최 종
연구보고서

GOVP1200711713

버섯균사체가 분비하는 알코올의 생산과 이를 이용한 기능성 주류 개발

Production of alcohol and development of functional alcohol by mushroom mycelium

연 구 기 관
동 의 대 학 교

농 림 부

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “버섯균사체가 분비하는 알코올의 생산과 이를 이용한 기능성 주류 개발에 관한 연구” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2006 년 2 월 17 일

주관연구기관명 : 동의대학교
총괄연구책임자 : 정 영 기
세부연구책임자 : 최 병 태
세부연구책임자 : 최 성 희
연 구 원 : 서 민 정
연 구 원 : 김 지 은
연 구 원 : 이 준 혁
연 구 원 : 임 성 임
연 구 원 : 이 혜 린
연 구 원 : 이 윤 영

요 약 문

Ⅰ. 제 목

버섯 균사체가 분비하는 알코올 생산과 이를 이용한 기능성 주류 개발

Ⅱ. 연구개발의 목적 및 필요성

술은 수천 년 동안 음식으로서 인간을 즐겁게 해 주고 있다. 인류의 역사가 시작되면서 인간들은 자연과 신에게 바치는 음식의 하나로 술을 빚었다. 그 범위는 점차 확대되어 임금이 보위에 오를 땐 보위주로, 결혼식에선 합환주로서 뿐만 아니라, 심지어 집집마다 고유의 가양주(집에서 빚는 술)를 빚어 조상의 제사를 지내는 것은 집안의 대사 중 하나로 자리 잡게 되었다. 서양의 경우에도 와인은 오랜 세월동안 교회의식과 함께 하여 왔는데, 일찍이 플라톤은 신이 인간에게 내려준 선물 중 와인만큼 위대한 가치를 지닌 것은 없다고 하였을 정도다.

우리나라의 전통주를 크게 분류하면 발효시켜 만든 탁주와 청주, 그리고 이것을 증류하여 만든 소주로 구분할 수 있다. 전통주의 매력은 역시 발효주에 있다고 볼 수 있는데, 대표격인 탁주와 청주는 본래 누룩을 사용하여 빚은 유서 깊은 우리 술이다(정종은 일본 술인 '사케'의 변형된 이름으로 우리의 전통주인 청주와는 다르다). 좋은 술을 규정하기는 어렵지만 눈(색), 코(향), 입(맛)으로 마시는 우리 전통 곡주는 색에서는 죽엽색에 가까울수록 좋고 향은 은은해야 하고 맛은 감칠맛이 있어야 한다는 것이 특징이다. 일제강점기인 1907년 조선총독부가 제정한 주세법이 시행되면서 민속주는 엄격하게 금지되어 전통주의 맥이 끊어지게 되었다가, 88년 올림픽을 전후하여 국제화의 흐름을 타고 그 명맥은 다시 살아나게 되었다. 그러나 현재 양주 수입량이 세계 으뜸인 상황이 말해주듯이 당시의 영향이 지금에도 크게 미치고 있다. 또한 잘못된 음주습관으로 지방간 및 간 손상과 같은 부작용을 낳고 있다.

버섯은 섬유질, 비타민, 미네랄 등이 풍부하여 웰빙 식품으로 많은 각광을 받고 있다. 특히, 상황버섯은 항암작용이 밝혀지면서 약용식품으로 널리 이용되고 있다. 최근 몇몇 버섯종에서 균사체를 이용한 알코올 발효가 가능성해지면서 이들에 대한 알코올가수분해 효소(alcohol dehydrogenase, ADH)에 대한 연구가 보고 되고 있다. 따라서 지금까지 효모에 의해서만 생산되던 알코올성 주류를 버섯의 독특한 은은한 향과 부드러운 감칠맛을 지닌 버섯 균사체를 이용한 새로운 주류생산 기술 개발의 필요성이 강하게 요구되고 있다. 그러므로 본 연구개발의 목적은 약용버섯 균사체를 이용하여 신 기능성 주류를 개발하여 주류문화 개선 및 주류 시장 개척에 있다.

Ⅲ. 연구개발 내용 및 범위

1. 버섯 균사체 배양과 알코올 생산 및 신기능성 주류생산

1-1. 버섯 균사체 종균배양 및 알코올 생산 최적화

종균보존 시스템 확립을 위하여 실온에서 시험관에 agar slant로 보존, petridish에 agar를 넣고 4℃에서 냉장보관하면서 1개월에 1회씩 계대하는 방법, 액체배양하여 -80℃에서 초저온 보존, 액체질소에 보존, 균체를 동결건조 하여 보존 등의 5가지 방법으로 종균보존 시험을 행한 결과, 냉장보존하면서 1개월에 1회 계대배양을 해서 보존하는 방법이 균체 생육률이나 알코올생산 효율이 높은 것으로 나타났다. 하지만 장기보존이나 대량보존에는 이방법이 한계가 있기 때문에 더 신중한 검토가 요구된다.

종균 배양은 대부분의 버섯균사체는 질소원이 중요하므로 기초배지에 몇 가지 질소원을 첨가하여 균의 생육도를 측정하였다. 기초배지를 2% glucose, 0.17% KH_2PO_4, 0.05% $MgSO_4.7H_20$의 조성으로 배양한 결과, Malt extract 와 yeast extract가 균사체의 생육에 좋은 효과를 보였다.

알코올 생산을 위한 기본배지, 탄소원, 질소원, Metal 이온 등 여러 가지 최적 조건을 확정하였다(기업의 요구에 의해 data를 공개하지 못함). 이렇게 확정된 최적 조건과 알코올 생산으로 잘 알려진 효모의 알코올 생산 을 비교하여 본 결과, 상황버섯 균사체는 약 8%까지 alcohol을 생산하는데 비하여 효모는 약 4% 전후 이거나 이보다 저조한 생산량을 보였다. 물론 이결과는 효모가 버섯 균사체보다 알코올 생산능력이 떨어진다는 것이라고 말할 수 없으며, 단지 배양조건이 버섯균사체의 최적 알코올 생산 조건에 맞춰져 있기 때문이라고 말할 수 있다.

알코올 생산 버섯 균사체로부터 alcohol dehydrogenase를 분리 및 정제한 결과, 분자량은 약 46,000 dalton이였고, 기질의 특이성은 산화 반응에서는 ethanol이, 환원반응에서는 acetaldehyde에 대하여 가장 친화성이 뛰어남을 알 수 있었다.

상기의 실험 결과를 바탕으로 하여 당원으로 쌀 Koji와 쌀을 사용하여 청주, 약주의 제조방법에 따라 알코올 발효원으로 기존의 효모 대신에 상기의 상황버섯 균사를 이식하여 발효를 시도하였다. 그 결과 발효 11일째에 약 12.3%의 alcohol이 생산되는 것을 확인 하였다. 이 결과는 본 상황버섯 균사체는 기존의 약주와 같은 수준으로 기능성 신 주류를 생산할 수 있는 가능성을 충분히 시사하였다.

1-2. 약리성분 함유 신 기능성 주류개발

상황버섯균사체(PI-21)배양에 의해 생산된 약주는 혈액순환개선제 역할을 하는 혈전용해활성(Fibrinolytic activity)과 항혈전활성(Anti-thrombin activity)이 있는 것으로 밝혀졌다. 그러므로 이의 약리작용을 증가시키기 위하여, 본 연구팀에서 혈전용해활성과 항혈전활성이 높은 것으로 규명되어온 버섯균사 W8과 W130에 대하여 검토하기로 하였다. 즉, W8과

W130은 알코올 발효능력이 없으므로 P1-21에 이 두 균주를 혼합배양함으로써 약리효과를 높이는 것에 착안하였다. 그 결과 혈전 용해 활성은 혼합 배양한 것이 높은 것을 알 수 있었다. 그리고 항혈전효과는 W8의 혼합배양은 뛰어나게 좋았으나 W130혼합배양은 증가하지 않았다. 이런 혼합배양이 알코올 생산에 미치는 영향을 분석한 결과, P1-21 균사체 단독배양이 혼합배양보다 알코올 생산성, 맛, 향이 훨씬 뛰어난 것을 확인하였다.

1-3. 신기능성 주류의 대량생산과 제품화

신 기능성 주류의 대량생산을 위해 먼저 3톤에서 청정수, 쌀, 코오지, 누룩, 균사체 등의 발효조건을 잡은 다음 비율에 따라 13톤에서 알콜올 발효조건을 확립하였다. 상황버섯 기능성 신주류의 제품은 천년약속(14%, 375ml), 천년약속 프라임(12%, 500ml), LINTEUS(16%, 700ml) 등이 출시되어 시판되고 있다. 특히 천년약속 프라임은 2005년 APEC 공식 건배주로 지정되었다.

2. 영양, 식품학적 분석 및 고선호도 주류의 제품화

2-1. 종균이 생산하는 약리성분 물질의 분리

크로마토그래피를 이용한 단백다당체의 분리 결과, 단백다당체는 산성다당체이며, 분자량은 약 200,000정도임을 확인할 수 있었다. 이렇게 분리된 단백다당체의 총당량은 약 72.2%이며, 총단백질양은 22.3%였다. 또한 본 다당체는 많은 양의 mannose (41.6%), galactose (23.4%), and glucose (23.8%)으로 이루어져 있었다. 아미노산의 조성을 분석한 결과 aspartic acid (9.0%), serine (11.8%), glutamic acid (11.1%), glycine (12.0%), alanine (12.7%) 등이 대체로 높은 %를 함유하고 있었다.

종균이 생산하는 휘발성성분분석의 기초 자료로서 3 종류의 상황버섯의 향기성분(휘발성 성분)을 분석한 결과, 총 65종의 휘발성성분이 동정되었다. 관능기별로 alcohol류가 7종, aldehyde류가 15종, ketone류가 12종, ester류가 8종, hydrocarbon류가 10종, furan류 3종, phenol류 3종, acid류 2종 및 기타 5종으로 나타났다. 확인된 성분 중 주성분은 저 비점의 alcohol류, aldehyde류 및 ketone류 등이었다. 세 종류의 상황버섯 중 공통적으로 동정된 화합물은 ethyl acetate, hexanol, benzaldehyde, 1-octen-3-ol, 2-pentyl furan, (E)-2-octenal 및 octanol등이며 이중 1-octen-3-ol, E-2-octenal, benzaldehyde등은 다른 식용버섯에서 많이 함유되어 있는 주요 휘발성분이다.

2-2. 생산된 주류에 대한 영양, 식품학적 분석

상황버섯 균사체 (P1-21)로서 발효한 약주의 영약·식품학적 분석의 일환으로 주류내의 당분석과 유기산 그리고 알코올의 종류를 분석하였다.

당의 분석결과는 대체적으로 Glucose와 Sucrose가 많은 양으로 분석되었다. 알코올의 분석

결과, 특히 숙취의 원인 물질인 Acetaldehyde가 매우 낮고, 건강에 해로운 Methylalcohol이 전혀 없는 것이 본 주류의 특징으로 들 수 있다.
유기산은 주류의 맛과 높은 상관관계가 있으므로 상황버섯 균사체 발효주에 포함되어 있는 유기산을 HPLC 방법으로 분석하였다. C18 Column (4.6 x 250mm, 5㎛)을 사용하여 상황버섯발효주 내에 존재하는 유기산을 표준 유기산과 retention time을 비교하여 정성분석 하였다. 버섯발효주에서 5 종의 유기산(oxalic acid, formic acid, malonic acid, lactic acid, succinic acid)이 검출되었으며 이들 중 formic acid와 lactic acid의 상대적 함량이 높았다.

2-3. 생산된 주류에 함유된 약리물질 분석

Fibrin plate (혈전 plate)에 상황버섯발효주 (Rice wine) 와 일반술(주정)을 떨어뜨린 (분주한)결과, 상황버섯 발효주 주변에서는 혈전이 녹아 clear zone이 형성된 것을 알 수 있었다. 또한 시험관에 일반 술과 상황버섯 발효주를 각각 넣고 혈전유도물질을 넣었을 때, 상황버섯 발효주에서 혈전형성이 지연되는 것을 알 수 있었다. 이상 결과에서 상황버섯 발효주는 혈전용해 및 혈전형성 억제 기능이 있다는 것을 의미한다. (그러나 병입시 가열에 의해 기능성 소실을 초래하였다.)
혈액속에 있는 GOT 및 GPT수치를 분석한 결과, 상황버섯 발효주인 천년약속을 먹인 쥐는 일반주정을 먹인 쥐보다 GOT 및 GPT수치 모두 감소되는 결과를 얻었다. 특히 간에서만 존재하는 GPT의 수치가 현저히 감소하는 것을 보아 술로 인한 간의 손상을 최소화시켜는 것으로 판단된다. 또한 일반주정을 식이한 쥐의 간조직은 국부 염증부위가 관찰되지만, 천년약속을 식이한 간조직은 정상적인 간조직과 비슷한 결과를 보였다. 따라서 천년약속은 간의 염증질환에 거의 영향을 주지 않을 것으로 판단된다. 부가적으로 상황버섯 발효주를 식이한 흰쥐에서 Total Cholesterol 및 중성지질(Triacylglycerol) 농도 증가가 일반 술에 비해 아주 낮았다.

2-4. 생산된 주류 고유 향의 분석

상황버섯 균사체가 분비하는 알코올을 이용한 상황버섯 균사체 발효주인 천년약속을 이용하여 술의 기호성에 관계되는 휘발성 향기성분을 GC 및 GC-MS로 분석, 동정하였다. 그 결과 휘발성 향기성분 농축물의 수량은 12.5mg% 였으며 관능적 특징으로는 꿀향, 맥주, 곡주 및 와인향 등이 느낄 수 있었으며, 특히 꽃향기와 벌꿀향 등의 달콤한 냄새를 강하게 느낄 수 있었다. 상황버섯 균사체 발효주의 휘발성 향기성분으로는 3-methyl butanol, phenylethyl alcohol 등의 alcohol류 15종, acetic acid 등의 acid류 6종, ethyl acetate, diethyl butanedioate 등의 ester류 (1.60%) 12종, propyl benzene 등의 hydrocarbon류 (0.32%) 4종, δ-decalactone 등의 ketone류 (0.28%) 3종, phenol류, acid류 (0.48%) 및 기타 (3.57%)등 총 43종의 화합물을 추정 또는 동정하였다.

3. 주류 함유 약리 물질의 생리활성 및 알코올성 질환모델에 대한 효과 검정

3-1. 상황버섯 균사체를 이용한 발효주(SHJ)의 추출물이 염증관련 단백질의 발현과 세포내 활성산소 생성에 미치는 영향

상황버섯균사체를 이용한 발효주가 HepG2 세포계에서 IκBα분해를 억제함으로서 NF-κBp65의 핵내 이동억제에 의해 COX-1, COX-2 같은 염증성 단백질발현이 저해되었다. 또한 H_2O_2에 의한 ROS 생성이 저해되었다. 이상의 결과는 SHJ가 상황버섯이 가지는 효능을 나타냄을 알 알 수 있다.

3-2. 상황버섯 균사체를 이용한 발효주가 인체간암세포와 흰쥐간의 염증관련 단백질발현에 미치는 영향

SHJ가 인체간암세포와 흰쥐 간에서 염증관련단백질의 발현과 간 손상 관련효소에 미치는 영향에 대해 조사하였다. 에탄올, SHJ를 인체 간암세포인 HepG2 세포에 24시간 처리한 경우, 대조군에 비해 에탄올을 처리한 세포는 농도가 증가할수록 세포의 형태 변화가 심한 반면 SHJ를 처리한 세포는 알코올의 농도가 증가해도 세포의 형태 변화를 관찰할 수 없었다. HepG2 세포의 염증 관련 단백질 발현을 보기 위해 Western blot과 RT-PCR을 한 결과 COX-1, COX-2, ıNOS, TNF-α의 발현이 에탄올에 의해 현저하게 유도되었으나, SHJ는 HepG2 세포에서 mRNA와 단백질의 발현이 에탄올에 비해 억제되었다. 흰쥐를 이용한 동물실험에서 간 기능의 지표가 되는 혈청내 GOT와 GPT양 등이 에탄올 투여 그룹에서 현저히 증가했으나 SHJ를 투여한 그룹에서 에탄올 투여 그룹에 비해 낮게 나타났다. 면역조직화학적 분석에서 에탄올을 투여한 쥐의 간세포에서 iNOS와 COX-2의 발현이 현저히 증가하나 SHJ를 투여한 쥐의 간세포에서 미약한 면역반응이 관찰되었다. 이상의 결과로 보아 SHJ는 동일한 농도의 에탄올에 비하여 간 손상의 가능성이 적은 것으로 사료되며 이 자료들은 상황버섯에 대한 연구와 다른 기능성 주류에 대한 기초 자료가 될 것이다.

3-3. 상황버섯 균사체를 이용한 발효주가 흰쥐의 위점막에 미치는 영향

병리조직학적 소견을 보면 정연한 점막구조를 가진 정상군에 비해 ethanol을 투여한 대조군은 표면상피세포의 손상이 심하여 내강에서도 관찰되며 위점막의 현저한 울혈, 부종과 함께 일부 출혈성 궤양이 관찰되었다. 이에 비해 SHJ 투여군는 미약한 병리학적 변화를 나타낼 뿐 정상군과 유사한 소견을 보여 주었다. Western blot분석에서 iNOS는 ethanol투여에 의해 증가하나 SHJ투여에서는 발현되지 않았다. COX발현은 ethanol투여에 의해 모두 증가하나 COX-1에 비해 COX-2의 발현이 현저하였으며 SHJ투여에 의한 COX-2발현도 대조군에 비해 현저히 낮았다. Ethanol투여에 의해 TNF-α와 c-Fos발현이 유도되나 SHJ투여에 의한 변화는 관찰되지 않았다. 이로 보아 SHJ에는 ethanol에 의한 위점막손상부터 보호 기능을 가진 성분이 함유할 가능성을 시사하고 있다.

3-4. 상황버섯 균사체 추출물 (MCPL)이 알코올성 위궤양에 미치는 영향

정상군과 MCPL 처리군 모두 육안적인 위점막 괴사 등이 관찰되지 않았으나 ethanol투여군에서는 출혈과 더불어 심한 위 점막 파괴를 볼 수 있었다. 그러나 ethanol을 투여하기 전 MCPL (20 및 60 ㎎/㎏)를 전처리한 군에서는 위강내 출혈지수를 현저히 저하하였다. 또한 ethanol투여군에 비해 현저히 저하된 위궤양 수 및 지수를 보였다. Ethanol투여군에서 매우 심한 부종, 출혈 및 괴사를 보여 주었으나 MCPL을 전 처리한 군에서는 ethanol에 의한 위 손상을 현저히 감소하였으며 특히 출혈 및 괴사가 현저히 감소하였다.

Alcohol 투여에 의한 점액성을 보면 MCPL을 전처리한 군에서 점액질의 감소가 현저히 완화되며 특히 선내 점액세포인 점액경세포의 감소가 현저히 저하되었다. Lectin조직화학적으로 ethanol 투여군에서 위궤양이 형성된 부위에 α/β-N-acetyl-D-galactosamine를 인지하는 SBA반응이 증가하며 α-D-galactose을 인지하는 BSL-1반응은 표면상피세포와 상부점액경세포에서 관찰되지 않았으나 MCPL을 전처리한 군에서는 정상군과 유사한 lectin 반응을 보여 MCPL에 의한 복합당질의 유지가 지속됨을 알 수 있었다.

Ⅳ. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

술(알코올 음료)은 인류가 생명을 유지하기 위하여 먹어온 음식물 중에서 인간에게 새로운 차원의 즐거움을 안겨준 음료라 할 수 있다. 그래서 술은 인류역사와 함께 하였을 뿐만 아니라 세계 각국의 민속문화와 밀접한 관계를 맺고 있다. 우리나라에도 전통민속주가 잘 개발되어 왔으며, 우리 민족 특유의 음주문화가 이어지고 있으나 최근들어 세계에서 양주소비 제1위를 차지하는 변질된 음주습관이 고착되고 있다. 그러므로 순하고 향이 은은하면서 건강에 좋은 새로운 차원의 발효주를 개발함으로써 우리사회 음주문화 변화의 필요성이 강하게 요구되고 있는 현실이다.

술의 생산은 본래 효소인 *Saccharomyces cerevisiae* 가 당은 이용하여 알코올 발효 대사경로를 거쳐 ethylalcohol을 만들어 냄으로써 이루어진다. 따라서 *S. cerevisiae*외에 *S. carshergensis, S. ellipsodes, S. sake, Schizosaccharomyces pombe* 등의 효소가 에칠알코올 생산에 관여하는 것으로 알려져 있다. 지금까지 효모에 의해서만 생산되던 알코올성 주류를 버섯 균사체 배양에 의해서도 알코올 생산이 가능한 사실을 발견하였다. 그러므로 버섯은 자체의 독특한 향이 있으며 또한 증미성분인 핵산이 풍부하게 함유되어 있으므로 버섯 균사체에 의하여 발효생산 되는 주류는 순하고 향긋하여 소비자의 기호에 맞는 주류로 개발할 수 있어 고도의 배양기술개발을 필요로 한다.

따라서 본 연구에서는 약용버섯 균사체(Pl-YK21)를 이용하여 새로운 차원의 알코올과 신기능성 주류를 개발하여 주류시장의 개척과 새로운 주류문화의 개선에 기여할 필요성이 있다고 사료된다.

버섯 균사체를 이용한 기능성 신 주류 개발에 대해여 본 연구진이 이룩한 성과는 아래와 같다.

1) 버섯 균사체 종균 보존방법 확립과 종균배양 조건, 즉 배지조성, 온도, pH, 산도요구도 등의 최적화 통한 alcohol dehydrogenase 생산에 대한 최적화를 확립하였다. 또한 버섯 균사체로부터 alcohol dehydrogenase를 분리, 정제하였다.

2) 종균이 생산하는 약리성분 물질의 분석
크로마토그래피를 이용한 단백질다당체 분리 하였으며, FT-IR 분석 및 NMR 분석으로 분리된 단백질다당체의 구조를 분석하였다. 생산된 주류에 함유된 약리물질 분석결과, 혈전용해기능, 항혈전(anti-thrombin)기능 있음을 밝혔다.

3) 종균이 생산하는 유효물질에 대한 세포주 수준에서 생리활성 검정
HepG2 세포실험을 통해, 상황버섯 균사체 발효주의 추출물은 알코올 대사과정에서 필연적으로 생산되는 acetaldehyde에 의해 이차적인 염증반응을 부분적으로 지연 및 억제시킴을 밝혔다. 또한 HepG2에서 상황버섯 발효주의 추출물이 acetaldehyde에 의한 NO의 생성의 감소효과를 밝혔다.

4) 종균의 대량 배지의 개발, 대량배양 체제구축, Koji 제조 시 종균의 접종률 확립, 증자 및 무증자 발효에 의한 주류생산 효율 비교, 소규모 발효를 통한 초기 pH, 품온조절 등 알코올 생산 환경의 구축하여 약리성분 함유 신 기능성 주류개발에 성공하였다.

5) 주류 제품화를 위한 단백질, 유리 아미노산, 지질당, 미량원소 등의 성분분석 및 관능검사를 통한 고 선호도 주류제품을 완성하였다.

6) 기능성 주류의 실험모델적용에 의한 효능 검증 및 간질환 모델에 대한 적용
상황버섯 균사체 발효주의 투여에 의한 흰쥐 동물실험을 통해, 술로인한 GOT 및 GPT 상승억제, 혈중 총콜레스테롤 및 지질저하, 간조직 염증완화, 위점막 손상완화 등의 효과를 밝혔다.

7) 신 기능성 주류의 대량생산에 성공하여 현재 주당 약 42만병이 생산되고 있다. 생산되는 제품의 종류는 천년약속, 천년약속 프라임, LINTEUS 등 3종류가 있으며, 특히 천년약속 프라임은 2005년 APEC 공식 건배주로 채택되었다.

본 과제의 결과는 이미 산업화되어 국내외에 판매되어 매출을 올리고 있다. 그러므로 관계기관에서는 국내판매 혹은 수출 등을 위한 제반 지원에 애정을 갖고 협조해 주기 바란다.

SUMMARY

I. Title

Production of alcohol and development of functional alcohol by mushroom mycelium

II. Purpose

Alcoholic drinks have given human beings pleasure for a few thousand years. Since the start of human history, human beings have brewed alcoholic beverages. The range of use of these alcoholic beverages has been gradually enlarged; they have been used, for example, in ceremonies of succession to a throne, in wedding ceremonies, and in religious services for ancestors. In the case of Western countries, wine has been used in a church ceremony long ago, and "among the gifts God has given human beings, there is nothing as valuable as wine", Plato said.

Korean traditional alcoholic beverages can be broadly divided into unstrained rice wine and clear strained rice wine prepared by fermentation, and distilled rice liquor (Soju). The attractiveness of Korean traditional alcoholic beverages can be found in fermented alcoholic beverages, whose typical members, unstrained rice wine and clear strained rice wine, are Korean historic alcoholic beverages brewed using yeast (Japanese rice wine (Jeongjong) is the modified name of Japanese wine "Sake",which is different from Korean traditional wine, clear strained rice wine). Although it is difficult to define a good alcoholic beverage, Korean traditional grain wines must desirably be closer to a bamboo leaf color, have delicate fragrance and be tasty. Since the Liquor Tax Law made in the year 1907, the preparation of Korean traditional wines was strictly restricted so that the life of traditional wines was cut off, and then, with the trend of internationalization around before and after the 1988 Seoul Olympic Games, they became popular again. However, as can be seen from the fact that Korea is the largest importer of wine in the world, the influence at that time remains now. Additionally, excessive alcohol drinking causes side effects, such as fatty liver and liver injury.

Mushrooms are rich in fibrous materials, vitamins, minerals, etc., and thus are receiving much attention as "well-being"foods. Particularly, Phellinus sp. is being

widely used in medicinal foods, since it has been found to have anticancer effects. As fermenting alcohols using mycelia of several mushroom species recently became possible, studies on alcohol dehydrogenase (ADH) for these mushrooms are being reported. Therefore it has yet to develop new alcoholic drinks with delicate fragrance and taste using mushroom mycelia in stead of yeast. The purpose of this research is development of a new functional wine using medicinal mushroom mycelia, which improves bibbing culture and explores liquor market.

Ⅲ. Research Content and Scope

1. Mycelial Culture, Alcohol Production and Making Alcohol Beverage

1-1. Mycelial Culture and Optimization for Alcohol Production

The strain was maintained on agar slant or petridish at 4℃. Subculture was done once in every month. Alternatively, liquid culture was prepared to be stored at -80℃ and in liquid nitrogen. Yield of growth and alcohol production were better from mycelia of subculture in every month than from ones of other storage stocks. A new technique should be developed because subculture in every month has limit for long-term store and large-scale culture. Culture was done with basal medium containing different nitrogen sources: the composition of basal medium was 2% glucose, 0.17% KH_2PO_4, 0.05% $MgSO_4.7H_20$. Basal medium with either malt extract or yeast extract showed better growth than other nitrogen sources.

Optimal condition was determined for best alcohol production, which is confidential to the company. Under this condition mycelia produced 8% alcohol while yeast did less than 4%. This results reflect that the condition is better for mycelia than yeast.

Alcohol dehydrogenase was purified from mycelia and its molecular mass was approximately 46,000 dalton and substrate specificity of the enzyme was higher to ethanol by oxidation reaction and to acetaldehyde by reduction reaction.

Alcohol fermentation by mycelia, instead of yeast, was done with rice and rice koji under the optimal condition following traditional fermentation technique. 12.3% alcohol was produced by 11 days of fermentation indicating that mycelial fermentation can be applied to alcohol beverage production.

1-2. Development of Alcoholic Beverage containing Pharmaceutical Compounds

It has been reported that alcoholic beverage made by Pl-21 mycelium showed fibrinolytic and anti-thrombin activities. We, therefore, investigated W8 and W130 which showed higher fibrinolytic and anti-thrombin activities. However, W8 and W130 did not ferment alcohol. We tried mixed-culture of Pl-21 with W8 or W130 in order to increase fibrinolytic and anti-thrombin activities in fermented product. Anti-thrombin activity was increased by Pl-21 and W8 while Pl-21 and W130 did not. Pl-21 alone showed better alcohol production, flavor and taste than Pl-21 and W8.

1-3. Making commercial product of functional alcoholic beverage

Fermentation condition was determined for 3 ton scale with water, rice, koji, Nuruk, mycelia to produce large-scale alcoholic beverage. 3 ton scale condition was modified for 13 ton scale. Alcoholic beverage produced in this way became commercial products named "Millenium Promise (14%, 375ml)", "Millenium Promise Prime (12%, 500ml)" and "LINTEUS (16%, 700ml)". Specially, "Millenium Promise Prime" was the official toast wine of 2005 APEC.

2. Food and Nutritional Analysis of Product and Making commercial product to meet Costumer's Trends

2-1. Analysis of Pharmaceutical Compounds in Alcohol Product

Isolated glycoprotein was acidic polysaccharide of MW 200,000, which was analysed by chromatography. Glycoprotein composed with 72.2% polysaccharide and 22.3% protein. Polysaccharides contained mannose (41.6%), galactose (23.4%), and glucose (23.8%) and proteins contained mainly aspartic acid (9.0%), serine (11.8%), glutamic

acid (11.1%), glycine (12.0%), alanine (12.7%).

Volatile flavor compounds of 3 different Pellinus mushrooms were identified to be 65 volatile flavor compounds: 7 alcoholic, 15 aldehyde, 12 ketone, 8 ester, 10 hydrocarbon, 3 furan, 3 phenol, 2 acid, and 5 unidentified compounds. Common compounds found in 3 different Pellinus mushrooms were ethyl acetate, hexanol, benzaldehyde, 1-octen-3-ol, 2-pentyl furan, (E)-2-octenal and octanol. 1-octen-3-ol, E-2-octenal and benzaldehyde of them have been known to be present in other edible mushrooms.

2-2. Food and Nutritional Analysis of Alcohol Product

Sugars, organic acids and alcoholic compounds were analyzed in order to understand food and nutritional aspects of alcohol beverage made by PI-21. Sugar analysis showed high composition of glucose and sucrose. Concentration of acetaldehyde was low and methyl alcohol was not detected in alcoholic compounds. Organic acids are close related with taste of alcohol beverage and those were analyzed by HPLC technique. Organic acids in alcohol beverage were identified by retention time of standard organic acids using C18 Column (4.6 x 250mm, 5㎛). 5 organic acids (oxalic acid, formic acid, malonic acid, lactic acid, succinic acid) were detected and relative concentrations of formic acid and lactic acid were higher than others.

2-3. Analysis of Pharmaceutical Compounds in Alcohol Product

Clear zone on the spot where mycelial alcohol product was placed occurred on fibrin plates while no clear zone by distilled alcohol. Also, when distilled alcohol or mycelial alcohol product was mixed with fibrin mycelial alcohol product delayed formation of fibrin. This results indicated that mycelial alcohol product has fibrinolytic and fibrin formation inhibition activities.

After administration of distilled alcohol or mycelial alcohol product to rats GOT and GPT level in blood were lower in rats administered with mycelial alcohol product than in rats administered with distilled alcohol. Specially GPT, which present in liver only, decreased, indicating that liver damage could be less. Histochemical

study showed similar results. Therefore, mycelial alcohol product appeared not to give damage to liver inflammation. Additionally, increase of total cholesterol and triacylglycerol concentration was lower in rats administered with mycelial alcohol product.

2-4. Analysis of Flavor in Alcohol Product

Flavor is close related with customer's trends. Thus, volatile flavor of mycelial alcohol product, Millenium Promise, was analyzed using GC and GC-MS. The amount of volatile flavor in the extract was 12.5mg% and obvious flavor of honey, beer, and wine was smelled. Major flavor compounds identified were followed:
15 alcohol group such as 3-methyl butanol, phenylethyl alcohol, 6 acidic group such as acetic acid, 12 ester group (1.60%) such as ethyl acetate, diethyl butanedioate, 4 hydrocarbon group (0.32%) such as propyl benzene, 3 ketone group (0.28%) such as δ-decalactone, phenol group and other minor groups (3.57%).

3. Effects of medicinal materials of rice wine on the physiological activity and alcoholic disease model.

3-1. Effect of the evaporating extract from rice wine of fermentation using mycelium of *Phelinus* sp. (SHJ) on the expression of inflammatory proteins and the generation of reactive oxygen species

The SHJ inhibited acetaldehyde-induced morphological change in HepG2 cells. Also, SHJ inhibits expression of inflammatory proteins including COX-1 and COX-2 through suppressing nuclear translocation of NF-κBp65 and degradation of IκBα. In addition, SHJ inhibits generation of ROS by H_2O_2 in HepG2 cells. These results suggest that SHJ has the pharmaceutical, especially anti-inflammatory, activity similar to *Phellinus sp.* mushroom.

3-2. Effects of fermented rice wine by using mycelium of *Phellinus sp.* (SHJ) on the expression of inflammation-related proteins in human hepatoma cells and rat liver

To examine the effect of SHJ on the morphology and expression of inflammatory proteins in $HepG_2$ cells, the cells were incubated with ethanol, and SHJ for 24

hours, and then analyzed by microscopic observation and Western blot and RT-PCR. While ethanol induced the morphological change accompanied with cell debris formation and scattering on $HepG_2$ cells, SHJ had no effect. The results of Western blot and RT-PCR analyses showed that the level of iNOS, COX-1 and COX-2 was induced by ethanol, however, SHJ inhibited the expression of these proteins and its mRNAs. In the animal model, the value of GOT and GPT was significantly increased by administration with ethanol. But the group administrated with SHJ showed lower levels on the changes of these markers compared with ethanol-administrated group. Besides, the results of Western blot and RT-PCR analyses showed that the expression of inflammatory proteins such as iNOS, COX-1 and COX-2 was not affected by SHJ administration in rat liver. About histopathological and immunohistochemical observations, ınflammatory loci were markedly decreased ın the SHJ-administrated rat compared to ethanol-administrated rats and showed weaker COX-2 and ıNOS ımmunoreactions. These results suggested that SHJ showed slight changes on the inflammatory protein expression compared to ethanol and SHJ may be used as a functional alcoholic beverage.

3-3. Effects of fermented rice wine using mycelium of *Phellinus sp.* on the gastric mucosa of rat

The administration of SHJ showed a similar pattern as like normal except trace histopathological changes. The results of Western blot analyses showed that the higher expression of iNOS, COX-1, COX-2, TNF-α and c-fos, especially COX-2, in the ethanol-administrated rat compared with normal rat. But SHJ-administrated rat showed a trace ıncrease of these expression compared to normal rat. About ımmunohistochemical observations, weaker iNOS reactions were detected in mucous cells of epıthelium of ethanol administrated rat compared with normal and SHJ-administrated rat. These results suggested that SHJ-administrated rat showed a trace changes on the mucus barrier-related protein expression compared with ethanol-administrated rat and thus SHJ may be use to develop a functional alcoholic beverage.

3-4. Effects of mycelial culture of *Phellinus sp.* (MCPL) on ethanol-induced gastric ulcer in rats

Pre-administration with MCPL at doses of 20 and 60 ㎎/㎏ showed a significant decrease of bleeding and ulcer index and alleviated the histopathological changes induced by ethanol such as hemorrhage and necrosis. Ethanol treatment decreased gastric adhesion mucus content, but higher level of gastric mucus persisted by pre-administration of MCPL. As for histochemical properties of mucins, marked changes were observed in both surface and gland mucous cells in ethanol treated rats, but these changes were detected only in surface mucous cells in rat pre-administrated with MCPL. By conventional methods for mucins, ethanol-treated rats revealed a decrease of neutral and acid mucin in the surface epithelium and mucous neck cells compared with normal rats. A marked decrease of BSL-1 by lectin histochemistry was also revealed in the ethanol-treated rats. But the MCPL pre-administrated rat showed similar stainabilities and lectin affinities patterns for mucins as normal ones. These results indicate that pretreatment of MCPL provided a protection of gastric mucosa from ethanol-induced injury through maintaining mucus barrier in rats.

Ⅳ. Research Results and Suggestion for Result Application

Alcoholic beverage has been one of beverages that give human being great pleasure. History of alcoholic beverage developed following human history and traditional cultures of every country in the world rooted in alcoholic beverage. Traditional alcoholic beverages in Korea have been developed well and distinctive culture of alcohol social was established. However, drinking habit in Kora changed by judging the first ranked consumption of imported liquor. Therefore Korean society demands new culture of alcohol social which needs to develop a new alcoholic beverage with good flavor and mild taste.

In general ethanol fermentation is carried out by *Saccharomyces cerevisiae* through alcohol metabolic pathway. Besides *Saccharomyces cerevisiae*, other yeasts such as *S. carshergensis, S. ellipsodes, S. sake, Schizosaccharomyces pombe* are used in ethanol fermentation. We discovered that mushroom mycelia also can be used for ethanol fermentation. Mushroom has aromas and rich nucleic acids and can be used for alcoholic beverage. But it requires special culture technique.

Therefore, we developed new alcoholic beverage using mycelia Pl-YK21 and tried change culture of alcohol social.

We accomplished the followings:

1) Optimum condition for alcohol dehydrogenase production was established with strain storage, medium composition, temperature, pH, and acidity. Also, alcohol dehydrogenase was purified from mycelia.

2) Analysis of Pharmaceutical Compounds produced by Pl-YK21
Chromatography was used to separate glycoprotein and FT-IR and NMR was used to analyze structure of glycoprotein. Fibrinolytic and anti-thrombin activity was detected in mycelial alcoholic beverage

3) Functional Experiment of pharmaceutical compounds with level of cell lines in vitro. It was discovered that secondary inflammation of $HepG_2$ cell line by acetaldehyde was delayed and/or inhibited by the extract of mycelial alcoholic beverage. The extract of mycelial alcoholic beverage reduced synthesis of NO by acetaldehyde.

4) Development of medium for large culture and large production process was done. Also the followings were done: innoculation amount for Koji production, yield comparison of steamed and unsteamed fermentation, initial pH, temperature, etc for alcohol production condition.

5) Analysis of protein, free amino acids, glycolipids, minerals and commercialization of mycelial alcoholic beverage by semsory test.

6) Investigation on liver Damage of experiment animals with mycelial alcohol beverage
We showed that effects of mycelial alcohol beverage on GOT and GPT, cholesterol and lipid of blood, inflammation of liver, stomach mucose

7) Large scale production was accomplished and 420,000 bottles is being produced per a week. Alcoholic beverages produced are "Millenium Promise", "Millenium Promise Prime" and "LINTEUS". Specially, "Millenium Promise Prime" was selected

the official toast wine of 2005 APEC.

Results of this study are commercialized, sold and make profits. Therefore, we ask cooperation for domestic sales and export.

CONTENTS

SUBMISSION ····· 1

ABSTRACT ····· 2

SUMMARY ····· 9

CONTENTS ····· 18

CONTENT ····· 23

CHAPTER 1. OUTLINE OF RESEARCH DEVELOPMENT THEME ····· 27

PART 1. REQUIREMENT OF RESEARCH DEVELOPMENT ····· 27

1. TECHNICAL FIELD ····· 27

2. ECONOMIC·INDUSTRIAL FIELD ····· 28

3. SOCIAL·CULTURAL FIELD ····· 29

CHAPTER 2. SITUATION AND PROBLEM OF DOMESTIC·FOREIGN ELATION TECHNIQUE ····· 31

PART 1. SITUATION AND PROBLEM OF DOMESTIC RELATION TECHNIQUE ·31

PART 2. SITUATION AND PROBLEM OF EXTERNAL RELATION TECHNIQUE ·· 31

CHAPTER 3. RESEARCH DEVELOPMENT PERFORMANCE CONTENTS AND RESULTS ··· ····· 32

PART 1. MATERIAL AND METHOD ····· 32

1. Determination of Alcohol Concentration ····· 32
2. Activity Assay of Alcohol Dehydrogenase ····· 32
3. Purification of Enzyme ····· 32
4. Alcohol Fermentation by Mushroom Mycelia ····· 33
5. Method of Polysaccharide Extract ····· 33

6. Separation of Polysaccharide by Ion Exchange and Gel Filtration Chromatography 33
7. Determination of Protein Concentration and Amino Acid Analysis 34
8. Analysis of Sugar 34
9. Analysis of FT-IR and NMR 34
10. Analysis of Flavor Compounds of Three Different *Phellinus* Mushrooms 34
11. Assay of Blood Clot Lysis and Anti-lood Clot Activity 35
12. Preparation of Flavor Compounds Extract 35
13. Analysis and Identification of Volatile Flavor Compounds 36
14. Determination of Mixing Ratio of Flavor and Taste for Costumer's Trends 36
15. Functional Analysis of Mycelial-fermented Alcohol and Mycelium Extract against Cell Line 41
15-1. Separation of Mycelial-fermented Alcohol and Mycelium Extract 41
15-2. Culture and Treatment of Cell Line 41
15-3. Microscopic Observation 41
15-4. Determination of Nitric Oxide Concentration 41
15-5. Fluorescent Staining of Reactive Oxygen Species 41
15-6. Separation of Nuclear Extract 41
15-7. SDS-PAGE and Western Blotting 42
15-8. Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction 42
15-9. Optical Density of Protein Bands 42
16. Functional Analysis of Mycelial-fermented Alcohol and Mycelium Extract against Lab Animals 42
16-1. Lab Animals 42
16-2. Administration of Mycelial-fermented Alcohol and Mycelium Extract 42
16-3. Determination of Blood Catecholamine 43
16-4. Alcohol-induced Ulcer 43
16-5. analysis of Stomach Mucose 43
16-6. Histopathological Analysis 43
16-7. Immunohistological Analysis 43
16-8. Histchemistry for Complex Polysaccharides 43
16-9. Lectin Histology for Complex Polysaccharides 44
16-10. Statistics 44

PART 2. Results 45
Ⅰ. Mycelial Culture and Optimization for Alcohol Production 45
1. Strain Storage 45
2. Liquid Culture of Mycelium 45
3. Optimum Condition for Alcohol Production 46
4. Identification of Alcohol Dehydrogenase from Mycelium 49
5. Identification of Amylase from Mycelium 50

6. Basic Experiment for Alcoholic Beverage Production ····· 51

Ⅱ. Development of Alcoholic Beverage containing Pharmaceutical Compounds ···· 52
1. Medium Development for Large-Scale Mycelium Production ····· 52
1-1. Mycelium Production upon Culture Conditions ····· 52
1-2. Medium Composition ····· 52
1-3. Alcohol Production upon Medium Composition ····· 53
2. Preliminary Experiment of Strain Selection for Koji ····· 54
2-1. pH Change by *Asp. kawachii* and *Asp. oryza*e on Koji and Quality Change during Fermentation by *Asp. kawachii* and *Asp. oryzae* ····· 54
2-2. Alcohol Production by *Asp. kawachii* and *Asp. oryzae* ····· 55
3. Stragy to increase Pharmaceutical Compounds ····· 55
3-1. Comparision of Blood Circulation Improvement by Mixed Culture of Mycelium ····· 55
3-2. Comparision of Alcohol Production by Mixed Culture of Mycelium ····· 56
4. Comparison of Alcohol Production with Steamed- and Unsteamed-Rice ····· 57
4-1. Comparison of Alcohol Production with the Second and Third Addition of Unsteamed-Rice ····· 57
4-2. Alcohol Production with Steamed- and Unsteamed-Rice ····· 57
5. Optimum Condition for Alcohol Production ····· 58
5-1. Alcohol Production and Quality upon Medium Composition for Mycelium (Pl-21) Culture ····· 58
6.Optimum Condition for Pilot-Scale Alcohol Production ····· 59
6-1. Quality Change by Water 10ℓ and 40ℓ Culture ····· 59
6-2. Alcohol Production by Water 10ℓ and 40ℓ Culture ····· 59

Ⅲ. Large-Scale Production and Making a Product of Functional Alcohol Beverage ····· 60
1. Determination of Large-Scale Fermentation Condition ····· 60
1-1 Large Production of Mycelium ····· 60
1-2. Condition Change of Ferment Tank in Case of Large Alcohol Production and Alcohol Production ····· 62
2. Initial Growth Condition of Large Alcohol Production ····· 67
2-1. Mycelium Innoculation for 3 ton Ferment Tank ····· 67
2-2. Mycelium Innoculation for 13 ton Ferment Tank ····· 68
3. Problem Solve for Addition of Mushroom Extract during Fermentation ····· 69
4. Trial Process for Large Production ····· 69
5. Early Product of Functional Alcohol Beverage ····· 71

Ⅳ. Analysis of Pharmaceutical Compounds by Mycelium ····· 72
1. Separation of Glycoprotein Chromatography ····· 72
2. Analysis of Glycoprotein Composition ····· 73

3. Analysis of FT-IR ····· 73
4. Analysis of Flavor Compounds ····· 75

V. Food and Nutritional Analysis of Product and Strategy for Pharmaceutical Compounds Increase ····· 78
1. Food and Nutritional Analysis of Alcohol Product ····· 78
2. Analysis of Pharmaceutical Compounds in Alcohol Product ····· 79
2-1. Anti-Blood Clot Function ····· 79
2-2. Effect on GOT · GPT ····· 80
2-3. Effect on Liver Tissue ····· 81
2-4. Decreasing Effect on Total Cholesterol and Lipids in Blood ····· 81
3. Nutritional Strategy to increase Pharmaceutical Compounds ····· 82
4. Nutritional Strategy to develop Flavor and Taste ····· 82
4-1. Method reducing Acidic Taste ····· 82
4-2. Removal of Acetic Acid by Resine ····· 83
4-3. Method to improve Flavor ····· 83
5. Analysis of Flavor in Alcohol Product ····· 84
5-1. Ester Group ····· 84
5-2. Alcohol Group ····· 84
5-3. Acid and hydrocarbon Groups ····· 85
5-4. Lactone Group ····· 85
6. Method to improve Flavor and Taste for Costumer's Trends ····· 87

VI. Completion of Product of Alcohol Product with High Costumer's Trends ···· 88
1. Analysis of Protein, Free Amino Acids, Glycolipids, and Other Compounds to standardize Product ····· 88
1-1. Protein Determination of Alcoholic Beverage ····· 88
1-2. Analysis of Organic Acids of Alcoholic Beverage ····· 88
2. Mixing Ratio of Flavor and Taste for Costumer's Trends ····· 93
2-1 General Consideration ····· 93
2-2 First Cause for Drinking Alcoholic Beverag ····· 93
2-3 First Time to Drink Alcoholic Beverage ····· 94
2-4 The most Important Factor to judge Alcoholic Beverage ····· 94
3. Completion of Tests to meet Liquor Law ····· 10

VII. Functional Experiment of Pharmaceutical Compounds against Alcohol-disease Model ····· 102
1. Effects of *Phellinus* mycelial Extract on Inflammation-related Proteins and Cellular Reactive Oxygen ····· 102
1-1. Effects of *Phellinus* mycelial Extract on Alcohol Hydrolysis ····· 102
1-2. Effects of *Phellinus* mycelial Extract on Anti-Oxydation ····· 103
2. Effects of *Phellinus* mycelial-fermented Alcohol Beverage on

Inflammation-related Proteins of $HepG_2$ ····· 105
3. Analysis of Plasma and Inflammation-related Proteins of Rat administered with *Phellinus* mycelial-fermented Alcohol Beverage ····· 108
3-1. Serological Analysis ····· 108
3-2. Expression of Inflammation-related Proteins ····· 111
4. Liver Damage of rat administered with *Phellinus* mycelial-fermented Alcohol Beverage ····· 112
4-1. Histopathological Observation of Liver ····· 112
4-2. Histochemical Observation on Glycogen Distribution ····· 113
4-3. Immunohistochemical Observation on Inflammation-related Proteins ····· 114
5. Stomach Mucose Damage on Rat administered with *Phellinus* mycelial-fermented Alcohol Beverage ····· 115
5-1. Histopathological Observation of Stomach Mucose ····· 115
5-2. Inflammation-related Proteins Change of Rat administered with *Phellinus* mycelial-fermented Alcohol Beverage ····· 116
6. Effects of *Phellinus* mycelial Extract on Alcoholic Stress and Ulcer ····· 118
6-1. Effects of *Phellinus* mycelial Extract on Stress Hormone ····· 118
6-2. Effects of *Phellinus* mycelial Extract on Alcoholic Ulcer ····· 120

CHAPTER 4 Accomplishments ····· 126

※ REFERENCES

목 차

제 출 문 ····· 1

요 약 문 ····· 2

SUMMARY ····· 9

CONTENTS ····· 18

목 차 ····· 23

제1장. 연구개발과제의개요 ····· 27
제1절. 연구개발의 필요성 ····· 27
1. 기술적 측면 ····· 27
2. 경제·산업적 측면 ····· 28
3. 사회·문화적 측면 ····· 29

제2장. 국내외 관련기술의 현황과 문제점 ····· 31
제1절. 국내 관련기술의 현황과 문제점 ····· 31
제2절. 국외 관련기술의 현황과 문제점 ····· 31

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과 ····· 32
제 1 절 연구 개발방법 ····· 32
1. 알코올 농도의 측정 ····· 32
2. Alcohol dehydrogenase의 활성 측정 ····· 32
3. 효소의 정제 ····· 32
4. 버섯 균사체에 의한 약주 발효 ····· 33
5. 다당체추출법 ····· 33
6. 이온교환수지와 겔거르기 크로마토그래피를 이용한 이온 다당체의 분리 ····· 33
7. 단백질량과 아미노산조성측정 ····· 34
8. 당분석 ····· 34
9. FT-IR과 NMR분석 ····· 34
10. 3 종류의 상황버섯의 향기성분(휘발성 성분)을 분석방법 ····· 34
11. 혈전용해 활성측정과 항 혈전활성측정 ····· 35
12. 휘발성 향기성분 농축물 제조 ····· 35
13. 휘발성 향기성분의 분석 및 동정 ····· 36
14. 향과 맛을 소비자 기호에 맞추어 조성비를 확립 ····· 36
15. 세포주를 이용한 상황버섯균사체 발효주 및 그 추출물의 기능성 검정 ····· 41
15-1. 상황버섯균사체 발효주 및 추출물 분리 ····· 41
15-2. 세포주의 배양 및 처리 ····· 41
15-3. 광학현미경적 관찰 ····· 41

15-4. Nitric oxide (NO) 농도 측정 ····· 41
15-5. Reactive oxygen species (ROS) 검출을 위한 형광염색 ····· 41
15-6. Nuclear extract의 분리 ····· 41
15-7. SDS-PAGE 및 Western blotting ····· 42
16-8. Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) 분석 ····· 42
15-9. 단백질 밴드의 optical density 측정 ····· 42

16. 실험동물을 이용한 상황버섯 균사체 발효주 및 그 추출물의 기능성 검정 ····· 42
16-1. 실험동물 ····· 42
16-2. 알코올 또는 상황버섯균사체 발효주 투여 ····· 42
16-3. 혈액채취 및 혈장 catecholamine측정 ····· 43
16-4. Alcohol 유발 위궤양 및 측정 ····· 43
16-5. 위벽의 점액 측정 ····· 43
16-6. 조직병리학적 검색 ····· 43
16-7. 면역조직화학적 검색 ····· 43
16-8. 복합당질에 대한 고전적 조직화학 ····· 43
16-9. 복합당질에 대한 lectin조직화학 ····· 44
16-10. 통계처리 ····· 44

제 2 절, 연구 개발 결과 ····· 45
Ⅰ. 버섯 균사체 종균배양 및 알코올 생산 최적화 ····· 45
1. 종균보존 시스템의 확립 ····· 45
2. 종균의 액체배양- ····· 45
3. 종균으로부터 알코올 생산을 위한 최적 조건 확립 ····· 46
4. 종균 유래의 alcohol dehydrogenase 의 확인과 특성 ····· 49
5. 종균으로부터 amylase의 분비 확인 ····· 50
6. 주류 생산을 위한 기초적 실험의 확립 ····· 51

Ⅱ. 약리성분함유 신 기능성 주류개발 ····· 52
1. 종균의 대량생산 배지의 개발과 대량 배양 체제의 구축 ····· 52
1-1. 배양에 따른 균사체 생산량 비교 ····· 52
1-2. 종균배양을 위한 배지조성 ····· 52
1-3. 배지조성별 배양전 균사체의 알코올 생산능력비교 ····· 53
2. Koji제조시 종균 선택을 위한 검정 ····· 54
2-1. Koji제조 종균 *Asp. Kawachii*와 *Asp.oryzae*사용시 술덧의 pH변화와 제조 종균 *Asp.Kawachii*와 *Asp.oryzae*사용시 술덧 발효과정중 품온의 변화 ····· 54
2-2. Koji종균 *Asp.Kawachii*와 *Asp.oryzae*를 썼을 경우 알코올생산의 비교 ····· 55
3. 약리물질 함량을 증가하기 위한 대책확립 ····· 55
3-1. 버섯균사체 혼합배양에 의한 혈액순환개선효과의 비교 ····· 55
3-2. 버섯균사체 혼합배양에 의한 알코올 생산력 비교 ····· 56
4. 증자·무증자 쌀의 발효에 의한 주류생산 효율성 비교 ····· 57
4-1. 2단, 3단 사입을 무증자 쌀로 발효할 경우 알코올의 생산 ····· 57
4-2. 증자 쌀과 무증자 쌀 사입에 의한 알코올 생산 ····· 57
5. 주류발효를 위한 최적 환경의 구축 ····· 58
5-1. 균사체(PI-21)배양을 위하여 배지조성에 따른 알코올 생산과 품온의 변화 ····· 58

6. 소규모 발효를 통한 최적 주류 생산 환경의 구축 ····· 59
6-1. 물 10ℓ와 40ℓ배양 중 품온의 변화 ····· 59
6-2. 물 10ℓ와 40ℓ배양에 의한 알코올(Ethylalcohol)의 생산 ····· 59

Ⅲ. 신기능성 주류의 대량생산과 제품화 ····· 60
1. 주류의 대량생산 체제에 대비한 발효환경조건의 설정확립 ····· 60
1-1. 균사체의 대량생산 ····· 60
1-2. 주류 대량생산시 발효 탱크의 환경변화와 alcohol생산 ····· 62
2. 대량 주류 발효시 초기 종균 생육조건 확립 ····· 67
2-1. 3ton 발효탱크의 균사체 종균 접종비율 ····· 67
2-2. 13ton 발효탱크의 균사체 종균 접종 비율 ····· 68
3. 버섯 추출물 첨가에 따른 발효 중 문제점 해결 ····· 69
4. 공장 수준의 시설에서 신 기능성 주류의 대량생산 시범운행 ····· 69
5. 신 기능성 주류 제품을 위한 시제품의 생산 ····· 71

Ⅳ. 종균이 생산하는 약리성분 물질의 분석 ····· 72
1. 크로마토그래피를 이용한 단백다당체의 분리 ····· 72
2. 단백다당체의 조성분석 ····· 73
3. FT-IR분석 ····· 73
4. 향기분석 ····· 75

Ⅴ. 제품의 영양·식품학적분석 및 약리성분의 증대 방안 확립 ····· 78
1. 생산된 주류에 대한 영양·식품학적 분석 ····· 78
2. 생산된 주류에 함유된 약리물질 분석 ····· 79
2-1. 혈전용해기능 ····· 79
2-2. GOT · GPT의 영향 ····· 80
2-3. 간조직에 미치는 영향 ····· 81
2-4. 혈중 총 콜레스테롤과 총 지질저하 효과 ····· 81
3. 주류에 약리성분을 증가하기 위한 식품학적 대책 ····· 82
4. 향과 맛을 개발하기 위한 식품학적 대책구축 ····· 82
4-1. 신맛을 위한 대책 ····· 82
4-2. 레진 사용을 통한 acetic acid의 제거 ····· 83
4-3. 향의 개선을 위한 대책 ····· 83
5. 생산 주류 고유 향의 분석 ····· 84
5-1. Ester류 ····· 84
5-2. Alcohol류 ····· 84
5-3. Acid류 및 hydrocarbon류 ····· 85
5-4. Lactone류 ····· 85
6. 제품의 소비자 선호도를 높이기 위한 대책의 확립 ····· 87

Ⅵ. 고 선호도 주류 제품의 완성 ····· 88
1. 주류 제품화를 위한 단백질, 유리아미노산, 지질당, 미량원소등의 성분 분석을 위한 제품 규정에 맞게 기준을 확립 ····· 88
1-1. 개발 주류의 단백질 측정 ····· 88
1-2. 개발 주류의 유기산 분석 ····· 88

2. 향과 맛을 소비자 기호에 맞추어 조성비를 확립 ····· 93
2-1. 일반사항 ····· 93
2-2. 술을 처음으로 마시게 된 경위 ····· 93
2-3. 술을 처음으로 마신 시기 ····· 94
2-4. 술을 평가할 때 가장 중요하게 생각하는 것 ····· 94
3. 주세법 규정에 맞춘 제품 허가 기준에 준한 검정완료 ····· 101

Ⅶ. 주류 함유 약리 물질의 생리활성 및 알코올성 질환 모델에 대한 효과 검정 ····· 102
1. 상황버섯균사체 발효주의 추출물이 염증관련 단백질 및 세포내 활성산소에 미치는 영향 ··
····· 102
1-1. 상황버섯균사체 발효주의 추출물이 알코올 분해에 미치는 영향 ····· 102
1-2. 상황버섯균사체 발효주의 추출물이 항산화 작용에 미치는 영향 ····· 103
2. $HepG_2$ 세포에서 상황버섯균사체 발효주의 염증관련 인자에 미치는 영향 ····· 105
3. 상황버섯균사체 발효주의 투여에 의한 흰쥐의 혈장분석 및 간내 염증관련 인자 분석
····· 108
3-1. 혈청학적 분석 ····· 108
3-2. 염증관련 단백질의 발현 ····· 111
4. 상황버섯균사체 발효주의 투여가 흰쥐의 간 손상에 미치는 영향 ····· 112
4-1. 간에 대한 조직병리학적 관찰 ····· 112
4-2. Glycogen 분포에 대한 조직화학적 관찰 ····· 113
4-3. 염증관련 단백질에 대한 면역조직화학적 관찰 ····· 114
5. 상황버섯균사체 발효주 투여가 위 점막 손상에 미치는 영향 ····· 115
5-1. 위점막의 병리조직학적 관찰 ····· 115
5-2. 상황버섯균사체 발효주의 투여에 따른 위 조직의 염증 관련 단백질의 변화 ·· 116
6. 상황버섯 균사체 추출물 (MCPL)이 알코올성 스트레스 및 위궤양에 미치는 영향 118
6-1. 스트레스성 호르몬에 미치는 영향 ····· 118
6-2. Alcohol성 위궤양에 미치는 영향 ····· 120

제 4 장 목표달성도 ····· 126

※ 참고문헌

제 1 장. 연구 개발 과제의 개요

제 1 절. 연구 개발의 목적과 범위

1. 연구개발의 필요성

술(알코올 음료)은 인류가 생명을 유지하기 위하여 먹어온 음식물 중에서 인간에게 새로운 차원의 즐거움을 안겨준 음료라 할 수 있다. 그래서 술은 인류역사와 함께 하였을 뿐만 아니라 세계 각국의 민속문화와 밀접한 관계를 맺고 있다.

우리나라에도 전통민속주가 잘 개발되어 왔으며, 우리 민족 특유의 음주문화가 이어지고 있으나 최근들어 세계에서 양주소비 제1위를 차지하는 변질된 음주습관이 고착되고 있다. 그러므로 순하고 향이 은은하면서 건강에 좋은 새로운 차원의 발효주를 개발하므로써 우리 사회 음주문화 변화의 필요성이 강하게 요구되고 있는 현실이다.

술의 생산은 본래 효소인 *Saccharomyces cerevisiae* 가 당은 이용하여 알코올 발효 대사 경로를 거쳐 ethylalcohol을 만들어 냄으로써 이루어진다. 따라서 *S. cerevisiae*외에 *S. carshergensis, S. ellipsodes, S. sake, Schizosaccharomyces pombe* 등의 효소가 에칠알코올 생산에 관여하는 것으로 알려져 있다.

효소외의 알코올 생산미생물로는 세균에서 *Psudomonas* sp., *Zymomonae mobilis, Halobacterium* sp. 등이 알코올을 생산하는 것으로 보고된 바 있다. 그리고 곰팡이류의 균에서는 극히 미량의 알코올을 생산하는 균주가 알려진 바있으나 세균이나 곰팡이에 의한 알코올 생산은 산업적으로 이용될 수 없을 미미한 수준에 거치고 있다.

본 연구에서는 약용버섯 균사체(Pl-YK21)을 액체 배양할 때 alcohol을 생산하는 것을 발견하였으므로 이를 이용하여 새로운 차원의 알코올과 신기능성 주류를 개발하여 주류시장의 개척과새로운 주류문화의 개선에 기여할 필요성이 있다고 사료된다.

가. 연구개발의 필요성

(1) 기술적 측면

○ 지금까지 효모에 의해서만 생산되던 알코올성 주류를 버섯 균사체 배양에 의해서도 알코올 생산이 가능한 사실을 발견하였다. 그러므로 **효모이외의 균류로부터 높은 수율의 알콜올 생산할 수 있는 기술의 개발이 필요하다.**

○ 버섯은 자체의 독특한 향이 있으며 또한 중미성분인 핵산이 풍부하게 함유되어 있으므로

버섯균사체에 의하여 발효생산 되는 주류는 순하고 향긋하여 소비자의 기호에 맞는 주류로 개발할 수 있어 고도의 배양기술개발을 필요로 한다.

○ 버섯균사체 배양에 의한 주류생산 뿐만아니라 **기능성 다당체를 주류에 다량 함유 할 수 있는 기술의 개발이 필요하다.**

○ 버섯의 기능성 다당체가 함유된 기능성 주류는 면역을 강화시켜 질병예방 효과를 높일 뿐만 아니라 항암작용이 뛰어난 암의 예방 뿐만아니라 치료에도 크게 기여할 것으로 예상된다.

○ 주류생산에 소비되는 물을 버섯 추출물로 대체하여 기능성을 높이면서 **기존의 약주와 차별화되는 새로운 주류생산 기술 개발의 필요성이 강하게 요구된다.**

○ Koji생산과정에서 기존의 황국균 (*Aspergillus orgzae*) 만을 사용하는 것이 아니라 **버섯 균사체를 병행접종하여 독특한 Koji제조기술을 개발할 필요성이 있다고 사료된다.**

○ 다양한 애주가에 의해 사랑 받을 수 있는 **버섯의 독특한 향과 부드러운 감칠맛을 지닌 차세대의 주류를 발효할 수 있는 기술개발**의 필요성이 강하게 요구되고 있다.

항암다당류의 함유

↑

부드럽고 순한맛 ← **버섯 균사체 P1-YK21 발효주** → 건강술의 이미지

↓

버섯특유의 향 함유

(2) 경제·산업적 측면

○ **버섯 균사체가 그 배양과정에서 에칠알코올(Ethylalcohol)을 생산하여 주류를 개발한 기술의 예는 드문 것으로 안다.** 그러므로 본 기술이 개발되어 주류생산을 본격화 한다면 청주·약주쥬 시장에 파급될 효과는 클 것으로 예상된다.

○ 참고로 년도별 국내 청주 판매시장의 규모를 보면 다음과 같다.

주류	시장규모 / 년도	판매액
청주·약주류	1997년	80억원
	1998년	200억원
	1999년	620억원
	2000년	1,100억원

표 1. 청주·약주류의 판매규모

○ 상기의 표에서 보는 바와 같이 해마다 청주·약주의 소비가 증가하는 현상으로 볼 때

버섯균사체가 발효하는 기능성 약주의 경제적 파급효과는 과히 획기적일 것으로 그 개발의 필요성이 더욱 요구되는 바이다.

○ 매년 국내에서 소비되는 주류의 많은 양이 외국에서 수입되는 실정이다. 표에서 보는 바와 같이 2000년도를 기준으로 총 2억 4480만 달러의 외화 낭비를 초래하고 있다.

주류	수입규모
과실발효주	2,000만 달러
맥　　주	250만 달러
청　　주	30만 달러
일반증류수	200만 달러
리큐러제품	400만 달러
위 스 키	2억 1,000만 달러
브 랜 디	600만 달러
계	2억 4,480만 달러

표 2. 외국 주류의 수입현황(2000년 기준)

○ 새로운 차원의 건강주류가 개발된다면 **음주문화의 개선을 초래함과 동시에 주류수입으로 인한 외화 낭비를 막을 수 있어 경제적인 측면에서 공헌하는 바 클 것으로 사료되어** 본 연구의 필요성이 강조된다.

○ 버섯균 사체를 알코올생산 주체로하여 개발된 새로운 주류가 널리 알려지고 건강증진에 유효한 것이 연구를 통하여 입증될 경우 **수출로 인한 외화 획득**에 크게 공헌 할 수 있다.

○ 효모 일변도의 주류생산에서 벗어나 다양한 주류를 개발할 수 있는 계기가 되어 주류산업에 공헌하는 바 클 것으로 기대된다.

○ 버섯의 약리 작용을 주류 제조시에 함께 응용할 수 있어 고부가가치 주류 상품을 개발할 수 있으며 그에 따른 경제적 가치가 높을 것으로 사료된다.

○ 주류산업 뿐만 아니라 버섯관련 산업도 활성화 할 수 있는 계기가 되어 산업전반에 미치는 영형이 클 것으로 사료된다.

(3) 사회·문화적 측면

○ 버섯균사체로부터 알코올 외에 항암물질인 β-1,4 glucan계 다당류가 부수적으로 생산되어 면역강화 뿐만아니라 식욕을 돋게하고 암을 치유하는 효과가 있어 국민건강에 크게 이바지 한다.

○ 애주가에게 음주를 즐기면서 건강을 지킬 수 있는 희망을 줄수 있어 음주문화를 밝게 유도할 수 있다.

○ 버섯 배양에 의해 술을 만들 수 있다는 사실만으로도 술에 대한 나쁜 인식을 불식 시킬 수 있다.
○ 독한 위스키 보다 순하고 향기로운 버섯술을 찾을 수 있게하여 독한 술을 선호하는 음주 문화에 변화를 줄 수 있다.
○ 독특한 버섯술의 특징을 적극적으로 홍보하여 해외시장에 진출하므로서 한국술의 품위를 높여 주류수출에 기여할 수 있다.
○ 국내 많은 음주 인구의 건강을 보호한다. (표 참조)

표 3. 국내 주류소비 인구의 현황

구 분	인 구 분 포
20세이상 남녀 음주 인구	63%
성 인	70%

제2장. 국내외 관련기술의 현황과 문제점

제 1 절. 국내 관련기술의 현황과 문제점

○ 국내 모든 주류의 발효는 효모를 종균으로 하고 있다. 즉, 버섯 균사체를 알코올 생산 균주로 사용한 예는 없는 실정이다.

○ 발효과정 중 약초 추출액이나 기타 한약재를 첨가하여 약주를 발효하는 경우는 상품화된 주류가 다양하게 있다. 그러나 이들 역시 발효원은 모두 효모이다.

○ 그 외 과실 리큐러나 기타 리큐러제제가 다양하게 개발되고 있으나 이런류의 술은 모두 침출주에 속한다.

○ 최근 상황버섯이나 신령버섯(*Agaricus*) 등의 버섯을 이용한 침출주를 개발하고 있는 것으로 알려져 있으나 이는 발효주가 아니기 때문에 일종의 리큐러에 속한다.

○ 버섯의 알려진 약리작용(참고문헌참조)을 이용하여 동충하초(1), 상황버섯(2-14), 아가리쿠스(15-18) 등의 추출물을 첨가하여 약리효과를 가미한 주류의 개발이 시도되고 있는 것으로 안다. 그러나 이들 주류 역시 효모를 종균으로 발효에 임하고 있다.

제 2 절. 국내 관련기술의 현황과 문제점

○ 최근 일본에서 신령버섯(*Agaricus blazei* MWU-20)균사체를 액체배양할 때 8%알코올을 생산할 수 있었다는 보고가 오카무라(OKAMURA)등에 의하여 발표된 바 있다(19-20).

○ 이들은 이 신령버섯의 균사체로서 주류제조를 위한 시도를 하고 있는 것으로 안다.

○ 일본의 오카무라 등은 이 버섯균사체를 이용하여 청주, 맥주, 포도주 발효에 임하고 있으며 새로운 주류 개발을 위한 제반 노력을 경주하고 있는 것으로 알려지고 있다. 그러나 아직은 제품이 출시되지는 않고 있다.

○ 그 외 일본을 비롯한 어떤 나라에서도 버섯배양에 의한 주류 생산의 예는 없으며 모든 주류생산에는 효모 발효에 기인하고 있다.

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 1 절. 연구 개발 방법

1. 알코올 농도의 측정

배양액의 알코올 농도를 측정하기 위하여 gas chromatography를 이용하였다. 시료의 전처리는 syringe에 0.45 ㎛ membrane filter를 부착하여 여과한 여액을 분석시료로 하였다. 알코올 농도 분석에 사용한 column은 J&W의 capillary column DB-WAX (ID : 0.53 mm, length : 30 m, film thickness : 1 ㎛)을 장착한 GC (HP6890, USA)로 분석하였다. Injection과 FID detector의 운전온도는 각각 220℃로 설정하였고, 초기에는 35℃에서 3min 동안 holding한 다음, 35℃부터 75℃까지는 3℃/min으로 ramping하였고, 이후 post running은 150℃로 운전하였다. Carrier gas flow rate는 N_2 20ml/min, 시료 1ml의 split rate는 5 : 1로 운전하였다.

2. Alcohol dehydrogenase의 활성 측정

효소의 활성측정을 위해 산화반응과 환원반응 2가지를 행하였다. 먼저 NADH standard를 설정하기 위하여 NADH를 농도별로 희석하여 UV-1601PC spectrophotometer(Shimadzu co. Japan) A_{340nm}에서 흡광도를 측정하여, 측정된 데이터 값을 최소자승법을 이용하여 linear regression하여 다음의 결과에 이용하였다. 산화반응은 20mM Tris-HCl buffer (pH 8.0), 1mM NAD^+(Sigma co.)에 효소를 첨가하여 25℃에서 10분간 반응한 다음, 100mM ethylalcohol을 기질로 첨가하여 생성된 NADH량을 측정하였다. 환원반응은 20mM citrate-HCl buffer (pH 8.0), 1mM NADH(Sigma co.)에 효소를 첨가하여 산화반응과 동일한 조건으로, 100mM acetaldehyde를 이용하여 소모된 NADH량을 측정하였다.

3. 효소의 정제

① Cell free extract

균사체의 대량배양으로 생산된 균사체를 거즈를 이용하여 거른 후, 20mM Tris-HCl buffer(pH 8.0, contained 10% glycerol)에 2:1 v/v으로 섞어서 Branson ultrasonicator system(Branson Sonifier 250, USA)을 이용하여 균사체를 파쇄하였다. 파쇄액을 centrifuge(Hitachi Koki co. Japan)를 이용하여 4℃, 13,000rpm에서 20분 동안 원심분리한 상등액을 molecularporous membrane tubing(MWCO : 12~14,000, Spectra/Por, Spectrum co.)을 이용하여 20mM Tris-HCl buffer (pH 8.0)에 투석하여 조효소액으로 사용하였다.

② DEAE Sephadex A-50 ion-exchange column chromatography

조효소액을 20mM Tris-HCl buffer(pH 8.0)로 완충된 DEAE Sephadex A-50(Sigma co.) ion-exchange column(3.5×20cm)에 50 ml을 loading하여 목적효소는 통과시키고 이외의 단백질들을 흡착시키는 batch method를 이용하였다. 이 때의 유속은 20 ml/hr로 행하였으며, 6 ml/tube씩 분취하였다. 활성분획을 molecularporous membrane tubing(MWCO : 12~14,000, Spectra/Por, Spectrum co.)을 이용하여 DDW에 투석하여

freeze dry(Eyela co. Japan)하여 다음 정제 단계에 이용하였다.

③ Sephadex G-200 gel filtration column chromatography

동결건조된 부분정제 효소를 0.1% NaCl이 포함된 20mM Tris-HCl buffer(pH 8.0)로 녹여 최종 volume이 1 ml이 되게 하였다. Sephadex G-75 superfine resin(Sigma co.)으로 충진된 analytical chromatography column(15mm×1000mm, 171.8 ml, Omnifit co.)을 이용하여 시료 1ml를 injection하여 gel filtration을 행하였다. 유속은 7.5 ml/hr으로 행하였으며, 1.5 ml/tube씩 분취하여 효소 활성과 단백질 량을 측정하고 활성분획을 앞의 단계와 동일하게 처리하였다.

④ Sephadex G-75 superfine gel filtration column chromatography

효소액을 0.1% NaCl이 포함된 20mM Tris-HCl buffer(pH 8.0)로 녹여 최종 volume이 0.5 ml이 되게 하였다. Sephadex G-75 superfine resın(Sigma co.)으로 충진된 analytical chromatography column(10mm×1000mm, 76.3 ml, Omnifit co.)을 이용하여 시료 0.5 ml를 injection하여 gel filtration을 행하였다. 유속은 7.5 ml/hr으로 행하였으며, 1 ml/tube씩 분취하여 효소 활성과 단백질 량을 측정하고 활성분획을 앞의 단계와 동일하게 처리하였다.

4. 버섯균사체에 의한 약주 발효

약주 제조시 물은 부산시 기장군 정관의 지하수를 사용했으며, 당원으로는 증미에 Koji 종균인 *Aspergillus Kawachii*와 *Aspergiius oryzae*중 선별하여 종균으로 접종하여 제조한 Koji를 사용하였다. 물과 Koji 그리고 증미를 섞어 술밑을 만들고 여기에 효모나 누룩 대신 상황버섯 균사체를 접종하여 배양하면서 초점, 중첨, 유첨과정을 거쳐 알코올 발효를 진행한다.

5. 다당체추출법

상황버섯자실체를 균일하게 분쇄한 후 100 °C증류수에서 약 3시간동안 열수추출하였다. 추출 후 자실체는 여과를 하여 제거하고, rotary evaporator를 이용하여 농축하였다. 농축액의 3배양의 에탄올을 첨가한 후 4°C에서 24시간 방치하였다. 침전물을 증류수에 녹인후 10,000g에서 15분간 원심분리를 하여 침전물을 제거하고 증류수에 용해되는 다당체만을 획득한후 동결건조하여 조단백다당체를 얻었다.

6. 이온교환수지와 겔거르기 크로마토그래피를 이용한 다당체의 분리

조단백다당체를 증류수에 용해시킨 후 DEAE-cellulose column (3×45 cm)을 이 한 NaCl농도구배(0-2 M)에 의해서 분획을 받았다. 약 0.45M NaCl에서 용출되는 분획을 획득하여 투석 후 동결건조하였다.

본 단백다당체의 분자량을 측정하기 위하여 Sepharose CL-4B (detection range of molecular weight; 10^4-10^7) column (1.5×105 cm)를 사용하였다. Blue dextran (M.W. 2,000,000), dextran-5251 (M.W. 473,000), and dextran-1662 (M.W. 41,272)을 분자량 측정을 위한 표준물질로 사용하였다. 우선 용출은 0.01 M of sodium phosphate buffer (pH 6.4)를 이용하여 안정화 시킨 후 사용하였다.

7. 단백질량과 아미노산조성측정

본 다당체의 단백질정량은 Bradford법에 준하여 실시하였으며, 표준물질로 bovine serum albumin을 사용하여 280 nm에서 측정하였다. 아미노산 분석을 위하여 단백다당체를 5mg/ml의 phenol이 포함된 6 M HCl을 이용하여 110°C에서 24시간동안 산가수분해를 실시하였다. 가수분해산물을 농축건조한후 0.5 ml의 citrate buffer에 용해시킨 다음 ninhydrin법을 이용한 Biochrom 20 amino acid analyzer (Pharmacia, Fullerton, CA) 을 이용하여 측정하였다.

8. 당분석

총당분석을 위해 dinitrosalicylic acid (DNS)법을 이용하였으며, 표준물질로 glucose를 사용하였다. 또한 단당류의 분석을 위해서 분리되어진 다당체를 2 M trifluoroacetic acid (TFA)로 가수분해시킨 후 농축건조하였다. 가수분해산물을 Sugar-Pak column (7.8×300 mm; Milipore, Tokyo, Japan)을 이용하고, differential refractive index (RI) detector (RID-6A)를 이용하여 high-pressure liquid chromatography system (Waters, Milford, MA, USA) 을 통하여 분석하였다.

9. FT-IR과 NMR분석

FT-IR (Magna-IR 560)분석은 KBr disc법을 이용하여 기능기를 확인하였다. 표준β-glucan의FT-IR spectrum을 위하여 *Lendtinus edodes의* β-glucan을 이용하였다.^{1}H and ^{13}C-NMR (Varian, Unity-inova 500)은 용매로 D_2O를 사용하여 구조상의 특징(α- or β-bond and degree of methylation)을 조사하였다.

10. 3 종류의 상황버섯의 향기성분(휘발성 성분)을 분석방법

① 본 실험에 사용한 상황버섯은 진성농원(2003년 수확, 부산), 금황(2004년 수확, 진주), 제주귤림(2004년 수확, 제주)의 건조된 제품을 구입하여 전처리 없이 사용하였다. 각 시료는 잘게 자른 후 분쇄기(Heung sang trading Co., LTD)로 분쇄 후 사용하였다. 각 휘발성 성분의 동정에 이용한 탄화수소, 알데히드류, 알코올류, 케톤류 및 산류의 표준시약은 각 2-methyl pentenal, hexanal, hexanol, 3-heptanone, 2-acethyl furan, 5-methyl furfural, limonene, coumaran, (*E,E*)-2,4-decadienal(Aldrich, Milwaukee, WI, USA), 2-butoxy ethanol, 2,4-pentandione, benzaldehyde, 1-octen-3-ol, 2-hexyl ethanol, (*E*)-2-octenal, phenylacetaldehyde, acetophenone, camphor, (*E*)-2-nonenal, phytol(Wako, Osaka, Japan), heptanoic acid, β-ionone, ethyl dodecanoate(Sigma, St. Louis MO, USA), 그 외의 시약은 Tokyo Kasei, Fluka등의 특급 시약을 사용하였다.

② 상황버섯의 휘발성성분 추출은 연속수증기증류장치(simultaneous steam distillation and extraction : SDE법)를 사용하였다. 즉, 증류용 둥근 플라스크에 균질화한 각 버섯 시료 50 g, 증류수 1 L 및 내부표준물질로서 tridecane 용액(8 mg/ 100mL dichloromethane) 1 mL를 넣고 증류하였다. 이때, 보온을 위해 증류용 플라스크에는 섬유재질의 천과 알루미늄 호일을 이중으로 덮어, 증류용 플라스크 용기의 온도를 일정하게 유지하였다. 용매플라스크에는 50 mL의 정제한 diethyl ether와 비등석을 넣고, 38-40℃의 수욕 온도에서 에테르증기를 환류하였다. 추출시간은 휘발성 농축물의 수량을 높이고, 가온에 의한 변화를 되도록 피하기 위해 3시간으로 설정하였다. 이 장치에 의해 3시간 연속증류를 행한 후, 얻어진 에테르추출물은 무수황산나트륨을 가해 하룻밤 탈수 후, 상압에서 에테

르를 제거, 농축한 후 연속수증기증류법에 의한 휘발성성분농축물을 얻었다. 얻어진 휘발성성분 농축물은 GC 및 GC-MS분석에 제공하였다.

③ 연속수증기증류에 의해 얻어진 휘발성농축물은 상압(수욕 온도 38-40℃)에서 농축한 후, Shimadzu GC-9A gas chromatography에 의해 휘발성성분을 분리하였다. 휘발성성분의 검출에는 FID(불꽃이온화검출기), 칼럼은 HP-5MS capillary column(30 m×0.25 mm i.d.×0.25 μm film thickness : J & W Scientific, USA)을 사용하였으며, 칼럼온도는 60℃에서 5분간 유지한 후, 220℃까지 2℃/min 의 속도로 승온하였으며, GC의 주입부는 200℃를 유지하였다. 운반기체로서는 질소가스를, 칼럼내의 유속은 1.0 mL/min으로 유지하였다. GC-MS 분석장치는 HP 6890과 HP5973 Mass Selective Detector(Palo Alto, CA, USA)가 연결된 것을 사용하였으며 분석조건은 다음과 같다. GC주입부와 interface온도는 200℃, mass range는 25-450 m/z, linear velocity는 40 cm/sec, multiplier voltage은 1500 V, ionization voltage는 70 eV로 설정하고, 운반기체로는 헬륨가스를 사용하였으며, 그 이외의 조건은 GC의 분석조건과 동일하게 설정하였다. 휘발성성분의 동정은 mass spectral library data에 의한 검색, Wiley/NBS Registry of Mass Spectra Data, Eight Peak Index of Mass Spectra에 의한 문헌의 질량분석 데이터 검색 및 Kovats Index(KI) 수치로부터 물질을 추정하고, 표준물질의 머무름시간(t_R) 및 KI치의 일치에 의해 정성분석하였다.

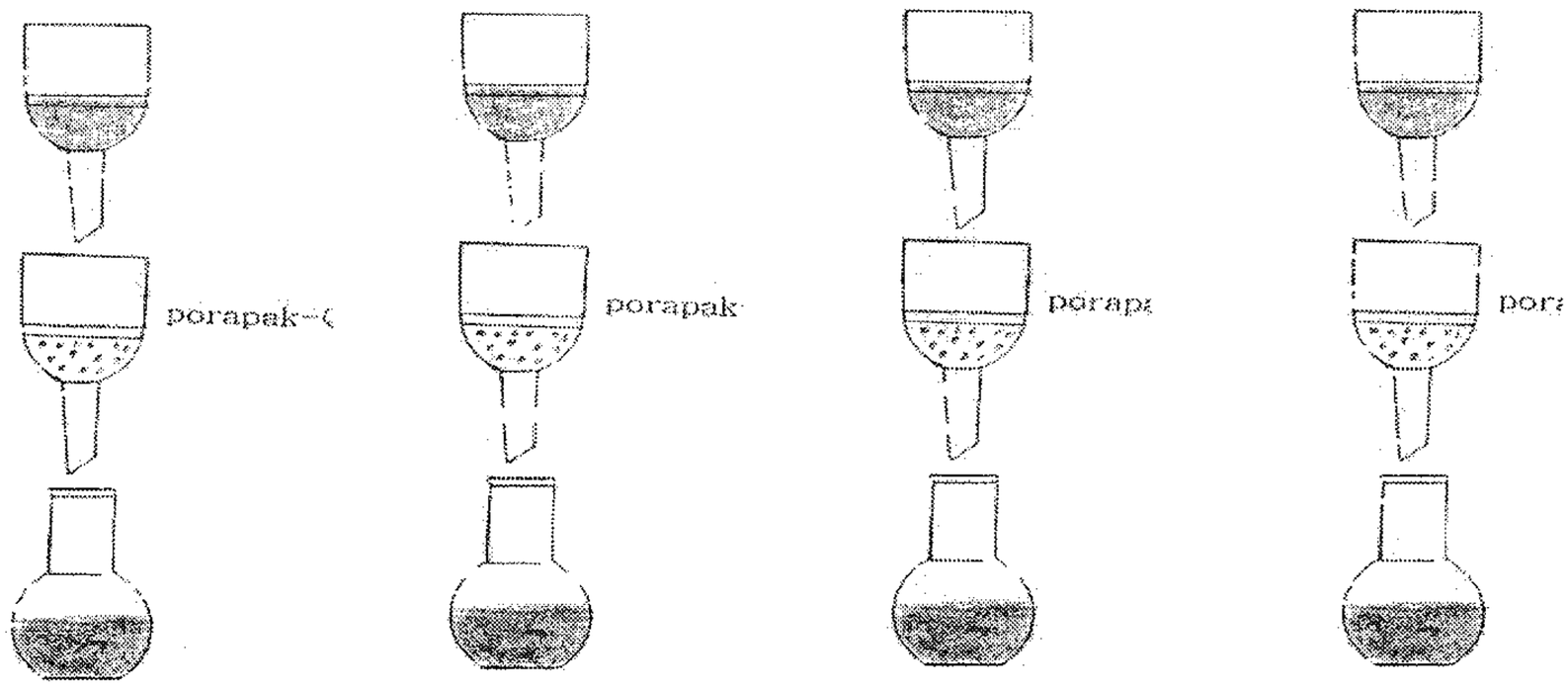
11. 혈전용해 활성측정과 항 혈전활성측정

Fibrin을 기질로 하는 방법 중 fibrin 평판법(fibrin plate method)을 사용하였다. 즉. fibrinogen에 thrombin을 가항 fibrin palte를 작성한다. 그 위에 시료 검체를 얻어 37℃에서 시간별로 처리하여 fibrin의 분해면적으로 측정하는 방법으로 실시하였다.

그리고 항 혈전 활성 측정은 fibrinogen에 thrombin이 작용하여 fibrin(혈전)이 되는 원리를 이용하여 thrombin을 저해시키면 혈전(fibrin)이 생성되지 않는 원리를 이용하였다. 즉, 시료와 thrombin을 전처리 (preincubation)하루 fibrinogen에 적용시켜서 fibrin이 생성되지 않는 조건 다시 말하면, fibrinogen이 응고되지 않는 시간을 측정함으로서 항 혈전 활성을 측정하였다.

12. 휘발성 향기성분 농축물 제조

휘발성 향기성분 농축물의 제조에 사용된 다공질 중합체인 Porapak Q (ethyl vinyl benzene- divinyl benzene, 50~80 mesh, Waters)는 hexane을 용매로 soxhlet 추출장치에서 6시간 추출하여 정제하였다. 정제한 porapak Q는 정량 칼럼관 (2.0 cm I.d. × 12.0 cm length)에 2.0g 충진한 후, 충진제의 10배량의 정제한 diethyl ether로 세정하였다. 또한, 3~4배량의 methanol로 diethyl ether를 배출, 치환 후, 7~8배량의 탈이온수를 흘린 후 사용하였다(그림 1). 준비된 칼럼관은 탈이온수 50 mL로 습윤 시킨 다음 시료 100 mL를 흘려 다공질 중합체에 흡착시켰다. 탈이온수 50 mL로 수용성 성분을 씻어 낸 후 추출용매인 diethyl ether 80 mL를 사용하여 유기성분을 추출하였다. 내부표준용액으로 tetradecane (dichloromethane중 80 ppm농도로 조제)을 추출액내에 0.5 mL를 주입 후 물층은 무수황산 나트륨으로 제거한 후 상압(40 ℃)에서 증류, 농축한 후 N_2 gas로 농축하였다.



① H_2O,50mLpassed through porapak-Q ② Sample,100mLpassed through porapak-Q ③ H_2O, 50mL passed through porapak-Q ④ Diethyl ether, 80mLpassed through porapak-Q

Fig. 1. Apparatus for adsorption

13. 휘발성 향기성분의 분석 및 동정

휘발성 향기성분의 분석 및 동정은 gas chromatography (GC)와 gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS)에 의하였다. GC는 Shimadzu model GC 17A(Kyto, Japan) 형을 사용하였다. 휘발성 향기성분 검출에는 FID(불꽃이온화검출기), 칼럼은 HP-5MS capillary column (30 m length × 0.25 mm i.d. × 0.25 ㎛ film thickness: J&W Scientific, USA)을 사용하였으며, column온도는 35 ℃에서 5분간 유지한 후, 210 ℃까지 5 ℃/min 의 속도로 승온하였으며, GC의 주입부와 검출기는 220℃를 유지하였다. Carrier gas는 질소가스를, 유량은 1.0 mL/min, 분석시 split mode로 split ratio는 1:50을 유지하였다. GC-MS는 HP 6890와 HP 5973 Mass Selective Dectector (Palo Alto, CA, USA)가 연결된 것을 사용하였다. Carrier gas로 helium을 사용한 것을 제외하고는 온도조건은 GC와 동일하게 설정하였다. MS의 이온화 전압은 70eV로 하였다. GC에 의해 분리된 각 peak성분은 표준물질의 머무름 시간(t_R) 및 GC-MS 분석 결과로 얻은 mass spectral library data와 비교하여 확인 하였다.

14. 향과 맛을 소비자 기호에 맞추어 조성비를 확립

재료

본 관능평가의 실험군은 상황버섯 균사체가 분비하는 알코올을 이용하여 제조된 발효주인 '천년약속' (알코올 함량 14%, 천년약속 제조) 과 대조군으로는 알코올 도수가 비슷하며 10여 가지 한약재를 넣어 만든 발효주인 '다른술' (알코올 함량 13%, A사 제조)의 시판품을 구입하여 사용하였다.

방법

대학생과 성인 각 5명을 통한 예비조사 결과를 토대로 설문 사항의 문제점을 보완·수정하여 다음에 제시된 설문지를 작성하여 조사하였다. 본 실험인 기호도 조사에 응한 남녀는 150명으로 남녀에게 각각 천년약속(375mL)과 다른술(375mL) 한 병 씩을 포장하여 관능평가 용지와 함께

나누어 준 후 자유롭게 각각의 시료를 마신 후 평가하는 방법을 사용하였다. 관능평가에 사용된 설문지는 다음에 제시된 것과 같으며, 설문지 내용으로는 일반사항으로 개인의 음주경력, 즐겨 마시는 술의 종류에 관한 내용이 포함되었다. 관능평가 설문 자료에 대한 통계 분석은 t-Test 방법을 사용하였으며, 그 결과를 요약하면 다음과 같으며, 분석결과는 부록에 수록하였다.

술의 소비자 기호도 조사용 설문지

제품번호	조사일	조사자	조사지역	비고
	년 월 일			

이 설문조사는 천연약속과 다른술의 소비자 기호를 알아보기 위한 것으로 이 결과는 순수한 연구용 자료로 사용됨을 말씀드립니다.
다른술과 천연약속이라는 술의 이름에 구애 받지 마시고 솔직하게 느끼신 대로 응답해 주시면 감사하겠습니다.

※ 다음의 해당 항목에 √표를 해주세요(1-10번 문항)

1. 일반사항

귀하의 성별은	① 남성( )	② 여성( )
귀하의 연령은	① 10~20대( ) ③ 50~60대( )	② 30~40대( ) ④ 70대 이상( )
귀하의 음주 경력은?	① 1년 미만( ) ③ 5년~10년( )	② 1년~5년 ( ) ④ 10년 이상( )
귀하의 술 마시는 횟수는?	① 매일( ) ③ 1개월에 1~2회( )	② 1주일에 1~2회( ) ④ 1년에 1~2회( )
소주를 기준으로 한 귀하의 주량은?	① 소주반병 이하( ) ③ 소주2병( )	② 소주1병( ) ④ 소주2병 이상 ( )
귀하의 거주 지역은 어디입니까?	거주 지역 : (거주지역은 지역별 차이를 위한 것으로 부산시, 경남등으로 기재해 주십시오)	

2. 술을 처음으로 마시게 된 경위는 무엇입니까?

① 제사 후 음복( ) ② 호기심( ) ③ 친구들과의 모임( )
④ 선/후배의 모임(또는)권유( ) ⑤ 가족의 권유( )

3. 술을 처음으로 마신 시기는 언제입니까?

① 중학생 때 ( ) ② 고교생 때( )
③ 대학생 때 ( ) ④ 사회 진출 후( )

4. 평상시 술을 평가할 때 가장 중요하게 생각하는 것은 무엇입니까?

① 맛(　　)　② 향기(　　)　③ 색(　　)

④ 가격(　　)　⑤ 기능성(　　)　⑤ 숙취의 유무(　　)

5. 귀하가 가장 즐겨 마시는 술의 종류는 무엇입니까?

① 맥주(　　)　② 소주(　　)　③ 와인(　　)

④ 막걸리(　　)　⑤ 기능성 술(　　)　⑥ 위스키(　　)

⑥ 보드카(　　)　⑦ 럼주(　　)

6. 방금 드신 각각의 술(㉠천년약속 및 ㉡다른술)의 맛을 평가하신다면?

㉠ 천년약속

① 아주 좋다(　)　② 좋다(　)　③ 보통이다(　)　④ 미흡하다 (　)　⑤ 아주 미흡하다(　)

㉡ 다른술

① 아주 좋다(　)　② 좋다(　)　③ 보통이다(　)　④ 미흡하다 (　)　⑤ 아주 미흡하다(　)

7. 방금 드신 각각의 술(㉠천년약속 및 ㉡다른술)의 향기를 평가 하신다면?

㉠ 천년약속

① 아주 좋다(　)　② 좋다(　)　③ 보통이다(　)　④ 미흡하다 (　)　⑤ 아주 미흡하다(　)

㉡ 다른술

① 아주 좋다(　)　② 좋다(　)　③ 보통이다(　)　④ 미흡하다 (　)　⑤ 아주 미흡하다(　)

8. 방금 드신 각각의 술(㉠천년약속 및 ㉡다른술)의 색을 평가 하신다면?

㉠ 천년약속

① 아주 좋다(　)　② 좋다(　)　③ 보통이다(　)　④ 미흡하다 (　)　⑤ 아주 미흡하다(　)

㉡ 다른술

① 아주 좋다(　)　② 좋다(　)　③ 보통이다(　)　④ 미흡하다 (　)　⑤ 아주 미흡하다(　)

9. 방금 드신 각각의 술(㉠천년약속 및 ㉡다른술)을 전체적으로 평가 하신다면?

㉠ 천년약속

① 아주 좋다(　)　② 좋다(　)　③ 보통이다(　)　④ 미흡하다 (　)　⑤ 아주 미흡하다(　)

㉡ 다른술

① 아주 좋다(　)　② 좋다(　)　③ 보통이다(　)　④ 미흡하다 (　)　⑤ 아주 미흡하다(　)

10. 각 각의 술을 전체적인 평가에 가장 영향을 미친 것은 무엇입니까?

① 맛(　　)　② 향기(　　)

③ 색(　　)　④ 기능성(　　)

11. 각각의 술을 드시면서 좋았던 항목에 √표를 해주세요. (중복응답이 가능합니다)

구분		항 목		
맛	㉠ 천년약속	단맛( )	과일의 상큼한 맛( )	신맛( )
		맑고 개운한 맛( )	곡류의 구수한 맛( )	쓴맛( )
		가벼운 맛( )	쌉쌉한 맛( )	
	㉡ 다른술	단맛( )	과일의 상큼한 맛( )	신맛( )
		맑고 개운한 맛( )	곡류의 구수한 맛( )	쓴맛( )
		가벼운 맛( )	쌉쌉한 맛( )	
향기	㉠ 천년약속	달콤한 향( )	과일향 ( )	꽃향( )
		한약재 향( )	발효취( )	
	㉡ 다른술	달콤한 향( )	과일향 ( )	꽃향( )
		한약재 향( )	발효취( )	
색	㉠ 천년약속	투명함( )	옅은 노란색( )	밝은 색( )
		맑은 색( )	진한 색( )	
	㉡ 다른술	투명함( )	옅은 노란색( )	밝은 색( )
		맑은 색( )	진한 색( )	

12. 각각의 술을 드시면서 싫었던 항목에 √표를 해주세요. (중복응답이 가능합니다)

구분		항 목		
맛	㉠ 천년약속	단맛( )	신맛( )	쓴맛( )
		가벼운 맛( )	쌉쌉한 맛( )	한약재의 맛( )
	㉡ 다른술	단맛( )	신맛( )	쓴맛( )
		가벼운 맛( )	쌉쌉한 맛( )	한약재의 맛( )
향기	㉠ 천년약속	달콤한 냄새( )	한약재의 냄새( )	목재냄새( )
		발효취( )	강하고 진한 냄새( )	
	㉡ 다른술	달콤한 냄새( )	한약재의 냄새( )	목재냄새( )
		발효취( )	강하고 진한 냄새( )	
색	㉠ 천년약속	투명함( )	옅은 노란색( )	밝은 색( )
		맑은 색( )	진한 색( )	
	㉡ 다른술	투명함( )	옅은 노란색( )	밝은 색( )
		맑은 색( )	진한 색( )	

13. 기타 하시고 싶은 말씀이 있으시다면?

♣설문에 응해주셔서 대단히 감사드립니다.

15. 세포주를 이용한 상황버섯균사체 발효주 및 그 추출물의 기능성 검정

15-1. 상황버섯균사체 발효주 및 추출물 분리

알코올 수득율을 높이기 위해 쌀을 기초로 한 배지를 사용하였으며 *Aspergillus oryzae*와 *Phellinus* sp.의 균사체를 함께 배양하였다. 우선 *A. oryzae*를 1.2 ㎏의 멸균된 쌀에 접종하여 충분한 균체를 형성시킨 후 3 ㎏의 멸균된 쌀과 90 g의 *Phellinus* sp. 균사체를 혼합하였으며, 이어 멸균한 물을 총 5 L가 되도록 부가하여 25℃에서 11일 간 발효시켰다. 이를 통해 얻은 상황버섯균사체 발효주를 0.22 ㎛ pore size를 가진 여과지로 여과한 후 rotary evaporator로 감압농축하고 동결건조시켜 상황버섯균사체 발효주의 추출물을 얻었다.

15-2. 세포주의 배양 및 처리

본 연구에 사용된 인체 간암 세포주인 HepG2 세포는 한국세포주은행에서 구입하였으며, 세포의 배양을 위해 90%의 DMEM (Gibco BRL, NY, USA)에 10% fetal bovine serum (Gibco BRL)과 1% penicillin/streptomycin (Gibco BRL)이 포함된 성장배지를 사용하였으며, 5%의 CO2가 공급되는 37℃ humidity incubator에서 배양하였다. 실험을 위하여 배양 플라스크에 부착되어 있는 HepG2 세포를 trypsin-EDTA (Gibco BRL)로 부유시켜 각각의 실험에 맞는 수로 T-25, T-80, 60 ㎜, 100 ㎜ 배양 용기에 나눈 다음, 24시간 동안 안정화시킨 후, serum이 들어있지 않는 배지에 상황버섯균사체 발효주 또는 그 추출물을 녹여 1시간 동안 전처리하고 acetaldehyde를 처리하거나 H_2O_2를 처리할 때는 parafilm 등으로 밀봉하여 적절한 시간동안 배양하였다.

15-3. 광학현미경적 관찰

직경 60 ㎜의 배양용기에 세포를 분주하고 세포를 부착시킨 후, 시료의 처리가 끝난 24시간 후 inverted microscope (Carl Zeiss, Germany)를 이용하여 관찰하고 200배 배율로 사진을 찍었다.

15-4. Nitric oxide (NO) 농도 측정

세포에 다양한 농도의 상황버섯균사체 발효주 또는 그 추출물을 1시간 동안 전처리하고 250 μM의 acetaldehyde를 24시간 동안 처리한 후, 그 배지를 Greiss A 및 Greiss B 용액의 혼합액과 동량으로 반응시켜 540 nm에서 흡광도를 측정하여 상대적인 값을 비교하였다.

15-5. Reactive oxygen species (ROS) 검출을 위한 형광염색

세포에 2.0 ㎎/㎖의 상황균사체 발효주 또는 그 추출물을 1시간 동안 전처리하고 0.2 mM의 H2O2를 40분 동안 처리하면서 0.5 ㎕/㎖의 2',7'-dichlorofluorescin diacetate (DCFH-DA, Molecular Probes, USA)를 첨가하여 20분간 더 배양하였다. 3.7%의 formaldehyde로 고정시킨 후, PBS로 수세하고 10 ㎍/㎖ Hoechst 33258 (Molecular Probes)로 핵을 염색하고 PBS와 DW로 수세한 다음 형광현미경 (Carl Zeiss)으로 관찰 한 다음 디지털 카메라 (Carl Zeiss)로 그 영상을 200배의 배율로 촬영하였다.

15-6. Nuclear extract의 분리

Nuclear extract는 Yang et al. (2003)의 방법을 사용하여 분리하였다. 세포를 PBS로 세 번 수세하고, ice-cold hypotonic buffer (10 mM HEPES/KOH, 2 mM MgCl2, 0.1 mM EDTA,

10 mM KCl, 1 mM DTT, 0.5 mM PMSF, pH7.9)로 10분 간 반응시키고 15,000 g에서 30초 간 원심 분리하여 세포핵 침전물을 얻어내었다. 침전물에 ice-cold saline buffer (50 mM HEPES/KOH, 50 mM KCl, 300 mM NaCl, 0.1 mM EDTA, 10% glycerol, 1 mM DTT, 0.5 mM PMSF, pH7.9)를 가하여 20분간 반응시킨 후 15,000 g에서 5분간 원심 분리하여 상층액을 nuclear extract로 사용하였다.

15-7. SDS-PAGE 및 Western blotting

세포를 PBS로 세 번 수세하고, radioimmunoprecipitation (RIPA) buffer(50 mM Tris-HCl pH7.4, 1% NP-40, 0.25% sodium deoxycholate, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM PMSF, 1 mM NaF, 1 mM sodium orthovanadate, 1 ㎍㎖ aprotinin, leupeptin, pepstatin)로 lysis를 실시하고, 14,000 rpm에서 20분간 원심분리하여 단백질을 포함하는 상층액을 얻어내어 Bradford's method에 따라 정량한 후 Laemli's sample buffer와 섞어 3분간 끓인 후 8-12%의 polyacrylamide gel상에서 전기영동을 수행하였다. 전기영동 후, gel상의 단백질을 nitrocellulose membrane으로 옮겨 10% skim milk로 blocking을 한 후, 순차적으로 일차항체 및 이차항체를 처리한 후 enhanced chemiluminoescence method로 발광시켜 X-ray 필름에 감광하였다.

15-8. Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) 분석

동일한 조건에서 세포를 RNAzol B를 이용하여 total RNA를 분리하였다. 분리된 RNA를 정량한 후, oligo dT primer와 AMV reverse transcriptase를 이용하여 2 ㎍의 RNA에서 ss cDNA를 합성하였다. 이 cDNA를 template로 사용하여 조사할 유전자들을 PCR방법으로 증폭시켰으며 housekeeping 유전자인 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) 유전자를 포함하여 internal control로 사용하였다. 각 PCR 산물들을 1% agarose gel을 이용하여 전기영동하였고 ethidium bromide (EtBr, Sigma)를 이용하여 염색한 후 UV 하에서 확인하였다.

15-9. 단백질 밴드의 optical density 측정

SDS-PAGE와 Western blotting의 결과로 나온 필름사의 단백질 밴드의 optical density는 Personal Densitometer (Molecular Dynamics, USA)를 사용하여 측정하였으며, 이에 대한 값은 mean±SE로 표시하였다.

16. 실험동물을 이용한 상황버섯 균사체 발효주 및 그 추출물의 기능성 검정

16-1. 실험동물

6주된 건강한 Sprague-Dawley계 수컷 흰쥐를 샘타코 (주)로부터 구입하여 2주간 자유식이법으로 실험실환경에 순화시킨 실험에 사용하였다.

16-2. 알코올 또는 상황버섯균사체 발효주 투여

Saline, 14% ethanol 및 상황버섯균사체 발효주를 10일간 오전과 오후로 나누어 각각 5 ㎖씩 구강으로 투여하였으며, 10일 후 10% chloral hydrate (350 ㎎/㎏)로 마취하여 간 또는 위 조직을 취하여 Western blotting과 RT-PCR을 수행하기 위하여 -70℃에 보관하였다.

16-3. 혈액채취 및 혈장 catecholamine측정

심장천자를 통해 혈액을 채취하였다. 혈액을 EDTA-2Na 용기에 주입하여 잘 섞고 4℃ 1500 rpm에서 10분간 원심분리하여 혈장을 분리하였다. Catecolamine 측정을 위해 High Performance Liquid Chromatography (HPLC, Bio-Rad, USA), Waters 712 Wisp autosampler, 460 electrochemical detector를 사용하였다.

16-4. Alcohol 유발 위궤양 및 측정

흰쥐를 18시간 물만 공급한 채 절식시킨 후 100% ethanol (1 ml/200 g)을 경구 투여한 후 위궤양을 유발시켰다. 상황균사체 추출물 저농도투여군 (20 mg/ml), 고농도투여군 (60 mg/ml) 및 대조약물로 사용되는 Famotidine (3.6 mg/Kg)은 ethanol 투여 1시간전에 경구투여하였다. Ethanol 투여 후 3시간 후 10% chloral hydrate (350 mg/Kg i.p.)로 마취한 후 위를 절취하여 대만부위를 따라 절개하고 찬 PBS로 세척하였다. 세척한 위를 cold plate에 놓고 핀으로 고정한 후 해부현미경하에서 위점막에 나타나는 손상부위를 관찰하고 계수 하였으며 출혈지수 및 위궤양 지수를 Kunisaki와 Sugiyama (1992)의 방법에 따라 측정하였다.

16-5. 위벽의 점액 측정

위벽 점액은 Corne 등 (1974)의 방법을 사용하였다. 위의 위선부를 취하여 무게를 측정한 후 1 % alcian blue (0.16 M sucrose in 0.05M sodium acetate, pH 5.8)에 2시간 동안 둔 후 3000 rpm에 10분간 원심분리후 상층액을 498 nm에서 흡광도를 측정하였으며 대조군에 대비 상대적 증감으로 표시하였다.

16-6. 조직병리학적 검색

조직을 절취하여 4% paraformaldehyde에 4℃ 12시간 고정하여 순차적인 탈수와 투명화를 거쳐 paraffin에 포매한 후 6 ㎛ 연속절편을 얻었다. 조직병리학적 관찰을 위하여 연속절편을 탈 파라핀한 후 hematoxylin-eosin 및 periodic acid Schiff (PAS) 염색을 실시하였으며 간에서 PAS염색을 이용하여 glycogen 정도를 관찰하였다.

16-7. 면역조직화학적 검색

면역조직화학적 관찰을 위해 탈파라핀한 후 10 mM sodium citrate buffer (pH 6.0)에서 95℃ 5분간 처리하고, 이를 3% methanolic hydrogen peroxide에 30분간 실온에서 처리하였다. PBS로 세척한 후 goat normal serum (Vector Lab.)으로 실온에서 30분간 처리하였으며 iNOS을 비롯한 다양한 염증관련 항체 (Santa Cruz Biotechnology Inc.)를 200:1 로 희석하여 4℃ 습실에 16시간 동안 반응시켰다. PBS로 세척하고 biotinylated anti-rabbit IgG (Vector Lab.)를 실온에서 30분 동안 반응 시켰으며 PBS로 세척 후 ABC kit (Vector Lab.)에 실온에서 60분간 반응시켰다. DAB substrate kit (Vector Lab.)로 실온에서 5분간 발색시켰으며 상기 실험 방법 중 일차항체대신 10% BSA/PBS을 처리하고 동일한 과정으로 염색한 것을 대조군으로 삼았다.

