최 종
연구보고서

버섯균사체를 이용한 고기능성 녹차 및 양파 제품개발

연구기관

(주)HK바이오텍

농림부

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “**버섯균사체를 이용한 고기능성 녹차 및 양파 제품개발에 관한 연구**” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2008 년 4 월 24 일

주관연구기관명 : (주)HK바이오텍

총괄연구책임자 : 김정옥

연 구 원 : 박철우

연 구 원 : 김미숙

연 구 원 : 엄기춘

연 구 원 : 이윤화

연 구 원 : 정성훈

협동연구기관명 : 경상대학교

협동연구책임자 : 하영래

요 약 문

Ⅰ. 제 목

버섯균사체를 이용한 고기능성 녹차 및 양파 제품개발
(Biofunctional green tea and onion cultured with mushroom mycelia)

Ⅱ. 연구개발의 목적 및 필요성

1. 연구개발의 목적

가. 기술개발의 최종 목표

1) 녹차와 양파에 함유된 phytochemical을 버섯균을 이용하여 bioconversion시킴으로써 항산화성, 항관절염성, 항당뇨성, 골다공증치료효과, 갱년기장애억제, 면역력향상, 항암효과 등의 기능성을 갖는 고 기능성 소재로 개발함과 동시에 녹차와 양파제품의 기호성을 향상시키는 기술개발 (두가지 기술: 녹차 또는 양파를 배지로하여 버섯균사체 배양기술, 버섯균사체 배양물과 녹차 또는 양파와 반응하는 기술)

2) 이러한 소재를 이용한 버섯균사체녹차제품 및 버섯균사체양파제품 개발과 기능성식품소재개발

나. 단계별 목표

1) 1단계 (기초연구)

가) 녹차와 양파중의 phytochemical bioconcersion에 적합한 버섯균주 선발

나) 배양 및 반응 조건구명

다) 배양 및 반응물의 추출 및 정제

라) 기능성조사 (면역력증진, 항암성, 항산화성, 관절염억제효과)
마) 관능평가

2) 2단계 (응용연구 및 시제품제작)
가) 녹차와 양파를 배지로한 버섯균사체 대량생산
나) 기능성 (면역력증진, 항암성,항산화성, 관절염억제효과)물질의 분리 및 구조추정
다) 제품화기술 개발
라) 제품의 기능성조사
마) 독성조사
바) 시작품제품
사) 관능평가

3) 3 단계 (사업화)
가) 제품화 : 형태결정, 규격결정, 시장적용성조사
나) 제품의 품질평가 : 기능성, 유효성분함량, 기호성 및 안전성, 관능

4) 최종목적
가) 제품과 원료소재의 기능성과 기호성
나) 제품의 시장적용성

2. 필요성

가. 기술적측면

1) 버섯균사체 배양에 의한 녹차나 양파 가공품의 기능성 증진 기술
가) 녹차, 양파, 버섯은 면역증진효과, 항산화성, 항암성, 관절염억제효과 등의 다기능성이 있는 소재로 오래전부터 사용되어왔다.
나) 녹차 중에는 카테킨이 기능성을 갖는 주요화합물임이 밝혀져있으며, 이와 유사구조를 가진 flavonoids 화합물이 당과의 배당체로 존재하면서 여러 가지 생리활성을 갖는 것으로 알려져 있다. 이들 flavonoids계 화합물은

배당체보다 비배당체 (aglycon)의 형태로써 고 기능성을 나타내는 것으로 보고되어있다.

다) 녹차를 발효시켜 만든 발효차는 발효과정에서 효소에의해 agycon으로 변화된 flavonoids에 의해 기능성이 증가하는 것으로 알려져 있다. 최근 중국에서 개발되어 수입되고 있는 보이차는 녹차에 비해 가격이 비싸지만 (2-10배) 그 소비량은 점점 늘어나고 있다. 가공공정상 시간이 더 많이 걸리고 복잡함이 고가의 원인이 된다.

라) 녹차나 양파를 함유하는 배지에 버섯균사체배양 또는 배양된 효소반응으로 flavonoids glycoside를 aglycoside로 전환이 가능하고, flavonoids의 생물학적 작용에 의해 기능성이 높은 flavonoid로 전환으로 기능성을 증가시킬 수 있다. 또한 항암효과가 우수한 flavonoid-β-D-glucan으로 전환이 가능하다.

2) 버섯균사체 배양에 의한 녹차나 양파 가공품의 기능성 시너지효과 창출 기술

가) 버섯균사체를 배양할 경우 녹차와 양파 중의 유효성분의 기능성과 기호성을 증진시킨다.

나) 또한 β-D-glucan과 같은 버섯균사체의 기능성을 부가함으로써 synergy효과를 얻을 수 있다.

3) 버섯균사체 배양에 의한 기호성 증진 기술

가) 버섯균사체배양에 의해 생성되는 B-glucan은 휘발성 황화합물을 흡착시키는 기능이 있어 섭취 시에 느끼는 역한 맛을 경감시킬 수 있어 양파를 이용한 기능성 제품의 활용성을 증진시키고 또한 녹차의 경우 풋내를 경감시켜 소비를 증대시킬 수 있다.

나) 버섯균사체 배양 시 다양한 효소반응에 의해 생성되는 물질에 의해 기호성이 부여된다.

4) 버섯균사체 배양에 의한 녹차 전체 잎 가공 기술

가) 녹차는 양파의 섬유소를 버섯균에 의해 분해함으로써 녹차 잎 전체 또는 양파 전체를 가공할 수 있다.

나. 경제.산업·문화적측면

1) 고부가가치 창출

면역증진, 항암보조, 항산화제, 관절염치료효과를 갖는 다기능성 건강보조식품 소재는 약 1조 500억으로 추정되는 국내 건강기능성식품시장과 약 650억불 규모로 추정되는 세계시장에서 수요가 급부상하고 있다. 따라서 고 기능성 버섯균사체 녹차 및 버섯균사체 양파 가공품 및 소재 개발은 국내뿐만 아니라, 국외에서도 고부가가치를 창출할 수 있다.

2) 부가가치가 높아 경제성이 있고, 가격이 저렴

현재 시판되고 있는 항암보조제, 면역증진제, isoflavone, flavonoids, β-D-glucan함유제품을 비롯한 기능성식품은 암예방과 성인병예방을 위해 지속적으로 복용하여야 되는데 비해 가격이 비교적 비싼 편이라, 경제적인 부담이 만만치 않다. 본 제품은 버섯균사체와 우리나라의 주요작물인 녹차와 양파를 소재로 하여 대량으로 생산될 수 있기에, 수요의 증가와 함께 소재자체의 원가가 저렴해질 수 있는 장점을 가지고 있다.

3) 녹차를 생산/가공하는 농가의 소득을 증대

녹차는 우리나라최고의 전통 다류이며 년간 약 천톤의 녹차가 생산되고있다. 녹차의 효능이 알려지면서 해마다 20-30%씩 소비가 증가되고 전남의 광양, 구례와 경남의 하동에서 재배 농가가 늘어나고 국산차 생산이 증가되고 있으나, 재래식가공기법에 의존하는 가내공업수준에 머무르고 있다. 고기능성 녹차제품생산은 녹차생산 농가나 제품생산업자의 소득 증대원이 될 것이다.

4) 양파소비의 증대와 양파생산농가의 소득증대

양파고추장, 양파음료, 양파농축액, 양파건면 등의 가공품 개발은 소비와 소득을 증대에 기여하고 있다. 그러나 음료, 농축액등의 경우, 상품의 기호성이 항상 문제시되어 시장 확대에 문제가 되고 있다. 따라서, 냄새를 제거하는 기술과 기능성 증진 기술개발은 이들을 해소할 수 있을 것이다.

5) 국내 수요 증대 및 수술 시장 확보

녹차, 양파, 버섯의 3대 주요 기능성 식품소재를 이용한 고기능성 신제품 개발 기술로 국내수요 및 수출시장 확보로 소득증대가 가능 할 것이다.

6) 수입대체를 위한 국내에서 생산이 가능

현재 사용되고 있는 기능성건강식품소재는, 많은 양을 수입에 의존한다. 최근

국내 기능성 식품이 소비가 급속히 늘어나는 만큼 외화유출이 심각하여 이를 대체할 수 있을 것이다.

7) 현대인에게 발병하는 갱년기 여성 및 성인병 예방 및 치료 가능

고 기능성과 영양성을 갖는 버섯균 이용 고기능성 녹차, 양파 제품 개발은 소비자의 건강 개념이 질병 치료에서 예방으로 전환되고 있는 추세에 활용될 것이다.

Ⅲ. 연구개발 내용 및 범위

1. 버섯균주 선발

가. 균주의 선발

녹차추출물 또는 양파 추출물을 10% (w/v) 첨가한 PDA 배지에서의 버섯균주의 활성화 및 균사생장을 조사한다. ㈜HK바이오텍이 보관중인 70여 버섯균주 중 예비실험을 거쳐 선발된 버섯균주를 PDA배지에 일정량 (8 ㎜ i.d)을 접종하여 25℃의 항온기에서 배양하면서 균사의 생육을 조사하였다.

나. 액체배지에서 버섯균주 활성화 및 균사생장 조사

1) 액체배지 조제 (300 ㎖ 용)

녹차추출물 또는 양파추출물 (10% w/v)을 첨가한 HK 기본배지 (1 L)에 황백당 20 g, $MgSO_4$ 0.5 g, KH_2PO_4 0.5 g을 첨가한다. 이 액체배지를 500 ㎖ 용량의 삼각플라스크에 300 ㎖ 씩 분주하고 121℃에서 30분간 살균하여 액체배지로 사용하였다.

2) 액체배양

상기 나). 1).의 방법으로 조제된 액체배지에 Table 1의 버섯균을 접종 (1/4 petri dish/flask) 하고 shaking incubator (120 rpm, 25℃)에서 7일간 배양한다. 육안으로 균사체밀도를 조사하고, 배양액의 viscosity를 측정하였다.

2. 버섯균사체배양용 배지조성 개발

가. Phytochemical bioconversion에 적합한 기본 액체배지 (Know-How)

이 배지의 주요 구성분은 농산물이다. 농산물을 효소로 처리하여 균사생장촉진물질

및 고순도 소재의 전구체를 생성한다. KH_2PO_4, $MgSO_4$ 등을 포함하는 다수의 무기성분을 첨가한다.

나. Phytochemical bioconcesion에 적합한 소재 생산을 촉진시키기 위해 기본배지에 추가로 사용될 성분

1) 배지의 탄소원: glucose, fructose, xylose, rhamnose, ribose

2) 배지의 질소원과 sulfur원: pro, hydroxypro, ser, thr, cys, phe, leu, gly등

3) 기타 배지성분: 대두분, 양파, 녹차 등

3. 배양조건 확립

가. 배지조성 및 균주

배지조성과 균주는 상기 1), 2) 항에서 선발된 것을 사용할 것이다.

나. 최적의 배양조건 구명 [seed배양 및 소량배양]

1) 배양 온도

가) 항온배양 (10, 20, 25, 30, 37℃)

나) 변온 (25℃ → 4℃, 10℃ → 25℃) : 각 항온배양 완료 후 4, 10℃에서 배양하며, 예비실험으로부터 얻은 결과를 기준으로 하여 설정하였으나, 버섯균종에 따라 배지조성에 따라 수정될 수 있다.

2) 배양기간 : 7, 9일

다. 대량배양에서의 최적의 배양조건 구명

1) 배지조성별 배양

2) 공기공급량: 0.5, 1.0, 1.5v/v/m

3) 배양온도 : 20, 25, 30℃

4) 배양기간: 3, 4, 5 (항온)

4. 녹차와 양파에 버섯균사체가 분비한 효소를 처리하여 β-glucan과 phytochemical 배당체생성

가. 반응물에 의한 배양체 확인

1) 자가분해 반응에 의한 배당체 확인

녹차분말 또는 양파분말을 500 ㎖ 삼각플라스크에 담고 선발된 버섯균주의 배양액을 녹차 및 양파분말 분량에 대해 (1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 1:10, 1:20)의 비율로 첨가한 다음, 55℃에서 3시간동안 반응시킨다.

2) 버섯균사체 배양물에 의한 배당체 확인

버섯균사체 배지에 녹차분말 및 양파분말을 함유하여 배양시켜 배당체를 확인

나. 배당체의 추출 및 분리

1) 용매추출 및 분획

녹차분말을 첨가한 균사체배양물을 methanol (1:3, v/v)로 추출하여 여과한 다음, 여액에 chloroform을 (1:2, v/v) 비율로 첨가한 다음, 추출/분리한다. 분리된 상층에 hexane을 (1:2, v/v)의 비율로 첨가하여 다시 hexane층을 분리하였다.

2) 에탄올 침전물 조제

상기 "3."에서 제조한 시료를 10배 농축한 액 100 g에 에탄올 농도가 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80%가 되도록 각각 가하여, 4℃에서 24시간 동안 방치하여 침전시킨 다음, 원심분리하여 (10,000 rpm, 10분) 상등액과 침전물을 분리하였다.

3) DEAE column chromatography

상기에서 분리된 ethanol 침전물은 DEAE column (2 ㎝, 110㎝)에서 5 mM sodium phosphate buffer를 사용하여 분획한다.

4) TLC

DEAE column chromatography에 의해 분리된 분획물을 다시 TLC (Silica 60 F-254 plate, 5 × 10 ㎝)를 사용하여 분리한다. Butanol:Ethanol: H_2O를 5:3:3 (v/v/v)을 전개용매로 사용한다.

5) Preparative HPLC

DEAE column chromatography 분획물을 순수 분리하기 위해서 Bio-Sep S2000 column (mobile phase; 20 mM sodium phosphate), TSK column (mobile phase; H_2O), C_{18} column (mobile phase; MeOH: 1 mM ammonium acetate 6:4)을 사용하였다.

6) Aglycon 및 β-glucan의 구조 확인

가) IR

작용기 확인을 위해 IR을 이용하였다.

나) UV scan

200～600nm에서 UV를 scan하여 최대 흡광도를 확인하였다.

다) GC-MS/MS

Pazur등의 방법에 따라 분리된 다당체의 구조 동정은 acetyl화된 단당을 GC-MS를 사용하여 구조를 확인하고, periodate oxidation방법을 이용하여 연결구조를 밝히고, acetolysis방법을 이용하여 1→6 glycosidic linkage와 1→2, 1→3 linkage를 구분하고, methanolysis를 이용하여 다당체를 부분적으로 분해시켜 올리고당을 만들어서 분리 한 다음, 구성당 분석을 통해 구조를 동정하였다.

5. 기능성 조사

가. 항산화력 검증

1) Peroxide value (POV) 측정 : Thiocyanate method의 방법에 준하여 Ha 등의 방법을 응용하여 실험을 수행하였다.
2) Free radical scavenging activity (DPPH) :Fenton's reagent 방법에 의해 시료의 MA의 함량을 측정을 하였다.
3) Malaldehyde (MA) 측정 : 시료를 시간에 따라 반응시킨 다음, MA의 함량을 측정하였다.
4) Superoxide (O_2^-) assay: NBT reduction : RAW 264.7 cell (murine macro phage cell line)를 이용하여 측정한다.

나. 세포독성 및 항암성 (S-180 cell에 대한 독성 실험)

1) 배지조제: Dulbecco's Modified Eagle Medium을 사용
2) 전배양: S-180 cell을 mouse의 복강에서 회수한 다음 DMEM배지에 희석하여 사용하였다.
3) 세포독성실험: 1 ㎎/㎖ DDW로 조제한 시료를 미리 배양된 S-180 cell을 1.5×10^5 cell/㎖이 되게 희석하여 3 ㎖ 부피로 처리한다.

다. Mouse에 대한 항암성 (Mouse 항복수암 실험)

Female ICR mouse (6～7주령)를 cage당 10마리씩 넣고 S-180 cell (1×10^7 cell/㎖ PBS)을 각 mouse에 0.1 ㎖씩 복강에 주사하여 복수암을 유발한다. 복수암 유발 후 2일마다 시료 0.1 ㎖을 mouse의 복강에 주사한다.

라. 항관절염성

1) 골아세포 배양

골아세포 (ROS: rat osterosarcoma17/2.8)는 1%의 항생제와 10%의 fetal bovine serum이 함유된 DMEM 배양액을 이용하여 37℃ 5% CO_2 incubator에서 배양한다.

2) NO (nitric oxide) 생성

골아세포에서 NO의 측정을 알아보기 위해 LPS, TNF-α, IL-1β 단독에서 NO가 생성되는 지를 확인한다.

마. 면역성

1) Tumor necrosis factor의 역가 측정

Tumor necrosis factor (TNF)의 측정은 ELISA kit (Genzyme, Boston, MA)를 사용하여 시행한다.

2) 혈장의 C_3, IL-2 및 IL-6 농도를 측정

면역성분으로 혈장의 C_3, IL-2 및 IL-6 농도를 측정한다.

3) Marcrophage로부터 cytokines의 유도분비 조사

Balb/c 마우스에 1% thioglycollate를 1 ㎖ 복강주사하고 4일 후에 경추탈골법으로 마우스를 희생시킨 후, 복강에 RPMI 1640 배지 10 ㎖을 주입하고 복벽을 가볍게 두드려 복강내 세포를 잘 섞이게 한 후 복강내 세포 (peritoneal exudative cells; PEC)를 수집한다

6. 제품화기술 개발

가. 버섯균사체 추출물 제조

5 kl 배양조에서 배양된 양파와 녹차성분 함유 버섯균사체를 열수 추출법으로 추출할 것이다.

나. 균사체배양액과 엑기스 분리

1) 진동박막 분리장치 : 진동박막분리장치를 이용하여 균사체 추출물과 균사체를 분리

2) 한외여과장치: 분자량에 따라 분리·농축하는데 활용할 것이다.

3) 동결농축: 동결농축기술은 용액중의 물을 결정화 (ice화)한 다음, 제거하여 농축하는 기술로 시료를 건조하기 위해 동결전조 방법을 활용할 것이다.

4) 정제기술 : 반투막과 조절식 압력 활성 장치를 사용함으로써 분자 크기와 분자량이 멤브레인 분화 분자량 이하인 다른 물질은 막을 통과하고 투과물로 나오는 반면에 통과하지 못한 물질은 점차로 원액 흐름속에서 남게되는 기술로써 막의 크기에 따라 분자량 별로 정제

5) 정제 및 제제화

가) 버섯균사체 배양물에 양파 및 녹차추출물을 첨가하여 배양한 후 스프레이 드라이로 분말화

나) 버섯균사체 배양물을 배양하고 나서 양파 및 녹차분말을 첨하가여 스프레이 드리아로 분말화.

6) 엑기스화 및 음료화

양파와 녹차 버섯균사체배양액은 농축하여 엑기스로 제품화하거나 농축없이 음료원료로 사용할 것이다.

7) 원료소재

양파와 녹차버섯균사체를 분말화할 것이다.

7. 제품의 품질평가

가. 관능검사

개발된 향료의 품질평가 및 향의 특성을 알기 위해 미리 훈련된 7~30명의 penalist로 하여금 향의 특징을 description하게하고 그 중 많은 description을 얻은 향의 특징에 대해 품질을 descriptive sensory analysis 평가법에 의해 다시 측정한다.

나. 향기성분의 분석

1) Simultaneous distillation extractor (SDE)

2) 제제된 시료는 GC-Mass로 확인

다. 맛 성분의 분석

1) 유리당: HPLC로 분석한다

2) 유기산: C18-HPLC column으로 분석한다.

3) 유리아미노산: Spackerman등의 방법에 따라 아미노산 자동 분석기로 분석한다.

8.. 안전성 조사

가. 단회투여 독성실험 (급성)

500㎎/㎏=15㎕/30g의 시료를 각 처리구는 멸균 증류수를 사용하여 stock를 만들어서 희석하여 사용(Autoclave)하고 암·수 각 각 5마리씩 복강투여 volumn: 0.2㎖ (1회 복강투여)하여 시험할것이다.

측정은 일반증상 및 사망동물의 관찰, 체중측정, 부검, 통계학적 분석

나. 장기투여 독성시험 (아급성)

대조군으로 Saline을 사용하며 저용량 (500㎎/㎏=15㎕/30g, 1,000㎎/㎏=30㎕/ 30g), 고용량 (2,000㎎/㎏=60㎕/30g)을 암·수 각 각 10마리씩 강제 경구 투여로 경구로 투여할 volumn: 0.2㎖씩 매일 일정시간에 1시간 이내로 동물번호 순서대로 투여하여 각 개체별 투여시간을 유사하게하고 (매주 2회-월, 목). 30일 동안 1주일에 2번(월, 목)투여하고, 2번 body weight측정 (화,금)을 측정하고 부검 24시간 전 절식시킨 후 부검한다. 측정방법은 일반증상 및 사망동물의 관찰, 체중측정, 사료 섭취량 및 물 섭취량, 뇨검사, 혈액학적 검사, 혈액생화학적 검사, 조직병리검사, 장기 적출, 육안적 소견 및 장기중량, 조직병리 검사, 통계학적 분석

Ⅳ. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

1. 연구개발 결과

가. 버섯균주 선발

1) 녹차 및 양파추출물을 첨가한 고체배지 (PDA배지)에서 아가리쿠스, 영지, 느타리버섯의 균사체 생육이 활발 하였다.
2) 녹차 및 양파추출물을 첨가한 액체배지에서 아가리쿠스 균사체의 생육이 가장 활발하였음. 따라서, 아가리쿠스버섯을 배지조성시험 및 유효성분생성시험에 이용하였다.

나. 액체배양 배지조성 개발

1) HK기본배지의 제조는 대두박분해물 0.1%, 황백당 1.2%, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.0375%, KH_2PO_4 0.0375%가 첨가된 액체배지를 HK기본배지라 함
2) HK기본배지에 탄소원 및 질소원을 각각 0.3%씩 혼합하여 배양할 때 균사체의 성장은 일부증가하였으나, 유효성분 (β-glucan)의 생성은 비슷하거나 오히려 줄어들었다. 따라서 이후 실험에서는 HK기본배지에 녹차열수추출물과 양파열수추출물을 첨가한 배지를 사용하였다.
3) 균사체량과 β-glucan생성량으로 볼 때 녹차분말 (0.5%), 양파분말 (1.0%)을 HK기본배지에 첨가하여 배양하는 것을 선택하였다.

다. 배양조건 확립

1) 최적 배양조건 구명 [seed배양 및 소량배양]
   가) 삼각플라스크배양 (Seed 및 시험용액배양)에서는 25, 30℃에서 β-glucan의 생성이 가장높았다. 잡균오염에 대한 안전성을 고려할 때 25℃의 배양을 선택하였다.
   나) 변온에 의한 균사체 자극에 의한 추가적인 β-glucan의 생성능력은 없었다.
   다) 배양기간이 7일이상이되면 균사체의 개체성장보다는 부피만 커지면서 노화현상이 발생하여 seed 및 소량배양은 7일 이내 배양을 선택하였다.
2) 대량배양에서의 최적의 배양조건 구명

가) 녹차 및 양파분말을 추가로 첨가하여 녹차분말 0.5%, 양파분말 1.0%를 첨가한 배지에서 균사체의 함량과 β-glucan의 함량이 높았다.

나) 공기공급량 1v/v/m이었을 때 균사체의 생육이 양호하였다.

다) 배양온도 20, 25, 30℃ 범위내에서는 균사체의 생육과 β-glucan의 함량에 큰영향을 미치지 않았다.

라) 대량량배양에서 균사체의 생장은 3일이면 충분하며 그 이상 배양하면 균사체 크기는 커지지만 배양액표면에 균사체 노화 증거인 띠를 형성하였다.

라. 녹차와 양파에 버섯균사체가 분비한 효소를 처리하여 β-glucan과 phytochemical 배당체생성

1) 배당체생성 확인과 제품개발

가) 녹차분말과 양파분말을 기본 액체배지에 혼합하여 배양한시료에서 β-glucan과 phytochemical(catechin, quercetin)의 배당체가 생성되었다.

나) 버섯균사체배양물로부터 효소를 분리한 다음, 녹차와 양파중의 phytochemical (catechin, quercetin)과 버섯이 분비한 β-glucan을 효소반응시켜 배당체를 생성시키고자한 실험에서도 배당체가 생성되었다.

다) 버섯균사체배양물로부터 분리한 효소를 처리하였을 때, 제품의 향과 맛이 아주 좋은 제품이 개발되었음.

2) 배당체의 추출 및 분리

가) 녹차시료

(1) DEAE celluloase coloumn으로 80%에탄올침전물을 분리하였을 때 GT0.5시료로 부터 280nm에서 흡광을 갖는 2개의 peak를 얻었다.

(2) TLC로 분리한 결과 Rf 0.08, 0.18에서 DAP과 UV모두에서 발색되는 물질이 분리됨으로써 이들 두 개의 벤드가 β-glucan catechin배당체로 추정된다.

(3) HPLC에서 β-glucan catechin배당체를 재분리하였다.

나) 양파시료

(1) DEAE celluloase coloumn으로 80%에탄올침전물을 분리하였을 때 ON1.0시료로 부터 280nm에서 흡광을 갖는 4개의 peak을 얻었다.

(2) TLC로 분리한 결과 Rf 0.07, 0.12에서 DAP과 UV모두에서 발색되는 물질이 분리됨으로써 이들 두 개의 벤드가 β-glucan quercetin배당체로 추정된다.

(3) HPLC에서 β-glucan quercetin배당체를 재분리하였다.

3) 구조확인

가) GT0.5-80EP와 ON1.0-80EP는 616.96~540.33 cm^{-1}에서 흡광벤드가 나타남. 버섯균사체를 배양하지않은 녹차추출물과 양파추출물, 그리고 녹차추출물과 양파추출물을 첨가하지 않고 배양한 버섯균사체배양물에서는 발견되지않았다.

나) 이 특징적인 흡광벤드는 catechin과 quercetin표준품과 비교하였을 때, sharp하지 않고 board하게 나타난 것이 특징이다.

다) 특징적인 UV흡광은 GT-80EP는 279nm와 350nm이었으며, ON-80EP는 279nm와 557nm이었다.

라) GC-MS를 이용하여 구성당을 확인한 결과, GT0.5-80EP의 경우 Glucose, xylose, 그리고 ON-80EP의 경우는 Glucose와 mannose가 확인되었다.

마. 기능성 조사

1) 항산화효과

가) Peroxide value (POV)

(1) GT-80EP와 ON-80EP를 처리하였을 때 POV가 낮아 짐으로 항산화성이 있다.

(2) 처리 농도가 증가할 수록 POV의 감소가 크므로, 처리량에 따른 dose response를 보인다.

나) Free radical scavenging activity (DPPH)

(1) GT-80EP는 34.2%의 free radical 제거능을 보인다. GT-80EP의 용매분획물중 EtOAc분획물의 free radical 제거능은 78.5%로 BHT (79.9%)와 유사한 활성을 나타내었다. Dose response를 나타낸다.

(2) ON-80EP의 경우 21.3%의 free radical 제거능을 보임. ON-80EP를 용매분획한것중 EtOAc분획물의 free radical 제거능은 60.2%로 BHT (79.9%)보다는 약간 낮음. Dose response를 나타내다.

다) Maloaldehyde (MA) 측정

(1) GTC0.1-80EP의 MA생성억제효과는 대조군에 비해 53.7%로 BHT

(57.8%)와 유사한 생성억제능을 보임. 이것을 다시 용매분획한 분획물중 ethyl acetate분획물은 70.2%의 억제능을보이므로써 BHT보다 높았았다.

(2) ON1.0-80EP의 경우 용매분획물중 EtOAc분획물이 30.4%로 BHT (57.8%)보다는 약간 낮은 MA 생성억제능을 보였다.

라) Superoxide (O_2^-) assay: NBT reduction

GT0.5-80EP의 Superoxide (O_2^-) 제거능력은 처리구에 비하여 66%로 높은 Superoxide (O_2^-) 제거능력을 가진다.

2) 세포독성 및 항암성

가) S-180 cell에 대한 독성 실험

(1) GT0.5-80EP와 ON1.0-80EP는 각각 ED_{50} 값이 2.9와 3.9 ㎍/㎖로 S-180세포에 대한 독성이 AG-80EP (5.5 ㎍/㎖), GTE (8.1 ㎍/㎖), ONE (11.0 ㎍/㎖)보다 크다.

(2) 기본배지에 녹차 및 양파분말의 첨가량이 클수록 세포독성이 높음

3) Mouse에 대한 항암성

가) 마우스에 GT0.5-80EP와 ON1.0-80EP를 처리함으로써 32,4 (127%연장), 30.6 (120%연장)의 수명연장효과가 있었고, 암에 전혀 걸리지 않은 마우스도 각각 2마리 (20%)와 1마리 (10%)가 있었다.

나) 기본배지에 녹차분말을 첨가하는 량이 많을 수 록 대조군 (24.5일)에 비해 32.2, 36.6, 42.2일로 131, 136, 142%의 수명연장효가 있었으며 10~20%에서는 치유효과가 나타났다.

다) 기본배지에 양파분말을 첨가하는 량이 많을 수 록 대조군 (24.5일)에 비해 30.2, 31.3, 33.2일로 123, 128, 136% 수명연장효가 있었으며, 최고농도에서 10%의 치유효과가 나타났다.

4) 항관절염성

(1) MTT assay를 위한 시료 농도 결정시험에서 1 ㎍/10 ㎕의 농도가 정당하였다.

(2) Cytokine으로 활성화 시킨 ROS 17/2.8 cell의 NO 생성 억제 효과는 GTC0.1-80EP에서 34.4%로 가장 높은 NO억제 효과를 나타냄. 그 다음이 GT0.5-80EP이었다. 녹차추출물 또는 버섯균사체추출물보다 높은 억제 효과가 있었다.

(3) iNOS 발현이 가장적은것은 GTC0.1-80EP로 27.3%가 발현되었다.

4) 면역성

(1) LPS 1 ㎍/㎖, IL-1β 12.5 ㎍/㎖, TNF-α 25 ㎍/㎖을 처리하였을때 가장 높은 NO생성능력을 보인다.

(2) GT0.5-80EP, ON1.0-80EP의 섭취로 인하여 마우스의 T 세포와 B 세포의 증식을 증가시키고 혈장 C_3함량을 증가시키므로 GT0.5-80EP의 섭취가 일반적으로 면역 능력증진에 효과가 있었다.

(3) GT0.5-80EP, ON1.0-80EP의 섭취로 IL-1와 IFN-γ 생성능력이 향상되었다.

바. 제품화 기술개발

1) 버섯균사체녹차제품의 개발: 버섯균사체 배양물을 하등급의 녹차에 처리하여 발효시킨 제품으로, 향미가 우수하면서 여러 가지 생리활성을 갖는 고급 녹차가 개발되었다.

2) 양파제품의 경우는 차 또는 분말 보다는 액상제품으로 하는 것이 바람직할 것으로 생각되며, 양파음료의 단점인 양파향을 없애주며 기능성이 강화된 제품이 개발되었다.

사. 제품의 품질평가

1) 관능검사

가) GT0.5에서 맛과 향에서 기호도가 우수하였다.

나) ON1.0에서 맛과 향에서 기호도가 우수하였다.

2) 향기성분

맛과 향에서 기호도가 우수한 녹차제품 GT0.5의 향기성분

3) 맛

가) 녹차제품 (GT0.5)과 양파제품 (ON1.0)의 유리당 : sucrose, glucose, fructose.

나) 녹차분말 또는 양파분말을 첨가하지 않은 기본배지에 버섯균사체를 배양한 제품 (AP)는 oxalic acid와 succic acid함량이 높았다.

다) 녹차제품 (GT0.5)은 malic acid와 malonic acid의 비율이 높았다.

라) 양파제품 (ON1.0)은 oxalic acids와 succinic aicd의 비율이 높았다.

마) 녹차제품 (GT0.5) L-alanine, L-phenylalanine류의 아미노산 함량이 높았다.

바) 양파제품 (ON1.0)은 L-serine이 높았다.

아. 안정성

1) 급성독성 (단회투여독성)

GT0.25-80EP, GT0.5-80EP, ON0.5-80EP, ON1.0-80EP 시료를 각각 500㎎/kg mouse (15 ㎎/30 g) 경구투여시 급성독성을 보지지 않았다.

2) 장기투여 독성실험 (아급성)

GT0.25-80EP, GT0.5-80EP, ON0.5-80EP, ON1.0-80EP 시료를 각각 0, 15, 30, 60 ㎕/30 g mouse body weight 경구투여시 아급성 독성을 보지지 않았다.

2. 활용에 대한 건의

가. 국내외 특허출원을 할 것이다.

1) 특허명: 1. 버섯균사체액체배양기법을 이용한 버섯녹차제조방법과 기능성
2. 버섯균사체액체배양기법을 이용한 버섯양파제품의 제조방법과 기능

나. 현장지도 및 교육자료로 이용할 것이다.

1) 녹차를 재배하여 직접제다를 하는 소규모 농가에 기술교육과 현장지도를 할 것이다. 전남의 광양, 구례와 경남 하동등 늘어가는 녹차 농가에 버섯균사체를 이용한 기능서과 기호성을 증가시는 방법을 현장지도할 것이다.

2) 녹차를 2차가공하는 기업체에 기술이전 할 것이다. 버섯균사체를 이용하여 녹차와 접목하면 본기술에서 개발된 일부 내용을 적용하더라도 다양한 녹차 제품을 생산할 수 있다. 이러한 제품개발을 시도하는 업체에 기술을 이전할 것이다.

3) 양파시험장과 영계하여 양파가공업체에 기술지도 할 것이다. 양파가격의 하락과 보관비용의 절감을 위하여 양파가공업체에 본 기술을 이전 또는 지도하여 다향한 버섯균사체 양파 제품을 생산할 것이다.

SUMMARY

Mycelial growth of *Agaricus blazei*, *Ganoderma lucidum, Pleurotus ostreatus* on PDA medium containing green tea extract and onion extract was active. Mycelial growth of Agaricus blazei in submerged liquid culture containing green tea powder and onion powder was most active. Thus Agaricus blazei was selected for the following experiment.

All of the submerged liquid culture media are based on the basal medium developed by HK Biotech. Carbon source (0.3%) and nitrogen source (0.3%) in addition to basal medium were tested for the mycelial growth enhancement and β-glucan production. However, additional carbon and nitrogen source are not effective for the growth of mycelia and production of β-glucan. Therefore, green tea powder and onion powder were used for following experiment. Green tea powder (0.5%) and onion powder (1.0%) were selected for the following experiment considering the factors of β-glucan production and mycelial growth.

Optimum temperature for the production of β-glucan in the liquid culture of elenmyer flask was 25 and 30℃. Contamination of bacteria is less at 25℃, thus 25℃ was selected for the culture. Culturing periods of longer than 7days results enlargement of mycelial volume , and ageing of mycelia.

Dry weight of mycelia and β-glucan were high in the culture medium with green tea powder (0.5%) and onion powder (1.0%). The best airation condition for mycelial growth was 1v/v/m. Culturing period for the large size culture was in the best of 3days.

Catechin-β-glucan and quercetin-β-glucan were produced from mycelial culture in the medium containing green tea powder and onion powder. Catechin-β-glucan and quercetin-β-glucan were produced from the reaction of catechin and quercetin with β-glucan by enzyme from mushroom mycelial culture. Commercial product was developed from green tea treated with mushroom mycelial culture.

Two peaks (UV absorbance 280nm) were obtained from GT0.5-80EP by DEAE

cellulose coloumn chromatography. Two spot at Rf 0.08 and 0.18 on TLC were colored by DAP and UV. They are suspected as glycone of catechin-β-glucan. Glycone of catechin-β-glucan were re-separated by HPLC. Four peaks (UV absorbance 280nm) were obtained from ON1.0-80EP by DEAE cellulose coloumn chromatography. Four spot at Rf 0.07 and 0.12 on TLC were colored by DAP and UV. They are suspected as glycone of catechin-β-glucan. Glycone of catechin-β-glucan were re-separated by HPLC. Typical IR spectrum GT0.5-80EP and ON1.0-80EP are shown absorption band at 616.96~540.33 cm^{-1}. This absorption band are not shown from the sample of green tea extract and onion powder extract. Maximum UV absorbance were shown at 279nm and 350nm from GT-80EP, and 279nm and 557nm from ON-80EP. Sugar composition of GT0.5-80EP analyzed by GC-MS were Glucose and xylose, and of ON-80EP were Glucose and mannose.

POV of linoleic acid were lowered by treatment of GT-80EP and ON-80EP indicating that they exhibit antioxidant activity. Dose responses on the lowering effect of POV were shown by both samples. Free radical scavenging activity (FRSA, 34.2%) was shown by GT0.5-80EP. FRSA of ethyl acetate fraction from GT-80EP were 78.5%, that was similar with BHT activity (79.9%). Dose response was shown for FRSA. Free radical scavenging activity (FRSA, 21.3%) was shown by ON1.0-80EP. FRSA of ethyl acetate fraction from GT-80EP were 60.2%, that was lower than BHT activity (79.9%). Dose response was shown for FRSA. Inhibitory effect (53.7%) of GTC0.1-80EP on MA production was similar to BHT (57.8%). Inhibitory effect (70.2%) of ethyl acetate fraction from GTC0.1-80EP was higher than that of BHT. Inhibitory effect (30.4%) of ethyl acetate fraction from ON1.0-80EP was lower than that of BHT. Removal activity of Superoxide (O_2^-) of GT0.5-80EP was 66%, that is higher than control.

ED_{50} of GT0.5-80EP and ON1.0-80EP against S-180cell were 2.9 and 3.9 ㎍/㎖, respectively. Cytotoxicity of these two samples were higher than that of AG-80EP (5.5 ㎍/㎖), GTE (8.1 ㎍/㎖), ONE (11.0 ㎍/㎖). Dose response was shown on cytotoxicity of these samples. Life span of mouse were extended by treatment of GT0.5-80EP and ON1.0-80EP as 32,4 (127% extension), 30.6 (120% extension). Extension of life span showed for dose response with 131, 136, 142% compared with control. 10~20% of mice

were recovered from cancer. Extension of life span showed for dose response with 123, 128, 136% compared with control. 10% of mice were recovered from cancer. Inhibition (34.4%) of NO production in ROS 17/2.8 cell induced by Cytokine was high in the treatment of GTC0.1-80EP. iNOS expression (27.3%) was low by treatment of GTC0.1-80EP. Growth of T and B cell of mice were enhanced by treatment of GT0.5-80EP and ON1.0-80EP. Contents of Serum C_3 in the mice increased by treatment of GT0.5-80EP. The production of IL-1 and IFN-γ were increased by treatment of GT0.5-80EP. Green tea fermented with mushroom mycelia was developed. The high quality product was produced from low grade green tea. Drink was developed from submerged mycelial cultured with onion powder. The flavour of onion was improved by culturing mushroom mycelia.

Product developed with GT0.5 and ON1.0 were the best for the sensory quality. Free sugar from GT0.5 and ON1.0 were sucrose, glucose, and fructose. Oxalic acid and succic acid from mushroom mycelia cultured in basal medium, malic acid and malonic acid from GT0.5, oxalic acid and succinic acid from ON1.0, L-alanineand, L-phenylalanine from GT0.5, and L-serine from ON1.0 were quantitated.

No toxicity were observed in GT0.25-80EP, GT0.5-80EP, ON0.5-80EP, ON1.0-80EP from the results of acute and subacute test.

CONTENTS

Chapter 1 Summary of Research Project ····· 30

Part 1 Purpose of Research Project ····· 30
1. Goal of Research Project ····· 30
2. Purpose of devided project ····· 31

Part 2 Necessity of Research ····· 32
1. Technology view point ····· 32
2. Economics, industry, culture view point ····· 33

Part 3 Scope of Research ····· 35

Chapter 2 Current Status of Technology in Domestic and Abroad ····· 38

Part 1 Current status and issue of related technology in Domestic and Abroad ····· 38

Part 2 Effects of technology development ····· 42

Chapter 3 Results of Research ····· 44

Part 1 Methods of Research ····· 44
1. Selection of mushroom strains ····· 44
2. Development of composition of medium for the mycelial culture ····· 54

3. Culture condition ····· 47
A. Medium composition and strains ····· 47
B. Optimum culture condition [seed culture and small size culture] ····· 84
C. Optimum culture condition for the large size of culture ····· 84

4. Glycon production of β-glucan and phytochemical from culture medium with green tea powder and onion powder ····· 50
A. Identification of glycon production and product development ····· 50
B. Extraction and Isolation of glycon ····· 50

5. Biological activity ····· 53
A. Antioxidant activity ····· 53
B. Cell cytotoxicity and anticancer activity ····· 55
C. Anticancer activity on Mouse ····· 55
D. Antiarthritis ····· 55
E. Immune enhancement ····· 56

6. Development of product ····· 58

7. Quality test of product ····· 59
A. Sensory analysis ····· 59
B. Flavour compounds ····· 59
C. Components contributing to taste ····· 59

8. Safety test ····· 60
A. Acute toxicity test ····· 60
B. Subacut toxicity test ····· 61

Part 2 Results ····· 62
1. Selection of mushrom strains ····· 62
2. Development of composition of medium for the mycelial culture ····· 56
3. Culture condition ····· 71
A. Medium composition and strains ····· 71
B. Optimum culture condition [seed culture and small size culture] ····· 77
C. Optimum culture condition for the large size of culture ····· 74
4. Glycon production of β-glucan and phytochemical from culture medium with green tea powder and onion powder ····· 81
A. Identification of glycon production and product development ····· 83
B. Extraction and Isolation of glycon ····· 82
5. Biological activity ····· 99
A. Antioxidant activity ····· 99
B. Cell cytotoxicity and anticancer activity ····· 111
C. Anticancer activity on Mouse ····· 120
D. Antiarthritis ····· 124
E. Immune enhancement ····· 127
6. Development of product ····· 134
7. Quality test of product ····· 138
A. Sensory analysis ····· 138
B. Flavour compounds ····· 138
C. Components contributing to taste ····· 140
8. Safety test ····· 147

A. Acute toxicity test ····· 147
B. Subacut toxicity test ····· 156

Chapter 4 Achievement and Contribution ····· 171

Part 1 Achievement ····· 171
1. First year ····· 171
2. Second year ····· 172
3. Third year ····· 173

Part 2 Contribution ····· 174

Chapter 5 Application of developed technology ····· 176

Chapter 6 Overseas Scientific imformation obtained ····· 178

Chapter 7 References ····· 181

목 차

제 1 장 연구개발과제의 개요 ····· 30

제 1 절 연구개발 목적 ····· 30
1. 기술개발의 최종 목표 ····· 30
2. 단계별 목표 ····· 31

제 2 절 연구개발의 필요성 ····· 32
1. 기술적 측면 ····· 32
2. 경제·산업·문화적측면 ····· 33

제 3 절 연구개발 범위 ····· 35

제 2 장 국내·외 기술개발 현황 ····· 38

제 1 절 국내외 관련기술의 현황 및 문제점 ····· 38

제 2 절 기술개발의 효과 ····· 42

제 3 장 연구개발 수행내용 및 결과 ····· 44

제 1 절 연구수행 방법 ····· 44
1. 버섯균주 선발 ····· 44

2. 버섯균사체배양용 배지조성 개발 ····· 45

3. 배양조건 확립 ····· 47

가. 배지조성 및 균주 ····· 47
나. 최적 배양조건 구명 [seed배양 및 소량배양] ····· 48
다. 대량배양에서의 최적의 배양조건 구명 ····· 48

4. 녹차와 양파에 버섯균사체가 분비한 효소를 처리하여 β-glucan과 phytochemical 배당체생성 ····· 50
가. 배양체생성 확인과 제품개발 ····· 50
나. 배당체의 추출 및 분리 ····· 50

5. 기능성 조사 ····· 53
가. 항산화력 검증 ····· 53
나. 세포독성 및 항암성 ····· 55
다. Mouse에 대한 항암성 ····· 55
라. 항관절염성 ····· 55
마. 면역성 ····· 56

6. 제품화기술 개발 ····· 58
가. 버섯균사체 추출물제조 ····· 58
나. 균사체 추출물 제품의 생산 ····· 58
다. 버섯균사체액체 배양액을 이용한 분말 제품의 생산 ····· 58

7. 제품의 품질평가 ····· 59
가. 관능검사 ····· 59
나. 향기성분의 분석 ····· 59
다. 맛 성분의 분석 ····· 59

8. 안전성 조사 ····· 60
가. 단회투여 독성실험 (급성) ····· 60
나. 장기투여 독성시험 (아급성) ····· 61

제 2 절 연구결과 ····· 62
1. 버섯균주 선발 ····· 62

2. 버섯균사체배양용 배지조성 개발 ····· 65

3. 배양조건 확립 ····· 71
가. 배지조성 및 균주 ····· 71
나. 최적 배양조건 구명 [seed배양 및 소량배양] ····· 71
다. 대량배양에서의 최적의 배양조건 구명 ····· 74

4. 녹차와 양파에 버섯균사체가 분비한 효소를 처리하여 β-glucan과 phytochemical 배당체생성 ····· 81
가. 배양체생성 확인과 제품개발 ····· 81
나. 배당체의 추출 및 분리 ····· 82

5. 기능성 조사 ····· 99
가. 항산화력 검증 ····· 99
나. 세포독성 및 항암서 ····· 111
다. Mouse에 대한 항암성 ····· 120
라. 항관절염성 ····· 124
마. 면역성 ····· 127

6. 제품화기술 개발 ····· 134
가. 버섯균사체 녹차 ····· 134
나. 균사체 엑기스 제품의 생산 ····· 135
다. 버섯균사체양파음료 제조 ····· 136
라. 버섯균사체액체 배양액을 이용한 분말 제품의 생산 ····· 137

7. 제품의 품질평가 ····· 138
가. 관능검사 ····· 138

나. 향기성분의 분석 ····· 140
다. 맛 성분의 분석 ····· 142

8. 안전성 조사 ····· 147
가. 단회투여 독성실험 (급성) ····· 147
나. 장기투여 독성시험 (아급성) ····· 156

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도 ····· 171

제 1 절 목표달성도 ····· 171
1. 1차년도 ····· 171
2. 2차년도 ····· 172
3. 3차년도 ····· 173

제 2 절 관련분야 기여도 ····· 174

제 5 장 연구개발결과의 활용계획 ····· 176

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술 정보 ····· 178

제 7 장 참고문헌 ····· 181

용어정리 ····· 186

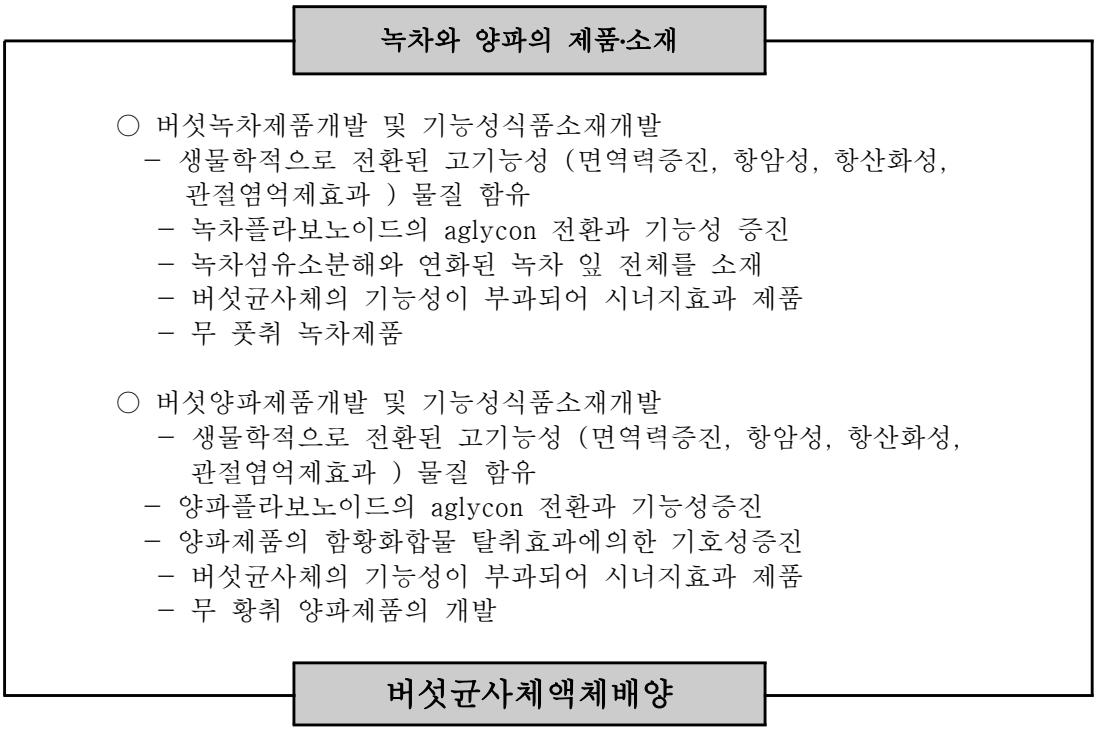
제 1 장 연구개발과제의 개요

제 1 절 연구개발의 목적

1. 기술개발의 최종 목표

가. 녹차와 양파에 함유된 phytochemical을 버섯균을 이용하여 bioconversion시킴으로써 항산화성, 항관절염성, 항당뇨성, 골다공증치료효과, 갱년기장애억제, 면역력향상, 항암효과 등의 기능성을 갖는 고 기능성 소재로 개발함과 동시에 녹차와 양파제품의 기호성을 향상시키는 기술개발 (두가지 기술: 녹차 또는 양파를 배지로하여 버섯균사체 배양기술, 버섯균사체 배양물과 녹차 또는 양파와 반응하는 기술)

나. 이러한 소재를 이용한 버섯균사체녹차제품 및 버섯균사체양파제품 개발과 기능성식품소재개발



2. 단계별 목표

1단계 (기초연구)	○ 녹차와 양파중의 phytochemical bioconcersion에 적합한 버섯균주 선발 ○ 배양 및 반응 조건구명 ○ 배양 및 반응물의 추출 및 정제 ○ 기능성조사 (면역력증진, 항암성, 항산화성, 관절염억제효과) ○ 기호성향상평가: 관능평가,휘발성향기성분분석
2단계 (응용연구 및 시제품제작)	○ 녹차와 양파를 배지로한 버섯균사체 대량생산 ○ 기능성 (면역력증진, 항암성,항산화성, 관절염억제효과)물질의 분리 및 구조추정 ○ 기호성 평가:관능평가,휘발성향기성분분석 ○ 제품화기술 개발 ○ 제품의 기능성조사 ○ 안전성조사: 급성/아급성 독성조사 ○ 시작품제품
3 단계 (사업화)	○ 녹차와 양파를 배지로한 버섯균사체 대량생산 ○ 제품화 -형태결정 -규격결정 -시장적용성조사 ○ 제품의 품질평가 -기능성: 유효성분함량 -기호성: 관능평가, 휘발성향기성분분석 -안전성: 급성, 아급성 독성시험

제 2 절 연구개발의 필요성

1. 기술적측면

가. 버섯균사체 배양에 의한 녹차나 양파 가공품의 기능성 증진 기술

1) 녹차, 양파, 버섯은 면역증진효과, 항산화성, 항암성, 관절염억제효과 등의 다기능성이 있는 소재로 오래전부터 사용되어왔다.

2) 녹차 중에는 카테킨이 기능성을 갖는 주요화합물임이 밝혀져있으며, 이와 유사구조를 가진 flavonoids 화합물이 당과의 배당체로 존재하면서 여러 가지 생리활성을 갖는 것으로 알려져 있다. 이들 flavonoids계 화합물은 배당체보다 비배당체 (aglycon)의 형태로써 고 기능성을 나타내는 것으로 보고되어있다.

3) 녹차를 발효시켜 만든 발효차는 발효과정에서 효소에의해 agycon으로 변화된 flavonoids에 의해 기능성이 증가하는 것으로 알려져 있다. 최근 중국에서 개발되어 수입되고 있는 보이차는 녹차에 비해 가격이 비싸지만 (2-10배) 그 소비량은 점점 늘어나고 있다. 가공공정상 시간이 더 많이 걸리고 복잡함이 고가의 원인이 된다.

4) 녹차나 양파를 함유하는 배지에 버섯균사체배양 또는 배양된 효소반응으로 flavonoids glycoside를 aglycoside로 전환이 가능하고, flavonoids의 생물학적 작용에 의해 기능성이 높은 flavonoid로 전환으로 기능성을 증가시킬 수 있다. 또한 항암효과가 우수한 flavonoid-β-D-glucan으로 전환이 가능하다.

나. 버섯균사체 배양에 의한 녹차나 양파 가공품의 기능성 시너지효과 창출 기술

1) 버섯균사체를 배양할 경우 녹차와 양파 중의 유효성분의 기능성과 기호성을 증진시킨다.

