

최 중  
연구보고서

표고버섯으로부터의 면역 및 항콜레스테롤  
활성물질 분리 및 가공제품 개발

Purification of Biological Response Modifier for  
Immune and Anticholesterol from *Lentinus edodes* and  
Development of Functional Manufactured Product

주관연구기관 : 강원대학교  
협동연구기관 : 강원대학교  
협동연구기관 : 광주여자대학교

농 립 부

# 제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “표고버섯으로부터의 면역 및 항콜레스테롤 활성 물질 분리 및 가공제품 개발” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2007 년 5 월 일

주관연구기관명 : 강원대학교  
총괄연구책임자 : 홍 익 기  
세부연구책임자 : 조 재 열  
협동연구기관명 : 광주여자대학교  
협동연구책임자 : 박 정 숙

# 요 약 문

## I. 제 목

표고버섯으로부터의 면역 및 항콜레스테롤 활성물질 분리 및 가공제품 개발

## II. 연구개발의 목적 및 필요성

### 가. 생리활성물질 특성분석 및 분리정제

담자균류의 버섯으로부터 생산되는 생리활성을 나타내는 물질이 주로  $\beta$ -D-glucan의 polysaccharide로 밝혀져 있다. 이런 담자균류 버섯들 중 표고버섯(*Lentinus edodes*)은 자실체 뿐만 아니라 균사체 액체 배양물로부터 분리된 다당의 생리활성과 활성물질의 정제 및 화학적 특성 등 많은 연구가 이루어져 있다. 이외에도 양송이버섯(*Agaricus blazei*), 영지버섯(*Ganoderma lucidum*), 운지버섯(*Coriolus versicolor*) 등의 자실체, 균사체 그리고 배양 여액에서 추출된 다당체의 효능 및 구조적 특성에 대한 연구는 국내, 국외 연구가 활발히 이루어지고 있는 현황이다. 그러나 국내수준에서 아직까지 균사체 대량배양과 활성물질의 추출 및 분리정제에 대한 표준화되고, 산업화된 기술이 전무한 실정이다. 따라서 본 연구에서는 표고버섯으로부터 단백다당체 및 주요 생리활성물질을 분리정제할 수 있는 최적화 기술을 개발하여 항암 등 면역활성 증대 및 항콜레스테롤 등 항성인병에 탁월한 효능을 보이는 생리활성물질을 대량생산하여 이를 가공적성 검색을 통하여 전통적 기능성 가공제품을 개발하는데 기초자료로 이용하고자 한다.

## 나. 생리활성물질 효능평가

일반적으로 알려진 버섯유래 다당체의 효능은 직접 암세포에 작용하여 항암효과를 내는 것이 아니고 면역계의 host mediate immune response에 관여하여 손상된 면역기능을 회복시키거나 촉진시켜 줌으로써 효과를 나타낸다. 또한 생체내에서 감염방어 등의 면역계와 관계있는 보체계(complement system)를 활성화시키고 macrophage를 활성화하여 암세포의 생물학적 반응을 변화시켜서 치료효과를 나타내므로 부작용이나 독성이 합성 항암제보다 적거나 거의 없는 장점을 가지고 있다. 보체계 활성화 다당들이 실제로 임상실험에서 항종양효과를 발휘하는데 이러한 면역반응은 면역계 세포들인 monocyte들이나 macrophage들의 표면에 있는 mannose, fucose,  $\beta$ -glucan과 같은 탄수화물을 인식하는 receptor들이 자극되면 대식작용(phagocytosis) 및 leukotriene과 lysosomal enzyme의 분비와 같은 세포성 면역반응들이 일어나게 되는 것이다. 이들의 면역 기전은 명확히 밝혀지지 않았지만, 다당체의 항암력은 면역세포 및 대식세포의 활성 증가와 다양한 cytokine의 생산을 촉진함으로써 항암효과를 나타내는 것으로 알려져 있다. 영지버섯 유래 추출물은 마우스의 복강 내 면역세포 수의 증가, 대식세포의 활성화 및 용혈반 형성 세포 수의 증가에도 영향을 미치는 것으로 보고되었고, 잿빛만가닥버섯 (*Lyophyllum decastes*)으로부터 분리한 항암성분 lyophyllan이 sarcoma 180 세포에 대한 직접적인 세포독성은 나타내지 않았으나 적혈구에 대한 용혈반 형성 세포수 및 지연형 과민 반응을 증가시켰으며, 이 성분의 항암 효과 기전이 NK 세포 작용 및 활성화된 세포독성능, 대식세포의 유도과 항원 특이성 T 임파구의 축적 등 대식세포를 경유한 세포 중개성 면역 반응에 의한 것이라 보고되고 있다. 표고버섯 유래 생리활성 물질로 많이 알려진 Lentinan 의 항암 효능은 이미 입증된 바 있다. 하지만 국내에서 아직까지 표고버섯에서 생리활성물질에 대한 일반적인 연구만 있었을 뿐 그 효능에 미치는 요인에 대한 자세한 검증이나, 면역반응에 대한 효능기전 연구는 미비한 실정이다. 따라서, 본 연구에서 표고버섯 자실체에서 추출한 생리활성 다당체에 대한 전반적인 면역학적 효능과 항콜레스테롤 및 항당뇨에 대해 알아보고자 한다.

#### 다. 기능성 가공제품 개발

표고버섯이 갖는 낮은 지방 함량에 의한 저칼로리 식품의 장점과, 단백질, 비타민 및 각종 무기성분이 풍부하게 함유되어 있어 건강식품으로서의 각광을 받고 있는 연중 수확이 가능한 버섯을 식품으로 이용하기 위한 적절한 가공방법을 모색하여 고부가가치를 갖는 식품으로의 개발이 필요한 실정이다. 지금까지의 표고버섯에 관한 연구로는 버섯에 관한 특성에 집중되었고 일부 가공제품에 관한 연구들이 이루어져 왔다. 본 연구에서는 전통식품인 조청에 표고버섯 분말을 첨가하여 탄수화물이 주원료인 기존 조청의 영양학적 단점을 보완하고자 하는 가공 적성을 조사하였고, 조청보다는 좀 더 일반적으로 이용이 되고 있는 물엿에 첨가한 제품을 개발할 수 있는 가능성에 관한 연구를 행하였다.

### Ⅲ. 연구개발 내용 및 범위

#### 가. 생리활성물질 특성분석 및 분리정제

표고버섯 자실체로유래의 생리활성물질을 분리정제에 대한 최적화 공정에 대해 연구하였다. polysaccharide의 추출을 위해서 에탄올침전의 방법을 사용하였고, 자실체로부터 추출된 polysaccharide를 DEAE-cellulose column를 이용하여 분리정제의 첫 단계로서 고정상의 해리기가 갖는 전하와 용질이 갖는 전하사이에 작용하는 정전기적 인력을 이용한 ion exchange chromatography를 실시하여, 조다당체를 중성분획과 산성분획으로 나누었다. Ion exchange chromatography로 얻어진 분획의 분자량 분포를 알아보기 위해서 Sepharose CL-6B column를 이용하여 gel chromatography를 실시하였다. 이 최적조건을 맞추어 분자량별, 다당체를 나누어 각각의 분리정제된 다당에 대해서 항산화활성과 총페놀함량을 분석하여 생리활성물질을 얻기 위한 분리정제공정의 최적화를 유도하고자 하였다.

#### 나. 생리활성물질 효능평가

표고버섯으로부터 추출한 생리활성물질은 자실체 열수추출물에 에탄올 침전을 가한 분획을 중심으로 효능 검색을 실시하였다. 대표적인 receptor인 TLR-2와 dectin-1의 blocking 항체를 이용하여 표고버섯 단백다당류가 나타내는 대식세포에서 유리되는 대표적인 세포독성 물질인 Nitric Oxide (NO)의 분비 효과에 대한 조절 정도, 세포면역반응 활성유도 cytokine (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-12, IL-23) 및 chemokine (MCP-1, MIP-1 $\alpha$ , MIP-2) 등의 분비에 미치는 영향을 조사하였으며, 단백다당체가 costimulatory molecule의 발현에 어떤 영향을 미치는지 그 효과를 검토함으로써, 단백다당체에 의한 대식세포의 항원공여 조절능, homotypic cell aggregation assay법과 fibronectin을 부착한 플레이트를 이용한 세포 유착과정 (cell-fibronectin adhesion assay)법을 이용하여 세포이동성 매개 단백질의 활성화에 관한 단백다당류 분획의 조절 가능성, 조사단백다당체 함유 분획에 의한 유착조절 단백질의 발현양 조절 가

능성을 조사하였다.

또한, 표고버섯의 기능성식품에 대한 가능성을 확인하기 위해 항당뇨 활성을 조사하였다. 실험동물은 streptozotocin (STZ)에 의한 제 1형 당뇨병모델 마우스에 대한 표고버섯 추출물의 혈당강하 및 항 당뇨 효과를 알아보려고 하였다.

#### 다. 기능성 가공제품 개발

표고버섯 분말을 이용한 조청, 전병, 강정의 고부가가치 가공제품개발을 위하여, 각각 제조공정에 따른 여러 가지 최적제조방법 확립 및 최적조건을 갖추기 위해서 다양한 물성평가와 식품학적 특성을 평가 비교하고자 하였다. 반죽의 amylogram & extensogram 특성을 분석하고, 유리당 함량 및 색도 평가도 시행하였다. 물성평가에 있어서 rheometer를 이용하였고, 관능검사도 시행하여, 최적조건의 검색에 이용하고자 하였다.

▶ 1차년도 과제별 연구개발 내용 및 범위

구 분	연 구 개 발 목 표	연구개발 내용 및 범위	연 구 개 발 결 과
1차년도 (2004)	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 제1세부과제</li> </ul> <p>생리활성물질 추출 및 성분분석</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 추출물 제조 및 수율 검토               <ul style="list-style-type: none"> <li>- 용매(열수, 에테르, 아세테이트, 에탄올, NaOH 등)별 추출방법 및 수율 검토</li> </ul> </li> <li>○ 추출물의 활성분획 선별               <ul style="list-style-type: none"> <li>- 용매별 각 추출물의 활성분획 특성 검토 및 분획 선별</li> </ul> </li> <li>○ 생리활성물질 성분 분석               <ul style="list-style-type: none"> <li>- 단백다당체를 포함한 주요 생리활성물질 성분분석</li> </ul> </li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 생리활성물질 추출물 활성분획 선별 및 성분 분석 확인</li> </ul>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 제2세부과제</li> </ul> <p>분자면역학적 생리활성 효능평가</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 분자면역학적 효능 평가               <ul style="list-style-type: none"> <li>- 세포사멸에 미치는 효과</li> <li>- 사이토카인 및 세포독성물질 분비에 미치는 효과</li> </ul> </li> <li>○ 작용기전 연구               <ul style="list-style-type: none"> <li>- 신호전달과정 검토</li> <li>- 세포표면 당단백질 발현 및 활성검토</li> </ul> </li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 분자면역학적 검증 및 기전 확인</li> </ul>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 제3세부과제</li> </ul> <p>표고조청 제조</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 조청 제조방법 확립               <ul style="list-style-type: none"> <li>- 전통 제조과정 검토 및 확립</li> </ul> </li> <li>○ 최적 제조방법 확립               <ul style="list-style-type: none"> <li>- 전처리에 따른 가공적성 검토</li> <li>- 최적조건 확립을 통한 표고조청 제조</li> </ul> </li> <li>○ 식품학적 특성 분석               <ul style="list-style-type: none"> <li>- 표고조청 특성검토 및 성분분석</li> <li>- 관능평가</li> </ul> </li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 표고조청제조</li> </ul>



▶ 2차년도 과제별 연구개발 내용 및 범위

구 분	연구개발 목표	연구개발 내용 및 범위	연구개발 결과
2차년도 (2005)	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 제1세부과제</li> </ul> <p>생리활성물질 분리정제기술 개발</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 생리활성물질 분리정제                             <ul style="list-style-type: none"> <li>- 활성분획내 생리활성물질 분리정제 조건 확립</li> <li>- 주요 생리활성물질 함량분석</li> </ul> </li> <li>○ 단백질다당체 분리정제                             <ul style="list-style-type: none"> <li>- 분자량 및 구조 변화유도</li> <li>- 분자량별 분리정제 및 구성성분 분석</li> </ul> </li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 생리활성물질 분리정제 확인</li> </ul>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 제2세부과제</li> </ul> <p>세포면역학적 생리활성 효능평가</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 세포면역학적 효능 평가                             <ul style="list-style-type: none"> <li>- 대식세포 탐식작용 검토</li> <li>- 세포유착과정 및 신생혈관형성 억제 작용 검토</li> </ul> </li> <li>○ 작용기전 연구                             <ul style="list-style-type: none"> <li>- 신호전달과정 검토</li> <li>- 세포표면 당단백질 발현 및 활성검토</li> </ul> </li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 세포면역학적 검증 및 기전 확인</li> </ul>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 제3세부과제</li> </ul> <p>표고전병/한과 제조</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 전병/한과 제조방법 확립                             <ul style="list-style-type: none"> <li>- 전통 제조공정 검토 및 활용</li> </ul> </li> <li>○ 최적 제조조건 확립                             <ul style="list-style-type: none"> <li>- 전처리에 따른 가공적성 검토</li> <li>- 최적조건 확립을 통한 전병/한과 제조</li> </ul> </li> <li>○ 식품학적 특성 분석                             <ul style="list-style-type: none"> <li>- 표고전병/한과 특성검토 및 성분분석</li> <li>- 관능평가</li> </ul> </li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 표고전병/한과 제조</li> </ul>

▶ 3차년도 과제별 연구개발 내용 및 범위

구 분	연구 개발 목표	연구개발 내용 및 범위	연구 개발 결과
3차년도 (2006)	○ 제1세부과제  생리활성물질 분리 정제 공정 최적화	○ 분리정제공정 개발 - 분리정제 수율 촉진 및 저해 요인 검토 - 분리정제 최적조건 검토  ○ 생산성 극대화를 위한 공정 최적화 - 고수율 최적화 공정시스템 구축	○ 분리정제공정 최적화 확립
	○ 제2세부과제  가공과정에 따른 효능변화 검색	○ 번역효능 평가 - 항암 효능 검토  ○ 항성인병 효능 평가 - 항당뇨 효능 검토 - 콜레스테롤 저하 효능 검토  ○ 급성독성 평가 - 일반증상 검토 - 혈액 생화학적 변화 검색	○ 가공과정에 따른 효능변화 확인
	○ 제3세부과제  고부가가치 가공제품개발	○ 추출물 가공적성 검토 - 추출 및 분리과정에 따른 적성 검토  ○ 가공 제품화 - 제품특성 검토를 통한 가공기술 개발 - 제품제형 검토를 통한 고부가가치 가공제품 개발 - 각 제품별 포장방법 검토	○ 가공 제품화 ○ 포장방법 확립

## IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

### 가. 생리활성물질 특성분석 및 분리정제

자실체 유래의 crude polysaccharide(CPF)에 대한 중성분획(CPFN)의 수율은 32.1 mg/100 mg, 산성분획(CPFA)의 수율은 40.4 mg/100 mg 으로 나타났다. 자실체에서 분리한 crude polysaccharide는 모두 연한 갈색 분말형태이었으나, ion exchange chromatography를 실시한 후 얻어진 중성과 산성 다당체는 모두 백색의 분말형태이었다. 이런 것은 ion exchange chromatography에서 색소를 가지고 있는 부분이 NaCl의 농도가 높은 뒷부분에서 용출되기 때문에 제거된 것을 확인할 수 있었다. 이렇게 얻어진 분획물들을 Gel filtration chromatography를 실행하여 분자량별로 분획하였다. 자실체 중성분획물은 고분자와 저분자 다당체 분획 총 3종(CPFN-G-I, CPFN-G-II, CPFN-G-III)으로 분자량은 각각 CPFN-G-I: 580kDa, CPFN-G-II: 308kDa, CPFN-G-III: 31kDa 확인되어 각각 수집하였고 단백질은 검출되지 않았으며, 산성분획물은 고분자 한 분획(CPFA-G : 658kDa)이 확인되었고, 저분자 분획에서 미량의 다당체가 검출되었지만 그 OD값이 신뢰범위에 미치지 못해 신뢰할 수 없다고 판단하여 고분자 분획만 수집하였고, 중성과 마찬가지로 단백질은 검출되지 않았다. 고효능의 생리활성분획을 검색하기 위한 총페놀함량 분석과 항산화활성 평가 결과는 페놀함량이 높은 분획에서 항산화활성이 높게 검색이 되었다.

### 나. 생리활성물질 효능평가

표고버섯 및 표고버섯 유래 다당류의 면역활성 증진효과, 급성독성, 항당뇨효과, 및 항콜레스테롤 대사능을 여러 가지 in vitro 및 in vivo 모델을 이용하여 조사하였다. 다당류 분획 (LECE-PF)은 강력하게 대식세포의 면역활성을 유도하였다. 즉 이들 분획은 탐식능, 독성물질 (ROS 및 NO) 분비능, 사이토카인 발현능, 활성화에 따른 형태변화 등을 유도하였다. 특별히 이들 활성유도는 NF- $\kappa$ B의 핵내 이동을 촉진하였고 이들 과정을 위한 상부신호전달 체계인 PI3K/Akt 및 MAPK 효소계의 활성을 유도한 것으로 확인되었다. 특별히 기능저해용 항체를 이용하여 이들 다당류분획이 세포표면 단백질인 dectin-1 및 TLR-2를 경유하여 여러 가지 대식세포 활성 유도 신호전달 과정을 증폭하는

것으로 사료된다. 예상대로 본 분획은 2g/kg로 투여시에도 전혀 독성을 나타내지 않는 것으로 확인되었으며, 그 외에도 혈중 당농도를 감소시키는 항당뇨 효능, 혈중 콜레스테롤 수치 및 동맥경화 관련 지표들이 값을 감소시키는 항콜레스테롤 대사 효능을 나타내었다. 따라서 본 결과로 미루어 볼 때 표고버섯 및 표고버섯 유래 다당류들은 다양한 면역 및 성인병 조절 효능을 가지고 있는 것으로 판단된다.

#### 다. 기능성 가공제품 개발

조청, 전병, 강정, 건강보조식품을 제조하는데 있어서 표고버섯 분말을 첨가함에 따라서 변화할 수 있는 여러 가지 요소들을 물리화학적 분석에 의해서 분석하였다. 지방 함량이 낮아 저칼로리 식품이면서, 단백질, 비타민 및 각종 무기성분이 풍부하게 함유되어 있어 건강식품으로서의 각광을 받고 있는 연중 수확이 가능한 표고버섯을 식품으로 이용하기 위한 적절한 가공방법을 모색하여 고부가가치를 갖는 식품으로 개발을 하고자 표고버섯 첨가 조청을 표고버섯 분말을 밥에 직접 첨가하여 제조하는 방법, 표고버섯 분말을 당화액에 첨가하여 제조하는 방법, 표고버섯 추출액을 첨가하는 방법의 의해 제조하였다.

표고버섯 추출액을 제조하여 졸이기 전에 당화액에 일정 비율(10:0, 7:3, 5:5, 3:7)로 첨가하여 제조한 조청의 경우 이화학적 성분들이 일부 유리당 등을 제외하고 큰 차이를 보이지 않았으며, 관능적 요소에서의 경우 5:5 첨가구 이상에서는 기존 조청 제품과 상당한 차이를 보이는 것으로 나타났다. 따라서 추출액을 첨가할 경우 당화액과 추출액의 비가 7:3을 넘지 않은 범위에서 제조를 하거나 혹은 졸이기를 하는 과정 중 시간을 기존 제품보다 좀 더 길게 설정해야만 기존 조청과 유사한 제품을 만들 수 있을 것으로 기대된다.

표고버섯 분말을 첨가한 전병을 제조하여 첨가 수준별 품질특성을 조사하였다. 전병 반죽의 물성 특성 중 흡수율은 표고버섯 분말 첨가량이 많아지면서 증가하였으며, 반죽도달시간과 최고점도는 첨가량에 따라 낮아졌다. 호화개시온도와 최고점도에 도달하는 온도의 경우에는 시료간 차이를 보이지 않았다. 또한 extensogram을 통한 반죽의 energy값은 첨가량과 부의 결과를 보였으며 신장도도 감소하였다.

쌀강정에 표고버섯을 일정 비율로 첨가하여 표고버섯 강정을 제조하고, 여러 특성을 조사한 결과 기존의 쌀강정에 비하여 표고버섯 첨가 강정이 더 우수한 제품이 될 수 있었고, 최적의 첨가량은 쌀 튀밥을 기준으로 30%로 나

타났다.

표고버섯의 효율적인 이용과 가공식품 소재로서 상품성과 부가가치를 높이기 위한 방법으로 추출액을 제조하고, 이를 이용한 음료의 개발 가능성을 살펴보고, capsule 형태의 제품을 개발하여 건강식품 및 의약품으로의 이용가치를 높이기 위한 실험을 실시한 결과 다음과 같은 결과를 얻었다.

#### 1) 표고버섯 추출액을 이용한 음료

표고버섯 추출액 특유의 맛과 향을 억제하면서 음료로서 좀 더 기호성이 가미된 제품을 개발하고자 녹차 추출액을 함량별 첨가하여 관능검사를 실시한 결과 색을 제외한 나머지 항목(맛, 향, 종합적 기호도)에서 녹차 추출액 20% 첨가구가 가장 좋은 결과를 보였다.

녹차추출액을 20% 첨가하여 제조한 표고버섯 추출액 음료를 60일간 상온에서 보관하면서 일정 기간별(0일, 20일, 40일, 60일)로 당도, pH, 조단백질, 총당을 분석한 결과 저장기간에 따른 변화는 관찰할 수가 없었다. 또한 세균수와 대장균군의 경우 60일까지 저장하면서 관찰한 결과 모두 음성으로 나타나 살균공정만 잘 이행된다면 retort pouch로 포장한 표고버섯 음료의 유통기한의 경우 큰 문제는 없을 것으로 생각된다.

음료의 색도 측정 결과, 명도를 나타내는 L값, 적색도를 나타내는 a값은 저장기간에 따른 차이가 없었으며, 황색도를 나타내는 b값은 다소 증가하는 경향을 보이기는 하나 큰 차이를 보이지는 않았다. 표고버섯 추출액 음료의 구성 아미노산 함량을 분석한 결과 총 아미노산 함량은 128.17 mg/100 g이었으며, 가장 많이 함유된 아미노산은 glutamic acid (39.24 mg/100 g)이었으며, aspartic acid (11.72 mg/100 g), alanine (8.99 mg/100 g), lysine (8.75 mg/100 g), leucine (7.82 mg/ 100 g) 순으로 나타났다.

#### 2) 표고버섯 농축액을 이용한 음료

추출액을 농축할 경우에는 특유의 맛과 향이 더해져 소비자들의 식미에 부의 영향을 주며, 이러한 부분을 개선할 수 있는 조건을 찾아보고자 계피와 생강 열수추출액을 일정비율로 첨가하여 버섯 농축액 음료(용량 20 mL)를 제조하여 관능검사를 실시한 결과, 색의 경우 계피와 생강 추출액 첨가구(10%, 20%) 모든 시료에서 대조구보다 높은 점수를 받았으며, 계피 추출액 20% 첨가구가 5.6으로 가장 높은 색에 대한 기호도를 보였다. 향(flavor)의 경우 색과 같은 결과를 보여 계피 추출액 20%가 가장 기호도가 좋았다. 맛(taste)의 경

우, 계피 추출액 첨가구만 대조구보다 선호도가 더 높았으며, 종합적인 기호도도 다른 항목과 거의 비슷하여 계피 추출액 20% 첨가구가 가장 높은 점수를 받았다.

계피 추출액을 20% 첨가하여 제조한 표고버섯 농축액 음료를 60일간 상온에서 보관하면서 일정 기간별(0일, 20일, 40일, 60일)로 당도, pH, 조단백질, 총당을 분석한 결과 당도(3.8~4.0°), pH(4.93~5.33), 조단백질(0.67~0.82%)과 총당(2.46~3.15%) 모두 저장기간에 따른 변화는 없었다. 또한 세균수와 대장균군의 경우 60일까지 저장하면서 관찰한 결과 모두 음성으로 나타났으며, 이러한 결과는 추후 표고버섯 농축액 음료의 유통기한 설정에 기준이 될 수 있을 것으로 생각된다.

음료의 색도 측정 결과, 명도를 나타내는 L값, 적색도를 나타내는 a값과 황색도를 나타내는 b값 모두 저장기간에 따른 차이가 없었으며, 구성 아미노산 함량을 분석한 결과 총 아미노산 함량은 360.75 mg/100 g이었으며, 가장 많이 함유된 아미노산은 glutamic acid (101.65 mg/100 g)이었으며, 다음은 aspartic acid (32.17 mg/100 g), lysine (26.26 mg/100 g), alanine (26.25 mg/100 g), glycine (22.31 mg/100 g) 순으로 나타났다.

### 3) 표고버섯에서 추출한 조다당체 분말의 특성

표고버섯의 상품성과 부가가치를 높이기 위한 방법 중 하나로 정제된 버섯 추출물을 분말이나 capsule 형태로 상품화하기 위하여 조다당체를 분리하여 동결건조 후 분말로 만든 후 부형제와 함께 200 mg 단위로 capsule에 포장하였다.

조다당체의 수율은 표고버섯 분말 300 g을 열수 추출하여 얻은 추출액을 이용하여 약 15 g 정도의 조다당체를 얻었으며 이는 표고버섯 분말의 약 0.5%에 해당하는 양이다. 이를 200 mg 단위로 capsule 포장을 할 경우 부형제를 첨가하여 약 100 capsule 정도 포장이 가능하며, 100 capsule에 대한 표고버섯의 원가는 15,000원 정도로서, 일반적으로 한달 복용량으로 120개의 캡슐 규모로 병포장을 한다면 1회당 2알, 1일 2회 즉, 1일당 4 캡슐을 복용하는 양이 될 것이다.

부형제로 maltodextrin을 함량별(20%, 30%)로 첨가한 표고버섯 조다당체 분말의 일반성분을 분석한 결과 수분의 경우 부형제 첨가량 20% 시료가 4.50%, 30%인 경우 4.03%로 나타나 부형제 첨가량이 많을수록 수분 함량은 낮았다. 조단백질은 20%와 30% 첨가구가 각각 0.57%과 0.53%로 시료간 차이를 보이지 않았으며, 총당 함량은 부형제 20% 첨가구가 90.95%, 30% 첨가구

가 94.90%로 첨가량이 많은 시료에서 총당 함량이 더 높았음을 알 수 있었다.

표고버섯 조다당체 분말의 아미노산 함량을 분석한 결과 총 아미노산 함량은 20% 첨가구가 548.36 mg/100 g, 30% 첨가구가 413.12 mg/100 g으로 나타나 30% 첨가구가 약간 낮은 결과를 보였다. 구성 아미노산 중 가장 많이 함유된 아미노산은 glutamic acid (20%; 113.40 mg/100 g, 30%; 91.48 mg/100 g)이었으며, arginine (20%; 76.60 mg/100 g, 30%; 57.65 mg/100 g), aspartic acid (20%; 55.13 mg/100 g, 30%; 41.94 mg/100 g), alanine (20%; 52.08 mg/100 g, 30%; 39.66 mg/100 g), lysine (20%; 39.61 mg/100 g, 30%; 29.29 mg/100 g) 순으로 나타났다.

이상의 결과로 보아 표고버섯 특유의 맛과 향을 억제하면서 음료로서 좀 더 기호성이 가미된 표고버섯 추출액 음료의 조건으로 녹차 추출액을 20% 첨가하여 제조(100 mL 용량)하는 것이 가장 바람직하였으며, 표고버섯 농축액 음료(20 mL 용량)의 경우 계피 추출액 20%를 첨가하여 제조 시 가장 기호성이 우수한 것으로 나타났다. 또한, 표고버섯 추출액에서 조다당체를 분리하여 분말화 한 후 capsule에 포장하는 경우 부형제로 maltodextrin을 선정하였고, 첨가량은 20%와 30% 모두 무난하였다.

# SUMMARY

(영문 요약문)

## I. Title

Purification of biological response modifier for immune and anticholesterol from *Lentinus edodes* and development of functional manufactured product

## II. Propose and significance of the study

### A. Characteristic analysis and purification and isolation process of biological response modifier

*Lentinus edodes* is a well known edible and medicinal mushroom. It has attracted great attention owing to its anti-tumor activities, because the fruiting body was supposed to contain a  $\beta$ -D-glucan, which is known to have the antitumor activity against Sarcoma 180. Its antitumor effect seems to be due to the restoration or augmentation of immunological response and to the potentiation of host-defense systems through cellular immunity. The significance of the these activities is dependent on the structure of the polysaccharides such as an anomeric configuration, glycosidic linkage, degree of branching, triple helix conformation and so on.

In this study, we are tried to investigate the purification and isolation conditions, chemical compositions and structural properties of polysaccharides extracted from fruiting body of *Lentinus edodes* for the industrial application.

### B. Efficacy analysis of biological response modifier

Wide varieties of applications of glucan have been reported, including thickening and stabilizing agents in chemical industries, and immunostimulating and antitumor agents in clinical uses. Apart from these



applications, glucan has been used as a substance that enhances the skin's natural ability to heal and protect itself against infection. The immunomodulating action of mushroom polysaccharides is especially valuable as a prophylactic, a mild and non-invasive form of treatment, and in the prevention of metastatic tumors, etc as described above.

Polysaccharides from mushrooms do not attack cancer cells directly, but produce their antitumor effects by activating different immune responses in the host. This has been verified in many experiments, such as the loss of the antitumor effect of polysaccharides in neonatal thymectomized mice or after administration of anti-lymphocyte serum. Lentinan's immune-activating ability may be linked with its modulation of hormonal factors, which are known to play a role in tumor growth. Aoki showed that the antitumor activity of lentinan is strongly reduced by administration of thyroxin or hydrocortisone. Lentinan can also restore tumor-specific antigen-directed delayed-type hypersensitivity reaction.

We have not yet been properly investigated their components which one is better for increasing immune activities, except fruiting body. In this study, we investigated the immune-activity, anti-cholesterol and anti-diabetes effect of fruiting body extract from *Lentinus edodes*.

### **C. Process development of Functional product.**

In the event that there are large shipments of mushrooms due to the fact that it is difficult to keep most mushrooms to be fresh for a prolonged period of time, an unbalance between consumption and distribution occurs. This in turn results in heavy losses at the production farms caused by a decline in prices.

In addition, despite increased productions through improved cultivation technologies, if the demand cannot meet the increased production, there is the possibility that a price drop may occur due to excessive supplies. Therefore, there is a need to develop processing technologies for adjusting shipments. However, there are only a small amount of ways to process mushrooms such as in snacks, drinks, alcohol and canned foods. *Lentinus edodes* mushrooms can be harvested all year round and has come into the limelight as a

low-calorie health food that contains a rich amount of protein, vitamins and various minerals, even glucan. Thus, there is currently a need to find appropriate processing methods in order to develop this high value-added food. Therefore, in this study, *L. edodes* were used to make *Jocheong*, *Jeonbyeong*, *Gangjeong*, *L. edodes* extracts and concentrate and powders by separating the crude saccharide from extracts. These characteristics were then examined.

### III. Contents and scope of the study

#### A. Characteristic analysis and purification and isolation process of biological response modifier

The polysaccharides were extracted from fruiting body of *Lentinus edodes*. The crude polysaccharides were obtained by the ethanol addition. They were further purified using ion-exchange chromatography and gel chromatography. Ion-exchange chromatography using DEAE-cellulose column separated neutral and acidic polysaccharides. Neutral polysaccharides were then purified with gel filtration chromatography. For various peaks obtained from gel filtration chromatography, molecular weight was measured with Sepharose CL-6B. Total sugars and protein contents were detected by phenol-sulfuric acid method and Bradford assay, respectively. Crude extracts, crude polysaccharides and crude polysaccharides-free from fruiting body were investigated for their antioxidant capacity in total polyphenolics and 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging activity.

#### B. Efficacy analysis of biological response modifier

Biological response modifier extracted from *Lentinus edodes* was utilized for the effect searching through ethanol precipitation with fruiting body hot-water extraction. we investigated the effects that *Lentinus edodes* proteo-glycan might regulate the secretion of Nitric Oxide's(NO), cell

immunoreaction release cytokine(TNF- $\alpha$ , IL-1b, IL-6, IL-12, IL-23) and chemokine(MCP-1, MIP-1a, MIP-2) etc. There were representative cell toxicity materials that were removed from realities in Phagocyte that appeared using blocking antibody of TLR-2 and dectin-1 that was the representative receptor .

By examining the effect whether proteo-glycan affected some costimulatory molecule's revelation, being antigen shearing activity of Phagocyte by proteo-glycan regulation ability, using cell adhesion process(cell-fibronectin adhesion assay) method that used plate that conglutinating homotypic cell aggregation assay department fibronectin cell mobility course of events proeto-glycan fraction's regulation possibility about protein vitality, the possibility of adhesion regulation protein expression was investigated by proteo-glycan fraction.

Also, we investigated hyperglycemia to confirm the possibility for regulation function of *Lentinus edodes* fruiting body. An experiment animals were prepared to search the blood sugar control of *Lentinus edodes* fruiting body extract for estimating type 1 diabetes model mouse and hyperglycemia effect by streptozotocin(STZ).

### **C. Process development of Functional product.**

*L. edodes* were used to make *Jocheong*, *Jeonbyeong*, *Gangjeong*, *L. edodes* extracts and concentrate and powders by separating the crude saccharide from extracts. We investigated the quality characteristics of *Jocheong* containing various level of *Lentinus edodes* powder and extracts by adding *L. edodes* powder in rice, *L. edodes* powder in saccharide *L. edodes* extracts in saccharide. Then, we studied the quality characteristics of *Gangjeong* containing various level of *Lentinus edodes*, properties of *Jeonbyeong* containing *Lentinus edodes* powder and development of functional food using *Lentinus edodes* extracts.

## IV. Results and recommendation

### A. Characteristic analysis and purification and isolation process of biological response modifier

The internal standard reagents were glucose, galactose, mannose and fucose. The peaks of neutral polysaccharides and acidic polysaccharides were obtained as CPFN and CPFA, respectively. CPFN and CPFA were divided into CPFN-G1, G2, G3 and CPFA-G1, respectively. The range of average molecular weight was between 31 kDa to 658 kDa. Total polyphenolics in the crude polysaccharides-free from fruiting body were higher than those from the other ones. And crude polysaccharides-free from fruiting body showed the higher DPPH free radical scavenging activity. Positive correlations were found between total polyphenolics and their antioxidant activity.

### B. Efficacy analysis of biological response modifier

In this study, we explored the biological efficacies (immunostimulatory potency and molecular mechanisms, acute toxicity, anti-diabetic activity and anti-hyperlipidemic effect) of various polysaccharide fractions prepared from liquid culture of *Lentinus edodes* using various *in vitro* and *in vivo* models. Polysaccharide fraction (LECE-PF) from crude extract was able to strongly up-regulate the phenotypic functions of macrophages such as phagocytic uptake, ROS/NO production, cytokine expression and morphological changes. LECE-PF triggered the nuclear translocation of NF- $\kappa$ B and activated its upstream signaling cascades such as PI3K/Akt and MAPK pathways as assessed by their phosphorylation levels. The function-blocking antibodies to dectin-1 and TLR-2, but not CR3 markedly suppressed LECE-PF-mediated NO production. The fraction was also found to be non-toxic up to 2g/kg, according to acute toxicity analysis. Crude extract of *Lentinus edodes* (LECE) also reduced serum glucose level increased by streptozotocin. Finally, LECE significantly diminished serum levels of cholesterol, LDL-cholesterol,  $\beta$ -lipoprotein, and atherogenic index. Therefore, our data suggested that

*Lentinus edodes* and its polysaccharide might have the immunostimulating potency via activation of multiple signaling pathways, anti-diabetic effect and anti-hyperlipidemic activity without displaying acute toxicity.

### C. Process development of Functional product.

In either case of adding *L. edodes* extracts directly to the rice or adding it while boiling with the saccharide, there were almost no physico-chemical differences. It was suggested that the amount of additives should be set at 1~2% or below.

Prior to processing the *L. edodes* extracts for boiling, when saccharide is added at a constant proportion (10:0, 7:3, 5:5, 3:7), the *Jocheong* showed a large difference in its sensory factors when additives were beyond 5:5. Therefore, when adding the extracts, the proportion between saccharide and extracts should be processed at no more than 7:3 or the boiling process should be given the more time in order to produce a product that was similar to the existing *Jocheong*.

*Jeonbyeong* was prepared by adding *L. edodes* powder to improve its quality and some functional properties. The water absorption increased as the amount of *L. edodes* powder increased while the arrival time and calorimeter value decreased. The temperature at gelatinization and temperature at peak point were similar to control. The extensogram showed that the energy of dough and extensibility decreased.

Using the above results, the most recommendable method for producing *L. edodes* extract beverages that suppresses the taste and flavor of the mushroom, while making it more preferable as a beverage, is to add 20% green-tea extracts in each unit (100 mL). In the case of *L. edodes* concentrate beverages (20 mL), it is the most preferable to add 20% cinnamon extracts. In addition, when separating the crude polysaccharide from the *L. edodes* extracts and making into powder for use in a capsule, maltodextrin was selected as the binding agent with the both 20% and 30% additive quantities.

# CONTENTS

Project Proposal .....	2
Project Overview: Purpose, Introduction and Contents .....	3
Summary .....	16
Contents .....	22
Chapter 1. Introduction of Project .....	28
Chapter 2. Current Status on Domestic and Foreign Technology .....	31
Chapter 3. Results of Research .....	33
Title: Purification of Biological Response Modifier for Immune and Anticholesterol from <i>Lentinus edodes</i> and Development of Functional Manufactured Product	
Section 1. Characteristic Analysis and Purification and Isolation Process of Biological Response Modifier .....	33
1. Introduction .....	33
2. Materials and Methods .....	34
1) Extraction and Yield Analysis .....	34
2) Selection of Extract .....	35
3) Biological Response Modifier Composition analysis .....	35
4) Purification and Isolation of Biological Response Modifier .....	37
5) Extraction and Quantitative Analysis of Polysaccharide .....	39
6) Purification and Isolation of Polysaccharide .....	39
7) Composition Analysis of Polysaccharide .....	43
8) Structure Analysis of Polysaccharide .....	47
9) Efficacy Analysis .....	47
3. Results .....	50
1) Extraction and Yield Analysis .....	50
2) Selection of Extract .....	54
3) Biological Response Modifier Composition analysis .....	56
4) Purification and Isolation of Biological Response Modifier .....	61

5) Purification and Isolation of Polysaccharide .....	65
6) Physico-chemical Properties of Polysaccharide .....	73
7) Efficacy Analysis .....	80
 Section 2. Efficacy Analysis of Biological Response Modifier .....	 86
1. Introduction .....	86
2. Materials and Methods .....	87
1) Experimental Materials .....	87
2) Animal Cell Culture .....	87
3) Cell Viability Analysis .....	87
4) Cell Cytotoxicity Material (Nitric oxide) Analysis by Phagocytes .....	88
5) Cell Cytotoxicity Material (ROS : Reactive oxygen species) Analysis by Phagocytes .....	88
6) Cytokine Release Ability of Phagocyte: Investigation Cytokine Expression Level Using RT-PCR .....	89
7) Phagocytosis Activity Analysis .....	89
8) Cell Signaling Analysis .....	91
9) Proteo-glycan Expression Inspection of Immune Cells Using Flow-cytometer .....	91
10) Effect of fractions on cell-cell aggregation .....	91
11) Expression Level of Immune Cells Using Flow-cytometer .....	92
12) Cell Surface Protein Expression Level Analysis .....	92
13) NF-kB Activity Analysis .....	92
14) Cell-fibronectin Aggregation Analysis .....	92
15) Acute Toxicity Analysis .....	93
16) Anti-diabetes Effect of <i>Lentinus edodes</i> Extract .....	95
3. Results .....	97
1) Cell Viability Analysis .....	97
2) Nitric Oxide (NO) Production Analysis .....	99
3) Reactive Oxygen Species (ROS) Production Analysis .....	99
4) Investigation of Cytokine mRNA Expression Level .....	101
5) Phagocytosis Assay .....	101
6) Antigen Presentation Ability .....	104
7) Effect of Fractions on Cell-Cell Aggregation .....	106

8) Cell Signaling Analysis .....	109
9) Proteo-glycan Expression Inspection of Immune Cells Using Flow-cytometer .....	110
10) Effect of TNF- $\alpha$ Release According to L.E Fraction. ....	113
11) Expression Level of Immune Cells Using Flow-cytometer ....	113
12) Instant Administration Research of Mouse about <i>Lentinus</i> <i>edodes</i> Extract .....	116
13) Anti-diabetes Effect Assay .....	119
14) Anti-cholesterol Effect .....	121
Section 3. Process Development of Functional Product .....	132
1. Introduction .....	132
2. Materials and Methods .....	135
1) Experimental Materials .....	135
2) Manufacture of <i>Jocheong</i> .....	135
3) Manufacture of <i>Jeonbyeong</i> .....	136
4) Manufacture of <i>Gangjeong</i> .....	136
5) Development of Functional Food Using <i>Lentinus edodes</i> Extracts .....	139
6) Composition Analysis of Products .....	139
7) Physico-chemical Properties of Products .....	145
다. Results .....	150
1) Manufacture of <i>Jocheong</i> .....	150
2) Manufacture of <i>Jeonbyeong</i> .....	199
3) Manufacture of <i>Gangjeong</i> .....	217
4) Development of Functional Food Using <i>Lentinus edodes</i> Extracts .....	226
Chapter 4. Attainment of Objectives and Contribution .....	253
Chapter 5. Applications of the Results .....	257
Chapter 6. Scientific and Technological information from Abroad .....	258
Chapter 7. References .....	259



# 목 차

제 출 문 .....	2
요 약 문 .....	3
SUMMARY .....	16
CONTENTS .....	22
목 차 .....	25
제 1 장 연구개발과제의 개요 .....	28
제 2 장 국내·외 기술개발 현황 .....	31
제 3 장 연구개발 수행 내용 및 결과 .....	33
제 1 절 생리활성물질 특성분석 및 분리정제 (제1세부과제) .....	33
가. 연구배경 .....	33
나. 연구방법 .....	34
1) 추출물 제조 및 수율 검토 .....	34
2) 추출물의 활성 분획 선별 .....	35
3) 생리활성물질 성분 분석 .....	35
4) 생리활성물질 분리정제 .....	37
5) Polysaccharide 추출 및 함량 .....	39
6) Polysaccharide 분리 및 정제 .....	39
7) Polysaccharide 성분분석 방법 .....	43
8) Polysaccharide 구조분석 .....	47
9) 효능분석 .....	47
다. 연구결과 및 고찰 .....	50
1) 추출물 제조 및 수율 검토 .....	50
2) 추출물의 활성 분획 선별 .....	54
3) 생리활성물질 성분 분석 .....	56
4) 생리활성물질 분리정제 .....	61
5) Polysaccharide의 분리 및 정제 .....	65

6) Polysaccharide의 이화학적 특성 분석 .....	73
7) 효능분석 .....	80
제 2 절 생리활성물질 효능평가 (제2세부과제) .....	86
가. 연구배경 .....	86
나. 연구방법 .....	87
1) 실험재료 .....	87
2) 세포배양 .....	87
3) 세포 생존율 (cell viability) 측정 .....	87
4) 대식세포 유래 세포독성물질 Nitric oxide의 정량 .....	88
5) 대식세포 유래 세포독성물질 Reactive oxygen species의 정량 .....	88
6) 대식세포의 cytokine 분비능 측정: RT-PCR을 이용한 cytokine 발현량 조사 .....	89
7) 대식세포의 탐식작용 측정 .....	89
8) 신호전달과정 검토 .....	91
9) Flow cytometer를 이용한 면역세포의 당단백질 발현성 검증 .....	91
10) 세포-세포간 유착반응 정량 .....	91
11) 표적 단백질의 발현량 검토 .....	92
12) NF- $\kappa$ B activity 확인 .....	92
13) 세포-fibronectin간의 유착반응 정량 .....	92
14) Flow Cytometry를 이용한 면역세포의 표현형 분석 .....	92
15) 급성독성시험 .....	93
16) 표고버섯 추출물의 항당뇨능 시험 결과 .....	95
다. 연구결과 및 고찰 .....	97
1) 세포 생존율 (cell viability) 시험 .....	97
2) 대식세포 유래 세포독성물질 Nitric oxide (NO)의 정량 결과 .....	99
3) 대식세포 유래 세포독성물질 Reactive oxygen species (ROS)의 정량 결과 .....	99
4) RT-PCR을 이용한 전사수준에서 사이토카인 발현량 조사 결과 .....	101
5) 대식세포의 탐식작용 assay 결과 .....	101
6) 대식세포의 항원공여능력 조절가능성 검토 .....	104
7) 세포유착과정 및 세포 이동 유도인자의 발현 조절가능성 검토 .....	106

8) 확인된 세포면역학적 효능과 관련된 세포내 신호전달과정 검토 .....	109
9) 대식세포 기능을 조절하는 표면 당단백질 발현 및 그들의 활성화 검토 .....	113
10) 분리정도에 따른 단백다당류의 TNF-a 분비에 미치는 효과 .....	116
11) Flow Cytometer를 이용한 면역세포의 표현형 분석 결과 .....	116
12) 표고버섯 추출물의 마우스에 대한 단회경구독성시험 .....	119
13) 표고버섯 추출물의 항당뇨능 시험 결과 .....	122
14) 표고버섯 추출물의 콜레스테롤 저하 효능 검토 .....	124
 제 3 절   기능성 가공제품개발 (협동연구과제) .....	135
가. 연구배경 .....	135
나. 연구방법 .....	138
1) 실험 재료 .....	138
2) 조청의 제조 .....	138
3) 전병의 제조 .....	139
4) 강정의 제조 .....	140
5) 건강식품의 제조 .....	142
6) 제품의 성분분석 .....	142
7) 제품의 물성분석 .....	148
다. 연구결과 및 고찰 .....	153
1) 조청 제품화 .....	153
2) 전병 제품화 .....	202
3) 강정 제품화 .....	220
4) 고부가가치 기능성 식품 제품화 .....	229
 제 4 장   목표달성도 및 관련분야에의 기여도 .....	256
 제 5 장   연구개발결과의 활용계획 .....	260
 제 6 장   연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보 .....	261
 제 7 장   참고문헌 .....	262

## 제 1장 연구개발과제의 개요

표고버섯(*Lentinus edodes*)은 담자균류강 주름버섯목 느타리과 잣버섯속에 속하는 식용버섯으로 봄에서 가을에 걸쳐 주로 온대지방의 참나무류 등 활엽수의 나무토막, 그루터기위에 단생 또는 군생하는 목재 백색부후균이며 한국, 중국, 일본, 동남아시아, 뉴질랜드 등지에 분포되어 있고, 우리나라에서 가장 많이 재배되고 있는 임산버섯 중 하나이다. 표고버섯은 수분량이 많고 각종 아미노산, 비타민, 단백질, 당질, 섬유질 효소 무기질 등의 영양학적 가치와 표고만이 가지는 독특한 향으로 천연 조미 소재로도 연구가 되어지고 있고, 식품으로서 뿐만 아니라 강장, 이뇨, 고혈압, 신장염, 신경쇠약, 불면증, 천식, 위궤양 등의 치료에 효능이 있는 것으로 알려져 있다.

표고버섯은 자실체뿐만 아니라 액체배양 배양액에서도 여러 효능을 가지는 물질이 확인되고 보고되어지고 있는데, 그 중 하나가 항산화 활성이다. 생체내 각 조직에서 활성산소의 반응물질이 증가되어 암, 당뇨, 간경화증, 심혈관계질환 등의 여러 가지 질병이나 노화를 가져오는 것으로 보고되고, 항산화물질로 표고버섯뿐만 아니라 천연물 중 생리활성 물질 탐색에 관한 연구가 이루어지고 있다. 암화 과정의 개시단계에서 발생하는 세포 돌연변이는 DNA의 산화적 손상에 의해 초래되며, 그 원인물질 중 하나가 산소를 소비하는 정상적인 세포대사과정에서도 다량 생성되는 free radical이다. 즉 친전자성을 띤 free radical들은 세포내 DNA의 친핵성 부위와 결합함으로써 세포돌연변이를 일으키게 된다. 따라서 대사과정 중 free radical 생성은 세포의 암화에 긴밀하게 연관되어 관여하는 것으로 보인다. 이를 막는 것이 항산화 활성인데, 우리가 일상적으로 섭취하고 있는 식품 재료 중에서도 항산화 효과가 있는 천연성분이 다수 보고되어 있으며, 그 중에서도 페놀성 물질은 항산화성을 가진 대표적인 물질로 보고되어 있다. 또한 이들 성분의 항산화성은 식물의 종류 및 항산화 성분의 종류에 따라 다르며, 추출방법에 따라 차이가 난다고 알려지고 있다. 현재 알려진 천연 항산화물질로는 아스코르브산, 토코페롤류, 플라보노이드와 그 유도체, 갈변반응 생성물, 아미노산 및 단백질 등으로 알려져 있다.

식용 및 약용으로 널리 이용되고 있는 버섯류도 천연 항산화 물질을 함유하고 있어 큰 관심을 끌고 많이 연구되어지고 있다. Cheung 등은 표고버섯(*Lentinus edodes*)과 풀버섯(*Volvariella volvacea*)의 페놀릭 성분과 항산화 활성을 측정하고 페놀릭 성분의 함량과 과산화지질에 대한 항산화활성의 관계를 보고하였고, Kim 등은 여러 식용버섯 추출물의 높은 항산화 활성을 확인하고 천연 항산화제

로 버섯의 효능을 보고하였다.

표고버섯의 열수 추출물로부터 얻어진  $\beta$ -1,3-gluco-pyranoside 결합을 주쇄로 하여  $\beta$ -1,6-gluco-pyranoside 분지를 가지는 다당류가 마우스에 이식한 Sarcoma-180에 대하여 항종양 활성이 인정되어 발암억제 및 면역증강 효과가 있는 것이 1970년대부터 알려져 항암활성 약리연구가 진행되고 있고, 표고버섯 자실체에서 분리한 eritadenine은 혈중 콜레스테롤 및 체중감소 및 지질 대사에 효과가 있고, 뇌중심부에 작용하여 자율신경을 안정시켜 주는 색소성분 melanin 등이 함유되어 있다는 것이 보고되고 있다.

본 연구에서는 생리활성물질로 잘 알려진 버섯유래 다당체의 대량생산 및 분리정제 공정 최적화 하는 것을 시작으로 표고버섯(*Lentinus edodes*)의 자실체로부터 추출한 다당체의 효능검색도 실시하였다. 면역효능평가로서 항암효능을 평가 하였고, 항성인병 효능 평가를 위해 항당뇨와 콜레스테롤 저하 효능을 검토하였으며, 급성독성평가로 마우스에서 체혈한 혈액을 통해서 일반증상과 더불어 생화학적 영향을 평가하였다. 이러한 결과를 바탕으로 한 생리활성효능이 검증된 표고버섯(*Lentinus edodes*) 자실체를 이용하여, 제품특성에 맞는 가공기술개발과 고부가가치제품 생산을 위한 제품제형의 검토를 하였다.

## 1) 기술적 측면

표고버섯의 부가가치 향상으로 수요 창출 및 기능성 가공제품의 다양화를 통하여 버섯재배 관련 농가소득 증대에 크게 기여 할 수 있다. 또한, 기능성을 강화시킨 고품질의 기능성 가공제품 개발을 통해 외국의 항암 및 면역계 관련 기능성 가공제품의 수입대체 효과를 이롭과 동시에 국내시장 뿐 아니라 국제시장에 수출할 수 있는 경쟁력을 갖출 것으로 기대할 수 있다. 그리고 생산 및 분리정제 공정 최적화 기술을 개발함으로써 생산비용 절감에 따른 시장경쟁력 강화 및 성인병 관련 예방식으로 섭취 가능한 기능성 식품 개발을 통하여 새로운 가공제품 시장창출과 고부가가치의 식품산업 발전에 기여하고자 한다.

## 2) 경제 산업적 측면

단백다당체를 포함한 생리활성물질의 분자량 및 구조변화를 유도하는 효소/화학적 처리기술을 개발함으로써 다양한 크기 및 형태의 생리활성물질을 확보하

여 효능적용 범위를 넓히고 보다 고효능의 생리활성물질 생산이라는 새로운 분야의 기술개발에 기여할 수 있으며, 고효능 생리활성물질 개발을 통한 기능성 가공제품의 다양화 및 산업화에 기여 할 수 있다.

최적 생산 및 분리정제 공정기술을 개발함으로써 고부가가치의 생리활성물질 생산성을 향상시켜 산업화를 이루는데 커다란 기여가 예상되며, 가공기술을 개발함으로써 고품질의 기능성 가공제품 생산성 제고 할 수 있다.

### 3) 사회 문화적 측면

최근 식생활 문화의 서구화와 외식의 증가에 따라 국민들의 영양 불균형이 초래되고 있으며, 특히 어린이들의 편식이 건강을 위협하고 포화지방산의 과도 섭취로 인해 LDL 콜레스테롤을 증가시켜 동맥경화나, 관상 심장병 등 여러 가지 성인병이 발생하고 있다. 이에 따라 항콜레스테롤이나 체지방 개선을 목적으로 한 기능성 식품 및 소재의 수요가 증가했다. 또한, 현대인의 대표적인 질병으로 인식되어 지고 있는 암과 이와 관련된 염증치료과정에서의 부작용을 최소화하고 복용이 간편한 기능성 가공제품 개발이 절실한데, 이와 관련지어 항암 등 면역활성 증대 및 항콜레스테롤등 항성인병에 탁월한 효능을 지닌 생리활성물질을 이용한 다양한 가공제품 개발은 국민건강 증진에 기여할 수 있다.

## 제2장 국내 · 외 기술개발 현황

### 1. 국내 · 외 관련 기술의 현황과 문제점

최근연구 결과에 의하면 beta-glucan과 같은 고분자 다당체들은 소장내 M cell zone을 통해 endocytosis되어 이들 세포결합체 부위에서 대식세포나 수지상세포들을 자극하거나 혈액내로 흡수되는 것으로 보고되었다. 그러나 현재까지도 흡수정도와 고분자 다당체 분자량과의 상관성은 정확히 평가되어져 있지 않다.

2001년도에 면역증강 다당류인 (1->3)- $\beta$ -D-glucan의 면역세포내 수용체가 dectin-1으로 동정된 이래 (Brown and Gordon, 2001), 이들 수용체 매개성 면역반응과 분자량과의 상관성연구 혹은 수용체 결합부위에 관한 3차원구조 해석 등의 연구들이 활발히 진행되고 있다. dectin-1은 곰팡이 감염 시 동반되는 여러 감염면역 현상을 매개하는 세포표면 당단백질로 알려졌으나 (Lipke et al., 1998), 현재는 항암면역 증진을 위한 주요 표적단백질로 인식되어 dectin-1의 기능향진을 위한 방법이나 리간드 개발 등과 같은 다양한 연구가 진행되고 있다 (Ishurd et al., 2004).

고분자 다당체들이 나타내는 여러 가지 항성인병 효과들이 보고되고 있다. 즉 beta-glucan은 serum내 콜레스테롤 수치를 낮추고 당대사를 촉진하는 효과가 있다고 알려져 있다 (Bjorklund et al., 2005; Kim et al., 2005). 따라서 표고에서 새롭게 분획되어지는 성분들이 항성인병 효능이 있는지를 평가하는 것은 표고버섯 소재를 이용한 가공식품 개발 시 매우 큰 차별화 전략 포인트가 될 것으로 판단된다. 또한 이들 소재의 효능을 극대화하기 위한 보조용 흡수 소재 개발도 활발히 진행되고 있다. 특히 나노기술을 접목하여 고분자량의 활성소재들의 세포내 운반을 촉진하는 전달소재들이 활발히 연구 개발되고 있다 (Gupta and Gupta, 2004).

### 2. 앞으로 전망

국민의 건강에 대한 인식과 삶의 질이 향상되면서 웰빙이 시대적 코드로 대두 되고 있다. 이에 따라서 건강유지와 체질개선을 위한 기능성 식품에 대한 수요가 앞으로도 계속 급증할 것으로 보인다.

따라서 건강유지를 위한 식품보조제나 질병의 치료 및 예방효과를 얻을 수 있는 생리활성물질의 생산성을 크게 향상 시킬 수 있는 기술 개발이 필요할 것

으로 전망된다.

또한 생리활성물질의 구체적인 효능연구를 통하여, 보다 정제된 고순도, 고효능 활성물질을 분리함으로써 국내에서 뿐만 아니라, 국외의 제품들과 경쟁력을 갖추어 나가는데 도움을 줄 수 있을 것이다.

### 3. 기술도입의 필요성

예로부터 표고버섯은 우리 식생활에 다양하게 이용되어 왔으며, 여러 가지 가공방법을 통하여 사용 빈도와 범위를 확장시킬 수 있는 방안이 연구되어 왔다. 그러나 전통식품 중 하나인 엇강정에 표고버섯을 첨가하여 제조하는 표고버섯강정의 제조는 수행된 바가 없다. 현재 시중에 제품화 되어 있지도 않은 실정이며 따라서 품질 특성에 관한 조사도 거의 이루어지지 않고 있으므로 적당한 가공방법의 확립과 최적의 배합비 등을 설정하여 제품화 한다면 강정에 대한 새로운 인식과 표고버섯의 소비를 촉진할 수 있는 기반의 조성, 또한 강정의 주성분인 쌀에 부족한 영양성분을 보충해줄 수 있는 역할까지 할 수 있을 것으로 생각된다.

표고버섯은 봄, 여름, 가을에 걸쳐 생산이 되며 생표고의 수분 함량은 75~90% 내외로서 쉽게 변질되므로 신선한 상태로의 장기간 저장이 어려워진다. 따라서 품질의 보존을 위해서는 적절한 건조, 저장 방법 등이 필수적으로 요구되거나 제품의 품질 감소를 초래할 뿐만 아니라 막대한 저장 비용도 감수해야 된다. 또한 최근 식생활 문화의 서구화와 외식의 증가에 따라 국민들의 영양 불균형이 초래되고 있으며, 특히 어린이들의 편식이 건강을 위협하고 포화지방산의 과도 섭취로 인해 LDL 콜레스테롤을 증가시켜 동맥경화나, 관상 심장병 등 여러 가지 성인병이 발생하고 있다.

따라서 표고버섯이 갖는 낮은 지방 함량에 의한 저칼로리 식품의 장점과, 단백질, 비타민 및 각종 무기성분이 풍부하게 함유되어 있어 건강식품으로서의 각광을 받고 있는 연중 수확이 가능한 버섯을 식품으로 이용하기 위한 적절한 가공방법을 모색하여 고부가가치를 갖는 식품으로의 개발이 필요한 실정이다.



## 제3장 연구개발 수행 내용 및 결과

### 제1절. 생리활성물질 특성분석 및 분리정제(제1세부과제)

#### 가. 연구배경

균류중 버섯은 극히 일부를 제외하고는 대부분이 담자균문(Basidiomycota)에 속하며, 담자균문 중 동포자를 형성하는 녹병균강(Uredinomycetes)과 갸부기병균강(Ustomycetes)을 제외한 자실체를 형성하는 담자균강 (Basidiomycetes)을 버섯이라고 한다. 원래 산야에 야생하고 있는데, 전 세계적으로 약 15,000여종이 알려져 있다. 그 중 식용으로 사용 가능한 것은 약 2,000여종이다. 게다가, 200여종 이상의 버섯은 야생에서 직접 채집되고 대부분 동아시아에서 전통약용으로 이용되고 있다. 최근까지 약 35종의 버섯이 상업적으로 재배되고 있고 그것들 중 20여종은 산업규모로 생산되고 있다고 한다. 버섯은 당질, 단백질, 비타민, 무기질과 같은 영양소를 일반채소류 이상으로 골고루 함유하고 있어 특유한 맛과 향기를 지닌 기호성이 높은 식품으로 예로부터 인류와 밀접한 관계를 맺고 있고, 한국에서는 신라시대부터 버섯을 이용하여 왔다(1). 예전에는 담자균류 대부분 자실체(fruiting body)를 이용하여 고체배양에 의해 재배되었다. 그러나 많은 시간과 노동력에 비해 생산량은 적어 가격이 높아지게 되었다. 하지만, 차츰 액체 배양법으로 발효조를 통한 균사체 배양을 통해 적은 시간과 노동력으로 많은 생산을 얻을 수 있어, 가격대비 경쟁력이 생길 수 있게 되었고(2-4), 액체배양물 역시 자실체와 비슷하거나 자실체와는 다른 효능이 있다는 것이 보고되어지고 있다(5,6).

효능을 갖는 대부분의 버섯에는 다당류가 존재하는데, 일반적으로 에너지 저장역할을 하는 세포내다당, 세포벽의 주요 구성성분으로 세포의 형태를 유지하는 구조다당류, 세포벽 외부의 점질 물질로서 발효중 축적되는 세포외 다당의 세 가지 형태로 구분된다. 항암활성을 가지는 것으로 보고된 버섯의  $\beta$ -glucan은 세포질이나 세포 외부공간에 저장 혹은 구조적인 목적으로 세포벽에 존재한다고 보고되어지며, 여러 버섯에서 이 물질은 *in vitro*에서 면역 유도 효과와 동물실험에서 항암활성 효과를 나타내었다고 보고되고 있다(7-16). 담자균류의 항암성분에 관한 연구는 Roland 등(17)이 *Calvatia gigantea*로부터 calvacin을 분리함으로써 시작되어, Gregory 등(18)에 의해 광범위한 연구가 이루어졌다.

Komatsu 등(19)은 *Schizophyllum commune*로부터 항암성 다당체인 schizophyllan을 분리하였고, Tsukagoshi와 Ohashi (20)는 *Coriolus versicolor*의 배양균사로부터 항암성 단백질다당체인 PS-K를 분리하였으며, Chihara 등(21)은 *Lentinus edodes*의 자실체로부터 sarcoma 180에 강력한 저지력을 지닌 다당체 lentinan을 분리정제 하였다.

## 나. 연구방법

### 1) 추출물 제조 및 수율 검토

#### 가) 용매별 추출 수율 검토

건조한 표고버섯을 분쇄기를 이용하여 분쇄한 후 분말을 각각의 용매(열수, 에테르, 아세테이트, 에탄올, NaOH)에 넣어 상온에서 추출하였다. 열수의 경우는 90℃로 유지된 항온수조에서 추출 하여 여과지(Whatman # 4)를 이용하여 여과후 각각을 동결건조 하였다.

#### 나) 열수추출 최적 수율 검토

분말화한 표고버섯을 각 온도별, 시간별로 열수추출을 수행하였다. 추출액의 분리를 위하여 여과지(Whatman # 4)를 이용하여 여과후 여과액을 농축한 후 에탄올(순도 95%이상)을 넣고 4℃에서 24시간동안 침전 대기하였다. 원심분리(6000rpm)를 통하여 상등액을 제거하고 침전물을 분리하여 소량의 증류수로 침전물을 녹인 후 dialysis tube(MWCO: 12,400 Da)에 넣고 투석을 실시하였다. 투석후 침전물을 여과하여 제거하고 동결건조하여 다당체(polysaccharide)를 최종적으로 분리하였다.

#### 다) 수용성분과 불용성분의 분리

열수 추출물을 동결건조하여 분말화 한 후 소량의 증류수로 녹인 후 원심 분리(5000rpm, 10min)한 후 침전물과 상등액을 분리하여 수용성분과 불용성분 각각의 중량을 측정하였다. 열수추출후 투석공정까지 거친 시료도 위와 동일한 방법으로 분리하여 중량을 측정하였다.

### 2) 추출물의 활성 분획 선별

각 용매별로 추출한 추출물의 수율을 검토하여 추출용매를 선택 후 최적의 수율을 만들 수 있는 공정을 검토하기 위해 30-90℃에서 4-12시간 동안 추출하였다. 추출액을 여과 후 2-5배량의 에탄올을 넣어 침전시켜 침전물을 동결건조한 후 건조한 물질을 소량의 증류수에 녹여 원심분리하여 수용성분과 불용성분으로 나눔으로써 추출물의 활성분획을 얻을 수 있었다.

