

발 간 등 록 번 호

보안과제() , 일반과제(O) 과제번호 107056-3

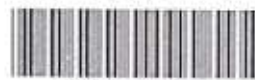
11-1541000-000524-01

장내 유해미생물 제어를 위한
담자균류 소재의 산업화 기술 개발

(Development of technology for the
industrialization of Basidiomycota to
inhibit harmful intestinal

충북대학교

농림수산식품자료실



0004954

농림수산식품부

제 출 문

농림수산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “장내 유해미생물 제어를 위한 담자균류 소재의 산업화 기술 개발에 관한 연구” 과제의 보고서로 제출합니다.

2010 년 5 월 29 일

주관연구기관명 : 충북대학교

주관연구책임자 : 김 광 엽

세부연구책임자 : 박 의 석

세부연구책임자 : 오 세 출

세부연구책임자 : 윤 향 식

연 구 원 : 장 금 일

연 구 원 : 이 강 휘

연 구 원 : 조 윤 원

연 구 원 : 이 윤 중

연 구 원 : 조 윤 식

연 구 원 : 이 성 영

연 구 원 : 정 은 지

연 구 원 : 박 경 란

연 구 원 : 오 미 현

연 구 원 : 박 정 수

연 구 원 : 유 영 선

연 구 원 : 정 준 영

연 구 원 : 권 오 성

연 구 원 : 주 선 중

연 구 원 : 김 기 식

연 구 원 : 오 은 희

요 약 문

I. 제 목

장내 유해미생물 제어를 위한 담자균류 소재의 산업화 기술 개발

II. 연구개발의 목적 및 필요성

건강 기능성 식품시장은 고령화 사회로의 진입, 생활수준의 향상과 고령화로 인한 건강지향 욕구증대, 건강식품에 대한 지식의 축적, 대체의학 및 자가 치료의 관심증대, 식품 및 천연물에 대한 관심축적, 기능성식품의 종류와 공급증대, 기능성식품에 대한 각국의 법규지원추세 등으로 시장이 계속적으로 성장할 것으로 예측된다.

1991 ~ 2004년 농림업 총생산액은 20조에서 37조로 연평균 약 4.9%의 성장을 기록하고 있음 반면 버섯류는 같은 기간 금액으로는 2,300억 원에서 7,800억 원 수준으로, 연평균 약 10%의 성장을 보이고 있음 따라서 버섯산업이 농림업 전체 생산에서 차지하는 비중 구조는 2004년 2.1%로서 1990년대 후반 이후 특약용 작물을 능가하고 있다.

버섯 산업의 성장은 2000년대 이후에도 지속되고 있으며 2000-2004년 사이에 농림업의 연평균 성장률은 3.0% 이지만 버섯은 3.4%를 나타내고 있을 정도로 지속 성장하고 있으나 성장속도는 과거보다 상당히 느려졌으나, 이는 생산량의 문제라기보다는 가격의 문제로 나타는 결과이며 버섯의 1인당 소비량이나 전체는 소비량은 증가하고 있다.

버섯의 가격은 과거 5년 전과 비슷한 수준이며 다른 품목의 농산물 가격에 비해 상대적으로 하락하고 있으나 종합적으로 볼 때 버섯산업은 분명 성장산업이며 2000년대 이전과 같은 빠른 성장을 기대하기는 어려우나 여전히 생산량과 생산액에서 성장하고 있다.

사람이 섭취한 음식물은 위장관을 통해 이동하면서 주로 위와 소장상부에서 분비되는 소화효소에 의해 대부분이 소화 흡수되지만, 흡수되지 않은 영양물질들은 대장 내에서 유해세균에 의하여 분해되어 각종 아민류, 암모니아, 지방산 등이 되고 이는 상피세포를 통하여 수분과 함께 흡수되어 건강에 나쁜 영향을 주는 것으로 알려져 있다

대장 내 전체 미생물은 그 내용물의 40-55%를 차지하며 그 종류는 약 200-400여 종이고 균수는 100조에 달하고 있으며, 현재까지의 연구 결과 장내세균은 사람의 건강에 유익한 작용을 하는 균과 유해한 작용을 하는 균으로 나누고 있다.

최근 Nature지(Vol.444, 2006)에 발표된 내용에 따르면 장내 세균의 조성이 비만의 원인중 하나로 작용하는 것으로 밝혀짐. 비만 증상을 보인 사람들의 장 속에는 정상인에 비해 유익균의 일종인 *Bacteroidetes*문에 속하는 세균 종이 적고, *Firmicutes*문에 속하는 *Clostridium*, *Eubacterium*, *Peptostreptococcus*, *Desulfotomaculum*, *Veilonella*속 세균이 장내 미생물의 90%를 차지하고 있음이 발견되었고, 이 현상은 쥐를 이용한 동물실험에서도 동일하게 증명되었다.

사람의 장내에서 유해균은 감소시키고 유익균은 증가시키기 위한 여러 가지 연구가 이루어졌으나, 장내 유해미생물의 생육 억제를 위하여 담자균류를 조사하는 연구는 아직까지 이루어지지 않았다.

더욱이 광범위한 버섯종의 인체 장내 미생물중 유해균의 항균효과에 대해서는 그간 연구가 거의 진행되지 않고 있음. 버섯 종은 인간이 오래전부터 섭취해왔으므로 안전성이 확보된 식품으로 다양한 생리활성 효과가 입증되어 있다.

버섯의 생산량 증가에 따른 가격 하락으로 인한 버섯산업의 위기를 극복하기 위해서는 새로운 수익모델의 개발을 통한 버섯산업의 고부가가치화가 필요하며 현재의 표고버섯에 집중된 연구에서 벗어나 다양한 버섯류의 생리활성물질을 발견하고 그 물질을 산업화하여 대량 생산하는 연구가 필요하다.

Ⅲ. 연구개발 내용 및 범위

제 1절 인체 장내 유해미생물 제어를 위한 담자균류 탐색 및 식품 신소재 개발

1. 장내 유해미생물 생육 억제를 위한 담자균류 탐색 및 선발

- 가. 다양한 용매를 이용하여 추출된 각각의 분획별 항균효과 분석
- 나. 다양한 담자균류의 항균성 확인(*in vitro* 시험)
- 다. 장내 세포에 부착된 유해 미생물의 생육 억제 효과 분석

2. 선발 담자균류의 생리활성 물질 분리 및 *in vivo* test를 통한 항균효과 분석

- 가. 선발 담자균류에 의한 실험동물의 장내균총 변화 분석
- 나. 생리활성물질의 MIC 분석

3. 장내 유해미생물 생육억제 소재를 이용한 식품신소재개발

- 가. 유해미생물 생육억제 담자균류 소재의 캡슐화
- 나. 선발 소재의 저장성 분석 및 향상 방안 모색

제 2 절 장내 유해미생물 제어를 위한 담자균류와 천연소재 혼합 배양 기술 확립

1. 장내 유해미생물 제어를 위한 담자균류 배양기술 개발

- 가. 효능이 확보된 담자균류의 균사체 배양기술 개발확보
- 나. 인체에 무해한 산업적 대량배양 배지 개발 최적 탄소원, 질소원등 선정
- 다. 선발 배지의 실용성 검토 : 균사체량, 기능성분 생성량 등

2. 유용 담자균류 및 천연소재 혼합 배양 기술 개발

- 가. 최적 한방원료 조사 및 유용균류에 의한 발효 가능성 타진
- 나. 기확보 담자균류와 천연소재의 최적 첨가농도 구명
- 다. 기확보 담자균류와 소재의 혼합배양 산업적 최적조건 확립

3. 담자균류와 천연소재 발효제품의 경제성 및 안정성 검토

- 가. 적정 부재료 첨가에 의한 기호성 조사 및 선발
- 나. 산업적 혼합배양을 위한 경제성 검토
- 다. 시생산 상품의 안정성 검토

제 3 절 유용 담자균류 배양액과 가공제품의 생리활성 및 성분 분석

1. 담자균류 배양액의 생리 활성 구명 및 품질 지표 결정
 - 가. 담자균류 배양액 생리활성 및 기능성분 분석
2. 유용 담자균류 활성 상승 천연소재 혼합 배양액 선발 및 품질 특성 분석
 - 가. 담자균류 및 천연소재 혼합 배양액의 생리활성과 성분분석
3. 유해 미생물 제어 기능성 소재 및 활용 제품의 생리활성 및 품질 특성 구명
 - 가. 유해 미생물 제어 기능성 소재 및 활용 제품의 생리활성 및 성분 분석

제 4 절 인체 장내 유해 미생물 제어를 위한 담자균류 소재의 산업화

1. 담자균류와 천연소재 혼합 제품 시생산 기술개발(병입 제품)
 - 가. 병입 상품 산업화를 위한 적정 배합비 결정
 - 나. 병입 제품의 유통기한 설정
 - 다. 천연물(유자 등) 소재 함유 담자균류 병입 제품으로 시생산
2. 담자균류와 천연소재 혼합 제품 시생산 기술개발 (파우치 제품)
 - 가. 파우치 상품 산업화를 위한 적정 배합비 결정
 - 나. 파우치 상품의 유통기한 설정
 - 다. 천연물(유자 등) 소재 함유 담자균류 파우치 상품으로 시생산
3. 담자균류와 천연소재 혼합 제품화 기술개발(기능성 담자균류 상품화 기술 확보)
 - 가. 최종 상품의 포장기술 및 제조공정 확보
 - 나. 공정 확보에 따른 담자균류의 상품화
 - 다. 천연물소재(유자 등)이용 상품의 해외소비자 선호도 테스트 실시

IV. 연구개발결과

제 1절 인체 장내 유해미생물 제어를 위한 담자균류 탐색 및 식품 신소재 개발

식이섬유소가 풍부하고 저칼로리인 담자균류 추출물을 이용하여 인체 장내 유해미생물 제어를 위한 담자 균류 소재를 탐색한 결과, 장내 유해 미생물의 생육을 억제하는 동시에, 장내 유익 미생물의 생육을 증진 시키는 석이버섯 자실체와 운지버섯 균사체의 추출물을 선발하였고, 선발된 담자균류 소재 추출물의 기능성을 분석한 결과 열에 대단히 안정하였고, pH에도 비교적 안정한 것으로 나타났다. 또한 Rat을 이용한 *In vivo*에서도 석이버섯 80%에탄올 추출물군이 고지방식이만 투여한 군에 비해 *Bifidobacterium*의 경우 상당히 증가되었고, *Clostridium* spp와 *Eubacterium* spp는 감소되는 것으로 나타났다. 또한 이러한 결과를 바탕으로 석이버섯과 운지버섯 추출물을 첨가하여 비만에 영향을 줄 수 있는 장내 균총 개선에 도움을 줄 수 있는 기능성 음료를 제조하고자 관능 평가를 실시한 결과 운지버섯 균사체 배양액에 석이버섯 추출물을 3% 첨가한 실험구가 관능적으로 우수함을 보여, 장내 균총을 개선하는 음료로의 개발이 가능할 것으로 생각된다.

제 2 절 장내 유해미생물 제어를 위한 담자균류와 천연소재 혼합 배양 기술 확립

최적 탄소원으로 조사된 sucrose 3%, 대두분 0.3%의 배지를 조제 후 1.200L fermentor에서 800L를 working volumn으로 하여 발효조에 넣은 후, 121℃에서 40분간 멸균 하였다. 특히 대두분의 배지 제조시 미리 대두분을 용수에 넣고 30-40분 동안 침전 후 상등액 만을 취하여 수행하였다. 이렇게 조제된 배지에, 30L의 seed tank에 working volumn이 15L가 되도록 미리 배양한 공시균주를 1%의 농도로 첨가하여 통기량 1vvm, 150rpm으로 배양 하면서 1200L 산업적 대량배양에 집중후 48시간 경과후 오미자 3%를 첨가후 72시간 혼합배양을 실시하였다. 그 결과 예비 조건과 동일한 결과로 생육에는 문제가 없었다.

제 3 절 유용 담자균류 배양액과 가공제품의 생리활성 및 성분 분석

본 연구에서는 β -glucuronidase 저해 활성이 강화된 상황균사체 배양액을 식품 소재로 개발하고자, 상황균사체의 최적 액체 배양 조건을 확립하고, β -glucuronidase 저해활성을 갖는 천연소재를 탐색하여 이를 첨가한 상황균사체 배양액의 β -glucuronidase 저해활성, 전자공여능, ACE 저해활성, 혈당강하능, β -glucan 함량 분석 및 관능평가를 수행하였다. 그 결과, 상황균사체 최적배양조건은 30℃, pH 5.0, 최적배양기간은 8일이었다. 갈근, 감초, 결명자, 대추, 오미자

5종의 생리활성을 측정한 결과, β -glucuronidase 저해활성, 전자공여능, ACE 저해활성, 혈당강하능을 측정한 결과, 결명자가 각각 95.0%, 80.9%, 96.1%, 24.2%로 다른 식품소재에 비해 우수하였다. 따라서 상황균사체 배양을 위한 배지에 첨가 할 식품소재로 결명자를 선정하였다. 상황버섯 자실체의 생리활성 및 β -glucan 함량을 측정한 결과, β -glucuronidase 저해활성 54.1%, 전자공여능 81.9%, ACE 저해활성 30.0%, 영지버섯 55.5%, 혈당강하능 20.1%이었고, β -glucan 함량은 25.6% 이었다. 상황 균사체 배양 시 결명자 추출액의 배지 첨가량과 첨가시기를 결정하기 위해, 결명자 3~10%의 농도로 배양 전과 배양 후에 첨가하여 배양한 결과, 결명자 첨가량 7% 까지 균체량이 유의적으로 증가하였고, 최종 pH에는 영향을 주지 않는 것으로 나타났다. 색도는 첨가량에 따라 L값은 감소하였고, a값과 b값은 증가하였으며, 첨가시기에 따라 L값은 배양 전에 첨가한 것이 낮은 값을 나타내었고, a값과 b값은 배양 전에 첨가한 것이 높은 값을 나타내었다. β -glucuronidase는 결명자의 첨가량에 따라 증가하였으며 배양 전에 첨가한 것이 높았다. 전자공여능은 결명자의 첨가량에 따라 약간 증가하였으며 배양 후에 첨가한 것이 높았다. ACE 저해활성은 배양 전 첨가구에서 모두 40%이상의 활성을 보였으나, 유의적 차이가 없었고, 배양 후 첨가구는 7% 첨가구까지 증가 하였으나 모두 배양 전의 저해활성 보다 낮았다. 혈당 강하능은 모두 30% 이내의 낮은 활성을 보였는데, 결명자의 첨가량에 따라 증가하였으며, 첨가 시기는 배양 후 첨가구가 약간 높은 정도를 보였다. β -glucan 함량은 대조구는 4.18 mg/L, 결명자 10% 첨가구는 16.81 mg/L로 결명자 첨가량에 따라 β -glucan 함량이 증가하였다. 관능평가는 배양 전 첨가구에서는 색, 향, 맛, 전반적인 기호도에서 유의적 차이를 보이지 않았으나 배양 후 첨가구에서는 첨가량에 따라 기호도가 감소하는 경향을 보였다. 종합적으로 색도, β -glucuronidase 저해활성, 전자공여능, ACE 저해활성, 혈당강하능, 관능평가를 고려 할 때, 결명자의 첨가 시기는 배양 전 첨가가 적당하며, 첨가량이 많아질수록 생리활성은 증가하나, 기호도는 감소하므로 5~7% 첨가량이 상황균사체 배양의 식품 또는 식품소재로서 응용 가능성이 높을 것으로 판단된다.

제 4 절 인체 장내 유해 미생물 제어를 위한 담자균류 소재의 산업화

기존의 병제품이 갖는 운반 및 유통의 어려움을 해결한 새로운 포장(가볍고, 파손위험이 적고, 운반이 편리한) 제품을 개발하였다. 개발포장재의 수준 및 성능을 아래 표에 나타내었다.

Table. 개발포장재의 수준 및 성능

제품비교	포장형태	용기무게	파손위험	유통기한	제품형태
기존제품	병 포장	무겁다	크다	짧다	국내시장형
개발제품	AL+PET 포장	가볍다	작다	길다	해외시장형

V. 연구성과 및 성과활용 계획

기존에 연구되지 않은 장내 유해 미생물에 대한 버섯류의 항균성을 평가하여 새로운 기능성을 부여함으로써 버섯 재배 농업 부문의 활성화에 기여 가능할 것으로 판단되며 대장 내에서 유해미생물에 의해 생성되어 수분과 함께 흡수되는 유해 저분자 단백질 분해산물을 제어함으로써, 혈액 혼탁을 막는 동시에 비만을 방지할 수 있는 두 가지의 효과를 기대할 수 있는 기능성식품을 개발하여 지방 소재 농식품 제조 중소기업의 활성화에 기여할 수 있다.

SUMMARY

The functional food components from various Basidiomycota were investigated to improve the balance of human intestinal microflora, especially associated with obesity. The 80% ethanol extracts of *Gyrophora Esculanta* showed effective antimicrobial activities on *Eubacterium limosum*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium paraputrificum*, *Clostridium difficile* and *Clostridium ramosum*. The water extracts of *Coriolus versicolor judae* mycelia were effective in increasing the growth of *Bifidobacterium bifidum* and *Bacteroides fragilis*. The feeding of *Gyrophora Esculanta* and *Coriolus versicolor judae* mycelia extracts increased the body and kidney weight of rats. Although the extract did not reduce weight of the rat in high fat diet , it decreased the level of LDL-cholesterol. Also in case of *Coriolus versicolor judae* mycelia extract, the concentration of total cholesterol, HDL-cholesterol and TG were decreased. These results demonstrated the possibilities of *Coriolus versicolor judae* and *Gyrophora Esculanta* as a functional food components to control intestinal microbial flora.

CONTENTS

Chapter 1 Summary of research	12
Chapter2 Current condition of technical developments in domestic and abroad	17
Chapter 3 Results of research work	22
Chapter 4 Achieve and contribution of related areas of research work	118
Chapter 5 Product of research works and practical use of products	122
Chapter 6 References	124

목 차

제 1 장 연구개발과제의 개요	12
제 2 장 국내외 기술개발 현황	17
제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과	22
제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도	118
제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획	122
제 6 장 참고문헌	124

제 1 장 연구개발과제의 개요

제 1 절 연구 개발의 목적 및 필요성

- 건강 기능성 식품시장은 고령화 사회로의 진입, 생활수준의 향상과 고령화로 인한 건강지향 욕구증대, 건강식품에 대한 지식의 축적, 대체의학 및 자가 치료의 관심증대, 식품 및 천연물에 대한 관심축적, 기능성식품의 종류와 공급증대, 기능성식품에 대한 각국의 법규지원추세 등으로 시장이 계속적으로 성장할 것으로 예측된다.
- 전 세계 건강식품 시장은 2002년 기준 약 1600억 달러 규모로 추산되고 있는데 이 중 미국 시장이 전체의 약 30%인 565억 달러 규모를 점유하는 것으로 알려졌으며, dietary supplement로 표현되는 식이보조제 즉 건강기능식품 시장 규모는 전체의 약 33% 정도에 해당하는 185억 달러 규모로 추정한다.
- 1991 ~ 2004년 농림업 총생산액은 20조에서 37조로 연평균 약 4.9%의 성장을 기록하고 있음 반면 버섯류는 같은 기간 금액으로는 2,300억 원에서 7,800억 원 수준으로, 연평균 약 10%의 성장을 보이고 있음 따라서 버섯산업이 농림업 전체 생산에서 차지하는 비중 구조는 2004년 2.1%로서 1990년대 후반 이후 특약용 작물을 증가하고 있다.
- 버섯 산업의 성장은 2000년대 이후에도 지속되고 있으며 2000-2004년 사이에 농림업의 연평균 성장률은 3.0% 이지만 버섯은 3.4%를 나타내고 있을 정도로 지속 성장하고 있으나 성장속도는 과거보다 상당히 느려졌으나, 이는 생산량의 문제라기보다는 가격의 문제로 나타는 결과이며 버섯의 1인당 소비량이나 전체는 소비량은 증가하고 있다.
- 버섯의 가격은 과거 5년 전과 비슷한 수준이며 다른 품목의 농산물 가격에 비해 상대적으로 하락하고 있으나 종합적으로 볼 때 버섯산업은 분명 성장산업이며 2000년대 이전과 같은 빠른 성장을 기대하기는 어려우나 여전히 생산량과 생산액에서 성장하고 있다.

- 약리·생리활성 물질의 탐색과 소재화는 기술의존도가 높은 무공해 산업으로 향후 국내산업의 재편과정에서 중추적인 역할을 담당하게 될 것이며 특히 제조공정 상 하나의 시설로 다양한 제품의 생산이 가능하고 공정이 단순하기 때문에 소량 다품종 생산의 특성을 지니는 중소기업형 산업으로 발전시킬 수 있다.
- 우리 고유의 자원으로부터 탐색된 물질은 1차적으로 외국의 기존특허와 마찰을 일으키지 않는 신규후보물질일 가능성이 높고 오랫동안 먹어 온 식품 중에 함유되어 있는 물질이므로 유기합성에 의한 신규물질들보다 안전성의 확보가 용이하여 따라서 의약과 식품용 leading compound의 연구개발과 실용화에 있어 기술선진국보다 비교우위에 있다.
- 사람이 섭취한 음식물은 위장관을 통해 이동하면서 주로 위와 소장상부에서 분비되는 소화효소에 의해 대부분이 소화 흡수되지만, 흡수되지 않은 영양물질들은 대장 내에서 유해세균에 의하여 분해되어 각종 아민류, 암모니아, 지방산 등이 되고 이는 상피세포를 통하여 수분과 함께 흡수되어 건강에 나쁜 영향을 주는 것으로 알려져 있다.
- 대장 내 전체 미생물은 그 내용물의 40-55%를 차지하며 그 종류는 약 200-400여 종이고 균수는 100조에 달하고 있으며, 현재까지의 연구 결과 장내세균은 사람의 건강에 유익한 작용을 하는 균과 유해한 작용을 하는 균으로 나누고 있다.
- *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*속 등의 유익균은 젖산, 초산과 같은 유기산을 생성하여 유해균의 성장을 억제하고 발암물질들을 분해하거나 이들 물질과 쉽게 결합하여 항암성에 중요한 역할을 하며 숙주의 면역체계를 자극하거나 면역반응의 보조인자로 작용하여 감염에 대한 저항성을 강화시켜 주는 것으로 알려져 있다.
- 반면 *Clostridium*, *Eubacterium*, *Peptostreptococcus*, *Desulfotomaculum*, *Veilonella*속 등의 유해균은 단백질, 담즙산 또는 콜레스테롤로부터 유독한 부패성 대사산물을 생성하거나, 장내의 유해효소들을 생산하여 독성물질이나 돌연변이원 들을 생성하여 장 점막과 각종 장기에 손상을 입히며 대장 관련 질병, 면역기능 저하 및 암세포 유발을 초래하는 것으로 알려져 있다.

- 상기의 장내 유해미생물들은 노인과 환자들에서 현저히 증가되는 것으로 나타나 노화 및 면역기능 저하와 관계가 있는 것으로 판단되는 반면, 대표적인 유익균인 *Bifidobacterium*속은 장내에서 유기산과 항생물질을 생산하여 외부 병원균의 성장과 유해균종의 과잉성장을 억제하는 것으로 보고되었다.
- 최근 **Nature**지(Vol.444, 2006)에 발표된 내용에 따르면 장내 세균의 조성이 비만의 원인중 하나로 작용하는 것으로 밝혀짐. 비만 증상을 보인 사람들의 장 속에는 정상인에 비해 유익균의 일종인 *Bacterioidetes*문에 속하는 세균 종이 적고, *Firmicutes*문에 속하는 *Clostridium*, *Eubacterium*, *Peptostreptococcus*, *Desulfotomaculum*, *Veilonella*속 세균이 장내 미생물의 90%를 차지하고 있음이 발견되었고, 이 현상은 쥐를 이용한 동물실험에서도 동일하게 증명되었다.
- 사람의 장내에서 유해균은 감소시키고 유익균은 증가시키기 위한 여러 가지 연구가 이루어졌으나, 장내 유해미생물의 생육 억제를 위하여 담자균류를 조사하는 연구는 아직까지 이루어지지 않았다.
- 인류가 활용하고 있는 대표적 고등균류인 버섯은 분류학상 담자포자를 형성하는 담자균류(*Basidiomycota*)와 자낭포자를 형성하는 자낭균류(*Ascomycota*)로 나뉘며 자연계에서 유기물질을 분해하여 순환하는 organic recycling에 매우 중요한 분해자의 역할을 수행하는 동시에 그 자실체는 기능성 바이오소재로서 식용 및 약용으로 사용되는 고소득 농산물이다.
- 세계적으로 고등균류의 종류는 약 15,000여종으로 추산되며 그 중 식용으로 개발 가능한 것은 약 2,000여종으로 알려져 있으며, 우리나라에서 자생하는 것은 약 1,500여종으로 그 중 330여종이 식용 및 약용으로 분류되고 있으나 실제적으로 이용되고 있는 것은 20여 종이다.
- 식용 및 약용으로 널리 이용되어 온 버섯의 약리효과에 대하여 지금까지 여러 종류의 버섯으로부터 항암효과(Chihara등, 1970; Fukuda등, 1975; Vanisolalo등, 1983; Kawagishi등, 1988), 혈중 콜레스테롤 함량저하 효과(Suzuki와 Oshima, 1976), 및 혈압강하효과(Kabir와 Kimura, 1989)와 이밖에 다양한 약리작용을 나타내는 생리활성물질들에 대한 연구가 광범

위하게 진행되었다.

- 버섯의 2차 대사산물 중 항균물질에 관하여 연구로는 Kavanagh등(1949)과 Bose(1955)에 의하여 담자균류의 항균성분에 대한 연구가 보고된 이래 현재까지 몇몇 제한된 종류의 버섯으로부터 그람 양성 및 음성세균, 효모 또는 곰팡이류에 대한 항균물질에 대하여 연구가 진행되었다.
- Takeuchi등(1969)은 *Coriolus consors* 배양액으로부터 그람 양성세균에 대하여 항균성을 갖는 coriolin을 분리하였으며, Anke등(1977)은 *Cyathus striatus* 균사체로부터 그람 양성 및 그람 음성세균과 불완전균류에 대한 항균물질 striatins A, B, C를 분리하여 이들의 분자식을 비롯한 물리화학적 성질을 밝혔다.
- 세균 및 곰팡이에 대한 항균활성물질로서 *Oudemansiella mucida*중의 oudemansin(Anke등, 1979), *Calvatia cranformis*중의 calvatic acid(Umezawa, 1975), *Agrocybe aegerita*중의 antifungal compounds(Stransky등, 1992), 그리고 *Aleurodiscus mirabilis*중의 aleurodiscal(Lauer와 Anke, 1989)등이 보고되었다.
- 이상에서와 같이 일부 국한된 버섯 종류로부터 항균활성물질의 생물학적 항균력과 그 화학 구조가 밝혀져 있으나, 그 외 대부분의 버섯 중에서 항균활성의 검색 및 구조구명에 대한 연구는 아직 미흡한 실정이다.
- 더욱이 광범위한 버섯종의 인체 장내 미생물중 유해균의 항균효과에 대해서는 그간 연구가 거의 진행되지 않고 있음. 버섯 종은 인간이 오래전부터 섭취해왔으므로 안전성이 확보된 식품으로 다양한 생리활성 효과가 입증되어 있다.
- 버섯의 생산량 증가에 따른 가격 하락으로 인한 버섯산업의 위기를 극복하기 위해서는 새로운 수익모델의 개발을 통한 버섯산업의 고부가가치화가 필요하며 현재의 표고버섯에 집중된 연구에서 벗어나 다양한 버섯류의 생리활성물질을 발견하고 그 물질을 산업화하여 대량 생산하는 연구가 필요하다.

- 균류는 기능성 바이오 소재 혹은 의약품 소재 발굴을 위한 최고의 재료이며 이는 영지버섯, 상황버섯, 차가버섯 등을 포함한 수종의 버섯이 약용으로 사용되고 있는 것으로 입증됨. 또한 인삼, 홍삼, 대추, 갈근, 감초, 오미자, 결명자 등 한방소재등도 다양한 기능을 가진 소재로서 농가 소득증대에 도움을 줄 것으로 기대된다.

- 담자균류는 균사체의 생육 특성상 동일한 생육조건을 유지한다면 동일한 품질의 제품을 대량생산 하는 것이 가능하므로, 그 기반 하에 기능성 생리활성물질을 대량생산하고 산업화한다면 국내 버섯 생산 업계의 지속적 성장에 큰 도움이 될 수 있을 것으로 판단된다.

제 2장 국내외 기술개발 현황

제 1 절 연구개발 대상 기술의 국외 현황

- 담자균류(버섯류)가 항생물질, 항종양물질, 항바이러스물질, 면역조절물질, 혈압조절물질, 혈당조절물질, 콜레스테롤저하물질, 항혈전 물질, 간기능 보호물질, 항소염 물질 등 다양한 생물활성을 나타내는 것을 발견, 기능성 식·의약품 소재로 활용하고 있다.
- 과학적인 근거에 의하여 실제 의약품으로 연구하기 시작한 것은 1970년 초부터이며 버섯류가 생산하는 다당류(polysaccharide)를 항암면역증강제로 개발하여 의약품으로 이용함. 즉 *Coriolus versicolor* CM 101 균주의 배양균사체로부터 Krestin (PSK), *Lentinus edodes*의 자실체로부터 Lentinan, *Schizophyllum commune* 균주의 액내 배양생성물로부터 schizophyllan 등의 다당류 항암면역증강제가 개발되어 현재 시판되고 있다.
- 버섯류는 다양한 항생물질을 생산하는데 항생물질 연구는 1945년 marasmic acid가 보고된 이래 현재까지 약 100여종의 항생물질이 보고됨. 현재 의약용으로 개발된 항생물질은 아직 없으나 strobilurin 계열의 화합물들이 농업용 항생물질로서 개발되었다.
- 버섯류의 생체기능조절물질로서 혈당강하물질 ganoderan 화합물, 콜레스테롤 감소물질 eritadenin, 신경제작용물질 ibodenic acid, lipoxxygenase 저해물질 grifolic acid, 유독물질인 amanitin, phalloidin을 포함한 혈압저하물질, 항혈전 물질 등 많은 다양한 구조의 저분자 생리활성물질들이 보고됨에 따라 천연물 학자들을 중심으로 활발한 연구가 진행되었다.
- 버섯의 β -glucan은 10만 이상의 고분자 물질이면서도 저분자의 생리활성물질들이 갖는 체내 penetration을 보이고 있어 업계에서는 기능성 식품 개발로의 응용 및 의약품 원료로까지 그 연구 분야를 확장하고 있다.

제 2 절 연구개발 대상 기술의 국내 현황

- 버섯에 관한 연구 중 품종 확인, 분류에 대한 연구는 오래전부터 진행되어 왔으며 특히 표고버섯에 대한 연구는 높은 수준이다.
- 버섯의 형질 중 대치배양, 균사 피막형성 유무, 균총 표면의 색 유무, 갓 인피의 유무, 대의 표면색 유무 등을 통한 형질 구분에 관한 연구도 진행되어 있으며, 각종 기능성 식품으로써의 활용방안에 대한 연구도 활발하게 진행되고 있다.
- 제한된 버섯 종으로부터 항균활성물질의 생물학적 항균력과 그 화학구조가 밝혀져 있으며, 1980년대부터 약용버섯 유래의 항암활성물질인 다당체(polysaccharide)를 중심으로 버섯 유래 기능성 바이오 소재 및 한방소재의 연구가 시작되었다.
- 산업계에서는 한국신약, 광동제약, 일양약품 등에서 다당체 항암활성물질을 개발하였는데 한국신약에서 *Phellinus linteus*로부터 meshima, 광동제약에서 *Coprinus versicolor*로부터 copolang이 개발되어 시판되고 있고 일양약품에서는 *Ganoderma applanatum*으로부터 간염 치료 물질을 개발 중이다.
- 국내의 버섯 유래 저분자 생리활성물질에 관한 연구는 한국생명공학연구원의 연구팀에 의하여 주도되어 왔으며 그 결과 조개껍질버섯(*Lenzites betulina*) 및 금빛시루뽀버섯(*Inonotus xeranticus*)으로부터 각각 강력한 지질과산화 저해 항산화 화합물인 betulinan A, B 및 inoscavin A를, 두엄먹물버섯(*Coprinus atramentarium* ASI 20013)의 균사체 배양액으로부터 항균항생물질인 신규 illudin계열 화합물 illudin C₂ 및 C₃를, 우단버섯(*Paxillus curtisii*)과 은행잎우단버섯 (*Paxillus panuoides*)로부터 강력한 신규 terphenyl 계열 항산화 화합물인 curtisians A~D 및 leucomentin 화합물을, 젓비단그물버섯(*Suillus granulatus*)으로부터 결장암 세포주, 피부암 세포주에 선택적으로 세포독성을 나타내는 새로운 형태의 화합물격을 지닌 suillusin을 분리, 보고함. 또한 한방소재들이 다양한 생리활성을 나타냄이 다수 보고되었다.

- 이상에서와 같이 일부 국한된 버섯 종류로부터 생리활성물질에 대한 연구가 진행되고 있으나 그 외 대부분의 버섯 중에서 항균활성의 검색 및 구조 구명에 대한 연구는 아직 미흡한 실정이며, 버섯종의 생리활성물질이 인체 장내 미생물군총의 구성에 미치는 영향에 대한 연구는 거의 전무한 실정이다.
- 담자균류의 생리활성 물질에 대한 탐색/선발, 균사체의 대량배양, 생리활성물질 추출 및 대량 생산, 산업화 같은 실질적인 버섯산업에 영향을 미칠 수 있는 연구도 매우 미흡하다.
- 본 연구팀에서는 광범위한 담자균류에 대하여 장내 유해미생물에 대한 생육저해 최소농도 측정 방법(*in vitro* MIC test)을 이용한 항균성 분석, 동물실험을 통한 생리활성물질 효과 측정, 생리활성 물질 추출 분리, 균사체 배양 기술, 생리활성물질에 대한 마이크로/마이크로 캡슐화 기술 등을 기 확보하고 있으므로, 버섯산업의 고부가가치화에 기여하고 신개념 건강 기능식품소재를 이용하는 몇 가지 형태의 가공식품의 제조 기술 확립이 가능할 것으로 판단된다.

제 3 절 연구개발대상 기술에 관련된 국내외 연구현황

[버섯의 항균력에 관한 연구]

연구수행 기관	연구개발의 내용	연구개발성과의 활용현황
제주대학교 외	감귤농축액 첨가배지에서 배양한 버섯균사체 추출물의 항균활성 및 항산화활성 비교	감귤농축액에 의한 버섯의 항균성 및 항산화성 기능성 소재 개발
동국대학교	버섯 추출물이 인체 병원성 균에 미치는 항균활성의 특성	항균활성 버섯 추출물 소재 개발
순천대학교 광주보건대학	표고버섯(<i>Lentinus edodes</i>)추출물의 항균활성	식이 버섯의 항균성 소재의 개발 가능
동국대학교	버섯 중 항균물질의 검색 및 개발에 관한 연구 - 그람음성균 및 곰팡이에 대한 항균물질의 검색	다양한 항균물질의 탐색 및 식품 소재 가능성 제시
동국대학교	버섯중 항균물질의 검색 및 개발에 관한 연구 - 버섯중 항진균활성 물질의 검색	항진균물질 소재 개발 가능

[버섯 균사체 배양 관련 연구]

연구수행 기관	연구개발의 내용	연구개발성과의 활용현황
단국대학교	건강식품 소재화를 위한 신령버섯 균사체의 배양조건 최적화	균사체 배양 조건의 향상에 따른 건강식품 소재로서의 적용 가능
임업연구원	간버섯과 주걱간버섯의 배양특성	각각의 버섯 배양 특성 분석으로 버섯 생산 향상
동의대학교 창원대학교	버섯 균사체 배양에 의한 혈전용해효소 생산 조건의 검토	혈전용해효소 제품의 생산 가능
환인제약 외	<i>Phellinus linteus</i> WI - 001 균사체의 고밀도 배양을 위한 배양학적 특성 연구	<i>Phellinus linteus</i> 균사체의 대량 생산 가능
대구대학교 영남대학교	천연물을 이용한 담자균의 균사체 배양	천연물 함유 담자균 균사체의 배양 방법 확립
연세대학교 강원대학교	Air - lift Fermenter System 을 이용한 <i>Ganoderma lucidum</i> 균사체의 심부배양에 의한 세포외 다당류의 생산 조건	다당류 생산조건 확립에 따른 균사체 소재로서 적용 가능
영남대학교 대구대학교 대구공업대학	화학합성배지 및 곡물을 이용한 <i>Phellinus iginiarius</i> 의 균사체 배양조건	균사체 소재로서 적용 가능
충북대학교 산학협력단 (누리사업)	담자균류를 이용한 전통식품의 개발 및 산업화	담자균류 전통식품의 개발 가능

- 2000년대부터 버섯의 기능에 대한 다양한 연구가 시작되었음. 즉 린테우스균 상황버섯, 차가버섯추출물 등의 기능성에 대한 연구 및 건강기능성 식품으로의 연구가 그것이다. 천연의 약용버섯을 이용한 항암활성 등 기능성 바이오소재로의 연구는 1980년대부터 시작되었다.
- 국내의 주요 중소기업으로는 (주)바이오알앤즈(<http://www.biornds.co.kr>), 하나바이오텍(주) (<http://www.hanabiotech.co.kr>), (주)하나팜리드(<http://www.hplead.co.kr>), (주)더멋진바이오텍(<http://www.dmjbio.com>)등의 기업들이 수입대체를 위하여 제품개발에 열중하고 있다.
- 중대형 업체로는 한국신약, 광동제약, 일양약품 등에서 다당체 항암활성물질을 개발하여 의약품으로 시판되고는 있으나, 식품에 적용된 사례는 없는 실정이다.
- 특히 보존성을 위한 연구와 상업적으로 경쟁력 있는 대량배양기술에 의한 생산 및 제품 등 산업적으로 가치 있는 제형화 기술은 확보되어 있지 않다.
- 버섯의 배양 중 분비되거나 균사체내에 존재하는 생리활성물질에 대한 연구는 오래전부터 진행되어 왔으나, 이러한 담자균류 구성 물질이 인체 장내 유해미생물 생육에 미치는 영향과 균사체 배양 방법을 이용하여 기능성식품을 제품화하는 연구는 전무하다.

