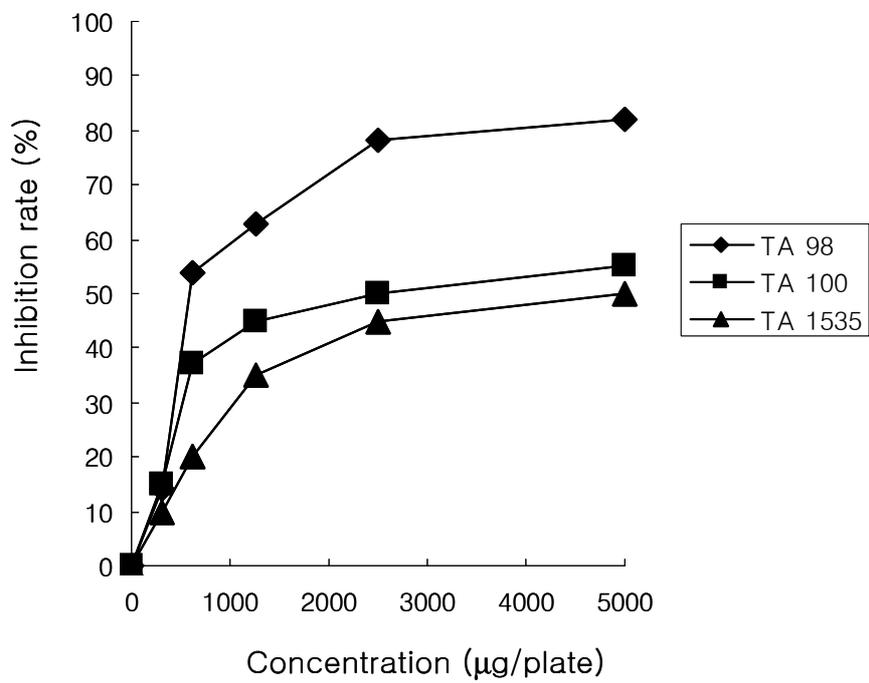


Fig. 12-1. Antimutagenic effects of 3% hot water extracts of *Phellinus gilvus* against 2,AF(1 µg/plate) for TA 98 and TA 100 and against SA(1µg/plate) for TA 1535 at 0, 313, 625, 1,250, 2,500 and 5,000 µg/plate.

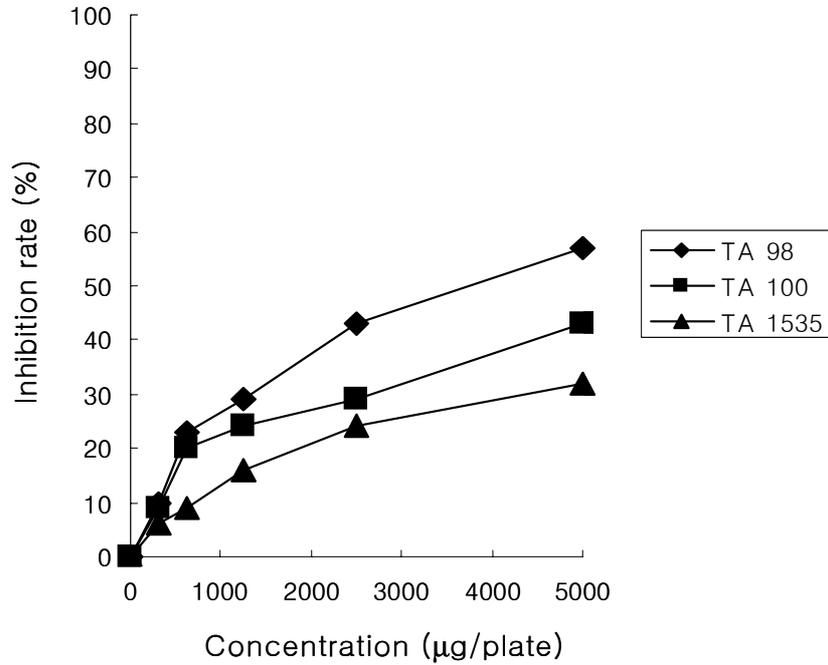


Fig. 12-2. Antimutagenic effects of 10% hot water extracts of *Phellinus gilvus* against 2-AF(1 µg/plate) for TA 98 and TA 100 and against SA(1 µg/plate) for TA 1535 at 0, 313, 625, 1250, 2500 and 5000 µg/plate.

Phellinus gilvus 추출액에 대한 Ames test를 이용한 돌연변이성 및 항돌연변이성 *S. typhimurium* TA 98과 TA 100을 이용한 Ames test를 시행한 결과 Table 1-4.에서 보여주는 것처럼 돌연변이는 일어나지 않았으며 Fig. 12-1, 12-2.에서 보여주는 것처럼 항돌연변이 억제 효과가 있는 것으로 나타났다.

13. 진흙버섯 자실체를 이용한 건강기능성 제품의 개발

마른진흙버섯 기능성 음료 개발을(주)여러분의 천년초에서 3가지 기본 형태로 제조를 하였다. 그 결과를 Table 13-1.에 나타내었다.

1형의 마른진흙버섯 추출액에 천년초 열매 선인장 추출물을 첨가하여 복합 기능성 음료로 제조되었다. 1형은 면역활성에 강조를 둔 기능성음료의 개념이었다. 2형은 영양학적인 기능성음료로 마른진흙버섯과 천년초 열매추출액을 1:1의 비율로 하였다. 3형은 천년초를 강조한 음료로 위장관 및 관절염을 강조하여 실시한 결과이다.

음료 제조일반 음료에 사용되는 기본 recipe를 기준으로 하여 잎새버섯 추출액과 한약재 추출액의 첨가량을 달리한 3가지 샘플을 만들었다. 잎새버섯 추출액과 한약재 추출액은 각각 20배 량의 증류수를 가하여 끓기 시작한 후 4시간 동안 가열하여 추출하였으며, 추출이 끝난 후에는 와트만 여과지 No. 2 로 여과하였다. 각 재료들을 표 25에 서술한 배합비에 따라 섞은 다음, 최종적으로 증류수를 사용하여 기준 용량을 제조하였다. 훈련된 panel을 이용한 관능검사 결과, 잎새버섯 추출액의 농도가 너무 낮아 특징적인 음료의 맛이 제대로 나지 않았기 때문에 다음의 실험에서는 추출용매비를 1:10(w/w)으로 낮추고 추출액의 첨가량도 증가시키기로 하였다. 그리고 잎새버섯과 한약재들을 따로 따로 추출하여 섞는 것은 실제 공장에서의 생산성 향상 측면에서 비효율적이므로 배합비를 결정한 후에는 한꺼번에 추출하기로 하였다.

Table 13-1. Recipe for functional beverage

(100 ml 기준시)

음료 첨가물		A type	B type	C type
마른버섯추출물	2.9 °Bx	18 ml	10 ml	2 ml
천연초열매 추출물	2.9 °Bx	2 ml	10 ml	18 ml
인삼 extract	4 °Bx	2 ml	-	-
과당	71 °Bx	16 g	18 g	18 g
구연산		0.36 g	0.36 g	0.36 g
배농축액	25°Bx	0.08 g	0.08 g	0.08 g
사과농축액	72 °Bx	2 g	2 g	2 g
안식향산나트륨		0.05 g	0.05 g	0.05 g

Table 13-2. Final recepe

(100 ml 기준시)

음료 첨가물		A type
마른진흙버섯추출액 ①	2.9 °Bx	100 ml로 fill up
천년초 열매 혹은 줄기추출액②	3.2 °Bx	100 ml로 fill up
별꽃		2 g
고과당	71 °Bx	14 g
사과농축액,	63 °Bx	0.2 g
오미자	63 °Bx	0.05 g
구연산		0.05 g

제 4 장 진흙버섯 품종별 인공재배기질 다양화

제 1 절 서 설

고등균류 중 버섯은 고대로부터 인류생활과 밀접한 관계를 가져 식용과 약용 및 산업용 등으로 널리 이용되고 있어 이에 따른 여러 가지 생리적 특성(Hayes 등, 1978)이나 유해성분 및 독성(Pegler 등, 1982) 등에 대한 연구가 활발하게 진행되어 왔다.

현재 국내에서 인공재배가 되고 있는 대표적인 식용버섯으로는 느타리버섯 (*Pleurotus ostreatus*), 양송이(*Agaricus bisporus*), 표고버섯(*Lentinula edodes*) 3종과 약용버섯인 영지버섯(*Ganoderma lucidium*)이 주종을 이루고 있고, 최근에 들어서는 자동화시설을 이용한 팽이버섯(*Flammulina velutipes*)과 큰느타리버섯(*Pleurotus eryngii*)가 재배되고 있다. 이들 버섯류는 목재부후균(Paul 등, 1981)의 일종인 사물기생균으로 활엽수원목과 톱밥, 벗짚등을 주재료로 하여 각기 특성에 따라 재배되고 있다. 그러나 외국에 비해 국내에서 재배되고 있는 버섯종류가 제한되어 있으므로 여러 가지 버섯류의 인공재배법이 요구되는 실정이다.

마른진흙버섯(*Phellinus gilvus*)는 민주름버섯목(*Aphylllophorales*), 소나무비닐버섯과(*Hymenochaetaceae*), 진흙버섯속(*Phellinus*)에 속하는 백색부후균으로 주로 참나무와 같은 활엽수에 발생하는데, 표고버섯 재배 시 참나무골목에 발생하여 병을 일으키기도 한다(차 등, 1994). 자실체는 코르크질로 단년생 또는 다년생으로 알려져 있으며 자실체는 나무에 부착된 편반구형으로 보통 상하가 서로 연결되어있는 균생형으로 발생하며 크기는 지름 5~12 cm정도로 상층표면은 암황갈색으로 융모가 있고 가장자리는 갓에 비해서 색이 옅고 관공의 표면은 암자갈색으로 mm당 6~8개가 있으며 포자는 $4\sim 5 \times 3\sim 3.5 \mu\text{m}$ 로 타원형이며 표면은 평활하다고 알려져 있다(Ryvardan, 1993). 마른진흙버섯은 다른 진흙버섯류와 같이 자연계에서 분포와 발생수가 적어 자실체를 구하기가 어렵다.

진흙버섯 중에서 목질진흙버섯(*Phellinus linteus*)의 자실체 열수추출물은 소화기

계통의 암에 저지효과(Ikekawa 등, 1968)가 있는 것으로 나타나 많은 연구가 진행되어 왔다. 국내에서 *Phellinus*속 버섯에 대한 인공재배에 관한 연구로는 송 등(1997)에 의해 *Phellinus linteus*의 인공재배와 *Phellinus gilvus*의 원목을 이용한 인공재배에 관한 연구(류 등, 1999)는 있으나 원목재배는 노동력과 비용이 많이 소요되는 단점이 있어, 톱밥을 이용한 인공재배 가능성에 대한 시험을 실시하였는바 결과를 요약하면 다음과 같다. 현재 국내에 품종등록된 상황버섯 품종은 장수상황버섯(*Phellinus baumii*), 고려상황버섯(*Phellinus linteus*), 마른상황버섯(*Phellinus gilvus*) 3종으로 원목을 이용한 인공재배로 생산되고 있을 뿐 톱밥을 이용한 재배성공사례는 없는 상태이다.

제 2 절 재 료 및 방 법

1. 균주

본 실험에 사용된 균주는 마른진흙버섯(*Phellinus gilvus*)은 경북농업기술원에서 자체개발된것을 사용하였고, 고려상황(*Phellinus linteus*)과 장수상황(*Phellinus baumii*)은 농촌진흥청 응용미생물과에서 분양받은 균주를 사용하였다. 균주보관용 배지는 Potato Dextrose Agar(Merck사)를 사용하였으며 Potato Dextrose Agar에 계대 배양하면서 본 실험에 사용하였다.

2. 균사배양

균의 보존용 배지는 PDA배지를 사용하였고 기본적인 배지에서의 균사의 성장속도를 비교하기 위한 배지로는 Table 1. 에서와 같이 PDA, MEA, YEA, Czapek 배지를 사용하였다. 각 배지는 121℃에서 15분간 고압살균하여 직경 9cm의 평판배양샤알레에 20 ml씩 분주하였다. 평판배양은 배지종류별로 제조된 평판배지의 중앙에 PDA배지에서 10일간 배양된 균사의 가장자리 부위를 직경 5 mm의 cork borer로 절단하여 접종원으로 사용하였으며 항온배양기에서 30℃로 배양하였다.

Table 1. Composition of culture media

Media reagent	Media and composition(g/l)			
	PDA	MEA	YEA	Czapek's
potato	200			
glucose	20		10	
sucrose				30
malt extract		30		
yeast extract			5	
peptone		3		
sodium nitrate				3
magnesium sulfate				0.5
potassium chloride				0.5
iron sulfate				0.01
di-potassium hydrogen phosphate				1
agar	15	15	20	13

3. 최적 배양 온도

균사배양에 적합한 온도를 조사하기 위하여 온도별 배양실험은 PDA배지에서 10일간 배양된 균사의 가장자리 부위를 직경 5 mm의 cork borer로 절단하여 PDA등 4종의 배지에 접종한 후 10, 15, 20, 25, 30, 35°C로 각각 조정된 항온배양기에서 10일간 배양한 후 배양된 균사체의 직경을 측정하였다.

4. 공시재료

주재료로 사용한 나무는 참나무(*Quercus* spp.)로 이를 톱밥과 원목으로 사용하였다. 원목의 벌채는 수액의 이동이 정지된 11월경부터 이듬해 2월 사이에 벌채된 것을 사용하였으며 벌목후 음지에서 자연건조 하였다. 원목의 절단은 수분함량이 35~45%

일 때 지름 12~15 cm, 길이 20 cm(약 900 g) 정도로 해서 사용하였으며 포트재배용 톱밥은 톱밥제조기로 제조하여 3개월 정도 야적한 후 사용하였고 첨가제로서는 신선하게 건조된 미강을 각 처리에 동일량을 첨가하여 사용하였다.

5. 재료의 성분분석

이화학성 분석은 농촌진흥청 토양이화학분석법(한기학, 1988)에 준하였는데 CaO, MgO, K₂O는 조제된 공시시료 10 g을 삼각 flask에 평량한 후 0.1N HCl용액 50 ml를 가하고 상온에서 회전진탕기로 1시간 진탕한 후에 No.6 여과지로 여과한 다음 그 여액을 Atomic Absorption Spectrophotometer(Perkin Elmer 2380)로, 전탄수화물은 Tyurin법으로, 전질소는 Kjeldahl법으로, P₂O₅는 비색법으로, pH는 건조시료 5 g을 증류수 25 ml에 30분간 침적시킨 후 pH-Meter(Fisher model-50)로 분석하였다.

6. 배지조제

마른진흙버섯 배지제조 시 주재료인 참나무톱밥(수분조절전 중량 900g)에 영양원으로 미강을 부피비율(V/V)로 각 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30%씩 첨가하여 균일하게 혼합하였다. 배지의 수분함량을 65%로 조절한 다음 내열성 polypropylene bag에 약 2 kg씩 넣고 마개를 닫아 이를 121℃에서 90분간 고압살균 하였다. 고압살균된 배지가 15℃ 정도로 식힌 후 미리 배양된 종균을 배지 표면에 약 100 g정도씩 접종하여 22±2℃에서 배양하면서 배양완성일수를 조사하였다.

7. 자실체형성

자실체 발생을 위한 토질은 배수 및 수분유지에 유리한 모래를 선택하였으며 재배사는 영지버섯재배사를 기준으로 설치하였다. 배양실에서 균사배양이 완료된 배지를 내열성 polypropylene bag을 상층부로부터 약 70% 제거한 후 충분히 관수하여 버섯 발생을 유도하였다. 약 11~13일 후부터 버섯원기형성(Primordium formation)이 시작

되었을 때 환기를 충분히 시키면 약 50일 이후부터는 자실체의 형태가 완전하게 형성되어 수확이 가능하였다. 자실체 수확량은 자실체의 개체중, 장경, 단경, 두께, 생체중, 건물중으로 나타내었다.

