

발간등록번호
11-1541000-001410-01

보안과제(), 일반과제(●)

과제번호 109089-3

목이버섯(*Auricularia auricula-judae*)의 품종육성
대량재배시스템확립, 식품·약리활성분석과 식품소재화

Mass culture system and species improvement,
food pharmacological action and food materials of
Auricularia auricula-judae

경상북도농업기술원

농림수산식품자료실



0009197

농림수산식품

제 출 문

농림수산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “목이버섯 (*Auricularia auricula-judae*)의 품종육성·대량재배 시스템확립, 식품·약리활성분석과 식품소재화” 과제의 보고서로 제출합니다.

2012 년 4 월 일

주관연구기관명 : 경상북도농업기술원

주관연구책임자 : 조 우 식

세부연구책임자 : 조 우 식

연 구 원 : 최 충 돈

연 구 원 : 최 성 용

연 구 원 : 박 소 득

협동연구기관명 : 경북대학교

협동연구책임자 : 박 승 춘

연 구 원 : 최 명 진

연 구 원 : 레 자

위탁연구기관명 : (주)전진바이오팜

위탁연구책임자 : 이 태 훈

연 구 원 : 장 훈 창

요 약 문

I. 제 목

목이버섯(*Auricularia auricula-judae*)의 품종육성·대량재배시스템확립, 식품·약리활성분석과 식품소재화

II. 연구개발의 목적 및 필요성

○ 연구목표

- 새로운 식용 및 약용버섯 대량생산재배기술 보급으로 농가의 소득 증대.
- 농산자원의 식용·약리효능 검증에 따른 버섯소비 촉진.
- 버섯을 이용한 제품의 개발범위 확대.
- 목이버섯의 대량생산기술 및 효능 (특허출원, 품종등록)
- 목이버섯 추출물에 대한 제제화에 따른 식품·약리활성의 검증.
- 목이버섯에 대하여 **확립된 약리활성 검증시스템**을 기반으로 **생체기능조절물질 (이하, BMM)**을 약용버섯에서 탐색 (다검정시스템이용: 항암활성, 항혈전활성, 항염증활성, 항당뇨활성, 항균활성, 면역활성에 대한 DB화 구축)
- 목이버섯의 품질관리 시스템의 확립
- 목이버섯의 대량 생산 기술 개발
 - 교배균주육성, 최적배지개발, 재배환경구명, 접종기술개발
- 목이버섯의 추출, 분리 및 정제공정 개발, 생체기능조절물질의 제형 공정별 최적화 및 저장성시험
- 목이버섯 가공 제품 개발로 새로운 소득원 창출

○ 연구개발의 필요성

○ 버섯은 고급식품이며 건강식품으로 경제성장과 소득수준의 향상에 따라 그 수요가 증가하고 있다. 현재 국내에서 식용버섯으로 느타리, 표고, 팽이, 새송이, 양송이버섯이 주로 인공재배 되고 있고, 최근 버들송이, 만가닥버섯, 아워버섯등의 재배가 시도되고 있다.

○ 목이버섯은 세계적으로 널리 분포되어 있고, 특히 한국, 중국, 일본 등지에서는 다량의 야생 버섯이 발견되고 있다. 목이의 종류는 크게 나누어서 목이목(Auriculariales) 목이과(Auriculariaceae) 목이속(*Auricularia*)에 속하는 목이

(*Auricularia auricula*)와 털목이(*Auricularia polytricha*)가 있고, 흰목이목 (Tremellales) 흰목이과(Tremellaceae) 흰목이속(*Tremella*)에 속하는 흰목이 (*Tremella fuciformis*)가 있다.

이들은 각종 활엽수의 고사목이나 반고사목에서 성장하고 있으며, 버섯의 모양이 사람의 귀와 같아서 중국에서는 목이(木耳), 우리나라에서도 목이 또는 흐르레기, 일본에서는 해파리 또는 기쿠라케(キクラケ)라고 하며, 서구에서는 ear mushroom이라고도 한다.

이 중에서 목이는 보통 흑목이라고 하면, 중국에서는 검정귀버섯으로 불리는데, 대량으로 재배되고 있다. 이 버섯은 다른 버섯보다 맛과 씹는 촉감이 좋아서 널리 애용되고 있다

○ 목이버섯의 대량생산이 가능하게 되면 현재 중국등지에서 거의 대부분 수입에 의존하는 국내소요량 (약400톤, 약 60억원, 2007년)의 대체가 가능하여 수입대체 효과 및 국내버섯농가의 새로운 소득품목화되어 농가수익증대효과가 기대됨.

표 . 목이버섯 수입동향 (단위: ton)

구분	2002	2003	2004	2005	2006	2007
수입량(건물중)	44	71	125	257	254	392

* 관세청자료

○ 또한 부가가치가 높은 균류 유래 약용물질(mycomedicinal)의 생산 및 개발이 가능하게 되므로 야생버섯의 인공재배기술의 개발은 새로운 버섯의 대량재배 기술 확립과 기능성성분의 개발에 의한 새로운 가치의 창출 등으로 농민의 수익증대와 신약개발에 크게 이바지할 것으로 기대됨.

Ⅲ. 연구개발 내용 및 범위

구분	연도	연구개발의 목표	연구개발의 내용
1차 년도	2009년 경북농업 기술원	○목이버섯 균주수집 및 유연관계 분석 및 현미경적특성 분석 ○최적배지개발 ○목이버섯 수집균주의 생육특성 조사	<ul style="list-style-type: none"> ● 국내외 균주수집, DNA분석과 생리형 태특성 구명 ● 유연관계분석 및 현미경적특성 분석 ● 선발육종에 위한 목이버섯 생육재배시 험: 수집 및 분양계통 10여종. ● 최적배지개발: 배지재료의 이화학적, 물리적특성 조사
	2009년 경북대	○목이버섯 처리별 및 추출법에 따 른 식품·약리활성(영양성분, 향 암, 항균 및 항산화) 탐색	<ul style="list-style-type: none"> ● 목이버섯에 관한 특허 및 정보화 분석 ● 목이버섯 영양성분 분석 ● 목이버섯 추출별 항암 활성 비교 ● 목이버섯 추출별 항균 활성 비교 ● 목이버섯 추출별 항산화 비교
	2009년 (주)진진 바이오	○목이버섯 및 목이버섯 추출액의 식품 소재화	<ul style="list-style-type: none"> ● 목이버섯을 이용한 추출액의 1차 상품 화 -미네랄 성분 분석 -식품 성분 분석 -베타-글루칸 함유량의 분석 ● 목이버섯의 추출액 및 가공제품에 대한 제제화
2차 년도	2010년 경북농업 기술원	○우량 모균주의 교배에 의한 품 종육성 ○최적 발이환경 구명 ○최적배지개발 ○접종방법의 개발	<ul style="list-style-type: none"> ● 모균주 특성검정, 교배조합검정, 우량균 주획득 *실험방법 : 분류학적 구별성이 확보된 목이버섯 종 중 일차적으로 균사생장, 균종밀도 등을 조사하여 양 적형질이 우수한 계통을 선발한 후 이로부터 단포자 를 분리하여 교배형을 결정한 후 이차적으로 단핵주 의 양적형질조사를 실시한다. 양적형질이 우수하고 교배형이 결정된 단핵주간 mono-mono mating을 실 시, 양적형질이 우수한 이핵체 조합 확보. ● 배지개발: 최적배지조합, 대체배지개발 ● 최적 온도, 습도 구명으로 발이조건확 립 ● 고체종균과 액체종균비교
	2010년 경북대	○목이버섯 추출별에 따른 실험동 물에서 식품·약리활성 및 독성시 험	<ul style="list-style-type: none"> ● 목이버섯에 대한 제품화 프로그램 작성 ● 목이버섯 추출별 항염증, 면역활성 비 교시험, 미백효능비교시험, rat에서 단 회경구독성시험 ● 질환모델동물을 이용한 당뇨 및 지질저 하제에 대한 효능 검정 ● 생체조절다기능성물질에 대한 단회경구 독성시험
	2010년 (주)진진바 이오	○목이버섯의 추출액의 발효물에 대한 식품 소재화	<ul style="list-style-type: none"> ● 목이버섯을 이용한 추출액의 발효물에 대한 상품화 ● 대용량 발효 시스템에서 조건 확립 ● 대용량 정제 공정 개발 ● 추출/분리/정제 공정중 기능성 원료의 대량 생산

			<ul style="list-style-type: none"> ● 발효전과 후의 미네랄 성분 분석 ● 발효전과 후의 식품 성분 분석 ● 발효전과 후의 베타-글루칸 함유량의 분석
3차 년도	2011년 (경북농업 기술원)	<ul style="list-style-type: none"> ○ 신제품의 육성 및 품종등록 ○ 농가실증시험 및 보급 ○ 목이버섯 건조법 구명 	<ul style="list-style-type: none"> ● 신제품의 DNA분석과 배양 및 재배특성 구명 ● 농가실증시험: 3개소이상지역, 생산력 검정, ● 경제성검증, 최적 재배시설 구명. ● 유통을 위한 자실체의 최적건조방법 구명: 열풍건조, 동결건조, 원적외건조, 건조기, 자연건조(양건, 음건) 등 ● 조사내용: 색도, 효능, 경도 등
	2011년 (경북대)	<ul style="list-style-type: none"> ○ 목이버섯 및 추출액의 농약잔류 분석법 및 멜라민 분석에 의한 품질관리설정 	<ul style="list-style-type: none"> ● 약용버섯 추출생체조절다기능성물질에 대한 항암활성, 항균활성, 항혈전, 항염증 및 당뇨에 대한 동물시험 ● 약용버섯으로부터 생체조절다기능성물질 제조법에 대한 최적화 ● 농약잔류분석 MRL 설정 (감마에이치에이치, 구아자틴, 글루포시네이트암모늄, 글리포세이트)
	2011년 (주)전진바 이오	<ul style="list-style-type: none"> ○ 목이버섯, 목이버섯추출액 및 발효액의 식품소재화 	<ul style="list-style-type: none"> ● 목이버섯을 이용한 다양한 식품소재군의 개발 ● 목이버섯 추출액을 이용한 식품가공제품 ● 목이버섯 발효액을 이용한 발효 가공 제품의 개발 ● 대용량 목이버섯 추출 원료 개발 ● 목이버섯의 유통 및 저장성 시험

IV. 연구개발결과

1. 세부과제 : 목이버섯(*Auricularia auricula-judae*)의 품종육성·대량재배시스템확립

가. 진흙버섯류 균의 기본 적정배지를 선별하기 위하여 PDA, Czapek dox, MEA, YMA, MCM 배지 등 12종의 배지를 제조하여 군사생장을 조사한 결과는 Table 4와 같다. 군사생장은 MEA, Glucose peptone, MCM, Malt Yeast extract 배지에서 양호하였고, Czapek dox, Leonian, Hennerberg 배지에서는 군사가 눈에 띄지 않을 정도의 무색투명한 상태로 배지 표면에 퍼지는 현상을 나타내어 공시균의 배양에는 부적합하였다. 목이버섯균의 군사생장에는 유기태질소원이나 복합질소원이 함유된 배지에서 군사생장이 양호하였다. 목E 균주는 목F 균주에 비해 생육이 부진하였으며, 군사체 배양시 색깔은 대체적으로 흰색을 나타내었다.

나. 목이버섯류 균사생장에 적합한 탄소원 농도 및 질소원과의 비율을 조사한 결과 탄소원(Glucose)의 농도 2%와 C/N비가 10:1일 때 균사생장과 밀도가 양호하였다. 이것은 이 등(2004)이 목질진흠버섯(*P. linteus*) C/N비 10:1에서 균사생장과 밀도가 양호하였다는 보고와 유사하였다.

다. 탄소원은 균류에 있어서 탄수화물, 단백질, 지질, 핵산 등의 합성과 에너지 공급원으로서 균의 생장에 필수적인 영양원이다. 각종 탄소원이 진흠버섯류의 균사생장에 미치는 영향을 조사한 결과는 단당류인 Glucose, Mannose를 첨가한 배지에서 균사생장이 양호하였고, 2당류인 Maltose에서도 대체로 양호한 편이었다. 목이버섯의 탄소원은 주로 단당류가 적합하였다.

라. 발색반응배지에서의 균주간 효소분해능력을 비교하였다. 투명환은 발색반응배지 내에 고르게 분포하여 존재하는 발색시약에 결합된 효소의 기질이 목이버섯균에서 분비된 세포외 효소와 반응하여 기질이 분해되면서 나타나기 때문에 투명환의 크기가 크면 세포외 효소 분비능력이 우수하다고 할 수 있다. 따라서 목이버섯 균주간에 세포외효소 분비능력 비교 평가는 균사의 접종원으로부터 투명환이 형성된 부분까지 길이를 측정하여 비교하였다. 0~20mm의 투명환이 보이는 균주는 효소분해능력이 약한 균주(W), 20~50mm의 투명환이 보이는 균주는 중도적인 효소분해능력을 보이는 균주(M), 그리고 50mm 이상의 투명환을 보이는 균주를 효소분해능력이 강한 균주(S)로 구분하여 평가하였다.

마. *A. auricula-judae*의 균사생장 최적온도를 구명하고자 15℃에서 35℃까지 5℃ 간격으로 처리하여 균사를 배양한 결과 Fig. 1에서와 같이 25~30℃가 배양적온으로 나타났다. 이는 목이의 진탕배양방법으로 균사체 생산시 최적온도가 25~30℃라는 보고(홍 등, 1983)와 유사한 경향이였다. 처리의 배양소요일수는 31일, 초발이소요일수 15일, 자실체 생육일수 18일로 나타났다. 수량의 경우 배지당 생체중이 295 g, 건물중이 31 g으로 나타났다.

사. 참나무 톱밥봉지배지(2.4kg)를 이용하여 목이버섯재배시 생체중 572g, 건물중 51g의 생산이 가능하였다. 2007년 약 400톤 수입되는 목이버섯의 수입대체효과가 기대된다. 기존 1.2kg 배지와 비교하여 인건비, 재료비등의 절감으로 1,000봉지(일) 생산농가의 경우 연간 15,000천원의 소득향상효과가 예상된다.

아. 균주별 배양특성은 목C가 PDA 38.3mm, 톱밥배지 89mm로 생육이 부진한데 비해, ASI 16023은 PDA 51.3mm, 톱밥배지 102.3mm로 생육이 빨랐다. 균주별

자실체 생육특성은 참나무톱밥붕지배지(2.4kg) 이용 재배시 목C가 배양소요일수 60일, 초발이소요일수 18일, 자실체생육일수 36일, 생체중 949g 으로 우수하였다.

자. 경상북도농업기술원에서 배양완료된 자실체형성용 배지를 3개 농가에서 실증시험을 수행하였다. 시험장소는 고령군 쌍림면, 경산시 자인면, 대구시 학정동 농가에서 경북농업기술원 목이버섯 생육시험 시험하우스와 동일하게 버섯자실체의 유도 및 관수 등의 방법으로 2011년 9월부터 11월에 걸쳐 수행한 결과, 초발이소요일수 16~17일, 자실체생육일수 34~37일, 생체중 585~645g으로 지역적인 차이는 나타나지 않았다.

2. 협동과제 : 목이버섯(*Auricularia auricula-judae*)의 식품·약리활성분석과 식품소재화

가. 본 연구의 목적은 목이버섯 70% 에탄올 추출액에서 분리된 여러 용매의 분획물(에탄올, dichloromethane, 에틸 아세테이트, butanol 및 물)의 에 대하여 P388D1 대식 세포와 육종의 180 cells에서 antitumor 활성을 평가하고 비교하는 것이었다. 각 용매의 분획 (0.01 mg/ml, 0.3 mg/ml)의 이 위의 두 세포주에서 antitumor 활성이 농도-의존적으로 나타났다. 항암활성은 MTT와 SRB의 assays 로 확인하였고 항암활성은 두 방법에서 통계적 차이는 없었다. dichloromethane 분획의 IC₅₀ 값은 sarcoma 180 세포에서 94.2 μ g/ml로 다른 분획 추출물보다 낮은 농도를 보였다. Dichloromethane (DCM) 분획 추출물은 BALB/c mice에서 고형암에 대하여 항암활성을 보였다. 비장의 거대증과 높은 splenic index는 tumor-bearing mice에서 발견되었으나 DCM 분획추출물은 이를 방지하였다. 이 결과는 항암활성의 후보물질로 DCM 분획추출물이 가장 높은 활성을 보였다.

나. 목이버섯 디클로르메탄의 층의 함염증효과를 조사하였다. 목이버섯의 디클로르메탄층은 10 μ g/ml 이하의 농도에서 농도-의존적인 방법으로 LPS에 의해서 유도된 염증반응을 억제하였다. 더욱이 RT-PCR 결과는 inflammatory cytokines (IL-6, TNF- α and IL-1 β) mRNA의 발현이 억제되었다. 그러나 디클로르메탄층은 IL-6 mRNA를 억제하지 않았다. 단백질 수준에서 IL-1 β cytokine의 발현은 농도의존적으로 억제되었다. 결론적으로 목이버섯의 에탄올추출액은 RAW264.7 cell에서 LPS에 의해 유도되는 NO, IL-6, TNF- α 그리고 IL-1 β 발현을 억제하였다.

다. *Auricularia auricula-judae*, *Phellinus gilvus*, *Ganoderma lucidum* extracts와 한국전통식물 추출물에 대해서 P388D1 대식세포를 이용하여 항암활성을 비교하고자 실시하였다. 목이버섯추출액(44.21%)과 마른진흙버섯 추출액(39.46%), *Ganoderma lucidum* 추출액 (36.64%)를 비교시 항암활성에 차이가 없었다. 100 한국야생식물 중에서 *Morus bombycis* for. *Kase*, *Draba nemorosa* var *hebecarpa*, *Sedum oryzifolium*, *Lotus corniculatus* var. *japonicus* 그리고 *Auricularia auricula-judae* 70% ethanol extracts는 41.85%, 37.31%, 30.29%, 31.98% 그리고 25.40%의 억제율을 3 mg/ml의 농도에서 보였다. 50% 항암억제율(IC₅₀)는 1.81, 1.49, 1.05, 1.10 그리고 0.72 mg/ml를 보였다. Sarcoma 180, NCI H358 그리고 SNU 1 세포주에 대해서는 목이버섯추출액은 65.71%, 69.76% 그리고 68.01% 각각 보여주었다. 위의 결과를 종합시에는 4개의 야생식물과 *Auricularia auricula-judae*, *Phellinus gilvus*, *Ganoderma lucidum* extracts는 비슷한 수준의 항암활성을 나타내었으며 이러한 추출액은 새로운 항암제의 후보물질로 가능성을 나타내었다.

라. 본 연구의 목적은 70% 목이버섯 에탄올 추출액으로부터 분획추출물에 대하여 기관지폐포암과 위암을 이용하여 항암활성을 비교하는 것이고 특히 DCM 추출액의 활성성분을 확인하고자 하였다. 70% 에탄올 추출액에서 추출한 각 용매추출액은 농도-의존적인 항암활성을 보였다. DCM에서의 주요 성분은 5,11,17,23-tetrakis (1,1-dimethyl)-28-methoxypentacyclo (65.85%)과 diazane (6.17%)이다. 특히 diazane과 gibberellic acid (GA3)는 Gas Chromatography Coupled Mass Spectroscopy (GC-MS) analysis에서 분석되었지만 DCM 분획물보다는 약한 항암활성을 보여 새로운 성분이 포함되어있다는 것을 암시한다. IC₅₀ value를 기초로 gibberellic acid는 작은 항암활성을 보였다. Apoptosis에 대하여 조사한 결과 Bcl-2의 down-regulation과 P53의 과발현을 용매분획물과 diazane 그리고 gibberellic acid의 존재하에서 보였다. Dichloromethane (DCM) fraction의 DPPH free radical 소거의 강한 활성과 antioxidant activity index (AAI)는 1.24로 항산화기능성 식품으로의 응용이 가능할뿐만 아니라 항암활성을 갖는 기능성식품의 중요한 소재로 활용이 가능할 것으로 사료되었다.

V. 연구성과 및 성과활용 계획

1. 새로운 약용버섯 재배기술 보급으로 농가의 소득 증대 (농가이전기술): 1차산업
2. 목이버섯을 이용한 제품의 개발범위 확대 (기술개발) : 2차산업
3. 목이버섯 추출액을 이용한 효능 검증
4. 목이버섯을 이용한 가공품의 개발
5. 언론홍보(TV, 신문): 새로운 야생버섯의 대량생산기술 개발 및 효능.
6. 농민의 계약재배에 따른 농가소득의 향상과 기업의 제품생산에 의한 매출액 증대
7. 논문발표, 농민교육등으로 버섯농가이용 확대.

SUMMARY

I. TITLE

Mass culture system and species improvement, food pharmacological action and food materials of *Auricularia auricula-judae*

II. OBJECTIVE AND NECESSITY

Auricularia auricula-judae is called wood ear, free ear, black ear mushroom, and free jelly fish etc. and is mainly cultivated in China, Taiwan, Thailand and Indonesia.

This is an edible mushroom and has reddish brown, gelatinous, usually wrinkled or

veined surface and with out distinctive smell. *A. auricula-judae* has been consumed medicinally as it demonstrates significant antitumor, cardiovascular, and hypercholesterolemic effects. This study has been conducted to development of mass culture system and species improvement, food pharmacological action and food materials of *Auricularia auricula-judae*.

III. RESULTS OF THE STUDY

1. This study was carried out to obtain the basic information for mycelial culture conditions of *Auricularia auricula-judae* According to colony diameter and mycelial density, the media for suitable mycelial growth of them were shown in PDA, YMA and MCM. The optimum temperature for mycelial growth was 25 ~ 30°C. Carbon and nitrogen sources were mannose and dextrin, respectively. The optimum C/N ratio was 10:1 to 2:1 with 2% glucose concentration, vitamin was thiamine-HCl and biotine, organic acid was succinic acid and lactic acid, and mineral salt was $MgSO_4 \cdot 7H_2O$,

KH₂PO₄ and NaCl.

2. *Auricularia auricula-judae*, which is also known as wood ear, free ear, black ear mushroom, and free jelly fish, is an edible mushroom. Present experiments were conducted to determine the possibility of artificial culture with oak sawdust of *A. auricula-judae*. The duration of mycelial growth and days of pinhead formation of oak sawdust bag (1.4kg) were 9~32days and 13~17days, respectively. The yield of mushroom fresh fruitbody was 275~350g.

3. To obtain basic information on the detection of cellulolytic activity in *Auricularia auricula-judae*, the influences of dye reagent, pH, and temperature were assessed. Chromogenic dye (Congo Red, Phenol Red, Remazol Brilliant Blue, and Trypan Blue) was individually incorporated into a medium containing either carboxymethyl-cellulose, Avicel, or D-cellobiose as a polysaccharide carbon substrate. The other assessments utilized pHs ranging from 4.5 to 8.0 and temperatures from 15-35°C. Overall, when *A. auricula-judae* species were transferred onto media contained Congo red and adjusted pH7.0 and then incubated at 25°C for 5 days, the clear zone indicative of cellulolytic activity was more pronounced.

4. *Auricularia auricula-judae*, which is also known as wood ear, free ear, black ear mushroom, and free jelly fish, is an edible mushroom. Present experiments were conducted to determine the possibility of artificial culture with oak sawdust of *A. auricula-judae*. The duration of mycelial growth and days of pinhead formation of oak sawdust bag (1.4kg) were 9~32days and 13~17days, respectively. The yield of mushroom fresh fruitbody was 275~350g. *A. auricula-judae* and *Auricularia polytricha* mushrooms were compared by the morphology in the electric microscope etc. They were similar but showed a little differences. And fine structure of basidiospore was investigated.

- 1) *A. auricula-judae* GBAA-01, GBAA-02, ASI 16023, ASI 16033 of Basidiospores were kidney-shape and its size is 11.0~14.4×4.0~5.3 μm.
- 2) *A. polytricha* ASI 16009, ASI 16021 were kidney-shape and its size is 11.1~13.3×3.9~5.1 μm.

5. Comparative antitumor activity of different solvent fractions from an *Auricularia auricula-judae* ethanol extract in P388D1 and sarcoma 180 cells:

The objective of this study was to evaluate and compare the antitumor activity of different solvent fractions (ethanol, dichloromethane, ethyl acetate, butanol and water) of the *Auricularia auricula-judae* 70% ethanol extract on the P388D1 macrophage and sarcoma 180 cells. A dose-dependent antitumor activity of each solvent fraction (from 0.01 mg/ml to 0.3 mg/ml) was shown against both cell types. These cytotoxic effects of all the tested fractions were confirmed on the MTT and SRB assays, without statistical differences each other. IC₅₀ value of dichloromethane fraction was 94.2 µg/ml against sarcoma 180 cells lower than any other solvent fractions. The potent antitumor effect of the dichloromethane (DCM) fraction was also found against solid tumor in BALB/c mice. The splenomegaly and higher splenic index were found in tumor-bearing mice, with the DCM fraction returning to the negative control values. Thus, the results indicated the dichloromethane fraction may have potential ingredients as antitumor candidates.

6. Anti-inflammatory activity of dichloromethane extract of *Auricularia auricula-judae* in RAW264.7 cells

The present study investigated the anti-inflammatory effects of dichloromethane extract of *Auricularia auricula-judae*. Dichloromethane extract of *Auricularia auricula-judae* inhibited Lipopolysaccharide (LPS)-induced nitric oxide (NO) production significantly in a dose-dependent manner in the concentration $\geq 10 \mu\text{g/mL}$ ($p < 0.05$). Furthermore, RT-PCR results of this study indicated that the extract markedly reduced the expressions of inflammatory cytokines (IL-6, TNF- α and IL-1 β) mRNA in LPS-treated murine RAW 264.7 macrophages, which could possibly ameliorate the inflammation. Nevertheless, dichloromethane extract of *Auricularia auricula-judae* did not show complete inhibition of IL-6 mRNA expression. The inhibition of IL-1 β cytokine at protein level was also observed in a dose dependent manner. In conclusion, the current study revealed the previously unknown effect of dichloromethane ethyl extract of *Auricularia auricula-judae* inhibitions of

the production of NO, IL-6, TNF- α and IL-1 β in LPS-stimulated macrophages.

7. Comparative antitumor activity of *Auricularia auricula-judae* extracts against tumor cells in vitro

The present study was carried to compare the anti-tumor activity of *Auricularia auricula-judae*, *Phellinus gilvus*, *Ganoderma lucidum* extracts and 100 Korean wild plants in the P388D1 macrophage cell line. In comparison with the antitumor activity of *Auricularia auricula-judae* extract (44.21%) was not differed significantly ($P < 0.05$) with *Phellinus gilvus* (39.46%) and *Ganoderma lucidum* (36.64%) at 1 mg/mL of concentration. Among 100 wild plants, *Morus bombycis* for. Kase, *Draba nemorosa* var *hebecarpa*, *Sedum oryzifolium*, *Lotus corniculatus* var. *japonicus* and *Auricularia auricula-judae* 70% ethanol extracts exhibited the viability of tumor cells by 41.85%, 37.31%, 30.29%, 31.98% and 25.40% at 3 mg/mL of concentration, while inhibition concentration (IC₅₀) values were 1.81, 1.49, 1.05, 1.10 and 0.72 mg/mL respectively. In sarcoma 180, NCI H358 and SNU 1 cell lines, the inhibitory activities of *Auricularia auricula-judae* extract were 65.71%, 69.76% and 68.01% respectively. Taken together, the results obtained from the present study indicated that four plants extracts (4% of tested wild plants) and *Auricularia auricula-judae* extract with similar levels of *Phellinus gilvus* and *Ganoderma lucidum* extracts may be as the candidates of the new potential anti-tumor agents.

8. In vitro antitumor and antioxidant activities of dichloromethane fraction of *Auricularia auricula-judae* 70% ethanol extracts

The aim of this study was to investigate the antitumor activity of solvent fractions from *Auricularia auricula-judae* 70% ethanol extract and confirmed the active components of dichloromethane (DCM) fraction showing a potent antitumor activity than other fractions in the bronchoalveolar and gastric cancer cells. The solvent fractions of *Auricularia auricula-judae* extract, inhibited the growth proliferation of tumor cells in dose-dependent manner. The principle components of dichloromethane fraction were 5,11,17,23-tetrakis (1,1-dimethyl)-28-methoxypentacyclo (65.85%) and diazane (6.17%). The antitumor active components, diazane and gibberellic acid (GA3) were

identified in this fraction by Gas Chromatography Coupled Mass Spectroscopy (GC-MS) analysis and found lower antitumor activities than dichloromethane fraction. So, the unknown components of dichloromethane fraction were responsible for its cytotoxic effects on tumor cells. On the basis of IC50 value, gibberellic acid was little cytotoxic itself. The apoptosis of tumor cells were induced by the down-regulation of Bcl-2 and over-expression of P53 on the presence of solvent fractions, diazane and gibberellic acid. The strong ability of dichloromethane (DCM) fraction to scavenge the DPPH free radicals and the antioxidant activity index (AAI) was 1.24. Thus, these findings suggest that the dichloromethane fraction might be used as functional feed additive that suppress the tumor growth in the body and enhancing antioxidant activity.

CONTENTS

I. Mass culture system and species improvement of *Auricularia auricula-judae*.

1. Summary of Project
2. Charactererization of cultured *Auricularia auricula-judae*
3. Biochemical Characterization of the tree ear fungus
4. Wood ears of the fruiting bodies produced by Sawdust cultivation and Breeding
5. Application in mushroom farm

II. Food pharmacological action and food materials of *Auricularia auricula-judae*

1. Summary of Project
2. Comparative antitumor activity of different solvent fractions from an *Auricularia auricula-judae* ethanol extract in P388D1 and sarcoma 180 cells
3. Anti-inflammatory activity of dichloromethane extract of *Auricularia auricula-judae* in RAW264.7 cells
4. Comparative antitumor activity of *Auricularia auricula-judae* extracts against tumor cells in vitro
5. In vitro antitumor and antioxidant activities of dichloromethane fraction of *Auricularia auricula-judae* 70% ethanol extracts

목 차

I. 목이(*Auricularia auricula-judae*)의 품종육성·대량재배시스템

확립

제1장. 연구개발의 개요

제2장. 국내외 연구개발 현황

제3장. 목이버섯류의 배양적특성 조사

제4장. 목이버섯 균류의 생화학적 특성조사

제5장. 톱밥재배에 의한 목이버섯의 자실체 생산 및 계통육성

II. 목이버섯(*Auricularia auricula-judae*)의 식품·약리활성분석과

식품소재화

제1장. 총 론

제2장. P388D1과 sarcoma 180 cell에서 목이버섯 에탄올 추출액으로부터 여러

용매 분획의 비교항암효과 시험

제3장. RAW264.7 cells에서 목이버섯의 디클로메탄층의 항염증 효과시험

제4장. 목이버섯추출물의 항암활성

목이(*Auricularia auricula-judae*)의 품종육성·

대량재배시스템 확립

제 1 장 연구개발과제의 개요

1. 서언

목이버섯(*Auricularia*)의 이름은 그리스어인 “Auricula”에서 왔으며 “귀(ear)”라는 뜻이다. 따라서 보통 나무귀(tree ear), Jew's 귀 또는 귀버섯이라고 불린다. 즉 자실체의 형태가 귀와 비슷하고(그림 1), 촉감이 고무질과 젤라틴질에 의해 귀처럼 느껴지기 때문이다. Lowy에 의해 분류된 목이버섯 10여 종류 가운데 목이(*A. auricula*)와 털목이(*A. polytricha*)가 가장 인기있는 버섯으로 두종류 모두 사물기생균이다. 목이는 최초로 인공재배된 버섯으로 보고되었는데, A.D. 600년경부터 중국에서 재배되어왔다.



그림1. 야생 목이버섯

1) 목이의 생물학

목이는 세계적으로 널리 분포되어 있고, 특히 한국, 중국, 일본 등지에서는 다량의 야생 버섯이 발견되고 있다. 목이의 종류는 크게 나누어서 목이목(*Auriculariales*) 목이과(*Auriculariaceae*) 목이속(*Auricularia*)에 속하는 목이(*Auricularia auricula*)와 털목이(*Auricularia polytricha*)가 있고, 흰목이목(*Tremellales*) 흰목이과(*Tremellaceae*) 흰목이속(*Tremella*)에 속하는 흰목이(*Tremella fuciformis*)가 있다. 이들은 각종 활엽수의 고사목이나 반고사목에서 성장하고 있으며, 버섯의 모양이 사람의 귀와 같아서 중국에서는 목이(木耳), 우리나라에서도 목이 또는 흐

르레기, 일본에서는 해파리 또는 기쿠라케(キクラケ)라고 하며, 서구에서는 ear mushroom이라고도 한다.

이 중에서 목이는 보통 흑목이라고 하면, 중국에서는 검정귀버섯으로 불리는데, 대량으로 재배되고 있다. 이 버섯은 다른 버섯보다 맛과 씹는 촉감이 좋아서 널리 애용되고 있다.

2) 버섯의 형태적 특성 및 식품적 가치

가. 형태적 특성

야생 목이는 봄부터 가을에 걸쳐 활엽수의 고목(枯木), 마른가지에 군생(群生)하며, 전세계에 분포한다. 자실체(子實體)는 지름 3~12cm로 중형~귀형이며 젤라틴질이다. 갓 표면은 미세한 털이 뽀뽀 나 있으며 황갈색~갈색이다. 아랫면의 자실층은 평활하나 불규칙한 연락맥(連絡脈)이 있으며 표면보다 옅은색이다. 담자기는 원통형이며, 가로막에 의해 4실이 된다. 포자(孢子)는 11~17×4~7 μ m로 콩팥형이고, 표면은 평활하고, 포자문(孢子紋)은 백색이다(그림.1). 식용버섯이며 중국요리 특히 잡채요리에 많이 사용된다.

목이는 따뜻하고 건조한 지역에서 생장이 잘 되므로, 남부 지방에서의 재배가 적당하다. 버섯의 외부 형태는 종(鐘) 또는 귀 모양이며, 버섯의 지름이 2~6cm 내외이고 잎맥 모양의 주름살이 있다. 버섯의 조직은 한천질로서 부드러우나 탄력성이 있어 질긴 편이며, 건조하게 되면 딱딱하고 얇아지게 된다. 생버섯 상태에서는 표면의 색깔이 적갈색이지만 건조되면 남흑색을 띠며, 안쪽에는 짧은 털이 있다. 그러나 이 같은 털은 짧고 부드러워서 식용하는 경우에 아무런 지장이 없다.

버섯은 대가 거의 없고 갓만 발달되어 있으며, 앞면과 뒷면의 색깔이 다르다. 앞면은 비교적 반들반들하고, 흑갈색 윤기를 띠고 있으며, 아래로 오그라들어 있다. 그러나 뒷면에는 옅은 색깔을 띠는 번식 기관인 담자층이 있고, 돌기가 있으며, 연한 회백색의 짧은 털이 있어 앞면보다 흰빛을 띠게 된다. 버섯의 담자포자는 신장형으로서 크기가 4~9 μ m × 6~5 μ m 정도이다.

나. 식품 및 약리적 가치

목이는 특유한 맛과 향이 있고 씹는 촉감이 좋으며, 버섯이 변질되지 않고 건조가 잘 되어 보관과 저장성이 강한 장점이 있다. 또, 표 1, 2, 3, 4에서 보는 바와 같이 영양가가 비교적 높아서, 단백질이 11.3%, 칼륨 1200mg, 인 434mg, 철 및 칼슘이 많으며, 각종 비타민의 함량이 높다. 특히 섬유소 함량이 높고 교질상 물질이 많

아서, 식용하게 되면 식도 및 위장을 씻어 내는 특수한 작용을 하게 된다. 외국에서는 인체 내에 들어간 털 및 섬유 모양의 잡물질을 제거하는 데 효과적이므로, 광부 또는 방직 공장 근로자들이 애용하고 있다. 의학적으로는 혈액을 적당히 응고시키는 작용이 있어서 출산모 또는 출혈이 심한 환자에게도 이용할 수 있다. 중국에서는 예부터 불로장생의 버섯으로 인식되어 있으며, 지금도 검정귀버섯으로 널리 알려져 전 국민이 즐겨 먹고 있다. 항암, 심혈관질환, 항고콜레스테롤 효과가 있는 것으로 보고되어있다(이 등, 1981; Chen, 1989; Cheung, 1996; Misaki and Kakuta, 1995). 목이버섯의 식품적 가치는 특유의 맛과 향이 있고 씹는 촉감이 좋으며, 버섯이 변질되지 않고 건조가 잘되어 보관과 저장성이 강한 장점이 있으며, 목이버섯의 국내 수요는 2007년 392톤을 수입하는등 대부분 중국에서 수입되고 있으나 최근들어 경북, 경기 등지에서 재배가 시도되고 있다.

제 2 장 국내외 기술개발 현황

중국에서 식용과 약용으로 이용되어왔으며, 목이 (*A. auricularia*)는 온대지역에서 주로 발견되고 주요생산국은 중국, 대만등지이며 비닐백(봉지)재배를 주로하며 재배지의 재한을 적게 받는다. 1987년 농촌진흥청에서 목이1호가 육성되었으나(소규모재배시험, 850ml 툽밥배지), 목이버섯의 대량생산 기술은 국내에서 연구된바 없으며, 목이버섯의 대량생산기술은 본연구진(경북농업기술원)에서 수행하여 상당한 결과를 도출하였다.

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

1. 목이버섯 균류의 배양적 특성조사

가. 시험방법

본 연구에 사용한 균주는 Table 1에 표시하였다. *Auricularia auricula-judae* 6계통을 사용하였으며, 버섯균주 보관용 배지는 PDA(Merck사)를 사용하였으며, PDA배지에 30℃ 항온기에 7~10일간 배양된 균사의 선단 부위를 직경 5mm cork borer로 절단하여 접종원으로 사용하였으며 30℃ 항온기에서 10일 간격으로 계대 배양하면서 본 실험에 사용하였다.

Table 1. List of *Phellinus* spp. strains used in this study

Scientific name	Strain name	Common name	Origin culture
<i>Auricularia auricula-judae</i>	목A	Mogjilbeoseot	GBAA-01
<i>Auricularia auricula-judae</i>	목B	Mogjilbeoseot	GBAA-02
<i>Auricularia auricula-judae</i>	목C	Mogjilbeoseot	GBAA-03
<i>Auricularia auricula-judae</i>	목D	Mogjilbeoseot	GBAA-04
<i>Auricularia auricula-judae</i>	목E	Mogjilbeoseot	GBAA-05
<i>Auricularia auricula-judae</i>	목F	Mogjilbeoseot	GBAA-06

(1) 배지선발

적정배지를 선별하기 위하여 PDA(Potato dextrose agar)를 비롯한 12종의 배지를 이용하였으며 각각의 배지는 121℃에서 20분간 고압살균후 살균된 Petri-dish(직경 8.5cm)에 20ml씩 분주하여 조제하였으며, PDA배지, 30℃에서 7일간 배양된 목질진흠버섯 균들의 균사 선단부분을 직경 5mm cork borer로 균사체를 조제한 배지의 중앙에 접종하였다. 접종된 배지는 30℃의 항온기에서 9일간 배양하여 균사생장, 밀도, 색도를 조사하였다. 시험균주의 균사생장에 적합한 배지를 구명하기 위한 배지조성은 Table 2와 같다.

Table 2. Composition of media used in this study

Nutritional reagents	Media and composition(g/l)											
	PDA	MEA	YEA	Czapek dox	Glucose peptone	YMA	Malt Yeast extract	Leonian	MCM	Henner-berg	Lilly	Hopkins
Glucose			10		10		10	25	20	50		10
Sucrose				30								
Maltose											10	
Peptone		3			10	5			2			
Yeast extract			5		10	3	5		2			
Malt extract		30			15	3	3					
Potato extract	4											
DL-Asparagine											2	
Dextrose	20					10						
NaNO ₃				3						2		
MgSO ₄ · 7H ₂ O				0.5				0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
KCl				0.5								
FeSO ₄ · 7H ₂ O				0.01				0.02				
CaCl ₂ · 2H ₂ O										0.1		
ZnSO ₄ · 7H ₂ O												
MnSO ₄ · 5H ₂ O								0.01				
K ₂ HPO ₄				1					1			
KH ₂ PO ₄				1				1	0.5	1	1	0.1
KNO ₃										2		2
Agar	15	15	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20

(2) 배양온도

공시균주의 군사생육 최적온도를 구명하기 위하여 MEA(Malt extract agar)를 기본배지로 하여 직경 5mm cork borer로 잘라낸 군사체를 접종하여 10℃, 15℃, 20℃, 25℃, 30℃, 35℃로 조절된 항온기에서 10일간 생육시켜 군사생장 길이를 측정하였다.

(3) 탄소원

기본배지는 버섯최소배지(Mushroom Minimal Media, MMM, Dextrose 20g, MgSO₄ 0.5g, KH₂PO₄ 0.46g, K₂HPO₄ 1g, Asparagine 2g, Thiamine HCl 120 μg, Bacto Agar 20g, DW 1,000ml)에 탄소원 Sucrose, Lactose, Dextrin, Mannitol, Maltose, Glucose, Fructose, Sorbitol, Mannose, Starch 10종의 탄소원을 각각 2%씩 첨가하여, petri dish에 20ml씩 분주하여 공시균주를 접종하였고, 30℃ 항온기에서 10일간 배양후 군사생장, 밀도, 색도를 조사하였다.

(4) 질소원

기본배지 버섯최소배지(MMM)에 질소원 Yeast extract, Malt extract, Pepton, Urea, Ammonium nitrate, ammonium chloride, ammonium acetate, ammonium sulfate, Pottasium nitrate, sodium nitrate, calcium nitrate, Glutamic acid, Arginine 12종의 질소원을 각각 0.2%씩 첨가하여, petri dish에 20ml씩 분주하여 공시균주를 접종하였고, 30℃ 항온기에서 10일간 배양후 군사생장, 밀도, 색도를 조사하였다.

(5) 최적 C/N비 선발

버섯최소배지(MMM)를 기본배지로 하여 질소원 NaNO₃을 0.2%로 고정시키고 탄소원으로 Glucose 농도를 10, 8, 6, 4, 2, 1, 0.4, 0.2%로 하여, C/N비가 50:1, 40:1, 30:1, 20:1, 10:1, 5:1, 2:1, 1:1이 되도록 첨가하여, petri dish에 20ml씩 분주하여 공시균주를 접종하였고, 30℃ 항온기에서 9일간 배양후 군사생장, 밀도, 색도를 조사하였다.

(6) Vitamin의 영향

기본배지는 버섯최소배지(Mushroom Minimal Media, MMM, Dextrose 20g, MgSO₄ 0.5g, KH₂PO₄ 0.46g, K₂HPO₄ 1g, Asparagine 2g, Thiamine HCl 120 μg, Bacto Agar 20g, DW 1,000ml)로 하였고, thiamine-HCl 0.1mg/l,

riboflavin 0.5mg/ℓ, biotine 0.005mg/ℓ, pyridoxine 0.5mg/ℓ, nicotinamide 2.0 mg/ℓ의 농도로 비타민류를 살균수에 혼합하여 Metrical membrane filter(0.2μm)로 여과한 후에 기본배지 살균후 첨가하여, petri dish에 20ml씩 분주하여 공시균주를 접종하였고, 30℃ 항온기에서 9일간 배양후 균사생장, 밀도, 색도를 조사하였다.

(7) 유기산

버섯최소배지에 Acetic acid, Citric acid, Maleic acid, Lactic acid, Succinic acid, Fumaric acid 6종의 유기산을 각각 0.1%씩 첨가하고, petri dish에 20ml씩 분주하여 공시균주를 접종하였고, 30℃ 항온기에서 9일간 배양후 균사생장, 밀도, 색도를 조사하였다.

(8) 미량요소

최적 미량요소를 구명하기위해 무기염류가 배제된 YM 고체배지(Peptone 5g, Yeast extract 3g, Malt extract 3g, Dextrose 10g, Agar 20g, DW 1,000ml)를 기본배지로 하여 MgSO₄·7H₂O 등 9종을 처리농도 0.1%로 첨가하여 살균후 petri dish에 20ml씩 분주하여 공시균주를 접종하였고, 30℃ 항온기에서 9일간 배양후 균사생장, 밀도, 색도를 조사하였다.

나. 시험결과

(1) 배지선발

진흙버섯류 균의 기본 적정배지를 선별하기 위하여 PDA, Czapek dox, MEA, YMA, MCM 배지 등 12종의 배지를 제조하여 균사생장을 조사한 결과는 Table 4와 같다. 균사생장은 MEA, Glucose peptone, MCM, Malt Yeast extract 배지에서 양호하였고, Czapek dox, Leonian, Hennerberg 배지에서는 균사가 눈에 띄지 않을 정도의 무색투명한 상태로 배지 표면에 퍼지는 현상을 나타내어 공시균의 배양에는 부적합하였다. 목이버섯균의 균사생장에는 유기태질소원이나 복합질소원이 함유된 배지에서 균사생장이 양호하였다. 목E 균주는 목F 균주에 비해 생육이 부진하였으며, 균사체 배양시 색깔은 대체적으로 흰색을 나타내었다.

(2) 배양온도

목이버섯균의 균사생장 최적온도를 구명하고자 10℃부터 5℃ 간격으로 35℃까지 처리하여 균사를 배양한 결과, Fig. 3에서와 같이 25℃~30℃ 범위에서 균사생장이 가장 양호하였으며, 20℃ 이하와 30℃ 이상의 온도에서는 생장이 극히 저조하였다.

(3) 탄소원

탄소원은 균류에 있어서 탄수화물, 단백질, 지질, 핵산 등의 합성과 에너지 공급원으로서 균의 생장에 필수적인 영양원이다. 각종 탄소원이 진흙버섯류의 균사생장에 미치는 영향을 조사한 결과는 Table 5에서와 같이 단당류인 Glucose, Mannose를 첨가한 배지에서 균사생장이 양호하였고, 2당류인 Maltose에서도 대체로 양호한 편이었다. 이 등(2004)은 균사생장과 밀도 면에서 볼 때 malt extract가 가장 좋은 탄소원이며, xylose를 첨가한 배지에서는 control 배지보다 균사생장이 부진하다고 보고하였고, 지 등(1996)은 D-glucose, D-mannose, dextrose를 첨가한 배지에서 균사생장이 가장 양호하다고 하였다. 이는 실험결과와 대체로 일치하였으며 목이버섯류의 탄소원은 주로 단당류가 적합하였다.

(4) 질소원

질소원은 세포질을 구성하고 있는 주요성분의 합성에 필수적인 영양원으로 각종 질소원이 목이버섯류 균의 생장에 미치는 영향을 조사한 결과는 Table 6과 같다. Malt extract가 균사생장 및 밀도가 가장 양호하였으며, Amino acid류인 L-glutamic acid를 첨가한 배지에서도 균사생장이 양호하였다. 복합질소원인 Peptone을 첨가한 배지에서도 균사생장이 양호하였으나, 유기태질소원인 Urea 첨가시 균사생장이 부진하였다. 무기태질소원인 Potassium nitrate와 Sodium nitrate에서는 Ammonium태 질소원보다 균사생장이 빠른 편이었다. 이 등(2004)은 질소원 선발에서 yeast extract가 가장 양호하였고, peptone과 NH_4NO_3 첨가 배지에서는 질소원을 첨가하지 않은 배지보다 균사생장이 떨어졌다고 보고하였으며, 지 등(1996)은 유기태질소원인 cassamino acid와 Amino acid류인 L-alanine, L-glutamic acid를 첨가한 배지에서 균사생장이 가장 양호하였다고 보고한 내용과 유사한 결과로 판단된다.

(5) 최적 C/N 비

목이버섯류 균사생장에 적합한 탄소원 농도 및 질소원과의 비율을 조사한 결과는 Table 7에서와 같이 탄소원(Glucose)의 농도 2%와 C/N비가 10:1일 때 균사생장

과 밀도가 양호하였다. 이것은 이 등(2004)이 목질진흙버섯(*P. linteus*) C/N비 10:1에서 균사생장과 밀도가 양호하였다는 보고와 유사하였다.

(6) Vitamin의 영향

기본배지는 버섯최소배지(MMM)에 각종 vitamin을 첨가하여 균사생장량을 조사한 결과는 Table 8과 같다. Riboflavin, Pyridoxine, Nicotinamide도 생육이 비슷한 수준으로 양호하였으나, Thiamine-HCl과 Biotin의 생육이 상대적으로 더욱 양호하였다.

(7) 유기산

기본배지(MMM)에 각종 유기산을 0.1%씩 첨가하여 균사생장량을 조사한 결과는 Table 9에서와 같이 succinic acid와 lactic acid에서 양호하였고, acetic acid에서는 전혀 균사가 성장하지 못하였다.

(8) 미량요소

최적 미량요소를 구명하기위해 무기염류가 배제된 YM 고체배지를 기본배지로 하여 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, KH_2PO_4 , KCl 등 9종을 처리농도 0.1%로 첨가하여 균사생장량을 조사한 결과는 Table 10과 같이 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 와 KH_2PO_4 에서 양호하였고, $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 처리구에서는 거의 균사가 성장하지 못하였다.

Table 3. Effect of culture medium on mycelial growth of *Auricularia auricula-judae* at 25°C

Culture media	Colony diameter(mm / 10 days)						Mycelial density ^{a)}						Color ^{b)}					
	목A	목B	목C	목D	목E	목F	목A	목B	목C	목D	목E	목F	목A	목B	목C	목D	목E	목F
PDA	46.0±1.0 ^{abc}	45.3±1.5 ^{bc}	42.7±1.2 ^c	41.0±1.0 ^{cd}	38.0±1.0 ^{de}	32.3±1.5 ^e	SC	SC	C	C	C	C	W	W	W	W	W	W
MEA	52.3±1.5 ^a	52.7±1.5 ^{ab}	54.3±1.5 ^a	55.3±4.7 ^{ab}	50.0±1.0 ^a	62.0±1.0 ^{ab}	SC	C	SC	C	SC	SC	W	W	W	W	W	W
YEA	40.0±2.0 ^c	50.7±0.6 ^{ab}	49.0±1.0 ^{ab}	50.3±2.1 ^{abc}	34.3±1.5 ^{ef}	52.7±2.5 ^{cd}	C	C	C	C	C	C	W	W	W	W	W	W
Czapek dox	40.0±1.0 ^c	37.0±1.0 ^d	31.0±3.6 ^{ef}	34.3±8.6 ^{de}	43.7±3.5 ^{bcd}	62.0±2.0 ^{ab}	T	T	T	T	T	T	W	W	W	W	W	W
Glucose peptone	42.7±4.9 ^{bc}	41.3±1.5 ^{cd}	35.3±1.5 ^{de}	44.0±6.2 ^{bcd}	41.3±1.5 ^{bcd}	64.3±1.5 ^a	C	C	C	C	ST	C	W	W	W	W	W	W
YMA	47.3±3.1 ^{ab}	42.7±3.2 ^{cd}	36.7±1.5 ^d	40.3±3.5 ^{cd}	47.0±1.0 ^{ab}	63.0±1.0 ^{ab}	SC	C	C	C	ST	C	W	W	W	W	W	W
Malt Yeast extract	43.3±1.5 ^{bc}	47.0±2.6 ^{abc}	43.7±1.5 ^{bc}	54.7±6.0 ^{ab}	39.0±1.0 ^{cde}	65.3±2.1 ^a	C	C	C	C	C	C	W	W	W	W	W	W
Leonian	42.3±1.5 ^{bc}	22.7±2.5 ^e	25.7±3.1 ^f	34.0±5.3 ^{de}	13.7±3.5 ^h	31.7±4.2 ^e	T	T	T	T	T	T	W	W	W	W	W	W
MCM	46.7±3.1 ^{ab}	53.0±2.6 ^a	52.7±1.5 ^a	61.0±2.6 ^a	44.3±3.1 ^{abc}	68.7±3.2 ^a	SC	SC	ST	SC	SC	C	W	W	W	W	W	W
Hennerberg	27.7±1.5 ^d	9.7±0.6 ^f	9.7±1.2 ^h	9.0±1.0 ^g	8.7±0.6 ^h	17.7±0.6 ^f	T	T	T	T	T	T	W	W	W	W	W	W
Lilly	13.0±1.0 ^e	16.3±2.1 ^{ef}	17.0±2.0 ^g	14.3±1.5 ^{fg}	21.3±2.5 ^{abc}	56.3±1.5 ^{bc}	ST	T	T	T	T	ST	W	W	W	W	W	W
Hoppkins	52.3±1.5 ^a	13.3±1.5 ^f	17.3±2.5 ^g	21.7±3.8 ^{ef}	31.3±3.2 ^h	47.0±6.6 ^d	T	T	T	T	T	T	W	W	W	W	W	W

a): C; compact, SC; somewhat compact, ST; somewhat thin, T; thin

b): Br; brownish, SY; somewhat Yellowish, Y; Yellowish, W; Whitish

z): Values in the same line with different literal differ at Duncan's multiple range test (P<0.05) and results are mean ± standard deviation of three replicates.

Table 4. Effect of carbon source on the mycelial growth of *Auricularia auricula-judae* at 25°C

Culture media	Colony diameter(mm / 14 days)						Mycelial density ^{a)}						Color ^{b)}					
	목A	목B	목C	목D	목E	목F	목A	목B	목C	목D	목E	목F	목A	목B	목C	목D	목E	목F
Sucrose	67.7±2.1 ^{ab}	27.3±5.2 ^{ab}	21.7±2.5 ^{bc}	31.0±2.9 ^a	58.7±4.2 ^{bc} _d	71.0±1.0 ^a	ST	T	T	ST	ST	T	W	W	W	W	W	W
Lactose	45.3±9.5 ^c	25.3±4.6 ^{ab}	21.0±3.7 ^{bc}	42.0±9.4 ^a	66.3±2.6 ^{ab} _c	80.3±1.2 ^a	ST	T	T	ST	T	ST	W	W	W	W	W	W
Dextrin	54.0±6.5 ^{bc}	50.7±7.3 ^a	22.0±0.8 ^{bc}	57.0±12.8 _a	68.7±2.6 ^{ab}	80.0±0.8 ^a	ST	T	T	ST	ST	SC	W	W	W	W	W	W
Mannitol	66.3±2.6 ^{ab}	29.0±0.8 ^{ab}	20.7±2.9 ^{bc}	36.0±5.4 ^a	69.0±0.8 ^a	82.0±0.8 ^a	ST	T	T	ST	ST	ST	W	W	W	W	W	W
Maltose	61.3±1.9 ^{abc}	25.3±1.2 ^{ab}	19.3±1.2 ^{bc}	31.3±1.2 ^a	57.7±2.1 ^{cd}	79.7±0.5 ^a	ST	T	T	ST	ST	T	W	W	W	W	W	W
Glucose	44.7±2.5 ^c	20.0±0.8 ^b	16.3±2.1 ^c	27.7±2.1 ^a	45.3±2.9 ^e	51.3±2.5 ^b	SC	T	T	ST	T	ST	W	W	W	W	W	W
Fructose	64.3±4.8 ^{ab}	27.0±7.0 ^{ab}	24.0±3.7 ^{bc}	33.0±2.9 ^a	57.7±4.8 ^{cd}	67.7±3.8 ^a	T	T	T	ST	T	ST	W	W	W	W	W	W
Sorbitol	66.7±2.6 ^{ab}	47.7±20.3 _a	42.7±8.7 ^a	53.0±18.8 _a	60.3±2.6 ^{ab} _c	81.7±0.5 ^a	ST	ST	T	ST	T	ST	W	W	W	W	W	W
Mannose	73.0±2.4 ^a	29.3±2.5 ^{ab}	21.0±1.6 ^{bc}	55.7±9.9 ^a	50.0±0.8 ^{de}	79.0±2.9 ^a	ST	T	ST	ST	T	ST	W	W	W	W	W	W
Starch	61.3±8.7 ^{abc}	35.7±4.5 ^{ab}	30.3±0.5 ^{ab}	41.3±2.6 ^a	60.3±3.7 ^{ab} _c	69.0±12.2 _a	SC	T	T	ST	ST	SC	W	W	W	W	W	W

a): C; compact, SC; somewhat compact, ST; somewhat thin, T; thin

b): Br; brownish, SY; somewhat Yellowish, Y; Yellowish, W; Whitish

z): Values in the same line with different literal differ at Duncan's multiple range test (P<0.05) and results are mean ± standard deviation of three replicates.

Table 5. Effect of nitrogen source on the mycelial growth of *Auricularia auricula-judae* at 25°C

Culture media	Colony diameter(mm / 10 days)						Mycelial density ^{a)}						Color ^{b)}					
	목A	목B	목C	목D	목E	목F	목A	목B	목C	목D	목E	목F	목A	목B	목C	목D	목E	목F
Yeast extract	46.3±7.6 ^a	67.0±2.0 ^a	69.0±4.6 ^a	64.7±2.1 ^a	46.3±1.5 ^a	75.7±2.1 ^a	C	SC	SC	SC	SC	C	W	W	W	W	W	W
Malt extract	42.0±4.0 ^{ab}	43.7±1.5 ^b	35.0±7.1 ^b	50.7±3.8 ^b	41.3±1.5 ^{ab}	75.7±0.6 ^a	ST	T	ST	ST	T	T	W	W	W	W	W	W
Peptone	36.0±2.6 ^{bc}	22.3±4.2 ^c	21.3±1.5 ^{bcd}	35.3±4.7 ^c	24.7±1.5 ^{def}	60.3±7.5 ^c	SC	T	ST	ST	C	ST	W	W	W	W	W	W
Urea	14.0±1.0 ^e	13.3±1.5 ^{cd}	14.3±2.1 ^d	9.7±2.1 ^e	15.0±1.0 ^{fg}	32.3±1.5 ^d	T	T	T	T	T	T	W	W	W	W	W	W
Ammonium nitrate	14.0±1.0 ^e	9.7±2.1 ^d	14.0±3.0 ^d	15.7±4.2 ^{de}	37.3±3.1 ^{abc}	69.0±1.0 ^{abc}	T	T	T	T	T	T	W	W	W	W	W	W
Ammonium chloride	21.3±2.1 ^{de}	10.3±2.3 ^d	15.0±1.0 ^d	17.7±1.5 ^{de}	29.3±4.9 ^{cde}	70.7±1.5 ^{ab}	T	T	T	T	T	ST	W	W	W	W	W	W
Ammonium acetate	27.0±1.0 ^{cd}	18.7±8.0 ^{cd}	19.0±2.0 ^{cd}	21.7±6.4 ^d	22.7±2.1 ^{ef}	60.3±1.5 ^c	T	T	T	T	T	ST	W	W	W	W	W	W
Ammonium sulphate	24.7±3.8 ^d	10.0±1.0 ^d	10.0±1.0 ^d	15.3±1.5 ^{de}	29.3±2.1 ^{cde}	60.7±2.5 ^c	T	T	T	T	T	ST	W	W	W	W	W	W
Potassium nitrate	41.0±3.6 ^{ab}	14.7±2.1 ^{cd}	15.3±3.5 ^d	21.7±2.1 ^d	34.3±5.5 ^{bcd}	63.7±5.5 ^{bc}	ST	T	T	T	T	ST	W	W	W	W	W	W
Sodium nitrate	40.3±2.5 ^{ab}	14.3±2.5 ^{cd}	16.0±1.0 ^d	19.5±0.7 ^{de}	31.0±9.6 ^{b-e}	61.0±3.6 ^c	ST	T	T	T	T	ST	W	W	W	W	W	W
Calcium nitrate	25.7±4.9 ^d	11.0±1.0 ^d	12.7±0.6 ^d	17.3±0.6 ^{de}	9.3±0.6 ^g	24.7±0.6 ^{de}	ST	T	T	T	T	ST	W	W	W	W	W	W
L-glutamic acid	21.7±4.7 ^{de}	16.7±0.6 ^{cd}	17.7±6.4 ^{cd}	19.7±2.1 ^d	21.7±1.5 ^{ef}	20.0±2.6 ^e	ST	T	ST	ST	T	ST	W	W	W	W	W	W
L-arginine	41.0±2.0 ^{ab}	21.0±6.6 ^c	31.5±13.4 ^{bc}	21.7±2.5 ^d	40.0±2.0 ^{ab}	71.0±1.0 ^{ab}	T	T	T	ST	ST	ST	W	W	W	W	W	W

a): C; compact, SC; somewhat compact, ST; somewhat thin, T; thin

b): Br; brownish, SY; somewhat Yellowish, Y; Yellowish, W; Whitish

z): Values in the same line with different literal differ at Duncan's multiple range test (P<0.05) and results are mean ± standard deviation of three replicates.