2) 또한 β-D-glucan과 같은 버섯균사체의 기능성을 부가함으로써 synergy효과를 얻을 수 있다.

다. 버섯균사체 배양에 의한 기호성 증진 기술

1) 버섯균사체배양에 의해 생성되는 B-glucan은 휘발성 황화합물을 흡착시키는

기능이 있어 섭취 시에 느끼는 역한 맛을 경감시킬 수 있어 양파를 이용한 기능성 제품의 활용성을 증진시키고 또한 녹차의 경우 풋내를 경감시켜 소비를 증대시킬 수 있다.

2) 버섯균사체 배양 시 다양한 효소반응에 의해 생성되는 물질에 의해 기호성이 부여된다.

라. 버섯균사체 배양에 의한 녹차 전체 잎 가공 기술

1) 녹차는 양파의 섬유소를 버섯균에 의해 분해함으로써 녹차 잎 전체 또는 양파 전체를 가공할 수 있다.

2. 경제·산업·문화적측면

가. 고부가가치 창출

면역증진, 항암보조, 항산화제, 관절염치료효과를 갖는 다기능성 건강보조식품 소재는 약 1조 500억으로 추정되는 국내 건강기능성식품시장과 약 650억불 규모로 추정되는 세계시장에서 수요가 급부상하고 있다. 따라서 고 기능성 버섯균사체 녹차 및 버섯균사체 양파 가공품 및 소재 개발은 국내뿐만 아니라, 국외에서도 고부가가치를 창출할 수 있다.

나. 부가가치가 높아 경제성이 있고, 가격이 저렴

현재 시판되고 있는 항암보조제, 면역증진제, isoflavone, flavonoids, β-D-glucan함유제품을 비롯한 기능성식품은 암예방과 성인병예방을 위해 지속적으로 복용하여야 되는데 비해 가격이 비교적 비싼 편이라, 경제적인 부담이 만만치 않다. 본 제품은 버섯균사체와 우리나라의 주요작물인 녹차와 양파를 소재로 하여 대량으로 생산될 수 있기에, 수요의 증가와 함께 소재자체의 원가가 저렴해질 수 있는 장점을 가지고 있다.

다. 녹차를 생산/가공하는 농가의 소득을 증대

녹차는 우리나라최고의 전통 다류이며 년간 약 천톤의 녹차가 생산되고있다. 녹차의 효능이 알려지면서 해마다 20-30%씩 소비가 증가되고 전남의 광양, 구례와 경남의 하동에서 재배 농가가 늘어나고 국산차 생산이 증가되고 있으나, 재래식가공기법에 의존하는 가내공업수준에 머무르고 있다. 고기능성 녹차제품생산은 녹차생산 농가나 제품생산업자의 소득 증대원이 될 것이다.

라. 양파소비의 증대와 양파생산농가의 소득증대

양파고추장, 양파음료, 양파농축액, 양파건면 등의 가공품 개발은 소비와 소득을 증대에 기여하고 있다. 그러나 음료, 농축액등의 경우, 상품의 기호성이 항상 문제시되어 시장 확대에 문제가 되고 있다. 따라서, 냄새를 제거하는 기술과 기능성 증진 기술개발은 이들을 해소할 수 있을 것이다.

마. 국내 수요 증대 및 수술 시장 확보

녹차, 양파, 버섯의 3대 주요 기능성 식품소재를 이용한 고기능성 신제품 개발 기술로 국내수요 및 수출시장 확보로 소득증대가 가능 할 것이다.

바. 수입대체를 위한 국내에서 생산이 가능

현재 사용되고 있는 기능성건강식품소재는, 많은 양을 수입에 의존한다. 최근 국내 기능성 식품이 소비가 급속히 늘어나는 만큼 외화유출이 심각하여 이를 대체할 수 있을 것이다.

사. 현대인에게 발병하는 갱년기 여성 및 성인병 예방 및 치료 가능

고 기능성과 영양성을 갖는 버섯균 이용 고기능성 녹차, 양파 제품 개발은 소비자의 건강 개념이 질병 치료에서 예방으로 전환되고 있는 추세에 활용될 것이다.

제 3 절 연구개발 범위

1. 버섯균사체 녹차 (음료, 분말, 정제)

가. 기술 I (버섯균사체 배양 효과)

녹차를 배지성분으로 사용하여 버섯균사체를 배양하여 녹차 phytochemical (catechin 등)을 고 기능성 phytochemical 형태로 생물전환 시켜 기능성 및 기호성을 증가시킴과 동시에 버섯균사체 배양액에 의한 기능성과 기호성을 부과하는 기술

나. 기술 II (효소반응 효과)

배양된 버섯균사체액의 효소를 이용하여 녹차의 기호성과 기능성을 증진시킴과 동시에 버섯균사체 배양액에 의한 기능성과 기호성을 부과하는 기술

2. 버섯균사체 양파 (음료, 분말, 정제)

가. 기술 I (버섯균사체 배양 효과)

양파를 배지성분으로 사용하여 버섯균사체를 배양하여 양파 phytochemical (quercetin 등)을 고 기능성 phytochemical 형태로 생물전환 시켜 기능성 및 기호성을 증가시킴과 동시에 버섯균사체 배양액에 의한 기능성과 기호성을 부과하는 기술

나. 기술 II (효소반응 효과)

배양된 버섯균사체액 중의 효소를 이용하여 양파의 기호성과 기능성을 증진시키과 동시에 버섯균사체 배양액에 의한 기능성과 기호성을 부과하는 기술

3. 제품의 특징

가. 생물학으로 전환된 고기능성 (면역력강화, 항암성, 항산화성 등) 물질 함유

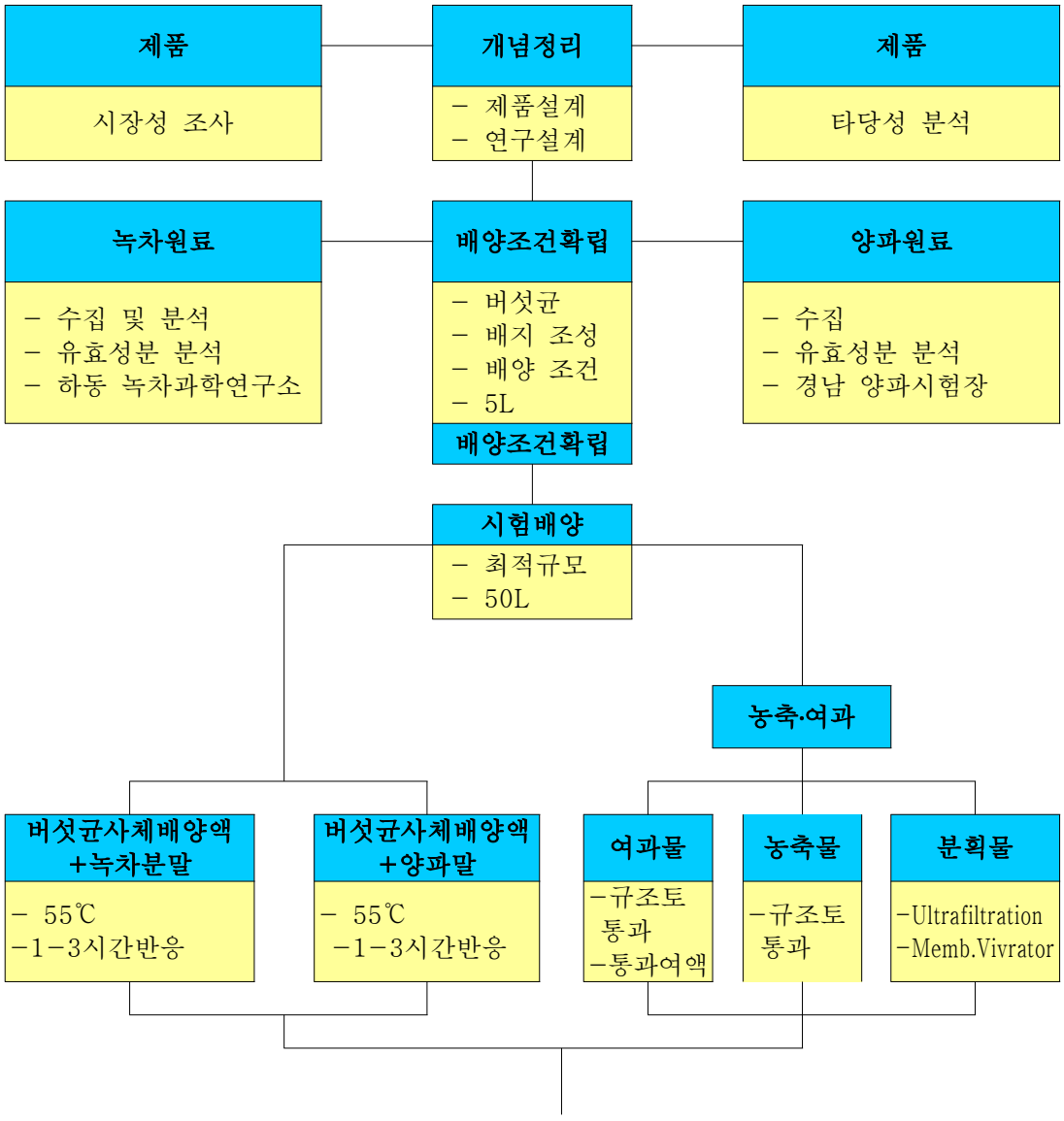
1)버섯균 glucosidase에 의한 catechin과 quercetin의 aglycon 전환과 기능성 증진

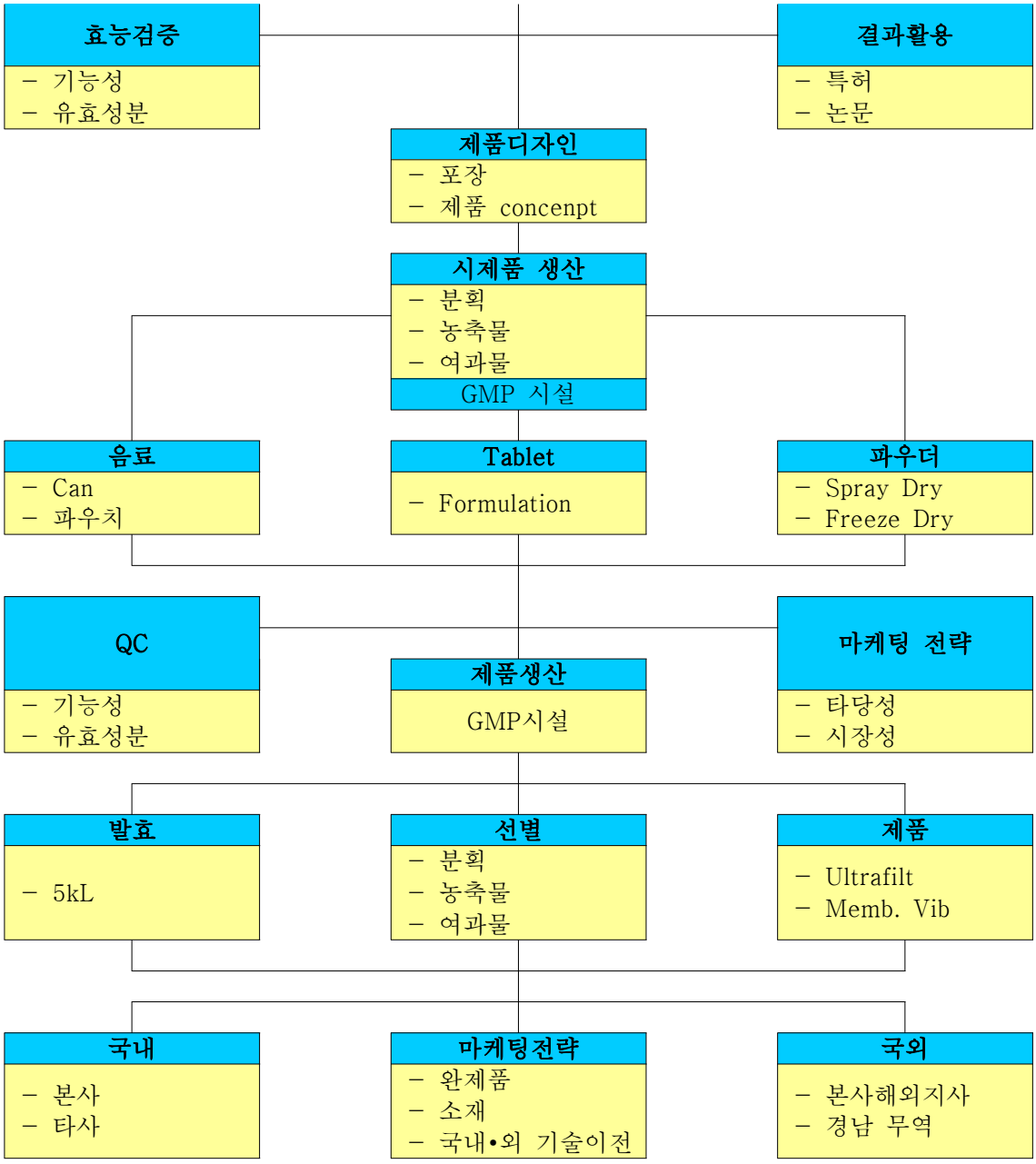
나. 버섯균효소를 이용하여 녹차 연화에 의한 녹차 잎 전체 함유

다. 버섯균사체의 기능성이 부과되어 시너지 기능성

라. 무 황취 양파제품, 무 풋취 녹차제품

4. 기술개발 추진체계


제품
시장성 조사
개념정리
- 제품설계
- 연구설계
제품
타당성 분석
녹차원료
- 수집 및 분석
- 유효성분 분석
- 하동 녹차과학연구소
배양조건확립
- 버섯균
- 배지 조성
- 배양 조건
- 5L
배양조건확립
양파원료
- 수집
- 유효성분 분석
- 경남 양파시험장
시험배양
- 최적규모
- 50L
농축·여과
버섯균사체배양액 +녹차분말
- 55℃
-1-3시간반응
버섯균사체배양액 +양파말
- 55℃
-1-3시간반응
여과물
-규조토 통과
-통과여액
농축물
-규조토 통과
분획물
-Ultrafiltration
-Memb.Vivrator


효능검증
– 기능성
– 유효성분
결과활용
– 특허
– 논문
제품디자인
– 포장
– 제품 concenpt
시제품 생산
– 분획
– 농축물
– 여과물
GMP 시설
음료
– Can
– 파우치
Tablet
– Formulation
파우더
– Spray Dry
– Freeze Dry
QC
– 기능성
– 유효성분
제품생산
GMP시설
마케팅 전략
– 타당성
– 시장성
발효
– 5kL
선별
– 분획
– 농축물
– 여과물
제품
– Ultrafilt
– Memb. Vib
국내
– 본사
– 타사
마케팅전략
– 완제품
– 소재
– 국내•외 기술이전
국외
– 본사해외지사
– 경남 무역

제 2 장 국내외 기술개발 현황

제 1 절 국내외 관련기술의 현황 및 문제점

1. 녹차를 이용한 기능성 식품개발의 현황과 문제점

가. 녹차제품의 개발현황

1) 녹차생산량의 증가

녹차중의 catechin과 같은 효능성분이 밝혀지고, 항산화성과 같은 효능이 식품의약품안전청으로부터 인정되면서, 해마다 20~30%씩 소비가 증가되고 전남의 광양, 구례와 경남의 하동에서 재배 농가가 늘어나고, 우리나라최고의 전통 다류로 자리메김하고 있으며 년간 약 천톤의 녹차가 생산되고 있다.

2) 일반적으로 제품개발은 가내공업 수준

제조기법이 재래식 가공기법에 의존하고 있고, 가내공업수준에 머무르고 있다.

3) 고급발효차의 수입 증가

제조기법에 따라 녹차에 함유되어있는 여러 가지 성분을 수용성성분으로 만들거나, 발효에 의해 보다 효능이 증진된 제품이 중국으로부터 수입되어 확산되고 있어 저급 국산차를 고급화할 수 있는 가공기법의 개발과 이를 기능성식품소재로 활용함으로써 고부가가치를 창출할 수 있다. 따라서, 녹차의 기능성을 살린 다양한 제품이 개발되고 이를 소재로 한 기능성 소재의 개발이 필요하다.

4) 다양한 녹차 첨가 제품 출시

녹차를 소재로하는 제품은 다른 식품에 단순히 첨가하여 혼합하는 정도로써 한미전두유(주) 에서 개발된 “콩두”, 쌀의 표면에 녹차농축액을 코팅하여 제조된 “녹차쌀” (전남농업기술원), 세안용화장품 “녹차팩”(한국콜마), 해태제과의 “녹차아이스크림 ”산녹차“, ”내안에 녹아든 차“, 빙그레의 요만때, ”녹차가다가올수록“, 롯데제과의 ”나뚜르“ 베스킨라빈스31의 ”녹차 아이스크림 케이크“ 등은 녹차의 기능성을 강조하는 고가 웰빙제품으로 판매 1위를 자랑하고 있다.

5) 녹차 가공품

녹차는 잎차, 티백형태의 다류제품, 그리고 음료 (캔)이 가장 많이 소비되고 있다.

나. 기존 녹차제품의 문제점 및 대책

1) 단순 가공으로 경제성이 결여

녹차는 잎을 사용하여 잎차를 생산하고 있는데, 부위별로 수확시기별로 등급이 나뉘어 지며 고급제품은 수량이 매우 작아 고가이다. 녹차 수확량의 대부분을 차지하는 분말 형 티백제품은 생산량은 많은데 비해 저가의 제품으로써 농가에서는 인건비도 건지기 어려울 때가 있다.

2) 대책

따라서 녹차재배농가의 소득증대를 위해서는 저급 녹차를 고기능성 제품으로 고급화하는 기술의 개발과 가공식품에 사용하기에 적합한 형태의 소재로 개발해야 한다. 이러한 문제는 버섯균사체배양 시 저급녹차를 배지 또는 배양물의 효소와 반응시켜 고기능성 녹차제품을 개발로 해결될 수 있을 것이다.

2. 양파를 이용한 기능성식품개발의 현황과 문제점

가. 양파제품의 개발현황

양파는 수요와 공급의 불균형에 의해 농가수익을 예측할 수 있는 작목중의 하나이다. 양파가격의 폭락과 급등을 반복하는 상황속에서도 이를 극복하기위한 농가, 산업체, 연구소 (창녕양파시험장)의 노력은 계속되고 있다. 이러한 노력에 의해 창녕양파고추장, 양파음료, 양파농축액, 양파건면 등이 상품화되어있다.

나. 기존 양파제품의 문제점 및 대책

1) 문제점

양파고추장은 일본에 12만불 수출계약을 할 정도로 우수성을 인정받았다. 그러나, 음료, 농축액등의 경우, 상품의 기호성이 문제가 되고 있다. 따라서, 냄새를 제거하는 기술개발 등 여러 가지로 기호성 향상을 위해 기술개발을 해왔지만, 커다란 성과를 거두지 못하고 있다.

2) **대책**

버섯균사체배양 시 양파를 배지 또는 배양물의 효소와 반응시켜 고기능성 양파제품(특히 음료) 개발로 해결될 수 있을 것이다.

3. 버섯균사체를 이용한 가공제품과 기능성식품의 개발현황

가. 버섯균사체를이용한 제품

면역증진용, 혈행개선에 도움을 주는 기능성식품으로 인정되고있다. β-Glucan을 주요성분으로하는 것으로써 일본과 미국으로부터 고가의 제품이 수입되었으며, 국내에서는 한국신약의 상황버섯유래 다당체 메시마를 비롯하여, 2-3개의 소규모 제조업에서 생산되고있다. 그러나, 2000년부터 (주)HK바이오텍에서는 버섯균사체의 대량배양 시설을 갖추고 아가리쿠스, 상황, 표고, 느타리버섯균사체를 비롯한 수종의 버섯균사체를 배양하고 그로부터 유래되는 기능성물질을 추출, 정제하는등 각각 다른 기능성을 가진 다양한 제품을 개발하여 국내시판 뿐만아니라, 일본수출로 버섯균사체제품의 종주국이라할 수 있는 일본시장에 도전하고있다.

나. 국외 제품개발현황

일본에서는 표고, 잎새 등 몇 가지 버섯균사체 배양물로부터 올리고당인 AHCC와 arabinoxylane을 생산하여 항암성 외에도 면역증강, 혈당저하기능 등을 갖는 기능성식품으로 생산 (아미노업사, 주 기린)하고있으며, 아가리쿠스버섯균사체를 이용한 기능식품이 과립, 정제, 액상형태의 고가 상품으로 국내에 수입되어 판매되고 있다.

다. 국내 제품개발 현황

한국신약이 상황버섯균사체 배양물로부터 항암성 올리고당을 추출하여 “메시마”로 상품화하였다. 이들 버섯균사체 올리고당은 항암성이 인정되었고, 이들의 항암 기전은 면역기능강화와 NK세포의 활성화로 암세포를 선택적으로 공격하여 사멸시키는 것으로 알려져 있다.

라. (주)HK바이오텍의 버섯균사체를 이용한 기능성식품소재개발 기술과 제품개발 현황

1) 아가리쿠스버섯균사체제품 (아가리쿠스 M 과 A plus)

아가리쿠스버섯균사체를 액체배양한 다음, 당사가 개발한 자가분해효소기법을

사용하여 고분자 다당체를 수용성 중저분자 다당체로 분해시켜서 만든 액상제품. 면역증진효과, 항당뇨성, 항관절염성, 항암성이 있는 제품

2) 노보미 (NOVOMI)

아가리쿠스버섯균사체의 액체배양물을 고농축한 다음, 항암치료시에 나타나는 구토를 억제시키는 분획물을 한외 여과장치로 분리한 다음, 액상으로 만든 제품

3) 머쉬-고 (MUSH-Go)

느타리버섯균사체로 부터 숙취해소음료로 개발된 제품

4) 아이윈 (IWIN)

표고버섯균사체와 아가리쿠스버섯균사체를 콩을 함유하는 배지에서 액상배양한 다음 분말화한 제품. 면역증진용 항암보조제로 개발됨

5) 글루본 파우더 (GLUBON POWDER)

아가리쿠스버섯균사체와 표고버섯균사체를 콩배지에 액체배양함으로써 Gluvone (Genestein-β-D-glucan)을 생성시킨 제품이며, 이는 genestein의 β-D-glucan 배당체로써 기존의 aglycone 또는 glucan에 비해 기능성이 우수하고 과량투여 시에도 독성이 없어 시장성이 기대되는 제품임. 현재 일본 수출용으로만 사용

6) 글루본의 특징

가) 대장암 (Caco-2 cell), 폐암 (A549 cell) 등의 암세포 생장을 억제하고 사멸시키는 효과를 보였으며, S-180과 같은 쥐의 복수암 세포에도 동일한 효과를 보임.

나) 타 항암제와는 달리 부작용이 없고, 면역기능의 증강과 함께 암세포만을 선별적으로 사멸시킨다는 획기적인 소재로써 현재, 면역증진용, 항암보조용으로 사용될 수 있도록 한국, 일본, 미국에 특허출원중임.

제 2 절 기술개발의 효과

1. 기능성과 기호성 증대 방법 개발

가. 양파와 녹차성분의 bioconversion에 의한 고기능성 (면역력강화, 항암성, 항산화성, 관절염치료보조제기능) 물질생성이 기대됨

나. 버섯균사체의 기능성분과 양파/녹차성분의 시너지효과가 있는 제품개발이 기대됨

다. 버섯균사체가 생성하는 glucosidase에의한 녹차catechin과 양파 quercetin의 aglycon 생성과 기능성증진이 기대됨

라. 버섯균사체 배양에의한 양파가공식품의 함황화합물의 탈취효과로 양파를 이용한 기능성식품의 기호성증진이 기대됨

마. 버섯균효소를 이용하여 녹차의 섬유소를 연화시킨 다음 가공식품으로 개발함으로써 녹차잎을 통째로 섭취할 수 있는 기능식품의 개발이 기대됨

바. 녹차와 양파를 이용한 다기능성 소재개발이 기대됨

2. 농업생산성 증대 및 소득 증대

가. 양파재배농가의 소득증대

채소생산액중 4.0%를 점유하는 작물로써 생산액이 증가하는 작목임. 양파의 기능성에 대한 소비자 인지도가 높아짐에따라 소비량이 증가하는 작물로써 년간 약 100만톤이 생산된다. 그러나, 수급과 공급의 불안정으로 2001년의 경우 13천톤이 산지폐기되었으며 10천톤을 정부가 수매하였다. 이때 소요된 정부가격안정 투입금액은 32억원이지만, 재배면적과 생산량은 지속적으로 늘어나고있다. 지금까지는 국산양파의 품질이 우수하여 미국과 중국등에 수출하고있지만, 차츰 중국산 양파의 품질향상과 저가에 밀려, 대책마련이 시급하다. 이러한 측면에서 버섯양파제품의 개발은 양파 소비를 증대시킬 수 있어 농가소득증대가 기대된다. 수요와 공급의 불균형해소로 양파생산의 안정화

나. 녹차를 생산/가공하는 농가의 소득증대가 기대된다.

저급녹차를 고급화시키는 기술을 개발하여 농가에 보급함으로써 농가의 소득 증대가 기대됨.

다. 양파제품의 기능성증대와 품질향상

양파가공식품의 기호성증진으로 인한 양파소비의 증가와 이로 인한 양파생산농가의 소득증대가 기대됨. 양파를 함유하는 배지에 버섯균사체를 배양하거나, 버섯균사체를 배양한 다음, 양파추출물에 혼합함으로써 양파특유의 역겨운 냄새는 없애주고 quercetin과같은 기능성성분을 aglycon향태로 전환시킴으로써 기능성을 증진시키는 효과를 얻을 수 있다. 본 기술의 개발은 양파제품의 기호성을 향상시킬 수 있어 양파의 소비가 증가될 수 있으며, 양파재배농가의 소득증대가 기대됨

라. 기업의 생산 매출 및 고용 창출

녹차, 양파, 버섯균사체를 이용한 면역증진, 항암보조, 항산화제, 관절염치료효과를 갖는 다기능성 건강보조식품소재는 약 1조 500억으로 추정되는 국내 건강기능성식품시장과 약 650억불 규모로 추정되는 세계시장에서 고부가가치를 창출할 수 있을 것으로 기대됨.

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 1절 연구수행 방법

1. 버섯균주 선발

녹차와 양파중의 phytochemical bioconcersion에 적합한 버섯균주선발

가. 고체 배지에서의 버섯균주의 선발

1) 버섯균주의 배양

녹차 또는 양파 동결건조물 (고형분함량 90%이상) 열수추출물을 10% (w/v) 첨가한 PDA 배지에서의 버섯균주의 활성화 및 균사생장을 조사하였다. ㈜HK바이오텍이 보관중인 70여 버섯균주 중 예비실험을 거쳐 선발된 (Table 1) 버섯균주를 녹차 및 양파 열수추출물이 함유된 PDA배지에 일정량 (8 ㎜ i.d)을 접종하여 항온기 (25℃, 14일)에서 배양하면서 균사의 생육 정도를 조사하였다.

Table 1. Used mushroom strains

Abbriviation	Korean Name	Scientific Name
AB	신령버섯	*Agaricus blazei*
PO	느타리버섯	*Pleurotus ostreatus*
GL	영지버섯	*Ganoderma lucidum*
LE	표고버섯	*Lentinus edodes*
PJ	동충하초	*Paecilomyces japonicus*
PL	상황버섯	*Phellinus linteus*
GF	잎새버섯	*Grifola frondosa*

나. 액체 배지에서의 균주선발.

1) 액체배지의 조제

대두박분해물 0.1%, 황백당 1.2%, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.0375%, KH_2PO_4 0.0375%가 첨가된 액체배지를 HK기본배지라 명명 하였다.

2) 버섯균사체 액체배양

HK기본배지 300 ㎖을 500 ㎖ 용량의 삼각플라스크에 첨가하고 고압멸균 (121℃, 30분)한 다음, 실온에서 충분히 식힌 후 PDA배지에서 생육한 버섯균주 (1/4 petri dish/△flask)를 지름 5 ㎜이하로 잘게 잘라 접종하고 shaking incubator (120 rpm, 25℃)에서 배양하였다 (**Figure 1**).

Figure 1. Submerged culture of mushrooms.

2. 버섯균사체배양용 배지조성 개발

가. Phytochemical bioconversion에 적합한 기본 액체배지 (Know-How)

대두박분해물 0.1%, 황백당 1.2%, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.0375%, KH_2PO_4 0.0375%가 첨가된 액체배지를 HK기본배지라 명명 하였다.

나. Phytochemical bioconcesion에 적합한 소재 생산을 촉진시키기 위해 기본배지에 추가로 사용될 성분

1) 탄소원 0.3% 첨가배양

HK기본배지에 탄소영양원으로 glucose, fructose, xylose, rhamnose, ribose를 각각 0.3% 첨가하여 액체배지를 조제하였다. HK기본배지에 각각의 탄소원 0.3%가 혼합된 액체배지를 멸균 (121℃, 20분)한 다음 신령버섯균사체 액체배양 종균을 5% 접종한 다음 shaking incubator (25℃, 120rpm, 7일) 배양하였다.

2) 질소원 0.3% 첨가배양

HK기본배지에 질소영양원으로 proline, hydroxyproline, serine, threonine, cysteine, phenylalanine, leucine, glycine을 기본배지에 각각 0.3% 첨가하여 액체배지를 조제하였다. HK기본배지에 각각의 질소원 0.3%가 혼합된 액체배지를 멸균 (121℃, 20분)한 다음 신령버섯균사체 액체배양 종균을 5% 접종한 다음 shaking incubator (25℃, 120rpm, 7일) 배양하였다.

3) 녹차 0.1, 0.5, 1.0% (w/v) 첨가배양

HK기본배지에 신령버섯균사체 액체배양종균을 5% 접종한 후 전배양 (shaking incubator, 25℃, 120rpm, 3일)하여 균사체 적응시킨 다음 녹차고형분을 각각 0.1, 0.5, 1.0% (w/v) 추가하여 후배양 (shaking incubator, 25℃, 120rpm, 4일)하였다.

4) 양파 0.1, 0.5, 1.0% (w/v) 첨가배양

HK기본배지에 신령버섯균사체 액체배양종균을 5% 접종한 후 전배양 (shaking incubator, 25℃, 120rpm, 3일)하여 균사체 적응시킨 다음 양파고형분말 각각 0.1, 0.5, 1.0% (w/v) 추가하여 후배양 (shaking incubator, 25℃, 120rpm, 4일)하였다.

5) 균사체 배양 및 유효성분 분석

가) 균사체 함량분석

균사체의 무게는 배양이 완료된 액체균사체를 원심분리 (10,000 rpm, 10 min, 4℃)하여 무게를 측정하였다.

나) β-glucan 함량측정

검체 약 2 g을 정밀히 달아 삼각플라스크에 취하고 물 100㎖을 가하였다. 여기에 α-amylase (Sigma, Co. Ltd.) 약 780 unit을 취하여 넣고 0.1N NaOH로 pH 6.9로 한 후 20℃에서 2시간동안 진탕하여 효소분해 시켰다. 이어서 protease (Sigma, Co. Ltd.) 약 110 unit을 넣고 0.1N NaOH로 pH 7.5로 한 후 37℃에서 2시간동안 진탕하여 효소분해 시켰다. 이어서 Amyloglucodisase (Fluka Co. Ltd.) 약 1,494 unit을 넣고 0.1N HCl로 pH 4.8로 한 후 60℃에서 2시간동안 진탕하여 효소분해 시켰다.

효소분해물에 95% 에탄올 400㎖을 가하여 4℃에서 12시간 동안 침전시킨

후, 원심분리(10,000rpm, 10분, 4℃)하여 검체의 침전물을 취하고, 다시 80% 에탄올 500㎖을 침전물에 가하여 4℃에서 1시간 동안 2차 침전을 유도한다음, 원심분리(10,000rpm, 10분, 4℃) 하였다.

원심분리된 침전물에 물을 가하여 100㎖로 보정한다음 적정 농도로 희석하여 시험용액으로 사요하였다. 글루칸 함량은 Phenol-H_2SO_4 방법에 의하여 총당함량을 측정한다음 아래의 계산식에 준하여 함량을 측정하였다.

$$\beta\text{-glucan함량(㎎/g)} = \Delta E \times 1{,}000(A) \times \frac{1}{1{,}000}(B) \times \text{희석배수} \times \frac{162}{180} \times \frac{1}{W}$$

$$= \Delta E \times \text{희석배수} \times 0.9 \times \frac{1}{W}$$

- ΔE (glucose, ㎍/0.1㎖) : 흡광값으로부터 계산된 glucose 함량
- 1000(A) : 시험용액 0.1㎖을 100㎖로 환산
- $\frac{1}{1000}$ (B): ㎍을 ㎎으로 환산수치
- 희석배수 : 상기의 시험용액조제에서 희석된 희석배수 값
- $\frac{162}{180}$: β-glucan 상수값
- W : 시료량(g)

다) Brix 측정

Brix meter (ATAGO, Japan) 를 이용하여 20℃에서 측정하였다.

라) Viscosity 측정

Visco meter (Viscobasic+L, Barcelona, Spain)를 이용하여 20℃에서 측정하였다.

3. 배양조건 확립

가. 배지조성 및 균주

사용균주는 상기 "1."의 결과에서 따라 균사체의 생육과 phytochemical bioconcesion에 용이한 신령버섯균사체를 선별하여 배양에 이용하였다.

배지조성은 상기 "2. 나."의 결과에 따라 균사체의 생육이 용이하고 β-glucan

생성에 용이하며 대량배양시 배양원가 절감에 적합한 배지인 HK기본배지를 이용하여 배양하였다.

나. 최적 배양조건 구명 [seed배양 및 소량배양]

1) 배양온도

가) 항온 배양

대량배양의 seed 배양 및 균사체의 시료의 시험에 사용할 균주를 배양하여 위하여 HK기본배지 (300㎖)에 이미 배양이 완료된 신령버섯균사체 배양물 5% (약 15㎖)을 첨가하여 10, 20, 25, 30, 37℃로 조정된 shaking incubator에서 배양 (120rpm, 7일)하여 β-glucan의 함량으로 균사체의 생육정도를 확인하였다.

나) 변온 배양

항온배양과 동일한 균사체와 배지를 사용하였다. 신령버섯균사체를 25℃에서 5일 동안 배양한 후, 4℃와 10℃로 온도를 조정한다음, 4일간 재배양 시키고 4℃와 10℃에서 변온 배양한 균을 다시 25℃에서 3일간 계속 배양하였다. 균사체의 β-glucan의 함량으로 변온 조건하에서 균사체의 생육정도를 확인하였다.

2) 배양기간

상기 "1), 가)"의 방법과 동일한 조건하에서 균사체를 각각 7, 9일간 배양시켜 균사체 무게를 (wet weight) 조사하여 균사체의 생육정도를 확인하였다.

다. 대량배양에서의 최적의 배양조건 구명

1) 배지조성별 배양

가) 녹차와 양파성분함유 버섯균사체 대량생산을 위한 seed 배양

상기 "3. 가"의 방법에서 준하여 배양하였다. HK기본배지를 멸균 (300 ㎖, 121℃, 30분)한 다음, 실온에서 충분히 식힌 후 PDA배지에서 생육한 버섯균주 (1/4 petri dish/△flask)를 지름 5 ㎜이하로 잘게 잘라 접종하고 배양 (shaking incubator, 120 rpm, 25℃, 7일) 하였다.

나) 녹차 동결건조물 첨가 액체배지의 배양

HK기본배지에 추가로 녹차동결건조물 분말 0.125, 0.25, 0.5% (w/v)을 각각 추가로 첨가하여 5L 용량의 J-fermenter에 배지를 3.4L 첨가하고 멸균 (121℃, 20분)하였다. 멸균된 배지에 상기 "가)"의 방법으로 배양된 신령버섯 균사체를 2병 (600㎖) 접종하여 배양 (J-fermenter, 1 v/v/m, 25℃, 3일)하여 균사체의 생육정도를 확인하였다.

다) 양파 동결건조물 첨가 액체배지의 배양

HK기본배지에 추가로 양파동결건조물 분말 0.25, 0.5, 1.0% (w/v)을 각각 추가로 첨가하여 5L 용량의 J-fermenter에 배지를 3.4L 첨가하고 멸균 (121℃, 20분)하였다. 멸균된 배지에 상기 "가)"의 방법으로 배양된 신령버섯 균사체를 2병 (600㎖) 접종하여 배양 (J-fermenter, 1 v/v/m, 25℃, 3일)하여 균사체의 생육정도를 확인하였다.

2) 공기공급량

상기 "1)"의 방법과 동일하게 균사체를 접종한 다음 통기량을 0.1, 0.5, 1.0 v/v/m로 달리하여 주입하여 배양 (J-fermenter, 25℃, 3일)하여 균사체의 생육정도를 조사하였다. 대량배양기에서는 공기주입량에 따라 균사체의 생육에 다른 영향을 미칠 수 있다.

3) 배양온도 결정

상기 "1)"의 방법과 동일하게 균사체를 접종한 다음 배양온도를 20, 25, 30℃로 달리하여 주입하여 배양 (J-fermenter, 1 v/v/m, 3일)하여 균사체의 생육정도를 조사하였다.

4) 배양기간 결정

상기 "1)"의 방법과 동일하게 균사체를 접종한 다음 배양기간을 3, 4, 5일로 달리하여 주입하여 배양 (J-fermenter, 1 v/v/m, 25℃)하여 균사체의 생육정도를 조사하였다.

4. 녹차와 양파에 버섯균사체가 분비한 효소를 처리하여 β-glucan과 phytochemical 배당체생성

가. 배양체생성 확인과 제품개발

1) 자가분해 반응에 의한 배당체 확인

녹차분말 또는 양파분말을 500 ㎖ 삼각플라스크에 담고 신령버섯균사체 배양액을 녹차 및 양파분말 분량에 대해 무게에 대한 비율 (1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 1:10, 1:20)로 첨가한 다음, 55℃에서 3시간동안 반응시켜 버섯균사체가 분비하는 효소처리에 의한 기능성분의 분리를 실시하였다.

2) 버섯균사체 배양물에 의한 배당체 확인

HK기본배지 및 녹차동결건조물 0.125, 0.25, 0.5%와 양파동결건조물 0.25, 0.5, 1.0% (w/v)을 함유한 배지에서 배양 (J-fermenter, 1 v/v/m, 3일, 25℃)된 배양물을 열수추출 (100℃, 60분)법에 준하여 균사체를 열수추출하여 열수 추출물을 얻었다. 열수 추출된 추출물을 이용하여 기능성성분의 추출 및 분리를 실시하였다.

나. 배당체의 추출 및 분리

1) 용매추출 및 분획

녹차분말을 첨가한 균사체배양물을 hexane (1:3, v/v)로 추출하여 여과한 다음, 여액에 chloroform을 (1:3, v/v) 비율로 첨가한 다음, 추출/분리하고, 분리된 상층에 ethylacetat을 (1:3, v/v)의 비율로 첨가하여 다시 ethylacetate층을 분리하고 남은 여액에 butanol (1:3, v/v)의 비율로 첨하여 butanol 층을 분리하였다 (**Figure 2**).

양파분말을 첨가한 균사체 배양물을 hexane (1:3, v/v)로 추출하여 여과한 다음, 여액에 chloroform을 (1:3, v/v) 비율로 첨가한 다음, 추출/분리한다. 분리된 상층에 ethylacetat을 (1:3, v/v)의 비율로 첨가하여 다시 ethylacetate층을 분리하고 남은 여액에 butanol (1:3, v/v)의 비율로 첨하여 butanol 층을 분리하였다.

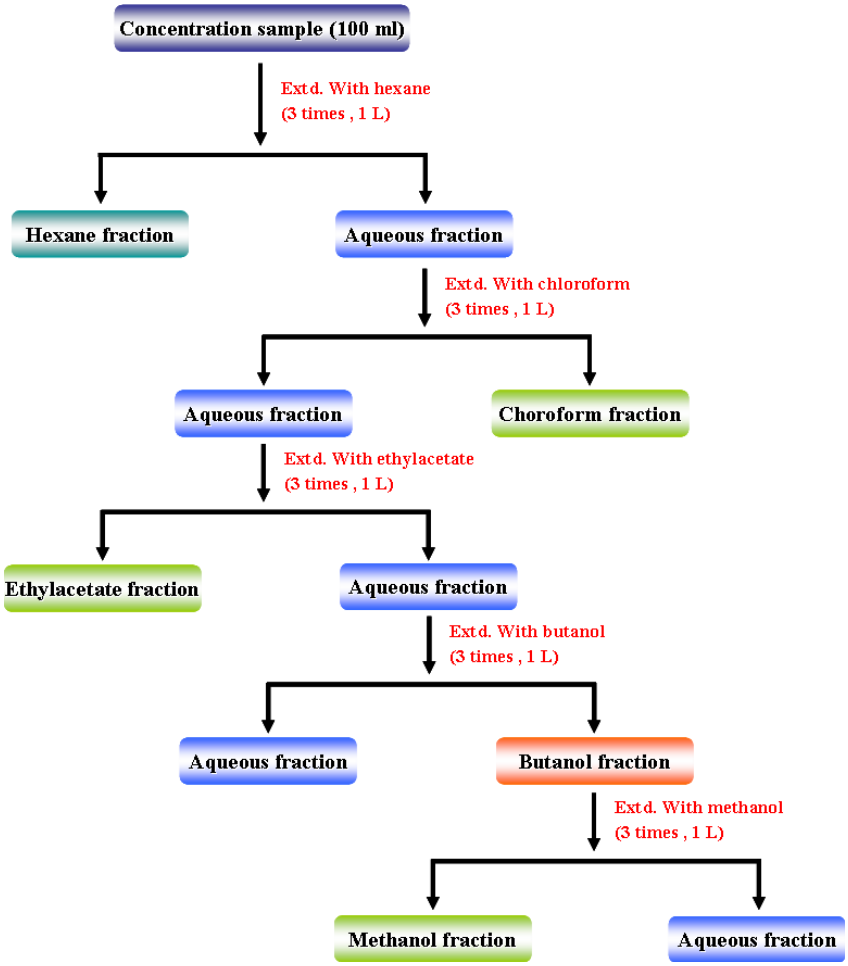


Figure 2. A flow diagram for the fractionation of freeze-dried materials from green tea 0.5% (w/v) and onion 1.0% (w/v) add the submerged liquid culture of *Agaricus blazei*

2) 에탄올 침전물 조제

녹차분말 및 양파분말을 첨가하여 배양한 버섯균사체 배양물을 열수 추출한다음 시료를 1/10로 농축하였다. 10배 농축액 100 ㎖에 에탄올 농도가 각각 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90%가 되도록 농도를 증가시키면서 분획하였다. 각 분획물을 4℃ 냉장고에서 12시간 방치시켜 침전을 유도한 다음, 원심분리 (10,000 rpm, 10분, 4℃)하여 상등액과 침전물을 분리하였다.

3) DEAE column chromatography

DEAE cellulose column (2.2×110 ㎝)에 5 mM sodium phosphate buffer (pH 7.7)로 충진 시키고 동일한 buffer로 column을 세척 (300 ml)하였다. HK기본배지에 녹차분말 0.5% (w/v)을 첨가하여 배양한 버섯균사체 배양추출물의 80% 에탄올 침전물 2 ml (0.424g/ml)를 loading 한 후 5 mM sodium phosphate buffer (pH 7.7)를 mobile phase로 하여 fraction collector (Pharmacia Biotech RediFrac)를 이용하여 10 ml씩 collection하였다. 분리된 분획물들은 UV spectrum (Backman p-680 spectrophotometer) 을 이용하여 280 ㎚에서 흡광을 확인하였다.

HK기본배지에 양파분말 1.0% (w/v)을 첨가하여 배양한 버섯균사체 배양추출물의 80% 에탄올 침전물 2 ml (0.423g/ml)를 loading한 후 5 mM sodium phosphate buffer (pH 7.7)을 mobile phase로 하여 fraction collector를 이용하여 10 ml씩 collection하였다. 분리된 분획물들은 280 ㎚ UV spectrum으로 확인하였다.

4) TLC에서의 확인

DEAE column chromatography에 의해 분리된 분획물을 다시 TLC (Silica 60 F-254 plate, 5 × 10 ㎝)를 사용하여 분리하였다. 표준물질로는 DP7 (Maltoheptaose), DP5 (Maltopentaose), DP3 (Maltotriose), 녹차배양물의 경우 catechin을 양파배양물의 경우 quercetin을 사용하였다. 전개물질은 녹차 0.25, 0.5% 배양물과 양파 0.5, 1.0% 배양물이었다. 전개 용매로는 Butanol:Ethanol: H_2O를 5:3:3 (v/v/v)을 전개용매로 사용하였다. 발색시약은 DAP (Diphenylamine Aniline Phosphoric acid)를 사용하였다.

5) HPLC 분석

녹차 및 양파분말을 첨가한 배지에서 배양된 버섯균사체 배양액 80EPP를 시료를 HPLC [Dionex PDA-100 UV detector, P-680 pump, ASI-100 fraction collector, TSK-GEL column (4.6 ×250 ㎜, TOSOH), Flow rate; 1 ml/min), Moblie phase; deionized water, Oven temp 25℃]를 이용하여 분석하였다. UV의 흡광도는 257, 260, 280 ㎚의 3파장을 측정하였으나 효소활성과 관련된 280 ㎚에서의 함량변화를 조사하였다.

6) Aglycon 및 β-glucan의 구조 확인

가) IR

녹차 및 양파분말에서 배양된 버섯균사체추출물의 80EEP의 구조분적을 위하여 KBr을 대조구로 하여 FT-IR spectrum (BRUKER IFS 48)을 측정하였다. KBr pellet은 KBr분말을 130℃에서 24시간 가열건조한 후 데시케이타에서 방냉시키킨 다음, KBr 200 ㎎을 700 ㎏/㎠의 압력하에서 성형한 다음 시료 30 ㎎/㎖ 농도로 희석된 시료액 100 ㎕을 KBr cell에 떨어트린 다음 건조하여 측정하였다.

나) UV scan

녹차 및 양파분말을 첨가하여 배양한 버섯균사체 추출물이 녹차유래의 catechin과 양파유래의 quercetin이 버섯균사체가 분비하는 효소에 의해 β-glucan과 결합된 형인지를 확인하기 위하여 catechin과 quercetin의 특이한 UV/Vis 흡수 pattern과 비교하여 확인하였다. UV spectrum (Backman C-680 spectrophotometer)에서 흡광값 (200~600)을 scan하여 이들의 최대흡광도와 흡광 pattern을 비교 측정하였다.

다) GC-MS/MS

Pazur등의 방법에 따라 분리된 다당체의 구조 동정은 acetyl화된 단당을 GC-MS를 사용하여 구조를 확인하고, periodate oxidation방법을 이용하여 연결구조를 밝히고, acetolysis방법을 이용하여 1→6 glycosidic linkage와 1→2, 1→3 linkage를 구분하고, methanolysis를 이용하여 다당체를 부분적으로 분해시켜 올리고당을 만들어서 분리 한 다음, 구성당 분석을 통해 구조를 동정하였다.

5. 기능성조사

가. 항산화력 검증

1) Peroxide value (POV) 측정

대조군을 Linoleic acid (LA, 275 μmol)와 LA + 375 nmol BHT, LA + 375 nmol α-Tocopherol, LA + 375 nmol ascorbic acid를 사용하고 시료는 LA + 20, 50, 100 ㎍/㎖ 녹차 및 양파분말 함유 배양 신령버섯균사체 80EPP을 사용하였다. 각각의 대조군과 시료에 10 ㎖의 0.2M sodium phosphate buffer (pH 8.0), 4.5 ㎖의 DDW, 10.5 ㎖의

HPLC용 ethanol 혼합용액에 녹여서 shaking incubator (200 rmp, 40℃)에서 16일 동안 반응시켰다. Linoleic acid oxidation (peroxide value)는 ferrous ammonium sulfate 와 ammonium thiocyanate을 첨가하여 480 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준물질로 benzoyl peroxide를 사용하였다.

2) Free radical scavenging activity (DPPH)

1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) 시약을 MeOH에 0.15 mM 농도로 만들어 96 well-plate에 200 μl 와 시료 100 ㎍/50 μl MeOH 농도로 첨가하고 실온에서 30분간 반응시키고 microplate reader (Model 550, Biorad, USA)를 사용하여 517 nm에서 흡광도를 측정하여 free radical 제거능을 계산하였다.

3) Malaldehyde (MA) 측정

MA 반응액 4.9㎖ (2% sodium dodecyl sulfate + 1μM ferrous chloride + 0.5mM hydrogen peroxide)과 시료 (녹차 0.25%, 0.5%, 양파 0.5%,1.0%) 0.1㎖을 처리하여 25μM Linoleic acid 0.1㎖, 0.5㎖, 1㎖ 첨가하여 55℃에서 1일간 반응을 시켜 전처리를 하였다. 전처리가 완료된 시료를 screw-capped test tube에 1% phosphoric acid (3 ml)와 0.6% thiobarbituric acid (TBA) 용액 (1㎖)을 첨가하고 vortex로 10초간 2회 현탁 시킨 후 boiling water bath에서 45분간 반응시킨 다음 실온으로 냉각시켰다. 냉각시킨 후 Butanol (4 ml)을 첨가하여 10초간 강하게 흔들어 준 후 원심분리 (2,000 rpm, 3분) 하여 . Butanol층을 회수 후 535nm에서 흡광도를 측정하여 표준곡선으로부터 MA 값을 측정하였다. 표준곡선은 1,1,3,3,-tetra-methoxypropane {malonaldehyde bis [dimethylacetal], MA}를 2, 4, 6, 8, 10 nmol 농도로 조제하여 screw-capped test tube에 취하여 시료와 동일한 조건으로 수행하여 표준곡선으로 값을 계산하였다.

4) Superoxide (O_2^-) assay: NBT reduction

시료로 24시간 처리된 RAW 264.7 cell (murine macro phage cell line)의 상층액을 제거 한 후 PBS로 세척한 후 100 ㎍/ml PMA를 포함한 600 ㎍/ml NBT 반응액을 50 μl 첨가하여 2시간 배양시킨 후 상층액을 제거하고 methanol로 2회 세척한 후 140 μl DMSO로 결정을 용해하여 540 ㎚에서 흡광도를 측정하고 O^{2-}의 생성지표는 대조군에 대한 %로 나타내었다.

나. 세포독성 및 항암성 (S-180 cell에 대한 독성 실험)

버섯균사체 추출물 10 ㎎/㎖ DDW로 조제한 시료를 다시 DMEM 배지로 다시 10배 희석하여 control처리는 DDW (100 ㎕) + DMEM (900 ㎕), 시료처리는 시료 희석액 (100 ㎕) + DMEM (900 ㎕) 농도가 되게 구성하였다. 미리 배양된 S-180 cell을 1.5×10^5 cell/㎖이 되게 희석하여 3 ㎖ 부피로 처리한 다음 (5×10^4 cell/㎖ DMEM으로 희석), 처리된 well plate를 5% CO_2 incubator (37℃)에서 48시간 동안 배양하고 나서 tryphane blue로 cell을 염색하여 haemacytometor로 생세포수를 조사하여 ED_{50} 값을 구하였다.

다. Mouse에 대한 항암성

Female ICR mouse (6~7주령)를 cage당 10마리씩 넣었다 (이때, cage당 평균무게가 같게 임의적으로 넣는다). 온도와 습도가 조절되는 시설에 물과 음식을 자유롭게 먹도록 하여 1주일 동안 사육하였다. ICR 암컷 mouse 복강에서 계대 배양된 S-180 cell (1×10^7 cell/㎖ PBS)을 각 mouse에 0.1 ㎖씩 복강에 주사하여 복수암을 유발하였다. 복수암 유발 후 2일마다 시료 0.2 ㎖을 mouse의 경구 투여하였다. S-180 세포 복강 투여 후 3일 간격으로 mouse의 무게와 사료 섭취량을 조사하며 42일 동안 생존한 mouse의 수와 생존일수를 기록하였다.

라. 항관절염성

1) 골아세포 배양

골아세포인 ROS 17/2.8 (Rat osteosarcoma 17/2.8) cell line을 DMEM/F12 배지에 10% FBS, 1% penicillin-streptomycin을 첨가하여 37℃, 5% CO_2 incubator의 조건에서 10 cm Petri dish에 배양하였다.

세포를 배양 후 시료의 처리 농도를 알기 위하여 96 well로 계대 배양 후 각각의 sample을 처리한 후 MTT (3-[4,5-Dimethylthylthiazol-2-yl]- 2,5-diphenyl-tetrazolium bromide) 100 ㎍/100 ㎕로 처리 4시간 후 570 ㎚에서 흡광도를 측정하였다.