16-8. 복합당질에 대한 고전적 조직화학

위 또는 간을 절취하여 4℃ 10% 중성 포르말린에 24시간 고정하였다. 순차적인 알코올에 탈수, 투명화를 거쳐 파라핀에 포매한 후 6 ㎛의 연속절편을 얻었다. 중성 복합당질에 대한 관찰은 periodic acid Schiff반응법을, 산성 복합당질은 alcian blue pH 2.5염색을 실시하였다. 산성 복

합당질 중 황화 복합당질은 alcian blue pH 1.0염색을, 황화와 비황화 복합당질의 구별은 aldehyde fuchsin pH 1.7-alcian blue pH 2.5염색을 사용하였다.

16-9. 복합당질에 대한 lectin조직화학

복합당질 잔기에 특이적인 lectin조직화학을 위하여 탈파라핀한 조직을 3% methanolic hydrogen peroxide에 실온에서 30분간 처리하고, PBS로 10분간 3회 세척한 후 1% bovine serum albumin용액에 실온에서 30분간 두었다. 이를 아래 표의 biotinylated lectin (Vector Lab)을 10 ㎍/㎖ 농도로 Hepes buffer (10 mM Hepes, pH 7.5, 0.15 M NaCl, 0.1 mM Ca++, 0.01 mM의 Mn++)에 희석하여 실온에서 1시간 동안 반응시켰다. PBS로 세척후 ABC kit (Vector Lab, PK-4000)에 60분간 반응시키고 DAB substrate kit (Vector Lab, SK-4100)로 실온에서 5분간 발색시켜 Mayer's hematoxylin으로 대조 염색하였다.

본 실험에 사용된 lectin의 종류 및 특이성

Lectin	Source	Major sugar specification	Concentration (㎍/㎖)
DBA	*Dolichos biflorus*	α-N-acetyl-D-galactosamine	10
SBA	*Glycine max*	α/β-N-acetyl-D-galactosamine	10
PNA	*Arachis hypogaea*	Galactosyl-(β -1,3)-N-acetyl-D-galactosamine	10
BSL-1	*Bandeiraea simplicifolia*	α-D-galactose	10
RCA-1	*Ricinus communis*	β-D-galactose	10
sWGA	*Triticum vulgaris*	β-N-acetyl-D-glucosamine	10
UEA-1	*Ulex europaeus*	α-L-fucose	10
Con A	*Canavalia ensiformis*	α-D-mannose, α -D-glucose	10

sWGA : succinylated WGA

16-10. 통계처리

통계처리는 평균과 표준편차로 표시하였으며 SigmaPlot version 6.0 (SPSS, Chicago, IL) 로 Student's t-test로 유의차를 검사하였다.

제 2 절. 연구 개발 결과

Ⅰ. 버섯 균사체 종균배양 및 알코올 생산 최적화

1. 종균보존 시스템의 확립

종균보존을 위하여 ①실온에서 대시험관에 agar slant로 보존, ②petridish에 agar를 넣고 4℃에서 냉장보관하면서 1개월에 1회씩 계대하는 방법, ③액체배양하여 -80℃에서 초저온 보존, ④액체질소에 보존, ⑤균체를 동결건조 하여 보존 등의 5가지 방법으로 종균보존 시험을 행하였다.

그 결과, Fig. 2에서 보는 바와 같이 냉장보존하면서 1개월에 1회 계대배양을 해서 보존하는 방법이 균체 생육률이나 알코올생산 효율이 높은 것으로 나타났다. 그러나 장기보존이나 대량보존에는 이방법이 한계가 있기 때문에 더 신중한 검토가 요구된다.

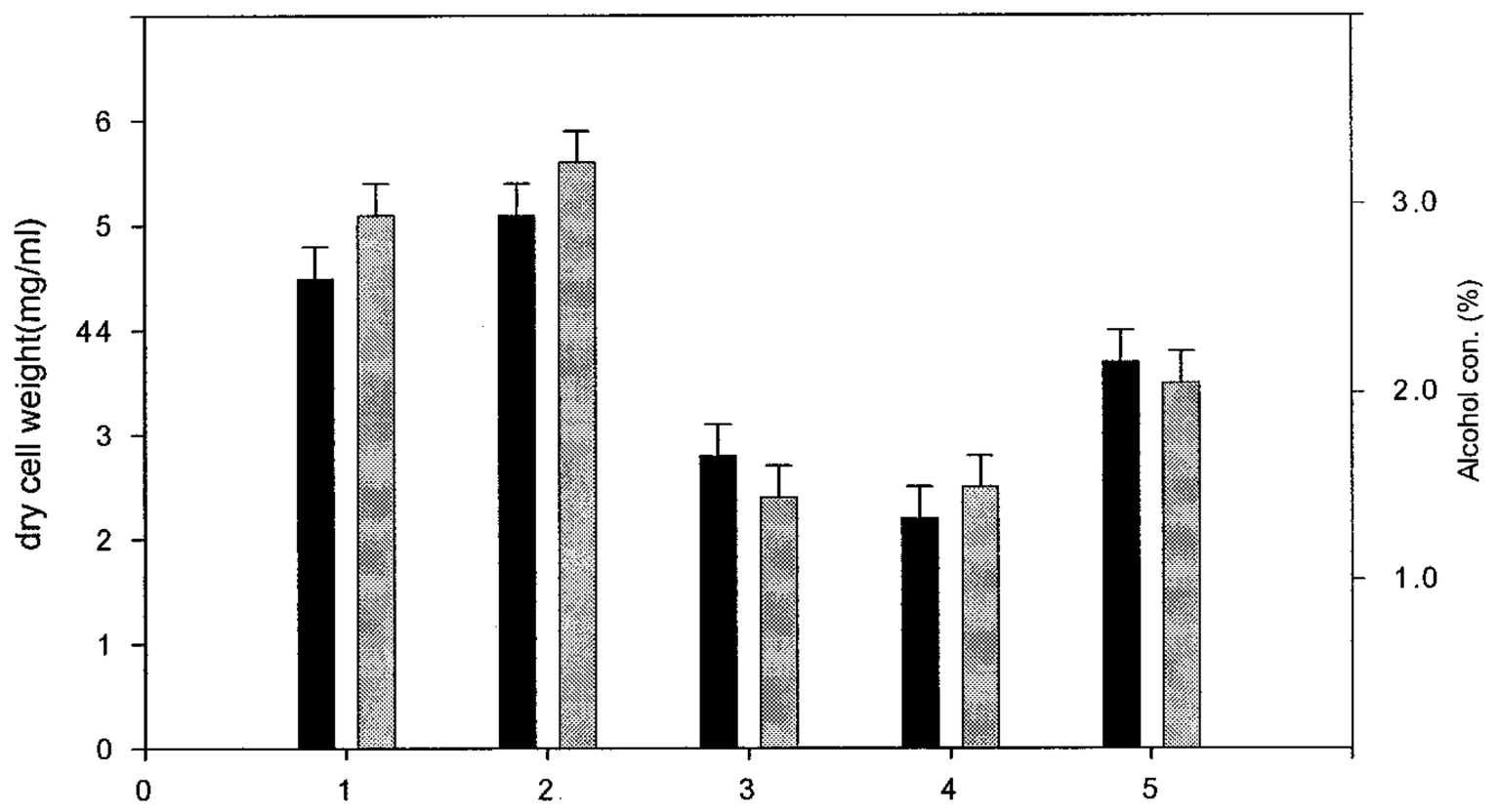


Fig. 2. 균주 보존의 효율성 비교

1. 실온에서 agar slant보존
2. 4℃냉장보존(1개월에 1회 계대)
3. -80℃초저온 보존
4. 액체질소 보존
5. 균체 동결 건조

2. 종균의 액체배양

대부분의 버섯균사체는 질소원이 중요하므로 기초배지에 몇 가지 질소원을 첨가하여 균의 생육도를 측정하였다. 균의 생육도는 건조균체의 무게로서 나타내었다. 기초배지는 2% glucose, 0.17% KH_2PO_4, 0.05%$MgSO_4.7H_20$의 조성으로 사용하였다. 결과는 Fig. 3에서 보이는 바와 같이 Malt extract 와 Yeast extract가 균사체의 생육에 좋은 효과를 보였다.

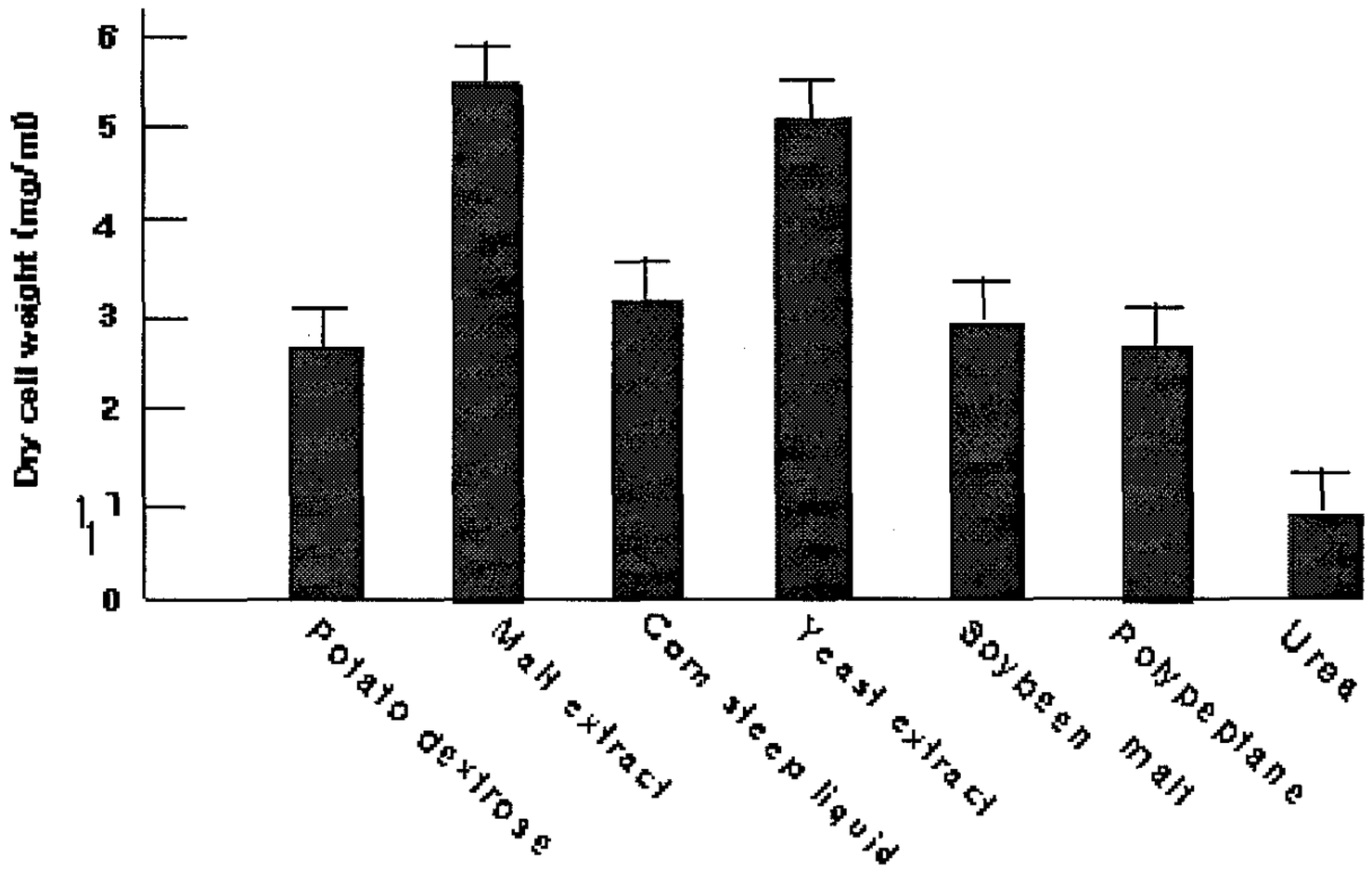


Fig. 3. 각종 질소원이 균의 생육에 미치는 영향

3. 종균으로부터 알코올 생산을 위한 최적 조건 확립

① 기본배지 결정

알코올 생산 최적조건을 정하기 위한 첫 단계로 먼저 6가지의 배지 조성으로 알코올생산을 검토하였다. 결과는 Fig. 4에서 보이는 바와 같이 F배지가 기본배지로 적합하다는 결론을 내릴 수 있었다.

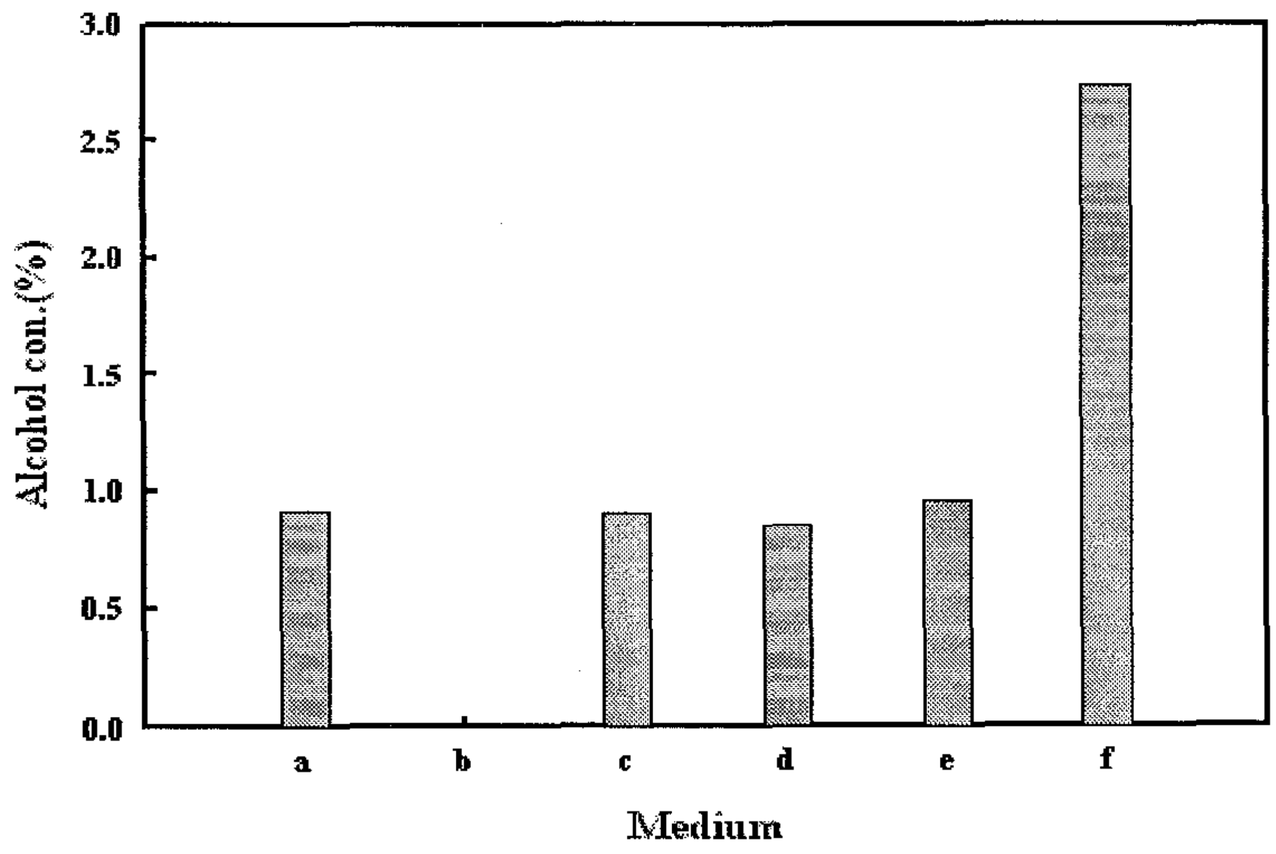


Fig. 4. 각종 배지가 *Phellinus* sp. mycelium의 알코올 생산에 미치는 효과

② 탄소원의 결정

알코올 생산을 최적화하는 탄소원을 결정하기 위하여 기본 배지조성 중 탄소원을 빼고 여

러 가지의 탄소원을 적용하여 실험하였다. 결과는 Fig. 5에서 보이는 바와 같이 A탄소원이 균체 생육에 비하여 알코올 생성율이 높은 것을 알 수 있었다 (※기업의 기밀상 탄소원을 밝힐 수 없음을 양해바랍니다).

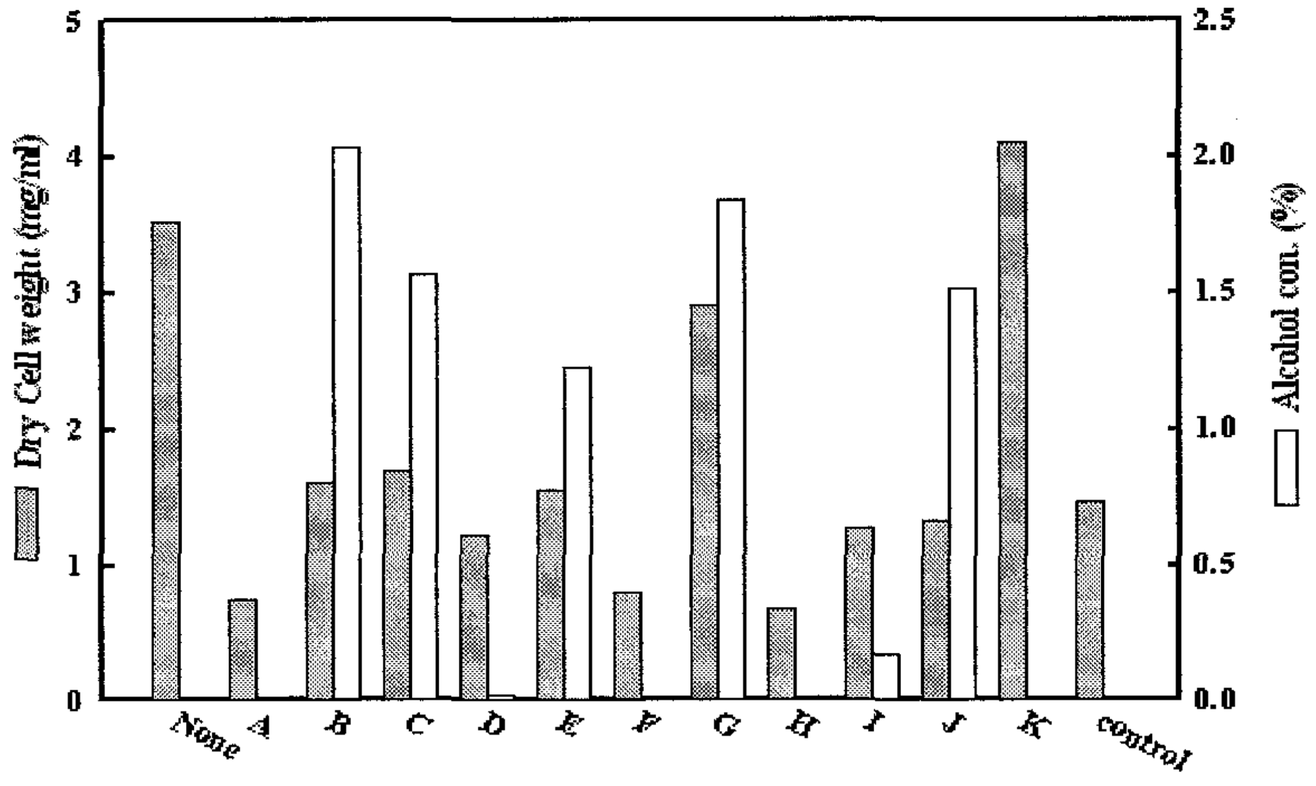


Fig. 5. 각종 탄소원이 *Phellinus* sp. mycelium의 알코올 생산에 미치는 효과

③ 질소원의 결정

최적 알코올 생산을 위한 질소원을 결정하기 위하여 여러 가지 질소원을 적용하여 균체 증식과 알코올 생산을 비교하였다. 그 결과 Fig. 6에서 보는 바와 같이 A질소원이 가장 많은 알코올을 생산하는 것을 알 수 있었다 (※ 기업 기밀을 보호하기 위하여 data를 공개하지 못하는 점을 양해 바랍니다).

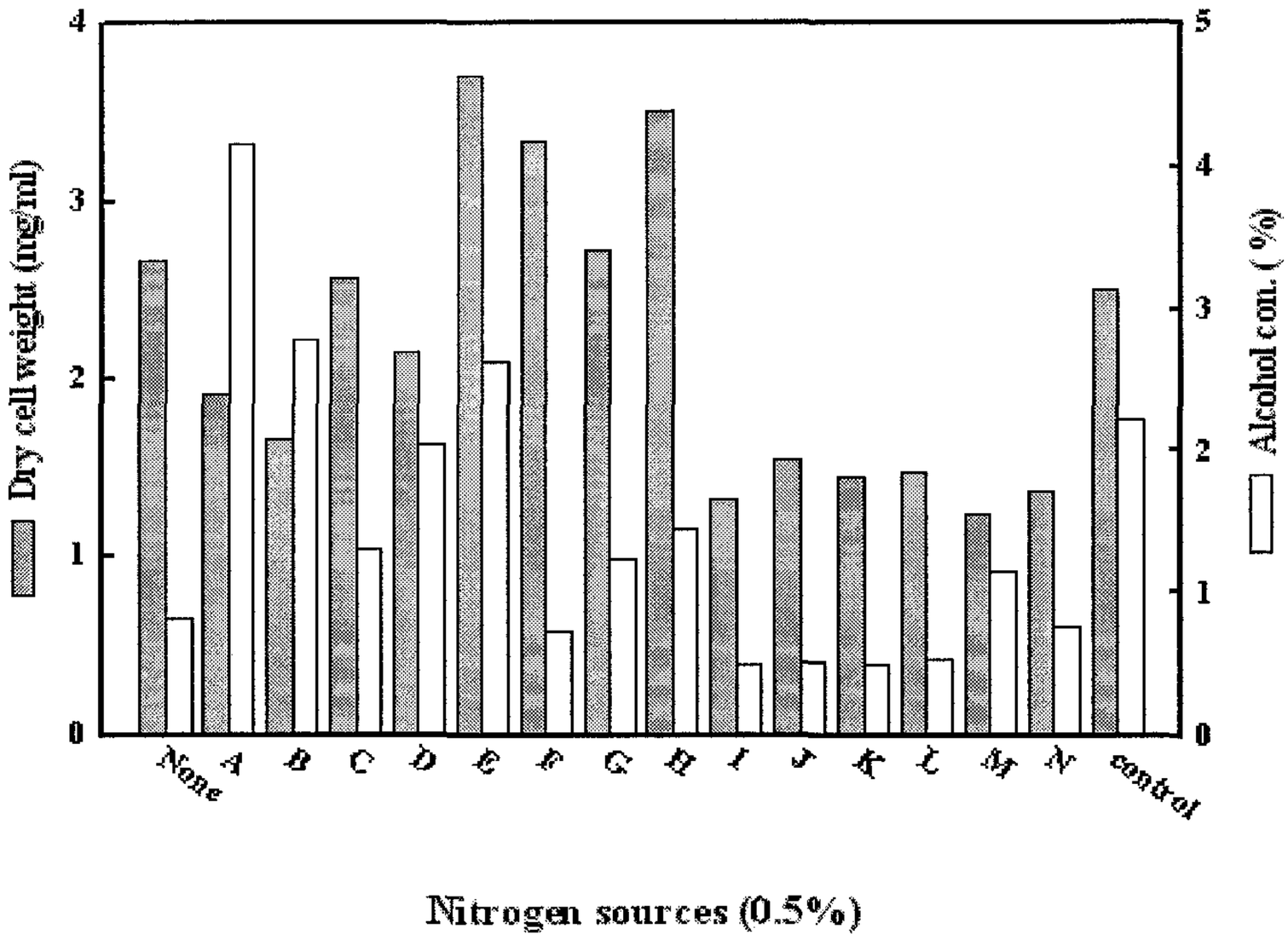


Fig. 6. 각종 질소원이 *Phellinus* sp. mycelium의 알코올 생산에 미치는 효과

④ Metal 이온의 영향

예비실험을 통하여 alcohol생산에는 metal이온이 필수적이라는 사실을 확인한 바 있다. 그래서 여러 가지 metal이온이 alcohol생산에 미치는 영향을 시험한 결과 metal이온이 없을 경우에는 균체 증식도 저조할 뿐만 아니라 alcohol 생산도 매우 미약하여 metal 이온이 필수적임을 알 수 있었다. 그 결과 Fig. 7에서 보는 바와 같이 B metal이온이 alcohol생산에 매우 중요한 존재임을 확인하였다 (※ 기업의 요구에 의해 data를 공개하지 못함을 이해하기 바랍니다).

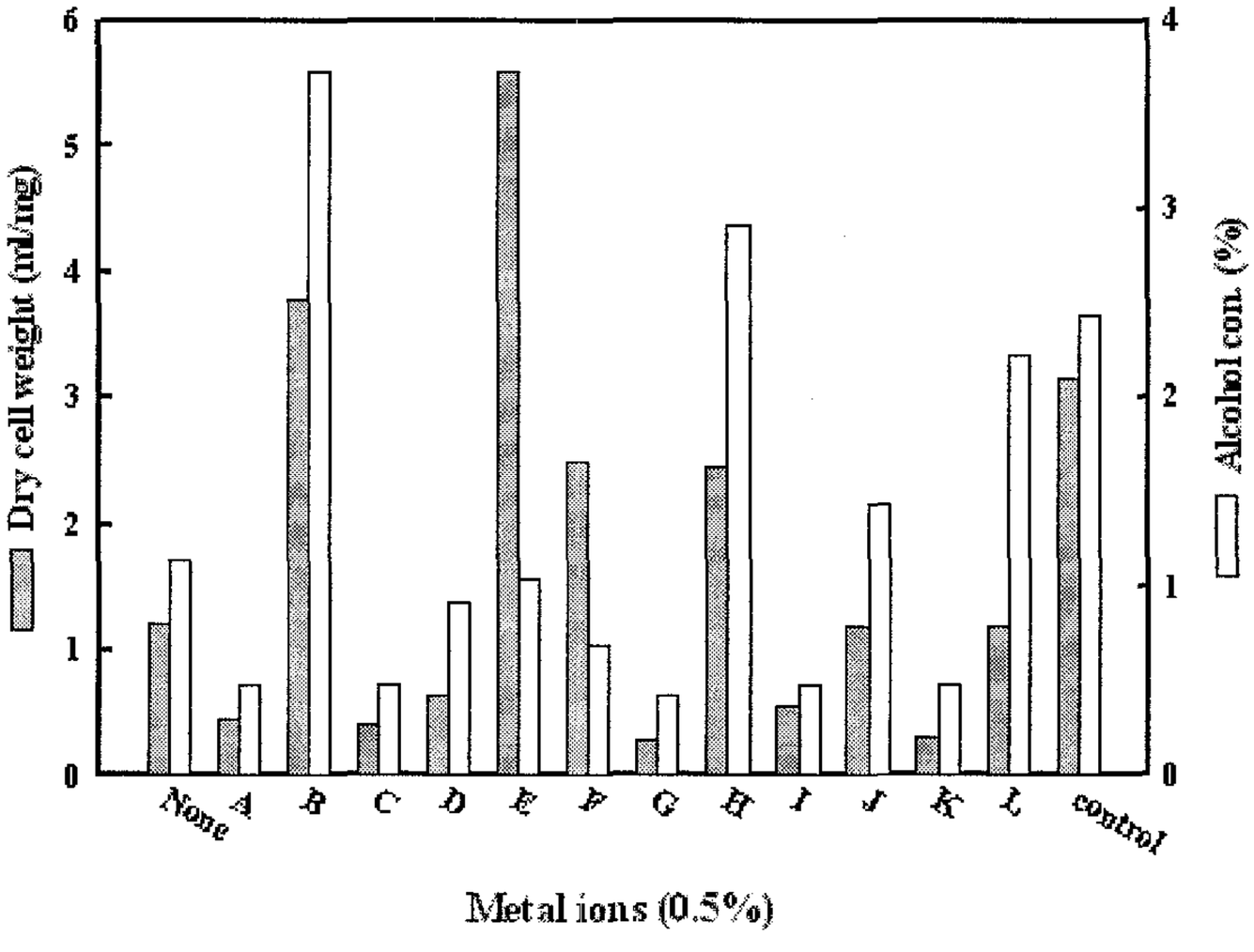


Fig. 7. 각종 metal 이온이 *Phellinus* sp. mycelium의 알코올 생산에 미치는 효과

⑤ 버섯 균사체 알코올 최적 생산조건에서 효모와 알코올 생산의 비교

앞서 알코올 생산을 위한 여러 가지 최적 조건을 확정하였다 (최적 pH, 최적 배양 온도, 산소 요구도 등 몇몇 data는 보고서의 volume관계상 생략하였음). 이렇게 확정된 최적 조건과 알코올 생산으로 잘 알려진 효모의 알코올 생산을 비교하여 보았다. 그 결과 상황버섯 균사체는 약 8%까지 alcohol을 생산하는데 비하여 효모는 약 4% 전후 이거나 이보다 저조한 생산량을 보였다. 물론 이 결과는 효모가 버섯 균사체보다 알코올 생산능력이 떨어진다는 것이라고 말할 수 없으며, 단지 배양조건이 버섯균사체의 최적 알코올 생산 조건에 맞춰져 있기 때문이라고 말 할 수 있다.

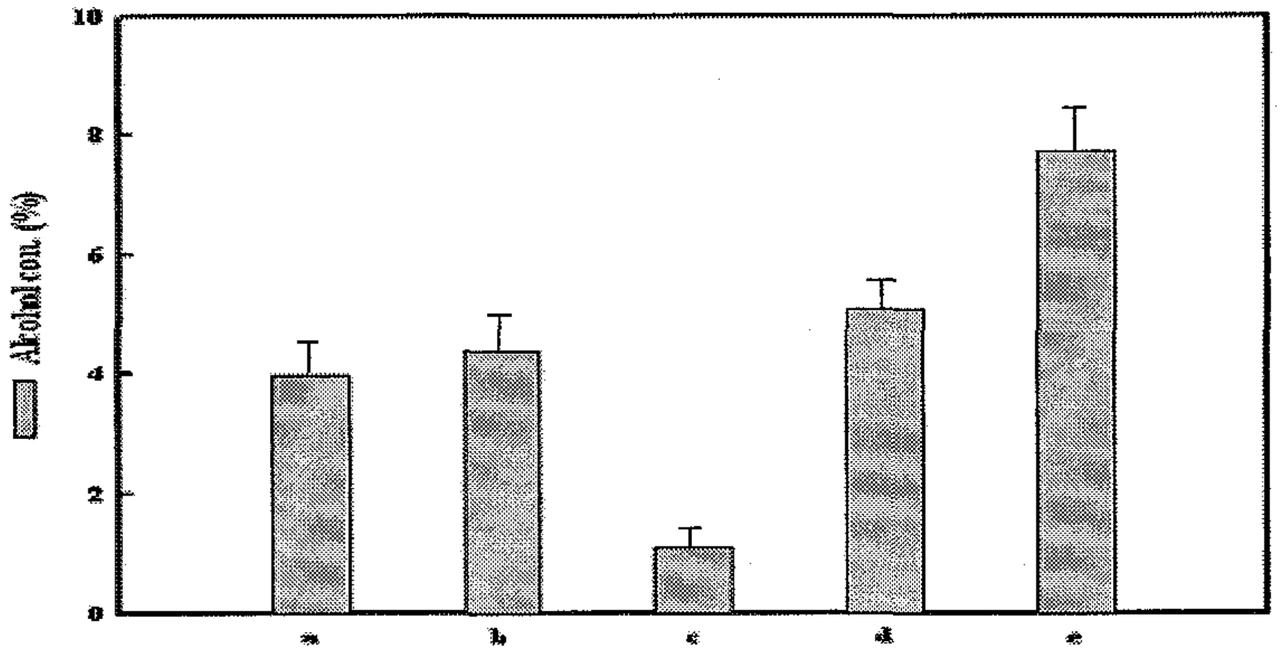


Fig. 8. 여러 종균의 알코올 생산비교
(a) *Saccharomyces ellipsoideus KCTC-7243*
(b) *Saccharomyces cerevicsiae IFO-2114*
(c) *Saccharomyces cerevicsiae IFO-2363*
(d) *Saccharomyces uvarum ATCC-26603*
(e) *Phellinus sp.* mycelium

4. 종균 유래의 alcohol dehydrogenase 의 확인과 특성

① alcohol dehydrogenase의 정제 결과

알코올 생산 버섯 균사체는 당으로부터 알코올을 전환하는 대사과정에서 alcohol dehydrogenase의 존재가 필수적이다. 그러므로 종균 균사체 유래 alcohol dehydrogenase의 존재를 확인하고 이를 정제하였다. 그 결과 Fig. 9에서 보는 바와 같이 46,000 daton의 분자량을 가진 alcohol dehydrogenase를 확인할 수 있었다.

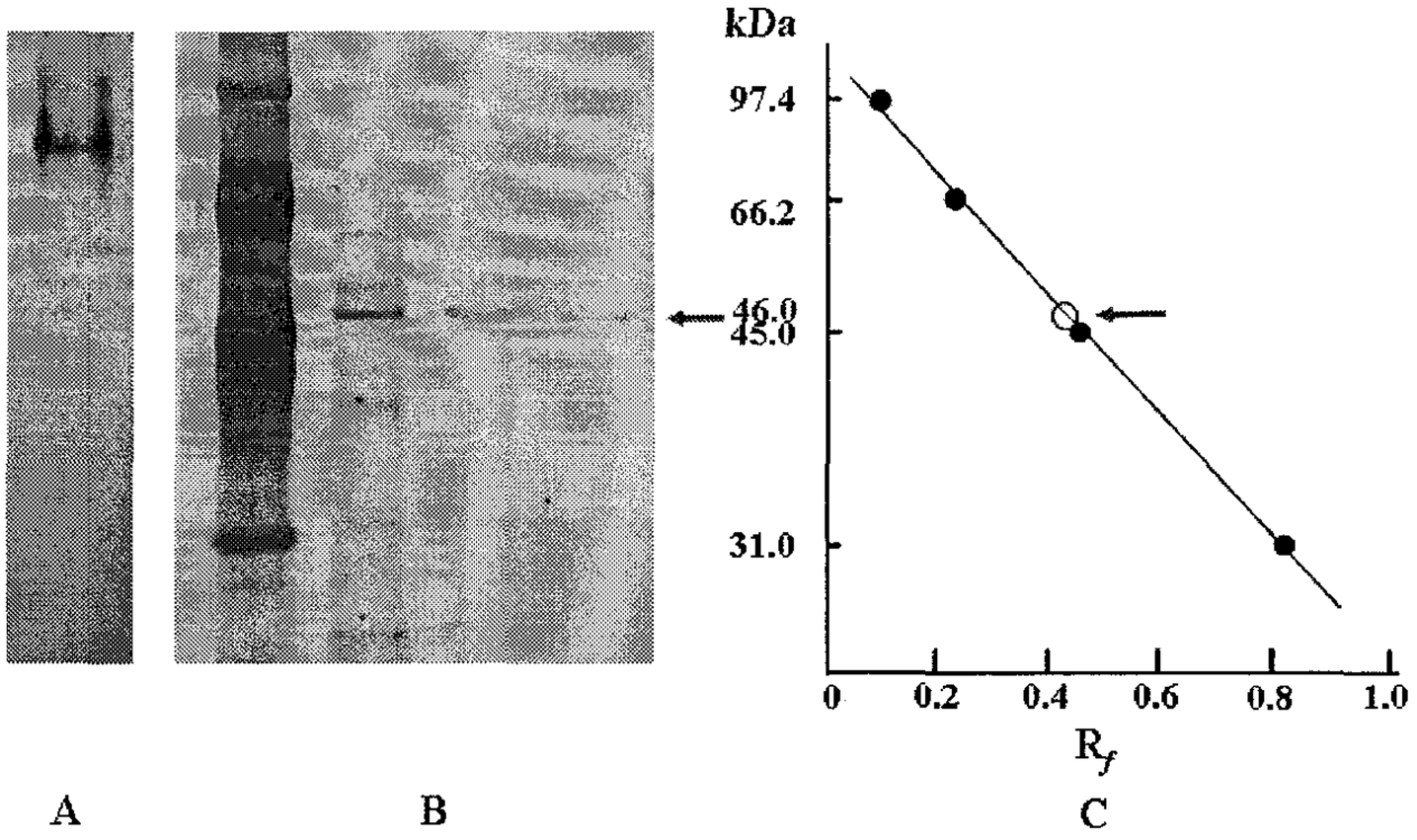


Fig.9. SDS-PAGE 및 native PAGE상에서의 ADH 분자량
A: The molecular weight of ADH on SDS-PAGE and native PAGE.
B: Silver stainig of SDS-PAGE, M : low molecular weight marker.
C: Estimation of the molecular weight on logarithmic graph.

② 정제 alcohol dehydrogenase의 특성

정제 alcohol dehydrogenase의 기질 특이성은 산화 반응에서는 ethanol이, 환원반응에서는 acetaldehyde에 대하여 가장 친화성이 뛰어남을 알 수 있었다. (Table 1 참조)

Table 1. *Phellinus* sp. mycellium에서 추출한 alcohol dehydrogenase의 기질 특이성

Substrate (200mM)	Relativeactivity (%)
Ethanol	**100.0**
1,3-butandiol	**4.4**
Ethyleneglycol	**4.8**
Isopropanol	**4.6**
Methanol	**4.5**
Acetaldehyde	**68.0**
Glutaraldehyde	**16.6**
Isobutylaldehyde	**18.3**
1-butanol	**ND***
Diethylene glycol	**ND***
Hexanol	**ND***
Propionaldehyde	**ND***
Glyceraldehyde	**ND***

ND, <1.0% of the activity ditected

나아가 정제 효소의 최적 반응 pH는 pH8이며 pH 안정성 역시 pH8에서 가장 안정하였으나, 그 외 범위에서는 급격한 불안정성을 보였다 (data 생략). 또한 온도에 대한 영향에서 최적 반응 온도는 25℃~ 35℃에서는 대체로 좋은 반응 결과를 보였다. 그러나 40℃이상에서는 반응이나 안정성에서 급격히 불안정한 결과를 보였다 (data 생략).

5. 종균으로부터 amylase의 분비 확인

종균으로부터 amylase가 분비된다는 사실은 Koji제조시 국균인 *Aspergillus oryzae* 대신 상황균사체를 바로 쓸 수 있다는 것을 시사함으로 매우 중요한 사안이다. 본 균사체를 기본 배지에서 액체 배양하면서 배양액으로부터 amylase활성을 측정하였다. 그 결과 Fig. 10에서 보는 바와 같이 배양 7일부터 최고의 분비를 보였다. 이로서 본 균사체는 액체배양에서 amylase분비 능이 있음이 확인되었다. 앞으로 Koji 제작용 균사로서 개발하기 위하여 더 많은 연구가 개발되어야 한다고 사료된다.

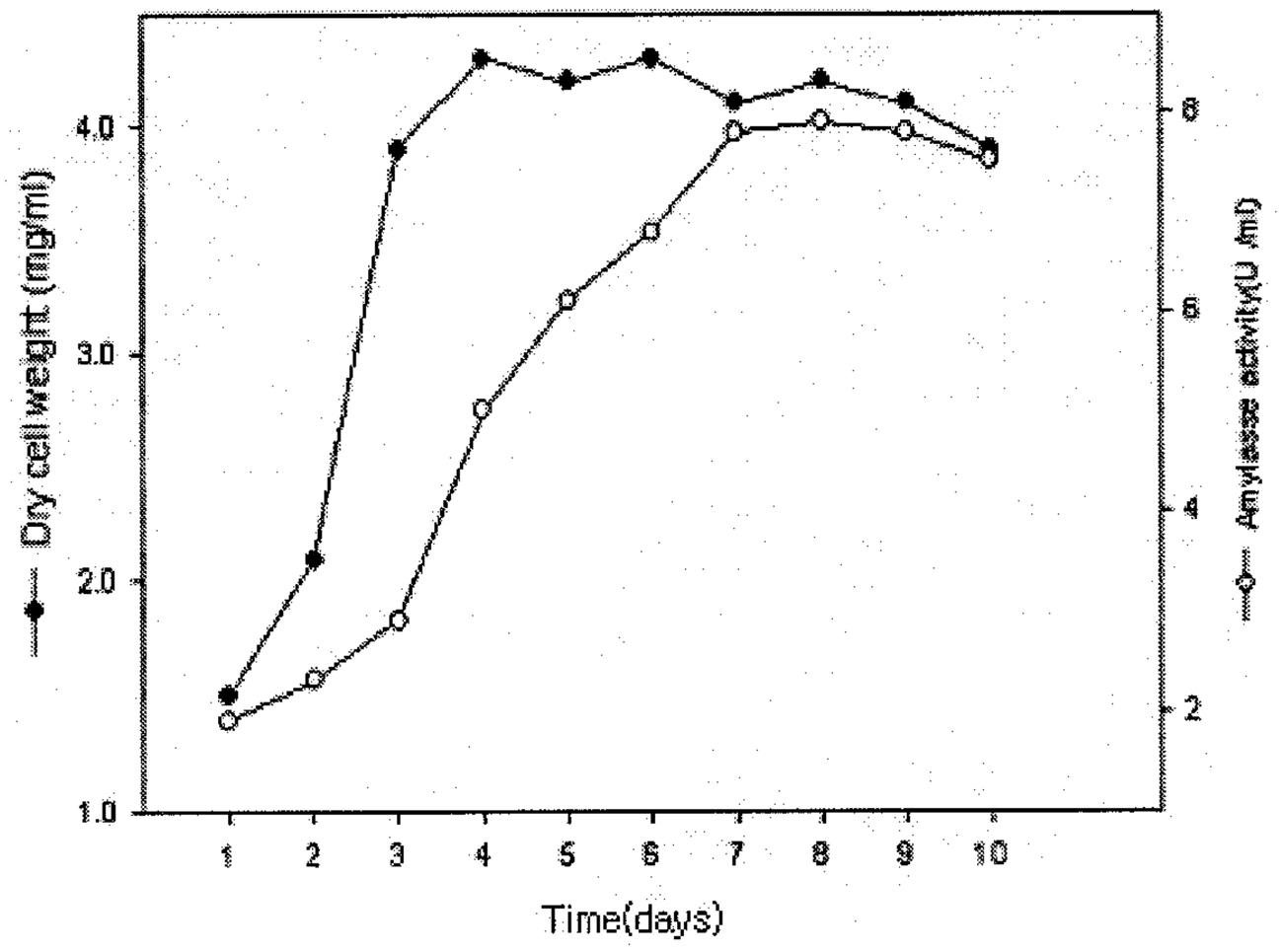


Fig. 11. *Phellinus sp.* mycelium의 성장과 amylase 활성도

6. 주류 생산을 위한 기초적 실험의 확립

상기의 실험 결과를 바탕으로 하여 당원으로 쌀 Koji와 쌀을 사용하여 청주, 약주의 제조 방법에 따라 알코올 발효원으로 기존의 효모 대신에 상기의 상황버섯 균사를 이식하여 발효를 시도하였다. 그 결과 발효 11일째에 약 12.3%의 alcohol이 생산되는 것을 확인 하였다 (Fig. 11). 이 결과는 본 상황버섯 균사체는 기존의 약주와 같은 수준으로 기능성 신 주류를 생산할 수 있는 기능성을 충분히 시사하였다.

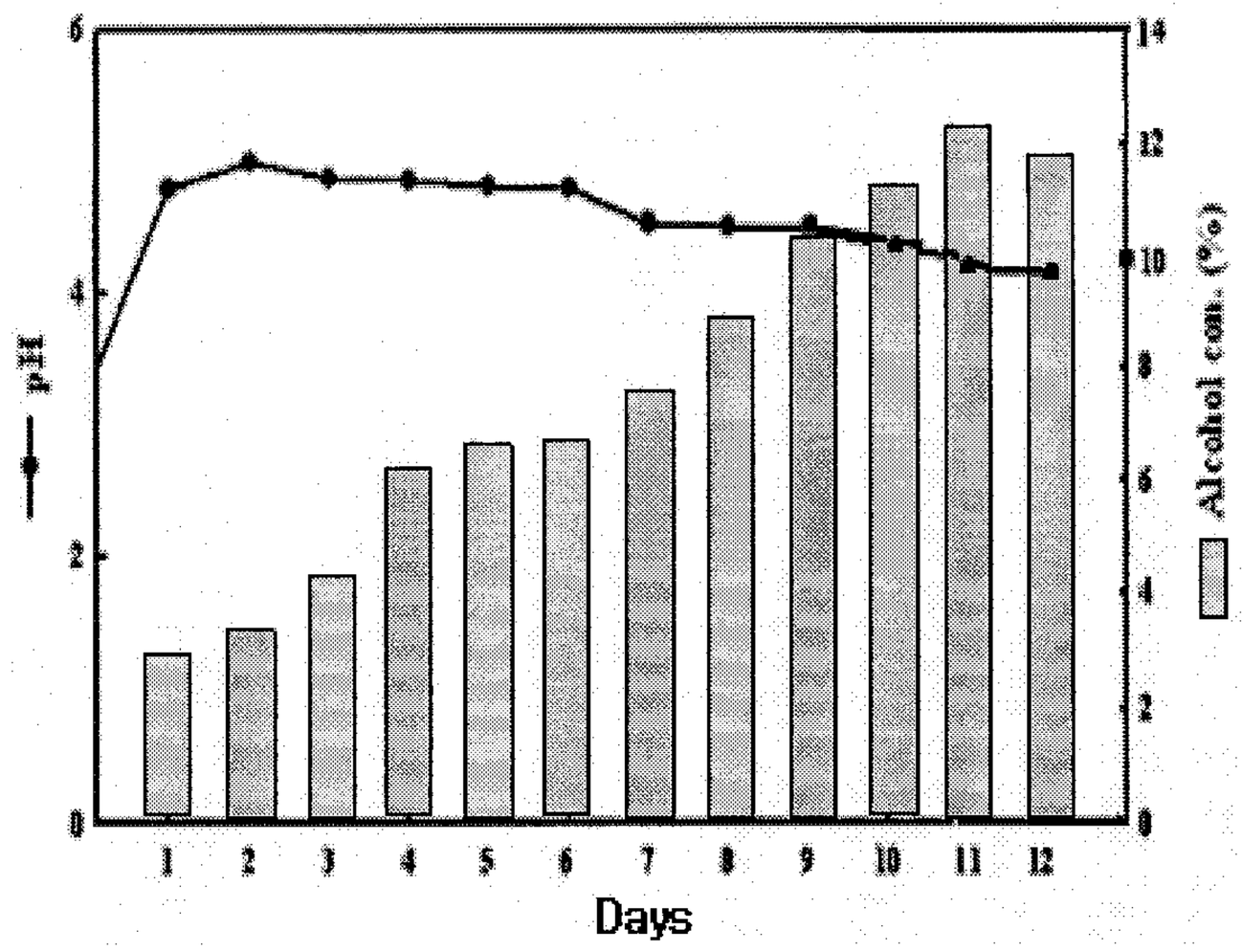


Fig. 11. *Phellinus sp.* mycelium으로 제조한 청주의 시간에 따른 pH와 알코올 농도의 변화

Ⅱ. 약리성분함유 신 기능성 주류개발

1. 종균의 대량생산 배지의 개발과 대량 배양 체제의 구축

1-1. 배양에 따른 균사체 생산량 비교

종균대량생산을 위하여 2가지의 용기를 사용하였다. 하나는 20ℓ의 물통을 개조하여 Fig. 12과 같이 배양기를 만들었다. 다른 하나는 Fig. 13와 같이 배양기를 맞춤 제조하여 Pump로 공기를 주입하면서 균사체를 배양하였다. 배지는 XY-21(기업기밀 유지상 상세한 배지조성을 공개하지 못함)을 사용하여 3일간 배양하였다. 그 결과 물통개조배양기의 4%의 균사체를 얻었으며 맞춤 배양기는 5.5%의 균사체를 얻을 수 있었다.

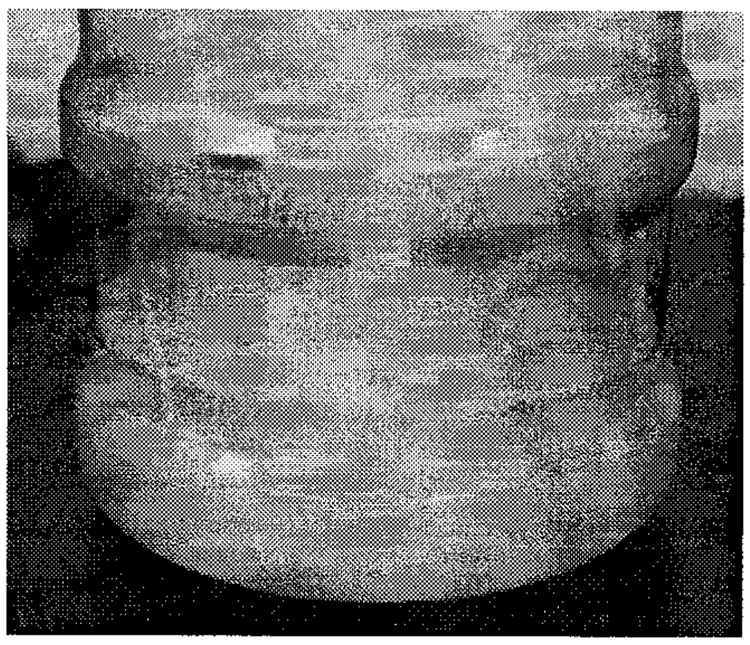


Fig. 12. 물통개조 배양기

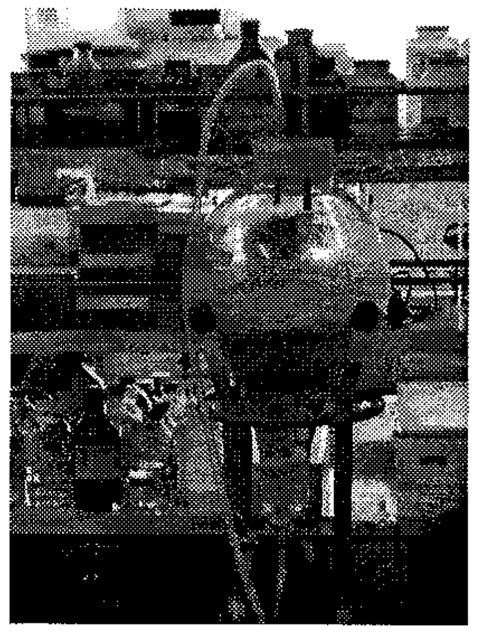


Fig. 13. 맞춤배양기

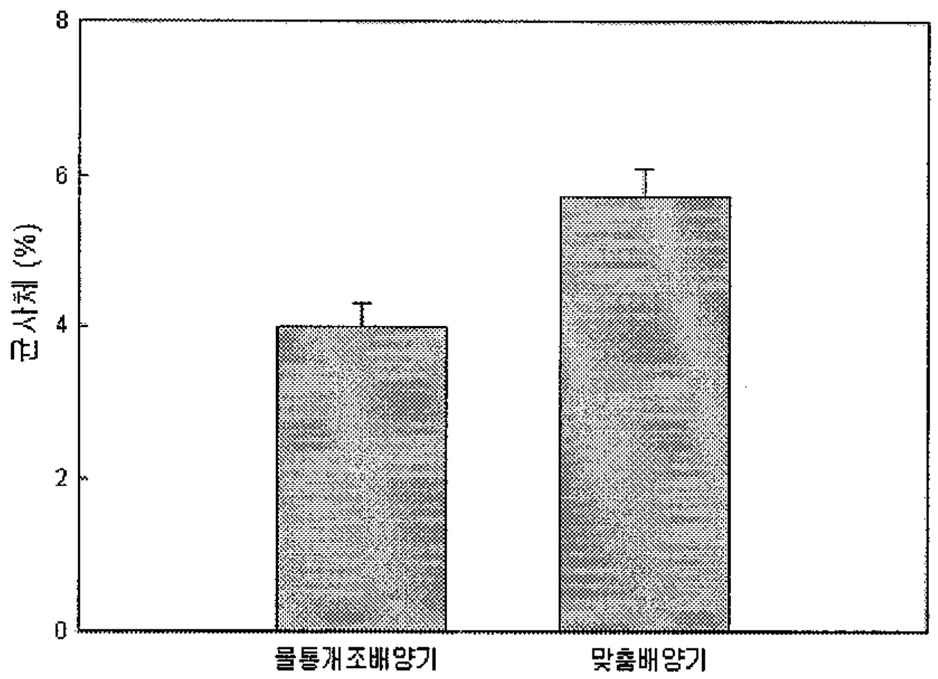


Fig. 14. 배양기에 따른 균사체 생산량 비교

1-2. 종균배양을 위한 배지조성

종균대량생산을 위하여 XY-21배지, XMY배지, XM배지, YM배지, XY-O배지를 사용하였다. 결과는 XY-21배지가 약 6.2%의 균사체를 생산하였으며 XM배지가 2%에 거쳐 제일 낮은 수율을 보였다. 결과 Fig. 15에서 보이는 바와 같다.

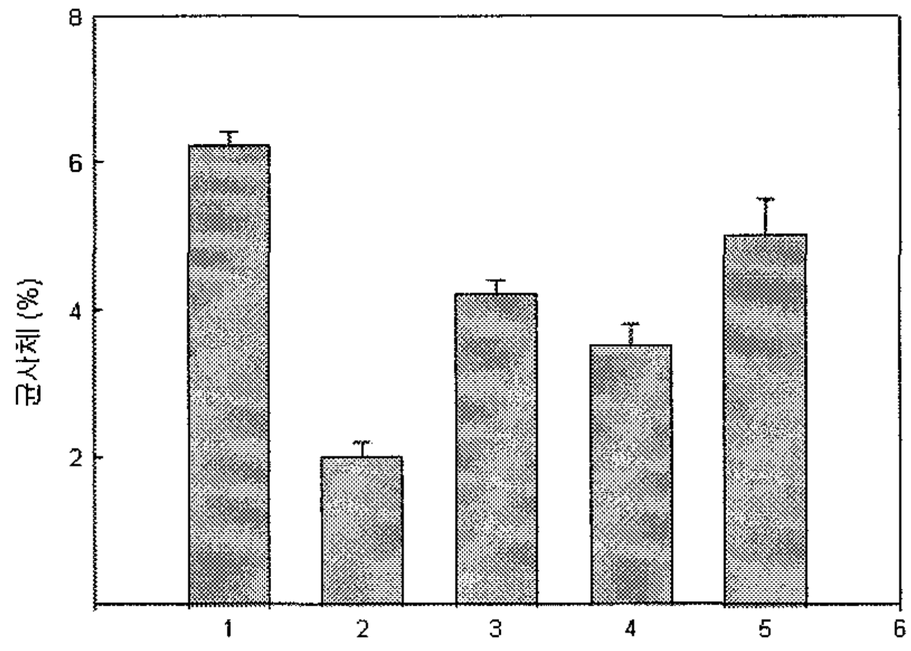


Fig. 15. 각 배지조성에 따른 균사체 생산량
1. XY-21배지, 2. XMY배지,3. XM 배지,
4. YM 배지, 5. XY-O배지

1-3. 배지조성별 배양전 균사체의 알코올 생산능력비교

각 배지에서 배양된 균사체는 에틸알코올 대량배양을 위하여 전배양조건이 중요한 영향을 미치는 것을 알았다. 그러므로 ①XY배지,②XYY배지,③XS+ MgCl2배양후 PY배지에서 정치배양과 ④진탕배양한 균사체 그리고 ⑤XS+ $MgCl_2$배양후 PYS배지에서 배양한 균사체를 알코올 발효에 이용하여 에틸알코올 생산량을 비교하였다.

결과는 Fig.16에서 보이는 바와같이 ⑤의 조건에서 배양한 균사체가 8일간 배양이후 5.5%에 가까운 알코올 생산능력을 보여 가장 높은 성적을 나타내었다.

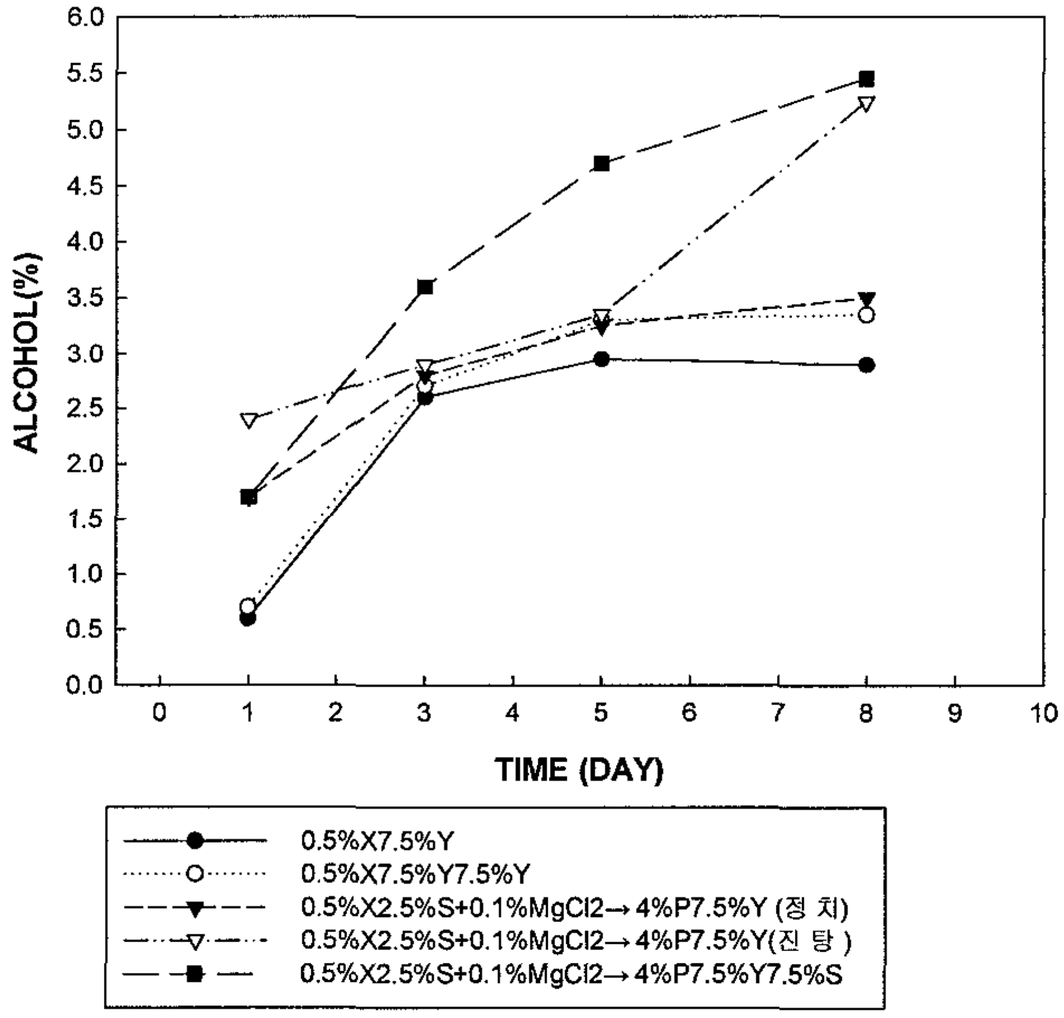


Fig. 16. 배지조성별 배양된 균사체의 알코올 생산능력비교

2. Koji제조시 종균 선택을 위한 검정

2-1. Koji제조 종균 *Asp. Kawachii*와 *Asp.oryzae*사용시 술덧의 pH변화와 제조 종균 *Asp.Kawachii*와 *Asp.oryzae*사용시 술덧 발효과정중 품온의 변화

Koji제조 종균 *Asp. Kawachii*와 *Asp.oryzae*사용시 술덧의 pH변화술덧의 pH변화가 높으면 잡균 오염의 가능성이 크기 때문에 종균선택은 매우중요하다. 그러므로 Koji종균으로 사용되는 *Asp.Kawachii*와 *Asp.oryzae*를 사용하여 술 발효중 술덧의 pH를 측정하였다.

결과는 Fig.17에서 보이는 바와같이 *Asp. Kawachii*와 *Asp.oryzae* 보다 pH가 낮게 유지되면서 발효가 진행되므로 발효초기에 유산생성이 왕성하여 잡균오염 방지에 유리한 것으로 판단되었다.

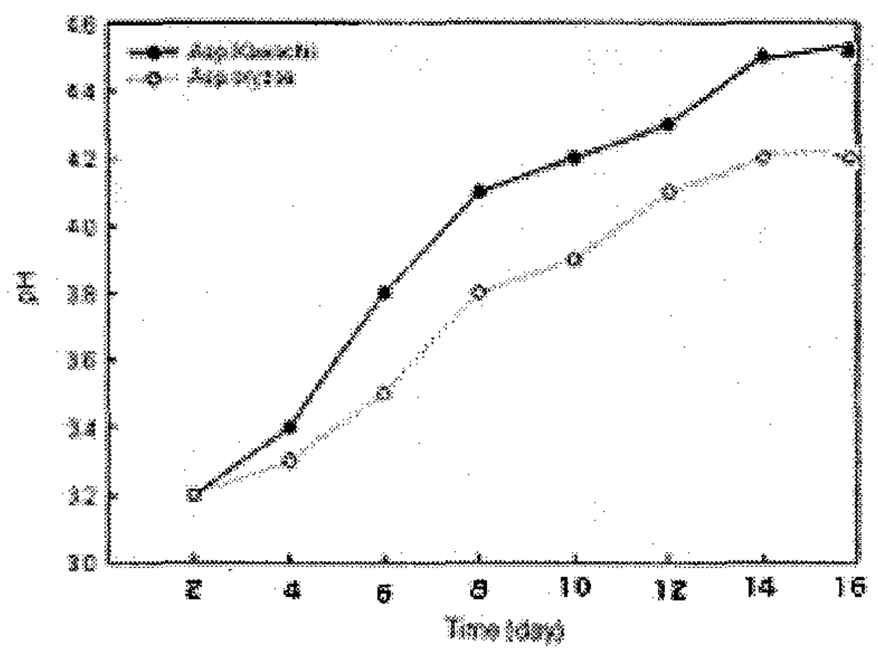


Fig. 17. Koji종균 *Asp.Kawachii*와 *Asp.oryzae*에 의한 술덧 pH의 변화

두 Koji종균에 의해 제조된 Koji를 사용했을때 만약 높은 열을 발생한는 요인이 있다면 알코올 발효원인 상황버섯 균사체의 생육에 큰 영향을 미치게 되어 알코올발효에 차질이 생기게 된다.

결과는 Fig.18에서 보이는 바와 같이 두 균주 모두 품온 변화에 큰 차이를 보이지 않았으며 품온은 최고 27℃를 넘지 않으므로 어느 균주를 사용하더라도 상황버섯 균사체생육에는 영향을 미치지 않을 것으로 판단된다.

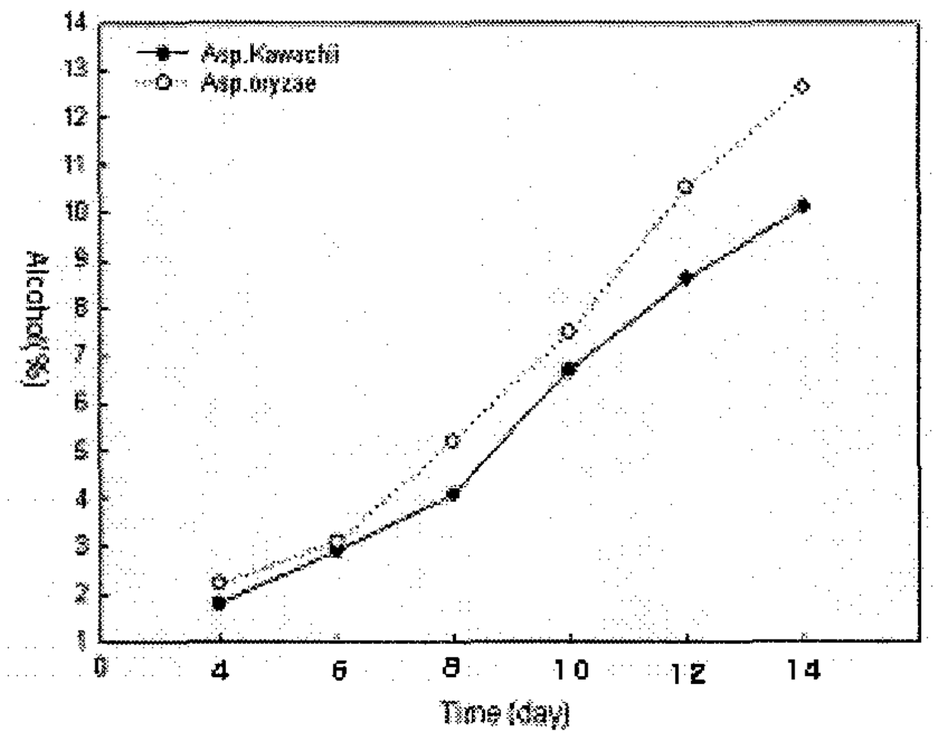


Fig. 18. Koji종균*Asp.Kawachii*와 *Asp.oryzae*에 의한 술 발효 과정 중 품온의 비교

2-2. Koji종균 *Asp.Kawachii*와 *Asp.oryzae*를 썼을 경우 알코올생산의 비교

*Asp.Kawachii*와 *Asp.oryzae*로 제조된 Koji를 사용하여 같은 조건에서 상황버섯 균사체로 알코올 발효를 하여 알코올의 농도를 비교하였다. 그 결과 *Asp.Kawachii*가 최종 알코올 생산량이 많은 것으로 나타났다.

결론적으로 Koji종균으로는 초기 pH를 낮추어 잡균오염을 방지 할 수 있고, 품온 27℃이상으로 오르지 않으며, 알코올 생산량을 높이는 균주 *Asp.Kawachii*를 선택하기로 하였다. (Fig.19참조)

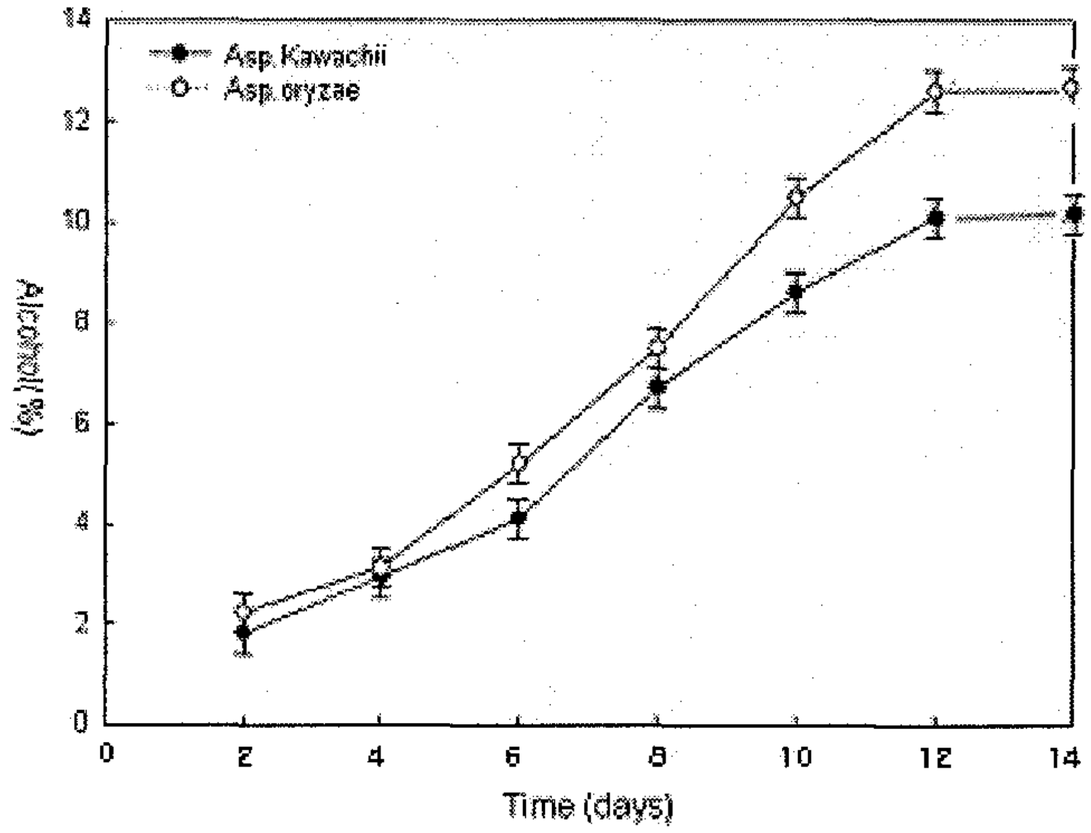


Fig. 19. Koji종균 *Asp.Kawachii*와 *Asp.oryzae* Koji사용에 의한 알코올 생산의 비교

3 약리물질 함량을 증가하기 위한 대책확립

3-1. 버섯균사체 혼합배양에 의한 혈액순환개선효과의 비교

상황버섯균사체(PI-21)배양에 의해 생산된 약주는 혈액순환개선제 역활을 하는 혈전용해활성(Fibrinolytic activity)과 항혈전활성(Anti-thrombin activity)이 있는것으로 밝혀졌다. 그러므로 이의 약리작용을 증가시키기 위하여, 본 연구팀에서 혈전용해활성과 항혈전활성이 높은 것으로 규명되어온 버섯균사 W8과 W130에 대하여 검토하기로 하였다.

즉, W8과 W130은 알코올 발효능력이 없으므로 PI-21에 이 두 균주를 혼합배양함으로서 약리효과를 높이는 것에 착안하였다.

그 결과 Fig.20에서 보이는 바와 같이 혈전 용해 활성은 혼합 배양한 것이 높은 것을 알수 있었다. 그리고 항혈전효과는 W8의 혼합배양은 뛰어나게 좋았으나 W130혼합배양은 증가하지 않았다. 그러나 이런 혼합배양이 알코올 생산에 미치는 영향이나 술의 맛과 향에 미치는 영향을 고려해야 되기 때문에 다음 실험을 준비한다.

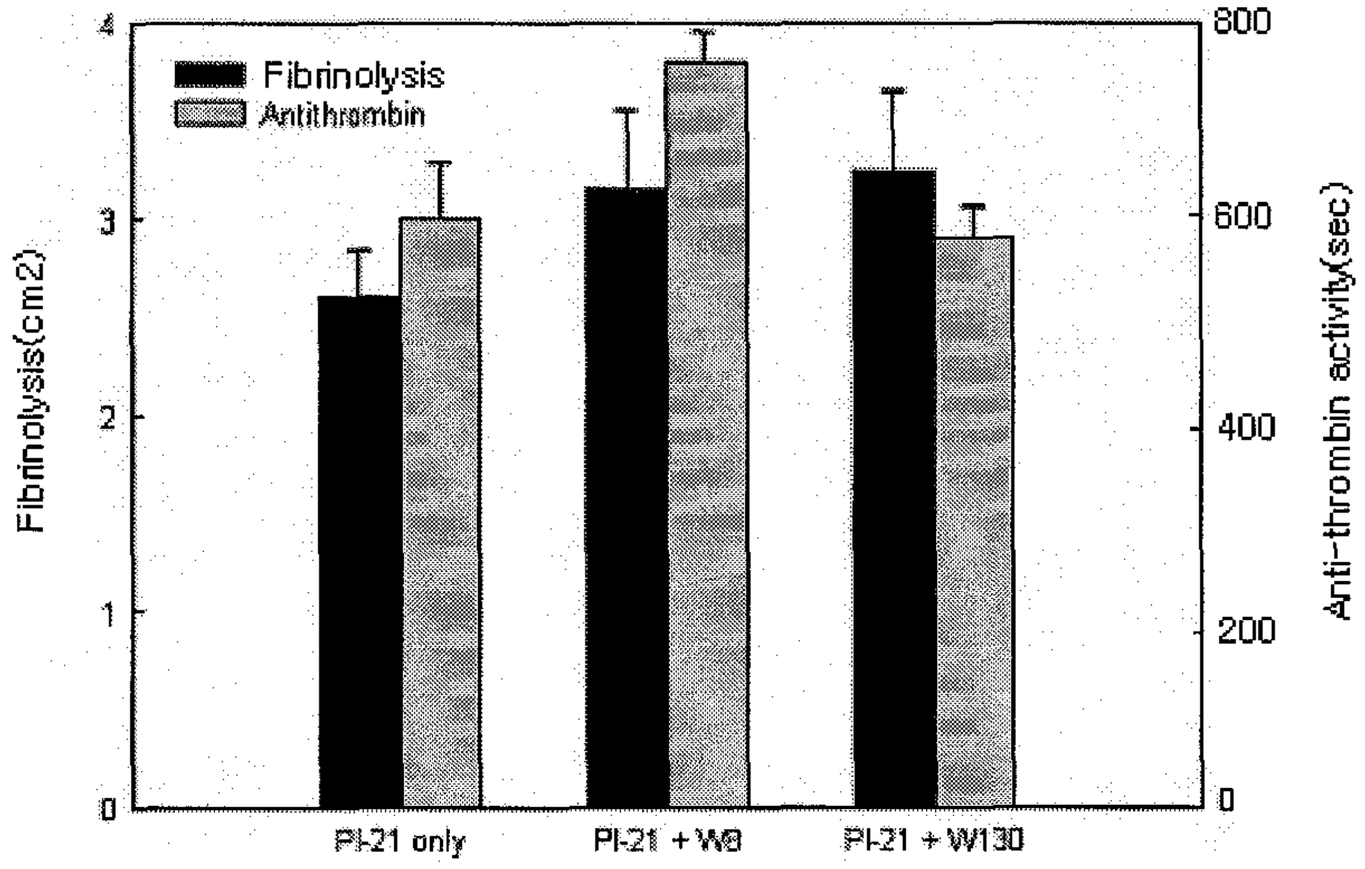


Fig.20 버섯균사체 혼합배양에 의한 혈행개선 기능성 비교

3-2. 버섯균사체 혼합배양에 의한 알코올 생산력 비교

3-1의 결과를 바탕으로 PI-21과 W8, W130을 혼합배양 할때 혈행개선 기능성은 증가하는 것을 알았으나 이들을 발효할때 알코올 생산에 미치는 영향을 파악하였다. 그 결과 Fig. 21에서 보이는 바와 같이 혼합배양보다는 PI-21균사체 단독으로 배양하는 것이 알코올 생산성이 가장 높은 것을 알 수 있었다.

또한 PI-21단독발효가 혼합발효보다 향과 맛이 훨씬 뛰어난 것을 확인하였다. (data미제출)

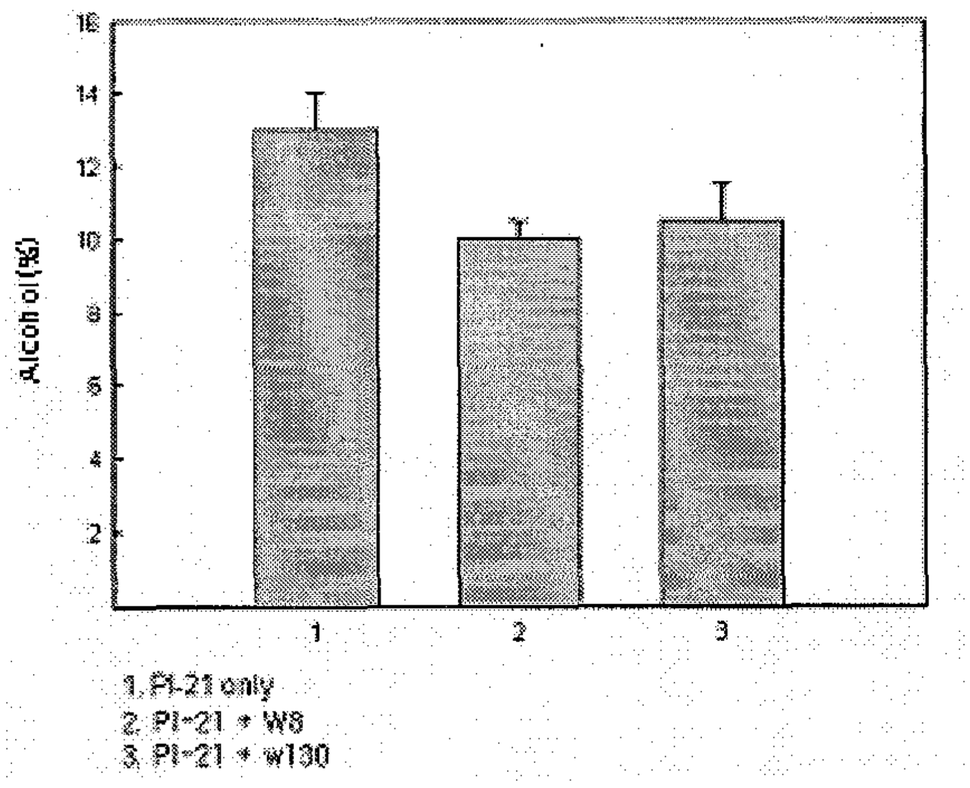


Fig.21 버섯균사체 혼합발효에 의한 알코올 생산의 비교

4. 증자·무증자 쌀의 발효에 의한 주류생산 효율성 비교

4-1. 2단, 3단 사입을 무증자 쌀로 발효할 경우 알코올의 생산

초기사입은 종균 *Asp.Kawachii*와 *Asp.oryzae*로 제조한 Koji와 증자쌀을 첨가하여 발효후 2단, 3단사입을 무증자 쌀로 발효하였다. 그 결과 3일째부터 알코올 약2%로 시작하여 12일째까지 약9%까지 생산하였다. (Fig.22)

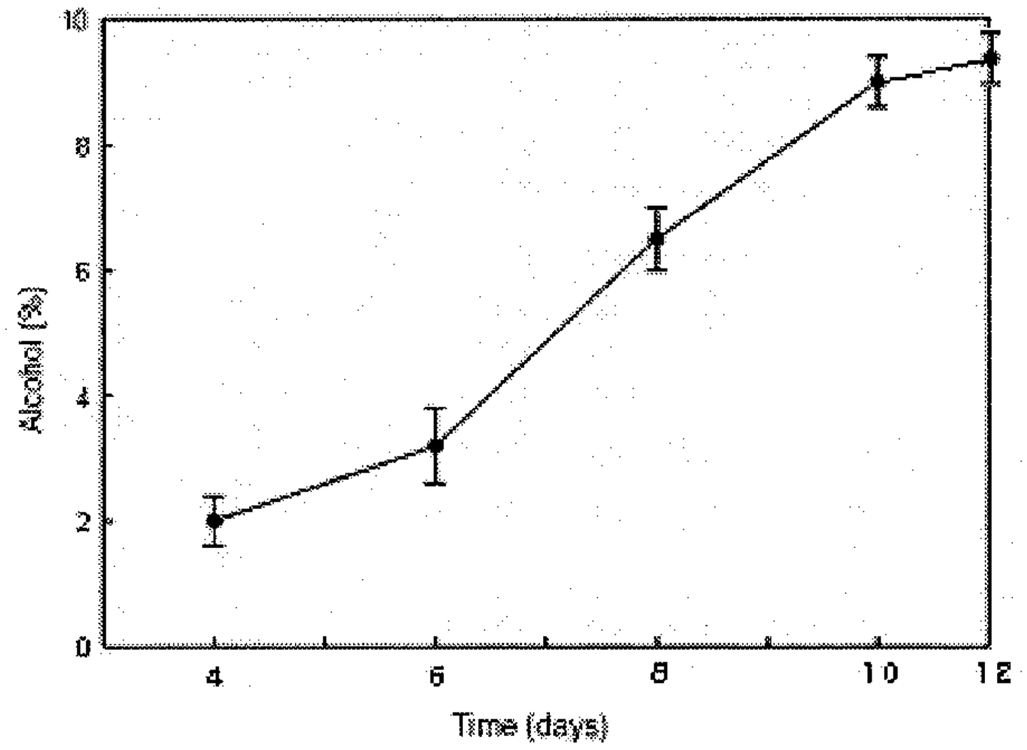


Fig. 22. 무증자 쌀 사입에 의한 Alcohol의 생산

4-2. 증자 쌀과 무증자 쌀 사입에 의한 알코올 생산

증자쌀과 무증자 쌀로서 사입했을때 알코올(Ethylalcohol)생산에 미치는 영향을 검토하였다. 즉, 초입 Koji로 하고 발효후 2단사입을 무증자 쌀과 증자쌀로 하고 3단사입은 3단사입을 하지 않은것, 무증자 쌀로 하는것, 증자쌀로 하는것등으로 시험하여 알코올 생산량을 비교하였다.

결과는 Fig.23에서 보이는 바와 같이 모두 증자 쌀로 발효하는 것이 알코올 생산이 있어 월등히 우수한 성적을 보였다.

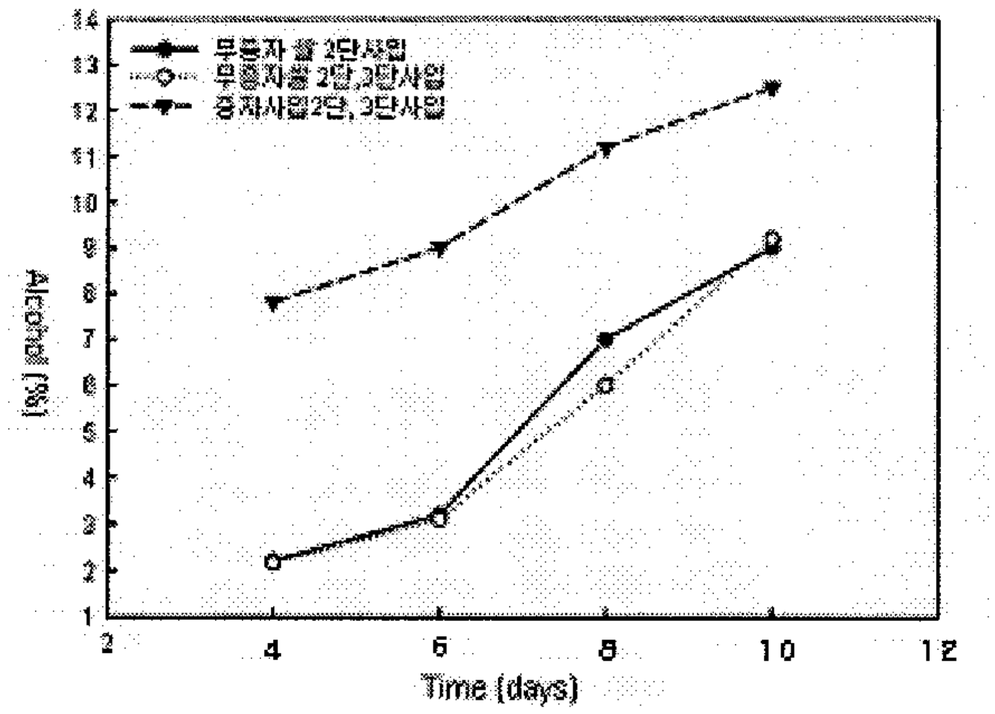


Fig. 23. 증자쌀과 무증자쌀 사입에 의한 알코올 생산의 비교

5. 주류발효를 위한 최적 환경의 구축

5-1. 균사체(PI-21)배양을 위하여 배지조성에 따른 알코올 생산과 품온의 변화

대량생산으로 이행하기 위하여 버섯균사체 배양의 비용을 줄여야 할 필요성이 있다. 균사체 배양에 사용되는 배지를 시약수준의 수준배지(Pu)를 쓸 것이나, Crud배지(iPu)를 쓸 것이냐에 따라 비용의 차이가 크다.

이를 검토하기 위하여 Puqowl와 iPu배지간의 alcohol생산과 발효과정중 품온의 변화를 정리해 보았다.

결과는 fig.24와 fig.25에서 보이는 바와 같이 품온의 변화는 4가지 조건 모두 특별한 변화가 없이 비슷하였다. 또한, 품온은 PI-21이 알코올 발효를 진행하는데 아무런 영향을 주지 않는 범위에서 변화하였다. 알코올 생산에 있어서는 Pu배지와 지하수에서 15%를 상회하는 알코올 생산능을 보였다.

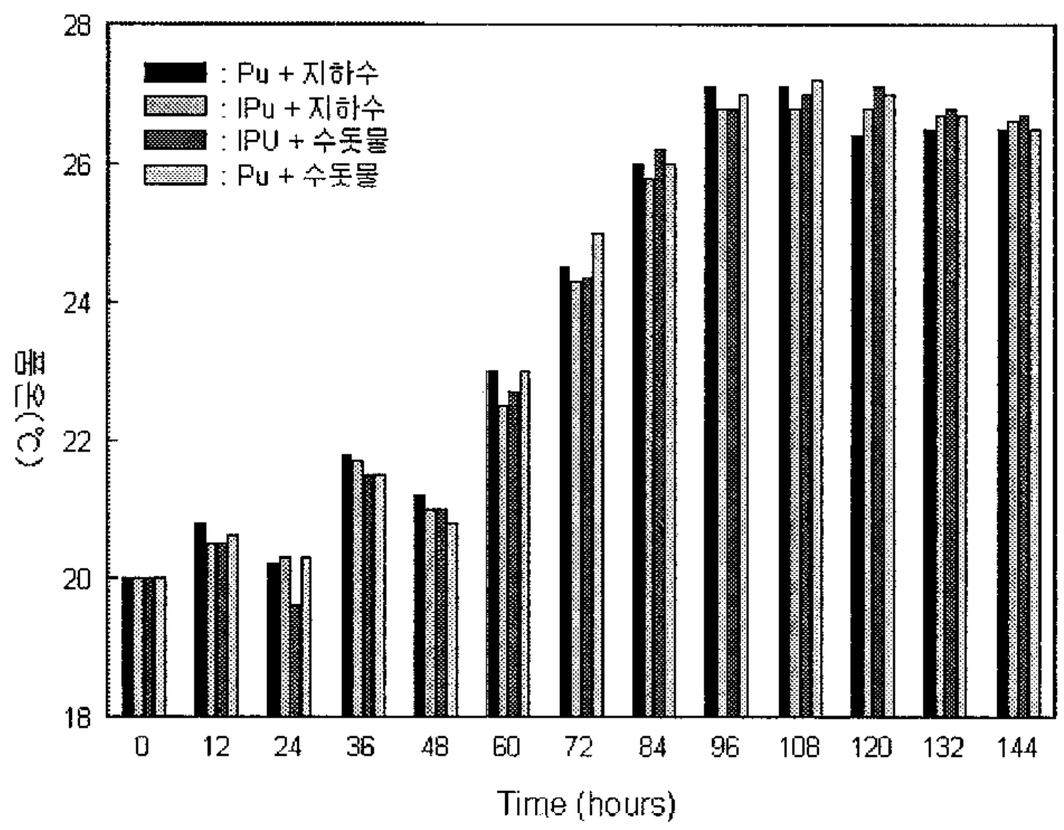


Fig. 24. 배지의 순도와 물의 종류에 따른 발효중 품온의 변화

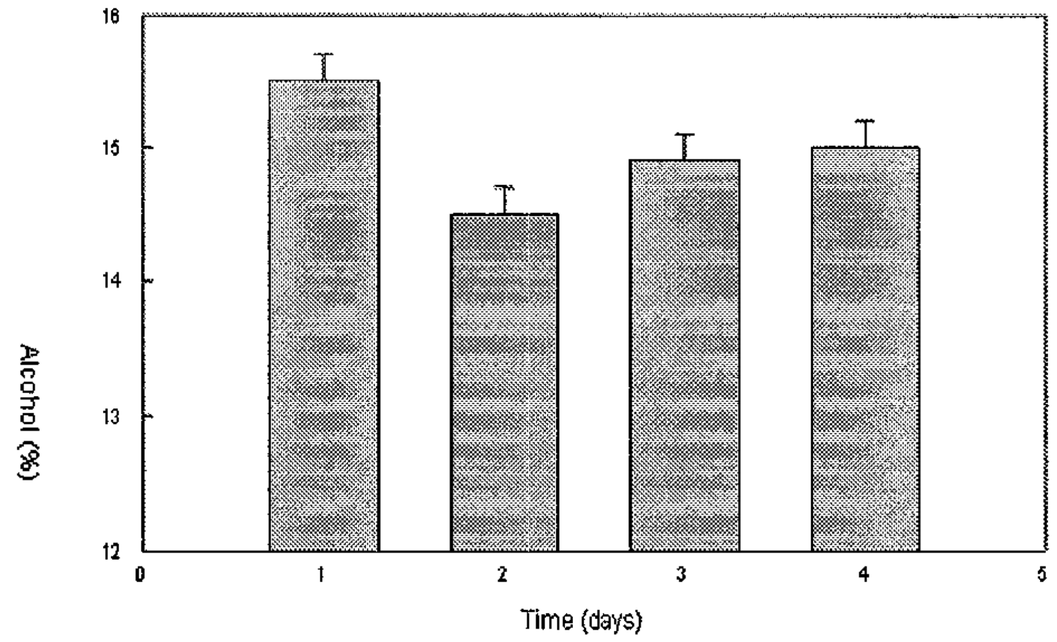


Fig. 25. 배지의 순도와 물의 종류에 따른 발효 중 알코올 생산

1. Pu+ 지하수　　2. iPu+ 지하수

3. iPu+ 수돗물　　4. Pu+ 수돗물

6. 소규모 발효를 통한 최적 주류 생산 환경의 구축

6-1. 물 10ℓ와 40ℓ배양 중 품온의 변화

대량배양을 위한 예비 실험의 일환으로 물 10ℓ와 40ℓ배양을 실시하여 발효중 품온의변화를 검토하였다. 물 10ℓ이면 Koji와 증미를 합하면 약16.7ℓ의 술덧이 되며, 40ℓ의 물이면 술덧은 약67ℓ가 되는 셈이다.

결과는 Fig.26에서 보이는 바와 같이 최고 28℃를 넘지 않으므로 알코올 생산에 나쁜영향을 주지 않는 것으로 확인되었다.

6-2. 물 10ℓ와 40ℓ배양에 의한 알코올(Ethylalcohol)의 생산

대량배양을 위한 예비실험의 일환으로 총Vol. 물10ℓ포함하여 16.7ℓ와 물 40ℓ포함한 총Vol. 67ℓ(물40ℓ)술덧 쪽의 알코올 생산이 우수한 것을 알 수 있었다.

이로서 공장규모의 대량생산체제로 이행 할 수 있는 가능성을 열어주는 중요한 정보를 얻었다고 할 수 있다.

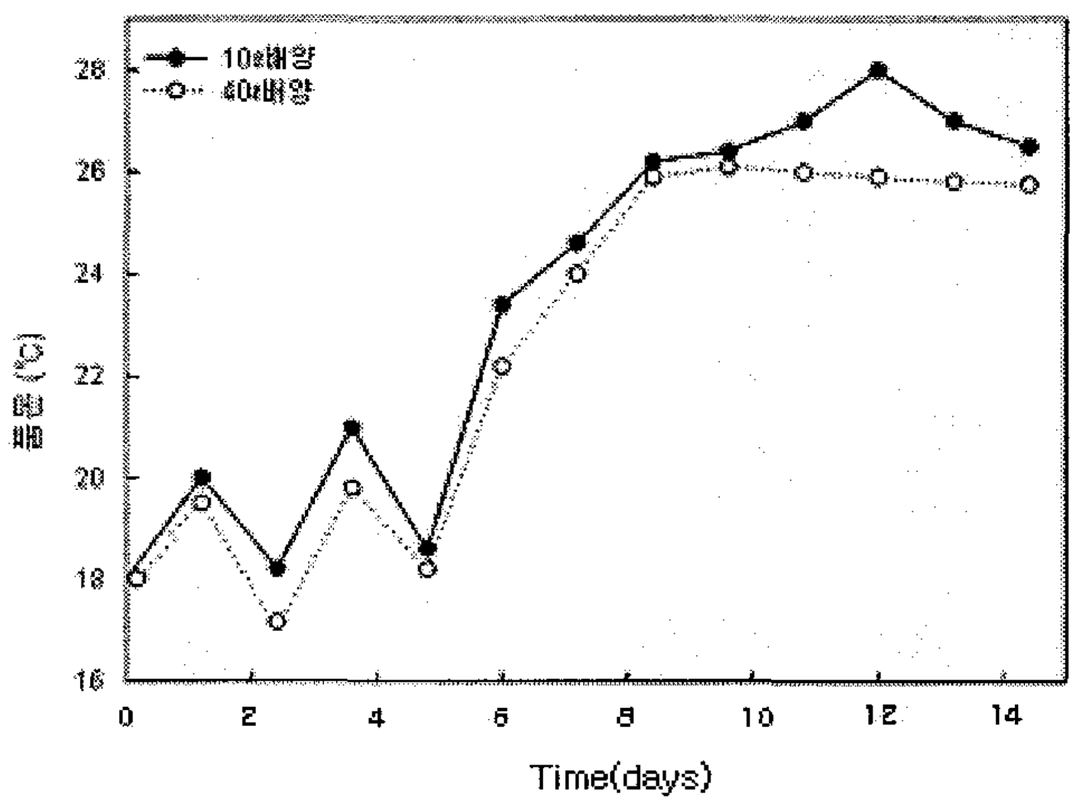


Fig. 26. 10ℓ와 40ℓ 배양중 품온의 변화

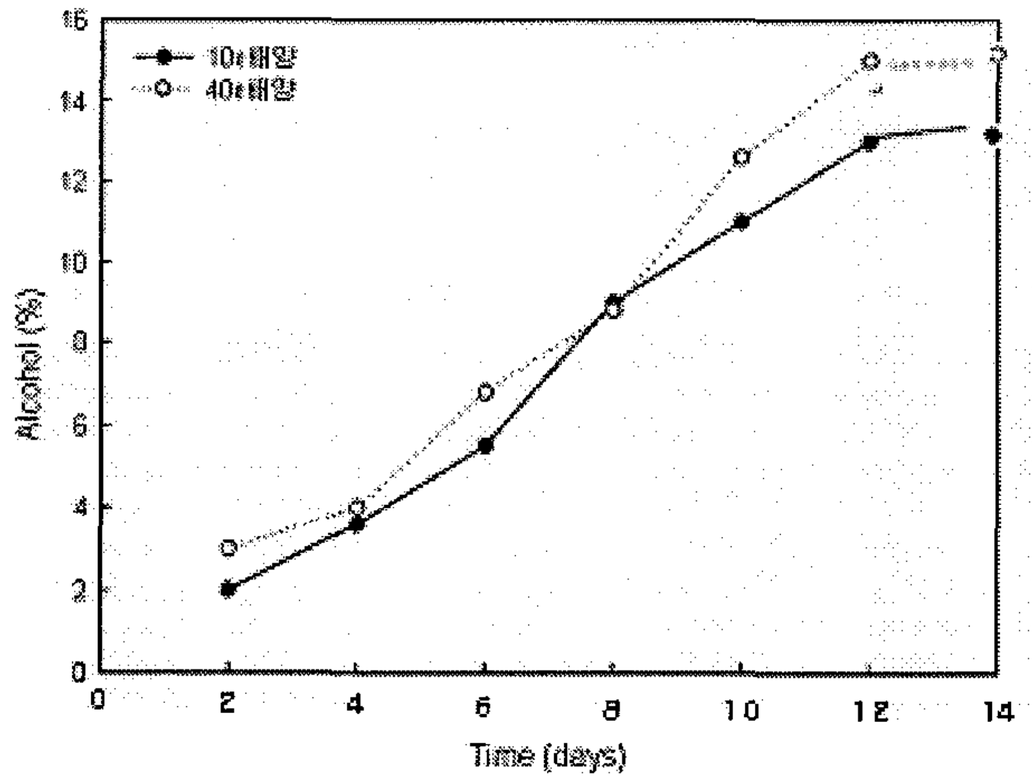


Fig. 27 10ℓ와 40ℓ 배양에 의한 알코올 생산의 비교

Ⅲ. 신기능성 주류의 대량생산과 제품화

1. 주류의 대량생산 체제에 대비한 발효환경조건의 설정확립

1-1 균사체의 대량생산

1) 배지량에 따른 균사체의 생산량

대량배양 발효탱크는 3,000ℓ(3ton)최대용량을 수용할 수 있으므로 이 발효탱크에 배지량을 어느정도 정하는 것이 균사체량의 효율적 생산이 될 수 있는지 실험하였다. Fig.28에서 보이는 바와 같이 균사체의 접종량 0.01%, 배양온도 25℃, Air공급량을 45ℓ/min하였을때 1,600ℓ배지량에서 균사체가 최대로 생산되었다. 그러나 배지량 2,000ℓ에서도 거의 같은 결과 였으므로 경제적 효율성을 따져 볼 때 1,600ℓ가 최적 배지량으로 결정되었다.

이때 배양일수는 24시간으로 하였다.

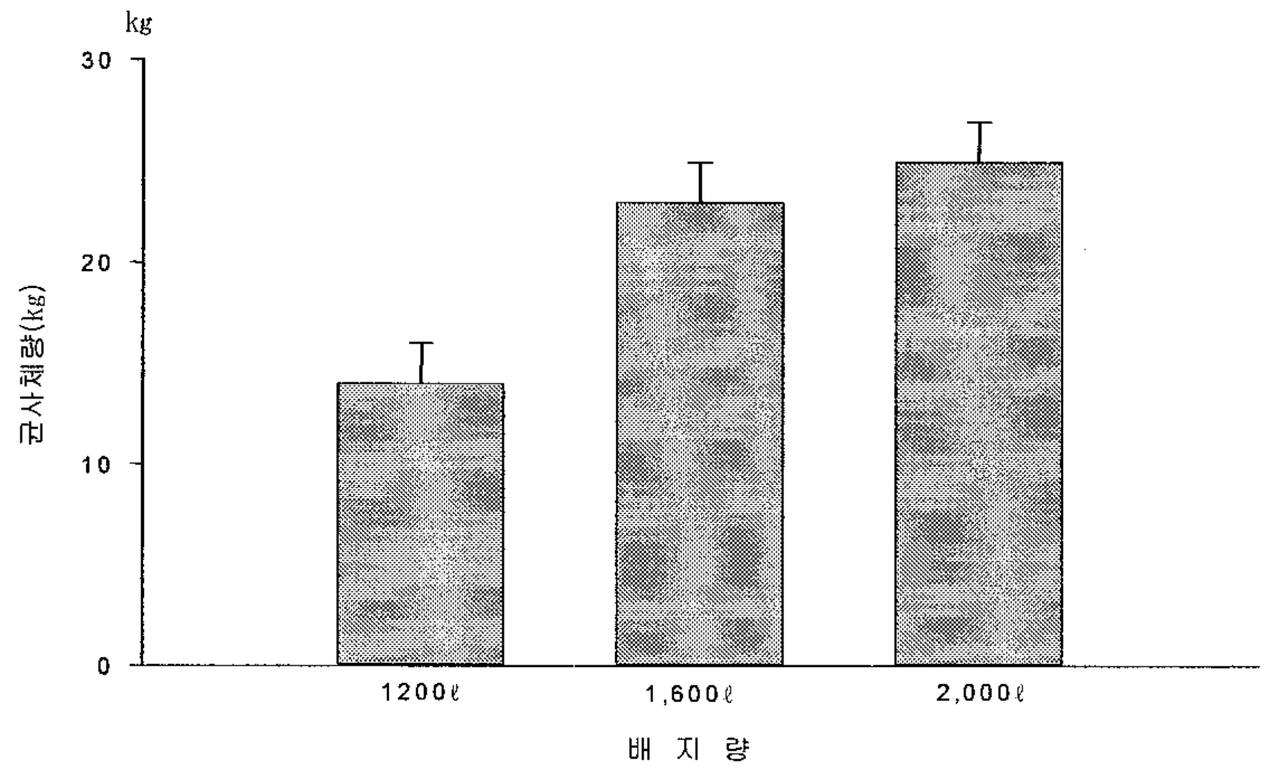


Fig. 28 3ton 발효탱크에서 배지량에 따른 균사체 생산량의 산출
균사체 0.01% 동일접종
배양온도 : 25℃
공기량 : 45ℓ/min

2) 전배양 균사체 접종량에 따른 효율적 균사체의 생산

전 배양한 균사체의 접종량에 따라 균사체의 회수율에 차이가 생길 수 있어 효율적인 접종량을 정하기 위하여 배지량을 앞의 결과에서 결정된 1,600ℓ로 하고 균사체의 접종량을 0.01%와 0.02%접종의 경우가 거의 비슷한 생산율을 보였으므로 대량생산을 위한 전배양의 접종율을 배지량의 0.01%접종하는 것으로 결론 내렸다.

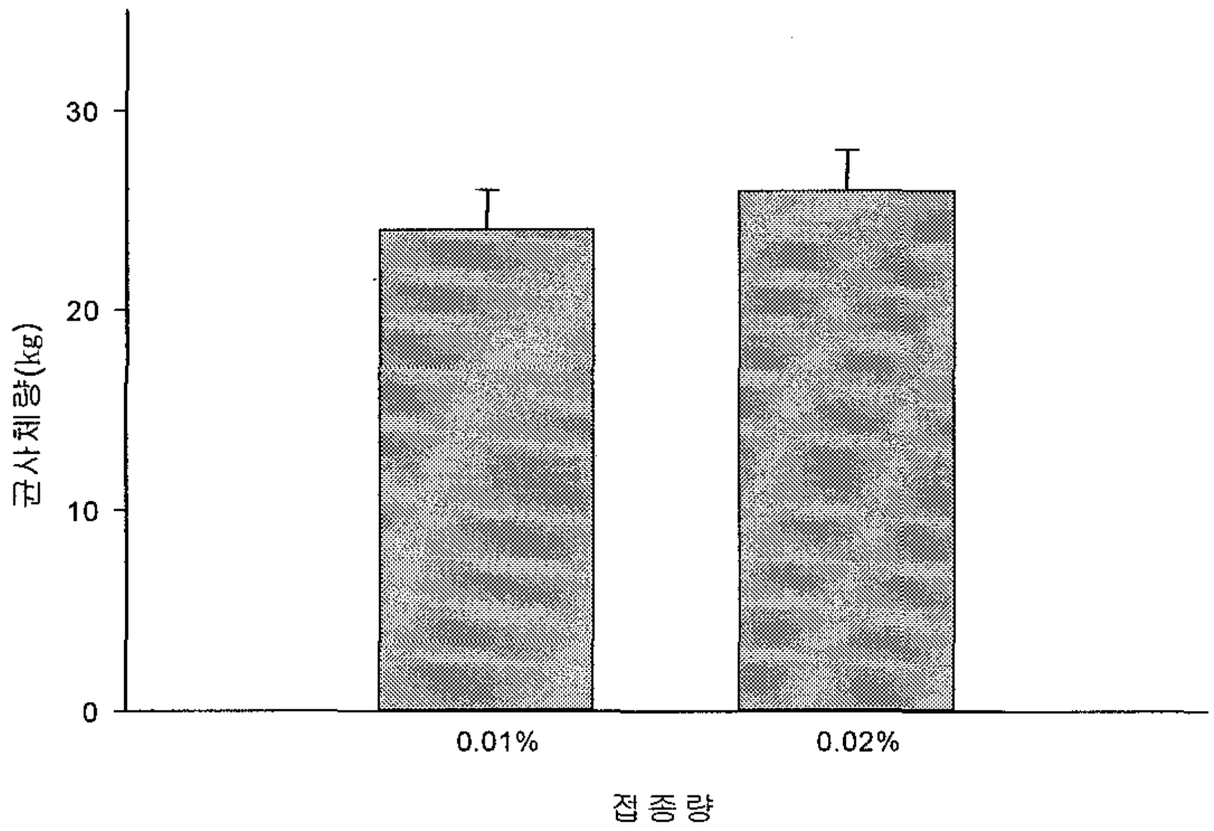


Fig. 29 균사체 접종량이 대량배양 균사체 생산에 미치는 영향
배지량 : 1,600ℓ
배양온도 : 25℃
공기량 : 45ℓ/min

3) 균사체 대량배양시 공기공급량이 균사체 생산에 미치는 영향
앞서 실험에서 정한 3ton의 발효탱크에 배지량 1.6ton과 0.01%의 균사체를 접종하여 배양시 공기 공급량에 따른 균사체의 생산효율성을 검토하였다
그 결과 Fig.30에서 보이는 바와 공기공급량을 45ℓ/min이 최적이었으며, 60ℓ/min에서는 오히려 균사량이 감소하는 결과를 보였다.