Table 6. Effect of C/N ratio on the mycelial growth of *Auricularia auricula-judae* at 25°C

Culture media	Colony diameter(mm / 15 days)						Mycelial density ^{a)}						Color ^{b)}					
	목A	목B	목C	목D	목E	목F	목A	목B	목C	목D	목E	목F	목A	목B	목C	목D	목E	목F
50 : 1	9.0±1.0 ^{d(z)}	10.0±1.0 ^d	10.7±0.6 ^d	11.7±0.6 ^e	7.0±0.0 ^e	8.7±0.6 ^c	T	ST	T	T	T	T	W	W	W	W	W	W
40 : 1	9.3±0.6 ^d	12.7±0.6 ^d	13.3±2.3 ^{cd}	13.7±1.5 ^e	11.0±1.0 ^{de}	10.7±2.5 ^c	ST	ST	T	ST	T	T	W	W	W	W	W	W
30 : 1	13.3±0.6 ^{cd}	15.3±0.6 ^d	16.3±0.6 ^{bcd}	17.0±1.0 ^{de}	20.0±1.0 ^{cd}	14.0±1.7 ^c	ST	ST	T	ST	C	ST	W	W	W	W	W	W
20 : 1	23.3±1.5 ^c	29.7±9.0 ^{bc}	18.7±2.1 ^{bc}	22.0±1.7 ^{bcd}	28.7±4.0 ^c	32.7±11.1 ^b	SC	ST	T	ST	SC	SC	W	W	W	W	W	W
10 : 1	39.0±1.0 ^b	22.3±4.0 ^{bcd}	21.3±1.2 ^{ab}	19.3±1.5 ^{cde}	53.7±2.5 ^b	77.7±2.5 ^a	SC	ST	ST	ST	C	ST	W	W	W	W	W	W
5 : 1	52.3±7.8 ^a	44.3±7.6 ^a	26.7±3.1 ^a	26.7±4.0 ^{bc}	62.7±0.6 ^{ab}	78.0±3.0 ^a	ST	ST	ST	SC	C	ST	W	W	W	W	W	W
2 : 1	61.7±1.5 ^a	34.7±5.1 ^{ab}	26.7±3.5 ^a	29.7±4.7 ^{ab}	69.7±2.5 ^a	80.3±0.6 ^a	ST	ST	ST	ST	C	ST	W	W	W	W	W	W
1 : 1	61.7±5.9 ^a	19.3±4.0 ^{cd}	21.0±0.0 ^{ab}	35.0±4.6 ^a	61.3±9.1 ^{ab}	81.0±1.0 ^a	ST	ST	ST	ST	SC	ST	W	W	W	W	W	W

a): C; compact, SC; somewhat compact, ST; somewhat thin, T; thin

b): Br; brownish, SY; somewhat Yellowish, Y; Yellowish, W; Whitish

z): Values in the same line with different literal differ at Duncan's multiple range test (P<0.05) and results are mean ± standard deviation of three replicates.

Table 7. Effect of vitamins on the mycelial growth of *Auricularia auricula-judae* at 25°C

Culture media	Colony diameter(mm / 12 days)						Mycelial density ^{a)}						Color ^{b)}					
	목A	목B	목C	목D	목E	목F	목A	목B	목C	목D	목E	목F	목A	목B	목C	목D	목E	목F
Thiamine-HCl	36.7±13.7 ^{a(z)}	49.3±4.9 ^{ab}	52.7±11.0 ^a	62.7±7.6 ^a	49.0±3.0 ^{ab}	73.0±2.0 ^c	SC	ST	T	ST	SC	SC	W	W	W	W	W	W
Riboflavin	44.7±6.7 ^a	41.3±2.1 ^b	57.0±2.0 ^a	49.0±6.2 ^a	42.7±3.1 ^b	77.0±1.0 ^{bc}	SC	T	T	ST	ST	ST	W	W	W	W	W	W
Biotin	52.3±1.5 ^a	47.0±1.0 ^{ab}	53.0±4.6 ^a	65.0±7.8 ^a	50.7±2.5 ^{ab}	80.0±2.0 ^{ab}	SC	ST	T	ST	SC	SC	W	W	W	W	W	W
Pyridoxine	60.3±4.5 ^a	53.7±5.7 ^{ab}	58.7±1.5 ^a	57.7±4.2 ^a	54.3±2.9 ^a	81.0±1.0 ^{ab}	SC	T	T	ST	ST	SC	W	W	W	W	W	W
Nicotinamide	42.5±10.4 ^a	59.0±7.8 ^a	65.3±5.1 ^a	57.0±6.1 ^a	53.0±4.6 ^a	82.0±1.0 ^a	SC	ST	T	T	ST	SC	W	W	W	W	W	W

a): C; compact, SC; somewhat compact, ST; somewhat thin, T; thin

b): Br; brownish, SY; somewhat Yellowish, Y; Yellowish, W; Whitish

z): Values in the same line with different literal differ at Duncan's multiple range test (P<0.05) and results are mean ± standard deviation of three replicates.

Table 8. Effect of organic acid on the mycelial growth of *Auricularia auricula-judae* at 25°C

Culture media	Colony diameter(mm / 13 days)						Mycelial density ^{a)}						Color ^{b)}					
	목A	목B	목C	목D	목E	목F	목A	목B	목C	목D	목E	목F	목A	목B	목C	목D	목E	목F
Acetic acid	5.0±0.0 ^{d(z)}	24.7±17.2 ^{bc}	62.7±12.4 ^a	70.3±3.2 ^a	5.0±0.0 ^d	5.0±0.0 ^c	T	ST	ST	SC	T	T	W	W	W	W	W	W
Citric acid	47.0±1.0 ^b	45.3±5.7 ^{ab}	46.3±35.9 ^a	14.3±4.5 ^b	21.0±3.0 ^b	57.3±12.4 ^{ab}	ST	ST	ST	SC	C	C	W	W	W	W	W	W
Maleic acid	56.0±4.6 ^a	42.0±4.4 ^{abc}	30.0±34.9 ^a	13.0±1.0 ^b	5.0±0.0 ^d	6.7±2.9 ^c	SC	ST	SC	SC	T	C	W	W	W	W	W	W
Lactic acid	48.7±2.1 ^b	51.7±6.5 ^a	68.7±7.8 ^a	62.7±20.5 ^a	57.0±1.0 ^a	52.7±41.3 ^{abc}	SC	ST	ST	ST	C	SC	W	W	W	W	W	W
Succinic acid	57.7±2.5 ^a	62.7±10.2 ^a	62.3±19.4 ^a	33.0±2.6 ^b	59.3±3.1 ^a	76.3±1.5 ^a	SC	ST	ST	ST	C	C	W	W	W	W	W	W
Fumaric acid	26.3±0.6 ^c	17.7±0.6 ^c	15.7±1.5 ^a	20.7±0.6 ^b	12.7±1.2 ^c	10.7±0.6 ^{bc}	SC	ST	ST	ST	C	SC	W	W	W	W	W	W

a): C; compact, SC; somewhat compact, ST; somewhat thin, T; thin

b): Br; brownish, SY; somewhat Yellowish, Y; Yellowish, W; Whitish

z): Values in the same line with different literal differ at Duncan's multiple range test (P<0.05) and results are mean ± standard deviation of three replicates.

Table 9. Effect of mineral salt on the mycelial growth of *Auricularia auricula-judae* at 25°C

Culture media	Colony diameter(mm / 10 days)						Mycelial density ^{a)}						Color ^{b)}					
	목A	목B	목C	목D	목E	목F	목A	목B	목C	목D	목E	목F	목A	목B	목C	목D	목E	목F
MgSO ₄ · 7H ₂ O	44.0±11.4 ^{a(z)}	51.0±1.0 ^{ab}	54.0±1.0 ^{ab}	56.0±3.5 ^a	51.0±2.6 ^a	77.3±1.5 ^a	SC	SC	ST	C	C	SC	W	W	W	W	W	W
KCl	40.0±8.0 ^a	45.7±3.8 ^b	47.0±1.0 ^b	54.7±2.5 ^a	49.7±5.9 ^a	75.0±1.0 ^{ab}	ST	SC	ST	C	C	SC	W	W	W	W+SY	W	W
KH ₂ PO ₄	46.7±2.5 ^a	46.3±2.5 ^b	51.7±4.2 ^b	60.3±5.5 ^a	47.7±1.5 ^{ab}	71.0±1.0 ^b	SC	SC	ST	C	C	SC	W	W	W	W+SY	W	W
K ₂ HPO ₄	44.0±4.0 ^a	56.3±1.5 ^a	60.0±1.0 ^a	61.7±1.2 ^a	40.3±2.5 ^b	77.0±1.0 ^a	ST	C	SC	C	SC	ST	W	W	W+SY	W+SY	W	W
NaCl	47.7±1.5 ^a	48.7±6.1 ^b	46.7±3.8 ^b	54.0±3.6 ^a	47.7±5.0 ^{ab}	78.0±1.0 ^a	ST	SC	ST	C	SC	SC	W	W	W	W+SY	W	W
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	5.0±0.0 ^c	5.0±0.0 ^c	5.0±0.0 ^c	5.0±0.0 ^b	5.0±0.0 ^c	5.0±0.0 ^e	T	T	T	T	T	T	-	-	-	-	-	W
FeSO ₄ · 7H ₂ O	15.0±2.6 ^{bc}	10.0±1.0 ^c	11.3±2.1 ^c	8.3±0.6 ^b	6.3±2.3 ^c	12.0±1.0 ^d	SC	ST	T	T	ST	ST	W	W	W	W	W	W
CuSO ₄ · 5H ₂ O	21.7±3.2 ^b	11.0±1.0 ^c	10.7±1.5 ^c	12.0±1.0 ^b	5.7±0.6 ^c	19.3±3.1 ^c	SC	T	T	ST	T	SC	W	GB	GB	GB	GB	W
Control	43.3±3.5 ^a	53.0±1.0 ^{ab}	50.3±4.9 ^b	57.3±2.3 ^a	46.0±2.6 ^{ab}	72.3±1.5 ^b	SC	C	C	C	SC	ST	W	W	W	W	W	W

a): C; compact, SC; somewhat compact, ST; somewhat thin, T; thin

b): Br; brownish, SY; somewhat Yellowish, Y; Yellowish, W; Whitish

z): Values in the same line with different literal differ at Duncan's multiple range test (P<0.05) and results are mean ± standard deviation of three replicates.

2. 목이버섯 균류의 생화학적 특성조사

가. 시험방법

cellulolytic 효소의 검출을 위한 최적의 배지조성을 위해 다당류로 결합하여 염료를 기반으로 방법을 선택하였다. 염료 또는 염료 고분자 복합이 분해되면 투명 또는 무색 halo를 생산한다. 셀룰로오스는 일반적으로 cellulolytic 효소를 분비 곰팡이의 검출을 위해 사용되었다. Trichoderma와 Saccharomyces는 각각 cellulolytic 효소 생산을 위한 positive, negative control로 사용되었다.

모든 배양은 감자한천배지(Difco)에 5~7일간 25 °C에서 준비되었다. 기본적인 매체는 질소와 1.5 % 한천 가루로 0.1 % yeast nitrogen base (Difco)으로 구성되었다. 또한, 세가지 종류의 다당류 carboxymethyl (CM)-cellulose (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), Avicel (Fluka, Buches, Switzerland), and D-cellobiose (Sigma-Aldrich)가 추가되었다. 배양후, 각각의 플레이트는 각 곰팡이 균종 주위의 투명 또는 무색 haloes (이하 맑은 지대로 지칭)의 직경 측정하였다.

cellulolytic activity를 감지하는 가장 좋은 염료를 선택하려면 chromogenic 염료 (콩고 레드, 페놀 레드, Remazol 브릴리언트 블루, 또는 Trypan 블루)의 0.5 %가 uninoculated 매체를 추가되었다. 배양은 각 chromogenic 매체로 전이하여 5일 동안 25°C에서 배양하였다. 산도의 효과를 평가하기 위해 우수한 것으로 판단 chromogenic 매체가 접종 따라 4.0-8.0의 산도에서 준비되었고, 배양은 5일 동안 25°C에서 실시되었다.

나. 시험결과

발색반응배지에서의 균주간 효소분해능력을 비교하였다. 투명환은 발색반응배지내에 고르게 분포하여 존재하는 발색시약에 결합된 효소의 기질이 목이버섯균에서 분비된 세포외 효소와 반응하여 기질이 분해되면서 나타나기 때문에 투명환의 크기가 크면 세포외 효소 분비능력이 우수하다고 할 수 있다. 따라서 목이버섯 균주간에 세포외효소 분비능력 비교 평가는 균사의 접종원으로부터 투명환이 형성된부분까지 길이를 측정하여 비교하였다. 0~20mm의 투명환이 보이는 균주는 효소분비능력이 약한 균주(W), 20~50mm의 투명환이 보이는 균주는 중도적인 효소분해 능력을 보이는 균주(M), 그리고 50mm 이상의 투명환을 보이는 균주를 효소분비능력이 강한 균주(S) 로 구분하여 평가하였다.

Table 1. Comparison of chromogenic reaction by *Auricularia auricula-judae* on media containing different dyes

Species	Congo Red			Phenol Red			Remazol Brilliant Blue			Trypan Blue		
	CM	Avi	Cel	CM	Avi	Cel	CM	Avi	Cel	CM	Avi	Cel
GBAA-01	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+
ASI 6009	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-
ASI 6021	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
<i>Trichoderma.</i> (positive control)	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Saccharomyces.</i> (negative control)	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-

CMC, Carboxymethyl cellulose; Avi, Avicel; Cel, D-Cellobiose; +, clear zone detection; -, no clear zone detection.

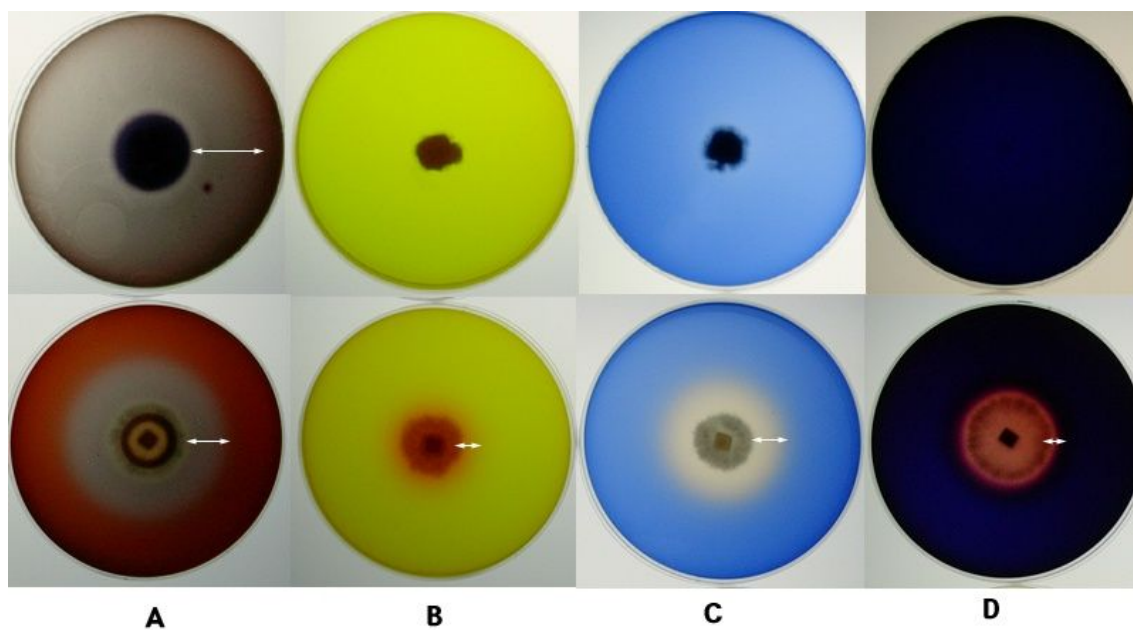


Fig. 1. Examples of clear zones formed in media containing D-cellobiose and dye (A, Congo Red; B, Phenol Red; C, Remazol Brilliant Blue; D, Trypan Blue). Top row: after incubation of *Trichoderma* used as positive control. Bottom row: after incubation of GBAA-01. Arrows indicate clear zones.

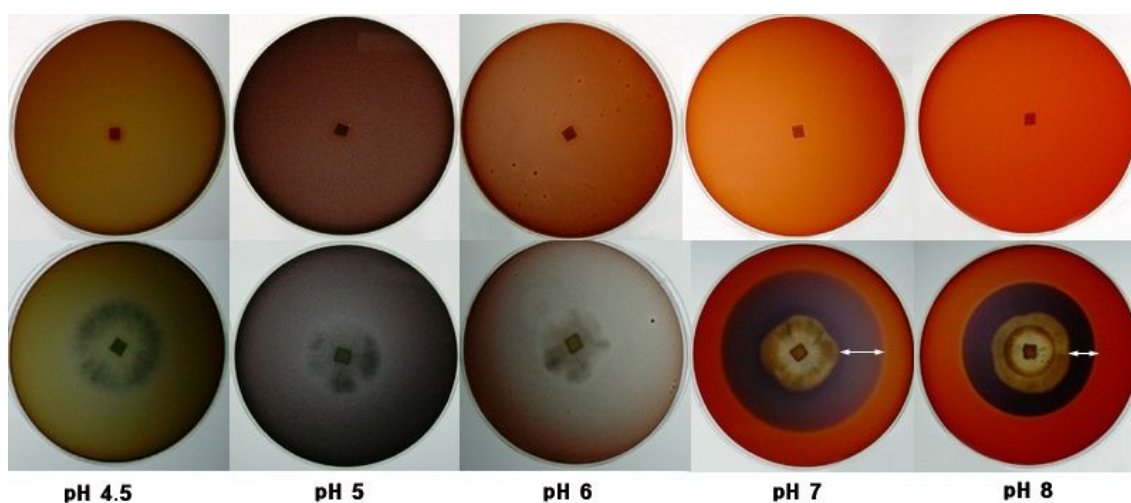


Fig. 2. Examples of clear zones formed in pHs ranging from 4.5 to 8.0. Media contain D-cellobiose and Congo Red as carbon substrate and chromogenic dye, respectively. Top row: before incubation. Bottom row: after incubation of GBAA-01. Arrows indicate clear zones.

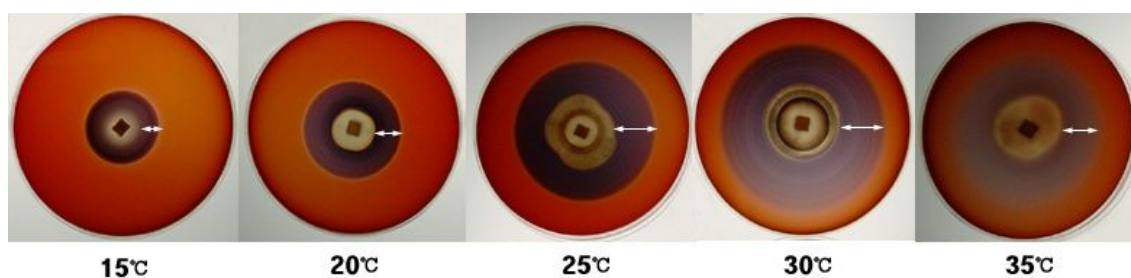


Fig. 3. Result of chromogenic reaction of GBAA-01 on the Congo red containing, pH 7.0 medium incubated at various temperatures . D-cellobiose was used as the carbon substrate. Arrows indicate clear zones.

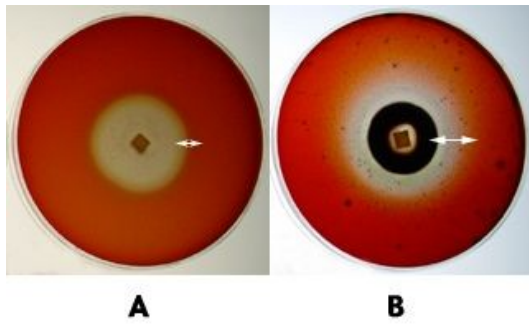


Fig. 4. Clear zone formed on Congo Red-containing, pH 7.0 medium by chromogenic reaction of GBAA-01. Carbon substrates used were Avicel (A), and CM-cellulose (B). Arrows indicate clear zones.

3. 톱밥재배에 의한 목이버섯의 자실체 생산 및 계통육성

가. 시험방법

(1) **공시균주** : 시험에 사용한 공시균주는 대구 앞산에서 채취한 목이(*Auricularia auricula-judae*; GBAA-01)로 시험을 수행하였으며, 균주는 PDA 배지에서 계대 배양을 하면서 재배실험에 사용하였다.

(2) **배양온도** : 시험에 사용한 목이(*A. auricula-judae*)의 균사생장에 적합한 온도를 조사하기 위하여 온도별 배양실험은 PDA 배지에 7일간 배양된 균사의 선단 부위를 직경 5 mm의 cork borer로 절단하여 PDA 배지에 접종한 후 10, 15, 20, 25, 30, 35℃로 각각 조정된 항온기에 5일간 배양한 후 균사체의 직경을 조사하였다.

(3) 재료의 성분분석

이화학성 분석은 AOAC법에 준하여 일반성분을 대상으로 분석하였고 C/N율은 농업기술연구소 토양이화학분석법 (한기학, 1988)에 준하였는데, 전탄수화물은 Tyurin법(개량법)으로 전질소는 Kjeldahl법으로 P₂O₅는 비색법으로 CaO, MgO, K₂O는 원자흡광분석법으로, pH는 건조시료 5 g을 증류수 25 ml에 30분간 침적시킨 후 pH-Meter (Fisher model-50)로 분석하였다.

(4) 배지조제

배지재료로는 참나무톱밥 (oak sawdust) 90% (v/v), 첨가제로는 미강 10%를 사용하였으며, 재료와 첨가제를 부피비율 (V/V)로 혼합하여 배지의 수분함량을 65%로 조절한 다음, 내열성 비닐봉지 (부피 2 l)에 1.4 kg씩 충전하고 배지 중앙에 직경 15 mm의 구멍을 뚫은 후 마개를 닫아 121℃에서 90분간 고압살균하였다.

(5) 균사배양 및 자실체 생육조사

고압살균된 배지가 15℃ 정도로 식은 후 미리 배양된 종균을 20 g 정도씩 접종하여 20℃에 배양하면서 배양완성일수를 조사하였다. 배양이 완료된 배지는 발이를 유도하기 위하여 온도 15~20℃, 습도 90%의 조건에서 발이를 유도하면서 초발이 소요일수를 조사하였다. 그 후, 온도 15~20℃, 습도 85%의 조건에서 수확기까지 생육시킨후 자실체를 수확하여 배지당 수량과 자실체 특성을 조사하였다.

(6) RAPD에 의한 DNA 양상분석

교잡체(hybride)로부터 DNA를 분리하여 Bioneer PCR Premix kit를 이용하여 genomic DNA 50 ng 2 μ l, primer 100 ng 1 μ l, DDW 7 μ l를 첨가하였다. PCR 증폭반응은 ABI PCR SYSTEM 9700을 이용하여 처음 DNA의 열변성을 위하여 94 $^{\circ}$ C에서 5분간 1cycle, 그리고 94 $^{\circ}$ C에서 1분, 55 $^{\circ}$ C에서 1분, 72 $^{\circ}$ C에서 2분간으로 총 35 cycle 실시하였으며, 최종 DNA의 합성은 72 $^{\circ}$ C에서 10분으로 하였다. 증폭된 PCR 산물은 1 \times TAE (40 mM Tris; 8.0, 20 mM acetic acid, 1nM EDTA)완충용액에서 1.5%의 agarose gel로 전기영동한 후 1 μ g/ml ethidium bromide 용액으로 염색하여 UV transilluminator상에서 나타나는 DNA band를 확인하였다.

(7) 인공재배 자실체의 형태학적 특징 조사

자실체의 형태와 담자포자의 미세구조 등을 관찰하기 위하여 관공(Hymenial pore)은 실체현미경(Olympus SZX9)을 이용하여 40배로 관찰하였으며, 담자포자는 광학현미경(Olympus AX70)을 이용하여 400배의 배율로 관찰하였다.

(8) 농가실증시험

경상북도농업기술원에서 배양완료된 자실체형성용 배지를 3개농가에서 실증시험을 수행하였다. 시험장소는 고령군 쌍림면, 경산시 자인면, 대구시 학정동 농가에서 경북농업기술원 목이버섯 생육시험 시험하우스와 동일하게 버섯자실체의 유도 및 관수등의 방법으로 2011년 9월부터 11월에 걸쳐 수행하였다.

나. 시험결과

(1) 배지재료의 이화학성

배지재료로 사용한 참나무톱밥, 미강의 이화학적 특성을 조사한 결과, 산도 (pH)는 참나무톱밥 6.0, 미강 6.4로 각각 분석되었다. T-C는 참나무톱밥 46.6%, 미강 52.4%로 나타났고, T-N는 참나무톱밥이 0.28%, 미강 0.94%로 나타났다. CaO의 경우 참나무톱밥 0.92%으로 나타났으며, 미강 0.07%으로 낮게 나타났다 (Table 1).

Table 1. Chemical compositions of substrates for cultivation of *Auricularia auricula-judae*

Substrate	pH (1:5)	T-N	T-C	C/N	P ₂ O ₅	K ₂ O	CaO	MgO
		(%)						
Sawdust	6.0	0.28	46.6	166	0.03	0.10	0.92	0.04
Rice bran	6.4	0.94	52.4	55.8	2.16	1.93	0.07	0.95

(2) 균사생장 및 자실체 생육특성

*A. auricula-judae*의 균사생장 최적온도를 구명하고자 15℃에서 35℃까지 5℃ 간격으로 처리하여 균사를 배양한 결과 Fig. 1에서와 같이 25~30℃가 배양적온으로 나타났다. 이는 목이의 진탕배양방법으로 균사체 생산시 최적온도가 25~30℃라는 보고(홍 등, 1983)와 유사한 경향이였다. 처리의 배양소요일수는 31일, 초발이소요일수 15일, 자실체 생육일수 18일로 나타났다. 수량의 경우 배지당 생체중이 295 g, 건물중이 31 g으로 나타났다 (Table 2, Fig. 1, 2).

Table 2. Mycelial growth and mushroom production by sawdust bag cultivation of *Auricularia auricula-judae* strain GBAA-01

Duration of mycelial growth(days)	Days for pinhead formation	Fruiting body					
		Wt. of fresh individual fruitbody(g)	Wt. of dried individual fruitbody(g)	Length of Pileus (mm)	Width of Pileus (mm)	Thickness of Pileus (mm)	Wt. of fresh fruitbody(g)
29~32	13~17	6.8±4.2 ^{a)}	1.5±0.8	62.9±18.1	41.6±14.1	0.78±0.12	275~350

The sawdust bag medium was 1.4 kg.

a): Mean ± standard deviation of ten replicates

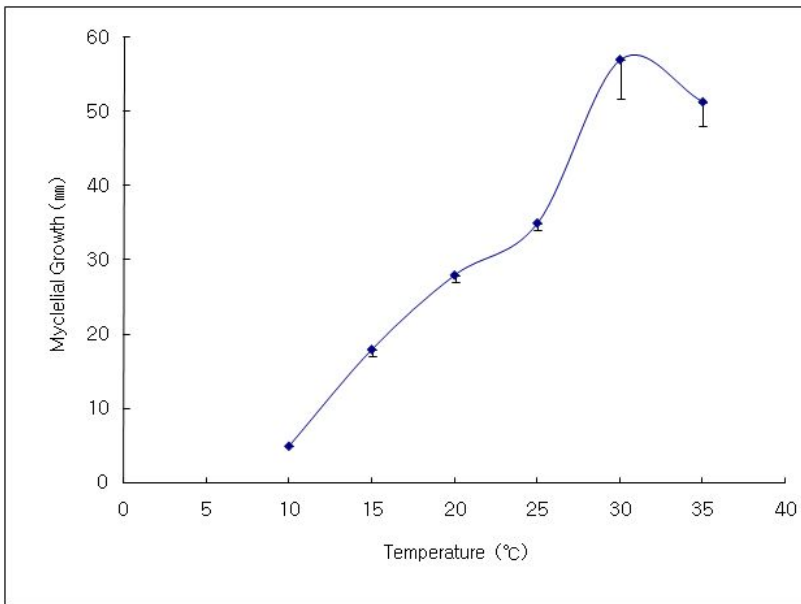


Fig. 1. Effect of temperature on mycelial growth of *Auricularia auricula-judae* strain GBAA-01 on PDA medium

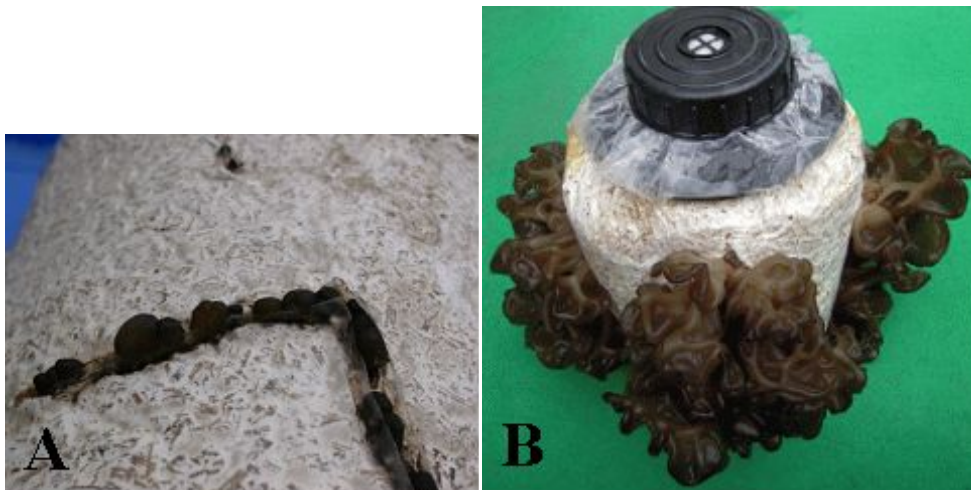


Fig. 2. Primordia (A) and mature fruiting bodies (B) of *Auricularia auricula-judae* on sawdust cultivation.

표. 배지처리별 균배양 및 자실체 생육특성

배지조성	배양소요일수 a) (일)	초발이소요일수 b)	자실체생육일수 b)	생체중 (g)	건물중 (g)
참나무톱밥 90%+ 미강 10% (1.2kg)	21	10	18	215	22
참나무톱밥 90%+ 미강 10% (2.4kg)	25	9	21	572	51

a) 온도; 22±1℃, 습도; 50~60%, b) 온도; 15±1℃, 습도; 80~90%

* 2.4kg 톱밥배지

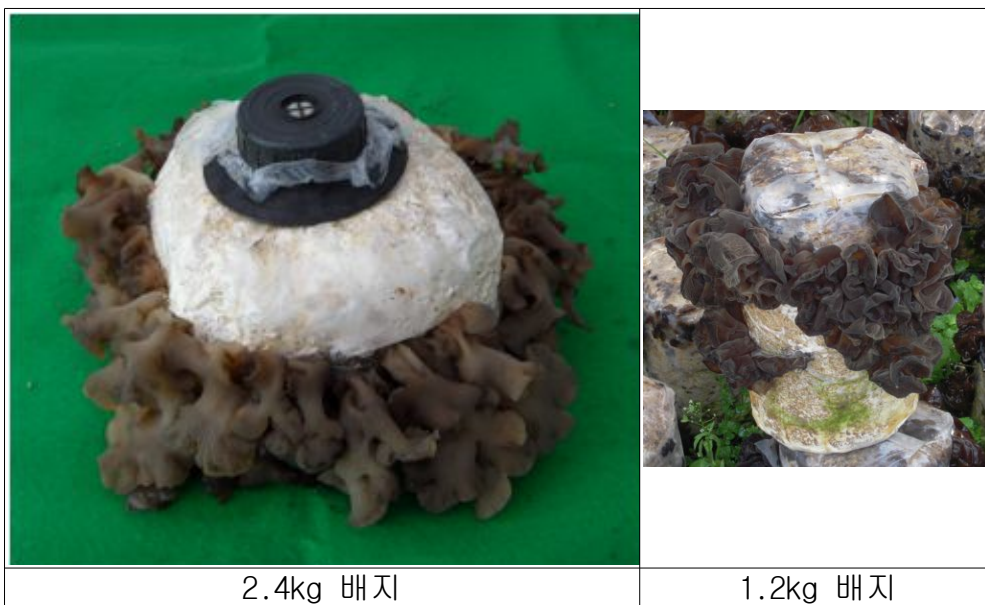


그림. 목이버섯의 수확기

6. 현장활용 기대효과

- 참나무 톱밥봉지배지(2.4kg)를 이용하여 목이버섯재배시 생체중 572g,건물중 51g 의 생산이 가능하였다. 2007년 약 400톤 수입되는 목이버섯의 수입대체효과가 기대된다.
- 기존 1.2kg 배지와 비교하여 인건비, 재료비등의 절감으로 1,000봉지(일) 생산농가의 경우 연간 15,000천원의 소득향상.
- 경제성분석 (일: 1,000봉지 생산농가 기준)

손실적요소(A)	이익적요소(B)
-	- 인건비(30% 절감) : 1,100천원 × 10개월 = 11,000 천원
-	- 재료비(40% 절감) : 40 × 10,000장 = 400 × 10천원 = 4,000천
계(A) : 0	계(B) : 15,000천원
o 추정수익액 (B-A): 15,000천원	

(3) 목이버섯의 우수계통육성시험

균주별 배양특성은 목C가 PDA 38.3mm, 톱밥배지 89mm로 생육이 부진한데 비해, ASI 16023은 PDA 51.3mm, 톱밥배지 102.3mm로 생육이 빨랐다. 균주별 자실체 생육특성은 참나무톱밥봉지배지(2.4kg) 이용 재배시 목C가 배양소요일수 60일, 초발이소요일수 18일, 자실체생육일수 36일, 생체중 949g 으로 우수하였다.

표 1. 균주별 균배양 및 자실체 생육특성

균 종	PDA 생장정도 (mm)	톱밥배지 생장정도 (mm)	균사밀도
목B	39.0	96.5	중
목C	38.3	89.8	상
목D	38.7	89.0	상
ASI6009	41.0	99.8	중
ASI6021	40.2	99.3	중
ASI6023	51.3	102.3	중
ASI6033	50.4	100.3	중

* 25℃ (8일차), 25℃ (26일차), 2.4kg봉지

표 2. 균주처리별 균배양 및 자실체 생육특성

균종	배양소요일수 ^{a)} (일)	초발이소요일수 ^{b)} (일)	자실체 생육일수 ^{b)} (일)	생체중 (g)
목B	63	21	36	903
목C	60	18	36	949
목D	59	21	36	834
ASI6009	57	25	36	262
ASI6021	58	22	36	645
ASI6023	59	16	36	775
ASI6033	60	15	36	572

a) 온도: $20 \pm 1^\circ\text{C}$, 습도: 50~60%,

b) 온도: $15 \pm 1^\circ\text{C}$, 습도: 80~90%



그림1. 균주별 자실체 생육특성

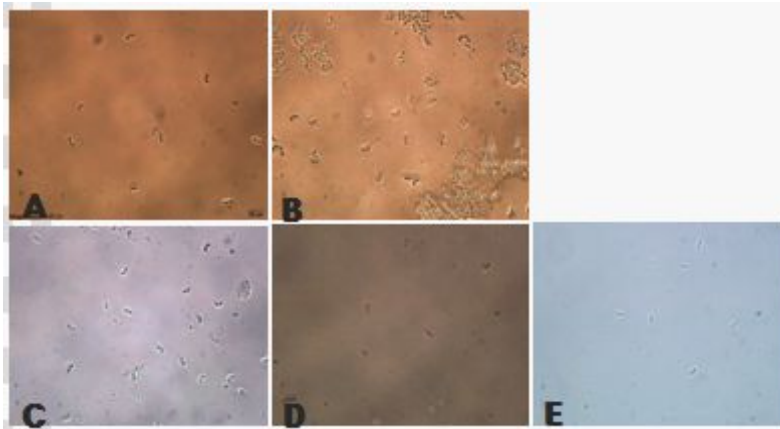


그림. 목이버섯 담자포자 형태 (×200)

(4) 농가실증시험

경상북도농업기술원에서 배양 완료된 자실체형성용 배지를 3개 농가에서 실증시험을 수행하였다. 시험장소는 고령군 쌍림면, 경산시 자인면, 대구시 학정동 농가에서 경북농업기술원 목이버섯 생육시험 시험하우스와 동일하게 버섯자실체의 유도 및 관수등의 방법으로 2011년 9월부터 11월에 걸쳐 수행한결과, 초발이소요일수 16~17일, 자실체생육일수 34~37일, 생체중 585~645g으로 지역적인 차이는 나타나지 않았다.

표 . 지역별 목이버섯 자실체 생육특성

지역	초발이소요일수 ^{b)} (일)	자실체 생육일수 ^{b)} (일)	생체중 (g)	건물중 (g)
고령군	17	37	585	61
경산시	16	35	610	58
대구시	16	34	645	67

a) 온도; 20±1℃, 습도; 50~60%,

b) 온도; 15±1℃, 습도; 80~90%

1. 구분 : 품종육성

2. 육성내력

가. 균주수집 : 2007 ~ 2010

나. 특성검정

- 2007 ~ 2008 : 배양 및 재배적 특성조사.
- 2008 ~ 2010 : 자실체 발생 균주 선발 시험.
- 2009 ~ 2010 : 우수 균주 농가 실증 시험

다. 육성기관 : 경상북도농업기술원 농업환경연구과¹⁾
 농촌진흥청²⁾
 경북대학교³⁾

라. 육성자 : 조우식¹⁾, 최성용¹⁾, 유영복²⁾, 석순자²⁾, 정희영³⁾, 박승춘³⁾

3. 주요특성

- 가. 군사배양 최적온도는 25 ~ 30℃로 30℃에서 군사생장이 가장 양호하며 자실체 발생 및 생육온도는 15 ~ 25℃.
- 나. 접종 후 약 1개월간 배양을 실시한 후, 매물작업을 실시해야 함.
- 다. 자실체의 형태는 중형~귀형이며, 중생형으로 발생함.
- 라. 단일 개체중은 자실체 크기가 중형(장경 271mm, 두께 2.3mm)이어서 조직은 젤라틴질이다. 참나무톱밥에서 자실체 발생이 양호하고 자실체 중량도 높음.
- 마. 발생작업 후, 9 ~ 10일 이후부터 자실체의 발생이 시작함.
- 바. 배지별 군사생육에서는 PDA, MEA배지가 양호함.
- 사. 참나무톱밥방지재배에서 수량 및 품질 우수.

4. 적응지역 : 전 국

5. 재배상 유의점

- 가. 참나무에서 군사활착과 군사생육이 양호함.
- 나. 재배용배지 살균시 배지수분을 65% 내외로 조절하여 살균하는 것이 유리함.
- 다. 이식작업시 상품성 향상을 위해서는 늦어도 5월전 또는 9월이후에 매물하여 여름철 고온기의 생장정지를 피해야 함.
- 라. 재배사 습도는 80 ~ 90%이상으로 유지하며 지면의 습도를 이용하는 것이 유리함.
- 마. 자실체 생육시 공중습도를 유지해야 하므로 습도조절이 가능한 시설재배사에서 실시해야 함

6. 보완을 요하는 특성

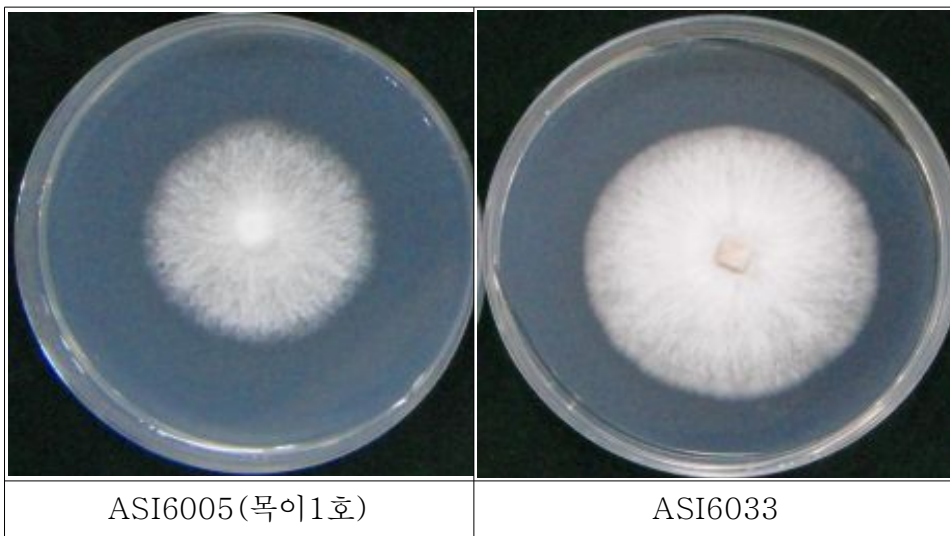
7. 시험성적

가. 선발균주의 배양적 특성

○ 배지별 균사생장특성 (배양온도 25℃, 배양기간 : 21일, 단위 : cm)

균 주	구 분	PDA	MEA	YEA	CDA
ASI6005	균사생장	52	54	73	25
	균사색택	W	W	W	W
ASI6033	균사생장	87	85	85	28
	균사색택	W	W	W	W

※ W : white



○ 균사생장(PDA, 25℃, 16일)

○ 온도별 균사생장특성 (공시배지 : PDA, 배양기간 : 16일, 단위 : mm)

균 주	구 분	10℃	15℃	20℃	25℃	30℃	35℃
ASI6005	균사생장	5.0	10.3	19.3	34.0	45.7	6.3
	균사색택	W	W	W	W	W	W
ASI6033	균사생장	5.	12.3	19.0	81.0	49.3	50.7
	균사색택	W	W	W	W	W	W

○ 균총 형태 특성 및 최적 pH(PDA, 25℃, 15일배양)

균 주	균총밀도	균총색택	최적pH
ASI6005	보통	흰색	6.0
ASI6033	보통	흰색	6.0

나. 원목배양 및 자실체 형성 특성

○ 참나무톱밥배지의 배양완성소요일수(2.4kg, 20℃)

균 주	참나무톱밥		
	배양완성일수	균사밀도 ^{a)}	오염율 ^{b)}
ASI6005	27	+++	+
ASI6033	25	++++	+

a) + : poor, ++ : ordinary, +++ : good, ++++ : very good

b) - : 오염없음, + : 5%미만, ++ : 10%미만, +++ : 15%미만, ++++ : 20%미만

○ 자실체 발생 및 생육 특성

균 주	초발이 소요기간 ^{a)}	자실체발생 최적온도	자실체생육 적온	자실체50% 발생소요기간 ^{b)}
ASI6005	10일	20~25℃	20~35℃	26일
ASI6033	9일	15~25℃	15~25℃	21일

a) 원목배지 이식후 첫 자실체 발생소요기간

b) 원목매물 후 배양원목의 50%에서 자실체가 발생하는 소요기간

○ 자실체 병해저항성





균 주	푸른곰팡이병	세균성병
ASI6005	0	0
ASI6033	0	0

※ 푸른곰팡이병, 세균성병저항성(자연발생정도): 0(무발생), 1(병반면적을 1%미만), 3(1-10%), 5(11-30%), 7(30-50%), 9(50%이상)

○ 자실체의 형태적 특성

균 주	자실체발생형	단면 형태	표면색택	이면(포자공) 색택	포자비산량
ASI6009	중생형	귀형, 중형	갈색	갈색	+
ASI6033	중생형	귀형, 중형	흑갈색	흑갈색	+

○ 자실체의 색도조사

균주		L	a	b	color
ASI6005	Contex	20.16	4.84	7.19	
	Tubes	27.29	5.28	6.72	
ASI6033	Contex	16.36	1.83	3.17	
	Tubes	19.10	0.75	1.77	

○ 자실체의 경도

균주		경도 (kg/cm ²)
ASI6005	Contex	3674
	Tubes	4120
ASI6033	Contex	5140
	Tubes	5325

○ 자실체의 개체 특성

균 주	개체무게 (생체중, g)	길이(mm)	두께(mm)
ASI6005	24.3	295	2.2
ASI6033	16.2	271	2.3

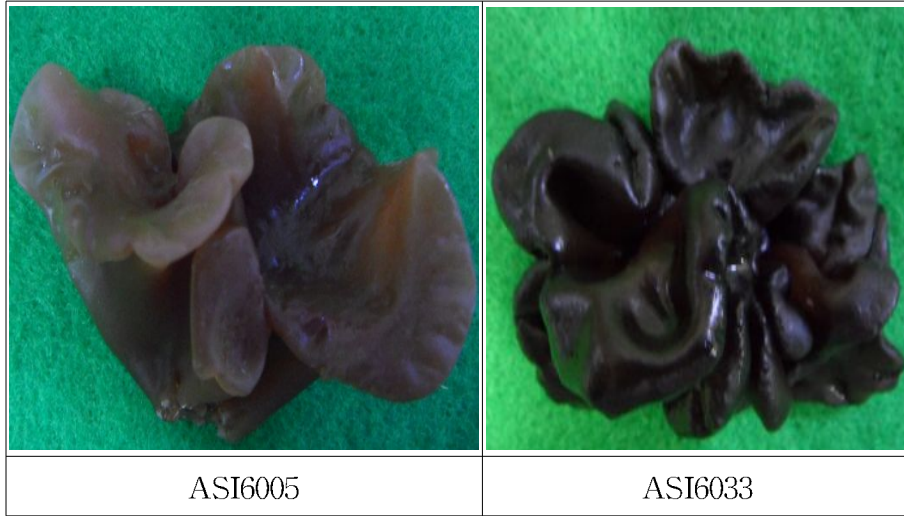
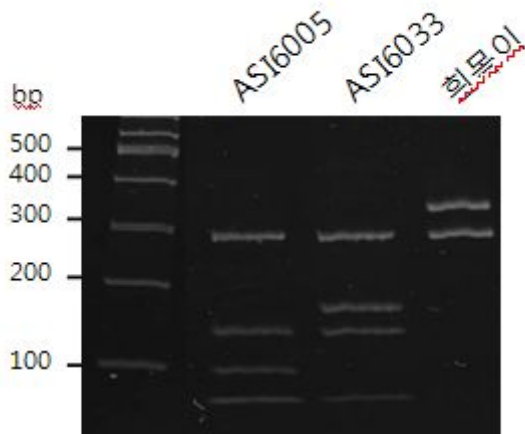


그림. 자실체의 개체특성

8. 육성경과

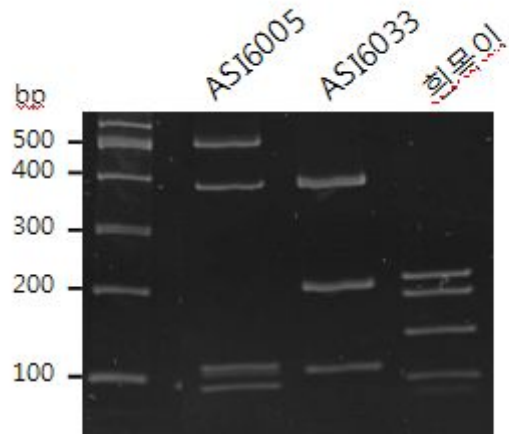
목이버섯의 28S rDNA 영역 PCR-RFLP 결과

- *Hae* III 제한효소 -



- *Hae* III : 0.5ul
- Buffer B5 : 1ul
- DDW : 6.5ul
- PCR Product : 2ul (50ng/1ul)
- 37°C 2시간 Heating block 방치
- 8 % Acrylamide gel 사용.

- *Msp* I 제한효소 -



- *Msp* I : 0.5ul
- Green buffer : 1ul
- DDW : 6.5ul
- PCR Product : 2ul (50ng/1ul)
- 37°C 2시간 Heating block 방치
- 8 % Acrylamide gel 사용.

※ 육성계보 : 2007년부터 수행한 목이버섯류의 인공재배법개발 연구수행중에서 경북지역 채집균주와 분양받은 균주중에서 균사생장과 자실체발생이 양호한 목이버섯균주를 계통선발하여 육성.

9. 종자확보량

가. 균주증식용 시험관 10개를 5℃에서 보관중이며, 수시로 대량증식 가능.

10. 대체품종 : 없음.

11. 기타 참고사항

가. 품종명칭 추천안 및 명명사유

작물명	계통명	명명안	명 명 사 유
목이버섯	ASI 6033	흑수정	검정색의 깨끗한 목이버섯

목이버섯(*Auricularia auricula-judae*)의 식품·약리활성분 석과 식품소재화

제 1 장 연구개발과제의 개요

1) 연구개발의 목적

- 목이버섯은 각종 요리에 감초처럼 사용되는 식품버섯으로 연구시작 전에는 대부분 수입에 의존하였으나 최근에는 국내에서 많이 재배되는 종이 되었다. 목이버섯은 식품버섯으로 분말가루가 유일하게 변비증상의 개선 효과라는 고시형 기능성 식품소재로 식약청에 등록되어 있는 버섯이다. 안전성이 확보된 버섯에 대한 식품 및 약리활성분석을 실시하여 목이버섯의 활용가치를 높이고 국내 버섯농가에게 그 결과를 제공하는 것이 목적이다.

- 식품버섯으로 변비를 위한 된장 및 분말된장

2) 필요성 및 범위

(제1세부과제): 목이버섯(*Auricularia auricula-judae*)의 품종육성·대량재배시스템 확립

- 새로운 식용버섯의 대량생산재배기술 보급으로 농가의 소득 증대
- 목이버섯의 분류학적 위치구명
- 수집 목이버섯 자실체 특성조사를 통한 계통화 및 육성모분화
- 목표 품종특성에 적합한 모본선발 및 육성을 통한 구별성 확보.
- 대량생산을 위한 최적배지 개발
- 최적 재배용기의 개발
- 적정 발이환경 구명

(제2세부과제): 목이버섯(*Auricularia auricula-judae*)의 식품·약리활성분석 및 식품소재화

- 목이버섯 추출법에 따른 다기능성 약리활성에 대한 DB화 구축 (목이버섯 처리별 및 추출법에 따른 식품·약리활성(영양성분, 항암, 항균 및 항산화) 탐색)
- 목이버섯 추출법에 대한 제제화에 따른 약리활성의 검증(목이버섯 추출법에 따른 실험동물에서 식품·약리활성 및 독성시험)
 - 목이버섯의 다용도 제형개발(목이버섯의 추출액의 발효물에 대한 식품 소재화)
 - 목이버섯의 저장안정성 및 제형별 용해속도 조절 예측
 - 산업화를 위한 목이버섯 추출액의 대량 추출/분리/정제 공정 확립, 목이버섯 및

추출액의 농약잔류분석법 및 멜라민 분석에 의한 품질관리설정 (목이버섯의 농약잔류분석, 멜라민 분석을 실시하고자 하였으나 국내에서 재배되는 목이버섯의 경우는 멜라민 오염의 근원이 없는 관계로 농약의 잔류분석만 실시하였다.

- 목이버섯을 이용한 다기능성 food의 개발
- 목이버섯의 상품에 대한 산업화 시스템의 확립 (목이버섯, 목이버섯추출액 및 발효액의 시제품)

제 2 장 국내외 기술개발 현황

연구수행 기관	연구개발의 내용	연구개발성과의 활용현황
경북농업기술원	목이버섯 톱밥봉지 인공재배기술개발 (2008.11.)	영농활용, 보도자료 등 활용
농촌진흥청	목이1호 품종육성 (1987년)	-
Chang, S. T.	중국에서의 목이버섯 원목재배연구 (1982년)	-
Vilela, L. C.	필리핀에서 목이버섯 톱밥재배	-

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 1 절 목이버섯(*Auricularia auricula-judae*)의 식품·약리활성분석과 식품소재화

목이버섯의 약리활성을 구명하고 식품소재화의 가능성을 확인하기 위하여 항암활성과 항염증효과에 대하여 실시하였다. 그 외 시험은 계획에 따라 추가적인 보완의 방법으로 실시를 하였다. 목이버섯은 일반적으로 가장 많이 요리에 사용되는 버섯이지만 약리활성이 강한 약용버섯이라고 할 수 있다. 목이버섯은 흐르레기라고도 하는데 자연상태에서는 여름에서 가을까지 활엽수의 죽은 나무에 3~12cm의 자실체로 서로 달라붙어 불규칙한 덩어리로 자란다. 수분이 있으면 목처럼 흐물흐물해진다. 특히 건조시키면 연골질로 되고 물을 먹으면 다시 원형으로 된다. 형태는 귀 모양을 이루고 있다. 중국요리에 널리 쓰이고 있으며 최근에는 한국 전통음식에도 많이 사용되고 있다. 또한 목이버섯의 분말은 변비 예방 및 치료를 위한 기능성식품으로 등록이 되어 있다. 이러한 점에 착안하여 본 연구에서는 목이버섯을 이용한 식품소재의 개발과 약리활성에 대하여 집중적으로 연구하였다.

본 연구에서는 목이버섯의 약리활성과 식품소재화를 중점으로 연구되었다. 약리활성은 목이버섯 추출액, 목이버섯의 추출액중 여러 가지 분획추출액 그리고 식품소재화 대한 연구를 실시하였다. 또한 추가적으로 식품의 소재화를 위해서 시험계획서상에 없는 추가적인 연구도 보완하여 탄력적인 연구로 수행을 실시하였다. 특히 연차별 평가에 따라 중요도를 조정하여 실험을 실시하였다.

본 연구는 연차별 그리고 연구의 흐름에 따라 다음과 같이 진행을 하였다.

1) 목이버섯의 70% 에탄올 추출액을 1차 원료로 하여 함암스크린닝 균주인 P388D1과 sarcoma 180 cells로 항암활성을 실시하였다. Basidiomycetes는 항암활성, 면역활성, 항심혈관질환, 항바이러스, 항균작용 그리고 항기생충 작용 등 다양한 약리작용 알려져 있다. 이중 항암활성은 버섯류에서 가장 많이 알려진 약리작용이다(Wasser and Weis, 1999). 따라서 본 연구에서도 carbohydrates, protein 그리고 minerals (Ca, P and Fe) 등이 풍부한 목이버섯에 대하여 항암활성을 주요 목표 약리작용으로 삼았다. 목이버섯 역시 polysaccharide가 많은 것으로 알려졌다. 이 다당류는 rhamnose, xylose 그리고 glucose와 더 적은 양의 mannose, galactose 그리고 arabinose가 있으며 그 외 uronic acids, sulfate groups, N 그리고 ash (Chen et al., 2008) 및 활성 성분인 beta (1-3) 그리고 (1-6) D glucans이 많이 포함되어 있는 것으로 알려져 있다. 목이버섯의 약리작용으로는 antitumor activity, anticoagulant, anti-lipidemic, anti-cholesterol, 그리고

antiplatelet aggregation (Chen et al., 2008; Misaki et al., 1981; Yoon et al., 2003)가 보고되어 있다. 그러나 분획별 추출용매에 따른 약리활성은 많이 알려져 있지 않다.

2) Dichloromethane 분획층의 항염증 활성에 대하여 RAW264.7 cells에서 측정을 하였다. 목이버섯은 식용버섯으로 약리활성이 많이 알려져 있다. 식용버섯이므로 안전성이 높을 것으로 예상이 되고 새로운 치료약물로써 가능성이 매우 높을 것으로 예측하고 있다(Misaki et al., 1981). 식용버섯이 항암활성이 있다는 것은 여러 보고에서 알려져 있다. 식용버섯의 열수추출물이 Sarcoma 180을 Swiss albino mice에 이식한 후에 항암활성을 보고하였다(Ikekawa., 1969; Misaki et al., 1981). 그 외 hypoglycemic 효과, anti-diabetic 효과 (Yuan, 1998). 또한 anticoagulant와 platelet aggregation이 조사되었다(Yoona et al., 2003; Francia., 1999). 그러나, 우리가 알기로는 항염증에 대한 목이버섯 추출액의 보고는 이 보고서가 처음이다.

염증반응은 모든 질병의 시초가 되는 기전이다. 건강을 유지하기 위해서는 항염증을 제거하여야 한다. 항염증을 보기 위해서는 pro-inflammatory cytokines, tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukins (ILs), cyclooxygenase (COX), 그리고 inducible nitric oxide synthase (iNOS)을 주로 표식자로 관찰을 한다 (Bonizzi and Karin, 2004; Verma et al., 2010; Duffield, 2003). 이러한 pro-inflammatory mediators에 대한 gene은 항염증 시작과 유지에 중요하게 나타난다. 항염증에 중요한 nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs)은 COXdfp 주로 작용하고 최근에는 COX-2 inhibitors를 사용하여 부작용을 줄인다 (Chowdhury et al., 2009). 본 연구에서는 dichloromethane 추출액에 대하여 RAW 264.7 cells를 이용해서 NO, cytokine IL-6, TNF- α 그리고 IL-1 β pro-inflammatory markers에 대한 변화를 측정하였다.

3) 목이버섯 추출액과 약용식물 그리고 약용버섯의 추출액과 항암활성을 비교하였다. 항암제의 발견에서 약용식물은 안전성의 차원에서 매력적인 자원이다. 이들 자원에서 얻어진 항암성분으로는 vinblastine, vincristine, camptothecin derivatives, topotecan, irinotecan, etoposide 그리고 paclitaxel이 임상에 이용이 되고 있다. 한편, 약용버섯 역시 오랫동안 식용으로 이용하여 왔다. 최근에 많은 연구가들은 약용버섯의 생리활성에 지대한 관심을 갖고 오고 있다. Basidiomycetes는 항암활성이 많이 알려져 있다. Basidiomycetes에는 Agaricus, Pleurotus, Lentinus, Ganoderma, Grifola, Volvariella, Auricularia 그리고 Tremella 속이 산업체에 관심을 받고 있다. 본 보고서에는 100 wild plants, *Auricularia auricula-judae*, *Phellinus gilvus* 그리고 *Ganoderma lucidum* extracts에 대하여 P388D1 세포주를 이용하여 비교 실험을 실시하였다.