2) NO 생성 검증

가) ROS 17/2.8 cell의 NO 생성과 NO 억제효과

상기 "1)"의 10 ㎝ dish에 배양한 세포를 PBS로 1회 washing 한 후 24 well plate에 2×10^5 개/㎖ 분주하였다. 24시간을 배양하고 10% FBS, 1%

penicillin-streptomycin이 첨가 된 새로운 배지로 교체하였다. TNF-α, IL-1β, LPS를 처리하여 배양하였다. 48시간 배양 후 배지와 Griess Reagent (1% sulfanilamide in 5% phosphate : 0.1% naphthylethylenediamine dihydrochloride in water = 1:1, v/v)를 혼합하여 540 ㎚에서 흡광도를 측정하였다. 표준곡선은 sodium nitrite를 사용하였다.

3) **iNOS 발현 검증**

상기 "1)"의 방법으로 배양한 세포를 PBS로 1회 washing 한 후 3 × 10^6개의 세포를 10 ㎝ dish에 분주하였다. 24시간 배양하고 새로운 배지로 교체하여 37℃, 5% CO_2 incubator에서 24시간 배양하였다. 1% penicillin-streptomycin과 10% FBS가 첨가 된 새로운 배지로 교체한 후 시료를 처리하였다. 1시간 후 cytokine mixture인 LPS 1 ㎍/㎖, TNF-α 25 ng/㎖, IL-1β 12.5 ㎍/㎖를 처리하여 48시간 배양하였다. 배양 후 세포를 PBS로 세척을 한 후 모아서 50 mM Tris buffer (pH 7.4) 용액에 protease inhibitor [1.0 mM EDTA, 0.1 uM (2.0 ㎍/㎖) aprotini, 1uM (0.5 ㎍/㎖) leupetin, 1 uM (0.7 ㎍/㎖) pepstatin A, 1.0 mM (174 ㎍/㎖) phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF)]를 200 ㎕을 처리하여 세포를 파쇄시켰다. 이것을 13,000 rpm에서 30분간 원심 분리하여 상층액을 얻어 Bradford법으로 protein을 정량하였고, 7.5% SDS-PAGE를 이용하여 분리하였다. 전기영동이 끝난 후 gel로부터 단백질을 PVDF membrane로 transfer한 후, TTBS로 10분간 3회 washing한 후 5% non-fat skim milk에 상온에서 2시간 동안 blocking하였다. Blocking 후 PVDF membrane을 washing하고 primary antibody를 처리하여 4℃에서 overnight하고 secondary antibody (HRP-conjugated)를 상온에서 1시간 동안 반응시킨 후 ECL detection reagents (Amersham, Berkshire, UK)로 감광하여 발현을 확인하였다.

마. 면역성

1) Tumor necrosis factor의 역가 측정

골아세포에 cytokine과 LPS를 혼합한 cytokine 혼합액으로부터 NO의 생성을 확인하여 Tumor necrosis factor를 측정하였다. 10% FBS와 1% 항생제를 포함하는 DMEM/F12 배지로 교환 후 Cytokine 혼합액 (TNF-α; 25 ng/㎖, IL-1β; 12.5 ng/㎖, LPS; 1 ug/㎖)을 처리하고 이것을 48시간동안 배양하였다. Cytokine 처리 48시간 후, 각 well로부터 배양한 배지 100 ㎕씩을 취하여 96well plate에 옮기고 같은 양의 Griess Reagent (Mixture of 1 part of 1% sulfanilamide in 5% phsphoric acid and 1 part of

0.1% naphthylethylenediamine dihydrochloride in water)를 첨가하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이 때 측정값에 대한 표준 곡선은 $NaNO_2$ (Sodium nitrite)를 이용하여 값을 나타내었다.

2) 혈장의 C_3, IL-2 및 IL-6 농도를 측정

신령버섯균사체 추출물 80% 에탄올 침전물 (AP)과 녹차분말을 첨가해여 배양한 신령버섯균사체 배양물의 80% 에탄올침전물 (GT0.25, GT0.5 80EP)와 양파분말을 첨가해여 배양한 신령버섯균사체 배양물의 80% 에탄올침전물 (ON0.5, ON1.0 80EP)의 기능성으로서 면역능 증진에 미치는 영향을 살펴보기 위해 혈장의nterlukin-2 (IL-2), Interlukin-6 (IL-6), C_3의 분비량을 비교 조사하였다.

ICR mouse에 AP 및 GT0.25, GT0.5 80EP, ON0.5, ON1.0 80EP을 100 ㎎/㎖을 5일간 섭취시킨후 2주간 방지한 다음 ON1.0 80EP을 100 ㎎/㎖의 섭취 전 후의 면역성분으로 혈장의 C_3, IL-2 및 IL-6 농도를 측정하였다. 대조군은 같은 양의 phosphate buffer (pH 7.3)을 사용하였다. 혈장 C_3는 면역 활산법을 이용한 radial immunodiffusion plate (Nor-partigen, Behring Co., Germany)를 사용하여, IL-2,와 IL-6는 enzyme immunoassay kit (Immunotech, A Beckman Coulter Co., France)를 사용하여 ELISA reader로 측정하였다.

3) Marcrophage로부터 cytokines의 유도분비 조사

Balb/c 마우스에 1% thioglycollate를 1 ㎖ 복강주사하고 4일 후에 경추탈골법으로 마우스를 희생시킨 후, 복강에 RPMI 1640 배지 10 ㎖을 주입하고 복벽을 가볍게 두드려 복강내 세포를 잘 섞이게 한 후 복강내 세포 (peritoneal exudative cells; PEC)를 수집하였다. 수획한 PEC를 24 well cuture plate에 1.5×10^6 cell/well의 농도로 조정하여 platin 하였다. 2시간 동안 배양하여 macrophage를 plate 부착 후, 배양액으로 세척하여 부착되지 않은 세포를 제거하였다. 그 후, 적정농도로 조정된 시료를 첨가하여 24시간 동안 macrophage를 자극하였다. Macrophage 배양 상등액에 유도된 IL-1 및 IFN-γ등의 측정은 각 cytokine에 대한 ELISA kit (Endogen)을 구입하여 조사하였다.

6. 제품화 기술개발

가. 버섯균사체 추출물 제조

녹차 및 양파첨가분말 첨가 버섯균사체의 대량배양 (5 kl 배양조)을 하기 위하여 HK기본액체배지에 녹차 0.5% (w/v)와 양파 1.0% (w/v)을 첨가한 배지 3.5kl을 5.0kl 용량의 대량배양조에 첨가하고 고압멸균 (121℃, 60분)한 다음, 냉각조를 이용하여 충분히 식힌 후 50 L 배양조에서 배양된 균사체 액체배양물을 접종한 후 5 kl 배양조 (120 rpm, 25℃, 3일, 0.2v/v/m) 배양하여 3.5 kl의 배양물을 얻었다.

나. 균사체 추출물 제품의 생산

1) 진동박막 분리장치

대량배양조에 배양된 버섯균사체 열수추출물 3.5 kl을 0.22㎛ microfilter가 50장 장착된 진동박막여과 장치로 순환 정제하여 버섯균사 여과고형물 (100 L)과 버섯균사체배양 추출물 (3.4 kl)을 분리하였다. 열수추출에 의하여 유효활성물질인 isoflavone-β-glucan이 균사체에서 용액으로 용출되어 나오고 이것을 정제하기 위하여 균사체 찌거기와 균사체 추출액기스를 분리하였다.

2) 진공농축

진동박막여과장치를 이용하여 정제된 버섯균사체배양 추출물을 1.5 kl 용량의 대형 진공농축기로 시간당 120 L씩 농축하였다. 농축액은 시료의 분석과 제품형으로 저농도의 Brix 4와 고농도의 Brix 30으로 조절하여 각각 농축하여 시험시료로 사용하였다.

다. 버섯균사체액체 배양액을 이용한 분말 제품의 생산

1) Freeze dry를 이용한 분말 제품의 생산

상기 "가"의 방법으로 제조된 버섯균사체배양물에 10% (w/v)의 탈지대두분을 첨가하여 자가분해효소반응 (60℃, 2시간, 150 rpm) 시킨다음 동결건조기를 이용하여 동결건조 (-80℃, 3일간, 5 mTorr)하여 분말을 제조하였다.

대형 freeze dryer에 GT 0.125, 0.25, 0.5%, ON 0.25, 0.5, 1.0배양물 400 L에 대두분 40 kg (10%, w/v)을 혼합하여 동결건조하였다. 동결건조한 후의 회수된 분말은 41kg으로 균사체내의 고형분과 대부분의 고형물 대부분이 회수되었다.

2) 버섯균사체 자가분해효소를 이용한 기능성이 강화된 분말차 제조

신령버섯균사체 액체배양액 30Ｌ을 녹차 및 양파분말 30kg에 혼합하여 55℃에서 3시간동안 효소반응시킨 다음 다시 동결건조하여 기능성이 증가된 버섯균사체 차를 제조하였다.

7. 제품의 품질평가

가. 관능검사

HK기본배지 녹차 및 양파분말을 첨가하여 배양한 신령버섯균사체 배양물의 열수추출물에 대한 대한 관능검사를 실시하였다. 관능검사는 다변량 해석법 및 Anderson 등의 방법에 따라 (주)HK바이오텍 직원과 경상대학교 환경생명화학과 학생을 대상으로 9점법으로 관능을 검사하였다. 검사항목은 향미, 풍미, 불쾌치, 색도, 떫은맛, 감미였으며 종합적인 기호성향도 조사하였다 (Table 10). 조사방법은 아주좋음은 9점, 좋음은 7점, 보통은 5점, 나쁨은 3점, 아주나쁨은 1점을 주는 방법으로 9점법으로 측정하였다.

나. 향기성분의 분석

1) 향기성분의 포집

Simultancous distillation extractor (SDE)장치를 이용하여 용매분획하여 향기성분을 포집하였다. 증류기 쪽에 분말 10g 또는 액상 100㎖을 넣고 포집조에 ether 2㎖을 첨가하여 ether에 포집되는 향기성분을 회수하였다. Ehter층에 포집된 향기성분은 무수황산나트륨으로 수분을 제거한 다음 GC-MS를 이용하여 분석하였다.

2) GC-MS분석조건

Agilent 6890 Series GC system에 Agilent 5913 Network Mass Selective Detctor가 연결된 GC-MS를 사용하였다. 분석 컬럼은 Supelcowax-10 (60m×0.32mm)였으며, 온도는 50℃ (5min hold)에서 200℃ (10min hold)였다. 온도는 4℃/min으로 증가시켰다. Carrier gas 유속은 1.5ml/min 이었다. 검출기 온도는 250℃였다.

다. 맛 성분의 분석

1) 유리당 분석

신령버섯균사체 배양액 및 녹차 및 양파분말을 첨가하여 얻은 신령버섯균사체

배양액 추출물을 Sep pak C18로 1차 여과하여 색소와 고분자물질을 제거시키고, membrane filter (0.22 ㎛)로 2차 여과하여 HPLC로 분석하였다 [Shimadzu LC-10A HLPC {Column; Supelcogel Ca (7.8 ㎜ I.D × 300 ㎜), Column temp.; 80℃, Mobile phase; Deionized water, Detecter; RID-10A, Flow rate; 0.5 ㎖/min)}]. 표준물질 (arabinose, fructose, galactose, glucose, lactose, maltose, mannose, ribose, sucrose, xylose, fucose)의 retention time과 비교하였다. 표준물질은 모두 1 ㎎/㎖로 조제하였다.

2) 유리당 분석

버섯균사체 배양액을 Sep pak C_{18}로 1차 여과하여 색소와 고분자물질을 제거시키고, membrane filter (0.22 ㎛)로 2차 여과하여 HPLC로 분석하였다. 사용한 컬럼은 μBondapack (10 ㎛, 300 × 7.8 ㎜, Waters)이었다. 컬럼온도는 25℃이엇다. 이동상은 phosphoric acid로 pH를 2.8로 조정한 0.02M KH_2PO_4이었으며 flow rate 는 0.8 ㎖/min이었다. 시료주입량은 20 ㎕이었으며, UV detector를 사용하여 215 ㎚에서 검출하였다.

3) 아미노산분석

녹차와 양파첨가버섯균사체 배양액의 유리아마노산 분석은 경상대학교내에 존재하는 Biochrom 20 Plus Amino Acid Analyzer를 이용하여 수탁하여 분석하였다.

8. 안전성 조사

가. 단회투여 독성실험 (급성)

20~25 g의 ICR계 흰쥐에게 일반 고형사료를 공급하면서 체중이 약 30 g이 될 때까지 사육 환경에 적응시킨 후 3군으로 나누어 실험에 사용하였다.

실험동물은 대조군, AG-80EP, GT0.25-80EP, GT0.5-80EP, ON0.5-80EP, ON1.0-80EP (n=10)으로 나누었다. 시료의 농도는 500㎎/㎏ mouse (= 15 ㎎/30 g)로 조제하여 멸균된 증류수를 사용하여 Stock를 만들어서 희석하여 사용하였으며 (autoclave) 암.수 각각 10마리씩 0.2㎖ (15 ㎎/30 g)를 경구 투여하였다. 측정은 일반증상 및 사망동물의 관찰, 체중측정, 부검으로 혈액학적 검사 및 혈액 생화학적 분석을 하였다. Total protein은 Alkaline 용액 중에서 단백중 4개의 peptide 결합이 Cu^{2+}와 chelate 결합하여 자색으로 발색하는 원리를 이용하여 발색된 흡광도를 측정하여 protein의 농도를

정량하였으며, Albumin은 Albumin 에게만 단백 오차를 일으키는 지시약의 색조 변화의 크기를 측정하므로 Albumin을 정량하였다. 또한 BUN은 NADPH의 흡광도의 감소속도를 측정하여 뇨소 질소치를 구하였으며, Creatinine은 Creatinine은alkaline성 용액중에서 picricacid 와 반응하여 등적색 creatinine picrate가 되는 원리를 이용하여 측정하였고, AST는 NADH 의 흡광도 감소율을 측정하여 AST의 활성치를 정량 하였다.

나. 장기투여 독성시험 (아급성)

20～25 g의 ICR계 흰쥐에게 일반 고형사료를 공급하면서 체중이 약 30 g이 될 때까지 사육 환경에 적응시킨 후 3군으로 나누어 실험에 사용하였다.

실험동물은 대조군, AG-80EP, GT0.25-80EP, GT0.5-80EP, ON0.5-80EP, ON1.0-80EP (n=5)으로 나누었다. 시료의 농도는 15, 30, 60 ㎎/30 g로 조제하여 멸균된 증류수를 사용하여 Stock를 만들어서 희석하여 사용하였으며 (autoclave) 암·수 각각 5마리씩 0.2㎖ (15, 30, 60 ㎎/30 g)를 경구 투여하였다. 매일 일정시간에 1시간 이내로 동물번호 순서대로 투여하여 각개체별 투여시간을 유사하게 하고 (매주 2회- 월, 목). 30일 동안 1주일에 2번 (월,목)투여하고, 2번 body weight 측정 (화,금)을 측정하고 부검 전 동물을 24시간 동안 절식시키고, 경추 탈골법으로 희생시켰다. 실험 분석결과는 평균±표준편차 (mean±SD)로 표시하였다. 측정방법은 일반 증상 및 사망동물의 관찰, 체중측정, 사료 섭취량 및 물 섭취량, 혈액학적 검사, 혈액 생화학적 검사, 장기 적출, 육안적 소견 및 장기중량을 분석하였다.

제 2 절 연구결과

1. 버섯균주 선발

요약

○녹차 및 양파추출물을 첨가한 고체배지 (PDA배지)에서 아가리쿠스, 영지, 느타리버섯의 균사체 생육이 활발 하였슴.

○녹차 및 양파추출물을 첨가한 액체배지에서 아가리쿠스 균사체의 생육이 가장 활발하였음. 따라서, 아가리쿠스버섯을 배지조성시험 및 유효성분생성시험에 이용하였슴.

가. 녹차열수추출물 첨가 PDA 배지에서의 균사생장 조사

녹차열수추출물 (고형분 90%) 10% (w/v)를 PDA배지제조시에 첨가하여 멸균 (121℃, 15분)한 다음 petridish PDA배지를 제조하였다. 여기에 (주)HK바이오텍에서 보관중인 버섯균주 (Table 1)를 지름이 약 8 ㎜ 크기가 되게 자른 다음 제조한 녹차함유 PDA배지의 중앙에 접종하여 저온배양기에서 배양 (25℃, 14일)하면서 균사의 생장 속도를 관찰하였다 (Table 2). 균사의 생장이 가장 활발한 것은 아가리쿠스버섯 (AB), 영지버섯 (GL), 느타리버섯 (PO)이었으며 배양 14일 이전에 petri dish를 모두 덮어 생육하였다. 균사의 생육이 가장 느린것은 상황버섯 (PL)이었다. 표고버섯 (LE), 동충하초버섯 (PJ), 운지버섯 (GF)는 PL보다 생육이 좋았으나 대체적으로 녹차함유PDA배지에서는 생육이 활발하지 않았다.

나. 양파 PDA 배지에서의 버섯균주의 활성화 및 균사생장 조사

양파열수추출물 (고형분 90%) 10% (w/v)를 PDA배지제조시에 첨가하여 멸균 (121℃, 15분)한 다음 petri dish PDA배지를 제조하였다. 여기에 (주)HK바이오텍에서 보관중인 버섯균주 (Table 1)를 지름이 약 8 ㎜ 크기가 되게 자른 다음 제조한 녹차함유 PDA배지의 중앙에 접종하여 저온배양기에서 배양 (25℃, 14일)하면서 균사의 생장 속도를 관찰하였다 (Table 3). 균사의 생장이 가장 활발한 것은 아가리쿠스버섯 (AB), 영지버섯 (GL), 느타리버섯 (PO)이었으며 배양 14일 이전에 petri dish를 모두 덮어 생육하였다. 균사의 생육이 가장 느린것은 동충하초버섯 (PJ)이었다. 표고버섯 (LE), 상황버섯 (PL),

운지버섯 (GF)는 PJ보다 생육이 좋았으나 대체적으로 양파함유 PDA에서는 생육이 활발하지 않았다.

Table 2. Growth of mushroom mycelia (㎜) on PDA with the 10% green tea extract media[1)]

Mushroom Strains[2)]	Incubation (Day)			
	3	7	10	14
AB	21.3±1.5[3)]	40.0±1.5	73.2±2.3	89.0[4)]
PO	19.0±2.1	39.0±2.1	68.0±3.4	89.0
GL	19.3±1.5	37.0±2.5	71.0±4.5	89.0
LE	19.3±1.5	30.8±2.9	50.2±3.3	62.2±3.1
PJ	14.3±2.5	35.5±2.0	60.7±3.1	72.1±2.2
PL	11.5±1.5	25.0±2.1	40.3±4.3	52.4±4.2
GF	13.5±1.2	26.3±1.5	62.4±3.4	68.3±3.4

1) PDA media with 10% (w/v) green tea extract. This media sterilized by autoclave at 121℃ for 15 min.

2) AB, *Agaricus Blazei;* PO, *Pleurotus ostreatus;* GL, *Ganoderma lucidum;* LE, *Lentinus edodes;* PL, *Phellinus linteus;* GF, *Grifola frondosa;* and PJ, *Paecilomyces japonicus.*

3) Average±S.D. of triplication.

4) The plate was fully covered by mycelia.

Table 3. Growth of mushroom mycelia (㎜) on PDA with the 10% onion extract media[1)]

Mushroom Strains[2)]	Incubation (Day)			
	3	7	10	14
AB	23.3±1.5[3)]	45.0±1.5	76.2±0.3	89.0[4)]
PO	22.0±0.1	45.0±2.0	71.2±2.4	89.0
GL	21.3±1.0	42.0±2.0	74.2±3.3	89.0
LE	22.3±1.2	33.8±1.4	45.4±4.2	65.5±4.2
PJ	16.3±1.1	27.5±1.5	43.2±3.2	56.3±3.5
PL	13.5±0.8	18.5±0.2	43.1±3.5	62.4±4.4
GF	16.5±1.0	28.3±1.2	45.2±4.5	68.3±3.4

1) PDA media included 10% (w/v) onion extract. This media sterilized by autoclave at 121℃ for 15 min.

2) AB, *Agaricus Blazei;* PO, *Pleurotus ostreatus;* GL, *Ganoderma lucidum;* LE, *Lentinus edodes;* PL, *Phellinus linteus;* GF, *Grifola frondosa;* and PJ, *Paecilomyces japonicus.*

3) Average±S.D. of triplication.

4) The plate was fully covered by mycelia.

다. 액체배지에서의 버섯균주의 활성화 및 균사생장 조사

액체배지에서 균사체 생육이 양호한 버섯균를 선발하기 위하여 삼각플라스크에서 14일간 배양하면서 3, 7, 10, 14일에 각각 균사체 배양액을 100 ㎖씩 채취하여 원심분리(10,000 rpm, 10 min, 4℃)하여 균사체를 회수한 다음, 무게를 측정 (wet weight)하여 액체버섯균사체의 생육정도를 관찰하였다 (**Table 4**).

균사생장이 가장 양호한 것은 아가리쿠스버섯이었다. 느타리버섯 또한 균사체생육이 양호 하였으나 영지버섯, 표고버섯, 동충하초버섯, 상황버섯, 운지버섯은 균사체의 생육이 비슷하였다.

Table 4. Dry weight of mushroom mycelia (g/ 100 ㎖) in the submerged liquid culture incubated at 25℃ for various incubation time[1)]

Mushroom Strains[2)]	Incubation (Day)			
	3	7	10	14
AB	3.1±0.4[3)]	5.5±0.7	12.1±0.9	19.9±1.1
PO	3.1±0.5	4.4±0.8	12.2±0.8	18.5±1.0
GL	3.1±0.5	4.0±0.5	9.2±0.7	14.8±0.8
LE	2.3±0.3	3.3±0.3	7.3±0.5	13.9±0.9
PJ	1.9±0.5	3.2±0.6	8.4±0.9	12.9±0.8
PL	1.4±0.4	2.9±0.4	8.3±0.8	12.8±0.7
GF	1.8±0.2	2.9±0.7	9.4±0.8	12.8±0.9

1) Liquid media included soybean powder 0.1%, brown sugar 1.2%, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.0375%, KH_2PO_4 0.0375%. This media sterilized by autoclave at 121℃ for 15 min. Mushroom mycelia was separated by centrifuge (10,000 rpm, 10 min, 4℃).

2) AB, *Agaricus Blazei;* PO, *Pleurotus ostreatus;* GL, *Ganoderma lucidum;* LE, *Lentinus edodes;* PL, *Phellinus linteus;* GF, *Grifola frondosa;* and PJ, *Paecilomyces japonicus.*

3) Average±S.D. of triplication.

2. 액체배양 배지조성 개발

요약

○기본배지의 제조는 (주)HK바이오텍의 기술 know-how로써 배합비율만 공개함 (대두박분해물 0.1%, 황백당 1.2%, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.0375%, KH_2PO_4 0.0375%를 혼합한 액체배지)

○기본배지에 탄소원 및 질소원을 각각 0.3%씩 혼합하여 배양할 때 균사체의 성장은 일부증가하였으나, 유효성분 (β-glucan)의 생성은 비슷하거나 오히려 줄어듬. 따라서 이후 실험에서는 기본배지에 녹차열수추출물과 양파열수추출물을 첨가한 배지를 사용함

○균사체량과 β-glucan생성량으로 볼 때 녹차분말 (0.5%), 양파분말 (1.0%)을 기본배지에 첨가하여 배양하는 것을 선택함.

가. 기본 액체배지

대두박분해물 0.1%, 황백당 1.2%, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.0375%, KH_2PO_4 0.0375%를 혼합한 액체배지를 기본배지로 사용하였음.

나. 기본배지에 추가로 사용된 성분의 균사생육에 대한 영향 조사

1) 탄소원 0.3% 첨가배양

기본배지에 탄소영양원 0.3%를 추가적으로 혼합하여 배양한다음 균사체의 무게, 배양액중의 β-glucan 함량, Brix와 Viscosity를 측정하였다 (**Table 5**). 균사체의 생장이 가장 양호한 것은 ribose 첨가구 (5.9±0.4 g/300 ml)였다. 균사체의 생장과 동일하게 β-glucan (65.9±2.4 mg/300 ml), Brix (1.2±0.1), Viscosity (18.9±06 sec) 함량도 가장 높게 나타났다. 그러나 여러 가지 탄소원의 첨가에 따른 균사체 및 유효성분이 대조군과 비교하여 유의성 있는 증가요인은 없었다. 이상의 결론으로 볼때 기본배지에 함유된 탄소원 이외에 다른 탄소원의 추가로 인한 균사체성장 촉진 효과가 없었다. 따라서 이후의 실험에서는 기본배지를 이용하여 배양을 하였다.

Table 5. Wet weight of Mycelia (*Agaricus Blazei*), β-Glucan, Brix, and Viscosity of the submerged liquid cultured in the medium with various carbon sources (0.3%, w/v)

Sugar	Wet weight of Mycelia (g/300 ml)	β-Glucan[1)] (mg/100 ml)	Brix[2)]	Viscosity[3)] (sec)
Control	5.5±0.7	62.5±3.5	1.0±0.2	17.9±0.7
Ribose	5.9±0.4	65.9±2.4	1.2±0.2	18.9±06
Glucose	5.8±0.7	64.7±2.8	1.2±0.2	18.2±0.4
Fructose	5.6±0.5	63.8±2.0	1.0±0.2	17.9±0.5
Xylose	5.6±0.6	63.3±1.8	1.0±0.2	17.8±0.8
Rhamnose	5.7±0.6	64.4±2.1	1.0±0.2	·17.6±0.7

[1)] β-Glucan content in 100 ml culture solution was determined by 80% ethanol precipitation method.

[2)] Brix of culture solution was measured with Brix meter.

[3)] Viscosity of culture solution was measured at 20℃ with Ostwald viscometer.

2) 질소원 0.3% 첨가배양

기본배지에 질소영양원을 0.3% 첨가하여 배양한 후 균사체의 무게, 배양액중의 β-glucan 함량, Brix와 Viscosity를 측정하였다 (**Table 6**). 각각의 질소원 첨가에 대하여 hydroxyproline proline과 serine 처리가 다른 처리군과 대조군에 비하여 균사체의 생장은 뛰어났으나, 유효성분인 β-glucan의 함량은 오히려 줄어 들었다.

이상의 결론으로 볼때 추가적인 질소원의 첨가는 균사체의 생육은 증대시키나 유효성분인 β-glucan의 분비는 억제 시키는 것으로 나타났다. 따라서 이후 시험에서는 추가적인 질소원을 첨가시키지 않았다.

Table 6. Wet weight of Mycelia (*Agaricus Blazei*), β-Glucan, Brix, and Viscosity of the submerged liquid cultured in the medium with various amino acids (0.3%, w/v)

Amino acid	Wet weight of mycelia (g/300 ml)	β-Glucan[1)] (mg/100 ml)	Brix[2)]	Viscosity[3)] (sec)
Control[4)]	5.5±0.7	62.5±3.5	1.0±0.2	17.9±0.7
Proline	5.9±0.6	60.5±1.3	1.2±0.2	18.5±0.5
Hydroxyproline	5.8±0.5	60.9±1.7	1.2±0.2	18.5±0.6
Serine	5.9±0.8	60.9±2.3	1.2±0.2	18.9±0.8
Threonine	5.7±0.6	59.1±2.1	1.0±0.2	17.3±0.4
Cysteine	5.8±0.5	59.0±1.8	1.0.±0.2	17.1±0.3
Phenylalanine	5.7±0.7	50.8±1.2	1.0±0.2	16.9±0.4
Leucine	5.8±0.4	51.6±0.9	1.0±0.2	17.2±0.5
Glycine	5.8±0.5	50.5±2.2	1.0±0.2	17.1±0.4

1) β-Glucan content in 100 ml culture solution was determined by 80% ethanol precipitation method.

2) Brix of culture solution was measured with Brix meter.

3) Viscosity of culture solution was measured at 20℃ with Ostwald viscometer.

4) Control represents basic media plus 0.3% ribose.

3) 녹차분말 0.1, 0.5, 1.0% (w/v) 첨가배양

기본배지에 아가리쿠스버섯균사체를 접종한 후 3일간 전배양한 다음 녹차분말을 각각 0.1, 0.5, 1.0% (w/v) 추가하여 4일간 후 배양하여 균사체의 함량을 측정하였다 (**Table 7**). 배양이 완료된 균사체를 원심분리 (10,000 rpm, 10 min, 4℃)하여 무게를 측정하였다.

균사체의 무게는 녹차분말 1.0%을 첨가한 처리구에서 (7.2 g/300 ml), β-glucan의 함량은 0.5% (82.5 mg/100 ml)에서 많이 생성되었다. 녹차분말의 함유농도가 높을수록 배양액은 검갈색을 나타내었다 (**Figure 3**). 따라서, 이후의 시험에서 녹차분말 0.25%와 0.5%를 첨가한 배지를 사용하였다.

Table 7. Dry weight of mushroom mycelia (*Agaricus Blazei*) and Brix of the submerged liquid cultured with green tea powder incubated at 25℃ for 3days .

	Percent of green tea powder added in the culture medium			
	0%	0.1%	0.5%	1.0%
Wet weight of mycelia (g/300 ml)	5.5±0.7	6.1±0.2	6.8±1.5	7.2±0.25
Brix	1.0±0.2	1.2±0.2	1.3±0.2	1.4±0.2
β-Glucan (mg/100 ml)[1)]	62.5±3.5	73.8±2.2	82.5±1.8	70.2±2.6

[1)] β-Glucan content in 100 ml culture solution was determined by 80% ethanol precipitation method.

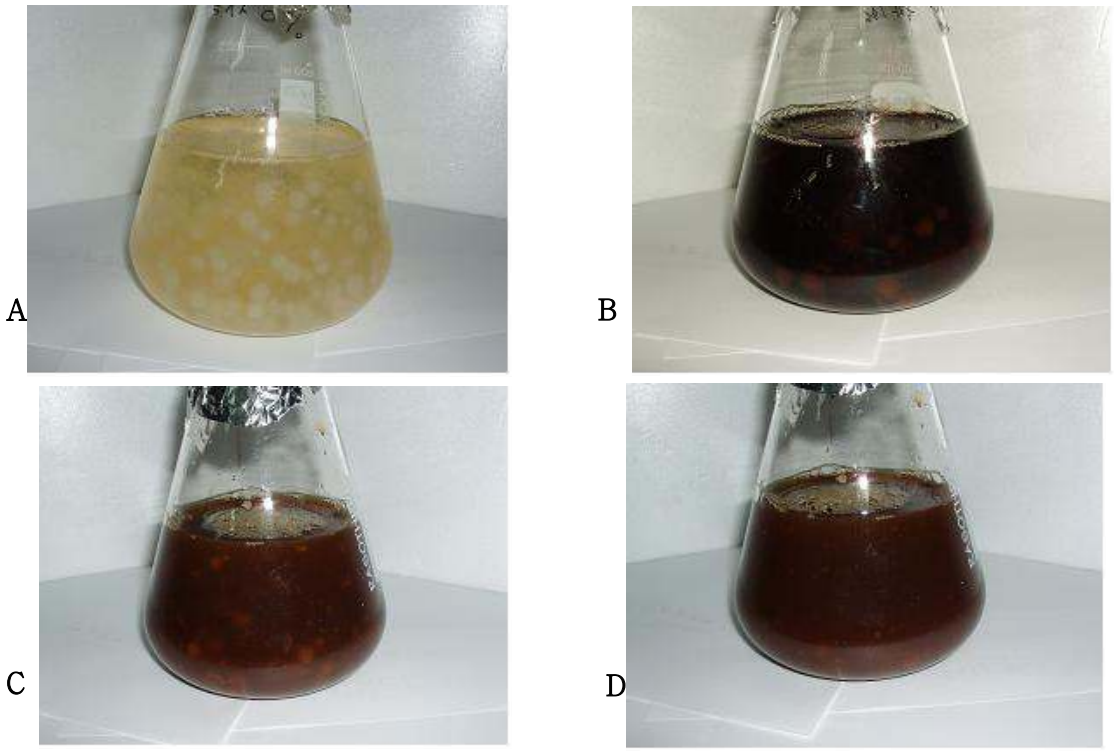


Figure 3. Submerged culture of *Agaricus Blazei* with green tea extract. A: Control, B: 0.1% extract, C: 0.5% extract, D: 1.0% extract.

4) 양파분말 0.1, 0.5, 1.0% (w/v) 첨가배양

양파분말의 첨가량이 높을수록 배양액은 진한 갈색을 나타내었다. 양파분말 첨가량이 많을수록 균사체 및 β-glucan의 함량이 높아졌다. 기본배지에 아가리쿠스버섯균사체를 접종한 후 3일간 전배양한 다음 양파분말을 각각 0.1, 0.5, 1.0% (w/v) 추가하여 4일간 후 배양하여 균사체의 함량을 측정하였다 (**Table 8**). 배양이 완료된 균사체를 원심분리 (10,000 rpm, 10 min, 4℃)하여 무게를 측정하였다.

균사체의 무게와 β-glucan의 함량 모두 분말 1.0%을 첨가한 처리구에서 (7.5 g/300 ㎖) 많이 생성되었다. 양파분말의 첨가량이 많을수록 균사체의 무게와 β-glucan의 함량이 모두 높아졌지만, 첨가시 양파분말의 부피가 크고, 양파향이 진하여 첨가량을 1.0%로 결정하였다 (**Figure 4**).

Table 8. Dry weight of mushroom mycelia (*Agaricus Blazei*) and Brix of the submerged liquid cultured with onion powder incubated at 25℃ for 3days

	Percent of onion powder added in the culture medium			
	0%	0.1%	0.5%	1.0%
Wet weight of mycelia (g/300 ㎖)	5.5±0.7	6.3±0.02 g	7.1±0.02 g	7.5±0.02 g
Brix	1.0±0.2	1.3±0.2	1.4±0.2	1.5±0.2
β-Glucan (㎎/100 ml)[1)]	62.5±3.5	80.2±2.6	86.7±2.9	92.2±3.2

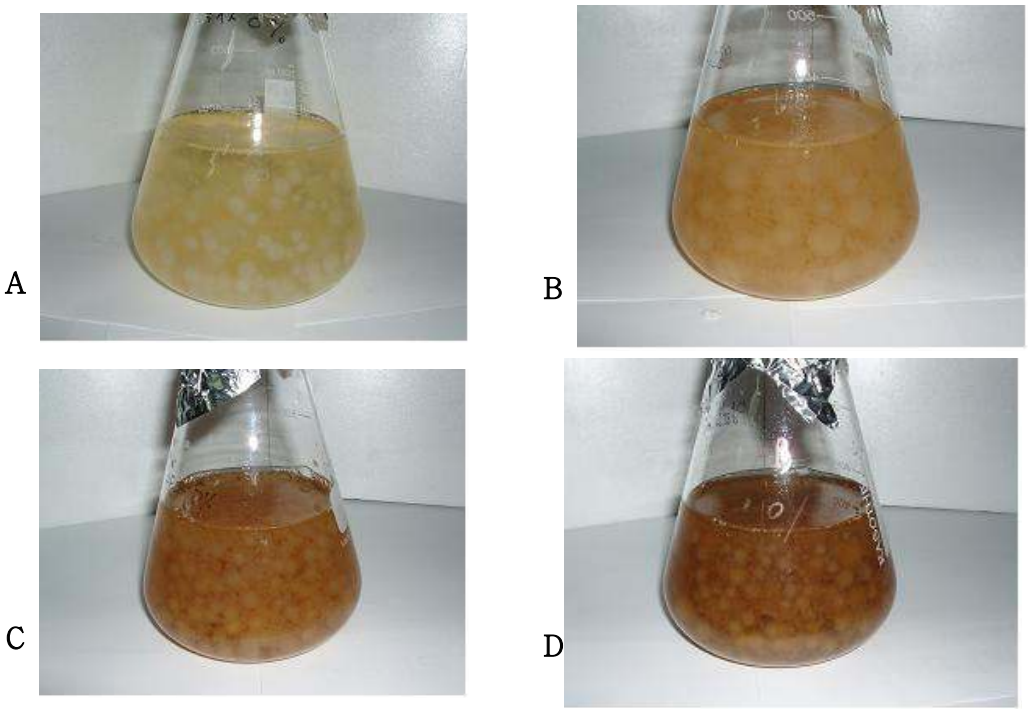


Figure 4. Submerged liquid culture of *Agaricus Blazei* in the medium with onion extract. A: Control, B: 0.1% extract, C: 0.5% extract, D: 1.0% extract.

3. 배양조건 확립

가. 배지조성 및 균주

사용균주는 상기 "1."의 결과에서 따라 균사체의 생육과 β-glucan 생성에 용이한 아가리쿠스버섯균사체를 선발하여 배양에 이용하였다.

배지조성은 상기 "2. 나."의 결과에 따라 균사체의 생육이 용이하고 β-glucan 생성에 용이하며 대량배양시 배양원가 절감에 적합한 배지인 기본배지를 이용하여 배양하였다. 그리고 질소원으로 각종 아미노산을 함유시켰으나 오히려 균사체의 생육이 저조하였다.

나. 최적 배양조건 구명 [seed배양 및 소량배양]

요약

○삼각플라스크배양 (Seed 및 시험용액배양)에서는 25, 30℃에서 β-glucan의 생성이 가장높았다. 잡균오염에 대한 안전성을 고려할 때 25℃의 배양을 선택하였다.

○변온에 의한 균사체 자극에 의한 추가적인 β-glucan의 생성능력은 없었다

○배양기간이 7일이상이되면 균사체의 개체성장보다는 부피만 커지면서 노화현상이 발생하여 seed 및 소량배양은 7일 이내 배양을 선택하였다.

1) 배양온도

가) 항온 배양

대량배양의 전단계인 seed 배양에 사용할 균주를 배양하기 위하여 삼각플라스크에서 균사체의 생육정도와 β-glucan 생성량을 확인하였다. Seed 배양은 기본배지 (300㎖)에 이미 배양이 완료된 아가리쿠스버섯균사체 배양물 5% (약 15㎖)을 첨가하여 사용하였다.

아가리쿠스버섯균사체를 25℃와 30℃에서 7일간 배양하였을 때 균사생장 및 β-glucan함량이 다른 온도에서 배양한 경우보다 다소 양호하였지만 큰 차이는 없었다 (**Figure 5**). 그러나, 30℃ 이상에서는 세균 및 바이러스의 생육이 활발해지는 온도임을 감안할 때, 균사생장량은 25℃와 비교해서 크게 차이가 없지만 다른 미생물의 오염으로부터 보다 안전한 25℃에서의 배양을 최적배양온도로 선택하였다.

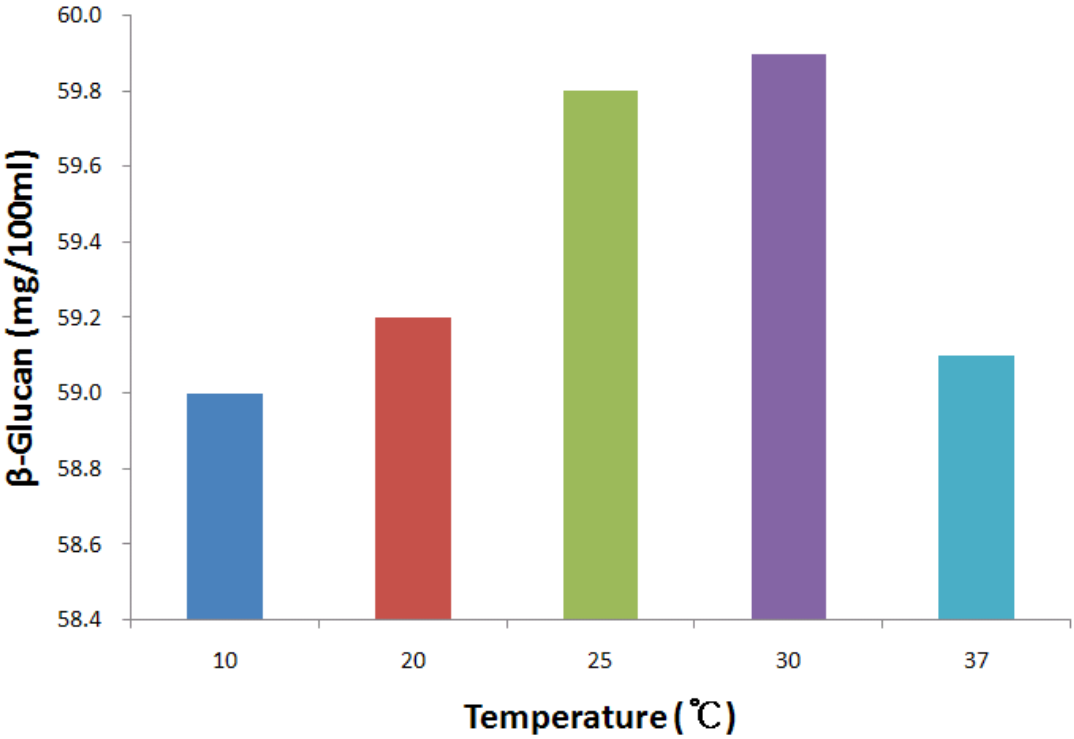


Figure 5. Content of β-glucan produced by mushroom mycelia (*Agaricus Blazei*) in the liquid cultured at different incubation temperature.

나) 변온 배양

변온조건 하에서 균사체 생육과 β-glucan의 생성정도를 확인하기위하여 실온과 변온 과정을 거치면서 균사체의 배양하였다. 25℃에서 5일간 배양한 후 4℃와 10℃에서 각각 4일간 배양한 다음, 다시 25℃에서 재 배양 (3일)한 결과 4℃ 변온 배양할 때 (69.3 ㎎/100 ㎖)가 10℃ 변온 배양할 때 (67.6 ㎎/100 ㎖) 보다 약간 더 양호하였지만 25℃에서 계속 배양한것과 비교할 때 함량이 크게 증가하지는 않았다 (**Figure 6**). 변온조건하에서 균사체에 자극을 주어 β-glucan의 생성정도를 높이려 하였으나 큰 변화를 가져 오지 못하였다. 따라서 균사체에 변온에 의한 자극을 주지 않고 25℃에서 계속 배양시키는 방법을 채택하였다.

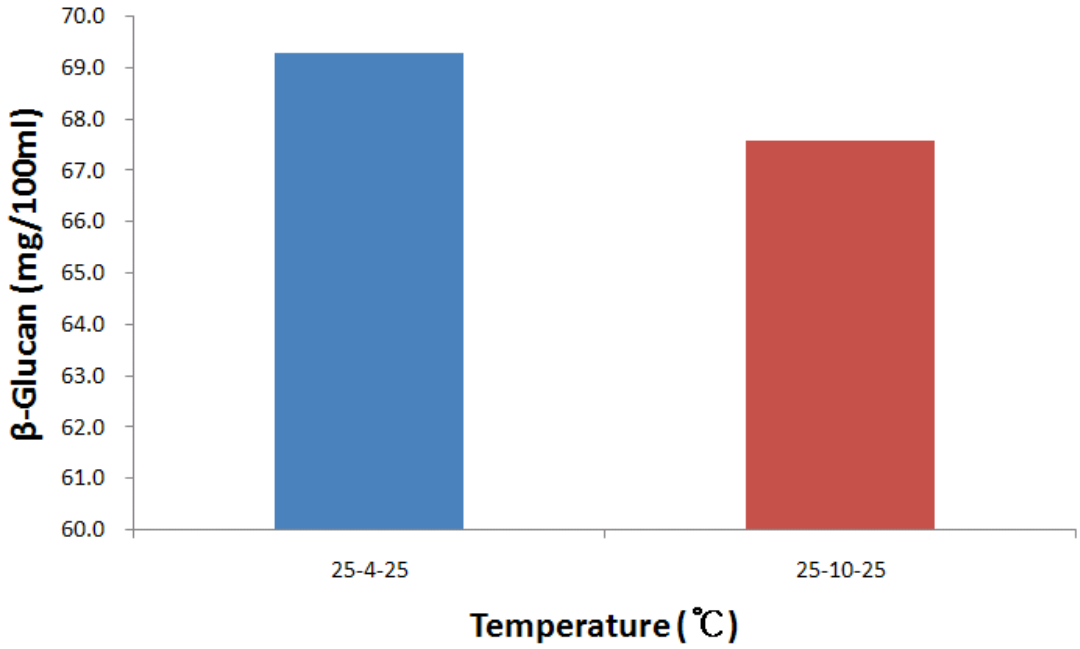


Figure 6. β-Glucan produced by *Agaricus Blazei* mycellia in the submerged liquid culture by changing incubation temperatures (25℃, 5 days → 4℃, 4 days →25℃, 3 days and 25℃, 5 days →10℃, 4 days →25℃, 3 days).

2) **배양기간의 영향**

상기에 "1). 가)."의 방법과 동일하게 균사체를 7일, 9일간 배양한 다음균사체 무게를 (wet weight) 측정하여 균사체의 생육정도를 확인하였다 (**Figure 7**).

온도에 따른 영향은 항온조건하에서의 결과와 동일하였다. 그러나 기간이 길어질수록 균사체의 함량은 증가하였다. 배양 7일까지 균사체의 생육은 균사체의 무게를 증가시켰다. 그러나 배양 7일이 경과되면 구형모양의 둥근 형태로 균사체의 크기가 크지면서 목질화되는 (일명, 균사체 노화현상)을 나타내었다. 즉 균사체의 개체수는 늘지 않고 균사체의 크기만 증가하는 경향을 나타내었다. 따라서 균체의 생장과 균체량의 적절히 조절되는 7일 이하를 선택하였다.

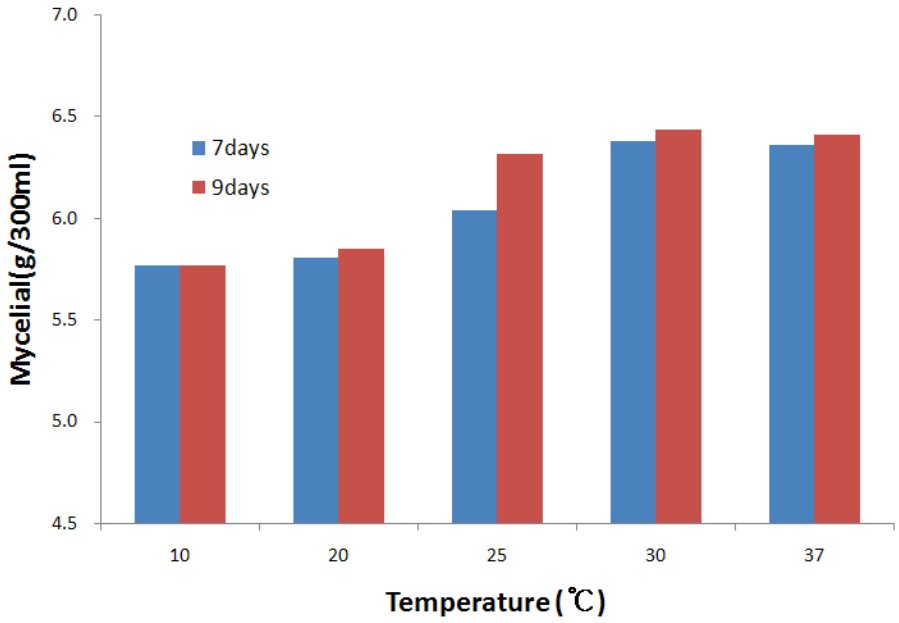


Figure 7. Wet weight of mushroom mycelia (*Agaricus Blazei*) in the submerged liquid cultured at different incubation temperature and incubation periods.

다. 대량배양에서의 최적의 배양조건 구명

요약

○녹차 및 양파분말을 추가로 첨가하여 녹차분말 0.5%, 양파분말 1.0%를 첨가한 배지에서 균사체의 함량과 β-glucan의 함량이 높음

○공기공급량 1v/v/m이었을 때 균사체의 생육이 양호

○배양온도 20, 25, 30℃ 범위내에서는 균사체의 생육과 β-glucan의 함량에 큰영향을 미치지 않음.

○대량배양에서 균사체의 생장은 3일이면 충분하며 그 이상 배양하면 균사체 크기는 커지지만 배양액표면에 균사체 노화 증거인 띠를 형성함

1) 배지조성별 배양

가) 녹차분말첨가량에 따른 균사체생성량과 β-glucan의 함량

배지에 녹차분말을 많이 첨가할 수 록 (0.125, 0.25, 0.5%, w/v) 균사체의 생성량이 많았으며, 대조군 (0.69g/100ml) 보다 높은 1.05, 1.38, 1.80 g/100ml 이었다.

β-glucan생성량도 대조군 (23.24 ㎎/100㎖) 보다 높은 28.14, 41.80, 80.07 ㎎/100㎖이었다 (**Table 9**). 대량배양에서도 동일한 경향을 보였으며, 이후 모든 배양에서 녹차분말을 0.5%첨가하여 배양하였다.

Table 9. Wet weight of mushroom mycelia (g/ 100 ㎖) and the β-glucan in the submerged liquid cultured by *Agaricus Blazei.* Culture medium was consisted of basal medium with green tea powder (%, w/v).

Treatment	Wet weight of Mycelia (g/100 ㎖)	β-Glucan[1)] (㎎/100 ㎖)
Control	0.69±0.04	23.24±1.65
GT0.125	1.05±0.10	28.14±5.03
GT0.250	1.38±0.13	41.80±4.78
GT0.500	1.80±0.18	80.07±9.11

[1)] β-Glucan content of culture medium was determined by 80% ethanol precipitation method.

Figiure 8. The submerged liquid culture in the 5 L fermenter. Left; 0.25% (w/v) green tea included, Right; 0.5% (w/v) green tea included.

나) 양파분말을 첨가한 액체배지에서 배양

양파분말을 첨가한 배지에서 균사체를 배양하였을 때, 대조군 (0.69 g/100㎖)에 비해 균사체 함량이 증가하였으며, 양파분말의 첨가량이 많을수록 균사체의 함량이 높았다. β-glucan의 함량은 대조군에서는 23.24 ㎎/100㎖이었으며, 양파분말을 각각 0.25%, 0.5%, 1.0%첨가하였을 때, 22.24, 39.24, 80.00 ㎎/100㎖이었다. 균사체의 생육이 가장 활발하고, β-glucan생성이 많은 것은 1.0%분말을 첨가한 배지였다 (**Table 10**).

Table 10. Wet weight of mushroom mycelia and β-glucan of submerged liquid cultured by *Agaricus Blazei.* The culture medium was consisted of basal medium and onion powder (ON %, w/v).

Treatment (%)	Wet weight of Mycelia (g/100 ml)	β-Glucan[1)] (㎎/100 ml)
Control	0.69±0.04	23.24±1.65
ON0.25	1.70±0.07	22.23±3.19
ON0.50	2.45±0.55	39.24±6.62
ON1.00	2.83±0.24	80.00±2.52

[1)] β-Glucan content was determined by 80% ethanol precipitation method.

Figiure 9. The submerged liquid culture in the 5 L fermenter. Left; 0.5% (w/v) onion included, Right; 1.% (w/v) onion included.

2) 공기공급량

가) 녹차분말 첨가 액체배지에서 배양

녹차분말을 첨가한 액체배지에서 아가리쿠스버섯균사체를 배양할 때 최적 공기공급량을 결정하기 위한 시험을 한 결과는 **Table 11**과 같다. 공기주입량을 각각 0.1, 0.5, 1.0 v/v/m로 하여 25℃에서 3일 간 배양한 경우, 균사체함량은 각각 1.09, 1.33, 1.80 g/100㎖이었다. 공기 주입량이 많을 수록 균사체생성량은 증가하였으며, β-glucan생성량도 각각 36.77, 56.27, 80.07 ㎎/100 ㎖으로 증가하였다.

Table 11. Wet weight of mushroom mycelia and β-glucan of submerged liquid cultured with different airation amount by *Agaricus Blazei.* The culture medium was consisted of basal medium and Green tea powder (GT 0.5%, w/v).

Air (v/v/m)	Wet weight of Mycelia (g/100 ㎖)	β-Glucan[1)] (㎎/100 ㎖)
0.1	1.09±0.14	36.77±4.87
0.5	1.33±0.12	56.27±2.66
1.0	1.80±0.18	80.07±9.11

[1)] β-Glucan content was determined by 80% ethanol precipitation method.

나) 양파분말 첨가 액체배지에서 배양

양파분말을 첨가한 액체배지에서 아가리쿠스버섯균사체를 배양할 때 최적 공기공급량을 결정하기 위한 시험을 한 결과는 Table 12과 같다. 공기주입량을 각각 0.1, 0.5, 1.0 v/v/m로 하여 25℃에서 3일 간 배양한 경우, 균사체함량은 각각 1.40, 2.17, 2.83 g/100 ㎖이었다. 공기 주입량이 많을 수록 균사체생성량은 증가하였으며, β-glucan생성량도 각각 34.54, 58.22, 80.00㎎/100 ㎖로 통기량이 많을 수록 β-glucan생성량도 증가하였다 (**Table 12**).