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 1 절 장내 유해미생물 생육 억제를 위한 담자균류 탐색 및 선발

1. 장내 유해 미생물의 생육 저해를 위한 다양한 담자 균류 탐색

본 실험에 사용하기 위한 담자 균류는 지금까지 약용으로 이용되는 담자 균류들과 식용으로 이용되는 담자 균류들 중 15종을 탐색하였고 각 담자 균류들에 대한 효능 및 이용은 Table 1-1에 정리 하였다.

Table 1-1. 장내 유해 미생물 생육 제어를 위한 다양한 담자 균류 소재

담자 균류 소재	효능 및 이용	비고
느타리 버섯	항암 효과	박무현, 한국식품과학회지, 1998
애느타리 버섯	식용	
양송이 버섯	식용	
팽이 버섯	다양한 약리 작용	한서영, 한국식품과학회지, 2003
영지 버섯	영지 버섯 다당체의 항 미생물 작용 및 항암 작용	김성한, 한국식품영양과학회지, 1998
백만송이 버섯	식용	
두송이 버섯	식용	
맛느타리	식용	
표고 버섯	표고 버섯 균사체로부터 추출한 단백질 다당체의 항암 효과	이병우, 한국식품과학회지, 1998
해송이 버섯	해송이 버섯 열수 추출물의 항산화 효과	서효매, 한국식품영양과학회지, 2007
새송이 버섯	노화 억제와 항암 작용	고진복, 한국식품영양과학회지, 2005
석이 버섯	석이 버섯 용매 추출물의 항산화 및 아질산염 소거 효과	정은재, 한국식품영양과학회지, 1998
목이 버섯	항암 효과	이송애, 한국균학회지, 1981
흰구름 버섯	항암 성분의 면역 촉진 효과	심미자, 한국균학회지, 1980
황금꽃 버섯	식용	

2. 장내 유해 및 유익 균주에 대한 생육 활성 조절 능력을 가진 담자 균류 소재의 선발

가. 실험재료

(1) 담자 균류 소재

본 연구에서 사용하고자 하는 담자균류는 식용버섯의 경우 흠에버 청주점에서 구입하였고 약용버섯의 경우 제천 약초 시장에서 구입하여 사용하였다.

(2) 균주

본 연구에 사용된 장내 유해 균주는 *Eubacterium. limosum* KCTC 3326이고 장내 유익 균주는 *Bacteroides fragilis* KCTC 3688이며, 이 균주들은 생물 자원센터(BRC)에서 분양받아 9ml Reinforced Clostridial Medium(DIFCO)에 접종하고 혐기조정장치를 이용하여 혐기 조건을 만들어주고 37℃에서 24시간 혐기 배양하여 사용하였다. 그리고 혐기 배양 장치는 Fig. 1-1에 나타내었다.

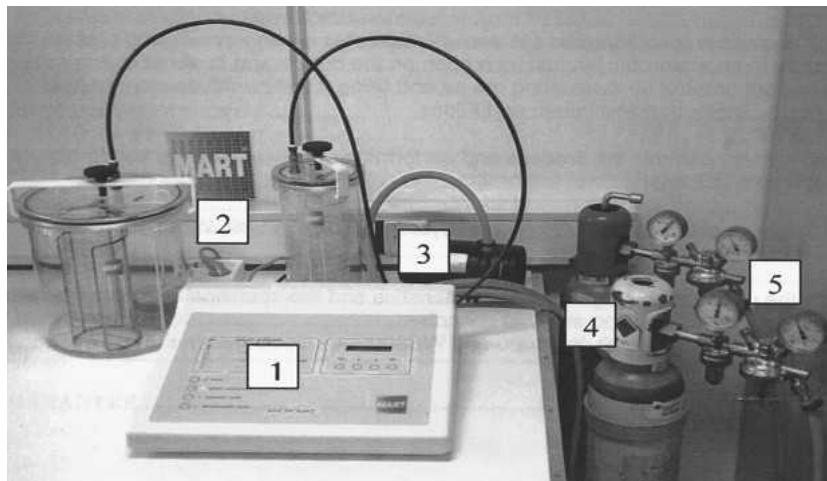


Fig. 1-1. Anoxomat system WS8080

- ①. Anoxomat WS-Model
- ②. Mart Jars
- ③. Vacuum pump
- ④. Gases
- ⑤. Reducing valves(1.8 bar)

(3) 시료 추출 및 농축

버섯 균사체로부터 유용성분을 추출하기 위한 추출방법은 배양액을 filter paper(advantec No.2)로 여과하여 균사체와 배양여액을 분리하였다. 균사체는 상압가열건조방법으로 80℃에서 12시간 건조하고 blender (HALLDE MASKINER, Sweden)로 분쇄 후 균사체 10 g에 추출용매인 80% 에탄올과 증류수 200 mL을 각각 첨가하여 shaking incubator(SI-300R, Lab. Companion)을 이용하여 60℃에서 200 rpm에서 3시간 추출한 후 원심분리(대용량원심분리기, 한일 model Union55R, 3000 rpm, 10분)하여 상등액을 1 mL씩 eppendorf tube에 분주하여 회전진공증발기 speed vac (SC110A, Thromo Electron Co.)을 이용하여 농축하였다. 자실체도 균사체 추출 및 농축 방법과 동일한 방법으로 추출 및 농축하였다. 또한 배양여액은 그대로 농축하여 실험에 사용하였다.

나. 실험 방법

각각의 버섯 추출물의 항균력 및 최소저해농도를 비교 분석하기 위해 먼저 96 well plate에 RCM broth 100 μ l를 분주하였고, 각 버섯의 80%에탄올 및 열수 추출물을 30% DMSO로 녹인 버섯 시료를 100 μ l를 분주한 다음 10-fold dilution법으로 각각의 버섯 시료를 희석하였다. 그리고 준비된 well에 10³ CFU/mL의 균들이 배양된 RCM broth 100 μ l를 첨가하고 37℃에서 *Bacteroides fragilis* KCTC 3688은 24시간 *Eubacterium limosum* KCTC 3326은 36시간동안 혐기배양 하였으며, 버섯 시료를 첨가하지 않고 균주를 접종하여 positive control로 이용하였고, 버섯 시료를 첨가하였지만 균주를 접종하지 않은 well을 negative control로 이용하였다. 각각의 배양된 균주 시육은 650nm에서 흡광도를 이용하여 측정하였으며, 각각의 흡광도는 positive 및 negative control의 흡광도와 각각의 담자 균류에 추출물의 흡광도 측정값을 통하여 측정하여 아래 식을 이용하여 통하여 아래 미생물 생육 조절에 대한 항균력을 비교 측정하였다.

Inhibitory effect(%)

$$= \{1 - (24 \text{ hr sample} - 0 \text{ hr sample blank}) / (\text{control} - \text{control blank})\} \times 100$$

다. 실험 결과

시중에서 구입할 수 있는 담자 균류 소재중에서 장내 유해균인 *Eubacterium limosum* KCTC 3266를 억제하고 유익균인 *Bacteroides fragilis* KCTC 3688를 증진시키는 소재를 선발

하기 위해 분석한 결과는 Fig. 1-2와 Fig. 1-3와 같다. 석이, 상황 버섯의 80% 에탄올 자실체 추출물과 영지 버섯 열수 추출물은 *Eubacterium limosum* KCTC 3266에 대하여 80%이상의 높은 항균력을 나타내었으나 유익균인 *Bacteroides fragilis* KCTC 3688에 대한 생육에는 영향을 미치지 못했다. 또한 운지버섯은 장내 유해균인 *Eubacterium limosum* KCTC 3266의 생육에는 영향을 미치지 못했지만 *Bacteroides fragilis* KCTC 3688를 60%이상 증진시켰고, 상황, 전복느타리, 팽이 버섯도 장내 유해균인 *Eubacterium limosum* KCTC 3266의 생육에는 영향을 미치지 못했지만 *Bacteroides fragilis* KCTC 3688를 증진시켰다. 따라서, 본 결과를 통하여 장내 유해 균주와 유익 균주에 대한 생육 조절을 위한 담자 균류 소재로서 석이 버섯, 상황 버섯과 장내 유해균인 *Eubacterium limosum* KCTC 3266의 생육에는 영향을 미치지 못했지만 본 실험에 장내 유익균으로 사용한 *Bacteroides fragilis* KCTC 3688을 증진 시킨 운지 버섯을 선발하였다.

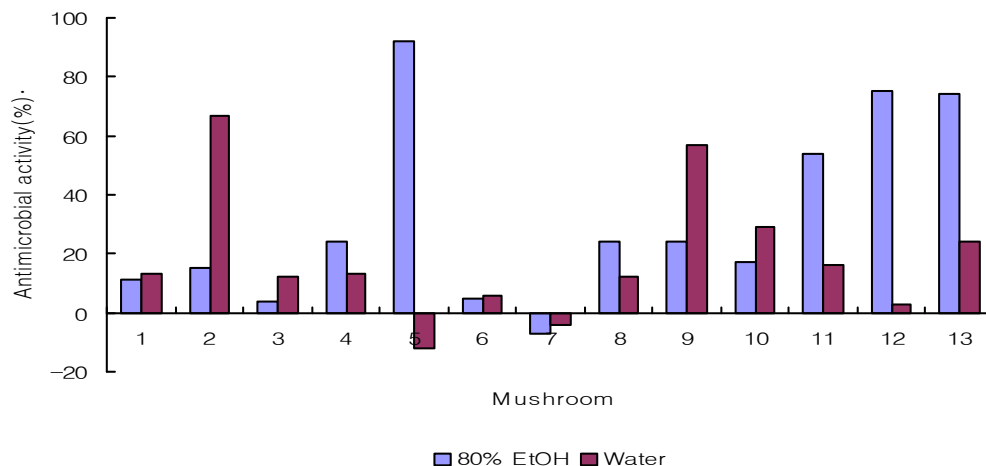


Figure 1-2. Antimicrobial activity of edible mushroom extracts against *Eubacterium limosum* KCTC 3266
 1. *Esculanta Agaricuss subfunereus*. 2. *Ganoderma lucidum* 3. *Pleurotus osteratus* 4. *Pyrophyllum shimegi* 5. *Umbilicaria esculenta* 6. *Sparassis crispa* 7. *Coriolus versicolor* 8. *Tremella fuciformis* 9. *Agrocybe aegerita* 10. *Agaricus bisporus* 11. *phellinus linteus* 12. *Lentinus edodes* 13. *Flammulina velutipes*

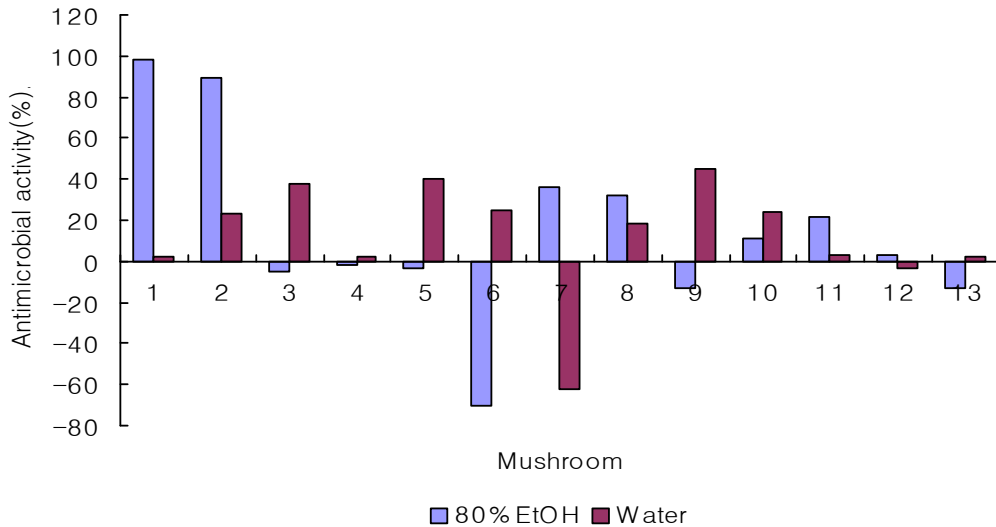


Figure 1-3. Antimicrobial activity of edible mushroom extracts against *Bacteroides fragilis* KCTC 3688
 1. *Esculanta Agaricuss subfunereus*. 2. *Ganoderma lucidum* 3. *Pleurotus osteratus* 4. *Pyrophyllum shimegi* 5. *Umbilicaria esculenta* 6. *Sparassis crispa* 7. *Coriolus versicolor* 8. *Tremella fuciformis* 9. *Agrocybe aegerita* 10. *Agaricus bisporus* 11. *phellinus linteus* 12. *Lentinus edodes* 13. *Flammulina velutipes*

3. 선발된 석이버섯의 80% 에탄올 추출물에 대한 paper disc method를 이용한 장내 유해 미생물 억제 실험

가. 사용 균주

본 실험에 사용한 균주는 *Eubaeterium limosum* KCTC 3326, *Clostridium perfringens* KCTC 5100, *Clostridium paraputrificum* KCTC 5331, *Clostridium difficile* KCTC 5009, 를 사용하였다.

나. 실험 방법

한천배지확산법(Disc plate method)으로 선발된 소재 중 석이버섯 80% 에탄올 추출물에 대한 항균력을 측정하였다. 균기전 상태의 Reinforced Clostridial Medium(RCM,Difco) agar 에 37℃에서 24시간 배양된 균액을 1 % 접종하고 배지와 시험균액을 고루 섞이게 한 후 petri dish에 약 15 mL 씩 분주하여다. 균이 접종된 RCM agar에 지름 8 mm의 멸균된 filter paper disc(ADVANTEC 8 mm, Toyo Roshi Kaisha, Ltd, Japan)에 추출액(500 mg/mL) 30 μ l을 흡수시킨 후, 평판배지위에 밀착시키고 37℃에서 48시간 배양 후 filter

paper disc 주변에 발생하는, 생육저해환에 대한 clear zone의 직경을 측정하여 생육 저해환 유무를 확인하였다.

다. 실험 결과

장내 미생물 생육 조절을 위한 담자 균류 탐색을 통하여 선발된 소재인 석이버섯 80% 에탄올 추출물이 4균주에 대한 항균력을 측정한 결과는 Table 1-2와 같다. 석이버섯 80% 에탄올 추출물은 특히 *Clostridium* spp. 3종에 대하여 높은 항균력을 보였고 *Eubacterium limosum* KCTC 3266에 대해서도 항균력을 나타내었다.

Table 1-2. Antimicrobial activity of 80% EtOH extract on *Umbilicaria esculenta* against microorganisms

Microorganism ¹⁾	Clear zone(mm) ²⁾
<i>Eubacterium limosum</i> KCTC 3326	13
<i>Clostridium perfringens</i> KCTC 5100	15
<i>Clostridium paraputrificum</i> KCTC 5331	17
<i>Clostridium difficile</i> KCTC 5009	14

¹⁾ Final cell concentration for each bacterium was approximately 1.0×10^6 cfu/mL

²⁾ 500 mg/mL of extract was absorbed into paper disc ($\varnothing 8$ mm) and diameter of clear zone was measured.

4. 선발된 석이 버섯추출물 항균력에 대한 pH 및 열 안정성 실험

가. 사용 균주

본 실험에 사용한 균주는 *Eubacterium limosum* KCTC 3266와 *Clostridium perfringens* KCTC 5100를 사용하였다

나. 실험 방법

열 안정성 실험은 80℃, 100℃에서 10분, 미생물 살균 조건인 121℃에서 15분 열처리 후 대 조구와 같이 한천배지 확산법으로 생육저해환을 측정하여 비교하였다. pH의 안정성 실험은 pH 2, 4, 8로 0.1N NaOH와 0.1N HCl를 사용하여 조정한 후 실온에서 1시간 방치한 후, 증

화시켜 대조구와 같이 한천배지확산법으로 생육저해환을 측정하여 비교하였다. 이때 사용한 시료원액의 농도는 500 mg/mL이었다.

다. 실험 결과

석이버섯 80% 에탄올 추출물의 pH에 대한 안정성을 살펴본 결과는 Fig 1-4와 같다. 시료를 pH 2, 4, 8 으로 조정한 후 실온에서 1시간 방치하고 증화시켜 항균력을 살펴본 결과 산성 또는 pH 4, 8에서는 활성을 잃어버리지 않았으나 pH 2에서는 어느정도 항균활성이 pH 4, 8 보다 실패 되는 현상을 나타내었다. 석이버섯 80% 에탄올 추출물의 열에 대한 안정성을 살펴본 결과는 Fig 1-5와 같다. 80℃, 100℃에서 10분, 121℃에서 15분 열처리하여 시료로 사용한 경우의 항균력은 열처리하지 않은 대조구의 항균력에 비해 항균력이 감소하지 않은 결과로 나타나 매우 높은 열안정성을 나타내었다.



Figure 1-4. pH Stability of the antimicrobial activity of *Umbilicaria esculenta* 80% EtOH extract for *Eubaeterium limosum* KCTC 3266

①: 0.1N NaOH ②: 0.1N HCl ③: pH 8 ④: pH 4 ⑤: pH 2

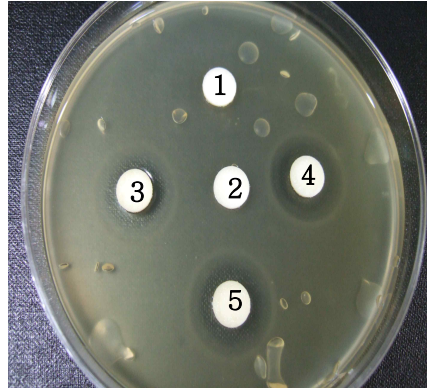


Figure 1-5. Heat Stability of the antimicrobial activity of *Umbilicaria esculenta* 80% EtOH extract for *Eubaeterium limosum* KCTC 3266

①: not temperature treatment

②: 80% EtOH ③: 121°C, 15분 ④: 100°C, 10분 ⑤: 80°C, 10분

5. 선발된 석이 버섯추출물에 대한 최소 저해 농도(MIC) 분석

가. 사용 균주

본 실험에 사용한 균주는 *Eubaeterium limosum* KCTC 3266와 *Clostridium perfringens* KCTC 5100를 사용하였다

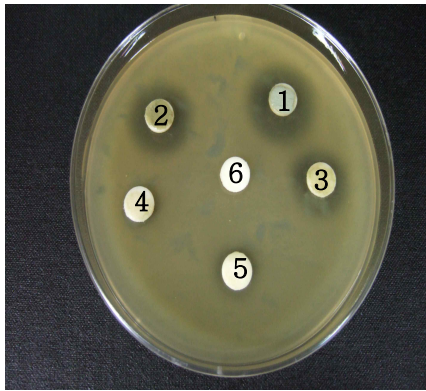
나. 연구 방법

석이버섯 자실체 80% EtOH에 대한 최소 저해농도 측정은 한천배지 확산법과 동일한 방법으로 실험하였다. 사용한 시료액의 농도는 500 mg/mL, 100 mg/mL, 50 mg/mL, 25 mg/mL, 12.5 mg/mL이었다. MIC는 생육저해환이 나타나지 않는 최소농도로 결정하였다.

다. 연구 결과

항균력 검색에서 항균력이 높은 석이버섯 80% 에탄올 추출물의 최소저해 농도를 측정한 결과 Fig 1-6과 같다. 300 mg/mL, 100 mg/mL, 50 mg/mL, 25 mg/mL, 12.5 mg/mL로 희석한 것을 시료로 하여 *Eubaeterium limosum* KCTC 3266와 *Clostridium perfringens* KCTC 5100에 대한 MIC를 구한 결과 *Eubaeterium limosum* KCTC 3266에 대해서는 300 mg/mL, 100

mg/mL, 25 mg/mL에서 항균력을 보였고, *Clostridium perfringens* KCTC 5100도 동일하였다.



Eubaeterium limosum KCTC 3266



Clostridium perfringens KCTC 5100

Figure 1-6. Antimicrobial activity of *Umbilicaria esculenta* 80% EtOH extract against microorganism

①: 300 mg/ml ②: 100 mg/ml ③: 50 mg/ml ④: 25 mg/ml ⑤: 12.5 mg/ml ⑥: 80% EtOH

6. 생육증진

가. 실험 균주

본 실험에 사용한 균주는 *Bacteroides fragilis* KCTC 3688를 사용하였다

나. 실험 방법

Reinforced Clostridial Medium(RCM, Difco) broth 9 mL에 *Bacteroides fragilis* KCTC 3688(37 °C에서 24시간 전 배양한 균 O·D값 0.1) 균 액을 0.5 mL 분주한 후 시료를 1 mL 혼합하였다. 대조구로는 시료대신 증류수를 1 mL 혼합하여 37°C에서 36시간 배양하면서 일정시간 간격으로 시료를 채취하여 650 nm에서 흡광도를 측정하였다. 또한 대수기에서 시료를 채취하여 균수를 측정하여 대조구와 비교하였다.

다. 실험 결과

항균력 시험에서 장내 유익균인 *Bacteroides fragilis* KCTC 3688의 생육을 증진시킨 운지버섯 자실체를 균사체 배양을 통해 액체 배양 시 생육특성에 미치는 영향을 Fig 1-7과 Fig 1-8에 나타내었다. 운지버섯 균사체 열수 추출물이 80% 에탄올 추출물보다

Bacteroides fragilis KCTC 3688의 생육을 증진시키는 것을 보았고, 이를 바탕으로 운지 균사체의 농도를 200, 100, 50, 25, 12.5 mg/mL 로 희석하여 실험한 결과 200, 100 mg/mL 농도의 시료는 대수기에 도달하는 시간이 다소 늦었지만 모든 농도에서 대조구 보다 높은 흡광도 값을 나타내어 *Bacteroides fragilis* KCTC 3688의 생육을 증진시켰다. 또한 대수기에서 운지버섯 균사체 열수 추출물의 경우 총균수가 2.6×10^8 CFU/mL이고 대조구의 경우는 2.1×10^8 CFU/mL였다.

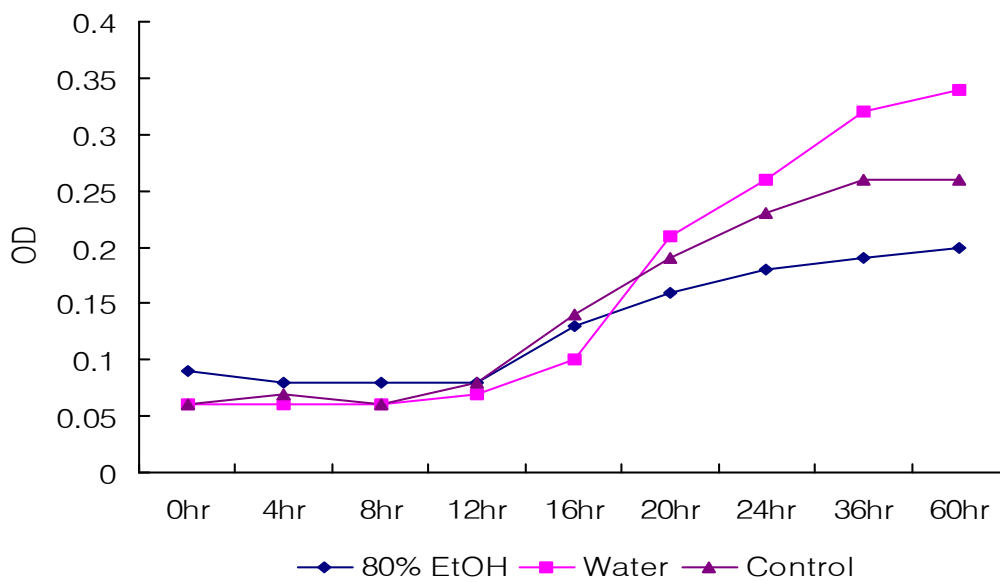
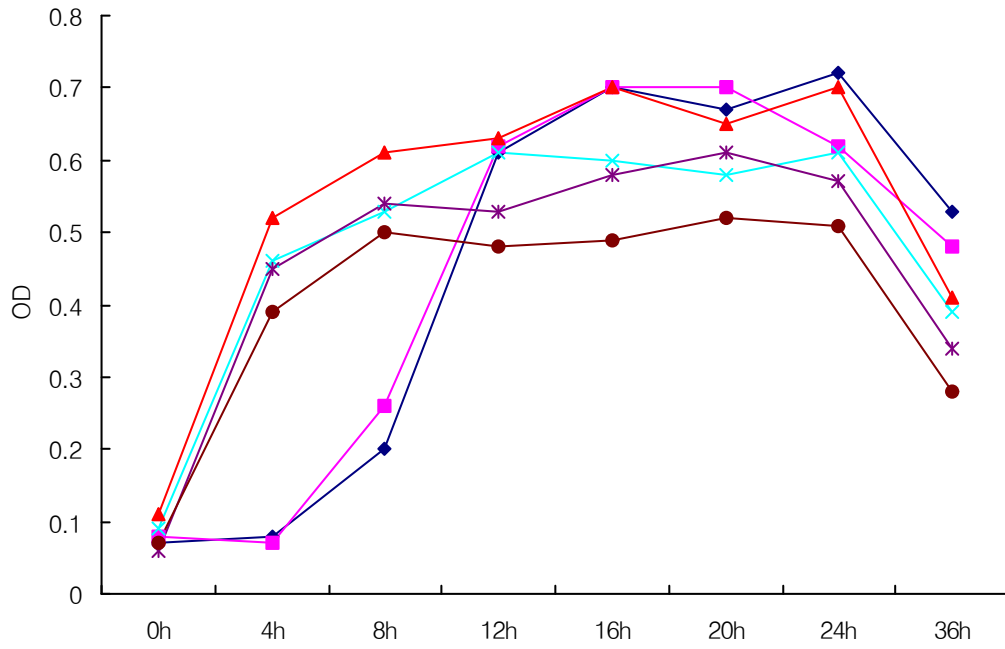


Figure 1-7. Effect of *Coriolus versicolor* mycelium extracts on *Bacteroides fragilis* KCTC 3688



◆ 200mg/ml ■ 100mg/ml ▲ 50mg/ml × 25mg/ml * 12.5mg/ml ● control

Figure 1-8. Effect of *Coriolus versicolor* mycelium water extracts on *Bacteroides fragilis* KCTC 3688

제 2 절 선별 담자군류에 의한 실험동물의 장내 균총 및 생리 활성 분석

1. 동물 실험

가. 실험동물의 식이 및 사육

(주)중앙실험동물의 Sprague-Dawley(120~140 g)계 수컷 Rat을 대상으로 하고, 일반식이군(Control 1), 고지방식이군(Control 2), 고지방식이 +석이버섯 80% EtOH 추출물군 및 고지방식이 + 운지버섯 균사체 열수 추출물군으로 분류하여 각 군당 8마리씩 1주간 일반식으로 적응기간을 거친 후 6주 동안 석이버섯 80% EtOH 추출물과 운지버섯 균사체 열수 추출물을 1일 1회 경구투여 사육하고 실험에 사용하였다.

나. 체중 측정 및 장내 균총 변화와 생리활성 분석

체중은 주2회 측정하였고, 실험종료일에 20시간 절식시킨 실험동물을 ethyl ether로 마취하여 개복한 후 장내균총의 변화는 맹장 취한 후 0.85% NaCl 희석액에 넣어 균질화하고 미쓰오카 방법에 따라 실험하였고 각 군 특성에 맞는 배지와 배양방법에 따라 배양하였다.(Table 2-1) 배지에 나타난 집락들에 대하여 Mitsuoka의 방법에 따라 집락 모양과 균의 형태 등을 조사함으로써 속(genus)을 동정하였고 각각의 균수를 측정하여 장내균총 변화를 확인하였다. 생리 활성 분석은 심장에서 채혈하였고, 혈액은 실온에서 30분간 두었다가 3,000 rpm에서 20분간 원심 분리하여 혈청을 분리한 후 즉시 혈액 분석에 사용하였다. 간과 부고환 지방을 채혈 후 즉시 떼어 생리식염수로 혈액을 씻은 다음 무게를 측정하였다. 혈청의 중성지질과 총 콜레스테롤 농도는 WAKO kit 시약(JAPAN)을 사용하였고, HDL-콜레스테롤과 LDL-콜레스테롤 농도는 DAIICHI kit 시약(JAPAN)으로 측정하였고 분석기기(HITACHI7080, JAPAN)를 사용하였다.

Table 2-1. Characteristics of culture media and conditions of incubation

Used media	Major bacteria forming colonies	Culture condition	Dilution (log10)	Incubation time(hr)
Enrichment				
BL	Strictly anaerobic bacteria	Anaerobic	6,7,8	48
TS	Aerobic bacteria	Aerobic	6,7,8	48
Selective & Differential				
DHL	<i>Enterobacteriaceae</i>	Aerobic	2,4,6,8	24
P	<i>Yeast</i>	Aerobic	2,4,6,8	24
BS	<i>Bifidobacterium</i>	Anaerobic	2,4,6,8	48
PEES	<i>Staphylococcus</i>	Anaerobic	2,4,6,8	48
NN	<i>Clostridium</i>	Anaerobic	2,4,6,8	48

다. 실험 결과

(1) 장내 균총 및 장내 유해 미생물 균총 변화

석이버섯이 장내세균총에 미치는 영향은 *Bifidobacterium* spp를 상당히 증가시켰고, *Clostridium* spp와 *Eubacterium* spp를 억제시켰다. 운지버섯 균사체의 경우는 *Bifidobacterium* spp와 *Bacteroidaceae*를 증가시켰다.(Table 2-2)

Table 2-2. Analysis of intestinal microflora in the rats fed with the *Basidiomycota* extracts by Mitsuoka method

Microorganisms	Group ¹⁾ (CFU/mL)			
	Normal	High fat	EC	CV
<i>Enterobacteriaceca</i>	1.3×10 ⁷	4.2×10 ⁸	2.7×10 ⁶	4.8×10 ⁶
<i>Bifidobacterium</i>	4.1×10 ⁸	4.0×10 ⁸	5.2×10 ¹¹	5.7×10 ⁶
<i>Clostridium</i>	6.8×10 ⁷	8.5×10 ⁸	8.8×10 ⁶	5.0×10 ⁷
<i>Staphylococcus</i>	1.0×10 ⁸	2.1×10 ⁷	8.8×10 ⁴	3.3×10 ⁴
<i>Eubacterium</i>	1.9×10 ⁶	2.5×10 ⁸	1.0×10 ⁶	1.9×10 ⁶
<i>Bacteroidaceae</i>	2.9×10 ⁷	3.6×10 ⁸	3.6×10 ⁸	3.9×10 ⁶
<i>Yeast</i>	2.8×10 ⁸	2.9×10 ⁸	6.3×10 ⁶	1.3×10 ⁶

¹⁾Normal = normal diet group, High fat = High fat diet group, EC = 80% extract on *Gyrophora Esculanta*, CV = Water extract on *Coriolus versicolor*

(2) 장내 생리활성 변화 분석

석이버섯 80% 에탄올 추출물과 운지버섯 균사체의 열수 추출물을 6주간 급여한 결과 실험 동물의 체중증가량, 부고환지방의 무게는 Table 2-3과 같다. 체중증가량은 일반식이와 고지방 식이군에 비하여 증가하였고 부고환 지방의 무게 또한 증가하였지만 유의적 차이는 나타나지 않았다. 보고서에 의하면 8주령의 흰쥐에 고콜레스테롤식이로 6주간 사육한바 정상군에 비하여 간과 부고환지방의 무게가 유의하게 증가하여 비대 되었다고 하였다. 본 실험결과도 고지방식이를 섭취한 쥐에 석이버섯과 운지버섯을 급여하여도 지방이 축적되어 부고환지방이 비대해진 것으로 보아 석이버섯과 운지버섯이 체중 감소에 영향을 주지 않고 부고환지방의 지방 축적을 억제하지는 못하는 것으로 나타났다. 혈청의 지질농도는 Table 2-4와 같다. 석이버섯의 경우 혈청의 총 콜레스테롤, HDL-콜레스테롤, TG 농도는 고지방식이군에 비해 증가하였고, LDL-콜레스테롤은 유의하게 감소하였다. 또한 운지버섯의 경우 혈청의 총 콜레스테롤, HDL-콜레스테롤, TG 농도는 고지방식이군에 비해 다소 감소하였고, LDL-콜레스테롤은 고지방식이군과 비슷한 경향으로 나타났다.