4) 사람 유래의 세포주를 이용하여 dichloromethane 분획층의 항암활성에 대하여 실시하였고 GC-MS 분석을 통하여 항암활성에 대하여 연구하였다. Bronchoalveolar tumor는 악성 종양이다. 이 암은 폐암에서 80%에 해당되고 예후가 불량하다 (Giaccone, 2002; Langer, 2004). 그리고 위암은 4번째로 흔한 암으로 초기에 발견되지 못하고 3기 혹은 4기에 발견이 되면 예후가 좋지 못하다 (Parkin et al., 2005). 특히 위암은 한국에서 가장 흔하다 (Kim et al., 2010; Yamamoto, 2001). 특히 폐와 위의 초기 진단은 매우 어렵고 생존율이 1년 이상이 되지 못할 것이다 (Janku et al., 2010). 따라서 더 효과적이고 안전한 치료법이 요구된다. 식물과 약용버섯 추출액은 초기에 암 예방에 효과적이라고 보고되고 있다(Lee et al., 2009 Wasser, 2002). 본 연구에서는 여러 유기용매 분획물에 대하여 항암활성을 측정하였다. 이 연구에서 우리는 ethyl acetate, butanol, dichloromethane, ethanol 그리고 water fractions을 70% ethanol extracts에서 얻어 NCI H358M, SNU1 cell에 대하여 항암활성 즉 tumor progression genes (Bcl-2 그리고 CD147), tumor suppressor genes (Bax 그리고 P53)을 RT-PCR 분석을 실시하였다. 그리고 가장 강력한 dichloromethane 층에 대하여 GC-MS analysis을 실시하였다.

5) 식품소재화를 위하여 위탁연구를 통하여 참여기업체와 함께 목이버섯의 된장 제조법, 목이버섯 분말 된장 제조법, 목이버섯 된장의 약리활성에 대하여 연구를 하였으며 상품화 연구를 위하여 각종 인증 실험을 함께 실시를 하였다. 목이버섯은 약용버섯이 아니므로 식품 소재화 및 소비 활성화를 위하여 다양한 상품화 연구가 필요하다. 된장은 우리의 일상 식탁에서 빼놓을 수 없는 중요한 식품이며, 한국인이 가장 선호하는 정통 발효식품이다. 역사적으로 오래전부터 우리 식생활에 이용되어 온 한국의 재래식 된장은 대두의 발효로부터 생성되는 독특한 맛과 냄새를 가지고 있으며, 숙성 중에 원료에 함유된 아미노산화합물과 당에 의해 생성된 갈변 물질은 강한 항산화력을 가진다. 또한, 타 조미식품과는 달리 단백질뿐만 아니라 아미노산, 유기산, 미네랄 및 비타민류를 풍부히 함유하여 조미목적 이외에도 된장 그 자체로서 훌륭한 영양원이 되고 있다.

된장은 콩을 이용한 발효식품이므로 콩이 가지고 있는 생리 활성이 된장에도 존재하고 있으므로 최근 된장의 기능성에 관한 연구가 증가되고 있다.

된장은 원료인 콩이 가지는 영양성분 이외에도 인체의 건강증진을 위한 생리활성 물질이라고 알려진 식이섬유, 인지질, 아이소플라본(isoflavones: genistein, daidzein, etc.), 페놀화합물(phenolic acids), trypsin inhibitor, maillard 반응산물, globulin, peptide 등의 성분이 들어있어 혈관계질환(동맥경화), 신장질환, 심장병, 당뇨병 예방효과, 노인성 치매 예방효과, 항암효과(유방암, 대장암, 폐암 등), 골다공증 억제 등의 성인병 예방효과가 있음이 발표되었다. 이외에도 된장이 미생물에 의한 발효과정 중 기능성 펩타이드 등의 생리활성 물질을 생성하여 혈압 상승

억제효과 및 지질대사 개선 효과, 항 돌연변이성 및 항암성, 항균작용 등을 나타내는 것으로 알려져 있다.

특히, 된장의 항암효과는 된장을 끓일 경우에도 효과가 살아 있는 것으로 나타났고, 실험예로 발암물질을 투여하여 쥐를 암에 걸리도록 한 후, 전통조리법인 된장찌개에서 된장을 먹인 결과, 된장을 먹이지 않은 쥐보다 암 조직의 무게가 80% 이상 감소하였다는 결과가 보고되고 있다.

최근 된장의 효능이 입증되고 있음에도 불구하고, 여성의 경제활동 참여 증가와 핵가족화와 같은 빠른 도시화의 진행, 식품의 편의성 증대 등에 따라 가정에서 전통식 된장을 담그는 비율은 감소되고 있으며, 된장의 섭취 또한 감소하고 있는 추세로, 최근에는 공장에서 제조되는 개량식 된장의 생산량이 증대되고 있다.

따라서, 전통 된장을 현대인의 기호에 맞게 변형시키고, 여러 가지 기능성 소재를 첨가하여 그 기능성을 향상시키는 연구와 개발이 요구되고 있다.

버섯은 고급식품이며 건강식품으로 경제 성장과 소득 수준의 향상에 따라 그 수요가 증가하고 있다. 그 중 목이버섯은 세계적으로 널리 분포되어 있고, 특히 한국, 중국, 일본 등지에서는 다량의 야생 버섯이 발견되고 있다.

목이의 종류는 크게 나누어서 목이목(Auriculariales) 목이과(Auriculariaceae) 목이속(*Auricularia*)에 속하는 목이(*Auricularia auricula*)와 털목이(*Auricularia polytricha*)가 있고, 흰목이목(Tremellales) 흰목이과(Tremellaceae) 흰목이속(*Tremella*)에 속하는 흰목이(*Tremella fuciformis*)가 있다. 이들은 각종 활엽수의 고사목이나 반고사목에서 성장하고 있으며, 버섯의 모양이 사람의 귀와 같아서 중국에서는 목이(木耳), 우리나라에서도 목이 또는 흐르레기, 일본에서는 해파리 또는 기쿠라케(キクラケ)라고 하며, 서구에서는 ear mushroom이라고도 한다.

이 중에서 목이는 보통 흑목이라고 하며, 중국에서는 검정귀버섯으로 불리는데, 이것이 대량으로 재배되고 있다. 이 버섯은 다른 버섯보다 맛과 씹는 촉감이 좋아서 널리 애용되고 있다.

목이버섯의 주요 기능으로는 영양분 공급에 의한 자양기능, 사람으로 하여금 식욕을 자극하는 기능, 그리고 인체의 건강 상태를 조절하는 조절기능을 가진다.

목이버섯은 버섯 중에서도 항종양 억제율이 매우 높은 것으로 알려져 있으며, 오장을 좋아지게 하고, 이질과 하혈을 멎게 해준다. 또한 목이버섯은 혈액을 정화시켜 피부미용과 빈혈, 고혈압, 동맥경화와 같은 성인병 등에 도움을 주며, 천연 젤라틴을 다량 함유하고 있어, 배설을 촉진시켜 변비에도 좋은 효과를 가진다.

본 연구에서는 된장의 기능성 및 부가가치를 향상시키고, 기능성과 맛을 증진시킨 된장 개발을 위하여 목이버섯 분말을 첨가하여 발효 숙성시킨 된장을 제조하여 된장의 성분 변화 정도와 관능적 특성을 조사하였다.

본 연구에서는 된장의 기능성 및 부가가치를 향상시키고, 기능성과 맛을 증진시킨 된장 개발을 위하여 목이버섯 분말을 첨가하여 발효 숙성시킨 된장을 제조하여

제조 및 대량 판매를 목적으로 하는 100% 국산 원료만을 사용하여 된장의 성분 변화 정도와 관능적 특성, 이화학적 특성, 항암 테스트 등을 중점연구 하였다.

제2절 재료 및 방법

1. P388D1과 sarcoma 180 세포주에서 목이버섯 에탄올 추출액으로부터 추출용매에 따른 항암활성의 비교 시험

가. 사용시약(Chemicals/reagents). RPMI 1640 medium, fetal bovine serum (FBS), L-glutamine (2 mM), penicillin (100 i.u/ml) and streptomycin (10 mg/ml), dimethyl sulfoxide (DMSO), 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT), trypan blue (TB), sulphorhodamine B (SRB), 50% trichloroacetic acid (TCA), 1% acetic acid, 10 mM unbuffered tris Base (PH 10.5) 그리고 doxorubicin은 Sigma-Aldrich Chemical Co. (St Louis, MO, U.S.A.)에서 구입하였다. 그 외 시험에 사용한 시약은 analytical grade로 사용하였다.

나. 목이버섯의 준비

본 실험에 사용한 목이버섯은 경상북도 농업기술원에서 공급받아 사용하였다. 목이버섯의 항암활성, 항산화활성, 항염증활성 등을 비교하고자 버섯을 건조하여 분쇄한 후 70% Ethanol과 1:50의 비율로 혼합하여 85℃에서 5시간 추출한 후 감압농축하였다. 이 후 chloroform, ethyl acetate, butanol을 통하여 분획추출 후 5 μ m filterpaper 을 통하여 여과 한 후 감압농축하여 샘플로 사용하였다. 목이버섯의 일관성을 확보하기 위하여 목이버섯을 분쇄기로 분말화하여 각각의 목이버섯 분말로부터 3 군데에서 1 g를 각각 취해 경북대학교 공동실습관으로부터 Elemental Analyzer(FISONS, EA 1110)를 지원받아 carbon(C), oxygen(O), hydrogen(H), 그리고 nitrogen(N)을 정량분석하여 비교하였다. 중금속은 elementary analyzer와 ICP로 분석하였다. 무기성분의 비교·분석을 위하여 건식법으로 전 처리 과정은 목이버섯을 건조분말로 만든 다음 각각의 시료 0.2~0.3 g를 Teflon vessel 용기에 취하여 HNO₃(고순도, Merck사 GR Grade) 5 ml을 가한 후 마개를 연 상태로 100~150℃에서 가열하였다. 이 과정을 통해 산을 완전히 날려 보낸 다음 여기에 다시 HNO₃ 3 ml과 HCl 0.5 ml을 취하여 마개를 닫고 가압 상태로 100℃ 부근에서 하루 정도 가열하였다. 용기를 완전히 식힌 다음 마개를 열고 시료가 완전히 산에 녹은 것을 확인한 다음 마개를 연 상태에서 산이 1 ml 정도 남을 때까지 다시 가열하였다. 증류수로 희석($\times 100$)하여 ICP 분석기(Jobin-Yvon, JY 38 Plus, France)를 이용해 ICP-AES으로 분석하였다.

Table 1-1. General elementary analysis of *Auricularia auricula-judae*

Nitrogen	Carbon	Hydrogen	Sulphur
2.27%	40.19%	6.02%	0%

Table 1-2. Heavy metal analysis of *Auricularia auricula-judae*

Cd	Pb	Zn	Fe	Ca	K
0 ppm	0 ppm	942.63 ppm	177.56 ppm	15905.73 ppm	6204.66 ppm

다. *Auricularia auricula-judae* 추출액의 준비.

건조된 *Auricularia auricula-judae*를 70% ethanol(EtOH)로 100°C에서 6시간 동안 추출하였다. 상층액은 여과지(70 mm, Advantec, Toyo Roshi Kaisha Ltd, Japan)를 이용하여 여과하고 진공농축기 (Buchi Water Bath B-480)로 70°C에서 감압 농축하였다. 감압 농축한 에탄올 농축액은 Fig 1에 도시한 방법에 따라 Soxhlet extractor를 이용하여 연속적으로 분획을 실시하였다(Figure 1-1). 이때 이용한 분획용매는 dichloromethane(DCM), ethyl acetate(EtOAc), butanol(BuOH), 그리고 water(DW)를 이용하여 분획 실시하여 농축 및 건조를 하였다.

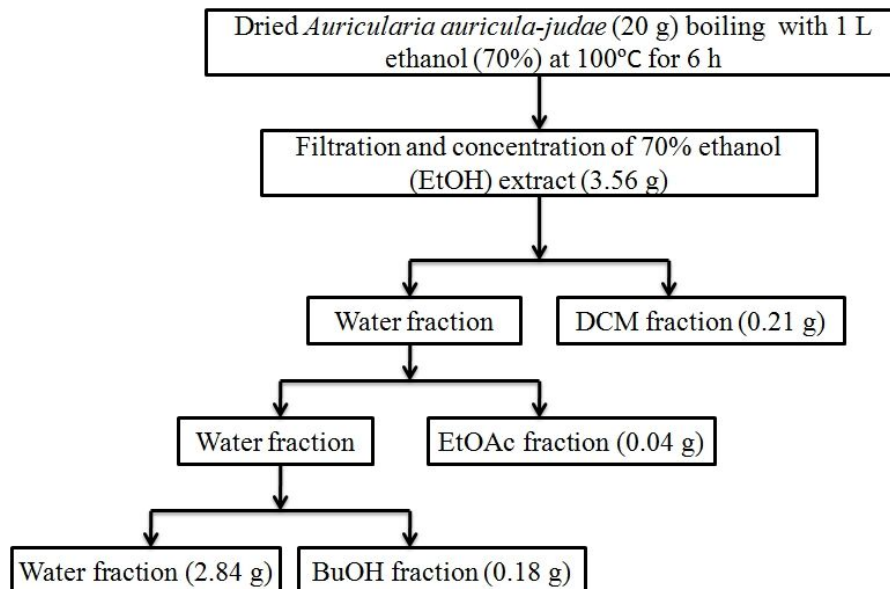
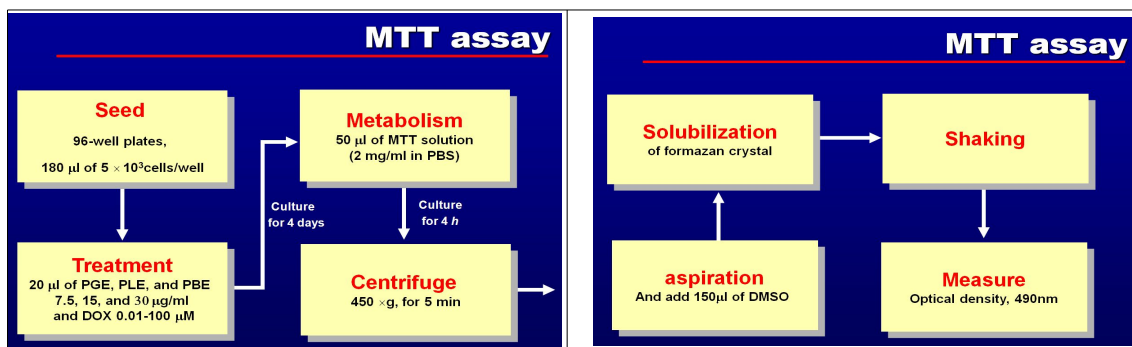


Figure 1-1. Schematic diagram of fractionations of *Auricularia auricula-judae* ethanol extracts. EtOH, DCM, EtOAc and BuOH are stand for ethanol, dichloromethane, ethyl acetate and butanol, respectively.

다. 세포배양. 본 실험에서 사용된 sarcoma 180과 P388D1의 두 개의 확립된 마우스 유래 종양 세포주로 한국세포주은행(KOREAN CELL LINE BANK)에서 분양 받았다. 종양세포주의 배양 및 유지를 위한 배지는 RPMI 1640을 이용하였으며 fetal bovine serum(FBS) 10%를 첨가하고, penicillin과 streptomycin이 각각 10,000 units/ml 와 10 mg/ml 섞인 배양액으로 tissue culture flask 25cm²를 사용하여 37°C, 5% CO₂ 세포배양기에서 배양하였다.



라. Determination of cell viability by MTT and SRB assay. 두 마우스 유래 종양 세포에 대하여 목이버섯의 여러용매 추출액을 1, 0.3, 0.1, 0.03 and 0.01 mg/ml의 농도로 만든 후에 양성대조군 DOX의 세포성장 정도를 sulforhodamine(SRB) B(Kim 등, 1996)와 microtetrazolium(MTT) assay(Mosmann 등, 1983)을 약간 변형하여 다음과 같이 시행하였다. 우선 SRB 법은 두 종양세포수가 각 well당 1만개가 되도록 96-well plate에 접종한 후 24 시간 동안 배양하고 각 시험물질을 접종하여 48시간 동안 추가 배양하였다. 각 종양세포에 50% trichloroacetic acid(TCA)를 추가하여 4°C 및 2시간 동안 고정을 실시하였고, 증류수에 5회 수세하여 고정액을 제거하였다. 종양세포에 0.4% sulforhodamine B(SIGMA)를 이용하여 30분 동안 실온에 염색을 실시한 후 Tris base(10 mM, pH 10.5)를 추가하여 생존한 종양세포에만 염색된 염색액을 녹여내었다. MTT법은 well당 세포 수 5천 개가 되도록 접종하고 SRB법과는 달리 배양 전에 미리 각 시험물질을 접종하였다. 접종 후 4일 동안 배양을 실시하였다. 배양이 종료된 후 3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide(MTT, SIGMA, USA) 용액을 well 당 50 µl씩 가하여 4시간 동안 더 배양하였고, 배양이 끝난 후 각 well에서 주의 깊게 배지를 제거하였다. 다음은 DMSO(dimethylsulphoxide) 을 well 당 150 µl를 가하여 formazan crystal을 녹여내었다. SRB 및 MTT법에서 염색된 cell plate 들은 microplate reader(VERSAmatrix™, Molecular Devices, USA)를 이용하여 490 nm에서 그 흡광도를 측정하였다. 종양 세포들에 대한 시험물질의 효과를 평가하기 위하여 세포수의 측정은 시험물질을 처치한 well의 흡광도를 시험물질을 처치하지 않은 음성 대조군 well의 흡광도로 나누어 %로 나타내었다. 통계분석은 SAS statistical package(release 8.1 SAS Institute Inc., Cary, North Carolina, USA)를 이용

하여 ANOVA를 실시하고 그 유의 수준은 $P < 0.05$ 로 하였다.

The inhibition of tumor cell proliferation was calculated using the following Formula:

$$\text{Inhibition rate (\%)} = \{1 - (\text{OD value of sample} / \text{OD value of control})\} \times 100$$

IC₅₀ concentrations required to inhibit growth by 50% were calculated from survival curves using the Bliss method.

마. In vivo tumor model and treatment. 7주령 웅성 BALB/c mice((Charles River Technology))를 (주)오리엔트로부터 구입하였다. 몸무게는 22-24 g이었고 실험동물실 내부는 20-25 ℃로 12시간 명암이 유지되는 동시에 상대습도는 55±10%로 유지되었다. Sarcoma 180 세포주(한국세포주은행)를 RPMI 배지에서 배양 한 후 이식한 암 동물 모델이 이용되었다. 모든 동물실험의 절차는 경북대학교 실험동물윤리위원회의 승인을 받았다. 1 주간 동물사육실에서 적응시킨 후 실험에 사용하였다. Sarcoma 180 cells (2x10⁶ cells/0.2 ml/mouse)는 saline (0.85% NaCl)에 희석하여 피하주사를 실시하였다. 접종 6일째에 눈에 보이는 암 덩어리를 관찰 할 수가 있었다. 실험동물은 3그룹으로 구분하고 각 그룹당 6마리로 구성되었다. 1 그룹은 정상대조군으로 암세포의 접종이 없었으며 2 그룹은 음성대조군으로 0.85% saline을 경구투여하였다. 3그룹은 dichloromethane fraction (DCM) (100 mg/kg b.w., p.o.)으로 시험물질 투여 후 7일 뒤에 암의 크기 및 존재유무를 확인하였다. Doxorubicin (3 mg/kg b.w., i.p.)은 양성대조군으로 복강내 접종을 실시하였다. 투여 7일 후에 모든 mice는 살처분하였으며 tumor mass를 측정하고 암성장의 억제와 암덩어리의 크기를 per cent (%)로 계산하였다. 암덩어리의 부피는 다음과 같은 식으로 계산하였다(Lee et al., 2003).

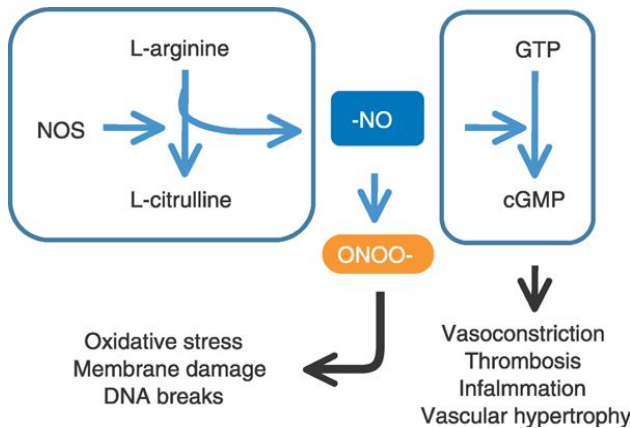
$$\text{Inhibition of tumor growth (\%)} = (1 - T/C) \times 100 \%,$$

where T is the tumor growth of treated groups and C is the control mice (1).

$$\text{Tumor Volume (cm}^3\text{)} = 4/3 \pi (a^2b)/2,$$

where a is the short diameter (mm²) and b is the long diameter (mm²) (2)

바. Calculation of splenic index. 비장은 정상투여군과 암을 갖고 있는 mice를 희생하여 즉시 무게를 측정하였다. 결과는 몸무게당 비장의 무게로 spleen index (mg/g body weight)로 표시한다(Lee et al., 2003).



사. Statistical analysis. 모든 수치는 mean \pm S.D.로 표시하고 통계분석은 the one way analysis of variance (ANOVA)로 실시하였고 SAS program를 사용하였다. GraphPad Prism program은 IC50 values를 얻기 위해 사용되었다. 통계학적 차이는 $P < 0.05$ 수준에서 유의성 유무를 판단하였다.

2. RAW264.7 세포에서 목이버섯의 디클로르메탄 추출액의 항염증작용

가. 세포배양

마우스 대식세포인 Murine macrophage RAW 264.7 cell은 한국세포주은행 (KCLB 40071, Korean Cell Line Bank, Seoul, South Korea)에서 분양을 받아 사용하였다. 배지는 Dulbecco's Modified Eagles Medium (DMEM)으로 10% FBS, 1% L-glutamine, 그리고 100 IU/ml penicillin-100 μ g/ml streptomycin이 포함되어 있으며 5% CO₂ humidified air가 공급되는 37° C 배양기에서 실시하였다.

나. Nitric oxide (NO assay)의 측정

RAW 264.7 cells (2×10^5 cells/ml)는 LPS (1 μ g/mL)로 처리한 군과 처리하지 않은 군으로 설정하고 목이버섯의 DCM 추출액을 (10, 30 and 100 μ g/mL)을 24시간 동안 반응을 시켰다. NO를 측정하기 위하여 100 μ l를 96 well flat bottom plate에 분주를 하였다. 그리고 100 μ l의 Griess reagent를 각 well에 넣고 실온에서 빛을 차단한 채 반응을 시킨다. 그리고 Optical density (OD)값을 540 nm에서 VERSA max microplate reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)를 이용하여 측정하였다. NO의 양을 각 시료에서 측정하였다. 정확한 수치는 정량표준곡선을 sodium nitrite로 0에서 100 μ M까지를 cell culture 배지로 만들어서 작성하였다. 자세한 방법은 다음과 같이 실시를 하였다.

1) Preparation of reagents

① Griess Reagent A : Sulfanilamide solution

: 5%의 H₃PO₄ 를 이용하여 1% Sulfanilamide solution을 준비한다.

② Griess Reagent B : NED(N-1-Naphthylethylenediamine) solution

: DDW를 이용하여 0.1% NED solution을 준비한다.

2) Cell culture

Raw 264.7 cell을 3 cm Diskplate에 DMEM 배지를 3ml 넣고 18 시간 배양한다.

3) Sample 및 LPS 처리

배양된 Raw 264.7 cell에 Sample과 0.1 mg/ml의 LPS를 30 ul를 처리하여 12 시간 추가 배양한다.

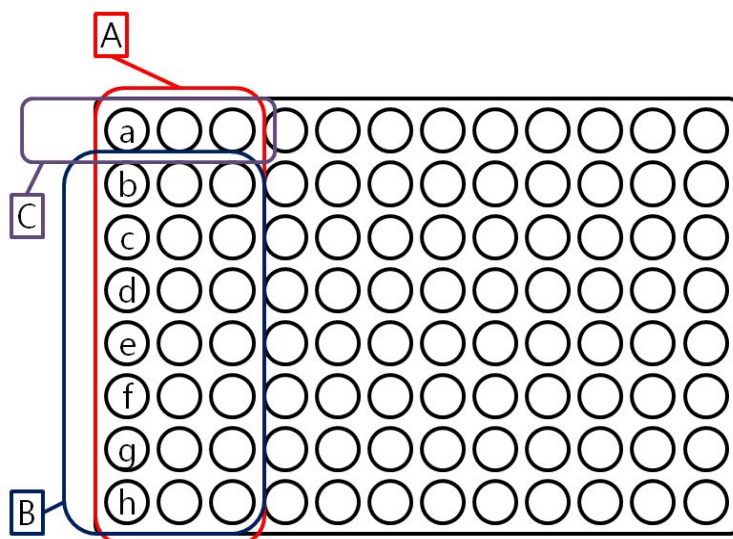
4) 상층액 분리

NO 측정을 위해 상층액 1ml을 1.5ml E-tube에 옮겨 담는다.

5) 세포 부유

MTT 측정을 위해 Diskplate 바닥에 붙어 있는 Cell을 남아있는 상층액을 이용하여 피펫팅하여 부유시킨다.

6) NO 측정



① 96 well plate를 준비하여 측정할 구획을 설정한다.

- A 구획은 Standard curve를 그리기 위하여 NO를 단계별로 희석한다.

- B 구획은 NO 원액을 단계별(2배) 희석을 하기 위하여 DDW를 100 ul씩 분주한다.

- C 구획은 NO 원액을 200 ul분주하여 이 중 100 ul를 취하여 b 열의 DDW 100ul와 혼합하여 1/2 희석한다. 이와 같은 작업을 g 열까지 반복하여 단계별 2배 희석한다.

- 마지막 h 열은 NO가 혼합되지 않은 DDW의 상태로 남겨두며 g 열에서 혼합 후 200 ul 중 100 ul는 제거한다.

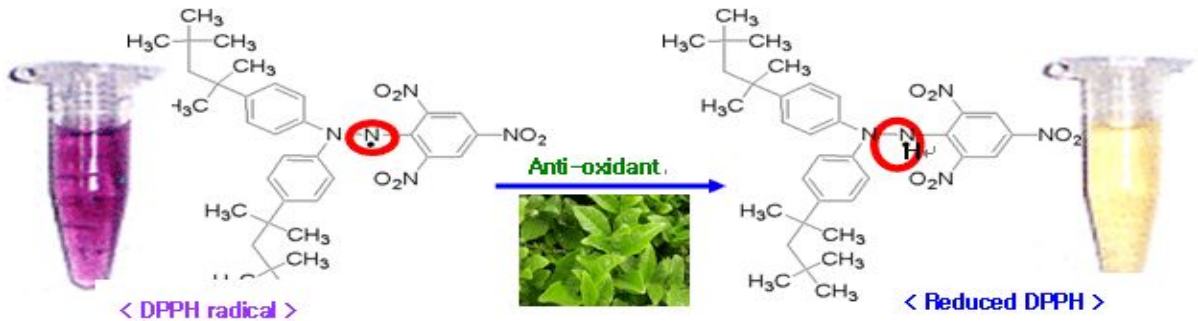
② LPS을 처리한 cell과 비처리 cell을 구분하여 분주한다.

: 보통 각 sample에 대하여 3회 반복 분주를 하며 최소 2회 반복 분주를 하도록 한다.

③ Multi pipet을 이용하여 시료가 있는 모든 well에 reagent A solution을 50 ul씩 분주한다.

④ Multi pipet을 이용하여 시료가 있는 모든 well에 reagent B solution을 50 ul씩 분주하며, cap을 덮고 빛이 닿지 않도록 차단하여 10분간 방치한다.

⑤ 540 nm에서 흡광도를 측정한다.



다. Enzyme-linked immune-sorbent assay (ELISA)를 이용한 사이토카인의 측정

RAW 264.7 cells (2×10^5 cells/ml)는 LPS ($1 \mu\text{g/mL}$)로 처리한 군과 처리하지 않은 군으로 설정하고 목이버섯의 DCM 추출액을 ($10, 30$ and $100 \mu\text{g/mL}$)을 24시간 동안 반응을 시켰다. 반응 후에 세포배양액을 모은 후 사이토카인을 측정하였다. 세포배양액에서 IL- 1β 의 농도는 제조사의 지시에 따라서 ELISA commercial kits (Invitrogen, Camerillo, CA. USA) 로 실시된다.

라. RT-PCR에 의한 mRNA의 사이토카인의 측정 (RT-PCR)

mRNA 발현을 RAW 264.7 cells에서 측정하기 위하여 LPS ($1 \mu\text{g/mL}$)을 목이버섯의 dichloromethane 추출액이 전처리되어 있는 것과 전처리 되지 않은 세포주에서 검사하였다. dcm 추출액의 농도는 $10, 30$ 그리고 $100 \mu\text{g/mL}$ 이었다. 총 RNA는 Trizol reagent (Invirogen, CA,USA)를 이용하여 실시를 하였다. 분리된 총 RNA는 oligo (dT)15primer와 배양을 하였고 그런 다음 thermal cycler (Mycycler, BIO-RAD)를 실시하였다. PCR amplification은 PCR primers를 이용하여 실시를 하였고 primer는 Sense(S) CAGGATGAGGACATGAG-CACC, Antisense (AS) CTCTGCAGACTCAAA-CTCCAC for IL- 1β , (S) GTACTCCA-GAAGACCAGAGG, (AS) TGCTGGTGACAAC-CACGGCC for IL-6, (S) TTAACCTA-CGCGCTGAGTTG,(AS)

CCTGTAGCCCACGR-CGRAGC for TNF- α , and (S) ATGC-TCCTGCTTGAGTATGT, (AS) GGAGGAAGAG-GATGCGGCAGT for β -actin (as a housekeeping gene)를 포함하고 있다. PCR reaction은 IL-1 β , IL-6, TNF- α 그리고 β -actin이 검출하고자 하였다. 반응조건은 denaturation at 95°C for 1 min에 30회, annealing at 55°C for 45 sec 그리고 extension at 72°C for 5 sec로 thermal cycler (Mycycler, BIO-RAD, USA)와 AccuPower PCR Premix (BioNEER, Dageon, Korea)를 사용하였다. 방법은 manufacture's instruction에 준하였다. RT-PCR 반응물은 1% TAE agarose gel로 분리하여 ethidium bromide로 염색을 실시하였다. EAGLE-EYE™ (Stratagene, La. Jolla, CA, USA)으로 확인하였다.

마. 통계학적인 분석 Statistical analysis

모든 수치는 means \pm SEM로 나타내었고 One-way analysis of variance (ANOVA)로 통계분석을 실시하였으며 Student's t-test (version 9.1, SAS, NC, USA)로 분석을 하였다. 통계학적인 유의성에 대한 차이점은 $p < 0.05$ level에서 실시를 하였다.

3. 목이버섯 추출액, 약용버섯 그리고 약용식물과 항암비교시험

가. 목이버섯과 약용식물 추출액의 준비

실험전에 마른 목이버섯, 마른진흙버섯, 영지버섯(A. auricula-judae, P. gilvus, G. lucidum)을 입자크기 0.2-0.5 mm로 분말화하였다. 분말화된 5 g의 시료를 70% ethanol solvent (solid to liquid ratio of 1/50 w/v)로 관류시키면서 10 0°C에서 6 시간동안 열수 추출하였다. 열수추출하는 동안, 상층액은 필터(70 mm, Advantec, Toyo Roshi Kaisha Ltd, Japan)를 이용하여 여과하였다. 여과액은 boiling bottle로 이동하여 water bath (Buchi Water Bath B-480)에서 70% ethanol 추출액으로 70°C에서 진공농축을 실시하였다. 이때 농축기기는 Buchi Rotavapor R-114로 100 rpm그리고 Eyela CCA-1111 (Tokyo Rikakikai Co. Ltd, made in China)로 실시하였다. 농축액을 분말화하기 위하여 vacuum concentrator (BioTron, BioTron Inc., Korea)로 약 50°C에서 건조화시켰다. 실험시에 분말화는 멸균 생리식염수에 녹여서 0.2 um filter로 실시를 하였다. 필터액 들은 분주하여 stock solution으로 사용하였다. 항암활성을 목이버섯추출액과 야생 식물추출액을 비교하였다. 100 종류의 야생식물추출액은 methanol 추출액으로 Plant Resource Center, Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology (KRIBB), Korea.에서 분양을 받아서 사용하였다.

나. Cell Culture

시험에 사용된 세포주는 P388D1 macrophage cell, Sarcoma 180 cell, Human NSCLC NCI H358 cell (Bronchioalveolar) 그리고 SNU1 cell (Gastric carcinoma) lines이었다. 이 세포주는 Korean Cell Line Bank (Seoul, Korea)에서 구입하였다. 세포주는 RPMI-1640 medium으로 배양하였고 배지에는 10% FBS, L-glutamine (2 mM), penicillin (100 i.u./mL) 그리고 streptomycin (10 mg/mL)이 포함된다. 배양된 세포들은 37°C에서 배양하고 배양기는 humidified atmosphere로 5% CO₂가 공급되었다

다. Determination of cell viability by MTT assay

MTT가 formozan으로 미토콘드리아의 환원은 신속한 colorimetric assay로 실시를 아래와 같이 실시를 하였다. 이는 세포의 호흡과 세포의 생존율을 알 수 있는 방법이다. 실험의 방법은 P388D1 cells(1×10⁵ cells/well)를 flat-bottomed 96-well plates에서 배양을 하고 각각의 추출액을 1 mg/mL, 0.3 mg/mL, 0.1 mg/mL, 0.03 mg/mL 그리고 0.01 mg/mL에서 실시한다. A. auricula-judae와 100 plant 추출액은 72 시간동안 5% CO₂ 배양기 37°C에서 배양하였다. 양성 대조군 약물로 doxorubicin을 10 μg/mL, 1 μg/mL 그리고 0.1 μg/mL의 농도에서 항암활성을 실시하였다. MTT법은 well당 세포 수 5천 개가 되도록 접종하고 SRB법과는 달리 배양 전에 미리 각 시험물질을 접종하였다. 접종 후 4일 동안 배양을 실시하였다. 배양이 종료된 후 3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide(MTT, SIGMA, USA) 용액을 well 당 50 μl씩 가하여 4시간 동안 더 배양하였고, 배양이 끝난 후 각 well에서 주의 깊게 배지를 제거하였다. 다음은 DMSO(dimethylsulphoxide) 을 well 당 150 μl를 가하여 formazan crystal을 녹여내었다. SRB 및 MTT법에서 염색된 cell plate 들은 microplate reader(VERSAmax™, Molecular Devices, USA)를 이용하여 490 nm에서 그 흡광도를 측정하였다. 종양 세포들에 대한 시험물질의 효과를 평가하기 위하여 세포수의 측정은 시험물질을 처치한 well의 흡광도를 시험물질을 처치하지 않은 음성대조군 well의 흡광도로 나누어 %로 나타내었다. 통계분석은 SAS statistical package(release 8.1 SAS Institute Inc., Cary, North Carolina, USA)를 이용하여 ANOVA를 실시하고 그 유의 수준은 P < 0.05로 하였다.

$$\text{Viability of cells (\%)} = (\text{OD value of sample}/\text{OD value of control}) \times 100 \quad (\text{I})$$

$$\text{Inhibition rate (\%)} = \{1 - (\text{OD value of sample}/\text{OD value of control})\} \times 100 \quad (\text{II})$$

라. 통계학적인 분석

모든 수치는 mean±S.D.로 나타내었고 통계학적인 분석은 one way analysis of variance (ANOVA) 를 실시하였다. 비선형분석(nonlinear regression analysis) 은 GraphPad Prism 5 program (GraphPad Software, Inc., U.S.A)으로 IC50 값을 얻었다. 통계학적인 유의성에 대한 차이점은 $p < 0.05$ level에서 실시를 하였다.

4. *Auricularia auricula-judae* 70% ethanol extracts로부터 분리된 dichloromethane fraction의 항암활성 및 항산화작용

가. Carbohydrate 측정. 목이버섯의 70% ethanolic extract의 당 측정을 Brix로 측정하였다. Brix 측정은 Pocket refractometer PAL-1 (ATAGO, Japan)로 실시를 하였다.

나. 단백질의 측정. 단백질은 Pierce BCA Protein Assay Kit (Pierce Biotechnology, Rockford, IL, USA)로 측정을 하였다.

다. 세포배양. 세포주는 사람 유래의 NSCLC NCI H358 (bronchioalveolar) cells 과 SNU1 cells (Gastric carcinoma)를 Korean Cell Line Bank (Seoul, Korea)에서 분양을 받았다. 이들 세포주는 RPMI-1640 배지를 사용하였다. 사용된 배지는 10% FBS, L-glutamine (2 mM), penicillin (100 i.u. /ml) 그리고 streptomycin (10 mg/ml)이 포함되었다. 배양조건은 37° C의 5% CO₂ 배양기에서 진행하였다.

라. MTT assay 항암활성. 세포의 생존은 Mosmann (1983)의 방법으로 실시를 하였다. NCI H358과 SNU1 cells (1×10^5 cells/well)는 96-well plate를 이용하였고 1, 0.3, 0.1, 0.03 그리고 0.01 mg/mL의 여러 유기용매 분획물을 갖고 실시를 하였다. 한편 분리된 성분인 gibberellic acid (G)와 diazane (D)도 doxorubicin (1, 0.1 and 0.01 μ g/mL)과 함께 비교하여 항암활성을 측정하였다. MTT의 방법은 상기에 기술한 방법으로 실시를 하였다.

마. Gas Chromatography Coupled Mass Spectroscopy analysis. G목이버섯 추출액에 포함되어 있는 신규성분을 확인하기 위하여 성분분석을 하였다. 특히 활성 성분이 많이 포함되어 있는 디클로르메탄 분획물에 대하여 집중적인 분석을 실시하였다 (Gas Chromatography Coupled Mass Spectroscopy (GCanalysis was performed by Kyungpook National University Center For Scientific Instruments. GC-MS was carried out using a HP (Hewlett-Packard) 6890

Plus GC gas chromatograph with (MSD) -HP 5973 MSD mass selective detector). 시료는 HPLC-grade dichloromethane으로 1:1000(v/v)으로 희석하여 측정하였다. 시료는 1ml를 HP-5 column으로 주입하였다. GC oven program은 50° C에서 4 분동안 그리고 280 ° C까지 4° C/min로 올렸다. 그리고 마지막 온도는 2분동안 유지하였다. He(99.99%)의 속도는 분당 0.7 ml로 올렸다. 정량분석은 피크면적으로 실시를 하였다.

바. RNA extraction과 mRNA expressions of tumor genes by PCR. 총 RNA을 세포배양 후에 Trizol Reagent (BioNEER, Korea)를 사용하여 추출하였다. 분리된 RNA는 oligo (dT)15 primer와 함께 배양하였다. 그리고 난 후에 reverse transcription이 AccuPower RT- Premix (BioNEER, Korea)에 의해 진행되었다. 기기는 thermal cycler (2720 Thermal Cycler, Applied Biosystems, U.S.A.)를 이용하였다. Apoptosis 분석을 위하여 4 human apoptosis primers로는 Bax, Bcl-2, P53 그리고 CD147를 PCR amplification를 실시하였다. β -actin은 housekeeping gene으로 사용하였다. Primers는 Table 4-1에 나타나 있다.

Table 4-1. PCR primers used in the gene expression studies.

Gene	Primers	Accession No.
β -actin	(S) CTGTCTGGCGGCACCACCA,	X00351.1
	(AS) GCAACTAAGTCATAGTCCGC	
Bax	(S) AAGCTGAGCGAGTGTCTCAAGCGC,	L 22473
	(AS) TCCCGCCACAAAGATGGTCACG	
Bcl-2	(S)AGATGTCCAGCCAGCTGCACCTGAC,	M 13994
	(AS)AGATAGGCACCCAGGGTGATGCAAGCT	
P53	(S) AAGACCTGCCCTGTG,	NM_000546.4
	(AS) TGACGCACACCTATTGCAAG	
CD147	(S) CCATGCTGGTCTGCAAGTCAG,	AB085790
	(AS) CCGTTCATGAGGGCCTTGTC	

Bax, Bcl-2, P53, CD147 그리고 β -actin에 대한 반응조건은 다음과 같다. An initial denaturations at 95 ° C for 5 min (Bcl-2, Bax and β -actin), 94 ° C for 5 min (P53) and 94 ° C for 1 min (CD147). The amplification conditions were: denaturation at 95 ° C for 30 s, annealing at 66 ° C for 30 s and enlongation at 72 ° C for 30 s with 40 cycles for Bcl-2, denaturation at 95 ° C for 30 s, annealing at 64 ° C for 45 s and elongation at 72 ° C for 30 s with 35 cycles for Bax, denaturation at 94

° C for 30 s, annealing at 62 ° C for 45 s and elongation at 72 ° C for 30 s with 40 cycles for P53, denaturation at 97 ° C for 20 s, annealing at 64 ° C for 20 s and elongation at 72 ° C for 20 s with 30 cycles for CD147 and denaturation at 95 ° C for 45 s, annealing at 55 ° C for 45 s and elongation at 72 ° C for 45 s with 30 cycles for β -actin. Finally all additional extension steps at 72 ° C for 10 min were done for all.

PCR amplifications은 thermal cycler (GeneAmp PCR system 9700, Applied Biosystems, U.S.A.)와 AccuPower PCR Premix (BioNEER, Daegeon, Korea) 로 제조사의 지시에 따라 실행되었다. RT-PCR products는 2 % TAE agarose gel로 분석되었다. 염색은 ethidium bromide로 실시되고 EAGLE-EYE™ (Startagene, La. Jolla, CA, USA)로 분석하였다.

사. 항산화작용(Antioxidant activity). DPPH (2,2-diphenylpicrylhydrazyl) free radicals는 Chang et al. (2011)과 Hwang et al. (2001) 방법을 변환하여 실시하였다. 간략하게 방법을 기술하면 시험시료 10 μ L (DCM at 10, 3, 1, 0.3 and 0.1 mg/mL) 혹은 standard (ascorbic acid)에 200 μ L의 DPPH in methanol (100 μ M)을 96-well microplate (SPL, Suwon, Korea)에 첨가하였다. 처리된 plate는 37 ° C에 30 min동안 반응 후에 optical density (OD)를 517 nm에서 VERSA max microplate reader (Molecular Devices Corp, Sunnyvale, CA, U.S.A.)를 이용하여 측정하였다. Scavenging activity은 다음과 같은 식으로 계산하였다.

$$\text{Inhibition (I) \%} = (1 - (\text{Sd} - \text{Sm}) / \text{C}) \times 100\%$$

where Sd is the OD of sample with DPPH, Sm is the OD of sample with methanol, and C is the OD of vehicle with DPPH.

The IC₅₀ value은 50% scavenging of DPPH free radicals의 농도이다. 이것은 Graphpad Prism program으로 계산하였다. 항산화 능력은 antioxidant activity index (AAI)로 다음과 같이 계산하였다.

$$\text{AAI} = \text{final concentration of DPPH (mg/mL)} / \text{IC}_{50} \text{ (mg/mL)}$$

Thus, the AAI of sample fraction is classified as poor antioxidant (> 0.5), moderate antioxidant (0.5–1.0), strong antioxidant (1.0– 2.0) and very strong antioxidant (< 2.0) (Ruch et al., 1984).

아. Statistical analysis. 모든 수치는 mean \pm S.D.로 나타내었고 통계학적인 분석

은 one way analysis of variance (ANOVA) 를 실시하였다. 비선형분석 (nonlinear regression analysis)은 GraphPad Prism 5 program (GraphPad Software, Inc., U.S.A)으로 IC50 값을 얻었다. 통계학적인 유의성에 대한 차이점은 $p < 0.05$ level에서 실시를 하였다. Nonlinear regression analysis (GraphPad Prism 5 program, GraphPad Software, Inc., U.S.A)으로 IC50 values를 구하였다.

2-6. 목이버섯 추출물에 대한 단회경구독성시험

목이버섯의 추출액 혹은 분획층에 대한 생리활성이 확인됨에 따라서 Lead optimization toxicology의 차원에서 목이버섯의 1차 추출액인 에탄올추출액의 단회경구독성시험을 다음과 같이 실시를 하였다.

실험동물은 5주령 Sprague-Dawley 계통의 특정병원균 부재(specific pathogen free) 랫트(오리엔트 바이오, 대구)로, 시험군은 암컷과 수컷 각 5 마리씩 대조군과 투여군으로 정하였다. 이 동물들은 인수 시 그리고 적응 기간 동안 일반증상의 이상이 관찰되지 않았다. 사육조건은 온도 $22 \pm 2^\circ\text{C}$, 상대습도 $55 \pm 10\%$, 조명시간 12 시간(오전6시~오후 6시) 및 조도 150~300 Lux로 설정 한 뒤 수행하고, 방사선조사로 멸균된 실험동물용 고형사료(효창 싸이언스)와 정수시스템을 이용한 물(Tap water)을 자유섭취 하도록 하였다(식약청동물실험시설등록 제228호, 경북대학교 약리·생리학 동물사육실). 투여용량의 설정은 목이버섯 에탄올 추출액을 멸균 생리식염수에 0, 625, 1,250, 2,500, 5,000 mg/kg 투여량으로 조정하였다. 대조군은 생리식염수를 투여하였으며, 랫트는 시료 투여 12시간 전에 절식시키고 3 mL/kg으로 1회 경구투여 한 후 14일 동안 관찰하였다. 관찰 및 검사항목은 식품의약품안전청의 독성시험기준 및 OECD test guideline 420(TG 420)에 따라 실시하였다. 임상증상 관찰은 모든 실험동물에 투여 당일 날에 투여 후 6시간 동안 매 시간마다 관찰 하였으며, 다음날부터 14일까지는 1일 1회씩 동물의 일반상태의 변화, 중독증상의 발현 및 사망유무를 관찰하였다. 시험에 사용된 모든 실험동물에 대하여 시험물질 투여일, 투여후 3일, 7일, 14일째에 체중을 측정하였다. 시험 종료 후 실험동물을 이산화탄소로 마취하여 복대동물 절단방법으로 치사 시킨 다음 외관 및 내부 장기의 이상 유무를 육안적으로 관찰하였다. 본 시험 결과는 평균값과 표준편차로 표기하였으며, 통계학적 분석은 SAS system(9.1)을 이용하였다. 측정 항목 중 단회 경구 투여 독성시험 중 체중 결과에 대하여 one-way analysis of variance (ANOVA) 검정법을 사용하였고, 이때 p-value가 0.05 이하일 경우 유의한 것으로 판정하였다. 단회 경구 투여 독성시험에서 사망동물이 관찰되지 않아 반수치사량(LD₅₀)의 산출을 위한 통계는 실시하지 않았다.

2-8. 3T3-L1 세포주에서 지질저하제에 대한 효능 검증

질환 모델동물을 이용한 당뇨 및 지질저하제에 대한 효능 검증에 앞서, 전지방세포를 이용하여 각각의 목이버섯 추출물에 대한 스크리닝을 실시하였다. 전지방세포는 마우스 유래 섬유아세포인 3T3-L1 세포주(KCLB NO.10092.1)를 사용하였다. 3T3-L1 세포를 24 well plate에 5×10^3 cells/ml로 분주하여 10% 우혈청을 첨가한 Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM)에 배양하였다. 세포가 충분히 자란 뒤 2일 후 (day 0)에 10% fetal bovine serum(FBS)를 첨가한 DMEM 배지에 세포분화 유도 물질인 0.5 mM isobutylmethylxanthine(IBMx), 1 μ M dexamethasone, 1 μ g/ml insulin을 첨가하여 2일 동안 배양하였다. 그 후 10% FBS와 1 μ g/ml insulin을 첨가한 DMEM으로 배양하였다. 에탄올과 물로 추출한 목이버섯 추출물을 3, 30, 300 μ g/ml 농도로 조절한 후 분화 전 과정동안 배지에 첨가하였다. 첨가 후 배양 8일째에 세포를 phosphate-buffered saline(PBS)로 두 번 세척하고, 실온에서 2 시간 동안 0.6% Oil Red O solution으로 염색하였다. 그런 다음 증류수로 세척한 후 이소프로판올로 용출시켜 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 3T3-L1에 대한 시험물질의 효능을 평가하기 위한 분화율의 측정은 시험물질을 처리한 well의 흡광도를 시험물질로 처리하지 않은 음성대조군 well의 흡광도로 나누어 %로 나타내었다. 그 외에 glycerol-3-phosphate dehydrogenase(GPDH) 활성 및 triglyceride 측정은 kit (Takara, Japan; Zenbio, Japan)를 사용하였다.

2-9. 질환모델동물을 이용한 당뇨 및 지질저하제에 대한 효능 검증

6주령의 SD rat 수컷을 구입하여 1주간 순화시켰다. 시험은 7주령부터 실시되었으며, 양성대조군을 제외한 모든 랫트에 당뇨 유발 약물인 STZ(streptozotocin, 50 mg/kg BW)를 0.1 mol/citrate buffer(pH 4.5)에 녹여 복강주사하였다. 복강주사 후 48시간 이후에 공복혈당을 측정하여 300 mg/dl 이상의 혈당수치가 나온 랫트를 *Auricularia auricula-judae* ethanol extract 원액을 투여하는 시험군(목이추출액군, n=6), 3배의 *Auricularia auricula-judae* ethanol extract 희석액 시험군(추출액 x3 희석, n=6), 10배의 *Auricularia auricula-judae* ethanol extract 희석액 시험군(추출액 x10 희석, n=6), 정상대조군(n=6)과 음성대조군(당뇨유도실험군, n=6)으로 구분하였다. 목이버섯 추출액의 투여는 정상사료에 위에서 제시한 용량으로 사료를 제조하여 30일간 사료내 투여하였다. 당 내당성시험은 12시간 절식후에 Glucose를 5g/kg으로 투여전 60분에 미정맥에서 채혈하고, 투여 후 30, 60, 120, 180, 그리고 300분에 채혈하여 혈당측정기를 사용하여 혈당을 측정한다. 일주일마다 채혈하여 혈청을 분리한 후 혈당, 혈청 cholesterol, 혈

청 triglyceride, 혈청 urea 그리고 혈청 insulin levels을 측정하였다.

5. 목이버섯의 식품소재화

5-1. 목이 된장 제조법

최초의 연구계획서에 따라서 목이버섯의 활용성을 증대 시키기 위한 일환으로 1차년도 시제품 연구를 동시에 시도하였다. 목이버섯은 항종양 억제율이 매우 높은 것으로 알려져 있으며, 오장을 좋아지게 하고, 이질과 하혈을 멎게 해준다. 또한 목이버섯은 혈액을 정화시켜 피부미용과 빈혈, 고혈압, 동맥경화와 같은 성인병 등에 도움을 주며, 천연 젤라틴을 다량 함유하고 있어, 배설을 촉진시켜 변비에도 좋은 효과를 가진다. 특히 천연 젤라틴은 변비에 탁월한 효과가 있으므로 시장에서 상품화되지 않은 목이된장을 마케팅 분석에 의거(시장성, 보편성, 기술성)하여 상품화하는 것으로 하였다.

본 연구에서는 된장의 기능성 및 부가가치를 향상시키고, 기능성과 맛을 증진시킨 된장 개발을 위하여 목이버섯 분말을 첨가하여 발효 숙성시킨 된장을 제조하여 된장의 성분 변화 정도와 관능적 특성을 조사하였다.

대두를 선별하여 세척하고 침지하여 증자하고 냉각시킨다. 여기에 종균을 접종한 후, 파쇄, 성형하여 발효하여 메주를 얻어 장을 담그고 숙성시켜 장뜨기를 한다. 일정 기간이 지난 후, 된장과 간장을 얻어, 목이버섯 분말 1%와 간장 9%를 혼합하여 숙성 후, 된장과 배합하고 한 번 더 숙성하여 제품화하였다.

가. 된장의 원료

1). 대두

대두는 된장에 풍부한 단백질을 공급하고 된장 제조시 각종 효소의 작용에 의하여 peptide와 아미노산으로 분해되어 향기 생성에 중요한 역할을 한다. 또한 된장의 지방질도 대두에서 유래되며, lipase의 작용을 받아 glycerine과 지방산으로 분해되어 된장의 향미 생성에 관여하므로 된장의 주원료로 사용하였다.

2) 곡류(쌀)

전분질이 가수분해되어 당분의 단 맛을 생성하며 본 연구에서는 쌀을 주원료로 이용하였다. 쌀은 발효시킬 때, 자기소화되어 쌀전분은 환원당으로, 단백질은 peptide를 거쳐 아미노산으로, 지방은 지방산과 글리세린으로 된다. 이러한 분해생성물은 미생물의 영양원이 되고 향미 생성에 관여하므로 주원료로 사용하였다.

3) 소금

소금의 품질 규격은 NaCl이 95% 이상 되어야하고, 나머지 5%의 불순물 중, 수분을 제외한 무기물 중에서 Fe이나 Cu 등은 된장 성분의 산화, 특히 유지의 산화와 산화적 갈변에 영향을 미친다. 본 연구에서는 정제소금을 사용하였다.

나. 된장 제조 방법

대두를 선별하여 세척하고 침지하여 증자하고 냉각시켰다. 여기에 종균을 접종한 후, 파쇄, 성형하여 발효하여 메주를 얻어 장을 담그고 숙성시켜 장뜨기를 하였다. 일정 기간이 지난 후, 된장과 간장을 얻어, 목이버섯 분말 1%와 간장 9%를 혼합하여 숙성 후, 된장과 배합하고 한 번 더 숙성하여 제품화하였다.

다. 목이 된장의 제조 및 성분분석

1) 점조도

된장의 점조도는 된장을 일정량의 물로 희석하여 상등액만을 취해 레오미터 시스템(Rheometer System)(HAAKE RheoStress 1, Germany)에 스피들(spindle)(Rotor DG43 DIN 53544 Titan)을 장착하여 측정용 컵 DG43(measuring cup DG43)을 사용하여 측정하였다. 점조도 값은 변형 속도(shear rate)(1/s)와 변형 압력(shear stress)(Pa)으로 나타내어 점조도가 높아짐에 따라 층밀림 변형력이 높아지는 효과를 측정하였다. 측정온도 20℃에서 전단 속도는 1~100 s⁻¹의 범위로 유동특성을 알아보았고, 점조도지수와 유동지수 값은 파워로우 모델(Power law model)($\tau = ar^b$)로 측정하였다.

2) 혈전용해효소

혈전용해능 측정 시료는 된장 2 g을 0.1M 인산완충용액(phosphate buffer)(pH 7.5) 8 mL에 혼합한 후 원심분리하여 얻은 상등액을 조효소액으로 사용하였다.

혈전용해효소활성은 피브린 플레이트법(fibrin plate method)의 일종인 아스트룹 및 물러츠법(Astrup and Mullertz method)을 사용하여 측정하였다. 피브린 플레이트(Fibrin plate)는 0.5% 피브리노젠(fibrinogen)을 0.067M 인산화 나트륨 완충용액(sodium phosphate buffer)(pH 7.4)에 용해시켜서 직경 9cm인 페트리 접시(petri dish)에 10mL을 가하였다. 여기에 0.067M 인산화 나트륨 완충용액(sodium phosphate buffer)에 용해된 트롬빈(thrombin)(100 NIH/mL) 0.1 mL를 가하고 신속하게 혼합하고 균일한 평판을 제조한 후 실온에서 30분 방치하여 사용하였다. 피브린 플레이트(Fibrin plate)에 시료 점적 위치를 표시하고 배양 상등액(조효소액)을 20 μ L씩 각 표시한 위치에 점적하여 37℃ 항온기에서 2시간 반응시킨 후 용해 면적으로 효소활성을 구하였다.

혈전용해효소의 표준곡선을 구하기 위해서 표준 플라스민(plasmin) 용액을 0.6, 1.6, 2.6, 5 unit/mL로 되도록 트리스-라이신 완충용액(Tris-lysine buffer)(pH 9.0)으로 조제한 다음, 피브린 플레이트(fibrin plate)에 20 μ L씩 가하여 형성된 용해 면적으로부터 플라스민(plasmin) 효소활성의 표준곡선을 작성하였다. 배양액 중의 혈전용해효소는 표준곡선과 비교하여 플라스민 단위(plasmin unit)로 환산한 것

이며, 아래 식을 이용하여 혈전용해효소 활성을 계산하였다.

<식 1>

$$\text{혈전용해활성(\%)} = \frac{\text{시료의용해영역}}{\text{플라스민의용해영역}} \times 100$$

3) 타이로신 함량

된장의 펩타이드 생성정도를 측정하기 위하여 Folin phenol 시약을 이용하여 tyrosine 함량을 측정하였다. 된장을 증류수로 5배 희석하여 추출한 시료액 0.7 mL에 0.44 M TCA (trichloroacetic acid) 0.7 mL을 첨가하여 37°C에서 30분간 반응시킨 다음, 15,000 rpm에서 10분 동안 원심 분리하여 침전물을 제거하였다. 회수된 상등액 1 mL에 0.55 M Na₂CO₃ 2.5 mL와 Folin phenol 0.5 mL을 차례로 넣고 혼합한 후 37°C 항온수조에서 30분간 반응시켰다. 상온에서 냉각시킨 후 반응액의 흡광도를 흡광도로 660 nm에서 측정하였다.

4) 프로테아제 활성

된장 5 g에 0.02M phosphate buffer(pH 7.0) 95 mL을 첨가한 뒤 실온에서 진탕 후 원심분리(15000 rpm, 15분)하여 상등액으로부터 효소액을 조제한 다음 효소활성을 측정하였다. Protease의 활성도는 Anson의 방법을 변형하여 측정하였다.

기질로는 0.6%의 카제인 용액 0.35 mL과 효소액 0.35 mL를 e-tube에 넣고 항온수조에서 반응(37°C, 10분)시킨 다음 0.44 M TCA 용액 0.7 mL을 넣어 반응을 정지시킨 후 37°C에서 30분간 정치시켰다. 이 반응액을 원심분리(15,000rpm, 15분)한 후 여액 1 mL에 0.55 M Na₂CO₃ 2.5 mL과 3배 희석된 Folin reagent 0.5 mL을 넣고 37°C에서 30분간 반응시킨 후 660 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이 반응조건 하에서 1분간에 tyrosine 1 μg을 유리시키는 효소량을 1 unit로 하였다.

5) 관능평가

10명의 훈련된 패널을 대상으로 60일간 저장한 된장의 관능특성을 평가하였다. 된장의 평가항목은 색, 맛의 특성 강도와 전체적 기호도에 대해 9점 채점법으로 평가하였다. 각 항목에 대한 특성 강도는 없다(1점)에서 강도가 증가함에 따라 대단히 강하다(9점), 전체적 기호도는 대단히 싫다(1점), 보통이다(5점), 대단히 좋다(9점)로 하여 평가하였다.