8. 복토재 쇄석처리에 의한 진흙버섯류 푸른곰팡이병(*Penicillium citrinum*) 방제 효과 시험

가. 병원균의 형태 및 배양적 특성

분리된 *Penicillium* spp.균의 배양 및 형태적 특성을 관찰하기 위하여 PDA평판배지상에서 25℃, 암조건에서 2주간 배양한 후 분생포자병 및 포자를 주사전자현미경(SEM)으로 관찰하였다. 군사생장 적온은 10℃에서 35℃까지 5℃ 간격으로, 각 처리당 5개의 PDA 평판배지 중앙에 직경 5 mm의 균총 절편을 이식하여 8일간 배양한 후 형성된 균총직경을 측정하여 비교하였다. 또한 배지의 종류, 온도에 따른 균총의 형태 등을 조사하기 위해 병원균의 균총 절편을 각각 Czapek, MEA, PDA, YEA 배지에 놓아 10℃에서 35℃까지 5℃ 간격으로 8일간 배양하여 조사하였다.

나. 병원성 검정

분리한 *Penicillium* spp.균의 병원성 검정을 위하여 접종원으로 이균을 PDA배지에서 배양한 군사절편을 이용하였다. 군사절편 검정은 직경 5 mm 정도의 균총 절편을 상황버섯 자실체에 접종하여 상대습도 80% 이상, 온도 25±2 ℃의 항온·항습실에서 생육시켜 발병유무를 조사하였다.

다. 복토처리효과 검정

복토재 쇄석처리에 의한 상황버섯 푸른곰팡이병(*Penicillium citrinum*) 방제효과를 구명코자 공시품종 장수상황(*Phellinus baumii*), 마른상황(*Phellinus gilvus*) 2품종을

대상으로 모래, 마사토, 쇠석 3가지를 복토재로 처리하여 푸른곰팡이병 발생율을 생육 초기, 중기에 조사하였으며, 각 복토재별 이화학적 성을 조사하였다.

9. 농가실증시험

경북농업기술원에서 배양완료된 자실체 형성용배지를 3개 농가에서 실증시험을 수행하였다. 시험장소는 고령군 성산면, 의성군 안계면, 안동시 풍산읍 농가에서 경북농업기술원의 상황버섯 자실체 시험하우스와 동일하게 버섯자실체 유도 및 관수등의 방법을 2005년 8월부터 10월에 걸쳐 수행하였다.

제 3 절 결과 및 고찰

1. 자실체형성

자실체 발생을 위한 토질은 배수 및 수분유지에 유리한 모래를 선택하였으며 재배사는 영지버섯 재배사를 기준으로 설치하였다. 배양실에서 균사배양이 완료된 배지를 내열성 polypropylene bag을 상층부로부터 약 70% 제거한 후 충분히 관수하여 버섯 발생을 유도하였다. 약 11~13일 후부터 버섯원기형성(Primordium formation)이 시작되었을 때 환기를 충분히 시키면 약 50일 이후부터는 자실체의 형태가 완전하게 형성되어 수확이 가능하였다. 자실체 수확량은 생체중, 건물중, 생산효율(Biological efficiency)로 나타내었다.

2. 상황버섯 균주별 배지종류 및 온도처리에 따른 균사 성장 특성

Table 2. 진흙버섯 균주별 배지종류 및 온도처리에 따른 균사성장

온도 (°C)	균사성장량(mm /10일)											
	PDA			MEA			YEA			Czapek		
	P.l	P.b	P.g	P.l	P.b	P.g	P.l	P.b	P.g	P.l	P.b	P.g
10	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
15	6	13	12	12	16	16	8	9	12	6	9	7
20	6	31	29	20	36	40	18	21	31	7	18	11
25	5	35	41	24	48	52	23	28	40	6	24	13
30	7	68	81	35	80	55	39	66	50	9	34	14
35	6	55	38	22	50	31	19	44	45	10	31	11

* P.l : 고려상황(*Phellinus linteus*), P.b : 장수상황(*Phellinus baumii*), P.g : 마른진흙버섯(*Phellinus gilvus*)

고려상황(*Phellinus linteus*), 장수상황(*Phellinus baumii*), 마른진흙버섯(*Phellinus gilvus*)의 균사성장 최적온도를 구명하고자 10°C에서 35°C까지 5°C 간격으로 처리하여 균사를 배양한 결과 Table 2.에서와 같이 25°C에서 30°C가 배양적온으로 나타났으며 특히 장수상황, 마른진흙버섯 균주는 35°C에서도 PDA, MEA배지에서는 31~55 mm/10일로 균사생육이 왕성하여 상당히 고온성 균임을 보여주고 있다. 그에 반해 고려상황 균주는 6~22 mm/10일로 두 종류의 균주에 비해 생장이 느렸다. 영지버섯의 균사성장 최적온도가 30°C이고(홍 등, 1986) 목질진흙버섯의 균사성장 최적온도가 25~30°C라는 보고(지 등, 1996)와 비교하여 볼 때 최적온도는 유사한 경향이였다. 균사성장 특성은 평판배지에서의 성장량 측정이 용이하나 향후 액체배지에서의 균체량측정과 pH 농도에 따른 조사도 이루어져야 할 것으로 생각되어진다.

Table 3. 진흙버섯 균주별 배지종류 및 온도처리에 따른 균체색 및 균사밀도

온도 (°C)	균체색 ^{a)} , 균사밀도 ^{b)}																					
	PDA			MEA			YEA			Czapek												
	P.l	P.b	P.g	P.l	P.b	P.g	P.l	P.b	P.g	P.l	P.b	P.g										
10	Br	T	Br	T	Br	T	Y	T	Br	T	Br	T	Y	T	Y	T	W	T	W	T	W	T
15	Y	T	Y	ST	Br	ST	Y	ST	Y	SC	W	SC	Y	T	Y	ST	W	T	W	T	W	T
20	Y	T	Y	SC	Br	SC	Y	SC	Y	SC	W	SC	Y	SC	Y	SC	Br	SC	W	T	W	T
25	Br	T	Y	C	Br	C	Y	C	W	C	Br	C	Y	SC	Y	SC	W	SC	W	T	W	T
30	Br	T	Y	C	Br	C	Y	C	Y	C	Br	C	Y	C	Y	C	Br	C	W	T	W	T
35	Br	T	Y	C	Br	C	Y	SC	Y	C	Br	C	Y	SC	Y	C	W	SC	W	T	W	T

^{a)}Br: brownish, Y: yellowish, W: whitish

^{b)}C: compact, SC: somewhat compact, ST: somewhat thin, T: thin

* P.l : 고려상황(*Phellinus linteus*), P.b : 장수상황(*Phellinus baumii*), P.g : 마른진흙버섯(*Phellinus gilvus*)

고려상황(*Phellinus linteus*), 장수상황(*Phellinus baumii*), 마른진흙버섯(*Phellinus gilvus*)의 균사생장 온도에 따른 균체색과 균사밀도를 조사하기 위해 10°C에서 35°C까지 5°C 간격으로 처리하여 균사를 배양한 결과 Table 3에서와 같이 25°C에서 30°C가 균사밀도가 가장높아 배양적온으로 나타났으며 균체색은 MEA배지상, 30°C 조건에서 고려상황(*Phellinus linteus*)은 노란색, 장수상황(*Phellinus baumii*) 노란색, 마른진흙버섯(*Phellinus gilvus*) 갈색으로 나타났다.

3. 배지재료의 이화학적

배지재료로 사용한 참나무톱밥, 뽕나무톱밥, 느릅나무톱밥, 아카시아나무톱밥, 사과나무톱밥과 미강의 화학적 특성을 조사한 결과 T-N는 참나무톱밥이 0.35%, 뽕나무톱밥 0.24%, 느릅나무톱밥 0.23%, 아카시아나무톱밥 0.52%, 사과나무톱밥 0.33%, 미강

2.21%로 수종간에는 비슷하였으나 미강은 상대적으로 높은 수치를 보였다. 중금속은 Fe의 경우 아카시나무톱밥이 112.75 ppm으로 상대적으로 높았고, Mn은 미강이 246.57 ppm, Zn은 미강이 57.2 5ppm으로 상대적으로 높은 수치를 보였다.

Table 4. 배지재료의 이화학적

배지재료	T-N	T-C	P ₂ O ₅	K ₂ O	CaO	mgO	pH	Fe	Mn	Cu	Zn	Pb	Cd	Cr	As	
								(1:5)	ppm							
			%													
참나무톱밥	0.35	53	0.07	0.22	0.92	0.11	5.9	92.9	140.5	2.6	2.67	0.92	-	-	1.53	
팽나무톱밥	0.24	55	0.06	0.35	0.84	0.07	6.4	62.33	8.51	1.23	3.12	-	-	-	-	
느릅나무톱밥	0.23	50	0.05	0.25	1.79	0.05	6.8	61.04	8.09	2.03	5.77	-	-	-	4.27	
아카시나무톱밥	0.52	51	0.05	0.16	0.98	0.06	5.8	112.75	23.15	2.08	5.06	2.59	-	-	0.14	
사과나무톱밥	0.33	54	0.09	0.31	0.82	1.22	5.3	90.18	41.31	2.37	8.84	-	-	-	-	

4. 미강 처리비율별 균사생장

마른진흙버섯의 인공재배 시 톱밥배지의 재배 가능성을 구명하기위해 참나무톱밥, 미강을 사용해 균사배양 상태를 조사한 결과는 Table 5.와 같다. 톱밥배지 각 처리별 배양완성일수는 25~30일로 대비로 실험한 원목배지의 배양완성일수 56일보다 배양소요일수가 약 1/2로 단축되었으며 미강 5%, 10% 처리구가 25일로 가장 빨랐다. 균사 밀도는 미강 20%, 25% 처리구가 높은 것으로 나타나 미강의 첨가밀도가 높아질수록 균사밀도도 높아지는 경향이였다. 미강 30%를 첨가한 톱밥배지는 푸른곰팡이 (*Trichoderma* spp.)에 모두 오염되었다. 이는 배지내 영양성분 과다로 오염병원균의 서식이 용이한 것으로 생각된다.

Table 6. 마른진흙버섯의 배지재료별 균사생장 특성(25℃)

배지재료	미강비율 (v/v,%)	배양소요일수(일)	균사밀도*	오염율(%)
참나무톱밥	0	28	+++	0
	5	25	+++	0
	10	25	+++	0
	15	28	+++	0
	20	28	++++	20
	25	30	++++	60
	30	-	-	100
	참나무원목(관행)		56	+++

* 균사밀도 : +++=저, ++++=중, ++++=고

5. 자실체발생 특성

내열성 polypropylene bag을 제거하고 관수로 버섯발생을 유도한후 버섯원기가 형성되는 초발이 소요 일수는 톱밥배지 처리별로 11~13일로 대비로 실험한 원목배지의 초발이 소요 일수 12일과 비슷하였고, 미강 10% 첨가 톱밥배지의 생체중은 577 g, 건물중 97 g, 생산효율 64.1%로 원목배지에서의 생체중 231 g, 건물중 38.7 g, 생산효율 25.6% 보다 양호한 것으로 나타났으며 참나무톱밥 단독처리구의 경우는 생체중 570 g, 건물중 92 g, 생산효율 63.3%로 나타났다. 이결과를 고려할 때 마른진흙버섯 톱밥재배시 작업의 편리성등을 감안하여 참나무톱밥 단독 사용이 유리할 것으로 생각된다. 류 등(2000)이 수행한 *Phellinus gilvus*의 원목을 이용한 인공재배시험에서는 자실체수확량이 180±86 g 정도 수확되는 것과 비교할 때 톱밥배지에서의 수확성이 매우 높음을 알 수 있다. 마른진흙버섯의 균사생장과 자실체형성은 다른 진흙버섯류에 비해 상당히 용이한 편으로, 앞으로 기능성물질분석 및 효과가 검토되어야 할 것이다. 고려상황(*Phellinus linteus*), 장수상황(*Phellinus baumii*)의 자실체는 아직 발생치 않았으며, 마른진흙버섯(*Phellinus gilvus*)의 뽕나무톱밥, 느릅나무톱밥, 아카시나무톱밥, 사과나무톱밥배지 이용시험은 자실체가 발생 생육중인 상태이며 앞으로 수확 후

의 자실체발생 특성 등을 조사할 계획이다.

Table 7. 마른진흙버섯의 배지재료별 자실체생산 특성

배지재료	미강비율 (v/v,%)	초발이소요 일수	자실체 생체중(g)	자실체 건물중(g)	생산효율 ^a	수량지수 (건물중)
참나무 톱밥	0	11	570	92	63.3	232
	5	11	421	66	46.8	167
	10	12	577	97	64.1	222
	15	12	550	81	61.1	201
	20	12	382	83	42.4	210
	25	13	166	39	18.4	99
	30	-	-	-	-	-
참나무 원목		12	231	38.7	25.6	100

a) (자실체 생체중/배지재료 건물중)×100

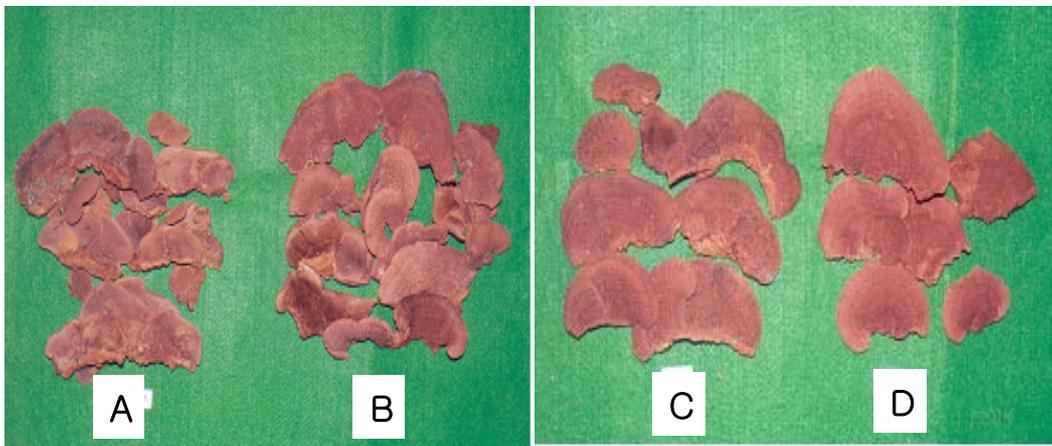


Fig. 1. 처리별 마른진흙버섯 자실체

A: 참나무원목; B: 참나무톱밥; C: 뽕나무원목; D: 뽕나무톱밥

6. 톱밥배지 처리별 균사생장

마른진흙버섯의 인공재배 시 톱밥 및 원목배지의 재배 가능성을 구명하기 위해 참나무, 뽕나무, 느릅나무, 아카시아나무, 사과나무 5종을 원목 및 톱밥을 사용해 균사배양 상태를 조사한 결과는 Table 8.과 같다. 배양소요일수의 경우 톱밥배지에서는 참나무톱밥 28일, 뽕나무톱밥 27일, 느릅나무톱밥 30일 등이었으며, 원목배지의 경우에는 참나무원목 56일, 뽕나무원목 54일, 느릅나무원목 60일로 나타났는데, 5종 원목배지에서의 각 처리별 배양완성일수는 54~63일로, 5종의 톱밥배지 각 처리별 배양완성일수 27~33일보다 약 2배정도 소요되는 경향이였다.

참나무, 뽕나무, 느릅나무, 아카시아나무, 사과나무 5종의 톱밥 및 원목을 이용해 마른진흙버섯의 인공재배 가능성을 조사한 결과, 자실체발생 특성은 배양이 완성된 배지의 내열성 polypropylene bag을 제거하고 관수로 버섯발생을 유도한 후 버섯원기가 형성되는 초발이 소요일수는 5종류의 원목배지에서는 처리별로 12~15일 이었으며, 5종의 톱밥배지에서는 11~14일로 원목배지와 톱밥배지가 비슷하였다.