### 3) 생리활성물질 성분 분석

#### 가) total sugar, uronic acid 및 Peptide 양 측정

total sugar은 glucose를 표준 탄수화물로 사용하여 phenol-sulfuric acid법으로 정량적으로 분석하였고, uronic acid 함량은 glucuronic acid를 표준물질로 하여 *m*-hydroxydiphenyl법을 이용하여 비색정량하였고, peptide는 bovine serum albumin을 표준 단백질로 하여 Bradford 시약으로 발색 반응하는 Bradford법으로 정량 분석하였다.

#### 나) 단당류 분석의 전처리 및 분석장치

추출된 물질의 단당류 분석을 위하여 추출물질 3mg을 2M TFA(Trifluoroacetic acid)에 넣고 110℃에서 4시간동안 가수분해시킨 후, vacuum distillation을 두 번 반복하여 잔류 TFA를 제거하고, 처리된 추출물질에 1 mL의 증류수에 녹인 후 0.2 $\mu$ m PTFE membrane에 여과한 후, 상등액을 10배 희석하여 20  $\mu$ l를 HPLC system를 이용하여 주입하여 분석하였다. HPLC system은 isocratic pump를 사용하였고, 이동상으로는 DI water, column 은

도는 90℃로 하여 분석하였다. 검출기는 SHODEX RI-71를 이용하였다.

다) 아미노 당(hexoseamine) 양 측정

당단백질의 중요한 성분인 hexosamine의 양 측정을 위해 p-aminobenzaldehyde시약을 이용한 Elson-Morgan법으로 측정 하였다. standard는 Glucosamine을 사용하였다.

라) helical conformation 확인

추출물이 helical conformation을 가지는지 여부를 알기 위하여 congo red 시약을 써서 NaOH를 농도별로 첨가시킨 후 최대흡광도 값의 변화로 측정하였다. 대조구로 curdlan과 dextran을 사용하였다.

마) total phenolic compound 양 측정

천연물질 중에는 여러 가지 산화방지 작용을 가지는 물질이 많은데 그중에서도 페놀성물질은 항산화성을 가진 대표적인 물질로 보고되어 있다. 표고의 total phenolic compound 양을 알아보기 위해 Folin-Denis법을 응용한 방법으로 Folin-ciocalteu's phenol reagent 시약으로 발색반응 시켜 측정하였다. standard는 gallic acid를 사용하였다.

바) 항콜레스테롤 물질의 분리

표고의 콜레스테롤저하작용을 하는 물질은 수용출액이므로 ion-exchange column 크로마토그래피를 이용하여 Amberlite IR-120에 흡착되고, 1N암모니아에 용출되어 구분에 효과가 확인되고, 염기성초산염에 침전한 구분의 효과를 이행하고, Amberlite IR-4B에 흡착되고, 0.5N 초산에 용출되어 구분에 효과가 확인된 것으로 이 IR-4B 흡착구분으로 유효물질을 분리해 보았다.

#### 4) 생리활성물질 분리정제

##### 가) 생리활성 물질의 활성분획의 분리조건 확립

각각의 실험에 사용하는 sample의 제조를 위해 건조 표고버섯 자실체를 분말화 하여 fig. 1과 같은 방법으로 각각의 분획(열수추출, 메탄올추출, 에탄올침전 후 투석까지 실행한 부분<polysaccharide>, 에탄올침전 후 단백다당체를 제외한 부분<polysaccharide-free>)으로 분리하여 동결건조 하였다.

##### 나) 각각의 활성분획의 추출수율 검토

분리해낸 각각의 분획(열수추출, 메탄올추출, 에탄올침전 후 투석까지 실행한 부분 <polysaccharide>, 에탄올침전 후 단백다당체를 제외한 부분 <polysaccharide-free>)의 추출수율을 알아보았다.

##### 다) 활성분획내 함유되어있는 phenolic compound의 함량 분석

항산화성을 가진 대표적인 물질로 보고되어 있고, 돌연변이 유발의 부작용도 없고 동맥경화와 항암 그리고 최근에는 콜레스테롤 저하효과도 있는 훌륭한 항산화제로 알려진 phenolic compound의 함량을 알아보기 위해 Folin-Denis법을 응용한 방법으로 Folin-ciocalteu's phenol reagant 시약으로 발색반응 시켜 측정하였다. standard는 gallic acid를 사용하였다.

##### 라) 활성분획의 라디칼 소거능 분석

항산화 물질의 가장 특징적인 역할 중 하나인 라디칼 소거능을 분석하기 위하여 0.1mM DPPH(methanol) 라디칼을 이용하여 발색반응 시켜 측정하였다. control로 합성항산화제로 알려진 BHT(butylated hydroxytoluene)을 사용하였다.

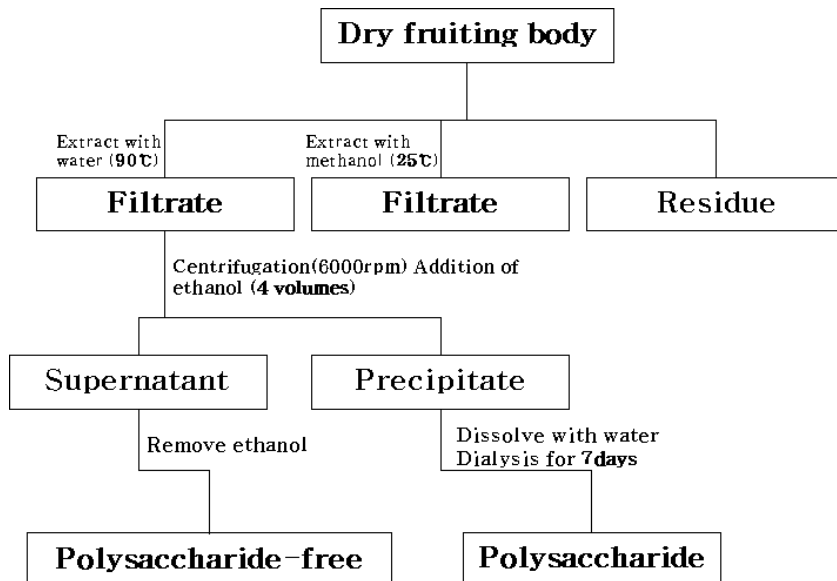


Figure 1. Extraction process of polysaccharide, polysaccharide-free

## 5) Polysaccharide 추출 및 정량

Crude polysaccharide의 추출 및 분리는 자실체를 열수추출을 통하여 행하였으며, 열수추출은 자실체 100g (dry weight)을 121 °C에서 2 시간씩 2번에 걸쳐 추출한 후, 원심분리(5000 rpm, 25 min)를 통하여 침전물을 제거하고 남은 상등액에 3배의 ethanol을 가하여 4 °C에서 24시간동안 방치하였다. 상층에 위치하는 부유된 다당체를 filter paper(whatman #4)를 사용하여 분리하고 다시 증류수로 용해한 후 rotary vaccum evaporator (N-1000, EYELA, Japan)를 이용하여 ethanol을 제거하고 다당체를 농축하였다. 농축된 시료는 dialysis tube(MWCO : 12,400 Da)를 이용하여 5일간 투석하고 동결건조하여 crude polysaccharide를 분말화하였다(Fig. 2). Polysaccharide 정량은 추출액에 3배 부피의 ethanol을 가하여 4°C에서 24시간 방치하였고, 원심분리 (6000 rpm, 20 min)를 실시한 후 filter paper(Whatman #4)를 사용하여 분리하고 60°C에서 약 24시간동안 항량이 될 때까지 건조시켰다. 건조된 조다당체(crude polysaccharide)를 desiccator에서 항량이 될 때까지 방치시킨 후 정량하여 배양액 부피당 crude polysaccharide량으로 표시하였다.

## 6) Polysaccharide 분리 및 정제

### 가) Ion exchange chromatography에 의한 분리

증류수 500 mL에 DEAE cellulose(Sigma Aldrich, U.S.A.)를 넣고 교반한 후 24시간동안 1 L 비이커에서 팽윤시켰다. 충전물의 전처리 과정은 Buchner funnel을 이용하여 증류수를 제거 후, 0.2N HCl 용액 500 mL을 가하여 교반하여 주었다. HCl 제거 후 다시 증류수로 수세하여 준 다음 0.2N NaOH 용액 500 mL을 가하여 교반하여 주었다. 상기 과정을 3회 반복 후, 최종 0.2N HCl 용액 500 mL을 가하여 교반하고 Cl<sup>-</sup> form으로 전처리된 DEAE cellulose를 glass column(2.5 X 50cm)에 충전하고 증류수 300 mL을 주입하였다. 시료 (CPF, CPB) 100 mg을 증류수 10 mL에 용해시킨 후, 원심분리(3000 rpm, 15min)를 통하여 불용성 물질을 분리하여 상등액만 주입하였다. 증류수 300 mL을 사용하여 중성 분획을 용출시켰으며, 용출 유속은 4 mL/min으로 10 mL씩 분획하였다. 증류수 용출분획은 동결 건조하여 중성 다당체(CPFN)를 분리

하였다. 반면, column에 흡착된 성분들은 0~2N NaCl 용액의 농도 구배로 용출하였다. 용출액에 포함된 NaCl을 제거하기 위해 dialysis tube(MWCO : 12,400 Da)로 5일간 투석을 실시한 후, 동결 건조하여 산성 다당체(CPFA)로 분리하였다(Fig. 3). 각 분획물의 당 분석 및 단백질 분석은 phenol-sulfuric acid method(22)와 Bradford method(23)로 각각 실시하였다.

#### 나) Gel chromatography에 의한 분자량 확인

중성분획물과 산성분획물을 분자량 크기별로 분획하고 각 분획물의 분자량을 결정하기 위해 gel filtration chromatography를 수행하였다. Sepharose CL-6B(Sigma aldrich, U.S.A.)를 증류수로 수세한 후에 glass column(2.3 X 80cm)에 충전하였다. 용출 용매는 0.5N NaCl 600 mL을 흘려주었다.

분자량 측정은 분자량을 알고 있는 표준 시료 Dextran D-670(MW 670 kDa), D-410(MW 410 kDa), D-150(MW 150 kDa), D-25(MW 25 kDa)와 blue dextran(MW 2000 kDa)을 사용하였다. 농도는 각 10 mg을 0.5N NaCl 1 mL에 용해시킨 후 원심분리(5000 rpm, 10 min)를 실시하여 불용성 물질을 제거한 후 주입하였다. 용출 유속은 2 mL/min이었으며, 5 mL씩 fraction collector(Foxy Jr., Teledyne Isco, Inc., U.S.A.)를 이용하여 분획하였다. 각 분획물의 당 측정은 phenol-sulfuric acid method를 이용하여 확인하였다. 표준 분자량 곡선은 용출 부피(mL)와 분자량(MW)을 토대로 표준곡선을 만들었다(35).



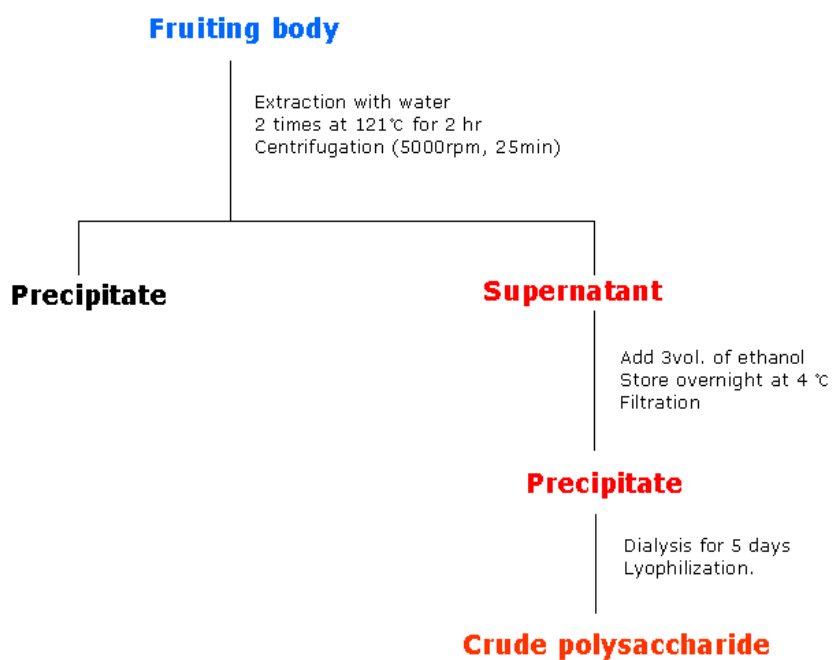


Figure 2. Extraction and separation procedures of crude polysaccharides from fruiting body of *Lentinus edodes*

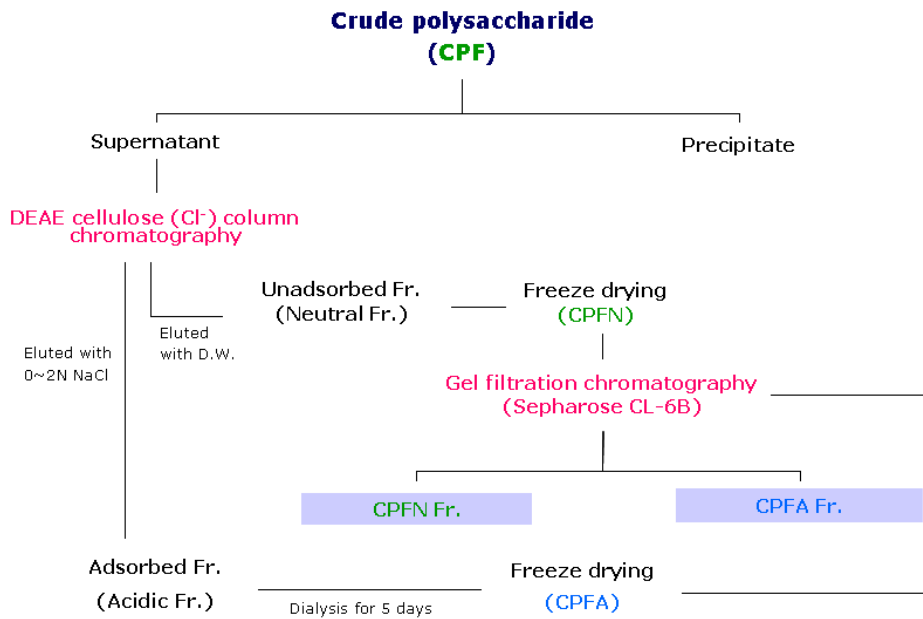


Figure 3. Isolation procedures of neutral and acidic fractions of crude polysaccharides by ion exchange and gel filtration chromatographies

각각의 시료 10 mg에 0.5N NaCl 1 mL에 용해시킨 후 원심분리(5000 rpm, 10 min)를 실시하여 불용성 물질을 제거한 후 주입하였다. 용출 유속은 2 mL/min으로 5 mL씩 fraction collector를 사용하여 분획들을 수집하였다. 용출액에 포함되어 있는 NaCl을 제거하기 위하여 dialysis tube(MWCO : 12,400 Da)로 5일간 투석을 한 후 동결건조하여 분자량을 확인하였다. 각 분획들의 당 및 단백질 분석은 phenol-sulfuric acid method(22)와 Bradford method(23)를 사용하여 측정하였다.

## 7) Polysaccharide 성분분석 방법

### 가) 총 당함량 분석

총 당의 함량은 phenol-sulfuric acid 법(22)을 사용하여 5% phenol과 sulfuric acid로 실온에서 20분간 반응시킨 후, 발색된 색을 분광광도계(GENESYS 5, Spectronic Co., U.S.A.)를 이용하여 490 nm에서 흡광도를 측정하였고, D-glucose를 standard로 이용하여 표준곡선을 작성한 뒤 비색 정량하였다. 총 당함량은 최초 시료의 농도(w/v)에 대한 당의 농도(w/v)의 백분율로 나타내었다.

### 나) 단백질의 정량

단백질 정량은 Bradford법(23)에 따라 시료를 증류수에 완전히 용해시킨 검액을 취하여 Protein assay dye reagent (Bio-Rad co.)를 사용하여 실온에서 5분 반응시킨 후, 595 nm에서 분광광도계를 이용하여 측정하였다. 증류수를 검액과 동일하게 처리하여 대조액으로 사용하였고 표준곡선 작성은 BSA(bovine serum albumin, Sigma)를 standard로 사용하였다.

#### 다) Hexosamine 함량 측정

헥소사민 정량은 Elson-Morgan 방법(36)을 사용하였고, 각 시료 5 mg을 3N HCl 1 mL에 넣고 질소 가스로 충전시킨 후 밀봉하여, 100°C에서 18시간 가수분해하고 여과한 여액을 감압 농축하여 동결 건조시켜 얻은 시료를 1mL H<sub>2</sub>O에 녹였다. 농도별 glucosamine 표준액과 시료액에 0.5 mL에 각각 시약 A-1 및 A-2를 1 mL씩 가하고 96°C에서 1시간 반응시킨 후 실온에서 방치하여 냉각 후 4 mL 96% ethanol과 1 mL 시약 B를 넣고 30분간 방치 후, 분광광도계를 사용하여 526 nm에서 흡광도를 측정하였다. 총 hexosamine의 함량은 glucosamine(Sigma, USA)을 standard로 작성한 표준곡선을 이용하여 계산하였다.

#### Reagent A

A-1 표준 glucosamine에 대한 시약 A

; acetylacetone 1.5 mL에 0.5N Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 50 mL을 첨가

A-2 시료에 대한 시약 A

; acetylacetone 1.5 mL에 1.25N Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 50 mL을 첨가

#### Reagent B

conc. HCl 30 mL에 p-dimethylaminobenzaldehyde 1.6g을 녹인 후 30 mL 96% ethanol을 첨가

#### 라) Uronic acid 함량 분석

시료중 uronic acid의 함량분석은 Blumenkrantz(37)의 방법에 준해 실시하였다. 98% 황산에 sodium tetraborate를 넣어 0.0125 M의 황산 용액을 조제한 후 분석시료와 표준물질인 glucuronic acid 및 대조구인 증류수 200 $\mu$ l와 상기 제조된 시약 1.2 mL을 첨가한 후 ice chamber에 보관하였다. 이후 100°C에서 5분간 반응시킨 후 water-ice bath에 넣어 반응을 정지시킨 다음, 0.5% NaOH 수용액에 *m*-hydroxydiphenyl을 0.15%가 되도록 조제한 용액을 20  $\mu$ l 첨가하여 진탕한 후 실온에서 5분간 방치 후 분광광도계를 이용하여 520 nm에서 흡광도를 측정하였다. 또한 각 시료에 해당하는 uronic acid를 제외한 다른 hexose와 pentose 계열의 당이 황산용액에 의해 발색되어진 흡광도를 제외시

키기 위해 0.15% *m*-hydroxydiphenyl 용액대신 0.5% NaOH를 첨가하여 520 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이후 uronic acid의 함량은 전체 흡광도에서 blank 흡광도를 빼준 값을 표준곡선을 이용하여 정량하였다. Uronic acid의 함량은 최초 시료의 농도(w/v)에 대한 uronic acid(w/v)의 백분율로 나타내었다.

#### 마) 구성당 분석

Polysaccharide의 구성당 조성비를 알아보기 위해 시료 2 mg을 정확히 칭량하여 1.5 mL microtube에 담은 후 b.p.가 비교적 낮아 산의 제거가 용이한 2M trifluoroacetic acid 1 mL을 넣어 진탕하여 녹인 후, 100 °C에서 4시간동안 산가수분해하여 완전히 monomer size로 절단한 후 vacuum distillation 장치를 이용하여 용매를 완전히 제거하였다. 용매가 제거된 시료에 1 mL의 DI water(deionized water)를 넣어 완전히 녹인 후 0.2 $\mu$ m PTFE membrane에 filtering하여 희석하여 HPLC용 시료로 사용하였다. Standard는 D-glucose, D-galactose, D-mannose, L-fucose를 사용하였다. HPLC 조건은 Table 1. 과 같다.

Table 1. Operation conditions of HPLC

Instrument	YoungLinMP30
Columns	Agilent Zorbax Cabohydrate
Flow rate	1.4 mL/min
Oven temperature	60 °C
Injection volume	20 $\mu$ l
Mobile phase(%)	Acetonitrile : DI water = 85 : 15
Detector	ELSD ZAM 3000

## 8) polysaccharide 구조분석

### 가) polysaccharide의 결합형태 분석

Crude polysaccharide와 각 분획들의 주쇄결합 형태가  $\alpha$ 결합인지  $\beta$ 결합인지를 확인하기 위해 Fungi-Fluor Kit(Polyscience, Inc., U.S.A.)를 사용하여 확인하였다. Kit는 solution A와 solution B로 되어 있으며, 증류수에 녹인 sample을 약 400  $\mu$ l를 덜어 absolute methanol을 첨가하고 vortexing 후 slide에 올려놓고 dry oven에 넣고 건조시킨다. 건조후 solution A를 두어 방울 떨어뜨려 약 3분간 염색시킨 후 증류수로 rinsing하고 UV Illuminator(Vilber Lourmat, Inc., France)에서 형광을 확인하였다.

### 나) Helical conformation 확인

자실체에서 추출된 crude polysaccharide와 각 분획들의 helical conformation의 유무를 확인하기 위하여 Ogawa와 Tsurugi(38)의 방법을 변형시켜 실행하였다. NaOH(0.01~0.5 N)에 시료 1 mg/mL의 농도로 희석시켰다. 최종농도가 0.71 mM이 되도록 0.001 N NaOH에 congo red를 녹였다. Congo red 100  $\mu$ l와 시료를 녹인 NaOH 용액 900  $\mu$ l을 잘 혼합한 후 room temperature에서 5분간 반응을 실시하고, 분광광도계(GENESYS 5, Spectronic Co., U.S.A.)를 사용하여 400~700 nm 범위에서 scan하여 최대 흡수파장을 측정하였다.

## 9) 효능분석

### 가) 항산화활성 측정

시료의 분획물에 대한 항산화 활성은 DPPH free radical의 소거활성(전자공여능)으로 검정하였다. 우선 시료의 총 페놀 함량 측정을 Singleton and Rossi(39)의 방법을 응용하여 비색정량 하였다. 시료 1 mL에 1 mL의 Folin-Ciocalteu's reagent 시약을 혼합하여 3분 반응시킨 뒤 (~10%)  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  용액 1 mL을 가하였다. 이것을 잘 혼합하여 실온에서 1시간 방치시킨 후 700nm에서 흡광도를 측정하였다. Standard는 gallic acid(Sigma aldrich, U.S.A.)를 이용하였다.

전자공여능(EDA)은 Cheung 등(31)의 방법을 이용하였다. 0.5 mL DPPH radical(0.15mM ethanol)용액에 농도별로 시료 1 mL 을 넣은 후 상온에서 vortex mixer로 잘 혼합한 후, 520nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때 전자공여능은 시료 첨가구와 무첨가구의 흡광도 차이를 다음 식에서와 같이 계산하여 백분율로 환산하여 구하였다.

● Scavenging activity (%)

$$= \left( 1 - \frac{\text{absorbance in the presence of sample}}{\text{absorbance in the absence of sample}} \right) * 100$$

나) 면역학적 효능분석

(1) NO (nitric oxide)의 측정

마우스 단핵구 기원인 Raw 264.7을 10% fetal bovine serum을 함유한 DMEM(Dulbecco's modified eagle's medium) 배지에서 배양하여 시료가 nitric oxide 생성 및 세포증식에 미치는 영향을 관찰하였다.

반응질소 대사산물(reactive nitrogen intermediates : RNI) 혹은 활성 질소인 산화물(nitro oxide : NO·), 아질산이온(nitrite : NO<sub>2</sub><sup>-</sup>) 및 질산이온(nitrate : NO<sub>3</sub><sup>-</sup>)은 세포배양액 속에 NO<sub>2</sub><sup>-</sup> 및 NO<sub>3</sub><sup>-</sup> 형태로 존재하며, 대부분 NO<sub>2</sub><sup>-</sup>의 형태로 축적된다. NO<sub>3</sub><sup>-</sup>의 측정은 환원효소로 다시 환원시켜서 측정해야 되기 때문에 이들 중에 환원반응이 필요 없는 NO<sub>2</sub><sup>-</sup>을 발색시켜서 570nm에서 ELISA 측정기로 측정하였다. Cell line은 RAW 264.7을 사용하였으며, 각각 1×10<sup>6</sup> cells/mL 농도의 세포를 18시간 CO<sub>2</sub> incubator에서 전배양한 후 각 well 중의 세포배양액을 제거하고 새로운 배양액과 시료를 처리하여 다시 30분간 배양하였다. 그 후 inducer로 LPS (lipopolysaccharide)를 2.5μl/mL의 농도로 처리하였고, inducer가 처리되지 않은 대조구 well에는 배지를 넣어 다시 24시간 배양하였다. 혼합배양한 각 well에서 100μl의 세포배양 상층액을 취하여 동량의 Griess 시약(50μl of 1% sulanilamide in 5% phosphoric acid + 50μl of 0.1% N-naphthylethylenediamine in H<sub>2</sub>O)과 실온에서 30분간 반응시킨 후 ELISA 측정기로 측정하였다. NO<sub>2</sub><sup>-</sup>의 정량은 단계회색에 의한 sodium nitrite의 표준곡선을 작성하여 정량하였다. 실험값은 평균±표준편차로 표시하였다.



(2) 면역활성과의 상관관계 분석을 위한 Acetylation 방법

시료를 1당량의 pyridine(Sigma-aldrich, U.S.A.)과 1당량의 acetic anhydride(Sigma-aldrich, U.S.A.)를 농도별로 넣고 50℃에서 가온하며 교반하였다. 이후 증류수를 가한 후 dichloromethane으로 추출하였으며, 추출된 유기층을 포화  $\text{NaHCO}_3$  수용액으로 세척한 후 유기용액에  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ 를 첨가하여 여과하였다.

## 다. 연구결과 및 고찰

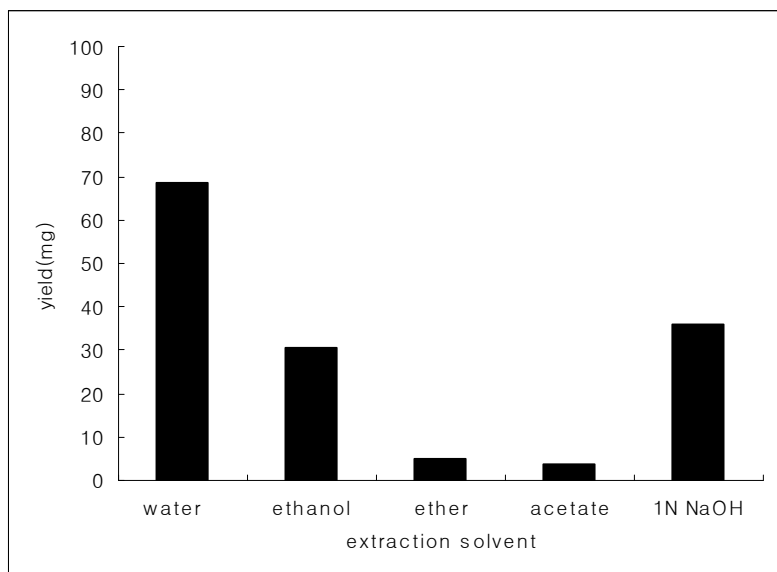
### 1) 추출물 제조 및 수율 검토

#### 가) 용매별 추출 수율 검토

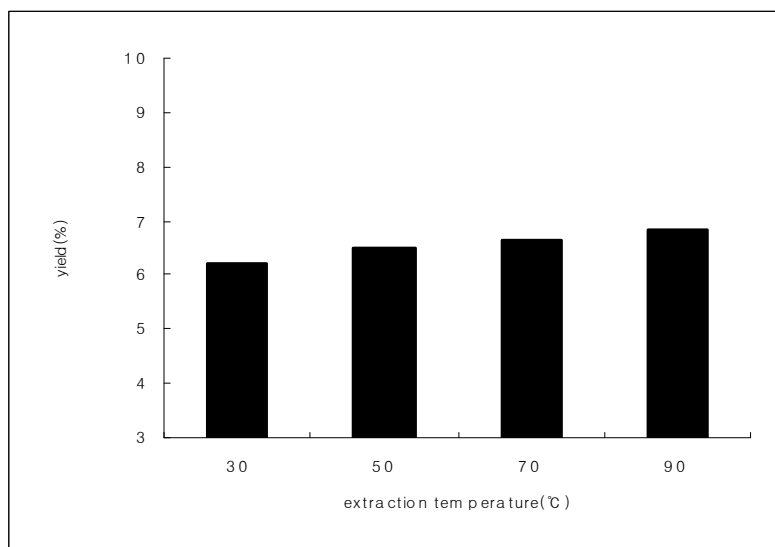
용매별 추출 수율의 결과는 Fig. 4와 같이 나타났다. 열수로 추출한 경우가 68.5mg으로 가장 높았다. 1N NaOH는 36.1mg, 에탄올은 30.7mg으로 그다음으로 높았고, 에테르와 아세테이트는 각각 5.0, 3.8mg으로 열수추출에 비해 적은 양의 추출물을 얻을 수 있었다.

#### 나) 열수추출 최적 수율 검토

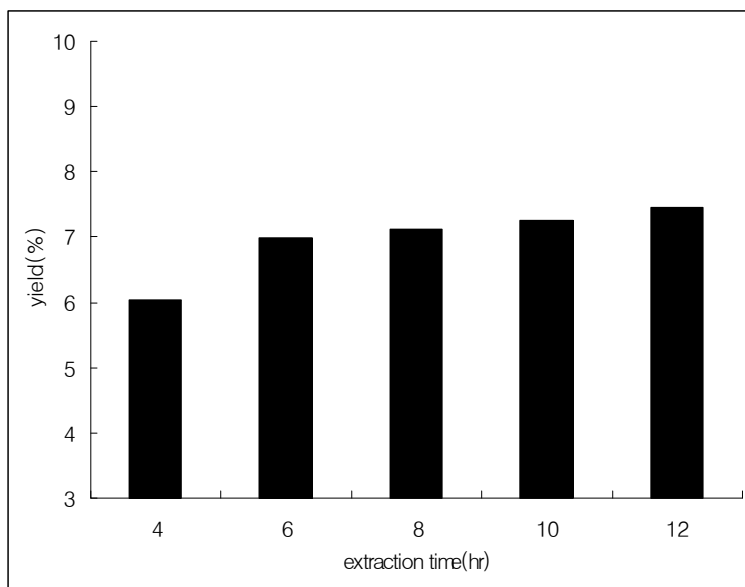
최적의 수율공정을 찾기 위해 열수추출의 온도를 달리하여 추출한 결과는 Fig. 5와 같이 나타났다. 추출온도를 달리한 결과 큰 폭의 차이는 없었으나 온도가 높을수록 추출된 다당체의 수율이 높아지는 것을 알 수 있었다. 그래서 최적 추출온도는 90℃로 결정하였다. 열수추출 시간을 달리 하였을 때(Fig. 6) 생성된 다당체의 수율은 4시간에서 생성된 양보다 12시간에서 생성된 양이 눈에 띄게 높은 것을 알 수 있었다. 그래서 최적 추출시간을 12시간으로 결정하였다. 최적 침전용매량을 결정하기 위하여 침전용매인 ethanol의 양을 열수추출 액량의 2-5배로 변화시켰을 때의 다당체의 양은 Fig. 7과 같이 나타났다. ethanol의 양이 증가함에 따라 다당체의 수율이 증가하지만, 4배 이상의 양에서는 더 이상 수율의 증가가 이루어지지 않아 최적침전 용매량을 추출액의 4배에 해당하는 ethanol량으로 결정하였다. 저분자의 불순물들을 제거하기 위한 투석공정이 필요함에 따라 최적 투석시간은 생성물에서 저분자 불순물들이 검출되지 않는 최소의 시간으로 결정하였으며, 그렇게 하기 위해 투석시간을 달리 하였을 때 다당체량의 변화는 Fig. 8과 같이 나타났다. 5일 동안 투석한 이후에는 저분자 불순물의 투석이 거의 완료되어 다당체량의 변화가 거의 없으므로 고분자량 다당체를 얻기 위한 최적 투석시간을 5일로 결정하였다.



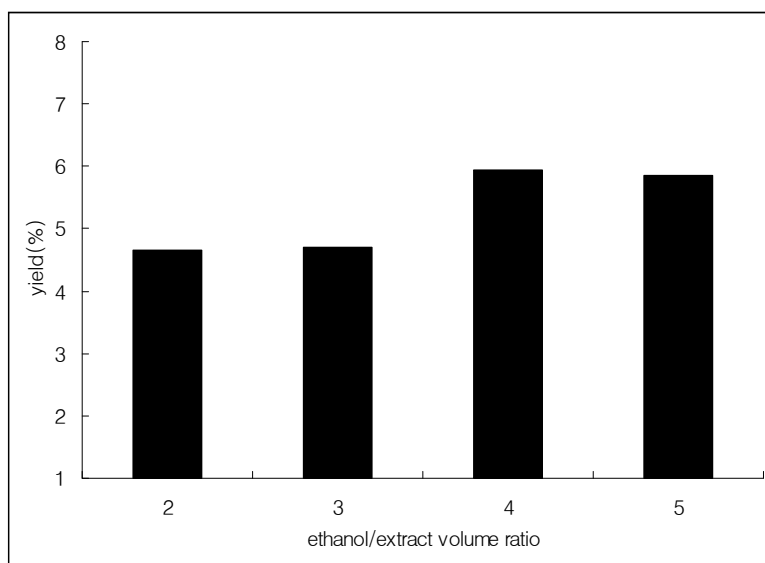
**Figure 4. Comparison of polysaccharide yields according to extraction solvent**



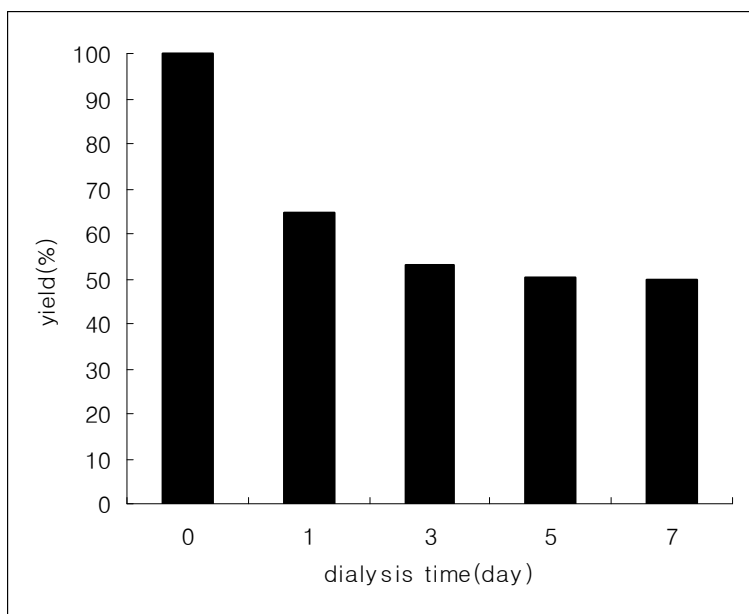
**Figure 5. Comparison of polysaccharide yields according to extraction temperature**



**Figure 6. Comparison of polysaccharide yields according to extraction temperature**



**Figure 7. Comparison of polysaccharide yields according to extraction temperature**



**Figure 8.** Comparison of polysaccharide yields according to dialysis time

#### 다) 수용성분과 불용성분의 분리

수용성분과 불용성분을 분리한 결과는 Table 2와 같이 나타났다. 열수추출물의 경우는 거의 대부분이 수용성 성분이고, 투석공정까지 마친 다당체는 수용성분과 불용성분의 비가 약 5.5 대 4.5로 나타나는 것을 알 수 있었다.

#### 2) 추출물의 활성 분획 선별

건조 표고분말 1g씩을 각 용매별로 50ml을 만든 후 추출한 결과 열수로 추출하였을 경우가 가장 높게 나타났다. 또한 다른 유기용매를 추출용매로 사용하였을 경우에는 이차적인 처리가 필요했다. 그래서 열수를 가장 좋은 추출용매로 선택하였다. 그래서 열수추출의 최적수율공정을 찾기 위해 Fig. 9와 같은 공정으로 열수추출의 추출온도를 30,50,70,90℃로, 추출시간을 4,6,8,10,12hr로, 에탄올을 침전 불륨비를 2,3,4,5배로 하여 추출을 한 결과 최적의 조건은 추출온도 90℃, 추출시간 12hr, 에탄올 침전 불륨비는 4배라는 것을 알 수 있었다. 그리고 동결건조 한 후 다시 소량의 증류수로 녹인 후 원심분리하여 수용성분과 불용성분으로 나눈 결과 열수추출의 경우는 9 : 1, 에탄올침전을 하고 투석을 한 경우는 5.5 : 4.5로 수용성분이 더 많은 비율을 차지하는 활성분획을 얻을 수 있었다.

Table 2. ratio of watersoluble component and insoluble component

	water extract		dialysis	
	supernatant	precipitant	supernatant	precipitant
weight(mg)	90.5	9.6	52	40
ratio(watersoluble : insoluble)	9 : 1		5.5 : 4.5	

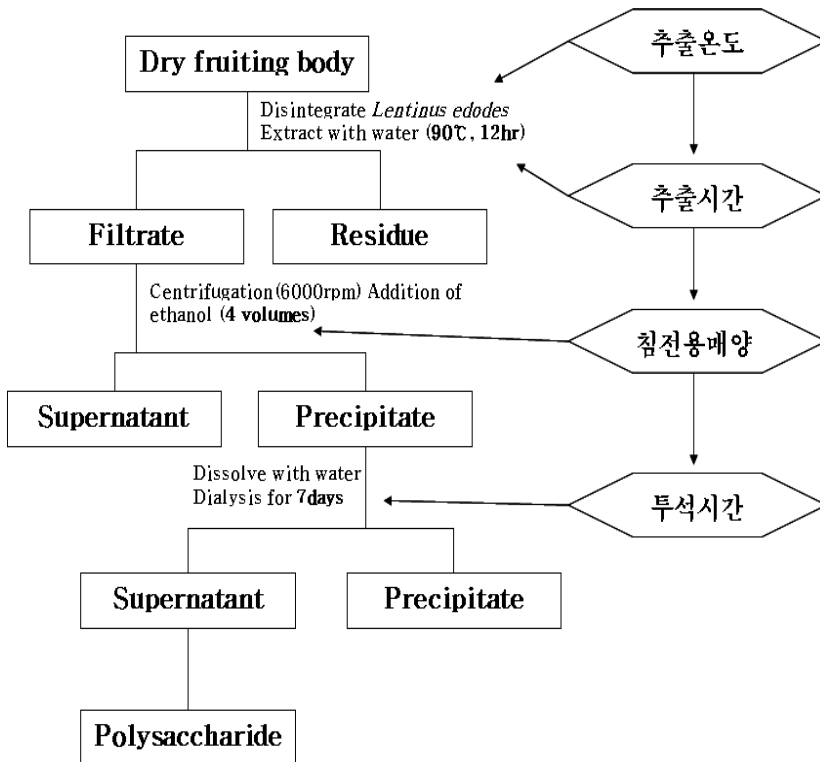


Figure 9. Optimum extraction process of polysaccharide

### 3) 생리활성물질 성분 분석

#### 가) total sugar, uronic acid 및 Peptide 양 측정

각각의 검출 방법으로 측정된 양은 Table 3와 같이 나타났다. phenol-sulfuric acid법을 이용하여 sample 200 $\mu$ l와 5% phenol solution 200 $\mu$ l를 1.5ml microtube에 넣고 교반시킨 후 진한농황산 1ml을 넣고 상온에서 10분간 반응시킨 후 spectrophotometer로 490nm에서 흡광도 값을 측정된 결과 total sugar의 양은 70.32%로 나타났고, *m*-hydroxydiphenyl법을 이용하여 sample 0.2ml에 sulfuric acid/sodium tetraborate solution 1.2ml을 넣은 후 교반하여 100 $^{\circ}$ C에서 5분간 반응시킨 후 얼음물에 식힌 후 0.15% solution of *m*-hydroxydiphenyl in 0.5% NaOH 20 $\mu$ l를 넣고 vortex mixer에 mixing을 시킨 후 spectrophotometer로 520nm에서 흡광도 값을 측정된 total absorbance에 blank absorbance값을 뺀 결과로 측정된 uronic acid 양은 0.46%, Bradford법으로 sample 800 $\mu$ l에 protein Assay Kit 과 D.W.의 비율을 각각 1:4로 한 diluted kit 200 $\mu$ l을 넣고 상온에서 5분간 반응시킨 후 spectrophotometer로 595nm에서 흡광도 값을 측정된 결과 peptide 양은 0.718%로 각각 나타났다.

#### 나) 단당류 분석의 전처리 및 분석장치

HPLC를 이용하여 flow rate는 0.4ml/min으로, 이동상은 DI water (isocratic)으로, 컬럼은 CHO-682 (resin: lead, ligand exchange)로 컬럼온도는 90 $^{\circ}$ C로 Detector는 RI(\*16), 주입량은 20 $\mu$ l로 압력은 800-810 psi로 60분간 작동하여 sample의 구조 단당류를 분석한 결과 Fig. 10과 같은 결과를 얻을 수 있었다. standard를 먼저 분석하고 sample의 peak와 면적을 비교하여 분석해본 결과 주요당은 glucose가 99.42%로 가장 많았고, manose가 0.58%로 미량 포함되어 있었다. 그리고 나머지 다른 단당류는 검출되지 않았다.

#### 다) 아미노 당(hexoseamine) 양 측정

Eloson-morgan법을 이용하여 sample 5mg에 3N HCl 1mL을 넣고 질소가스로 충전한 다음 100 $^{\circ}$ C에서 18시간 동안 가수분해하고 vacuum dry oven에서 건조시켜 증류수 1mL에 녹였다. sample과 표준 glucosamine 0.5ml에 Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 50ml이 가해진 acetylacetone 1.5mL시약을 1mL 가하고 96 $^{\circ}$ C에서 1시간 반응시



Table 3. content of Peptide, starch, uronic acid in polysaccharide

peptide(%)	0.718
starch(%)	70.32
uronic acid(%)	0.46

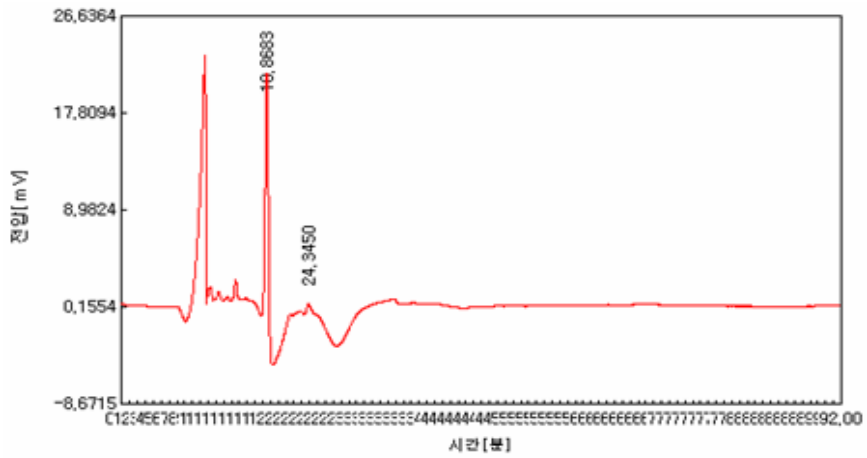


Figure 10. Constituent analysis of neutral sugar with HPLC

킨 후 상온에서 식히고 96% 에탄올 4mL과 1mL 시약(HCl 30mL 에 p-dimethylaminobenzaldehyde 1.6g을 녹인후 30mL 96% 에탄올을 가함)을 넣고, 30분간 반응시킨 후 spectrophotometer로 526nm에서 흡광도 값을 측정한 결과 Hexoseamine의 함량은  $56.5\mu\text{g}/\text{mg}$  으로 5.65%가 함량되어 있다는 것을 알 수 있었다.

#### 라) helical conformation 확인

추출한 물질에 helical conformation을 알아보기 위하여 sample에 NaOH를 0.01-0.5N로 희석 시킨 후 상온에서 하루를 방치시킨 후 0.5mg/1mL로 제조한 congo red 시약을 sample 0.9mL과 congo red 0.1mL로 혼합하여 spectrophotometer로 400-700nm에서 scan을 하여 최대흡광도 값의 변화를 살펴본 결과는 Fig. 11과 같이 나타났다. 이를 Triple helical구조를 가지고 있는 curdlan과 random coil의 구조를 가지고 있는 dextran의 흡광도 값의 변화와 비교해 본 결과 표고버섯 자실체 추출물에서 얻은 다당체에는 helical 구조가 없다는 것을 알 수 있었다.

#### 마) total phenolic compound 양 측정

Folin-Denis법을 응용하여 sample 1ml에 Folin-ciocalteu's용액 1mL을 넣은 후 10-20%의  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ 을 1mL 넣어서 vortex mixer에 mixing을 한 후 상온에서 60분간 반응시킨 후 spectrophotometer에 700nm에서 흡광도 값을 측정한 결과 total phenolic compound 양은  $15.85\mu\text{g}/\text{mg}$ , 약 1.59%가 있다는 것을 알 수 있었다.

#### 바) 항콜레스테롤 물질의 분리

항콜레스테롤 물질을 Amberlite IR-120을 더해서 진탕흡착한 후 흡착부를 1N  $\text{NH}_4\text{OH}$  로 용출하여 용출액을 모아서 감압한 후 20% 염기성초산염에 침전시킨 후  $\text{Ba}(\text{OH})_2$  용액에 처리 한 후 Amberlite IR-4B를 더해서 진탕흡착한 후 흡착부를 0.5N 아세트산으로 용출한다. 이 방법을 2,3회 반복하여 얻은 용출액을 냉동고에 방치하여 침전물을 석출하는 방법(Fig. 12)으로 콜레스테롤저해 작용이 있는 물질(Fig. 13)을 분리해 내고자 하였다.

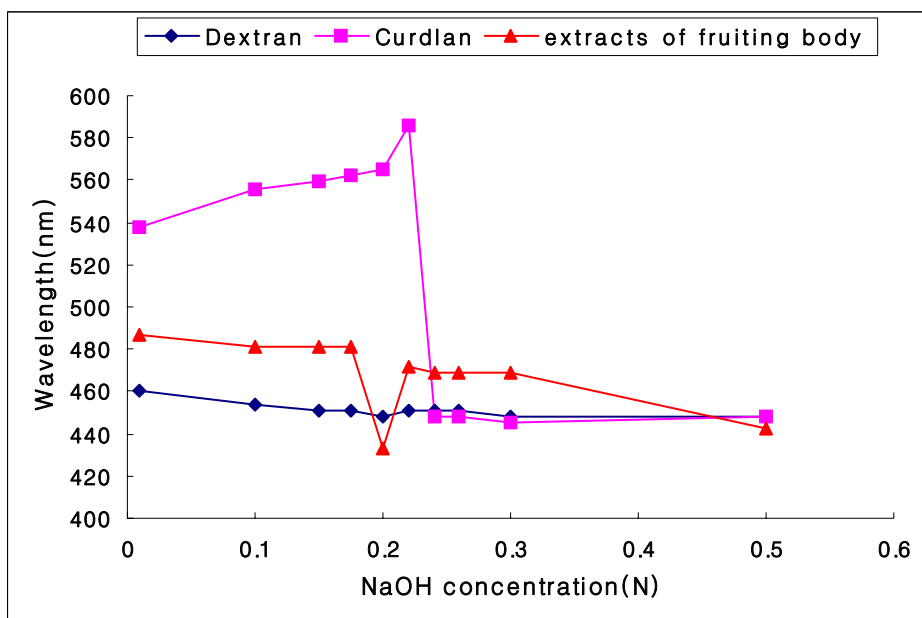


Figure 11. Change in the maximum absorption of the congo red

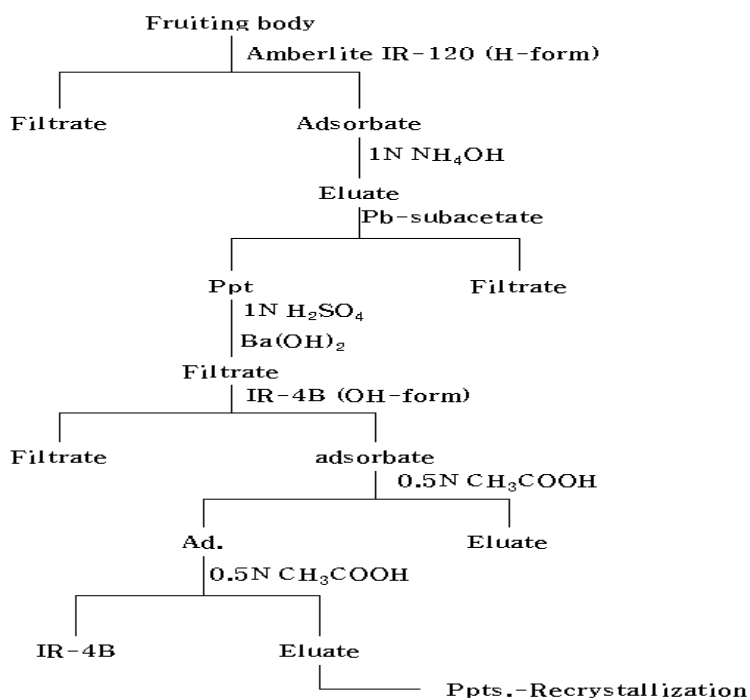


Figure 12. Separation of hypocholesterolemic substance of fruiting body

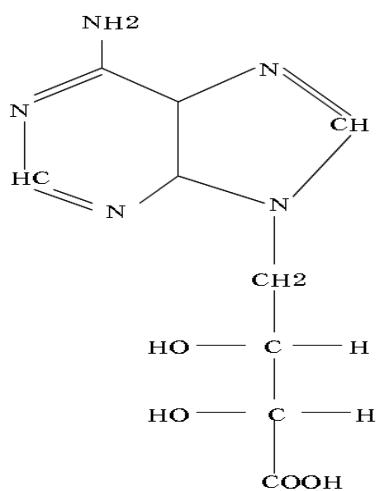


Figure 13. Hypocholesterolemic substance

#### 4) 생리활성물질분리정제

##### 가) 생리활성 물질의 활성분획의 분리조건 확립

건조 표고버섯 자실체를 분말화 하여 fig. 14와 같은 방법으로 표고버섯 분말 1g에 추출용매(water, methanol) 50mL을 넣고 water는 90℃로 methanol은 상온으로 유지된 항온수조에서 추출 하였다. 추출액의 분리를 위하여 여과지(Whatman # 4) 이용하여 여과 후 여과액을 동결건조 하였다. 또한 열수추출물은 단백다당체 부분과 단백다당체를 제거한 부분의 분리를 위해 열수추출을 수행한 추출액을 여과지(Whatman # 4)를 이용하여 여과후 여과액의 4배량의 에탄올(순도 95%이상)을 넣고 4℃에서 24시간동안 침전 대기하였다. 그리고 원심분리를 통하여 상등액과 침전물로 분리하여 상등액은 에탄올을 제거한 후 동결건조하여 에탄올침전 후 단백다당체를 제외한 부분(polysaccharide-free)을 얻었고, 침전물은 소량의 증류수로 침전물을 녹인 후 dialysis tube(MWCO: 12,400 Da)에 넣고 7일간 투석을 실시하고 침전물을 여과하여 제거하고 동결건조하여 에탄올침전 후 투석까지 실행한 부분(polysaccharide)을 분리하였다. 그래서 각각의 분획(열수추출, 메탄올추출, 에탄올침전 후 투석까지 실행한 부분<polysaccharide>, 에탄올침전 후 단백다당체를 제외한 부분<polysaccharide-free>)으로 분리하여 동결건조 하였다.

##### 나) 각각의 활성분획의 추출 수율 검토

Fig. 14와 같은 방법으로 추출한 각각의 분획을 메탄올 추출은 열풍건조를 실시하였고, 나머지 열수추출, 에탄올침전 후 투석까지 실행한 부분(poly-saccharide), 에탄올침전 후 단백다당체를 제외한 부분(polysaccharide-free)은 각각 동결건조하여 추출 수율을 알아본 결과 fig. 15와 같이 열수추출물 342mg, 메탄올추출물 284mg, 에탄올침전 후 단백다당체를 제외한 부분(polysaccharide-free) 190mg, 에탄올침전 후 투석까지 실행한 부분(polysaccharide) 62mg 으로 나타났다.

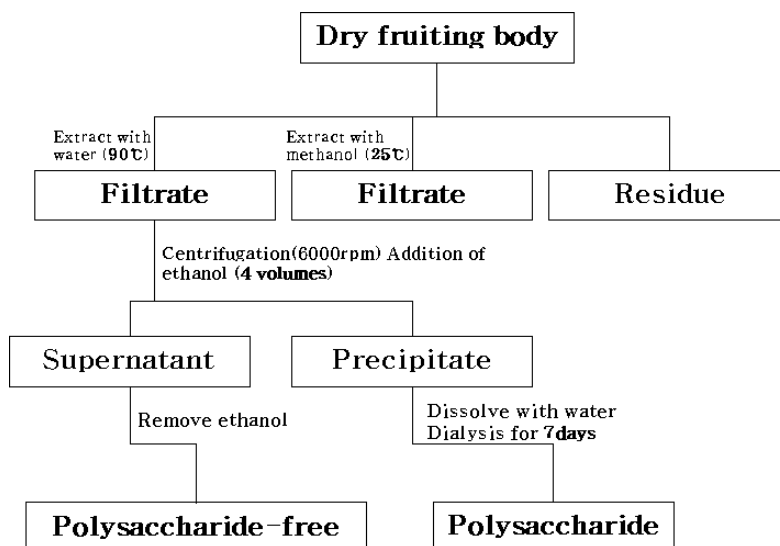


Figure 14. Extraction process of polysaccharide, polysaccharide-free

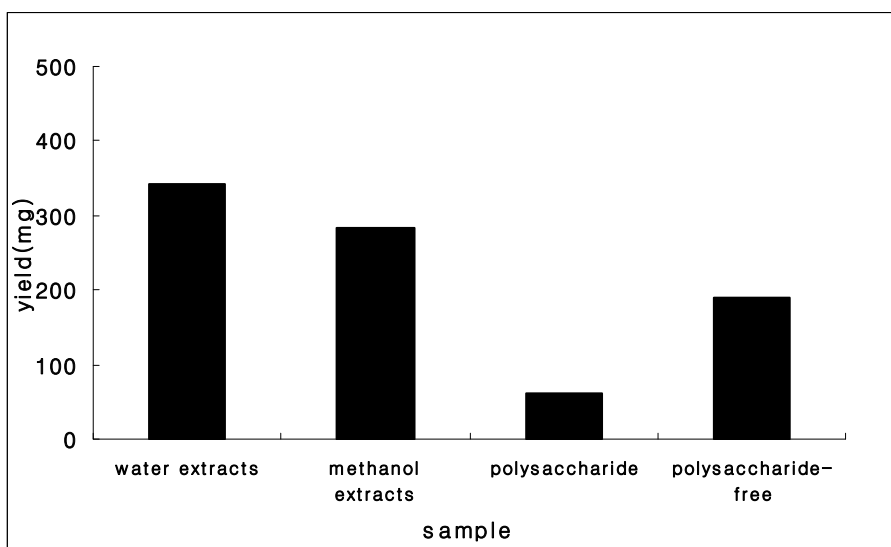


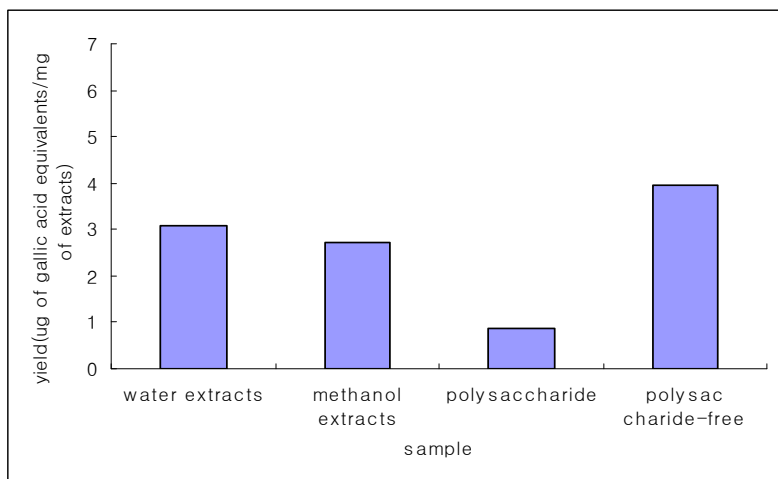
Figure 15. Comparison of extraction yields extracted by various method

다) 각각의 활성분획내 함유되어있는 phenolic compound의 함량 분석

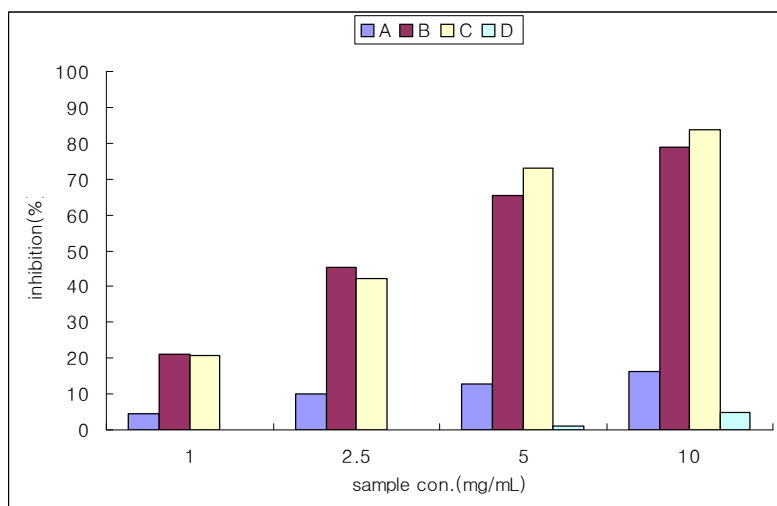
total phenolics 함량을 Folin-Denis의 방법을 응용하여 각 sample 1mL에 Folin-ciocalteu용액 1mL을 가한 후 3분 후에  $\text{Na}_2\text{CO}_3(10\%)$  1mL을 첨가하여 vortex mixer로 진탕하여 60분간 반응 시킨 후, spectrophotometer를 사용하여 700nm에서 흡광도를 측정한 결과 fig. 16 와 같이 나타났다. 에탄올 침전시 단백질다당체를 제외한 부분(polysaccharide-free)이 3.94로 가장 높은 polyphenol의 함량을 가지고 있고, 그 다음 열수추출물과 메탄올 추출물 분획이 각각 3.08과 2.73의 함량을 가지고 있었고, 에탄올침전 후 투석까지 실행한 부분(polysaccharide)이 0.85로 가장 낮은 polyphenol함량을 나타냈다.

라) 각각의 활성분획의 항산화 활성 분석

0.1mM DPPH(methanol)를 이용한 라디칼 소거능의 측정은 0.1mM DPPH(methanol) 0.5mL에 각 sample 1mL씩을 가한 후 spectrophotometer를 사용하여 520nm에서 흡광도를 측정하였다. 그 결과 fig. 17과 같이 모든 분획이 높은 농도에서 항산화 활성이 높게 나타나는 것을 알수 있었고, 그중 에탄올 침전시 단백질다당체를 제외한 부분<polysaccharide-free>)이 농도가 10mg/mL일때 83.5%로 가장 높은 항산화 활성을 갖고 있었고, 그다음으로 열수추출물, 메탄올추출물, 에탄올침전 후 투석까지 실행한 부분(polysaccharide) 순으로 높다는 것을 확인 하였다.



**Figure 16.** Comparison of total polyphenolic contents extracted by various method



**Figure 17.** Comparison of DPPH radical scavenging activity extracted by various solvents at different concentrations.

- A: water extracts
- B: methanol extracts
- C: crude polysaccharides-free
- D: crude polysaccharides



## 5) Polysaccharide의 분리 및 정제

### 가) Ion exchange chromatography

분리정제의 첫 단계로서 고정상의 해리기가 갖는 전하와 용질이 갖는 전하 사이에 작용하는 정전기적 인력을 이용한 ion exchange chromatography를 실시하여, 조다당을 중성분획과 산성분획으로 나누었다. Fig. 18은 자실체유래의 조다당을 각각 100 mg/10 mL로 증류수에 용해하여  $\text{Cl}^-$  form으로 활성화된 DEAE-cellulose resin에 주입하여 얻은 chromatogram이다.

Fig. 18에서와 같이 분리한 자실체 유래의 crude polysaccharide(CPF)에 대한 중성분획(CPFN)의 수율은 32.1 mg/100 mg, 산성분획(CPFA)의 수율은 40.4 mg/100 mg 으로 나타났다. Ion exchange chromatography를 통해 얻어진 중성 분획들과 산성 분획들은 같이 용출된 저분자의 불순물들이나 NaCl을 제거하기 위해 5일간 투석을 실시한 후 동결건조를 수행하였다. 자실체에서 분리한 crude polysaccharide는 연한 갈색 분말형태이었으나, ion exchange chromatography를 실시한 후 얻어진 중성과 산성 다당체는 모두 백색의 분말 형태이었다. 이런 것은 ion exchange chromatography에서 색소를 가지고 있는 부분이 NaCl의 농도가 높은 뒷부분에서 용출되기 때문에 제거된 것을 확인할 수 있었다(25). 이렇게 얻어진 분획물들을 Gel filtration chromatography를 실행하여 분자량별로 분획하였다.

### 나) Gel chromatography

Ion exchange chromatography를 통해 얻은 자실체와 배양여액 분획들(CPFN, CPFA)의 분자량 분포를 겔 여과 크로마토그래피로 조사하였으며, 그 결과는 Fig. 19~20과 같다. 자실체 중성분획물은 Fig. 19에서처럼 고분자와 저분자 다당체 분획 총 3종(CPFN-G-I, CPFN-G-II, CPFN-G-III)으로 확인되어 각각 수집하였고 단백질은 검출되지 않았으며, 산성분획물은 Fig. 20에서와 같이 고분자 한 분획이 확인되었고, 저분자 분획에서 미량의 다당체가 검출되었지만 그 OD값이 신뢰범위에 미치지 못해 신뢰할 수 없다고 판단하여 고분자 분획만 수집하였고, 중성과 마찬가지로 단백질은 검출되지 않았다.

Gel filtration이 수행된 시료분획에서는 모두 단백질이 검출되지 않았다. 이는 ion exchange chromatography 분획물에서 나타난 protein peak는 추출물 중에 함께 포함된 free protein이라 사료된다. 따라서 ion exchange

chromatography 실시와 투석을 거치면서 모두 제거되었기 때문이라고 판단된다. 자실체의 crude polysaccharide를 ion exchange chromatography를 거친 중성 및 산성 분획의 수율(mg/100mg crude polysaccharide from fruiting body or culture broth)과 gel filtration chromatography를 거친 각 분획들의 수율(mg/10mg CPFN, CPFA)은 각각 Table 4에 나타내었다. Table 4에서 확인할 수 있듯이 수율이 조금 좋지 않다는 것을 확인할 수 있는데, ion exchange chromatography를 거친 분획물 수율에서의 원인은 free protein이나 작은 size의 물질이 나머지 부분을 차지해서 생긴 오차로 판단되어지고, gel filtration chromatography를 거친 분획물의 수율에서는 미량을 다루는데 생기는 어려움과 동결건조과정에서 생긴 loss에 의한 오차로 판단되어진다.