Table 12. Wet weight of mushroom mycelia and β-glucan of submerged liquid cultured with different airation amount by *Agaricus Blazei.* The culture medium was consisted of basal medium and onion powder (ON 1.0%, w/v).

Air (v/v/m)	Wet weight of Mycelia (g/100 ml)	β-Glucan[1)] (mg/100 ml)
0.1	1.40±0.15	34.54±3.82
0.5	2.17±0.22	58.22±5.52
1.0	2.83±0.24	80.00±2.52

[1)] β-Glucan content was determined by 80% ethanol precipitation method.

3) 배양온도 결정

가) 녹차분말 첨가 액체배지에서의 배양

상기 시험에서 결정된 배지 (녹차분말 0.5%첨가)에서 공기주입량 (1 v/v/m)으로하고 배양온도를 각각 20, 25, 30℃로 하여 배양 (J-fermenter, 1 v/v/m, 3일)하였다. 아가리쿠스버섯균사체의 무게 및 β-glucan의 함량은 각각 1.71, 1.80, 1.80 g/100㎖과 71.36, 80.07, 78.17 ㎎/100㎖이었다 (**Table 13**).

25℃와 30℃ 보다 20℃에서 약간의 균사체와 β-glucan의 함량이 낮게 나타났으나 온도 편차간에는 큰 영향을 미치지 않았다. 따라서, 세균오염이 적으면서 균사체생장은 활발한 25℃를 이후시험에서 배양온도로 설정하였다.

Table 13. Wet weight of mushroom mycelia and β-glucan of submerged liquid cultured at different temperature by *Agaricus Blazei.* The culture medium was consisted of basal medium and green tea (GT 0.5%, w/v).

Temperature (℃)	Wet weight of Mycelia (g/100 ml)	β-Glucan[1)] (mg/100 ml)
20	1.71±0.04	71.36±2.60
25	1.80±0.18	80.07±9.11
30	1.80±0.03	78.17±4.88

[1)] β-Glucan was determined by 80% ethanol precipitation method.

나) 양파분말 첨가 액체배지에서의 배양

상기 시험에서 결정된 배지 (양파분말 1.0%첨가)에서 공기주입량 (1 v/v/m)으로하고 배양온도를 각각 20, 25, 30℃로 하여 배양 (J-fermenter, 1 v/v/m, 3일)하였다. 아가리쿠스버섯균사체의 무게 및 β-glucan의 함량은 각각 2.59, 2.83, 2.70 g/100㎖과 78.30, 80.00, 80.01 ㎎/100㎖이었다 (**Table 14**).

25℃와 30℃ 보다 20℃에서 약간의 균사체와 β-glucan의 함량이 낮게 나타났으나 온도 편차간에는 큰 영향을 미치지 않았다. 따라서, 세균오염이 적으면서 균사체생장은 활발한 25℃를 이후시험에서 배양온도로 설정하였다.

Table 14. Wet weight of mushroom mycelia and β-glucan of submerged liquid cultured at different temperature by *Agaricus Blazei.* The culture medium was consisted of basal medium and onion (ON 1.0%, w/v).

Temperature (℃)	Wet weight of Mycelia (g/100 ㎖)	β-Glucan[1)] (㎎/100 ㎖)
20	2.59±0.32	78.30±3.25
25	2.83±0.24	80.00±2.52
30	2.70±0.12	80.01±4.32

[1)] β-Glucan content determined by 80% ethanol precipitation method.

4) 배양기간

가) 녹차분말 첨가 액체배지에서의 배양

배양기간이 길어질수록 (3, 4, 5일) 균사체 및 β-glucan의 함량은 증가하였다. 그러나 배양기간에 따른 큰 유의성은 없었다 (**Table 15**). 3일간 배양하면 배지성분을 대부분 버섯균사체가 이용하여 균사체의 확대배양은 종료되고, 그 이후에는 균사체의 노화가 이루워지기 시작하여 균사체 크기만 증가 하였다. 노화현상으로 균사체의 생장이 더디어지며 목질화가 형성되어 일부 배양액 표면에서 자실체가 발생하려는듯 균사체띠를 형성하였다. 이상의 결과를 볼 때 5L 이상 대량배양조에서는 배양기간이 3일이면 적당하였다.

이상의 결과로 볼때, 대량배양조건에는 강제공기주입을 하지 않는 삼각플라스크 배양과는 달리 공기를 주입함으로써 균사체간 마찰을 강하게 유도하고 균사체가 잘게 부수어지는 속도가 증가함으로 인하여 균사체가 짧은 시간내에 생장하는 것으로 생각된다.

Table 15. Wet weight of mushroom mycelia and β-glucan of submerged liquid cultured at different temperature by *Agaricus Blazei*. The culture medium was consisted of basal medium and green tea (GT 0.5%, w/v).

Temperature (℃)	Wet weight of Mycelia (g/100 ml)	β-Glucan[1)] (mg/100 ml)
3	1.80±0.18	80.07±9.11
4	1.96±0.14	82.42±4.29
5	2.13±0.11	81.48±5.57

[1)] β-Glucan content was determined by 80% ethanol precipitation method.

나) 양파분말 첨가 액체배지에서의 배양

양파분말을 첨가하여 제조한 액체배지에서도 녹차분말을 첨가한 배지의 경우와 비슷하게 균사체와 β-glucan 함량이 약간 증가하였을뿐 유의성은 없었다 (**Table 16**).

Table 16. Wet weight of mushroom mycelia and β-glucan of submerged liquid cultured at different temperature by *Agaricus Blazei*. The culture medium was consisted of basal medium and onion (ON 1.0%, w/v).

Culture peroid (day)	Wet weight of Mycelia (g/100 ml)	β-Glucan[1)] (mg/100 ml)
3	2.83±0.24	80.00±2.52
4	3.06±0.14	83.05±4.32
5	3.14±0.17	84.31±1.76

[1)] β-Glucan content was determined by 80% ethanol precipitation method.

4. 녹차와 양파에 버섯균사체가 분비한 효소를 처리하여 β-glucan과 phytochemical 배당체생성

가. 배당체생성 확인과 제품개발

요약

○녹차분말과 양파분말을 기본 액체배지에 혼합하여 배양한시료에서 β-glucan과 phytochemical(catechin, quercetin)의 배당체가 생성됨.

○버섯균사체배양물로부터 효소를 분리한 다음, 녹차와 양파중의 phytochemical (catechin, quercetin)과 버섯이 분비한 β-glucan을 효소반응시켜 배당체를 생성시키고자한 실험에서도 배당체가 생성됨.

○버섯균사체배양물로부터 분리한 효소를 처리하였을 때, 제품의 향과 맛이 아주 좋은 제품이 개발되었음.

1) 녹차분말과 양파분말을 기본 액체배지에 혼합하여 배양한시료에서 β-glucan과 phytochemical(catechin, quercetin)의 배당체 생성

녹차및 양파분말을 기본배지에 첨가하여 버섯균사체를 배양한 배양물을 열수추출하여 고형물로 부터 배당체를 분리하고 확인하였다.

2) 버섯균사체배양물로부터 효소를 분리한 다음, 녹차와 양파중의 phytochemical (catechin, quercetin)과 버섯이 분비한 β-glucan을 효소반응시켜 배당체를 생성

기본배지에서 버섯균사체를 배양한 다음, 배양액을 양파분말과 녹차분말에 첨가(1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 1:10, 1:20-분말 : 배양액, w/v)한 다음, 55℃에서 3시간동안 반응시킨 결과 β-glucan과 phytochemical **(catechin, quercetin)**배당체가 생성됨을 확인하였다. 그러나, 생성량은 버섯균사체를 직접 배양한 경우 보다 훨씬 적었다.

나. 배당체의 추출 및 분리

요약

녹차시료

○ DEAE celluloase coloumn으로 80%에탄올침전물을 분리하였을 때 GT0.5시료로 부터 280nm에서 흡광을 갖는 2개의 peak를 얻었슴

○ TLC로 분리한 결과 Rf 0.08, 0.18에서 DAP과 UV모두에서 발색되는 물질이 분리됨으로써 이들 두 개의 벤드가 β-glucan catechin배당체로 추정됨

○ HPLC에서 β-glucan catechin배당체를 재분리함

양파시료

○ DEAE celluloase coloumn으로 80%에탄올침전물을 분리하였을 때 ON1.0시료로 부터 280nm에서 흡광을 갖는 4개의 peak을 얻었음

○ TLC로 분리한 결과 Rf 0.07, 0.12에서 DAP과 UV모두에서 발색되는 물질이 분리됨으로써 이들 두 개의 벤드가 β-glucan quercetin배당체로 추정됨

○ HPLC에서 β-glucan quercetin배당체를 재분리함

1) 용매추출 및 분획

녹차분말 및 양파분말을 첨가하여 배양한 버섯균사체 배양추출물 (GT, ON)로부터 β-glucan과 catechin배당체, 그리고 β-glucan과 quercetin의 배당체생성의 확인을 위하여 용매분획하였다. 기본배지에 녹차분말 (0.5%, w/v)을 첨가하여 배양한 버섯균사체 배양추출물 (**GT0.5**)에 hexane, chloroform, ethylacetate, butanol 분획물 순으로 분획하여 각각 0.03, 0.24, 0.61, 0.39 g/L을 얻었다 (**Figure 10, Table 17**). 기본배지에 양파분말 1.0% (w/v)을 첨가하여 배양한 버섯균사체 배양추출물 (**ON1.0**)을 hexane, chloroform, ethylacetate, butanol 분획물 순으로 분획하여 각각 0.03, 0.34, 0.72, 0.41 g/L 이었다 (**Table 17**).

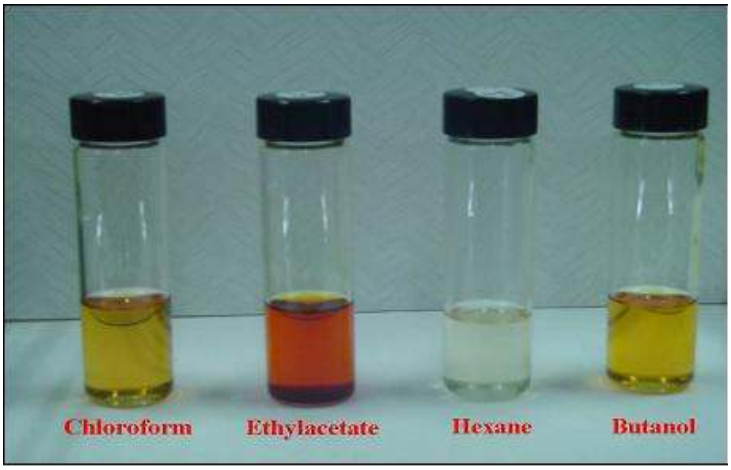


Figure 10. Solvent fractions of submerged liquid cultured by *Agaricus Blazei.* Culture medium was basal medium with green tea powder (GT 0.5%, w/v).

Table 17. Fractionated amount of solvent fractions from submerged liquid cultured by *Agaricus Blazei*s

Fraction	Amount (Dry weight, g/L)	
	GT0.5	ON1.0
Hexane	0.03	0.03
Chloroform	0.24	0.34
Ethylacetate	0.61	0.72
Butanol	0.39	0.41
Total	1.27	1.50

2) 에탄올 침전물 조제

GT0.5와 ON1.0로 부터 β-glucan과 catechin배당체, 그리고 β-glucan과 quercetin의 배당체생성 확인을 위하여 에탄올 수용액을 농도별로 제조하여 배양물을 침전시켰다 (**Table 18**).

Table 18. Percent of ethanolic precipitates of submerged liquid cultured by *Agaricus Blazei.*

Ethanol concentration (%)[1)]	Amount of precipitates (Dry weight g/L)	
	GT0.5	ON1.0
10EP	0.15	0.12
20EP	0.19	0.12
30EP	0.25	0.20
40EP	0.31	0.31
50EP	0.77	0.72
60EP	1.34	1.42
70EP	1.77	1.86
80EP	4.24	4.23
90EP	0.98	0.90

[1)]Ethanol concentration used for precipitation

3) DEAE column chromatography

기본배지에 녹차분말 0.5% (w/v)을 첨가하여 배양한 버섯균사체 배양추출물의 80% 에탄올 침전물 (GT0.5-80EP)를 DEAE cellulose column을 이용하여 분획하였다. GT0.5-80EP 2 ml (0.424g/ml)를 loading한 다음, 5 mM sodium phosphate buffer (pH 7.7)로 용출시켜 fraction collector (Pharmacia Biotech RediFrac)를 이용하여 10 ml씩 분획하였다. 분획물들은 UV spectrum (Backman p-680 spectrophotometer)을 이용하여 280 ㎚에서 흡광을 확인하였다. 3~7번 tube, 8~11 tube을 동일한 물질로 판단되는 2개의 peak를 얻었다 (**Figure 11**).

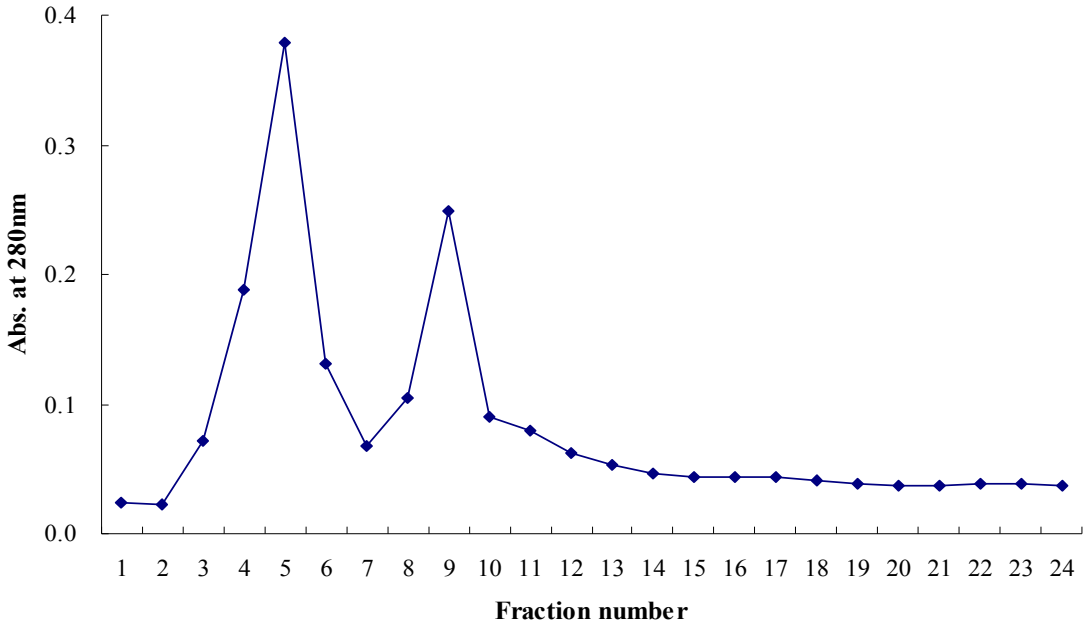


Figure 11. Fractionation of GT0.5-80EP by DEAE column. 5 mM sodium phosphate buffer (pH 7.7) was used as eluent. The collected volume of each fraction was 10 ㎖.

기본배지에 양파분말 0.5% (w/v)을 첨가하여 배양한 버섯균사체 배양추출물의 80% 에탄올 침전물 (ON1.0-80EP)를 DEAE cellulose column을 이용하여 분획하였다. ON1.0-80EP 2 ㎖ (0.423g/㎖)를 loading한 다음, 5 mM sodium phosphate buffer (pH 7.7)로 용출시켜 fraction collector (Pharmacia Biotech RediFrac)를 이용하여 10 ㎖씩 분획하였다. 분획물들은 UV spectrum (Backman p-680 spectrophotometer)을 이용하여 280 ㎚에서 흡광을 확인하였다. 6~9 tube, 10~14, 20~25, 31~34 fraction 4개를 얻었다 (**Figure 12**).

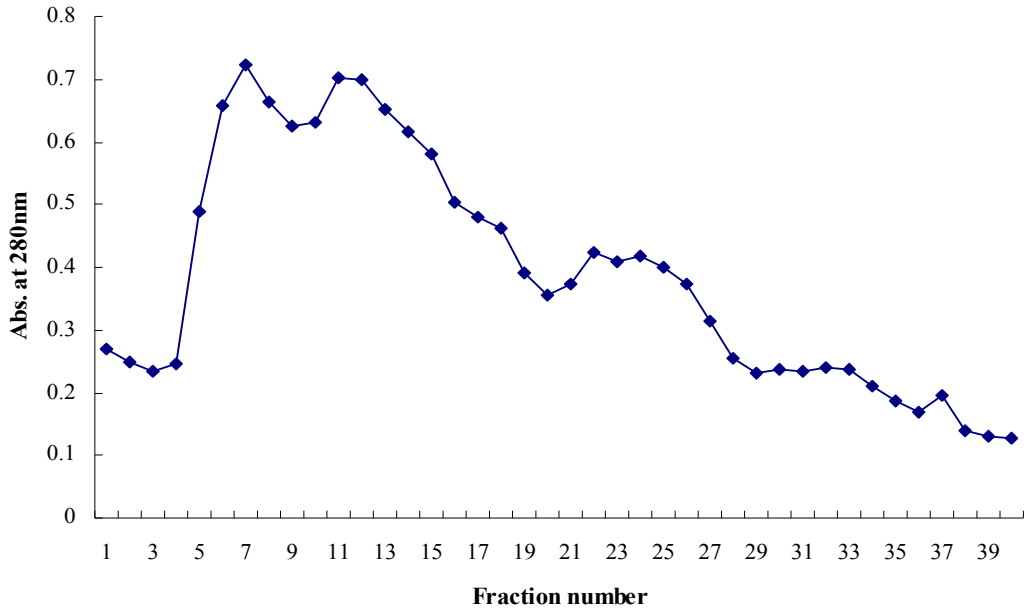


Figure 12. Fractionation of ON1.0-80EP by DEAE column. 5 mM sodium phosphate buffer (pH 7.7) was used as eluent. The collected volume of each fraction was 10 ml.

4) TLC에서의 확인

가) GT-80EP

다당체의 표준품으로는 DP7 (maltoheptaose), DP5 (maltopentaose), DP3 (maltotriose)를 사용하였고 이들의 Rf값은 각각 0.19, 0.25, 0.40이었고 이들은 모두 DAP에 의해 발색되었다. 표준품 catechin의 경우 Rf 0.89에서 spot을 나타내었고 이것은 UV와 DAP에서 모두 발색하였다. GT 80EP의 경우 Rf 0, 0.1, 0.27부분에서 UV와 DAP에서 모두 발색하였으며, Rf 0.22와 0.30, 0.48에서는 DAP에서만 발색하였다.

DAP에서만 발색된 Rf 0.22는 DP6과 분자량이 유사한 당이며 Rf 0.3은 DP4와 분자량이 유사한 당이고, Rf 0.48은 단당일것으로 예상된다. UV와 DAP모두에서 발색한 Rf 0의 경우 catechin과 동일한 색상의 발색을 나타내면서도 분자량이 커서 전개용매에 전개되지 않는 것으로 보아 고분자의 β-glucan과 catechin이 배당체를 이루고 있는 형태인 것으로 예상된다. Rf 0.1의 spot 또한 고분자다당체의 catechin배당체로부터

분리된 DP 8~10정도의 β-glucan과 catechin 배당체로 예상된다. Rf 0.27은 DP5와 유사한 위치에 spot을 나타낸 것으로 보다 DP5정도의 분자량을 가진 β-glucan과 catechin 배당체로 예상된다.

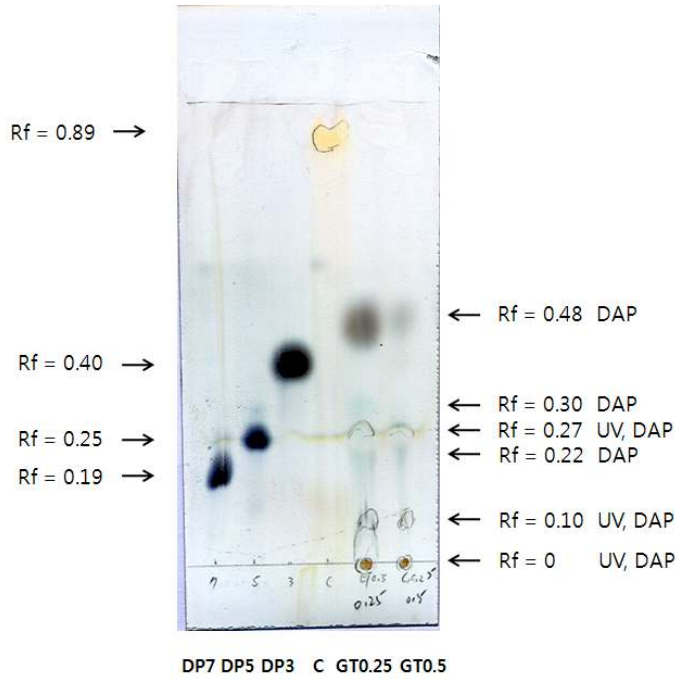


Figure 13. TLC pattern of GT-80EP. Elution solvent; BuOH:EtOH: DDW (5:3:3: v/v/v). DP7; maltoheptaose. DP5; maltopentaose, DP3; maltotriose, C; Cathchin, GT0.25; Green tea powder (0.25%) was added to the basal culture medium, and cultured liquid was precipitated with 80% ethanol. GT0.5; Green tea powder (0.5%) was added to the basal culture medium, and cultured liquid was precipitated with 80% ethanol.

나) ON-80EP

ON-80EP의 경우 Rf 0, 0.05, 0.16, 0.25부분에서 UV와 DAP에서 모두 발색하였으며, Rf 0.30, 0.48에서는 DAP에서만 발색하였다.

DAP에서만 발색된 Rf 0.3은 DP4와 분자량이 유사한 당이고, Rf 0.48은

단당일것으로 예상된다. 양파분말을 첨가하지 않은 버섯균사체배양물 (AP)의 경우 Rf 0.05부위에 DAP에만 발색하는 sopt을 나타내었으나 ON-80EP의 경우 Rf 0, Rf 0.07, Rf 0.12의 spot은 UV와 DAP에서 모두 발색을 나타내었으며, 양파유래 quercetin과 β-glucan 배당체일 가능성이 있다.

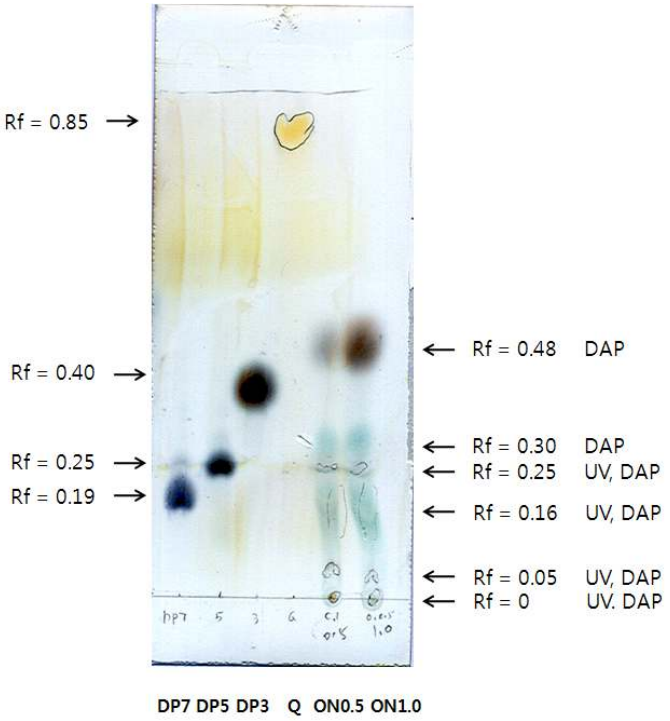


Figure 14. TLC pattern of ON-80EP. Elution solvent; BuOH:EtOH: DDW (5:3:3: v/v/v). DP7; maltoheptaose. DP5; maltopentaose, DP3; maltotriose, Q; quercethin, ON 0.5; Onion powder (0.5%) was added to the basal culture medium, and cultured liquid was precipitated with 80% ethanol. ON 1.0; Onion powder (1.0%) was added to the basal culture medium, and cultured liquid was precipitated with 80% ethanol.

5) HPLC 분석

GT0.5-80EP를 DEAE 컬럼으로 분획한 것을 HPLC로 분석하였다 (**Figure 15**). DEAE column에서 분획된 첫 번째 peak (GT0.5-80EP-A)를 collection하여 HPLC로 다시 분석한 결과, RT 10.212에서는 UV에서만 detection되는 peak가 나타났다. DEAE column에서 분획된 컬럼의 두 번째 peak (GT0.5-80EP-B)를 collection하여 HPLC로 다시 분석한 결과, RT 8.886 분대에서 RI와 UV 모두에서 detection되었다. 따라서, RT 8.886분대에 detection된 peak가 배당체일 가능성이 크다.

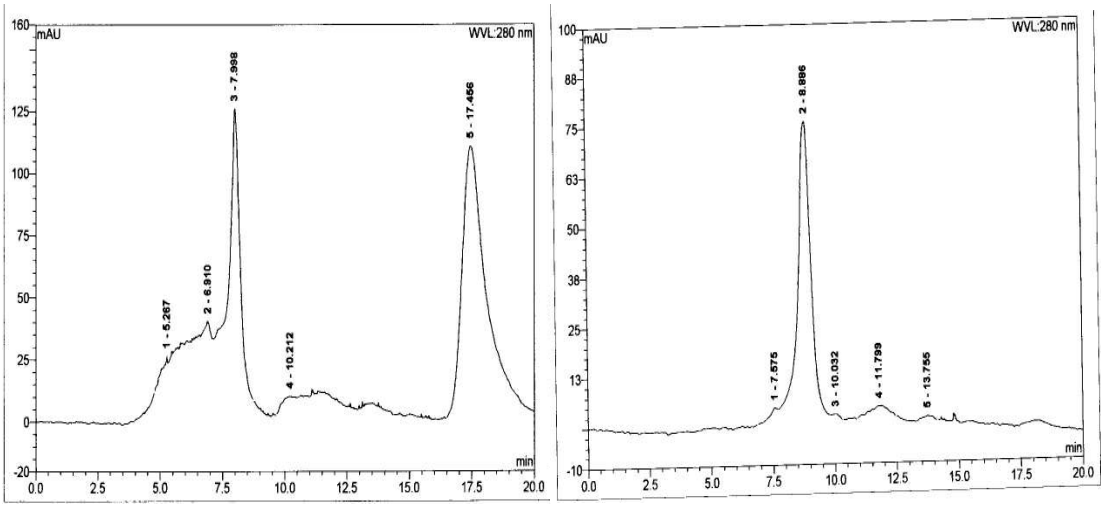


Figure 15. HPLC chromatogram of GT0.5-80EP-A, GT0.5-80EP-B. Detector: UV. Column: TSK-GEL column (4.6×250 ㎜). Flow rate: 1 ㎖/min, Moblie phase: DDW. left column: GT0.5-80EP-A, right column: GT0.5-80EP-B.

ON1.0-80EP를 DEAE 컬럼으로 분획한 것을 HPLC로 확인하였다 (**Figure 16**). DEAE column에서 분획된 첫 번째 peak (ON1.0-80EP-A)는 RT 8.146분대와 17.466에서 RI와 UV모두에서 detection되는 peak가 나타났으며, DEAE column에서 분획된 두 번째 peak (ON1.0-80EP-B)는 RT 8.913분대와 17.724 분대에서 RI와 UV모두에서 detection되는 peak가 나타났다. DEAE column에서 분획된 세 번째 peak (ON1.0-80EP-C)는 RT 6.769, 7.753, 17.480 분대에서 나타났다. DEAE column에서 분획된 네 번째 peak (ON1.0-80EP-D)는 RT 8.867와 17.480 분대에서 나타났다.

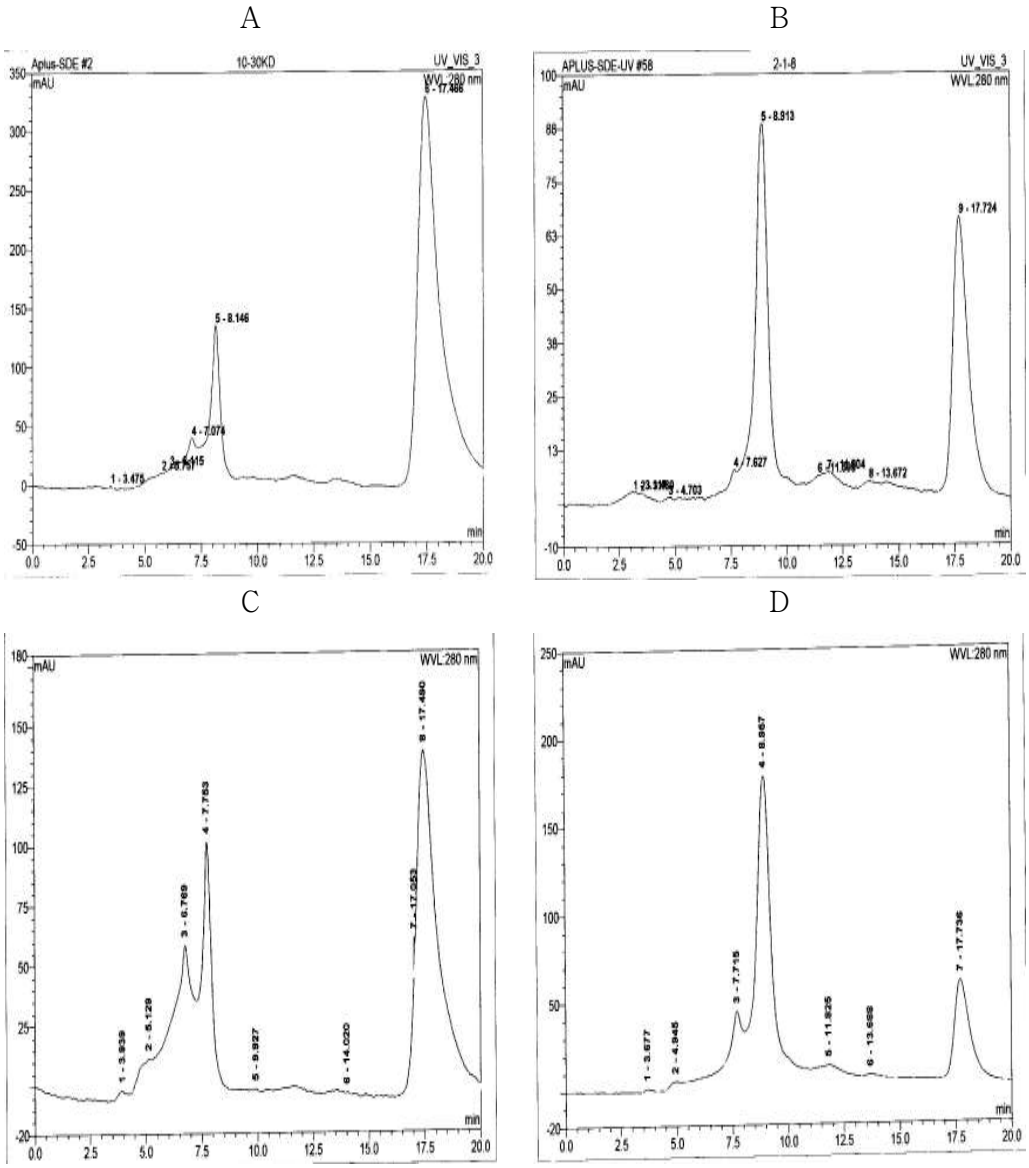


Figure 16. HPLC chromatogram of ON1.0−80EP−A, ON1.0−80EP−B, ON1.0−80EP−C and ON1.0−80EP−D. Detector: UV. Column: TSK−GEL column (4.6×250 ㎜). Flow rate: 1 ㎖/min, Moblie phase: DDW. A:ON1.0−80EP−A, B:ON1.0−80EP−B, C:ON1.0−80EP−C, D:ON1.0−80EP−D.

6) 구조확인

요약

○GT0.5-80EP와 ON1.0-80EP는 616.96~540.33 ㎝$^{-1}$에서 흡광벤드가 나타남. 버섯균사체를 배양하지않은 녹차추출물과 양파추출물, 그리고 녹차추출물과 양파추출물을 첨가하지 않고 배양한 버섯균사체배양물에서는 발견되지않았음

○이 특징적인 흡광벤드는 catechin과 quercetin표준품과 비교하였을 때, sharp하지 않고 board하게 나타난 것이 특징임.

○특징적인 UV흡광은 GT-80EP는 279nm와 350nm이었으며, ON-80EP는 279nm와 557nm이었음.

○GC-MS를 이용하여 구성당을 확인한 결과, GT0.5-80EP의 경우 Glucose, xylose, 그리고 ON-80EP의 경우는 Glucose와 mannose가 확인되었음.

가) IR

Catechin 표준품의 특징적인 IR 스펙트럼은 3386.33 ㎝$^{-1}$(broad OH absorption), 1606.38~ 1030.41 ㎝$^{-1}$ (very weak or medium sharp eight peaks), 983.55, 870.05, 823.09, 766.59, 666.09 ㎝$^{-1}$(very weak, sharp)이었다 (**Figure 17**).

아가리쿠스버섯균사체 추출물을 80% 에탄올로 침전시킨 침전물 (AG-80EP)은 3441.94 (broad OH absorption), 2924.35 ㎝$^{-1}$ (small, medium broad), 1636.45 ㎝$^{-1}$ (medium, broad)와 1058 ㎝$^{-1}$ (medium, broad)에서 특징적인 흡광을 보였다.

녹차열수추출물 (GTE)은 3453.83 (broad OH absorption) 및 1636.46 ㎝$^{-1}$ (medium, broad)와 1052.15 ㎝$^{-1}$ (medium, broad)에서 특징적인 흡광을 보였다. GT0.5-80EP의 경우는 GTE 및 AG-80EP에서 관찰된 흡광 이외에 616.96, 540.33 ㎝$^{-1}$ (medium broad)에서 특이한 흡광을 나타내었다.

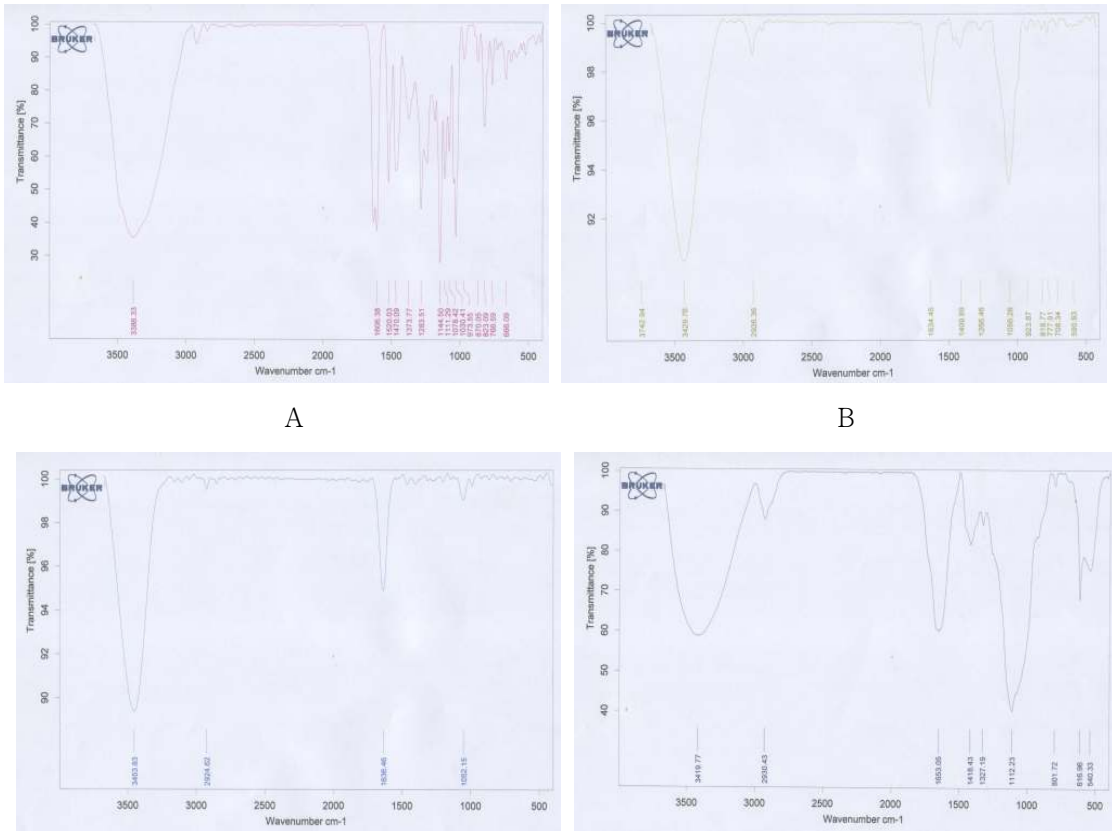


Figure 17. IR spectrum of catechin (A), AG-80EP (B), hot water extract of green tea (C), GT0.5-80EP (D)

Quercetin 표준품의 특징적인 IR 스펙트럼은 3410.45 cm^{-1} (broad OH absorption), 1660.26~ 1168.93 cm^{-1} (very weak or medium sharp 9 peaks), 1014.72, 825.55, 639.01 cm^{-1}(very weak, sharp) 이다 (**Figure 18**).

양파열수추출물 (ONE)은 3441.94 (broad OH absorption), 2924.35 cm^{-1} (small, medium broad), 1636.46 cm^{-1} (medium, broad)와 1058.33 cm^{-1} (medium, broad)에서 특징적인 흡광을 보였다. ON1.0-80EP의 경우는 ONE와 AG-80EP의 흡광벤드 이외에 657.13, 615.79, 540.73 cm^{-1} (medium broad)에서 특징적인 흡광을 보였다.

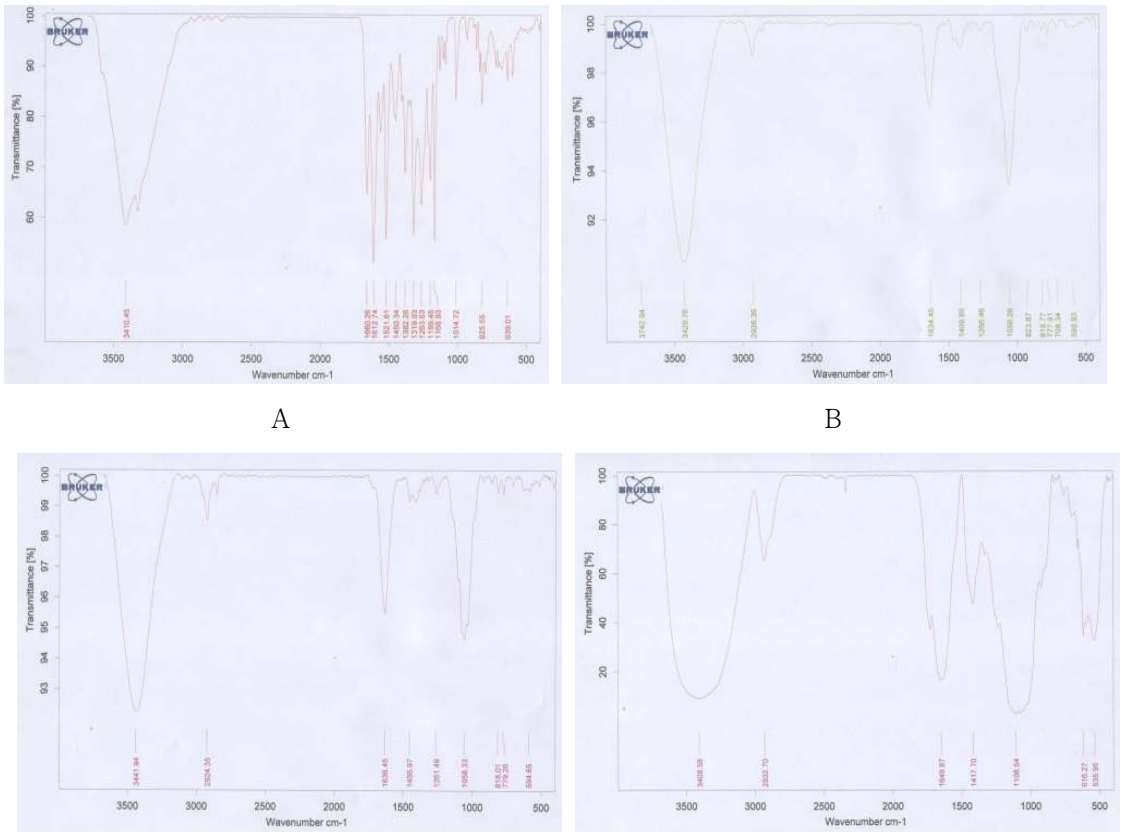


Figure 18. IR spectrum of Quercetin (A), AG-80EP (B), Onion tea hot water extract (C), ON1.0-80EP (D)

나) UV scan

AG-80EP는 273nm에서 최대 peak을 나타내며 GTE의 경우 251, 265 nm에서 최대 peak을 나타내었다. Catechin 표준품은 207 nm에서 최대peak를 나타내고 279, 530, 541, 548 nm에서도 흡광을 나타내었다. DP7 당의 경우 최대 흡광값은 231 nm였으며, 275, 279, 282, 295nm에서 흡광을 나타내었다.

GT0.5-80EP를 6일간 배양하면 251, 258, 265, 279 nm에서 최대 흡광도를 나타내었다. 배양기간이 9일이상 경과되면 이러한 특징적인 UV흡광을 나타내는 peak들이

사라지는데, 이는 bioconversion된 배당체가 다른 물질로 전환되므로써 일어나는 현상일 수도 있을 것으로 추정된다. 따라서, 배당체를 생성하기위해서는 배양기간을 6일 이내로 하는 것이 바람직할 것으로 생각된다.

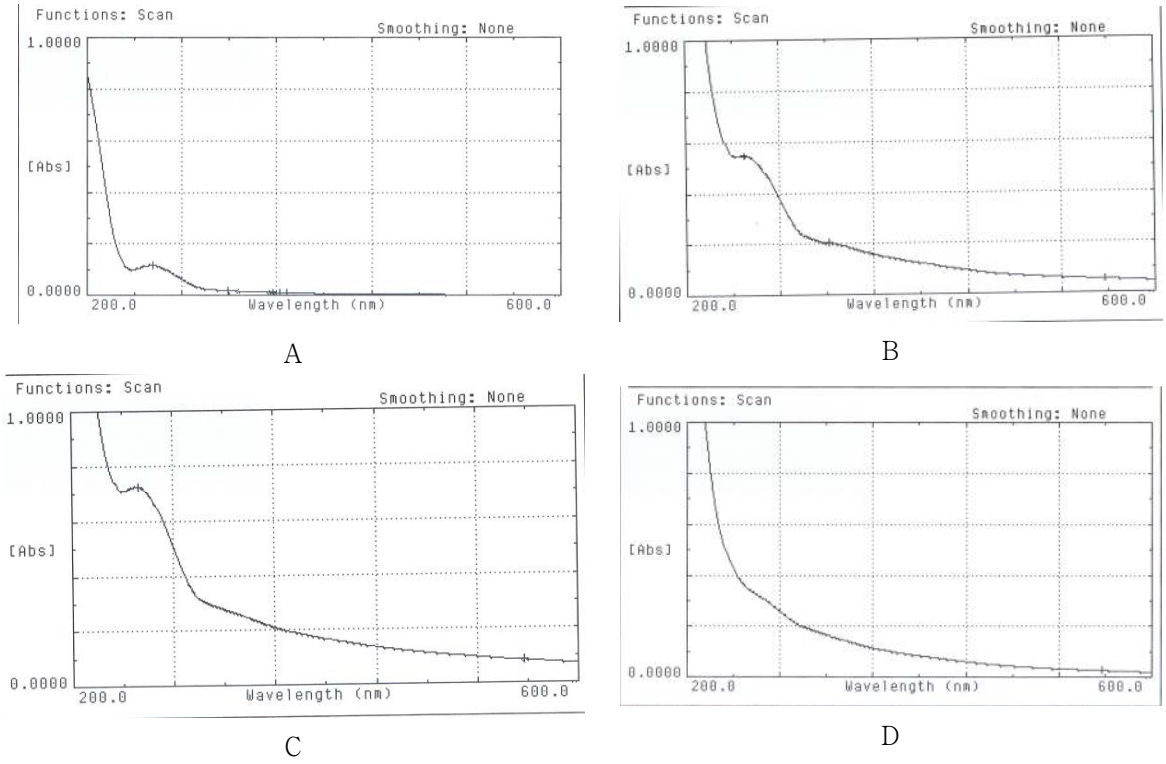


Figure 19. UV scan of GT. Absorbance was scanned at 200 to 600 ㎚ by Backman C-680 series spectrophotometer. A; AG-80EP, B: Submerged liquid culture of Agaricus blazei in medium containing 0.125% green tea powder (GT0.125%), C; GT0.25, D; GT0.5.

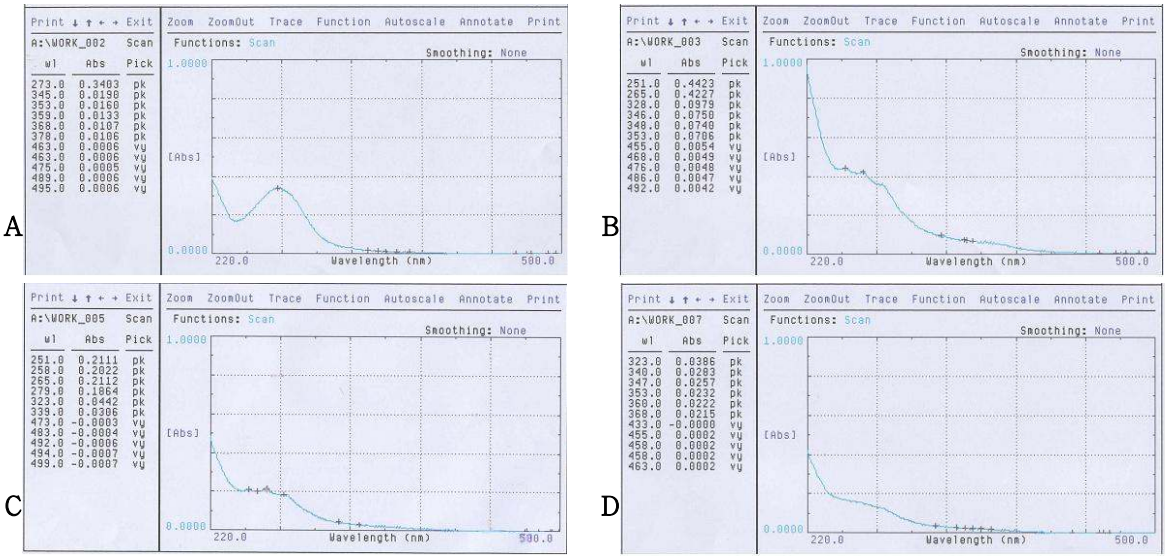


Figure 20. UV scan of AG-80EP (A). B; GTE. C: 6 day *Agaricus blazei* with green tea extract. D: 9 day *Agaricus blazei* with green tea extract.

ON1.0-80EP은 255 ㎚에서 최대 peak을 나타내었으며, 257, 267 ㎚에서 peak의 흔적을 나타내고 350, 523, 557 ㎚에서도 peak를 나타내었다. 양파의 quercetin은 228, 202, 373, 557 ㎚에서 peak를 나타내었다. 양파를 첨가한 배양물의 열수출물에 공통적으로 257, 350 ㎚에서 peak를 나타낸다는 사실로 미루어 보아 bioconversion 물질, 즉 β-glucan과 quercetin 배당체가 생성되었을 가능성이 크다. Quercetin의 특질적인 peak인 557 ㎚에서 흡광을 나타내는 것으로 미루어, quercetin 배당체 생성 가능성은 더욱 크다.

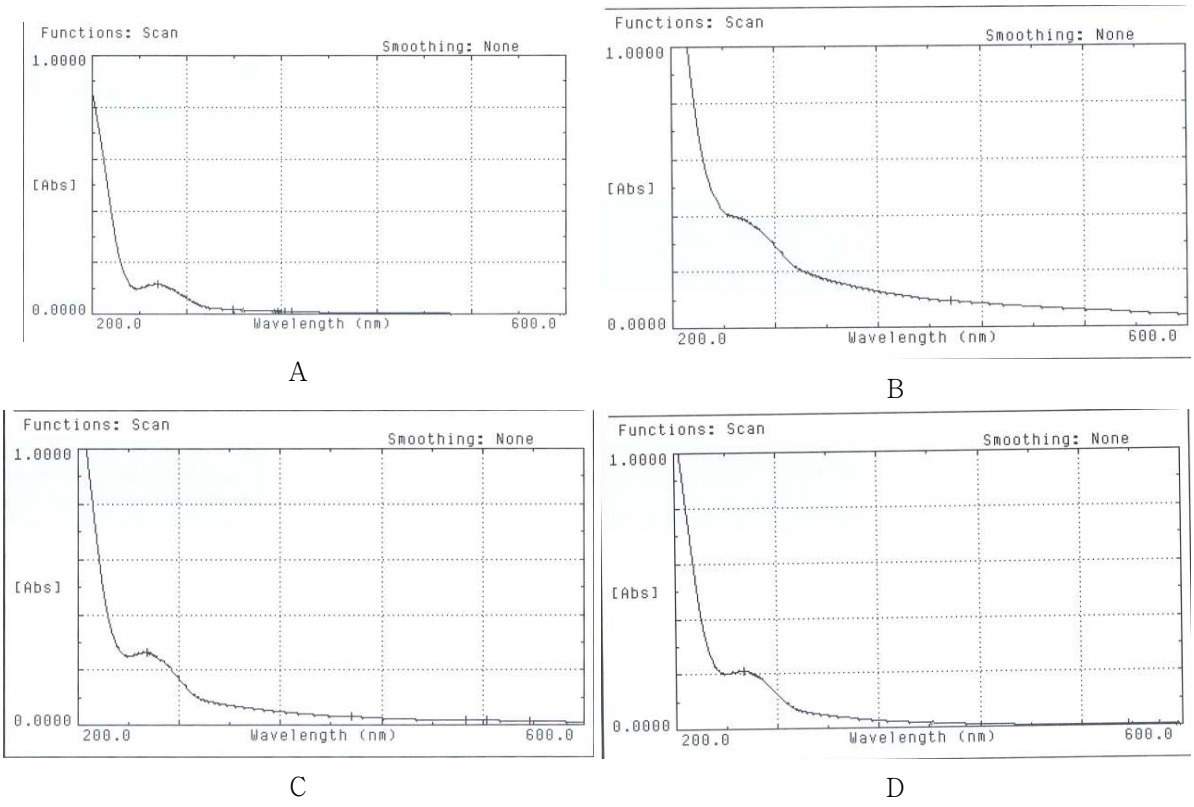


Figure 21. UV scan of GT. Absorbance was scanned at 200 to 600 ㎚ by Backman C-680 series spectrophotometer. A; AG-80EP, B: Submerged liquid culture of Agaricus blazei in medium containing 0.5% onion powder (ON0.125), C; ON0.25, D; ON0.5.

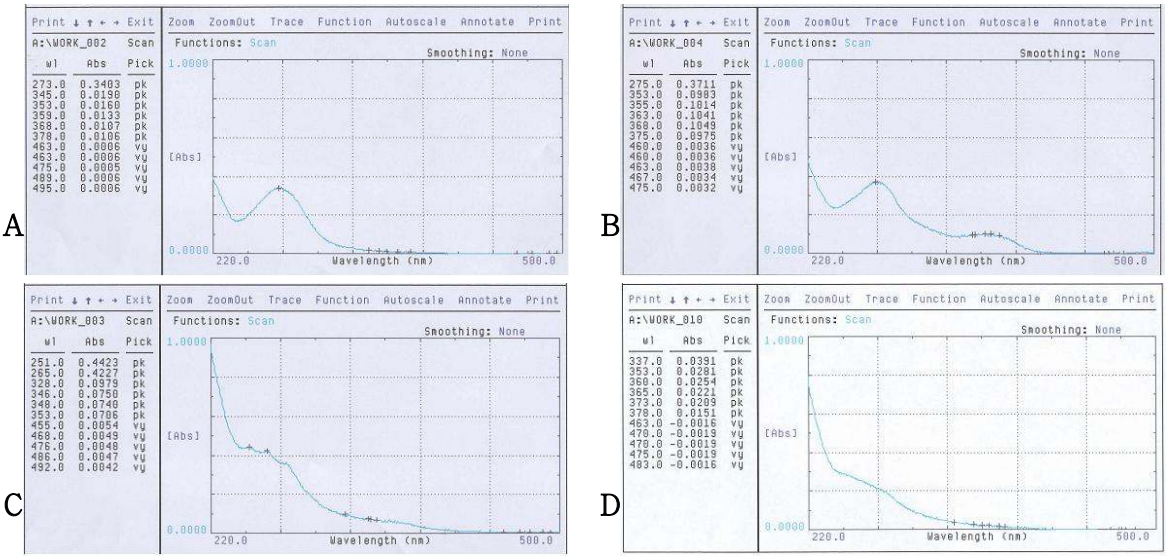


Figure 22. UV scan of AG-80EP (A). B; ONE. C: 6 day *Agaricus blazei* with onion extract. D: 9 day *Agaricus blazei* with onion extract.

