

발간등록번호

11-1543000-002767-01

목질진흙버섯의 안정적 생산을 기반으로 하는 면역강화 고부가가치 가공식품개발 최종보고서

2018. 11.

주관연구기관 / 머쉬아트영농조합

협동연구기관 / 한경대학교

협동연구기관 / 전북대학교

농림축산식품부

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “목질진흙버섯의 안정적 생산을 기반으로 하는 면역강화 고 부가가치 가공식품 개발”(개발기간 : 2017. 12. 01 ~ 2018 . 11.)과제의 최종보고서로 제출합니다.

2018년 11월 30일

주관연구기관명 : 머쉬아트영농조합
주관연구책임자 : 박순애
세부연구책임자 : 박순애
협동연구기관명 : 한 경 대 학 교
협동연구책임자 : 강 희 완
연 구 원 : 민 경 진
연 구 원 : 유 혜 린
협동연구기관명 : 전 북 대 학 교
협동연구책임자 : 윤 봉 식
연 구 원 : 이 인 경
연 구 원 : 김 지 울
연 구 원 : 우 이 음
연 구 원 : 김 재 옥
연 구 원 : 정 경 운
연 구 원 : 하 이 수
연 구 원 : 김 영 희

국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제18조에 따라 보고서 열람에 동의
합니다.

<보고서 요약서>

보고서 요약서

과제고유번호	116164-2	해 당 단 계 연 구 기 간	2년	단 계 구 분	(해당단계)/ (총 단 계)
연구사업명	단 위 사 업	농식품기술개발사업			
	사 업 명	목질진흙버섯의 안정적 생산을 기반으로 하는 면역강화 고부가가치 가공식품개발			
연구과제명	대 과 제 명	(해당 없음)			
	세부 과제명	(해당 없음)			
연구책임자	박순애	해당단계 참여연구원 수	총: 16 명 내부: 3 명 외부: 13 명	해당단계 연구개발비	정부: 천원 민간: 천원 계: 천원
		총 연구기간 참여연구원 수	총: 16 명 내부: 3 명 외부: 13 명	총 연구개발비	정부: 310,000천원 민간: 7,750천원 계:69,750 천원
연구기관명 및 소속부서명	머쉬아트영농조합법인			참여기업명	
국제공동연구	상대국명:			상대국 연구기관명:	
위탁연구	연구기관명:			연구책임자:	

※ 국내외의 기술개발 현황은 연구개발계획서에 기재한 내용으로 같음

연구개발성과의 보안등급 및 사유	
-------------------------	--

9대 성과 등록·기탁번호

구분	논문	특허	보고서 원문	연구시설 ·장비	기술요약 정보	소프트 웨어	화합물	생명자원		신품종	
								생명 정보	생물 자원	정보	실물
등록·기탁 번호	4	2									

국가과학기술종합정보시스템에 등록한 연구시설·장비 현황

구입기관	연구시설· 장비명	규격 (모델명)	수량	구입연월일	구입가격 (천원)	구입처 (전화)	비고 (설치장소)	NTIS 등록번호

최적 면역활성을 가지는 상황버섯 차 재료는 발아현미 64.5%, 노루궁뎅이버섯 10%, 표고버섯 10%, 린테우스상황버섯 5.5%로 구성 한다. 상황버섯차는 탄수화물 85.1g, 단백질 8.16g, 지방 0.327g, 당류 0.687g, 포화지방 0.177, 나트륨 3.95mg, 칼슘 18.9mg, 철 0.934mg, 식이섬유 11.2g, 회분 1.26g, 수분 5.13g 포함되어 있으며, 트랜스 지방이나 콜레스테롤, 비타민은 검출 되지 않았다. 상황버섯 차의 연령대별 식미조사에서 87%가 만족한다고 하였다. 시제품으로 순수담과 Linteus imperial defense의 3종의 과립형, 티백형 및 컵형을 개발 하였다.

보고서 면수

Phellinus linteus KACC93057P (PLHS)은 원목에서 발이율이 95%였으며 자실체 형성 율은 95%로 안정적인 생산성이 확인 되었다. PLHS조당체 생산량은 0.15g로 PBJs의 0.058 와 PLKS의 0.2g보다 높았으며 PLHS에서 25g/100g으로 가장 많은 β -Glucan 함량을 나타내었다. Polysaccharide의 MTT assay 결과에서 PLHS-EA추출물은 농도 의존적으로 200 μ g/ml에서 400 μ g/ml에서 Raw cell 264.7세포의 생존능이 85%였으며 Nitrate oxidation assay에서 200 μ g/ml에서 가장높은 18.7 μ M의 염증억제효과를 보였다. 첨가적으로 KACC93057P를 이용한 식품가공품제조조건 확립 하였다.

PLHS유래 페놀성분 Hypholomine B과 Davalliacton는 Raw cell 264.7세포에 독성이 없었으며 결장암세포 HCT116 에대하여 Davalliacton 250 μ g/ml 처리구 에서는 51.90%의 우수한 항암 효과를 보였다. 시토카인인 종양 괴사 인자 알파(tumor necrosis factor-alpha, TNF- α .)가 농도 의존적으로 감소되는 것을 확인 하였다.

동물실험에서 각 처리군의 비장을 채취하여 H&E분석을 실시한 결과 Negative control 군의 비장에 비하여 HNP의 비장이 비대해져 있었으며, Wp의 표면적 증가가 이루어져 있었고 비장의 비대종대와는 다른 비장 확대적 현상이 나타나고, Wp의 면적 증가 및 lymphocyte의 증가가 다른 군에 비하여 초래되어 있음을 확인 되었다. 비장 내 각 위치에 따른 VEGF(vascular endothelial growth factor)와 IL-2의 발현양상 및 위치 분석을 수행한 결과 HNP 처리군 비장 조직에서 VEGF와

IgG의 발현양상을 확인 할 수 있었다. 장 내 세포사멸인자 (Casp-3) 의 발현양상 분석에서 비장에서 각 실험군별 세포사멸인자인 Casp-3의 발현양상을 분석한 결과 HNP 처리군의 림프계 세포체에서 다른 처리군에 비하여 매우 높은 Casp-3의 발현양상을 확인 할 수 있었다. 지표물질의 선정은 화합물의 특이성, 검출용이성 등을 고려하여 hispidin으로 지표성분을 설정하였다.

지표성분으로 선정된 hispidin의 분석법 밸리데이션을 위하여 목질진 흙버섯으로부터 hispidin을 분리 및 정제한 후, 순도를 확인한 결과, 93.7%의 순도를 나타내었다. 지표성분 hispidin의 직선성을 평가하는 correlation coefficient(R^2) 값은 0.9996이며, 검출한계(limit of detection)는 0.078 mg/L, 정량한계(limit of quantification)는 0.239 mg/L를 나타내었다. 한경대학교에서 제공받은 세 가지 시료별 hispidin 함량은 시료 1에서 0.07208%, 시료 2에서 0.06134%, 시료 3에서 0.06696%를 나타내었다. 시료간의 함량에는 다소 차이를 나타내어 추후 원료의 표준화 연구가 요구된다. 결론적으로 지표성분인 hispidin의 시험법 밸리데이션 결과를 통하여 분석법이 신뢰성이 있음을 확인하였다.

국문 요약문

<p>연구의 목적 및 내용</p>	<p><주관> ○ 목질진흠버섯 KACC93057P 가공식품 생산과 기초조건 확립</p> <p><제 1협동> ○ 유기농 목질진흠버섯 KACC93057P의 재배 특성조사 ○ 군사배양체 및 자실체를 이용한 식품소재 생산최적조건 확립 ○ 자실체 생리활성물질의 효능탐색: 항암, 항산화, 면역활성</p> <p><제 2협동> ○ 목질진흠버섯 KACC93057P 유효 활성 분획물의 항산화활성 평가 ○ 기능성 생리활성물질의 분리 및 정제</p>
<p>연구개발성과</p>	<p><주관> ○ 현미 군사 배양체의 티백차 제조조건 확립 및 시제품제조 - 상황버섯티백차 제조 및 침출 최적 조건 확립 ○ 목질진흠버섯KACC93057P 자실체 열수추출물이용 과립형 가공식품 제조조건 조사</p> <p><제1협동> ○ 종균유형별, 수목 종류별 목질진흠버섯KACC93057P발이 및 자실체 형성 조건 구명 및 유기농 상황버섯 자실체 생산 -액체, 곡립, 톱밥종균을 다양한 수중에 접종 하여 균 활착율과 오염율과 발이, 자실체형성을 조사. ○ 목질진흠버섯KACC93057P 현미배양체 배양 최적 조건과 가공조건 확립 - 배양기간에 따른 현미 배양체 가공기술개발 - 식품규정에 따른 상황버섯 차 생산의 최적 조건확립 - 노루궁뎅이 자실체 분말을 과립매개체로 상황버섯 추출 가공품생산 조건</p> <p>○ 목질진흠버섯 KACC93057P 자실체의 추출방법에 따른 면역, 항염증, 항산화, 항혈소판응집 효과 검정</p> <p>○ 동물세포와 동물실험을 통한 목질진흠버섯 KACC93057P의 항산화물질 hypholomine B, davallialactone과 다당체 β-glucan의 면역, 항암활성 기구 해명</p> <p>○ 목질진흠버섯 KACC93057P(환경상황버섯)의 다당체 β-glucan의 함량, 면역, 항암, 항산화 활성의 타 상황버섯 종과의 비교분석</p> <p><제 2협동> ○ 목질진흠버섯 KACC93057P과 타 진흠버섯(장수진흠버섯)과의 기능성성분 함유량 비교 분석 - 본 목질진흠버섯KACC93057P과 시판되고 있는 장수진흠버섯(<i>Phellinus baumii</i>)과의 폴리페놀 기능성성분 함유량 및 성상을 비교 분석함</p> <p>○ 목질진흠버섯KACC93057P과 타 진흠버섯의 항산화 활성 비교 분석 - 본 목질진흠버섯과 시판되고 있는 진흠버섯의 추출물을 제조한 후 항산화활성을 검정하고 비교 분석함</p> <p>○ 목질진흠버섯KACC93057P과 타 진흠버섯의 자실체 및 군사체 대사산물 비교 분석 - 목질진흠버섯과 타 진흠버섯의 자실체 및 군사체 추출물을 제조한 후 HPLC로 분석하여 비교함</p> <p>○ 목질진흠버섯KACC93057P 활성물질의 분리, 정제 및 화학구조 구명 - 유기용매에 의한 분배, 다양한 column chromatography, HPLC를 이용하여 항산화 활성물질을 분리, 정제함 - Mass 및 NMR spectrum을 측정하여 화학구조를 동정함</p>

연구개발성과	<p><1세부과제></p> <ul style="list-style-type: none"> ○ 목질진흙버섯 곡물배양체를 이용한 티백차 생산공정 확립 및 관능평가 <ul style="list-style-type: none"> - 목질진흙버섯 상황현미배양 차 제품생산 (제품명: 순수담) 및 홍보 3건 - 목질진흙버섯 자실체 상황버섯 차 3종 제품 생산(제품명: 린테우스임페리얼 디펜스 (침출 차, 과립차, 컵형 등 3종: ISO인증, 제품품목번호: 20150308101115), <p><제 1협동></p> <ul style="list-style-type: none"> ○ 목질진흙버섯 KACC93057P 재배를 위한 최적중균 구멍 및 생산성 구멍하였으며 유기농인증으로 유기가공재료 활용 (인증번호 제10-1-34호, 논문작성 중) ○ 목질진흙버섯 자실체 상황버섯 차 최적조건을 확립하여 제품생산을 위한 정보 제공 ○ 상황버섯, <i>Phellinus linteus</i> 계통과 <i>Phellinus baumii</i> 의 항 혈소판 응집 효과 구멍 (논문: 2017, J. Mushrooms 15(3):124-128) ○ 목질진흙버섯 KACC93057P현미배양체생산과 최적 상황 차 생산조건 확립 (2017, 특허출원 10-2017-0154588) ○ 동물세포와 동물실험에서 목질진흙버섯 KACC93057P유래 항산화물질 hypholomine B, davallialactone과 다당체 β-glucan의 면역, 항암활성이 타 상황버섯 종에 비해 우수성 입증 (2018, 특허출원 10-2018-0159126, SCI논문 2편 작성 중) ○ 목질진흙버섯 KACC 93057P, ‘한경상황버섯’ 인공재배자실체 페놀추출물의 항산화 활성 및 화학적 동정 (논문: J. Mushrooms 2018, 16(4):311-317) ○ 학술발표 3건: 2017 춘계 한국버섯학회, 2017 아시아균학회(10. 25-28, 제주) , 한국균학회 (2017년 5월 25일, 여수 The Ocean Resort). ○ 홍보 2건: 홍보전시회 1건, 버섯정보신문 1건 <p><제 2협동></p> <ul style="list-style-type: none"> ○ 목질진흙버섯KACC93057P과 타 상황버섯(장수진흙버섯)과의 기능성성분 함유량 비교 분석 <ul style="list-style-type: none"> - 폴리페놀 기능성성분 함유량은 타 진흙버섯(장수진흙버섯)이 목질진흙버섯보다 높았으며 색상도 진한 갈색으로 폴리페놀 함량이 높음을 확인함 ○ 목질진흙버섯KACC93057P과 타 진흙버섯의 항산화 활성 비교 분석 <ul style="list-style-type: none"> - 동일농도의 추출물을 비교한 결과 타 상황버섯 종과 유사한 항산화활성을 나타냄 ○ 목질진흙버섯과 타 진흙버섯의 자실체 및 균사체 대사산물 비교 분석 <ul style="list-style-type: none"> - HPLC로 분석한 결과 균사체보다는 자실체에서 다양한 폴리페놀이 검출되었으며 함량도 높았음. ○ 목질진흙버섯 KACC93057P활성물질의 분리, 정제 및 화학구조 구명 <ul style="list-style-type: none"> - HPLC를 이용하여 3종의 항산화 활성물질을 정제하고 ESI-mass 및 NMR spectrum을 측정하여 화학구조를 각각 hispidin, hypholomine B, inoscavin A로 동정함 ○ 학술발표 2건 <ul style="list-style-type: none"> - Antioxidant activities of the medicinal mushrooms <i>Phellinus linteus</i> and <i>Phellinus baumii</i>. 한국균학회, 2017년 5월 25일, 여수 The Ocean Resort. - Chemical constituents of the fruiting body of <i>Phellinus linteus</i>. 한국미생물학회연합학회, 2017년 11월 2일, 킨텍스. ○ 논문 1건 (SCI논문투고 중) <ul style="list-style-type: none"> - Lipoxygenase inhibitors from the medicinal fungus <i>Phellinus baumii</i>.
--------	---

연구개발성과
의
활용계획
(기대효과)

- 국내에서 주로 재배되고 있는 상황버섯은 *Phellinus baumii* (장수상황버섯)으로 상황버섯의 원조라 볼 수 있는 *Phellinus linteus* (목질진흙버섯)의 생산이 어려워 실효성 없었으나 본 연구의 목질진흙버섯 KACC93057P은 인공재배와 생산력이 우수하여 안정적 생산이 가능하여 다양한 가공식품생산과 유통이 활발해지면 버섯생산 농가의 중요 소득원이 될 것임
- 2017년 식품의약품안전처에서 목질진흙버섯에 한하여 “면역에도움을 줄 수 있는” 기능성식품으로 고시된 바 있어 본 연구의 재료로 활용한 목질진흙버섯 KACC93057P은 후속연구로 기능성식품으로 활용 가능
- 유기농으로 인증된 친 환경 우리고유 목질진흙버섯KACC 93057P의 고유특성과 약리활성 면역활성 유효성분 기능이 최적화된 자실체와 현미 군사배양체를 활용한 고 부가가치의 유기 가공 건강식품 제품생산 활용
- 본 연구에 사용될 목질진흙버섯 KACC 93057P의 유용성분에 대한 면역활성기능성을 부여할 수 있는 약리 효능이 동물체 수준에서 구명 됨으로서 고 부가가치성 상황버섯으로 경제적 파급효과가 클 것으로 보며, 군사체/자실체를 이용한 가공식품생산으로 국내 소비증대는 물론 향 후 의약품 개발을 위한 전초 연구로 경제적 가치는 상당할 것으로 전망 됨
- 목질진흙버섯 KACC 93057P 자실체의 유기농 인증(인증번호 제10-1-34호)재료를 사용함으로써 국내외 시장에 유통되는 상황버섯 가공품과 차별화된 면역활성강화 고 부가가치 유기가공 건강식품 개발 가능
- 목질진흙버섯은 다려서 먹어야되는 번거로움이 있으나 본 연구에서 개발된 가공식품은 언제 어디서나 쉽게 복용 할 수 있어 대중적 접근으로 시장을 확대 할 수 있으며 백세시대 도래에 따른 노인 건강식품인 실버푸드를 Target으로 복용이 간편한 건강기능 제형으로 시장 활로를 개척 함
- 항암치료에 의한 면역력저하는 암환자의 면역관련 2차 질환 발병의 원인이 암 발병률과 항암치료를 받은 환자의 수의 증가에 의한 면역기능증진 식품의 수요가 급격히 증가하고 있으며 신종플루, 슈퍼바이러스, SARS등과 같은 새로운 면역질환이 증가함에 따라 전 세계적으로 면역기능증진을 위한 기능성 식품의 개발에 활용

중심어 (5개 이내)	한글	목 질 진 흙 버 KACC93057P	생산성	가공소재	면역효과	가공식품
	영문	<i>Phellinus linteus</i> KACC93057P	Productivity	Processed Materials	Immunomodulating efficacy	Processed food

영문요약문

Phellinus linteus is one of the 220 species of *Phellinus* that belong to the Hymenochaetaceae family and growing in the tropic region. It has been used as a healthy food and a traditional medicine in Korea, Japan, and China for the treatment of various diseases including cancer, microbial infection, ulcer, and stomach. The fruiting body of *P. linteus* has been reported to produce polysaccharides, terpenes, and polyphenols with biological activities including anti-oxidants, anti-melanoma, anti-leukemia, and aldose reductase inhibitory activities.

Phellinus linteus KACC93057P (PLHS) has artificially been cultivated with stable productivity. Therefore, The purpose of this study is to develop a high value - added processed food with PLHS having physiologically active substances and enhanced immunity.

The tea material with optimal immune system consists of 64.5% germinated brown rice, 10% roe deer mushroom, 10% shiitake mushrooms, and 5.5% fruiting bodies of PLHS. The tea materials include 85.1g of carbohydrates, 8.16g of protein, 0.327g of fat, 0.687g of sugar, 0.177g of sodium, 18.95mg of calcium, 0.934mg of iron, 11.2g of dietary fiber, 1.26g of ash, 5.13g of water, and no trans fat, cholesterol and vitamins were detected. In a survey of the ages of five types, 87 percent said they were satisfied. Sangwhang mushroom teas “Sunsu Dam” and “Linteus Imperial Defense” (Granular, tea-bag and cup-types) were developed as names of prototypes.

PLHS was found to have a stable productivity with 95 % pinhead and fruiting body formation rates in oak logs. The polysaccharide content from fruiting body of PLHS was 0.15g, higher than 0.058g of PBJs and 0.2g of PLKS, and the highest β -glucan content at 25g/100g. The MTT assay of polysaccharide from PLHS showed that PLHS-EA extract had 85% viability of Raw cell 264.7 cells at 200 μ g/ml-400 μ g/ml dependent on concentration and showed the highest inflammatory effect at 200 μ g/ml. The cell survival rate of the macrophage cell line was increased to be 93% to 170% in a concentration-dependent manner at 16, 31, 63, 125, and 250 μ g / ml. Therefore, hypholomine B and davallialactone are characterized by their ability to activate macrophage proliferation. IL-6 and TNF- α cytokines induced by LPS were both found significantly inhibited by hypholomine B and davallialactone dependently on their concentrations (12.5, 25, 50 and 100 μ g/mL) in the macrophage cells.

In animal experiment using old mouse, the results of the H&E analysis by collecting spleen from each treatment group confirmed that polysaccharide(HNP) from PLHS treated the spleen was enlarged compared to that of the negative control, the surface area of Wp was increased, the spleen magnification was different from that of the spleen hypertrophy, and that the increase of Wp area and lymphocyte were caused by treatment of HNP. Based on the expression and location analysis of VEGF (vascular endothelial grower) and IL-2

(interleukin-2) according to their location in the spleen, the appearance of VEGF and IL-2 could be confirmed in spleen tissue of HNP treatment group. An analysis of the expression patterns of the apoptosis factor (Casp-3) in the intestinal tract showed that the expression of the apoptosis factor Casp-3 in each experimental group was found to be very high compared to other treatment groups in the lymphatic cell bodies of HNP treatment group.

In the study, we reported the antioxidant activity, isolation and structure determination, and the method validation of PLHS. The fruiting bodies of *P. linteus* KACC93057P (Hankyong Sanhwang, PLHS) *P. baumii* (Jangsu sanghwan, PBJs), *P. linteus* ASI 26099 (Korea sanghwang, PLKS) and *P. linteus* 6036 (PL6036) were received from Hankyong National University. We compared the yield of the ethanolic extract of the fruiting bodies of *P. linteus* and *P. baumii*. Each sample was extracted under same condition (50°C, 60% aq. EtOH, 6 hours). The extract yield of PBJs was more higher than that of PLHS.

We compared the antioxidant activity of the fruiting bodies of PLHS and PBJs under two different conditions (same extraction condition/same concentrate level). In antioxidant activity, PLHS was less active than PBJs in the same extraction condition. However, PLHS was comparable to PBJs in the same concentrate level. To compare the polyphenol content of different samples from the fruiting bodies and mycelium of PBJs and PLHS, each sample was analyzed by analytical reversed-phase HPLC. The HPLC profiles of the fruiting bodies were significantly different from those of the mycelial culture in the same analytical condition. The result suggested that the fruiting bodies produced more diverse secondary metabolites and polyphenols than the mycelial cultures.

To identify the anti-oxidative polyphenols of the cultivated fruiting bodies of PLHS, the methanolic extract of PLHS was partitioned and subjected to silica gel and Sephadex LH-20 column chromatographies. The polyphenol fractions were further isolated by reversed-phase HPLC to afford six compounds. Their structures were determined by the interpretation of NMR and mass spectroscopic data. These compounds were identified as hispidin, hypholomine B, inoscavin A, davallialactone, baumin, and inoscavin E, respectively.

Sangwhang mushrooms, PLHS PBJs, PLKS and PL6036 were gave similar extract yield under same extraction conditions (1 g, 60°C, 20 mL MeOH, 30 min). To compare relative polyphenol content and other secondary metabolites, these samples were analyzed by analytical reversed-phase HPLC. The results revealed that these samples produced hispidin, davallialactone, and hypholomine B in similar content.

To standardize the extracts of the fruiting bodies of PLHS, the marker compound, hispidin, was selected and validated a analytical HPLC method for the detection of hispidin in PLHS extracts. Our HPLC method was accurate and reproducible. It can provide a quantitative basis for quality control of PLHS extracts.

CONTENTS

Chapter 1. Outline of Research and Development Project	11
Clause 1. The Objectives of Research	11
Clause 2. The Needs of Research	12
Clause 3. The Scope of Research	15
Chapter 2. Current Status of Technology Development in Domestic and Overseas	20
Clause 1. Current Status of Technology Development in Korea	20
Clause 2. Current Status of Technology Development in Overseas	21
Chapter 3. Contents and Results of Research and development	23
Clause 1. Development of high value-added processed foods with enhanced functionality from <i>Phellinus linteus</i> KACC93057P	23
Clause 2. Development of Immune Functional Processed Food Material From <i>Phellinus linteus</i> KACC93057P	71
Clause 3. Validation and Identification of Immunoactive Components	131
Chapter 4. Achievements of Goals and Contribution to the Related Area	131
Clause 1. Prospects of Related Fields	131
Clause 2. Achievement of Research Objectives	133
Chapter 5. Usage Plan and Achievements of Research Results	140
Clause 1. Achieve Performance to Research results	140
Clause 2. Usage of Achievements for contribution to Technology Development of Related Field	142
Clause 3. Plans to Secure Intellectual Property Rights Such as Patents, Varieties, and Papers	143
Chapter 6. References	144

본문목차

제 1 장 연구개발과제의 개요	11
제1절 연구 개발 목적	11
제2절 연구 개발의 필요성	12
제3절 연구 개발 범위	15
제 2 장 국내·외 기술 개발 현황	20
제1절 국내의 기술개발 현황	20
제2절 국외의 기술개발 현황	21
제 3 장 연구개발 수행내용 및 결과	23
제1절 목질진흠버섯 KACC93057P의 기능성 강화 고 부가가치 가공식품 개발	23
제2절 목질진흠버섯의 면역 기능성 강화 가공식품소재 개발	33
제3절 목질진흠버섯의 면역활성성분 규명 및 시험법 밸리데이션	71
제 4 장 목표달성도 및 관련분야에서의 기여도	131
제1절 관련분야 전망	131
제2절 연구 목표 달성여부	133
제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획	140
제1절 연구성과 목표 대비 실적	140
제2절 관련분야의 기술발전 기여를 위한 성과 활용	142
제3절 특허, 품종, 논문 등 지식재산권 확보계획	143
제 6 장 참고문헌	144

제 1 장 연구개발과제의 개요

제 1 절 연구개발 목적

급격한 사회, 경제적 발전에 따라 생활수준이 빠르게 향상되고, 특히 의료산업의 발달로 수명이 급격히 증가하게 된 반면, 노령화 인구의 증가에 따라 암, 당뇨, 동맥경화, 면역성 질환 등 많은 만성, 난치성 질환을 포함한 성인병 및 퇴행성 질환이 급증하게 되어 삶의 질은 상대적으로 저하를 나타낸다. 이같은 만성, 퇴행성 질환의 발병원인이 상당부분 매일 섭취하는 식품 및 식생활과 깊게 관련된 생활습관병으로 인식되면서 이를 극복할 수 있는 바이오소재 특히 기능성 식품소재를 개발하려는 연구가 활발히 진행되고 있다. 버섯은 분류학상 담자포자를 형성하는 담자균류 (Basidiomycota)와 자낭포자를 형성하는 자낭균류 (Ascomycota)로 나뉘나 대부분 담자균류에 속하며 자연계에서 유기물질을 분해하여 순환시키는 organic recycling에 매우 중요한 분해자의 역할을 수행한다. 버섯은 맛과 향기가 독특하고 필수아미노산을 포함한 단백질, 지방, 비타민, 탄수화물, 섬유질, 미네랄, 핵산 등을 함유하고 있어 고급 식품으로 애용되어 왔으며, 또한 생체방어물질로서 항생물질, 항암물질, 항바이러스물질과 생체기능조절물질로서 면역조절물질, 혈압조절물질, 혈당조절물질, 콜레스테롤저하물질, 항혈전물질, 간기능 보호물질 등 다양한 생물활성을 지닌 화합물을 함유한다. 목질진흙버섯은 항암, 혈중 콜레스테롤 저하, 혈압강하, 항바이러스, 항당뇨, 항혈전 등의 약리효과를 나타내는 것으로 알려짐. 이에 따라 의약, 건강 기능식품, 향장 및 주류 산업 등에도 폭넓게 활용되고 있다. 그러나 이같은 산업적 활용은 목질진흙버섯 자체의 활용보다는 균주를 배양하여 배양물을 활용하고 있으며, 이는 목질진흙버섯의 재배에 많은 시간이 소요되고 자실체의 형성율이 낮아 가격이 매우 높게 형성되어 산업적인 활용에 많은 제약이 있다. 또한 효능적인 측면에서도 목질진흙버섯의 기능성 성분과 관련하여는 면역 활성을 증진하는 고분자 다당체(polysaccharide)에 관한 연구가 대부분이며, 면역 기능성 생리활성 성분과 관련한 연구는 거의 수행되지 않음. 따라서 유효 활성성분보다는 추출물 자체를 활용하는 단계에 머물러 있어, 이에 대한 과학적 접근방법에 의한 체계적 연구가 요원한 실정이다.

본 연구 목적은 국내 최초로 안정적 재배에 성공한 우리고유 목질진흙버섯(*Phellinus linteus*) KACC 93057P의 재배적 환경을 구명하고 면역활성 유효성분인 항산화물질 탐색과 다당체 β -glucan의 효능을 구명 하여 유효기능이 최적화된 가공소재를 활용하여 식품소재 유형을 개발하고 고 부가가치의 유기 가공 건강식품의 산업화 제품개발 하는데 있다

제2절 연구개발의 필요성

1. 목질진흙버섯의 고 부가가치 식품 소재 활용

가. 목질진흙버섯의 약리작용

(1) 약용식품 소재로의 활용

버섯은 최근 재배방법의 개발로 양산체계가 구축되어 있다. 특히 상황버섯(장수진흙버섯, 목질진흙버섯 등)은 항암, 혈중 콜레스테롤 저하, 혈압강하, 항바이러스, 항당뇨, 항혈전 등의 약리효과를 나타내는 것으로 알려져 있으며, 이에 따라 의약분야에서의 특허출원도 급격히 증가하고 있고, 건강 기능식품, 향장 및 주류 산업 등에도 폭넓게 활용되고 있다.

그럼에도 불구하고, 상황버섯의 기능성 소재에 관하여는 면역 활성을 증진하는 고분자 다당체(polysaccharide)에 관한 연구가 대부분이며, 저분자 기능성 생리활성성분에 관한 연구는 매우 미진하다. 또한 유효성분보다는 추출물 자체를 활용하는 단계에 머물러 있어 이에 대한 과학적 접근방법에 의한 체계적 연구가 요원한 실정이다. 또한, 최근 인공재배 기술의 발달로 상황버섯의 과잉공급에 의한 가격하락이 야기되고 있어, 기능성 식·의약소재로의 전환에 의한 부가가치의 향상 및 이를 통한 재배 농가의 소득증대 및 소득안정화를 위한 대책이 필요하다. 2015년 현재 건강기능식품 제조, 판매가 가능한 버섯류의 기능성 원료는 총 8건이며 고시형 원료로는 영지버섯과 목이버섯이 각각 혈행개선과 배변활동 원활화 기능성으로 등록되어 있다. 개별인정형 원료로는 금사상황버섯과 표고균사체 AHCC가 면역증진 기능성으로, 표고버섯 균사체추출물(2건)이 간 건강에 도움 기능성으로 인정을 받았고, 2011년 동충하초 발효추출물이 지구력 증진 기능성으로 추가된 데 이어, 2013년 동충하초 주정추출물이 면역증진 기능성으로 새롭게 추가되었다.

(2) 고 부가가치 식품소재로의 활용

진흙버섯은 전 세계적으로 약 48여종이, 한국에는 8종이 분포하고 있는 것으로 알려져 있다. 진흙버섯 중에서 목질진흙버섯(*Phellinus linteus*, PL)은 뽕나무를 기주식물체로 하여 자실체 형태가 누런색을 띠다하여 “상황버섯”으로 불리고 있다. 일본에서 자실체 추출물에서 96.7% 고형암세포 저지율을 나타내는 가장 강력한 항암버섯으로 알려지게 되면서 (Ikekawa *et al.*, 1968) *P. linteus* (PL)은 세계적인 주목을 받기 시작하였다. 지금까지, PL은 항암뿐만 아니라, 면역증강제, 항염, 항알러지, 혈과형성억제제 등의 다양한 약리효과가 보고 되었다 (Daniel, 2010). PL은 인공재배가 용이하지 않아 대부분 균사배양체를 연구재료로 사용되어 왔다. *P. linteus* ASI 26099균주를 이용한 자실체의 인공재배연구가 수행되었지만 (Hong *et al.*, 2002), 자실체 성장이 매우 느리고 생산량이 극히 제한적이라서 재배에 난점이 있어 농가에서는 거의 재배하지 않고 있다. 따라서 재배가 비교적 용이한 유사종인 *P. baumii* (장수상황)를 대체 종으로 재배하고 있다. 장수상황의 특성은 균사체성장이 빠르고 참나무 원목재배시 자실체 원기가 잘 형성됨으로 해서 자실체 성장과 형성율이 높아 안정적 생산을 할 수 있는 장점이 있으나 자실체의 형태적 특성이 기존에 보고된 *P. linteus*와는 차이를 보이고 있다.

목질진흙버섯 (*Phellinus linteus*, L. ex Fr) Quel)은 민주름버섯목 (Aphyllporales) 진흙버섯과(Phellinaceae)에 속하는 백색부후균으로 고산지대에 서식하고 있는 산뽕나무 등의 고목에서 자생하는 매우 희귀한 다년생 버섯으로 일반명은 뽕나무 상(桑)에 누른황(黃)을 써 뽕나무에서 분리된 누런 버섯이란 뜻으로 “상황버섯”으로 부르고 있음. 한의서에는 상이(桑耳) 상목이(桑木耳) 등의 이름으로 기록 하고 있으며 일본에서는 메시마코프로 불리고 있다. 일반적으로 진흙버섯 (*Phellinus* spp.)를 분류할 때 분리된 기주식물체에 따라 분류학적 명칭이 부여 되고 있음. 예를 들면 장수진흙버섯 (*Phellinus baumii*)은 개화나무에서 분리 되었으며 목질진흙버섯 (*Phellinus linteus*)는 뽕나무에서 분리되어 명명 된 것임. 따라서 목질진흙버섯(*Phellinus linteus*)이 진정한 “상황버섯”이다. 최근 2017년 식품의약품안전처에서 목질진흙버섯에 한하여 “면역에도움을 줄 수 있는” 기능성식품으로 고시된 바 있다.

국내에서 신규 *P. linteus* KACC93057P가 분리되었으며 전형적인 *P. linteus* 종의 형태적 특성을 보유하며 *In vitro*에서 항산화, 면역, 항암효과가 우수한 것으로 평가 되었으며 자실체의 안정적 생산에 성공하여 활용할 수 생산체계가 확립된 바 있다. 따라서 *P. linteus* KACC93057P의 자실체를 활용한 고 부가가치 식품소재를 개발하고 면역에 유효한 성분을 탐색 동정하여 기능성식품 개발을 위한 중요한 기점이 될 수 있어 본 연구가 필요 하다.

(3) 건강 가공식품개발 재료 적용성

다양한 생리활성을 나타내는 것으로 알려진 목질진흙버섯 즉 상황버섯은 재배의 어려움으로 인하여 고가의 약용버섯으로 인식되고 있으며 산업적 활용에 많은 어려움이 있음. 따라서 현재 시장에서는 재배가 용이한 장수진흙버섯이 상황버섯으로 판매되고 있음. 본 연구에서는 새로운 균주 개발을 통하여 재배가 용이하고 생육이 우수한 목질진흙버섯의 양산체계와 최적 약리 효과의 재배방법을 구축하고 이의 기능성을 구명하여 새로운 기능성 식품소재를 개발하고자 하는 연구다. 이는 궁극적으로 양산체계가 가능한 목질진흙버섯을 활용한 다양한 기능 강화식품을 개발하여 만성적인 사회적 질환의 발병을 감소시키고 완화시켜 국민의 삶의 질을 향상시키고 국가의 의료비 부담을 감소시켜 사회적, 경제적 이익의 창출을 도모하고자 한다.

목질진흙버섯은 인공재배가 어려워 자실체 안정적 생산 공급이 제한적이므로 국내외 연구와 제품생산은 대부분 균사 배양체를 사용하고 있음. 상황버섯자실체와 균사체추출물의 약리활성을 비교한 결과 자실체가 항암, 면역강화, 종양저지효과, 자궁출혈, 월경불순 등에서 현저히 우수한 것으로 알려졌다. 세계적으로 목질진흙버섯 (*P. linteus*)의 약리활성 효과연구는 균사체를 열수 추출 또는 Ethylacetate 등의 용매 추출 시료로 사용되고 있으며 이는 인공재배로 균일하고 지속적으로 자실체 재료 확보가 어렵기 때문이다. 목질진흙상황버섯의 안정적 생산을 기반으로 자실체의 약리활성물질 구명과 건강 가공식품 개발은 농가 --> 산업체와 연계되는 시스템이 성립됨으로 농가에는 새로운 소득증대 창출과 기능성물질의 극대화를 이룰 수 있다. 우리나라 상황버섯 재배기술은 지상형 재배와 지면재배로 나뉘며 참나무, 산뽕나무 등의 원목으로 재배되고 있으나 대부분 장수상황버섯 생산시스템에 중점을 두고 있어 목질진흙버섯 생산을 위한 재배법개발이 시급하다.

(4) 식품 소재로서의 특징

목질진흙버섯 KACC 93057P는 균사생장이 국외 *P. linteus*와 *P. baumii* 등의 다른 *Pellinus* 종에 비하여 월등히 빠르고 곡물 배양체와 자실체 추출물은 맛과 향이 좋아 상황버섯의 무색 무취의 개념을 넘어 식품가공소재로서 특징이 있다. 목질진흙버섯 KACC 93057P 자실체의 유기농 인증(인증번호 제10-1-34호)재료를 사용함으로써 국내외 시장에 유통되는 상황버섯 가공품과 차별화된 고 부가가치 유기가공 건강식품 개발 가능하다. 상황버섯은 다려서 먹어야 하는 번거로움이 있으나 언제 어디서나 쉽게 복용할 수 있는 대중적 접근으로 시장을 확대할 수 있다. 따라서 본 연구에 사용될 목질진흙상황버섯 KACC93057P의 유용성분에 대한 기능성을 부여할 수 있는 약리 효능이 구명될 경우, 고 부가가치성 상황버섯으로 경제적 파급효과가 클 것으로 보며, 균사체/자실체를 이용한 가공품생산으로 국내 소비증대는 물론 향후 의약품 개발을 위한 기초연구로 경제적 가치는 상당할 것으로 전망 된다.

제 3 절 연구개발 범위

1. 목질진흙버섯 KACC93057P의 기능성 강화 고 부가가치 가공식품 개발

가. 목질진흙버섯 KACC93057P 발아현미 배양체를 이용한 티백 차 시제품 개발

한경대학교에서 분양받은 발아현미 배양체를 이용하여 그림 1 같이 레시피를 작성하여 시제품을 완성 하였다. 최종적으로 시제품 생산을 위하여 제품상자 디자인 및 제품명을 “순수담 상황 차” 로 결정하여 시제품을 완성하고 전시회 및 기타 시음회를 가졌다.

나. 자실체분말, 추출물을 이용하여 과립체 생산 조건을 확립

노루궁뎅이의 과립체생산기술이 확립되어 제품생산하고 있으며 선행기술이 설정되어 있었다. 특히 노루궁뎅이의 과립체 생산은 물엿 등 과당을 첨가 하지 않더라도 자실체 추출물만으로 과립형성이 가능하다. 따라서 목질진흙버섯 KACC93057P 고 농축 열수 추출을 노루궁뎅이 자실체에 첨가하고 반죽하여 과립체를 완성 할 수 있었다.

다. 최적 기능성 효능을 가지는 유기가공 상황버섯 차 제조

본 제품 개발연구는 목질진흙버섯 KACC93057P 발아현미 배양체를 이용한 티백 차 시제품 개발하였다. 1차년도 과립체 생산조건을 확립하였다. 2차년도에는 과립체의 상황버섯 차를 제조 하기 위한 조건을 확립 하는데 목적을 두고 수행 하였다.

라. 목질진흙버섯 농축액을 첨가한 과립체 식품 주요성분 함량 분석

목질진흙버섯 추출물을 함유한 과립체 주요 성분으로 유기농으로 재배한 발아현미를 사용하였다. 그 외 원료로 사용 되는 표고버섯, 상황버섯 등 국내산 농산물을 이용하였다. 노루궁뎅이 과립차 2g의 주요 함량으로는 발아현미 64.5%, 노루궁뎅이버섯 10% ,표고버섯10%, 린테우스상황버섯5.5%을 포함하고 있다. 주요 성분 분석은 한국에스지에스(주) 에 의뢰하여 식품 시험 및 심사를 진행하였다.

마. 상황버섯 과립차의 연령대별 식미조사

상황버섯 과립차 제품을 이용하여 30대 이하, 40대, 50대, 60대 이상 4개의 그룹으로 나눠 총 558명을 대상으로 식미조사를 실시하였다.

2. 목질진흙버섯의 면역 기능성 강화 가공식품소재 개발

가. 재배방법과 환경에 따른 유기농 목질진흙버섯 KACC93057P의 고유특성 검정

목질진흙버섯 KACC93057P 균사성장 환경 PDA(Potato Dextrose Agar)배지에서 지경 5mm의 균층을 접종하고 15-40℃로 배양온도를 달리하여 최적 균사생장온도를 조사 하였다.

나. 목질진흙버섯 KACC93057P의 종균종류에 따른 원목배양 효율조사

목질진흙버섯 KACC93057P를 원균으로 하여 상기 곡립, 톱밥, 액체종균을 제조하여 20ml를 살균된 종균별 500개의 상수리나무 원목에 접종하고 90일 후에 원목 균사확장과 오염율을 조사 하며 발이율, 자실체 형성율을 조사 하였다.

다. 목질진흙버섯 KACC93057P(PLHS)의 생리활성물질의 효능탐색

Phellinus 종 및 추출조건별 조당체 β -Glucan, polyphenol 함량 을 조사하고, 항염증분석(Nitrate oxidation assay), 세포생존율측정(MTT saasy), 항 혈소판 응집 효과, 항산화효과를 조사하였다.

라. 목질진흙버섯 KACC93057P를 이용한 식품가공품제조조건 확립

본 연구의 유기농인증 *Phellinus linteus* KACC93057P (한경상황버섯)분말과 추출물 및 상황버섯 현미배양균사체를 이용한 상황버섯차를 개발 하였다. 1차년도 에서는 상황버섯 현미배양체 배양조건을 확립하였다. 2차년도에는 상황버섯 차를 제조 하기위한 조건을 확립 하는데 목적을 두고 수행 하였으며 상황버섯 가공품의 ABTS와 DPPH 라디칼 소거능 활성능에 의한 유효성분 활성을 조사 하였으며 침출 능력을 색형에의하여 확인 하였다.

마. 목질진흙버섯 KACC93057P(PLHS) 열 수 추출물과 노루궁뎅이버섯 자실체를 조성으로 하는 항산화 기능성 강화 과립 차 개발

노루궁뎅이 버섯분말과 PLHS 자실체 열 수 추출 농축물을 제조하고 노루궁뎅이버섯을 수확 하여 53 ℃에서 수분함량을 12%정도로 건조단계와 건조된 버섯을 100 mesh로 분쇄물을 혼합하여 교반하고 반죽하고 성형틀에 주입시켜 입자크기를 2mm로 하여 과립체를 성형하여 48℃에서 수분함량을 5%이하로 건조 하였으며 과립형과 침출시간에 따른 침출물의 색형과 투명도 및 항산화 활성을 조사 하였다.

바. 목질진흙버섯 KACC93057P 다당체 β -glucan의 면역활성분석

(1) 사이토카인 억제 분석

Raw 264.7 cell을 24well에 1×10^6 cell/ml 씩 넣고, 12시간 배양 후 농도별 Polysaccharide 를 처리하고 30분 뒤에 lipopolysaccharide (LPS) 100 ng/ml를 처리한다. 12시간 후에 배양여액을 조심스럽게 옮기고 1500rpm에서 10분간 원심분리하여 사용하였다.TNF-alpha, IL-6 Cytokine 생성 억제 분석을 실시 하였다.

(2) 결장암세포의 항암 효과

HCT116 cell을 전배양한 RPMI 배지에 24 well 1×10^5 농도로 계수하여 Seeding 하였다. 5% CO₂ incubator에서 24시간 배양 후 Hypholomine B, Davallialactone (60, 125, 250 µg/ml) 농도별로 처리하여 12시간 배양하였다. 배양이 끝난 후 MTT 5mg/ml 용액을 10% 넣은 뒤 5% CO₂ incubator에서 2시간 배양한다. 배양 후 배양여액을 버리고 dimethylsulfoxide(DMSO)를 1ml 넣어 5분간 50 rpm으로 shaking 한 후 ELISA reader (517nm)로 흡광도를 측정하여 대조군과 비교하였다.

사. 노령쥐에 대한 면역활성 개선효과 구명

(1) 실험용 동물

구입한 12주령의 ICR 마우스를 실험 동물로 사용하였다. 7일간 안정화를 시킨 뒤 실험군을 편성하였다. 통계적 유의성을 확보하기 위해 처리구당 7마리 이상을 실험군으로 하였다. 실험 기간 중에 사료와 물을 자유 급이 하였고 실온은 $22 \pm 2^\circ\text{C}$ 를 유지하였다.

(2) 실험 암종 및 시료 투여

마우스를 7일간 순화 시킨 후 HCT116 cell을 RPMI 배지에 배양하여 plate에서 cell을 떼어낸 뒤 1×10^6 cell/ml 로 계수 하였다. 1×PBS에 현탁 시켜 4°C에서 하루 동안 정치 한 후 주사기를 이용하여 준비하고 마우스의 복강을 에탄올 솜으로 드레싱한 뒤 0.1ml 씩 복강 내 주사 하였다. 암 이식 96시간 경과 후에 처리구별로 식염수에 현탁 하여 1일 1회 7 일간 경구 투여로 진행한 뒤 희생하여 실험을 진행 하였다.

(3) Immunohistochemistry (IHC) 분석 방법

4% paraformaldehyde 로 4°C에서 overnight 반응하여 조직을 고정 후 antibody 투과성을 높이기 위하여 0.2% Triton-X 100 으로 30분간 처리 후 1X PBS 로 세척한다. 0.3% H₂O₂로 3분간 처리하였다. 5% Horse serum 으로 blocking 하여, 1차 항체는 1% BSA가 첨가된 PBS에 희석한 후 조직에 처리하고 상온에서 3시간 동안 반응시켰다. 2차 항체를 1% BSA에서 희석 시켜 1시간 반응시켰다. 그리고 1X PBS로 5분씩 4번 수세한 뒤 staining workingolution (1µg/ml in ultrapure water)을 조직에 완전히 덮히도록 뿌려주고 빛을 차단할 수 있게 호일로 샘플을 덮은 뒤 상온에서 10분 동안 반응시켰다. gel mounting solution을 조직위에 뿌리고 Nikon C1si Laser Confocal Microscope를 이용하여 관찰하였다.

(4) Immunofluorescence (IF) 분석 방법

처리된 조직 slide를 0.2% Triton X-100으로 RT에서 5분씩 2회 재형성화를 하였다. 이후 TTBS (1×Tris , 1×NaCl Tris , 1×NaCl , 0.02% Tween 20)로 3회 세정한 후 5% normal horse serum에 1% goat serum을 1×PBS에 섞어 blocking solution을 만든 후 실온에서 1시간

동안 blocking하였다. Primary antibody (VEGF and IgG) 를 blocking solution으로 1:200으로 희석하여, 4°C에 24시간 동안 항원항체 반응을 유도 하였다. 반응 유도 후 1×PBS로 4회 세정 하였고, secondary antibody 로 37°C에서 30분 동안 반응하고, 1×PBS로 5분씩 3회 세정한 후 Hoechst 33342로 염색하여 형광현미경으로 200배 분석하였다.

3. 목질진흙버섯의 면역활성성분 규명 및 시험법 밸리데이션

한경대학교에서 개발한 목질진흙버섯의 우수성을 밝히고자 항산화 활성기반 폴리페놀 성분의 분리, 정제 및 화학구조 동정, 폴리페놀 함량, 지표성분 설정, 설정된 지표성분을 이용한 밸리데이션 연구를 수행하였다. 본 연구개발의 내용 및 범위는 다음과 같다.

가. 목질진흙버섯과 장수진흙버섯 자실체 추출물 수율 비교

한경대학교에서 제공받은 *P. linteus* KACC93057P (Hankyong Sanghwang, PLHS), *P. baumii* (Jangsoo sanghwan, PLJS), *P. linteus* (Korea Sanghwang, PLKS)을 추출한 후 유효성분을 함유한 추출물의 수율을 비교하였다.

나. 목질진흙버섯과 장수진흙버섯 자실체 추출물의 항산화 활성 비교

상기의 3개의 추출물을 동일한 용매의 양으로 녹여 희석하며 항산화 활성으로 ABTS radical 소거활성, DPPH radical 소거활성, 환원력 측정, 총 폴리페놀 함량 등을 측정하였다.

다. PLHS, PLJS, PLKS의 자실체 및 균사체 대사산물 비교 분석

PLHS, PLJS, PLKS의 자실체를 메탄올로 추출하여 추출물을 제조하고, 이들 균사를 potato dextrose agar(PDA) 배지에 배양한 후 배양액을 ethyl acetate 로 추출하여 추출물을 제조하였다. 이들 추출물을 각각 HPLC로 분석하여 polyphenol을 포함한 대사산물의 다양성을 비교, 분석하였다.

라. *P. linteus* KACC93057P 유래 항산화 polyphenol 성분의 분리 및 정제

한경대에서 제공한 목질진흙버섯KACC93057P 4.4 kg을 마쇄한 후 메탄올에 침지하여 추출하였다. 또한 2차 추출로 60% 메탄올에 침지한 후 열탕기를 이용하여 60°C에서 추출하였다. 추출물을 합한 후 감압 농축하여 메탄올을 제거한 후 용매 분획, silica gel column chromatography, Sephadex LH-20 column chromatography, preparative HPLC 등을 수행하여 항산화 polyphenol 성분을 분리, 정제하였다.

마. *P. linteus* KACC93057P 유래 항산화 polyphenol 성분의 화학구조 동정

한경대에서 제공한 목질진흙버섯으로부터 분리한 항산화 polyphenol 성분의 화학구조를 동정하기 위하여 ESI-mass 및 NMR spectrum을 측정하여 해석하였다.

바. 지표물질의 선정 및 분석법 밸리데이션 확립

지표물질의 선정은 화합물의 특이성, 검출용이성 등을 고려하여 설정하였으며, 분석법 밸리데이션을 위하여 목질진흙버섯으로부터 hispidin을 분리, 정제한 후 순도를 확인하였다.

밸리데이션을 통하여 직선성, 검출한계(LOD), 정량한계(LOQ), 지표성분의 함량 등을 조사하였다.

제 2 장 국내 · 외 기술 개발 현황

제1절 국내의 기술 개발 현황

1. 국내 목질진흙버섯의 식품 개발

세계적으로 진흙버섯 (*Phellinus* spp.) 유사종이 200여종이 알려져 있으나 우리나라 식품의약품안전처에서는 목질진흙상황버섯(*Phellinus linteus*)과 장수상황버섯 (*Phellinus baumii*)만을 식품으로 인정 되고 있으나 일반마켓에서 흔히 볼 수 있는 상황버섯은 대부분 재배가 용이한 장수상황버섯 이며 목질진흙상황버섯은 국내에서 자생하나 희귀하고 재배가 까다로워 일부 농가에서 재배되고 있으나 안정생산이 어려워 장수상황버섯에 비하여 3-4배의 매우 고가 판매되고 있어 식품소재로의 걸림돌이 되고 있다. 상황버섯은 농산물형태의 유통이 주를 이루고 있지만 2003년 목질진흙버섯 상황버섯이 식품원료로 허가 받은 후 파우치, 타블렛, 기능성 차, 과일, 발아현미, 식초, 김치, 라면 등 다양한 형태로 가공 출시되고 있으며 점차적으로 상황버섯의 우수한 효능에 대한 소비자 인식 증대 등의 요인으로 2011년에는 48.3억원 정도의 시장으로 추정 된다. 국내시장에 유통되는 상황버섯종류는 대략적으로 5종류가 있으며 그밖에 북한산 등의 지역명으로 한 자연산 상황버섯으로 인터넷 상에서 거래되고 있다.

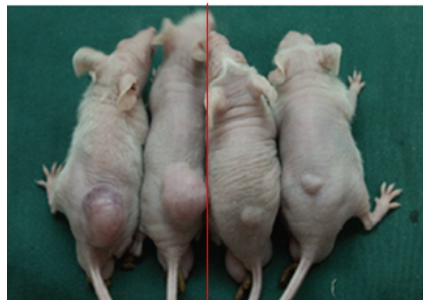
장수상황버섯 (*Pellinus baumii*)은 학문명으로는 장수진흙버섯으로 불리며 농가 주요재배 품종이며 고려상황(*Pellinus linteus*)의 학문명으로 목질진흙버섯으로 으로 재배기간 (3-4년)이 길고 재배법이 까다로워 재배가 거의 되고 있지않고 있다. 금사상황 (*Pellinus linteus*)은 균주의 근원이 밝혀지지 않고 있으며 균사체로부터의 면역활성체가 개별인정 된 바 있으나 사실체 생산이 불명 하다. 캄보디아 상황은 캄보디아의 산뽕나무에서 채취한 버섯으로 선전하고 있으나 그 실체를 알 수없으며 황금상황버섯 (*Phellinus gilvus*): 2004년도 경남농업기술원에서 개발한 마른진흙버섯 종이나 식품으로 등록 되지 않고 있다. 최근 전형적인 목질진흙버섯의 형태를 지닌 새로운 목질진흙버섯 균주 KACC 93057P를 개발하고 인공재배에 의한 안정적 생산체계가 구축되어 목질진흙버섯의 안정적 공급이 가능하게 되었다. 상황버섯을 이용한 가공식품은 주로 균사체를 이용한 가공식품이 주류이며 티백, 된장 등 장류 첨가물, 과일, 발효주, 음료 등이 있다. 목질진흙상황버섯 대량 균사액체배양체로부터 조당체를 분리 정제하여 메시마엑스(한국신약)로 의약품으로 등록 일본으로 연간 30억의 수출되고 있으며 2006년에는 상황버섯 술인 “천년약속”이 186억의 매출을 기록 하였다. 장수상황버섯 추출액 파우치 또는 곡물배양 균사체 분말, 절편을 제조하여 판매 하고 있으나 대부분 영세 농가에서 가내 수공업 수준으로 제조 판매하고 있기 때문에 체계적인 가공식품 생산 기술이 요구 되고 있다. 2004년 건강기능식품법이 발효되면서 시작된 개별인정형 기능성원료 인정현황을 보면, 2013년 누계 총 인정 원료 수는 463건이나 버섯류는 전체의 6건에 불과 하다.

제1절 국외 목질진흙버섯의 식품 개발

버섯이 항생물질, 항종양물질, 항바이러스물질, 면역조절물질, 혈압조절물질, 혈당조절물질, 콜레스테롤저하물질, 항혈전물질, 간기능 보호물질, 항소염물질 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 생산된 Krestin (PSK), *Lentinus edodes*의 자실체로부터 생산되는 Lentinan, *Schizophyllum commune* 균주의 액내 배양생성물로부터 생산되는 schizophyllan 등의 다당류 항암면역증강제가 개발되어 시판되고 있으며 시장규모도 연간 약 3억불 규모를 형성하고 있다. Krestin은 Sankyo, Ouwa에 의해서 제조 판매되고 있는 항종양제품으로 담자균인 구름버섯 *Coriolus versicolor* CM101 균주 배양균사체의 열수 추출액에 황산 암모니움을 포화시킨 후 생성되는 침전물을 분취, 탈염하여서 제조하였다. Lentinan은 Aginomoto, Yamanouchi 제약, Morisita 제약 등에 의해서 판매되고 있는 제품으로 표고버섯의 자실체로부터 분리 정제된 생체방어 증강물질(host defence potentiators : HDPs)임. AIDS 치료약으로 이용을 검토중이다. Schizophyllan은 목재부후균의 일종인 *Schizophyllum commune* 균주를 glucose 액체배지에서 배양하였을 때 균체외로 생산되는 다당류를 분리한 것으로 β -(1→3)-glucoside 결합으로 이루어진 직쇄상에, β -(1→6)-glucoside 결합의 분지를 갖는데 glucose 잔기 3개에 1개의 분지를 갖는 화학구조를 지니고 있다.