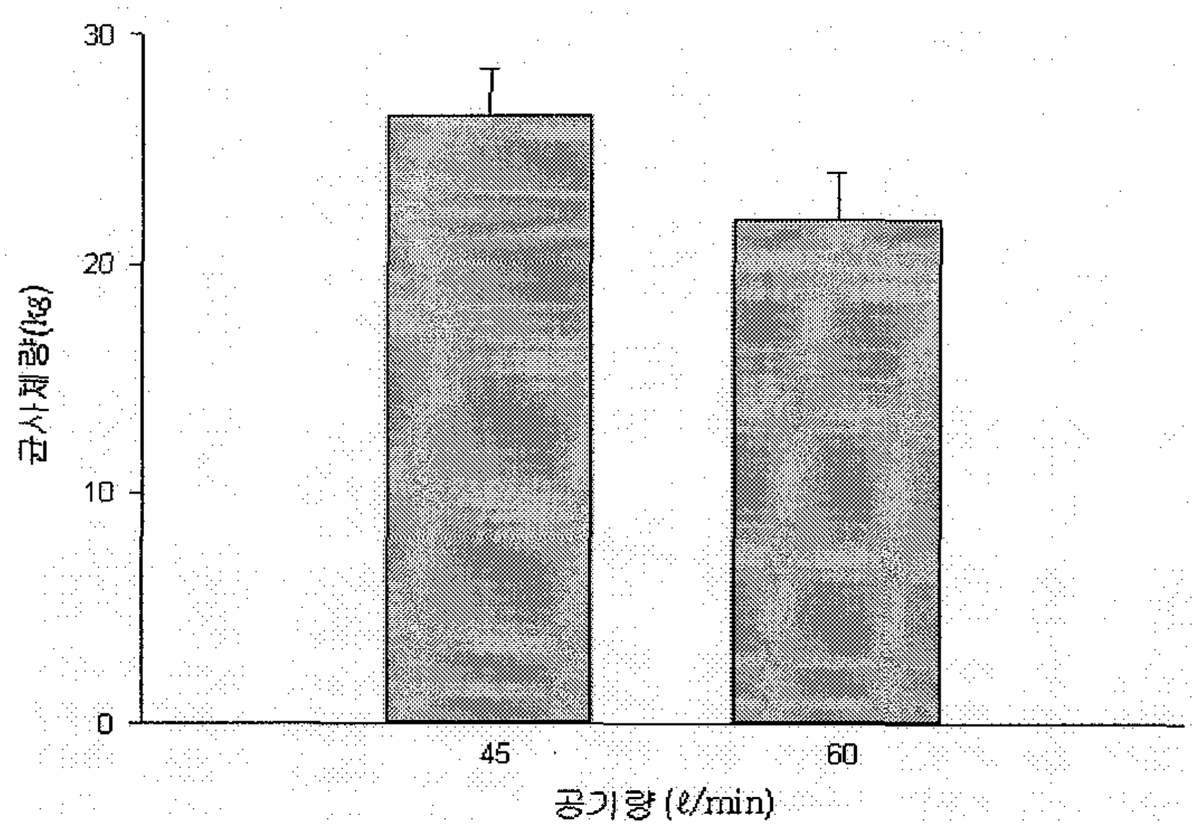


Fig. 30 공기량이 대량배양 균사체 생산에 미치는 영향
배지량 : 1,600ℓ
배양온도 : 25℃
접종량: 0.01%

1-2. 주류 대량생산시 발효 탱크의 환경변화와 alcohol생산

1) 3ton발효탱크에서 주류 발효시 품온의 변화

3ton발효탱크의 경우 물을 100으로 하였을때 쌀 28, Koji 21, 누룩2, 균사 1의 비율로 주류 본 발효 과정 중 품온의 경시변화와 술의 pH변화를 체크하였다. 이때 pH 및 온도의 측정은 2단, 3단 사입 후 충분히 mixing된 1일후에 측정하였다.

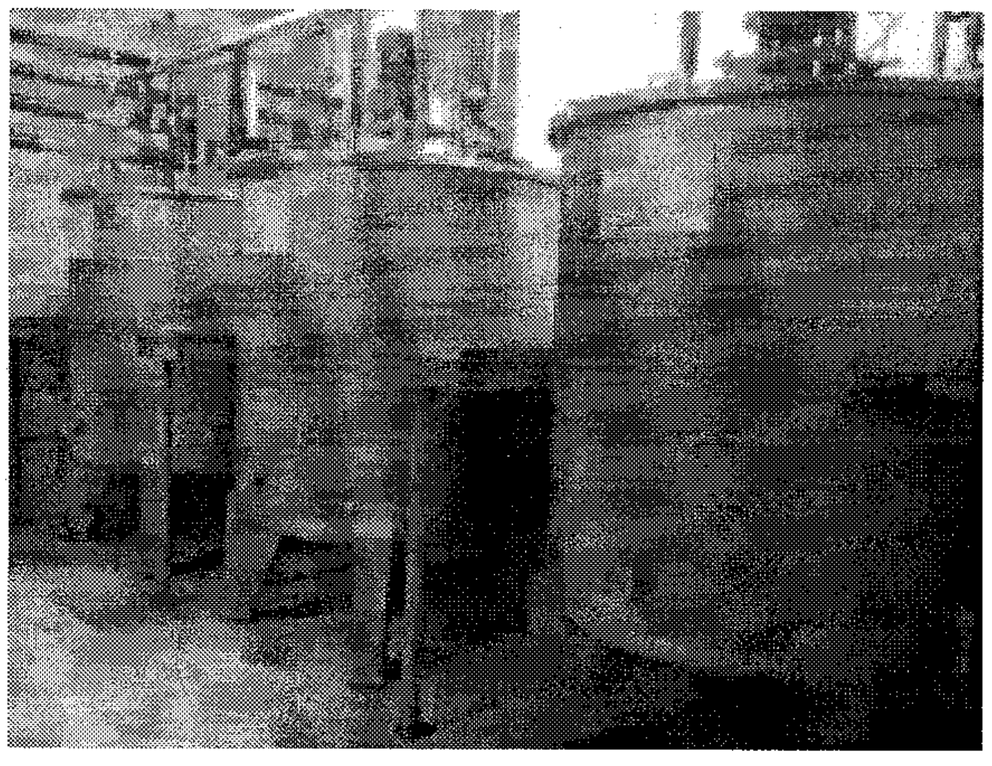


Fig. 31. 3ton 배양탱크

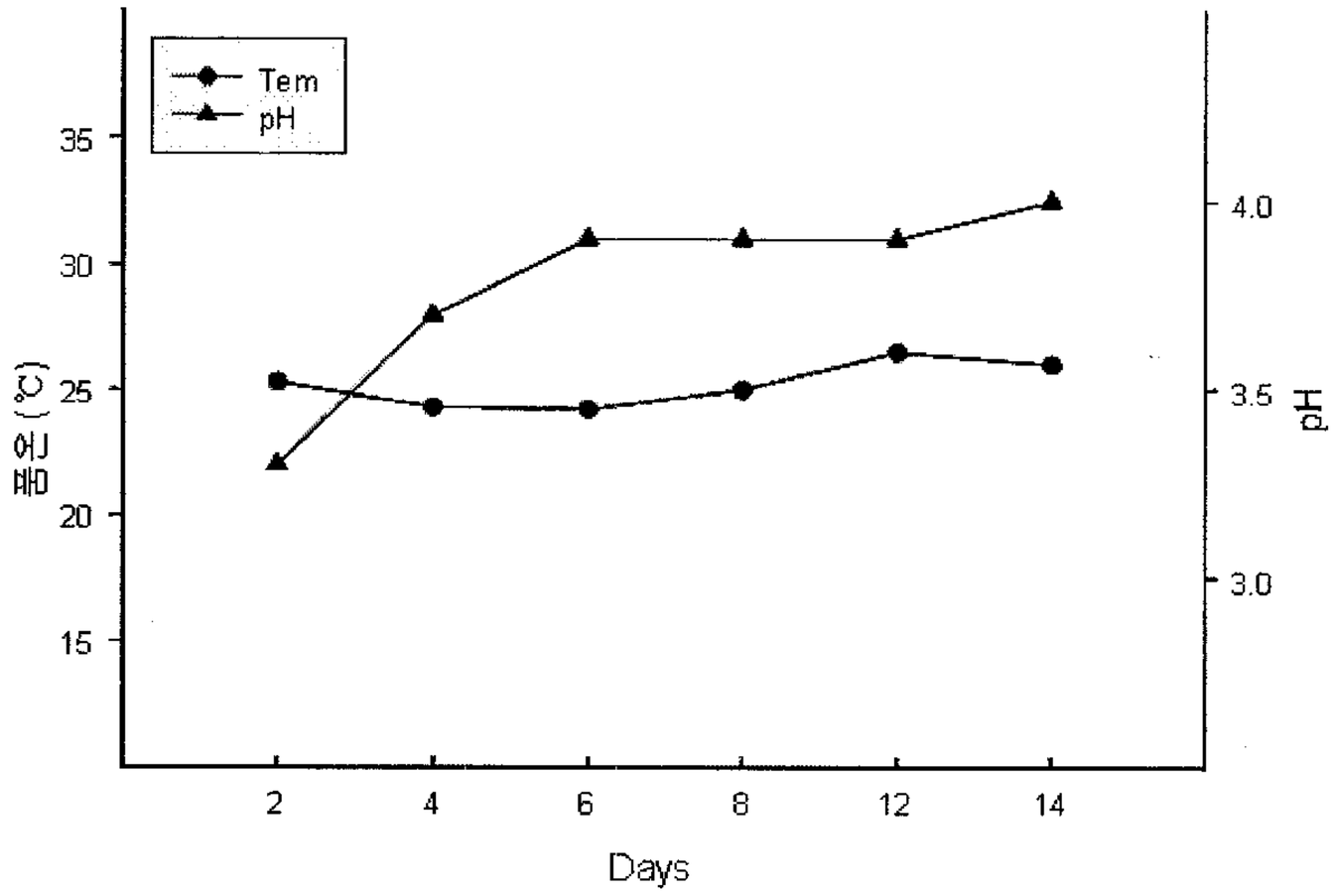


Fig. 32. 주류 발효시 품온의 변화 (3ton 발효탱크)

※ 1, 2, 3단 사입 시 물온도를 25℃로 맞춤.

※ 온도 control은 25℃로 함.

※ pH는 citrate로서 pH3.5로 맞추어서 담금함.

2) 3ton발효탱크에서 주류의 발효시 산도의 변화

위와 같은 조건으로 주류 발효할 때 산도의변화를 검토한 결과 Fig. 33에서 보이는 바와 같다. 단, 산도의 측정은 발효 4일후라야 측정가능하므로 4일 이후부터 산도를 측정하였다.

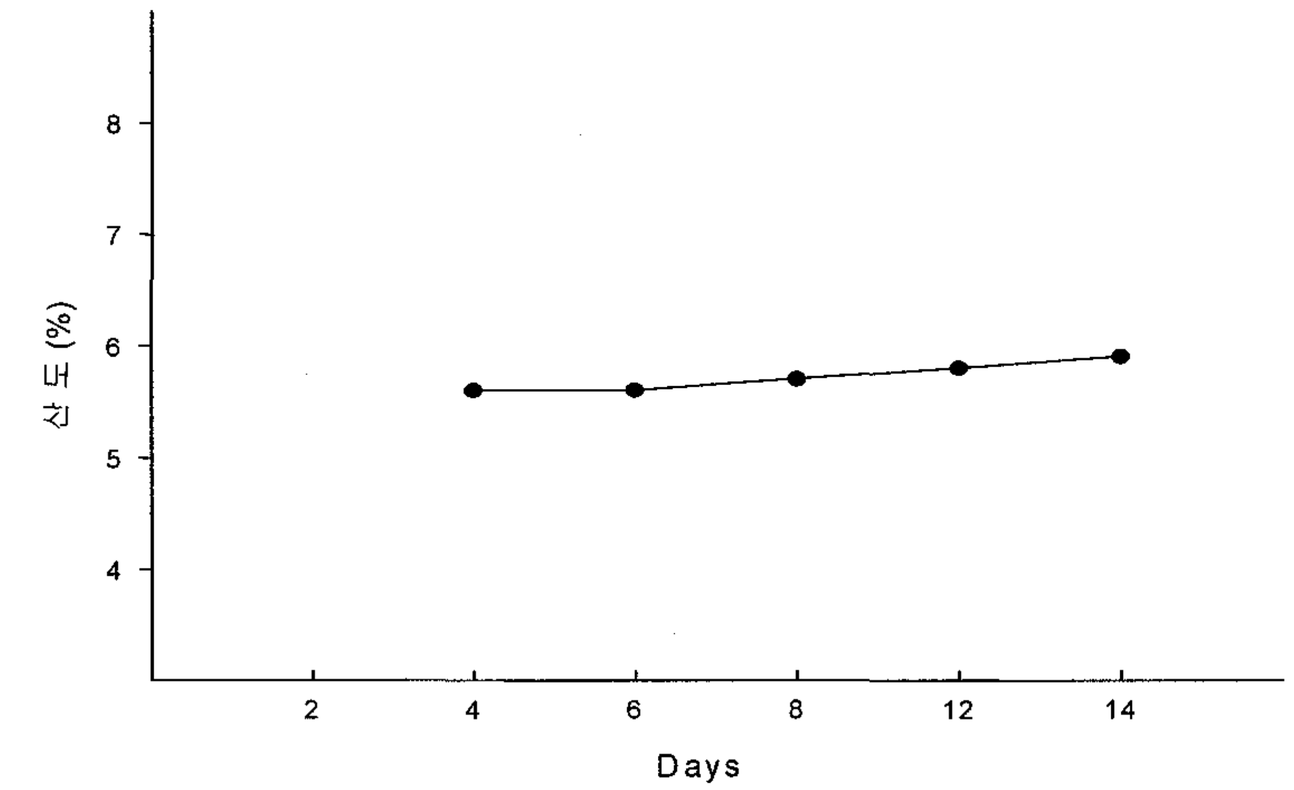


Fig. 33 주류 발효시 산도의 변화 (3ton 탱크)

3) 3ton 발효탱크에서 주류 발효시 alcohol의 농도와 비중

상기 1)의 조건에서 주류 발효를 시도하여 알코올의 농도와 비중을 시간별로 검토하였다. 결과는 Fig. 33에서 보는 바와 같이 발효 후 약 2주가 지나면 alcohol농도 15.7%에 달하며 비중의 변화는 6일째부터 약간 감소하는 변화를 보였다.

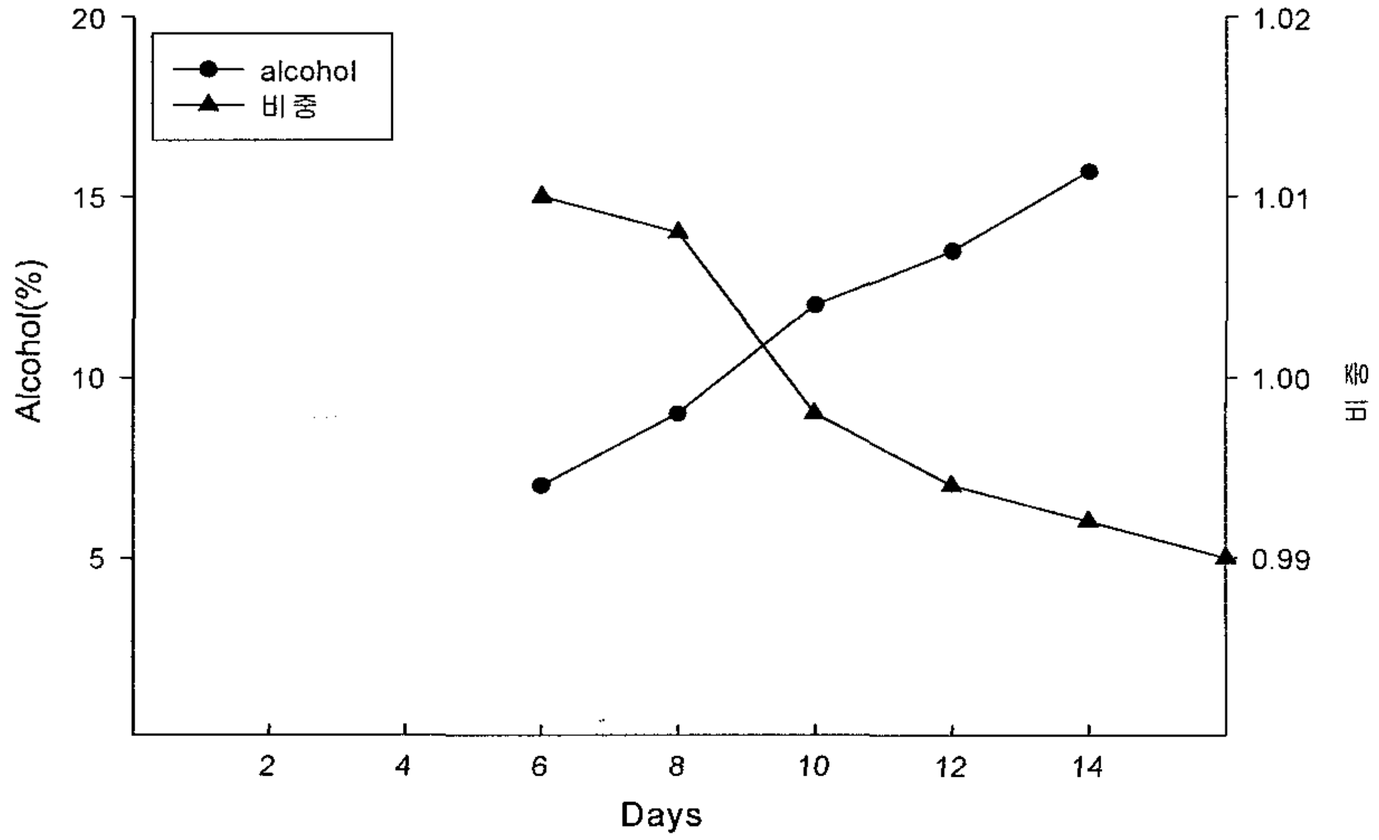


Fig. 34 주류 발효시 alcohol의 농도와 비중의 경시변화(3ton탱크)

4) 13ton 발효탱크에서 주류 발효시 품온, pH의 변화

13ton발효 탱크의 경우 물을 100으로 할 때 쌀 23, Koji 20, 누룩 2, 균사 0.5~1의 비율로 주류 발효를 시도하였다. 발효과정 중 품온과 pH의 변화를 체크한 결과 Fig. 35에서 보이는 바와 같이 발효 8일이 경과하면서 품온은 27℃로 가장 높았다가 10일 이후는 서서히 낮아 졌다. pH역시 8일 이후는 pH 4.2~4.3으로 약간 높은 변화를 보였다.

담금시에는 물의 온도를 25℃로 맞추며, 온도 control을 25℃로 하였으므로 품온은 25℃~27℃에서 항상 보존된다.

pH도 담금시에 citrate로 pH3.5로 맞추기 때문에 pH 3.5~4.0사이에서 보존됨.

Fig. 35. 13ton 배양탱크

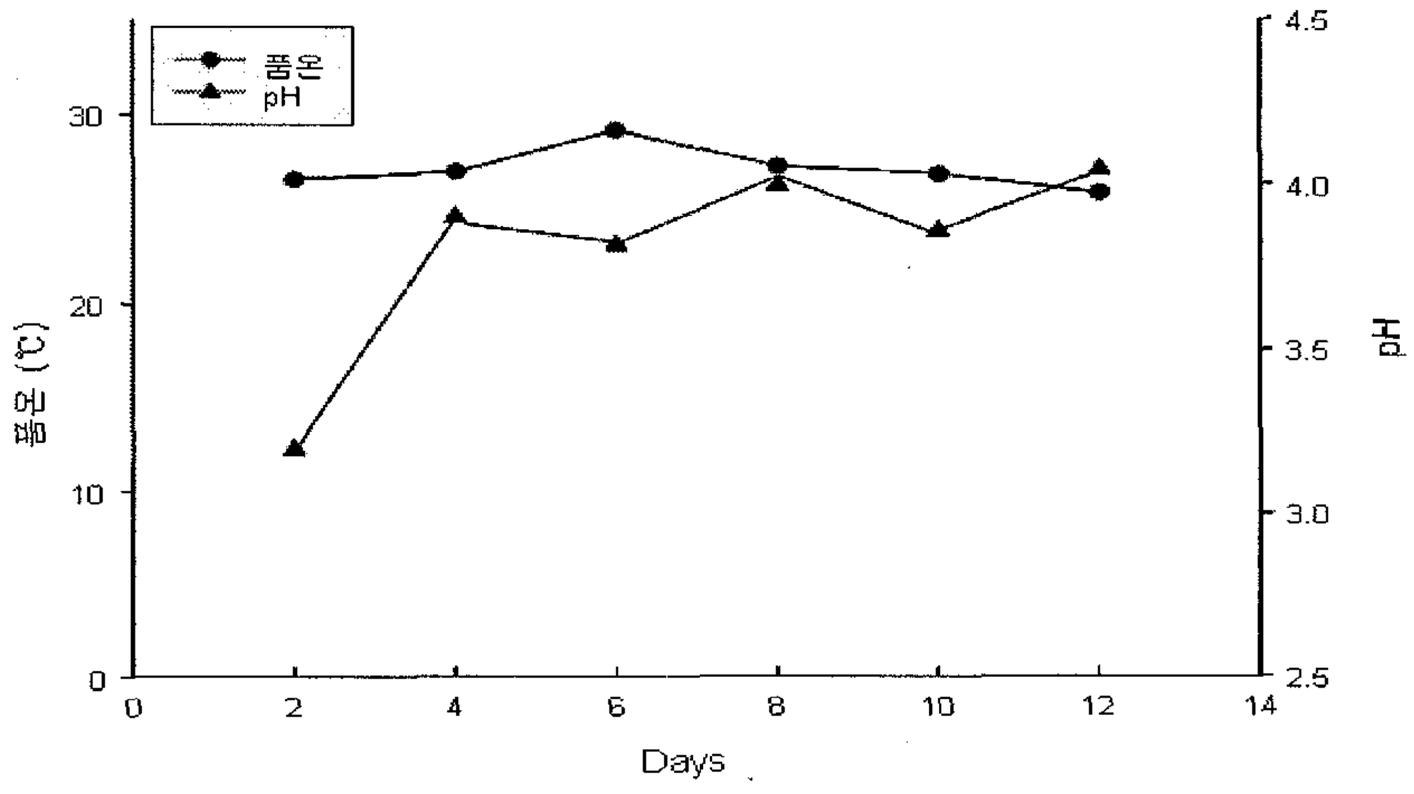


Fig. 36 주류 발효시 품온과 pH의 변화 (13ton 탱크)

5) 13ton 발효탱크에서 주류 발효시 산도의 변화

상기 4)의 조건으로 13ton 발효탱크에서 발효과정중 산도의 변화를 체크한 결과 Fig. 37과 같이 규명하였다. 단, 산도 측정은 발효 후 4일 이후라야 가능하므로 그 이하에서는 체크할 수 없었다.

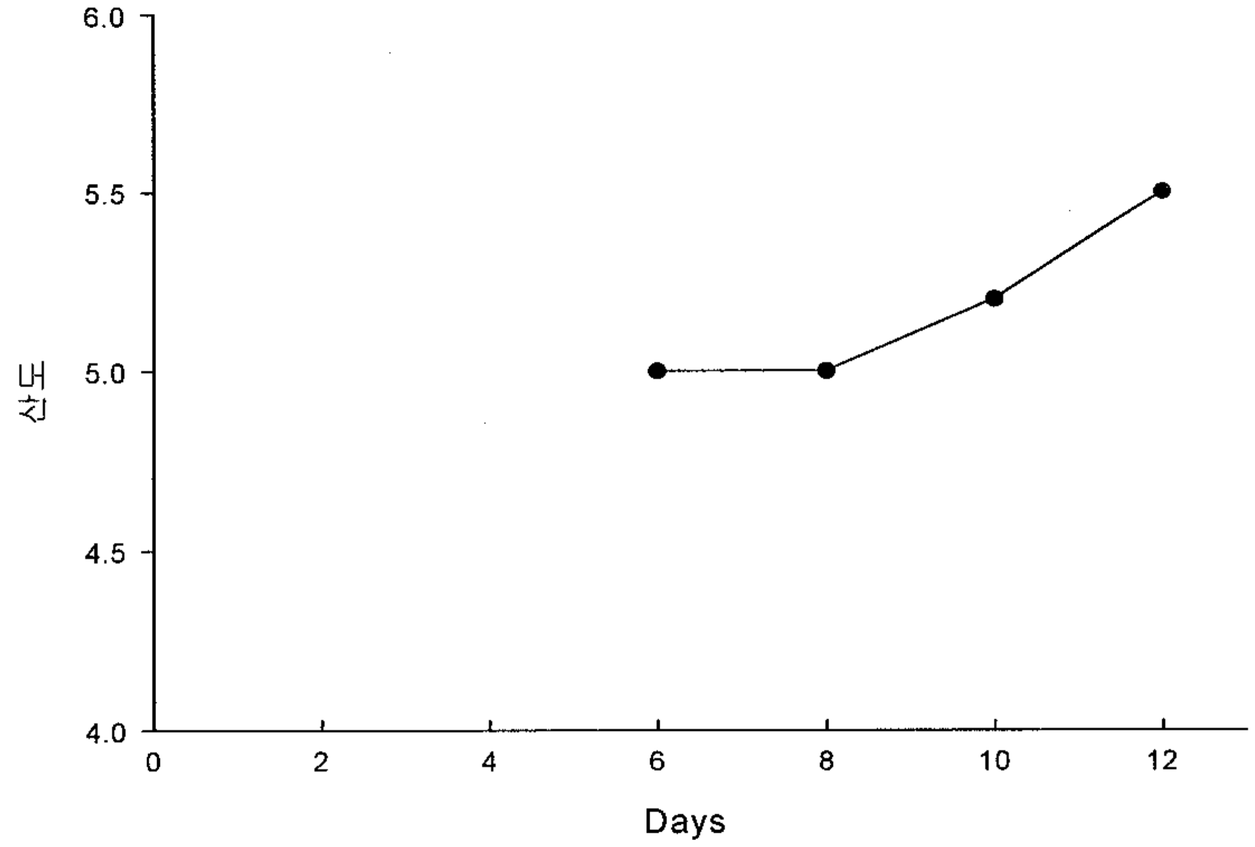


Fig. 37. 발효과정중 산도의 변화(13ton 탱크)

6) 13ton 발효 탱크에서 주류 발효시 비중의 변화와 alcohol생산

Fig. 38에서 보이는 바와 같이 13ton 발효 탱크에서 4)에서 언급한 조건으로 발효할 때 alcohol의 생산은 발효 12일째 16%에 달했다. 반면 비중은 0.989로 떨어지는 것을 알았다.

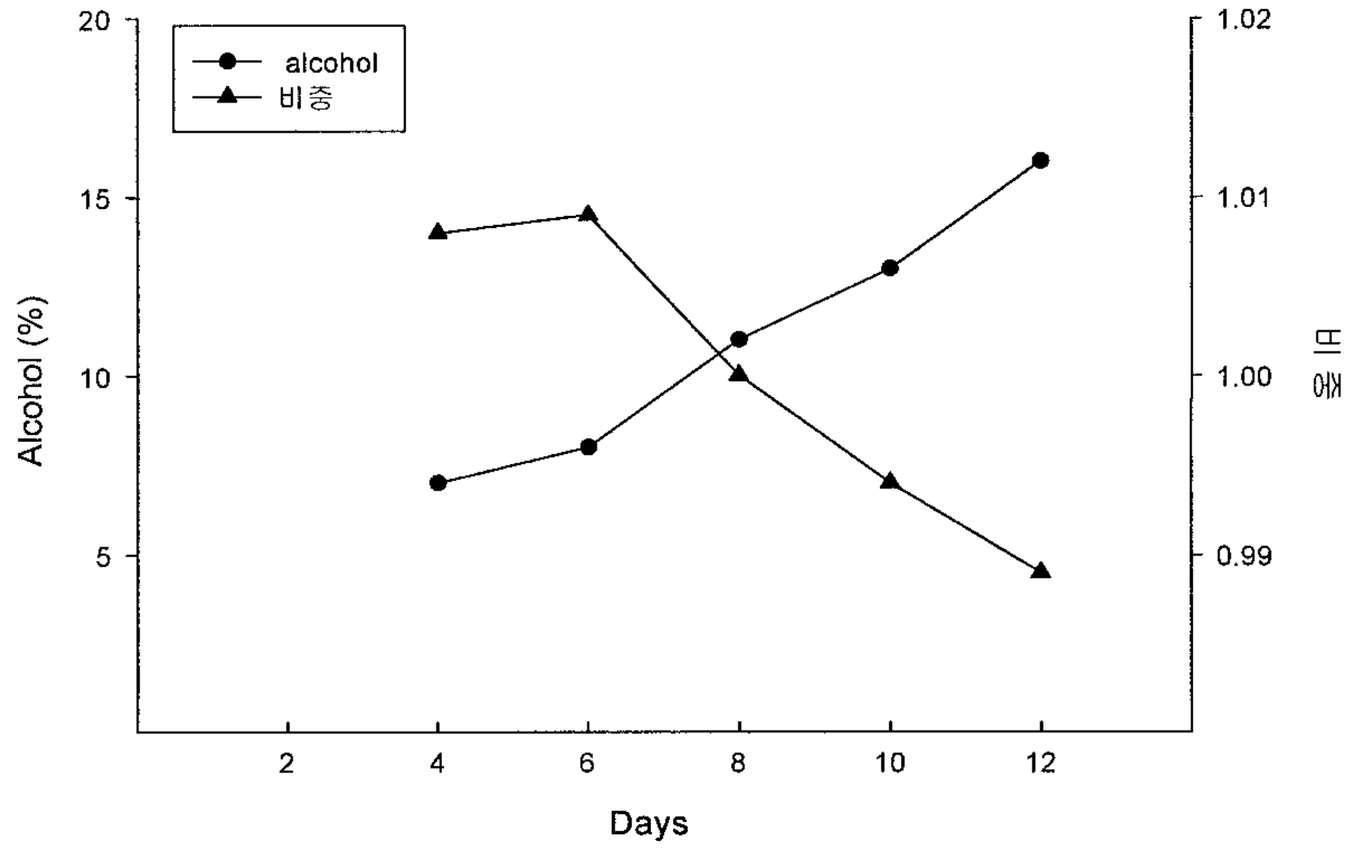


fig. 38. 주류 발효시 비중의 변화와 alchohol농도 변화(13ton탱크)

6) Koji의 대량 생산시 온도와 산도의 변화

① 수동 발효기 (500Kg 제조기)

수동 발효기는 500Kg의 Koji를 생산할 수 있으며 수동 개폐식 발효조로서 온도와 습도를 수동적으로 조절하는 Koji제조기 이다. (Fig. 39참조)

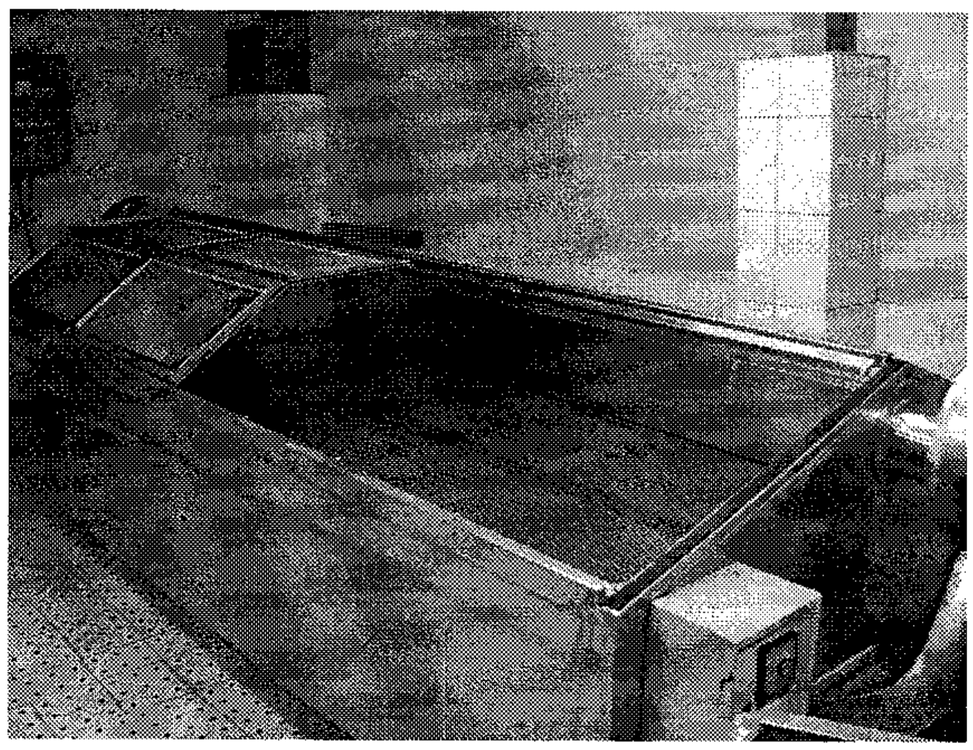


Fig. 39. 수동 Koji발효기 사진

발효시 품온을 발효 후 약 18시간 까지는 42℃를 유지하다가 그 이후는 서서히 품온이 내려가 28시간에는 32℃그리고 40시간이 지나면 30℃이하로 떨어진다.
반면에 산도는 초기 18시간 까지는 0.9%이하를 유지하지만 20시간 이후는 급격히 증가하여 30시간이 되면 4.5%보이며 4시간이 되며 산도 5.2%를 유지한다. (Fig. 40 참조)

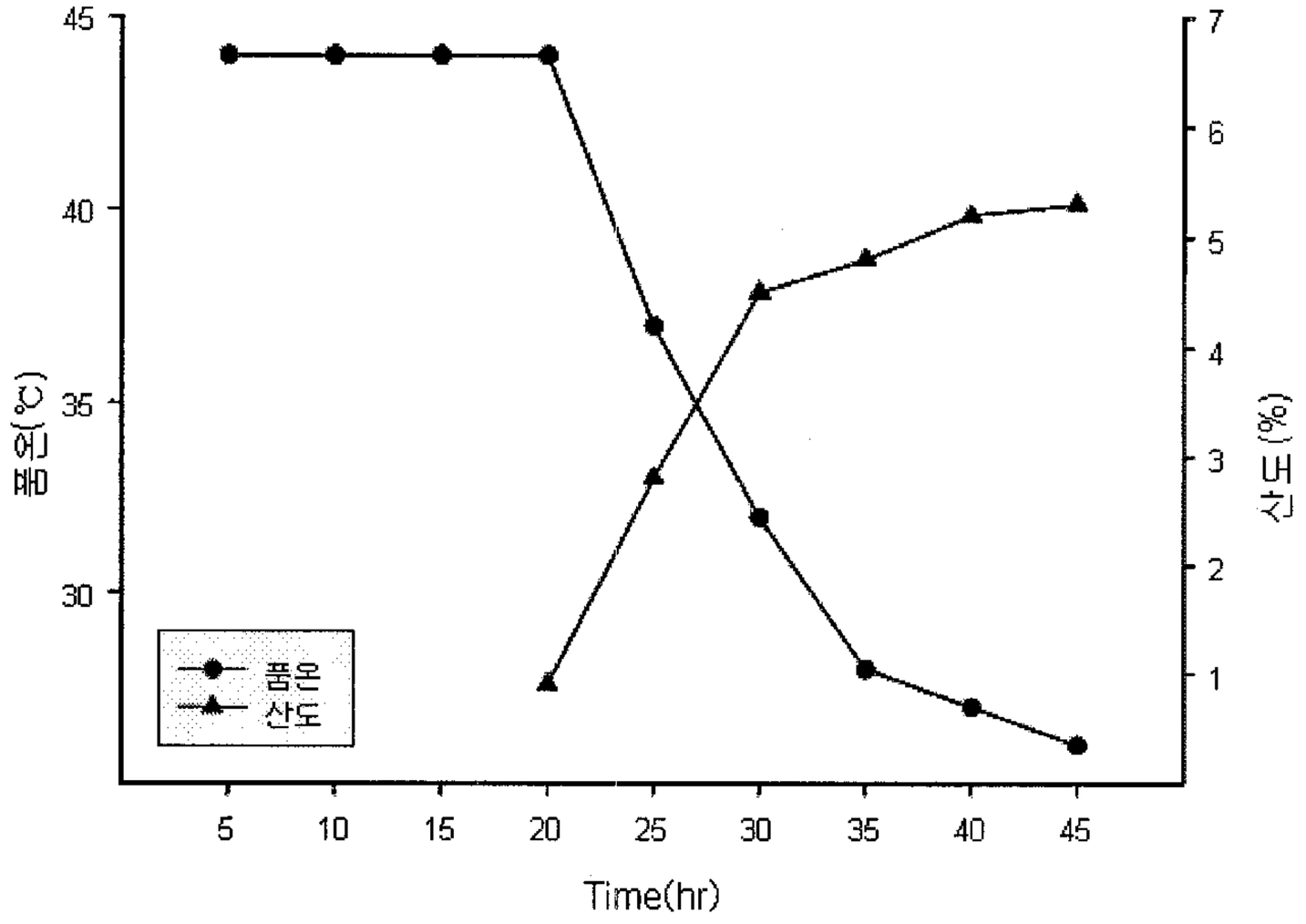


Fig. 40. 수동제조기에의 Koji제조시 품온과 산도의 변화

② 자동 발효기 (1,500Kg제조기)
자동 발효기는 최대 1,500Kg의 Koji를 생산할수 있으며 완전 밀폐형으로 한번 쌀과 물을 섞어 넣으면 자동적으로 약 45시간동안 온도, 습도, 시간이 조절되게 Setting 되는 기계이다.
수동식보다 후반기의 품온이 약간 높은 편이며 최후의 산도는 오히려 낮은편이다. 품온과 산도의 변화는 Fig.41에서 보이는 바와 같다.

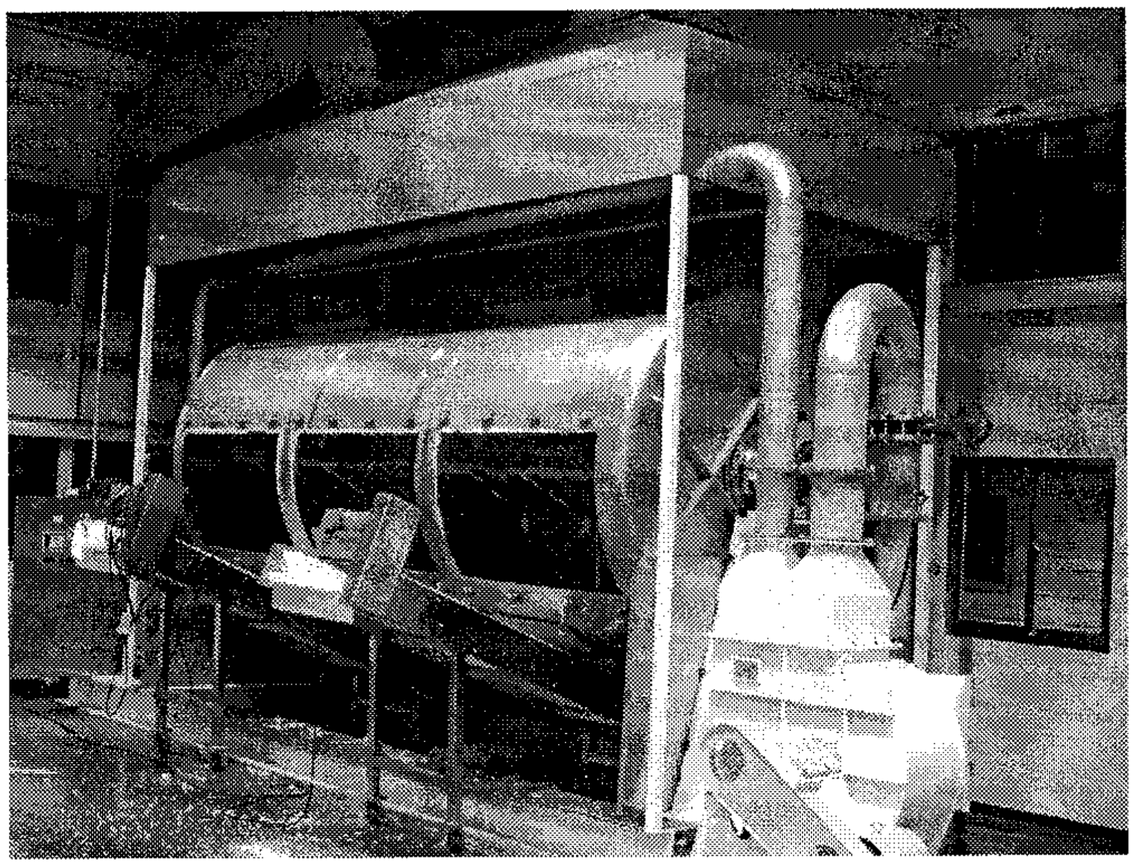


Fig. 41. 자동제국기

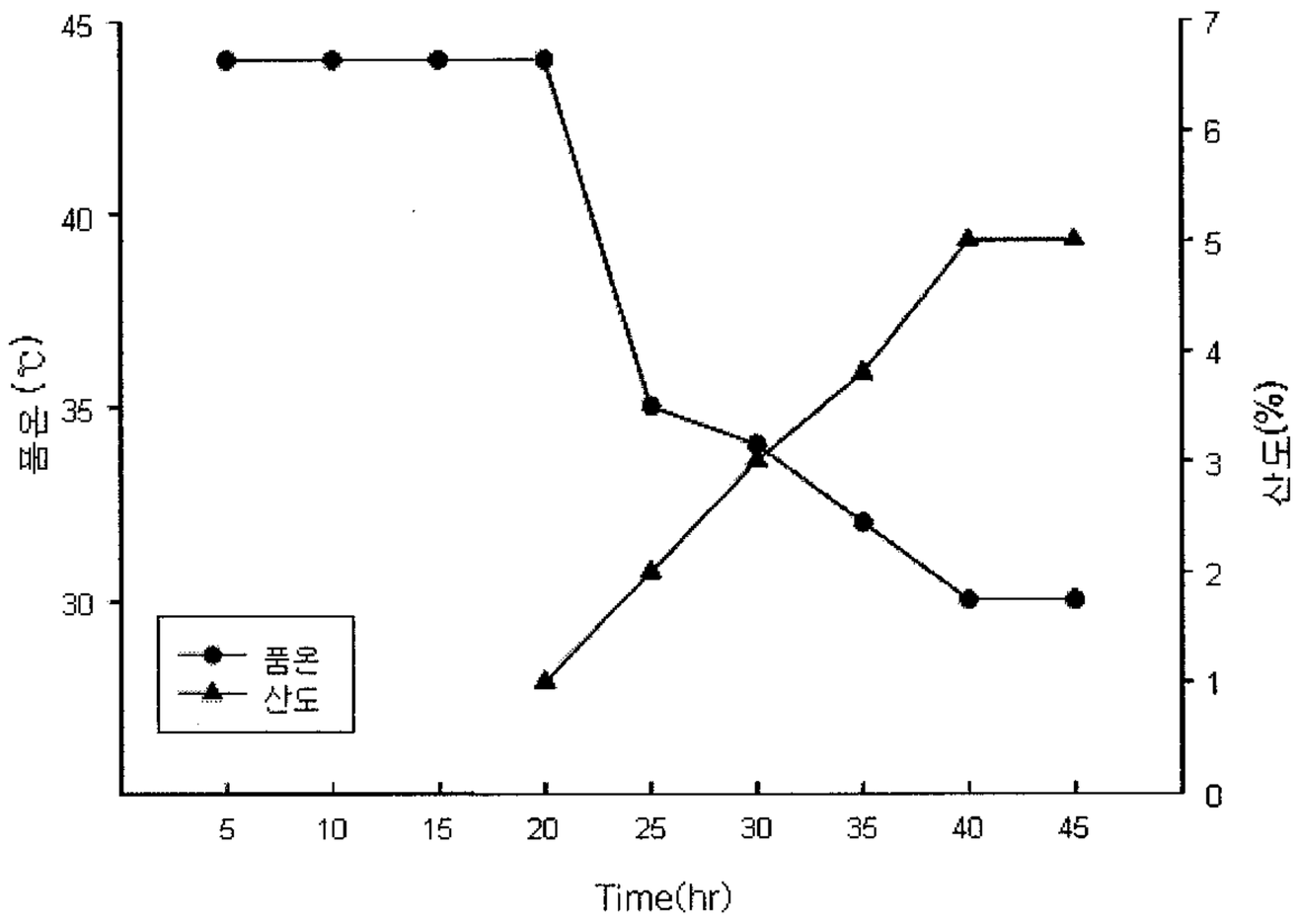


Fig. 42자동 제조기의 Koji제조시 품온과 산도의 변화

2. 대량 주류 발효시 초기 종균 생육조건 확립

3ton 발효탱크와 13ton 발효탱크에서 주류를 대량 발효할 때 균사체 종균의 접종 비율을 정하였다.

2-1. 3ton 발효탱크의 균사체 종균 접종비율

3ton의 대량주류생산을 위하여 앞에서 언급한 비율대로 물과 쌀, Koji, 누룩을 섞어 여기에 균사의 량을 어느정도 결정하는 실험을 하였다. 즉 균사 종균량을 0.25%, 0.5%, 2%로 하여 alcohol의 생산량을 측정하였다.

결과는 Fig. 43에서 보이는 바와 같이 종균의 균사체량은 0.5%가 경제적인 접종량으로 결

정되었다.

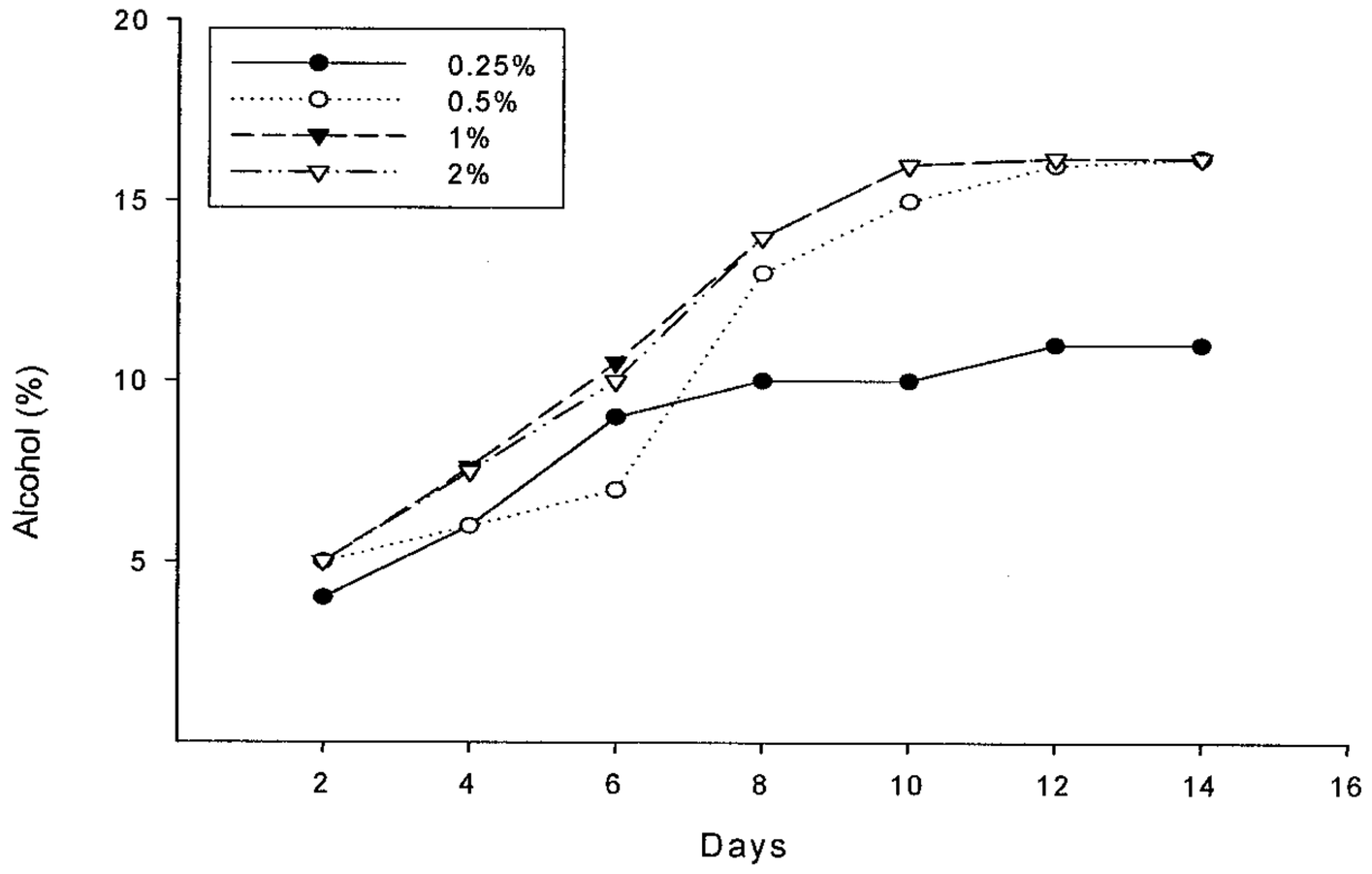


Fig. 43. 주류 대량 배양시 종균량과 Alcohol생산의 경시적 변화 (3ton)

2-2. 13ton 발효탱크의 균사체 종균 접종 비율

13ton 발효 tank에 의한 주류의 대량생산을 위하여 상기와 같은 방법으로 발효를 행하였다. 최적의 종균 균사체량을 결정하기 위하여 접종 균사체량을 0.25%, 0.5%, 1%의 3가지를 시험했다. 그 결과 Fig. 44에서 보이는 바와 같이 0.25%의 균사체 량을 종균으로 접종하는 것이 가장 효율적이라고 판단되었다.

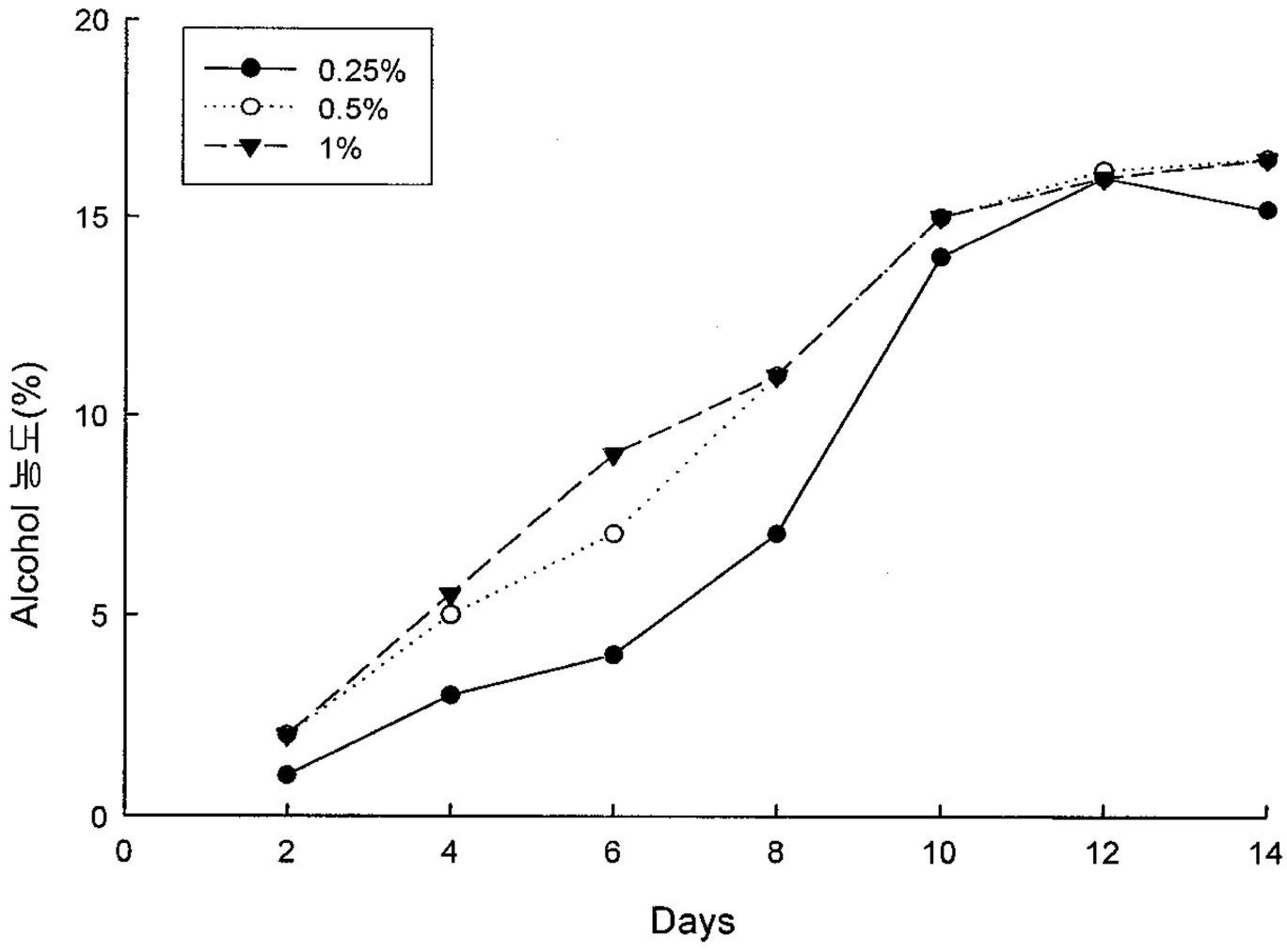
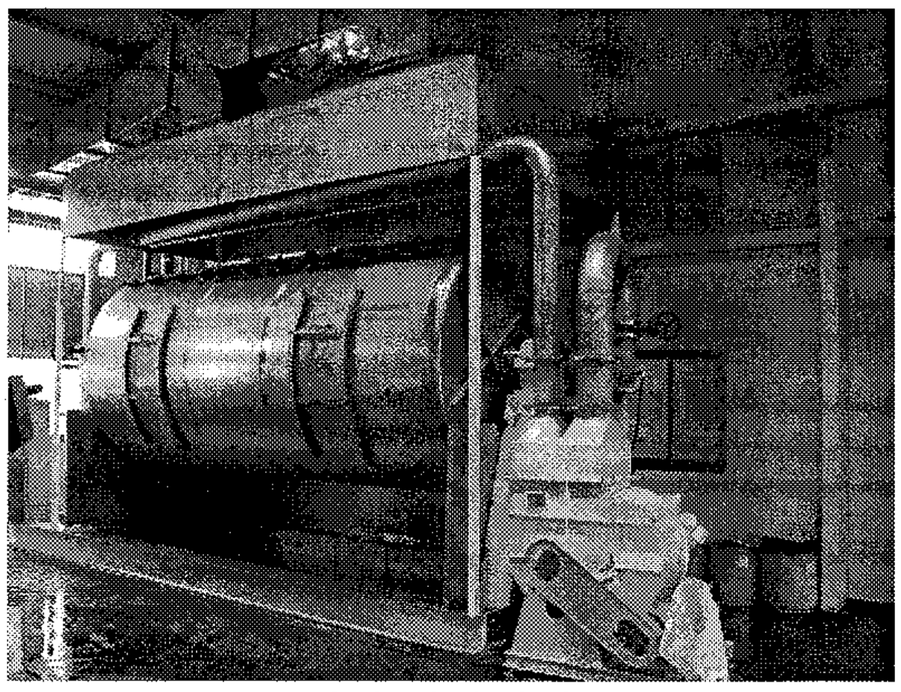


Fig. 44. 주류 대량배양시 종균량과 Alcohol 생산의 경시적 변화 (13ton 탱크)

3. 버섯 추출물 첨가에 따른 발효 중 문제점 해결

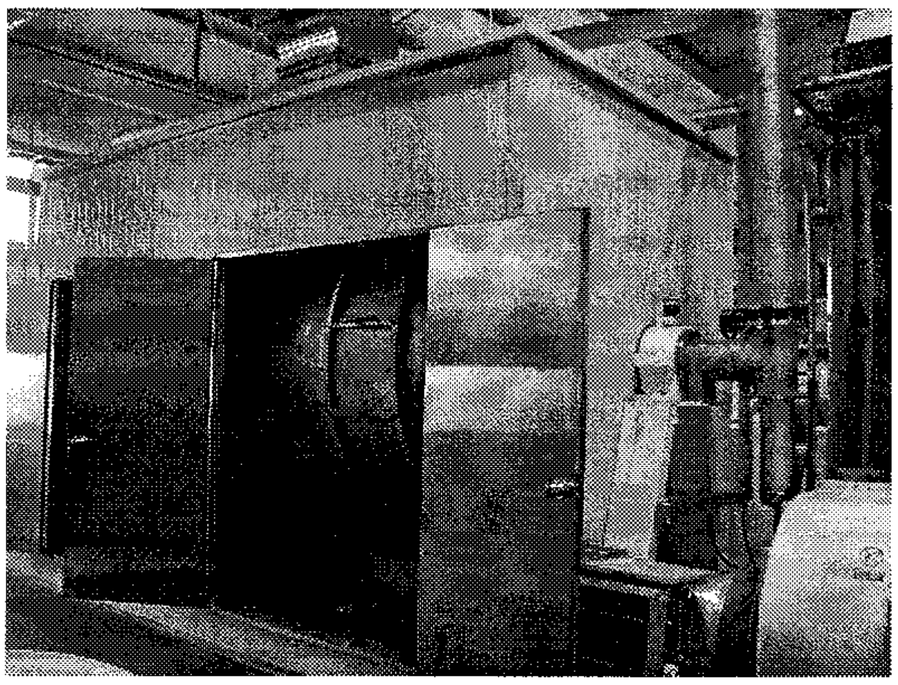
상황버섯의 자실체를 열탕추출하여 주류 발효시 첨가하였을 경우 무 첨가 발효과정에서와 큰 차이가 없이 발효가 진행되는 것을 확인하였다. 발효 종료 후 Alcohol생산면에 있어서도 무첨가 시와 거의 차이가 없이 동일한 결과를 보였다. 그러나 맛과 향에 있어서 추출물 무첨가 주류와 비교하여 크게 떨어지므로 본 보고서에서 data 수록을 생략함과 동시에 산업적으로도 사용하지 않기로 결정하였다.

4. 공장 수준의 시설에서 신 기능성 주류의 대량생산 시범운행

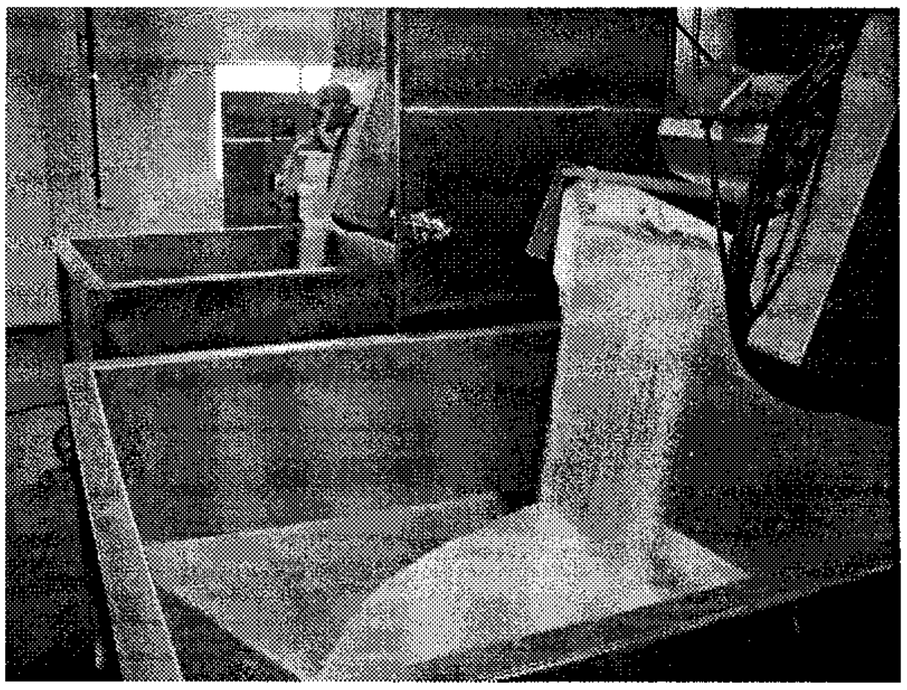


침미(쌀불리기)

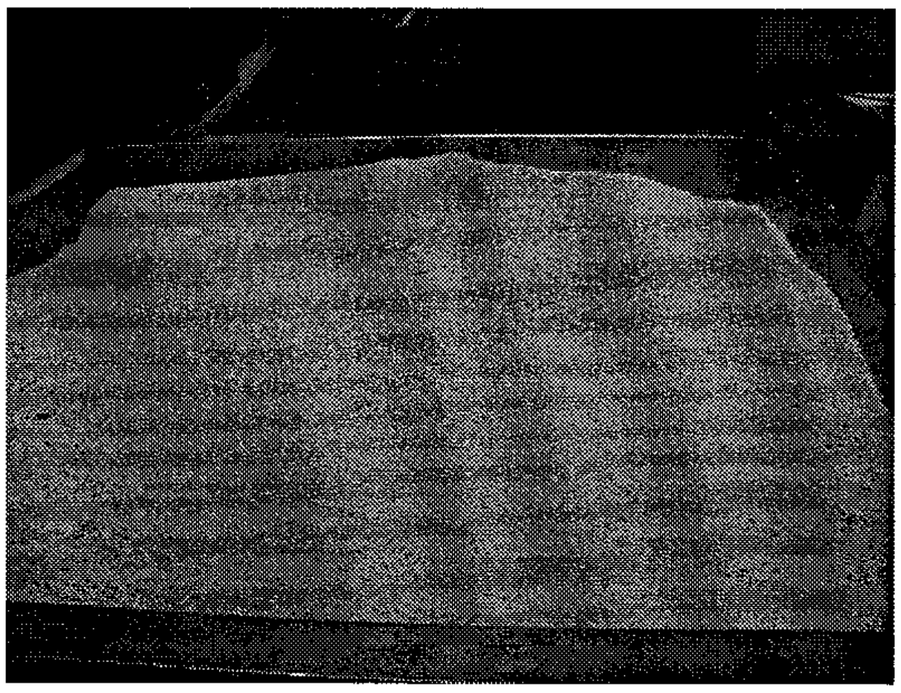
증미(호화과정)



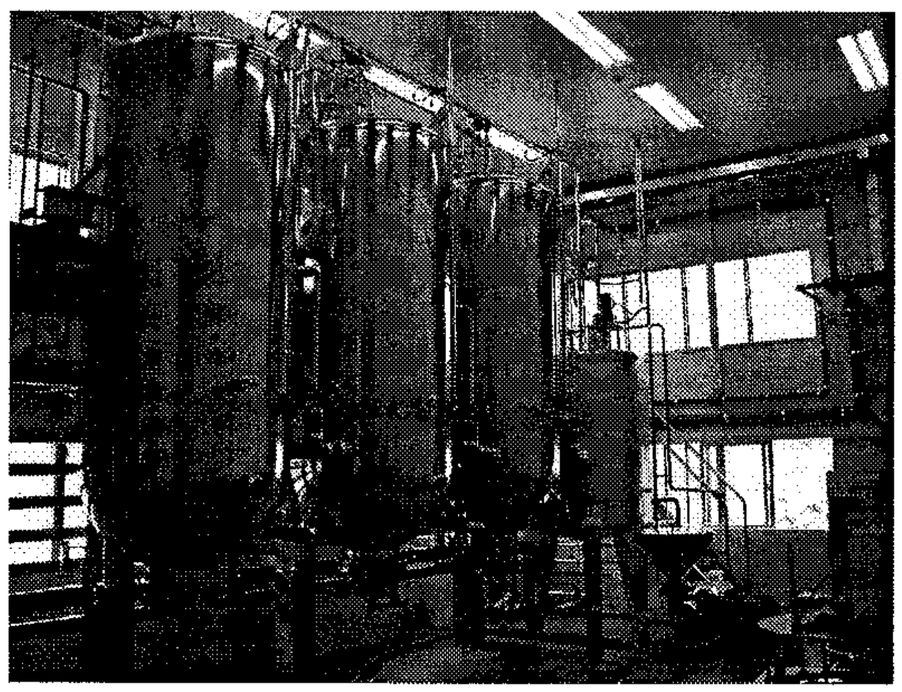
제국(당화)



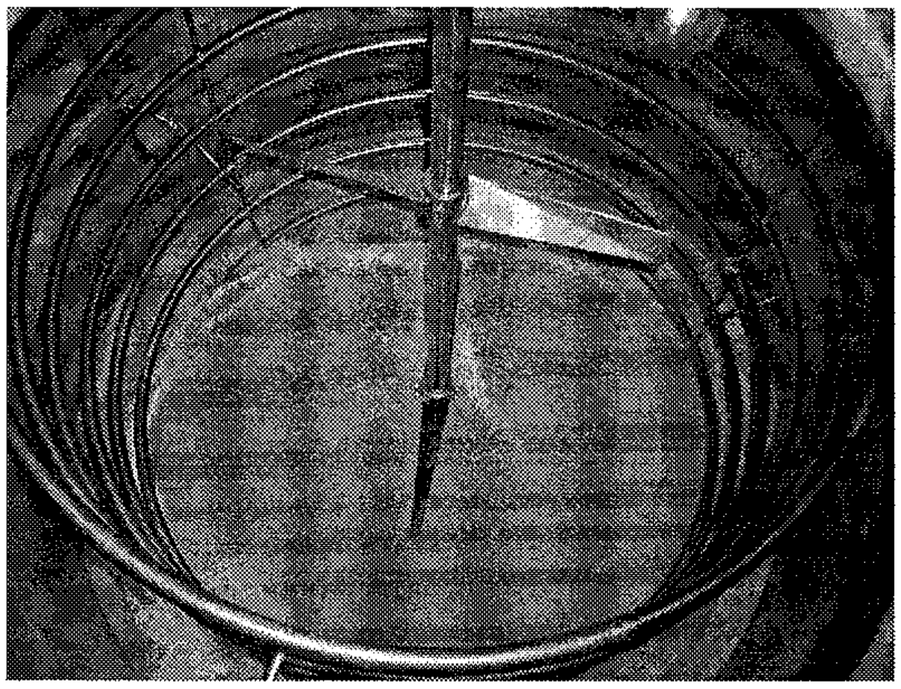
출국(배출)



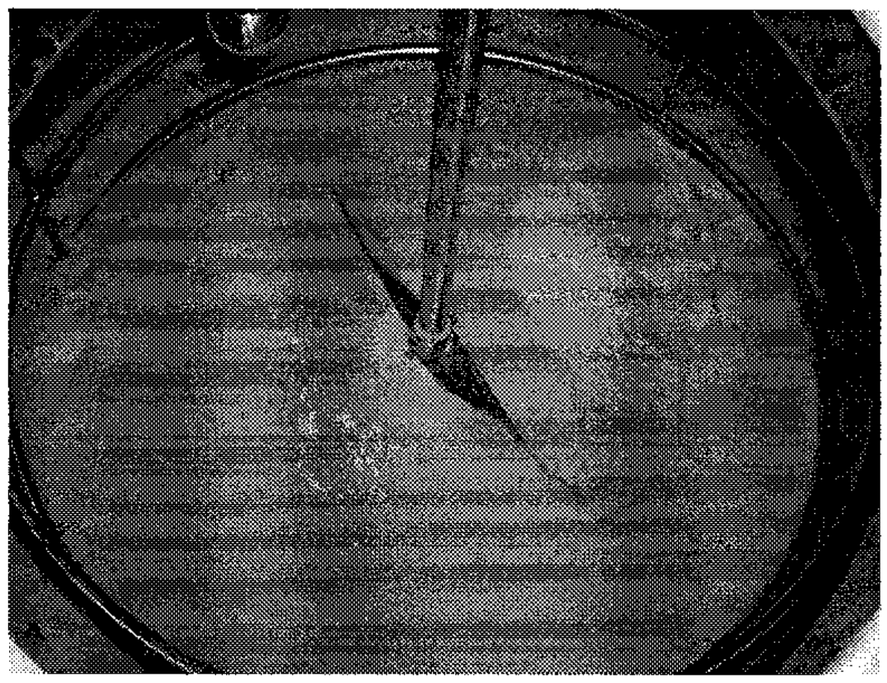
당원(원료준비)



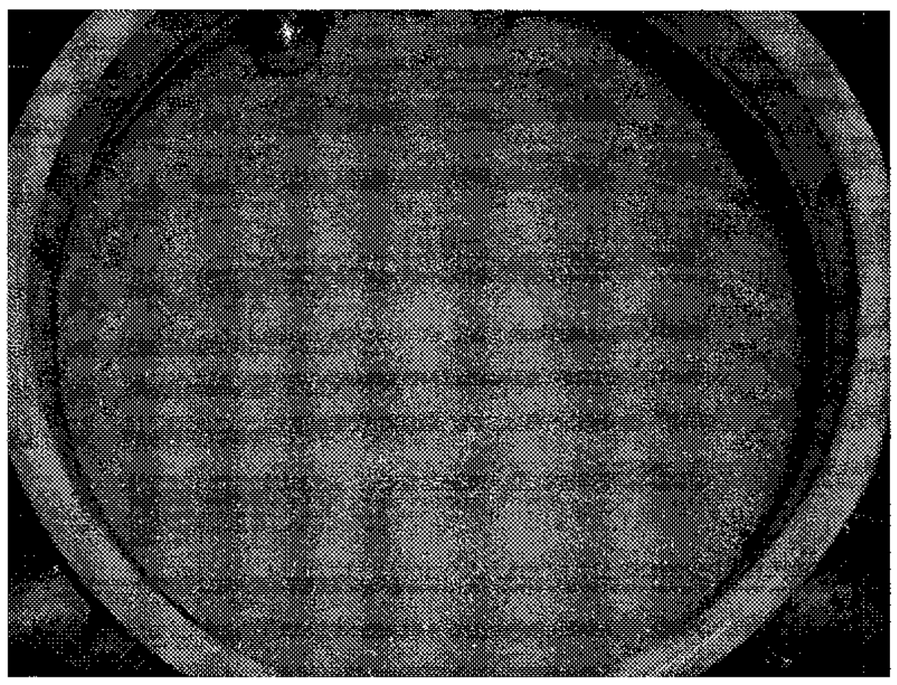
상황균사대량배양(발효주체)



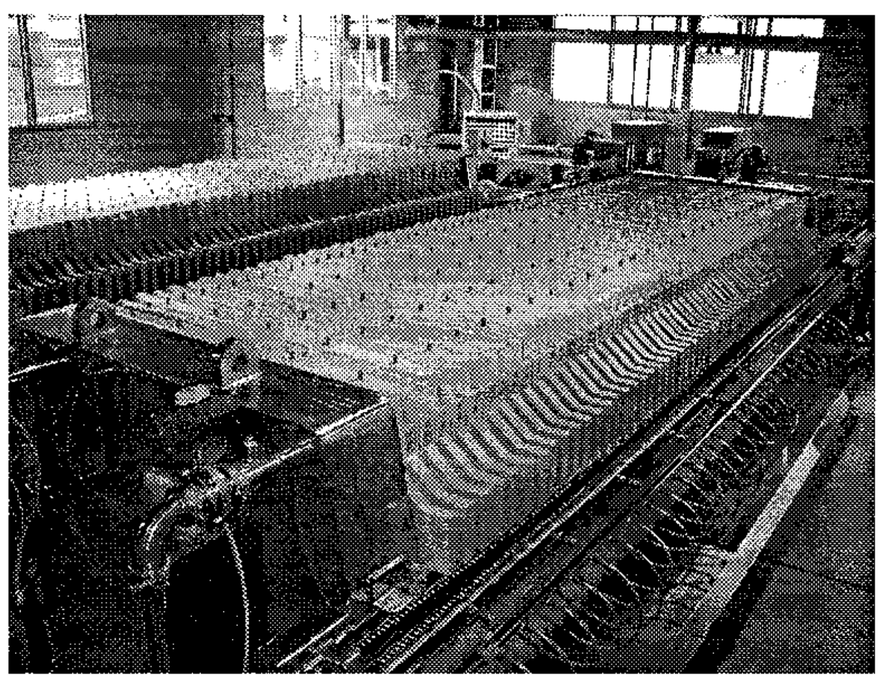
1단 담금 (발효진행)



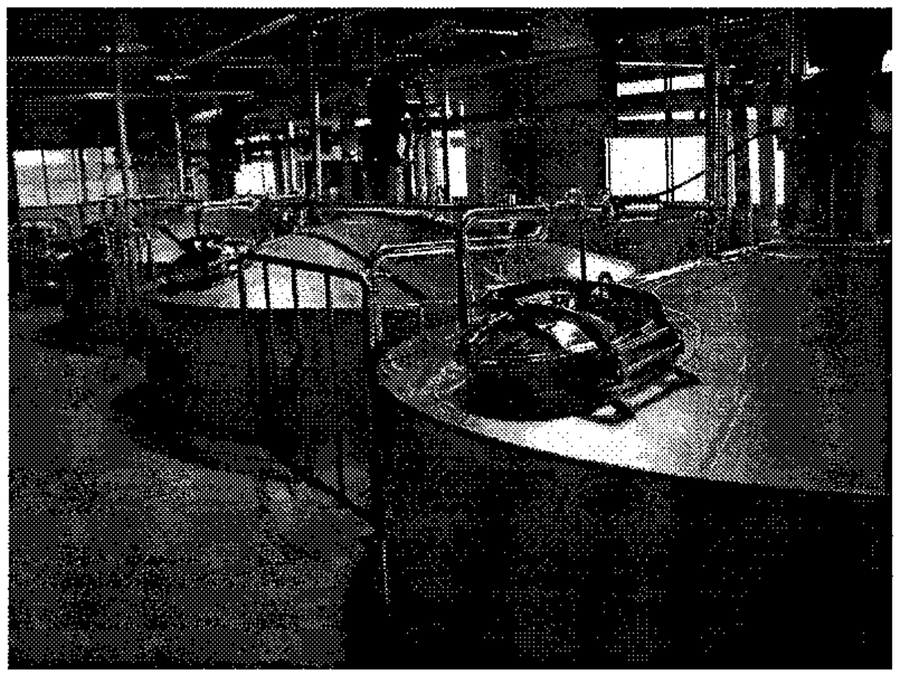
2단 담금 (발효진행)



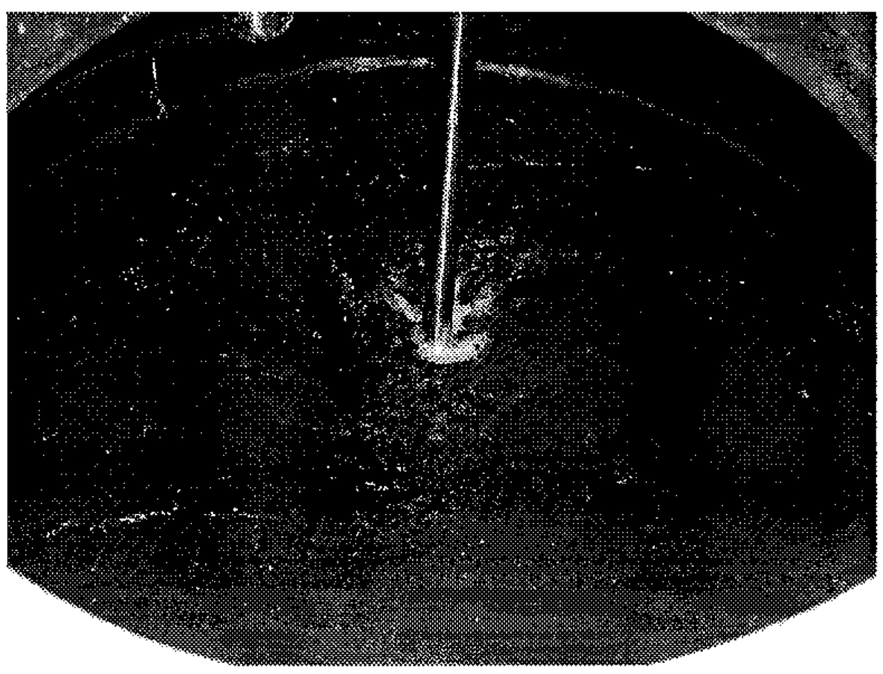
3단 담금 (발효진행)



1차 여과 (주박 분리)



냉동숙성



제성

Fig. 45. 신 기능성 주류의 대량 생산 공정

5. 신 기능성 주류 제품을 위한 시제품의 생산

상황버섯발효주 천년약속 프라임

주류의 종류 약주(藥酒)

주원료 찹쌀, 쌀, 상황버섯균사체, 청정수

도수 12%

용량 500ml

상황버섯발효주 LINTEUS

주류의 종류 약주(藥酒)

주원료 찹쌀, 상황버섯, 청정수

도수 16%

용량 700ml(2005년 1월 출시)

Fig. 46. 상황버섯 기능성 신주류의 제품

Ⅳ. 종균이 생산하는 약리성분 물질의 분석

1. 크로마토그래피를 이용한 단백다당체의 분리

Fig. 47에서 보다시피 단백다당체는 약 0.45M NaCl에서 용출되는 산성다당체임을 확인할 수 있었다. 또한 다당체의 분자량을 측정한 결과 약 200,000정도임을 확인할 수 있었다 (Fig. 48).

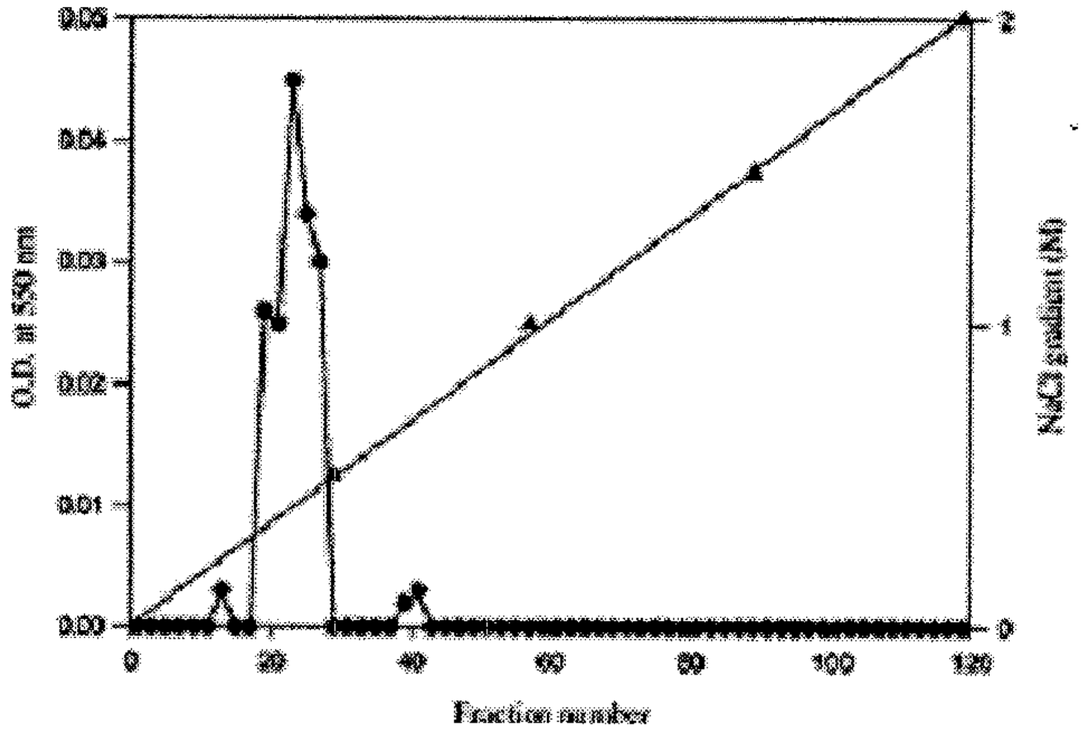


Fig. 47. Anion exchange chromatography of crudeproteo-heteroglycan derived from fruiting body of *Phellinus* sp. DEAE-cellulose column (3×45 cm). The column was eluted with distilled water. O.D. was measured by the DNS method. ( ) activity of sugar; ( ) NaCl gradient.

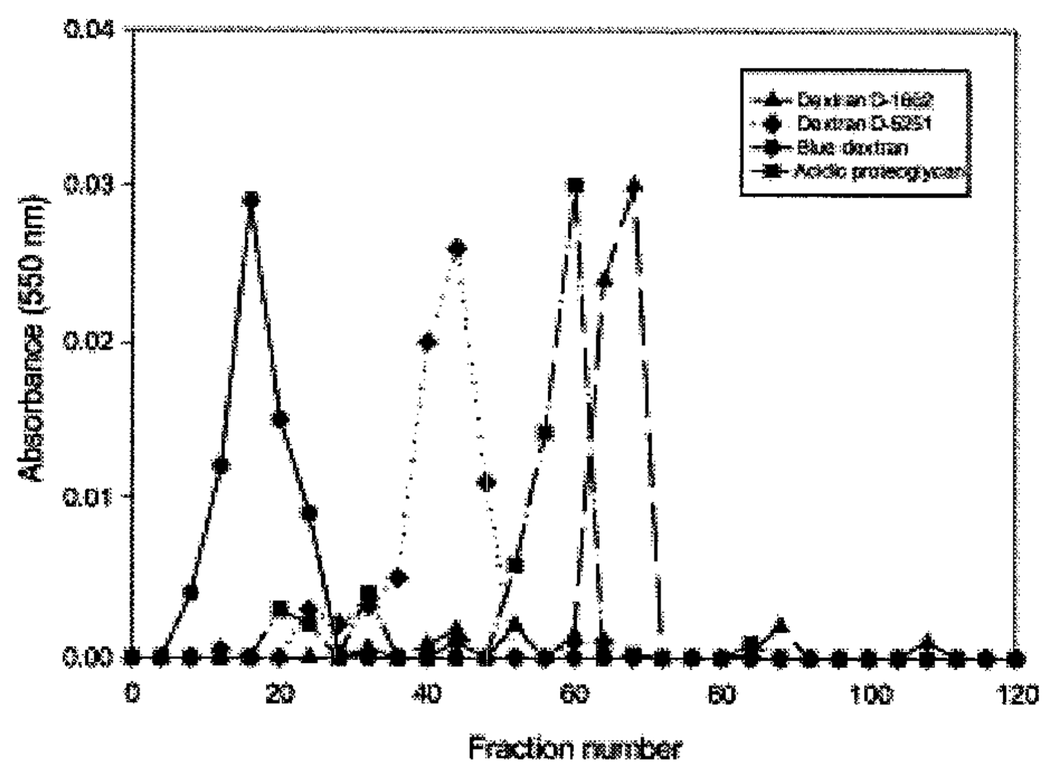


Fig. 48. Gel filtration of acidic proteo-heteroglycan from fruiting body of *Phellinus* sp. on Sepharose CL-4B column (1.5×105 cm). The column was eluted with 0.01 M sodium phosphate buffer (pH 6.4). O.D. was measured by the DNS method.

2. 단백다당체의 조성분석

이렇게 분리된 단백다당체의 총당량은 약 72.2%이며, 총단백질양은 22.3%였다. 이상의 결과로 미루어 볼 때 본 다당체는 순수한 glucan이 아니라, proteo-glycan임을 확인 할 수 있었다. 또한 본 다당체는 많은 양의 mannose (41.6%), galactose (23.4%), and glucose (23.8%)으로 이루어져 있었다. 최종적으로 아미노산의 조성을 분석한 결과 Table 2에서 보는바와 같인 높은 %의 aspartic acid (9.0%), serine (11.8%), glutamic acid (11.1%), glycine (12.0%), alanine (12.7%)를 함유하고 있었다.

Table 2.. Amino acid composition of hydrolysed acidic proteo-heteroglycan from *Phellinus* sp.

Amino acid	M%
Aspartic acid	9.0
Threonine	6.9
Serine	11.8
Glutamic acid	11.1
Glycine	12.0
Alanine	12.7
Cystine	0.7
Valine	5.1
Methionine	1.0
Isoleucine	2.9
Leucine	5.6
Tyrosine	1.6
Phenylalanine	8.4
Histidine	1.2
Lysine	4.2
Arginine	2.8
Proline	3.0

3. FT-IR분석

Fig. 49에서 보는것과 마찬가지로 본 단백다당체의 기능기를 분석하기 위한 FT-IR스펙트럼에서 표준 glucan과 유사한 흡수대 파장의 진동이 확인되었다. 약 1650 cm^{-1}에서 carboxyl group의 (C=O) vibration을 확인 할 수 있었으며, 28702930 cm^{-1}에서 banding-like-structure의 (CH) vibrations 특성이 확인 되었으며, 약 3400 cm^{-1}에서 전형적인 carbohydrate ring의 특성을 가지는 전형적인 당의 구조를 이루고 있슴을 확인할 수 있었다. 특징적으로 두 당에서 약 915 cm^{-1}에서 전형적인 β-linked glucan의 구조를 확인 할 수 있었다. 반면에 본 연구에서 추출된 단백다당체는 860 cm^{-1}에서 알파결합도 확인됨을 알 수 있었다.

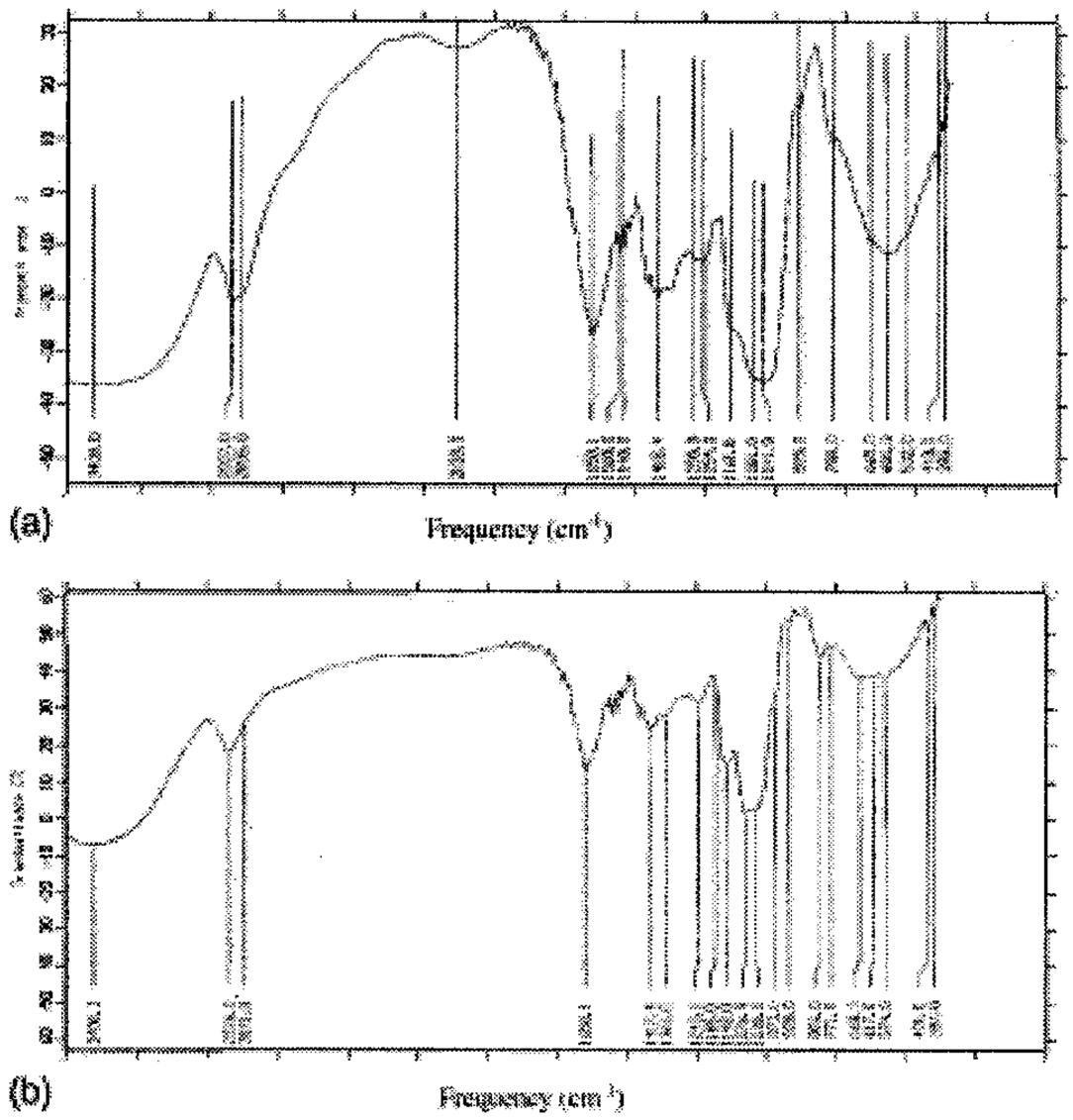


Fig. 49. FT-IR spectrum comparison of: (a) -glucan (standard) from Lentinus edodes and (b) acidic proteo-heteroglycan from *Phellinus* sp.

좀 더 자세한 당의 결합양상을 알아기보기 위하여 NMR을 측정한 결과를 Fig. 50에 나타내었다. FT-IR에서 나타난 것과 유사하게 당의 configuration 104.86와 약 100.51에서 -conformation확인되었다 (Fig. 49). 또한 당의 많은 부분이 메틸화가 일어나 있음을 확인 할 수 있었다 (Fig. 50).

※ 현 분석 체계에서는 β-glucan의 정량 분석이 불가능하므로 정성분석 결과만 도출할 수 있음. 정량 분석결과는 추후 실시할 예정임.

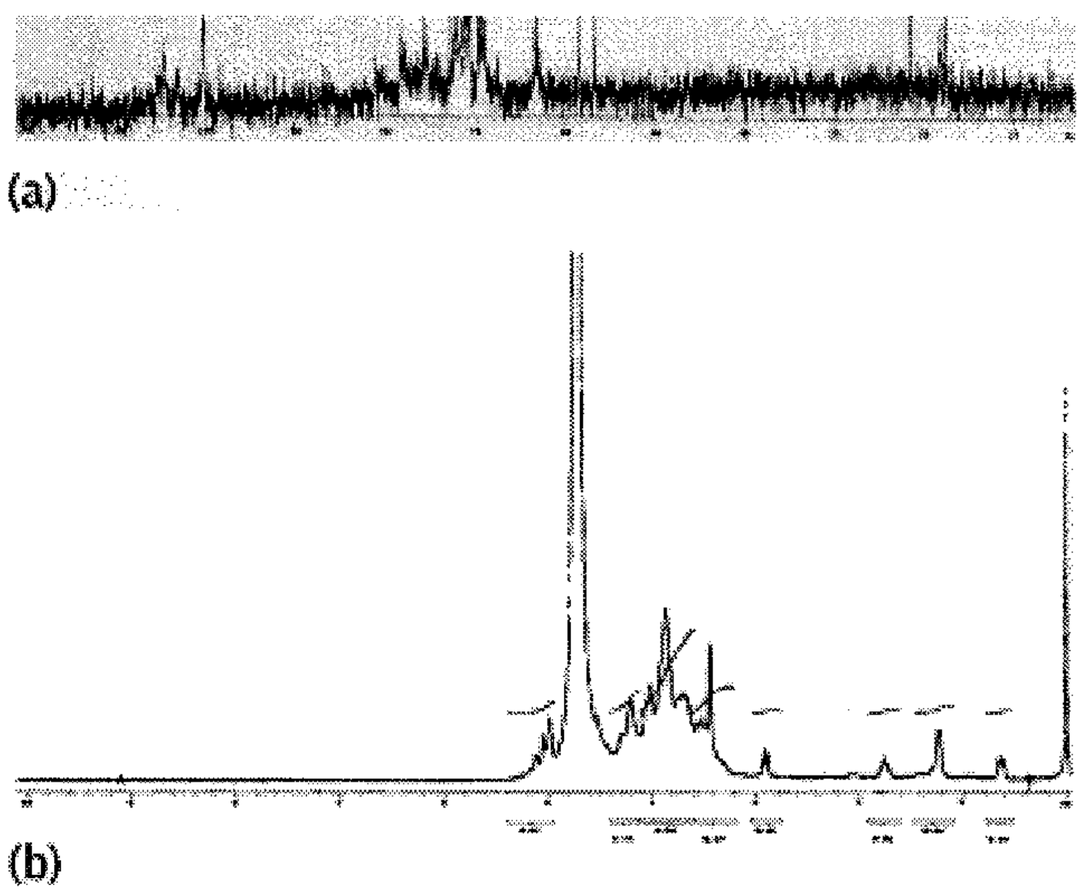


Fig. 50. NMR spectrum of acidic proteo-heteroglycan in D_2O: (a) 13C-NMR and (b) 1H-NMR.

4. 향기분석

종균이 생산하는 휘발성성분분석의 기초 자료로서 3 종류의 상황버섯의 향기성분(휘발성성분)을 분석하여 비교하였다 (Fig. 51). 또한 휘발성분의 종류와 그 차이는 Table 2에서 보여주는 것과 같다.

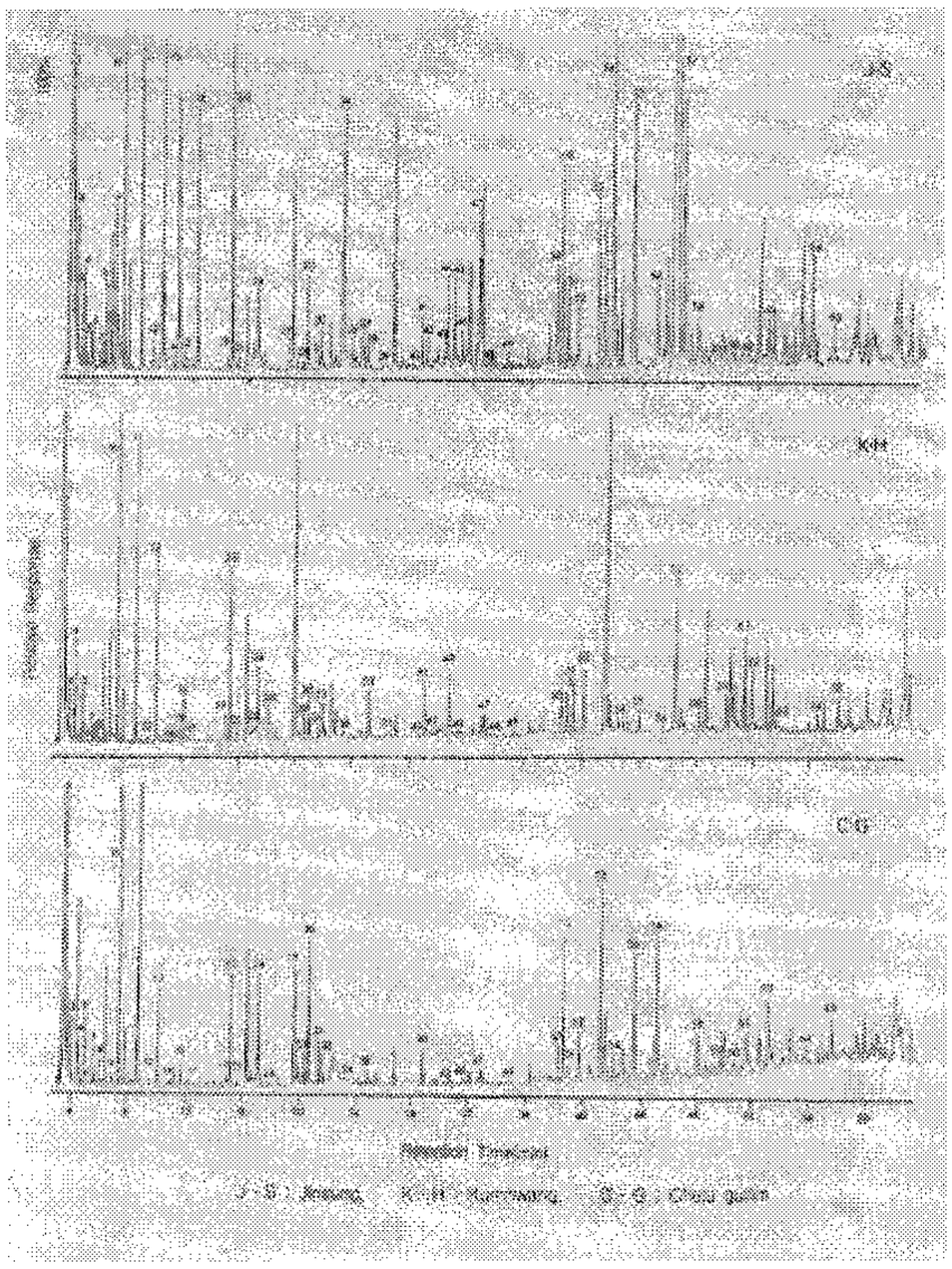


Fig. 51. Gas chromatograms of volatile components from three kinds of *Phellinus* sp.

종균이 생산하는 주류의 휘발성성분분석의 기초 자료로서 국내산 상황버섯 중 산지와 품종이 다른 세 종류의 시료를 선택하여 휘발성 향기성분을 분석하여 비교하였다. 세 종류의 상황버섯은 모양과 색깔이 서로 달랐다. 휘발성 향기성분의 추출은 SDE법으로 하였고, 분석 및 동정은 GC, GC-MS를 이용하였다. 각 시료의 개스크로마토그램은 Fig에 나타내었고 추정 또는 동정된 화합물의 결과는 Table 3에 나타내었다. 총 65종의 휘발성성분이 동정되었다. 관능기별로 alcohol류가 7종, aldehyde류가 15종, ketone류가 12종, ester류가 8종, hydrocarbon류가 10종, furan류 3종, phenol류 3종, acid류 2종 및 기타 5종으로 나타났다. 확인된 성분 중 주성분은 저 비점의 alcohol류, aldehyde류 및 ketone류 등이었다.

세 종류의 상황버섯 중 공통적으로 동정된 화합물은 ethyl acetate, hexanol, benzaldehyde, 1-octen-3-ol, 2-pentyl furan, (E)-2-octenal 및 octanol등이며 이중 1-octen-3-ol,. E-2-octenal, benzaldehyde등은 다른 식용버섯에서 많이 함유되어 있는 주요 휘발성분이었는데 향이 다른 식용 버섯과 전혀 다른 상황버섯에도 존재하고 있었다. 품종과 산지가 다른 세 시료에서 동정된 화합물은 거의 같았으나 함량적 차이는 다소 있었다.

Table 3. Volatile compounds identified in *Phellinus* sp.

Peak No	Compound	Kovat's Index	jin sung	kum hwang	cheju gullim
1	3-methyl pentane	-	565.78	563.25	11.52
2	ethyl acetate	-	26.15	46.48	15.19
3	3-methyl butanal	735	9.72	30.67	44.20
4	butanol	740	10.36	78.53	10.06
5	pentanal	788	4.90	29.93	20.70
6	1,4-dioxane	803	6.37	5.29	2.28
7	3-penten-2-one	822	4.75	12.48	11.74
8	2-methyl pentenal	842	12.36	10.63	12.63
9	2,4-pentanedione	877	37.56	113.75	3.94
10	hexanal	897	78.26	443.10	219.15
11	furfural	933	69.03	282.39	260.82
12	furfurol	952	10.29	13.33	5.42
13	hexanol	967	78.44	221.84	42.87
14	3-heptanone	985	4.30	17.61	2.67
15	heptanal	1001	4.30	22.26	12.71
16	2-butoxy ethanol	1006	3.08	58.28	1.72
17	2-acethyl furan	1013	4.95	8.09	4.35
18	methoxy benzene	1010	56.74	-	-
19	2-ethyl hexanal	1059	4.84	46.64	6.03
20	benzaldehyde	1064	90.11	252.78	114.06
21	5-methyl furfural	1072	5.95	29.19	4.02
22	1-octen-3-ol	1086	7.54	11.00	10.48
23	2,3-octanedione	1089	17.15	30.94	7.60
24	2-pentyl furan	1093	37.22	103.01	67.99
25	butyl butylate	1095	8.61	-	-
26	(*E,E*)-2,4-heptadienal	1104	-	31.99	2.15
27	limonene	1134	9.80	813.11	67.35
28	2-ethyl hexanol	1139	68.85	37.86	16.21
29	(*E*)-3-octen-2-one	1144	3.64	57.69	19.72
30	phenylacetaldehye	1149	32.08	105.08	87.11
31	(*E*)-2-octenal	1159	7.50	50.87	24.39
32	2-methyl phenol	1162	14.88	71.87	18.46
33	acetophenone	1165	2.91	29.83	5.70
34	coumaran	1183	103.82	37.76	1.55
35	hexanoic acid	1189	15.15	7.99	1.88
36	octanol	1192	8.83	2.12	2.52
37	undecane	1193	24.67	-	-
38	nonanal	1207	13.53	112.32	10.70
39	heptanoic acid	1231	7.96	-	22.57
40	camphor	1247	1.73	22.47	22.44
41	(*E*)-2-nonenal	1265	25.49	141.19	-
42	benzyl acetate	1270	17.66	15.02	-
43	*p*-methyl acetophenone	1287	18.39	228.82	3.67
44	2,4,6-trimethyl phenol	1288	46.23	16.66	4.07

Table 4. continued

Peak No	Compound	Kovat's Index	jin sung	kum hwang	cheju guelim
45	methyl salicylate	1295	47.63	-	2.83
46	dodecane	1302	21.23	16.66	6.08
47	4-ethyl-2-methyl pyrrole	1320	76.44	58.96	9.26
48	benzothiazole	1331	8.32	38.39	1.61
49	2-ethyl hexyl-2-propenoate	1351	13.93	32.73	1.90
50	2-undecanone	1397	73.40	131.89	28.67
51	2-propenyl benzeneacetate	1410	32.94	137.12	13.80
52	(*E,E*)-2,4-decadienal	1422	30.95	173.24	32.13
53	2,3-dihydro-5,7-dimethyl -1H-inden-1-one	1445	90.05	1251.03	157.18
54	phytol	1459	191.64	42.36	22.82
55	hexyl butylate	1480	187.11	71.60	90.05
56	3-octyl phenol	1504	60.12	26.65	92.57
57	α-cedrene	1518	1678.65	436.49	-
58	α-ionone	1545	59.14	76.41	28.25
59	geranyl acetone	1575	8.30	136.65	23.94
60	β-ionone	1589	29.77	58.80	19.61
61	α-longipinene	1603	36.45	274.30	3.82
62	α-selinene	1634	14.44	221.42	33.30
63	β-selinene	1672	47.21	51.30	59.30
64	diphenyl methane	1706	98.23	89.16	30.66
65	ethyl dodecanoate	1807	77.00	183.76	70.35

*peak area of each compound / peak area of internal standard (I.S) × 100

Ⅴ. 제품의 영양·식품학적분석 및 약리성분의 증대 방안 확립

1. 생산된 주류에 대한 영양·식품학적 분석

상황버섯 균사체 (PI-21)로서 발효한 약주의 영약·식품학적 분석의 일환으로 주류내의 당 분석과 유기산 그리고 알코올의 종류를 분석하였다.
결과는 Table5,6,7에서 보이는 바와 같다.
당의 분석결과는 대체적으로 Glucose와 Sucrose가 많은 양으로 분석되었다.

Table5. 상황버섯 발효주 중의 당류분석

Sample / Saccharide(mg%)	Sample 1	Sample 2	Sample 3	Sample 4
Fructose	15.7	19.13	11.86	14.66
Sorbitol	72.92	75.91	75.07	71.99
Glucose	252.95	280.26	236.68	149.55
Sucrose	295.62	300.60	401.79	226.21
Maltose	-	-	-	-
Total	636.57	675.90	725.40	462.41

유기산의 분석결과는 Table6에서 보이는 바와같이 Lactic acid가 많은 양을 하지 않고 있었다.

Table6. 상황버섯 발효주 중의 유기산의 분석

Sample / Organic acid (mg%)	Sample1	Sample 2	Sample 3	Sample 4
Citric acid	-	36.27	36.46	41.88
Tartaric acid	-	-	-	-
Matic acid	-	66.96	-	-
Succinic acid	38.38	36.86	33.86	31.20
Lactic acid	305.45	307.04	396.24	226.04
Acetic acid	130.28	129.06	101.48	101.04
합 계	474.11	516.19	568.04	401.06

알코올의 분석결과는 Table 7에서 보이는 바와 같다. 특히 숙취의 원인 물질인 Acetaldehyde가 매우 낮고, 건강에 해로운 Methylalcohol이 전혀 없는 것이 본 주류의 특징으로 들수 있다.

Table 7. 상황버섯 발효주의 Alcohol분석

Sample / Alcohol (ppm)	Sample1	Sample 2	Sample 3	Sample 4
Acetaldehyde	19.39	20.12	17.02	21.37
Acetone	0.37	0.58	1.56	0.76
Methyl acetate	-	-	-	-
Ethyl acetate	308.07	484.03	238.49	246.23
Methyl alcohol	-	trace	-	trace
2-butanol	-	-	-	-
n-propanol	69.05	75.86	63.45	80.89
Isobutanol	195.10	214.44	154.25	186.89
Isoamylacetate	1.85	2.57	1.44	1.49
n-butanol	2.86	-	3.43	3.89
Isoamylalcohol	532.25	592.73	443.54	521.42
Ethyl caproate	1.19	0.69	-	-
Fufural	-	12.23	-	-
Benzaldehyde	-	3.11	-	6.10

2. 생산된 주류에 함유된 약리물질 분석

2-1. 혈전용해기능

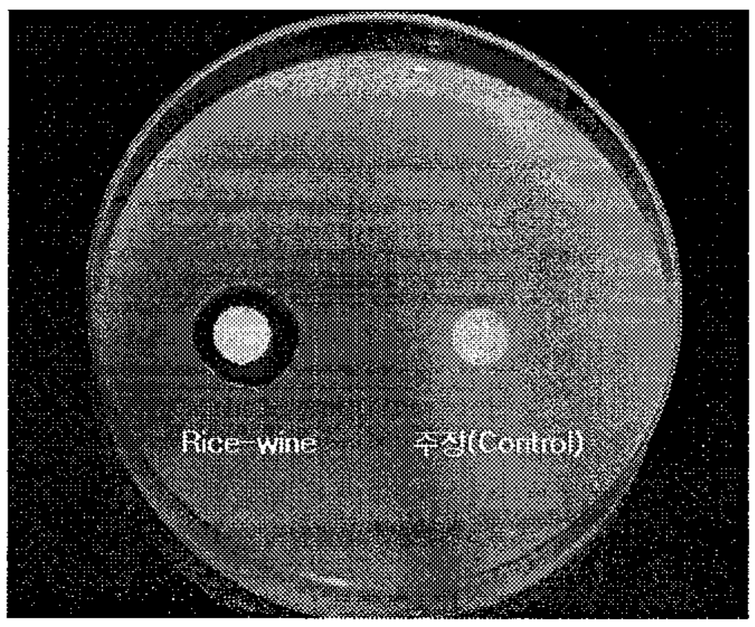


Fig.52 상황버섯 발효주의 혈전용해 효과

Fibrin plate (혈전 plate)에 상황발효주 (Rice wine) 와 일반술(주정)을 떨어뜨린 (분주한) 결과, 상황버섯 발효주 주변에서는 혈전이 녹아 clear zone이 형성된 것을 알 수 있었다.