6. 목이버섯 된장 판매용 시제품의 생리활성실시

가. 목이된장의 제조

대두를 선별하여 세척하고 침지하여 증자하고 냉각시킨다. 여기에 종균을 접종한 후, 파쇄, 성형하여 발효하여 메주를 얻어 장을 담그고 숙성시켜 장뜨기를 한다. 일정 기간이 지난 후, 된장과 간장을 얻어, 목이버섯 분말 1%와 간장 9%를 혼합하여 숙성 후, 된장과 배합하고 한 번 더 숙성하여 시제품화하였다. 경북 고령소재 알알이 식품사를 통한 OEM 대량 생산을 실시하였으며 제품의 중량은 시장성에 맞게 1차년도 (주)대자연B&T에서 시제품으로 생산한 500g 용량에서 900g으로 변경하여 식약청 보고를 의무화하고 생산하였다. 또한 국산 대두 등의 농산물 원료의 가격 급등으로 인한 제품 원가의 상승에 따른 영업판매의 애로 사항이 있어, 제품의 고급화를 추구하고자 아웃박스를 제작 및 개별 포장으로 변경하였다.

나. 목이버섯 첨가 발효 후 목이된장의 비교

목이버섯 첨가 유무에 의해 생산된 된장의 이화학적 효능평가와 생리활성(항염증 및 항암 효능)평가를 통해 목이된장의 기능성을 비교하였다. 효능평가를 위해 된장 40 g을 200 ml (200 mg/ml) 증류수에 풀어 90℃에서 1시간 추출 되었으며 각 된장추출물은 원 추출액, filter paper(Whatman No.2, 8 μ m)를 사용하여 여과한 여과액, 여과한 시료를 원심분리(4℃, 3000rpm, 10min)하여 얻은 상등액을 여과한 (25cs, 0.45 μ m, 10ml 실린지)한 여과액으로 준비하였다. 시료의 준비는 다음과 같다.

된장 O (목이버섯 첨가 된장시료)	추출	여과	filter
된장 X (목이버섯 무첨가 된장시료)	추출	여과	filter

다. 이화학적 평가

당도는 여과한 시료와 filtration 되어진 시료를 당도계(Pocket refractometer)를 이용하여 3회 반복 측정하였다. pH는 원 추출 시료와 여과한 시료를 pH meter를 이용하여 3회 반복 측정하였다. 색도는 여과 되어진 시료를 colorimeter(분광측색계)를 이용하여 3회 반복 측정 하였다. 갈색도는 여과된 시료를 UV/Vis spectrophotometer(분광광도계)를 이용하여 420nm에서 3회 반복하여 갈색도를 측정하였다. Total polyphenol contents 측정은 여과액을 1/10 희석(20 mg/ml)한 액을 시료로 하여 Folin-ciocal법을 이용하여 Total polyphenol contents를 측정하였으며, 지표물질로써 Tannic acid를 사용하였다.

다. 생리활성의 평가

항산화능 비교를 위하여 전자공여능 측정을 실시하였다. 여과액(200mg/ml)을 1/10 희석(20mg/ml)으로 희석한 액을 시료로 하여 DPPH법을 이용하여 항산화능을 알아보았다. 항암 및 항염증 효능평가 추출물을 200, 20, 2, 0.2, 0.02 mg/ml 농도 구간으로 희석하고 및 여과한 시료를 항암 및 항염증 효능평가 분석을 위해 사용하였다. 항암 효능평가는 MTT 및 SRB test를 통하여 세포독성 측정으로 신장암, 자궁암, 위암 및 대장암 세포주에 대하여 항암효능평가를 비교하였다. 항염증 효능평가는 Raw 264.7 cell에 대하여 세포독성 확인 실험을 통해 선별되어진 2 mg/ml 농도의 시료를 이용하여 Nitric oxide 생산저해능 확인을 통해 항염증 효능평가를 하였다.

라. 목이된장 저장성 시험

시료를 실험실 진열대의 실온(25~26℃)과 항온기(35, 40℃)에 각각 보관 후 30일 경과 시 아래의 관능검사, 이화학검사 및 미생물 항목을 점검하였다.(항온기 실험은 미생물의 최적 생육조건을 맞추어 미생물 발생 최소기간을 알기 위함) 실험 항목은 관능적 항목(성상, 이미, 이취, 이물)과 미생물적 항목(대장균군, 세균수), 이화학적 항목(수분) 실험을 통해 저장 테스트를 하였다. 목이된장에 대한 일반 성분검사, 대장균, 바실러스 세레우스균 검사는 공인성적 검사기관인 계명대학교 전통미생물 자원연구소에 의뢰하여 정확한 품질 검사를 실시하였다. 관능검사는 패널요원은 20명 이상으로 하여 가장 좋거나 강한 것은 5점, 약하거나 싫은 것은 1점으로 하여 5점 척도법으로 설문지를 작성하여 결과를 평가 분석하였다.

7. 목이버섯 함유 분말 청국장

가. 특성 분석을 위해 사용되어진 시제품 및 시험 시료

Fig 1.과 같은 포장으로 15g/pack 으로 시생산 되어진 “목이버섯 첨가 분말형 청국장” 시제품을 이용하여 이화학적 효능평가와 *in vitro* 항암효능평가를 수행하였다. 이를 통해 생산되어진 시제품 분말 청국장의 품질특성과 기능성을 조사하고자 하였다.



Fig. 1. 분말청국장 시제품

2) 시험 시료

시험에 사용된 목이버섯 시료는 경기도 평택시에 위치한 버섯중앙회(주)로부터 구입하여 사용하였다. 시제품의 품질 특성 및 효능을 평가하기 위하여 청국장분말 5g을 100ml(50mg/ml) 증류수에 용해하여 90℃에서 1시간 추출 후 원심분리(Eppendorf centrifuge 5810R, Germany)(20℃, 4000rpm, 30min)를 통해 얻어진 상등액을 filtration(Toyo Roshi, Cellulose Acetate 0.45 μ m, 25mm(CS) Syringe Filters, Japan)하였다. 시제품으로부터 최종적으로 filtration 후 확보한 액상 시료를 특성 및 효능평가를 위한 시료로써 사용하였다. 또한 15g/pack 규격으로 시생산 되어진 “목이버섯 첨가 분말형 청국장” 시제품을 사용하여 본 시제품의 저장성 및 유통기한 설정 실험에 사용하였다.

원산지 증명서

1. 농산물 품목 : 목이버섯

2. 사업체명 : 버섯중앙회(주)

3. 사업자 등록번호 : 119-86-27141

4. 사업장 소재지


제1농장 : 경기도 평택시 청북면 삼계리 371-1,38번지

제2농장 : 경기도 평택시 청북면 이소리 31번지

5. 사업장 연락처 : 031)683-9888 010-7535-7999

상기내용과 같이 본 업체에서 직접 재배·생산한 “목이버섯”
임을 증명합니다.

2011 년 7 월 4 일

버섯중앙회(주) 대표이사 

검사 성적서

생명과학연구원

발급번호: 경중 1110-222호 검수번호: 12 - 1109 - 419

제품명	목이버섯	제조원/차나 유통기회 또는 제조번호	-
의뢰인	업소명: 경진바이오(주)	성명	이태훈
	소재지: 대구시 달서구 호산동 711 대구테크노파크벤처공장 302		
접수날월일	2011년 9월 29일	검사완료일	2011년 10월 14일
채분유형(채질)	-		
검사목적	원고용		

시험 항목 및 결과

시험항목	결과	비고
Bendiocarb	불검출	
Carbendazim	불검출	
Carbofuran	불검출	
Chlorfenvinphos	불검출	
Chlorpyrifos	불검출	
DDT	불검출	
Diazinon	불검출	
Dichlorvos	불검출	
Malathion	불검출	
Methomyl	불검출	
Parathion-methyl	불검출	
Pirimiphos-methyl	불검출	
Teflubenzuron	불검출	

본 검사성적서의 내용은 의뢰인이 제출한 시료에 대한 검사 결과로서 용도 이외의 목적으로 사용하에
비고: 따라 발생하는 모든 사항에 대해, 당사는 그 어떠한 법적책임도 지지 않습니다.

2011년 10월 14일


충북대학교 산학협력단
 식품의약품안전청 식품위생검사기관지정

나. 시제품의 물성분석 및 이화학적 특성분석을 위한 시험 방법

1) 수분

분말청국장 시제품의 수분은 수분측정기(Sartorius Mechatronics, Germany)를 이용하여 3회 반복 측정하였다.

2) 입도

분말청국장 시제품의 입도는 Isopropylalcohol(Merck, Germany)에 분말을 용해시킨 후 입도분석기(BECKMAN COULTER, LS™ 13 320 Series Laser Diffraction Particle Size Analyzers, USA)를 이용하여 3회 반복 측정하였다.

3) 색도

분말청국장 시제품의 색도는 Colorimeter(Color Techno System.co.ltd, Japan)를 이용하여 3회 반복 측정하였다.

4) 붕해도

국가공인 식품 시험분석 전문기관인 계명대학교 전통미생물자원개발 및 산업화연구센터에 의뢰하여 조사되어졌다.

나. 시제품의 기능성 성분함량 분석 방법

1) Total polyphenol contents 측정

Folin-ciocal법을 이용하여 Total polyphenol contents를 측정하였다. 지표물질로써 Tannic acid(Sigma, USA)를 사용하여 정량곡선을 작성하였으며, 정량곡선 범위 내에서 확인되어지는 농도의 시험시료를 이용하여 분말청국장의 total polyphenol contents를 정량(mg/g)하였다.

2) Total flavonoid contents 측정

AlCl₃법을 이용하여 Total flavonoid contents를 측정하였다. 지표물질로써 Catechin(Sigma, USA)를 사용하여 정량곡선을 작성하였으며, 정량곡선 범위 내에서 확인되어지는 농도의 시험시료를 이용하여 분말청국장의 total flavonoid contents를 정량(mg/g)하였다.

3) 전자공여능 측정

1/10× 단계 희석을 통하여 시험시료를 50mg/ml, 5mg/ml, 0.5mg/ml 농도로 준비하여 DPPH법을 이용하여 전자공여능 측정을 통한 항산화력을 확인하였다. 지표물질로써 L-ascorbic acid(Sigma, USA)를 사용하여 정량곡선을 작성하였으며, 정량곡선 범위 내에서 확인되어지는 농도의 시험시료를 이용하여 분말청국장의 L-ascorbic acid에 상응되는 항산화력(%)을 대조군과 대비하여 조사하였다.

4) Superoxide anion radical 소거능 측정

1/10× 단계 희석을 통하여 시험시료를 50mg/ml, 5mg/ml, 0.5mg/ml 농도로 준비하여 NBT법을 이용하여 인체에 유해한 산소독성에 대한 방어능으로써 Superoxide anion radical 소거능(%)을 대조군과 대비하여 조사하였다.

5) 아질산염소거능 측정

1/10× 단계 희석을 통하여 시험시료를 50mg/ml, 5mg/ml, 0.5mg/ml 농도로 준비하여 Griess 법을 이용하여 식품섭취 등에 의해 유도되어지는 발암성 물질 생성 저해능인 아질산염 소거능(%)을 대조군과 대비하여 조사하였다.

다. 항암 *in vitro* 효능평가

시험시료를 10, 2, 0.2, 0.02, 0.002mg/ml 농도 구간으로 희석 및 filtration 하여 신장암, 자궁암, 위암, 대장암, 간암 세포주에 대한 항암 효능평가 분석을 위해

사용하였다. MTT((3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide)) assay 및 SRB(sulforhodamine B) assay를 통한 대조군 대비 세포의 생존 및 생육능(%)평가를 통하여 시험되어진 시료의 암세포 생존 및 생육 억제능 확인(세포독성 평가)으로 항암효능평가를 하였으며, $\times 10^4$ Cell 에 해당 되는 각 세포주를 대상으로 실험하였다.

라. 유통기한 설정실험 지표

유통기한 설정 실험은 식품의약품안전청에서 제시한 “식품, 식품첨가물 및 건강기능식품의 유통기한 설정기준”에 따라 실험 지표가 설정되었으며 식품의약품안전청에서 고시한 “식품공전” 및 “건강기능식품의 기준 및 규격 고시전문_기준규격”에 따른 실험법으로 수행되어졌다. 또한 Table 1. 같은 가속실험 조건을 통하여 시제품의 유통기한을 예측 및 설정 하였다.

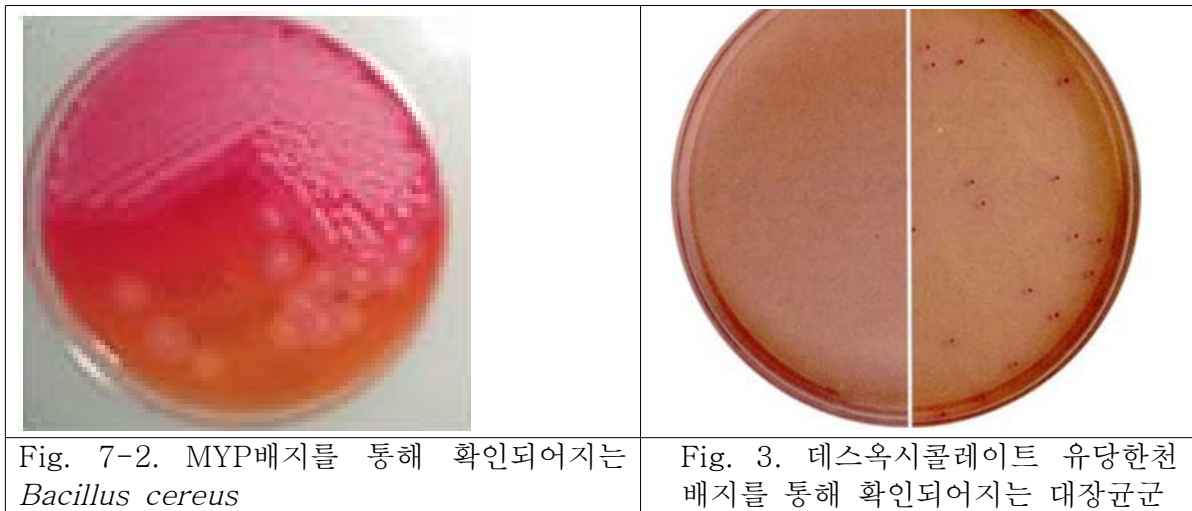
Table 1. 시제품의 가속실험에 의한 유통기한 설정 시험조건

구분	유통온도	설정 저장 조건			
		온도	상대습도	시험 기간	측정 기간 (6구간 측정)
상온 유통제품	15-25℃	대조구(유통온도): 25℃ 실험구: 25℃, 30℃, 45℃	75%	120일 (4개월)	0일 15일 30일 60일 90일 120일

1) 미생물 실험

식품의약품안전청 “식품, 식품첨가물 및 건강기능식품의 유통기한 설정기준”에 근거하여 시제품(장류)에 해당되는 미생물 실험은 *Bacillus cereus*와 대장균군 대상이며 다음과 같은 방법으로 시험되어졌다. 시제품 분말 시료를 단계별로 멸균수에 희석 한 다음, MYP 한천배지(Mannitol egg Yolk Polymixin Agar, Oxoid, England)에 1ml씩 도말하여 30℃에서 24시간 배양한 후 *Bacillus cereus* 의심집

락을 의미하는 분홍색 집락(Fig. 2)을 선별 및 개수하였으며, 선별되어진 의심집락은 1차적으로 그람염색을 통해 확인되었으며 그람양성균으로 판별되는 균주는 2차적으로 API KIT(Biomerieux, France)를 이용하여 manual과 분석 프로그램을 통해 확인시험 되어졌다. 대장균군은 시제품 분말 시료를 단계별로 멸균수에 희석한 다음, 데스옥시콜레이트 유당한천 배지(Desoxycholate Lactose Agar, BD, USA)에 1ml씩 도말하여 35℃에서 24시간 배양한 후 대장균군 의심집락을 의미하는 암적색의 집락(Fig. 3)을 확인하였다.



2) 이화학분석

식품의약품안전청 “식품, 식품첨가물 및 건강기능식품의 유통기한 설정기준”에 근거하여 시제품(장류)에 해당되는 이화학적 지표는 수분, 총질소, 아미노산성질소가 대상이며 다음과 같은 방법으로 시험 및 조사되어졌다.

(1) 수분

분말청국장 시제품의 수분함량은 수분측정기(Sartorius Mechatronics, Germany)를 이용하여 3회 반복 측정으로 조사되어졌다.

(2) 총질소

국가공인 식품 시험분석 전문기관인 계명대학교 전통미생물자원개발 및 산업화연구센터에 의뢰하여 조사되어졌다.

(3) 아미노산성질소

국가공인 식품 시험분석 전문기관인 계명대학교 전통미생물자원개발 및 산업화연구센터에 의뢰하여 조사되어졌다.

3) 관능적 분석

시제품에 대한 성상시험은 “식품공전” 제10. 일반시험법 9. 일반시험법, 9.1 성상(관능시험)에 제시된 시험법에 따라 다음과 같은 4항목(색깔, 풍미, 조직감, 외관)을 감지하여 5점척도법에 의한 관능평가로 측정 및 조사하였다.

(1) 색깔

- ① 색깔이 양호한 것은 5점으로 한다.
- ② 색깔이 대체로 양호한 것은 그 정도에 따라 4점 또는 3점으로 한다.
- ③ 색깔이 나쁜 것은 2점으로 한다.
- ④ 색깔이 현저히 나쁜 것은 1점으로 한다.

(2) 풍미

- ① 풍미가 양호한 것은 5점으로 한다.
- ② 풍미가 대체로 양호한 것은 그 정도에 따라 4점 또는 3점으로 한다.
- ③ 풍미가 나쁜 것은 2점으로 한다.
- ④ 풍미가 현저히 나쁘거나 이미.이취가 있는 것은 1점으로 한다.

(3) 조직감

- ① 조직감이 양호한 것은 5점으로 한다.
- ② 조직감이 대체로 양호한 것은 그 정도에 따라 4점 또는 3점으로 한다.
- ③ 조직감이 나쁜 것은 2점으로 한다.
- ④ 조직감이 현저히 나쁜 것은 1점으로 한다.

(4) 외관

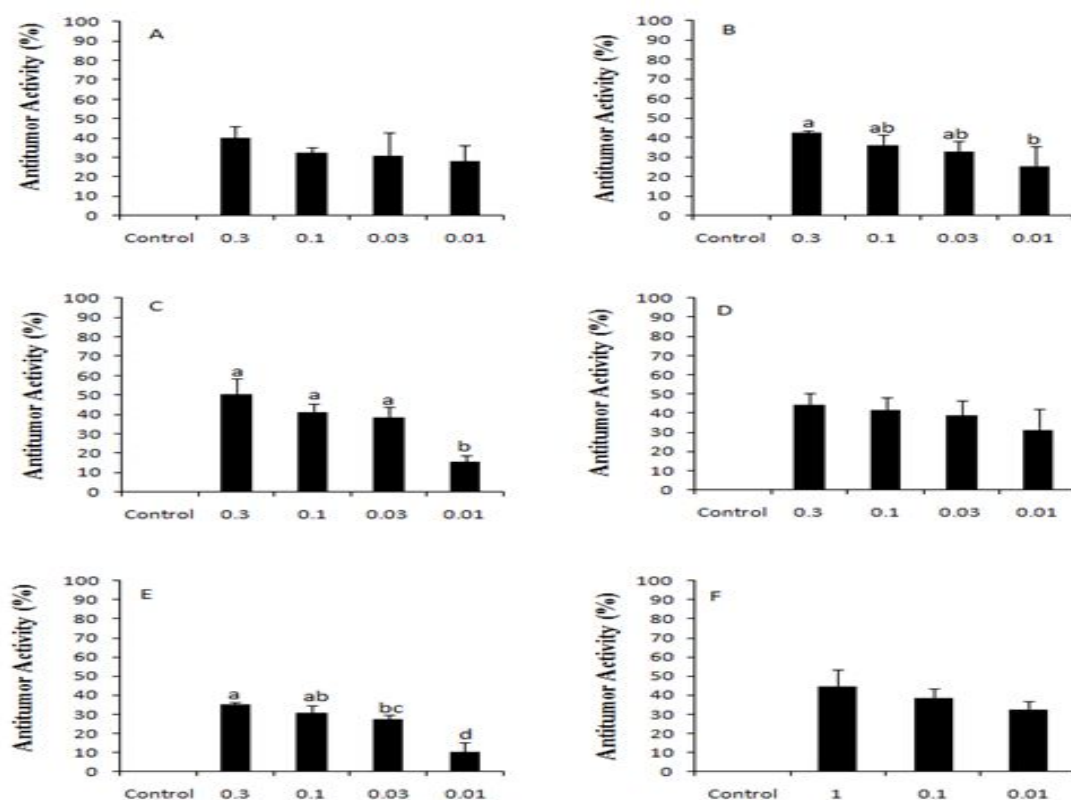
- ① 병충해를 입은 흔적 및 불가식부분 제거, 제품의 균질 및 성형상태와 포장상태 등 외형이 양호한 것은 5점으로 한다.
- ② 제품의 제조·가공상태 및 외형이 비교적 양호한 것은 그 정도에 따라 4점 또는 3점으로 한다.
- ③ 제품의 제조·가공상태 및 외형이 나쁜 것은 2점으로 한다.
- ④ 제품의 제조·가공상태 및 외형이 현저히 나쁜 것은 1점으로 한다.

제3절 결과 및 고찰

1. P388D1과 sarcoma 180 세포주에서 목이버섯 에탄올 추출액으로부터 추출용매에 따른 항암활성의 비교 시험

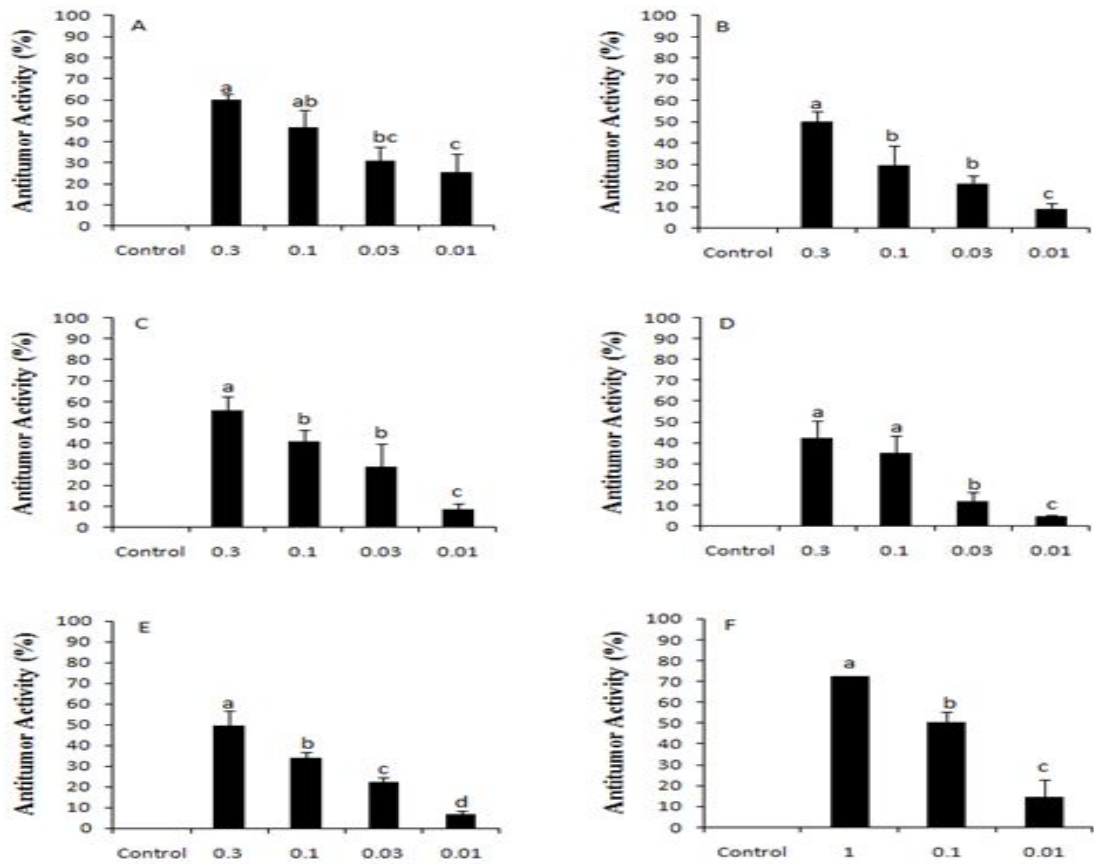
가. MTT와 SRB assay에 의한 항암활성

암세포주인 sarcom180와 P338-D1의 표준균주를 한국세포주은행(KOREAN CELL LINE BANK)에서 분양받아, RPMI1640(10% FBS, 100 unit/ml-100 mg/ml penicillin and streptomycin)를 이용하여 tissue culture flask(25 cm²)를 사용하여 37℃에서 5% CO₂ 배양기에서 배양하였다. 항암활성은 MTT assay, SRB assay방법을 이용하여 측정하였다. 목이버섯 분획추출물의 항암활성여부를 확인하기 위하여 추출물들을 1 mg/ml과 0.3 mg/ml, 0.01 mg/ml, 0.03 mg/ml, 0.001 mg/ml 로 농도를 조정하여 항암활성을 측정하였다. 양성대조군으로 실제 항암치료에 사용되고 있는 약물인 doxorubicin을 사용하여 항암활성을 비교하였다. EtOAc, BuOH, DCM, EtOH 그리고 water 분획추출물에 대하여 70% ethanol extract을 P388D1와 sarcoma 180 cells에 농도별로 처리하여 MTT 및 SRB assay를 통해 확인한 결과, 각각의 분획 추출물은 P388D1와 sarcoma 180 cells에 대하여 용량-의존적으로 유의적인 항암활성을 보였다 ($p < 0.05$) (Fig. 1-2, Fig. 1-3).



Concentration of fractional extracts (mg/ml) and doxorubicin ($\mu\text{g/ml}$)

Figure 1-2. Anti-tumor activity of solvent fractions on P388D1 cells; A. Ethyl acetate (EtOAc), B. Butanol (BuOH), C. Dichloromethane (DCM), D. Ethanol (EtOH) and E. Water fractions of *Auricularia auricula-judae* ethanol extract at the various concentrations (0.3 mg/ml, 0.1 mg/ml, 0.03 mg/ml and 0.01 mg/ml) and F. Doxorubicin as a positive control at different concentrations (1 $\mu\text{g/ml}$, 0.1 $\mu\text{g/ml}$ and 0.01 $\mu\text{g/ml}$) on P388D1 cell by MTT assay. All values are presented as percentages of the results from control, and are expressed as mean \pm SD of three independent (triplicate wells) experiments and the different alphabet superscripts differ significantly at $P < 0.05$.



Concentration of fractional extracts (mg/ml) and doxorubicin ($\mu\text{g/ml}$)

Fig. 1-3. Anti-tumor activity of solvent fractions on sarcoma 180 cells; A. ethyl acetate (EtOAc), B. butanol (BuOH), C. dichloromethane (DCM), D. ethanol (EtOH) and E. Water of ethanol extract from *Auricularia auricula-judae* at the various concentrations (0.3 mg/ml, 0.1 mg/ml, 0.03 mg/ml and 0.01 mg/ml) and F. Doxorubicin as a positive control at different concentrations (1 $\mu\text{g/ml}$, 0.1 $\mu\text{g/ml}$ and 0.01 $\mu\text{g/ml}$) on Sarcoma 180 cell line by MTT assay. All values are presented as percentages of the results from control, and are expressed as mean \pm SD of three independent (triplicate wells) experiments and the different alphabet superscripts differ significantly at $P < 0.05$.

분획물 중에서 1 mg/ml의 농도에서 P388D1 cells에 대하여 MTT법과 SRB 법으로 측정된 결과 DCM 분획추출물이 가장 항암활성이 뛰어났으며 그 뒤를 따라서 BuOH층, EtOH 층, EtOAc 층 그리고 water 층으로 보여주었다. (Table 1-1).

Table 1-1. Comparative estimation of inhibitory activities solvent fractions of *A. auricula-judae* extract between MTT and SRB assays,

Solvent Fractions (1 mg/ml)	P388D1 cells		Sarcoma 180 cells	
	MTT assay	SRB assay	MTT assay	SRB assay
EtOAc	42.78 ± 0.78 [#]	46.01 ± 2.12 ^{*#}	69.61 ± 2.19	69.08 ± 4.03 [#]
BuOH	48.13 ± 3.16 [#]	51.17 ± 2.07 [#]	65.74 ± 2.44	67.53 ± 1.30 [#]
DCM	53.95 ± 7.67 [#]	51.71 ± 3.71 [#]	73.97 ± 1.11	72.67 ± 2.47 [#]
EtOH	46.57 ± 6.32	47.42 ± 6.33	65.71 ± 9.14	59.67 ± 1.97
Water	37.23 ± 0.87	37.93 ± 1.70	64.48 ± 3.51	58.39 ± 4.59
Dox (1 µg/ml)	44.33 ± 9.11	46.04 ± 2.76	72.54 ± 0.26	72.81 ± 2.09

All values are presented as percentages of the results from control, and are expressed as mean ± SD of three independent (triplicate wells) experiments, * is expressed as significant different that compared to MTT values with SRB values of the respective fraction in same cell line (1 mg/ml) at P<0.05 and # is expressed as significant differences of solvent fractions than water fraction in same cell line. EtOAc, ethyl acetate; BuOH, butanol; DCM, dichloromethane; EtOH, ethanol; Dox, doxorubicin (positive control).

하지만 sarcoma 180 cells에서는 다르게 나타났다. DCM fraction은 EtOAc층, BuOH층, EtOH층 그리고 water 층으로 나타났다(Table 1). 항암활성의 비교를 위해 항암억제 정도를 IC₅₀ values를 계산하여 Table 2에 나타내었다. 가장 낮은 IC₅₀ 값은 P388D1 세포주에서 water fraction을 처리하였을 때, 28.2 µg/ml로 나타났고 sarcoma 180 세포주에서 DCM 층을 처리하였을 때, 94.2 µg/ml로 나타났다. 양성대조군인 doxorubicin은 P388D1과 sarcoma 180 세포주에서 100 ng/ml과 95 ng/ml의 각각 보여주었다(Table 1-2).

Table 1-2. IC₅₀ values of different solvent fractions of *Auricularia auricula-judae* extract on tumor cell lines

Cell lines	Fractions of <i>Auricularia auricula-judae</i> (µg/ml)					Doxorubicin (ng/ml)
	EtOAc	BuOH	DCM	EtOH	Water	
P388D1	143.80	94.62	38.32	44.03	28.19	100.00
Sarcoma 180	108.90	134.10	94.20	133.00	102.30	95.00

Data are presented as IC₅₀ values by MTT assay from three independent experiments, performed in triplicate on tumor cell lines, obtained by nonlinear regression using the GRAPHPAD Prism program. EtOAc, ethyl acetate; BuOH, butanol; DCM, dichloromethane; EtOH, ethanol; Dox, doxorubicin (positive control).

나. 실험동물에서 dichloromethane (DCM) fraction의 항암활성.

실험동물인 BALB/c mice의 배복쪽 가랑이 사이에 sarcoma cells을 $1 \times 10^6/ml$ 피하주사하여 암을 유발하였다. 그 후, dichloromethane (DCM) fraction 100 mg/kg b.w(시험물질 처리군 n=6), doxorubicin 3 mg/kg b.w(양성대조군 n=6), 생리식염수(음성대조군 n=6)을 경구투여하였을 때, DCM 투여군에서 가장 좋은 항암활성을 보여주었다. DCM 분획추출물 ($P < 0.05$)을 투여하였을 경우 항암크기는 대조구의 그것과 비교시 줄어들었으며(Fig. 1-4A). 암 크기가 76.13%까지 감소하였다 (Fig. 1-4B).

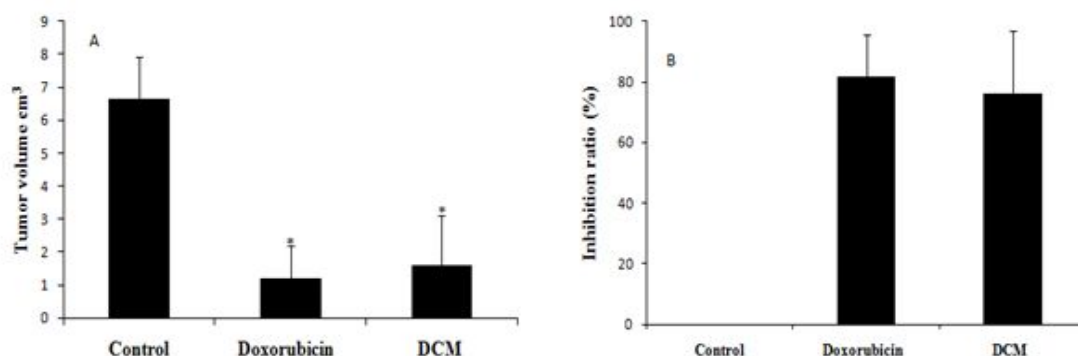


Fig. 1-4. *In vivo* antitumor effects of DCM (dichloromethane) fraction from 70% ethanolic *A. auricula-judae* extract on tumor volume (A) and inhibition of tumor volume (B) of sarcoma 180 solid tumor-bearing BALB/c mice. All values are presented as cm^3 (A) and % (B) and are expressed as mean \pm SD. * superscripts differ significantly at $P < 0.05$ compared to control.

이러한 결과는 양성대조군인 doxorubicin과 DCM 투여군이 비슷한 크기로 감소하였다. 한편 양성대조군과 DCM fraction은 음성대조군과 비교시 33.33%까지 그 크기가 감소하였다 (Table 1-3). 시험군 사이에서 체중변화의 차이는 나타나지 않았다.

다. 비장지수(Spleen Index). Splenomegaly(비장거대증)은 sarcoma 180 solid tumor-bearing mice에서 나타났다(Figure not shown).

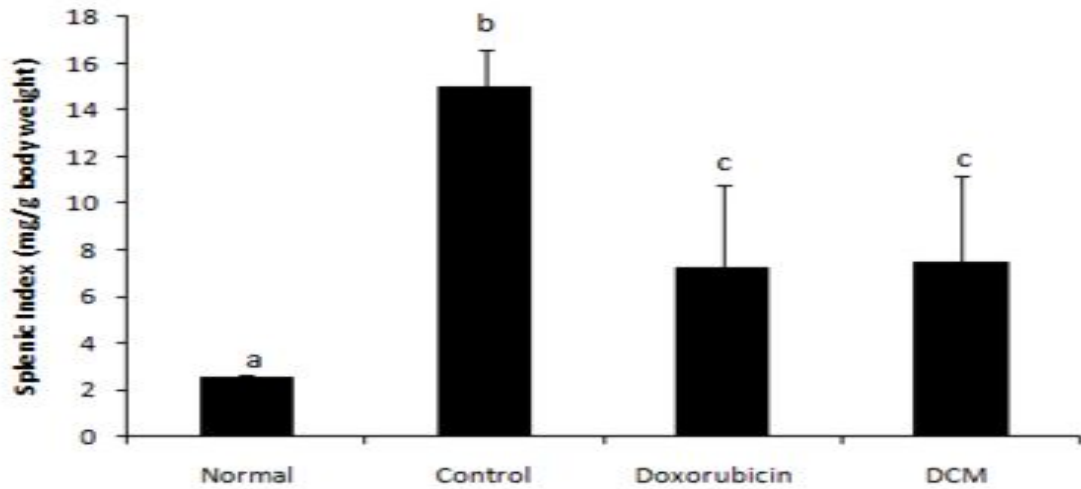


Fig. 1-5. Effect of dichloromethane (DCM) fraction from 70% ethanolic *A. auricula-judae* extract on spleen on sarcoma 180 solid tumor-bearing mice and non-tumor-bearing mice without DCM. All values are presented as mg/g body weight of mice and are expressed as mean \pm SD. The different alphabet superscripts differ significantly at $P < 0.05$.

비장지수는 암이 발생되지 않은 군과 처치되지 않은 군보다 유의성 있게 높은 수치를 보였다(Fig 1-5). 비장의 크기는 대략 6배, 3배, 그리고 3배 정도로 나타났다. 비장 지수 수치는 정상군(비처치군)과 비교시 6배(음성대조군), 3배(양성대조군) 그리고 3배 (디클로르메탄투여군) 보다 유의성있는 수치를 보였다.

Table 1-3. Effect of dichloromethane (DCM) fraction from 70% ethanolic *A. auricula-judae* extract on sarcoma 180 solid tumor in BALB/c mice

Groups	Body weight (g)	Tumor weight (g)	Inhibition rate (%)	Complete regression
Control	26.00 \pm 1.27	1.89 \pm 0.15	00.00	0/6
Doxorubicin	26.67 \pm 1.63	0.96 \pm 0.76	49.23	2/6
DCM	27.5 \pm 1.38	1.08 \pm 0.84	42.62	2/6

Each value is presented as mean \pm S.D. (n=6/group). Control (0.85% saline), doxorubicin (Positive control, 3 mg/kg body weight), DCM (dichloromethane fraction, 100 mg/kg body weight).

다양한 항암활성은 목이버섯의 추출액 성분인 다당체 혹은 여러 성분에 의하여 다양한 분획추출물인 다양한 기전에 의하여 발생한다. 화학적으로 변환된 버섯의 다당체는 강력한 항암활성을 보여준다. 그러나 용해성 및 알칼리 비용해성인 목이버섯의 β -glucan은 강력한 항암활성을 보였다. 그러나 원래의 알칼리 비용해성인 β -glucan은 inhibitory effect가 없는 것으로 알려졌다 (Misaki et al., 1981).

이들 용매 추출액의 결과는 다른 버섯 추출물의 항암활성과 유사한 결과들을 보여주었다(Jagetia and Rao, 2006; Song et al., 2008; Wang et al., 2008).

유기용매별 분획추출물에 의해 관찰되는 세포독성의 차이점은 식물추출물의 유기용매에 따라서 활성 성분의 차이점에 의한 것으로 생각된다. 그러나 두 개의 세포주에서 나타나는 항암활성의 차이점은 같은 용매에서도 나타나는데 기전에 의한 차이로 생각된다. 이러한 결과가 나타내는 것은 추출물의 세포독성은 추출물과 추출액에 의존하고 또한 세포주에 따라서 다르게 나타나는 것을 보여준다(Ait Mbarek et al., 2007). 가장 강력한 세포독성은 목이버섯의 DCM 층에 의해서 관찰되고 guduchi의 DCM 층에서의 그것과 유사한 결과이다 (Jagetia and Rao, 2006). 그리고 이러한 항암활성은 다른 유기용매층과 비교시 월등하다. *Livistona chinensis* R.Br, 의 70% 에탄올 층으로 추출한 추출액에서 에틸아세테이트 층으로 분획시에 VEGF protein 분비와 연관이 되어있다. 그리고 Flk-1 mRNA와 protein의 억제로 나타내었다(Wang et al., 2008). 게다가 P388 세포주와 Sarcoma 180 세포주에서 목이버섯 70% 에탄올 추출액에서 분리한 유기용매별 분획물은 용량-의존적인 항암활성을 보였다.

MTT법과 SRB 법에 대한 항암활성의 차이점은 Henriksson 등은 (Henriksson et al., 2006)은 없다고 보고하였다. 그러나 본 실험에서 이 두가지 시험법에서 에틸아세테이트 분획물에서는 차이점을 보였으나 그 이유는 아직 불분명하다.

비장은 조혈작용을 하는 중요한 기관이다. 이 장기에는 과립백혈구, 단핵구, 림파구와 비과립 백혈구 모두 포함되어 있다. 이것은 마우스에서 humoral immunity의 중요한 역할을 한다. 비장거대증과 암이 발생한 마우스의 높은 비장 지수는 paraneoplastic syndromes에 기인하는 것으로 알려져있고 암의 존재하에서 splenic cytokines과 humoral factors에 영향을 받는 것으로 알려져 있다(Yoneda et al., 1991.).

결론적으로 본 연구에서는 목이버섯 70% 에탄올 추출액에서 분리한 각종 용매추출물에 대한 목이버섯 추출액이 P388D1과 sarcoma 180 tumor 세포주에 대하여 억제효과를 보였다. 이러한 억제효과는 용량-의존적으로 나타났으나 MTT와 SRB 법에 의하여 확인되었다. IC50 values를 기준으로 DCM solvent fraction에서 sarcoma 180 cells in vitro와 마우스실험에서 나타났다. 한편 높은 비장 지수와 비장거대증이 암발생의 마우스에서 보여주었다.

2. 목이버섯 70% 에탄올 추출액에서 분리된 디클로르메탄 분획추출물의 항염증작용

염증반응은 정상적인 생리상태에서 중요한 역할을 한다. 그러나 암과 같은 악성발생을 유도하는 힘으로서 인식된다. Medicinal plant와 이것들로부터 얻은 생산품은 수세기 동안에 상처치유, 부종 그리고 류마티스성 관절염을 치료하는데 수세기 동안 사용되었다(Abrham et al., 2010). 그러나 몇가지 전통적으로 사용된 약초와 상관없이, 이것들의 약리효과 즉 면역활성 값은 약리효과는 많이 알려져 있지 않다. 본 연구에서 목이버섯의 항염증 활성연구를 처음으로 *A. auricula-judae* 70% 추출액에서 추출한 디클로르 메탄층의 분획물에서 처음으로 RAW 264.7 cells를 이용하여 처음으로 발표하였다.

목이버섯 추출액에서 분리된 디클로르메탄 분획층의 항염증 역할을 이해하기 위하여, 양성대조약물로 RW264.7 cells에 LPS를 처리하여 염증 억제정도를 관찰하였다. 처음으로 목이버섯 추출액으로부터 분리한 디클로르메탄 분획물을 처리하였을 경우 LPS에서 유도되는 NO 생성의 억제를 관찰 할 수가 있었다. 염증 정도를 확인하기 위하여 몇가지 사이토카인의 발현유무를 LPS를 처리한 것과 목이버섯의 디클로르메탄층으로 처리한 결과 TNF- α 와 IFN- γ 발현 억제를 확인하였다. 특히 NO 발생은 급성 및 만성 염증반응에 참여하는 것으로 알려져 있다(Murakami et al., 2003; Hyun et al., 2004, ; Kiemer et al.,2002; Numata et al., 1998). 이러한 NO는 LPS 처리시 많은 발생이 있으며 L-arginine으로부터 nitric oxide synthase (iNOS)에 의해서 생성된다. 그래서 NO production을 억제하면 주요 inflammatory 및 infectious diseases을 치료할 수 있다고 제안되었다 (Boucher et al., 1999; Albina and Reichner, 1998; Zhang and Ghosh, 2000). 본 연구에서는 목이버섯 추출액과 약용식물추출물에 대하여 NO production의 억제효과를 LPS-stimulated RAW 264.7 cells에서 확인하였다.

그 결과를 Fig. 2-1에 나타내었다. 디클로르메탄층은 LPS-induced NO production을 $\geq 10 \mu\text{g/ml}$ 에서 용량-의존적으로 유의성 있게 억제하였다 ($p < 0.05$). 지금까지 알려지기를, 목이버섯에서 디클로르메탄층이 NO 생성억제 효과는 처음 보고하는 것이다. 높은 용량에서는 대조군과 비교시 NO 생성을 73.5% 까지 억제하였다($p < 0.01$).

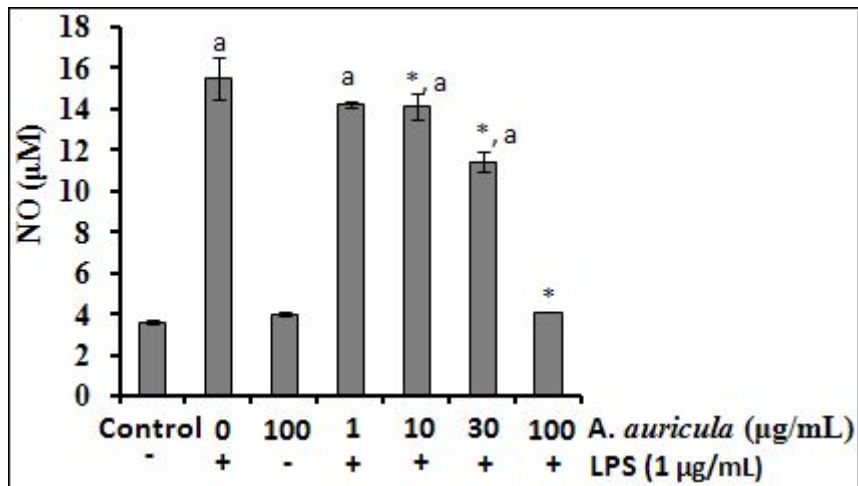


Fig 2-1. Inhibition of nitric oxide production measured as nitrite in the cell free culture supernatants of LPS (1 lg/ml) challenged RAW 264.7 murinemacrophages. NO concentration in the culture supernatant was determined by Griess assay using sodium nitrite standard curve. Data are presented as means \pm SD from three sets of independent experiments. * $p < 0.05$ represent significant difference compared with cells treated with LPS alone. a $p < 0.05$ represent significant difference compared with control group.

염증성 사이토카인인 IL-6, TNF- α , 그리고 IL-1 β 는 내인성 발열인자로 작용한다(Wu et al., 2008). 이러한 사이토카인은 LPS 처리시 증가하였으나 디클로르메탄으로 처리시 모두 현저하게 억제하는 경향을 보였다. 이 연구에서 보여주는 것은 (Fig. 2-2) 목이버섯의 클로르메탄층은 염증반응을 개선시킬 수가 있다. 게다가 목이버섯의 다클로르메탄층은 확실하게 IL-6의 발현을 억제하지는 못하였다. 이러한 IL-6의 불완전한 억제의 이유는 더 연구가 되어야 한다.

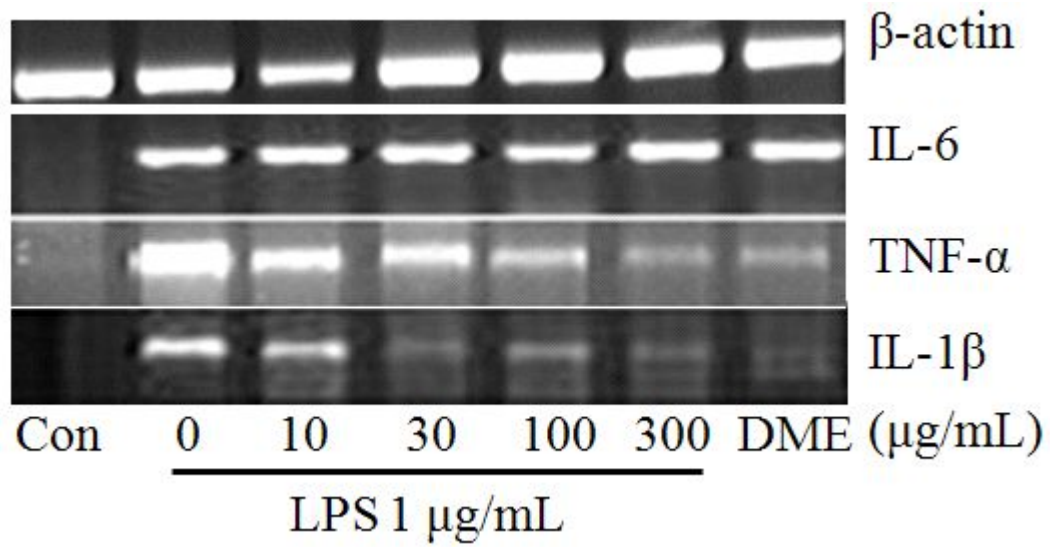


Fig 2-2. Inhibition of LPS induced cytokine mRNA expression in RAW 264.7 murine macrophages. Total RNA was extracted and RT PCR was done to check the expression level of IL-6, TNF- α and IL-1 β mRNA. DME (Dichloro Methane Ethyl extract), Con (Control). Figure is representative of two independent experiments.

단백질 차원에서 IL-1 β 는 용량의존적으로 mRNA 수준과 용량-의존적으로 비례하여 증가하였다(Fig. 2-3).

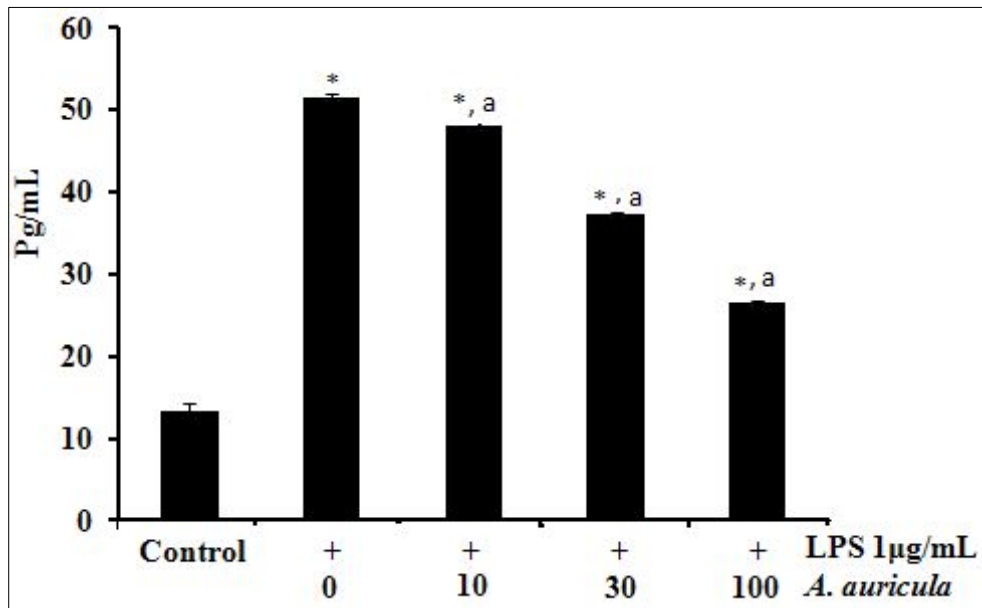


Fig 2-3. Inhibition of IL-1 β production measured with ELISA in the cell free culture supernatants of LPS (1 μ g/ml) challenged RAW 264.7 murine macrophages. IL-1 β concentration in the culture supernatant was determined by ELISA using standard curve. Data are presented as means \pm SD from three sets of independent experiments. * $p < 0.05$ represent significant difference compared with cells treated with LPS alone. a $p < 0.05$ represent significant difference compared with control group.

결론적으로, 목이버섯의 디클로르메탄층은 NO, IL-6, TNF- α 그리고 IL-1 β 의 발현을 억제하여 염증반응을 억제시킬 수 있으며 메카니즘에 대한 연구는 더 진행이 되어야 할 것으로 생각되고 본 연구 범위에 벗어나므로 추후에 연구하기로 결정하였다.

3. Comparative antitumor activity of *Auricularia auricula-judae* extracts against tumor cells in vitro (목이버섯과 약용식물에서의 항암활성의 비교)

상기의 시험에서 항암활성을 검토한 결과 최근 항암효과가 많이 알려진 마른진흙버섯, 영지버섯 그리고 100 가지 약용식물추출을 비교하여 그 가치를 입증하고자 하였다. 목이버섯은 식용버섯으로 오래전부터 애용되어 왔다(8, 9). 영양학적으로 100g에 293.1 Kcal 이고 64.82% carbohydrate, 9.69% proteins, 1.22% fat 그리고 7.87% ash로 이루어져 있다(10). 최근 들어, 목이버섯 추출액들이 의학적으로 많이 주목을 받고 있다. 약리활성으로 hypoglycemic(11), liver damage 예방(12), 항응고작용(13), 항보체작용(14), hypolipidemic(저지방혈증), antioxidant(16, 17) 그리고 허혈 예방(18)이 보고되고 있다. 전 보고에 의하면 *Auricularia auricula-judae* aqueous extract의 항암작용을 동물에서 보고하였다

(19). 본 연구에서 버섯과 약용식물의 추출액에 대한 항암활성을 비교하여 산업적 가치가 있는지에 대한 내용을 비교하였다. 아직까지 버섯류와 약용식물사이에 항암활성의 정도를 비교한 내용은 없기 때문에 본 연구에서 실시를 하였다. 또한 *P. gilvus*, 와 *G. lucidum* 70% extracts를 *A. auricula-judae* 70% extract와 함께 같은 농도에서 비교를 하였다. 예비 선별과정을 기초로 목이버섯의 70% 에탄올 추출액과 100가지 한국 고유의 약용식물을 갖고 MTT법으로 항암활성을 비교하였다. 이때 이용한 암세포주는 표준균주인 P388D1 macrophage를 갖고 실시를 하였다. *A. auricula-judae* 70% ethanol과 100 plant extracts의 항암활성을 Table 3-1에 나타내었다. Table 1에서 보여주는 것처럼, *A. auricula-judae* extract의 평균 항암활성은 42.21%를 보였다. 그 결과 *A. auricula-judae* extract가 plant extracts (*Morus bombycis* for. *Kase*, *Draba nemorosa* var. *hebecarpa* and *Lotus corniculatus* var. *japonicas* except *Sedum oryzifolium*)보다 항암활성이 높았다 (Table 3-1 and Figure 3-1).

TABLE 3-1. Anti-tumor screening of 100 Korean wild plants and Auricularia extracts on P388D1 macrophage tumor cells (1 mg/mL).

Sameple Name	Anti-tumor activity (%)	Sameple Name	Anti-tumor activity (%)
<i>Ardisia japonica</i>	24.26 ± 1.30	<i>Potentilla discolor</i>	14.20 ± 1.20
<i>Astilbe koreana</i>	16.84 ± 1.20	<i>Potentilla nivea</i>	15.24 ± 1.03
<i>Centaurea cyanus</i>	14.23 ± 1.01	<i>Prunus salicina</i> var. <i>columnnalis</i>	23.37 ± 1.52
<i>Draba nemorosa</i> var. <i>hebecarpa</i>	28.98 ± 3.63 ^{ab}	<i>Rheum undulatum</i>	18.28 ± 1.03
<i>Evodia daniellii</i>	27.04 ± 1.31	<i>Robinia pseudo-accacia</i>	33.54 ± 1.05
<i>Juniperus rigida</i>	14.93 ± 1.23	<i>Sciadopitys verticillata</i>	25.76 ± 2.01
<i>Lotus corniculatus</i> var. <i>japonicus</i>	30.64 ± 3.29 ^{ab}	<i>Sedum oryzifolium</i>	35.99 ± 3.93 ^{bc}
<i>Magnolia obovata</i>	17.02 ± 1.32	<i>Spinacia oleracea</i>	18.73 ± 1.23
<i>Mallotus japonicus</i>	20.13 ± 1.37	<i>Ulmus davidiana</i> var. <i>japonica</i>	15.99 ± 0.98
<i>Morus bombycis</i> for. <i>kase</i>	27.26 ± 1.15 ^a	<i>Vitis amurensis</i>	29.28 ± 1.31
<i>Paulownia coreana</i>	13.27 ± 1.20	<i>Auricularia auricula-judae</i>	42.21 ± 4.09 ^c

<i>Philadelphus schrenckii</i>	17.65 ± 1.05	Doxorubicin*	36.35 ± 1.89
<i>Phlomis umbrosa</i>	22.30 ± 0.96		

Note. Data are expressed as mean ± SD. Values with different superscript letters differed significantly among selected plant and mushroom extracts at P<0.05.

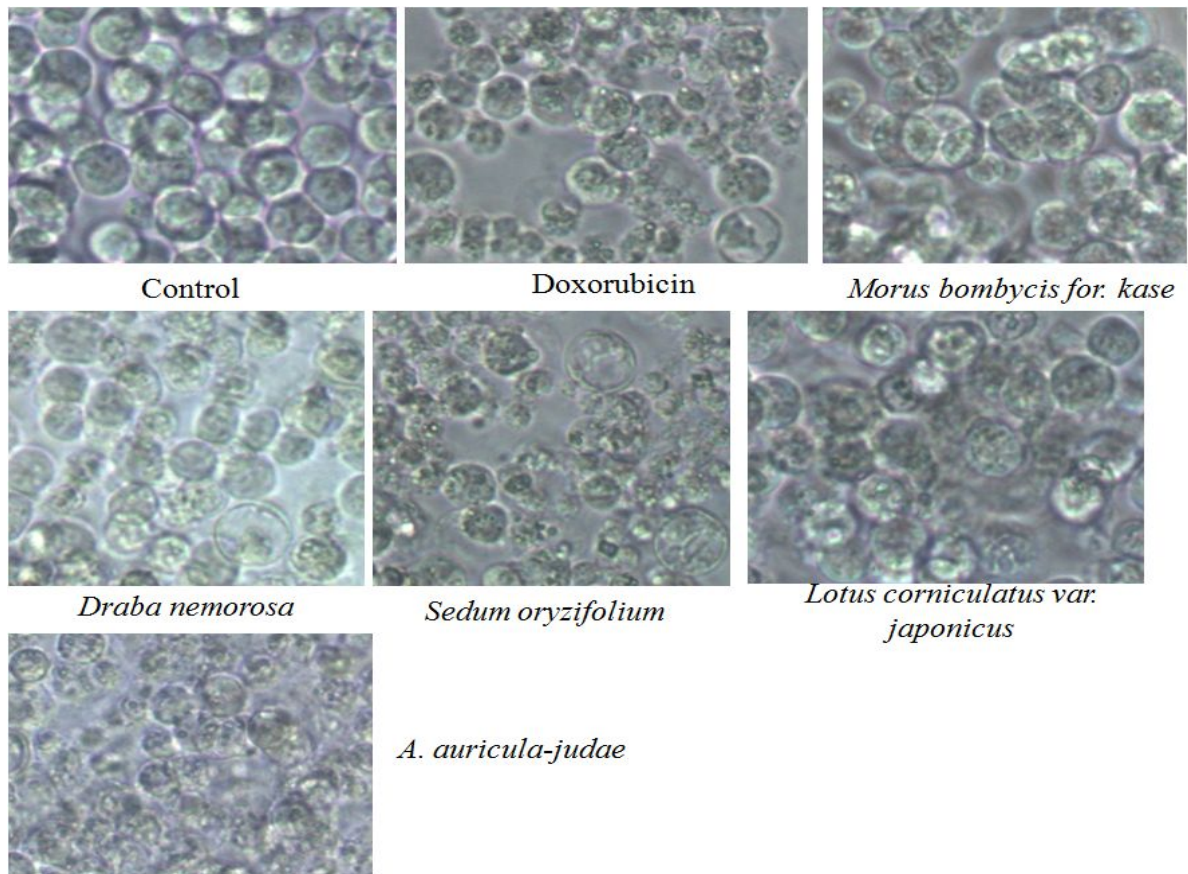


FIGURE 3-1. Cytotoxicity of P388D1 macrophage tumor cells by administration plant and mushroom extracts (1 mg/mL) and doxorubicin (1 µg/mL) for 48 h. (A) Control, (B) Doxorubicin, (C) *Morus bombycis* for. *kase*, (D) *Draba nemorosa*, (E) *Sedum oryzifolium*, (F) *Lotus corniculatus* var. *japonicus*, (G) *Auricularia auricula-judae*.

부가적으로 *Auricularia auricula-judae* 70% 에탄올추출액과 *Phellinus gilvus*과 *Ganoderma lucidum* 버섯 추출액을 이용하였다. 목이버섯의 물과 70% 에탄올 비교 항암활성 추출액은 Figure 3-2에 나타내었다.