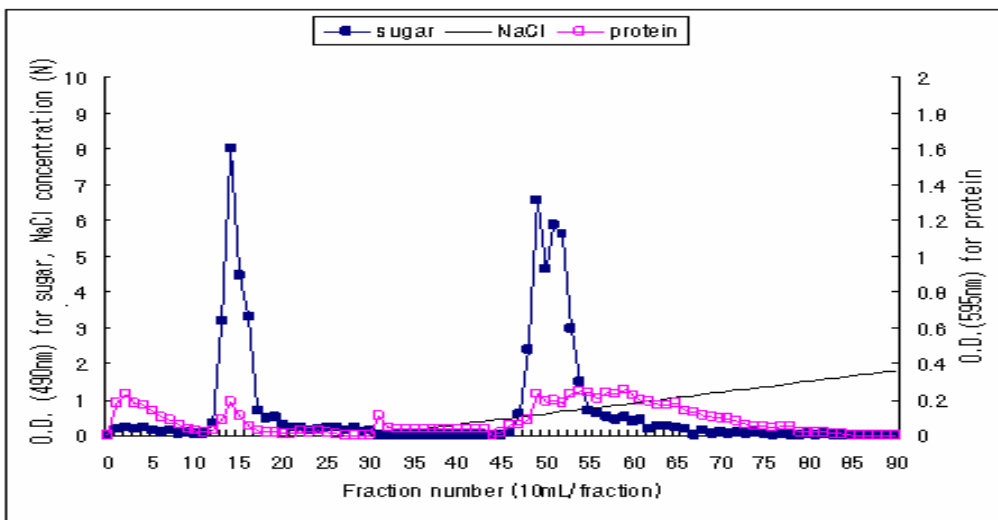


Figure 18. Ion exchange chromatogram of polysaccharide extracted from fruiting body on DEAE cellulose column

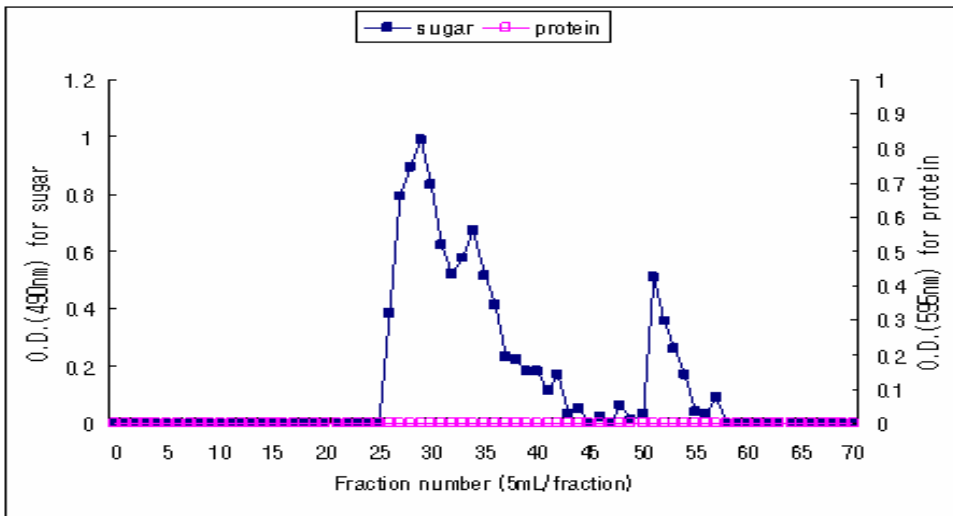


Figure 19. Gel filtration chromatogram of neutral polysaccharide fraction extracted from fruiting body on Sepharose CL-6B (Fraction number of ion exchange chromatography : 14~19)

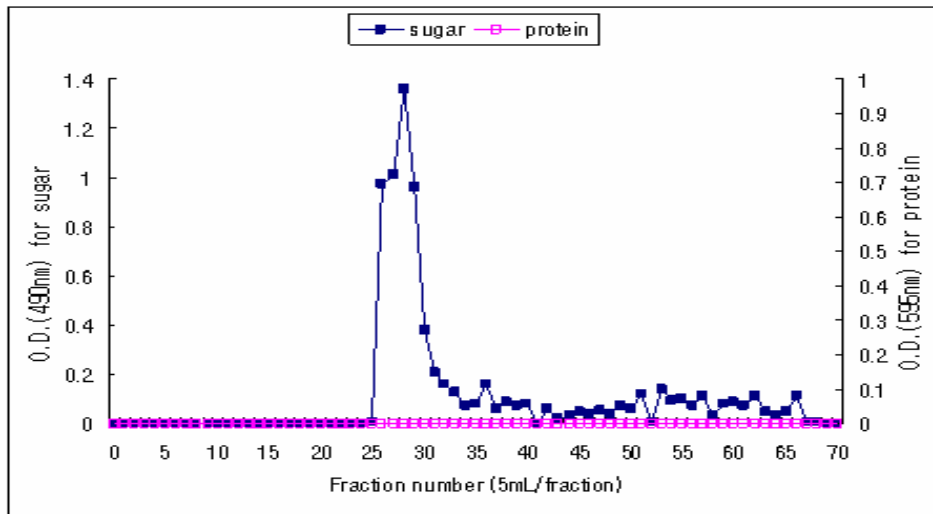


Figure 20. Gel filtration chromatogram of acidic polysaccharide fraction extracted from fruiting body on Sepharose CL-6B (Fraction number of ion exchange chromatography : 45~53)

Table 4. The yields of separated and purified polysaccharides from fruiting body by chromatography

		Yield (%)
Ion exchange	CPFN	32.1
	CPFA	40.4
Gel filtration	CPFN-G-I	34.5
	CPFN-G-II	24.5
	CPFN-G-III	20
	CPFA-G	85

\* CPF : crude polysaccharide extracted from fruiting body

CPFN : neutral fraction separated by ion exchange chromatography

CPFA : acidic fraction separated by ion exchange chromatography

#### 다) 다당체 분자량 확인

Fig. 21은 blue dextran(2000 kDa)과 standard dextran(670 kDa, 410 kDa, 150 kDa, 25 kDa)에 대한 Sepharose CL-6B 겔 크로마토그래피의 용출곡선이다. Blue dextran 및 각 standard dextran의 용출 부피는 blue dextran : 120 mL, 670 kDa : 130 mL, 410 kDa : 165 mL, 150 kDa : 210 mL, 25 kDa : 260 mL이었다. 이를 사용하여 분자량 측정을 위한 표준곡선을 작성하였으며, 이 표준곡선에 따라 각각의 중성분획과 산성분획들의 평균 분자량을 계산하여 나타낸 결과는 Table 5와 같다.

표준 용출곡선에 standard dextran을 대입하여 확인한 결과, 자실체 중성분획 1(CPFN-G-I)의 분자량은 Fr. 29를 기준으로 580 kDa으로, 자실체 중성분획 2(CPFN-G-II)의 분자량은 Fr. 34를 기준으로 308 kDa으로, 자실체 중성분획 3(CPFN-G-III)의 분자량은 Fr. 52를 기준으로 31 kDa으로 추정되고, 자실체 산성분획(CPFA-G)은 Fr. 28을 기준으로 658 kDa으로 계산되었다.

표고버섯 자실체 유래 lentinan의 경우 400 ~ 800 kDa 이고, Zheng 등(40)은 여러 효능을 지닌 자실체 열수추출 다당체가 200 kDa임을 보고하였다. 본 연구에서는 자실체 분획에서 보고와 같은 범위의 분자량을 지니는 분획 뿐 아니라 그보다 작은 분자량의 분획도 얻을 수 있었다.

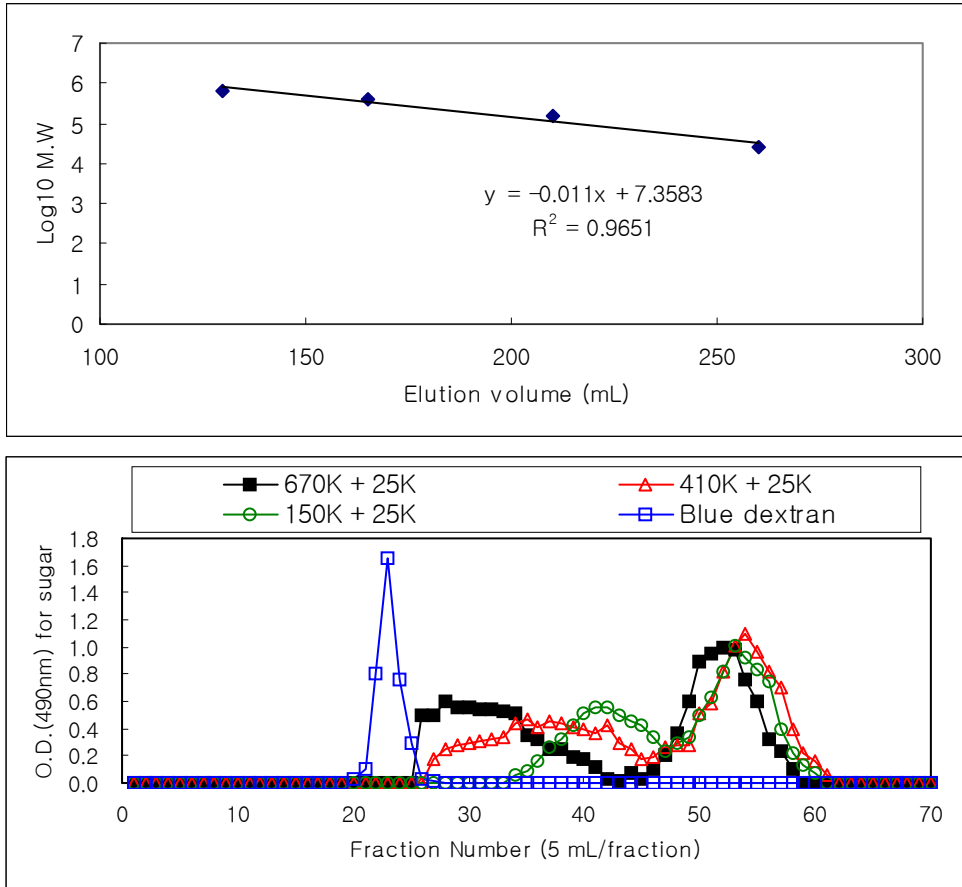


Figure 21. Molecular weights of standard dextrans by Sepharose CL-6B gel filtration chromatography

Table 5. Sepharose CL-6B elution volume and corresponding average molecular weight of purified polysaccharides extracted from fruiting body and culture broth

Fraction	Elution volume (mL)	Average MW (kDa)
CPFN-G-I	145	580
CPFN-G-II	170	308
CPFN-G-III	260	31
CPFA-G	140	658



## 6) Polysaccharide의 이화학적 특성 분석

### 가) Polysaccharide의 구성성분 분석

자실체에서 추출된 crude polysaccharide와 분리정제된 시료를 이용하여 총당, 단백질, 핵소사민 및 우론산 함량을 조사한 결과는 Table 6과 같다. 총당의 함량은 자실체에서 추출된 crude polysaccharide의 경우 72.89%로 자실체에서 비교적 높은 당의 함량을 나타내었고, 분리정제된 polysaccharide(CPFN-G-I, CPFA-G)에서는 각각 92.37%, 91.23%로 측정되었다. 이는 분리정제 과정을 거치면서 당 이외의 물질들이 거의 다 제거되고 정제된 분획물이 당으로 주성분을 이루고 있다는 것을 알 수 있었다. 그리고 자실체에서 추출된 crude polysaccharide(CPF, CPB)의 단백질 함량은 0.68%로 미미한 값이 측정되었고, 분리정제를 실시한 polysaccharide(CPFN-G-I, CPFA-G)에서는 단백질이 검출되지 않았다. 또한, crude polysaccharide(CPF)에서 핵소사민은 0.42%로 나타났으며 우론산은 3.24%의 비율로 나타났다. 분리정제를 실시한 polysaccharides(CPFN-G-I, CPFA-G)에서 핵소사민은 0.09%, 0.06%로 각각 측정되었다. 우론산은 2.24%, 2.66%로 각각 존재하였다. 산성다당체가 산성을 띠는 이유가 주로 우론산이 함유되어 있어서 산성을 띠는 것인데 본 실험에서도 산성 분획물이 중성 분획물보다 다량의 우론산을 함유하고 있었지만, 그 차이가 조금 적었다. 하지만 균주에 따라서 중성 분획물과 산성 분획물의 차이없이 전체적으로 낮은 우론산의 함량을 보이기도 한다.

HPLC에 의한 구성 단당류의 정성결과는 HPLC chromatogram에서 나오는 peak의 면적을 적분하여 구성당의 비율로 나타내었다. Fig. 22는 자실체에서 추출된 crude polysaccharide(CPF)와 분리정제를 실시한 polysaccharide(CPFN-G-I, CPFA-G)를 분석한 결과이다. Standard의 경우 fucose는 13.6817분에 mannose는 25.1883분에 glucose는 28.1650분에 그리고 galactose는 32.6167분에 각각 peak를 형성하며 나타났다.

자실체유래의 분획물(CPF, CPFN-G-I, CPFA-G)은 모두 glucose만으로 구성단당이 존재하는 것을 확인할 수 있었다. 구성단당류의 확인결과 자실체에서는 주요단당이 glucose로 이루어진 다당체임을 확인할 수 있었다.

본 연구에 쓰여진 분리정제된 시료에는 다른 연구에서 분리된 다당체와 다르게 자실체 유래에서 glucose만으로도 그 면역활성 능력이 높음을 확인할 수 있었다. (26,27)

Table 6. Proximate compositions of crude and purified polysaccharides extracted from fruiting body and culture broth

Samples	Contents(%)			
	Sugar	Protein	Hexosamine	Uronicacid
Extracts of fruiting body (CPF)	72.89	0.68	0.42	3.24
CPFN-G-I	92.37	0	0.09	2.24
CPFA-G	91.23	0	0.06	2.66

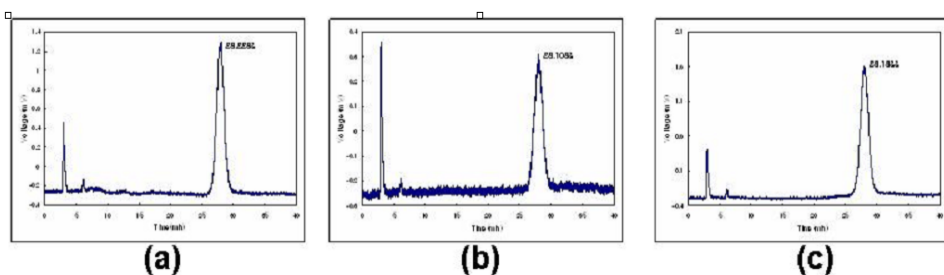


Figure 22. Monosaccharide compositions of polysaccharides  
 (a) CPF, (b) CPFN-G-I, (c) CPFA-G

## 나) Helical conformation 확인

Polysaccharide의 입체구조(helical conformation)를 어떻게 제어하는가는 BRM(Biological response modifier)으로 활성을 평가하는데 있어서 중요한 문제로 인식되고 있다. 일반적으로 polysaccharide의 입체구조는 triple helix, single helix, 그리고 random coil의 구조로 되어 있다. 이런 여러 구조 중에서 3중 나선 구조(triple helix)가 가장 안정적이며, 물리·화학적 처리로 triple helix에서 random coil로, random coil에서 single helix로 바뀌어 질 수 있다. Single helix는 가장 불안정한 상태로 상온에 두면 시간이 지나면서 점차 triple helix로 바뀐다고 보고되어 있다(41). Fig. 23은 일반적으로 알려진 triple helical conformation의 상변화를 나타내었다(42).

Fig. 24는 triple helix를 알칼리로 처리하여 구조변화를 유도시켜 congo red 시약을 처리하여 반응시킨 후, 분광광도계를 이용 400~700 nm 파장범위에서 scan하였으며, 최대 흡광도를 측정함으로써 polysaccharide 구조변화의 특징을 간접적으로 검토한 결과이다. 즉, 최대 흡광도 변화(wavelength shift)는 triple helical conformation에서 random coil 구조로 변화됨을 의미하며 polysaccharide의 triple helix의 유무를 확인할 수 있다. Random coil의 구조인 dextran의 경우 최대 흡광도가 450 nm 내외의 범위에서 변화가 없었으며, triple helical conformation이라고 알려진 curdlan의 경우 0.24N NaOH에서 최대 흡광도가 변화하는 것을 확인하였다. 하지만 또 다른 triple helical conformation으로 알려져 있는 larminarin은 흡광도가 580 nm 내외로 변화하지 않았다(28). 이는 curdlan이 larminarin에 비해 낮은 농도의 NaOH에서 denature가 잘 이루어지는 것으로 보아 보다 쉽게 triple helix가 열리는 구조를 가진 것으로 판단되어진다.

자실체에서 추출한 crude polysaccharide(CPF)와 이를 분리 정제한 CPFN-G-I를 검토해본 결과 자실체에서 추출한 경우 crude polysaccharide(CPF)는 random coil 영역 부근에서 흡광도가 관찰되었고, 분리정제된 시료(CPFA-G) 역시 유사한 영역에서 흡광도를 나타내었다. 이로부터 자실체 추출물 유래 다당체는 random coil의 구조라는 것을 간접적으로 확인할 수 있었다.

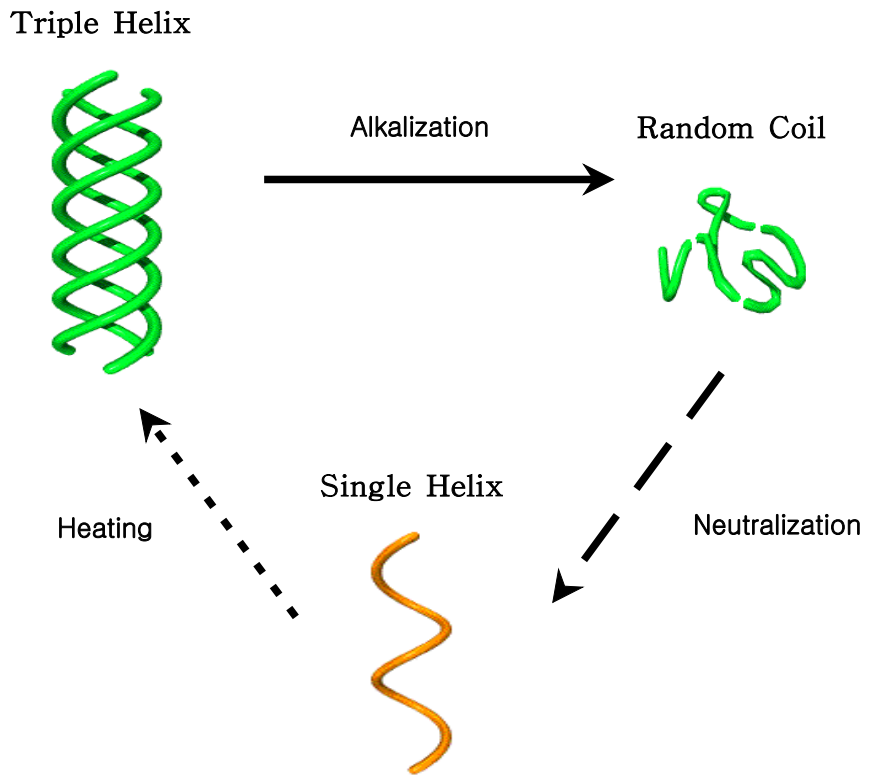


Figure 23. Changes of triple helix conformation

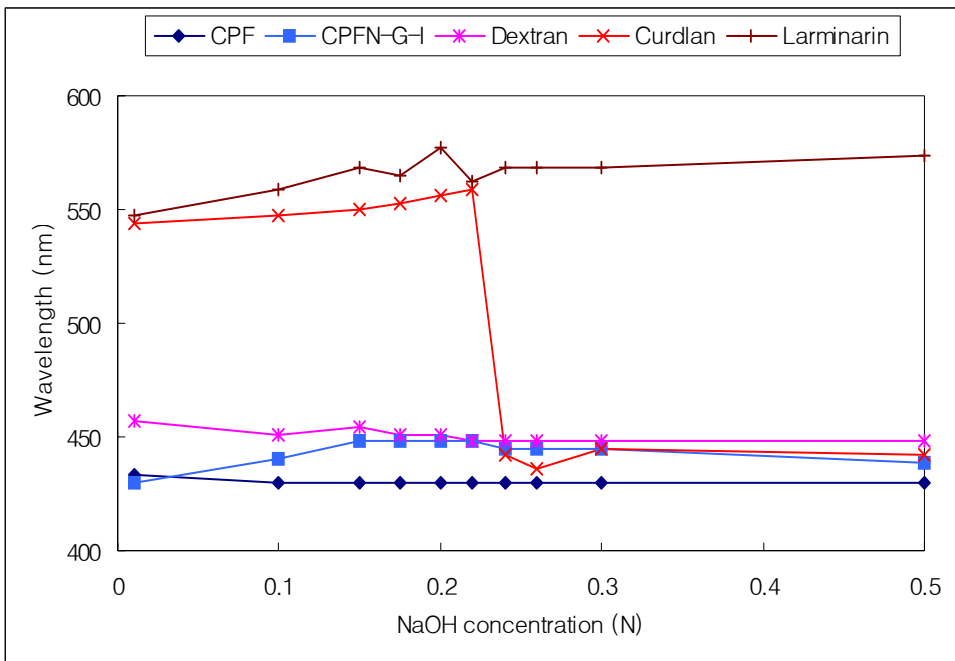


Figure 24. Change in the absorption maximum with congo red

#### 다) Polysaccharide의 결합형태 분석

Fig. 25는 Fungi-Fluor Kit(Polyscience, Inc., U.S.A.)를 사용하여 자실체에서 추출한 crude polysaccharide와 분리정제된 polysaccharide의 결합형태를 확인한 결과이다. Fungi-Fluor Kit에서 사용되는 solution A는 증류수에 용해시킨 고순도 Cellufluor의 clearing agent로서 potassium hydroxide를 첨가시킨 용액으로 주로 곰팡이나 박테리아 유래 다당류의  $\beta$ 결합에 비특이적으로 반응하여 형광을 나타내는 것으로 알려져 있다(28).

각 시료(CPF, CPFN-G-I, CPFA-G)를 증류수에 녹인 후 slide에 올려놓고 dry oven에서 건조시킨 후 absolute methanol을 넣고 다시 건조시킨다. Solution A를 각 시료에 2~3 방울 넣고 약 3분간 room temperature에서 반응시키고 rinsing한 후 UV에서 관찰하였다. 그 결과,  $\alpha$ 결합으로 알려진 dextran에서는 형광이 전혀 보이지 않았고,  $\beta$ 결합으로 알려진 curdlan에서는 뚜렷하게 형광이 관찰되었다. 또한 CPF에서 curdlan 보다는 약하지만 그래도 뚜렷한 형광이 관찰되어  $\beta$ 결합으로 존재하는 것을 확인하였다. 또한 분리정제된 시료(CPFN-G-I, CPFA-G)인 자실체 추출 분획에서 뚜렷하게 형광이 관찰되었다. 위의 결과로 *Lentinus edodes*의 crude polysaccharide뿐 아니라 정제한 시료들도 curdlan과 유사한  $\beta$ 결합을 가지고 있다는 것을 간접적으로 확인할 수 있었다.

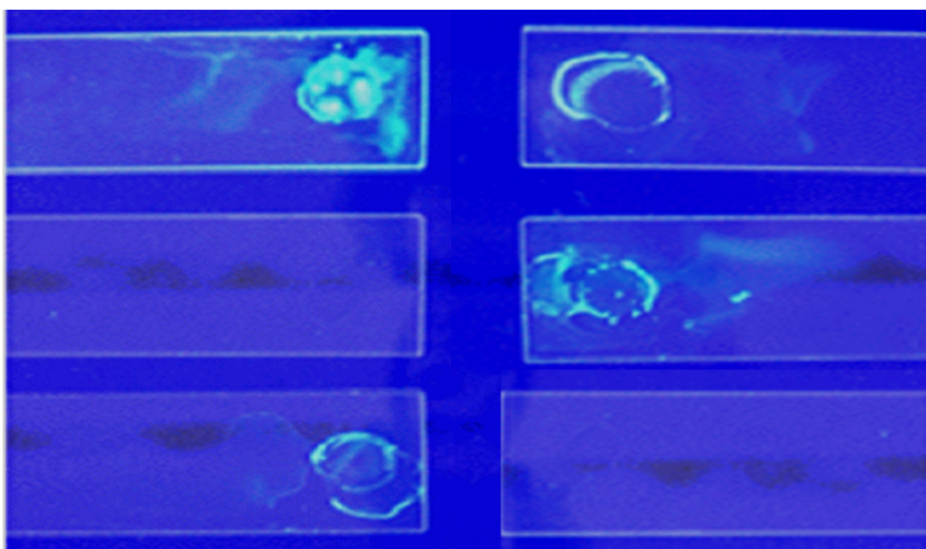


Figure 25. Visualization of  $\beta$ -linked polysaccharides by use of Fungi-Fluor Kit

- (A) curdlan (B) dextran (C) CPF  
(D) CPFN-G-I (E) CPFA-G (F) Blank

## 7) 효능분석

### 가) 항산화활성

페놀성 물질들은 녹차의 catechin류의 구조를 단량체로 볼 때, 이와 유사하거나 동일한 화합물의 polymer로 구성되어 있다고 볼 수 있다. 항산화 효과에 대한 측면에서 총 페놀 함량과 항산화 효과는 밀접한 관계가 있는 것으로 보고되고 있다(29~32). 전자공여능(EDA)은 지질 과산화 반응의 연쇄반응에 관여하는 산화성 free radical에 전자를 제공하여 연쇄반응을 반응초기나 반응중간에 정지시키는 능력이다. DPPH법은 항산화물질의 전자공여능으로 인해 방향족 화합물 및 방향족 아민류에 의해 환원되어 짙은 보라색이 탈색되는 정도를 나타내는 것으로 이런 항산화능을 나타내는 척도가 된다고 알려져 있다.

각 분획물(CF, CPF, CPF-Free)의 총 페놀 함량을 측정한 결과는 Fig. 26과 같다. 각 분획물 중 페놀 함량이 가장 높았던 것은 열수 추출한 crude 자실체(CF) 분획과 crude 자실체에서 crude polysaccharide(CPF)를 제거한 나머지 부분(CPF-Free) 분획으로 2~3%정도의 함량을 나타냈는데, 이는 Yang 등(43) 및 Cheung 등(31)이 보고한 표고버섯이나 타 버섯류의 페놀 함량에 비해 2배정도 높은 함량을 나타내었다. Crude polysaccharide(CPF) 분획은 아주 낮은 함량을 나타내었다.

또한 각 분획물의 항산화 활성을 DPPH법에 의해 측정한 결과는 Fig. 27과 같이 나타냈다. DPPH에 의해서 생긴 라디칼을 얼마나 많이 소거하는가에 따라 흡광도 값에 차이가 나는데 그 정도에 의해 항산화 활성의 좋고 나쁨을 나타내는 것이다. 자실체 crude 추출물(CF)과 자실체 유래 polysaccharide-free (CPF-Free) 분획이 각각 52%, 57%로 비교적 높은 활성을 나타내었다. 자실체의 crude polysaccharide 분획은 모두 낮은 값으로 낮은 항산화활성을 나타내었다. 이는 Kim 등(32) 및 Cheung 등(31)이 보고한 표고나 타 버섯류의 DPPH 라디칼 소거능과 비슷한 항산화활성을 보였다. 하지만 control인 BHT와 ascorbic acid에 비교하여 보면 낮은 활성을 보였는데, 이는 버섯 추출물의 경우 단일 성분이 아니라 여러 가지 활성물질이 공존하여 이들의 상호작용에 의한 결과라고 보고한 Kim 등(32)과 비슷한 원인에 의한 것이라 생각된다. 본 실험에서 total polyphenol의 함량이 많을수록 항산화 활성이 좋아지고 total polyphenol의 함량이 적을수록 항산화 활성이 작아지는 양상을 보이는 것으로 보아 본 균주의 항산화 활성을 띠는 유효물질은 페놀성 물질로 판단되어진다.



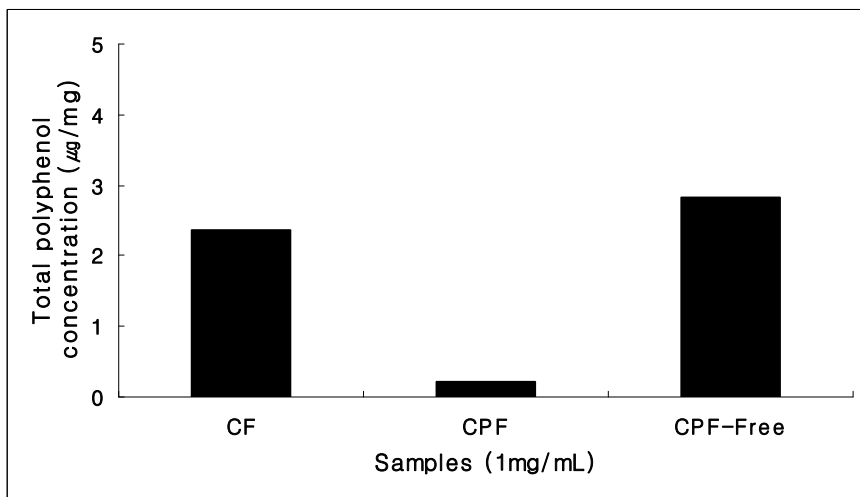


Figure 26. Comparison of total polyphenolic contents extracted by various fractions

CF : Crude extract of fruiting body

CPF : Crude polysaccharide of fruiting body

CPF-Free : Crude extract except crude polysaccharide of fruiting body

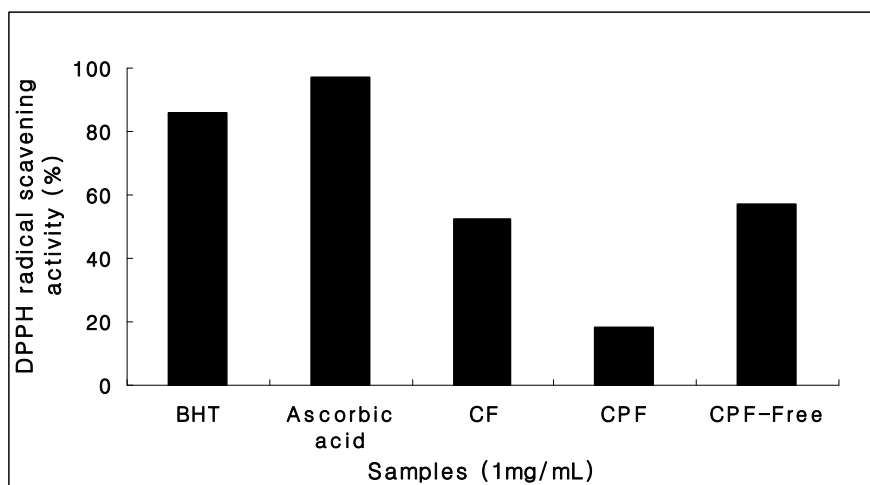
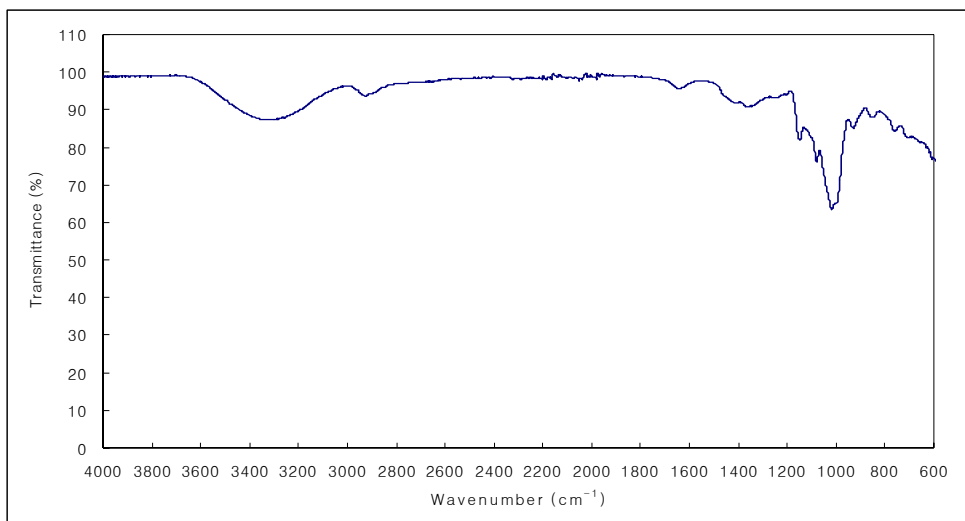


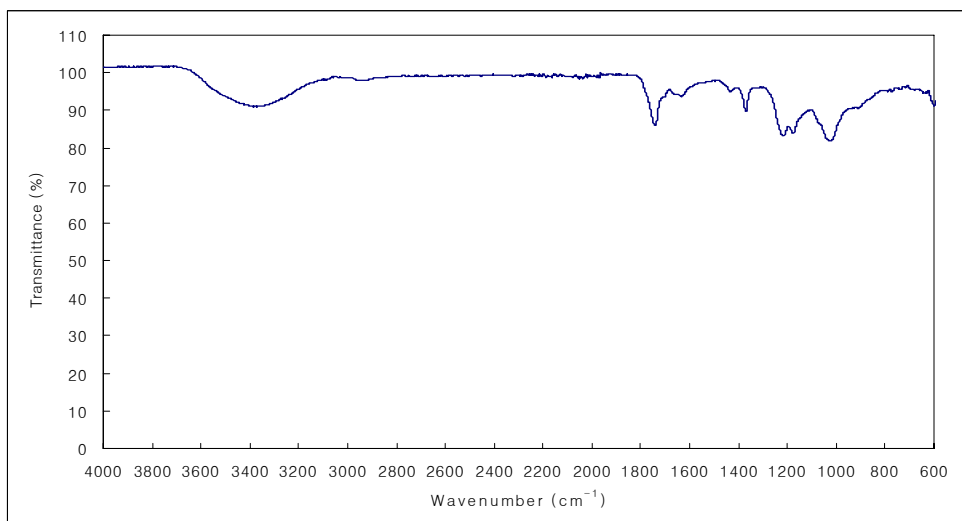
Figure 27. Comparison of DPPH radical scavenging activity extracted by various fractions

## 나) Polysaccharide의 구조적 특성과 면역활성과의 상관관계

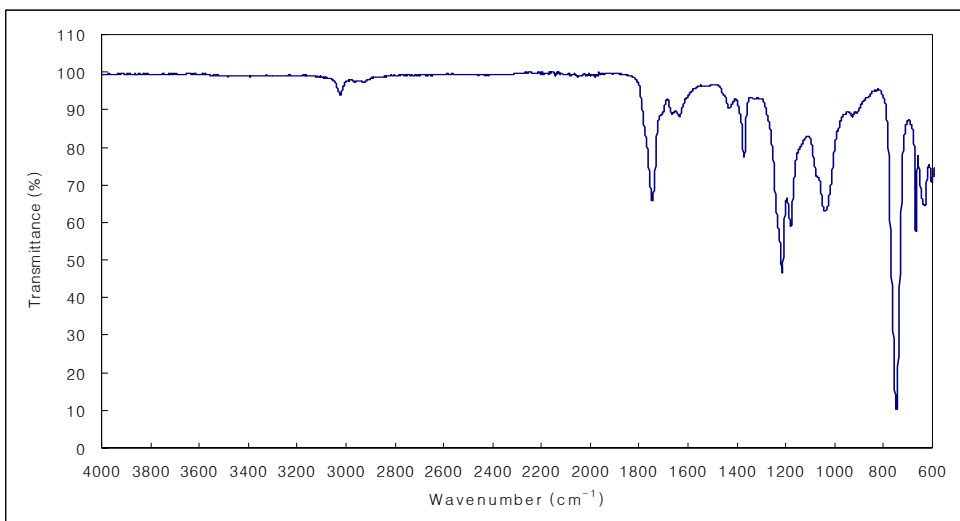
항암에 큰 효능을 보여 암 대응 건강식품으로 주목 받고 있는 AHCC와 알로에에서 추출된 면역활성 및 항암에 효능이 있는 acemanman은 각각  $\alpha$ -glucan과 mannan이 아세틸화된 구조이다(33,34). 이점을 착안하여 면역활성 효능이 있는 다당체 분획을 아세틸화를 시켜서 아세틸화 정도에 따른 면역활성의 변화를 실험하였다. LECP (*Lentinus edodes* crude polysaccharide) 시료를 acetylation 방법으로 아세틸화시킬 때 acetic anhydride의 첨가량을 각각 0, 0.1, 0.3, 0.6 mL로 첨가하여 아세틸화의 정도를 달리하였다. Fig. 28~31은 아세틸화가 된 것을 FT-IR로 확인한 그림이다. 아세틸화 전에는 당류 구조에 존재하는 O-H stretching 흡수피크가  $3200\text{cm}^{-1}\sim 3400\text{cm}^{-1}$ 에서 broad하게 나타났으며,  $2800\text{cm}^{-1}\sim 3000\text{cm}^{-1}$ 에서 C-H stretching 흡수피크,  $1080\text{cm}^{-1}\sim 1100\text{cm}^{-1}$ 에서 C-O stretching 흡수피크를 나타내고 있어 당 고리구조의 전형적인 작용기들을 확인할 수 있었고, 아세틸화 후  $3400\text{cm}^{-1}$ 에서 나타나는 O-H stretching 흡수피크가 일정량 사라지고  $2800\text{cm}^{-1}\sim 2900\text{cm}^{-1}$ 에서 C-H stretching 흡수피크,  $1080\text{cm}^{-1}\sim 1100\text{cm}^{-1}$ 에서 C-O stretching 흡수피크들이 상대적으로 증가하는 것을 확인하였고,  $1750\text{cm}^{-1}$  부근에서 C=O stretching 흡수피크를 확인함으로써 분획들이 아세틸화가 진행되었다는 것을 알 수 있었다. 아세틸화가 되었을 때의 예상되는 구조는 Fig. 32와 같을 것이라고 생각된다. Fig. 33은 각각 아세틸화된 시료의 NO 생성량을 나타낸 결과이다. 전체적으로 NO 생성량이 낮은 것을 알 수 있는데 이는 아세틸화된 시료를 용해하는데 있어서 소량의 DMSO를 사용하였는데, 이 용매가 NO 생성에 있어서 저해제로 작용한 것이라고 판단된다. Fig. 33의 결과를 보면 아세틸화를 진행시킨 분획물(B, C, D)이 아세틸화가 되지 않은 시료(Normal, A)보다 NO 생성량이 높게 나타난 것을 볼 수 있다. 그리고 아세틸화가 진행될수록 NO 생성량도 높아진다는 것을 확인할 수 있었다. 그 중에서도 시료 중에 가장 많이 아세틸화가 진행된 분획물(D)에서 가장 많은 NO 생성량을 보였다. 이는 host immune system에서 가장 좋은 효과를 얻을 수 있는 가능성을 제시하였다.



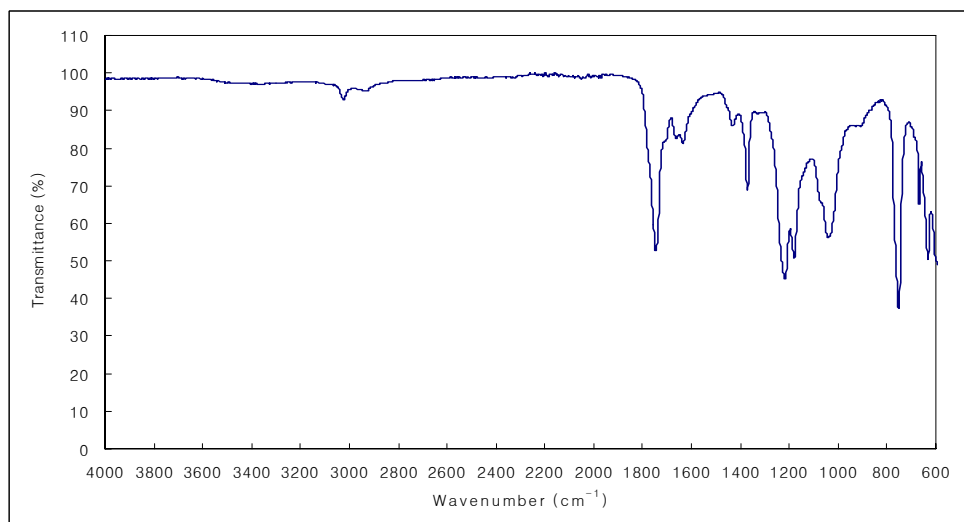
**Figure 28.** FT-IR spectra of non acetylated crude polysaccharide



**Figure 29.** FT-IR spectra of acetylated crude polysaccharide added 0.1 mg/mL acetic anhydride



**Figure 30.** FT-IR spectra of acetylated crude polysaccharide added 0.3 mg/mL acetic anhydride



**Figure 31.** FT-IR spectra of acetylated crude polysaccharide added 0.6 mg/mL acetic anhydride

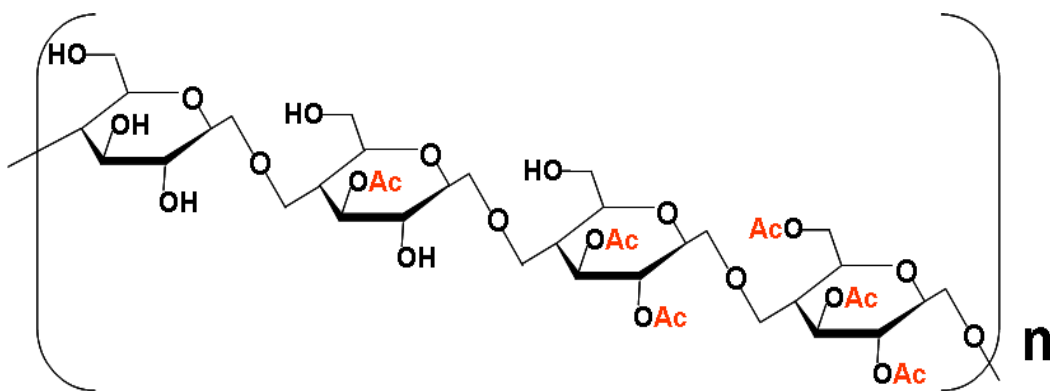


Figure 32. Expected structure of acetylated glucan

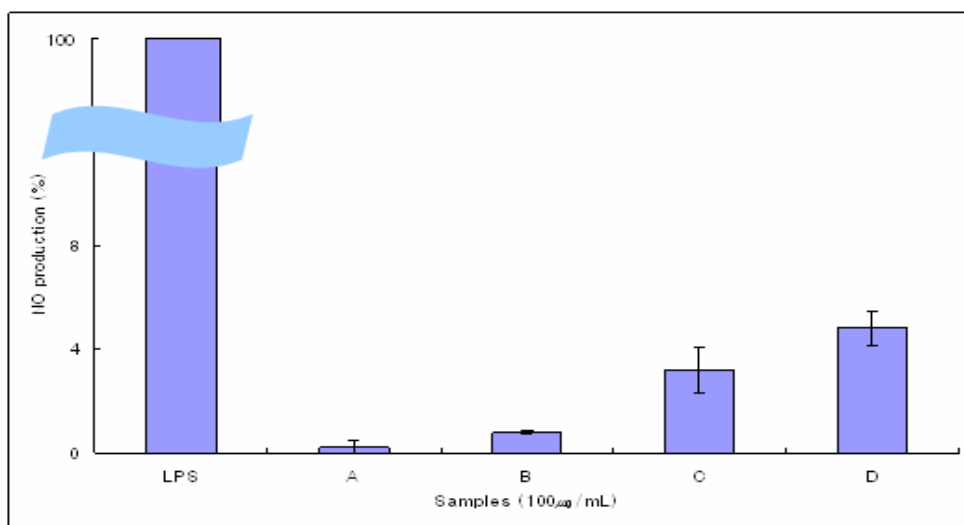


Figure 33. The effect of degree of acetylation on NO synthesis in murine macrophage cell

A : Non acetylated CP

B : Acetylated CP added 0.1 mg/mL acetic anhydride

C : Acetylated CP added 0.3 mg/mL acetic anhydride

D : Acetylated CP added 0.6 mg/mL acetic anhydride

## 제 2 절 생리활성물질 효능평가 (제2세부과제)

### 가. 연구배경

면역반응은 크게 innate immunity와 adaptive immunity로 구분된다. innate immunity는 주로 대식세포나 수지상세포와 같은 탐식세포에 의해 매개되며 주로 분비되는 독성물질 및 complement나 defensin과 같은 방어용 단백질 등에 의해 유입된 병원성 물질 (세균이나 바이러스 등)들을 제거시키는 작용을 하는 즉시형 반응이다. 반면에 adaptive immunity는 innate immunity에 의해 활성화된 antigen-presenting cells들이 항원을 가공하여 MHC class II나 I과 같은 분자위에 공여함으로써 이에 선택적인 반응을 하는 TCR (T cell receptor)을 가지고 있는 T cell들이 분열을 이루고 관련 면역반응을 유도하는 지연성 반응이다. 특별히 innate immunity는, 대식세포와 같은 탐식세포가 pattern recognition에 의한 특정 표면항원의 활성화 유도에 의해 조절되는 것으로 알려져 있다. 이들 pattern recognition-based cell receptor는 toll-like receptor들 beta-glucan receptor (alpha-dectin-1)들이 있다. beta-glucan도 이들 수용체를 매개로 여러 가지 면역반응을 자극하는 것으로 알려져 있다. 그러나 단백질다당류의 경우도 주요 성분이 beta-glucan이기 때문에 유사한 작용을 통해 대식세포의 기능을 촉진하는 것으로 예측되나 아직 이를 정확히 설명할 데이터는 충분히 보고되어 있지 않다. 따라서 본 연구에서는 이들 중 대표적인 receptor인 TLR-2와 dectin-1의 blocking 항체를 이용하여 표고버섯 단백질다당류가 나타내는 대식세포에서 유리되는 대표적인 세포독성 물질인 Nitric Oxide (NO)의 분비 효과에 대한 조절 정도, 세포면역반응 활성화유도 cytokine (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-12, IL-23) 및 chemokine (MCP-1, MIP-1 $\alpha$ , MIP-2) 등의 분비에 미치는 영향을 조사하였으며, 단백질다당체가 costimulatory molecule의 발현에 어떤 영향을 미치는지 그 효과를 검토함으로써, 단백질다당체에 의한 대식세포의 항원공여 조절능, homotypic cell aggregation assay법과 fibronectin을 부착한 플레이트를 이용한 세포 유착과정 (cell-fibronectin adhesion assay)법을 이용하여 세포이동성 매개 단백질의 활성화에 관한 단백질다당류 분획의 조절 가능성, 조사단백다당체 함유 분획에 의한 유착조절 단백질의 발현량 조절 가능성을 조사하였다.

또한, 표고버섯의 기능성식품에 대한 가능성을 확인하기 위해 항당뇨 활성을 조사하였다. 실험동물은 streptozotocin (STZ)에 의한 제 1형 당뇨병모델 마우스에 대한 표고버섯 추출물의 혈당강하 및 항 당뇨 효과를 알아보고자 하였다.

## 나. 연구방법

### 1) 실험재료

실험에 사용한 마우스 대식세포주인 RAW264.7 세포와 인간 단핵구 세포인 U937 세포는 American Type Culture Collection (ATCC : Manassas, VA)에서 분양 받았다. 세포 배양용 배지 RPMI1640 media와 FBS는 각각 Hyclone (Hyclone, South Logan, UT, USA)와 PAA (Pasching, Austria)를 사용했다. Cynaropicrin, Genistein, U0126, SP600125, SB203580은 calbiochem (San Diego, CA, USA)에서 구입했다. Human fibronectin은 BD Biosciences (San Jose, CA USA)에서 구입했고, 사용된 항체는 아래와 같다. Beta 1-integrins (CD29) (P5D2, purified IgG1) : R&D system (Minneapolis, MN, USA); CD18 (CLB-LFA-1/1,54, IgG1, ascites) : Sanquin (Amsterdam, Netherlands); CD80 (MEM-233, purified IgG1), CD86 (BU63, purified IgG1) 및 CD62L (FMC46, purified IgG2b) : Serotec (Oxford, UK); CD29 (K20, purified IgG2a) : Immunotech, (Marseille Cedex, France); CD29 (MEM 101A, IgG1, ascites) 및 CD43 (161-46, ascites, IgG1)는 V. Horejsi 와 R Villela로부터 각각 제공받아 사용하였다. p-ERK, p-JNK, p-p38 항체는 Cell Signaling Technologies 그리고 anti-ERK는 Promega (Madison, WI, USA) 제품을 사용하였다. 그밖에 MTT(3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide)를 포함한 화학시약은 Sigma 제품을 사용하였고, RT-PCR에 사용된 PCR primer (Table. 7)는 Bioneer사에 제작을 의뢰하였다.

### 2) 세포배양

마우스 macrophage like cell line, RAW 264.7, 인간 monocyte cell line, U937, 5 % CO<sub>2</sub>, 37 °C incubator에서 배양했다. 배지는 10 % FBS가 포함된 RPMI 1640을 사용하였다.

### 3) 세포 생존율 (cell viability) 측정

세포성 면역 활성 효과를 검증하기 위한 선행실험으로서, 표고버섯 유래 다당류 분획과 효소억제제들이 나타내는 세포생존에 미치는 효과를 MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide) assay법을 이용하여 분석하였다. 96-well plate에  $1 \times 10^6$ 의 세포를 plating하고 전처리

후 각 실험물질을 처리하였다. 37 °C에서 각 면역실험 조건에 상응하는 배양 시간 동안 CO<sub>2</sub> incubator에서 배양하였다. 이후 10 µl MTT 용액 (stock concentration : 5 mg/mL)을 첨가하고 3시간 동안 추가반응을 유도하였다. 반응 종료 및 formazan crystal 용해를 위해 각 well에 100 µl MTT stopping solution (10 % Sodium dodecyl sulfate in 0.01M HCL)을 추가적으로 첨가하였다. 세포 생존율은 MTT가 formazan으로 환원된 양을 570 nm에서 흡광도를 측정하여 얻어진 OD 값을 통해 산출하였다.

#### 4) 대식세포 유래 세포독성물질 Nitric oxide의 정량

RAW264.7 세포를, 배양용 배지를 이용하여  $1 \times 10^6$  cell/mL의 농도로 조절한 후, 96 well plate에 접종하고, 5 % CO<sub>2</sub> 및 37 °C에서 18시간 동안 전배양 하였다. 전배양 후 배지를 제거하고 4배 농도로 조제된 시험물질 50 µl와 50 µl의 LPS (최종농도 2.5 µg/mL) 함유 배지를 처리하여 배양했다. 24시간 배양 후 100 µl씩 상층액을 회수하여 또 다른 96 well plate에 옮기고 NO 정량은 Griess 용액 (0.5 % naphthylethylenediamine dihydrochloride, 5 % sulfanilamide, 25 % H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>)을 이용하여 실시하였다. 표준물질로 sodium nitrite (0 에서 100 µM)를 사용하여 검량선을 작성하였다.

#### 5) 대식세포 유래 세포독성물질 Reactive oxygen species의 정량

Murine 대식 세포주인 RAW264.7 세포를 penicillin (100 IU/mL) 및 streptomycin (100 µg/mL)과 10 %의 FBS를 함유하는 RPMI 1640 배지를 이용해서  $2 \times 10^6$  cells/mL의 농도로 조절한 후, 6 well plate에 접종하고, 5 % CO<sub>2</sub> 및 37 °C에서 18시간 동안 전배양 하였다. 4 배 농도로 조제된 표고버섯 유래 다당류 분획과 LPS (최종 농도 2.5 µg/mL) 함유배지를 처리하여 12 시간 배양했다. 배양 후 DCF-DA (dichlorodihydrofluorescein diacetate) 10 µM을 분주하고 빛을 차단하여 3시간 동안 배양하였다. Cold-PBS로 세포를 세척하고 1 % formaldehyde로 고정 후 flow cytometry를 사용하여 형광정도를 측정하였다.



## 6) 대식세포의 cytokine 분비능 측정: RT-PCR을 이용한 cytokine 발현량 조사

사이토카인의 발현 정도를 전사수준에서 조사하기 위해 각 시료를 일정시간 동안 처리하고 Trizol reagent를 사용하여 total RNA를 추출하였다. 추출한 total RNA를 First strand cDNA synthesis kit (Fermentas)를 사용하여 cDNA를 제조한 다음, 동량의 cDNA를 PCR로 증폭하였다. 이때 사용한 표적단백질의 sense 및 antisense primer 염기서열은 기존문헌을 참조하여 제조했고, 대조군 유전자로는 GAPDH을 사용하였다. PCR amplification은 i-Master PCR kit (iNtRON)을 사용하여 각 실험군 cDNA와 표적단백질들의 sense 및 antisense primers, 대조군 GAPDH primers를 dNTP 250  $\mu$ M, Tris-HCL(pH8.3) 10 mM, KCl 50 mM,  $\text{NgCl}_2$  1.5 mM를 포함한 i-mater solution 20ul에서 시행하였다. PCR은 95 °C에서 45초 간 denaturing, 55 °C에서 45초 간 annealing 그리고 72 °C에서 1분간 extension 하는 조건으로 시행하며, 총 30 cycles을 수행하였다. PCR로 증폭된 DNA는 1.5 % agarose gel에서 전기영동하였고 분획된 DNA band의 intensity를 측정하였다. 실험에 사용된 각 cytokine 유전자를 대표하는 DNA primer의 서열은 Table 7과 같다.

## 7) 대식세포의 탐식작용 측정

RAW264.7 세포를  $2 \times 10^6$  cells/well 로 조정하여 6 well plate에 분주하고 전배양 하였다. 전배양 후 10 % heat inactivated FCS를 함유한 성장용 배지 (growth medium : GM)로 표고버섯 유래 다당류 분획과 LPS 농도를 조절하여 처리하고 6 시간동안  $\text{CO}_2$  incubator에서 배양하였다. 6시간 배양 후 형광으로 표지된 particle FITC-dextran (1mg/mL, 5 % FCS in PBS)을 세포에 처리하고 빛을 차단하여 30분간 배양하였다. Cold-PBS로 세포를 세척하여 미탐식된 입자를 제거하고 1 % formaldehyde로 고정 후 flow cytometry로 형광정도를 측정하였다.

Table 7. Primer list of cytokines and chemokines used in this experiment  
(F: forward, R: reverse)

Gene		Primer sequence
TNF- $\alpha$	F	5'-TTGACCTCAGCGCTGAGTTG-3'
	R	5'-CCTGTAGCCCACGTCGTAGC-3'
IL-1b	F	5'-CAGGATGAGGACATGAGCACC-3'
	R	5'-CTCTGCAGACTCAAACCTCCAC-3'
IL-6	F	5'-GTACTCCAGAAGACCAGAGG-3'
	R	5'-TGCTGGTGACAACCACGGCC-3'
IL-12p40	F	5'-CAGAAGCTAACCATCTCCTGGTTT-3'
	R	5'-TCCGGAGTAATTTGGTGCTTCACA-3'
IL-23	F	5'-GACTCAGCCAACCTCCTCCAG-3'
	R	5'-GGCACTAAGGGCTCAGTCAG-3'
MIP-1a	F	5'-GCCCTTGCTGTTCTTCTCTGT-3'
	R	5'-GGCAATCAGTTCCAGGTCAGT-3'
MIP-2	F	5'-GAACAAAGGCAAGGCTAACTGA-3'
	R	5'-AACATAACAACATCTGGGCAAT-3'
MCP-1	F	5'-ACTGAAGCCAGCTCTCTTCTCCTC-3'
	R	5'-TTCCTTCTTGGGGTCAGCACAGAC-3'
GAPDH	F	5'-CACTCACGGCAAATTCAACGGCAC-3'
	R	5'-GACTCCACGACATACTCAGCAC-3'

#### 8) 신호전달과정 검토

Murine 대식 세포주인 RAW264.7 세포를 penicillin (100 IU/mL) 및 streptomycin (100 µg/mL)과 10 %의 FBS를 함유하는 RPMI 1640 배지를 이용해서  $1 \times 10^6$  cell/mL의 농도로 조절한 후, 96 well plate에 접종하고, 5 % CO<sub>2</sub> 및 37°C에서 18시간 동안 전배양 하였다. 이후 배지를 제거하고 4배 농도로 조제된 표고버섯 유래 다당류 분획 50 µl와 50 µl의 각 신호전달과정을 block 시키는 inhibitor 함유 배지를 동시에 처리하여 배양하였다. 24시간 후 상층액을 100 µl씩 또 다른 96 well plate에 옮기고 NO 정량은 Griess 용액 (0.5 % naphthylethylenediamine dihydrochloride, 5 % sulfanilamide, 25 % H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>)을 이용하여 실시하였다. 표준물질로 sodium nitrite (0 에서 100 µM)를 사용하여 검량선을 작성하였다.

#### 9) Flow cytometer를 이용한 면역세포의 당단백질 발현성 검증

U937세포를 10 % FCS와 1 % Antibiotics를 함유하는 RPMI 1640 배지를 이용해서  $2.0 \times 10^6$  cells/mL의 농도로 조절한 후, 35×10 mm의 petri dish에 접종한 후, 5 % CO<sub>2</sub> 및 37 °C에서 1시간 동안 전 배양하였다. 이후 표고버섯 유래 다당류 분획을 최종 농도 1 mg/mL의 농도로 조제하여 처리 한 후, 6시간 후에 96 well plate에 접종하고, staining을 시작한다. 1차 Ab로는 CD18, CD29, CD43, CD98, CD147을 사용하였고, 2차 Ab는 Rabbit Anti-Mouse FITC conjugate(1:250농도)를 사용하였다. 각 washing작업은 FACs buffer (2 % FCS and 1 % Sodium Azide in PBS)를 사용하였고, 그래프는 normal 대비 '% of control'로 작성했다.

#### 10) 세포-세포간 유착반응 정량

여러 가지 처리 농도로 희석된 표고버섯 유래 다당류 분획 10 µl를 round type의 96 well plate에 처리하고 배지 10 µl와 세포( $2 \times 10^6$  cells/mL)용액으로부터 10 µl를 처리하여 30분에서 한 시간 정도 37°C에서 배양하였다. 다시 여기에 10 µl의 세포유착 신호물질을 첨가하여 4 시간에서 6 시간정도 더 배양하였다. 세포-세포 간 유착 정량은 hemocytometer를 이용하여 실시하였다. 즉 20 µl용 길슨 autopipette을 10 µl로 고정한 후 yellow tip를 이용하여 6 번 정도

파이펫팅을 한 후, hemocytometer에 조심스럽게 옮겨놓고 현미경으로 세포를 관찰하며 사진 촬영을 했다.

#### 11) 표적 단백질의 발현량 검토

표고버섯 유래 다당류 분획을 비롯한 inducer의 stimulation이 끝난 세포들을 lysis buffer에서 용해시킨 후 세포질 단백질을  $12,000 \times g$ 에서 15분간 원심분리 하였다. 동일한 양의 단백질을 10 % SDS-polyacrylamide gels에서 전기영동하고 Wet-blotting transfer 방법을 이용하여 nitrocellulose membranes으로 단백질을 transfer하였다. Membrane을 5 % skim milk를 포함하는 blocking buffer에서 반응시킨 후 특정 단백질에 특이한 1차 항체를  $4^{\circ}C$ 에서 하루 동안 반응시켰다. 이 후 2차 항체를 적용한 다음 ECL chemiluminescence로 반응 정도를 확인하였다.

#### 12) NF- $\kappa$ B activity 확인

RAW264.7 세포 ( $4 \times 10^5$  cells/well)를 6-well plate에 12시간 동안 전배양한 후, 리포펙타민 플러스 reagent를 이용하여 NF- $\kappa$ B-luciferase plasmid (1 ug)를 transfection 하였다. 30시간이 지난 후 세포에 표고버섯 유래 다당류 분획 (1 mg/mL)을 처리하고 각 시간 (1, 2, 4, 8시간) 별로 luciferase activity를 조사하기 위해 세포를 harvest하였다.

#### 13) 세포-fibronectin간의 유착반응 정량

여러 가지 처리 농도로 희석된 표고버섯 유래 다당류 분획 10  $\mu$ l를 round type의 96 well plate에 처리하고 ( $5 \times 10^6$  cells/mL) 용액으로 준비된 세포용액 90  $\mu$ l를 처리하여 30분에서 한 시간 정도  $37^{\circ}C$ 에서 배양하였다. 이들 배양액을 fibronectin이 붙여져 있는 96 well plate에 옮겨 넣은 후, 4 시간 추가 배양을 실시하였다. 세포-fibronectin 간 유착 정량은 0.05 % crystal violet 용액을 첨가한 후 두 시간동안 반응 유도 후 microplate reader로 540 nm에서의 흡광도를 측정하여 실시하였다.

#### 14) Flow Cytometry를 이용한 면역세포의 표현형 분석

단핵세포주 (U937 cell)를 표고버섯 유래 다당류 분획 처리 후 세포막에 존재하는 여러 가지 세포유착 조절 당단백질 (CD18, CD29, CD43 등)의 발현정도

를 flow cytometry로 분석하였다. 표현형의 분석 시 Cell Quest software program에 따라 죽은 세포는 배제되며, 단일항체의 염색에 의해 표면 항원이 양성반응을 보인 세포에 관해서 그 비율을 표시하였다.

## 15) 급성독성시험

### 가) 실험동물 및 사육환경

실험동물은 (주) 오리엔트에서 생산된 ICR계 마우스이며, 온도  $23\pm 1$  °C, 습도  $55\pm 5$  %, 배기 10-18회/hr, 형광등 명암 12 hr cycle, 조도 300-500 Lux의 사육환경에서 사육하였다. 사료는 퓨리나(주)의 실험동물용 사료를 구입하여 실험동물에 자유로이 공급하였으며, 음수는 1차 증류수를 자유롭게 섭취시켰다.

### 나) 투여용량의 설정

본 시험물질은 버섯 crude 추출물 *Lentinus edodes* crude extract (LECE)와 버섯의 배양여액 *Lentinus edodes* culture medium (LECM)로서 예비시험 결과 한계용량인 2000 mg/kg의 용량에서 사망동물이 관찰되지 않아 한계용량 시험의 일환으로 최고용량을 2000 mg/kg으로 하고, 매체를 투여하는 매체대조군만을 두었다. 단, 식품의약품 안전청의 '의약품등의 독성시험기준'에는 한계용량에 대한 기준이 없기 때문에 일본 후생성의 "의약품 비임상시험 guideline 해설 (1997)"을 참고하였다. 각 군당 투여 마리 수는 암 · 수 각 5마리로 정하였다. (Table 8) 시험물질을 투여하기 직전 실험동물의 체중 범위는 수컷  $33.5 \pm 2.0$  g, 암컷  $27.0 \pm 1.7$  g 으로 연령은 5주령이었다.

**Table 8. Experimental design used in this study**

Groups	sex	No. of animals	Dose (mg/kg)
1M	Male	5	2000
2M	Male	5	2000
vehicle	Male	5	0
control	Male	5	0
1F	Female	5	2000
2F	Female	5	2000
vehicle	Female	5	0
control	Female	5	0

M=male, F=female

1. *Lentinus edodes* crude extract (LECE)
2. *Lentinus edodes* culture medium (LECM)

Vehicle control ;

0.5 % carboxymethylcellulose 80 % + ethyl alcohol 10 % + tween 80 10 %

#### 다) 시험물질의 조제 및 투여

시험물질은 0.5 % carboxymethylcellulose 80 % + ethyl alcohol 10 % + tween 80 10 %에 균질하게 현탁시켜, 투여하기 전 12시간 절식 후 투여 직전에 측정된 체중에 따라 시험 물질의 투여량을 산출하여 실험동물에 1 회 경구 투여하였다. 투여액량은 1 mL로 하였으며, 대조군에는 0.5 % carboxymethylcellulose 80 % + ethyl alcohol 10 % + tween 80 10 %를 투여하였다. 임상증상 관찰은 모든 실험동물에 대하여 투여당일은 투여 후 6 시간 동안 매 시간마다 관찰하였으며, 투여 다음날부터 14 일까지는 1 일 1 회씩 동물의 일반상태의 변화, 중독증상의 발현 및 사망유무를 관찰하였다. 또한 시험에 사용된 모든 실험동물에 대하여 시험물질 투여일, 투여 후 4 일, 7 일, 14 일째에 체중을 측정하였다. 시험 종료 후 실험동물을 ether로 마취하여 복대동맥 절단방법으로 치사시킨 다음 외관 및 내부 장기의 이상 유무를 육안으로 관찰하였다.