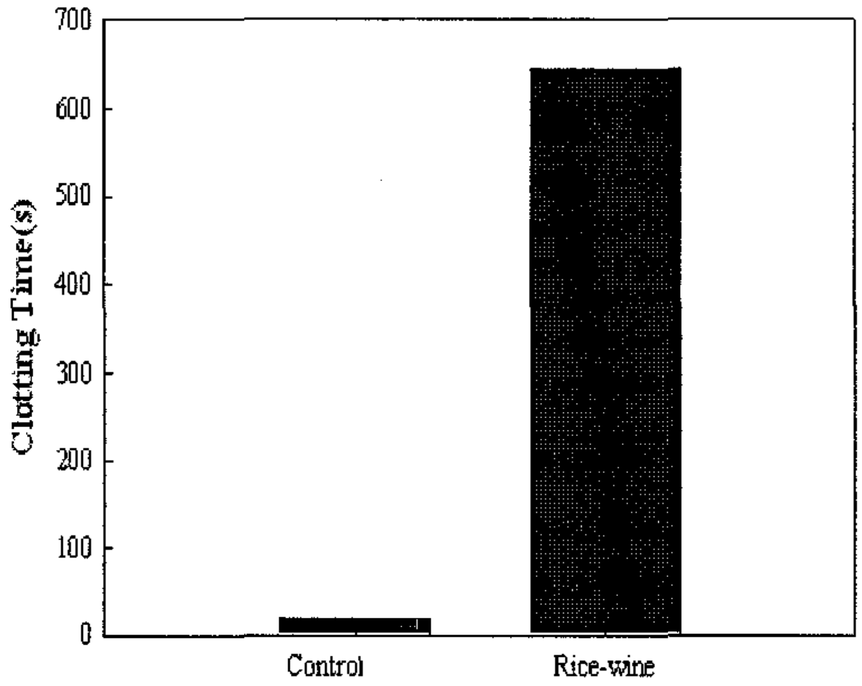


Fig.53 상황버섯주의 Anti-thrombin 활성

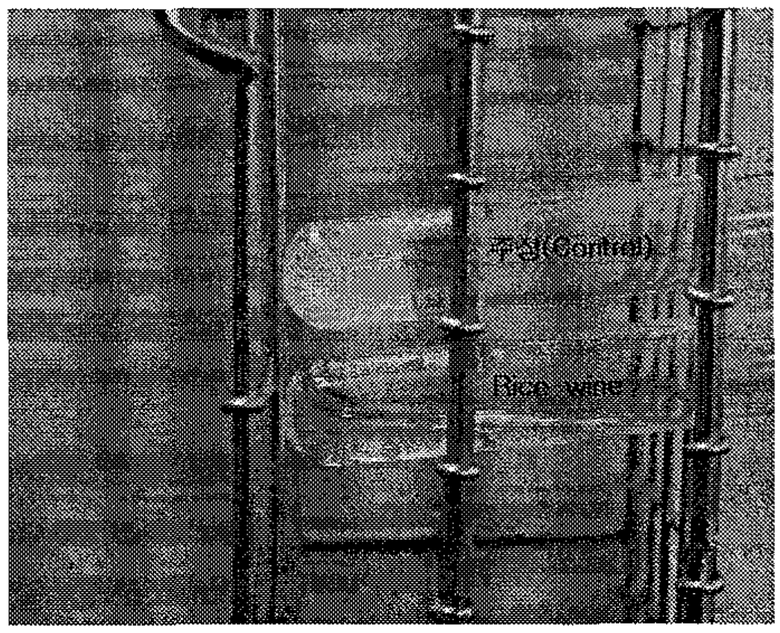


Fig. 54 상황버섯주의 Anti-thrombin 효과

시험관에 일반술 (주정, 위쪽)과 상황버섯 발효주(아래)를 각각 넣고 혈전을 넣었을 때, 나타나는 결과로 이는, 상황버섯 발효주에 의해 혈전 형성을 예방할 수 있음을 알 수 있다.

2-2. GOT · GPT의 영향

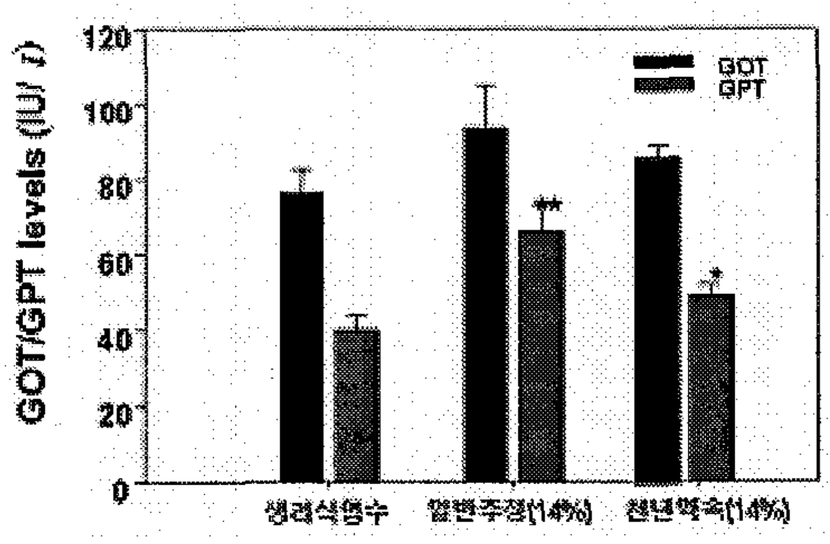


Fig. 55 상황버섯 발효주의 GOT · GPT의 영향

일반적으로 간에 질병이 있으면 GPT가 상승하고 GOT 는 심장 질환의 경우에 주로 상승한다. GOT는 간, 심근, 골격근, 적혈구에 많이 존재하기 때문에 심근경색, 용혈 등을 진단하는 데 이용되고 GPT는 주로 간에 분포하기 때문에 간장질환의 중요한 지표가 됩니다. 따

라서 이 두지표는 간의 질환을 예측하는 지표가 되고, GOT의 경우는 앞서 말한 것과 같이 심근이나 골격근의 이상에서도 증가하게 된다.

본 실험결과는 혈액속에 있는 GOT 및 GPT수치를 본 것이다. 상황버섯 발효주인 천년약속을 먹인 쥐는 일반주정을 먹인 쥐보다 GOT 및 GPT수치 모두 감소되는 결과를 얻었다. 특히 간에서만 존재하는 GPT의 수치가 현저히 감소하는 것을 보아 술로 인한 간의 손상을 최소화시켜는 것으로 판단된다.

2-3. 간조직에 미치는 영향

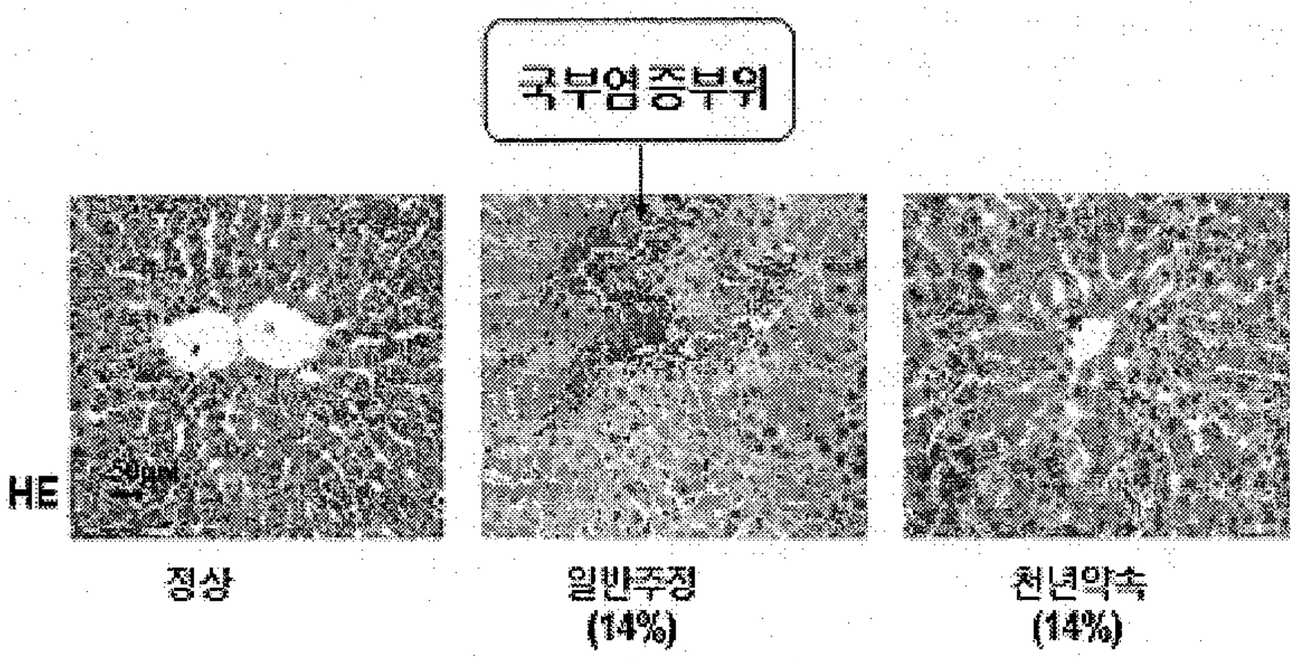


Fig.56 상황버섯 발효주가 간조직에 미치는 영향

일반주정을 식이한 쥐의 간조직은 국부 염증부위가 관찰되지만, 천년약속을 식이한 간조직은 정상적인 간조직과 비슷한 결과를 보였다. 따라서 천년약속은 간의 염증질환에 거의 영향을 주지 않을 것으로 판단된다.

이상 천년약속은 술로인한 일반적인 간 질환을 완화시켜줄 것을 확신한다.

2-4. 혈중 총 콜레스테롤과 총 지질저하 효과

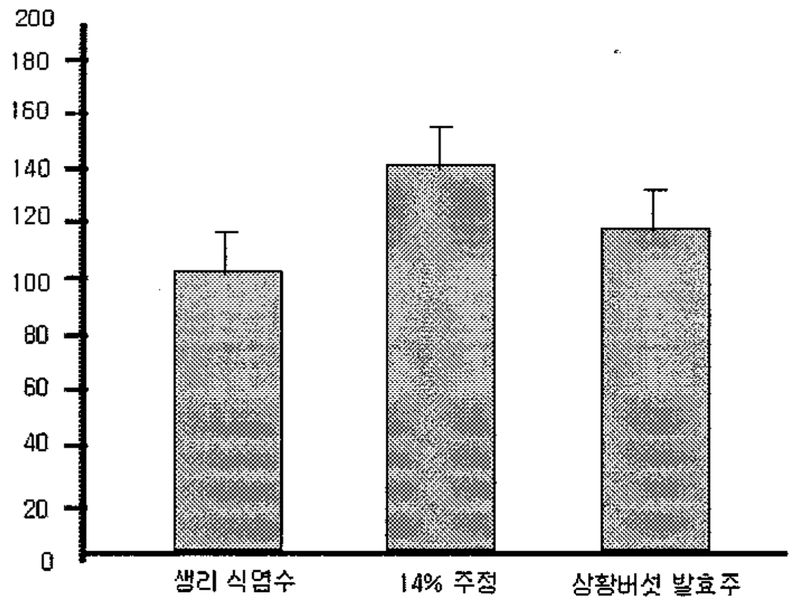


Fig.57 Cholesterol 저하 효과

혈중의 콜레스테롤은 혈관에 침착하여 동맥경화증을 일으켜 혈관의 기능을 약화시킨 결과 고혈압을 일으킬 수 있다. 상황 버섯 발효주는 Fig. 57에서 알 수 있듯이 Total

Cholesterol 농도 증가가 일반 술에 비해 아주 낮다. 따라서 .콜레스테롤의 수치저하 등에 의한 성인병 예방의 효과를 기대할 수 있을 것이라 생각된다.

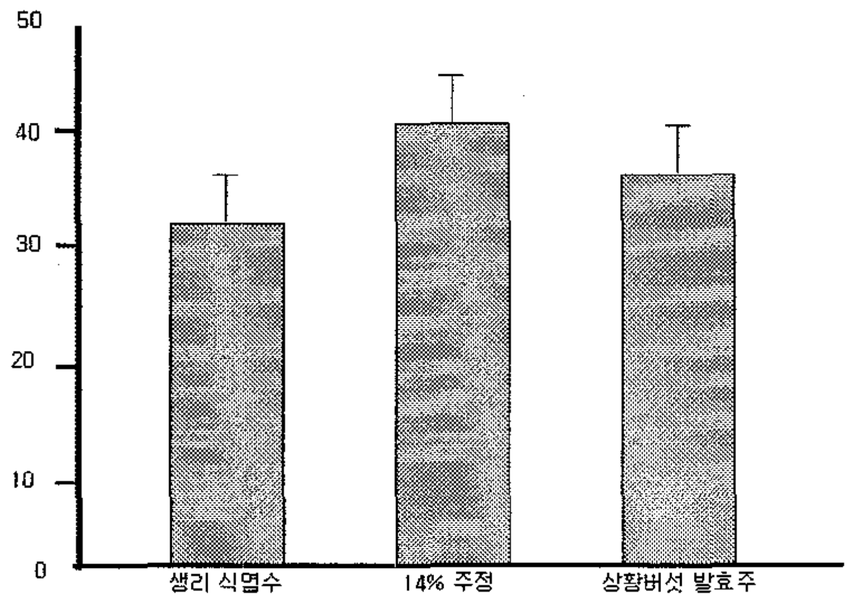


Fig.58 혈중 지질 수치의 저하효과

Fig.58의 결과를 통해 알 수 있듯이 동물 실험에 의해 혈중 지질 수치를 저하시키는 것을 알 수 있었다. 따라서 고지혈증, 동맥경화, 심장병, 협심증, 고혈압 등 성인병 예방의 효과가 기대된다.

3. 주류에 약리성분을 증가하기 위한 식품학적 대책

주류에 함유되는 약리성분은 여러가지 성분의 복합체인 것으로 추정하고 있으나 그 중 항암성분인 β-glucan 다당체의 증가를 첫째 목표로 삼았다. 그러나 상황버섯 균사체 배양에 의하여 세포외로 분비되는 다당체의 양을 증가시키는 것은 다양하게 시도 해보았으나 한계가 있음을 절감할 수 있었다. (data는 제시 않음)

그래서 식품학적으로 가능한 방법으로서 상황버섯 자실체에서 다당체 추출물을 첨가하는 실험을 하였다. 그러나 이 방법은 다당체의 함유량은 다소 증가시킬 수는 있었으나 주류제품의 고유의 맛과 향을 나쁘게 하는 요인이 되어 더 이상 진행하지 않기로 결론을 내렸다.

(※ 이 항의 data는 기업의 사정상 공개하지 않았으면 하는 기업의 제의를 존중하므로 이해를 바람.)

4. 향과 맛을 개발하기 위한 식품학적 대책구축

4-1. 신맛을 위한 대책

발효후 최종 제품의 pH는 약 3.5~ 3.8정도가 적당하다고 사료된다. 그러나 pH3.0전후가 되어 발효과정 중 잡균오염이 심할 경우 초산발효가 실할 수 있으므로 발효 탱크의 소독과 살균작업을 철저히 하도록 하였다. 발효 탱크 살균후와 살균전의 제품의 pH가 다른 것을 Fig.59에서 알 수 있다.

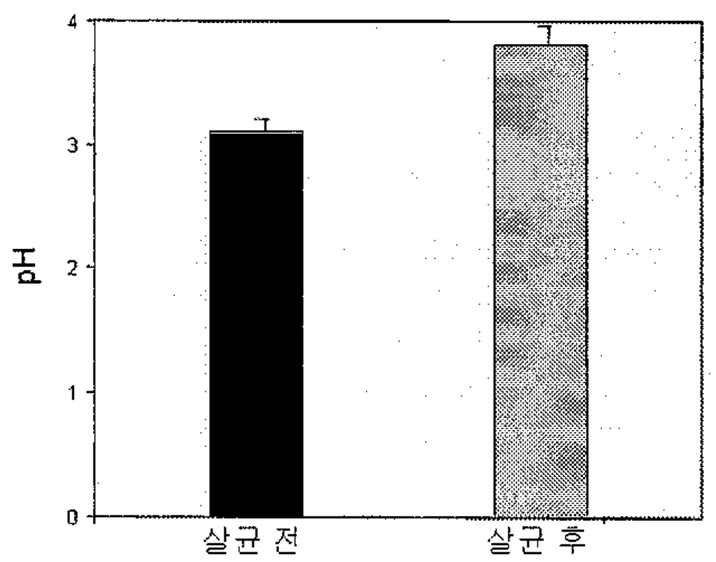


Fig.59 살균 전 후의 제품 pH비교

4-2. 레진 사용을 통한 acetic acid의 제거

제품의 텁텁한 산미를 일으키는 원인 물질은 acetic acid이다. 초산미를 없애기 위하여 가종 레진을 사용하는 시험을 하였다. 그 결과는 Fig.60에서 보인다.
레진 3이 텁텁한 맛을 내는 초산을 제거하는 효과가 컸다.

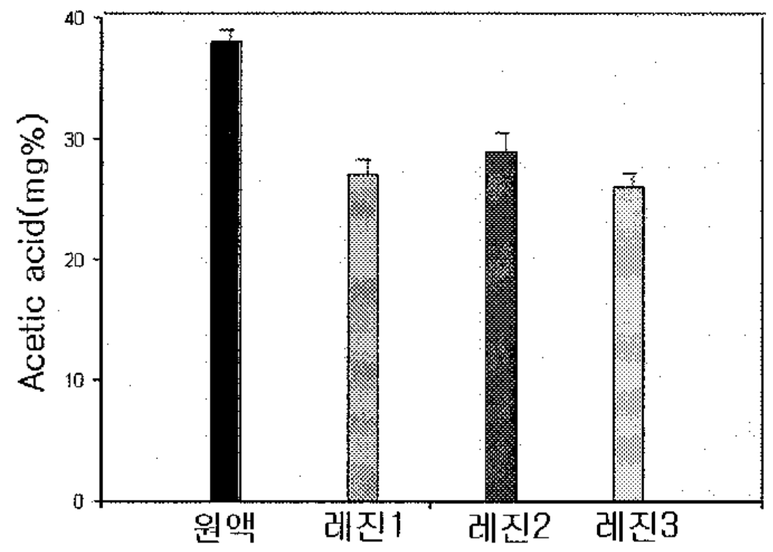


Fig.60 레진에 의한 acetic acid의 제거
(※ 회사 사정상 레진의 종류를 밝히지 못함을 이해바람)

4-3. 향의 개선을 위한 대책

곡류 발효주의 약점이라면 제품생산 후 누룩의 영향을 받은 누룩냄새와 시간의 경과에 따른 좋지 못한 향의 발생이 큰 문제점으로 들 수 있다.이를 해결하기 위하여 흡착제를 사용하였다. 결과는 흡착제 사용 후 소비자의 선호도를 조사하여 백분율로 환산 했으며 수치가 높을수록 향이 좋은 것으로 나타난다. 결과는 Fig.61에서 보이는 바와 같이 흡착제 X-1에 의한 선호도가 높은 것으로 나타났다.

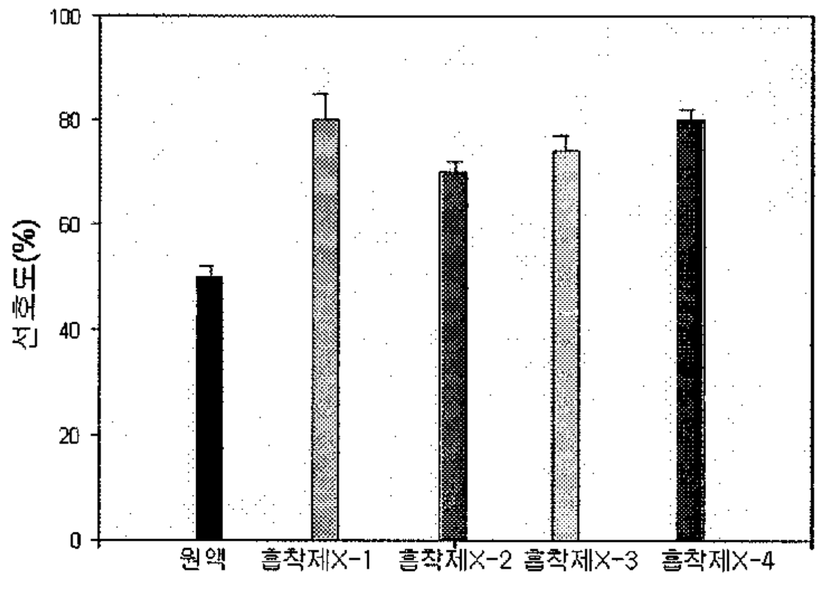


Fig.61 여러 흡착제를 통한 향의 개선 결과

5. 생산 주류 고유 향의 분선

상황버섯 균사체가 분비하는 알코올을 이용한 상황버섯 균사체 발효주인 '천년약속' 이용하여 술의 기호성에 관계되는 휘발성 향기성분을 GC 및 GC-MS로 분석, 동정하여 Table 8에 나타내었다. 휘발성 향기성분 농축물의 수량은 12.5mg% 였으며 관능적 특징으로는 꿀향, 맥주, 곡주 및 와인향 등이 느낄 수 있었으며, 특히 꽃향기와 벌꿀향 등의 달콤한 냄새를 강하게 느낄 수 있었다. 상황버섯 균사체 발효주의 휘발성 향기성분으로는 3-methyl butanol, phenylethyl alcohol 등의 alcohol류 15종, acetic acid 등의 acid류 6종, ethyl acetate, diethyl butanedioate 등의 ester류 (1.60%) 12종, propyl benzene 등의 hydrocarbon류 (0.32%) 4종, δ-decalactone 등의 ketone류 (0.28%) 3종, phenol류, acid류 (0.48%) 및 기타 (3.57%)등 총 43종의 화합물을 추정 또는 동정하였다.

5-1. Ester류

주류에서 ester는 함유량은 적으나 방향(芳香)을 가지고 있어 alcohol보다 향의 기여도가 큰 성분이다. Ester는 일반적으로 대부분의 냄새성분을 가지며 과일향기의 주성분이기도 하다. 또한, 탄소수가 10 이하인 화합물은 거의 과일향이나 분자량이 커지면 향기가 농후해지고 과일향보다 꽃 향이 강해지는 경우가 있다(11,12). Ethyl acetate는 과일향, 파인애플을 연상시키는 특징적인 에스테르향으로 맥주와 일본소주의 주요 에스테르 성분이기도 하며, 누룩에 존재하는 젖산균에 의해 생성된 것으로 생각된다. 이 성분은 맥주에서 함량이 높으면 오히려 쓴맛의 원인이 되는 것으로 알려져 있다. 딸기향인 ethyl lactate (ethyl-2-hydroxy propanoate), 배, 바나나향의 ısoamyl acetate (3-methylbutyl acetate), ethyl caprylate (ethyl octanoate), 벌꿀향인 2-phenylethyl acetate, 포도향인 ethyl decanoate(13) 등이 동정되었다. 2-Phenylethyl acetate는 phenylethyl alcohol이 초산으로 ester화 되어 생성되며, 벌꿀향을 비롯한 장미향, 사과향 등의 여러 종류의 향미를 생성함으로 fantasy 향료나 과실 에센스 제조에 많이 이용되는 좋은 향기성분(12,14)이다. 탄산수나 시럽의 향료로 사용되는 isoamyl acetate는 배, 바나나, 사과의 향미에도 생성되는 주요 ester류이다. 이와 같은 각 ester의 유무와 함량의 차이는 술의 전체적인 향기 형성에 크게 영향을 미칠 것으로 생각된다.

5-2. Alcohol류

Alcoho류는 증류주에서 다량 존재하는 대표적 향기성분으로, 본 실험에서 사용한 흡착법으로는 3-methyl butanol, phenylethyl alcohol의 함량이 현저하게 높았다. 2-Methyl propanol의 함량이 3-methyl butanol보다 높으면 맥주의 관능상 품질이 저하되는 것으로 보고 되어있으며 본 실험에서 모두 3-mthyl butanol의 함량이 2-methyl propanol의 함량보다 현저하게 높았다. 휴젤류성분 중 아미노산 발효로 생성되어 바나나 향을 나타내는 3-methyl butanol은 감미를 지닌 방향성분으로, leucine으로 부터 생성되고 ethanol과 함께 소주 및 기타 주류의 주 향기성분으로 알려져 있다(12). 또한, 2-methyl propanol은 청주, 일본소주 및 맥주에서도 검출 된 바 있다(15). 1-Propanol은 중국 주류인 마이오타이주에서 함량이 높은 것으로 알려져 있고, 2,3-Butanediol은 맥주, 포도주 및 탁주 등의 주류나 빵, 치즈 등의 발효식품 등에 1~500 ppm정도 함유되어 풍미를 부여하는 지방족 2가 성분으로 알려져 있으며(12,17) 많은 양이 검출되었다. 시료에서 전체 peak area % 중 대부분을 차지하는 phenylethyl alcohol은 장미향으로서 술덧에서 효모의 아미노산 발효에 의하여 아미노산에 대응하는 고급 alcohol이 생성된다(16). Phenyl alanine에서 장미향의

phenylethyl alcohol이 생성된다고 보고된 바 있으며(18,19), 이는 상황버섯 균사체 발효주의 향긋한 꽃 향에 기여하는 중요한 성분으로 생각되어진다.

5-3. Acid류 및 hydrocarbon류

유기산인 acetic acid는 자극취를 나타내는 산미로 미생물에 의한 산화생성물(12)로 상황버섯 발효주에는 소량 함유되어 있었다. Hydrocarbon류는 L- limonene, dodecane이었으며 L-limonene은 terpene 탄화수소로 감귤류의 주요성분이며 dodecane은 직쇄탄화수소로 술 향기에 크게 관여하지 않을 것으로 생각되어진다.

5-4. Lactone류

Lactone류는 자연 중에서 있는 비교적 향기가 좋은 화합물이며, 상황버섯 균사체의 발효주에서는 benzaldehyde 및 4-vinyl-2-methoxy phenol이 검출되었으며 4-vinyl-2-methoxy phenol은 많은 양이 확인되었다.

Table 8. Volatile compounds identified in *Phellinus* sp.-fermented alcoholic beverage

Peak[1] No	t_R(min)	Compound	Sample[2] A[3]	B[4]	C[5]
1	1.758	ethanol[6]	997.67	163.39	425.89
2	2.164	1-propanol[6]	29.38	43.74	62.68
3	2.415	hexane[6]	-	192.12	112.58
4	2.568	ethyl acetate[6]	64.86	79.63	31.22
5	2.719	2-methyl propanol[6]	194.22	1228.30	176.50
6	3.242	acetic acid[6]	6.10	13.42	3.64
7	5.143	3-methyl butanol[6]	2885.59	7033.57	1597.43
8	5.185	2-methyl butanol[6]	398.54	1060.54	326.96
9	6.277	isobutyl acetate[6]	-	8.95	-
10	6.813	2,3-butanediol[6]	264.55	50.00	28.98
11	7.098	ethyl butanoate[6]	51.17	22.40	11.82
12	7.775	ethyl-2-hydroxy propanoate[7]	6.75	55.58	69.05
13	8.872	3-ethoxy-1-propanol[6]	3.33	37.03	-
14	9.739	2-methyl octane[7]	-	-	2.61
15	10.019	3-methyl octane[7]	-	-	2.65
16	10.033	hexanol[6]	6.35	28.15	-
17	10.068	3-methylbutyl acetate[6]	38.92	75.64	23.73
18	10.333	2-methylbutyl acetate[6]	13.91	15.21	4.05
19	10.839	3-methyl butanoic acid[6]	-	6.06	6.54
20	11.199	nonane[6]	-	6.13	17.91
21	11.807	dihydro-2(3H)-furanone[7]	3.50	15.11	6.79
22	12.994	ethyl-3-hydroxy butyrate[6]	-	25.33	2.50
23	13.647	propyl benzene[6]	11.85	-	14.50
24	13.743	1-ethyl-2-methyl benzene[7]	7.68	-	-
25	13.842	benzaldehyde[6]	14.39	91.71	19.90
26	14.111	heptanol[6]	3.75	-	4.70
27	14.404	methionol[6]	19.42	58.88	-
28	14.817	2-pentyl furan[7]	7.42	-	-
29	15.157	decane[6]	-	7.57	21.45

30	15.227 ethyl hexanoate[6]	-	14.93	38.23
31	16.162 L-limonene[6]	3.39	11.29	18.04
32	16.302 2-ethyl hexanol[6]	12.90	91.09	39.22
33	17.335 hexanoic acid[6]	14.87	8.95	37.98
34	17.826 2-propanol[6]	49.28	376.64	215.66
35	18.041 heptanoic acid[6]	51.57	58.05	-
36	18.788 undecane[6]	-	13.39	13.18
37	19.982 phenylethylalcohol[6]	9887.33	6808.55	4909.56
38	21.018 ethyl benzaldehyde[7]	-	6.64	5.63
39	21.866 dodecane[6]	33.50	493.85	13.03
40	22.096 ethyl octanoate[6]	10.02	134.52	50.97

Table 9.(continued)

Peak[1] No	t_R(min)	Compound	Sample[2] A[3]	B[4]	C[5]
41	22.672	octanoic acid[6]	-	130.94	32.23
42	22.929	diethyl butanedioate[6]	62.18	61.05	3.74
43	24.011	2-phenylethyl acetate[6]	21.45	60.98	62.70
44	24.225	dipropyl butanedioate[6]	4.09	32.45	-
45	24.250	3-ethyl acetophenone[7]	-	34.00	18.00
46	24.832	4-ethyl acetophenone[6]	-	11.49	7.43
47	25.212	phenylacetic acid[7]	4.06	7.05	7.86
48	25.883	4-vinyl-2-methoxy phenol[7]	590.50	35.44	2.81
49	27.196	dihydro-5-pentyl-2(3H)-furanone[7]	50.30	14.63	3.70
50	27.355	decanoic acid[6]	6.24	17.10	6.68
51	29.325	4-hydroxy-benzeneethanol[7]	368.73	802.32	484.53
52	29.703	4-methylmethoxy phenol[7]	20.63	78.67	-
53	30.954	δ-decalactone[6]	4.74	-	-
54	32.610	α-hydroxy-benzene propanoate[7]	5.90	-	-
55	32.748	ethyl decanoate[6]	26.02	27.43	16.16
56	33.156	hexyl salicylate[7]	3.58	-	-
57	37.267	tetradecanoic acid[6]	3.16	-	-
58	37.648	1H-indole-3-ethanol[6]	613.72	329.05	131.20
59	42.105	hexadecanoate[6]	5.90	8.22	9.52

[1]Peak number in Fig. 2.

[2]Peak area of each compound / peak area of internal standard (I · S) × 100

[3]*Phellinus* sp.-fermented alcoholic beverage

[4]Bekseju

[5]Bekhwasubok

[6]The compound was identified by comparing its mass spectral data and retention time with those of the reference compound.

[7]The compounds were tentatively identified by comparing its mass spectral data with those reported in the literature.

6. 제품의 소비자 선호도를 높이기 위한 대책의 확립

제품의 선호도는 주류에 함유되어 있는 많은 요인이 있으리라고 사료된다. 그 중에서도 당의 종류와 함량 그리고 산도가 결정적인 요인이 될 수 있다. 그 중 산도는 앞서 (4-1)에서 언급되었으므로 이 항에서는 당의 control에 대하여 논하기로 한다. 물론, 아미노산의 성분과 함량도 소비자의 선호도에 결정적인 작용을 하지만 아미노산 분석은 3년차에 계획되어 있으므로 차기년도에 하기로 한다.

결과는 Table10에서 보이는 바와 같이 흡착제 X-1이 sorbitol과 glucose의 비율을 높이는 것으로 나타났다. 이 결과는 위의 결과 (4-3)의 소비자의 향선호도와 일치하며 제품 맛을 부드럽게 하는 좋은 결과라 사료된다.

Table 10. 각 종 흡착제에 의한 당 함량의 변화

흡착제 / 당(mg%)	원액	X-1	X-2	X-3	X-4
Sorbitol	119.2	153.8	141.9	118.9	152.7
Glucose	187.2	197.8	197.9	194.6	190.8

VI. 고 선호도 주류 제품의 완성

1. 주류 제품화를 위한 단백질, 유리아미노산, 지질당, 미량원소등의 성분 분석을 위한 제품 규정에 맞게 기준을 확립

1-1. 개발 주류의 단백질 측정

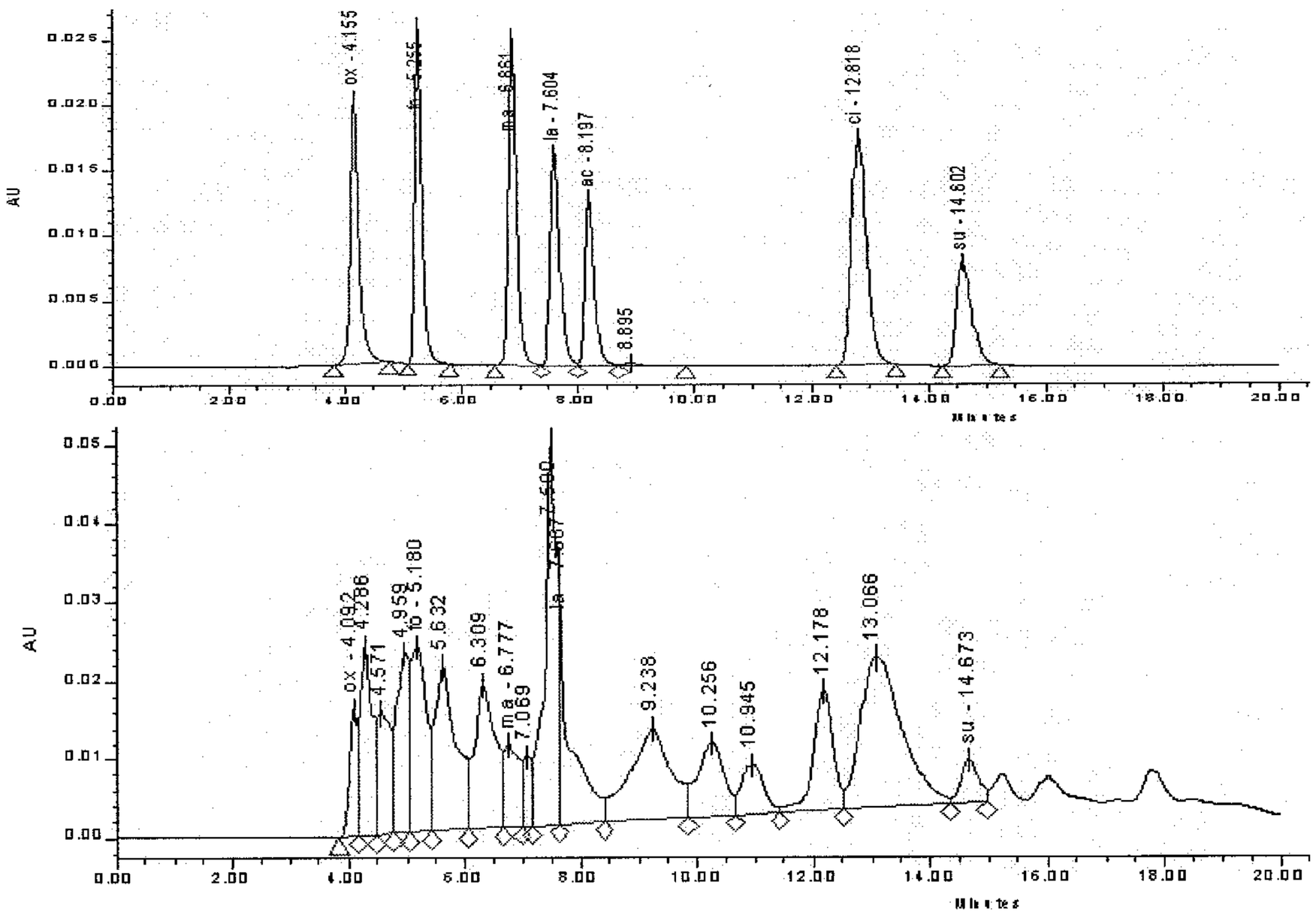
상황버섯 균사체 발효주에 포함되어 있는 단백질의 총량을 bovine serum albumin을 표준 단백질로 하여 Bradford 발색방법으로 Braford 시약(BioRad 회사제품)을 사용하여 측정하였다. 이 때 상황버섯 균사체 발효주의 단백질 양을 비교하기 위하여 시판 중인 타사 약주 제품과 청주 제품의 단백질 양도 같이 측정하였다. 청주제품은 약주보다 단백질의 양이 현저히 적었으며, 상황버섯발효주와 시판약주의 단백질 양은 비슷하였으나 상황버섯발효주의 경우가 시판 약주 보다 약 14 ug/ml 더 높았다.

제품 (Sample)	단백질 량 (ug/ml)*
상황버섯발효주	58.8
A사 (시판 약주)	44.4
B사 (시판 청주)	7.9

*단백질 양은 세 번의 실험결과를 평균값으로 나타내었음

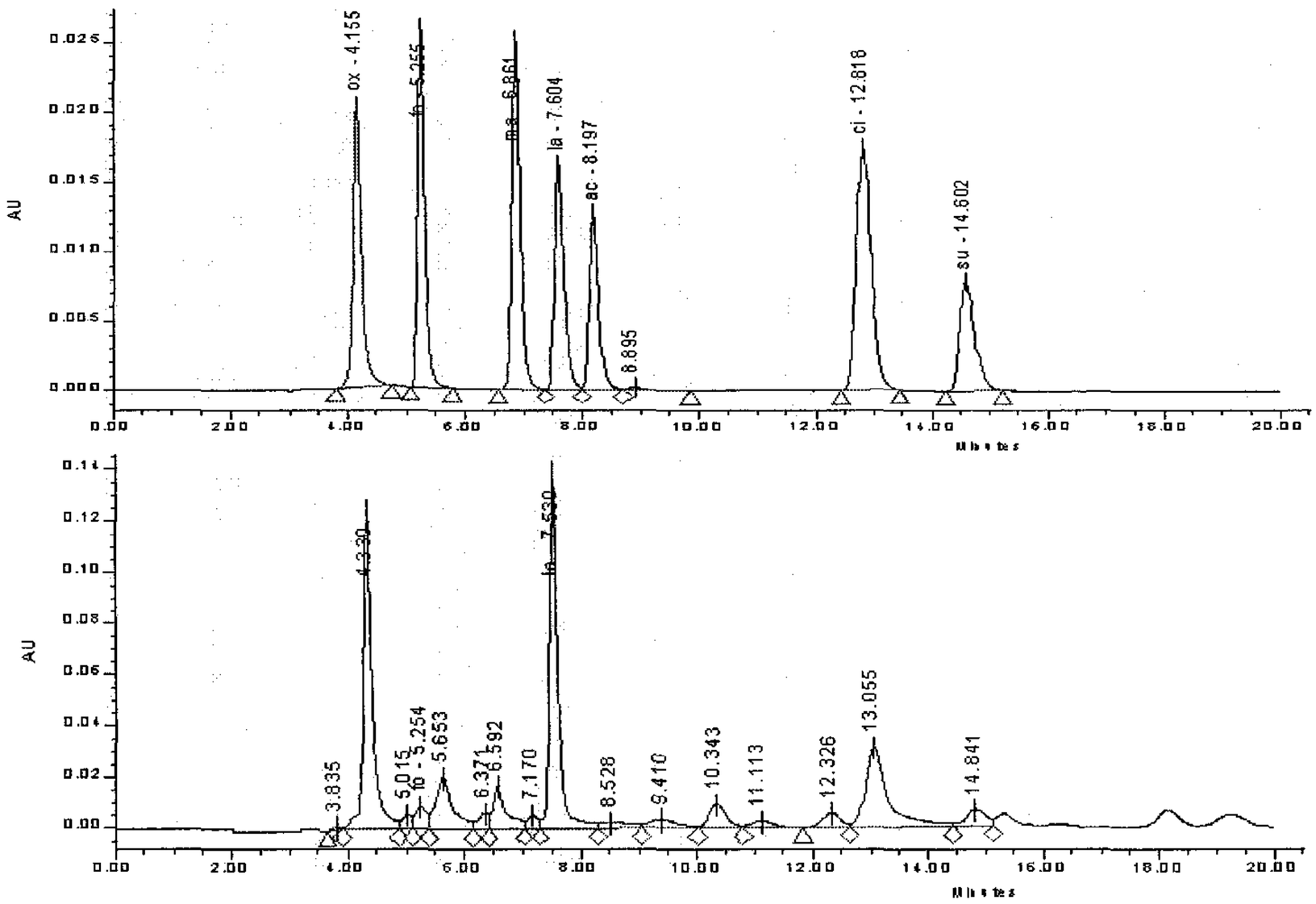
1-2. 개발 주류의 유기산 분석

유기산은 주류의 맛과 높은 상관관계가 있으므로 상황버섯 균사체 발효주에 포함되어 있는 유기산을 HPLC 방법으로 분석하였다. C18 Column (4.6 x 250mm, 5㎛)을 사용하여 상황버섯발효주 내에 존재하는 유기산을 표준 유기산과 retention time을 비교하여 정성분석하였다. 함유된 유기산의 종류를 비교하기 위하여 시판 중인 타사 약주와 청주에 존재하는 유기산도 동일한 조건에서 함께 분석하였다. 상황버섯발효주의 경우 5 종의 유기산(oxalic acid, formic acid, malonic acid, lactic acid, succinic acid)이 검출되었으며 이들 중 formic acid와 lactic acid의 상대적 함량이 높았다. 시판 약주의 경우는 formic acid와 lactic acid, 두 종이 검출되었으며 lactic acid의 함량이 월등히 높았다. 시판 청주의 경우는 oxalic acid, formic acid와 lactic acid, 세 종이 검출되었으며 역시 lactic acid의 함량이 월등히 높았다. 세 주류 중 공통으로 검출된 것은 lactic acid이며, 시판 약주, 시판 청주, 상황발효주의 순으로 상대적으로 농도가 높았다. 이러한 유기산 성분과 상대적 함량의 차이가 각 주류의 맛과 관계가 있다고 생각된다.



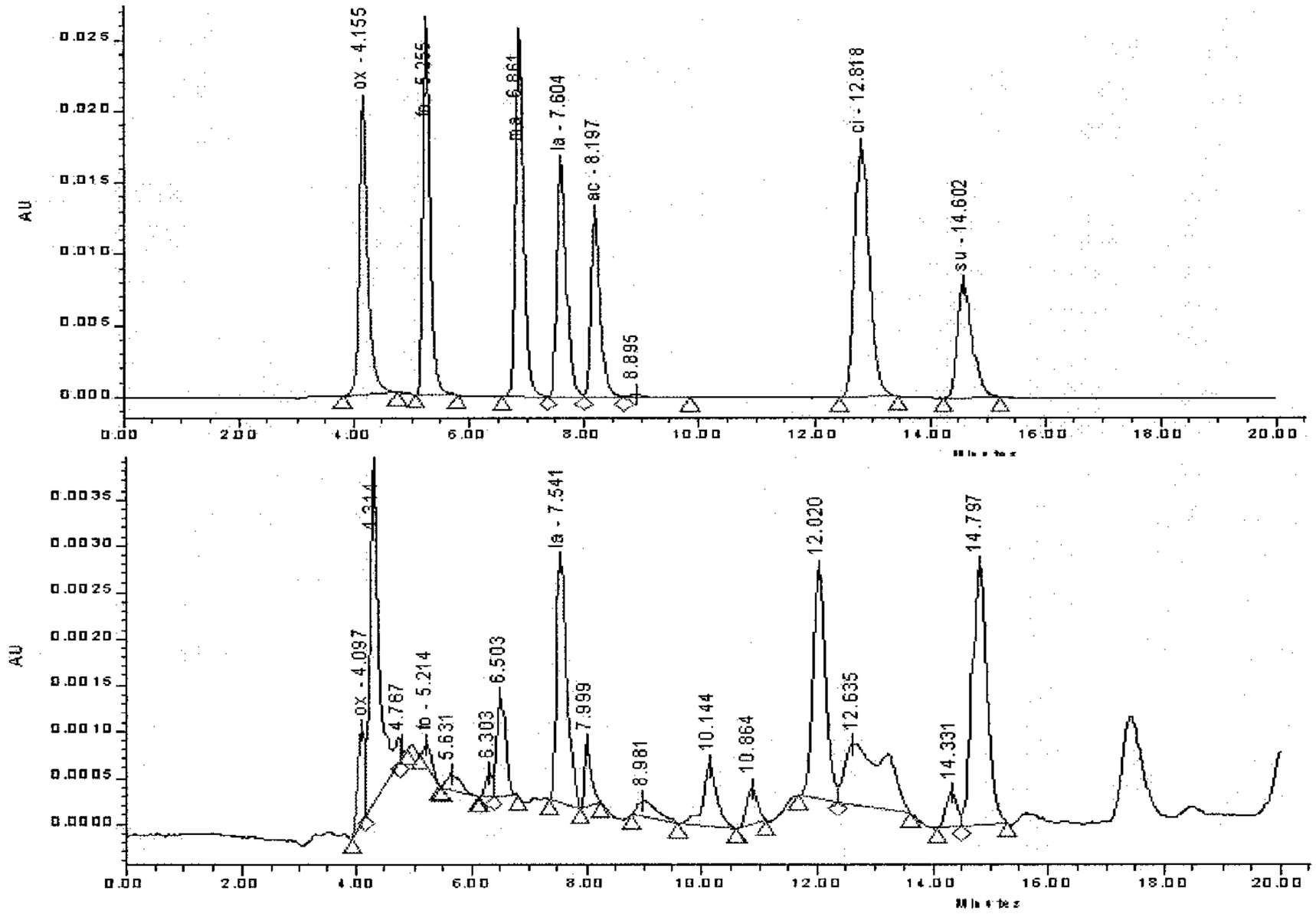
PEAK NUMBER	RT	AREA	% AREA	유기산
1	4.092	156816	2.45	OXALIC ACID
2	4.286	346199	5.41	
3	4.571	262611	4.10	
4	4.959	317722	4.96	
5	5.180	454967	7.11	FORMIC ACID
6	5.632	524085	8.18	
7	6.309	490947	7.67	
8	6.777	171098	2.67	MALONIC ACID
9	7.069	87146	1.36	
10	7.500	736869	11.51	
11	7.667	360812	5.63	LACTIC ACID
12	8.197	ND	ND	ACETIC ACID
13	9.238	578539	9.04	
14	10.256	302829	4.73	
15	10.945	165226	2.58	
16	12.178	368309	5.75	
17	12.818	ND	ND	CITRIC ACID
18	13.066	961655	15.02	
19	14.673	117300	1.83	SUCCINIC ACID

표준 유기산 7종(위)과 상황발효주(아래)의 HPLC 분석 그래프와 상황발효주에서 검출된 peak의 retention time과 일치되는 유기산(표). ND: Not Determined.



PEAK NUMBER	RT	AREA	% AREA	유 기 산
1	3.835	9991	0.18	
2	4.155	ND	ND	OXALIC ACID
3	4.330	1396961	25.63	
4	5.015	73907	1.36	
5	5.254	125061	2.29	FORMIC ACID
6	5.653	433077	7.95	
7	6.371	84610	1.55	
8	6.592	273349	5.01	
9	6.861	ND	ND	MALONIC ACID
10	7.170	73158	1.34	
11	7.530	1370946	25.15	LACTIC ACID
12	8.197	ND	ND	ACETIC ACID
13	8.528	87388	1.60	
14	9.410	121438	2.23	
15	10.343	207766	3.81	
16	11.113	66876	1.23	
17	12.326	119168	2.19	
18	12.818	ND	ND	CITRIC ACID
19	13.055	861792	15.81	
20	14.602	ND	ND	SUCCINIC ACID
21	14.841	145296	2.67	

표준 유기산 7종(위)과 시판 약주(아래)의 HPLC 분석 그래프와 시판 약주에서 검출된 peak의 retention time과 일치되는 유기산(표). ND: Not Determined.



PEAK NUMBER	RT	AREA	% AREA	유기산
1	4.097	8878	3.56	OXALIC ACID
2	4.314	41251	16.52	
3	4.767	547	0.22	
4	5.214	2364	0.95	FORMIC ACID
5	5.631	2756	1.10	
6	6.303	2299	0.92	
7	6.503	10293	4.12	
8	6.861	ND	ND	MALONIC ACID
9	7.541	28637	11.47	LACTIC ACID
10	7.999	5628	2.25	
11	8.197	ND	ND	ACETIC ACID
12	8.981	4484	1.80	
13	10.144	11747	4.70	
14	10.864	5480	2.19	
15	12.020	39706	15.90	
16	12.635	31706	12.70	
17	12.818	ND	ND	CITRIC ACID
18	14.331	5379	2.15	
19	14.602	ND	ND	SUCCINIC ACID
20	14.797	48520	19.43	

표준 유기산 7종(위)과 시판 청주(아래)의 HPLC 분석 그래프와 시판 청주에서 검출된 peak의 retention time과 일치되는 유기산(표). ND: Not Determined.

Table. 11 상황버섯 발효주 '천년약속' 분석결과

분석내용 \ 분석샘플		천년약속
알코올 (v/v, 15℃)		15.46
pH		3.55
색 도 (450nm, Abs)		0.1561
탁 도 (NTU)		8.1
Brix (%)		3.2
총 산 (%, 구연산)		0.6656
HMF (mg/Kg)		58.43
아미노산도 (glycine g/100ml)		0.181
미생물	일반세균	-
	대장균	-
	효모 및 곰팡이	-
제품표기사항	알콜분 (5)	14
	용량 (ml)	375
	원료	쌀, 상황버섯 균사
	유통기한	제조일로부터 1년
	제조원	(주) 천년약속 부산시 기장군 정관면 예림리 926번지
	판매원	(주)천년약속
	주종	약주
Saccharide (mg%)	Fructose	89.11
	Sorbitol	144.78
	Glucose	211.54
	Sucrose	-
	Maltose	-
	합계	445.43
Organic acid (mg%)	Citric acid	41.88
	Tartaric acid	-
	Malic acid	10.75
	Succinic acid	37.06
	Lactic acid	58.87
	Acetic acid	127.59
	합계	733.66
Alcohols (ppm)	Acetaldehyde	19
	Aceton	-
	Mthyl acetate	-
	Eethyl acetate	219.57
	Methyl alcohol	-
	2-Propanol	trace
	n-propanol	98.79
	isobutanol	225.59
	isoamylactate	1.58
	n-butanol	7.71
	Isoamylalcohol	666.05
	Ethyl caproate	trace
	Furfural	17.45
	Benzaldehyde	6.53
	합계	1289.79
Cation (ppm)	Li^+	-
	Na^+	20.25
	NH_4^+	80.1
	K^+	75.78
	Mg^{2+}	65.17
	Ca^{2+}	7.88
	합계	180.49
Anion (ppm)	F^-	435.8
	Cl^-	34.38
	NO_3^-	-
	PO_4^{3-}	160.82
	SO_4^{2-}	98.95
	합계	729.95

상황버섯 균사체 발효주 '천년약속'분석결과 알코올 농도는 15℃에서 15.46%였으며, 색도(450nm, Abs)는 0.156, 탁도 8.1, 총산중 구연산의 농도는 0.67%, 특히 아미노산도(glycine g/100ml)는 0.18로 다른 술에 비해 아주 높게 나타났다.

2. 향과 맛을 소비자 기호에 맞추어 조성비를 확립

2-1 일반사항

본 연구의 관능평가에 참가한 응답자는 10대에서 70대까지의 남녀를 대상으로 하였으며, 불성실한 응답을 제외한 150명(남자 77명, 여자 73명)의 자료만이 실제 분석에서 사용되었다. 응답자의 일반적 특성은 〈Table 12〉에 제시된 바와 같다.

Table 12. 일반사항

변수	구분	빈도	퍼센트
성별	남성	77	51.33
	여성	73	48.67
연령	10~20대	23	15.33
	30~40대	83	55.33
	50~60대	42	28.00
	70대 이상	2	1.33
음주경력	1년 미만	3	2.00
	1~5년	14	9.33
	5~10년	40	26.67
	10년 이상	93	62.00
음주횟수	매일	8	5.33
	1주일에 1~2회	58	38.67
	1개월에 1~2회	72	48.00
	1년에 1~2회	12	8.00
주량	소주반병 이하	61	40.67
	소주 1병	67	44.67
	소주 2병	14	9.33
	소주 2병 이상	8	5.33
거주지역	1	140	93.33
	2	5	3.33
	3	5	3.33
합계		150	100.00

평가에 참가한 응답자의 성별은 남성과 여성이 각각 51.33%, 48.67%이며, 연령은 30-40대가 55.33%로 가장 많았으며, 50-60대가 28%, 10-20대가 15.33% 및 70대 이상이 1.33%였다. 음주경력은 5년 이상이 88.67%로 술의 맛과 향 등의 관능평가 항목에 관한 이해도를 가진 응답자로 사료되었으며 주량은 소주 반병에서 한 병이 85.34%이며, 응답자의 대부분은 부산에 거주하는 사람들로 구성되었다.

2-2 술을 처음으로 마시게 된 경위

친구들과의 모임 및 선·후배 모임 또는 권유라고 응답한 사람이 전체의 79.46%로 많았으며 성별에 따른 술을 처음으로 마시게 된 경위는 차이가 없는 것으로 나타났다 〈Table 13〉

Table 13. 성별에 따른 술을 처음으로 마시게 된 경위

	남성		여성		X^2	p
	빈도	퍼센트	빈도	퍼센트		
제사 후 음복	9	11.69	8	10.96	2.407	0.661
호기심	1	1.30	2	2.74		
친구들과의 모임	46	59.74	36	49.32		
선/후배의 모임(또는)권유	18	23.38	22	30.14		
가족의 권유	3	3.90	5	6.85		
합계	77	100.00	73	100.00		

2-3 술을 처음으로 마신 시기

대학생 또는 고교시절 처음으로 술을 접하는 것으로 나타났으며, 주량에 따른 술을 처음 마신 시기는 술을 어린나이에 마시기 시작한 사람일수록 음주량이 많은 것으로 나타났다 〈Table 14〉

Table 14. 주량에 따른 술을 처음으로 마신 시기

	소주반병 이하		소주 1병		소주 2병 이상		X^2	p
	빈도	퍼센트	빈도	퍼센트	빈도	퍼센트		
중학생 때	3	4.92	3	4.48	2	9.09	19.625	0.003
고교생 때	15	24.59	20	29.85	14	63.64		
대학생 때	22	36.07	33	49.25	3	13.64		
사회 진출 후	21	34.43	11	16.42	3	13.64		
합계	61	100.00	67	100.00	22	100.00		

2-4 술을 평가할 때 가장 중요하게 생각하는 것

Table 15. 술을 평가할 때 가장 중요하게 생각하는 것

	빈도	퍼센트
맛	97	64.67
향기	21	14.00
가격	11	7.33
기능성	5	3.33
숙취의 유무	16	10.67
합계	150	100.00

술을 평가할 때 가장 중요하게 생각하는 것은 전체의 64.67%가 맛이라고 응답했으며, 여성의 경우 남성보다 술의 맛을 더욱 중시하는 것(79.45%)으로 조사되었다 〈Table 16〉. 또한, 주량에 따른 술을 평가할 때 가장 중요하게 생각하는 것에 관한 답으로는 주량이 적은 사람일수록 맛에 대한 민감도가 높아 맛을 중시했으며(70.49%), 소주2병 이상 마시는 사람의 경우는 술의 맛(50.00%)과 함께 숙취의 유무(31.82%)를 중요하게 생각하는 것으로 나타났다. 이는 주량이 소주 반병 이하인 사람들이 소주 2병 이상인 사람들에 비해 술의 맛을 즐기는 것으로 해석할 수 있다.

Table 16. 성별에 따른 술을 평가할 때 가장 중요하게 생각하는 것

	남성		여성		X^2	p
	빈도	퍼센트	빈도	퍼센트		
맛	39	50.65	58	79.45	19.090	0.661
향기	11	14.29	10	13.70		
가격	10	12.99	1	1.37		
기능성	4	5.19	1	1.37		
숙취의 유무	13	16.88	3	4.11		
합계	77	100.00	73	100.00		

(5) 가장 즐겨 마시는 술의 종류

Table 17. 가장 즐겨 마시는 술의 종류

	빈도	퍼센트
맥주	43	28.67
소주	71	47.33
와인	14	9.33
막걸리	6	4.00
기능성 술	13	8.67
위스키	3	2.00
합계	150	100.00

우리나라 사람들이 가장 즐겨 마시는 술은 소주로 전체의 47.33%를 다음이 맥주로 28.67%를 차지했다. 기능성 술의 경우 8.67%로 와인(9.33%)과 비슷한 기호도를 나타냈다. 한편, 주량에 따른 가장 즐겨 마시는 술의 종류로는 소주반병 이하의 주량을 가진 사람의 경우 맥주가 31.15%인데 비해 소주 1병과 소주2병 이상의 주량을 가진 사람의 경우 가장 즐겨 마시는 술이 소주로 각각 55.22%, 72.73%로 주량이 많을수록 소주를 즐겨 마시는 빈도가 높아짐과 동시에 기능성술에 대한 선호도가 증가되는 것으로 나타났다〈Table 18〉.

Table 18. 주량에 따른 가장 즐겨 마시는 술의 종류

	소주반병 이하		소주 1병		소주 2병 이상		X^2	p
	빈도	퍼센트	빈도	퍼센트	빈도	퍼센트		
맥주	19	31.15	21	31.34	3	13.64	32.775	0.000
소주	18	29.51	37	55.22	16	72.73		
와인	11	18.03	3	4.48	0	0.00		
막걸리	6	9.84	0	0.00	0	0.00		
기능성 술	4	6.56	6	8.96	3	13.64		
위스키	3	4.92	0	0.00	0	0.00		
합계	61	100.00	67	100.00	22	100.00		

(6) 맛에 대한 평가

관능평가 시료로 제시된 천년약속과 다른술의 맛에 대한 평가 결과는 다음과 같다〈Table 19〉.

Table 19. 맛에 대한 평가

종류	Mean	SD	t-value	p
천년약속	3.91	0.83	3.339	0.001
다른술	3.64	0.71		

맛에 대한 자료는 분산분석(ANOVA)을 이용하였다. 그 결과 천년약속과 다른술은 각각 3.91과 3.64로 천년약속에 대한 맛의 평가가 1% 수준에서 유의차가 있게 높게 나타났다. 또한, 성별과 연령에 따른 평가에 있어서도 유의차는 없었지만 천년약속의 평가가 높게 나타났다〈Table 20, 21〉.

Table 20. 성별에 따른 술의 종류간 맛에 대한 평가 비교

성별	종류	Mean	SD	t-value	p
남	천년약속	3.94	0.73	3.972	0.000
	다른술	3.55	0.70		
여	천년약속	3.89	0.94	1.143	0.257
	다른술	3.74	0.71		

Table 21. 연령대에 따른 술의 종류간 맛에 대한 평가 비교

연령대	종류	Mean	SD	t-value	p
10~20대	천년약속	3.78	0.90	0.617	0.544
	다른술	3.65	0.88		
30~40대	천년약속	3.95	0.76	2.683	0.009
	다른술	3.67	0.63		
50대 이상	천년약속	3.91	0.94	2.020	0.050
	다른술	3.57	0.76		

(7) 향에 대한 평가

제시된 두 시료의 향에 대한 평가 결과는 다음과 같다〈Table 22〉.

Table 22. 향에 대한 평가

	Mean	SD	t-value	p
천년약속	3.93	0.82	4.473	0.000
다른술	3.55	0.71		

향에 대한 관능평가 결과 천년약속이 3.93, 다른술이 3.55로 천년약속이 1% 수준에서 유의하게 높게 평가되었다.

(8) 색에 대한 평가

제시된 두 시료의 색에 대한 평가 결과는 다음과 같다〈Table 23〉.

Table 23. 색에 대한 평가

	Mean	SD	t-value	p
천년약속	3.91	0.73	1.017	0.311
다른술	3.84	0.68		

색에 대한 평가 결과 천년약속과 다른술은 각각 3.91과 3.84로 유의차가 없이 나타났다.

(9) 전체적 평가

제시된 두 시료의 전체적인 평가 결과는 다음과 같다〈Table 24〉.

Table 24. 전체적 평가

	Mean	SD	t-value	p
천년약속	4.01	0.79	4.540	0.000
다른술	3.65	0.69		

맛, 향, 색을 비롯한 전체적인 평가 결과 천년약속은 4.01, 다른술은 3.65로 1% 수준에서 천년약속이 유의하게 높게 평가되었다.

(10) 전체적 평가에 가장 영향을 미친것은

제시된 두 시료의 전체적인 평가에 가장 영향을 미친 요인에 대한 분석 결과는 다음과 같다〈Table 25〉.

Table 25. 전체적인 평가에 가장 영향을 미친 것은

	빈도	퍼센트
맛	108	72.00
향기	22	14.67
색	3	2.00
기능성	17	11.33
합계	150	100.00

전체적인 술의 평가에는 술의 맛이 72%로 가장 영향을 미친 것으로 나타났으며, 그 외에 향기와 기능성인 것으로 조사되었다.

(11) 술을 드시면서 좋았던 맛, 향기, 색에 대한 항목은

Table 26. 술을 드시면서 좋았던 맛에 대한 항목

종류 / 맛	천년약속			다른술		
	빈도	응답비 %	전체%	빈도	응답비 %	전체%
단맛	37	25.17	17.54	19	13.01	9.45
과일의 상큼한 맛	22	14.97	10.43	10	6.85	4.98
신맛	1	0.68	0.47	3	2.05	1.49
맑고 개운한 맛	63	42.86	29.86	42	28.77	20.90
곡류의 구수한 맛	38	25.85	18.01	54	36.99	26.87
쓴맛	1	0.68	0.47	11	7.53	5.47
가벼운 맛	35	23.81	16.59	29	19.86	14.43
쌉쌀한 맛	14	9.52	6.64	33	22.60	16.42
합계	147	100.00		146	100.00	
총합	211		100.00	201		100.00

천년약속과 다른술의 맛의 평가 시 가장 좋았던 맛에 대한 항목으로, 천년약속은 응답자는 맑고 개운한 맛(29.86%), 곡류의 구수한 맛(18.01%), 단맛(17.54%)을 선택하였으며, 다른술의 경우 곡류의 구수한 맛 (26.87%), 맑고 개운한 맛(20.90%), 쌉쌀한 맛(16.42%)을 선택하여 두 종류의 발효주가 갖는 맛의 특징이 다름이 나타났다. 특히, 천년약속의 경우 단맛에 대해, 다른술의 경우 쌉쌀한 맛에 대한 선호도 차이가 특징적으로 나타났다.

Table 27. 술을 드시면서 좋았던 향기에 대한 항목

종류 / 맛	천년약속			다른술		
	빈도	응답비 %	전체%	빈도	응답비 %	전체%
달콤한 향	49	34.03	27.53	25	17.48	15.63
과일향	18	12.50	10.11	17	11.89	10.63
꽃향	14	9.72	7.87	4	2.80	2.50
한약재 향	48	33.33	26.97	79	55.24	49.38
발효취	49	34.03	27.53	35	24.48	21.88
합계	144	100.00		143	100.00	
총합	178		100.00	160		100.00

술의 향기에 대한 선호도 조사에서는 천년약속의 경우, 달콤한 향(27.53%), 발효취(27.53%), 한약재의 향(26.97%), 등이 전체의 82.03%를 차지하였으며, 다른술의 경우 한약재 향(49.38%), 발효취(21.88%), 달콤한 향(15.63%)의 순으로, 천년약속은 달콤한 향, 한약재 향, 발효취를 비슷하게 선호하는 데 비해, 다른술의 경우 가장 선호하는 향기의 특징이 한약재 향인 것으로 나타났다.

Table 28. 술을 드시면서 좋았던 색에 대한 항목

종류 / 맛	천년약속			다른술		
	빈도	응답비 %	전체%	빈도	응답비 %	전체%
투명함	38	26.76	23.03	15	10.49	9.62
옅은 노란색	73	51.41	44.24	77	53.85	49.36
밝은 색	11	7.75	6.67	8	5.59	5.13
맑은 색	38	26.76	23.03	35	24.48	22.44
진한 색	5	3.52	3.03	21	14.69	13.46
합계	142	100.00		143	100.00	
총합	165		100.00	156		100.00

술의 색에 대한 선호도에서는 천년약속과 다른술은 동일하게 옅은 노란색인 부분을 가장 선호하는 것으로 나타났다.

(12) 술을 드시면서 싫었던 맛, 향기, 색에 대한 항목은

Table 29. 술을 드시면서 싫었던 맛에 대한 항목

종류 / 맛	천년약속			다른술		
	빈도	응답비 %	전체%	빈도	응답비 %	전체%
단맛	33	25.98	23.74	28	20.00	18.54
신맛	20	15.75	14.39	22	15.71	14.57
쓴맛	17	13.39	12.23	22	15.71	14.57
가벼운 맛	20	15.75	14.39	9	6.43	5.96
쌉쌀한 맛	30	23.62	21.58	30	21.43	19.87
한약재의 맛	19	14.96	13.67	40	28.57	26.49
합계	127	100.00		140	100.00	
총합	139		100.00	151		100.00

맛에 있어 바람직하지 못한 항목으로 천년약속의 경우, 단맛이 23.74%, 쌉쌀한 맛이 21.58%, 신맛이 14.39%로 나타났으며, 다른술의 경우 한약재의 맛이 26.49%, 쌉쌀한 맛이 19.87%, 단맛 이 18.54%로 나타났다. 또한, 단맛은 천년약속의 좋아하는 맛과 싫어하는 맛으로 동시에 선택되는 특징이 나타났다.

Table 30. 술을 드시면서 싫었던 향기에 대한 항목

종류 / 맛	천년약속			다른술		
	빈도	응답비 %	전체%	빈도	응답비 %	전체%
달콤한 냄새	26	21.14	19.55	12	9.23	8.51
한약재의 냄새	18	14.63	13.53	42	32.31	29.79
목재냄새	29	23.58	21.80	12	9.23	8.51
발효취	36	29.27	27.07	34	26.15	24.11
강하고 진한 냄새	24	19.51	18.05	41	31.54	29.08
합계	123	100.00		130	100.00	
총합	133		100.00	141		100.00

싫었던 향기의 항목으로 천년약속은 발효취, 목재냄새, 달콤한 냄새가 각각 27.07%,

21.80% 및 19.55%로 다른술은 한약재의 냄새, 강하고 진한 냄새, 발효취가 29.79%, 29.08%, 24.11%로 나타났다. 두 시료 모두 발효취가 부적절한 향기 항목인 것으로 나타났다.

Table 31. 술을 드시면서 싫었던 색에 대한 항목

맛 \ 종류	천년약속			다른술		
	빈도	응답비 %	전체%	빈도	응답비 %	전체%
투명함	16	16.33	15.69	13	13.00	12.87
옅은 노란색	42	42.86	41.18	41	41.00	40.59
밝은 색	9	9.18	8.82	6	6.00	5.94
맑은 색	11	11.22	10.78	9	9.00	8.91
진한 색	24	24.49	23.53	32	32.00	31.68
합계	98	100.00		100	100.00	
총합	102		100.00	101		100.00

색에 대한 싫어하는 항목으로는 천년약속과 다른술 모두 옅은 노란색이 41.18%, 40.59%로, 좋았던 색으로 선택되었던 항목이던 옅은 노란색이 싫어하는 항목으로도 선정되는 특징이 나타났다.

3. 주세법 규정에 맞춘 제품 허가 기준에 준한 검정완료

분석·감정서

①분류기호	분석과-793	②수 신	금정세무서장
③품 명	약주 천년약속, 14% - 375㎖	④제 조 자	(주)제이앤제이바이오
⑤용 도			

⑥

시 험 결 과

분 석 항 목	기 준	분 석 결 과
성상	고유의 색택과 특유의 향미	적합
주정분(V/V%)	표시도수 ±0.50이하	14.0
총산(W/V%)	0.70이하	0.27
아미노산도	-	1.4
불휘발분(W/V%)	-	6.2
메탄올(㎎/㎖)	0.50이하	불검출
파라옥시안식향산부틸(g/ℓ)	0.050이하	불검출
삭카린나트륨	불검출	불검출
혼탁도(E.B.C)	18E.B.C이하	0.4

////

위와 같이 분석·감정합니다.

2005년 4월 4일

국세청기술연구소장

1. 이 성적은 제시된 공시품에 한하며 분석·감정 의뢰목적외의 광고, 선전 등에 이용할 수 없으며, 용기, 포장 등에 표시할 수 없습니다.

Ⅶ. 주류 함유 약리 물질의 생리활성 및 알코올성 질환 모델에 대한 효과 검정

1. 상황버섯균사체 발효주의 추출물이 염증관련 단백질 및 세포내 활성산소에 미치는 영향

1-1. 상황버섯균사체 발효주의 추출물이 알코올 분해에 미치는 영향

Acetaldehyde는 체내에 흡수된 알코올의 분해로 인해 생성되는 이차산물이며, 숙취 및 간독성과 여러 알코올성 질환을 유발하는 독성물질로, 이를 세포에 직접 처리함으로써 세포내에서 일어나는 여러 알코올성 질환의 유도제로 사용되고 있다. 본 연구는 상황버섯균사체 발효주 추출물 (LSHJ)의 전처리가 acetaldehyde에 의해 일어나는 세포의 형태학 및 생화학적 변화에 어떤 효과를 나타내는지를 조사하였다.

Acetaldehyde의 처리에 의해 $HepG_2$ 세포는 간암세포 특유의 성장형태인 cell-cell adhesion이 약해지면서 scattering과 함께 rounding되는 등의 형태학적인 변화를 보여주었으나 1.0 및 2.0 ㎎/㎖의 LSHJ 전처리에 의해 형태적인 변화가 억제됨을 보여주었다 (Fig. 62.). 이러한 결과는 acetaldehyde에 의해 야기되는 일련의 세포내 변화를 LSHJ가 차단 할 수 있음을 추측케 한다.

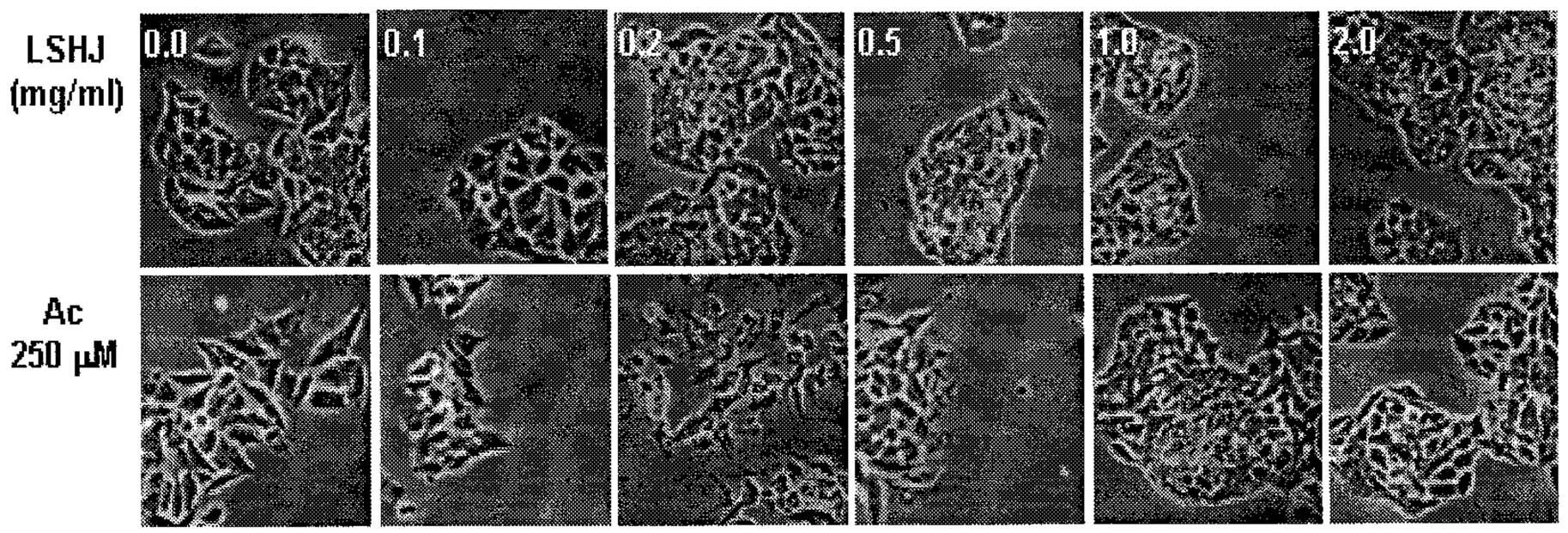


Fig. 62. Acetaldehyde에 의해 유도되는 $HepG_2$ 세포의 형태적인 변화에 대한 LSHJ의 억제 효과

Acetaldehyde는 세포내의 염증반응을 포함한 여러 신호전달 기전의 중간 매개체로 작용하는 NF-κB의 활성화를 일으키는 것으로 보고되어 있으므로 이 단백질의 활성화에 LSHJ가 어떤 영향을 미치는지 조사하였다. NF-κB는 세포질에 IκBα에 의해 결합되어져 불활성화 되어 있다가 외부 신호에 의해 IκBα가 인산화를 거쳐 분해되면 활성화되어 핵 속으로 이동 (nuclear translocation)하여 염증 관련 유전자의 promoter에 결합하여 전사를 활성화시킨다.

Fig. 63A에서 보는 바와 같이 acetaldehyde에 의해 NF-κBp65는 핵 속으로 이동하였고 IκBα는 분해되었으나, LSHJ를 전처리한 경우 이러한 현상이 부분적으로 억제되었다. 염증반응의 촉진제로 작용하는 prostaglandin E_2를 생성하는 COX-1 및 COX-2의 경우 acetaldehyde에 의해 약간의 증가가 보이지만 이 역시 LSHJ에 의해 부분적으로 억제됨을

볼 수 있었다 (Fig. 63B). 이러한 결과는 알코올의 대사작용에서 필연적으로 생성되는 acetaldehyde에 의한 이차적인 염증반응을 상황주에 용해되어 있는 성분이 부분적으로나마 지연 또는 억제시킴으로써 음주에 의한 손상을 줄일 수 있음을 추측케 한다.

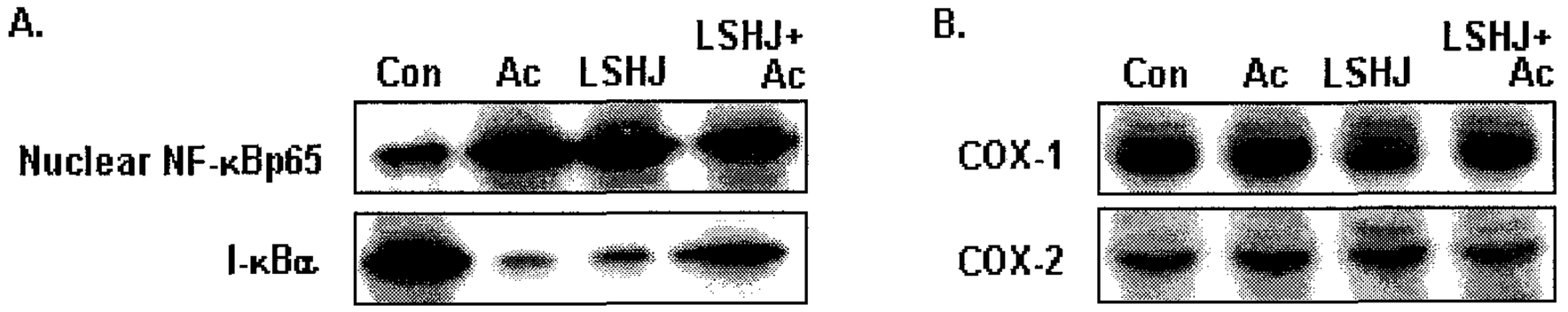


Fig. 63. Acetaldehyde에 의한 NF-κB 활성화에 미치는 LSHJ의 효과

1-2. 상황버섯균사체 발효주의 추출물이 항산화 작용에 미치는 영향

산화적 스트레스 (oxidative stress)는 세포내의 산화·환원 상태 (redox state)에 영향을 주어 신호전달계의 교란을 일으켜 여러 질환의 원인이 되기도 하며, 노화 (aging)를 유발하는 것으로도 알려져 있으며, 알코올의 체내 섭취는 신호전달계를 거치면서 산화적 스트레스를 유발하는 것으로 보고되어 있다. 본 연구에서는 $HepG_2$ 세포에 LSHJ를 전처리하여 acetaldehyde에 의한 NO 생성에 어떤 영향을 미치는 지 조사하였고, H_2O_2에 의한 ROS의 생성에도 어떤 영향을 미치는지 조사하였다.

Fig. 64에서 보여주는 것과 같이 $HepG_2$ 세포에서 acetaldehyde에 의한 NO의 생성은 LSHJ의 전처리에 의해 감소하는 것이 관찰되었으나 특이한 점은 정상조건에서 배양한 세포에 비해 LSHJ의 단독처리에 의해서도 NO가 생성된다는 것이었으며, 이에 대한 연구는 앞으로 더 진행해봐야 할 것으로 사료된다.

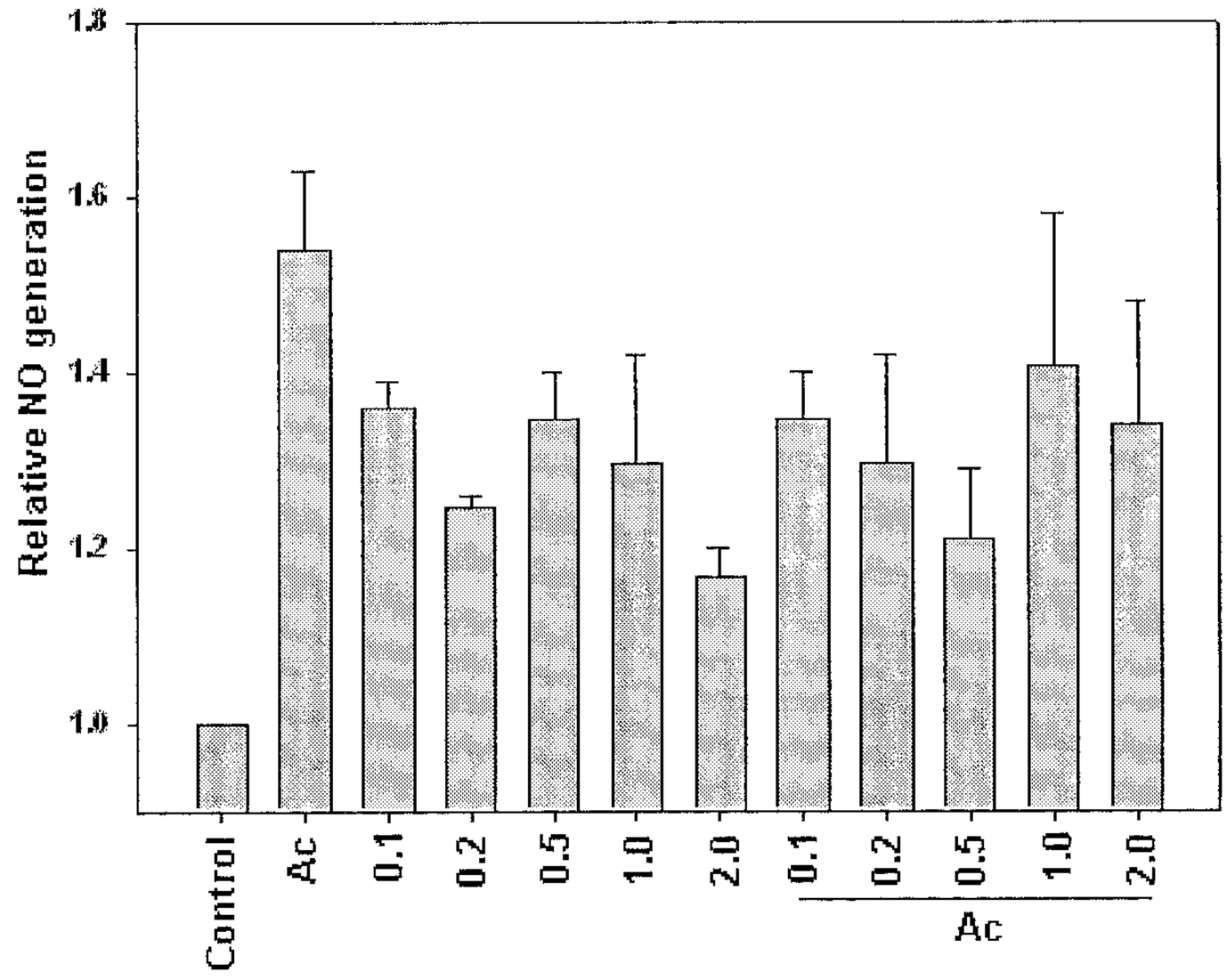


Fig. 64. Acetaldehyde에 의한 NO 생성에 미치는 LSHJ의 효과

ROS는 세포내의 산화와 환원의 균형에 영향을 주어 비정상적인 신호전달기전과 함께 여러 질환을 초래할 수 있는 것으로 알려져 있으며, 대표적으로 hydrogen peroxide (H_2O_2), hydroxyl radical (OH ·), reactive oxygen (O_2) 등이 보고되어 있다. 본 실험에서는 H_2O_2에 의한 ROS의 생성이 LSHJ에 의해 어떤 영향을 받는지를 형광염색법을 통해 조사하였다. 그 결과 0.1 mM의 저농도부터 1.0 mM의 고농도에 의한 ROS 생성을 LSHJ가 억제함을 알 수 있었고 (Fig. 65), 이러한 결과는 상황주의 유효성분 중에는 산화적인 스트레스에 대응할 수 있는, 즉 항산화 작용을 가진 성분이 함유되어 있음을 뜻하는 것으로 생각된다.

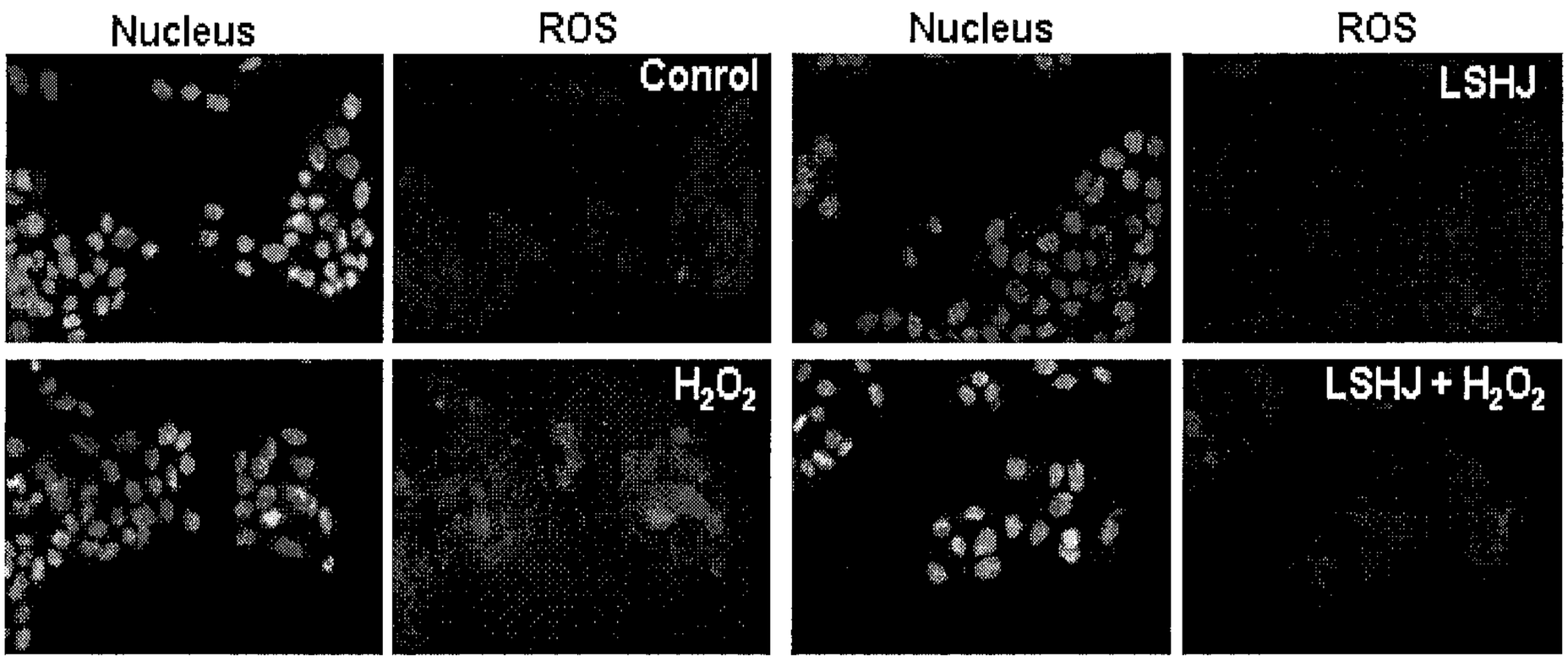


Fig. 65. H_2O_2에 의한 ROS 생성에 미치는 LSHJ의 효과

2. $HepG_2$ 세포에서 상황버섯균사체 발효주의 염증관련 인자에 미치는 영향

상황버섯균사체 발효주 (SHJ), 대조주 (S-1)와 동일한 알코올 농도를 가진 ethanol을 1:10 (1.4%, 300 mM), 25 (0.56%, 120 mM), 50 (0.28%, 60 mM), 100 (0.14%, 30 mM)의 비율로 성장배지에 희석하여 $HepG_2$ 세포에 처리하고 24시간 후 형태학적 관찰을 통해 적정농도를 정하고자 하였으며, 그 결과 1:50으로 희석한 농도에서 ethanol 처리 세포와 차이가 보였으므로, 이 농도의 S-1, SHJ를 실험에 사용하였다.

1:50으로 희석한 비율의 ethanol (60 mM)을 처리하였을 때 $HepG_2$ 세포에 형태적인 변화와 함께 세포가 손상을 입었을 때 나타나는 debris가 발견되었으나, 같은 희석비율의 SHJ, S-1에서는 정상세포와 같은 모습을 보였으며, 1:10의 고농도 SHJ에서도 정상군과 유사한 형태적인 모습을 보여주었다 (Fig. 66)

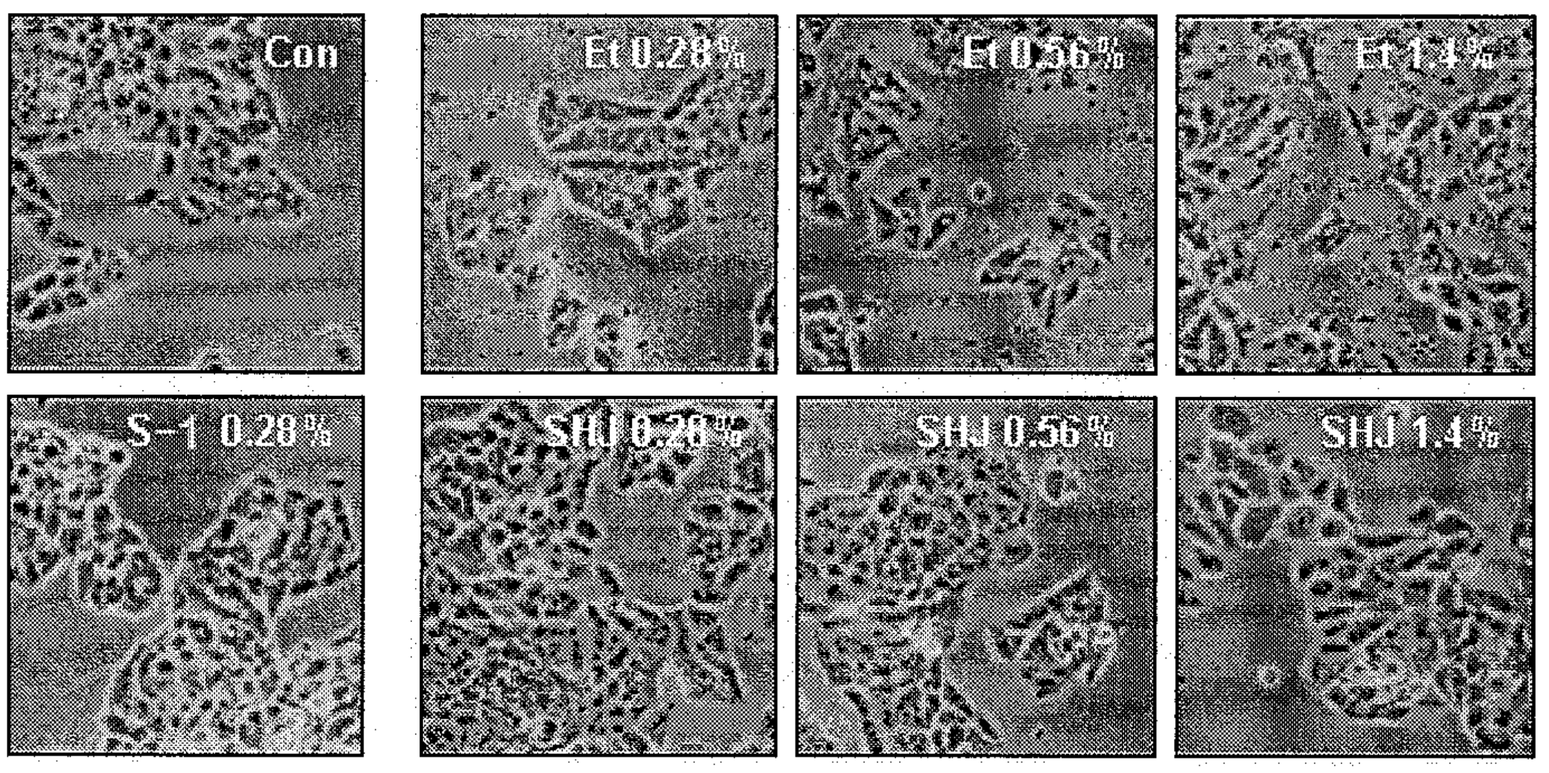


Fig. 66. 상황주버섯균사체 발효주와 동일 농도의 ethanol 및 S-1가 $HepG_2$ 세포의 형태에 미치는 영향

SHJ가 $HepG_2$ 세포의 염증관련 인자들에 어떤 영향을 미치는지 조사하기 위해 $HepG_2$ 세포를 정상군과 0.28%의 알코올이 함유된 ethanol, S-1, SHJ 처리군으로 나누어 이들에서 total protein과 total RNA를 추출하여 각각 Western blotting과 RT-PCR을 실시하였다. 그림 2-2에서 보는 바와 같이 iNOS와 COX-2 단백질의 약한 증가가 ethanol 처리에 의해 관찰되지만 동일한 농도의 알코올이 함유된 S-1와 SHJ에서는 상대적으로 낮게 나타나고 있다. COX-1, IL-1β, TNF-α는 ethanol, S-1, SHJ 세 그룹에서 차이점을 볼 수 없었다. 다음으로 이들 단백질에 대한 mRNA 양을 조사하였는데 단백질의 양적 변화와는 달리 mRNA의 발현 양상은 그리 큰 차이를 보이지 않았다 (Fig. 67).

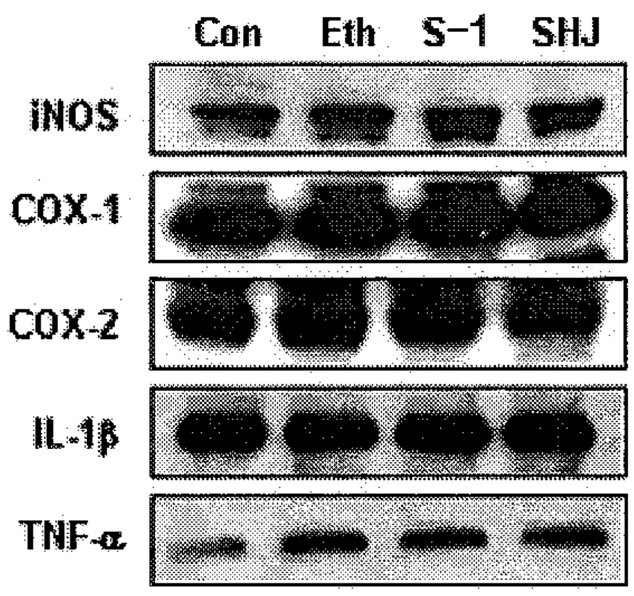


Fig. 67. 상황주버섯균사체 발효주와 동일 농도의 ethanol 및 S-1가 HepG2 세포의 염증관련 단백질에 미치는 영향

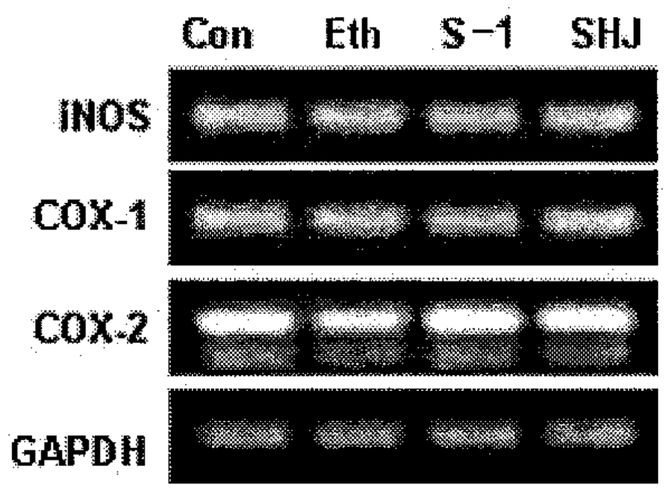


Fig. 68. 상황주버섯균사체 발효주와 동일 농도의 ethanol 및 S-1가 $HepG_2$ 세포의 염증관련 단백질의 mRNA 발현에 미치는 영향

1:50으로 희석한 ethanol을 $HepG_2$ 세포에 처리하였을 때, debris가 많이 생겨났고, 세포의 형태가 불규칙적으로 변화하는 것을 관찰하였으므로 (Fig. 66), 이 현상이 세포 사멸, 즉 apoptosis와 관련이 있는지를 조사하기 위하여 세포주기 분석을 실시하였다. 본 실험의 기본 조건은 serum이 함유되어 있지 않은 배지에 ethanol, S-1, SHJ를 희석시켜 사용함으로 실제적으로 24시간의 serum deprivation 상태에 놓이게 된다. 그러므로 정상조건에서 배양한 세포 외에 대조군으로 아무것도 처리하지 않고 serum-free 배지에만 배양한 세포를 사용하였다.

일반적인 경우 serum deprivation은 세포주기를 G1 기에서 멈추게 만들며, 이러한 현상은 본 실험에서도 동일하게 나타났다 (Fig. 67A). 그러나 같은 조건임에도 불구하고 ethanol을 처리한 세포의 경우 G1 기의 비율이 좀 더 높게 나타났으며, S-1, 특히 SHJ는 상대적으로 정상군과 유사한 정도의 G1 비율을 가지는 것으로 나타났다 (Fig. 67B). 이러한 결과들로 속단하기는 이르나 상황주의 유효성분에는 세포의 성장에 필요한 성장인자 (growth factor)가 함유되어 있음을 추측할 수 있다.

흥미로운 사실은 Fig. 67C에서 보는 바와 같이 여러 부분에서 SHJ와 유사한 효과를 나타내었던 S-1가 사멸된 세포를 나타내는 Sub-G1 비율에서 가장 높게 나왔다는 사실이다. 물론 10% 안쪽의 낮은 사멸 비율과 한 번의 실험으로는 확언하기 이르지만 SHJ에 비해 세포의 사멸에 더 큰 영향을 준다는 것은 주목할 사항이다.

이러한 결과들을 바탕으로 각각 세포 사멸에 억제작용과 촉진 작용을 수행하는 것으로 알려진 cIAP-1, cIAP-2, 그리고 Fas L의 발현을 조사하였다. 그 결과, 세포사멸의 억제 인자로 알려져 있으며 일반적으로 항암제의 처리에 의해 그 발현이 감소하는 것으로 알려져 있는 cIAP-1 및 cIAP-2 mRNA의 발현이, 특히 cIAP-2의 경우, SHJ에 의해 현저히 감소하는 것으로 나타났다 (Fig. 68). 이것은 ethanol이나 S-1를 처리한 세포에서 cIAP-2의 발현이 증가하는 것과는 반대의 현상으로 SHJ의 유효성분 중 항암성분이 존재하는 것인지 아니면 간기능에 더 큰 손상을 입히는 성분이 존재하는지에 대한 연구가 정상 간 세포주 또는 동물실험에서 더 진행되어야 할 것으로 사료된다.

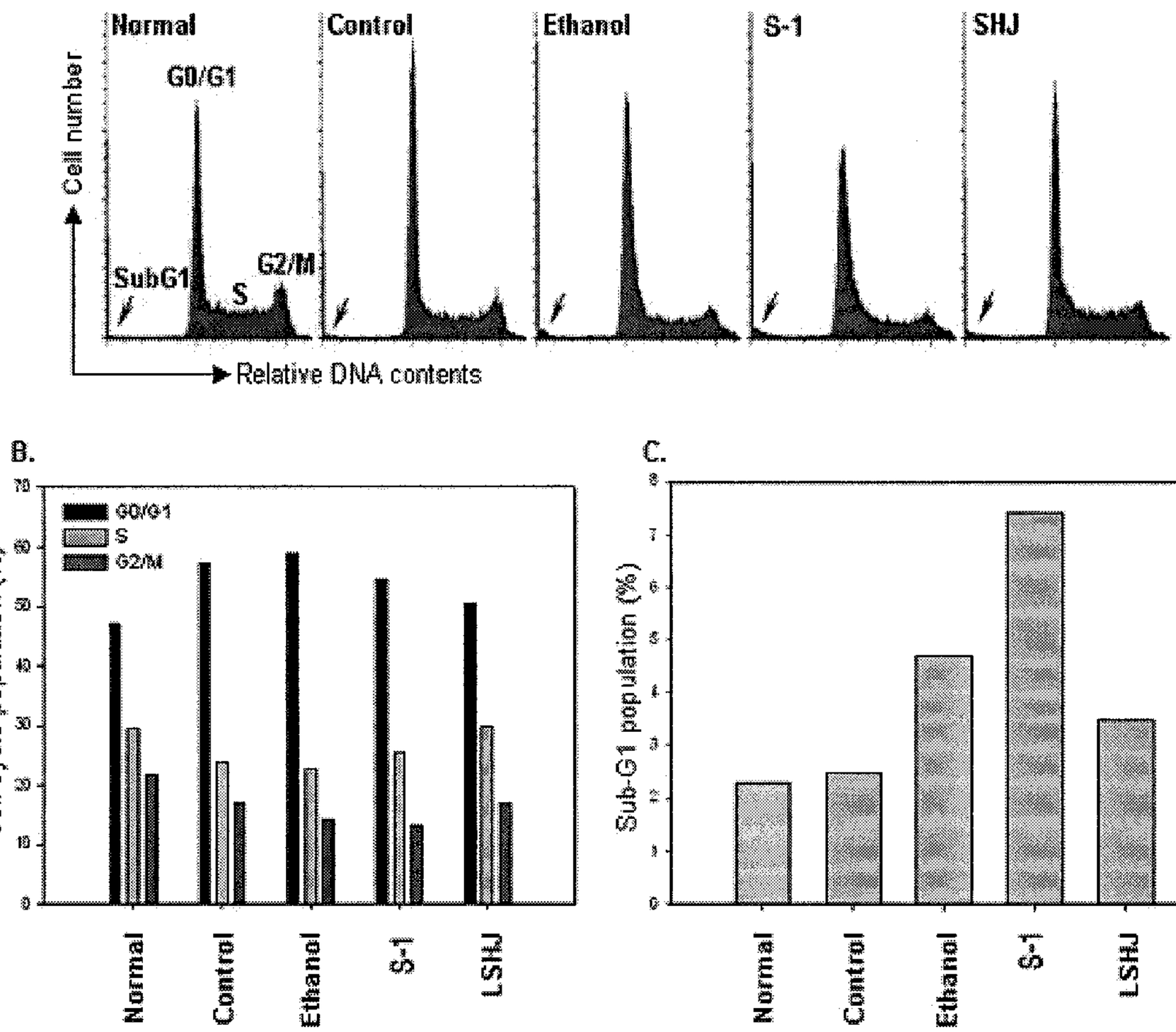


Fig. 69. 상황주버섯균사체 발효주와 동일 농도의 ethanol 및 S-1가 HepG2 세포주기에 미치는 영향.

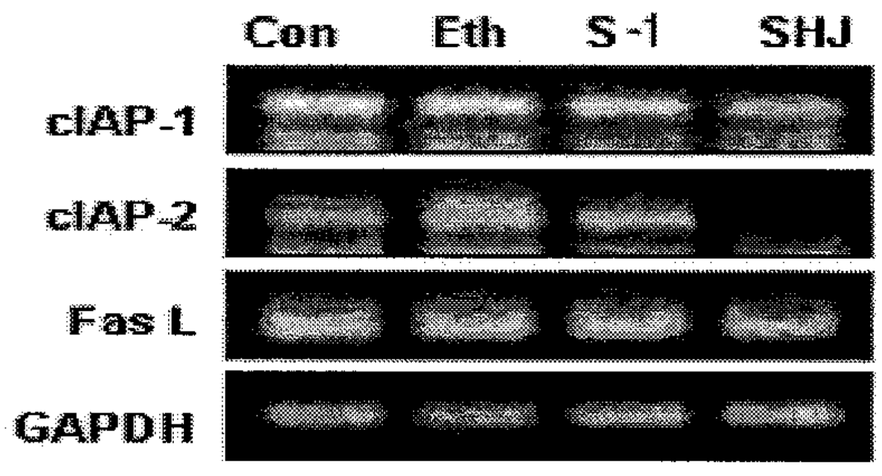


Fig. 70. 상황주버섯균사체 발효주와 동일 농도의 ethanol 및 S-1가 HepG2 세포사멸 관련 단백질의 mRNA 발현에 미치는 영향.

3. 상황버섯균사체 발효주의 투여에 의한 흰쥐의 혈장분석 및 간내 염증관련 인자 분석

3-1. 혈청학적 분석

상황버섯균사체 발효주 (SHJ)와 14%로 동일한 알코올 농도를 가진 주류 (S-1), ethyl alcohol (HPLC용 100%를 희석)을 비교 실험군으로 정하여 수컷 흰쥐에 10일간 구강투여한 후, 혈구 및 혈청분석 등을 행하였다. 심장채혈을 통해 혈액을 채취한 후, 혈청을 분리하여 분석을 수행하였다. 간 기능 장애의 지표가 되는 GOT (glutamic oxaloacetic transaminase) 수치의 경우, ethanol 투여군에서 대조군에 비해 높게 나타났으나, S-1나 SHJ에 의해서는 그 증가의 정도가 낮게 나옴을 알 수 있었다 (Fig. 69)

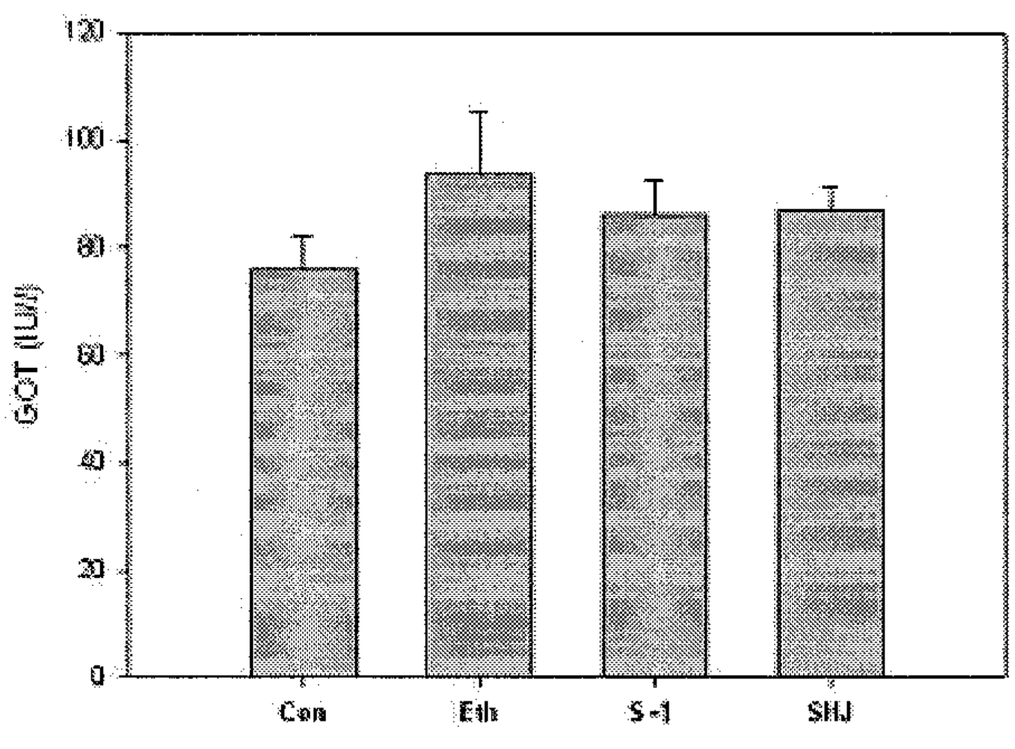


Fig. 71. SHJ, S-1, 동일농도의 ethanol을 장기투여한 흰쥐의 GOT 수치분석.

GOT와 함께 간 기능 장애의 또 다른 축을 이루는 GPT (glutamic pyruvic transaminase) 역시 ethanol 투여군에서는 유의차를 가질 만큼 높게 나타났으나 S-1 및 SHJ 투여군에서는 낮게 나타남을 알 수 있었다 (Fig. 70).