항암면역증강 활성을 나타내는 다당류의 화학구조는 β -glucan이며 모두 평균 분자량이 10만-50만 정도의 화합물로 macrophage, 보체, T세포, B세포, NK세포 등과 관련하여 인체내의 면역기능을 강화, 인터루킨이나 인터페론 등 cytokine의 생산을 촉진함으로써 항암효과(Biological Response Modifiers의 일종)를 나타내어 부작용이 없는 것으로 보고되었다. 균사체 및 배양액으로부터 항종양 활성 (Sarcoma 180/mice)을 나타내는 다당류가 분리 보고된 바 있다. 버섯류래 다당류는 macrophage, 보체, T cell, B cell, NK cell 등에 관여하는 면역기능을 활성화하여 인터페론이나 인터루킨 등의 cytokine의 생성을 촉진시킴으로써 항암효과를 나타내므로 화학요법제의 상용에 따른 부작용의 문제점이 없다. 또한 이같은 항암면역 다당체 이외에도 최근 독버섯인 *Clitocybe illudens*로부터 항암항생물질로 분리 보고된 illudin S의 유도체가 합성되어 미국 식품의약국(FDA)의 우선심사대상 품목으로 선정되어 특별한 치료약이 없는 췌장암 치료를 위하여 상용화 될 것으로 전망되고 있다. 버섯류는 또한 다양한 항생물질을 생산하는데 항생물질 연구는 1945년 marasmic acid가 보고된 이래 현재까지 약 100여종의 항생물질이 보고됨. 현재 의약품으로 개발된 항생물질은 아직 없으나 strobilurin 계열의 화합물들이 농용항생물질로서 개발되었다. 이 외에도 버섯으로부터 생체기능조절물질로써 혈당강하물질 ganoderan 화합물, 콜레스테롤 감소물질 eritadenin, 신경제작용물질 ibodenic acid, lipoxygenase 저해물질 grifolic acid, 유독물질인 amanitin, phalloidin을 포함한 혈압 저하물질, 항혈전물질 등 많은 다양한 구조의 저

분자 생리활성물질들이 분리, 보고됨에 따라 천연물 학자들을 중심으로 활발한 연구가 진행되고 있다. 목질진흙상항버섯은 일본국립 암 연구 센터에서 고형암 (Sarcoma 180) 저지율 96.7%로 버섯중 최고의 항암효과가 밝혀짐에 따라 다수의 세계적인 학술지에 암, 면역 , 항산화 등 인체의 유효 효능이 입증 되었다 (2002, FDA 10대 항암식품 선정) 목질진흙버섯균주 (*Pellinus linteus*) 균사체로 부터 물추출물과 다당체 등을 이용하여 대장암, 유방암, 방광암, 폐암, 전립선암세포 억제 및 면역활성 효과가 보고되었다 (NCBI, PubMed 23편 게재). 최근 미국 보스턴 약대에서는 Doxorubicin항암 항생제에 *P. linteus* 추출물과 혼합 하였을 때 전 립선암 세포 파괴능력이 향상 된 것으로 보고 되었다(2013, 미국보스턴약대).



대조구 | 목질진흙버섯추출물

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제1절 목질진흙버섯 KACC93057P의 기능성 강화 고 부가가치 가공 식품 개발

1. 목질진흙버섯 KACC93057P 발아현미 배양체를 이용한 티백 차 시제품 개발
 한경대학교에서 분양받은 발아현미 배양체를 이용하여 (그림 1) 같이 레시피를 작성하여 시제품을 완성 하였다.

업 체 명	머쉬아트영농조합		
제 품 명	상황차	유 형	기타가공품
원 재 료 명 (100%)	상황버섯 린테우스 현미균사체 100% (국산)		
< 제 조 방 법 >			
공정명	제조방법 설명		
입고.보관	원부재료 입고시 외관상태 확인후 정상제품만 입고.보관한다		
▼			
선별. 정선	안전한 재료를 선별. 정선작업(이물제거)을 한다		
▼			
분쇄	용도에 맞게 소립으로 분쇄한다		
▼			
뒤움	80℃ 10min 간 뒤은후 재빨리 식힌다		
▼			
계량.포장	피라밋여과지에 3g씩 밀봉 포장한다		
▼			
검사	밀봉포장 상태 검수후 외박스 입수한다		
▼			
출하	완제품은 출하한다.		

<그림 1> 상황 티백차 제조공정 확립

가. 버섯의 전처리

목질진흙버섯을 2년 생육후 수확하여 에어 세척기로 이물을 제거후 곧바로 건조된 버섯을 구매하였다. 버섯을 수냉식 간접열풍 건조기로 50℃에서 48h 건조후 입자 20mesh로 처리하여 500g단위로 PE필름 포장하였다. 이는 보관중 버섯이 가지고 있는 수분함량이 가장 낮은 입자 크기로 제품 품질의 균일성을 보증할 수 있는 물성변화가 적은 보관방법으로 20mesh로 처리하여 10℃ 이하에서 보관하였다.

나. 최적 레서피 개발

1차적으로 발아현미 군사배양체 100%를 증숙 및 뒤움방법에 따라 맛과 풍미를 개발하였다. 시료800개를 간이로 침출이 용이한 티백포장하여 소비자 선호도 조사를 실시 하였다. 조사결과 및 제1협동의 식품소재 개발결과로 2차 레서피를 개발하였다. 목질진흙버섯과 잘 융합되는 버섯종 중에서 노루궁뎅이버섯, 표고버섯을 선별하였다.

맛과 풍미에 따른 원재료 배합비를 개선하여 최종레서피를 개발 시제품 생산에 따른 식품공정을 확립하였다.

최종적으로 시제품 생산을 위하여 제품상자 디자인 및 제품명을 “순수담 상황 차” 로 결정하여 시제품을 완성하고 전시회 및 기타 시음회를 가졌다.



전시및 홍보전
수출홍보활동 공로상



시제품 순수담 상황차



전시 및 시음회 (2017.4.20 ~ 22 부산도시농업



2017.6.10 ~ 11, 서울특별시 강동도시농업박람회, 전시 및 홍보전



2017.6. 9. 충남대학교, 버섯학회준계학회장 전시참가



<그림 2> 상황차 시제품 및 전시 시음회

다. 자실체분말, 추출물을 이용하여 과립체 생산 조건을 확립

노루궁뎅이의 과립체생산기술이 확립되어 제품생산하고 있으며 선행기술이 설정되어 있었다. 특히 노루궁뎅이의 과립체 생산은 물엿 등 과당을 첨가 하지 않더라도 자실체 추출물만으로 과립형성이 가능하다. 따라서 목질진흙버섯 KACC93057P 고 농축 열수 추출을 노루궁뎅이 자실체에 첨가하고 반죽하여 과립체를 완성 할 수 있었다(그림 2).

(1) 버섯의 전처리

목질진흙버섯은 유기농인증을 받은 버섯을 구입하여 수분함량 7%이하로 건조하였다. 입자 20mesh로 처리하여 500g단위로 PE필름 포장후 10℃ 이하에서 물성변화가 적도록 보관하였다.

(2) 최적 레서피 개발

발아현미 74.5%, 노루궁뎅이버섯 자실체10%, 표고버섯10%를 50mesh로 분쇄하여 혼합한다. 혼합된 재료를 상황버섯추출물5.5%(린테우스상황버섯100%, 자실체100g)을 분사하여 50℃에서24h 건조후 80℃에서 30min튀는다.



노루곰덩이버섯+상황버섯 과립형상

업 체 명	미쉬아트명농조합
특 허 명	상황버섯농축액을 이용한 과립 제형개발
원 재 료 명 (100%)	상황추출물3%(국산),노루곰덩이버섯 자실체 97% (국산)
< 제 조 방 법 >	
공정명	제조방법 설명
건조	노루곰덩이버섯은 수확후 열풍건조기 53℃에서 수분함량 12%로 건조한다
▼	
선별, 정선	건조된 버섯을 선별, 정선작업(이물제거)을 한다
▼	
분쇄	버섯을 적정 매수로 분쇄한다
▼	
금속검출	미분을 금속검출기를 통과 정선한다
▼	
반죽	상황버섯 농축액을 용법에 따라 계량후 교반한다.
▼	
성형	성형틀에 입자크기에 맞게 성형한다.
▼	
건조	48℃에서 수분함량 5%이하로 건조한다.
▼	
물리적처리	180℃에서 2분간 호화 시킨다.
▼	
냉각	퇴출즉시 빠르게 식힌다.
▼	
분쇄	물밀로 용도에 따라 분쇄후 가미 한다.

<그림2> 상황버섯 농축액을 이용한 노루곰덩이 과립체 생산공정

노루곰덩이 과립체 생산에 상황버섯 농축액을 첨가함으로써 노루곰덩이의 고유 향미와 함께 상황버섯의 구수한 향미가 혼합되어 우수한 향미를 관능 평가 할 수 있었다.

라. 최적 기능성 효능을 가지는 유기가공 상황버섯 차 제조

본 제품 개발연구는 목질진흙버섯 KACC93057P 발아현미 배양체를 이용한 티백 차 시제품 개발하였다. 1차년도 과립체 생산조건을 확립하였다. 2차년도에는 과립체의 상황버섯 차를 제조 하기 위한 조건을 확립 하는데 목적을 두고 수행 하였다.

마. 목질진흙버섯 농축액을 첨가한 과립체 식품 주요성분 함량 분석

노루궁뎅이와 목질진흙버섯 추출물을 함유한 과립체 주요 성분으로 유기농으로 재배한 발아현미를 사용하였다. 그 외 원료로 사용 되는 표고버섯, 상황버섯 등 국내산 농산물을 이용하였다. 노루궁뎅이 과립차 2g의 주요 함량으로는 발아현미 64.5%, 노루궁뎅이버섯 10% ,표고버섯10%, 린테우스상황버섯5.5%을 포함하고 있다. 주요 성분 분석은 한국에스지에스(주)에 의뢰하여 식품 시험 및 심사를 진행하였다. 린테우스 상황버섯차의 식품 주요함량으로는 (표1)에서 나타내는 것과 같이 총 열량 354g으로 분석 되었고, 탄수화물 85.1g, 단백질 8.16g, 지방 0.327g, 당류 0.687g, 포화지방 0.177, 나트륨 3.95mg, 칼슘 18.9mg, 철 0.934mg, 식이섬유 11.2g, 회분 1.26g, 수분 5.13g 포함되어 있으며, 트랜스 지방이나 콜레스테롤, 비타민 부분에서는 불검출로 분석 되었다.

<표1> 노루궁뎅이 목질진흙버섯 과립 차의 식품 주요성분

시험항목	단위	시험방법	정량한계	결과
열량	kcal/100g	식품공전	-	354
탄수화물	g/100g	식품공전	-	85.1
단백질	g/100g	식품공전.Protein Analyzer	-	8.16
지방	g/100g	식품공전	-	0.327
당류	g/100g	식품공전, HPLC/RI	-	0.687
포화지방	g/100g	식품공전, GC/FID	-	0.177
트랜스지방	g/100g	식품공전, GC/FID	-	불검출
콜레스테롤	mg/100g	식품공전, GC/FID	1	불검출
나트륨	mg/100g	식품공전, ICP/OES	1	3.95
칼슘	mg/100g	식품공전, ICP/OES	0.5	18.9
철	mg/100g	식품공전, ICP/OES	0.06	0.934
비타민A (레티놀)	μgRE/100g	식품공전, GC/FLD	20	불검출
비타민C	mg/100g	식품공전, HPLC/UV	0.5	불검출
식이섬유	g/100g	식품공전	-	11.2
회분	g/100g	식품공전	-	1.26
수분	g/100g	식품공전	-	5.13

- (1) 불검출 = 정량한계 이하
- (2) g/100g = %(W/W)
- (3) - = No Regulation
- (4) ** = 단위없음

바. 상황버섯 과립차의 연령대별 식미조사

상황버섯 과립차 제품을 이용하여 30대 이하, 40대, 50대, 60대 이상 4개의 그룹으로 나눠 총 558명을 대상으로 식미조사를 실시하였다. 노루궁뎅이 농축액을 첨가한 과립체 2g 기준 5분간 따뜻한 물에 우려 차를 맛의 정도를 약하게, 만족, 더 진하게 3개의 항목으로 나누어 조사 하였다. 차의 맛이 지금 보다 약했으면 한다는 의견이 23명으로 4.1%, 만족한다는 의견이 485명 87%, 더 진한 맛을 원하는 의견이 50명 8.9% 로 집계 되었다. 그리고 남성과 여성 모두 만족한다는 평이 많았지만 여성 응답자가 상대적으로 차에 대한 관심과 만족도가 높았다. 과립차 적정 용량은 2g 기준 5분 이상 침출했을 때 소비자들이 상황버섯 차의 풍미를 느끼며 침출 색미 또한 만족하는 것을 확인 할 수 있었다.

<표2> 상황버섯 과립차 연령대 식미조사

연령대	성별	구수한 맛의 선호도 (명,%)		
		약하게	만족	더 진하게
30대	남자	0	72	0
	여자	18	88	0
40대	남자	0	68	0
	여자	5	47	0
50대	남자	0	95	15
	여자	0	99	3
60대	남자	0	6	23
	여자	0	10	9
합 계		23(4.1%)	485(87%)	50(8.9%)

사. 상황버섯 차의 소비자 선호도 조사

소비자의 선호도 조사를 위해 구매용도 설문조사를 실시하였다. 총 558명 중에 379명 66% 가 선물을 위해 상황차를 구입할 의사가 있다고 응답하였고, 179명 32% 가 자가소비를 위한 상황차를 구매할 의사가 있다고 응답하였다. 소비자들은 차의 주재료가 상황버섯으로 약리기능이 있는 기능성 차로 대부분 인식하고 선물용의 구매 선호도가 36% 높은 것으로 나타났다.

<표3> 상황버섯 차의 소비자 선호도 조사

연령대	성별	구매용도 (명,%)	
		선물용	자가소비
30대	남자	72	0
	여자	98	8
40대	남자	48	20
	여자	40	12
50대	남자	60	50
	여자	39	63
60대	남자	6	23
	여자	16	3
합 계		379(68%)	179(32%)

아. 패키지 변경에 따른 고객 맞춤 제품 상품화

상황버섯 식미조사 및 차 선호도 조사를 기반으로 최종 평가한 결과 주요 고객층은 30대~60대를 아울러 특히 30, 40대 여성들의 선물용과 50, 60대의 자가 소비 선호도가 높다는 결과를 얻을 수 있었다. 이를 바탕으로 (그림3)과 같이 상품을 휴대가 용이하고 소분하여 간단히 이용이 가능한 스틱형과 선물용 패키지를 생산하였다. 또 편의점에서 커피나 녹차 같이 컵커피 형태의 패키지를 제작하여 접근성을 높였다. 최종적으로 완성된 제품을 가지고 홍보와 기타 시음회를 위한 전시회 및 박람회에 참여 하였다. (그림4)





<그림3> 상황버섯 과립체 스틱형, 선물용, 컵커피용 테이크아웃 포장 제품



부산도시농업축제 홍보부스 참가 및 시음행사
일시: 2018.04.27



평창동계올림픽 K-food 홍보관 참가
일시: 2018.02.24



경기 우먼비즈페어 부스 참가
일시: 2018.03.20



경기도농업기술센터 주관
유통업체 구매담당자 초청
일시: 2018.07.13



관악 도시농업축제 홍보부스
참가 및 시음행사
일시: 2018.05.26



킨텍스 서울국제식품산업대전 부스 참가
일시: 2018.05.03



2018 aT 대한민국 식품대전 부스 참가
일시: 2018.10.24



농촌진흥청 주관 국내수출업체
바이어 초청 상담회
일시: 2018.03.15



제품명: 상황버섯과립스틱
출시일: 2018. 06. 20



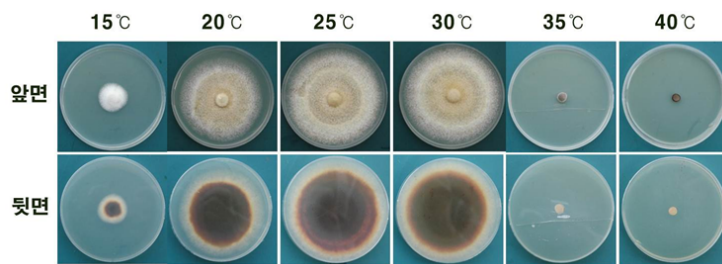
국립수목원 버섯가공품 품평회
일시: 2018.10.18

<그림 4> 상황차 제품 홍보를 위한 전시회 및 박람회 참여

제2절 목질진흙버섯의 면역 기능성 강화 가공식품소재 개발

1. 재배방법과 환경에 따른 유기농 목질진흙버섯 KACC93057P의 고유특성 검정

목질진흙버섯 KACC93057P 군사성장 환경 PDA(Potato Dextrose Agar)배지에서 지경 5mm의 균총을 접종하고 15-40℃로 배양온도를 달리하여 최적 군사생장온도를 조사 한 결과 25℃에서 32℃에서 군사생장이 양호 하였으나 20℃이하 또는 35℃이상에서는 군사생장이 저조 하였으며 톱밥배지에서의 성장률은 기존의 장수상황버섯과 비등하거나 약간의 성장효과가 좋은 것으로 나타났다(그림 1).



목질진흙버섯 KACC 93057P 배양 14일 후 온도별 군사성장



<그림 1> 목질진흙버섯 KACC93057P의 최적온도

2. 목질진흙버섯 KACC93057P의 종균종류에 따른 원목배양 효율조사

가. 곡립종균

유기농 밀을 구입하여 4시간 정도 정수 물에 밀을 불린다. 찜기에 면포를 깔고 밀을 100℃에서 수증기를 이용하여 찐다. 밀을 완전히 익히지 않고 밀을 반으로 갈랐을 때 겉은 투명하게 익고 안이 하얗게 남은 덜 익은 상태로 polyethylene bag에 넣어 121℃ 2시간 멸균하고 PDA상에 키운 상황버섯 군사를 가로X세로 1cm 크기로 잘라 클린벤치 상에서 접종하였다

나. 톱밥제조

PDA상에서 키운 상황버섯 군사를 10일간 배양하여 살균수 250ml을 넣고 petri dish 5장을 놓고 2500rpm으로 5분간 균질 한 후 멸균된 플라스크에 옮겨 담고 500ml로 Fill up 시킨다. 톱밥 80%에 미강 20%를 첨가하여 고루 섞어준 뒤 멸균하여 20ml씩 접종하였다.

다. 액체종균

툽밥과 미강을 8:2로 섞은 뒤 원목을 polyethylene bag에 살균하기 전에 30g 올려놓고 원목과 함께 상압살균으로 105℃ 24시간 살균한 뒤, 상황버섯 균사체를 분쇄하여 준비하여 살균이 끝난 원목 위에 20ml씩 분주하여 접종 하였다.

본 연구의 목질진흙버섯 KACC93057P를 원균으로 하여 상기 곡립, 툽밥, 액체종균을 제조하여 20ml를 살균된 종균별 500개의 상수리나무 원목에 접종하고 90일 후에 원목 균사확과 오염율을 조사 한 결과 표 1과 같이 곡립종균은 12% 이하의 낮은 오염율과 100%의 균사 활착을 보인 반면에 툽밥종균은 21% 오염율과 98%의 균사활착을 보였다. 액체종균은 95% 오염율과 균사활착율이 매우 저조하게 나타나 곡립종균 사용이 원목재배시 가장 유용한 것으로 확인 되었다. 그림 2는 목질진흙버섯 KACC93057P의 재배과정을 총괄적으로 나타낸 그림이며 그림 3은 종균접종 모습이다.



원목준비



봉지싸기



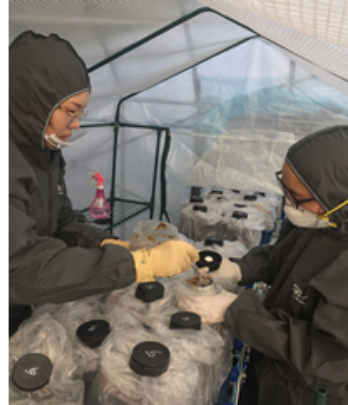
원목살균



배양



<그림 2> 목질진흙버섯 KACC93057P재배과정



〈그림 3〉 목질진흙버섯 KACC93057P 종균접종

〈표 1〉 종균종류별 원목오염율 및 군사활착율

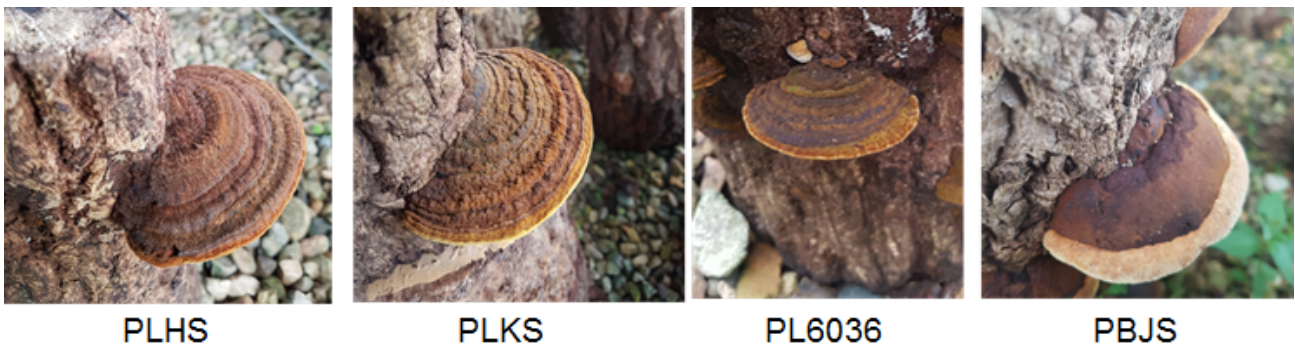
종균종류	원목오염율(%)	군사활착율 (%)
곡립	12	100
톱밥	21	90
액체	95	70

라. 원목종류별 발이율 검정

참나무 (상수리나무, 신갈나무, 굴참나무), 산뽕나무, 박달나무를 포함한 각각원목을 확보하여 목질진흙버섯 KACC93057P 종균을 접종하고 그림 2의 상황버섯재배방법에 의해 군사활착 원목을 만들어 균피를 제거하고 입상하여 3개월에 발이율과 자실체 형성율을 조사하였다. *Phellinus linteus* KACC93057P (Hankyong Sanhwang, PLHS) 발이기간은 *Phellinus baumii* (Jangsu sanghwan, PBJs)와 유사하였으나 *Phellinus linteus* ASI 26099 (Korea sanghwang, PLKS)보다는 40일 빠르고 발이율이 30%이상 높았다. 특히 자실체 형성율은 95%로 안정적인 생산성이 확인 되었다 (표 2). 그림 4는 각 *Phellinus* spp.의 참나무 원목에서의 자실체의 형태적인 특성을 나타내고 있으며 HS는 다른 종에 비해 생산성이 높게 나타나 식품가공생산에 있어 안정적 공급이 가능 할 것으로 사료 되었다. 특히 국내 최초로 PLHS 는 친환경 인증 (유기농)을 받아 친환경 유통업체 ‘한살림’에서 ‘린테우스 상황버섯’으로 판매중에 있다 (그림 5).

〈표 2〉 참나무원목에서 목질진흙버섯 KACC93057P의 발이율과 자실체 형성을 조사

<i>Phellinus</i> spp.	발이기간 (일)	발이율(%)	자실체형성율(%)
<i>Phellinus linteus</i> KACC93057P	60	95	95
<i>Phellinus linteus</i> ASI 26099 (Korea sanghwang, KS)	100	60	57
<i>Phellinus baumii</i> (Jangsu sanghwan, JS)	60	97	97



〈그림 4〉 참나무원목에 형성된 *Phellinus* spp. 자실체



〈그림 5〉 *Phellinus linteus* KACC93057P 유래 유기농 “린테우스상황버섯” 판매

마. 목질진흙버섯 재배시 발생되는 유해균 및 해충

친환경 유기농재배를 수행된 목질진흙버섯 재배지에서 다양한 유해균 및 해충이 발견되었다. 유해균의 경우 시루뻥버섯과 구름버섯류가 피해를 주었으며 심하면 약 20%정도가 유해균으로 원목을 폐상 하여야 하였다. 주로 높은 습도로 인하여 이끼류가 자실체와 원목을 덮고 있어 자실체성장을 저해하는 피해를 주었으며 발이 후 초기 자실체 형성기에 쭈나방 유충이 발이체와 어린 자실체를 갉아 먹는 피해를 초래 하였다.

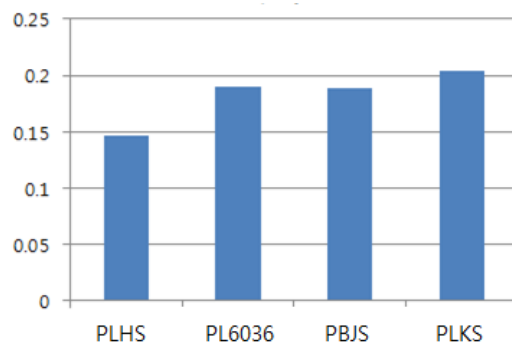


<그림 6> 목질진흠버섯KACC93057P재배지에서 발생하는 병해충

3. 목질진흠버섯 KACC93057P(PLHS)의 생리활성물질의 효능탐색

가. Phellinus 종 및 추출조건별 조당체 및 β -Glucan 함량

상황버섯 시료를 10g 곱게 마쇄한 후 distilled water 300ml을 첨가한다. 환류추출 장치를 이용하여 95°C에서 22시간 추출 하고 10배 농축물을 에탄올을 4 volume 첨가하여 -20°C에서 2시간 놓고 12000rpm에 10분간 원심 분리하여 침전물을 조당체로 회수하고 동결 건조하였다. 그림 7은 그 결과로 조당체 생산량은 PLHS는 0.15g, PBJs는 0.058, PLKS는 0.2g순이 었다.

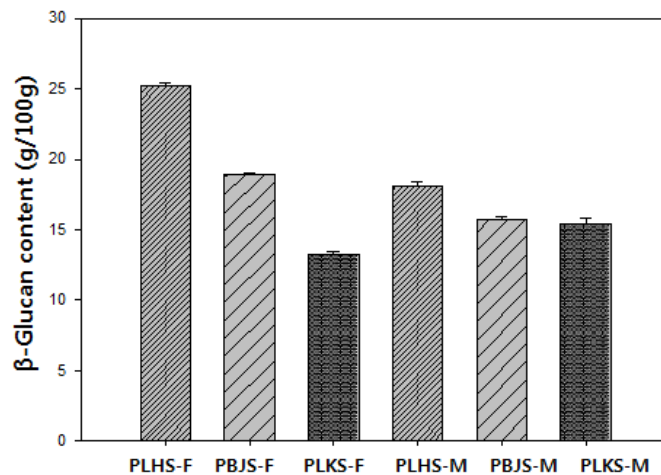


<그림 7> Phellinus spp. 자실체로부터 분리된 조당체 함량

Phellinus linteus KACC93057P (Hankyong Sanhwang, PLHS), *P. baumii* (Jangsu sanghwang, PBJs), *P. linteus* ASI 26099 (Korea sanghwang, PLKS), *P. linteus* 6036 (PL6036)

Phellinus spp. 자실체내에 존재하는 β -Glucan 함량을 측정 하였다. β -Glucan 함량은 mixed-linkage beta-glucan kit (Megazyme Ltd.)를 이용하여 측정하였다. 상황버섯 자실체와 균사체를 100 mesh로 곱게 갈아 90mg를 2ml 12M sulfuric acid를 넣고 잘 혼합하고 ice water에 2시간 반응 시켰다. 4ml DW를 넣고 10초간 혼합 6ml의 DW를 첨가하고 5분간 100°C 2시간 동

안 열처리 하였다. 100ml Flask에 10M KOH solution 6ml을 첨가하고 200mM sodium acetate buffer (pH 5.0) 첨가하여 100ml로 하였다. 1,500g에서 10min 원심분리 하여 0.1ml 취하여 200mM sodium acetate buffer (pH 5.0)에 희석한 $\text{exo-1,3-}\beta\text{-glucanase(20U/mL)}$ $\beta\text{-glucosidase(4U/mL)}$ 0.1ml을 넣고 40°C에서 60분간 반응하였다. GOPOD (glucose oxidase/peroxidase) reagent를 3ml 넣고 40°C에서 20분간 반응시키고 spectrophotometer 를 사용하여 510 nm에서 흡광도를 측정하여 Total-Glucan 함량을 계산하였다. $\beta\text{-Glucan}$ 함량은 PLHS에서 25g/100g으로 가장많은 함량을 보였으며 균사체 18g/100g보다 많았다(그림 8). 그 외 PBJs, PLKS보다 높은 $\beta\text{-Glucan}$ 함량을 보였다. $\beta\text{-Glucan}$ 은 면역, 항암활성에 중요 물질로 보고되었으며 현재까지 대부분 균사배양체로 연구 되어 왔다. 그러나 본 연구의 PLHS 자실체는 다른 *Phellinus* 계통보다 높은 $\beta\text{-Glucan}$ 함량을 가져 향 후 면역활성 연구에 유효성이 높을 것으로 사료 되었다. PLHS자실체 10g 분말을 이용하여 물 500mL를 이용 10, 22, 28, 34, 40시간 추출시간을 달리하고 각 추출시간별 재탕, 삼탕으로 추출횟수를 달리하여 $\beta\text{-Glucan}$ 함량의 변화를 조사하였다. 표 3은 그 결과로 10시간 추출보다 22시간 열수 추출에서 높은 $\beta\text{-Glucan}$ 함량을 보였으며 3회 추출물에서 가장 높은 $\beta\text{-Glucan}$ 함량을 보였다.



<그림 8> 상황버섯 종 간 $\beta\text{-Glucan}$ 함량

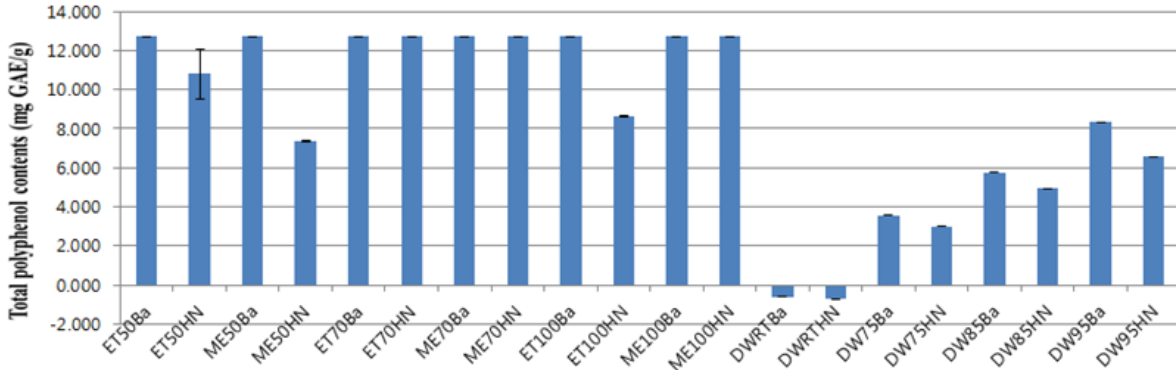
Phellinus linteus KACC93057P (Hankyong Sanhwang, PLHS), *Phellinus baumi* (Jangsu sanghwan, PBJs),
Phellinus linteus ASI 26099 (Korea sanghwang, PLKS)

<표 3> 열수 추출시간, 횟수에 따른 β -Glucan 함량변화

Hot water extraction	Total glucan (g/시료100g)	α -glucan (g/시료100g)	β -glucan (g/시료100g)
10H-1	29.03	4.28	24.75
10H-2	34.16	0.61	33.55
10H-3	34.54	1.11	33.42
22H-1	19.35	1.39	26.96
22H-2	35.67	1.09	34.58
22H-3	44.21	0.74	43.47
28H-1	33.02	4.16	28.85
28H-2	40.42	1.68	38.74
28H-3	39.47	1.17	38.30
34H-1	38.14	1.47	36.67
34H-2	37.57	0.88	36.69
34H-3	43.83	1.09	42.74
40H-1	37.00	3.60	33.41
40H-2	41.94	1.54	40.39
40H-3	42.31	1.33	40.99

나. *Phellinus* 종 및 추출조건별 polyphenol 함량 및 항산화 활성

실험에 사용한 *Phellinus* spp는 같은 상황버섯 재배지에서 동시에 재배된 *Phellinus linteus* KACC93057P (Hankyong Sanhwang, PLHS), *Phellinus baumi* (Jangsu sanghwan, PBJS), *Phellinus linteus* ASI 26099 (Korea sanghwan, PLKS) 자실체 시료를 사용하였다. 자실체 및 균사체 미세분말 1g당 추출용매 50% 에탄올 (ET50), 50%메탄올(ME50), 70% 에탄올 (ET70), 70%메탄올 (70ME), 100%에탄올 (ET100), 100%메탄올(100ME), 실온 물 추출 (DWRT), 85°C 열수추출 (DW85), 95°C 열수추출(DW95)를 50ml을 첨가하고 25° C, 150 rpm에서 24시간 추출 하였다. 추출 후 Whatman filter paper를 이용하여 여과 시킨 뒤 -4° C에서 보관 하면서 실험에 사용하였다. 대조구는 표고버섯 자실체와 균사체를 사용했다. 총 폴리페놀 함량은 Folin-Denis 방법을 이용하여 측정하였다. 상황 추출물 1.0 mL는 0.2N Folin Ciocalteu's phenol reagent (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) 5.0 mL를 첨가하여 5분 동안 반응시킨 후, 7.5% Na₂CO₃ 4 mL를 첨가하였다. 반응액은 암소에서 1시간 동안 반응시켜 Epoch Microplate Spectrophotometer (BioTek Instruments, Winooski, VT, USA)를 사용하여 765 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준물질은 gallic acid (Sigma-Aldrich)를 사용하여 표준곡선으로부터 계산하였고 mg/g으로 나타내었다. HN(PLHS)는 70% 이상의 메탄올추출시 13mg GAE/g)으로 가장높은 Polyphenol함량을 보여 Ba(PBJS)와 유사한 결과로 나타났다. 그러나 대체적으로 *Phellinus* 균주는 열 수 추출시 낮은 Polyphenol함량을 보이는 경향이 있었다. 이는 불용성 페놀물질이 많이 포함하는 것으로 반증 하는 결과이다.



〈그림 9〉 추출용매별 목질진흙버섯의 Polyphenol함량 비교

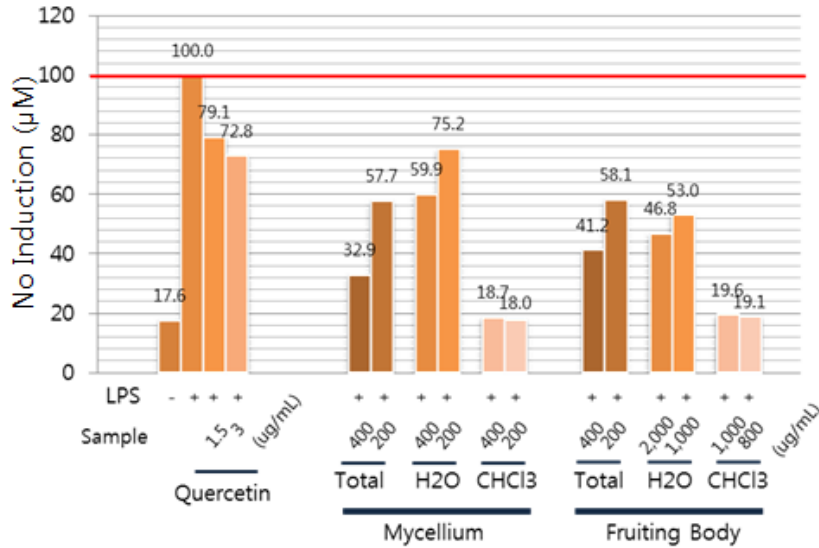
다. 항염증 및 면역활성 분석

(1) 항염증분석(Nitrate oxidation assay)

RAW264.7 세포를 96 well plate (4×10^4 개/well)에 $200 \mu\text{l}$ 씩 분주하여 37°C , 5% CO_2 조건에서 24시간 배양한 후 자실체와 균사체의 추출물을 각각 $100 \mu\text{g/ml}$ 로 첨가하였다. 접종 후 37°C , 5% CO_2 조건에서 30분간 배양한 후 LPS(Lipopolysaccharide)를 $0.1 \mu\text{g/ml}$ 농도가 되도록 첨가하여 염증을 유발시키고 18시간 후 NO assay를 실시하였다. 배양시킨 세포를 꺼내어 각 well에서 상층액을 $100 \mu\text{l}$ 씩 96 well plate에 옮겨 Griess reagent [Griess reagen A (0.1% NEDHC 수용액), griess reagent B (5% H_3PO_4 , 1% Sulfanilamide 혼합수용액)를 각각 1:1비율로 혼합]를 동량첨가 하였다. 실온에서 반응 후 microplate reader를 사용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하고 그 값을 NaNO_2 를 사용하여 만든 표준(standard) 용액을 통해 표준값(대조군)을 얻은 후 표준값들의 직선 그래프에 대한 상대값($y = ax + b$ 일때, $x' = (y' - b) / a$, x' 는 NO 생성값(μM), y' 는 비교군 측정값으로 계산하여 나타내었다.

Phellinus linteus KACC93057P (Hankyong Sanhwang, PLHS)자실체와 균사체를 추출물의 염증억제 기전을 알아보기 위해 NO assay를 시행하였다. 먼저, NO assay는 포유 세포의 면역 기전에서의 주요 산물인 nitricoxide의 생성을 측정하는 방법으로 macrophage(대식세포)인 RAW264.7 세포주를 사용하여 측정하였다. Lipopolysaccharide (LPS)를 넣어주면 toll-like receptor 4를 경유하여 대식세포에 activating signal을 주고 inducible NO synthase(iNOs)의 발현에 영향을 주어 NO를 합성한다. LPS는 Gram 음성세균의 세포벽을 구성하는 성분으로 염증 유발원으로 알려져 있다(Yun et al., 1996). 이때 생성된 NO_2 와 NEDHC, sulfanilamide를 반응시키면 azo coupling을 이루는데 이 두 개의 링 구조가 540 nm의 파장에서 최대의 흡광도 값을 가진다. 그러므로 이 값을 측정하여 간접적으로 NO의 생성을 정량할 수 있다. RAW264.7 세포를 이용한 PLHS 자실체와 균사체를 CHCl_3 추출물과 열수 추출하여 NO분석을 실시 하였다. 농도 의존적으로 원액 $400 \mu\text{g/ml}$ 에서는 $32.9 \mu\text{M}$ 의 염증억제 효과가 있었다. 이는 양성 대조구로 사용된 Quercetin $3 \mu\text{g/ml}$ 보다 높은 염증 효과를 보였으며 자실체가 균사체 추출물보다 높은 항염증 효과가 있는 것으로 확인 되었다. 특히 CHCl_3 추출물에

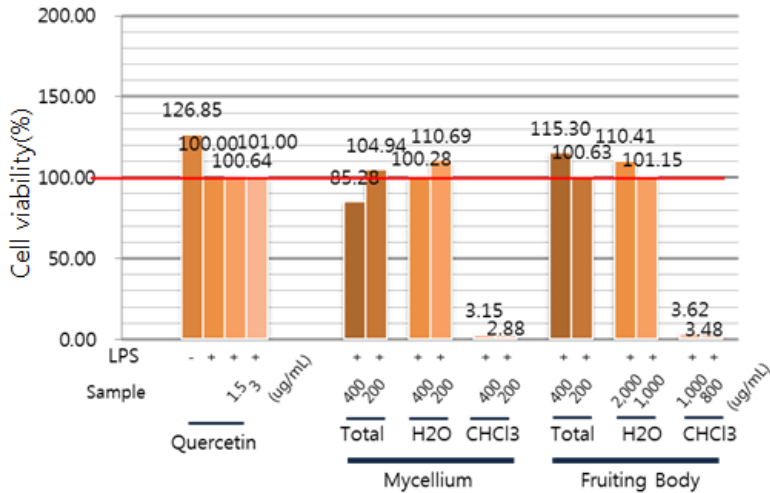
서 200 $\mu\text{g/ml}$ 에서 가장높은 18.7 μM 의 염증억제효과를 보여 CHCl_3 분획물내의 염증억제 물질이 존재 할 것 으로 추측되었다.



<그림 10> Macrophage cell (RAW 264.7)에서 PLHS 자실체와 균사체와 용매 분획별 항염증 효과

(2) 세포생존율 측정(MTT assay)

추출물의 세포독성은 Green 등(1983)의 방법에 따라 3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT)를 사용하여 측정하였다. RAW264.7 cell의 배양은 상기의 항염증분석과 동일하게 하였고 균사체 추출물을 원액을 희석하여 200 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 첨가하였다. 배양한 세포 배지에 MTT(-20°C, 2 mg/ml) 용액을 well마다 50 μl 씩 넣어 세포가 formazan을 형성하도록 4시간 동안위와 동일한 조건에서 다시 배양하였다. 4시간 후 배지의 상층액을 천천히 모두 제거하고 DMSO를 150 μl 씩 각 well에 넣고 shaker에서 30분 이상 충분히 formazan을 녹인 후 Microplate reader에서 540 nm로 흡광도를 측정하였다. 결과는 세포 생존능 (Viability, %) = (비교군 측정값) / (대조군 평균값) \times 100으로 계산하였다. 그림 10은 PLHS의 CHCl_3 추출 분획물 열 수추출물의 MTT assay 결과에서 PLHS-EA추출물은 농도 의존적으로 200 $\mu\text{g/ml}$ 에서 400 $\mu\text{g/ml}$ 에서 Raw cell 264.7세포의 생존능이 85% 이상을 유지되어 세포 독성을 거의 가지지 않으면서 세포면역에 의한 항염증 효과를 나타내는 것으로 판단되었다. 특히 자실체 추출물의 경우는 1000 $\mu\text{g/ml}$ 이상에서도 세포독성이 특이할만한 세포독성이 관찰되지 않았다. 그러나 CHCl_3 추출 분획물에서는 세포가 급격히 사멸되는 것으로 볼 때 용매성분이 잔존 하여 영향을 주는 것으로 판단 되었다.



<그림 10> Macrophage cell (RAW 264.7)에서 Phellinus spp. 자실체 추출물의 MTT분석

라. 항 혈소판 응집 효과

혈전질환의 예방과 치료에는 항혈소판제, 항응고제, 형성된 혈전을 치료하기 위한 혈전용해제 등이 사용되고 있다. 그러나 대표적인 항혈소판 제제인 아스피린은 효과는 뛰어나지만 위장관 출혈과 소화성궤양 등의 부작용을 일으킨다, 혈소판의 부착과 응집은 혈전 형성 초기에 중요한 역할을 한다. 혈소판은 혈관 손상 시 출혈을 멈추는 작용을 하나, 죽상동맥경화증이나 혈관벽 손상과 같은 병적상태에서의 혈관에서는 혈소판이 콜라겐에 노출 되거나, 여러 가지 인자로 자극받아 혈소판에서 분비된 ADP, thromboxane A2 (TXA2) 등에 의해 혈소판과 응집이 일어나게 된다. 본 연구는 목질진흙버섯 KACC3057P(PLHS) 항 혈소판 응집 반응효과를 조사 하였다.

(1) 혈소판 준비

랫드의 복대동맥으로부터 venipuncture를 통해 뽑은 전혈 8ml를 1ml citrate phosphate dextrose solution (CPD: 90mM $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 14 mM $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 100 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, and dextrose 2.55g/100 ml)와 혼합 하였다. 혈액 샘플을 $170 \times g$ 에서 7분간 원심분리 하여 상등액의 혈소판 부유혈장(platelet-rich plasma, PRP)를 취하여 $120 \times g$ 에서 7분간 원심 분리하여 적혈구 성분을 제거하였다. CPD solution성분을 제거하고 혈소판을 분리하기 위하여, PRP를 $350 \times g$ 에서 10분간 원심분리하여 침전된 혈소판은 Tyrode buffer (137mM NaCl, 12mM NaHCO_3 , 5.5mM glucose, 2mM KCl, 1 mM MgCl_2 , 0.3mM NaHPO_4 , pH 7.4)에서 $10^8/\text{ml}$ 의 농도로 조정 하여 사용 하였다.

(2) 혈소판응집억제효과 검증

상황버섯 메탄올추출물을 농도별로 혈장($10^8/\text{ml}$)에 2분간 37°C 에서 전처리 하고 혈소판 응집

촉진물질 (collagen 2.5 μ g/ml, thrombin 0.1 U/ml, ADP (10 μ M)를 가하여 250g로 stirring하면서 5분간 반응시켜 혈소판 응집억제 능을 측정 하였다. 혈소판응집은 Aggregometer (Chrono Log, Havertown, PA, USA)를 이용하여 전혈의 혈소판 응집을 측정하는 impedance 방법으로, 혈소판의 응집에 따라 형성되는 두 전극사이에 형성된 전기적 저항(ohm)의 변화로 나타내었다. 혈소판 응집억제 활성은 유도된 aggregation (%)을 대조군(A)으로, 상황버섯 Methanol 추출물 처리 후 유도된 aggregation (%)을 실험군(B)으로 하여 다음 계산식에 따라 저해율 (%)로 나타내었다.

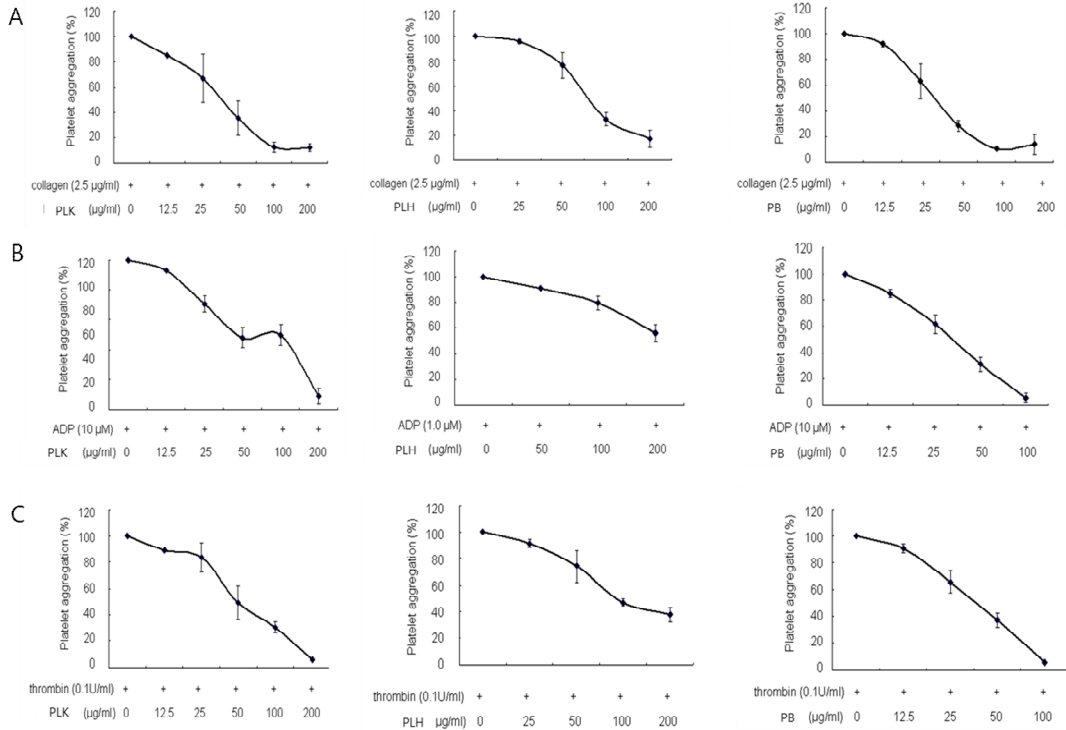
$$\text{Inhibition (\%)} = \frac{A-B}{A} \times 100$$

(3) ATP release 분석

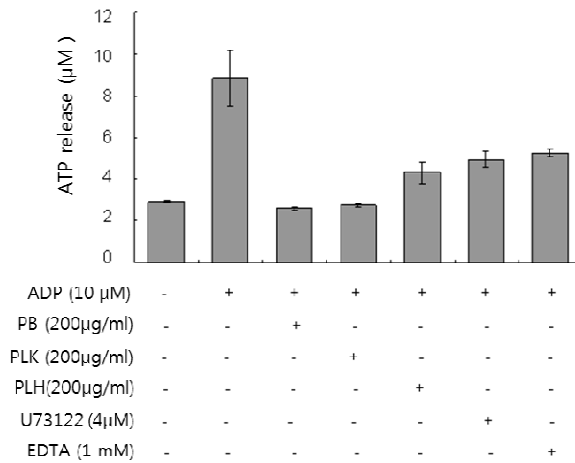
Luciferin-luciferase와 ATP가 반응할 때 발생하는 luminescence로 ATP release를 측정 하였다. 혈소판을 37°C에서 3분간 200 μ g/ml 농도의 PLK, PLH, PLJS methanol 추출물을 전 처리하고 ADP (10 μ M)를 가하여 5분간 반응을 유도한 후 원심분리로 상층액을 취하여 분석에 사용하였다. ATP release는 ATP assay kit (Biomedical Research Service Center, Buffalo, USA)를 사용하여 luminometer (GloMax 20/20, Promega, Madison, USA)로 측정하였다. 대조구로서 ATP release 억제 효과가 알려진 Phospholipase C의 inhibitor인 U73122 (4 μ M)와 calcium chelator인 EDTA (1mM)를 사용 하였다.

(4) 실험결과

PLJS, PLK, PLH methanol 추출물을 전 처리하고 혈소판 응집촉진물질인 collagen (2.5 μ g/ml), ADP (10 μ M), thrombin (0.1U/ml) 처리에 50 μ g/ml에서 200 μ g/ml 농도에서 50%에서 95%의 혈소판응집억제 효과가 나타났으며(그림 10-1) ATP release 감소효과는 200 μ g/ml 농도에서 ADP (10 μ M)처리 혈소판에서 60%에서 50%로 나타났으며 이는 Phospholipase C의 inhibitor인 U73122 (4 μ M)과 calcium chelator인 EDTA (1mM)에 비하여 20%이상 높게 나타났다(그림 10-2). 본 결과로부터 상황버섯 PLJS, PLK, PLH methanol 추출물은 심혈관계질환을 예방 하는 유용한 소재로 활용 가능 할 것으로 사료 된다.



<그림 10-1> 혈소판이 응집 유도된 collagen (2.5 μ g/ml), ADP (10 μ M) and thrombin (0.1 U/ml)에서 상황버섯추출물의 항응집 효과



<그림 10-2> ADP처리로 활성화된 혈소판의 상황버섯추출물 처리에 의한 ATP 방출효과

4. 목질진흙버섯 KACC93057P (PLHS)의 현미배양체 배양조건 확립

유기농현미를 한 살림에서 구입하여 물에 2일 동안 10°C에서 침적하고 발아가 2-3 mm 정도 되었을 때 발아현미로 하여 내열성배양봉지 (20cm X 15cm)에 800g을 넣고 2시간동안 고압살균 하였다. 살균 발아현미를 냉각시킨 후 PLHS 액체종균을 10ml 접종하고 20-30일 동안 배양 하였다. 20일정도 에서는 배양되지 않은 현미가 부분적으로 발견되고 Roasting 하고 침출시험

을 한 결과 향미가 약하였으나 배양 30일 경과 상황버섯 발아현미 배양체는 발아현미 내부까지 균사가 침투 되어 누린 균사체가 골구루 덩어리 있었다 (그림 11). 30일 배양체를 이용하여 자동볶음기로 170-180℃로 30-40분정도 roasting 하였을 때 가장 우수한 색감과 향미를 관능적으로 평가 할 수 있었다. (그림 11)



PLHS접종후 30일 의 상황버섯 발아현미 배양체



Roasting 후 분쇄

<그림 11> PLHS 접종 후 30일 경과한 발아현미 배양체 형상

5. 최적 기능성 효능을 가지는 유기가공 상황버섯 차 제조

본 연구의 유기농인증 *Phellinus linteus* KACC93057P (한경상황버섯)분말과 추출물 및 상황버섯 현미배양균사체를 이용한 상황버섯차를 개발 하였다. 1차년도 에서는 상황버섯 현미배양체 배양조건을 확립하였다. 2차년도에는 상황버섯 차를 제조 하기위한 조건을 확립 하는데 목적을 두고 수행 하였다.

가. 유기농 발아현미 상황버섯 배양체 생산

유기농현미를 구입하여 물에 30℃에서 침적하고 발아가 2-3 mm정도 되었을 때 발아현미로 하여 내열성배양봉지 (20cm X 15cm)에 800g을 넣고 2시간동안 고압살균 하였다. 살균 발아현미를 냉각시켰다. 한경상황버섯(PLHS)액체종균을 제작하기 위하여 균사절편 (5mm x 5mm) 5개를 500ml YMG액체배지에 접종하여 20일동안 추가 배양 하였다. 배양 후 균사체를 살균된 여과지에 걸러내고 살균수로 세척하여 배지성분을 제거하고 물 1 L를 첨가하여 균질기로 균사체를 파쇄하고 접종원을 제조 하였다. 접종원 10 ml를 살균된 발아현미에 접종 하고 30일동안 70%의 습도조절로 25℃에서 배양하였다. 상황버섯 발아현미 배양체 분리하여 건조하고 분쇄하여 상황버섯 차 재료로 활용 하였다.