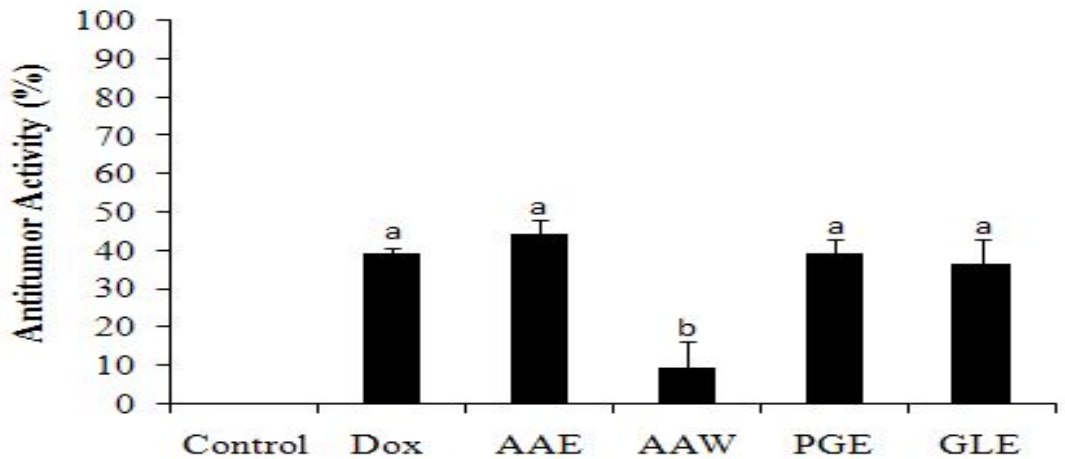


FIGURE 3-2. Cytotoxic effects of water extract (AAW) and 70% ethanol extract (AAE) from *A.auricula-judae*, *Phellinus gilvus* (PGE) and *Ganoderma lucidum* (GLE) extracts (1 mg/mL) and doxorubicin (1 μ g/mL) on P388D1 macrophage tumor cells. Mean values \pm SD from triplicate separated experiments are shown. Different alphabets are differed significantly at $P<0.05$.

Auricularia auricula-judae 70% 목이버섯 ethanol 추출액과 *Phellinus gilvus* 그리고 *Ganoderma lucidum* extracts은 4.5, 4.0 그리고 3.5 배 더 큰 *Auricularia auricula-judae* hot water extract보다 더 큰 항암활성을 보여주었다. *Auricularia auricula-judae* 70% ethanol, *Phellinus gilvus* 그리고 *Ganoderma lucidum* extracts의 효능을 차이점을 보여주지 않았다($P<0.05$). 용량-의존적인 항암활성은 plant extracts, *Auricularia auricula-judae* 70% ethanol extract를 보여주어 IC50 values를 계산하였다 (Figure 3-3).

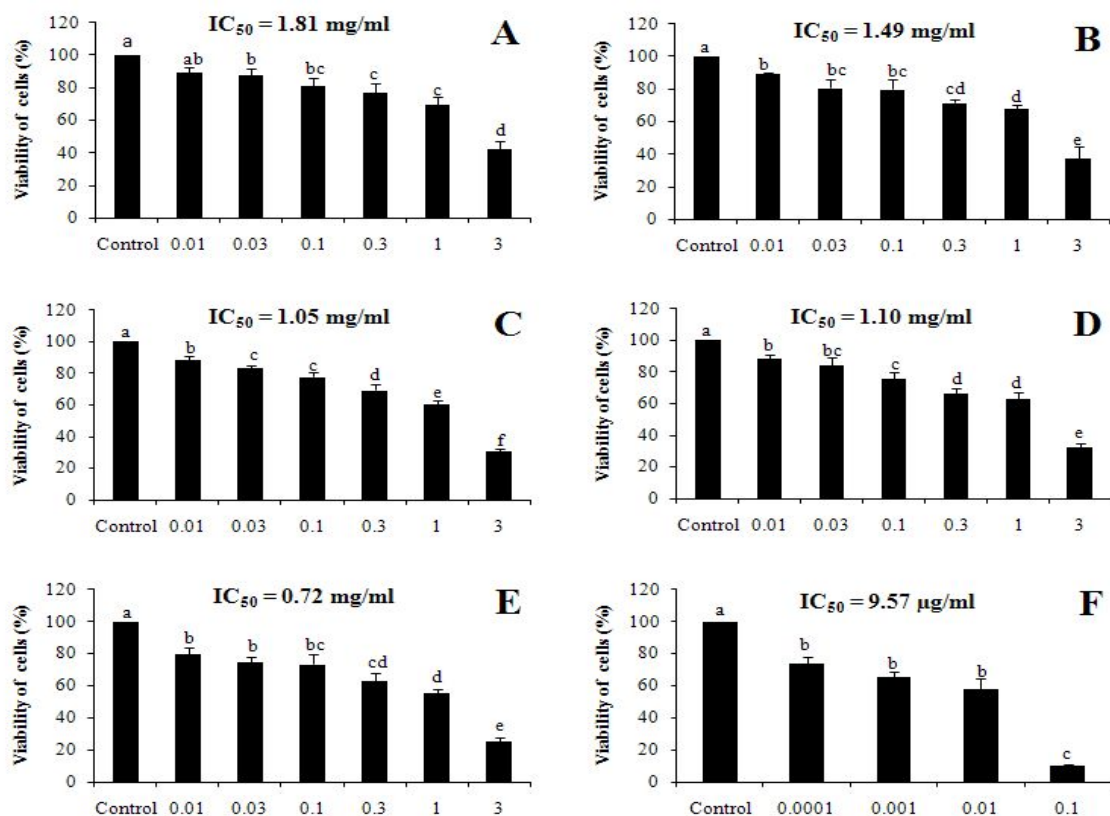


FIGURE 3-3. Dose-dependent antitumor effects of plants and mushroom extracts on P388D1 macrophage like cell line *in vitro*. A, B, C, D, E and F stand for *Morus bombycis* for. *Kase*, *Draba nemorosa* var. *hebecarpa*, *Sedum oryzifolium*, *Lotus corniculatus* var. *japonicus*, *Auricularia auricula-judae* extracts and doxorubicin respectively. Concentrations of samples are mg/mL. Mean values \pm SD from triplicate separated experiments are shown and different alphabets in the same figure are differed significantly at $P < 0.05$ among different concentrations.

*Morus bombycis*의 IC₅₀ values를 구하였다. 그 결과 *Kase*, *Draba nemorosa* var. *hebecarpa*, *Sedum oryzifolium*, *Lotus corniculatus* var. *japonicus*는 2.5, 2.0, 1.45 그리고 1.53 배가 *Auricularia auricula-judae* extracts의 그것 보다 각각 크다. 추출액의 세포독성은 용량-의존적으로 유의성 있게 증가하였다 ($P < 0.05$). 또한 *A. auricula-judae* 70% ethanol extract의 sarcoma 180, human NSCLC NCI H358 (bronchoalveolar) 그리고 SNU 1 (gastric carcinoma) cell lines에 대하여 독소루비신과 비교하여 시험관내에서 항암활성을 Figure 3-4에 나타내었다.

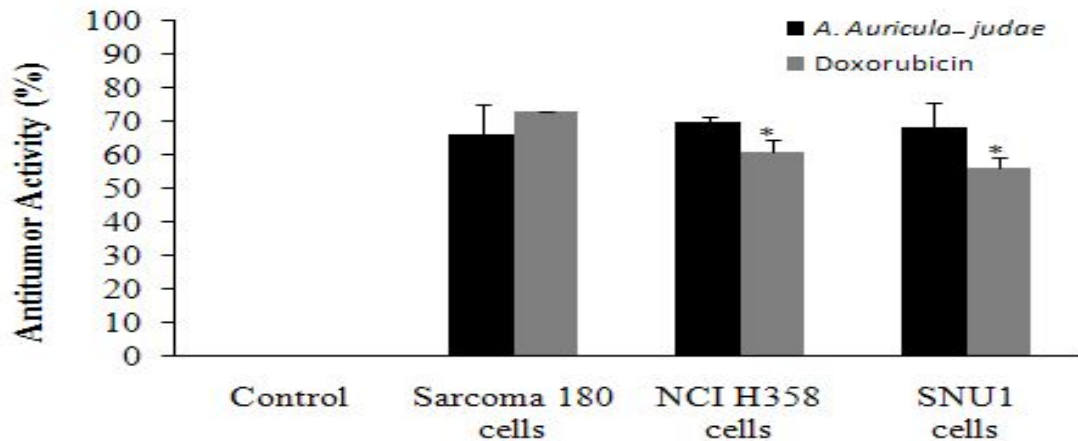


FIGURE 3-4. Cytotoxic effects of 70% ethanol extract from *A. auricula-judae* on different tumor cells. Mean values \pm SD from triplicate separated experiments are shown. * differ significant at $P < 0.05$ on same tumor cell line among 70% AAE (1 mg/mL) and doxorubicin (1 μ g/mL).

70% ethanol extract은 세포주에 따라서 다양한 항암활성을 나타내었고 큰 차이는 보이지 않았다. 따라서 목이버섯의 추출액에는 당당류 외에 항암성분이 포함되어 있는 것을 확인 할 수가 있었다(20).

전세계적으로 암은 남성 및 여성에서 발생하는 질병 중 죽음을 일으키는 질병이다. 오늘날은 호르몬 치료, 방사성치료 및 화학요법 그리고 외과적수술이 암치료를 하는 방법들이다. 그러나 이러한 치료법이 암을 치료하는 완전한 방법들은 아니다(21). 그 결과로써, 식물로부터 항암물질을 찾는 연구는 1950년 초부터 시작되었다. 그리고 알칼로이드를 포함한 항암제들이 개발되었다. 이러한 연구 결과는 많은 임상적인 항암물질이 동정되었다. 이러한 항암물에는 taxenes와 camptothecins를 포함하여 항암활성을 보여주었다(1).

목이버섯의 항암활성은 열수추출액과 70%에탄올추출액사이에서 상당히 다양했다. 열수추출액은 에탄올 및 다른 유기용매추출액과 비교시 항암활성이 크지 않았다. 하지만 목이버섯의 70%에탄올추출액은 다른 식물추출액보다 더 강력한 항암활성을 보여주었다. 한편 70%에탄올추출액은 *Phellinus gilvus*, *Ganoderma lucidum* extracts 보다 더 강한 항암활성을 보여주었으나 통계적인 유의성은 보여주지 않았다($P < 0.05$). *Ganoderma lucidum* 추출액은 human myeloid leukemia (HL-60) cells에서 44.8%로 세포성장을 억제하였다. 그리고 다른 세포주에는 2.0%에서 82.5%까지 시험관내에서 세포성장을 억제한다는 보고가 있었다(22). 한편 마른진흙버섯인 *Phellinus gilvus*는 용량의존적으로 B16F10 melanoma cells에서 시험관 및 동물실험에서 항암효과가 보고되어있다(23). 이것은 추출동안에 항암활성의 성분의 변환으로 나타난 것이 추측되어진다. 70% ethanolic *Auricularia auricula-judae* extract에서 수용성 β -glucan이 항암효과가 있다고 보고되었다

(24). 그러나 alkali-insoluble β -glucan은 항암활성이 없는 것으로 알려졌으나 변환된 β -glucan은 강력한 항암활성을 보인다고 알려졌다(19). 목이버섯의 경우 열수추출물은 42.6%까지 고형암에서 항암활성이 있는 것으로 보고되었다(25). 따라서 본 실험에서는 70%에탄올추출액 보다는 용매에 의해 부분 정제되거나 순수분리 정제되어질 경우 강력한 항암활성을 보일 것으로 추측되므로 본 연구에서는 여러 추출용매로 분획추출을 실시하여 항암활성을 비교하였다. Lotus corniculatus extract는 1차 항암선별과정에서 항암활성을 보였다. 그 이유는 이 버섯의 추출액은 kaempferol과 quercetin이 포함되어 있기 때문인 것으로 알려졌다(26). Kaempferol은 apoptosis를 glioblastoma cells에서 oxidative stress를 통해서 일어나는 것을 보여주었다(27). 하지만 quercetin은 NK cell-mediated lysis를 암세포주에서 보였고 connexin 43을 증가하였다. 이 단백질은 암세포주의 성장을 억제하였다(21, 28). Morus bombycis for. Kase는 in vitro 검사에서 항암활성이 보고되었다. Prenylated flavonoids, benzofurans 그리고 다른 phenolic compound들은 Morus sp.에서 분리되었고 cytotoxic substances로 tumor growth을 억제하였다. 이러한 억제는 COX-1, COX-2, NO production 그리고 HIF1의 down-regulation에 의해서 일어나는 것으로 보고되었다(29). Draba nemorosa var hebecarpa, Sedum oryzifolium, Robinia pseudo-acacia, Sciadopitys verticillata 그리고 Evodia daniellii에 대한 생리활성에 관한 보고가 없는 관계로 본고에는 더 이상 논의할수 없었다. 결론적으로 *Auricularia auricula-judae* mushroom이 항암활성이 존재하는 혹은 antitumor candidate로 가능성이 있는지를 100 Korean plant extracts와 비교 검토하였다. *Auricularia auricula-judae*, *Phellinus gilvus* 그리고 *Ganoderma lucidum* extracts의 항암활성은 비슷하였다. 국내 자생식물의 추출액과 *Auricularia auricula-judae* 70% ethanol extracts (IC50, 0.72 mg/mL)과 비교시 Morus bombycis for. Kase (IC50, 1.81 mg/mL), Draba nemorosa var hebecarpa (IC50, 1.49 mg/mL), Sedum oryzifolium (IC50, 1.05 mg/mL) 그리고 Lotus corniculatus var. japonicas (IC50, 1.10 mg/mL)보다 더 강력한 항암활성을 보여주었다. 또한 *Auricularia auricula-judae* extract 은 65.71%, 69.76% 그리고 68.01%의 암세포 성장 억제를 sarcoma 180, NCI H358 그리고 SNU 1 cell에서 보여주었다. 본 연구의 결과는 *Auricularia auricula-judae* extract 는 새로운 항암활성 소재의 가능성을 보여주었다.

4. NCI H358 세포주와 SNU 1 세포주에서 A항암활성 및 황산화작용 측정

4-1. 70% 목이버섯 추출액의 당과 단백질 농도의 측정

Brix와 BCA 단백질 측정법으로 당과 단백질을 측정하였다. 70% 에탄올추출액은 당을 함유하고 있음을 알았다. 당의 함량은 74.12%로 나타났다. 하지만 단백질은

4.17%였다. 자실체는 탄수화물과 단백질이 많이 포함되어 있고 단백질에는 라이신과 루신이 많이 포함되어 있는 것으로 알려져 있다(Fan et al., 2007). 열수 목이버섯 추출액에서는 탄수화물이 42.5% 함유되어 있는 것으로 알려져 있다(Chen et al., 2008). 이러한 결과는 70% 에탄올 추출액이 열수추출물보다 많은 더 많은 탄수화물을 추출되는 것을 보여주었다.

4-2. 목이버섯추출액의 NCI H358 세포주와 SNU 1 세포주에서 항암활성 비교시험

70% 에탄올 추출액에서 분리된 EtOAc, BuOH, DCM, ETOH 그리고 water 분획물에 대한 bronchoalveolar (NCI H358) 그리고 gastric (SNU 1) tumor cell lines에서 항암활성을 측정한 결과를 IC₅₀ values으로 구하여 Figure 4-1과 4-2에 각각 나타내었다. 대조 약물은 독소루비신을 사용하였다. 유기용매별 항암활성은 농도-반응에 따른 항암활성을 보였다(P<0.05). 디클로르메탄층은 가장 높은 항암활성을 보였다. 수층은 NCI H358에서 그리고 ethanol fraction은 SNU 1 세포주에서 가장 낮은 항암활성을 보였다.

용매 추출별 항암활성을 비교시 DCM > BuOH > ETOH > EtOAc > Water 순으로 NCI H358 cells에서 항암활성을 보여주었다. 그리고 DCM > BuOH > EtOAc > Water > ETOH 순으로 SNU1 cells에서 보여주었다. 이러한 항암활성은 한 성분에 의해서 나타나는 결과가 아니라 여러성분이 여러 기전에 의해서 나타나는 것으로 생각되었다.

4-3. 디클로르메탄 분획물의 GC-MS 분석

Dichloromethane fraction은 다른 유기용매의 분획물 보다 강력한 항암활성을 보여주었다. 따라서 이 디클로르메탄 분획물에 대하여 성분 분석을 GC-MS로 분석하였다. 그 결과를 Table 4-2에 나타내었다. 분석 결과 주요 성분은 5, 11, 17, 23-tetrakis (1,1-dimethyl)-28-methoxypentacyclo (65.84%) 그리고 diazane (6.17%)이었다. 이 때 retention time은 42.54 min과 1.47 min으로 각각 보여주었다. 이들 성분 가운데 diazane 그리고 gibberellic acid는 antitumor active를 갖는 것으로 보고되어있다(Chen et al., 2009 Emanuel et al., 1976). 하지만 2,4-di-tert-butylphenol 그리고 n-hentriacontane는 antioxidant properties를 갖고 있는 것으로 알려져 있다 (Olubunmi et al., 2010; Yoon et al., 2006). 목이버섯의 디클로르메탄층에서 이러한 성분의 보고는 처음으로 밝혔다.

본 연구에서는 DCM fraction, diazane 그리고 gibberellic acid에 대하여 항암

활성을 비교하였다. 그 결과를 Table 4-3에 나타내었다. Diazane, gibberellic, 그리고 디클로르메탄 층의 IC₅₀ values를 비교하였을 경우, dichloromethane fraction이 가장 좋은 항암활성을 보였다. 특히 gibberellic acid가 이들 중에서 human tumor cell lines에 대해서 가장 낮은 항암활성을 보였다. 이러한 결과는 디클로르메탄층에 다른 항암활성 성분이 포함되어 있다는 것을 의미한다.

Diazane는 S-phase를 cell division에서 억제하는 것으로 알려졌고 DNA-synthesizing cells를 감소시킨다. 그리고 DNA synthesis은 30-50% 감소하는 것으로 보고 되어있다(Goncharova et al., 1980; Shamaev et al., 1981). 그리고 diazane은 암세포의 성장을 억제하고 백혈병을 갖고 있는 동물의 수명을 증가시키는 것으로 알려져 있다(Emanuel et al., 1976).

Gibberellic acid는 human cancer cell lines에서 강한 항암활성을 보였고 이것들의 IC₅₀ values은 0.13 μ g/ml에서 100 μ g/ml으로 보고되어있다 (Chen et al., 2009; Zhang et al., 2012). Diazane 그리고 gibberellic acid는 DCM fraction과 비교되었다. 그러나 DCM 분획층이 가장 강한 항암효과를 보인다는 것을 보고하였다 (Reza et al., 2011). 에틸아세테이트층과 에탄올층은 NCI H358 cell lines에서 더 강한 항암활성을 보였다. Paecilomyces japonica 에탄올 층은 cell cycle progression을 G1-arrest를 통해서 억제하여 phosphorylation을 차단하는 결과로 나타난다. 그리고 ethyl acetate extract는 apoptosis를 mitochondria-dependent apoptotic signaling pathway를 나타나게 한다 (Song et al., 2007). Livistona chinensis R.Br의 에틸아세테이트 층은 강력한 항암활성을 갖고있다. 그리고 항암기전은 VEGF protein secretion를 억제하고 Flk-1 mRNA 그리고 protein 발현을 억제한다 (Wang et al., 2008). IC₅₀ values에 의하면 doxorubicin이 SNU1 cell 그리고 NCI H358 cell lines에서 항암활성을 보였다. 이러한 항암활성은 목이버섯분획층보다 높은 활성이었다. 그러나 이러한 강한 항암활성에도 불구하고 독성이 높아 임상에 오랫동안 사용하면 부작용이 나타난다(Kluza et al., 2004).

특히, Gibberellic acid는 apoptosis를 유도할 것으로 추측된다. 그 이유는 α , β -unsaturated ketone units 가 gibberellic acids의 A-ring 그리고 D-ring이 topoisomerase-I activity 억제하여 apoptosis를 유도하는 것으로 알려져 있다 (Chen et al., 2009). 위의 결과로부터 gibberellic acid가 포함되어 있는 디클로르메탄 분획층은 apoptosis를 유도할 것이라는 가설이 가능하다. 본 연구에서는 이에 대한 연구를 추가로 실시하였다.

4-4. 항암원성 유전자의 mRNA 발현

Apoptosis는 Bcl-2, P53, Bax 그리고 CD147 genes의 mRNA를 측정하는데 이들 유전자들은 apoptosis의 조절에서 중요한 역할을 한다. 분자 혹은 생화학적인 기전을 이해하기 위하여, DCM 층에 대해서 NCI H358 그리고 SNU 1 cells에서

apoptosis를 구명하였다. 이를 위해 우리는 Bax와 Bcl-2 유전자의 발현을 RT-PCR로 측정을 하였다. DCM 층은 시험한 세포주 모두에서 Bcl-2의 down-regulation을 보였다. 특히 CD147 expression이 butanol 층과 water 층 처리 후에 SNU1 cell에서 보여주었다(Fig. 4-4A, B). 암세포주의 증식은 P53의 과발현에 의해서 SNU 1 세포주 (Figure 4A, B) 그리고 NCI H358 세포주 (Figure 3A, B)에서 억제되었다. 하지만 Bax의 과발현이 doxorubicin, EtOH, DCM, BuOH 그리고 water fractions으로 NCI H358 cell line에 처리시 억제되었다 (Figure 3A, B). 이러한 결과는 수용성 β -D-glucan이 목이버섯의 70% ethanol extract에서 Sarcoma-180 tumor cell의 Bax의 up-regulation과 Bcl-2의 down-regulation (Ma et al., 2010)에 의한 apoptosis라는 것과 일치하는 결과였다. P53는 apoptosis를 growth arrest에 의해서 나타난다. 이것은 cell cycle progress의 억제가 cyclin-dependent kinase와 G1 arrest의 비활성화 때문이다. Apoptosis는 또한 p53이 과발현에 의해서도 일어난다 (Polyak et al., 1996). P53는 KILLER/DR5 expression 그리고 degradation of FLICE-inhibitor protein (FLIP)의 증가에 의해서 시초될 수 있다. 이 두 단백질은 apoptotic signaling을 유도한다 (Fukazawa et al., 2001). Bcl-2의 감소는 apoptosis를 발생시킨다. 이러한 발생은 caspase를 활성화하는 cytochrome c의 위치이동과 방출에 기인한다. 그래서 apoptotic process가 시작한다 (Kluck et al., 1997).

4-5. Antioxidant activity

Dichloromethane (DCM) fraction의 항산화활성은 상기한 DPPH assay로 실시를 하였다. Figure 4-5에서 보여주는 것처럼, DCM fraction이 가장 강한 항산화활성을 보여주었다. 자유라디칼의 소거능이 10.02%에서 73.31%까지 0.1에서 10 mg/mL에서 보여주었다. DCM fraction의 IC50은 31.75 μ g/mL 그리고 antioxidant activity index (AAI)는 1.24를 보여주었다. 버섯에서 antioxidant activity index는 전에 보고된 것과 유사하였다 (Ruch et al., 1984). 목이버섯에서도 다당류가 DPPH radical-scavenging activity가 매우 높다는 것을 보여주었다 (Fan et al., 2007). 그리고 분리정제된 목이버섯의 수용성 다당류가 강력한 항산화활성을 보유하고 있다는 것을 보고되었다 (Zhang et al., 2011).

결론적으로 항암작용에서 모든 유기용매 층은 농도-의존적인 활성을 보여주었다. 5,11,17,23-tetrakis (1,1-dimethyl)-28-methoxypentacyclo [19.3.1.1 (3,7).1 (65.85%)과 diazane (6.17%)의 항암활성은 크지 않았으나 apoptosis를 유도하는 것으로 나타났다. 모든 유기용매 중에서 디클로르메탄층이 가장 큰 항암활성을 보였다. Diazane과 gibberellic acid는 Bcl-2를 억제하고 P53활성을 증가시켰다. 또한 디클로르메탄층은 높은 항산화 활성을 보였다.

Table 4-2. GC-MS analysis of dichloromethane fraction from 70% ethanol extract of *A. auricula-judae*.

Compounds	Retention time (min.)	Area (%)	Functions	References
Diazane	1.47	6.17	Antitumor	Emanuel et al, 1976
2-Mercaptobenzoic acid	9.0	2.47	Preservatives of vaccine, immunoglobulins and ophthalmic solution and analgesic, antipyretic, anti-inflammatory and cytotoxic	Gonçalo, et al., 1992; Fadeyi et al., 2004
2,4-Di-tert-butylphenol	14.88	3.29	Antioxidant	Yoon et al., 2006
n-Hentriacontane	28.78	2.47	Diuretics, anti-inflammatory, Antioxidant and probably antitumor	Rizvi et al., 1985 Olubunmi et al., 2010.
n-hexacosane	29.88	2.88	Unknown	-----
N-ethoxycarbonyl-3-hydroxyindoline	30.87	2.47	Unknown	-----
n-Heptacosane	30.95	3.29	Unknown	-----
Gibberellin A3	31.74	1.65	Strong antitumor of its derivatives	Chen et al., 2009; Zhang et al., 2012
n-Eicosane	31.97	2.47	Antiseptic and antimicrobial activities of n-eicosane derivatives	Härtner et al., 2009
5-Acetamido-4,7-dioxo-4,7-dihydrobenzofurazan	32.96	1.24	Unknown	-----
Silane, 1,4-phenylenebis [trimethy-	35.82	2.88	Unknown	-----
Floridanine	38.94	2.88	spasmolytic and hypotensive properties	Litvinchuk et al., 1979
5,11,17,23-tetrakis (1,1-dimethyl)-28-methoxypentacyclo/Sodium ionophore X	42.54	65.84	Na ⁺ measurement in blood	Jayakannan et al., 2011

Table 4-3. IC₅₀ values of diazane and gibberellic acid on human tumor cell lines.

Cell lines	IC ₅₀ values (µg/mL)	
	Diazane	gibberellic acid
NCI H358	117.8	812.3
SNU1	85.2	1065.0

Data are presented as IC₅₀ values by MTT assay from three independent experiments, performed in triplicate on tumor cell lines, obtained by nonlinear regression using the GRAPHPAD Prism program.

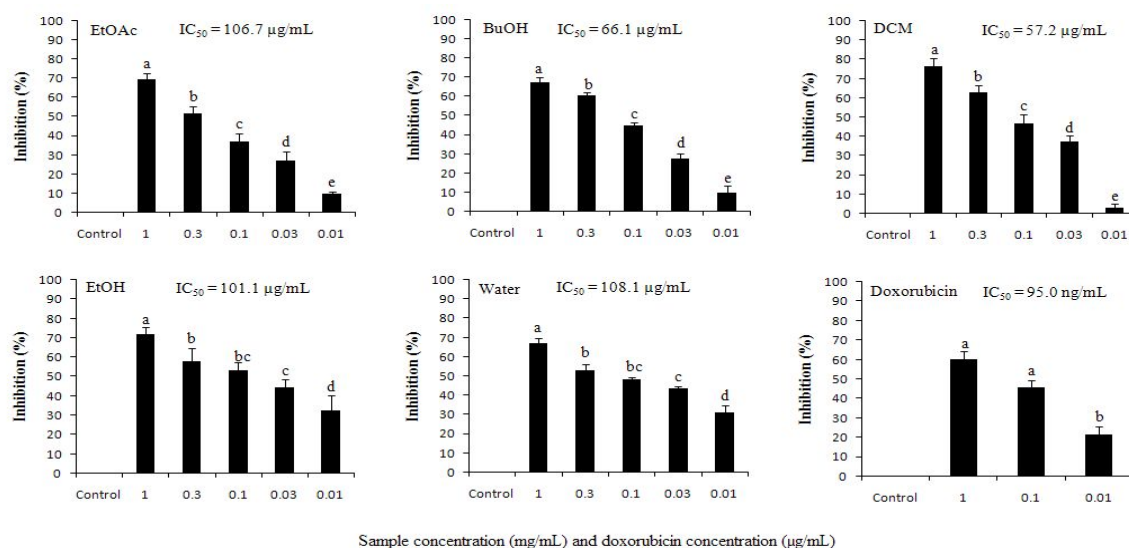


Figure 1. Percentages of inhibition by solvent fractions of 70% ethanolic *Auricularia auricula-judae* extract and doxorubicin was used as a positive control on NCI H358 cell line by MTT assay. All values are presented as percentages of the results from control, and are expressed as mean \pm standard deviation (SD) of three independent (triplicate wells) experiments, different letters are significantly different within various concentrations at $P < 0.05$ and showed the dose-dependent decreasing manner of anti-tumor activity.

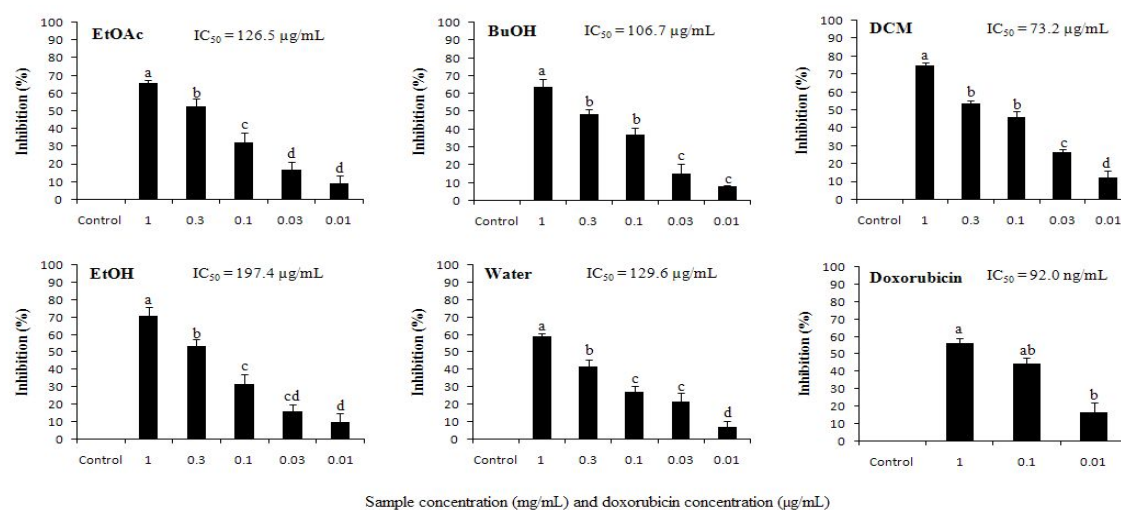


Figure 2. Percentages of inhibition by solvent fractions of 70% ethanolic *Auricularia auricula-judae* extract and doxorubicin was used as a positive control on SNU1 cell line by MTT assay. All values are presented as percentages of the results from control, and are expressed as mean \pm standard deviation (SD) of three independent (triplicate wells) experiments, different letters are significantly different within various concentrations at $P < 0.05$ and showed the dose-dependent decreasing manner of anti-tumor activity.

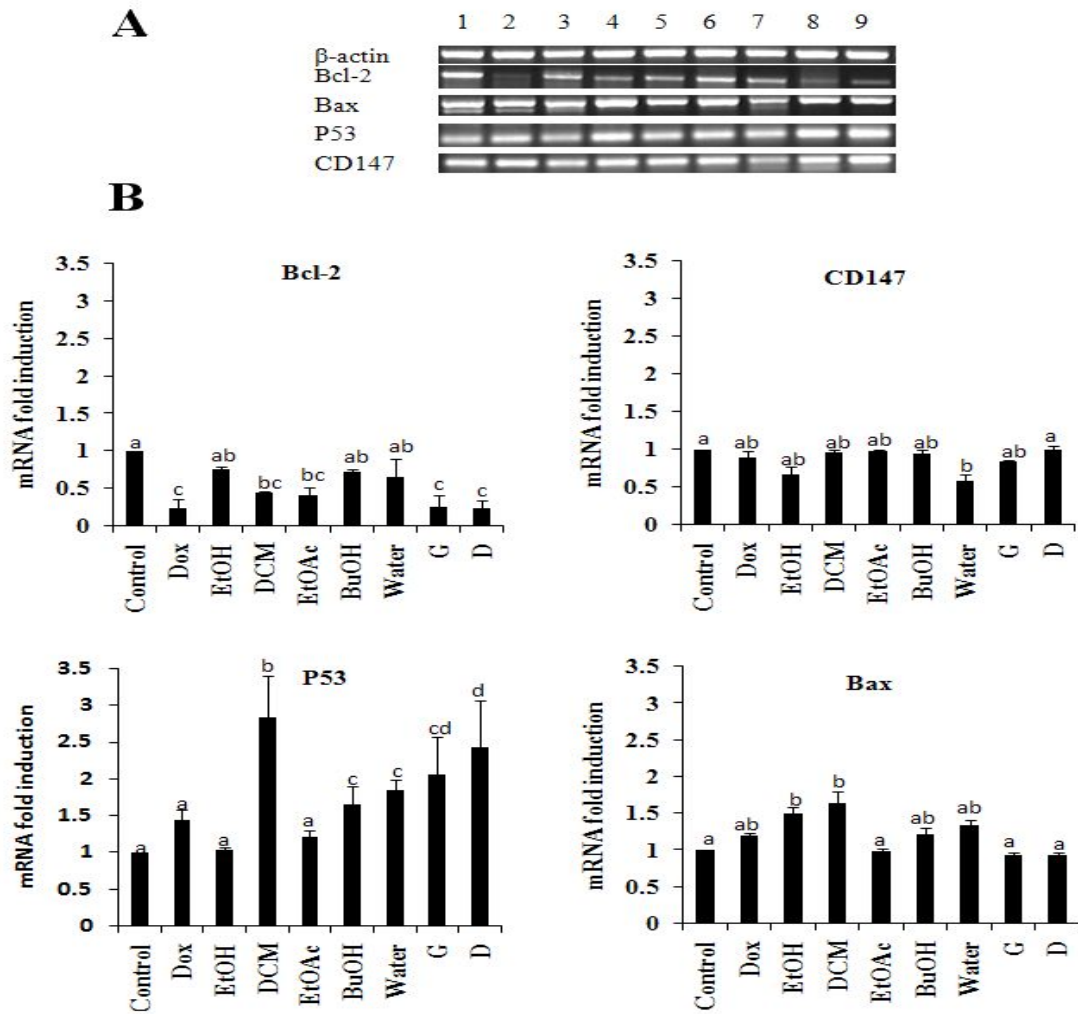


Figure 3. mRNA expression of Bcl-2, Bax, P53 and CD147 in NCI H358 cells with different solvent fractions of 70% ethanol extract from *Auricularia auricula-judae*, gibberellic acid and diazane (1 mg/ml). (A) Electrophoresis of PCR products in an agarose gel (2.0%). (B) The mRNA fold induction of Bcl-2, Bax, P53 and CD147 in NCI H358 to β -actin mRNA levels. Values are mean \pm SD of three independent experiments. * is expressed as significant different that compared to control (PBS) at $P < 0.05$. 1. Control (PBS), 2. doxorubicin (dox), 3. ethanol fraction (EtOH), 4. dichloromethane fraction (DCM), 5. ethyl acetate fraction (EtOAc), 6. butanol fraction (BuOH), 7. water fraction, 8. gibberellic acid (G) and 9. Diazane (D) respectively.

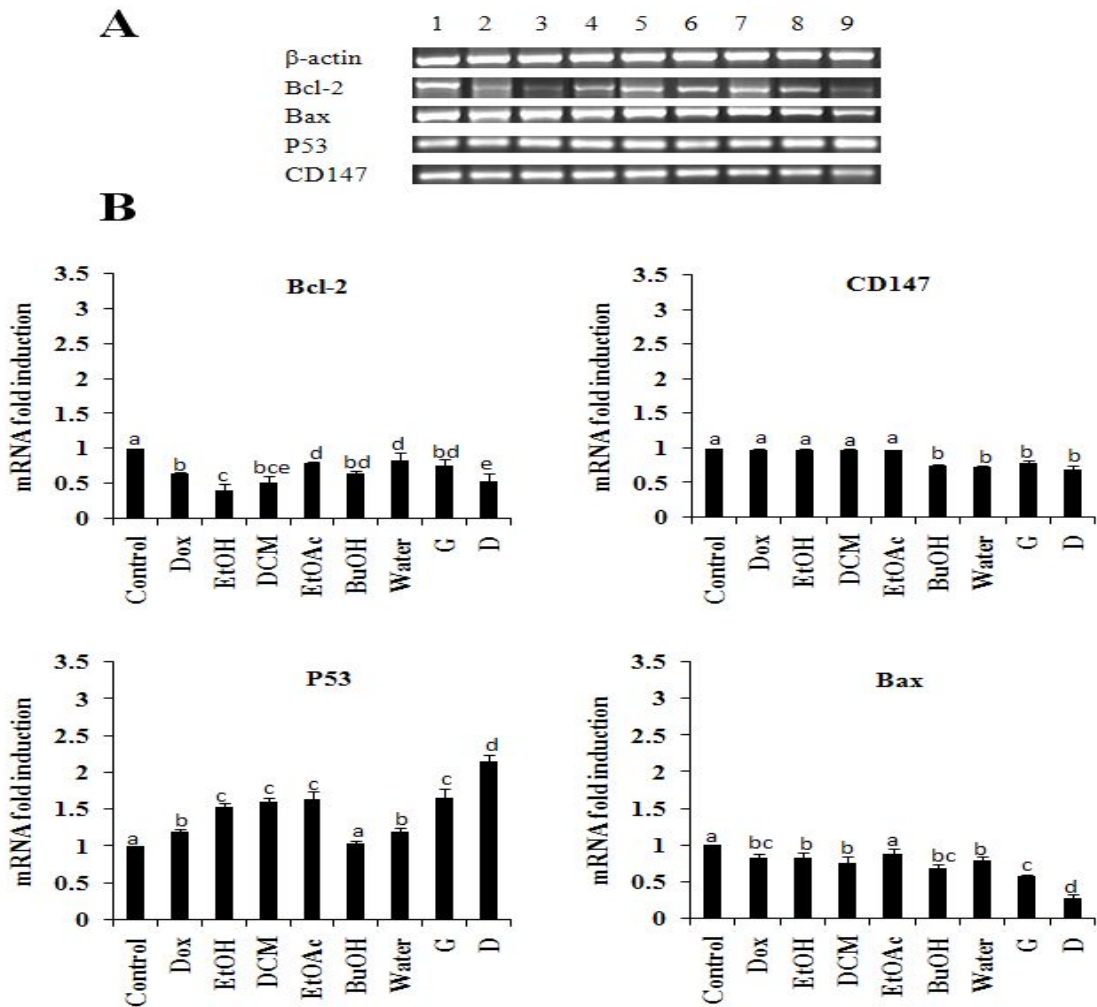
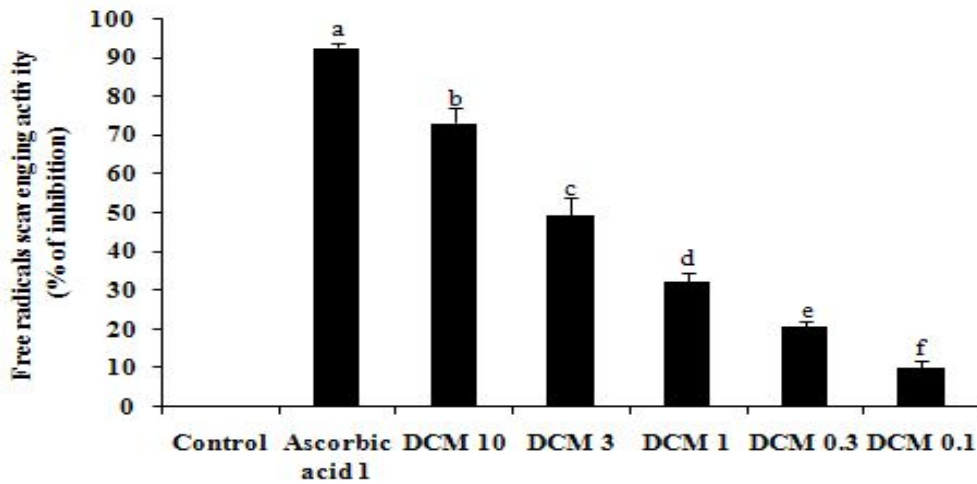


Figure 4. mRNA expression of Bcl-2, Bax, P53 and CD147 in SNU1 cells with different solvent fractions of 70% ethanol extract from *Auricularia auricula-judae*, gibberellic acid and diazane (1 mg/ml). (A) Electrophoresis of PCR products in an agarose gel (2.0%). (B) The mRNA folds induction of Bcl-2, Bax, P53 and CD147 in SNU1 to β -actin mRNA levels. Values are mean of three independent experiments \pm SD. *is expressed as significant different that compared to control (PBS) at $P < 0.05$. 1. Control (PBS), 2. doxorubicin (dox), 3. ethanol fraction (EtOH), 4. dichloromethane fraction (DCM), 5. ethyl acetate fraction (EtOAc), 6. butanol fraction (BuOH), 7. water fraction, 8. gibberellic acid (G), and 9. Diazane (D) respectively.



Ascorbic acid and DCM (dichloromethane) fraction with concentration (mg/mL)

Figure 5. DPPH free radical scavenging activity of dichloromethane fraction from *Auricularia auricula-judae* 70% ethanol extract was spectrophotometrically measured at 517 nm using DPPH assay. All values are presented as inhibition percentages of the results from control, and are expressed as mean \pm standard deviation (SD) of three independent (triplicate wells) experiments, different letters are significantly different within various concentrations at $P < 0.05$ and showed the dose-dependent decreasing manner of anti-tumor activity.

2-5. 목이버섯 추출물 미백효능비교시험

목이버섯 추출물에 대한 다양한 다기능성 바이오소재의 개발 일환으로 연구계획서에 준하여 미백효능시험을 실시하였다. 1차년도 시험의 결과에 따라서 물리화학적 특성이 다른 두 개의 분획구인 dichloromethane 분획층과 water 분획층을 추출시간에 따라 비교하여 실시하였다.

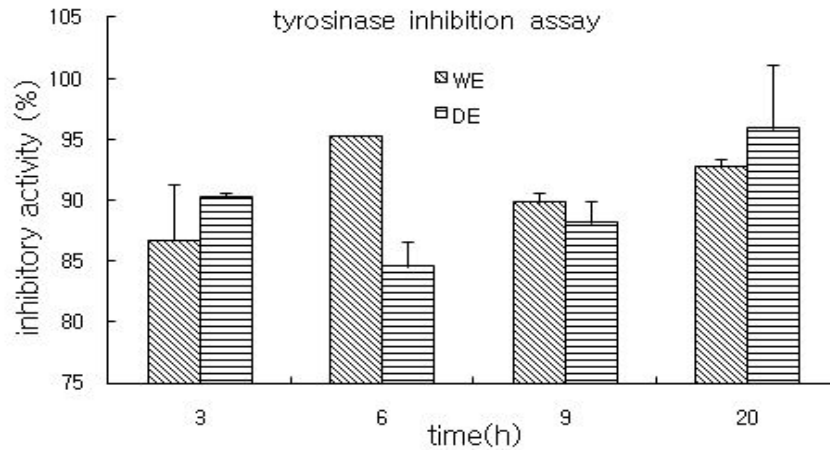


Fig 10. Tyrosinase inhibitory activity (%) of water(WE) and dicloromethane extract(DE).

Fig 10에서 보여주는 것처럼 추출시간에 따른 타이로신 생성 억제율(%) 시험에서 추출 6시간에는 water 분획층 그리고 추출 20시간에는 dichloromethane 분획층이 타이로신 생성 억제율이 높음을 확인 할 수 있었다. 이러한 결과로 특성이 독특한 목이버섯의 추출액은 화장품의 기능성소재에 응용이 가능하다는 것을 확인할 수 있었다. 3차년도에는 원안의 계획서에는 없었지만 추가적인 실험을 보완하여 다기능성바이오소재 확보 차원에서 주관기관과 상의하여 추가적인 연구를 추진하고자 한다.

2-7. 단회 경구 투여 독성시험

치사율 및 임상증상: 여러 농도의 *Auricularia auricula-judae* ethanol extract를 랫트에 경구 투여시 모든 시험군에서 14일 동안 *Auricularia auricula-judae* ethanol extract 투여로 사망한 랫트는 관찰되지 않았다(Table 1). 시험물질에 의한 독성증상과 특이적 임상소견도 나타나지 않았다(Table 2). 위의 결과를 통해, *Auricularia auricula-judae* ethanol extract를 랫트에 단회 경구 투여 하였을 때 LD50값은 암컷과 수컷 모두에서 5,000 mg/kg 이상임을 알 수 있었다. 그러나 체중은 *Auricularia auricula-judae* ethanol extract의 용량이 증가 할수록 대조군에 비하여 감소하는 경향을 보였다.

Table 1. Mortality and LD50values in male and female rats treated orally with *Auricularia auricula-judae* ethanol extract

Groups	Dose(mg/kg)	Hours after treatment						Days after treatment							Final mortality	
		1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6	7 ~ 14		
Male	0	0*	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5
	625	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5
	1,250	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5
	2,500	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5
	5,000	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5
Female	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5
	625	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5
	1,250	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5
	2,500	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5
	5,000	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5

* : Number of dead animals.

Table 2. Clinical findings of male and female rats administered orally with *Auricularia auricula-judae* ethanol extract

Groups	Dose(mg/kg)	Clinical signs	Hours after treatment						Days after treatment							
			1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6	7~14	
Male	0	NAD*	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	625	NAD	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	1,250	NAD	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	2,500	NAD	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	5,000	NAD	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
Female	0	NAD	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	625	NAD	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	1,250	NAD	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	2,500	NAD	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	5,000	NAD	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5

*NAD: No abnormality detected.

Table 3. Body weights of males and females by oral administration (group summary)

Sex	Days after treatment	Dose (mg/kg)					
		0	313	625	1,250	2,500	5,000
Male	0	109.4±7.2	109.6±7.3	110.6±7.1	107.7±4.1	108.3±7.4	108.2±7.6
	1	126.1±6.9	126.0±4.2	129.6±8.4	126.1±6.9	123.3±6.4	127.1±6.3
	3	150.7±6.6	154.3±8.1	152.5±10.7	150.7±6.6	151.8±9.3	153.3±10.4
	7	188.7±10.8	190.0±7.4	186.0±10.0	184.4±6.2	176.2±10.1	176.1±10.1
	14	234.4±10.4	237.9±11.2	227.1±10.4	228.8±12.6	211.8±13.1	211.8±11.3
Female	0	96.4±6.9	95.6±6.4	96.8±8.9	95.8±7.4	98.6±3.1	95.2±6.0
	1	111.4±7.2	110.3±6.5	111.7±8.5	111.0±7.1	110.6±6.9	109.8±6.9
	3	129.5±7.5	126.4±140.6	127.8±10.9	128.7±6.8	127.5±8.4	127.7±8.7
	7	144.1±7.6	140.6±11.7	143.0±14.8	140.4±12.4	138.4±10.2	138.2±10.2
	14	171.0±7.3	170.8±14.2	170.4±14.1	168.1±14.3	158.6±12.2	159.9±16.2

Each value is mean±SD.

a) : No. of animals examined

- : All animals were died

Table 4. Body temperature changes in male and female rats after single oral administration of *Auricularia auricula-judae* ethanol extract

Day	Male body temperature					Female body temperature				
	Dose (mg/kg)					Dose (mg/kg)				
	0	625	1,250	2,500	5,000	0	625	1,250	2,500	5,000
pre-treatment	37.5 ± 0.4	37.5 ± 0.3	37.5 ± 0.2	37.6 ± 0.2	37.7 ± 0.2	37.6 ± 0.3	37.7 ± 0.2	37.4 ± 0.2	37.6 ± 0.2	37.7 ± 0.2
Day 1	37.4 ± 0.3	37.4 ± 0.2	37.7 ± 0.2	37.4 ± 0.2	37.6 ± 0.2	37.4 ± 0.2	37.6 ± 0.2	37.4 ± 0.2	37.6 ± 0.1	37.7 ± 0.2
Day 2	37.6 ± 0.2	37.5 ± 0.1	37.6 ± 0.2	37.4 ± 0.3	37.4 ± 0.3	37.7 ± 0.2	37.6 ± 0.1	37.6 ± 0.2	37.5 ± 0.1	37.5 ± 0.1
Day 3	37.6 ± 0.1	37.4 ± 0.3	37.4 ± 0.3	37.6 ± 0.2	37.5 ± 0.1	37.7 ± 0.2	37.5 ± 0.1	37.5 ± 0.1	37.6 ± 0.2	37.5 ± 0.1
Day 4	37.6 ± 0.1	37.7 ± 0.2	37.4 ± 0.3	37.5 ± 0.1	37.6 ± 0.2	37.6 ± 0.2	37.6 ± 0.1	37.5 ± 0.2	37.4 ± 0.3	37.5 ± 0.1

Values are presented as mean ± S.D. No significant difference observed ($p < 0.05$).

체중변화 및 체온변화: 시험기간 동안 체중의 변화를 관찰한 결과, 모든 시험군의 체중이 정상적으로 증가하였다(Table 3). 체온변화에서도 대조군과 시험군에서 유의적인 이상 체온은 나타나지 않았으며, 시험군 간의 유의적인 이상 체온도 없었다(Table 4).

Table 5. Absolute organ weights(g) of males by oral administration

Parameters	\ sex	Male					
		\ Dose(mg/kg)					
		0	313	625	1,250	2,500	5,000
	\ No. of animals	5	5	5	5	5	5
Body weight(g)		234.4±10.4	237.9±11.2	227.1±10.4	228.8±12.6	211.8±13.1	211.8±11.3
Liver(g)		13.58±0.44	13.29±0.45	13.44±0.18	13.57±0.43	13.60±0.33	13.71±0.40
Spleen(g)		0.63±0.08	0.57±0.03	0.59±0.06	0.58±0.07	0.61±0.04	0.64±0.17
Kidney(g)	Right	1.14±0.05	1.18±0.05	1.15±0.03	1.17±0.03	1.13±0.02	1.16±0.07
	Left	1.14±0.04	1.19±0.07	1.16±0.06	1.17±0.03	1.15±0.05	1.13±0.03

Values are presented as mean±standard deviation (SD).

Table 3-6. Absolut organ weights(g) of females by oral administration

Parameters	\ sex	Female					
		\ Dose(mg/kg)					
		0	313	625	1,250	2,500	5,000
\ No. of animals		5	5	5	5	5	5
B o d y weight(g)		171.0±7.3	170.8±14.2	170.4±14.1	168.1±14.3	158.6±12.2	159.9±16.2
Liver(g)		8.60±1.15	8.44±0.72	8.46±0.70	8.21±0.59	8.07±0.14	9.04±1.07
Spleen(g)		0.46±0.07	0.45±0.07	0.51±0.08	0.49±0.06	0.44±0.03	0.46±0.07
Kidney(g)	Right	0.83±0.05	0.79±0.07	0.75±0.04	0.82±0.08	0.81±0.06	0.82±0.07
	Left	0.76±0.07	0.86±0.07	0.77±0.12	0.81±0.09	0.77±0.13	0.80±0.09

Values are presented as mean±standard deviation (SD).

사료 섭취량 및 음수량 변화: 0, 625, 1,250, 2,500, 5,000 mg/kg의 *Auricularia auricula-judae* ethanol extract를 랫트에 경구투여한 후, 투여일로부터 시험기간인 14일 동안 매일 사료량 및 음수량의 변화를 관찰한 결과, 모든 시험군의 암, 수 동물에서 정상적인 사료 섭취량과 음수량을 보였다. 또한, 대조군과 비교시 유의성 있는 섭취 변화는 관찰되지 않았으며, *Auricularia auricula-judae* ethanol extract의 농도에 따른 유의적인 차이가 발견되지 않았다. 부검 및 장기무게는 14일 동안의 시험기간 종료 후, 내부 장기에 대하여 육안적 병변을 관찰한 결과 이상 소견이 발견되지 않았다. 또한, 간, 신장, 비장의 무게를 관찰한 결과, 유의적인 변화가 관찰되지 않았다 (Table 5, Table 6).

2-8. 3T3-L1 세포주에서 지질저하제에 대한 효능 검증

질환 모델동물을 이용한 당뇨 및 지질저하제에 대한 효능 검증에 앞서, 전지방세포를 이용하여 각각의 목이버섯 추출물에 대한 스크리닝을 실시하였다.

그림 8-1에서 보는 것처럼 전지방세포가 지방세포로 분화되는 과정을 0.6% Oil Red O solution을 이용하여 염색한 사진이다. 대조군은 전지방세포에서 지방세포로 변화하는 분화유도물질을 처리한 군으로 붉은 색으로 염색된데 비하여, 분화유도 물질이 없는 fibroblast의 경우 거의 염색이 되지 않은 것을 확인할 수 있었다. 마우스 유래 섬유아세포인 3T3-L1 세포주(KCLB No. 10092.1)에서 GPDH 활성을 측정해 본 결과, 분화된 대조군과 비교시 분화되지 않은 fibroblast 및 anti-lipidemic drug인 fenofibrate, 목이버섯 에탄올과 물 추출물을 처리하였을 때 유의적으로 감소한다는 것을 알 수 있었다. Fenofibrate는 0.1-10 µg/ml, 목이버섯 에탄올 및 물추출물은 3-300 µg/ml로 농도의존적인 GPDH 활성의 감소를 보여 비슷한 수준의 GPDH 활성 감소를 보였다. 3T3-L1 세포에 목이버섯 에

탄올추출물과 물 추출물을 처리하였을 때, 농도-의존적으로 triglyceride의 축적되는 양이 감소한다는 것을 알 수 있었다. 특히 목이버섯 물 추출물 300 mg/ml 농도에서 약 55%의 triglyceride의 축적양이 감소하였으며, 이는 Fenofibrate 10 μ g/ml 농도에서의 triglyceride의 축적 양 감소와 유사하였다.

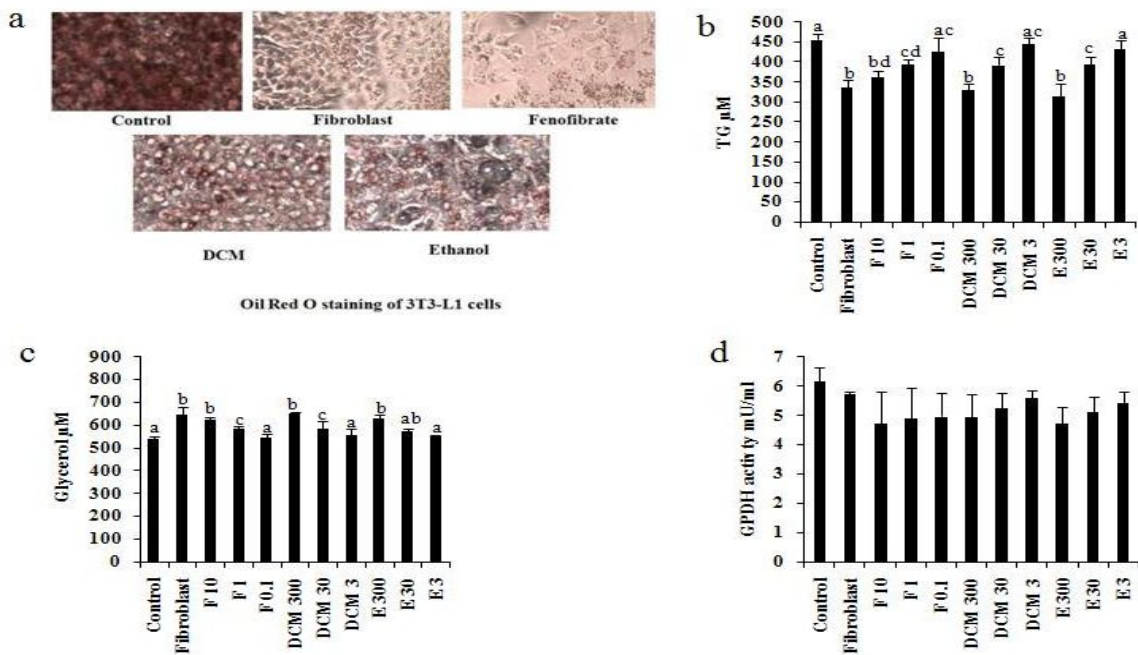


그림 8-1. Effects of 70% ethanol extract from *Auricularia auricula-judae* (Ethanol/EtOH) and its dichloromethane extract(DCM) on the differentiation and adipogenesis of 3T3-L1 cells. Cells (differentiation and induction medium) treated with 0.1% DMSO was used as controls, while cells (without differentiation and induction medium) treated with 0.1% DMSO was used as fibroblast. (a) On day 8, intracellular lipids were stained with Oil Red O at 10 μ g/ml (fenofibrate) and 300 μ g/ml (DCM and ethanol). (b) Synthesis of triglyceride (TG) in differentiated 3T3-L1 cells. (c) Release of glycerol in differentiated 3T3-L1 cells. (d) GPDH activity in differentiated 3T3-L1 cells. F. Fenofibrate at 10, 1 and 0.1 μ g/ml, DCM. Dichloromethane extract at 300, 30 and 3 μ g/ml, E. Ethanol extract of *Auricularia auricula-judae* at 300, 30 and 3 μ g/ml. All values are expressed as mean \pm SD of three independent experiments and the different alphabet differ significantly at $P < 0.05$ by ANOVA.

2-8. 질환모델동물을 이용한 지질저하 효과에 대한 효능 검증

2차년도 당뇨유발 뒤에 지질 저하능력의 효과를 측정하여 그 가능성을 보였다. 그러나 당뇨유발 뒤에 나타나는 복잡한 양상의 실험으로 정확한 지질감소효과에 대한 결과를 알기 어렵기 때문에 고지질사료를 투여한 후 목이버섯의 효과를 관찰하였다. 그 결과 다음과 같다.