### 16) 표고버섯 추출물의 항당뇨능 시험 결과

#### 가) 실험동물

체중 30 g 이상의 6주령 ICR 마우스를 대상으로 streptozotocin 100 mg/kg 을 citrate buffer에 녹여 복강 내로 주입하여 당뇨병을 유발하였다. STZ는 췌장의  $\beta$ -cell만을 선택적으로 파괴시켜 인슐린 의존형 당뇨병을 유발하는 것으로 알려져 있다. STZ를 처음 투여한 후 14 일째 되는 날에 혈당을 측정하여 200 mg/dl 이상인 것들만 당뇨병이 유발된 것으로 인정하여 시험에 사용하였다.

#### 나) 실험 설계

STZ로 유발한 인슐린 의존형 당뇨병 유발 동물은 2종류의 버섯 추출물 투여군 그리고 대조군으로서 vehicle 투여군으로 나누었으며, 버섯 추출물 투여군에서는 추출물을 0.5 % CMC 수용액에 녹여 300 mg/kg의 농도로 매일 일정한 시간에 경구로 10 일간 투여하였다. 대조군에는 같은 부피의 CMC 수용액은 방법으로 투여하였다.

실험 기간 동안 당뇨병 실험동물은 cage당 6마리 이하로 하여 마우스용 또는 랫트용 polycarbonate cage에 넣어 온도  $20 \pm 2$  °C, 12시간 (07:00~19:00)의

인공조명의 환경에서 사육하였고, 사료 및 음수는 자유로이 공급하였다.

다) 체중, 혈당량 및 장기의 무게 측정

실험기간 중 체중 및 혈당량은 추출물을 투여하기 전과 투여 후 10 일째 되는 날 비절식 상태에서 일정한 시간에 측정하였으며, 10 일째 되는 날 혈당과 체중을 측정한 후 바로 희생시켜 간, 위, 신장의 무게를 측정하였다. 혈당은 미정맥에서 채혈하여 glucose oxidase 방법으로 측정하였다. 결과는 평균과 표준오차로 나타내었고 유의성 검정은 unpaired student-t test로 하였으며, p값이 0.05이하인 것만을 유의성 있는 것으로 인정하였다



## 다. 연구결과 및 고찰

### 1) 세포 생존율 (cell viability) 시험

단백다당류를 함유하는 세 분획을 각각 같은 농도로 희석하여 처리하고, 6 시간, 12 시간 배양한 후 MTT assay를 한 결과를 Fig. 34에 제시하였다. 결과에서처럼, 6 시간 동안의 단백질다당류 처리는 20 % 미만의 세포 생존율 저해작용을 보였으며, 12 시간의 경우에는 분획 LECE-PF (1 mg/mL 농도)가 control 대비로 25 %정도, 분획 LECE-NPF (1 mg/mL 농도)가 26 %정도의 세포생존율 억제효과를 나타냈다. 그러나 이들 작용은 NO분비에 따른 세포사멸 작용에서 기인된 것으로 판단된다. 구체적인 실험에 앞서, 이들 연구를 위해서는 우선적으로 이들 효소저해제들이 세포독성을 나타내는지에 관한 선행연구가 필요하므로 RAW264.7 cell에서 12시간 동안 처리한 후 이들 약물이 세포에 미치는 cell viability에 관한 영향을 측정하여 Fig. 35에 제시하였다. 결과에서처럼 각 효소억제제들은 유의적인 세포독성을 나타내지 않았으므로, 신호전달에 관한 연구 시 해당 농도를 사용하여도 세포독성에서 기인된 억제효과는 나타나지 않을 것으로 판단되었다.

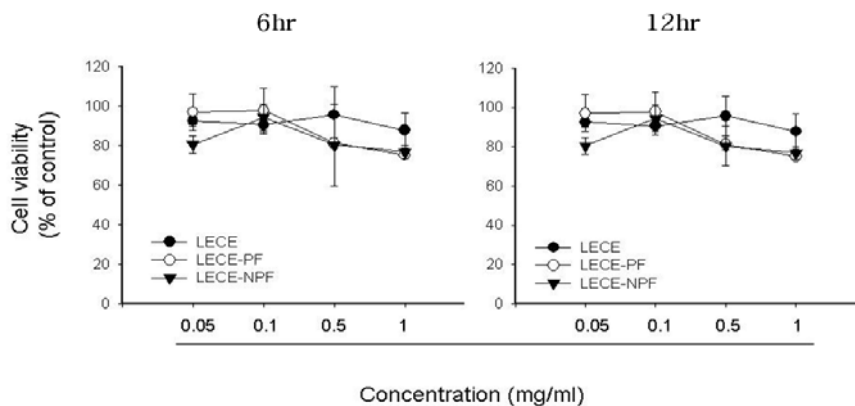


Figure 34. Effect of fractions from *L. edodes* on macrophage cell viability.

Viability of the cells was determined by MTT assay, as described in Materials and methods section. LECE : *Lentinus edodes* crude extract ; LECE-PF : *Lentinus edodes* crude extract polysaccharide fraction ; LECE-NPF : *Lentinus edodes* crude extract non-polysaccharide fraction.

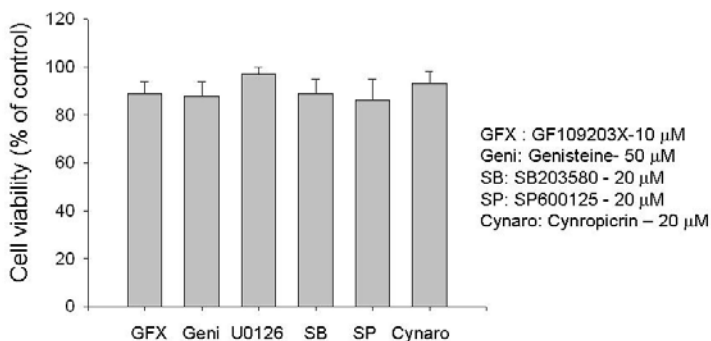


Figure 35. Effect of various enzyme inhibitors on cell viability of RAW264.7 cells.

Viability of the cells was determined by MTT assay, as described in Materials and methods section. [GFX : GF109203X (a protein kinase C inhibitor); Geni : genistein (a protein tyrosine kinase inhibitor); b-cAMP : 8-bromo cyclicAMP (a protein kinase A activator); PD : PD98059 (an ERK inhibitor); SB : SB203580 (a p38 inhibitor); SP : SP209105 (a JNK inhibitor); cynaro : cynaropicrin (a NF- $\kappa$ B inhibitor)].

## 2) 대식세포 유래 세포독성물질 Nitric oxide (NO)의 정량 결과

대식세포에서 유리되는 대표적인 세포독성 물질인 Nitric Oxide (NO)의 분비에 미치는 단백다당류 함유 분획의 효과를 조사하여 분획 2에 제시하였다. NO 정량 결과를 보면, 분획 LECE-PF의 경우 1 mg/ml에서 17  $\mu$ M의 NO 생성을 유도하였고, 그 외의 분획 LECE-NPF와 분획 LECE는 1  $\mu$ M 정도 이하의 NO를 분비하게 하였다. 반면에, 대조군으로 사용된 LPS (2.5  $\mu$ g/mL)는 40  $\mu$ M 정도의 NO 생성 촉진 효과를 나타냈다. 한편, LPS와 각 분획을 병용 처리한 경우에도 NO 분비유도 효과는 LPS 단독 처리 효과에 비해 크게 증가되지 않은 것으로 나타났다 (Fig. 36). 따라서 단백다당류 함유 분획 LECE는 대식세포 활성화에 기여하는 활성형의 단백다당류를 함유하는 것으로 사료된다.

## 3) 대식세포 유래 세포독성물질 Reactive oxygen species (ROS)의 정량 결과

대식세포 유래 세포독성 물질인 ROS의 분비에 미치는 단백다당류 함유 분획의 효과를 조사하여 Fig. 37에 제시하였다. 각 분획의 처리농도는 NO 분비 유도 작용을 나타낸 1 mg/mL의 농도에서 실시하였다. 결과에서처럼, LPS 단독 처리는 약 두 배 이상 증가된 ROS분비 양상을 보였으나, 처리된 단백다당류 분획들은 큰 ROS 분비 촉진 효과를 나타내지 못하였다. 그러나 처리된 단백다당류 분획중에서는 분획 LECE-PF가 가장 높은 ROS분비 효과를 나타냈다.

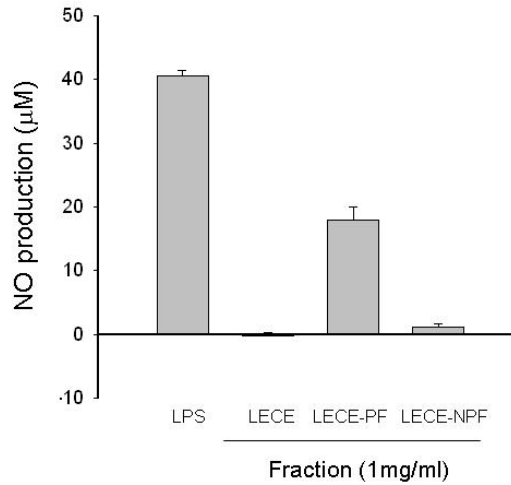


Figure 36. Effect of fractions from *L. edodes* on NO release from macrophage. NO level was determined by Griess assay.

LECE : *Lentinus edodes* crude extract ; LECE-PF : *Lentinus edodes* crude extract polysaccharide fraction ; LECE-NPF : *Lentinus edodes* crude extract non-polysaccharide fraction.

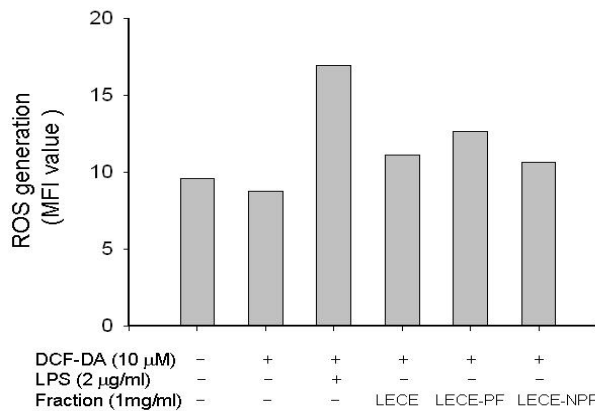


Figure 37. Effect of fractions from *L. edodes* on ROS generation from macrophage.

ROS level was determined by flowcytometry. LECE : *Lentinus edodes* crude extract ; LECE-PF : *Lentinus edodes* crude extract polysaccharide fraction ; LECE-NPF : *Lentinus edodes* crude extract non-polysaccharide fraction.

#### 4) RT-PCR을 이용한 전사수준에서 사이토카인 발현량 조사 결과

세포독성물질인 NO와 ROS 분비 효과 평가시 효과가 가장 우수했던 분획 LECE-PF를 이용하여, 세포면역반응 활성유도 cytokine (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-12, IL-23) 및 chemokine (MCP-1, MIP-1 $\alpha$ , MIP-2) 등의 분비에 미치는 영향을 조사하였다. Fig. 38에서 제시되었듯이, 표고 분획 LECE-PF는 IL-1 $\beta$ , IL-6, MIP-1 $\alpha$ 를 제외하고, 조사한 모든 cytokine 및 chemokine의 발현을 유도한 것으로 확인되었다. 특별히 IL-23 및 MIP-2 발현 효과평가에서는 대조군인 LPS에 의한 발현유도 효과보다 더 큰 것으로 나타났다. 따라서 본 결과로 미루어 볼 때, 표고유래 단백다당류들도 매우 강력한 cytokine 매개성 면역증가물질로 작용한다고 사료된다.

#### 5) 대식세포의 탐식작용 assay 결과

표고 단백다당류 함유 분획 농도를 1 mg/mL로 처리하여 대식세포 탐식능에 미치는 효과를 조사하여 Fig. 39에 제시하였다. 그림에서처럼, LPS 처리는 약 40 % 정도 증가된 대식세포 탐식능을 유도하였으며, 이제까지 우수한 면역활성 효과를 보인 분획 LECE-PF 역시 약 25 % 정도 대식세포 탐식능을 촉진하였다. 따라서 이제까지 결과와 일치해서, 시험된 표고 단백다당류 함유 분획중 LECE-PF는 가장 효과적인 탐식능 촉진 단백다당류를 함유하는 것으로 판단된다.

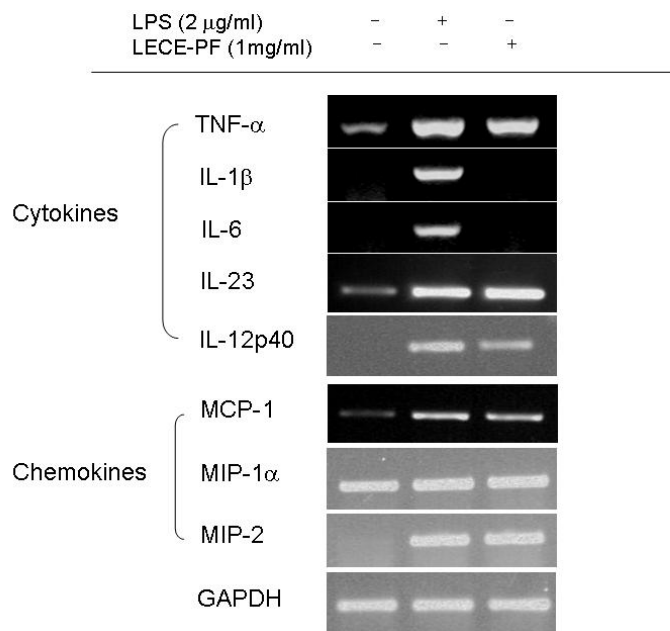


Figure 38. Effect of fractions from *L. edodes* on cytokine and chemokine expression from RAW264.7 cells. mRNA was analyzed by semiquantitative RT-PCR. LECE-PF : *Lentinus edodes* crude extract polysaccharide fraction.

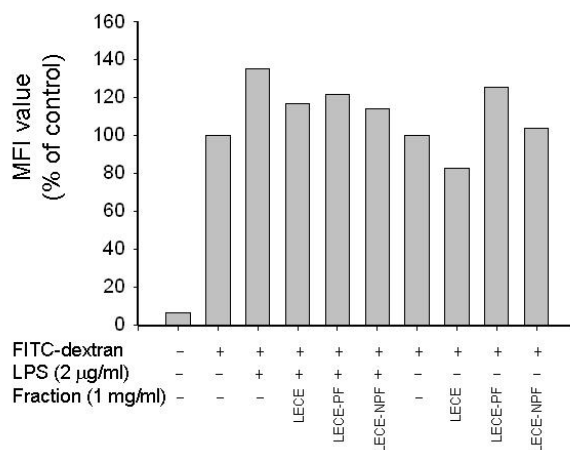


Figure 39. Effect of fractions from *L. edodes* on the phagocytic activity of macrophages. The extent of phagocytosis was determined by flowcytometry. LECE : *Lentinus edodes* crude extract ; LECE-PF : *Lentinus edodes* crude extract polysaccharide fraction ; LECE-NPF : *Lentinus edodes* crude extract non-polysaccharide fraction.

## 6) 대식세포의 항원공여능력 조절가능성 검토

대식세포는 대표적인 탐식세포의 하나로써, 감염된 병원성 균이나 바이러스에 감염된 세포 혹은 종양 등과 면역대상 물질 혹은 세포들을 탐식하여 제거하는 일차적인 기능을 담당하는 세포다. 이외에도, 탐식된 면역반응 유발 물질들을 세포내에서 흡수, 소화 및 가공의 과정을 통해 자신의 표면항원의 하나인 MHC class II 분자위에 항원을 공여하게 하는 항원제시기능을 수행하고 있다. 이들 항원제시세포들은 대식세포 외에도 B cell 및 수지상세포 등을 포함하고 있다. 세포막에 존재하는 MHC class II 분자위에 가공된 small peptide가 제시된 이후에는 peptide-MHC class II complex를 형성하게 되고 이는 T cell의 TCR (T cell receptor)과 결합하여 T cell의 분열을 유도하는데 결정적인 역할을 다하게 된다. 그러나 항원공여 기능 자체로는 효과적인 T cell 분열과정을 유도할 수 없는 것으로 알려져 있으며, 특별히 이들 과정을 위해서는 costimulatory molecule이라고 하는 대식세포 막단백질들의 발현 정도가 굉장히 중요한 역할을 담당하는 것으로 최근 보고되고 있다 (Fig. 40). 따라서, 본 연구에서는 단백다당체가 이들 costimulatory molecule의 발현에 어떤 영향을 미치는지 그 효과를 검토함으로써, 단백다당체에 의한 대식세포의 항원공여 조절능을 검토하였다. Fig. 41에 볼 수 있듯이, LPS는 CD80 및 CD86의 발현을 향진시켰다. 그러나 표고버섯 분획 LECE-PF는 전혀 향진효과를 나타내지 않았다. 따라서 표고버섯의 면역활성분획은 costimulatory molecule의 표면 발현 양은 증가시키지 않는 것으로 판단된다.



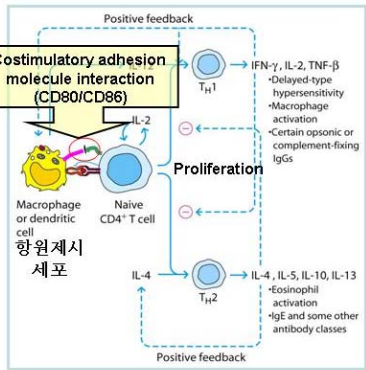


Figure 40. Schematic diagram of the relationship between APC and T cells.

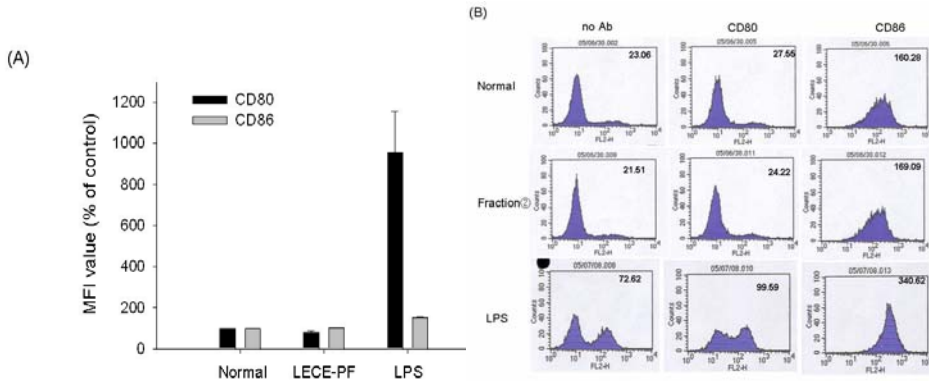


Figure 41 (A and B). Flow cytometric analysis of CD80 and CD86 using LPS or LECE-PF-treated RAW264.7 cells. LECE-PF : *Lentinus edodes* crude extract polysaccharide fraction

## 7) 세포유착과정 및 세포 이동 유도인자의 발현 조절가능성 검토

세포유착현상은 암세포의 발생이나 병원성물질 침투시 혈액내 존재하는 백혈구들이 효과적으로 암세포나 감염원을 제거하기 위해 혈관으로부터 표적 장기나 조직내로 이동시 필수적인 면역학적인 현상중의 하나이다. 즉 이들 현상을 통해 백혈구들은 혈관벽이나 조직의 기저막에 부착하게 되며, 이후 세포와 세포 사이에 형성된 간극을 통해 면역세포들이 표적병변 혹은 표적암조직 (세포)으로 이동하게 된다 (Fig. 42).

이들 이동현상은 세포의 유동성이나 이동성, 그리고 유착성을 조절하는 adhesion molecule에 의해 매개되는 것으로 알려져 있다. 따라서 이들 과정을 증진시키는 약물들은 효과적인 면역증강 물질로 평가되고 있다. 본 연구에서는 이들 과정을 손쉽게 확인할 수 있는 homotypic cell aggregation assay법과 fibronectin을 부착한 플레이트를 이용한 세포 유착과정 (cell-fibronectin adhesion assay)법을 이용하여 세포이동성 매개 단백질의 활성화에 관한 단백질 당류 분석의 조절 가능성을 조사하였다. Homotypic aggregation assay를 위해서는 대표적인 adhesion molecule인 beta1-integrin (CD29) 및 CD43의 활성을 유도하는 항체를 처리하여 발생하는 동종세포간의 clustering 정도를 평가하였으며, cell-fibronectin adhesion assay 에서는 CD29 매개성 유착과정을 유도하는 extracellular matrix protein인 fibronectin 층에 세포가 얼마나 유착되는가를 측정하였다. 그러나, 결과에서 볼 수 있듯이 표고버섯 분획류는 homotypic cell-cell aggregation (Fig. 43)과 cell-fibronectin adhesion (Fig. 44)에서 cell adhesion의 패턴을 촉진하지 못하는 것으로 나타났다. 반면에 U0126은 U937 cell에 fibronectin이 부착된 96-well plate에 유착되는 현상을 통계적으로 유의성 있게 억제하였다.

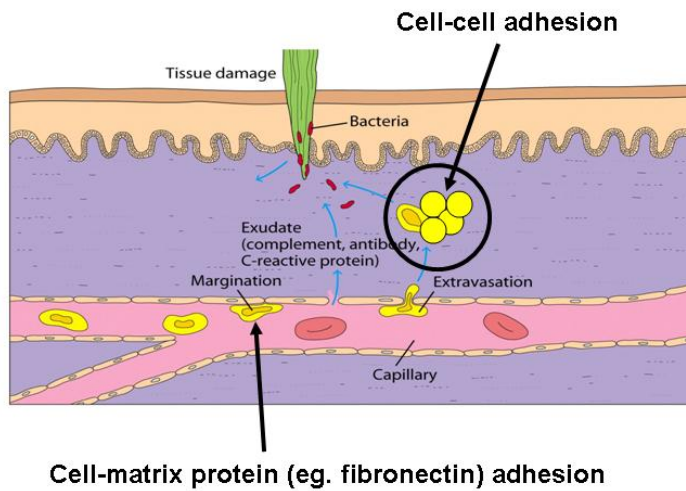


Figure 42. Schematic diagram of cell migration and adhesion.

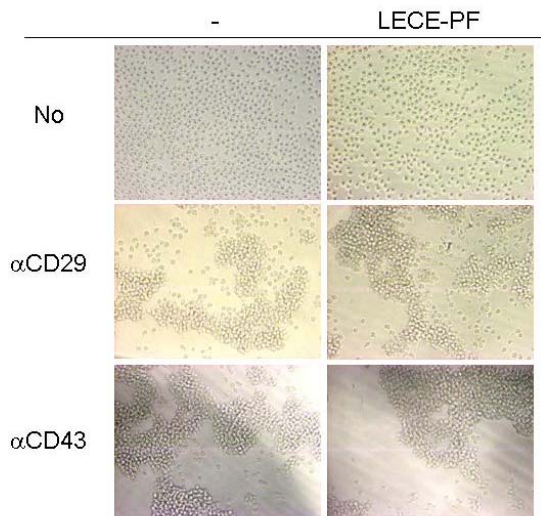


Figure 43. Effect of fractions from *L. edodes* on cell-cell aggregation. LECE-PF : *Lentinus edodes* crude extract polysaccharide fraction.

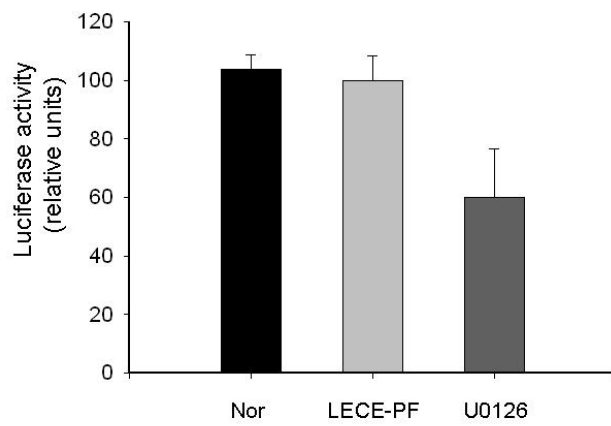


Figure 44. Effect of fractions from *L. edodes* on cell-fibronectin adhesion.  
LECE-PF : *Lentinus edodes* crude extract polysaccharide fraction

## 8) 확인된 세포면역학적 효능과 관련된 세포내 신호전달과정 검토

단백다당류 분획 LECE-PF를 1 mg/mL로 RAW264.7세포에 처리하고, 각 신호 전달 과정을 blocking하는 inhibitor를 처리하여, 분획 LECE-PF 매개에 의한 NO 생성 관련 세포내 경로를 조사하였다. Fig. 45 에서처럼, 신호전달 효소억제제들은 분획 LECE-PF 매개에 의한 NO 생성을 유의적으로 억제하였다. 특별히 PKC inhibitor인 GF109203X와 JNK inhibitor인 SP209105, 그리고 NF- $\kappa$ B inhibitor인 BAY11-7082와 cynaropicrin 처리는 70 % 이상의 강력한 NO 생성 저해 효과를 나타냈다. 따라서 분획 LECE-PF 매개에 의한 NO생성은 PKC, JNK 및 NF- $\kappa$ B의 연속적인 활성화 유도에 의해 진행되는 것으로 판단된다. 특이적으로 Akt inhibitor로 알려져 있는 Wortmannin과 LY294002를 처리했을 경우에는 Wortmannin에 의한 NO의 분비량이 상당히 증가했음을 확인하였다. NO 이외에도 TNF- $\alpha$  분비 시 참여하는 이들 신호전달 매개 효소들의 관련성을 비교 분석하였다. Fig. 46 에서처럼, TNF- $\alpha$  분비 시에는 protein kinase C, protein tyrosine kinase, ERK, p38 및 protein kinase A 등이 보다 강력하게 관련되어 있는 것으로 나타났다. 따라서 이들 결과는 표고버섯 유래 단백질다당류에 의한 면역기능 향진 시 NO와 TNF- $\alpha$  분비에 관여하는 세포내 신호전달체계는 각각 다른 분비유도 경로에 의해 조절된다고 할 수 있다.

또한 NF- $\kappa$ B inhibitor인 cynaropicrin은 매우 효과적으로 NO 생성이나 TNF- $\alpha$  생성을 억제하였으므로, reporter gene assay system 인 NF- $\kappa$ B-luciferase assay를 이용하여 표고버섯의 단백질다당류가 NF- $\kappa$ B 활성을 유도하는지 확인하여 보았다. Fig. 47 에서 보여지 듯, LPS는 매우 강력한 NF- $\kappa$ B 활성화 효과를 나타냈다. 이들 효과는 시간이 지남에 따라 더욱 증가하였다. 흥미있게도, 표고 버섯 단백질다당류 분획 LECE-PF의 경우에도 LPS와는 차이를 보이긴 하지만 뚜렷하게 NF- $\kappa$ B 활성을 유도한 것으로 나타났다. protein tyrosine kinase inhibitor인 genistein과 ERK inhibitor U0126이 표고매개성 TNF- $\alpha$  생성을 매우 강력하게 억제하였으므로 Western blot을 이용하여 이들 두 효소의 활성화 지표인 phospho-ERK 발현양 및 tyrosine phosphorylated protein pattern을 비교 분석하였다. Fig. 48 ~ 49 에서 보여지 듯, 표고의 단백질다당류 분획 LECE-PF는 약 60 kDa의 단백질의 tyrosine 잔기에 인산화를 유도하는 것으로 확인되었고, LPS와는 뚜렷하게 차이가 나지만 정상군 대비 확실한 phospho-ERK 와 phospho JNK의 양상을 보여 주었다. 따라서 이들 결과는 표고 분획류들이 적어도 복잡한 신호전달 체계 (protein tyrosine phosphorylation과 ERK 및 JNK)를 통해 활성화 유도된 NF- $\kappa$ B를 바탕으로 cytokine 및 chemokine의 발현을 유도하는 것으로 판단된다.

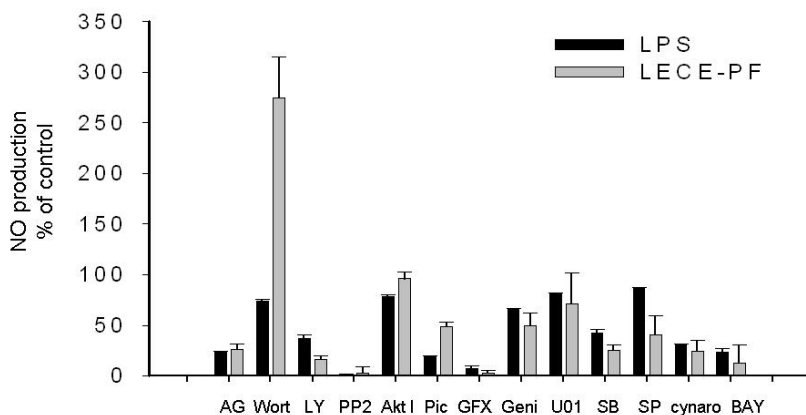


Figure 45. Effects of various inhibitors on NO production induced by fraction (LECE-PF) from *L. edodes* (experiment 1).

LECE-PF : *Lentinus edodes* crude extract polysaccharide fraction. [AG : AG490 (a JAK2 inhibitor) ; Wort : Wortmannin (an Akt/PI3K inhibitor) ; LY : LY294002 ( an Akt/PI3K inhibitor) ; PP2 : PP2 (a Src inhibitor) ; Akt I : Akt inhibitor (an Akt inhibitor) Pic : Piceatanol (a Syk inhibitor) ; GFX : GF109203X (a protein kinase C inhibitor); Geni : genistein (a protein tyrosine kinase inhibitor) ; U012 : U0126 (an ERK inhibitor); SB : SB203580 (a p38 inhibitor); SP : SP209105 (a JNK inhibitor); cynaro : cynaropicrin (a NF- $\kappa$ B inhibitor) ; BAY : BAY11-7082 (a NF- $\kappa$ B inhibitor)].

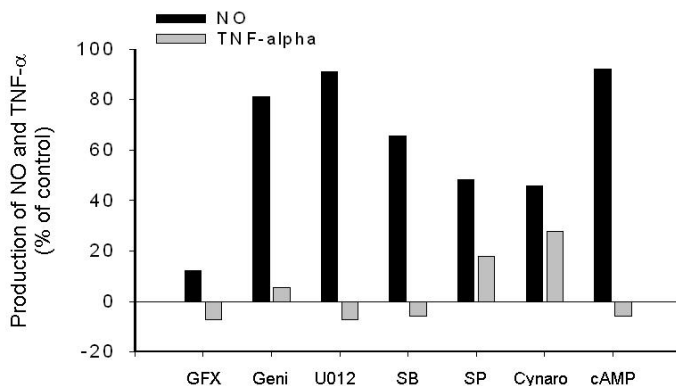


Figure 46. Effects of various inhibitors on NO and TNF- $\alpha$  production induced by fraction (LECE-PF) from *L. edodes* (experiment 2).

[GFX : GF109203X (a protein kinase C inhibitor); Geni : genistein (a protein tyrosine kinase inhibitor) ; U012 : U0126 (an ERK inhibitor); SB : SB203580 (a p38 inhibitor); SP : SP209105 (a JNK inhibitor); cynaro : Cynaropicrin (a NF- $\kappa$ B inhibitor) ; cAMP : cyclicAMP (a protein kinase A activator)].

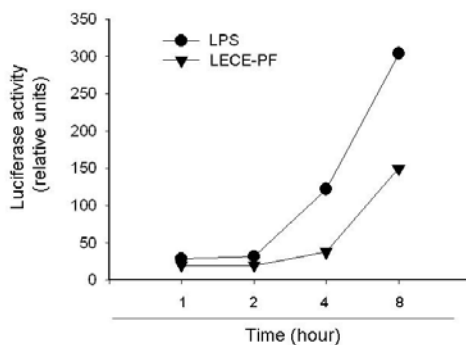


Figure 47. Effect of LECE-PF on NF- $\kappa$ B activation assessed by luciferase activity. LECE-PF : *Lentinus edodes* crude extract polysaccharide fraction.

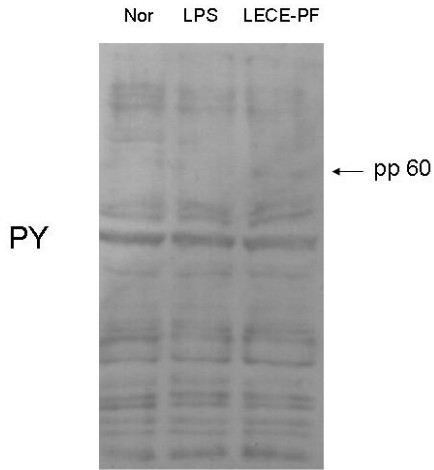


Figure 48. Effect of fraction from *L. edodes* on tyrosine phosphorylation. LECE-PF : *Lentinus edodes* crude extract polysaccharide fraction.

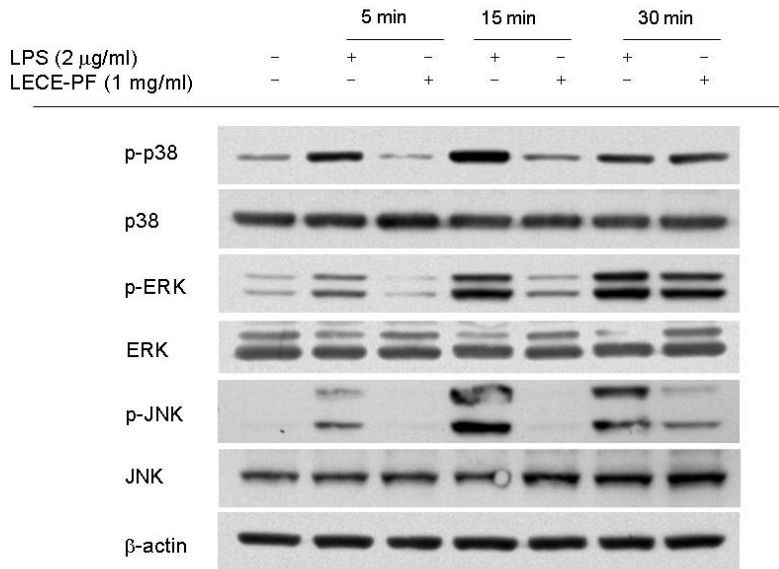


Figure 49. Effect of fraction from *L. edodes* on ERK and JNK activation judged by its phosphorylation. LECE-PF : *Lentinus edodes* crude extract polysaccharide fraction.



## 9) 대식세포 기능을 조절하는 표면 당단백질 발현 및 그들의 활성화 검토

상기에서도 언급한 것처럼, 면역반응은 크게 innate immunity와 adaptive immunity로 구분된다. innate immunity는 주로 대식세포나 수지상세포와 같은 탐식세포에 의해 매개되며 주로 분비되는 독성물질 및 complement나 defensin과 같은 방어용 단백질 등에 의해 유입된 병원성 물질 (세균이나 바이러스 등) 들을 제거시키는 작용을 하는 즉시형 반응이다. 반면에 adaptive immunity는 innate immunity에 의해 활성화된 antigen-presenting cells들이 항원을 가공하여 MHC class II나 I과 같은 분자위에 공여함으로써 이에 선택적인 반응을 하는 TCR (T cell receptor)을 가지고 있는 T cell들이 분열을 이루고 관련 면역 반응을 유도하는 지연성 반응이다. 특별히 innate immunity는, 대식세포와 같은 탐식세포가 pattern recognition에 의한 특정 표면항원의 활성화 유도에 의해 조절되는 것으로 알려져 있다. 이들 pattern recognition-based cell receptor는 toll-like receptor들 beta-glucan receptor (alpha-dectin-1)들이 있다. beta-glucan도 이들 수용체를 매개로 여러 가지 면역반응을 자극하는 것으로 알려져 있다. 그러나 단백질다당류의 경우도 주요 성분이 beta-glucan이기 때문에 유사한 작용을 통해 대식세포의 기능을 촉진하는 것으로 예측되나 아직 이를 정확히 설명할 데이터는 충분히 보고되어 있지 않다. 따라서 본 연구에서는 이들 중 대표적인 receptor인 TLR-2와 dectin-1의 blocking 항체를 이용하여 표고버섯 단백질다당류가 나타내는 NO 분비 효과에 대한 조절 정도를 조사하였다. Fig. 50~52에서 제시되어 있는 것처럼, dectin-a 항체처리하는 표고에 의해 유도된 NO 생성이 억제되었고, TLR-2 항체 처리시에는 LPS 및 표고다당류 모두에서 유의성있는 NO 분비 감소 현상을 유도한 것으로 나타났다. 즉 표고는 dectin-a 매개와 TLR-2 매개에 의해 NO 생성을 조절하는 것으로 판단된다.

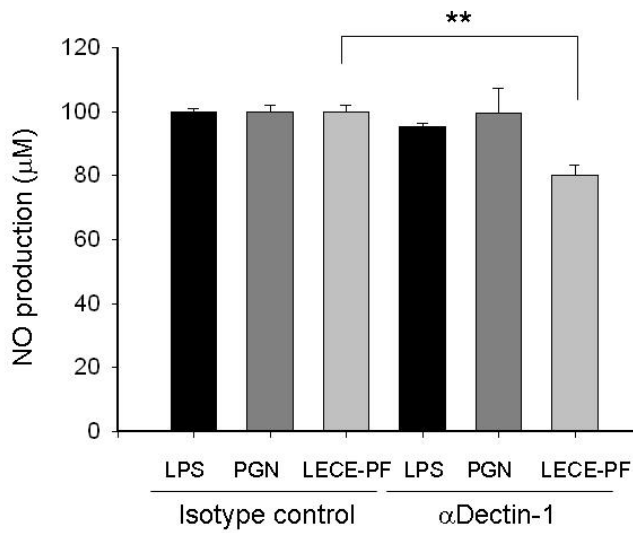


Figure 50. Blocking effect of alpha-dectin antibody on LECE-PF-induced NO production. LECE-PF : *Lentinus edodes* crude extract polysaccharide fraction.

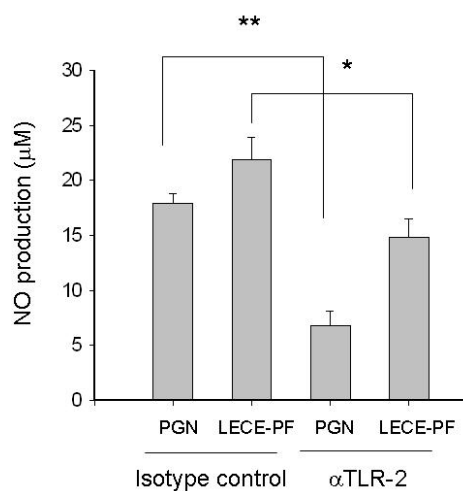


Figure 51. Blocking effect of alpha-TLR-2 antibody on LECE-PF-induced NO production. LECE-PF : *Lentinus edodes* crude extract polysaccharide fraction.

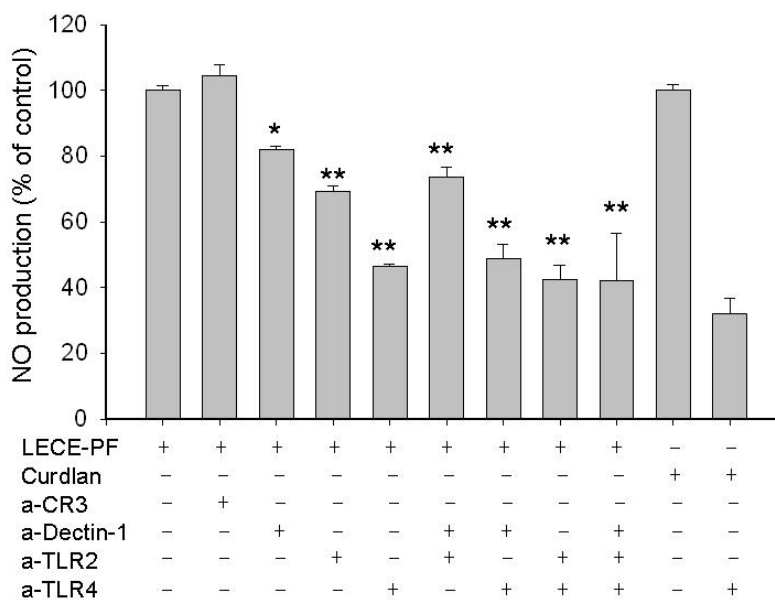


Figure 52. Blocking effect of antibody on LECE-PF-induced NO production. LECE-PF : *Lentinus edodes* crude extract polysaccharide fraction.

#### 10) 분리정도에 따른 단백다당류의 TNF- $\alpha$ 분비에 미치는 효과

이들 분리 분획이 TNF-alpha 분비에 미치는 영향도 조사하였다. Figure 39에서 나타내어져 있듯이 분획 7번에서 가장 강한 TNF-alpha 유도활성을 나타냈다. 따라서 TNF-alpha는 7번 분획이, NO는 9번 분획이 가장 우수한 것으로 확인되었다. (Fig. 53~54)

#### 11) Flow Cytometer를 이용한 면역세포의 표현형 분석 결과

조직이나 장기 내에서 암세포나 침입된 병원균을 신속히 제거하기 위해서는 혈액 내에 존재하는 단핵구들이 조직 내로 신속히 이동되어야 한다. 이와 같은 이동과정은 단핵구의 세포표면에 발현되어 있는 유착조절 당단백질들에 의해서 조절되는 것으로 알려져 있다. 따라서 본 연구자들은 단백다당체 함유 분획에 의한 유착조절 단백질의 발현량 조절 가능성을 조사하였다. Fig. 55에서 확인할 수 있듯이 분획 LECE-PF의 처리는 단핵구의 대표적인 유착단백질들의 발현을 크게 증가시키지는 못하는 것으로 확인되었다. 다만 분획 LECE-PF는 CD29의 기능 조절 단백질인 CD98의 발현량을 약 25 %정도 상승시키는 것으로 사료되었다.

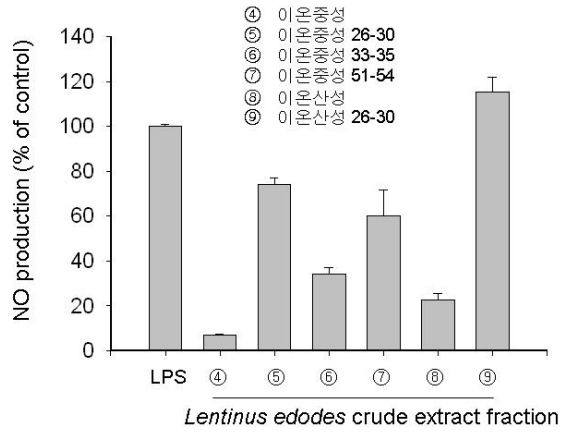


Figure 53. Effect of NO production by fractions from *L. edodes* separated ion exchange column chromatography.

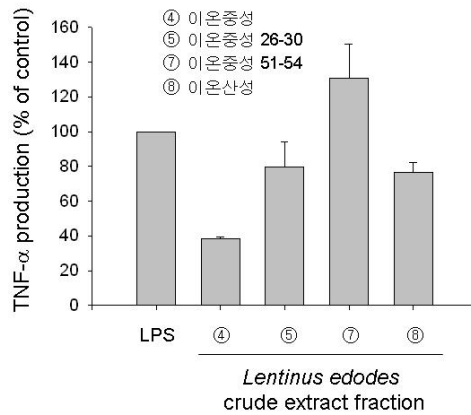


Figure 54. Effect of TNF-α production by fractions from *L. edodes* separated ion exchange column chromatography.

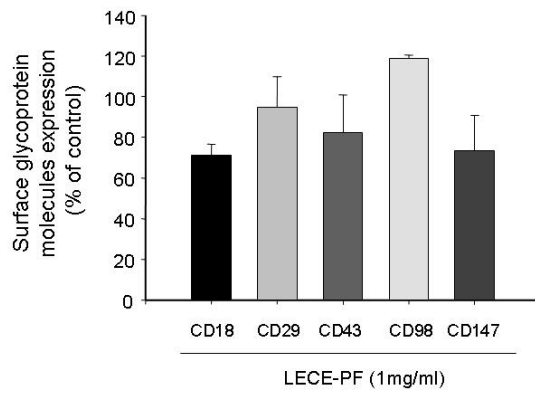


Figure 55. Effect of fraction from *L. edodes* on surface level of adhesion molecule in U937 cells. LECE-PF : *Lentinus edodes* crude extract polysaccharide fraction.

## 12) 표고버섯 추출물의 마우스에 대한 단회경구독성시험

본 시험은 표고버섯의 기능성식품에 대한 가능성을 보기위하여 단회급성독성을 조사하였다. *Lentinus edodes* crude extract (LECE) 와 *Lentinus edodes* culture medium (LECM)를 마우스에 경구투여 시 모든 시험군에서 시험기간 동안 시험물질에 기인한 사망은 관찰되지 않았으며 (Table 9), 시험물질에 의한 독성증상과 특이할 만한 임상증상도 나타나지 않았다 (Table 10). 이상의 결과를 종합하여 보면, *Lentinus edodes* crude extract (LECE) 와 *Lentinus edodes* culture medium (LECM)를 마우스에 1회 경구투여 하였을 때의 LD<sub>50</sub>치는 암 · 수 모두에서 2000 mg/kg 이상으로 산출된다.

또한 시험물질 투여 14일 후 체중증가량을 살펴보면, 시험물질을 투여한 모든 군에서 대조군과 비교해 체중증가의 양상이 유사하였다 (Table 11). 생존동물의 부검 시 *Lentinus edodes* crude extract (LECE) 와 *Lentinus edodes* culture medium (LECM) 투여군과 대조군 모두 내부 장기의 육안적 이상소견은 관찰되지 않았다 (Table 12).

**Table 9. Mortality and LD<sub>50</sub> values in male and female mice treated orally with LECE and LECM.**

Groups	Days after treatment								Final Mortality	LD <sub>50</sub> (mg/g)
	0	1	2	...	12	13	14			
LECE	1M	0/5	0/5	0/5	...	0/5	0/5	0/5	0/5(0%)	>2000
	2M	0/5	0/5	0/5	...	0/5	0/5	0/5	0/5(0%)	>2000
	vehicle	0/5	0/5	0/5	...	0/5	0/5	0/5	0/5(0%)	
	control	0/5	0/5	0/5	...	0/5	0/5	0/5	0/5(0%)	
LECM	1F	0/5	0/5	0/5	...	0/5	0/5	0/5	0/5(0%)	>2000
	2F	0/5	0/5	0/5	...	0/5	0/5	0/5	0/5(0%)	>2000
	vehicle	0/5	0/5	0/5	...	0/5	0/5	0/5	0/5(0%)	
	control	0/5	0/5	0/5	...	0/5	0/5	0/5	0/5(0%)	

LECE : *Lentinus edodes* crude extract ; LECM : *Lentinus edodes* culture medium values are expressed as number of dead animals/total animals (n=5) (percentages).

**Table 10. Clinical signs in rats and mice administered orally with LECE and LECM.**

Groups	Clinical signs	Hours after treatment						Days after treatment					
		1	2	...	5	6	1	2	...	12	13	14	
LECE	1M	NAD	5/5	5/5	...	5/5	5/5	5/5	5/5	...	5/5	5/5	5/5
	2M	NAD	5/5	5/5	...	5/5	5/5	5/5	5/5	...	5/5	5/5	5/5
	vehicle	NAD	5/5	5/5	...	5/5	5/5	5/5	5/5	...	5/5	5/5	5/5
	control	NAD	5/5	5/5	...	5/5	5/5	5/5	5/5	...	5/5	5/5	5/5
LECM	1F	NAD	5/5	5/5	...	5/5	5/5	5/5	5/5	...	5/5	5/5	5/5
	2F	NAD	5/5	5/5	...	5/5	5/5	5/5	5/5	...	5/5	5/5	5/5
	vehicle	NAD	5/5	5/5	...	5/5	5/5	5/5	5/5	...	5/5	5/5	5/5
	control	NAD	5/5	5/5	...	5/5	5/5	5/5	5/5	...	5/5	5/5	5/5

LECE : *Lentinus edodes* crude extract ; LECM : *Lentinus edodes* culture medium

M : Male ; F : Female

Values are expressed as animal numbers.

NAD: no abnormality detected



**Table 11. Body weight gains in male and female mice after once orally dose of LECE and LECM.**

Groups	Interval			
	Day 0–Day 7	Day 7–Day 14	Day 0–Day 14	
LECE	1M	3.4±0.9	0.0±0.7	3.4±1.1
	2M	2.8±0.8	0.2±0.4	3.0±0.7
	vehicle	3.8±0.4	0.6±0.5	4.4±1.5
	control	4.2±1.6	0.4±0.9	4.6±1.8
LECM	1F	1.4±0.5	1.0±0.0	2.4±0.5
	2F	2.8±4.2	0.0±4.1	2.4±0.9
	vehicle	0.6±0.5	3.6±0.5	4.2±1.1
	control	3.6±1.1	0.8±0.8	4.4±1.5

LECE : *Lentinus edodes* crude extract ; LECM : *Lentinus edodes* culture medium

M : Male ; F : Female

Values are expressed as mean ± S.D., g (n=5); All animals were overnight fasted at dosing (Day 0).

**Table 12. Gross findings of necropsy in mice administered orally with LECE and LECM.**

Groups	Observation	Frequency	
LECE	1M	N.G.L	5/5
	2M	N.G.L	5/5
	vehicle	N.G.L	5/5
	control	N.G.L	5/5
LECM	1F	N.G.L	5/5
	2F	N.G.L	5/5
	vehicle	N.G.L	5/5
	control	N.G.L	5/5

LECE : *Lentinus edodes* crude extract ; LECM : *Lentinus edodes* culture medium

Values are expressed as animal numbers.

M : Male ; F : Female

Values are expressed as animal numbers.

N.G.L: no gross lesion.

### 13) 표고버섯 추출물의 항당뇨능 시험 결과

앞서 조사한 독성실험과 마찬가지로 표고버섯의 기능성식품에 대한 가능성을 확인하기 위해 항당뇨 활성을 조사하였다. 실험동물은 streptozotocin (STZ)에 의한 제 1형 당뇨병모델 마우스에 대한 표고버섯 추출물의 혈당강하 및 항당뇨 효과를 알아보려고 하였다. STZ투여에 의해 인슐린 의존형 당뇨병이 유발된 동물에서 vehicle 투여군은 실험 개시 일에  $32.7 \pm 1.5$  g에서 실험 종료일에는  $31.5 \pm 1.6$  g 으로 약간 감소하는 경향을 보였고, *Lentinus edodes* crude extract (LECE) 투여군은 실험 개시 일에  $30.0 \pm 3.5$  g에서 실험 종료일에는  $29.8 \pm 2.8$  g 로 변화가 거의 없었으며, *Lentinus edodes* culture medium (LECM) 투여군은 실험 개시 일에  $31.9 \pm 1.1$  g 에서  $31.0 \pm 1.3$  g 으로 약간 감소하였으나, 세 군 모두 유의성 있는 변화는 없었다. 또한 실험 종료일의 체중 역시 세군 간에 유의성 있는 차이를 보이지 않았다 (Fig. 56).

STZ투여에 의해 인슐린 의존형 당뇨병이 유발된 동물에서 vehicle 투여군은 실험 개시 일에  $240 \pm 28$  mg/dl에서 실험종료일에는  $211 \pm 47$  mg/dl으로 약간 감소되었으나 유의성은 없었다. 한편 *Lentinus edodes* crude extract (LECE) 투여군은 실험 개시일에  $252 \pm 8$  mg/dl에서  $137 \pm 9$  mg/dl로 유의성 있게 감소하였으며, *Lentinus edodes* culture medium (LECM) 투여군은 실험 개시 일에  $261 \pm 18$  mg/dl에서  $182 \pm 14$  mg/dl으로 역시 유의성 있게 감소하였다 (Fig. 57).

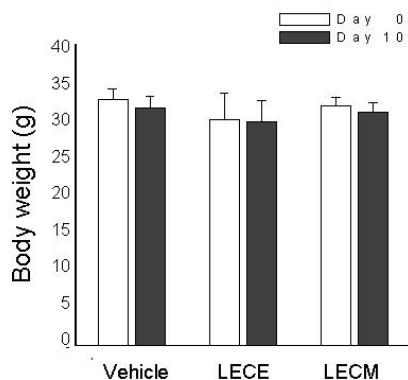


Fig. 56. Effect of fractions from *L. edodes* on body weight in streptozotocin-treated ICR mice. LECE : *Lentinus edodes* culture extract ; LECM : *Lentinus edodes* culture medium.

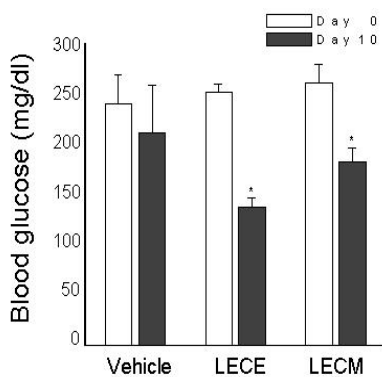


Fig. 57. Effect of fractions from *L. edodes* on blood glucose level in streptozotocin-induced diabetic ICR mice. LECE : *Lentinus edodes* culture extract ; LECM : *Lentinus edodes* culture medium. Differs significantly from the Day 0,  $p < 0.05^*$ .

#### 14) 표고버섯 추출물의 콜레스테롤 저하 효능 검토

근래에 우리나라는 산업화 및 음식물의 서구화 등으로 심혈관계 질환에 의한 사망이 전체 원인의 30 % 정도를 차지하는 것으로 보고되었다. 우리나라 심혈관계 질환 발생의 3대 위험인자로서 고콜레스테롤혈증, 고지혈증, 및 고혈압으로 알려져 있으며, 그중에서 고콜레스테롤 혈증이 가장 큰 비율을 차지하는 것으로 알려져 있다. 그러므로 본 연구에서는 표고버섯을 이용하여 다양한 시료를 제조하여 식이에 의하여 생산된 고콜레스테롤혈증 모델 동물을 이용하여 이들 추출물의 항콜레스테롤혈증을 조사하였다.

가) 표고버섯 추출물의 콜레스테롤 식이 마우스에 대한 혈중콜레스테롤 저하 효과 시험

##### (1) 체중 변화에 미치는 영향

각 실험군의 체중은 Table. 13에 나타낸 바와 같다. 0.5 % 콜레스테롤 식이군에서 식이 후 7 일에 체중이 noraml 군에 비해 감소하였으며 이러한 체중 감소는 표고버섯 추출물의 투여에 의하여 유의한 차이는 관찰할 수 없었다.

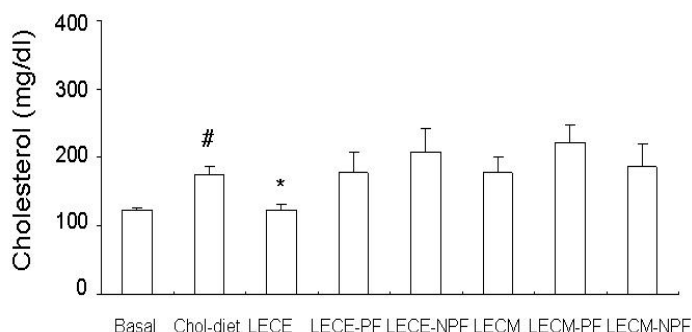
##### (2) 혈청 지질함량에 미치는 영향

실험동물을 일주일간 사육하고 각 실험군의 혈청 총콜레스테롤의 함량을 조사한 결과는 Fig. 58과 같다. 정상대조군의 혈청 콜레스테롤  $122.3 \pm 4.5$  mg/dl 는 0.5 % 콜레스테롤 식이군에서  $174.0 \pm 11.6$  mg/dl 로 통계적인 유의성 있는 혈청 콜레스테롤의 함량 증가를 유발하였다. 한편 표고버섯 조추출물 처리군에서  $122.0 \pm 8.6$  mg/dl을 나타내어 기타 처리군에 비해 가장 우수한 콜레스테롤 저하효과를 보였다. Low density lipoprotein (LDL) 콜레스테롤은 콜레스테롤을 운반하는 지질단백질로서 간에서 합성된 콜레스테롤을 다른 조직으로 옮겨주는 지질단백질로서 혈관의 동맥경화 등을 유발하는 대표적인 동맥경화 위험인자의 지표이다. 정상대조군, 콜레스테롤 식이군 및 각종 표고버섯 추출물 처리군에 있어서 혈청 LDL 콜레스테롤 함량은 Fig. 59와 같다.

**Table 13. Changes in body weight in rats fed with high cholesterol diets for 1 weeks**

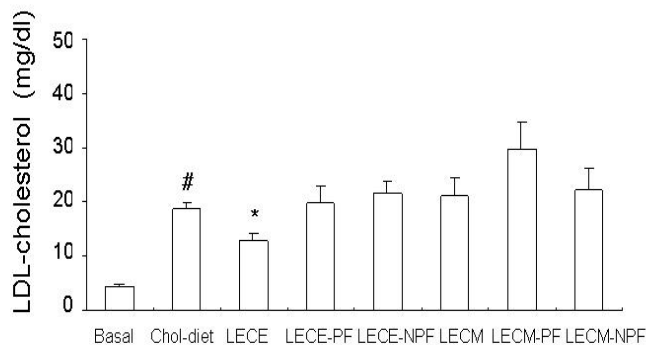
Group	Body weight		
	-7 days	0 days	+7 days
Normal	26.3±0.5	31.3±1.0	36.3±2.4
High cholesterol diet	25.3±1.0	29.0±0.8	31.3±1.0
LECE	25.0±0.8	29.8±0.5	33.3±1.3
LECE-PF	24.0±0.7	29.2±1.6	31.4±2.2
LECE-NPF	24.2±0.8	30.2±2.2	32.8±2.5
LECM	24.4±0.5	29.8±1.3	30.8±1.1
LECM-PF	25.0±1.0	29.0±1.6	31.8±2.7
LECM-NPF	23.8±0.8	28.8±1.3	30.6±1.5

LECE : *Lentinus edodes* crude extract ; LECE-PF : *Lentinus edodes* polysaccharide fraction ; LECE-NPF : *Lentinus edodes* non-polysaccharide fraction ; LECM : *Lentinus edodes* culture medium ; LECM-PF : *Lentinus edodes* culture medium polysaccharide fraction ; LECM-NPF : *Lentinus edodes* culture medium non-polysaccharide fraction.



**Figure 58. Total cholesterol of blood in mice fed with high cholesterol diets for 1 weeks.**

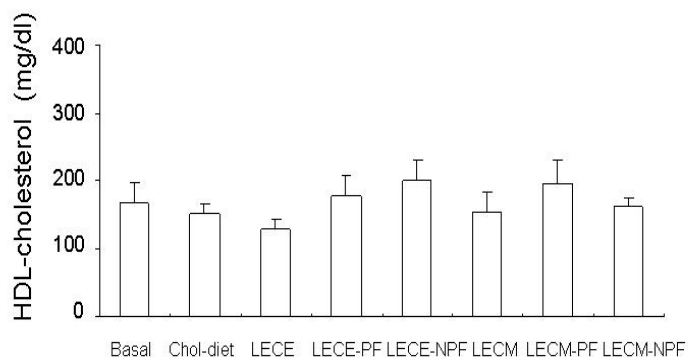
LECE : *Lentinus edodes* crude extract ; LECE-PF : *Lentinus edodes* crude extract polysaccharide fraction ; LECE-NPF : *Lentinus edodes* crude extract non-polysaccharide fraction ; LECM : *Lentinus edodes* culture medium ; LECM-PF : *Lentinus edodes* culture medium polysaccharide fraction ; LECM-NPF : *Lentinus edodes* culture medium non-polysaccharide fraction. # p < 0.05 versus basal, \* P<0.05 versus cholesterol diet.



**Figure 59. LDL-cholesterol of blood in mice fed with high cholesterol diets for 1 weeks.**

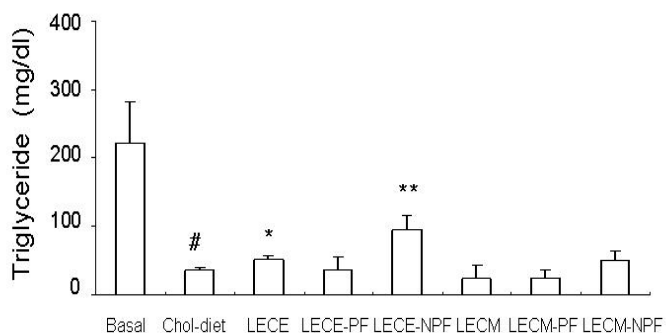
LECE : *Lentinus edodes* crude extract ; LECE-PF : *Lentinus edodes* crude extract polysaccharide fraction ; LECE-NPF : *Lentinus edodes* crude extract non-polysaccharide fraction ; LECM : *Lentinus edodes* culture medium ; LECM-PF : *Lentinus edodes* culture medium polysaccharide fraction ; LECM-NPF : *Lentinus edodes* culture medium non-polysaccharide fraction. # p < 0.05 versus basal, \* P<0.05 versus cholesterol diet.

정상대조군에서 혈청 LDL-cholesterol 값은  $4.3 \pm 4.5$  mg/dl 이었으며 콜레스테롤 식이군에서는  $18.8 \pm 1.1$  mg/dl로서 통계적으로 유의성 있는 증가경향을 보였다. 한편 표고버섯 처리군에 있어서 표고버섯 조추출물 처리군에 있어서만 혈청 LDL 콜레스테롤 값이 통계적인 유의성있는 감소경향을 보였다 ( $12.8 \pm 1.5$  mg/dl). 또한 High density lipoprotein (HDL) 콜레스테롤은 조직에서 간으로 콜레스테롤을 운반해주는 지질단백질로서 혈관등에서 콜레스테롤을 제거해주는 역할을 할 것으로 기대되는 지질단백질로 알려져 있다. 본 실험계에서 정상대조군, 콜레스테롤식이군 및 다양한 표고버섯 추출물 처리군에서 혈청 HDL-콜레스테롤의 함량 변화는 유의성이 없었다 (Fig. 60). 중성지방 (triglyceride)은 정상대조군에서  $111.3 \pm 29.7$  mg/dl의 혈중함량을 보였으며 콜레스테롤 식이군에서  $18.0 \pm 1.9$  mg/dl로 급격히 감소하였으며 표고버섯 추출물 처리군 중에서 조추출물 처리군에서 혈중 중성지방 함량은  $25.3 \pm 3.2$  mg/dl 이었고 표고버섯자실체의 비다당류 분획 처리군에서는  $47.0 \pm 10.7$  mg/dl이로서 통계적으로 유의성있게 중성지방함량이 회복되는 경향을 보였다 (Fig. 61). 정상 대조군, 콜레스테롤 식이군 및 다양한 표고버섯 추출물 처리군에 있어서의 혈청  $\beta$ -lipoprotein 함량 변화는 Fig. 62 과 같다.  $\beta$ -lipoprotein은 very low density lipoprotein (VLDL) 형태로 간에서 혈중으로 방출되며 이는 혈중에서 lipoprotein lipase에 의해 분해되어 생성되어 hyperlipoproteinemia를 유발하는 것으로 알려졌다 정상대조군에서  $\beta$ -lipoprotein은  $158.3 \pm 22.1$  mg/dl의 함량을 보였으며 콜레스테롤 식이군에서  $197.0 \pm 13.9$  mg/dl로 증가하였으며 표고버섯 추출물 처리군 중에서 조추출물 처리군에서 혈중  $\beta$ -lipoprotein 함량은  $131.0 \pm 13.7$  mg/dl 로서 콜레스테롤 식이군보다 통계적으로 유의성있게 감소되는 경향을 보였다 (Fig. 63).



**Figure 60. HDL-cholesterol of blood in mice fed with high cholesterol diets for 1 weeks.**

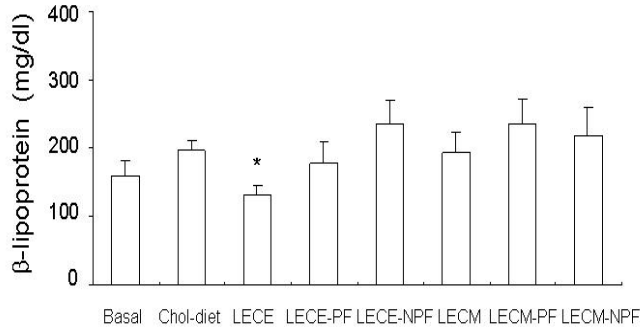
LECE : *Lentinus edodes* crude extract ; LECE-PF : *Lentinus edodes* crude extract polysaccharide fraction ; LECE-NPF : *Lentinus edodes* crude extract non-polysaccharide fraction ; LECM : *Lentinus edodes* culture medium ; LECM-PF : *Lentinus edodes* culture medium polysaccharide fraction ; LECM-NPF : *Lentinus edodes* culture medium non-polysaccharide fraction. #  $p < 0.05$  versus basal, \*  $P < 0.05$  versus cholesterol diet.