나. 상황버섯 차 제조

1차년도에서는 상황버섯 발아현미 배양체를 이용한 상황버섯 차를 제조한 바 있으나 차로써 용출 및 향이 부족하고 식품위생법 상 상황버섯 차 조건이 자실체 함량 이 3%이상이어

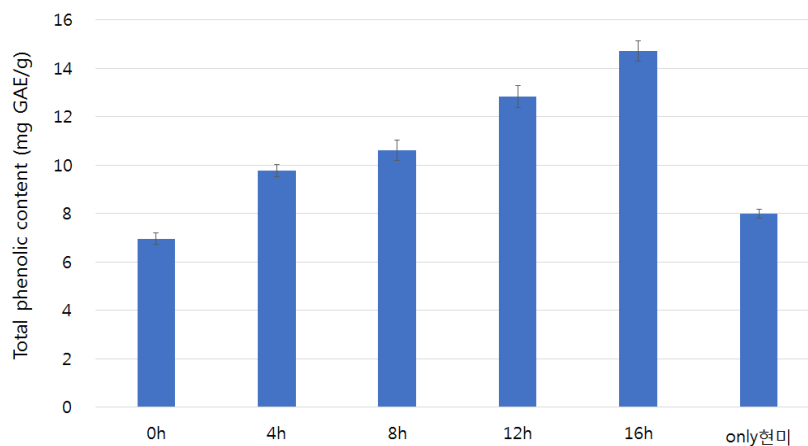
야 함으로 자실체를 함유하는 것을 규정 하고 있어 유기농 상황버섯 차 생산을 목적으로 하여 다음과 같은 재료를 사용하여 방법을 개발 하였다.

- ① 상황버섯 발아현미 배양체를 50℃에서 수분함량을 5%이하로 건조하고 100 mesh로 분쇄한다.
- ② PLHS 자실체를 100 mesh로 분쇄 한다
- ③ 상황버섯 발아현미 배양체 분말: PLHS 자실체분말: 노루궁뎅이버섯 분말: 표고버섯분말(70: 10: 10: 10 v/v)에 물 50ml/100g를 첨가하고 잘 혼합하여 준다.
- ④ 위 혼합물을 비닐봉지에 넣고 밀폐하여 50℃에서 2, 4, 8, 16시간 숙성시킨다.
- ⑤ 시간별 처리된 제조물을 50℃에서 수분함량을 5%이하로 건조하고 180℃에서 2분간 호화시키고 퇴출 즉시 빠르게 식힌다.

다. 조건별 유기농 상황버섯 차의 항산화 활성 과 색형 및 향미 분석

(1) 총 폴리페놀 함량 측정

상황버섯 차 조성물을 50℃에서 0시간에서 16시간동안 숙성하여 건조한 후 호화하여 상황버섯 차의 형태로 제조한 다음 2g을 90℃ 물에 5분간 침출 후 침출액을 사용하여 숙성 시간에 따른 폴리페놀 함량변화를 조사 하였다. 총 폴리페놀 함량은 Folin-Denis 방법(Chan *et al.*, 1993)을 이용하여 측정하였다. Folin-Ciocalteu reagent가 폴리페놀성 화합물에 의해 환원, 몰리브덴 청색으로 발색하는 것을 원리로 하였다. 시료 1mg/ml을 0.2N Folin Ciocalteu's phenol reagent (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) 5.0ml을 첨가하여 5분 동안 반응시킨 후, 7.5% Na₂CO₃ 4ml을 첨가 후 암소에서 1시간동안 반응 시켰다. Epoch Microplate Spectrophotometer (BioTek Instruments, Winooski, VT, USA)를 사용하여 765 nm에서 흡광도를 측정하였다.



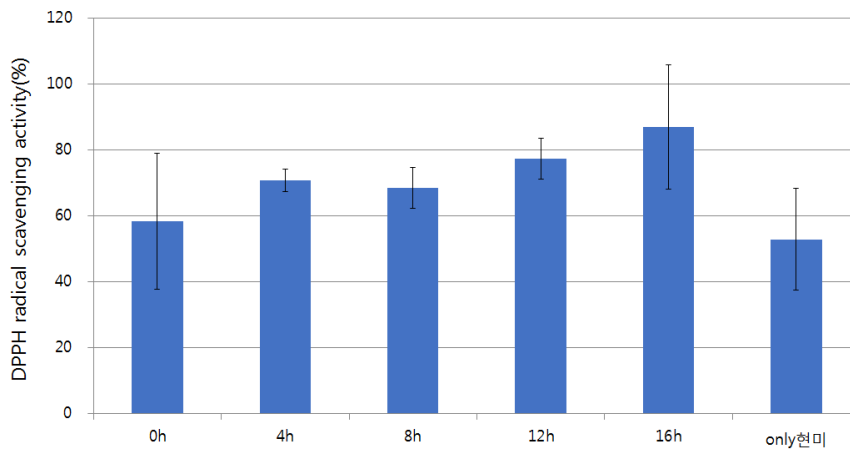
<그림 1> 상황버섯 차 조성물의 숙성시간 별 Polyphenol 함량 변화

그림 1에서 보여준 바와 같이 상황버섯 차 조성물의 숙성시간 별로 폴리페놀함량이 증가하는 경향치를 보였다. 현미만을 측정 하였을때는 8mg GAE/g이었으나 4시간 숙성부터 상황버섯 차 조성물의 폴리페놀함량이 증가하기 시작하여 숙성 16시간에 15 mg GAE/g로 높게 나타나 숙성 시간이 폴리페놀함량을 증가시키는 원인으로 생각 되었다.

(2) DPPH 라디칼 소거능 활성 측정

DPPH 라디칼소거능은 Blois의 방법(Blois, 1958)에 의하여 a,a-diphenyl-β-picrylhydrazul(DPPH)의 환원력을 측정하였다. 위와 동일하게 숙성시간별로 제조한 상황버섯 침출 시료를 혼합, 1.0 mL에 0.2 mM DPPH 용액 1.0 mL를 혼합한 후 암소에서 30분간 반응시킨 후 Epoch Microplate Spectrophotometer를 사용하여 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 양성 대조구는 ascorbic acid(Sigma-Aldrich)를 사용하였고, 공시험은 추출 용매를 사용하였다. DPPH라디칼 소거 활성은 시료 용액의 대조구와 시료 첨가구의 흡광도 차이를 백분율로 산출하였다.

$$\text{DPPH 라디칼 소거능 (\%)} = \frac{\text{대조구 흡광도} - \text{시료첨가구 흡광도}}{\text{대조구 흡광도}} \times 100$$



<그림 2> 상황버섯 차 조성물의 숙성시간 별 침출물의 DPPH 라디칼 소거 활성

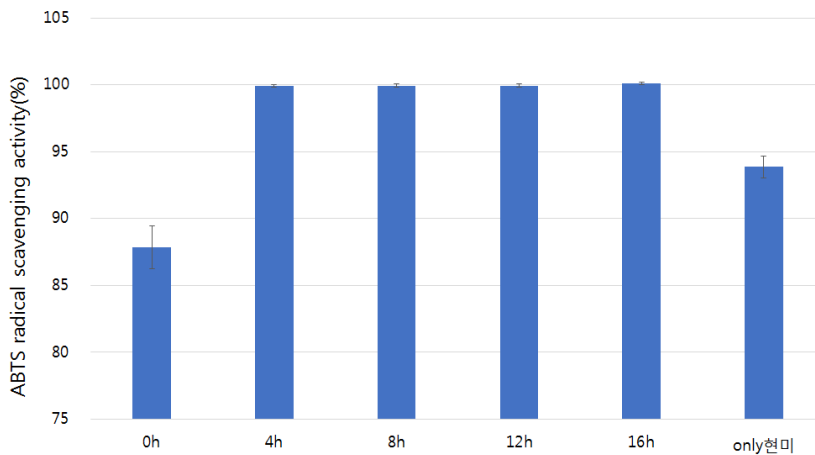
그림 2는 상황버섯 차 조성물의 숙성시간이 증가 함에 따라 DPPH 라디칼 소거능이 증가하였다. 특히 숙성 0시간의 58%의 DPPH 라디칼 소거능이 16시간 숙성에서 87%로 증가하여 숙성시간에 따른 58%의 DPPH 라디칼 소거능이 증가하는 것으로 나타났다.

(3) ABTS 라디칼 소거능 활성 측정

ABTS 라디칼 소거능 활성 측정은 Re R의 방법(Re R, 1999)을 이용하여 측정하였다. 7mM ABTS용액과 2,45 mM potassium persulfate 용액을 혼합하고 25℃ 암소에서 16시간 방치, ABTS

양이온을 형성시켰다. 그 후 Epoch Microplate Spectrophotometer (BioTek Instruments, Winooski, VT, USA)를 이용, 734nm에서 흡광도가 0.700이 되도록 5mM potassium phosphate buffer (pH7.4)를 이용하여 희석하여 사용하였다. 희석된 ABTS용액 900 μ l에 하게 숙성시간별로 제조한 상황버섯 차 침출 시료 100 μ l을 혼합, 5분간 실온 정치 후 734nm에서 흡광도를 측정, 양성 대조구는 ascorbic acid (Sigma-Aldrich)를 사용하였고, 공시험은 추출 용매를 사용하였다.

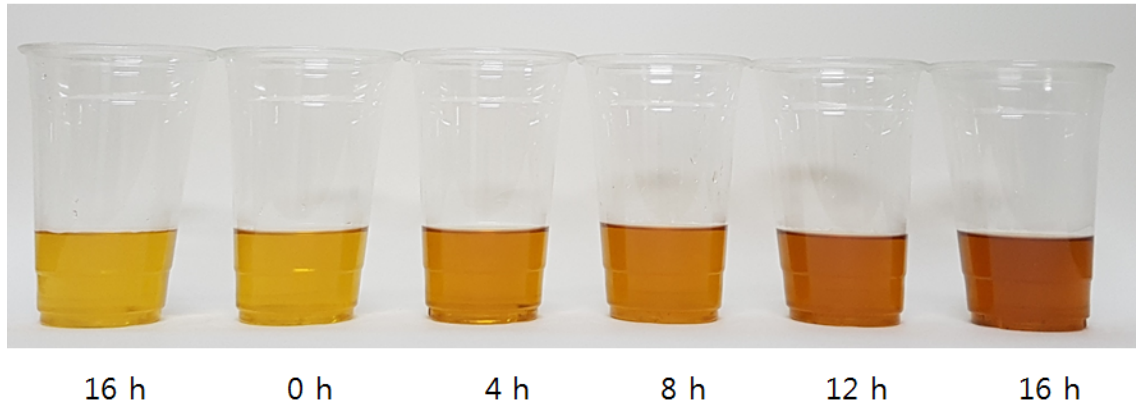
$$\text{ABTS 라디칼 소거능 (\%)} = \frac{\text{대조구 흡광도} - \text{시료첨가구 흡광도}}{\text{대조구 흡광도}} \times 100$$



<그림 3> 상황버섯 차 조성물의 숙성시간 별 침출물의 ABTS 라디칼 소거 활성

그림 3 은 상황버섯 차 조성물의 숙성시간이 0시간인 침출차는 87%의 ABTS 라디칼 소거 활성을 보였지만 4시간 이후 부터 100% ABTS 라디칼 소거능이 나타났다. 현미만을 이용하여 침출한 침출물은 94%의 ABTS 라디칼 소거 활성을 보였다.

이상의 결과에서 본 연구의 방법에서 상황버섯 조성물을 16시간동안 숙성하였을 때 침출한 시료에서 항산화 활성이 높게 나타났다. 침출 차의 색형의 비교 하였을 때 그림 4와 같이 숙성 시간이 오래 될수록 상황버섯 침출 색형이 진 갈색으로 나타나 침출능이 우수한 것으로 나타났다. 숙성 시간 별 차의 향미도 숙성 16시간에 가장좋은 것으로 나타났다. 결론적으로 상황버섯 차 조성물의 숙성으로 침출효율을 증가시킬 수 있었으며 항산화 기능성을 증가 할 수 있었다.



〈그림 4〉 상황버섯 차 조성물의 숙성 시간에 따른 침출 색형 변화

6. 목질진흙버섯 KACC93057P(PLHS) 열 수 추출물과 노루궁뎅이버섯 자실체를 조성으로 하는 항산화 기능성 강화 과립 차 개발

본 연구는 노루궁뎅이버섯분말과 PLHS 자실체 열 수 추출 농축물을 제조하고 노루궁뎅이버섯을 수확 하여 53 ℃에서 수분함량을 12%정도로 건조단계와 건조된 버섯을 100 mesh로 분쇄물을 혼합하여 혼합하여 교반하고 반죽하고 성형틀에 주입시켜 입자크기를 2mm로 하여 과립체를 성형하여 48℃에서 수분함량을 5%이하로 건조 한다. 건조물을 180℃에서 2분간 호화시킨 후 퇴출하여 빠르게 식혀 롤밀로 적절한 크기로 과립을 분쇄 하고 티백에 투입 하여 과립 차를 완성 하였다. 본 발명의 과립제조물은 목질진흙 버섯의 주요성분인 항산화에 유효한 폴리페놀, 면역 활성화에 효과적인 베타글루칸 함량을 높여 식품기능성을 향상 시킬 수 있을 뿐만 아니라 180℃ 이상에서의 노루궁뎅이버섯에 흡착된 목질진흙버섯 추출물은 호화가공과정으로 향미를 향상시켜 버섯의 가공품의 맛과 향을 기호도를 높였다. 따라서 노루궁뎅이버섯 분말의 과립 화 특성은 식물, 다른 버섯류 및 미생물 유용 추출물을 흡착 가공 할 수 있는 식품가공 매체로서 유용성이 높으며 유용성분을 포함하는 추출물의 흡착 식품매체로서 중요한 기능을 할 것으로 사료된다.

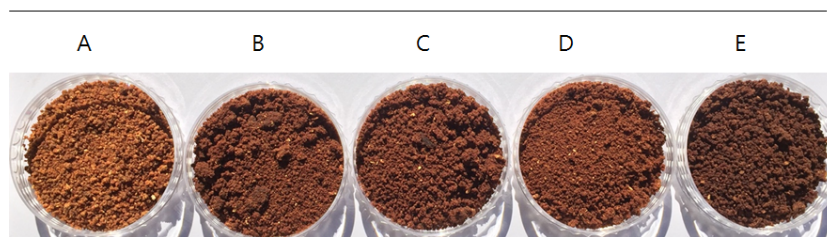
가. 과립형과 침출시간에 따른 침출물의 색형과 투명도

물 80 ml 와 노루궁뎅이버섯 분말을 혼합하여 과립 화 (과립형 A), 목질진흙버섯 열 수 농축액 10ml + 물 70ml 와 노루궁뎅이버섯 분말을 혼합하여 과립화 (과립형 B), 목질진흙버섯 열 수 농축액 20ml+물 60ml와 노루궁뎅이버섯 분말을 혼합하여 과립화 (과립형 C), 목질진흙버섯 열 수 농축액 40ml+물 40ml와 노루궁뎅이버섯 분말을 혼합하여 과립화 (과립형 D), 목질진흙버섯 열 수 농축액 80ml와 노루궁뎅이버섯 분말을 혼합하여 과립화 (과립형 E) 하였다. 그림 2는 과립형 A, B, C, D, E의 형상과 색상을 보이고 있는데 린테우스상황버섯 열 수 농축액 첨가 과립형은 무 첨가 과립형 A에 비하여 짙은 갈색으로 나타났다.

< 제조 방법 >	
공정명	제조방법 설명
건조	노루궁뎅이버섯은 수확후 열풍건조기 53℃에서 수분함량 12%로 건조한다
▼	
선별, 정선	건조된 버섯을 선별, 정선작업(이물제거)을 한다
▼	
분쇄	버섯을 적정 매쉬로 분쇄한다
▼	
금속검출	미분을 금속검출기를 통과 정선한다
▼	
반죽	상황버섯 농축액을 용법에 따라 계량후 교반한다.
▼	
성형	성형틀에 입자크기에 맞게 성형한다.
▼	
건조	48℃에서 수분함량 5%이하로 건조한다.
▼	
물리적처리	180℃에서 2분간 호화 시킨다.
▼	
냉각	퇴출즉시 빠르게 식힌다.
▼	
분쇄	물밀로 용도에 따라 분쇄후 가미 한다.

<그림 1> 노루궁뎅이버섯과 과립 침출차 조성물의 제조방법 흐름도

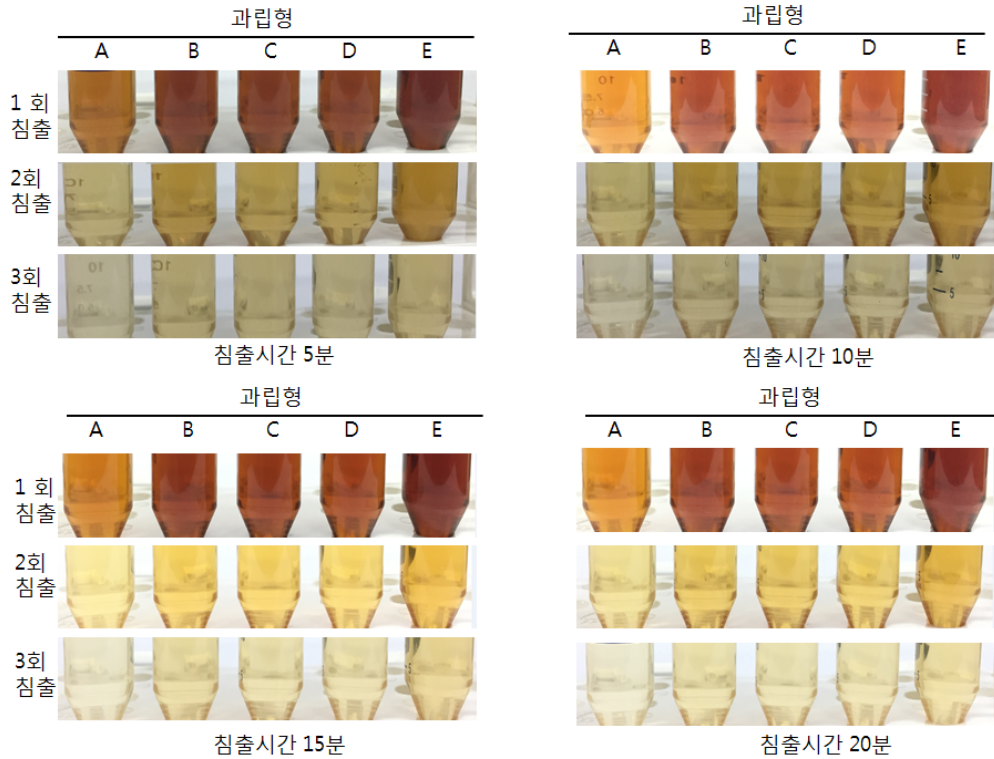
과립형



<그림 2> 상황버섯 추출물배합에 따른 노루궁뎅이 과립형 색형

그림 3은 과립형 A, B, C, D, E를 2g씩 티백에 투입하고 95℃ 뜨거운 물 100ml에서 시간을 달리 하여 침출한 침출 차를 나타낸다. 5분 동안 침출한 린테우스상황버섯 추출물을 포함 하는 과립형 B, C, D, E는 과립형 A에 비 하여 짙은 갈색으로 침출 되었다. 그러나 2회, 3회 침출 시에는 침출차의 색이 연한 갈색으로 보여 침출능이 떨어지는 것을 확인 할 수 있었다. 특히 10분에서 20분 동안 침출한 침출 차 색도는 5분 동안 침출한 침출차 색과 큰 차이를 보이지

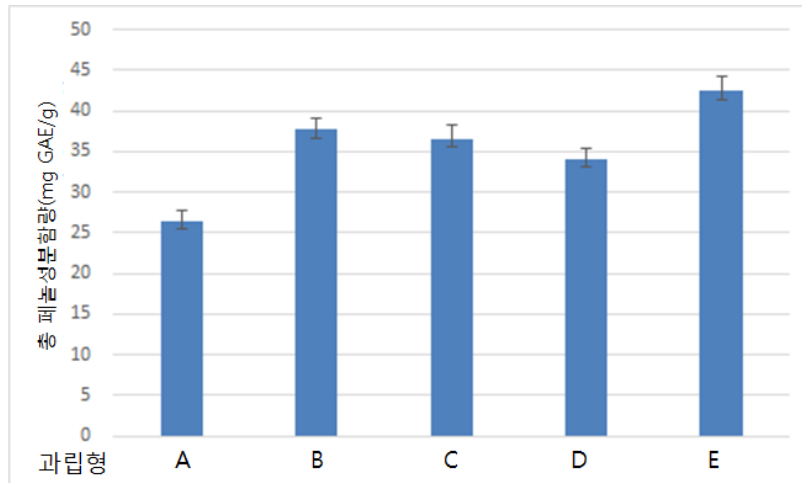
않았다. 일반적으로 현미녹차, 등글레차 등 시중판매 침출 차는 짧은 시간에 충분한 침출 될 수 있도록 제조 되었으며 침출차의 중요한 요소이다.



<그림 3> 노루궁뎅이 과립형에 따른 침출 색형

나. 과립형 열수 침출물 에서의 폴리페놀 함량 분석

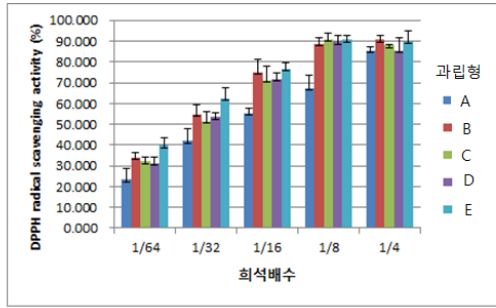
폴리페놀은 항산화 물질의 주성분으로 많이 알려져 있다. 따라서 폴리페놀함량이 항산화활성의 척도가 될 수 있다. 따라서 폴리페놀분석 방법은 위의 방법에 준하여 실시 하였다. 과립형 A, B, C, D, E를 2g씩 티백에 투입하고 95℃ 뜨거운 물 100ml에서 5분간 침출하여 얻어진 침출물 1 ml을 0.2 N Folin Ciocalteu's phenol reagent (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) 5.0 mL를 첨가하여 5분 동안 반응시킨 후, 7.5% Na₂CO₃ 4 mL를 첨가하였다. 반응액은 암소에서 1 시간 동안 반응시켜 Epoch Microplate Spectrophotometer (BioTek Instruments, Winooski, VT, USA)를 사용하여 765 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준물질은 gallic acid (Sigma-Aldrich)를 사용하여 표준곡선으로부터 계산하였고 mg GAE/g으로 나타내었다. 그림 4는 과립형의 침출물의 폴리페놀 함량을 측정 한 것이다. 과립형 A침출물은 22 mg/GAE/g로 다른 과립형 B (37 mg/GAE/g), C (36 mg/GAE/g), D (34 mg/GAE/g), E (42 mg/GAE/g)보다 낮게 나타나고 있으며 폴리페놀함량이 항산화 활성에 영향을 끼치는 것을 알 수 있다. 결론적으로 상황버섯 열 수 추출액은 폴리페놀 함량을 증대시켜 항산화 활성을 높이는 요인으로 작용 하는 것으로 사료 되었다.



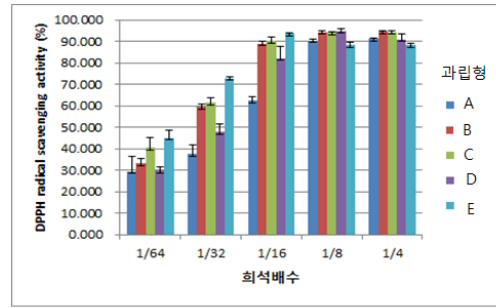
〈그림 4〉 과립형 별 폴리페놀함량

다. DPPH 라디칼 소거 활성분석에 의한 과립형 별 침출 시간에 따른 항산화 활성 효과 검정 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) 라디칼 소거 활성은 Blois의 방법을 이용하여 측정하였다. <실시 예 1>의 침출시간을 달리하여 침출한 과립형 A, B, C, D, E 침출 차를 물로 1/2에서 1/64배로 희석 1.0 mL에 0.2 mM DPPH methanol 용액 1.0 mL를 혼합한 후 암소에서 30분간 반응시킨 후 Epoch Microplate Spectrophotometer (BioTek Instruments, Winooski, VT, USA)를 사용하여 517 nm에서 흡광도를 측정하였다.

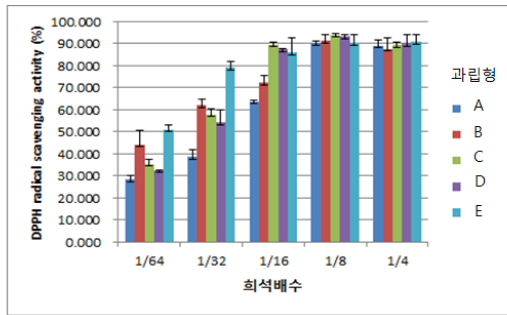
그림 5에서 나타난 것과 같이 린테우스상항버섯 추출물을 포함하는 과립형 B, C, D, E는 노루궁뎅이버섯만을 사용한 과립형 A에 비하여 희석 농도 별로 50-20%이상의 항산화 활성이 높게 나타났다. 침출시간을 5, 10분, 15분, 20분으로 달리 하였을 때 침출시간에 따른 항산화 활성은 비슷한 경향치로 나타나 침출은 5분동안에 유효 항산화 물질이 충분히 침출 되는 것을 확인 할 수 있었다.



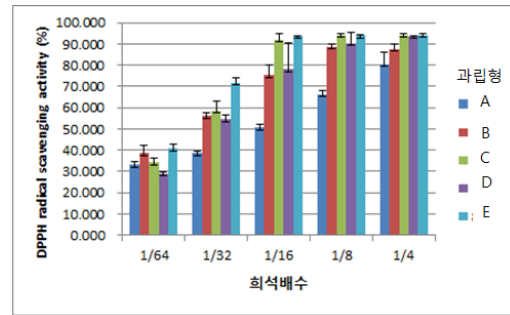
95°C 물에서 5분 침출



95°C 물에서 10분 침출



95°C 물에서 15분 침출

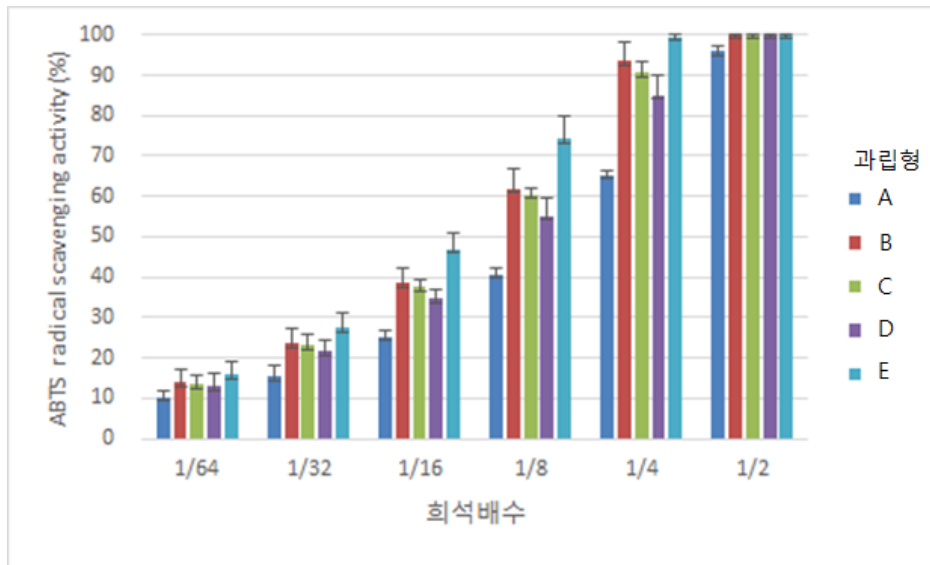


95°C 물에서 20분 침출

<그림 5> 침출시간과 과립형 별 DPPH 라디칼 소거 활성

라. ABTS radical 소거활성측정에 의한 과립형 별 침출 시간에 따른 항산화 활성 효과 검정

과립형 A, B, C, D, E를 2g씩 티백에 투입하고 95°C 뜨거운 물 100ml에서 5분간 침출하여 얻어진 침출물을 1/2에서 1/64로 희석한 침출물 100 μ l을 ABTS용액 900 μ l에 혼합, 5분간 실온 정치 후 734nm에서 흡광도를 측정 하였다. ABTS radical 소거 활성 (%) = $\{1 - ((\text{대조구 흡광도} - \text{시료 첨가구 흡광도}) / \text{대조구 흡광도})\} * 100$. 그림 6은 과립형 추출물의 희석농도별 ABTS radical 소거 활성을 나타낸 결과로서 희석배수가 1/8일 때 과립형 A (노루궁뎅이 버섯만 사용한 과립형)는 40%의 ABTS radical 소거 활성이 있었으나 과립형 B, C, D, E는 62%, 60%, 55%, 74%의 ABTS radical 소거 활성을 보여 린테우스상황버섯 추출 투입량에 따라 15에서 34%의 높은 활성을 보였다. 이러한 경향치는 1/4 희석농도까지 나타났다. 이러한 결과는 상기의 DPPH 라디칼 소거 활성과 유사한 결과로서 상황버섯 열 수 추출물을 첨가 함 으로서 항산화 활성이 크게 향상된 것을 확인 할 수 있었다.



<그림 6> 과립형 침출물의 희석 농도 별 ABTS 라디칼 소거 활성

마. 과립체형 별 β -Glucan (베타글루칸) 함량

과립체형 별 베타글루칸 함량은 mixed-linkage beta-glucan kit (Megazyme Ltd.)를 이용하여 측정하였다. 과립체 90mg에 2ml 12M sulphuric acid를 넣고 vortex로 혼합하고 얼음에서 2시간 반응 시켰다. 반응액에 4ml 증류수를 넣고 혼합 후 6ml의 증류수를 추가하여 넣고 90°C 이상의 고온에서 2시간 동안 가열하고 실온에서 식힌다. 100ml Flask에 10M KOH 용액 6ml와 200mM sodium acetate buffer (pH 5.0) 첨가하여 100ml로 하고 1,500g에서 10min 원심분리 하여 0.1ml 취하여 200mM sodium acetate buffer (pH 5.0)에 희석한 exo-1,3- β -glucanase(20U/mL) β -glucosidase(4U/mL) 0.1ml을 넣고 40°C에서 60분간 반응시킨다. 반응 시킨 후 GOPOD (glucose oxidase/peroxidase) reagent를 3ml 넣고 40°C에서 20분간 반응시키고 spectrophotometer 를 사용하여 510 nm에서 흡광도를 측정하여 Total-Glucan, 베타글루칸 함량을 계산하였다. 표 4 는 그 결과로서 목질진흠버섯 추출액이 포함된 과립체 B, C, D, E는 노루궁뎅이 과립체 A보다 20%에서 30%이상의 베타글루칸 함량이 증가 되었다.

<표1> 과립체형 별 Glucan 함량

과립체형	Total-Glucan (g/시료g)	Alpha-Glucan (g/시료g)	Beta-Glucan (g/시료g)
A	13.73	4.43	9.29
B	10.83	1.28	9.54
C	10.24	1.4	8.83
D	13.69	1.62	12.06
E	12.44	1.43	11

바. 노루궁뎅이 상황버섯 추출물 과립 차의 관능평가

표 5 는 과립형, A, B, C, D, E의 2g을 티백에 충전 하여 95℃ 내지 100℃ 열 수에 5분 침출 하여 얻은 침출 차를 패널요원 25명이 향미와 맛을 기준으로 순위법으로 평가한 관능 평가이다. 향미정도는 구수함으로 표현 하였으며 구수함의 정도는 높은 순으로 5에서 1로 하였다. 과립형 A는 약한 쓴 맛과 신맛과 향미 1정도로 가장 낮은 평가를 받았으며 과립 형 D는 고소한 맛과 향미 5의 가장높은 평가를 받았으며 25명의 패널 중 16명이 선택하여 가장 높은 기호도를 보였다.

<표2> 노루궁뎅이 상황버섯 추출물 과립 차의 관능평가

과립형	기호도	향미(구수함정도)	맛
A	5	1	약간시고 쓰다
B	4	2	약간 신 맛
C	2	4	고소한 맛
D	1	5	고소한 맛
E	3	3	신맛 및 탄맛

7. 목질진흙버섯 PLHS, PLJS, PLK, PL6036 의 자실체 특성 및 자실체 유래 다당체Polysaccharide 의 사이토카인 억제 분석

본 연구는 *P. Linteus*, *P. Baumii* 로 분류된 균주의 자실체 특성 및 균주의 우수성을 확인하기 위해서 균주별로 100개씩 지름 15cm 세로 20cm 간격으로 토막 낸 참나무 원목을 준비한다. 단목을 내열성 비닐봉지에 담아 종균 투입구를 만들고 100℃ 에서 48시간 상압 살균 한다. 살균이 끝난 원목은 하온 시키고 원목에서 배출된 가스를 완전히 환기 시킨다. 살균 소독을 철저히 한 클린룸 안에서 곡물종균을 이용하여 10g씩 상황버섯 균주별로 접종한다. 접종이 완료된 단목은 배양실로 옮겨 온도 23℃ 습도 90%에서 90일간 배양한다. 배양이 완료된 단목을 재배사에 배치 후 재원조사와 베타글루칸 함량을 확인하였다. 각 자실체로부터 Polysaccharide를 분리하여 세포 독성 실험과 면역세포 증식 효능을 확인 하였다. 또한 실제 면역활성과 관련이 있는 사이토카인 분비 억제 효과를 확인함으로써 각 자실체의 효능을 확인 할 수 있었다.

가. 목질진흙버섯 PLHS, PLJS, PLK, PL6036 의 자실체 특성 및 베타글루칸 함량

자실체의 발생 개수 및 가로 길이, 세로 길이, 두께, 개체 무게 등 재원 조사를 실시하였다. 버섯의 색깔 및 버섯 형태에 차이가 있음을 확인할 수 있었다. PLHS는 자실체 가로 직경 9.70 ± 2.52 세로 4.65 ± 1.38 두께 1.24 ± 0.28 무게 19.00 ± 7.05 g 이었고, PLK 은 자실체 가로 직경 6.16 ± 1.92 세로 2.9 ± 0.48 두께 1.92 ± 0.37 무게 5.08 ± 2.25 g 이었고, PLJS 는 자실체 가로 직경 8.32 ± 2.18 세로 3.27 ± 0.71 두께 1.91 ± 0.51 무게 15.52 ± 5.59 g 이었다. PL6036 은

자실체 가로 직경 4.06 ± 0.93 세로 2.11 ± 0.51 , 두께 0.67 ± 0.18 무게 5.65 ± 1.89 g 이었다. 베타글루칸 함량 분석시 PLHS 자실체 35% , 균사체 31% 가 함량 되어 있었고 PLJS 은 자실체 27% , 균사체 25% , PLK 는 자실체 24% 균사체 23%, PL6036 은 자실체 29%, 균사체 22% 의 베타글루칸이 함량 되어 있는 것을 확인 하였다. 이와 같이 재배적 특성 및 베타글루칸 함량을 고려하였을 때 PLHS 균주가 우수한 특성을 나타내었다.

<표1> 목질진흙버섯 PLHS, PLJS, PLK, PL6036 의 재원조사

Strain No.	Horizontal (cm)	Vertical (cm)	Thickness (cm)	Weight (g)	Number(ea)
PLHS	$9.70 \pm 2.52a$	$4.65 \pm 1.38a$	$1.24 \pm 0.28b$	$19.00 \pm 7.05a$	$9.24 \pm 2.41c$
PLJS	$8.32 \pm 2.18b$	$3.27 \pm 0.71b$	$1.91 \pm 0.51a$	$15.52 \pm 5.59b$	$11.14 \pm 3.21b$
PLK	$6.16 \pm 1.92c$	$2.9 \pm 0.48b$	$1.92 \pm 0.37a$	$5.08 \pm 2.25c$	$3.25 \pm 0.24d$
PL 6036	$4.06 \pm 0.93d$	$2.11 \pm 0.51c$	$0.67 \pm 0.18c$	$5.65 \pm 1.89c$	$20.6 \pm 0.91a$

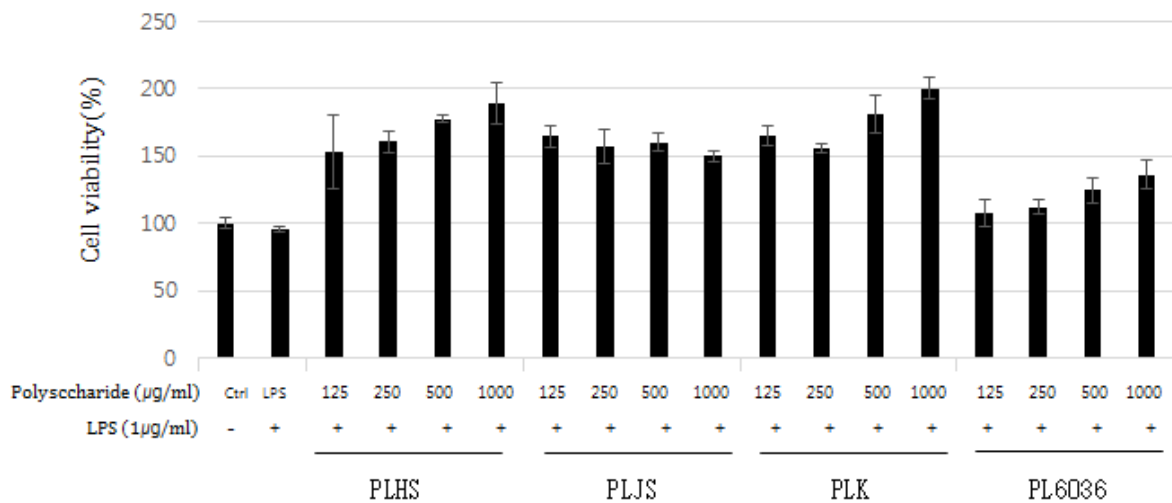
<표2> 목질진흙버섯 PLHS, PLJS, PLK, PL6036 의 자실체 및 균사체 베타글루칸 함량

(g/100g)	Mycellium			Fruting Body		
	Total Glucan	Alpha-Glucan	Beta-Glucan	Total Glucan	Alpha-Glucan	Beta-Glucan
PLHS	36.42 ± 0.52	0.78 ± 0.01	35.64 ± 0.54	32.08 ± 0.51	0.83 ± 0.01	31.25 ± 0.52
PLJS	28.04 ± 0.37	0.73 ± 0.32	27.31 ± 0.40	26.62 ± 2.62	0.83 ± 0.02	25.79 ± 2.63
PLK	24.86 ± 0.14	0.70 ± 0.01	24.16 ± 0.14	24.65 ± 2.27	0.83 ± 0.02	23.82 ± 2.29
PL6036	31.45 ± 1.27	1.64 ± 0.63	29.81 ± 1.86	23.64 ± 0.35	0.82 ± 0.01	22.82 ± 0.36

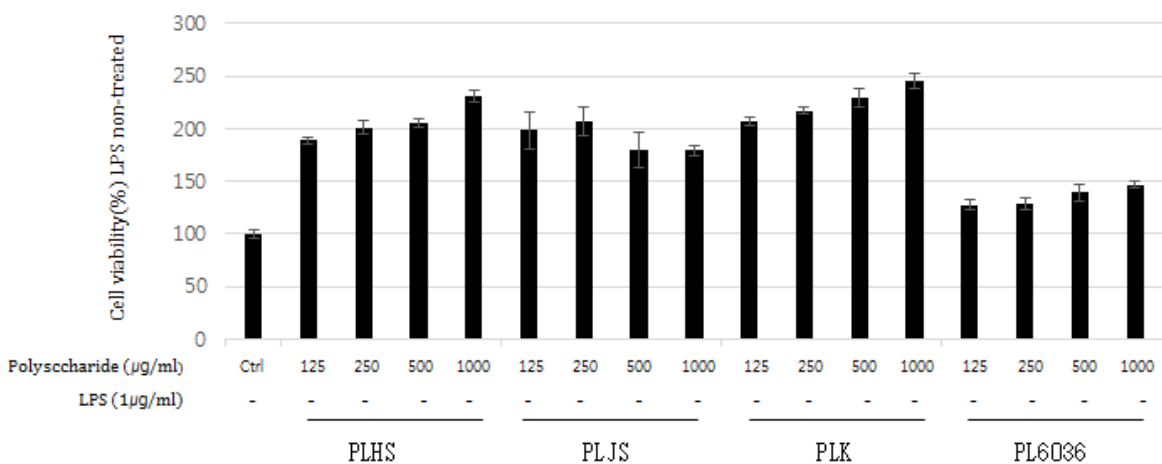
나. 자실체로부터 분리한 다당체의 세포독성평가

자실체가 발생하는 4종류의 상황버섯으로부터 분리한 Polysccharide 의 독성평가 자료이다. 세포독성은 Green 등(1983)의 방법에 따라 3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT)를 사용하여 측정하였다. 배양한 세포 배지에 MTT(5mg/ml) 용액을 well마다 $100 \mu\text{l}$ 씩 넣어 세포가 formazan을 형성시키고 30분 뒤에 배지를 완전히 제거한 뒤 DMSO를 $1000 \mu\text{l}$ 씩 각 well에 넣고 shaker에서 5분 동안 formazan을 녹인 후 Microplate reader에서 517 nm로 흡광도를 측정하였다. 결과는 세포 생존능 (Viability, %) = (비교군 측정값) / (대조군 평균값) \times 100으로 계산하였다. (그림1)는 일반 면역세포 기준으로 비교하였을 때 모든 처리구에서 세포독성을 보이지 않

았다. PLJS 를 제외한 모든 처리구에서 농도 의존적으로 면역세포의 생존율이 증가하는 것을 확인 할 수 있었다. 하지만 PLJS 500 μ g 처리군에서 부터 세포생존율이 반대로 감소하는 경향을 보였다.(그림2)는 Gram 음성세균의 세포벽을 구성하는 성분으로 염증 유발시켜 세포막의 전면적 파괴를 일으킬 수 있다고 알려져 있는 LPS (Lipolysccharide) 처리 후 세포의 증식력을 평가 한 것으로 LPS 미처리시 보다 세포의 증식력이 낮아지는 경향이 있었으나 LPS 처리 후에도 여전히 면역세포의 생존율이 농도 의존적으로 높은 것을 확인하였을 때 염증으로부터 높은 세포 보호 능력을 확인 할 수 있었다.



<그림 1> 자실체로부터 분리한 상황버섯 4 균주 Polysaccharide 세포독성 평가

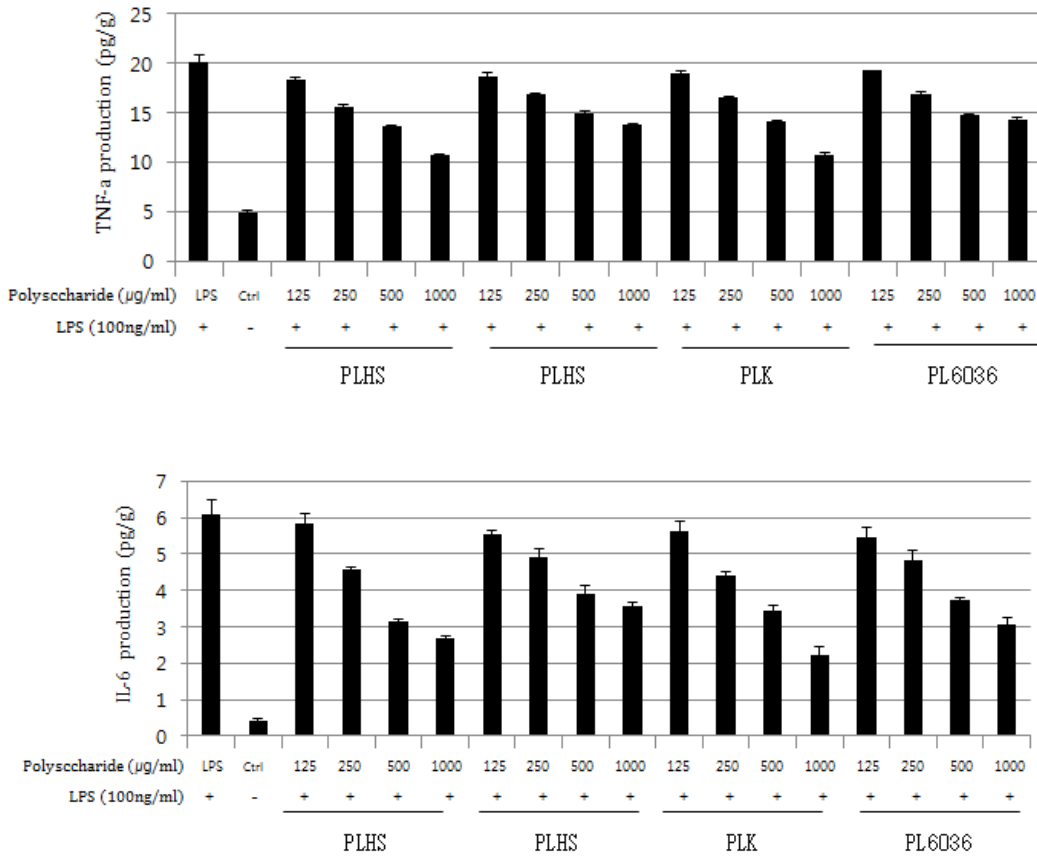


<그림 2> LPS 처리 후 세포 상황버섯 4 균주 Polysaccharide 세포증식

다. TNF-alpha, IL-6 Cytokine 생성 억제 분석 방법

Raw 264.7 cell을 24well에 1×10^6 cell/ml 씩 넣고, 12시간 배양 후 농도별 Polysaccharide를 처리하고 30분 뒤에 lipopolysaccharide (LPS) 100 ng/ml를 처리한다. 12시간 후에 배양여액을

조심스럽게 옮기고 1500rpm에서 10분간 원심분리하여 사용하였다. Cytokine 분석은 Kit를 (TNF-alpha K0331186, IFN-gamma K0331138 KOMABIOTECH Co.) 이용하였다. 1×PBS를 이용하여 분석 well을 200 μ l로 2회 300 μ l 2회 총 4회 세척하여 활성화를 시킨 뒤, 분리한 배양여액을 100 μ l 씩 분주하여 2시간 RT에서 incubation 한다. 2시간 뒤 배양여액을 제거 시키고 1×BSA에 Anti body detection을 1:20 비율로 섞어 100 μ l 씩 well에 분주하고 2시간 RT에서 incubation 한다. 2시간 뒤 Anti body detection을 제거하고 HRP conjugate solution 을 1×BSA 에 희석하여 RT에서 30분간 반응 시킨다. 반응이 끝나면 TMB buffer를 100 μ l 넣고 반응정도 확인 후 Stop solution으로 반응을 정지시킨다. 반응 정지 후 ELISA reader (450nm)로 흡광도를 측정하여 대조군과 비교하였다.(그림3)의 결과를 보면 *Phellinus* 4균주의 Polysccharide 에서 염증반응에 포함되고 급성 기 반응(acute-phase protein)의 구성원인 시토카인인 종양 괴사 인자 알파 (tumor necrosis factor-alpha, TNF- α)가 농도 의존적으로 감소되는 것을 확인 하였다. 또한 cytokine 중 interleukin-6, IL-6) 는 생체 내 여러 세포들에서 분비되어 면역계와 조혈계에 다양한 영향을 미치며 급성기 반응과 전신염증 반응 등에 관여하는 것으로 알려진 Cytokine 으로 농도 의존적으로 감소되는 것을 확인하였다. (그림3) 결과로 특정한 자실체 만이 염증성 사이토카인을 억제하는데 효과적인 것은 아니지만 정도의 차이를 확인 할 수 있었으며 Polysccharide 자체가 TNF- α , IL-6 염증과 관련된 사이토카인을 농도 의존적으로 억제 시키는 것을 확인 할 수 있었다.



<그림 3> 상황버섯 4균주의 Polysaccharide TNF-α, IL-6 억제능 분석

8. *Phellinus* 유래 styrylpyrone계 Hypholomine B Davallialacton 의 항산화 활성

본 연구는 목질진흠버섯의 자실체 유래 styrylpyrone계분 발명은 목질진흠버섯 KACC93057P(*Phellinus linteus*) 유래의 스티릴파이론(styrylpyrone)계 화합물인 하이폴로민 비(hypholomine B)와 다발리아락톤(davallialactone)에 대한 세포의 증식 활성화와 면역 효과를 나타낸 결과이다.

재료 및 방법

가. DPPH 라디칼 전자공여능 측정

항산화 효능 실험에 사용되는 DPPH는 분자 내 radical을 함유하고 있어 polyhydroxy 방향족 화합물, 방향족 아민류 등에 의해 환원되면, radical이 소거되어 짙은 자색이 되는 정도를 수소 공여능으로 흡광도법으로 측정된다. 탈색의 과정은 환원되는 과정으로 설명될 수 있는데 환원력이 클수록 항산화 능력이 크다고 할 수 있으며, 수소공여능 측정에 사용된 DPPH는 안전한 자유 radical로서 그것의 비공유 전자로 인해 517nm부근에서 최대 흡수치를 나타낸다. 0.2mM DPPH용액에 0.1ml에 여러 농도의 시료용액 0.2ml을 첨가하고 혼합한 다음 20분간 실온반응 시킨 후 517nm에서 흡광도의 감축을 측정하였다.

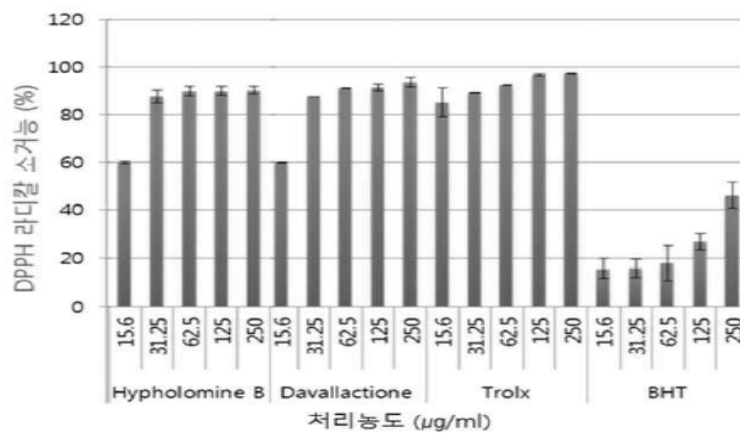
나. ABTS 라디칼 소거능 측정

ABTS 라디칼 소거능은 증류수에 용해한 7mM의 ABTS와 2.45 mM의 potassium persulphate을 혼합한 후, 안정화를 위해 암실상태에서 24시간 방치한다. 734nm에서 O.D 값이 0.70 ± 0.02 가 되도록 5mM potassium phosphate buffer(pH 7.4)로 희석하였다. 농도별 노루궁뎅이 버섯추출물과 Standard인 ascorbic acid 20 μ l와 위의 ABTS 용액 180 μ l를 혼합한 후, 실온에서 5분간 반응시킨 후 734nm에서 흡광도를 측정하였다. ABTS계산법은 아래와 같다. ABTS scavenging activity (%) = $\{(C-D)-(A-B)/(C-D)\} \times 100$

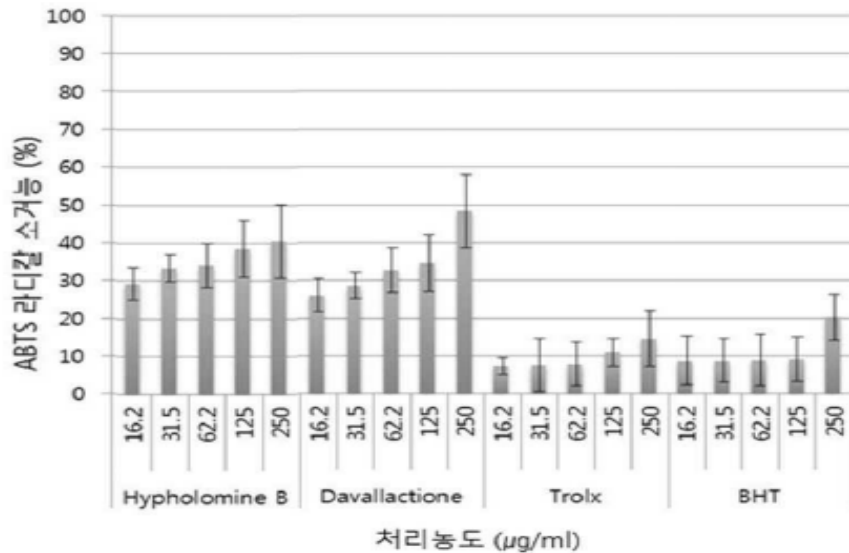
위의 식에서 A는 ABTS 용액과 시료 또는 standard의 측정값을, B는 potassium persulfate 용액에 시료 또는 standard의 측정값을, C는 ABTS 용액과 증류수의 측정값을, D는 potassium persulfate 와 증류수의 측정값을 의미한다.

(1) DPPH 및 ABTS 실험결과

(그림1)에서 나타낸 것 같이 분석 물질의 처리 농도는 (16.2 31.5 62.2 250 μ g/ml)에서 DPPH 소거작용을 나타내었다. 합성 항산화제인 Trolox 와 BHT 를 대조구로 사용하였다. Hypholomine B 의 처리구는 31.25 μ g에서 250 μ g까지 크게 변화 없이 90% 소거능을 보였으나 Davalliacton 의 처리구 경우 농도 의존적으로 소거능이 높았으며 그 결과는 표준물질인 Trolox 와 비슷한 경향치를 보였다. ABTS 라디칼 소거능에서도(그림2) 같은 농도로 처리시 (16.2 31.5 62.2 250 μ g/ml) Hypholomine B, Davalliacton 처리 농도가 높아짐에 따라 농도 의존적으로 환원력이 높아지는 것을 확인하였다. Davalliacton 이 250 μ g에서 Hypholomine B 250 μ g의 환원력 보다 9% 높은 경향을 보였으며 표준물질의 비해 높은 환원력으로 Hypholomine B 와 Davalliacton 의 높은 항산화력을 확인할 수 있었다.



<그림1> Hypholomine B, Davalliacton 의 DPPH 라디칼 소거능 측정



<그림2> Hypholomine B, Davalliactone 의 ABTS 라디칼 소거능 측정

9. *Phellinus* 유래 styrylpyrone계 Hypholomine B Davalliactone 의 세포의 독성평가 및 염증성 사이토카인 억제능과 암세포 저지 효과

본 연구는 Hypholomine B Davalliactone 의 세포 독성을 평가하고 염증성 사이토카인의 억제능을 확인 하였다. 항암효능은 염증반응에 포함되고 급성 기 반응(acute-phase protein)의 구성원인 시토카인인 종양 괴사 인자 알파(tumor necrosis factor- α , TNF- α) 와 cytokine 중 interleukin-6, IL-6) 는 생체 내 여러 세포들에서 분비되어 면역계와 조혈계에 다양한 영향을 미치며 급성기 반응과 전신염증 반응 등에 관여하는 것으로 알려진 Cytokine 으로 농도 의존적으로 감소되는 것을 확인하였다. 또한 사람 유래 결장 암세포인 HCT116 cell에 대한 저지 효과를 확인하였고 Hypholomine B 와 Davalliactone 처리 후 24시간이 지난 뒤 효과를 현미경으로 관찰하였다.