Table 8. 마른진흙버섯의 배지재료별 균사생장 특성(25℃)

No.	처리	배양소요일수 (일)	균사밀도*	초발이소요일수 (일)
1-1	참나무원목	56	+++	12
1-2	참나무톱밥	28	+++	11
2-1	뽕나무원목	54	+++	13
2-2	뽕나무톱밥	27	+++	13
3-1	느릅나무원목	60	++	14
3-2	느릅나무톱밥	30	++	14
4-1	아카시아원목	63	++	15
4-2	아카시아톱밥	33	+++	14
5-1	사과나무원목	57	+++	13
5-2	사과나무톱밥	29	+++	11

* 균사밀도 : +++=저, ++++=중, ++++=고

7. 자실체 발생 특성

2차 년도 시험에서 5종의 원목 및 톱밥배지에서의 자실체 생육특성은 건물 중이 참나무원목배지에서 63 g, 참나무톱밥배지 75 g, 느릅나무원목배지 10 g, 느릅나무톱밥배지 33 g, 사과나무원목배지 46 g, 사과나무톱밥배지 54 g 등으로 각 수종별로 원목을 이용한 인공재배보다 톱밥이용재배가 수량성이 높고, 5개 나무 종류 중에서는 참나무원목배지 및 참나무톱밥배지가 다른 수종보다 수량성이 높음을 알 수 있다. 수종별로 자실체의 각 개체별 건물중을 살펴보면 참나무원목 9.0 g, 참나무톱밥 6.4 g, 사과나무원목 3.7 g, 사과나무톱밥 7.2 g 등으로 원목과 톱밥에 따른 일치된 경향을 나타내지 않았으나 자실체 각 개체별 두께는 참나무원목 2.8 mm, 참나무톱밥 2.4 mm, 느릅나무원목 2.9 mm, 느릅나무톱밥 2.4 mm, 사과나무원목 2.5 mm, 사과나무톱밥배지 2.3 mm로 톱밥배지에 비해 원목배지 자실체 두께가 큰 경향을 나타내었다. 마른진흙버섯의 균사생장과 자실체형성은 다른 진흙버섯균에 비해 상당히 용이한 편이다(Table 8.).

Table 9. 마른진흙버섯의 배지재료별 자실체생산 특성

No.	처리	개체중 건물중 (g)	장경 (mm)	단경 (mm)	두께 (mm)	생체중 (g)	건물중 (g)
1-1	참나무원목	9.0	83	47.9	2.8	167	63
1-2	참나무톱밥	6.4	79	48.3	2.4	227	75
2-1	뽕나무원목	5.4	72	42.1	2.7	105	43
2-2	뽕나무톱밥	7.3	91	52.0	2.4	83	29
3-1	느릅나무원목	3.0	58	30.0	2.9	21	10
3-2	느릅나무톱밥	4.8	69	43.6	2.4	76	33
4-1	아카시원목	2.6	57	30.4	2.4	25	8
4-2	아카시톱밥	4.0	71	43.7	1.9	109	37
5-1	사과나무원목	3.7	64	35.4	2.5	106	46
5-2	사과나무톱밥	7.2	81	49.3	2.3	137	54

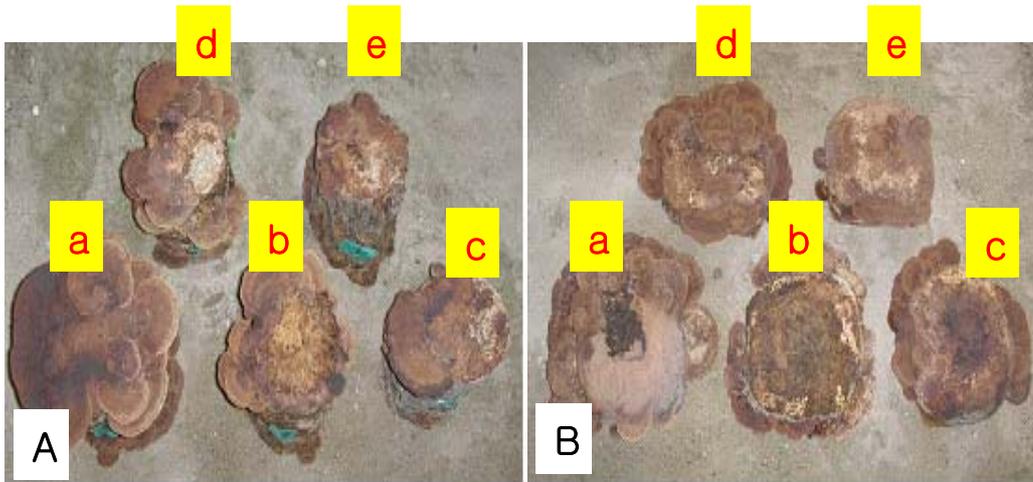


Fig. 2. 처리별 마른진흙버섯 자실체. (a : 원목인공재배, b : 톱밥인공재배 a: 참나무, b: 뽕나무, c: 느릅나무, c :사과나무, e: 아카시나무)

8. 복토재 쇠석처리에 의한 진흙버섯류 푸른곰팡이병(*Penicillium citrinum*) 방제효과 시험

가. 병원균의 형태 및 배양적 특성

최근 국내 진흙버섯 재배농가가 증가하면서 병원균의 발생이 문제점으로 나타나고 있다. 진흙버섯(*Phellinus baumii*)의 자실체에 발생하는 *Penicillium* spp.균을 경북농업기술원내 진흙버섯재배사 수집하여 분리 동정 및 생리적 특성을 조사하였다. 분리된 *Penicillium* spp.균의 형태적 특성을 조사한 결과, 분생포자의 모양은 타원형이고 직경이 1.8~2.3 μm 크기로 분생포자를 많이 형성한다. 분생자병은 균사로부터 one-stage branch 모양을 형성하고, Matulae는 4~6개로 길이가 5.2~7.8 μm 이며, Phialide는 플라스크상이고 크기가 5.7~7.5 \times 2.2~2.7 μm 이었다. Czapek 배지상의 생육에서 25 $^{\circ}\text{C}$ 온도에서는 8일에 균체가 23 mm 성장했다. PDA 배지 상에서 균총의 형태는 처음에는 조밀한 솜털모양의 백색을 띠었으며 차츰 기중균사가 형성되었고, 점차 청녹색으로 변하였다. 본 병원균의 균사생장 적온을 조사한 결과 균사생장은 20~30 $^{\circ}\text{C}$ 에서 왕성하였다. 이상의 관찰된 특징을 Samson 등(1981)의 보고와 비교한 결과 진흙버섯(*Phellinus baumii*)의 자실체에서 분리한 *Penicillium* spp.를 *Penicillium citrinum* 으로 동정하였다.

Table 10. *Phellinus baumii*에서 분리된 *Penicillium citrinum*의 형태적, 배양적 특징

Characteristics	Present isolates	<i>Penicillium citrinum</i> ^a
Colony color	blue-green	blue-green
Conidia		
shape	subglobose, ellipsoidal, smooth	subglobose, ellipsoidal, smooth
size(μm)	1.8~2.3 μm	2.5~3.0 μm
Conidiophore	one-stage branched	one-stage branched
Metulae		
number	4~6	3~5
size(μm)	5.2~7.8 μm	5.5~9.2 μm
Phialide		
shape	flask-shaped,	flask-shaped,
size(μm)	5.7~7.5 \times 2.2~2.7 μm	7~10 \times 2.2~2.5 μm

^a From Samson

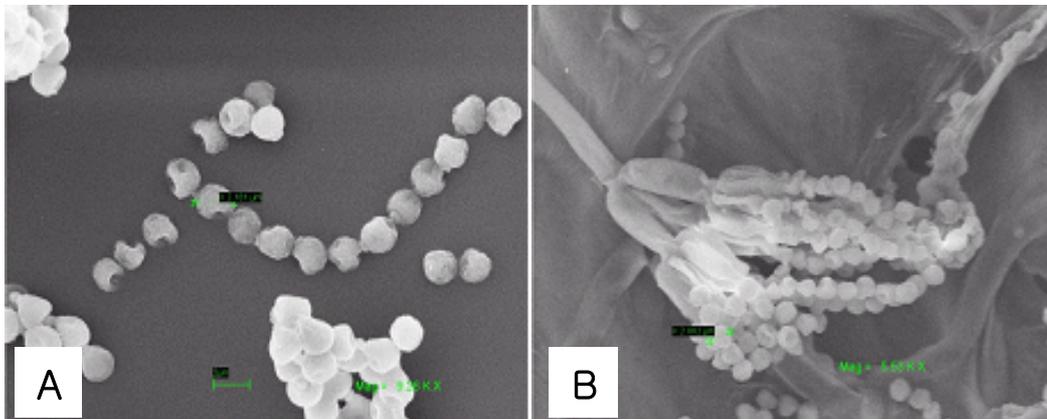


Fig. 3. Conidial head of *Penicillium citrinum* \times 5,000(B), Conidia of *Penicillium citrinum* \times 9,000(A)

나. 병원성 검정

병원성 검정을 위하여 PDA 배지에서 배양하였으며, 직경 5 mm의 균총 절편을 진흙버섯 자실체에 접종한 결과 접종 5일후부터 자실체 표면에 푸른곰팡이가 발생되어 포장에서 발생한 병징과 동일한 병적 증상을 나타내었다. 또한, 이 병반으로부터 병원균을 분리한 *Penicillium* spp. 는 *Penicillium citrinum* 이었다.

진흙버섯에 발생하는 푸른곰팡이병은 지금까지 국내에 보고된 바가 없으며, *Penicillium* 에 의한 푸른곰팡이병은 현재 큰 피해는 없으나 일단 발병된 자실체는 상품성이 저하된다. 또한, 앞으로 큰문제가 될 수 있을 것으로 생각되므로 구체적인 방제법 및 적절한 조기진단체계를 수립하기위해 체계적인 연구가 요구된다.

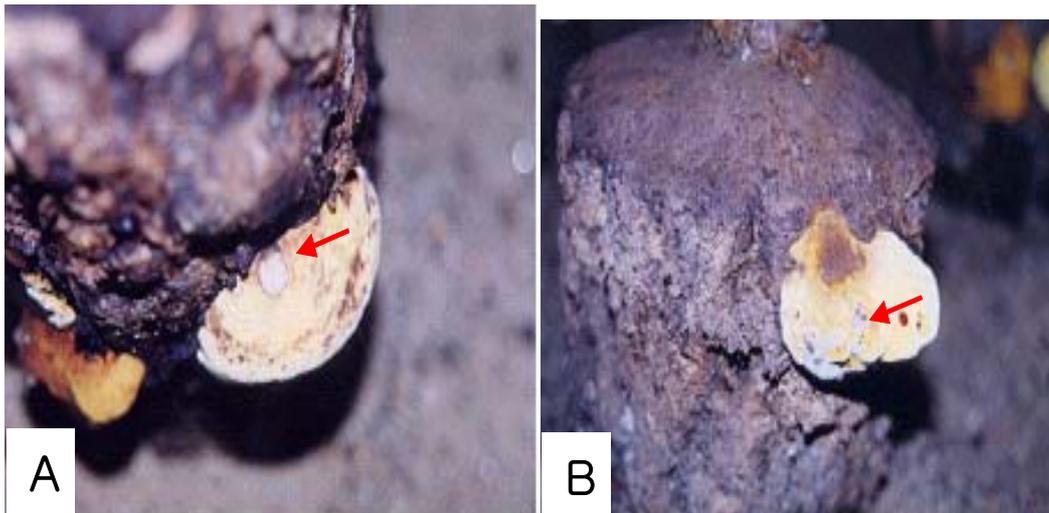


Fig. 4. Symptom of green mold disease of *Phellinus baumii* in field(A),
Symptom was reproduced on fruitbody at 15 days after artificial inoculation(B)

다. 복토처리효과 검정

마른진흙버섯의 경우 푸른곰팡이병 발병율이 생육초기에 0~5%로 장수상황의 0~10%에 비해 낮았으며, 복토재를 크기 1~2 cm의 쇄석을 10 cm 두께로 처리한 곳에서는 푸른곰팡이병이 발생치 않았다. 또한, 복토재료의 이화학특성 분석결과 pH의 경우 쇄석 8.4로 강알칼리성을 나타내었으며, 마사토 7.5, 모래 6.1로 나타났다. 중금속의 경우 쇄석에서 Mn, Fe가 검출되었을 뿐 Pb, As등 기타 중금속은 3종류의 복토재에서 검출되지 않았다.

Table 11. 진흙버섯류 복토재료별 푸른곰팡이병 발병율(%)

구분 일시	푸른곰팡이병 발병율(%)					
	모래		마사토		쇄석	
	<i>Phellinus</i>	<i>Phellinus</i>	<i>Phellinus</i>	<i>Phellinus</i>	<i>Phellinus</i>	<i>Phellinus</i>
	<i>gilvus</i>	<i>baumii</i>	<i>gilvus</i>	<i>baumii</i>	<i>gilvus</i>	<i>baumii</i>
생육초기 (6. 20)	5	10	3	10	0	0
생육중기 (7. 16)	2	5	3	5	0	0

Table 12. 복토재료별 이화학적 특성 (%)

배지 재료	pH (1:5)	P ₂ O ₅	CaO	mgO	K ₂ O	EC	Mn	Fe	Cu	Zn	Pb	Cd	Cr	As
쇄석	8.4	23	8.66	0.41	0.08	0.57	7.15	38.5	-	-	-	-	-	-
마사토	7.5	10	7.70	2.73	0.07	0.13	-	-	-	-	-	-	-	-
모래	6.1	3	0.98	0.20	0.04	0.07	-	-	-	-	-	-	-	-

9. 자실체의 형태 및 담자포자의 미세구조

1) *Phellinus gilvus* (품종명: 황금, 일반명: 마른진흙버섯)

관공의 모양은 원형이고, 관공수는 mm당 8~9이며, 크기는 0.05 mm이다. 담자포자는 난형으로 크기는 $3.3 \times 2.5 \mu\text{m}$ 이다.

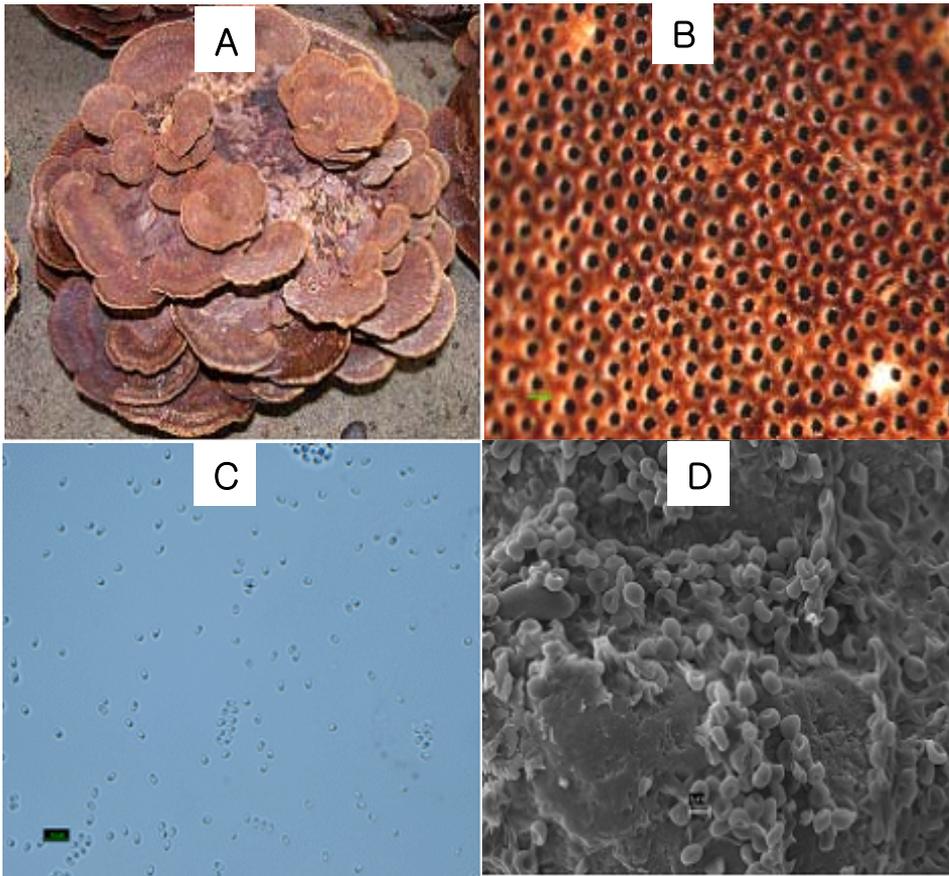


Fig. 5. Morphological characteristics of *Phellinus gilvus* fruitbody

A : Basidiocap

B : Hymenial pores ($\times 40$)

C : Basidiospores observed with light microscope ($\times 400$)

D : Basidiospores observed with SEM ($\times 5,000$)

2) *Phellinus baumii*(품종명 : 장수상황)

관공의 모양은 원형이고, 관공수는 mm당 7~8이며, 크기는 0.07 mm이다. 담자포자는 난형으로 크기는 $3.3 \times 2.5 \mu\text{m}$ 이다.