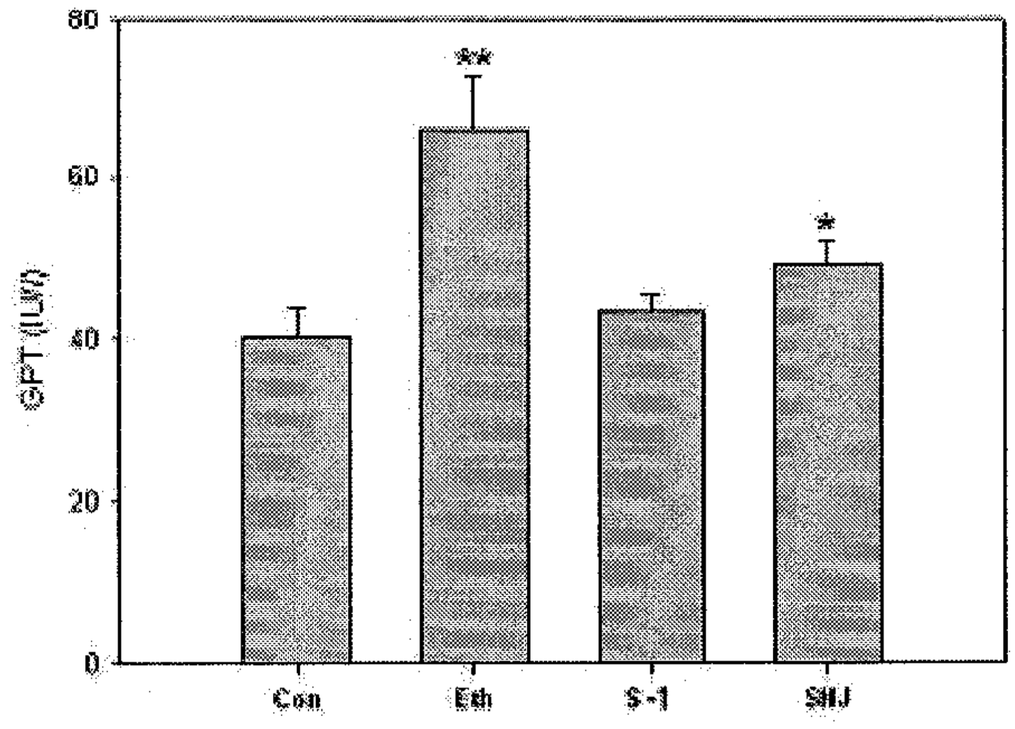


Fig. 72. SHJ, S-1, 동일농도의 ethanol을 장기투여한 흰쥐의 GPT 수치분석. *, $p<0.05$; **, $p<0.005$

Fig. 71에서 보여주는 바와 같이 ALK (alkaline phosphatase)의 단위는 ethanol 투여군에서 대조군에 비해 낮게 나왔으나 이 역시 S-1 및 SHJ 투여군에서는 대조군과 동일한 수준을 유지하는 것으로 나타났다. 간에 염증이 있을시 수치가 올라가는 LDH (lactate dehydrogenase)의 경우에는 ethnol 처리군에서는 대조군과의 차이가 별로 나지 않았으나 S-1와 SHJ 투여군에서는 상대적으로 증가하는 것으로 나타났으며, S-1와 SHJ 둘을 놓고 비교했을 때 이러한 증가의 정도는 SHJ가 S-1보다 낮게 나타남을 알 수 있었다 (Fig. 72).

체내의 염증 지표로 사용되는 혈청 총 단백질 (total protein)과 그 중 알부민 (albumin), 면역글로불린 G (IgG)의 경우 ethanol 투여군에서는 현저한 증가가 나타났으나 S-1와 SHJ의 투여에 의해서는 대조군과의 차이가 거의 없을 정도로 나타남을 알 수 있었다 (Fig. 73,74,75).

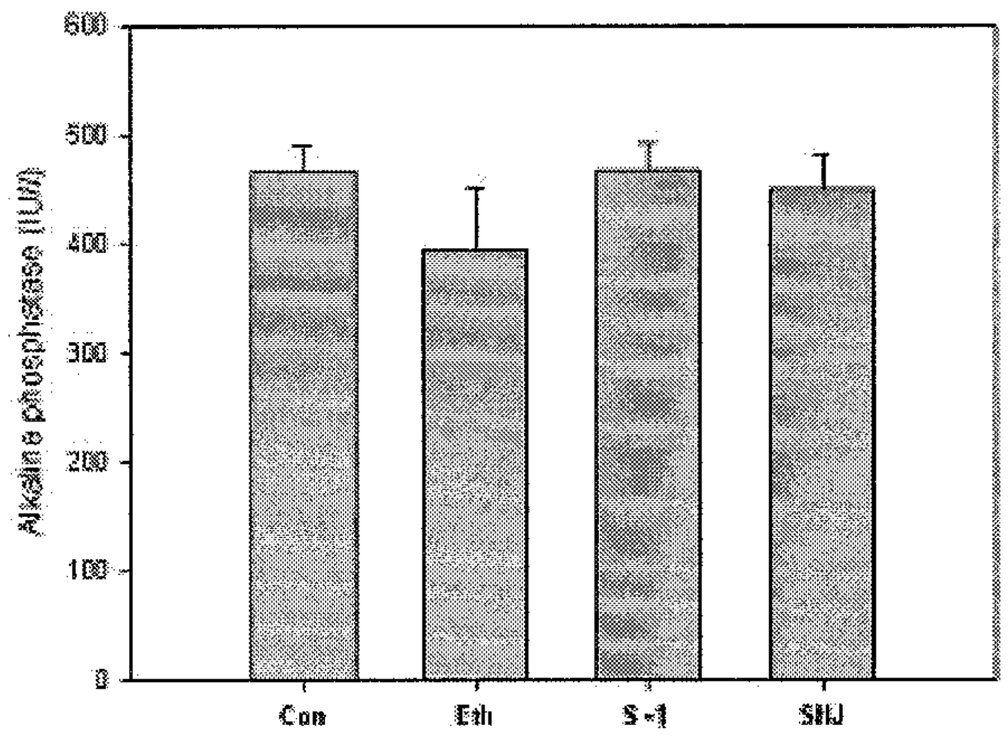


Fig. 73. SHJ, S-1, 동일농도의 ethanol을 장기투여한 흰쥐의 ALK 수치분석.

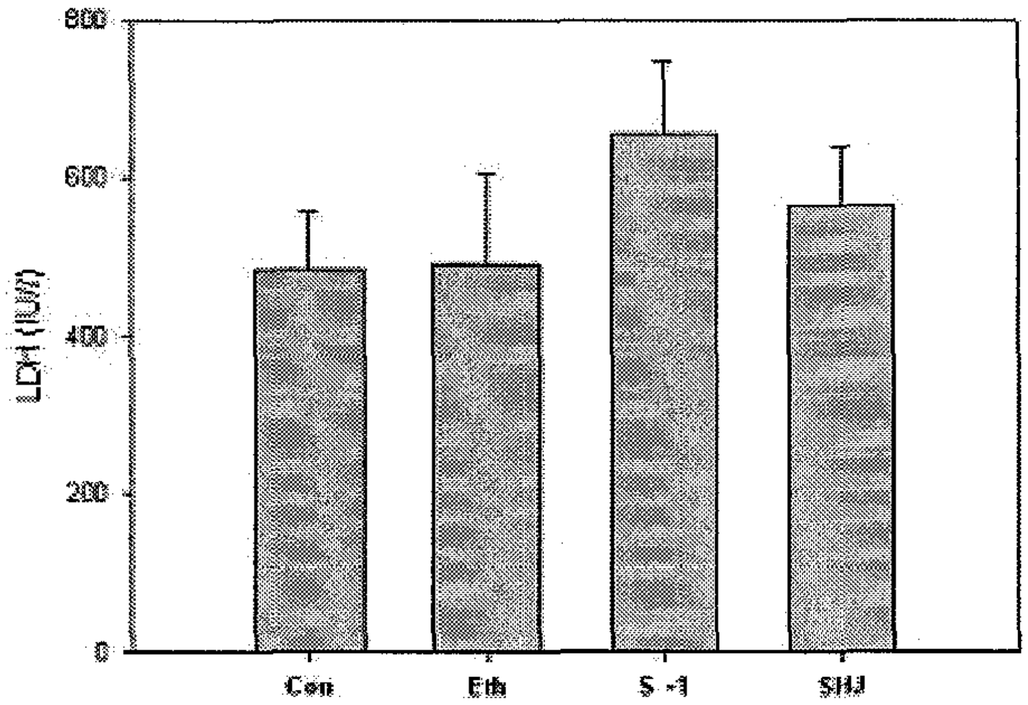


Fig. 74. SHJ, S-1, 동일농도의 ethanol을 장기투여한 흰쥐의 LDH 수치분석.

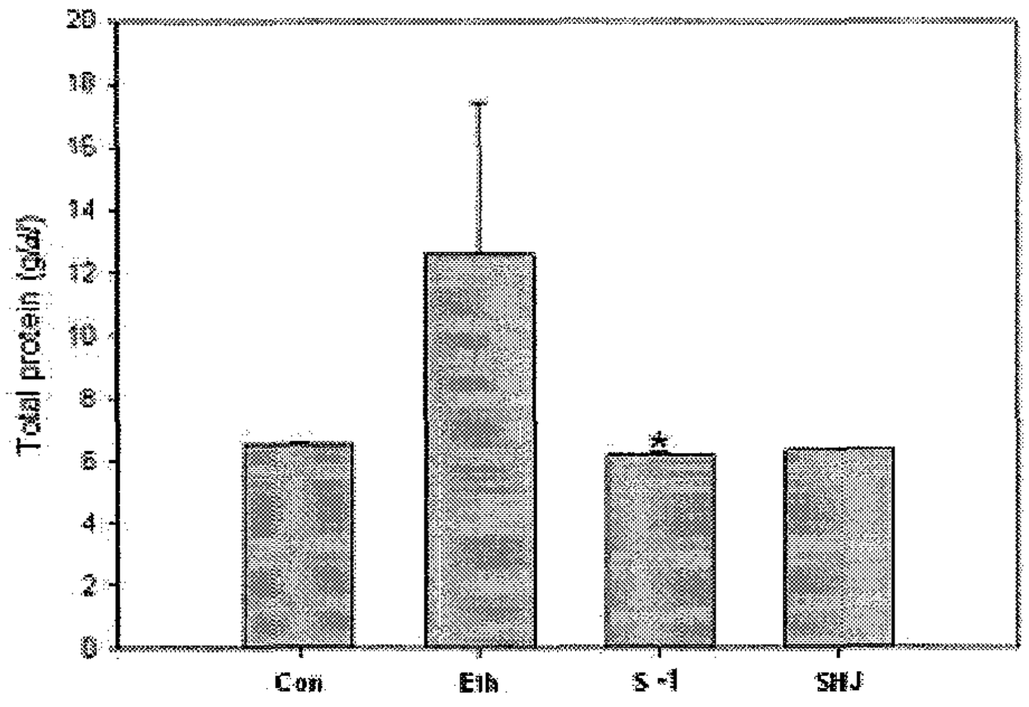


Fig. 75. SHJ, S-1, 동일농도의 ethanol을 장기투여한 흰쥐의 TP 농도분석.*, $p<0.05$

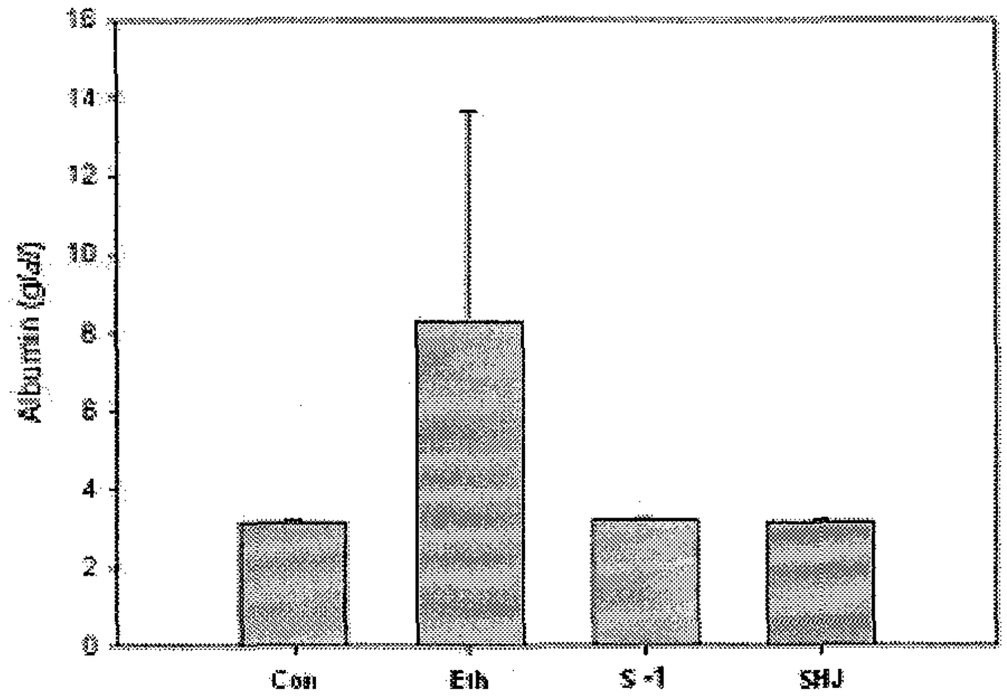


Fig. 76. SHJ, S-1, 동일농도의 ethanol을 장기투여 한 흰쥐의 albumin 농도분석.

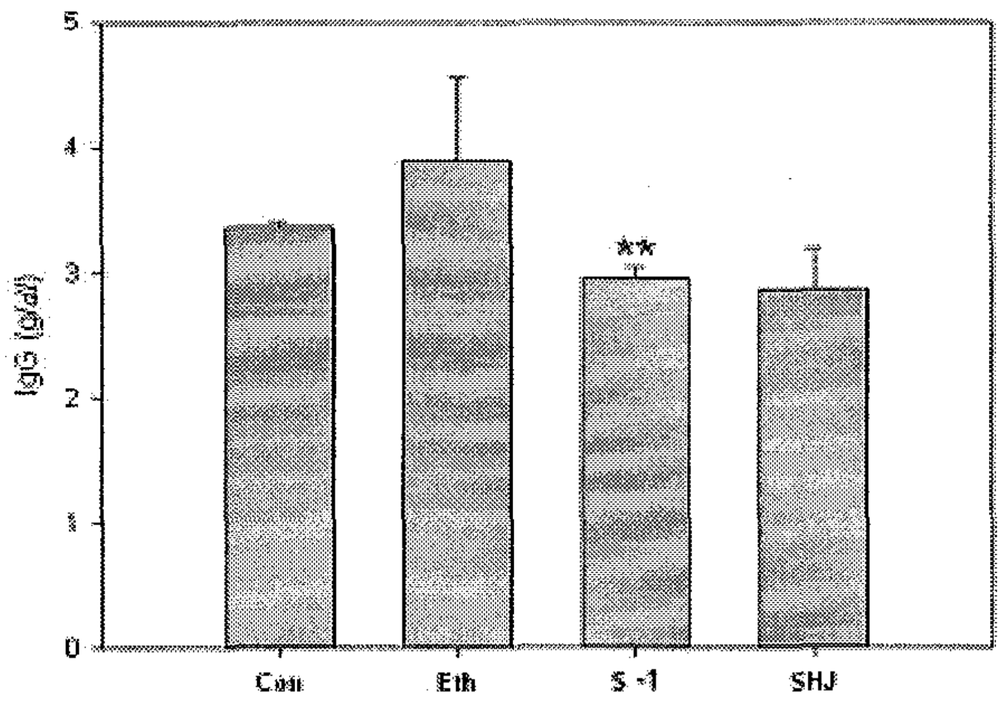


Fig. 77. SHJ, S-1, 동일농도의 ethanol을 장기투여 한 흰쥐의 IgG 농도분석. **, $p<0.005$

3-2. 염증관련 단백질의 발현

채혈 후 개복하여 간 조직의 단백질 변화를 조사하였으며, 그 결과 COX-1과 COX-2의 증가가 ethanol 투여군과 S-1 투여군에서는 나타났으나 SHJ 투여군에서는 상대적으로 낮은 증가를 보여 주었다 (Fig. 78). 그러나 RT-PCR을 통한 COX-1, COX-2 mRNA 발현의 양적 비교를 통해 ethanol, S-1, SHJ 처리군에서 별 차이가 없음을 확인 할 수 있었다 (Fig. 79).

특이한 것은 NO의 주 생성 효소인 iNOS의 발현이 ethanol 투여군 보다 S-1 투여군에서 더 높게 일어난다는 것이며, SHJ에서는 대조군보다 좀 더 낮게 발현된다는 사실이었다. 또한편으로 간 조직의 total RNA를 추출하여 세포사멸 인자들에 대한 mRNA 양을 조사하였으나 대조군과 ethanol, S-1 및 SHJ 투여군에서 큰 차이를 보이지 않았다. (Fig. 80.)

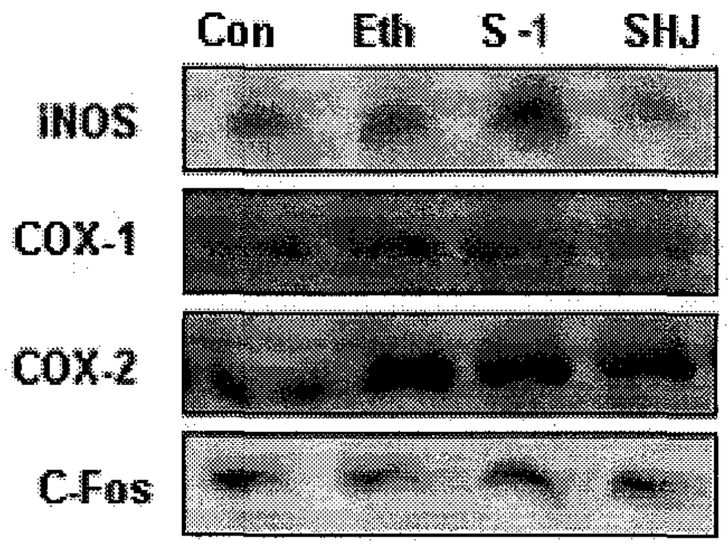


Fig. 78. SHJ, S-1, 동일농도의 ethanol을 장기투여 한 흰쥐 간의 염증 관련단백질의 변화 조사.

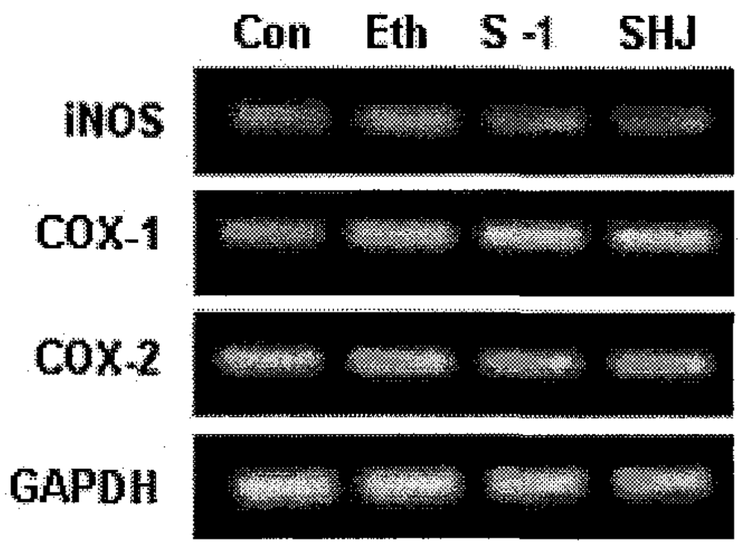


Fig. 79. SHJ, S-1, 동일농도의 ethanol을 장기투여 한 흰쥐 간의 염증관련 단백질 mRNA 발현변화조사.

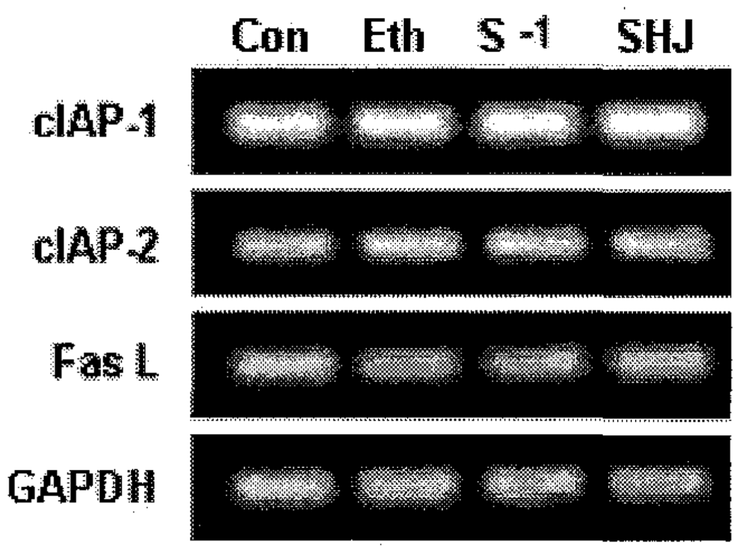


Fig. 80. SHJ, S-1, 동일농도의 ethanol을 장기투여 한 흰쥐 위장 및 간의 세포 사멸 관련 단백질 mRNA 발현변화조사.

4. 상황버섯균사체 발효주의 투여가 흰쥐의 간 손상에 미치는 영향

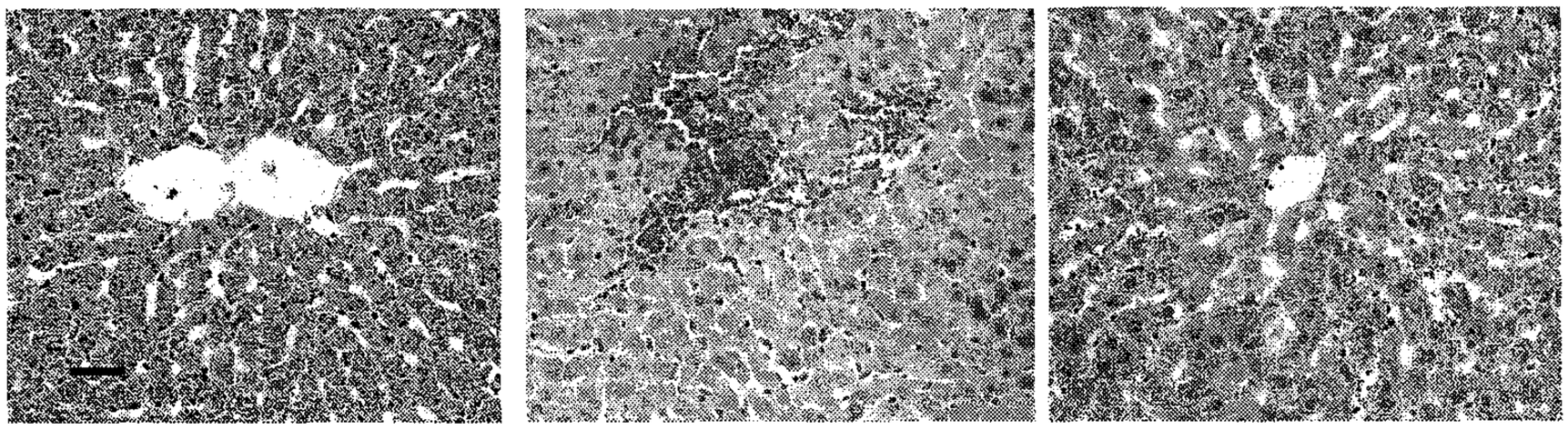
4-1. 간에 대한 조직병리학적 관찰

정연한 간소엽 형태를 갖추고 있는 정상군에 비해 14% ethanol을 투여한 대조군에서는 혼탁종창, 수포성변성, Kupper세포반응과 더불어 지방변성이 관찰되었으며 특히 국소적인 염증과 더불어 출혈을 나타내는 부분이 관찰되었다. 이에 비해 동일 알코올 농도를 가진 상황버섯균사체 발효주 (SHJ)는 약한 혼탁종창과 수포성변성등이 나타나나 국소적 염증과 출혈 등은 관찰되지 않았다 (Table 32 및 Fig. 81).

Table 32. 흰쥐 간의 염증관련 조직병리학적 소견

Group \ HC	CS	HD	KR	FC	LN
Normal	0-+	0-+	+	0-+	0
Control	+++	+++	+++	++	++-+++
SHJ	+-++	+	+	+	+

HC, 조직병리학적 변화; CS, 혼탁종창 (cloudy swelling); HD, 점액수종 (hydropic degeneration); KR, 쿠퍼세포반응 (Kupffer cell reaction); FC, 지방변성 (fat change); LN, 국소적 괴사 (local necrosis). 0-+++ 조직병리학적 변화의 정도를 표시함 : 0, 없거나 흔적적; +, 약함; ++, 중등도; +++, 심함.



A B C

Fig. 81. 정상군 (A), ethanol (B) 및 SHJ (C) 투여군 간의 현미경적 구조. Ethanol 투여군에 심한 국소적 염증을 보이는데 반해 SHJ 투여군에 정상군과 유사한 소견을 보임. Hematoxylin-eosin 염색. Scale bar = 50 um

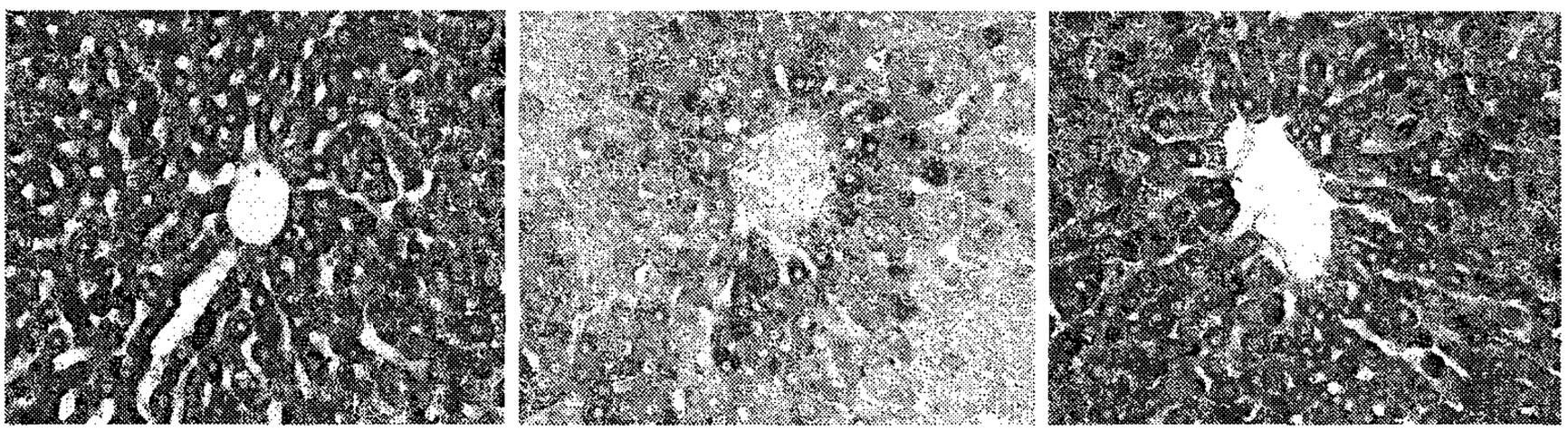
4-2. Glycogen분포에 대한 조직화학적 관찰

정상군에서 간소엽 모든 부위에 강한 반응을 보여 다량의 glycogen을 가지고 있으나 대조군에서 중심소엽에서 중등도 반응을 보일 뿐 다른 부위에서는 염색성이 현저히 떨어져 글리코겐이 현저한 감소를 보여 주었다 이에 비해 SHJ 투여한 군에서는 대조군과 유사한 글리코겐 분포를 보여 주었다 (Table 26 및 Fig. 82).

Table 33. 흰쥐 간에서 glycogen의 분포

Group	Zone 1	Zone 2	Zone 3
Normal	+++	+++	+++
Control	0-++	0-++	++
SHJ	+++	+++	+++

Zone 1, 문맥주변부 (periportal region); Zone 2, 소엽중간부 (midlobular region); Zone 3, 중심정맥부 (centrolobular region). 0-+++ glycogen 침적정도를 표시함 : 0, 없거나 흔적적; +, 약함; ++, 중등도; +++, 강함.



A B C

Fig. 82. 정상군 (A), ethanol (B) 및 SHJ (C) 투여군의 간에 대한 glycogen 침적. Ethanol 투여군에 비해 SHJ 투여군은 정상군과 유사하게 중심정맥 주변부에 glycogen 침적을 나타내는 강한 반응을 보이고 있음. PAS 반응.

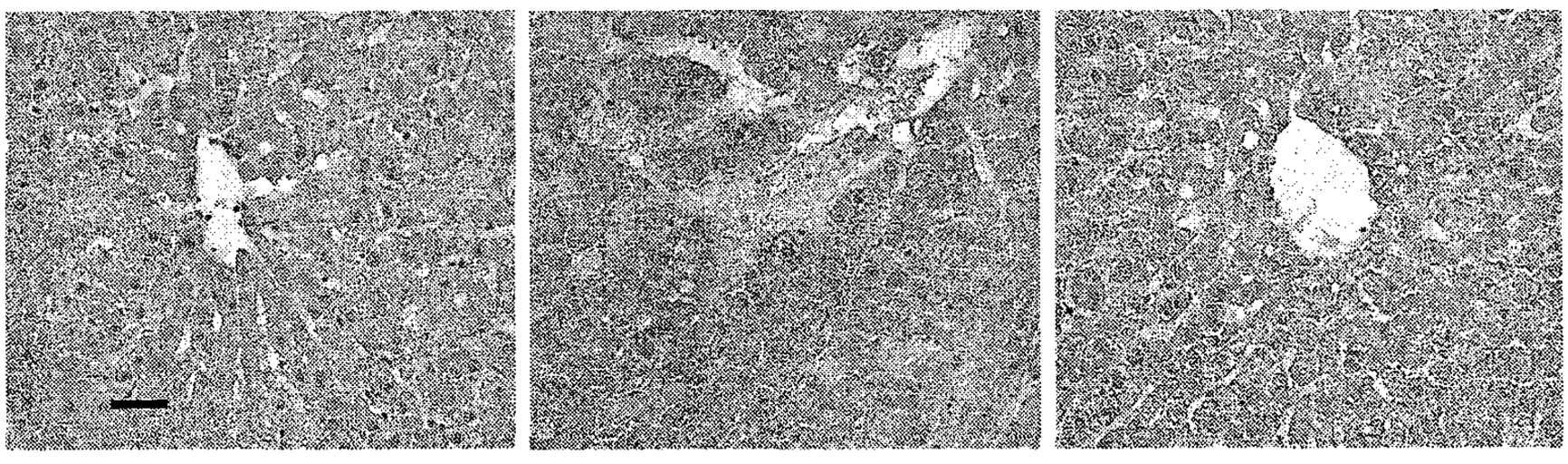
4-3. 염증관련 단백질에 대한 면역조직화학적 관찰

간에서 염증관련 단백질인 iNOS, COX-1, COX-2에 대한 면역조직화학적 반응을 살펴보았다. iNOS는 중심소엽에서 약한 반응을 보이나 그 외 간세포는 흔적적인 반응을 보이나 대조군은 이들의 반응이 다소 증가하였다. 이에 비해 SHJ 투여군은 정상군과 유사한 반응을 보였다. COX계 면역반응은 모든 간세포에서 흔적적인 반응만을 보여 주며 COX-1은 그 변화가 현저하지 않으나 COX-2는 국소적인 염증반응이나 출혈이 나타나는 부위의 반응이 증가하였다 (Table 34 및 Fig. 83 및 Fig. 84).

Table 34. 흰쥐 간에서 염증관련 단백질 발현에 대한 면역조직화학적 반응

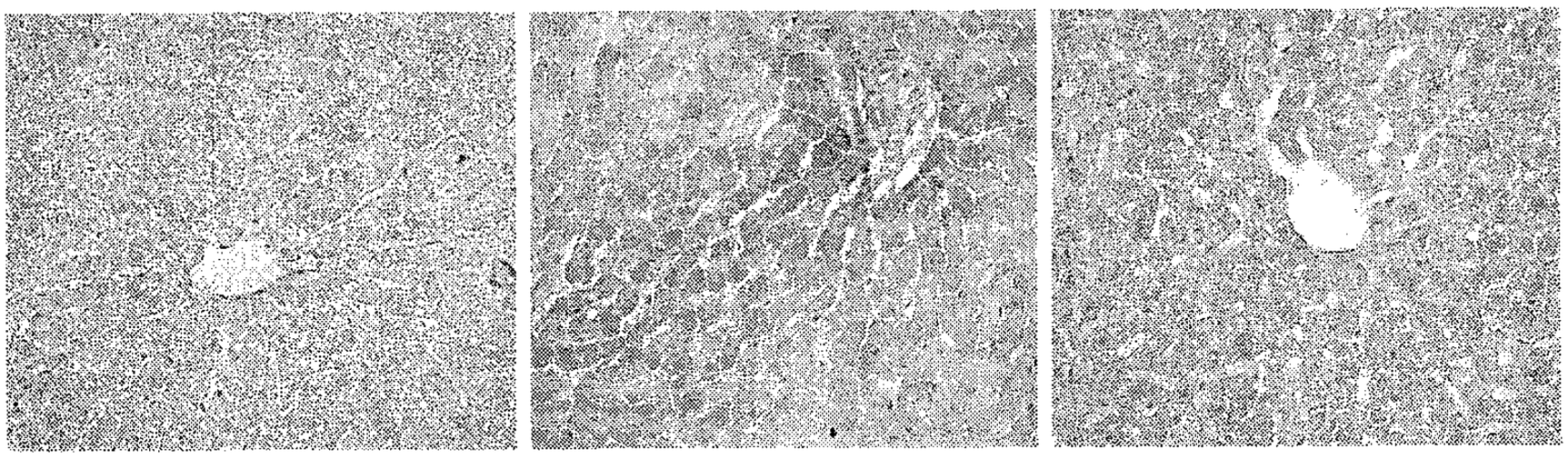
Group	iNOS	COX-1	COX-2
Normal	0-+	0-+	0-+
Control	0-++/++*	0-+	0-+/++*
SHJ	0-+	0-+	0-+

*, 이 반응은 주로 국소적 괴사 나 출혈부위에서 현저함. 0-++ 상대적인 면역반응의 정도를 표시함. 0, 없거나 흔적적; +, 약함; ++, 중등도.



A B C

Fig. 83. 정상군 (A), ethanol (B) 및 SHJ (C) 투여군의 간에 대한 iNOS 면역반응. 정상군에서 흔적적인 반응이 보이는 반면 ethanol 투여군의 반응이 현저히 증가하는 것을 볼 수 있음. SHJ투여군은 ethanol투여군에 비해 다소 낮은 반응을 보임. Scale bar = 50 um



A B C

Fig. 84. 정상군 (A), ethanol (B) 및 SHJ (C) 투여군의 간에 대한 COX-2 면역반응. Ethanol 투여군의 중심정맥주변에 현저히 반응이 증가함을 볼 수 있으나 SHJ 투여군은 정상군과 유사한 흔적적인 반응을 보임.

5. 상황버섯균사체 발효주 투여가 위 점막 손상에 미치는 영향

5-1. 위점막의 병리조직학적 관찰

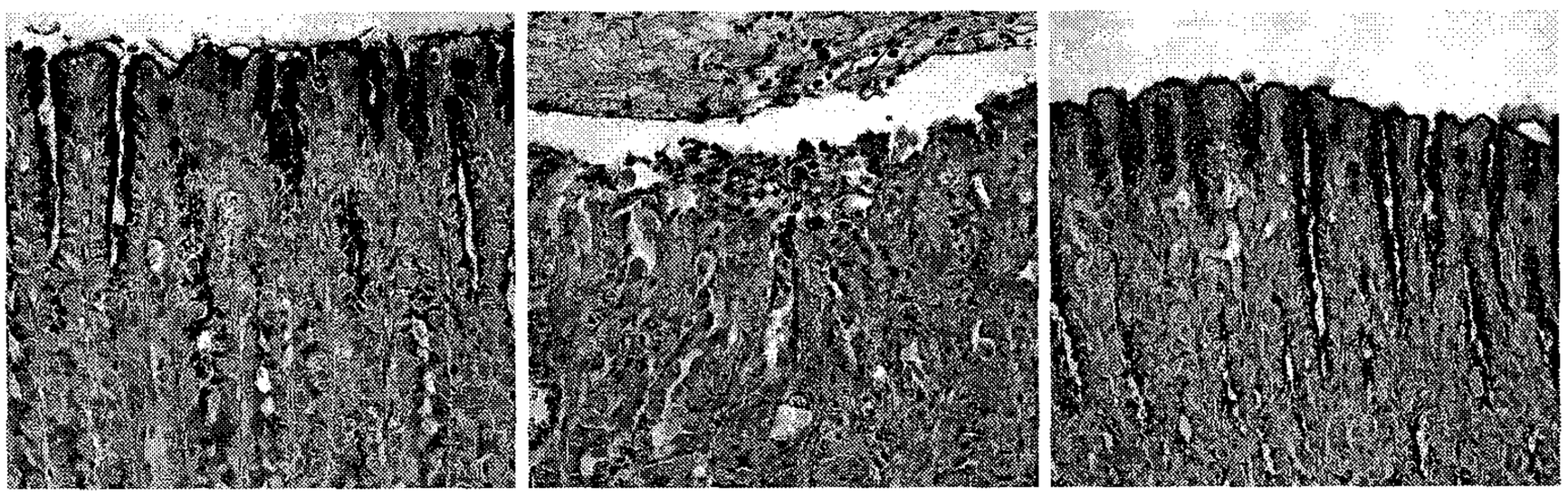
육안적으로 ethanol을 투여한 대조군의 위는 장기간의 알코올 섭취로 인해 정상군에 비해 팽대되어 있었으며 일부 출혈성 궤양의 흔적이 관찰되었다. 정상군에서 정연한 자유표면상피세포와 소와상피세포를 볼 수 있었으나 대조군에서는 표면상피세포가 탈락되어 내강에서 관찰되었다. 또한 위점막의 울혈과 부종과 더불어 일부 위소와 및 위선이 손상된 출혈성 궤양이 관찰되었다 (Table 35).

이에 비해 SHJ 투여군은 미약한 병리학적 변화가 관찰되나 정상군과 유사한 형태를 나타내었다. 위의 점액장벽을 관찰하기 위한 PAS반응에서 정상군의 정연한 상피세포에 강한 반응을 보인 반면 대조군의 궤양부위에서 손상된 상피세포에 미약한 반응을 보여 주었다. 이에 비해 SHJ 투여군은 정상군과 유사한 반응을 보여 주었다 (Fig. 85).

Table 35. 알코올 투여에 의한 흰쥐 위의 병리조직학적 소견

Group	Congestion	Edema	Hemorrhage	Necrosis
Normal	0	0	0	0
Ethanol	++	++	+	+
SHJ	0-+	0-+	0-+	0-+

0-+++ 상대적인 변형 정도를 표시함. 0, 영향이 없음; +, 미약함; ++, 중등도; +++, 심함.



A B C

Fig. 85. 정상군 (A), ethanol (B) 및 SHJ (C) 투여군의 위에 대한 현미경적 구조. 정상군과 SHJ 투여군에 비해 Ethanol투여군에서 심한 위표면상피세포의 탈락을 볼 수 있음. Scale bar = 50 ㎛

전통적으로 위궤양은 위점막내 방어인자와 공격인자의 불균형에 의해 형성되는 것으로 알려져 있다. 소화성궤양은 위산과 펩신복합체는 공격인자로 mucin-bicarbonate분비 점액층, 지질층 등은 방어인자로 보고 있다. Ethanol유발 위궤양모델에서 ethanol은 위점막에 대해 공격인자로 작용한다. 본 실험 결과에서 ethanol을 투여한 대조군에 비해 동일농도의 알코올을 가진 SHJ 투여군이 울혈, 부종 및 출혈 등 병리학적 변화가 현저히 적어 ethanol에 의한 위장 손상이 적음을 알 수 있다.

점액세포에서 분비되며 당과 단백질 결합을 총칭하는 당단백질로 구성된 물질인 점액질은 위궤양 형성과정에 매우 중요한 인자로 위장관내 물리·화학적 보호, 윤활작용, 세포막 근접 영역의 환경조성에 관여한다. 표면점액세포에서 점액질 장벽을 알아보기 위해 PAS반응을 실시한 결과 대조군은 표면상피의 점액세포가 매우 낮은 반응을 보인 반면 SHJ 투여군은 정상군과 유사한 성상을 보여 방어인자로서 점액장벽이 유지됨을 알 수 있다.

5-2. 상황버섯균사체 발효주의 투여에 따른 위 조직의 염증 관련 단백질의 변화

Western blot분석에 의한 nitrix oxide (NO)형성에 관여하는 iNOS단백질은 ethanol투여에 의해 증가하는데 비해 SHJ투여시에는 나타나지 않았다. Prostglandins (PGs)생성에 관여하는 COX-1 및 COX-2발현도 ethanol투여에 의해 발현이 증가하나 COX-1에 비해 COX-2가 현저한 증가를 보였다. 이들 발현은 SHJ투여군에서 대조군보다 낮게 나타나며 COX-2가 더 낮게 나타났다. 출혈성 궤양에서 발현이 증가되는 것으로 알려져 있는 TNF-α 및 c-Fos 역시 ethanol처리에 의해 증가하나 SHJ투여군에는 관찰되지 않았다 (Fig 86A).

그러나 RT-PCR을 통한 COX-1, COX-2의 mRNA발현을 비교해 보면 ethanol투여와 SHJ투여군 간의 차이를 보여 주지 않았다 (Fig 84B). iNOS, COX-1 및 COX-2에 대한 면역조직화학적 검색에서 COX-1와 COX-2반응은 각 군에 따른 차이를 보여 주지 않았으나 iNOS반응은 표면과 위선상피의 점액세포에서 반응을 나타내나 ethanol을 투여한 대조군의 손상된 표면상피세포에서는 반응이 관찰되지 않았다. 이에 비해 SHJ투여군은 정상군과 유

사한 반응을 보여 주었다 (Fig 87).

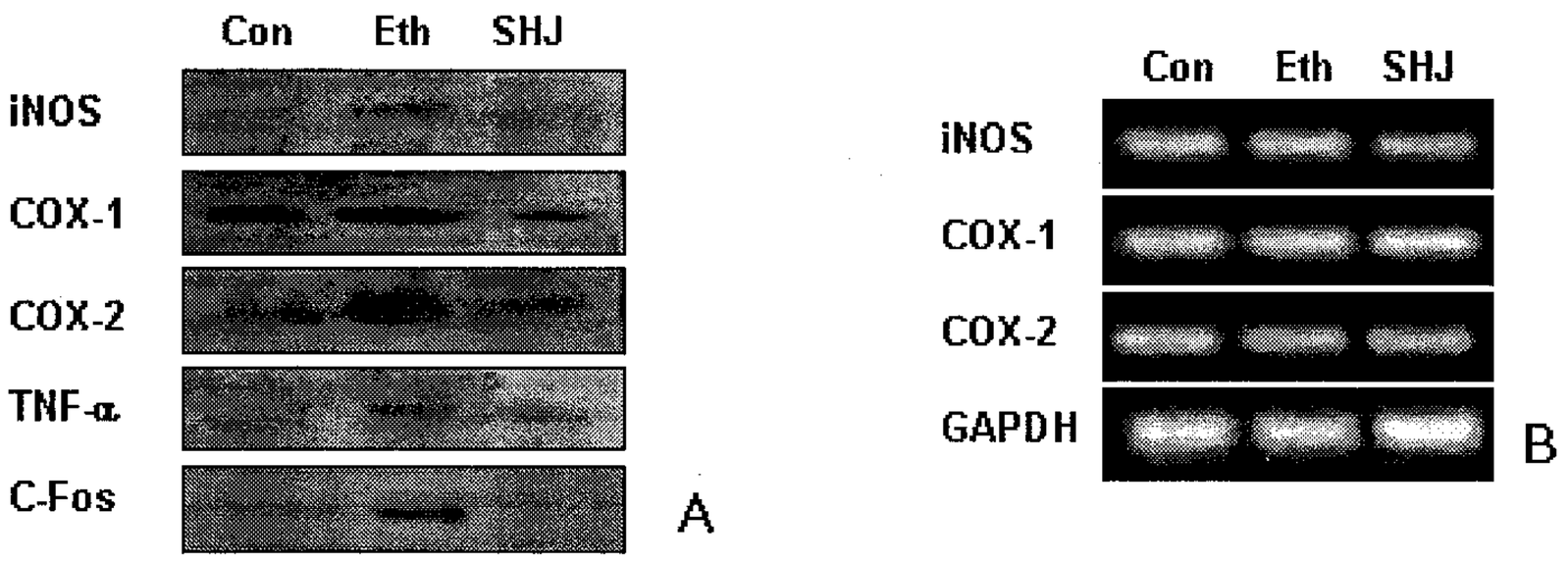


Fig 86. 흰쥐 위의 염증 및 점액관련 단백질 (A) 및 mRNA (B) 발현.

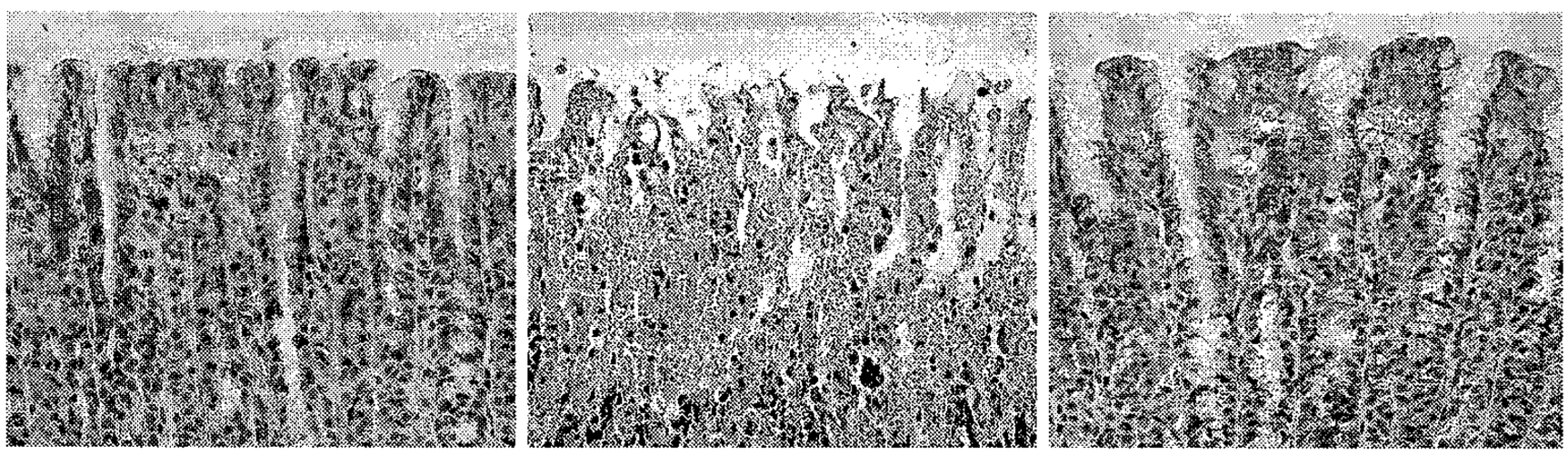


Fig 87. 정상군 (A), ethanol (B) 및 SHJ (C) 투여군의 위에 대한 iNOS 면역반응. Ethanol 투여군에 현저히 감소된 면역반응을 볼 수 있음.

iNOS는 염증성 자극이 주어질 때 발현이 유도되며 L-arginine, O_2, NADPH-derived electron으로부터 L-citrulline, NADP, NO를 생성시키며 NO는 생체내 면역체계에서 활성산소종 또는 활성산소중간매개물로 작용하여 박테리아 등에 감염된 세포가 자체 방어기전을 나타낼 때 생성된다. 그러나 위장에서 NOS는 위점막 유지와 보호에 관여하는데 이는 주로 endothelial NOS (eNOS)이 관여하며 iNOS는 위보호 작용보다는 위손상과 관련 있다.

본 실험 결과 ethanol에 의해 iNOS발현의 증가를 보여 주고 있어 ethanol같은 공격인자에 의한 iNOS의 발현으로 볼 수 있으며 SHJ투여군의 발현이 되지 않는 것으로 보아 위장손상이 적음을 알 수 있다. 그러나 면역조직화학적 반응에서 손상된 표면상피세포에서 반응이 감소하는데 이는 점액장벽의 손상에 의한 반응의 감소로 보여 진다.

염증관련 인자로 잘 알려진 PGs 중 PGE_2는 생리적으로 위장의 혈류량을 증가시키고 위산분비를 저해하여 위장관 점막보호와 위장관 점막 손상이나 궤양의 회복에 관여한다. PGs는 COX에 의해 arachidonic acid로부터 형성되며 COX-1이 구조적 성분임에 비해 COX-2는 염증과 관련한 유도성 효소로 과도한 PGs형성에 관여한다.

COX-1은 혈소판, 전립선 및 위장에서 현저히 발현되며 COX-2는 위장에서 보통 관찰되지 않으나 *Helicobactor pylori* 감염, 위궤양, 암형성, 스트레스에 노출될 때 증가한다. 그리

고 COX-2저해제 투여시 위궤양 회복이 저해되는 것으로 보아 위궤양회복에 관여한다. COX-1에 의해 생성되는 PGs는 위장 점막의 유지 등 일반적인 생리작용에 관여하며 COX-2에 의해 생성되는 PGs는 위장관 염증을 포함한 병리적 환경에서 기능을 한다. COX-1과 COX-2 모두를 저해하는 nonsteroidal anti-inflammatory drugs는 심한 위장 손상을 나타내나 선택적인 COX-2저해제는 손상이 경미하다.

COX-1은 대조군에 비해 ethanol투여에 의해 증가하나 현저하지 않으며 SHJ투여에 의해서도 유사한 발현을 보여 구조적 성분으로 COX-1의 발현으로 생리적 위장 점액장벽의 유지를 알 수 있다. COX-2의 발현은 ethanol투여에 의해 정상군에 비해 현저히 증가하는데 COX-2가 위궤양 수복에 관여하나 기본적으로 병리적 유발인자로 ethanol에 의한 위궤양 형성과정에 유발되는 것으로 보여 진다. 이에 비해 SHJ투여군은 대조군에 비해 낮은 발현을 보여 위장 손상이 적음을 알 수 있다.

6. 상황버섯 균사체 추출물 (MCPL)이 알코올성 스트레스 및 위궤양에 미치는 영향

상황버섯균사체 발효주 생산을 위해 액상배지에 배양한 상황버섯 균사체의 추출물에 대한 스트레스호르몬 및 항위궤양 효과를 조사하였다.

6-1. 스트레스성 호르몬에 미치는 영향

스트레스 연구에서 순환 catecolamine수준 증가, 특히 norepinephrine증가를 보고하고 있다. 다양한 스트레스 원은 norepinephrine, epinephrine, dopamine의 농도를 증가시키며 이들 호르몬은 면역반응조절에 관여하여 다양한 질환의 원인이 되고 있다. 본 실험에서 정상군에 비해 ethanol군에서 이들 호르몬의 현저한 증가를 관찰할 수 있으나 상황버섯 균사체 추출물을 투여한 군과는 유의성은 관찰할 수 없었다 (Fig 88,89,90).

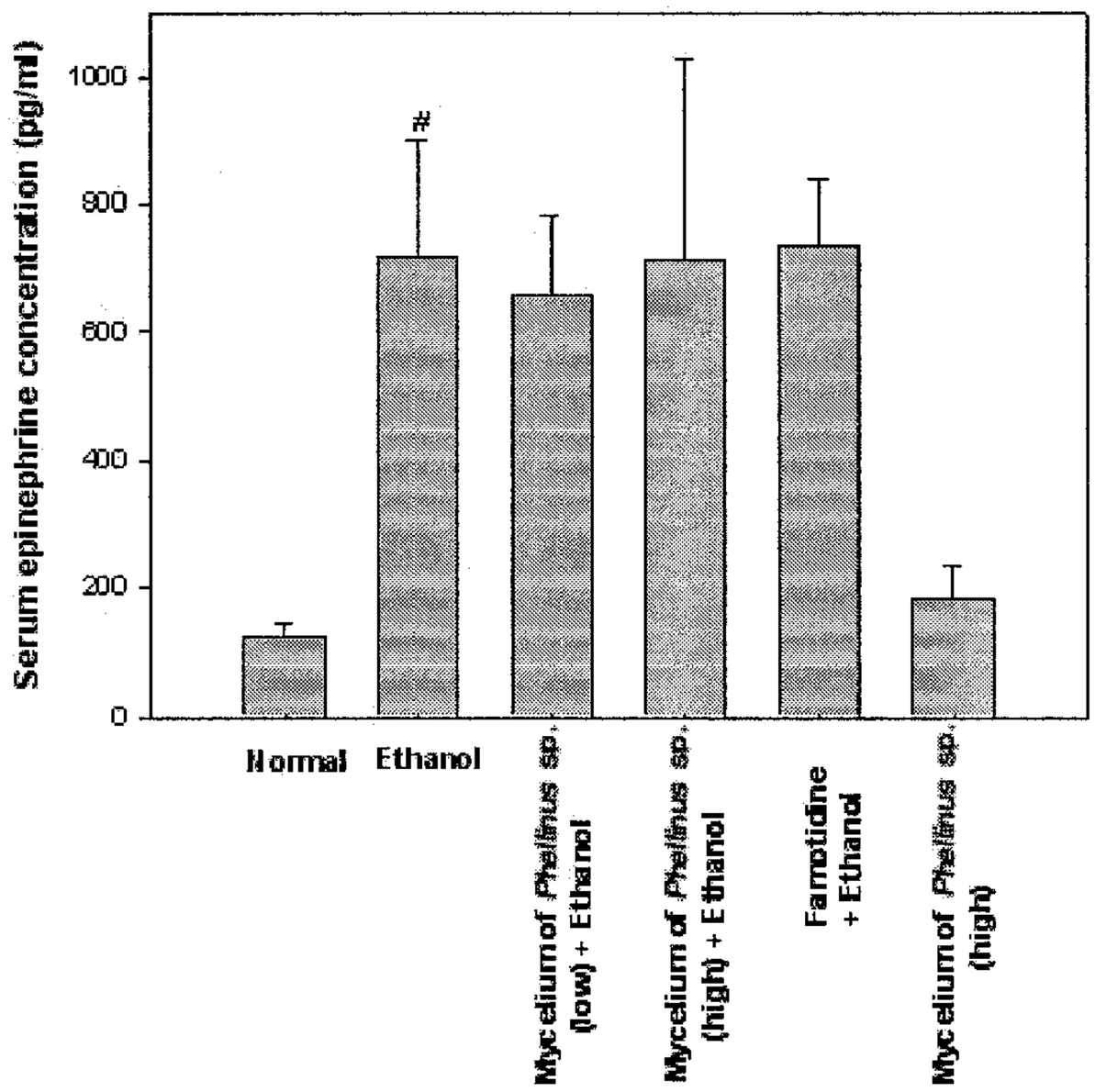


Fig 88. 흰쥐 혈장내 epinephrine의 변화. Means±SE (n=8).

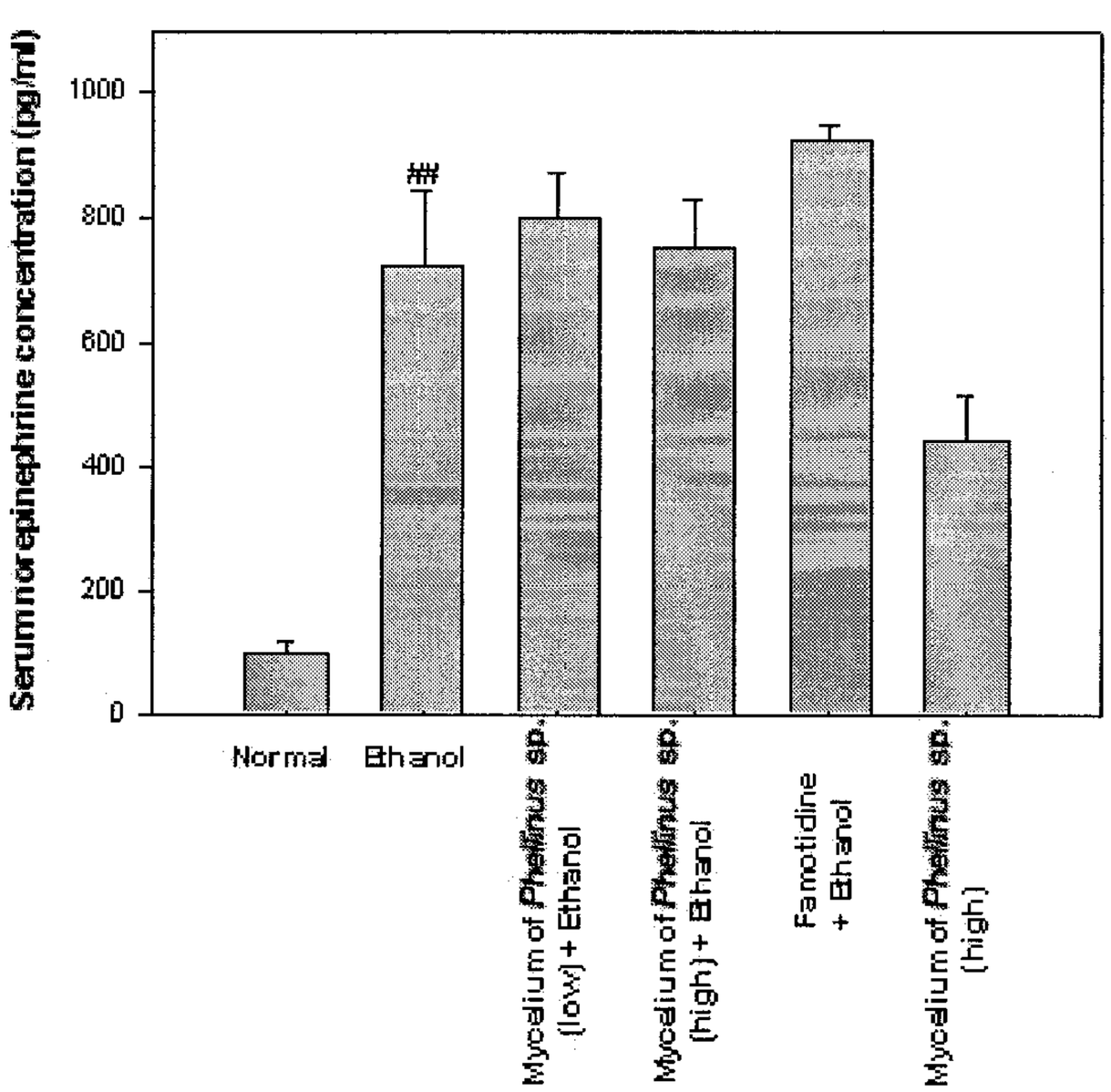


Fig 89. 흰쥐 혈장내 norepinephrine의 변화. Means±SE (n=8).

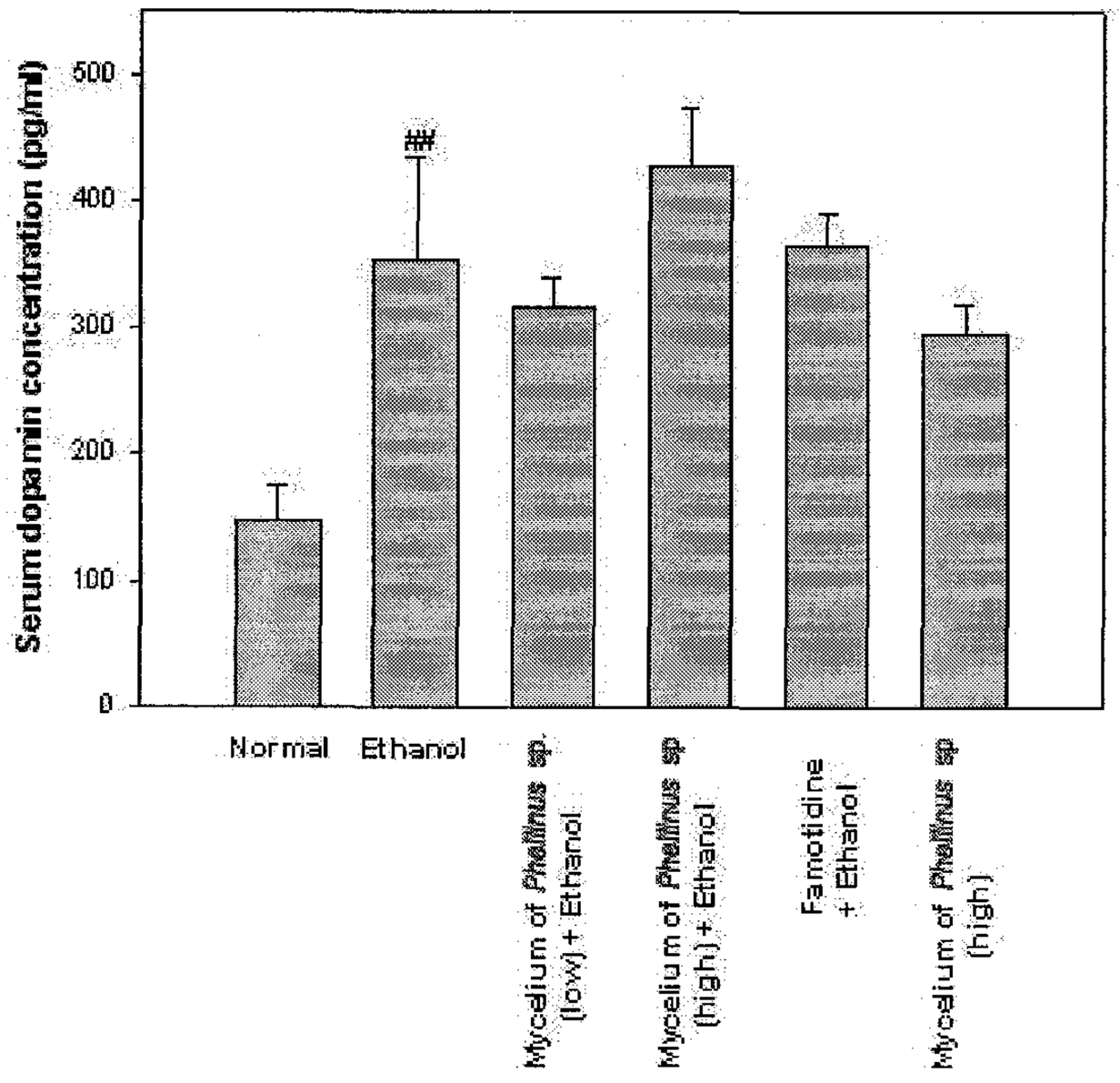


Fig 90. 흰쥐 혈장내 dopamin의 변화. Means±SE (n=8).

6-2. Alcohol성 위궤양에 미치는 영향

6-2-1. Alcohol성 위출혈 및 궤양 지표 (index)에 대한 영향

소화성 궤양은 점액장벽과 위내강내 acid peptic attack사이의 불균형으로 알려져 있다. 위산과 pepsin복합체는 공격인자로 mucin-bicarbonate분비의 점액층, 지질층, 세포증식, prostaglandins, urogastrone/epidermal healing factor가 방어인자로 보고 있다.

Table 36은 출혈 및 위궤양지표를 나타낸 표이다. 정상군과 MCPL 처리군 모두 육안적인 위점막 괴사 등이 관찰되지 않았으나 ethanol투여군에서는 출혈과 더불어 심한 위 점막 파괴를 볼 수 있었다. 그러나 ethanol을 투여하기 전 MCPL (20 및 60 ㎎/㎏)를 전처리한 군에서는 위강내 출혈지수를 현저히 저하하였다. 또한 ethanol투여군에 비해 현저히 저하된 위궤양 수 및 지수를 보였다.

Table 36. Alcohol성 위궤양에 대한 MCPL의 영향

Treatment and dose (㎎/㎏)	Bleeding index	Number of ulcer	Ulcer index (㎜)	Protection (%)
Normal	0	0.28±0.15	0.28±0.15	
Ethanol	2.33±0.21	15.17±1.11 #	9.59±1.03 #	
MCPL (20) + ethanol	1.57±0.20 *	8.74±2.07 *	6.37±1.30 *	33.6

MCPL (60) + ethanol	1.66±0.31 *	7.70±2.44 **	4.43±1.67 *	53.8
MCPL (60)	0	0.17±0.17	0.17±0.17	
Famotidine (3.6)	1.83±0.16 *	11.03±1.64 *	7.22±1.38	24.7

<.005 compared with normal; * <.05 and ** <.01 compared with ethanol alone treated rat.

6-2-2. 위의 병리조직학적 소견

Alcohol성 위궤양에 미치는 MCPL의 영향은 Table 37. 및 Fig 91에서 보는 바와 같다. Ethanol투여군에서 매우 심한 부종, 출혈 및 괴사를 보여 주었으나 MCPL을 전 처리한 군에서는 ethanol에 의한 위 손상을 현저히 감소하였으며 특히 출혈 및 괴사가 현저히 감소하였다.

Table 37. Alcohol성 위궤양에 대한 MCPL의 효과에 대한 병리조직학적 소견

Treatment and dose (㎎/kg)	Congestion	Edema	Hemorrhage	Necrosis
Normal	0	0	0	0
Ethanol	+++	+++	+++	+++
MCPL (20) + ethanol	++	++	+	+
MCPL (60) + ethanol	++	++	+	+
MCPL (60)	0	0	0	0
Famotidine (3.6)	++	++	++	++

0-+++ 상대적인 변화 정도를 표시함: 0, 변화 없음; +, 미약함; ++, 중등도; +++, 심함.

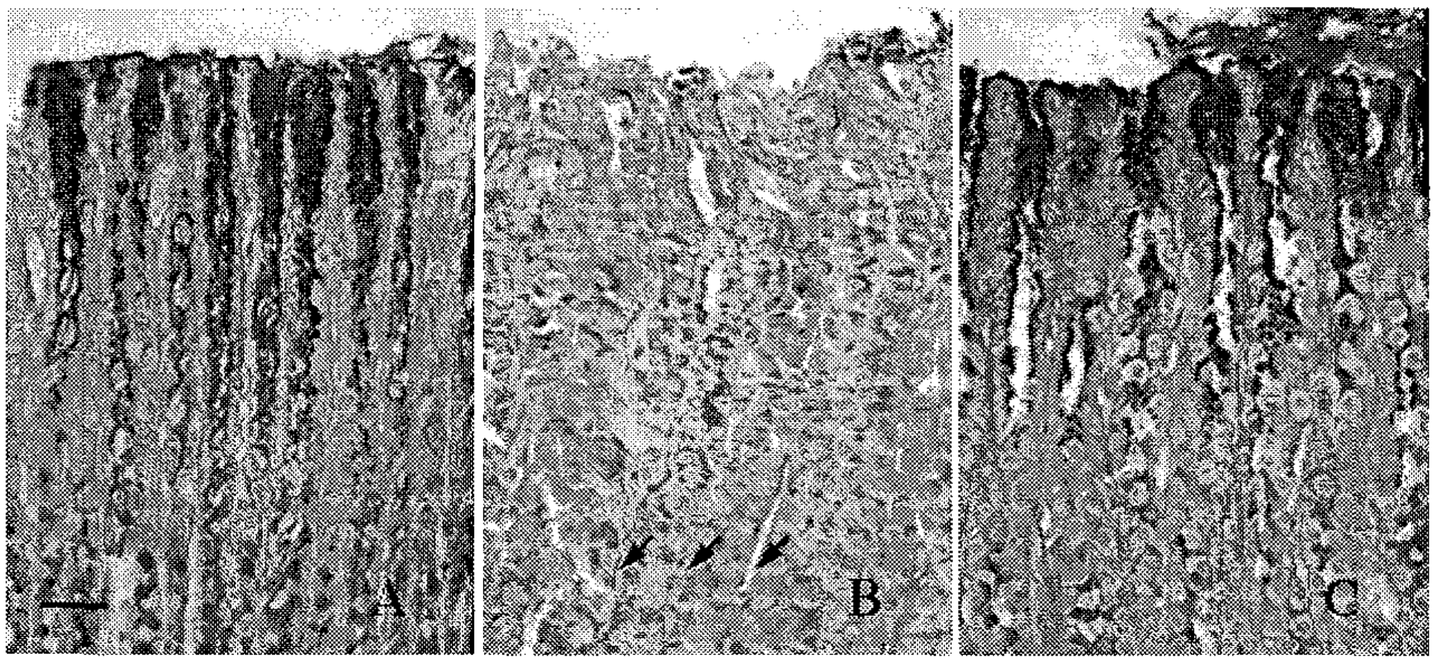


Fig 91. 정상군 (A), ethanol투여군 (B) 및 MCPL 전처리군 (C)의 위 점막에 대한 현미경적 구조. Ethanol 투여군에서 현저히 저하된 중성점액을 볼 수 있으며 하부점액경세포 (lower mucous neck cells, 화살표)에 이름을 알 수 있음. Scale bar = 50 ㎛.

6-2-3. 위의 점액 및 염증 관련 단백질의 발현

점액생성과 염증관련 단백질 발현에 대한 결과는 Fig 92에서 보는 바와 같다. NF-κBp65 및 I-κBα는 alcohol처리와 MCPL전처리에 의해 변화를 보여 주었다. NF-κBp65는 핵의 단독 발현이 아닌 전 위세포에 대한 결과로 이를 I-κBα의 발현으로 유추하면 ethanol 투여에 의한 염증 반응과 MCPL 전처이레 의한 환화 효과를 볼 수 있다. 점액생성과 연곤된 iNOS 및 COX 발현 중 COX-1에서 ethanol에 의한 발현과 MCPL 전처리에 의한 저하를 보여 주었다.

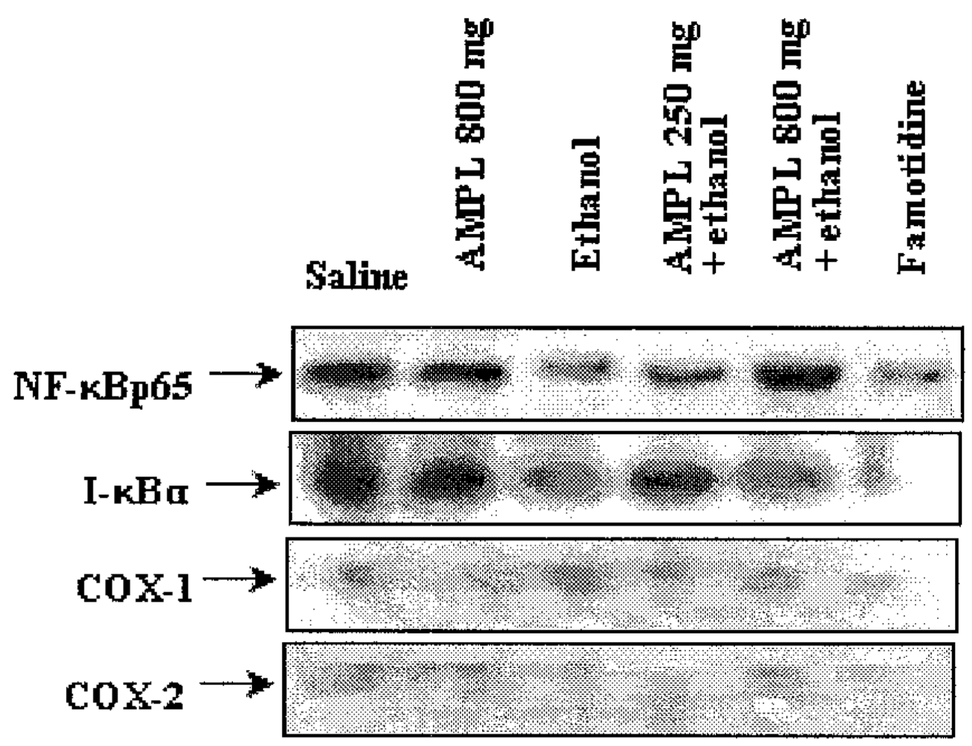


Fig 92. 위 점막의 점액생성 및 염증 관련 단백질의 발현.

6-2-4. 위의 표면 점액양에 대한 영향

이 표면 점액양 (adhesion mucus content)에 대한 결과는 Table 38에서 보는 바와 같다. 위 표면점액은 위강내 위궤양인자 (ulcerogens)에 대한 장벽으로 작용한다. Ethanol 투여에 의해 점액양은 현저히 감소하나 MCPL (20 및 60 ㎎/㎏)을 전처리한 군은 점액양이 유지되어 위점막 보호 기능이 유지됨을 알 수 있다.

Table 38. 위표면 점약양에 대한 MCPL의 효과

Treatment and dose (㎎/㎏)	Normal	Ethanol	MCPL (20) + ethanol	MCPL (60) + ethanol	MCPL (60)	Famotidine (3.6)
O.D./g of wet glandular tissue	6.28±0.52	3.97±0.32 #	5.23±0.46 *	5.72±0.25 **	6.68±0.42	5.45±0.33 **

<.005 compared with normal; * <.05 and ** <.01 compared with ethanol alone treated rat.

6-2-5. 위점막 복합당질에 대한 조직화학적 검색

위 점막의 보호인자로 작용하는 점액에 대한 검색을 조직화학적으로 검색한 결과는 표 6-2-4와 같다. 위 점액의 주된 분비세포인 자유면상피세포와 소와상피세포 같은 표면상피세포 및 점액경세포에 대해 관찰하였다. 중성점액질을 나타내는 PAS반응은 표면상피세포와 상부점액경세포에서 강하게, 하부점액경세포에서는 약하게 나타났다. 산성점액질을 타나내는 alcian blue염색은 하부 점액경세포를 제외하고 모두 관찰되며 황화점액질 (sulfated mucin)을 나타내는 aldehyde fuchsin 염색은 위소와상피세포와 상부점액경세포에서만 관찰되었다.

Alcohol 투여에 의한 점액성을 보면 표면상피세포는 물론 선내 점액세포에 이르기까지 중성과 산성 점액질 모두 현저히 감소하였으며 일부 위 소와상피세포에 황화점액질도 관찰되었다. 그러나 MCPL을 전처리한 군에서는 이러한 점액질의 감소가 현저히 완화되며 특히 선내 점액세포인 점액경세포의 감소가 현저히 저하되었다. 또한 위소와에서 관찰되던 황화점액질도 감소하였다.

Table 39. 위 점막 복합당질에 대한 조직화학적 검색

Stains/dose (㎎/㎏)	Region	Normal	Ethanol	MCPL (20)+ethanol	MCPL (60)+ethanol	MCPL (60)	Famotidine (3.6)
PAS	FSMC	3	0/3	0-2/3	0-2/3	3	0-2/3
	GPMC	3	0/3	0-2/3	0-2/3	3	0-2/3
	UMNC	3	0/2	3	3	3	3
	LMNC	1-2	0/1	1-2	1-2	1-2	1-2
AB at pH 2.5	FSMC	2	0/1	0-2/2	0-2/2	2	0/1
	GPMC	2	0/2	0-2/2	0-2/2	2	0/2
	UMNC	2	0/2	2	2	2	2
	LMNC	0	0	0	0	0	0
AB at pH 1.0	FSMC	1	0/1	0/1	0/1	1	0/1
	GPMC	2	0/2	2	2	2	0/1
	UMNC	2	0/2	2	2	2	2
	LMNC	0	0	0	0	0	0
AF at pH 1.7-AB at pH 2.5	FSMC	3R	0/3R,3BP	0/3R	0/3R	3R	0/3R
	GPMC†	3R,3BP	0/3BP	0/3R,3BP	0/3,3BP	3R,3BP	0/3R,3BP
	UMNC	3BP	0/3BP	3BP	3BP	3BP	3BP
	LMNC	2R	0/2R	2R	2R	2R	2R

수자는 상대적인 염색성 정도를 표시함: 3, 강함; 2, 중등도; 1, 약함; 0, 없음; FSMC, 표면상피세포 중 자유면상피세포 (free surface mucous cells in the surface epithelium); GPMC, g표면상피세포 중 위소와상피세포 (gastric pit mucous cells in the surface epithelium); UMNC, 상부점액경세포 (upper mucous neck cells in the gland epithelium); LMNC, 하부점액경세포 (lower mucous neck cells in the gland epithelium); AB, alcian blue; AF, aldehyde fuchsin; B, blue; BP, bluish purple; /, 괴사부/비괴사부의 상이한 염색성; †, 산성점액질을 분비하는 bluish purple색을 띈 세포가 주로 위소와 하부에서 관찰됨.

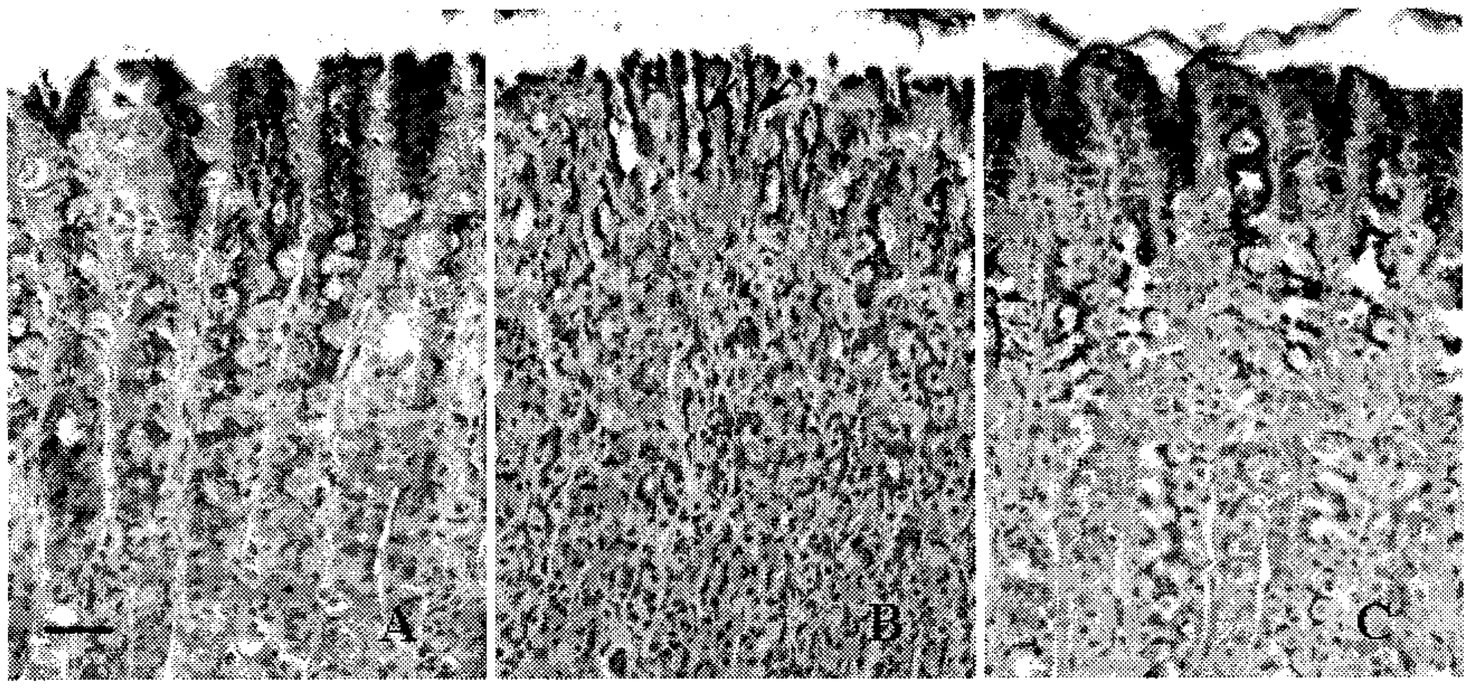


Fig 93. 정상군 (A), ethanol 투여군 (B) 및 MCPL 전처리군 (C)에 대한 AF pH 1.7 및 AB pH 2.5의 복합염색. 황화와 비황화 점액질의 혼합성인 bluish purple색을 띈 세포 (화살표)가 ethanol 투여군의 위소와에서 관찰되나 MCPL 처리군에서 관찰되지 않음. Scale bar = 50 ㎛.

6-2-6. 위점막 복합당질에 대한 lectin 조직화학적 검색

위 점막의 복합당질에 대한 lectin 조직화학적 검색은 Table 40에서 보는 바와 같다. 대부분의 lectin은 벽세포 (parietal cells)에서 강한 반응을 보였으나 점액분비세포에 한정하여 관찰하였다. 다양한 SBA, BSL-1, sWGA 및 Con A 반응이 표면과 선내 점액세포에서 관찰되며 β-N-acetyl-D-glucosamine을 인지하는 sWGA 반응이 강하게 나타났다. Ethanol 투여군에서 위궤양이 형성된 부위에 α/β-N-acetyl-D-galactosamine를 인지하는 SBA반응이 증가하나 다른 lectin 염색성은 감소하였다. 특히 α-D-galactose을 인지하는 BSL-1반응은 표면상피세포와 상부점액경세포에서 관찰되지 않았다. 그러나 MCPL을 전처리한 군에서는 정상군과 유사한 lectin 반응을 보여 주어 MCPL에 의한 복합당질의 유지가 지속됨을 알 수 있었다.

Table 40. 위 점막 복합당질에 대한 lectin 조직화학적 검색

Stains/dose(㎎/㎏)	Region	Normal	EtOH	MCPL (20) +ethanol	MCPL (60)+ ehtanol	MCPL (60)	Famotidine (3.6)
SBA	FSMC	1	0-1/2	1	1	1	1
	GPMC	1-2	1/2	1-2	1-2	1-2	1-2
	UMNC	1-2	1	1-2	1-2	1-2	1-2
	LMNC	0-1	0-1	0-1	0-1	0-1	0-1
BSL-1	FSMC	0-1	0	0-1	0-1	0-1	0-1
	GPMC	0-1	0	0-1	0-1	0-1	0-1
	UMNC	1	0	1	1	1	1
	LMNC	1	0-1	1	1	1	1
sWGA	FSMC	1	0-1	1	1	1	1
	GPMC	1-2	0-1	1-2	1-2	1-2	1-2
	UMNC	2	1-2	2	2	2	2
	LMNC	3	2	3	3	3	3
Con A	FSMC	2	1-2	2	2	2	2
	GPMC	2	1-2	2	2	2	2
	UMNC	2	1-2	2	2	2	2
	LMNC	1	1	1	1	1	1

약어는 Table 40과 같음.

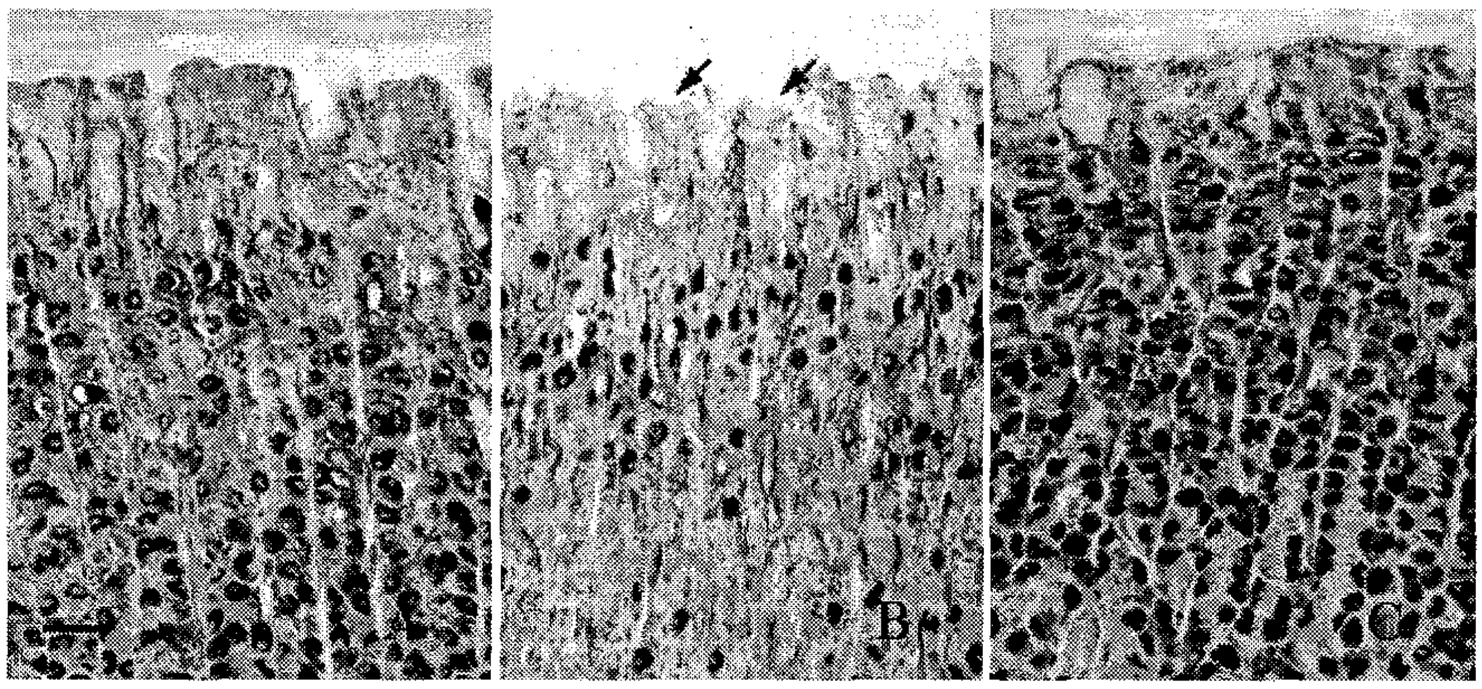


Fig 94. 정상군 (A), ethanol 투여군 (B) 및 MCPL 전처리군 (C)에 대한 BSL-1 반응. Ethanol 투여군에서 표면상피세포에 정상군에 비해 매우 약한 반응을 볼 수 있으나 MCPL 전처리에 의한 반응이 유지됨을 보임. Scale bar = 50 ㎛.

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

제 1 절 목표달성도

1. 1차년도 (2003~2004)

구분	연구 개발 목표	연구 개발 내용 및 범위	달성도(%)
제 1 세부과제	▶ 버섯균사체 종균배양 및 알코올 생산 최적화	○ 종균 보존 시스템의 확립	100
		○ 종균의 액체배양을 위한 최적 조건의 설정	100
		○ 종균으로부터 알코올 생산을 위한 최적 조건 확립	100
		○ 종균 유래의 alcohol dehydrogenase 의 확인과 특성규명	100
		○ 종균으로부터 amylase 등 효소 분비 확인	100
		○ 주류 생산을 위한 기초적 실험 확립	100
제 2 세부과제	▶종균이생산하는 약리성분물질의 분석	○ 배양액으로부터 약리물질 분리 시스템 구축	100
		○ 다당체의 정량법 확립	100
		○ 단백성 다당체의 정량법 확립	100
		○ 약리 성분물질의 용매 안정성 확립	100
		○ 유효물질의 특성과 제반 성상을 파악	100
제 3 세부과제	▶ 종균이생산하는 유효물질에 대한 생리활성 검정 및 실험동물 모델에 대한 적용	○ 세포주를 이용한 기능성 주류의 알코올 분해 기전에 대한 연구	100
		○ 세포주를 이용한 기능성 주류의 항산화 작용에 대한 효능 연구	100
		○ 세포주를 이용한 기능성 주류의 염증관련 인자에 대한 효능 검증	100
		○ 실험동물 모델에서 기능성 주류에 대한 단기 및 장기적 복용에 의한 생화학적 및 내분비학적 분석	100

2. 2차년도 (2004~2005)

구분	연구개발 목표	연구개발 내용 및 범위	달성도
제 1 세부과제	▶약리성분함유신기능성 주류개발	○ 종균의 대량생산 배지의 개발과 대량배양 체제 구축	100
		○ Koji제조시 종균의 접종률과의 검정	100
		○ 약리물질 함량을 증가하기 위한 대책 확립	100
		○ 증자, 무증자 발효에 의한 주류생산 효율성 비교	100
		○ 소규모의 주류발효를 통한 초기 pH, 품온조절을 위한 최적 생산 환경의 구축	100
제 2 세부과제	▶제품의 영양·식품학적분석 및 약리성분의 증대 방안 확립	○ 생산된 주류에 대한 영양·식품학적 분석	100
		○ 생산된 주류에 함유된 약리물질의 분석	100
		○ 주류에 약리성분을 증가하기 위한 식품학적 대책 구축	100
		○ 향과 맛을 개발하기 위한 식품학적 대책 구축	100
		○ 생산 주류 고유 향의 분석	100
		○ 제품의 소비자 선호도를 높이기 위한 대책의 확립	100
제 3 세부과제	▶기능성 주류의 실험모델적용에 의한 효능 검증 및 간질환 모델에 대한 적용	○ 질환 모델에서 면역기능 증강 가능성 규명	100
		○ 스트레스성 동물 모델에서 NO관련 인자 분석	100
		○ 호르몬 분석을 통한 항 스트레스성 기능 검정	100
		○ 알코올성 간질환 모델에 대한 적용 가능성 평가	100
		○ NF-kB를 중심으로 한 염증 관련 인자에 대한 분자 생물학적 및 면역조직화학적 분석	100

3. 3차년도 (2005~2006)

구분	연구 개발 목표	연구 개발 내용 및 범위	달성도(%)
제 1 세부과제	▶신 기능성 주류의 대량생산과 제품화	○ 주류의 대량생산 체제에 대비한 발효 화경 조건의 설정확립	100
		○ 대량 주류 발효시 초기 종균 생육 조건의 확립	100
		○ 버섯추출물 첨가에 따른 발효 중 문제점 해결	100
		○ 공장 수준의 시설에서 신 기능성 주류의 대량생산 시범운행	100
		○ 신 기능성 주류 제품을 위한 시제품의 생산	100
제 2 세부과제	▶고 선호도 주류 제품의 완성	○ 주류제품화를 위한 단백질, 유리아미노산, 지질당, 미량원소 등의 성분 분석을 통한 제품 규정에 맞게 기준을 확립	100
		○ 향, 맛을 소비자 기호에 맞추어 조성비를 확립함	100
		○ 주세법 규정에 맞춘 제품허가 기준에 준한 검정 완료	100
제 3 세부과제	▶ 간 질환 모델에서 합병증 유발에 대한 신 기능성 주류의 효능작용 및 바람직한 기능성 주류의 근거 도출	○ 위장 질환 모델에 대한 기능성 주류에 대한 영향을 PEG2, 및 Cox를 중심으로 한 인자 분석	100
		○ 위장 보호인자로서 점액질의 복합당질 분석을 통한 위장 보호 기능 분석	100
		○ 알코올성 질환 모델의 합병증 유도에 대한 기능성 주류의 작용	100
		○ 동물실험을 통한 부작용이 적은 기능적 주류에 대한 적절한 근거 도출	100

참고문헌

1. Jae-Mo Sung, Young-Sang Choi, Bhushan Shrestha and Young-Joon Park. 2002. Cultural Characteristics of Mycelial Growth by *Cordyceps militaris*. THE KOREAN JOURNAL OF MYCOLOGY. Vo 30 : No 1
2. June-Woo Lee, Sung-Jin Baek, Kwang-Woong Bang, Shin-Wook Kang, Sang-Mo Kang, Byung-Yong Kim and Ick-Su Ha. 2000. Biological Activities of Polysaccharide Extracted from the Fruit Body and Cultured Mycelia of *Phellinus linteus* IY001. KOREAN J. FOOD SCI. TECHNOL. Vol. 32 : 726~735
3. Young-Kyung Rhee, Myung Joo Han, Soon-Young Park and Dong-Hyun Kim. 2000. In vitro and vivo Antitumor Activity of the Fruit Body of *Phellinus linteus* KOREAN J. FOOD SCI.TECHNOL Vol. 32 : 477~480
4. June-Woo Lee, Sung-Jin Baek, Kwang-Woong Bang, Shin-Wook Kang, Sang-Mo Kang, Byung-Yong Kim and Ick-Su Ha. 2000. Biological Activities of Polysaccharide Extracted from the Fruit Body and Cultured Mycelia of *Phellinus linteus* IY001. KOREAN J. FOOD SCI. TECHNOL Vol 32 : 726~735
5. Jeong-Hwan Ji, Mi-Nam Kim, Cha-Kwon Chung and Seung-Shi Ham. 2000. Antigenotoxic Effects of *Phellinus linteus* and *Agaricus blazei* Murill Extracts. J. Korean Soc. Food Sci. Nutr. 29(3) : 513~517
6. Jeong-Hwan Ji, Mi-Nam Kim, Cha-Kwon Chung and Seung-Shi Ham. 2000. Antimutagenic and Cytotoxicity Effects of *Phellinus linteus* Extracts. 2000. J. Korean Soc. Food Sci. Nutr. 29(2), 322~328
7. Myung-Eun Jung, Seung-Shi Ham, Sang-Myung Nam, Il-Jun Kang, Soo-Jin Kim and Cha-Kwon Chung. 2001. Biochemical and Histological Effects of *Phellinus linteus* Methanol Extract on Liver Lipid Metabolism Of Rats Fed CCl_4 and High Fat. J. Korean Soc. Food Sci. Nutr. 30(2), 331~337
8. June-Woo Lee and Kwang-Woong Bang. 2001. Biological Activity of *Phellinus* spp. Food Industry and Nurrition 6(1). 25~33
9. Ikekawa, J., Nakamishi, M., Uehara, N., Chihara, G., and Fukuoka, F. 1968. Antitumor action of some basidiomycetes especially *Phellinus limteus*. *Gann* 59 : 155~157
10. Larsen, M. J. and Cobb-Poulle. 1988. One Gifford pinchchot Drive Madison, *Phellinus* (Hymenochaetaceae). 1~6.
11. Lee, J. H., Cho, S. M., Ko, K. S. and Yoo, I. D. (1995) Effect of cultural condition on polysaccharide production and its monosaccharide composition in *Phellinus linteus* L13202. *Kor. J. Mycol.* 23, 325~331.
12. Song, K. S., Cho, S. M., Ko, K. S. Han, M. W. and Yoo, I. D. (1994) Secondary metabolites from the mycelial culture broth of *Phellinus linteus*. *J. Korean Aric. Chem. Soc.* 37, 100~104
13. Lee, J. H., Cho, S. M., Song., K. S., Hong, N. D., Yoo, I. D., 1996a. Cheracteriztion of carbohydrate-peptide linkage of acidic heteroglycopeptide with immunostimulating activity from mycelium of *Phellinus linteus*. *Chem. Pharm. Bull.* 44(5), 1093~1095

14. Lee, J. H., Cho, S. M., Song., K. S., Han, S. B., Kim, H. M., Hong, N. D., Yoo, I. D., 1996b. Immunostimulating activity and chracterization of polysaccharides from mycellium of *Phellinus linteus. J. Microbiol. Biotech.* 6 (3), 213~218.
15. Jung-Mi Choi and Sung-Ja Koo. 2000. Effects of β-Glucan from *Agaricus blazei* Murill on Blood Glucose and Lipid Composition in db/db Mice. KOREAN J. FOOD SCI. TECHNOL vol.32: 1418-1425
16. Jeong-Woo Choi, Dong-Yeul Ryu, Young-Kee, Eok-Gui Hong, Myung-Sang Kwun, and Jin-Soo Han. 2000. Extraction and purification of Bioactive Materials from *Agaricus blazei* Fruiting Bodies. Korean J. Biotechnol. Bioeng. vol. 15 : 293~298
17. Jeong-Hwan Ji, Mi-Nam Kim, Kun-Pyo Choi, Cha-Kwon Chung and Seung-Shi Ham. 2000. Antimutagenic and Cytotoxicity Effects of *Agaricus blazei* Murill Extracts. KOREAN J. FOOD SCI. TECHNOL Vol. 32 : 1371~1371
18. Kim,Y.M K.H.Cho, Y.H.Kim, S.H.Lee. S.S.Oh. A Study of Depress Drying Technical for Mushroom(I)-Drying characteristics of mushroom and *Agricus blazei*
19. OKamura, T., T. Ogata, N. Minamimoto, T. Takeno, H. Noda, S. Fukuda and M. Ohsugi, 2001, Characteristics of wine produced by mushroom fermentation., Biosci. Biotechnol, Biochem., 65(7), 1596-1600
20. Okamura, T. eta;., 2000, Production of sake by mushroom fermentation, 일본 응용 버섯 학회지, Vol.8 No.3, 109-114
21. Ando, N., Kono, T., Iwamoto, J., Kikuchi-Utsumi, K., Yoneda, M., Karasaki, H., Kasai, S., 1998. Nitric oxide release from the liver surface to the ıntraabdominal cavity during acute endotoxemia in rats. Nitric Oxide 2, 481-488.
22. Arenzana-Seisdedos, F., Turpin, P., Rodriguez, M., Thomas, D., Hay, R.T., Virelizier, J.L., Dargemont, C., 1997. Nuclear localization of I kappa B alpha promotes active transport of NF-kappa B from the nucleus to the cytoplasm. J. Cell Sci. 110, 369-378.
23. Buttery, L.D.K., Evans, T.J., Springall, D.R., Carpenter, A., Cohen, J., Polak, J.M., 1994. Immunochemical localization of inducible nitric oxıde synthase in endotoxin-treated rats. Lab. Invest. 71, 755-764.
24. Díaz-Guerra, M.J.M., Velasco, M., Martín-Sanz, P., Bosca, L., 1996. Evidence for common mechanisms in the transcriptional control of type II nitric oxide synthase in isolated hepatocytes: Requirement of NF-B activation after stimulation with bacterial cell wall products and phorbol esters. J. Biol. Chem. 271, 30114-30120.
25. Hong, K., Chu, A., Ludviksson, B.R., Berg, E.L., Ehrhardt, R.O., 1999. IL-12, independently of IFN-gamma, plays a crucial role in the pathogenesis of a murine psoriasis-like skin disorder. J. Immunol. 162, 7480-7491.
26. Sen, R., Baltimore, D., 1986. Inducibility of kappa immunoglobulin enhancer-binding protein NF-κB by a posttranslational mechanism. Cell 47, 921-928.
27. Yamakawa, T., Eguchi, S., Matsumoto, T., Yamakawa, Y., Numaguchi, K., Miyata, I., Reynolds C.M., Motley, E.D., Inagami, T., 1999. Intracellular signaling in rat

cultured vascular smooth muscle cells: Roles of nuclear factor-B and p38 mitogen-activated protein kinase on tumor necrosis factor- production, Endocrinology 140, 3562-3573.

28. Jae-Mo Sung, Young-Sang Choi, Bhushan Shrestha and Young-Joon Park. 2002. Cultural Characteristics of Mycelial Growth by *Cordyceps militaris.* THE KOREAN JOURNAL OF MYCOLOGY. Vo 30 : No 1
29. June-Woo Lee, Sung-Jin Baek, Kwang-Woong Bang, Shin-Wook Kang, Sang-Mo Kang, Byung-Yong Kim and Ick-Su Ha. 2000. Biological Activities of Polysaccharide Extracted from the Fruit Body and Cultured Mycelia of *Phellinus linteus* IY00l. KOREAN J. FOOD SCI. TECHNOL. Vol. 32 : 726~735
30. Young-Kyung Rhee, Myung Joo Han, Soon-Young Park and Dong-Hyun Kim. 2000. In vitro and vivo Antitumor Activity of the Fruit Body of *Phellinus linteus* KOREAN J. FOOD SCI.TECHNOL Vol. 32 : 477~480
31. June-Woo Lee, Sung-Jin Baek, Kwang-Woong Bang, Shin-Wook Kang, Sang-Mo Kang, Byung-Yong Kim and Ick-Su Ha. 2000. Biological Activities of Polysaccharide Extracted from the Fruit Body and Cultured Mycelia of *Phellinus linteus* IY001. KOREAN J. FOOD SCI. TECHNOL Vol 32 : 726~735
32. Jeong-Hwan Ji, Mi-Nam Kim, Cha-Kwon Chung and Seung-Shi Ham. 2000. Antigenotoxic Effects of *Phellinus linteus* and *Agaricus blazei* Murill Extracts. J. Korean Soc. Food Sci. Nutr. 29(3) : 513~517
33. Jeong-Hwan Ji, Mi-Nam Kim, Cha-Kwon Chung and Seung-Shi Ham. 2000. Antimutagenic and Cytotoxicity Effects of *Phellinus linteus* Extracts. 2000. J. Korean Soc. Food Sci. Nutr. 29(2), 322~328
34. Myung-Eun Jung, Seung-Shi Ham, Sang-Myung Nam, Il-Jun Kang, Soo-Jin Kim and Cha-Kwon Chung. 2001. Biochemical and Histological Effects of *Phellinus linteus* Methanol Extract on Liver Lipid Metabolism Of Rats Fed CCl_4 and High Fat. J. Korean Soc. Food Sci. Nutr. 30(2), 331~337
35. June-Woo Lee and Kwang-Woong Bang. 2001. Biological Activity of *Phellinus* spp. Food Industry and Nurrition 6(1). 25~33
36. Ikekawa, J., Nakamishi, M., Uehara, N., Chihara, G., and Fukuoka, F. 1968. Antitumor action of some basidiomycetes especially *Phellinus limteus. Gann* 59 : 155~157
37. Larsen, M. J. and Cobb-Poulle. 1988. One Gifford pinchchot Drive Madison, *Phellinus* (Hymenochaetaceae). 1~6.
38. Lee, J. H., Cho, S. M., Ko, K. S. and Yoo, I. D. (1995) Effect of cultural condition on polysaccharide production and its monosaccharide composition in *Phellinus linteus* L13202. *Kor. J. Mycol.* 23, 325~331.
39. Song, K. S., Cho, S. M., Ko, K. S. Han, M. W. and Yoo, I. D. (1994) Secondary metabolites from the mycelial culture broth of *Phellinus linteus. J. Korean Aric. Chem. Soc.* 37, 100~104
40. Lee, J. H., Cho, S. M., Song., K. S., Hong, N. D., Yoo, I. D., 1996a. Cheracteriztion of carbohydrate-peptide linkage of acidic heteroglycopeptide

with immunostimulating activity from mycelium of *Phellinus linteus*. *Chem. Pharm. Bull.* 44(5), 1093~1095

41. Lee, J. H., Cho, S. M., Song., K. S., Han, S. B., Kim, H. M., Hong, N. D., Yoo, I. D., 1996b. Immunostimulating activity and chracterization of polysaccharides from mycellium of *Phellinus linteus*. *J. Microbiol. Biotech.* 6 (3), 213~218.
42. Jung-Mi Choi and Sung-Ja Koo. 2000. Effects of β-Glucan from *Agaricus blazei* Murill on Blood Glucose and Lipid Composition in db/db Mice. KOREAN J. FOOD SCI. TECHNOL vol.32: 1418-1425
43. Jeong-Woo Choi, Dong-Yeul Ryu, Young-Kee, Eok-Gui Hong, Myung-Sang Kwun, and Jin-Soo Han. 2000. Extraction and purification of Bioactive Materials from *Agaricus blazei* Fruiting Bodies. Korean J. Biotechnol. Bioeng. vol. 15 · 293~298
44. Jeong-Hwan Ji, Mi-Nam Kim, Kun-Pyo Choi, Cha-Kwon Chung and Seung-Shi Ham. 2000. Antimutagenic and Cytotoxicity Effects of *Agaricus blazei* Murill Extracts. KOREAN J. FOOD SCI. TECHNOL Vol. 32 : 1371~1371
45. Kim,Y.M K.H.Cho, Y.H.Kim, S.H.Lee. S.S.Oh. A Study of Depress Drying Technical for Mushroom(I)-Drying characteristics of mushroom and *Agricus blazei*
46. OKamura, T., T. Ogata, N. Minamimoto, T. Takeno, H. Noda, S. Fukuda and M. Ohsugi, 2001, Characteristics of wine produced by mushroom fermentation., Biosci. Biotechnol, Biochem., 65(7), 1596-1600
47. Okamura, T. eta;., 2000, Production of sake by mushroom fermentation, 일본 응용 버섯 학회지, Vol.8 No.3, 109-114
48. Ando, N., Kono, T., Iwamoto, J., Kikuchi-Utsumi, K., Yoneda, M., Karasaki, H., Kasai, S., 1998. Nitric oxide release from the liver surface to the intraabdominal cavity during acute endotoxemia in rats. Nitric Oxide 2, 481-488.
49. Arenzana-Seisdedos, F., Turpin, P., Rodriguez, M., Thomas, D., Hay, R.T., Virelizier, J.L., Dargemont, C., 1997. Nuclear localization of I kappa B alpha promotes active transport of NF-kappa B from the nucleus to the cytoplasm. J. Cell Sci. 110, 369-378.
50. Buttery, L.D.K., Evans, T.J., Springall, D.R., Carpenter, A., Cohen, J., Polak, J.M., 1994. Immunochemical localization of inducible nitric oxide synthase in endotoxin-treated rats. Lab. Invest. 71, 755-764.
51. Díaz-Guerra, M.J.M., Velasco, M., Martín-Sanz, P., Bosca, L., 1996. Evidence for common mechanisms in the transcriptional control of type II nitric oxide synthase in isolated hepatocytes: Requirement of NF-B activation after stimulation with bacterial cell wall products and phorbol esters. J. Biol. Chem. 271, 30114-30120.
52. Hong, K., Chu, A., Ludviksson, B.R., Berg, E.L., Ehrhardt, R.O., 1999. IL-12, independently of IFN-gamma, plays a crucial role in the pathogenesis of a murine psoriasis-like skin disorder. J. Immunol. 162, 7480-7491.
53. Sen, R., Baltimore, D., 1986. Inducibility of kappa immunoglobulin enhancer-binding protein NF-κB by a posttranslational mechanism. Cell 47, 921-928.

54. Yamakawa, T., Eguchi, S., Matsumoto, T., Yamakawa, Y., Numaguchi, K., Miyata, I., Reynolds C.M., Motley, E.D., Inagami, T., 1999. Intracellular signaling in rat cultured vascular smooth muscle cells: Roles of nuclear factor-B and p38 mitogen-activated protein kinase on tumor necrosis factor- production, Endocrinology 140, 3562-3573.
55. Atkinson, K.J., Rao, R.K. Role of protein tyrosine phosphorylation in acetaldehyde-induced disruption of epithelial tight junctions. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 280, G1280-G1288, 2001.
56. Choi, Y.H., Huh, M.K., Ryu, C.H., Choi. B.T., Jeong, Y.K. Induction of apoptotic cell death by mycelium extracts of Phellinus linteus in human neuroblastoma cells. Int J Mol Med, 14, 227-232, 2004.
57. Chun, K.S., Surh, Y.J. Signal transduction pathways regulating cyclooxygenase-2 expression: potential molecular targets for chemoprevention. Biochem Pharmacol, 68, 1089-1100, 2004.
58. Gukovskaya, A.S., Mouria, M., Gukovsky, I., Reyes, C.N., Kasho, V.N., Faller, L.D., Pandol, S.J. Ethanol metabolism and transcription factor activation in pancreatic acinar cells in rats. Gastroenterology, 122, 106-118, 2002.
59. Hoek, J.B., Pastorino, J.G. Ethanol, oxidative stress, and cytokine-induced liver cell injury. Alcohol, 27, 63-68, 2002.
60. Kim, S.H., Lee, H.S., Lee, S., Cho, J., Ze, K., Sung, J., Kim, Y.C. Mycelial culture of Phellinus linteus protects primary cultures rat hepatocytes against hepatotoxins. J Ethnopharmacol 95, 367-372, 2004.
61. Wu, K.K. Control of COX-2 and iNOS gene expressions by aspirin and salicylate. Thromb Res, 110, 273-276, 2003.