재료 및 방법

가. HCT116 cell 배양

Human colon cancer cell line HCT116 cell을 한국세포주은행에서 분양받아 사용하였다. 10% 우태아혈청(fetal bovine serum, FBS) 및 1%의 antibiotics-antimycotics (Gibco BRL, Grand Island, NY, USA)가 함유된 RPMI 1640 medium (Hyclone Laboratories, UT, USA)을 이용하여 37°C 5% CO₂ 조건에서 Passage 5번을 지나고 실험에 사용 하였다.

나. Human 유래 결장암 항암 효과

HCT116 cell을 전배양한 RPMI 배지에 24 well 1×10⁵ 농도로 계수하여 Seeding 하였다. 5% CO₂ incubator에서 24시간 배양 후 Hypholomine B, Davalliactone (60, 125, 250 µg/ml) 농

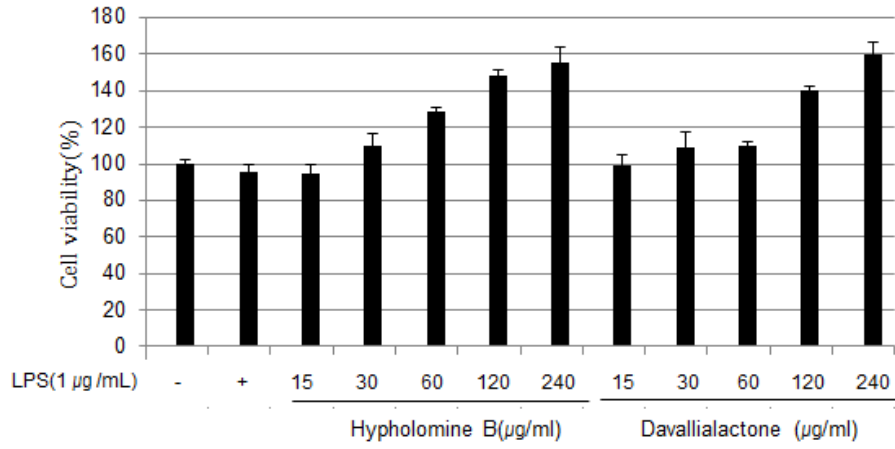
도별로 처리하여 12시간 배양하였다. 배양이 끝난 후 MTT 5mg/ml 용액을 10% 넣은 뒤 5% CO₂ incubator에서 2시간 배양한다. 배양 후 배양여액을 버리고 dimethylsulfoxide(DMSO)를 1ml 넣어 5분간 50 rpm으로 shaking 한 후 ELISA reader (517nm)로 흡광도를 측정하여 대조군과 비교하였다.

다. TNF-alpha, IL-6 Cytokine 생성 억제 분석

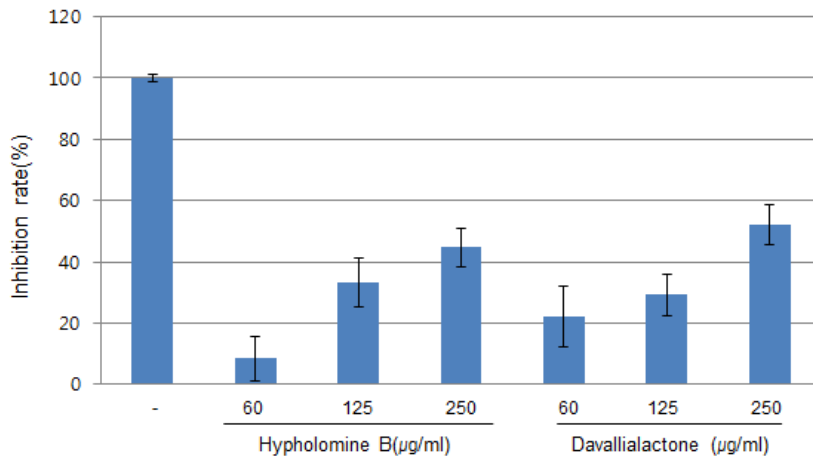
Cytokine 분석 kit는 (TNF-alpha K0331186, IFN-gamma K0331138 KOMABIOTECH Co.) 사용하였다. 1×PBS를 이용하여 96well을 200µl로 2회 300µl 2회 총 4회 세척하여 활성화를 시킨 뒤, 배지를 100µl 씩 분주하여 2시간 RT에서 incubation 한다. 2시간 뒤 배지를 제거 시키고 1×PBS를 이용하여 4회 세척한 뒤 1×BSA에 Anti body detection을 1:20 비율로 섞어 100µl 씩 배지를 제거한 well에 분주하고 2시간 RT에서 incubation 한다. 2시간 뒤 Anti body detection을 제거하고 HRP conjugate solution 을 1×BSA 에 1:20 으로 희석하여 100(µl RT에서 30분간 반응 시킨다. 반응이 끝나면 TMB buffer를 100µl 넣고 반응시켜 10분간 반응정도 확인 후 Stop solution으로 반응을 정지 한 후 한 후 ELISA reader (450nm)로 흡광도를 측정하여 대조군과 비교하였다.

(1) 실험 결과

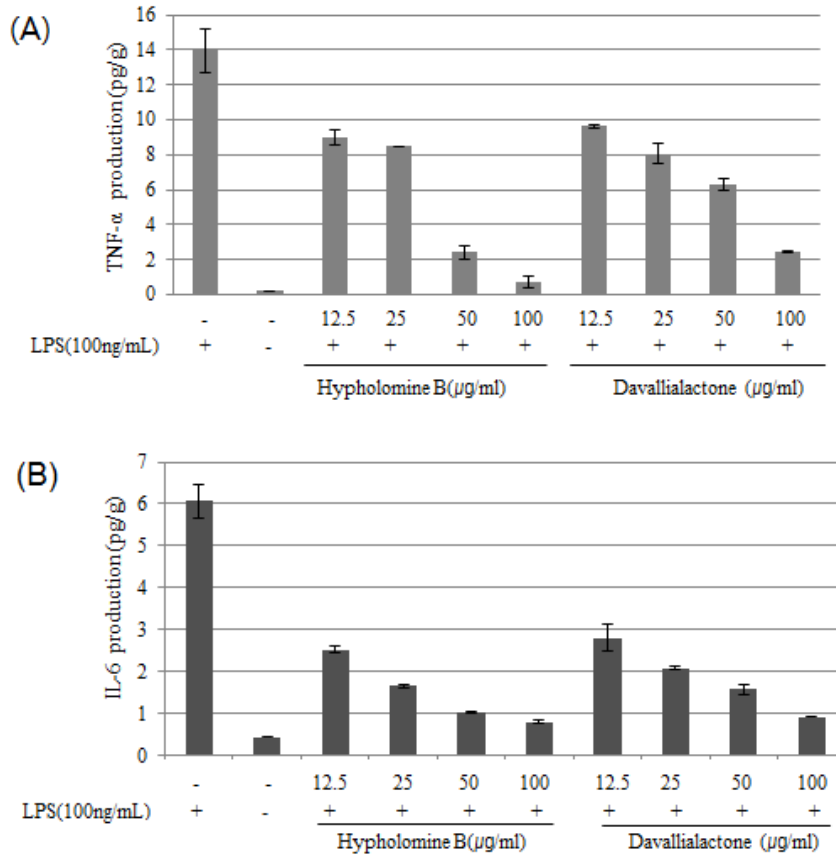
Phellinus 자실체 유래 Hypolomine B, Davalliacton을 인간 유래 결장암 세포인 HCT116 cell 에 처리한뒤 12시간을 경과하여 항암 효과를 확인하였다. Hypolomine B 250µg/ml에서 44.65%의 억제 효과를 나타내었고 Davalliacton 250µg/ml 처리구 에서는 7.25% 높은 51.90%의 우수한 항암 효과를 확인 할 수 있었다. (표1), (그림4) 현미경 관찰에서는 Hypolomine B 와 Davalliacton 에서 정상적인 암세포의 모양이 변화되고 세포질이 손상을 입는 모습 등이 관찰 되었다. (그림4) 또한 Hypolomine B, Davalliacton을 60, 125, 250 µg/ml 농도별로 처리하고 면역 자극 물질인 LPS (Lipopolysccharide) 100ng을 처리한 뒤 24시간 후 Cytokine 억제 능력을 확인 하였다. 염증반응에 포함되고 급성 기 반응(acute-phase protein)의 구성원인 시토카인인 종양 괴사 인자 알파(tumor necrosis factor-alpha, TNF- α ,)가 농도 의존적으로 감소되는 것을 확인 하였다. 또한 cytokine 중 interleukin-6 (IL-6) 는 생체 내 여러 세포들에서 분비되어 면역계와 조혈계에 다양한 영향을 미치며 급성기 반응과 전신염증 반응 등에 관여하는 것으로 알려진 184개의 아미노산 구성물로 Hypolomine B, Davalliacton 처리시 농도 의존적으로 감소 하는 것을 확인 하였다. (그림4) 이로써 Hypolomine B, Davalliacton 은 *Phellinus* 유래 유용 물질로 염증 및 항암 효과를 나타내는 핵심적인 물질로 확인하였다. 실제 인체 복용했을 시에도 염증반응을 줄여주는 유용한 소재로 활용 가능할 것을 판단된다.



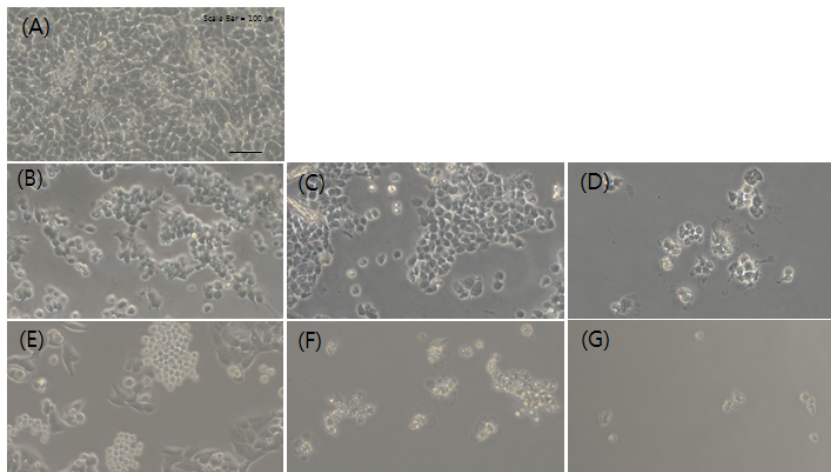
<그림 1> Hypholomine B Davallialacton 의 세포의 독성평가



<그림 2> Hypholomine B, Davallialactone에 의한 결장암세포 HCT116의 억제 효과



<그림 3> *Phellinus* 자실체 유래 Hypolomine B, Davallialactone 의 TNF- α (A)와 IL-6 (B) Cytokine 생성 억제



HCT116 cell culture and treatment with Hypolomine B, Davallialactone. HCT116 cells were cultured and treated with (A) Control (A) 60 (B) 125 (C) 250 μ g/ml concentrations of Hypolomine B, and (D) 60 (E) 125 (F) 250 μ g/ml concentrations of Davallialactone. The cells were cultured as a monolayer in microtitration plates and cell morphology was evaluated microscopically after 48 h of Hypolomine B exposure (magnification, \times 100).

<그림 4> Hypolomine B, Davallialactone 에 의한 결장암 세포의 형태적인 변화

9. *Phellinus* 유래 다당체의 in vivo 면역활성

본 연구는 *Phellinus* PLHS 유래 Polysaccharide 의 in vivo 면역활성 효과를 확인 하였다. *Phellinus* PLHS Polysaccharide를 HNP 로 명명하였고 ICR 마우스를 이용하여 암종을 이식한 후 96시간 경과 후에 항암제로 사용되는 Cisplatin(5mg), HNP(15mg), Positive control(암종 무처리), Negative control(암종 처리)별로 경구 투여 진행하였다. 1일 1회 7일간 처리 하였으며 처리 후에는 희생하여 비장 조직을 적출하여 VEGF와 IgG인자의 발현양상 분석과 비장 내 세포사멸인자(Casp-3)의 발현양상을 분석하였다.

재료 및 방법

가. 실험용 동물

구입한 12주령의 ICR 마우스를 실험 동물로 사용하였다. 7일간 안정화를 시킨 뒤 실험군을 편성하였다. 통계적 유의성을 확보하기 위해 처리구당 7마리 이상을 실험군으로 하였다. 실험 기간 중에 사료와 물을 자유 급이 하였고 실온은 $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 를 유지하였다.

나. 실험 암종 및 시료 투여

마우스를 7일간 순화 시킨 후 HCT116 cell을 RPMI 배지에 배양하여 plate에서 cell을 떼어낸 뒤 1×10^6 cell/ml 로 계수 하였다. $1 \times \text{PBS}$ 에 현탁 시켜 4°C 에서 하루 동안 정치 한 후 주사기를 이용하여 준비하고 마우스의 복강을 에탄올 솜으로 드레싱한 뒤 0.1ml 씩 복강 내 주사 하였다. 암 이식 96시간 경과 후에 처리구별로 식염수에 현탁 하여 1일 1회 7 일간 경구 투여로 진행한 뒤 희생하여 실험을 진행 하였다.

다. Immunohistochemistry (IHC) 분석 방법

4% paraformaldehyde 로 4°C 에서 overnight 반응하여 조직을 고정 후 antibody 투과성을 높이기 위하여 0.2% Triton-X 100 으로 30분간 처리 후 $1 \times \text{PBS}$ 로 세척한다. 0.3% H_2O_2 로 3분간 처리하였다. 5% Horse serum 으로 blocking 하여, 1차 항체는 1% BSA가 첨가된 PBS 에 희석한 후 조직에 처리하고 상온에서 3시간 동안 반응시켰다. 2차 항체를 1% BSA에서 희석시켜 1시간 반응시켰다. 그리고 $1 \times \text{PBS}$ 로 5분씩 4번 수세한 뒤 staining working solution ($1 \mu\text{g/ml}$ in ultrapure water)을 조직에 완전히 덮히도록 뿌려주고 빛을 차단할 수 있게 호일로 샘플을 덮은 뒤 상온에서 10분 동안 반응시켰다. gel mounting solution을 조직위에 뿌리고 Nikon C1si Laser Confocal Microscope를 이용하여 관찰하였다.

라. Immunofluorescence (IF) 분석 방법

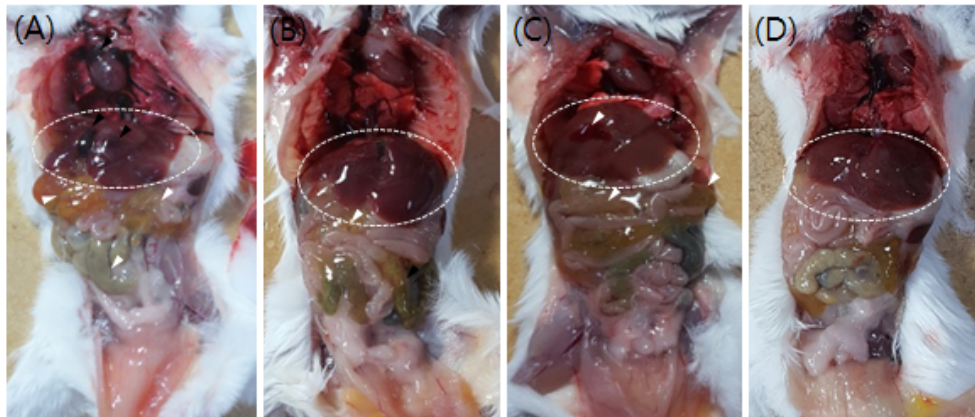
처리된 조직 slide를 0.2% Triton X-100으로 RT에서 5분씩 2회 재형성화를 하였다. 이후 TTBS ($1 \times \text{Tris}$, $1 \times \text{NaCl}$ Tris , $1 \times \text{NaCl}$, 0.02% Tween 20)로 3회 세정한 후 5% normal horse serum 에 1% goat serum을 $1 \times \text{PBS}$ 에 섞어 blocking solution을 만든 후 실온에서 1시간 동안 blocking

하였다. Primary antibody (VEGF and IgG) 를 blocking solution으로 1:200으로 희석하여, 4°C 에 24시간 동안 항원항체 반응을 유도 하였다. 반응 유도 후 1×PBS로 4회 세정 하였고, secondary antibody 로 37°C 에서 30분 동안 반응하고, 1×PBS로 5분씩 3회 세정한 후 Hoechst 33342로 염색하여 형광현미경으로 200배 분석하였다.

마. 실험결과

(1) 처리구에 따른 해부학적 연구

암세포 투여 마우스에 각각의 항암제를 투여한 후 복강 내 변화를 분석한 결과는 (그림1) 과 같다. Cisplatin 첨가군의 경우 간 및 복강 내 염증 현상이 산재되어 있으며, 소장 내 복수낭 이 형성 되어 있음을 확인 하였고, HNP 경우 다른 군에 비하여 복강 내 염증이 다소 완화되어 있음을 확인 하였다. 본 실험의 결과는 복강 내 암세포에 의한 육안적 결과로 장상군에 비하여 전체적 농성 및 복수가 형성되어있음을 확인 하였으나, HNP의 경우 간 및 소화기 주요 장기의 상태가 Negative control 과 많은 비중이 동일시함을 확인 할 수 있었다.

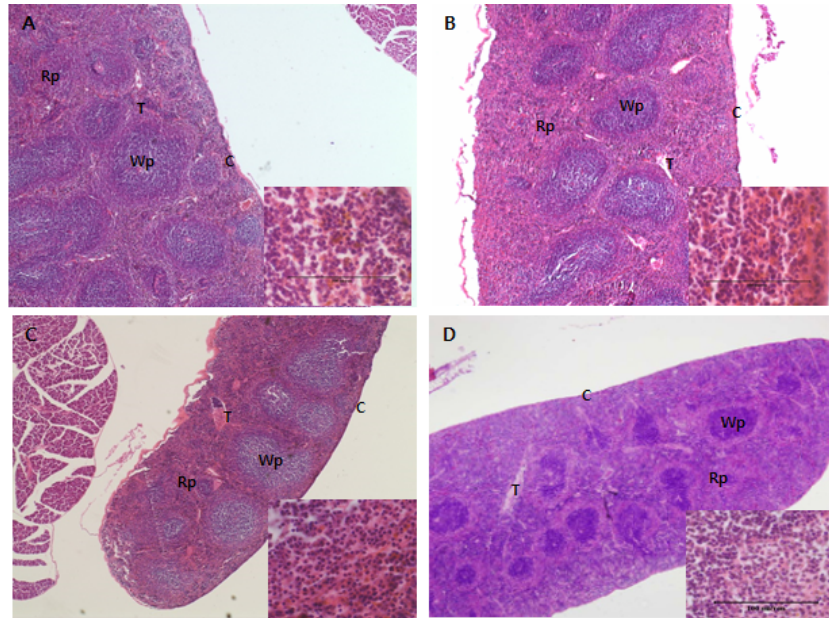


Anatomical analysis of an anticancerized mouse model.
A) Cisplatin B) HNP C) Positive control and D) Negative control

<그림 1> 마우스 처리구에 따른 해부학적 모습

(2) 비장 조직분석

비장 조직 형태적 분석 조직 형태적 관찰에서는 복강 내 병변 소견과 함께 신체 내 T림프구 중량의 25%이상을 차지하면서, 복강 내 염증 등에 반응하는 비장의 T림프구 활동 구간인 Wp (White pulp: 백질) 구간의 형태학적 분석을 실시하였으며, 그 결과는 그림2와 같다. 각 처리군의 비장을 채취하여 H&E분석을 실시한 결과 Negative control 군의 비장에 비하여 HNP의 비장이 비대해져 있었으며, Wp의 표면적 증가가 이루어져 있었고 비장의 비대증대와는 다른 비장 확대적 현상이 나타나고, Wp의 면적 증가 및 lymphocyte의 증가가 다른 군에 비하여 초래되어 있음을 확인 하였고, 비장의 표면적의 형태가 정상적인 비장의 형태를 이루는 것으로 볼 수 있다.

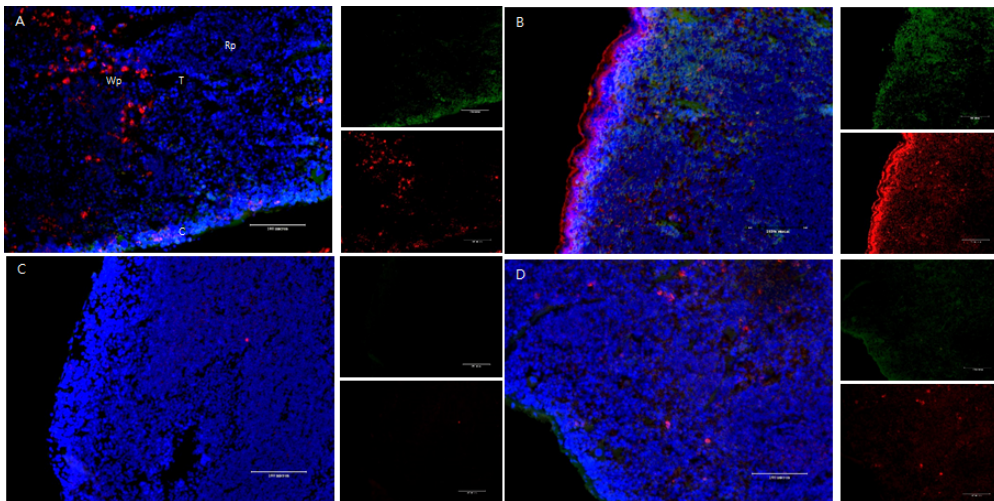


Representative spleen sections from mice fed with anticancer compound.
 A section of spleen stained with H&E from an mouse. A (large figure) magnification X4 and A (small figure) magnification X400. A) Cisplatin B) HNP C) Positive control and D) Negative control
 C: Capsule, T: Trabecula, Wp: White pulp, Rp: Red pulp.

<그림 2> 마우스 처리구별 비장 조직 형태적 분석

(3) 비장 내 VEGF와 IL-2인자의 발현양상 분석

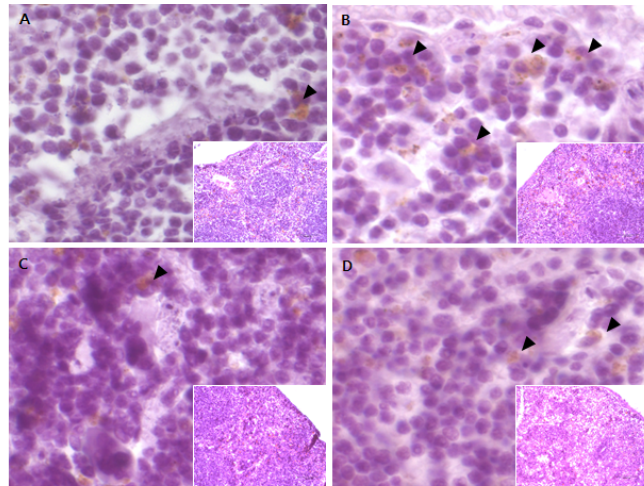
비장 내 각 위치에 따른 VEGF(vascular endothelial growth factor)와 IL-2(interleukin-2)의 발현양상 및 위치 분석을 수행한 결과 (그림 3)의 cancer positive control 을 제외한 negative control 그리고 HNP 처리군 비장 조직에서 VEGF와 IL-2의 발현양상을 확인 할 수 있었다. 비장 내 VEGF와 IL-2인자의 발현양상 분석 에서는 (그림 3)의 경우 Cisplatin 처리군 은 Wp주변 Rp (Red pulp : 적질)구간 내에서 VEGF의 발현을 관찰 할 수 있었으나 IL-2의 발현은 cortex (피질) 구간에서 발현된 것을 확인 할 수 있었다. HNP 처리의 경우 다른 군에 비하여 각 유전자의 발현이 매우 높게 발현되었으며, 특히 HNP 처리 경우 Wp 구간 및 T (Trabecula) 구간에서 IL-2의 높은 발현을 확인 할 수 있었다. 그리고 Rp 및 피질 내에서 VEGF의 발달이 극대화 되어 있음을 확인 할 수 있었다. Negative control 과 Positive control 을 비교하여 볼 때 HNP 처리군 에서 IL-2인자의 발현이 매우 높아짐을 확인 하였다. 따라서 본 결과를 종합적으로 볼 때 HNP군에서의 IL-2 및 VEGF의 발현이 Wp 와 cortex 구간에서 높은 발현을 보이는 것을 확인 하였다.



<그림 3> 비장 내 VEGF와 IL-2인자의 발현양상 분석

(4) 비장 내 세포사멸인자(Casp-3)의 발현양상 분석

장 내 세포사멸인자 (Casp-3)의 발현양상 분석에서 비장에서 각 실험군별 세포사멸인자인 Casp-3의 발현양상을 분석한 결과는 (그림4)와 같다. 비장의 Wp와 Trabecula가 인접된 곳에서의 Casp-3 발현양상의 비교 결과 HNP 처리군의 림프계 세포체에서 다른 처리군에 비하여 매우 높은 Casp-3의 발현양상을 확인 할 수 있었다. Negative control 에서의 세포 형태와 Casp-3의 발현양상과 비교하여 볼 때 세포의 군집형태는 HNP와 매우 흡사하였으며, 본 결과에서는 세포사멸 표시인자인 Casp-3의 발현양상이 HNP 군에서 매우 높게 발현 되는 것을 확인하였다.

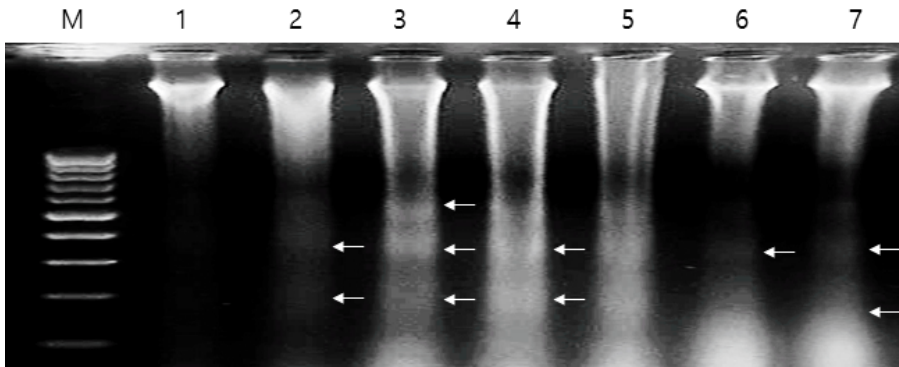


A: Cisplatin처리군, B: HNP처리군, C: Positive control: 정상군(무처리), D: Negative control: 복강내 암세포(무처리)

<그림 4> 비장 내 세포사멸인자(Casp-3)의 발현양상 분석을 위한 Immunohistochemistry

(5) 비장 내 DNA fragment 분석 (Treatment Group No. 1 ~ 7)

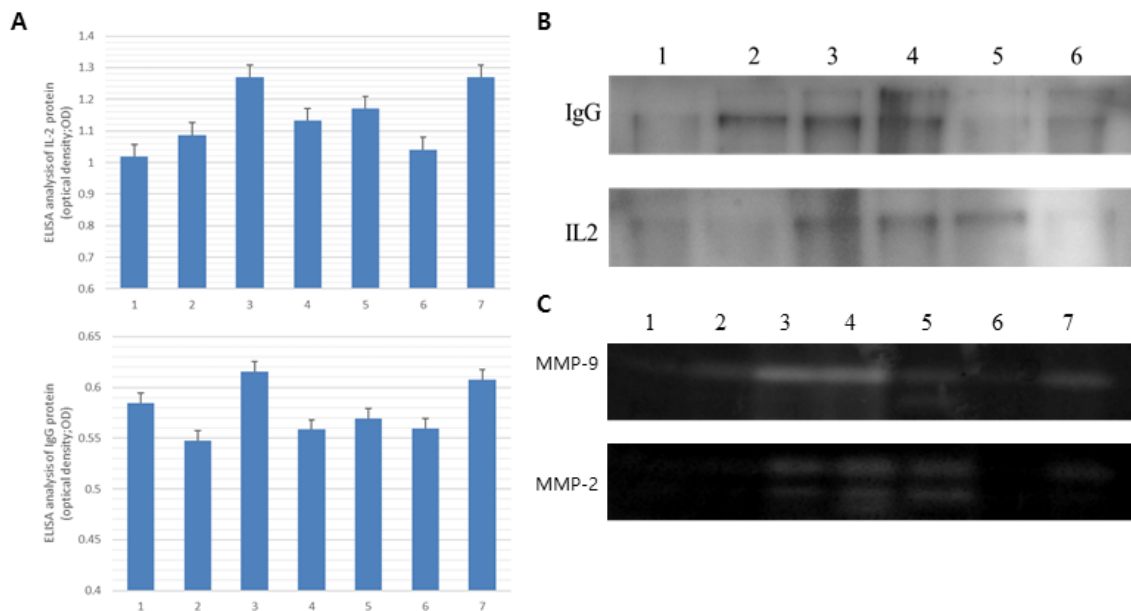
쥐 복강내에 결장암세포 HCT116 처리하고 항암제 Cisplatin와 PLHS유래 다당체를 처리하고 비장으로부터 염색체 DNA를 분리하여 1.2%의 Agarose gel에 loading 하여 처리구별 염색체 DNA분절 현상을 관찰 하였다. DNA 분절 발생을 통한 세포의 사멸을 분석한 결과는 그림 5와 같다. 세포사멸과정에 따라 DNA 분절 현상이 가장 많이 형성된 군은 HNP를 처리한 Line 2, 3, 4와 5에서 높게 형성 되었는데 특히 HNP처리구 3번 lane 에서 분절 현상이 다른 군에 비하여 매우 높게 형성되어 있음을 확인 하였다. 그러나 1과 6, 7군에서는 분절 현상이 매우 낮았다, 따라서 3군의 DNA 분절 현상이 다른 군에 비하여 높아져 세포사멸현상이 가장 높은 것으로 사료될 수 있다.



<그림 5> 목질진흙버섯 KACC93057P유래 다당체(HNP) 처리에 따른 쥐 비장 염색체의 분절
Lane 1: Cisplatin (5mg) 처리구, Lane2: HNP를 glucanase효소처리, Lane3: HNP(15 mg), Lane 4: Cisplatin(5mg)+HNP(15mg), Lane5: 열 수 추출물(250ul), Lane 6: 복강내 암세포처리 안한것 (정상군), Lane 7: 암세포만 복강내 처리

(6) 비장 내 면역관련 유전자의 발현양상 분석

- 비장 IL-2 및 VEGF의 발현양상과 Zymography를 통한 세포질 내 collagen분해 작용을 MMP-9과 MMP-2의 활성 분석을 통하여 분석한 결과는 그림 7과 같다. 분석 결과 그림 7A의 ELISA의 분석에서 HNP처리 B군과 정상군에서 IL-2 및 IL-2의 발현이 유의적으로 가장 높게 발현됨을 확인 하였다. 특히 B군의 경우 다른 군에 비하여 IL-2의 발현이 매우 높았으며, 이에 따라 IgG의 발현 또한 높았다. 그러나 C군의 경우 IL-2의 발현은 상대적으로 낮았으나, IgG의 발현 높아져 있음을 확인 하였다. 그림 7B의 Western blot결과에서는 ELISA와 약간의 차이를 보였는데, IgG의 경우 B 군에서 IL-2의 발현이 높아졌으며, 특히 B군에서 발현이 매우 높아진 것을 확인 하였다. IgG의 경우는 B 그리고 C군에서 IL-2의 발현이 높았으며, 특히B 군에서의 IL-2발현은 IgG의 결과와 같이 높게 형성됨을 확인 할 수 있었다. Zymography의 결과는 MMP-9의 반응이 3, 4군에서 매우 높게 형성되었는데, MMP-2의 경우에는 3군에 비하여 4군에서 활성화된 MMP-2의 발현이 상대적으로 높아짐을 확인 할 수 있었다. (*MMP-9의 경우 세포 분화과정에서 증가되는 인자이며, MMP-2는 세포 분해 및 탈락에 관여하는 인자로 볼 수 있다.

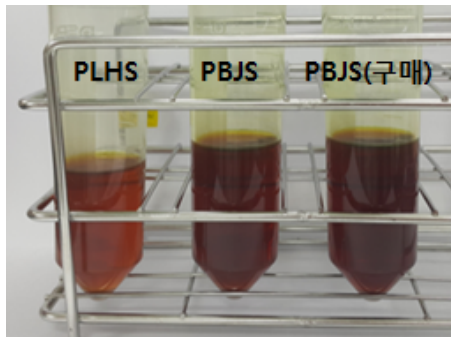


<그림 6> 목질진흙버섯 KACC93057P유래 다당체(HNP) 처리에 따른 matrix metalloproteases 활성과 면역관련 유전자 발현 A) IL-2 and IL-2 protein의 ELISA 분석, B) L-2 and IL-2 protein의 Western blotting, C) Gelatin zymography analysis. Lane 1: Cispaltin (5mg) 처리구, Lane2: HNP를 glucanase효소처리, Lane3: HNP(15 mg), Lane4: Cispaltin(5mg)+HNP(15mg), Lane5: 열 수 추출물(250ul), Lane 6: 복강내 암세포처리 안한것 (정상군), Lane7: 암세포만 복강내 처리

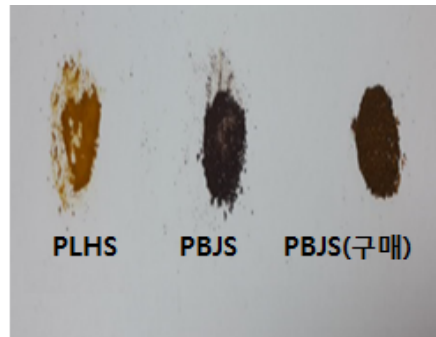
제 3 절 목질진흙버섯의 면역활성성분 규명 및 시험법 밸리데이션

1. 목질진흙버섯(*Phellinus linteus*)과 장수진흙버섯(*Phellinus baumii*) 자실체 추출물의 수율 비교

제1협동기관 (한경대학교) 에서 제공받은 상황버섯 즉 목질진흙버섯 *Phellinus linteus* KACC93057P (Hankyong Sanhwang, PLHS), *Phellinus baumii* (Jangsoo sanghwan, PLJS), *Phellinus linteus* (Korea Sanghwan, PLKS), *Phellinus linteus* 6036 (PL6036)을 추출한 후 유효성분을 함유한 추출물의 수율을 비교하였다. 각각의 시료 2 g을 분쇄한 후 60% 에탄올 50 ml에 넣은 뒤 50℃에서 6시간 동안 추출하였다. 추출물을 거름종이를 이용하여 거른 뒤 감압 농축을 한 후 추출물의 무게를 측정한 후 비교하였다. PLHS와 두 종의 PBJs를 추출물 및 가루 형태의 색상 비교를 한 결과, HS는 노란색의 형태를 보이며, PLJS는 진한 갈색의 형태를 나타내었다. 각 시료의 수율을 비교한 결과, PLHS가 동일 조건에서 추출물의 양이 적은 것을 확인하였다.



추출물의 색형



분말색형

상황버섯 종	수율
<i>P. linteus</i> (PLHS)	73.3 mg
<i>P. baumii</i> (PLJS)	190.4 mg
<i>P. baumii</i> (PLJS, 구매)	225.5 mg

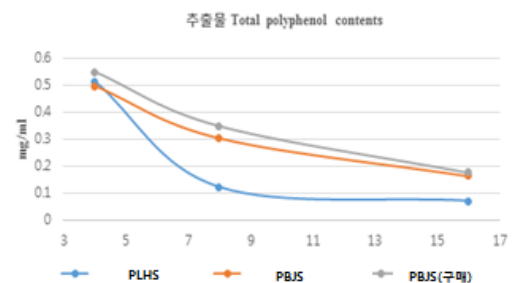
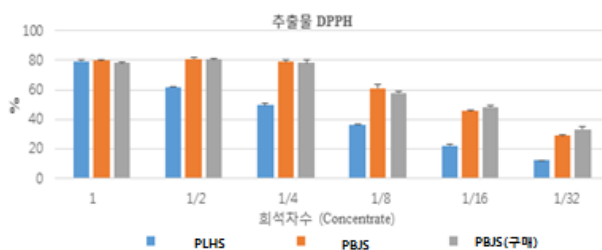
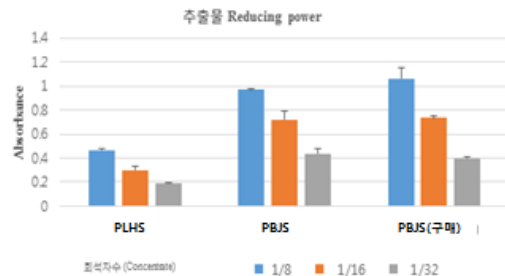
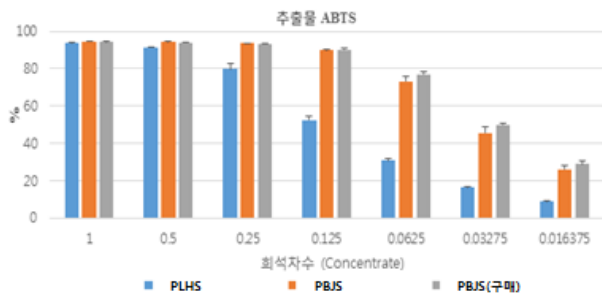
<각 추출물의 수율 비교>

2. 목질진흙버섯(*P. linteus* KACC93057P)과 장수진흙버섯(*P. baumii*) 자실체 추출물의 항산화 활성 비교

상기 추출조건을 통하여 얻은 추출물을 가지고 항산화 활성 (ABTS radical 소거활성, DPPH radical 소거활성), 환원력 측정 (Reducing power assay), 폴리페놀 함량 (Total polyphenol content) 측정을 실시하였다. 항산화 및 환원력 측정을 위한 양성 대조구로 BHA와 Trolox를 사용하였고, 폴리페놀 함량 측정을 위한 양성 대조구로 gallic acid를 사용하였다.

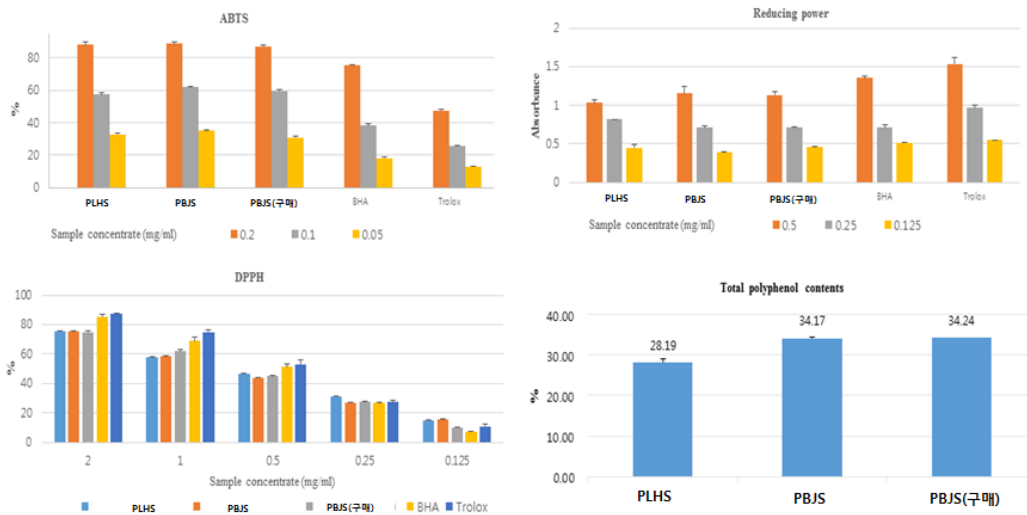
가. 진흙버섯 추출물을 동량의 용매에 녹인 후 항산화 활성 비교

상술한 추출조건으로 확보한 3개의 추출물을 동일한 용매의 양으로 녹여 희석하며 항산화 활성을 측정하였다. 그 결과 PLHS, PLJS(구매)가 오차 범위 수준에서 비슷한 활성을 보이는 것을 확인하였고, 반면에 PLHS는 추출물이 희석 될수록 활성이 PLJS에 비하여 낮게 나타나는 것을 확인하였다.



나. 진흙버섯 추출물을 동일 농도로 처리하여 항산화 활성 비교

상술한 추출조건으로 확보한 3개의 추출물을 동일한 농도 (mg/ml)로 처리한 후, 희석하며 항산화 활성을 측정하여 비교하였다. PLHS, PLJS(구매), PLJS가 오차 범위 수준에서 유사한 항산화 활성을 나타내는 것을 확인하였다.

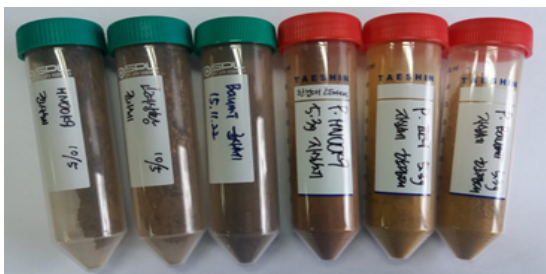


<각 추출물의 동일농도에서의 항산화, 환원력, 폴리페놀 함량 비교>

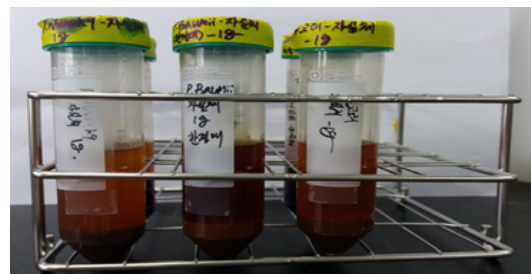
3. 상황버섯의 자실체 및 균사체 대사산물 비교 분석

가. 시료의 전처리

한경대학교에서 제공받은 *P. linteus* KACC93057P (Hankyong Sanghwang, PLHS), *P. baumii* (Jangsoo sanghwan, PLJS), *P. linteus* (Korea Sanghwang, PLKS)의 자실체 및 균사체의 대사산물을 비교하기 위하여 HPLC 분석을 수행하였다. 각각의 시료 1 g을 60% 에탄올 25 ml에 넣은 후 60°C에서 6시간 추출하였다. 추출물은 거름종이를 이용하여 여과한 후 감압농축한 후 10 ml의 물에 녹인 뒤 ethyl acetate로 분획하였다. Ethyl acetate 층을 농축한 후 각 sample을 10 mg/ml의 농도로 맞추어 10 ml를 injection하여 HPLC 분석을 수행하였다. 자실체 추출물의 경우 UV 380 nm에서 검출하였고, 균사체의 경우 UV 250 nm에서 검출하였다.



<자실체 및 균사체 시료>



<대사산물 비교분석을 위한 시료 제조>

나. 상황버섯 종의 자실체 및 균사체의 HPLC profiles

상기의 방법으로 제조한 6개 시료의 추출물을 HPLC로 분석하였다. 그 결과, 한경대에서 개발한 목질진흠버섯인 PLHS(한경상황), PLKS (고려상황), PBJs(장수상황)의 자실체는 균사체에 비하여 다양한 polyphenol 및 metabolite가 존재하는 것이 확인되었다. 또한 자실체와 균사체의 구성성분이 현저히 다른 것으로 나타났다. 따라서 자실체를 구성하는 대사산물의 분석을 수행하였다.

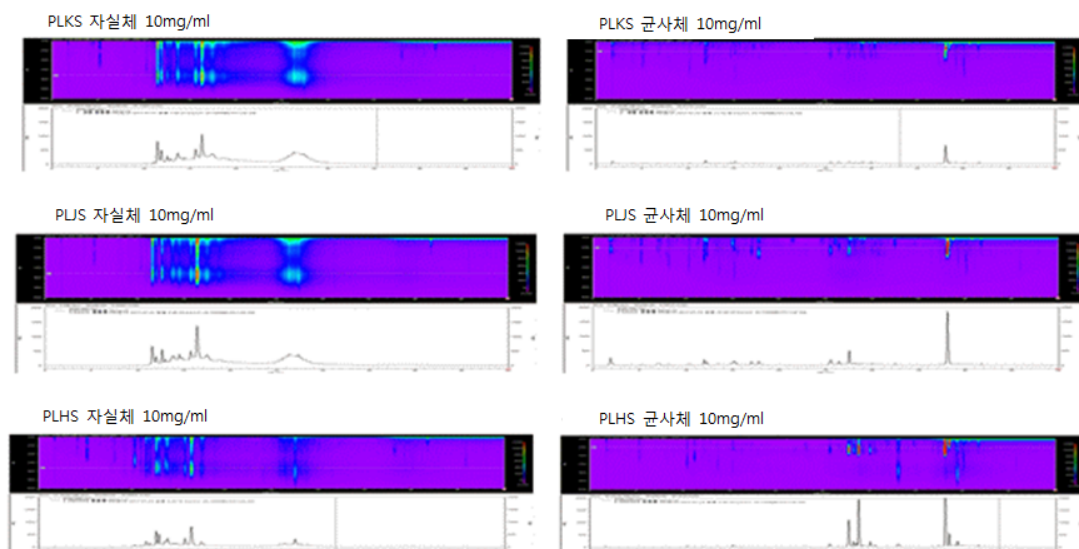
4. 목질진흠버섯(*P. linteus*, 한경대 개발 상황버섯) 유래 항산화 polyphenol 성분의 분리, 정제 및 화학구조 분석

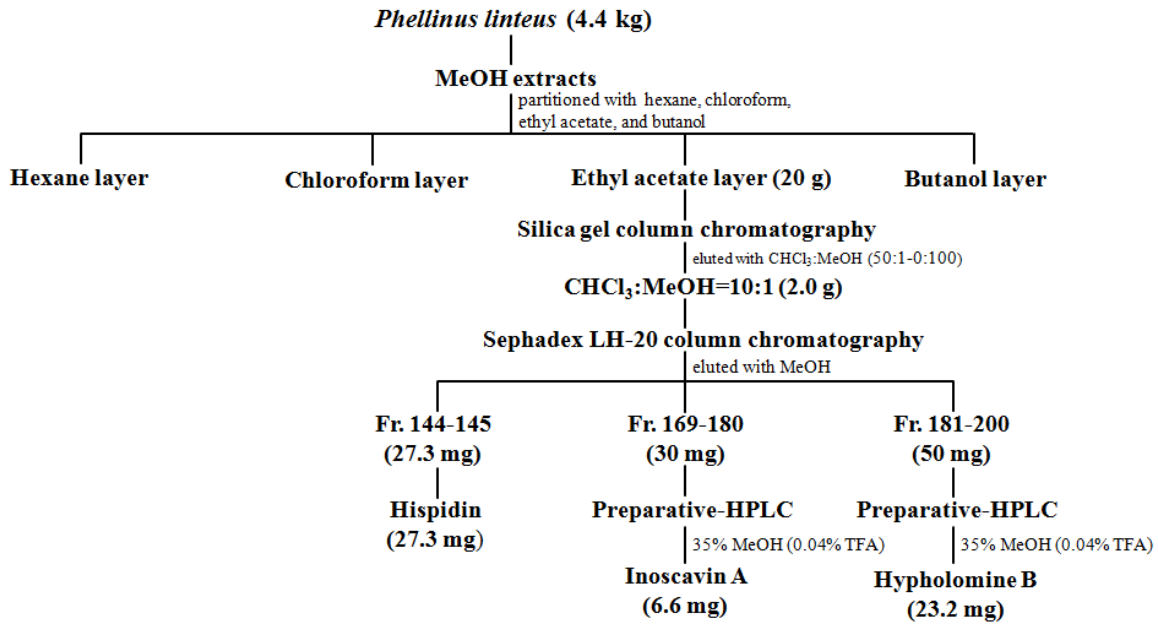
가. 목질진흠버섯 유래 polyphenol의 분리 및 정제

한경대에서 제공한 PLHS 4.4 kg을 마쇄한 후 메탄올(20 L)에 침지하여 실온에서 24시간 동안 추출하였다. 또한 2차 추출로 60% 메탄올(20 L)에 침지한 후 열탕기를 이용하여 60°C에서 6시간 동안 추출하였다. 추출물을 합한 후 감압 농축하여 메탄올을 제거하고, 동량의

<*P. linteus* KACC93057P (Hankyong Sanghwang, PLHS), *P. baumii* (Jangsoo sanghwan, PLJS), *P. linteus* (Korea Sanghwang, PLKS)의 HPLC profile>

hexane, chloroform, ethyl acetate, butanol을 넣어 순서대로 각각 용매 분획하였다. 항산화 polyphenol이 함유된 것으로 알려진 ethyl acetate 층을 감압 농축한 후, chloroform : methanol (50:1-0:100, v/v)을 용출용매로 silica gel column chromatography를 수행하였다. 주요 polyphenol 분획인 chloroform : methanol (10:1, v/v) 분획을 농축한 후 Sephadex LH-20 column chromatography를 수행하였다. 그 결과 fraction 144-145번에서 hispidin을 확보하였고, fraction 181-200을 농축한 후 35% MeOH (0.04% trifluoroacetic acid)을 이용하여 preparative HPLC를 수행하여 hypohomine B를 확보하였다. 또한, fraction 161-180을 농축한 후 35% MeOH (0.04% trifluoroacetic acid)을 이용하여 preparative HPLC를 수행하여 inoscavin A를 정제하였다.





〈상황버섯유래 항산화 polyphenol의 분리 및 정제 과정〉

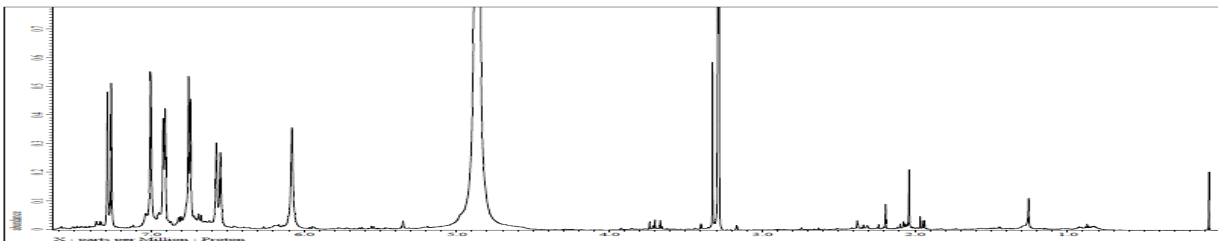
나. 목질진흠버섯(*P. linteus*) 유래 polyphenol의 화학구조 규명

(1) 화합물 Hispidin의 화학구조

목질진흠버섯(*P. linteus* KACC93057P)으로부터 화합물 hispidin을 분리하였으며 화학구조 동정은 다음과 같이 수행되었다. 정제한 화합물을 CD₃OD에 녹여 ¹H NMR spectrum을 측정하여 해석하고, ESI-mass 분석을 통하여 화학구조를 확인하였다.

① ¹H NMR spectrum의 측정 및 해석

¹H NMR spectrum을 측정한 결과, 7.30, 6.53 ppm에서 *trans*-1,2-disubstituted double bond가 관찰되었고, 6.10 ppm에서 sp² methine proton, 7.03, 6.94, 6.77 ppm에서 1,2,4-trisubstituted benzene proton이 관찰되었다. 이를 바탕으로 문헌검색을 수행한 결과 진흠버섯 유래의 화합물 hispidin과 잘 일치하였다.

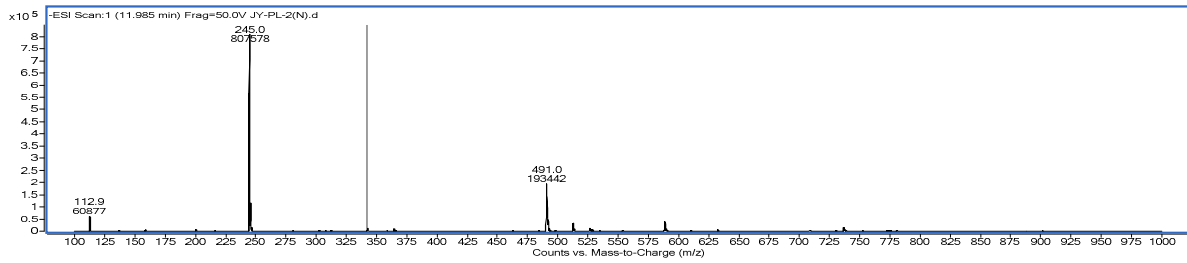


〈정제한 화합물(hispidin)의 ¹H NMR spectrum〉

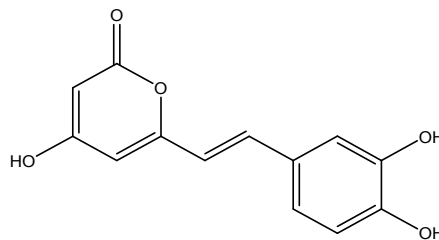
② Mass spectrum의 측정 및 해석

¹H NMR spectrum을 측정한 결과 hispidin으로 추정되어 이를 확인하기 위하여 ESI-mass spectrum을 측정하였다. negative mode에서 측정한 결과, m/z 245에서 [M-H]⁻ peak가 관찰되었다. 이 같은 결과로부터 본 화합물은 분자량 246, 분자식 C₁₃H₁₀O₅의 hispidin으로 동정되었으며

구조는 아래의 그림과 같다.



<정제한 화합물(hispidin)의 ESI-mass spectrum>



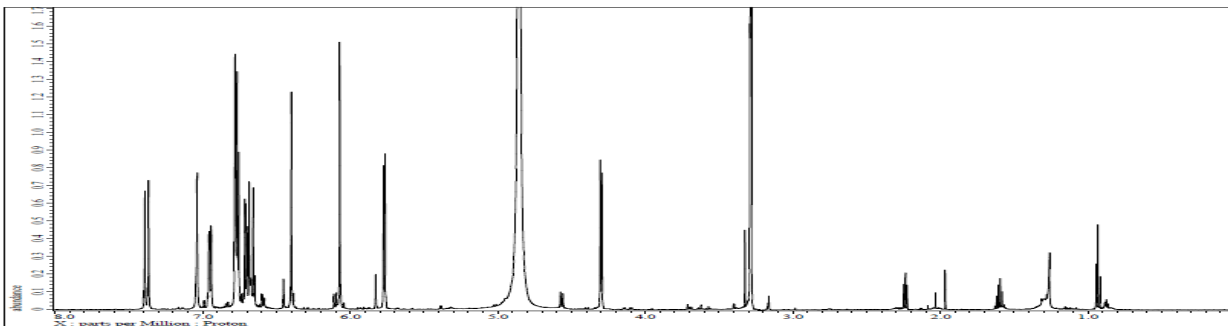
<Hispidin의 화학구조>

(2) 화합물 hypholomine B의 화학구조

목질진흙버섯 KACC93057P으로부터 화합물 hypholomine B를 분리하였으며 화학구조 동정은 다음과 같이 수행되었다. 정제한 화합물을 CD₃OD에 녹여 ¹H NMR spectrum을 측정하여 해석하고, ESI-mass 분석을 통하여 화학구조를 확인하였다.