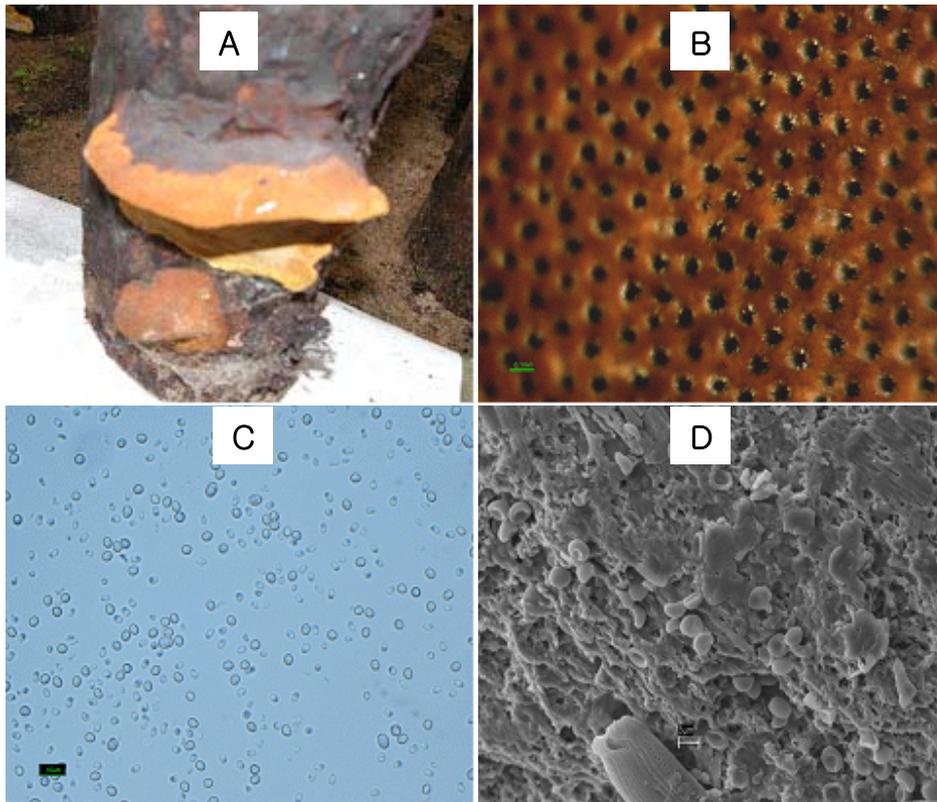


Fig. 6. Morphological characteristics of *Phellinus baumii* fruitbody

A : Basidiocap

B : Hymenial pores ($\times 40$)

C : Basidiospores observed with light microscope ($\times 400$)

D : Basidiospores observed with SEM($\times 5,000$)

3) *Phellinus linteus* (품종명 : 고려상황)

관공의 모양은 원형이고, 관공수는 mm당 8~9이며, 크기는 0.08 mm이다. 담자포자는 난형으로 크기는 $4.0 \times 3.3 \mu\text{m}$ 이다.

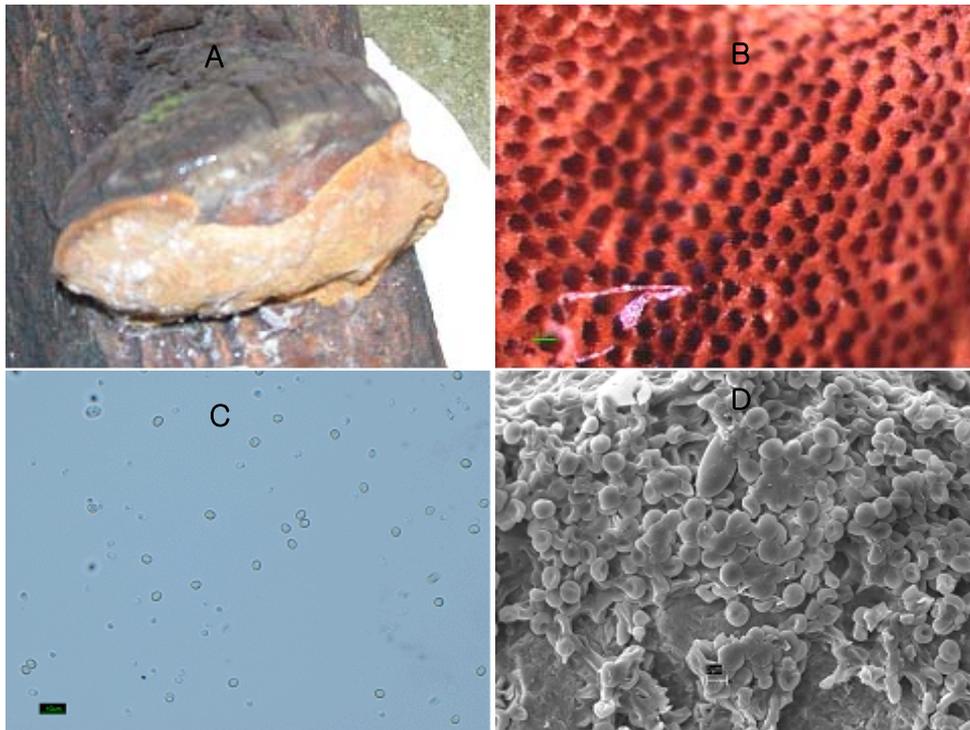


Fig. 7. Morphological characteristics of *Phellinus linteus* fruitbody

A : Basidiocap

B : Hymenial pores ($\times 40$)

C : Basidiospores observed with light microscope ($\times 400$)

D : Basidiospores observed with SEM($\times 5,000$)

10. 농가실증시험

가. 고령군 성산면

Table 14. 마른진흙버섯의 배지재료별 자실체생육 특성(고령군 성산면)

No.	처리	초발이소요일수(일)	생체중(g)	건물중(g)
1-1	참나무원목	11	160	59
1-2	참나무툽밥	10	215	70
2-1	뽕나무원목	12	100	36
2-2	뽕나무툽밥	12	78	25
3-1	느릅나무원목	13	50	21
3-2	느릅나무툽밥	13	75	27
4-1	아카시아원목	13	85	32
4-2	아카시아툽밥	13	100	34
5-1	사과나무원목	12	102	42
5-2	사과나무툽밥	10	128	49

고령군의 경우 5종의 원목 및 툽밥배지에서의 자실체 생육특성은 건물중이 참나무 원목배지에서 59 g, 참나무툽밥배지 70 g, 느릅나무원목배지 21 g, 느릅나무툽밥배지 27g, 사과나무원목배지 42 g, 사과나무툽밥배지 49 g 등으로 각 수종별로 원목을 이용한 인공재배보다 툽밥이용재배가 수량성이 높고, 5종 나무 종류 중에서는 참나무원목배지 및 참나무툽밥배지가 다른 수종보다 수량성이 높음을 알 수 있다.

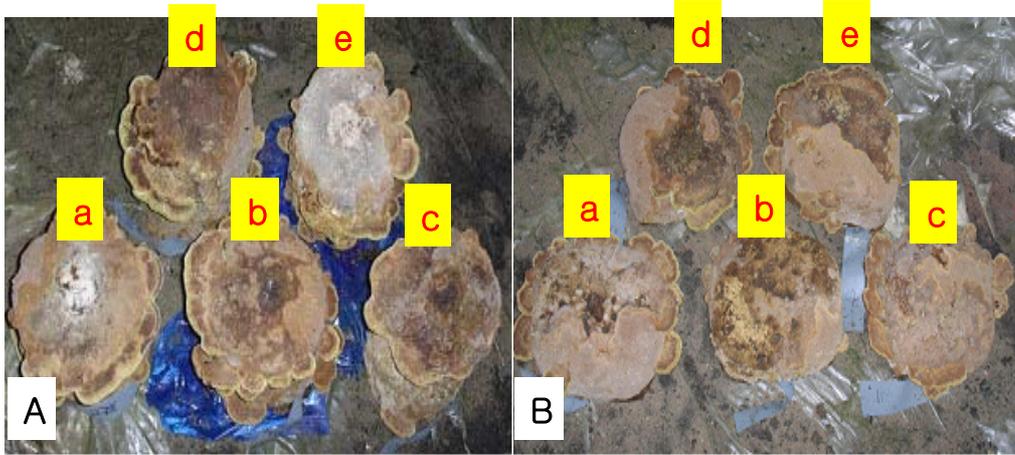


Fig. 8. 처리별 마른진흙버섯 자실체

A : 원목인공재배, B : 톱밥인공재배

a: 참나무, b: 뽕나무, c: 느릅나무, d:사과나무, e: 아카시나무

나. 의성균 안계면

Table 14. 마른진흙버섯의 배지재료별 자실체생육 특성(의성균 안계면)

No.	처리	초발이소요일수(일)	생체중(g)	건물중(g)
1-1	참나무원목	12	184	70
1-2	참나무톱밥	11	210	78
2-1	뽕나무원목	11	120	48
2-2	뽕나무톱밥	12	126	53
3-1	느릅나무원목	13	30	13
3-2	느릅나무톱밥	12	62	24
4-1	아카시아원목	12	70	30
4-2	아카시아톱밥	13	100	34
5-1	사과나무원목	11	65	25
5-2	사과나무톱밥	10	120	45

의성군의 경우 5종의 원목 및 톱밥배지에서 자실체 생육특성은 건물중이 참나무 원목배지에서 70 g, 참나무톱밥배지 78 g, 느릅나무원목배지 13 g, 느릅나무톱밥배지 24 g, 사과나무원목배지 25 g, 사과나무톱밥배지 45 g 등으로 각 수종별로 원목을 이용한 인공재배보다 톱밥이용재배가 수량성이 높고, 5종 나무 종류 중에서는 참나무원목배지 및 참나무톱밥배지가 다른 수종보다 수량성이 높음을 알 수 있다.

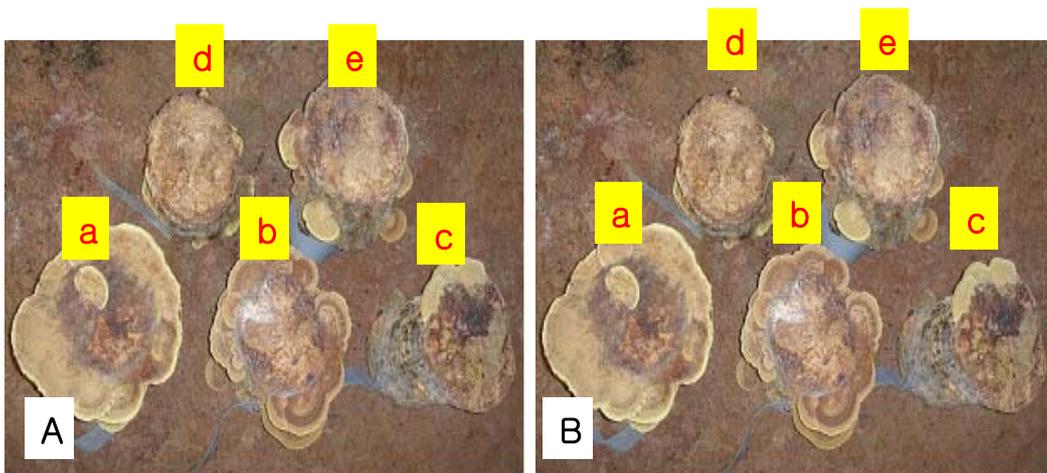


Fig. 9. 처리별 마른진흙버섯 자실체

A : 원목인공재배, B : 톱밥인공재배

a: 참나무, b: 뽕나무, c: 느릅나무, d:사과나무, e: 아카시나무

다. 안동시 풍산읍

Table 15. 마른진흙버섯의 배지재료별 자실체생육 특성(안동시 풍산읍)

No.	처리	초발이소요일수(일)	생체중(g)	건물중(g)
1-1	참나무원목	13	130	45
1-2	참나무툽밥	12	163	59
2-1	뽕나무원목	12	152	54
2-2	뽕나무툽밥	13	160	57
3-1	느릅나무원목	12	25	11
3-2	느릅나무툽밥	14	15	84
4-1	아카시아원목	12	65	27
4-2	아카시아툽밥	14	15	4
5-1	사과나무원목	12	58	21
5-2	사과나무툽밥	12	75	35

안동시의 경우 5종의 원목 및 툽밥배지에서의 자실체 생육특성은 건물중이 참나무 원목배지에서 45 g, 참나무툽밥배지 59 g, 뽕나무원목배지 54 g, 뽕나무툽밥배지 57 g, 사과나무원목배지 21 g, 사과나무툽밥배지 35 g 등으로 각 수종별로 원목을 이용한 인공재배보다 툽밥이용재배가 수량성이 높고, 5종 나무 종류 중에서는 뽕나무와 참나무배지가 다른 수종보다 수량성이 높음을 알 수 있다.

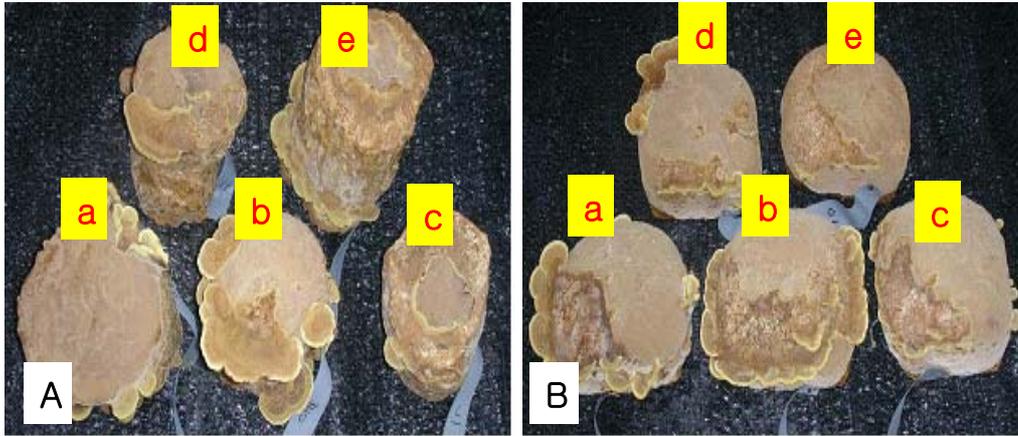


Fig. 10. 처리별 마른진흙버섯 자실체

A : 원목인공재배, B : 톱밥인공재배

a: 참나무, b: 뽕나무, c: 느릅나무, d:사과나무, e: 아카시나무

제 5 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

제 1 절 총괄추진계획표

연 도 세부과제 및 주요내용	2002년 (1차년도)	2003년 (2차년도)	2004년 (3차년도)	가중치	진도(%)
○ 진흙버섯 품종별 기능성 물질분석 및 효과연구 (세부과제)					
-버섯 처리별 및 추출별 항암 검색				20	100
-버섯 추출물의 항 암 분석비교				15	100
-버섯 추출물과 항 암제의 상호작용				5	100
-실험동물에서 효능 및 독성시험				20	100
-진흙버섯류 재배기질 가능성 연구 (협동연구기관)					
-진흙버섯 품종별 각 툽밥 재배이용성 검토				5	100
-살균법에 의한 균사 배양효과의 비교				15	100
-버섯 처리별 생육조 건 비교				15	100
-농가실증시험으로 실 제 활용성 검토				5	100
사 업 진 도(%)	30	30	40	100	100
소 요 인 원(명)	9	9	9		
소요 예산(천원)	60,000	60,000	60,000	180,000	
주요 연구 결과	진흙버섯의 품종별, 처리별 항암활성검증	진흙버섯의 대량생산 체계의 확립 및 추출법	농가실증시 험 및 시제품제작		

제 2 절 연구개발 목표의 달성도

1. 세부과제 : 진흙버섯 품종별 기능성물질 분석 및 효과 연구

가. 진흙버섯 품종별 *Phellinus linteus*, *Phellinus baumii* 그리고 *Phellinus gilvus*에 대한 형태학적 차이, 일반성분 및 무기성분을 조사하였다. 원소조성 및 일반성분 비교에서는 *Phellinus linteus*, *Phellinus baumii* 그리고 *Phellinus gilvus*의 큰 차이점이 나타나지 않았다.