다) GC-MS/MS

Pazur등의 방법에 따라 분리된 다당체를 acetyl화 한 다음, GC-MS를 사용하여 구조를 확인하였다. 그 결과, GT0.5-80EP의 경우 Glucose, xylose, 그리고 ON1.0-80EP의 경우는 Glucose와 mannose가 확인되었다 (**Figure 23**).

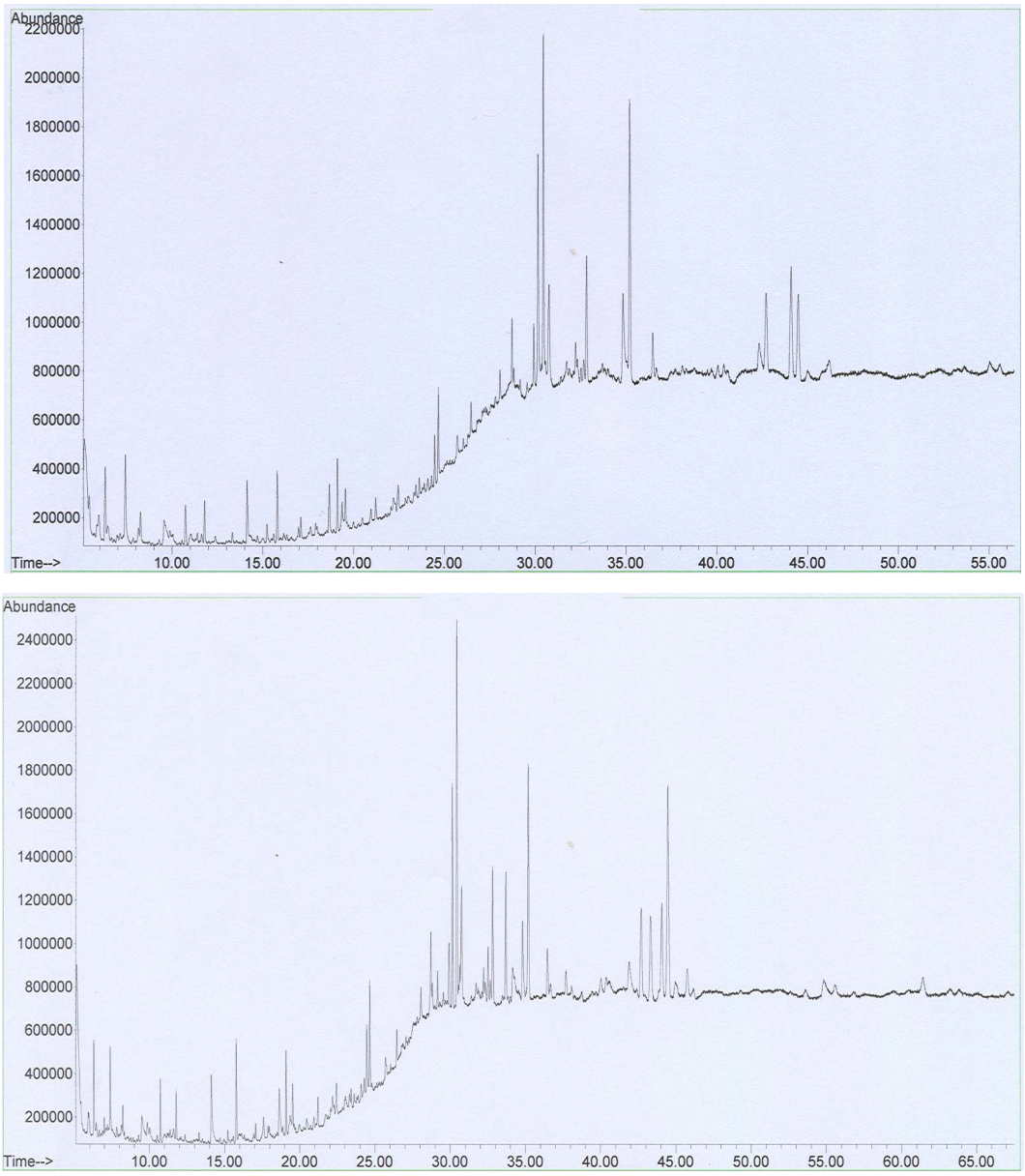


Figure 23. GC-MS of GT0.5-80EP (up) and ON1.0-80EP (down). GC column; Supelcowax-10 (60m, 0.32mm i.d.). Temperature program; 150C (5min) - 240C (20min), at 4℃/min.

5. 기능성 조사

가. 항산화효과

1) Peroxide value (POV)

요약
○GT-80EP와 ON-80EP를 처리하였을 때 POV가 낮아 짐으로 항산화성이 있음.
○처리 농도가 증가할 수록 POV의 감소가 크므로, 처리량에 따른 dose response를 보임

Linoleic acid를 대조군으로하고 linoleic acid에 ascorbic acid, BHT, α-tocopherol 및 GT0.5-80EP를 첨가하여 시간이 경과하면서 과산화물가 (POV)의 변화에 대해 관찰한 결과는 Figure 24, 25와 같다.

GT0.5-80EP의 처리농도가 증가할 수록 POV생성을 억제하였다. 동일량을 처리하였을 때 ascorbic acid와 α-tocopherol처리구 보다 높은 POV생성 억제 효과를 나타내었다. 그러나 BHT의 항산화효과 보다는 낮게 나타났다 (**Figure 24**).

ON1.0-80EP를 처리한 경우에도 GT0.5-80EP를 처리하였을 때와 유사한 경향을 나타내었으나, dry weight기준으로 동일량을 처리하여 비교하였을 때 보다, POV값은 높았다 (**Figure 25**).

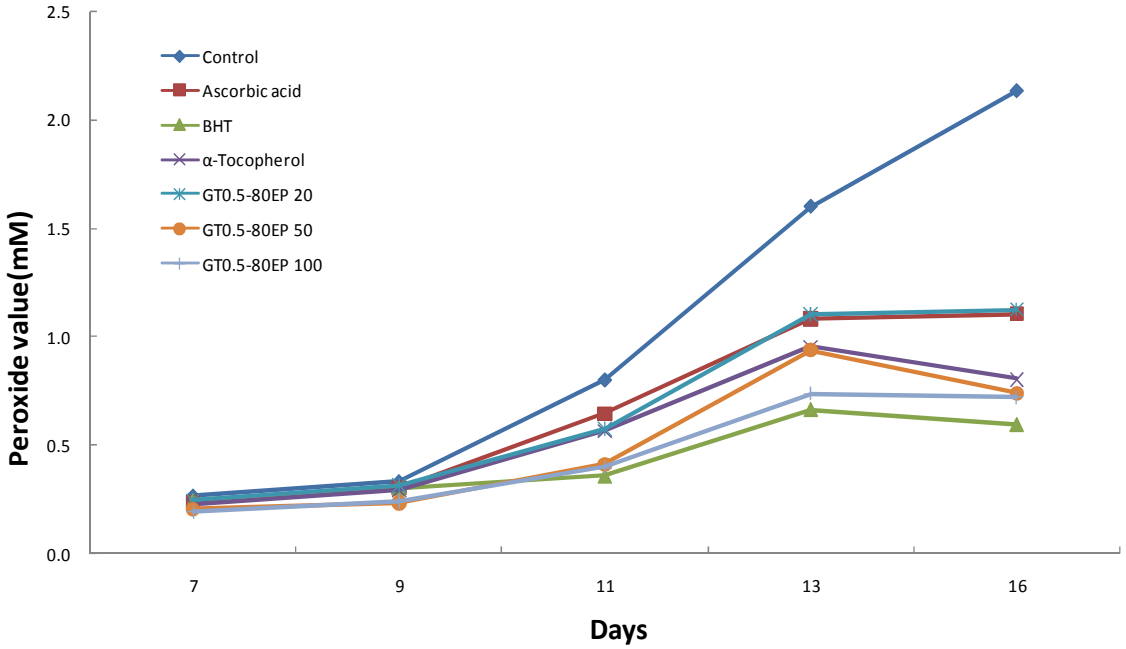


Figure 24. POV of linoleic acid with ascrorbic acid, α-Tocoperol, GT0.5-80EP 20, GT0.5-80EP 50, GT0.5-80EP 100.

-*- ; GT0.5-80EP 20: 20 ㎍/㎖ of 80% ethanol precipitates of submerged liquid cultured in basal medium with 0.5% greed tea powder by mushroom mycelia.

-•- ; GT0.5-80EP 50: 50㎍/㎖ of 80% ethanol precipitates of submerged liquid cultured in basal medium with 0.5% greed tea powder by mushroom mycelia.

-+- ; GT0.5-80EP 100: 100㎍/㎖ of 80% ethanol precipitates of submerged liquid cultured in basal medium with 0.5% greed tea powder by mushroom mycelia.

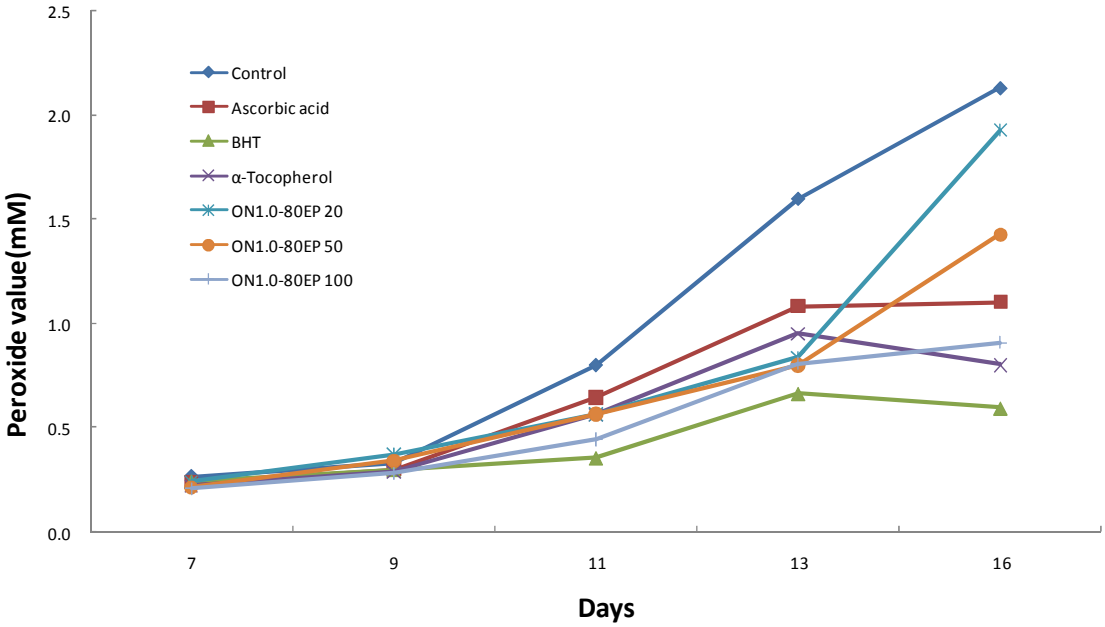


Figure 25. POV of linoleic acid with ascrorbic acid, α-Tocoperol, ON1.0-80EP 20, ON1.0-80EP 50, ON1.0-80EP 100.

-*- ; ON1.0-80EP 20: 20㎍/㎖l of 80% ethanol precipitates of submerged liquid cultured in basal medium with 1.0% greed tea powder by mushroom mycelia.

-•- ; ON1.0-80EP 50: 50㎍/㎖l of 80% ethanol precipitates of submerged liquid cultured in basal medium with 1.0% greed tea powder by mushroom mycelia.

-+- ; ON1.0-80EP 100: 100㎍/㎖l of 80% ethanol precipitates of submerged liquid cultured in basal medium with 1.0% greed tea powder by mushroom mycelia.

2) Free radical scavenging activity (DPPH)

요약

○GT-80EP는 34.2%의 free radical 제거능을 보임. GT-80EP의 용매분획물중 EtOAc분획물의 free radical 제거능은 78.5%로 BHT (79.9%)와 유사한 활성을 나타내었다. Dose response를 나타냄.

○ON-80EP의 경우 21.3%의 free radical 제거능을 보임. ON-80EP를 용매분획한것중 EtOAc분획물의 free radical 제거능은 60.2%로 BHT (79.9%)보다는 약간 낮음. Dose response를 나타냄.

가) GT0.5-80EP의 free radical 제거능

GT0.5-80EP의 free radical 제거능을 DPPH 방법을 이용해서 측정 해보았다. 시료는 AG-80EP, 기본배지에 녹차분말 0.5% 첨가하여 제조한 배지에 버섯균사체를 배양하지 않고 열수 추출한 시료 (GTE-BM) 및 GTE를 사용하였다. Positive control로 BHT를 하여 비교시험을 하였다. 96 well plate에 DPPH 시약 200 μl 과 각각의 시료 250 μg/MeOH 50 μl를 첨가하여 free radical 제거능을 조사하였다.

AG-80EP, GTE-BM, GT0.5-80EP, GTE는 각각 12.3, 25.5, 34.2, 31.5 %의 free radical 제거능을 나타내었고, positive control인 BHT (90.5%)에 비해 낮은 제거능을 보였으나 처리시료중 GT0.5-80EP가 가장 높은 제거능을 보였다 (**Figure 26**).

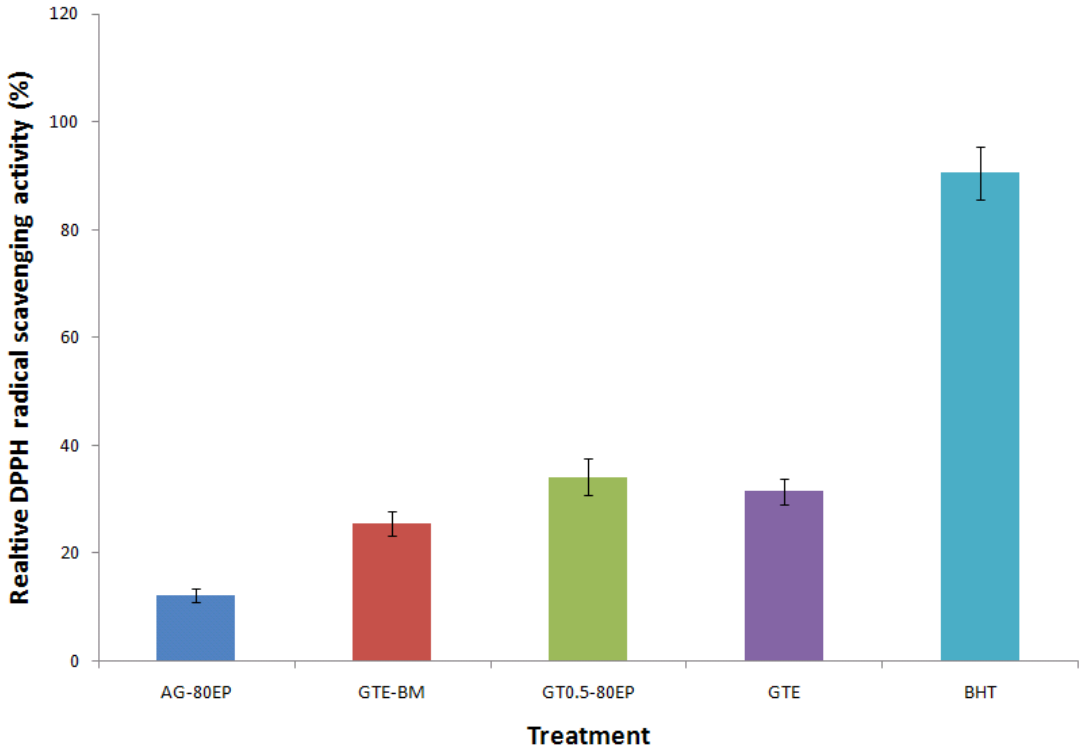


Figure 26. Free radical scavenging effects of AG-80EP, GTE-BM, GT0.5-80EP, GTE **AG-80EP**: 80% ethanol precipitates of submerged liquid cultured in basal medium by mushroom mycelia., **GTE-BM**: hot water extract of the mixture of catechin (0.5%) extracted from green tea powder and basal medium., **GT0.5-80EP**: 80% ethanol precipitates of submerged liquid cultured in basal medium with 0.5% greed tea powder by mushroom mycelia. **GTE**: hot water extract of green tea powder.

나) GTC0.1-80EP의 free radical 제거능

기본배지에 녹차분말에서 추출한 catechin을 첨가 (dry weight base로 0.1%)하여 제조한 배지에 버섯균사체를 배양한 다음, 이를 열수 추출하고 80%에탄올침전을 시킨 시료 (GTC0.1-80EP)의 free radical 제거능을 측정 하였다. AG-80EP, 기본배지 열수추출물 (BM), 기본배지에 녹차분말에서 추출한 catechin을 첨가하여 열수추출한 시료

(GTC-BM), 녹차분말에서 추출한 catechin 열수추출물 (GTC-HE), BHT를 대조구로 하여 비교하였다.

AG-80EP, GTC0.1-80EP, BM, GTC-BM, GTC-HE, BHT의 free radical 제거능은 각각 12.4, 62.7, 8.5, 48.9, 52.4, 79.8% 이었다 (**Figure 27**).

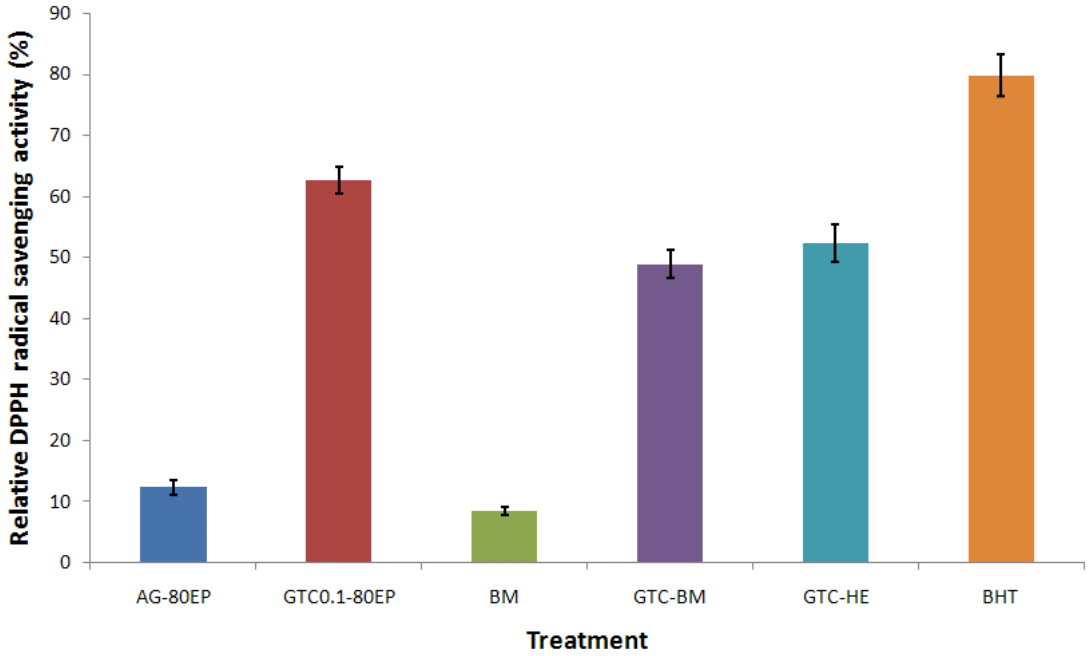


Figure 27. Free radical scavenging effects of AG-80EP, GTC0.1-80EP, BM, GTC-BM, GTC-HE, BHT. **AG-80EP**: 80% ethanol precipitates of submerged liquid cultured in basal medium by mushroom mycelia. **GTC0.1-80EP**: 80% ethanol precipitates of submerged liquid cultured in basal medium with 0.5% catechin extracted from green tea powder by mushroom mycelia. **BM**: Basal medium., **GTC-BM**: hot water extract of the mixture of catechin (0.1%) extracted from green tea powder and basal medium, **GTC-HE**: hot water extract of catechin extracted from green tea powder.

다) GT0.5-80EP용매 분획물의 free radical제거능

GT0.5-80EP를 다시 용매 (hexane, chloroform, ethylacetate, butanol,

methanol)로 분획한 분획물의 free radical제거능을 조사하였다.

용매별로 각각 10.02, 10.25, 78.50, 42.50, 45.04%를 보임으로써 ethylacetate fraction이 가장 높은 제거능을 보였으며, BHT와 유사하였다 (79.90%) (Figure 28).

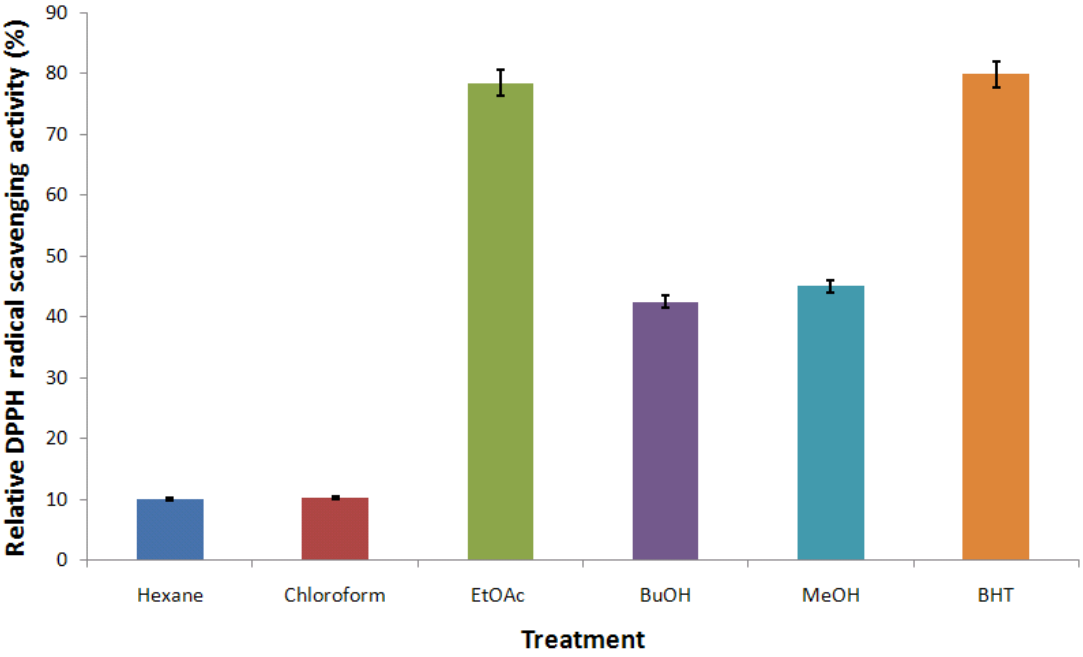


Figure 28. Free radical scavenging effects of solvent fractions (hexane, chloroform, ethylacetate, butanol, methanol) from GT0.5-80EP. GT0.5-80EP is 80% ethanol precipitates of submerged liquid cultured in basal medium with 0.5% green tea powder by mushroom mycelia.

라) GT0.25-80EP와 GT0.5-80EP의 free radical 제거능

기본배지에 첨가된 녹차분말의 첨가량을 0.25%와 0.5%로 달리하여 버섯균사체를 배양한 다음, 열수로 추출한 용액을 80%에탄올로 침전시킨 침전물의 free radical 제거능을 조사하였다.

AG-80EP, GT0.25-80EP, GT0.5-80EP, BHT의 free radical제거능은 각각 19.87, 28.27, 45.27, 78.2%이었다. 배지에 첨가한 녹차분말의 함량이 높은 배지에서 배양된 버섯균사체배양물의 free radical 제거능이 높았다 (**Figure 29**).

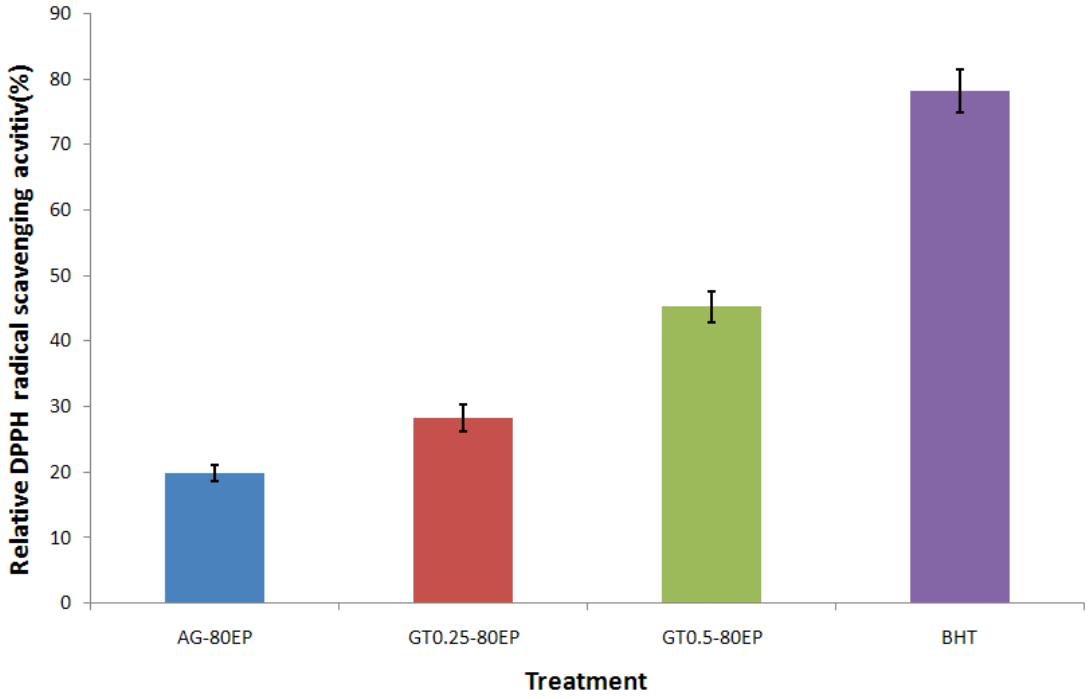


Figure 29. Free radical scavenging effects of AG-80EP, GT0.25-80EP, GT0.5-80EP, BHT. GT0.25-80EP and GT0.5-80EP are 80% ethanol precipitates of submerged liquid cultured in basal medium with 0.25% and 0.5% green tea powder by mushroom mycelia, respectively.

마) ON1.0-80EP의 free radical 제거능

양파분말 (dry weight base로 1.0%)을 기본배지에 첨가하여 배양한 버섯균사체배양액을 80%에탄올로 침전시킨 다음, 원심분리하여 얻은 시료 (ON1.0-80EP)의 free radical 제거능을 DPPH 방법을 이용해서 측정 하였다.

대조군으로 AB-80EP, 기본배지에 양파분말 1.0% 첨가하여 열수출한 것 (ONE-BM), ONE, BHT를 사용하였다. DPPH 방법을 통해 free radical 제거능을 측정해 본 결과, AG-80EP, ONE-BM, ON1.0-80EP, ONE, BHT의 free radical 제거능은 12.3, 13.4, 21.3, 18.3, 90.5% 이었다. ON1.0-80EP는 BHT보다는 훨씬 낮은 제거능을 보였다. 동일한 과정을 통해 제조된 녹차시료 GT0.5-80EP에 비해서도 낮은 제거능을 보였다 (**Figure 30**).

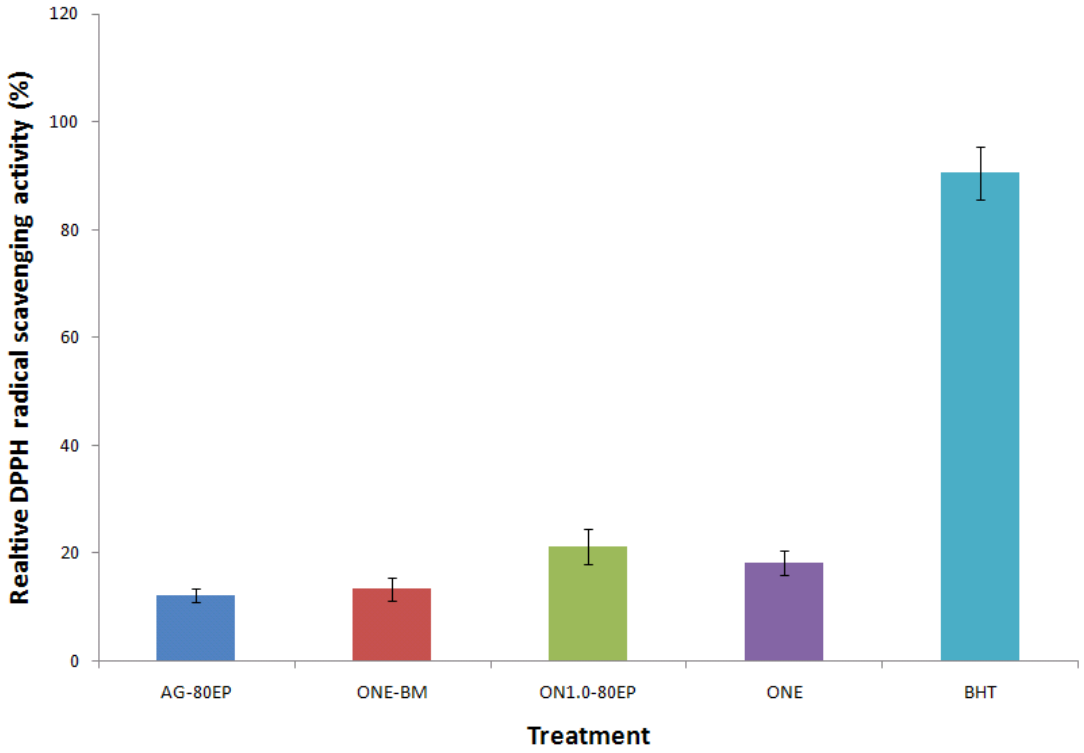


Figure 30. Free radical scavenging effects of AG-80EP, ONE-BM, ONE, BHT. **AG-80EP**: 80% ethanol precipitates of submerged liquid cultured in basal medium. **ONE-BM**: hot water extract of the mixture of onion powder (1.0%) and basal medium. **ON1.0-80EP**: 80% ethanol precipitates of submerged liquid cultured in basal medium with 1.0% onion powder by mushroom mycelia. **ONE**: hot water extract of onion powder.

바) ON1.0-80EP의 용매분획물의 free radical제거능

양파분말 (dry weight base로 1.0%)을 기본배지에 첨가하여 배양한 버섯균사체배양액을 80%에탄올로 침전시킨 다음, 원심분리하여 얻은 시료 (ON1.0-80EP)를 다시 용매분획한 다음, 이들 분획물에 대한 free radical 제거능을 조사하였다. 분획을 위해 사용된 용매는 hexane, chloroform, ethylacetate, butanol, methanol이었으며, 각각 12.5,

13.6, 60.2, 32.3, 27.8%의 제거능을 보였다. Ethyl acetate분획물이 60.2%로써 가장높은 제거율을 보였으나, BHT (79.90%)에 비해서는 낮았다 (**Figure 31**).

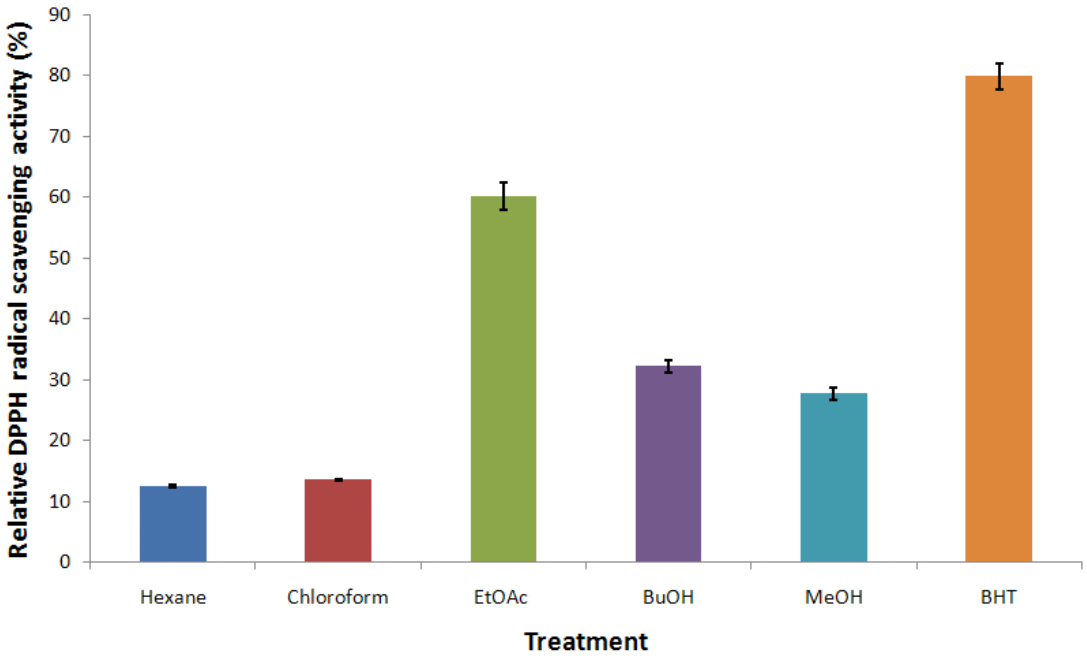


Figure 31. Free radical scavenging effects of solvent fractions (hexane, chloroform, ethylacetate, butanol, methanol) from ON1.0-80EP. **ON1.0-80EP** is 80% ethanol precipitates of submerged liquid cultured in basal medium with 1.0% onion powder by mushroom mycelia.

사) ON0.5-80EP와 ON1.0-80EP의 free radical 제거능

기본배지에 첨가된 양파분말의 첨가 량을 0.5%와 1.0%로 달리하여 버섯균사체를 배양한 다음, 열수로 추출한 용액을 80%에탄올로 침전시킨 침전물의 free radical 제거능을 조사하였다.

AG-80EP, ON0.5-80EP, ON1.0-80EP, BHT의 free radical제거능은 각각 19.87, 13.27, 21.33, 78.2%이었다. 배지에 첨가한 양파분말의 함량이 높은 배지에서 배양된 버섯균사체배양물의 free radical 제거능이 높았다 (**Figure 32**).

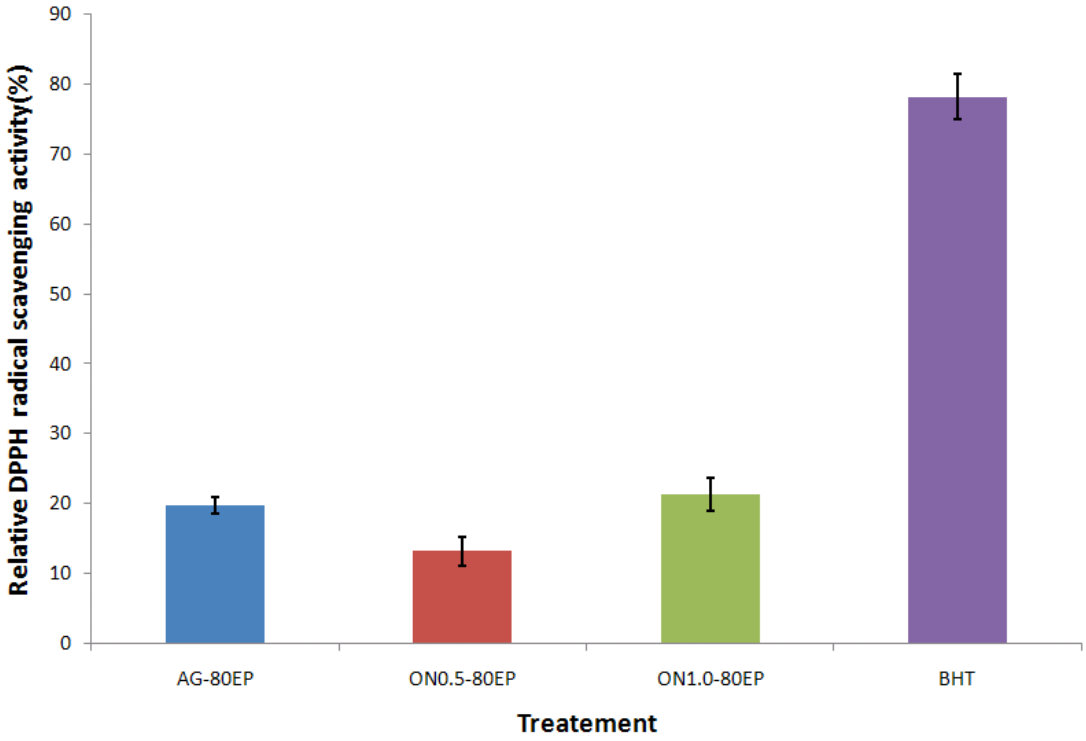


Figure 32. Free radical scavenging effects of AG-80EP, ON0.5-80EP, ON1.0-80EP, BHT. ON0.5-80EP and ON1.0-80EP are 80% ethanol precipitates of submerged liquid cultured in basal medium with 0.5% and 1.0% onion powder by mushroom mycelia, respectively.

3) Maloaldehyde (MA) 측정

요약

○GTC0.1-80EP의 MA생성억제효과는 대조군에 비해 53.7%로 BHT (57.8%)와 유사한 생성억제능을 보임. 이것을 다시 용매분획한 분획물중 ethyl acetate분획물은 70.2%의 억제능을보이므로써 BHT보다 높았슴.

○ON1.0-80EP의 경우 용매분획물중 EtOAc분획물이 30.4%로 BHT (57.8%)보다는 약간 낮은 MA 생성억제능을 보였슴.

가) GTC0.1-80EP의 MA생성억제 효과

녹차분말에서 추출한 catechin을 기본배지에 첨가 (dry weight base로 0.1%)하여 제조한 배지에 버섯균사체를 배양한 다음, 이를 열수 추출하고 80%에탄올침전을 시킨 시료 (GTC0.1-80EP)의 MA생성억제 효과 효과를 조사 하였다.

AG-80EP, BM, GTC-BM, GTC-HE, BHT를 대조구로 하여 비교하였다. AG-80EP, GTC0.1-80EP, BM, GTC-BM, GTC-HE, BHT의 MA생성 억제율은 각각 6.4, 53.7, 4.3, 32.2, 34.4, 57.8%이었다. GTC0.1-80EP는 positive control구인 BHT와 유사한 생성억제능을 보였다 (**Figure 33**).

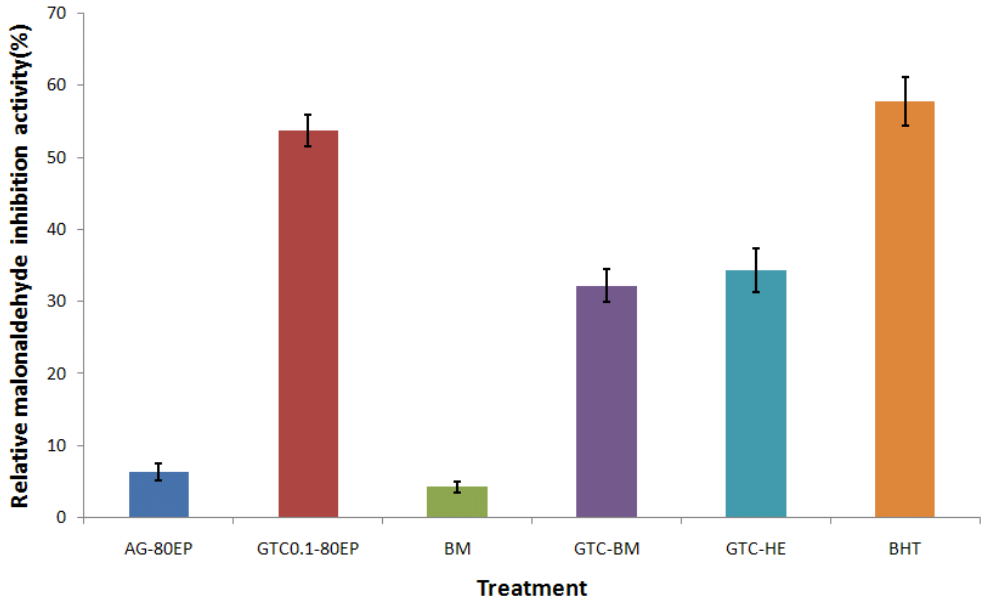


Figure 33. Inhibition ratio of malonaldehyde production from linoleic acid by GTC0.5-80EP. **AG-80EP**: 80% ethanol precipitates of submerged liquid cultured in basal medium by mushroom mycelia. **GTC0.1-80EP**: 80% ethanol precipitates of submerged liquid cultured in basal medium with 0.1% catechin extracted from green tea powder by mushroom mycelia. **BM**: Basal medium. **GTC-BM**: hot water extract of the mixture of catechin (0.1%) extracted from green tea powder and basal medium. **GTC-HE**: hot water extract of catechin extracted from green tea powder.

나) GTC0.1-80EP의 용매분획별 MA생성억제 효과

녹차분말로부터 추출한 catechin (dry weight base로 0.1%)을 기본배지에 첨가하여 배양한 버섯균사체배양액을 80%에탄올로 침전시킨 다음, 원심분리하여 얻은 시료(GTC0.1-80EP)를 다시 용매 (hexane, chloroform, ethylacetate, butanol, methanol)로 분획한 분획물의 MA생성 억제효과를 조사하였다.

용매별로 각각 control에 비해 3.8, 7.0, 70.2, 36.1, 41.1% 의 MA 생성 억제능을 보였으며 ethylacetate fraction은 70.2% 억제능을 보이므로써 57.8%의 억제능을 보인 BHT 보다도 약 12% 더 높은 억제효과를 보였다 (**Figure 34**).

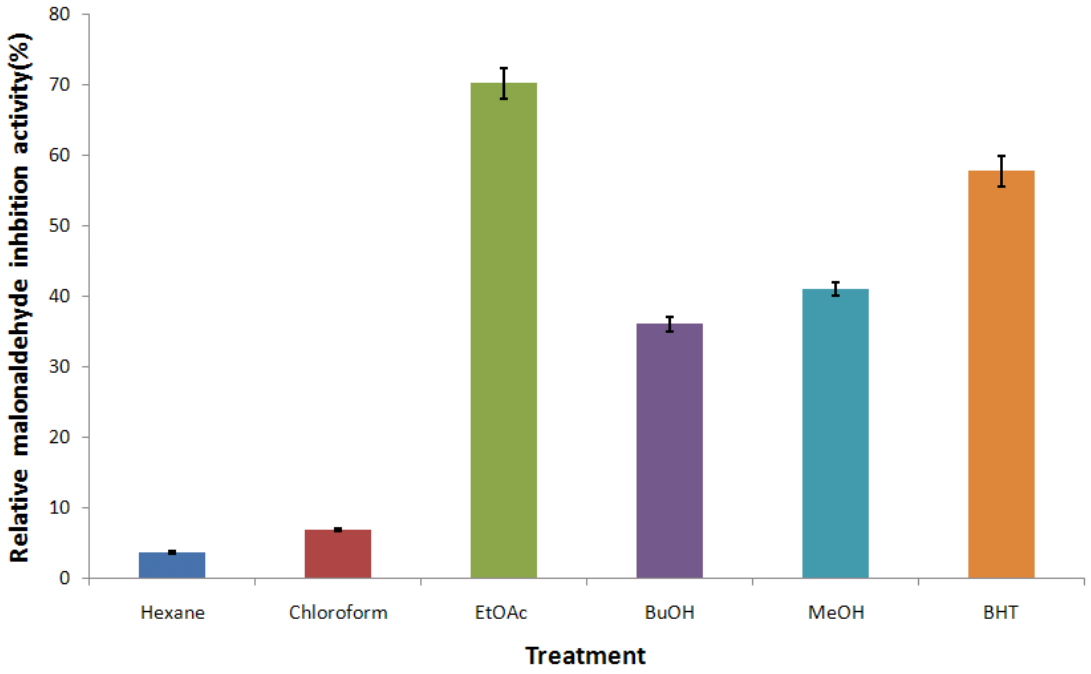


Figure 34. Inhibition ratio of malonaldehyde production from linoleic acid by solvent fractions (hexane, chloroform, ethylacetate, butanol, methanol) from GTC0.1-80EP. GTC0.1-80EP is 80% ethanol precipitates of submerged liquid cultured in basal medium with 0.1% catechin extract of green tea powder by mushroom mycelia.

다) GT0.25-80EP와 GT0.5-80EP의 MA생성억제효과

기본배지에 첨가된 녹차분말의 첨가 량을 0.25%와 0.5%로 달리하여 버섯균사체를 배양한 다음, 열수로 추출한 용액을 80%에탄올로 침전시킨 침전물을 linoleic acid에 첨가하여 MA생성억제효과를 조사하였다.

대조군으로 AG-80EP와 BHT를 사용하였다. AG-80EP, GT0.25-80EP, GT0.5-80EP, BHT의 MA생성억제효과는 각각 25.0, 57.1, 63.1, 68.0%로써 배지에 첨가한 녹차분말의 함량이 높은 배지에서 배양된 버섯균사체배양물의 MA생성억제효과가 크게 나타났다 (**Figure 35**).

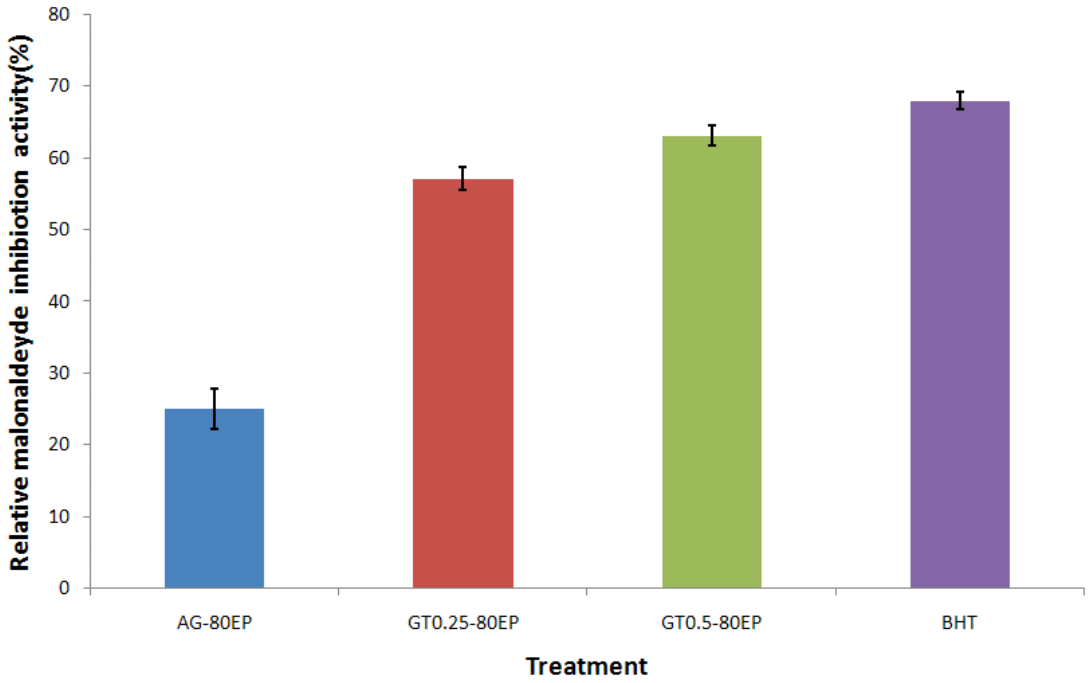


Figure 35. Inhibition ratio of malonaldehyde production from linoleic acid by 80% ethanol precipitates of submerged liquid cultured in basal medium with 0.25% and 0.5% green tea powder by mushroom mycelia, respectively.

라) ON1.0-80EP의 용매분획별 MA생성억제 효과

양파분말 (dry weight base로 1.0%)을 기본배지에 첨가하여 배양한 버섯균사체배양액을 80%에탄올로 침전시킨 다음, 원심분리하여 얻은 시료 (ON1.0-80EP)를 다시 용매분획한 다음, 이들 분획물에 대한 MA생성억제 효과를 조사하였다.

분획을 위해 사용된 용매는 hexane, chloroform, ethylacetate, butanol, methanol이었으며, 각각 control에 비해 3.8, 4.0, 30.4, 22., 23.4% 의 MA 생성 억제능을 보였으며 BHT는 57.8% 억제능을 보였다. 양파분말 함유 배양물은 대체적으로 BHT에 비해 낮은 MA생성억제 능력을 나타내었다 (**Figure 36**).

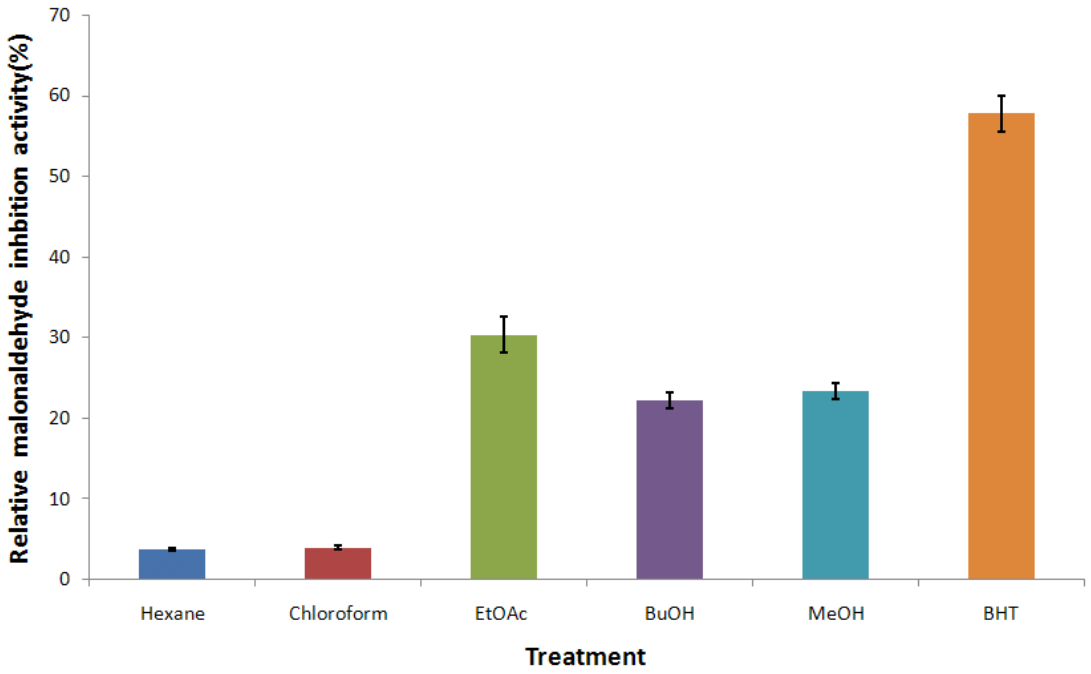


Figure 36. Inhibition ratio of malonaldehyde production from linoleic acid by solvent fractions (hexane, chloroform, ethylacetate, butanol, methanol) from ON1.0-80EP. ON1.0-80EP is 80% ethanol precipitates of submerged liquid cultured in basal medium with 1.0% of onion powder by mushroom mycelia.

마) ON0.5-80EP와 ON1.0-80EP의 MA생성억제효과

기본배지에 첨가된 양파분말의 첨가량을 0.5%와 1.0%로 달리하여 버섯균사체를 배양한 다음, 열수로 추출한 용액을 80%에탄올로 침전시킨 침전물을 linoleic acid에 첨가하여 MA생성억제효과를 조사하였다. 대조군으로 AG-80EP와 BHT를 사용하였다.

AG-80EP, ON0.5-80EP, ON1.0-80EP, BHT의 MA생성억제효과는 각각 25.0, 57.1, 63.1, 68.0%로써 배지에 첨가한 양파분말의 함량이 높은 배지에서 배양된 버섯균사체배양물의 MA생성억제효과가 크게 나타났다 (**Figure 37**).