① ¹H NMR spectrum의 측정 및 해석

¹H NMR spectrum을 측정한 결과, 7.05, 6.97, 6.78, 6.80, 6.72, 6.79 ppm에서 2개의 1,2,4-trisubstituted benzene에 유래하는 proton이 관찰되었고, 7.38, 6.67 ppm에서 *trans*-1,2-disubstituted double bond에 유래하는 proton, 5.77, 4.30 ppm에서 sp³ methine proton, 6.40, 6.08 ppm에서 sp² methine proton이 관찰되었다. 이를 바탕으로 문헌검색을 수행한 결과 진흙버섯 유래의 화합물 hypholomine B와 잘 일치하였다.

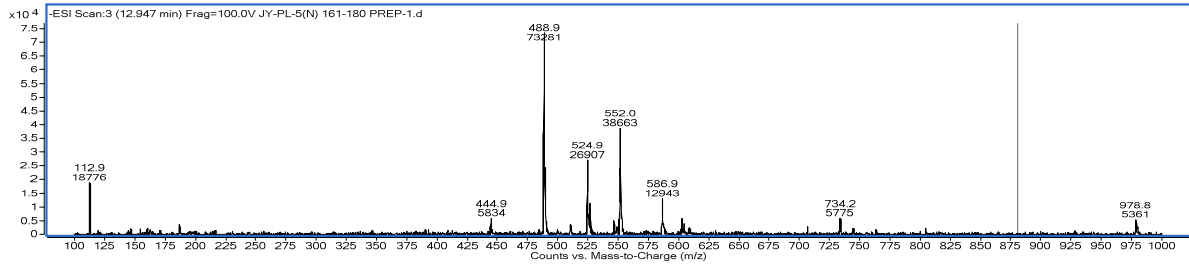


<정제한 화합물(hypholomine B)의 ¹H NMR spectrum>

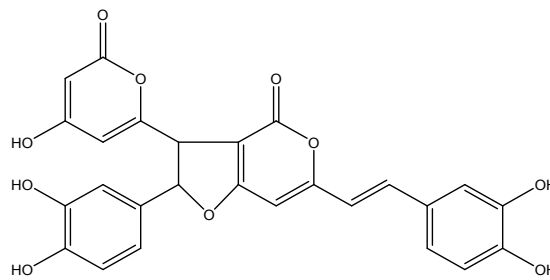
② Mass spectrum의 측정 및 해석

¹H NMR spectrum을 측정한 결과 hypholomine B로 추정되어 이를 확인하기 위하여 ESI-mass

spectrum을 측정하였다. Negative mode에서 측정한 결과, m/z 488.9에서 $[M-H]^-$ peak가 관찰되었다. 이 같은 결과로부터 본 화합물은 분자량 490, 분자식 $C_{26}H_{18}O_{10}$ 의 hypholomine B로 동정되었으며 구조는 아래의 그림과 같다



<정제한 화합물(hypholomine B)의 ESI-mass spectrum>



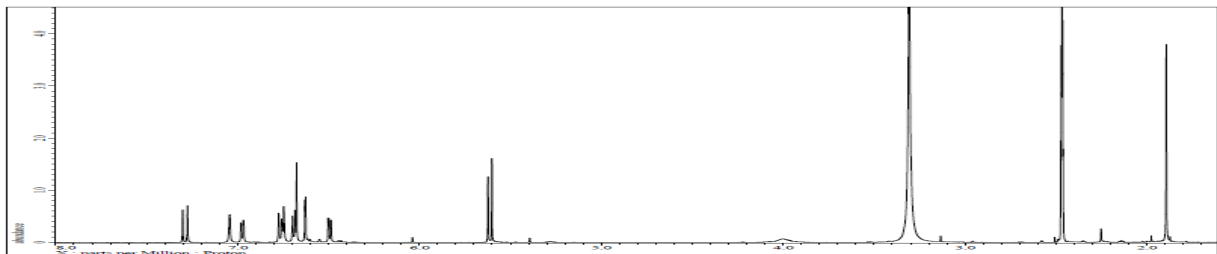
<Hypholomine B의 화학구조>

(3) 화합물 inoscavin A의 화학구조

목질진흙버섯KACC93057P으로부터 화합물 inoscavin A를 분리하였으며 화학구조 동정은 다음과 같이 수행되었다. 정제한 화합물을 $DMSO-d_6$ 에 녹여 1H NMR spectrum을 측정하여 해석하고, ESI-mass 분석을 통하여 화학구조를 확인하였다.

① 1H NMR spectrum의 측정 및 해석

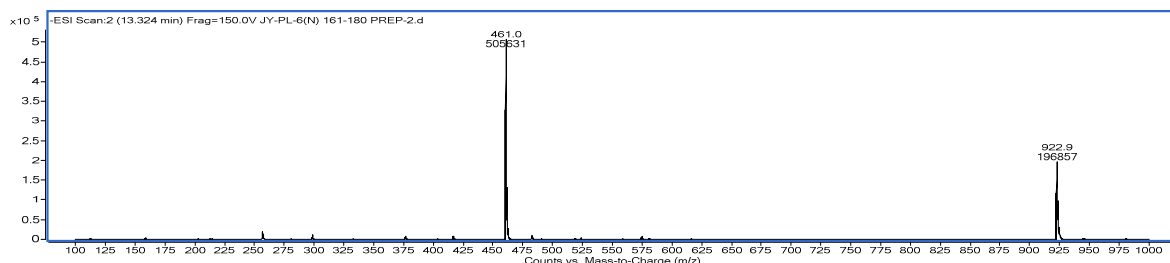
1H NMR spectrum을 측정한 결과, 7.28, 6.49 ppm에서 *trans*-1,2-disubstituted double bond에 유래하는 proton, 6.98, 6.76, 6.74, 6.68, 6.67, 6.68 ppm에서 2개의1,2,4-trisubstituted benzene에 유래하는 proton, 5.61 ppm에서 methine proton, 1.89 ppm에서 methyl proton이 관찰되었다. 이를 바탕으로 문헌검색을 수행한 결과 진흙버섯 유래의 화합물 inoscavin A와 잘 일치하였다.



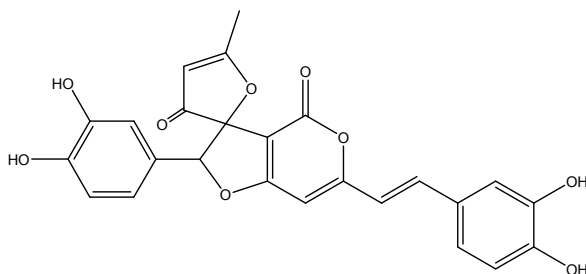
<정제한 화합물(inoscavin A)의 1H NMR spectrum>

② Mass spectrum의 측정 및 해석

^1H NMR spectrum을 측정한 결과 inoscavin A로 추정되어 이를 확인하기 위하여 ESI-mass spectrum을 측정하였다. Negative mode에서 측정한 결과, m/z 461.0에서 $[\text{M}-\text{H}]^-$ peak가 관찰되었다. 이 같은 결과로부터 본 화합물은 분자량 462, 분자식 $\text{C}_{26}\text{H}_{18}\text{O}_{10}$ 의 inoscavin A로 동정되었으며 구조는 아래의 그림과 같다.



<정제한 화합물(inoscavin A)의 ESI-mass spectrum>



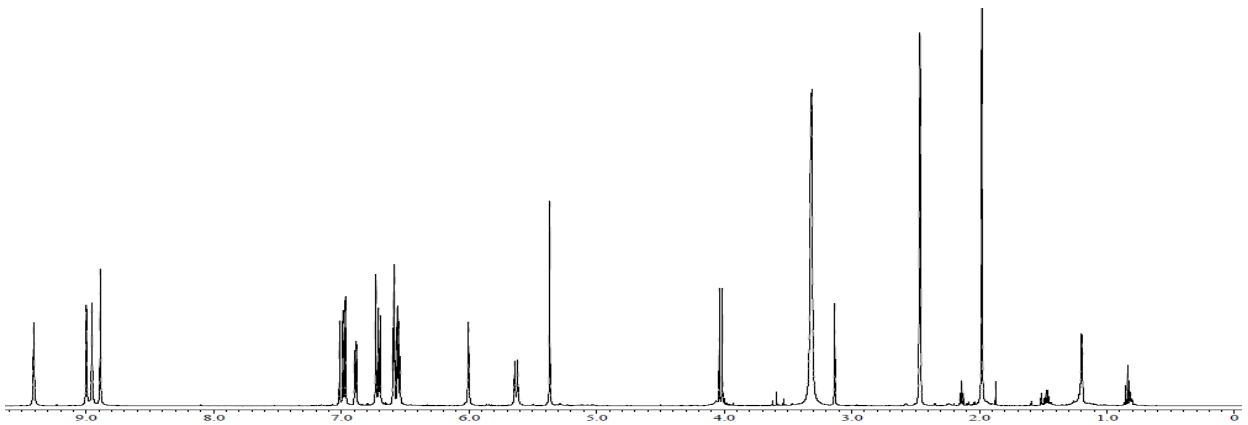
<Inoscavin A의 화학구조>

(4) 화합물 davallialactone의 화학구조

목질진흙버섯으로부터 화합물 davallialactone를 분리하였으며 화학구조 동정은 다음과 같이 수행되었다. 정제한 화합물을 $\text{DMSO}-d_6$ 에 녹여 ^1H NMR spectrum을 측정하여 해석하고, ESI-mass 분석을 통하여 화학구조를 확인하였다.⁸

① ^1H NMR spectrum의 측정 및 해석

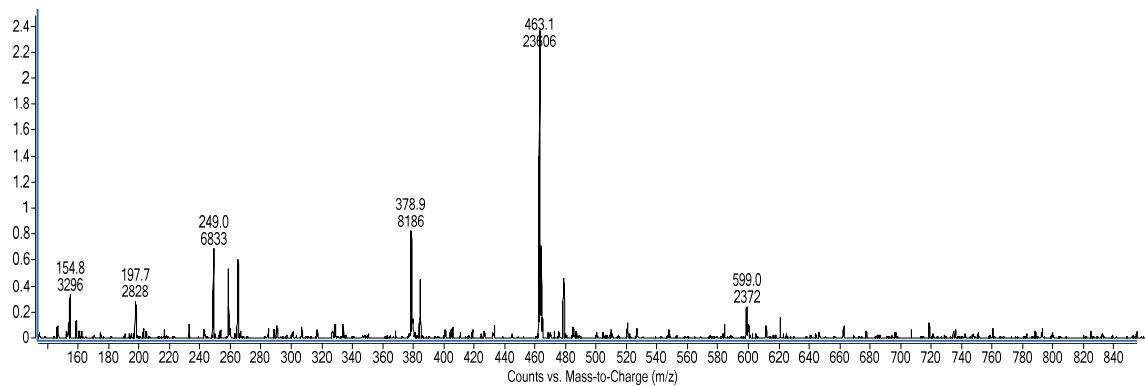
^1H NMR spectrum을 측정한 결과, 9.44, 9.03, 8.98, 8.92 ppm에서 hydroxyl group에 유래하는 protons, 7.00, 6.92, 6.76, 6.73, 6.62, 6.58 ppm에서 2개의1,2,4-trisubstituted benzene에 유래하는 protons, 7.03, 6.61 ppm에서 trans-1,2-disubstituted double bond에 유래하는 protons, 6.03, 5.40 ppm에서 2개의 double bond에 유래하는 protons, 5.66, 4.06 ppm에서 2개의 methine에 유래하는 protons, 2.01 ppm에서 methyl proton을 관찰되었다. 이를 바탕으로 문헌검색을 수행한 결과, 진흙버섯 유래의 화합물 davallialactone과 잘 일치하였다.



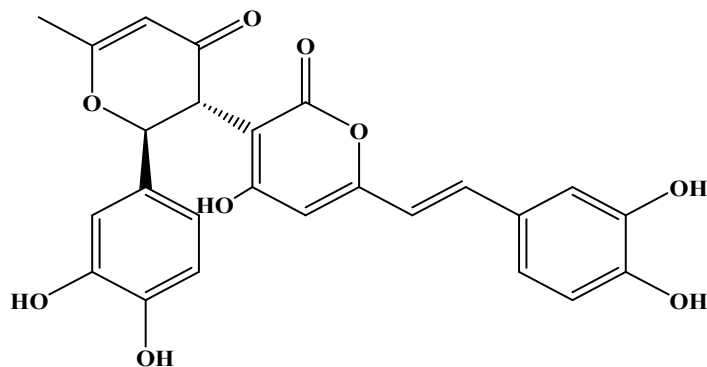
<정제한 화합물(davallialactone)의 ^1H NMR spectrum>

② Mass spectrum의 측정 및 해석

^1H NMR spectrum을 측정한 결과 davallialactone로 추정되어 이를 확인하기 위하여 ESI-mass spectrum을 측정하였다. Negative mode에서 측정한 결과, m/z 463.1에서 $[\text{M}-\text{H}]^-$ peak가 관찰되었다. 이 같은 결과로부터 본 화합물은 분자량 464, 분자식 $\text{C}_{25}\text{H}_{20}\text{O}_9$ 의 davallialactone으로 동정되었으며 구조는 아래의 그림과 같다.



<정제한 화합물(davallialactone)의 ESI-mass spectrum>



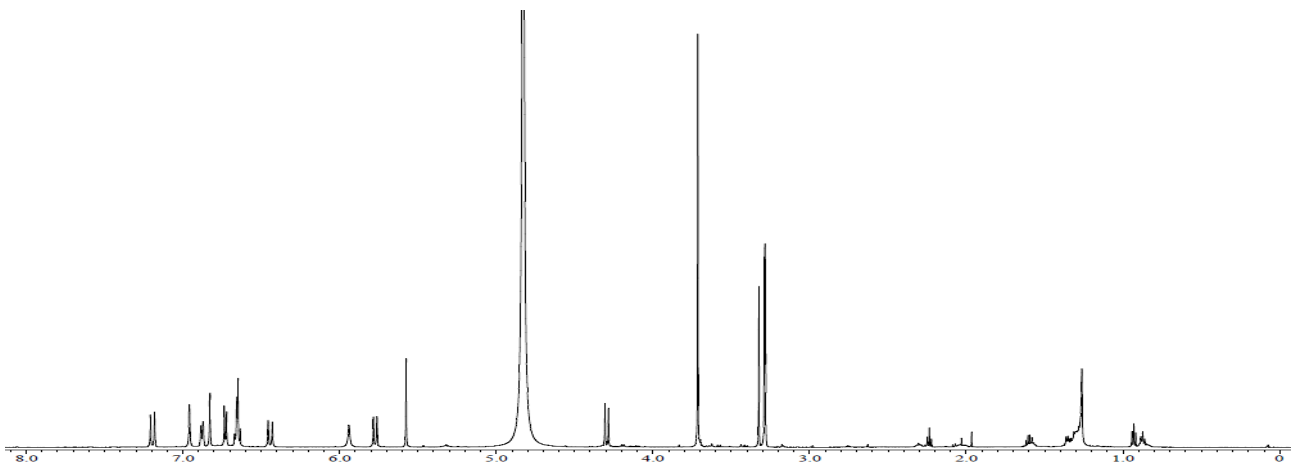
<davallialactone의 화학구조>

(5) 화합물 baumin의 화학구조

목질진흙버섯으로부터 화합물 baumin을 분리하였으며 화학구조 동정은 다음과 같이 수행되었다. 정제한 화합물을 CD₃OD에 녹여 ¹H NMR spectrum을 측정하여 해석하고, ESI-mass 분석을 통하여 화학구조를 확인하였다.⁹

① ¹H NMR spectrum의 측정 및 해석

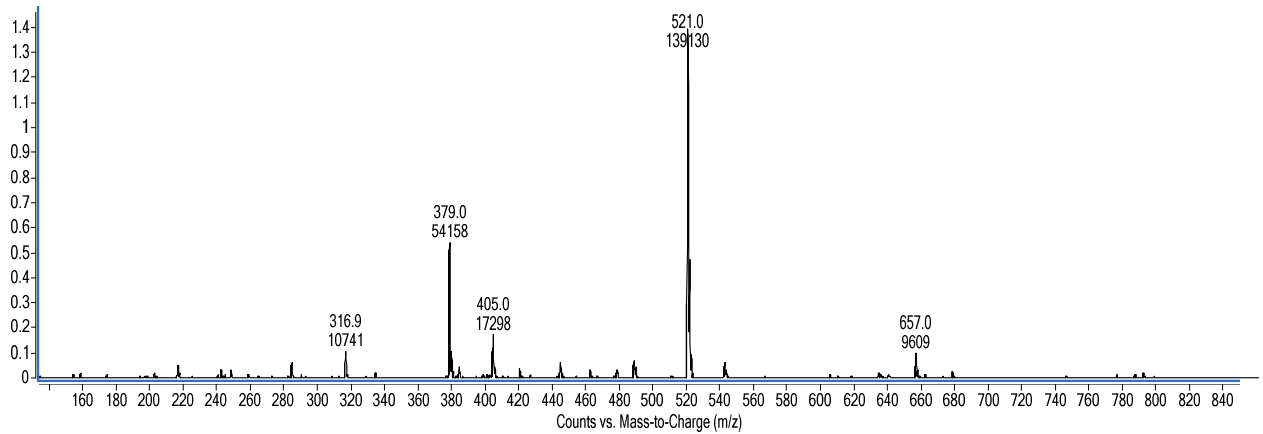
¹H NMR spectrum을 측정한 결과, 6.98, 6.89, 6.85, 6.75, 6.68, 6.66 ppm에서 2개의 1,2,4-trisubstituted benzene에 유래하는 protons, 7.21, 6.48 ppm에서 trans-1,2-disubstituted double bond에 유래하는 protons, 5.96, 5.60 ppm에서 2개의 double bond에 유래하는 protons, 5.79, 4.32 ppm에서 2개의 methine에 유래하는 protons, 3.73 ppm에서 methyl proton을 관찰되었다. 이를 바탕으로 문헌검색을 수행한 결과, 진흙버섯 유래의 화합물 baumin과 잘 일치하였다.



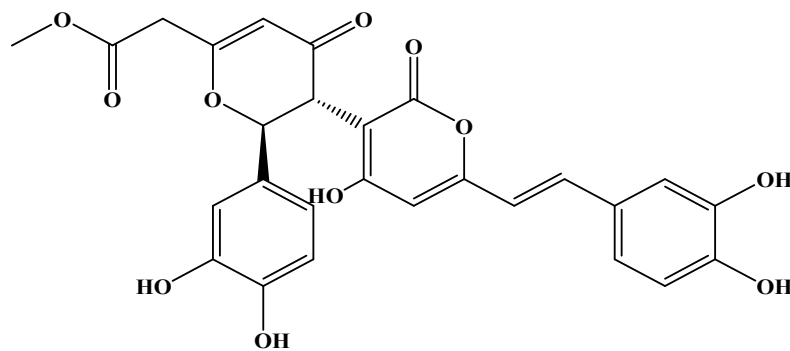
<정제한 화합물 (baumin)의 ¹H NMR spectrum>

② Mass spectrum의 측정 및 해석

¹H NMR spectrum을 측정한 결과 baumin로 추정되어 이를 확인하기 위하여 ESI-mass spectrum을 측정하였다. Negative mode에서 측정한 결과, *m/z* 521.0에서 [M-H]⁻ peak가 관찰되었다. 이 같은 결과로부터 본 화합물은 분자량 521, 분자식 C₂₇H₂₂O₁₁의 baumin으로 동정되었으며 구조는 아래의 그림과 같다.



<정제한 화합물(baumin)의 ESI-mass spectrum>



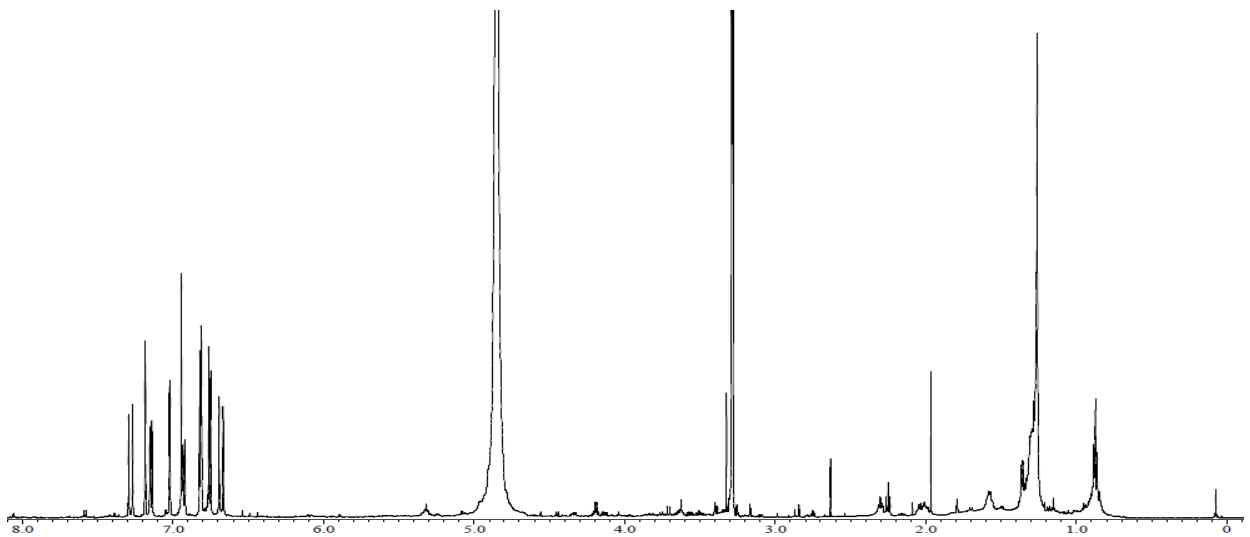
<baumin의 화학구조>

(6) 화합물 inoscavin E의 화학구조

목질진흙버섯으로부터 화합물 inoscavin E를 분리하였으며 화학구조 동정은 다음과 같이 수행되었다. 정제한 화합물을 CD₃OD에 녹여 ¹H NMR spectrum을 측정하여 해석하고, ESI-mass 분석을 통하여 화학구조를 확인하였다.¹⁰

① ¹H NMR spectrum의 측정 및 해석

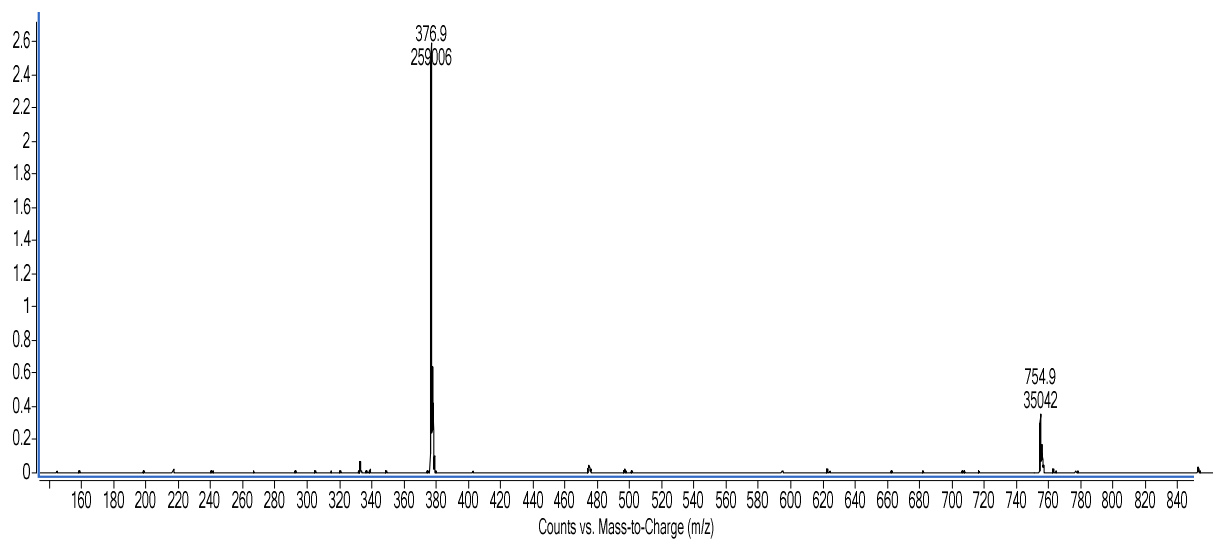
¹H NMR spectrum을 측정한 결과, 7.20, 7.16, 7.04, 6.95, 6.83, 6.77 ppm에서 2개의 1,2,4-trisubstituted benzene에 유래하는 protons, 7.30, 6.70 ppm에서 trans-1,2-disubstituted double bond에 유래하는 protons, 6.96, 6.83 ppm에서 2개의 double bond에 유래하는 protons을 관찰되었다. 이를 바탕으로 문헌검색을 수행한 결과, 진흙버섯 유래의 화합물 inoscavin E와 잘 일치하였다.



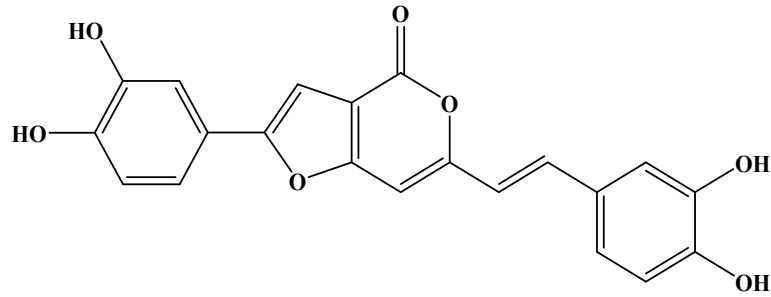
<정제한 화합물 (inoscavin E)의 ^1H NMR spectrum>

② Mass spectrum의 측정 및 해석

^1H NMR spectrum을 측정한 결과 inoscavin E로 추정되어 이를 확인하기 위하여 ESI-mass spectrum을 측정하였다. Negative mode에서 측정한 결과, m/z 376.9 에서 $[\text{M}-\text{H}]^-$ peak가 관찰되었다. 이 같은 결과로부터 본 화합물은 분자량 378, 분자식 $\text{C}_{21}\text{H}_{14}\text{O}_7$ 의 inoscavin E으로 동정되었으며 구조는 아래의 그림과 같다.



<정제한 화합물(inoscavin E)의 ESI-mass spectrum>

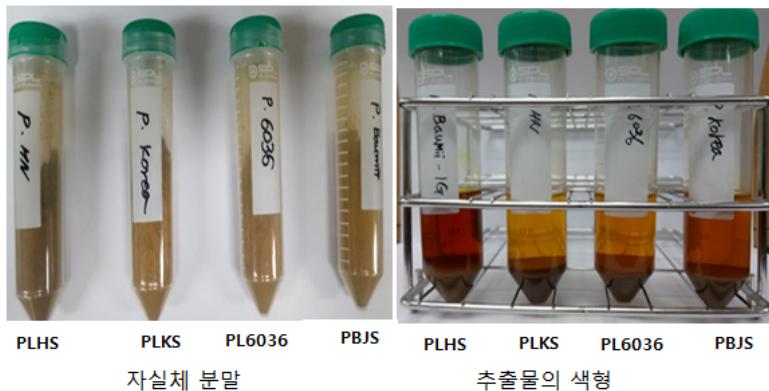


<inoscavin E의 화학구조>

5. 상황버섯 종의 자실체 추출물 비교

가. 상황버섯 종의 추출물 수율 비교

한경대학교에서 제공받은 *P. linteus* KACC93057P (Hankyong Sanhwang, PLHS), *P. baumii* (Jangsoo sanghwang, PLJS), *P. linteus* (Korea Sanghwang, PLKS), *P. linteus* 6036 (PL6036)을 동일 조건에서 추출하여 수율을 비교하였다. 각각의 시료 1 g을 분쇄한 후 메탄올 20 mL에 넣은 뒤 60°C에서 30분 동안 추출하였다. 각각의 추출물에서 500 uL 농축 후 무게를 확인하였다. 각 시료의 수율을 비교한 결과, PLJS가 동일 조건에서 추출물의 양이 가장 많은 것으로 확인 하였고 *Phellinus linteus* 계통인 PLHS, PLKS, PL6036은 서로 비슷한 수준의 양을 갖는 것으로 확인 하였다.



PLHS PLKS PL6036 PBJs 자실체 분말
 PLHS PLKS PL6036 PBJs 추출물의 색형

상황버섯 종	수율
PBJs	2.5 mg
PLHS	0.9 mg
PLKS	0.9 mg
PL6036	0.9 mg

<각 추출물의 수율 비교>

나. 상황버섯 종 추출물의 HPLC profiles

한경대학교에서 제공받은 4종의 시료 즉 PLHS, PLJS, PLKS, PL6036의 HPLC 분석을 수행하였다. 각각의 시료 1 g을 메탄올 20 mL에 넣은 후 60°C 에서 30분간 추출하였다. 추출물을 centrifuge를 통하여 시료의 전처리를 수행하였다. sample을 10 uL을 injection하여 HPLC 분석을 수행하였다. 각각의 추출물의 경우 UV 380 nm에서 검출하였다. 4개의 분석시료에서 다양한 polyphenol 및 metabolites가 존재하는 것이 확인되었다. PLJS에서 PLHS, PLKS, PL6036와 비슷한 HPLC profiles을 확인 하였던 결과 davallialactone, hispidin, hypholomine B의 peaks가 검출되었으며 PLJS 는 PLHS, PLKS, PL6036 와 비교한 결과, 추출물 내 폴리페놀 함량이 더 높은 것으로 확인되었다.

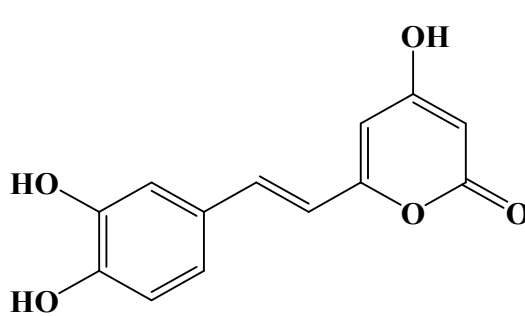
6. hispidin 의 밸리데이션

가. hispidin 의 정량분석

(1) 개요

① 분석시료
: 복합물

② 기능/지표물질

성분명	hispidin 
CAS Number	555-55-5
Other name	6-(3,4-dihydroxystyryl)-4-hydroxy-2-pyrone
Molecular formula	C ₁₃ H ₁₀ O ₅
Molecular weight	246.2

(2) 시험법 검증

복합물 중 hispidin의 함량을 확인하기 위하여 분석법의 유효성을 검증하였다(표 1).

표 1. 복합물 중 hispidin 분석법의 유효성 검증(요약)

항 목	평가 방법	설 정 값
특이성 (Specificity)	HPLC 분석 시 검출시간(Retention time), spectrum, peak purity 검토	o 검출시간 : 약 20.1 분대 o spectrum : λ_{max} 약 369 nm 표준용액과 시험용액 일치 o peak purity : 시험용액 중 hispidin peak가 5 points일 치, 단일물질로 확인됨
직선성 (Linearity)	표준물질에 대한 5개 농도에서 직선성 확인	o 5.9375~95.0 ug/mL의 농도에서 확인 o R^2 : 0.9996
검출한계	$3.3 \cdot \sigma / S$ (σ : y절편 표준편차, S:기울기)	o 검출한계 : 0.078 ppm
정량한계	$10 \cdot \sigma / S$	o 정량한계 : 0.239 ppm

① 분석방법

분석 장비 (HPLC system)

- HITACHI Chromaster, HITACHI , Japan
- Pump 5110, Autosampler 5210,
- Column Oven 5310, PDA Detector 5430

분석 시약

- Hispidin : 93.7%
- Acetonitrile : J.T.Baker, 4 L, 9012-03
- Trifluoroacetic acid(TFA): ACROS, 139721000

표준용액의 조제

표준물질 hispidin 9.5 mg을 정밀히 달아 50% methanol 10 mL 에 녹인 후 50% methanol로 희석하여 표준용액으로 사용하였다.

hispidin		STD 1	STD 2	STD 3	STD 4	STD 5
ppm		5.9375	11.875	23.75	47.5	95
표준용액 제조	STD 1	STD 2를 2배 희석				
	STD 2	STD 3을 2배 희석				
	STD 3	STD 4를 2배 희석				
	STD 4	STD 5를 2배 희석				
	STD 5	9.5 mg / 10 ml (95 ppm)				
표준품		hispidin, 93.7%				

시험용액의 조제

제공받은 복합물 분말 약 1 g에 50% methanol 수용액 20 mL을 넣고 30분간 60°C로 추출 하였다. 3 반복용 시험용액을 조제하였다.

분석조건

- Instrument: HPLC system
- Detector: UV detector DAD(369 nm)
- Column: TSK-gel 100V(4.6 mm×250 mm, 5 μm), TOSOH, Japan
- Column Oven: 25°C
- Injection vol.: 10 μL
- Flow rate: 1.0 mL/min
- Mobile phase: A, acetonitrile, B, 3rd D.W(0.04% TFA)

min	A (%)	B (%)
0	17	83
23	17	83

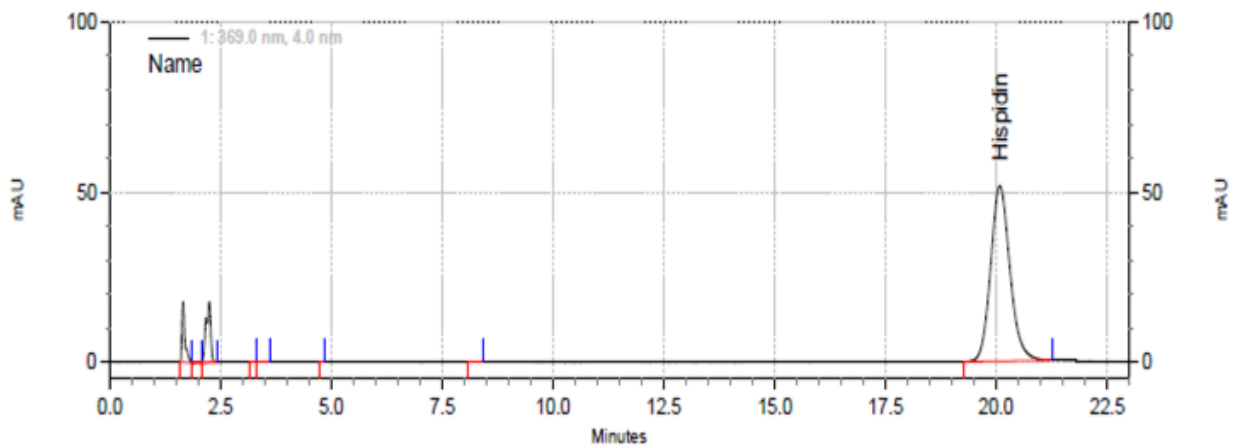
② 시험법 검증 결과

특이성(Specificity)

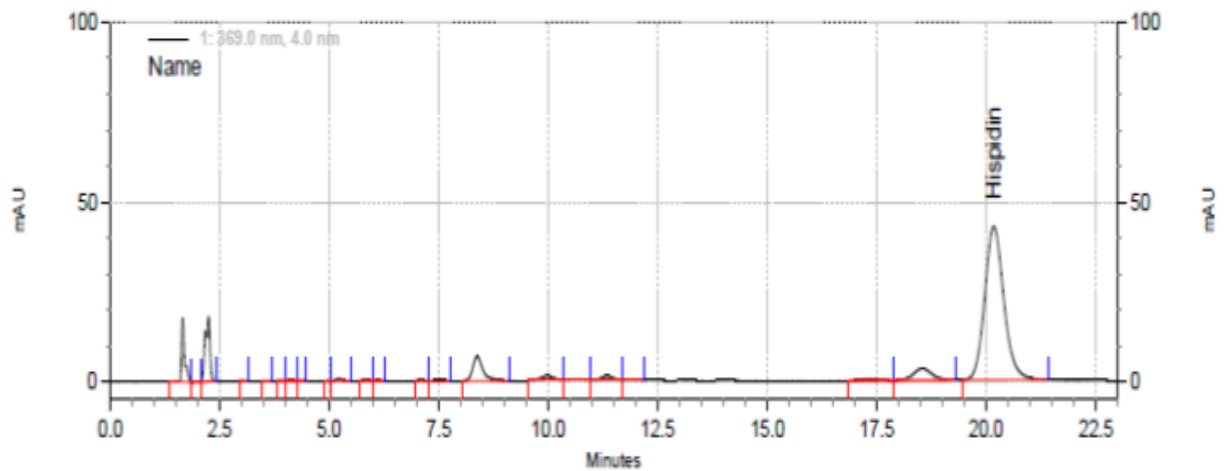
- 복합물 추출물 중 hispidin의 retention time과 peak 분리도 확인

hispidin 표준물질과 복합물 추출물을 분석하여 검출된 peak를 확인하였다. 표준용액과 추출물에서 약 20.1분대에 peak가 검출되어 동일한 물질임을 확인하였다. 시험용액에서 주변 peak와의 분리가 완전히 이루어짐을 확인할 수 있었다(그림 1).

A



B

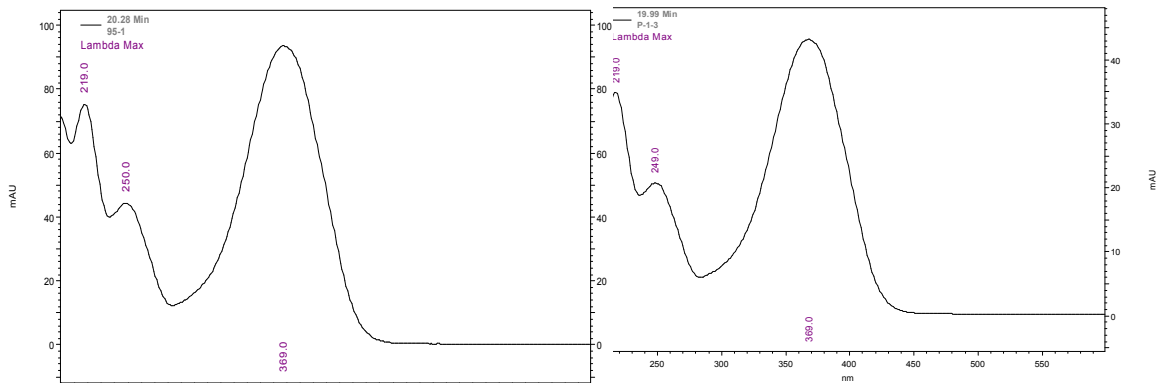


<표준용액과 복합물 추출물 중의 hispidin의 HPLC chromatogram>

(A. hispidin 표준용액, B. 복합물 추출물)

- 복합물 추출물 중 hispidin의 spectrum과 peak purity 확인

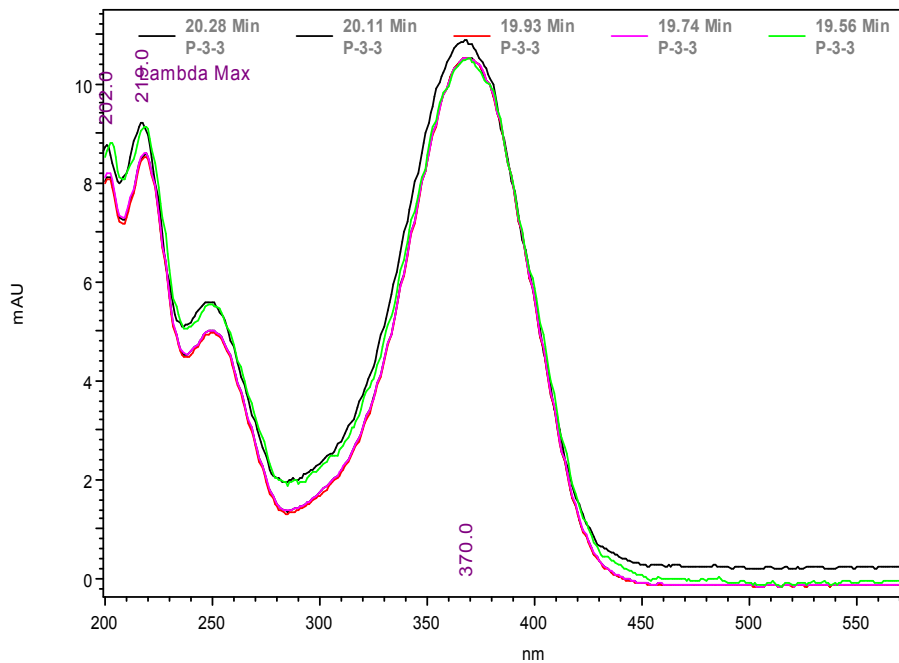
시험용액 중 검출된 chromatogram이 표준용액인 hispidin과 동일한지 확인하기 위하여 표준용액과 시험용액의 spectrum을 확인하였다. 약 20.1 분대 검출된 peak의 spectrum을 확인한 결과, 219, 250, 369 nm에서 최대 흡광도를 보였으며, 표준용액과 시험용액에서 동일한 패턴의 spectrum을 나타냄을 확인하였다(그림 2). 또한 시험용액의 hispidin peak의 purity를 확인하기 위하여 peak의 5 point UV spectrum을 표시하였다(그림 3). 그 결과 5개의 지점에서 모두 일치하는 UV spectrum을 나타내어 hispidin이 단일물질임을 확인하였다.



[hispidin]

[복합물 추출물 시험용액]

<hispidin과 복합물 추출물 시험용액의 UV spectrum>



<시험용액 중 hispidin peak 각 5개 지점의 UV spectrum 분석>

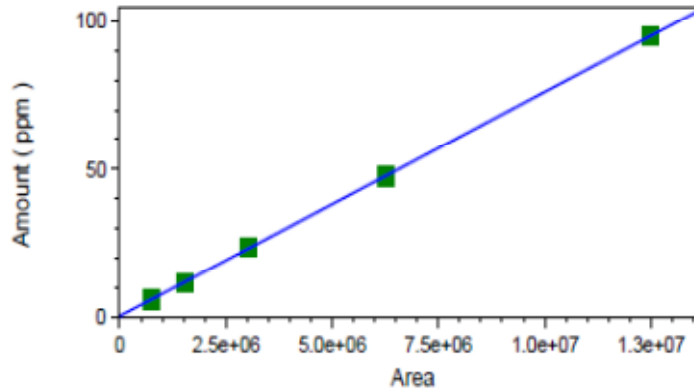
직선성(Linearity)

- 표준물질에 대한 직선성

Hispidin의 검출농도 5.9375~95.0 ug/mL 에서 직선성을 평가하였다. 분석결과 R²는 0.9996, 즉 99.96%의 직선성을 확인할 수 있었다.

Goodness of fit (r²): 0.99917

Peak: Hispidin -- ESTD -- 1: 369.0 nm, 4.0 nm



<표준물질에 대한 직선성>

복합물 중의 hispidin 정량 결과

- 계산식

$$\text{Hispidin 함량 (\%)} = \frac{\text{검량선에서 계산된 수량 (ppm)}}{\text{시료 무게 (mg)}} \times \frac{\text{시험용액의 정량 (mL)}}{\text{시료 무게 (mg)}} \times \text{표준품의 순도 (\%)} \times \frac{1}{1000}$$

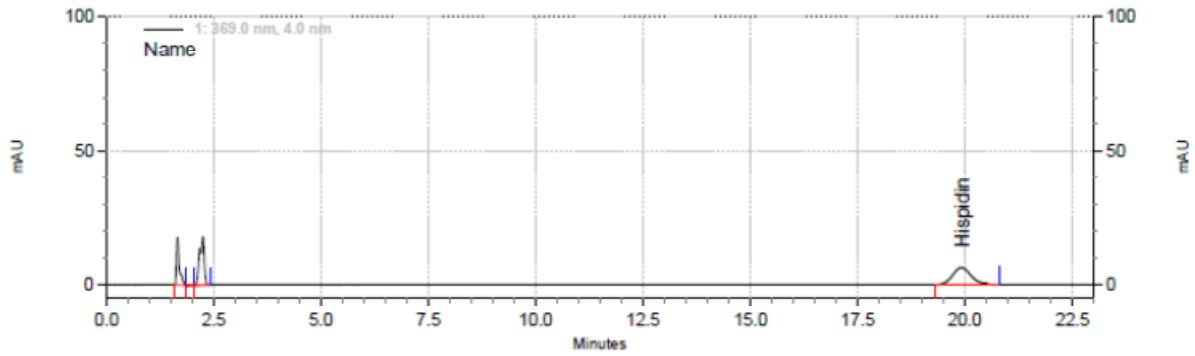
표2. 복합물 중의 hispidin 정량 결과

	검량선결과 (ug/mL)	최종량 (mL)	시료무게 (mg)	표준품 순도(%)	hispidin 함량 (%)
시료-1	38.592	20	1 g	93.4	0.07208
시료-2	32.842	20	1 g	93.4	0.06134
시료-3	35.850	20	1 g	93.4	0.06696
평균					0.06679±0.0053

(3) HPLC profiles

① Hispidin

- STD 1

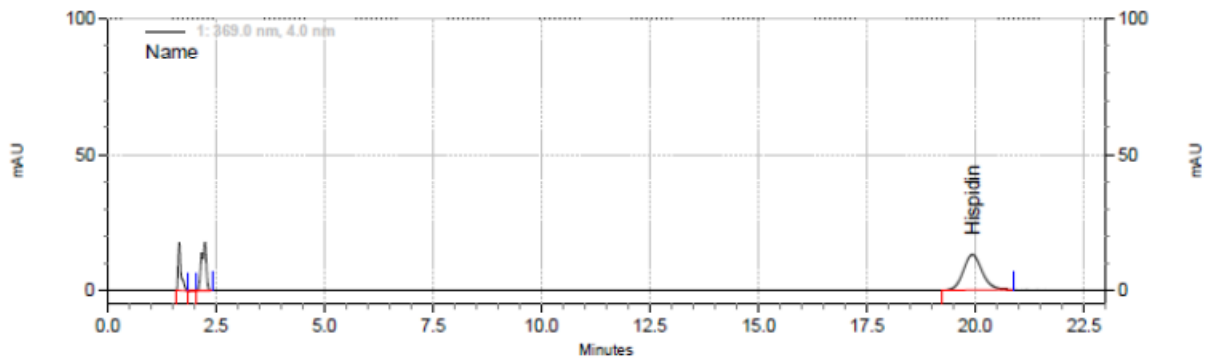


1: 369.0 nm, 4.0 nm

Results

Name	Retention Time	Area	PPM
Hispidin	19.927	746887	5.938 CAL

- STD 2

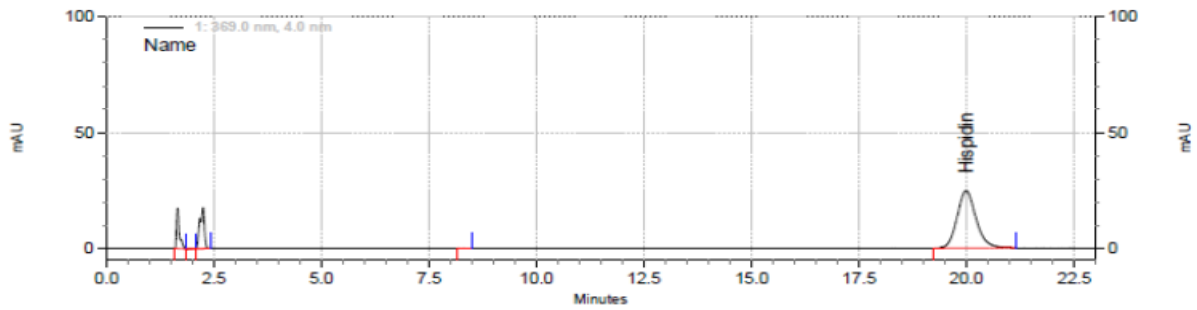


1: 369.0 nm, 4.0 nm

Results

Name	Retention Time	Area	PPM
Hispidin	19.933	1544339	11.875 CAL

- STD 3

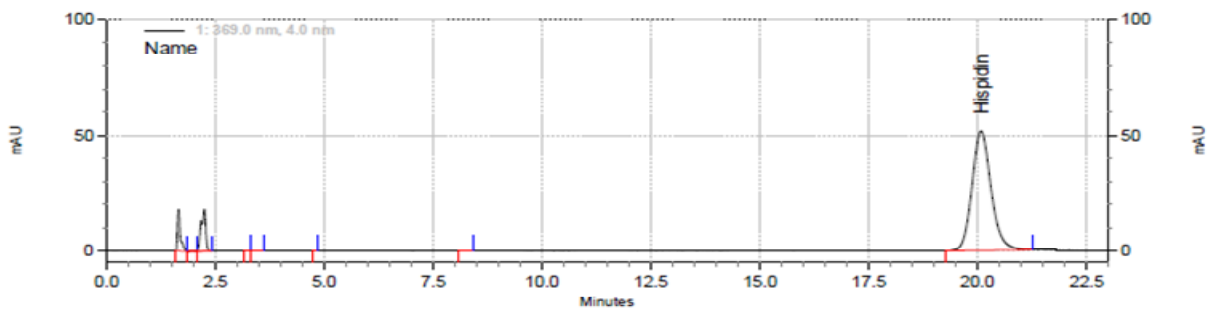


1: 369.0 nm, 4.0 nm

Results

Name	Retention Time	Area	PPM
Hispidin	19.993	3036723	23.750 CAL

- STD 4

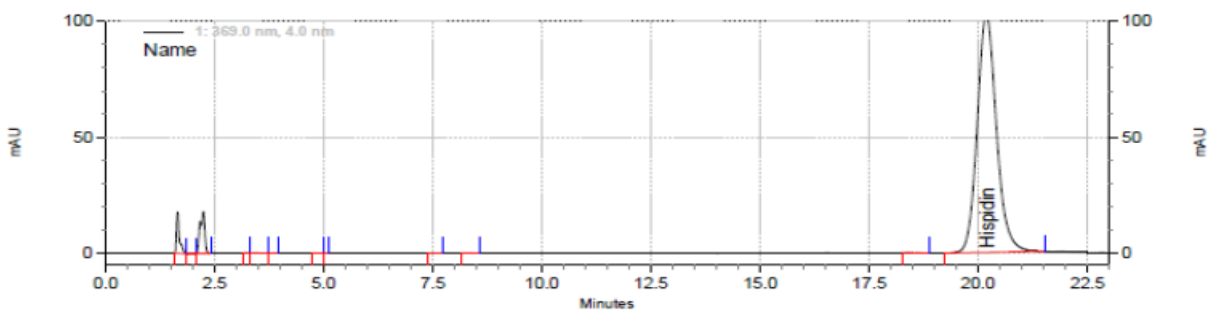


1: 369.0 nm, 4.0 nm

Results

Name	Retention Time	Area	PPM
Hispidin	20.087	6264685	47.500 CAL

- STD 5



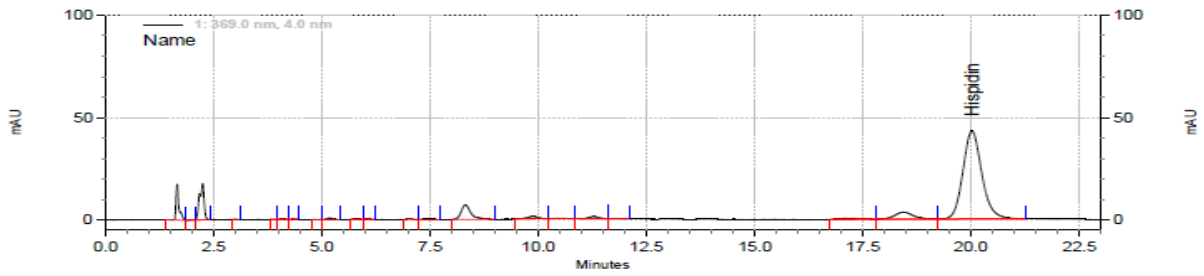
1: 369.0 nm, 4.0 nm

Results

Name	Retention Time	Area	PPM
Hispidin	20.193	12524138	95.000 CAL

② 복합물 추출물

시료-1

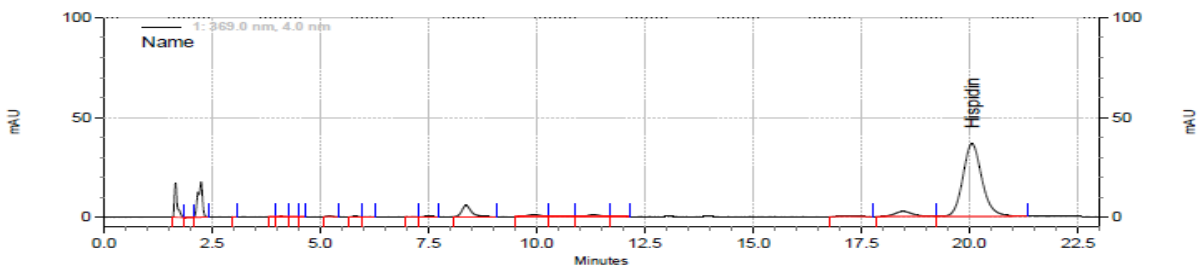


1: 369.0 nm, 4.0 nm

Results

Name	Retention Time	Area	PPM
Hispidin	20.027	5208555	38.592

시료-2

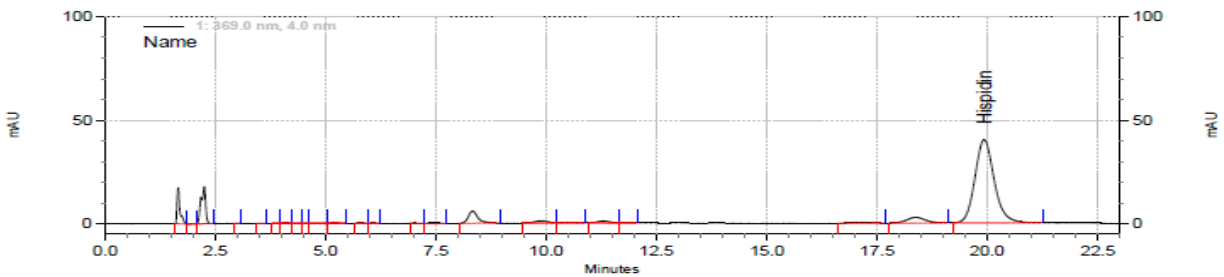


1: 369.0 nm, 4.0 nm

Results

Name	Retention Time	Area	PPM
Hispidin	20.060	4454685	32.842

시료-3



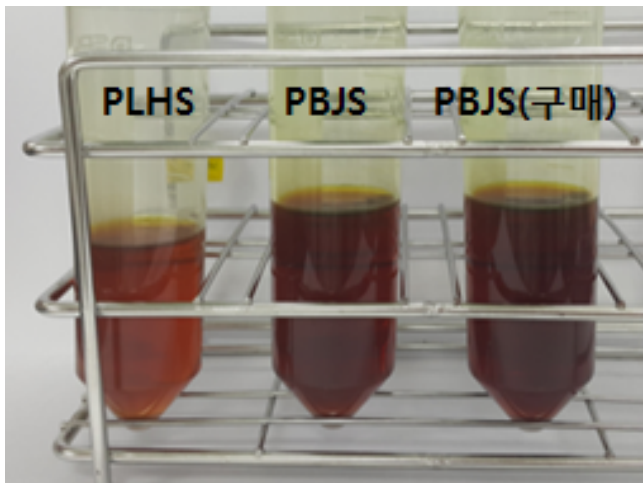
1: 369.0 nm, 4.0 nm

Results

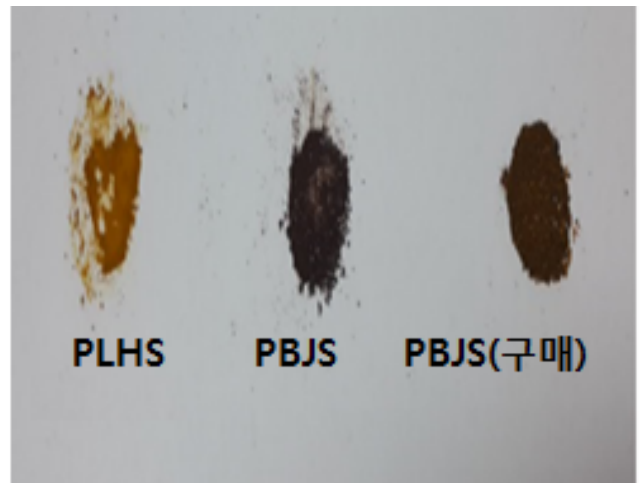
Name	Retention Time	Area	PPM
Hispidin	19.933	4849062	35.850

7. 목질진흙버섯과 장수진흙버섯 자실체 추출물 수율 비교

한경대학교에서 제공받은 상황버섯 즉 목질진흙버섯(*P. linteus*(한경대))과 두 계통의 장수진흙버섯(*P. baumii*(구매)), (*P. baumii*(한경대))를 추출한 후 유효성분을 함유한 추출물의 수율을 비교하였다. 각각의 시료 2 g을 분쇄한 후 60% 에탄올 50 mL에 넣은 뒤 50°C에서 6시간 동안 추출하였다. 추출물을 거름종이를 이용수하여 거른 뒤 감압 농축을 한 후 추출물의 무게를 측정 한 후 비교하였다. *P. linteus*와 두 종의 *P. baumii*를 추출물 및 가루 형태의 색상 비교를 한 결과, *P. linteus*는 노란색의 형태를 보이며, *P. baumii*는 진한 갈색의 형태를 나타내었다. 각 시료의 수율을 비교한 결과, *P. linteus*가 동일 조건에서 추출물의 양이 적은 것을 확인하였다.