부 록

- 논문
- 학술발표
- 특허
- 수상
- 신문방송보도
- 회사현황
- 매출현황
- 수출현황
- APEC 2005 KOREA 정상건배

▪ 논 문

1. 상황버섯 균사체를 이용한 발효주의 추출물이 염증관련 단백질발현과 세포내 활성산소 생성에 미치는 영향.
   동의생리병리학회지, 18(6):1825-1831, 2004.

2. Effects of mycelial culture of *Phellinus linteus* on ethanol-induced. gastric ulcer in rats. Phytother. Res.
   Phytother. Res. 20, 396-402 (2006)

3. 상황버섯 균사체를 이용한 발효주가 흰쥐의 위점막에 미치는 영향.
   동의생리병리학회지, 2006 20(1); 65-68 (2006).

4. Effects of Fermented Liquor by using Mycelium of *Phellinus linteus* on the Expression of Inflammation-Related Proteins in Human Hepatoma Cells and Rat Liver.
   한국생명과학회지, 16(1):113-119, 2006.

5. 산지가 다른 상황버섯의 휘발성성분.
   한국식품과학회지 vol. 38, No 2, pp. 159-164 (2006)

상황버섯 균사체를 이용한 발효주의 추출물이 염증관련 단백질의 발현과 세포내 활성산소 생성에 미치는 영향

이준혁 · 최영현[1] · 이용태[2] · 최성희[3] · 정경태[4] · 정영기[4] · 최병태*

동의대학교 한의과대학 해부학교실, 1 : 생화학교실, 2 : 생리학교실,
3 : 동의대학교 생활과학대학 식품영양학과, 4 : 동의대학교 자연과학대학 생명응용과학과

Effect of the Evaporating Extract from Liquor of Fermentation Using Mycelium of *Phellinus linteus* on the Expression of Inflammatory Proteins and the Generation of Reactive Oxygen Species

Jun Hyuk Lee, Yung Hyun Choi[1], Yong Tae Lee[2], Sung Hee Choi[3], Kyung Tae Chung[4], Young Kee Jeong[4], Byung Tae Choi*

Departments of Anatomy, 1 : Department of Biochemistry, 2 : Department of Physiology, College of Oriental Medicine, 3 : Department of Food and Nutrition, College of Human Ecology, 4 : Department of Life Science and Biotechnology, College of Natural Science, Dong-Eui University

Phellinus linteus is known as a medicinal mushroom, which has the pharmaceutical activity on tumors and inflammatory diseases in traditional Oriental medicine. However, despite extensive pharmacological studies on *P. linteus*, the liquor of fermentation using mycelium of *P. linteus*(LFMP) has not been investigated. In the present study, it was examined the effect of the evaporating extract from LFMP(E-LFMP) on the expression of inflammatory proteins and the generation of reactive oxygen species in human hepatocarcinoma HepG2 cells. E-LFMP inhibited acetaldehyde-induced morphological change in HepG2 cells. Also, E-LFMP inhibits expression of inflammatory proteins including cyclooxygenase(COX)-1 and COX-2 through suppressing nuclear translocation of nuclear factor κB(NF-κB) and degradation of inhibitory κBα(IκBα). In addition, E-LFMP inhibits generation of reactive oxygen species(ROS) by hydrogen peroxide(H_2O_2) in HepG2 cells. These results suggest that LFMP has the pharmaceutical, especially anti-inflammatory, activity similar to *P. linteus* mushroom.

Key words : *Phellinus linteus*, cyclooxygenase, acetaldehyde, nuclear factor κB, reactive oxygen species

서 론

상황버섯(*Phellinus linteus*)은 동의보감 탕액편에 상목이(桑木耳)라는 이름으로 기재되어 있으며[1], 다른 이름으로 목질진흙버섯이라고도 불리는 목재부후균의 일종으로 두께 2~10 ㎝, 지름 6~12 ㎝의 갓을 가지고 갓의 형태는 반원 모양, 편평한 모양, 말굽 모양 등 다양한 모양을 하고 있다. 한의학에서 상황버섯은 생식기관 및 소화기관의 혈병과 어혈 등을 치료하는데 사용되어 왔으며[2], 최근에 이르러 체내의 면역력 증대를 통해 각종 암에 대한 저항성을 부여하는 것으로 알려지고 있다. 국내에서 자생하는 상황버섯의 종류는 모두 8종으로 알려져 있으며, 이 중 *P. linteus*의 균사체로부터 자라나는 목질진흙버섯의 항암 및 항염증 작용에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다[3-5].

최근 기능적 상품의 등장과 함께 단일 또는 복합 한약재나 그 추출물을 첨가한 기능성 주류가 출시되고 있다. 이들의 대부분은 양조주(brewing liquor)로서 누룩을 이용하여 곡물을 발효시켜 제조하고 있다. 그러나 누룩을 사용함에 따라 누룩 발효주 특유의 향이 그대로 남아 있는 경우가 많아 일부 기피하는 경향이 있다. 본 연구진은 선행 연구에서 *P. linteus*의 균사체가 알코올을 생산하는 것을 이용하여 상황버섯 균사체 발효주(liquor of

* 교신저자 : 최병태, 부산시 진구 양정 2동 산 45-1 동의대학교 한의과대학
· E-mail : choibt@deu.ac.kr, · Tel : 051-850-8635
· 접수 : 2004/09/21 · 수정 : 2004/10/25 · 채택 : 2004/11/25

fermentation using mycelium of *Phellinus linteus*, LFMP)를 개발하였다[6]. LFMP는 연한 노란색을 띄며 누룩 발효주와는 달리 독특한 향을 내는 발효주로 상황버섯 고유의 효능을 가지고 있다면 또 다른 기능성 주류로서 자리매김할 수 있을 것이다. 그러나 LFMP와 같은 기능성 발효주 역시 인체에 해를 주는 알코올이라는 한계를 벗어나지 못하므로 이에 대한 고찰이 필요하다.

알코올의 체내 흡수는 주로 위와 소장을 통해서 일어나며, 흡수된 알코올은 혈류를 통해 간으로 이동하고 alcohol dehydrogenase에 의해 acetaldehyde와 acetic acid로 분해되며, acetaldehyde는 다시 aldehyde dehydrogenase에 의해 acetate, 물, 이산화탄소 등의 순차적인 경로로 분해된다. 음주로 인한 혈중 acetaldehyde의 증가는 자율신경계와 심혈관계에 작용하여 구토, 어지럼증 등과 같은 급성 증상을 나타내며 체내의 거의 모든 기관에 손상을 입히며, 특히 간 세포의 염증 유발에 강한 전사인자로 작용하는 nuclear factor κB(NF-κB)의 활성화를 일으켜 하위에 있는 염증관련 유전자들의 전사를 유발하여 급 · 만성적인 손상을 나타내는 것으로 알려져 있다[7,8]. 또한 알코올의 섭취에 의해 일어나는 간 질환은 간 세포내에 생성되어 축적되는 reactive oxygen species(ROS)와 관련 있으며, 생성된 ROS는 간 세포의 괴사 및 사멸을 유도하여 간 기능의 손상을 나타낼 수 있다[9].

이에 본 연구에서는 LFMP의 증발 추출물(E-LFMP)이 acetaldehyde에 의한 간 세포 형태 변화 및 염증관련 단백질의 발현 변화에 어떤 영향을 미치는지를 Western blotting으로 조사하였으며, 또한 hydrogen peroxide(H_2O_2)에 의한 간 세포내 ROS 생성에 미치는 영향을 형광현미경 관찰법으로 조사하였다.

재료 및 방법

1. LFMP의 제조 및 E-LFMP의 추출

알코올 수득율을 높이기 위해 쌀을 기초로 한 배지를 사용하였으며 *Aspergillus oryzae*와 *P. linteus*의 균사체(mycelium, Fig. 1)를 함께 배양하였다. 우선 *A. oryzae*를 1.2 Kg의 멸균된 쌀에 접종하여 충분한 군체를 형성시킨 후 3 Kg의 멸균된 쌀과 90 g의 *P. linteus* 균사체를 혼합하였으며, 이어 멸균한 물을 총 5 L가 되도록 부가하여 25℃에서 11일 간 발효시켰다. 이를 통해 얻은 LFMP를 0.22 ㎛ pore size를 가진 여과지로 여과한 후 rotary evaporator로 감압농축하고 동결건조시켜 E-LFMP를 추출하였다.

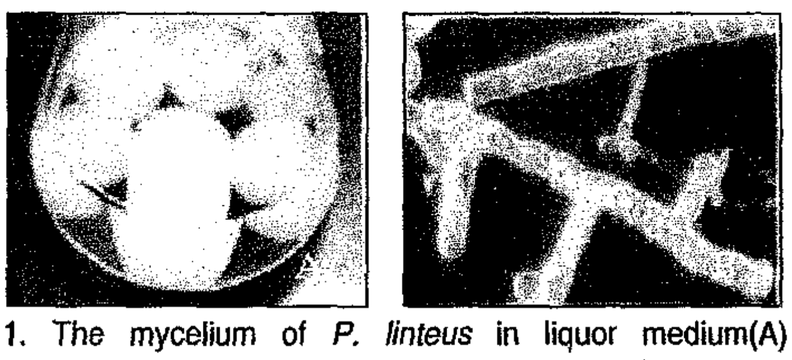


Fig. 1. The mycelium of *P. linteus* in liquor medium(A) and photomicrograph(B)

2. HepG2 세포주의 배양 및 처리

본 연구에 사용된 인체 간암 세포주인 HepG2 세포는 한국세포주은행에서 구입하였으며, 세포의 배양을 위해 90%의 DMEM(Gibco BRL, NY, USA)에 10% fetal bovine serum(Gibco BRL)과 1% penicillin/streptomycin(Gibco BRL)이 포함된 성장배지를 사용하였으며, 5%의 CO_2가 공급되는 37℃ humidity incubator에서 배양하였다. 실험을 위하여 배양 플라스크에 부착되어 있는 HepG2 세포를 trypsin-EDTA(Gibco BRL)로 부유시켜 각각의 실험에 맞는 수로 T-25, T-80, 60 ㎜, 100 ㎜ 배양 용기에 나눈 다음, 24시간 동안 안정화시킨 후, serum이 들어있지 않는 배지에 E-LFMP를 녹여 1시간 동안 전처리하고 acetaldehyde를 처리하거나 H_2O_2를 처리하고 parafilm 등으로 밀봉하여 적절한 시간동안 배양하였다.

3. 광학현미경적 관찰

직경 60 ㎜의 배양용기에 HepG2 세포를 분주하고 세포를 부착시킨 후, 시료의 처리가 끝난 24시간 후 *inverted microscope*(Carl Zeiss, Germany)를 이용하여 관찰하고 200배율로 사진을 찍었다.

4. Nitric oxide(NO) 농도 측정

HepG2 세포에 다양한 농도의 E-LFMP를 1시간 동안 전처리하고 250 μM의 acetaldehyde를 24시간 동안 처리한 후, 그 배지를 Greiss A 및 Greiss B 용액[10]의 혼합액과 동량으로 반응시켜 540 nm에서 흡광도를 측정하여 상대적인 값을 비교하였다.

5. Nuclear extract의 분리

*Nuclear extract*는 Yang *et al.*의 방법[11]을 사용하여 분리하였으며, 간단히 설명하면 다음과 같다. HepG2 세포를 PBS로 세 번 수세하고, ice-cold hypotonic buffer(10 mM HEPES/KOH, 2 mM $MgCl_2$, 0.1 mM EDTA, 10 mM KCl, 1 mM DTT, 0.5 mM PMSF, pH7.9)로 10분 간 반응시키고 *15,000* × g에서 30초간 원심 분리하여 세포핵 침전물을 얻어내었다. 침전물에 ice-cold saline buffer(50 mM HEPES/KOH, 50 mM KCl, 300 mM NaCl, 0.1 mM EDTA, 10% glycerol, 1 mM DTT, 0.5 mM PMSF, pH7.9)를 가하여 20분간 반응시킨 후 15,000 × g에서 5분간 원심 분리하여 상층액을 nuclear extract로 사용하였다.

6. SDS-PAGE 및 Western blotting

HepG2 세포를 PBS로 세 번 수세하고, radioimmunoprecipitation(RIPA) buffer(50 mM Tris-HCl pH7.4, 1% NP-40, 0.25% sodium deoxycholate, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM PMSF, 1 mM NaF, 1 mM sodium orthovanadate, 1 ㎍㎖ aprotinin, leupeptin, pepstatin)로 lysis를 실시하고, 14,000 rpm에서 20분간 원심분리하여 단백질을 포함하는 상층액을 얻어내어 Bradford's method에 따라 정량한 후 Laemli's sample buffer와 섞어 3분간 끓인 후 8-12%의 polyacrylamide gel상에서 전기영동을 수행하였다. 전기영동 후, gel상의 단백질을 nitrocellulose membrane으로 옮겨 10% skim milk로 blocking을 한 후, 순차적으로 일차항체 및 이차항체를 처리한 후 enhanced chemiluminoescence method로

발광시켜 X-ray 필름에 감광하였다.

7. *Reactive oxygen species* (ROS) 검출을 위한 형광염색

HepG2 세포에 2.0 ㎎/㎖의 E-LFMP를 1시간 동안 전처리하고 0.2 mM의 H_2O_2를 40분 동안 처리하면서 0.5 ㎕/㎖의 2′,7′-dichlorofluorescin diacetate(DCFH-DA, Molecular Probes, USA)를 첨가하여 20분간 더 배양하였다. 3.7%의 formaldehyde로 고정시킨 후, PBS로 수세하고 10 ㎍/㎖ Hoechst 33258(Molecular Probes)로 핵을 염색하고 PBS와 DW로 수세한 다음 형광현미경 (Carl Zeiss)으로 관찰 한 다음 디지털 카메라 (Carl Zeiss)로 그 영상을 200배의 배율로 촬영하였다.

8. 단백질 밴드의 *optical density* 측정

SDS-PAGE와 Western blotting의 결과로 나온 필름상의 단백질 밴드의 optical density는 Personal Densitometer(Molecular Dynamics, USA)를 사용하여 측정하였으며, 이에 대한 값은 mean±SE로 표시하였다.

결 과

1. Acetaldehyde에 의한 간암세포의 형태변화에 미치는 E-LFMP의 영향

LFMP에서 증발 추출법으로 얻은 E-LFMP를 0.1 ㎎/㎖의 농도에서부터 2.0 ㎎/㎖의 농도까지 배지에 희석하여 24시간 동안 인체 간암세포주인 HepG2세포에 처리하여 그 형태를 위상차 광학현미경으로 관찰하였다(Fig. 2).

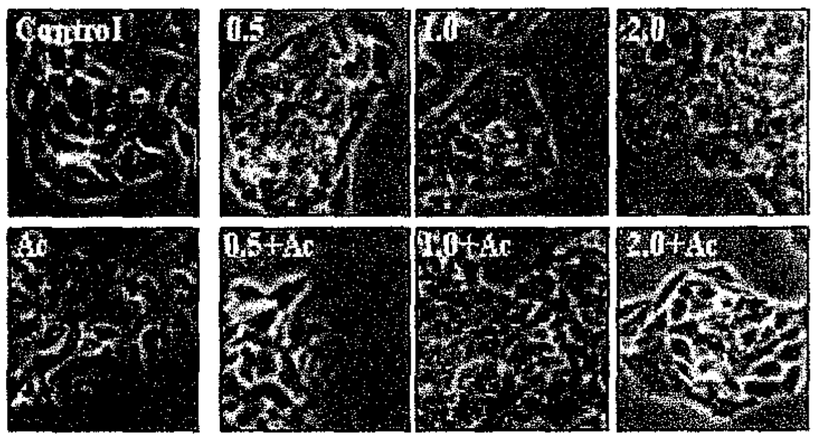


Fig. 2. Effect of E-LFMP on acetaldehyde-induced morphological change in HepG2 cells. Cells were pretreated with or without E-LFMP(0.5-2 ㎎/㎖) for one hour and incubated with 250 μM of acetaldehyde (Ac) for 24 hours, subsequently, photographed by microscope (×200).

상대적으로 고농도의 E-LFMP인 2.0 ㎎/㎖ 처리 세포에서도 대조군과 비교하여 특이한 형태적인 변화나 세포수의 감소 등이 관찰되지 않았으며(0.1 및 0.2 ㎎/㎖의 처리 결과 미제시), trypan blue로 염색하여 살아있는 세포수를 계수하여 E-LFMP이 처리되지 않은 대조군과 비교하여도 차이가 없었다. Fig. 2에서 보는 바와 같이 250 μM의 acetaldehyde가 24시간동안 처리된 HepG2세포는 비정형적인 형태로 형태적 변화를 일으켰으며, colony를 형성하며 인접한 세포와 붙어 자라 대조군과는 상이하게 세포사이의 연접이 끊어져 분산된 형태를 나타내었다. 그러나 1.0 ㎎/㎖의 E-LFMP를 한 시간 동안 전처리하고 acetaldehyde를 처리한 HepG2 세포의 경우 acetaldehyde를 단독으로 처리한 세포에 비해 대조군과 큰 차이를 나타내지 않았으며, 이러한 현상은 2.0 ㎎/㎖의 E-LFMP를 전처리한 세포에서 현저하게 나타났다. 이러한 결과는 E-LFMP가 포함하고 있는 유효성분이 acetaldehyde에 의한 간암세포의 형태적인 변화 및 손상을 억제할 수 있음을 보여 준다.

2. Acetaldehyde에 의한 간암세포의 cyclooxygenase(COX)-1 및 COX-2단백질 발현에 미치는 E-LFMP의 영향

상대적으로 높은 2 ㎎/㎖의 E-LFMP농도에서도 간암세포의 형태에 어떠한 영향을 미치지 않으며 오히려 acetaldehyde에 의한 형태적 변화를 억제하였으므로 2.0 ㎎/㎖의 E-LFMP를 1시간 동안 전처리하여 acetaldehyde에 의한 간암세포의 COX-1과 COX-2단백질의 발현을 24시간 후 Western blotting으로 조사하였다. COX는 염증유발 물질인 prostaglandin E2를 arachidonic acid로부터 합성하는 단백질로 다양한 세포와 자극에 의하여 발현되는 것으로 알려져 있다[12]. Fig. 3A에서 보이는 바와 같이 acetaldehyde에 의한 COX-1과 COX-2의 발현 증가는 현저히 나타나지는 않으나 이미지 분석 프로그램을 통해 이를 확인한 결과 Fig. 3B의 결과에서처럼 부분적인 증가가 일어남을 확인하였다. 특이한 것은 COX-1의 발현은 2 ㎎/㎖의 E-LFMP 단독 처리에 의해서도 대조군에 비해 감소하였지만 COX-2단백질의 발현은 E-LFMP 단독 처리에 의해 대조군에 비해 오히려 증가하였으며, acetaldehyde를 단독으로 처리한 HepG2세포와 근사한 정도의 발현을 나타내었다는 것이다. 그러나 2 ㎎/㎖의 E-LFMP를 전처리한 후 acetaldehyde를 처리한 HepG2세포의 경우 COX-1과 COX-2의 발현이 양쪽 모두 대조군과 acetaldehyde단독 처리군보다 감소하는 것으로 나타났다. 이러한 결과는 COX의 발현 증가로 대변되는 acetaldehyde에 의한 일련의 염증성 반응 유도 기전이 부분적이기는 하지만 E-LFMP에 의해 억제될 수 있음을 나타낸다.

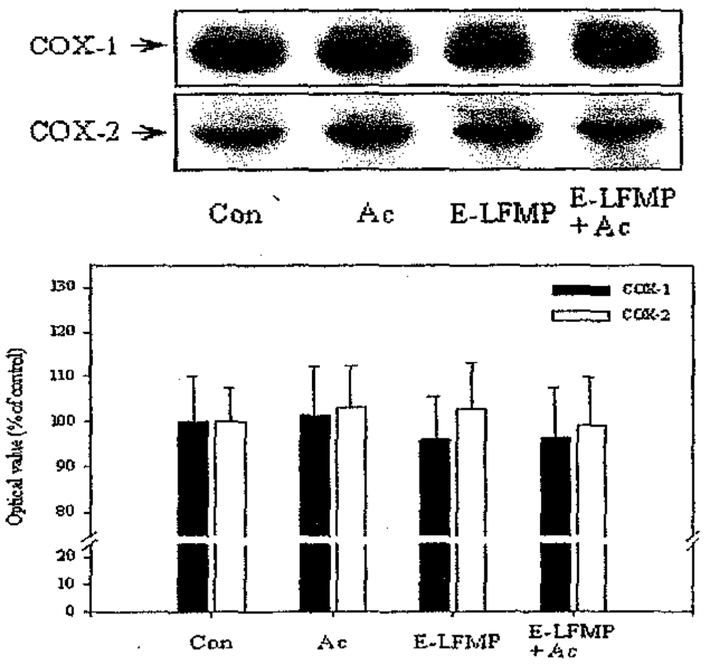


Fig. 3. Effect of E-LFMP on the expression of COX-1 and COX-2 by acetaldehyde in HepG2 cells. A, Cells were pretreated with or without E-LFMP(2 ㎎/㎖) for one hour and incubated with 250 μM of acetaldehyde for 24 hours, subsequently, analyzed by Western blotting using anti-COX-1 and 2 antibodies. B, Protein expression density was determined by densitometer. Each point represents the mean±SE of three independent experiments.

3. Acetaldehyde에 의한 간암세포의 NF-κB 활성화에 미치는 E-LFMP의 영향

COX-2는 대표적인 염증 반응의 매개 단백질로 국소 염증 부위뿐만 아니라 인체의 각종 암 조직 부위에서도 발현의 증가가 나타나는 것으로 알려져 있으며[13], COX-2의 발현 조절은 전사인자인 NF-κB의 활성화에 의하여 일어난다[14]. 또한 acetaldehyde는 HepG2세포의 NF-κB를 활성화시키는 것으로 보고되어 있어 acetaldehyde에 의한 NF-κB의 활성화가 본 실험 조건에서도 일어나는지를 확인하고, 활성화가 일어난다면 이에 대한 E-LFMP의 효과를 조사하고자 하였다. 먼저 HepG2세포에 E-LFMP를 한 시간 동안 전처리하고 acetaldehyde를 30분간 처리한 후, HepG2 세포의 nuclear extract를 얻어내어 NF-κBp65에 대한 SDS-PAGE와 Western blotting을 실시하였다. Fig. 4A에서 보는 바와 같이 Ac를 처리하면 대조군에 비하여 많은 양의 NF-κBp65가 핵 속에서 관찰되는 것으로 나타났으며, NF-κB의 억제 조절자인 inhibitory κB(IκB)α의 경우 대조군에 비해 그 양이 현저히 감소함을 알 수 있었다. 흥미롭게도 앞서 Fig. 3의 결과와 유사하게 NF-κBp65 단백질의 핵으로의 이동이 acetaldehyde단독 처리군보다 상대적으로 낮지만 E-LFMP를 단독으로 처리한 세포에서도 관찰되었다. 그러나 핵으로의 NF-κBp65 이동은 E-LFMP 전처리에 의하여 부분적으로 억제되었으며, 또한 이를 조절하는 IκBα의 분해 역시 부분적으로 억제됨을 알 수 있었다. Fig. 4B는 이 결과가 이미지 분석 프로그램을 통하여서도 확인되었음을 보여준다.

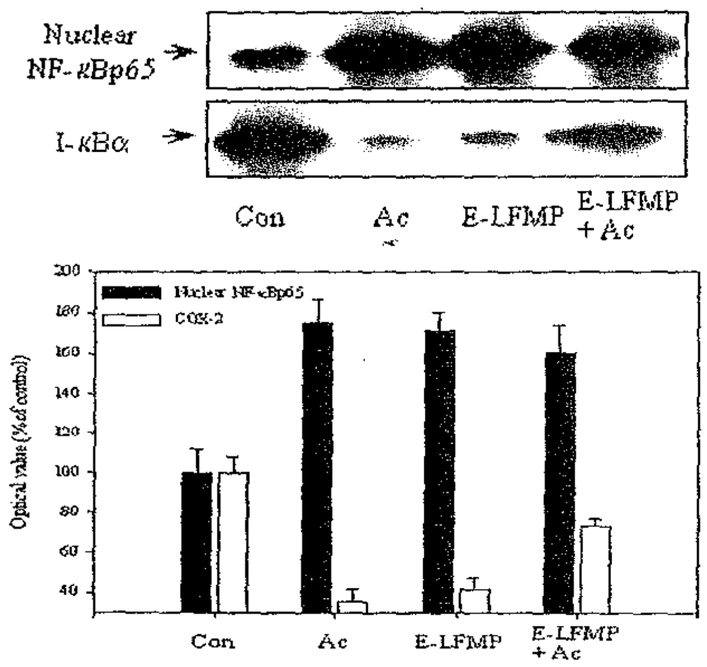


Fig. 4. Effect of E-LFMP on acetaldehyde-induced nuclear translocation of NF-κBp65 in HepG2 cells. A, Cells were pretreated with or without E-LFMP(2 ㎎/㎖) for one hour and incubated with 250 μM of acetaldehyde for 30 minutes, subsequently, analyzed by Western blotting using anti-NF-κBp65 and anti-IκBα antibodies. B, Protein expression density was determined by densitometer. Each point represents the mean±SE of three independent experiments.

4. Acetaldehyde 및 H_2O_2에 의한 간암세포의 NO와 ROS생성에 미치는 E-LFMP의 영향

산화적 스트레스는 세포내의 산화·환원 상태에 영향을 주어 신호전달계의 교란을 일으키고 그로 인해 여러 질환의 원인이 되기도 하며, 노화를 유발하는 것으로도 알려져 있다[15,16]. 음주로 인해 체내로 섭취된 알코올은 대사과정을 통해 acetaldehyde로 전환되어 세포내의 신호전달계를 거치면서 산화적 스트레스를 유발하는 것으로 보고되고 있으므로[17] 본 연구에서는 HepG2세포에 E-LFMP를 전처리하여 acetaldehyde에 의한 NO 생성에 어떤 영향을 미치는지 조사하였다. HepG2세포에 E-LFMP를 한 시간 동안 전처리한 후, 250 μM의 acetaldehyde처리하고 24시간 동안 배양한 후 NO를 측정하였으며, 그 결과는 Fig. 5와 같이 나타났다. Acetaldehyde에 의한 NO의 생성은 대조군에 비해 50% 이상 증가되었으나, acetaldehyde단독 처리군에는 못 미치지만 E-LFMP 단독 처리군 역시 농도에 따라 낮게는 18%에서 높게는 거의 20%까지 대조군에 비해 NO의 생성이 증가됨을 알 수 있었다. 이러한 결과는 앞서의 Fig. 3과 4에서 보여준 COX 단백질의 발현 양상, 그리고 NF-κB의 핵으로의 이동 현상과 유사하다. 또한 결정적으로 E-LFMP의 전처리에 의하여 acetaldehyde에 의한 NO의 생성이 부분적으로 억제되는 것으로 보임으로 이러한 결과들은 앞서 보인 결과들과 연관이 있을 것을 생각된다.

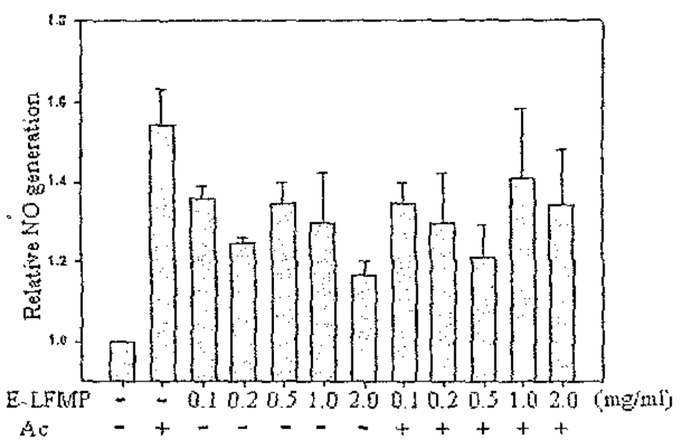


Fig. 5. Effect of E-LFMP on acetaldehyde-induced NO generation in HepG2 cells. Cells were pretreated with or without E-LFMP(2 ㎎/㎖) for one hour and incubated with 250 μM of acetaldehyde for 24 hours. NO synthesis was determined by assaying culture supernatants for nitrite, the stable reaction product of NO with molecular oxygen. Each point represents the mean±SE of three independent experiments.

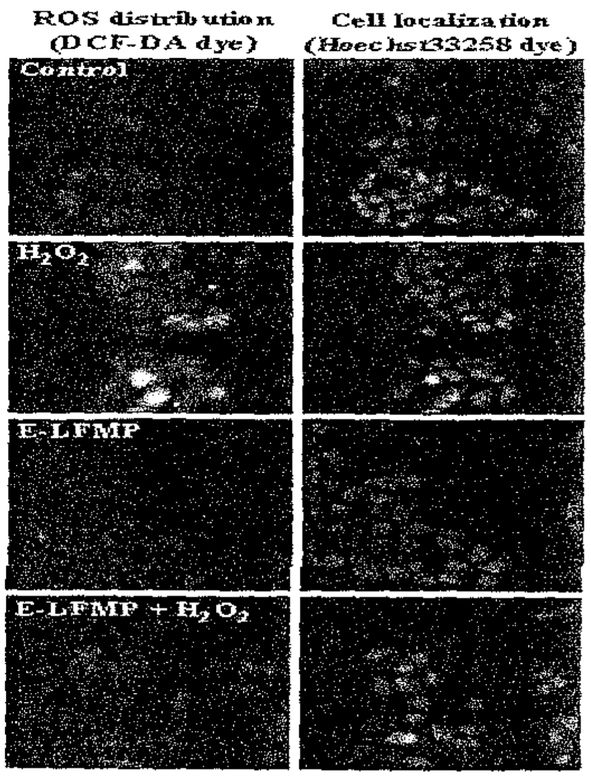


Fig. 6. Effect of E-LFMP on H_2O_2-induced ROS generation in HepG2 cells. Cells were pretreated with or without E-LFMP(2 ㎎/㎖) for one hour and incubated with 0.2 mM of H_2O_2 for one hour. And then, cells were stained with DCFH-DA and Hoechst 33342 (×200).

Acetaldehyde에 의한 NO의 생성을 E-LFMP에 의해 부분적으로 억제하므로, 강력한 세포내 ROS유발 물질인 H_2O_2에 의한 ROS생성에 E-LFMP가 어떤 영향을 미치는지를 조사하고자, HepG2세포에 E-LFMP를 한 시간 동안 전처리한 후 1 mM의 H_2O_2를 처리하여 한 시간 동안 배양하고 세포내 ROS에 특이적

으로 결합하여 형광을 나타내는 시료를 이용하여 형광 염색을 실시하였다. Fig. 6의 우측 패널은 세포핵을 염색하여 HepG2세포의 분포를 보여주고 있으며, 좌측 패널은 생성된 ROS를 보여주고 있다. HepG2 세포는 H_2O_2의 처리에 의하여 많은 양의 ROS 생성을 유도하였으나, E-LFMP의 전처리에 의하여 이러한 생성 유도는 거의 완벽하게 억제됨을 알 수 있었으며, 또한 대조군에서 약하게 보이는 세포내 ROS가 E-LFMP의 단독 처리군에서는 basal level이하로 떨어지는 것도 확인하였다.

고 찰

본 연구에서 상황버섯의 균사체를 이용하여 만든 LFMP의 증발 추출물인 E-LFMP가 알코올의 이차산물인 acetaldehyde에 의한 인체 간암세포의 염증 반응 및 손상과 활성산소종의 형성에 어떤 영향을 미치는지를 조사하였다. Acetaldehyde에 의한 HepG2의 형태변화는 세포사이의 연접이 해체되는 양상은 이미 보고되어 있다[18]. 세포간 결합의 대표적인 경로는 tight junction과 adherent junction이 있으며, 여기에는 E-cadherin/β-catenin complex와 occludin/ZO-1 complex가 각각 중요한 기능을 담당하고 있는 것을 알려져 있다[19]. Acetaldehyde는 세포간의 tight junction을 방해하여 scattering을 유발하는 것으로 이미 알려져 있으며[20], 최근의 연구결과에 따르면 이러한 현상은 세포내 골격인 actin cytoskeleton으로부터 occludin, E-cadherin, ZO-1 및 β-catenin을 떼어 내어 cell-cell adhesion을 방해하는 것으로 보고되었다[21]. 흥미롭게도 본 연구 결과에서는 이러한 현상이 E-LFMP에 의해 억제되었다. Acetaldehyde에 의한 세포의 scattering을 억제하는 물질로는 L-glutamine이 보고되어져 있으며[21], 상황버섯에는 glutamine이 풍부하게 존재하는 것으로 알려져 있어[22] acetaldehyde에 의한 세포 간 연접의 분해가 E-LFMP에 의해 억제되는 이유로 제시될 수 있다.

COXs는 세포내에서 항상 발현되는 형태로 존재하는 COX-1과 세포외 특이 자극에 의해 발현되는 COX-2 두 가지 형태가 존재하며, 염증과 각종 암에서 과다 발현되는 것은 COX-2로 알려져 있다[12]. COX-2는 여러 pro-inflammatory cytokine에 의해 발현이 유도되며, 최근 알코올 및 acetaldehyde에 의한 발현 유도가 보고되어진바 있다[23]. COX-2를 특이적으로 억제하여 염증성 질환의 치료와 항암제로 개발하려는 노력이 전 세계적으로 활발히 진행 중이며 대표적인 약물로는 non-steroidal anti-inflammatory drugs(NSAIDs)의 일종인 NS-398, celecoxib 등이 개발되어 있다[24,25]. 앞서 본 연구의 결과에서 제시된 바와 같이 COX-2의 발현 증가는 미약하지만 acetaldehyde에 의해 일어나고 있으며, E-LFMP에 의해 억제되는 양상을 보이고 있다 (Fig. 3). E-LFMP에 의해 acetaldehyde에 의한 COX-2와 같은 염증성 단백질의 발현 증가가 억제되는 것은 E-LFMP의 유효성분 중에 앞서 제시하였던 NSAIDs로 작용할 가능성이 있는 물질이 존재함을 시사하며 이에 대한 분석은 앞으로 더 진해되어져야 할 것으로 사료된다. 그러나 E-LFMP를 단독으로 처리한 HepG2 세포에서도 발현증가가 일어나는 현상에 대해서는 더 많은 연구가 필요할 것으로 사료되지만 Fig. 4에서 보여준 바와 같이 E-LFMP 단독 처리에 의해서 COX-2의 대표적인 전사인자인 NF-κB의 핵 속으로의 이동이 나타났으므로 이와 관련지어 설명할 필요가 있을 것으로 판단된다. 정상적인 조건에서 *NF-κB*는 그 억제 조절 단백질인 IκBα와 결합되어 세포질에 존재하며, 세포외부의 특이적인 신호물질에 의해 여러 신호전달경로를 거쳐 IκB kinase(IKK)의 활성화가 일어나면 연속적으로 일어나는 IκBα의 인산화와 분해로 인해 자유롭게 되고, 핵 속으로 이동하여 여러 염증관련 유전자의 프로모터에 결합하여 전사를 유도한다[26]. Fig. 4는 acetaldehyde에 의한 NF-κB의 핵 속으로의 이동이 E-LFMP의 전처리에 의하여 부분적으로 억제됨을 보여주고 있으며, 이는 억제 조절자인 IκBα의 분해가 억제되어짐으로써 일어남을 보여주었다. 그러므로 이러한 현상은 IκBα를 인산화시켜 *ubiquitination*에 의해 분해되도록 만드는 IKK를 억제함으로써 가능할 것으로 사료되나 이에 대하 연구는 더 진행되어져야 할 것이다. 그리고 앞서 언급하였듯이 E-LFMP 단독으로 처리된 HepG2세포에서 IκBα의 분해와 함께 NF-κB의 핵 속으로의 이동이 관찰되어 동일 조건에서의 COX-2발현이 부분적으로 설명되어 지지만 그 원인에 대해서는 더 자세한 연구가 필요하다. 그러나 NF-κB에 의한 전사가 단지 염증반응만을 활성화시키는 것이 아니라 여러 생리활성반응, 특히 세포 생존에 관계되는 여러 단백질들의 발현에도 관련이 있으므로 이 부분으로의 연구 진행도 흥미로울 것으로 사료된다.

활성산소종인 ROS에 의한 세포내의 산화-환원 상태의 붕괴는 현재 다양한 질환 및 노화와 관련이 있는 것으로 보고되어져 있고, 특히 음주로 인한 알코올의 섭취는 간세포의 ROS를 생성시키는 것으로 알려져 있다[17]. 세포내에서 생성되는 ROS로 대표적인 예로 hydrogen peroxide(H_2O_2), hydroxyl radical(OH·), reactive oxygen(O_2-) 및 nitric oxide(NO) 등이 보고되어 있다[27,28]. 본 연구에서 Fig. 5는 비록 미약한 정도이긴 하지만 Ac의 처리에 의해 HepG2세포에서 NO가 생성됨을 알 수 있었으며, 이러한 현상이 E-LFMP에 의해 억제됨을 보았다. NO는 면역체계에서도 작용하지만 신호전달물질로도 작용하며 nitric oxide synthases (NOSs)에 의해 생성되어 지는데, 주로 inducible NOS (iNOS)에 의해 생성되며, iNOS는 NF-κB의 발현조절을 받는 것으로 알려져 있다[28]. 그러므로 E-LFMP에 의한 NO 생성 억제는 NF-κB 활성화 억제와 연관이 있을 것으로 사료된다. 또한 앞서의 결과들과 마찬가지로 E-LFMP가 단독으로 처리된 HepG2세포에서 NO가 대조군에 비해 증가하는 결과는 이를 뒷받침한다.

세포내의 ROS는 여러 방법으로 관찰이 가능하나 최근에는 ROS에 직접 결합하여 형광을 나타내는 시료를 사용하여 형광 또는 공초점현미경로 관찰하는 방법이 주로 사용되어 지며, 본 연구에서도 이 방법을 사용하였다. Fig. 6에서 보여준 바와 같이 H_2O_2의 처리에 의해 세포내 ROS 형광반응이 증가하였으나 E-LFMP의 전처리에 의해 이러한 현상이 억제되는 것은 E-LFMP의 유효물질 중에 항산화제로 작용 가능한 물질이 존재함을 시사한다. 여러 질환들, 그리고 특히 사회적 관심사로 대두되고 있는 노화현상이 세포내 활성산소종의 증가와 많은 관련이 있는 것을 생

각한다면 E-LFMP에 의한 ROS의 억제 결과는 흥미로울 수밖에 없다. 그러나 이러한 억제현상이 어떤 기전을 통해서 일어나는지에 대한 연구는 앞으로 더 진행되어져야 할 것이다.

이상의 결과에서 E-LFMP는 인체 간암세포인 HepG2세포에서 세포 간 연접을 보호하며, NF-κB의 핵 내로의 이동을 저해하여 COX-2의 발현과 NO의 생성을 억제하고, 또한 ROS의 생성을 억제함으로써 알코올의 이차산물인 acetaldehyde에 의한 염증 및 세포 손상에 대하여 보호 작용을 함을 알 수 있었다. 본 연구 결과는 다른 주정을 사용하여 제조하는 주류와는 달리 상황버섯 *P. linteus*의 균사체를 이용하여 생산되는 주류는 알코올의 섭취로 인해 유발되는 알코올성 질환을 일으킬 가능성이 적으며 오히려 그러한 질환을 유발하는 알코올 이차산물에 의한 여러 반응을 억제함으로써 건강을 위한 기능성 주류로 자리매김할 수 있음을 시사한다. 또한 기존에 알려져 있는 상황버섯의 효능이 그 균사체를 이용하여 제조한 발효주에도 일부 포함되어 있는 것을 알 수 있었다. 앞으로 상황버섯 균사체를 이용한 발효주의 유효성분 중 어떤 물질이 이러한 보호기전을 나타내는 지를 조사하면 상황버섯의 효능에 대한 추가적인 자료로 사용되어 질 수 있을 것이며, 다른 기능성 주류의 개발에도 참고 자료가 될 것으로 사료된다.

감사의 글

본 연구는 농림부 농림기술개발사업(첨단기술개발분야) 및 J&J 바이오의 연구비 지원에 의해 이루어 졌음을 밝히며 이에 감사드립니다.

참고문헌

1. 허준. 동의보감, 남산당, 서울. p719, 1993.
2. 이시진. 본초강목, 고문사, 서울. p980, 1975.
3. Kim, G.Y., Han, M.G., Song, Y.S., Shin, B.C., Shin, Y.I., Lee, H.J., Moon, D.O., Lee, C.M., Kwak, J.Y., Bae, Y.S., Lee, J.D., Park, Y.M. 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-kappaB. Biol Pharm Bull, 27, 1656-1662, 2004.
4. Choi, Y.H., Huh, M.K., Ryu, C.H., Choi. B.T., Jeong, Y.K. Induction of apoptotic cell death by mycelium extracts of Phellinus linteus in human neuroblastoma cells. Int J Mol Med, 14, 227-232, 2004.
5. Kim, S.H., Lee, H.S., Lee, S., Cho, J., Ze, K., Sung, J., Kim, Y.C. Mycelial culture of Phellinus linteus protects primary cultures rat hepatocytes against hepatotoxins. J Ethnopharmacol 95, 367-372, 2004.
6. 정영기. 버섯균사체가 분비하는 알코올의 생산과 이를 이용한 기능성 주류의 개발. 농림부 연구과제. 2004
7. Gukovskaya, A.S., Mouria, M., Gukovsky, I., Reyes, C.N., Kasho, V.N., Faller, L.D., Pandol, S.J. Ethanol metabolism and transcription factor activation in pancreatic acinar cells in rats. Gastroenterology, 122, 106-118, 2002.
8. Machida, I., Matsuse, H., Kondo, Y., Kawano, T., Saeki, S., Tomari, S., Fukushima, C., Shimoda, T., Kohno, S. Acetaldehyde induces granulocyte macrophage colony-stimulating factor production in human bronchi through activation of nuclear factor-kappa B. Allergy Asthma Proc, 24, 367-371, 2003.
9. Koch, O.R., Pani, G., Borrello, S., Colavitti, R., Cravero, A., Farre, S., Galeotti, T. Oxidative stress and antioxidant defenses in ethanol-induced cell injury. Mol Aspects Med, 25, 191-198, 2004.
10. Francoeur, C., Denis, M. Nitric oxide and interleukin-8 as inflammatory components of cystic fibrosis. Inflammation. 19, 587-598, 1995.
11. Yang, H., Sadda, M.R., Yu, V., Zeng, Y., Lee, T.D., Ou, X., Chen, L., Lu, S.C. Induction of human methionine adenosyltransferase 2A expression by tumor necrosis factor alpha. Role of NF-kappa B and AP-1. J Biol Chem, 278, 50887-50896, 2003.
12. Zha, S., Yegnasubramanian, V., Nelson, W.G., Isaacs, W.B., De Marzo, A.M. Cyclooxygenases in cancer: progress and perspective. Cancer Lett, 215, 1-20, 2004.
13. Chun, K.S. and Surh, Y.J. Signal transduction pathways regulating cyclooxygenase-2 expression: potential molecular targets for chemoprevention. Biochem Pharmacol, 68, 1089-1100, 2004.
14. Wu, K.K. Control of COX-2 and iNOS gene expressions by aspirin and salicylate. Thromb Res, 110, 273-276, 2003.
15. Willcox, J.K., Ash, S.L., Catignani, G.L. Antioxidants and prevention of chronic disease. Crit Rev Food Sci Nutr, 44, 275-295, 2004.
16. Apel, K., Hirt, H. REACTIVE OXYGEN SPECIES: Metabolism, Oxidative Stress, and Signal Transduction. Annu Rev Plant Biol, 55, 373-399, 2004.
17. Hoek, J.B., Pastorino, J.G. Ethanol, oxidative stress, and cytokine-induced liver cell injury. Alcohol, 27, 63-68, 2002.
18. Ramanathan, R., Wilkemeyer, M.F., Mittal, B., Perides, G., Charness, M.E. Alcohol inhibits cell-cell adhesion mediated by human L1. J Cell Biol, 133, 381-390, 1996.
19. Blystone, S.D. Integrating an integrin: a direct route to actin. Biochim Biophys Acta, 1692, 47-54, 2004.
20. Atkinson, K.J., Rao, R.K. Role of protein tyrosine phosphorylation in acetaldehyde-induced disruption of epithelial tight junctions. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 280, G1280-G1288, 2001.
21. Seth, A., Basuroy, S., Sheth, P., Rao, R.K. L-Glutamine

ameliorates acetaldehyde-induced increase in paracellular permeability in Caco-2 cell monolayer. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 287, G510-G517, 2004.

22. 나경수, 송치현, 양병근, 전용재. 목질진흙(상황) 버섯의 면역활성. 한국균학회지, 26, 86-90, 1998.
23. Blanco, A.M., Pascual, M., Valles, S.L., Guerri, C. Ethanol-induced iNOS and COX-2 expression in cultured astrocytes via NF-kappa B. Neuroreport, 15, 681-685, 2004.
24. Roberts, E.G., Vona-Davis, L., Riggs, D.R., Jackson, B.J., Hohseni, H., Kandzari, S.J., McFadden, D.W. COX-2 inhibition and cancer: experimental findings and clinical correlates. W V Med J, 100, 96-101, 2004.
25. Abou-Issa, H., Alshafie, G. Celecoxib: a novel treatment for lung cancer. Expert Rev Anticancer Ther, 4, 725-734, 2004.
26. Aggarwal, B.B. Nuclear factor-kappaB: the enemy within. Cancer Cell. 6, 203-208, 2004.
27. Jeremy, J.Y., Shukla, N., Muzaffar, S., Handley, A., Angelini, G.D. Reactive oxygen species, vascular disease and cardio-vascular surgery. Curr Vasc Pharmacol, 2, 229-236, 2004.
28. Krotz, F., Sohn, H.Y., Pohl, U. Reactive Oxygen Species: Players in the Platelet Game. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 24, 1988-1996, 2004.

PHYTOTHERAPY RESEARCH
Phytother. Res. **20**, 396–402 (2006)
Published online in Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com) **DOI**: 10.1002/ptr.1868

Effects of Mycelial Culture of *Phellinus linteus* on Ethanol-induced Gastric Ulcer in Rats

Jun Hyuk Lee[1], Soo Jin Lee[1], Yung Hyun Choi[2,4], Kyung Tae Chung[3], Young Kee Jeong[3] and Byung Tae Choi[1,4]*

[1]Department of Anatomy, College of Oriental Medicine, Dong-Eui University, Busan 614-052, Republic of Korea
[2]Department of Biochemistry, College of Oriental Medicine, Dong-Eui University, Busan 614-052, Republic of Korea
[3]Department of Life Science and Biotechnology, College of Natural Science, Dong-Eui University, Busan 614-052, Republic of Korea
[4]Department of Biomaterial Control, Graduate School, Dong-Eui University, Busan 614-052, Republic of Korea

The gastroprotective effects of a mycelial culture of *Phellinus linteus* (MCPL) were evaluated by determining the ulcer index, gastric mucus content, histopathological observation and histochemical properties of mucin in an ethanol-induced ulcer model of rats. Preadministration with MCPL at doses of 20 and 60 mg/kg, showed a significant decrease of bleeding and ulcer index and alleviated the histopathological changes induced by ethanol such as hemorrhage and necrosis. Ethanol treatment decreased the gastric adhesion mucus content, but a higher level of gastric mucus persisted after preadministration of MCPL. As for the histochemical properties of mucins, marked changes were observed in both the surface and gland mucous cells in ethanol-treated rats, but these changes were detected only in the surface mucous cells in rat preadministered with MCPL. Using conventional methods for mucins, ethanol-treated rats revealed a decrease of neutral and acid mucin in the surface epithelium and mucous neck cells compared with normal rats. A marked decrease of BSL-1 by lectin histochemistry was also revealed in the ethanol-treated rats. But the MCPL preadministered rats showed similar stainabilities and lectin affinity patterns for mucins as the normal rats. These results indicate that pretreatment with MCPL provided protection of the gastric mucosa from ethanol-induced injury by maintaining the mucus barrier in rats. Copyright © 2006 John Wiley & Sons, Ltd.

Keywords: Phellinus linteus; mycelial culture; ulcer; ethanol; mucin.

INTRODUCTION

Mushroom extracts and constituents have a long history of traditional use for treating various diseases. *Phellinus linteus*, commonly referred to as Sangwhang in Korea, has been used as a medicinal mushroom for the treatment of inflammatory diseases and cancer in Oriental Medicine (Nakamura *et al.*, 2004; Kim *et al.*, 2004). Until now investigations of the crude extract and the chemical constituents of *P. linteus* were focused mostly on their antitumor activities (Kim *et al.*, 2004).

However, the uses of *P. linteus* are restricted because it is extremely rare to find it in nature. The recent establishment of mycelial cultures of this mushroom enabled an easier study of its pharmacological activities. During mass-culture of the mycelia of this fungus, it was discovered that the mycelium of *P. linteus* possesses some alcohol dehydrogenases and produces alcohol. The production of alcohol of about 14° proof is possible using the mycelium of *P. linteus* without yeast or any kind of microorganism.

* Correspondence to: Dr Byung-Tae Choi, Department of Anatomy, College of Oriental Medicine, Dong-Eui University, Busan 614-052, Republic of Korea.
E-mail: choibt@deu.ac.kr
Contract/grant sponsor: Technology Development Program for Agriculture and Forestry, Ministry of Agriculture and Forestry, Republic of Korea (HTDP).

Copyright © 2006 John Wiley & Sons, Ltd.

Mucins secreted from the mucous cells in the stomach play an important role in producing a barrier to various chemicals and digestive enzymes (Kemper and Specian, 1991). Histochemical studies indicated a general loss of mucin and compositional changes during the process of gastric ulcer (Celebi *et al.*, 2002). Conventional histochemistry for mucins employing cationic dye and lectin histochemistry can be used to study compositional changes in the stomach in ethanol-induced ulcers.

Many extracted polysaccharide fractions from the fruiting body and the mycelia of mushrooms have been reported to have antiulcer effects against experimental ulcers in rats (Gao *et al.*, 2004). However, it remains unclear whether the mycelial culture of *P. linteus*, known to be rich in polysaccharide, is effective in the treatment of acute ulcers. This study aimed to investigate the effects of a mycelial culture from *P. linteus* (MCPL) on the antiulcer effect induced by ethanol in rat stomachs and to elucidate changes in mucin properties by histochemical methods.

MATERIALS AND METHODS

Mycelial culture of *P. linteus*. Fresh fruiting bodies of *P. linteus* were obtained from a local farm. The mushroom was authenticated by Professor Jeong, Department of Life Science and Biotechnology, College of

Received 2 January 2006
Accepted 11 January 2006

Table 1. Lectins used for identifying carbohydrate residues

Lectin	Source	Major sugar specification	Concentration (μg/mL)
DBA	*Dolichos biflorus*	α-*N*-acetyl-D-galactosamine	10
SBA	*Glycine max*	α/β-*N*-acetyl-D-galactosamine	10
PNA	*Arachis hypogaea*	Galactosyl-(β-1,3)-*N*-acetyl-D-galactosamine	10
BSL-1	*Bandeiraea simplicifolia*	α-D-galactose	10
RCA-1	*Ricinus communis*	β-D-galactose	10
sWGA	*Triticum vulgaris*	β-*N*-acetyl-D-glucosamine	10
UEA-1	*Ulex europaeus*	α-L-fucose	10
Con A	*Canavalia ensiformis*	α-D-mannose, α-D-glucose	10

sWGA, succinylated WGA.

Natural Science, Dong-Eui University. The medium components for the mycelial culture were as follows: 2.5% sucrose, 0.5% yeast extract and 0.1% $MgCl_2$ in distilled water. The culture medium was adjusted to pH 7.0. The aerated liquid culture was carried out in a 300 mL flask containing 100 mL of the medium and incubated at 25 °C for 6 days. The culture broth of *P. linteus* was filtered through a filter paper after cultivation. Then 100 g of wet weight of mycelium was evaporated *in vacuo* to give a solid extract (yield, 5 g) and a voucher specimen was deposited (DE-0401).

Animals. Male Sprague-Dawley rats, weighing about 120 g on average, were obtained from Hyochang Science Co. in Korea. The rats were housed under conditions of 22 °C in 12 h dark and light cycles, fed a commercial diet and allowed tap water *ad libitum* starting 2 weeks before and throughout the study. The experimental procedures were conducted under the ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. Eight rats were used in each group.

Alcohol induced gastric ulcer. All rats were fasted for 18 h before experiments with free access to drinking water until 1 h before testing. Gastric ulcers were induced by administering absolute alcohol at a dose of 1 mL after 1 h of MCPL at two dose levels of 20 and 60 mg/kg or vehicle treatment. Famotidine (3.6 mg/kg) was used as a standard antiulcer drug.

Assessment of gastric ulcer. The rats were killed at 3 h after ethanol challenge under 10% chloral hydrate anesthesia (350 mg/kg i.p.). The stomachs were removed rapidly and then opened along the greater curvature. They were then thoroughly rinsed with sterile saline. The bleeding index was determined as follows: 0 points for no bleeding, 1 point for mild bleeding (a small amount of coagula in the stomach), 2 points for moderate bleeding (intermediate between 1 and 3 points) and 3 points for severe bleeding (contents of the stomach were filled with blood). The ulcers were counted and the size was measured along its greatest length and in the case of patches, five such lesions were considered to be the equivalent of one ulcer and a 1 mm ulcer.

Histopathological observation. The stomachs were fixed in 4% paraformaldehyde in phosphate buffered saline (PBS, 10 mM, pH 7.4) for 18 h and dehydrated in a graded ethanol series. After embedding in paraffin, serial 5 μm thick sections were prepared. For histopathological examination, hematoxylin-eosin stain was used. Histopathological changes such as congestion, edema, hemorrhage and necrosis were observed and expressed on an arbitrary scale.

Determination of gastric adhesion mucus. The gastric adhesion mucus content was determined by the alcian blue method. Each glandular segment was immediately immersed in 10 mL of 0.1% alcian blue solution (0.16 M sucrose/0.05 M sodium acetate, pH 5.8) for 2 h, and excess dye was removed by rinsing twice with 10 mL of 0.25 M sucrose for 20 min. The gastric tissue was transferred to 0.5 M magnesium chloride solution and shaken for 2 h. An aliquot of the blue extract was vortex-mixed vigorously and the resulting emulsion was centrifuged at 1500 × **g** for 10 min. The absorbance of the aqueous layer was read at 580 mm.

Conventional histochemistry for mucins. For the conventional mucin histochemistry, the following staining procedures were used: the periodic acid Schiff's (PAS) reaction for studying neutral mucin, alcian blue (AB) staining at pH 2.5 for the demonstration of acid mucin, and AB at pH 1.0 and a combination staining of aldehyde fuchsin (AF) at pH 1.7 and AB at pH 2.5 to allow the difference of sulfated and nonsulfated mucin.

Lectin histochemistry for mucins. For the lectin histochemistry, deparaffinized sections were treated with 0.3% methanol hydrogen peroxide for 30 min to remove peroxidase remains in the tissues. To prevent non-specific immunoreactions, the sections were exposed to 1% bovine serum albumin for 30 min at room temperature. Eight different biotinylated lectins purchased from Vector Laboratories Inc. (Burlingame, CA, USA) were used the concentration and oligosaccharide specification of which are shown in Table 1. Sections were incubated with lectins for 18 h at 4 °C, and rinsed with PBS and then incubated with an avidin-biotin-peroxidase-complex (Vector Laboratories) for 1 h at room temperature. The horseradish peroxidase-conjugated lectin was visualized by exposure to a diaminobenzidine substrate kit (Vector Laboratories). As controls for the lectin histochemistry, sections were incubated with HRP-conjugated lectins in the presence of 0.2 M inhibitory sugars.

Copyright © 2006 John Wiley & Sons, Ltd.

Table 2. Effect of MCPL on ethanol-induced gastric ulcer in rats

Treatment and dose (mg/kg)	Bleeding index	Number of ulcers	Ulcer index (mm)	Protection (%)
Normal	0	0.28 ± 0.15	0.28 ± 0.15	
Ethanol	2.33 ± 0.21	15.17 ± 1.11[a]	9.59 ± 1.03[a]	
MCPL (20) + ethanol	1.57 ± 0.20[b]	8.74 ± 2.07[b]	6.37 ± 1.30[b]	33.6
MCPL (60) + ethanol	1.66 ± 0.31[b]	7.70 ± 2.44[c]	4.43 ± 1.67[b]	53.8
MCPL (60)	0	0.17 ± 0.17	0.17 ± 0.17	
Famotidine (3.6)	1.83 ± 0.16[b]	11.03 ± 1.64[b]	7.22 ± 1.38	24.7

[a] $p < 0.005$ compared with normal; [b] $p < 0.05$ and [c] $p < 0.01$ compared with ethanol alone treated rat.

Table 3. Histopathological findings for the effect of MCPL on ethanol-induced gastric ulcer in rats .

Treatment and dose (mg/kg)	Congestion	Edema	Hemorrhage	Necrosis
Normal	0	0	0	0
Ethanol	+++	+++	+++	+++
MCPL (20) + ethanol	++	++	+	+
MCPL (60) + ethanol	++	++	+	+
MCPL (60)	0	0	0	0
Famotidine (3.6)	++	++	++	++

Relative intensity of the reaction: 0, no effect; +, mild effect; ++, appreciable effect; +++, severe effect.

Table 4. Effect of MCPL on adhesion mucus content in the ethanol-induced gastric wall of rat

Treatment and dose (mg/kg)	Normal	Ethanol	MCPL (20) + ethanol	MCPL (60) + ethanol	MCPL (60)	Famotidine (3.6)
OD/g of wet glandular tissue	6.28 ± 0.52	3.97 ± 0.32[a]	5.23 ± 0.46[b]	5.72 ± 0.25[c]	6.68 ± 0.42	5.45 ± 0.33[c]

[a] $p < 0.005$ compared with normal; [b] $p < 0.05$ and [c] $p < 0.01$ compared with ethanol alone treated rat.

Data analyses. The data were analysed for statistical significance using Student's *t*-test. Values of $P < 0.05$ were considered to be significant.

RESULTS

Effect of MCPL on gastric ulcer

The effect of MCPL on the bleeding and gastric ulcer index is shown in Table 2. While gastric mucosal lesions were not seen macroscopically in either normal or MCPL alone treated rats, the treatment of rats with absolute ethanol produced severe bleeding and acute lesions in the gastric mucosa. But preadministration with MCPL at both doses of 20 and 60 mg/kg alleviated the severity of the intraluminal bleeding. The MCPL pretreatment also caused a significant decrease in the number and index of the gastric ulcers compared with ethanol alone treated rats.

Effect of MCPL on histopathological changes

Histopathological findings of the stomachs examined are presented in Table 3. Very severe gastric ulceration such as congestion, edema, hemorrhage and necrosis was observed in the rats challenged with ethanol. Although these histopathological changes were also detected in rats preadministered with MCPL, MCPL provided a significant protection against the action of ethanol, especially in hemorrhage and necrosis.

Effect of MCPL on adhesion mucus content

The results of the adhesion mucus content in the stomachs are outlined in Table 4. The mucus level of the gastric wall being the first barrier of defense against luminal ulcerogens, was significantly decreased in the ethanol exposed rats. But preadministration with MCPL at both doses of 20 and 60 mg/kg

Copyright © 2006 John Wiley & Sons, Ltd.

Table 5. Mucin properties in the fundic region of the stomach by conventional methods

Stain/dose (mg/kg)	Region	Normal	Ethanol	MCPL (20) + ethanol	MCPL (60) + ethanol	MCPL (60)	Famotidine (3.6)
PAS	FSMC	3	0/3	0–2/3	0–2/3	3	0–2/3
	GPMC	3	0/3	0–2/3	0–2/3	3	0–2/3
	UMNC	3	0/2	3	3	3	3
	LMNC	1–2	0/1	1–2	1–2	1–2	1–2
AB at pH 2.5	FSMC	2	0/1	0–2/2	0–2/2	2	0/1
	GPMC	2	0/2	0–2/2	0–2/2	2	0/2
	UMNC	2	0/2	2	2	2	2
	LMNC	0	0	0	0	0	0
AB at pH 1.0	FSMC	1	0/1	0/1	0/1	1	0/1
	GPMC	2	0/2	2	2	2	0/1
	UMNC	2	0/2	2	2	2	2
	LMNC	0	0	0	0	0	0
AF at pH 1.7-AB at pH 2.5	FSMC	3R	0/3R,3BP	0/3R	0/3R	3R	0/3R
	GPMC*	3R,3BP	0/3BP	0/3R,3BP	0/3,3BP	3R,3BP	0/3R,3BP
	UMNC	3BP	0/3BP	3BP	3BP	3BP	3BP
	LMNC	2R	0/2R	2R	2R	2R	2R

The numbers indicate relative intensity of the reaction: 3, intense; 2, moderate; 1, weak; 0, absent; FSMC, free surface mucous cells in the surface epithelium; GPMC, gastric pit mucous cells in the surface epithelium; UMNC, upper mucous neck cells in the gland epithelium; LMNC, lower mucous neck cells in the gland epithelium; PAS, periodic acid Schiff's reaction; AB, alcian blue; AF, aldehyde fuchsin; B, blue; BP, bluish purple; /, lesion field/non-lesion field showed a different staining; *, bluish purple cell producing acidic mucin are usually detected at the bottom of the gastric pit.

significantly suppressed or restored the decreased gastric mucus levels compared with ethanol alone treated rats.

Effect of MCPL on mucin properties by conventional methods

The results of the histochemical properties of mucins in the fundic region of the stomach using conventional methods are outlined in Table 5. The mucin properties of mucous cells in the stomachs including the surface and gland mucous cells only are described in the present study. An intense PAS-positive reaction for neutral mucin was shown in the surface epithelium and upper mucous neck cells, and a weak or moderate one was revealed in the lower mucous neck cells. Alcian blue for acid mucin was detected in the all regions observed except for the lower mucous neck cells, and aldehyde fuchsin for sulfated mucin detected on restricted gastric pit epithelium and upper mucous neck cells. Concerning the properties of mucin and the amount in the rats with ethanol treatment, significant decreases of both neutral and acid mucins were observed over the surface to deeper gland mucous cells such as lower mucous neck cells. Some mucous cells producing sulfated mucins were also detected in the surface and gastric pit epithelium. Marked different stainabilities for mucins were observed mainly in the gland mucous cells in the MCPL preadministered rats with significant reduction in ulceration compared with ethanol-treated rats. Furthermore, more prominent staining for neutral and acid mucins were detected in the MCPL-administered rats compared with ethanol alone treated rats and decreases of sulfated secreting mucous cell in the surface epithelium were also revealed.

Effect of MCPL on mucin properties by lectin histochemistry

The results using lectin histochemistry are outlined in Table 6. Although marked lectin affinities were shown in the parietal cells, only mucous cells are described in the present study. Different affinities for SBA, BSL-1, sWGA and Con A were shown in the surface and gland mucous cells, and a somewhat denser sWGA affinity to mucin containing *β-N*-acetyl-D-glucosamine was observed in the lower mucous neck cells. Significant increases in the SBA affinity to mucin containing *α/β-N*-acetyl-D-galactosamine was revealed in the surface epithelium with an increase of the ulcer loci in the ethanol treated rats compared with normal rats. The other lectin affinities were decreased in ethanol treated rats, but BSL-1 affinity to mucin containing *α*-D-galactose was not observed in surface epithelium and upper mucous neck cells. The MCPL preadministered rats showed a similar affinity pattern to those of the normal rats.

DISCUSSION

Polysaccharides have been isolated from the fruiting body and the mycelia of medical mushrooms and used for the prevention and treatment of ulcer diseases (Gao *et al.*, 2004; Kim *et al.*, 2004). The aqueous extract from the fruiting body or mycelia of *P. linteus* has been reported to produce antitumor activities (Nakamura *et al.*, 2004; Choi *et al.*, 2004), but this mushroom is well known to be enriched in polysaccharide (Kim *et al.*, 2004). During mass-culture of mycelia of this mushroom, it was discovered that the mycelium of *P. linteus* possesses alcohol dehydrogenases and produces

Copyright © 2006 John Wiley & Sons, Ltd.

Table 6. Mucin properties in fundic region of the stomach by lectin histochemistry

Stain/dose (mg/kg)	Region	Normal	EtOH	MCPL (20) + ethanol	MCPL (60) + ethanol	MCPL (60)	Famotidine (3.6)
SBA	FSMC	1	0–1/2	1	1	1	1
	GPMC	1–2	1/2	1–2	1–2	1–2	1–2
	UMNC	1–2	1	1–2	1–2	1–2	1–2
	LMNC	0–1	0–1	0–1	0–1	0–1	0–1
BSL-1	FSMC	0–1	0	0–1	0–1	0–1	0–1
	GPMC	0–1	0	0–1	0–1	0–1	0–1
	UMNC	1	0	1	1	1	1
	LMNC	1	0–1	1	1	1	1
sWGA	FSMC	1	0–1	1	1	1	1
	GPMC	1–2	0–1	1–2	1–2	1–2	1–2
	UMNC	2	1–2	2	2	2	2
	LMNC	3	2	3	3	3	3
Con A	FSMC	2	1–2	2	2	2	2
	GPMC	2	1–2	2	2	2	2
	UMNC	2	1–2	2	2	2	2
	LMNC	1	1	1	1	1	1

Abbreviations given in Table 5.

alcohol. Therefore this study demonstrated the antiulcer effects of MCPL in an ethanol-induced model focused on changes in mucins of the gastric mucosa.

Gastric ulceration results from an imbalance of gastric defensive and aggressive factors. Ethanol-induced ulcers result from direct necrotizing effects of aggressive factors such as ethanol on the gastric mucosa. But it was observed that MCPL significantly reduced the bleeding and ulcer index in the present study. It is evident from the results that MCPL at a dose of 20 and 60 mg/kg is more cytoprotective on the ulcer index than a standard antiulcer drug, famotidine, at a dose of 3.6 mg/kg in the ulcer index (Table 2). The histopathological symptoms and severity of the ethanol-induced ulcer, hemorrhage and necrosis in particular, were also significantly reduced by preadministering MCPL with a reduction of the ulcer index (Table 3).

The gastric epithelium is covered by a continuous mucus layer, which plays an important role as a protective barrier for the underlying epithelium (Kemper and Specian, 1991). The gastric adhesion mucus layer could provide a defensive barrier against potential ulcerogens, hence increases in mucus secretion will be effective in the ethanol-induced model. Ethanol treatment induced a marked decrease of gastric mucus content, but preadministration of MCPL can maintain adhesion mucus as normal (Table 4). These results suggest that MCPL may alleviate the ulcerogenic action of ethanol by maintaining the mucus barrier.

Mucins which are large glycoproteins secreted by mucous cells, play important protective roles in the gastric defense mechanisms against various aggressive factors (Kunisaki and Sugiyama, 1992). The mucous cells of the mammalian gastric mucosa have been classified mainly into surface and gland mucous cells, and these two types of cells release mucins with different sugar structures (Ota *et al.*, 1991; Spicer, 1993). This study detected changes in the mucin properties of surface epithelium, which are distinguished into free surface and gastric pit epithelium, and gland mucous cells involving upper and lower mucous neck cells in the fundic region of the stomach.

Epithelial mucins have been classified into neutral and acid types, with the latter being subdivided into sulfated and nonsulfated groups by conventional methods (Spicer and Schulte, 1992). Although understanding the function of the mucins still remains unclear in ulceration, changes in the sulfated mucin appear to play an important role in healing, and nonsulfated sialomucin a role in regenerating epithelia (Lyons *et al.*, 1997; Hayashida *et al.*, 2001). The results of mucin properties of the present studies showed that ethanol-treated rats revealed a marked decrease of neutral and acid mucin in all regions examined and an increased sulfated mucin in the gastric pit and upper mucous neck cells (Table 5; Figs 1 and 2).

Lectins, glycoproteins that bind with an antibody-like affinity to specific oligosaccharides, are useful histochemical tools for more specific information about the localization of mucin in abnormalities of the gastrointestinal tract (Spicer, 1993). Affinities with different types of lectins indicate alterations in the glycosylation of the gastric mucosa that are probably attributed to changes in the physiological functioning of the stomach. The data indicated that the marked increase of SBA affinity and the decrease of BSL-1 were revealed in the ethanol-treated rats compared with the normal rats (Table 6; Fig. 3).

These changes in the mucin properties in rats with ethanol-induced ulcers may be the result of ulcer progression. Ethanol alone treated rats showed a severe change of staining over the surface to the deeper gland mucous cells, but after MCPL preadministration only in the surface mucous cells. The maintenance of these stainabilities and lectin affinities in the MCPL preadministered rats may reveal a protective property of MCPL in the gastric mucosa of ethanol-treated rats.

Although the antiulcer effects of MCPL on the mucus barrier in the stomach remains to be elucidated,

Copyright © 2006 John Wiley & Sons, Ltd.

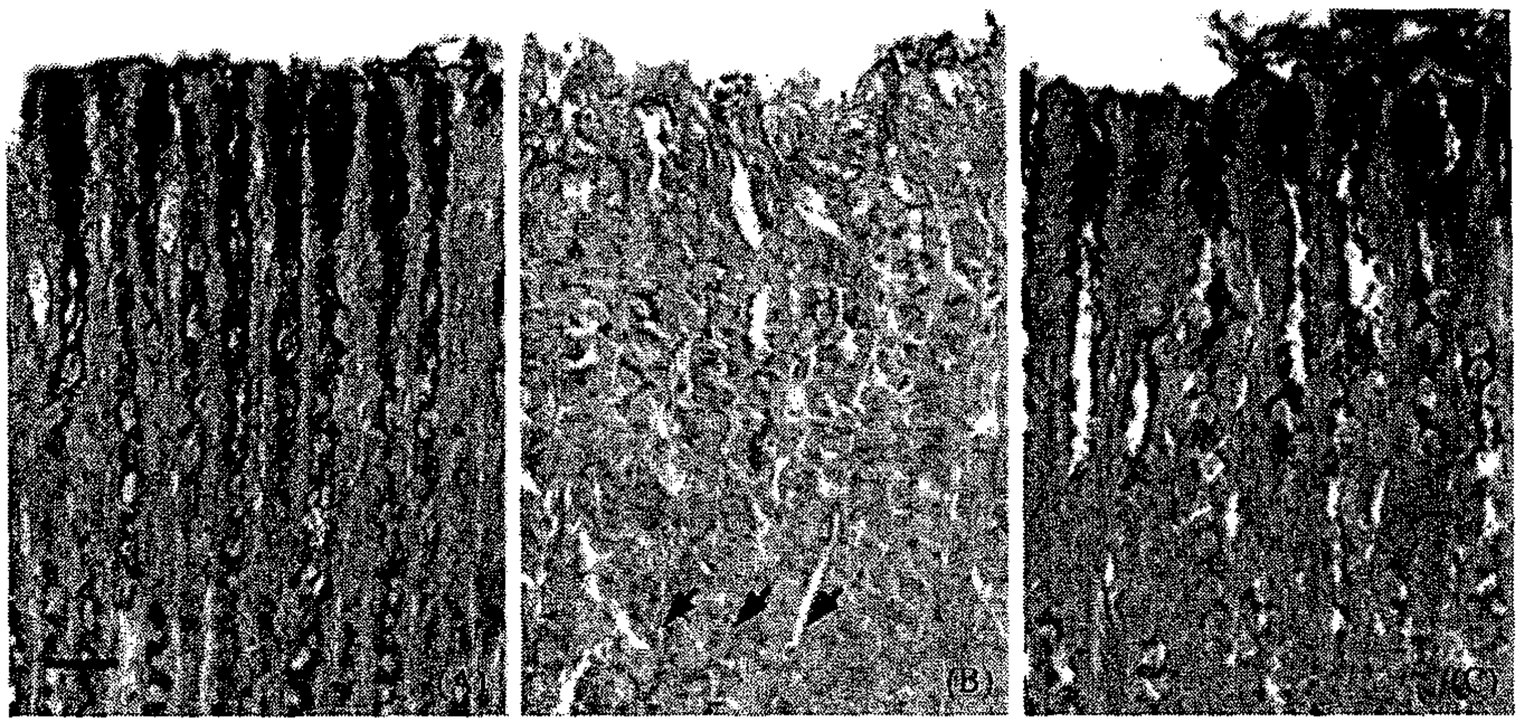


Figure 1. PAS reaction in the normal (A), ethanol alone treated (B) and MCPL preadministered rats before ethanol challenge (C). A marked decrease of neutral mucin was detected over surface to lower mucous neck cells (arrows) in the ethanol-treated rat. Scale bar = 50 μm.

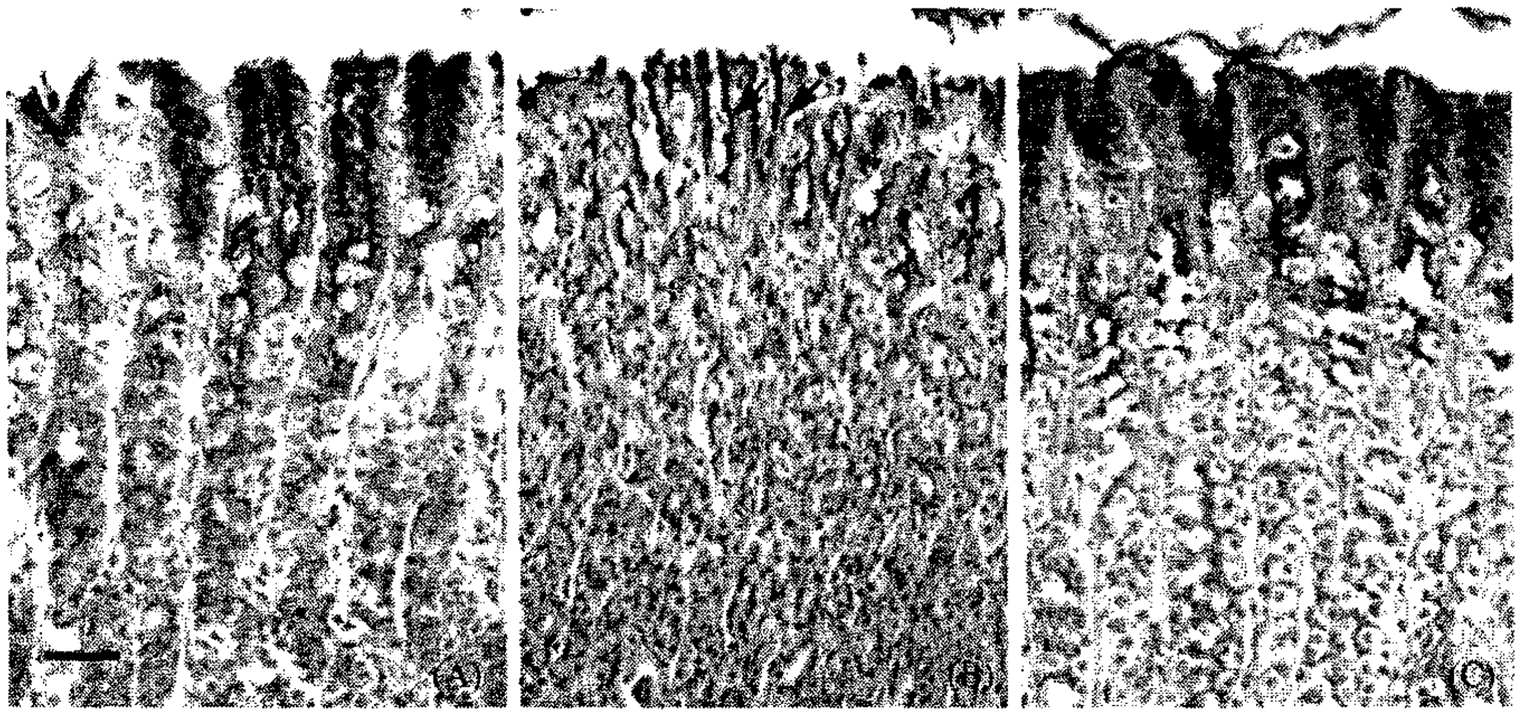


Figure 2. A combination staining of AF at pH 1.7 and AB at pH 2.5 in the normal (A), ethanol alone treated (B) and MCPL preadministered rats before ethanol challenge (C). Note a marked bluish purple color showing a mixture of nonsulfated and sulfated mucin in the gastric epithelium (arrows) of ethanol-treated rat. Scale bar = 50 μm.

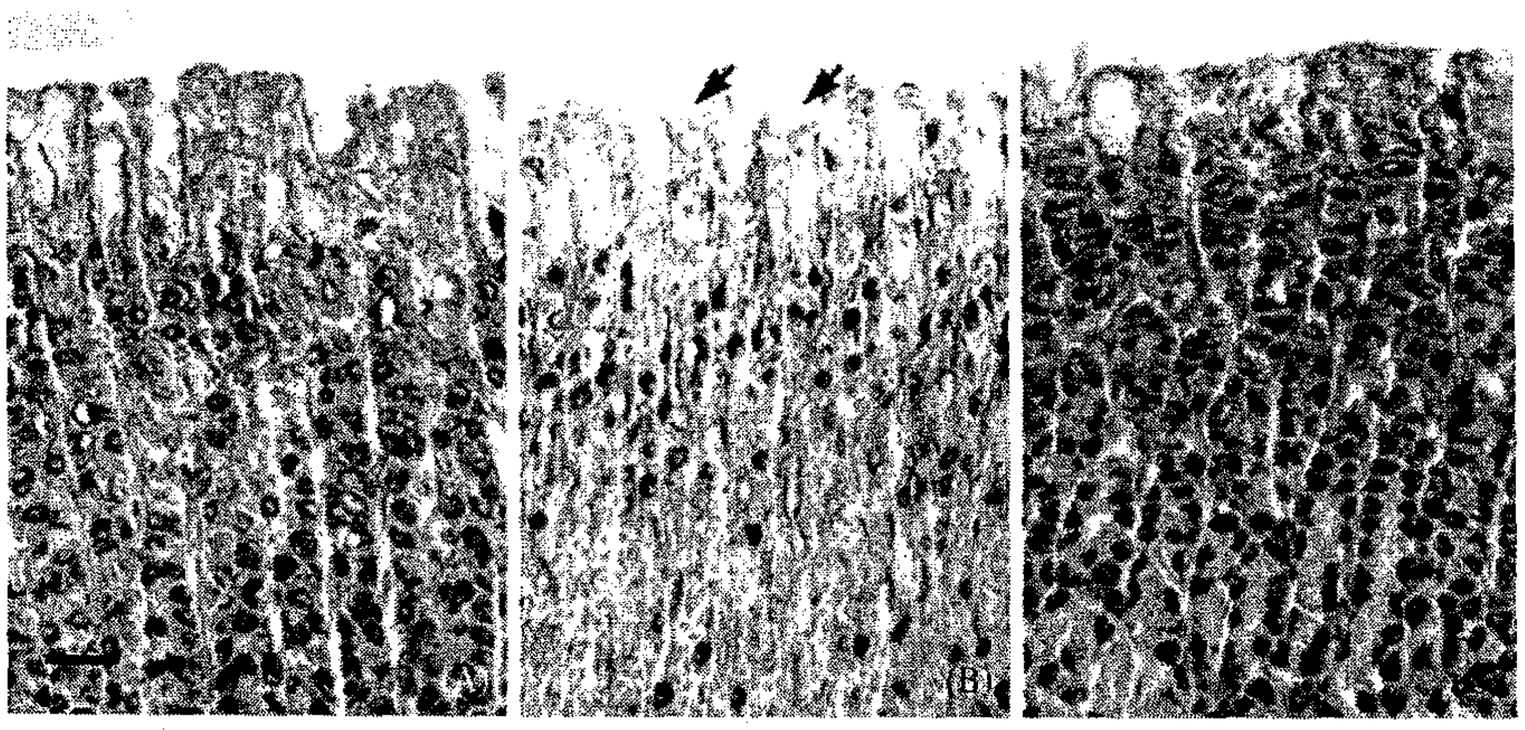


Figure 3. BSL-1 affinity in the normal (A), ethanol alone treated (B) and MCPL preadministered rats before ethanol challenge (C). Weaker affinity is observed in surface epithelium (arrows) of ethanol-treated rat compared with normal one. Scale bar = 50 μm.

Copyright © 2006 John Wiley & Sons, Ltd.

the present results suggest that the preadministration of MCPL effectively suppresses and prevents ethanol-induced ulceration through the maintenance of the mucosal barrier in the stomach. The sulfated mucin and SBA affinity showing prominent changes in ethanol-treated rat may be useful as a marker of the antiulcer effect in the ethanol-induced model. In conclusion, MCPL may be a useful herbal prescription for the prevention and treatment of alcohol-induced ulcerogenesis and gastric mucosal injury.

Acknowledgement

This study was supported by the Technology Development Program for Agriculture and Forestry, Ministry of Agriculture and Forestry, Republic of Korea (HTDP).

REFERENCES

Celebi N, Turkyilmaz A, Gonul B, Ozogul C. 2002. Effects of epidermal growth factor microemulsion formulation on the healing of stress-induced gastric ulcers in rats. *J Control Release* **83**: 197–210.

Choi YH, Huh MK, Ryu CH, Choi BT, Jeong YK. 2004. Induction of apoptotic cell death by mycelium extracts of *Phellinus linteus* in human neuroblastoma cells. *Int J Mol Med* **14**: 227–232.

Gao Y, Tang W, Gao H, Chan E, Lan J, Zhou S. 2004. *Ganoderma lucidum* polysaccharide fractions accelerate healing of acetic acid-induced ulcers in rats. *J Med Food* **7**: 417–421.

Hayashida H, Ishihara K, Ichikawa T *et al.* 2001. Expression of a specific mucin type recognized by monoclonal antibodies in the rat gastric mucosa regenerating from acetic acid-induced ulcer. *Scand J Gastroenterol* **36**: 467–473.

Kemper AC, Specian RD. 1991. Rat small intestinal mucins: a quantitative analysis. *Anat Rec* **229**: 219–226.

Kim SH, Lee HS, Lee S *et al.* 2004. Mycelial culture of *Phellinus linteus* protects primary cultured rat hepatocytes against hepatotoxins. *J Ethnopharmacol* **95**: 367–372.

Kunisaki C, Sugiyama M. 1992. Effect of teprenone on acute gastric mucosal lesions induced by cold-restraint stress. *Digestion* **53**: 45–53.

Lyons KC, Andrews FJ, Comper WD, O'Brien PE. 1997. Changes in sulfated macromolecules produced *in vivo* during normal and indomethacin-delayed ulcer healing in rats. *Dig Dis Sci* **42**: 1755–1764.

Nakamura T, Matsugo S, Uzuka Y, Matsuo S, Kawagishi H. 2004. Fractionation and anti-tumor activity of the mycelia of liquid-cultured *Phellinus linteus*. *Biosci Biotechnol Biochem* **68**: 868–872.

Ota H, Katsuyama T, Ishii K, Nakayama J, Shiozawa T, Tsukahara Y. 1991. A dual staining method for identifying mucins of different gastric epithelial mucous cells. *Histochem J* **23**: 22–28.

Spicer SS. 1993. Advantages of histochemistry for the study of cell biology. *Histochem J* **25**: 531–547.

Spicer SS, Schulte BA. 1992. Diversity of cell glycoconjugates shown histochemically: a perspective. *J Histochem Cytochem* **40**: 1–38.

Copyright © 2006 John Wiley & Sons, Ltd.

상황버섯 균사체를 이용한 발효주가 흰쥐의 위점막에 미치는 영향

이수진[1] · 최영현[2,5] · 이용태[3] · 정경태[4] · 정영기[4] · 최병태[1,5*]

동의대학교 한의과대학 1:해부학교실, 2:생화학교실, 3:생리학교실,
4:자연과학대학 생명응용과학과 5:대학원 바이오물질제어학과

Effects of Fermented Rice Wine Using Mycelium of *Phellinus linteus* on the Gastric Mucosa of Rat

Soo Jin Lee[1], Yung Hyun Choi[2,5], Yong Tae Lee[3], Kyung Tae Chung[4], Young Kee Jeong[4], Byung Tae Choi[1,5*]

Departments of 1:Anatomy, 2:Biochemistry, 3:Physiology, College of Oriental Medicine,
4:Department of Life Science and Biotechnology, College of Natural Science,
5:Department of Biomaterial Control, Graduate School, Dong-eui University

It was examined the effect of fermented rice wine using mycelium of *Phellinus linteus* (FWPL) on the gastric mucosa of rat. The gastric mucosal lesions were not seen macroscopically in normal, but ethanol-administrated rats produced congestion and edema with a few local lesions. The administration of FWPL showed a similar pattern as like normal except trace histopathological changes. The results of Western blot analyses showed that the higher expression of inducible nitric oxygenase (iNOS), cyclooxygenase (COX)-1, COX-2, tumor necrosis factor-α and c-fos, especially COX-2, in the ethanol-administrated rat compared with normal rat. But FWPL-administrated rat showed a trace increase of these expression compared to normal rat. About immunohistochemical observations, weaker iNOS reactions were detected in mucous cells of epithelim of ethanol administrated rat compared with normal and FWPL-administrated rat. These results suggested that FWPL-administrated rat showed a trace changes on the mucus barrier-related protein expression compared with ethanol-administrated rat and thus FWPL may be use to develop a functional alcoholic beverage.

Key words : *Phellinus linteus*, gastric mucosa, alcohol, inducible nitric oxygenase, cyclooxygenase

서 론

상황버섯으로 알려진 *Phellinus linteus*는 체내 면역력의 증대를 통해 각종 염증성 질환과 암에 사용되고 있다[1,2]. 현재 상황버섯의 자실체와 균사체 추출물에 대한 연구는 주로 항암 및 항염증 효과에 치중되어 있다[2,3]. 그러나 상황버섯은 자연 상태에서 매우 희귀하여 실험에 사용하기 어려웠으나 최근 균사체 대량 배양기술을 통해 이에 대한 연구가 용이해졌다.

본 연구진은 상황버섯 균사체 배양 중 이 균사체가 alcohol dehydrogenase를 가지며 알코올을 생성하는 것을 발견하였다. 버섯의 자실체나 균사체에서 추출된 다당류는 면역을 강화시켜 질병예방 효과를 높일 뿐만 아니라 항암작용이 뛰어나 암의 예방과 치료에 기여한다[2,3]. 만약 상황버섯균사체를 이용한 발효주가 상황버섯 자실체 또는 균사체와 유사한 기능성을 나타낸다면 다양한 파생 상품 개발이 가능하다.

상황버섯균사체를 이용한 발효주 (fermented rice wine using mycelium of *P. linteus*, FWPL)는 14%의 알코올을 포함하고 있어 알코올에 의한 간 및 위장의 장애를 예견할 수 있다. 버섯이 함유한 다당류는 항암효과 외에 각종 궤양성 동물 모델에서 항 궤양효과를 나타낸다[4]. 아직 상황버섯이 위궤양에 미치는 효능에 대한 연구는 없다.

본 연구는 상황버섯균사체를 이용한 발효주를 흰쥐에 장기간 투여하였을 때 위에 나타나는 변화를 병리조직학적 관찰과 더불어 위점막 유지에 관련한 inducible nitric oxygenase (iNOS), cyclooxygenase (COX)-1, COX-2 및 관련 염증성 단백질 발현에 대해 살펴보았다.

* 교신저자 : 최병태, 부산시 진구 양정2동 산 45-1 동의대학교 한의과대학
· E-mail : choibt@deu.ac.kr, · Tel : 051-850-8653

· 접수 : 2005/10/28 · 수정 : 2006/01/16 · 채택 : 2006/02/07

재료 및 방법

1. 상황버섯 균사체 발효주 (FWPL)

알코올 수득율을 높이기 위해 쌀을 기초로 한 배지를 사용하였으며 *Aspergillus oryzae*와 *P. linteus*의 균사체를 함께 배양하였다. 우선 *A. oryzae*를 1.2 ㎏의 멸균된 쌀에 접종하여 충분한 균체를 형성시킨 후 3 ㎏의 멸균된 쌀과 90 g의 P. linteus 균사체를 혼합하였으며, 이어 멸균한 물을 총 5 L가 되도록 부가하여 25℃에서 11일 간 발효시켰다. 이를 통해 얻은 발효주를 0.22 ㎛ pore size를 가진 여과지로 여과하여 알코올 농도 14%의 주류를 얻었다.

2. 실험동물 및 처치

8 주된 건강한 수컷 Sprague-Dawley계 흰쥐를 효창 (주)으로부터 구입하여 2주간 자유식이법으로 실험실 환경에 순화시킨 후 실험에 사용하였으며 기능성 규명을 위해 14% 알코올 농도의 발효주를 5 ㎖을 1일 2회 나누어 10일간 경구 투여하였다. 대조군으로 동일농도의 ethanol을 동일기간 투여하였다.

3. Western blot 분석

흰쥐를 10% chloral hydrate (350 ㎎/㎏ i.p.)로 마취하여 위를 적출하여 HEPES buffer (0.5% Triton X-100, 1 mM DTT, 5 mM sodium orthovanadate, 10 ㎍/㎖ aprotinin, 10 ㎍/㎖ leupeptin and 10 mM phenymethylsulfonly fluoride) 수세 후 동일 용액으로 마쇄하였다. 30분동안 4℃ 14,000 rpm에서 원심분리하여 세포내 잔사물을 분리시킨 후 동량의 단백질을 8-12% SDS-polyacrylamide gel 전기영동으로 분리한다. 분리된 단백질을 함유한 acrylamide gel을 nitrocellulose membrane으로 electroblotting에 의해 전이시킨 후, 10% skim milk를 함유한 PBS-T (0.1% Tween 20 in PBS)에 실온에서 1시간 이상 incubation하면서 비특이적인 단백질들에 대한 blocking을 실시하였다. 그리고 iNOS, COX-1, COX-2, tumor necrosis factor (TNF)-α, c-fos 항체 (Santa Cruz Biotechnology Inc.)를 적용시켜 항원 항체 반응을 일으킨 후, PBS-T로 씻어내고 특정 항체에 대한 이차 항체 반응을 실시한 후 ECL (Enhanced ChemiLuminoesence) 용액을 적용시킨 다음 X-ray film에 감광시켜 특정 단백질의 양을 분석하였다.

4. Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) 분석

동일한 조건에서 준비된 위를 대상으로 RNAzol B를 이용하여 total RNA를 분리하였다. 분리된 RNA를 정량한 후, oligo dT primer와 AMV reverse transcriptase를 이용하여 2 ㎍의 RNA에서 ss cDNA를 합성하였다. 이 cDNA를 template로 사용하여 조사할 유전자들을 PCR방법으로 증폭시켰으며 housekeeping 유전자인 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) 유전자를 포함하여 internal control로 사용하였다. 각 PCR 산물들을 1% agarose gel을 이용하여 전기영동하였고 ethidium bromide (EtBr, Sigma)를 이용하여 염색한 후 UV 하에서 확인하였다.

5. 조직병리학적 및 면역조직화학적 검색

위를 절취하여 4% paraformaldehyde에 4℃ 12시간 고정하여 순차적인 탈수와 투명화를 거쳐 paraffin에 포매한 후 6 ㎛ 연속절편을 얻었다. 위장의 조직병리학적 관찰을 위하여 연속절편을 탈 파라핀한 후 hematoxylin-eosin 및 periodic acid Schiff염색을 실시하였다. 면역조직화학적 관찰을 위해 탈파라핀한 후 10 mM sodium citrate buffer (pH 6.0)에서 95℃ 5분간 처리하고, 이를 3% methanolic hydrogen peroxide에 30분간 실온에서 처리하였다. PBS로 세척한 후 goat normal serum (Vector Lab.)으로 실온에서 30분간 처리하였으며 iNOS, COX-1 및 COX-2, 항체를 200:1 로 희석하여 4℃ 습실에 16시간 동안 반응시켰다. PBS로 세척하고 biotinylated anti-rabbit IgG (Vector Lab.)를 실온에서 30분 동안 반응 시켰으며 PBS로 세척 후 ABC kit (Vector Lab.)에 실온에서 60분간 반응시켰다. DAB substrate kit (Vector Lab.)로 실온에서 5분간 발색시켰으며 상기 실험 방법 중 일차항체대신 10% BSA/PBS을 처리하고 동일한 과정으로 염색한 것을 대조군으로 삼았다.

결과 및 논의

1. 위점막의 병리조직학적 관찰

육안적으로 ethanol을 투여한 대조군의 위는 장기간의 알코올 섭취로 인해 정상군에 비해 팽대되어 있었으며 일부 출혈성 궤양의 흔적이 관찰되었다. 정상군에서 정연한 자유표면상피세포와 소와상피세포를 볼 수 있었으나 대조군에서는 표면상피세포가 탈락되어 내강에서 관찰되었다. 또한 위점막의 울혈과 부종과 더불어 일부 위소와 및 위선이 손상된 출혈성 궤양이 관찰되었다(Table 1).

이에 비해 FWPL투여군은 미약한 병리학적 변화가 관찰되나 정상군과 유사한 형태를 나타내었다. 위의 점액장벽을 관찰하기 위한 PAS반응에서 정상군의 정연한 상피세포에 강한 반응을 보인 반면 대조군의 궤양부위에서 손상된 상피세포에 미약한 반응을 보여 주었다. 이에 비해 FWPL투여군은 정상군과 유사한 반응을 보여 주었다 (Fig. 1).

Table 1. Histopathological findings for the effect of FWPL on the stomach of rat

Group	Congestion	Edema	Hemorrhage	Necrosis
Normal	0	0	0	0
Ethanol	++	++	+	+
FWPL	0-+	0-+	0-+	0-+

0-+++ indicated relative intensity of the reaction: 0, no effect; +, mild effect; ++, appreciable effect; +++, severe effect.

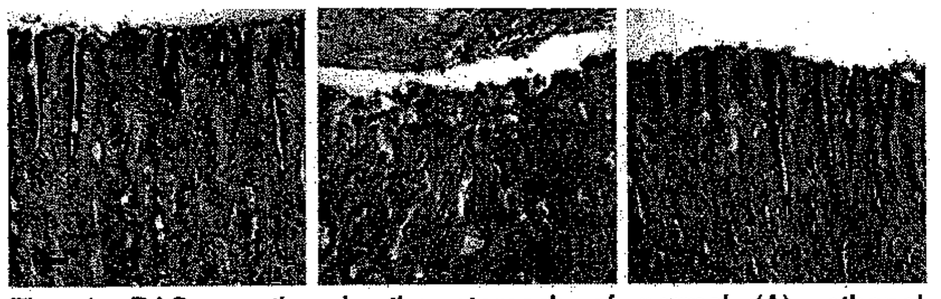


Fig. 1. PAS reaction in the stomach of normal (A), ethanol-administrated (B) and FWPL-administrated rats (C). Note destructive surface epithelium of the stomach showing weak red color in ethanol-administrated rats compared with normal and FWPL-administrated rats. Scale bar = 50 ㎛

전통적으로 위궤양은 위점막내 방어인자와 공격인자의 불균형에 의해 형성되는 것으로 알려져 있다. 소화성궤양은 위산과 펩신복합체는 공격인자로 mucin-bicarbonate분비 점액층, 지질층 등은 방어인자로 보고 있다[5]. Ethanol유발 위궤양모델에서 ethanol은 위점막에 대해 공격인자로 작용한다. 본 실험 결과에서 ethanol을 투여한 대조군에 비해 동일농도의 알코올을 가진 FWPL투여군이 울혈, 부종 및 출혈 등 병리학적 변화가 현저히 적어 ethanol에 의한 위장 손상이 적음을 알 수 있다.

점액세포에서 분비되며 당과 단백질 결합을 총칭하는 당단백질로 구성된 물질인 점액질은 위궤양 형성과정에 매우 중요한 인자로 위장관내 물리·화학적 보호, 윤활작용, 세포막 근접영역의 환경조성에 관여한다[6]. 표면점액세포에서 점액질 장벽을 알아보기 위해 PAS반응을 실시한 결과 대조군은 표면상피의 점액세포가 매우 낮은 반응을 보인 반면 FWPL투여군은 정상군과 유사한 성상을 보여 방어인자로서 점액장벽이 유지됨을 알 수 있다.

2. 위점막의 iNOS 및 COX발현의 변화

Western blot분석에 의한 nitrix oxide (NO)형성에 관여하는 iNOS단백질은 ethanol투여에 의해 증가하는데 비해 FWPL투여시에는 나타나지 않았다. Prostglandins (PGs)생성에 관여하는 COX-1 및 COX-2발현도 ethanol투여에 의해 발현이 증가하나 COX-1에 비해 COX-2가 현저한 증가를 보였다. 이들 발현은 FWPL투여군에서 대조군보다 낮게 나타나며 COX-2가 더 낮게 나타났다. 출혈성 궤양에서 발현이 증가되는 것으로 알려져 있는 TNF-α 및 c-Fos 역시 ethanol처리에 의해 증가하나 FWPL투여군에는 관찰되지 않았다 (Fig. 2A).

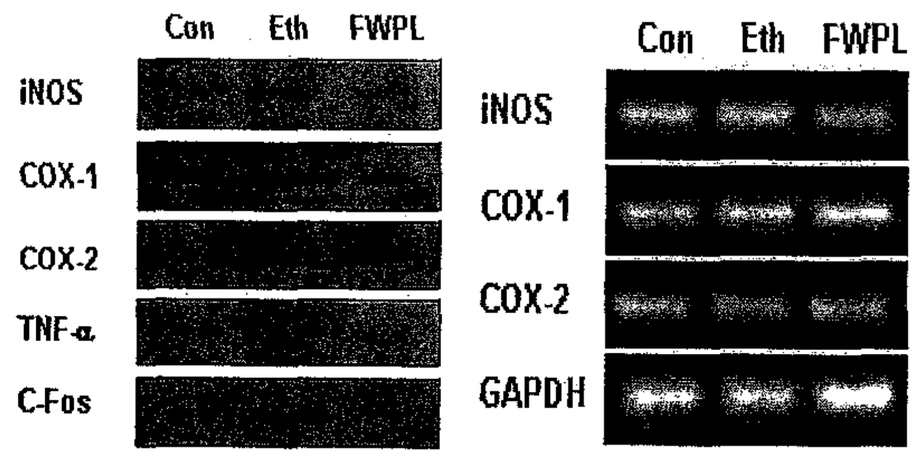


Fig. 2. Effects of ethanol and FWPL on the expression of iNOS, COX-1, COX-2, TNF-α and c-fos proteins (A) and mRNA (B) in rat stomach. Rats were administrated with 14% ethanol and FWPL (14% alcohol content) twice a day for 10 days and examined by Western blot and RT-PCR analysis.

그러나 RT-PCR을 통한 COX-1, COX-2의 mRNA발현을 비교해 보면 ethanol투여와 FWPL투여군 간의 차이를 보여 주지 않았다 (Fig. 2B). iNOS, COX-1 및 COX-2에 대한 면역조직화학적 검색에서 COX-1와 COX-2반응은 각 군에 따른 차이를 보여 주지 않았으나 iNOS반응은 표면과 위선상피의 점액세포에서 반응을 나타내나 ethanol을 투여한 대조군의 손상된 표면상피세포에서는 반응이 관찰되지 않았다. 이에 비해 FWPL투여군은 정상군과 유사한 반응을 보여 주었다 (Fig. 3).

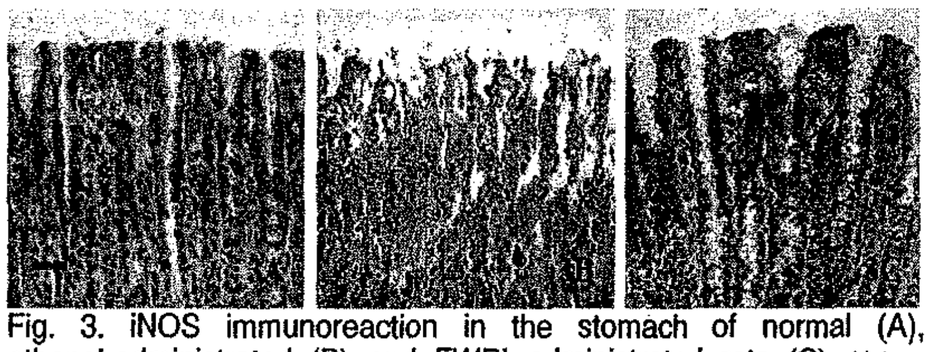


Fig. 3. iNOS immunoreaction in the stomach of normal (A), ethanol-administrated (B) and FWPL-administrated rats (C). Note a significant decreased immunoreaction in the ethanol-administrated group. Scale bar = 50 ㎛

iNOS는 염증성 자극이 주어질 때 발현이 유도되며 L-arginine, O_2, NADPH-derived electron으로부터 L-citrulline, NADP, NO를 생성시키며 NO는 생체내 면역체계에서 활성산소종 또는 활성산소중간매개물로 작용하여 박테리아 등에 감염된 세포가 자체 방어기전을 나타낼 때 생성된다[7]. 그러나 위장에서 NOS는 위점막 유지와 보호에 관여하는데 이는 주로 endothelial NOS (eNOS)이 관여하며 iNOS는 위보호 작용보다는 위손상과 관련 있다[8]. 본 실험 결과 ethanol에 의해 iNOS발현의 증가를 보여 주고 있어 ethanol같은 공격인자에 의한 iNOS의 발현으로 볼 수 있으며 FWPL투여군의 발현이 되지 않는 것으로 보아 위장 손상이 적음을 알 수 있다. 그러나 면역조직화학적 반응에서 손상된 표면상피세포에서 반응이 감소하는데 이는 점액장벽의 손상에 의한 반응의 감소로 보여 진다.

염증관련 인자로 잘 알려진 PGs 중 PGE2는 생리적으로 위장의 혈류량을 증가시키고 위산분비를 저해하여 위장관 점막보호와 위장관 점막 손상이나 궤양의 회복에 관여한다[9,10]. PGs는 COX에 의해 arachidonic acid로부터 형성되며 COX-1이 구조적 성분임에 비해 COX-2는 염증과 관련한 유도성 효소로 과도한 PGs형성에 관여한다[11].

COX-1은 혈소판, 전립선 및 위장에서 현저히 발현되며 COX-2는 위장에서 보통 관찰되지 않으나 Helicobactor pylori 감염, 위궤양, 압형성, 스트레스에 노출될 때 증가한다[9,10]. 그리고 COX-2저해제 투여시 위궤양 회복이 저해되는 것으로 보아 위궤양회복에 관여한다[12]. COX-1에 의해 생성되는 PGs는 위장 점막의 유지 등 일반적인 생리작용에 관여하며 COX-2에 의해 생성되는 PGs는 위장관 염증을 포함한 병리적 환경에서 기능을 한다[13]. COX-1과 COX-2 모두를 저해하는 nonsteroidal anti-inflammatory drugs는 심한 위장 손상을 나타내나 선택적인 COX-2저해제는 손상이 경미하다. COX-1은 대조군에 비해 ethanol투여에 의해 증가하나 현저하지 않으며 FWPL투여에 의해서도 유사한 발현을 보여 구조적 성분으로 COX-1의 발현으로 생리적 위장 점액장벽의 유지를 알 수 있다. COX-2의 발현은 ethanol투여에 의해 정상군에 비해 현저히 증가하는데 COX-2가 위궤양 수복에 관여하나 기본적으로 병리적 유발인자로 ethanol에 의한 위궤양 형성과정에 유발되는 것으로 보여 진다. 이에 비해 FWPL투여군은 대조군에 비해 낮은 발현을 보여 위장 손상이 적음을 알 수 있다.

염증관련인자인 TNF-α와 전사인자가 AP-1이며 c-jun의 활성과 밀접한 연관성을 가지는 c-fos의 발현 또한 ethanol투여에 의해 증가하였다. 이는 염증성 자극에 의해 TNF-α가 생성되며[14], 스트레스 유발 위궤양에서 c-fos mRNA가 증가하는 보고[15]와 일

치하고 있으며 FWPL투여군은 정상군과 유사한 발현을 보여 ethanol에 의한 위장 손상에 대한 보호 기능을 유추할 수 있다.

이상의 결과로 보아 동일한 농도의 ethanol을 장기간 투여한 군에 비해 FWPL을 투여한 군에서 보다 완화된 병리조직학적 소견과 더불어 점막 장벽의 유지에 관여하는 iNOS 및 COX의 발현이 저하되어 ethanol에 의해 가해지는 위장 손상이 FWPL투여에서 낮게 나타남을 알 수 있다. 이는 FWPL내에 동일 농도의 ethanol에 의한 위장 손상에 대해 보호 기능을 유효인자를 함유함을 유추할 수 있으며 이에 심도 있는 연구가 요구된다.

결 론

병리조직학적 소견을 보면 정연한 점막구조를 가진 정상군에 비해 ethanol을 투여한 대조군은 표면상피세포의 손상이 심하여 내강에서도 관찰되며 위점막의 현저한 울혈, 부종과 함께 일부 출혈성 궤양이 관찰되었다. 이에 비해 FWPL투여군는 미약한 병리학적 변화를 나타낼 뿐 정상군과 유사한 소견을 보여 주었다. Western blot분석에서 iNOS는 ethanol투여에 의해 증가하나 FWPL투여에서는 발현되지 않았다. COX발현은 ethanol투여에 의해 모두 증가하나 COX-1에 비해 COX-2의 발현이 현저하였으며 FWPL투여에 의한 COX-2발현도 대조군에 비해 현저히 낮았다. Ethanol투여에 의해 TNF-α와 c-Fos발현이 유도되나 FWPL 투여에 의한 변화는 관찰되지 않았다. 이로 보아 FWPL에는 ethanol에 의한 위점막손상으로부터 보호 기능을 가진 성분이 함유할 가능성을 시사하고 있다.

감사의 글

본 연구는 농림부 농림기술개발사업 (첨단기술개발분야) 연구비 지원에 의해 이루어 졌음을 밝히며 이에 감사드립니다.