Table 2-3. The body weight gain, food intake and organ weights of the rats fed with the Basidiomycota extracts for six weeks

Groups ¹⁾	Weight gains (g)			
	Initial	Final	Gains	Kidney
Normal	222.83±7.22 ^{2)NS}	347.66±6.56 ^{NS3)}	124.83±6.88 ^{NS}	6.14±1.50 ^{NS}
High fat	230.50±3.72	368.83±9.70	138.33±6.71	8.93±1.06
EC	238.33±8.31	390.16±23.47	151.83±15.89	11.69±2.53
CV	232.62±9.23	398.16±25.02	165.54±17.13	10.74±1.30

¹⁾Normal = normal diet group, High fat = High fat diet group, EC = 80% extract on *Gyrophora Esculanta*, CV = Water extract on *Coriolus versicolor*

²⁾All values are mean±SD (n=8)

³⁾Not significant

Table 2-4. The serum cholesterol concentrations of the rats fed with the Basidiomycota extracts for six weeks

Groups ¹⁾	Serum (mg/dL)			
	T-CHO	HDL-C	LDL-C	TG
Normal	66.25±4.58 ^{2)NS3)}	28.11±0.73 ^a	5.68±2.95 ^b	82.98±18.58 ^a
High fat	63.06±3.19	24.05±1.40 ^b	11.16±3.15 ^a	51.75±19.06 ^b
EC	66.26±13.33	25.05±3.18 ^b	9.21±6.47 ^{ab}	70.58±14.23 ^a
CV	61.48±5.86	22.80±3.21 ^b	12.68±2.08 ^a	41.35±5.70 ^b

¹⁾Normal = normal diet group, High fat = High fat diet group, EC = 80% extract on *Gyrophora Esculanta*,

CV = Water extract on *Coriolus versicolor*, ²⁾All values are mean±SD (n=8) ³⁾Not significant

^{a,b}Values within a column with different superscripts letters are significantly different at p<0.05

2. 선발된 담자균류 추출물의 생리활성물질의 분석

가. 총 폴리페놀 함량 및 항산화력 측정

(1) 실험 방법

총 폴리페놀 화합물의 함량은 Folin-Denis법으로 측정하였다. 각 추출액을 100 µg/mL에 알칼리 조건을 형성하기 위해 2% Na₂CO₃ 용액 2 mL를 가한 후 3분 방치하여 50% Folin-Ciocalteu's phenol reagent(Sigma) 100 µL를 가하였다. 30분 후 반응액의 흡광도 값을 720 nm에서 측정하였고 표준물질로 0.1% gallic acid(Sigma Chemical Co., USA)를 사용하였고 추출물의 총 폴리페놀 함량은 mg gallic acid equivalent per 100 g sample로 나타내었다. ABTS 측정은 7.4 mM ABTS 용액과 2.6 mM과 황산칼륨을 혼합하여 암소에서 약 15시간 반응시킨 후 414 nm에서 흡광도가 1.5가 되도록 희석하였다. 희석한 용액 3 mL에 각 농도별로 조제한 시료 150 µL를 첨가하여 vortex mixer로 초간 진탕하고 실온에 90분간 방치한 다음 414 nm에서 흡광도를 측정하였다. 한편, ascorbic acid를 시료와 같은 농도로 조제하여 동일한 방법으로 흡광도를 측정함으로써 비교하였다. 양이온 소거능은 RAEAC(relative ascorbic acid equivalent antioxidant capacity)로 나타내었으며, 이는 ascorbic acid의 소거능을 1.000으로 하였을 때 동일 농도 시료의 ABTS 양이온 소거능을 나타내는 것으로 다음과 같은 식에 의해 계산하였다.

$$\text{RAEAC} = \frac{C_{aa}}{\Delta A_{aa}} \times \frac{\Delta A_s}{C_s}$$

ΔA_{aa} : ascorbic acid를 넣었을 때의 흡광도의 변화

C_{aa} : ascorbic acid의 농도

ΔA_s : 시료를 넣었을 때의 흡광도의 변화

C_s : 시료의 농도

(2) 연구 결과

석이버섯과 운지버섯 자실체, 균사체의 추출 용매 별 총 폴리페놀 함량은 시료 100g에 해당하는 항산화물질을 mg 수준으로 Table 2-5에 나타내었다. Gallic acid를 표준물질로 하여 Folin-Ciocateu assay에 의해 시행하였다. 석이버섯의 80%에탄올 추출물은 423.51 mg/100g였고, 열수 추출물은 368.56 mg/100g으로 80%에탄올 추출물이 더 높았다. 운지버섯 자실체 80%에탄올 추출과 열수 추출물은 각각 45.99 mg/100g, 51.08 mg/100g로 열수추출물이 더 높았고, 운지버섯 균사체의 경우는 80% 에탄올 추출과 열수 추출물에서 각각 13.83mg/100g, 3.48mg/100g로 운지버섯 자실체와는 반대로 80% 에탄올 추출에서 더 높은 폴리페놀함량을 보였다. 또한 운지버섯 균사체 배양액의 경우는 7.99 mg/100g로 운지버섯 균사체 열수 추출물보다는 높았다. 위와 동일한 시료의 추출 용매 별 총 항산화력을 측정한 결과는 Table 2-6와 같다. 시료 100g에 해당하는 석이버섯의 80% 에탄올 추출물과 열수 추출물의 총 항산화력은 각각 1595.85mg AA eq/100g, 1124.73 mg AA eq/100g로 가장 높은 항산화력을 보였고 이는 100g당 ascorbic acid 1595.85 mg과 1124.73 mg에 해당하는 항산화력을 지니는 것으로 해석할 수 있다. 운지버섯 자실체 80% 에탄올 추출과 열수 추출물의 경우 각각 59.83 mg AA eq/100g, 39.87 mg AA eq/100g로 총 폴리페놀 함량과 상관성을 나타내지 않았다. 운지버섯 균사체 80% 에탄올 추출물, 열수 추출물 및 배양액에서는 각각 11.92 mg AA eq/100g, 21.23 mg AA eq/100g, 4.61 mg AA eq/100g로 운지버섯 자실체와 마찬가지로 총 폴리페놀 함량과 상관성을 보이지 않았다.

Table 2-5. Contents of total polyphenolic compounds (mg of gallic acid mushroom per 100g of sample)

Mushroom	Extracts	Total polyphenol (mg/100g)
<i>Gyrophora Esculanta</i> fruit body	80% EtOH	423.51±2.37
	Water	368.56±1.81
<i>Coriolus versicolor</i> fruit body	80% EtOH	45.99±0.60
	Water	51.08±0.17
<i>Coriolus versicolor</i> mycelia	80% EtOH	13.83±0.26
	Water	3.48±0.03
	Culture broth	7.99±0.10

Table 2-6. Scavenging effect of extracts from mushroom on ABTS radical (mg ascorbic acid mushroom per 100g of sample)

Mushroom	Extracts	ABTS radical scavanging activity(mg/100g)
<i>Gyrophora Esculanta</i> fruit body	80% EtOH	1595.85±0.09
	Water	1124.73±0.01
<i>Coriolus versicolor</i> fruit body	80% EtOH	59.83±0.09
	Water	39.87±0.02
<i>Coriolus versicolor</i> mycelia	80% EtOH	11.92±0.07
	Water	21.23±0.00
	Culture broth	4.61±0.02

3. 시음료 제조 및 관능평가

가. 실험 방법

석이버섯과 운지버섯 균사체를 이용한 시음료 제조를 위해 콩가루 0.5%, 설탕 3% 를 기본배지로 하여 pH를 5~5.5로 조정 한 배지에 운지 균사체를 접종하여 28℃, 150 rpm에서 7일 간 배양하였다. 배양 후 배양액 전체를 추출하여 여과 후 여과액에 석이버섯 추출액을 3%,

5%, 7%첨가하였다. 관능평가는 충분한 훈련을 거쳐 품질 차이를 식별할 수 있는 능력이 갖추어진 검사요원 5명을 선발하여 실시하였다. 평가 항목은 색, 향, 맛, 전반적인 기호도에 대하여 9점 기호 척도법을 이용하여 실시하였으며, 관능검사 항목에 대하여 평가하였다.

나. 실험 결과

석이버섯과 운지버섯 균사체를 혼합하여 제조한 시음료에 대한 관능평가 결과는 Table 2-7 와 같다. 석이버섯 추출물 3%, 5%, 7% 첨가구 모두 0.05% 유의수준에서 유의차를 보이지 않았고, 관능평가 항목인 색과 향은 석이버섯 추출물을 3% 첨가한 샘플이 각각 6.0, 6.33의 비교적 높은 점수를 나타냈고, 맛에서는 석이버섯 추출물을 7% 첨가한 샘플이 6.0으로 가장 우수하게 나타났으며, 전반적 기호도는 석이버섯 추출물을 3% 첨가한 샘플이 5.90으로 다른 sample에 비해 높은 점수를 받았다($P > 0.05$). 그러므로 기호도에서 다른 샘플 군에 비해 좋은 평가를 받은 운지버섯 균사체 배양액에 석이버섯 추출물 3%를 첨가한다면 앞으로 맛과 기능성을 가미한 음료로의 개발이 가능할 것으로 생각된다.

Table 2-7. Sensory evaluation of liquid culture *Coriolus versicolor* containing *Gyrophora esculanta* 80% EtOH extracts

Mushroom(%)	Sensory score			
	color	flavor	taste	overall
0	5.00 ^a	5.00 ^a	5.00 ^a	5.00 ^a
3	6.0±0.92 ^b	6.33±0.72 ^{NS1)}	4.53±0.96 ^a	5.90±0.91 ^a
5	4.93±1.43 ^b	5.46±1.30 ^{NS}	4.86±2.13 ^a	5.23±1.43 ^a
7	4.53±1.80 ^b	4.93±1.57 ^{NS}	6.00±1.45 ^b	5.01±1.42 ^b
F-value	9.91	0.69	1.47	4.37

¹⁾Not significant

Any means in the same column followed by the same letter are not significantly ($p < 0.05$) different by Duncan's multiple range test

제 3 절 장내 유해미생물 제어를 위한 담자균류 배양기술 개발

- 효능이 확보된 담자균류의 균사체 대량배양 조건 및 배지 선발 통한 산업적 배양기술 확보하고자 함
- 기존의 상황 자실체는 1-2년 이상의 재배기간이 길고 이에 따라 경비가 많이 드는 단점이 상존하고 있으나 균사체 배양은 단시간에 다량의 균사체를 얻을 수 있으며, 배양액 중에 함유된 기능성 생리활성물질을 파괴나 손실 없이 이용이 가능함
- 본 차년도에서는 상황버섯균사체 배양을 위한 최적의 배양조건을 검토한 후 이를 바탕으로 식품에 이용 가능한 배양원료 선발 및 대량배양 조건을 확보하고자 함
- 또한 액체배양시의 다당체 등의 함량 분석을 통한 배양액 및 균사체의 기능성 물질을 확보하고자 함.

1. 효능이 확보된 담자 균류의 균사체 배양기술 확보

가. 사용균주의 생리적, 영양적 특성

기확보 상황 균주의 형태적 특성을 PDB(potato dextrose broth)에서 28℃에서 48시간 배양한 후 현미경 관찰한 결과는 Fig. 3-1과 같이 균사가 왕성하게 생육하였으며, 평판 배양하여 colony를 관찰한 결과는 Fig. 3-2와 같다. 한편, 상기의 배양액을 10,000rpm에서 10분간 원심분리 후 균체를 회수하여 80℃에서 향량이 될 때까지 건조한 후 건조 균체의 조단백, 탄수화물, 조지방, 조회분 등의 일반 성분을 분석한 결과는 Table 3-1과 같이 건조균체 단백질이 단백질 23.5%, 탄수화물은 총당 49.3%, 섬유성분 6.8, 지질 3.9%, 회분 4.1% 등이 함유되어 양질의 단백질 및 탄수화물 공급원으로 작용할 수 있을 것으로 추측된다.



Fig. 3-1. Mycellium of *Phellinus linteus* on the PDB



Fig. 3-2. Mycellium of *Phellinus linteus* on the PDA

Table 3-1. Approximate composition of *Phellinus linteus* mycelium broth (dry basis)

Crude protein (%)	Crude ash(%)	Crude fat(%)	Carohydrate(%)
0.13	0.03	0.01	4.53

나. 플라스크에서의 최적 배양조건 설정

(1) 최적배양조건 설정

(가) 최적온도

균주의 대량 배양을 위한 최적 배양조건을 설정하기 위해 250ml, 5000ml 삼각플라스크에 PDB 배지를 일정량 넣은 후 120℃에서 30분간 가압멸균한후 전배양액 0.1%를 접종하여 30℃, 150rpm으로 진탕 배양하면서 최적 배양온도, 배양시간, 초기 pH 등을 따른 건조 균체량과 균 밀도를 검토한 결과 *Phellinus linteus*는 250ml, 5000ml 삼각플라스크 모두 25℃와 30℃ 에서 우수한 건조 균체량을 나타내었으며, 특히 30℃에서 건조 균체량 및 균 밀도가 각각 3.68, 3.53g/L, 와 5.7×10^7 , 5.23×10^7 cfu/ml 로 가장 우수한 것으로 조사되었으며, 40℃ 이상의 조건에서는 모두 현저한 감소를 보였다. 한편 플라스크 용량에 따른 차이는 거의 없는 것으로 나타났다.

(나) 최적 pH

초기 생육 최적 pH는 250ml의 경우 pH 6.0에서 균 밀도와 건조 균체량은 각각 6.2×10^7 cfu/ml, 4.83g/L이었으며, 5000ml의 대량 플라스크 배양에서는 6.9×10^7 cfu/ml, 5.01g/L을 보여 가장 우수하였고, 5000ml 대량 플라스크 배양이 250ml의 배양보다 다소 높게 나타났다.

(다) 최적 배양선정

한편 최적 배양시간을 검토한 결과 250ml의 경우 120시간에서 균 밀도와 건조 균체량은 각각 7.8×10^7 cfu/ml, 5.91g/L, 5000ml의 대량 플라스크 배양에서는 배양 96시간에 9.2×10^7 cfu/ml, 6.87g/L을 보여 가장 우수하였다. 250ml과 5,000ml 플라스크를 이용한 배양조건 검토에서 전체적으로 5,000ml 배양에서 균 생육이 우수한 것으로 나타났는데, 이와 같은 결과는 담자균류들이 호기성 미생물로 5000ml의 경우 산소 공급량이 높았기 때문인 것으로 추측되어지며 공기의 주입이 용이한 fermentor에서 배양 시 보다 우수한 배양결과가 예측된다. 따라서 대량 배양을 위한 배양조건을 30°C, pH 6.0, 배양시간 96시간으로 확립하여 산업적 대량배양 및 배지를 선별하였다.

2. 인체에 무해한 산업적 대량배양 배지 개발 최적 탄소원, 질소원의 선정

가. 최적 배양배지 설정

상황균주의 최적 배양 배지를 설정하기 위해 상기의 최적 배양 조건, 즉 96시간의 배양 시간, 초기 pH 6.0, 배양온도 30°C로 배양조건을 설정하고, glucose, sucrose, starch 등의 탄소원 각 3% 농도로 첨가하고 질소원으로는 yeast extract를 0.9% 농도로 첨가하여 수행하였고, 최적 질소원 선별에는 최적 탄소원으로 조사된 탄소원 3% 농도에 yeast extract, peptone, tryptone 등의 질소원을 각 농도별로 첨가하여 최대 균 밀도 및 건조 균체량을 조사한 결과, 탄소원의 경우 조사한 모든 탄소원을 기질로 이용하였는데, 특히, sucrose 첨가구에서 건조 균체량 및 균 밀도가 8.65g/L, 7.5×10^8 cfu/ml로 가장 우수한 결과를 보였다. *Phelinus linteus* 경우 단당 및 2당류뿐만 아니라 전분과 같은 다당 첨가에서도 이와 유사한 정도의 높은 균 밀도 및 건조 균체량을 보였다. 한편 질소원의 경우 시험한 전 질소원에서 6.94-7.36g/L, 4.2×10^7 - 7.5×10^8 cfu/ml의 높은 건조균체량 및 균밀도를 보였으나, 시험에 사용한 질소원의 경우 그 가격이 상대적으로 고가이므로 산업적 배양에는 가격이 저렴한 질소원의 선별이 필요할 것으로 생각된다.

Table 3-2. Effect of various carbon sources on the dry weight and colony number of *Phelinus linteus*

	Glucose	Sucrose	Potato starch
Dry weight of mycelium(g/L)	7.36	8.65	6.94
Colony number(cfu/ml)	2.84×10^8	7.5×10^8	4.2×10^7

Table 3-3. Effect of various nitrogen sources on the dry weight and colony number of *Phelinus linteus*

	Yeast extract	Peptone	Tryptone
Dry weight of mycelium(g/L)	8.44	7.21	7.95
Colony number(cfu/ml)	6.37×10^8	2.46×10^8	5.17×10^7

나. Jar- fermentor을 이용한 대량배양 확립

산업적 대량배양을 위한 조건을 설정하기 위해, 상기의 최적 배양조건 및 배지 조성을 이용하여 Fig 3-3과 같은 7L-Jar fermentor에서 수행하였다. 7L 발효조 배양에서는 고형물을 3% sucrose, 0.9% soybean meal을 넣어 제조한 배지 4L를 발효조에 채운 다음, 121℃에서 30분간 멸균하고, 미리 배양한 공시균주를 1%의 농도로 첨가하여 통기량 1vvm, 150rpm에서 배양하면서 시간에 따라 시료를 채취하여 건조균체량 및 균밀도를 조사한 결과는 Table 3-4와 같다. 7L-발효조 배양시 삼각플라스크 배양에서 최대 균 밀도 및 균체 생성이 배양 96시간만에 최대를 보인 것과 유사한 시간에 최대 균 밀도 및 균체 생성을 나타내었는데 특히 건조균체량 및 균 밀도는 9.21g/L, 4.64×10^9 cfu/ml 을 나타내 5,000ml 플라스크 배양의 6.87g/L, 9.2×10^7 cfu/ml 에 비해 균체 생성량이 약 30% 정도 증가하였다.



Fig. 3-3. Incubation of *Phelinus linteus* in the 7L-jar fermentor

Table 3-4. Dry weight and colony number of *Phelinus linteus* in the 7L-jar fermentor during the incubation time

	48 hrs	72 hrs	96 hrs	120 hrs	144 hrs
Dry weight of mycelium(g/L)	5.33	7.98	9.88	9.71	8.53
Colony number(cfu/ml)	4.76×10^6	6.43×10^8	4.2×10^9	5.17×10^9	4.56×10^8

다. 산업적 대량 배양

(1) 최적 배양배지 선정

산업적 생산을 위한 대량배양 조건을 설정하기 위해서는 PDA 배지는 너무 고가이고 또한 식용으로 사용하기에는 부적절하다. 따라서 상기의 배양조건에서 최적 탄소원으로는 조사된 sucrose를 기본으로 경제적 질소원의 선별이 시급한 실정이다. 따라서 경제적 질소원을 선정하기 위해 sucrose 3%를 첨가하고, 질소원의 경우 경제성을 고려하여 비교적 가격이 저렴하고 손쉽게 구입할 수 있는 대두박, 옥침수 등을 이용하여 7L-Jar fermentor에서 4L를 working volumn으로 하여 각각의 배지를 발효조에 넣은 후, 121℃에서 40분간 멸균하고, 미리 배양한 공시균주를 1%의 농도로 첨가하여 통기량 1vvm, 150rpm으로 배양 하면서 시간에 따라 시료를 채취하여 실험에 사용한 결과는 Table 3-5와 같다. 조사된 질소원의 경우 어분을 제외한 대두박, 옥침수 등에서 높은 균 밀도 및 건조균체량을 보였으며 특히 0.9% 대두박 첨가구가 건조 균체량 및 균 밀도 6.95g/l, 1.54×10^8 cfu/ml로 가장 우수한 결과를 보였다. 특히 탄소원의 농도를 고정한 후 대두박의 첨가농도를 달리 하였을 때(Table 3-6), 0.9%와 2% 첨가에서 건조 균체량 및 균 밀도가 각각 7.29g/l, 3.54×10^8 cfu/ml, 8.92g/l, 6.99×10^8 cfu/ml 로 대두박의 첨가 농도가 증가 할수록 균 밀도 및 건조 균체율이 증가하였는데, 경제성을 고려할 때 0.9% 첨가가 적당할 것으로 생각되며, 또한 대두박의 경우 손쉽게 구입할 수 있으며 가격이 비교적 저렴한 장점을 지니고 있다. 특히, 배양액 전체를 전부 이용하여 제품 개발시 배양액중의 성분이 식용가능한 식품 원료이어야 한다는 식품공전 상이 법적인 문제도 고려할 경우 대두분을 이용한 산업적 대량배양에 충분히 이용 가능할 것으로 추측된다.

Table 3-5. Effect of various nitrogen sources on the dry weight and colony number of *Phelinus linteus*

	Soybean meal	Cornsteep liquor	fish meal
Dry weight of mycelium(g/L)	6.95	5.37	3.67
Colony number(cfu/ml)	1.54×10^8	7.54×10^7	2.7×10^6

Table 3-6. Effect of various soybean meal concentration on the dry weight and colony number of *Phelinus linteus*

	0.9%	1.5%	2%
Dry weight of mycelium(g/L)	7.29	8.33	8.92
Colony number(cfu/ml)	3.54×10^8	7.54×10^8	6.99×10^8

(2) 1,200L 배양조를 이용한 산업적인 배양

상기에서 확립된 최적 배양조건으로 1,200L 대량 발효조를 이용한 scale-up 실험을 수행하였다. 즉, 최적 탄소원으로 조사된 sucrose 3%, 대두분 0.3%의 배지를 조제 후 1,200L fermentor에서 800L를 working volumn으로 하여 발효조에 넣은 후, 121℃에서 40분간 멸균하였다. 특히 대두분의 배지 제조시 미리 대두분을 용수에 넣고 30-40분 동안 침전후 상등액만을 취하여 수행하였다. 이렇게 조제된 배지에, 30L의 seed tank에 working volumn이 15L가 되도록 미리 배양한 공시균주를 1%의 농도로 첨가하여 통기량 1vvm, 150rpm으로 배양 하면서 시간에 따라 시료를 채취하여 실험에 사용한 결과 Fig. 3-5와 같이 120 시간만에 최적 균체량에 도달하였으며, 이와 같은 결과는 7L 발효조에서와 같은 수준으로, 거품발생도 전혀 없었기 때문에 성공적으로 액체대량배양기술이 확립된 것으로 평가된다.



Fig. 3-4. Incubation of *Phelinus linteus* in the 1,200L fermentor system

Table 3-7. Optimun culture medium and condition of *Phelinus linteus*

Component	Concentration(%)
Surcose	3.0
Soybean meal	0.9
Temperature	28℃
pH	6.5
Incubation time	72hrs

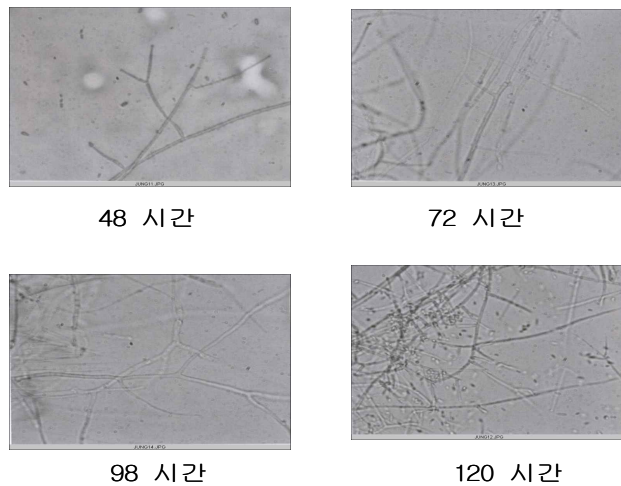


Fig. 3-5. Incubation of *Phelinus linteus*

3. 선발 배지의 실용성 검토(기능성분 생성량등)

가. 다당체 분석

상황버섯 균사체 배양액의 열수추출물을 단계적으로 EtOH 침전을 하여 60% EtOH에 soluble하고 80%EtOH에 insoluble한 활성분획을 얻었고, 이것을 Diethylaminoethyl(DEAE) - cellulose를 행한 결과 0.5M NaCl로 용출시 나온 분획이 강한 활성을 보였다. 분자량에 의한 활성 차이를 검토하기 위해 0.5M NaCl에서 용출된 분획을 Toyoperl hw65F에 의한 gel permeation chromatography를 행하여 분자량이 일정한 다당체를 얻었다.

상황버섯 균사체 배양액에서 추출된 조지방 함량은 0.01%였으며 조단백질은 0.13%, 총당 4.53%, 그리고 조회분은 0.03%였다. 분리되어진 유효 다당체의 활성을 비교하여본 결과 자연산은 65.7%이고 재배산은 63.9%였으며 상황버섯 균사체 배양액은 균사체에 41.95%, 배양액

에 21.87%로 총 63.82%로 재배산과 비교하여 큰 차이를 보이지 않았다. DEAE-cellulose에 의해 얻어진 활성본체는 DEAE-cellulose에 흡착되었으므로 산성다당류이고 gel permeation HPLC를 수행하여본 결과 분자량 15만의 순수한 다당체임을 확인하였다. 또한, 탄수화물이 대부분이었으며 약간의 단백질과 ursolic acid를 함유한 단백다당류로 다당체의 주요구성 비율은 분석 결과 라이보스 8.0%, 만노스 41.5%, 갈락토오스 22.3%, 글루코오스 20.1%였다.

나. 기타성분

상황버섯 균사체 배양액에서 추출된 조지방 함량은 0.01%였으며 조단백질은 0.13%, 총당 4.53%, 그리고 조회분은 0.03%였다. 분리되어진 유효 다당체의 활성을 비교하여본 결과 자연산은 65.7%이고 재배산은 63.9%였으며 상황버섯 균사체 배양액은 균사체에 41.95%, 배양액에 21.87%로 총 63.82%로 재배산과 비교하여 큰 차이를 보이지 않았다. DEAE-cellulose에 의해 얻어진 활성본체는 DEAE-cellulose에 흡착 되었으므로 산성다당류이고 gel permeation HPLC를 수행하여본 결과 분자량 15만의 순수한 다당체임을 확인하였다. 또한, 탄수화물이 대부분이었으며 약간의 단백질과 ursolic acid를 함유한 단백 다당류로 다당체의 주요구성비율은 분석 결과 라이보스 8.0%, 만노스 41.5%, 갈락토오스 22.3%, 글루코오스 20.1%였다.

다. 산업적 대량배양의 경제성 검토

산업적 대량배양을 위한 실요성 검토는 제품의 품질 및 가격과 관련을 가지고 있으므로 경제적인 배지의 선발은 매우 중요하다. 1,200L 배양조를 이용한 산업적인 배양결과 최종 선발배지(sucrose 3%, soybean meal 0.9%)는 일반적으로 사용하는 담자균류 배양배지인 PDB에 비교하여, 1,200L(working volumn 800L) 배양시 배양시간은 거의 유사하였다. 한편, 각 배지의 경제성을 검토한 결과, PDB의 경우 800L 배양시 약 900만원이 소요되었으나, 본 최종 선발배지의 경우 약 153,000원이 소요되어 PDB에 비해 약 60배 정도의 가격 경쟁력이 있는 것으로 나타났다. 또한 일반적으로 사용되는 담자균 배양배지인 PDB의 경우 공업용으로 시판되어 식용으로 사용이 제한되나 본 최종 선발배지는 sucrose 와 soybean meal 을 사용함에 따라 식품공전상 법적인 문제가 발생하지 않을 것으로 사료된다.종합적으로 검토시 상황버섯 균사체 배양액 및 균사체 중에는 기능성 다당체가 총 63.82%로 재배산과 비교하여 큰 차이를 보이지 않았으며 구성당의 조성은 라이보스 8.0%, 만노스 41.5%, 갈락토오스 22.3%, 글루코오스 20.1%로 조사되었고 담자균 배양 배지인 PDB에 비해 본 최종선발배지는 경제성이 확보 된 것으로 나타났다.

Table 3-8. 산업적 대량배양의 경제성 검토

배지종류	성분및합량	배양시간	원료가격		대량배양 단가(800L)	경제성	비고
PDB	24g/L	96시간	11,520원 (120,000원/250g.sigma)		9,216,000원		식용으로 사용불가(공업용)
최종선발 배지	sucrose 3%	96시간	102원(3,400/kg)	192원	153,600원	PDB에 비해 60배 저렴	식용으로 사용가능
	soybean meal 0.9%		90원(4,000/400g)				

제 4 절 장내 유해미생물 제어를 위한 담자균류와 천연소재 혼합 배양 기술 확립

○ 유용 담자균류 및 천연 소재 혼합배양 산업적 기술 확보

1. 기 확보(상황버섯) 담자균류와 천연소재의 혼합 발효 가능성 및 최적 첨가농도 구명

가. 충북대에서 장내 유해미생물 억제능이 확인된 오미자를 선발 후 추출액을 통하여 실시함. 기 확보 배양 조건에 오미자 추출액 첨가후 생육여부 조사 및 최적 첨가 조건을 위하여 다음과 같이 실시하였다.

나. 상황 및 오미자 배양액을 10,000rpm에서 10분간 원심분리 후 균체를 회수하여 80℃에서 향량이 될 때까지 건조한 후 건조 균체의 조단백, 탄수화물, 조지방, 조회분 등의 일반성분을 분석한 결과는 표 1과 같이 건조균체 단백질이 단백질 22.1%, 탄수화물은 총당 53.3%, 섬유성분 6.3, 지질 3.2%, 회분 3.6% 등이 함유되어 양질의 단백질 및 탄수화물 공급원으로 작용할 수 있을 것으로 추측하며 오미자 미첨가 분석과 비교시 큰 차이가

(dry basis)

Crude protein (%)	Crude ash(%)	Crude fat(%)	Carohydrate(%)	
			Crude fiber	Tatal sugar
22.1	3.6	3.2	6.3	53.3

Table 4-1. 오미자 첨가(3%)후 일반성분 분석

다. 상황균주와 오미자의 최적 배양 배지를 설정하기 위해 기 설정 최적 배양 조건, 즉 120시간의 배양 시간, 초기 pH 6.5, 배양온도 28℃로 배양조건을 설정하고, glucose, surcose, starch등의 탄소원 각 3% 농도로 첨가하고 질소원으로는 대두분을 0.9% 농도로 첨가하여 수행하였고, 최대 균 밀도 및 건조 균체량을 조사한 결과, 탄소원의 경우 조사한 모든 탄소원을 기질로 이용하였는데, 특히, surcose 첨가구 에서 건조 균체량 및 균 밀도가 8.65g/l, 1.5×10^8 cfu/ml로 가장 우수한 결과를 보였다(Table 4-2).

Table 4-2. 오미자 추출액 첨가(3%) 배양시 탄소원에 따른 최적 생육조건조사

	Glucose	Sucrose	Potato starch
Dry weight of mycelium(g/L)	6.36	8.65	6.94
Colony number(cfu/ml)	2.84×10^8	7.5×10^8	4.2×10^7

라. 한편 질소원의 경우 시험한 전 질소원에서 7.11-78.24g/L, 5.22×10^7 - 6.57×10^8 cfu/ml의 높은 건조 균체량 및 균밀도를 보였으나, 시험에 사용한 질소원의 경우 그 가격이 상대적으로 고가 이므로 산업적 배양에는 가격이 저렴한 대두분이 균체생성량 및 균밀도에서 적합하였으며 생육도 우수하였다.(Table 4-3).

Table 4-3. 오미자 추출액 첨가(3%) 배양시 질소원에 따른 최적 생육조건조사

	Yeast extract	Peptone	대두분
Dry weight of mycelium(g/L)	8.24	7.11	7.65
Colony number(cfu/ml)	6.57×10^8	2.34×10^8	7.22×10^7

마. 산업적 대량배양을 위한 조건을 설정하기 위해, 상기의 최적 배양조건 및 배지 구성을 이용하여 7L-Jar fermentor에서 수행하였다. 7L 발효조 배양에서는 고형물을 3% sucrose, 0.9% soybean meal을 넣어 제조한 배지 4L를 발효조에 채운 다음, 121℃에서 30분간 멸균하고, 미리 배양한 공시균주를 1%의 농도로 첨가하여 통기량 1vvm, 150rpm에서 배양하면서 시간에 따라 시료를 채취 하여 건조균체량 및 균밀도를 조사한 결과는 Table 4-4와 같다.

Table 4-4. 오미자 첨가후(3%) 7L-jar fermentor 생육조건

	48 hrs	72 hrs	96 hrs	120 hrs	144 hrs
Dry weight of mycelium(g/L)	5.63	8.13	9.02	9.71	9.13
Colony number(cfu/ml)	3.56×10^6	5.23×10^8	4.0×10^9	5.17×10^9	4.76×10^8

바. 오미자 첨가후 7L-발효조 배양시 오미자 미첨가 배양과 시간에 따른 최대 균 밀도 및 균체 생성율을 비교한 결과 미첨가 건조 균체량 및 균 밀도는 9.55g/L, 5.47×10^9 cfu/ml발효조 배양시 나타 났으며 오미자 첨가타 낮양의 9.71g/L, 5.17×10^8 cfu/m 시와 비교시 건조 균체량 및 균 밀도가타 유사하게 나타났다.

사. 오미자 첨가에 따른 유용성분 변화를 관찰하기 위하여 오미자 첨가 상황배양액과 미첨가 상황배양액 내에 존재하는 대표적 유용성분인 β -glucan의 변화 양상을 조사하였다.

아. Megazyme사의 Mushroom and Yeast Bata-Glucan Assay kit를 사용하여 β -glucan 함량을 분석한 결과는 Table 4-5 과 같다.

Table 4-5. 오미자 첨가후(3%) β -glucan 함량분석

	Total-glucan(mg/L)	α -glucan(mg/L)	β -glucan(mg/L)
균사체 배양액	13.9	5.97	7.9
오미자첨가 후배양	13.0	5.11	7.89

자. β -glucan 함량은 Megazyme사 (Wicklow, Ireland)의 β -glucan 분석법인 ‘Mushroom and Yeast Bata-Glucan Assay’법⁶⁹⁾을 변형하여 실험하였다. Total glucan은 분석시료 20 mg을 정확히 측정하여 glass cap tube (16 × 120 mm)에 넣고, 1.5 mL 37% HCl 용액을 vortex한 후 30℃에서 45분 반응한 후 10 mL water를 첨가하고 끓는 물에서 2시간 반응한 후 냉각시킨 후 10 mL 2 N KOH를 첨가하였다. 이를 100 mL 메스플라스크에 넣고 200 mM sodium acetate buffer(pH 5.0)로 정용하였다. 시료액에 생기는 불용성 물질은 1500 ×g에서 10분간 원심 분리하였다. 원심분리액 0.05 mL에 exo-1,3- β -glucanase plus β -glucosidase(Megazyme, Wicklow, Ireland)를 0.05 mL 첨가한 후 40℃에서 60분간 반응시켰다. Glucose 정량 kit인 GOPOD reagent (Megazyme, Wicklow, Ireland)를 사용하여 glucose를 정량하여 계산법에 의해 total-glucan으로 환산하였다. α -Glucan은 분석시료 20mg을 정확히 측정하여 glass cap tube (16 × 120 mm)에 넣고, 2 mL 2M KOH 용액을 넣은 후 Ice bath에서 20분간 교반 한 후 1.2 M sodium acetate buffer (pH 3.8) 8 mL을 넣고 즉시 0.2 mL amyloglucosidase plus invertase(Megazyme, Wicklow, Ireland)를 0.2 mL 첨가한 후 40℃에서 30분간 반응시켰다. 이를 1500 ×g에서 10분간 원심 분리하였다. 원심분리액 0.05 mL에 glucose 정량 kit인 GOPOD reagent (Megazyme, Wicklow, Ireland)를 사용하여 glucose를 정량하여 계산법에 의해 α -glucan으로 환산하였다. β -Glucan은 total-glucan과 α -glucan의 차에 의해 구한다.

차. 그 결과 오미자 첨가후 및 미첨가시의 β -glucan의 차이는 7.9mg/L, 7.89mg/L와 비교시 거의 나타나지 않았다.

카. 위와 같은 실험을 의하여 Table 4-4와 4-5를 기준으로 같은 오미자 1-5, 설탕 3%, 대두분 0.9%, 배양온도 28℃, pH 6.5, 오미자 첨가후 72시간 배양을 최적 조건으로 확립 하였다.

타. 산업적 최적 첨가조건 확립을 위하여 오미자 첨가에 따른 균밀도 및 생육량을 조사하였다.

파. 오미자 첨가량을 1-5% 첨가후 균밀도 및 생육량을 조사한 결과 농도에 따른 큰 차이는 보이지 않았으나 3% 첨가시 8.21g/L, 7.44×10^8 로 나타나 적당한 것으로 판단되었다 (Table 4-6).

Table 4-6. 오미자 첨가량에 따른 상황균사체 생육조사

	1%	3%	5%
Dry weight of mycelium(g/L)	7.49	8.21	8.62
Colony number(cfu/ml)	3.23×10^8	7.44×10^8	7.09×10^8

하. 오미자 첨가 농도 0.1~5% 첨가시 생육에는 문제가 없었으며 그 이상 농도에서는 생육 저하가 관찰되었다. 위와 같은 실험을 통해서 Table 4-7과 같은 최적 혼합배양 조건을 선정 하였다.

Table 4-7. 오미자 첨가후 최적 혼합배양조건

Component	Concentration(%)
오미자	3%
설탕	3.0
대두분	0.9
온도	28℃
pH	6.5
배양시간	72hrs



Fig. 4-1. 오미자 미첨가 상황배양액 Fig. 4-2. 오미자 첨가 상황배양액

2. 기 확보 담자균류와 소재의 혼합배양 산업적 최적조건 확립

가. 상기에서 확립된 최적 배양조건으로 1,200L 대량 발효조를 이용한 혼합배양 scale-up 실험을 수행하였다. 즉, 최적 탄소원으로 조사된 sucrose 3%, 대두분 0.3%의 배지를 조제 후 1,200L fermentor에서 800L를 working volume으로 하여 발효조에 넣은 후, 121℃에서 40분간 멸균 하였다. 특히 대두분의 배지 제조시 미리 대두분을 용수에 넣고 30-40분 동안 침전 후 상등액 만을 취하여 수행하였다. 이렇게 조제된 배지에, 30L의 seed tank에 working volume이 15L가 되도록 미리 배양한 공시균주를 1%의 농도로 첨가하여 통기량 1vvm, 150rpm으로 배양 하면서 1200L 산업적 대량배양에 접종후 48시간 경과후 오미자 3%를 첨가후 72시간 혼합배양을 실시하였다. 그 결과 예비 조건과 동일한 결과로 생육에 는 문제가 없었다.