추출물의 색형



분말색형

상황버섯 종	수율
<i>P. linteus</i> (PLHS)	73.3 mg
<i>P. baumii</i> (PBJs)	190.4 mg
<i>P. baumii</i> (PLJS, 구매)	225.5 mg

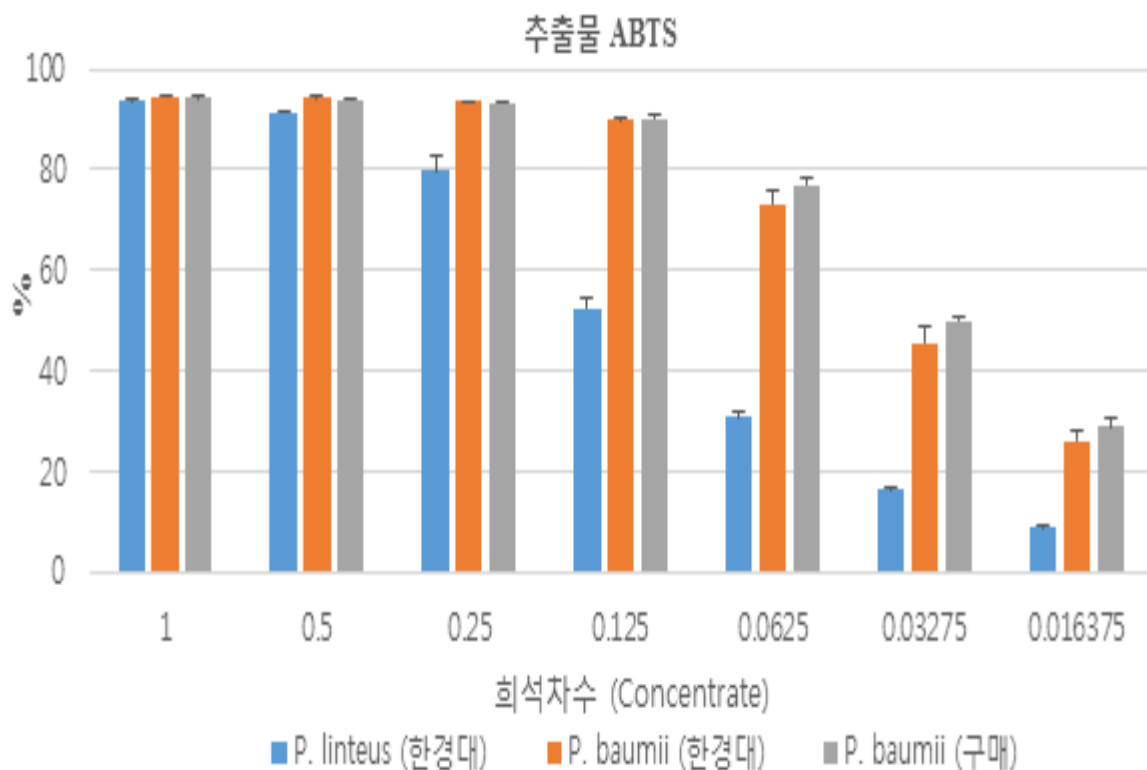
<각 추출물의 수율 비교>

8. 목질진흙버섯과 장수진흙버섯 자실체 추출물의 항산화 활성 비교

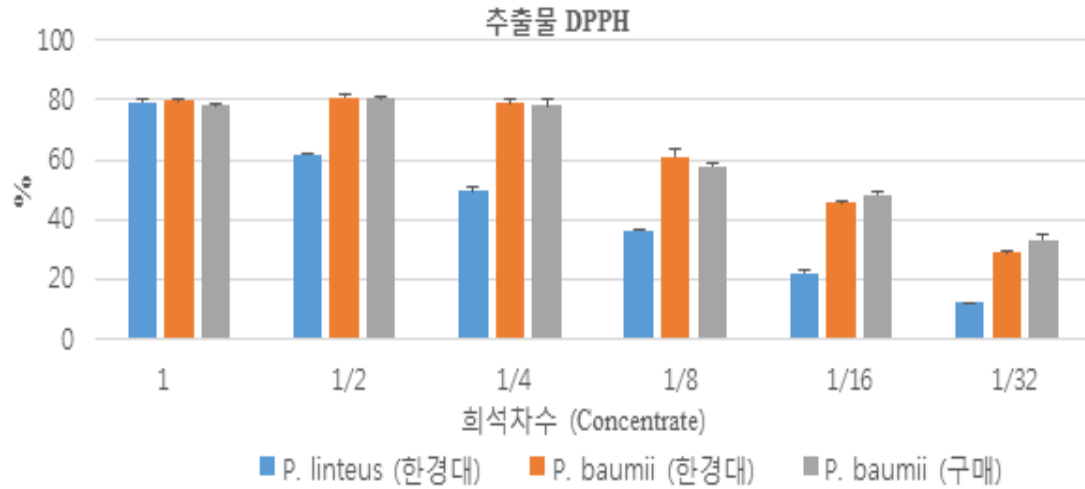
상기 추출조건을 통하여 얻은 추출물을 가지고 항산화 활성(ABTS radical 소거활성, DPPH radical 소거활성), 환원력 측정(Reducing power assay), 총 폴리페놀 함량(Total polyphenol content) 측정을 실시하였다. 항산화 및 환원력 측정을 위한 양성 대조구로 BHA와 Trolox를 사용하였고, 폴리페놀 함량 측정을 위한 양성 대조구로 gallic acid를 사용하였다.

가. 진흙버섯 자실체를 동량의 용매에 추출 후 항산화 활성 비교

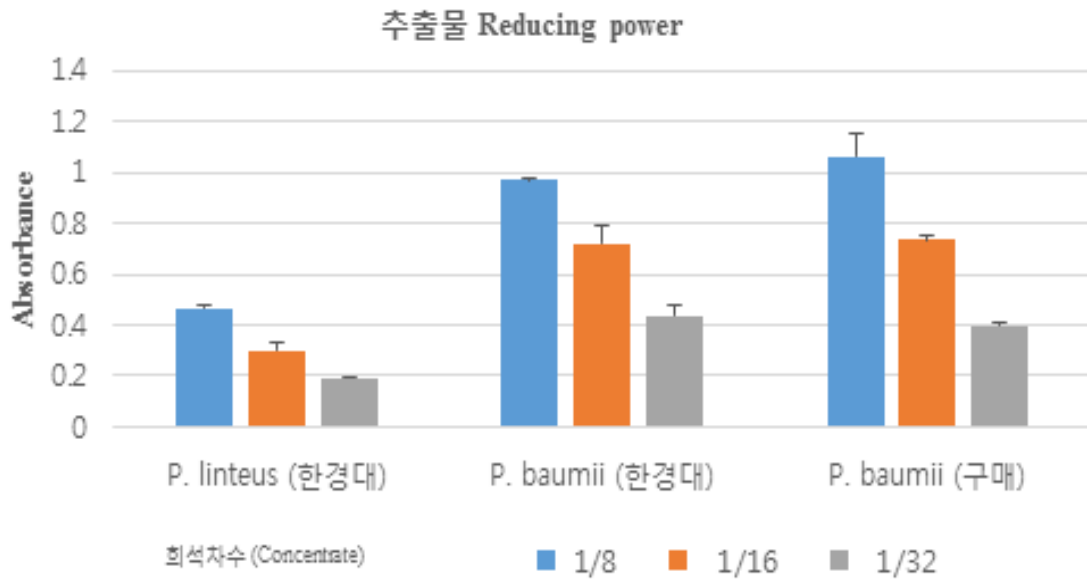
상술한 추출조건으로 확보한 3개의 추출물을 동일한 용매의 양으로 녹여 희석하며 항산화 활성(ABTS radical 소거활성, DPPH radical 소거활성, 환원력 측정, 총 폴리페놀 함량)을 측정하였다. 그 결과 *P. baumii*(한경대), *P. baumii*(구매)가 오차 범위 수준에서 비슷한 항산화 활성을 보이는 것을 확인하였고, 반면에 *P. linteus*(한경대)는 추출물이 희석 될수록 항산화 활성이 *P. baumii*에 비하여 낮게 나타나는 것을 확인하였다.



<추출물 상태에서 ABTS radical 소거활성 결과>

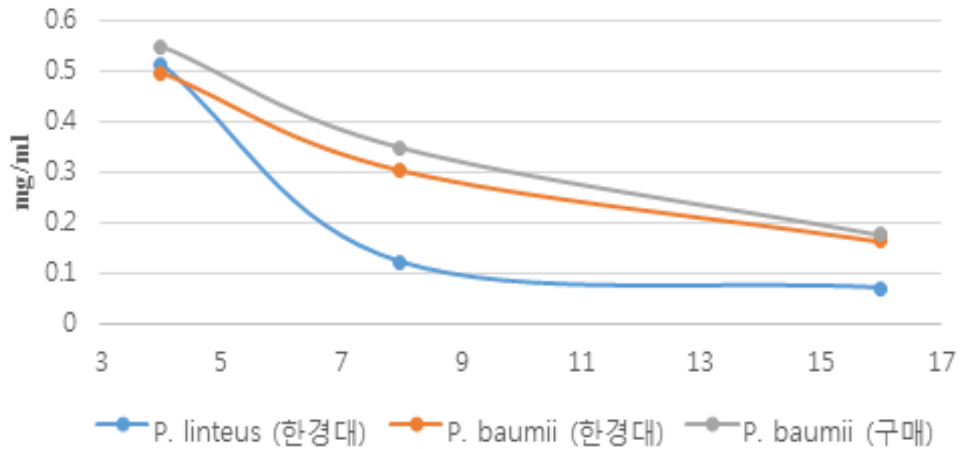


〈추출물 상태에서 DPPH radical 소거활성 결과〉



〈추출물 상태에서 환원력 측정 결과〉

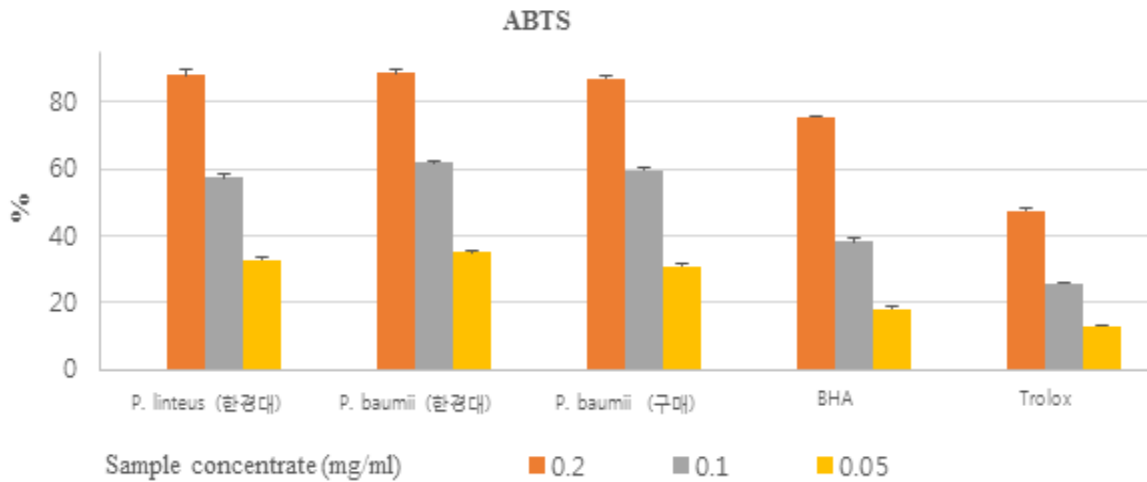
추출물 Total polyphenol contents



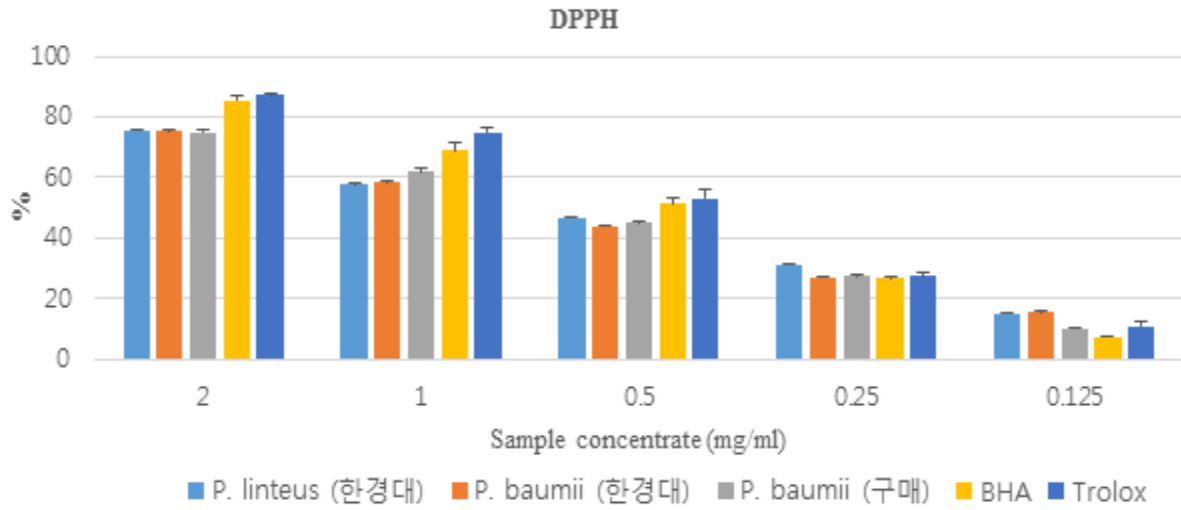
<추출물 상태에서 총 폴리페놀 함량 측정 결과>

나. 진흙버섯 추출물을 동일 농도로 처리하여 항산화 활성 비교

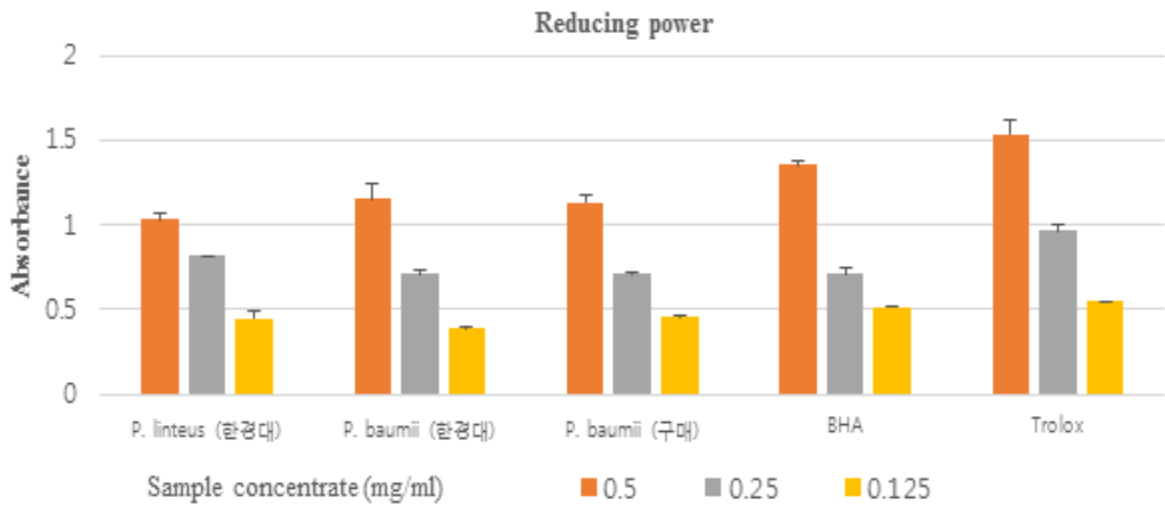
상술한 추출조건으로 확보한 3개의 추출물을 동일한 농도(mg/mL)로 처리한 후, 희석하며 항산화 활성(ABTS radical 소거활성, DPPH radical 소거활성, 환원력 측정, 총 폴리페놀 함량)을 측정하여 비교하였다. *P. baumii*(한경대), *P. baumii*(구매), *P. linteus*(한경대)가 오차 범위 수준에서 유사한 항산화 활성을 나타내는 것을 확인하였다.



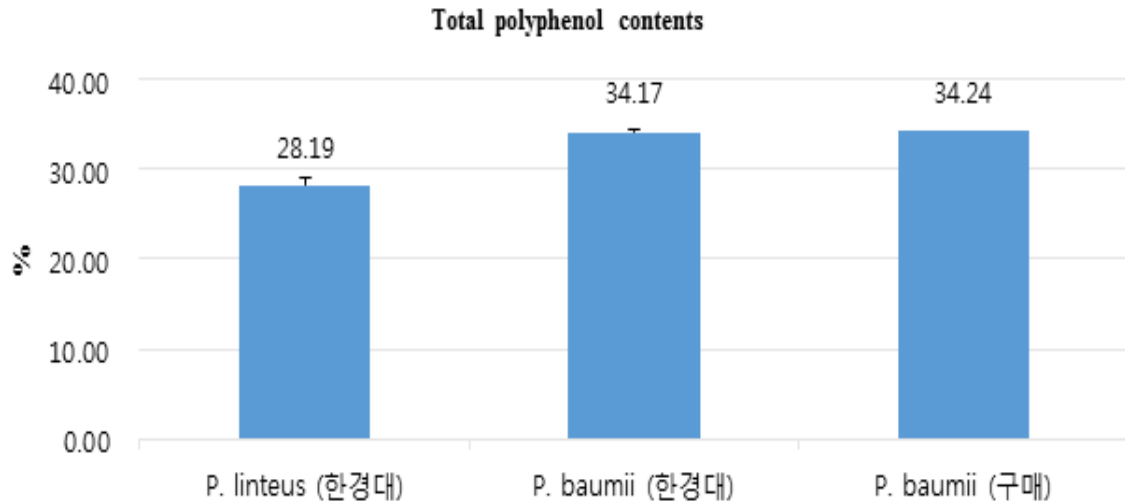
<동일 농도에서 ABTS radical 소거활성 결과>



〈동일 농도에서 DPPH radical 소거활성 결과〉



〈동일농도에서 환원력 측정 결과〉

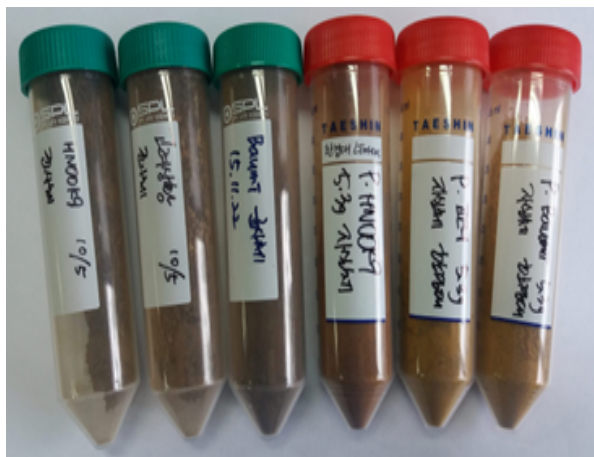


〈동일농도에서 총 폴리페놀 함량 측정 결과〉

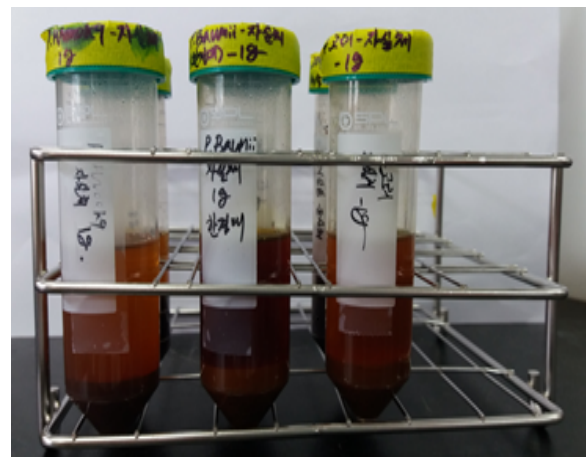
9. 상황버섯 종의 자실체 및 균사체 대사산물 비교 분석

가. 시료의 전처리

한경대학교에서 제공받은 6종의 시료 즉 목질진흙버섯(*P. linteus*(*P. HNOOK9*), 장수진흙버섯 (*P. baumii*), 구매한 고려상황(제품명)의 자실체 및 균사체의 대사산물을 비교하기 위하여 HPLC 분석을 수행하였다. 각각의 시료 1 g을 60% 에탄올 25 mL에 넣은 후 60°C에서 6시간 추출하였다. 추출물은 거름종이를 이용하여 여과한 후 감압농축한 후 10 mL의 물에 녹인 뒤 ethyl acetate로 분획하였다. Ethyl acetate 층을 농축한 후 각 sample을 10 mg/mL의 농도로 맞추는 후 10 μ L를 injection하여 HPLC 분석을 수행하였다. 자실체 추출물의 경우 UV 380 nm에서 검출하였고, 균사체의 경우 UV 250 nm에서 검출하였다.



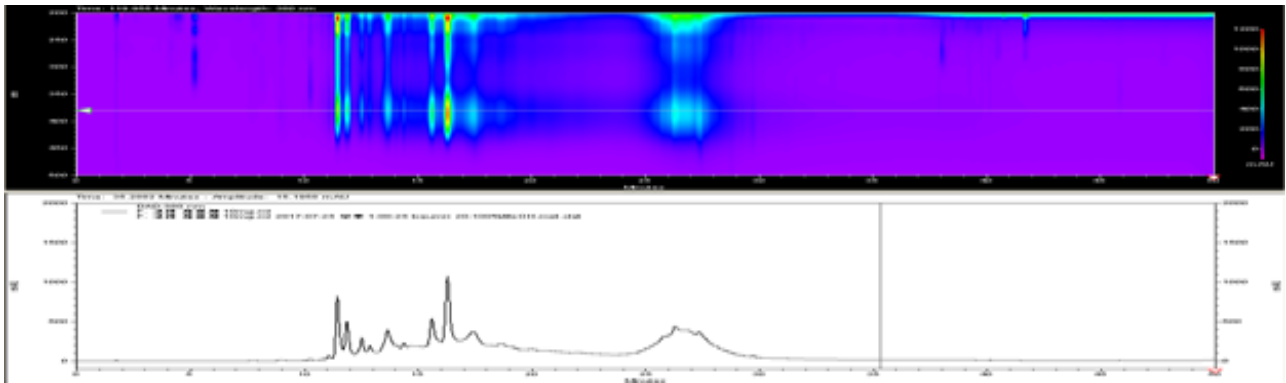
〈자실체 및 균사체 시료〉



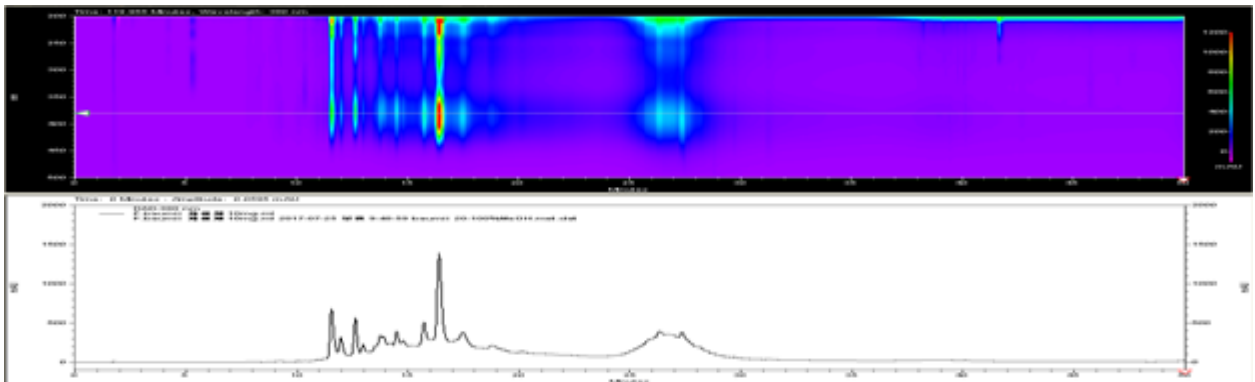
〈대사산물 비교분석을 위한 시료 제조〉

나. 상황버섯 종의 자실체 및 균사체의 HPLC profiles

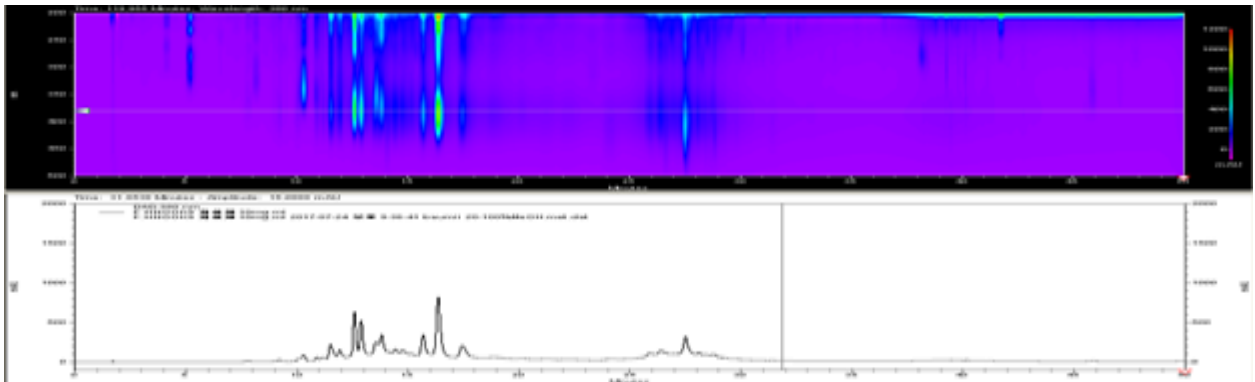
상기의 방법으로 제조한 6개 시료의 추출물을 HPLC로 분석하였다. 그 결과, 한경대에서 개발한 목질진흙버섯인 *P. linteus*(P. HNOOK9), *P. baumii*, 고려상황의 자실체는 균사체에 비하여 다양한 polyphenol 및 metabolite가 존재하는 것이 확인되었다. 또한 자실체와 균사체의 구성성분이 현저히 다른 것으로 나타났다. 따라서 자실체를 구성하는 대사산물의 분석을 수행하였다.



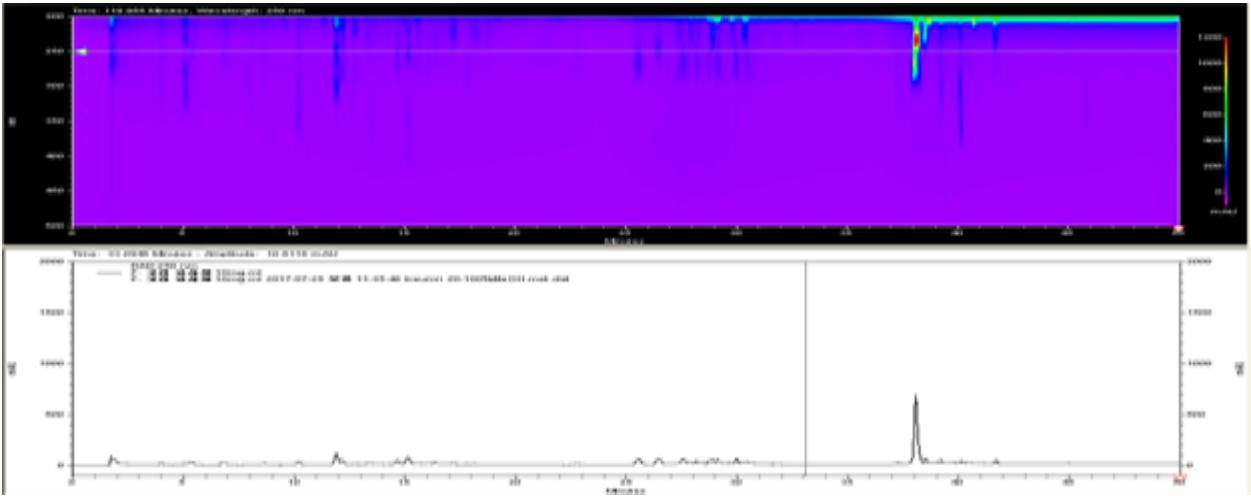
<고려상황 자실체 10 mg/mL>



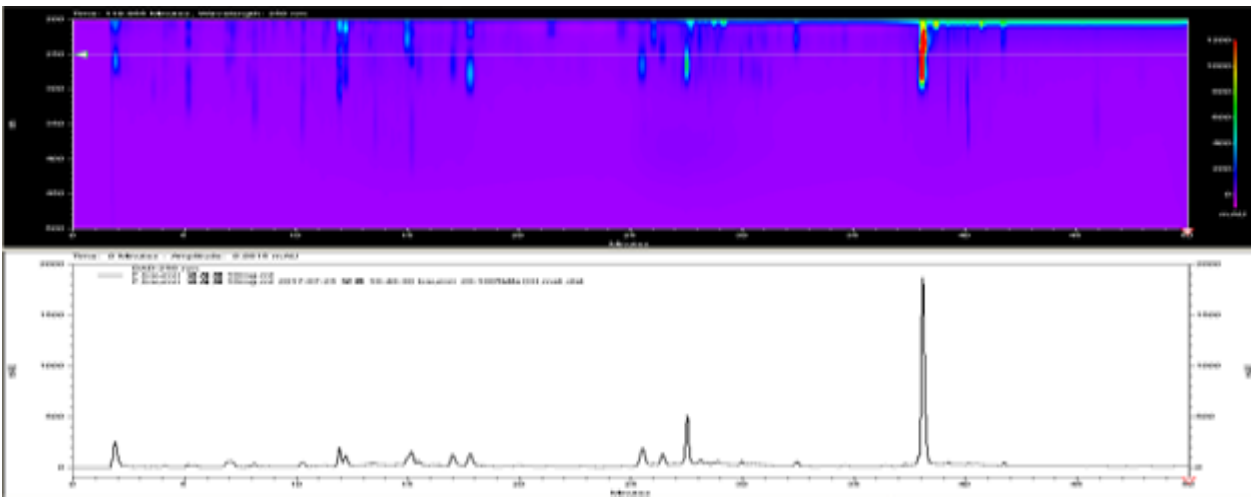
<*P. baumii* 자실체 10 mg/mL>



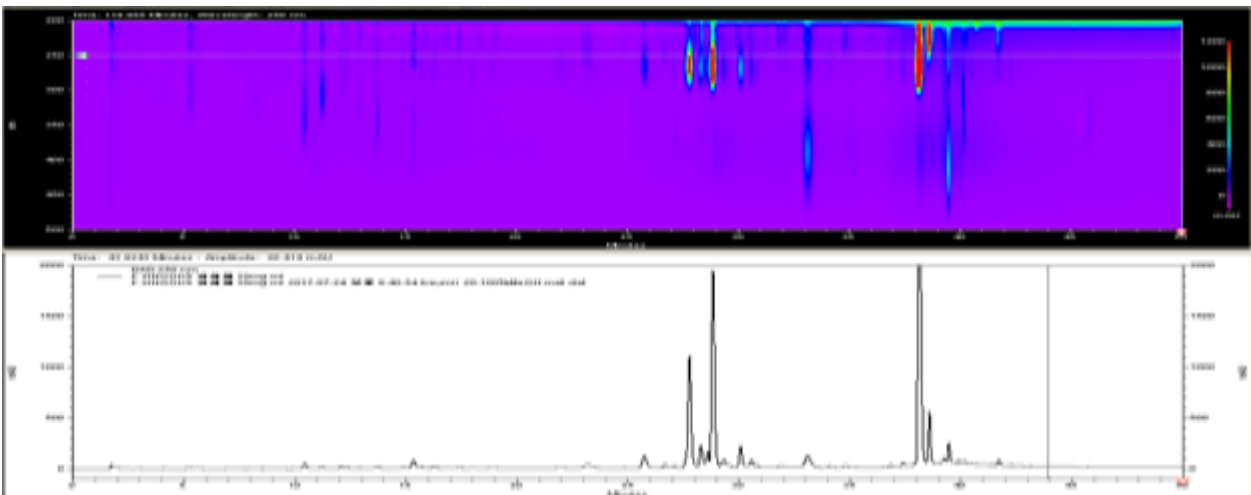
<*P. HNOOK9* 자실체 10 mg/mL>



<고려상황 균사체 10 mg/mL>



<P. baumii 균사체 10 mg/mL>

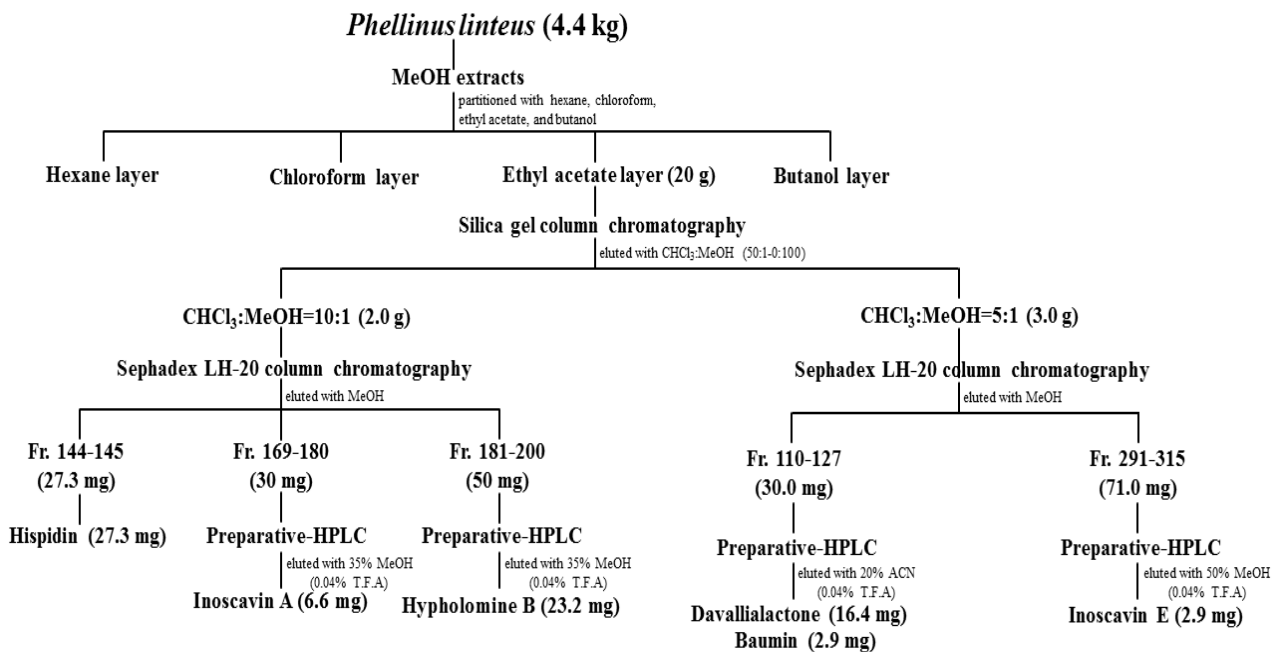


<P. HNOOK9 균사체 10 mg/mL>

10. 목질진흙버섯(한경대 개발) 유래 polyphenol 성분의 분리, 정제 및 구조 분석

가. 목질진흙버섯 유래 polyphenol의 분리 및 정제

한경대에서 제공한 목질진흙버섯 4.4 kg을 마쇄한 후, 메탄올(20 L)에 침지하여 실온에서 24 시간 동안 추출하였다. 또한 2차 추출로 60% 메탄올(20 L)에 침지한 후 열탕기를 이용하여 60°C에서 6시간 동안 추출하였다. 추출물을 합한 후 감압 농축하여 메탄올을 제거하고, 동량의 hexane, chloroform, ethyl acetate, butanol을 넣어 순서대로 각각 용매 분획하였다. 항산화 polyphenol이 함유된 것으로 알려진 ethyl acetate 층을 감압 농축한 후, chloroform : methanol(50:1-0:100, v/v)을 용출용매로 silica gel column chromatography를 수행하였다. 주요 polyphenol 분획인 chloroform : methanol(10:1, v/v) 분획을 농축한 후 Sephadex LH-20 column chromatography를 수행하였다. 그 결과 fraction 144-145에서 hispidin을 확보하였고, fraction 181-200을 농축한 후 35% MeOH(0.04% trifluoroacetic acid)을 이용하여 preparative HPLC를 수행하여 hypholomine B를 확보하였다. 또한, fraction 161-180을 농축한 후 35% MeOH(0.04% trifluoroacetic acid)을 이용하여 preparative HPLC를 수행하여 inoscavin A를 정제하였다. chloroform : methanol(5:1, v/v) 분획을 농축한 후 Sephadex LH-20 column chromatography를 수행하였다. 그 결과 fraction 110-127에서 20% ACN(0.04% trifluoroacetic acid)을 이용하여 preparative HPLC를 수행하여 davallialactone, baumin을 확보하였다. 또한, fraction 291-315에서 50% MeOH(0.04% trifluoroacetic acid)을 이용하여 preparative HPLC를 수행하여 inoscavin E을 확보하였다.



<상황버섯(*P. linteus*) 유래 항산화 polyphenol의 분리 및 정제 과정>

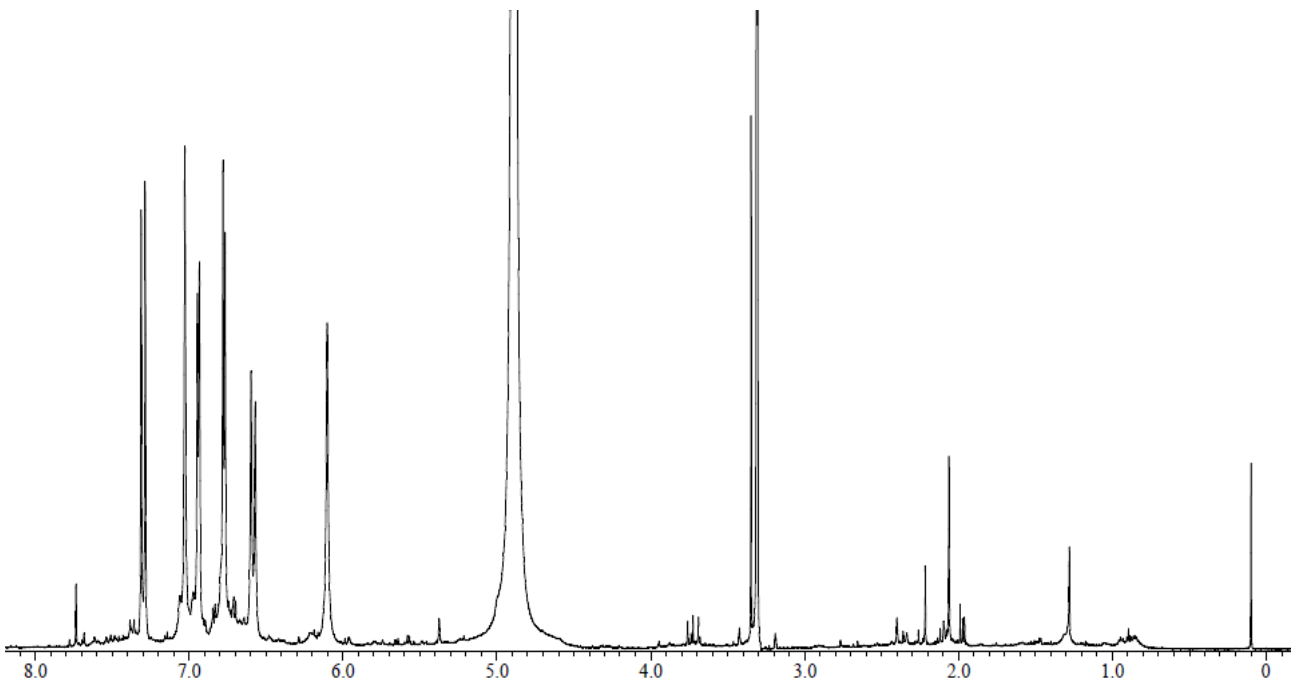
나. 목질진흙버섯 유래 polyphenol의 화학구조 규명

(1) 화합물 hispidin의 화학구조

목질진흙버섯으로부터 화합물 hispidin을 분리하였으며 화학구조 동정은 다음과 같이 수행되었다. 정제한 화합물을 CD₃OD에 녹여 ¹H NMR spectrum을 측정하여 해석하고, ESI-mass 분석을 통하여 화학구조를 확인하였다.⁵

① ¹H NMR spectrum의 측정 및 해석

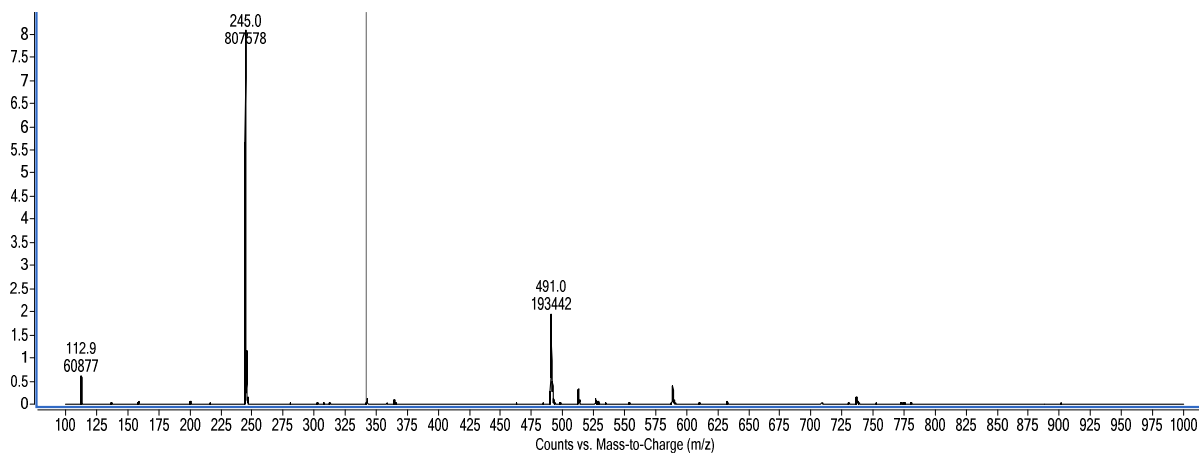
¹H NMR spectrum을 측정한 결과, 7.30, 6.53 ppm에서 trans-1,2-disubstituted double bond가 관찰되었고, 6.10 ppm에서 sp² methine proton, 7.03, 6.94, 6.77 ppm에서 1,2,4-trisubstituted benzene protons이 관찰되었다. 이를 바탕으로 문헌검색을 수행한 결과 진흙버섯 유래의 화합물 hispidin과 잘 일치하였다.



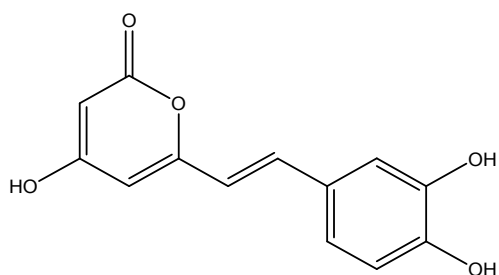
<정제한 화합물(hispidin)의 ¹H NMR spectrum>

② Mass spectrum의 측정 및 해석

¹H NMR spectrum을 측정한 결과 hispidin으로 추정되어 이를 확인하기 위하여 ESI-mass spectrum을 측정하였다. negative mode에서 측정한 결과, m/z 245에서 [M-H]⁻ peak가 관찰되었다. 이 같은 결과로부터 본 화합물은 분자량 246, 분자식 C₁₃H₁₀O₅의 hispidin으로 동정되었으며 구조는 아래의 그림과 같다.



<정제한 화합물(hispidin)의 ESI-mass spectrum>



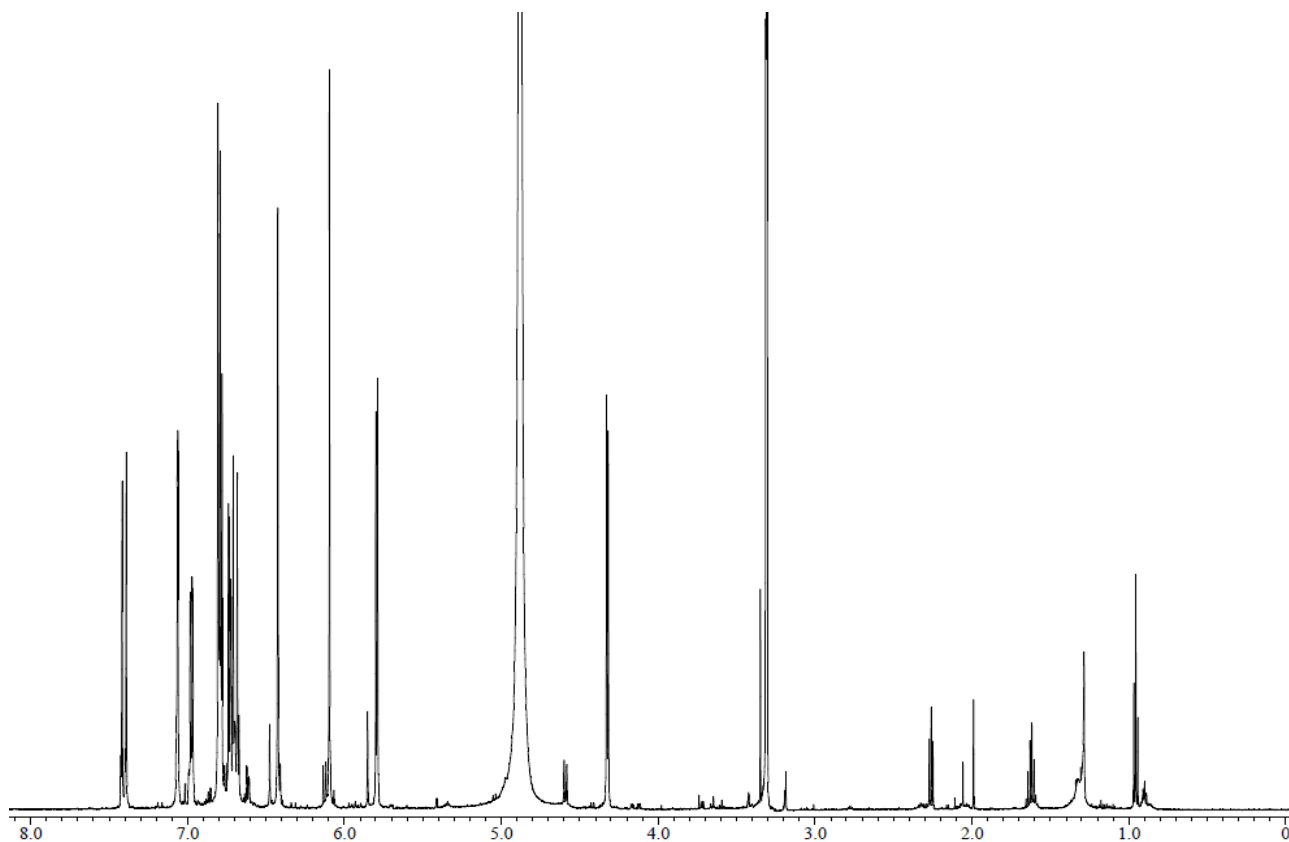
<Hispidin의 화학구조>

(2) 화합물 hypholomine B의 화학구조

목질진흙버섯으로부터 화합물 hypholomine B를 분리하였으며 화학구조 동정은 다음과 같이 수행되었다. 정제한 화합물을 CD₃OD에 녹여 ¹H NMR spectrum을 측정하여 해석하고, ESI-mass 분석을 통하여 화학구조를 확인하였다.⁶

① ¹H NMR spectrum의 측정 및 해석

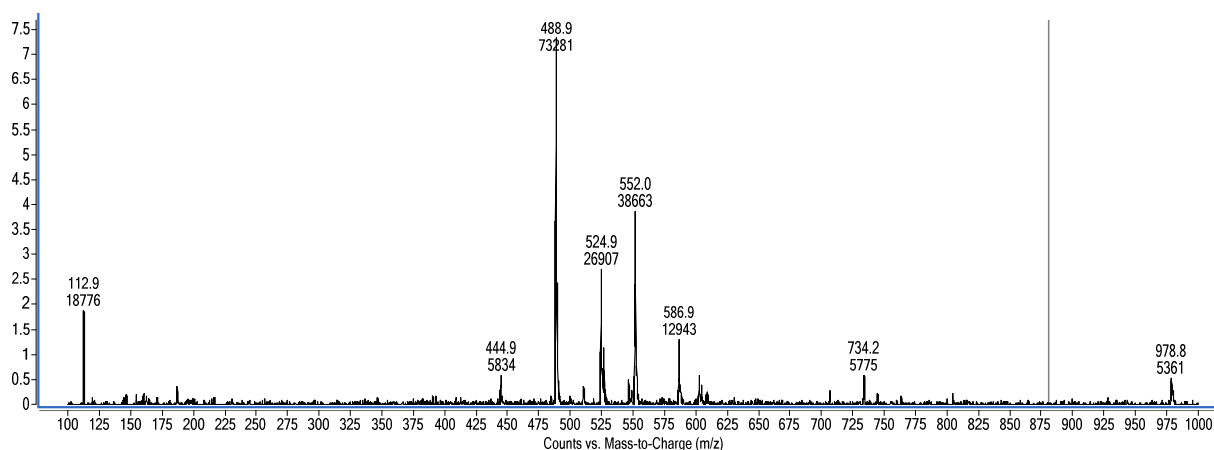
¹H NMR spectrum을 측정한 결과, 7.05, 6.97, 6.78, 6.80, 6.72, 6.79 ppm에서 2개의 1,2,4-trisubstituted benzene에 유래하는 protons이 관찰되었고, 7.38, 6.67 ppm에서 trans-1,2-disubstituted double bond에 유래하는 protons, 5.77, 4.30 ppm에서 sp³ methine proton, 6.40, 6.08 ppm에서 sp² methine protons이 관찰되었다. 이를 바탕으로 문헌검색을 수행한 결과 진흙버섯 유래의 화합물 hypholomine B와 잘 일치하였다.



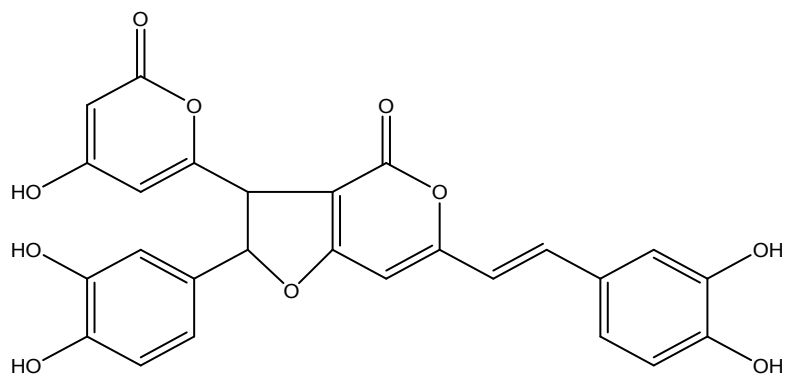
<정제한 화합물(hypholomine B)의 ^1H NMR spectrum>

② Mass spectrum의 측정 및 해석

^1H NMR spectrum을 측정한 결과 hypholomine B로 추정되어 이를 확인하기 위하여 ESI-mass spectrum을 측정하였다. Negative mode에서 측정한 결과, m/z 488.9에서 $[\text{M}-\text{H}]^-$ peak가 관찰되었다. 이 같은 결과로부터 본 화합물은 분자량 490, 분자식 $\text{C}_{26}\text{H}_{18}\text{O}_{10}$ 의 hypholomine B로 동정되었으며 구조는 아래의 그림과 같다.