참고문헌

1. Nakamura, T., Matsugo, S., Uzuka, Y., Matsuo, S., Kawagishi, H. Fractionation and anti-tumor activity of the mycelia of liquid-cultured Phellinus linteus. Biosci. Biotechnol. Biochem. 68, 868-872, 2004.
2. Kim, S.H., Lee, H.S., Lee, S., Cho, J., Ze, K., Sung, J., Kim, Y.C. Mycelial culture of Phellinus linteus protects primary cultures rat hepatocytes against hepatotoxins. J. Ethnopharmacol. 95, 367-372, 2004.
3. Choi, Y.H., Huh, M.K., Ryu, C.H., Choi. B.T., Jeong, Y.K. Induction of apoptotic cell death by mycelium extracts of Phellinus linteus in human neuroblastoma cells. Int. J. Mol. Med. 14, 227-232, 2004.
4. Gao, Y., Tang, W., Gao, H., Chan, E., Lan, J., Zhou, S. Ganoderma lucidum polysaccharide fractions accelerate healing of acetic acid-induced ulcers in rats. J. Med. Food 7, 417-421, 2004.
5. Goel, R.K., Bhattacharya, S.K. Gastroduodenal mucosal defence and mucosal protective agents. Indian J. Exp. Biol. 29, 701-714, 1991.
6. Neutra, M.R., Forstner, J.F. Gastrointestinal mucus, synthesis, secretion and funtion. In Physiology of the gastrointestinal tract, ed. Johnson LR, Raven Press, New York. pp. 975-1009, 1987.
7. Nathan, C.F., Xie. F. Regulation of biosynthesis of nitric oxide. J. Biol. Chem. 269, 13725-13728, 1994.
8. West, S.D., Helmer, K.S., Chang, L.K., Cui, Y., Greeley, G.H., Mercer, D.W. Cholecystokinin secretagogue-induced gastroprotection: role of nitric oxide and blood flow. Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol. 284, G399-410, 2003.
9. Brzozowski, T., Konturek, P.C., Konturek, SJ., Schuppan, D., Drozdowicz, D., Kwiecien, S., Majka, J., Nakamura, T., Hahn, E. Effect of local application of growth factors on gastric ulcer healing and mucosal expression of cyclooxygenase-1 and -2. Digestion 64, 15-29, 2001.
10. Konturek, P.C., Brzozowski, T., Kwiecien, S., Drozdowicz, D., Harsch, I.A., Meixner, H., Stachura, J., Hahn, E.G., Konturek, S.J., Effect of Helicobacter pylori on delay in ulcer healing induced by aspirin in rats. Eur. J. Pharmacol. 451, 191-202, 2002.
11. Peleg, I.I., Wilcox, C.M. Role of eicosanoids, cyclooxygenases, and nonsteroidal antiinflammatory drugs in colorectal tumorigenesis and chemoprevention. J. Clin. Gastroenterol. 34, 117-125, 2002.
12. Tsuji, S., Sun, W.H., Tsujii, M., Kawai, N., Kimura, A., Kakiuchi, Y., Yasumaru, S., Komori, M., Murata, H., Sasaki, Y., Kawano, S., Hori, M. Lansoprazole induces mucosal protection through gastrin receptor-dependent up-regulation of cyclooxygenase-2 in rats. J. Pharmacol. Exp. Ther. 303, 1301-1308, 2002.
13. Komori, M., Tsuji, S., Sun, W.H., Tsujii, M., Kawai, N., Yasumaru, M., Kakiuchi, Y., Kimura, A., Sasaki, Y., Higashiyama, S., Kawano, S., Hori, M. Gastrin enhances gastric mucosal integrity through cyclooxygenase-2 upregulation in rats. Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol. 283, G1368-1378, 2002.
14. Menon, R., Lombardi, S.J., Fortunato, S.J. TNF-alpha promotes caspase activation and apoptosis in human fetal membranes. J. Assist. Reprod. Genet. 19, 201-204, 2001.
15. Wang, J.Y., Johnson, L.R. Expression of protooncogenes c-fos and c-myc in healing of gastric mucosal stress ulcers. Am. J. Physiol. 266, G878-886, 1994.

Journal of Life Science 2006 Vol. 16. No. 1. 101~107 ©JLS

Effects of Fermented Rice Wine by Using Mycelium of *Phellinus linteus* on the Expression of Inflammation-Related Proteins in Human Hepatoma Cells and Rat Liver

Seung-Min Ahn, Jun-Hyuk Lee, Yung-Hyun Choi[1], Yong-Tae Lee[2], Kyung-Tae Chung[3], Young-Kee Jeong[3], Un-Bock Jo[4] and Byung-Tae Choi*

Departments of Anatomy, [1]Biochemistry and [2]Physiology, College of Oriental Medicine, [3]Department of Life Science and Biotechnology, College of Natural Science, Dong-Eui University, Busan 614-052, [4]Department of Biology Education, College of Education, Pusan National University, Busan 609-735, Republic of Korea

Received November 24, 2005 / Accepted January 18, 2006

We have recently discovered that mycelium of *Phellinus linteus*, popular medical mushrooms in Korea, possess alcohol dehydrogenase and produce alcohol. In the present study, it was examined that the effect of fermented rice wine made by using mycelium of *P. linteus* (FLMP) on the expression of inflammation-related proteins in both $HepG_2$ cells and rats. To examine the effect of FLMP on the morphology and expression of inflammatory proteins in $HepG_2$ cells, the cells were incubated with ethanol, and FLMP for 24 hours, and then analyzed by microscopic observation and Western blot and reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR). While ethanol induced the morphological change accompanied with cell debris formation and scattering on $HepG_2$ cells, FLMP had no effect. The results of Western blot and RT-PCR analyses showed that the level of inducible nitric oxide synthase (iNOS), cyclooxygenase (COX)-1 and COX-2 was induced by ethanol, however, FLMP inhibited the expression of these proteins and its mRNAs. In the animal model, the value of glutamate oxaloacetate transaminase and glutamate pyruvate transaminase was significantly increased by administration with ethanol. But the group administrated with FLMP showed lower levels on the changes of these markers compared with ethanol-administrated group. Besides, the results of Western blot and RT-PCR analyses showed that the expression of inflammatory proteins such as iNOS, COX-1 and COX-2 was not affected by FLMP administration in rat liver. About histopathological and immunohistochemical observations, inflammatory loci were markedly decreased in the FLMP-administrated rat compared to ethanol-administrated rats and showed weaker COX-2 and iNOS immunoreactions. These results suggested that FLMP showed slight changes on the inflammatory proteins expression compared to ethanol and FLMP may be used as a functional alcoholic beverage.

Key words – *Phellinus linteus*, wine, inflammation, liver

The *Phellinus linteus*, commonly referred to as Sangwhang in Korea, is well known as one of the most popular medical mushrooms due to its high anti-tumor and immunostimulating activities[6,11]. Aqueous extract from the fruiting body or mycelia of *P. linteus* has been reported to produce anti-tumor, anti-angiogenic, anti-mutagenic and immunomodulatory activities *in vivo* and *vitro*[3].

Despite such great medical value, *P. linteus* is restricted to use by reason of it being extremely rare to find in the nature and it's high price. During mass-culture of mycelia of this fungus, we have discovered that mycelium of *P.linteus* possesses some alcohol dehydrogenases and produces alcohol. Most alcoholic beverages are made by the fermentation process involving the action of various yeasts [13]. The fermented rice wine is made by using mycelium of *P. linteus* (FLMP) is the first alcoholic beverage without alcoholic fermentation by yeast or any kind of microorganism. Furthermore, if the FLMP is beneficial as *P. linteus*, this rice wine may be a new type of healthy functional rice wine.

However, all kinds of alcoholic beverages have an injurious effect on the function of the liver and other organs. Thus it is necessary to confirm the effect of FLMP on the inflammatory proteins and liver function markers. The present study was designed to examine the effects of FLMP on the expression of inflammation-related proteins and the change of functional markers in human hepatocarcinoma cells and rat livers.

***Corresponding author**
Tel : +82-51-850-8653, Fax : +82-51-853-4036
E-mail : choibt@deu.ac.kr

Materials and Methods

Production of FLMP

To increase ethyl alcohol production the rice-based medium was used, and *P. linteus* was co-cultured with *Aspergillus oryzae*. First, *A. oryzae* was aseptically inoculated on 1.2 kg of autoclaved rice. When the spawned rice had been fully colonized with *A. oryzae*, 3 kg of autoclaved rice and 90 g (wet weight) of *P. linteus* mycelia were mixed all together in 5 liters of autoclaved water. Incubation was done for 11 days at 25℃ without shaking. Each 1.5 kg of autoclaved rice was additionally added at 24 h and at 72 h of the incubation period. The FLMP has 14% alcoholic concentration.

Antibodies and chemicals

Antibodies against cyclooxygenase (COX)-1, COX-2 and inducible nitric oxide synthase (iNOS) and secondary horseradish peroxidase-conjugated rabbit immunoglobulin G antibodies were obtained from Santa Cruz Biotechnology (CA, USA). All other chemicals were obtained from Sigma (MO, USA).

Cell culture and treatment

$HepG_2$ cells were obtained from Korean Cell Line Bank (Seoul, Korea) and were grown in DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, GIBCO BRL, NY, USA) supplemented with 10% fetal bovine serum (GIBCO BRL) and 1% penicillin-streptomycin (GIBCO BRL). $HepG_2$ cells have been widely employed to analyze in vitro alcoholic disease model systems. The cells were cultured at 37℃ in a 5% CO_2 atmosphere. Cells were seeded and stabilized for 24 h and then, treated with a fresh medium containing 14% ethanol or FLMP for 24 h.

Ethanol and FLMP administration

Male Sprague-Dawley rats, weighing about 120 g on average, were obtained from Hyochang Science Co. in Korea. Rats were housed under conditions of 22℃ and 12 h dark and light cycle, were fed a commercial diet, and allowed tap water *ad libitum* starting 2 weeks before and throughout the study. Rats were administrated orally 5 ml of 14 % ethanol, FLMP and PBS twice a day for 10 days.

SDS-PAGE and western blot analysis

Cells were washed in a cold phosphate-buffered saline and lysed in lysis buffer (40 mM Tris-Cl pH 8.0, 120 mM NaCl, 0.1% NP-40, 0.1 mM sodium orthovanadate, 2 μg/ml leupeptin and 100 μg/ml phenyl methylsulfonyl fluoride) at 4℃ for 30 min. The lysates were centrifuged at 14,000 rpm for 30 min at 4℃, and the supernatants were served as whole cell protein extracts. Rat livers were washed in cold HEPES buffer, and homogenized in 9 volumes of potassium HEPES buffer containing 0.5% Triton X-100, 1 mM DTT, 5 mM sodium orthovanadate, 10 μg/ml aprotinin, 10 μg/ml leupeptin and 10 mM phenyl methylsulfonly fluoride. The homogenates were centrifuged at 14,000 rpm for 30 mun at 4℃ and the supernatants served as liver protein extracts. Equal amounts of proteins were separated by 8-12% SDS-PAGE. The resulting gels were transferred to immobilon-P transfer membranes (Millipore, Bedford, MA, USA). For Western blotting, the membranes were incubated with the specific first antibodies for 2 h at room temperature, and then the blots were incubated with horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody. The antibody-specific proteins were visualized by the enhanced chemiluminescence detection system according to the recommended procedure (Amersham, Arlington Heights, IL, USA).

Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR)

For mRNA analysis, cells and rat livers were washed in cold phosphate-buffered saline and homogenized in TRIzol reagent (Invitrogen) following the manufacturer's manuals. mRNA levels were determined by RT-PCR using the GeneAmp RNA-PCR kit (Perkin Elmer) with 50-100 ng of poly A^+ RNA and specific primers as previously described [1]. 10 μl of the reaction products were subjected to electrophoresis in 1% agarose gel and visualized by ethidium bromide (EtBr) staining.

Serum analysis

For the serum analysis, the blood was collected from the heart and immediately centrifuged at 3,000 rpm for 25 min and the plasma was stored at -20℃ for later analysis. Levels of serum glutamate oxaloacetate transaminase (GOT) and glutamate pyruvate transaminase (GPT) were determined by the Cobas Mira (Roche, Switzerland).

Histopathology and immunohistochemistry

The livers were fixed in 4% paraformaldehyde in PBS for 18 h and dehydrated in a graded ethanol series. After embedment in paraffin, serial 5 μm thick sections were prepared. For histopathological examinations, hematox-

ylin-eosin stain and periodic acid Schiff's (PAS) reaction were used. After deparaffinized in 58℃ xylene, the sections were exposed to 0.3% methanolic hydrogen peroxide for 30 min, and washed with PBS. Tissues were then treated with goat normal serum at room temperature for 30 min followed by treatment with anti-iNOS, COX-1 and COX-2 diluted for 1:500 in moisture chamber at 4℃ for 16 h. After being washed by PBS, tissues were incubated with the secondary antisera, biotinylated anti-rabbit IgG for 30 min and washed with PBS. These sections were further incubated in avidin-biotin-peroxidase complex kit (Vector Lab. CA, USA) at room temperature for 1 h. Diaminobenzidine substrate kit for peroxidase (Vector Lab. CA, USA) was applied. For the controls, treatment with primary and secondary antibodies was omitted.

Results

Effect of FLMP on the morphology of $HepG_2$ cells

It was examined the effects of FLMP compared with ethanol on the morphology of liver cell. $HepG_2$ cells were treated with ethanol or FLMP including 0.28%, 0.56% and 1.4% of alcoholic concentration for 24 h. As shown in Fig. 1, ethanol induced morphological change including scattering and cell debris formation, while the cells treated with FLMP had no change similar to the control. The result suggests that FLMP have some components which are able to protect cellular morphology or structure from its own alcohol.

Effect of FLMP on the expression of inflammation-related proteins in $HepG_2$ cells

To investigate the effect of FLMP on the expression of inflammation-related proteins in $HepG_2$ cells, the cells were treated with 0.28% of alcoholic concentration of ethanol and FLMP for 24 h. As shown in Fig. 2A, expression of COX-1 and COX-2 was induced in $HepG_2$ cells treated ethanol than FLMP. Also, iNOS expressions were strongly induced in $HepG_2$ cells treated ethanol than FLMP. This alleviative effect of FLMP on the protein expression was confirmed by RT-PCR analysis (Fig. 2B). The results indicated that FLMP lowered the induction of inflammation more than ethanol through decreasing the inflammatory

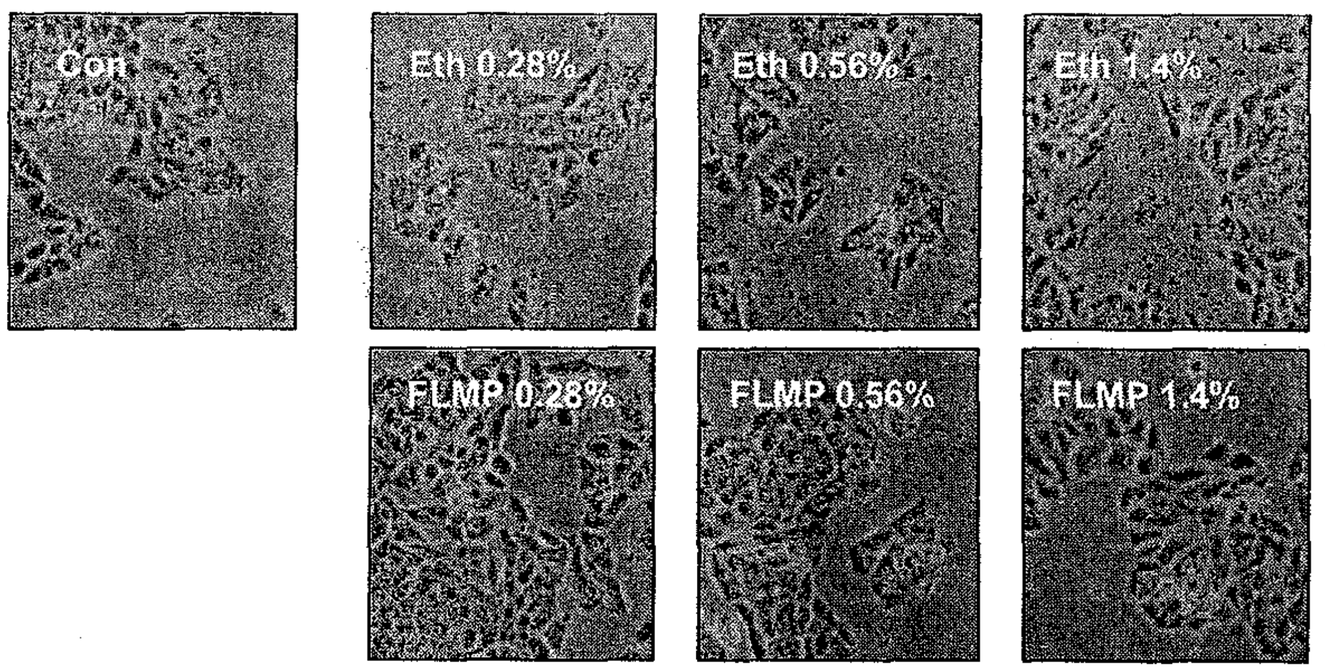


Fig. 1. Morphological changes in $HepG_2$ cells following incubation with ethanol and FLMP. Cells were treated with ethanol and FLMP of various alcoholic concentrations for 24 h (×200).

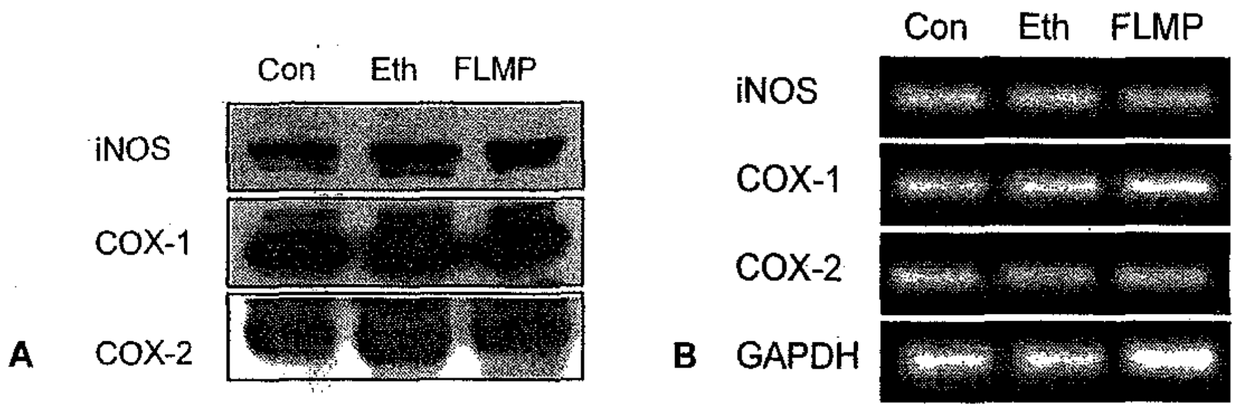


Fig. 2. Effects of ethanol and FLMP on the expression of inflammation-related proteins (A) and mRNAs (B). $HepG_2$ cells were incubated with ethanol and FLMP (0.28% alcohol each) for 24 h. The expression levels of iNOS, COX-1 and COX-2 protein and mRNA were examined by Western blot and RT-PCR as detailed in Materials and Methods.

protein expression.

Effect of FLMP on the liver function in rats

In the results of *in vitro* experiment, ethanol could induce morphological change and inflammation in $HepG_2$ cells, however, FLMP showed little marked effects. Therefore, the effect of FLMP on the liver function was examined in the animal model. Rats were administrated orally 5 ml of ethanol, FLMP or PBS twice a day for 10 days. After treatment, the markers for liver function including serum GOT and GPT were examined. As shown in Fig. 3, the level of GOT was increased in the ethanol-administrated group compared with control, but there was no significant changes. However, GPT level was significantly increased in ethanol-administrated group compared with control and this level also markedly decreased in the FLMP-administrated group compared with the ethanol-treated group.

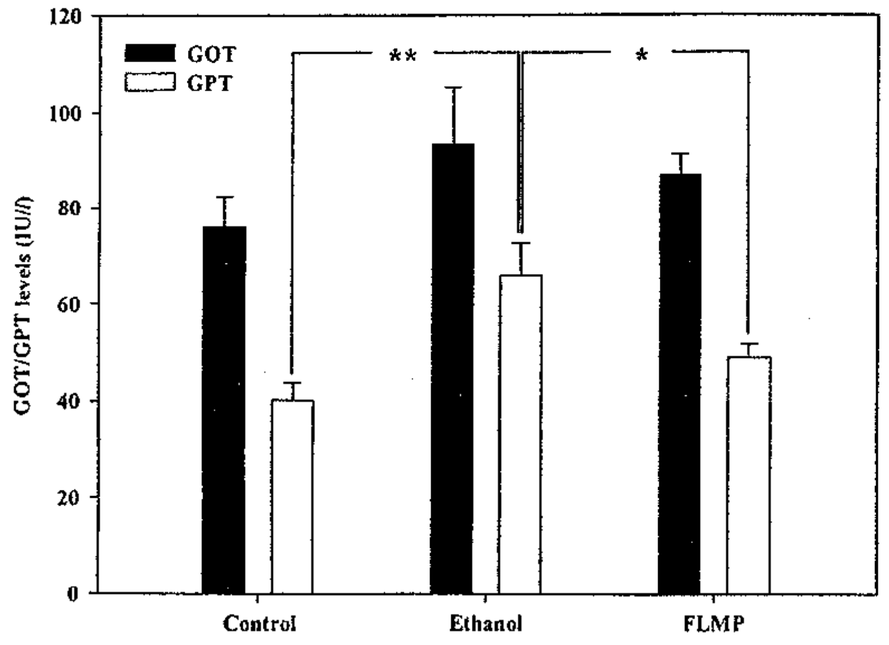


Fig. 3. Effects of ethanol and FLMP on the serum GOT and GPT levels. Rats were administrated with 14% ethanol and FLMP (14% alcohol content) twice a day for 10 days and examined by a blood serum analysis instrument. Values are means±SEM of eight animals. *, $P<0.05$; **, $P<0.005$.

Effect of FLMP on the expression of inflammation-related proteins in the rat liver

Fig. 3 suggests that ethanol has injurious effects on the liver function markers relating to inflammation in the liver. Then inflammation-related proteins in the rat liver administrated with ethanol were examined. As shown in Fig. 4A, iNOS, COX-1 and COX-2 protein was increased in the rats administrated with ethanol, but these proteins, especially iNOS, were reduced in the rats administrated with FLMP. To confirm these results, RT-PCR analysis was performed as shown in Fig. 4B.

Histopathological and immunohistochemical observation of rat liver

Inflammatory loci with stromatic changes including cloudy swelling, hydropic degeneration and inflammatory cells infiltration were markedly increased in the ethanol-administrated rat. But a similar histopathological pattern with PAS reaction showed in rats administrated with FLMP compared with control ones (Fig. 5). The iNOS and COX-2 immunoreaction of hepatocytes, especially in the inflammatory loci, were increased in ethanol-administrated groups compared to control ones. But these immunoreactions were decreased in the rats administrated by FLMP with fewer inflammatory loci (Fig. 6).

Discussion

Generally, *P. linteus* has been used as a medicinal mushroom for the treatment of inflammatory disease and cancer in Korea. The investigations for the crude extract and chemical constituents of this fungus were also focused on

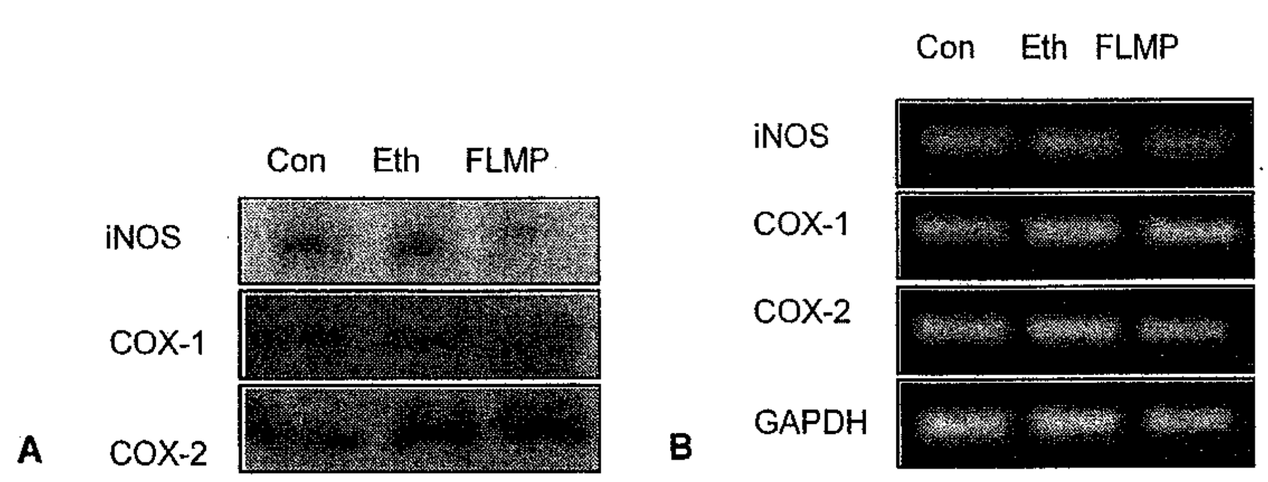


Fig. 4. Effects of ethanol and FLMP on the expression of inflammation-related proteins (A) and mRNA (B) in rat liver. Rats were administrated with 14% ethanol and FLMP (14% alcohol content) twice a day for 10 days and examined by Western blot and RT-PCR analysis in rat liver.

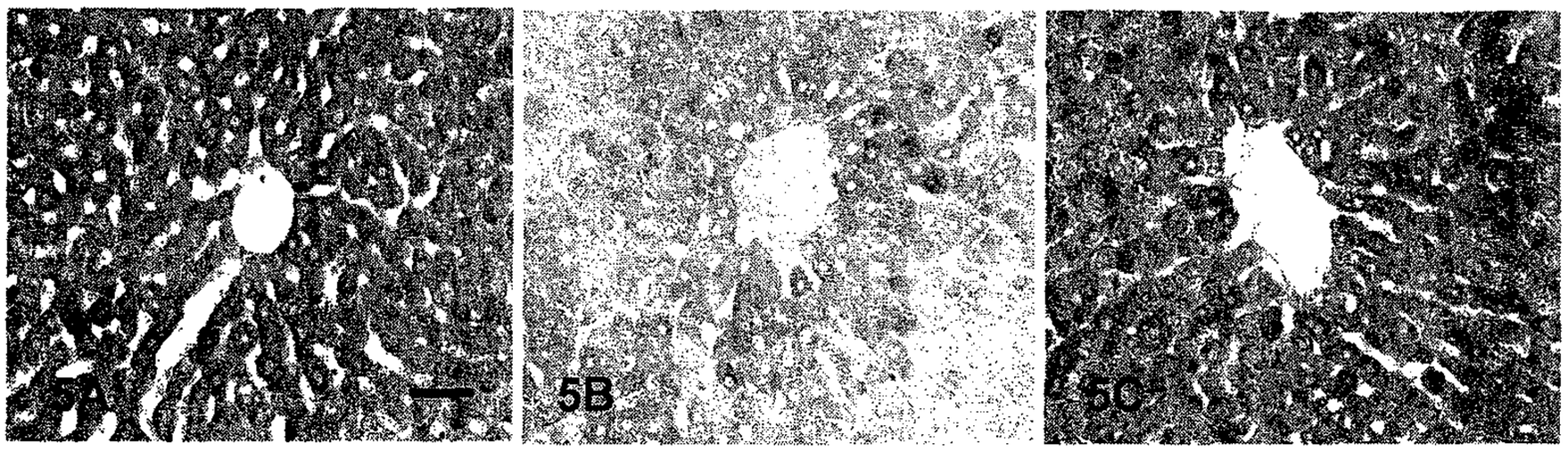


Fig. 5. Photomicrographs showing the liver of the rat in the control (A), ethanol- (B) and FLMP-administrated rats (C). Note severe inflammatory loci and a marked weak PAS reaction of the ethanol-administrated rats compared with the control and FLMP-administrated ones. Scale bar=50 μm.

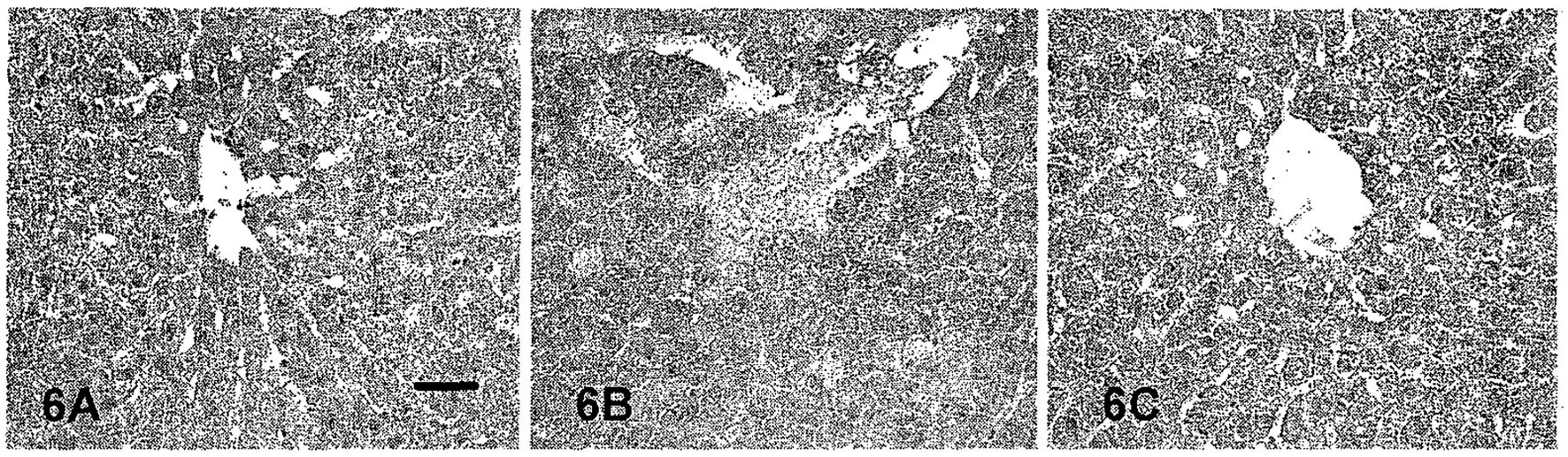


Fig. 6. Immunoreaction of COX-2 in the liver of control (A), ethanol- (B) and FLMP-administrated rats (C). Note decline of COX-2 immunoreaction, especially in inflammatory loci, in the FLMP administrated rats compared with ethanol-administrated ones. Scale bar=50 μm.

their anti-tumor activities. Like fruiting bodies of *P. linteus*, its mycelial extract was found to contain potent anti-tumor activities[3] and showed anti-tumor activity toward solid tumors planted in mice[11]. The polysaccharides of mycelial culture of *P. linteus* stimulate humoral and cell-mediated immunity and exhibit a wider range of immunostimulation and anti-tumor activity[5].

The liver is one of the major organs to be damaged during the heavy intake of alcohol. Many studies have demonstrated that liver disease resulted from the dose-and time-dependent consumption of alcohol[4,8]. We have firstly observed that the effects of FLMP on the morphological change of $HepG_2$ cells in the present study. $HepG_2$ cells treated with FLMP showed a similar morphology as like the normal cells. These results suggest that FLMP may have some components to protect cellular morphology or structure from its own alcohol.

The liver injury in response to alcohol is associated with an inflammatory response as an important precursor to the development of irreversible liver disease[10]. The iNOS is a member of the nitric oxide synthases family and hepatic injury is associated with up-regulation of this enzyme expression[9,14]. COX-1 is constitutively expressed in most cells and tissues, whereas COX-2 is only expressed when induced by inflammatory stimuli[16,17]. COX-2 is selectively expressed in response to various inflammatory stimuli and is increased in adjacent cirrhotic tissue of hepatocellular carcinoma[2,12].

In the present study, higher expression of iNOS, COX-1 and COX-2 were induced in the ethanol treated $HepG_2$ cells compared with FLMP-treated cells (Fig. 2). Furthermore, *in vivo* experimental data confirmed that FLMP could affect an expression of inflammatory proteins in rat liver (Fig. 4). The immunohistochemical analysis also showed a similar result with mRNA and protein expression. The declines of iNOS and COX-2 immunoreaction with a decrease of inflammatory loci in an FLMP-administrated rat were observed compared to ethanol-administrated ones (Fig. 6).

The GOT and GPT levels are correlated with the degree of inflammation or cell death of the liver[7,15]. Therefore, it was investigated that the effects of FLMP on the alteration of GOT and GPT levels in rat blood serum served as

a liver functional marker. Lower levels of these enzymes, especially GPT, were demonstrated in the serum of FLMP-administrated rats compared to ethanol-administrated ones with histological changes such as fewer inflammatory loci (Figs. 3 and 5).

Previous studies showed that the methanolic extract of the mycelial culture of *P. linteus* significantly protects against hepatotoxins-induced toxicity in primary cultured rat hepatocytes[6]. It suggested that alcohol causes liver damage through hapatocytic necrosis including inflammatory process, but some components of FLMP may prevent alcohol-induced liver injury.

Although exact components of this beverages are not clear, active fraction of FLMP was composed of 68±9% of protein and 15±4% of sugar. It's constitute of sugars were Glu:Gal:Man:Fru=46.6:12.8:26.4:3.8 in molar ratio. The ^{1}H, ^{13}C-NMR analysis showed that the main glucan part of the extract of FLMP was a mixtures α-D-glucan and β-D-glucan (unpublished data). Though FLMP has relative low alcohol content (14%), FLMP can also cause the alcoholic liver disease. However, FLMP administration induced lower expression of inflammation-related proteins in both $HepG_2$ cell and rat liver compared with ethanol. Furthermore, FLMP-administrated groups showed slight changes on the liver enzyme abnormalities. This was also confirmed by histopathological and immunohistochemical observations in rat liver.

As shown in a previous report that anti-tumor polysaccharides from mushrooms are β-D-glucan[11], the polysaccharides of FLMP may prevent alcohol-induced liver injuries. Consequently, these results suggest that FLMP may have some components to hepatoprotective activities. Then these data will be a useful additional source of information about mycelium of *P. linteus* and a good guide for the developments of the other functional alcoholic beverages.

Acknowledgement

This Study was supported by Technology Development Program of the Ministry of Agriculture and Forestry, Republic of Korea

References

1. Araki, H., Y. Komoike, M. Matsumoto, A. Tanaka and K. Takeuchi. 2004. Healing of duodenal ulcers is not impaired by indomethacin or rofecoxib, the selective COX-2 inhibitor, in rats. *Digestion* **66**, 145-153.
2. Cheng, J., H. Imanishi, H. Iijima, S. Shimomura, T. Yamamoto, Y. Amuro, A. Kubota and T. Hada. 2002. Expression of cyclooxygenase 2 and cytosolic phospholipase A_2 in the liver tissue of patients with chronic hepatitis and liver cirrhosis. *Hepatology Res.* **23**, 185-195.
3. Choi, Y. H., M. K. Huh, C. H. Ryu, B. T. Choi and Y. K. Jeong. 2004. Induction of apoptotic cell death by mycelium extracts of *Phellinus linteus*in human neuroblastoma cells. *Int. J. Mol. Med.* **14**, 227-232.
4. Dai, L. L., J. P. Gong, G. Q. Zuo, C. X. Wu, Y. J. Shi, X. H. Li, Y. Peng, W. Deng, S. W. Li and C. A. Liu. 2003. Synthesis of endotoxin receptor CD14 protein in Kupffer cells and its role in alcohol-induced liver disease. *World J. Gastroenterol.* **9**, 622-626.
5. Han, S. B., C. W. Lee, Y. J. Jeon, N. D. Hong, I. D. Yoo, K. H. Yang and H. M. Kim. 1999. The inhibitory effect of polysaccharides isolated from *Phellinus linteus* on tumor growth and metastasis. *Immunopharmacol* **41**, 157-164.
6. Kim, S. H., H. S. Lee, S. Lee, J. Cho, K. Ze, J. Sung and Y. C. Kim. 2004. Mycelial culture of *Phellinus linteus* protects primary cultured rat hepatocytes against hepatotoxins. *J. Ethnopharmacol.* **95**, 367-372.
7. Kim, S., C. Y. Hwang, N. K. Kim, M. C. Park and J. Kim. 2002. Effects of cordyceps militaris on CCl_4-induced liver damage and cancer cell ($HepG_2$ cell) growth. *Kor. J. Oriental. Physol. Pathol.* **16**, 684-692.
8. Mann, R. E., R. G. Smart and R. Govoni. 2003. The epidemiology of alcoholic liver disease. *Alcohol Res. Health.* **27**, 209-219.
9. McNaughton, L., L. Puttagunta, M. A. Martinez-Cuesta, N. Kneteman, I. Mayers, R. Moqbel, Q. Hamid and M. W. Radomski. 2002. Distribution of nitric oxide synthase in normal and cirrhotic human liver. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**, 17161-17166.
10. Nagy, L. E. 2004. Molecular aspects of alcohol metabolism: transcription factors involved in early ethanol-induced liver injury. *Annu. Rev. Nutr.* **24**, 55-78.
11. Nakamura, T., S. Matsugo, Y. Uzuka, S. Matsuo and H. Kawagishi. 2004. Fractionation and anti-tumor activity of the mycelia of liquid-cultured *Phellinus linteus*. *Biosci. Biotechmol. Biochem.* **68**, 868-872.
12. Qiu, D. K., X. Ma, Y. S. Peng and X. Y. Chen. 2002. Significance of cyclooxygenase-2 expression in human primary hepatocellular carcinoma. *World J. Gastroentetol.* **8**, 815-817.
13. Querol, A., M. T. Fernandez-Espinar, M. del Olmo and E. Barrio. 2003. Adaptive evolution of wine yeast. *Int. J. Food. Microbiol.* **86**, 3-10.
14. Ronco, M. T., L. Alvarez Mde, J. A. Monti, M. C. Carrillo, G. B. Pisani, M. C. Lugano and C. E. Carnovale. 2004. Role of nitric oxide increase on induced programmed cell death during early stages of rat liver regeneration. *Biochem. Biophys. Acta* **6**, 70-76.

15. Takeda, Y., A. Ichihara, H. Tanioka and H. Inove. 1964. The biochemistry of enzyme from dispersed rat liver cell. *J. Biol. Chem.* **239**, 3590-3596.
16. Warner, T. D and J. A. Mitchell. 2004. Cyclooxygenases: new forms, new inhibitors, and lessons from the clinic. *FASEB J.* **18**, 790-804.
17. Zha, S., V. Yegnasubramanian, W. G. Nelson, W. B. Isaacs and A. M. De Marzo. 2004. Cyclooxygenases in cancer: progress and perspective. *Cancer Lett.* **215**, 1-20.

초록 : 상황버섯 균사체를 이용한 발효주가 인체간암세포와 흰쥐 간의 염증관련 단백질 발현에 미치는 영향

안성민 · 이준혁 · 최영현[1] · 이용태[2] · 정경태[3] · 정영기[3] · 조운복[4] · 최병태*
(동의대학교 한의과대학 해부학교실, [1]생화학교실, [2]생리학교실, 자연과학대학 [3]생명응용과학과, [4]부산대학교 사범대학 생물교육과)

상황버섯균사체를 이용한 발효주 (FMLP)가 인체간암세포와 흰쥐 간에서 염증관련단백질의 발현과 간 손상 관련효소에 미치는 영향에 대해 조사하였다. 에탄올, FLMP를 인체 간암세포인 $HepG_2$세포에 24시간 처리한 경우, 대조군에 비해 에탄올을 처리한 세포는 농도가 증가할수록 세포의 형태 변화가 심한 반면 FLMP를 처리한 세포는 알코올의 농도가 증가해도 세포의 형태 변화를 관찰할 수 없었다. $HepG_2$세포의 염증 관련 단백질 발현을 보기 위해 Western blot과 RT-PCR을 한 결과 COX-1, COX-2, iNOS, TNF-α의 발현이 에탄올에 의해 현저하게 유도되었으나, FLMP는 $HepG_2$세포에서 mRNA와 단백질의 발현이 에탄올에 비해 억제되었다. 흰쥐를 이용한 동물실험에서 간 기능의 지표가 되는 혈청내 GOT와 GPT양 등이 에탄올 투여 그룹에서 현저히 증가했으나 FLMP를 투여한 그룹에서 에탄올 투여 그룹에 비해 낮게 나타났다. 면역조직화학적 분석에서 에탄올을 투여한 쥐의 간세포에서 iNOS와 COX-2의 발현이 현저히 증가하나 FLMP를 투여한 쥐의 간세포에서 미약한 면역반응이 관찰되었다. 이상의 결과로 보아 FLMP는 동일한 농도의 에탄올에 비하여 간 손상의 가능성이 적은 것으로 사료되며 이 자료들은 상황버섯에 대한 연구와 다른 기능성 주류에 대한 기초 자료가 될 것이다.

KOREAN J. FOOD SCI. TECHNOL. Vol. 38, No. 2, pp. 159~164 (2006)

KOREAN JOURNAL OF
한국식품과학회지
FOOD SCIENCE AND TECHNOLOGY
©The Korean Society of Food Science and Technology

산지가 다른 상황버섯의 휘발성성분

장은영 · 임성임[1] · 정영기[2] · 최성희*

동의대학교 식품영양학과, [1]동의대학교 생활과학연구소, [2]동의대학교 생명응용과학과

Volatile Components of *Phellinus linteus* from Different Areas

Eun-Young Jang, Sungim Im[1], Yong-Kee Jeong[2], and Sung-Hee Choi*

Department of Food Science and Nutrition, Dongeui University
[1]Research Institute of Life Sciences, Dongeui University
[2]Department of Life Science and Biotechnology, Dongeui University

Abstract Volatile components of *Phellinus linteus* produced from different areas were collected by simultaneous steam distillation-solvent extraction method (SDE). Concentrated extracts analyzed and identified by GC and GC-MS showed musty and earthy characteristics. 2-Methylphenol, methoxy benzene, coumaran, azulene, α-cedrene, α-longipinene, β-selinene, α-selinene, camphor, γ-ionone, β-ionone, phytol, and borneol not reported in other edible mushrooms, were identified and/or tentatively identified in *P. linteus* for the first time. Main volatile components of *P. linteus* (Busan-Jinsung: BJ) were phytol from chlorophyll and methoxy benzenes having musty odor. Volatile components of *P. linteus* (Jinju-Kumwhang: JK) resembled those of BJ, but with high concentration of phenylacetaldehyde contributing to flower-odor. *P. linteus* (Cheju-Gullim: CG) contained low concentration of methoxy benzenes, but high concentration of phenylacetaldehyde. Low concentrations of γ-ionone and β-ionone were identified in three kinds of *P. linteus*. They appeared to have been produced from degradation of carotenoid, which suggests *P. linteus* contains a carotenoid pigment.

Key words: *Phellinus linteus*, SDE, methoxy benzene, β-ionone, carotenoid

서 론

뽕나무의 그루터기에 자생하는 다년생 담자균류인 상황버섯(*Phellinus linteus*)은 항암활성의 효능이 전해지면서 최근에는 버섯재배농원에서 대량 생산되어 판매되고 있다. 담자균 유래 다당류들은 대부분 β-glucan성 다당류로 숙주의 면역 기능을 활성화시킴으로서 새로운 항암제 및 보조제로서 기능이 밝혀지면서 많은 연구가 수행되어 왔으며, 이들 중 상황버섯도 항암활성 및 높은 면역 활성을 갖는 것이 알려져 있다(1-3). 또한, 버섯자실체 열수추출물의 sarcoma 180 암세포에 대한 항종양 활성 측정 결과, 목질진흙버섯은 96.7%, 송이버섯은 91.8%, 표고버섯은 80.7% 등으로 식용버섯 및 약용버섯 27종 중 상황버섯의 항종양 활성이 가장 높은 것이 보고되었고(1), 면역능에 관련하여 자연산 자실체와 인공재배 자실체는 항보체 활성이 각각 65.8%와 63.9%로 큰 차이가 없는 것으로 보고되었다(4). 상황버섯 자실체의 열수추출 총 분획과 열수추출 에탄올처리 다당류 분획은 각각 30.7%와 85.9%, 배양 균사체의 경우 UF처리 다당류와 열수 추출 에탄올처리 다당류 분획은 각각 85.0%와 80.4%의 항암 활성을 나타내었고, 효소적 지질과 산화 유발시의 지질과산화 억제율은 상황버섯 자실체의 열수 추출 총 분획 및 열수 에탄올 처리 분획은 각각 89.9%와 90.7%로 나타났다고 보고하였다(5). 이상과 같이 항암 및 면역활성, 항산화활성등 약리작용에 관한 연구는 국내·외에서 진행되어져, 약효성분으로 다당체, 다당체 단백질 등을 들고 있지만, 다른 식용버섯류에 비해 항암성이 더 높은 이유는 명확하지 않다.

한편, 상황버섯의 기능성 식품소재로 개발시 높은 기호도에 영향을 미치게 되는 특유의 향기성분에 관한 연구는 거의 없는 실정이다. 현재까지 식용버섯의 휘발성성분에 관한 연구로는 양송이를 비롯하여 송이, 표고, 느타리등의 향기성분이 보고되어 있다. 양송이버섯의 경우 1-octen-3-ol과 1-octen-3-one이 주요 향기성분으로 밝혀져 있으며(6), 특히, 양송이버섯의 중요한 신선향기로는 1-octen-3-ol를 비롯한 3-octanone, 3-octanol, benzaldehyde, octanol, 2-octen-1-ol이, 가열 조리시에는 1-octen-3-one이 특징적인 성분으로서 생성되는 것으로 보고되어 있으며(7), 버섯에 가장 많이 함유된 1-octen-3-ol을 버섯을 건조했을 경우 대부분 소실되고, benzaldehyde와 benzyl alcohol의 비율이 증가하는 것으로 밝혀져 있다(8). 한국산 식용버섯인 송이, 표고, 양송이버섯의 경우에도 이들 버섯의 신선향기와 가열향기로 1-octen-3-ol이 주요성분으로 동정되어져 있으며(9-11), 느타리버섯의 경우, 생느타리버섯의 주요향기성분으로는 3-octanol(46.01%), 3-octanone(18.75%), 1-octen-3-ol(15.37%)이, 가열조리시의 느타리버섯 향기성분으로는 1-octen-3-ol(66.50%), 3-octanol(10.99%), 3-octanone(9.77%)이 동정되어, 느타리버섯은 생버섯의 경우 1-octen-3-ol이 15.39%였으나, 조리과정에서 66.50%로 증가하는 것으로 알려져 있다(12). 이와 같이 상용되고 있는 식용버섯에 관한 연구는 활발히 진행되어져 상세

*Corresponding author: Sung-Hee Choi, Department of Food Science and Nutrition, Dongeui University, Eomgwangno 995 Gaya-dong, Busanjin-gu, Busan 614-714, Korea
Tel: 82-51-890-1590
Fax: 82-51-890-1786
E-mail: choish@deu.ac.kr
Received Septemer 6, 2005; accepted March 7, 2006

하게 향기성분이 보고되어 있으나, 약용으로의 이용가치가 높은 상황버섯에 관한 연구는 미미한 실정이다. 최근에는 휘발성성분도 항암 등의 기능성 성분으로 연구되고 있으며, 그 예로 밀감껍질의 정유성분인 limonene은 발암 초기단계의 진행을 예방하며(13), 묵은 생강에 함유된 citral 또한 발암성물질의 생성을 억제하는 효과 및 피부종양발생률 저하에 효과자 있는 것으로 알려져 있다(14). 본 연구에서는 국내·외적으로 연구되어 있지 않은 상황버섯의 휘발성성분을 분석하여, 기능성 성분을 비롯한 특유의 향기성분을 밝히고자 한다.

재료 및 방법

재료

본 실험에 사용된 재료인 세 종류의 상황버섯은 버섯재배농원에서 인공재배하여 건조된 산지가 다른 것으로 각각 부산진성 상황버섯(Busan-Jinsung: BJ, 부산진성농원, 2003년 수확), 진주금황 상황버섯(Jinju-Kumwhang: JK, 진주금황, 2004년 수확), 제주귤림 상황버섯(Cheju-Gullim: CG, 제주도 귤림성, 2004년 수확) 제품을 구입하여 냉동보관(-20°C)하며 전처리 없이 사용하였다.

표준물질

각 휘발성성분의 동정에 이용한 탄화수소, 알데히드류, 알코올류, 케톤류 및 산류의 표준시약은 각 2-methyl pentenal, hexanal, hexanol, 3-heptanone, 2-acethyl furan, 5-methyl furfural, limonene, coumaran, (*E,E*)-2,4-decadienal, borneol, azulene(Aldrich, Milwaukee, WI, USA), 2-butoxy ethanol, 2,4-pentanedione, benzaldehyde, 1-octen-3-ol, (*E*)-2-octenal, camphor, (*E*)-2-nonenal, phenylacetaldehyde, acetophenone, phytol(Wako, Osaka, Japan), β-ionone, ethyl dodecanoate(Sigma, St. Louis MO, USA), 내부표준물질로 사용한 tridecane 및 dichloromethane(Wako, Osaka, Japan), 그 외의 표준시약은 Tokyo Kasei, Fluka등의 특급 시약을 사용하였다.

휘발성성분 농축물의 제조

상황버섯의 휘발성성분 추출은 동시증류추출장치(simultaneous steam distillation and extraction apparatus: SDE(15))를 주문제작(Jeil Glass, Busan, Korea)하여 사용하였다. 분쇄기(Heung Sang trading Co., LTD, Korea)를 이용해 균질화한 상황버섯 시료 각각 50 g, 증류수 1 L 및 내부표준물질(tridecane을 dichloromethane 용액 중 80 ppm 농도로 조제) 1 mL를 증류용 둥근 플라스크에 넣고 3시간 가열 환류하면서 휘발성성분을 추출하였다. 이때, 보온을 위해 증류용 플라스크에는 섬유재질의 천과 알루미늄 호일을 이중으로 덮어, 증류용 플라스크 용기의 온도를 일정하게 유지하였다. 용매플라스크에는 50 mL의 정제한 diethyl ether와 비등석을 넣고, 38-40°C의 수욕 온도에서 에테르증기를 환류하였다. 추출 후 얻어진 에테르추출물은 무수황산나트륨을 가해 하룻밤 탈수 후, 상압(38-40°C)에서 에테르를 제거, 농축한 후 휘발성성분 농축물을 얻었다. 얻어진 휘발성성분 농축물은 GC 및 GC-MS분석에 제공하였다.

휘발성성분의 분리 및 동정

동시증류추출장치에 의해 얻어진 휘발성성분 농축물은 상압에서 농축한 후, Shimadzu GC-9A GC에 의해 휘발성성분을 분리하였다. 휘발성성분의 분리에는 FID(불꽃이온화검출기), 칼럼은 HP-5MS capillary column(30 m × 0.25 mm i.d. × 0.25 μm film thickness: J & W Scientific, USA)을 사용하였으며, 칼럼온도는 60°C에서 5분간 유지한 후, 220°C까지 2°C/min의 속도로 승온하였으며, GC의 주입부는 220°C를 유지하였다. 운반기체로서는 질소가스를, 칼럼내의 유속은 1.0 mL/min 으로 유지하였다. GC-MS 분석 장치는 HP 6890과 HP 5973 Mass Selective Detector(Palo Alto, CA, USA)가 연결된 것을 사용하였으며 분석조건은 다음과 같다. GC 주입부와 interface온도는 200°C, mass range는 25-450 m/z, linear velocity는 40 cm/sec, multiplier voltage은 1500 V, ionization voltage는 70 eV로 설정하고, 운반기체로는 헬륨가스를 사용하였으며, 그 이외의 칼럼의 온도를 비롯한 분석조건은 GC의 분석조건과 동일하게 설정하였다. 휘발성성분의 동정은 mass spectral library data에 의한 검색, Wiley/NBS Registry of Mass Spectral Data, Eight Peak Index of Mass Spectra에 의한 문헌의 질량분석 데이터 검색으로부터 물질을 추정하고, 표준물질의 머무름 시간(t_R) 일치에 의해 정성분석 하였다.

결과 및 고찰

상황버섯의 휘발성성분

본 연구는 최근 항암활성에 관한 연구가 잘 알려진 산지가 다른 세 종류의 국내산 상황버섯의 휘발성 향기성분을 분석하여 비교하였다. 세 종류의 상황버섯은 나무의 질감을 갖는 공통의 특성을 갖고 있었으나, 모양과 색상은 세 종류 모두 약간의 차이를 나타내었다. 부산진성 상황버섯의 경우 어두운 갈색과 함께 흙내와 곰팡이 냄새를 느낄 수 있었으며, 진주금황 상황버섯은 안은 짙은 갈색이지만 황금빛의 테를 두른 모양으로 나무냄새와 함께 곰팡이 냄새를 나타내었다. 하지만, 제주귤림 상황버섯은 황색에 가까운 짙은 노랑색을 띄었으며, 옅은 오렌지향과 함께 나무와 곰팡이 냄새를 나타내었다. 가열한 상황버섯 휘발성성분 농축물의 냄새 특징으로는 다른 식용버섯과는 달리 나무냄새, 흙 및 옅은 곰팡이 냄새를 느낄 수 있었다. 휘발성성분 농축물은 GC로 분리한 후 GC-MS로 각 성분을 추정하고 GC에서 각각의 표준물질의 머무름시간(t_R)을 비교하여 동정하였으며, 추정 또는 동정된 화합물의 결과는 Table 1에 나타내었다. 휘발성성분으로는 알코올류, 알데히드류, 케톤류, 에스테르류, 페놀류, 다른 식용버섯에서는 보고되지 않은 몇 종류의 탄화수소류 및 기타의 성분이 동정 또는 추정되었다. 동정된 휘발성성분 중 1-octen-3-ol, (*E*)-2-octenal, benzaldehyde 등은 일반적인 식용버섯의 성분으로 동정된 화합물로, 상황버섯에서도 확인되었으나 함량은 미량이었다.

부산의 진성농원에서 생산된 부산진성 상황버섯(Busan-Jinsung: BJ)의 경우, 알코올류는 butanol을 비롯한 pentanol, hexanol, 2-ethylhexanol, borneol 및 phytol 등 12성분, 알데히드류는 pentanal, hexanal, heptanal 등의 alkanal류, (*E*)-2-heptenal, (*E*)-2-octenal, (*E*)-2-nonenal 등의 alkenal류를 비롯하여 (*E,Z*) 및 (*E,E*)-2,4-decadienal의 2,4-dienal류 및 furfural, benzaldehyde, phenylacetaldehyde 등의 17성분이 검출되었다. 그 외, geranyl acetone, 2,4-pentanedione, camphor, γ-ionone, β-ionone 등의 케톤류 및 α-cedrene, α-longipinene, β-selinene, α-selinene, L-limonene 등의 탄화수소류, phenol류 및 furan류 등 90종 이상의 peak가 검출되었으며, 이 중 총 82성분의 화합물이 추정 또는 동정되었다. 진주금황 상황버섯(Jinju-Kumwhang: JK)의 휘발성성분으로는 butanol, hexanol, heptanol, 2-ethyl hexanol 및 dodecanol 등의 알코올류 12성분, 3-penten-2-one, 2,4-pentanedione, γ-ionone 및 β-ionone 등의 케톤류 15성분, hexanal, furfural, benzaldehyde 및 phenylacetaldehyde 등의 알데히드류, 페놀류, 벤젠류 등을 포함하여 총 79성분의 화합물이 추정 또는 동정되었다. 제주귤림 상황버섯(Cheju-

Table 1. Volatile compounds identified in *Phellinus linteus*: Busan-Jinsung (BJ), Jinju-Kumwhang (JK) and Cheju-Gullim (CG)

Peak No.[1]	Compound	t_R (min)	Sample[2]			Identification[3]
			BJ	JK	CG	
Aldehydes						
4	3-methyl butanal	4.33	2.2	8.3	44.2	MS
6	*n*-pentanal	4.92	4.9	29.9	20.7	MS, GC
9	2-methyl pentanal	5.83	4.4	10.6	12.6	MS, GC
10	(*E*)-2-pentenal	5.98	12.3	6.8	2.6	MS, GC
13	*n*-hexanal	7.19	78.2	443.1	219.1	MS, GC
14	furfural	8.41	69.0	282.3	260.8	MS, GC
17	*n*-heptanal	11.40	4.3	17.6	1.3	MS, GC
21	(*E*)-2-heptenal	14.50	4.8	46.6	6.0	MS, GC
22	benzaldehyde	14.81	90.1	252.7	59.2	MS, GC
23	5-methyl furfural	15.28	3.6	29.1	4.0	MS, GC
33	phenylacetaldehyde	20.20	32.0	105.0	87.1	MS, GC
34	(*E*)-2-octenal	20.93	7.5	50.8	24.3	MS, GC
41	(*Z*)-3-hexenal	23.55	8.8	18.8	6.4	MS, GC
43	nonanal	24.40	13.5	9.9	10.7	MS, GC
48	(*E*)-2-nonenal	28.71	25.4	141.1	22.4	MS, GC
58	(*E,Z*)-2,4-decadienal	37.21	26.3	22.5	0.4	MS, GC
62	(*E,E*)-2,4-decadienal	39.25	30.9	173.2	32.1	MS, GC
Alcohols						
5	butanol	4.38	4.4	78.5	10.0	MS, GC
11	pentanol	6.37	17.8	61.9	39.1	MS, GC
15	hexanol	9.95	78.4	221.8	42.8	MS, GC
18	2-butoxy ethanol	11.64	3.0	22.2	12.7	MS, GC
24	heptanol	15.89	30.3	196.3	81.7	MS, GC
25	1-octen-3-ol	16.17	7.5	11.0	10.4	MS, GC
30	2-ethyl hexanol	19.16	68.8	813.1	67.3	MS, GC
31	benzyl alcohol	19.48	4.7	37.8	16.2	MS, GC
49	borneol	28.72	17.6	15.0	2.3	MS, GC
64	phytol	41.75	191.6	53.8	22.8	MS, GC
75	dodecanol	50.78	36.4	274.3	33.3	MS, GC
81	2-tetradecanol	58.85	111.2	157.5	21.5	MS
Ketones						
8	3-penten-2-one	5.64	4.7	15.1	11.7	MS, GC
12	2,4-pentanedione	6.66	37.5	113.7	3.9	MS, GC
16	3-heptanone	10.60	4.3	17.6	2.6	MS, GC
26	2,3-octanedione	16.40	17.1	30.9	7.6	MS
32	(*E*)-3-octen-2-one	19.87	3.6	57.6	19.7	MS
36	acetophenone	21.31	2.9	29.8	5.7	MS, GC
40	2-nonanone	23.09	12.0	37.7	1.8	MS, GC
45	camphor	26.91	10.5	18.0	1.4	MS, GC
51	p-methyl acetophenone	29.95	18.3	228.8	1.7	MS
59	2-undecanone	37.76	70.4	131.8	28.6	MS, GC
63	2,3-dihydro-5,7-dimethyl-1H-inden-1-one	40.69	90.0	1251.0	157.1	MS
70	g-ionone	47.23	23.7	35.2	5.2	MS
71	geranyl acetone	48.48	12.5	344.3	9.2	MS, GC
72	β-ionone	49.41	20.7	136.6	55.2	MS, GC
82	diphenyl methanone	59.58	50.8	416.7	20.5	MS
Benzenes						
20	methoxy benzene	12.32	56.7	8.0	4.3	MS, GC
44	1,2-dimethoxy benzene	26.36	102.7	131.8	22.5	MS
46	ethyl-2,3-dimethyl benzene	27.32	7.0	16.3	-	MS

Table 1. Continued

Peak No.[1)]	Compound	t_R (min)	Sample[2)]			Identification[3)]
			BJ	JK	CG	
Esters						
3	ethyl acetate	4.15	33.5	30.6	15.1	MS, GC
28	butyl butyrate	17.17	7.7	42.8	2.1	MS, GC
53	methyl salicylate	30.61	47.6	56.6	1.9	MS, GC
57	2-ethylhexyl-2-propanoate	34.31	13.9	32.7	1.9	MS
60	2-propyl benzeneacetate	38.54	32.9	137.1	13.8	MS
65	2-methylbutyl propanoate	43.21	187.1	71.6	90.0	MS
78	ethyl dodecanoate	55.67	98.2	89.1	35.2	MS, GC
Phenols						
35	2-methylphenol	21.15	14.8	71.8	18.4	MS, GC
39	3-ethyl-5-methylphenol	22.57	43.4	15.5	-	MS
52	2,4,6-trimethylphenol	30.12	46.2	-	4.0	MS
67	3-octylphenol	44.86	60.1	16.0	92.5	MS
Furans						
19	2-acetyl furan	12.00	4.9	58.2	1.7	MS, GC
27	2-pentyl furan	16.67	37.2	103.0	67.9	MS
38	coumaran	22.05	8.8	65.1	10.0	MS, GC
Hydrocarbons						
1	2-methyl pentane	3.84	36.1	53.6	11.5	MS
2	3-methyl pentane	3.93	26.1	46.4	17.8	MS, GC
7	1,4-dioxane	5.05	6.3	5.2	2.2	MS, GC
29	L-limonene	18.88	9.8	-	1.1	MS, GC
42	undecane	24.10	24.6	112.3	3.7	MS, GC
50	azulene	29.47	11.9	95.6	3.0	MS, GC
54	dodecane	31.17	21.2	16.6	6.0	MS, GC
68	α-cedrene	46.33	1678.6	436.4	8.3	MS
73	α-longipinene	50.10	29.7	493.0	19.6	MS
74	β-selinene	50.34	12.2	58.8	9.2	MS
76	α-selinene	51.23	14.4	221.4	23.5	MS
77	pentadecane	51.58	21.6	109.3	17.6	MS, GC
80	hexadecane	56.99	31.3	183.7	70.3	MS, GC
83	β-cyclotetradecane	61.49	84.2	492.3	198.0	MS
Acids						
47	2-ethyl hexanoic acid	28.33	1.9	22.4	-	MS
61	nonanoic acid	39.07	9.6	-	-	MS, GC
66	decanoic acid	44.42	10.7	18.7	3.8	MS, GC
79	dodecanoic acid	56.03	7.9	142.1	21.8	MS, GC
Pyrrole						
55	4-ethyl-2-methyl pyrrole	32.37	76.4	180.2	9.2	MS
Thiazole						
56	benzothiazole	33.01	8.3	38.3	1.6	MS, GC
Ether						
37	(*Z*)-linalool oxide	21.75	19.9	134.4	8.2	MS, GC
Unidentified						
69	unidentified	46.75	182.2	134.2	8.4	MS

[1)]Peak numbers in Figure 1. [2)]Peak area of each compound/peak area of internal standard (I.S) × 100. [3)]Compounds identified on the basis of the following criteria: tentatively identification based on mass spectral characteristics (MS), GC retention time was confirmed with that of standard sample (GC)

Gullim: CG)의 경우, heptanol, 1-octen-3-ol 등 알코올류 12성분, 3-octen-2-one, β-ionone 등 케톤류 15성분, hexanal 등 알데히드류 17성분, 3-octylphenol등 페놀류 3성분, methoxy benzene 및 1,2-dimethoxybenzene을 포함한 벤젠류 2성분, 기타 29성분 등 총 78성분의 화합물이 추정 또는 동정되었다.

동정된 휘발성성분 중 hexanal, furfural, hexanol, benzaldehyde, 2-ethylhexanol 등 저비점의 알데히드 및 알코올 화합물이 차지하는 양이 많았으며, 이는 부산진성 상황버섯에서 현저하게 나타났

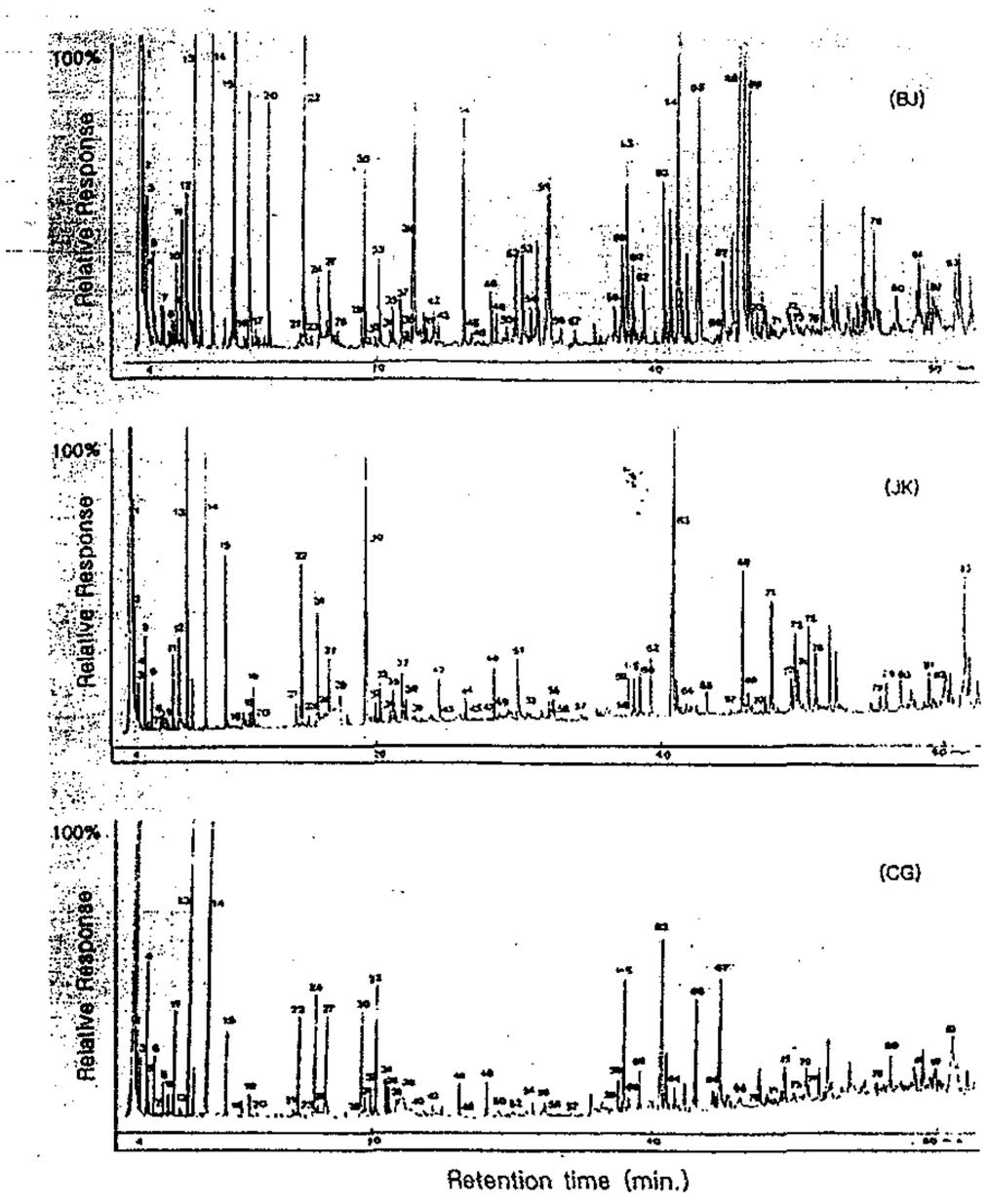


Fig. 1. Gas chromatograms of volatile compounds from *Phellinus linteus*: Busan-Jinsung (BJ), Jinju-Kumwhang (JK) and Cheju-Gullim (CG).

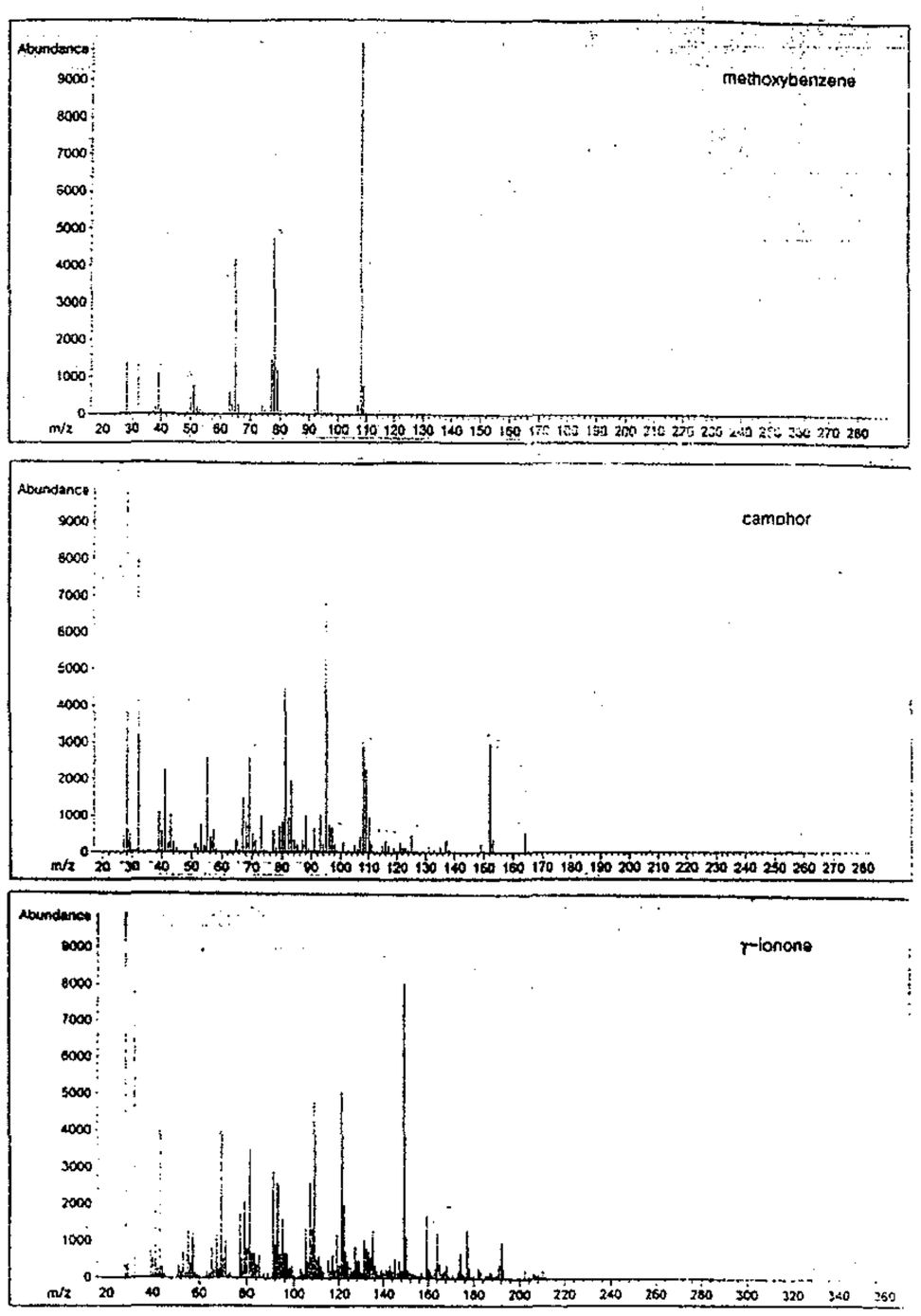


Fig. 2. Mass spectral data of newly identified in *Phellinus linteus*.

다. 하지만, 1-octen-3-ol, 3-octanone, 3-octanol, 1-octen-3-one 및 (Z)-2-octenol 등 식용버섯인 양송이버섯(*Agaricus bisporus*), 표고버섯(*Lentinus edodes*), 및 느타리버섯(*Pleurotus sajor-caju*) 등의 주요 향기성분으로 보고된(6,16,17) C_8의 알코올 및 케톤류 화합물의 경우, 상황버섯에서는 1-octen-3-ol이 소량 동정되었으나, 나머지 화합물은 검출되지 않아 식용버섯과 상황버섯의 휘발성성분의 조성이 크게 차이가 있음을 알 수 있었다.

한편, 식용버섯에서는 보고되지 않은 2-methylphenol, methoxy benzene, coumaran, azulene, α-cedrene, α-longipinene, β-selinene, α-selinene, camphor, γ-ionone, β-ionone, phytol, borneol 등 탄화수소류, 케톤류 및 알코올류의 화합물이 상황버섯에서 처음으로 검출되었다. 이 중, camphor, borneol 및 phytol은 참쑥의 방향성분으로도 보고되어 있으며(18), phytol의 경우 녹황색채소류의 엽록소 내에 존재하는 불포화 지방족알코올의 일종으로 비타민 E 제조에도 사용되는 식물성알코올로 들깻잎이나 들미나리에서 확인된 성분이며 항돌연변이 물질로서 그 효과가 큰 것이 밝혀진 바 있다(19). 또한, 양적으로는 적지만 세 종류의 상황버섯에서 동정된 camphor의 경우 독특한 민트와 같은 청량한 향기를 갖는 것으로 돌연변이 유발을 억제시키는 효과가 있는 것으로도 보고되어 있다. 세 종류의 버섯간의 특징으로는 부산진성 상황버섯의 경우, phytol의 함량이 다른 두 상황버섯의 4배에서 8배 정도 많은 함유량을 보였으며, 이는 다른 두 종류의 버섯에 비해 황색색소가 적기 때문이라 생각된다. 또한, 상황버섯 특유의 흙냄새와 곰팡이 냄새에 기여하는 것으로 보여지는 methoxy benzene이 많이 검출되었다. 진주금황 상황버섯은 꽃 향에 기여하는 phenylacetaldehyde와 acetophenone과 흙내 및 곰팡이냄새에 기여하는 1,2-dimedimethoxy benzene이 많이 검출되었다. 제주귤림 상황버섯은 진성상황버섯에 비해 꽃이나 과일향에 기여하는 phenylacetaldehyde 및 benzyl alcohol이 많고 methoxy benzene류가 적게 검출되었다. 세 종류의 상황버섯에서 양적인 차이는 있었지만 γ-ionone 및 β-ionone이 소량 동정되었으며, 이는 carotenoid의 분해물로 생성되는 것으로 상황버섯이 carotenoid계의 색소를 함유하는 것을 시사하고 있다. 느타리버섯의 경우 저장과정 중 tetradecanoic, pentadecanoic, hexadecanoic, octadecanoic acid 등과 같은 지방산류가 현저하게 증가됨이 보고되어 있으나(17) 상황버섯의 경우 이들 지방산 및 지방산의 분해산물인 C_8의 케톤류 및 알코올류의 생성도 거의 없음을 볼 수 있었다.

L-limonene, phenylacetaldehyde 및 acetophenone처럼 과일이나 꽃향에 관계되는 화합물로 좋은 향 형성에 기여하는 성분도 검출되었으나, 식용버섯과는 달리 2-methylphenol, 3-ethyl-5-methylphenol, 2,4,6-trimethylphenol, 3-octylphenol 등의 phenol류와 methoxy benzene, 1,2-dimethoxy benzene 등으로 예상되는 성분 또한 검출되었는데 이들은 후발효차인 퇴적차에서 동정된 바 있으며(20), 특히, methoxy alkylbenzene은 페놀성의 OH group이 미생물의 작용에 의해 메틸화(-OCH_3)되어 생성되어지는 것으로 예상하고 있다(20,21). 이와 같은 phenol류 및 methoxy benzene류의 형성은 상황버섯 특유의 흙냄새와 곰팡이냄새에 기여하는 것으로 상황버섯의 독특한 향기 형성에 일조하는 것으로 생각되어지나 그다지 친밀한 느낌을 주지는 않는 성분으로 생각되어진다.

요 약

산지가 다른 세 종류의 상황버섯의 휘발성 향기성분을 동시증류추출법에 의해 추출하고 GC 및 GC-MS를 이용하여 분리한 후 분석·동정하였다. 검출된 화합물 중 총 82성분을 동정 또는 추정하였으며, 관능기별로 알코올류, 알데히드류, 케톤류 및 탄호수소류 등이 검출되었다. 식용버섯에서는 보고되지 않았던 2-methylphenol, methoxy benzene, coumaran, azulene, α-cedrene, α-longipinene, β-selinene, α-selinene, camphor, γ-ionone, β-ionone, phytol, borneol등 탄화수소류, 케톤류 및 알코올류의 화합물이 상황버섯에서 처음으로 검출되었다. 부산진성 상황버섯은 클로로필 유래의 phytol과 곰팡이 냄새의 특징을 갖는 methoxy benzene이, 진주금황 상황버섯은 꽃냄새에 기여하는 phenylacetaldehyde가 많은 양 검출되었다. 반면, 제주귤림 상황버섯은 methoxy benzene류는 소량 검출되었으나, phenylacetaldehyde는 많은 양이 검출되었다. 함류량이 세 종류의 상황버섯에서 양적인 차이는 있었지만 γ-ionone 및 β-ionone이 소량 동정되었으며, 이는 carotenoid의 분해물로 생성되는 것으로 상황버섯이 carotenoid계의 색소를 함유하는 것을 시사하고 있다.

감사의 글

본 연구는 농림부에서 시행한 2003년 농림기술개발사업의 연구비 지원으로 수행된 연구결과의 일부로서 이에 감사드립니다.

문 헌

1. Ikegawa T, Nakanishi M, Uehara N, Chihara G. Fukuoka F. Antitumor action of some basidiomycetes, especially *Phellinus linteus*. Gann. 59: 155-157 (1968)
2. 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. 44: 1093-1095 (1996)
3. Chung KS, Kim SS, Kim HS, Han MW, Kim BK. Antitumor activity of Kp, a protein-polysaccharide from the mycelial culture of *Phellinus linteus*. J. Pharm. Soc. Korean 38, 158-165 (1994)
4. Song CH, Ra KS, Yang BK, Jeon YJ. Immunostimulating activity of *Phellinus linteus*. Korean J. Mycol. 26: 86-90 (1998)
5. Lee JW, Baek SJ, Bang KW, Kang SW, Kang SM, Kim BY, Ha IS. Biological activities of polysaccharide extracted from the fruit body and cultured mycelia of *Phellinus linteus* IY001. Korean J. Food Sci. Technol. 32: 726-735 (2000)
6. Cronin DA, Ward MK. The characterisation of some mushroom volatiles. J. Sci. Food Agric. 22: 477-480 (1971)
7. Picardi SM, Issenberg P. Investigation of some volatile constituents of mushrooms (*Agaricus bisporus*): Changes which occur during heating. J. Agric. Food Chem. 21: 959-962 (1973)
8. Macleod AJ, Panchasara SD. Volatile aroma components, particularly glucosinolate products, of cooked edible mushroom (*Agaricus bisporus*) and cooked dried mushroom. Phytochemistry 22: 705-709 (1983)
9. Ahn JS, Lee KH. Studies on the volatile aroma components of edible mushroom (*Tricholoma matsutake*) of Korea. J. Korean Soc. Food Nutr. 15: 253-257 (1986)
10. Ahn JS, Kim ES, Park ES. Studies on the volatile components of edible mushroom (*Lentinus edodes*) of Korea. J. Korean Soc. Food Nutr. 16: 328-332 (1987)
11. Ahn JS, Kim SK, Park ES. Studies on the volatile components of edible mushroom (*Agaricus bisporus*) of Korea. J. Korean Soc. Food Nutr. 16: 333-336 (1987)
12. Ahn JS, Lee KH. Studies on the volatile aroma components of edible mushroom (*Pleurotus ostreatus*) of Korea. J. Korean Soc. Food Nutr. 15: 258-262 (1986)
13. Pratt S, Matthews K. Superfoods Rx. Harpercollins, New York, USA. pp.84-97 (2004)
14. Kubota K, Morimitsu Y. Shokuhingaku. Tokyo Kagakudouzinn, Tokyo, Japan. pp.70-101 (2003)
15. Nickerson GB, Likens ST. Gas chromatographic evidence for the occurrence of hop oil components in beer. J. Chromatogr. 21: 1-5 (1966)
16. Kameoka H, Higuchi M. The constituents of the steam volatile oil from *Lentinus edodes* Sing (*Cortinellus shiitake P. Henn.*). Agric. Biol. Chem. 50: 185-186 (1976)
17. Jung ST, Hong JS. Changes of volatile components of *Pleurotus sajor-caju* during storage. Korean J. Mycol. 19: 292-298 (1991)
18. Choi KS, Choi BY, Park HK, Kim JH, Park JS, Yoon CN. Flavor components of *Artemisia Lavandulaefolia* DC. Korean J. Food Sci. Technol. 20:774-779 (1988)
19. Kim KH, Chang MW, Park KY, Rhee SH, Rhew TH, Sunwoo YI. Effect of phytol and small water dropwort extract on the T subset in the sarcoma 180-transplanted mice. J. Korean Soc. Food Nutr. 22: 405-411(1993)
20. Kawakami M. Yamanishi T, Kobayashi A, Shibamoto M. Characteristic phenolic compounds in fungal fermented tea proceedings of ISTS. Shizuoka, Japan. pp. 95-99 (1991)
21. Kawakami M, Yamamishi T, Kobayashi A. Flavor constituents of microbial-fermented teas chinese-Zhuan-cha and Koku-cha. Nippon Nogeikagaku Kaishi 61: 457-465 (1987)

■ 학술발표

1. The effects of the liquor of fermentation using mycelium of *p. linteus* on human hepatoma cell line and rat liver. 대한해부학회 (04.10.14~10.15)

2. 상황버섯의 휘발성 성분. 한국식품과학회 (04.06.23~06.25)

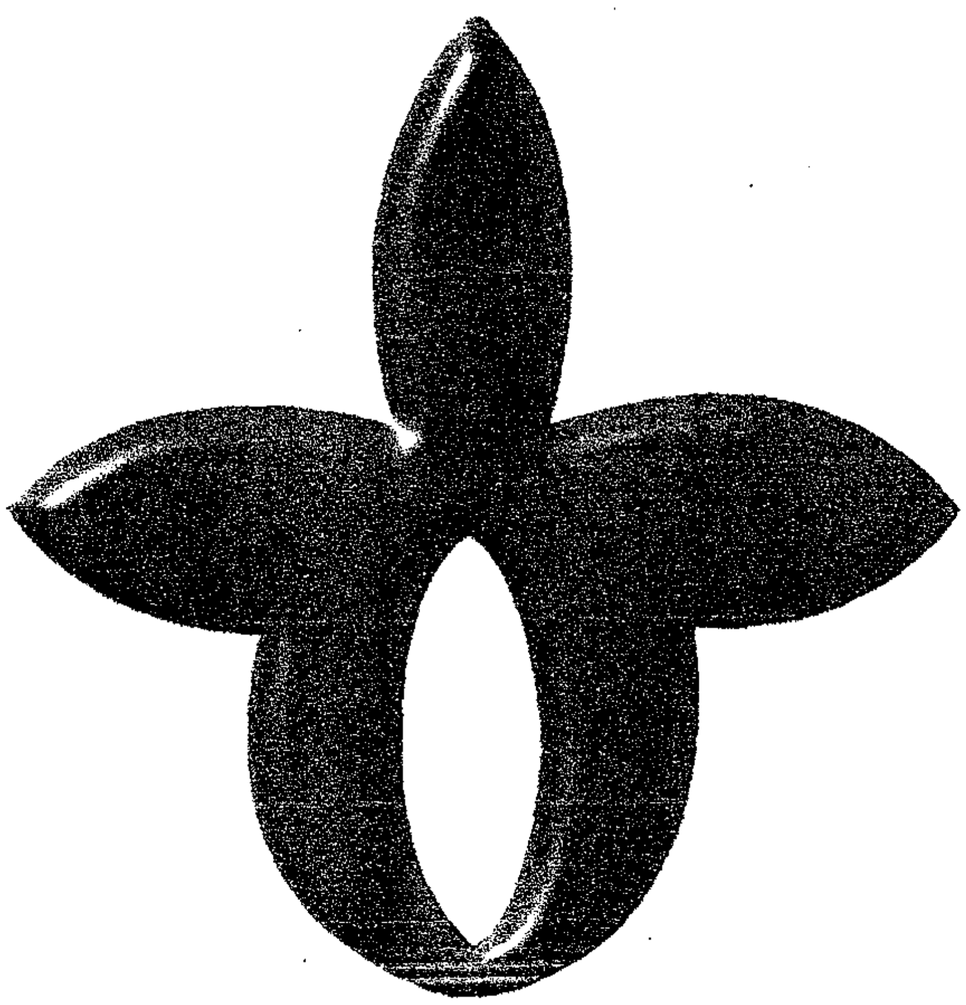
3. Volatile compounds of *Phelinus linteus* and its fermented alcoholic beverage. 한국식품과학회 (05.06.15~.6.17)

4. Effect pf Fermented Liquor by using *Phelinus linteus* on the Expression of Inflammation-Relatded Proteins in Human Hepatoma Cell and in Rat Liver.
한국생명과학회 (2005.4.8-4.9)

5. The Ameliorative effect of mycelial culture of *Phellinus linteus* on ethanol induced gastric ulcer in rats. 한국생명과학 (05.09.30~10.01)

제54회
대한해부학회 학술대회
순서 및 초록

일시 : 2004년 10월 14일 (목)~15일(금)
장소 : 연세대학교 의과대학 동문회관



1947~2004

주관 : 대 한 해 부 학 회
후원 : 한국과학기술단체 총연합회
학 술 진 흥 재 단

P114 THE EFFCTS OF THE LIQUOR OF FERMENTATION USING MYCELIUM OF P. LINTEUS ON HUMAN HEPATOMA CELL LINE AND RAT LIVER

Seong Min An[1,4], *Jun Hyuk Lee*[1], *Yung Hyun Choi*[2], *Young Kee Jeong*[3], *Un-Bock Jo*[4], *Byung Tae Choi*[1*]

[1]Departments of Anatomy and [2]Biochemistry, College of Oriental Medicine, Dong-Eui University, Busan 614-052, Korea, [3]Department of Life Science and Biotechnology, College of Natural Science, Dong-Eui University, Busan, 614-714, Korea, [4]Department of Biology Education, College of Education, Pusan National University, Busan, 609-735, Korea

Phellinus linteus is known as a drug, which has pharmacological activity for various tumors and inflammatory diseases in Oriental Medicine. In the present study, it was examined the effects of liquor of fermentation using mycelium of *P. linteus* (LFMP), on the alterations of inflammation-related proteins and liver function markers with human hepatocarcinoma cells and rats. $HepG_2$ cells were treated with ethanol and LFMP for 24 hours, the morphology and expression of inflammatory proteins were examined by microscopy, Western blotting, RT-PCR, and immunohistochemistry. In the morphological observation, $HepG_2$ cells were dose-dependently damaged in cells treated ethanol, however, LFMP had no effect on the morphology. Also, the expressions of cyclooxygenase (COX)-1, COX-2, which are major inflammatory enzymes, inducible nitric oxide synthase (iNOS) and tumor necrosis factor (TNF)-α were significantly induced by ethanol, however the expressions were weakly induced by LFMP. In the animal model, the markers for liver functions such as, GOT, GPT, total protein and were significantly increased by administration with ethanol, while the group administrated with LFMP had lower effect on the changes of markers compared with ethanol-administrated group. And also, the expressions of inflammatory proteins, including iNOS, COX-1 and COX-2 were induced in ethanol-administrated rat liver. However the expressions were not or weakly induced in LFMP-administrated rat liver. In conclusion, these results suggest that LFMP is not only lower than other grain alcohol in liver damage, but also stands comparison with other existing commercial functional liquors.

2004년 한국식품과학회
제77차 학술대회

International Symposium on FUSION TECHNOLOGY

기간 : 2004년 6월 23일(수) ~ 25일(금)
장소 : 강원도 용평리조트

Fusion Technology in Food science

P1-069 후지사과 (*Malus pumila*)의 구리억제 작용 및 특성 연구
허민수*, 서정은, 신의철, 장혜진, 박현덕, 이양봉, 김선봉
부경대학교 식품공학과

P1-070 Molecular Conformation of Waxy Maize Starch at Different pHs in an Aaqueous HPSEC-MALS-RI System
Joo-Hun Lee* and Seung-Taik Lim
Graduate School of Life Sciences and Biotechnology, Korea University

P1-071 블로 구기자의 향기성분에 관한 연구
김윤해*, 김현위[1], 고경희
가톨릭대학교 식품영양학과, [1]오뚜기 중앙연구소

P1-072 복분자 박을 활용한 색소추출
심용진*, 김성윤[1], 권순태[1], 남재련[2]
계명대학교, [1]㈜계명푸덱스, [2]청윤시 농업기술센터

P1-073 Effect of Starch Crystalline Morphology on Starch Digestibility and Glycemic Index
Hyun-Jung Chung*, Jin-Ho Ro, and Seung-Taik Lim
Graduate School of Life Sciences and Biotechnology, Korea University

P1-074 노화 및 산·효소 분해에 의한 찹쌀전분 미세결정 제조
정원준*, 김종애, 임승대
고려대학교 생명공학원

P1-075 Effects of Sesamol, Sesamin, and Sesamolin on the Oxidation of Methyl Linoleate during Heating
Jinyoung Lee* and Eunok Choe
Department of Food and Nutrition, Inha University

P1-076 홍화 적색소인 carthamin의 정제
장성주*, 서지인, 윤광로, 이단수[1], 장영[illegible], 권용관[1], 박재석[1], 박시환
중앙대학교 식품공학과, [1]식품의약품안전청

P1-077 발을 첨가해 발효시킨 쌀조도주의 갈변 억제에 관한 연구
구하나*, 김재식
경북대학교 발효생물공학과

● 식품분석

P2-001 Mass Spectrometer가 바탕이된 전자코를 이용한 당귀의 원산지 판별
노봉수*, 김유성[1]
서울여자대학교 식품과학부, [1]국립농산물품질관리원 시험조사과

P2-002 방사선 조사 인삼의 검지 및 물리적 특성 분석
최인너*, 김동호
한국 원자력 연구소, 방사선식품생명공학부

P2-003 Photostimulated luminescence(PSL)와 ESR spectroscopy 방법에 의한 방사선 조사 식품 검지
최인너*, 김동호
한국 원자력 연구소, 방사선 식품생명공학부

P2-004 대추 메탄올 추출물의 페놀성 화합물 함량과 항산화 효능
김효정*, 주광지
계명대학교 자연과학대학 식품영양학과

P2-005 상황버섯의 휘발성성분
장은영*, 최성희, 임성임[1], 정영기[2]
동의대학교 식품영양학과, [1]동의대학교 한방식품연구소, [2]동의대학교 생명과학부

P2-006 발효차 제조과정 중 향기성분의 변화
*최성희, 임성임[1], 장은영, 김영수[2]
동의대학교 식품영양학과, [1]동의대학교 한방식품연구소, [2]동우대학 제과제빵학과

P2-007 단기 발아시 콩의 성분변화
이영숙*, 김우정[1], 강일준, 신현경
한림대학교 식품영양학과, [1]세종대학교 식품공학과

P2-008 Analysis of Aroma Constituents in Korean Medicinal Plants Such as *Achyranthis Radix*, *Araliae Radix*, and *Carthami Flos*
Mi-Hyun Ka*, Hang-Sook Chun[1], and Kwang-Geun Lee[2]
LabFrontier Corp. [1]Korea Food Research Institute, [2]Department of Food Science and Technology Dongguk University

P2-009 Indophenol, HPLC, 2,4-dinitrophenylhydrazine methods 를 이용한 다양한 제품의 비타민 C 분석
최원선*, 김영진, 정진영, 정후길, 전호남
매일유업(주) 중앙연구소

P2-010 발아에 의한 곡류추출액 중의 GABA 및 유리아미노산 함량 변화
박기범*, 문연정, 오석흥
우석대학교 대학원 생명공학과

P2-011 고추의 추출조건에 따른 성분의 추출함량
박지은*, 양승용, 김임호, 성기승, 이남희, 김정옥
한국식품개발연구원

P2-012 Investigation of Selenium Contents in Food Supplements with Optimized Analysis Method Using ICP-MS
Chang-Hwan Oh*, Kyoung-Joo Lee, Jiyung Kim, Tae-Hwa Kim, Tack-Jae Kim, Jong-sei Park, YounJu Choi[1], Hye-Young Lee[1], Inbok Kim[1], and Hye Kyoung Park[1]
LabFrontier Corp. Ltd. Research Institute, [1]Korea Food & Drug Administration, Division of Nutrition

P2-013 HPLC를 이용한 채소류 중 dithiocarbamate 분석법 연구
최정희*, 박주성, 황래홍, 홍세라, 조인순, 김현진, 한선희, 박석기
서울시보건환경연구원 강남농수산물검사소 농산물검사팀

P2-014 근적외선 분광분석법을 이용한 현미의 일반성분 비파괴 분석 방법
윤연희, 김선민, 표병식, 박동진[1], 이진희*
동신대학교 생물자원산업화지원센터, [1]㈜화신기계상사

P2-015 FT-NIR을 이용한 현미 중 총 식이섬유 함량 분석 예측 모델 개발
윤연희, 박동진[1], 표병식, 김선민, 이진희*
동신대학교 생물자원산업화지원센터, [1]㈜화신기계상사

P2-016 이소스테비올 분석법에 관한 연구
이단수*, 장영미, 홍기원, 박성라, 김범석,

P2-001

Mass spectrometer가 배당이된 전자코를 이용한 당귀의 원산지 판별

노봉수', 김수성'
서울여자대학교 식품과학부, '국립농산물품질관리원 시험조사과

Mass spectrometer가 배당이된 전자코를 사용하여 국내에서 생산된 당귀와 외국으로부터 수입된 당귀제품의 원산지를 판별하였다. 국내 시료는 24개, 수입산 시료는 86개가 사용되었다. 당귀제품의 휘발성분으로부터 검출된 성분이 MS 스펙트럼을 확보하고 다른 channel을 선택하여 ion mass 강도가 얻어졌으며 저장된 값으로부터 각 변수에 대하여 정규 강도가 구해지고 이를 토대로 주성분분석을 실시하였다. 주성분분석결과 제1 주성분값이 96.78%로 나타났으며 이를 시료의 원산지가 판별되었고, 수입산당귀중 4개 시료가 국내산으로 판별되었으나 이를 제외한 국내산 당귀 및 수입산 당귀 모두의 원산지가 올바르게 판별되었다. 수입산 당귀의 주성분분석결과를 보다 구체적으로 확대한 결과 크게 3구류으로 나뉘어져 수입산이라 하더라도 각기 3개의 산지로부터 수입된 것으로 추측되었다.

P2-002

방사선 조사 인삼의 검지 및 물리적 특성 분석

최인덕', 김동호
한국 원자력 연구소, 방사선식품생명공학부

국내산 인삼의 방사선 조사 유무를 확인하기 위하여 인삼을 0, 1.0, 3.0, 5.0, 7.0 kGy로 조사하였다. 방사선 검지 방법으로 물리적 방법인 thermoluminescence(TL) 분석법이 이용되었고, 방사선 조사로 인한 조직감(texture)의 연화정도를 살펴보기 위하여 매 2 주 마다 texture analyzer를 이용하여 연화도를 저장 6주까지 측정하였다. TL 분석 결과, 조사 시료의 TL intensity가 비조사 시료에 비해 현저하게 높았으며, 조사 선량이 증가할수록 TL intensity는 비례 증가하였다. 한편, 조사시료에서 특이하게 나타나는 TL 발광곡선(glow curve)의 최대 발광이 180-200° C 부근에서 확인 되었으며, 비조사 시료에서는 특유의 발광 곡선이 나타나지 않았다. 또한 표준화(normalization)를 실시한 제 2 차 조사에서 유도된 발광곡선비(glow curve ratio)도 조사시료에서 0.5 이상으로 나타났다. 이로써, 무기미네랄(inorganic mineral) 추출이 가능한 식품의 방사선 조사유무를 검지하기에 TL 분석방법이 신뢰성 있게 적용 가능한 것으로 확인되었다. 한편, 조직감의 연화 측정 결과, 방사선량 5.0 kGy 까지 조사된 시료를 4 주까지 저장하는 동안, 방사선이 인삼의 조직감에는 영향을 주지 않는 것으로 나타났다.

P2-003

Photostimulated luminescence(PSL)와 ESR spectroscopy 방법에 의한 방사선 조사 유무 검지

최인덕', 김동호
한국 원자력 연구소, 방사선 식품생명공학부

건조된 과, 양파, 생강을 0, 0.3, 0.6, 0.9 kGy 선량으로 Co^{60} 감마선을 조사한 후, 방사선 조사 여부를 확인하기 위하여 photostimulated luminescence(PSL)와 electron spin resonance(ESR) spectroscopy 분석을 하였다. PSL 분석 결과, 조사 시료의 photon counts 는 European standard(EN 1787)에서 정한 threshold value(T2=5000) 이상으로 측정이 되었고, 반면에 비조사 시료의 photon counts 역시 기준치(T1=700) 이하로 측정이 되어 조사유무가 신속하게 판단되었다. 한편, ESR 분석 결과, 조사된 시료는 g=2.002±0.0003에서 특유의 비대칭 ESR 신호를 나타내었고(singlet 신호), 비조사 시료에서는 이런 신호가 나타나지 않아 방사선 조사 시료와 비조사 시료를 확실하게 구분하였다. 또한, 조사 선량의 증가에 따라 ESR 신호의 면적이 비례적으로 증가하였다. 결론적으로, PSL 분석은 방사선 조사 식품을 신속하게 screening하는 방법으로서 정성적인 분석법인 반면, ESR 분석은 방사선 조사선량에 따른 측정이 가능한 정량적인 분석법으로 조사유무를 매우 신뢰성 높게 적용 가능한 것으로 확인되었다.

P2-004

대추 메탄올 추출물의 페놀성 화합물 함량과 항산화 효능

김효경', 주광지
계명대학교 자연과학대학 식품영양학과

대추의 페놀성 화합물의 함량과 항산화 효능을 알아보기 위하여 특소(大棗: 대조), 상소(中棗: 중조), 약소(小棗: 소조) 세 종류의 대추를 80% 메탄올 추출물과 물에 침지한 후 80% 메탄올에 추출한 것을 각각 동결건조 하여 총 페놀화합물 함량, 전자공여능, 과산화물가, 산패유도기간 등을 측정하였다. 대추의 총 페놀화합물 함량은 메탄올에 추출한 약초가 가장 많았으며 그 다음이 상초와 특조 순이었다. 전자공여능은 대추 추출물의 첨가 농도가 증가할수록 상승하였으며 상초와 약초의 수침후 메탄올 추출물 1.0% 첨가구와 약초의 메탄올 추출물 2.0%, 2.5%, 3.0% 첨가구는 90%이상의 유리기소거능을 나타내었다. Lard에 대한 메탄올 추출물 및 수침후 메탄올 추출물의 산패유도기간은 추출물 무첨가구 보다 산패유도기간이 더 연장되었다. 특히 수침후 메탄올 추출물인 상초의 1.5%, 2.0% 및 약초의 1.0%, 1.5%, 2.0% 첨가구는 lard에 BHT 0.02%를 첨가한 것에 비하여 그 기간이 동일하거나 더 연장되었다.

P2-005

상황버섯의 휘발성분분석

장은영', 최성희, 임성인', 정영기'
'동의대학교 식품영양학과, '동의대학교 한방식품연구소, '동의대학교 생명과학부

최근 다양한 생리활성이 연구되고 있는 상황버섯에 있어서 국내산 산지별 품종이 다른 3종류의 시료에 대해 휘발성성분을 분석, 동정하였다. 추출은 SDE법으로 하고, 분석 및 동정은 GC' 및 GC-MS에 의하였다. 총 73종의 휘발성성분이 동정되었는데 관능기별로 alcohol류 9종, aldehyde류 15종, ketone류 13종, ester류 8종, hydrocarbon류 12종, acid류 6종, furan류 3종 및 기타 7종이었다. 상황버섯의 품종에 따라 공통적으로 동정된 화합물이 많았으나 각 시료간에는 화합물의 함량적 차이는 다소 있었다. 1-Octen-3-ol, (E)-2-octenal 및 benzaldehyde등과 같이 다른 식물버섯에서 공통적으로 함유되고 있는 성분들도 있었고 limonene, phenylacetaldehyde 및 acetophenone처럼 과일이나 꽃 향과 관계되는 화합물도 있었으나 2-methyl phenol, 2,4,6-trimethylphenol등의 phenol류도 동정되어 상황버섯의 독특한 향의 요인이라 여겨진다.

복지사회의
"건강과 식품안전"

제72차 학술발표회,
국제심포지엄 및 정기총회

Health & Food Safety in a Welfare Society

KOSFOST Annual Meeting, June 15-17, 2005
COEX Convention Center, Seoul

- 기간 : 2005년 6월 15일(수) ~ 17일(금)
- 장소 : 서울 COEX 컨벤션 센터
- 주최 : 사단법인 한국식품과학회 www.kosfost.or.kr
- 후원 : 농림부, 식품의약안전청, 서울특별시,
  대상식품(주), 동서식품(주), CJ(주)식품안전연구센터
  국제심포지엄 : (주)한국야쿠르트, 매일유업(주), (주)두산R&D센터

사단법인 한국식품과학회

대구산기술사업단 전통생물소재산업화센터

P1-034 해양심층수 첨가에 따른 청국장 발효균 증식도 변화 및 청국장 발효 특성
조미조*, 양효경, 이명희 경북과학대학 전통식품연구소, 이기동 대구산기술사업단 전통생물소재산업화센터

P1-035 인삼 추출 조건에 따른 품질 변화 모니터링
조미조*, 양효경, 이명희 경북과학대학 전통식품연구소, 이기동 대구산기술사업단 전통생물소재산업화센터

P1-036 고혈압 처방 복합 한의약재의 이화학적 특성 및 ACE 저해 활성
이명희*, 조미조, 장영주 경북과학대학 전통식품연구소, 김경욱, 이기동 대구산기술사업단 전통생물소재산업화센터, 임효권 계명대학교 식품가공학과, 이인선 세명대학교 TMR센터

P1-037 여수 및 제주지역 자생양하의 휘발성성분
임성임* 동의대학교 생활과학연구소, 정복미 여수대학교 식품영양학과, 최성희 동의대학교 식품영양학과

P1-038 물로 구기자 주스의 화학적 성분 분석
김은혜*, 고경희 가톨릭대학교 식품영양학과, 강현희 오뚜기 중앙연구소, 이철호 고려대학교 생명공학원 생물공학과

P1-039 상황버섯 균사체 발효주의 휘발성향기성분
장은영, 최성희* 동의대학교 식품영양학과, 임성임 동의대학교 생활과학연구소, 최병태 동의대학교 한의과대학 해부학교실, 정경태, 정영기 동의대학교 생명응용과학과

P1-040 GC/NPD를 이용한 식품 중 acrylamide 분석 방법 개발
황준호*, 강인애, 이은준, 이종근 동국대학교 식품공학과

P1-041 스테비아를 첨가하여 제배한 딸기의 품질특성
홍선표* 경배상 전북대학교 바이오식품 소재 개발 및 산업화 연구센터, 정도영, 정은정, 정명화, 신동화 전북대학교 응용생물공학부

P1-042 Quality Evaluation of Commercial Instant Refrigerated Noodles
Young-Jun Kim*, Choong-In Yun, Sun-Young An and Hyeon-Wee Kim *Otogi Research Center*

P1-043 Changes in Volatile Compounds of Spices by Steam Sterilization
Gil-Ok Shin*, Hae-Soon Lee and Hyeon-Wee Kim *Otogi Research Center*

P1-044 Determination of Measurement Uncertainty in Mercury from Dogfish (Squalus acanthias) Liver
Young-Jun Kim*, Seok-Hyun Yu, Ju-Hyoung Lee and Hyeon-Wee Kim *Otogi Research Center*

P1-045 Quality Characteristics of Commercial Sesame Oils processed in mass-production and traditional way
Hyeon-Wee Kim*, Gil-Ok Shin, Hae-Jin An and Hae-Soon Lee *Otogi Research Center*

P1-046 Determination and Evaluation of Quality indicator of Jam at Market
Choong-In Yun*, Hyeon-Wee Kim, Young-Jun Kim and Mi-Ja Jin *Otogi Research Center*

P1-047 스캐너(scanner)를 활용한 식품의 물성 측정방법 개발 및 적용
서한석*, 최혜경, 이민우, 이지현, 장경화, 황인경 서울대학교 식품영양학과

P1-048 FT-NIR를 이용한 백미 중 총 식이섬유 함량 분석 예측 모델 개발
윤연희, 이진철* 동신대학교 생물자원산업화지원센터

P1-049 근적외선 스펙트럼을 이용한 국내산 백미의 비파괴적 amylose 함량 분석
윤연희, 김선란, 표형식, 이진철* 동신대학교 생물자원산업화지원센터, 박동천 화산기계상사, 박홍규 전남농업기술원

P1-050 백미 중 비파괴 일반성분 분석을 위한 근적외선 분광분석법의 적용
윤연희, 김선란, 표형식, 이진철* 동신대학교 생물자원산업화지원센터, 박동천 화산기계상사, 박홍규 전남농업기술원

P1-051 분무수세 건조한 무세미와 부산물 쌀겨의 쌀가루 특성
최소연, 이영덕* 강원대학교 분자식품생명공학과

P1-052 제분방법에 따른 쌀가루의 저장시 품질특성의 변화
최소연*, 엄혜선, 이영덕 강원대학교 분자식품생명공학과

P1-053 Solid-phase microextraction에 의한 천마(*Gastrodia elata* Bl.)의 headspace 분석
최함숙*, 민경찬 신풍대학 식품영양과

P1-054 차풀(*Cassia mimosoides* var. nomame Makino) 오일의 저장조건에 따른 성분 변화
최함숙*, 김건희 덕성여자대학교 기초과학연구소, 경영선 삼육대학교 원예학과

P1-055 쇠반중 쌀의 세포벽 구조 변화와 수분이동에 관한 연구
미은수*, 홍영식, Vitaly I. Volkov *Center of Science and High Technologies, Branch of Karpov Institute of Physical Chemistry, Moscow, Russia*, 이철호 고려대학교 생명공학원

P1-056 HPLC/FLD(fluorescence Detector)를 이용한 수단색소(, , ,)의 분석
백동길*, 김효중, 윤석명, 김경태, 허찬성 한국아주드드 중앙연구소

P1-057 Comparison of the Flavor Profiles in Raw and Cooked Pine-Mushrooms (*Tricholoma matsutake Sing.*)
In Hee Cho* and Young-Suk Kim *Ewha Womans University*
Hyung-Kyoon Choi Chung-Ang University

P1-058 Development of an Improved Analytical Method for Caffeine and Catechins in Korean Green Tea
Hoejin Lee*, Minhye Shin, and Kyoung Heon Kim *Undergraduate Division of Food Science, College of Life and Environmental Sciences, Korea University, Seoul 136-713, Korea*

P1-059 Development of *Eucommia ulmoides* Tea Mixed with *Discorea batatas* and Analysis of Volatile Compounds
Su-Yeon Lee*, Jin-Sun Shin, Mi-Kyung Kim *Department of Foods and Nutrition, Duksung Women's University*, Kyung-Hee Kim and Mi-Sook Chung *Department of General Education, Duksung Women's University*

P1-060 Natural Occurring Preservation Contents Survey in Foodstuff by HPLC
Ji-Young Park, Bo-Kyung Yoo, Hee-Kyung Park and Dae-Woo Park *Food Safety Research Center, CJ Co.*

P1-061 배추 김치의 담금 및 숙성 과정 중 잔류농약 제거율
김정연, 유보경, 박희경, 박대우 CJ 주식회사 식품안전연구센터, 조관숙 CJ 주식회사 식품연구소

P1-062 클로렐라 및 스피루리나제품에 함유된 엽록소 a, 엽록소 b, 페오포르바이드 a 및 -카로틴의 동시분석법에 관한 연구
이영자, 김소희, 김진숙*, 송경희, 서혜정, 임효정, 최수영 서울지방식품의약품안전청

P1-063 난각 칼슘염의 종류와 난막의 존재 유무가 뼈의 칼슘 대사에 미치는 영향
노경희*, 이상현, 김재철, 김효정, 송영선 인제대학교 식품생명과학부, 바이오헬스 소재 연구센터 및 식품과학연구소, 김정욱 (주)BK 바이오넷

P1-064 Volatile Profiles in Cold-pressed Peel Oils from Korean Hallabong and Japanese Dekopon (*Citrus unshiu* Marcov. ×*C. sinensis* Osbeck ×*C. reticulata* Blanco)
Hee S. Song* and Yeon H. Park *Departments of Food & Nutrition and Bioindustry & Technology Research Institute, Kwangju Health College, 688-3 Shingchang-dong, Kwangju, Korea*, Nguyen Thi L. Phi and Masayoshi Sawamura *Department of Bioresources Science, Faculty of Agriculture, Kochi University, B-200 Monobe, Nankoku, Kochi 783-8502, Japan*

P1-065 엉겅퀴의 플라보노이드 함량 조사
임혜경*, 배은경, 김건희 덕성여자대학교 식품영양학과

P1-066 Keeping Quality of Onion (*Allium cepa*) by Nitrous Oxide Treatment during Storage

P1-037

여수 및 제주지역 자생양하의 휘발성성분

임실림* 동의대학교 생물과학연구소, 정복미 여수대학교 식품영양학과, 최상희 동의대학교 식품영양학과

양하는 우리나라 남부지방 및 제주도에서 자생하며 독특한 향과 맛을 지닌 초본으로 식용과 약용으로 이용 가능한 재료이다. 본 연구는 여수 및 제주지역에서 자생하는 양하의 휘발성성분을 GC 및 GC-MS를 통해 분석, 동정하고 검토하였다. 그 결과, 여수 및 제주지역 양하의 휘발성 농축물의 수율은 각각 11.2mg%, 23.0mg% 였으며, 주 휘발성성분으로는 sabinene, β-pinene, α-pinene, β-phellandrene, (E)-β-ocimene, β-caryophyllene, δ-elemene, α-humulene, myrcene등 테르펜계 탄화수소와 (Z)-3-hexenol, 1-penten-3-ol, linalool, endo-borneol, 4-terpineol 및 β-eudesmol 등의 알코올류, hexanal, safranal, pinocarvone, (Z)-piperitone등의 알데히드류 및 케톤류 였다. 이들 테르펜계 탄화수소는 양하의 독특한 냄새를 구성하는 성분으로 생각되어지며, pinene의 pine-like herbaceous, myrcene의 sweet-balsamic, grassy, endo-borneol의 woody, burning, linalool의 floral-woody, citrus-like등의 특징이 전체 양하의 독특한 향을 구성하는 인자로 생각되어진다.