	48 hrs	72 hrs	96 hrs	120 hrs	144 hrs
Dry weight of mycelium(g/L)	4.63	7.73	9.12	9.33	9.26
Colony number(cfu/ml)	3.86×10^6	5.62×10^8	4.8×10^9	5.97×10^9	4.76×10^8

Table 4-8. 오미자 첨가후(3%) 1200L fermentor 생육조건

나. 오미자 첨가후 1200L 발효조 배양시 오미자 미첨가 배양과 시간에 따른 최대 균 밀도 및 균체 생성율을 비교한 결과 미첨가 건조 균체량 및 균 밀도는 9.33g/L, 5.97×10^8 cfu/ml로서 7L-발효조와 비교시 건조 균체량 및 균 밀도가 유사하게 나타났다.

다. 대량 배양시 에도 오미자 첨가 시기는 초기 배양후 48시간 경과 후 투여하는 것이 우수 하였으며 혼합 배양후 72 시간후 배양액을 회수하였다.

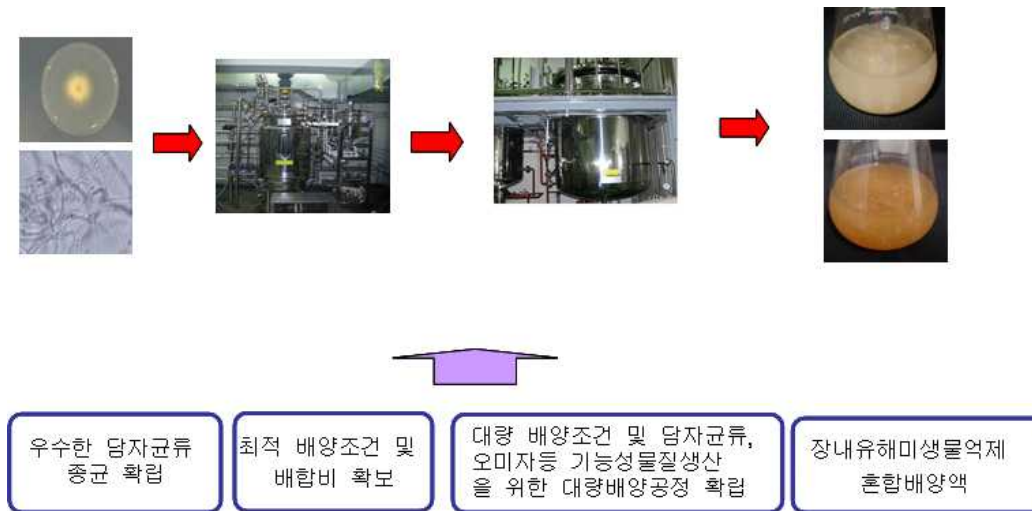


Fig. 4-3. 혼합배양 산업적 최적조건 확립

라. 충북대로부터 장내 유해미생물 억제능이 확인된 운지버섯의 배양조건을 조사하였다.

(1) 균사체의 최적배양조건

운지균사체의 초기 pH와 배양 온도, 배양 기간을 최적화하기 위해 PDB(2.4 g/200 mL)를 기본배지로 하여 5%(v/v)의 균사체를 접종하였다. pH는 0.1N NaOH와 0.1N HCl를 이용하여 배지의 pH를 4.5, 5.0, 5.5, 6.0 및 6.5로 조절하여 30 °C에서 150 rpm으로 4일 동안 배양하였고, 온도는 pH가 5인 배지에서 20°C, 25°C, 28°C, 30°C, 35 °C조건으로 하여 4일 동안 정지 배양하였다. 배양기간은 선정 된 pH, 온도 조건으로 150 rpm에서 10일 배양하여 균사체량을 균사체량 측정은 상압가열건조방법으로 배양액 20 mL을 filter paper disc(ADVANTEC 8mm, Toyo Roshi Kaisha, Ltd, Japan)로 여과하고 60°C에서 24시간 건조한 후 잔존하는 건조 균사체의 무게를 측정하였고, 시료를 filter paper disc(ADVANTEC 8 mm, Toyo Roshi Kaisha, Ltd, Japan)로 여과 한 여액을 pH meter(720 A, Orion, USA)를 이용하여 측정하였다. *Coriolus versicolor*의 균사생장에 적합한 최적 pH를 규명하기 위해 0.1N NaOH와 0.1N HCl 사용하여 pH를 4.5, 5.0, 5.5, 6.0 및 6.5로 조절한 PDB(2.4 g/200mL)배지에 5%(v/v)의 종균을 접종한 후 150 rpm으로 4일 동안 배양하여 균사체량을 측정한 결과 Fig. 4-4와 같았다. 통계 분석 결과 pH 5와 pH 5.5에서 유의적 차이(p<0.05)가 없었으며, 균사체량도 가장 높았다. 이는 균사체 액체 배양 시 pH 5.2~5.6이 운지버섯 균사체 배양최적 pH 조건이라고 한 보고와 유사하였으나, pH가 4.0, 5.5, 7.0이 최적 pH 조건이라고 한 보고와는 달랐는데 배양기간과 배

양조건이 다르기 때문인 것 같았다.

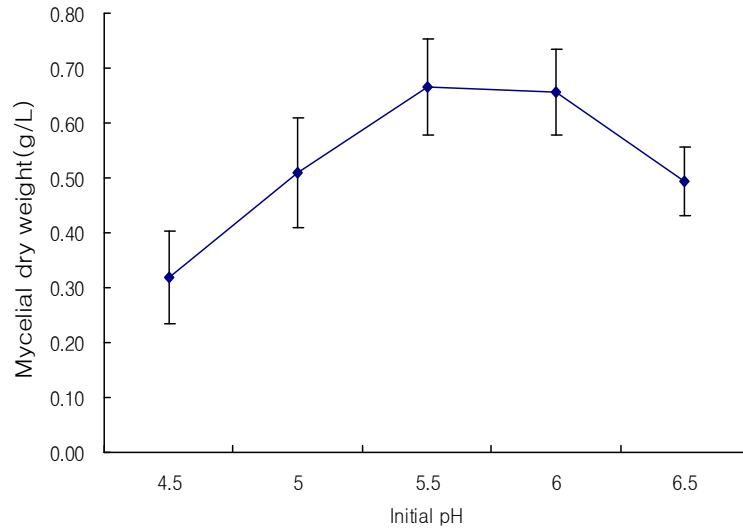


Fig. 4-4. 운지버섯 액체배양시 pH 및 균사체량

(2) 최적 온도

*Coriolus versicolor*의 균사생장에 적합한 최적 온도를 규명하기 위해 pH 5.0에서 배양 온도를 20°C, 25°C, 28°C, 30°C, 35°C로 다르게 하여 4일 후 균사체량을 측정된 결과는 Fig. 4-5 와 같았다. 통계분석 결과 28°C에서 유의적 차이가 없었으며 균사체량이 높아 전형적인 중온성 균주의 양상을 보였다.

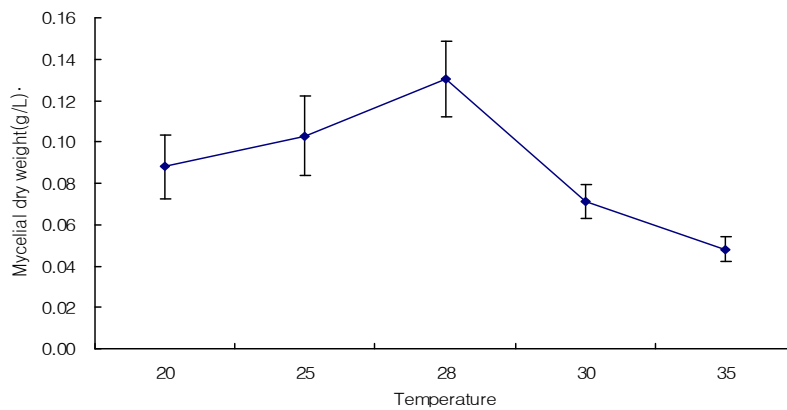


Fig. 4-5. 운지버섯 배양온도에 따른 최적 생육 조건

(3) 배양 기간

*Coriolus versicolor*의 균사 생장에 적합한 최적 배양기간을 규명하기 위해, 앞에서 선정된 조건인 pH 5.5, 28°C에서 10일간 배양하여 이틀마다 균사체량을 측정 한 결과는 Fig. 4-6과 같았다. 접종 후 4일까지 균체량이 급속히 증가한 반면 그 이후부터는 증가정도가 감소하는 경향을 나타내었다.

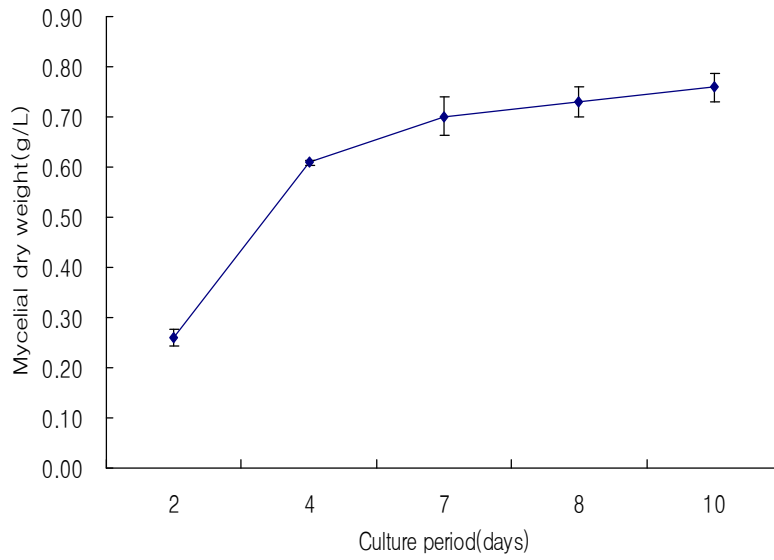


Fig. 4-6. 배양시간에 따른 최적 생육조건

(4) 일반성분 조사

다당체 구성성분을 분석하기 위하여 표준물질로 만노즈 갈락토즈 혼합액(1:1)을 사용하여 페놀-황산법으로 측정하였고, 당 구성성분은 Jones와 Albersheim의 방법에 따라 가수분해 및 아세틸화하여 GC로 분석하였다.

배양액을 100°C에서 3시간 추출한 다음 8,000rpm에서 20분간 원심분리하여 얻은 상등액을 감압 농축하고, ethanol을 가하여 4°C 에서 24시간 방치 하였다. 침전물을 회수하여 증류수로 녹인후 같은 조작을 2회 실시한 후 동결건조 하여 단백 다당체를 분리하였다.

총 단백질 함량은 표준물질로서 보바인 씨럼 알부민을 사용하여 Lowry등의 방법에 따라 측정하였고, 아미노산 구성성분은 단백질 가수분해 후 Na-form 컬럼으로 바이오크롬 20 아미노산 자가 분석기로 분석하였다.

Table 4-9. 운지버섯 균사체배양여액으로 부터 다당체 및 아미노산 및 당 성분

당	조성(%) ¹	아미노산	조성(%) ²
퓨코오스	8.0	아스파르트산	7.0
리보오스	0.3	트레오닌	6.5
아라비노스	0.7	세린	8.1
자일로즈	1.7	글루탐산	7.0
만노즈	18.5	글리신	2.5
갈락토즈	15.0	알라닌	12.7
글루코스	20.1	발린	3.3
		이소루이신	14.5
		루이신	5.5
		티로신	3.6
		페닐알라신	4.2
		히스티딘	trace
		라이신	2.3
		아르기닌	2.6
총당합량	64.3	총아미노산 합량	28.5

*1퍼센트는 총당량으로 계산하였다.

*2퍼센트는 총 아미노산당 함량으로 계산하였다

운지버섯 균사체는 건조중량으로 17.2~27.32g/L, 배양액에 포함된 베타글루칸 양은 6.2g/L의 생산량을 나타냈으며. 운지버섯 균사체 배양여액의 다당체는 탄수화물 64.3%와 단백질 28.5%로 이루어져있고 7종류의 탄수화물로 구성되어 있고, 주요 구성당은 만노오즈(18.5%), 그루코스(20.1%), 갈락토즈(15.0%)였다. 단백질은 15종의 아미노산으로 구성되었으며, 주요 구성 아미노산은 이소루신(14.5%), 알라닌 (12.7%), 세린(8.1%)이었다.

제 5 절 장내 유해미생물 제어를 위한 담자균류와 천연소재 혼합 대량 배양 기술 확립

1. 적정 부재료 첨가에 의한 기호성 조사 및 선발

가. 확보된 혼합배양조건과 적정 부재료 첨가 기호성 조사

배합 원료의 종류와 함량은 아래 표와 같이 각 원료의 종류별로 양을 다르게 하여 배양하였다. 배양액은 관능적 평가와 색차계를 이용하여 최적 품성을 선정하였다. 각 배합비에 의한 배양액은 맛과 색도에 차이가 있었다. 첨가 예비실험은 운지버섯 오미자 배양액, 유자, 대추, 당귀, 구기자, 등을 사용하였다. 각 시료는 0.1- 10% 까지 첨가후 기호성 검증을 실시하였다. 그 결과 활성이 있는 유자등을 첨가하여 조사하였다. 배양액은 옅은 황색 계통의 색깔을 나타내고 약간의 산미가 있는 성상으로 조정하였다.

나. 최적 배합비 결정

최적 배합비는 관능적 평가와 색도 및 추출물의 농도, 기호성 등을 종합적으로 고려하여 판단하였다. 추출물의 색은 황색계통으로 색이 맑고 선명한 것을 기준으로 하여 선별하고 맛과 향의 기호성을 관능검사를 통하여 우선 선발하였다. 최적 기호성 검증을 위하여 식품전공 학생 및 다양한 연령층의 일반인 50명을 대상으로 선발 배양액에 대한 기호성 조사를 실시하여 아래와 같은 결과를 얻었다. 만족도를 10점 만점으로 하였고 맛, 색감, 규격, 포장 등에 대한 전반적인 평가를 실시하였다.

Table 5-1. 최적 배합비 설정 및 관능적 평가

	오미자	운지균사체 배양액	유자	기타한약재
함량(%)	5	85	5	5

만족도 10점

구분	주관적			개관적		평점
	맛	색	당도	규격	포장	
제품사양	감미강화	황색	식후및식전	80-120ml	병및파우치	
1	8	8	8	9	10	43
2	8	9	8	9	10	44
종합	8	8.5	8	9	10	43.5
평가	우수	오미자부각	우수	우수	우수	

2. 산업적 혼합배양을 위한 경제성 검토

가. 선발제품의 액상, 고형화 연구

기호성이 우수한 두종류의 액상 형태 연구를 실시하였다. 오미자, 유자 함유 운지버섯 균사체 배양액을 회수후 원심분리 또는 부직포를 이용하여 필터후 액상형태 로 제조하였으며 건조 분말 형태는 배양액 회수후 필터한 시제품과 균사체가 함유되어 있는 상태로 동결건조 및 열풍건조(80-100℃)를 실시하였다.



Fig. 5-1. 배합 1



Fig. 5-2. 배합 2



Fig. 5-3. 오미자 운지버섯 건조소재

나. 선발제품의 경제성 검토

오미자, 유자 함유 운지버섯 균사체 배양시 배양 배지의 경우 식용 대두분 및 설탕을 사용하여 배양시 단가상승이 크지 않았으며 대형 발효조 배양비용도 큰 비중을 차지 않았다. 첨가 유자 및 오미자등 한약재의 경우도 농축액 등을 사용하여 전처리 비용 등이 발생하지 않았다. 건조 분말 소재의 경우에는 한약재를 첨가하여 동결건조 및 열풍건조를 실시하였는데 방법에 따른 비용의 차이가 커서 열풍건조 방법을 선정하였다.

Table 5-2. 경제성 검토

배지종류	성분및합량	배양시간	원료가격		대량배양 단가(800L)	경제성	비고
PDB	24g/L	96시간	11,520원 (120,000원/250g.sigma)		9,216,000원		식용으로 사용불가(공업용)
최종선발 배지	sucrose 3% soybean meal 0.9%	96시간	102원(3,400/kg)	192원	153,600원	PDB에 비해 60배 저렴	식용으로 사용가능

3. 혼합 배양물의 안정성 검토를 통한 적정 배양공정 확립

가. 안정성 확보를 위한 기확보 운지버섯 균사체와 오미자(5%) 및 유자(5%)와 혼합 배양물의 혼합 배양 배양기간, 온도 및 pH 최적 조건 확립

(1) 균사체의 최적배양조건

운지균사체의 초기 pH와 배양 온도, 배양 기간을 최적화하기 위해 선정배지에 균사체를 접종하였다. pH는 10N NaOH와 6N HCl를 이용하여 배지의 pH를 4.5, 5.0, 5.5, 6.0 및 6.5로 조절하여 30 °C에서 150 rpm으로 5일 동안 배양하였고, 온도는 pH가 6인 배지에서 20°C, 25°C, 28°C, 30°C, 35 °C조건으로 하여 5일 동안 정지 배양하였다. 배양기간은 선정된 pH, 온도 조건으로 150 rpm에서 5일 배양하여 균사체량을 균사체량 측정은 상압가열건조방법으로 배양액 20 mL을 filter paper disc(ADVANTEC 8mm, Toyo Roshi Kaisha, Ltd, Japan)로 여과하고 60-70°C에서 24시간 건조한 후 잔존하는 건조 균사체의 무게를 측정하였고, 시료를 filter paper disc(ADVANTEC 8 mm, Toyo Roshi Kaisha, Ltd, Japan)로 여과 한 여액을 pH meter(720 A, Orion, USA)를 이용하여 측정하였다.

그 결과 pH 5와 pH 6.5에서 차이가 없었으며, 균사체량도 가장 높았다. 이는 균사체 액체 배양 시 pH 5.2~5.6이 운지버섯 균사체 배양최적 pH 조건이었으나 오미자, 유자 첨가 후에는 다소 차이가 발견되어 pH 6.0-6.5 에서도 최적 생육 을 보였다.

(2) 최적 온도

운지버섯균주와 오미자 유자 첨가 배양 에 적합한 최적 온도를 규명하기 위해 pH6.5 에서 배양 온도를 20°C, 25°C, 28°C, 30°C, 35°C로 다르게 하여 5일 후 균사체량을 측정한 결과 28°C에서 유의적 차이가 없었으며 균사체량이 높아 전형적인 중온성 균주의 양상을 보였다.

(3) 배양 기간

운지버섯 의 균사 생장에 적합한 최적 배양기간을 규명하기 위해, 앞에서 선정된 조건인 pH 6.0-6.5, 28°C에서 10일간 배양하여 이틀마다 균사체량을 측정 한 결과 접종 후 5일까지 균체량이 급속히 증가한 반면 그 이후부터는 증가정도가 감소하는 경향을 나타내었다.

나. 안정성 확보를 위한 기확보 담자균류와 혼합 배양물 배양을 위한 식용가능 탄소원, 질소원 최적 조건 확립

(1) 탄소원 설정

운지버섯과 오미자, 유자의 최적 배양 배지를 설정하기 위해 기 설정 최적 배양 조건, 즉 120시간의 배양 시간, 초기 pH 6.5, 배양온도 28°C로 배양조건을 설정하고, glucose, sucrose, starch등의 탄소원 각 3% 농도로 첨가하고 질소원으로는 대두분을 0.9% 농도로 첨가하여 수행하였고, 최대 균 밀도 및 건조 균체량 을 조사한 결과, 탄소원의 경우 조사한 모든

탄소원을 기질로 이용하였는데, 특히, sucrose 첨가구 에서 건조 균체량 및 균 밀도가 우수한 결과를 보였다.

Table 5-3. 오미자 추출액, 유자 첨가 배양시 탄소원에 따른 최적 생육조건조사

	Glucose	Sucrose	Potato starch
Dry weight of mycelium(g/L)	7.08	9.25	6.84
Colony number(cfu/ml)	2.78×10^8	7.1×10^8	4.7×10^7

(2) 질소원 설정

질소원의 경우 시험에 사용한 질소원의 경우 그 가격이 상대적으로 고가 이므로 산업적 배양에는 가격이 저렴한 대두분이 균체생성량 및 균밀도 에서 적합하였으며 생육도 우수하였다.

Table 5-4. 오미자 추출액, 유자 첨가 배양시 질소원에 따른 최적 생육조건조사

	Yeast extract	Peptone	대두분
Dry weight of mycelium(g/L)	8.04	7.23	7.98
Colony number(cfu/ml)	6.26×10^8	2.55×10^8	7.01×10^7



Fig. 5-4. 오미자, 유자 함유 탄소원, 질소원 조건 확립 7L fermentor 실험

다. 3톤 대형 발효조를 이용한 안정성 확보된 대량배양조건 확립

확립된 최적 배양조건으로 3,000L 대형 발효조를 이용한 혼합배양 scale-up 실험을 수행하였다. 즉, 최적 탄소원으로 조사된 sucrose 3%, 대두분 0.9%의 배지를 조제후 3,000L fermentor에서 2,100L를 working volume으로 하여 발효조에 넣은 후, 121℃에서 60분간 멸균하였다. 특히 대두분의 배지 제조시 미리 대두분을 용수에 넣고 30-40분 동안 침전 후 상등액만을 취하여 수행하였다. 이렇게 조제된 배지에, 200L의 seed 발효조에 공시균주를 1%의 농도로 첨가하여 통기량 1vvm, 150rpm으로 배양 하면서 3,000L 산업적 대량배양에 접종후 48시간 경과후 오미자 5%, 유자 5% 첨가후 72시간 혼합배양을 실시하였다. 그 결과 예비 조건과 동일한 결과로 생육에는 문제가 없었다. 결과는 아래와 같다.

Table 5-5. 오미자, 유자 첨가후 3,000L fermentor 생육조건

	48 hrs	72 hrs	96 hrs	120 hrs	144 hrs
Dry weight of mycelium(g/L)	4.91	8.14	9.28	9.95	10.01
Colony number(cfu/ml)	3.89×10^6	5.71×10^8	5.2×10^9	5.9×10^9	6.76×10^9

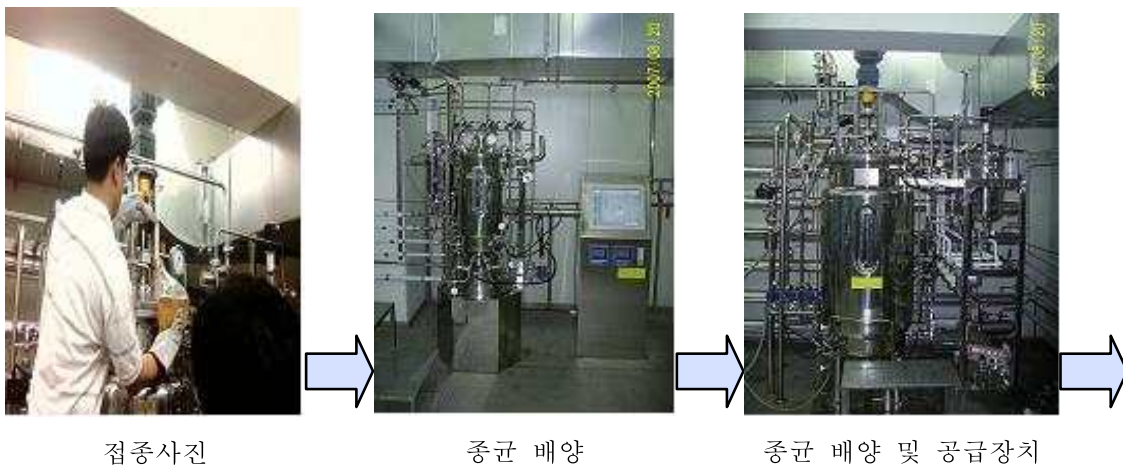




Fig. 5-5. 배양액 생산 공정

라. 혼합배양물의 균사체량, 조지방, 조단백, 조회분 및 기능성분등 식품공전에 의한 검사

- (1) 다당체 구성성분을 분석하기 위하여 표준물질로 만노즈 갈락토즈 혼합액(1:1)을 사용하여 페놀-황산법으로 측정하였고, 당 구성성분은 Jones와 Albersheim의 방법에 따라 가수분해 및 아세틸화하여 GC로 분석하였다.
- (2) 배양액을 100℃에서 3시간 추출한 다음 8,000rpm에서 20분간 원심분리 하여 얻은 상등액을 감압 농축하고, ethanol을 가하여 4℃에서 24시간 방치 하였다. 침전물을 회수하여 증류수로 녹인후 같은 조작을 2회 실시한 후 동결건조 하여 단백질 다당체를 분리하였다.

(3) 총 단백질 함량은 표준물질로서 Bovine serum albumin을 사용하여 Lowry등의 방법에 따라 측정하였고, 아미노산 구성성분은 단백질 가수분해 후 Na-form 컬럼으로 바이오크롬 20 아미노산 분석기로 분석하였다고 그 결과는 아래표 와 같다.

당	조성(%) ¹	아미노산	조성(%) ²
퓨코오스	7.0	아스파르트산	7.2
리보오스	0.3	트레오닌	6.3
아라비노스	0.9	세린	8.0
자일로즈	1.8	글루탐산	7.5
만노즈	19.3	글리신	2.3
갈락토즈	15.6	알라닌	13.1
글루코스	23.1	발린	2.9
		이소류이신	16.2
		류이신	6.1
		티로신	3.9
		페닐알라신	4.9
		히스티딘	trace
		라이신	2.8
		아르기닌	2.9
총당함량	68	총아미노산 함량	84.1

Table 5-6. 운지버섯 균사체배양액으로 부터 다당체 및 아미노산 및 당 성분

*1퍼센트는 총당량으로 계산하였다.

*2퍼센트는 총 아미노산당 함량으로 계산하였다

(4) 대량배양 생산을 위한 안정성 확립을 통한 식품소재로의 산업화

위 결과를 통해 3종의 식품소재 개발 하였으며 산업화를 통한 경제성이 확보되어 대량 생산 예정임.

(가) 오미자, 유자 함유 운지버섯 균사체 배양액



Fig. 5-6. 배합 1



Fig. 5-7. 배합 2

(나) 오미자, 유자 함유 운지버섯 배양액 및 균사체 건조분말



Fig. 5-8. 오미자 운지버섯 건조소재

(다) 오미자, 유자 함유 운지버섯 배양액 함유 젤류

젤화 식품의 목적은 씹지 않고 삼켜 먹을 수 있는 용도와 난분해성 식이섬유의 포만감으로 인한 다이어트 소재로 응용가능하다. 젤화베이스에 용도에 따라 적절한 보양 및 유용한 배합의 식품 등을 혼입시킴으로서 새로운 형태와 물성은 물린 소비접근성을 향상시킬 수 있는 다양한 향과 색소 등을 함께 혼입함으로써 상품성을 배가시킬 수 있는 식품을 제조할 수 있다. 물 500 ml에 펙틴 0.5g, 산탄검 0.5g, 소듐알긴에이트 0.5g, 글루코만난 3.0g을 순차적으로 가열하면서 넣고 용해액의 응고시 이수(물분자의 유리현상)방지를 위하여 가용성 전분 또는 한천 1.0g을 첨가하고 완전히 녹으면 80℃를 유지하면서 오미자 함유 운지버섯 균사체 배양여과액 20%를 가한후 약 20분간 유지하여 기포를 제거 후 완성하였다.



Fig. 5-9. 운지버섯 배양액 함유 젤류

제 6 절 담자균류 배양액과 가공제품의 생리활성 및 성분 분석

1. 연구배경

가. 상황버섯과 버섯의 β -glucan

뽕나무의 그루터기에 자생하는 다년생 담자균류인 상황버섯(*Phellinus linteus*)은 분류학적으로 담자균문(*Basidiomycotina*), 민주름버섯목(*Aphyllphorales*), 소나무 비늘과(*Hymenochaetaceae*), 진흙버섯속(*phellinus*)에 속하는 백색부후균으로 형태적 특징은 뽕나무의 그루터기에 자생하여 그 모양은 초기에는 노란 진흙 덩이가 뭉친 것 같은 형태를 유지하다가 다 자란 후의 형태는 그루터기에 헛바닥을 내민 모습이어서 수설(樹舌)이라고도 한다.¹⁾ 옛 문헌에 의하면 상황버섯은 본초강목에서 목이(木耳)의 향으로 분류하여 상이(桑耳), 상황(桑黃) 등으로 기록하고 있고, 동의보감에서는 탕액편에 상목이(桑木耳)라는 이름으로 기록되어 있으며 어혈, 혈병, 종양 등의 각종 질병 치료약으로 이용되어 온 것으로 기록되어 있다.²⁾ 또한 상황버섯은 항암·항종양효과³⁻¹⁰⁾, 항돌연변이원성¹¹⁾, 면역 활성화¹²⁻¹⁶⁾, 항산화능^{17,18)}, 염증저해효과¹⁹⁻²²⁾, 항알르제기성²³⁾, 항돌연변이원성²⁴⁾, 항균효과²⁵⁾ 등의 다양한 생리활성을 가지고 있다.

β -glucan은 자연계에 주로 yeast, 버섯, oat, barley에 존재하는 식이섬유로부터 유래한 다당체이다. Yeast와 버섯의 β -glucan은 (1→3), (1→6)- β -D-glucan 구조로 존재하고, oat와 barley는 (1→4), (1→6)- β -D-glucan 구조로 존재한다. β -glucan은 면역, 콜레스테롤 저하, 체중 감소, 항산화, 질병예방, 항암 등의 효과가 있다.²⁶⁾ 버섯의 β -glucan 연구는 많이 진행되었는데, Guerra²⁷⁾은 갈색공방귀버섯의 물 추출물 다당체에서 항산화활성과, 면역 활성을 확인하였고, Chakraborty²⁸⁾은 *Termitomyces eurhizus*의 알칼리 추출물의 β -glucan 구조는 NMR 결과 (1→3)- β -D-glucose임을 밝혀내었다. Pacheco-Sanchez²⁹⁾는 애기버섯의 다당체는 면역 활성을 갖고 있고, 다당체의 구조는 (1→3), (1→4)-glucose 결합을 갖고 있으며, 그 구조는 표고버섯의 β -glucan 구조와 유사하다고 하였다. Smiderle FR³⁰⁾은 팽이버섯에서 2개의 다당체를 분리해 내었는데, 2% KOH 추출물에서는 (1→3)-glucose back bone에 (1→6)-glucose가 branch된 구조를 가지고 있었고, 25% KOH 추출물에서는 (1→6) 결합 자리에 glucose, xylose, mannose와 결합되어 있는 구조를 가지고 있다고 하였다. Angeli³¹⁾는 신령버섯의 β -glucan에서 항돌연변이 효과가 있음을 확인하였다. Shin³²⁾은 상황버섯 다당체의 구조는 NMR 결과 (1→3)-glucose back bone에 (1→6)-glucose가 branch된 구조임을 확인하였고, 다당체

를 carboxymethylation한 결과, solubility, NO synthase, HT1080에 대항하는 cytotoxic activity가 증가하는 것을 보고하였다.

나. β -glucuronidase

대장암은 북미, 서유럽을 비롯한 선진국에서 발생 빈도가 높은 반면 남미, 아프리카, 아시아 등에서는 그 빈도가 낮다. 그러나 우리나라에서도 식생활의 서구화와 생활수준 향상과 더불어 대장암 발생 빈도가 증가하는 추세이며 암으로 인한 사망률의 4위를 차지하는 주요 암으로 대두되고 있다. 이러한 경향은 식습관의 차이에 의한 것으로 채소의 섭취가 적고 육류의 섭취가 높은 식습관은 장내세균의 β -glucosidase, β -glucuronidase, tryptophanase, azoreductase, nitroreductase 등의 활성을 높여 아민류와 독성물질, 변이원 등을 생성하여 장점막에 손상을 주어 대장암을 일으키고, 장관내로 흡수된 유독 물질들은 체내를 순환하면서 암유발, 동맥경화, 간장 장애, 면역기능 저하등의 원인이 된다.^{33,34)} 장내세균의 구성은 음식물, 연령, 유산균 섭취, 발암원의 흡수 등에 의해 영향을 받으며 그 결과 장내세균이 생산하는 효소활성도 영향을 받는다. 한편 probiotic의 기능은 장내 *lactobacillus*와 *bifidobacteria*와 같은 유산균의 증식을 돕고, 장내유해세균의 생육을 떨어뜨리며 β -glucuronidase의 생성과 활성을 떨어뜨려 대장암을 예방한다.³⁵⁾

β -glucuronidase(EC 3.2.1.31)는 glucuronic acid의 β -형태의 1번 탄소에 비당체가 결합한 glucuronide unit를 가수분해하는 효소이다. 이 효소는 미생물, 식물, 동물 등에 폭넓게 분포하고 있으며, 동물에서는 주로 간장과 신장에 분포하고 있다. 이 효소중 간장에서 분리한 것은 분자량이 300,000 dalton이고 동일한 4개의 subunit로 구성되어 있으며 등전점은 5.8이다. 사람의 장내세균인 *E.coli* HGU-3로부터 분리정제 한 이 효소는 분자량이 290,000 dalton이고 동일한 4개의 subunit로 구성되어 있으며 등전점은 4.8이다.³⁶⁾ 이 효소는 간에서 benzopyrene 등 β -glucoside 배당체 화합물과 glucuronic acid 화합물이 glucuronic acid conjugate로 무독화 되어 장으로 보내졌을 때 이 결합을 끊어 주어 발암 원인을 제공한다.³⁷⁾ β -glucuronidase는 세균 및 장내의 생태에 의해 결정되는데, *Clostridium* sp.에서 가장 활성이 높고 *Bacteroides* sp., *Eubacterium* sp., *Peptostreptococcus* sp. 등도 이 효소를 생산하고 있으나 *Bifidobacterium* sp.에서는 β -glucuronidase의 활성이 없다.³⁸⁾

현재, β -glucuronidase 저해효과를 갖는 식품들이 많이 알려져 있는데, 이³³⁾ 는 감초의 ether 분획과 대추의 ethylacetate 분획에서 β -glucuronidase 생산성 저해효과가 우수하였으며,

대추의 ether 및 ethylacetate 분획, 인삼 ether 분획, 감초의 ether 분획에서 β -glucuronidase 효소 저해활성이 가장 우수하다고 보고하였다. 심³⁶⁾은 현재 많이 사용되는 생약류의 β -glucuronidase 저해활성을 조사한 결과, 오배자의 물 추출 분획에 대해 흰쥐의 간장 및 대장균의 β -glucuronidase 저해 활성 IC_{50} 은 각각 0.02와 0.01 mg/mL이라고 보고하였다. 배³⁸⁾는 표고버섯으로부터 분리한 trehalose가 β -glucuronidase가 80% 이상 저해함을 발견하였다. 김³⁹⁾은 재배상황버섯을 배지에 첨가한 경우 lactulose 보다는 약하지만 대조군과 비교해서는 사람의 장내세균 총과 흰쥐의 장내세균 총을 이식한 모든 경우에 약 30%의 저해효과를 나타내었다고 보고하였다.

다. 버섯균사체의 액체배양

버섯균사체의 생육특성을 이용하여 액체배양을 할 경우, 배지의 조성 및 생육조건에 따라 발효대사작용에 의해 생리활성을 갖는 다양한 중간 또는 대사산물을 얻을 수 있다. 즉, 버섯균사체는 배지에 함유된 성분을 다양한 기능성을 갖는 물질로 생물 전환할 수 있으며, 배지에 함유된 기능성 물질도 배양액으로 포함시킬 수도 있다. 또한 버섯균사체가 생산하는 여러 가지 기능성 물질도 배양액에 부가시킬 것이다. 대부분의 생물에 의한 바이오메스 및 물질 생산은 계절에 제한을 받지만 이와 같은 버섯균사체 배양액의 생산은 계절에 영향을 받지 않고, 값싸게 대량생산이 가능하여 원료공급이 용이하고, 산업화가 쉽다는 특징을 가지고 있다.⁴⁰⁾

천연소재를 이용한 버섯균사체 배양에 관련 된 연구는 활발히 진행되고 있다. 김⁴⁰⁾은 감귤농축액 첨가배지에서 배양 한 번데기동충하초와 영지버섯의 배양 추출물의 라디칼 소거능이 증가한 것을 확인하였고 superoxide radical 소거능은 대부분의 합성배지 배양 추출물에서 높은 활성을 보였으며, 감귤농축액 첨가 배지에서의 버섯균사체 배양 추출물의 항균활성은 일반 합성 배지에서와 거의 비슷한 결과를 확인하였다. 장⁴¹⁾은 소나무잔나비버섯의 녹차 및 꿀피 물 추출물에서 배양한 균사체와 배양액의 다당류와 유리아미노산의 함량을 조사하였고, 한⁴²⁾은 곡물 액체배지에서 배양시킨 팽이버섯의 생리특성을 보고하였으며, 문⁴³⁾은 마늘 첨가 복합배지에서 배양된 영지 균사체의 면역 증진 효과를 관찰하였다. 강⁴⁴⁾은 현미, 가시오가피 및 인진쑥을 기질로 하여 큰 느타리버섯 균사의 고체배양 조건을 검토하고 배양 산물의 성분분석 및 추출물의 ACE 저해 활성을 조사하였고 김⁴⁵⁾은 대두 추출물에서 배양한 버들송이와 말뚝진흙버섯의 암 예방효과를 조사하였다.