<정제한 화합물(hypholomine B)의 ESI-mass spectrum>



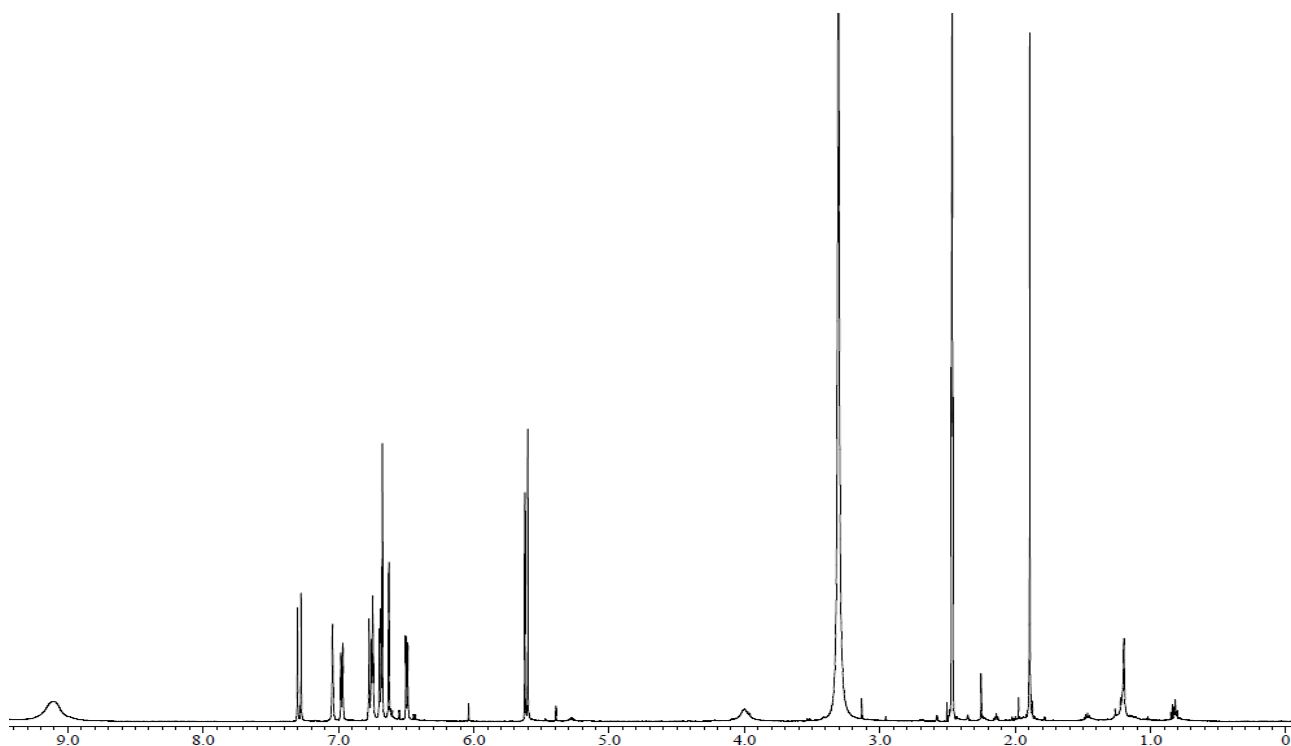
<Hypholomine B의 화학구조>

(3) 화합물 inoscavin A의 화학구조

목질진흙버섯으로부터 화합물 inoscavin A를 분리하였으며 화학구조 동정은 다음과 같이 수행되었다. 정제한 화합물을 DMSO- d_6 에 녹여 ^1H NMR spectrum을 측정하여 해석하고, ESI-mass 분석을 통하여 화학구조를 확인하였다.⁷

① ^1H NMR spectrum의 측정 및 해석

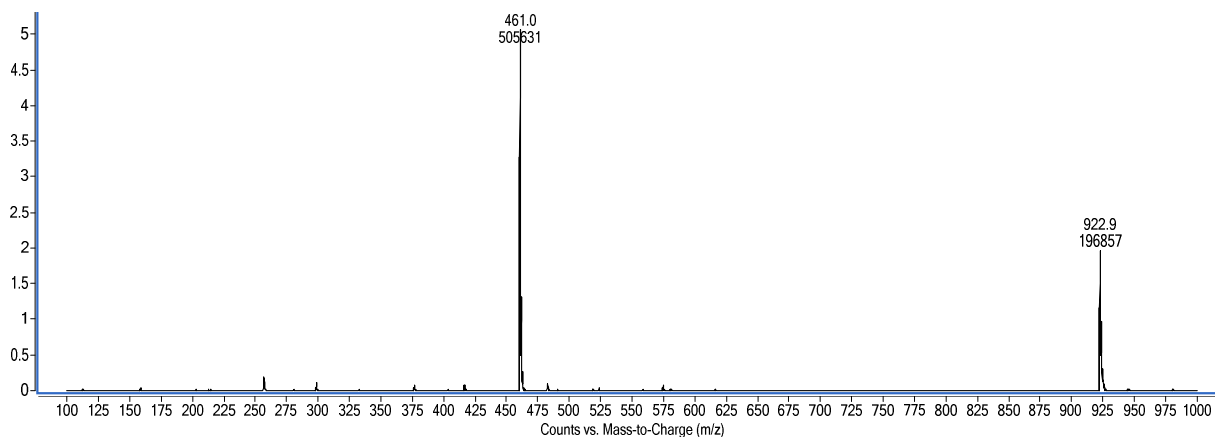
^1H NMR spectrum을 측정한 결과, 7.28, 6.49 ppm에서 trans-1,2-disubstituted double bond에 유래하는 protons, 6.98, 6.76, 6.74, 6.68, 6.67, 6.68 ppm에서 2개의1,2,4-trisubstituted benzene에 유래하는 protons, 5.61 ppm에서 methine proton, 1.89 ppm에서 methyl proton이 관찰되었다. 이를 바탕으로 문헌검색을 수행한 결과 진흙버섯 유래의 화합물 inoscavin A와 잘 일치하였다.



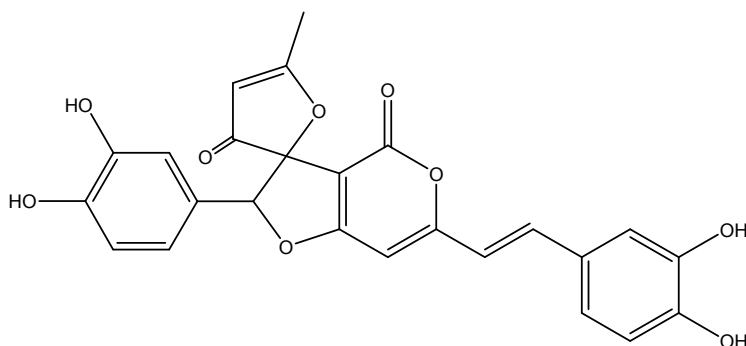
<정제한 화합물(inoscavin A)의 ^1H NMR spectrum>

② Mass spectrum의 측정 및 해석

^1H NMR spectrum을 측정한 결과 inoscavin A로 추정되어 이를 확인하기 위하여 ESI-mass spectrum을 측정하였다. Negative mode에서 측정한 결과, m/z 461.0에서 $[\text{M}-\text{H}]^-$ peak가 관찰되었다. 이 같은 결과로부터 본 화합물은 분자량 462, 분자식 $\text{C}_{26}\text{H}_{18}\text{O}_{10}$ 의 inoscavin A로 동정되었으며 구조는 아래의 그림과 같다.



<정제한 화합물(inoscavin A)의 ESI-mass spectrum>



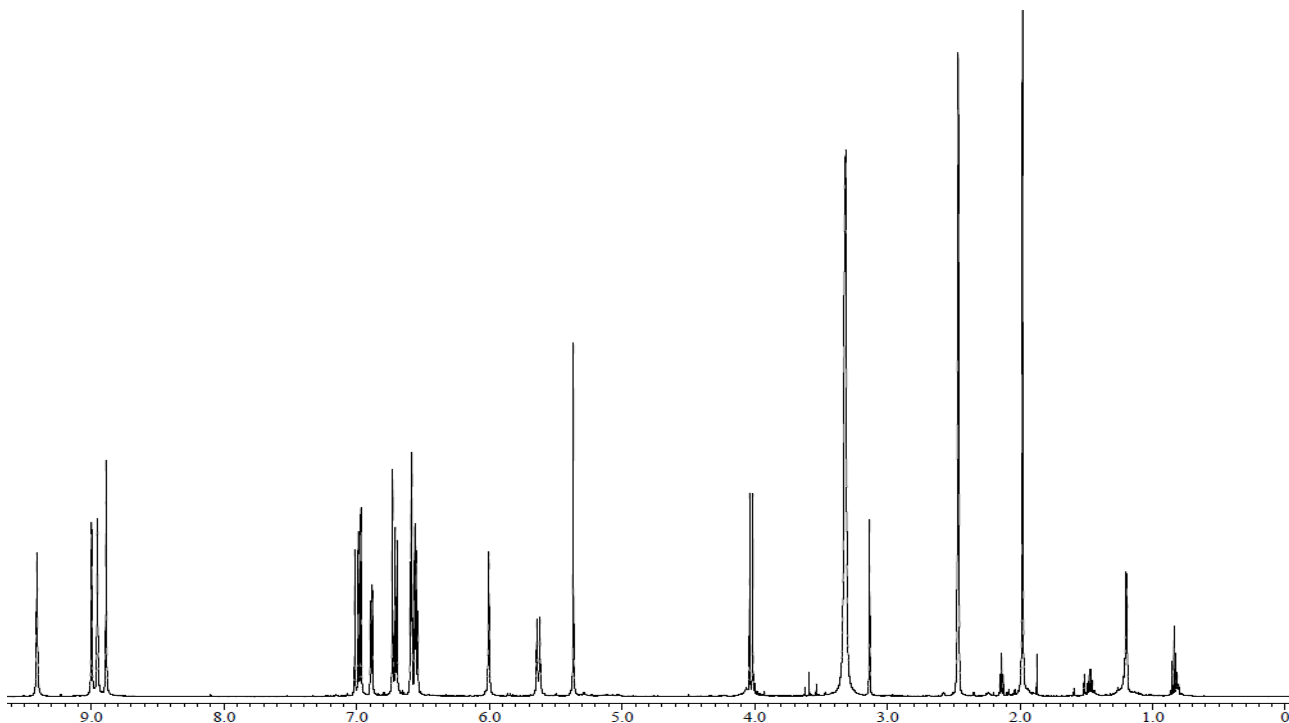
<Inoscavin A의 화학구조>

(4) 화합물 davallialactone의 화학구조

목질진흙버섯으로부터 화합물 davallialactone를 분리하였으며 화학구조 동정은 다음과 같이 수행되었다. 정제한 화합물을 $\text{DMSO}-d_6$ 에 녹여 ^1H NMR spectrum을 측정하여 해석하고, ESI-mass 분석을 통하여 화학구조를 확인하였다.⁸

① ^1H NMR spectrum의 측정 및 해석

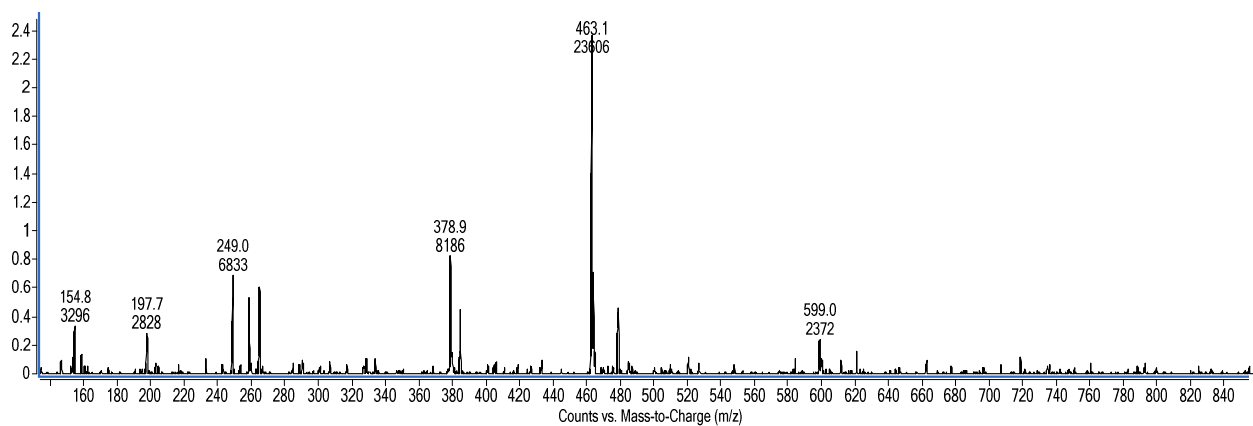
^1H NMR spectrum을 측정한 결과, 9.44, 9.03, 8.98, 8.92 ppm에서 hydroxyl group에 유래하는 protons, 7.00, 6.92, 6.76, 6.73, 6.62, 6.58 ppm에서 2개의 1,2,4-trisubstituted benzene에 유래하는 protons, 7.03, 6.61 ppm에서 trans-1,2-disubstituted double bond에 유래하는 protons, 6.03, 5.40 ppm에서 2개의 double bond에 유래하는 protons, 5.66, 4.06 ppm에서 2개의 methine에 유래하는 protons, 2.01 ppm에서 methyl proton을 관찰되었다. 이를 바탕으로 문헌검색을 수행한 결과, 진흙버섯 유래의 화합물 davallialactone과 잘 일치하였다.



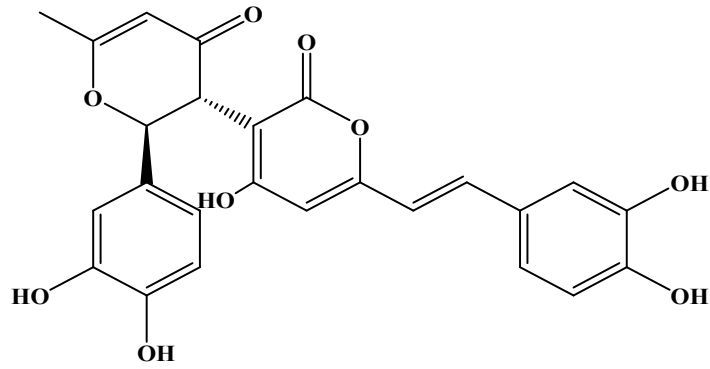
<정제한 화합물(davallialactone)의 ^1H NMR spectrum>

② Mass spectrum의 측정 및 해석

^1H NMR spectrum을 측정한 결과 davallialactone로 추정되어 이를 확인하기 위하여 ESI-mass spectrum을 측정하였다. Negative mode에서 측정한 결과, m/z 463.1에서 $[\text{M}-\text{H}]^-$ peak가 관찰되었다. 이 같은 결과로부터 본 화합물은 분자량 464, 분자식 $\text{C}_{25}\text{H}_{20}\text{O}_9$ 의 davallialactone으로 동정되었으며 구조는 아래의 그림과 같다.



<정제한 화합물(davallialactone)의 ESI-mass spectrum>



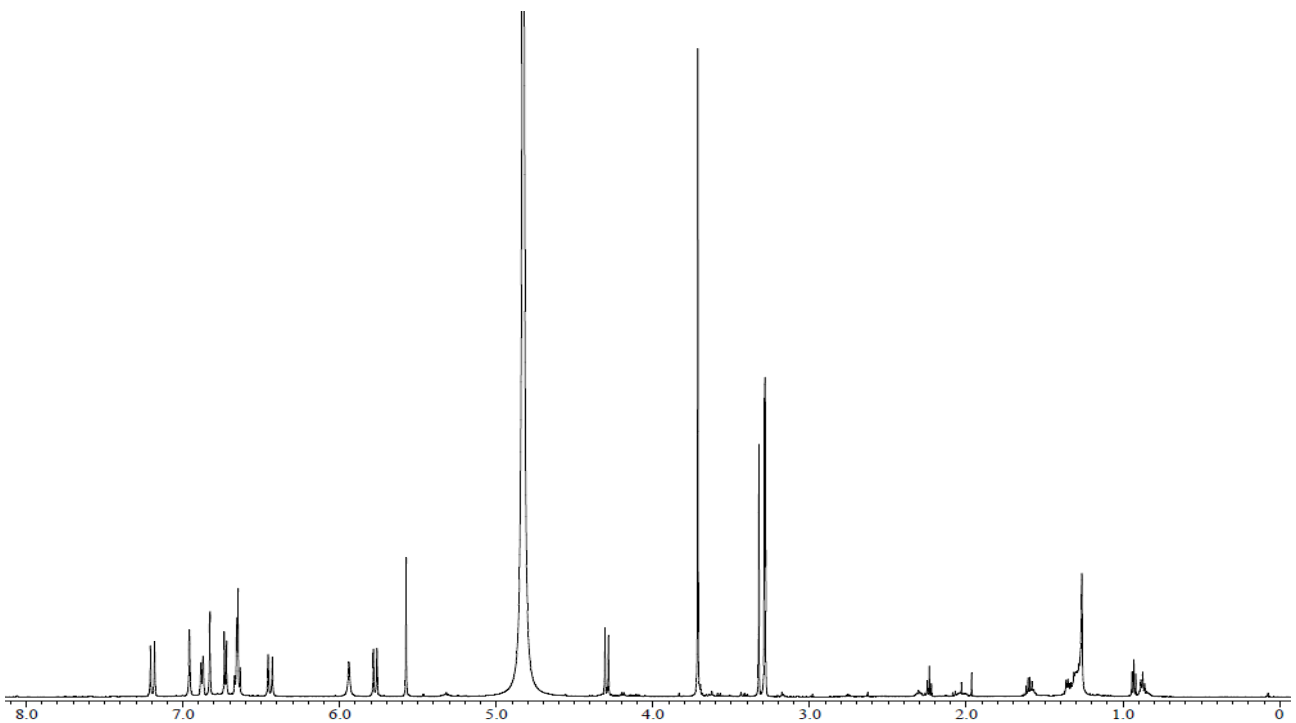
<davallialactone의 화학구조>

(5) 화합물 baumin의 화학구조

목질진흙버섯으로부터 화합물 baumin을 분리하였으며 화학구조 동정은 다음과 같이 수행되었다. 정제한 화합물을 CD₃OD에 녹여 ¹H NMR spectrum을 측정하여 해석하고, ESI-mass 분석을 통하여 화학구조를 확인하였다.⁹

① ¹H NMR spectrum의 측정 및 해석

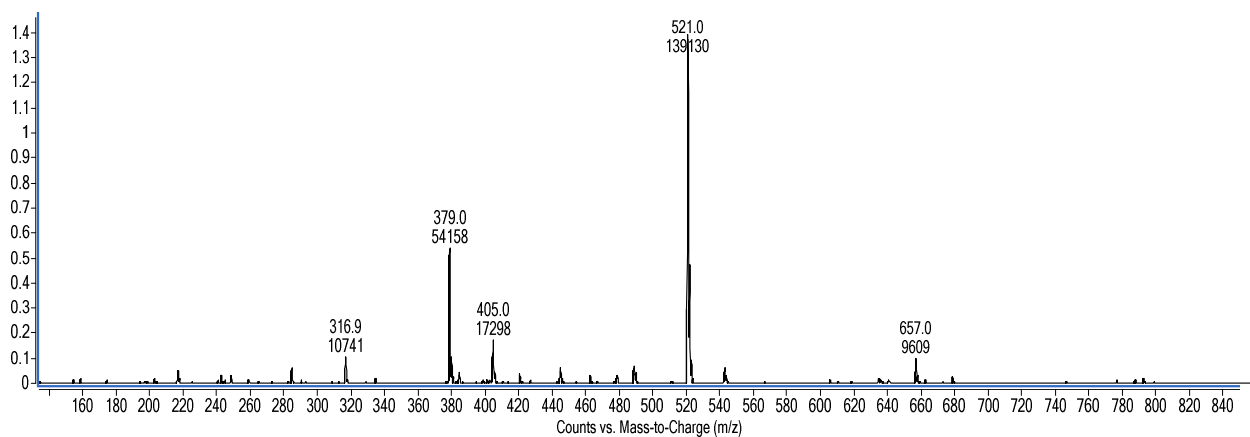
¹H NMR spectrum을 측정한 결과, 6.98, 6.89, 6.85, 6.75, 6.68, 6.66 ppm에서 2개의 1,2,4-trisubstituted benzene에 유래하는 protons, 7.21, 6.48 ppm에서 trans-1,2-disubstituted double bond에 유래하는 protons, 5.96, 5.60 ppm에서 2개의 double bond에 유래하는 protons, 5.79, 4.32 ppm에서 2개의 methine에 유래하는 protons, 3.73 ppm에서 methyl proton을 관찰되었다. 이를 바탕으로 문헌검색을 수행한 결과, 진흙버섯 유래의 화합물 baumin과 잘 일치하였다.



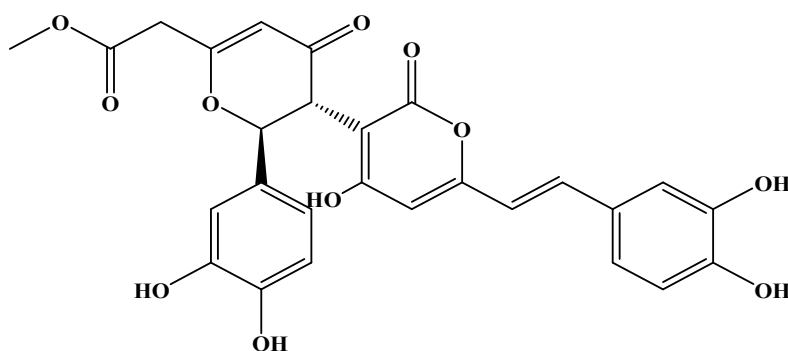
<정제한 화합물 (baumin)의 ¹H NMR spectrum>

② Mass spectrum의 측정 및 해석

^1H NMR spectrum을 측정한 결과 baumin로 추정되어 이를 확인하기 위하여 ESI-mass spectrum을 측정하였다. Negative mode에서 측정한 결과, m/z 521.0에서 $[\text{M}-\text{H}]^-$ peak가 관찰되었다. 이 같은 결과로부터 본 화합물은 분자량 521, 분자식 $\text{C}_{27}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$ 의 baumin으로 동정되었으며 구조는 아래의 그림과 같다.



<정제한 화합물(baumin)의 ESI-mass spectrum>



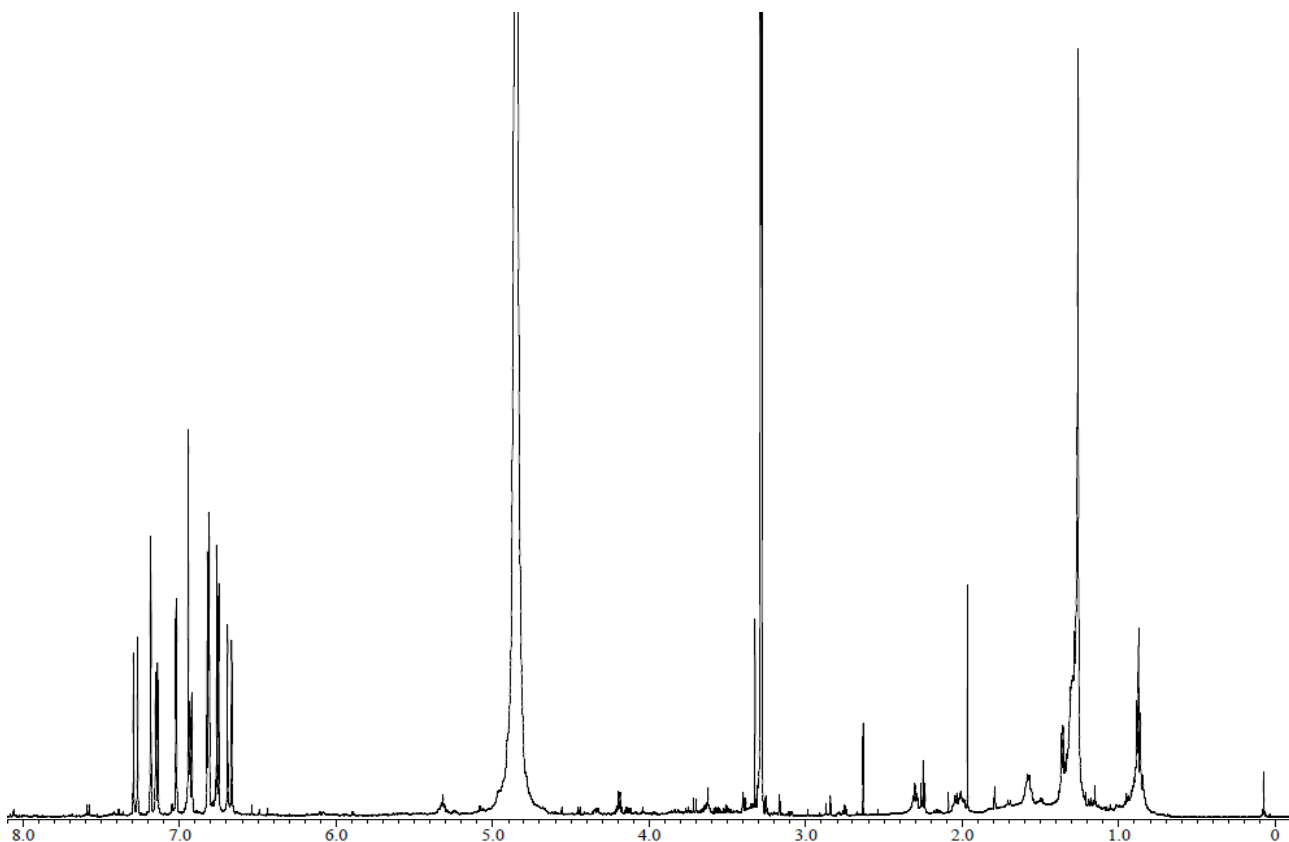
<baumin의 화학구조>

(6) 화합물 inoscavin E의 화학구조

목질진흙버섯으로부터 화합물 inoscavin E를 분리하였으며 화학구조 동정은 다음과 같이 수행되었다. 정제한 화합물을 CD_3OD 에 녹여 ^1H NMR spectrum을 측정하여 해석하고, ESI-mass 분석을 통하여 화학구조를 확인하였다.¹⁰

① ^1H NMR spectrum의 측정 및 해석

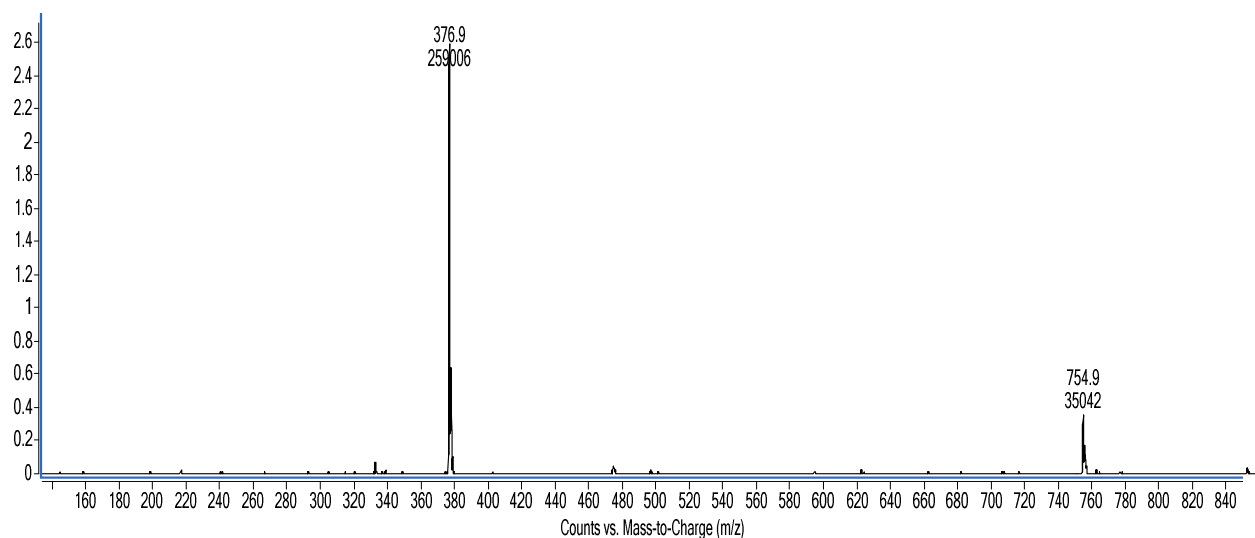
^1H NMR spectrum을 측정한 결과, 7.20, 7.16, 7.04, 6.95, 6.83, 6.77 ppm에서 2개의 1,2,4-trisubstituted benzene에 유래하는 protons, 7.30, 6.70 ppm에서 trans-1,2-disubstituted double bond에 유래하는 protons, 6.96, 6.83 ppm에서 2개의 double bond에 유래하는 protons을 관찰되었다. 이를 바탕으로 문헌검색을 수행한 결과, 진흙버섯 유래의 화합물 inoscavin E와 잘 일치하였다.



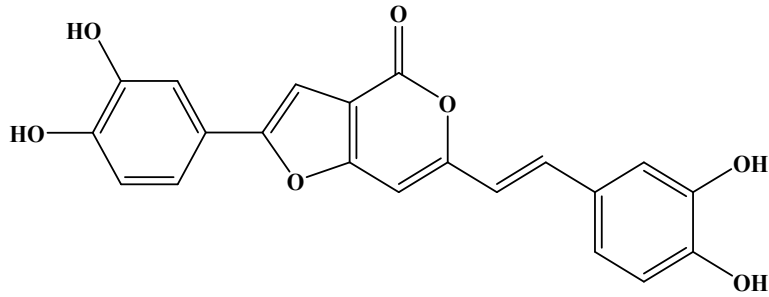
<정제한 화합물 (inoscavin E)의 ^1H NMR spectrum>

② Mass spectrum의 측정 및 해석

^1H NMR spectrum을 측정한 결과 inoscavin E로 추정되어 이를 확인하기 위하여 ESI-mass spectrum을 측정하였다. Negative mode에서 측정한 결과, m/z 376.9 에서 $[\text{M}-\text{H}]^-$ peak가 관찰되었다. 이 같은 결과로부터 본 화합물은 분자량 378, 분자식 $\text{C}_{21}\text{H}_{14}\text{O}_7$ 의 inoscavin E으로 동정되었으며 구조는 아래의 그림과 같다.



<정제한 화합물(inoscavin E)의 ESI-mass spectrum>

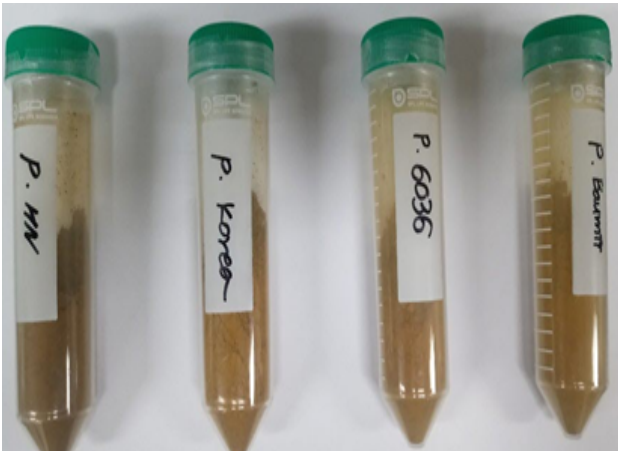


<inoscavin E의 화학구조>

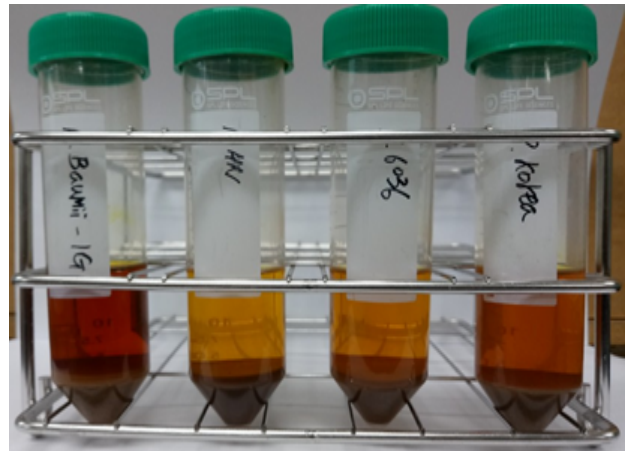
11. 상황버섯 종의 자실체 추출물 비교

가. 상황버섯 종의 추출물 수율 비교

한경대학교에서 제공받은 목질진흠버섯 (한경대)과 3 개의 샘플 (*P. HN*, *P. Korea*, *P. 6036*)을 동일 조건에서 추출하여 수율을 비교하였다. 각각의 시료 1 g을 분쇄한 후 메탄올 20 mL에 넣은 뒤 60°C에서 30분 동안 추출하였다. 각각의 추출물에서 500 uL 농축 후 무게를 확인하였다. 각 시료의 수율을 비교한 결과, *P. baumii*가 동일 조건에서 추출물의 양이 가장 많은 것으로 확인 하였고 *P. HN*, *P. Korea*, *P. 6036*은 서로 비슷한 수준의 양을 갖는 것으로 확인하였다.



<자실체 시료 비교>



<분석을 위한 시료제조>

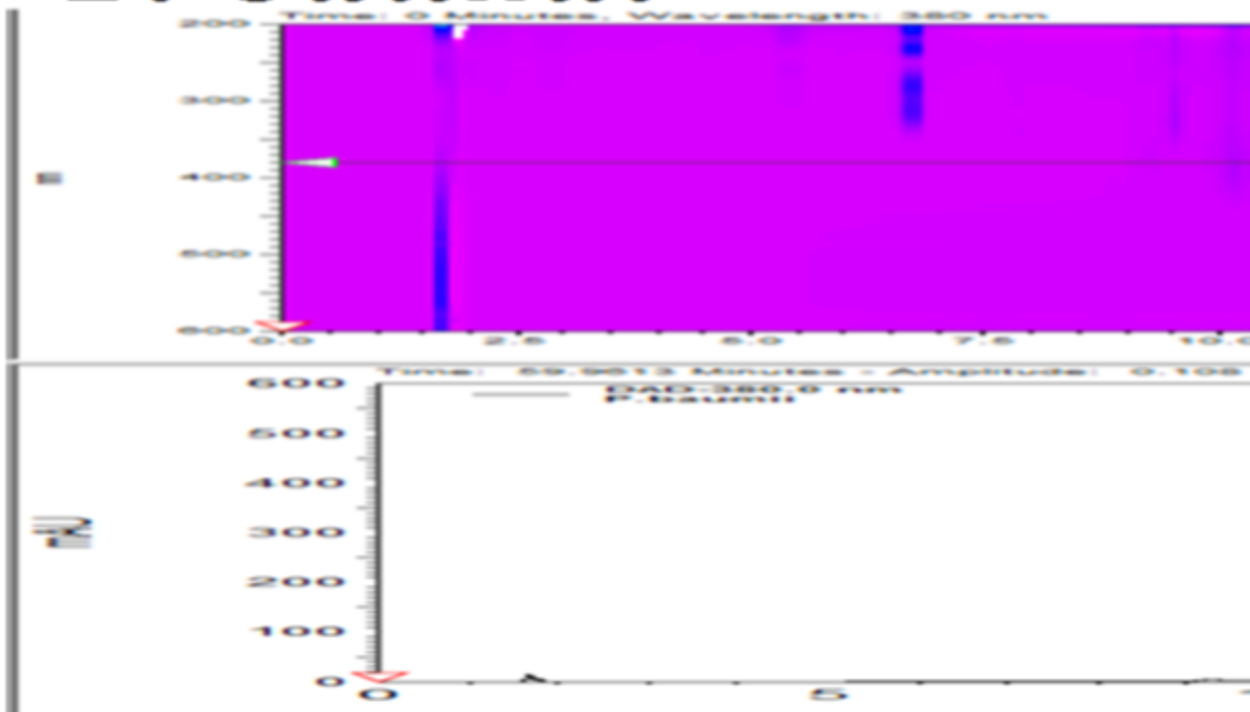
상황버섯 종	수율
PBJS	2.5 mg
PLHS	0.9 mg
PLKS	0.9 mg
PL6036	0.9 mg

<각 추출물의 수율 비교>

나. 상항버섯 종 추출물의 HPLC profiles

한경대학교에서 제공받은 4종의 시료 즉 장수진흙버섯(*P. baumii*), *P. HN*, *P. korea*, *P. 6036*의 HPLC 분석을 수행하였다. 각각의 시료 1 g을 메탄올 20 mL에 넣은 후 60°C에서 30분간 추출하였다. 추출물을 centrifuge를 통하여 시료의 전처리를 수행하였다. sample을 10 uL을 injection하여 HPLC 분석을 수행하였다. 각각의 추출물의 경우 UV 380 nm에서 검출하였다. 4개의 분석시료에서 다양한 polyphenol 및 metabolites가 존재하는 것이 확인되었다. *P. baumii*에서 *P. HN*, *P. korea*, *P. 6036*과 비슷한 HPLC profiles을 확인하였다. davallialactone, hispidin, hypholomine B의 peaks을 확인하였고 *P. baumii*는 *P. HN*, *P. korea*, *P. 6036*와 비교한 결과, 추출물 내 폴리페놀 함량이 더 높은 것으로 확인되었다.

P. baumii



12. hispidin의 밸리데이션

밸리데이션이란 분석을 하기 위해 필요한 상세히 기술된 일련의 시험 과정을 말한다. 확인시험, 순도시험, 정량시험 등에 사용된 분석대상물질, 검체, 표준품, 분석 장비의 사용, 검량선 작성, 계산식의 이용 등을 포함한다.

가. 시료의 전처리

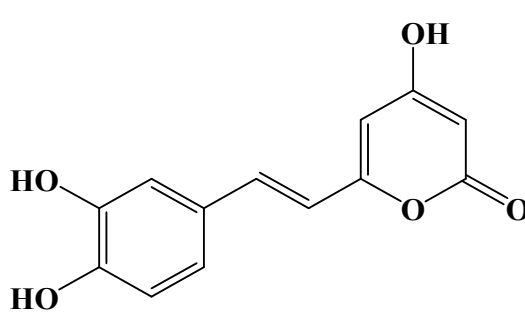
한경대학교에서 제공받은 목질진흙버섯(30.85 g)을 믹서기로 간 후, sample 1 g (3개)로 나누었고 각각의 시료를 20 mL, 60°C, 30 분 동안 추출하였다. 목질진흙버섯 자실체로부터 분리·정제를 통하여 확보한 면역활성성분인 hispidin의 밸리데이션 수행하였다. hispidin의 전처리는 9.5 mg을 50% MeOH 10 mL에 녹인 후, 50% MeOH로 희석하여 95 ppm, 47.5 ppm, 23.75 ppm, 11.875 ppm, 5.9375 ppm을 조제하여 분석하였다.

나. hispidin 의 정량분석

(1) 개요

① 분석시료
: 복합물

② 기능/지표물질

성분명	hispidin 
CAS Number	555-55-5
Other name	6-(3,4-dihydroxystyryl)-4-hydroxy-2-pyrone
Molecular formula	C ₁₃ H ₁₀ O ₅
Molecular weight	246.2

(2) 시험법 검증

복합물 중 hispidin의 함량을 확인하기 위하여 분석법의 유효성을 검증하였다(표 1).

표 1. 복합물 중 hispidin 분석법의 유효성 검증(요약)

항 목	평가 방법	○ 설정 값
특이성 (Specificity)	HPLC 분석 시 검출시간 (Retention time), spectrum, peak purity 검토	○ 검출시간 : 약 20.1 분대 ○ spectrum : λ_{max} 약 369 nm 표준용액과 시험용액 일치 ○ peak purity : 시험용액 중 hispidin peak가 5 points일치, 단일물질로 확인됨
직선성 (Linearity)	표준물질에 대한 5개 농도 에서 직선성 확인	○ 5.9375~95.0 ug/mL의 농도에서 확인 ○ R^2 : 0.9996
검출한계	$3.3^* \sigma / S$ (σ : y절편 표준편차, S:기 울기)	○ 검출한계 : 0.078 ppm
정량한계	$10^* \sigma / S$	○ 정량한계 : 0.239 ppm

① 분석방법

분석 장비 (HPLC system)

- HITACHI Chromaster, HITACHI , Japan
- Pump 5110, Autosampler 5210,
- Column Oven 5310, PDA Detector 5430

분석 시약

- Hispidin : 93.7%
- Acetonitrile : J.T.Baker, 4 L, 9012-03
- Trifluoroacetic acid(TFA): ACROS, 139721000

표준용액의 조제

표준물질 hispidin 9.5 mg을 정밀히 달아 50% methanol 10 mL 에 녹인 후 50% methanol로 희석하여 표준용액으로 사용하였다.

hispidin		STD 1	STD 2	STD 3	STD 4	STD 5
ppm		5.9375	11.875	23.75	47.5	95
표준용액 제조	STD 1	STD 2를 2배 희석				
	STD 2	STD 3을 2배 희석				
	STD 3	STD 4를 2배 희석				
	STD 4	STD 5를 2배 희석				
	STD 5	9.5 mg / 10 ml (95 ppm)				
표준품		hispidin, 93.7%				

시험용액의 조제

제공받은 복합물 분말 약 1 g에 50% methanol 수용액 20 mL을 넣고 30분간 60°C로 추출 하였다. 3 반복용 시험용액을 조제하였다.

분석조건

- Instrument: HPLC system
- Detector: UV detector DAD(369 nm)
- Column: TSK-gel 100V(4.6 mm×250 mm, 5 μm), TOSOH, Japan
- Column Oven: 25°C
- Injection vol.: 10 μL
- Flow rate: 1.0 mL/min
- Mobile phase: A, acetonitrile, B, 3rd D.W(0.04% TFA)

min	A(%)	B(%)
0	17	83
23	17	83

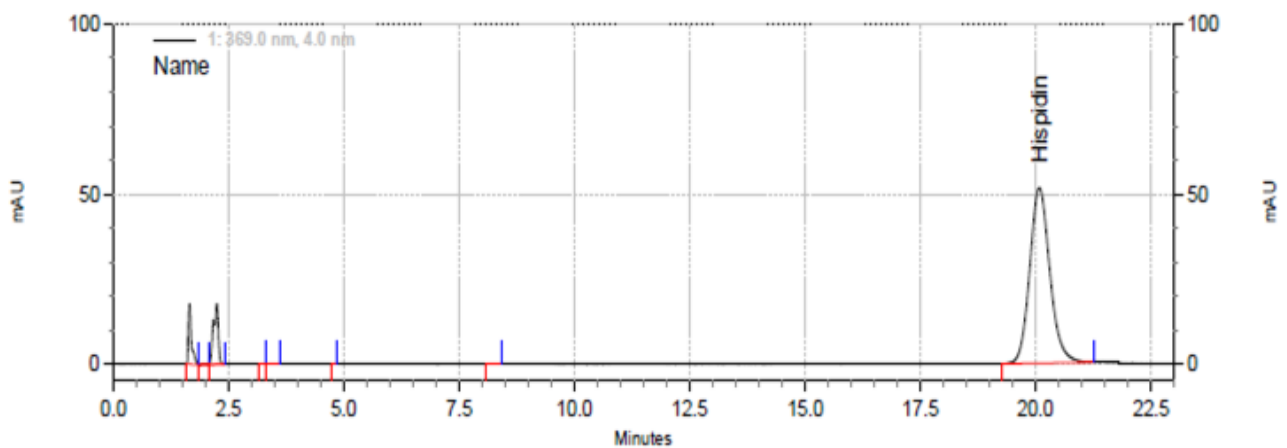
② 시험법 검증 결과

특이성(Specificity)

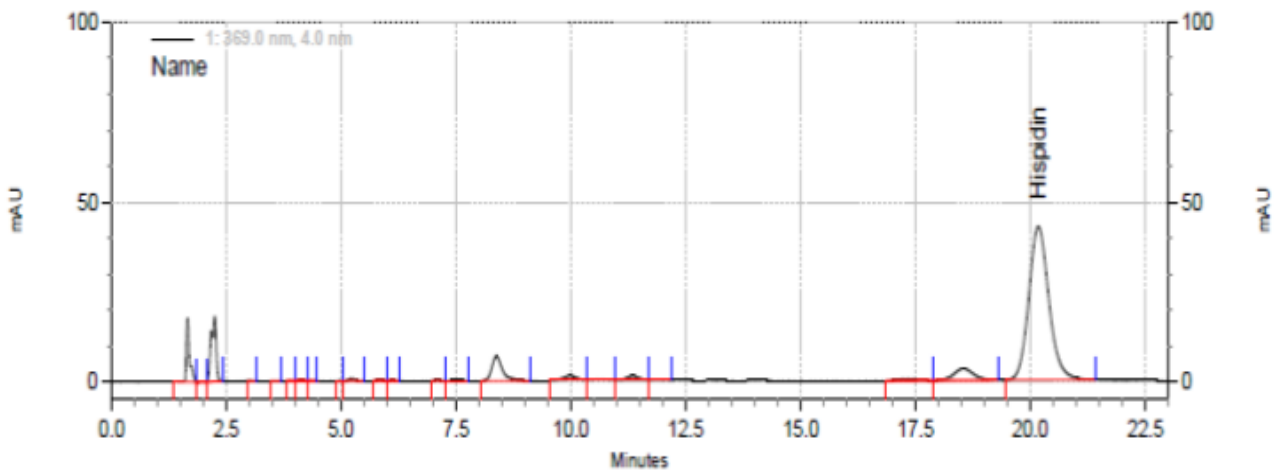
- 복합물 추출물 중 hispidin의 retention time과 peak 분리도 확인

hispidin 표준물질과 복합물 추출물을 분석하여 검출된 peak를 확인하였다. 표준용액과 추출물에서 약 20.1분대에 peak가 검출되어 동일한 물질임을 확인하였다. 시험용액에서 주변 peak와의 분리가 완전히 이루어짐을 확인할 수 있었다(그림 1).

A



B

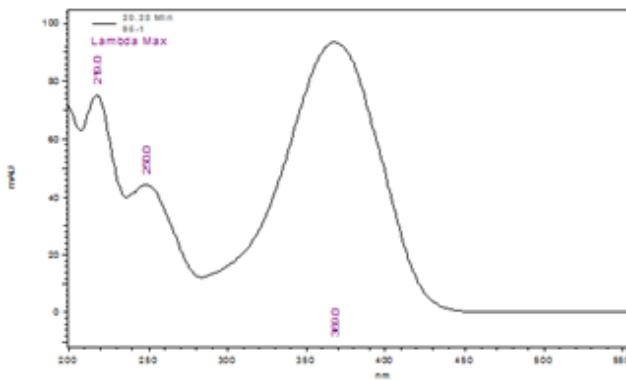


<표준용액과 복합물 추출물 중의 hispidin의 HPLC chromatogram>

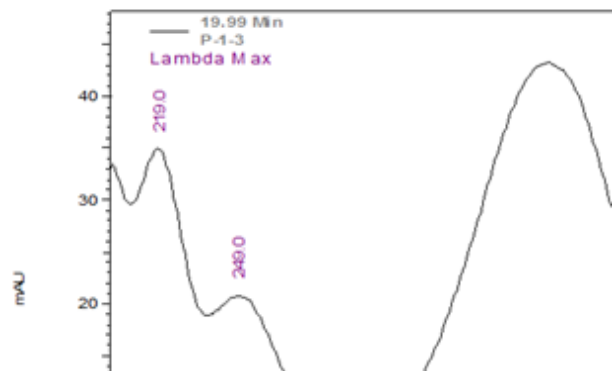
(A. hispidin 표준용액, B. 복합물 추출물)

- 복합물 추출물 중 hispidin의 spectrum과 peak purity 확인

시험용액 중 검출된 chromatogram이 표준용액인 hispidin과 동일한지 확인하기 위하여 표준용액과 시험용액의 spectrum을 확인하였다. 약 20.1 분대 검출된 peak의 spectrum을 확인한 결과, 219, 250, 369 nm에서 최대 흡광도를 보였으며, 표준용액과 시험용액에서 동일한 패턴의 spectrum을 나타냄을 확인하였다(그림 2). 또한 시험용액의 hispidin peak의 purity를 확인하기 위하여 peak의 5 point UV spectrum을 표시하였다(그림 3). 그 결과 5개의 지점에서 모두 일치하는 UV spectrum을 나타내어 hispidin이 단일물질임을 확인하였다.

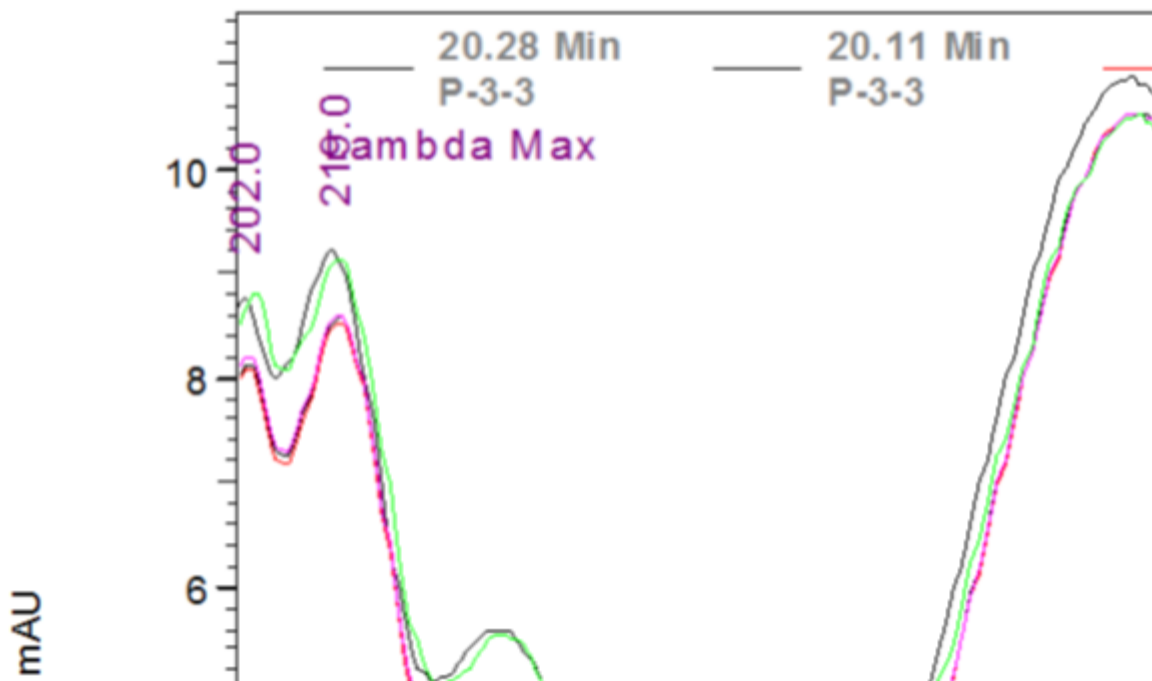


[hispidin]



[복합물 추출물 시험용액]

<hispidin과 복합물 추출물 시험용액의 UV spectrum>



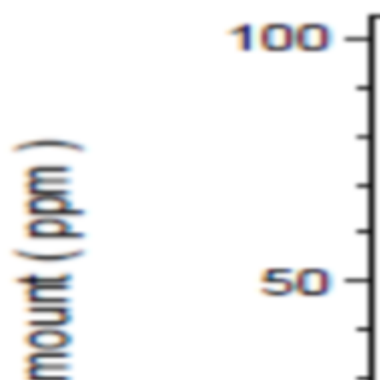
<시험용액 중 hispidin peak 각 5개 지점의 UV spectrum 분석>

직선성(Linearity)

- 표준물질에 대한 직선성

Hispidin의 검출농도 5.9375~95.0 ug/mL 에서 직선성을 평가하였다. 분석결과 R²는 0.9996, 즉 99.96%의 직선성을 확인할 수 있었다.