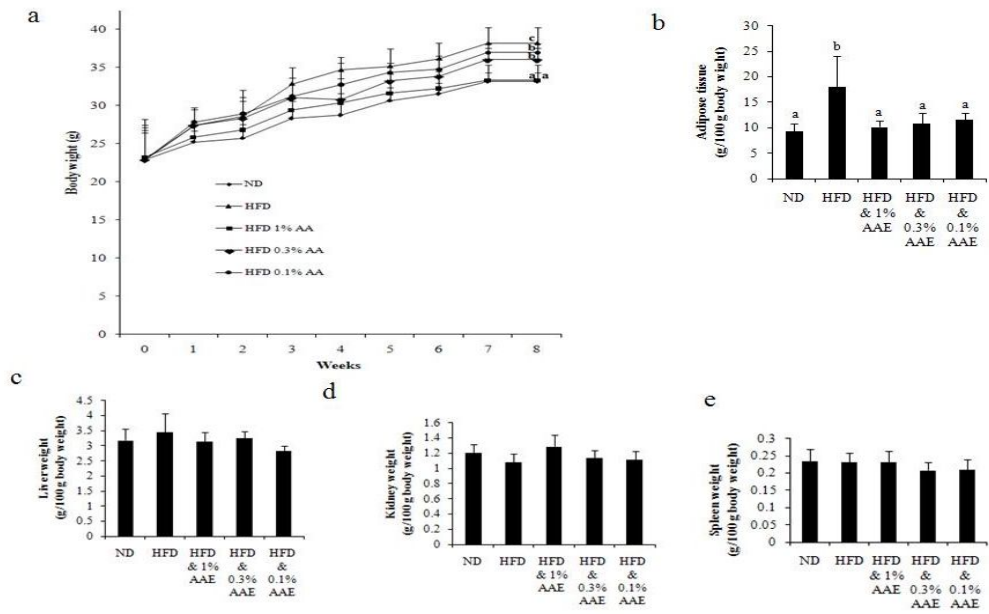
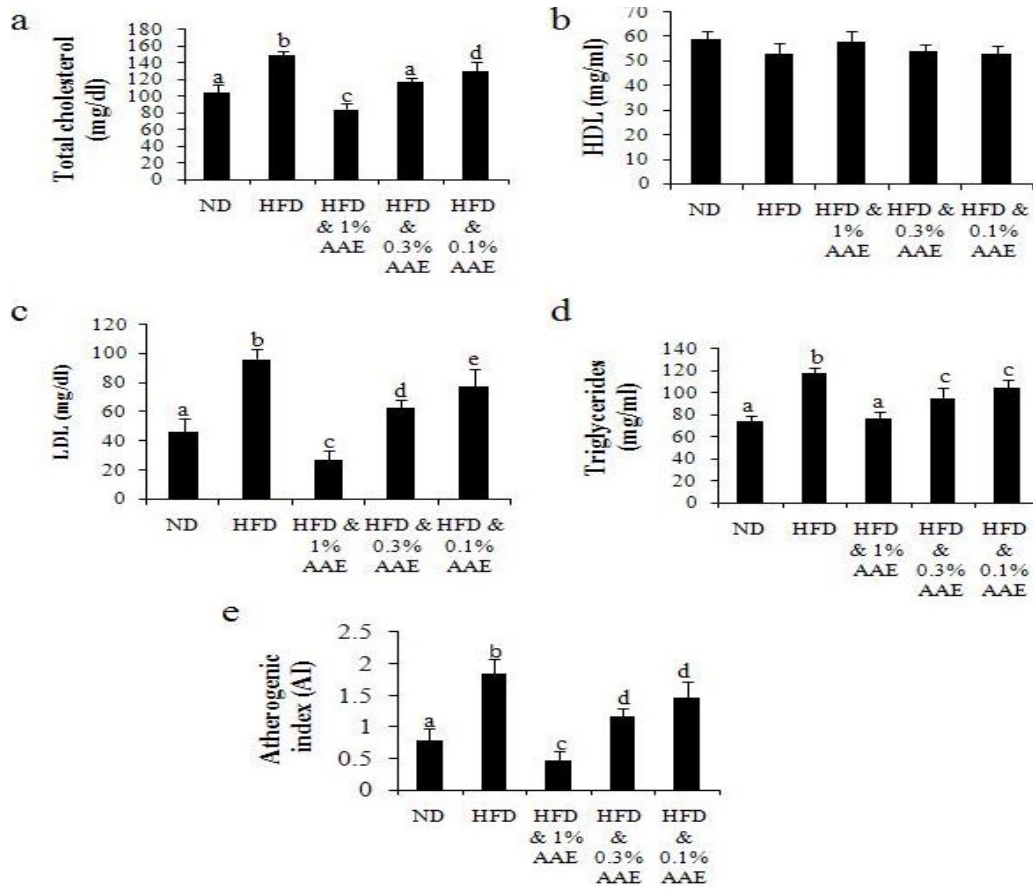


그림 8-2. Effects of *Auricularia auricula-judae* ethanol extract(AAE) at 1%, 0.3% and 0.1% on body weight(a), adipose tissue(b), liver(c), kidney(d) and spleen(e) weight in mice fed with high fat-diet(HFD) and normaldiet(ND) for 8weeks. Results are expressed as means±SD of 10 mice. Different alphabet differ significantly, $P<0.05$ by ANOVA.

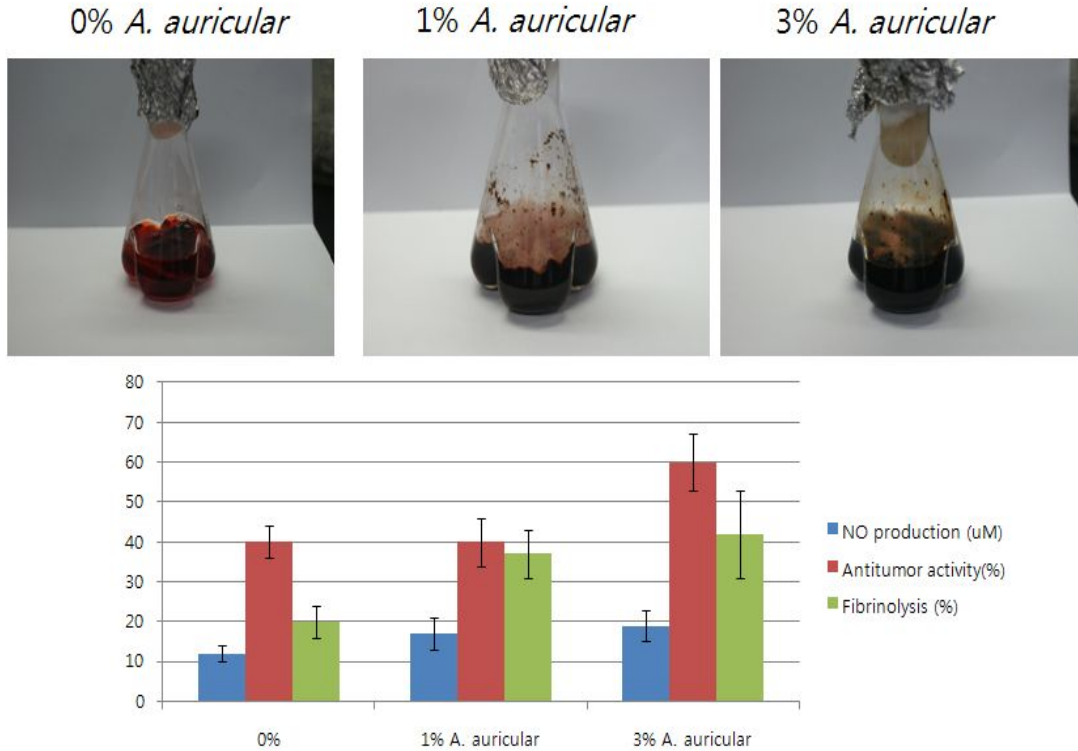


8-3. Effects of *Auricularia auricula-judae* ethanol extract(AAE) at 1%, 0.3% and 0.1% on plasma lipids. (a) Total cholesterol, (b) high density lipoprotein (HDL), © low density lipoprotein (LDL), (d) triglyceride and (e) atherogenic index(AI) in mice fed with high fat-diet (HFD) and normal diet(ND) for 8weeks. Results are expressed as means±SD of 10 mice. Different alphabet differ significantly, $P<0.05$ byANOVA.

70% 목이버섯추출액(AAE)을 8주동안 마우스에 투여한 결과 1% AAE 투여를 하였을 때 항지질효과를 확실하게 보여주었다.

2-9. 목이버섯추출액의 발효전과 후의 항암 및 항혈전활성의 비교시험

Biological activities after fermentation of *Auricularia Auricula-judae* ethanol extract by *Monascus Anka*



목이버섯의 활용 가능성을 증대하기 위한 일환으로 연구계획에 따라서 목이버섯 추출액 무첨가(0%), 1% 그리고 3%를 첨가한 후에 홍국균 3% 접종하여 48시간 배양하였다. 그 결과 목이버섯 추출액의 무첨가와 첨가한 후의 발효전과 발효후의 차이점으로 항암작용과 항혈전작용의 증가를 보여주었다. 그러나 NO의 생성은 변화를 보이지 않았다.

5. 목이버섯의 추출액의 발효물에 대한 식품 소재화

1. 생리활성물질 분석

목이버섯 함량에 따른 된장을 제조하여, 목이버섯 된장의 점조도 및 생리활성 물질을 분석한 결과는 아래와 같다.

전체적으로 모든 구간에서 생리활성 물질이 생성되는 것으로 나타났으며 【표 1】, 특히 목이버섯 분말을 1.0% 첨가한 된장의 점조도값이 가장 높았고, 혈전용해 효소 활성도 33.54%로 높게 나타났다 【그림 1】. 또한 타이로신 및 프로테아제 활성도 목이버섯 분말을 1.0% 첨가했을 때, 각각 115.47, 85.31 mg%로 다른 구간

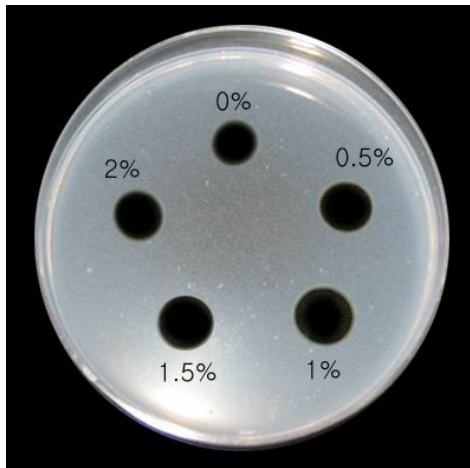
에 비해 높은 값을 나타내었다. 이는 목이버섯에 함유되어 있는 점질성 다당류 및 다양한 기능성 성분으로 인해 된장이 발효됨에 따라 더 많은 효소가 생성되고, 기능성 물질이 증가하는 것으로 사료된다.

반면, 목이버섯 분말을 2.0% 첨가하였을 때는 목이버섯 분말을 1.0% 첨가하였을 때보다, 타이로신 함량만 높았을 뿐, 다른 활성들은 목이버섯을 1.0% 첨가한 것보다 낮은 것으로 나타났다.

목이버섯 된장을 1.5% 이상 첨가하면 된장의 색이 아주 검게 변하여 기호도가 낮아질 우려가 있어, 목이버섯 된장 제조에 있어 목이버섯을 1.0% 수준으로 첨가하는 것이 경제적, 영양학적 측면 및 기호도면에서 가장 좋은 것으로 판단하였다. 타이로신 함량에서 1.0% 수준에서 115.47%와 1.5% 수준에서 89.27%는 시험 측정치에서 편차가 심하여 유의성이 없게 나왔다. 1차년도에서는 제조 중심의 상품화에 초점을 두어 연구가 진행이 되었으나, 2차년도에서는 분석 중심과 버섯 사용의 증가에 초점을 맞추어 연구를 진행하고자 한다. 타이로신 함량에 대한 편차 및 발효에 대한 일반식품 성분 분석을 2차년도에 집중 연구하고자 함.

【표 1】 목이버섯 분말 함량에 따른 된장의 분석 결과

목이버섯 분말 함량 (%)	점조도 (Pa·s ⁿ)	혈전용해효소 (%)	타이로신 함량 (mg%)	프로테아제 활성 (unit/g)
대조군	0.56	26.99	78.67	13.05
0.5	0.32	29.82	73.93	8.11
1.0	0.57	33.54	115.47	185.31
1.5	0.27	31.09	89.27	15.96
2.0	0.35	27.27	185.13	22.29



【그림 1】 목이버섯 첨가량에 따른 혈전용해능 변화

2. 관능평가



상표등록출원

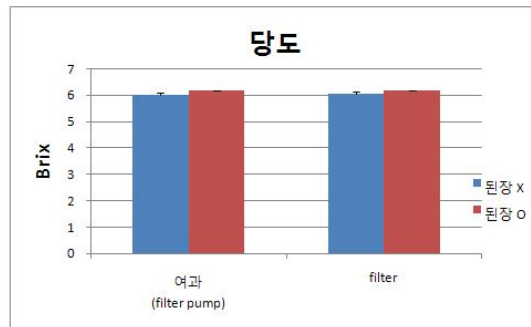
목이버섯 분말의 함량에 따른 된장의 관능특성을 평가한 결과는 【표 2】와 같다. 목이버섯 분말의 첨가량이 증가함에 따라 목이버섯의 고유한 검은 빛깔로 인해 된장의 색이 점점 진하게(검게) 보이는 것으로 나타났다. 단 맛, 짠 맛, 쓴 맛의 경우, 패넬들은 목이버섯 분말을 첨가한 된장이 단 맛, 짠 맛, 쓴 맛이 각각 덜한 것으로 평가하였다. 반면에, 구수한 맛은 목이버섯 분말의 첨가량이 증가할수록 강한 것으로 평가되었다. 전체적으로 목이버섯 분말 첨가에 따른 된장의 맛의 변화는 크지 않았으나, 1.0%의 목이버섯 분말을 첨가하였을 때 전반적인 기호도가 가장 높게 나타났다. 이에 최종 상품화 한 목이버섯 된장의 목이버섯 분말 함량은 1.0%로 하였다.

【표 2】 목이버섯 분말 함량에 따른 된장의 관능평가

항목 함량(%)	대조군	0.5	1.0	1.5	2.0
색	5.23	5.54	5.72	5.93	6.22
단 맛	4.57	3.32	3.46	3.28	3.37
짠 맛	6.52	6.33	6.30	6.25	6.18
쓴 맛	3.28	2.79	2.64	2.82	2.58
구수한 맛	5.22	5.58	5.73	5.68	5.14
전반적인 기호도	6.38	6.59	6.79	6.43	6.02

3-1. 당도

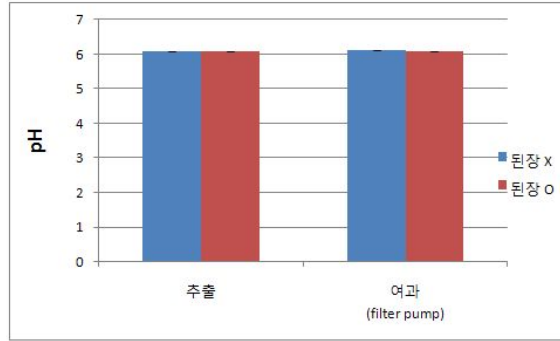
목이버섯이 첨가되지 않은 된장에서 여과전 당도는 6.03, 여과 후 당도는 6.07이고 목이첨가 된장의 여과액의 당도는 6.20보다는 값이 낮지만 값의 차이는 크지 않게 나타났다.



	된장 X (목이버섯 무첨가 된장)		된장 O (목이버섯 첨가된장)	
	여과 (filter pump)	filter	여과 (filter pump)	filter
당도(Brix)	6.03±0.06	6.07±0.06	6.20±0.00	6.20±0.00

3-2. pH

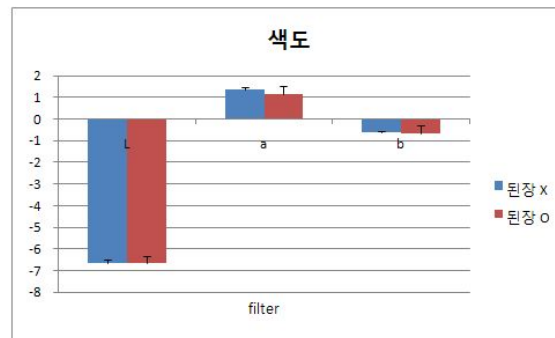
그림에서 보는 바와 같이 추출한 값이 목이버섯 무침가 된장(된장 X) 는 6.07, 목이버섯 침가 된장(된장 O)는 6.06이고, 목이버섯 무침가 된장의 여과액 값은 6.10, 목이버섯 침가 된장은 6.08로 pH 값의 차이는 거의 없었지만 추출값이 여과값 보다는 낮게 나타났다.



	된장 X		된장 O	
	추출	여과 (filter pump)	추출	여과 (filter pump)
pH value	6.07±0.01	6.10±0.00	6.06±0.01	6.08±0.00

3-3. 색도

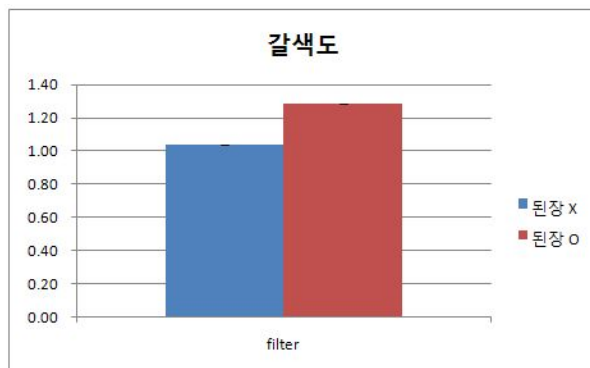
명도 L값은 된장 X는 -6.63, 된장 O는 -6.64로 조금 어둡게 나타났고, 적색도인 a값은 된장 X는 1.35, 된장O는 1.16, 황색도 b값은 된장 X는 -0.62, 된장 O는 -0.68로 된장 X와 O 사이의 값 차이는 서로 비슷한 값을 나타냈다.



Sample (filter)	color		
	L	a	b
된장 X	-6.63±0.11	1.35±0.13	-0.62±0.07
된장 O	-6.64±0.28	1.16±0.34	-0.68±0.37

3-4. 갈색도

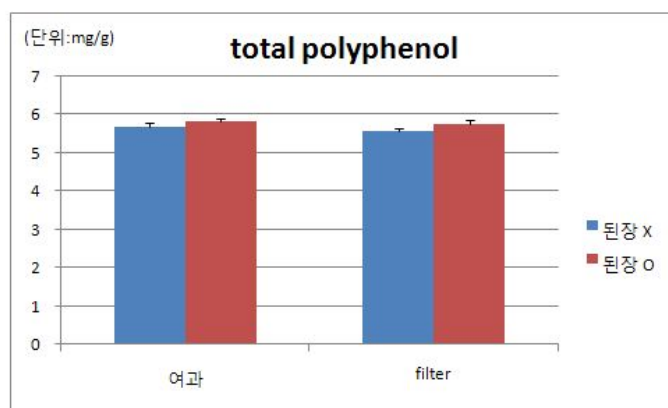
갈색도는 filter한 것만 사용하여 420 nm에서 측정하였다. 그 결과 된장 X는 1.04, 된장 O는 1.28로 목이버섯 첨가 된장 시료에서 갈색도가 더 높게 나타났다.



filter		
	된장 X	된장 O
갈색도	1.04±0.00	1.28±0.00

5. Total polyphenol contents

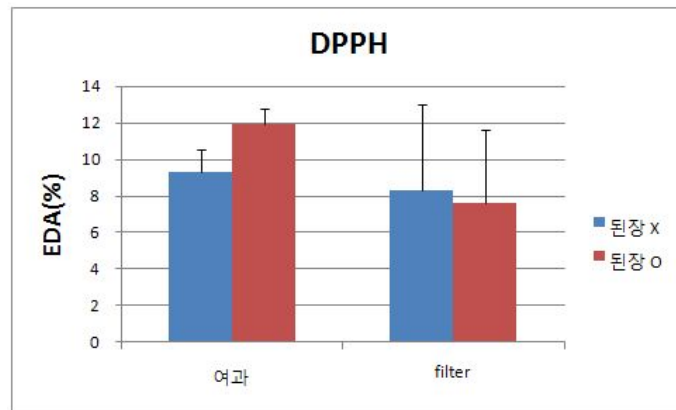
20 mg/ml의 된장시료를 사용하여 total polyphenol contents 를 측정하였다. 그 결과, 된장 X의 여과는 5.7mg/g, filter는 5.6mg/g였고, 된장 O의 경우 여과는 5.8mg/g, filter는 5.7mg/g로 나타났다. 된장 X가 된장 O에 비해 polyphenol값이 낮게 나타났지만 목이버섯 첨가 유무에 따른 total polyphenol contents 의 유의적 차이는 나타나지 않았다.



6. DPPH

20 mg/ml의 된장시료를 사용하여 DPPH법을 이용한 항산화능을 측정한 결과, EDA 값은 된장 X 여과는 9.28%, filter는 8.34%였고, 된장 O의 경우 여과는

11.95%, filter는 7.61%로 나타났다. 하지만 목이버섯 첨가 유무에 따른 항산화능은 유의적 차이를 나타내지 못하였다.



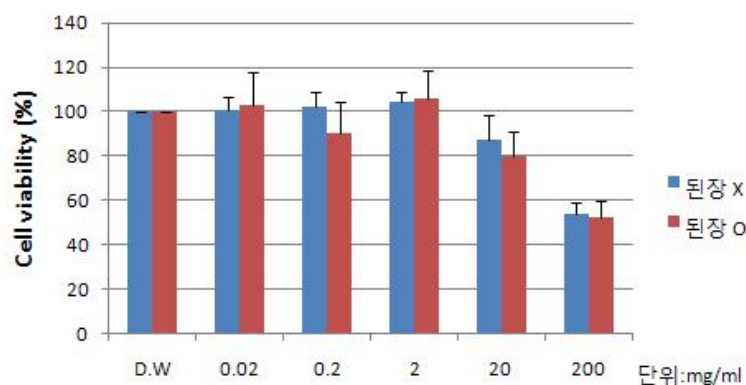
7. 항암활성시험

목이버섯 첨가 후 된장에서 항암활성의 변화를 4가지 암세포주에서 항암활성을 비교하였다.

7-1) MTT test

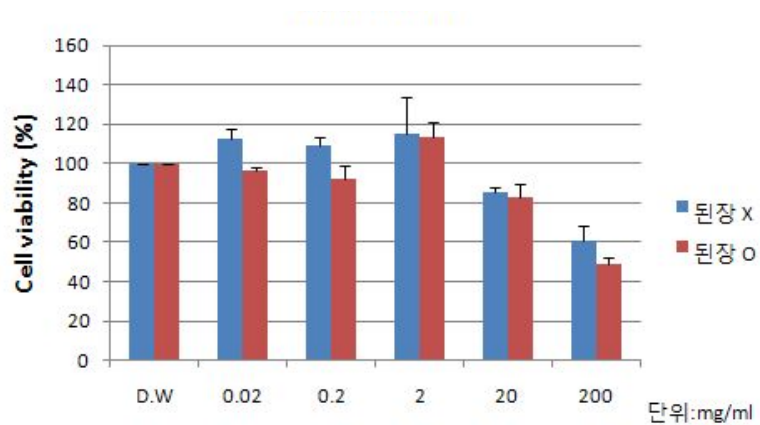
① 신장암

신장암 세포(A-498 cell)에서 세포증식 변화율은 된장 X는 2 mg/ml까지 증가하다가 점차 감소하였고, 된장 O의 경우는 0.2 mg/ml에서 감소하다가 2 mg/ml에서 다시 증가, 그리고 20mg/ml부터 다시 감소하기 시작하였다.



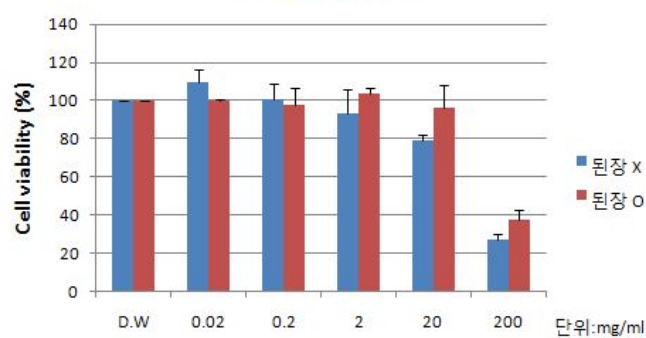
② 자궁암

자궁암 세포주(Hela cell)의 경우, 된장 O는 감소하다가 2 mg/ml에서 세포증식율이 증가, 다시 점차 감소하였고, 된장 X는 저농도에서 고농도로 갈수록 감소하는 것을 알 수 있다.



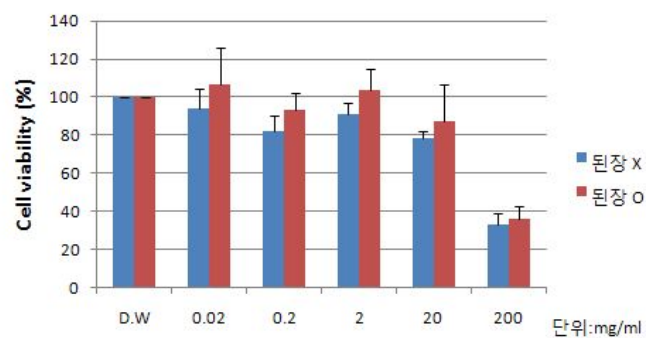
③ 위암

위암 세포주(SNU 719 cell)은 된장 X는 20mg/ml까지 점점 감소하다가 200mg/ml에서 급격히 세포증식율이 떨어졌고, 된장 O는 20 mg/ml까지는 증식률에 변화가 거의 없었다가 200mg/ml에서 된장 X와 마찬가지로 증식률이 급격히 감소하였다.



④ 대장암

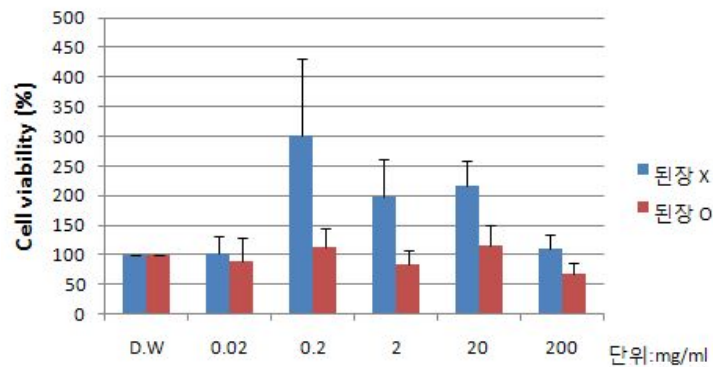
대장암 세포 (SW480 cell)의 경우, 된장 X, O 둘 모두 저농도에서부터 감소하다가 2mg/ml에서 잠시 증가하다 다시 증식률이 감소하였고, 200 mg/ml에서는 급격히 감소하였다.



7-2) SRB test

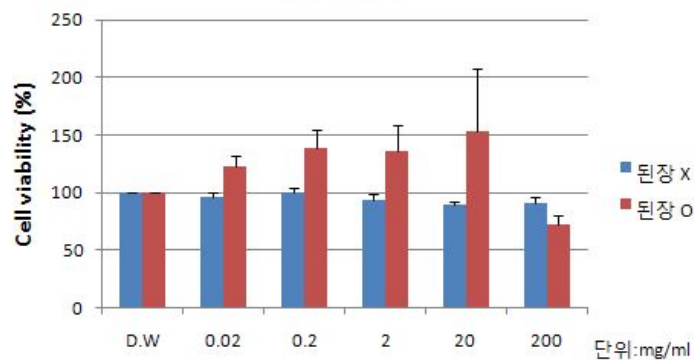
① 신장암

SRB 측정 결과 신장암에서는 된장 X, O 둘 모두 0.2mg/ml까지 증가하다가 2mg/ml에서 감소, 20mg/ml에서 다시 증가하다가 200mg/ml에서 다시 감소하는 경향을 보였으나, 된장 X가 O보다 세포증식변화율이 높았다.



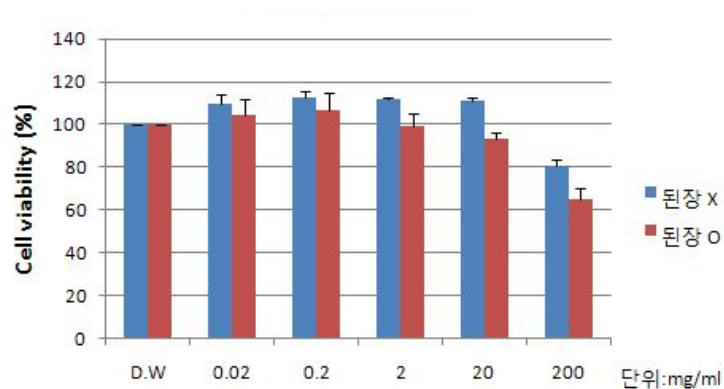
② 자궁암

자궁암의 경우에는 된장 X는 20 mg/ml까지는 세포증식율이 증가하다가 200 mg/ml에서 감소하였고, 된장 O는 저농도에서 고농도로 갈수록 증식률이 감소하였지만 값이 차이는 크지 않았다.



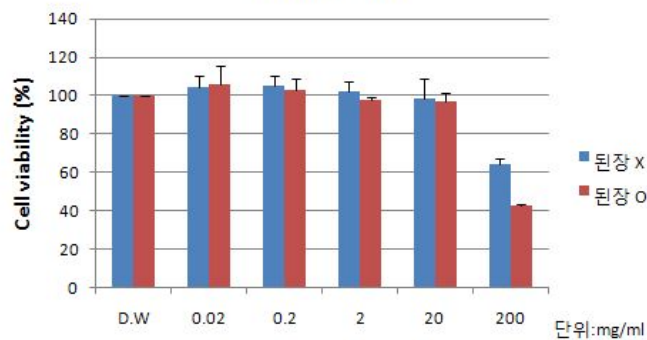
③ 위암

위암에서는 된장 X, O 둘 모두 0.2mg/ml까지 세포증식률이 증가하다가 점차 감소하는 경향을 보였다.



④ 대장암

대장암은 된장 X, O 모두 저농도에서 고농도로 갈수록 증식률이 감소하였다.



최종적으로 신장암 세포에 대한 항암효능 결과, MTT test에서 200 mg/ml의 두 된장시료를 첨가한 결과 세포독성을 나타냈으며, 두 시료 간에 유의적 차이는 보이지 않았다. SRB test에서의 세포 증식 억제능은 확인되지 않았다. 자궁암 세포에 대한 항암효능 결과 MTT test에서 20 mg/ml의 두 된장시료를 첨가한 결과 세포독성을 나타냈으며, 200 mg/ml 농도 시료 처리시 목이버섯이 첨가되어진 된장시료가 더 높은 세포독성을 나타내었다. SRB test에서도 200 mg/ml 시료 처리 목이버섯 첨가되어진 된장시료에서 세포증식 억제능을 나타냈다. 위암 세포에 대한 항암효능 결과 MTT test에서 20 mg/ml 농도에서 목이버섯을 첨가하지 않은 된장에서 세포독성을 나타냈으며 200 mg/ml 농도에서는 두 된장 시료 모두 세포독성을 나타내었으며 목이버섯을 첨가 하지 않은 된장에서 좀 더 높은 세포독성을 나타냈다. SRB test에서는 200 mg/ml 농도에서 두 된장 시료 모두 세포증식억제능이 확인되었으며 목이버섯 첨가 된장에서 좀 더 높은 증식억제능을 보였다. 대장암 세포에 대한 항암효능 결과 MTT test에서 20 mg/ml 농도에서 목이버섯을 첨가하지 않은 된장에서 세포독성을 나타냈으며, 200 mg/ml 농도에서는 두 된장 시료 모두 세포독성을 나타내었으나 유의적 차이는 나타나지 않았다. SRB test에서는 두 시료 모두 200 mg/ml 농도에서 세포증식 억제능을 나타냈으며 목이버섯 첨가 된장에서 좀 더 높은 증식 억제능을 보였다.

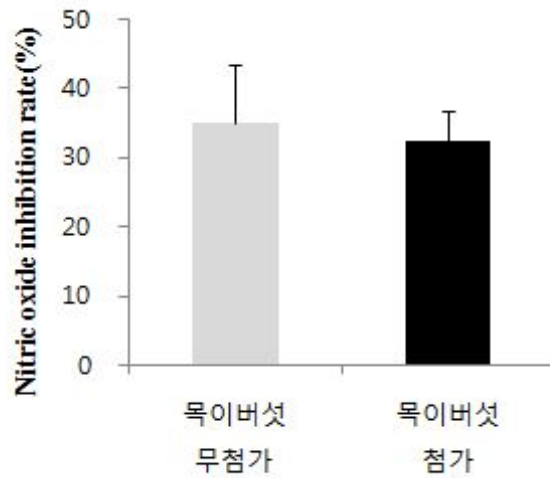
결론적으로 이번 시험의 결과 발효된장 자체가 항암활성이 있음이 확인되었으

며, 특히 중요한 관찰로 목이버섯 첨가는 항암활성에 변화를 줄 수 있는데 이러한 효과를 갖기 위해서는 3%의 목이버섯 첨가 수준에서 10%까지의 수준으로 높이고, 한편 목이버섯 추출액에 대한 소재의 첨가 또한 고려를 하여야 한다.

cancer cell	농도		0.02 mg/ml	0.2 mg/ml	2 mg/ml	20 mg/ml	200 mg/ml
A-498 (신장암)	된장 X	MTT	100.74 ±6.10	102.43 ±6.57	104.35 ±4.58	87.08 ±11.68	53.79 ±5.02
		SRB	101.49 ±30.32	301.74 ±129.03	199.33 ±63.47	216.96 ±41.68	109.71 ±23.88
	된장 O	MTT	102.81 ±15.36	90.61 ±13.50	106.29 ±12.27	80.17 ±11.26	52.22 ±7.40
		SRB	88.60 ±41.04	113.73 ±32.02	85.29 ±23.74	114.68 ±34.86	69.25 ±17.03
Hela (자궁암)	된장 X	MTT	112.49 ±5.28	108.90 ±4.87	115.05 ±18.75	85.57 ±2.50	60.53 ±7.55
		SRB	96.69 ±4.01	100.19 ±4.75	136.74 ±21.35	89.19 ±3.03	91.58 ±4.23
	된장 O	MTT	96.04 ±2.03	92.58 ±6.76	113.36 ±8.08	82.71 ±6.60	48.64 ±3.57
		SRB	122.39 ±9.20	138.34 ±16.67	136.74 ±21.35	153.83 ±53.27	72.13 ±8.23
SNU 719 (위암)	된장 X	MTT	109.31 ±7.27	100.91 ±7.83	93.45 ±12.27	79.05 ±3.39	27.45 ±2.53
		SRB	109.43 ±4.42	112.40 ±2.87	111.92 ±0.52	111.36 ±1.43	80.58 ±3.15
	된장 O	MTT	99.70 ±0.78	97.95 ±8.96	103.72 ±3.22	95.95 ±12.38	37.75 ±5.27
		SRB	104.55 ±7.69	107.00 ±7.58	99.00 ±6.56	93.37 ±2.75	65.05 ±5.41
SW480(대장암)	된장 X	MTT	93.77 ±10.60	82.05 ±8.11	91.28 ±6.11	78.19 ±4.02	33.45 ±6.00
		SRB	104.21 ±6.11	105.08 ±5.00	102.42 ±4.98	98.46 ±10.15	64.48 ±2.53
	된장 O	MTT	106.89 ±19.32	93.51 ±8.51	103.54 ±11.04	87.08 ±19.22	35.84 ±6.91
		SRB	105.81 ±10.09	102.88 ±6.08	97.61 ±1.27	97.11 ±4.66	43.00 ±0.91

8. 항염증 시험

목이버섯 첨가 유무에 따른 시제품의 된장에서 항염증 효능 차이는 유의적 결과를 나타내지 못하였다.



2 mg/ml	된장 X	된장 O
NO 저해능	34.80 ± 8.5	32.28 ± 4.3

9. 저장성 시험

보존성 실험을 통해 본연의 맛과 상품적 가치가 유지되는 유통기한을 설정하기 위한 가속성 시험

1) 실험방법

- a. 시 료: 표준제품으로 시험 생산된 제품
- b. 실험기간: 2010년 04월 02일 ~ 2011년 02월 01일 (10개월)
- c. 장 소: 전진바이오팜(주) 부설연구소 실험실
- d. 검사방법

시료를 실험실 진열대의 실온(25~26℃)과 항온기(35, 40℃)에 각각 보관 후 30일 경과 시 아래의 관능검사와 미생물 항목을 점검하였다.

(항온기실험은 미생물의 최적 생육조건을 맞추어 미생물 발생 최소기간을 알기 위함)

e. 평가항목

- 관능적 항목(성상, 이미, 이취, 이물)
- 미생물학적 항목(바실러스 균, 세균수) 이화학적 항목 (수분)

2) 실험결과


실험결과 10개월 이상 경과하여도 관능적인 부분이나 이화학적, 미생물학적 항

목에서 제품 본연의 맛과 상품적 가치가 변화가 없으므로 유통기한을 16개월로 설정하였다.

항목 경과일	관능적 항목				미생물학적 항목		이화학적 항목
	성상	이미	이취	이물	바실러스균	세균수	수분
한도규격	10.0	10.0	10.0	불검출	불검출	100이하/m l	10.0 % 이하
1개월	10.0	10.0	10.0	불검출	불검출	0	적합
2개월	10.0	10.0	10.0	불검출	불검출	0	적합
3개월	10.0	10.0	10.0	불검출	불검출	0	적합
4개월	10.0	10.0	10.0	불검출	불검출	0	적합
5개월	10.0	10.0	10.0	불검출	불검출	0	적합
6개월	10.0	10.0	10.0	불검출	불검출	0	적합
7개월	10.0	10.0	10.0	불검출	불검출	0	적합
8개월	10.0	10.0	10.0	불검출	불검출	0	적합
9개월	10.0	10.0	10.0	불검출	불검출	0	적합
10개월	10.0	10.0	10.0	불검출	불검출	0	적합

10. 제품에 대한 일반 성분검사, 대장균, 바실러스 세레우스균 검사

제품을 공인성적 검사 기관인 계명대학교 전통미생물 자원연구소에 의뢰한 결과는 다음과 같이 대장균류(g당 20,000이하 기준/ 장류 기준)에 대한 판정은 음성으로 적합하며 일반 성분검사에 대한 결과는 다음과 같다


계명대학교 전통미생물자원연구소
TRADITIONAL MICROORGANISM RESOURCE CENTER
http://www.tmr.or.kr

제 11-2-00040 호 발급번호 : 제 01-19-022 호

시험 성적서

검 체 명	목이원장	제조일자	
재 품 유 형	일반생검시	검 시 원 일	2011년 01월 14일
의뢰인 주소 및 성명	전진바이오파마주식회사	대 표 자	이태훈
	대구 달서구 효산동 711 대구테크노파크벤처공장 302		
시 험 의 회 의 적	참고용	접 수 년 월 일	2011년 01월 03일

귀하가 시험 의뢰한 결과 및 판정은 의뢰한 시험항목에 한하여 다음과 같습니다.
 결과 :

시 험 항 목	규 격 기 준	결 과
열량	-	145Kcal/100g
탄수화물	-	28g/100g (9%, %영양소 기준치)
단백질	-	1g/100g (2%, %영양소 기준치)
지방	-	3.2g/100g (6%, %영양소 기준치)
포화지방	-	1.0g/100g (7%, %영양소 기준치)
트랜스지방	-	0g/100g
콜레스테롤	-	0mg/100g (0%, %영양소 기준치)
나트륨	-	1130 mg/100g (57%, %영양소 기준치)

식품위생검시기관지정기준 제4호의 2 규정에 의하여 위와같이 검사성적서를 발급합니다.
 2011년 01월 14일

계명대학교 전통미생물자원연구소


식품의약품안전청 식품위생검시기관 제32호
 국립수의과학검역원 축산물위생검시기관 제 16호

이 검사결과는 제품인 관계에 한하여 의뢰목적 이외의 상업적인 광고 및
 법적인 해결수단으로 사용될 수 없습니다.

(전화: 053-650) 대구광역시 달서구 신일동 1000번지 | TEL: 0533590-6460-1 | FAX: 0533590-6465 | 소장: 이삼진 | 담당자: 남미영


계명대학교 전통미생물자원연구소
TRADITIONAL MICROORGANISM RESOURCE CENTER
http://www.tmr.or.kr

제 11-2-00041 호 발급번호 : 제 01-19-023 호

시험 성적서

검 체 명	목이원장	제조일자	
재 품 유 형	기준규격외	검 사 원 일	2011년 01월 12일
의뢰인 주소 및 성명	전진바이오파마주식회사	대 표 자	이태훈
	대구 달서구 효산동 711 대구테크노파크벤처공장 302		
시 험 의 회 의 적	참고용	접 수 년 월 일	2011년 01월 03일

귀하가 시험 의뢰한 결과 및 판정은 의뢰한 시험항목에 한하여 다음과 같습니다.
 결과 :

시 험 항 목	규 격 기 준	결 과	항 목 판 정
비실리세제리우스	-	4100/g	-
대장균 O157:H7	-	음성	-

식품위생검시기관지정기준 제4호의 2 규정에 의하여 위와같이 검사성적서를 발급합니다.
 2011년 01월 12일

계명대학교 전통미생물자원연구소


식품의약품안전청 식품위생검시기관 제32호
 국립수의과학검역원 축산물위생검시기관 제 16호

이 검사결과는 제품인 관계에 한하여 의뢰목적 이외의 상업적인 광고 및
 법적인 해결수단으로 사용될 수 없습니다.

(전화: 053-650) 대구광역시 달서구 신일동 1000번지 | TEL: 0533590-6460-1 | FAX: 0533590-6465 | 소장: 이삼진 | 담당자: 남미영

11. 관능검사

패널요원은 20명 이상으로 하여 가장 좋거나 강한 것은 5점, 약하거나 싫은 것은 1점으로 하여 5점 척도법으로 설문지를 작성하여 결과를 평가 분석한 결과는 다음과 같다.

평가인	색상 (목이버섯 분포도)	단맛	짠맛 (염도조정)	풍미	기호도 (재구매 의사)
A	4.3	4.9	4.7	5.0	4.5
B	3.8	5.0	5.0	5.0	4.5
C	4.8	5.0	5.0	4.9	4.3
D	5.0	5.0	5.0	4.5	4.8
E	4.5	4.9	5.0	4.8	5.0
F	4.9	5.0	4.2	4.2	4.2
G	5.0	4.5	4.7	4.5	4.1
H	5.0	4.7	4.0	5.0	4.5
I	4.7	5.0	4.8	5.0	4.0
J	3.9	5.0	4.2	5.0	4.8
K	5.0	5.0	5.0	5.0	4.2
L	5.0	5.0	5.0	4.6	4.6
M	4.8	5.0	5.0	4.6	4.1
N	5.0	4.2	4.8	4.7	4.1
O	5.0	4.8	4.2	4.9	4.8
P	4.9	3.4	5.0	5.0	4.7
Q	3.5	5.0	4.3	4.6	4.5
R	5.0	5.0	4.2	4.2	4.1
S	4.9	5.0	4.8	5.0	4.3
T	5.0	5.0	4.9	4.8	4.8
평균	4.70	4.82	4.69	4.76	4.45

2. 목이버섯 된장의 제품 제작 (900g)

	<p>완제품 된장 사진</p> <p>< 국내산 목이 된장의 디자인 패키지 작업 ></p> <ul style="list-style-type: none"> · 라벨 · 포장박스

1. 물성 및 이화학적 특성분석

가. 물성 분석

1) 수분, 입도, 색도


시제품의 수분을 측정한 결과 5.38%였고, 입도는 137.5um로써 결과 되어졌다. 수분함량 5-3% 범위의 식품은 미생물 생육이 저해될 수 있으며 건조분말형 식품규격은 수분 함량이 5% 이하로 결과되어진 시제품의 수분함량은 이를 만족시킬수 있는 결과다. 또한 137 um의 입도는 개발되어진 본 시제품의 높은 용해성을 수치적으로 나타냈다. 또한 색도를 측정한 결과, 청국장분말 시제품의 명도 L 값은 63.19였으며, 적색도인 a값은 4.83, 황색도 b값은 28.73으로 제품의 가시적 특성을 측정되어졌다.(Table 2.)

Table 2. 분말청국장의 수분, 입도, 색도

	수분(%)	입도(um)	색도		
			L	a	b
1	5.92	146.2	63.09	4.85	28.78
2	5.13	136.7	63.26	4.79	28.39
3	5.10	129.6	63.23	4.85	29.02
Average	5.38	137.5	63.19	4.83	28.73
STD	0.47	8.33	0.10	0.04	0.32

2) 봉해도

국가공인 식품 시험분석 전문기관인 계명대학교 전통미생물자원개발 및 산업화연구센터에 봉해도를 의뢰한 결과, 식품으로 이용하기에 적합하다고 확인되었다.



계명대학교 전통미생물자원연구센터
TRADITIONAL MICROORGANISM RESOURCES CENTER
http://www.tmr.or.kr

제 11-2-04662 호		발급번호 : 제 09-19-018 호	
시험 성적서			
검 체 명	분말된장	제조일자	
제 품 유 형	기준규격외		
의뢰인 주소 및 성명	전진바이오팜주식회사	대 표 자	이태훈
	대구 달서구 호산동 711 대구테크노파크벤처공장 302		
시 험 의 의 목 적	참고용	접 수 년 월 일	2011년 09월 01일
귀하가 시험 의뢰한 결과 및 판정은 의뢰된 시험항목에 한하여 다음과 같습니다.			
결과 :			
시 험 항 목	규 격 기 준	결 과	항 목 판 정
총질소	-	6.7%	-
아미노산질소	-	426mg%	-
타르색소	-	불검출	-
총 아플라톡신(B1, B2, G1 및 G2의 합)	-	불검출	-
대장균군	-	음성	-
보존료	-	불검출	-
봉해시험	-	적합	-

식품위생검사기관지정기준 제4호의 2 규정에 의하여 위와같이 검사성적서를 발급합니다.
 2011년 09월 14일

계명대학교 전통미생물자원연구센터 소장

식품의약품안전청 식품위생검사기관 제32호
 국립수의과학검역원 축산물위생검사기관 제 16호



이 검사결과는 제출된 검체에 한하며 의뢰목적 이외의 상업적인 광고 및
 법적인 해결수단으로 사용할 수 없습니다.

[71014]-[71011] 대구광역시 달서구 신당동 1000번지 | TEL : (053)580-6460~1 | FAX : (053)580-6465 | 소장 : 이삼민 | 담당자 : 남미영

Fig. 4. 분말청국장 시제품의 봉해도

나. 이화학적 효능평가법에 따른 생리활성물질 함량 분석

1) Total polyphenol과 Total flavonoid 함량 분석

식품 내 존재하며 항산화, 항염증, 항암 등의 유익성을 나타내며 인체 유용한 기능성 지표성분으로서 총칭되는 total polyphenol 및 total flavonoid 함량을 이화학적 평가방법으로 정량하였다. Tannic acid를 지표물질로 사용하여 준비되어진 시료의 Total polyphenol 함량 측정 결과, 15.68mg/g로써 정량되었다. 또한 Catechin을 지표물질로 사용하여 준비되어진 시료의 Total flavonoid 함량 측정 결과, 0.22mg/g 로써 정량되었다. Total polyphenol 함량 중 Total flavonoid가 차지하는 함량은 약 1.4%로 확인되어졌다.

Table 3. 분말청국장 total polyphenol와 total flavonoid contents

	Total polyphenol contents	Total flavonoid contents
기능성성분함량 (mg/g)	15.68±0.04	0.22±0.15

2) 전자공여능, 아질산염소거기능, Superoxide anion radical 소거능

시제품의 식품으로써 유익한 항산화활성을 측정하고자 DPPH법에 의하여 전자공여능(EDA,%)을 50mg/ml 농도의 시료를 사용하여 확인하였다. 그 결과 50mg/ml에서 대조군에 대비하여 확인된 항산화능은 61.96%로써 이는 지표물질로써 사용되어진 L-ascorbic acid의 322.45uM 농도의 효능에 해당되는 것을 확인하였다.

Superoxide anion radical 소거능을 통해 세포에 유해한 활성산소로부터 생체를 보호하는 항산화능을 나타내는지 알아보하고자 Nitroblue tetrazolium(NBT) 환원 방법을 이용하여 조사하였다. 50mg/ml 농도의 시료를 사용하여 대조군과 대비 확인 한 결과, 33.92% 활성을 나타내는 것을 확인하였다.

식품의 가공 및 저장 등에 첨가제로 사용되어 독소생성 억제와 산패방지제등으로

이용되거나 식품내의 상재 성분으로 인체에 유해적인 아질산염에 대한 시제품의 아질산염 소거능을 50mg/ml 농도의 시료를 사용하여 확인하였다. 대조군과 대비하여 pH 1.2, 3.0, 4.2 및 6.0에서 반응시켜 확인한 결과, pH 1.2에서 72.73%, pH 3.0에서 57.91%, pH 4.2에서 24.93%, pH 6.0에서 2.09%로 나타났다. 시험되어진 4개의 pH 구간에서의 시제품의 아질산염소거능은 반응 pH 조건에 따라서 차이가 나타났으며 낮은 pH 일수록 아질산염소거활성이 높은 것을 확인하였고 pH 6.0에서는 활성이 거의 없는 것을 알 수 있다. 인체의 위액과 조건이 비슷한 pH 1.2-3.0에서 상대적으로 활성이 높은 것으로 보아 시제품의 유익한 아질산염 소거능을 확인 할 수 있었다.

Table 4. 분말청국장의 전자공여능, Superoxide anion radical 소거능, 아질산염소거능

Tested function		Value(% in 50mg/ml)
전자공여능(EDA)		61.96±0.51 [†]
Superoxide anion radical 소거능		33.92±1.15
아질산염소거능	pH 1.2	72.73±2.31
	pH 3.0	57.91±3.54
	pH 4.2	24.93±2.23
	pH 6.0	2.09±2.45

† : L-ascorbic acid 322.45 uM농도에 상응된 효능

2. 시제품의 항암 *in vitro* 효능 평가

가. MTT assay에 의한 항암 *in vitro* 효능평가

시제품의 항암효능평가를 위하여 사용되어진 세포주는 신장암, 자궁암, 위암, 대장암, 간암 총 5종류의 암세포주를 사용하였다. 먼저 MTT assay를 통해 생존이 유지되어진 세포의 미토콘드리아를 염색함으로써 각 암세포주에 대한 시제품의 세포독성 및 생존 저해능을 평가하여 시제품의 함암능을 확인하고자 하였으며 Table 5. 와 같은 시료 농도 조건에서 그 결과를 확인하였다.

신장암(A-498), 자궁암(Hela), 대장암(SW 480) 세포주를 대상으로 실험한 결과, 처리되어진 시료에 농도 의존적인 세포독성을 나타내어 cell viability가 감소하는 것을 볼 수 있었으며 위암 세포주(SNU 719)는 시험되어진 농도 처리조건에 의존적인 세포독성을 나타내진 않았다. 시료 10mg/ml 농도 처리조건을 기준으로 각 세포주의 세포독성을 비교해 보았을때 대장암>위암>자궁암>신장암 순으로의 높은 세포독성을 결과하였다. 신장암, 자궁암, 위암 세포주를 대상으로 시험시 2-10mg/ml 농도에서 IC₅₀에 해당되는 결과가 예상되어졌으며 특히 대장암 세포주는 약 2mg/ml 시료농도로 IC₅₀을 나타낼 수 있었다. 간암 세포주(Hep3B)에서는 시제품의 세포생존 저해능이 확인 되지 않았다.(Table 4, Fig. 5)

Table 5. MTT assay에 의한 시제품의 5종 암세포주에 대한 함암효능평가

MTT assay	Tested cell (target cancer)	Final concentration of treated samples (mg/ml)				
		0.002	0.02	0.2	2	10
cell viability (%)	A-498 (신장암)	84.49 ±6.86	81.46 ±3.18	71.43 ±10.81	67.04 ±6.29	34.71 ±1.36
	Hela (자궁암)	84.61 ±18.51	94.72 ±6.91	66.57 ±3.94	60.99 ±8.74	19.48 ±0.34
	SNU 719 (위암)	93.44 ±3.21	99.87 ±1.85	86.61 ±6.52	87.10 ±7.94	17.39 ±1.91
	SW 480 (대장암)	77.42 ±0.56	74.39 ±5.37	65.81 ±3.32	55.44 ±2.69	13.59 ±0.38
	Hep3B (간암)	126.69 ±2.66	113.65 ±3.40	109.04 ±0.35	116.85 ±1.33	102.53 ±1.43

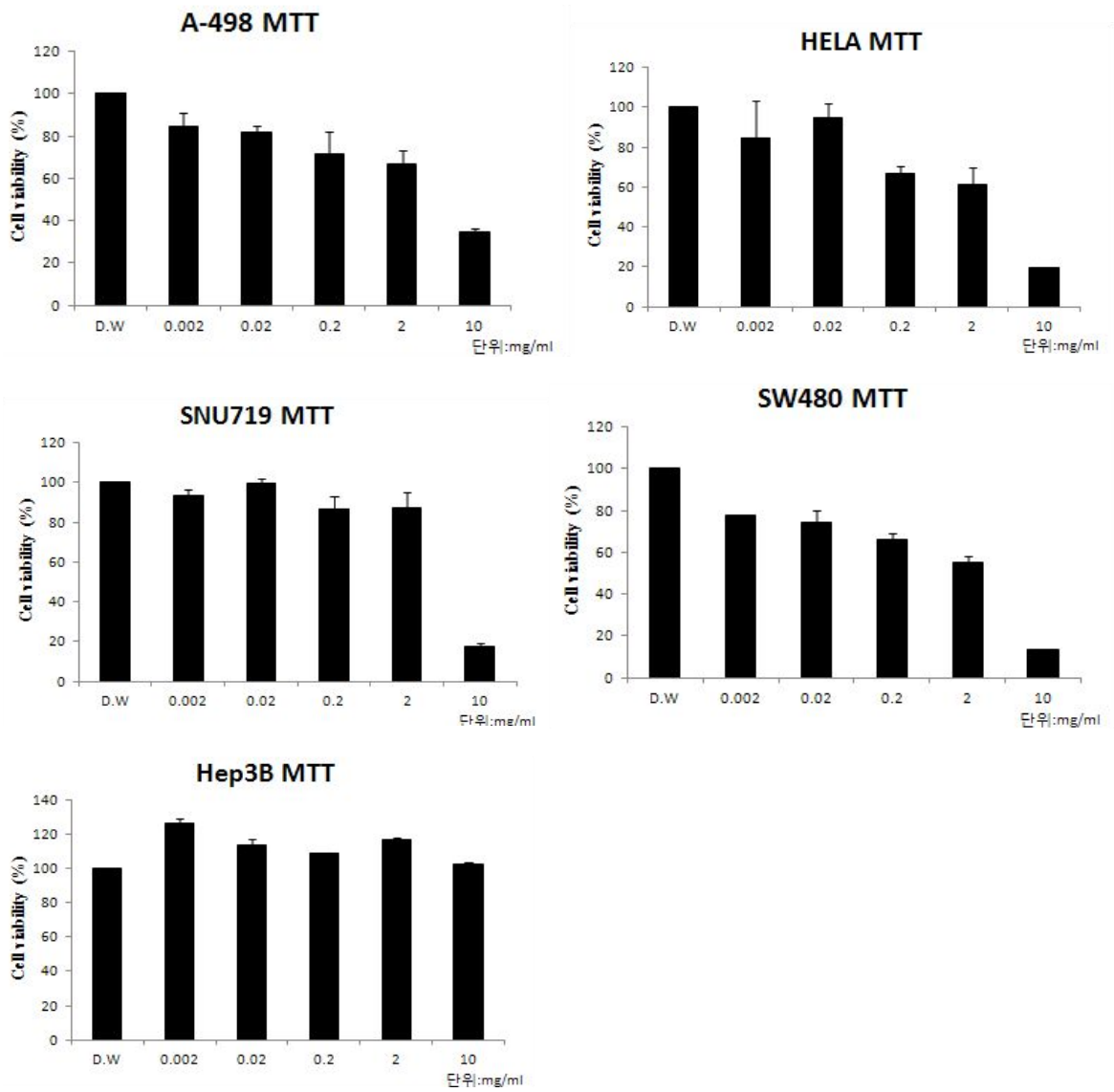


Fig. 5. MTT assay에 의한 시제품의 5종 암세포주에 대한 함암효능평가

나. SRB assay에 의한 항암 *in vitro* 효능평가

세포 단백질을 염색함으로써 세포증식도를 측정하는 SRB assay를 통해 각 암세포주에 대한 시제품의 세포독성 및 증식저해능을 평가하여 시제품의 함암능을 확인하고자 하였으며 Table 6. 와 같은 시료 농도 조건에서 그 결과를 확인하였다. 신장암(A-498), 대장암(SW 480) 세포주를 대상으로 실험한 결과, 처리되어진 시료에 농도 의존적인 세포독성을 나타내어 cell viability가 감소하는 것을 볼 수 있었으며 자궁암(Hela), 위암(SNU 719), 간암(Hep3B) 세포주들에서는 시험되어진 농도 처리조건에 의존적인 세포독성을 나타내진 않았으며 특히 간암 세포주에서의 세포 증식저해능이 가장 미약하였다. 시료 10mg/ml 농도 처리조건을 기준으로 각 세포주의 세포생육 저해능을 비교 해 보았을때 대장암>신장암>위암, 자궁암>간암 순으로의 높은 세포독성을 결과하였다. 신장암, 자궁암, 위암, 대장암 세포주를 대상으로 시험시 2-10mg/ml 농도 처리로 IC50에 해당되는 증식저해능 결과가 예상되어졌다.(Table 5, Fig. 6)

Table 6. SRB assay에 의한 시제품의 5종 암세포주에 대한 함암효능평가

MTT assay	Tested cell (target cancer)	Final concentration of treated samples (mg/ml)				
		0.002	0.02	0.2	2	10
cell viability (%)	A-498 (신장암)	96.05 ±14.73	99.77 ±2.91	92.62 ±9.92	74.21 ±0.81	21.95 ±1.89
	Hela (자궁암)	97.56 ±3.76	98.70 ±3.19	98.76 ±3.49	97.45 ±3.39	32.14 ±1.72
	SNU 719 (위암)	110.47 ±29.07	112.88 ±24.88	116.38 ±23.17	117.17 ±21.33	31.89 ±6.84
	SW 480 (대장암)	93.35 ±3.29	94.21 ±2.82	95.55 ±1.55	85.54 ±2.29	18.56 ±0.75
	Hep3B (간암)	99.61 ±0.99	89.58 ±4.85	92.68 ±3.70	104.60 ±0.53	78.55 ±4.48

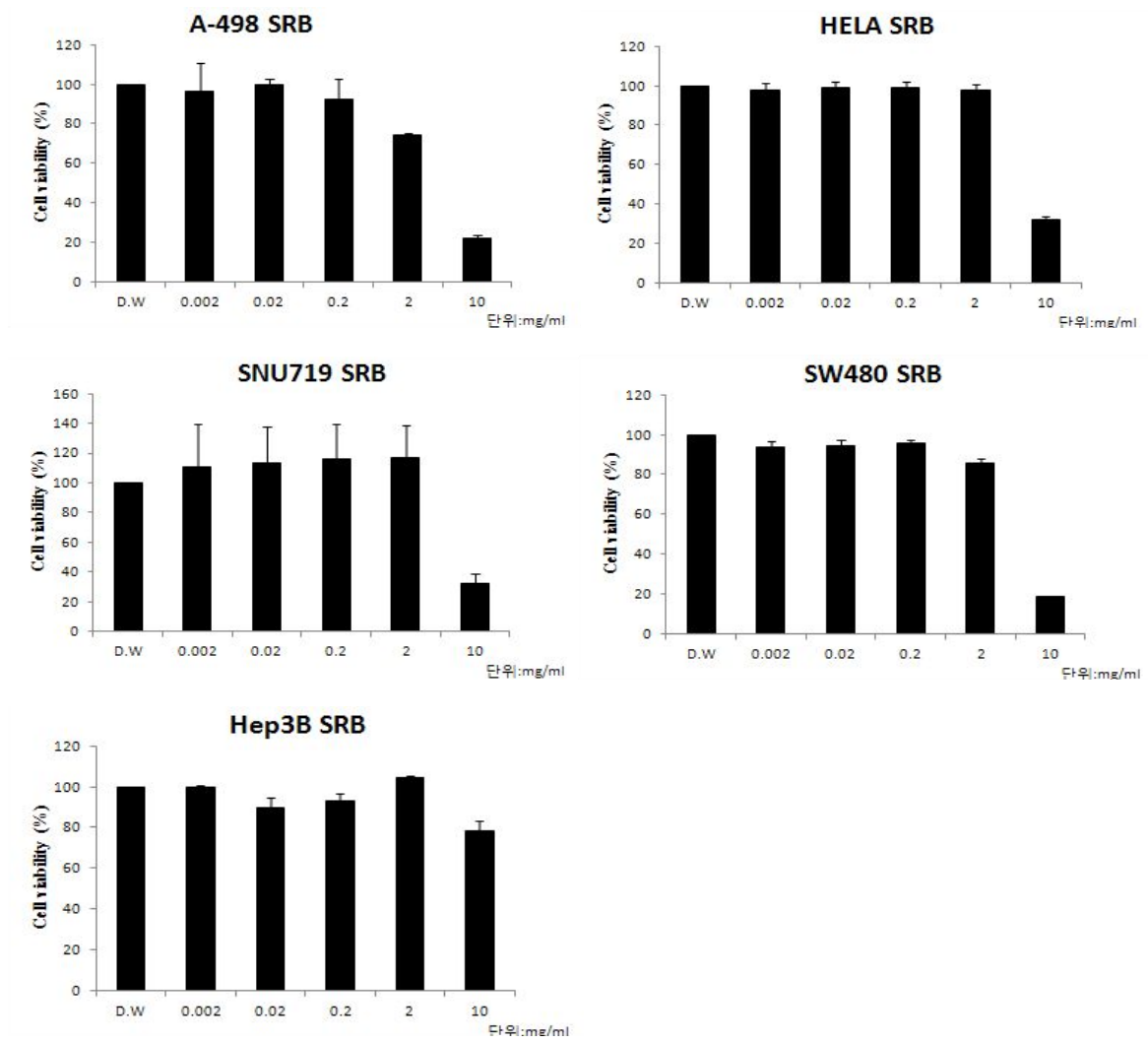


Fig. 6. SRB assay에 의한 시제품의 5종 암세포주에 대한 함암효능평가

다. *in vitro* assay에 의한 시제품의 항암효능

5종류의 암세포를 대상으로 MTT assay에 의해 확인되어진 시제품의 세포 생존 저해능과 SRB assay에 의해 확인되어진 시제품의 세포증식 저해능 결과를 최종적으로 살펴보면 두 종류 assay 모두에서 신장암 세포주와 대장암 세포주에 농도 의존적으로 세포독성이 결과 되어졌으며 이를 통해 시제품의 신장암과 대장암에 대한 항암효능을 확인하였다. 세포증식 저해보다 세포생존 저해에 대한 독성이 좀 더 우월하게 결과 되어졌으나 시제품이 신장암과 대장암 세포주의 생존과 증식 모두에 저해능을 나타내는 것으로 사료되며 이 두 저해능은 시제품 2-10mg/ml 농도 범위에서 IC₅₀을 나타내는 것을 확인 할 수 있었다.