나. *Phellinus gilvus*(PGE), *Phellinus linteus*(PLE) 그리고 *Phellinus baumii*(PBE)의 열수추출물에 대하여 SRB법과 MTT법으로 종양세포주(Sarcoma 180과 P388)를 이용하여 항암활성을 비교, 평가하였다. PGE, PLE 및 PBE는 Sarcoma 180과 P388에 항암활성을 보여주었다. PLE는 sarcoma 180 종양세포에 가장 효과가 뛰어났으나($P < 0.05$), SRB법에서는 PGE가 P388에 대해 가장 큰 항암활성을 나타내었다($P < 0.05$).

다. *Phellinus gilvus*에 대한 반응표면분석법을 사용하여 추출시 최적화조건을 구하여 항암물질 추출에 미치는 변수들간의 상호작용을 조사하였다. 추출시간은(8, 10, and 12 h, X1), 추출온도(80, 90, and 100°C, X2), 그리고 추출량은(water to sample ratios)(W/S)(10, 20, and 30 ml/g, X3)으로 중심합성구획법으로 설정하였다. 변수로는 anti-tumor activity(Y1), total sugar(Y2), 그리고 reducing sugar(Y3). 예비실험결과 이 모델의 신뢰계수는 Y1, Y2, 그리고 Y3는 0.9578($P < 0.01$), 0.9276($P < 0.01$), 그리고 0.9832($P < 0.001$)였다. 그 결과 최적추출조건은 anti-tumor activity, total sugar, 그리고 reducing sugar에 대하여 10.40 h, 98.2°C, 그리고 22.9 ml/g로 각각 설정되었다.

라. 5 종류의 원목과 톱밥 재배를 수행하여 일반성분을 비교하였다. DPPH assay와

Xanthine oxidase assay를 측정 결과 뽕나무 톱밥, 참나무 톱밥, 아카시아 원목, 느릅나무 원목에서 재배한 진흙버섯이 항산화능력이 높게 나왔다. 항암활성의 비교 결과 고농도에서 Sarcoma 180에 대해서는 70~80%의 항암활성을 보였고, P388D1에서는 90~95%의 항암활성을 보여 각각의 처리별은 큰 차이 없이 고농도에서 높은 항암활성을 보였다.

마. *Phellinus gilvus* 추출물과 항암제인 doxorubicin의 병용투여를 실시하여 SRB and MTT assay로 P388과 Sarcoma180 세포주를 이용하였다. PGE의 병용투여로 Doxorubicin의 항암활성은 크게 증가를 하였으며 PGE와 병용투여 시 Doxorubicin의 용량을 감소시킬 수 있는 결과를 얻었다.

바. *Phellinus gilvus*(PGE)에 대한 급성경구독성의 LD₅₀는 5,000 mg/kg 이상으로 안전한 물질로 나타났다.

사. 진흙버섯 자실체의 열수 추출물은 백혈구의 수를 감소시킴으로, 급성 호흡기 염증 억제 효과가 우수함을 알 수 있다. LPS로 처리한 랫드의 기관지액에서 TNF- α 와 IL-1 β 가 유의성있는 증가를 보여주었다. IL-1 β 의 농도는 실험군1에서 대조군보다 3배 정도 증가하였고, 실험군2에서는 대조군보다 1.7배 정도 증가하여, 본 발명의 진흙버섯 자실체의 열수 추출물이 염증반응을 효과적으로 억제함을 알 수 있다.

아. 참나무 원목에서 열수추출, 20, 40, 60 그리고 80%의 에탄올 추출물에 대한 항암활성(IC₅₀) 결과 148, 99, 83, 75 그리고 24 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 수치를 보여주었으며 참나무 톱밥에서는 63, 32, 24, 20 그리고 18 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 IC₅₀ 값을 보여주었다.

자. 임프구 세포의 증식을 조사한 결과. PB, PG, PL는 LPS 혹은 Con A의 mitogen이 없는 control 비장세포 배양에서도 증식반응 유도하여 그 자체가 mitogenic activity를 갖고 있음을 보여주었다. 진흙버섯 추출액을 8, 16, 32 및 64 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 처리하고 24시간 배양 후 측정된 fluorescent bead 탐식능 활성 결과는 PG > PB

> PL의 순으로 거식세포 기능을 향진하는 효능이 관찰되었다.

2. 협동과제 : 진흙버섯 품종별 인공재배기질 다양화연구

- 가. 균주는 기확보되어 있는 것과 장수상황, 고려상황 2품종은 육성기관인 농촌진흥청 응용미생물학과와 논공농산에서 분양을 받고, 경북농업기술원에서 자체개발된 품종인 마른상황버섯을 1차년도에 기확보하였으며 현재 고려상황, 장수상황, 마른진흙버섯은 경북농업기술원 시험포장에 재식되어 관리되고 있다.
- 나. *Phellinus gilvus*(품종명: 황금, 일반명: 마른진흙버섯), *Phellinus baumii*(품종명: 장수상황), *Phellinus linteus*(품종명: 고려상황) 진흙버섯류 3종의 현미경적 구조를 조사한 결과 3종간 유사하나, 미세한 차이를 보였다.
- 다. 마른진흙버섯의 톱밥을 이용한 인공재배법에 대한 우선권을 갖기 위해서 “톱밥을 포함하는 마른진흙버섯 배양용 배지 및 상기배지를 이용하여 마른진흙버섯을 인공재배하는 방법”이란 명칭으로 특허를 출원하였다.
- 라. 배지재료로 사용한 참나무톱밥, 뽕나무톱밥, 느릅나무톱밥, 아카시아나무톱밥, 사과나무톱밥 등 5종의 화학적 특성을 조사한 결과 T-C는 참나무톱밥이 53%, 뽕나무톱밥 55%, 느릅나무톱밥 50%, 아카시아나무톱밥 51%, 사과나무톱밥 54%로 나무종류간에는 비슷하였고, pH는 참나무톱밥 5.9, 뽕나무톱밥 6.4, 느릅나무톱밥 6.8, 아카시아나무톱밥 5.8, 사과나무톱밥 5.3으로 참나무톱밥, 사과나무톱밥은 약산성을 나타내었고, 뽕나무톱밥과 느릅나무톱밥은 상대적으로 중성을 나타내었다.
- 리. 마른진흙버섯의 인공재배 시 나무종류별 원목배지 및 톱밥배지의 재배 가능성을 구명하기 위해 참나무, 뽕나무, 느릅나무, 아카시아나무, 사과나무 5종의 톱밥 및 원목을 이용해 균사배양상태를 조사하였다. 5종 원목배지는 각 처리별 배양완성일수는 54~63일로, 5종의 톱밥배지 각 처리별 배양완성일수 27~33일보다 약 2배정도 소요되는 경향이였다.

바. 버섯 원기가 형성되는 초발이소요일수는 5종류의 원목배지에서는 처리별로 12~15일 이었으며, 5종의 톱밥배지에서는 11~14일로 원목배지와 톱밥배지가 비슷하였다. 5종의 원목 및 톱밥배지에서의 자실체 생육특성은 건물중이 참나무원목배지에서 63 g, 참나무톱밥배지 75 g, 느릅나무원목배지 10 g, 느릅나무톱밥배지 33 g, 사과나무원목배지 46 g, 사과나무톱밥배지 54 g 등으로 각 수종별로 원목을 이용한 인공재배보다 톱밥이용재배가 수량성이 높고, 5종 나무 종류 중에서는 참나무원목배지 및 참나무톱밥배지가 다른 수종보다 수량성이 높음을 알 수 있다.

사. 진흙버섯(장수상황)에 자실체에 발생한 푸른곰팡이병을 분리하여 균학적특성 조사 결과 *Penicillium citrinum*으로 동정하였으며, 이병의 방제를 위해 진흙버섯류 재배시 복토제로 쇄석을 처리 시험을 한 결과 마른진흙버섯의 경우 푸른곰팡이병 발병율이 생육초기에 복토재를 모래, 마사토를 사용한 곳에서는 3-5%로 장수상황의 10%에 비해 낮았으며, 복토재를 쇄석을 처리한 곳에서는 푸른곰팡이병이 발생치 않았다.

아. 고령균 성산면, 의성균 안계면, 안동시 풍산읍의 경우 5종의 원목 및 톱밥배지에서의 자실체 생육특성은 건물중이 참나무원목배지에서 59 g, 참나무톱밥배지 70 g, 느릅나무원목배지 21 g, 느릅나무톱밥배지 27 g, 사과나무원목배지 42 g, 사과나무톱밥배지 49 g 등으로 각 수종별로 원목을 이용한 인공재배보다 톱밥이용재배가 수량성이 높고, 5종나무 종류 중에서는 참나무원목배지 및 참나무톱밥배지가 다른 수종보다 수량성이 높음을 알 수 있다.

제 6 장 연구개발결과의 활용계획

제 1 절 활용 분야 및 활용 방안

1. 활용분야

- 가. 마른진흙버섯 추출물은 항암치료 보조제, 호흡기질환 완화제, 면역활성 증진용의 목적으로 건강 기능성원료 물질 혹은 식품보조재료로 활용
- 나. 기존의 고가 상황버섯 대신에 저렴한 가격으로 기업체에 공급 가능
- 다. 기존의 고가 상황버섯의 개념에서 일반 대중이 쉽게 이용이 가능

2. 활용방안

- 가. 마른진흙버섯 추출물의 첨가로 기능성식품, 기능성음료로 이용이 가능
- 나. 다른 농작물의 추출물과 혼합한 건강기능 강화 식품 및 음료로 이용이 가능
- 다. 화장품의 원료로 이용이 가능

제 2 절 현장보급방안, 산업화 계획방안 및 기술이전 방안

- 1.. 버섯농가의 실증시험의 완료로 사실상 재배 이전이 완료
- 2.. 필요시 농민에게 교육하였으며 농가에게 기술이전 실시 중
- 3.. 2003년 2건의 특허출원이 (주)천년초에 기술이전 상품 디자인 등 완료
- 4.. 시제품은 생산되었으나 상품화에 대한 계획을 논의 중에 있음.

제 3 절 추가 기술개발 방안

1. 마른진흙버섯 이외 현재 식품으로 사용이 가능한 상황버섯을 동시에 연구되어 마른진흙버섯의 상품화는 어려우나 다른 상황버섯은 쉽게 상품화가 가능
2. 마른진흙버섯은 현재 농산물로 유통이 되나 식품으로 가공시 식약청의 제제를 받으므로 식품부 원료로 사용 가능할 수 있도록 안전성 시험 등 추가적인 실험이 필요함
3. 마른진흙버섯에 대한 연구는 국내에서 처음 실시되었으므로 응용에 대한 추가적인 연구가 필요함

제 4 절 연구개발결과의 활용

1. 재배법 및 기술공정 및 응용제품에 대한 특허출원
2. 농가로 마른진흙버섯 재배 기술이전
3. 기술이전기업체와 상품화에 대한 지속적인 협의



4. 많은 연구결과를 얻기 위하여 마른진흙버섯추출물을 관심있는 연구자에게 제공
5. 연구과제 기간 중에 발표한 연구결과 목록

[학회발표]

1. U-sik Jo, Youn-ghyun Rew, Chang-bae Kim, Sung-guk Choi, Jae-youl Uhm, Jae-sung Bae, **Seung-chun Park**. Development of fruitbody in the artificial Oak Sawdust cultures of *Phellinus gilvus*. 2003 International Meeting of the Federation of Korean Microbiological Societies.
2. Jae-sung Bae, Kwang-ho Jang, Man-hee Rhee, Woo-sik Jo, Sung-guk Choi and **Seung-chun Park**. Comparative cytotoxicity of extracts derived from fruiting body of *Phellinus* spp. by MTT assay on murine P388 leukemic and Sarcoma 180. 한국임상수의학회 & 한국전통수의학회, 2003, 10월, 전주, 109
3. Jae-sung Bae, Kwang-ho Jang, Man-hee Rhee, Woo-sik Jo, Sung-guk Choi and **Seung-chun Park**. Comparative anticancer activity of extracts from fruiting body of *Phellinus* spp. by SRB assay on murine P388 leukemic and Sarcoma 180. 한국임상수의학회 & 한국전통수의학회, 2003, 10월, 전주, 114
4. Jae-sung Bae, Kwang-ho Jang, Sung-guk Choi, Woo-sik Jo, Man-hee Rhee, Jae-chan Song, **Seung-chun Park**. Optimization for hot water extraction conditions of *Phellinus gilvus* using Response Surface Methodology. Journal of Veterinary Science 4(2):60(suppl.) 2003. Daejeon, Korea.
5. **박승춘**, 조우식, 최성국. 진흙버섯 자실체를 이용한 기능성제품의 개발. 2004 버섯관련 농림기술설명회, 한국버섯학회 심포지움 및 상품전시회. 128-135, 농림부 (농림기술관리센터)
6. Young-se Cho, Chang-hyun Song, Jae-sung Bae, Wen-xue Lee, **Seung-chun Park**, Kwang-ho Jang. Healing of full-thickness skin wounds by polysaccharides isolated from *Phellinus gilvus* in dogs. 한국임상수의학회, 서울, 20(1, suppl. 1):105
7. Jae-sung Bae, Kwang-ho Jang, **Seung-chun Park**. Optimization of hot water extraction for *Phellinus gilvus* by response surface methodology. 한국임상수의학회, 2003, 11. 16, 서울, 157
8. Jae-sung Bae, Hee-kyung Jin, **Seung-chun Park**, Kwang-ho Jang.

- Prevention of intraperitoneal abscesses and adhesions using polysaccharide derived from *Phellinus* spp. in a rat peritonitis Model. 한국임상수의학회, 2003, 11. 16, 서울, 133.
9. Zhi-qiang Chang, Mi-Hyun Hwang, Kil-Soo Kim, Jae-Chan Song, **Seung-Chun Park**. The in vitro Anti-platelet Aggregation, Antioxidant Activities of Various Extracts of *Phellinus gilvus* and Cellular Immunity Activity of *Phellinus gilvus* polysaccharide, The 49th annual Meeting of the Korean Society of Veterinary Science, 133. 2005.09.23, Jeju.
 10. Zhi-qiang Chang, Mi-hyun Hwang, **Seung-chun Park**. Effects of *Phellinus baumii* polysaccharides on cellular immunity and the release of nitric oxide RAW264.7 Macrophage. Microorganisms and human well-being. Seoul, Korea. The Korean Society for Microbiology and Biochemistry, 401, F-1, 6/30-7/1. 45-04-10.
 11. 강성철, 황미현, 조우식, 김영환, 김길수, 송재찬, 이만휘, 김태완, **박승춘**. 3 종류의 진흙버섯(*Phellinus baumii*, *Phellinus gilvus* and *Phellinus linteus*) 자실체 추출물에 대한 면역활성 비교. *The 48th* Annual Meeting of the Korean Society of Veterinary Science, 2004, 44(3):199, Kyungju, 2004, The Korean Society of Veterinary Science
 12. Mi-hyun Hwang, Kil-soo Kim, Jae-chan Song, Man-hee Rhee, Tae-wan Kim, Kil-soo Kim, Woo-sik Jo, Sung-kuk Choi, Jong-choon Kim, **Seung-chun Park**. Antioxidant and mutagenicity activity of extracts derived from the fruiting body of *Phellinus gilvus*. 2004, *The 48th* Annual Meeting of the Korean Society of Veterinary Science, 44(3): 202, Kyungju, 2004, The Korean Society of Veterinary Science.