Goodness of fit (r²): 0.9996



복합물 중의 hispidin 정량 결과

- 계산식

$$\text{Hispidin 함량 (\%)} = \frac{\text{검량선에서 계산된 수량 (ppm)}}{\text{시료 무게 (mg)}} \times \frac{\text{시험용액의 정량 (mL)}}{\text{시료 무게 (mg)}} \times \text{표준품의 순도 (\%)} \times \frac{1}{1000}$$

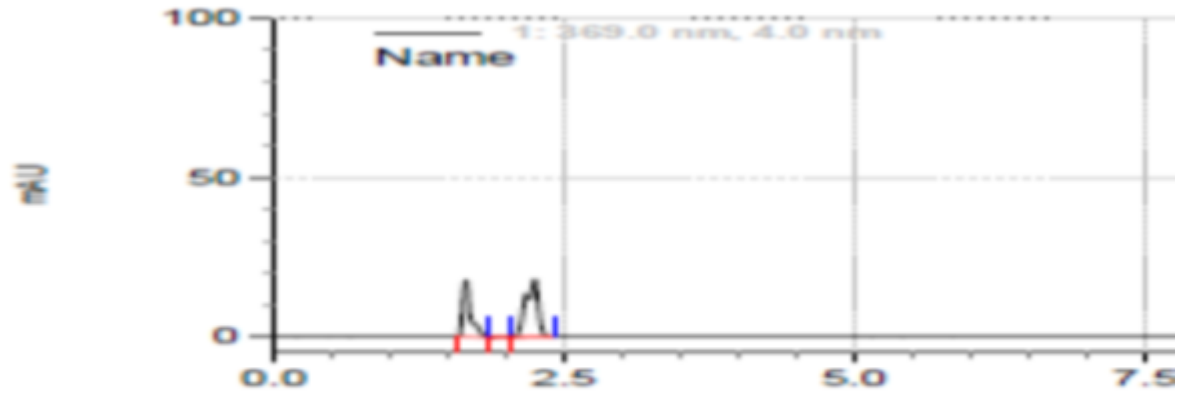
표2. 복합물 중의 hispidin 정량 결과

	검량선결과 (ug/mL)	최종량 (mL)	시료무게 (mg)	표준품 순도(%)	hispidin 함량 (%)
시료-1	38.592	20	1 g	93.4	0.07208
시료-2	32.842	20	1 g	93.4	0.06134
시료-3	35.850	20	1 g	93.4	0.06696
평 균					0.06679 ± 0.0053

(3) HPLC profiles

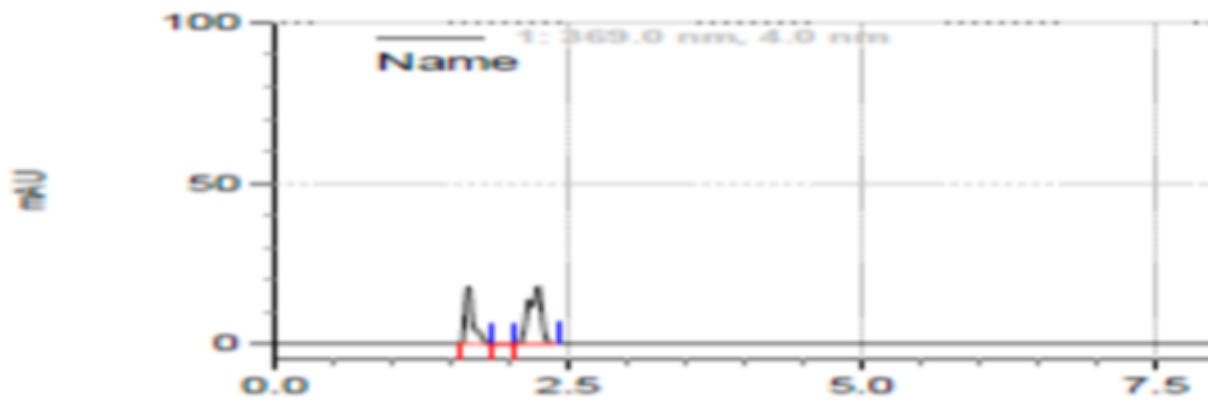
① Hispidin

- STD 1



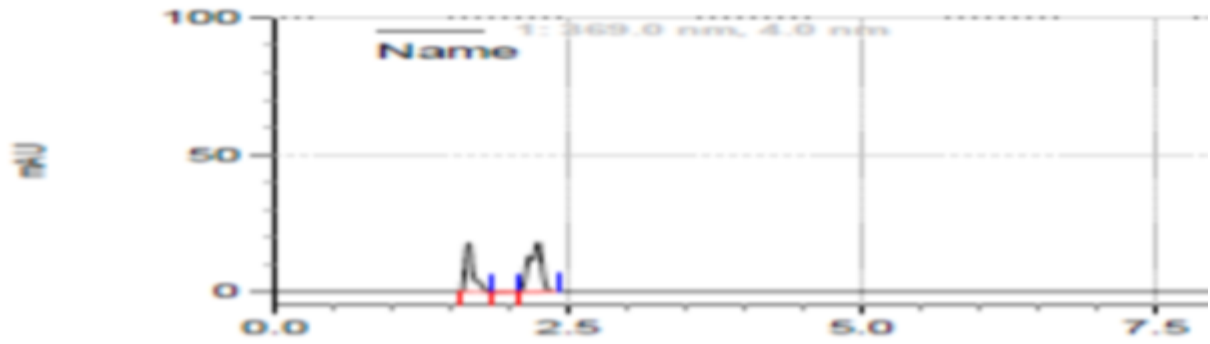
1: 369.0 nm, 4.0 nm

- STD 2



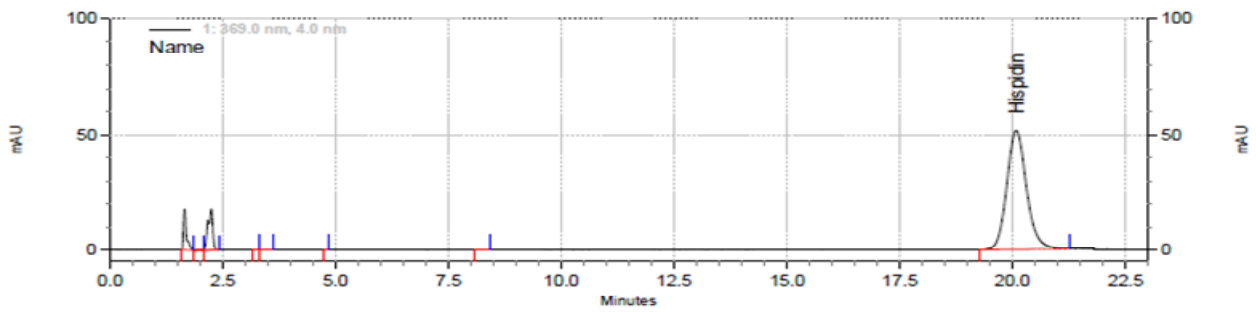
1: 369.0 nm, 4.0 nm

- STD 3



1: 369.0 nm, 4.0 nm

- STD 4

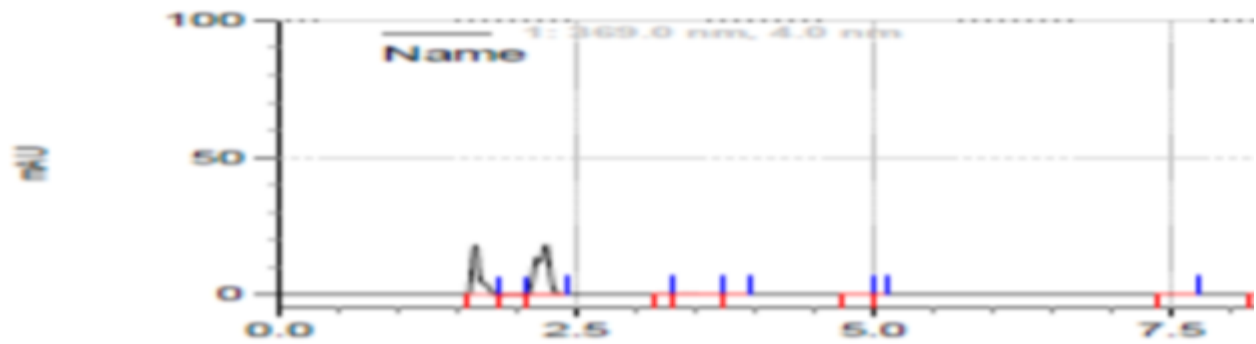


1: 369.0 nm, 4.0 nm

Results

Name	Retention Time	Area	PPM
Hispidin	20.087	6264685	47.500 CAL

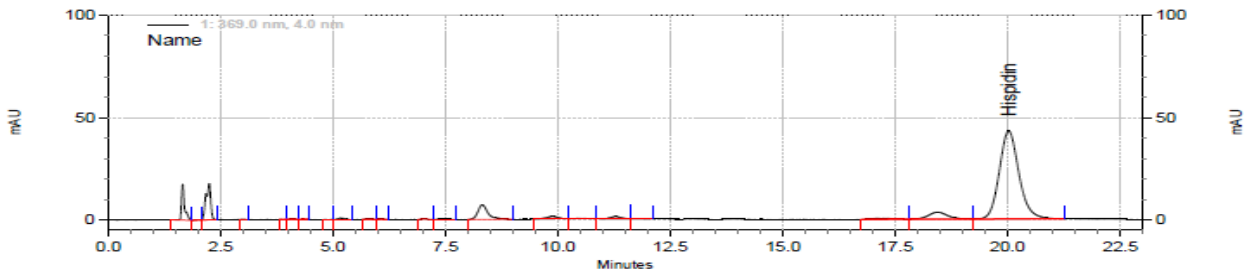
- STD 5



1: 369.0 nm, 4.0 nm

② 복합물 추출물

시료-1

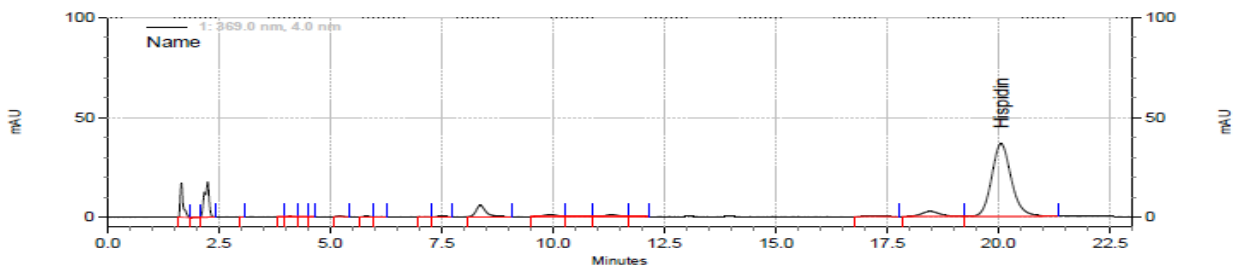


1: 369.0 nm, 4.0 nm

Results

Name	Retention Time	Area	PPM
Hispidin	20.027	5208555	38.592

시료-2

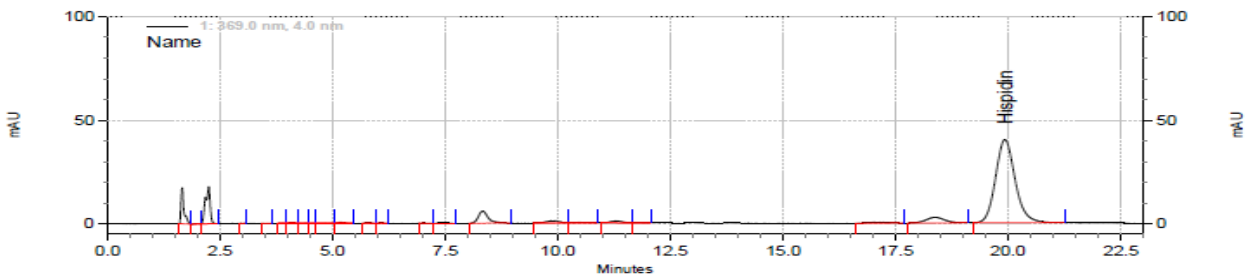


1: 369.0 nm, 4.0 nm

Results

Name	Retention Time	Area	PPM
Hispidin	20.060	4454685	32.842

시료-3



1: 369.0 nm, 4.0 nm

Results

Name	Retention Time	Area	PPM
Hispidin	19.933	4849062	35.850

제2절 연구내용 요약

1. 요약

최적 면역활성을 가지는 상황버섯 차 재료는 발아현미 64.5%, 노루궁뎅이버섯 10%, 표고버섯 10%, 린테우스상황버섯 5.5%로 구성 한다. 상황버섯차는 탄수화물 85.1g, 단백질 8.16g, 지방 0.327g, 당류 0.687g, 포화지방 0.177, 나트륨 3.95mg, 칼슘 18.9mg, 철 0.934mg, 식이섬유 11.2g, 회분 1.26g, 수분 5.13g 포함되어 있으며, 트랜스 지방이나 콜레스테롤, 비타민은 검출 되지 않았다. 상황버섯 차의 연령대별 식미조사에서 87%가 만족한다고 하였다. 시제품으로 순수담과 *Linteus imperial defense*의 3종의 과립형, 티백형 및 컵형을 개발 하였다.

Phellinus linteus KACC93057P (PLHS)은 원목에서 발이율이 95%였으며 자실체 형성 율은 95%로 안정적인 생산성이 확인 되었다. PLHS조당체 생산량은 0.15g로 PBJs의 0.058 와 PLKS의 0.2g보다 높았으며 PLHS에서 25g/100g으로 가장 많은 β -Glucan 함량을 나타내었다. Polysaccharide의 MTT assay 결과에서 PLHS-EA추출물은 농도 의존적으로 200 μ g/ml에서 400 μ g/ml에서 Raw cell 264.7세포의 생존능이 85%였으며 Nitrate oxidation assay에서 200 μ g/ml에서 가장높은 18.7 μ M의 염증억제효과를 보였다. 첨가적으로 KACC93057P을 이용한 식품가공품 제조조건 확립 하였다.

PLHS유래 페놀성분 Hypholomine B과 Davalliacton는 Raw cell 264.7세포에 독성이 없었으며 결장암세포 HCT116 에대하여 Davalliacton 250 μ g/ml 처리구 에서는 51.90%의 우수한 항암 효과를 보였다. 시토카인인 종양 괴사 인자 알파(tumor necrosis factor- α , TNF- α ,)가 농도 의존적으로 감소되는 것을 확인 하였다.

동물실험에서 각 처리군의 비장을 채취하여 H&E분석을 실시한 결과 Negative control 군의 비장에 비하여 HNP의 비장이 비대해져 있었으며, Wp의 표면적 증가가 이루어져 있었고 비장의 비대증대와는 다른 비장 확대적 현상이 나타나고, Wp의 면적 증가 및 lymphocyte의 증가가 다른 군에 비하여 초래되어 있음을 확인 되었다. 비장 내 각 위치에 따른 VEGF(vascular endothelial growth factor)와 IL-2의 발현양상 및 위치 분석을 수행한 결과 HNP 처리군 비장 조직에서 VEGF와 IgG의 발현양상을 확인 할 수 있었다. 장 내 세포사멸인자 (Casp-3)의 발현양상 분석에서 비장에서 각 실험군별 세포사멸인자인 Casp-3의 발현양상을 분석한 결과 HNP 처리군의 림프계 세포체에서 다른 처리군에 비하여 매우 높은 Casp-3의 발현양상을 확인 할 수 있었다.지표물질의 선정은 화합물의 특이성, 검출용이성 등을 고려하여 hispidin으로 지표 성분을 설정하였다.

지표성분으로 선정된 hispidin의 분석법 밸리데이션을 위하여 목질진흙버섯으로부터 hispidin을 분리 및 정제한 후, 순도를 확인한 결과, 93.7%의 순도를 나타내었다. 지표성분 hispidin의 직선성을 평가하는 correlation coefficient(R^2) 값은 0.9996이며, 검출한계(limit of detection)는 0.078 mg/L, 정량한계(limit of quantification)는 0.239 mg/L를 나타내었다. 한경대학교에서 제공받은 세 가지 시료별 hispidin 함량은 시료 1에서 0.07208%, 시료 2에서 0.06134%,

시료 3에서 0.06696%를 나타내었다. 시료간의 함량에는 다소 차이를 나타내어 추후 원료의 표준화 연구가 요구된다. 결론적으로 지표성분인 hispidin의 시험법 밸리데이션 결과를 통하여 분석법이 신뢰성이 있음을 확인하였다.

제3절 연구성과

1. 목질진흙버섯 곡물배양체를 이용한 티백차 생산공정 확립 및 관능평가
 - 목질진흙버섯 상황현미배양 차 제품생산 (제품명: 순수담) 및 홍보 3건
 - 목질진흙버섯 자실체 상황버섯 차 3종 제품 생산(제품명: 린테우스임페리얼 디펜스 (침출차, 과립차, 컵형 등 3종: ISO인증, 제품품목번호: 20150308101115),
2. 티백차 제품화 완료
 - 목질진흙버섯을 집에서 다림차로 끓이던 번거로움을 80℃ 물에서 2분만에 유효성분이 용출 되도록함.
 - 연령대에 관계없이 친숙한 구수한맛으로 소비자가 수분섭취를 최대로 할 수 있도록 맛의 농도를 은은하게 조절하였음.
 - 간편성을 더하기위한 1회용 개별포장형으로 개발하였음.
3. 과립형 스틱 제품화 완료
 - 목질진흙버섯, 노루궁뎅이버섯, 표고버섯을 활용한 과립형 스틱제품.
 - 운동전후, 야외에서 편하게 마실수 있도록 찬물에서 용출되는 타입.
 - 콤팩트한 사이즈를 위한 농축형 제품으로 개발.
4. 정량지표
 - 중앙TV방송: 홈앤쇼핑 중소기업 신상품 소개

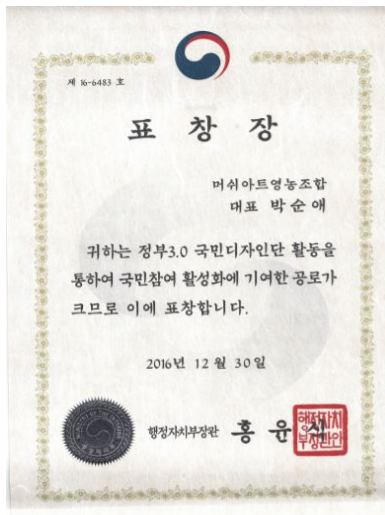




- 중앙전문지 기고: 월간버섯 “세계인의 입맛 사로잡는 버섯 가공품 만들기” (2018. 2. 1)

5. 수상실적:

- 행정자치부장관상 버섯산업 국민홍보활동 공로(2016. 12. 31)
- 한국식품연구원 2017한국식품기술대전 금상수상(2017. 12. 31)



6. 전시홍보: 상황차

- 평창동계올림픽 K-food 홍보관 참가 (2018. 2. 24.)
- 경기 우먼비즈페어 부스참가 (2018. 3. 20.)
- 농촌진흥청주관 국내수출업체 바이어초청 상담회 (2018. 3. 15)
- 부산도시농업축제 홍보부스참가 및 시음행사 (2018. 4. 27)
- 서울관악도시농업축제 홍보부스참가 및 시음행사 (2018. 05. 26)
- 경기도농업기술센터주관 유통업체구매담당자초청1:1 제품상담회 선정(2018. 7.13)
- 킨텍스 국제식품산업대전 참가 (2018. 5. 3)
- 국립수목원 버섯가공품 품평회 (2018. 10. 18)

- aT 대한민국식품대전 부스참가 (2018. 10. 24)
- 코엑스 제12회, 제13회 서울국제식품산업전 연속참가 (2018. 11. 28)



킨텍스 서울국제식품산업대전 부스 참가
일시: 2018.05.03



2018 aT 대한민국 식품대전 부스 참가
일시: 2018.10.24



농촌진흥청 주관 국내수출업체
바이어 초청 상담회
일시: 2018.03.15



제품명: 상황버섯과립스틱
출시일: 2018. 06. 20



국립수목원 버섯가공품 품평회
일시: 2018.10.18



부산도시농업축제 홍보부스 참가 및 시음행사
일시: 2018.04.27



평창동계올림픽 K-food 홍보관 참가
일시: 2018.02.24



경기 우먼비즈페어 부스 참가
일시: 2018.03.20



경기도농업기술센터 주관
유통업체 구매담당자 초청
일시: 2018.07.13



관악 도시농업축제 홍보부스
참가 및 시음행사
일시: 2018.05.26

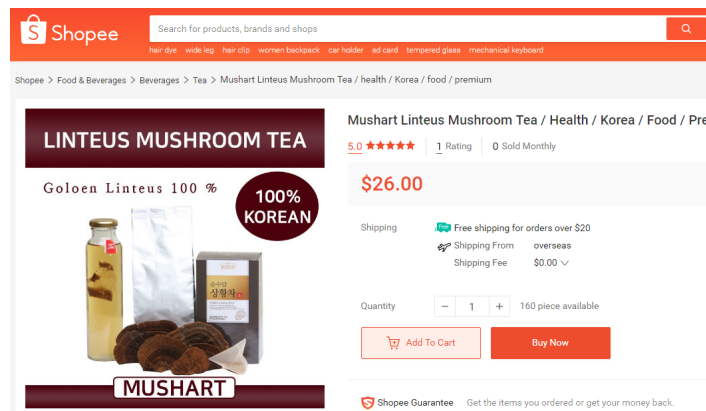
7. 제품의 판로개척 및 수출을 위한 기여

국내 5대 백화점 MD 1:1 미팅상담회, 국제전시회등 시음행사11건의 소비자 선호도를 종합한 결과는 다음과 같다.

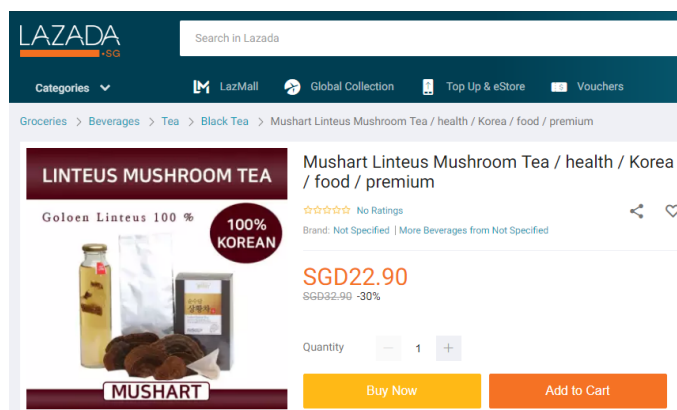
- BM 목표 및 핵심경쟁요인 으로는 간편성, 빠른추출로 약리효능 섭취의 편리성, 목질진 흠버섯 자실체 대비 저렴한 가격, 맛과 풍미의 높은 선호도이다.,

- 수익 확보 전략

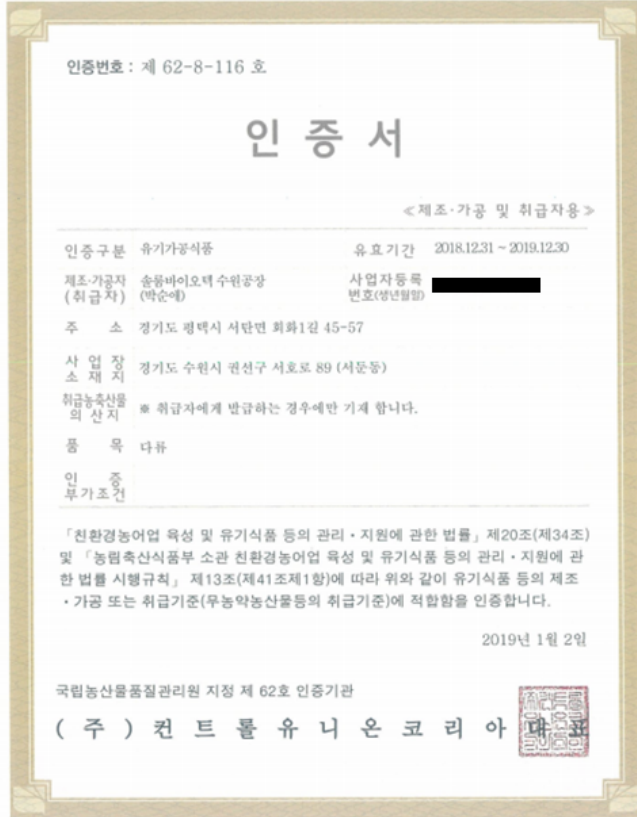
- 유기가공인증품 제품으로 제품생산 변경하여 2019년 2월초부터 5대 백화점 입점 심사중이다
- 유기전용매장 입점 심사중이다(초록마을)
- ISO 22000:2005 인증 제조시설에서 생산하여 온라인 해외몰에 입점하였으며 2019년 3월 베트남 하노이, 4월 호치민 박람회 및 식품전시회에 참가 확정되었다. 또한 제1협동의 제품의 기술특허를 이전하였으며 이로 후발업체의 기술적 우위선점이 가능하게 되었다.



<싱가폴 온라인커머스 Shopee 입점>



<동남아시아 온라인커머스 LAZADA 입점>



<유기가공인증서>



<ISO22000:2005 식품안전관리경영인증>

<제 1협동>

- 목질진흙버섯 KACC93057P 재배를 위한 최적종균 구명 및 생산성 구명하였으며 유기농인 증으로 유기가공재료 활용 (인증번호 제10-1-34호, 논문작성 중)
- 목질진흙버섯 자실체 상황버섯 차 최적조건을 확립하여 제품생산을 위한 정보 제공
- 상황버섯, *Phellinus linteus* 계통과 *Phellinus baumii* 의 항 혈소판 응집 효과 구명 (논문: 2017, J. Mushrooms 15(3):124-128)
- 목질진흙버섯 KACC93057P 현미배양체 생산과 최적 상황 차 생산조건 확립 (2017, 특허출원 10-2017-0154588)
- 동물세포와 동물실험에서 목질진흙버섯 KACC93057P유래 항산화물질hypholomine B, davallialactone과 다당체 β -glucan의 면역, 항암활성이 타 상황버섯 종에 비해 우수성 입증 (2018, 특허출원 10-2018-0159126, SCI논문 2편작성 중)
- 목질진흙버섯 KACC 93057P, ‘환경상황버섯’ 인공재배자실체 폐놀추출물의 항산화 활성 및 화학적 동정 (논문: J. Mushrooms 2018, 16(4):311-317)
- 학술발표 3건: 2017 춘계 한국버섯학회, 2017 아시아균학회(10. 25-28, 제주) , 한국균학회

(2017년 5월 25일, 여수 The Ocean Resort).

- 홍보 2건: 홍보전시회 1건, 버섯정보신문 1건

<제 2협동>

- 목질진흙버섯 KACC93057P과 타 상황버섯(장수진흙버섯)과의 기능성성분 함유량 비교분석
 - 폴리페놀 기능성성분 함유량은 타 진흙버섯(장수진흙버섯)이 목질진흙버섯보다 높았으며 색상도 진한 갈색으로 폴리페놀 함량이 높음을 확인함
- 목질진흙버섯KACC93057P과 타 진흙버섯의 항산화 활성 비교 분석
 - 동일농도의 추출물을 비교한 결과 타 상황버섯 종과 유사한 항산화활성을 나타냄
- 목질진흙버섯과 타 진흙버섯의 자실체 및 균사체 대사산물 비교 분석
 - HPLC로 분석한 결과 균사체보다는 자실체에서 다양한 폴리페놀이 검출되었으며 함량도 높았음.
- 목질진흙버섯 KACC93057P활성물질의 분리, 정제 및 화학구조 구명
 - HPLC를 이용하여 3종의 항산화 활성물질을 정제하고 ESI-mass 및 NMR spectrum을 측정하여 화학구조를 각각 hispidin, hypholomine B, inoscavin A로 동정함
- 학술발표 2건
 - Antioxidant activities of the medicinal mushrooms *Phellinus linteus* and *Phellinus baumii*. 한국균학회, 2017년 5월 25일, 여수 The Ocean Resort.
 - Chemical constituents of the fruiting body of *Phellinus linteus*. 한국미생물학회연합학회, 2017년 11월 2일, 킨텍스.
- 논문 1건 (SCI논문투고 중)
 - Lipoygenase inhibitors from the medicinal fungus *Phellinus baumii*.

제 4 장 목표 달성도 및 관련 분야 기여도

제1절 관련분야 전망

1. 버섯산업의 수출확대에 기여할 것으로 전망됨.
 - 제품화2건은 제품 품질 및 상품성에 대한 반응이 호감적이나 가격이 높다는 평임. 국내시장에서는 백화점 및 특화매장에서 선호도 높고 샘플수출 형태로 중국과 베트남, 싱가포르에서 반응이 뜨거워 향후 각 나라별로 소비 트렌드가 반영된 패키지로 개발시 수출이 용이할 것으로 사료됨.
 - 목질진흙버섯의 효능은 영지버섯에 이어 대부분 소비자들이 인지하고 있었음. 맛에 대한 호감도 좋으나 높은 가격에 따른 제품안전성을 나타내는 유기농인증 및 국제식품인증서를 요구하였음.
2. 농가의 소득증대에 기여할 것으로 전망됨.
 - 신선버섯 생산기반의 다변화
 - 그동안 기능성위주 가공제품에서 탈피해 다양한 버섯을 블렌딩하여 자연주위 먹거리 트렌드에 부합한 맛과 풍미를 제현한 기술 전파.
3. 국내에서 주로 재배되고 있는 상황버섯은 *Phellinus baumii* (장수상황버섯)으로 상황버섯의 원조라 볼 수 있는 *Phellinus linteus* (목질진흙버섯)의 생산이 어려워 실효성 없었으나 본 연구의 목질진흙버섯 KACC93057P은 인공재배와 생산력이 우수하여 안정적 생산이 가능하여 다양한 가공식품생산과 유통이 활발해 지면 버섯생산 농가의 중요 소득원이 될 것임.
4. 2017년 식품의약품안전처에서 목질진흙버섯에 한하여 “면역에도움을 줄 수 있는” 기능성 식품으로 고시된 바 있어 본 연구의 재료로 활용한 목질진흙버섯 KACC93057P은 후속연구로 기능성식품으로 기여 할 수 있음
5. 유기농으로 인증된 친 환경 우리고유 목질진흙버섯 KACC93057P의 고유특성과 약리활성 면역활성 유효성분 기능이 최적화된 자실체와 현미 군사배양체를 활용한 고 부가가치의 유기 가공 건강식품 제품생산
6. 본 연구에 사용될 목질진흙버섯 KACC 93057P의 유용성분에 대한 면역 활성 가능성을 부여할 수 있는 약리 효능이 동물체 수준에서 구명됨으로써 고 부가가치성 상황버섯으로 경제적 파급효과가 클 것으로 보며, 군사체/자실체를 이용한 가공품생산으로 국내 소비증대는 물론 향후 의약품 개발을 위한 전초연구로 경제적 가치는 상당할 것으로 전망 됨
7. 목질진흙버섯 KACC 93057P 자실체의 유기농 인증(인증번호 제10-1-34호)재료를 사용함으로써 국내외 시장에 유통되는 상황버섯 가공품과 차별화된 면역활성강화 고 부가가치 유기농 가공 건강식품 개발 가능
8. 목질진흙버섯은 다려서 먹어야 하는 번거로움이 있으나 본 연구에서 개발된 가공식품은 언

제 어디서나 쉽게 복용 할 수 있어 대중적 접근으로 시장을 확대 할 수 있으며 백세시대 도래에 따른 노인 건강식품인 실버푸드를 Target으로 복용이 간편한 건강기능 제형으로 시장 활로를 개척 함

9. 항암치료에 의한 면역력저하는 암환자의 면역관련 2차 질환 발병의 원인이 암 발병률과 항암치료를 받은 환자의 수의 증가에 의한 면역기능증진 식품의 수요가 급격히 증가하고 있으며 신종플루, 슈퍼바이러스, SARS등과 같은 새로운 면역질환이 증가함에 따라 전 세계적으로 면역기능증진을 위한 기능성 식품의 개발에 활용

10. 과학적 근거를 마련하고 상황버섯의 효능과 소재로서의 우수성을 밝히고 천연물 신약 및 건강기능식품의 소재로서 사용 가능성을 제시함으로써 버섯자원을 이용한 새로운 산업창출의 기반을 제공

11. 재배가능한 버섯인 상황버섯으로부터 새로운 기능성 식의약 소재의 발굴 및 개발을 통하여 농가소득 증대 및 새로운 소재발굴로 경제적 이익 창출에 기여

12. 목질진흙버섯의 기능성을 규명하고 다양한 질환의 발병을 감소시키고 완화시켜 국민의 삶의 질을 향상시키고 국가의 의료비용을 감소시켜 사회적, 경제적 이익 창출을 도모

13. 우수한 목질진흙버섯을 선발하여 국내에서 재배되는 상황버섯의 품종육성, 신제품 발굴, 국내의 상황버섯의 우수성을 입증하는 자료로 활용

14. 국민의 의약품, 식품 소비 관련 의식변화로 다양한 수요가 발생하며 소비자의 제품 선택권의 확대에 활용

15. 목질진흙버섯 유래 기능성 물질특히 획득에 따른 지식재산권 확보 및 해당 분야의 국가 경쟁력을 확보하는데 활용할 수 있다.

16. 목질상황버섯의 가치 향상을 위하여 연구논문 발표에 따른 국가 과학 기술 경쟁력 제고

제2절 연구 목표 달성여부

1. 현미 군사배양체의 티백차 제품화

- 유기농 발아현미 목질진흙버섯의 티백차 생산공정 확립과 제품화를 위한 식미검사 및 소비자 관능평가를 조사하여 최적의 맛과 차의 풍미를 설정, 이를 토대로 대량생산시 불량률 저감을 위한 공정 확립함.

2. 과립형 목질진흙버섯 스틱 제품화

- 자실체분말, 추출물을 이용하여 물에 빠르게 용해되고 목넘김에 이질감이 없도록 분쇄도를 조절, 최적의 용해성 확립.
- 목질진흙버섯과 노루궁뎅이버섯 표고버섯의 혼합비율에 따른 과립제품의 용해도, 과립체의 물성, 과립제품의 풍미감이 개선된 레서피 선정.

3. 목질진흙버섯의 식품으로서의 영양성분 및 유효성 평가

- 목질진흙버섯, 현미군사배양체를 이용한 제품의 영양성분 함량조사
- 최종 제품화된 식품의 적합성을 위한 유효성 실시

<제 1협동과제>

1. 종균유형별, 수목 종류별 목질진흙버섯 KACC93057P 발이 및 자실체 형성 조건 구명 및 유기농 상황버섯 자실체 생산

- 액체, 곡립, 톱밥종균을 다양한 수중에 접종 하여 균 활착율과 오염율과 발이, 자실체형성을 조사.

2. 목질진흙버섯 KACC93057P 현미배양체 배양 최적 조건과 가공조건 확립

- 배양기간에 따른 현미 배양체 가공기술개발
- 식품규정에 따른 상황버섯 차 생산의 최적 조건 확립
- 노루궁뎅이 자실체 분말을 과립매개체로 상황버섯 추출 가공품 생산 조건

3. 목질진흙버섯 KACC93057P 자실체의 추출방법에 따른 면역, 항염증, 항산화, 항혈소판응집 효과 검정

4. 동물세포와 동물실험을 통한 목질진흙버섯 KACC93057P의 항산화물질 hypholomine B, davallialactone과 다당체 β -glucan의 면역, 항암활성 기구 해명

5. 목질진흙버섯 KACC93057P(한경상황버섯)의 다당체 β -glucan의 함량, 면역, 항암, 항산화활성의 타 상황버섯 종과의 비교분석

<제 2협동>

1. 목질진흙버섯 KACC93057P과 타 진흙버섯(장수진흙버섯)과의 기능성성분 함유량 비교 분석
 - 본 목질진흙버섯KACC93057P과 시판되고 있는 장수진흙버섯(*Phellinus baumii*)과의 폴리페놀 기능성성분 함유량 및 성상을 비교 분석함
2. 목질진흙버섯KACC93057P과 타 진흙버섯의 항산화 활성 비교 분석
 - 본 목질진흙버섯과 시판되고 있는 진흙버섯의 추출물을 제조한 후 항산화활성을 검정하고 비교 분석함
3. 목질진흙버섯KACC93057P과 타 진흙버섯의 자실체 및 균사체 대사산물 비교 분석
 - 목질진흙버섯과 타 진흙버섯의 자실체 및 균사체 추출물을 제조한 후 HPLC로 분석하여 비교함.
4. 목질진흙버섯KACC93057P 활성물질의 분리, 정제 및 화학구조 구명
 - 유기용매에 의한 분배, 다양한 column chromatography, HPLC를 이용하여 항산화 활성물질을 분리, 정제함
 - Mass 및 NMR spectrum을 측정하여 화학구조를 동정함

<세부과제: 머쉬하트영농조합>

세부 연구 목표	달성도 (%)	연구성과
제품화 1: 조건별 현미 군사배양체의 티백차 제조 조건확립	100	<ul style="list-style-type: none"> ◆ 80℃ 물에서 2분만에 유효성분이 용출 되도록함 공정개선. <ul style="list-style-type: none"> - 유기농원물로 친숙하고 편안함을 주는 구수한맛 레서피 개발 및 선정 - 1회용 개별포장형으로 고급화. - 수출위주로 패키지 변경 - 제품생산: “제품명 순수담 상황 차” 생산 출시 ◆ 시제품을 완성하고 전시회 및 기타 시음회 개최
- 과립형 목질진흙버섯 가공식품 제조	100	<ul style="list-style-type: none"> ◆ 목질진흙버섯 자실체분말, 열수추출액 농축액을 노루궁뎅이 분말과 혼합건조 하여 과립형제조 - 목질진흙버섯의 유효성분을 간편하게 섭취하도록 과립형 스틱제품개발 - 찬물에서도 용출되는 타입. - 콤팩트한 사이즈를 위한 농축형 제품으로 개발. - 유기가공인증에 적합한 원재료로 레서피 개발 및 선정
- 목질진흙버섯 주요성분함량	100	<ul style="list-style-type: none"> ◆ 탄수화물 85.1g, 단백질 8.16g, 지방 0.327g, 당류 0.687g, 포화지방 0.177, 나트륨 3.95mg, 칼슘 18.9mg, 철 0.934mg, 식이섬유 11.2g, 회분 1.26g, 수분 5.13g 포함되어 있으며, 트랜스 지방이나 콜레스테롤, 비타민은 검출
- 최적 기능성 강화 가공소재를 이용한 고 부가가치 시제품개발	100	<ul style="list-style-type: none"> ◆ Linteus imperial defense의 3종의 과립형, 티백형 및 컵형을 개발 ◆ 현미군사배양체의 티백차 제품화 <ul style="list-style-type: none"> - 유기농 발아현미 목질진흙버섯의 티백차 생산공정 확립과 제품화를 위한 식미검사및 소비자 관능평가를 조사하여 최적의 맛과 차의 풍미를 설정, 이를 토대로 대량생산시 불량률 저감을 위한 공정 확립함. ◆ 과립형 목질진흙버섯 스틱 제품화 <ul style="list-style-type: none"> -자실체분말, 추출물을 이용하여 물에 빠르게 용해되고 목넘김에 이질감이 없도록 분쇄도를 조절, 최적의 용해성 확립. -목질진흙버섯과 노루궁뎅이버섯 표고버섯의 혼합비율에 따른 과립제품의 용해도, 과립체의 물성, 과립제품의 풍미감이 개선된 레서피 선정.

<제1 협동과제: 한경대학교>

세부연구 목표	달성도 (%)	연구성과
- 재배방법과 환경에 따른 유기농 목질진흙버섯 KACC93057P의 고유특성검정	100	<ul style="list-style-type: none"> ◆ 상수리나무, 산뽕나무, 박달나무, 신갈나무, 굴참나무를 포함한 원목을 확보 하여 상황버섯원목재배에 준하여 원목절단->봉지짜기->살균->냉각->종균접종->배양->균긋기->입상 - 곡립종균, 톱밥종균, 액체종균을 접종하고 오염을 및 활착을 조사
- 자실체유래 생리활성물질의 효능탐색	100	<ul style="list-style-type: none"> ◆ 다양한 추출조건에서 항산화, 면역활성 및 항암유효성 검정 - 기능성 지표물질 β-Glucan, polyphenol 함량 등의 자실체, 균사, 추출방법에 따른 최적 량 검정 - NO, MTT, DPPH, ABTS 등의 검정법으로 항산화, 항염증, 면역활성 검정
- 곡물 균사배양체 식품소재 생산최적조건 확립	100	<ul style="list-style-type: none"> ◆ 유기농현미를 24시간 물에 침적하여 수분을 흡수시키고 내열성 봉지에 800g씩 투입하여 고압살균으로 2시간살균 및 냉각. - 액체종균을 접종 후 20-30일동안 배양 하였을 때 균사의 발아현미에 대한 협착율과 가공시 색깔, 맛, 향기 등의 관능성 조사
- 목질진흙버섯 KACC93057P 자실체 추출물의 In vitro 면역활성 세포단위 검정	100	<ul style="list-style-type: none"> ◆ 목질진흙버섯 KACC93057P추출물유래 다당체와 페놀성분 Hypholomine B과 Davalliacton는 Raw cell 264.7세포에 독성이 없었으며 결장암세포 HCT116에 대하여 Davalliacton 250μg/ml 처리구에서는 51.90%의 우수한 항암 효과를 보였다. 시토카인인 종양 괴사 인자 알파(tumor necrosis factor-α, TNF-α)가 농도 의존적으로 감소되는 것을 확인
- 기능성 강화 최적 목질진흙 상황버섯 KACC93057P자실체의 가공소재 개발	100	<ul style="list-style-type: none"> ◆ 조건별 유기농 가공 상황버섯 차의 항산화 활성 과 색형 및 향미 분석 ◆자실체를 함유하는 것을 규정 하고 있어 유기농 상황버섯 차 생산을 목적으로 하여 다음과 같은 재료를 사용하여 방법을 개발

세부연구 목표	달성도(%)	연구성과
노령쥐에 대한 면역 활성 개선효과 구명 (2018)	100	<ul style="list-style-type: none"> ◆ 노령쥐 비장을 채취하여 H&E분석을 실시한 결과 Negative control 군의 비장에 비하여 HNP의 비장이 비대해져 있었으며, Wp의 표면적 증가가 이루어져 있었고 비장의 비대증대와는 다른 비장 확대적 현상이 나타나고, Wp의 면적 증가 및 lymphocyte의 증가가 다른 군에 비하여 초래되어 있음을 확인 ◆ 비장 내 각 위치에 따른 VEGF(vascular endothelial growth factor)와 IL-2(immunoglobulin G)의 발현양상 및 위치 분석 ◆ HNP 처리군 비장 조직에서 VEGF와 IgG의 발현양상을 확인. ◆ 비장 내 세포사멸인자 (Casp-3) 의 발현양상 분석에서 비장에서 각 실험군별 세포사멸인자인 Casp-3의 발현양상을 분석한 결과 HNP 처리군의 림프계 세포체에서 다른 처리군에 비하여 매우 높은 Casp-3의 발현양상을 확인

<제 2협동>

세부연구 목표	달성도(%)	연구성과
- 목질진흙버섯과 장수진흙버섯 자실체의 추출물 비교 (연구기간: 2017년)	100	<ul style="list-style-type: none"> ◆ 한경대학교에서 제공받은 목질진흙버섯과 장수진흙버섯을 동일 조건에서 추출하여 추출물의 수율을 비교하였고 목질진흙버섯의 수율이 적은 것을 확인함.
- 목 질 진 흙 버섯 KACC93057P과 장수진흙버섯 자실체 추출물의 항산화 활성 비교	100	<ul style="list-style-type: none"> ◆ 상술한 동일한 용매의 양으로 녹여 희석하여 처리 후 항산화 활성을 측정하였고 장수진흙버섯보다 목질진흙버섯의 활성이 낮은 것으로 확인함. ◆ 동일한 농도로 처리한 후, 항산화 활성을 측정하였고 목질진흙버섯과 장수진흙버섯이 오차 범위 수준에서 유사한 활성을 확인함
- 목 질 진 흙 버섯 KACC93057P 장수상황버섯, 고려상황버섯의 자실체 및 균사체 대사산물의 비교분석	100	<ul style="list-style-type: none"> ◆ 한경대학교에서 제공받은 버섯의 자실체 및 균사체 배양물을 HPLC로 분석하였고 자실체는 균사체에 비하여 다양한 polyphenols 과 metabolites가 존재하는 것을 확인함.
- 목질진흙버섯(한경대) 유래 항산화 polyphenol 성분의 분리 및 정제	100	<ul style="list-style-type: none"> ◆ 목질진흙버섯 추출물로부터 항산화 polyphenols을 확보하기 위하여 column chromatography 및 HPLC를 통하여 3개의 화합물을 분리 및 정제함(2017년) ◆ 목질진흙버섯 추출물로부터 항산화 polyphenols을 확보하기 위하여 column chromatography 및 HPLC를 통하여 3개의 화합물을 분리 및 정제함(2018년)
- 목질진흙버섯(한경대) 유래 항산화 polyphenol 성분의 화학구조 동정 (연구기간: 2017-2018년)	100	<ul style="list-style-type: none"> ◆ 분리 및 정제를 통하여 확보한 3개의 화합물의 화학구조 규명을 위하여 NMR 및 mass 분석을 수행하였고 hispidin, hypholomine B, inoscavin A로 동정함(2017년) ◆ 분리 및 정제를 통하여 확보한 3개의 화합물의 화학구조 규명을 위하여 NMR 및 mass 분석을 수행하였고 davallialactone, baumin, inoscavin E로 동정함(2018년)

세부연구 목표	달성도(%)	연구성과
- 지표물질의 선정 및 분석 법 밸리데이션 확립(2018)	100	<ul style="list-style-type: none"> ◆ 화합물의 특이성, 검출용이성 등을 고려하여 hispidin을 지표성분으로 설정함 ◆ hispidin의 순도는 93.7%로 확인함 ◆ 직선성을 평가하는 $R^2=0.9996$으로 확인함. ◆ 검출한계: 0.078 mg/L, 정량한계: 0.239 mg/L로 확인함. ◆ 추출물의 함량분석을 통하여 시료1: 0.07208%, 시료2: 0.6134%, 시료3: 0.06696%로 확인함

제 5 장 연구성과 및 성과활용 계획

제1절 연구성과 목표대비실적

본 연구의 목질진흙버섯 KACC93057P은 인공재배와 생산력이 우수하여 안정적 생산이 가능하여 다양한 가공식품생산하며 본 연구에서 개발한 *Linteus imperial defense*의 3종의 과일형, 티백형 및 컵형의 대량생산으로 중국, 일본, 미국 등에 수출할 수 있는 활로를 개척하며 유기가공품인증에 의한 고 부가가치 가공품을 개발하며 현재 ISO인증을 받아 구체적으로 판로를 개척하고자 한다. 2017년 식품의약품안전처에서 목질진흙버섯에 한하여 “면역에도움을 줄 수 있는” 기능성식품으로 고시된 바 있어 본 연구의 재료로 활용한 목질진흙버섯 KACC93057P은 후속연구로 기능성식품으로 활용 할 예정 이다.

1. 국내에서 주로 재배되고 있는 상황버섯은 *Phellinus baumii* (장수상황버섯)으로 상황버섯의 원조라 볼 수 있는 *Phellinus linteus* (목질진흙버섯)의 생산이 어려워 실효성 없었으나 본 연구의 목질진흙버섯 KACC93057P은 인공재배와 생산력이 우수하여 안정적 생산이 가능하여 다양한 가공식품생산과 유통이 활발해지면 버섯생산 농가의 중요 소득원이 될 것임
2. 2017년 식품의약품안전처에서 목질진흙버섯에 한하여 “면역에 도움을 줄 수 있는” 기능성식품으로 고시된 바 있어 본 연구의 재료로 활용한 목질진흙버섯 KACC93057P은 후속연구로 기능성식품으로 활용 가능
3. 유기농으로 인증된 친 환경 우리고유 목질진흙버섯KACC 93057P의 고유특성과 약리활성면역활성 유효성분 기능이 최적화된 자실체와 현미 군사배양체를 활용한 고 부가가치의 유기 가공 건강식품 제품생산 활용
4. 본 연구에 사용될 목질진흙버섯 KACC 93057P의 유용성분에 대한 면역활성 가능성을 부여할 수 있는 약리 효능이 동물체 수준에서 구명 됨으로서 고 부가가치성 상황버섯으로 경제적 파급효과가 클 것으로 보며, 군사체/자실체를 이용한 가공식품생산으로 국내 소비 증대는 물론 향후 의약품 개발을 위한 전초연구로 경제적 가치는 상당할 것으로 전망 됨
5. 목질진흙버섯 KACC 93057P 자실체의 유기농 인증(인증번호 제10-1-34호)재료를 사용함으로써 국내외 시장에 유통되는 상황버섯 가공품과 차별화된 면역활성강화 고 부가가치 유기가공 건강식품 개발 가능
6. 목질진흙버섯은 다려서 먹어야 하는 번거로움이 있으나 본 연구에서 개발된 가공식품은 언제 어디서나 쉽게 복용 할 수 있어 대중적 접근으로 시장을 확대 할 수 있으며 백세 시대 도래에 따른 노인 건강식품인 실버푸드를 Target으로 복용이 간편한 건강기능 제형으로 시장 활로를 개척 함

7. 항암치료에 의한 면역력저하는 암환자의 면역관련 2차 질환 발병의 원인이 암 발병률과 항암치료를 받은 환자의 수의 증가에 의한 면역기능증진 식품의 수요가 급격히 증가하고 있으며 신종플루, 슈퍼바이러스, SARS등과 같은 새로운 면역질환이 증가함에 따라 전 세계적으로 면역기능증진을 위한 기능성 식품의 개발에 활용
8. 과학적 접근법에 의하여 상황버섯의 우수성을 밝히고 천연물 신약 및 기능성 식품소재로의 가능성을 밝혀 버섯자원을 이용한 신산업창출의 기반을 제공한다.
9. 농산버섯인 목질진흙버섯 KACC93057P으로부터 새로운 기능성 식의약 소재의 발굴 및 개발을 통한 농가소득 증대 및 경제적 이익 창출에 기여한다.
10. 목질진흙버섯 KACC93057P의 기능성을 규명하여 만성적인 사회적 질환의 발병을 감소시키고 완화시켜 국민의 삶의 질을 향상시키고 국가의 의료비 부담을 감소시켜 사회적, 경제적 이익 창출을 도모할 수 있다.
11. 목질진흙버섯 KACC93057P의 기능성 식·의약소재로의 전환에 따른 기호 및 생활습관성 질환 군에 따른 소비자의 기능성 식품 선택권의 확대에 활용할 수 있다.
12. 목질진흙버섯 KACC93057P 유래 기능성물질의 물질특허 획득에 따른 지적재산권 확보 및 관련 연구분야의 글로벌 기술 경쟁력 확보에 활용한다.
13. 기능성 식의약 소재 창출을 통한 가치 재조명 및 연구논문 발표에 따른 국가 과학 기술 경쟁력 제고에 기여한다.

제2절 관련분야의 기술발전 기여를 위한 성과 활용

1. 버섯가공제품 수출확대

- 목질진흙버섯의 1차 농산물 수출에서 유효성분이 빠르게 추출되는 기술개발 활용으로 가공 제품 활성화 촉진.
- 목질진흙버섯 유기가공인증 및 국제식품안전시스템 ISO 22000:2005 인증으로 고가매장 진입.
- 목질진흙버섯과 다양한 버섯을 블렌딩한 레서피 개발 기술로 수출용 가공버섯활성화.
- 2019년 3월에 베트남 하노이에서 열리는 한국버섯박람회 홍보촉진 행사에 참여 현지 소비자 조사 수행 계획.

2. 버섯가공산업 활성화의 기초인 유기농산물 재배 농민교육 정책제안

- 목질진흙버섯, 노루궁뎅이버섯, 표고버섯의 가공 기술은 시장에서 요구하는 유기가공인증서가 절실하나 버섯은 무농약으로 재배하는 관습에서 유기농인증서의 필요성을 농민이 인지하지 못하고 있음.

3. 버섯가공제품 시장확대

- 국내5대 백화점 및 유기농매장에서의 시식행사 계획.
- 목질진흙버섯의 효능에 대한 인식이 면역력인 점을 감안하여 면역력에 대한 시너지 효과를 낼수 있는 기존 제품과의 콜라보된 차기 상품 필요.

4. 신 가공제품 개발

- 중국 및 베트남에서 기능성 버섯에 대한 인지도가 높으며 가공제품 시장성이 확인된 버섯은 한국산 노루궁뎅이버섯으로 2차년도 과립형 목질진흙버섯 스틱제품은 레서피를 업그레이드시켜 노루궁뎅이버섯과 표고버섯으로 과립 제형을 개발하였음.
- 2019년 3월에 베트남 하노이를 기점으로 유기농전문매장에서 현지인의 기호성에 맞는 제품 개발을 하고자함.

제3절 특허, 품종, 논문 등 지식재산권 확보계획

1. SCI 논문게제

- (1) Styrylpyrones from the Fruiting Body of *Phellinus linteus* KACC93057P and Their Immunomodulating efficacy (2019년 논문게제예정)
- (2) Lipoxygenase inhibitors from the medicinal fungus *Phellinus baumii*. (투고중)
- (3) Productivity and Bioactivity of Fruiting Body from Artificial Cultivation of *Phellinus linteus* KACC93057P (2019년 논문게제예정)
- (4) Immunohistography in spleen of mice induced polysaccharide from *Phellinus linteus* KACC93057P (2019년 논문게제예정)

제 6 장 참고문헌

1. Lee, I. K, et. al. 2007. New antioxidant polyphenols from the medicinal mushroom *Inonotus obliquus*. *Bioorg Med Chem Lett*, 17: 6678-81.
2. Lee, I. K and Yun, B. S. 2007. Highly oxygenated and unsaturated metabolites providing a diversity of hispidin class antioxidants in the medicinal mushrooms *Inonotus* and *Phellinus*. *Bioorg Med Chem Lett* 15: 3309-14.
3. Lee, I. K, et. al. Daldinan A. 2012. a novel isoindolinone antioxidant from the ascomycete *Daldinia concentrica*. *J Antibiot (Tokyo)*. 65: 95-7.
4. Anesini, C, et. al. 2008. Total polyphenol content and antioxidant capacity of commercially available tea (*Camellia sinensis*) in Argentina. *J Agric Food Chem*. 56: 9225-9.
5. Yeom, J. H, et. al. 2012. Neuraminidase Inhibitors from the Culture Broth of *Phellinus linteus*. *Mycobiology*. 40: 142-44.
6. Jung, J. Y, et. al. 2008. Antioxidant polyphenols from the mycelial culture of the medicinal fungi *Inonotus xeranticus* and *Phellinus linteus*. *J Appl Microbiol*. 104: 1824-32.
7. J. P, Kim, et. al. Inoscavin A, 1999. A New Free Radical Scavenger from the Mushroom *Inonotus xeranticus*. *Tetrahedron Lett*. 40: 6643-44.
8. Lee, I. K and Yun, B. S. Hispidin analogs from the mushroom *Inonotus xeranticus* and their free radical scavenging activity. *Bioorg Med Chem Lett*. 2006, 16, 2376-79.
9. Lee, I. K, et. al. 2010. Styrylpyrones from the medicinal fungus *Phellinus baumii* and their antioxidant properties. *Bioorg Med Chem Lett* 20: 5459-61.
10. Lee, I. K, et. al. Inoscavin E. 2007. a Free Radical Scavenger from the Fruiting Bodies of *Inonotus xeranticus*. *J Antibiot (Tokyo)*.60: 745-747.
11. Kim BC, Choi JW, Hong HY, Lee SA, Hong ST, Park EH, Kim SJ, Lim CJ. 2006. Heme oxygenase-1 mediates the anti-inflammatory effect of mushroom *Phellinus linteus* in LPS-stimulated RAW264.7 macrophages. *Journal of Ethnopharmacology* 106: 364-371
12. Del Prete G, De Carli M., Almerigogna F, Giudizi MG, Biagiotti R, Romagnani S.1993. Human IL-10 is produced by both type 1 helper (Th1) and type 2 (Th2) T cell clones and inhibits their antigen-specific proliferation and cytokine production, *J Immunol*.150: 353-360.
13. Chan KM, Decker EA, Means WJ. 1993. Extraction and activity of carnosine, a naturally occurring antioxidant in brrf muscle. *J Food Sci*. 58: 1-4.

14. Choi SJ, Lee YS, Kim JK, Kim JK, Lim SS. 2010. Physiological activities of extract from edible mushrooms. *J Kor Soc Food Sci Nutr.* 39: 1087-1096.
15. Daniel S. 2010. Medicinal mushroom *Phellinus linteus* as an alternative cancer therapy (Review). *Exp Ther Med.* 1: 407-411.
16. Fridovich I. 1989. Superoxide dismutases. An adaptation to a paramagnetic gas. *J Biol Chem.* 264: 7761-7764.
17. Hong IP, Jung IY, Nam SH, Park JS, Cho JH, Lee HW, Guo SX. 2002. Cultural Characteristics of a medicinal mushroom, *Phellinus linteus*. *Mycobiology.* 30: 208-212.
18. Ikekawa T, Nakanishi M, Uehara N, Chihara G. 1968. Antitumor action of some basidiomycetes, especially *Phellinus linteus*. *Gann.* 59: 155-57
19. Ishikawa Y, Morimoto K, Hamasaki T. 1984. Flavoglaucin, a metabolite of *Eurotium chevalieri*, its antioxodation and synergism with tocopherol. *J Am Oil Chem Soc.* 61:1862-1868.
20. Kang HW, Lee MH, Seo GS. 2013. Antioxidant and Antiinflammatory Effects of *Phellinus linteus* HN1009K. *Kor J Mycol* 41: 243-247
21. Kim HJ, Bae JT, Lee JW, Hwang Bo MH, Im HG, Lee IS, 2005. Antioxidant activity and inhibitive effects on human leukemia cells of edible mushrooms extracts. *Kor J Food Preserv.* 12: 80-85.
22. Jung JY, Lee IK, Seok SJ, Lee HJ, Lee HJ, Kim YH, Yun BS. 2008. Antioxidant polyphenols from the mycelial culture of the medicinal fungi *Inonotus xeranticus* and *Phellinus linteus*. *J Applied Microbiol.* 104: 1824-832
23. Min GJ, Kwak AM., Seok SJ, Kang HW. 2016. Morphological and cultural characteristics of a novel *Phellinus linteus* KACC93057P. *J Mushrooms.* 14; 75-80.

주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림축산식품부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니 됩니다.