라. 버섯균사체의 생리활성

상황균사체의 생리활성에 관한 연구가 활발히 진행되고 있다. Lee⁴⁶⁾는 쥐에 상황균사체를 미리 섭취한 결과 mucus 막을 유지시켜 ethanol로 인한 위궤양을 방지하는 것을 확인하였고, Inagaki⁴⁷⁾는 상황균사체 열수추출물이 항알르레기 효과를 갖는 것을 확인하였으며, Lim⁴⁸⁾은 발아현미에서 키운 상황버섯의 IgE 생산 억제능이 존재하는 것을 확인하였다. Kim⁴⁹⁾은 상황균사체의 ethyl acetate fraction이 간의 glutathione과 RNA 합성 수준을 유지시켜 H₂O₂- 또는 galactosamine의 hepatotoxin에 의한 간 손상으로부터 간을 보호해주는 것을 확인하였고, Pack⁵⁰⁾은 yeast-malt medium 에서 키운 상황균사체에서 분리한 노인성 치매예방 물질인 hispidin이 super oxide anion radical, hydroxyl radical, DPPH radical 저해 효과가 있으나 hydrogen peroxide radical 저해효과가 없음을 확인하였고, Choi⁵¹⁾는 상황버섯균사체의 immunomodulatory 와 anti-tumor activities 작용 기작을 알아보았다. Nakamura⁵²⁾는 상황버섯 균사체는 항종양효과가 있으며 그 효과를 갖는 물질은 α-1,3-glucan chain 을 형성하고 있음을 확인하였고, Jeon⁵³⁾은 발아현미에서 키운 상황균사체 추출물이 사염화탄소에 의한 간 손상 저해 효과가 있음을 확인하였다. 한편, 송⁵⁴⁾은 상황버섯 자실체추출 다당의 면역 활성이 63.94%로 균사체추출 다당의 활성 41.95% 그리고 균체외 다당 21.87% 보다 높은 활성을 나타내었다고 하였고, Lee⁵⁵⁾는 상황버섯 자실체추출 다당과 균사체추출 다당의 항암 활성, 항보체 활성, 독성물질 및 금속이온의 유리기 반응에 대한 항산화 효과를 비교하였으나, 상황버섯 자실체와 균사체의 생리활성 비교 연구는 미흡한 실정이다.

마. 생리활성

DPPH(1,1-diphenyl-2-picryl hydrazyl)를 이용하여 전자공여능을 측정하였다. DPPH는 분자 내 radical을 함유하여 다른 free radical들과 결합하여 안정한 complex를 만들고 있어 항산화 활성이 있는 물질과 만나면 라디칼이 소거되며 이 때 고유의 청남색이 옅어지는 특성을 가지고 있어 이 색차를 비색 정량하여 전자공여능을 측정하였고, 이 방법은 항산화제 탐색에 일반적으로 이용되는 방법으로 알려져 있다. ⁵⁶⁾ 고혈압 발생기작에서 renin-angiotensin system은 혈압 조절에 매우 중요한 역할을 한다. 특히 Angiotensin converting enzyme(ACE)는 일명 kininase라고도 불리며 인체 내에서 renin에 의해 angiotensinogen으로부터 생성된 decapeptide인 angiotensin I로부터 C-말단의 dipeptide(His-Leu)를 가수분해시킴으로써 강력한 혈관수축 작용을 나타내는 octapeptide인 angiotensin II로 전환시켜 강력한 혈관수축 작용을 일으켜 혈압상승 작용을 유발하는 효소이다. 생성된 angiotensin II는 부신피질에서 알도스테

론의 분비를 촉진하여 물과 나트륨의 배설을 억제하며, 혈관 이완작용을 돕는 nonapeptide인 bradykinin을 분해하여 불활성화 시키므로 결과적으로 혈압 상승을 일으키는 역할을 한다. 그러므로 ACE 작용억제는 혈압상승의 원인인 angiotensin II의 생산을 저해하므로 혈관수축을 막고, 체내 수분저류를 막아 고혈압을 치료하는데 효과적이며, 실제 고혈압 환자의 치료제로 ACE 저해제는 이노제 칼슘길항제 및 angiotensin 수용체 차단제 등과 함께 사용되고 있다.^{44,56,57)} 이러한 ACE의 저해인자로서는 저분자 peptide 들과 그 유도체들, 차(tea)에 존재하는 catechin 과 메밀의 rutin 같은 polyphenol 성분들이 대표적으로 알려져 있다.⁵⁸⁾ 당뇨병은 암 및 순환기 질환과 더불어 3대 질병의 하나로 지목되고 있는데, α -glucosidase는 소장의 brush-border membrane에 존재하는 소화효소이며, 이당류나 다당류를 탄수화물이 소화 흡수 되기 위한 상태인 단당류로 가수분해하는 역할을 한다. α -glucosidase 저해제는 탄수화물 식이 후 혈당상승을 억제할 수 있다.⁵⁹⁾ 본 연구에서는 β -glucuronidase 저해 활성이 강화된 상황균사체 배양액을 이용한 식품 또는 식품 소재를 개발하고자, 상황버섯의 최적 액체 배양 조건을 확립하고, β -glucuronidase 저해활성을 갖는 천연소재를 탐색하여 β -glucuronidase 저해활성이 우수한 천연소재를 첨가한 상황균사체 배양액의 전자공여능, ACE 저해활성, 혈당강하능 생리활성 평가 및 관능평가를 수행하였다.

2. 재료 및 방법

가. 재료 및 시약

결명자는 거창북부농협협동조합에서 갈근, 감초, 대추, 오미자, 영지버섯은 농협약용작물 전국협회에서 건조체로 구입하였고, 상황버섯 자실체는 (주)머쉬빌에서 건조체로 구입하였다. Angiotensin converting enzyme (EC 3.4.15.1, from rabbit lung), α -glucosidase (EC 3.2.1.20, from *Bacillus stearothermophilus*), β -glucuronidase (EC 3.2.1.31, from *Escherichia coli*), 1,1-Diphenyl-2-picryl-hydrazyl, N-Benzoyl-Gly-His-Leu, *p*-nitrophenyl beta-D-glucuronide, *p*-nitrophenol 은 Sigma Chem. Co.(USA)에서 구입하였으며, potato dextrose broth는 Difoco사에서 구입하여 사용하였고, 그 외 시약은 특급시약을 사용하였다.

나. 균주

본 연구에서 사용된 *Phellinus linteus*는 (주)바이오라이프(BF-1)으로부터 분양 받아 사용하였다. 200 mL의 PDB(2.4g/200 mL)배지에 *Phellinus linteus* 균주를 5%(v/v) 접종하여 30℃,

150 rpm으로 4일 동안 배양한 후, 이를 냉장고(4℃)에 보관하여 사용하였다.⁶⁴⁾

다. 배양특성

상황균사체의 배양 온도와 초기 pH, 배양기간을 최적화하기 위해 PDB(2.4g/200 mL)를 기본배지로 하여 5%(v/v)의 균사체를 접종하였다. 온도는 pH가 5인 배지에서 20℃, 25℃, 30℃, 35℃, 40℃ 조건으로 하여 4일 동안 정지 배양하였다. pH는 0.1N NaOH와 0.1N HCl를 이용하여 배지의 pH를 4.5, 5.0, 5.5, 6.0 및 6.5로 조절하여 30℃에서 150 rpm으로 4일 동안 배양하였다. 배양기간은 선정된 pH, 온도 조건으로 150 rpm 에서 10일 배양하여 균사체량을 상압가열건조방법으로 측정하였다.

라. 천연소재 첨가량 결정

상황균사체 배양액의 생리활성을 강화하기 위한 천연소재로 결명자가 선택 되었으며, 결명자 추출액의 배지 첨가량과 첨가시기를 결정하기 위한 연구를 수행하였다.

- 배양 전 결명자 첨가 : 기본배지 조성은 30mesh 콩 0.5%, 설탕 3%로 하여 고형물 함량이 2.28%인 결명자 추출액을 3%, 5%, 7%, 10% 첨가하여 배지를 제조 한 후 pH를 5로 조정 한 다음 121℃, 15분 멸균하였다. 종균은 5%(v/v) 접종하고 30℃, 170 rpm에서 8일 동안 배양 하였다.
- 배양 후 결명자 첨가 : 기본배지 조성은 30 mesh 콩 0.5%, 설탕 3%로 하여 배지를 제조 한 후 pH를 5로 조정 한 다음 121℃, 15분 멸균하였다. 종균은 5%(v/v) 접종하고 30℃, 170 rpm에서 8일 동안 배양 한 후 고형물 함량이 2.28%인 결명자 추출액을 3%, 5%, 7%, 10%의 농도가 되도록 첨가하였다.

마. 추출

(1) 천연소재 추출

Blender (HALLDE SB-4, HALLDE MASKINER, Sweden)로 분쇄 한 시료 30 g에 증류수 300 mL를 가하여 3시간 동안 환류추출 하였다. 이를 filter paper(advantec No. 2)로 여과 한 후 -40℃ 냉동보관하면서 생리활성 분석에 사용하였다.

(2) 버섯 추출

Cyclotec 1093 Sample Mill (I ficator, Japan)을 이용하여 100 mesh로 분쇄 한 시료 2 g에 증류수 100 mL를 가하여 4시간 동안 환류추출한 후 filter paper(advantec No. 2)로 여과하여 얻은 물 추출액을 -40°C 냉동보관하면서 생리활성 분석에 사용하였다.

(3) 상황균사체 배양액 추출

추출방법은 Fig. 6-1과 같다. 배양액을 균질화하여 121°C에서 60분간 고압추출 한 후 2000 ×g에서 10분간 원심분리 한 후, filter paper(advantec No. 2)로 여과하여 균사체를 제거하였다. 여과액의 일부는 생리활성 분석에 사용하였고, 나머지 여액에 3배량의 Ethanol을 첨가하여, 4°C에서 24시간 방치한 후 12000 rpm 에서 30분간 원심 분리하였다. Ethanol 층을 제거하고 얻어진 침전물은 동결 건조하여 β-glucan 실험에 사용하였다.^{55,65)}

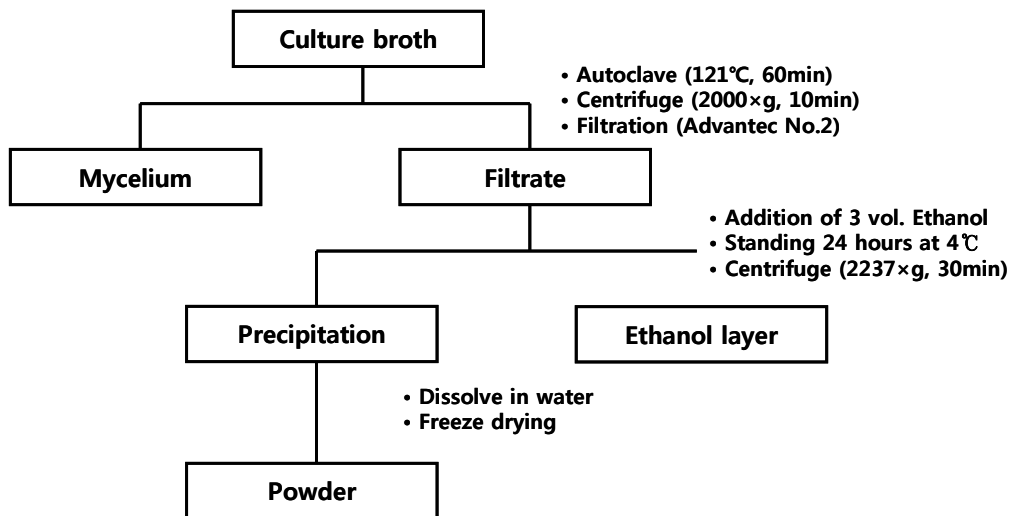


Figure 6-1. Extraction procedure from liquid culture of *P. linteus* mycelium

바. 건조 균체량

균사체량 측정은 상압가열건조방법으로 배양액 20 mL을 80 mesh로 여과 • 세척한 후 , 80°C에서 24시간 건조한 후 잔존하는 건조 균사체의 무게를 측정하였다.⁴²⁾

사. pH 측정

시료를 2000 ×g에서 10분간 원심분리 한 후, filter paper(advantec No. 2)로 여과 한 여액을 pH meter (720A, Orion, USA)를 이용하여 측정하였다.

아. 색도

시료를 2000 ×g에서 10분간 원심분리 한 후, filter paper(advantec No. 2)로 여과 한 여액의 색도를 Spectrophotometer(CM-3500d, Minolta, Japan)를 이용하여 L값(lightness), a값(redness), b값(yellowness)을 측정하였다.

자. β-glucuronidase 저해활성

β-glucuronidase 저해활성은 이³³⁾의 방법을 변형하여 실험하였다. 100 unit beta-glucuronidase 효소액 0.02 mL에 2 mM p-nitrophenyl-β-D-glucuronide 0.2 mL, 0.2 M phosphate buffer(pH 7.0) 0.2 mL, 시료 0.1 mL를 혼합하였고, 대조구는 시료 대신 0.1 mL의 증류수를 첨가하여 37°C에서 30 min 반응시킨 후 0.25 N NaOH 0.5 mL를 가하여 반응을 종료시키고 증류수 1 mL를 가하여 원심분리(2000 ×g, 20분)한 후 상등액으로 효소에 의해 기질로부터 분리된 p-nitrophenol을 405 nm에서 흡광도를 측정하였다. 다음 식에 의하여 β-glucuronidase inhibition을 계산하였고, 대조구로는 증류수를 사용하였다.

$$Inhibiton(\%) = \frac{C_{p-nitrophenol} - S_{p-nitrophenol}}{C_{p-nitrophenol}} \times 100$$

$C_{p-nitrophenol}$: Amount of p-nitrophenol of Control (ppm)

$S_{p-nitrophenol}$: Amount of p-nitrophenol of Sample (ppm)

차. 전자공여능

전자공여능은 Blois⁶⁶⁾의 방법을 변형하여 측정하였다. 각 시료 0.2 mL에 0.4 mmol α,α-diphenyl-2-picryl-hydrazyl(DPPH) 용액 0.8 mL를 넣고 vortex한 후 10분 동안 방치한 다음 510 nm에서 흡광도를 측정하였다. 전자공여능은 다음 식으로 나타내었으며 대조구로는 증류수

를 사용하였다.

$$Inhibitor(\%) = \frac{C_{Abs} - S_{Abs}}{C_{Abs}} \times 100$$

C_{Abs} : Absorbance of Control

S_{Abs} : Absorbance of Sample

카. ACE 저해활성

ACE 저해활성은 Cushman과 Cheng의 방법⁶⁷⁾으로 측정하였다. 0.3 M NaCl을 포함한 0.1M potassium phosphate buffer(pH 8.3)에 기질 5 mM hippuryl-histidyl-leucine용액 0.1 mL와 ACE (0.2 unit/mL)용액 0.08 mL 및 저해용액 0.1 mL를 혼합하였고, 대조구는 저해용액 대신 0.1 mL의 증류수를 가하여 37°C에서 30분간 반응시키고, 1 N HCl을 0.25 mL 첨가하여 반응을 중지시킨 뒤 1.25 mL의 ethylacetate를 첨가하였다. 이를 vortex 한 후 원심분리 하여 ethylacetate층 1 mL을 취하고 휘발 시킨 후, 증류수 1 mL을 첨가하여 효소에 의해 기질로부터 분리된 hippuric acid를 280 nm에서 흡광도를 측정하여 다음과 같은 식으로 ACE 저해도를 계산하였다. 대조구로는 증류수를 사용하였다.

$$Inhibitor(\%) = \left(1 - \frac{C_{Abs} - S_{Abs}}{C_{Abs}}\right) \times 100$$

C_{Abs} : Absorbance of Control

S_{Abs} : Absorbance of Sample

타. 혈당강하능

혈당강하능은 Wenling⁶⁸⁾의 방법으로 측정하였다. 기질 20 mmol maltose 0.08 mL와 시료 0.02 mL에 α -glucosidase 효소액 0.02 mL을 가하여 37°C에서 20분간 반응시키고, 반응액 0.02 mL에 glucose 정량 kit 인 Quantichrom TM Glucose Assay kit Reagent 1.5 mL를 가하여 끓는 물에서 8분간 반응시키고 4분간 냉각시킨 후 생성된 glucose를 510 nm흡광도에서 측정하였다. 다음과 같은 식에 의해 혈당강하능을 구하였으며 대조구로는 증류수를 사용하였다.

$$Inhibiton(\%) = (1 - \frac{C_{glc} - S_{glc}}{C_{glc}}) \times 100$$

C_{glc} : Amount of glucose of Control (ppm)

S_{glc} : Amount of glucose of Sample (ppm)

과. β -glucan 함량

버섯 자실체는 100 mesh 건조체를 시료로 사용하였고, 상황균사체 배양액은 ethanol 침전하여 얻은 다당체를 사용하였다. β -glucan 함량은 Megazyme사 (Wicklow, Ireland)의 β -glucan 분석법인 'Mushroom and Yeast Bata-Glucan Assay'법⁽⁶⁹⁾을 변형하여 다음과 같이 실험하였다. Total glucan은 분석시료 20 mg을 정확히 측정하여 glass cap tube (16 × 120 mm)에 넣고, 1.5 mL 37% HCl 용액을 vortex 한 후 30°C에서 45분 반응한 후 10 mL water를 첨가하고 끓는 물에서 2시간 반응한 후 냉각시킨 후 10 mL 2 N KOH를 첨가하였다. 이를 100 mL 메스플라스크에 넣고 200 mM sodium acetate buffer(pH 5.0)로 정용하였다. 시료액에 생기는 불용성 물질은 1500 ×g에서 10분간 원심 분리하였다. 원심분리액 0.05 mL에 exo-1,3- β -glucanase plus β -glucosidase(Megazyme, Wicklow, Ireland)를 0.05 mL 첨가한 후 40°C에서 60분간 반응시켰다. Glucose 정량 kit인 GOPOD reagent (Megazyme, Wicklow, Ireland)를 사용하여 glucose를 정량하여 계산법에 의해 total-glucan으로 환산하였다. α -Glucan은 분석시료 20 mg을 정확히 측정하여 glass cap tube (16 × 120 mm)에 넣고, 2 mL 2M KOH 용액을 넣은 후 Ice bath에서 20분간 교반 한 후 1.2 M sodium acetate buffer (pH 3.8) 8 mL을 넣고 즉시 0.2 mL amyloglucosidase plus invertase (Megazyme, Wicklow, Ireland)를 0.2 mL 첨가한 후 40°C에서 30분간 반응시켰다. 이를 1500 ×g에서 10분간 원심 분리하였다. 원심분리액 0.05 mL에 glucose 정량 kit인 GOPOD reagent (Megazyme, Wicklow, Ireland)를 사용하여 glucose를 정량하여 계산법에 의해 α -glucan으로 환산하였다. β -Glucan은 total-glucan과 α -glucan의 차에 의해 구한다.

$$Total-Glucan(\% w/w) = \Delta E \times F \times \frac{21.6}{0.05} \times \frac{1}{1000} \times \frac{100}{W} \times \frac{162}{180}$$

$$\alpha-Glucan(\% w/w) = \Delta E \times F \times \frac{10.3}{0.05} \times \frac{1}{1000} \times \frac{100}{W} \times \frac{162}{180}$$

$$\beta - \text{Glucan} = \text{Total-Glucan} - \alpha - \text{Glucan}$$

where:

DE = reaction absorbance - blank absorbance

F = a factor to convert of absorbance to μg of glucose

$$F = \frac{50(\mu\text{g of the } D\text{-glucose standard})}{\text{GOPOD absorbance for } 50 \mu\text{g } D\text{-glucose standard}}$$

21.6/0.05 = volume correction factor; for total glucan

(0.05 mL out of 21.6 mL was analysed)

10.3/0.05 = volume correction factor; for α -glucan

(0.05 mL out of 10.3 mL was analysed);

1/1000 = conversion from μg to milligrams;

100/W = conversion back to weight of sample (i.e. as %);

W = weight of sample analysed;

162/180 = a factor to convert from free glucose, as determined, to anhydroglucose, as occurs in β -glucan.

하. 관능평가 및 통계분석

상황균사체 배양액을 관능검사용 시료로 하여 검사요원 10명이 9점 평점법과 차이척도법⁷⁰⁾을 변형하여 평가하였다. 색, 향, 맛, 전반적인 기호도를 평가하였고, 평가방법은 제시된 표준시료와 비교하여, 표준시료에 비하여 좋을 경우 5점 보다 높은 점수를, 나쁠 경우 5점 보다 낮은 점수를 주었으며 3회 반복 실시하였다. 실험결과는 3회 반복 실험을 실시하였고, 모든 측정치를 평균과 표준편차로 나타내었으며, 통계분석은 Statistical Analysis System(SAS) program을 이용하여 분산분석(ANOVA) 하였으며, 시료 간 차이의 유무는 Duncan's multiple range test를 사용하여 비교분석하였다.($p < 0.05$)⁷¹⁾

3. 결과 및 고찰

가. 상황균사체의 최적배양조건

상황버섯의 액체배양을 통한 균사체의 생육특성을 알아보기 위한 최적배양조건을 조사하였다.

(1) 최적온도

*Phellinus linteus*의 균사생장에 적합한 배양온도를 규명하기 위해 pH 5.0에서 배양온도를 20°C, 25°C, 30°C, 35°C, 40°C로 달리하여 4일 후 균사체량을 측정된 결과 Fig. 6-2와 같았다. 통계분석 결과 25°C, 30°C에서 유의적 차이가 없었으며 균사체량이 높아 전형적인 중온성 균주의 양상을 보였다. *Phellinus* 속 균주의 최적배양온도는 25~30°C에서 최적이었다고 보고한 지⁷²⁾와 허⁷³⁾의 보고와 일치하였으며, *Phellinus linteus*의 최적배양온도가 30°C라고 한 Hwang⁶⁴⁾과 이⁷⁴⁾의 보고와도 유사하였다.

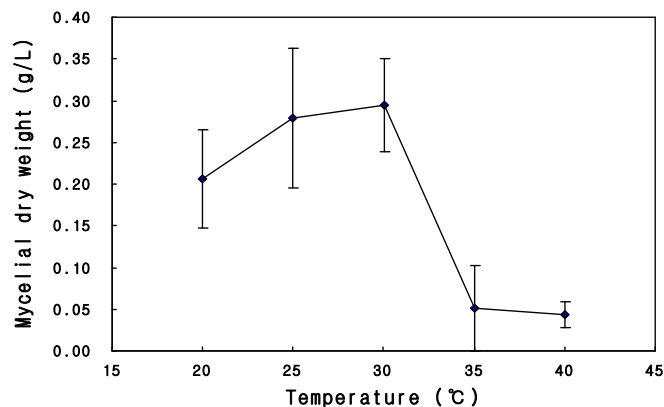


Figure 6-2. Effect of temperature on the mycelial growth in liquid culture of *P. linteus*

(2) 최적 pH

*Phellinus linteus*의 균사생장에 적합한 최적 pH를 규명하기 위해 0.1 N HCl 혹은 0.1 N NaOH를 사용하여 pH를 4.5, 5.0, 5.5, 6.0 및 6.5로 조절된 PDB 배지에 종균을 5%(v/v)로 접종한 후 150 rpm, 30에서 4일간 배양하여 균사체량을 측정된 결과 Fig. 6-3과 같았다. 통계분석 결과 pH 4.5와 pH 5.0에서 유의적 차이($p < 0.05$)가 없었으며, 균사체량도 가장 높았다. 이는 액체배양 시 pH 5.0이 최적 pH 조건이라고 한 Hwang⁶⁴⁾의 보고와 유사하였고, 이⁷⁴⁾은 pH 5.0과 pH 6.0에서 생육이 양호하였다고 하였다. 그러나 YMB 배지에서 배양한 *Phellinus linteus*의 최적 pH는 6.0~7.0으로 조사한 지⁷²⁾의 보고와 *Phellinus spp.*의 최적 pH는 6.0

~8.0 으로 조사 한 허⁷³⁾의 보고와는 다르다. pH 5.5~6.5에서는 유의적 차이가 없었는데, 이는 *Phellinus spp.*가 pH 5.0~8.0에서는 큰 차이 없이 비교적 양호한 성장속도를 나타낸 허⁷³⁾의 보고와 유사하다.

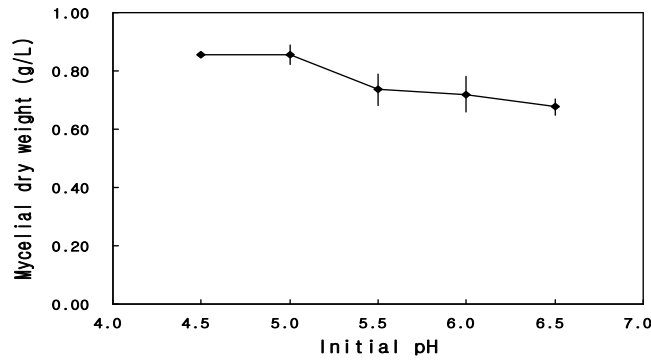


Figure 6-3. Effect of initial pH on the mycelial growth in liquid culture of *P. linteus*

(3) 배양기간

*Phellinus linteus*의 균사생장에 적합한 최적 배양기간을 규명하기 위해, 앞에서 선정된 조건인 30°C, pH 5에서 10일간 배양하여 균사체량을 측정 한 결과는 Fig. 6-4와 같다. 접종 후 8일까지 균사체량이 증가하였고, 이는 배양기간 15일까지 균사체량이 증가 한 Hwang⁶⁴⁾의 보고와 MYB배지를 이용하여 300 mL삼각플라스크에서 배양 시 20일에 최적 균사체량을 얻었고, 8 L 삼각플라스크에서 배양 시 12일에 최적 균사체량을 얻었다고 보고한 이⁷⁴⁾의 보고와 다르다. 이는 접종방법, 배지조성, 배양용기, 공기주입량에 따라 상황 균사체의 최적 배양기간이 다르며, 상황 균사체를 대량 생산하기 위한 기초 연구가 활발히 진행되고 있다.^{75,76)} 본 실험 결과, 상황버섯의 최적배양조건은 온도 30°C, pH 5.0, 배양기간 8일로 각각 선정되었다.

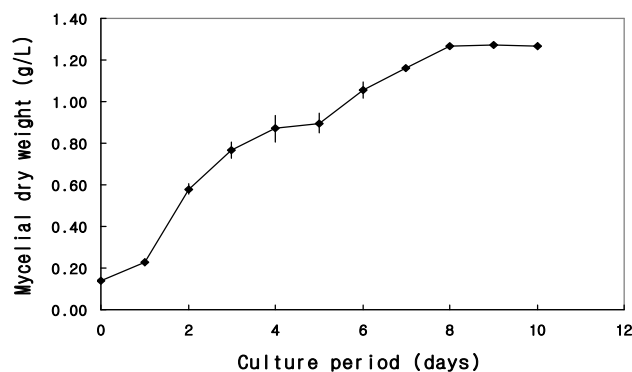


Figure 6-4. Effect of culture period on the mycelial growth in liquid culture of *P. linteus*

나. 천연 첨가 소재의 결정

상황균사체 배양 시 배지의 첨가소재를 결정하기 위하여 갈근, 감초, 결명자, 대추, 오미자의 생리활성을 분석 한 결과는 Table 6-1과 같다. 각 시료 30 g에 물 300 mL을 넣고 3시간 환류추출 한 후 여과하여 추출액의 고형물 함량이 5 mg/mL이 되도록 조정하여 실험하였다.

(1) β -glucuronidase 저해활성

β -glucuronidase 저해활성은 갈근, 감초는 50% 이상의 저해활성을 나타내었는데, 결명자가 95%로 가장 높았으며 대추는 활성이 나타나지 않았다. 이³³⁾는 β -glucuronidase를 생산하는 *E.coli* HGU-3를 사용하여 저해활성을 측정한 결과, 갈근 77%, 감초 91%, 결명자 62%, 대추 75%, 오미자 0%의 활성이 보였다고 보고하였고, 심³⁶⁾은 β -glucuronidase를 생산하는 *E.coli* HGU-3를 사용하여 0.08 mg/mL 물 추출물에서 저해활성을 측정한 결과, 감초 36.5%, 결명자 20.8%, 대추 0%, 오미자 7.5%의 활성을 보였다고 보고하였다. 본 실험은 β -glucuronidase를 이용하여 저해활성을 측정하였고, 이³⁴⁾와 심³⁶⁾은 β -glucuronidase를 생산해 내는 *E.coli* HGU-3를 이용하여 β -glucuronidase의 활성을 측정 한 것으로, 측정 방법에 따라 결과가 다르게 나온 것으로 생각된다.

(2) 전자공여능

DPPH에 대한 전자공여능을 측정한 결과, 물 추출물 5 mg/mL에서 결명자가 80.9%로 높은 항산화력을 보였고, 감초, 대추, 오미자는 50% 미만의 낮은 항산화력을 보였다. 김⁷⁷⁾은 물 추출물 1 mg/mL에서 갈근 16.8%, 감초 13.3%, 오미자 33.5%의 전자공여능을 확인하였고, 임⁷⁸⁾은 결명자 methanol 추출물 0.1 mg/mL에서 36.5%의 전자공여능을 보았다. 강⁷⁹⁾은 전자공여능이 phenolic acids와 flavonoids 및 기타 phenolic 물질에 대한 항산화 작용의 지표라 하였으며, 이러한 물질은 환원력이 큰 것일수록 전자공여능이 높다고 하였다. DPPH는 아스코르빈산, 토코페롤, polyhydroxy 방향족 화합물, 방향족 아민류에 의하여 환원되어 짙은 자색이 탈색됨으로써 전자공여능의 차이 측정이 가능하다, 따라서 항산화물질의 전자공여능을 측정할 때는 DPPH법이 편리하다고 알려져 있다. 결명자와 갈근의 경우 추출물의 색소로 인하여 측정에 많은 어려움이 있었는데, 김⁸⁰⁾은 색소가 함유된 추출물의 경우 DPPH법의 적용에는 많은 경험이 요구된다고 하였다.

(3) ACE 저해활성

ACE 저해활성을 측정한 결과, 감초, 결명자가 물 추출물 5 mg/mL에서 각각 97.7%, 96.1% 로 우수한 활성을 보였고, 대추는 13.1%로 가장 낮은 활성을 보였다. 결명자 물 추출물 1 mg/mL에서 ACE 저해활성을 측정해 본 결과 66.2%의 ACE 저해활성을 보였는데, 윤⁸¹⁾은 결명자 70% methanol 추출물 1 mg/mL에서 64.2% 의 ACE 저해활성을 보고하였다.

(4) 혈당강하능

저해활성을 측정한 결과 물 추출물 5 mg/mL에서 결명자가 24.2% 로 가장 높게 나왔고, 갈근, 감초, 대추, 오미자는 모두 10% 이내로 낮은 활성을 보였다. 본 실험의 결과 상황균사체 배양 시 배지의 첨가소재는 β -glucuronidase 저해활성, 전자공여능, ACE 저해활성, 혈당강하 능이 다른 소재에 비해 우수한 결명자로 선정하였다.

Table 6-1. Biological activities of water extract of some plants^{1,2)}

Plant	EDA (%)	β -glucuronidase inhibition (%) ³⁾	ACE inhibition (%)	α -glucosidase inhibition (%)
<i>Pueraria thunbergiana</i> (갈근)	56.0±0.82	51.9±0.91	67.7±2.60	8.8±0.19
<i>Glycyrrhiza uralensis</i> (감초)	9.0±0.04	85.25±0.08	97.7±2.40	7.8±2.39
<i>Cassia semen</i> (결명자)	80.9±0.25	95.3±1.80	96.1±7.38	24.2±0.00
<i>Zizyphi fructus</i> (대추)	13.18±0.97	ND ⁴⁾	13.1±2.48	4.8±0.15
<i>Schizandra chinensis</i> (오미자)	20.43±0.21	6.8±1.27	43.8±1.07	7.8±0.45

¹⁾ Each plant extract was measured at 5 mg/mL

²⁾ Values are mean \pm S.D. of triple determinations

³⁾ Produced enzyme activity, 0.08 unit per tube

⁴⁾ ND Not detectable

다. 상황버섯 및 영지버섯 자실체의 생리활성 비교

상황버섯 자실체의 생리활성을 영지버섯과 비교하여 측정하기 위하여 버섯 중량의 20배의 물을 가하여 추출 여과 하여 시료로 사용하였다. 생리활성을 분석한 결과는 Table 6-2와 같다.

(1) β -glucuronidase 저해활성

β -glucuronidase 저해활성은 상황 54.7%, 영지 6.1%로 상황버섯이 더 우수하였으며, 김³⁹⁾은 사람 및 흰쥐의 장내세균총으로써 신선한 분변 또는 *Bifidobacterium breve* JCM 1192를 상황 추출물 0.1% 함유한 배지에 접종하여 혐기적 조건에서 배양한 결과, 사람은 51%, 흰쥐는 30%의 β -glucuronidase 저해활성을 확인하였다.

(2) 전자공여능

전자공여능은 상황 81.9%, 영지 29.7%로 상황버섯이 더 우수하였고, 권⁸²⁾은 추출방법에 따른 상황버섯의 전자공여능은 ethanol에서 80°C, 4시간, 50 g/L 조건에서 추출 한 추출액의 IC₅₀이 17.14 mg/mL로 가장 우수하였다고 보고하였고, 이⁵⁷⁾도 ethanol 농도별 추출물 대부분이 80% 이상의 전자공여능을 나타내었으며 100% ethanol 추출물에서 전자공여능이 94.61%로 가장 우수하다고 하였다. 송⁸³⁾은 0.1 mg/mL 찔레영지버섯의 물 추출물의 전자공여능이 28.1%라고 보고하였다.

(3) ACE 저해활성

ACE 저해활성은 상황 30.0%, 영지 55.5%로 영지버섯이 더 우수하였고, 이⁵⁷⁾은 상황버섯을 ethanol 농도별로 추출한 결과, 80% ethanol 추출물의 ACE 저해도가 95.1%로 가장 우수하다고 보고하였다. 송⁸³⁾은 40% ethanol에서 찔레영지버섯 추출물의 ACE저해활성은 12.0%로 나타내었다고 보고하였고, Hagiwara⁸⁴⁾는 노랑느타리버섯의 물 추출물이 6 mg/mL의 ACE저해활성 IC₅₀을 나타내었고, 노랑느타리버섯에서 분리한 D-mannitol과 그 외 당알코올에서도 ACE 저해활성이 있음을 확인하였다. Lee⁸⁵⁾는 여름느타리버섯, 느타리버섯, 팽이버섯, 왕송이버섯, 양송이버섯, 복령버섯, 저령버섯, 표고버섯을 30°C, 12 시간 추출하여 ACE 저해활성을 측정한 결과, 왕송이버섯 물 추출물의 저해활성이 61.3%로 가장 높았고, ACE 저해활성을 나타내는 물질은 tripeptide로 구성되어 있음을 확인하였다.

(4) 혈당강하능

혈당강하능은 영지 40.1%, 상황 20.1%로 영지버섯이 더 우수하였다. 한편, Matsuur⁸⁶⁾은 잎새버섯의 물 추출물에서 α -glucosidase 저해효과가 있음을 확인하였고, 이를 나타내는 물질은 D-(+)-trehalose임을 확인하였다.