[특허출원]

13. **박승춘**, 최성국, 조우식. 마른진흙버섯 자실체의 추출물을 유효성분으로 함유하는 조성물. 특허출원 2003-61937호, 출원일 2003년 9월 4일.

14. **박승춘**, 배재성, 최성국, 조우식. 진흙버섯 자실체의 열수 추출물을 유효성분으로 하는 급성 호흡기 질환의 예방 및 치료용 조성물. 특허출원 제2003-88748호, 출원일, 2003년 12월 8일
15. 조우식, 최성국, **박승춘**, 배재성. - 명칭: 툽밥을 포함하는 마른진흙버섯 배지 및 상기배지를 이용하여 마른진흙버섯을 인공재배 하는 방법. - 출원인: 경상북도(승계청:경상북도농업기술원, 관리청:경상북도 도지사), 특허출원 제 2003-91641호, - 출원일 : 2003년 12월 15일.

[국내논문]

16. Jae-sung Bae, Kwang-ho Jang, Man-hee Rhee, Kyu-shik Jeong, Woo-sik Jo, Sung-guk Choi, Young-hoan Kim, **Seung-chun Park**. Comparison on the morphology, general composition, elemental composition and mineral contents of *Phellinus linteus*, *Phellinus baumii* and *Phellinus gilvus*. Korean J Vet Res, 43(3):423-428.
17. Jae-sung Bae, Kwang-ho Jang, Sung-Guk Choi, Woo-sik Jo, Man-hee Rhee, Oh-Deog Kwon, Young-hoan Kim, Eun-young Kim, **Seung-chun Park**. Acute oral toxicity of extract derived from fruiting body of *Phellinus gilvus* in rats. J. Toxicol. Pub. Health. 19(3):211-215, 2003.
18. Jae-Sung Bae, Kwang-Ho Jang, Man-Hee Rhee, Keun-Woo Lee, Woo-Sik Jo, Sung-Kuk Choi, Hyo-In Yun, Jong-Hwan Lim, Jong-Choon Kim and **Seung-Chun Park**. Comparative Antitumor Activity of Water Extracts from Fruiting Body of *Phellinus linteus*, *Phellinus baumii* and *Phellinus gilvus*. J. Toxicol. Pub. Health. 20(1): 37-42(2004)
19. Mi-hyun Hwang, Young-hoan Kim, Kil-soo Kim, Tae-wan Kim, Woo-sik Jo, Sung-guk Choi, Jong-choon Kim, and **Seung-chun Park**. Antioxidant and antitumor activities of ethanol extracts from the fruiting body of *Phellinus gilvus* grown in oak and artificial sawdust. *Korean J Vet Res*(2005) 45(2):151-154

[SCI 논문]

20. Beom-Su Jang, Jong Chun Kim, Jae-Sung Bae, Man-Hee Rhee, Kwang-Ho Jang, Jae-Chan Song, Oh-Deog Kwon, **Seung-Chun Park**. Extracts of *Phellinus gilvus* and *Phellinus baumii* inhibit pulmonary inflammation induced by lipopolysaccharide in rats. 2004, Biotechnology Letters, 26:31-33.
21. Bae JS, Jang KH, Yim H, **Park SC**, Jin HK. Inhibitory effects of polysaccharides isolated from *Phellinus gilvus* on benzo(a)pyrene-induced forestomach carcinogenesis in mice. World J Gastroenterol. 2005 Jan 28;11(4):577-579.
22. Bae JS, Jang KH, **Park SC**, Jin HK. Promotion of dermal wound healing by polysaccharides isolated from *Phellinus gilvus* in rats. J Vet Med Sci. 2005 Jan;67(1):111-114.

[본 연구사업에서 제공한 마른진흙버섯 추출물에 의한 SCI 논문]

23. Bae JS, Jang KH, and Jin HK(2005). Effects of natural polysaccharides on the growth and peritoneal carcinomatosis of human gastric adenocarcinoma in a nude mouse model. Cancer Letters, In press.
24. J. S. Bae, SJ Ahn, KH Jang, H Yim, HK Jin.(2005) Prevention of intraperitoneal adhesions and abscesses by polysaccharides isolated from *Phellinus* spp. in a rat peritonitis model. Annals of Surgery. 241(3):534-540.
25. J. S. Bae, KH Jang, SC Park, HK Jin.(2005) Promotion of dermal wound healing by polysaccharides isolated from *Phellinus gilvus* in rats. The Journal of Veterinary Medical Science. 67(1):111-114.
26. J. S. Bae, KH Jang, HK Jin.(2005) Comparison of intraperitoneal anti-adhesive polysaccharides derived from *Phellinus* mushrooms in a rat peritonitis model. World Journal of Gastroenterology. 11(6): 810-816.
27. J. S. Bae, KH Jang, H Yim, HK Jin.(2005) Polysaccharides isolated from *Phellinus gilvus* inhibit melanoma growth in mice. Cancer Letters. 218(1):

43-52.

28. J. S. Bae, HK Jin, KH Jang.(2004) The effect of polysaccharides and carboxymethylcellulose combination to prevent intraperitoneal adhesion and abscess formation in a rat peritonitis model. The Journal of Veterinary Medical Science. 66(10): 1205-1211.

제 7 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

1. 연구 기간 중 진흙버섯류에 대한 국제 특허를 중심으로 분석하고 연구를 진행시켜 앞으로 상품 개발에 이용하고자 하였다. 진흙버섯 관련 특허로는 국내 연구진과 일본연구진 만이 미국특허를 등록하였다.(특허등록번호 US-0149117/20041026).

1) 특허제목으로는 “Compositions containing polysaccharides from *Phellinus linteus* and methods for treating diabetes mellitus using same” 으로 당뇨병 환자를 위한 다당체 이용에 대한 조성물 특허이다. 청구범위를 보면 아래와 같다.

1. A composition comprising a polysaccharide substance(PL) as an active component from *Phellinus linteus* for treating diabetes mellitus, wherein the polysaccharide substance has the following features:(a) said polysaccharide substance comprises 13.2% proteins and 82.5% saccharides, wherein 6.8(b) molecular weight of PL is 153 KD; and(c) the neutral sugar composition of the PL consists of 7.0% Ara, 3.7% Xyl, 21.1% Glc, 24.1% Gal, and 44.2% Man. 2. The composition of claim 1, wherein the composition further comprises a pharmaceutically accep carrier. 3. A method for treating diabetes mellitus in a patient in need thereof, comprising administering to the patient a therapeutically effective amount of the composition of claim 1. 4. The method of claim 3, wherein said diabetes mellitus is insulin-dependent diabetes mellitus. 5. The method of claim 3, wherein the PL is administered to said patient in an amount of about 100 mg/kg of body weight. 6. The method of claim 3, wherein said composition is administered to said patient via intraperitoneal injection. 7. The method of claim 3, wherein said composition is administered to said patient every other day.

2) 특허제목으로 “Physiologically active substance EEM-S originating in mushrooms, process for producing the same and drugs”로 버섯에서 유래된 다당류를 약으로 개발하고자 하는 내용으로 특허번호 US-6783771/20040831이다.

그 외 국제특허를 나열하면 한국과 일본에서 제출한 특허가 주를 이루면 주로 기능성식품과 제약의 보조성분에 대한 특허가 주를 이루고 있다.

- 1) EXTRACTION METHOD OF BETA GLUCAN FROM PHELLINUSLINTEUS THROUGH CELL DESTRUCTION AND ENZYME FERMENTATION METHOD, KIM, Kwan-Ho, KR, 2004050
- 2) METHOD OF EXTRACTING CRUDE BETA GLUCAN FROM PHELLINUS INTEUS, KIM, Kwan Ho, KR, 2003082
- 3) HISTAMINE RELEASE INHIBITOR, AKIYAMA, Yukihiro, JP; NAKAMURA, Tomoyuki, JP,2003120
4. IDENTIFYING PARASITIC FUNGI OF THE ORGANISM, AND TREATMENT THEREOF, ANTONOV, Roumen, FR,2002052
5. IDENTIFYING PARASITIC FUNGI OF THE ORGANISM, AND TREATMENT THEREOF, ANTONOV, Roumen, FR,;2002052
6. NOVEL USE OF POLYSACCHARIDE FROM PHELLINUSLINTEUS FOR TREATING DIABETES MELLITUS, KOREA RESEARCH INSTITUTE OF BIOSCIENCE AND BIOTECHNOLOGY ; KIM, Hwanmook ; HAN, Sangbae ; LEE, Changwoo ; LEE, Kihoon ; HONG, Dongho,2000081
7. PHYSIOLOGICALLY ACTIVE SUBSTANCE EEM-S ORIGINATING IN MUSHROOMS, PROCESS FOR PRODUCING THE SAME AND DRUGS LIFE SCIENCE LABORATORIES CO., LTD. ; IKEKAWA, Tetsuro ; IKEKAWA, Akiko ; SHIMADA, Fumitake,2001011
8. HEALTH BEVERAGE CONTAINING THE EXTRACT OF PHELLINUS LINTEUS, HAN KOOK SIN YAK PHARM. CO., LTD. ; HONG, Nam-Doo ; HAN, Man-Woo ; YOO, Jae-Kuk,1997112
9. A REMOVAL METHOD OF AGRICULTURAL CHEMICAL RESIDUES ON ROOT CROPS AND NEW FUNCTIONAL FOODS DERIVED FROM ITS PROCESS, PARK, Dong Ki, KR, 2004062

10. MANUFACTURING METHOD FOR EXTRACT OF PHELLINUSLINTEUS,
THE EXTRACT AND FOOD COMPOSITIONS COMPRISING THEREOF
REPUBLIC OF KOREA(MANAGEMENT : RURAL DEVELOPMENT
ADMINISTRATION), KR;JINJU SANGWHANG MUSHROOM AGRICULTURAL
MANAGEMENT ASSOCIATION, KR, 2004063

제 8 장 참고문헌

1. A.O.A.C., Official Method of Analysis, 15th ed., Association of Official Analytical Chemists, Washington DC.(1980).
2. Ajith TA, Janardhanan KK. Antioxidant and antihepatotoxic activities of *Phellinus rimosus*(Berk) Pilat. *J Ethnopharmacol.*(2002). 81:387-391
3. Ajith TA, Janardhanan KK. Antioxidant and anti-inflammatory activities of methanol extract of *Phellinus rimosus*(Berk) Pilat. *Indian J Exp Biol.*(2001). 39:1166-1169
4. Ajith TA, Janardhanan KK. Cytotoxic and antitumor activities of a polypore macrofungus, *Phellinus rimosus*(Berk) Pilat. *J Ethnopharmacol.*(2003). 84:157-162
5. Ajith TA, Jose N, Janardhanan KK. Amelioration of cisplatin induced nephrotoxicity in mice by ethyl acetate extract of a polypore fungus, *Phellinus rimosus*. *J Exp Clin Cancer Res.*(2002). 21:213-217
6. Alphons G.J. Voragen, Technological aspects of functional food-related carbohydrates. *Trends in Food Science & Technology.*(1998). 9:328-335
7. Atsumi S, Nosaka C, Ochi Y, Iinuma H, Umezawa K. Inhibition of experimental metastasis by an alpha-glucosidase inhibitor, 1,6-epi-cyclophellitol. *Cancer Res.*(1993). 53:4896-4899
8. Atsumi S, Umezawa K, Iinuma H, Naganawa H, Nakamura H, Iitaka Y, Takeuchi T. Production, isolation and structure determination of a novel beta-glucosidase inhibitor, cyclophellitol, from *Phellinus* spp. *J Antibiot(Tokyo).*(1990). 43:49-53
9. Ayer WA, Muir DJ and Chakravarty P, Phenolic and other metabolites of *Phellinus pini*, a fungus pathogenic to pine. *Phytochemistry.*(1996). 42:1321-1324
10. Bae JS, Jang KH, Choi SG., Jo WS, Rhee MH and Park SC. Acute oral

- toxicity of extract derived from fruiting body of *Phellinus gilvus* in rats. *J Toxicol Pub Health*.(2003). 19:211-215
11. Bae, EA, Cho, SM, Hong, ND, Kim, DH, Lee, CB, Yoo, JG. Pharmaceutical composition for treatment of lung cancer, containing as active ingredient polysaccharides obtained by extracting and purifying mycelium of *Phellinus linteus*. *Repub. Korean Kongkae Taeho Kongbo*.(2003). 63-64
 12. Bucci SJ, Scholz FG., Goldstein G, Meinzer FC and Sternberg LDA SL, Dynamic changes in hydraulic conductivity in petioles of two savanna tree species: factors and mechanisms contributing to the refilling of embolized vessels. *Plant Cell and Environment*.(2003). 26:1633-1645
 13. Chang, ST. Global impact of edible and medicinal mushrooms on human welfare in the 21st century: nongreen revolution. *Int. J. Med. Mushrooms*.(1999). 1:1-8
 14. Chihara G., Maeda Y.Y, Hamuro J. Current status and perspectives of immunomodulators of microbial origin. *Int. J. Tiss. Reac*.(1982). 4:207-225
 15. Cho JH, Cho SD, Hu H, Kim SH, Lee SK, Lee YS, Kang KS. The roles of ERK1/2 and p38 MAP kinases in the preventive mechanisms of mushroom *Phellinus linteus* against the inhibition of gap junctional intercellular communication by hydrogen peroxide. *Carcinogenesis*.(2002). 23:1163-1169
 16. Choi, SB, Park, CH, Choi, MK, Jun, DW, Park, SM. Improvement of insulin resistance and insulin secretion by water extracts of *Cordyceps militaris*, *Phellinus linteus*, and *Paecilomyces tenuipes* in 90% pancreatectomized rats. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*.(2004). 68: 2257-2264
 17. Dai YC and Xu MQ. Studies on the medicinal polypore, *Phellinus baumii*, and its kin, *Phellinus linteus*. *Mycotaxon*.(1998). 67:191-200
 18. Dombrows'ka OM, Kostyshyn SS. [Biotransformation of lignocellulose by the fungi *Pleurotus floridae*(Fries) Kummer and *Phellinus igniarius*(Linneaus:Fries) Quelet--the pathogens of white rot in trees] *Ukr*