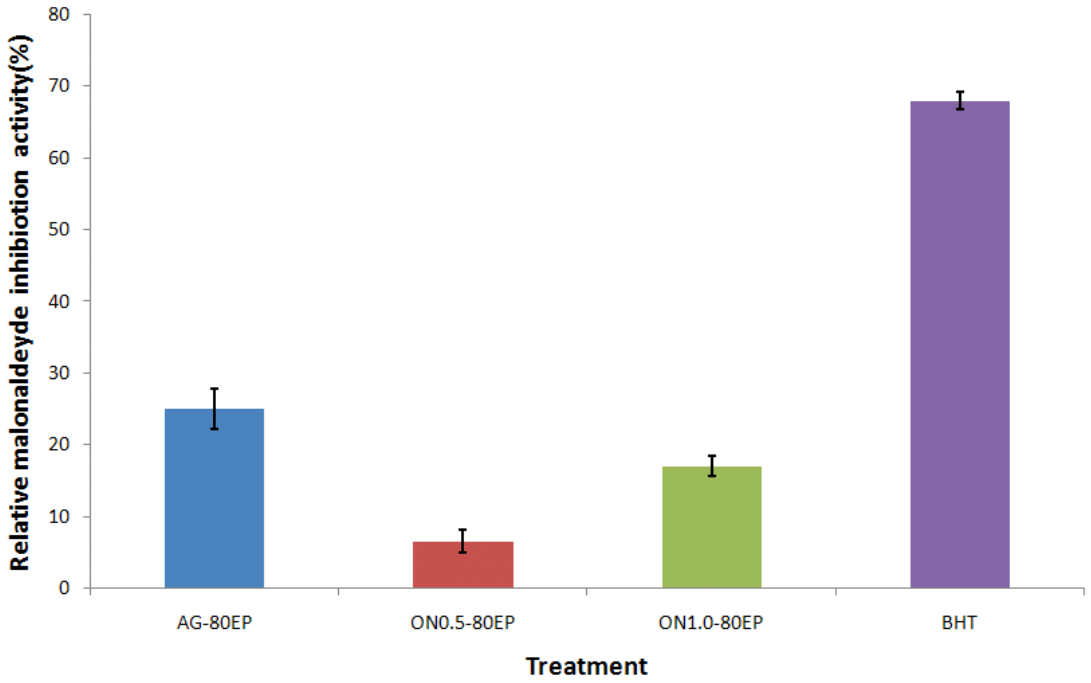


Figure 37. Inhibition ratio of malonaldehyde production from linoleic acid by 80% ethanol precipitates of submerged liquid cultured in basal medium with 0.5% and 1.0% onion powder by mushroom mycelia, respectively.

4) Superoxide (O_2^-) assay: NBT reduction

요약

○GT0.5-80EP의 Superoxide (O_2^-) 제거능력은 처리구에 비하여 66%로 높은 Superoxide (O_2^-) 제거능력을 가짐

GT0.5-80EP, GTE, GTE-BM을 각각 용매분획한 다음, ethyl acetate 분획물을 superoxide 측정을 위한 시료로 사용하였다. 각각 66.00, 46.80, 53.10%의 superoxide 생성 저해율을 보였으며 GT0.5-80EP의 ethylacetate fraction이 가장 높은 저해율을 보였다 (**Figure 38**).

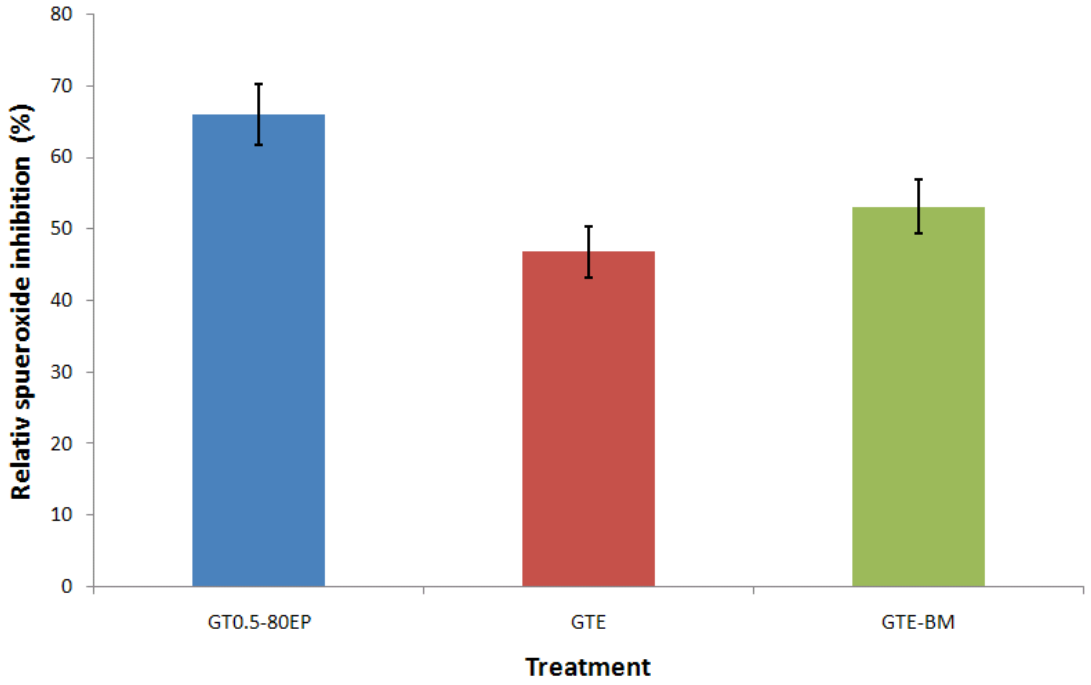


Figure 38. Inhibition of superoxide anion production in RAW 264.7 cell by ethylacetate fraction of GT0.5-80EP (50 ㎍). GT0.5-80EP is 80% ethanol precipitates of submerged liquid cultured in basal medium with 0.5% green tea powder by mushroom mycelia.

나. 세포독성 및 항암성

1) S-180 cell에 대한 독성 실험

요약

○GT0.5-80EP와 ON1.0-80EP는 각각 ED_{50} 값이 2.9와 3.9 ㎍/㎖로 S-180세포에 대한 독성이 AG-80EP (5.5 ㎍/㎖), GTE (8.1 ㎍/㎖), ONE (11.0 ㎍/㎖)보다 큼

○기본배지에 녹차 및 양파분말의 첨가량이 클수록 세포독성이 높음

가) AG-80EP, GTE, GT0.5-80EP, ONE, ON1.0-80EP의 S-180세포에 대한 독성시험

기본배지에서 버섯균사체를 배양한 배양액을 80%에탄올로 침전시킨 침전물 (AG-80EP), 녹차분말을 열수추출한 열수추출물 (GTE), 녹차분말 (dry weight base로 0.5%)을 기본배지에 첨가하여 배양한 버섯균사체배양액을 80%에탄올로 침전시킨 다음, 원심분리하여 얻은 시료 (GT0.5-80EP), 양파분말의 열수추출물 (ONE), 양파분말 (dry weight base로 1.0%)을 기본배지에 첨가하여 배양한 버섯균사체배양액을 80%에탄올로 침전시킨 다음, 원심분리하여 얻은 시료 (ON1.0-80EP)를 처리하였을 때 S-180세포사멸을 조사하였다.

최초 5×10^4 cell을 주입한 대조구는 48시간 배양 후 18.7×10^4cell/㎖로 세포수가 증가하였다. AG-80EP의 ED_{50} 값은 5.5 ㎍/㎖이었고 GTE와 ONE의 ED_{50} 값은 각각 8.1, 11.0 ㎍/㎖이었다. GT0.5-80EP와 ON1.0-80EP의 ED_{50} 값은 각각 2.9와 3.9 ㎍/㎖이었다 (**Table 19**). 이상의 결과로 볼때, S-180 cell에 대한 GT0.5-80EP와 ON1.0-80EP는 대조군에 비하여 적은량으로도 세포사멸을 유도하여 월등히 높은 암세포 독성 작용을 나타내었다.

Table 19. Cytotoxicity of AG-80EP, GTE, GT0.5-80EP, ONE, ON1.0-80EP against S-180 cells.

Treatment[1)]	Doses (㎍/㎖)	Growth of Cells ($\times 10^4$ cells/㎖)	Growth Inhibition Ratio (%)[2)]	ED_{50} (㎍/㎖)
Control (DMSO)	10 20 30	18.7±1.5		-
AG-80EP	10	10.4±0.4	44.4	5.5
	20	8.2±0.5	56.1	
	30	7.6±1.2	59.4	
GTE	10	11.3±0.5	39.6	8.1
	20	9.3±0.4	50.3	
	30	8.4±0.7	55.1	
GT0.5-80EP	10	8.4±0.8	55.1	2.9
	20	7.5±0.8	59.9	
	30	6.8±0.6	63.6	
ONE	10	12.2±0.7	34.8	11.0
	20	9.9±0.9	47.1	
	30	9.0±0.8	51.9	
ON1.0-80EP	10	9.2±0.4	50.8	3.9
	20	8.6±0.5	54.0	
	30	8.0±0.3	57.2	

[1)] **AG-80EP**: 80% ethanol precipitates of submerged liquid cultured in basal medium by mushroom mycelia. **GTE**: hot water extract of green tea powder. **GT0.5-80EP**: 80% ethanol precipitates of submerged liquid cultured in basal medium with 0.5% green tea powder by mushroom mycelia. **ONE**: hot water extract of onion powder. **ON1.0-80EP**: 80% ethanol precipitates of submerged liquid cultured in basal medium with 1.0% of onion powder by mushroom mycelia.

[2)] Growth inhibition ratio $= 100 - \frac{sampls\ \ growth\ \ of\ \ cells}{control\ growth\ \ of\ cells} \times 100$

나) GT0.125-80EP, GT0.25-80EP, GT0.5-80EP의 S-180세포에 대한 독성

기본배지에 첨가된 녹차분말의 첨가량을 0.125, 0.25, 0.5%로 달리하여 버섯균사체를 배양한 다음, 열수로 추출한 용액을 80%에탄올로 침전시킨 침전물 (GT0.125-80EP, GT0.25-80EP, GT0.5-80EP)을 S-180세포에 처리하여 세포성장억제

정도를 조사하였다.

최초 5×10^4 cell을 주입한 대조구는 48시간 배양 후 18.7×10^4cell/㎖로 세포수가 증가하였다. 비교대조군인 AG-80EP의 ED_{50} 값은 11.0 ㎍/㎖이었고 GT0.125-80EP, GT0.25-80EP, GT0.5-80EP의 ED_{50} 값은 각각 5.5, 3.9, 2.9 ㎍/㎖로 농도가 증가함에 따라 S-180cell에 대한 세포독성효과가 크게 나타났다 (**Table 20**).

Table 20. Cytotoxicity of GT0.125-80EP, GT0.25-80EP, GT0.5-80EP against S-180 cells.

Treatment[1)]	Doses (㎍/㎖)	Growth of Cells ($\times10^4$ cells/㎖)	Growth Inhibition Ratio (%)[2)]	ED_{50} (㎍/㎖)
Control (DMSO)	10 20 30	18.7±1.5		-
AG-80EP	10	12.2±0.7	34.8	
	20	9.9±0.9	47.1	11.0
	30	9.0±0.8	51.9	
GT0.125-80EP	10	10.4±0.4	44.4	
	20	8.2±0.5	56.1	5.5
	30	7.6±1.2	59.4	
GT0.25-80EP	10	9.2±0.4	50.8	
	20	8.6±0.5	54.0	3.9
	30	8.0±0.3	57.2	
GT0.5-80EP	10	8.4±0.8	55.1	
	20	7.5±0.8	59.9	2.9
	30	6.8±0.6	63.6	

[1)]**AG-80EP**: 80% ethanol precipitates of submerged liquid cultured in basal medium by mushroom mycelia. **GT0.125-80EP**: 80% ethanol precipitates of submerged liquid cultured in basal medium with 0.125% green tea powder by mushroom mycelia. **GT0.25-80EP**: 80% ethanol precipitates of submerged liquid cultured in basal medium with 0.25% green tea powder by mushroom mycelia. **GT0.5-80EP**: 80% ethanol precipitates of submerged liquid cultured in basal medium with 0.5% green tea powder by mushroom mycelia.

[2)]Growth inhibition ratio = $100-\frac{sampls\ \ growth\ \ of\ \ cells}{control\ growth\ \ of\ cells}\times100$

다) ON0.25-80EP, ON0.5-80EP, ON1.0-80EP의 S-180세포에 대한 독성시험

기본배지에서 버섯균사체를 배양한 배양액을 80%에탄올로 침전시킨 침전물 (AG-80EP), 양파분말 (dry weight base로 0.25, 0.5, 1.0%)을 기본배지에 첨가하여 배양한 버섯균사체배양액을 80%에탄올로 침전시킨 다음, 원심분리하여 얻은 시료 (ON0.25-80EP, ON0.5-80EP, ON1.0-80EP)를 처리하였을 때 S-180세포사멸을 조사하였다.

최초 5×10^4 cell을 주입한 대조구는 48시간 배양 후 18.7×10^4cell/ml로 세포수가 증가하였다. AG-80EP의 ED_{50} 값은 11.0 ㎍/ml이었고 ON0.25-80EP, ON0.5-80EP, ON1.0-80EP의 ED_{50} 값은 각각 8.1, 4.3, 1.67 ㎍/ml로 농도가 증가함에 따라 S-180cell에 대한 세포독성효과가 크게 나타났다 (**Table 21**).

Table 21. Cytotoxicity of ON0.25-80EP, ON0.5-80EP, ON1.0-80EP against S-180 cells.

Treatment[1)]	Doses (㎍/ml)	Growth of Cells ($\times10^4$ cells/ml)	Growth Inhibition Ratio (%)[2)]	ED_{50} (㎍/ml)
Control (DMSO)	10 20 30	18.7±1.5		-
AG-80EP	10	12.2±0.7	34.8	11.0
	20	9.9±0.9	47.1	
	30	9.0±0.8	51.9	
ON0.25-80EP	10	11.3±0.5	39.6	8.1
	20	9.3±0.4	50.3	
	30	8.4±0.7	55.1	
ON0.5-80EP	10	10.2±0.5	28.0	4.3
	20	8.7±0.6	27.0	
	30	8.0±0.5	21.9	
ON1.0-80EP	10	9.4±0.4	32.1	1.7
	20	8.2±0.5	23.4	
	30	7.9±0.6	21.2	

[1)] **AG-80EP**: 80% ethanol precipitates of submerged liquid cultured in basal medium by mushroom mycelia. **ON0.25-80EP**: 80% ethanol precipitates of submerged liquid cultured in basal medium with 0.25% onion powder by mushroom mycelia. **ON0.5-80EP**: 80% ethanol precipitates of submerged liquid cultured in basal medium with 0.5% onion powder by mushroom mycelia. **ON1.0-80EP**: 80% ethanol precipitates of submerged liquid cultured in basal medium with 1.0% onion powder by mushroom

mycelia.

[2)]Growth inhibition ratio = $100 - \frac{sampls\ \ growth\ \ of\ \ cells}{control\ growth\ \ of\ cells} \times 100$

다. Mouse에 대한 항암성

요약

○마우스에 GT0.5-80EP와 ON1.0-80EP를 처리함으로써 32,4 (127%연장), 30.6 (120%연장)의 수명연장효과가 있었고, 암에 전혀 걸리지 않은 마우스도 각각 2마리 (20%)와 1마리 (10%)가 있었슴

○기본배지에 녹차분말을 첨가하는 량이 많을 수 록 대조군 (24.5일)에 비해 32.2, 36.6, 42.2일로 131, 136, 142%의 수명연장효가 있었으며 10～20%에서는 치유효과가 나타났슴.

○기본배지에 양파분말을 첨가하는 량이 많을 수 록 대조군 (24.5일)에 비해 30.2, 31.3, 33.2일로 123, 128, 136% 수명연장효가 있었으며, 최고농도에서 10%의 치유효과가 나타났슴.

1) GT0.5-80EP와 ON1.0-EP의 mouse에 대한 항암성

S-180 복수암 세포를 ICR female mouse의 복강에 투여한 1일 후에 GT0.5-80EP와 ON1.0-80EP를 각각 100 ㎍/0.2㎖씩을 2일간격으로 5회에 걸쳐 경구투여한 후 42일 동안 생존한 mouse의 수와 생존일수를 조사하였다 (**Table 22**).

대조군 마우스의 평균수명은 25.6일 이었으며 마우스의 최장 생존일 수는 32일이었다. GT0.5-80EP 처리구에서는 평균수명이 32.4일로 대조군에 비해 27% 수명이 연장되었으며, 2마리는 복수가 줄어들면서 암이 치유되어 42일이 경과시까지 생존하였다. ON1.0-EP처리구에서는 평균수명이 30.6일로 대조군에 비해 20%의 생명연장효과가 있었다. 그중 1마리가 복수가 줄어들면서 암이 치유되어 42일까지 생존하였다. 이상의 결과로 볼때 녹차 및 양파 추출물을 함유한 버섯균사체 추출물들이 S-180 세포에 의해 유발된 복수암에 항암력을 가지며, 생명연장효과와 암을 치유할수 있음을 알 수 있었다.

Table 22. Anticancer effects of GT0.5-80EP and ON1.0-80EP on the S-180 cell-induced mouse ascites cancer

Treatment[1)]	Mean survival day[2)]	Survival rate (%)[3)]	Survival Mouse[4)]
Control (DMSO)	25.6	100	0/10
GT0.5-80EP	32.4	127	2/10
ON1.0-80EP	30.6	120	1/10

[1)]Each treatment was consisted of 10 mice treated with 100 ㎎ mouse/0.2 ㎖ PBS. Control mice were given only S-180 cells and PBS. **GT0.5-80EP**: 80% ethanol precipitates of submerged liquid cultured in basal medium with 0.5% green tea powder by mushroom mycelia., **ON1.0-80EP**: 80% ethanol precipitates of submerged liquid cultured in basal medium with 1.0% onion powder by mushroom mycelia.

[2)]Average survival days of mouse until 42 days after treatment.

[3)]$\text{Survical rate} = \frac{\text{mean survival days of treatment mice}}{\text{mean survival days of control mice}} \times 100$

[4)]Numbers of mouse survived until 42 days after treatment.

2) GT0.125-80EP, GT0.25-80EP, GT0.5-80EP의 mouse에 대한 항암성

녹차분말 (dry weight base로 0.125, 0.25, 0.5%)을 기본배지에 첨가하여 배양한 버섯균사체배양액을 80%에탄올로 침전시킨 다음, 원심분리하여 얻은 시료 (GT0.125-80EP, GT0.25-80EP, GT0.5-80EP)의 mouse에 대한 항암성을 조사하였다 (**Table 23**).

S-180 복수암 세포를 ICR female mouse의 복강에 투여한 1일 후에 GT0.125-80EP, GT0.25-80EP, GT0.5-80EP 각각 100㎍/0.2㎖을 처리한 다음 2일간격으로 5회에 걸쳐 경구투여한 후 42일 동안 생존한 mouse의 수와 생존일수를 조사하였다.

대조군 마우스의 평균수명은 24.5일 이었으며 마우스의 최장 생존일 수는 30일이었다. GT0.125-80EP 처리구의 평균수명은 32.2일로 대조군에 비해 31% 수명이 연장되었으며 그중 1마리는 암이 치유되어 42일이 경과시까지 생존하였다. GT0.25-80EP 처리구는 평균수평이 33.4일로 대조군에 비해 36%의 연장효과가 있었다. 그중 1마리는 암이 치유되어 42일이 경과시까지 생존하였다. GT0.5-80EP 처리구는 평균수명이 34.7일

이었으며 대조군에 비해 42%의 수명연장효과를 나타내었다. 시험이 종료되는 시점까지 2마리가 생존하였다. 시험종료시까지 약 10~20%는 암에 걸리지 않았다.

Table 23. Anticancer effects of GT0.125-80EP, GT0.25-80EP, GT0.5-80EP on the S-180 cell-induced mouse ascites cancer

Treatment[1)]	Mean survival day[2)]	Survival rate (%)[3)]	Survival Mouse[4)]
Control (DMSO)	24.5	100	0/10
GT0.125-80EP	32.2	131	1/10
GT0.25-80EP	33.4	136	1/10
GT0.50-80EP	34.7	142	2/10

[1)]Each treatment was consisted of 10 mice treated with 100 ㎎ mouse/0.2 ㎖ PBS. Control mice were given only S-180 cells and PBS. **GT0.125-80EP**: 80% ethanol precipitates of submerged liquid cultured in basal medium with 0.125% green tea powder by mushroom mycelia., **GT0.25-80EP**: 80% ethanol precipitates of submerged liquid cultured in basal medium with 0.25% green tea powder by mushroom mycelia., **GT0.5-80EP**: 80% ethanol precipitates of submerged liquid cultured in basal medium with 0.5% green tea powder by mushroom mycelia.,

[2)]Average survival days of mouse until 42 days after treatment.

[3)]$\text{Survical rate} = \frac{\text{mean survival days of treatment mice}}{\text{mean survival days of control mice}} \times 100$

[4)]Numbers of mouse survived until 42 days after treatment.

3) ON0.25-80EP, ON0.50-80EP, ON1.0-80EP의 mouse에 대한 항암성

양파분말 (dry weight base로 0.25, 0.5, 1.0%)을 기본배지에 첨가하여 배양한 버섯균사체배양액을 80%에탄올로 침전시킨 다음, 원심분리하여 얻은 시료 (ON0.25-80EP, ON0.50-80EP, ON1.0-80EP)의 mouse에 대한 항암성을 조사하였다.

S-180 복수암 세포를 ICR female mouse의 복강에 투여한 1일 후에 ON0.25-80EP, ON0.50-80EP, ON1.0-80EP를 각각 100㎍/0.2㎖을 처리한 다음 2일간격으로

5회에 걸쳐 경구투여한 후 42일 동안 생존한 mouse의 수와 생존일수를 조사하였다.

대조군 마우스의 평균수명은 24.5일 이었으며 마우스의 최장 생존일 수는 30일이었다. ON 0.25-80EP 처리구의 평균수명은 30.2일로 대조군에 비해 23% 수명이 연장되었으며 그중 1마리는 41일이 경과시까지 생존하였다. ON 0.5-80EP 처리구는 평균수평이 31.3일로 대조군에 비해 28%의 연장효과가 있었다. 그중 1마리는 41일이 경과시까지 생존하였다. ON1.0-80EP 처리구는 평균수명이 33.2일 이었으며 대조군에 비해 36%의 수명연장효과를 나타내었다. 시험이 종료되는 시점까지 1마리가 생존하였다. 시험종료시까지 약 10%는 암에 걸리지 않았다 (**Table 24**).

Table 24. Anticancer effects of ON0.25-80EP, ON0.50-80EP, ON1.0-80EP on the S-180 cell-induced mouse ascites cancer

Treatment[1)]	Mean survival day[2)]	Survival rate (%)[3)]	Survival Mouse[4)]
Control (DMSO)	24.5	100	0/10
ON0.25-80EP	30.2	123	0/10
ON0.50-80EP	31.3	128	0/10
ON1.00-80EP	33.2	136	1/10

[1)]Each treatment was consisted of 10 mice treated with 100 ㎎ mouse/0.2 ㎖ PBS. Control mice were given only S-180 cells and PBS. **ON0.25-80EP**: 80% ethanol precipitates of submerged liquid cultured in basal medium with 0.25% onion powder by mushroom mycelia., **ON0.5-80EP**: 80% ethanol precipitates of submerged liquid cultured in basal medium with 0.5% onion powder by mushroom mycelia., **ON1.0-80EP**: 80% ethanol precipitates of submerged liquid cultured in basal medium with 1.0% onion powder by mushroom mycelia.,

[2)]Average survival days of mouse until 42 days after treatment.

[3)]$\text{Survical rate} = \frac{\text{mean survival days of treatment mice}}{\text{mean survival days of control mice}} \times 100$

[4)]Numbers of mouse survived until 42 days after treatment.

라. 항관절염성

요약

○MTT assay를 위한 시료 농도 결정시험에서 ㎍/10 ㎕의 농도가 정당함

○Cytokine으로 활성화 시킨 ROS 17/2.8 cell의 NO 생성 억제 효과는 GTC0.1-80EP에서 34.4%로 가장 높은 NO억제 효과를 나타냄. 그 다음이 GT0.5-80EP이었다. 녹차추출물 또는 버섯균사체추출물보다 높은 억제 효과가 있음

○iNOS 발현이 가장적은것은 GTC0.1-80EP로 27.3%가 발현됨.

1) MTT assay에 의한 Cytotoxicity 확인

녹차분말첨가배지의 catechin의 처리 농도를 알기 위하여 MTT assay를 실시하였다. 5 ㎍/10 ㎕, 10 ㎍/10 ㎕ 처리 시 ROS 17/2.8 cell의 증식도가 감소되는 것을 확인할 수 있었고, 1 ㎍ 처리 시 control과 비교하여 증식도가 유사하였다. 따라서 NO assay를 위하여 1 ㎍/10 ㎕의 농도로 sample의 양을 결정하였다.

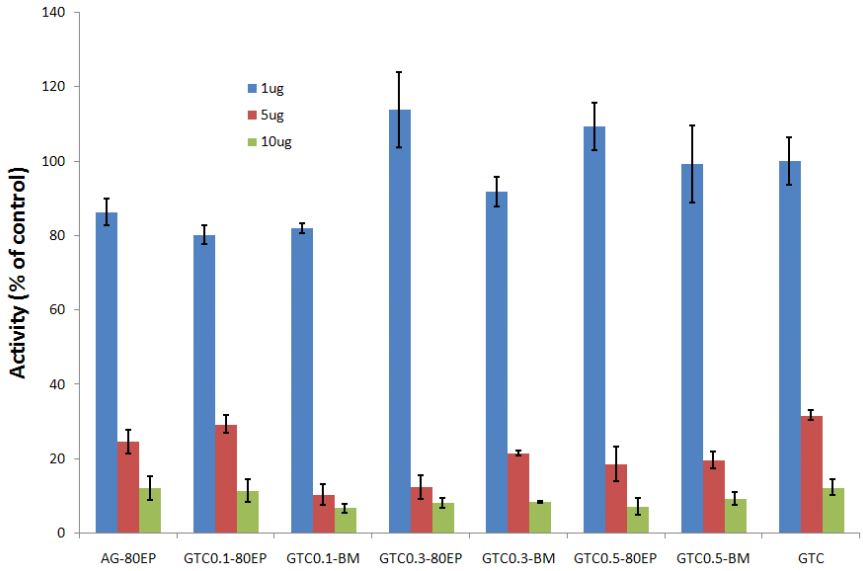


Figure 39. MTT assay of GTC0.1-80EP in the ROS 17/2.8 cell. GTC0.1-80EP: 80% ethanol precipitates of submerged liquid cultured in basal medium with 0.1% catechin extracted from green tea powder by mushroom mycelia.

2) Cytokine으로 활성화 시킨 ROS 17/2.8 cell의 NO 생성 억제 효과

Cyokine으로 활성화 시킨 ROS 17/2.8 cell에 GTC0.1-80EP을 농도별로 첨가하여 NO 생성 억제를 확인 해 보았다. 시료 100 ug/ml를 처리하였을 때, NO 생성억제 정도는 Figure 40에서 보는 바와 같이 AG-80EP (14.8±1.3), GTC0.1-80EP (34.4±1.9), GTC0.1-BM (17.3±2.1), GTC0.3-80EP (22.4±1.3), GTC0.3-BM (19.7±1.7), GTC0.5-80EP (30.3±1.7), GTC0.5-BM (27.9±1.3), GTC(22.0±1.5)의 NO 억제율을 나타내었다. Cytokine으로 활성화 된 ROS 17/2.8 cell에 0.1% GTC0.1-80EP의 NO 생성 억제가 가장 좋았다.

GTC0.1-80EP는 녹차분말로부터 추출한 catechin (dry weight base로 0.1%)을 기본배지에 첨가하여 배양한 버섯균사체배양액을 80%에탄올로 침전시킨 다음, 원심분리하여 얻은 시료이다. 녹차를 첨가하지 않고 배양한 신령버섯균사체 배양물에 비해 NO 생성 억제 효과가 나타났다.

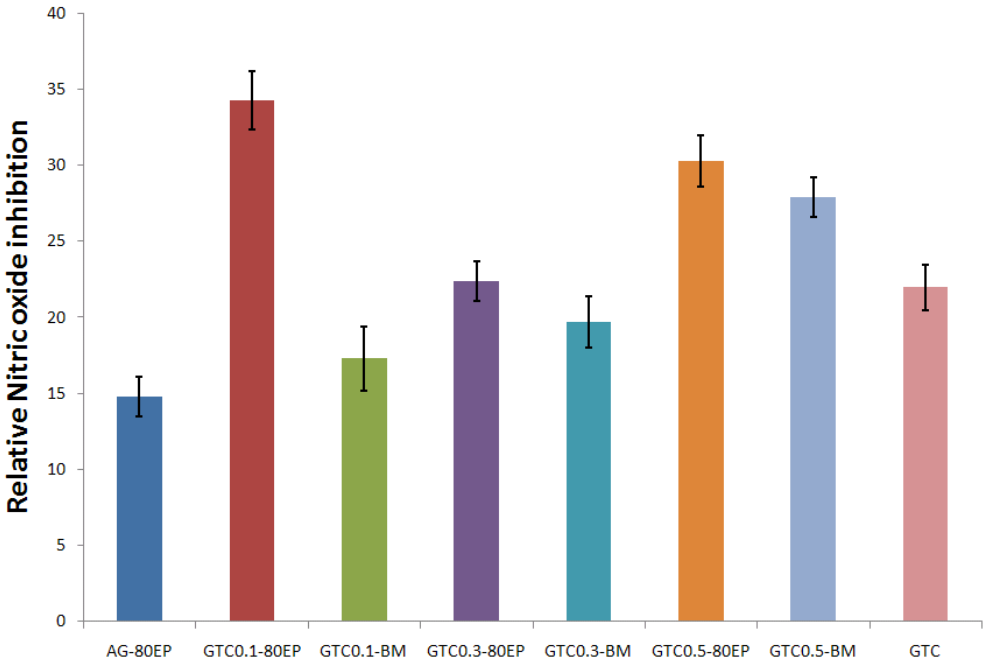


Figure 40. NO inhibition by GTC0.1-80EP. GTC0.1-80EP: 80% ethanol precipitates of submerged liquid cultured in basal medium with 0.1% catechin extracted from green tea powder by mushroom mycelia.

3) 신령버섯균사체 배양액의 iNOS 생성억제 효과

Cytokine으로 활성화 시킨 ROS 17/2.8 cell에서 GTC0.1-80EP가 iNOS의 발현에 미치는 영향을 확인하였다. Figure 41과 같이 iNOS 발현이 저해됨을 확인 할 수 있었다. iNOS 발현은 AG-80EP (86.3±6.1), GTC0.1-80EP (27.3±5.0), GTC0.1-BM (82.7±3.1), GTC0.3-80EP (75.0±6.1), GTC0.3-BM (77.3±7.1), GTC0.5-80EP (36.0±6.2), GTC0.5-BM (55.7±4.5), GTC (57.7±5.1) 로 확인하였고, 이 결과로부터 NO 생성억제의 원인은 iNOS 발현에 의한 것이라는 것을 추정할 수 있었다. 상기 NO 생성억제의 결과와 같이 GTC0.1-80EP에서 iNOS 발현억제가 가장 컸다.

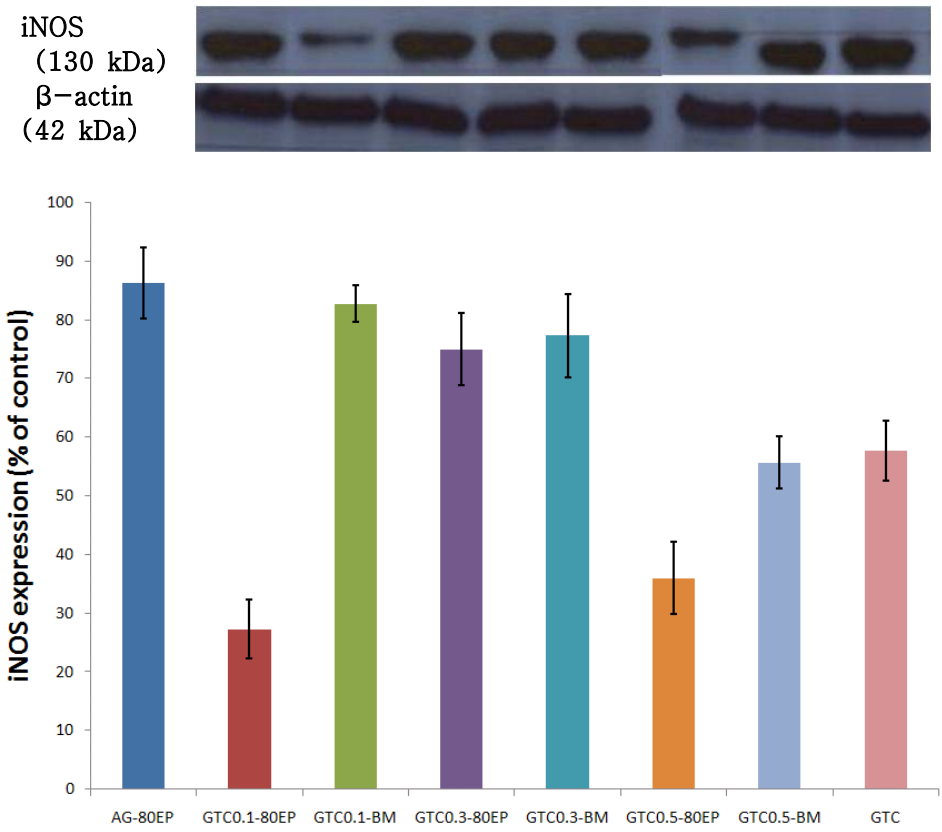


Figure 41. Inhibition of iNOS expression by GTC0.1-80EP in the ROS 17/2.8 cell. GTC0.1-80EP: 80% ethanol precipitates of submerged liquid cultured in basal medium with 0.1% catechin extracted from green tea powder by mushroom mycelia.

마. 면역성

요약

○LPS 1 ㎍/㎖, IL-1β 12.5 ㎍/㎖, TNF-α 25 ㎍/㎖을 처리하였을때 가장 높은 NO생성능력을 보임

○GT0.5-80EP, ON1.0-80EP의 섭취로 인하여 마우스의 T 세포와 B 세포의 증식을 증가시키고 혈장 C_3함량을 증가시키므로 GT0.5-80EP의 섭취가 일반적으로 면역 능력증진에 효과가 있음

○GT0.5-80EP, ON1.0-80EP의 섭취로 IL-1와 IFN-γ 생성능력이 향상됨

1) Tumor necrosis factor의 역가 측정

세포내에서 tumor necrosis factor를 확인하기 위하여 세포내에서 NO (nitric oxide) 측정하였다. 2×10^5개의 세포를 24well에 분주하여 1%의 항생제와 10%의 fetal bovine serum이 함유된 DMEM 배양액에서 37℃ 5% CO_2 incubator에서 하루동안 배양한 다음 새로운 배양액으로 교체하였다. 여기에 Cytokine 혼합액을 처리하여 24, 48시간 동안 배양한 다음, 배양액을 Griess Reagent (mixture of 1 part of 1 % sulfanilamide in 5% phosphoric acid and 1 part of 0.1% naphthylethylenediamine dihydrochloride in water) 와 1:1로 혼합하여 sodium nitrite를 10～100 μM을 표준곡선으로 이용하여 550 nm에서 흡광도를 측정하였다.

Cytokine과 LPS의 단독 처리시에는 NO 생성의 변화를 확인 할 수가 없었다. 그래서 cytokine과 LPS를 혼합한 cytokine 혼합액으로부터 NO의 생성을 확인할 수가 있었다. 이상의 결과를 볼때 LPS 1 ㎍/㎖, IL-1β 12.5 ㎍/㎖, TNF-α 25 ㎍/㎖을 처리하였을때 가장 높은 NO생성능력을 보였다 (**Fiture 42**).

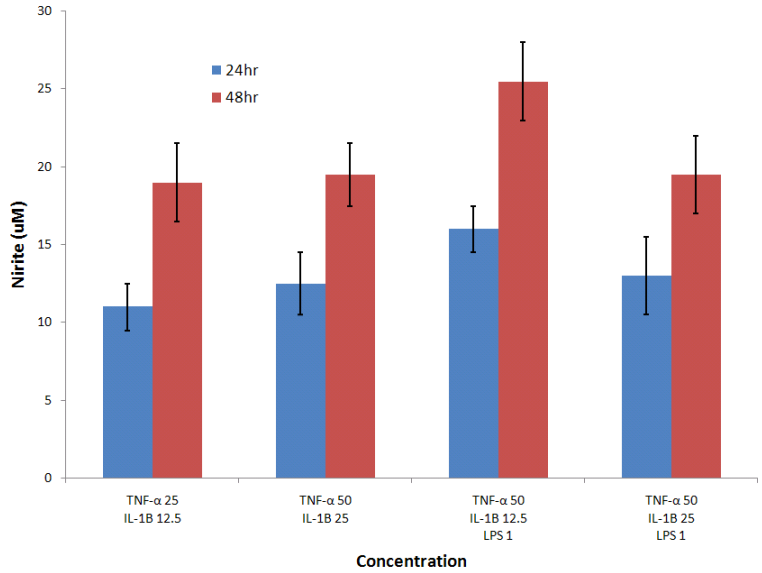


Figure 42. NO production by concentration and treated time of cytokine mixture.

2) 혈장의 C_3, IL-2 및 IL-6 농도를 측정

버섯균사체 추출물 80% 에탄올 침전물 (AG-80EP)과 녹차분말을 첨가한 배지에서 배양한 버섯균사체 배양물의 80% 에탄올침전물 (GT0.5-80EP)와 양파분말을 첨가한 배지에서 배양한 버섯균사체 배양물의 80% 에탄올침전물 (ON1.0-80EP)의 면역력 증진에 미치는 영향을 살펴보기 위해 혈장의 IL-2, IL-6, C_3농도를 조사하였다.

AG-80EP 및 GT0.25, GT0.5의 IL-2 (Antiinflammatroy cytokine의 혈장농도는 AG, GT0.5, GT1.0에서 각각 31.2, 25.2, 24.0 pg/ml로 대조구의 49.6 pg/ml과 비교하였을때 유의적으로 낮아졌다 (**Figure 43**). IL-6는 대조군의 140.5 pg/ml보다 높은 193.8, 219.7, 240.8 pg/ml으로 녹차분말을 첨가하고 농도를 증가시킬수록 IL-6의 활성이 높게 나타났다 (**Figure 44**). C_3함량은 녹차분말의 처리와 농도가 증가할수록 증가는 하였으나 유의적인 증가를 보이지는 않았다 (**Figure 45**).

IL-6 및 C_3의 주요작용은 T 세포와 B 세포의 발달 및 활성화, 다른 cytokines의 유도 및 cytokines receptor 합성등에 있다. 생체의 면역 체계에서 T 세포와 식세포가 주 역할을 하여, 세포성 면역과 B 세포와 T 세포에 항원을 나타내는 마이크로파지 등에 의해 형성되는 항체생산등이 있다.

IL-2 (T-cell growth factor)는 T 세포에서 분비되는 glycosiylated protein으로 helper T cell의 합성에 결정적인 역할을 하는데, 활성화된 T 세포는 IL-2를 분비하며 표면에 IL-2 receptor와 transferrin recepter가 나타나고, 이것이 T 세포의 계속적인 증식을 일으킨다. 그러므로 IL-2의 분비가 적으면 림프구 억제와 NK 세포증식 및 B 세포의 항체합성을 증가시키며, 동물에서 antimetastatic 효과를 나타낸다. 이상의 결과로 볼때 GT-80EP의 섭취로 인하여 마우스의 T 세포와 B 세포의 증식을 증가시키고 혈장 C_3함량을 증가시키므로 GT0.5-80EP의 섭취가 일반적으로 면역 능력증진에 효과가 있다고 볼 수 있다.

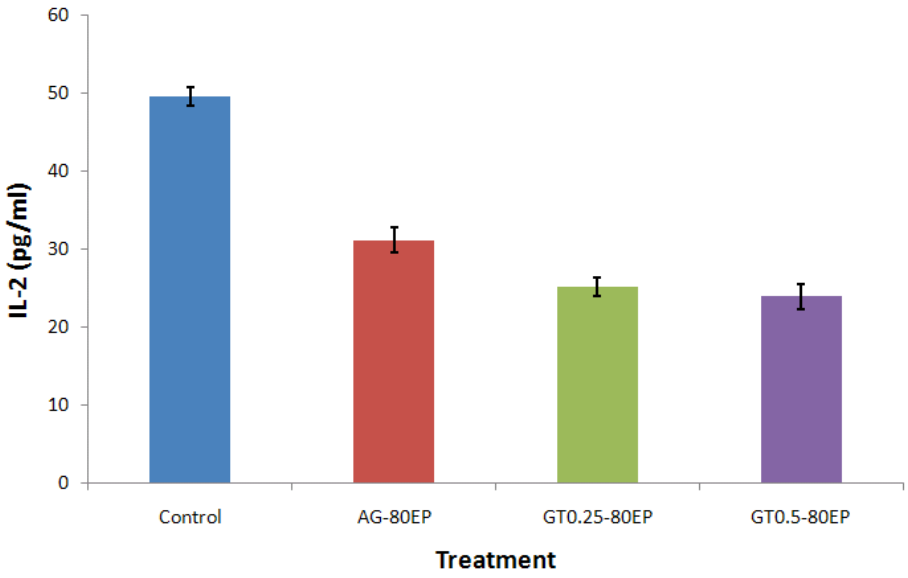


Figure 43. Serum interlukin-2 level of mice injected I.P. with GT0.25-80EP and GT0.5-80EP for 2 weeks.

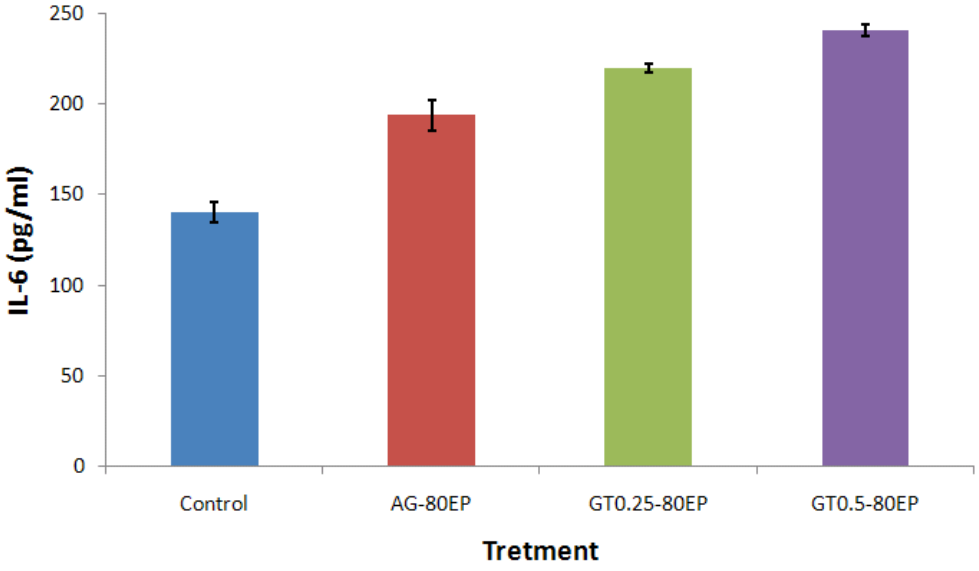


Figure 44. Serum interlukin-6 level of mice injected I.P. with GT0.5-80EP for 2 weeks.

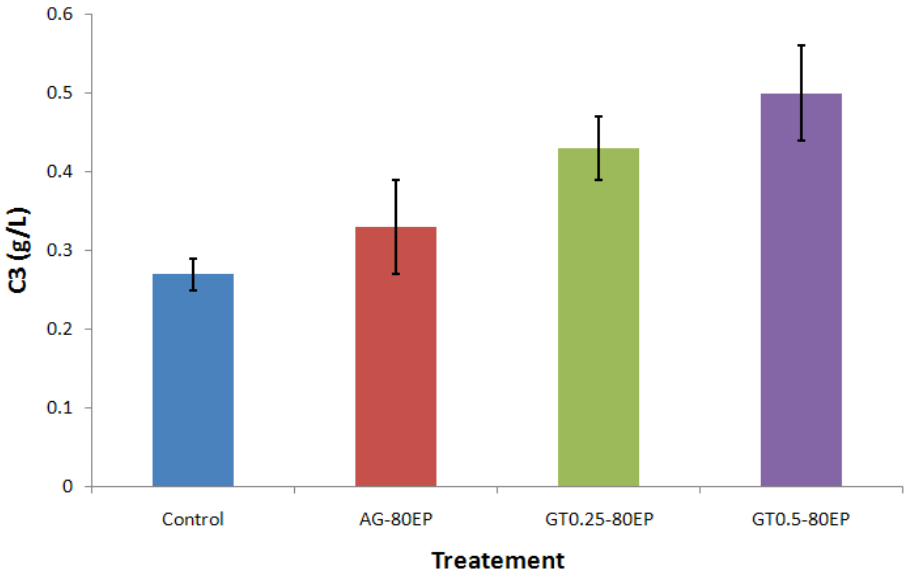


Figure 45. Serum C3 level of mice injected I.P. with GT0.5-80EP for 2 weeks.

양파분말을 첨가한 배지에서 배양시킨 버섯균사체의 IL-2, IL-6, C_3농도를 조사하였다. AG-80EP, 및 GT0.25-80EP, GT0.5-80EP의 IL-2의 혈장농도는 AG, GT0.5-80EP, GT1.0-80EP에서 각각 31.2, 28.0, 27.2 pg/ml를 나타내었다 (**Figure 46**). 대조구의 49.6 pg/ml 보다는 낮은 수치였으나 각각의 처리구간에는 유의적인 증가는 없었다. IL-6는 대조군의 140.5 pg/ml보다 높은 193.8, 208.0, 221.4 pg/ml으로 양파분말을 첨가하고 농도를 증가시킬수록 IL-6의 활성이 높게 나타났다 (**Figure 47**). C_3함량은 양파분말의 처리농도가 증가할수록 활성이 증가 하였으나 유의적인 증가를 보이지는 않았다 (**Figure 48**).

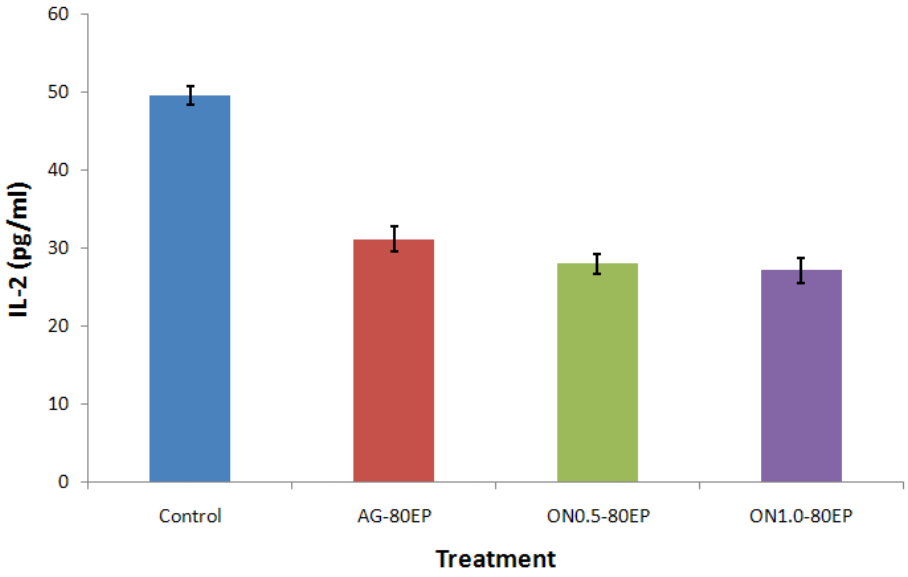


Figure 46. Serum interlukin-2 level of mice injected I.P. with ON0.5-80EP and ON1.0-80EP for 2 weeks.

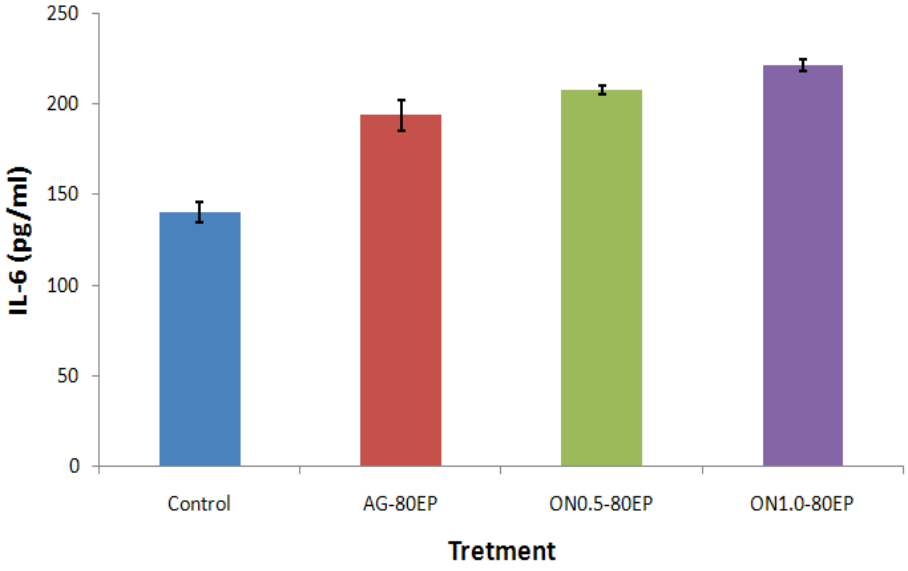


Figure 47. Serum interlukin-6 level of mice injected I.P. with ON0.5-80EP and ON1.0-80EP for 2 weeks.

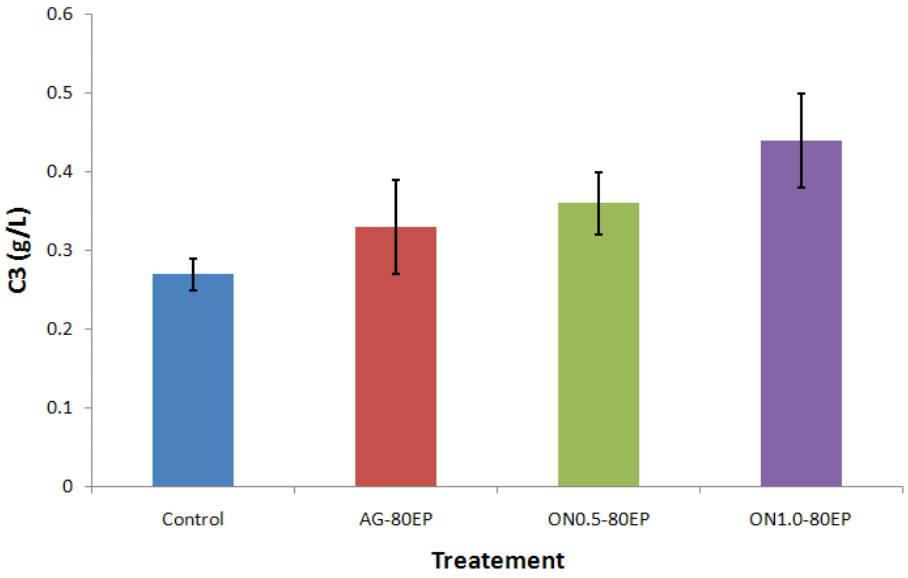


Figure 48. Serum C_3 level of mice injected I.P. with ON0.5-80EP and ON1.0-80EP for 2 weeks.

3) Marcrophage로부터 cytokines의 유도분비 조사

AG-80EP 및 GT0.25-80EP, GT0.5-80EP에 대한 macrophage 자극활성에 의한 cytokines의 유도능을 조사하기 위하여 IL-1과 INF-γ의 활성을 측정하였다. AP 및 GT0.25-80EP, GT0.5-80EP의 처리로 인하여 따라 대조구 (8.4, 40.4 pg/ml)에 비하여 AG-80EP 및 GT0.25-80EP, GT0.5-80EP의 처리에 의하여 IL-1와 IFN-γ 생성능력이 각각 24,8, 30.2, 34.1 pg/ml, 40.7, 57.7, 69.2 pg/ml로 유의적으로 증가하였다 (**Figure 49**).