P1-038

참로 구기자 주스의 화학적 성분 분석

김은혜* 가톨릭대학교 식품영양학과, 김현위 오두기 종양연구소, 이철호 고려대학교 생명공학원 생물공학과, 고경희 가톨릭대학교 식품영양학과

제조방법을 달리한 생 참로 구기자 주스(FJ), 볶은 건과 참로 구기자 주스(RJ)와 볶지 않은 건과 참로 구기자 주스(DJ)의 이화학적 분석을 하였다. FJ, RJ, DJ의 pH는 각각 4.84, 5.14, 5.05로 나타났고, 총산도는 각각 0.58%, 0.19%, 0.24%로 나타났으며, 당도는 FJ가 16°으로 가장 높은 값을 보였다. RJ와 DJ의 색도를 비교해보면, L값은 볶을수록 증가하고, a값은 감소하며, b값에는 차이가 없었다. 당 함량은 FJ, RJ, DJ의 glucose는 100 g 당 6.91 g, 1.18 g, 1.13 g, fructose는 4.62 g, 1.67 g, 1.40 g을 보였다. 주요 유기산은 citrate, malate, lactate, acetate이며, 향기성분은 acid류 9개, alcohol류 6개, aldehyde 1개, ester류 5개, furan류 5개, hydrocarbon류 18개, phenol류 4개, pyrrole 1개, 그 외 4개의 향기성분이 확인되었다. Hexadecanoic acid와 9,12-octadecadienoic acid가 주요 향기성분으로 나타났다.

P1-039

상황버섯 균사체 발효주의 휘발성향기성분

정은영 동의대학교 식품영양학과, 임실림 동의대학교 생물과학연구소, 최명래 동의대학교 한의과대학 해부학교실, 정경태, 정영기 동의대학교 생명응용화학과, 최상희* 동의대학교 식품영양학과

건강에 대한 관심이 높아지면서 생리기능성을 갖춘 약용주의 개발과 소비가 증가하고 있는 추세이다. 본 연구는 면역활성 및 항돌연 효과를 나타내는 것으로 알려진 상황버섯의 균사체가 분비하는 탐모올을 이용한 기능성 주류인 청년약속 및 시판주류(맥세주, 백화수복)를 이용하여 Porapak Q를 충전한 탈리에 의해 휘발성성분을 분석·동정함으로 기능성주류의 기호성과 관계되는 독특한 향미성분인 물질을 검토하였다. 그 결과, 청년약속의 휘발성성분으로는 에스테르류, 알코올류 및 케톤류등 총 45종, 맥세주는 총 49종, 백화수복은 총 46종을 동정 또는 추정하였다. 특히, ethyl acetate, isoamyl acetate, ethyl caprylate, phenylethyl acetate 및 ethyl decanoate등의 에스테르류는 모든 시료에서 동정되었으나, 각 시료에서의 함량은 차이를 나타내었다. 증류주에 다량 존재하는 알코올의 경우, 3-methyl butanol은 맥세주에서, phenylethyl alcohol은 청년약속, 백세주, 백화수복의 순으로 함유되어 있었다. 그 외 산류 및 소량의 타르류등이 확인되었다. 주류의 방향성에 기여하긴 에스테르류는 모든 시료에서 검출되었으나 그 함량의 면에서 차이를 보여 각 시료의 관능적인 차이를 나타내는 주 원인물질인 것으로 생각되어지며, 더불어 백주, 포도주등의 주류에 풍미를 부여하는 2,3-butanediol등의 알코올류와 향주변 물질에 기여하는 phenylethyl alcohol등의 존재가 술의 풍미를 향상시킬 수 있는 인자로 생각되어진다.

P1-040

GC/NPD를 이용한 식품 중 acrylamide 분석 방법 개발

홍준호*, 정현석, 이은규, 이광근 동국대학교 식품공학과

Acrylamide는 발암 가능성 물질로 분류가 되어 있는 유독성이 의심 되는 물질이다. 식품에서 acrylamide의 생산 메커니즘은 환수화물과 단백질을 풍부하게 가지고 있는 식품을 가공에 가열할 경우 maillard reaction에 의해 생산이 된다. Acrylamide분석은 미국 FDA에서 추천하는 LC-MS/MS방법을 많이 이용하고 있다. 이 방법은 높은 감도를 가지고 있지만 LC-MS/MS가 고가의 장비로 분석에 많은 설비투자와 비용이 드는 단점을 가지고 있다. 그래서 본 연구에서는 이 방법을 대체할 수 있는 GC/NPD를 이용한 acrylamide 분석법을 개발하였다. 분석을 위한 전처리 방법은 evaporation과 SPME을 사용하였고, 회수율은 53.4%, 79%으로 계산되었다.

P1-041

스테비아를 첨가하여 제배한 딸기의 품질특성

홍선표* 경북생물 전북대학교 바이오식품 소재 개발 및 산업화 연구센터, 정도영, 채은경, 김병화, 선동화 전북대학교 응용생물공학부

스테비아(*Stevia rebaudiana* Bertoni)는 남미지방의 고산지대에서 자생하는 국화과의 감미식물로 스테비오사이드라는 천연 감미성분을 함유하고 있다. 스테비오사이드는 감미도가 설탕의 약 300배이고 우칼로리의 당대체 감미료로 사용되고 있다. 본 실험에서는 감미도가 높은 스테비아의 첨가가 딸기의 당도, 신맛, 색상과 조직 등 품질에 미치는 영향을 조사하고자 스테비아를 첨가하여 재배한 딸기를 농가로부터 제공받아 일반성분, pH, 산도, 당도, 색도, 경도, 유리당과 유기산 등을 분석하고 관능검사를 실하며 무첨가딸기와 품질을 비교하였다. 스테비아첨가딸기와 무첨가딸기의 수분함량은 '90.8%, 89.2%, 회분은 0.38%, 0.43%, 지방은 0.57%, 0.63%, 단백질은 0.16%, 0.18%를 각각 나타내었다. pH는 스테비아첨가딸기와 무첨가딸기가 3.85, 3.32, 적정산도는 0.83, 0.96, 당도는 7.93 °Brix, 7.55 °Brix를 나타내어 시료 간 다소의 차이를 보였다. 색도는 적색을 나타내는 a값이 스테비아첨가딸기(28.42)가 무첨가딸기(16.20)보다 높게 나타났으며 조직의 경도는 유의적 차이는 보지 않으나 스테비아첨가딸기(51.0 g)가 무첨가딸기(54.3 g) 보다 약간 낮은 것으로 나타났다. 관능 분등검사를과 색상, 향, 단맛, 신맛, 전반적기호도 등에서 스테비아첨가딸기가 무첨가딸기보다 선호도가 더 높은 것으로 평가되었다.

P1-042

Quality Evaluation of Commercial Instant Refrigerated Noodles

Young-Jun Kim, Choong-In Yun, Sun-Young An and Hyeon-Wee Kim*
Ottogi Research Center

Major sensory characteristics of instant refrigerated noodle are a taste of soup base and texture of rheology in noodle. The objective of this study is to evaluate and objectify the amounts of component such as sweet (free sugars), salty (NaCl, cations), savory taste (free amino acids, MSG, IMP, GMP), sourness (acidity, organic acids, pH) in commercial instant refrigerated noodles (7 udongs, 4 spaghettis, 5 chinese noodles, 5 chopped noodles, 2 jjolmyeons). The soup bases of noodles contained sugars (5.7~32.3%), cations (1.0~5.2%), amino acids (0.6~4.4%), nucleotides (0.01~0.47%), organic acids (0.6~1.9%). The results showed that the major factors which effect on the components of the tastes were as follows: sucrose (41%) and glucose (33%) for sweetness, NaCl (93%) for salty taste, glutamic acid (74%) for savory taste, citrate (37%) and acetate (27%) for sourness. On the other hand, gumminess affects an important factor of semisolid foods on the rheology of noodles. Rheology results showed that gumminess were udongs (920~1025g), spaghettis (605~1042g), jjajangs (83~715g), jjambbongs (559~715g), chopped noodles (583~1098g) and jjolmyeons (104~311g). In addition, the sensory evaluation results showed that the overall preferences were high as the gumminess were low in udong and chopped noodles, high in spaghettis and jjolmyeons, and medium from Chinese noodles.

2005년
한국생명과학회
국제학술심포지움
The 44th Annual Meeting of Korean Society for Life Science

Innovation in Life Sciences for Future

-미래를 위한 생명과학의 혁신

- 일시 : 2005. 4. 8(금) ~ 4. 9(토)
- 장소 : 국립 경상대학교 남명관(1층)

사단법인 한국생명과학회

주 최 : 국립 경상대학교

후 원 : 한국학술진흥재단
한국과학기술총연합회
경상대학교(농업생명과학연구원
해양산업연구소.기초과학연구소
식물분자생물학 및 유전자조작연구소
환경생명과학국가핵심센터
BK21 대학원육성사업단)
진주산업대학교 동물생명산업협력연구센터
진주국제대학교
경상남도 · 진주시 · 남해군 · 하동군
경남농업기술원
(주)천년약속
(재)바이오21센터

P66

Effects of Fermented Liquor by using *Phellinus linteus* on the Expression of Inflammation-Related Proteins in Human Hepatoma Cell and in Rat Liver

Seong Min An[1], Jun Hyuk Lee[1], Yung Hyun Choi[2], Young Kee Jeong[3] and Byung Tae Choi[1]

[1]Departments of Anatomy and [2]Biochemistry, College of Oriental Medicine, [3]Department of Life Science and Biotechnology, College of Natural Science, Dong-Eui University, Busan, 614-714, Korea

Phellinus linteus is known as a drug, which has pharmacological activity for various tumors and inflammatory diseases in Oriental Medicine. In the present study, it was examined the effects of liquor of fermentation using mycelium of *P. linteus* (LFMP), on the alterations of inflammation-related proteins and liver function markers with human hepatocarcinoma cells and rats. $HepG_2$ cells were treated with ethanol and LFMP for 24 hours, the morphology and expression of inflammatory proteins were examined by microscopy, Western blotting, RT-PCR, and immunohistochemistry. In the morphological observation, $HepG_2$ cells were dose-dependently damaged in cells treated ethanol, however, LFMP had no effect on the morphology. Also, the expressions of cyclooxygenase (COX)-1, COX-2, which are major inflammatory enzymes, inducible nitric oxide synthase (iNOS) and tumor necrosis factor (TNF)-α were significantly induced by ethanol, however the expressions were weakly induced by LFMP. In the animal model, the markers for liver functions such as, GOT, GPT, total protein and were significantly increased by administration with ethanol, while the group administrated with LFMP had lower effect on the changes of markers compared with ethanol-administrated group. And also, the expressions of inflammatory proteins, including iNOS, COX-1 and COX-2 were induced in ethanol-administrated rat liver. However the expressions were not or weakly induced in LFMP-administrated rat liver. In conclusion, these results suggest that LFMP is not only lower than other grain alcohol in liver damage, but also stands comparison with other existing commercial functional liquors.

2005년도 한국생명과학회
제45회 학술심포지엄 및 추계학술대회

마린바이오 산업의 연구동향과 전망

- 일시 : 2005. 9. 30(금) - 10. 1(토)
- 장소 : 신라대학교 동북아비지니스센터(1층)

■주 최 : (사)한국생명과학회
■주 관 : 신라대학교 Marine-Bio산업화 지원센터, RIS 사업단
■후 원 : 한국학술진흥재단 · 한국과학기술단체총연합회
산업자원부 · 부산광역시 · (주)천년약속
(주)동우산업 · (주)바이넥스 · (주)송호식품개발
대선주조(주) · F&F(주) · (주)비락

사단법인 한국생명과학회
Korea Society of Life Science

P4

The Ameliorative Effect of Mycelial Culture of *Phellinus linteus* on Ethanol-induced Gastric Ulcer in Rats

Jun-Hyuk Lee, Soo-Jin Lee, Yung-Hyun Choi[1], Kyung-Tae Chung[2], Young-Kee Jeong[2] and Byung-Tae Choi

Departments of Anatomy
[1]Biochemistry, College of Oriental Medicine
[2]Department of Life Science and Applied Biotechnology, College of Natural Science, Dong-Eui University, Busan, 614-714, Korea

The ulcer protective potential of aqueous extract of mycelial culture of *P. linteus* (AMPL) was studied using ethanol-induced ulcer model in rats. The gastroprotective effects of AMPL were evaluated by determining the ulcer index, gastric mucus content, histopathological observation and mucin properties using conventional and lectin histochemistry. Pre-administration with AMPL at doses of 250 and 800 mg/kg, one hour before of ethanol treatment caused a significant decrease bleeding and in ulcer index and ameliorated the histopathological changes of gastric lesions induced by ethanol, especially hemorrhage and necrosis. Ethanol treatment decreased gastric adhesion mucus content, but higher level of gastric mucus persisted by pre-administration of AMPL. An examination was made to determine changes of mucin on the gastric mucosa after ethanol treatment, the changes in the amount and properties of mucin detected were more severe in the surface than in the other mucous cells. The ethanol-treated rats revealed a decrease of neutral and acid mucin in the surface epithelium and mucous neck cell and showed increased sulfated mucin in the surface epithelium and upper mucous neck cell in comparison with normal rats. The marked increase of SBA affinity and decrease of BSL-1 were revealed in the ethanol-treated rats. These stainabilities and affinities ameliorated in the AMPL pre-treated rat compared with ethanol treated ones. These results indicate that pretreatment with AMPL provided a protection of gastric mucosa from ethanol-induced injury through maintaining mucus barrier in rats.

◆ 특 허

1. 버섯으로부터 유래한 알코올 가수분해효소를 함유한 균사체 및 이를 이용한 알코올성 음료 및 주류

◆ 수 상

2005 부산과학기술상

제 549 호

상 장

동 상

회 사 명 : ㈜천년약속
상 품 명 : 상황버섯발효주 천년약속Prime
브랜드명 : 천년약속

위 상품은 YTN, 문화일보, 한국디자인진흥원이
주최한 2005 벤처디자인상품 선정에서 우수상품으로
입상하였기에 이에 상장을 수여합니다.

2005년 10월 27일

한국디자인진흥원장 김 철

제 2006039 호

유망중소기업지정서

업체명 : 주식회사 천년약속

대표자 : 김성열

사업자등록번호 : 621-81-54923

선정일자 : 2006. 03. 23

귀사를 정부의 중소기업 육성시책에 의거 부산은행의 유망중소기업으로 지정합니다

2006 년 03 월 23 일

부 산 은 행

은행장 沈 勳

제 11914 호

상 장

대 상

생활서비스 및 제조 부문

회사명: (주)천년약속

대표자: 김 성 열

귀사는 매일경제가 주최하고 과학기술부가 후원하는 2005년 매경우수벤처기업대상에서 사업모델과 기술력, 경영능력이 탁월하여 벤처대상으로 선정되었기에 이 상을 수여합니다.

2005년 7월 22일

부총리겸 과학기술부장관 오 명

감사장

2004 고객감동
Power Brand "KHANT" 大賞

(주류)우수품질 부문

(주)제이엔제이바이오
대 표 김 성 열

위 기업은 우수한 기술력과 경쟁력을 바탕으로
해당산업분야 발전에 기여한 점을 높이 평가하여
일간스포츠 IS라이프의 「2004 고객감동 Power Brand
"KHANT" 大賞」에 선정되어 상패를 수여합니다.

2004년 11월 30일

일간스포츠
I S 라이프

100大
우수특허제품
2004

認 證 牌

(주)제이엔제이바이오

상황버섯균 사체가 분비하는
알코올 생산과 이를 이용한 주류개발

특허청에서 국내 우수 특허기술을 장려하고, 사업화에 성공한
기술을 선도 발굴·육성하기 위해 시행하는 "100대 우수 특허제품 大賞"에
귀사의 제품이 선정되었기에 이 패를 드립니다.

2004년 11월 24일

한국일보社
사장 이 종 승

특허청 ◎서울경제

KPAA 한국변리사회 한국특허정보원 KWJA 한국여성발명협회

Awards
Luxury
Goods
Queen's
2005
Queen's
名品 BRAND 大賞
전 통 주 부 문
브랜드명:천년약속
(주)천 년 약 속
대표이사 김성열
귀사는 우수한 품질과 마케팅·서비스
디자인에서 차별화된 브랜드경쟁력으로
나라사랑·이웃사랑을 실천하여 여성종합
지 Queen에서 "2005 Queen's 명품브랜드
대상"으로 선정되어 본 상패를 수여합니
다.
2005. 12. 9
Queen
대표이사 전 재 성

제 05GQ086 호

우수산업디자인상품선정증

상 품 명 : 상황버섯 발효주
천년약속 Prime

브 랜 드 명 : 천년약속

형 식 명 :

회 사 명 : ㈜천년약속

디자이너명 : 한수홍,이영환

위 상품은 산업디자인진흥법 제6조 제1항의 규정에 의하여 우수산업디자인상품으로 선정되었음을 증명합니다.

2005년 9월 30일

한국디자인진흥원

CERTIFICATE

KS Registrar Co., Ltd.

㈜ 천년약속

부산광역시 기장군 정관면 예림리 926

위 회사의 품질경영시스템이

아래에 기재된 품질규격에 적합함을 인정합니다.

KS A 9001:2001/ISO 9001:2000

다음의 인증범위에 대하여 품질경영시스템 인증서로
등록하는 권리를 부여합니다.

상황버섯 발효주의 생산, 판매 및 부가서비스

Certificate No. : KSR-Q-05393

Date of Issue : 07 April 2006 (10 October 2005)

Expiry Date : 09 October 2008

Certification Body of KS Registrar Co., Ltd.

KSR KAB

Accredited by the Korea Accreditation Board for QMS Certification Reg. No. KAB-QC-34
KS Registrar Co., Ltd., #50-1, Yonggang-Dong, Mapo-Gu, Seoul, Korea(Tel. +82-2-784-9043)

본 인증서의 인증 유효 여부는 정이엔스레지스타㈜를 통해 반드시 확인하시기 바랍니다.

■ 신문방송보도자료

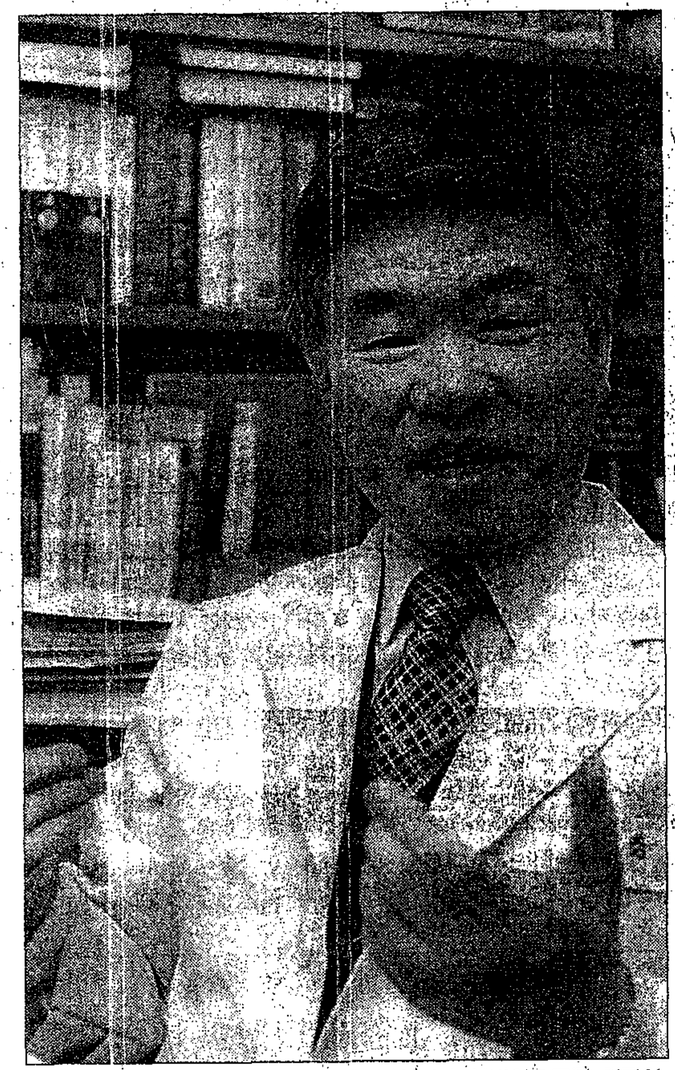
No	언론메체	일 자	기 사 내 용
1	부산일보	2004년 3월 23일	상황버섯 이용 발효주 개발
2	연합뉴스	2004년 3월 23일	버섯균사체 이용 알코올 발효기술 개발
3	뉴시스	2004년 3월 23일	동의대 버섯균사체 이용 주류 개발 - 지역 업체에 기술이전
4	중앙일보	2004년 3월 23일	상황버섯균 술 시판… 동의대 정영기 교수 개발
5	국제신문	2004년 3월 24일	상황버섯균사체 이용한 상황버섯 술 개발
6	문화일보	2004년 3월 24일	동의대 정영기 교수팀, 균사체 발효기술 특허
7	Focus	2004년 3월 24일	버섯 균사체 이용한 술 나온다
8	부산 MBC	2004년 3월 25일	상황버섯 이용 술 개발 및 산학협력
9	국제신문	2004년 3월 25일	상황버섯 균사체 이용한 발효주 개발
10	metro busan	2005년 3월 24일	'몸에좋은' 암 예방 술 나온다
11	농민신문	2004년 4월 2일	"상황버섯 균사체 담근 술 어때요"
12	e 크리스챤신문	2004년 8월 14일	술, 가치 중립적 물질… 천년약속
13	농수축산 신문	2004년 9월 1일	미리보는 2004 농림과학기술대전 - 식품과학기술분야 '천년약속'
14	농수축산 신문	2004년 9월 20일	2004 농림과학기술대전 - 천년약속
15	스포츠조선	2004년 9월 28일	천년약속 새모델 발탁 - 송지은
16	식품음료신문	2004년 10월 1일	약주시장 춘추전국시대 ' 천년약속' 쪽풍의 핵
17	월간조선	2004년 11월	상황버섯 균사체로 술을 만든 부산 동의大 鄭永基 교수
18	한국일보	2004년 11월 24일	상황버섯균사체로 빚은 웰빙 酒
19	일간스포츠	2004년 11월 30일	"당신의 아침을 약속합니다" 상황버섯균사체로 발효한 신개념의 술
20	관광숙박음식저널	2005년 1월	상황버섯발효주 '천년약속' 2종 구도 국내 약주 시장에 출사표
21	경남도민신문	2005년 1월 13일	상황버섯균사체 이용 술 개발
22	한국기독신문	2005년 1월 15일	한국바이오 산업을 이끈다
23	일간스포츠	2005년 2월 1일	간손상 최소화 효과 … 천년약속
24	매일경제	2005년 2월 12일	술에 과학을 담았다 … 효모 대신 상황버섯 균사체 이용
25	경남도민일보	2005년 2월 15일	상황버섯 균사체 이용 술 개발
26	MBN	2005년 3월 8일	톡톡! 아이디어 비즈니스 현장 기업탐방
27	국제신문	2005년 4월 4일	부산 APEC 대표 관광 상품
28	조선일보	2005년 4월 5일	"APEC 정상에 부산 대표상품을"
29	YTN	2005년 4월 12일	사이언스 플러스 '천년약속 제조 신기술 소개'(예정)
30	부산시보	2005년 4월 13일	부산 대표관광상품 21가지 선정
31	국제신문	2005년 4월 18일	제4회 부산과학기술상 영광의 수상자들
32	경향신문	2005년 4월 20일	APEC 공식건배주 '銘酒 전쟁'
33	부산일보	2005년 4월 21일	'천년약속'을 APEC 건배주로
34	조선일보	2005년 4월 23일	APEC 건배酒 선정경쟁 벌써 후끈
35	부산일보	2005년 4월 25일	'천년약속' 약주시장 돌풍
36	매일경제	2005년 4월 26일	상황버섯 발효 술
37	중앙일보	2005년 4월 26일	지역 상품들 '정상' 도전 시동
38	metro busan	2005년 4월 26일	상황버섯 발효주 인기
39	조선일보	2005년 4월 27일	지역특산주 '천년약속' 대박 예감
40	국제신문	2005년 4월 27일	APEC 마케팅 경쟁 치열
41	think food	2005년 4월 27일	천년약속 APEC 건배주 물망
42	조선일보	2005년 4월 27일	11월 APEC '해운대 정상회담'
43	매일경제	2005년 4월 28일	크루져 관광객이 좋아하는 기념품은?
44	식품음료신문	2005년 5월 2일	'천년약속' APEC 건배주 물망
45	식품경제신문	2005년 5월 9일	'천년약속' 약주시장 돌풍
46	부산일보	2005년 5월 11일	대학 '벤처' 눈부신 성장
47	부산일보	2005년 5월 18일	애주가 입 사로잡은 천년약속
48	연합뉴스	2005년 5월 31일	전통약주 APEC 관리들로부터 호평
49	국제신문	2005년 6월 2일	'발효'가 이끄는 새로운 웰빙
50	파이낸셜 뉴스	2005년 6월 3일	[부산 APEC 정상회의 D-168] 세계정상 전통술로 축배
51	한국경제신문	2005년 6월 23일	부산 약주시장 '천년약속' 돌풍
52	세계일보	2005년 6월 27일	상황버섯발효주 '천년약속' 부산대표관광상기념품에

No	언론매체	일 자	기 사 내 용
53	국제신문	2005년 6월 28일	부산관광상품 공모전 '천년약속' 금상
54	부산일보	2005년 6월 28일	부산관광상품 공모전 시상식
55	조선일보	2005년 7월 6일	약주시장에선 '천년약속' 총공세
56	한국경제신문	2005년 7월 11일	부산APEC 와인 뭘로 하지?
57	MBN 뉴스	2005년 7월 22일	제2회 매경우수벤처기업대상 수상
58	연합뉴스	2005년 7월 26일	술 1병에 4월씩 장애인복지 시설 후원
59	조선일보	2005년 7월 27일	'천년약속' 첫 이행
60	국제신문	2005년 7월 27일	'천년약속' 첫발 내딛다
61	MBN 뉴스	2005년 8월 11일	'우수벤처기업 대상 수상'
62	한국경제신문	2005년 8월 18일	'교수기업인'들 연구성과 제품화로 돈방석
63	서울경제신문	2005년 8월 28일	[2005 떠오르는 향토 CEO] 정영기 천년약속 연구소장
64	서울경제신문	2005년 8월 29일	바이오기술 응용 신개념 술개발
65	부산일보	2005년 9월 9일	성공APEC 기념촬영의상 오찬메뉴
66	부산일보	2005년 9월 22일	ACC 공식 건배주 '천년약속' 선정
67	조선일보	2005년 9월 23일	'천년약속' 공식 건배주 -APEC 상공회의소 총회
68	FOCUS	2005년 9월 23일	ACC공식 건배주에 천년약속
69	국제신문	2005년 9월 23일	㈜천년약속 공장방문 -향토 기업사랑
70	국제신문	2005년 9월 23일	천년약속 ACC건배주 선정
71	서울경제신문	2005년 9월 23일	천년약속 부산 APEC건배주로 선정
72	경향뉴스원(인터넷)	2005년 9월 23일	천년약속 ACC 공식 건배주 선정
73	경남도민일보	2005년 9월 27일	APEC 상공회의소 총회 공식 건배주 "천년약속" 선정
74	한국경제신문	2005년 9월 28일	기장군 약주 "천년약속" ACC 건배주 선정
75	관광저널	-	APEC 건배주' 천년약속을 위하여
76	GOODDAY	2005년 10월 13일	상황버섯 발효주 '천년약속' 미국진출
77	국제신문	2005년 10월 5일	기업인 in news, ㈜ 천년약속
78	연합뉴스	2005년 10월 13일	상황버섯 발효주 '천년약속' 미국진출
79	부산일보	2005년 10월 13일	국내 전통주 '천년약속' 미국 5년간 수출 계약
80	edaily	2005년 10월 14일	산자부-벤처기업, 해외투자설명회 개최
81	한국경제	2005년 10월 17일	상황버섯 발효주 '천년약속' 미국진출
82	문화일보	2005년 10월 18일	상황버섯 발효주 '천년약속' 미국진출
83	연합뉴스	2005년 10월 17일	상황버섯 발효주 '천년약속' 미국시장 진출
84	한국일보	2005년 10월 20일	상황버섯 발효주 '천년약속' 내년초 뉴욕에 들어온다
85	중앙일보	2005년 10월 20일	술 '천년약속' 미국 진출
86	조선일보	2005년 10월 21일	천년약속 미국에 수출
87	미주 세계일보	2005년 10월 21일	전통주 미국 시장 공략 뜨겁다
88	국제신문	2005년 10월 22일	천년약속 해외 첫 수출
89	매일경제	2005년 10월 22일	"5년내 5000만달러 수출 자신"
90	동아일보	2005년 10월 24일	상황버섯발효주 해외로, ㈜천년약속 1550만달러 美수출
91	식품외식경제	2005년 10월 24일	천년약속, 미국 진출 순항
92	중앙일보	2005년 11월 2일	민속주들, APEC 공신건배주 경쟁
93	Sports Today	2005년 11월5일	상황버섯발효주 천년약속' 미국간다
94	한국일보	2005년 11월 7일	건배주엔 상황버섯 발효주유력
95	국민일보	2005년 11월 8일	부산APEC 18일 만찬메뉴 뭘까… 세계 정상들 전통주로 '건배'
96	경향신문	2005년 11월8일	APEC D-3 기업APEC 마케팅 후끈
97	조선일보	2005년 11월9일	사상 최대 만찬' 뭘 먹고 마시나
98	국제신문	2005년 11월 10일	웰컴투APEC 한국 전통주로 건배 퓨전한식 만찬 유력
99	연합뉴스	2005년 11월 10일	전통주 '천년약속' APEC 건배주 5관왕 도전
100	이데일리	2005년 11월 11일	D-1 부산APEC 정상맞이, 완벽하게 준비했어요
101	파이낸셜 신문	2005년 11월 11일	한복입고 전통주로 건배
102	국제신문	2005년 11월 11일	도청도설 'APEC 건배주'
103	중앙경제	2005년 11월 11일	부산에 올 APEC 정상들 어떤 국산제품쓰나?
104	중앙일보	2005년 11월 11일	부산APEC D-7 완벽준비, 성공개최 '예약'

No	언론매체	일 자	기 사 내 용
105	헤럴드 생생뉴스	2005년11월11일	APEC 찬조출연은 우리 몫!
106	헤럴드 경제	2005년 11월11일	유통사 'APEC 찬조출연은 우리몫'
107	한국경제	2005년11월12일	전통과 미래의 조화 한국혼 첨단기술 알린다
108	세계일보	2005년11월12일	상황버섯술 '공식건배주'로 유력
109	부산일보	2005년11월14일	쉿! 정상들 숙소는 어디?
110	매일경제	2005년11월15일	부산APEC은 기업 마케팅 '전쟁터'
111	연합뉴스	2005년11월16일	부산 벤처기업들, 정상회의 덕분에 떴다'
112	한겨레	2005년11월16일	8만발 불꽃 하늘 수놓고 화상대화로 한-일 마음잇고
113	부산시보	2005년11월16일	퓨전한식에 '천년약속' 건배 유력
114	부산일보	2005년11월17일	천년약속"보해 복분자주' '위하여…'
115	연합뉴스	2005년11월17일	정상회의 어떻게 진행되나
116	노컷뉴스	2005년11월17일	APEC 정상 건배주 '복분자주+천년약속', 지역화합상징
117	조선일보	2005년11월17일	APEC '부산알리기' 잘나간다
118	국정브리핑	2005년11월17일	APEC정상회의 무역자유화 반부패 논의
119	매일경제	2005년11월17일	'한국의 맛과 멋에 반했어요'
120	연합뉴스	2005년11월17일	정상만찬에 부산의 명요리사 총동원
121	경향신문	2005년11월17일	정상만찬'뭘 먹고 마시나
122	중앙일보	2005년11월18일	천년약속 복분자로 건배
123	국제신문	2005년11월18일	송이 너비아니 곁들인 '웰빙한식'
124	한국경제	2005년11월18일	'21개국 정상들 우리술로 건배…꿈만 같지요'
125	THE KOREA TIMES	2005년11월18일	Summit Banquet Largest Official Dinner in Korea
126	연합뉴스	2005년11월18일	정.관계 인사 부산집결
127	조선일보	2005년11월18일	15억짜리 APEC 정상들의 밥상
128	이데일리	2005년11월18일	정상들 '1분간격 도착' 노대통령 영접
129	헤럴드경제	2005년11월18일	정상들이 마시면 뜬다?
130	부산일보	2005년11월18일	정상 만찬 송이.가리비 등 '악이 되는 밥상'
131	연합뉴스	2005년11월19일	문화공연 곁들인 노대통령 주재 정상만찬
132	한국경제	2005년11월19일	아이슈타인 로봇 APEC 스타됐네
133	데일리 서프라이즈	2005년11월18일	APEC 정상들의 만찬메뉴는?
134	매일경제	2005년11월19일	각국정상 IT코리아 생생체험
135	이데일리	2005년11월19일	정상회의 개시 '경제 통상의제 논의'
136	한국일보	2005년11월22일	APEC이 가져다준 대박
137	중앙일보	2005년11월26일	청와대가 밝힌 APEC뒷얘기
138	중앙일보	2005년11월28일	APEC바람에 중기들 떴네
139	조선일보	2005년11월30일	부산전통산업 APEC 효과
140	부산일보	2005년11월30일	천년약속 연일 브라보
141	이코노미스트(중앙)	815호	'부시 후진타오가 우리술 모델이죠'
142	KBS1	2005년12월6일	경제포커스
143	KBS2	2005년12월7일	뉴스타임
144	스포츠서울	2005년12월13일	2005 블루오션히트상품 &서비스 경영대상
145	경향신문	2005년12월13일	APEC 정상회의 공식 건배주 '천년약속'
146	경향신문	2005년12월13일	전통주 기행-부산 '천년약속'
147	경향신문	2005년12월13일	생명공학이 빚은 웰빙주
148	서울경제신문	2005년12월20일	APEC정상회의 때 공식건배주 '천년약속' 대량생산 돌입
149	부산일보	2005년12월23일	천년약속' 새해1월 '美'상륙
150	한겨레	2005년12월23일	아펙 정상건배주 '천년약속'대량생산
151	MBN	2006년1월5일	파워코리아 신 성장시대를 연다 - 세계인의 입맛을 잡아라
152	한국경제	2006년 1월 12일	항도 부산 블루오션은 해외시장에 있다/
153	한국경제신문	2006년 1월 11일	APEC서 정상 건배주 '천년약속'수출 길 활짝
154	부산 트래블 저널	2006년 1월 16일	신이 내려준 선물'천년약속' '첨자를 빚는 장인의 마음으로'
155	부산일보	2006년 2월9일	APEC 이후 '명주' 반열 '첨단바이오 연구 산물'

파워인터뷰

좋은 술 들고 장애인 도우세요



기능성 건강술 '천년약속'을 개발한 정영기 부산바이오포럼 회장이 부산지역 바이오 업체들이 제품에 첨단 바이오기술을 결합, 부가가치를 높여야 한다고 강조하고 있다. 박수현기자 parksh@kookie.co.kr

■ 부산바이오포럼 정영기 회장

상황버섯 원료로 건강술 '천년약속' 개발
부인은 김해에 정신지체장애인 학원 운영
판매금 일부 기부 … "APEC 건배주 소망"

"몸에 좋은 물질을 가진 버섯 연구를 계속할 생각입니다".

부산바이오포럼의 회장을 맡고 있는 정영기(동의대 생명응용과학과) 교수는 사람좋은 웃음부터 지어 보였다.

정 교수는 최근 부산지역 주류 및 요식업계에서 가장 각광을 받고 있는 인물이다. 지난해 3월부터 시판되고 있는 기능성 건강술 '천년약속'을 개발한 주인공이기 때문. 그는 농림부의 지원을 받아 상황버섯에서 새로운 항암물질을 추출하는 연구를 수년간 하던 중 상황버섯 균사체가 알코올 생산에 관여하는 효소를 가지는 것을 발견했다.

알코올은 고구마, 포도 등 각종 식물을 이용한 주정이나 화학적인 방법으로 만들었기에 정 교수의 연구는 어쩌면 '인류의 술 역사' 또는 '주정의 개념'을 바꾼 획기적인 사건일지도 모를 일이다.

정 교수의 연구성과는 곧바로 기업으로 이전돼 현재 '천년약속'이라는 이름으로 생산 판매되고 있다. 술은 술이되, 술맛은 알코올이 아니라 상황버섯 추출액이 내고 있는 것이다.

이러한 연구결과는 하루 아침에 이뤄진 것이 아니다. 특히 오랜 연구 끝에 개발한 비법을 본인의 창업 등 사사로운 이익을 위해 쓰지 않고 기업체에 이전시켜 빨리 제품화한 것은 국내 연구계의 풍토상 극히 드문 일이다.

이는 대학교수이자 연구자이면서 동시에 부산지역 바이오 산업 육성을 위해 앞장서왔던 그의 지난 행적을 보면 이해가 된다. 그는 지난 2002년 5월 창립된 부산바이오포럼의 주역이다. 정 교수는 "바이오 산업의 고부가가치 때문에 전국의 많은 도시들이 바이오산업 육성에 나섰으나 당시 부산에서는 이러한 인식이 부족했다"며 "전문가들부터 바이오산업 육성에 나서보자는 생각으로 포럼을 만들었다"고 말했다. 정 교수는 "부산지역 바이오 관련업체는 715개이며, 대부분 해양 동·식물을 이용해 제품을 생산하거나 발효 등에 관련있는 전통사업"이라며 "이들 업체의 제품에 첨단 바이오기술을 결합, 부가가치를 높여야 한다"고 강조했다.

그는 사회복지법인 한마음 학원의 재단 이사장이다. 전공과는 무관한 복지사업에 눈을 돌리게 된 것은 자신의 딸 때문. 현재 스물네 살인 딸은 정신지체장애인으로, 정신연령은 3세 정도. 그런 딸과 정상인인 아들, 부인과 함께 지난 1985년 일본으로 유학을 떠났다.

부인도 직장에 나가야 했기에 아이 둘을 맡기기 위해 가까운 탁아소를 찾았던 그는 인생의 변화를 가져올 충격을 받았다. 고국의 어떤 곳도 딸을 환영하는 곳이 없었지만 일본의 탁아소는 대환영이라며 당장 다음날부터 두 아이를 모두 보내라고 권유했다.

장애아동일수록 정상아동들과 함께 지내야 자극을 받아 생활지도나 치료의 성과가 높아진다는 것이다. 또 정상 아동들이 어렸을 때부터 자신이 도움을 줘야 하는 다른 친구가 있다는 것을 배워야 한다고 했다. 이에 큰 감명을 받은 정 교수는 귀국한 뒤 지난 1989년 정신지체장애인들의 보금자리인 한마음 학원을 설립했다. 현재 경남 김해시 장유면 2000평 규모의 시설에 51명의 정신지체장애인들이 생활하고 있는데, 정 교수의 부인이 원장을 맡아 운영 중이다.

큰 욕심없이 독창적인 연구성과를 기업체에 넘긴 정 교수에게 '천년약속' 측은 병당 4원씩의 판매대금을 한마음학원에 기부하고 있다.

그는 "오는 11월 개최되는 APEC 정상회담 때 '천년약속'이 건배주가 되면 좋겠다"고 말했다. 최영지기자 jadore@kookie.co.kr

국제신문

2004년 3월 25일(음력 閏2월5일) 목요일

쌀·균사체 넣어 저어주면 발효

'데히드로게나제' 효소가 알코올 생산 도와줘

동의대 정영기교수 "미생물학 연구의 새 발견"

상황버섯 균사체 술 제조법

수천년전 이집트인들이 만든 맥주에서부터 우리나라 국민술인 소주와 탁주 청주 양주에 이르기까지 우리가 아는 거의 모든 술은 효모를 이용해서 만든다.

미생물인 효모가 곡물의 당분을 알코올과 탄산가스로 분해하는 발효작용을 하기 때문이다. 즉, 술은 효모의 작용으로 만들어진다. 누룩 역시 미생물인 효모를 분리하지 못했던 옛날사람들이 밀기울을 반죽해 효모 등의 미생물이 자라도록 만든 것이다.

최근 동의대 생명응용과학과 정영기 교수팀이 효모가 아니라 상황버섯의 균사체를 이용한 발효법을 개발해 주목을 받고 있다. 효모를 사용하지 않고 상황버섯의 균사체로 알코올을 만든 것은 세계 미생물학계에 아직 보고된 적이 없는 새로운 발효법이다.

미생물학 연구에서 시작된 이번 성과는 정 교수팀이 지난 1998년 농림부의 지원을 받아 상황버섯에서 새로운 항암물질을 추출하려는 시도가 출발점이었다. 상황버섯의 균사체가 알코올 생산에 관여하는 효소를 갖고 있다는 사실을 확인, 기능성 건강술로 연결한 것이다.

지금까지 상황버섯 추출물을 사용한 술이나 건강식품은 있었지만 이처럼 균사체 자체를 이용해 술을 만든 것은 처음이다. 균사체는 상황버섯의 세포라고 볼 수 있다.

상황버섯을 땅에서 재배하려면 3년이 걸린다. 그러나 정 교수팀은 상황버섯 균사체를 배양액에 넣어 3~6일만에 키워냈다. 이 균사체에 포함된 알코올 데히드로게나제라는 효소가 알코올 생산을 도와줘 알코올 14%의 술이 만들어졌다.

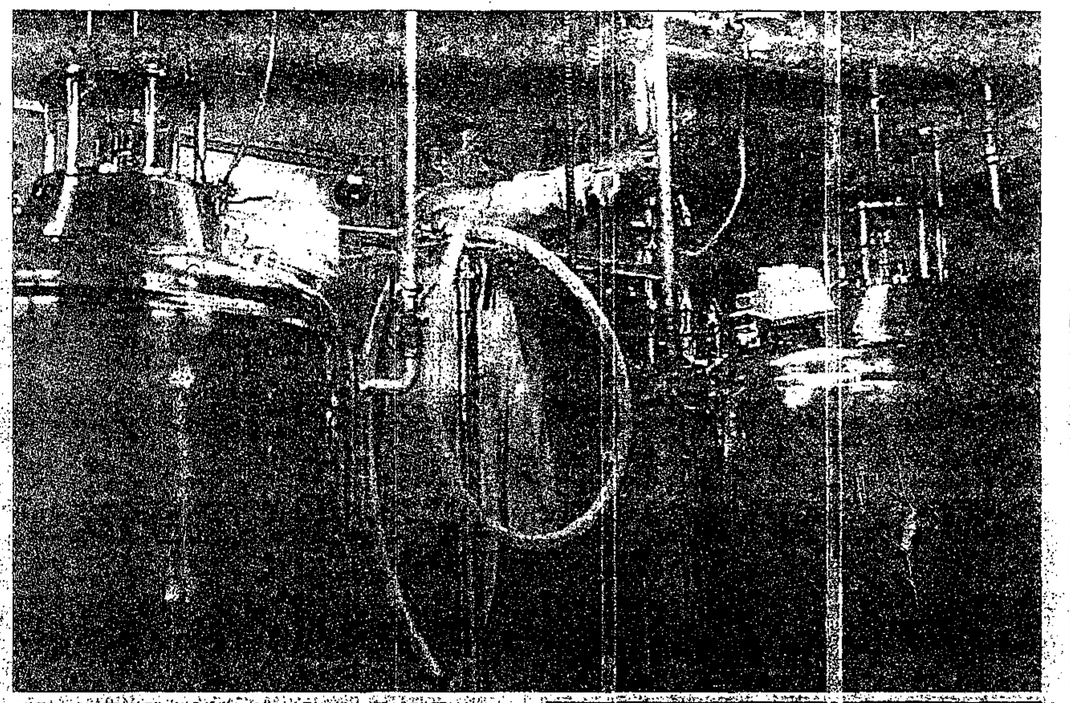
정 교수는 "보통의 술은 효모로 발효시킨 것인데 반해 이 술은 상황버섯 균사체가 누룩의 역할을 한다"며 "이러한 발효기술은 미생물학 연구의 새로운 발견이며 곧 일본과 유럽의 전문학술지에 발표할 예정"이라고 밝혔다.

술의 제조는 경단 크기만한 3~5㎝의 균사체를 잘게 부수어 발효탱크에 쌀과 함께 넣어 공기를 불어넣고 일정기간 저어주며 발효를 돕는다. 탱크속의 균사체는 찐 쌀을 당원으로 삼아 알코올로 변화시킨다. 균사체가 대사해 내놓은 물질이 알코올이 되는 것이다. 이렇게 만들어진 술은 상황버섯 특유의 항암 및 혈전용해 작용, 혈중 콜레스테롤 수치를 줄이는 효과 등이 있는 것으로 확인됐다.

부산바이오기업지원센터 김병진 박사는 "이번 연구는 효모를 사용하지 않는 새로운 미생물 발효법을 개발한데다 제품화로 연결시켜 의의가 크다"고 말했다.

이 기술을 상용화하기 위해 부산 기장군에 'J&J 바이오'기업이 설립돼 '천년약속'이라는 이름의 술을 제조하고 있다.

정 교수는 새로운 발효법과 관련된 특허를 학교측에 양도해 권리를 반씩 나눠 갖기로 했으며 제조판매사는 1병당 4원씩을 정 교수가 설립한 장애인 복지시설인 '한마음'에 기부한다. /최영지기자



대형 버섯균사체 배양탱크에 상황버섯 균사체를 넣고 있다. 작은 사진은 플라스크 속에서 균사체를 액체 배양하는 모습.

釜山日報
2004년 3월23일 화요일 (음력·閏2월3일)

상황버섯 이용 발효주 개발

동의대 정영기 교수, 14도짜리 제조

벤처기업에 기술이전 내달부터 출시

부산지역의 한 대학이 상황버섯 배양 과정에서 발생한 알코올로 술을 만드는 기술을 개발,지역 업체와 손잡고 대량생산키로 해 화제를 모으고 있다.

23일 동의대는 오는 25일 본관 회의실에서 주류 제조업체인 ㈜제이엔제이 바이오와 상황버섯 균사체로 발효한 술을 만드는 기술에 대한 기술이전 계약을 체결한다고 밝혔다.

제이엔제이 바이오 측은 이미 기장군 정관면에 하루 1만병 정도 생산할 수 있는 양조공장을 만들었다. 내달 중 시판되는 이 술의 제품명은 '천년약속(사진)'이며 알코올 도수는 14도(350㎖ 들이)이다. 출고가격(주세포함)은 2천728원.

상황버섯 균사체를 이용해 술을 만드는 기술은 이 대학 생명응용과학과 정영기 교수가 지난 1998년부터 연구해 개발한 것이다.

정영기 교수는 "상황버섯 균사체 발효주는 효모 발효주보다 훨씬 부드럽고 암 예방과 혈전을 용해

하는 효과가 기대된다"며 "쥐를 이용한 임상실험을 통해 간 손상이 상대적으로 적다는 것도 확인했다"고 밝혔다.

술 제조기술은 아주 우연하게 개발됐다. 참나무로 상황버섯을 키우던 기존방식을 탈피,대량생산을 위해 액체에다 키우는 방식을 연구하던 중 알코올이 나오는 것을 발견한 것이다.

정 교수는 이 기술을 지난 2000년 특허신청을 내 지난 2월 인정을 받았다. 이어 농림기술관리센터에 연구개발비를 신청,2억1천만원을 지원받기도 했다.

제이엔제이 바이오는 기술을 넘겨받는 조건으로 일단 기술료 3천만원을 건네고 앞으로 20년(특허권 인정 기간) 동안 연간 매출액이 100억원 이하일 경우 매출액 3%를,초과할 경우에는 2%를 기술료로 지불키로 했다.

이와 함께 연간 매출액의 2%를 연구비로 매년 지원하고 정 교수가 원장으로 있는 경남 김해시 장유면의 장애인 복지시설인 한마음학원에 1병당 4원씩 기부하기로 했다.

김마선기자 msk@

버섯 균사체 이용한 술 나온다

동의대가 버섯 균사체를 이용한 알콜 주류를 개발, 기업체에 기술을 이전해 성공적인 산학협력 모델로 평가받고 있다.

동의대 생명응용과학전공 정영기 교수가 개발한 이 기술은 지금까지의 주류가 효모에 의한 발효과정을 거쳐 생산되는 것과는 달리 효모대신 상황버섯의 균사체만으로 당을 발효해 술을 생산하는 방법으로 동의대는 이 기술을 주류 제조업체인 (주)제이엔제이 바이오(대표 정호권)에 이전키로 하고 25일 오전 11시 본관 2층 회의실에서 기술설명회 및 기술이전 계약을 체결할 예정이다.

제이엔제이 바이오는 이 술의 상품명을 '천년약속'이라 정하고 병당 350ml의 제품을 하루 1만병 생산할 수 있는 규모의 양조공장을 기장군 정관에 설립해 놓고 있다.

동의대 정영기 교수 개발
제이엔제이바이오서 생산
건강에 이로운 물질 함유

제이엔제이 바이오는 기술료 3000만원과 상품 매출액 100억원 이하일 경우 매출액의 3%, 100억원 초과일 경우에는 3%외에 초과매출액의 2%를 동의대에 지급하게 된다. 또 기술료와는 별도로 정영기 교수에게 상품 매출액에 대한 2%의 연구비를 조건없이 지급하며, 상품 병의 종류와 크기에 상관없이 병당 4원을 장애인복지시설인 사회복지법인 한마음학원에 기부하게 된다.

상황버섯 균사체 발효주는 종래의 효모 발효주에서 느낄 수 없는 부드러움과 버섯의 향취가 있으며 발효중 상황버섯 특유의 인체건강에 효능이 있는 물질을 생산해 내는 것이 특징이다. 암 예방물질인 다당체가 함유돼 있어 건강에 이롭고, 혈전을 녹여 혈액순환을 원활히 하는 항혈전 물질이 함유돼 있는 것이 확인됐다는 것이다.

또 동물 임상실험결과 혈액내 콜레스테롤 수치를 낮추는 효과가 있고 다른 술에 비해 GOT 수치가 높지 않은 것으로 나타나 간의 손상을 최소화할 수 있다고 동의대측은 밝혔다. 이 기술은 지난달 동의대 소유로 특허등록이 됐다.

동의대 기술이전센터 이달상 소장은 "이번 기술 이전으로 대학의 연구개발을 상용화 해 대학은 수익을 창출하는 효과를 거두고, 업체는 외국의 와인에 대적할 수 있는 전통주를 생산해 음주문화 변화와 지역 경제 발전에 도움을 줄 것으로 기대한다"고 말했다.

/김정호기자 jhkim@focus.co.kr

국제신문

2004년 3월 24일(음력 閏2월4일) 수요일

버섯균 이용한 술 개발

동의대 정영기 교수팀

동의대 생명응용과학전공 정영기 교수팀이 버섯균사체를 활용한 주류 개발에 성공했다.

지금까지의 모든 주류는 효모에 의한 발효 과정을 거쳐 생산됐으나 버섯균사체 술은 상황버섯의 균사체만으로 발효한 점이 특징이라고 동의대측은 23일 밝혔다.

제이엔제이 바이오는 '천년약속'(사진)이라는 이름으로 부산 기장군 정관면에서 하루 1만병(병당 375㎖)을 생산할 계획이다.

암 예방물질 다당제 함유…간손상 최소화

동의대는 이 기술을 주류 제조업체인 (주)제이엔제이 바이오(대표 정호권)에 이전한다고 덧붙였다. 기술이전 계약을 통해 동의대는 기술료 3000만원과 상품 매출액이 100억원 이하일 경우 매출액의 3%, 100억원을 넘어설 경우 초과 판매액의 2%를 받기로 했다.

이 술은 기존의 효모 발효주에서 느끼지 못하는 부드러움과 버섯의 향긋한 향취를 지니고 있으며, 암 예방 물질인 다당제가 함유돼 간 손상을 최소화하는 효과도 발휘한다고 동의대측은 설명했다. /이선정기자

중앙일보
2004년 3월 24일 수요일

'상황버섯균 술' 시판
동의대 정영기 교수 개발

효모가 아닌 상황버섯 균사체(菌絲體)를 이용한 술이 나왔다.

동의대는 23일 "생명응용과학과 정영기 교수가 상황버섯 균사체를 발효원으로 해 술을 빚는 기술을 개발했다"고 밝혔다.

'제이엔제이 바이오'에 이전한 '천년약속'

정 교수는 이 기술을 특허등록을 하고 부산의 '제이엔제이 바이오'에 이전했다.

이 회사는 이 술을 '천년약속(사진)'이라는 브랜드로 4월부터 하루 1만병(350㎖)을 생산할 계획이다.

정 교수는 여러가지 영양이 들어있는 액체 속에서 상황 균사체를 키워 쌀을 쪄 넣은 뒤 발효시켜 14%의 술을 빚는데 성공했다.

정 교수는 "균사체를 키우는 과정에서 알콜 생산에 관여하는 '알콜 데히드로게나제'와 혈전을 용해하는 물질 등이 존재하는 사실을 확인했다"며 "상황 균사체로 빚은 술은 효모 술보다 부드럽고 감미롭다"고 말했다.

정 교수는 "동물실험을 통해 혈액 내 콜레스테롤 수치를 줄이고 음주로 인한 간손상을 최소화하는 효과가 있음을 확인했다"고 덧붙였다. 정용백 기자

chungyb@joongang.co.kr

'몸에 좋은' 암 예방 술 나온다

동의대 정영기 교수 개발
상황버섯 균사체로 발효
간 손상 최소화 효과 확인

효모대신 상황버섯 균사체로 발효시켜 암 예방물질, 항 혈전물질 등 몸에 좋은 성분이 함유된 '기특한' 술이 조만간 나올 예정이다.

동의대는 23일 동의대 생명응용과학전공 정영기 교수 연구팀이 이 같은 기술을 개발, 이미 특허등록을 마쳤으며 25일 주류 제조업체와 기술이전계약을 체결할 예정이라고 밝혔다.

정 교수팀이 개발한 기술은 기존의 모든 술이 효모에 의해 발효되는 데 반해 상황버섯의 균사체 만으로 당을 발효시켜 술을 생산하는 방법이다.

상황버섯 균사체 발효주는 기존의 효모 발효주에서 느끼지 못하는 부드러움과 버섯의 향긋한 향취가 있어 색다른 맛을 느낄 수 있다는 장점도 있지만 이보다 건강에 유효한 기능성을 갖고 있어 학계 뿐 아니라 애주가들의 이목을 끈다.

이 기술로 제조된 술은 상황버섯이 갖고 있는 인체에 유익한 특성들을 고스란히 함유하게 돼 '몸에 좋은' 술을 제조할 수 있다는게 연구팀의 결론이다.

연구팀은 "균사체 발효주는 암 예방물질인 다당체가 함유되어 있으며, 혈전을 녹여 혈액순환을 원활히 하는 물질과 항 혈전물질이 함유되어 있는 것이 확인됐다"고 밝혔다.

또 동물 임상실험 결과 혈액내의 콜레스테롤 수치를 낮추는 효과와 다른 술에 비해 GOT수치가 높지 않은 것으로 보아 간 손상을 최소화하는 효과를 지닌 것으로 확인됐다고 덧붙였다.

동의대는 이 기술의 특허등록을 마쳤으며 주류 제조업체인 ㈜제이엔제이 바이오(대표 정호권)에 기술료 3000만원과 매출액의 일정비율을 지급 받는 조건으로 기술이전계약을 체결할 예정이다.

㈜제이엔제이 바이오는 하루 약 1만병을 생산할 수 있는 규모의 양조공장을 기장군 정관에 설립해 놓고 '천년약술'이라는 상품명으로 이 술을 양산할 계획이다.

동의대 기술이전센터 이달상 소장은 "이 기술의 이전으로 대학의 연구개발을 상용화해 대학에 수익을 창출함은 물론, 외국의 전통와인에 대적할 수 있는 새로운 차원의 전통주로 인정받아 지역사회의 경제 발전에 도움을 줄 것으로 기대한다"고 말했다.

/하태현기자 hath@clubmetro.co.kr

⇒ news line

신라대 외국인유학생 입학식

신라대는 25일 오전 10시 30분 교내 예음관에서 2004학년도 1학기 외국인유학생 입학식을 갖는다.

이날 입학식에는 리운전평 부산주재 중국총영사를 비롯해 외국영사관관계자들과 이병화 신라대 총장 등이 참석한 가운데 세계 각국에서 유학 온 64명의 외국인 학생들이 입학한다.

신라대는 지난 2002학년도 1학기부터 외국인 유학생들이 대규모로 입학하기 시작해 부산, 울산, 경남지역 대학중 가장 많은 270명의 외국인 유학생이 현재 재학중이다.

이들은 한국어학부에서 일정기간 한국어 교육과 한국문화교육 등을 이수한 뒤 본과에 진학하게 된다.

버섯 균사체 이용한 술 나온다

동의대 정영기 교수 개발
제이엔제이바이오서 생산
건강에 이로운 물질 함유

동의대가 버섯 균사체를 이용한 알콜 주류를 개발, 기업체에 기술을 이전해 성공적인 산학협력 모델로 평가받고 있다.

동의대 생명응용과학전공 정영기 교수가 개발한 이 기술은 지금까지의 주류가 효모에 의한 발효과정을 거쳐 생산되는 것과는 달리 효모대신 상황버섯의 균사체만으로 당을 발효해 술을 생산하는 방법으로 동의대는 이 기술을 주류 제조업체인 (주)제이엔제이 바이오(대표 정호권)에 이전키로 하고 25일 오전 11시 본관 2층 회의실에서 기술설명회 및 기술이전 계약을 체결할 예정이다.

제이엔제이 바이오는 이 술의 상품명을 '천년약속'이라 정하고 병당 350ml의 제품을 하루 1만병 생산할 수 있는 규모의 양조공장을 기장군 정관에 설립해 놓고 있다.

제이엔제이 바이오는 기술료 3000만원과 상품 매출액 100억원 이하일 경우 매출액의 3%, 100억원 초과일 경우에는 3%외에 초과매출액의 2%를 동의대에 지급하게 된다. 또 기술료와는 별도로 정영기 교수에게 상품 매출액에 대한 2%의 연구비를 조건없이 지급하며, 상품 병의 종류와 크기에 상관없이 병당 4원을 장애인복지시설인 사회복지법인 한마음학원에 기부하게 된다.

상황버섯 균사체 발효주는 종래의 효모 발효주에서 느낄 수 없는 부드러움과 버섯의 향취가 있으며 발효중 상황버섯 특유의 인체건강에 효능이 있는 물질을 생산해 내는 것이 특징이다. 암 예방물질인 다당체가 함유돼 있어 건강에 이롭고, 혈전을 녹여 혈액순환을 원활히 하는 항혈전 물질이 함유돼 있는 것이 확인됐다는 것이다.

또 동물 임상실험결과 혈액내 콜레스테롤 수치를 낮추는 효과가 있고 다른 술에 비해 GOT 수치가 높지 않은 것으로 나타나 간의 손상을 최소화할 수 있다고 동의대측은 밝혔다. 이 기술은 지난달 동의대 소유로 특허등록이 됐다.

동의대 기술이전센터 이달상 소장은 "이번 기술 이전으로 대학의 연구개발을 상용화 해 대학은 수익을 창출하는 효과를 거두고, 업체는 외국의 와인에 대적할 수 있는 전통주를 생산해 음주문화 변화와 지역 경제 발전에 도움을 줄 것으로 기대한다"고 말했다.

/김정호기자 jhkim@focus.co.kr

농민신문
2004년 4월 2일 금요일 (음력 윤2월 13일)

"상황버섯 균사체로 담근 술 어때요"

동의대 정영기교수 개발…부드럽고 건강기능성 다양

버섯 균사체를 이용한 알코올 발효기술이 개발돼 상품화를 눈앞에 두고 있다.

동의대 기술이전센터(소장 이달상)는 3월25일 오전 본관 9층 회의실에서 버섯 균사체를 이용한 알코올 발효기술 설명회를 갖고 주류 제조업체인 ㈜제이엔제이 바이오와 기술이전 계약을 체결했다.

동의대 정영기 교수가 2002년부터 농림부 첨단과제로 2억1,000만원을 지원받아 개발한 이 기술은 효모에 의해 발효과정을 거치는 일반주류와는 달리 상황버섯 균사체만으로 당을 발효해 술을 생산하는 방법으로, 3월10일 특허 등록을 마쳤다.

이 술은 기존 효모 발효주에서 느끼지 못하는 부드러움과 버섯 고유의 향을 갖춘 것이 특징이다. 특히 이 술은 상황버섯 균사체에 포함된 다당체(암예방 물질)와 혈전을 녹이는 물질도 함유하고 있다.

정교수는 "버섯 균사체에 의한 발효주는 동물 임상실험에서도 혈액 내 콜레스테롤 수치를 낮추는 것은 물론 간 손상을 최소화하는 것으로 확인됐다"고 밝혔다.

정영기 교수

동의대는 기술이전 조건으로 기술료 3,000만원과 주류 매출액이 100억원 이하일 경우 매출액의 3%를, 100억원을 초과할 경우 초과 매출액의 2%를 받게 된다. 한편 ㈜제이엔제이 바이오는 상황버섯 균사체 발효주 상품명을 〈천년약속〉으로 이름짓고, 하루 1만병을 생산할 수 있는 양조공장을 부산 기장군 정관면에 설립했다. 문의 ☎051-890-1534.

〈부산=박종명〉
jmpark@nongmin.com

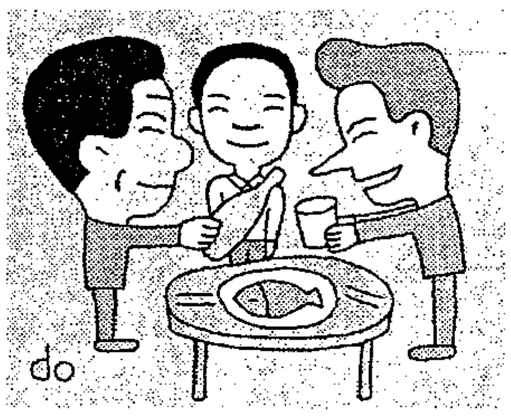
조선일보

2005년 4월 23일 토요일

APEC 건배酒 선정경쟁 벌써 후끈

"대박 확실"…개최지 부산, 상황버섯주 밀어

오는 11월 부산에서 열리는 APEC(아시아·태평양경제협력체) 정상회의 때 공식 건배주는 어떤 술이 될까? APEC 건배주는 11월 18일 1차 정상회의 만찬 때 노무현 대통령이 건배를 제의하면서 21개 회원국 정상들이 함께 마시는 술이다. 홍보 효과도 크고 브랜드 가치도 높일 수 있어 각 지역과 술 제조업체에서는 물밑 경쟁이 한창이다. 앞서 2000년 ASEM 회의 때는 선운산 복분자주가 건배주로 채택돼, 이후 매출액이 연간 4억~5억원에서 20억원으로 4배 이상 급증하는 효과를 봤었다.



선수(先手)는 개최도시인 부산시가 쳤다. 부산시는 최근 외교통상부 APEC 준비기획단에 "지역 특산주인 '천년약속'(상황버섯주)을 공식 건배주로 선정해달라"고 요청했다. 개최도시의 상징성을 반영할 수 있고 누룩 발효가 아닌 상황버섯 균사체로 만든 술로 맛과 기능성이 뛰어나다는 것이다. 여기에 국화·산머루·산수유·솔잎·석류·산딸기 등으로 만든 술들이 경쟁 대열에 가세하고 있다.

APEC준비기획단측은 알코올 농도가 포도주와 비슷한 12~14%이면서 곡주가 아닌 국내 전통주 80여종을 대상으로 사전 조사를 하고 있다. 3~5가지로 후보 술을 압축해 오는 5월 제주도에서 열리는 APEC 통상장관회의 때 참석자들을 상대로 품평회를 가질 계획이다.

기획단의 한 관계자는 "공식 건배주는 정상들이 직접 마실 것이기 때문에 선정 대상이 되고 있는 술의 이름은 대외비(對外祕)이며, 아마 정상회의 만찬 때에야 알게 될 것"이라고 말했다.

부산=박주영기자 (블로그)park21.chosun.com

부산일보
2005년 5월 18일 수요일 (음력 4월 11일)

애주가 입 사로잡은 '천년약속'

'부' 창출 대학연구실

❷동의대 정영기 교수

부산은 물론 전국 애주가들의 입에 오르내리고 있는 상황버섯 균사체 발효주 '천년약속'. 동의대 정영기 교수(생명응용과학과·사진)가 세계 최초로 개발한 천년약속이 올해 100억원이 넘는 매출액을 올릴 것으로 예상돼 화제다.

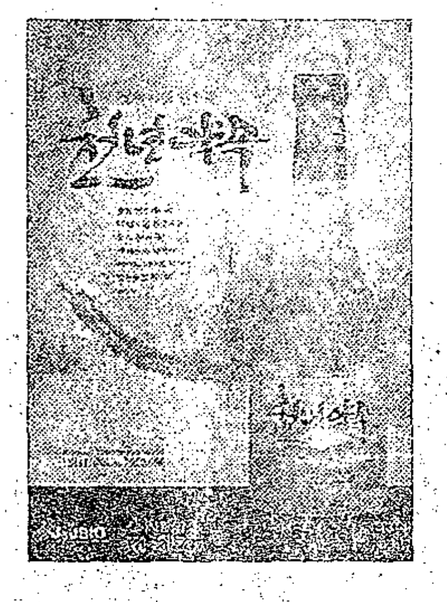
간 손상 최소화 효과 … 올 100억대 매출 기대

정 교수가 개발한 이 술은 지금까지 모든 술이 누룩 등 효모에 의하여 발효돼 만들어지는 것과는 달리 상황버섯의 균사체만으로 생산하는 것이 특징. 이렇게 발효된 술은 암예방 물질인 다당체는 물론 혈전을 녹여 혈액순환을 원활히 하는 항혈전 물질까지 들어 있어 혈액 내의 콜레스테롤 수치를 낮추고 간의 손상을 최소화하는 효과를 지닌 것으로 나타났다. '상황버섯 균사체 발효주'는 우연한 발견에서 시작됐다.

정 교수는 "6년 전 상황버섯에서 항암물질을 찾기 위해 여러 가지 실험을 진행하던 중 우연히 배양액에서 술 냄새가 나 알코올 농도를 쟀더니 0.5%나 됐다"고 설명한다. 연구팀은 배양조건을 변화시켜 가면서 알코올 농도를 높인 결과 8%까지 끌어올리는 데 성공했다.

정 교수는 지난 2000년 '버섯 균사체가 분비하는 알코올의 생산과 이를 이용한 기능성 주류 개발'이란 이름으로 특허를 출원했다. 이 특허는 지난해 2월 동의대 소유로 등록됐다. 동의대는 지난 2003년 주류 제조업체인 ㈜천년약속(당시 제이엔제이바이오)에 3천만원을 받고 기술을 이전했다.

동의대는 옵션으로 기술이전에 의한 상품 매출액이 100억원 이하일 경우에는 매출액의 3%, 100억원을 초과할 경우에는 초과 매출액의 2%를 대학 연구비로 받게 된다. 정 교수도 상품매출액의 2%를 연구비로 받게 된다. 이 밖에 판매액의 일정 부분은 장애인 복지시설인 사회복지법인 '한마음학원'에 기부하게 된다.



㈜천년약속은 현재 부산 기장군 정관면에 월 24만병(375mL)을 생산할 수 있는 규모의 양조공장을 운영하고 있다. 올 9월에는 제2공장을 준공, 월 150만병의 대량생산체제까지 구축해 올해까지 100억~120억원의 매출액을 올릴 예정이다.

정 교수는 "천년약속은 숙취의 원인이 되는 아세트알데히드가 거의 완벽하게 알코올로 전환되기 때문에 숙취가 적은 것이 특징"이라며 "현재 APEC 정상회의의 공식 건배주로 거론되고 있는데 이를 계기로 세계 속의 명품 술로 발전했으면 한다"고 밝혔다. 임원철기자

항암효과 상황버섯 균사체로 빚은 건강주

혈전분해 혈액순환 원활·콜레스테롤 생성 억제효과 입증

출시 1년만 약주시장 돌풍…해외수출길 올라

 # 천년약속 탄생

상황버섯을 이용한 신개념의 술, '천년약' 이 새로운 음주문화를 창조하고 있어 화제.

(주)천년약속(대표:김성열)이 선보인 상황버 발효주 천년약속은 항암효과가 있는 것으로 려진 상황버섯 균사체를 이용해 만든 건강주. 정영기 부산 동의대 미생물학 박사가 4년여의 연구 끝에 제품 완성에 성공했다.

현재 (주)천년약속의 이사를 맡고 있는 정영 박사는 "상황버섯 균사체로 발효한 술은 실 결과 혈액내의 혈전을 분해해 혈액순환을 원히 하고, 콜레스트롤 생성을 억제하는 것으로 타났다"며 "8년전 지렁이 장내 세균과 볏짚에 발견한 '공발효세균'에서 기존의 혈전용해제다 최고 36배나 분해능력이 뛰어난 혈전용해소를 개발해 이 효소를 이용, 천년약속을 만들 됐다"고 말했다.

일반적으로 상황버섯을 땅에서 재배할 경우 3 이 지나야 수확이 가능하지만, 정 박사는 상황섯 균사체를 미생물 공학적으로 액체배양해 3 7일만에 키워내는 믿기지 않는 결과를 만들어 다.

이에 대해 정 박사는 "나무에서 키운 상황버 을 상황버섯 자실체(子實體)라고 하는데, 이 실체에서 세포를 떼어내 액체배양(균사체)을 후, 물에 상황버섯 균사체와 함께 영양분을 루 넣어서 자라기 좋은 조건을 만드는 것이 가 중요하다"며 "균사체를 1주일 정도 키우면 사체 한개의 크기가 포도 알맹이 정도로 자라 되고, 이 균사체에서 가장 건강한 항암물질을 출하게 되는데 이것이 연구의 핵심이며 노하"라고 설명했다.

정 박사는 천년약속의 개발과 관련 "알코올을 산하는 것은 효모라는 것은 널리 알려진 상식로 효모가 아닌 버섯 균사체가 알코올을 생산하는 것은 학문적으로도 큰 의의가 있는 발"이라며 "상황버섯 균사체가 더 높은 도수의 코올을 만들어 낼 수 있도록 배양조건을 다변하는 연구를 계속해 시작한지 2년반만에 알코 농도를 8%까지 끌어올리는데 성공했다"고 밝다.

지난 2000년 3월에는 '버섯 균사체가 분비하 알코올의 생산과 이를 이용한 기능성 주류개 특허를 출원해 본격적인 주류생산 채비에 실했다.

그는 또 술 제품명을 천년약속으로 지은 이유

(주)천년약속 김성열 대표.

 # 천년약속 생산

천년약속은 출시 초기에는 월 3만병 수준이었으나 현재는 25만병을 생산할 정도로 사랑을 받고 있다. 특히 기장 제2공장이 준공되면 월 생산량이 200만병 수준으로 늘어나게 돼 매출액 120억원과 시장점유율 3~4% 달성이 무난할 것으로 전망되고 있다.

(주)천년약속의 김성열 대표는 "항상 남을 섬기는 자세, 세상을 섬기는 자세로 거듭날 수 있도록 정진해 건전한 음주문화를 추구하는 기업이 되도록 노력하겠다"며 "몸에 무리를 주지 않는 주류를 계속적으로 기획해 소비자에게 기여하는 기업으로 보답하겠다"고 경영철학을 밝혔다.

김 대표는 천년약속을 즐겁게 마실 수 있는 방법에 대해 "일반 소주와 천년약속을 5 대 5로 희석해 마실 경우 소주 특유의 강한 맛을 즐일 수 있어 맛이 더욱 부드러워 '5백년주'라는 애칭으로 즐길 수 있다"고 소개했다.

한편, 김성열 대표는 기업이익의 사회환원을 위해 술 1병을 판매할 때마다 4원씩을 모아 장애인 등 불우이웃돕기에 사용하고 있어 화제가 되고 있다.

특히 지난 7월부터 천년약속이 본격 판매된 이후 모아진 100만원의 기금을 경남 김해시에 위치한 재활학교 '한마음학원'에 전달해 본격적인 불우이웃 돕기에 나섰다.

김 대표는 "지난해 8월부터 본격 시판한 천년약속은 사업 초기에는 판매량이 많지 않아 100만원의 후원금밖에 조성하지 못했다"며 "하지만 올해 전국 판매망이 구축된 데다, 월 20여만병을 생산할 수 있는 공장을 가동해도 소화하지 못할 정도의 주문이 밀려 다음에는 1천500여

천년약속은

천년 동안 변치 않는 맛과 건강을 챙기는 술

지난 '98년 동의대 정영기 박사의 상황버섯을 이용한 항암 연구를 시작으로 천년약속의 역사는 시작됐다.

천년약속은 그동안 술은 효모에 의해서만 발효돼 만들어진다는 고정관념을 깨고 효모가 아닌 균사체를 발효원으로 하여 빚어지는 술이다.

일반적인 약주는 누룩에서 당화된 포도당(glucose)을 사카로마이세스(Saccharomyces)속의 효모를 이용해 알코올로 생산한다. 하지만 상황버섯발효주 천년약속은 상황버섯의 균사체를 발효원으로 해 알코올을 생산하고 있다.

즉 쌀을 당원으로 해 상황누룩을 이용, 상황균사체로 에탈알코올 14%의 술을 빚어내기 때문에 상황버섯의 향과 부드러운 맛이 묻어 나오게 된다.

게다가 효모 술에서 얻을 수 없는 건강에 이로운 기능성 물질들을 다량 함유하고 있다는 것이 천년약속의 가장 큰 특장이라고 할 수 있다.

회사측은 혈전을 용해시키는 물질과 항암물질이 존재하는 것이 확인돼 웰빙술로 인정을 받아 지난해 약주시장에서 돌풍을 일으킬 수 있었다고 한다.

이런 효과와 특징으로 천년약속은 지난해 농림부우수전시회에 출품돼 우수기술로 선정됐다. 아울러 특허청과 한국일보에서 주관하는 '2004 100대 우수특허제품'에 선정되기도 했다.

올해초에는 육·해·공군에 납품이 확정됐고, 제7회 부산상징 관광기념품공모전 금상(1위) 수상 및 매경우수벤처상, 우수산업디자인상(GD 마크) 수상 등 그 우수성을 인정받아 'APEC 2005 부산' 공식 지정주 유력한 후보로 거론되고 있다.

美 주류판매회사와 1천500만달러 수출계약 체결

지난해 약주시장에서 출시 1년만에 돌풍을 불러일으키며 애주가들의 사랑을 받아온 상황버섯 발효주 천년약속이 태평양을 건너 미국까지 진출하게 됐다.

(주)천년약속은 지난달 19일(이하 현지시각) 미국 뉴욕에서 미국내 주류판매 전문회사인 세존트레이딩(대표:이성율)과 '천년약속'의 수출계약을 체결했다.

이번 계약은 국내 우수기술 보유기업의 미국시장 진입을 지원하기 위해 산업자원부에서 주최한 '한·미기술투자 로드쇼' 행사를 통해 이뤄졌다. 이로써 천년약속은 향후 5년간 미국으로 1천500만달러이상 수출될 전망이다.

"미국 등 세계인이 함께 즐기는 천년약속을 만들게 될 것"이라는 포부를 밝혔다.

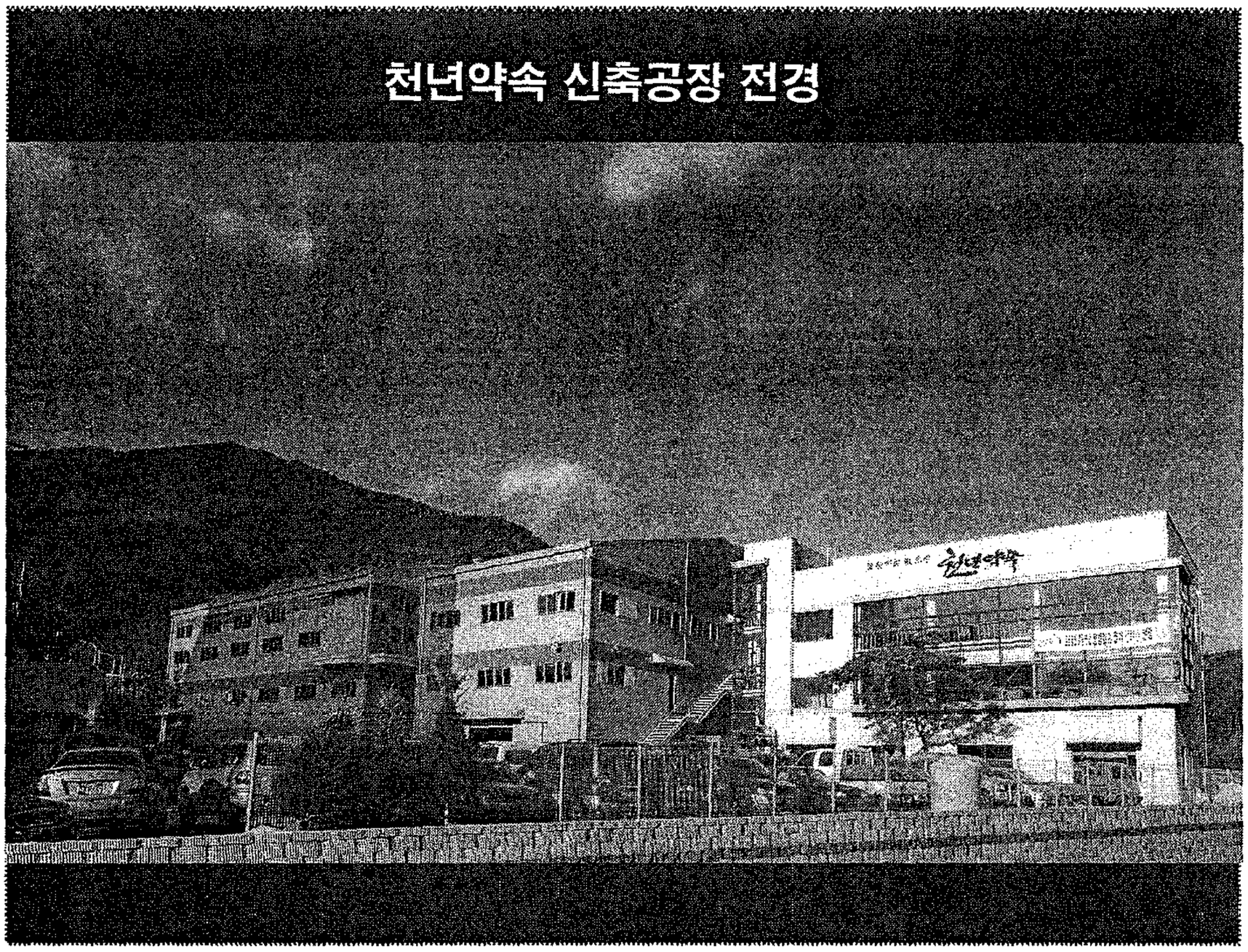
천년약속은 그동안 국내에서 있었던 국제행사의 만찬, 오찬 등에서 여러차례 외국인들에게 소개돼 호평을 받은 바 있다.

특히 지난 5월 제주에서 있었던 APEC 관료회의 때에 맞춰 열린 와인콘테스트에서 21개국의 전통주 및 와인들과 겨뤄 3위에 입상해, 동양인들은 물론 와인을 즐기는 서양인들의 기호에도 잘 맞는다는 평가를 받았다.

천년약속의 미국 진출은 이번달 열린 예정인 APEC 정상회의 건배주 선정에 큰 이점으로 작용될 것으로 보인다.

■ 회사현황

천년약속 신축공장 전경



천년약속 연혁 1

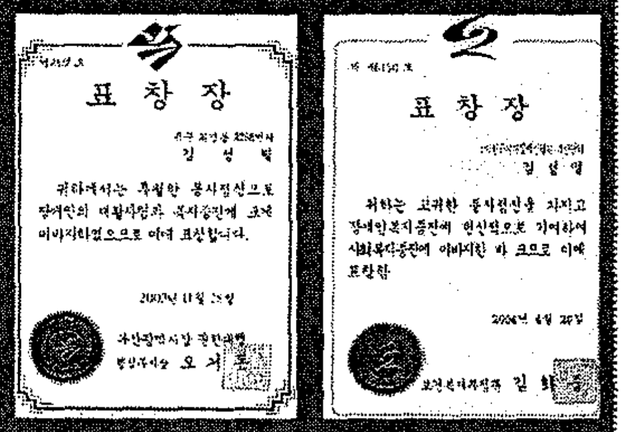
1998 .상황버섯을 이용한 항암 기능성 연구(동의대)
2000. 상황버섯을 이용한 알코올 생산 - 특허출원 (제2000-001514)
농림부 첨단 기술 과제 선정
2003. 6월 회사 설립, 연구소 준비 및 기자재 구입, 공장생산라인준비
2004. 2월 특허등록(제0419882호)
3월 주류제조허가취득, 산학협력조인식(동의대) - 기술이전
4월 천년약속 출시
9월 농림부 우수기술 전시회 출품
11월 벤처 기업 인증
12월 특허청 선정 100대 우수특허제품 선정, 농협 입점 코드 계약
우량기술 기업 선정
특허기술대전 및 서울국제발명전시회

천년약속 연혁 2

2005. 1월 700ml 린테우스 출시
2월 군납 업체 선정
3월 기업부설연구소 인증
4월 메가마트, 롯데마트, GS유통 입점, 사명 '천년약속' 으로 변경
부산시 지정 APEC 관광상품 지정 , 제4회 부산과학기술상 수상
500ml 천년약속 Prime 출시
5월 서울 국제주류 박람회 참가, 서울국제식품전 참가
APEC 고위관료회의 와인 콘테스트 입상(3위)
6월 제7회 부산상징 관광기념품 공모전 금상(1위)
7월 매경우수벤처대상(과학기술부총리상 수상)
9월 우수산업디자인상(GD 마크) 수상 – 천년약속 프라임
10월 ISO 9001 인증획득 , 미국수출 계약
11월 APEC 2005 KOREA 정상만찬 공식 건배주 선정
12월 제 2공장 가동, 고객만족도 1위 상품 선정

최고 경영자 및 개발자

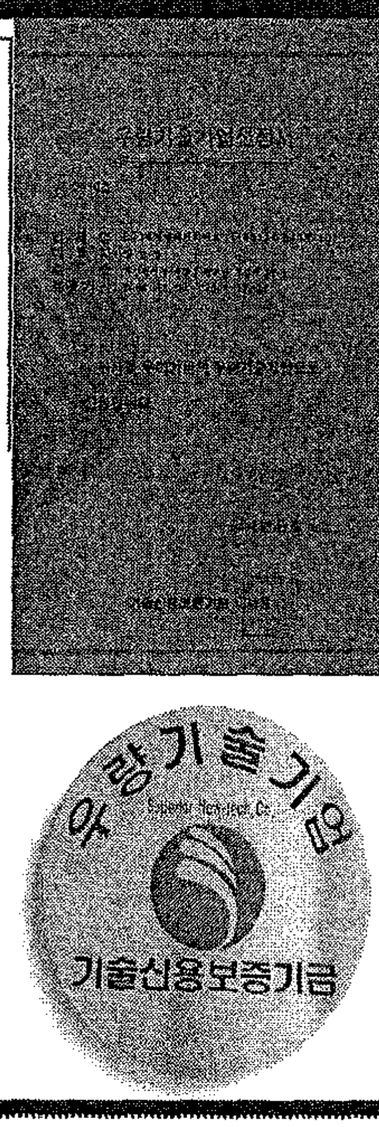
C E O : 김 성 열
주 소 : 부산시 기장군 정관면 예림리 926번지
도 메 인 : www.1000yr.co.kr
설 립 일 : 2003년 6월 25일
종업원수 : 71명
유 통 망 : 전국 45개 도매점, 대형 할인점, 군납, 수출

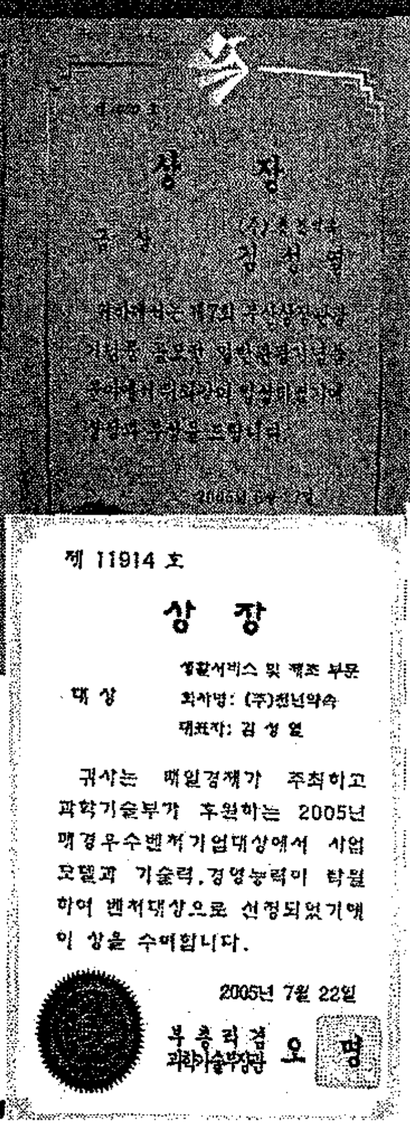


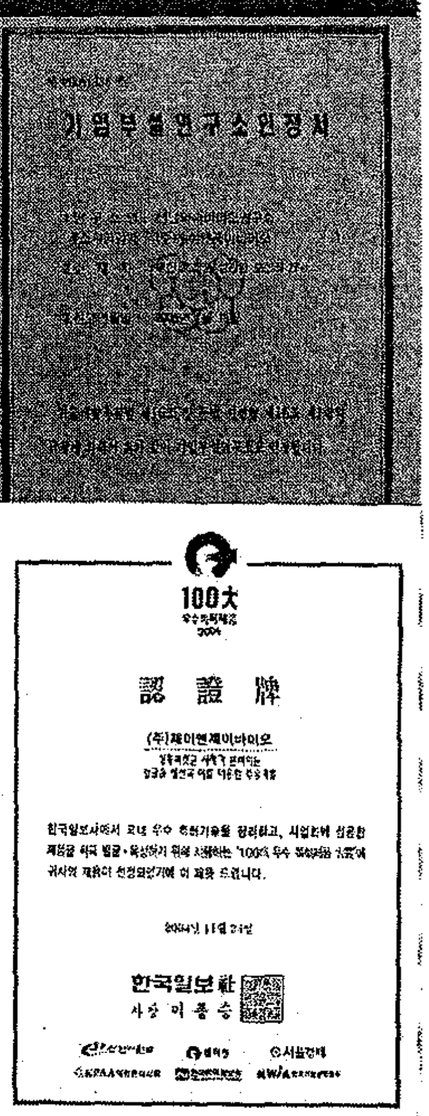
개발자 : 정영기 박사 : 국립 경상대학교 → 일본 동경대학 → 일본 히로시마대학
경 력 : ◇동의대학교 생명응용과학부 교수 ◇ 한국 생명과학회 회장
◇ 부산 바이오포럼 회장 ◇ 부산 생물산업협회 부회장
◇ 한마음복지재단 이사장 ◇ 제4회 부산과학상 바이오의학상 수상
◇ 국가균형발전위원회 부산과학기술분과 부위원장
◇ 천년약속 연구소장, 상임고문

대표논문: 버섯으로부터 유래한 알코올가수분해효소를 함유한 물질 및 이를 이용한 알코올성 음료 및 주류 외 100여편

각종 인증

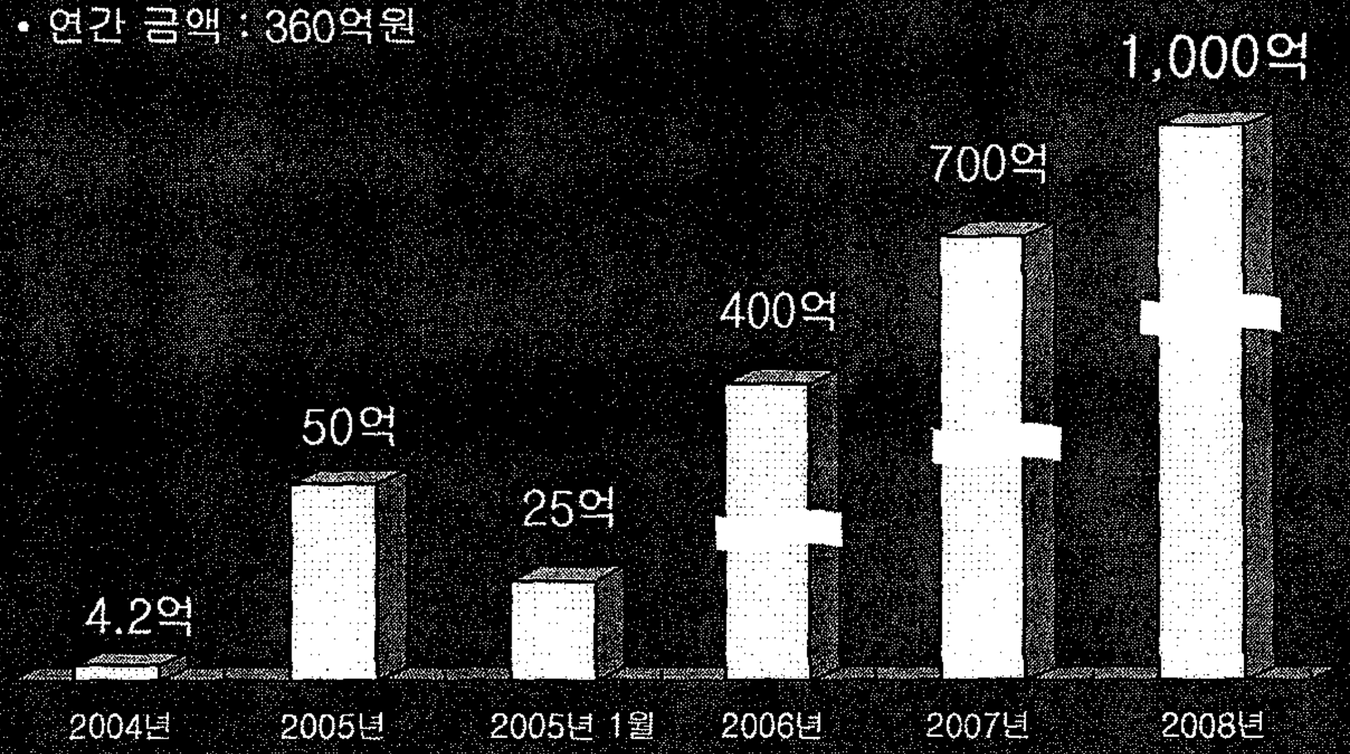






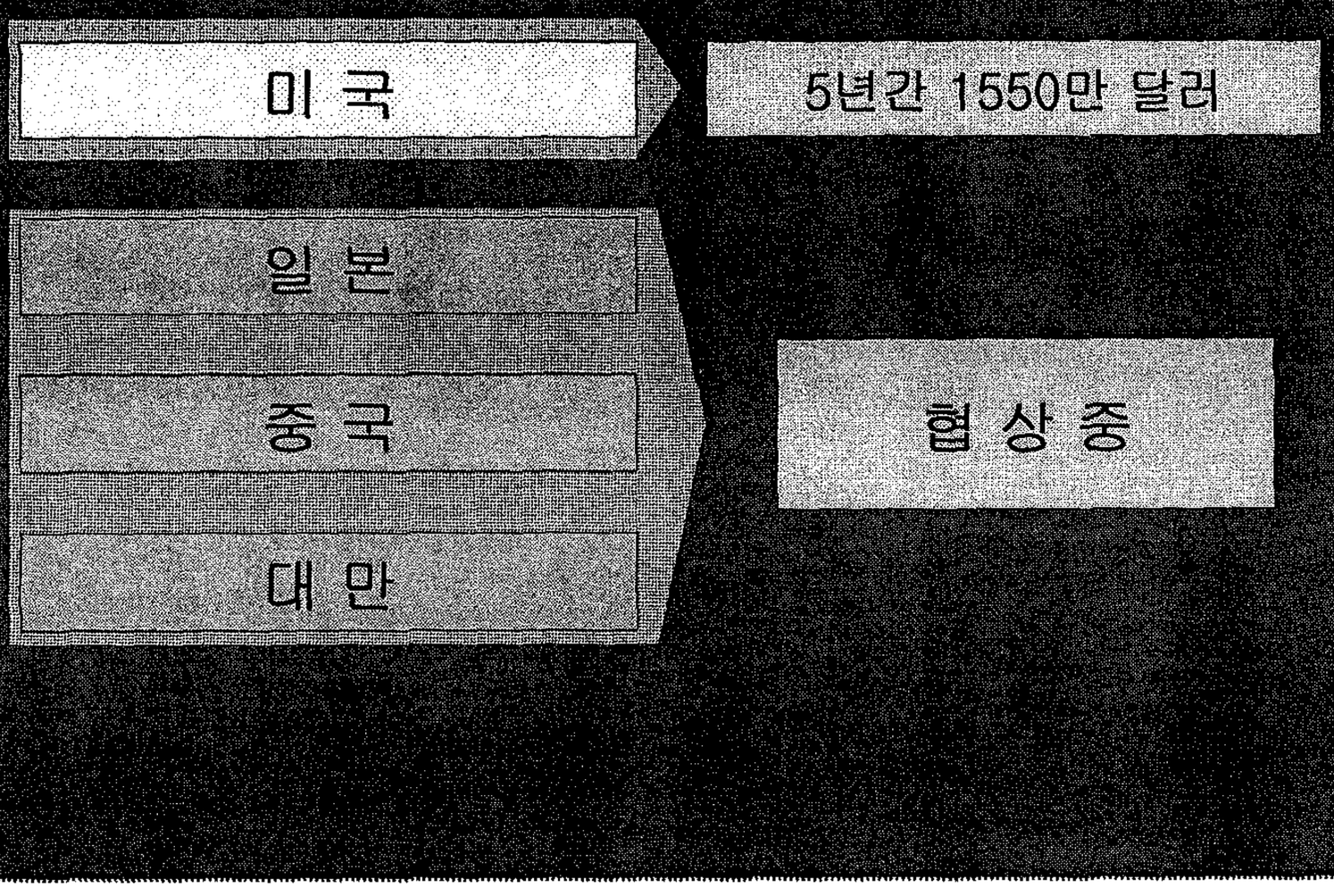
현재 생산 현황 및 매출 현황

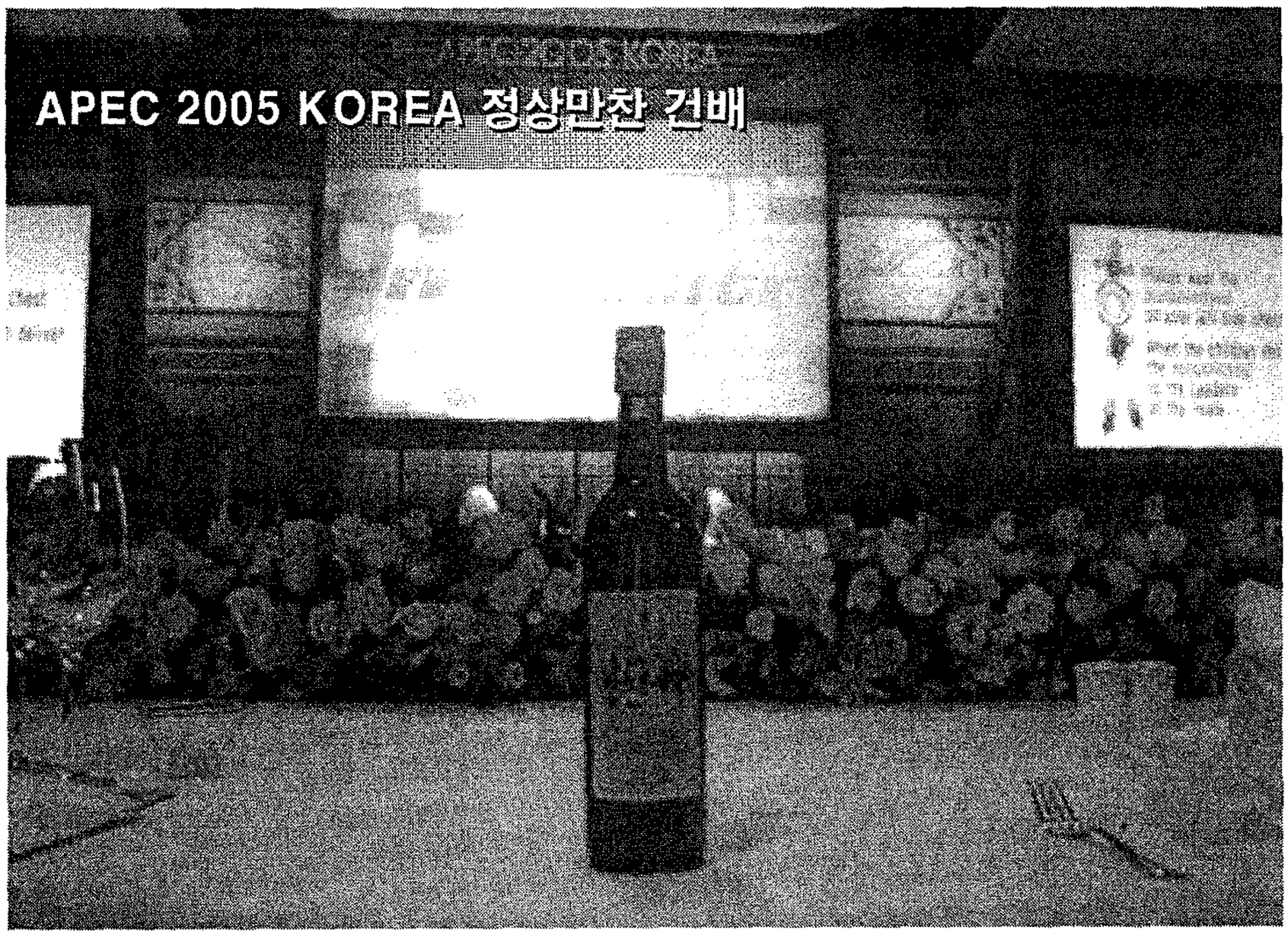
- 생산 규모 : 일일 6만병 / 월간 156만병
- 생산 금액 : 약 30억원 / 月
- 연간 금액 : 360억원



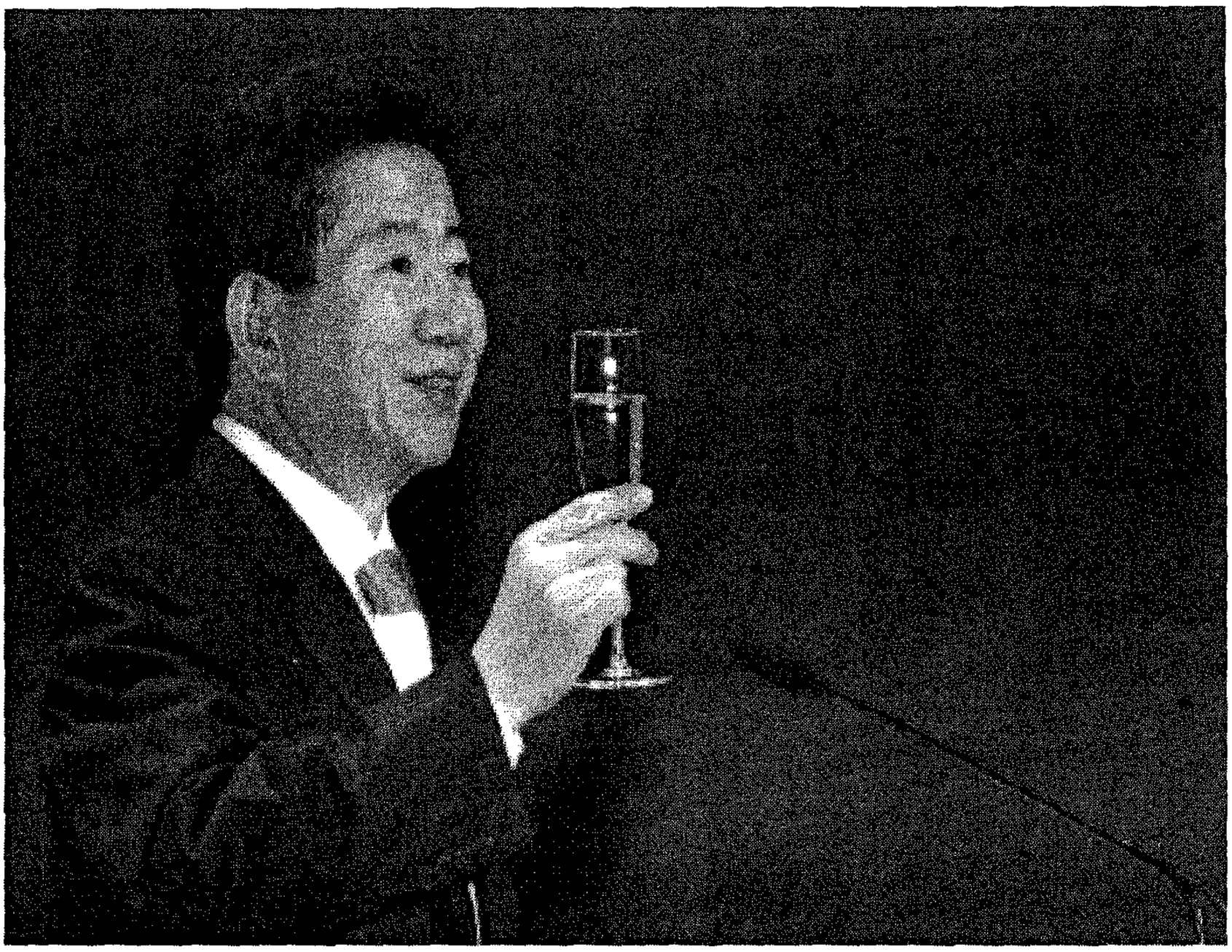
<주세 제외>

수출 현황





- 정상회의 만찬에 사용된 천년인삼



~ APEC 정상들이 건배합니다. 천년약속으로...

~ 정상 만찬을 축하하는 각국 정상들