- Biokhim Zh.*(1998). 70:68-74.
19. Franz, G. Polysaccharides in pharmacy: current applications and future concepts. *Planta Med.*(1989). 55: 493-497.
 20. Haaland PD, Experimental design in biotechnology. Dekker, New York,(1989). 19-35.
 21. Han SB, Lee CW, Jeon YJ, Hong ND, Yoo ID, Yang K H, Kim HM. The inhibitory effect of polysaccharides isolated from *Phellinus linteus* on tumor growth and metastasis. *Immunopharmacology.*(1999), 41:157-64.
 22. Han, YS., Park, SY., Choi, BK., Choung, SY. Acute oral toxicity studies of extract of sanghwang mushroom(*Phellinus linteus*). *J. applied pharmaco.*(2001). 9:46-50.
 23. Harper DB, Kalin RM, Hamilton JT, Lamb C. Carbon isotope ratios for chloromethane of biological origin: potential tool in determining biological emissions. *Environ Sci Technol.*(2001). 35:3616-3619.
 24. Hirase, S., Nakai, S., and Aktsu, T. Structure studies on the antitumor active polysaccharides from *Coriolus versicolor*(Basidiomycetes).I. Fractionation with barium Hydroxide. *Yakugaku Zasshi.*(1976). 96:413-418.
 25. Hwang EI, Yun BS, Kim YK, Kwon BM, Kim HG, Lee HB, Jeong WJ, Kim SU. Phellinsin A, a novel chitin synthases inhibitor produced by *Phellinus* spp. PL3. *J Antibiot(Tokyo).*(2000). 53:903-911.
 26. Hwang HJ, Kim SW, Xu CP, Choi JW, Yun JW. Morphological and rheological properties of the three different species of basidiomycetes *Phellinus* in submerged cultures. *Journal of applied microbiology.*(2004). 96:1296-1305.
 27. Hwang HJ, Kim SW, Lim JM, Joo JH, Kim HO, Kim HM, Yun JW. Hypoglycemic effect of crude exopolysaccharides produced by a medicinal mushroom *Phellinus baumii* in streptozotocin-induced diabetic rats. *Life sciences.*(2005). 76:3069-3080.
 28. Ikekawa T, Nakanishi M, Uehara N, Chihara G and Fukuoka F, Antitumor

- action of some basidiomycetes, especially *Phellinus linteus*. *Gann.*(1968). 59:155-157.
29. Ishihara, Shinji; Watanabe, Toshiro; Mazumder, Tapan Kumar; Nagai, Shiro; Tsuji, Keisuke. Effect of a hot water extract from *Phellinus linteus* mycelia on postprandial blood glucose level. *Nippon Eiyo, Shokuryo Gakkaishi.*(2005). 58:225-229.
 30. Jang, BS, Kim, JC, Bae, JS, Rhee, MH, Jang, KH, Song, JC, Kwon, OD and Park, SC. Extracts of *Phellinus gilvus* and *Phellinus baumii* inhibit pulmonary inflammation induced by lipopolysaccharide in rats. *Biotechnol. Lett.*(2004). 26:31-33.
 31. Jo WS, Rew YH, Kim CB and Choi SG, Development of fruitbody in the artificial oak sawdust cultures of *Phellinus gilvus* Mushroom. *Korean J Mycol.*(2002). 30:109-112.
 32. Jong, SC and JM Birmingham. Medicinal benefits of the mushroom *Ganoderma*. *Advances in Appl. Microbiol.*(1992). 37: 104-134.
 33. Jung HG, Valdez FR, Abad AR, Blanchette RA, Hatfield RD. Effect of white rot basidiomycetes on chemical composition and in vitro digestibility of oat straw and alfalfa stems. *J Anim Sci.*(1992). 70:1928-1935.
 34. Jung IC, Kim SH, Kwon YI, Kim SY, Lee JS, Park S, Park KS and Lee JS, Cultural condition for the mycelial growth of *Phellinus igniarius* on chemically defined medium and grains. *Korean J Mycol.*(1997). 25:133-142.
 35. Jung, YC. *Phellinus linteus*-based health food. *Repub. Korean Kongkae Taeho Kongbo* (2003). Section 17-14. (Food and Feed Chemistry)
 36. Kawagishi, H, Isagaki, R, Kanto, T and Mizuno, T. Fractionation and antitumor activity of the water-insoluble residue of *Agaricus blazei* fruiting bodies. *Carbohydrate Res.*(1989). 186:267-273.
 37. Keepers, YP, Pizao, PE, Peters, GJ, van, Ark-Otte J., Winograd, B., Pinedo, HM. Comparison of the sulforhodamine B protein and tetrazolium(MTT)

- assays for in vitro chemosensitivity testing. *Eur. J. Cancer.*(1991). 27:897-900
38. Kim HM, Han SB, Kim MS, Kang JS, Oh GT and Hong DH. Efficient fixation procedure of human leukemia cells in sulforhodamine B cytotoxicity assay. *J Pharmacol Toxicol Methods.*(1996). 36:163-169.
39. Kim HM, Han SB, Oh GT, Kim YH, Hong DH, Hong ND, Yoo ID. Stimulation of humoral and cell mediated immunity by polysaccharide from mushroom *Phellinus linteus*. *Int J Immunopharmacol.*(1996). 18:295-303.
40. Kim SW, Hwang HJ, Park JP, Cho YJ, Song CH, Yun JW. Mycelial growth and exo-biopolymer production by submerged culture of various edible mushrooms under different media. *Lett Appl Microbiol.*(2002). 34:56-61.
41. Kim, GY, Choi, GS, Lee, SH, Park, YM. Acidic polysaccharide isolated from *Phellinus linteus* is enhanced through the up-regulation of nitric oxide and tumor necrosis factor- α from peritoneal macrophages. *Journal of Ethnopharmacology.*(2004). 95:69-76.
42. Kim, GY, Han, MG, Song, YS, Shin, BC, Shin, YI, Lee, HJ, Moon, DO, Lee, CM, Kwak, JY, Bae, YS, Lee, JD, Park, YM. Proteoglycan isolated from *Phellinus linteus* induces toll-like receptors 2- and 4-mediated maturation of murine dendritic cells via activation of ERK, p38, and NF- κ B. *Bio Pharma Bull.*(2004). 27:1656-1662.
43. Kim, HM, Han, SB, Kim, MS, Kang, JS, Oh, GT, Hong, DH. Efficient fixation procedure of human leukemia cells in sulforhodamine B cytotoxicity assay. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods.*(1996). 36:163-169.
44. Kim, KH, Roh, IK. Extraction of crude β -glucan from *Phellinus linteus*. *PCT Int. Appl.*(2004). pp 15.
45. Kim, KH, Roh, IG. High yield extraction of β -glucan from *Phellinus linteus*. *PCT Int. Appl.*(2004). pp 14.
46. Kim, SH, Song, YS, Kim, SK, Kim, BC, Lim, CJ, Park, EH. Anti-inflammatory and related pharmacological activities of the n-BuOH

- subfraction of mushroom *Phellinus linteus*. *J. Ethnopharmacol.*(2004). 93:141-146.
47. Kirk, PM., Cannon, PF., David, JC., and Stalpers, JA. Ainsworth and Bisby's dictionary of the fungi. 9th edn., *CAB International, Wallingford.*(2001).
48. Kondo, Akira. Fermented meshimakobu(*Phellinus linteus*) health foods. *Jpn. Kokai Tokkyo Koho.*(2005). pp 8.
49. Kruger G, Pfeil E. Purification and characterization of peroxidase from *Phellinus igniarius*(author's transl). *Arch Microbiol*(German).(1976). 109:175-179.
50. Lee JH, Cho SM, Kim HM, Hong ND and Yoo ID, Immunostimulating activity of polysaccharides from mycelia of *Phellinus linteus* grown under different culture conditions. *J Microbiol.*(1996). 6:52-55.
51. Lee JH, Cho SM, Song KS, Hong ND, Yoo ID. Characterization of carbohydrate-peptide linkage of acidic heteroglycopeptide with immuno-stimulating activity from mycelium of *Phellinus linteus*. *Chem Pharm Bull(Tokyo).*(1996). 44:1093-1095.
52. Lee, HJ, Lee, HJ, Lim, ES, Ahn, KS, Shim, BS, Kim, HM, Gong, SJ, Kim, DK, Kim, SH. Cambodian *Phellinus linteus* inhibits experimental metastasis of melanoma cells in mice via regulation of urokinase type plasminogen activator. *Biol Pharm Bull.*(2005). 28:27-31.
53. Li, G, Kim, DH, Kim, TD, Park, BJ, Park, HD, Park, JI, Na, MK, Kim, HC, Hong, ND, Lim, K, Hwang, BD, Yoon, WH. Protein-bound polysaccharide from *Phellinus linteus* induces G2/M phase arrest and apoptosis in SW480 human colon cancer cells. *Cancer Lett(Amsterdam, Netherlands).*(2004). 216:175-181.
54. Lim, BO, Jeon, TI, Hwang, SG, Moon, JH, Park, DK. *Phellinus linteus* grown on germinated brown rice suppresses IgE production by the modulation of Th1/Th2 balance in murine mesenteric lymph node lymphocytes. *Biotechnol. Lett.*(2005). 27:613-617.

55. Lim, BO, Yamada, Koji, Cho, BG, Jeon, TI, Hwang, SG, Park, TK, Kang, SA, Park, DK. Comparative study on the modulation of IgE and cytokine production by *Phellinus linteus* grown on germinated brown rice, *Phellinus linteus* and germinated brown rice in murine splenocytes. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*.(2004). 68:2391-2394.
56. Makristathis A, Stauffer F, Feistauer SM and Georgopoulos A. Bacteria induce release of platelet-activating factor(PAF) from polymorphonuclear neutrophil granulocytes: possible role for PAF in pathogenesis of experimentally induced bacterial pneumonia. *Infect Immun*.(1993). 61:1996-2002.
57. Mead R and Pike DJ, A review of response surface methodology from a biometric viewpoint. *Biometrics*.(1975). 31:803-851.
58. Miller GL, Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal Chem*.(1959). 31:426-428.
59. Min KL, Kim YH, Kim YW, Jung HS, Hah YC. Characterization of a novel laccase produced by the wood-rotting fungus *Phellinus ribis*. *Arch Biochem Biophys*.(2001). 392:279-286.
60. Mizuno T, The extraction and development of antitumor-active polysaccharides from medicinal mushroom in Japan. *Int J Med Mushroom*.(1999). 1:9-29.
61. Mizuno, T. Development and utilization of bioactive substances from medicinal and edible mushroom fungi(1). *The chemical times*.(1989). 1:12-21.
62. Mizuno, T. Food function and medicinal effect of mushroom fungi. *Foods & Food Ingredients Journal*.(1993). 158:8-23.
63. Montgomery DC, Response surface methods and other approaches to process optimization. In Design and analysis of experiments(4th edn). *John Wiley & Sons, New York*.(1997). pp 372-422.
64. Moon DC, Hwang KH, Choi KR, Lee YM, Kim JH, Kim JG., Park YH, Kim R and Zee OP, Constituents of ceramide of a native mushroom, '*Phellinus ribis*' in Korea. *Anal Sci Technol*.(1994). 7:547-554.

65. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. immunol. Methods.*(1983). 65:55-63.
66. Nakamura, Tomoyuki; Matsugo, Seiichi; Uzuka, Yasuyuki; Matsuo, Sumitaka; Kawagishi, Hirokazu. Fractionation and anti-tumor activity of the mycelia of liquid-cultured *Phellinus linteus*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry.* (2004). 68:868-872.
67. Reshetnikov, S.V., Wasser, S.P., Tan, K.K. Higher Basidiomycota as a source of antitumor and immunostimulating polysaccharides. *Int. J. Med. Mushroom.*(2001). 3:361-394.
68. Rew, YH, Jo, WS, Jeong, KC., Yoon, JT and Choi, BS. Cultural characteristics and fruitbody formation of *Phellinus gilvus*. *Korean J Mycol.*(2000). 28:6-10.
69. Sasaki T, Arai Y, Ikekawa T, Chihara G, Fukuoka F. Antitumor polysaccharides from some polyporaceae, *Ganoderma applanatum*(Pers.) Pat and *Phellinus linteus*(Berk. et Curt) Aoshima. *Chem Pharm Bull(Tokyo).*(1971). 19:821-826.
70. Sears MR. Descriptive epidemiology of asthma. *Lancet.*(1997). 350(Suppl 2):SIII-SII4.
71. Shon YH, Nam KS. Antimutagenicity and induction of anticarcinogenic phase II enzymes by basidiomycetes. *J Ethnopharmacol.*(2001). 77:103-109.
72. Shon YH, Nam KS. Inhibition of cytochrome P450 isozymes in rat liver microsomes by polysaccharides derived from *Phellinus linteus*. *Biotechnol Lett.*(2003). 25:167-172.
73. Skehan, P., Storeng, R., Scudiero, D., Monks, A., McMahon, J., Vistica, D., Warren, J.T., Bokesch, H., Kenney, S., Boyd, M.R. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. *J. Natl. Cancer Inst.*(1990). 82:1107-1112.
74. Song KS, Cho SM, Lee JH, Kim HM, Han SB, Ko KS, Yoo ID.

- B-lymphocyte-stimulating polysaccharide from mushroom *Phellinus linteus*. *Chem Pharm Bull(Tokyo)*.(1995). 43:2105-2108.
75. Spond J, Case N, Chapman RW, Crawley Y, Egan RW, Fine J, Hey JA, Kreutner W, Kung T, Wang P and Minnicozzi M. Inhibition of experimental acute pulmonary inflammation by pirfenidone. *Pulm Pharmacol Ther.*(2003). 16:207-214.
 76. Spond J, Chapman R, Fine J, Jones H, Kreutner W, Kung TT and Minnicozzi M. Comparison of PDE 4 inhibitors, rolipram and SB 207499(ariflo), in a rat model of pulmonary neutrophilia. *Pulm Pharmacol Ther.*(2001). 14:157-164.
 77. Tzianabos AO, Polysaccharide immunomodulators as therapeutic agents: structural aspects and biological function. *Clin Microbiol Rev.*(2000). 13:523-533.
 78. Warren JS, Barton PA, Mandel DM and Matrosic K. Intrapulmonary tumor necrosis factor triggers local platelet-activating factor production in rat immune complex alveolitis. *Lab Invest.*(1990). 63:746-775.
 79. Wasser SP and Weis AL, Medicinal properties of substances occurring in Higher Basidiomycetes mushrooms: current perspectives. *Int J Med Mushrooms.*(1999). 1:31-62.
 80. Withers SG, Umezawa K. Cyclophellitol: a naturally occurring mechanism-based inactivator of beta-glucosidases. *Biochem Biophys Res Commun.* 1991. 177:532-537.
 81. Saar M. Fungi in Khanty folk medicine. *J Ethnopharmacol.*(1991). 31:175-179.
 82. Yoo, Id, Cho, SM, Park, BW, Yoo, JK. Hong, ND, Kim, HM, Han, SB, Lee, CW. Immuno-stimulating polysaccharide substance from *Phellinus* spp. strain and use thereof. *Eur. Pat. Appl.*(2001). pp 36.
 83. 김길수 , 박준형. 사염화탄소에 의한 랫드의 간손상에 미치는 인진호추출물의 영향 - 2. 혈청내 효소(ALP, LAP) 활성도, 단백, bilirubin 함량 및 간내 glycogen 함량에 미치는 영향. *대한수의학회지*, 32:357-358.

84. 박정식, 장갑열, 차동열, 전창선. 신령버섯 재배 생리 연구. 농촌진흥청 시험연구사업보고서.(1996). pp 645-650.
85. 박정식, 조수목, 정종철, 홍인표, 김양섭. 버섯류로부터 기능성물질 탐색. 농촌진흥청 시험연구사업보고서.(1999).
86. 송치현, 나경수, 양병근 등. 목질진흙버섯(상황버섯)의 면역활성. 한국균학회지,(1998). 26:86-90.
87. 정경수, 김신숙, 김희수 등. 한국산 목재부후균류의 분포상에 대한 연구(II) -담자균류 민주름 버섯목의 분포에 대하여-. 한국균학회지,(1994). 22:62-99.
88. 조수목. 버섯류의 영양성 및 항암성분. 한국버섯연구회 발표집.(2001). 4:1호 17.
89. 조우식, 류영현, 김창배 등. 마른진흙버섯(*Phellinus gilvus*)의 톱밥재배 기술에 관한 연구. 한국균학회지.(2002). 30:109-112.
90. 최 면. 불포화 지방산의 영양학적 중요성과 대사. 식품산업과 영양.(1996). 1:5-9.