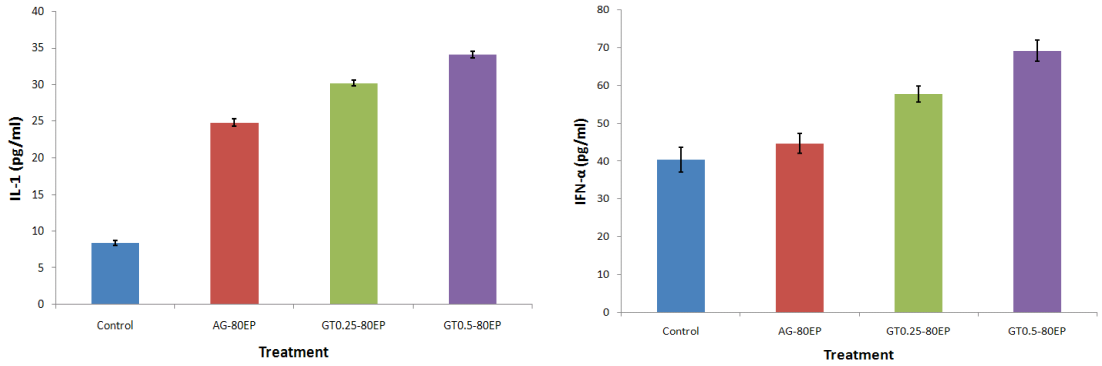


Figure 49. Induction of IL-1 and IFN-γ form macrophages by the stimulation with GT0.25-80EP and GT0.5-80EP.

AG-80EP 및 ON0.5-80EP, ON1.0-80EP에 대한 macrophage 자극활성에 의한 cytokines의 유도능을 알아보기 위하여 IL-1과 INF-γ의 활성을 측정하였다. 대조구 (8.4, 40.4 pg/ml)에 비하여 AG-80EP 및 ON0.5, ON1.0 80EP의 처리구에서는 IL-1와 IFN-γ 생성능력이 각각 24,8, 26.3, 30.1 pg/ml, 40.7, 45.9, 51.4 pg/ml로 증가하였으나 유의성은 없었다 (**Figure 50**).

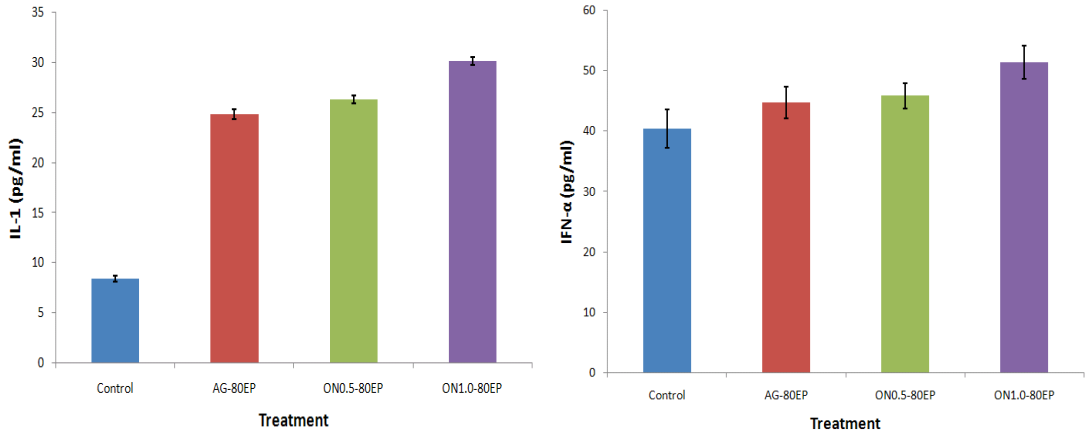


Figure 50. Induction of IL-1 and IFN-γ form macrophages by the stimulation with ON0.5-80EP and ON1.0-80EP

6. 제품화 기술개발

요약

○버섯균사체녹차제품의 개발: 버섯균사체 배양물을 하등급의 녹차에 처리하여 발효시킨 제품으로, 향미가 우수하면서 여러 가지 생리활성을 갖는 고급 녹차가 개발되었슴 .

○양파제품의 경우는 차 또는 분말 보다는 액상제품으로 하는 것이 바람직할 것으로 생각되며, 양파음료의 단점인 양파향을 없애주며 기능성이 강화된 제품이 개발되었음.

가. 버섯균사체녹차

버섯균사체 액체배양액 30L을 하급 건조녹차 30kg에 혼합하여 55℃에서 3시간동안 효소반응시킨 다음 다시 건조한 제품이다. 향이 우수하고 기능성이 증가된 버섯균사체 차를 제조하였다 (**Figure 51**).

Figure 51. Green tea treated with submerged liquid culture of mushroom mycelia.

나. 균사체 엑기스 제품의 생산

기본배지에 녹차분말 (0.5%)을 첨가하여제조한 배지에 버섯균사체 (5 kl)를 배양한 다음, 이를 여과한 것을 제품화 (GT 0.5)하였다.

녹차분말 0.125%를 첨가한 배지에서 버섯균사체를 배양한 GT 0.125의 경우 약간 초록색을 띄는 붉은 액상이었다. 냄새는 약간 녹차향이 났으나 신령버섯균사체의 특이한 향이 더욱강하였다. 맛은 약간 덟은맛이 나는것 같았으나 신령버섯균사체의 특이한 맛이 더욱 강하였다. 녹차분말 0.25%를 첨가한 배지에서 버섯균사체를 배양한 GT0.25는 녹차를 우려낼때 나타나는 약간 붉은빛이 조금 강하였으나 대체적으로는 초록색이 약간 강하였다. 신령버섯균사체의 특이한 향과 맛이 강하지만 녹차의 향과 맛이 강하게 나타났다. 녹차분말 0.5%를 첨가한 배지에서 버섯균사체를 배양한 GT0.5의 경우는 색상이 검푸른빛을 나타내었다. 맛과 향도 버섯균사체의 특이한 맛과 향은 줄어들고 녹차의 덟은맛과 향이 강하나게 나타났다. 버섯음료로서의 기호도는 GT0.25군이 가장좋았다 (**Figure 52**).

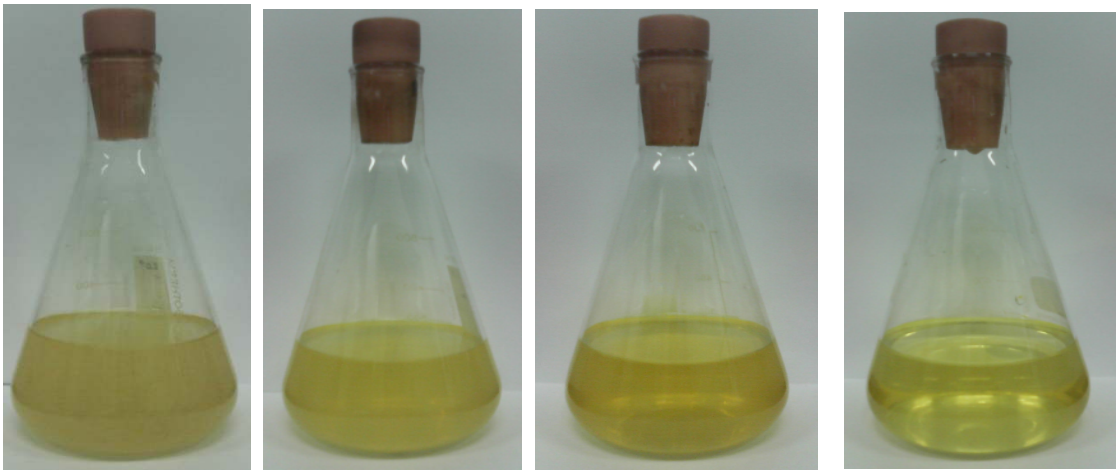
Control GT 0.125 GT 0.25 GT 0.5

Figure 52. Green tea drink fermented with mushroom mycelia by submerged liquid culture

다. 버섯균사체양파음료 제조

양파제품의 경우 분말보다는 음료개발이 더 바람직할 것으로 생각되었다. 전처리구에서 모두 색상이 노란색의 액상제품이었다. 양파분말을 많이 첨가할수록 배양액이 더 맑았다. 이것은 양파분말로부터 첨가된 물질들이 열수추출시 균사체로부터 분리되지 않고 그대로 남아 용액중으로 추출되지 않은 것으로 생각된다.

ON 0.25제품의 경우 양파분말로부터 유래된 황성분의 냄새가 있으나, 신령버섯균사체의 특이한 향과 맛이 강했다. 그러나 대조군에 비하여 단맛이 더 강하고 양파의 향과 맛이 났다 (**Figure 53**). ON 0.5과 ON 1.0의 처리구는 양파의 향과 맛이 더욱 강했지만, 기호도를 떨어뜨릴 정도로 나쁜 향은 아니었다.



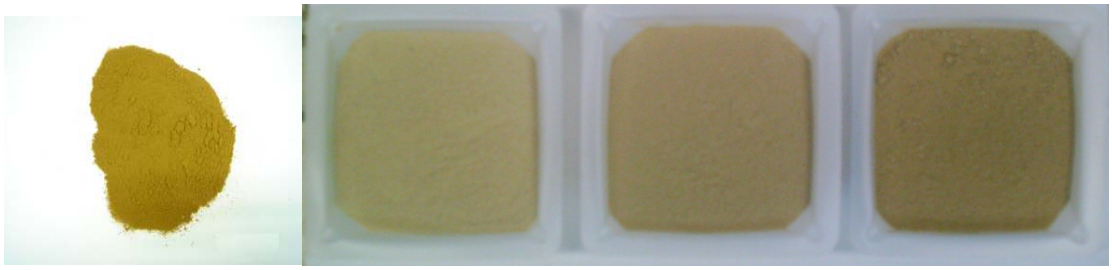
Control ON0.25 ON 0.5 ON1.0

Figure 53. *Agaricus blazei* hot water extract submerged culture with onion.

라. 버섯균사체액체 배양액을 이용한 분말 제품의 생산

GT 0.125, 0.25, 0.5%, ON 0.25, 0.5, 1.0배양물 400 L에 대두분 40 kg (10%, w/v)을 혼합하여 freeze dry하였다. Freeze dry한 후의 회수된 분말은 41kg으로 약 10%의 고형분이 회수되었다 (**Figure 54**).

녹차분말을 첨가하여 배양한 배양물의 경우 그 농도가 증가할 수록 연한 초록색에서 진한초록색으로 색상이 짙어졌다. 동결건조되면서 녹차와 버섯균사체의 특이한 냄새는 사라지고 약간 고소한 맛과 향이 나는 분말로 다양하게 소재로 사용될 수 있을 것으로 생각된다.



AP GT0.125 GT0.25 GT0.5

Figure 54. Freeze dried green tea powder treated with submerged liquid culture of mushroom mycelia.

양파분말을 넣고 배양한 배양물의 경우 색상이 약간 붉은 색을 나타내었다 (**Figure 55**). 양파분말의 첨가량이 많은 배양물 일 수록 붉은 색이 강했다. 동결건조되면서 양파의 매운맛과 특이한 향이 사라지고 녹차와 동일하게 약간 구수한 분말이 형성되어 기호도가 높았다. 양파에서 유래된 특이한 단맛과 버섯균사체의 맛이 어우러져 식용소재로 사용하기에 적합하였다.

AP ON0.25 ON0.5 ON1.0

Figure 55. Freeze dried onion powder treated with submerged liquid culture of mushroom mycelia.

7. 제품의 품질평가

가. 관능검사

요약
○GT0.5에서 맛과 향에서 기호도가 우수함
○ON1.0에서 맛과 향에서 기호도가 우수함

1) 녹차제품의 관능검사

녹차분말을 배지에 0.5% 첨가하여 버섯균사체를 배양한 처리구 (GT0.5)에서 향 (7.0)와 맛 (6.8)에 있어 높은 점수를 얻었다. 이는 대조군와 0.25% (GT0.25), 1.0% (GT1.0)에 비해 전반적인 기호도가 높은 것으로 평가되었다. 색도에서도 GT0.5 처리구에서 6.4로 높이 나타났다. GT1.0 처리구에서는 대조구에 비하여 전체적인 기호도에 있어 낮은 값을 얻었다. 이는 제품 자체의 검은 색깔 때문에 panelist의 편견이 있었을 수 도 있을 것으로 생각된다. 또한 GT1.0구는 녹차성분이 다량함유되어 떫은맛은 높았고 단맛은 다소

덜하였다. GT0.5구에서 약간 떫은맛이 대조구에 비하여 높지만 유의성있는 값은 이니었다. 종합적인 기호도에 의한 평가는 GT0.5 녹차제품이 높게 평가되었다 (Table 25).

Table 25. Sensory score of green tea powder treated with submerged liquid culture of mushroom mycelia

	Control	GT0.1[1)]	GT0.5[2)]	GT1.0[3)]
Aroma	5.6±1.0[4)]	6.3±1.2	7.0±1.5	6.7±1.4
Flavor	5.6±1.0	6.4±1.2	6.8±1.2	6.4±1.2
Color	5.6±1.0	6.0±1.5	6.4±1.4	5.0±1.0
Off-flavor	2.5±0.9	2.5±1.4	2.4±1.4	2.5±0.9
Tartness	3.1±1.4	3.3±1.2	3.8±1.4	5.9±1.0
Sweet taste	4.8±0.7	5.0±1.0	5.1±1.1	4.1±1.0
Acceptability	5.4±0.8	6.0±1.0	6.3±1.0	5.1±1.1

[1)]Submerged liquid cultured in basal medium with 0.1% green tea powder by mushroom mycelia.
[2)]Submerged liquid cultured in basal medium with 0.5% green tea powder by mushroom mycelia.
[3)]Submerged liquid cultured in basal medium with 1.0% green tea powder by mushroom mycelia.
[4)]Averager±S.D.. Sixteen peoples participated panelist.

2) 양파제품의 관능검사

양파분말을 배지에 1.0% 첨가하여 버섯균사체를 배양한 처리구 (ON1.0)에서 향 (6.7)와 맛 (6.5)에 있어 높은 점수를 얻었다. ON1.0처리구 제품의 경우 색상도 양호하였으며, 불쾌치와 매운맛은 양파추출물의 농도가 증가할수록 증가하였으나 종합적인 기호도에는 큰 영향을 미치지 않았다. 양파의 농도가 증가할수록 단맛은 증가하였다 (Table 26).

Table 26. Sensory score of onion powder treated with submerged liquid culture of mushroom mycelia

	Control	ON0.1[1)]	ON0.5[2)]	ON1.0%[3)]
Aroma	5.6±1.0[4)]	6.0±1.3	6.3±1.4	6.7±1.4
Flavor	5.6±1.0	6.1±1.0	6.4±1.0	6.5±1.5
Color	5.6±1.0	5.8±1.4	6.6±1.1	6.6±1.4
Off-flavor	2.5±0.9	2.8±1.0	3.1±0.9	3.5±0.9
Pungent taste	3.1±1.4	3.4±1.3	4.3±1.0	4.8±1.0
Sweet taste	4.8±0.7	5.1±0.9	6.0±1.0	6.1±1.0
Acceptability	5.4±0.8	5.8±1.0	6.4±1.0	6.5±0.9

[1)]Submerged liquid cultured in basal medium with 0.1% onion powder by mushroom mycelia.
[2)]Submerged liquid cultured in basal medium with 0.5% onion powder by mushroom mycelia.
[3)]Submerged liquid cultured in basal medium with 1.0% onion powder by mushroom mycelia.
[4)]Averager±S.D.. Sixteen peoples participated panelist.

나. 향기성분

요약
○ 맛과 향에서 기호도가 우수한 녹차제품 GT0.5의 향기성분

맛과 향이 우수한 GT0.5제품의 향기성분을 GC-MS로 동정한 결과 **Table 27, Figure 56**과 같이 녹차만으로는 만들어 질 수 없는 방향성 화합물이 생성되었다.

Table 27. Volatile flavor compounds identified from green tea product (GT0.5) by GC-MS

RT	Compounds	RT	Compounds
11.834	4-terpineol	33.158	phenethyl alcohol
12.943	2-hendecanone	34.747	o-xylene-3,6-diol
15.053	bicycloelemene	35.581	caryophyllene oxide
24.236	3methyl-6-piperitone	36.387	perilla alcohol
24.630	undeca-2,6-diene	36.844	benzene 1-methyl
24.968	aceticacid,benzylester	37.176	benzeneethanol, 2-methony
27.122	ethanone	38.656	o-ethylphenol
28.768	4-decene	38.804	veridiflorol
28.888	2,6-octadien-1-ol,3,7-dimethyl	39.016	trans-2-cyclohexan-1-ol
28.471	benzeneethanol, 3-methoxy	39.325	benzenemethanol
29.191	1h-indene,1,7,3-trimethyl	40.456	phenol 2-ethyl-6-methyl
29.346	propanoic acid 2-phenylethylester	41.245	phenol.4ethyl
30.214	trans[+]carveol	41.725	alpha-cadinol
30.449	imidazole, 2-ethyl-4-methyl	42.916	alpha-cadinol
30.752	benzenenethanol	43.908	phenol,3,4-dimethoxy
30.872	2.6-octadien-1-ol,3.7-dimethyl	44.285	1-octadecanol
31.123	nerylacetone	45.388	1-ethanone

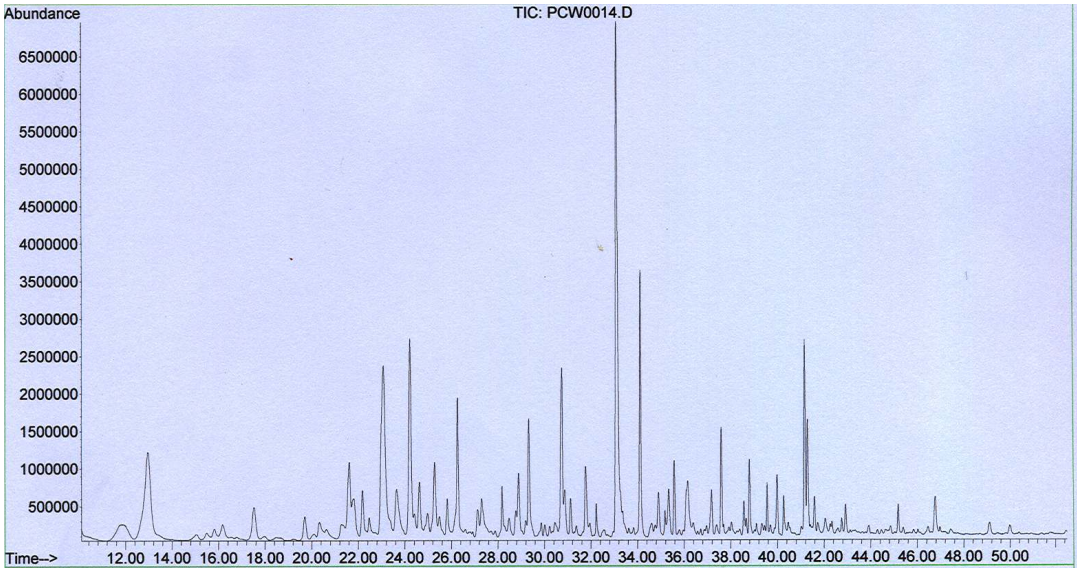


Figure 56. A typical GC-MS chromatogram of volatiles from GT0.5 product.

다. 맛

요약

○녹차제품 (GT0.5)과 양파제품 (ON1.0)의 유리당 : sucrose, glucose, fructose.
○녹차분말 또는 양파분말을 첨가하지 않은 기본배지에 버섯균사체를 배양한 제품 (AP)는 oxalic acid와 succic acid함량이 높음.
○녹차제품 (GT0.5)은 malic acid와 malonic acid의 비율이 높음.
○양파제품 (ON1.0)은 oxalic acids와 succinic aicd의 비율이 높음.
○녹차제품 (GT0.5) L-alanine, L-phenylalanine류의 아미노산 함량이 높음.
○양파제품 (ON1.0)은 L-serine이 높음 (12.70%).

1) 당

표준품의 retention time은 arabinose 15.65, fructose 16.41, galactose 14.41, glucose 12.64, lactose 11.46, maltose 11.14, mannose 16.00, ribose 29.40, sucrose 10.70, xylose 13.64, fucose 15.62이었다. 녹차와 양파제품 모두, 주요 당은 sucrose, glucose, fructose이었으며, 7.71분에 다당체가 2.87% 함유되어 있었다 (**Figure 57**). 녹차분말 첨가량과 양파분말 첨가량에 따른 당의 종류와 함량에는 크게 차이가 없었다 (**Figure 58**).

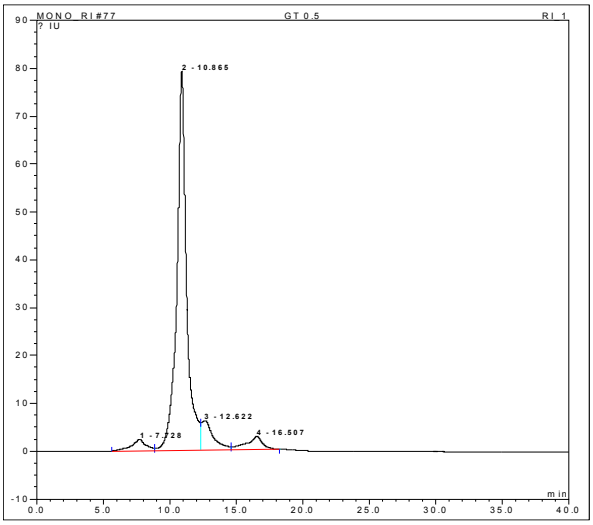


Figure 57. HPLC of sugar in green tea powder treated with submerged liquid culture of mushroom mycelia

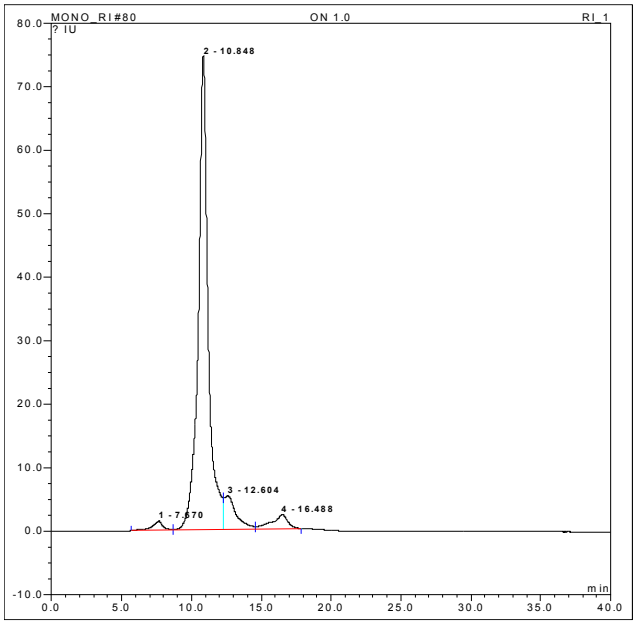


Figure 58. HPLC of sugar in onion powder treated with submerged liquid culture of mushroom mycelia

2) 유기산

표준품의 retention time은 oxalic acid 7.99, tartaric acid 8.38, malic acid 9.62, malonic aicd 9.99, lactic acid 10.92, acetic aicd 11.53, maleic acid 12.16, citric aicd 14.43, fumaric acid 14.55, succinic acid 16.64분 이었다.

녹차분말 또는 양파분말을 배지에 첨가하지 않고 버섯균사체를 배양한제품중에는 oxalic acid (43.09%), acetic acid (2.67%), succinic acid (12.31%) 가 함유되어 있었다. 녹차분말을 첨가하여 배양한 제품의 경우 oxalic acid, fumaric acid, succinic acid, tartaric acid, malonic acid, acetic acid, succinic acid가 함유되어있었다 (**Figure 59**). 양파분말을 첨가하여 배양한 제품의 경우 oxalic acid, fumaric acid, succinic acid가 미량존재하고 succinic acid 다량 함유되어있었다 (**Figure 60**).

녹차제품과 양파제품 모두 강한 신맛을 부여할 정도의 유기산을 함유하지는 않았고, 녹차분말 또는 양파분말을 첨가히지 않고 배양한 제품과 맛은 유사하였다. 맛에 양향을 주는 성분은 녹차의 떫은 맛과 양파의 단맛으로 유기산이 아닌것으로 생각된다.

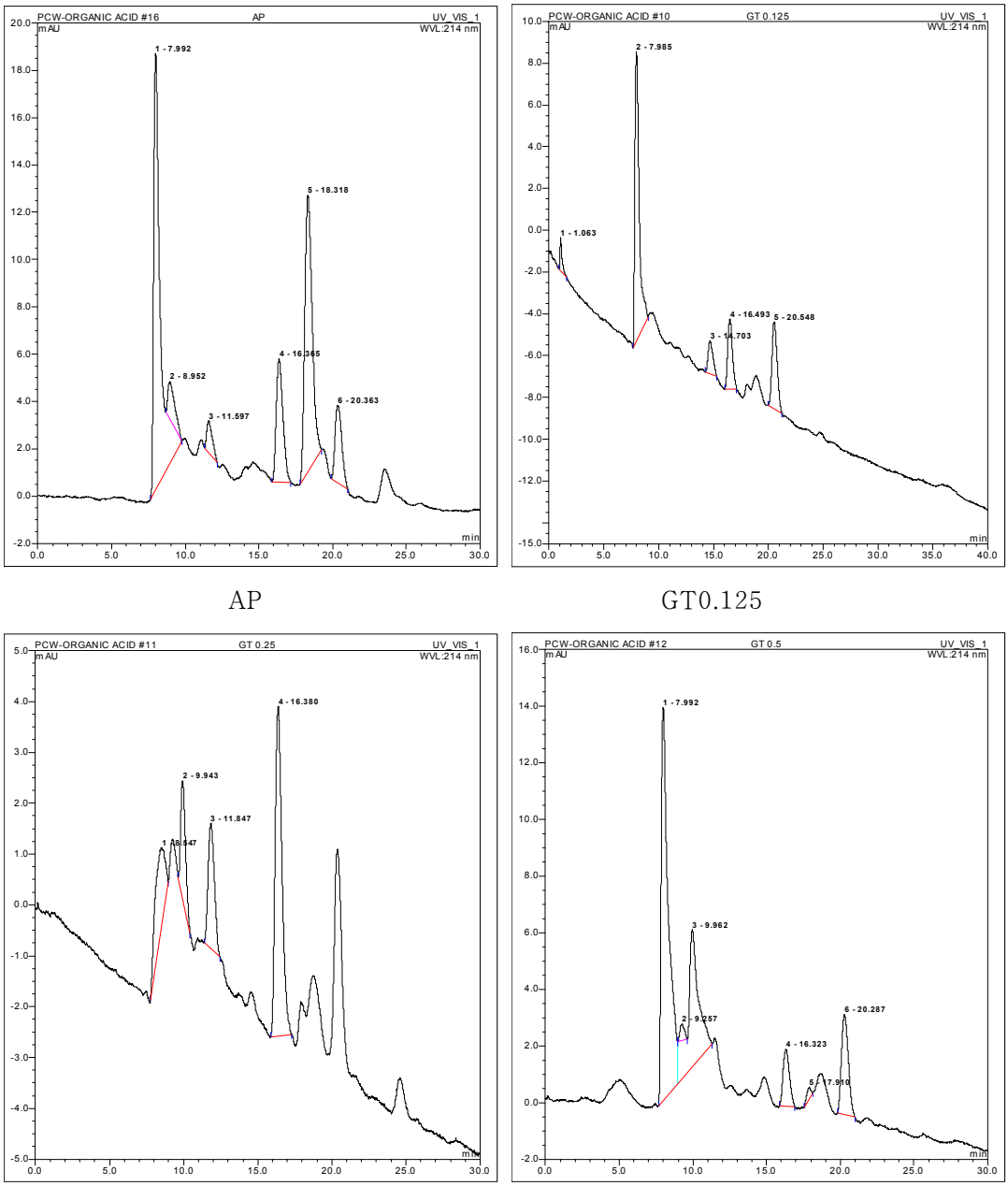


Figure 59. HPLC profile of organic acis in Green tea (GT) products.

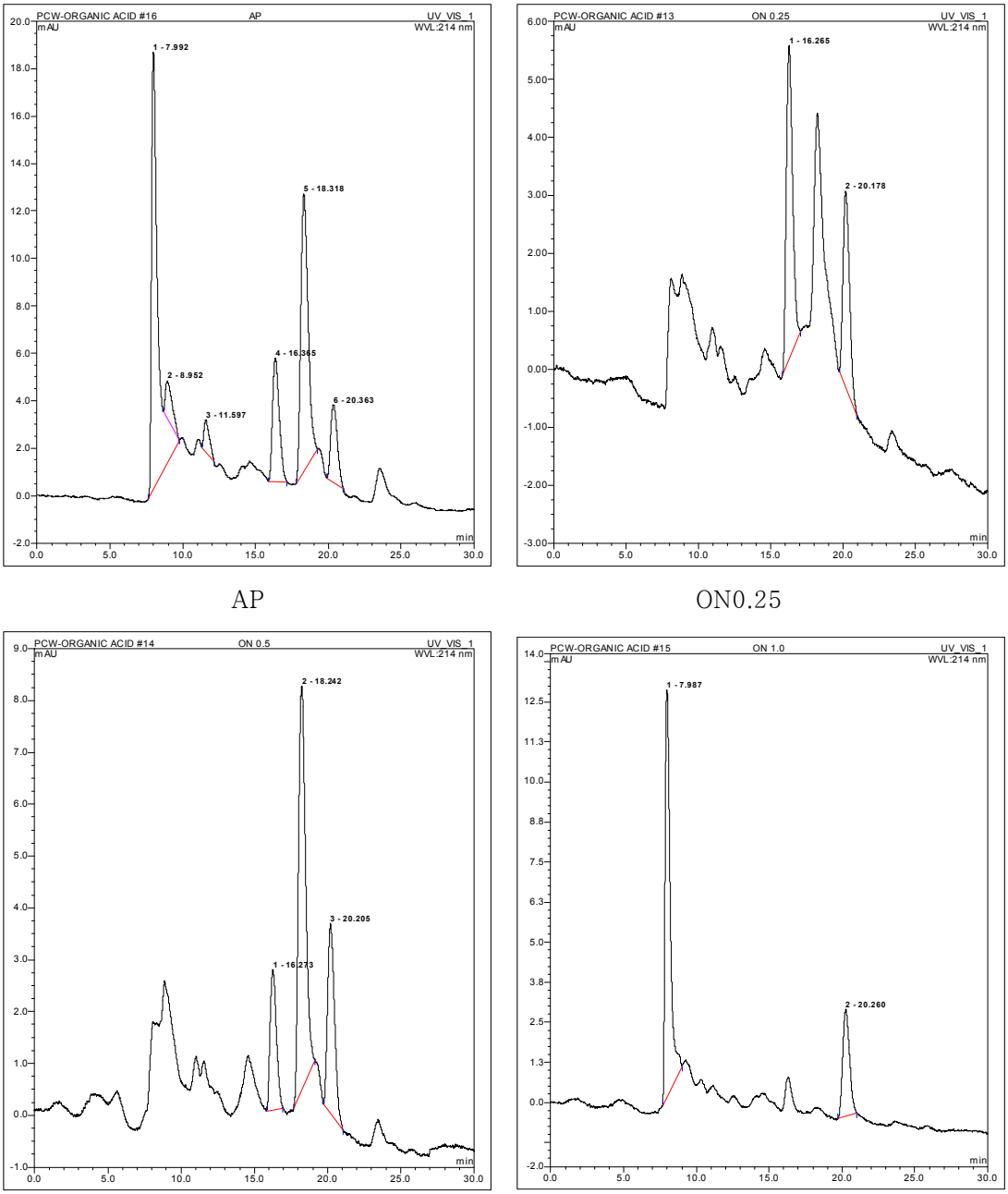


Figure 60. HPLC profile of organic acids in Green tea (GT) products.

3) 아미노산

녹차의 열수추출물의 경우, L-alanine, L-valine, L-Phenylalanine가 함유되어 있었다. 녹차분말을 첨가하여 배양한 제품의 경우 (GT 0.5)는 L-alanine, L-leucine, L-phenylalanine, L-arginine이 함유되어 있었다 (Table 28).

Table 28. Compositions of free amino acids of green tea product (GT0.5) and onion product (ON1.0)

Amino acids	GT0.5[1)]	`ON1.0[2)]
L-Proline	1.05	1.16
Glycine	2.72	1.89
L-Alanine	8.02	11.84
L-Valine	3.34	3.04
L-Isoleucine	2.33	2.12
L-Leucine	4.43	3.85
L-Phenylalanine	4.24	2.22
γ-Amino-n-butyric Acid	4.64	3.95
Ammonium Chloride	37.65	6.86
L-Ornithine	4.91	2.87
L-Lysine	3.99	21.47
L-Histidine	3.11	8.84
L-Arginine	4.44	4.11

[1)]Green tea powder (0.5%) treated with submerged liquid culture of mushroom mycelia

[2)]Onion powder (1.0%) treated with submerged liquid culture of mushroom mycelia

8. 안전성 조사

가. 단회투여 독성실험 (급성)

요약

○GT0.25-80EP, GT0.5-80EP, ON0.5-80EP, ON1.0-80EP 시료를 각각 500㎎/㎏ mouse (15 ㎎/30 g) 경구투여시 급성독성을 보지지 않음

1) 사망 및 임상증상 관찰

AG-80EP와 GT0.25-80EP, GT0.5-80EP, ON0.5-80EP, ON1.0-80EP 시료를 각각 500㎎/㎏ mouse (15 ㎎/30 g)로 희석하여 0.2 ㎖씩 복강 투여하였다 (㎎. ICR 암수 각 10마리에 경구투여 하여 급성독성시험을 수행하면서 7일간 사망수를 조사하였고 (**Table 29**), 또한 여러 가지 임상학적인 변화를 관찰하였다. 투여 당일부터 7일 동안 사망한 동물은 암수 모두에서 없었다. 이 결과는 AG와 GT, ON시료모두 가 경구 급성독성실험에서 아무런 독성을 보이지 않았다 (**Table 30**).

Table 29. Mortality of mice treated orally with GT0.25-80EP, GT0.5-80EP, ON0.5-80EP and ON1.0-80EP for 7 days.

Sex	Treatment (15㎎/30g)	Days after treatment								Final mortality
		0	1	2	3	4	5	6	7	
Male	Control	0/10[1)]	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
	AG-80EP	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
	GT0.25-80EP	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
	GT0.5-80EP	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
	ON0.5-80EP	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
	ON1.0-80EP	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
Female	Control	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
	AG-80EP	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
	GT0.25-80EP	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
	GT0.5-80EP	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
	ON0.5-80EP	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
	ON1.0-80EP	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10

[1)]Values are expressed as animal numbers (cumulative mortality number of mice/total number of mice)

Table 30. Clinical signs in mice treated, orally with GT0.25-80EP, GT0.5-80EP, ON0.5-80EP and ON1.0-80EP for 7 days[1].

Sex	Treatment (15mg/30g)	Clinical sign	Days after treatment							
			0	1	2	3	4	5	6	7
Male	Control	NAD[2]	10	10	10	10	10	10	10	10
	AG-80EP	NAD	10	10	10	10	10	10	10	10
		DMA[3]	10	10	10	10	10	10	10	10
	GT0.25-80EP	NAD	10	10	10	10	10	10	10	10
		DMA	10	10	10	10	10	10	10	10
	GT0.5-80EP	NAD	10	10	10	10	10	10	10	10
		DMA	10	10	10	10	10	10	10	10
	ON0.5-80EP	NAD	10	10	10	10	10	10	10	10
		DMA	10	10	10	10	10	10	10	10
	ON1.0-80EP	NAD	10	10	10	10	10	10	10	10
		DMA	10	10	10	10	10	10	10	10
Female	Control-80EP	NAD	10	10	10	10	10	10	10	10
	AG-80EP	NAD	10	10	10	10	10	10	10	10
		DMA	10	10	10	10	10	10	10	10
	GT0.25-80EP	NAD	10	10	10	10	10	10	10	10
		DMA	10	10	10	10	10	10	10	10
	GT0.5-80EP	NAD	10	10	10	10	10	10	10	10
		DMA	10	10	10	10	10	10	10	10
	ON0.5-80EP	NAD	10	10	10	10	10	10	10	10
		DMA	10	10	10	10	10	10	10	10
	ON1.0-80EP	NAD	10	10	10	10	10	10	10	10
		DMA	10	10	10	10	10	10	10	10

[1]Mice were used in all treatments

[2]NAD : not abnormalities detected.

[3]DMA : decrease of motor activity.

2) 체중

시료의 열수 추출물을 0.2 ml (15 mg/30g)를 ICR 암수 각 10마리에 경구투여하여 급성독성시험을 수행하면서 7일간 몸무게의 변화를 측정하였다. 투여 후 7일 동안 증가한 몸무게는 수컷에서 대조구에 비해 증가하였지만 유의성은 없었다. 즉 대조구는 3.9 g이 증가하였고, 처리구에 따라 각각 3.7, 3.5, 4.9, 3.6, 3.8 g이 증가하였다.

또한 암컷에서도 대조구에 비해 증가하였지만 유의성은 없었다. 즉 대조구는 2.0

g이 증가하였고, 처리구에 따라 각각 2.0, 2.5, 3.1, 4.1, 3.7, 3.4 g이 증가하였다 (**Table 31**).

Table 31. Body weights in mice treated orally with GT0.25-80EP, GT0.5-80EP, ON0.5-80EP, ON1.0-80EP for 7 days[1)]

Sex	Treatment (15㎎/30g)	Days after treatment Final mortality			
		0	4	7	Gain
Male	Control	31.2±1.0[2)]	32.9±1.5	35.1±1.5	3.9
	AG-80EP	31.1±1.1	32.6±1.1	34.9±1.4	3.7[3)]
	GT0.25-80EP	31.7±1.1	32.5±1.2	35.2±1.3	3.5
	GT0.5-80EP	30.3±0.8	32.7±0.8	35.2±1.2	4.9
	ON0.5-80EP	31.7±0.9	33.7±1.3	35.3±1.4	3.6
	ON1.0-80EP	31.4±1.2	32.5±1.1	35.2±1.5	3.8
Female	Control	28.4±1.2	29.5±1.3	30.4±1.3	2.0
	AG-80EP	27.9±0.9	29.0±0.8	30.4±1.2	2.5
	GT0.25-80EP	28.1±0.8	29.3±1.2	30.3±1.2	3.1
	GT0.5-80EP	27.6±0.8	29.9±1.1	31.7±1.3	4.1
	ON0.5-80EP	28.1±1.0	29.7±1.3	31.8±0.9	3.7
	ON1.0-80EP	27.7±0.8	29.0±1.2	31.1±1.5	3.4

[1)] 10 mice were used in all treatments

[2)]Mean ± SD.

[3)]No significantly different from control at $p<0.05$ by t-test.

3) 육안적 해부소견

모든 시료를 0.2 ㎖ (15 ㎎/30g)를 ICR 암수 각 10마리에 경구투여 하여 급성독성시험을 수행하면서 장기(cecum, intestine, stomach, adr. gland, brain, heart, liver, kidney, spleen, testis, thymus)의 정상/이상 증상을 육안적으로 조사하였다 (**Table 32, Table 33**). 시료 투여 후 7일 후 장기를 적출하여 유착, 확장, 종대를 조사한 결과 아무런 이상적인 증상은 관찰되지 않았다.

Table 32. Gross findings in male mice treated orally with GT0.25-80EP, GT0.5-80EP, ON0.5-80EP and ON1.0-80EP for 7 days

Organ	Clinical sign	Treatment (15㎎ /30 g)					
		Control	AG-80EP	GT0.25 -80EP	GT0.5 -80EP	ON0.5 -80EP	ON1.0 -80EP
Organ	Adhesion	-	-	-	-	-	-
	NGF[1)]	10(100%)[2)]	10(100%)	10(100%)	10(100%)	10(100%)	10(100%)
Cecum	Enlargement	-	-	-	-	-	-
	NGF	10(100%)	10(100%)	10(100%)	10(100%)	10(100%)	10(100%)
Intestine	Enlargement	-	-	-	-	-	-
	NGF	10(100%)	10(100%)	10(100%)	10(100%)	10(100%)	10(100%)
Stomach	Enlargement	-	-	-	-	-	-
	NGF	10(100%)	10(100%)	10(100%)	10(100%)	10(100%)	10(100%)
Adr. gland	Enlargement	-	-	-	-	-	-
	NGF	10(100%)	10(100%)	10(100%)	10(100%)	10(100%)	10(100%)
Brain	Enlargement	-	-	-	-	-	-
	NGF	10(100%)	10(100%)	10(100%)	10(100%)	10(100%)	10(100%)
Heart	Enlargement	-	-	-	-	-	-
	NGF	10(100%)	10(100%)	10(100%)	10(100%)	10(100%)	10(100%)
Liver	Enlargement	-	-	-	-	-	-
	NGF	10(100%)	10(100%)	10(100%)	10(100%)	10(100%)	10(100%)
Kidney	Enlargement	-	-	-	-	-	-
	NGF	10(100%)	10(100%)	10(100%)	10(100%)	10(100%)	10(100%)
Spleen	Enlargement	-	-	-	-	-	-
	NGF	10(100%)	10(100%)	10(100%)	10(100%)	10(100%)	10(100%)
Testis	Enlargement	-	-	-	-	-	-
	NGF	10(100%)	10(100%)	10(100%)	10(100%)	10(100%)	10(100%)
Thymus	Enlargement	-	-	-	-	-	-
	NGF	10(100%)	10(100%)	10(100%)	10(100%)	10(100%)	10(100%)

[1)]NGF: No gross finding.

[2)]( ) : % of finding from animal number 10.

Table 33. Gross findings in female mice treated orally with GT0.25−80EP, GT0.5−80EP, ON0.5−80EP and ON1.0−80EP for 7 days

Organ	Clinical sign	Treatment (15㎎ /30 g)					
		Control	AG−80EP	GT0.25 −80EP	GT0.5 −80EP	ON0.5 −80EP	ON1.0 −80EP
Organ	Adhesion	−	−	−	−	−	−
	NGF[1)]	10(100%)[2)]	10(100%)	10(100%)	10(100%)	10(100%)	10(100%)
Cecum	Enlargement	−	−	−	−	−	−
	NGF	10(100%)	10(100%)	10(100%)	10(100%)	10(100%)	10(100%)
Intestine	Enlargement	−	−	−	−	−	−
	NGF	10(100%)	10(100%)	10(100%)	10(100%)	10(100%)	10(100%)
Stomach	Enlargement	−	−	−	−	−	−
	NGF	10(100%)	10(100%)	10(100%)	10(100%)	10(100%)	10(100%)
Adr. gland	Enlargement	−	−	−	−	−	−
	NGF	10(100%)	10(100%)	10(100%)	10(100%)	10(100%)	10(100%)
Brain	Enlargement	−	−	−	−	−	−
	NGF	10(100%)	10(100%)	10(100%)	10(100%)	10(100%)	10(100%)
Heart	Enlargement	−	−	−	−	−	−
	NGF	10(100%)	10(100%)	10(100%)	10(100%)	10(100%)	10(100%)
Liver	Enlargement	−	−	−	−	−	−
	NGF	10(100%)	10(100%)	10(100%)	10(100%)	10(100%)	10(100%)
Kidney	Enlargement	−	−	−	−	−	−
	NGF	10(100%)	10(100%)	10(100%)	10(100%)	10(100%)	10(100%)
Spleen	Enlargement	−	−	−	−	−	−
	NGF	10(100%)	10(100%)	10(100%)	10(100%)	10(100%)	10(100%)
Testis	Enlargement	−	−	−	−	−	−
	NGF	10(100%)	10(100%)	10(100%)	10(100%)	10(100%)	10(100%)
Thymus	Enlargement	−	−	−	−	−	−
	NGF	10(100%)	10(100%)	10(100%)	10(100%)	10(100%)	10(100%)

[1)]NGF: No gross finding.

[2)]( ) : % of finding from animal number 10.

4) 혈액학적 검사

모든 시료를 0.2 ml (15 mg/30g)를 ICR 암수 각 10마리에 경구투여 하여 급성독성시험을 수행하면서 7일 후에 혈액중의 WBC, RBC, Hb, Hct, Platelet, MCV, MCH, MCHC를 측정하였다 (**Table 34, 35**). 수컷에서 대조구에 비해 RBC, Hb, Hct 및 BLP가 증가하였다. 또한 암컷에서도 RBC, Hb, Hct, 및 BLP가 증가하였다.

따라서 이 GT 및 ON은 mouse의 암수 혈액학적인 인자에 영향을 미치지 않는 것으로 확인되었다.

Table 34. Hematological findings in male mice treated orally with GT0.25-80EP, GT0.5-80EP, ON0.5-80EP and ON1.0-80EP for 7 days

Item[1)]	Treatment (15mg /30 g)					
	Control	AG-80EP	GT0.25 -80EP	GT0.5 -80EP	ON0.5 -80EP	ON1.0 -80EP
WBC (Thous/μl)	3.35	3.24	3.59	4.12	4.05	3.98
RBC (Mil/μl)	7.35	7.57	7.54	7.48	7.95	7.62
Hb (g/dL)	12.8	12.4	13.4	13.6	12.9	12.5
Hct (%)	40.6	41.5	39.7	44.2	48.4	40.3
Platelet (Thous/μl)	498	398	498	385	412	431
MCV (fL)	56.3	59.7	58.4	54.6	58.4	57.5
MCH (pg)	17.1	18.4	18.3	16.3	17.5	17.3
MCHC (g/dL)	32.4	31.4	33.1	29.4	28.5	29.1

[1)]WBC; white blood cell, RBC; red blood cell, Hb; hemoglobin, Hct; hematocrit, BLP; blood platelet, MCV; mean corpuscular volume, MCH; mean corpuscular hemoglobin, MCHC; mean corpuscular hemoglobin concentration.

Table 35. Hematological findings in female mice treated orally with GT0.25-80EP, GT0.5-80EP, ON0.5-80EP and ON1.0-80EP for 7 days

Item[1)]	Treatment (15㎎ /30 g)					
	Control	AG-80EP	GT0.25 -80EP	GT0.5 -80EP	ON0.5 -80EP	ON1.0 -80EP
WBC (Thous/㎕)	3.20	3.00	1.94	4.10	3.90	4.05
RBC (Mil/㎕)	7.40	7.76	7.39	8.62	7.46	7.68
Hb (g/dL)	12.9	13.8	12.3	13.3	13.2	12.9
Hct (%)	40.4	41.6	39.5	46.3	44.8	46.4
Platelet (Thous/㎕)	546	484	364	343	435	431
MCV (fL)	53.6	53.6	53.5	53.7	60.1	54.8
MCH (pg)	16.8	17.8	16.6	15.4	17.7	17.7
MCHC (g/dL)	31.4	33.2	31.1	28.7	29.5	30.6

[1)]WBC; white blood cell, RBC; red blood cell, Hb; hemoglobin, Hct; hematocrit, BLP; blood platelet, MCV; mean corpuscular volume, MCH; mean corpuscular hemoglobin, MCHC; mean corpuscular hemoglobin concentration.

5) 혈액 생화학적 검사

모든 시료를 0.2 ㎖ (15 ㎎/30g)를 ICR 암수 각 10마리에 경구투여 하여 급성 독성시험을 7일 후에 혈액중의 lactic dehydrogenase, aspartate aminotransferase, alanine aminotransferase, alkaline phosphatase, creatine phosphate kinase의 활성과 total protein, albumin, glucose, cholesterol, triglyceride, creatinine, blood urea nitrogen, calcium, phosphorus, uric acid의 함량을 측정하였다 (**Table 36, 37**).

Table 36. Biochemical findings in male mice treated orally with GT0.25−80EP, GT0.5−80EP, ON0.5−80EP and ON1.0−80EP for 7 days

Item[1)]	Treatment (15㎎ /30 g)					
	Control	AG−80EP	GT0.25 −80EP	GT0.5 −80EP	ON0.5 −80EP	ON1.0 −80EP
Protein (g/dL)	5.5	5.5	5.7	5.4	5.4	5.3
Albumin (g/dL)	2.0	2.0	2.1	1.9	1.9	2.0
BUN (mg/dL)	34	34	32	26	25	22
Creatinine (mg/dL)	0.4	04	0.4	0.4	0.4	0.3
Uric acid (mg/dL)	4.9	4.1	4.7	4.7	5.0	5.4
Glucose (FBS, mg/dL)	286	255	228	272	294	335
AST (SGOT IU/L)	53	65	96	62	54	64
ALT (SGPT IU/L)	36	43	74	41	28	36
γ−GTP (IU/L)	ND[2)]	ND	ND	ND	ND	ND
ALP (IU/L)	423	455	522	412	346	385
CPK (IU/L)	158	148	194	130	204	155
Cholestrol (mg/dL)	151	160	129	165	151	155
Triglyceride (mg/dL)	215	158	100	78	74	83
Calcium (mg/dL)	11.6	12.1	12.3	11.8	11.5	11.6
Phosphorus (mg/dL	19.5	18.4	18.0	14.5	14.0	14.8

[1)]BUN; blood urea nitrogen, AST; aspartate aminotransferase, ALT; alanine aminotransferase, ALP; alkaline phosphatase, CPK; Creatine phosphate kinase

[2)]ND : Not detected

Table 37. Biochemical findings in female mice treated orally with GT0.25, GT0.5, ON0.5, and ON1.0 for 7 days

Item[1)]	Treatment (15㎎ /30 g)					
	Control	AG	GT0.25	GT0.5	ON0.5	ON1.0
Protein (g/dL)	6.3	6.2	5.5	5.4	5.5	6.3
Albumin (g/dL)	2.3	2.3	2.1	2.0	2.0	2.3
BUN (mg/dL)	24	24	17	21	25	25
Creatinine (mg/dL)	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3
Uric acid (mg/dL)	6.8	4.2	4.2	5.4	3.8	6.0
Glucose (FBS, mg/dL)	132	15	106	199	194	148
AST (SGOT IU/L)	93	239	85	103	78	93
ALT (SGPT IU/L)	38	50	28	43	33	35
γ-GTP (IU/L)	ND[2)]	ND	ND	ND	ND	ND
ALP (IU/L)	578	589	495	491	504	442
CPK (IU/L)	191	4634	419	365	184	292
Cholestrol (mg/dL)	121	136	104	114	106	115
Triglyceride (mg/dL)	84	105	49	71	68	98
Calcium (mg/dL)	11.9	11.0	9.9	11.3	11.0	12.2
Phosphorus (mg/dL	28.5	31.9	23.2	22.3	18.9	23.9

[1)]BUN; blood urea nitrogen, AST; aspartate aminotransferase, ALT; alanine aminotransferase, ALP; alkaline phosphatase, CPK; Creatine phosphate kinase

[2)]ND : Not detected

나. 장기투여 독성실험 (아급성)

요약

○GT0.25-80EP, GT0.5-80EP, ON0.5-80EP, ON1.0-80EP 시료를 각각 0, 15, 30, 60 μl/30 g mouse body weight 경구투여시 아급성 독성을 보지지 않음

1) 사망 및 임상증상 관찰

시료를 농도별 (0, 15, 30, 60 μl/30 g mouse body weight)로 ICR 암수 각 5마리에 경구투여 하여 아급성 독성시험을 4주간 수행하면서 mouse 사망수를 조사하였고, 여러 가지 임상학적인 변화를 관찰하였다. 투여 당일부터 4주 동안 사망한 동물은 암수 모두에서 없었다. 임상증상 관찰에서는 시료 투여 직후 암수는 약간의 행동저하 증상을 보였으나, 곧 회복하여 행동이 정상적으로 회복되었다. 이 결과는 시료 GT-80EP 및 ON-80EP이 경구 아급성 독성시험에서 아무런 독성을 보이지 않았다는 것을 의미한다 (**Table 38, 39, 40, 41**).

Table 38. Mortality of mice treated orally with GT0.25-80EP and GT0.5-80EP for 4 weeks

Sex	Treatment (mg/30 g)		Week after treatment					Final mortality
			0	1	2	3	4	
Male	GT0.25 -80EP	0	0/5[1)]	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
		15	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
		30	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
		60	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
	GT0.5 -80EP	0	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
		15	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
		30	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
		60	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
Female	GT0.25 -80EP	0	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
		15	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
		30	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
		60	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
	GT0.5 -80EP	0	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
		15	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
		30	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
		60	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5

[1)]Values are expressed as animal numbers: (observed/treated)

Table 39. Mortality of mice treated orally with ON0.5-80EP and ON1.0-80EP for 4 weeks

Sex	Treatment (mg/30 g)		Week after treatment					Final mortality
			0	1	2	3	4	
Male	ON0.5-80EP	0	0/5[1)]	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
		15	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
		30	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
		60	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
	ON1.0-80EP	0	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
		15	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
		30	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
		60	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
Female	ON0.5-80EP	0	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
		15	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
		30	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
		60	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
	ON1.0-80EP	0	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
		15	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
		30	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
		60	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5

[1)]Values are expressed as animal numbers: (observed/treated)

Table 40. Clinical signs in mice treated, orally with GT0.25-80EP and GT0.5-80EP for 4 weeks

Sex	Treatment (㎎/30 g)		Clinical sign	Week after treatment				
				0	1	2	3	4
Male	GT0.25 -80EP	0	NAD[1)]	0/5[2)]	0/5	0/5	0/5	0/5
		15	NAD	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
		30	NAD	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
		60	NAD	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
	GT0.5 -80EP	0	NAD	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
		15	NAD	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
		30	NAD	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
		60	NAD	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
Female	GT0.25 -80EP	0	NAD	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
		15	NAD	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
		30	NAD	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
		60	NAD	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
	GT0.50 -80EP	0	NAD	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
		15	NAD	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
		30	NAD	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
		60	NAD	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5

[1)]NAD : not abnormalities detected.