Table 6-2. Biological activities of water extract of mushrooms¹⁾

mushroom	EDA (%)	β -glucuronidase inhibition (%) ²⁾	ACE inhibition (%)	α -glucosidase inhibition (%)
<i>Phellinus linteus</i>	81.9±0.19	54.74±1.05	30.0±6.9	20.1±0.33
<i>Ganoderma lucidum</i>	29.7±0.03	6.1±4.67	55.5±12.24	40.1±5.12

¹⁾ Values are mean \pm S.D. of triple determinations

²⁾ Produced enzyme activity, 0.08 unit per tube

(5) β -glucan 함량

Megazyme사의 Mushroom and Yeast Bata-Glucan Assay kit를 사용하여 β -glucan 함량을 분석한 결과는 Table 6-3과 같다. 상황버섯 건조분말의 β -glucan 함량은 25.6%이고, 영지버섯 건조분말의 β -glucan 함량은 16.0%로 상황버섯의 β -glucan 함량보다 낮은 수준이었다. Pamela⁸⁷⁾이 변형된 MCCeary 법에 의해 분석한 β -glucan 함량은 느타리버섯은 0.38%, 새송이버섯은 0.38%, 산느타리 버섯은 0.53%, 표고버섯은 0.22% 으로 보고하였다. 본 실험 결과, 상황버섯 자실체의 생리활성은 β -glucuronidase 54.7%, 전자공여능 81.9%, ACE 저해활성 30.7%, 혈당강하능 20.1%를 갖고 있는 것을 확인하였다.

Table 6-3. β -glucan contents in some mushrooms^{1,2)}

Sample	β -glucan (%) (w/w)
<i>Phellinus linteus</i> powder	25.6±1.36
<i>Ganoderma lucidum</i> powder	16.0±0.09

¹⁾ Values are mean \pm S.D. of triple determinations

²⁾ Samples were analysed by Megazyme method of "Mushroom and Yeast Beta-Glucan Assay"

라. 결명자 추출액을 첨가한 배지에서 상황균사체 배양

상황균사체의 생리활성을 강화하기 위하여 갈근, 감초, 대추, 오미자 보다 β -glucuronidase, 전자공여능, ACE 저해도, 혈당강하능 생리활성이 우수한 결명자를 첨가하여

상황버섯 균사체를 배양하였다. 콩 0.5%, 설탕 3%로 구성된 기본 배지에 고형물 함량이 2.28%인 결명자 추출액을 3%, 5%, 7%, 10% 첨가하여 첨가량을 결정하였고, 첨가시기는 상황균사체 배양 전에 배지 성분으로 결명자 추출액을 넣은 것과 배양 후 배양이 완료된 배양액에 결명자 추출액을 넣은 것을 비교 실험하여 생리활성이 우수하게 나타난 것으로 결정하였다. 배양 조건은 pH를 5로 조정된 배지를 이용하여 30℃, 170rpm에서 8일간 배양하였다.

(1) 결명자 추출액이 균사체량에 미치는 영향

배양 전에 결명자 추출액을 첨가한 배지에서 상황균사체를 배양 한 결과는 Fig. 6-5와 같다. 균사체량은 첨가량에 따라 7%까지 유의적으로 증가하는 것으로 나타났다. 최⁸⁸⁾은 배지에 식물추출물을 첨가하여 뽕나무버섯 균사체를 배양한 결과, 가시오가피 뿌리, 유근피, 홍삼박 추출물 첨가에 따라 균사체량이 증가하였으며, 당귀, 상백피 첨가구는 균사체량에 영향을 미치지 않으며, 옷피, 참마, 가시오가피 가지는 첨가농도에 의존적으로 저해를 받는다고 하였다. 기본배지에 상황균사체를 배양 한 후 결명자 추출액을 3%, 5%, 7%, 10% 첨가하여 균사체량을 측정 한 결과 7%까지는 유의적 차이($p < 0.05$)가 없는 것으로 나타났다.

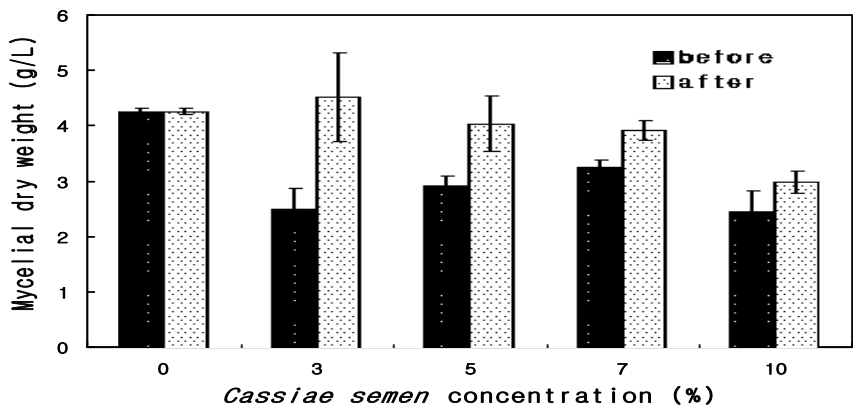


Figure 6-5. Effect of *Cassiae semen* extracts on the mycelial growth in liquid culture of *P. linteus* ■ Addition *Cassiae semen* in medium before culture □ Addition *Cassiae semen* in medium after culture

(2) 결명자 추출액이 pH 에 미치는 영향

상황 균사체 배양시 결명자 추출액 첨가량에 따른 pH 변화는 Fig. 6-6과 같으며, 결명자 첨가 전, 3~10% 첨가량에 따라 pH는 7.21~7.67 이었고, 결명자 첨가 후 3~10% 첨가량에 따라 pH는 7.06~7.67로 결명자 첨가량과 첨가시기에 따라 pH에는 영향을 주지 않는 것으로 보인다.

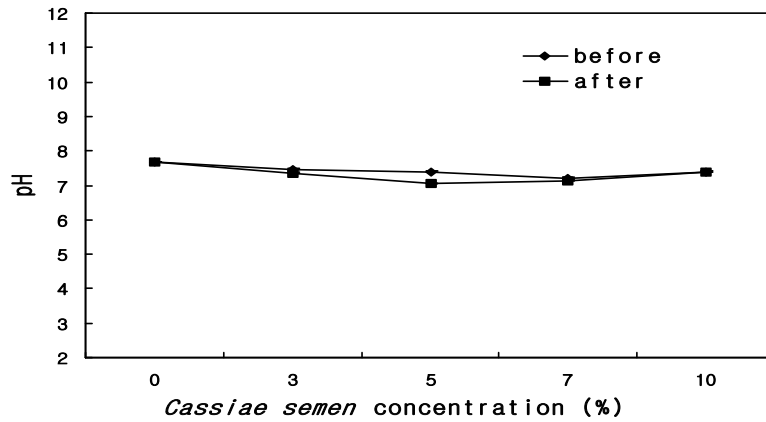
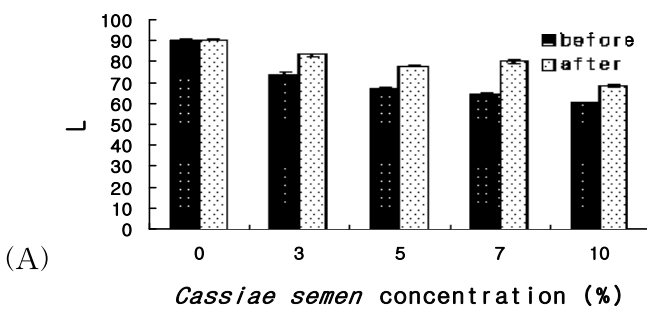


Figure 6-6. Effect of *Cassiae semen* extracts on the final pH in liquid culture of *P. linteus* —◆— Addition *Cassiae semen* in medium before culture —■— Addition *Cassiae semen* in medium after culture

(3) 결명자 추출액이 색도에 미치는 영향

결명자를 첨가한 상황 균사체 배양액의 색도를 측정하기 위하여 배양액을 2000 ×g에서 원심 분리하여 균사체를 제거한 후 색도를 측정한 결과 Fig. 6-7과 같다.



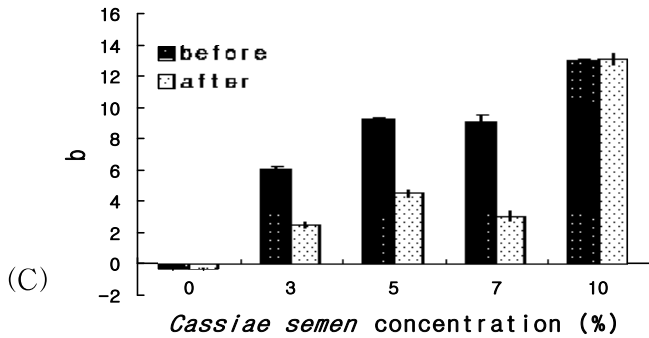
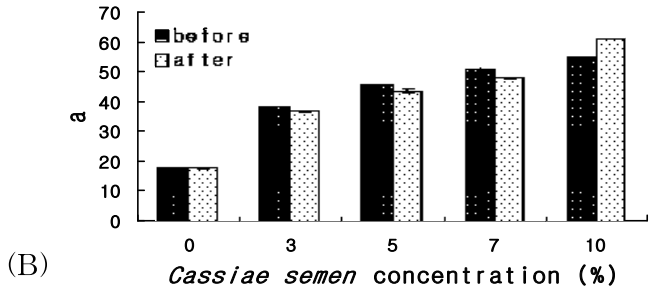


Figure 6-7. Hunter color value of *P. linteus* mycelia cultured with *Cassiae semen* extracts (A) L value (B) a value (C) b value ■ Addition *Cassiae semen* in medium before culture □ Addition *Cassiae semen* in medium after culture

명도를 나타내는 L값은 결명자의 첨가량에 따라 감소하였으며, 배양 전에 첨가한 것이 배양 후에 첨가 한 것보다 낮은 경향을 보였다. 적색도를 나타내는 a값은 결명자의 첨가량에 따라 증가하였으며, 배양 전에 첨가한 것이 배양 후에 첨가한 것보다 약간 높은 경향을 보였다. 이는 결명자 첨가 배지 제조 시 결명자 추출액의 유리당⁸⁹⁾인 raffinose, fructose, glucose와 배지성분인 콩의 단백질과 반응하여 열에 의해 색이 변성되는 Maillard reaction⁹⁰⁾에 의한 것으로 생각된다.

(4) β -glucuronidase 저해활성

상황 균사체 배양 시 결명자의 첨가량과 첨가시기에 따른 β -glucuronidase 저해활성 변화는 Fig. 6-8과 같으며, 결명자의 첨가량에 따라 증가하였고, 첨가 시기는 배양 전에 첨가한 것이 배양 후에 첨가한 것 보다 높은 활성을 보였다. 특히, 결명자 추출액 10% 첨가구에서는 배양 전보다 배양 후에 26.4%의 저해활성이 증가하였다. 이는 결명자의 기능성과 함께 액체 배양에 따른 결명자 구성물질의 생물전환에 의해 β -glucuronidase 저해활성이 증가한 것으로 사료된다.

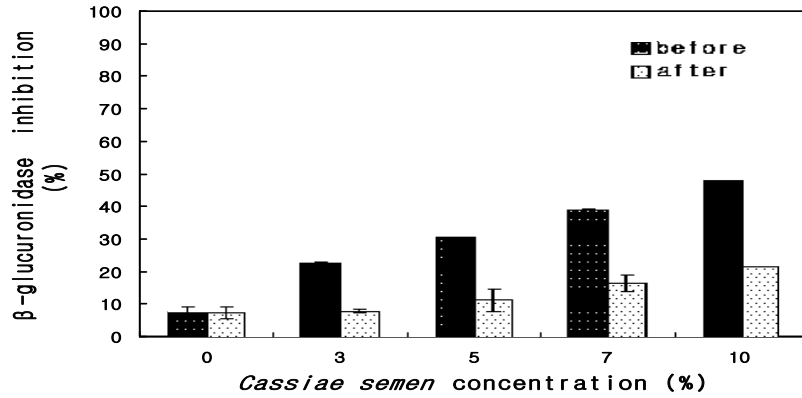


Figure 6-8. Inhibition effect on β -glucuronidase by the extract of *P. linteus* mycelia cultured with *Cassiae semen* extracts ■ Addition *Cassiae semen* in medium before culture □ Addition *Cassiae semen* in medium after culture

(5) 전자공여능

결명자의 첨가량과 첨가시기에 따른 전자공여능은 Fig. 6-9와 같다. 전자공여능은 결명자 첨가량이 증가함에 따라 약간 증가하였으며, 첨가 시기는 배양 후에 첨가한 것이 배양 전에 첨가한 것보다 높은 활성을 보였다. 이는 감귤 농축액 첨가 배지에서 상황버섯, 번데기동충하초, 운지버섯, 꽃송이버섯, 신령버섯, 차가버섯, 표고버섯, 노루궁뎅이버섯, 영지버섯 균주를 배양한 결과, 영지버섯과 번데기동충하초를 제외한 대부분의 버섯에서 배양액의 전자공여능이 감소한 결과와 비슷하다.⁴⁰⁾ 이는 액체배양에 따른 발효대사작용에 의해 결명자의 전자공여능이 감소된 것으로 사료된다

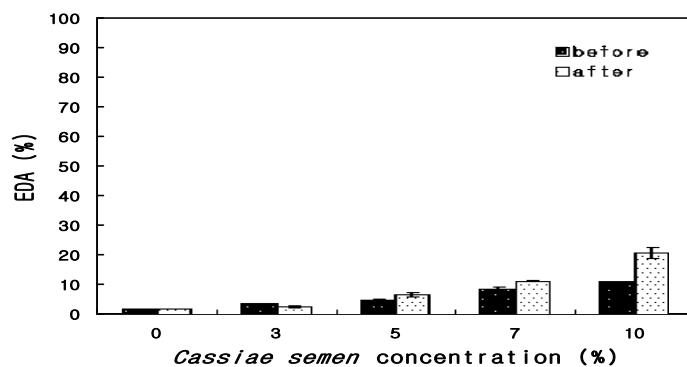


Figure 6-9. Electron donating activities of the extract of *P. linteus* mycelia cultured with *Cassiae semen* extracts ■ Addition *Cassiae semen* in medium before culture □ Addition *Cassiae semen* in medium after culture

(6) ACE 저해 활성

결명자의 첨가량과 첨가시기에 따른 ACE저해활성 변화는 Fig. 6-10과 같다. 결명자를 배양 전에 첨가한 것은 첨가량에 따라 모두 40% 이상의 저해활성을 보였으며, 그룹 간에 유의적인 차이를 보이지 않았으나, 배양 후에 첨가한 것은 결명자 7% 첨가구의 ACE 저해활성이 38.8%로 가장 높은 수준이었다. Kim⁹¹⁾은 버섯 액체배양액의 ACE저해활성을 측정하였는데, 잎새버섯 8.1%, 표고버섯 44.4%, 마른진흙버섯 27.4%, 맛비늘버섯 45.4%, 영지버섯 16.4%, 팽이 버섯 52.8%, 느타리버섯 18.9%로 보고하였다. 이는 결명자 무첨가구의 ACE 저해활성 44.6% 보다 낮은 수준이다. 또한 Kim⁹¹⁾는 sucrose, ammonium acetate, glutamic acid를 이용하여 팽나무버섯 액체배양 시 ACE 저해활성을 80% 이상 높였다.

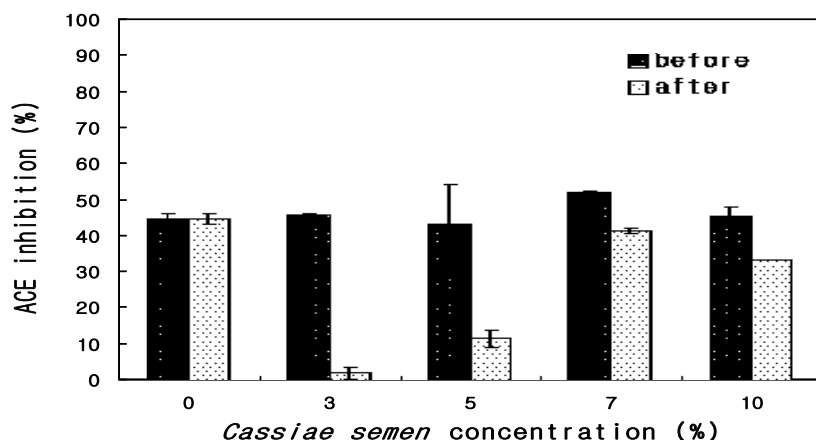


Figure 6-10. Inhibition effect on angiotensin converting enzyme by the extract of *P. linteus* mycelia cultured with *Cassiae semen* extracts ■ Addition *Cassiae semen* in medium before culture □ Addition *Cassiae semen* in medium after culture

(7) 혈당강하능

결명자의 첨가량과 첨가시기에 따른 혈당강하능은 Fig. 6-11과 같다. 결명자를 배양 전에 첨가한 것은 결명자 5%까지 유의적 차이를 보이지 않았으나 7%, 10% 첨가구에서는 유의적으로 혈당강하능이 증가하였다. 배양 후에 첨가한 것은 첨가량에 따라 증가하였다.

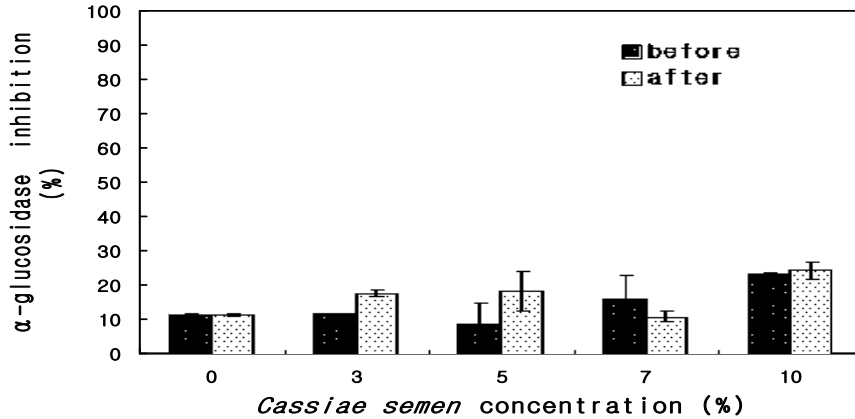


Figure 6-11. Effects of the extracts of *P. linteus* mycelia cultured with *Cassiae semen* extracts on the digestion of maltose by α -glucosidase. ■ Addition *Cassiae semen* in medium before culture □ Addition *Cassiae semen* in medium after culture

(8) β -glucan 함량

상황 균사체 배양액의 β -glucan 함량은 세포 내외의 β -glucan 함량을 측정하기 위하여 균사체와 배양액을 분리하지 않고 같이 열수 추출하여 얻은 다당체를 이용하여 측정하였다. 배양 전에 결명자를 배지에 첨가하여 키운 상황 균사체 배양액의 β -glucan 함량을 측정한 결과는 Fig. 6-12와 같다. 결명자 첨가량에 따라 증가하는 경향을 보였다. 무첨가구는 4.18 mg/L, 결명자 10% 첨가구에서는 16.81 mg/L로 4배의 증가율을 보였다. 또한 PDB에서 키운 상황버섯 배양액의 β -glucan 함량은 8.77 mg/L이고 결명자를 10% 첨가한 상황버섯 배양액의 β -glucan 함량은 16.81 mg/L로 PDB에서 키운 상황버섯 배양액의 β -glucan 함량에 비해 2배의 증가율을 보였다.

이⁶⁵⁾는 아가리쿠스 버섯 균사체 배양 시 배지의 feeding을 통해 세포 외 β -glucan 생성량을 2.8 g/L에서 5.2 g/L로 증가시켰고, 일반적으로 균사체 내에 단백질이나 기타 고분자와 결합된 구조로 추출효율이 높지 않은 β -glucan을 효소반응을 통해 3.5 g/L까지 추출하게 되어, 세포 내외의 β -glucan을 합하여 총 8.7 g/L을 얻었다고 보고하였다. Reverberi⁹²⁾는 olive mill wastewater에서 10종은 버섯을 액체배양 한 결과, 표고버섯과 느타리버섯에서의 β -1,3-glucan synthase의 활성이 증가하는 것을 관찰하였다. 이는 결명자의 첨가가 발효대사과정에 영향을 주어 β -glucan 합성을 증진시키는 것으로 생각된다.

또한 β -glucan이 β -glucuronidase 활성 저해에 관련 된 보고는 없었으나, 식이 섬유 중 하나인 β -glucan은 항암효과를 가지고 있는 것으로 밝혀져 있고,⁹³⁾ 식이 섬유의 섭취로 인한 항암효과와 β -glucuronidase 활성 저해효과에 대한 보고가 있어,^{94,95)} β -glucan 함량 증가에 따라 β -glucuronidase 저해활성이 증가 된 것으로 생각된다. 따라서 향후 β -glucan의 β -glucuronidase 저해활성에 대한 연구 필요하다.

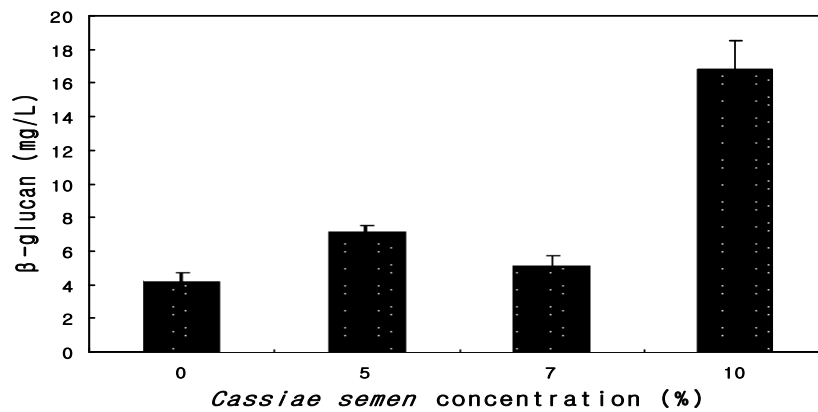


Figure 6-12. Changes of β -glucan content of *P. linteus* mycelia cultured with *Cassiae semen* extracts ■ Addition *Cassiae semen* in medium before culture

(9) 관능평가

관능평가는 9점 평점법과 차이척도법을 변형하여 평가 하였으며 통계분석은 0.05% 유의 수준에서 검정 한 결과 Table 6-4와 같다. 배양 전, 배양 후 모두 0.05% 유의수준에서 유의차를 보이지 않았고, 배양 전에 첨가한 것은 색, 향, 맛, 전반적인 기호 도에서 모두 각 시료별 grouping에서 차이를 보이지 않았으나, 5% 첨가 구에서 전반적인 기호도가 5.27점으로 가장 좋은 점수를 얻었다. 배양 후 첨가한 것에서 색은 유의적 차이가 없었으나 향과 전반적인 기호도는 각 시료별로 3 group 으로 나뉘었으며, 첨가량이 많아질수록 낮은 점수를 얻었다.

Table 6-4. Sensory evaluation of liquid cultured *P. linteus* with *Cassiae semen* extracts^{1,2)} (A) Addition *Cassiae semen* in medium before culture. (B) Addition *Cassiae semen* in medium after culture

	<i>Cassiae semen</i> (%)	Sensory score			
		color	flavor	taste	overall 1
(A)	0	5.00 ^a	5.00 ^a	5.00 ^a	5.00 ^a
	3	5.07 ^a	4.20 ^a	4.87 ^a	4.67 ^a
	5	5.07 ^a	4.80 ^a	5.27 ^a	5.27 ^a
	7	5.07 ^a	4.60 ^a	5.00 ^a	5.20 ^a
	10	4.87 ^a	4.73 ^a	4.67 ^a	4.60 ^a
	F-value	0.06 ^{NS}	0.78 ^{NS}	0.42 ^{NS}	0.72 ^{NS}

	<i>Cassiae semen</i> (%)	Sensory score			
		color	flavor	taste	overall 1
(B)	0	5.00 ^a	5.00 ^a	5.00 ^a	5.00 ^a
	3	4.73 ^a	4.13 ^{ab}	3.80 ^c	4.07 ^{ab}
	5	5.47 ^a	4.40 ^{ab}	4.73 ^{ab}	4.33 ^{ab}
	7	5.60 ^a	4.73 ^{ab}	4.93 ^{ab}	4.73 ^{ab}
	10	4.93 ^a	4.07 ^b	4.07 ^{bc}	3.93 ^b
	F-value	1.41 ^{NS}	1.82 ^{NS}	3.20 ^{NS}	1.77 ^{NS}

¹⁾ Means within a column not followed by the same letter are significantly different (p < 0.05).

²⁾ NS not significant

따라서 색도, β -glucuronidase 저해활성, 전자공여능, ACE 저해활성, 혈당강하능, 관능평가를 고려 할 때, 결명자의 첨가시기는 배양 전 첨가가 적당하며, 첨가량이 많아질수록 생리활성은 증가하나, 관능평가는 감소하므로 첨가량은 5~7%가 적당하다.

4. 요약

본 연구에서는 β -glucuronidase 저해 활성이 강화된 상황균사체 배양액을 식품 소재로 개발하고자, 상황균사체의 최적 액체 배양 조건을 확립하고, β -glucuronidase 저해활성을 갖는 천연소재를 탐색하여 이를 첨가한 상황균사체 배양액의 β -glucuronidase 저해활성, 전자공여능, ACE 저해활성, 혈당강하능, β -glucan 함량 분석 및 관능평가를 수행하였다.

- 상황균사체 최적배양조건은 30℃, pH 5.0, 최적배양기간은 8일이었다.
- 갈근, 감초, 결명자, 대추, 오미자 5종의 생리활성을 측정한 결과, β -glucuronidase 저해활성, 전자공여능, ACE 저해활성, 혈당강하능을 측정한 결과, 결명자가 각각 95.0%, 80.9%, 96.1%, 24.2%로 다른 식품소재에 비해 우수하였다. 따라서 상황균사체 배양을 위한 배지에 첨가 할 식품소재로 결명자를 선정하였다.
- 상황버섯 자실체의 생리활성 및 β -glucan 함량을 측정한 결과, β -glucuronidase 저해활성 54.1%, 전자공여능 81.9%, ACE 저해활성 30.0%, 영지버섯 55.5%, 혈당강하능 20.1%이었고, β -glucan 함량은 25.6% 이었다.
- 상황 균사체 배양 시 결명자 추출액의 배지 첨가량과 첨가시기를 결정하기 위해, 결명자 3~10%의 농도로 배양 전과 배양 후에 첨가하여 배양한 결과, 결명자 첨가량 7% 까지 균체량이 유의적으로 증가하였고, 최종 pH에는 영향을 주지 않는 것으로 나타났다. 색도는 첨가량에 따라 L값은 감소하였고, a값과 b값은 증가하였으며, 첨가시기에 따라 L값은 배양 전에 첨가한 것이 낮은 값을 나타내었고, a값과 b값은 배양 전에 첨가한 것이 높은 값을 나타내었다.
- β -glucuronidase는 결명자의 첨가량에 따라 증가하였으며 배양 전에 첨가한 것이 높았다. 전자공여능은 결명자의 첨가량에 따라 약간 증가하였으며 배양 후에 첨가한 것이 높았다. ACE 저해활성은 배양 전 첨가구에서 모두 40%이상의 활성을 보였으나, 유의적 차이가 없었고, 배양 후 첨가구는 7% 첨가구까지 증가 하였으나 모두 배양 전의 저해활성 보다 낮았다. 혈당강하능은 모두 30% 이내의 낮은 활성을 보였는데, 결명자의 첨가량에 따라 증가하였으며, 첨가시기는 배양 후 첨가구가 약간 높은 정도를 보였다. β -glucan 함량은 대조구는 4.18 mg/L, 결명자 10% 첨가구는 16.81 mg/L로 결명자 첨가량에 따라 β -glucan 함량이 증가하였다 .
- 관능평가는 배양 전 첨가구에서는 색, 향, 맛, 전반적인 기호도에서 유의적 차이를 보이지 않았으나 배양 후 첨가구에서는 첨가량에 따라 기호도가 감소하는 경향을 보였다.

종합적으로 색도, β -glucuronidase 저해활성, 전자공여능, ACE 저해활성, 혈당강하능, 관능평가를 고려 할 때, 결명자의 첨가시기는 배양 전 첨가가 적합하며, 첨가량이 많아질수록 생리활성은 증가하나, 기호도는 감소하므로 5~7% 첨가량이 상황균사체 배양의 식품 또는 식품소재로서 응용 가능성이 높을 것으로 판단된다.

제 7 절 병입 제품의 산업화 기술개발

1. 병입 상품으로의 산업화를 위한 적정 배합비를 설정하였다.

가. 실험실 공정 실험

실험실 공정 실험은 제3세부 연구기관인 바이오라이프의 발효공정을 답습하여 자사의 소형(10ℓ) 발효기에서 시험 실시한 다음, 본 연구과제의 자체적으로 제품의 맛과 향에 대한 선호도 조사를 실시하여 재설계되었다. 따라서 원료로써는 홍삼엑기스를 주원료로 하여 가능한 한방원료와 유자추출액 사용하였다.

나. 한방원료를 이용한 대량생산 연구

Table 7-1. 간단한 제조공정

Pilot 공정	Check Point	시생산 범위	최적치
발효	1차 발효시간	10~14일	12~13일
	2차 발효시간	3~5일	2일
	Brix	5~15	12
	발효온도	30~40℃	35℃
	제품의 색	흑갈색	

소형발효기를 활용하여 자체적으로 테스트를 실시한 결과, 가장 우수한 풍미를 제공하는 것으로 다음과 같은 배합비를 결정하였다.

Table 7-2. 원료 배합비

* 원료 배합비	
원료	함량 %
홍삼농축액	5.38
쌍화농축액	3.23
대추농축액	43.1
당귀농축액	10.73
구기자농축액	16.1
감초농축액	10.73
계피농축액	10.73
합 계	100

다. 유자를 이용한 대량생산 연구

해외 수출상품화 상품으로 개발하기 위한 제품으로 맛과 향에서 보다 우수한 유자를 이용한 제품개발을 시도하였으며, 이 역시 자체적으로 테스트를 실시한 결과, 가장 우수한 풍미를 제공하는 것으로 다음과 같은 배합비를 결정하였다.

라. 식용배지에 발효 후 혼합에 의한 제품화 연구

Table 7-3. 수출 상품화를 위한 원료 배합비

* 원료 배합비	
원료	함량 %
유자과즙	5.5
정백당	5
고과당	4
벌꿀	2
사과엑기스	2
구연산	0.2
사과산	0.15
펙틴	0.4
정제수	80.75
합 계	100

담자균류를 이용한 상품은 그 발효시간이 길어 단가에 있어서 단시간에 이루어지는 유산균 제품 등에 비하여 상품화가 매우 불리하다. 이것을 해결하기 위한 연구로써, 발효가 완료된 균체체에 맛과 향을 위한 첨가물을 혼합하여 제품화하는 공정을 개발하였다.

유통기한 설정시험 결과 미생물적(세균수와 대장균군)으로나 이화학적(성상)으로 어떠한 변화도 감지되지 않았다. 즉 미생물적 안전성과 이화학적 안정성이 확보되었다.

담자균 발효음료

1. 제품유형 : 기타가공식품

- 과채 또는 착즙액 원료를 담자균에 의하여 발효하고 여기에 당을 혼합하여 제조한 액체상.
- 또는 액상에 식품 또는 식품 첨가물을 혼합 하여, 직접 식용 또는 음용수에 희석하여 사용하는 제품.

2. 제품 규격(자가규격)

- 1) 성 상 : 고유의 색택과 향미를 가지고 이미 이취가 없어야한다.
- 2) 타르색소 : 검출되어서는 아니된다.
- 3) 대 장 균 : 음성이어야 한다.

3. 제품 기본 배 합 비

1) 1차 발효공정

원 료 명	비 율	비 고
정백당	5%	@700원/kg
함수포도당	5%	@700원/kg
대두분말	0.2%	
정제수	89.8%	
계	100	

2) 살균공정

- 살균온도 및 살균시간 : 75℃에서 30분

3) 혼합공정(1차) - 발효액 + 첨가제

원 료 명	비 율	비 고
상황균사체 발효액	20%	10brix 이상
과당	7%	@700원/kg
사과액기스	3%	
대추액기스	2%	
구연산	0.3%	
사과산	0.2%	
구연산삼나트륨	0.15%	
펙틴	0.3%	
정제수	67.05%	
계	100	

Table 7-4. 담자균 발효음료

2. 병입 제품개발 공정을 수립

상업적으로 경쟁력 있는 제품화를 위하여 발효원료에 첨가물을 혼합하여 제품을 완성하는 제품화 기술을 개발하였으며, 제품의 품질관리항목을 설정하여 관리하였다.

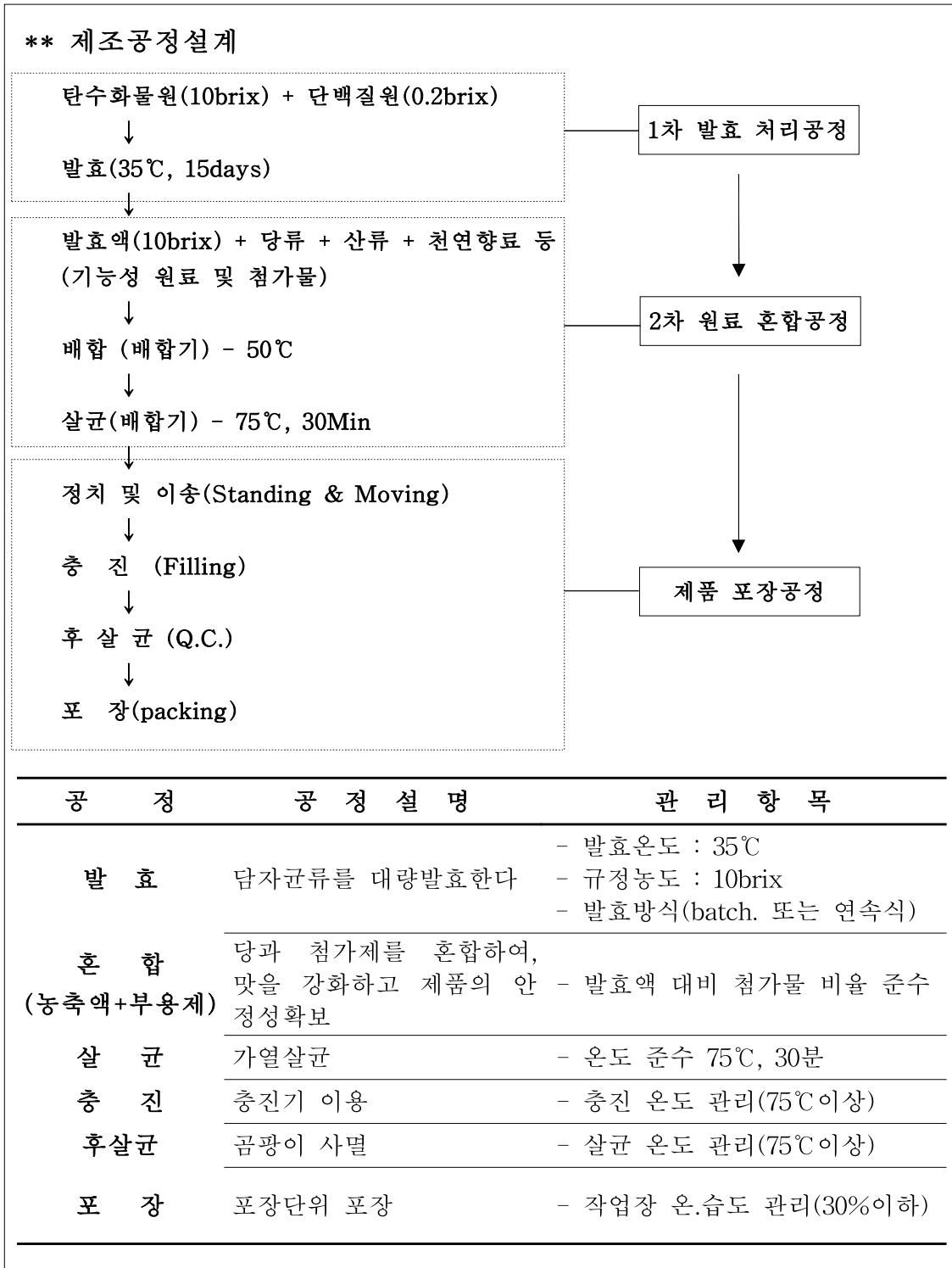


Table 7-5. 담자균류 발효 제품의 제조 공정설계 및 설명

3. 홍삼을 함유한 한방발효음료 100% 제품화 기술 연구

100% 발효음료(고기능성)를 개발하였으며, 그 제조방법 및 배합비는 다음과 같다. 더불어 본 제품은 시제품을 활용하여 바이어의 Quality Test와 소비자의 선호도 조사용으로 개발하기 위하여, 식품위생법을 준수하여 아래와 같은 규격 및 제조방법을 만족하는 품목을 개발하였다.