**Figure 61. Triglyceride of blood in mice fed with high cholesterol diets for 1 weeks.**

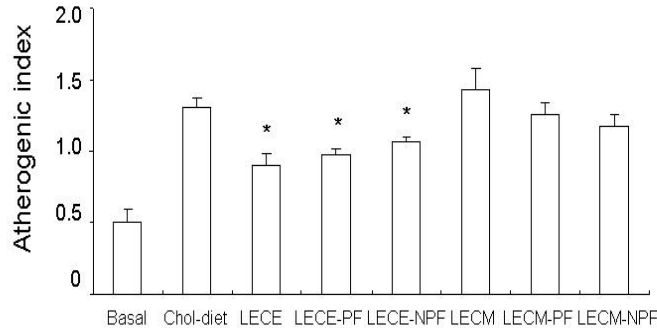
LECE : *Lentinus edodes* crude extract ; LECE-PF : *Lentinus edodes* crude extract polysaccharide fraction ; LECE-NPF : *Lentinus edodes* crude extract non-polysaccharide fraction ; LECM : *Lentinus edodes* culture medium ; LECM-PF : *Lentinus edodes* culture medium polysaccharide fraction ; LECM-NPF : *Lentinus edodes* culture medium non-polysaccharide fraction. #  $p < 0.05$  versus basal, \*  $P < 0.05$  versus cholesterol diet.





**Figure 62.  $\beta$ -lipoprotein of blood in mice fed with high cholesterol diets for 1 weeks.**

LECE : *Lentinus edodes* crude extract ; LECE-PF : *Lentinus edodes* crude extract polysaccharide fraction ; LECE-NPF : *Lentinus edodes* crude extract non-polysaccharide fraction ; LECM : *Lentinus edodes* culture medium ; LECM-PF : *Lentinus edodes* culture medium polysaccharide fraction ; LECM-NPF : *Lentinus edodes* culture medium non-polysaccharide fraction. #  $p < 0.05$  versus basal, \*  $P < 0.05$  versus cholesterol diet.



**Figure 63. Atherogenic index in mice fed with high cholesterol diets for 1 weeks. Atherogenic index was calculated as followings**

(total cholesterol-HDL cholesterol)/HDL cholesterol. LECE : *Lentinus edodes* crude extract ; LECE-PF : *Lentinus edodes* crude extract polysaccharide fraction, LECE-NPF : *Lentinus edodes* crude extract non-polysaccharide fraction ; LECM : *Lentinus edodes* culture medium ; LECM-PF : *Lentinus edodes* culture medium polysaccharide fraction ; LECM-NPF : *Lentinus edodes* culture medium non-polysaccharide fraction. #  $p < 0.05$  versus basal, \*  $P < 0.05$  versus cholesterol diet.

나) 표고버섯 추출물의 LDL 수용체 knockout 마우스에 대한 혈중콜레스테롤 저하 효과 시험

콜레스테롤은 지방의 일종으로 생체에 필수적인 구성성분이며 성호르몬, 부신피질호르몬 및 비타민 D등을 만드는 원료로 사용된다. 콜레스테롤은 주로 간에서 합성되며 혈중에서 다른 지방과 단백질과 함께 작은 등근 입자인 지질단백질 (lipoprotein) 형태로 존재한다. 특히 LDL-콜레스테롤은 혈중의 콜레스테롤을 간조직에 있는 LDL 수용체와 결합하여 간조직으로 전달해주는 역할을 하므로 혈중 콜레스테롤의 함량을 낮추어 준다. 그러나 LDL 수용체를 knockout 시킨 마우스에서는 이러한 작용이 결핍되어 콜레스테롤의 혈중 함량이 증가하므로 동맥경화증과 허혈성 심질환과 같은 순환기 질환에 걸리기 쉬운 것으로 알려져 있다. 그러므로 본 실험에서는 식이에 의한 혈청 콜레스테롤 함량을 낮춘 표고버섯 자실체를 선정하여 LDL 수용체 knockout 마우스의 증가된 혈중 콜레스테롤에 미치는 표고버섯 자실체 추출물의 효과를 확인하고자 한다.

(1) 체중 변화에 미치는 영향

각 실험군의 체중은 Table. 14에 나타난 바와 같다. 0.5 % 콜레스테롤 식이군에서 식이 후 7일에 체중이 normal 군에 비해 감소하였으며 이러한 체중 감소는 표고버섯 추출물의 투여에 의하여 유의한 차이는 관찰할 수 없었다.

(2) 혈청 지질함량에 미치는 영향

혈중 콜레스테롤의 약 70 %정도는 LDL에 결합된 형태로 존재하며 일정한 농도의 혈중 LDL 콜레스테롤의 유지를 위해서 생체 조직세포에 존재하는 LDL 수용체의 존재는 필수적이다. 만약 LDL 수용체의 활성이 높으면 혈중 콜레스테롤의 수치가 낮아지지만 LDL 수용체의 활성이 낮거나 특이적으로 LDL 수용체를 제거하면 (LDL 수용체 knockout 마우스) 혈중 콜레스테롤의 함량이 증가되어 혈관이 손상되므로 동맥경화증 등 혈관질환에 걸리기 쉽게 된다. 본 실험에 사용한 LDL 수용체 knockout 마우스의 혈청 콜레스테롤은  $427.8 \pm 43.6$  mg/dl 로서 정상대조군의  $99.3 \pm 4.1$  mg/dl 에 비해 유의적인 증가 경향을 보였으며 중성지방은 정상대조군에서  $61.3 \pm 26.3$  mg/dl 에 비해 LDL 수용체 knockout 마우스에서는

**Table 14. Changes in body weight in rats fed with high cholesterol diets for 1 weeks**

Group	Body weight		
	-7 days	0 days	+7 days
Normal	22.3±1.2	24.3±1.1	25.2±2.1
LDL knockout mice	25.2±0.8	26.2±1.3	26.4±1.7
LECE	26.5±0.8	27.2±1.6	25.6±2.1
LECE-PF	26.0±1.2	27.0±6.4	26.6±6.8
LECE-NPF	29.4±3.9	30.2±5.0	27.8±4.3

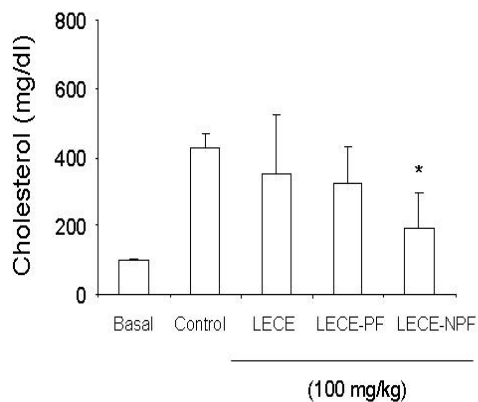
LECE : *Lentinus edodes* crude extract ; LECE-PF : *Lentinus edodes* crude extract polysaccharide fraction ; LECE-NPF : *Lentinus edodes* crude extract non-polysaccharide fraction

228.5 ± 46.8 mg/dl 로서 통계적인 유의성 있는 증가 경향을 보였다.

또한 LDL-콜레스테롤 (6.3 ± 1.2 mg/dl 와 92.5 ± 18.6 mg/dl) 및 혈청 β-lipoprotein의 함량에 있어서도 정상대조군은 94.0 ± 18.6 mg/dl 였지만 LDL 수용체 knockout 마우스에서는 1011.8 ± 255.4 mg/dl 로서 유의성있는 증가현상을 보였다. 이들의 결과를 종합해 볼 때 LDL 수용체 knockout 마우스는 고콜레스테롤 혈증을 보였으며 콜레스테롤 식이에 의한 고콜레스테롤혈증과 함께 표고버섯의 항콜레스테롤 효능을 시험하기에 적합한 모델 동물로 판단되었다. 시험물질을 일주일간 투여하고 각 실험군의 혈청 총콜레스테롤의 함량을 조사한 결과는 Fig. 64과 같다.

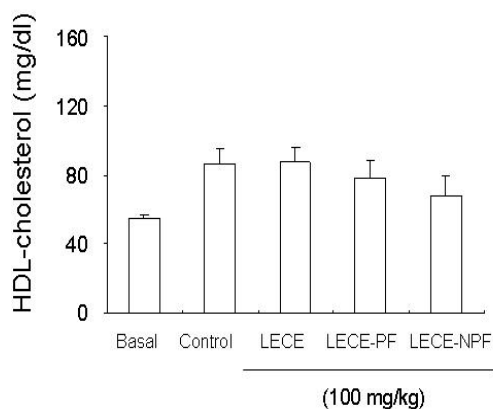
LDL 수용체 knockout 마우스에 일주일간 표고버섯 자실체의 조추출물, 표고버섯 자실체의 다당류 분획 및 비다당류분획을 투여한 후 혈청 콜레스테롤은 427.8 ± 43.6 mg/dl에서 350.8 ± 171.2 mg/dl, 320.8 ± 109.8 mg/dl, 192.0±103.0 mg/dl 로서 표고버섯 자실체의 비다당류 분획 처리군에 있어서 통계적인 유의성 있는 감소현상을 보였다. 이러한 결과는 콜레스테롤 식이에 의한 고콜레스테롤혈증 동물모델로부터 얻은 결과와 상이하였으며 표고버섯의 추출물의 항콜레스테롤 효과는 성분에 따라 모델 특이적인 항콜레스테롤 효과를 보였다. 혈중 HDL-콜레스테롤 함량에 있어서 LDL 수용체 knockout 마우스에 있어서 정상 대조군에 비해 증가하는 경향을 보였으며 표고버섯 자실체 추출물 처리군에 있어서도 통계적인 유의성 있는 HDL-콜레스테롤의 함량 변화는 관찰되지 않았다 (Fig. 65 참조).

LDL 수용체 knockout 마우스에서 증가된 혈청 LDL-콜레스테롤에 미치는 표고버섯 자실체의 각각 추출물의 효과는 (Fig. 66)와 같다. LDL knockout 마우스에서의 혈청 LDL-콜레스테롤 함량은 92.5 ± 18.6 mg/dl 로서 정상대조군의 6.3 ± 1.2 mg/dl에 비해 통계적인 유의성 있는 증가현상이 관찰되었다. 그러나 표고버섯 자실체 추출물을 일주일간 경구투여는 증가된 LDL-콜레스테롤의 함량을 조절하는 활성을 보이지 못하였다 (Fig. 67).



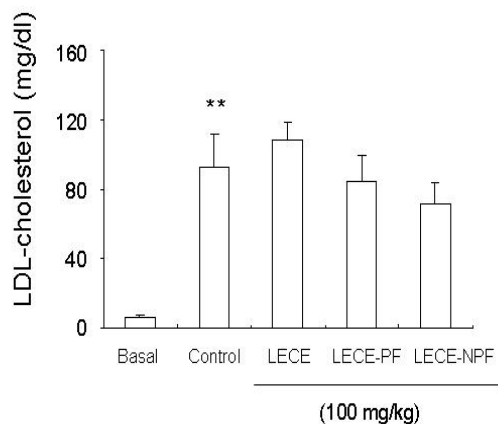
**Figure 64. Total cholesterol of blood in LDL knockout mice fed with vehicle or various fractions of *Lentinus edodes* for 1 weeks.**

LECE : *Lentinus edodes* crude extract ; LECE-PF : *Lentinus edodes* crude extract polysaccharide fraction ; LECE-NPF : *Lentinus edodes* crude extract non-polysaccharide fraction. \* P<0.05 versus LDL knockout mice.



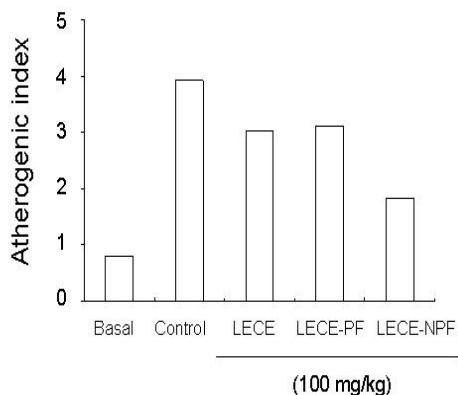
**Figure 65 . HDL-cholesterol of blood in LDL knockout mice fed with vehicle or various fractions of *Lentinus edodes* for 1 weeks.**

LECE : *Lentinus edodes* crude extract ; LECE-PF : *Lentinus edodes* crude extract polysaccharide fraction ; LECE-NPF : *Lentinus edodes* crude extract non-polysaccharide fraction.



**Figure 66. LDL-cholesterol of blood in LDL knockout mice fed with vehicle or various fractions of *Lentinus edodes* for 1 weeks.**

LECE : *Lentinus edodes* crude extract ; LECE-PF : *Lentinus edodes* crude extract polysaccharide fraction ; LECE-NPF : *Lentinus edodes* crude extract non-polysaccharide fraction. \*\* P<0.01 versus LDL knockout mice.



**Figure 67. Atherogenic index in LDL knockout mice fed with vehicle or various fractions of *Lentinus edodes* for 1 weeks.**

Atherogenic index was calculated as followings ; (total cholesterol-HDL cholesterol)/HDL cholesterol. LECE : *Lentinus edodes* crude extract ; LECE-PF : *Lentinus edodes* crude extract polysaccharide fraction ; LECE-NPF : *Lentinus edodes* crude extract non-polysaccharide fraction.

### 제 3 절 기능성 가공제품개발 (협동연구과제)

#### 가. 연구배경

예로부터 식용 및 약용으로 널리 이용되어 온 자연식품인 버섯은 약리학적인 면에서 생체방어, 질병회복, 뇌졸중, 심장병 등의 성인병에 대한 예방과 개선 등에 효과가 있으며, 이 외에도 고지혈증, 노인성 치매에 효과가 있는 유효성분이 보고되었으며, 특히 뇌 내의 acetylcholine esterase 활성 억제로 뇌 내의 choline 성 기능을 향진시켜 노인성 치매의 제증상을 완화하고 있으며(3), 버섯에서 분리된  $\beta$ -D-glucan 류의 항암활성, 항산화성, 면역증강 기능 등이 보고되면서 버섯 다당류에 대한 연구가 이루어지고 있는 실정이며 이와 더불어 기능성 식품소재로서 그 활용가치가 높아지고 있다(49, 50).

우리나라에는 식용으로 이용되고 있는 버섯류 중 대표적인 것으로는 느타리 버섯, 표고버섯, 양송이 및 송이 등을 들 수 있으며, 이들 중 특히 표고버섯 등을 1965년경부터 정부의 농가소득 향상을 위한 장려정책으로 인공재배법이 널리 보급되면서 계절에 구애 받지 않고 식용으로 이용할 수 있게 되었다(51). 표고버섯 (*Lentinus edodes*)은 담자균류 느타리과 잣버섯속 혹은 송이과 표고속으로 분류되며, 활엽수(참나무, 졸참나무, 너도밤나무)의 목재 그루터기에서 발생한다. 표고는 우리나라에서 생산량이 가장 많은 버섯 중에 하나로 열량이 높고 단백질과 비타민이 많기 때문에 동양인이 좋아하고, 서양인들도 많이 소비하고 있는 실정이다. 그러나 버섯류는 대부분 신선한 상태로 장기간 저장이 어려워 출하가 많아졌을 경우 소비와 공급의 적절한 균형이 맞지 않아 가격의 폭락으로 생산농가에 막대한 손실을 주기도 하며, 재배기술이 개선되어 점진적으로 생산량이 증가되거나 수요가 이를 따르지 못해 계절적 공급과잉으로 가격파동 또한 우려된다(52). 따라서 출하조절을 위한 가공기술의 개발이 필요한데 버섯을 이용한 가공품으로는 스낵, 음료, 술, 통조림 등으로 매우 한정되어 있다.

우리나라 전통 식품 중 하나인 전병(前餅)이란 이름의 음식은 기원전 200년 전부터 중국에서 있었다고 하는데, 아무시기에나 많이 먹을 수 있는 음식이라기 보다는 음력 1월 1일과 3월 3일의 특별한 축일(祝日)에만 해먹은 음식이었다고 한다. 이런 중국의 전병이 일본에 들어온 때는 8세기말에서 9세기초경에 승려인 코오보오 대사(弘法大師)가 중국에서의 공부를 마치고 돌아오면서이다. 그리고 시간이 흐르면서 그 제조법이 중국에서 만드는 방법과는 달라졌는데 처음에는 밀가루에 설탕과 물을 넣고 반죽한 후 증기로 찌고, 그 큰 덩어리에서 조금씩 떼

어서 얇고 둥근 모양으로 만들어 말린 후 한 장씩 화로 위에서 구워 내었다고 한다.

한편, 도쿄 근처의 평야지대에서는 쌀농사가 많이 이루어졌는데, 특히 지금의 사이타마현 소카시 부근의 농가에서는 논일을 하다가 쉽게 먹을 수 있도록 밀가루 전병과 비슷한 음식을 만들어 내었다. 처음엔 이런 서민의 음식을 전병에 비해 낮은 취급을 하였으나 시간이 지나면서 아예 멥쌀을 갈아서 증기에 찌고 반죽하여 말려서 만들었기 때문에 오래 보관도 되면서 밥 대용으로 먹을 수 있어서 점점 사람들 사이에 인기를 모으며 퍼지기 시작했다. 멥쌀로 만들어 굵고 소금을 뿌린 이 음식을 이 지역사람들은 ‘시오센베이’라고 불렀으며, 더 나아가 찹쌀로 만든 것을 ‘아라레 또는 오카키’라고도 한다.

또한 오사카 중심의 지방에서는 밀가루에 설탕과 계란을 넣어 반죽해서 얇게 구워낸 것을 ‘센베이’라고 부른다. 우리나라에서 많이 먹는 전병의 원조라고 할 수 있다. 전병은 순수한 우리말로 ‘부꾸미’라고 하며, 화전(花煎)과 수수, 찹쌀 부꾸미 등 수 천년 동안 각 지방마다 다양하게 발달해 온 먹을거리지만, 일본의 전통 먹을거리인 쌀 센베이에 비하면 인식 부족과 존재의 이유와 그 가치가 잊혀져 가고 있는 실정이다.

강정은 우리나라 전통식품의 하나로 고대로부터 각종 제례, 잔칫상에 항상 사용하였으며 지금도 애용되고 있는 식품으로(53), 과거 곡물생산의 증대와 숭불사조(崇佛思潮)에서 오는 육식을 기피하는 음다(飲茶) 등을 배경으로 신라, 고려 시대부터 고도로 발달하였던 음식이다(54). 한과류의 일종인 옛강정은 증탕한 옛물이나 조청, 꿀, 설탕을 끓인 시럽에 종실류, 과실류, 곡류 등을 넣고 버무려서 반대기를 지어서 굳으면 편으로 썬 음식으로 일반 대중들에게 지속적인 사랑을 받으면서 전해 내려오고 있으며 현재는 기호식품으로 애용되고 있다(55,56).

옛강정의 종류에는 콩옛강정, 깨옛강정(흰깨옛강정, 들깨옛강정), 백자편(잣박산, 잣옛강정), 낙화생옛강정, 호두옛강정, 대추옛강정, 보리옛강정 등이 있으며, 쌀을 주식으로 하는 우리 식생활에서 결핍되기 쉬운 영양소를 보충해주는 역할을 해왔다. 또한 식생활이 발달함에 따라 식생활구조가 주식, 부식, 후식의 식사형태로 뚜렷해지면서 후식의 위치로 자리 잡게 되었다(57).

전통식품이나 기호식품으로 애용되고 있는 강정은 화학물질을 전혀 사용하지 않는 자연식이라 건강식으로 그 인식과 소비가 확산되고 있으며, 이러한 수요증가에 따라 대량생산의 필요성과 아울러 소비자의 기호도에 따른 제품의 다양화 필요성과 품질측면에서 발전시켜야 할 여지가 많다. 지금까지의 유과류(강정)에 관한 연구로는 강정의 표준화(58), 품질 개선에 관한 연구(59) 등과 일부 첨가물을 달리한 강정의 품질 향상 효과에 대한 연구가 시도되었다(60,61).

예로부터 표고버섯은 우리 식생활에 다양하게 이용되어 왔으며, 여러 가지



가공방법을 통하여 사용 빈도와 범위를 확장시킬 수 있는 방안이 연구되어 왔다. 그러나 전통식품 중 하나인 엿강정에 표고버섯을 첨가하여 제조하는 표고버섯강정의 제조는 수행된 바가 없다. 현재 시중에 제품화 되어 있지도 않은 실정이며 따라서 품질 특성에 관한 조사도 거의 이루어지지 않고 있으므로 적당한 가공방법의 확립과 최적의 배합비 등을 설정하여 제품화 한다면 강정에 대한 새로운 인식과 표고버섯의 소비를 촉진할 수 있는 기반의 조성, 또한 강정의 주성분인 쌀에 부족한 영양성분을 보충해줄 수 있는 역할까지 할 수 있을 것으로 생각된다.

표고버섯의 유통은 생 버섯, 건조품, 분말 등이 주로 유통되고 있으며, 과립 및 추출액 등의 형태로 극히 소량이 유통되고 있는 실정이다. 생 버섯은 호흡량과 수분함량이 높고 조직이 연하여 유통기한이 짧아 주로 건조품으로 유통되며, 이러한 건조품을 이용하여 분말, 과립 또는 추출액의 형태로 2차 가공되어 진다.

약용 및 기호성 식물체로부터 유효성분을 섭취하기 위한 수단으로 열수에 우려거나 타서 마시는 과립차의 형태가 오래 전부터 널리 이용되어 왔으나, 근래에 들어서는 추출액, 농축액, 과립, 캡슐 등과 같은 섭취 편리성이 강조된 제품들이 생산되고 있다. 분말 제조 시 사용되는 부형제로는 starch, dextrin, lactose, glucose, maltose, gelatin, arabic gum, methyl cellulose 등이 있다. 이들 중 dextrin은 glucose와 maltose를 제외한 전분의 가수분해 생성물을 말하며 분해정도를 나타내는 dextrose equivalent(DE)에 따라 각기 다른 성질을 가지나 일반적으로 흡습성이 낮고 용해분산성이 우수하고 조직감 개선효과가 있어 널리 사용되고 있다(62-64).

표고버섯은 봄, 여름, 가을에 걸쳐 생산이 되며 생표고의 수분 함량은 75~90% 내외로서 쉽게 변질되므로 신선한 상태로의 장기간 저장이 어려워진다. 따라서 품질의 보존을 위해서는 적절한 건조, 저장 방법 등이 필수적으로 요구되나 제품의 품질 감소를 초래할 뿐만 아니라 막대한 저장 비용도 감수해야 된다. 또한 최근 식생활 문화의 서구화와 외식의 증가에 따라 국민들의 영양 불균형이 초래되고 있으며, 특히 어린이들의 편식이 건강을 위협하고 포화지방산의 과도 섭취로 인해 LDL 콜레스테롤을 증가시켜 동맥경화나, 관상 심장병 등 여러 가지 성인병이 발생하고 있다.

따라서 표고버섯이 갖는 낮은 지방 함량에 의한 저칼로리 식품의 장점과, 단백질, 비타민 및 각종 무기성분이 풍부하게 함유되어 있어 건강식품으로서의 각광을 받고 있는 연중 수확이 가능한 버섯을 식품으로 이용하기 위한 적절한 가공방법을 모색하여 고부가가치를 갖는 식품으로의 개발이 필요한 실정이다.

지금까지의 표고버섯에 관한 연구로는 버섯에 관한 특성에 집중되었고(65, 66) 일부 가공제품에 관한 연구들이 이루어져 왔다(67-69). 본 연구에서는 전통

식품인 조청에 표고버섯 분말을 첨가하여 탄수화물이 주원료인 기존 조청의 영양학적 단점을 보완하고자 하는 가공 적성을 조사하였고, 조청보다는 좀 더 일반적으로 이용이 되고 있는 물엿에 첨가한 제품을 개발할 수 있는 가능성에 관한 연구와 우리가 흔히 접할 수 있는 전병에 표고버섯 분말을 첨가하여 기존 전병의 영양학적 단점을 보완하고자 하는 가공 적성을 조사하였고, 첨가량에 따른 선택도를 조사하여 최적 표고버섯 첨가량을 조사하였으며, 쌀을 이용하여 제조하는 강정에 표고버섯 첨가량을 달리하여 제조하고 이화학적 특성을 조사하였으며, 최적의 첨가량 등을 검토하여 가장 기호도가 높은 표고버섯 강정의 기본 recipe(조리법)를 설정하고자 하였다. 그리고 마지막으로, 표고버섯의 효율적인 이용과 가공식품 소재로서 상품성과 부가가치를 높이기 위한 방법으로 추출액을 제조하고, 이를 이용한 음료의 개발 가능성을 살펴보고, capsule 형태의 제품을 개발하여 건강식품 및 의약품으로의 이용가치를 높이기 위한 실험을 실시하였다.

## 나. 재료 및 방법

### 1) 실험 재료

표고버섯(*Lentinus edodes*) 분말은 장흥 표고유통공사에서 흑고를 건조시켜 분말화한 것을 재료로 사용하였다.

조청의 제조에 사용한 멍쌀과 엿기름은 시중 농협에서 구입하여 사용하였다.

전병에 이용된 밀가루는 중력 1등급(대한제분)을 이용하였으며, 기타 부재료로서 98% 정제염(한주소금), 설탕(제일제당) 등은 시중 농협에서 구입하여 사용하였다.

### 2) 조청의 제조

표고버섯(*Lentinus edodes*) 분말을 첨가하는 방법을 달리하여 다음과 같이 3가지 방법에 의하여 조청을 제조하였다.

#### 가) 표고버섯 분말을 밥에 첨가하여 조청을 제조하는 방법

멍쌀을 증류수로 3회 세척 후 실온에서 4시간 수침을 하였다. 수침한 쌀 1 kg에 표고버섯 분말을 각각 10 g(1%), 20 g(2%), 30 g(3%)씩 첨가하고, 전기 밥솥(SJ-320, Samsung)에서 고두밥을 짓는다. 그 후 물 4 L와 엿기름 300 g을

첨가하여 55℃ 향온기에서 4시간 동안 당화하였다. 당화액은 면포로 걸러낸 후 시료내의 온도가 91℃에서 1시간 저어주면서 가열하여 조청을 제조하였다. 대조구로서 표고버섯 분말을 넣지 않은 조청을 제조하여 사용하였다.

나) 표고버섯 분말을 당화액에 첨가하여 조청을 제조하는 방법

멥쌀을 증류수로 3회 세척 후 실온에서 4시간 수침을 하였다. 수침한 쌀을 전기밥솥(SJ-320, Samsung)에서 밥짓기를 하였다. 그 후 밥 1 kg에 엿기름 300 g과 물 4 L를 넣어 55℃ 향온기에서 4시간 당화시킨다. 당화액을 면포로 걸러낸 후 표고버섯 분말을 각각 10 g(1%), 20 g(2%), 30 g(3%)를 첨가하여 시료내의 온도가 91℃에서 1시간 저어주면서 가열하여 조청을 제조하였다.

다) 표고버섯 추출액을 첨가하는 방법

추출액은 표고버섯 분말 50 g에 증류수 1.5 L를 첨가하여 약탕기(DWP-1800T, 대웅전기산업)를 이용하여 추출하고 추출액의 최종부피가 1 L가 되게 농축한 후 추출액으로 사용하였다.

멥쌀을 증류수로 3회 세척 후 실온에서 4시간 수침을 하였다. 수침한 쌀을 전기밥솥(SJ-320, Samsung)에서 밥짓기를 하였다. 그 후 밥 1 kg에 엿기름 300 g과 물 4 L를 넣어 55℃ 향온기에서 4시간 당화시킨다. 당화액을 면포로 걸러낸 후 당화액을 줄일 때 당화액과 표고 추출액을 다음과 같이 혼합하여 줄이기를 하였다. 당화액 : 표고추출액의 비가 10:0, 7:3, 5:5, 3:7의 비율로 첨가하여 각각 시료를 제조하였다.

### 3) 전병의 제조

전병은 표고버섯(*Lentinus edodes*) 분말의 첨가하는 비율을 달리하여 전병을 제조하였다. 표고버섯 분말 첨가 전병의 재료 배합비는 Table 15와 같다. 밀가루 중량 500g을 기준으로 표고버섯 분말은 5%(25g), 10%(50g), 15%(75g), 20%(100g)를 첨가하였으며, 설탕(550g), 계란(350g), 버터(40g), 우유(350g), 소금(5g), 물엿(5g)은 전 시료군에 일정하게 첨가하여 전병을 제조하였다.

먼저 밀가루에 일정 비율의 표고버섯 분말을 섞어 체로 친다. 계란 흰자와 설탕은 머랭을 올려놓고, 노른자에 우유, 소금, 물엿과 미리 중탕하여 녹인 버터를 섞는다. 위의 밀가루에 고루 섞은 후 1시간 정도 휴지한 다음 전병을 제조하였

다. 대조구로서 표고버섯 분말을 넣지 않은 전병을 제조하여 사용하였다.

#### 4) 강정의 제조

강정은 표고버섯(*Lentinus edodes*)을 일정 비율로 첨가하면서 제조하였다. 표고버섯 첨가 강정의 재료 배합비는 Table 15와 같이 쌀 튀밥 300 g을 기준으로 표고버섯을 20%(60 g), 30%(90 g), 40%(120 g), 50%(150 g)를 각각 첨가하였으며, 설탕(20 g), 조청(180 g), 식용유(10 g)는 전 시료군에 일정하게 첨가하여 강정을 제조하였다.

먼저 쌀을 팽화시켜 튀밥을 만들어 놓는다. 건조 표고버섯을 일정한 크기로 잘게 세절한 다음 튀밥기계(압력솥)에서 1분정도 튀긴 후 쌀 튀밥과 일정 비율로 고르게 섞어둔다. 조청에 설탕과 식용유를 넣고 1분간 열을 가하여 설탕을 녹인 후 쌀 튀밥과 표고버섯 혼합 시료를 넣고 재빨리 혼합한 다음 틀에 넣고 성형을 한다. 5분 정도 지난 후 적당한 크기로 잘라 표고버섯 강정을 제조하였다. 대조구로서 표고버섯을 넣지 않은 강정을 제조하여 사용하였다.

Table 15. Formulas for *Gangjeong* added with different amounts of *Lentinus edodes*

(unit : g)

	Control	Substitution level of <i>Lentinus edodes</i>			
		20%	30%	40%	50%
Puffed rice	300	240	210	180	150
<i>Lentinus edodes</i>	0	60	90	120	150
Sugar			20		
Starch syrup			180		
Vegetable oil			10		

## 5) 건강식품의 제조

### 가) 표고버섯 추출액의 제조

표고버섯(*Lentinus edodes*) 분말 30 g에 증류수 1000 mL를 reflux condenser가 부착된 추출장치에 넣고,  $90\pm 5^{\circ}\text{C}$ 로 유지하면서 10시간 동안 열수 추출하였다. 추출액은 filter paper(Whatman No. 41)를 이용하여 감압 여과하고, 1000 mL로 정용하여 제조하였다.

### 나) 농축액 제조

위와 같은 방법으로 제조된 표고버섯 추출액 1 L를 여과지로 여과한 후, 여과액을 증발농축기(EYELA, Tokyo Rikakikai Co. Ltd., Japan)로 200 mL까지 1/5로 농축하여 농축액을 제조하였다.

### 다) 조다당체(crude polysaccharide)의 추출, 분리

추출액에 약 5배량의 에탄올을 넣고 충분히 흔들어 준 후,  $4^{\circ}\text{C}$ 에서 24시간 동안 침전 대기하였다. 원심분리를 하여 상등액을 제거하고 침전물을 분리하여 동결·건조하여 조다당체를 최종적으로 분리하였다.

## 6) 성분분석

### 가) 일반성분

표고버섯을 첨가한 시료의 일반성분은 A.O.A.C법(70)에 따라 분석하였다. 즉, 수분은 상압가열건조법, 조회분은 건식회화법, 조지방은 특수법, 조단백질은 자동질소증류장치를 이용한 micro Kjeldahl법으로 정량하였으며, 탄수화물은 100에서 수분, 조단백질, 조지방과 회분의 함량을 제외한 값으로 하였다.

### 나) 무기성분 및 납의 분석

시료의 무기성분과 납의 분석은 건식분해법(71)에 따라 시료 일정량을 도가니에 취하여 예비 탄화시킨 다음 전기로( $500\sim 600^{\circ}\text{C}$ )에서 완전히 회화시켰다.

방냉 후 염산:물(1:1 v/v) 10 mL를 첨가하여 수욕상에서 증발 건조시킨 다음 염산:물(1:3 v/v) 10 mL를 첨가하여 30분 정도 수욕상에서 가열하여 방냉 후 1 N HNO<sub>3</sub> 용액으로 50 mL로 정용하여 유도결합플라스마(Inductively Coupled Plasma, Model JY-138 Ultrace, Jobin Yvon, France)로 Table 16의 분석조건에 따라 무기성분(Ca, Fe, Cu, Mn, Zn, Mg, Na, K)과 납(Pb)을 분석하였다(72). P은 몰리부덴블루비색법(71)으로 실험하여 625 nm의 흡광도를 UV/VIS Spectrophotometer(Model 150-20, Hitachi, Ltd., Japan)로 측정하여 정량하였다.

#### 다) 유리당 분석

유리당은 Gancedo 등의 방법(73)에 따라 분석하였다. 즉, 각각의 시료에 75% ethanol을 가하여 80°C 수욕상에서 2시간 환류 추출한 다음 감압농축 하여 ethanol을 제거하고, 추출물을 Sep-pak C<sub>18</sub> cartridge로 정제한 후 0.45 μm membrane filter (Millipore Co., USA)로 여과한 후 HPLC를 이용하여 Table 17의 조건으로 분석하였다.

**Table 16. Analytical condition of ICP-AES for mineral**

---

○ Operating conditions for an aqueous medium	
Optic	: Multi
Wavelength	: Variable
Integration time	: 2.0 sec
Mode	: 4
Calculation	: 3 pts
Argon coolant flow rate	: P1 = 12 ℓ/min
Argon carrier flow rate	: G1 = 0.3 ℓ/min
Nebulizer flow rate	: 0.3 ℓ/min
○ Plasma generator	
RF frequency	: 40.68 MHz
○ Sequential monochromator	
Halographic grating	: 2400 groovws /mm
○ Ultrasonic nebulizer	
RF source	: 1.35 MHz, 35 W
Sample uptake rate	: 2.5 ml/min
Carrier gas flow	: 0.7 ℓ/min
Desolvation heating temp.	: 140°C
Desolvation coolong temp.	: 3°C

---



**Table 17. Operating conditions of HPLC for analysis of free sugar**

Instrument	TSP (Thermo Separation Products) S <sub>PECTRA</sub> System
Detector	Shodex RI-71(Reference Index) detector
Column	Carbohydrate analysis (3.9×300 mm)
Eluent	Water : Acetonitrile (17 : 83)
Injection volume	20 $\mu$ l
Flow rate	10 mL/min

#### 라) 아미노산 분석

아미노산 분석은 시료 0.2 g 정도를 정밀히 달아 각각 시험관에 취해 0.05% (W/V) 2-mercaptoethanol ( $C_2H_6SO$ )을 함유한 6 N HCl 15 mL를 가하여 11  $0^{\circ}C \pm 1^{\circ}C$ 에서 24시간 가수분해한 후 여과하고, 여액을 감압·농축하여 염산을 제거하고 증류수로 2~3회 수세하여 감압 농축한다. 농축분을 pH 2.2 sodium citrate buffer에 정용하여 0.45  $\mu m$  membrane filter로 여과한 여액을 아미노산 전용 분석기(LC-10 Avp, Shimadzu, Japan)를 이용하여 분석하였다(74). 아미노산 분석을 위한 조건은 Table 18과 같다.

#### 마) 유리아미노산 추출

시료의 추출은 일정량의 시료와 10% trichloroacetic acid(TCA) 100 mL를 혼합하여 균질화한 후 5,500×g에서 20분간 원심분리 하였다(75). 원심분리한 액을 여과(Whatman No.5)하고 상정액을 분액여두에 취해 동량의 ether로 2회에 걸쳐 추출하여 TCA 층만을 취한다. TCA 층을 감압 농축하고 sodium citrate buffer 용액(pH 2.2)을 가하여 50 mL로 정용한 후 0.45  $\mu m$  membrane filter로 여과하여 아미노산 전용분석기 시료로 사용하였다(Table 18).

#### 바) 지방산 분석

지방의 추출은 Folch 등의 방법(76)에 의하여 추출 및 정제하였으며, A.O.A.C 방법(70)에 따라서 14% BF<sub>3</sub>-methanol을 사용하여 지방산을 methyl ester화 시킨 다음 Gas Chromatography(GC/FID, Agilent Technologies, U.S.A)로 Table 19와 같은 조건으로 분석하였다.

#### 사) 환원당 측정

Bertrand 법(77)에 의하여 대조구와 비율별로 첨가된 조청의 환원당을 측정하여 maltose로 환산하여 나타내었다.

#### 아) 당고형분

고형분은 조청 일정량을 도가니에 담아 105 $^{\circ}C$ 에 건조 후 증발 잔사의 양으로 하였다.

**Table 18. Analytical condition of amino acid analyzer for amino acid**

Instrument	Shimadzu LC-10 Avp amino acid analyzer
Column	Shim-pack Amino Na (6 mm × 100 mm) Shim-pack ISC-30 (Na) (4.0 mm × 50 mm)
Buffer solution	pH 3.2, pH 10.0 sodium citrate
Flow rate	Buffer 0.6 ml/min, o-Phathalaldehyde(OPA) 0.6 ml/min
Column temp.	60°C
Injection volume	10 $\mu$ l

**Table 19. Operating conditions of GC for analysis of fatty acids**

Instrument	Agilent Technologies 6890N
Column	Stabilwax-DA(30 m×0.25 mm×0.25 $\mu$ m)
Detector	FID
Injector temp.	220°C
Detector temp.	240°C
Oven temp.	150°C(2 min)-3°C/min-240°C(8 min)
Injection volume	1 $\mu$ l(split 20 : 1)
Carrier gas (make up + column)	N <sub>2</sub> , 30 mL/min

## 7) 제품의 물성분석

### 가) 점도 측정

각 시료의 점도는 Brookfield viscometer(Model-LV II, Brookfield Engineering Labs, U.S.A)를 사용하여 조청을 직경 3.5 cm, 높이 7.5 cm인 원형용기에 넣어 20℃에서 Spindle No. 1로 2분간 회전시키면서 측정하였다.

### 나) pH 측정

식품공전의 엿류 시험법(78)에 따라 조청 1 g을 정확히 달아 증류수로 10배 희석한 후 pH meter(Accumet AR50, Fisher Scientific, U.S.A)로 측정하였다.

### 다) 색도

시료 일정량을 취하여 Hunter 색차계(Color and Color Difference Meter, Model No. TC-3600, Tokyo Denshoku Co., Ltd., Japan)로 측정하여 Hunter system의 3차극치인 L(lightness), a(redness), b(yellowness)값 및 색차( $\Delta E$ , color difference)값으로 나타내었다. 여기에서  $\Delta E$ 는 대조구 즉, 표고버섯을 첨가하지 않은 조청과 표고버섯을 일정량 첨가한 조청을 비교한 색차값의 변화이다. 이때 사용한 표준백판은  $L=90.2$ ,  $a=1.3$ ,  $b=3.2$ 였다.

$$\Delta E = \sqrt{\Delta L^2 + \Delta a^2 + \Delta b^2}$$

### 라) 인공감미료(사카린나트륨) 분석

식품공전 인공감미료 시험법(71)에 따라 다음과 같이 분석하였다. 각 시료 20 g 정도를 정확히 취하여 투석내액 약 20 mL를 가하여 혼합한다. 이 혼합액을 투석용 튜브(분자량 12,000~14,000)에 넣고 튜브의 끝을 밀봉한다. 미리 투석외액 약 150 mL를 넣은 비이커에 튜브를 넣고 투석외액을 가하여 전량

을 약 200 mL로 한다. 때때로 흔들어 주면서 실온에서 24~48시간 방치하여 투석한 후 투석용 튜브를 제거하고 투석외액을 가해 200 mL로 하여 투석액으로 한다.

투석액 20 mL를 25 mL 메스플라스크에 넣고 0.1 M TPA-Br 용액 2 mL를 가한 다음 물을 가하여 25 mL로 한다. 이 액 5 mL를 역상계 카트리지에 분당 3~4 mL의 속도로 떨어뜨리고 물 10 mL로 세척한 후 메탄올 : 물(40 : 60) 혼합액 10 mL로 용출시킨다. 용출액 전량을 강음이온교환형 카트리지에 분당 3~4 mL의 속도로 떨어뜨리고 0.1% 인산 5 mL와 물 5 mL를 사용하여 세척한 후 0.3 N 염산 5 mL로 용출시킨 액을 시험용액으로 하여 HPLC로 분석하였다. 분석에 사용한 HPLC 조건은 detector : UV 210 nm, 유속 1.0 mL/min, injection volume 10  $\mu$ l, column : Nova-Pak C<sub>18</sub> 이었다.

#### 마) 관능검사

관능검사는 광주여자대학교 식품조리학과 학생 중 선별하여 실험목적을 설명하고 각 특성치에 대하여 반복하여 훈련시킨 후 색(color), 향미(flavor), 먹을때의 느낌(chewiness), 단맛(sweetness), 전반적인 기호도(overall acceptability)를 평가하였다. 시료는 관능검사 시작 10분 전에 관능검사용 그릇에 담아 관능검사원에게 평가하도록 제시하였고, 3회 반복 실시하였다. 그 결과는 SAS package로 통계처리 하였으며, 시료간의 항목별 유의성을 5% 수준에서 검정하였다.

#### 바) Farinograph에 의한 반죽의 특성

A.A.C.C법(79)에 따라 farinograph(Brabender Co., Germany)를 사용하여 측정하였다. Farinograph mixer bowl을 30±0.2°C로 유지시킨 다음 시료는 수분 함량 14.0%를 기준으로 300 g을 취하여 곡선의 중심점이 500±10 B.U.에 도달하도록 30°C의 물을 가하여 이때 수분 흡수율, 반죽형성시간, 반죽 안정도 및 반죽 연화도 등의 물리적 성질을 측정하였다. Farinogram에서 믹서가 가동되어 물이 투입되고 난 후 그래프의 최고점이 500 B.U. 선에 도달하는데 필요로 하는 시간을 반죽도달시간, 최고점에 도달할 때까지의 시간을 형성시간, 그래프의 상부가 500 B.U. 선을 최초로 횡단하고 나서부터 그래프가 떨어지기 시작하여 그 상부가 다시 500 B.U. 선을 횡단하기까지의 시간을 안정도, 반죽의 혼합 20분 후 그래프 폭의 중앙과 500 B.U. 선과의 거리를 연화도로 표시하였다.

#### 사) Amylograph에 의한 반죽의 특성

A.A.C.C법(79)에 따라 amylograph(Brabender Co., Germany)를 사용하여 측정하였다. 시료 65 g(수분 14.0% 기준)을 물 450 mL에 분산시킨 현탁액을 25°C에서부터 95°C까지 분당 1.5°C로 상승시키면서 호화개시온도, 최고점도 및 최고점도 온도를 측정하였다. Amylograph에서 그래프의 점도가 나타내는 온도를 호화개시온도, 전분의 호화과정 중 나타나는 그래프의 최고점을 최고점도, 현탁액의 점도가 최고점에 도달했을 때의 온도를 최고점도온도로 표시하였다.

#### 아) Extensograph에 의한 반죽의 특성

A.A.C.C법(79)에 따라 시료 300 g(수분 14.0% 기준)을 farinograph mixer bowl에 넣고 farinograph의 흡수율보다 2~5% 적은 양의 증류수에 소금 6 g을 용해시킨 용액을 사용하였다. Farinograph mixer bowl을 이용하여 3분간 반죽한 다음, 5분간 방치하고 다시 2분간 반죽하여 최종의 consistency가 500±10 B.U. 이내로 한 다음 150±1 g 씩 2개의 반죽을 취하여 우선 1개를 extensograph(Brabender Co., Germany)의 rounder 넣어 둥글리기를 하여 원통형으로 성형하였다. 이를 30°C의 항온조에서 일정시간 발효시킨 후 반죽의 신장도, 신장저항도 등을 측정하였다.

#### 자) 총당 측정

총당은 phenol-sulfuric acid법(75)으로 정량하였다. 시료를 증류수로 균질화시키고 희석한 것을 시료 용액으로 사용하였다. 시료 용액 1 mL와 5% phenol 용액 1 mL를 가하여 혼합하고, conc-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 5 mL를 가하여 발열시켜 30분간 방치한 후 분광광도계(UV-1650PC, UV-Vis spectrophotometer, Shimadzu, Tokyo, Japan)로 470 nm에서 흡광도를 측정하였다. 당 표준용액으로는 maltose(Sigma-Aldrich Co.)를 표준물질로 하여 농도별로 검량선을 작성한 후 시료 중의 총당 함량을 구하였다.

#### 차) 물성 측정

물성 측정은 rheometer(CR-500DX, Sun Scientific Co. Ltd., Tokyo, Japan)를 사용하여 시료(너비 18 cm)를 전병의 경우 4조각으로 세절하였고, 강정의 경우 mastication test로 실시 각각 15회 반복 측정한 후 평균값을 구하였다. 측정 항목은 rheometer의 probe가 3 mm 되는 지점까지 들어가면서 받는 힘을 측정하여 최대하중값(max weight ; g), 경도(hardness ;  $\text{g/cm}^2$ ) 및 파단점(breaking point ;  $\text{g/cm}^2$ )으로 나타내었다. 측정조건은 table speed 60 mm/min, sample depth 3 mm, adaptor No. 34, load cell(max) 2 kg으로 하였다. 전병은 구운 후 실온에서 몇 시간 방치한 후 폴리에틸렌 비닐 백에 넣고 실온 보관하면서 물성을 측정하였다.

**Table 20. Baking formula based on wheat flour weight**

(unit : g)

	Control	Substitution level of <i>Lentinus edodes</i> powder			
		5%	10%	15%	20%
Flour	500	475	450	425	400
<i>Lentinus edodes</i>	0	25	50	75	100
Sugar			550		
Egg			350		
Butter			40		
Milk			350		
Salt			5		
Starch syrup			5		

**Table 21. Operating conditions of rheometer for the measurement of *Gangjeong* by mastication test**

Instrument	Rheometer CR - 500 DX
Mode	21
Load cell(max.)	10 kg
Table speed	120 mm/min
Adaptor No.	5 (diameter)
Adaptor type	Round
Mastication distance	15.0 mm



## 다. 연구결과 및 고찰

### 1) 조청 제품화

#### 가) 일반성분

##### (1) 표고버섯 분말을 밥에 첨가하여 제조한 조청

수침한 쌀 1 kg에 표고버섯 분말을 각각 10 g(1%), 20 g(2%), 30 g(3%)씩 첨가하여 밥을 지어 제조한 조청의 일반성분은 Table 22과 같다.

무첨가구 즉, 표고버섯 분말을 첨가하지 않은 조청의 수분은  $25.68 \pm 2.62\%$ , 조단백질이  $2.14 \pm 0.01\%$ , 조지방  $0.38 \pm 0.01\%$ , 회분  $0.37 \pm 0.04\%$ , 탄수화물이  $71.47 \pm 1.92\%$  으로 나타났다. 표고버섯 분말을 첨가할수록 수분 함량은 증가하여 3% 첨가구의 경우  $34.82 \pm 0.99\%$ 까지 증가하였으며 조지방, 조단백질과 회분의 경우에는 무첨가구 보다 약간 증가하는 것으로 보이나 실제 건조물 기준으로 판단해보면 조단백질이 버섯 첨가 1%의 경우 3.17%에서 3% 첨가구의 경우 3.45%로 증가하였고 조지방과 회분도 거의 비슷한 수준으로 증가하였다. 탄수화물은 상대적으로 감소하여 3% 첨가구의 경우  $61.93 \pm 0.93\%$ 로 감소하는 결과를 보였다.

무첨가구에 비해 표고버섯 분말 첨가구에서 조단백질 등 함량이 높은 결과는 표고버섯을 첨가함으로써 버섯내의 영양성분에 의해 증가하는 결과이며, 수분의 경우 첨가된 건조 표고버섯 분말이 수분을 재흡수하면서 증가한 것으로 생각되며, 탄수화물은 수분 등 다른 성분의 함량이 높아지면서 상대적으로 낮아진 것으로 판단된다.

##### (2) 표고버섯 분말을 당화액에 첨가하여 제조한 조청

당화액을 졸이기 하는 과정에 표고버섯 분말을 각각 10 g(1%), 20 g(2%), 30 g(3%)씩 첨가하여 제조한 조청의 일반성분은 Table 23에서와 같이 밥에 첨가한 경우에 비해 다소 높지만 유사한 결과를 보였다. 수분, 조단백질, 조지방과 회분의 경우 전체적으로 첨가량이 많아질수록 증가하였으며 이에 따라 상대적으로 탄수화물의 양은 감소하였다.

표고버섯의 일반성분을 수분을 제외한 건물기준으로 볼 때 조단백질이 20.2~23.9%, 조지방이 3.1~3.5%, 회분이 5.0%, 탄수화물이 67.6~71.3%를 함

유하고 있어 이들 성분이 첨가구의 일반성분에 영향을 준 것으로 생각된다(60, 80).

이상의 결과로 보아 밥을 지을때와 당화액을 달이는 단계에 표고버섯 분말을 첨가하는 경우가 서로 큰 차이를 보이지 않고 거의 유사한 결과를 보이는 것으로 나타났다.

### (3) 표고버섯 추출액을 첨가하여 제조한 조청

당화액을 기준으로 추출액을 일정 비율(10:0, 7:3, 5:5, 3:7)로 첨가하여 줄이기를 한 조청에 대한 일반성분 분석결과는 Table 24과 같다.

수분의 경우 추출액 무첨가구의  $25.68 \pm 2.62\%$ 에서 당화액과 표고버섯 추출액의 첨가비가 7:3인 시료의 경우  $44.81 \pm 2.71\%$ 로 크게 증가하였으며 상대적으로 탄수화물의 양은 감소하였고, 조단백질, 조지방과 회분은 거의 변화가 없었다. 이상의 결과는 밥과 당화액에 직접 표고버섯 분말을 첨가하는 경우와는 차이를 보여 추출액의 첨가가 분말을 직접 첨가하는 것보다 효과가 덜한 것으로 분석되었다.

Table 22. Proximate composition of *Jochung* containing different amount of *Lentinus edodes* powder

(unit : %)

	Control	Substitution level of <i>Lentinus edodes</i> powder		
		1%	2%	3%
Moisture	25.68±2.62 <sup>1)</sup>	24.50±2.17	29.22±0.84	34.82±0.99
Crude protein <sup>2)</sup>	2.14±0.01 (2.88) <sup>3)</sup>	2.39±0.03 (3.17)	2.29±0.01 (3.24)	2.25±0.01 (3.45)
Crude lipid	0.38±0.01 (0.51)	0.48±0.02 (0.63)	0.47±0.01 (0.66)	0.50±0.02 (0.77)
Ash	0.37±0.04 (0.50)	0.44±0.03 (0.58)	0.50±0.03 (0.71)	0.50±0.05 (0.77)
Carbohydrate <sup>4)</sup>	71.43±1.92 (96.11)	72.19±2.06 (95.62)	67.52±0.65 (95.39)	61.93±0.93 (95.01)

<sup>1)</sup> Standard Deviation

<sup>2)</sup> N × 6.25

<sup>3)</sup> ( ) : content of crude protein, crude lipid, ash and carbohydrate was calculated by dry basis

<sup>4)</sup> 100 - sum of moisture, crude protein, crude lipid and ash contents

**Table 23. Proximate composition of *Jochung* containing different amount of *Lentinus edodes* powder**

(unit : %)

	Control	Substitution level of <i>Lentinus edodes</i> powder		
		1%	2%	3%
Moisture	25.68±2.62 <sup>1)</sup>	25.75±2.15	32.11±2.91	36.91±3.07
Crude protein <sup>2)</sup>	2.14±0.01 (2.88) <sup>3)</sup>	2.40±0.02 (3.23)	2.35±0.02 (3.46)	2.21±0.01 (3.50)
Crude lipid	0.38±0.01 (0.51)	0.64±0.04 (0.86)	0.54±0.02 (0.80)	0.53±0.03 (0.82)
Ash	0.37±0.04 (0.50)	0.52±0.06 (0.70)	0.52±0.03 (0.77)	0.51±0.08 (0.81)
Carbohydrate <sup>4)</sup>	71.43±1.92 (96.11)	70.69±1.83 (95.21)	64.48±2.16 (94.98)	59.84±2.42 (94.87)

<sup>1)</sup> Standard Deviation

<sup>2)</sup> N × 6.25

<sup>3)</sup> ( ) : content of crude protein, crude lipid, ash and carbohydrate was calculated by dry basis

<sup>4)</sup> 100 - sum of moisture, crude protein, crude lipid and ash contents

Table 24. Proximate composition of *Jochung* containing different amount of *Lentinus edodes* powder

(unit : %)

	Control	Ratio		
		(Saccharification liquids: <i>Lentinus edodes</i> extract)		
		10:0	3:7	5:5
Moisture	25.68±2.62 <sup>1)</sup>	35.04±4.12	39.10±3.46	44.81±2.71
Crude protein <sup>2)</sup>	2.14±0.01 (2.88) <sup>3)</sup>	1.93±0.03 (2.97)	1.73±0.01 (2.84)	1.67±0.04 (3.01)
Crude lipid	0.38±0.01 (0.51)	0.76±0.09 (0.55)	0.31±0.04 (0.50)	0.31±0.05 (0.57)
Ash	0.37±0.04 (0.50)	0.38±0.04 (0.59)	0.39±0.03 (0.64)	0.32±0.04 (0.59)
Carbohydrate <sup>4)</sup>	71.43±1.92 (96.11)	62.29±2.54 (95.89)	58.47±2.38 (96.02)	52.89±2.02 (95.83)

<sup>1)</sup> Standard Deviation

<sup>2)</sup> N × 6.25

<sup>3)</sup> ( ) : content of crude protein, crude lipid, ash and carbohydrate was calculated by dry basis

<sup>4)</sup> 100 - sum of moisture, crude protein, crude lipid and ash contents

## 나) 무기성분 및 납(Pb)의 함량

### (1) 표고버섯 분말을 밥에 첨가하여 제조한 조청

조청의 무기성분과 Pb의 함량은 Table 25과 같다. 버섯 분말을 첨가하지 않은 무첨가구의 경우 총 무기성분 함량이 2,642.34 mg/kg으로 나타났으며, 그 중 인(P)이  $1,089.41 \pm 11.4$  mg/kg, K ( $892.56 \pm 5.7$  mg/kg), Mg ( $280.14 \pm 4.3$  mg/kg), Na ( $204.79 \pm 2.6$  mg/kg), Ca ( $140.07 \pm 4.5$  mg/kg) 순이었으며, Pb의 경우에는 모든 시료에서 검출되지 않았다. 위해물질인 Pb를 분석한 이유는 식품공전 2-4 열류 중 조청의 규격기준에 Pb의 검사항목이 설정되어 있기 때문이며 그 기준은 1.0 mg/kg 이하로 명시되어 있다(78).

대부분 무기성분은 표고버섯 분말을 첨가한 시료와 큰 차이를 보이지 않았지만 K의 경우  $892.56 \pm 5.7$  mg/kg에서 3% 첨가구의  $1,367.54 \pm 19.2$  mg/kg으로 다소 증가하는 경향을 보였다. 이러한 결과는 버섯의 성분에 기인하는 것으로 추정되며 실제 표고버섯의 K 함유량은 Kwon 등의 보고(80)에서 17,000 mg/kg정도로 상당히 많이 함유하고 있는 것으로 나타났다. 전체 무기성분 함량의 경우에도 무첨가구의 2,642.34 mg/kg에서 3,158.34 mg/kg(3% 첨가구)으로 증가한 결과를 보였는데 이는 K의 함량이 증가하면서 전체 무기성분의 합계가 증가한 결과인 것으로 판단된다.

### (2) 표고버섯 분말을 당화액에 첨가하여 제조한 조청

당화액에 직접 첨가한 조청의 무기성분과 Pb의 함량은 Table 26에서와 같이 밥에 첨가한 조청의 결과와 거의 유사하였다. 무기성분은 3% 첨가구를 제외한 모든 시료가 P>K>Mg>Na>Ca 순으로 함유하고 있었고, 3% 첨가구에서만 K 함유량( $1,528.96 \pm 12.5$  mg/kg)이 증가하면서 P 함유량( $1,115.46 \pm 16.5$  mg/kg)보다 높은 결과를 보였으며 나머지 성분은 타시료와 거의 유사하였다. 전체적으로 Ca과 Na의 경우 표고버섯의 첨가량이 증가할수록 다소 높아지는 결과를 보였지만 그 수준은 미비한 정도이며 Pb의 경우 모든 시료에서 불검출이었다.

### (3) 표고버섯 추출액을 첨가하여 제조한 조청

추출액을 첨가한 조청의 무기성분과 Pb의 함량은 Table 27에서와 같다. 밥과 당화액에 버섯 분말을 직접 첨가하는 경우와는 다른 양상으로 모든 검사 항목에서 증가하는 결과는 볼 수 없었으며, 인(P)의 경우에는 대조구가  $1,052.13 \pm 11.1$  mg/kg에서 당화액과 버섯 추출액의 첨가비가 3:7인 시료에서  $1,006.50 \pm 12.0$  mg/kg으로 오히려 약간은 감소하는 경향을 보였고, Pb의 경우 모든 시료에서 불검출로 나타났다. 이는 일반성분 결과에서 보듯이 추출액을 첨가한 조청의 경우에는 타 시료에 비해 수분함량이 높아 상대적으로 감소하는 결과를 보이는 것으로 판단된다. 전체 무기성분 합계도  $2,642.34$  mg/kg ~  $1,916.03$  mg/kg으로 오히려 3:7 첨가구의 경우 대조구에 비해 적은 결과를 나타냈다.

이상의 결과로 보아 표고버섯 분말을 다량 첨가하는 경우를 제외하고는 첨가 시료와 무첨가구의 무기성분 함량은 큰 차이를 보이지 않아 성분에 변화가 K를 제외하고 거의 없는 것으로 조사되었다.

Table 25. Mineral and lead(Pb) content of *Jochung* containing different amount of *Lentinus edodes* powder

(mg/kg)

	Control	Substitution level of <i>Lentinus edodes</i> powder		
		1%	2%	3%
Mg	280.14±4.3 <sup>1)</sup>	261.75±3.2	312.61±8.3	307.34±5.1
Ca	140.07±4.5	147.78±1.5	140.20±5.2	159.70±8.5
Na	204.79±2.6	209.60±5.1	243.52±9.8	238.25±2.5
K	892.56±5.7	937.87±6.9	1,087.89±14.4	1,367.54±19.2
Zn	6.70±0.9	7.30±0.3	7.47±0.5	7.39±0.1
Cu	7.87±0.9	10.98±2.4	8.52±2.6	10.04±1.6
Fe	10.63±0.7	9.83±0.3	12.77±2.2	11.18±2.3
Mn	10.17±1.0	10.77±0.1	13.18±0.1	9.52±0.2
P	1,089.41±11.4	1,096.30±11.5	1,196.46±27.0	1,047.38±18.5
Pb	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
Total	2,642.34	2,692.18	3,022.62	3,158.34

<sup>1)</sup> Standard Deviation

<sup>2)</sup> N.D. : Not detected



Table 26. Mineral and lead(Pb) content of *Jochung* containing different amount of *Lentinus edodes* powder

(mg/kg)

	Ratio			
	Control	(Saccharification liquids: <i>Lentinus edodes</i> extract)		
		10:0	3:7	5:5
Mg	280.14±4.3 <sup>1)</sup>	262.24±8.1	287.27±6.3	262.23±4.4
Ca	140.07±4.5	132.39±7.7	168.46±9.6	155.58±5.6
Na	204.79±2.6	245.39±9.5	259.63±11.1	234.83±14.0
K	892.56±5.7	986.84±11.9	1,054.92±15.3	1,528.96±12.5
Zn	6.70±0.9	7.05±0.7	7.83±0.2	7.03±0.2
Cu	7.87±0.9	8.95±0.1	7.54±1.8	7.62±0.8
Fe	10.63±0.7	8.47±1.4	13.39±2.2	9.20±0.7
Mn	10.17±1.0	9.04±0.1	11.09±0.1	10.43±0.3
P	1,089.41±11.4	1,123.90±14.2	1,110.12±20.2	1,115.46±16.5
Pb	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
Total	2,642.34	2,784.27	2,920.25	3,331.34

<sup>1)</sup> Standard Deviation

<sup>2)</sup> N.D. : Not detected

**Table 27. Mineral and lead(Pb) content of *Jochung* containing different amount of *Lentinus edodes* powder**

(mg/kg)

	Control	Ratio (Saccharification liquids: <i>Lentinus edodes</i> extract)		
		10:0	7:3	5:5
Mg	280.14±4.3 <sup>1)</sup>	268.80±14.5	256.15±5.0	288.57±9.1
Ca	140.07±4.5	137.31±1.7	129.91±9.7	133.59±2.3
Na	204.79±2.6	241.78±11.5	273.25±13.5	181.02±6.8
K	892.56±5.7	780.07±16.3	942.22±16.2	911.76±17.1
Zn	6.70±0.9	6.37±0.3	7.26±0.2	6.66±0.6
Cu	7.87±0.9	7.22±1.1	7.67±0.6	7.24±0.6
Fe	10.63±0.7	10.31±2.0	14.53±3.3	11.73±0.7
Mn	10.17±1.0	12.04±0.2	9.33±0.3	11.78±0.5
P	1,089.41±11.4	1,052.13±11.1	1,033.92±18.7	1,006.50±12.0
Pb	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
Total	2,642.34	1,916.03	2,674.24	2,558.85

<sup>1)</sup> Standard Deviation

<sup>2)</sup> N.D. : Not detected

## 다) 유리당 함량

### (1) 표고버섯 분말을 밥에 첨가하여 제조한 조청

첨가수준을 달리하여 제조한 조청에 존재하는 유리당을 HPLC로 분석한 결과(Table 28), 가장 많이 존재하는 당은 maltose이었으며 표고버섯을 첨가하지 않은 대조구가 37,162.8 mg/100 g으로 가장 적게 함유되어 있었고, 표고버섯 분말 첨가 수준이 높아질수록 maltose 함량은 증가하였다. Glucose와 fructose 함량도 대조구의 경우 각각 3,777.9 mg/100 g과 407.7 mg/100 g에서 첨가 수준이 높아질수록 그 값이 증가하여 3% 첨가구에서 각각 5,917.2 mg/100 g과 890.4 mg/100 g으로 증가한 결과를 보였으며, sucrose는 검출되지 않았다.

쌀의 탄수화물은 주로 전분으로 구성되어 있고 그 중 amylose와 amylopectin이 약 2:8의 비율로 존재하여서 당화 과정 중에 엿기름의 amylase에 의해 분해되어 maltose를 생성하며 여기에 일부 버섯에 존재하는 당류가 포함되어 증가하는 것으로 보인다(81).

Bae 등(81)은 단감을 이용한 조청의 제조과정에서 단감의 첨가량을 증가할수록 maltose 함량은 감소하였고, glucose와 fructose 함량은 증가하였다고 보고하여 maltose 함량이 본 실험 결과와는 다른데 그 이유로는 단감의 첨가 방법이 본 실험의 버섯 첨가와 달리 쌀 일정량에 단감을 첨가하는 방법이 아닌 쌀과 일정 비율로 혼합하는 방법을 사용하여 쌀의 첨가량이 줄어들면서 maltose 함량이 감소하는 결과로 판단된다. 따라서 표고버섯에 존재하는 소량의 당으로 인하여 표고버섯이 첨가되는 비율이 증가하더라도 조청의 품질을 결정하는 중요한 요소인 당의 함량은 크게 문제되지 않음을 알 수 있었다.