자궁암 세포주와 위암 세포주에 대해서는 처리되어진 시제품의 농도 조건에 의존적인 세포독성은 MTT assay로 확인하였으나 SRB assay에서는 확인되지 않았으며 이는 시제품이 자궁암 세포주와 위암 세포주의 세포증식 저해 보다 세포생존 저해에 대한 독성이 더욱 우위적으로 나타나는 것으로 사료되었다. 하지만 시제품 2-10mg/ml 농도범위에서 자궁암과 위암 세포주의 생존 및 증식에 대한 저해능 IC₅₀이 나타남을 확인 하였다.

시험되어진 간암 세포주에 대한 시제품의 세포독성 시험 결과 MTT assay를 통한 세포생존 저해능은 확인되지 않았으며, SRB assay를 통한 세포 증식 저해능은 시험되어진 다른 4종의 암세포주에서 결과되어진 수치에 비해 긍정적 결과가 큰 차를 나타내는 낮은 세포증식 억제능을 보였다. 시험되어진 시제품 시료는 간암 세포주에 대해서는 항암효능을 나타낸다고 보기 어려운 것으로 사료된다.

두가지 방법에 의한 *in vitro* 항암효능 평가를 토대로 시험되어진 5종의 암세포주에 대한 시제품의 항암효능 우위성은 대장암>신장암>자궁암, 위암 순으로 나타낼 수 있다.

Table 7. MTT와 SRB assay에 의한 시제품의 항암효능평가 결과

Targeted cancer	Assay	Final concentration of treatd samples (mg/ml)					
		Control	0.002	0.02	0.2	2	10
신장암	MTT	100	84.49 ±6.86	81.46 ±3.18	71.43 ±10.81	67.04 ±6.29	34.71 ±1.36
	SRB	100	96.05 ±14.73	99.77 ±2.91	92.62 ±9.92	74.21 ±0.81	21.95 ±1.89
자궁암	MTT	100	84.61 ±18.51	94.72 ±6.91	66.57 ±3.94	60.99 ±8.74	19.48 ±0.34
	SRB	100	97.56 ±3.76	98.70 ±3.19	98.76 ±3.49	97.45 ±3.39	32.14 ±1.72
위암	MTT	100	93.44 ±3.21	99.87 ±1.85	86.61 ±6.52	87.10 ±7.94	17.39 ±1.91
	SRB	100	110.47 ±29.07	112.88 ±24.88	116.38 ±23.17	117.17 ±21.33	31.89 ±6.84
대장암	MTT	100	77.42 ±0.56	74.39 ±5.37	65.81 ±3.32	55.44 ±2.69	13.59 ±0.38
	SRB	100	93.35 ±3.29	94.21 ±2.82	95.55 ±1.55	85.54 ±2.29	18.56 ±0.75
간암	MTT	100	126.69 ±2.66	113.65 ±3.40	109.04 ±0.35	116.85 ±1.33	102.53 ±1.43
	SRB	100	99.61 ±0.99	89.58 ±4.85	92.68 ±3.70	104.60 ±0.53	78.55 ±4.48

* : 농도 의존적으로 결과 되어진 cell viability value(%)

* Red word : IC50E이하 cell vaibility value(%)

3. 유통기한 설정실험 지표

시제품의 유통기한 설정을 위하여 가속실험법을 계획 및 수행하였으며 시험기간 조건은 0, 15, 30, 60, 90, 120일로 총 6구간으로 설정하였으며 시험 온도조건은 25℃, 30℃, 45℃로 총 3구간으로 설정하였으며 이때 25℃를 대조구로써 사용하였다.

가. 미생물 지표

1) *Bacillus cereus*

10배 단계 희석에 의해 준비되어진 시제품 시료가 도말되어진 MYP 배지를 배양한 뒤 배지 색깔변화 관찰을 통해 *Bacillus cereus*로 의심 가능한 집락을 개수 및 선별하였으며, 1차적인 그람염색법을 통해 그람양성 균주를 선별 후, 선별되어진 균주는 2차적으로 API KIT를 이용하여 타겟되는 균주인 *Bacillus cereus* 임을 확인 시험하였다. 정확한 균주 동정결과를 얻고자 API KIT를 이용한 확인시험은 배양조건을 24시간과 48시간 배양으로 정하여 두 조건 모두에서 결과되는 kit 양상을 분석하여 균을 동정하였으며 그 결과, 장류에서 음성으로 결과되어져야 하는 *Bacillus cereus* 균주는 시험되어진 모든 조건에서 검출되지 않았다.

Table 8. 유통기한시험 기간 중 API kit를 통해 동정되어진 시제품 내 균주

Time Days	24hr	48hr	<i>Bacillus cereus</i> 검출 유무
0	<i>Bacillus smithii</i>	<i>Bacillus smithii</i>	불검출
15	<i>Bacillus firmus</i> <i>Bacillus smithii</i>	<i>Bacillus firmus</i> <i>Bacillus smithii</i>	불검출
30	<i>Bacillus firmus</i>	<i>Bacillus smithii</i>	불검출
60	-	-	불검출
90	<i>Bacillus firmus</i>	<i>Geobacillus</i> <i>stearothermophilus</i>	불검출
120	-	-	불검출

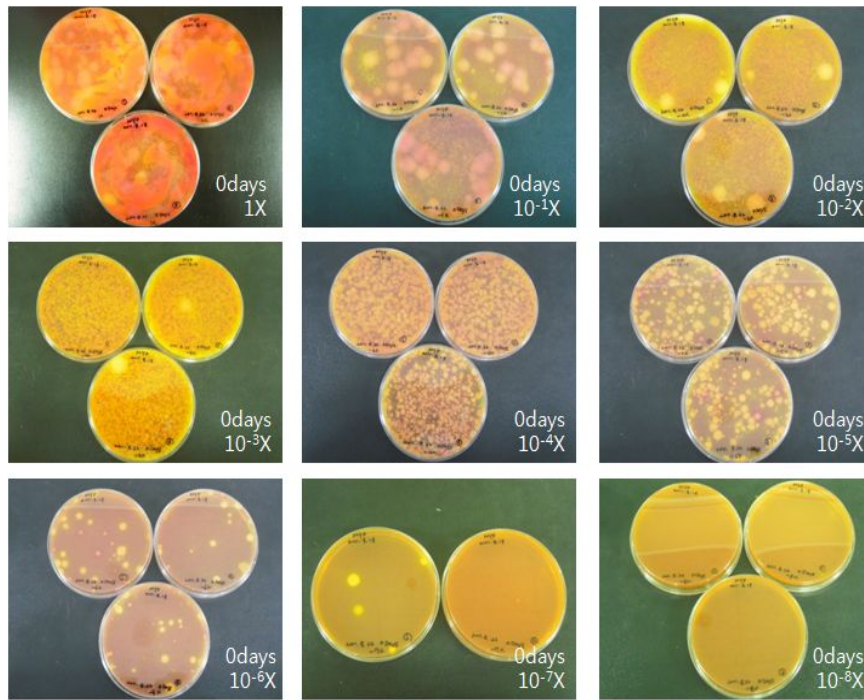


Fig. 7. MYP 한천배지를 통한 *Bacillus cereus* 유무 확인 시험(0 Days)

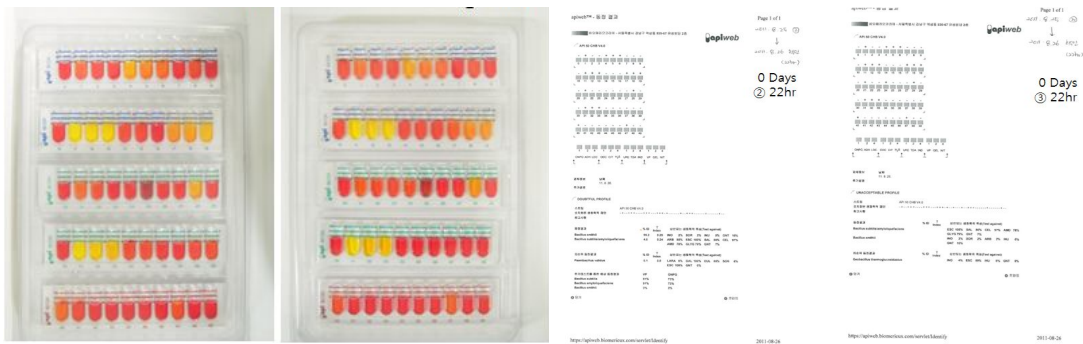


Fig. 8. API KIT assay 24hr 배양(0 Days)



Fig. 9. API KIT assay 48hr 배양(0 Days)

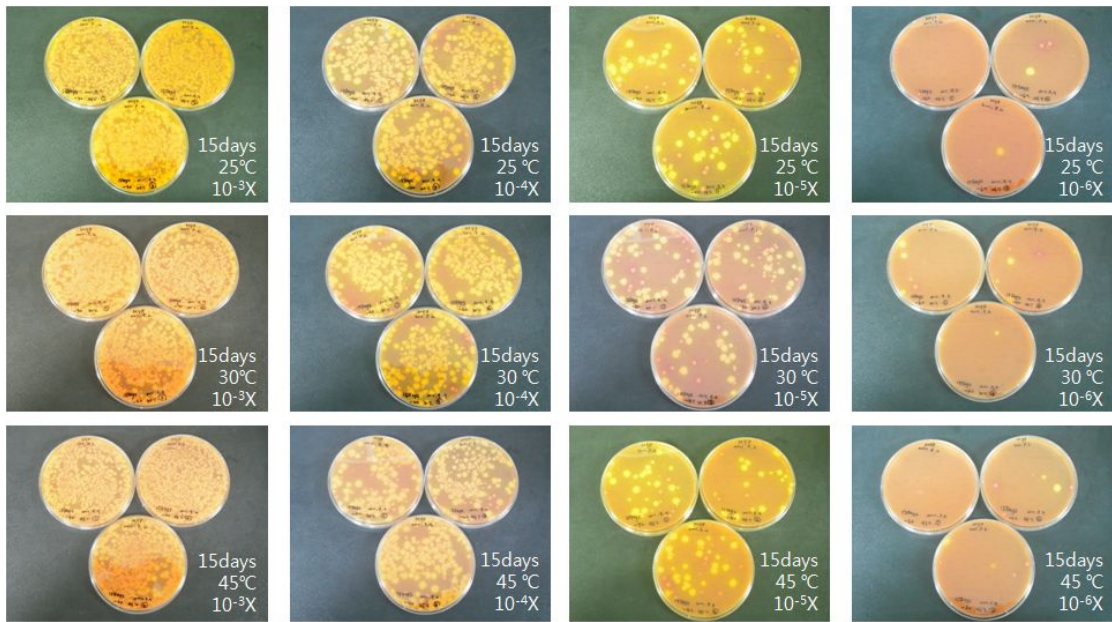


Fig. 10. MYP 한천배지를 통한 *Bacillus cereus* 유무 확인 시험(15 Days)



Fig. 11. API KIT assay 24hr 배양(15 Days)



Fig. 12. API KIT assay 48hr 배양(15 Days)

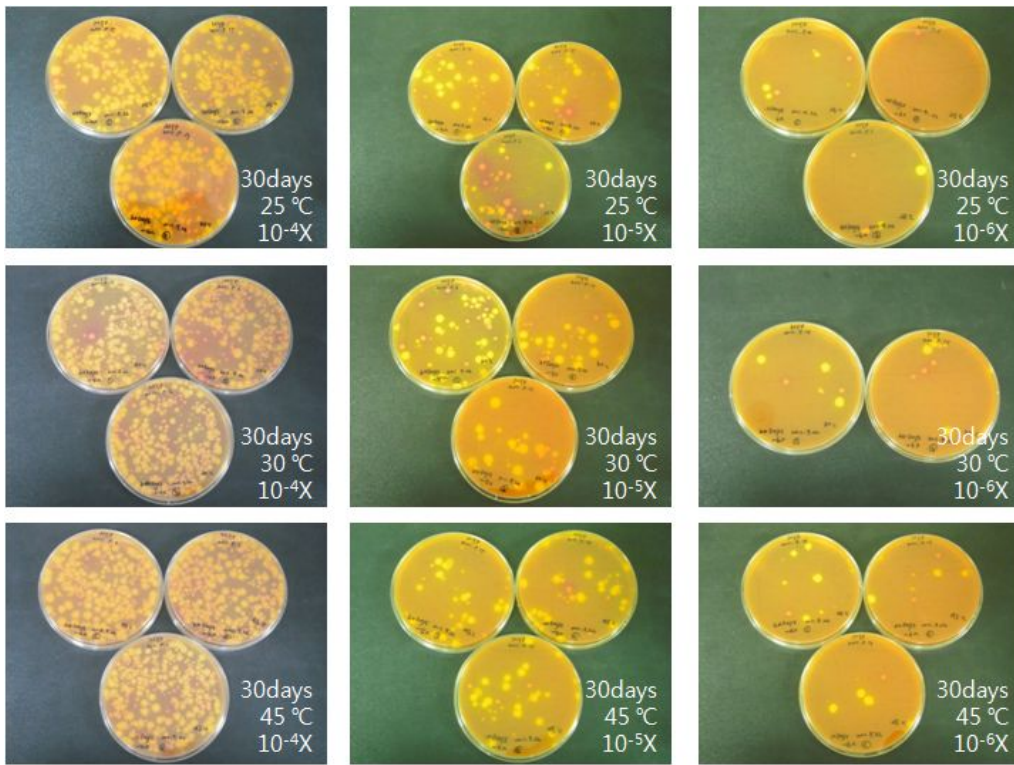


Fig. 13. MYP 한천배지를 통한 *Bacillus cereus* 유무 확인 시험(30 Days)



Fig. 14. API KIT assay 24hr 배양(30 Days)



Fig. 15. API KIT assay 48hr 배양(30 Days)

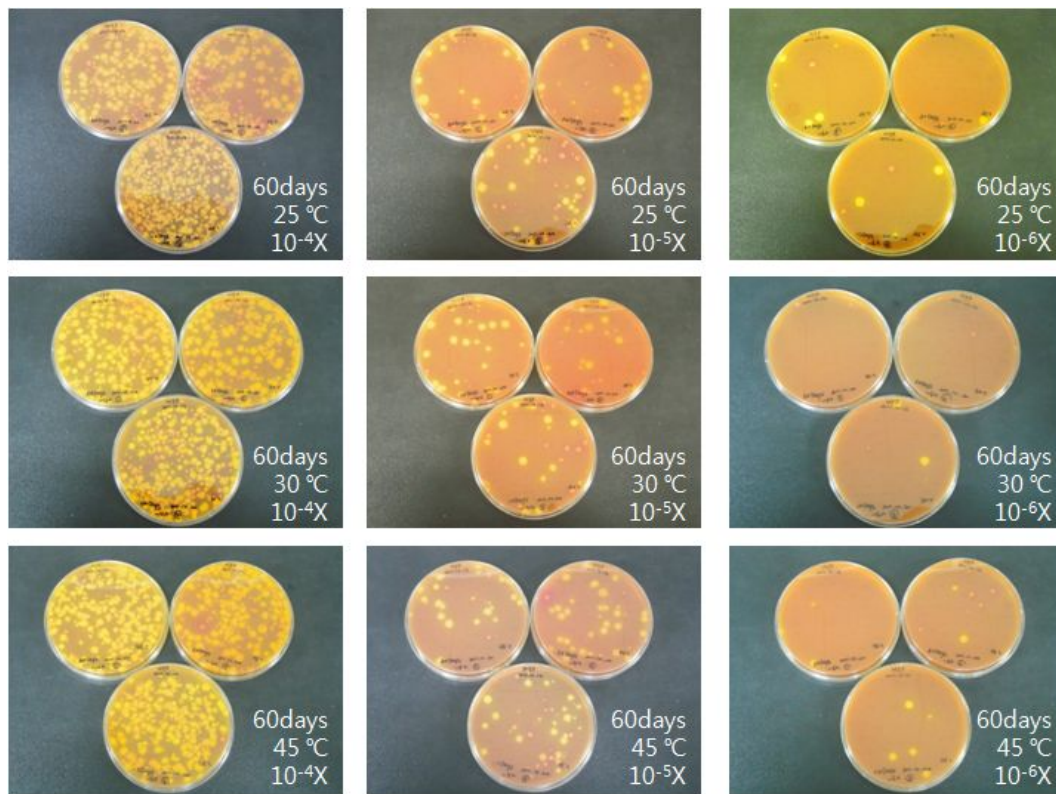


Fig. 16. MYP 한천배지를 통한 *Bacillus cereus* 유무 확인 시험(60 Days)

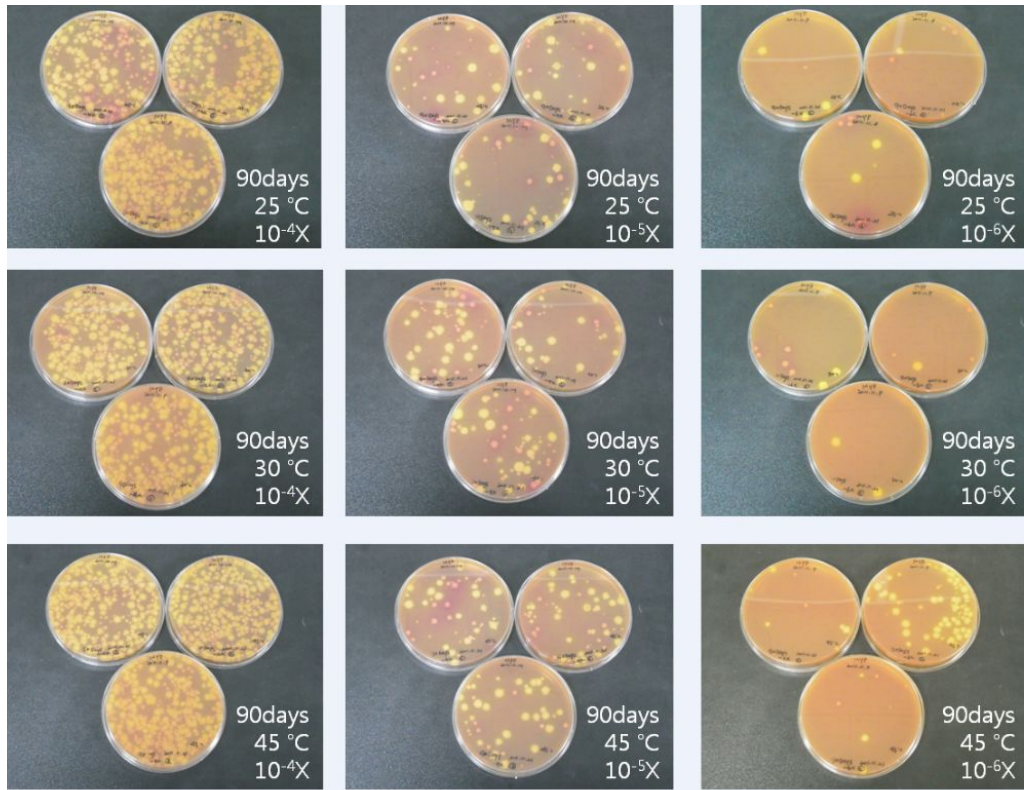


Fig. 17. MYP 한천배지를 통한 *Bacillus cereus* 유무 확인 시험(90 Days)



Fig. 18. API KIT assay 24hr 배양(90 Days)



Fig. 19. API KIT assay 48hr 배양(90 Days)

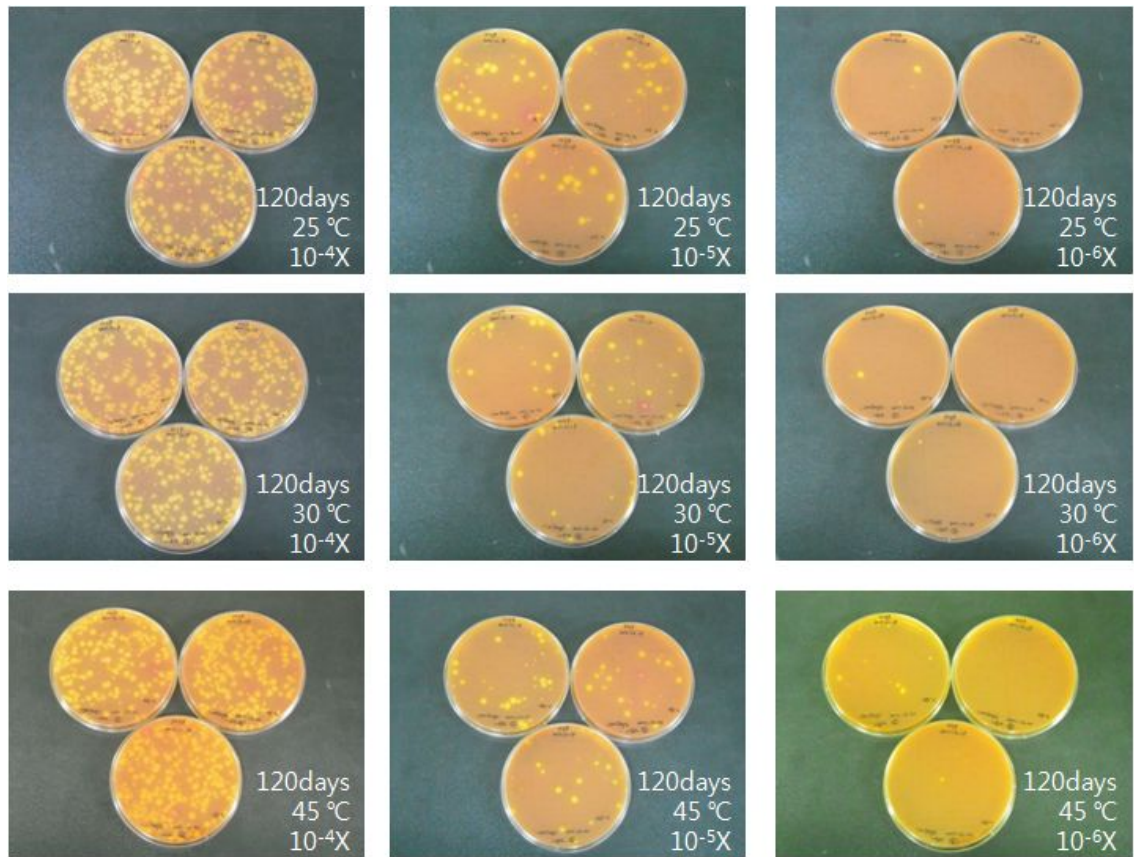


Fig. 20. MYP 한천배지를 통한 *Bacillus cereus* 유무 확인 시험(120 Days)

2) 대장균군

10배 단계 회석에 의해 준비되어진 시제품 시료가 도말되어진 데옥시콜레이트 유당 한천배지를 배양한 뒤 형성되는 콜로니 색깔 관찰을 통해 대장균군 의심 가능 집락을 확인하였다. 정확한 결과를 얻고자 24시간과 48시간 두 가지 배양시간을 조건으로하여 결과를 확인 하였으며 그 결과, 시험되어진 모든 조건에서의 시제품에서 위해요소 균주인 대장균군의 집락은 확인되지 않았으며 온도가 높아질 수록 데옥시콜레이트유당 한천배지에 형성되는 집락 수가 줄어드는 것이 관찰되었으며 30일 이후 45 °C 조건에서 시험되어진 시제품에서는 이 선택배지에서 균집락이 형성되지 않았다.

Table 9. 대장균군 검출 유무

대장균군	온도별	1X	-1X	-2X	-3X
0 Days		-	-	-	-
15 Days	25℃	-	-	-	-
	30℃	-	-	-	-
	45℃	-	-	-	-
30 Days	25℃	-	-	-	-
	30℃	-	-	-	-
	45℃	-	-	-	-
60 Days	25℃	-	-	-	-
	30℃	-	-	-	-
	45℃	-	-	-	-
90 Days	25℃	-	-	-	-
	30℃	-	-	-	-
	45℃	-	-	-	-
120 Days	25℃	-	-	-	-
	30℃	-	-	-	-
	45℃	-	-	-	-

-: 불검출

+: 검출

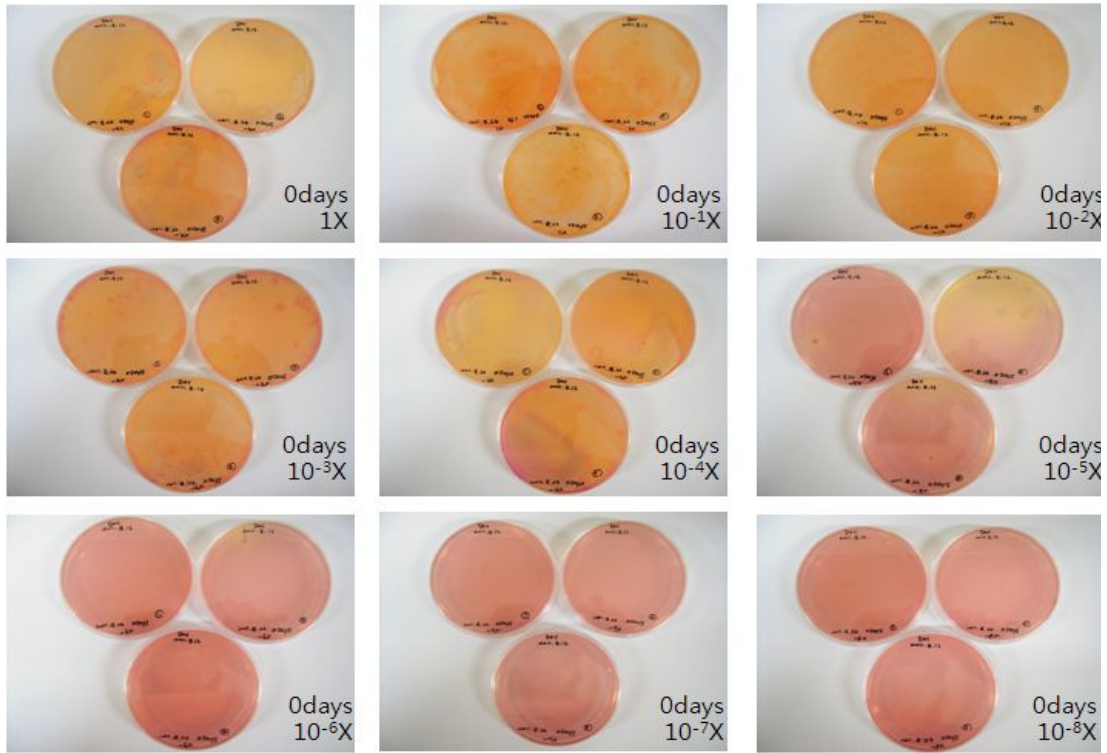


Fig. 21. DOC 한천배지를 통한 대장균군 유무 확인 시험(0 Days)

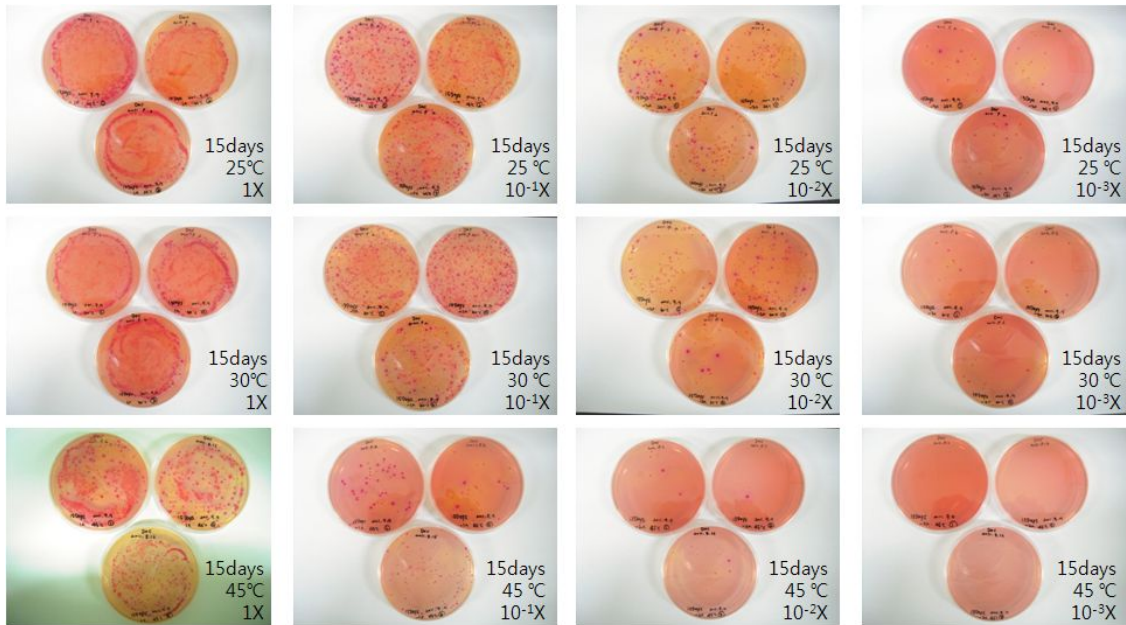


Fig. 22. DOC 한천배지를 통한 대장균군 유무 확인 시험(15 Days)

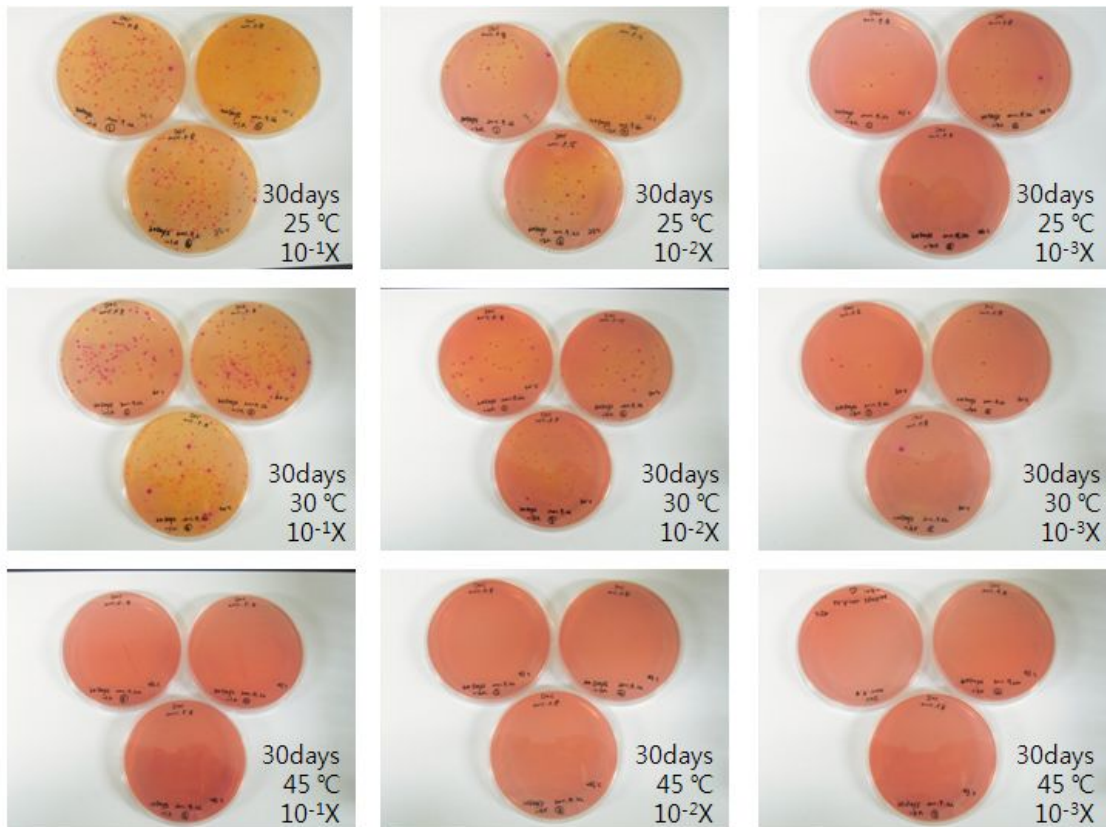


Fig. 23. DOC 한천배지를 통한 대장균군 유무 확인 시험(30 Days)

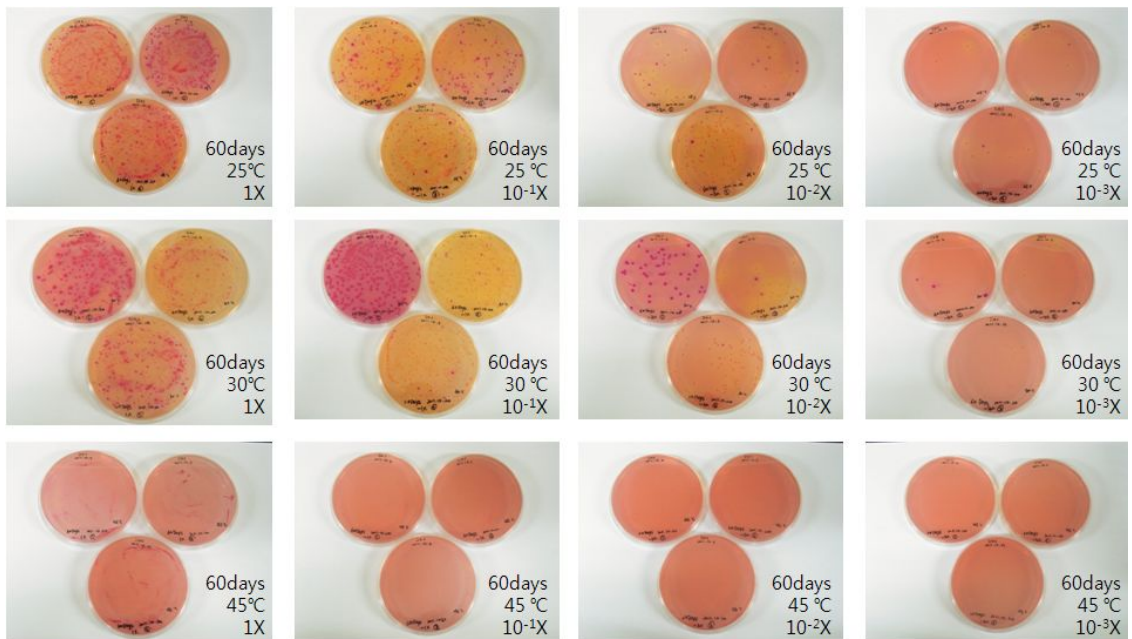


Fig. 24. DOC 한천배지를 통한 대장균군 유무 확인 시험(60 Days)

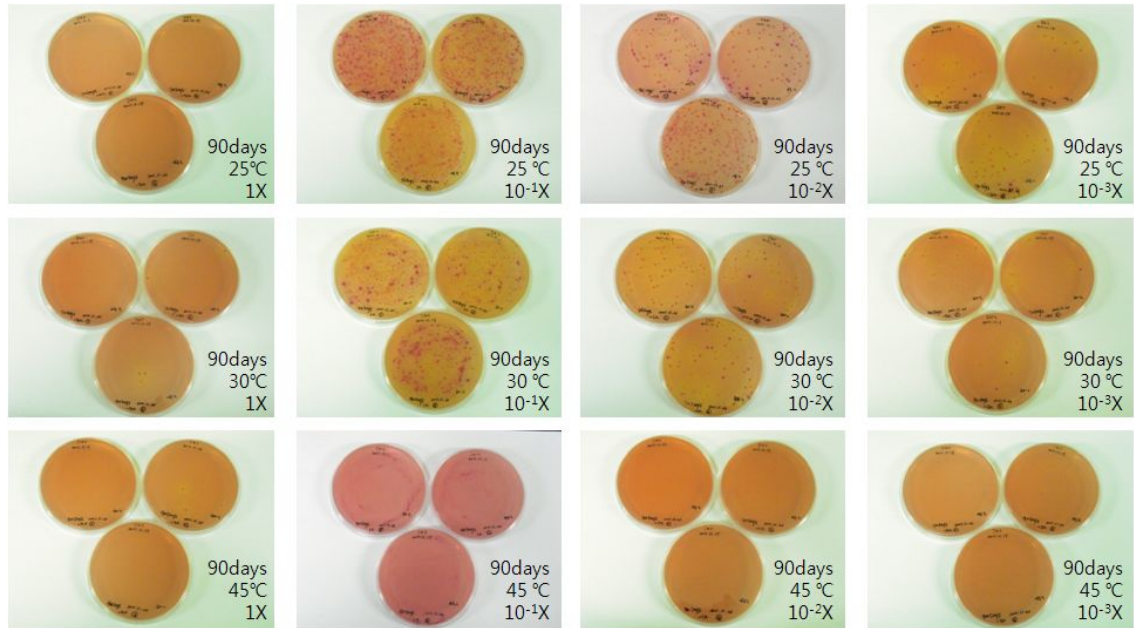


Fig. 25. DOC 한천배지를 통한 대장균군 유무 확인 시험(90 Days)

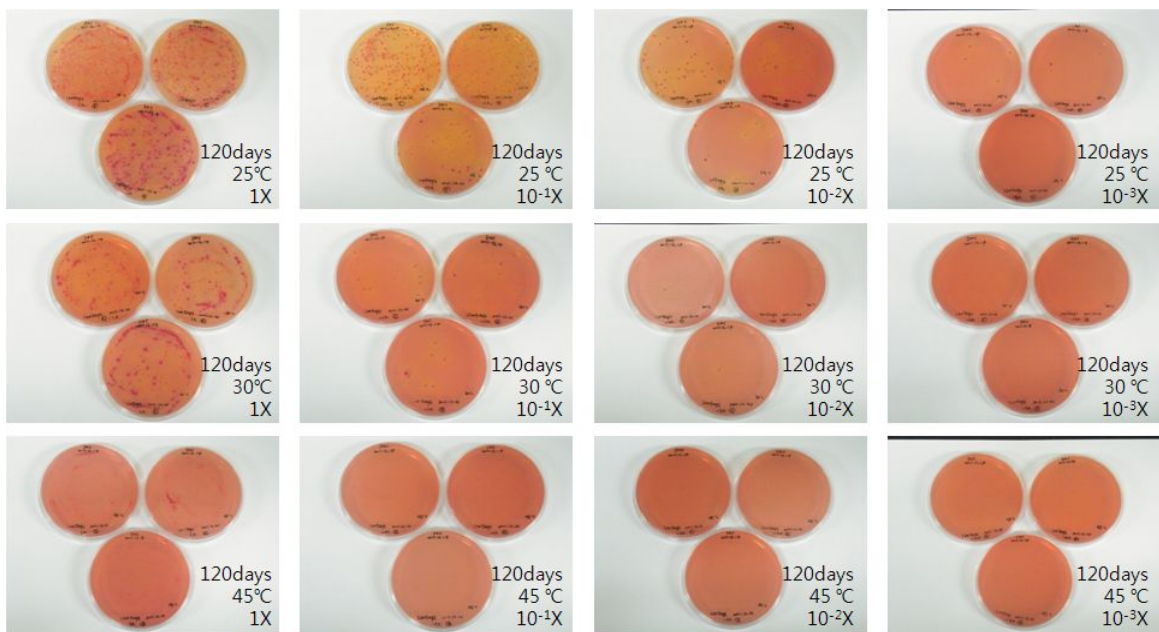


Fig. 26. DOC 한천배지를 통한 대장균군 유무 확인 시험(120 Days)

나. 이화학성분지표

1) 수분

유통기한 설정 기간별 시제품의 수분함량을 측정한 결과, 시험되어진 세 온도 조건 모두 시간에 따라 수분함량이 감소하였으며 25℃와 30℃에서 보관되어진 시제품의 수분은 미량 감소한 반면, 45℃에 보관 및 시험되어진 시제품의 수분은 다른 두 온도보다 급격한 감소를 보였다.

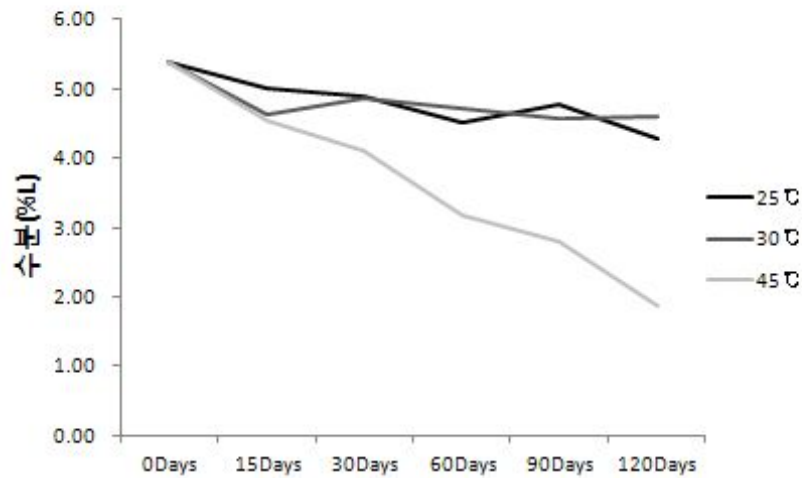


Fig. 27. 시간별에 따른 온도별 수분 변화

Table 10. 시간별에 따른 온도별 수분 변화

시간별	온도별 수분(%L)		
	25℃	30℃	45℃
0 Days	5.38±0.47 ^a	5.38±0.47 ^a	5.38±0.47 ^a
15 Days	5.01±0.2 ^{ab}	4.64±0.03 ^b	4.55±0.06 ^b
30 Days	4.90±0.18 ^{bc}	4.88±0.36 ^b	4.12±0.25 ^b
60 Days	4.52±0.21 ^{cd}	4.71±0.08 ^b	3.19±0.40 ^c
90 Days	4.79±0.15 ^{bc}	4.57±0.06 ^b	2.79±0.08 ^c
120 Days	4.29±0.14 ^d	4.59±0.09 ^b	1.87±0.09 ^d

2) 총질소

총질소 함량은 맛과 영양을 결정하는 콩 단백질에서 유래된 몸에 좋은 여러 종류의 아미노산 함량을 나타내는 척도로 높을수록 식품 내 아미노산 함량이 높다는 것을 의미한다. 식품공전의 장류 식품의 기준 및 규격에 따르면 총질소(w/v%)는 0.8% 이상이어야한다고 고시되어 있다. 전문기관에 의뢰하여 조사되어진 시제품의 유통기한 설정 조건 내 총질소는 Tabel 11.에서 보는바와 같이 시간, 온도에 상관없이 평균 6.7%로 제품규격에 적합한 결과를 보였다.

Table 11. 시간별에 따른 온도별 총질소 변화

시간별	온도별		
	총질소(%)		
	25℃	30℃	45℃
0 Days	6.7	6.7	6.7
15 Days	6.6	6.6	6.7
30 Days	6.6	6.7	6.7
60 Days	6.7	6.7	6.8
90 Days	6.6	6.7	6.9
120 Days	6.7	6.7	6.9

3) 아미노산성질소

청국장의 저장 중 콩 단백질이 분해되어 생성된 아미노산은 청국장의 구수한 맛에 기여하며, 이 때 아미노산성질소 함량이 증가하게 됨으로써 아미노산성 질소는 장류 맛의 지표는 물론 저장 중 장류 제품의 변화와 보관기관 설정 지표로써 사용된다. 전문기관에 의뢰하여 조사되어진 시제품의 유통기한 설정 조건 내 아미노산성 질소는 최초 426mg% 함량이던 것이 저장 시간과 온도가 증가함에 따라 비례적으로 최고 762-790mg%까지 증가하였으나 저장 60일 쯤 이후부터는 그 함량 변화 증감이 크게 나타나 최종 시험기간인 120일째에는 최초함량보다 더욱 감소되어 맛에 기여하는 아미노산에 변화를 예측 할 수 있었다.

Table 12. 시간별에 따른 온도별 아미노산성질소 변화

시간별	온도별 아미노산성질소(mg%)		
	25℃	30℃	45℃
0 Days	426	426	426
15 Days	724	727	749
30 Days	762	772	790
60 Days	504	520	538
90 Days	776	798	812
120 Days	389	361	323

계명대학교 전홍미생물지원센터
 TEL: 02-9500-4000 FAX: 02-9500-4001
 http://www.tam.ac.kr

제 11-2-04461 호 발급번호: 제 09-05-013 호

시험성적서

검 체 명	양분분말		
재 료 유 형	기준규격		
의뢰인 주소 및 성명	[제] 대구광역시 남구 대명동 891-5 대 명 차 이기동	대 표 자	이기동
시 험 의 의 목 적	완구용	접 수 년 월 일	2011년 09월 04일

귀사가 시험 의뢰한 결과 및 판정은 의뢰한 시험항목에 한하여 다음과 같습니다.

결과:

시 용 항 목	규 격 기 준	결 과	합 격 판 정
총질소	-	6.7%	-
아미노산성질소	-	426mg%	-
분말시용	-	적용	-

시험항목이 검사기준 제4조의 2 규정에 의하여 위약금이 감사항목을 발급합니다.
 2011년 09월 05일

계명대학교 전홍미생물지원센터 소장

시험항목별 시험항목별 검사기준 제 15호
 국립수의과학검역원 국립수의과학검역소 제 15호

이 검사 결과는 제공된 방법에 관하여 판정에 의하지 않으며, 판정 결과 및 판정인 변경사항은 사용될 수 없습니다.

02(02) 9500-4000 대구광역시 남구 대명동 891-5 TEL: 02-9500-4000 FAX: 02-9500-4001 0:00 ~ 24:00 24시간 응급 상담

Fig. 28. 분말청국장 시제품의 총질소, 아미노산성질소 함량(0 Days)

계명대학교 전홍미생물지원센터
 TEL: 02-9500-4000 FAX: 02-9500-4001
 http://www.tam.ac.kr

제 11-2-04767 호 발급번호: 제 09-22-028 호

시험성적서

검 체 명	양분분말 25℃		
재 료 유 형	기준규격		
의뢰인 주소 및 성명	[제] 대구광역시 남구 대명동 891-5 대 명 차 이기동	대 표 자	이기동
시 험 의 의 목 적	완구용	접 수 년 월 일	2011년 09월 07일

귀사가 시험 의뢰한 결과 및 판정은 의뢰한 시험항목에 한하여 다음과 같습니다.

결과:

시 용 항 목	규 격 기 준	결 과	합 격 판 정
총질소	-	6.8%	-
아미노산성질소	-	724mg%	-

시험항목이 검사기준 제4조의 2 규정에 의하여 위약금이 감사항목을 발급합니다.
 2011년 09월 09일

계명대학교 전홍미생물지원센터 소장

시험항목별 시험항목별 검사기준 제 15호
 국립수의과학검역원 국립수의과학검역소 제 15호

이 검사 결과는 제공된 방법에 관하여 판정에 의하지 않으며, 판정 결과 및 판정인 변경사항은 사용될 수 없습니다.

02(02) 9500-4000 대구광역시 남구 대명동 891-5 TEL: 02-9500-4000 FAX: 02-9500-4001 0:00 ~ 24:00 24시간 응급 상담

계명대학교 전홍미생물지원센터
 TEL: 02-9500-4000 FAX: 02-9500-4001
 http://www.tam.ac.kr

제 11-2-04768 호 발급번호: 제 09-22-029 호

시험성적서

검 체 명	양분분말 30℃		
재 료 유 형	기준규격		
의뢰인 주소 및 성명	[제] 대구광역시 남구 대명동 891-5 대 명 차 이기동	대 표 자	이기동
시 험 의 의 목 적	완구용	접 수 년 월 일	2011년 09월 07일

귀사가 시험 의뢰한 결과 및 판정은 의뢰한 시험항목에 한하여 다음과 같습니다.

결과:

시 용 항 목	규 격 기 준	결 과	합 격 판 정
총질소	-	6.8%	-
아미노산성질소	-	727mg%	-

시험항목이 검사기준 제4조의 2 규정에 의하여 위약금이 감사항목을 발급합니다.
 2011년 09월 09일

계명대학교 전홍미생물지원센터 소장

시험항목별 시험항목별 검사기준 제 15호
 국립수의과학검역원 국립수의과학검역소 제 15호

이 검사 결과는 제공된 방법에 관하여 판정에 의하지 않으며, 판정 결과 및 판정인 변경사항은 사용될 수 없습니다.

02(02) 9500-4000 대구광역시 남구 대명동 891-5 TEL: 02-9500-4000 FAX: 02-9500-4001 0:00 ~ 24:00 24시간 응급 상담

계명대학교 전홍미생물지원센터
 TEL: 02-9500-4000 FAX: 02-9500-4001
 http://www.tam.ac.kr

제 11-2-04769 호 발급번호: 제 09-22-030 호

시험성적서

검 체 명	양분분말 45℃		
재 료 유 형	기준규격		
의뢰인 주소 및 성명	[제] 대구광역시 남구 대명동 891-5 대 명 차 이기동	대 표 자	이기동
시 험 의 의 목 적	완구용	접 수 년 월 일	2011년 09월 07일

귀사가 시험 의뢰한 결과 및 판정은 의뢰한 시험항목에 한하여 다음과 같습니다.

결과:

시 용 항 목	규 격 기 준	결 과	합 격 판 정
총질소	-	6.7%	-
아미노산성질소	-	749mg%	-

시험항목이 검사기준 제4조의 2 규정에 의하여 위약금이 감사항목을 발급합니다.
 2011년 09월 09일

계명대학교 전홍미생물지원센터 소장

시험항목별 시험항목별 검사기준 제 15호
 국립수의과학검역원 국립수의과학검역소 제 15호

이 검사 결과는 제공된 방법에 관하여 판정에 의하지 않으며, 판정 결과 및 판정인 변경사항은 사용될 수 없습니다.

02(02) 9500-4000 대구광역시 남구 대명동 891-5 TEL: 02-9500-4000 FAX: 02-9500-4001 0:00 ~ 24:00 24시간 응급 상담

Fig. 29. 분말청국장 시제품의 총질소, 아미노산성질소 함량(15 Days)

계명대학교 전통미생물자원연구소 http://www.jmuc.kr		계명대학교 전통미생물자원연구소 http://www.jmuc.kr		계명대학교 전통미생물자원연구소 http://www.jmuc.kr	
제 11-2-06424 호		제 11-2-06425 호		제 11-2-06426 호	
발급번호 : 제 12-27-022 호		발급번호 : 제 12-27-023 호		발급번호 : 제 12-27-024 호	
시험 성적서					
검 체 명	현발현형(25℃)	제조일자		검 체 명	분발현형(45℃)
검 체 유 형	기준규격치	제조일자		검 체 유 형	기준규격치
의뢰인 주소 및 성명	제1대구광역시중구대동로15동5층508호 대구 달서구 대현동 891-5	대 표 자	이기훈	의뢰인 주소 및 성명	제1대구광역시중구대동로15동5층508호 대구 달서구 대현동 891-5
시 행 조 령 적	참고용	시 행 연 월 일	2011년 12월 21일	시 행 조 령 적	참고용
귀하가 시험 의뢰한 결과 및 판정은 의뢰한 시험항목에 한하여 다릅니다.					
결과:					
시 행 항목	규격 기준	결과	항목 판정	시 행 항목	규격 기준
총질소	-	6.7%	-	총질소	-
아미노산질소	-	389mg%	-	아미노산질소	-
<p>시험항목별사기검사항목은 제4호의 2 규격에 의하여 위조율이 검사성적서를 발급합니다. 2011년 12월 27일</p> <p style="text-align: center;">계명대학교 전통미생물자원연구소장</p> <p>식품의약품안전청 식품위생관리과 제32호 식품안전관리특별관 식품위생관리과 제 18호</p> <p>이 검사결과에 대해서는 제품별 판정에 한하여 제조업체에 의뢰하여 상담하신 결과 및 반적인 재검수단으로 사용될 수 없습니다.</p>					

Fig. 33. 분말청국장 시제품의 총질소, 아미노산성질소 함량(120Days)

다. 관능적 지표(성상 검사)

시제품의 색상은 25℃와 30℃ 조건에서는 시간에 의존적으로 큰 변화를 보이지 않았으나 45℃에서 보관되어진 시제품은 다른 온도 조건에 비해 시간에 의존적으로 짙어진 것을 확인 할 수 있었다. 시제품의 풍미는 온도가 높아질수록 구수함의 정도가 진해졌고, 시간의 경과와 온도별에 따라 촉각으로 판별되어지는 조직감의 차이는 크게 없었다. 그러나 60일째부터 45℃ 시료가 겉포장이 벌어져있는 등 외관적으로 시제품의 포장 상태가 양호하지 않았으며, 120일째에는 45℃ 시료뿐만 아니라 25℃와 30℃ 시료 역시 겉포장이 벌어져있는 등 외관적으로 시제품의 포장 상태가 양호하지 않았다.



Fig. 34. 시간별, 온도별 조건에 따른 시제품

Table 13. 시간별에 따른 온도별 관능검사

	온도별	색깔 (진하기*)	풍미 (구수함)	조직감	외관	최종 관능평점
0 Days		5	5	5	5	5
15 Days	25℃	5	5	5	5	5
	30℃	5	5	5	5	5
	45℃	5	4	5	5	4.75
30 Days	25℃	5	5	5	5	5
	30℃	4	5	5	5	4.75
	45℃	4	4	5	5	4.5
60 Days	25℃	4	4	5	4	4.25
	30℃	4	4	5	4	4.25
	45℃	3	3	5	3	3.5
90 Days	25℃	4	4	5	4	4.25
	30℃	4	4	5	4	4.25
	45℃	3	3	5	2	3.25
120 Days	25℃	4	4	5	3	4
	30℃	4	4	5	3	4
	45℃	3	3	4	2	3

*: 제품색상 변화 의미

라. 최종 유통기한 설정 결과

식품위생법 시행규칙 제45조제1항제3호에 따른 「식품 등의 유통기한 설정기준」에 따라 상기의 유통기한 설정시험 결과에 근거하여 유통기한을 예측하여 다음과 같이 나타내었다.

제품의 특성

1. 제품명 : "목이버섯이 첨가된 분말형 청국장"

2. 대상 식품의 특성

- 유형 또는 품목: 장류
- 성상: 분말
- 사용원료: 목이버섯, 청국장
- 제조·가공 공정: 건조분말
- 포장재질, 포장방법, 포장단위: 폴리에틸렌, 질소충전, 15g/Pack
- 보존 및 유통온도: 상온

3. 품질관리

4. 지표(실험항목)

- 미생물적 지표: *Bacillus cereus*, 대장균군
- 이화학적성분: 수분, 총질소, 아미노산성질소
- 관능적 지표: 성상

유통기한 설정 사유서

제 품 명	목이버섯이 첨가된 분말형 청국장
식 품 의 유 형	장류
보존 및 유통 방법	실온() / 상온(○) / 냉장() / 냉동() / 기타()
유통 기 한	12개월
실험수행기관종류	자사() / 의뢰() / 생략()
실험수행기관명	

유통기한 설정근거

1. 제품의 원료 및 보존 특성

가. 본 시제품 및 최종제품은 수분함량이 5.38% 이하의 청국장건조분말물이며 포장재질이 PE로 밀봉포장되어 외부의 공기 및 습기가 침투하지 못하므로 미생물의 생육이 억제됨

나. 품질 변화를 최소화하고 제품의 충격완화를 위하여 질소충진한 제품임

2. 유사제품 비교

구분	신규제품	기존 유통제품
제품명	목이버섯이 첨가된 분말형 청국장	
제조사	전진바이오팜(주)	
식품유형	장류	
성상	건조물(수분 5.38% 이하)	
포장재질	합성수지재(PE/PP)	
포장방법	밀봉(질소충진)	
보존 및 유통온도	상온	
보존료 사용여부	미사용	
살균 또는 멸균방법	질소충진	
유통기한	12개월	

상기와 같이 유통기한 설정 사유서를 제출합니다.