홍삼을 포함한 한방 발효 상황

1. 식 품 유 형 : 기타홍삼식품
2. 규 격 : 기타홍삼식품의 규격과 동일
3. 성분배합비율 : 상황균사체 발효액 99.95%. (원료조성비 홍삼농축액 5.38%. 쌍화농축액 3.23%. 대추농축액 43.1%. 당귀농축액 10.73%. 구기자농축액 16.1%. 감초농축액 10.73%, 계피농축액 10.73%.) 안식향산나트륨 0.05%.
4. 제조방법
 - 1)원 료 : 원료를 혼합한다.
 - 2)멸균 및 발효 : 배양액을 멸균처리하고, 상황버섯균사체 배양액에 혼합 발효한다.
 - 3)추가발효 : 발효가 끝난 배양액에 첨가물 투입한 후 추가 발효 한다.
 - 4)혼 합 : 추가 첨가물을 투입하고 혼합한다.
 - 5)살 균 : 90℃에서 10분 살균처리 한다.
 - 6)충 진 : 살균 처리된 혼합액을 정량 충전한다.
 - 7)포 장 : 충전된 액을 규격 case에 수량만큼 담는다.
 - 8)외포장 : 운반용 상자에 규격수량 포장한다.
5. 성 상 : 갈색의 약한 점조상으로 상황버섯 균사체가 있는 액상
6. 용 법 : 직접음용
7. 포장단위 : 30ml ~ 500ml
8. 유통기한 : 제조일로부터 24개월

Table 7-6. 홍삼을 포함한 한방 발효 상황

4. 병입 개발제품의 유통기한 설정


연구된 대량생산 공정에 따라 시험제조된 제품의 유통기한을 확인하기 위하여 아래와 같은 식을 생성하고 그에 따라 시험을 실시하였다. 연구결과 개발제품은 약 2년의 유통기한 동안에 미생물적으로 그리고 물리화학적으로 안정성이 확인되었다.

- 요구하는 유효기한 2년(24개월)이고
- TAA(가속보존온도) = 50℃
- TRT(실온 환경온도) = 25℃로 설정하였음
 - ☞ 각 요소를 대입한 결과는 다음과 같다.

$$AAF = Q \cdot 10^{[(TAA - TRT)/10]}$$

$$\blacktriangleright\blacktriangleright\blacktriangleright AAF = 2^{[(55 - 25)/10]} = 8$$

$$AAT = 24\text{개월}(104\text{주})/8 = \underline{3\text{개월}(13\text{주})}$$



유통기한설정시험 중 사진

Figure 7-1. 유통기한 설정시험

아래와 같이 개발제품 2종에 대한 유통기한설정시험을 실시하였다.

1. 발효제품 100%

- ① 식품유형 : 기타홍삼식품
- ② 성상 : 액체식품
- ③ 포장재질 및 포장방법 : 병, 진공포장
- ④ 유통 및 보존온도 : 상온
- ⑤ 보존료 사용여부 : 사용
- ⑥ 살균 또는 멸균방법 : 75℃, 30분

2. 발효제품 20% + 첨가물 80%

- ① 식품유형 : 기타식품
- ② 성상 : 액체식품
- ③ 포장재질 및 포장방법 : 병, 진공포장
- ④ 유통 및 보존온도 : 상온
- ⑤ 보존료 사용여부 : 비사용
- ⑥ 살균 또는 멸균방법 : 75℃, 30분

** 바이어의 QUALITY TEST를 위한 제품을 분석한 결과는 다음과 같다.



시험성적서

시험항목	단위	시험구분	결과치	시험기준	시험방법
밀도	g/100g		1.00	시험기준: 2007	
중량비율	g/100g		3.2	시험기준: 2007	
중산성	g/100g		3.4	시험기준: 2007	
조산성	g/100g		0.5	시험기준: 2007	
조당	g/100g		0.3	시험기준: 2007	
수분	g/100g		89.9	시험기준: 2007	
지방	g/100g		0.1	시험기준: 2007	
단백질(duroval)	g/100g		1.8	시험기준: 2007	
단백질(quicalval)	g/100g		2.9	시험기준: 2007	
단백질(microval)	g/100g		1.3	시험기준: 2007	
단백질(microval)	g/100g		0.5	시험기준: 2007	
당화도(sacchar)	g/100g		0.0	시험기준: 2007	
포도당(포도)	g/100g		0.0	시험기준: 2007	
포도당(포도)	g/100g		0.0	시험기준: 2007	
당화도(포도)	g/100g		0.0	시험기준: 2007	
당화도(포도)	g/100g		0.0	시험기준: 2007	

2007년 11월 19일

한국화학시험연구원장

Figure 7-2. 제품을 분석한 결과

5. 미생물 시험사진(무방부제 제품)

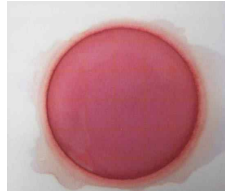
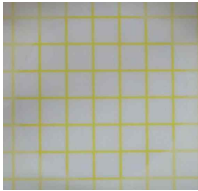

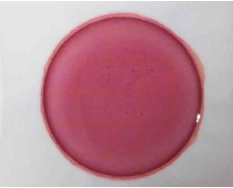
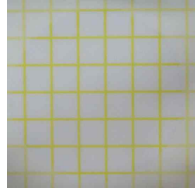
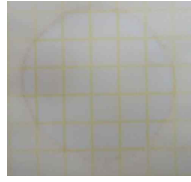
	대장균균	일반세균	효모, 곰팡이
항온기 투입 전			
항온기 투입 후			

Figure 7-3. 미생물 시험사진(무방부제 제품)

6. 시생산 중인 현장 사진

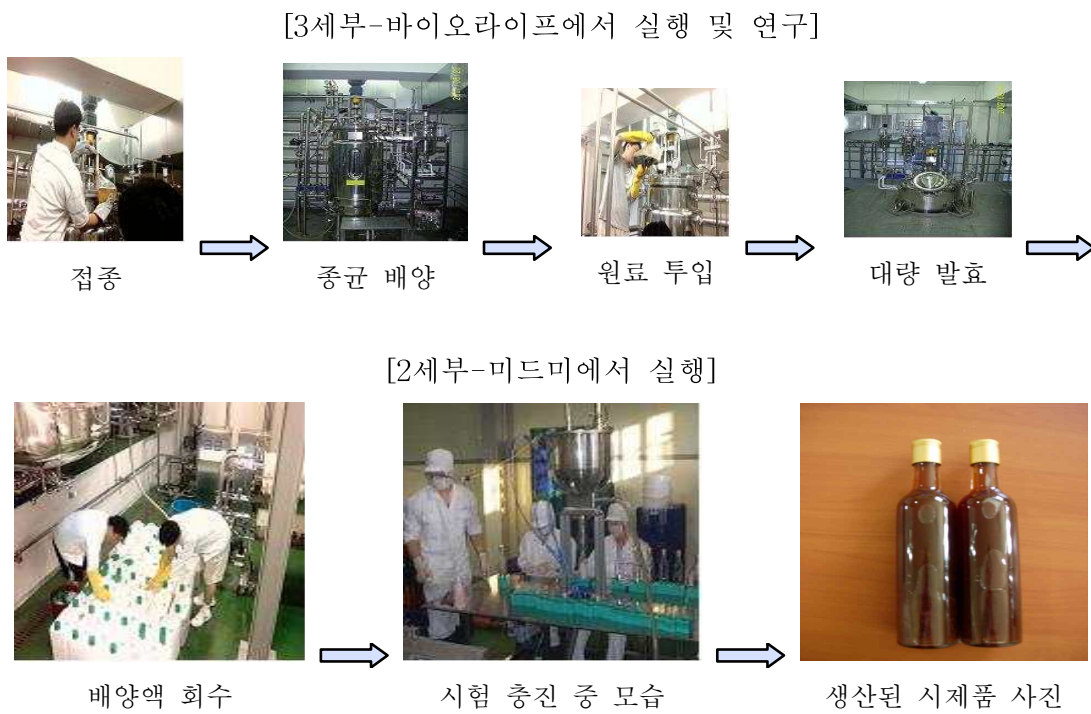


Figure 7-4. 시생산 중인 현장 사진

제 8 절 파우치 제품의 산업화 기술개발

1. 파우치 상품으로의 산업화를 위한 전처리공정과 전처리 원료배합비를 설정하였다.

가. 원료 전처리 생산공정 및 배합비 설정

원료 전처리 생산 공정 설정은 제3세부 연구기관인 바이오라이프와 협력하여 실시하였고, 제품 배합비는 농업기술원과의 협력을 바탕으로 완성하였다. 전처리의 원료 배합비와 BRIX를 아래의 표에 나타내었다.

나. 오미자함유 발효원료 배합비

* 오미자 발효원료 배합비	
원료	함량 %
오미자 추출물	4%
유자청추출액	5%
정제수	92%
혼합 BRIX	5.4

Table 8-1. 원료 전처리 과정에서의 원료 배합비

다. 결명자함유 발효원료 배합비

* 결명자 발효원료 배합비	
원료	함량 %
결명자 추출물	4%
유자청추출액	5%
정제수	92%
혼합 BRIX	5.4

Table 8-2. 원료 전처리 과정에서의 원료 배합비

2. 파우치 제품의 유통기한 설정

가. 유통기한 설정

유통기한 시험을 실시하여 관능검사와 미생물학적인 안전성을 확인하였으며 그 결과를 아래의 표로 나타내었다.

유통기한설정시험은,

- 1) 요구하는 유효기한 1년(12개월)이고,
 - 2) 가속보존온도는 55℃,
 - 3) 실온 환경온도는 25℃로 설정하였으며,
- 각 요소를 대입한 결과는 다음과 같다.

$$AAF = Q 10[(TAA - TRT)/10]$$

$$\blacktriangleright\blacktriangleright\blacktriangleright AAF = 2[55 - 25]/10 = 8$$

$$AAT = 12개월(52주)/8 = 1.5개월(6.5주)$$

나. 부원료 중 당 알코올의 선정

본 과제 특성인 장내세균 활성화를 위하여 당의 종류를 일반적인 당(설탕, 과당, 포도당)과 함께 당 알코올을 사용하였다. 당 알코올의 특성 및 식품 산업에서의 응용에 관하여 당 관련 업체인 (주)삼양제넥스 생명공학연구소의 도움을 받아 진행하였으며, 결과적으로 Maltitol, Solbitol, Xylitol을 사용하였다.

다. 유통기한 설정을 위한 미생물 시험결과

3M 배지를 사용하여 미생물학적인 안전성을 확인한 결과는 아래의 표와 같이 나타내었다. 약 50일까지의 실험결과 일반호기성세균, 대장균군, 효모/곰팡이 배지에서 안전성이 확인되었다.

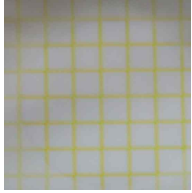
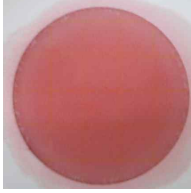
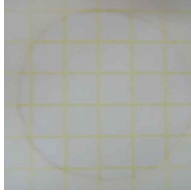
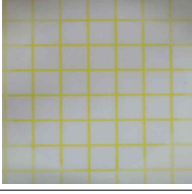
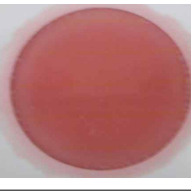
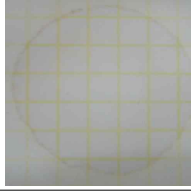
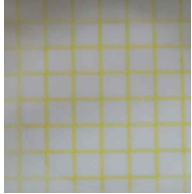
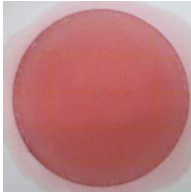
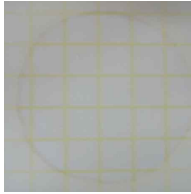
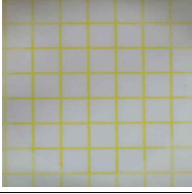
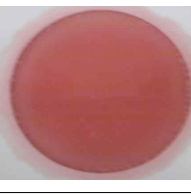
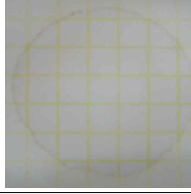
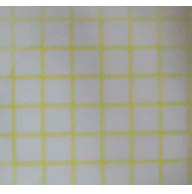
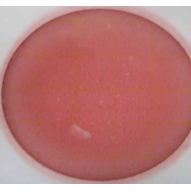
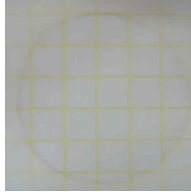
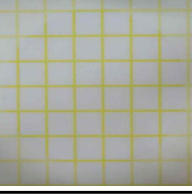
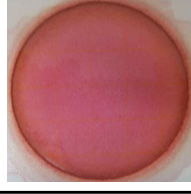
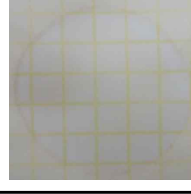
미생물		AerobicCountPlate	E.coli/ColiformCount Plate	YeastandMold
일자				
1일차	오미자 발효분말(차)			
	무가당결명자발효차			
20일차	오미자 발효분말(차)			
	무가당결명자발효차			
50일차	오미자 발효분말(차)			
	무가당결명자발효차			

Table 8-3. 유통기한 설정시험 중 미생물 검사사진

3. 파우치 포장 완제품응용시험

가. 제품화 공정을 확립

Pilot 시생산 및 완제품 응용시험을 하였으며 본 제품 시생산 공정 최적화 및 lot별로 시생산 시 생산품의 최종 완제품 적용시험을 완료하였고, 최종 배합비를 확립하였다. 제품 유형 및 배합비를 아래의 표에 정리하였다. 즉, 오미자 발효 분말 제품유형 및 배합비와 무가당 결명자 발효차 제품유형 및 배합비를 결정하였다.

오미자 발효분말(차)

1. 제품유형 : 기타가공품

- 과채 착즙액 원료를 물리적 고농축하고, 여기에 유자청(유자50%)을 혼합하여 원료로 한 다음, 상황버섯 균사체로 발효한 후, 여기에 분말당을 혼합하여 건조한 분말상.
- 본 제품(분말)에 식품 또는 식품 첨가물을 혼합 하여, 직접 식용 또는 음용수에 희석하여 사용하는 제품.

2. 제품 규격(자가규격)

- 1) 성 상 : 고유의 색택과 향미를 가지고 이미 이취가 없어야한다.
- 2) 수 분(%) : 10.0이하(고형제품)
- 3) 타르색소 : 검출되어서는 아니된다.
- 4) 대 장 균 : 음성이어야 한다.

3. 제품 기본 배 합 비

1) 농축공정

- 발효액(5.6°brix)을 농축기 투입하여, 55℃에서 60°brix 까지 농축한다.

2) 살균공정

- 살균온도 및 살균시간 : 65℃ 이상에서 30분

3) 혼합공정(1차) - 농축액 + 부용제

원 료 명	비 율	비 고
농 축 액	20%	60brix 이상
합수포도당	80%	@700원/kg
계	100 %	

- 건조 후 중량 : 수율 97%
- 건조시간 : 수분 함량 3%이하로 함.
- 열풍건조 : 55℃에서
- 농축액 단가
 - ◆ 발효액 5.6 brix 기준 6,000원/kg
 - ◆ 농축액 60 brix : 6,000원/kg ÷ 13%(수율) ≒ 46,150원/kg
 - ◆ 혼합 powder 단가 : 9,790원/kg ÷ 97%(수율) ≒ 11,000원/kg

4) 혼합공정(2차) - 건조분말 + 유자향

원 료 명	비 율	비 고
건조분말	99.77%	flavor coating
향	0.23%	
계	100 %	

- Flavor coating powder 단가 : 11,060kg/원

5) 혼합공정(3차) - 최종 배합비

원 료 명	비 율	예상단가 (kg/원)	소요단가 (kg/원)	비 고		
Flavor coated powder	농축액	8.7	43.5	11,060	4,810	유자즙으로 65.25%
	Glucose	34.7				
	flavor	0.1				
	소 계	43.5				
Xylitol(crystal)	45.3	6,000	2,720			
Sucrose						
Vitamin-C	1.7	15,000	260			
Citric Acid	0.3	1,300	4			
Collagen powder	10	60,000	6,000			
합 계	100		13,794			

Table 8-4. 오미자 발효 분말 제품유형 및 배합비

무가당 결명자 발효차

1. 제품유형 : 액상차

2. 제품 규격(자가규격)

- 1) 성 상 : 고유의 색택과 향미를 가지고 이미 이취가 없어야한다.
- 2) 수 분(%) : 10.0이하(분말제품에 한한다.)

- 3) 타르색소 : 검출되어서는 아니된다.
- 4) 대 장 균 : 음성이어야 한다.
- 5) 주석 : 150이하(mg/kg)
- 6) 납 : 2.0(mg/kg)이하
- 7) 세균수 : 1ml당 100이하
- 8) 내용량 : 표시량의 98%이상

3. 배 합 비

- 당알코올 : sorbitol, maltitol, amamil-k
- 감미료 : sucralose, stevio side
- 배합실험과 관능테스트를 통해 당알코올에는 말티톨을 사용하고 감미료는 sucralose를 사용하기로 함.
- 배합비 결정

원재료명	배합비(무감미료)1	배합비(감미료)2
결명자 상황 발효액 (60%)	70	70
말티톨시럽	29.2	29.15
비타민 c	0.2	0.2
구연산	0.4	0.4
Pectin	0.1	0.1
CMC	0.1	0.1
sucralose	0	0.05
계	100	100
brix	48	48

Table 8-5. 무가당 결명자 발효차 제품유형 및 배합비

나. Pilot 시생산 공정을 확립

Pilot 설계 및 시설, 시생산 및 최적화를 통하여 기능성 함유 제품의 pilot 시생산 공정을 확립하였고, 제조 특성을 연구하였다. 발효 분말 제품의 제조 공정을 아래의 표에 나타내었다.

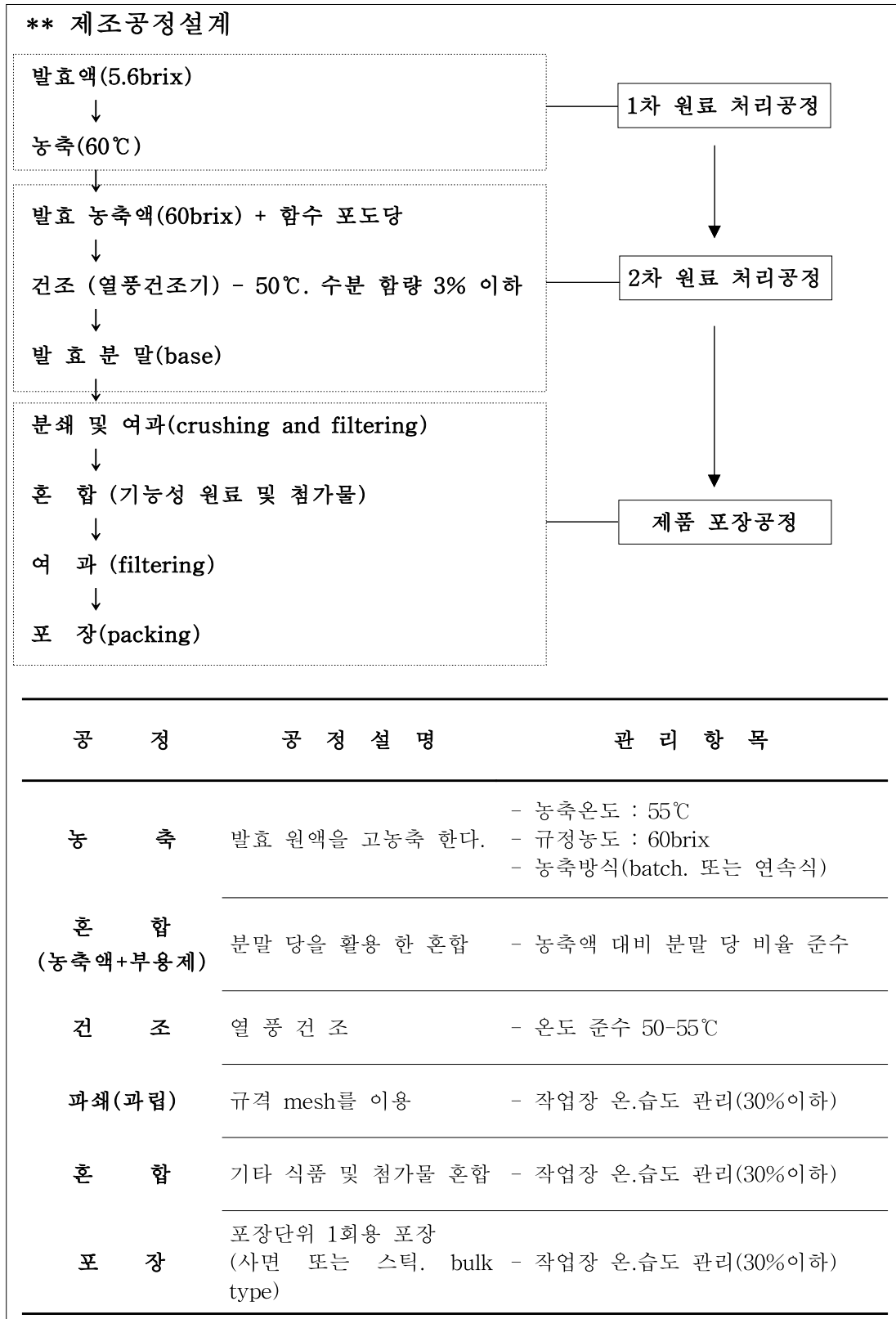


Table 8-6. 상황발효 분말 제품의 제조 공정설계 및 설명

제 9 절 기능성 담자균류 상품화 기술개발

1. 최종 상품의 포장기술 및 제조공정확보

가. 포장지 개발

기존의 병제품이 갖는 운반 및 유통의 어려움을 해결한 새로운 포장(가볍고, 파손위험이 적고, 운반이 편리한) 제품을 개발하고자 한다. 산업화 기술개발이 본 기술개발과제의 최종목표로서, 개발포장재의 수준 및 성능을 아래 표에 나타내었다.

Table 9-1. 개발포장재의 수준 및 성능

제품비교	포장형태	용기무게	파손위험	유통기한	제품형태
기존제품	병 포장	무겁다	크다	짧다	국내시장형
개발제품	AL+PET 포장	가볍다	작다	길다	해외시장형

나. 기존 포장재(알루미늄 포장재)

(1) 포장재 재질

$$\text{PET } 12\mu\text{m} + \text{AL 증착} + 30\mu\text{m} + \text{L-LDPE } 45\mu\text{m} = 87\mu\text{m}$$

(2) 포장재 특징

(가) PET(Poly Ethylene Tere Phthalate) 의 특징

증착 광택도 우수

항장력 : 항장력이 좋기 때문에 인쇄나 라미네이션 등의 가공시 텐션을 가해도 피치가 빠지지 않음.

내열성 : 필름의 용점이 264℃로 높고 사용가능 온도 범위로 -60℃ ~ 150℃로 광범위해서 특히 Retort처리나 고온 Seal 등에서 PET필름의 내열성이 발휘됨.

BARRIER성 : PET필름의 산소나 습기에 대한 Barrier성은, Barrier Film에 비해서는 다소 부족하지만, 향신료에 대한 보향성이나 유기용제에 대한 Barrier성은 우수함.

PET필름은 알루미늄과 밀착성이 좋고 더욱이 증착적성(항장력, 생산성)도 좋아서 증착 PET필름은 Barrier포장재 (산소, 습기, 자외선)로 널리 사용되고 있음.

SEALING 부위에 액체. 분말이 묻어 있는 경우 부적합한 재질.

(접질 부분 또는 액체 가 묻은 경우 SEALING 불량 가능성 있음)

(나) L-LDPE(Linear Low Density Poly Ethylene) 특징

용점 : 118~122℃

접착온도 : 150℃ (수동 씨링 할 경우)

작업온도 : A포장 설비 : 세로접착 195℃, 가로접착 175℃

B포장 설비 : 세로접착 215℃, 가로접착 135℃

다. 본 연구에서 선정된 포장재 (알루미늄 포장재)

(1) 포장 재질

PET 12 μ m(인쇄) + AL 9 μ m + Poly Ethylene 30 μ m + SURLYN 33 μ m = 84 μ m

(2) 포장재 특징 (내포장재: SURLYN-PE)

원료의 일종으로 저온에서 내약품성이 좋으며, 저온 고속 가공에 적합.

SEALING성은 밀봉부위에 액체. 분말이 묻어 있는 경우 적합한 재질.

저온에서도 유연하며, 충격에 잘 견디며 금속, 나일론, 폴리올레핀, 에폭시 그리고 우레탄 완제품에 쉽게 접착됨

제과류, 가공육류, 냉동식품포장에 많이 쓰이며, 초고분자 수지로 PVC 배합에 사용하면 내구성과 활용도를 배가시켜 줌

가구용 피혁제품, 비닐테이프, 자동차 시트, 경음기 패드 및 창문의 성애 억제를 위한 내장재, 전선절연과 케이블 자켓, 신발에 사용

접착온도 : 110 - 120℃(수동씨링 할 경우)

B 포장설비: 세로접착 135℃, 가로접착 115℃

(3) test 결과

접착 면에 이물이(유자 또는 당액) 끼일 경우 겹쳐 질수 있으나 접착력은 강함

열에 민감한 관계로 pet 부분 크랙 발생

표면이 열에 의하여 꾸겨짐 현상 발생

증착 pet 와 대체 film의 장점인 surlyn 으로 내면 처리한 ALI-증착 pet 사용하면 sealing 에 대한 안전성이 있을 것임.

sample film 규격 : 무지pet12 + 접착제 + AL-증착pet12 + surlyn 33 = 57 μ m

sample test 일자 : 2009. 5 ~ 2010년 4월

(4) 본 연구에서 선정된 내포장지필름(Surlyn)의 특성

Surlyn : 아이노머(innomer, 공유결합과 이온결합을 동시에 소유하고 있는 열가소성 플라스틱)수지에 대한 듀폰의 등록상표

(가) 저온실 강도가 크다.

Surlyn은 LLDPE에 비해 연화점이 낮기 때문에 20℃ 이상 저온에서 히트실이 가능하다. 용융온도가 높기때문에 실링부위의 수지밀림이 적고, Surlyn의 항장력이 LLDPE에 비해 크다.

(나) 히트실 강도가 크다.

(다) 열간 실링성이 극히 우수하다.

실성에 관계되는 최대의 특징은 열간 실성이 극히 우수하기 때문이다. 열간 실성이란 자동충진 포장에 있어서 히트실이 행하여진 직후에 내용물이 충전되어 실링부위에 내용물의 중량이 박리 시키는 힘으로 작용하는 경우의 히트 실성을 가르키는 것으로 자동충진 포장의 포장 속도를 좌우하는 중요한 성능이다. 넓은 온도 범위에서 박리거리가 작고 열간 실성이 양호하여 안정하다. Surlyn의 열간 실성이 양호한 것은 실링 부분이 냉각 고형화 단계에서 이온가교에 의해 용융 장력이 매우 크기 때문인 것이다. 따라서 LLDPE의 경우와 같이 가공조건으로부터 오는 산화도의 대소(大小)에 의한 열간 실성이 크게 변동하는 것이 없이 포장재의 충전 적성이 매우 양호하며 안정하다.

(라) 협잡물 부착 실성이 양호하다.

자동충진 포장에서 실링면에 충전물이 묻을 경우 실 온도를 통상보다 30℃ 이상 높게 해서 실링하는 것이 일반적으로 행하여지고 있다. 이 경우 LLDPE는 실링온도를 높인 것 때문에 용융점이 낮아지게 되고 열간 실성이 낮아져 내용물의 중량에 견딜 수 없게 되어 대(袋:Pouch)의 하부가 종종 박리되는 경우가 있다. Surlyn은 원래 협잡물 부착 실강도가 크고 실 온도가 높아도 열간 실성이 변하지 않기 때문에 완전한 히트실이 가능하다. 따라서 액체,

분말식품의 고속 자동충진포장에 많이 활용된다.

(마) 내굴곡성이 우수하고 내핀홀(Pinhole)성이 양호하다.

내굴곡성이 양호하여 핀홀(Pinhole) 발생이 어려워 실용적인 차단성은 LLDPE보다 우수하다. 특히 Surlyn과 알루미늄박의 조합은 Surlyn의 내굴곡성이 양호한 점이 AL-FOIL의 핀홀 발생을 방지하기 때문에 우수한 차단성을 부여한다.

(바) 금속에 대한 접착성이 양호하다.

Surlyn은 분자 중에 카르복실기를 갖기 때문에 금속에의 접착성이 양호하다. Surlyn을 알루미늄박에 코팅한 경우 접착제 처리가 없어도 높은 접착력을 얻을 수 있다.

(사) 내유성, 내그리이스성이 양호하다.

Surlyn은 오일의 투과 속도가 낮고 오일이 침투하기 어렵기 때문에 지방분이 많은 식품 포장에 사용되고 있다. Surlyn의 내유성은 아이노머 분자중의 극성 카르복실기 및 금속 이온결합의 소유(疎油) 작용이 유지(油脂)의 침투에 저항성을 갖고 있기 때문이다.

(아) 용도

Surlyn은 AL-FOIL과의 접착성 및 각종 물성이 우수하며 또 미국FDA의 위생시험에 합격한 것으로 여러가지 식품 포장에 널리 사용 되고 있다. 햄, 소시지, 액체포장 종이용기, 분말식품, 유성식품, 청량음료, 식용유, 커피, 차, 초콜릿 등의 포장에 많이 사용되고 있다.

나. 제조(공정)기술 확보

1차년도와 2차년도의 연구결과를 토대로 최종적으로 2개의 상품 출시용 제품 배합비 및 제조방법을 설정하였다.

(1) 80ml 음료 제조방법 및 배합비

Table 9-2. 80ml 음료 제조방법

제조방법설명서	
제 품 명	: 장운지(음료)
총 전 량	: 80ml
[발효용액A조제]	
1. (500)L 발효기를 준비한다.	
2. 다음 원료를 투입 후 121℃에서 60분간 가압 멸균한다. sucrose 3% , soybean meal 0.9%, 정제수	
3. 운지버섯균주를 접종 한 후 통기량 1vvm, 150rpm으로 28℃에서 5일간 배양 (발효)한다.	
[용액B조제]	
1. (30)L 고속회전 믹서기를 준비한다.	
2. 산탄검 5%, 펙틴5%, 정제수를 투입 후 고속 교반한다.	
3. 계속 교반하며 85℃ 까지 가온하여 완전히 수화시킨다.	
[용액C조제]	
1. (500)L 가온탱크를 준비한다.	
2. 다음 원료를 투입 후 교반하며 60~80℃까지 가온 용해시킨다. 유자청추출물(유자과즙) 5%, 오미자추출물 5%, 콜라겐파우더 3%, 정백당(또는 자일리톨) 3%, 꿀 2%, 비타민 C 0.3%, 비타민 B6 0.2%, 정제수	
[혼합]	
1. 용액C를 교반하며 용액A와 용액B를 투입한다.	
2. 5분 간 교반 후, 구연산 0.5% 투입하여 산+당+펙틴결합 유도를 위하여 5분 간 더 교반한다.	
[여과]	
1. 150um 카트리지 필터를 이용하여 여과한다.(80 mesh 체에 통과)	
2. 80℃ 를 유지, 교반하며 보관한다.	
[공정검사]	
성상	: 갈색의 점조성 내용물
pH	: 3.8
당도	: 11 ~12 brix
[충진]	
1 호파에 가온장치를 연결한다.	
2 내용물을 이송 후 75~85℃으로 충전한다.	
[정치][냉각][포장]	
10분간 정치 후, 50℃ 이하로 냉각한다음 정해진 수량을 포장한다.	

(2) 15gr의 젤 제조방법 및 배합비

Table 9-2. 15gr의 젤 제조방법

제조방법설명서
제 품 명 : 장운지(겔) 총 전 량 :15g
[발효용액A조제] 1. (500)L 발효기를 준비한다. 2. 다음 원료를 투입 후 121℃에서 60분간 가압 멸균한다. sucrose 3% , soybean meal 0.9%, 정제수 3. 운지버섯균주를 접종 한 후 통기량 1vvm, 150rpm으로28℃에서 5일간 배양 (발효)한다.
[용액B조제] 1. (30)L 고속회전 믹서기를 준비한다. 2. 산탄검 5%, 펙틴5%, 정제수를 투입 후 고속 교반한다. 3. 계속 교반하며 85℃ 까지 가온하여 완전히 수화시킨다.
[용액C조제] 1. (500~1,000)L 가온탱크를 준비한다. 2. 다음 원료를 투입 후 교반하며 60~80℃까지 가온 용해시킨다. 정백당(또는 자일리톨) 35%, 올리고당 10%, 꿀 5%, 유자청추출물(유자과즙) 5%, 오미자추출물 5%, 콜라겐파우더 3%, 비타민 C 0.3%, 비타민 B6 0.2%, 정제수
[혼합] 1. 용액C를 교반하며 용액A와 용액B를 투입한다. 2. 5분 간 교반 후, 구연산 0.5% 투입하여 산+당+펙틴결합 유도를 위하여 5분 간 더 교반한다.
[여과] 1. 150um 카트리지 필터를 이용하여 여과한다.(80 mesh 체에 통과) 2. 80℃ 를 유지, 교반하며 보관한다.
[공정검사] 성상 : 갈색의 점조성 내용물 pH : 3.5 당도 : 62.5 brix
[충진] 1 호파에 가온장치를 연결한다. 2 내용물을 이송 후 75~85℃으로 충전한다.
[정치][냉각][포장] 10분간 정치 후, 50℃ 이하로 냉각한 다음 정해진 수량을 포장한다.

2. 공정확보에 따른 담자균류의 상품화

가. 디자인개발

디자인 컨셉 : 핵심기술중 하나인 운지버섯균사체가 인체장관내에 좋다는 내용으로 제품명을 “장운지”라고 하였으며, 건강하고 심플한 장내환경을 나타내는 의미의 자연친화적인 느낌으로 디자인하였음.

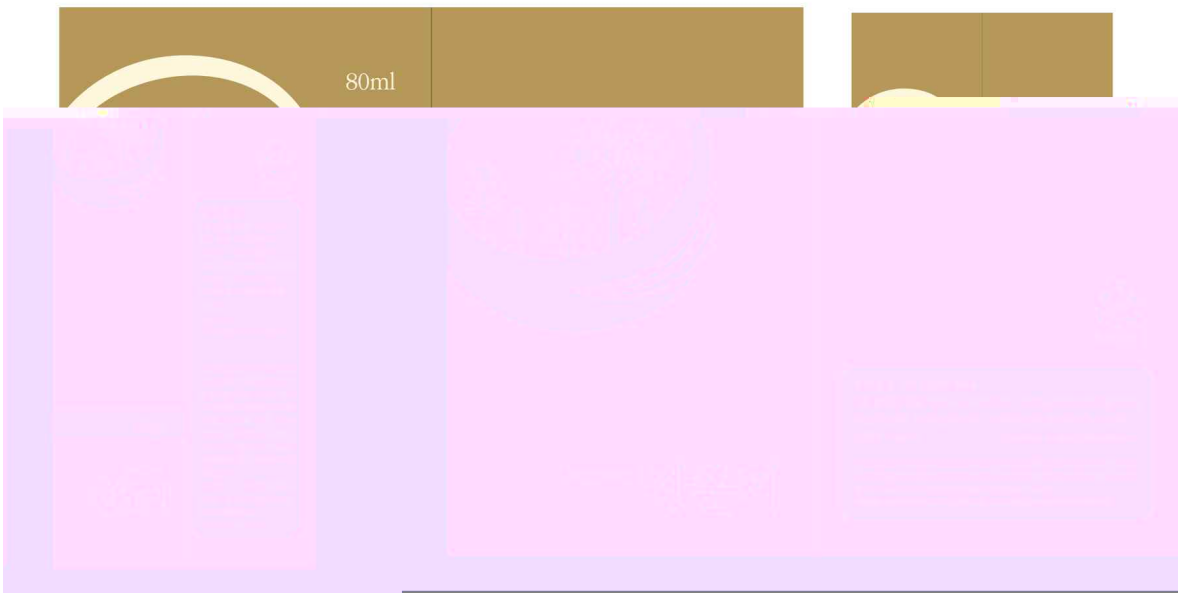


Figure 9-1. 디자인개발

나. 문구표시

본 상품은 농림부에서 시행한 농림기술개발과제의 연구결과물입니다. 본 제품에 포함된 성분은 “인체 장관 내에 존재하는 유해미생물의 생육을 억제하여 대장 내에서 생성되는 유해물질을 감소시키고, 상대적으로 장내 유익미생물을 증가시킬 수 있는 것”으로 발표된 바 있습니다. 게재년도: 학술지명: Volumn: 연구자: 충북대학교 산학협력단, 충청북도농업기술원, 바이오라이프, (주)미드미

3. 천연물소재(유자 등)이용 상품의 해외소비자 선호도 테스트실시

2010년 3월 2~5일에 개최되었던 동경식품박람회에 출전하여 시상품의 소비자 선호도를 조사하였다. 조사결과 기능성 음료(차) 그 중 장내유익균의 증식을 유도하고 유해균의 증식을 억제한다는 제품에 관심이 큰 것으로 나타났으며, 또한 시험삼아 구매하겠다는 소비자가 많

이 있었다. 설문 문항은 일본 오사카농업무역관의 도움을 받아 만들었으며, 설문진행은 (주) 뷰/다카미 사장에게 도움을 받아서 진행하였다. 설문시 소비자의 관심을 고조시키고, 보다 객관적인 답변을 얻기 위하여 설문 진행전에 자사제품을 선물로 기증하였다.