Table 28. Content of free sugar in *Jochung* containing different amount of *Lentinus edodes* powder

		(mg/100 g)		
		Substitution level of <i>Lentinus edodes</i> powder		
	Control	1%	2%	3%
Glucose	3,777.9	3,904.3	4,828.6	5,917.2
Fructose	407.7	480.0	612.7	890.4
Sucrose	-	-	-	-
Maltose	37,162.8	43,163.8	39,813.3	44,992.1
Total	41,348.4	47,548.5	45,254.6	51,799.7

## (2) 표고버섯 분말을 당화액에 첨가하여 제조한 조청

표고버섯 분말을 당화액에 첨가하여 졸이기를 한 조청의 유리당 함량은 Table 29와 같다. HPLC에 의해 검출된 maltose, glucose, fructose 모두 첨가 수준이 증가함에 따라 증가하였으며, 전체 함량은 무첨가구의 41,348.4. mg/100 g에서 50,320.5 mg/100 g으로 증가하는 결과를 보였다. 이러한 결과는 분말에 직접 밥에 첨가하여 제조한 조청의 결과와 거의 유사하였으며, sucrose는 모든 시료에서 검출되지 않았다.

Kim 등(82)은 곡류와 맥아를 이용한 전통엿의 유리당을 조사한 결과 유리당의 주성분은 maltose이었으며, 그 외 glucose가 전체 함량의 1% 내외, fructose가 미량 검출되었다고 보고하여 본 실험결과와 일치함을 알 수 있었다.

## (3) 표고버섯 추출액을 첨가하여 제조한 조청

일정 비율별 추출액을 첨가하여 제조한 조청의 유리당을 분석한 결과는 Table 30과 같다. 검출된 유리당은 밥과 당화액에 버섯 분말을 첨가하여 제조한 조청의 경우와 동일하게 maltose, glucose, fructose가 검출되었으며, 추출액 함량이 증가할수록 maltose가 37,162.8 mg/100 g에서 39,582.4 mg/100 g으로, glucose가 3,777.9 mg/100 g에서 5,714.3 mg/100 g으로 증가하였고, fructose가 407.7 mg/100 g에서 725.0 mg/100 g으로 각각 증가하였다.

유리당 전체 함량의 경우에도 무첨가구의 41,348.4 mg/100 g에서 당화액과 추출액의 비가 7:3인 첨가구의 경우 42,563.2 mg/100 g, 3:7 첨가구는 46,021.7 mg/100 g으로 증가하는 경향을 보였다. 또한 sucrose는 모든 처리구에서 검출되지 않았다.

이러한 결과는 쌀의 구성성분인 전분이 엿기름의 amylase에 의해 분해되어 생성된 maltose 및 유리당 등과 여기에 표고버섯 추출액을 제조시 용출된 유리당이 추가로 혼입되어 증가된 결과로 볼 수 있다.

**Table 29. Content of free sugar in *Jochung* containing different amount of *Lentinus edodes* powder**

(mg/100 g)

	Control	Substitution level of <i>Lentinus edodes</i> powder		
		1%	2%	3%
Glucose	3,777.9	4,369.2	4,640.4	5,501.5
Fructose	407.7	509.1	612.7	818.6
Sucrose	-	-	-	-
Maltose	37,162.8	38,068.9	44,052.5	44,000.4
Total	41,348.4	42,947.2	49,305.6	50,320.5

**Table 30. Content of free sugar in *Jochung* containing different amount of *Lentinus edodes* powder**

(mg/100 g)

	Control	Ratio (Saccharification liquids: <i>Lentinus edodes</i> extract)		
		10:0	7:3	5:5
Glucose	3,777.9	4,292.0	4,794.0	5,714.3
Fructose	407.7	408.1	669.9	725.0
Sucrose	-	-	-	-
Maltose	37,162.8	37,863.1	36,566.7	39,582.4
Total	41,348.4	42,563.2	42,030.6	46,021.7

## 라) 아미노산 분석

### (1) 표고버섯 분말을 밥에 첨가하여 제조한 조청

시료별 구성 아미노산과 유리 아미노산 함량을 아미노산 자동분석기로 분석한 결과는 Table 31과 같다. 구성 아미노산 중 가장 많이 함유된 아미노산은 glutamic acid이었으며 유리 아미노산의 경우에는 cystine으로 나타났다. 각 시료별 구성 아미노산의 경우 무첨가구가 glu>pro>cys>asp>thr 순이었고, 표고버섯 분말을 1% 첨가한 조청의 경우 glu>cys>pro>asp=thr, 2% 첨가구는 glu>met>pro>cys>asp, 3% 첨가구에서는 glu>pro=cys=asp>met 순으로 각 시료별 그 함량이 조금씩 차이를 보였다. 유리 아미노산의 경우에도 일정치 않은 차이를 보여 구성 아미노산과 경향은 비슷하였다.

필수 아미노산 함량은 무첨가구(0.89 g/100 g)에 비해 표고버섯 분말을 첨가한 시료가 더 많이 함유하고 있었으나 첨가수준과 비례하여 증가하지는 않는 것으로 나타났다. 총 아미노산 함량을 보면 무첨가구가 2.73 g/100 g, 1% 첨가구가 3.27 g/100 g, 2% 첨가구 3.51 g/100 g, 3% 첨가구의 경우 3.10 g/100 g으로 첨가하지 않은 시료보다 첨가된 시료에서 그 함량이 높게 나타났으며 유리 아미노산의 총 아미노산 함량도 같은 결과를 보였다.

전체 아미노산에 대한 필수 아미노산 함량의 비율은 2% 첨가구가 38.2%로 가장 높았으며, 3% 첨가구가 31.0%로 다소 낮은 결과를 보였는데, 이는 버섯이 첨가되면서 필수 아미노산 이외의 성분이 증가하면서 나타난 결과로 대부분의 시료가 FAO가 제시한 기준인 32.3%보다 높게 나타나 영양학적으로 우수한 것으로 보인다(84). 또한 구성 아미노산 중 무첨가구에 비해 aspartic acid, glutamic acid, cystine과 methionine 등이 첨가구에서 소량 증가하였으며, 이들은 버섯이 첨가되면서 버섯 내 함유된 아미노산이 추가되면서 증가된 것으로 보인다.

Kwon 등(80)은 표고버섯의 아미노산을 분석한 결과 tryptophan을 제외한 16종의 아미노산이 검출되었고 이들 중 glutamic acid, isoleucine, aspartic acid, phenylalanine 순으로 높은 함량을 나타내었다고 보고하였으며, Hong 등(58)의 경우에는 tryptophan 외 17종의 아미노산이 검출되었으며, aspartic acid, glutamic acid, phenylalanine, histidine 등을 많이 함유하고 있다고 보고하여 조금씩 다른 결과를 보였다. 이러한 차이는 각종 버섯류에 함유되어 있는 아미노산 함량은 종류에 따라 차이가 심하고 동일종인 경우에도 발육단계, 발생환경, 발생시기 등에 따라 많은 차이를 보이고 산지가 다른 동일 버섯의 경우도 약간씩 차이가 있으며 재배종과 야생종간의 차이에 따라서도 심하다고 하여 이에 기인한 것으로 판단된다(83).

**Table 31. Total and free amino acid composition of *Jochung* containing different amount of *Lentinus edodes* powder**

(g/100 g, dry basis)

	Total amino acid				Free amino acid			
	Control	1% <sup>1)</sup>	2%	3%	Control	1%	2%	3%
Aspartic acid	0.18	0.24	0.28	0.36	0.02	0.03	0.03	0.03
Threonine	0.17	0.24	0.22	0.18	0.02	0.04	0.04	0.04
Serine	0.10	0.12	0.11	0.08	-	0.02	0.01	0.01
Glutamic acid	0.44	0.49	0.48	0.53	0.04	0.05	0.05	0.05
Proline	0.35	0.38	0.38	0.36	0.05	0.04	0.04	0.04
Glycine	0.09	0.11	0.10	0.08	0.01	0.01	0.01	0.01
Alanine	0.10	0.13	0.11	0.09	0.01	0.01	0.01	0.01
Valine	0.14	0.19	0.17	0.13	0.03	0.04	0.03	0.04
Cystine	0.29	0.39	0.34	0.36	0.06	0.09	0.07	0.08
Methionine	0.16	0.15	0.39	0.21	0.01	0.01	0.04	0.01
Isoleucine	0.10	0.13	0.15	0.11	0.01	0.02	0.02	0.02
Leucine	0.10	0.13	0.15	0.11	0.01	0.02	0.02	0.02
Tyrosine	0.08	0.06	0.10	0.09	0.01	0.01	0.01	0.01
Phenylalanine	0.07	0.05	0.09	0.08	0.01	0.01	0.01	0.01
Histidine	0.11	0.13	0.13	0.10	0.02	0.03	0.02	0.02
Lysine	0.15	0.20	0.17	0.14	0.03	0.04	0.03	0.03
Arginine	0.10	0.13	0.14	0.09	0.02	0.03	0.02	0.03
E.A.A. <sup>2)</sup>	0.89	1.09	1.34	0.96	0.12	0.18	0.19	0.17
Total	2.73	3.27	3.51	3.10	0.36	0.50	0.46	0.47

<sup>1)</sup> Substitution level(%) of *Lentinus edodes* powder was added to rice

<sup>2)</sup> E.A.A. : Essential amino acid



## (2) 표고버섯 분말을 당화액에 첨가하여 제조한 조청

당화액에 첨가하여 제조한 조청의 아미노산을 분석한 결과는 Table 32와 같다. 구성 아미노산 중 가장 많이 함유된 아미노산은 glutamic acid이었으며 유리 아미노산의 경우에는 cystine으로 이는 밥에 버섯 분말을 첨가하여 제조한 조청의 경우와 일치한 결과를 보였다. 각 시료별 구성 아미노산의 경우 무첨가구가 glu>pro>cys>asp>thr 순이었고, 1% 첨가구의 경우 glu>met>pro=cys>asp 이었고, 2% 첨가구는 glu>asp>pro>cys=met 순이었으며, 3% 첨가구는 glu>asp>cys>pro>met 순으로 각 시료별 그 함량이 조금씩 차이를 보였다. 유리 아미노산의 경우에도 일정치 않은 차이를 보여 구성 아미노산과 경향은 비슷하였다.

필수 아미노산 함량은 무첨가구(0.89 g/100 g)에 비해 표고버섯 분말을 첨가한 시료가 더 많이 함유하고 있었으나 첨가수준과 비례하여 증가하지는 않는 것으로 나타났다. 총 아미노산 함량은 무첨가구가 2.73 g/100 g, 1% 첨가구가 3.38 g/100 g, 2% 첨가구 3.35 g/100 g, 3% 첨가구의 경우 3.39 g/100 g으로 첨가하지 않은 시료보다 첨가된 시료에서 그 함량이 높게 나타났으며 유리 아미노산의 총 아미노산 함량도 같은 결과를 보였다.

전체 아미노산에 대한 필수 아미노산 함량의 비율은 1% 첨가구가 35.8%로 가장 높았으며, 3% 첨가구가 29.8%로 다소 낮은 결과를 보였는데 대부분의 시료가 FAO가 제시한 기준인 32.3%보다 높게 나타나 영양학적으로 우수한 것으로 보인다(84). 또한 무첨가구에 비해 증가한 구성 아미노산은 aspartic acid, glutamic acid, cystine과 methionine 등이 소량 증가하였으며, 이들은 버섯이 첨가되면서 버섯 내 함유된 아미노산이 추가되면서 증가된 것으로 보인다.

**Table 32. Total and free amino acid composition of *Jochung* containing different amount of *Lentinus edodes* powder**

(g/100 g, dry basis)

	Total amino acid				Free amino acid			
	Control	1% <sup>1)</sup>	2%	3%	Control	1%	2%	3%
Aspartic acid	0.18	0.32	0.37	0.48	0.02	0.03	0.03	0.05
Threonine	0.17	0.15	0.20	0.20	0.02	0.04	0.04	0.03
Serine	0.10	0.11	0.10	0.09	-	0.01	0.01	0.01
Glutamic acid	0.44	0.48	0.54	0.68	0.04	0.05	0.05	0.06
Proline	0.35	0.34	0.34	0.30	0.05	0.04	0.04	0.04
Glycine	0.09	0.11	0.10	0.08	0.01	0.01	0.01	0.01
Alanine	0.10	0.12	0.12	0.10	0.01	0.01	0.01	0.01
Valine	0.14	0.17	0.16	0.13	0.03	0.04	0.04	0.04
Cystine	0.29	0.34	0.33	0.37	0.06	0.08	0.07	0.07
Methionine	0.16	0.37	0.33	0.21	0.01	0.01	0.01	0.01
Isoleucine	0.10	0.13	0.11	0.12	0.01	0.02	0.02	0.02
Leucine	0.10	0.13	0.11	0.12	0.01	0.02	0.02	0.02
Tyrosine	0.08	0.08	0.06	0.07	0.01	0.01	0.01	0.01
Phenylalanine	0.07	0.07	0.10	0.08	0.01	0.01	0.01	0.01
Histidine	0.11	0.15	0.11	0.12	0.02	0.02	0.03	0.03
Lysine	0.15	0.19	0.16	0.15	0.03	0.03	0.03	0.03
Arginine	0.10	0.12	0.11	0.09	0.02	0.02	0.03	0.03
E.A.A. <sup>2)</sup>	0.89	1.21	1.17	1.01	0.12	0.17	0.17	0.16
Total	2.73	3.38	3.35	3.39	0.36	0.45	0.46	0.48

<sup>1)</sup> Substitution level(%) of *Lentinus edodes* powder was added to rice

<sup>2)</sup> E.A.A. : Essential amino acid

### (3) 표고버섯 추출액을 첨가하여 제조한 조청

표고버섯 추출액을 함유한 조청의 구성 아미노산과 유리 아미노산의 분석 결과는 Table 33에서와 같이 구성 아미노산 중 가장 많이 함유된 아미노산은 glutamic acid이었으며 유리 아미노산의 경우에는 cystine이었다. 각 시료별 구성 아미노산의 경우 무첨가구가 glu>pro>cys>asp>thr 순이었고, 당화액과 버섯 추출액을 7:3으로 첨가한 조청의 경우 glu>pro>cys>asp>lys, 5:5 첨가구는 glu>pro=cys>asp>lys, 3:7 첨가구의 경우에는 glu>pro=cys>asp 순으로 각 시료별 그 함량이 조금씩 차이를 보였다. 유리 아미노산의 경우에도 일정치 않은 차이를 보여 구성 아미노산과 비슷한 경향을 보였다.

필수 아미노산 함량은 무첨가구(0.89 g/100 g)와 표고버섯 추출액 첨가한 시료간 큰 차이를 보이지 않았으며, 총 아미노산 함량도 무첨가구가 2.73 g/100 g, 3% 첨가구의 경우 2.79 g/100 g으로 그 차이를 관찰할 수 없었다. 또한 대조구에 비해 증가된 구성 아미노산도 aspartic acid와 glutamic acid 등이 소량 증가되었으며, 이는 버섯 추출액이 첨가되면서 일부 증가된 것으로 보인다.

**Table 33. Total and free amino acid composition of *Jochung* containing different amount of *Lentinus edodes* powder**

(g/100 g, dry basis)

	Total amino acid				Free amino acid			
	10:0 <sup>1)</sup>	7:3	5:5	3:7	10:0	7:3	5:5	3:7
Aspartic acid	0.18	0.22	0.26	0.28	0.02	0.03	0.02	0.03
Threonine	0.17	0.16	0.12	0.15	0.02	0.04	0.08	0.04
Serine	0.10	0.11	0.09	0.09	-	0.01	0.02	0.01
Glutamic acid	0.44	0.45	0.51	0.48	0.04	0.05	0.03	0.04
Proline	0.35	0.35	0.28	0.30	0.05	0.04	-	0.03
Glycine	0.09	0.10	0.09	0.09	0.01	0.01	0.01	0.01
Alanine	0.10	0.12	0.10	0.10	0.01	0.01	0.01	0.01
Valine	0.14	0.17	0.14	0.15	0.03	0.04	0.03	0.03
Cystine	0.29	0.34	0.28	0.30	0.06	0.08	0.07	0.07
Methionine	0.16	0.16	0.14	0.08	0.01	0.01	0.01	0.03
Isoleucine	0.10	0.10	0.09	0.12	0.01	0.02	0.01	0.02
Leucine	0.10	0.10	0.09	0.12	0.01	0.02	0.01	0.02
Tyrosine	0.08	0.06	0.07	0.09	0.01	0.01	-	0.01
Phenylalanine	0.07	0.09	0.08	0.08	0.01	0.01	-	0.01
Histidine	0.11	0.14	0.13	0.10	0.02	0.02	0.02	0.02
Lysine	0.15	0.18	0.15	0.15	0.03	0.03	0.03	0.03
Arginine	0.10	0.12	0.09	0.11	0.02	0.03	0.02	0.02
E.A.A. <sup>2)</sup>	0.89	0.96	0.81	0.85	0.12	0.17	0.17	0.18
Total	2.73	2.97	2.71	2.79	0.36	0.48	0.39	0.42

<sup>1)</sup> Ratio (Saccharification liquids:*Lentinus edodes* extracts)

<sup>2)</sup> E.A.A. : Essential amino acid

## 마) 지방산 분석

### (1) 표고버섯 분말을 밥에 첨가하여 제조한 조청

표고버섯 분말을 첨가하지 않은 무첨가구와 분말 첨가구의 지방산 조성을 비교한 결과는 Table 34과 같다. 무첨가구의 경우 linoleic acid(C18:2)가 23.8%로 가장 높은 비율을 차지하였고, palmitic acid(22.3%), oleic acid(19.0%), myristic acid(14.2%), caproic acid(9.4%) 순으로 나타났으며 이러한 결과는 1% 첨가구를 제외한 나머지 시료도 같은 경향을 보였다.

표고버섯 분말 첨가량을 높일수록 포화지방산(SFA)의 비는 57.2%에서 48.7%로 감소하였으며 상대적으로 불포화지방산(USFA)의 비는 42.8%에서 51.3%로 증가하였다. 확인된 지방산 9종 중 linoleic acid(C18:2), palmitic acid(C16:0)와 oleic acid(C18:1)는 표고버섯 분말을 첨가할수록 그 함량이 증가하였으며 이들 성분은 표고버섯 분말에서 유래된 것으로 판단된다.

건조 표고버섯의 지방산 조성은 linoleic acid(C18:2)가 77.9 g/100 g 지방산, palmitic acid(C16:0)가 19.0 g/100 g 지방산으로 가장 많이 함유되어 있었으며 그 외 stearic acid(C18:0)와 oleic acid(C18:1)가 소량 검출되었다고 하여 (60), 본 실험 결과에서 linoleic acid와 palmitic acid 함량이 증가하는 요인으로 여겨진다.

### (2) 표고버섯 분말을 당화액에 첨가하여 제조한 조청

시료별 지방산 조성을 비교한 결과는 Table 35와 같이 무첨가구의 경우 linoleic acid(C18:2)가 23.8%로 가장 높은 함량을 보였고, palmitic acid(22.3%), oleic acid(19.0%), myristic acid(14.2%), caproic acid(9.4%) 순으로 나타났으며, 1% 첨가구에서는 palmitic acid(C16:0)가 27.9%로 가장 높았고, 3% 첨가구에서는 caproic acid(5.3%) 보다 stearic acid(6.3%) 함량이 다소 높은 결과를 보였다. 이상의 결과는 분말을 밥에 첨가하여 제조한 조청의 지방산 조성 과 거의 유사한 결과이며 함량 또한 비슷한 수준이었다. 또한 표고버섯 분말 첨가량을 높일수록 포화지방산(SFA)의 비는 57.2%에서 48.3%로 감소하였으며 상대적으로 불포화지방산(USFA)의 비는 42.8%에서 51.7%로 증가하였다. 확인된 지방산 9종 중 linoleic acid(C18:2)가 23.8%에서 29.8%로 첨가수준에 따라 그 함량이 다소 증가하였으며, palmitic acid(C16:0)가 22.3%에서 27.9%로, oleic acid(C18:1)가 19.0%에서 21.9%로 첨가량이 증가할수록 증가하는 경향을 보였으며 이는 표고버섯 분말에서 유래된 것으로 판단된다.

**Table 34. Composition of fatty acids in *Jochung* containing different amount of *Lentinus edodes* powder**

(%)

	Control	Substitution level of <i>Lentinus edodes</i> powder		
		1%	2%	3%
Caproic acid (C6:0)	9.4	7.8	6.7	6.7
Caprylic acid (C8:0)	2.1	1.4	1.5	0.6
Capric acid (C10:0)	1.6	1.2	0.9	1.2
Lauric acid (C12:0)	1.0	0.2	0.9	0.9
Myristic acid (C14:0)	14.2	10.0	9.8	8.0
Palmitic acid (C16:0)	22.3	28.5	26.1	27.0
Stearic acid (C18:0)	6.6	5.0	2.8	4.3
Oleic acid (C18:1)	19.0	22.3	21.3	22.8
Linoleic acid (C18:2)	23.8	23.6	30.0	28.5
SFA <sup>1)</sup>	57.2	54.1	48.7	48.7
USFA <sup>2)</sup>	42.8	45.9	51.3	51.3
MUFA <sup>3)</sup>	19.0	22.3	21.3	22.8
PUFA <sup>4)</sup>	23.8	23.6	30.0	28.5
MUFA/SFA	0.33	0.41	0.44	0.47
PUFA/SFA	0.42	0.44	0.62	0.59
PUFA/MUFA	1.25	1.06	1.41	1.25
USFA/SFA	0.75	0.85	1.05	1.05

<sup>1)</sup> SFA : Saturated fatty acid

<sup>2)</sup> USFA : Unsaturated fatty acid

<sup>3)</sup> MUFA : Monounsaturated fatty acid

<sup>4)</sup> PUFA : Polyunsaturated fatty acid

Table 35. Composition of fatty acids in *Jochung* containing different amount of *Lentinus edodes* powder

(%)

	Control	Substitution level of <i>Lentinus edodes</i> powder		
		1%	2%	3%
Caproic acid (C6:0)	9.4	6.6	6.5	5.3
Caprylic acid (C8:0)	2.1	1.0	1.1	0.7
Capric acid (C10:0)	1.6	1.1	1.5	1.5
Lauric acid (C12:0)	1.0	0.4	0.1	0.1
Myristic acid (C14:0)	14.2	8.8	10.8	6.5
Palmitic acid (C16:0)	22.3	27.9	26.4	27.9
Stearic acid (C18:0)	6.6	8.6	4.5	6.3
Oleic acid (C18:1)	19.0	19.4	22.8	21.9
Linoleic acid (C18:2)	23.8	26.2	26.3	29.8
SFA <sup>1)</sup>	57.2	54.3	50.9	48.3
USFA <sup>2)</sup>	42.8	45.6	49.1	51.7
MUFA <sup>3)</sup>	19.0	19.4	22.8	21.9
PUFA <sup>4)</sup>	23.8	26.2	26.3	29.8
MUFA/SFA	0.33	0.36	0.45	0.45
PUFA/SFA	0.42	0.48	0.52	0.62
PUFA/MUFA	1.25	1.35	1.15	1.36
USFA/SFA	0.75	0.84	0.96	1.07

<sup>1)</sup> SFA : Saturated fatty acid

<sup>2)</sup> USFA : Unsaturated fatty acid

<sup>3)</sup> MUFA : Monounsaturated fatty acid

<sup>4)</sup> PUFA : Polyunsaturated fatty acid

### (3) 표고버섯 추출액을 첨가하여 제조한 조청

추출액을 첨가한 조청의 지방산 조성은 Table 36과 같다. 추출액을 첨가하지 않은 무첨가구의 경우 linoleic acid(C18:2)가 23.8%로 가장 높은 비율을 차지하였고, palmitic acid(22.3%), oleic acid(19.0%), myristic acid(14.2%), caproic acid(9.4%) 순으로 나타났다. 버섯 추출액을 첨가한 시료의 경우 그 양상이 다양하여 7:3 첨가구의 경우 linoleic acid(24.0%), palmitic acid(23.0%), oleic acid(17.7%), myristic acid(12.9%), stearic acid(12.3%) 순이었고, 5:5 첨가구에서는 palmitic acid(26.7%), linoleic acid(21.7%), oleic acid(15.4%), myristic acid(13.7%), stearic acid(12.6%), 3:7 첨가구의 경우 palmitic acid(25.4%), linoleic acid(24.5%), oleic acid(18.9%), myristic acid(14.2%), caproic acid(8.0%) 순으로 나타났다.

이러한 결과는 분말을 밥이나 당화액에 첨가하여 제조한 조청의 경우와는 다른 양상이었으며, 포화지방산(SFA)과 불포화지방산(USFA)의 비율도 추출액 첨가수준과는 관계가 없이 변화가 없었다.



Table 36. Composition of fatty acids in *Jochung* containing different amount of *Lentinus edodes* powder

(%)

	Control	Ratio (Saccharification liquids: <i>Lentinus edodes</i> extract)		
		10:0	7:3	5:5
Caproic acid (C6:0)	9.4	7.1	6.8	8.0
Caprylic acid (C8:0)	2.1	0.9	1.0	1.1
Capric acid (C10:0)	1.6	2.0	1.8	1.1
Lauric acid (C12:0)	1.0	0.1	0.3	0.1
Myristic acid (C14:0)	14.2	12.9	13.7	14.2
Palmitic acid (C16:0)	22.3	23.0	26.7	25.4
Stearic acid (C18:0)	6.6	12.3	12.6	6.7
Oleic acid (C18:1)	19.0	17.7	15.4	18.9
Linoleic acid (C18:2)	23.8	24.0	21.7	24.5
SFA <sup>1)</sup>	57.2	58.3	62.9	56.6
USFA <sup>2)</sup>	42.8	41.7	37.1	43.4
MUFA <sup>3)</sup>	19.0	17.7	15.4	18.9
PUFA <sup>4)</sup>	23.8	24.0	21.7	24.5
MUFA/SFA	0.33	0.30	0.24	0.33
PUFA/SFA	0.42	0.41	0.34	0.43
PUFA/MUFA	1.25	1.36	1.41	1.30
USFA/SFA	0.75	0.72	0.59	0.77

<sup>1)</sup> SFA : Saturated fatty acid

<sup>2)</sup> USFA : Unsaturated fatty acid

<sup>3)</sup> MUFA : Monounsaturated fatty acid

<sup>4)</sup> PUFA : Polyunsaturated fatty acid

## 바) pH 및 환원당

### (1) 표고버섯 분말을 밥에 첨가하여 제조한 조청

본 실험에서 제조한 조청은 식품공전의 엿류 규격기준 중 pH가 4.5~7.0의 범위에 포함되어야 한다고 규정되어 있다(78). pH meter를 이용하여 측정된 시료별 pH는 무첨가구가 5.5, 1%, 2% 첨가구가 각각 5.7, 3% 첨가구의 경우 5.8로 나타나 규격기준에 적합한 것으로 나타났으며 시료간의 차이를 관찰할 수 없었으며, 이는 표고버섯 분말이 조청의 pH에는 영향을 주지 않았음을 알 수 있었다.

환원당(maltose %)의 경우(Table 37) 무첨가구가 40.38%, 1% 첨가구가 43.16%, 2% 첨가구 41.04%, 3% 첨가구의 경우 46.30%로 나타나 무첨가구에 비해 첨가구의 환원당 함량이 높은 결과를 보였다. 이는 유리당 결과(Table 28참조)에서 maltose 함량이 무첨가구 37.16%, 1% 첨가구 43.16%, 2% 첨가구 39.81%, 3% 첨가구 44.99%의 결과와 비교해 볼 때 약간 높은 값을 나타냈다. 이는 Kim 등의 결과(82)와 유사한 경향으로 실제 HPLC 분석에 의해서는 순수한 유리당 만이 정량되었으나 Bertrand 법에 의해 측정된 환원당은 환원력을 가지는 단당류 일부가 환원당으로 측정되기 때문에 높게 나타나는 것으로 생각된다(81).

### (2) 표고버섯 분말을 당화액에 첨가하여 제조한 조청

표고버섯 분말을 당화액에 다양한 수준으로 첨가하여 제조한 조청의 pH와 환원당 분석 결과는 Table 38와 같다. pH의 경우 모든 시료에서 5.5~5.7로 변화가 없었으며 이는 식품공전(78) 엿류 규격기준 중 pH가 4.5~7.0의 범위 이내이어야 하는 기준에 적합한 것으로 나타났다.

환원당(maltose %)의 경우(Table 38) 무첨가구가 40.38%, 1% 첨가구가 41.02%, 2% 첨가구 46.52%, 3% 첨가구의 47.58%로 표고버섯 분말의 첨가 수준이 높아질수록 환원당 함량이 증가함을 알 수 있었다. 이는 기존 주재료인 쌀이 엿기름에 의해 분해되어 생성되는 당류와 일정 수준 첨가된 표고버섯에서 유래된 일부 당 때문인 것으로 생각된다. 또한 유리당 분석 결과(Table 29 참조)에서 maltose 함량과의 관계에서도 무첨가구의 maltose 함량 37.16%, 1% 첨가구 38.07%, 2% 첨가구 44.05%, 3% 첨가구 44.00%로 환원당 함량이 다소 높은 결과를 보여 밥에 첨가된 조청의 결과와 일치함을 알 수 있었다.

### (3) 표고버섯 추출액을 첨가하여 제조한 조청

표고버섯 추출액을 첨가하여 제조한 조청의 pH와 환원당 분석 결과는 Table 39과 같이 pH의 경우 5.5~5.7로 시료간 차이를 보이지 않았다. 이는 식품공전(78) 조청의 규격기준 중 pH가 4.5~7.0의 범위 이내이어야 하는 기준에 적합한 것으로 나타났다.

환원당(maltose %)의 경우(Table 39) 무첨가구가 40.38%, 당화액과 추출액의 첨가비가 7:3인 시료는 39.94%, 5:5 첨가구의 경우 39.16%, 3:7로 추출액이 당화액보다 많이 첨가된 경우에는 44.70%로 무첨가구에 비해 큰 차이를 보이지 않았으며, 단지 3:7 첨가구만이 무첨가구에 비해 높은 결과를 보였다. Table 30의 maltose 분석결과에서 무첨가구의 maltose 함량이 37.16%, 7:3 첨가구의 경우 37.86%, 5:5 첨가구 36.56%, 3:7 첨가구의 경우 39.58%로 환원당 함량이 HPLC에 의해 분석한 maltose 함량에 비해 다소 높은 결과를 보였다.

## 사) 점도 및 고형분 함량

### (1) 표고버섯 분말을 밥에 첨가하여 제조한 조청

표고버섯 분말 첨가량을 달리하여 제조한 조청의 점도는 Table 37과 같다. 무첨가구의 점도인  $132 \times 10^3$  cps와 비교해볼 때 1% 첨가구가  $213 \times 10^3$  cps로 다소 높은 결과를 보였고 2%와 3% 첨가구의 경우 각각  $128 \times 10^3$  cps,  $51.4 \times 10^3$  cps로 감소하는 경향을 보였다.

소비자들이 조청을 선택할 때 중요한 관능적 요소라고 생각되는 점도는 표고버섯 분말의 첨가 수준이 높아질수록 점차 감소하는 결과를 보여 적정 첨가 수준을 설정해야 할 필요성을 느꼈다. 실제 3% 첨가구의 경우 점도가 무첨가구의 점도인  $132 \times 10^3$  cps보다 약 60% 정도가 감소하였으며, 이러한 결과로 보아 점도 특성 항목을 고려하여 조청을 제조할 때 표고버섯 분말을 밥에 첨가시 3% 이상을 첨가하게 되면 조청의 물성에 부의 영향을 주는 것으로 나타났다.

고형분 함량의 경우(Table 37), 무첨가구가 74.32%에서 버섯 분말 첨가 수준이 증가할수록 감소하여 3% 첨가구의 경우 65.18%로 감소하였다. 고형분 함량이 감소할수록 점도 또한 감소하여 고형분 함량이 조청 점도와 정의 상관이 있음을 알 수 있었다. 따라서 점도를 측정할 수 없는 경우 고형분 함량을

측정함으로써 표고버섯 첨가량이나 줄이는 시간을 조절할 수 있을 것으로 본다.

### (2) 표고버섯 분말을 당화액에 첨가하여 제조한 조청

시료별 점도는 Table 38와 같이 무첨가구의 경우  $132 \times 10^3$  cps, 1% 첨가구가  $134 \times 10^3$  cps로 무첨가구와 유사하였고, 2% 첨가구의 경우  $88.2 \times 10^3$  cps, 3% 첨가구  $37.7 \times 10^3$  cps로 표고버섯 분말 첨가 수준이 증가할수록 점도는 감소하였다. 이상의 결과로 보아 조청의 관능적 요소 중 하나인 점도는 표고버섯 분말의 첨가량과는 부의 상관관계가 있는 것으로 판단되며 따라서 적정 첨가량을 설정해야 할 것으로 생각된다. 실제 3% 첨가구의 경우 점도가 무첨가구의 점도인  $132 \times 10^3$  cps에 비해 약 71% 정도가 감소하여 조청 고유의 점성을 거의 상실하였다. 따라서 표고버섯 분말을 당화액에 첨가하여 조청을 제조할 경우 여러 특성 가운데 점도 항목의 경우에는 2%를 초과하여 첨가하지 않는 것이 바람직하다고 본다.

고형분 함량의 경우(Table 38), 무첨가구가 74.32%, 1% 첨가구가 74.25%로 무첨가구와 거의 유사하였으며, 2% 첨가구의 경우 67.89%로 약간 감소하였고, 3% 첨가구는 63.09%로 감소하였다. 이러한 결과는 밥에 첨가하여 제조한 조청의 경우와 같은 결과로서, 고형분 함량이 감소할수록 점도 결과 또한 감소하여 고형분 함량이 조청 점도와 정의 상관이 있음을 알 수 있었다.

### (3) 표고버섯 추출액을 첨가하여 제조한 조청

표고버섯 추출액을 첨가하여 제조한 조청의 점도변화는 Table 39과 같다. 무첨가구의 경우  $132 \times 10^3$  cps이었으나 당화액과 추출액 첨가비가 7:3의 비율로 첨가한 경우  $27.6 \times 10^3$  cps로 크게 감소하였고, 첨가수준이 높아질수록 더 감소함을 알 수 있었다. 이는 밥과 당화액에 분말을 직접 첨가할 경우와 비교해볼 때 감소폭이 더 컸으며, 7:3 첨가구의 점도값( $27.6 \times 10^3$  cps)이 분말 3% 첨가구의 점도값( $51.4 \times 10^3$  cps,  $37.7 \times 10^3$  cps)보다도 더 낮아 조금은 묽은 상태였다.

이상의 결과로 보아 분말을 첨가하는 방법보다 추출액을 첨가하는 경우가 점도 감소폭이 더 컸고 추출액을 첨가하는 경우 줄이는 시간을 기존 제품에 비해 더 길게 설정할 필요성을 느꼈다.

고형분 함량의 경우(Table 39), 7:3 첨가구가 64.96%로 밥과 당화액에 분말을 3% 첨가하는 수준 정도로 감소하였으며 감소폭 또한 점도와 비슷한 경향을 보였다.

**Table 37. Viscosity, reducing sugar, solids and pH of *Jochung* containing different amount of *Lentinus edodes* powder**

	Control	Substitution level of <i>Lentinus edodes</i> powder		
		1%	2%	3%
Reducing sugar (maltose %)	40.38	43.16	41.04	43.30
Viscosity (centipoise)	132×10 <sup>3</sup>	213×10 <sup>3</sup>	128×10 <sup>3</sup>	51.4×10 <sup>3</sup>
Solids (%)	74.32	75.50	70.78	65.18
pH	5.5	5.7	5.7	5.8

**Table 38. Viscosity, reducing sugar, solids and pH of *Jochung* containing different amount of *Lentinus edodes* powder**

	Control	Substitution level of <i>Lentinus edodes</i> powder		
		1%	2%	3%
Reducing sugar (maltose %)	40.38	41.02	46.52	47.58
Viscosity (centipoise)	132×10 <sup>3</sup>	134×10 <sup>3</sup>	88.2×10 <sup>3</sup>	37.7×10 <sup>3</sup>
Solids (%)	74.32	74.25	67.89	63.09
pH	5.5	5.6	5.6	5.7

**Table 39. Viscosity, reducing sugar, solids and pH of *Jochung* containing different amount of *Lentinus edodes* powder**

	Control 10:0	Ratio (Saccharification liquids: <i>Lentinus edodes</i> extract)		
		7:3	5:5	3:7
Reducing sugar (maltose %)	40.38	39.94	39.16	44.70
Viscosity (centipoise)	132×10 <sup>3</sup>	27.6×10 <sup>3</sup>	25.6×10 <sup>3</sup>	21.9×10 <sup>3</sup>
Solids (%)	74.32	64.96	60.90	55.19
pH	5.5	5.6	5.7	5.7

## 아) 색도 및 인공감미료

### (1) 표고버섯 분말을 밥에 첨가하여 제조한 조청

표고버섯 분말 첨가량을 달리하여 제조한 조청의 색도 측정 결과는 Table 40과 같다. 명도를 나타내는 L값은 무첨가구가  $22.07 \pm 0.52$ 이었으며, 1% 첨가구가  $22.72 \pm 0.28$ , 2% 첨가구가  $20.24 \pm 0.11$ , 3% 첨가구에서  $19.02 \pm 0.41$ 로 표고분말 첨가량이 증가하면서 유의적으로 감소하는 경향을 나타내었다. Cho 등(85)은 표고가루 첨가량을 달리하여 제조한 설기떡의 색도를 측정한 결과 표고가루 첨가량이 증가할수록 L값이 유의적으로 감소하였다고 보고 하였으며, Son 등(87)의 결과에서도 표고버섯을 첨가하여 제조한 어묵의 색도가 첨가량이 증가되면서 감소하였다고 하여 조청은 아니지만 본 실험 결과와 같은 경향을 보였다.

이와 같이 L값이 감소하는 이유는 줄이기를 하는 가열공정 중에 버섯에 함유된 아미노산(86)과 유리당 및 당알코올 등이 조청 내 탄수화물과의 갈변반응에 의해 복합적으로 일어난 것으로 생각된다.

적색도를 나타내는 a값은 무첨가구의 경우  $7.45 \pm 0.49$ 에서 표고버섯 분말 첨가량을 증가시키면서 감소하여 3% 첨가구에서  $5.18 \pm 0.20$ 으로 유의적으로 감소하였으며, 황색도를 나타내는 b값도 같은 경향으로 무첨가구가  $17.80 \pm 0.73$ 이고 표고첨가량이 증가할수록 유의적으로 감소한 결과를 보였다.

전반적으로 색차를 나타내는  $\Delta E$ 값의 변화는 1% 첨가구가 0.65, 2% 첨가구가 4.02, 3% 첨가구에서 5.56으로 첨가량이 증가할수록 유의적으로 증가하였는데 이를 NBS(National Bureau of Standards)의 기준(88)에서 검토해 볼 때 표고버섯 분말 2%와 3% 첨가구는 무첨가구에 비해 현저한 차이(3.0~6.0 범위)를 보였으며, 향후 표고버섯 분말을 조청의 부원료로 이용하고자 할 때 색도 차이를 고려해야 할 것으로 판단된다.

분석 결과를 표로 나타내지는 않았지만 인공감미료를 분석한 결과 모든 시료에서 불검출이었다. 식품첨가물 성분 중 하나인 인공감미료를 분석한 이유는 식품공전 2-4 열류 중 조청의 규격기준에 인공감미료의 검사항목이 설정되어 있기 때문이며 그 기준은 불검출로 명시되어 있다(78).

Table 40. Hunter's color value of *Jochung* containing different amount of *Lentinus edodes* powder

	Control	Substitution level of <i>Lentinus edodes</i> powder		
		1%	2%	3%
L(whiteness)	22.07±0.52 <sup>1)a)</sup>	22.72±0.28 <sup>a)</sup>	19.02±0.41 <sup>c)</sup>	20.24±0.11 <sup>b)</sup>
a(redness)	7.45±0.49 <sup>a)</sup>	6.96±0.31 <sup>a)</sup>	5.90±0.36 <sup>b)</sup>	5.18±0.20 <sup>c)</sup>
b(yellowness)	17.80±0.73 <sup>a)</sup>	17.41±0.42 <sup>a)</sup>	14.57±0.36 <sup>b)</sup>	13.74±0.19 <sup>c)</sup>
$\Delta E^{2)}$	0.00	0.65	4.71	5.00

<sup>1)</sup> Standard Deviation

\* Means with the same letter are not significantly different( $p < 0.05$ )

<sup>2)</sup>  $\Delta E$  = total color difference



(2) 표고버섯 분말을 당화액에 첨가하여 제조한 조청

시료별 색도 측정 결과는 Table 41와 같다. 명도를 나타내는 L값은 무첨가구가  $22.07 \pm 0.52$ , 1% 첨가구가  $22.05 \pm 0.63$ 으로 무첨가구와 거의 유사하였으며, 2% 첨가구가  $19.24 \pm 0.06$ , 3% 첨가구에서  $18.29 \pm 0.09$ 를 나타내 표고버섯 분말 첨가량이 증가하면서 유의적으로 감소하는 결과를 보였다. 한편 이러한 결과는 조청은 아니지만 표고버섯을 첨가하여 제조한 설기떡과 어묵의 색도 측정 결과에서도 관찰되었는데 첨가량이 많아질수록 L값이 유의적으로 감소한다고 보고하였다(87, 85).

이와 같이 L값이 감소하는 이유로 버섯류에 공통으로 들어있는 유리당 및 당알코올(51)과 유리 아미노산 및 전아미노산(86) 등이 조청의 주성분으로 첨가되는 쌀에 존재하는 당류와 혼합된 상태로 높은 온도에서 가공되어지면서 갈변 반응을 일으키는 것이 주요원인으로 생각된다.

적색도를 나타내는 a값은 무첨가구의 경우  $7.45 \pm 0.49$ 에서 표고버섯 분말 첨가량을 증가시키면서 감소하여 3% 첨가구에서  $4.89 \pm 0.06$ 으로 유의적으로 감소하였으며, 황색도를 나타내는 b값도 같은 경향으로 무첨가구( $17.80 \pm 0.73$ )에서 표고첨가량이 증가할수록 유의적으로 감소하여 3% 첨가구에서  $12.73 \pm 0.16$ 으로 나타났다.

전반적으로 색차를 나타내는  $\Delta E$ 값의 변화는 1% 첨가구가 0.83, 2% 첨가구가 6.14, 3% 첨가구에서 6.82로 나타나 첨가량이 증가할수록 유의적으로 증가하였는데, 이를 NBS(National Bureau of Standards)의 기준(88)에서 검토해 볼 때 표고버섯 분말 2%와 3% 첨가구는 무첨가구에 비해 극히 현저한 차이(6.0~12.0 범위)를 보였다. 이러한 결과는 밥에 버섯 분말을 첨가한 경우와 거의 유사하였으며  $\Delta E$ 값의 경우 당화액에 첨가한 경우에 조금 더 크게 차이가 있음을 알 수 있었다.

분석 결과를 표에 나타내지는 않았지만 인공감미료를 분석한 결과 모든 시료에서 불검출이었다. 식품첨가물 성분 중 하나인 인공감미료를 분석한 이유는 식품공전 2-4 열류 중 조청의 규격기준에 인공감미료의 검사항목이 설정되어 있기 때문이며 그 기준은 불검출로 명시되어 있다(78).

Table 41. Hunter's color value of *Jochung* containing different amount of *Lentinus edodes* powder

	Control	Substitution level of <i>Lentinus edodes</i> powder		
		1%	2%	3%
L(whiteness)	22.07±0.52 <sup>1a)</sup>	22.05±0.63 <sup>a)</sup>	19.24±0.06 <sup>b)</sup>	18.29±0.09 <sup>c)</sup>
a(redness)	7.45±0.49 <sup>a)</sup>	6.66±0.31 <sup>b)</sup>	4.91±0.23 <sup>c)</sup>	4.89±0.06 <sup>c)</sup>
b(yellowness)	17.80±0.73 <sup>a)</sup>	17.54±0.28 <sup>a)</sup>	12.98±0.04 <sup>c)</sup>	12.73±0.16 <sup>c)</sup>
$\Delta E^{2)}$	0.00	0.83	6.14	6.82

<sup>1)</sup> Standard Deviation

\* Means with the same letter are not significantly different( $p < 0.05$ )

<sup>2)</sup>  $\Delta E$  = total color difference

### (3) 표고버섯 추출액을 첨가하여 제조한 조청

당화액 대비 추출액을 달리하여 첨가한 조청의 색도 측정 결과는 Table 42과 같다. 명도를 나타내는 L값은 무첨가구가  $22.07 \pm 0.52$ 이었고, 당화액과 추출액의 첨가비가 7:3인 시료의 경우  $19.55 \pm 0.23$ 으로 크게 감소하였으며, 5:5 첨가구의  $18.11 \pm 0.01$ , 3:7 첨가구의  $17.97 \pm 0.07$ 로서 추출액이 증가하면서 유의적으로 감소하였다. 이와 같이 L값이 감소하는 원인은 버섯류에 공통으로 들어 있는 유리당 및 당알코올(58)과 유리 아미노산 및 전아미노산(86) 등이 조청의 주성분으로 첨가되는 쌀에 존재하는 당류와 혼합된 상태로 높은 온도에서 가공되어지면서 갈변 반응을 일으키는 것이 주요원인으로 생각된다.

적색도를 나타내는 a값도 L값과 비슷하여 무첨가구의 경우  $7.45 \pm 0.49$ 에서 표고버섯 추출액의 첨가량을 증가함에 따라 감소하여 당화액과 추출액의 비가 3:7인 첨가구에서  $4.74 \pm 0.07$ 로 유의적으로 감소하였으며, 황색도를 나타내는 b값도 같은 경향으로 무첨가구( $17.80 \pm 0.73$ )에서 첨가량이 증가할수록 유의적으로 감소하였다.

전반적으로 색차를 나타내는  $\Delta E$ 값의 변화는 당화액과 추출액의 비가 7:3인 시료에서 6.32를 나타내 이를 NBS(National Bureau of Standards)의 기준(88)에서 검토해 볼 때 극히 현저한 차이(6.0~12.0 범위)를 보여 분말을 직접 첨가하는 경우와 큰 차이를 보였다. 또한 추출액 첨가량이 증가할수록 값의 변화도 커짐을 알 수 있었다. 따라서 표고버섯 추출액을 첨가하여 조청을 제조하는 경우 색의 차이를 고려한다면 좀 더 적은 양을 첨가하는 것이 바람직하다고 본다.

분석 결과를 표에 나타내지는 않았지만 인공감미료를 분석한 결과 모든 시료에서 불검출이었다. 식품첨가물 성분 중 하나인 인공감미료를 분석한 이유는 식품공전 2-4 엽류 중 조청의 규격기준에 인공감미료의 검사항목이 설정되어 있기 때문이며 그 기준은 불검출로 명시되어 있다(78).

Table 42. Hunter's color value of *Jochung* containing different amount of *Lentinus edodes* powder

	Control 10:0	Ratio (Saccharification liquids: <i>Lentinus edodes</i> extract)		
		7:3	5:5	3:7
L(whiteness)	22.07±0.52 <sup>1)a)</sup>	19.55±0.23 <sup>b)</sup>	18.11±0.01 <sup>c)</sup>	17.97±0.07 <sup>cd)</sup>
a(redness)	7.45±0.49 <sup>a)</sup>	4.86±0.70 <sup>c)</sup>	4.48±0.25 <sup>c)</sup>	4.74±0.07 <sup>c)</sup>
b(yellowness)	17.80±0.73 <sup>a)</sup>	12.61±0.29 <sup>c)</sup>	11.63±0.19 <sup>d)</sup>	11.74±0.03 <sup>d)</sup>
$\Delta E^{2)}$	0.00	6.32*	7.10*	7.98*

<sup>1)</sup> Standard Deviation

\* Means with the same letter are not significantly different( $p < 0.05$ )

<sup>2)</sup>  $\Delta E$  = total color difference

## 자) 관능검사

### (1) 표고버섯 분말을 밥에 첨가하여 제조한 조청

표고버섯 분말 함유 조청의 관능검사 결과를 Table 43에 나타내었다. 색(color)의 경우 무첨가구( $6.60 \pm 0.70$ )와 버섯 분말 1%를 첨가한 시료( $6.70 \pm 0.77$ )는 거의 비슷한 결과를 보였으며, 2% 첨가구에서  $5.60 \pm 1.07$ 로, 3% 첨가구에서  $3.50 \pm 0.51$ 로 낮아지는 경향을 보였다. 색차계에 의해 측정된 명도의 결과에서도 무첨가구와 1% 첨가구가 각각 22.07과 22.72로 거의 유사하였으며 버섯 분말을 첨가할수록 명도값이 감소하여 관능검사 결과와 잘 일치함을 알 수 있었다. 이러한 결과로 보아 버섯 분말을 1%까지 첨가하는 경우 무첨가구와 거의 차이가 없었으며, 2% 이상 첨가할 경우 기계적으로 또는 관능적으로 조금씩 차이가 남을 알 수 있었다.

향미(flavor)의 경우 무첨가구가  $6.30 \pm 1.06$ 이고, 1% 첨가구의 경우  $6.42 \pm 0.51$ 로 유의적이지는 않지만 오히려 다소 높은 점수를 받은 것으로 나타났고, 2% 첨가구부터 감소하였다. 먹을때의 느낌(chewiness)도 색, 향미와 같은 결과를 보여 1% 첨가구( $6.13 \pm 0.87$ )의 경우 무첨가구( $6.10 \pm 0.92$ )와 차이를 보이지 않았으며 2% 첨가구부터 감소하였다.

단맛(sweetness)은 버섯 분말 첨가량이 증가하면서 유의적으로 감소하였다. 전반적인 기호도(overall acceptability)의 경우에도 무첨가구( $6.50 \pm 0.71$ )와 1% 첨가구( $6.40 \pm 0.58$ )는 차이를 보이지 않았으나 2% 첨가구에서  $4.80 \pm 1.04$ 로 유의적으로 감소하였고, 3% 첨가구에서  $2.90 \pm 0.85$ 로 차이를 보였다. 첨가량이 증가할수록 검사 항목에 대한 평가가 낮아지는 것은 표고버섯 분말을 첨가하면서 조청 고유의 특성에 대한 기대치가 떨어지면서 발생하기도 하지만 조청에 대한 맛과 조직감 등 기존의 고정관념이 깊이 인식되어 있는 것도 한 원인 중 하나라고 해석되며, 즉 부원료인 버섯이 첨가될수록 조청에 기대하고 예상하는 맛과 조직감의 차이를 느끼고 낮은 점수를 주는 이유 중 하나라고 생각된다.

본 실험 결과 조청을 제조시 표고버섯 분말의 적정 첨가 비율은 1~2% 수준으로 생각되며 그 이상 첨가할 경우 전체적인 기호도나 조청 고유의 물성에 부의 영향을 주는 것으로 나타났으며 이러한 사실은 여러 가지 표고버섯이 갖는 장점 등을 조청에 적용할 수 있는 가능성을 시사한다고 볼 수 있다.

Table 43. Sensory characteristics of *Jochung* containing different amount of *Lentinus edodes* powder

	Control	Substitution level of <i>Lentinus edodes</i> powder		
		1%	2%	3%
Color	6.60±0.70 <sup>1)a)</sup>	6.70±0.77 <sup>a)</sup>	5.60±1.07 <sup>b)</sup>	3.50±0.51 <sup>c)</sup>
Flavor	6.30±1.06 <sup>a)</sup>	6.42±0.51 <sup>a)</sup>	4.90±0.85 <sup>b)</sup>	4.70±1.16 <sup>b)</sup>
Chewiness	6.10±0.92 <sup>a)</sup>	6.13±0.87 <sup>a)</sup>	5.20±0.81 <sup>ab)</sup>	3.00±1.26 <sup>c)</sup>
Sweetness	6.40±0.70 <sup>a)</sup>	5.40±0.63 <sup>ab)</sup>	4.10±1.03 <sup>b)</sup>	2.90±0.76 <sup>c)</sup>
Overall acceptability	6.50±0.71 <sup>a)</sup>	6.40±0.58 <sup>a)</sup>	4.80±1.04 <sup>b)</sup>	2.90±0.85 <sup>c)</sup>

<sup>1)</sup> Standard Deviation

\* Means with the same letter are not significantly different( $p < 0.05$ )

(2) 표고버섯 분말을 당화액에 첨가하여 제조한 조청

버섯 분말 첨가량을 달리하여 제조한 조청의 관능검사 결과는 Table 44와 같다. 먼저 색(color)의 경우 1% 첨가구(6.40±1.29)는 무첨가구(6.60±0.70)와 유의적인 차이가 없었으며, 2% 첨가구가 5.70±0.98로 나타나 무첨가구와 큰 차이를 보이지 않았다. 버섯 분말을 당화액에 3% 첨가한 시료의 경우 2.80±1.32로 감소하여 조청 고유의 색택과 차이를 보이면서 점차 색이 더 진해지는 것으로 나타났다. 이러한 결과는 색차계에 의한 색도(명도) 검사 결과에서도 비슷하여(Table 39 참조) 첨가량이 증가할수록 명도값이 감소하였다.

향미(flavor)의 경우 무첨가구가 6.30±1.06로 1% 첨가구의 6.25±0.66과 거의 차이가 없었으며, 2% 첨가구와 3% 첨가구가 각각 4.68±0.62와 4.20±0.93으로 조금씩 감소함을 알 수 있었다. 먹을때의 느낌(chewiness)도 색, 향미와 같은 결과를 보여 1% 첨가구(5.90±0.73)의 경우 무첨가구(6.10±0.92)와 차이를 보이지 않았으며 2% 첨가구부터 감소하였다. 단맛(sweetness)은 버섯 분말의 첨가량이 증가하면서 유의적으로 감소하였는데 다른 특성치에 비해 더 크게 감소함을 알 수 있었다.

전반적인 기호도(overall acceptability)의 경우에도 무첨가구(6.50±0.71)와 1% 첨가구(6.40±0.52)는 차이를 보이지 않았으나, 2% 첨가구가 4.00±0.52, 3% 첨가구가 2.70±0.82로 감소하여 유의적인 차이를 보였다. 본 실험 결과 표고버섯 분말을 당화액에 직접 첨가하여 조청을 제조시 적정 첨가 비율은 1~2% 혹은 2% 미만 정도의 수준으로 생각되며 그 이상 첨가할 경우 전체적인 기호도나 조청 고유의 물성에 부의 영향을 주는 것으로 판단되며 이러한 사실은 표고버섯이 갖는 여러 가지 영양학적인 장점 등을 조청에 적용할 수 있는 가능성을 시사하였다.

Table 44. Sensory characteristics of *Jochung* containing different amount of *Lentinus edodes* powder

	Control	Substitution level of <i>Lentinus edodes</i> powder		
		1%	2%	3%
Color	6.60±0.70 <sup>1)a)</sup>	6.40±1.29 <sup>a)</sup>	5.70±0.98 <sup>ab)</sup>	2.80±1.32 <sup>c)</sup>
Flavor	6.30±1.06 <sup>a)</sup>	6.25±0.66 <sup>a)</sup>	4.68±0.62 <sup>b)</sup>	4.20±0.93 <sup>bc)</sup>
Chewiness	6.10±0.92 <sup>a)</sup>	5.90±0.73 <sup>a)</sup>	5.12±1.01 <sup>b)</sup>	3.20±0.62 <sup>c)</sup>
Sweetness	6.40±0.70 <sup>a)</sup>	6.00±0.82 <sup>a)</sup>	3.60±0.65 <sup>bc)</sup>	2.10±0.32 <sup>d)</sup>
Overall acceptability	6.50±0.71 <sup>a)</sup>	6.40±0.52 <sup>a)</sup>	4.00±0.82 <sup>b)</sup>	2.70±0.82 <sup>c)</sup>

<sup>1)</sup> Standard Deviation

\* Means with the same letter are not significantly different ( $p < 0.05$ )



### (3) 표고버섯 추출액을 첨가하여 제조한 조청

표고버섯 추출액을 당화액에 첨가하여 제조한 조청의 관능검사 결과는 Table 45과 같다. 색(color)의 경우 추출액 첨가량이 증가할수록 모든 시료에서 유의적으로 감소하였는데 특히, 당화액과 추출액의 첨가비가 7:3인 시료( $3.50 \pm 1.27$ )도 무첨가구( $6.60 \pm 0.70$ )와 크게 차이가 났음을 알 수 있었다. 색차계에 의해 측정된 명도(L값)의 결과(Table 11-3 참조)에서도 1% 첨가구가 19.55로 무첨가구의 22.07에 비해 크게 낮아지는 결과이며 첨가량이 증가할수록 명도값이 감소하였다.

향미(flavor)의 경우 무첨가구( $6.30 \pm 1.06$ )와 당화액과 추출액의 첨가비가 7:3인 시료의  $5.60 \pm 0.78$ 로 유의적인 차이를 관찰할 수 없었으며 5:5 첨가구의 경우  $4.20 \pm 1.40$ , 3:7 첨가구의 경우  $3.40 \pm 0.52$ 로 유의적인 차이를 보였다. 먹을 때의 느낌(chewiness)은 추출액 첨가비가 증가할수록 유의적인 차이를 보여 무첨가구가  $6.10 \pm 0.92$ , 당화액과 추출액의 첨가비가 7:3인 시료가  $4.10 \pm 0.99$ , 5:5 첨가구가  $1.90 \pm 0.57$ 로 무첨가구에 비해 크게 감소되었으며, 3:7 첨가구도  $1.20 \pm 0.63$ 로 감소하였다. 단맛(sweetness)은 먹을 때의 느낌과 같은 경향으로 추출액의 비가 증가하면서 유의적으로 감소하는 결과를 보였다. 이상의 각 특성치에 대한 결과들로 보아 버섯 추출액을 제조하여 첨가하는 경우에는 분말을 직접 첨가하는 경우보다 더 차이가 났음을 알 수 있었고 그 감소폭 또한 크게 나타났다.

전반적인 기호도(overall acceptability)에서는 무첨가구의  $6.50 \pm 0.71$ 과 비교해볼 때 당화액과 추출액의 첨가비가 7:3인 시료에서는  $5.70 \pm 0.48$ 로 큰 차이를 보이지 않았으나 5:5 첨가구로 첨가량이 증가할 때는  $2.60 \pm 0.70$ 으로 크게 낮아졌으며, 3:7 첨가구의 경우에는  $1.20 \pm 0.82$ 로 감소하였다. 실제 성상에서도 5:5 첨가구부터는 조청 고유의 점성도 많이 떨어져 액상에 가까워졌으며, 단맛 또한 크게 감소하였고 고유의 색택도 갖지 못하는 등 조청으로서 기능을 다하지 못하는 것으로 나타났다. 이러한 결과로 보아 표고버섯 추출액을 일정 비율로 첨가하여 조청을 제조하는 경우에도 당화액 대비 추출액은 7:3의 비율로 첨가하여 제조한 조청만이 무첨가구와 큰 차이를 보이지 않았으며, 5:5 이상의 첨가구에서는 낮은 점수를 받는 것으로 나타났다.

Table 45. Sensory characteristics of *Jochung* containing different amount of *Lentinus edodes* powder

	Control 10:0	Ratio (Saccharification liquids: <i>Lentinus edodes</i> extract)		
		7:3	5:5	3:7
Color	6.60±0.70 <sup>1)a)</sup>	3.50±1.27 <sup>c)</sup>	2.10±0.52 <sup>d)</sup>	1.20±0.42 <sup>d)</sup>
Flavor	6.30±1.06 <sup>a)</sup>	5.60±0.78 <sup>a)</sup>	4.20±1.40 <sup>bc)</sup>	3.40±0.52 <sup>c)</sup>
Chewiness	6.10±0.92 <sup>a)</sup>	4.10±0.99 <sup>b)</sup>	1.90±0.57 <sup>d)</sup>	1.20±0.63 <sup>d)</sup>
Sweetness	6.40±0.70 <sup>a)</sup>	4.70±0.68 <sup>b)</sup>	2.00±0.82 <sup>d)</sup>	1.60±0.84 <sup>d)</sup>
Overall acceptability	6.50±0.71 <sup>a)</sup>	5.70±0.48 <sup>ab)</sup>	2.60±0.70 <sup>c)</sup>	1.20±0.82 <sup>c)</sup>

<sup>1)</sup> Standard Deviation

\* Means with the same letter are not significantly different( $p < 0.05$ )

#### (4) 최적 첨가량으로 결정된 조청 시료간 관능검사 결과

Table 46는 각 조건별 제조된 조청 중 관능검사 결과 가장 높은 점수를 받은 시료군만 선별하여 무첨가구와 비교한 결과이다. 색(color)의 경우 밥에 버섯 분말을 1% 첨가한 시료( $6.20 \pm 0.70$ )와 당화액에 버섯 분말을 1% 첨가한 시료( $5.10 \pm 1.04$ )가 무첨가구( $6.10 \pm 1.20$ )와 유의적인 차이가 거의 없는 것으로 나타났으며 버섯 추출액을 제조하여 당화액과 추출액의 비를 7:3으로 첨가하여 제조한 조청의 경우  $4.40 \pm 0.43$ 으로 다소 낮은 점수를 받았다.

향미(flavor)는 밥과 당화액에 버섯 분말을 직접 첨가한 경우 및 추출액을 당화액에 7:3의 비로 첨가한 조청 모두 시료간 큰 차이가 나지 않았다. 먹을 때의 느낌(chewiness)은 밥과 당화액에 버섯 분말을 1%씩 직접 첨가하는 경우 무첨가구와 유의적인 차이가 없었으며 당화액에 추출액을 7:3으로 첨가한 경우가  $3.40 \pm 1.27$ 로 다소 차이를 보였다. 단맛(sweetness)도 먹을 때의 느낌과 같은 경향을 보여 당화액에 추출액을 7:3의 비율로 첨가하여 제조한 경우를 제외하고 두 처리구에서 유의적인 차이를 관찰할 수 없었다.

전반적인 기호도(overall acceptability)에서는 무첨가구가  $6.10 \pm 0.57$ , 분말 1%를 밥에 첨가한 시료의 경우  $6.06 \pm 0.70$ , 분말 1%를 당화액에 첨가한 경우  $5.96 \pm 0.51$ 로 분말을 조청에 직접 첨가한 모든 경우 무첨가구와 거의 유사함을 알 수 있었고, 당화액과 추출액의 비가 7:3의 비율로 첨가하여 제조한 조청의 경우  $3.90 \pm 1.29$ 로 기존 제품에 비해 다소 낮은 점수를 받았다.

이상의 결과를 종합해 볼 때 표고버섯 분말을 조청에 직접 첨가하는 경우에는 밥에 첨가하는 경우와 당화액을 줄이기 하는 과정에서 첨가하는 두 경우 모두 이화학적 차이는 거의 없는 것으로 나타났으며, 첨가량을 설정하는데 있어 1~2% 정도 수준 혹은 그 이하가 적당할 것으로 판단된다. 실제 실험 결과에서도 1% 첨가수준의 시료는 무첨가구와 관능적인 부분이 거의 차이가 없었으며 오히려 일부 영양성분의 경우 증가하는 것으로 측정되었다.

표고버섯 추출액을 제조하여 줄이기 전에 당화액에 일정 비율(10:0, 7:3, 5:5, 3:7)로 첨가하여 제조한 조청의 경우 밥과 당화액에 버섯 분말을 직접 첨가하는 경우와는 조금 다른 양상을 보였다. 이화학적 성분들도 일부 유리당을 제외하고 큰 차이를 보이지 않았으며, 관능적 요소에서의 경우 5:5 첨가구 이상에서는 기존 조청 제품과 상당한 차이를 보이는 것으로 나타났다. 따라서 추출액을 첨가할 경우 당화액과 추출액의 비가 7:3을 넘지 않은 범위에서 제조를 하거나 혹은 줄이기를 하는 과정 중 시간을 기존 제품보다 좀더 길게 설정해야만 기존 조청과 유사한 제품을 만들 수 있을 것으로 기대된다.