[2)]Values are expressed as animal numbers treated.

Table 41. Clinical signs in mice treated, orally with ON0.5−80EP and ON1.0−80EP for 4 weeks

Sex	Treatment (㎎/30 g)		Clinical sign	Week after treatment				
				0	1	2	3	4
Male	ON0.5 −80EP	0	NAD[1)]	0/5[2)]	0/5	0/5	0/5	0/5
		15	NAD	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
		30	NAD	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
		60	NAD	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
	ON1.0 −80EP	0	NAD	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
		15	NAD	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
		30	NAD	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
		60	NAD	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
Female	ON0.5 −80EP	0	NAD	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
		15	NAD	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
		30	NAD	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
		60	NAD	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
	ON1.0 −80EP	0	NAD	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
		15	NAD	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
		30	NAD	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
		60	NAD	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5

[1)]NAD : not abnormalities detected.

[2)]Values are expressed as animal numbers treated.

2) 체중측정, 사료 섭취량 및 물 섭취량

시료를 농도별 (0, 15, 30, 60 μl/30 g mouse body weight)로 ICR 암수 각 5마리에 경구투여 하여 아급성 독성시험을 4주간 수행하면서 몸무게의 변화를 측정하였다 (Table). 4주가 경과과하면서 수컷 마우스들의 평균 몸무게는 5.0～8.7 까지 증가하였다. 대조군과 처리군의 평균 몸무게 변화는 없었다. 사료의 섭취량 대조군의 27.40 g과 유사하게 섭취하였다. 물의 섭취는 대조군의 48.89 g보다는 약간 적게 섭취하는 경향을 나타내었지만 생리작용에 이상을 가져올 정도는 아니었다 (**Table 42**).

암컷 마우스들은 4주가 경과과하면서 수컷 마우스들의 평균 몸무게는 2.1～3.2 까지 증가하였다. 대조군과 처리군의 평균 몸무게 변화는 없었다. 사료의 섭취량 대조군의 23.96 g과 유사하게 섭취하였다. 물의 섭취는 대조군의 35.56 g과 비슷하게 섭취하였다 (**Table 43**).

Table 42. Body weight, food consumption and water consumption of male mice treated orally with GT-80EP and ON-80EP for 4 weeks

Treatment	Doses (μl/g)	Body weight (g)	Food intake	Water intake
Control		37.73 ± 1.10	27.40 ± 9.40	48.89 ± 15.23
GT0.25-80EP	15	37.99 ± 1.41	27.03 ± 10.26	38.33 ± 10.70
	30	36.94 ± 0.77	25.90 ± 9.00	35.56 ± 7.97
	60	36.43 ± 0.77	25.01 ± 8.49	33.33 ± 11.43
GT0.5-80EP	15	36.42 ± 1.07	27.31 ± 9.77	38.33 ± 8.93
	30	35.57 ± 0.84	27.03 ± 9.37	36.67 ± 9.23
	60	38.73 ± 0.96	26.67 ± 9.46	37.22 ± 5.41
ON0.5-80EP	15	37.63 ± 1.06	24.28 ± 8.10	35.56 ± 9.84
	30	35.88 ± 0.94	25.94 ± 9.80	38.33 ± 12.47
	60	37.03 ± 0.82	26.82 ± 10.20	33.33 ± 11.67
ON1.0-80EP	15	36.08 ± 0.99	26.55 ± 8.61	37.22 ± 10.96
	30	36.88 ± 1.04	26.88 ± 8.41	37.22 ± 9.78
	60	38.31 ± 1.00	27.53 ± 10.08	40.56 ± 5.58

[1)]Mean ± S.D of 5 mice.

Table 43. Body weight, food consumption and water consumption of female mice treated orally with GT-80EP and ON-80EP for 4 weeks

Treatment	Doses (μl/g)	Body weight (g)	Food intake	Water intake
Control		28.15 ± 0.69	23.96 ± 6.32	35.56 ± 11.41
GT0.25-80EP	15	28.40 ± 0.71	21.88 ± 8.53	33.33 ± 12.24
	30	27.48 ± 0.77	23.06 ± 7.47	33.89 ± 12.08
	60	28.19 ± 0.93	23.46 ± 8.39	36.67 ± 11.30
GT0.5-80EP	15	27.84 ± 0.71	22.84 ± 9.03	33.89 ± 11.24
	30	27.87 ± 0.82	22.74 ± 7.45	32.78 ± 11.65
	60	26.59 ± 0.79	22.06 ± 7.66	32.22 ± 13.35
ON0.5-80EP	15	28.21 ± 1.01	21.52 ± 8.68	33.33 ± 12.41
	30	28.26 ± 0.70	21.88 ± 7.41	36.67 ± 11.68
	60	28.54 ± 0.89	22.97 ± 8.52	36.67 ± 11.30
ON1.0-80EP	15	28.91 ± 1.26	23.52 ± 7.28	37.78 ± 9.96
	30	27.03 ± 0.65	21.94 ± 7.31	35.00 ± 11.40
	60	29.29 ± 0.72	24.85 ± 8.42	41.67 ± 7.76

[1)]Mean ± S.D of 5 mice.

3) 육안적 해부소견

시료를 농도별 (0, 15, 30, 60 μl/30 g mouse body weight)로 ICR 암수 각 5마리에 경구투여 하여 아성독성시험을 4주간 수행하면서 장기 (간, 위, 지라, 콩팥, 허파)의 정상/이상 증상을 육안적으로 조사하였다 (**Table 44, 45**). 시료 투여 후 4주 후 장기를 적출하여 이상 유무를 조사한 결과 암수 모두에서 아무런 이상적인 증상은 관찰되지 않았다.

따라서 4주간의 아급성 독성시험에서 ICR mouse 장기의 육안적 소견에 아무런 영향을 미치지 않았다.

Table 44. Gross finding in mice treated orally with GT-80EP and ON-80EP for 4 weeks

Treatment[1)]	Doses (μl/g)	Liver (g)	Stomach	Spleen	Kindey	Lung
Control		5[2)] (100%)	5 (100%)	5 (100%)	5 (100%)	5 (100%)
GT0.25-80EP	15	5 (100%)	5 (100%)	5 (100%)	5 (100%)	5 (100%)
	30	5 (100%)	5 (100%)	5 (100%)	5 (100%)	5 (100%)
	60	5 (100%)	5 (100%)	5 (100%)	5 (100%)	5 (100%)
GT0.5-80EP	15	5 (100%)	5 (100%)	5 (100%)	5 (100%)	5 (100%)
	30	5 (100%)	5 (100%)	5 (100%)	5 (100%)	5 (100%)
	60	5 (100%)	5 (100%)	5 (100%)	5 (100%)	5 (100%)
ON0.5-80EP	15	5 (100%)	5 (100%)	5 (100%)	5 (100%)	5 (100%)
	30	5 (100%)	5 (100%)	5 (100%)	5 (100%)	5 (100%)
	60	5 (100%)	5 (100%)	5 (100%)	5 (100%)	5 (100%)
ON1.0-80EP	15	5 (100%)	5 (100%)	5 (100%)	5 (100%)	5 (100%)
	30	5 (100%)	5 (100%)	5 (100%)	5 (100%)	5 (100%)
	60	5 (100%)	5 (100%)	5 (100%)	5 (100%)	5 (100%)

[1)]Values are expressed as animal numbers. ( ): % of finding.

Table 45. Gross finding in femice treated orally with GT-80EP and ON-80EP for 4 weeks

Treatment[1)]	Doses (μl/g)	Liver (g)	Stomach	Spleen	Kindey	Lung
Control		5[1)] (100%)	5 (100%)	5 (100%)	5 (100%)	5 (100%)
GT0.25-80EP	15	5 (100%)	5 (100%)	5 (100%)	5 (100%)	5 (100%)
	30	5 (100%)	5 (100%)	5 (100%)	5 (100%)	5 (100%)
	60	5 (100%)	5 (100%)	5 (100%)	5 (100%)	5 (100%)
GT0.5-80EP	15	5 (100%)	5 (100%)	5 (100%)	5 (100%)	5 (100%)
	30	5 (100%)	5 (100%)	5 (100%)	5 (100%)	5 (100%)
	60	5 (100%)	5 (100%)	5 (100%)	5 (100%)	5 (100%)
ON0.5-80EP	15	5 (100%)	5 (100%)	5 (100%)	5 (100%)	5 (100%)
	30	5 (100%)	5 (100%)	5 (100%)	5 (100%)	5 (100%)
	60	5 (100%)	5 (100%)	5 (100%)	5 (100%)	5 (100%)
ON1.0-80EP	15	5 (100%)	5 (100%)	5 (100%)	5 (100%)	5 (100%)
	30	5 (100%)	5 (100%)	5 (100%)	5 (100%)	5 (100%)
	60	5 (100%)	5 (100%)	5 (100%)	5 (100%)	5 (100%)

[1)]Values are expressed as animal numbers. ( ): % of finding.

4) 장기중량측정

시료를 농도별 (0, 15, 30, 60 μl/30 g mouse body weight)로 ICR 암수 각 5마리에 경구투여 하여 아성독성시험을 4주간 수행하면서 장기 (간, 위, 지라, 콩팥, 허파)의 무게를 조사하였다. 시료 투여 후 4주 후 장기를 적출하여 무게를 측정한 결과 무게에는 아무런 영향을 미치치 않았다 (**Table 46, 47**).

Table 46. Organ weight in male mice treated orally with GT-80EP and ON-80EP for 4 weeks

Treatment[1)]	Doses (μl/g)	Liver (g)	Stomach	Spleen	Kindey		Lung
					R	L	
Control		1.96±0.22[1)]	0.29±0.11	0.13±0.01	0.35±0.05	0.34±0.05	0.22±0.03
GT0.25-80EP	15	2.10±0.17	0.26±0.06	0.12±0.02	0.35±0.06	0.35±0.04	0.21±0.02
	30	1.82±0.18	0.24±0.08	0.11±0.02	0.34±0.05	0.34±0.05	0.20±0.03
	60	1.79±0.22	0.23±0.10	0.10±0.04	0.33±0.04	0.32±0.03	0.22±0.04
GT0.5-80EP	15	1.92±0.23	0.26±0.11	0.13±0.04	0.35±0.07	0.36±0.04	0.24±0.03
	30	2.13±0.25	0.26±0.08	0.12±0.01	0.36±0.03	0.34±0.04	0.24±0.02
	60	2.29±0.22	0.28±0.07	0.16±0.02	0.38±0.04	0.36±0.02	0.21±0.02
ON0.5-80EP	15	1.93±0.19	0.26±0.06	0.12±0.03	0.30±0.05	0.32±0.01	0.21±0.01
	30	1.90±0.15	0.25±0.09	0.13±0.04	0.33±0.05	0.32±0.02	0.22±0.03
	60	2.01±0.15	0.28±0.07	0.12±0.02	0.38±0.04	0.35±0.04	0.24±0.02
ON1.0-80EP	15	2.03±0.13	0.24±0.05	0.14±0.02	0.31±0.04	0.30±0.03	0.22±0.02
	30	2.06±0.12	0.25±0.09	0.14±0.02	0.37±0.03	0.32±0.03	0.24±0.04
	60	2.03±0.11	0.27±0.08	0.12±0.03	0.38±0.02	0.36±0.02	0.23±0.02

[1)]Mean ±S.D. of 5 mice 4 weeks after treatment

Table 47. Organ weight in female mice treated orally with GT-80EP and ON-80EP for 4 weeks

Treatment[1)]	Doses (μl/g)	Liver (g)	Stomach	Spleen	Kindey		Lung
					R	L	
Control		1.47±0.12	0.35±0.05	0.12±0.02	0.16±0.03	0.18±0.03	0.20±0.04
GT0.25-80EP	15	1.34±0.17	0.51±0.06	0.11±0.03	0.20±0.02	0.21±0.02	0.18±0.02
	30	1.22±0.16	0.43±0.07	0.12±0.03	0.20±0.03	0.20±0.04	0.20±0.02
	60	1.23±0.12	0.40±0.06	0.13±0.02	0.20±0.02	0.21±0.03	0.20±0.04
GT0.5-80EP	15	1.42±0.18	0.56±0.06	0.13±0.04	0.20±0.03	0.21±0.02	0.18±0.03
	30	1.44±0.17	0.41±0.04	0.12±0.03	0.20±0.03	0.21±0.02	0.21±0.02
	60	1.32±0.12	0.39±0.08	0.14±0.03	0.20±0.02	0.20±0.03	0.21±0.03
ON0.5-80EP	15	1.26±0.11	0.60±0.04	0.13±0.03	0.20±0.01	0.20±0.02	0.18±0.03
	30	1.21±0.14	0.41±0.08	0.13±0.02	0.20±0.02	0.20±0.04	0.19±0.04
	60	1.30±0.12	0.44±0.04	0.13±0.02	0.21±0.01	0.21±0.02	0.18±0.02
ON1.0-80EP	15	1.46±0.12	0.45±0.03	0.14±0.03	0.21±0.01	0.21±0.03	0.21±0.03
	30	1.28±0.14	0.37±0.08	0.13±0.02	0.19±0.04	0.19±0.03	0.18±0.04
	60	1.45±0.12	0.42±0.03	0.13±0.03	0.22±0.04	0.23±0.03	0.20±0.02

[1)]Mean ±S.D. of 5 mice 4 weeks after treatment.

5) 혈액학적 및 혈액생화학적 검사 검사

시료를 농도별 (0, 15, 30, 60 ㎕/30 g mouse body weight)로 ICR 암수 각 5마리에 경구투여 하여 아성독성시험을 4주간 수행하면서 혈액중의 WBC, RBC, Hb, Hct, BLP, MCV, MCH, MCHC를 측정하였다 (**Table 48, 49, 50, 51, 52, 53**).

Table 48. Hematological findings in mice treated orally with GT0.25-80EP for 4 weeks[1)]

Item[2)]	Male				Female			
	0	15	30	60	0	15	30	60
WBC (Thous/㎕)	2.8	3.2	2.2	2.0	2.7	1.9	4.5	1.8
RBC (Mil/㎕)	7.6	8.2	8.7	7.1	8.41	8.3	7.3	7.7
Hb (g/dL)	12.2	12.2	12.5	11.5	13.1	12.6	11.4	11.9
Hct (%)	40.3	42.1	45.6	35.6	45.3	45.7	39.8	43.7
MCV (fL)	40.4	51.4	52.6	50.1	53.9	55.1	54.2	55.9
MCH (pg)	15.9	14.9	14.1	16.2	15.6	15.1	15.5	15.3
MCHC (g/dL)	29.4	29.0	27.4	32.3	28.9	27.6	28.7	27.6
Platelet (Thous/㎕)	597	559	716	557	591	455	308	447
Segment (%)	25.4	27.9	26.3	24.8	23.7	21.5	23.4	26.0
Lymphocyte (%)	60.4	59.4	56.2	66.6	66.2	69.9	65.7	66.7
Monocyte (%)	6.2	4.5	7.4	5.0	2.4	4.8	6.2	3.9
Eosinphill (%)	2.4	6.1	1.1	3.4	6.3	2.9	3.7	2.4
Basophil (%)	0.5	2.1	0.6	0.2	1.4	0.8	0.9	0.8

[1)]Measured in samples from 4 weeks after treatment.

[2)] WBC; white blood cell, RBC; red blood cell, Hb; hemoglobin, Hct; hematocrit, BLP; blood platelet, MCV; mean corpuscular volume, MCH; mean corpuscular hemoglobin, MCHC; mean corpuscular hemoglobin concentration.

Table 49. Hematological findings in mice treated orally with GT0.5-80EP for 4 weeks[1)]

Item[2)]	Male				Female			
	0	15	30	60	0	15	30	60
WBC (Thous/μl)	2.8	1.7	1.2	1.5	2.7	1.3	2.6	2.8
RBC (Mil/μl)	7.6	7.3	9.3	7.8	8.41	6.1	8.5	8.5
Hb (g/dL)	12.2	12.3	13.6	12.0	13.1	10.1	12.7	12.8
Hct (%)	40.3	38.9	46.7	41.8	45.3	32.4	46.6	44.0
MCV (fL)	40.4	53.2	50.0	53.4	53.9	53.0	54.8	51.7
MCH (pg)	15.9	16.8	14.6	15.3	15.6	16.7	15.0	15.1
MCHC (g/dL)	29.4	31.6	29.1	28.7	28.9	31.9	27.4	29.3
Platelet (Thous/μl)	597	762	801	488	591	235	506	408
Segment (%)	25.4	28.2	11.2	18.7	23.7	25.7	18.4	19.3
Lymphocyte (%)	60.4	68.7	83.6	70.2	66.2	67.1	70.3	74.1
Monocyte (%)	6.2	2.1	2.3	4.6	2.4	2.0	4.2	3.4
Eosinphill (%)	2.4	0.8	1.8	5.5	6.3	4.0	5.8	2.7
Basophil (%)	0.5	0.2	1.1	1.0	1.4	1.0	1.1	0.7

[1)]Measured in samples from 4 weeks after treatment.

[2)] WBC; white blood cell, RBC; red blood cell, Hb; hemoglobin, Hct; hematocrit, BLP; blood platelet, MCV; mean corpuscular volume, MCH; mean corpuscular hemoglobin, MCHC; mean corpuscular hemoglobin concentration.

Table 50. Hematological findings in mice treated orally with ON0.5-80EP for 4 weeks[1)]

Item[2)]	Male				Female			
	0	15	30	60	0	15	30	60
WBC (Thous/μl)	2.8	2.3	4.2	2.9	2.7	1.8	2.3	1.7
RBC (Mil/μl)	7.6	8.5	7.4	8.8	8.41	7.6	8.1	8.1
Hb (g/dL)	12.2	12.8	12.1	12.9	13.1	11.4	12.7	12.9
Hct (%)	40.3	46.6	42.9	42.4	45.3	39.0	42.6	42.1
MCV (fL)	40.4	55.0	57.7	48.4	53.9	50.9	52.5	51.5
MCH (pg)	15.9	15.1	16.3	14.7	15.6	14.8	15.7	15.7
MCHC (g/dL)	29.4	27.5	28.2	30.4	28.9	29.2	30.0	30.6
Platelet (Thous/μl)	597	720	875	451	591	512	509	437
Segment (%)	25.4	18.7	22.5	18.2	23.7	20.6	22.4	19.0
Lymphocyte (%)	60.4	73.1	57.5	76.7	66.2	73.2	72.6	71.0
Monocyte (%)	6.2	5.4	5.2	1.3	2.4	3.6	2.2	4.4
Eosinphill (%)	2.4	1.9	12.2	3.2	6.3	1.4	1.9	4.4
Basophil (%)	0.5	0.9	2.6	0.6	1.4	1.1	0.7	1.5

[1)]Measured in samples from 4 weeks after treatment.

[2)] WBC; white blood cell, RBC; red blood cell, Hb; hemoglobin, Hct; hematocrit, BLP; blood platelet, MCV; mean corpuscular volume, MCH; mean corpuscular hemoglobin, MCHC; mean corpuscular hemoglobin concentration.

Table 51. Hematological findings in mice treated orally with ON1.0-80EP for 4 weeks[1)]

Item[2)]	Male				Female			
	0	15	30	60	0	15	30	60
WBC (Thous/μl)	2.8	1.8	1.4	1.2	2.7	2.6	2.1	2.4
RBC (Mil/μl)	7.6	7.8	8.3	7.1	8.41	7.4	8.5	7.1
Hb (g/dL)	12.2	12.1	12.0	12.2	13.1	11.4	12.6	11.0
Hct (%)	40.3	44.5	43.8	35.2	45.3	38.6	45.1	39.5
MCV (fL)	40.4	54.7	52.7	49.5	53.9	52.0	52.8	55.3
MCH (pg)	15.9	15.6	14.4	17.2	15.6	15.4	14.8	15.5
MCHC (g/dL)	29.4	27.2	27.4	34.7	28.9	29.6	28.1	27.9
Platelet (Thous/μl)	597	530	496	252	591	326	317	195
Segment (%)	25.4	13.2	25.1	15.4	23.7	21.3	15.6	19.1
Lymphocyte (%)	60.4	80.7	70.9	82.0	66.2	71.8	78.0	72.6
Monocyte (%)	6.2	4.3	2.1	2.2	2.4	2.4	3.8	3.7
Eosinphill (%)	2.4	1.7	1.9	0.4	6.3	3.3	2.1	3.2
Basophil (%)	0.5	0.1	0	0	1.4	1.1	0.4	1.2

[1)]Measured in samples from 4 weeks after treatment.

[2)] WBC; white blood cell, RBC; red blood cell, Hb; hemoglobin, Hct; hematocrit, BLP; blood platelet, MCV; mean corpuscular volume, MCH; mean corpuscular hemoglobin, MCHC; mean corpuscular hemoglobin concentration.

Table 52. Biochemical findings in male mice treated orally with GT-80EP and ON-80EP for 4 weeks

Item[1)]	Treatment				
	Control	GT0.25	GT0.5	ON0.5	ON1.0
Protein (g/dL)	5.7	4.8	5.0	4.5	5.9
Albumin (g/dL)	2.1	1.8	1.8	1.7	2.1
BUN (mg/dL)	32	31	34	28	26
Creatinine (mg/dL)	0.4	0.4	0.6	0.5	0.5
Uric acid (mg/dL)	4.7	4.9	4.7	5.0	4.8
Glucose (FBS, mg/dL)	273	284	277	265	247
AST (SGOT IU/L)	193	227	147	166	221
ALT (SGPT IU/L)	47	52	47	37	31
γ-GTP (IU/L)	ND[2)]	ND	ND	ND	ND
ALP (IU/L)	354	432	455	421	385
CPK (IU/L)	185	184	149	134	155
Alk. Phosphatase (IU/L)	402	207	288	275	371
Cholestrol (mg/dL)	160	165	129	151	155
Triglyceride (mg/dL)	78	83	92	87	83
C3 (mg/dL)	22	18	21	26	23

[1)]BUN; blood urea nitrogen, AST; aspartate aminotransferase, ALT; alanine aminotransferase, ALP; alkaline phosphatase, CPK; Creatine phosphate kinase

[2)]ND : Not detected

Table 53. Biochemical findings in female mice treated orally with GT-80EP and ON-80EP for 4 weeks

Item[1)]	Treatment				
	Control	GT0.25	GT0.5	ON0.5	ON1.0
Protein (g/dL)	5.5	6.3	5.5	5.7	5.5
Albumin (g/dL)	1.9	2.3	2.0	2.0	2.0
BUN (mg/dL)	25	23	24	24	21
Creatinine (mg/dL)	0.5	0.6	0.6	0.5	0.5
Uric acid (mg/dL)	5.3	4.7	4.2	5.1	4.8
Glucose (FBS, mg/dL)	148	149	160	123	142
AST (SGOT IU/L)	83	146	89	101	85
ALT (SGPT IU/L)	32	34	22	24	27
γ-GTP (IU/L)	ND[2)]	ND	ND	ND	ND
ALP (IU/L)	492	503	571	482	537
CPK (IU/L)	282	385	287	294	322
Alk. Phosphatase (IU/L)	348	305	269	280	328
Cholestrol (mg/dL)	144	106	151	136	117
Triglyceride (mg/dL)	13.8	11.0	9.8	11.2	12.6
C3 (mg/dL)	22	28	20	18	20

[1)]BUN; blood urea nitrogen, AST; aspartate aminotransferase, ALT; alanine aminotransferase, ALP; alkaline phosphatase, CPK; Creatine phosphate kinase

[2)]ND : Not detected

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

제 1 절 목표달성도

1. 1차년도

(점선: 계획, 실선: 달성도)

연 구 내 용	추 진 일 정												결과
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
○ 양파와 녹차를 첨가한 배지 제조													100
○ Petridish와 삼각플라스크 배양													100
−선발기준: 균사체밀도육안조사, viscosity 측정에 의한 다당체생성조사													
○ 선발된 버섯균주를 이용한 배양													100
− 최적 배양조건 구명													
·배지조성													
·통기량 및 진탕 조건													
·배양온도 및 기간													
○ 버섯균사체배양을 이용한 양파와 녹차의 효소반응: 플라보노이드의 aglycon생성 및 β−glucan배당체 생산													100
− 반응조건구명													
− Aglycon과 배당체의 생성확인													
○ 액상배양물의 추출													100
−균사체분리													
○ 농축 및 정제													100
−한외여과 및 동결건조													
○ 녹차/양파와 균사체배양액의 반응물조제													100
													100
○ 항산화성													100
○ 항암성													100
○ 면역력증진효과													100
○ 관절염억제효과													100
○ 관능평가: 훈련된 10명의 panelists에 의한 향미 판정과 결과의 통계처리													100
○ 성분분석: 휘발성향기성분 (풋취−henanol등, 황취성분−황화합물)													
사 업 진 도(%)													
연 구 비(천원)													

2. 2차년도

세부연구분야	추 진 일 정												결과
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
○대량생산 (5KL) 방법 확립 −배지조성 −배양조건 확립 (삼각플라스크, 5L, 50L, 500L, 5KL)													100
○추출방법 −열수추출법,냉수추출법, 알카리추출법													100
○분리 및 확인 −DEAE column chromatography −NMR, GC−MS/MS, IR													100
○액상배양물의 추출 −균사체분리													100
○농축 및 정제 −한외여과 및 동결건조													100
○녹차/양파와 균사체배양액의 반응물조제													100
○항산화성													100
○항암성													100
○면역력증진효과													100
○관절염억제효과													100
○관능평가: 훈련된 10명의 panelists에 의한 향미 판정과 결과의 통계처리													100
○성분분석: 휘발성향기성분 (풋취−henanol등, 황취성분−황화합물)													100

3. 3차년도

세부연구분야	월 단위 추진계획												결과
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
○ 대량생산 (5KL 배양)													100
○ 형태결정: 액상, 분말, 과립,정제													100
○ 규격결정: 균사체함량, 녹차함량, 양파함량													100
○ 시장적용성조사: 소비자 의견수렴													100
○ 완제품의 기능성: 면역력증진, 항암성, 항산화성, 관절염억제효과													100
○ 유효성분함량조사													100
○ 관능평가: 훈련된 10명의 panelists에 의한 향미 판정과 결과의 통계처리													100
○ 성분분석:휘발성향기성분 (풋취-henanol등,황취성분-황화합물)													100
○ 안전성;급성/아급성 독성시험													100

제2절 관련분야 기여도

1. 기술적 측면

가. 녹차나 양파분말을 배지에 직접 첨가하여 버섯균사체를 배양하여 녹차 유래의 catechin이나 양파유래의 quercetin을 버섯균사체가 이용하여 β-glucan catechin, β-glucan quercetin 배당체를 생산하였다.

나. 버섯균사체가 분비하는 효소를 이용하여 버섯균사체와 녹차와 양파분말을 반응시켜 향미 및 기능성이 증가된 분말차를 생산하였다.

다. 버섯균사체와 녹차와 양파를 배양하여 생산한 제품은 버섯의 기능성을 증가시키는 시너지 효과를 나타내었다.

라. 버섯균사체 배양에 의해 생성되는 β-glucan과 버섯균사체가 분비하는 효소에 의해 양파의 냄새를 줄이고, 녹차의 덟은 맛과 풋내를 경감시켰다.

마. 버섯균사체가 녹차 및 양파분말을 배지성분으로 그대로 이용하여 영양성분으로 이용하여 분해함으로 녹차와 양파를 모두 사용가능하다. 그리고 엑기스 제품을 생산하고 남은 균사체를 동결건조하여 분말로 그대로 이용가능하다.

2. 경제·산업·문화적인 측면

가. 폐기물로 처리되는 저급 녹차와 양파를 배양배지로 이용하여 버섯균사체 배양이 가능하기 때문에 저렴한 가격에 고가의 제품을 생산할 수 잇는 고부가가지 창출을 할 수 있다.

나. 비싸게 시판되고 있는 항암보조제, 면역증진제등은 지속적으로 복용해야하면 가격이 비싸다. 우리나라에서 생산되는 녹차나 양파를 이용하여 생산하는 제품으로 소재 가격을 저렴하게 낮출 수 있다.

다. 우리나라의 녹차 생산량이 늘어나고 재배 농가가 늘어가고 있으나 가내수공업 수준의 생산에 머무른다. 하지만 버섯균사체를 이용하여 버섯균사체가 분비하는 효소를 이용하여 고부가가지를 가지며 고기능성을 가지는 제품과 다양한 제품생산을 할 수 있다.

라. 녹차나 양파의 기능에 추가적으로 버섯균사체의 β-glucan을 이용한 신제품개발로

이용함으로 국내 시장 및 수출시장을 확대하여 소득증대를 할 수 있다.

마. 국내 건강보조식품들의 대부분은 외국 수입품이 대부분이다. 본 기술로 개발된 제품은 (주)HK바이오텍의 know-how로 대량배양이 가능하며 기능성의 증대로 인해 외국 경쟁제품보다 우위에 설 수 있다.

바. 고 기능성과 영양성을 갖는 버섯균사체를 이용하여 고기능성 녹차, 양파 제품의 개발은 질병 치료와 예방에 활용될 것이다.

제 5 장 연구개발결과의 활용계획

1. 활용방안

가. 국내외 특허출원을 할 것이다.

1) 특허명: 1. 버섯균사체액체배양기법을 이용한 버섯녹차제조방법과 기능성
2. 버섯균사체액체배양기법을 이용한 버섯양파제품의 제조방법과 기능

나. 현장지도 및 교육자료로 이용할 것이다.

1) 녹차를 재배하여 직접제다를 하는 소규모 농가에 기술교육과 현장지도를 할 것이다. 전남의 광양, 구례와 경남 하동등 늘어가는 녹차 농가에 버섯균사체를 이용한 기능서과 기호성을 증가시는 방법을 현장지도할 것이다.
2) 녹차를 2차가공하는 기업체에 기술이전 할 것이다. 버섯균사체를 이용하여 녹차와 접목하면 본기술에서 개발된 일부 내용을 적용하더라도 다양한 녹차 제품을 생산할 수 있다. 이러한 제품개발을 시도하는 업체에 기술을 이전할 것이다.
3) 양파시험장과 영계하여 양파가공업체에 기술지도 할 것이다. 양파가격의 하락과 보관비용의 절감을 위하여 양파가공업체에 본 기술을 이전 또는 지도하여 다향한 버섯균사체 양파 제품을 생산할 것이다.

2. 상품화 및 판매 전략

가. 상품화 전략

1) 면역증강용, 항산화성, 항암성, 관절염억제 기능성식품과 원료
2) 완제품 type 1
   가) 버섯균사체녹차제품: 버섯제품 또는 녹차추출물제품으로 기능성식품제조
   나) 버섯균사체양파제품: 버섯제품으로 기능성식품제조
   다) 상품형태: 정제, 액상
3) 완제품 type 2:
   가) 버섯균사체녹차제품: 다류

나) 버섯균사체양파제품: 조미식품용

다) 상품형태: 분말 또는 과립

4) 원료:

가) 버섯균사체녹차분말 또는 엑기스: 식품소재

나) 버섯균사체양파분말 또는 엑기스: 식품소재

다) 상품형태: 분말, 과립, 또는 엑기스

나. 홍보전략

1) 국내·외 학회에 연구 결과 발표

2) 국내·외 관련 전시회 참여 (한국, 일본, 중국, 미국, 유럽)

3) 당사 영업부가 찻집, 슈퍼, 기능성식품판매처 및 소비자를 직접방문하여 홍보

4) TV, 라디오, 신문홍보

다. **기존시장 진입 및 판매전략**

1) 기능성식품전문판매처(파머시오케이등), 다류전문판매유통망을 통한 판매

2) 당사에서 버섯녹차와 버섯양파 기능성원료 생산후 타사에 원료공급

3) 당사 영업망을 통한 완제품 판매

4) 기능식품회사와 제약회사 식품사업부에 원료공급

라. **수출계획**

1) 일본: 현재 자사의 버섯균사체제품을 수입하여 판매하고있는 ㈜Air-rising을 통해 판매

2) 미국: 동부거점 (뉴욕), 서부거점 (씨에틀), 남부거점 (텍사스) 대형 건강식품 유통망 (GNC 등) 및 제약회사와의 접촉, 계획

3) 중국: 항주의 암환자 협회 (회원수 약 8,000명)에 보급 후, 각 성으로진출1차 항주의 암환자 협회를 통한 판매가 활발해지면, 다른 성에도 공략

4) 동남아: 인도, 말레이시아, 필리핀 등의 국제 박람회 참가를 통한 시장조사 및 홍보를 통한 관련회사 발굴 및 접촉

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

1. 녹차제품의 개발현황

가. 녹차생산량의 증가

녹차중의 catechin과 같은 효능성분이 밝혀지고, 항산화성과 같은 효능이 식품의약품안전청으로부터 인정되면서, 해마다 20-30%씩 소비가 증가되고 전남의 광양, 구례와 경남의 하동에서 재배 농가가 늘어나고, 우리나라최고의 전통 다류로 자리메김하고 있으며 년간 약 천톤의 녹차가 생산되고 있다.

나. 일반적으로 제품개발은 가내공업 수준

제조기법이 재래식 가공기법에 의존하고 있고, 가내공업수준에 머무르고 있다.

다. 고급발효차의 수입 증가

제조기법에 따라 녹차에 함유되어있는 여러 가지 성분을 수용성성분으로 만들거나, 발효에 의해 보다 효능이 증진된 제품이 중국으로부터 수입되어 확산되고 있어 저급 국산차를 고급화할 수 있는 가공기법의 개발과 이를 기능성식품소재로 활용함으로써 고부가가치를 창출할 수 있다. 따라서, 녹차의 기능성을 살린 다양한 제품이 개발되고 이를 소재로 한 기능성 소재의 개발이 필요하다.

라. 다양한 녹차 첨가 제품 출시

녹차를 소재로하는 제품은 다른 식품에 단순히 첨가하여 혼합하는 정도로써 한미전두유(주) 에서 개발된 “콩두”, 쌀의 표면에 녹차농축액을 코팅하여 제조된 “녹차쌀” (전남농업기술원), 세안용화장품 “녹차팩”(한국콜마), 해태제과의 “녹차아이스크림 ”산녹차“, ”내안에 녹아든 차“, 빙그레의 요만때, ”녹차가다가올수록“, 롯데제과의 ”나뚜르“ 베스킨라빈스31의 ”녹차 아이스크림 케이크“ 등은 녹차의 기능성을 강조하는 고가 웰빙제품으로 판매 1위를 자랑하고 있다.

마. 녹차 가공품

녹차는 잎차, 티백형태의 다류제품, 그리고 음료 (캔)이 가장 많이 소비되고 있다.

2. 양파제품의 개발현황

양파는 수요와 공급의 불균형에 의해 농가수익을 예측할 수 있는 작목중의 하나이다. 양파가격의 폭락과 급등을 반복하는 상황속에서도 이를 극복하기위한 농가, 산업체, 연구소 (창녕양파시험장)의 노력은 계속되고 있다. 이러한 노력에 의해 창녕양파고추장, 양파음료, 양파농축액, 양파건면 등이 상품화되어있다.

3. 버섯균사체를 이용한 가공제품과 기능성식품의 개발현황

가. 버섯균사체를이용한 제품은 면역증진용, 혈행개선에 도움을 주는 기능성식품으로 인정되고있다. β-Glucan을 주요성분으로하는 것으로써 일본과 미국으로부터 고가의 제품이 수입되었으며, 국내에서는 한국신약의 상황버섯유래 다당체 메시마를 비롯하여, 2-3개의 소규모 제조업에서 생산되고있다. 그러나, 2000년부터 (주)HK바이오텍에서는 버섯균사체의 대량배양 시설을 갖추고 아가리쿠스, 상황, 표고, 느타리버섯균사체를 비롯한 수종의 버섯균사체를 배양하고 그로부터 유래되는 기능성물질을 추출, 정제하는등 각각 다른 기능성을 가진 다양한 제품을 개발하여 국내시판 뿐만아니라, 일본수출로 버섯균사체제품의 종주국이라할 수 있는 일본시장에 도전하고있다.

나. 일본에서는 표고, 잎새 등 몇 가지 버섯균사체 배양물로부터 올리고당인 AHCC와 arabinoxylane을 생산하여 항암성 외에도 면역증강, 혈당저하기능 등을 갖는 기능성식품으로 생산 (아미노업사, 주 기린)하고있으며, 아가리쿠스버섯균사체를 이용한 기능식품이 과립, 정제, 액상형태의 고가 상품으로 국내에 수입되어 판매되고 있다.

다. 국내에서는 한국신약이 상황버섯균사체 배양물로부터 항암성 올리고당을 추출하여 “메시마”로 상품화하였다.

라 이들 버섯균사체 올리고당은 항암성이 인정되었고, 이들의 항암 기전은 면역기능강화와 NK세포의 활성화로 암세포를 선택적으로 공격하여 사멸시키는 것으로 알려져 있다.

4. 시장현황

가. 양파시장현황

2001년도 양파과잉생산으로인한 파동시에 총생산량은 생산량은 1056천톤으로 약 2,000억으로 보고되었다. 생산과잉 물량의 50%인 13천톤의 산지폐기와 수확 작업비 지원 (kg당 45원)에 정부가 양파가격 안정을 위한 지원금을 포함하면 약 32억원의 예산이 배정되었다 (폐기지원 9억원, 수매23억원). 이러한 양파의 과잉생산과 파동이 거듭되고있지만, 총소비량은 1인당 소비량과 소비인구증가로 인해 늘고 이에따른 생산량도 증가하고있다.

나. 녹차

년간 생산량은 약 6,000톤이며 생산액은 약 600억원으로 보고되었다 (식품의약품안잔청, 식품 및 식품첨가물생산실적, 1999). 녹차류인 우롱차와 홍차를 합치면 약 30,000톤으로 다류생산량의 으뜸을 차지하고있다. 녹차를 재배하는 농가수는 1990년 이후 976%의 증가를 나타내어 다업경영이 농가에 급속도로 확산되고있으며, 이는 정부의 농특사업과 대기업의 녹차홍보의 효과가 크게 뒷받침하고있다. 수확시기에따라 생엽의 가격은 크게 차이가 나는데 곡우나 세작의 1번차는 kg당 만원인데비해 엽차의 경우는 1,000원에 불과하다 (전남 보성의 다업시험장, 2000년). 전국의 다류 생산업소는 1990년에 142개업소, 1999년 12월 기준으로 625개의 생산업체가 있다. 그중 농가에서 직접 녹차와 홍차를 제조하녀 직판하는 영세농가가 있지만, 태평양화학과 동서식품처럼 1차가공품을 납품받아 2차가공하여 판매하는 기업체도있다.

제 7 장　참고문헌

1. Hara, Y., Matsuzaki, T. and Suzuki, T. 1987. Angiotensin Iconverting enzyme inhibiting activity of tea components. *Nippon Nogeikagaku kaishi* 61, 803-11.
2. Xu, Y., Ho, C. T., Amin, S.G., Han, C. and Chung, F.L. 1992. Inhibition of tobacco-specific nitrosamine-induced lung tumorigenisis in A/J mice by green tea and its major polyphenol as antioxidants. *Cancer Res.* 52, 3875-9.
3. Hayatsu, H., Inada, N., Katutani, T., Arimoto, S., Negishi, T., Mori, K., Okuta, T. and Sakata, I. 1992. Suppression of genotoxicity of carcinogens by (-)-epigallocatechins gallate., *Prev. Med.* 21, 370-6.
4. Sakagami, H., Asano, K., Hara, Y. and Shimamura, T. 1992. Stimulation of human monocyte and polymorphonuclear cell iodination and interleukin-1 production by epigallocatechin gallate. *J. Leukoc. Biol.* 51, 478-83.
5. Huang, M.T., Ho, C.T., Wang, G.Y., Ferraro, T., Finnegen Olive, T., Lou, Y. R., Mitchell, J. M., Laskin, J. D., Newmark, H. and Yang, C.S. 1992. Inhibitory effect of topical application of a green tea polyphenol fraction on tumor initiation and promotion in mouse skin. *Carcinogenesis* 13, 947-54.
6. Austin, C.A., Patel, S., Ono, K., Nakane, H. and Fisher, L.M. 1992. Site-specific DNA cleavage by mammalian DNA topoisomerase Ⅱ induced by novel flavone and catechin derivatives. *Biochem. J.* 282, 883-9.
7. Agarwal, R., Katiyar, S.K., Zaidi, S.I.A. and Mukhtar, H. 1992, Inhibition of skin tumor promoter-caused induction of epidermal ornithine decarboxylase in SENCAR mice by polyphenolic fraction isoated from green tea and its individualepicatechin derivatives. *Cancer Res.* 52, 3582-8.
8. Conney, A.H., Wang, Z.Y., Huang, M.T., Ho, C.T. and Yang , C.S. 1992, Inhibitory effect of green tea on tumorigenesis by chemicals and ultraviolet light. *Prev. Med.* 21, 361-9.
9. Jung, S.T. and Hong, J.S. 1991. Volatile components of mushroom (Pleurotus sp.) cultivated in korea. *Kor. J. Mycol.* 19 : 299-305

10. Lee, J.W. and Bang, K.W. 2001. Biological activity of *Phellinus sp*. ***Food Industry and Nutr***. 6(1): 25-33.
11. Jung, I.C., Park, K.S. and Ha, C.H. 1996. Antioxidative effect of fruit body and mycelia extracts of *Pleurotus ostreatus*. ***Kor. J. Food Sci. Tech***. 28: 646-649.
12. Kim, B.K., Shin, G.G., Jeon, B.S. and Cha, J.Y. 2001. Cholesterol-lowering Effect of Mushroom Powder in Hyperlipidemic Rars. ***J. Kor. Soc. Food Nutr***. 39(3): 510-515.
13. Lee, B.W. and Park, M.H. 1998. Anti-tumor activiy of protein-bound polysaccharides extracted from mycelia of *Lentinus edode*s. ***Kor. J. Food Sci. Tech***. 30(3): 665-671.
14. Park, M.H., Oh, K.Y. and Lee, B.W. 1998. Anti-cancer activity of *Lentinus edodes* and *Pleurotus ostreatus*. Kor. J. ***Food Sci. Tech***. 30(3): 702-708.
15. Park, M.H. and Lee, B.W, 1988. Extraction and purification of antitumor protein-bound polysaccharides from mycelia of *Lentinus edodes*. ***Kor. J. Food Sci. Tech***. 30(5): 1236-1242.
16. Kim, S.J., Kim, J.O., Park, C.W., Kim, J.M. and Ha, Y.L. 1999. Reduction of mouse bodyfats by water extract of *Pleurotus ostreatus*. ***Kor. J. Food Sci. Tech***. 31(2): 130-133.
17. Lee, G.D., Chang, H.K. and Kim, H.K. 1997. Antioxidative and nitrite-scavenging activities of edible mushrooms. Kor. ***J. Food. Sci. Technol.*** 29: 432-436.
18. Sugiura, M. and Ito, H. 1977. Toxicological studies if Gandermalucidum Karst. ***Tokyo Yakakyu Daigaku Daigaku Kenkyu Nempo***. 27: 722-725.
19. Lee, M.H., Kim, H.W., Shim, M.J. and Toh, S.H. 1986. Studies on constituents of higher fungi of Korea(LVI). ***Kor. J. Mycol***. 14(2): 149-163.
20. Kim, H.M., Han, S.B., Oh, G.T., Kim, Y.H., Hong, D.H. and Yoo. L.D. 1996. Stimulation of humoral and cell mediated immunity by polysaccharide from mushroom *Phellinus lintens*. ***Int. J. Immunopharmacol*** 18: 295-303.
21. Han, S.B., Lee, C.W., Jeon, Y.J., Hong, N.D. Yoo, L.D., Yang, K.H. and Kim, H.M. 1999. The inhibitary effect of polysaccharides isolated from *Phellinus lintens* on tumor growth and metastasis. ***Immunopharmacol*** 41: 157-164.

22. Kim, D.H., Choi, H.J., Bae, E.A., Han, M.J. and Park, S.Y. 1998. Effect of artificially culture *Phellinus lintens* on harmful intestinal bacteria enzymes and at intestinal β-glucosidases. ***J.Food Hygi Safe.*** 13: 20-23.
23. Chihara, G., Hamuro, J., Maeda, Y.Y., Arai, Y. and Fukuoka, F. 1976. Fractionation and purification of the polysaccharide with marked antitumor activity especially Letinan from Lentinus edodes(Berk) Sing. (an edible mushroom). ***Cancer Res.*** 30(11): 2776.
24. Suzuki, I., Hashimoto, K., Oikawa, S. and Sato, K. 1980. Antitumor and immunomodulating activities of a β-glucan obtained from liquid-cultured *Grifora frondosa*. ***Chem. Pham. Bull.*** 37: 410.
25. Kim, H.J., Lee, B.H., Kim, O.M., Bae, J.T., Park, S.H., Park, D.C. and Lee, K.R. 1999. Antimutagenic Effect of the Fruiting Body and the Mycelia Extracts of Coprinus comatus. ***J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.*** 28(2): 452-457.
26. Osaki, Y., Kato, T., Yamamoto, K., Okubo, J. and Miyzaki, T. 1994. Antimutagenic and bactericidal substances in the fruit body of a basidimycetes *Agaricus blazei*. Jun-17. ***YAKUGAKUZASSHI*** 114: 342-350.
27. Ji, J.H., Kim, M.N., Chung, C.K. and Ham, S.S. 2000. Antimutagenic and cytotoxicity effects of *Phellinus linteus* extracts. 2000. ***J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.*** 29: 322-328.
28. Kawagish, H., Kasumi, R., Sazawa, T., Mizuno, T., Hagiwara, T and Nakamura, T. 1988. Cytotoxic steroids from the mushroom *Agaricus blazei*. ***Phytchem.*** 27: 2777-2779.
29. Takaku, T., Kimuar, Y. and Okuda, J. 2001. Isolation of an antitumor compound from *Agaricus blazei* Muril and its mechanism of action. ***J. Nutr.*** 131: 1409-1413.
30. Chang, H.L., Chao, G.R., Chen. C.C. and Mau, J.L. 2001. Non -volatile taste components of Agaricus blazei, Antrodia camphorata and Cordyceps militaris mycelia. ***Food Chem.*** 74: 203-207.
31. Dong, Q., Yao, J., Yang, X.T. and Fang, J.N. 2002. Structural cha- racterization of the water-soluble β-D-glucan from fruiting bodies of *Agaricus blazei* Murr. ***Carbohydrate Res.*** 337: 1417-1421.

32. Kawagish, H., Inagaki, R. and Kanao, T. 1989. Fraction and anti-tumor activity of the water-insoluble residue of *Agaricus blazei* fruiting bodies. ***Carbohydrate Res***. 186: 267-273.
33. Mizuno, T., Hagiwara, Y. and Sumiya, T. 1990. Antitumor activity and some properties of water soluble polysaccharides from the fruiting body of *Agaricus blazei* Muril. ***Agric. Biol. Chem***. 54: 2889-2896.
34. Mizuno, T., Inagaki, R., Kanao, T. and Hagiwara, T. 1990. Antitumor activity and some properties of water-insoluble hetero-glucans from "Himematsutake" the fruiting body of *Agaricus blazei* Muril. ***Agric. Biol. Chem***. 54: 2897-2905.
35. Nathan, C. and Xie, Q. W. 1994. Nitric oxide synthases: role, tolls, and control. ***Cell*** 78:915-918.
36. Nathan, C. and Xie, Q. W. 1994. Regulation of biosynthesis of nitric oxide. ***J. Biol. Chem.*** 269:13725-13728.
37. Witthoht, T., Eckmann, L., Kim, J. M. and Kagnoff, M. F. 1998. Enteroinvasive bacteria directly activate expression of iNOS and NO production in human colon epithelial cell. ***Am. J. Physiol.*** 275:G564-G571.
38. Kolios, G., Brown, Z. and Westwick, J. 1995. Inducible nitric oxide synthase activity and expression in a human colonic epithelial cell line, HT-29. ***Br. J. Pharmacol.*** 116:2866-2872.
39. Kendall, H. K., Marshall, R. I. and Bartold, P. M. 2001. Nitic oxide and tissue destruction. ***Oral. Diseases.*** 7:2-10.
40. Moncada, S., Palmer, R. M. and Higgs, E. 1991. Nitric oxide: physiology, pathopgysiology and pharmacology. ***pharmacol. Rev.*** 43:109-142.
41. Moilanen, E. and Vapatalo, H. 1995. Nitric oxide in inflammation and immune reponse. ***Am Med.*** 27:359-367.
42. Gettigan, M. C., Adolph, V. R. and Ginsberg, H. G. 1998. New ways to ventilate newborns in acute respiratory failre. ***Pediatr. Clin. North. Am.*** 45: 475-509.
43. Husson, F., Bompas, D., Kermasha S., Belin, J.M. 2001. Biogeneration of 1-octen-3-ol by lipoxygenase and hydroperoxide lyase activities of *Agaricus bisporus.* ***Process Biochemistry*** 37: 177-182.

44. Shashirekha, M.N. Rajarathnam, S. Bano, Zakia. 2002. Enhancement of bioconversion efficiency and chemistry of the mushroom, Pleurotus sajor-caju (Berk and Br.) Sacc. produced on spent rice straw substrate, supplemented with oil seed cakes. *Food Chemistry* 76: 27-31.
45. Wua, J.Z., Cheung, C.K., Wonga, K.H., Huang, N.L. 2003Studies on submerged fermentation of Pleurotus tuber-regium (Fr.) Singer—.Part 1: physical and chemical factors affecting the rate of mycelial growth and bioconversion efficiency. *Food Chemistry* 81: 389-393.
46. Ku, J.I., Row, K.H. 2001, Recovery of Catechin Compound from Korean Green Tea by Solvent Extraction and Partition. *Kor. J. Biotechnol. Bioeng*. 16(5): 442-445.

용어정리

표현	용어
AG	신령버섯균사체배양추출물
AG-80EP	신령버섯균사체배양추출물의 80% 에탄올침전물
GT	녹차분말
GT0.25-80EP	기본배지에 녹차분말0.25%를 추가로 첨가하여 배양한 버섯균사체배양추출물의 80% 에탄올침전물
GT0.5	기본배지에 녹차분말0.5%를 추가로 첨가하여 배양한 버섯균사체배양추출물
GT0.5-80EP	기본배지에 녹차분말0.5%를 추가로 첨가하여 배양한 버섯균사체배양추출물의 80% 에탄올침전물
GT1.0	기본배지에 녹차분말0.25%를 추가로 첨가하여 배양한 버섯균사체배양추출물
GTC	녹차에서분리한 catechin
GTC0.1-80EP	기본배지에 녹차에서분리한 catechin을 0.1%첨가하여 배양한 버섯균사체배양추출물의 80% 에탄올침전물
GTC-80EP	기본배지에 녹차에서분리한 catechin을 첨가하여 배양한 버섯균사체배양추출물의 80% 에탄올침전물
GTC-BM	기본배지에 녹차에서 분리한 catechin을 첨가하여 열수추출한 추출물
GTC-HE	녹차에서 분리한 catechin을 첨가하여 열수추출한 추출물
GTE	녹차분말열수추출물
GTE-BM	기본배지에 녹차분말을 첨가하여 열수추출한 추출물
ON	양파분말
ON0.5	기본배지에 양파분말 0.5%를 추가로 첨가하여 배양한 버섯균사체배양추출물
ON0.5-80EP	기본배지에 양파분말 0.5%를 추가로 첨가하여 배양한 버섯균사체배양추출물의 80% 에탄올침전물
ON1.0	기본배지에 양파분말 1.0%를 추가로 첨가하여 배양한 버섯균사체배양추출물
ON1.0-80EP	기본배지에 양파분말 1.0%를 추가로 첨가하여 배양한 버섯균사체배양추출물의 80% 에탄올침전물
ONE	양파분말열수추출물
ONE-BM	기본배지에 양파분말을 첨가하여 열수추출한 추출물

주 의

1. 이 보고서는 농림부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구보고서입니다.

2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.

3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.