첨부 :별지2호 서식의 실험 결과보고서

2011 년 12 월 30 일

제출인 : (인)

목이버섯 첨가 분말 청국장의 유통기한설정실험 결과보고서

1. 예측 제품

예측 제품명	목이버섯 첨가 분말형 청국장	식품유형	장류(청국장)
품질 지표	마실러스 세레우스, 대장균군, 수분, 총질소, 아미노산성질소, 성장		

: 가속 실험을 통하여 본 시제품의 유통기한을 예측 및 설정하고자 하였음
 : 온도 조건을 이용한 시제품 저장 조건 설정을 통해 시험 및 계산하였음

2. 품질지표별 품질 변화

2.1 품질지표 미생물 품질 변화

측정 기간	Bacillus cereus	대장균군
0 Days	불검출	불검출
15 Days	불검출	불검출
30 Days	불검출	불검출
60 Days	불검출	불검출
90 Days	불검출	불검출
120 Days	불검출	불검출

2.2 품질지표 수분 품질변화

측정기간 \ 온도별	수분(%L)		
	25℃	30℃	45℃
0 Days	5.38±0.47 ^a	5.38±0.47 ^a	5.38±0.47 ^a
15 Days	5.01±0.20 ^{ab}	4.64±0.03 ^b	4.55±0.06 ^b
30 Days	4.90±0.18 ^{ab}	4.88±0.36 ^b	4.12±0.25 ^b
60 Days	4.52±0.21 ^b	4.71±0.08 ^b	3.19±0.40 ^c
90 Days	4.79±0.15 ^b	4.57±0.06 ^b	2.79±0.08 ^c
120 Days	4.29±0.14 ^d	4.59±0.09 ^b	1.87±0.09 ^d

2.3 품질지표 총질소 품질변화

측정기간 \ 온도별	총질소(%)		
	25℃	30℃	45℃
0 Days	6.7	6.7	6.7
15 Days	6.6	6.6	6.7
30 Days	6.6	6.7	6.7
60 Days	6.7	6.7	6.8
90 Days	6.6	6.7	6.9
120 Days	6.7	6.7	6.9

2.4 품질지표 아미노산성질소 품질변화

측정기간 \ 온도별	아미노산성질소(mg%)		
	25℃	30℃	45℃
0 Days	426	426	426
15 Days	724	727	749
30 Days	762	772	790
60 Days	504	520	538
90 Days	776	798	812
120 Days	389	361	323

2.5 품질지표 정상 품질변화

측정기간	온도별	색깔 (진하기)	풍미 (구수함)	조직감	외관	최종 관능평점
0 Days		5	5	5	5	5
15 Days	25℃	5	5	5	5	5
	30℃	5	5	5	5	5
	45℃	5	4	5	5	4.75
30 Days	25℃	5	5	5	5	5
	30℃	4	5	5	5	4.75
	45℃	4	4	5	5	4.5
60 Days	25℃	4	4	5	4	4.25
	30℃	4	4	5	4	4.25
	45℃	3	3	5	3	3.5
90 Days	25℃	4	4	5	4	4.25
	30℃	4	4	5	4	4.25
	45℃	3	3	5	2	3.25
120 Days	25℃	4	4	5	3	4
	30℃	4	4	5	3	4
	45℃	3	3	4	2	3

3. 품질지표별 반응속도 상수

3.1 품질지표 수분 반응속도 상수

1) 반응차수 0차 결과

온도(℃)	Slope(K)	Intercept(A0)	R ²
25℃	-0.2174	5.1955	0.8785
30℃	-0.1395	5.0392	0.6991
45℃	-0.8168	5.0794	0.9864

2) 반응차수 1차 결과

온도(℃)	Slope(K)	Intercept(A0)	R ²
25℃	-0.0453	1.6485	0.8812
30℃	-0.0283	1.6155	0.7052
45℃	-0.2458	1.6678	0.9904

3.2 품질지표 총질소 반응속도 상수

1) 반응차수 0차 결과

온도(°C)	Slope(K)	Intercept(A0)	R ²
25°C	0.0063	6.6389	0.1777
30°C	0.0105	6.6649	0.3974
45°C	0.0610	6.6764	0.9570

2) 반응차수 1차 결과

온도(°C)	Slope(K)	Intercept(A0)	R ²
25°C	0.0009	1.8929	0.1777
30°C	0.0015	1.8968	0.3974
45°C	0.0089	1.8986	0.9570

3.3 품질지표 아미노산성질소 반응속도 상수

1) 반응차수 0차 결과

온도(°C)	Slope(K)	Intercept(A0)	R ²
25°C	-21.1157	633.7859	0.1839
30°C	-24.7157	643.9192	0.2015
45°C	-33.5157	664.9859	0.2498

2) 반응차수 1차 결과

온도(°C)	Slope(K)	Intercept(A0)	R ²
25°C	-0.04310	6.4280	0.2139
30°C	-0.05491	6.4489	0.2515
45°C	-0.07803	6.4482	0.3176

3.4 품질지표 성상 반응속도 상수

1) 반응차수 0차 결과

온도(°C)	Slope(K)	Intercept(A0)	R ²
25°C	-0.2842	5.0807	0.9410
30°C	-0.2421	4.9236	0.9634
45°C	-0.5631	5.0271	0.9641

2) 반응차수 1차 결과

온도(°C)	Slope(K)	Intercept(A0)	R ²
25°C	-0.0628	1.6279	0.9443
30°C	-0.0541	1.5957	0.9666
45°C	-0.1429	1.6257	0.9730

4. 품질지표별 유통기한 산출

: Correlation vlaue가 높은 반응 차수의 반응속도상수를 적용하여 산정

4.1 품질지표 수분 유통기한 산출

차수	최초함량-품질규격	연간변화속도상수	유통기한(개월)
1	0.6199	0.3694	20.1

4.1 품질지표 총질소 유통기한 산출

차수	최초함량-품질규격	연간변화속도상수	유통기한(개월)
1	2.1253	0.0113	2256.9

4.1 품질지표 아미노산성질소 유통기한 산출

차수	최초함량-품질규격	연간변화속도상수	유통기한(개월)
1	0.0909	0.0751	12.1

4.1 품질지표 성장 유통기한 산출

차수	최초함량-품질규격	연간변화속도상수	유통기한(개월)
1	0.5108	0.3929	13.0

2011년 12월

○○기관(유통기한설정실험 수행기관)

대표자 직위 및 성명 (직인)

※ 대학의 경우 연구책임자 직인 가능

[별지 제2호 서식]

실험 결과보고서 요약					
제목	“목이버섯이 첨가된 분말형 청국장” 유통기한 설정 실험				
실험구분	자체실험() 의뢰실험()				
실험기간	2011년 08월 23일 ~ 2011년 12월 30일				
신청인	업소명		대표자		
	주소		연락처		
실험수행 기관	기관명		대표자		
	주소		연락처		
실험 참여자	책임자		연구원		
	연구원		연구원		
	연구원		연구원		
실 험 결 과	요약				
	<ul style="list-style-type: none"> 유통기한 설정 실험 조건 : 가속실험(4개월/ 3회반복 6구간 실험) : 보관온도(25℃, 30℃, 45℃) 식품유형에 근거한 유통기한 실험결과 				
	시험항목	허용한계 (단위)	예상유통기한 (개월)	산정유통기한 (개월)	비고
	바실러스 세레우스	불검출 (CFU/ml)	12개월	12개월	식품공전
	대장균군	불검출 (CFU/ml)	12개월	12개월	식품공전
	수분	3-5(%L)	12개월	19개월	식품공전
	총질소	0.8이상(%)	12개월	∞	장류규격 적용
	아미노산성 질소	426 (mg/%)	12개월	12개월	-
	관능검사	3 (score)	12개월	10개월	식품공전
	<ul style="list-style-type: none"> 최종 유통기한: 12 개월 				

마. 시제품 제품성

「식품위생법 시행규칙」 제45조제1항제3호에 따른 「식품 등의 유통기한 설정기준」 과 식약청에서 제공한 「식품의 유통기한 설정 실험 가이드라인」 에 따라 목이버섯이 첨가되어진 분말형 청국장 시제품의 유통기한 설정 실험 결과 최종 2개월의 유통기한이 결과 되었다. 미생물학적 측면에서의 시험되어진 시제품의 안전성과 이화학적 성분측면에서 수분 및 총 질소함량은 목표한 12개월 유통기한에 근접할 수 있는 시험 결과를 확인 할 수 있었다. 하지만 식품으로써 가장 중요시 되어야 하는 것은 맛으로써 청국장의 특성이 되는 구수한 맛의 과학적 지표로 사용되는 아미노산성 질소 항목에서 2개월의 품질유지가 가능한 유통기한이 결과 되었다. 본 사업에서 우수한 향산화능과 항암활성을 가지며 분말제형으로 개발되어진 목이버섯 첨가 분말형 청국장은 식품으로써 저장 안전성은 물론 질적 우수성을 나타낼 수 있도록 추가적인 시제품 포장 공정 등의 관련 시제품 제작 과정을 보완 및 수정을 통해 성공적인 제품화 및 산업화가 가능 할 것이다.

IV. 디자인 및 최종 제품

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

목이버섯(*Auricularia auricula-judae*)의 식품·약리활성분석과 식품소재화

* 연도별 연구목표 및 평가착안점에 입각한 연구개발목표의 달성도 및 관련분야의 기술 발전에의 기여도 등을 기술

제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

목이버섯(*Auricularia auricula-judae*)의 식품·약리활성분석과 식품소재화

- * 실용화·산업화 계획(기술실시 등)
- * 교육·지도·홍보 등 기술확산 계획 등
- * 특허, 품종, 논문 등 지식재산권 확보계획 등
- * 추가연구, 타연구에 활용 계획 등
- * 연구기획사업 등 사업별 특성에 따라 목차는 변경 가능함

*가로형 350x45mm



*직경 100mm



TMR **계명대학교 전통미생물자원연구센터**
TRADITIONAL MICROORGANISM RESOURCES CENTER

<http://www.tmr.or.kr>

제 11-2-04195 호

발급번호 : 제 08-30-024 호

시험성적서

검 체 명	목이버섯 청국장분말		제 조 일 자	
제 품 유 령	일반성분검사			
의뢰인 주소 및 성명	전진바이오팜주식회사	대 표 자	이태훈	
	대구 달서구 효상동 711 대구테크노파크벤처공장 302			
시 험 의뢰 목 적	참고용	접 수 년 월 일	2011년 08월 10일	

귀하가 시험 의뢰한 결과 및 판정은 의뢰된 시험항목에 한하며 다음과 같습니다.

결과 :

시 험 항 목	규 격 기 준	결 과
열량	-	445Kcal/100g
단수화물	-	33g/100g (10%, %영양소 기준치)
당류	-	1 g/100g
단백질	-	36g/100g (60%, %영양소 기준치)
지방	-	19g/100g (38%, %영양소 기준치)
포화지방	-	0g/100g (0%, %영양소 기준치)
트랜스지방	-	0g/100g
콜레스테롤	-	0 mg/100g (0%, %영양소 기준치)
나트륨	-	20 mg/100g (1%, %영양소 기준치)

식품위생검사기관지정기준 제4호의 2 규정에 의하여 위와같이 검사성적서를 발급합니다.
2011년 08월 22일

계명대학교 전통미생물자원연구센터 소장

식품의약품안전청 식품위생검사기관 제32호
국립수의과학검역원 축산물위생검사기관 제 16호



이 검사결과는 제출된 검체에 한하며 의뢰목적 이외의 상업적인 광고 및 법적인 해결수단으로 사용할 수 없습니다.

[710]~[710] 대구광역시 달서구 신당동 1000번지 TEL : (053)580-6460-1 FAX : (053)580-6465 소장 : 이삼빈 담당자 : 남미영

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

제1절. 평가의 착안점 및 기준

구분	연 도	세부연구개발 목표	가중치	평가의 착안점 및 기준
1차 년도	2009	○ 목이버섯 균주수집 및 유 연관계분석 및 현미경적특 성 분석	20%	- 국내외 균주수집, DNA분석과 생리형태특 성 구명 - 유연관계분석 및 현미경적특성 분석 - 선발육종에 위한 목이버섯 생육재배시험: 수집 및 분양계통 10여종.
		○ 최적배지개발	20%	- 배지재료의 이화학적, 물리적특성 조사
		○ 목이버섯 수집균주의 생 육특성조사	30%	- 생산된 균주별 자실체의 특성조사
		○ 목이버섯 약리활성에 따 른 최적화 시험	20%	- 약리활성에 따른 최적추출법을 확립 (항암, 항산화, 항균, 미백기능) - 특허출원
		○ 목이버섯의 가공제품의 개발	10%	- 시작품 제작
2차 년도	2010	○ 우량 모균주의 교배에 의 한 품종육성	40%	- 모균주 특성검정, 교배조합검정, 우량균주 획득, 자실체특성조사
		○ 최적 발이환경 구명	10%	- 배지개발: 최적배지조합, 대체배지개발
		○ 최적배지 및 접종법	10%	- 최적 온도, 습도 구명으로 발이조건확립 - 고체중균과 액체중균비교
		○ 처리별 및 추출법에 따른 약리활성	20%	- 논문투고 및 출판 3건 - 특허출원
		○ 추출액을 이용한 가공 시 제품의 개발	20%	- 상표등록 및 디자인출원
3차 년도	2011	○ 신품종의 육성 및 품종등 록	20%	- 신품종의 DNA분석과 배양 및 재배특성 구명
		○ 농가실증시험 및 보급	20%	- 농가실증시험: 3개소이상지역, 생산력검정, 경제성검증, 최적 재배시설 구명.
		○ 목이버섯 건조법 구명	20%	- 유통을 위한 자실체의 최적건조방법 구명: 열풍건조, 동결건조, 원적외건조, 건조기, 자 연건조(양건, 음건) 등
		○ 질환모델동물에서 효능 효과시험	10%	- 목이버섯 추출액과 발효물의 지질억제능의 측정 - 논문출판 2건
		○ 목이버섯의 식품소재화	10%	- 추출액과 발효액의 상품화
		○ 목이버섯의 잔류농약허용 기준의 설정	20%	- 4개 농약(Gamma HCH, Guazatin, Glufosinate ammonium, glyphosphate)
최종 평가		○ 목이버섯 신품종육성 및 대량생산기술 개발	20%	- 목이버섯 우수 신품종육성 및 안전생산체 계구축
		○ 농가실증시험등을 통한 신속한 보급	40%	- 농가실증시험, 경제성분석, 농가보급, 수출 (수입대체효과) etc.
		○ 농약잔류허용기준법의 설 정	10%	- 4종의 농약에 대한 목이버섯의 MRL 설정
		○ 추출액과 발효액의 제조 조건의 설정	10%	- 발효조건의 설정 및 특허출원
		○ 목이버섯의 식품소재화 및 가공식품의 개발	20%	- 마트, 휴게소, 인터넷 등에 판매 실시

제 5 장 연구개발성과 및 성과활용 계획

1. 사업화정보

No.	사업화명	제품명	업체명	비고
1	목이버섯 농가재배	목이버섯 (건조품, 생물)	자연영농조합법인	경북 경산시
2	목이버섯 농가재배	목이버섯	한마음영농조합법인	경북 경주시

2. 교육 및 지도활용

No.	교육명	교재명	주요내용	활용년도
1	경북농업마이스터대학(버섯과정)	경북농업마이스터대학	목이버섯 재배기술 등 버섯교육	2009
2	새로운 목이버섯 재배기술	과학영농	목이버섯 재배기술	2009
3	버섯종균실기교육	버섯종균실습	종균, 살균 등	2010
4	농업계고등학교 전문기술교육	버섯실습	배지제조, 접종 등	2010
5	산림비지니스아카데미	산림비지니스아카데미	목이버섯 등 (안동, 영덕, 영주, 경주)	2011

3. 정책활용

No.	정책명	주관부처	내용	활용년도
1	농촌진흥청 영농활용	농촌진흥청	목이버섯 톱밥재배기술 개발	2009
2	농촌진흥청 영농활용	농촌진흥청	목이버섯의 단목재배법	2010
3	농촌진흥청 영농활용	농촌진흥청	목이버섯 톱밥배지이용 대량재배개발	2010
4	농작물 신제품직무육성	농촌진흥청	목이버섯 우량신제품육성	2010

4. 타연구개발사업에의 활용

No.	연구사업명	연구제목	연구자	활용년도
1	경기도농업기술원 자체과제	목이버섯 연중 대량생산 기술개발	경기도농업기술원 김정환	2011
2	농촌진흥청 공동연구사업 (지역특화과제)	목이버섯 표준재배법 개발 및 가공제품 개발연구	전북농업기술원 유영진	2012

5. 특허

No.	출원명	출원자명	종류	출원년도
1	대자원의 목이흑된장	장승희 등	상표	2010
2	대자원의 목이된장	장승희 등	상표	2010
3	툽밥붕지배지 버섯재배용 대나무목칩 종균	조우식 등	실용신안	2012

6. 논문

No.	논문명	주저자	학술지명	활용 년도	SCI 구분	국내 외
1	Development of Detection Methods for Cellulolytic Activity of Auricularia auriculajudae	Jo W-S	Mycobiology	2010	비SCI	국내
2	Fruit-body Production of Auricularia auricular-judae by Sawdust Cultivation	조우식	한국균학회	2010	“	“
3	Optimization of culture media of Mycoplasma hyopneumoniae by a response surface methodology	박승춘	Journal of Veterinary Science	2010	SCI	“
4	Pharmacodynamics of florfenicol alone and in combination with amoxicillin or cefuroxime against pathogenic bacteria of fish origin	박승춘	Korean J Vet Res	2010	비SCI	“

No.	논문명	주저자	학술지명	활용 년도	SCI 구분	국내 외
5	발효 옷 추출물의 생리활성 및 단회 경구 투여 독성시험	최명진	대한수의학회지	2010	“	“
6	Mechanism of macrophage activation induced by β -glucan produced from <i>Paenibacillus polymyxa</i> JB115	Zhi-Qiang Chang	Biochemical and Biophysical Research Communications	2009	SCI	국외
7	Anti-inflammatory activity of <i>Auricularia auricula-judae</i> in RAW264.7 cells	Dereje Damte	Toxicological Research	2011	비SCI	국외
8	Pharmacokinetics of a Florfenicol-Tylosin Combination after Intravenous and Intramuscular Administration to Beagle Dogs	Eun-Young KIM	J Vet Med Sci	2011	SCI	국외
9	Allometric Scaling of Orbifloxacin Disposition in Nine Mammal Species: A Retrospective Analysis	박승춘	“	2011	SCI	국외
10	Role of JAK2/STAT Signaling in Pneumococcal EstA Protein-Induced Inflammatory Response in RAW 264.7 Macrophages.	박승춘	Microb Pathog.	2011	SCI	국외
11	Inflammatory responses to <i>Mycoplasma hyopneumoniae</i> in murine alveolar macrophage cell lines.	박승춘	N Z Vet J.	2011	SCI	국외

No.	논문명	주저자	학술지명	활용 년도	SCI 구분	국내 외
12	Comparative pharmacokinetics of orbifloxacin following a single intravenous or oral administration to healthy and diabetic rats.	박승춘	SCANDINAVIAN JOURNAL OF LABORATORY ANIMAL SCIENCE. 2011,	2011	“	“
13	Comparative antitumor activity of different solvent fractions from <i>Auricularia auricula-judae</i> ethanol extract in P388D1 and sarcoma 180 cells	Md. Ahsanur Reza	Toxicological Research	2011	비SCI	국내
14	Mutant prevention concentration and phenotypic and molecular basis of fluoroquinolone resistance in clinical isolates and in vitro-selected mutants of <i>Escherichia coli</i> from dogs	Dereje Damte	Veterinary Microbiology	2012	SCI	국외

7. 국내 및 국제학술회의

No.	발표자	발표제목	일 시	장소
1	Md.Ahanur Reza	In vitro antitumor activity of solvent fractions from ethanol extract of Auricularia auricular-judae on tumor cell lines	2010.11	경주
2	Md.Ahanur Reza	In vitro antitumor activity of solvent fractions from ethanol extract of Auricularia auricular-judae on tumor cell lines	2010.10	제천
3	최명진	Effects of Fermented Rhus Verniciflua Extract on Atopic Dermatitis in DNCB-induced BALB/c Mice	2010.06	서울
4	박승춘	Immunomodulatory Activities and Sub-acute Toxicity of a Novel Beta-glucan from Paenibacillus Polymyxa JB115 in rats	2010.06	서울
5	장승희	Hepatoprotective effect of Yerba Mate (Ilex Paraguariensis) extract against carbon tetrachloride-induced liver damage in rats	2010.06	서울
6	조우식	Morphological Characteristics of Auricularia auricula-judae and Auricularia polytricha Mushrooms	2010.10	서울
7	조우식	Characterization of cultural conditions and antitumor activity of culinary-medicinal mushroom Auricularia auricular-judae	2011.10	크로아티아
8	Md.Ahanur Reza	Antitumor activity of dichloromethane fraction separated from Auricularia auricula-judae 70% ethanol extracts against human bronchioalveolar and gastr	2011.11	안성
9	Md.Ahanur Reza	Suppressive effects of 70% ethanolic Auricularia auricula-judae extract in adipogenesis and lipogenesis on 3T3-L1 preadipocytes.	2011.11	안성
10	조우식	목이버섯류 (Auricularia auricula-judae)의 배양특성 및 약리활성	2011.11	안성

8. 홍보실적

No.	홍보유형	매체명	제목	일시
1	월간잡지	월간새농사	목이버섯 인공재배 성공	2009.05.14
2	중앙일간지 , 지방TV	산림신문, 연합통신, 대구KBS	경주에서 동아시아버섯대회 유치	2010.11.09
3	중앙전문지	산림신문	경북산림비즈니스아카데미, 임업인력 양성	2011.11.10
4	지방일간지	매일신문	경북산림비즈니스아카데미, 임업인력 양성!	2011.11.09
5	지방TV	대구KBS, 대구TBC	2012 IBC 세계인명사전에 등재	2011.03.22
6	지방일간지	매일신문	대구시, 2013년도 농림사업	2011.03.30
7	지방TV방 송	대구KBS	내년도 농업,산림 23개 사업확정	2011.04.01

9. 전시회 등 참여

No.	유형	행사명칭	전시품목	장소	일시
1	전시회	2011경북농업대 축전	버섯류 (목이버섯 등)	구미	2011
2	전시회	버섯박람회 및 산 업배가 방안 심포 지엄	“	서울	2010
3	전시회	버섯박람회.심포 지엄	버섯실물 등	서울	2011
4	전시회	'한국의 버섯' 품 평회	“	서울	2009

10. 연구인력양성

No.	인력양성명	년도	인력양성대상수	비고
1	경북대학교 현장실습교육과정	2009	2	
2	경북대학교 현장실습교육과정	2010	3	
3	경북대학교 현장실습교육과정	2011	3	
4	경북대 대학원 박사(예정)	2012	1	수의학과

11. 기타활용실적(수상실적 등)

No.	수상명칭	년도	내용
1	세계인명사전등재(마르퀴즈)	2009	2010 Edition of Who's Who in the World 등재
2	세계인명사전등재	2010	영국 케임브리지 국제인명센터 IBC(International Biographical Center) 2010년 '21세기 탁월한 지식인 2,000명
3	세계인명사전등재(마르퀴즈)	2010	2011 Edition of Who's Who in the World 등재
4	우수논문 발표상	2011	한국버섯학회 추계학술대회
5	과학의날 포상	2011	과학의날 포상(국무총리) - 국립과학관, 과천 (2011.4.21)
6	세계인명사전등재(IBC)	2012	세계인명사전등재(IBC)

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

제1절 공무국외여행개요

1. 여 행 국 : 크로아티아 (자그레브)
2. 출장목적
 - 제6회 국제약용버섯학회 참석·구두발표.
 - 버섯연구의 국제동향파악, 연구정보수입
3. 출장인원 : 1명
 - 경북농업기술원 지방농업연구사 조우식
 - 참석인원 : 300여명
4. 출장기간 : 2011. 9. 24~10. 2.(9일간)
5. 주요업무 수행사항
 - 제6회 국제약용버섯학회참석·발표
6. 보고서 작성자 : 지방농업연구사 조우식

【 여행일정 】

월일	출발지	도착지	방문기관	업무수행내용	접촉예정인물
9.24(토)	인천	이스탄불		- 인천공항 출발	
9.25(일)		자그레브		- 크로아티아 자그레브 도착 - 학술회의 등록	Dr. Myco San
9.26(월) ~9.30(금)		"	학회장	- 6th International Medicinal Mushroom Conference 참석 - 정보 수집 활동 - 연구내용 발표(목이)	Solomon Wasser
10.1(토)		"	버섯유통시장	-버섯유통시장	
10.2(일)	자그레브 / 이스탄불	인천		- 크로아티아 출발 - 인천공항 도착	

【 주요 업무수행사항 】

1. 제6회 국제약용버섯학회참석·발표

- 기간 : 2011. 9. 24~ 10. 2.
- 장소 : 크로아티아 자그레브

○ 제6회 국제약용버섯학회 발표내용

가. 기조강연

- 약용버섯류 연구의 미래전망과 연구방향 (Dr. P. Wasser, 이스라엘) 등 18건 발표.
- 약용버섯류의 상업화 방안 (Ivan Jakopovich, 크로아티아)
- 약용버섯의 축산업에 이용 가능성 (Omon, 미국)

나. 구두발표

1) 버섯분류, 생태, 유전자

- 팽이버섯류의 유전자형 분석과 산업화 전망 (공원식, 한국)
- 야생 구름버섯의 유연관계 분석과 생물활성 (Stajic M)
- 야생 느타리버섯의 재배기술과 향미생물제제물의 생산 (L.I.Sudirman)
- 크로아티아의 검정 송로버섯 신종 보고 (R. Bozac, 크로아티아)

2) 영양적특성, 의약적효과

- 약용버섯 제재화를 통한 HIV 감염 치료 (Holliday, 미국)
- 양송이버섯, 표고버섯, 잎새버섯 추출물 α -defensins 의 내병활성 (S. Kuvibidila)
- 양생영지버섯류의 추출물의 약리활성 (Vikineswary, 러시아)
- 꽃송이버섯 추출물의 면역활성효과 (신현재, 한국)
- 외생균근류의 Polyamine (Sarjsrs, 독일)

3) 재배기술, 약용버섯생산물 이용

- 인도에서의 약용버섯류의 생산, 현재, 미래 연구방향 (B.L.Dhar)
- 목이버섯류의 균사생장 및 자실체의 특성 (조우식, 한국)
- 액체배양기술에 의한 약용버섯류의 지속적 재배기술 (M.Petre, 슬로베니아)
- 체코 느타리버섯류 재배기술 (C.Jaramillo)

4) 생리, 생화학, 유전학

- 약용버섯(Lentinus polychrous)에 의한 해바라기씨 리그닌의 생분해 (Manurakchinakorn, 태국)
- 약용버섯류에 의한 kelp(갈조류) 잔유물의 생물학적 변화(Yan P-S, 말레이시아)
- 표고버섯류의 새로운 생리활성물질 (M.A.L.Amazonas)
- 버섯과 건강: 아프리카에서의 약용버섯의 가능성 (K.E.Mshigeni, 탄자니아)
- 영지버섯 추출물 다당류의 항암효과 (A.V. Shnyreva)
- 광처리에 의한 버섯류의 비타민 D 증가 효과 (Saad. A, 미국)

○ 국내버섯연구에 도입할 사항

- 균근성버섯의 실용화(인공재배, 약리효과, 가공제품화 등)
- 버섯산물의 축산업에 활용성 제고.
- 버섯의 기능성·약리효과 분석, 검증
- 신종 약용버섯의 재배 및 육종기술.
- 재배, 가공, 판매, 수출을 병행하는 경영시스템 도입.
- 버섯재배를 관광농원화 사업으로 운영.

2. 문헌수집 etc.

- The 6th Meeting of International Medicinal Mushroom. 2011. 120p.

【학술교류인사】

1. S.P.Wasser. 이스라엘 하이파대학 교수.
2. D.V.Griensven. 네덜란드 버섯연구소 연구원.
3. F.Pohleven. 슬로베니아 류블레냐대학 교수.
4. L.Z.Qiang. 중국식품수출:식용균분야 부국장.
5. Ivan Jakopovich. 크로아티아 기업가(버섯무역)

【 사진으로 본 국제약용버섯학회(크로아티아) 】



접수대



개막식



포스터세션



야생버섯전시



버섯시장



구두발표장면

제 7 장 참고문헌

1. Comparative antitumor activity of different solvent fractions from an *Auricularia auricula-judae* ethanol extract in P388D1 and sarcoma 180 cells

Ait Mbarek, .L, Ait Mouse, H.,Elabbadi, N., Bensalah, M., Gamouh, A., Aboufatima, R., Benharref, A., Chait, A., Kamal, M., Dalal, A. and Zyad, A. (2007). Anti-tumor properties of blackseed (*Nigella sativa*L.) extracts. *Braz. J. Med. Biol.Res.*, 40, 839–847.

Chen, G., Luo, Y.C., Ji, B.P., Li, B., Guo, Y., Li, Y., Su, W. and Xiao, Z.L. (2008). Effect of polysaccharide from *Auricularia auricula* on blood lipid metabolism and lipoprotein lipase activity of ICR mice fed a cholesterol-enriched diet. *J. Food Sci.*, 73, H103–108.

Henriksson, E., Kjell n, E., Wahlberg, P., Wennerberg, J. and Kjellstr m, J.H. (2006). Differences in estimates of cisplatin-induced cell kill in vitro between colorimetric and cell count/colony assays. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Anim.*, 42, 320–323.

Jagetia, G.C. and Rao, S.K. (2006). Evaluation of cytotoxic effects of dichloromethane

extract of guduchi (*Tinospora cordifolia* Miers ex Hook F & THOMS) on cultured HeLa cells. *Evid Based Complement Alternat Med.*, 3:267–272.

Lee, Y.L., Kim, H.J., Lee, M.S., Kim, J.M., Han, J.S., Hong, E.K., Kwon, M.S. and Lee, M.J. (2003). Oral administration of *Agaricus blazei* (H1 strain) inhibited tumor growth in a sarcoma 180 inoculation model. *Exp. Anim.*, 52, 371–375.

Misaki, A., Kakuta, M., Sasaki, T., Tanaka, M. and Miyaji, H. (1981). Studies on interrelation of structure and anti-tumor effects of polysaccharides: antitumor action of periodate-modified, branched (1 goes to 3)-beta-D-glucan of *Auricularia auricula-judae*, and other polysaccharides containing (1 goes to 3)-glycosidic linkages. *Carbohydr. Res.*, 92, 115–129.

Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods.*, 65, 55–63.

Skehan, P., Storeng, R., Scudiero, D., Monks, A., McMahon, J., Vistica, D., Warren, J.T., Bokesch, H., Kenney, S. and Boyd, M.R. (1990). New colorimetric cytotoxicity assay for anti-cancer-drug screening. *J. Natl. Cancer Inst.*, 82, 1107–1112.

- Song, T.Y., Lin, H.C., Yang, N.C. and Hu, M.L. (2008). Antiproliferative and antimetastatic effects of the ethanolic extract of *Phellinus igniarius* (Linnaeus: Fries) Quelet. *J.Ethnopharmacol.*, 115,50–56.
- Wang, H., Li, A., Dong, X.P. and Xu, X.Y. (2008). Screening of anti-tumor parts from the seeds of *Livistona chinensis* and its anti-angiogenesis effect. *Zhong Yao Cai.*, 31, 718–722.
- Wasser, S.P. (2002). Medicinal mushrooms as a source of antitumor and immunomodulating polysaccharides. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 60, 258–274.
- Wasser, S.P. and Weis, A.L. (1999). Therapeutic effects of substances occurring in higher Basidiomycetes mushrooms: a modern perspective. *Crit. Rev. Immunol.*, 19, 65–96.
- Yoneda, T., Alsina, M.A., Chavez, J.B., Bonewald, L., Nishimura, R. and Mundy, G.R.(1991). Evidence that tumor necrosis factor plays a pathogenic role in the paraneoplastic syndromes of cachexia, hypercalcemia, and leukocytosis in a human tumor in nude mice. *J. Clin. Invest.*, 87, 977–985.
- Yoon, S.J., Yu, M.A., Pyun, Y.R., Hwang, J.K., Chu, D.C., Juneja, L.R. and Mourão, P.A. (2003). The nontoxic mushroom *Auricularia auricula* contains a polysaccharide with anticoagulant activity mediated by antithrombin. *Thromb. Res.*, 112, 151–158.

2. Anti-inflammatory activity of dichloromethane extract of *Auricularia auricula-judae* in RAW264.7 cells

- Abraham, G., Dovrat, S., Bessler, H., Grossman, S., Nir, U., and Bergman M. (2010). Inhibition of Inflammatory Cytokine Secretion by Plant-Derived Compounds Inuviscolide and Tomentosin: The Role of NF- κ B and STAT1. *The Open Pharmacology Journal.* 4, 36–44.
- Albina, J.L., Reichner, J.S. (1998). Role of nitric oxide mediation of macrophage cytotoxicity and apoptosis. *Cancer Metastasis Rev.*, 17, 39-53
- Bonizzi, G., Karin, M. (2004).The two NF- κ B activation pathways and their role in innate and adaptive immunity. *Trends Immunol.*, 25, 280-288.
- Boucher, J.L., Moali, C. and Tenu, J.P. (1999). Nitric oxide biosynthesis, nitric oxide synthase inhibitors and arginase competition for L-arginine utilization. *Cell Mol Life Sci.* 55, 1015-1028.
- Chowdhury, M.A., Abdellatif, K.R.A., Don, Y., Das, D., Suresh, M.R., Knaus, E.E. (2009). Synthesis of celecoxib analogues possessing a N-Difluoromethyl-1,2-dihydropyrid-2-one s-Lipoxygenase

pharmacophore: Biological evaluation as dual inhibitors of cyclooxygenases and 5-Lipoxygenase with anti-inflammatory activity. *J Med Chem.*, 52, 1525–1529.

Duffield, JS. (2003). The inflammatory macrophage: a story of Jekyll and Hyde. *Clin Sci.*, 104, 27–38.

Francia, C., Rapior, S., Courtecuisse, R., Siroux, Y. (1999). Current research findings on the effects of selected mushrooms on cardiovascular diseases. *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 1, 169–72.

Hyun, E., Bolla, M., Steinhoff, M., John, L.W, del Soldato P., Vergnolle N. (2004). Anti-inflammatory effects of nitric oxide-releasing hydrocortisone NCX 1022, in a murine model of contact dermatitis. *British Journal of Pharmacology*, 143, 618–625.

Ikekawa T., Uehara N., Maeda, Y., Nakanishi M., Fukuoka, F. (1969). Antitumor activity of aqueous extracts of edible mushrooms. *Cancer Research*, 29, 734–5.

Kiemer AK, Müller C, Vollmar AM. (2002). Inhibition of LPS-induced nitric oxide and TNF- α production by alpha-lipoic acid in rat Kupffer cells and in RAW 264.7 murine macrophages. *Immunol Cell Biol.*, 80, 550–7.

Krakauer, T. (2004). Molecular therapeutic targets in inflammation, cyclooxygenase and NF- κ B. *Curr Drug Targets*, 3, 317–324.

Misaki, A., Kakuta, M., Sasaki, T., Tanaka, M., Miyaji, H. (1981). Studies on interrelation of structure and antitumor effects of polysaccharides: antitumor action of periodate-modified, branched (1 \rightarrow 3)- β -D-glucan of *Auricularia auricula-judae*, and other polysaccharides containing (1 \rightarrow)-glycosidic linkages. *Carbohydrate Research*, 92, 115–29.

Murakami, A., Takahashi, D., Hagihara, K. (2003). Combinatorial effects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs and food constituents on production of prostaglandin E2 and tumor necrosis factor alpha in RAW264.7 murine macrophages. *Biosci Biotechnol Biochem.*, 67, 1056–1062

Nathan, C. and Xie, QW. (1994). Nitric oxide synthases: roles, tolls, and controls. *Cell*, 78, 15–918.

Numata M, Suzuki S, Miyazawa N, Miyashita A, Nagashima Y, Inoue S, Kaneko T, Okubo T. (1998). Inhibition of inducible nitric oxide synthase prevents LPS-induced acute lung injury in dogs. *J Immunol.*, 160, 3031–7.

Verma N, Tripathi SK, Sahu D, Das HR, Das RH. (2010) Evaluation of inhibitory activities of plant extracts on production of LPS-stimulated

pro-inflammatory mediators in J774 murine macrophages. *Mol Cell Biochem.*, 336, 127–35.

Wu, LC., Fan, NC., Lin, MH., Chu, IR., Huang, SJ., Hu, CY., Han, SY. (2008). Anti-inflammatory effect of spilanthol from *Spilanthes acmella* on murine macrophage by down-regulating LPS-induced inflammatory mediators. *J Agric Food Chem.* 56, 2341–9.

Yoona, S., Yub, M., Pyunb, Y., Hwangb, J., Chuc, D., Juneja, L., Mourão, P.A.S. (2003). The nontoxic mushroom *Auricularia auricula* contains a polysaccharide with anticoagulant activity mediated by antithrombin. *Thrombosis Research*, 112 , 151-8.

Yuan, Z., He, P., Cui, J., Takeuchi, H. (1998). Hypoglycemic effect of water-soluble polysaccharide from *Auricularia auricula-judae* Quel. on genetically diabetic KK-Ay mice. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 62, 1898-1903.

Zhang, G., Ghosh, S. (2000). Molecular mechanisms of NF- κ B activation induced by bacterial lipopolysaccharide through Toll like receptors. *J Endotoxin Res.*, 6, 453-457.

3. Comparative antitumor activity of *Auricularia auricula-judae* extracts against tumor cells in vitro

1.Cragg GM, Newman DJ. Plants as a source of anticancer agents. *J Ethnopharm.* 2005 Aug100 (1–2): 72–79.

2.Wasser SP, Weis AL. Therapeutic effects of substances occurring in higher Basidiomycetes mushrooms: a modern perspective. *Crit Rev Immunol.* 199919(1): 65–96.

3.Clark DA, Adams MC. A commercial nutraceutical mix metabolic cell-supports (MC-S[TM]) inhibits proliferation of cancer cell lines in vitro. *Aust J Med Herbalism.* 2009 Jun21(2): 39–43.

4.Gregory FJ, Healy EM, Agersborg J, Warren GH. Studies of antitumor substances produced by Basidiomycetes. *Mycologia*, 1966 Jan–Feb58(1): 80–90.

5.Mizuno T. The extraction and development of antitumor active polysaccharides from medicinal mushrooms in Japan (review). *Int J Med Mushr.* 19991: 9–29.

6.Chang ST. Global impact of edible and medicinal mushrooms on human welfare in the 21st century: nongreen revolution. *Int J Med Mushr.* 19991:

1-7.

7. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*. 1983 Dec 1665(1-2): 55-63.

8. Ma Z, Wang J, Zhang L. Structure and chain conformation of β -glucan isolated from *Auricularia auricula-judae*. *Biopolymers*. 2008 Jul 89(7): 614-22.

9. Chen G, Luo YC, Ji BP, Li B, Su W, Xiao ZL, Zhang GZ. Hypocholesterolemic effects of *Auricularia auricula* ethanol extract in ICR mice fed a cholesterol-enriched diet. *J Food Sci Technol*. 2011 Nov-Dec 48(6): 692-98.

10. Gilbert FA, Robinson RF. Food from fungi. *Economic Botany*. 1957 April 11(2): 126-45.

11. Yuan Z, He P, Cui J, Takeuchi H. Hypoglycemic effect of water-soluble polysaccharide from *Auricularia auricula-judae* Quel. On genetically diabetic KK-Ay mice. *Biosci Biotechnol Biochem*. 1998 Oct 62(10): 1898-03.

12. Chang JS, Kim HJ, Bae JT, Park SH, Kim SE, Kim OM. Inhibition effects of *Auricularia auricula-judae* methanol extract on lipid peroxidation and liver damage in benzo (α) pyrene treated mice. *J. Kr. Soc. Food Sci. Nutr*. 1998 27: 712-17.

13. Yoon SJ, Yu MA, Pyun YR, Hwang JK, Chu DC, Juneja LR, Mourao PA. The nontoxic mushroom *Auricularia auricula* contains a polysaccharide with anticoagulant activity mediated by antithrombin. *Thrombosis Res*. 2003 112(3): 151-58.

14. Jeong SC, Cho SP, Yang BK, Gu YA, Jang JH, Huh TL, Song CH. Production of an anti-complement exo-polymer produced by *Auricularia auricula-judae* in submerged culture. *Biotechnol Lett*. 2004 26(11): 923-7.

15. Chen G, Luo YC, Li BP, Li B, Guo Y, Li Y, Su W, Xiao ZL. Effect of polysaccharide from *Auricularia auricula* on blood lipid metabolism and lipoprotein lipase activity of ICR mice fed a cholesterol-enriched diet. *J Food Sci*. 2008 Aug 73(6): H103-8.

16. Asatiani MD, Elisashyili V, Reznick A, Nevo E. Antioxidant activity of submerged cultured mycelium extracts of higher Basidiomycetes mushrooms. *Int J Med Mushr*. 2007 9(2): 151-58.

17. Luo Y, Chen G, Li B, Ji B, Guo Y, Tian F. Evaluation of antioxidant and hypolipidemic properties of a novel functional diet formulation of *Auricularia auricula* and Hawthorn. *Innovative Food Science and Emerging*

- Technologies. 2009 April10(2):215–21.
18. Ye TM, Sun LN, Su F, Shen J, Wang HP, Ye ZG, Xia Q. Study of the effects of *Auricularia auricula* polysaccharide on local ischemia/reperfusion injury in rat. *Zhongguo Ying Yong Sheng Li Xue Za Zhi*. 2010 Nov 26(4): 423–6.
19. Misaki A, Kakuta M, Sasaki T, Tanaka M, Miyaji H. Studies on interrelation of structure and anti-tumor effects of polysaccharides: antitumor action of periodate-modified, branched (1 goes to 3)-beta-D-glucan of *Auricularia auricula-judae*, and other polysaccharides containing (1 goes to 3)-glycosidic linkages. *Carbohydrate Res*. 1981 May92(1): 115–29.
20. Ait Mbarek L, Ait Mouse H, Elabbadi N, Bensalah M, Gamouh A, Aboufatima R, Benharref A, Chait A, Kamal M, Dala A, Zyad A. Anti-tumor properties of blackseed (*Nigella sativa* L.) extracts. *Braz J Med Biol Res*. 2007 Jun40(6): 839–47.
21. Conklin C M, Bechberger JF, MacFabe D, Guthrie N, Kurowska EM, Naus CC. Genistein and quercetin increase connexin43 and suppress growth of breast cancer cells. *Carcinogenesis*. 2007 Jan28(1): 93–100.
22. Liu YW, Gao JL, Guan J, Qian ZM, Feng K, Li SP. Evaluation of antiproliferative activities and action mechanisms of extracts from two species of *Ganoderma* on tumor cell lines. *J Agric Food Chem*. 2009 April 2257(8): 3087–93.
23. Bae JS, Jang KH, Yim H, Jin HK. Polysaccharides isolated from *Phellinus gilvus* inhibit melanoma growth in mice. *Cancer Lett*. 2005 Jan 31 218(1): 43–52.
24. Ma Z, Wang J, Zhang L, Zhang Y, Ding K. Evaluation of water soluble β -D-glucan from *Auricularia auricula-judae* as potential antitumor agent. *Carbohydrate Polymers*. 2010May 580(3):977–83.
25. Mizuno T, Saito H, Nishitoba T, Kawagishi HK. Antitumor active substances from mushrooms. *Food Rev Int*. 1995 11(1): 23–61.
26. Reynaud J, Lussignol M. The flavonoids of *Lotus corniculatus*. *Lotus Newslett*. 200535(1): 75–82.
27. Sharma V, Joseph C, Ghosh S, Agawal A, Mishra M K, Sen E. Kaempferol induced apoptosis in glioblastoma cells through oxidative stress. *Mol Cancer Ther*. 2007 Sept6(9): 2544–53.
28. Bae JH, Kim JY, Kim MJ, Chang SH, Park YS, Son CH, Park SJ, Chung JS, Lee EY, Kim SH, Kang CD. Quercetin enhances susceptibility to NK

cell-mediated lysis of tumor cells through induction of NKG2D ligands and suppression of HSP70. *J. Immunother.* 2010 May 33(4): 391–401.

29. Hoang DM, Ngoc TM, Dat NT, Ha DT, Kim YH, Luong HV, Ahn JS, Bae KH. Protein tyrosine phosphatase 1B inhibitors isolated from *Morus bombycis*. *Bioorg Med Chem Lett.* 2009 Dec 119(23): 6759–61.

4. In vitro antitumor and antioxidant activities of dichloromethane fraction of *Auricularia auricula-judae* 70% ethanol extracts

Acharya K, Samui K, Rai M, Dutta BB and Acharya R. 2004. Antioxidant and nitric oxide synthase activation properties of *Auricularia auricula*. *Indian J Exp Biol* 42: 538–540.

Chang JS, Kim HJ, Bae JT, Park SH, Kim SE, Kim OM. 1998. Inhibition effects of *Auricularia auricula-judae* methanol extract on lipid peroxidation and liver damage in benzo (α) pyrene treated mice. *J Kr Soc Food Sci Nutr* 27: 712–717.

Chang ZQ, Gebru E, Lee SP, Rhee MH, Kim JC, Cheng H, Park SC. 2011. In vitro antioxidant and anti-inflammatory activities of protocathechualdehyde isolated from *Phellinus gilvus*. *J Nutr Sci Vitaminol* 57: 118–122.

Chen G, Luo YC, Ji BP, Li B, Su W, Xiao ZL, Zhang GZ. 2011. Hypocholesterolemic effects of *Auricularia auricula* ethanol extract in ICR mice fed a cholesterol-enriched diet. *J Food Sci Technol* 48: 692–698.

Chen G, Luo YC, Ji BP, Li B, Guo Y, Li Y, Su W, Xiao ZL. 2008. Effect of polysaccharide from *Auricularia auricula* on blood lipid metabolism and lipoprotein lipase activity of ICR mice fed a cholesterol-enriched diet. *J Food Sci* 73: H103–H108.

Chen J, Sun Z, Zhang Y, Zeng X, Qing C, Liu J, Li L, Zhang H. 2009. Synthesis of gibberellin derivatives with anti-tumor bioactivities. *Bioorg Med Chem Lett* 19: 5496–5499.

Emanuel NM, Konovalova NP, Djachkovskaya RF. 1976. Antitumor activity of 1,2-bis diazoacetyl ethane. *Cancer Treat Rep* 60: 1601–1604.

Fan L, Zhang S, Yu L, Ma L. 2007. Evaluation of antioxidant property and quality of breads containing *Auricularia auricula* polysaccharide flour. *Food Chem* 101: 1158–1163.

Fadeyi OO, Obafemi CA, Adewunmi CO, Iwalewa EO. 2004. Antipyretic,

analgesic, anti-inflammatory and cytotoxic effects of four derivatives of salicylic acid and anthranilic acid in mice and rats. *Afr J Biotechnol* 3: 426–431.

Fukazawa T, Fujiwara T, Uno F, Teraishi F, Kadowaki Y, Itoshima T, Takata Y, Kagawa S, Roth JA, Tschopp J, Tanaka N. 2001. Accelerated degradation of cellular FLIP protein through the ubiquitin–proteasome pathway in p53–mediated apoptosis of human cancer. *Oncogene* 20: 5225–5231.

Giaccone G. 2002. Targeted therapy in non–small cell lung cancer. *Lung Cancer* 38: 29–32.

Gonalo M, Figueiredo A, Tavares P, Ribeiro CA, Teixeira F, Baptista AP. 1992. Photosensitivity to piroxicam: absence of cross–reaction with tenoxicam. *Contact Dermatitis* 27: 287–290.

Goncharova SA, Konovalova NP, Shevtsova VN. 1980. Effect of diazane on the mitotic cycle of transplantable leukemia LA in mice. *Vopr Onkol* 26: 59–63.

Hlörtner H, Schmitt S, Cui F, Barnes HM. 2009. The chemical and biological properties of polymeric betaine. International Research Group on wood protection 40th Annual Meeting, Beijing, China. IRG/WP 09–30512.

Hwang BY, Kim HS, Lee JH, Hong YS, Ro JS, Lee KS, Lee JJ. 2001. Antioxidant benzoylated flavan–3–ol glycoside from *Celastrus orbiculatus*. *J Nat Prod* 64: 82–84.

Janku F, Stewart DJ, Kurzrock R. 2010. Targeted therapy in non–small–cell lung cancer–is it becoming a reality? *Nat Rev Clin Oncol* 7: 401–414.

Jayakannan M, Babourina O, Rengel Z. 2011. Improved measurements of Na⁺ fluxes in plants using calixarene–based microelectrodes. *J Plant Physiol* 168:1045–1051.

Kim J, Park S, Nam BH. 2010. Gastric cancer and salt preference: a population–based cohort study in Korea. *Am J Clin Nutr* 91: 1289–1293.

Kluck RM, Bossy–Wetzel E, Green DR, Newmeyer DD. 1997. The release of cytochrome c from mitochondria: a primary site for Bcl–2 regulation of apoptosis. *Science* 275:1132–1136.

Kluza J, Marchetti P, Gallego MA, Lancel S, Fournier C, Loyens A, Beauvillain JC, Bailly C. 2004. Mitochondrial proliferation during apoptosis induced by anticancer agents: effects of doxorubicin and mitoxantrone on cancer and cardiac cells. *Oncogene* 23: 7018–7030.

- Langer CJ. 2004. EGFR inhibitors Emerging role of epidermal growth factor receptor inhibition in therapy for advanced malignancy: focus on NSCLC. *Int J Radiat Oncol BiolPhys* 58: 991–1002.
- Lee SH, Hwang HS, Yun JW. 2009. Antitumor activity of water extract of a mushroom, *Inonotus obliquus*, against HT-29 human colon cancer cells. *Phytother Res* 23: 1784–1789.
- Litvinchuk MD, Gařduk RI, Kit VI. 1979. Spasmolytic properties of pyrrolizidine alkaloids. *Farmakol toksikol* 42: 509–511.
- Luo Y, Chen G, Li B, Guo Y and Tian F. 2009. Evaluation of antioxidative and hypolipidemic properties of a novel functional diet formulation of *Auricularia auricula* and Hawthorn. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 10: 215–221.
- Ma Z, Wang J, Zhang L, Zhang Y, Ding K. 2010. Evaluation of water soluble β -D-glucan from *Auricularia auricula-judae* as potential anti-tumor agent. *Carbohydrate Polymers* 8: 977–983.
- McDowell A, Thompson S, Stark M, Ou ZQ, Gould KS. 2011. Antioxidant activity of Puha (*Sonchus oleraceus* L.) as assessed by cellular antioxidant activity (CAA) assay. *Phytother Res* 25: 1876–1882.
- Misaki A, Kakuta M, Sasaki T, Tanaka M, Miyaji H. 1981. Studies on interrelation of structure and antitumor effects of polysaccharides: antitumor action of periodate-modified, branched (1 goes to 3)-beta-D-glucan of *Auricularia auricula-judae*, and other polysaccharides containing (1 goes to 3)-glycosidic linkages. *Carbohydr Res* 92: 115–129.
- Mosmann T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 65: 55–63.
- Olubunmi A, Gabriel OA. 2010. Epicuticular wax and volatiles of *Kigelia pinnata* Leaf Extract. *Ethnobotanical Leaflets* 14: 797–806.
- Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. 2005. Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin* 55: 74–108.
- Polyak K, Waldman T, He TC, Kinzler KW, Vogelstein B. 1996. Genetic determinants of p53-induced apoptosis and growth arrest. *Genes Dev* 10: 1945–1952.
- Ratnam DV, Ankola DD, Bhardwaj V, Sahana DK, Kumar M. 2006. Role of antioxidants in prophylaxis and therapy: A pharmaceutical perspective. *J Control Release* 113: 189–207

- Reza A, Choi MJ, Damte D, Jo WS, Lee SJ, Lee JS, Park SC. 2011. Comparative antitumor activity of different solvent fractions from an *Auricularia auricula-judae* ethanol extract in P388D1 and sarcoma 180 cells. *Toxicol Res* 27: 77–83.
- Rizvi SH, Kapil RS, Shoeb A. 1985. Alkaloids and coumarins of *Casimiria*. *J Nat Prod* 48:146.
- Ruch RJ, Chug SU, Klaunig JE. 1984. Spin trapping of superoxide and hydroxyl radicals. *Methods Enzymol* 105: 198–209.
- Shamaev VI, Krutova TV, D'yachkovskaya RF, Korman DB, Shkrob OS, Kuznetsov NA. 1981. The effect of diazane on the proliferation of human tumor cells. *Biol Bull Acad Sci USSR* 8: 171–176.
- Song WS, Jun DY, Kim JS, Park HS, Kim JG, Seu YB, Bae YS, Yang CH, Woo MH, Kim YH. 2007. Suppressive effect of ethyl acetate extract of *Paecilomyces japonica* on cell cycle progression of human acute leukemia Jurkat T cell clone overexpressing Bcl-2. *Food Chem* 100: 99–107.
- Sun J, Chu YF, Wu X, Liu RH. 2002. Antioxidant and antiproliferative activities of common fruits. *J Agric Food Chem* 50: 7449–7454.
- Wang H, Li A, Dong XP, Xu XY. 2008. Screening of anti-tumor parts from the seeds of *Livistona chinensis* and its anti-angiogenesis effect. *Zhong Yao Cai* 31. 718–722.
- Wasser SP. 2002. Medicinal mushrooms as a source of antitumor and immunomodulating polysaccharides. *Appl Microbiol Biotechnol* 60: 258–274.
- Yamamoto S. 2001. Stomach cancer incidence in the world. *Jpn J Clin Oncol* 31: 471–475.
- Yoon MA, Jeong TS, Park DS, Xu MZ, Oh HW, Song KB, Lee WS, Park HY. 2006. Antioxidant Effects of Quinoline Alkaloids and 2,4-Di-tert-butylphenol isolated from *Scolopendra subspinipes*. *Biol Pharm Bull* 29: 735–739.
- Yoon SJ, Yu MA, Pyun YR, Hwang JK, Chu DC, Juneja LR, Mourão PAS. 2003. Nontoxic mushroom *Auricularia auricula* contains a polysaccharide with anticoagulant activity mediated by antithrombin. *Thromb Res* 112: 151–158.
- Yuan Z, He P, Cui J, Takeuchi H. 1998. Hypoglycemic effect of water-soluble polysaccharide from fruiting bodies of *Auricularia auricula-judae* Quel. on genetically diabetic KK-Ay mice. *Biosci Biotechnol Biochem* 62: 1898–1903.
- Zhang H, Wang ZY, Zhang Z, Wang X. 2011. Purified *Auricularia*

- auricula-judae polysaccharide (AAPI-a) prevents oxidative stress in an ageing mouse model. *Carbohydrate Polymers* 84: 638-648.
- Zhang Y, Zhang H, Chen J, Zhao H, Zeng X, Zhang H, Qing C. 2012. Antitumor and antiangiogenic effects of GA-13315, a gibberellin derivative. *Invest New Drugs* 30:8-16.
- Zeng XY, Li YD, He F, Chen LL, Lin MD. 1994. Pharmacological actions of hyphae body of *Auricularia auricula*(L.ex Hook) underw and its alcoholic extract. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi* 19: 430-2, 448.
- 박완희, 이호득. 1991. 원색도감 한국의 버섯. 교학사. 504p.
- 성재모, 유영복, 차동열. 2000. 버섯학 (MUSHROOM SCIENCE). 교학사. 614p.
- 이송애, 정경수, 심미자, 최응철, 김병각. 1981. 한국산 담자균류의 항암성분에 관한 연구(II), 치마버섯과 목이버섯의 항암성분. *한국균학회지*. 9(1): 25-29.
- 홍재식, 권용주, 정기태. 1983. 담자균에 관한 연구 (2) 느타리와 목이의 진탕 배양에 의한 균사체 생산에 관하여. *한국균학회지*. 11(1):1-7.
- 한기학. 1988. 토양이화학분석법. 농촌진흥청. pp 26-214.
- Chen, Q. 1989. Antilipemic effect of polysaccharides from *Auricularia auricula*, *Tremella fuciformis*, and *Tremella fuciformis* spores. *Zhongguo Yaoke Daxue Xuebae*. 20:344-347.
- Cheung, P. C. K. 1996. The hypocholesterolemic effect of two edible mushrooms: *Auricularia auricular* (tree-ear) and *Tremella fuciformis* (white jelly-leaf) in hypercholesterolemic rats. *Nutr Res*. 16(10):1721-1725.
- Misaki, A. and Kakuta, M. 1995. Kikurage(tree-ear) and shirokikurage(white jelly-leaf): *Auricularia auricular* and *Tremella fuciformis*. *Food Rev Int*. 11(1):219-224.
- Chang, S. T. 1996. Mushroom research and development equality and mutual benefit, pp. 1-10. PennsylvaniaStateUniversityPress,USA.
- Royse, D. J. 1997. Specialty mushrooms and their cultivation. *Horticult Rev*. 19:59-97.
- Chen, Q. 1989. Antilipemic effect of polysaccharides from *Auricularia auricula*, *Tremella fuciformis*, and *Tremella fuciformis* spores. *Zhongguo Yaoke Daxue Xuebae*. 20:344-347.
- Cheung, P. C. K. 1996. The hypocholesterolemic effect of two edible

- mushrooms: *Auricularia auricular* (tree-ear) and *Tremella fuciformis* (white jelly-leaf) in hypercholesterolemic rats. *Nutr Res.* 16(10):1721-1725.
- Misaki, A. and Kakuta, M. 1995. Kikurage(tree-ear) and shirokikurage(white jelly-leaf): *Auricularia auricular* and *Tremella fuciformis*. *Food Rev Int.* 11(1):219-224.
- Abraham, L., Hoffman, B., Gao, Y. and Breuil, C. 1998. Action of *Ophiostoma piceae* proteinase and lipase on wood nutrients. *Can. J. Microbiol.* 44:698-701.
- Shin, D. S., Lee, H. H., Lim, K. P., Cho, N. S. and Cho, B. M. 1991. Chemistry of Forest Product, pp.121-122. Haeng Mun Sa, Seoul.
- Hashimoto, K. 1972. Biochemical studies on the mushroom. *Toyo Shokuhin Kenkyusho Kenkyu Hokukusho.* 10:163.
- Hong, J. S., Uhm, T. B., Jung, G. T. and Lee, K. B. 1984. Studies on the enzymes produced by *Pleurotus sojor-caju*. *Kor. J. Mycol.* 12:59-64.
- Park, W. H., Kim, T. H. and Ro, I.H. 1986. Studies on enzymes of the higher fungiof Korea (II): identification of cellulolytic enzyme in *Lenzites betulina*. *Kor. J. Mycol.* 14:225-229.
- Castro, G. R., Ferrero, M. A., Mendez, B. S. and Sineriz, F. 1993. Screening and selection of bacteria with high amyolytic activity. *Acta Biotechnol.* 13:197-201.
- Hejgaard, J. and Gibbons, G. C. 1979. Screening for alpha-amylase in cereals: improved gel-diffusion assay a dye-labelled starch substrate. *Carlsberg Res. Commun.* 44:21-25.
- Yoon, J. H., Park, J. E., Suh, D. Y., Hong, S. B., Ko, S. J. and Kim, S. H. 2007. Comparison of dyes for easy detection of extracellular cellulases in fungi. *Mycobiology* 35:21-24.
- Hyun, M. W., Yoon, J. H., Park, W. H. and Kim, S. H. 2006. Detection of cellulolytic activity in *ophiostoma* and *leptographium* species by chromogenic reaction. *Mycobiology* 34:108-110.

주 의

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