가. 80ml 음료 소비자 선호도 조사

일본인들을 대상으로 한국전통차를 변형하여 일본인의 입맛에 맞추어 유자를 함유한 음료를 갖고 소비자 선호도 조사를 실시하였다. 표 12에서 보는 바와 같이 총 58명이 설문조사에 응답하였으며, 맛과 향 그리고 포장 패키지에 대해서는 85%가 딱 알맞다고 응답하였다. 또한 구매의향이 있는 이유로는 45%가 맛 때문에 35%가 기능성을 함유하고 있기 때문이라고 응답한 반면, 기타는 4%로 한류의 영향과는 관련이 없었다. 즉 현재까지 한국제품이 특히 한국의 식품이 일본에 대량 수출되지 못하고 있는 이유는 철저한 현지화가 되지 않았기 때문이므로, 현지화한 제품이 탄생된다면 얼마든지 대량수출의 길로 나아갈 수 있다고 판단되었다. 소비자 선호도 조사결과 맛과 향에는 만족하였으나, 시험 삼아 마셔보기 위해서 구매한다는 응답이 많이 나온 것으로 나타났으며, 전체응답자 58명중 20명이 전반적인 평가를 부탁하는 문항에 “흥미 없다”라고 답변한 것으로 보아 제품의 판매를 위해서는 보다 깊이 있는 마케팅 계획이 필요하다고 판단되었다.

나. 15gr 젤 소비자 선호도 조사

80ml 음료와 동시에 진행하였던 일본인들을 대상으로 젤 제품을 갖고 소비자 선호도 조사를 실시하였다. 일본인들에게는 젤 제품을 직접 먹는 문화가 없고 또한 익숙하지 않기 때문에 일본인들이 좋아하는 유자를 첨가하여 제조하였으며, 유자를 갖고 만든 기능성 제품이라고 홍보하며 시험 테스트를 실시하였다. 표13에서 보는 바와 같이 92명의 소비자가 설문조사에 응하였으며, 90%이상이 맛은 “좋다” 향은 “적당하다”고 응답하였다. 특히 제품가격이 약 2배인데도 불구하고 기능성 제품을 구매하겠다고 응답한 소비자가 50%를 차지하였다. 기능성 제품군에서도 전체응답자 92명중 45명이 다이어트 제품, 그리고 28명이 미용에 좋은 제품을 구매하겠다는 답변을 보였으며, 이는 현재 일본에는 한국 상품을 구매할 여력이 있는 고급소비자 층이 매우 폭넓게 자리하고 있는 결과라고 판단되며, 향후 그들을 목표로 한 제품이 출시되면 많은 소비자의 사랑을 받을 것임에 틀림이 없을 것이다. 포장관련해서 구매의향을 질문했던 항목에서는 분말 비닐포장 제품이 46명 파우치 포장 제품이 27명 그리고 액상 병 포장 제품이 15명으로 나타난 것으로 보아, 휴대와 사용이 편리한 1회용이 압도적으로 높았으며, 1회용 중에서도

분말포장제품이 높은 것을 나타냈다.



Figure 9-2. 소비자 선호도 조사

Table 9-3. 80ml 음료 소비자 선호도 조사표

2010 FOODEX JAPAN (마쿠하리 메세)

2010. 3. 2-5

*하기의 물음에 귀하의 의견을 말해주세요.

----- 본 제품의 개선점 -----

- 1. 맛은? 강함(8) 약함() 알맞음(50) 강하게() 약하게()
- 2. 향은? 강함(7) 약함() 알맞음(49) 강하게(2) 약하게()
- 3. 패키지 디자인은? 아주 좋음(20) 좋음(22) 별로 마음에 안듬(16)

----- 구매에 대한 평가 -----

1. 본 제품을 구매한다면 그 이유는?

품질(10) 디자인() 기능성(20) 맛(26) 기타(2)

2. 본 제품을 구매하지 않는다면 그 이유는?

품질() 디자인() 기능성() 맛() 기타()

3. 본 제품을 사고 싶다고 생각한 이유는?

선물(10) 시험삼아 마시기 위해(48) 기타()

4. 본 제품을 전반적인 평가는?

높음(15) 보통(23) 낮음() 흥미가 없음(20)

귀하의 성별은? 남 (20) 여 (38)

귀하의 나이는? 20 - 30 (5) 30 - 35 (32) 35 - 40 (11)

40 - 45 (6) 45 - 55 (4) 55이상 ()

☞ 감사합니다. 성의표시로 작은 선물을 드립니다.

제 4장 목표 달성도 및 관련 분야에의 기여도

제 1 절 연도별 연구 목표 및 평가 착안점

구분	연도	세부연구목표	가중치	평가의 착안점 및 기준
1차 연도	2007	○ 식용 및 약용으로 이용되고 있는 담자 균류 소재 탐색	8 %	연구 내용의 가설 설정, 진행 방법, 연구 내용의 타당성
		○ 다양한 담자 균류 소재의 추출 방법별 항균성 분석	8 %	연구 내용의 가설 설정, 진행 방법, 연구 내용의 타당성
		○ 장내 유해균 활성 억제 담자 균류 소재의 선별	9 %	연구 내용의 가설 설정, 진행 방법, 연구 내용의 타당성
		○ 병입 상품 산업화를 위한 적정 배합비 결정	8 %	제품 품목보고 여부
		○ 병입 제품의 유통기한 설정	8 %	유통기한 시험 결과
		○ 천연물(유자 등) 소재 함유 담자균류 병입 상품으로 시생산	9 %	시생산 여부
		○ 효능이 확보된 담자균류의 군사체 배양기술 개발확보	8 %	군사체 함량 조사
		○ 인체에 무해한 산업적 대량배양 배지 개발 최적 탄소원, 질소원의 선정	8 %	식용 가능한 탄소원 질소원을 이용한 대량배양 조건 확보
		○ 선발 배지의 실용성 검토 : 군사체량, 기능성분 생성량 등	9 %	최대 균체 및 생리활성 성분 생성조건 및 산업적 생산을 위한 최적조건확보
		○ 담자균류 및 배양액의 기능성 성분 분석	8 %	담자균류의 β -glucan 분석 및 배양액의 품질분석 방법 설정 및 분석
		○ 담자균류 및 배양액의 생리활성 분석	9 %	담자균류 및 배양액의 생리활성인 ACE저해도, 혈당강하능, 항산화성 등 분석
		○ 담자균류 배양액의 품질평가 방법 선정	8 %	군사체량, β -glucan 및 생리활성 등의 분석으로 군사체 품질 평가 가능

구분	연도	세부연구목표	가중치	평가의 착안점 및 기준
2차 년도	2008	○ 선별 담자균류에 의한 실험 동물의 장내 균총 변화 분석	10 %	연구 내용의 진행 방법, 연구 내용의 타당성
		○ 유해미생물 분포의 변화 및 유용 미생물 분포 의 변화 분석	8 %	연구 내용의 진행 방법, 연구 내용의 타당성
		○ 다양한 형광 항체와 공초점 현미경을 이용한 장내 유해 미생물 분포 분석	8 %	연구 내용의 진행 방법, 연구 내용의 타당성
		○ 1회용 파우치 포장 상품 산업화를 위한 적정 배합비 결정	8 %	배합비의 적정성
		○ 1회용 파우치 포장 제품의 유통 기한 설정	8 %	유통기한 시험 결과
		○ 천연물(유자 등) 소재 함유 담자균류 1회용 파우치 포장 상품으로 시생산	8 %	시생산 여부
		○ 최적 한방원료 조사 및 유용균류에 의한 발효 가능성 타진	8 %	최적한방원료선정 및 발효확인
		○ 기 확보 담자균류와 천연소재의 최적 첨가농도 구명	8 %	혼합 배양 최적 첨가농도 선정
		○ 기 확보 담자균류와 소재의 혼합배양 산업적 최적조건 확립	8 %	산업적 최적혼합배양 조건선정
		○ 장내유해세균 억제 천연소재선정	8 %	장내유해세균 억제 활성이 우수한 천연유용소재 선발
		○ 천연소재의 생리활성 분석	8 %	천연소재의 생리활성분석 및 평가
		○ 선정된 천연소재 첨가 균사체 배양조건 선정	10 %	선발된 천연소재 첨가로 균사체 배양액의 생리활성 상승

구분	연도	세부연구목표	가중치	평가의 착안점 및 기준
3차 년도	2009	○ 유해미생물 생육억제 담자균류 소재의 캡슐화	12 %	연구 내용의 진행 방법, 연구 내용의 타당성
		○ 선별 소재의 저장성 분석 및 향상 방안 모색	11 %	연구 내용의 진행 방법, 연구 내용의 타당성
		○ 담자균류와 천연소재 혼합 제품화 기술개발	11 %	포장기술 및 제조공정 확인
		○ 기능성 담자균류 상품화 기술 확보	11 %	상품화 기술의 적정성 검토
		○ 병입 제품의 가공안정성 검토	11 %	유통기한 설정 및 시제품 확인
		○ 적정 부재료 첨가에 의한 기호성 조사 및 선발	11 %	선발의 적정성 검토
		○ 산업적 혼합배양을 위한 경제성 검토	11 %	선발 제품의 경제성 검토
		○ 혼합 배양물의 안정성 검토를 통한 적정 배양공정 확립	11 %	최적 배양조건 확립 평가
		○ 유용미생물 제어 기능성 소재 및 활용 제품의 생리활성 및 성분 분석	11 %	연구 내용의 진행 방법, 연구 내용의 타당성

제 2 절 관련분야에의 기여도

가. 기존에 국내에서 한번도 연구되지 않은 비만 관련 장내 세균총에 대한 담자균류의 항균성을 평가한 결과, 운지버섯을 최종 선발하였다. 운지버섯에 새로운 식품소재로서의 기능성을 부여함으로써 버섯 재배 농업 부문의 활성화와 지방 소재 농식품 제조 중소기업의 수익 증대에 기여할 수 있게 되었다.

나. 담자균류 이외에도 생리활성이 우수한 천연소재를 *in vitro* 및 동물실험을 통하여 평가한 결과, 오미자를 최종 선발하였고, 이러한 천연소재 추출물을 첨가한 균사체 배양액 음료의 건강기능성을 확보함으로써 시장성 제고를 가속화시킬 것으로 기대된다.

다. 버섯 균사체 배양액 및 관련제품의 영양성분 및 생리활성성분을 종합적으로 분석하였고, 제품화 공정을 확립하였다. 본 연구과제에서 도출된 정보들을 다른 기업과 공유할 수 있으며, 이는 향후 관련분야의 저변 확대와 산업체 발전에 적극 활용되어 국민건강에 일익을 담당할 수 있을 것으로 기대된다.

제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

1. 사업화

NO.	사업화명	제품명	업체명	사업화형태
1	오미자와 운지균사체를 이용한 기능성 음료 사업화	오미양운지균	(주)미드미	기존업체에서 상품화
2	대추와 상황균사체를 이용한 기능성 음료 사업화	상황진대추	바이오라이프	기존업체에서 상품화

2. 논문 발표

NO.	논문명	주저자	학술지명	Vol.(No.)	SCI구분
1	오미자 추출물이 비만과 관련된 장내 세균의 생육에 미치는 영향	정은지	한국식품과학회지	41(6)	비SCI
2	석이버섯과 운지버섯 균사체 추출물이 장내 세균의 생육에 미치는 영향	박경란	한국식품영양과학회지	게재확정	

3. 국내 및 국제학술회의

NO.	발표자	발표제목	발표일시	장소/국명
1	박경란	Screening of functional food components in Basidiomycota to improve human intestinal	2008. 06	미국 뉴올리언즈
2	박경란	Investigation of functional food components inhibiting obesity associated intestinal bacteria	2008. 10	중국 상하이
3	오은희	Biological activities of Phellinus Linteus Mycelium culture with Cassiae Semen extract	2008. 06	한국식품과학회

4. 인력지원 성과

지원 총인원	지원 대상 (학위별, 취득자)				성별		지역별		
	박사	석사	학사	기타	남	여	수도권	대전	기타지역
6	1	5			2	4		1	5

5. 기술이전

가. 무상기술이전.

- 결명자 첨가 상황군사체 쌀식초 제조방법. 2010. 충청북도농업기술원

6. 기타 활용 계획

가. 실용화 · 산업화 계획(기술실시 등)

- 배양액 및 분말소재, 젤화 소재에 대한 산업화 진행중

나. 특허, 품종, 논문 등 지식재산권 확보계획 등

- 개발 3종에 대하여 특허 출원 예정
- Optimum Conditions for the Enzymatic Hydrolysis of Citron Waste Juice using Response Surface Methodology(Food Sci & Biotechnology 논문 투고중)

제 6 장 참고 문헌

1. 이준우 · 방광웅(2001), “상황버섯의 생리활성,” 식품산업과 영양, 6(1), 25-33.
2. 류하나 · 유종수 · 송명중 · 이대영 · 김동현 · 노영덕 · 김인호 · 백남인(2007), “상황버섯 (*Phellinus Linteus*) 자실체로부터 Ergosterol 유도체의 분리,” 한국응용생명화학회지, 50(1), 57-62.
3. Zhu T, Guo J, Collins L, Kelly J, Xiao ZJ, Kim SH, Chen CY. *Phellinus linteus* activates different pathways to induce apoptosis in prostate cancer cells. Br J Cancer. 2007, 96(4):583-90.
4. Guo J, Zhu T, Collins L, Xiao ZX, Kim SH, Chen CY. Modulation of lung cancer growth arrest and apoptosis by *Phellinus Linteus*. Mol Carcinog. 2007, 46(2):144-54.
5. Oh GS, Lee MS, Pae HO, Kwon J, Lee SS, Jeong JG, Shin MK, Kwon TO, Chung HT. Effects of oral administration of *Phellinus linteus* on the production of Th1- and Th2 type cytokines in mice. Immunopharmacol Immunotoxicol. 2006, 28(2):281-93.
6. Collins L, Zhu T, Guo J, Xiao ZJ, Chen CY. *Phellinus linteus* sensitises apoptosis induced by doxorubicin in prostate cancer. Br J Cancer. 2006 , 95(3):282-8.
7. Chen W, He FY, Li YQ. The apoptosis effect of hispolon from *Phellinus linteus* (Berkeley & Curtis) Teng on human epidermoid KB cells. J Ethnopharmacol. 2006, 105(1-2):280-5.
8. Lee HJ, Lee HJ, Lim ES, Ahn KS, Shim BS, Kim HM, Gong SJ, Kim DK, Kim SH. Cambodian *Phellinus linteus* inhibits experimental metastasis of melanoma cells in mice via regulation of urokinase type plasminogen activator. Biol Pharm Bull. 2005, 28(1):27-31.
9. Li G, Kim DH, Kim TD, Park BJ, Park HD, Park JI, Na MK, Kim HC, Hong ND, Lim K, Hwang BD, Yoon WH. Protein-bound polysaccharide from *Phellinus linteus* induces G2/M phase arrest and apoptosis in SW480 human colon cancer cells. Cancer Lett. 2004, 216(2):175-81.
10. Kim GY, Oh WK, Shin BC, Shin YI, Park YC, Ahn SC, Lee JD, Bae YS, Kwak JY, Park YM. Proteoglycan isolated from *Phellinus linteus* inhibits tumor growth through mechanisms leading to an activation of CD11c+CD8+DC and type I helper T

cell-dominant immunestate. FEBS Lett. 2004, 576(3):391-400.

11. Shon YH, Nam KS. Antimutagenicity and induction of anticarcinogenic phase II enzymes by basidiomycetes. J Ethnopharmacol. 2001 , 77(1):103-9.
12. 임상용 · 장연위 · 김남식 · 강종원 · 한윤수 · 신경섭 · 송형근 · 박순영 · 김정수 · 김현 · 김용대(2006), “금사상황버섯 추출물이 사람의 natural killer 세포 활성화에 미치는 영향,” 한국식품과학회지, 38(5), 717-719.
13. Partial characterization and immunostimulatory effect of a novel polysaccharide-protein complex extracted from *Phellinus linteus*. Biosci Biotechnol Biochem. 2006, 70(5):1218-26.
14. Proteoglycan isolated from *Phellinus linteus* induces toll-like receptors 2- and 4-mediated maturation of murine dendritic cells via activation of ERK, p38, and NF-kappaB. Biol Pharm Bull. 2004, 27(10):1656-62.
15. Kim GY, Choi GS, Lee SH, Park YM. Acidic polysaccharide isolated from *Phellinus linteus* enhances through the up-regulation of nitric oxide and tumor necrosis factor-alpha from peritoneal macrophages. J Ethnopharmacol. 2004, 95(1):69-76.
16. Park SK, Kim GY, Lim JY, Kwak JY, Bae YS, Lee JD, Oh YH, Ahn SC, Park YM. Acidic polysaccharides isolated from *Phellinus linteus* induce phenotypic and functional maturation of murine dendritic cells. Biochem Biophys Res Commun. 2003, 312(2):449-58.
17. Ye SF, Hou ZQ, Zhang QQ. Protective effects of *Phellinus linteus* extract against Iron overload-mediated oxidative stress in cultured rat hepatocytes. Phytother Res. 2007, 21(10):948-953.
18. Song YS, Kim SH, Sa JH, Jin C, Lim CJ, Park EH. Anti-angiogenic, antioxidant and xanthine oxidase inhibition activities of the mushroom *Phellinus linteus*. J Ethnopharmacol. 2003, 88(1):113-116.
19. Kim HG, Yoon DH, Lee WH, Han SK, Shrestha B, Kim CH, Lim MH, Chang W, Lim S, Choi S, Song WO, Sung JM, Hwang KC, Kim TW. *Phellinus linteus* inhibits inflammatory mediators by suppressing redox-based NF-kappaB and MAPKs activation in lipopolysaccharide-induced RAW 264.7 macrophage. J Ethnopharmacol. 2007, 114(3):307-15.
20. Kim BC, Jeon WK, Hong HY, Jeon KB, Hahn JH, Kim YM, Numazawa S, Yosida T, Park EH, Lim CJ. The anti-inflammatory activity of *Phellinus linteus* (Berk. & M.A.

- Curt.) is mediated through the PKCdelta/Nrf2/ARE signaling to up-regulation of heme oxygenase-1. *J Ethnopharmacol.* 2007, 113(2):240-7.
21. Anti-inflammatory and related pharmacological activities of the n-BuOH subfraction of mushroom *Phellinus linteus*. *J Ethnopharmacol.* 2004 , 93(1):141-6.
 22. Kim GY, Roh SI, ParkSK, AhnSC, Oh YH, Lee JD, Park YM. Alleviation of experimental septic shock in mice by acidic polysaccharide isolated from the medicinal mushroom *Phellinus linteus*. *Biol Pharm Bull.* 2003, 26(10):1418-23.
 23. Choi YH, Yan GH, Chai OH, Lim JM, Sung SY, Zhang X, Kim JH, Choi SH, Lee MS, Han EH, Kim HT, Song CH. Inhibition of anaphylaxis-like reaction and mast cell activation by water extract from the fruiting body of *Phellinus linteus*. *Biol Pharm Bull.* 2006, 29(7):1360-5.
 24. Shon YH, Nam KS. Antimutagenicity and induction of anticarcinogenic phase II enzymes by basidiomycetes. *J Ethnopharmacol.* 2001, 77(1):103-9.
 25. Hur JM, Yang CH, Han SH, Lee SH, You YO, Park JC, Kim KJ. Antibacterial effect of *Phellinus linteus* against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Fitoterapia.* 2004, 75(6):603-5.
 26. Kim SY, Song HJ, Lee YY, Cho KH, Roh YK. Biomedical issues of dietary fiber beta-glucan. *J Korean Med Sci.* 2006, 21(5):781-9. Review.
 27. Guerra Dore CM, Azevedo TC, de Souza MC, Rego LA, de Dantas JC, Silva FR, Rocha HA, Baseia IG, Leite EL. Antiinflammatory, antioxidant and cytotoxic actions of beta-glucan-rich extract from *Geastrum saccatum* mushroom. *Int Immunopharmacol.* 2007, 7(9):1160-9.
 28. Chakraborty I, Mondal S, Rout D, Islam SS. A water-insoluble (1->3)-beta-D-glucan from the alkaline extract of an edible mushroom *Termitomyces eurhizus*. *Carbohydr Res.* 2006, 341(18):2990-3.
 29. Pacheco-Sanchez M, Boutin Y, Angers P, Gosselin A, Tweddell RJ. A bioactive (1->3)-, (1->4)-beta-D-glucan from *Collybia dryophila* and other mushrooms. *Mycologia.* 2006, 98(2):180-5.
 30. Smiderle FR, Carbonero ER, Mellinger CG, Sasaki GL, Gorin PA, Iacomini M. Structural characterization of a polysaccharide and a beta-glucan isolated from the edible mushroom *Flammulina velutipes*. *Phytochemistry.* 2006, 67(19):2189-96.
 31. Angeli JP, Ribeiro LR, Gonzaga ML, Soares Sde A, Ricardo MP, Tsuboy MS, Stidl R,

- Knasmueller S, Linhares RE, Mantovani MS. Protective effects of beta-glucan extracted from *Agaricus brasiliensis* against chemically induced DNA damage in human lymphocytes. *Cell Biol Toxicol.* 2006, 22(4):285-91.
32. Shin JY, Lee S, Bae IY, Yoo SH, Lee HG. Structural and biological study of carboxymethylated *Phellinus linteus* polysaccharides. *J Agric Food Chem.* 2007, 55(9):3368-72.
33. 이영경 · 김동현 · 한명주(1998), “대추의 장내세균 유해효소 β -glucuronidase와 Tryptophanase 저해효과,” *한국식품과학회지*, 30(1), 199-205.
34. 강어진 · 이상선 · 양차범 · 신현경(1998) “주요 식이섬유질원이 첨가된 식이가 노화 흰쥐의 장내효소 및 유해산물에 미치는 영향,” *한국식품영양학회*, 11(5), 488-492.
35. Geier MS, Butler RN, Howarth GS. Probiotics, prebiotics and synbiotics: a role in chemoprevention for colorectal cancer? *Cancer Biol Ther.* 2006, 5(10): 1265-9.
36. 심상범 · 박주석 · 김남재 · 김동현(1999), “생약의 β -glucuronidase 저해와 간장보호효과,” *생약학회지*, 30(2), 111-114.
37. Nanno M, Morotomi M, Takayama H, Kuroshima T, Tanaka R, Mutai M. Mutagenic activation of biliary metabolites of benzo(a)pyrene by beta-glucuronidase-positive bacteria in human faeces. *J Med Microbiol.* 1986, 22(4):351-5.
38. 배은아 · 김동현 · 한명주(2001), “표고버섯 추출물 투여가 생쥐 장내세균 효소에 미치는 영향,” *한국식품과학회지*, 33(1), 142-145.
39. 김동현 · 최혁재 · 배은아 · 한명주 · 박순영(1998), “재배상황버섯의 장내세균 유해효소 및 알파글루코시다제 저해효과,” *한국식품위생안전성학회지*, 13(1), 20-23.
40. 김만철 · 김민주 · 김택 · 박근택 · 손홍주 · 김기영 · 최우봉 · 오덕철 · 허문수(2006), “감골농축액 첨가배지에서 배양한 버섯균사체 추출물의 항균활성 및 항산화활성 비교,” *한국생물공학회지*, 21(1), 72-78.
41. 장경호 · 신경옥 · 김순동(2005), “굴피 및 녹차추출물에서 배양한 소나무잔나비버섯 (*Fomitopsis pinicola*) 균사체의 유리아미노산 및 다당류 함량,” *한국식품저장유통학회*, 12(4), 379-388.
42. 한서영 · 손미예 · 이상원(2003), “곡물 액체배지에서 배양시킨 팽이버섯 균사체의 생리활성,” *식품산업과 영양*, 8(1), 50-58.
43. 문형철 · 이현수 · 박진홍 · 김대호 · 이신영 · 성낙술 · 방진기 · 정해곤 · 이현용(2004), “마늘 첨가 복합배지에서 배양된 영지 균사체의 면역 증진 효과,” *한약작지*, 12(1), 24-30
44. 강태수 · 정현상 · 이명렬 · 박희정 · 조택상 · 지성택 · 신명근(2003), “천연물을 이용한

- 큰느타리 균사배양 및 Angiotensin Conversion Enzyme 저해활성,” 한국균학회지, 31(3), 175-180.
45. 김소연 · 손준호 · 하효철 · 이항우 · 이재성(2002), “들송이와 말뚝진흙버섯을 배양한 대두 추출물의 암예방 효과,” 한국균학회지, 30(2), 124-130.
 46. Lee JH, Lee SJ, Choi YH, Chung KT, Jeong YK, Choi BT. Effects of mycelial culture of *Phellinus linteus* on ethanol-induced gastric ulcer in rats. *Phytother Res.* 2006, 20(5):396-402.
 47. Inagaki N, Shibata T, Itoh T, Suzuki T, Tanaka H, Nakamura T, Akiyama Y, Kawagishi H, Nagai H. Inhibition of IgE-dependent mouse triphasic cutaneous reaction by a boiling water fraction separated from mycelium of *Phellinus linteus*. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2005, 2(3):369-74.
 48. Lim BO, Jeon TI, Hwang SG, Moon JH, Park DK. *Phellinus linteus* grown on germinated brown rice suppresses IgE production by the modulation of Th1/Th2 balance in murine mesenteric lymph node lymphocytes. *Biotechnol Lett.* 2005, 27(9):613-7.
 49. Kim SH, Lee HS, Lee S, Cho J, Ze K, Sung J, Kim YC. Mycelial culture of *Phellinus linteus* protects primary cultured rat hepatocytes against hepatotoxins. *J Ethnopharmacol.* 2004, 95(2-3):367-72.
 50. Park IH, Chung SK, Lee KB, Yoo YC, Kim SK, Kim GS, Song KS. An antioxidant hispidin from the mycelial cultures of *Phellinus linteus*. *Arch Pharm Res.* 2004, 27(6):615-8.
 51. Choi YH, Huh MK, Ryu CH, Choi BT, Jeong YK. Induction of apoptotic cell death by mycelium extracts of *Phellinus linteus* in human neuroblastoma cells. *Int J Mol Med.* 2004, 14(2):227-32.
 52. Nakamura T, Matsugo S, Uzuka Y, Matsuo S, Kawagishi H. Fractionation and anti-tumor activity of the mycelia of liquid-cultured *Phellinus linteus*. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2004, 68(4):868-72.
 53. Jeon TI, Hwang SG, Lim BO, Park DK. Extracts of *Phellinus linteus* grown on germinated brown rice suppress liver damage induced by carbon tetrachloride in rats. *Biotechnol Lett.* 2003, 25(24):2093-6.
 54. 송치현 · 나경수 · 양병근 · 전용재(1998), “목질진흙 (상황)버섯의 면역활성,” 한국균학회지, 26(1), 86-90.

55. 이준우 · 백성진 · 방광웅 · 강신욱 · 강상모 · 김병용 · 하익수(2000), “목질진흙버섯 자실체와 배양 균사체 유래 β -glucan성 다당류의 생리활성,” 한국식품과학회지, 32(3), 726-735.
56. 김현구 · 한효석 · 이기동 · 김공환(2005), “새송이버섯 추출물의 생리활성 효과,” 한국식품영양과학회지, 34(4), 439-445
57. 이경환 · 권효정 · 천성숙 · 김정환 · 조영제 · 차원섭(2006), “상황버섯(*Phellinus linteus*) 추출물의 생리활성,” 한국응용생물화학회지, 49(4), 298-303.
58. Maruyama S. Miyoshi S, Tanaka H. Angiotensin I - converting enzyme inhibitors derived from ficus carica. Agric. Biol. Chem. 1989, 53:2763-2767
59. 광가 · 김영선 · 한웅 · 심태흠 · 사재훈 · 왕명현(2006), “쇠뜨기 추출물의 항산화 활성 분석 및 α -glucosidase 저해활성,” 한국응용생명과학회지, 49(1), 77-81.
60. 주혜경 · 황방연 · 강신정 · 장승엽 · 원도희 · 노재섭 · 이경순(2001), “결명자로부터 aurantio-obtusin의 분리 및 함량분석,” 생약학회지, 32(2), 157-162.
61. 나경민 · 한효석 · 예수향 · 김현구(2004), “결명자 추출물의 추출특성 및 항산화 효과,” 한국식생활문화학회지, 19(5), 499-505.
62. 이영석 · 장현유(2004), “상황버섯의 재배방법별 수익성 분석,” 농촌경제, 27(3), 111-129
63. 백경숙 · 배장순 · 오경근(2004), “건강식품 소재화를 위한 신령버섯 균사체의 배양조건 최적화,” 산업식품공학, 8(1), 53-57.
64. Hwang, H.J., S.W. Kim, J.W. Choi, and J.W. Yun(2003), “Production and characterization of exopolysaccharides from submerged culture of *Phellinus linteus* KCTC 6190,” Enzyme and Microbial Technology, 33, 309 - 319.
65. 이승현 · 임환미 · 김태영 · 조남석 · 박준성 · 유연우 · 김우성(2004), “*Agaricus blazei* 균사체 배양기술을 통한 효율적인 β -glucan의 생산,” 한국미생물학회지, 40(1), 54-59.
66. Blois. M.S. (1958) Antioxidant determination by the use of a stable free radical. Nature. 26. 1199-1204
67. Cushman, D.W. and Cheng, H.S. (1971) Spectrometric assay and properties of angiotensin converting enzyme of rabbit lung. Biochem. Pharmacol., 20, 1637-1647
68. Wenling, D., Tina, J., Mikael, S. and Michael, R. S. 1996. Evaluation of isofagomine and its derivatives as potent glycosidase inhibitors. Biochemistry 35, 2788-2795.
69. Megazyme International Ireland Ltd. 2005(10). Mushroom and yeast β -glucan : Assay procedure.
70. Herbert, A. and Joel, L.S. (1993) Sensory Evaluation Practies. 2nd ed., Academic Press, USA, p.68-75

71. SAS (1998) SAS User's Guide Statistics, 3th ed., Statistical Analysis System Institute, Cary, NC, U.S.A
72. 지정현 · 하태문 · 김영호 · 노영덕(1996), “목질진흙버섯균 *Phellinus linteus*의 균사체 생육에 미치는 주요 인자에 관한 연구,” 한국균학회지, 24(3), 214-222.
73. 허병수 · 이강수 · 박성철 · 이양수(2004), “진흙버섯속의 배양적 특성,” 한국균학회지, 32(2), 134-137.
74. 이원호 · 김수영 · 박영진 · 김태웅 · 김호경 · 성재모(2004), “목질진흙버섯(*Phellinus linteus*)의 적합한 균사생장,” 한국균학회지, 32(2), 95-100.
75. 최근호(1999), “*Phellinus linteus*의 액체배양을 위한 새로운 합성배지의 개발,” 한국생물공학회지, 14(2), 167-173.
76. Hwang HJ, Kim SW, Xu CP, Choi JW, Yun JW. Morphological and rheological properties of the three different species of basidiomycetes *Phellinus* in submerged cultures. J Appl Microbiol. 2004;96(6):1296-305.
77. 김은영 · 백인회 · 김정현 · 김성란 · 류미라(2004), “항산화활성을 나타내는 약용식물 소재 탐색,” 한국식품과학회지, 36(2), 333-338.
78. 임성훈 · 최선희 · 이홍숙 · 박미정(2005), “한방에서 안질환에 사용되어 온 천연물들의 항산화 작용,” 한국안광학회지, 10(4), 365-373.
79. 강운한 · 박용곤 · 이기동(1996), “페놀성 화합물의 아질산염 소거 및 전자공여 작용,” 한국식품과학회지, 28(2), 232-239
80. 김수민 · 조영석 · 성삼경(2001), “식물체 추출물의 항산화성 및 아질산염 소거작용,” 한국식품과학회지, 33(5), 626-632
81. 윤정식 · 정병희 · 김나영 · 성낙술 · 이현용 · 이진하 · 김종대(2003), “식물자원으로부터 Angiotensin Converting Enzyme 저해활성 탐색,” 한약작지, 11(3), 246-251.
82. 권대준 · 윤선주 · 조준구 · 최웅규 · 강선철(2006), “추출방법에 따른 상황버섯 추출물의 항산화활성 및 생물학적 특성,” 한국응용생명화학회지, 49(2), 91-96.
83. 송재환 · 이현숙 · 황진국 · 정태영 · 홍성렬 · 박기문(2003), “절레 영지버섯 추출물의 생리활성,” 한국식품과학회지, 35(4), 690-695.
84. Hagiwara SY, Takahashi M, Shen Y, Kaihou S, Tomiyama T, Yazawa M, Tamai Y, Sin Y, Kazusaka A, Terazawa M. A phytochemical in the edible Tamogi-take mushroom (*Pleurotus cornucopiae*), D-mannitol, inhibits ACE activity and lowers the blood pressure of spontaneously hypertensive rats. Biosci Biotechnol Biochem. 2005, 69(8):1603-5.

85. Hyoung Lee D, Ho Kim J, Sik Park J, Jun Choi Y, Soo Lee J. Isolation and characterization of a novel angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptide derived from the edible mushroom *Tricholoma giganteum*. *Peptides*. 2004, 25(4):621-7.
86. Matsuur H, Asakawa C, Kurimoto M, Mizutani J. Alpha-glucosidase inhibitor from the seeds of balsam pear (*Momordica charantia*) and the fruit bodies of *Grifola frondosa*. *Biosci Biotechnol Biochem*. 2002 Jul;66(7):1576-8.
87. Pamela Manzi, Laura Pizzoferrato. Beta-glucans in edible mushrooms. *Food Chemistry*. 2000, 68:315-318
88. 최한석 · 김명곤 · 박호숙 · 김재성 · 김성준(2005), “식물유래 물질이 빵나무버섯 균사체 생장 및 혈전분해 활성에 미치는 영향,” *한국균학회*, 33(1), 11-17.
89. 김중만 · 김형태 · 황신묵(1990), “결명자로부터 인스틴트차 제조,” *한국식품과학회지*, 22(3), 241-247.
90. 김동훈, 2001, *식품화학*, 탐구당, 404-416
91. Kim JM, Ra KS, Noh DO, Suh HJ. Optimization of submerged culture conditions for the production of angiotensin converting enzyme inhibitor from *Flammulina velutipes*. *J Ind Microbiol Biotechnol*. 2002 , 29(5):292-5.
92. Reverberi M, Di Mario F, Tomati U. beta-Glucan synthase induction in mushrooms grown on olive mill wastewaters. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2004, 66(2):217-25. Epub 2004 Jul 29.
93. Kim SY, Song HJ, Lee YY, Cho KH, Roh YK. Biomedical issues of dietary fiber beta-glucan. *J Korean Med Sci*. 2006, 21(5):781-9. Review.
94. Zusman I. Comparative anticancer effects of vaccination and dietary factors on experimentally-induced cancers. *In Vivo*. 1998, 12(6):675-89. Review.
95. Lampe JW, Li SS, Potter JD, King IB. Serum beta-glucuronidase activity is inversely associated with plant-food intakes in humans. *J Nutr*. 2002, 132(6):1341-4.