Table 46. Sensory characteristics of *Jochung* containing different amount of *Lentinus edodes* powder

	Control	1 <sup>1)</sup>	2 <sup>2)</sup>	3 <sup>3)</sup>
Color	6.10±1.20 <sup>4)a)</sup>	6.20±0.70 <sup>a)</sup>	5.10±1.04 <sup>ab)</sup>	4.40±0.43 <sup>bc)</sup>
Flavor	6.40±1.01 <sup>a)</sup>	6.10±1.29 <sup>a)</sup>	6.30±1.06 <sup>a)</sup>	5.50±0.68 <sup>ab)</sup>
Chewiness	6.40±1.08 <sup>a)</sup>	6.10±0.48 <sup>a)</sup>	6.20±1.10 <sup>a)</sup>	3.40±1.27 <sup>c)</sup>
Sweetness	5.70±0.57 <sup>a)</sup>	5.10±0.25 <sup>ab)</sup>	5.20±0.64 <sup>a)</sup>	2.90±0.43 <sup>c)</sup>
Overall acceptability	6.10±0.57 <sup>a)</sup>	6.06±0.70 <sup>a)</sup>	5.96±1.51 <sup>a)</sup>	3.90±1.29 <sup>c)</sup>

1) The number means the added amount % of *Lentinus edodes* powder in rice

2) The number means the added amount % of *Lentinus edodes* powder in saccharification liquids

3) Ratio (saccharification liquids : *Lentinus edodes* extract) = 3:7

4) Standard Deviation

\* Means with the same letter are not significantly different( $p < 0.05$ )

## 차) 조청 제품화를 위한 결론

지방 함량이 낮아 저칼로리 식품이면서, 단백질, 비타민 및 각종 무기성분이 풍부하게 함유되어 있어 건강식품으로서의 각광을 받고 있는 년중 수확이 가능한 표고버섯을 식품으로 이용하기 위한 적절한 가공방법을 모색하여 고부가가치를 갖는 식품으로 개발을 하고자 표고버섯 첨가 조청을 아래 3가지 방법의 의해 제조하였다.

### (1) 표고버섯 분말을 밥에 직접 첨가하여 제조하는 방법

수침한 멥쌀 1 kg에 표고버섯 분말을 각각 10 g(1%), 20 g(2%), 30 g(3%)씩 첨가하고 고두밥을 짓는다. 물 4 L와 엿기름 300 g을 첨가하여 55℃ 향온기에서 4시간 동안 당화한 후, 당화액은 면포로 걸러낸 후 시료내의 온도가 91℃에서 1시간 저어주면서 가열하여 조청을 제조하였다.

### (2) 표고버섯 분말을 당화액에 첨가하여 제조하는 방법

수침한 멥쌀로 밥을 지어 밥 1 kg에 엿기름 300 g과 물 4 L를 넣어 55℃향온기에서 4시간 당화한 후 당화액은 면포로 걸러낸 후 표고버섯 분말을 각각 10 g(1%), 20 g(2%), 30 g(3%)를 첨가하여 시료내의 온도가 91℃에서 1시간 저어주면서 가열하여 조청을 제조하였다.

### (3) 표고버섯 추출액을 첨가하는 방법

추출액은 표고버섯 분말 50 g에 증류수 1.5 L를 첨가하여 약탕기를 이용하여 추출하고 추출액의 최종부피가 1 L가 되게 농축한 후 추출액으로 사용하였다.

수침한 멥쌀로 밥을 지어 밥 1 kg에 엿기름 300 g과 물 4 L를 넣어 55℃향온기에서 4시간 당화시킨다. 당화액을 면포로 걸러낸 후 당화액을 줄일 때 당화액과 표고 추출액을 다음과 같이 혼합하여 줄이기를 하였다. 당화액 : 표고 추출액의 비가 10:0, 7:3, 5:5, 3:7의 비율로 첨가하여 각각 시료를 제조하여 실험을 행한 결과 다음과 같은 결과를 얻었다.

(1) 표고버섯 분말을 밥에 직접 첨가하여 제조한 조청

표고버섯 분말을 밥에 첨가하여 졸이기를 한 조청의 일반성분은 무첨가구에 비해 조단백질, 회분과 조지방 함량은 증가하였고, 탄수화물 함량은 감소하였다. 무기성분의 경우 무첨가구가 2,642.34 mg/kg, 1% 첨가구가 2,692.18 mg/kg, 2% 첨가구가 3,022.62 mg/kg, 3% 첨가구가 3,158.34 mg/kg으로 버섯 분말 첨가량을 높일수록 증가하였으며, 분석된 대부분 무기성분은 무첨가구와 차이를 보이지 않았으나 K의 경우 첨가수준이 높아질수록 증가하는 경향을 보였다.

시료별 유리당 함량은 maltose>glucose>fructose 순으로 분석되었으며 표고버섯 분말 첨가 수준이 높아질수록 유리당 함량은 증가하였고, 아미노산 분석 결과 총 17종의 아미노산이 검출되었는데 구성 아미노산 중 가장 많이 함유된 아미노산은 glutamic acid이었으며, 그 외 성분은 함량이 조금씩 차이를 보였다. 조청의 지방산 조성은 무첨가구의 경우 linoleic acid가 23.8%로 가장 높은 비율을 차지하였고, palmitic acid(22.3%), oleic acid(19.0%), myristic acid(14.2%)와 caproic acid(9.4%) 순으로 대부분 첨가구는 이와 비슷한 경향이었고, 확인된 지방산 9종 중 linoleic acid(C18:2), palmitic acid(C16:0), oleic acid(C18:1)은 표고버섯 분말을 첨가할수록 그 함량이 증가하였다.

조청의 pH를 측정된 결과 5.5~5.8로 시료간 차이를 보이지 않았으며, 환원당의 경우 무첨가구가 40.38%, 1% 첨가구가 43.16%, 2% 첨가구 41.04%, 3% 첨가구의 경우 46.30%로 나타나 무첨가구에 비해 첨가구의 함량이 높은 결과를 보였다. 또한 점도와 고형분 함량은 무첨가구가 각각  $132 \times 10^3$  cps와 74.32%, 1% 첨가구가  $213 \times 10^3$  cps와 75.50%, 2% 첨가구가  $128 \times 10^3$  cps와 70.78%, 3% 첨가구가 각각  $51.4 \times 10^3$  cps와 65.18%로 첨가량이 증가하면서 두 항목 모두 감소하는 결과를 보였으며 3% 이상 첨가시 기존 조청의 고유 점성과 큰 차이를 보이는 것으로 나타났다.

색도를 분석한 결과 L값, a값, b값 모두 첨가량이 증가하면서 감소하였고, 2% 이상의 시료군에서 기존 무첨가구와 현저한 차이를 보이는 것으로 나타났다. 시료별 관능검사 결과에서 색(color)과 향미(flavor)는 1% 첨가구 만이, 먹을때의 느낌(chewiness)은 2% 첨가구까지, 단맛(sweetness)과 전반적인 기호도(overall acceptability)는 1% 첨가구 만이 무첨가구와 유의적인 차이를 보이지 않았다.

이러한 결과로 보아 표고버섯 분말을 밥에 첨가하여 조청을 제조할 경우 적정 첨가 수준으로 1~2%, 혹은 그 이하를 첨가해야 버섯의 장점을 살리면

서 기존 조청의 특성을 변화시키지 않는 제품을 제조할 수 있을 것으로 보인다.

## (2) 표고버섯 분말을 당화액에 직접 첨가하여 제조한 조청

표고버섯 분말을 당화액에 첨가하여 졸이기를 한 조청의 일반성분은 무첨가구에 비해 조단백질, 회분과 조지방 함량은 증가하였고, 탄수화물 함량은 감소하였다. 무기성분의 경우 무첨가구가 2,642.34 mg/kg, 1% 첨가구가 2,784.27 mg/kg, 2% 첨가구가 2,920.25 mg/kg, 3% 첨가구가 3,331.34 mg/kg으로 버섯 분말 첨가량을 높일수록 증가하였으며, 분석된 대부분 무기성분은 무첨가구와 차이를 보이지 않았으나 K의 경우 첨가수준이 높아질수록 증가하는 경향을 보였고 Ca과 Na의 경우 다소 높아지는 결과를 보였지만 그 수준은 미비하였다.

시료별 유리당 함량은 maltose>glucose>fructose 순으로 분석되었으며 표고버섯 분말 첨가 수준이 높아질수록 유리당 함량은 증가하였고, 아미노산 분석 결과 총 17종의 아미노산이 검출되었는데 구성 아미노산 중 가장 많이 함유된 아미노산은 glutamic acid이었으며, 그 외 성분은 함량이 조금씩 차이를 보였다. 조청의 지방산 조성은 무첨가구의 경우 linoleic acid가 23.8%로 가장 높은 비율을 차지하였고, palmitic acid(22.3%), oleic acid(19.0%), myristic acid(14.2%)와 caproic acid(9.4%) 순이었으며, 1% 첨가구에서는 palmitic acid가 27.9%로 가장 높은 함유 아미노산이었고, 3% 첨가구에서는 caproic acid(5.3%)보다 stearic acid(6.3)함량이 다소 높은 결과를 보였다. 확인된 지방산 9종 중 linoleic acid(C18:2), palmitic acid(C16:0), oleic acid(C18:1)은 표고버섯 분말을 첨가할수록 그 함량이 증가하였다.

조청의 pH를 측정된 결과 5.5~5.7로 시료간 차이를 보이지 않았으며, 환원당의 경우 무첨가구가 40.38%, 1% 첨가구가 41.02%, 2% 첨가구 46.52%, 3% 첨가구의 경우 47.58%로 나타나 무첨가구에 비해 첨가구의 함량이 높은 결과를 보였다. 또한 점도와 고형분 함량은 무첨가구가 각각  $132 \times 10^3$  cps와 74.32%, 1% 첨가구가  $134 \times 10^3$  cps와 74.25%, 2% 첨가구가  $88.2 \times 10^3$  cps와 67.89%, 3% 첨가구가 각각  $37.7 \times 10^3$  cps와 63.09%로 첨가량이 증가하면서 두 항목 모두 감소하는 결과를 보였으며, 3% 이상 첨가시 기존 조청의 고유점성과 차이를 보이는 것으로 나타났다.

색도를 분석한 결과 L값, a값, b값 모두 첨가량이 증가하면서 감소하였고, 2% 이상의 시료군에서 기존 무첨가구와 극히 현저한 차이를 보이는 것

으로 나타났다. 시료별 관능검사 결과에서 색(color)의 경우 2% 첨가구까지, 단맛(sweetness), 향미(flavor), 먹을때의 느낌(chewiness)과 전반적인 기호도(overall acceptability)는 1% 첨가구만이 무첨가구와 유의적인 차이를 보이지 않았다.

이러한 결과로 보아 표고버섯 분말을 밥에 첨가하여 조청을 제조할 경우 적정 첨가 수준으로 1~2%, 혹은 그 이하를 첨가해야 버섯의 장점을 살리면서 기존 조청의 특성을 변화시키지 않는 제품을 제조할 수 있을 것으로 보인다.

### (3) 표고버섯 추출액을 당화액에 첨가하여 졸이기를 한 조청

표고버섯 추출액을 당화액에 일정 비율로 첨가하여 졸이기를 한 조청의 일반성분은 조단백질, 회분과 조지방 함량은 거의 변화가 없었으며, 탄수화물 함량은 감소하여 밥과 당화액에 버섯 분말을 직접 첨가하는 경우와는 다른 양상을 보였다. 무기성분의 경우 무첨가구가 2,642.34 mg/kg, 1% 첨가구가 1,916.03 mg/kg, 2% 첨가구가 2,674.24 mg/kg, 3% 첨가구가 2,558.35 mg/kg으로 버섯 추출액 첨가량에 따른 변화는 관찰할 수 없었다.

시료별 유리당 함량은 maltose>glucose>fructose 순으로 분석되었으며 표고버섯 추출액의 첨가 수준이 높아질수록 유리당 함량은 증가하였고, 아미노산 분석 결과 총 17종의 아미노산이 검출되었는데, 가장 많이 함유된 아미노산은 glutamic acid이었으며, 그 외 성분은 함량이 조금씩 차이를 보였다. 조청의 지방산 조성은 무첨가구의 경우 linoleic acid가 23.8%로 가장 높은 비율을 차지하였고, palmitic acid(22.3%), oleic acid(19.0%), myristic acid(14.2%)와 caproic acid(9.4%) 순이었으며 버섯 추출액을 첨가한 시료의 경우 그 양상이 다양하게 분석되었으며 이러한 결과는 분말을 밥이나 당화액에 첨가하여 제조한 조청의 경우와는 다른 양상이었으며, 포화지방산(SFA)과 불포화지방산(USFA)의 비율도 변화가 없었다.

조청의 pH를 측정한 결과 5.5~5.7로 시료간 차이를 보이지 않았으며, 환원당의 경우 무첨가구가 40.38%, 당화액과 추출액의 혼합비가 7:3인 시료는 39.94%, 5:5 첨가구는 39.16%, 3:7 첨가구의 경우 44.70%로 나타나 무첨가구에 비해 큰 차이를 보이지 않았으며, 단지 3:7 첨가구만이 다소 높은 결과를 보였다. 또한 점도와 고형분 함량은 무첨가구가 각각  $132 \times 10^3$  cps와 74.32%, 당화액과 추출액의 혼합비가 7:3인 첨가구가  $27.6 \times 10^3$  cps와 64.96%, 5:5 첨가구가  $25.6 \times 10^3$  cps와 60.90%, 3:7 첨가구가 각각  $21.9 \times 10^3$  cps와 55.19%로 첨가량이 증가하면서 두 항목 모두 크게 감소하는 결과를 보였는데, 이는 밥



과 당화액에 분말을 직접 첨가할 경우와 비교해볼 때 감소폭이 더 큰 결과이다.

색도를 분석한 결과 L값, a값, b값 모두 표고버섯 분말 함량이 증가하면서 감소하였고, 모든 처리구에서 기존 무첨가구와 극히 현저한 차이를 보이는 것으로 나타났다. 시료별 관능검사 결과에서 색(color), 먹을때의 느낌(chewiness)과 단맛(sweetness)의 경우 무첨가구와 모든 처리구가 유의적인 차이를 보였으며, 향미(flavor)와 전반적인 기호도(overall acceptability)에서 당화액과 추출액의 혼합비가 7:3인 시료구만이 무첨가구와 유의적인 차이를 보이지 않았다.

이러한 결과로 보아 표고버섯 추출액을 당화액에 첨가하여 조청을 제조할 경우 적정 첨가 수준으로 당화액과 추출액의 비가 3:7의 범위를 넘지 않아야 무첨가구와 큰 차이를 느끼지 않을 것으로 보인다.

#### (4) 최적 첨가량으로 결정된 조청 시료간 관능검사 결과

각 조건별 제조된 조청 중 관능검사 결과 가장 높은 점수를 받은 시료군만 선별하여 관능검사를 실시한 결과, 색, 먹을때의 느낌과 단맛은 밥 및 당화액에 버섯 분말을 각각 1%씩 첨가한 시료가 무첨가구와 유의적인 차이가 거의 없는 것으로 나타났으며 버섯 추출액을 제조하여 당화액과 추출액의 비를 7:3으로 첨가하여 제조한 조청의 경우 다소 낮은 점수를 받았다. 향미는 밥과 당화액에 버섯 분말을 직접 첨가한 경우 및 추출액을 당화액에 7:3의 비로 첨가한 조청 모두 시료간 큰 차이가 나지 않았다.

전반적인 기호도(overall acceptability)에서는 분말 1%를 밥에 첨가한 시료와 분말 1%를 당화액에 첨가한 모든 경우 무첨가구와 거의 유사함을 알 수 있었고, 당화액과 추출액의 비가 7:3의 비율로 첨가하여 제조한 조청의 경우 다소 낮은 점수를 받았다.

이상의 결과를 종합해 볼 때 표고버섯 분말을 조청에 직접 첨가하는 경우에는 밥에 첨가하는 경우와 당화액을 줄이기 하는 과정에서 첨가하는 두 경우 모두 이화학적 차이는 거의 없는 것으로 나타났으며, 첨가량을 설정하는데 있어 1~2% 정도 수준 혹은 그 이하가 적당할 것으로 판단된다.

표고버섯 추출액을 제조하여 줄이기 전에 당화액에 일정 비율(10:0, 7:3, 5:5, 3:7)로 첨가하여 제조한 조청의 경우 이화학적 성분들이 일부 유리당 등을 제외하고 큰 차이를 보이지 않았으며, 관능적 요소에서의 경우 5:5 첨가구 이상에서는 기존 조청 제품과 상당한 차이를 보이는 것으로 나타났다. 따

라서 추출액을 첨가할 경우 당화액과 추출액의 비가 7:3을 넘지 않은 범위에서 제조를 하거나 혹은 줄이기를 하는 과정 중 시간을 기존 제품보다 좀더 길게 설정해야만 기존 조청과 유사한 제품을 만들 수 있을 것으로 기대된다.

## 2) 전병 제품화

### 가) 반죽의 farinogram 특성

표고버섯 분말 첨가량에 따른 farinogram 특성값은 Table 47과 같다. 대조구인 밀가루의 흡수율은 62.3%였으며, 버섯 분말 5%와 10% 첨가구에서 각각 67.7%와 68.5%였고, 15%와 20% 첨가구는 각각 75.0%와 80.2%로 버섯 첨가량이 증가할수록 흡수율이 증가하는 경향을 보였다. 밀가루의 흡수율은 제과·제빵 등의 생산에 있어서 중요한 인자로서 흡수율이 높은 경우에는 생산량이 증가되므로 높은 흡수율을 가지는 것이 바람직하며, 이러한 흡수율은 farinograph에 의해서 결정된다.

밀가루의 흡수율은 주로 단백질 함량, 그 외 펜토산 함량, 입도 및 손상전분 등에 의해 영향을 받는다(89). 또한 본 결과는 보리 가루, 분리대두단백, whey protein, 식이섬유가 함유된 곡분 등을 밀가루 반죽에 첨가하면 흡수율이 증가한다는 보고(90-92)와 같은 결과를 보였다. 본 실험에 첨가된 표고버섯 분말은 보수력이 높은 인자로서 흡수율에 미치는 영향이 크므로, 표고버섯 분말 첨가량이 증가함에 따라 흡수율이 높아지는 것으로 판단된다.

반죽의 수화속도를 나타내는 반죽도달시간은 대조구의 10.5분에서 5% 첨가구의 경우 5.3분으로 크게 낮아졌으며, 20% 첨가구의 경우 3.1분으로 첨가량이 증가할수록 감소하였다. 반죽도달시간은 반죽이 형성되는 초기단계로서 물이 흡수되는 시간에 관계된다(93). 반죽에 첨가된 표고버섯 분말은 보수력과 흡수력이 커서 첨가로 인해 반죽의 흡수속도가 빨라지기 때문에 반죽이 형성되는 도달시간이 짧아지는 것으로 나타났다. 반죽형성시간은 밀가루 반죽을 실시하여 반죽의 최고점도에 도달하는 시간을 나타내는 수치로 대조구의 6.5분에서 표고버섯 분말 첨가구의 경우 5.0~5.8분으로 다소 낮은 결과를 보였으나 감소 비율이 일정하지 않아 첨가량과 직접적인 연관은 낮은 것으로 나타났다. 일반적으로 반죽형성시간이 길수록 제빵성 등이 좋은데 그 이유는 반죽하는 동안 거대분자의 글루텐이 적당하게 일직선으로 정렬되어 글루텐 시료를 형성하는데 시간이 오래 걸리기 때문이라고 한다(94).

탄력성은 band가 안정도를 지난 후 반죽 band의 폭을 B.U.로 표시한 것으로 5% 첨가구의 62 B.U.를 제외한 모든 시료에서 80~85 B.U.로 큰 차이를 보이지 않았다. 연화도는 표고버섯 분말을 넣지 않은 대조구가 42 B.U.이었고 표고버섯 분말 첨가량이 증가할수록 연화도가 증가하는 경향을 보여 글루텐 구조력이 저하되는 것으로 나타났다.

반죽시간과 반죽에 대한 저항성을 기초로 하여 계산되는 valorimeter value는 farinograph의 분석 결과를 대표하는 값으로 대조구의 경우 72에서 5% 첨가구와 10% 첨가구의 경우 56, 15% 첨가구의 경우 54, 20% 첨가구 50으로 각각 감소하였다. 이러한 결과는 표고버섯 분말과 동일한 첨가시료는 아니지만 흑미 가루나 양파분말 등을 첨가한 반죽에서도 같은 결과를 보여 밀가루 반죽에 첨가되는 물질이 반죽형성에 대한 글루텐의 힘을 감소시켜 연화도가 증가하는 현상과 같은 경향을 보였으며(95,96), 연화도의 대표적인 결과로 일반적으로 강력분은 70 이상, 박력분은 30 이하로 알려져 있다.

**Table 47. Farinograph characteristics of the dough added with *Lentinus edodes* powder**

	Substitution level of <i>Lentinus edodes</i> powder				
	0%	5%	10%	15%	20%
Water absorption(%)	62.3	67.7	68.5	75.0	80.2
Arrival time(min)	10.5	5.3	4.3	3.4	3.1
Development time(min)	6.5	5.4	5.0	5.8	5.7
Elasticity(B.U.)	85	62	80	81	80
Weakness(B.U.)	42	180	184	200	226
Valorimeter value(unit)	72	56	56	54	50

## 나) 반죽의 amylogram 특성

Amylogram은 전분의 호화로 밀가루 중에 포함된 효소  $\alpha$ -amylase의 강도에 관한 특성을 파악하여 제빵·제과시 초기상태를 예측하고 온도변화에 따른 밀가루의 점도에 미치는  $\alpha$ -amylase의 활성도를 간접적으로 예측하는 것으로서 표고버섯 분말 첨가 수준을 달리한 반죽의 amylogram 결과는 Table 48과 같다.

호화개시온도는 대조구가 62.5°C이었으며, 표고버섯 분말 5% 첨가구만 63.0°C로 약간 높았고, 10, 15, 20% 첨가구는 대조구와 같았다. 이는 쌀을 첨가한 밀가루 반죽에서도 첨가량에 관계없이 거의 비슷한 온도에서 일어난다는 보고(97)와 같은 결과를 보였으며, 표고버섯 분말을 생면에 첨가하여 측정된 결과(98)와도 일치하여 분말을 최대 7%까지 첨가하여도 호화개시온도가 차이를 보이지 않았다고 보고하였다.

최고점도에 도달하는 온도의 경우에도 대조구의 90.0°C와 첨가구(89.3~90.6°C)의 온도와 차이를 보이지 않았다. 그러나 최고점도 및 94°C에서의 점도는 표고버섯 분말 첨가 비율이 증가할수록 차이를 보였는데, 최고점도의 경우 대조구가 475 B.U.로 가장 점도가 높았으며, 버섯 분말 혼합 비율이 증가할수록 낮아져 20% 첨가구의 경우 416 B.U.로 낮아졌다.

최고점도는  $\alpha$ -amylase의 활성도를 예측하는 지표로 사용되는데 일반적으로 전분이 손상을 받을수록,  $\alpha$ -amylase의 활성이 강할수록 최고점도가 낮아지는 것으로 알려져 있으며 효소의 활성과 전분의 팽윤정도에 크게 영향을 받는다. 전분 입자의 팽윤정도는 현탁액의 pH 즉, 알칼리성에서 크게 촉진된다고 보고되어 왔다. 그러나 본 실험에서의 최고점도의 감소 결과는 효소의 활성보다는 표고버섯 분말의 첨가량이 증가하면서 상대적인 희석에 기인하는 것으로 생각된다.

Table 48. Amylograph characteristics of the dough added with *Lentinus edodes* powder

	Substitution level of <i>Lentinus edodes</i> powder				
	0%	5%	10%	15%	20%
Temperature at gelatinization(°C)	62.5	63.0	62.5	62.5	62.5
Temperature at peak point(°C)	90.0	90.6	90.3	89.3	90.3
Value at peak point(B.U.)	475	440	430	440	416
Value at 94°C(B.U.)	410	380	360	340	320

#### 다) 반죽의 extensogram 특성

표고버섯 분말을 첨가하여 제조한 반죽의 extensogram 결과는 Table 49과 같다. Extensogram은 밀가루 반죽을 farinogram에서 반죽하여 숙성 후 반죽이 끊어질 때까지 늘려서 힘과 신장과의 커브를 기록하는 장치로 곡선의 면적(energy)을  $\text{cm}^2$ , 신장저항도(resistance)는 처음 측정 후 5분후에서 곡선의 높이를 B.U.로 표시하며, 신장도(extensibility)는 곡선의 시작점에서 끝나는 점까지의 거리로서 mm로 표시한다. 또한, 신장저항도와 신장도와의 비를 R/E로 표시하였다.

Table 49의 결과에서 표고버섯 분말의 첨가량이 증가함에 따라 반죽의 energy는 크게 감소하였고, 저항도의 경우 대조구가 342 B.U., 5% 첨가구와 15% 첨가구가 310 B.U., 10% 첨가구가 298 B.U.로 다소 낮은 결과를 보였으나, 20% 첨가구의 경우 384 B.U.로 대조구보다 높은 값을 보였다. 신장도는 energy와 비슷한 경향으로 버섯 분말 첨가량이 증가할수록 신장도가 감소하였다.

신장도와 저항도의 비율값을 살펴보면 표고버섯 분말을 첨가하지 않은 대조구의 경우 2.07에서 20% 첨가구의 4.12로 첨가량이 증가할수록 비율이 증가함을 알 수 있었다. 따라서 표고버섯 분말 첨가량이 증가함에 따라 신장도가 감소하여 반죽이 약해지고 가스 보유력이 낮아 제빵적성 등을 저하시킬 수 있으며 표고버섯 분말 첨가 전병의 제조 시에는 이를 보완할 수 있도록 제조공정 등을 개선하거나 적절한 배합비를 찾아서 설정하는 등 적성을 향상시켜야 할 것으로 생각된다(98).

Table 49. Extensograph characteristics of the dough added with *Lentinus edodes* powder

	Substitution level of <i>Lentinus edodes</i> powder				
	0%	5%	10%	15%	20%
Energy(cm <sup>2</sup> )	233	175	137	134	97
Resistance(B.U.)	342	310	298	310	384
Extensibility(mm)	165	133	122	105	93
Ratio(R/E)	2.07	2.33	2.44	2.95	4.12



## 라) 일반성분

전병 제조시 첨가되는 밀가루에 일정비율(0, 5, 10, 15, 20%)로 표고버섯 분말을 첨가하여 제조한 전병의 일반성분 분석 결과는 Table 50과 같다.

표고버섯 분말을 첨가하지 않은 전병의 수분 함량은  $2.20 \pm 0.02\%$ , 조단백질은  $7.48 \pm 0.03\%$ , 조지방  $6.32 \pm 0.03\%$ , 회분  $0.69 \pm 0.02\%$ , 탄수화물이 83.32%로 나타났다. 수분의 경우 표고버섯 분말 첨가량이 많아질수록 증가하여 20% 첨가구의 경우  $6.71 \pm 0.15\%$ 까지 증가하였으며, 조단백질과 회분의 경우에도 버섯 분말 첨가량이 증가할수록 증가하는 결과를 보였다. 이러한 증가는 건조물 기준으로 보면 그 증가폭이 더 높은 것으로 나타났다. 조지방은 대조구가  $6.32 \pm 0.03\%$ 이었으며, 20% 첨가구의 경우  $6.20 \pm 0.03\%$ 로 변화가 없었으며, 탄수화물은 대조구의 83.32%에서 20% 첨가구의 78.03%로 상대적으로 감소하는 결과를 보였다.

식품공전(78)에 따르면 건과류의 규격기준 중 수분함량은 15% 이하로 규정되어 있으며, 본 실험에서 제조된 표고버섯 분말을 첨가한 전병의 경우 모두 기준 내에 적합한 것으로 나타났으나, 20% 첨가구의 경우 다소 눅눅한 느낌을 가지고 있어 장기간 보관하면서 섭취하기에는 약간 부적합할 것으로 판단된다. 그리고 대조구에 비해 표고버섯 분말 첨가구에서 조단백질과 회분의 함량이 높아지는 결과는 표고버섯 분말을 첨가함으로써 버섯내의 영양성분에 의해 증가하는 것으로 보이며, 수분함량이 증가하는 것은 첨가된 건조 표고버섯 분말이 수분을 재흡수하면서 증가하는 결과를 보이는 것으로 판단된다.

**Table 50. Proximate compositions of *Jeonbyoung* containing different amounts of *Lentinus edodes* powder**

(unit : %)

	Substitution level of <i>Lentinus edodes</i> powder				
	0%	5%	10%	15%	20%
Moisture	2.20±0.02 <sup>1)</sup>	4.46±0.15	4.78±0.05	5.22±0.13	6.71±0.15
Crude protein <sup>2)</sup>	7.48±0.03 (7.64) <sup>3)</sup>	7.57±0.02 (7.92)	7.73±0.05 (8.13)	7.93±0.06 (8.36)	8.10±0.05 (8.68)
Crude lipid	6.32±0.03 (6.46)	6.35±0.03 (6.65)	6.44±0.02 (6.76)	6.28±0.03 (6.63)	6.20±0.03 (6.65)
Ash	0.69±0.02 (0.71)	0.85±0.02 (0.90)	0.88±0.02 (0.92)	0.89±0.01 (0.94)	0.96±0.03 (1.03)
Carbohydrate <sup>4)</sup>	83.32 (85.19)	80.77 (84.53)	80.17 (84.19)	79.68 (84.07)	78.03 (83.64)

<sup>1)</sup> Standard Deviation

<sup>2)</sup> N × 6.25

<sup>3)</sup> ( ) : content of crude protein, crude lipid, ash and carbohydrate was calculated by dry basis

<sup>4)</sup> 100 - sum of moisture, crude protein, crude lipid and ash contents

## 마) 유리당 함량

표고버섯 분말 첨가량을 달리하여 제조한 전병의 유리당 분석결과는 Table 51과 같다. 분석결과 glucose, fructose, sucrose와 maltose가 분석되었으며, 표고버섯 분말 첨가량에 따른 차이를 관찰할 수 없었다. 또한 분석된 당류에서 가장 많이 존재하는 당은 sucrose였으며, 42.3~46.9%로 시료간의 큰 차이는 보이지 않았다. 분석된 sucrose는 대부분 전병 제조시 첨가되는 설탕이 주성분으로 표고버섯 첨가량과의 연관은 없는 것으로 나타났다. 분석된 유리당 합계의 경우에도 46480.41(10% 첨가구)~49474.35 mg/100 g(대조구)로 시료간 차이를 보이지 않았 Park 등은 표고버섯 분말을 첨가한 조청의 유리당을 분석한 결과 maltose 함량이 가장 높았으며, 첨가 수준이 증가하면서 maltose 함량은 증가하였다고 보고(99)하여 본 전병과는 다소 다른 결과를 보였다. 하지만 조청의 경우 제조하는 과정에서 당화 과정 및 줄이기를 하면서 열에 의해 줄이기를 하는 과정 중 제조 특성상 첨가되는 버섯이 분해되었을 것으로 추측되며 이러한 차이에 의해 본 실험 결과와는 상이한 것으로 판단된다.

Table 51. Contents of free sugar in *Jeonbyoung* containing different amounts of *Lentinus edodes* powder

(unit : mg/100 g)

	Substitution level of <i>Lentinus edodes</i> powder				
	0%	5%	10%	15%	20%
Glucose	588.74	1045.57	1469.86	503.02	1268.37
Fructose	572.06	1522.21	1051.74	883.42	1260.70
Sucrose	46867.54	43827.70	42304.05	43945.66	44164.95
Maltose	1446.01	1384.27	1654.76	2308.96	1443.86

바) 색도

전병의 색도 측정 결과는 Table 52에서와 같다. 명도를 나타내는 L값은 대조구가  $66.69 \pm 2.47$ 이었으며, 5% 첨가구가  $67.20 \pm 2.12$ 로 대조구와 차이를 보이지 않았으나, 10% 첨가구의 경우  $57.62 \pm 2.93$ , 15% 첨가구에서  $57.00 \pm 2.39$ , 20% 첨가구가  $56.03 \pm 2.59$ 로 표고 분말 첨가량이 증가하면서 유의적으로 감소하는 결과를 보였다. 이러한 결과는 비록 전병은 아니지만 표고버섯 분말을 첨가한 생면과 설기떡의 경우에도 분말 첨가량이 증가하면서 생면과 설기떡의 L값이 전체적으로 감소한다는 보고(100,102)를 하여 본 실험 결과와 같은 경향을 보였으며, 또한 Son 등(101)의 결과에서도 표고버섯을 첨가하여 제조한 어묵의 명도(L값)가 첨가량이 증가하면서 감소한다고 하여 같은 결과를 보였다.

적색도를 나타내는 a값은 대조구의 경우  $10.87 \pm 1.31$ , 5% 첨가구는  $10.30 \pm 1.17$ 로 대조구와 차이를 보이지 않았으나, 10% 첨가구의 경우에서  $13.59 \pm 1.69$ , 15% 첨가구  $12.74 \pm 1.06$ , 20% 첨가구에서  $12.55 \pm 1.29$ 로 나타나 버섯 분말을 첨가한 시료군에서 대조구보다 높은 결과를 보였다. 황색도를 나타내는 b값도 L값과 같은 경향으로 대조구가  $36.78 \pm 1.17$ 이고 표고버섯 분말 첨가량이 증가할수록 유의적으로 감소하였다.

대조구 시료와 타 시료간의 색차값을 비교한  $\Delta E$ 값의 변화는 5% 첨가구가 2.34, 10% 첨가구가 10.16, 15% 첨가구에서 10.44, 20% 첨가구가 12.00으로 첨가량이 증가할수록 크게 증가하였는데 5% 첨가구를 제외한 모든 시료군에서 NBS(National Bureau of Standards)의 기준(33)에 따른 상이한 변화가 있는 것으로 간주되는 3.0 이상의 값을 보였다. NBS 기준에서 나타내는 색차값의 범위는 0~0.5, 0.5~1.5, 1.5~3.0이면 각각 trace, slight, noticeable한 정도의 육안적인 차이에 해당한다. NBS의 기준은 감각적인 색의 차이와 잘 대응하므로 널리 이용되고 있다. 일반적인 사람이 떨어져 있는 2색 차이에 차이가 없다고 인정하는 색의 허용차이는  $\Delta E \leq 3$  이라고 한다(103).

**Table 52. Hunter's color value of *Jeonbyoung* containing different amounts of *Lentinus edodes* powder**

	Substitution level of <i>Lentinus edodes</i> powder				
	0%	5%	10%	15%	20%
L(Whiteness)	66.69±2.47 <sup>1)a)</sup>	67.20±2.12 <sup>a)</sup>	57.62±2.93 <sup>b)</sup>	57.00±2.39 <sup>b)</sup>	56.03±2.59 <sup>bc)</sup>
a(redness)	10.87±1.31 <sup>c)</sup>	10.30±1.17 <sup>c)</sup>	13.59±1.69 <sup>a)</sup>	12.74±1.06 <sup>ab)</sup>	12.55±1.29 <sup>b)</sup>
b(yellowness)	36.78±1.17 <sup>a)</sup>	34.57±0.59 <sup>b)</sup>	33.10±1.86 <sup>c)</sup>	33.38±0.79 <sup>bc)</sup>	31.54±1.33 <sup>d)</sup>
$\Delta E$ <sup>2)</sup>	0.00	2.34	10.16	10.44	12.00

<sup>1)</sup> Standard Deviation

<sup>2)</sup>  $\Delta E$  = total color difference

\* Means with the same letter are not significantly different( $p < 0.05$ )

#### 사) 전병의 물성 측정

전병을 제조한 후 rheometer를 이용하여 측정한 물성은 Table 53에서와 같이 전병에 대한 parameter들이 전반적으로 증가하는 경향을 보였다. 먼저 최대 하중값(max weight)의 경우 대조구의  $736.6 \pm 87.0$  g에서 20% 첨가구의 경우  $2145.3 \pm 145.6$  g으로 첨가량이 많아지면서 크게 증가하였으며, 경도(hardness)의 경우 대조구의  $15296 \pm 2483$  kg/cm<sup>2</sup>인 값이 표고버섯 분말 15% 첨가구의 경우  $23862 \pm 1989$  kg/cm<sup>2</sup>까지 증가하다 20% 첨가구에서는  $7865 \pm 1719$  kg/cm<sup>2</sup>으로 감소하였다. 이렇게 20% 첨가구에서 경도가 크게 감소하는 이유는 20% 첨가 전병의 경우 첨가 버섯 분말에 다량의 수분을 함유하고 있어 전병 자체가 약간 눅눅한 상태로 제조되기 때문이라고 생각된다. 따라서 전병의 수분 함량과 경도(hardness) 측정 결과로 보아 전병 제조시 표고버섯 분말을 20% 첨가하는 경우에는 무리가 있을 것으로 판단된다.

전병이 깨지는 파단점(breaking point)의 경우에도 최대 하중값과 경도와 같은 결과를 보여 대조구에 비해 버섯 분말이 첨가되면서 유의적으로 증가하는 결과를 보였다. 표고버섯 분말을 첨가하여 전병을 제조한 보고가 없어 직접적인 비교가 곤란하지만 표고버섯 분말을 첨가한 생면(100)의 경우에도 texture parameter(hardness, cohesiveness, chewiness, cutting force)가 전반적으로 크게 증가한다고 보고하여 비슷한 경향을 보인 것으로 나타났다.

Table 53. Textural properties of *Jeonbyoung* containing different amounts of *Lentinus edodes* powder

	Substitution level of <i>Lentinus edodes</i> powder				
	0%	5%	10%	15%	20%
Max weight(g)	736.6±87.0 <sup>1)d)</sup>	1259.8±75.5 <sup>c)</sup>	1329.9±58.2 <sup>b)</sup>	1430.0±172.3 <sup>b)</sup>	2145.3±145.6 <sup>a)</sup>
Strength(g/cm <sup>2</sup> )	73656±8697 <sup>d)</sup>	125312±7546 <sup>bc)</sup>	132993±5817 <sup>b)</sup>	143000±17229 <sup>b)</sup>	214529±14555 <sup>a)</sup>
Hardness(kg/cm <sup>2</sup> )	15296±2483 <sup>b)</sup>	16987±1662 <sup>b)</sup>	23694±2115 <sup>a)</sup>	23862±1989 <sup>a)</sup>	7865±1719 <sup>c)</sup>
Breaking point(g/cm <sup>2</sup> )	119323±14089 <sup>d)</sup>	204089±12224 <sup>bc)</sup>	215449±9424 <sup>b)</sup>	231660±27963 <sup>b)</sup>	347536±23579 <sup>a)</sup>

<sup>1)</sup> Standard Deviation

\* Means with the same letter are not significantly different( $p < 0.05$ )



## 아) 관능검사

버섯 분말 첨가 밀가루로 제조한 전병을 색, 향, 맛, 전반적인 기호도를 기준으로 하여 실시한 관능검사 결과는 Table 54과 같다. 색(color)의 경우 10% 첨가구와 대조구가  $6.50 \pm 0.53$ 과  $6.10 \pm 0.74$ 로 다른 시료보다 높은 결과를 보였으나 전병 색의 경우 굵는 정도에 따라서 서로 많은 차이를 보일 수 있는 항목이므로 본 관능검사 결과만으로 결과를 예측하기는 어렵다고 볼 수 있다. 그러나 색차계에 의한 결과와 비교해 볼 때 전체적으로 표고버섯 분말을 첨가한 시료에서 색의 변화를 관찰할 수 있었으므로 색의 변화에 따라 기호도가 달라진다고도 볼 수 있다.

향의 경우 표고버섯 분말 10%와 15% 첨가구에서  $6.20 \pm 0.92$ 와  $6.15 \pm 0.52$ 로 가장 높은 점수를 보였으며, 대조구( $5.70 \pm 0.82$ )와 5% 첨가구( $5.80 \pm 0.47$ )는 차이가 없었다. 따라서 버섯 분말을 첨가하여 전병을 제조하면 전병 고유의 향을 더 좋게 하는 것으로 보이며, 적정 첨가량은 10~15% 수준으로 나타났고, 20% 이상 첨가시 기호도가 감소하는 것으로 나타났다. 맛은 대조구와 10% 첨가구가 가장 높은 점수를 받았으며, 서로 유의적인 차이를 보이지 않았다. 15% 이상 첨가시 표고버섯 특유의 맛이 강하게 나타나면서 오히려 기호도를 떨어트리는 것으로 나타났다.

전반적인 기호도는 10% 첨가구가  $6.60 \pm 0.52$ 로 가장 높았고, 대조구( $6.30 \pm 0.68$ ), 5% 첨가구( $6.15 \pm 0.85$ ), 15% 첨가구( $5.90 \pm 0.85$ ), 20% 첨가구( $4.00 \pm 1.16$ )순으로 나타났다. 따라서 관능검사 결과 색, 향, 맛, 전반적인 기호도 모두 10% 첨가구에서 높은 점수를 보여 적정 첨가수준으로 판단되며, 15% 이상 첨가시 오히려 기호도가 조금씩 감소하는 것으로 나타났다. 밀가루 대비 10% 첨가량은 상당히 많은 수준으로 밀가루 전병이 갖는 영양학적인 단점을 보완함과 동시에 버섯 특유의 향을 가미한 고급스러운 전병 제품을 생산할 수 있을 것으로 기대된다.

Table 54. Sensory characteristics of *Jeonbyoung* containing different amounts of *Lentinus edodes* powder

	Substitution level of <i>Lentinus edodes</i> powder				
	0%	5%	10%	15%	20%
Color	6.10±0.74 <sup>1)a)</sup>	5.90±0.57 <sup>ab)</sup>	6.50±0.53 <sup>a)</sup>	5.80±0.79 <sup>ab)</sup>	4.80±0.99 <sup>c)</sup>
Flavor	5.70±0.82 <sup>ab)</sup>	5.80±0.47 <sup>ab)</sup>	6.20±0.92 <sup>a)</sup>	6.15±0.52 <sup>a)</sup>	4.90±0.97 <sup>c)</sup>
Taste	6.20±0.92 <sup>a)</sup>	6.05±0.47 <sup>ab)</sup>	6.40±1.08 <sup>a)</sup>	5.50±1.08 <sup>bc)</sup>	4.30±0.95 <sup>d)</sup>
Overall acceptability	6.30±0.68 <sup>a)</sup>	6.15±0.85 <sup>ab)</sup>	6.60±0.52 <sup>a)</sup>	5.90±0.85 <sup>b)</sup>	4.00±1.16 <sup>d)</sup>

<sup>1)</sup> Standard Deviation

\* Means with the same letter are not significantly different(p<0.001)

## 자) 전병 제품화에 대한 결론

영양학적, 생리학적 장점이 많은 표고버섯을 다양한 식품으로 이용하기 위한 적절한 가공방법을 모색하여 고부가가치를 갖는 식품으로 개발을 하고자 표고버섯 분말을 첨가한 전병을 제조하여 첨가 수준별 품질특성을 조사하였다.

전병 반죽의 물성 특성 중 흡수율은 표고버섯 분말 첨가량이 많아지면서 증가하였으며, 반죽도달시간과 최고점도는 첨가량에 따라 낮아졌다. 호화개시온도와 최고점도에 도달하는 온도의 경우에는 시료간 차이를 보이지 않았다. 또한 extensogram을 통한 반죽의 energy값은 첨가량과 부의 결과를 보였으며 신장도도 감소하였다.

표고버섯 분말 첨가 전병의 일반성분은 대조구에 비해 수분, 조단백질과 회분의 경우 증가하였고, 탄수화물 함량은 감소하였으며 20% 첨가구의 경우 약간 눅눅한 상태로 전병이 제조되어 전병 제조시 표고버섯 분말 첨가량은 20%를 넘지 않는 것이 적당할 것으로 판단된다. 시료의 유리당 함량은 sucrose가 가장 많았으며 시료간 차이는 없었다.

색도를 분석한 결과 L값과 b값은 첨가량이 증가하면서 유의적으로 감소하였고, a값은 10% 이상 첨가구에서 다소 증가하는 결과를 보였다. 또한 10% 이상 첨가시 기존 대조구와 현저한 색의 차이를 보이는 것으로 나타났다. Rheometer를 이용한 물성 측정 결과 경도(hardness)는 15%까지 증가하다 20% 첨가구에서 크게 감소하였는데, 이는 20% 시료의 조직이 눅눅한 상태의 결과와 일치하는 것으로 경도에 있어서도 20% 이상 첨가하는 경우 좋은 결과를 기대하기 힘들 것으로 보인다. 최대 하중값과 파단점도 경도와 비슷한 결과를 보여 대조구에 비해 증가하였다.

시료별 관능검사 결과는 색(color), 향(flavor), 맛(taste)과 전반적인 기호도(overall acceptability) 등 모든 항목에서 10% 첨가구가 가장 높은 점수를 받았으며 15% 이상 첨가시 기호도가 조금씩 감소하는 것으로 나타나 전병 제조시 최적의 표고버섯 분말 첨가량은 10% 수준이 될 것으로 판단된다.

### 3) 강정 제품화

#### 가) 일반성분

건조 표고버섯을 튀밥을 튀기는 기계를 이용하여 먼저 튀긴 후 쌀 튀밥에 일정비율(0, 20, 30, 40, 50%)로 혼합하여 제조한 강정의 일반성분 분석결과는 Table 55와 같다.

수분의 경우 대조구가  $4.63 \pm 0.02\%$ 이었으며 표고버섯의 첨가 비율이 높아질수록 수분함량이 증가하여 50%의 경우  $7.19 \pm 0.09\%$ 로 나타났다. 조단백질과 회분함량도 수분과 같은 경향으로 팽화시킨 표고버섯을 첨가할수록 분석항목의 함량이 증가하였으며, 이러한 증가는 건조물 기준으로 보았을 때 그 증가폭이 더 크게 나타난 것을 알 수 있었다. 조단백질과 회분의 증가는 표고버섯을 첨가한 조청의 경우에도 첨가량이 많아지면서 높아졌다는 Park 등의 보고(99)와도 일치하는 결과를 보였다.

조지방은 1.22~1.92%로 시료간 차이를 관찰할 수 없었으며, 탄수화물은 대조구의 88.81%에서 점차 감소하면서 50% 첨가구의 경우 82.363%로 감소하였는데, 이는 수분, 조단백질과 회분 등의 성분이 증가하면서 상대적으로 감소한 것으로 판단된다. 이러한 결과로 보아 쌀로만 강정을 제조하는 경우보다 표고버섯을 첨가함으로써 쌀강정의 영양학적인 단점을 보완해줄 수 있을 것으로 생각된다.

식품의 규격기준을 설정하고 있는 식품공전(78)에 따르면 강정의 규격기준은 성상이외 따로 규정되어 있는 항목이 설정되어 있지 않다. 따라서 수분 등 일반성분이 일정 기준에 적합해야 할 기준은 없지만 특히 수분의 경우 상대적으로 그 함량이 높을 경우 보관이나 식미에 영향을 주므로 관능검사 등을 통하여 적절한 표고버섯 첨가량을 설정해야 할 것으로 생각된다.

Table 55. Proximate compositions of *Gangjeong* containing different amounts of *Lentinus edodes*

(unit : %)

	Substitution level of <i>Lentinus edodes</i>				
	0%	20%	30%	40%	50%
Moisture	4.63±0.02 <sup>1)</sup>	4.99±0.07	5.82±0.11	6.93±0.02	7.19±0.09
Crude protein <sup>2)</sup>	4.66±0.11 (4.89) <sup>3)</sup>	5.74±0.05 (6.04)	6.23±0.28 (6.61)	6.82±0.26 (7.33)	6.94±0.23 (7.48)
Crude lipid	1.58±0.05 (1.66)	1.92±0.13 (2.02)	1.22±0.02 (1.30)	1.52±0.05 (1.63)	1.83±0.12 (1.97)
Ash	0.32±0.05 (0.34)	0.86±0.04 (0.91)	1.18±0.10 (1.25)	1.44±0.01 (1.55)	1.68±0.04 (1.81)
Carbohydrate <sup>4)</sup>	88.81 (93.11)	86.49 (91.03)	85.55 (90.84)	83.29 (89.49)	82.36 (88.74)

<sup>1)</sup> Standard Deviation

<sup>2)</sup> N × 6.25

<sup>3)</sup> ( ) : content of crude protein, crude lipid, ash and carbohydrate was calculated by dry basis

<sup>4)</sup> 100 - sum of moisture, crude protein, crude lipid and ash contents

## 나) 색도

표고버섯 첨가량을 달리하여 제조한 강정의 색도 측정결과는 Table 56와 같다. 명도를 나타내는 L값은 제조직후 대조구가  $59.10 \pm 0.51$ 로 가장 높았으며, 20% 첨가구가  $52.84 \pm 3.20$ , 30% 첨가구의 경우  $50.03 \pm 3.96$ , 40% 첨가구  $47.05 \pm 4.74$ , 50% 첨가구가  $44.44 \pm 2.66$ 으로 표고버섯 첨가량이 증가할수록 유의적으로 감소하였다. 표고버섯 첨가에 따른 명도가 감소하는 것은 조청(65), 설기떡(101), 어묵(102)과 생면(69) 등에서도 같은 결과를 보여 표고버섯 자체가 어두운 색을 띄고 있고 이러한 특성을 갖는 표고버섯이 가공식품에 첨가되면서 명도를 감소시키는 것으로 판단된다.

적색도를 나타내는 a값은 대조구가  $-1.00 \pm 0.12$ 에서 30% 첨가구가  $0.48 \pm 0.47$ , 50% 첨가 강정이  $2.10 \pm 0.47$ 로 버섯 첨가량이 증가할수록 증가하였으며, 30% 이상 즉, 40% 첨가구부터 그 값이 크게 변함을 알 수 있었다. b값(황색도)은 L값과 같은 경향으로 대조구( $13.11 \pm 0.52$ )가 가장 높았으며 20% 첨가구가  $10.71 \pm 0.84$ 로 크게 감소하였으며 첨가량이 증가할수록 유의적으로 감소하였다.

전반적 색차를 나타내는  $\Delta E$ 값의 변화를 NBS(National Bureau of Standards)의 기준(70)에서 검토해 볼 때 대조구를 제외한 모든 표고버섯 첨가구에서 현저한 차이(6.77~15.35)를 나타내었다. NBS 기준에서 나타내는 색차값의 범위는 0~0.5, 0.5~1.5, 1.5~3.0이면 각각 trace, slight, noticeable한 정도의 육안적인 차이에 해당하며 이러한 NBS의 기준은 감각적인 색의 차이와 잘 대응하므로 널리 이용되고 있다. 일반적인 사람이 떨어져 있는 2색 차이에 차이가 없다고 인정하는 색의 허용차이는  $\Delta E \leq 3$  이라고 한다(71).

Table 56. Hunter's color value of *Gangjeong* containing different amounts of *Lentinus edodes*

	Substitution level of <i>Lentinus edodes</i>				
	0%	20%	30%	40%	50%
L(Whiteness)	59.10±0.51 <sup>1)a)</sup>	52.84±3.20 <sup>b)</sup>	50.03±3.96 <sup>b)</sup>	47.05±4.74 <sup>c)</sup>	44.44±2.66 <sup>c)</sup>
a(redness)	-1.00±0.12 <sup>d)</sup>	-0.03±0.61 <sup>c)</sup>	0.48±0.47 <sup>c)</sup>	1.19±0.26 <sup>b)</sup>	2.10±0.47 <sup>a)</sup>
b(yellowness)	13.11±0.52 <sup>a)</sup>	10.71±0.84 <sup>b)</sup>	10.32±1.26 <sup>b)</sup>	9.45±0.75 <sup>c)</sup>	9.77±1.25 <sup>bc)</sup>
$\Delta E$ <sup>2)</sup>	0.00	6.77	9.61	12.78	15.35

<sup>1)</sup> Standard Deviation

<sup>2)</sup>  $\Delta E$  = total color difference

\* Means with the same letter are not significantly different( $p < 0.05$ )

#### 다) 강정의 물성 측정

표고버섯 함유 강정의 물성 측정결과를 Table 57에 나타내었다. 표고버섯 가량이 증가할수록 강정의 gumminess, brittleness, cohesiveness, springness가 증가하는 경향을 보였다. 측정 항목별로 살펴보면 gumminess, brittleness, cohesiveness, springness의 경우 대조구와 20%, 30% 첨가구에서는 큰 차이를 보이지 않았으며, 40% 첨가구부터 그 값이 유의적으로 증가하는 것으로 나타나 표고버섯을 첨가할수록 특성치가 증가되는 것으로 해석된다. 이러한 결과는 표고버섯의 첨가 및 그 양이 강정의 물성 즉, 가공적성 및 응용범위를 증가시켜준다고 볼 수 있다.

Hardness의 경우 40% 첨가구까지는 큰 차이를 보이지 않았으며, 유의적인 차이를 나타내지는 않았으나 20% 첨가구(143533)나 50% 첨가구(152094)에서 대조구(130406)보다 조금 높은 결과를 보였고, 전체적으로 다소 증가된 결과를 볼 수 있었다.

표고버섯을 첨가하여 강정을 제조한 예가 없어 직접적인 비교가 힘들지만 표고버섯을 첨가한 생면과 어묵의 경우에도 texture parameter(hardness, cohesiveness, chewiness, springness, adhesiveness 등)가 전반적으로 크게 증가한다고 보고하여 본 실험 결과와 비슷한 경향을 보이는 것으로 나타났다(68,69). 한편, 표고버섯을 첨가하여 어묵을 제조하는 경우 경도가 증가하였다고 하였으며(68), 양송이를 첨가한 어묵의 경우 유의차를 보일만큼 영향을 미치지 않는으나 경도는 대체로 증가하였다고 하며(72), 팽이버섯의 경우에도 일정한 경향을 보이지 않았다고 보고(73)하여 버섯 고유의 성분들이 제조되는 식품의 물성에 복합적으로 작용하는 것으로 나타났다.



Table 57. Textural properties of *Gangjeong* containing different amounts of *Lentinus edodes*

	Substitution level of <i>Lentinus edodes</i>				
	0%	20%	30%	40%	50%
Hardness(g)	130406±85870 <sup>1)a)</sup>	143533±595406 <sup>a)</sup>	106708±23168 <sup>b)</sup>	113564±29808 <sup>ab)</sup>	152094±32678 <sup>a)</sup>
Gumminess	366.8±195.7 <sup>bc)</sup>	306.1±133.0 <sup>c)</sup>	424.7±208.3 <sup>b)</sup>	757.2±301.2 <sup>ab)</sup>	951.67±309.94 <sup>a)</sup>
Brittleness	30.963±19.678 <sup>bc)</sup>	30.687±16.743 <sup>bc)</sup>	41.366±21.013 <sup>b)</sup>	102.843±78.979 <sup>ab)</sup>	189.910±75.014 <sup>a)</sup>
Cohesiveness	5.927±1.988 <sup>b)</sup>	5.854±2.084 <sup>b)</sup>	6.189±1.892 <sup>b)</sup>	9.698±3.726 <sup>ab)</sup>	14.045±3.498 <sup>a)</sup>
Springness	10.477±3.399 <sup>b)</sup>	10.295±3.804 <sup>b)</sup>	11.037±3.303 <sup>b)</sup>	16.569±4.547 <sup>ab)</sup>	21.686±4.584 <sup>a)</sup>

<sup>1)</sup> Standard Deviation

\* Means with the same letter are not significantly different( $p < 0.05$ )

## 라) 관능검사

표고버섯을 첨가한 강정의 관능검사(색, 향미, 맛, 바삭바삭한 정도, 전반적인 기호도) 결과는 Table 58에서와 같이, 모든 검사항목에서 30% 첨가구가 가장 높은 점수를 받았다. 전체적으로 대조구와 10% 첨가구는 유의적인 차이를 관찰할 수가 없었으며, 40%와 50% 첨가구에서는 검사항목 모두에서 기호도가 떨어지는 것으로 나타났다.

향미는 30% 첨가구까지 큰 차이를 보이지 않았으며, 40% 첨가구부터 낮아지는 결과를 보여 버섯을 40% 이상 첨가하는 경우에는 표고버섯 특유의 향이 꽤 널들로부터 인지가 되는 것으로 나타났다. 색과 맛의 경우 기호도가 뚜렷이 구분이 되었는데 30%가 가장 기호도가 높게 나타나, 표고버섯을 30% 첨가하여 제조한 강정이 시각적인 효과 및 맛에 있어서 가장 우수한 것으로 나타났다.

결론적으로 쌀강정에 표고버섯을 일정량(20, 30, 40, 50%) 첨가하여 제조한 후 특성을 살펴본 결과 표고버섯 30% 첨가구까지 기호도가 높아졌으며, 40% 이상의 경우 여러 특성치에서 다소 차이를 보였다. 따라서 쌀강정에 비해 표고버섯을 첨가한 강정이 더 우수한 제품이 될 수 있었으며 최적의 첨가량은 30%로 나타났다.

Table 58. Sensory characteristics of *Gangjeong* containing different amounts of *Lentinus edodes*

	Substitution level of <i>Lentinus edodes</i>				
	0%	20%	30%	40%	50%
Color	5.70±0.95 <sup>1)b)</sup>	5.80±0.63 <sup>b)</sup>	6.90±0.32 <sup>a)</sup>	5.40±0.97 <sup>b)</sup>	3.90±0.97 <sup>c)</sup>
Flavor	4.80±0.81 <sup>a)</sup>	4.90±0.58 <sup>a)</sup>	5.10±0.67 <sup>a)</sup>	4.30±0.70 <sup>ab)</sup>	4.20±0.69 <sup>ab)</sup>
Taste	5.40±0.45 <sup>ab)</sup>	4.70±0.82 <sup>b)</sup>	6.30±0.90 <sup>a)</sup>	5.20±0.78 <sup>ab)</sup>	3.10±0.47 <sup>c)</sup>
Cripsness	5.90±0.28 <sup>a)</sup>	5.70±0.67 <sup>a)</sup>	6.10±0.53 <sup>a)</sup>	4.50±0.71 <sup>b)</sup>	2.50±0.58 <sup>c)</sup>
Overall acceptability	5.20±0.37 <sup>b)</sup>	5.50±0.53 <sup>b)</sup>	6.70±0.48 <sup>a)</sup>	4.90±0.61 <sup>bc)</sup>	3.40±0.43 <sup>d)</sup>

<sup>1)</sup> Standard Deviation

\* Means with the same letter are not significantly different( $p < 0.05$ )

## 마) 강정 제품화를 위한 결론

영양학적, 생리학적 장점이 많은 표고버섯을 다양한 식품으로 이용하기 위한 적절한 가공방법을 모색하여 고부가가치를 갖는 식품으로 개발을 하고자 표고버섯을 첨가한 강정을 제조하여 첨가 수준별 품질특성을 조사하였다.

표고버섯 첨가 강정의 일반성분은 첨가량이 증가하면서 수분, 조단백질과 회분 함량은 증가하였고, 탄수화물 함량은 감소하였으며, 조지방은 차이를 보이지 않았다. 색도를 분석한 결과 L값은 대조구가  $59.10 \pm 0.51$ 로 가장 높았으며, 표고버섯 첨가량이 증가할수록 유의적으로 감소하였다. b값은 L값과 같은 경향을 보였으며, a값의 경우 증가하였다. 또한 모든 첨가구에서 대조구와 현저한 색의 차이를 보이는 것으로 나타났다.

강정의 물성 측정 결과 gumminess, britleness, cohesiveness, springness는 대조구와 20%, 30% 시료에서는 큰 차이를 보이지 않았으며, 40% 첨가구부터 그 값이 유의적으로 증가하였고, hardness의 경우 40% 첨가구까지 큰 차이를 보이지 않았다. 시료별 관능검사 결과는 색(color), 향미(flavor), 맛(taste), 바삭바삭한 정도(crispsness)와 전반적인 기호도(overall acceptability) 등 모든 검사 항목에서 30% 첨가구가 가장 높은 점수를 받았으며 40% 이상 첨가시 기호도가 조금씩 감소하는 것으로 나타났다.

쌀강정에 표고버섯을 일정 비율로 첨가하여 표고버섯 강정을 제조하고, 여러 특성을 조사한 결과 기존의 쌀강정에 비하여 표고버섯 첨가 강정이 더 우수한 제품이 될 수 있었고, 최적의 첨가량은 쌀 튀밥을 기준으로 30%로 나타났다.

#### 4) 고부가가치 기능성 식품 제품화

##### 가) 표고버섯 추출액 및 농축액의 음료 제조

###### (1) 표고버섯 추출액을 이용한 음료의 제조

예비실험을 통하여 표고버섯을 섭취하는데 부의 영향을 주는 특유의 맛과 향을 억제하면서 음료로서 좀 더 기호성이 가미된 제품을 개발하고자 녹차 추출액(보성녹차, 보성녹차영농조합법인)을 일정 비율로 첨가하여 버섯 추출액 음료(용량 100 mL)를 제조하였다. 녹차 추출액(0%, 10%, 20%, 30%, 40%)을 농도별로 첨가하여 제조한 버섯 음료를 색, 향, 맛 및 종합적 기호도로 나누어 관능검사를 실시한 결과는 Table 59과 같다.

대조구 즉, 녹차 추출액을 전혀 넣지 않은 시료와 비교한 결과 색의 경우 녹차 40% 첨가구를 제외하고 전 시료군에서 유의적으로 차이가 없었으며, 오히려 40% 첨가구의 경우 대조구보다 낮은 점수를 받았다. 향(flavor)의 경우 녹차 추출액 10%와 20% 첨가구가 타 시료에 비해 비교적 높은 점수를 받았으며, 맛(taste)의 경우에도 향과 같은 결과로 20% 첨가구가 5.5로 가장 높았으며, 10% 첨가구가 4.2 순으로 나타났다. 종합적인 기호도는 20% 첨가구가 5.7, 10% 첨가구가 4.5로 대조구에 비해 높은 기호도를 보였으며, 나머지 시료는 대조구와 비슷한 기호도를 보였다.

이상의 결과로 보아 표고버섯 추출액을 이용하여 건강음료를 만드는데 녹차 추출액은 20%를 첨가하는 것이 기호도 면에서 가장 좋은 것으로 평가되었다. 본 실험에서 첨가된 표고버섯 추출액은 약 3 g의 건조 표고버섯에 해당하는 양으로 음료로서 적당한 수준으로 생각된다.

본 관능검사 결과도 20% 녹차 추출액을 첨가하여 제조한 표고버섯 음료가 가장 기호도에서 좋은 것으로 평가되어 표고버섯 특유의 맛과 향을 어느 정도 상쇄시킬 수 있는 방안이 마련되었다고 판단되며, 좀 더 기호도가 높은 버섯 음료를 제조할 수 있을 것으로 생각된다.

**Table 59. Sensory evaluation of *Lentinus edodes* extracts containing different amount of green tea extracts**

	Control	Substitution level of green tea extracts			
		10%	20%	30%	40%
Color	4.9 <sup>b1)</sup>	5.0 <sup>b)</sup>	4.8 <sup>b)</sup>	4.7 <sup>b)</sup>	3.8 <sup>a)</sup>
Flavor	4.2 <sup>a)</sup>	4.6 <sup>ab)</sup>	5.1 <sup>b)</sup>	4.2 <sup>a)</sup>	4.1 <sup>a)</sup>
Taste	3.7 <sup>a)</sup>	4.2 <sup>ab)</sup>	5.5 <sup>c)</sup>	3.7 <sup>a)</sup>	3.8 <sup>a)</sup>
Overall acceptability	4.1 <sup>a)</sup>	4.5 <sup>b)</sup>	5.7 <sup>c)</sup>	3.9 <sup>a)</sup>	4.1 <sup>a)</sup>

<sup>1)</sup> Means in the same row with different superscripts are significantly different ( $p < 0.05$ )

## (2) 표고버섯 농축액을 이용한 음료의 제조

표고버섯의 경우 고유의 향과 맛이 있어 소비자들의 선호도가 떨어지는 단점이 있으며, 특히 표고버섯 추출액을 농축할 경우에는 특유의 맛과 향이 더해져 소비자들의 식미에 부의 영향을 준다. 이러한 부분을 개선할 수 있는 방안을 찾고자 여러 가지 첨가제(녹차, 계피, 생강 추출액)를 첨가하여 예비 실험을 하여 최종적으로 계피와 생강을 첨가제로 선정, 이들 재료를 열수 추출하여 얻은 추출액을 일정비율로 첨가하여 버섯 농축액 음료(용량 20 mL)를 제조하였다. 계피와 생강 추출액(각각 0%, 10%, 20%, 계피 10% + 생강 10%)을 농도별로 첨가하여 제조한 버섯 농축액 음료를 색, 향, 맛 및 종합적 기호도로 나누어 관능검사를 실시한 결과는 Table 60와 같다.