[상황버섯관련 국내 특허 인용]

1. 상황버섯 자실체 재배용 용기 / 박준선 KR; 서봉후 KR;(KUUM199807023184)
2. 현미 상황버섯의 재배 방법 / 정홍열 KR(KUPA200300050808)
3. 신경세포 보호활성을 갖는 상황버섯 균사체 추출물 및 이를 함유하는 퇴행성 뇌신경계 질환의 예방 및 치료제 / 주식회사 엘컴사이언스(K32658) KR; 주식회사 머쉬텍(K14842) KR(KUPA200300034420)
4. 꽃송이버섯(하나비라타케, 학명:스파라시스 크리스파) 및 상황버섯(헬리너스 린테우스)의 원목을 이용한 단기재배방법 / 농업회사법인하나바이오텍(주)(K27643) KR(KUPA200200048336)
5. 약용버섯류(동충하초, 상황버섯)의 균사체를 배양한 기능성 쌀의 생산방법 / 주식회사덕승바이오(K30158) KR(KUPA200200086216)
6. 상황버섯추출물과 포도발효액추출물을 함유하는 주름방지용 화장료 조성물 / 나드리화장품주식회사(K6938) KR(KUPA200200084619)
7. 상황버섯 추출물을 포함하는 , 갯 결함을 통한 세포간정보전달의 억제 및 항상성의 불균형과 관련된 질환의 예방 또는 치료용 조성물 / 강경선 KR; 이성구

- KR(KUPA200300026613)
8. 곡립종균을 이용한 인삼 상황버섯 재배 방법 / 김안식 KR(KUPA200300032678)
 9. 액체종균을 이용한 인삼 상황버섯 재배 방법 / 김안식 KR(KUPA200300032677)
 10. 유자 및 상황버섯, 동충하초를 이용한 기능성 화장품 /(주)시로텍코리아(K32389)
KR(KUPA200300027279)
 11. 발아곡물 및 식이섬유 원료를 이용한 버섯 균사체(菌絲體) 생산 방법 / 김천환
KR(KUPA200300026140)
 12. 항산화 효과를 증진시키는 상황버섯의 균사체 제조법 / 한영환
KR(KUPA200300021673)
 13. 화장료 조성물 / 박향진(00000) KR(KUPA200300008710)
 14. 동/식물의 약재를 이용한 건강식품 제조방법 / 조갑환(00000)
KR(KUPA200200078314)
 15. 상황버섯 속성 배양배지 및 이를 이용한 상황버섯 균사체속성 배양방법 /
남경수(00000) KR(KUPA200200074626)
 16. 자연산 상황버섯 추출물 함유 니오솜 및 이를 함유하는 화장료 조성물 /
나드리화장품주식회사(K6938) KR(KUPA200200068154)
 17. 버섯으로부터의 생리 활성 물질 EEM-S, 그의 제조방법 및 의약 /
생명과학연구소 유젠가이샤(J10308) JP(KUPA200200063618)
 18. 순환행어식 상황버섯 재배장치 / 최용주(00000) KR(KUPA200200026106)
 19. 한약성분이 첨가된 한방시트 제조방법 / 주식회사 뉴메디컴(K26035)
KR(KUPA200200023364)
 20. 버섯 균사체가 함유된 녹용 및 물질(VEL-GLUCAN) / 전병태(00000)
KR(KUPA200200019490)
 21. 약용버섯 자실체 또는 균사체의 가공방법과 조성물 / 김천환(00000) KR;
백이호(00000) KR(KUPA200200012391)
 22. 항암음료 / 전병관(00000) KR(KUPA200200007554)
 23. 버섯균사체를 이용한 가축 및 해수어, 담수어, 대하의기능성 사료 제조방법 및
첨가물질 / 앤씨 바이오텍 주식회사(K21853) KR(KUPA200200001692)

24. 자연산 상황 버섯 추출물이 함유된 미백 화장료 / 나드리화장품(주)
KR(KUPA200107070531)
25. 상황 버섯 자실체와 균사체로 부터 얻은 다당체 및 그 제조 방법 / 송치현 KR;
김재백 KR; 손동환 KR(KUPA200106046778)
26. 바나나 농축액을 배지로한 버섯균사체 대량 생산 방법 / 박태웅
KR(KUPA200102008069)
27. 콘드로이친과 상황 버섯 추출물을 함유한 화장품 조성물 / 최찬기 KR; 하배진
KR(KUPA200101000740)
28. 생체내 장관의 건강을 증진시키는 금사 상황 버섯 추출물 / 박순영 KR; 박준덕
KR; 김동현 KR(KUPA200101000327)
29. 상황버섯 균사체의 유가식 배양을 통한 대량 생산 방법 / 환인제약
주식회사(K18345) KR(KUPA200100113057)
30. 한약재를 주원료로 하는 차의 조성물 및 제조 방법 / 인천임업협동조합
KR(KUPA200011066769)
31. 한약재를 주원료로 하는 차의 조성물 및 제조 방법 / 인천임업협동조합
KR(KUPA200011066768)
32. 소양 체질용 건강 보조 식품 조성물 / 오용환 KR(KUPA200011063337)
33. 자연산 상황 버섯 추출물을 함유하는 발모제 조성물 및 이의 제조 방법 / 김상묵
KR(KUPA200009053859)
34. 상황 버섯 쌀의 제조 방법 / 유재문 KR; 박명복 KR(KUPA200007036716)
35. 상황 버섯 재배 방법 및 그 장치 / 한영주 KR; 안기섭 KR; 정선웅
KR;(KUPA200004017853)
36. 건강 음료의 제조 방법 / 동신제약(주)(K1379) KR; 이재성
KR;(KUPA200001001527)
37. 상황 버섯 재배 방법 / 머쉬텍 KR; 성재모 KR; 원종광 KR;(KUPA199912085245)
38. 상황 버섯 인공 재배 방법 및 그 상황 버섯 / 최용주 KR(KUPA199912084079)
39. 자연산 상황버섯을 이용한 피부화장료 / 나드리화장품(주)(K6938)

- KR(KUPA199911081226)
40. 상황 버섯 자실체의 비닐 포트 통나무 재배법 / 박준선 KR; 서봉후
KR;(KUPA199810065335)
41. 상황 버섯 균사체의 비닐 포트 재배 방법 / 박준선 KR; 서봉후 KR; 조선행 KR;
박준덕 KR;(KUPA199806021634)
42. 상황버섯의 원목 인공재배 방법 / 류충현 KR(KUPA199806020240)
43. 상황 버섯의 재배 방법 / 유연광 KR(KUPA199803000015)
44. 버섯의 재배 방법 / 유연광 KR(KUPA199707032365)
45. 상황버섯 조성물의 배양 방법 / 동은개발진흥(주)(K10341)
KR(KUPA199706027297)
46. 자실층 및 균피층이 생성된 상황(목질 진흙 버섯) 인공 배양물로부터 면역 활성
성분 및 암세포 살멸 효과 성분을 추출하는 방법 / 정경수
KR(KUPA199606016895)
47. 버섯재배용 골목 / 문상영(00000) KR; 이한식(00000) KR; 위성진(00000)
KR(KUMO200200271781)
48. 상황버섯 재배 장치 / 권오현(00000) KR(KUMO200200270012)
49. 순환형어식 상황 버섯 재배 장치 / 최용주 KR(KUMO200012214177)
50. 상황 버섯 재배틀(상) / 이한식 KR; 김대일 KR; 성병훈 KR; 정영철 KR; 전성식
KR; 이형주 KR; 이병천 KR(KUMO200008200047)
51. 상황버섯 자실체 재배용 용기 / 박준선 KR(KUMO199810134384)
52. 버섯류의 가공 방법 및 버섯류를 포함하는 건강보조식품 / 김천환 KR; 백이호
KR(KPTN200300385739)
53. 바나나 농축액을 배지로 한 버섯균사체의 생산 방법 / 박태웅
KR(KPTN200300384150)
54. 상황버섯 균사체의 유가식 배양을 통한 대량 생산 방법 / 환인제약
주식회사(K18345) KR(KPTN200300383078)
55. 소양체질용 건강보조식품 조성물 / 주식회사 쓰리엔포(K32089)
KR(KPTN200300376412)

56. 콘드로이친과 상황버섯추출물을 함유한 화장품 조성물 / 최찬기(00000) KR;
하배진(00000) KR(KPTN200200365242)
57. 자연산 상황버섯 추출물을 함유하는 발모제 조성물 및이의 제조방법 /
김상목(00000) KR(KPTN200200348155)
58. 자연산 상황버섯 추출물이 함유된 미백화장료 / 나드리화장품주식회사(K6938)
KR(KPTN200200345382)
59. 상황버섯 재배 방법 및 그 장치 / 한영주(00000) KR; 안기섭(00000) KR;
정선웅(00000) KR(KPTN200200331770)
60. 상황버섯 인공재배방법 / 최용주(00000) KR(KPTN200200328312)
61. 상황 버섯 재배 방법 /(주) 머쉬텍 KR; 성재모 KR; 원종광
KR(KPTN200006266083)
62. 상황 버섯의 재배 방법 / 유연광 KR(KPTN200002255999)
63. 상황버섯의 재배방법 / 정홍열 KR; 성기호 KR(KPTN199907226632)
64. 상황버섯 조성품 / 동은개발진흥(주)(K10341) KR(KPTN199907225050)
65. 상황 버섯 분말 추출물을 함유하는 피부 미백용 화장료 조성물 /
한블화장품(주)(K5938) KR(KPTN199904206538)
66. 상황버섯 조성물의 배양 방법 / 동은개발진흥(주)(K10341)
KR(KPTN199903204984)
67. 상황버섯의 원목 인공재배 방법 / 류충현 KR(KPTN199811180097)
68. 상황버섯 자실체의 비닐 포트 재배 방법 / 박준선 KR; 서봉후 KR; 조선행 KR;
박준덕 KR(KPTN199811179725)
69. 상황버섯의 균피배양법 / 안영남 KR(KPTN199806152692)
70. 마른진흙버섯의 원목 인공 재배법 / 경상북도 도지사 KR(KUPA200106048396)
71. 상황 균사체의 추출물을 함유하는 피부 노화방지 효과를 갖는 화장료 조성물 /
태평양 :(주)(K0017) KR(KUPA199808038284)
72. 상황 균사체의 추출물을 함유하는 피부 노화방지 효과를 갖는 화장료 조성물 /
태평양 :(주)(K0017) KR(KPTN199812181105)

[과제활용을 위한 종합검토 의견]

2005년도 완료 농림기술개발과제 최종평가 결과 본 연구과제는 우수 평가를 받았다. 평가위원들은 과제활용을 위한 의견으로 보고서의 보완제출을 요구하였다. 평가결과는 다음과 같다.

- 기능성 소재로서의 식품의약품안전청 허가가 요구되는 결과로서 안전성 확보를 위해서 후속연구가 필요하다고 판단됨.

: 현재 *P. gilvus*의 추출물에 대한 후속연구가 반드시 필요하다. 따라서 본 연구결과를 기업체 및 GLP 인증 실험동물사와 의논하여 2007년도에 후속연구가 반드시 필요하다.

-연구보고서에서 진흙버섯의 생리활성 부분의 정리가 필요하다고 판단됨. 항암성의 in vitro와 in vivo 결과가 정리되어 포함되어야 됨.

-연구결과가 농가수익에 이익이 될 수 있도록 구체적인 방법과 전망을 보고서에 강조되도록 할 것

-*P. gilvus*의 농가 보급시 재배단계별 최적생육조건을 기술하여 보고서에 보완하여 제출할 것.

위의 보완 요구서를 최종보고서 마지막부분에 첨부하여 첨부자료로 제출하는 것이 가장 타당할 것으로 생각된다.

1. 본 연구에서 얻은 직접적인 결과와 본 연구과정에서 제공하여 준 추출물을 갖고 실험한 논문에서 직접적으로 관련된 마른진흙버섯의 추출물의 생리활성(항암 효과 포함) 정리에 대한 정리 요약표

[본 연구에서 발표한 논문정리]

연번	생리활성	in vitro	in vivo	출처
1	항암활성	열수추출물의 sarcom180, P388D1 암세포에 대한 항암활성		J. Toxicol. Pub. Health(2004) 20:37-42
2	항암활성 & 항산화활성	에탄올 추출물의 항산화 활성과 항암활성		Korean J Vet Res (2005) 45:151-154
3	항암활성		열수추출물의 마우스의 benzo(a)-pyrene에 의한 전위의 발암발생 억제효과	World Journal Gastroenterolgy(2005) 28:577-579
4	항암활성		열수추출물의 누드마우스에서 사람 위샘암종의 증식과 암종증에 대한 억제효과	Cancer Letters. In press
5	항암활성		열수추출물의 마우스에서 멜라노마의 증식 억제 효과	Cancer Letters. (2005) 218:43-52
6	유착방지		열수추출물의 랫드복막염모델에서 복강내 유착과 농양형성 방지	Annals of Surgery(2005) 241-534-540
7	유착방지		열수추출물의 랫드복막염모델에서 복강내 유착과 농양형성에 대한 효과 비교	World Journal Gastroenterolgy(2005) 11:810-816
8	유착방지		열수추출물의 랫드복막염모델에서 carboxymethylcellulose와 병용시 복강내 유착과 농양형성 방지	The journal of Veterinary Medical Science(2005) 66:1205-1211
9	항염증효과		열수추출물의 랫드에서 LPS에 의한 폐염증의 억제효과	Biotechnology Letters(2004) 26:31-33
10	독성 없음		열수추출물의 랫드에서 급성경구독성시험 결과 무독함	J. Toxicol. Pub. Health(2003) 19:211-215
11	상처치유		랫드의 상처치유의 촉진	The journal of Veterinary Medical Science(2005) 67:111-114

[본 연구에서 발표한 학회 발표 내용 정리]

연번	생리활성	in vitro	in vivo	출처
1	항암활성	P388과 sarcoma180 암세포를 이용하여 MTT법으로 항암활성 비교		한국임상수의학회 & 한국전통수의학회, 전주 (2003)
2	항암활성	P388과 sarcoma180 암세포를 이용하여 SRB법으로 항암활성 비교		한국임상수의학회 & 한국전통수의학회, 전주 (2003)
3	상처치유		개에서 진흙버섯추출물의 피부전층 상처 치유효과	한국임상수의학회, 서울 (2003)
4	유착방지		랫드의 복막염 모델에서 추출물을 이용한 복강내 농양형성 및 유착 억제효과	한국임상수의학회, 서울 (2003)
5	항혈전, 항산화, 세포면역활성	자실체의 용매별 추출물의 항혈전, 항산화 효과 및 다당류의 세포면역활성 효과		The 49th annual Meeting of the Korean Society of Veterinary Science, 제주 (2005)
6	항염증 효과	Raw264.7대식세포에서 NO 생성 억제 및 세포면역에 대한 활성 효과		The Korean Society for Microbiology and Biochemistry, 경주 (2004)
7	면역활성	자실체추출물들의 면역활성 비교		The Korean Society for Microbiology and Biochemistry, 경주 (2004)
8	항산화 및 항돌연변이	자실체 추출물의 항산화 및 항돌연변이 효과		The Korean Society for Microbiology and Biochemistry, 경주 (2004)

2. 마른진흙버섯의 농가수익모델 및 전망

구체적인 농가수익모델 및 전망을 위해서는 재배농가와 기업체간의 계약 재배형태의 B2B가 되어야 한다. 따라서 2006년도에 이러한 Roadmap을 따라서 조직화한 후에 2007년도에 과제신청을 할 계획에 있다. 이것을 위하여 재배농가 + 농업기술원 + 기업체 + 학교의 구성을 기본 골격으로 아래와 같은 수익모델을 세웠다.

농가수익모델 및 전망



3. 마른진흙버섯의 농가보급시 재배법

농가의 재배 기술이전을 위하여 단계별 배양조건을 정리하여 농가에 보급하고자 생육조건을 설정하였다. 재배사의 조건은 일반 버섯농가의 환경에서 실시되었다. 실험 재배에서는 여러 가지 조건으로 실시하였으나 아래의 조건에서 충분한 생산량을 이룰 수 있어 아래와 같이 단순화 (simplification)하였다.