계피와 생강 추출액을 넣지 않은 대조구와 비교한 결과, 색의 경우 계피와 생강 추출액 첨가구(10%, 20%) 모든 시료에서 대조구보다 높은 점수를 받았으며, 그 중 계피 추출액 20% 첨가구가 5.6으로 가장 높은 색에 대한 기호도를 보였다. 향(flavor)의 경우 색과 비슷하여 추출액 첨가구가 대조구보다 상대적으로 더 높은 기호도를 보였으며, 생강 추출액에 비해 계피 추출액이 더 좋은 점수를 받은 것으로 나타났다. 특히, 색의 경우와 동일하게 계피 추출액 20% 첨가구가 가장 높은 결과를 보였다. 맛(taste)의 경우, 계피 추출액 첨가구는 대조구보다 선호도가 더 높았으나, 생강 추출액 첨가구는 대조구와 비슷하거나 오히려 선호도가 더 떨어지는 경우(생강 추출액 20% 첨가구와 계피 + 생강 각각 10% 첨가구)도 있었다. 종합적인 기호도도 다른 항목과 거의 비슷하여 계피 추출액 20% 첨가구가 가장 높은 점수를 받았으며, 계피 추출액 10% 첨가구, 계피 + 생강 10% 첨가구, 생강 추출액 10% 첨가구 순으로 나타났다.

이상의 결과로 보아 표고버섯 농축액을 원료로 하여 음료를 제조하는데 첨가되는 첨가제로 계피 추출액 20%를 첨가하여 표고버섯 농축액 음료를 만드는 것이 관능검사 측면에서 가장 선호도가 좋은 것으로 평가되었다. 그리고 본 실험에 첨가된 표고버섯의 경우 농축액 20 mL를 기준으로 약 3 g의 건조 표고버섯에 해당하는 양을 함유하며, 이 정도의 양은 음료로서 적당한 수준으로 생각된다.

Table 60. Sensory evaluation of hot water extractable concentrates of *Lentinus edodes* added with cinnamon and ginger extracts

	Control	Substitution level of cinnamon and ginger extracts				
		C 10%	C 20%	G 10%	G 20%	C 10%+G 10%
Color	4.4 <sup>a2)</sup>	4.9 <sup>ab)</sup>	5.6 <sup>b)</sup>	4.7 <sup>ab)</sup>	4.6 <sup>a)</sup>	4.4 <sup>a)</sup>
Flavor	3.5 <sup>a)</sup>	4.7 <sup>b)</sup>	5.4 <sup>c)</sup>	4.6 <sup>b)</sup>	4.1 <sup>ab)</sup>	4.1 <sup>ab)</sup>
Taste	3.0 <sup>a)</sup>	4.1 <sup>b)</sup>	5.4 <sup>c)</sup>	3.3 <sup>ab)</sup>	2.8 <sup>a)</sup>	3.0 <sup>a)</sup>
Overall acceptability	3.2 <sup>a)</sup>	4.0 <sup>b)</sup>	5.6 <sup>c)</sup>	3.5 <sup>ab)</sup>	2.7 <sup>a)</sup>	3.8 <sup>a)</sup>

C 10% : Hot water extractable concentrates of *Lentinus edodes* containing 10% cinnamon extracts

C 20% : Hot water extractable concentrates of *Lentinus edodes* containing 20% cinnamon extracts

G 10% : Hot water extractable concentrates of *Lentinus edodes* containing 10% ginger extracts

G 20% : Hot water extractable concentrates of *Lentinus edodes* containing 10% ginger extracts

C 10% + G 10% : Hot water extractable concentrates of *Lentinus edodes* containing 10% cinnamon extracts and 10% ginger extracts

<sup>1)</sup> Means in the same row with different superscripts are significantly different (p <0.05)



## 나) 제조된 표고버섯 음료의 저장기간에 따른 이화학적 특성

### (1) 표고버섯 추출액 음료의 일반성분

표고버섯 음료의 첨가제로 녹차 추출액을 선정하였으며, 관능검사를 통하여 최적의 첨가수준(20%)을 결정하였다. 따라서 표고버섯 추출액에 녹차 추출액(20%)을 첨가하여 100 mL의 용량(표고버섯 3 g에 해당하는 양)으로 표고버섯 추출액 음료를 다층복합필름(PET/Al foil/Nylon/PP, 성진 하이텍)에 포장하여 제조하였으며, 이를 60일간 상온에서 보관하면서 일정 기간별(0일, 20일, 40일, 60일)로 당도, pH, 조단백질, 총당을 분석한 결과 및 최종 제품의 형태는 Table 61과 Fig. 68와 같다.

당도계로 측정된 당도의 경우 저장기간에 관계없이 모든 시료에서 1.0~1.1°의 결과를 저장기간이 당도에 영향을 주지 않는 것으로 나타났다. 참고로 생 표고버섯의 당도는 7.4°이었으며, 건조 표고버섯 30 g을 증류수 1 L로 추출하여 제조하였기 때문에 상대적으로 희석이 되어 당도가 낮아진 결과로 생각된다. 표고버섯 음료의 경우 저장기간에 따라 미생물의 번식우려가 높은 음료 중 하나로서 미생물이 번식하는 정도에 따라 pH가 달라진다. 본 결과에서는 저장기간에 따른 pH의 변화가 관찰되지 않았으며 이러한 결과는 추후 제품의 유통기한 설정에 도움을 줄 것으로 생각된다. 참고로 분석결과를 표로 나타내지는 않았지만 식품공전(78) 중 음료에 대한 미생물의 기준인 세균수 (기준:1 mL당 100 이하)와 대장균군 (기준:음성)의 경우 60일까지 저장하면서 관찰한 결과 모두 음성으로 나타나 살균공정만 잘 이행된다면 retort pouch로 포장한 표고버섯 음료의 유통기한의 경우 큰 문제는 없을 것으로 생각된다. 조단백질 (0.23~0.24%), 과 총당(0.47~0.58%)의 경우에도 저장기간에 따른 변화는 관찰할 수가 없었다.

Table 61. Changes of brix(°), pH, crude protein and total sugar contents of *Lentinus edodes* extracts added with 20% green tea extracts during storage periods

	Storage time (days)			
	0	20	40	60
Brix (°)	1.1±0.1 <sup>1)</sup>	1.0±0.0	1.1±0.1	1.1±0.1
pH	5.43±0.01	5.57±0.02	5.41±0.01	5.40±0.03
Crude protein (%)	0.24±0.07	0.23±0.02	0.20±0.01	0.24±0.03
Total sugar (%)	0.58±0.03	0.54±0.01	0.47±0.01	0.51±0.02

<sup>1)</sup> Standard deviation



Figure 68. Beverages using *Lentinus edodes* extracts added with 20% green tea extracts.

(2) 표고버섯 추출액 음료의 색도

표고버섯 추출액에 녹차 추출액 20%를 첨가한 음료의 색도 측정 결과는 Table 62과 같다. 명도를 나타내는 L값은 저장 0일에  $77.80 \pm 0.07$ 에서, 60일 경과 후  $77.16 \pm 0.13$ 으로 나타났으며, 적색도를 나타내는 a값도 같은 경향으로 4.00~4.52로 저장기간에 따른 변화를 관찰할 수 없었다. 황색도를 나타내는 b값은 저장 0일에 37.70에서 20일에 38.49, 40일 39.41, 60일 38.65로 다소 증가하는 경향을 보이기는 하나 큰 차이를 보이지는 않았다.

Table 62. Changes in Hunter's color value of *Lentinus edodes* extracts added with 20% green tea extracts during storage periods

	Storage time (days)			
	0	20	40	60
L (lightness)	77.80±0.07 <sup>1)</sup>	76.80±0.17	77.82±0.11	77.16±0.13
a (redness)	4.00±0.02	4.52±0.05	4.43±0.05	4.27±0.03
b (yellowness)	37.70±0.05	38.49±0.10	39.41±0.29	38.65±0.13

<sup>1)</sup> Standard deviation

### (3) 표고버섯 추출액 음료의 아미노산 함량

표고버섯 추출액 음료의 구성 아미노산 함량을 아미노산 자동분석기로 분석한 결과는 Table 63과 같다. 구성 아미노산 중 가장 많이 함유된 아미노산은 glutamic acid (39.24 mg/100 g)이었으며, aspartic acid (11.72 mg/100 g), alanine (8.99 mg/100 g), lysine (8.75 mg/100 g), leucine (7.82 mg/100 g) 순으로 나타났다. 일반성분 등과 마찬가지로 저장기간에 따른 변화는 전혀 관찰되지 않아 저장기간에 따른 결과를 평균값에 표준편차로 산정하여 결과를 나타내었다.

총 아미노산 함량의 경우 128.17 mg/100 g 으로 나타났으며, 필수 아미노산 함량은 40.27 mg/100 g 으로 총 아미노산에 대한 필수 아미노산 함량의 비율은 약 31%를 차지하고 있었으며, 이러한 결과는 FAO가 제시한 기준인 32.3%과 거의 비슷한 수준으로 나타나 영양학적으로 우수한 것으로 보인다.

Hong 등(105)의 보고에 의하면 표고버섯의 갓부위와 자루부위의 아미노산 분포는 각각 glutamic acid, histidine, aspartic acid와 phenylalanine, glutamic acid, aspartic acid의 순으로 함유하고 있다고 하면서 식용버섯을 구성하고 있는 전 아미노산 조성을 전체적으로 봤을 때는 glutamic acid, aspartic acid, histidine, alanine 순으로 glutamic acid가 가장 많이 함유되어 있다고 하여 본 실험 결과와 다소 차이는 있지만 유사한 결과를 보였다. 이러한 차이는 각종 버섯류에 함유되어 있는 아미노산 함량의 경우 종류에 따라 차이가 심하고 동일종인 경우에도 발육단계, 발생환경, 발생시기 등에 따라 많은 차이를 보이고 산지가 다른 동일 버섯의 경우도 약간씩 차이가 있으며 재배종과 야생종간의 차이에 따라서도 심하다고 하여 이에 기인한 것으로 판단된다(106).

Table 63. Amino acid contents of *Lentinus edodes* extracts added with 20% green tea extracts

(unit : mg/100 g)

Amino acids	<i>Lentinus edodes</i> extracts added with 20% green tea extracts
Glutamic acid	39.24±4.62 <sup>1)</sup>
Aspartic acid	11.72±2.04
Alanine	8.99±1.72
Lysine	8.75±0.94
Leucine	7.82±1.06
Glycine	7.74±0.78
Serine	7.36±0.59
Arginine	7.21±0.61
Threonine	7.01±0.77
Valine	6.38±0.53
Isoleucine	4.94±0.58
Phenylalanine	4.83±0.36
Histidine	3.62±0.43
Tyrosine	1.37±0.09
Cystine	0.65±0.11
Methionine	0.54±0.10
Total g amino acid	128.17±9.79

<sup>1)</sup> Standard deviation

## 다) 표고버섯 농축액으로 제조된 음료의 이화학적 특성

### (1) 표고버섯 농축액 음료의 일반성분

표고버섯 추출액을 좀 더 간편하게 섭취할 수 있도록 소량 포장으로 제조하고자 추출액을 농축하였으며, 음료의 맛과 향을 위해 관능검사를 통하여 첨가제로 계피 추출액(20% v/v)을 선정하였다. 표고버섯 농축액에 계피 추출액(20%)을 첨가하여 20 mL의 용량(표고버섯 3 g에 해당하는 양)으로 표고버섯 농축액 음료를 다층복합필름(PET/Al foil/Nylon/PP, 성진 하이텍)에 포장하여 제조하였으며, 이를 60일간 상온에서 보관하면서 일정 기간별(0일, 20일, 40일, 60일)로 당도, pH, 조단백질, 총당을 분석한 결과와 최종 제품의 형태는 Table 64 및 Fig. 69와 같다.

당도의 경우 생 표고버섯의 당도는 7.4°였으며, 농축액 음료의 당도는 모든 저장기간 동안 3.8~4.0°으로 나타나 저장기간이 당도에 영향을 주지 않았으며, 생 표고버섯에 비해 조금 낮은 당도를 보였다. 참고로 표고버섯 추출액 음료의 경우에는 1.0~1.1로 농축을 하면서 음료의 당도도 추출액 음료에 비해 상대적으로 증가한 것으로 나타났으며, 건조 표고버섯 30 g을 증류수 1 L로 추출·농축하여 제조하였기 때문에 상대적으로 희석이 되어 생 표고버섯의 당도에 비해 당도가 낮아진 결과로 생각된다.

표고버섯 음료는 성분에 의해 유통 중 미생물의 번식우려가 높은 음료로서 미생물이 번식하게 되면 음료의 pH는 달라진다. 본 실험 결과 저장기간이 경과함에 따라 pH (4.93~5.33)가 변하지 않았으며, 이는 추후 표고버섯 농축액 음료의 유통기한 설정에 기준이 될 수 있을 것으로 생각된다. 참고로 분석결과를 표로 나타내지는 않았지만 식품공전(78) 중 음료에 대한 미생물의 기준인 세균수 (기준:1 mL당 100 이하)와 대장균군 (기준:음성)의 경우 60일까지 저장하면서 관찰한 결과 모두 음성으로 나타나 포장 전 살균공정만 잘 이행된다면 retort pouch로 포장한 표고버섯 음료의 유통기한의 경우 비교적 장기간 설정하여도 큰 문제는 없을 것으로 생각된다.

표고버섯 음료는 성분에 의해 유통 중 미생물의 번식우려가 높은 음료로서 미생물이 번식하게 되면 음료의 pH는 달라진다. 본 실험 결과 저장기간이 경과함에 따라 pH (4.93~5.33)가 변하지 않았으며, 이는 추후 표고버섯 농축액 음료의 유통기한 설정에 기준이 될 수 있을 것으로 생각된다. 참고로 분석결과를 표로 나타내지는 않았지만 식품공전(78) 중 음료에 대한 미생물의 기준인 세균수 (기준:1 mL당 100 이하)와 대장균군 (기준:음성)의 경우 60일까지 저장

하면서 관찰한 결과 모두 음성으로 나타나 포장 전 살균공정만 잘 이행된다면 retort pouch로 포장한 표고버섯 음료의 유통기한의 경우 비교적 장기간 설정하여도 큰 문제는 없을 것으로 생각된다.

조단백질 (0.67~0.82%),과 총당 (2.46~3.15%)의 경우에도 저장기간에 따른 변화는 관찰할 수가 없었다. 또한 표고버섯 추출액을 이용한 음료의 경우 조단백질 함량이 0.20~0.24%, 총당의 경우 0.47~0.58%로, 추출액을 농축하면서 분석한 당도, 조단백질, 총당 함량이 전체적으로 증가하였음을 알 수 있었다.



Table 64. Changes of brix(°), pH, crude protein and total sugar contents of hot water extractable concentrates of *Lentinus edodes* added with 20% cinnamon extracts during storage periods

	Storage time (days)			
	0	20	40	60
Brix (°)	3.9±0.1 <sup>1)</sup>	3.8±0.1	4.0±0.1	3.9±0.1
pH	5.33±0.01	4.93±0.01	5.32±0.01	5.17±0.01
Crude protein (%)	0.82±0.01	0.73±0.03	0.67±0.02	0.71±0.06
Total sugar (%)	3.15±0.94	2.46±0.68	2.59±0.01	2.85±0.89

<sup>1)</sup> Standard deviation



Figure 69. *Lentinus edodes* concentrate beverage with 20% cinnamon extracts.

(2) 표고버섯 농축액 음료의 색도

표고버섯 농축액에 계피 추출액 20%를 첨가한 음료의 색도 측정 결과는 Table 65와 같다. 명도를 나타내는 L값의 경우 저장 0일에  $48.50 \pm 0.20$ 에서, 60일 경과 후  $46.45 \pm 0.10$ 으로 저장기간에 따라 차이를 나타내지 않았으며, 표고버섯 추출액 음료의 L값인 76.80~77.82보다 낮은 값을 보여 농축을 하면서 좀 더 색이 진해졌음을 알 수 있었다.

적색도를 나타내는 a값도 12.47(저장 40일)~13.61(저장 20일)로 차이를 보이지 않았으며 추출액 음료의 a값(4.00~4.52)과는 차이를 보였다. 황색도를 나타내는 b값은 저장 0일에  $48.25 \pm 1.51$ , 20일에  $40.97 \pm 0.73$ , 40일  $48.33 \pm 1.15$ , 60일  $45.04 \pm 0.90$ 으로 저장기간별 다소 차이를 보이긴 하였지만 이는 저장에 따른 차이는 아닌 것으로 생각된다. 표고버섯 추출액 음료와는 전체적으로 차이를 나타내 추출액을 농축하는 과정이 제품의 색에 영향을 주는 것으로 나타났다.

Table 65. Changes in Hunter's color value of hot water extractable concentrates of *Lentinus edodes* added with 20% cinnamon extracts during storage periods

	Storage time (days)			
	0	20	40	60
L (lightness)	48.50±0.20 <sup>1)</sup>	42.58±0.07	50.76±0.09	46.45±0.10
a (redness)	12.89±0.07	13.61±0.08	12.47±0.02	13.35±0.05
b (yellowness)	48.25±1.51	40.97±0.73	48.33±1.15	45.04±0.90

<sup>1)</sup> Standard deviation

### (3) 표고버섯 농축액 음료의 아미노산 함량

표고버섯 농축액 음료의 구성 아미노산 함량을 아미노산 자동분석기로 분석한 결과는 Table 66와 같다. 구성 아미노산 중 가장 많이 함유된 아미노산은 glutamic acid (101.65 mg/100 g)이었으며, 다음은 aspartic acid (32.17 mg/100 g), lysine (26.26 mg/100 g), alanine (26.25 mg/100 g), glycine (22.31 mg/100 g) 순으로 나타났다. 표고버섯 추출액 음료의 glu> asp> ala> lys> leu의 결과와는 다소 차이를 보였으나, 표준편차 이내의 수준으로 큰 차이는 아니므로 판단된다. 또한, 일반성분 등과 마찬가지로 저장기간에 따른 변화는 관찰할 수가 없어 저장기간별 분석한 결과를 표준편차로 산정하여 결과를 나타내었다.

총 아미노산 함량의 경우 360.75 mg/100 g 으로 나타났으며 표고버섯 추출액 음료의 총 아미노산 함량의 약 3배에 해당하는 양으로 이러한 결과는 농축을 하여 농축 음료를 제조하는 과정 중 증가된 양에 해당된다. 필수 아미노산 함량은 116.68 mg/100 g 으로 총 아미노산에 대한 필수 아미노산 함량의 비율은 약 32.3%를 차지하고 있었으며, 이러한 결과는 FAO가 제시한 기준인 32.3%과 거의 비슷한 수준으로 나타나 영양학적으로도 우수한 것으로 보인다 (103).

Hong 등(105)의 보고에 의하면 표고버섯의 갓부위와 자루부위의 아미노산 분포는 각각 glutamic acid, histidine, aspartic acid와 phenylalanine, glutamic acid, aspartic acid의 순으로 함유하고 있다고 하면서 식용버섯을 구성하고 있는 전 아미노산 조성을 전체적으로 봤을 때는 glutamic acid, aspartic acid, histidine, alanine 순으로 glutamic acid가 가장 많이 함유되어 있다고 하여 본 실험 결과와 다소 차이는 있지만 유사한 결과를 보였다.

Table 66. Amino acid contents of hot water extractable concentrates of *Lentinus edodes* added with 20% cinnamon extracts

(unit : mg/100 g)

Amino acids	Hot water extractable concentrates of <i>Lentinus edodes</i> added with 20% cinnamon extracts
Glutamic acid	101.65±9.57 <sup>1)</sup>
Aspartic acid	32.17±3.42
Alanine	26.25±1.99
Lysine	26.26±2.85
Leucine	22.19±2.06
Glycine	22.31±2.91
Serine	20.73±1.78
Arginine	19.93±2.36
Threonine	18.17±2.08
Valine	19.92±3.54
Isoleucine	14.29±1.99
Phenylalanine	14.99±2.87
Histidine	9.54±1.03
Tyrosine	8.57±0.84
Cystine	2.92±0.47
Methionine	0.86±0.09
Total g amino acid	360.75±27.45

<sup>1)</sup> Standard deviation

## 라) 표고버섯의 조다당체로 제조한 분말의 특성

### (1) 표고버섯 조다당체 분말의 수율

표고버섯의 상품성과 부가가치를 높이기 위한 방법 중 하나로 정제된 버섯 추출물을 분말이나 capsule 형태로 상품화하여 식품 및 의약품으로서도 그 이용가치를 높일 수 있을 것으로 판단되어 조다당체를 분리하여 동결건조 후 분말로 만든 후 부형제와 함께 200 mg 단위로 capsule에 포장하였다(Figure 70).

조다당체의 수율은 표고버섯 분말 300 g을 열수 추출하여 얻은 추출액을 이용하여 에탄올을 넣고 침전 후 침전물을 동결·건조하여 약 15 g 정도의 조다당체를 얻었으며 이는 표고버섯 분말의 약 0.5%에 해당하는 양이다.

이를 200 mg 단위로 capsule 포장을 할 경우 부형제를 첨가하여 약 100 capsule 정도 포장이 가능하며, 100 capsule에 대한 표고버섯의 원가는 15,000 원 정도로서, 일반적으로 한달 복용량으로 120개의 캡슐 규모로 병포장을 한다면 1회당 2알, 1일 2회 즉, 1일당 4 캡슐을 복용하는 양이 될 것으로 생각된다.

### (2) 표고버섯 조다당체 분말의 일반성분

표고버섯 조다당체를 이용하여 분말을 제조하는 경우 분말의 흡습성이 아주 높아 유통과정 중 제품에 결함이 생기는 문제가 자주 발생한다. 이러한 문제를 해결하기 위해 부형제를 첨가하게 되는데, 분말이나 과립 제조 시 사용되는 부형제로는 starch, dextrin, lactose, glucose, maltose, gelatin, arabic gum, methyl cellulose 등이 있다. 이들 중 dextrin은 glucose와 maltose를 제외한 전분의 가수분해 생성물을 말하며 분해정도를 나타내는 dextrose equivalent(DE)에 따라 각기 다른 성질을 가지나 일반적으로 흡습성이 낮고 용해분산성이 우수하고 조직감 개선효과가 있어 널리 사용되고 있다(17,18). 따라서 본 실험에서는 부형제로 maltodextrin을 이용하여 함량별(20%, 30%)로 첨가한 표고버섯 조다당체 분말의 수분, 조단백질과 총당을 분석한 결과는 Table 67과 같다.

수분 분석 결과 부형제 첨가량이 20%인 경우 4.50%와 30%인 경우 4.03%로 나타나 부형제 첨가량이 증가할수록 수분 함량은 낮아졌다. 조단백질의 경우 20% 첨가 시료에서 0.57%, 30% 첨가 시료 0.53%로 시료간 거의 차이를 보이지 않았으며, 총당 함량은 부형제 20% 첨가구가 90.95%, 30% 첨가구가 94.90%로 첨가량이 많은 시료에서 총당 함량이 더 높았음을 알 수 있었다. 다

른 분석 항목과는 달리 총당의 경우 부형제 함량이 많을수록 더 높은 이유는 부형제로 첨가된 물질이 전분의 가수분해 생성물인 maltodextrin으로 부형제가 많이 첨가될수록 총당 함량이 증가하는 것으로 보인다. 한편 표고버섯의 주요 당 성분은 glucose, fructose, trehalose, glycerol, arabitol, mannitol 등인 것으로 보고된 바 있다(107).



Figure 70. Crude polysaccharide hard capsule

Table 67. Moisture, crude protein and total sugar contents of granule prepared by *Lentinus edodes* containing different amount of forming agents(maltodextrin)

(unit : %)

	Substitution level of forming agents (maltodextrin)	
	20%	30%
Moisture	4.50±0.44 <sup>1)</sup>	4.03±0.34
Crude protein	0.57±0.03	0.53±0.14
Total sugar	90.95±2.99	94.90±2.20

<sup>1)</sup> Standard deviation



### (3) 표고버섯 조다당체 분말의 아미노산 조성

표고버섯 조다당체 분말의 구성 아미노산 함량을 분석한 결과는 Table 68 과 같다. 구성 아미노산 중 가장 많이 함유된 아미노산은 glutamic acid (20%; 113.40 mg/100 g, 30%; 91.48 mg/100 g)이었으며, 다음은 arginine (20%; 76.60 mg/100 g, 30%; 57.65 mg/100 g), aspartic acid (20%; 55.13 mg/100 g, 30%; 41.94 mg/100 g), alanine (20%; 52.08 mg/100 g, 30%; 39.66 mg/100 g), lysine (20%; 39.61 mg/100 g, 30%; 29.29 mg/100 g) 순으로 나타났다. 표고버섯 추출액 음료의 glu> asp> ala> lys> leu의 결과와는 다소 차이를 보였으나 큰 차이는 아닌 것으로 판단된다.

총 아미노산 함량의 경우 20% 첨가구가 548.36 mg/100 g, 30% 첨가구가 413.12 mg/100 g 으로 나타나 30% 첨가구가 약간 낮은 결과를 보였다. 필수 아미노산 함량은 부형제 20% 첨가구의 경우 164.63 mg/100 g, 30% 첨가구가 124.67 mg/100 g 으로 나타났으며, 총 아미노산에 대한 필수 아미노산 함량의 비율이 두 시료군 모두 30.0% 이상이였다.

한편, 표고버섯 추출액과 농축액에서 분석된 histidine, cystine과 methionine은 검출되지 않았으며, 이러한 결과는 추출액을 다시 에탄올을 이용하여 조다당체를 재 추출하였기 때문으로 생각된다.

**Table 68. Amino acid contents of granule prepared by *Lentinus edodes* containing different amount of forming agents(maltodextrin)**

(unit : mg/100 g)

Amino acids	Substitution level of forming agents (maltodextrin)	
	20%	30%
Glutamic acid	113.40	91.48
Arginine	76.60	57.65
Aspartic acid	55.13	41.94
Alanine	52.08	39.66
Lysine	39.61	29.29
Glycine	37.56	21.07
Serine	33.62	25.84
Threonine	31.49	23.20
Leucine	28.35	22.40
Valine	27.04	19.98
Isoleucine	19.78	15.40
Phenylalanine	18.36	14.40
Tyrosine	15.34	10.81
Histidine	N.D. <sup>1)</sup>	N.D.
Cystine	N.D.	N.D.
Methionine	N.D.	N.D.
Total g amino acid	548.36	413.12

<sup>1)</sup> Not detected

(4) 조다당체 분말의 타블렛 제조

표고버섯 조다당체 분말을 이용하여 타블렛을 제조하였다. 조다당체 800mg 과 부형제로는 maltodextrin을 20% 첨가하여 1정당 1g단위로 제조하였다(Figure 71).

(5) 조다당체 분말의 연질캡슐 제조

표고버섯 조다당체 분말을 이용하여 연질캡슐을 제조하였다. 조다당체 80mg 과 부형제로는 백납, 콩기름을 첨가하여 1정당 200mg단위로 제조하였다(Figure 71).



Figure 71. Crude polysaccharide tablet(up) and soft capsule(down)

가공원료	가공제형		포장규모	함량 (추출물기준)	권장사용량	버섯건조 분말기준
일수추출물	음료	추출액	100mL/pack 60 pack/box	1g/pack	1~2pack/일	3g/pack
		농축액	20mL/pack 120 pack/box	1g/pack	1~2pack/일	3g/pack
	캡슐	경질	200mg/정 180정/병	160mg/정	2~3정/회 X 3회/일	500mg/정
에탄올추출물	캡슐	경질	200mg/정 180정/병	160mg/정	1정/회 X 3회/일	1.5g/정
		연질	200mg/정 180정/병	80mg/정	1~2정/회 X 3회/일	750mg/정
	타블렛		1g/정 180정/병	800mg/정	1정/1회/일	7.5g/정

Table 69. 고부가가치 가공제품의 권장 사용량

## 마) 고부가가치 기능성 식품화를 위한 결론

표고버섯의 효율적인 이용과 가공식품 소재로서 상품성과 부가가치를 높이기 위한 방법으로 추출액을 제조하고, 이를 이용한 음료의 개발 가능성을 살펴보고, capsule 형태의 제품을 개발하여 건강식품 및 의약품으로의 이용가치를 높이기 위한 실험을 실시한 결과 다음과 같은 결과를 얻었다.

### (1) 표고버섯 추출액을 이용한 음료

표고버섯 추출액 특유의 맛과 향을 억제하면서 음료로서 좀 더 기호성이 가미된 제품을 개발하고자 녹차 추출액을 함량별 첨가하여 관능검사를 실시한 결과 색을 제외한 나머지 항목(맛, 향, 종합적 기호도)에서 녹차 추출액 20% 첨가구가 가장 좋은 결과를 보였다.

녹차추출액을 20% 첨가하여 제조한 표고버섯 추출액 음료를 60일간 상온에서 보관하면서 일정 기간별(0일, 20일, 40일, 60일)로 당도, pH, 조단백질, 총당을 분석한 결과 저장기간에 따른 변화는 관찰할 수가 없었다. 또한 세균수와 대장균군의 경우 60일까지 저장하면서 관찰한 결과 모두 음성으로 나타나 살균공정만 잘 이행된다면 retort pouch로 포장한 표고버섯 음료의 유통기한의 경우 큰 문제는 없을 것으로 생각된다.

음료의 색도 측정 결과, 명도를 나타내는 L값, 적색도를 나타내는 a값은 저장기간에 따른 차이가 없었으며, 황색도를 나타내는 b값은 다소 증가하는 경향을 보이기는 하나 큰 차이를 보이지는 않았다. 표고버섯 추출액 음료의 구성 아미노산 함량을 분석한 결과 총 아미노산 함량은 128.17 mg/100 g이었으며, 가장 많이 함유된 아미노산은 glutamic acid (39.24 mg/100 g)이었으며, aspartic acid (11.72 mg/100 g), alanine (8.99 mg/100 g), lysine (8.75 mg/100 g), leucine (7.82 mg/ 100 g) 순으로 나타났다.

### (2) 표고버섯 농축액을 이용한 음료

추출액을 농축할 경우에는 특유의 맛과 향이 더해져 소비자들의 식미에 부의 영향을 주며, 이러한 부분을 개선할 수 있는 조건을 찾아보고자 계피와 생강 열수추출액을 일정비율로 첨가하여 버섯 농축액 음료(용량 20 mL)를 제조하여 관능검사를 실시한 결과, 색의 경우 계피와 생강 추출액 첨가구(10%, 20%) 모든 시료에서 대조구보다 높은 점수를 받았으며, 계피 추출액 20% 첨가구가 5.6으로 가장 높은 색에 대한 기호도를 보였다. 향(flavor)의

경우 색과 같은 결과를 보여 계피 추출액 20%가 가장 기호도가 좋았다. 맛 (taste)의 경우, 계피 추출액 첨가구만 대조구보다 선호도가 더 높았으며, 종합적인 기호도도 다른 항목과 거의 비슷하여 계피 추출액 20% 첨가구가 가장 높은 점수를 받았다.

계피 추출액을 20% 첨가하여 제조한 표고버섯 농축액 음료를 60일간 상온에서 보관하면서 일정 기간별(0일, 20일, 40일, 60일)로 당도, pH, 조단백질, 총당을 분석한 결과 당도(3.8~4.0°), pH(4.93~5.33), 조단백질(0.67~0.82%)과 총당(2.46~3.15%) 모두 저장기간에 따른 변화는 없었다. 또한 세균수와 대장균군의 경우 60일까지 저장하면서 관찰한 결과 모두 음성으로 나타났으며, 이러한 결과는 추후 표고버섯 농축액 음료의 유통기한 설정에 기준이 될 수 있을 것으로 생각된다.

음료의 색도 측정 결과, 명도를 나타내는 L값, 적색도를 나타내는 a값과 황색도를 나타내는 b값 모두 저장기간에 따른 차이가 없었으며, 구성 아미노산 함량을 분석한 결과 총 아미노산 함량은 360.75 mg/100 g이었으며, 가장 많이 함유된 아미노산은 glutamic acid (101.65 mg/100 g)이었으며, 다음은 aspartic acid (32.17 mg/100 g), lysine (26.26 mg/100 g), alanine (26.25 mg/100 g), glycine (22.31 mg/100 g) 순으로 나타났다.

### (3) 표고버섯에서 추출한 조다당체 분말의 특성

표고버섯의 상품성과 부가가치를 높이기 위한 방법 중 하나로 정제된 버섯 추출물을 분말이나 capsule 형태로 상품화하기 위하여 조다당체를 분리하여 동결건조 후 분말로 만든 후 부형제와 함께 200 mg 단위로 capsule에 포장하였다.

조다당체의 수율은 표고버섯 분말 300 g을 열수 추출하여 얻은 추출액을 이용하여 약 15 g 정도의 조다당체를 얻었으며 이는 표고버섯 분말의 약 0.5%에 해당하는 양이다. 이를 200 mg 단위로 capsule 포장을 할 경우 부형제를 첨가하여 약 100 capsule 정도 포장이 가능하며, 100 capsule에 대한 표고버섯의 원가는 15,000원 정도로서, 일반적으로 한달 복용량으로 120개의 캡슐 규모로 병포장을 한다면 1회당 2알, 1일 2회 즉, 1일당 4 캡슐을 복용하는 양이 될 것이다.

부형제로 maltodextrin을 함량별(20%, 30%)로 첨가한 표고버섯 조다당체 분말의 일반성분을 분석한 결과 수분의 경우 부형제 첨가량 20% 시료가 4.50%, 30%인 경우 4.03%로 나타나 부형제 첨가량이 많을수록 수분 함량은 낮았다. 조단백질은 20%와 30% 첨가구가 각각 0.57%과 0.53%로 시료간 차

이를 보이지 않았으며, 총당 함량은 부형제 20% 첨가구가 90.95%, 30% 첨가구가 94.90%로 첨가량이 많은 시료에서 총당 함량이 더 높았음을 알 수 있었다.

표고버섯 조다당체 분말의 아미노산 함량을 분석한 결과 총 아미노산 함량은 20% 첨가구가 548.36 mg/100 g, 30% 첨가구가 413.12 mg/100 g으로 나타나 30% 첨가구가 약간 낮은 결과를 보였다. 구성 아미노산 중 가장 많이 함유된 아미노산은 glutamic acid (20%; 113.40 mg/100 g, 30%; 91.48 mg/100 g)이었으며, arginine (20%; 76.60 mg/100 g, 30%; 57.65 mg/100 g), aspartic acid (20%; 55.13 mg/100 g, 30%; 41.94 mg/100 g), alanine (20%; 52.08 mg/100 g, 30%; 39.66 mg/100 g), lysine (20%; 39.61 mg/100 g, 30%; 29.29 mg/100 g) 순으로 나타났다.

이상의 결과로 보아 표고버섯 특유의 맛과 향을 억제하면서 음료로서 좀 더 기호성이 가미된 표고버섯 추출액 음료의 조건으로 녹차 추출액을 20% 첨가하여 제조(100 mL 용량)하는 것이 가장 바람직하였으며, 표고버섯 농축액 음료(20 mL 용량)의 경우 계피 추출액 20%를 첨가하여 제조 시 가장 기호성이 우수한 것으로 나타났다. 또한, 표고버섯 추출액에서 조다당체를 분리하여 분말화 한 후 capsule에 포장하는 경우 부형제로 maltodextrin을 선정하였고, 첨가량은 20%와 30% 모두 무난하였다.

## 제 4 장 목표 달성도 및 관련분야에의 기여도

### 제 1 절. 연차별 세부과제 평가착안점에 입각한 목표 달성도

#### 1. 1차년도 과제 목표달성도

구 분	연구 개발 목표	연구개발 내용 및 범위	척도 (점수)	달성도 (%)
1차년도 (2004)	○ 제1세부과제  생리활성물질 추출 및 성분분석	○ 추출물 제조 및 수율 검토 - 용매(열수, 에테르, 아세테이트, 에탄올, NaOH 등)별 추출방법 및 수율 검토  ○ 추출물의 활성분획 선별 - 용매별 각 추출물의 활성분획 특성 검토 및 분획 선별  ○ 생리활성물질 성분 분석 - 단백다당체를 포함한 주요 생리활성 물질 성분분석	40	100%
	○ 제2세부과제  분자면역학적 생리활성 효능평가	○ 분자 면역학적 효능 평가 - 세포사멸에 미치는 효과 - 사이토카인 및 세포독성물질 분비에 미치는 효과  ○ 작용기전 연구 - 신호전달과정 검토 - 세포표면 당단백질 발현 및 활성검토	30	100%
	○ 제3세부과제  표고조청 제조	○ 조청 제조방법 확립 - 전통 제조과정 검토 및 확립  ○ 최적 제조방법 확립 - 진처리에 따른 가공적성 검토 - 최적조건 확립을 통한 표고조청 제조  ○ 식품학적 특성 분석 - 표고조청 특성검토 및 성분분석 - 관능평가	30	100%



## 2. 2차년도 과제 목표 달성도

구 분	연구 개발 목표	연구개발 내용 및 범위	척도 (점수)	달성도 (%)
2차년도 (2005)	○ 제1세부과제  생리활성물질 분리정제기술 개발	○ 생리활성물질 분리정제 - 활성분획내 생리활성물질 분리정제 조건 확립 - 주요 생리활성물질 함량분석  ○ 단백질다당체 분리정제 - 분자량 및 구조 변화유도 - 분자량별 분리정제 및 구성성분 분석	40	100%
	○ 제2세부과제  세포면역학적 생리활성 효능평가	○ 세포면역학적 효능 평가 - 대식세포 탐식작용 검토 - 세포유착과정 및 신생혈관형성 억제 작용 검토  ○ 작용기전 연구 - 신호전달과정 검토 - 세포표면 당단백질 발현 및 활성검토	30	100%
	○ 제3세부과제  표고전병/한과 제조	○ 전병/한과 제조방법 확립 - 전통 제조공정 검토 및 활용  ○ 최적 제조조건 확립 - 전처리에 따른 가공적성 검토 - 최적조건 확립을 통한 전병/한과 제조  ○ 식품학적 특성 분석 - 표고전병/한과 특성검토 및 성분분석 - 관능평가	30	100%

### 3. 3차년도 과제 목표 달성도

구 분	연구 개발 목표	연구개발 내용 및 범위	척도 (점수)	달성도 (%)
3차년도 (2006)	○ 제1세부과제  생리활성물질 분리 정제 공정 최적화	○ 분리정제공정 개발 - 분리정제 수율 촉진 및 저해 요인 검토 - 분리정제 최적조건 검토  ○ 생산성 극대화를 위한 공정 최적화 - 고수율 최적화 공정시스템 구축	40	100%
	○ 제2세부과제  가공과정에 따른 효능변화 검색	○ 면역효능 평가 - 항암 효능 검토  ○ 항성인병 효능 평가 - 항당뇨 효능 검토 - 콜레스테롤 저하 효능 검토  ○ 급성독성 평가 - 일반증상 검토 - 혈액 생화학적 변화 검색	30	100%
	○ 제3세부과제  고부가가치 가공제품개발	○ 추출물 가공적성 검토 - 추출 및 분리과정에 따른 적성 검토  ○ 가공 제품화 - 제품특성 검토를 통한 가공기술 개발 - 제품제형 검토를 통한 고부가가치 가공제품 개발 - 각 제품별 포장방법 검토	30	100%

## 제 2 절 관련분야에의 기여도

- 가. 표고버섯의 부가가치 향상으로 수요 창출 및 기능성 가공제품의 다양화를 통하여 버섯재배 관련 농가소득 증대에 크게 기여한다.
- 나. 기능성을 강화시킨 고품질의 기능성 가공제품 개발을 통해 외국의 항암 및 면역계 관련 기능성 가공제품의 수입대체 효과를 이룸과 동시에 국내 시장 뿐 아니라 국제시장에 수출할 수 있는 경쟁력을 갖출 것으로 기대된다.
- 다. 생산 및 분리정제 공정 최적화 기술을 개발함으로써 생산비용 절감에 따른 시장경쟁력을 갖추는데 기여한다.
- 라. 암 및 성인병 관련 예방식으로 섭취 가능한 기능성 식품 개발을 통하여 새로운 가공제품 시장창출과 고부가가치의 식품산업 발전에 기여한다.
- 마. 단백질다당체를 포함한 생리활성물질의 분자량 및 구조변화를 유도하는 효소/화학적 처리기술을 개발함으로써 다양한 크기 및 형태의 생리활성물질을 확보하여 효능적용 범위를 넓히고 보다 고효능의 생리활성물질 생산이라는 새로운 분야의 기술개발에 기여한다.
- 바. 고효능 생리활성물질 개발을 통한 기능성 가공제품의 다양화 및 산업화에 기여한다.
- 사. 최적 생산 및 분리정제 공정기술을 개발함으로써 고부가가치의 생리활성물질 생산성을 향상시켜 산업화를 이루는데 커다란 기여한다.
- 아. 가공기술을 개발함으로써 고품질의 기능성 가공제품 생산성 제고에 기여한다.

## 제 5 장 연구개발결과의 활용계획

본 연구과제에서 수행으로 획득한 표고버섯으로부터 분리 정제한 단백다당체의 면역효능작용을 바탕으로 하여 고부가가치 창출을 위한 가공제품 개발기술의 활용 가능성은 다음과 같다.

### 제 1 절. 활용 계획

- 가. 버섯자실체 및 고효능 생리활성 물질에 대한 가공처리 기술 개발에 따른 버섯관련 가공제품의 기능성 증대에 활용한다.
- 나. 생물산업 관련업체에 기술을 이전하여 생리활성 물질의 분리정제 공정 최적화에 따른 생산비용 절감기술과 함께 고품질의 기능성 가공제품 생산하는데 활용한다.
- 다. 가공시제품 제작을 통한 고부가가치의 가공제품 개발 가능성을 제시하여 전통적인 식품의 기능성 가공제품 개발의욕을 고취하고, 산업 활성화 유도에 활용한다.
- 라. 개발된 최적의 생산기술을 다양한 기능성 가공제품 생산성 향상에 활용한다.

## 제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

### 제1절. 해외과학기술정보

- 최근연구 결과에 의하면 beta-glucan과 같은 고분자 다당체들은 소장내 M cell zone을 통해 endocytosis되어 이들 세포결합체 부위에서 대식세포나 수지상세포들을 자극하거나 혈액내로 흡수되는 것으로 보고되었다. 그러나 현재까지도 흡수정도와 고분자 다당체 분자량과의 상관성은 정확히 평가되어져 있지 않다.
- 특별히, 2001년도에 면역증강 다당류인 (1->3)- $\beta$ -D-glucan의 면역세포내 수용체가 dectin-1으로 동정된 이래 (Brown and Gordon, 2001), 이들 수용체 매개성 면역반응과 분자량과의 상관성연구 혹은 수용체 결합부위에 관한 3차원 구조 해석등의 연구들이 활발히 진행되고 있다.
- dectin-1은 곰팡이 감염시 동반되는 여러 감염면역 현상을 매개하는 세포표면 당단백질로 알려졌으나 (Lipke et al., 1998), 현재는 항암면역 증진을 위한 주요 표적단백질로 인식되어 dectin-1의 기능향진을 위한 방법이나 리간드 개발 등과 같은 다양한 연구가 진행되고 있다 (Ishurd et al., 2004).
- 한편 고분자 다당체들이 나타내는 여러 가지 항성인병 효과들이 보고되고 있다. 즉 beta-glucan은 serum내 콜레스테롤 수치를 낮추고 당대사를 촉진하는 효과가 있다고 알려져 있다 (Bjorklund et al., 2005; Kim et al., 2005). 따라서 표고에서 새롭게 분획되어지는 성분들이 항성인병 효능이 있는지를 평가하는 것은 표고버섯 소재를 이용한 가공식품 개발시 매우 큰 차별화 전략 포인트가 될 것으로 판단된다. 또한 이들 소재의 효능을 극대화하기 위한 보조용 흡수소재 개발도 활발히 진행되고 있다. 특히 나노기술을 접목하여 고분자량의 활성소재들의 세포내 운반을 촉진하는 전달소재들이 활발히 연구개발되고 있다 (Gupta and Gupta, 2004).

## 제 7 장 참고문헌

1. Ota, S. (1984), Shiitake (*Lentinus edodes*). *New Food Industry*, 26, 49
2. Park, K. S. and B. L. Lee (1997), Extraction and Separation of protein-bound polysaccharide by *Lentinus edodes*, *Kor. J. Food&Nutr.*, 10(4), 503-508
3. Lee, B. W., G. H. Im, D. W. Kim, K. M. Park, S. H. Son, and T.H. Shon (1993), Culture characteristics and pilot scale fermentation for the submerged mycelial culture of *Lentinus edodes*, *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 21(6), 609-614
4. Park, K. M. and B.W. Lee (1998), Extraction and purification of antitumor protein-bound polysaccharide from mycelia of *Lentinus edodes*, *Kor. J. Food. Sci. Technol.*, 30(5), 1236-1242
5. Samuel, C. (1959), Production of mushroom mycelium by the submerged culture process, Pp. 647-153. *Industrial Microbiology*. Reinhold Publishing, London.
6. Torev, A. (1964), Submerged culture of higher fungi mycelium on the an industrial scale, *Mushroom Science*, 7, 585-589
7. Wessels, J. G. H., P. C. Mol, J. H. Sietsma, and C. A. Vermerilen (1990), Wall Structure, Wall Growth, and Fungal Cell Morphogenesis. In PJ Kuhn, APJ Trinci, MJ Jung, MW Goosey, LG (eds.) *Copping Eds. Biochemistry of Cell Walls and Membranes in Fungi*, Springer Verlag
8. Wasser, A. T. and A. L. Weis (1999), Therapeutic effects of substances occurring on higher basidiomycetes mushrooms: a modern perspective, *Crit. Rev Immunol.*, 19, 65-96
11. Adachi, K., H. Nanba, and H. Kuroda (1987), Potentiation of host-mediated antitumor activity on mice by  $\beta$ -glucan obtained from *Grifola frondosa* (maitake), *Chem. Pharm. Bull.*, 35, 262-270

12. Aoki, T., H. Miyakoshi, Y. Horikawa, and Y. Usuda (1981), Staphage lysate and lentinan as immunomodulators and immunopotentiators in clinical and experimental systems, *Prog. Cancer Res. Ther.*, 16, 101-112
13. Aouadi, S., A. Heyraud, F. Seigle-Murandi, R. Steiman, J. Kraus, and G. Franz (1991), Structure and properties of an extracellular polysaccharide from *Laetisaria arvalis*. Evaluation of its antitumor activity, *Carbohydr. Polym.*, 16, 155-165
14. Araki, A., T. Inoue, S. Kimura, S. Fukase, and F. Sendo (1990), Enhancement of polymorphonuclear leukocyte-mediated tumor cytotoxicity by serum factors, *Jpn. J. Cancer Res.*, 81, 69-78
15. Bean, M. A., M. Akiyama, Y. Koderu, B. Dupont, and J. A. Hansen (1979), Human blood T lymphocytes that suppress the mixed leukocyte culture reactivity of lymphocytes from HLA-B14 bearing individuals, *J. Immunol.*, 123, 1610-1614
16. Chihara, G., J. Harumo, Y. Y. Maeda, T. Shiio, and T. Suga (1987), Antitumor and metastasis-inhibitory activities of lentinan as an immunomodulator: an overview, *Cancer Detect. Prev.*, 1, 423-443
17. Roland, J. F., Z. F. Chmielewicz, B. A. Weiner, and A. M. Gross (1960), Calvacin: a new antitumor agent, *Sci.*, 132, 1897
18. Gregory, F. J., E. M. Healy, H. P. K., Jr. Agerborg, and G. H. Warren (1966), Studies on antitumor substances produced by Basidiomycetes, *Mycologia*, 58, 80-90
19. Komatsu, N., S. Okubo, S. Kikumoto, K. Kimura, G. Saito, and S. Sakai (1969), Host mediated antitumor action of schizophyllan, a glucan produced by *Schizophyium commune*, *Gann.*, 60, 137
20. Tsukagoshi, S. and F. Ohashi (1974), Protein-bound polysaccharide preparation, PS-K, effective against mouse sarcoma 180 and rat ascites hepatoma AH-13 by oral use, *Gann.*, 65, 557-588

21. Chihara, G., J. Hamuro, Y. Maeda, Y. Arai, and F. Fukuoka (1970), Fractionation and purification of the polysaccharides with marked antitumor activity, especially lentinan, from *Lentinus edodes* (Berk.) Sing. (an edible mushroom), *Cancer Res.*, 30, 2776-2781.
22. Cooper, T. G. (1977), *The Tolls of Biochemistry*, Wiley-Interscience Publication, *New York*
23. Bradford, M. M. (1976), A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal. Biochem* 72: 248-254
24. Cheung, L. M., P. C. K. Cheung, and V. E. C. Ooi (2003), Antioxidant activity and total phenolics of edible mushroom extracts, *Food Chemistry*, 81, 249-255
25. Ukawa, Y., H. Ito, and M. Hisamatsu (2000), Antitumor effects of (1→3)- $\beta$ -D-glucan and (1→3)- $\beta$ -D-glucan purified from newly cultivated mushroom, Hatakeshimeji (*Lypohyllum decastes* Sing), *J. Biosci. Bioeng.*, 90, 98-104
26. Han, M. D., J. W. Lee, H. Jeong, S. K. Chung, S. Y. Lee, and K. H. Yoon (1995), The effect of carbon source on antitumor and anticomplementary activities of Ganoderan extracted from the mycelium of *Ganoderma lucidum* IY009, *Kor. J. Mycol.*, 23(3), 209-225
27. Kim, Y. O., S. B. Han, H. W. Lee, H. J. Ahn, Y. D. Yoon, J. K. Jung, H. M. Kim, and C. S. Shin (2005), Immuno-stimulating effect of the endo-polysaccharide produced by submerged culture of *Inonotus obliquus*, *Life Sciences*, 77, 2438-2456
28. Ryu, K., K. Y. Lee, and E. K. Lee (2001), The structure analysis and biosynthesis of  $\beta$ -glucan by *Alcaligenes faecalis*, *Korean J. Biotechnol. Bioeng.*, 16(4), 409-414
29. Avena, S. L. and L. V. Hinoat (1977), Ferulic acid and other phenolics in oat seeds, *J. Food Sci.*, 42, 551



30. Kozłowska, H. and R. Zadernowski (1983), Phenolic acids in rapeseed and mustard, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 60, 1119
31. Cheung, L. M., P. C. K. Cheung, and V. E. C. Ooi (2003), Antioxidant activity and total phenolics of edible mushroom extracts, *Food Chemistry*, 81, 249-255
32. Kim, H. J., J. T. Bae, J. W. Lee, M. H. Hwang Bo, H. G. Im, and I. S. Lee (2005), Antioxidant activity and inhibitive effects on human leukemia cells of edible mushrooms extracts, *Kor J. Food Preserv.*, 12(1), 80-85
33. 장석원 (2006), 암세포가 두려워하는 AHCC의 비밀, 건강신문사
34. Reynolds, T. and A. C. Dweck (1999), Aloe vera leaf gel: a review update, *Journal of Ethnopharmacology*, 68, 3 - 37
35. Chaplin, M. F. and J. F. Kennedy (1986), Carbohydrate Chemistry , *Oxford IRL Press*
36. Dische, Z. (1962), Color reaction of hexosamine. Method in Carbohydrate Chemistry I, *Academic Press*, pp. 507-508
37. Blumenkrantz, N. and G. Asboe-hansen (1973), New method for quantitative determination of uronic acids, *Analytical biochemistry*, 54(2), 484-489
38. Ogawa. K. and J. Tsurugi (1973), The dependence of the conformation of a (1→3)-β-D-glucan on chain-length in alkaline
39. Singleton, V. L. and J. A. Rossi, Jr. (1965), Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents, *American J. of Enology and Viticulture*, 16, 144-158
40. Zheng, R., S. Jie, D. Hanchuan, and W. Moucheng (2005), Characterization and immunomodulating activities of polysaccharide from *Lentinus edodes*, *International Immunopharmacology.*, 5, 811-820

41. Ciucanu, J. and F. Kerek (1984), A simple and rapid method for the permethylation of carbohydrates. *carbohydr. Res.*, 131, 209-217
42. Ydachi, Y., N. N. Miura, N. Ohno, H. Tamura, S. Tanaka, and T. Yadomae (1999), Enzyme immunoassay system for estimation the ultrastructure of (1,6)-branched (1,3)- $\beta$ -glucans, *Carbohydrate Polymer*, 39, 225-229
43. Yang, J. H., H. C. Lin, and J. L. Mau (2002), Antioxidant properties of several commercial mushrooms, *Food Chemistry.*, 77, 229-235
45. Cho JY, Kim AR, Yoo ES, Baik KU, Park MH. Immunomodulatory effect of arctigenin, a lignan compound, on tumour necrosis factor- $\alpha$  and nitric oxide production, and lymphocyte proliferation. *J Pharm Pharmacol.* 1999, 51(11):1267-73.
46. Cho JY, Fox DA, Horejsi V, Sagawa K, Skubitz KM, Katz DR, Chain B. The functional interactions between CD98, beta1-integrins, and CD147 in the induction of U937 homotypic aggregation. *Blood.* 2001, 98(2):374-82.
47. Choi SH, Lyu SY, and Park WB. Mistletoe lectin induces apoptosis and telomerase inhibition in human A253 cancer cells through dephosphorylation of Akt. *Arch. Pharm. Res.* 2004, 27:68-76.
48. Johnson MD, Torri JA, Lippman ME, and Dickson RB. Regulation of motility and protease expression in PKC-mediated induction of MCF-7 breast cancer cell invasiveness. *Exp Cell Res.* 1999, 247:105-13.
49. Ebihara K. Minamishima Y. Protective effect of biological response modifiers on murine cytomegalovirus infection. *J. Virology.* 51: 117-121 (1984)
50. Kweon MH. Lim EJ. Sung HJ. Studies on biological polysaccharides isolated from *Agaricus bisporus*. *J. Kor. Agric. Chem. Biotechnol.* 41: 60-66 (1998)

51. Hong JS. Kim TY. Contents of free-sugars & free sugar alcohols in *Pleurotus ostreatus*, *Lentinus edodes* & *Agaricus bisporus*. *Korean J. Food Sci. Technol.* 20: 459-462 (1988)
52. Kim YS. Quality of wet noodle prepared with flour and mushroom powder. *Korean J. Food Sci. Technol.* 30:1373-1380 (1998)
53. Jo MN. The effect of bean water concentration and incubation time of Yukwa paste on amylase activity and Yukwa characteristics. Yonsei University. Seoul. (1998)
54. Shin DH. Kim MK. Chung TK. Lee HY. Quality characteristics of Yukwa (popped rice snack) made by different varieties of rice. *Korean J. Food Sci. Technol.* 21: 820-825 (1989)
55. Hwang HS. Korean Traditional Foods. Kyomoon Publishing Co. (1998)
56. Yeo KM. Choi HS. Nutritional characteristics and industrial application of perilla oil. *Food Industry and Nutrition.* 3: 30-36 (1998)
57. Lee HJ. Korean Traditional Snack Food. *Food Science and Industry.* 22: 46-57 (1989)
58. Jeon HJ. Sohn KH. Park HK. Studies on optimum conditions for experimental procedure of Yukwa(1). On the soaking time of glutinous rice and the number of beating. *Korean J. Dietary Culture.* 10: 75-79 (1995)
59. Shin DH. Choi U. Lee HY. Yukwa quality on mixing of non-waxy rice to waxy rice. *Korean J. Food Sci. Technol.* 23: 619-624 (1991)
60. Lee YS. Jung HO. Rhee CO. Quality characteristics of Yukwa prepared with pigmented rice. *Korean J. Soc. Food Cookery Sci.* 18: 532-537 (2002)
61. Park GS. Lee GS. Sin YJ. Sensory and mechanical characteristics of Yukwa added safflower seed powder. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 30: 1088-1092 (2001)

62. Kang KH. No BS. Seo JH. Hu WD. Food Analysis. Sungkyunkwan university academic press, Seoul. pp. 387-394
63. Judd DG. Wyszecski G. Applied colorific science for industry and business. Diamond Co. Japan. p. 333 (1964)
64. Ha JU. Koo SG. Lee HY. Hwang YM. Lee SC. Physical properties of fish paste containing oyster mushroom(Pleurotus ostruatus). *J. KASBIR*. 1: 32-36 (2001)
65. Chu CC. Chi TH. Identification of sulfurous compounds of *Lentinus edodes* sing. *J. Agric. Food Chem.* 34: 630-637 (1986)
66. Joseph AM. Mushroom flavor. *J. Agric. Food Chem.* 29: 1-7 (1981)
67. Yasuo A. Sulfur containing peptides in *L. edodes*. *Agr. Biol. Chem.* 44: 2667-2672 (1980)
68. Lee GD. Chang HG. Kim HK. Antioxidative and nitrite scavenging activities of edible mushrooms. *Korean J. Foos Sci. Technol.* 29: 432-436 (1997)
69. Ma SJ. Effects of the substances extracted from dried mushroom (*Lentinus edodes*) by several organic solvents on the stability of fat. *Kor. J. Food Sci.* 22: 828-832 (1983)
70. AOAC. Official methods of analysis. 15th ed. Association of Official Analytical Chemists, Inc., Washington, DC, USA (1990)
71. KFDA. Food Code a separate volume. Munyoung sa. Seoul, pp. 3-29 (2002)
72. Osborne DR. Voogt P. The analysis of nutrients in foods. Academic Press, New York, pp. 266-270 (1981)
73. Gancedo M. Luh BS. HPLC analysis of organic acids and sugars in tomato juice. *J. Food Sci.* 51: 571-573 (1986)

74. Hugli TE. Moore S. Determination of the tryptophan content of proteins by ion exchange chromatography of alkaline hydrolysates. *J. Biol. Chem.* 247: 282-290 (1972)
75. Cho Y. Rhee HS. A study on flavorful taste components in Kimchi. *Korean J. Food Sci. Technol.* 11: 26-31 (1979)
76. Folch J. Less M. Sloane-Stanley GH. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem.* 226: 497-509 (1957)
77. Chae SG. Kang KS. Ma SJ. Bang KU. Oh MH. Oh SH. Analysis of food. Jigu publishing, Seoul, pp. 387-395 (2000)
78. KFDA. Food Code. Munyoung sa. Seoul, pp. 154-155 (2002)
79. American Association of Cereal Chemists(AACC). Approved Method. Secs. 22-10. The Association, St. Paul, MN, USA (1985)]
80. Kwon JH. Byun MW. Cho HO. Kim YJ. Effect of chemical fumigant and  $\gamma$ -rays on the physicochemical properties of dried oak mushrooms. *Korean J. Food Sci. Technol.* 19: 273-278 (1987)
81. Bae SM. Park KJ. Shin DJ. Hwang YI. Lee SC. Properties and characterization of jochung with sweet persimmons. *J Korean Soc. Agric. Biotechnol.* 44: 88-91 (2001)
82. Kim HS. Kang YJ. Optimal conditions of saccharification for a traditional malt syrup in Cheju. *Korean J. Food Sci. Technol.* 26: 659-664.
83. Choi MY. Jung TY. Hahm KJ. Cytotoxic effects of hot water soluble polysaccharides from mushrooms, *Lentinus edodes* and vitamin A & E supplementation against P388 cells. *Korean J. Nutrition.* 28: 1091-1099 (1995)
84. FAO. Amino acid content of food and biological data on protein. Rome, Italy (1970)

85. Cho JS. Choi MY. Chang YH. Quality characteristics of sulgiduk added with *Lentinus edodes* sing powder. *J. East Asian Soc. Dietary Life*. 12: 55-64 (2002)
86. Hong JS. Kim YH. Contents of free amino acids and total amino acids in *Agaricus bisporus*, *Pleurotus ostreatus* and *Lentinus edodes*. *Korean J. Food Sci. Technol.* 21: 58-62 (1989)
87. Son MH. Kim SY. Ha JU. Lee SC. Texture properties of surimi gel containing shiitake mushroom (*Lentinus edodes*). *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 32: 859-863 (2003)
88. Kang KH. No BS. Seo JH. Hu WD. Food Analysis. Sung kyun kwan *university academic press*, Seoul, pp. 387-394
89. Pylar EJ. Physical and chemical test methods. Chapter 21. in *Baking Science and Technol.* Vol II. Sosland Publishing Co., Kansas, USA, pp. 824-850 (1988)
90. Thomson LU. Baker LM. Influence of succinylated whey protein concentrate on farinograph characteristics and bread quality. *Cereal Chem.* 60: 71-73 (1982)
91. Chung JY. Kim CS. Development of buckwheat bread. Effects of vital wheat gluten and water-soluble gums on dough rheological properties. *Korean J. Soc. Food Sci.* 14: 140-147 (1998)
92. Cho MK. Lee WJ. Preparation of high-fiber bread with barley flour. *Korean J. Food Sci. Technol.* 28: 702-706 (1996)
93. Yook HS. Kim YH. Ahn HJ. Kim DH. Kim JO. Byun MW. Rheological properties of wheat flour dough and qualities of bread prepared with dietary fiber purified from Ascidian (*Halocynthia roretzi*) Tunic. *Korean J. Food Sci. Technol.* 32: 387-395 (2000)
94. Rasper VF. Dough rheology and physical testing of dough. *In Advances in Baking Technology.* MN, USA, pp. 107-110 (1992)

95. Jung DS. Eun JB. Rheological properties of dough added with black rice flour. *Korean J. Food Sci. Technol.* 35: 38-43 (2003)
96. Bae JH. Woo HS. Choi HJ. Choi C. Physicochemical properties of onion powder added wheat flour dough. *Korean J. Food Sci. Technol.* 35: 436-441 (2003)
97. Lee CY. Kim SK. Marston PE. Rheological and baking studies of rice-wheat flour blends. *Korean J. Food Sci. Technol.* 11: 99-104 (1979)
98. Choi UK. Yoo BH. Son DH. Kwon DJ. Kim MH. Kim YH. Rheological properties of dough added with barley bran. *Korean J. Food Sci. Technol.* 37: 751-756 (2005)
99. Park JS. Na HS. Quality characteristics of *Jochung* containing various level of *Lentinus edodes* powder. *Korean J. Food Sci. Technol.* 37: 768-775 (2005)
100. Kim YS. Quality of wet noodle prepared with wheat flour and mushroom powder. *Korean J. Food Sci. Technol.* 30: 1373-1380 (1998)
101. Son MH. Kim SY. Ha JU. Lee SC. Texture properties of surimi gel containing shiitake mushroom (*Lentinus edodes*). *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 32: 859-863 (2003)
102. Cho JS. Choi MY. Chang YH. Quality characteristics of sulgiduk added with *Lentinus edodes* sing powder. *J. East Asian Soc. Dietary Life.* 12: 55-64 (2002)
103. Judd DG. Wyszecski G. Applied colorific science for industry and business. Diamond Co. Japan, p. 333 (1964)
105. Hong JS. Kim YH. Kim MK. Kim YS. Sohn HS. Contents of free amino acids and total amino acids in *Agaricus bisporus*, *Pleurotus ostreatus*, and *Lentinus edodes*. *Korean J. Food Sci. Technol.* 21: 58-62 (1989)

106. Choi MY. Jung TY. Hahm KJ. Cytotoxic effects of hot water soluble polysaccharides from mushrooms, *Lentinus edodes* and vitamin A & E supplementation against P388 cells. *Korean J. Nutrition.* 28: 1091-1099 (1995)
107. Hong JS. Kim TY. Contents of free sugars and free sugaralcohols in *Pleurotus ostreatus*, *Lentinus edodes* and *Agaricus bisporus*. *Korean J. Food Sci. Technol.* 20: 459-462 (1988)



## 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.

## 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.