

혈당강하와 치매예방 기능을 가진  
버섯배양곡물 개발 및 가공제품화

Development of Basidiomycetes-fermented  
Cereals with Hypoglycemic and Anti-dementia  
Property and Their Products

2003. 9.

연 구 기 관  
한국식품개발연구원

농 립 부

# 제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “혈당강하와 치매예방 기능을 가진 버섯배양곡물 개발 및 가공 제품화“ 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2003년 9월 4일

주관연구기관명 : 한국식품개발연구원

총괄연구책임자 : 최 희 돈

세부연구책임자 : 박 용 곤

세부연구책임자 : 최 인 옥

연 구 원 : 김 흥 만

연 구 원 : 김 성 란

연 구 원 : 윤 혜 숙

연 구 원 : 송 임

협동연구기관명 : 영 남 대 학 교

협동연구책임자 : 김 정 애

연 구 원 : 이 재 성

연 구 조 원 : 김 대 경

연 구 조 원 : 박 병 철

# 요 약 문

## I. 제목

혈당강하와 치매예방 기능을 가진 버섯배양곡물 개발 및 가공제품화

## II. 연구개발의 목적 및 필요성

당뇨병은 고혈당 자체 보다는 고혈당에 의한 동맥경화, 고콜레스테롤혈증, 백내장, 심근경색, 신경병증 등의 합병증이 매우 심각하기 때문에 당뇨병환자들은 식후의 혈당상승을 억제하기 위해 식이에 극도의 주의를 기울이는 등 인간의 기본적인 욕구가 제한되어 삶의 질이 저하되고 수명이 단축되는 등 사회적으로 큰 문제가 되며, 또한 인간의 평균수명이 연장됨에 따라 유병기간이 증가하여 당뇨병환자의 수가 급속히 증가하는 추세이기 때문에 향후 더욱 큰 사회문제가 될 수 있다.

또한 고령화 사회로 진입하면서 노인성 치매 환자의 수는 급증하고 있지만 사회구조의 변화, 여성의 사회참여 확대 등으로 배우자나 가족이 치매 환자를 돌볼 수 없으며, 24시간 보호수발이 필요한 질병이기 때문에 부양가족의 극도의 육체적, 정신적 피로 및 막대한 진료비 등 치매가 단순히 한 개인의 문제가 아니라 국가 전체의 사회적인 차원에서 그 대책이 요구된다.

따라서 혈당강하와 치매예방 기능을 갖는 버섯균을 특정 곡물에 고체배양한 버섯배양 곡물의 개발, 보급은 우리나라는 물론 국제적인 고령화 시대의 사회문제에 대한 적절한 대처방안의 하나가 될 것이다.

## III. 연구개발의 내용 및 범위

### 1. 혈당강하와 치매예방 기능 버섯균 및 버섯배양곡물 탐색

- 버섯 균사체 배양 및 추출물 제조

- 버섯배양곡물 제조 및 추출물 제조
- 균사체 및 버섯배양곡물의 혈당강하와 치매예방 기능성 조사
  - 혈당강하
    - . 쥐 소장점막  $\alpha$ -glucosidase에 대한 저해활성 조사
    - . *In vitro*에서의 포도당 투과지연 효과 조사
    - . 당부하 시험
  - 치매예방
    - .  $\beta$ -amyloid에 의한 신경세포 생존률 감소 억제 효과
    - .  $\beta$ -amyloid에 의한 신경세포의 활성산소종 생성 및 지질과산화 억제 효과 조사

## 2. 혈당강하와 치매예방 기능 버섯배양곡물의 *in vivo* 상에서의 기능성 확인

- 버섯배양곡물 제조
- 버섯배양곡물의 혈당강하와 치매예방 기능성 조사
  - 혈당강하 : 정상쥐와 당뇨쥐에 대한 혈당강하 및 혈액의 지질대사 등에 미치는 영향
  - 치매예방 : 치매유도쥐 뇌조직의 신경섬유 다발 형성 및 염증과정에 대한 예방 및 억제 효과

## 3. 버섯배양곡물의 최적 제조조건 확립 및 식품학적 특성 조사

- 고체배양을 위한 곡물의 전처리 조건 설정
  - 현미, 콩, 보리, 울무, 팥
  - 곡물의 적정 수분함량 및 살균조건 설정
- 버섯균 고체배양 조건 최적화
  - 기질조건, 온도 등 배양조건 설정
- 배양기간별 버섯배양곡물의 이화학적 및 취반특성 조사

#### 4. 버섯배양곡물의 식품 소재화 및 가공제품 개발

- 활성획분의 특성 조사
  - 활성획분의 이화학적 특성
  - 활성획분의 가공적성
- 버섯배양곡물을 이용한 가공제품 개발
  - 차류제품 및 선식중간소재
  - 장류제품

### IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

#### 1. 혈당강하 기능 버섯균 및 버섯배양곡물 탐색

대표적인  $\alpha$ -glucosidase 저해제인 acarbose를 기준물질로 하여 버섯균사 추출물(1mg/mL)의  $\alpha$ -glucosidase에 대한 저해율을 조사한 결과 대부분의 버섯균사 추출물이  $\alpha$ -glucosidase에 대한 저해효과를 나타내지 않았다. 균사체의 포도당의 투석막을 통한 투과속도에 미치는 영향을 조사하기 위하여 균사체 존재시 투석막 내의 포도당이 투석막 외액으로 확산되는 정도를 대표적인 수용성 식이 섬유인 pectin, guar gum과 비교한 결과 균사체의 경우 전체 포도당 중 13.1~41.8%의 포도당이 투석막 내액에 잔존하는 것으로 나타나 대부분의 균사가 pectin과 guar gum 보다 포도당의 투석막 밖으로의 투과를 지연시키는 효과가 있음을 알 수 있었다. 특히 *Phellinus linteus*의 경우 전체 포도당 중 41.8%의 포도당이 투석막 내액에 잔존하는 것으로 나타나 그 효과가 가장 컸다. 당뇨쥐를 대상으로 균사체의 *in vivo*에서의 식후 혈당상승 억제 효과를 조사한 결과 버섯균사체가 pectin 보다 식후 혈당상승을 억제하는 효과가 월등히 우수하였으며, 특히 *Phellinus linteus*와 *Paecilomyces japonica*의 경우 30분 경과시 각각 145.7%와 143.2%로 기타 균사체에 비해서도 다소 낮은 식후 혈당값을 나타내었고 120분 경과시에는 95.4~104.1%로 맥아당 투여전의 초기 혈당 값으로 낮아진 것으로 나타나 이들 균주가 식후 혈당상승 억제 효과가 매우 우수함을 알 수 있었다. *Paecilomyces japonica*로 배양한 버섯배양쌀의 혈당강하 효능을 확인하기 위하여 당뇨쥐를 이용하여 동물실험한 결과 버섯배양쌀이 당뇨쥐의 혈당과 콜레스테

를 떨어뜨려 당뇨병을 크게 개선시킬 수 있는 것으로 나타났다.

## 2. 치매예방 기능 버섯균 및 버섯배양곡물 탐색

인간 뇌세포주에 치매의 원인물질인  $\beta$ -amyloid peptide( $\beta$ A)를 처리하여 노인성 치매의 신경 독성을 유발하고 이를 차단하는 버섯류를 탐색하기 위하여 균사체 추출물의 신경세포 생존률 감소에 대한 억제효능 및  $\beta$ A에 의한 신경세포의 독성 발현의 검증을 위하여 활성산소종 생성 및 지질과산화 정도를 억제하는 효능을 검색하였다. 신경세포 생존률 조사 결과 *Cordyceps ophioglossoides*, *Peniophora quercuna*, *Hypocrea citrina* var. *citrina*가 84~92%의 생존률을 나타내어  $\beta$ A의 독성을 현저하게 감소시킴을 확인하였다. 또한  $\beta$ A에 의한 활성산소종 생성 및 지질과산화에 대한 억제 효과를 조사한 결과  $\beta$ A에 의한 활성산소종 생성은 대조군에 비해 23%의 증가를 보였는데, 특히 *Cordyceps ophioglossoides*의 추출물로 처리하였을 경우 활성산소종 생성이 유의적으로 감소되는 경향을 보였다. *Cordyceps ophioglossoides*의 추출물의 기능성 물질에 대한 물리화학적 특성을 규명하기 위해 추출물 분획에 대한 활성을 조사한 결과, 물분획, 클로로포름 분획 및 핵산 분획에서는  $\beta$ A의 독성을 감소시키지 못하였으나, 부탄올 분획의 경우  $\beta$ A의 독성 (55%의 세포생존률)을 현저하게 감소시킴을 확인하였다 (약 70% 세포생존률). 이와 같이 치매의 원인물질인  $\beta$ A에 대한 생리활성물질을 함유한 *Cordyceps ophioglossoides*를 보리에 배양한 배양곡물이 쥐의 뇌에  $\beta$ A를 처리하여 만든 알츠하이머 동물 모델에서 기억력 감퇴에 대한 억제효능을 조사한 결과  $\beta$ A에 의한 뇌의 조직병리학적 병변이 억제됨과 동시에 기억력 감퇴에 대한 억제효능을 확인하여 노인성 치매를 예방 및 치료 기능을 갖는 버섯 배양 곡물을 도출하였다.

## 3. 버섯배양곡물의 최적 제조조건 확립 및 식품학적 특성 조사

현미, 보리, 콩, 울무, 팥 등의 곡물을 고체배양의 재료로 하여 대량 배양할 때 적합한 수분함량을 설정하기 위하여 비닐봉지에 수침하여 수분함량이 평형에 도달한 곡물을 담고 고압살균하여 살균 전후의 수분함량 변화를 조사한 결과 살균

후 모든 원료에서 수분함량이 감소하였고 특히 현미의 수분감소량이 상대적으로 많았으며 따라서 버섯배양시 고압살균후 감소되는 수분량을 고려하여 그에 적절한 배양방법이 강구되어야 함을 알 수 있었다. 버섯배양곡물 제조를 위한 살균조건을 확립하기 위하여 비닐봉지에 수침한 곡물을 양을 달리하여 담고 여러 가지 고압살균 조건으로 열처리한 후 배양하여 성장정도, 오염정도 등을 조사하여 각 곡물에 적합한 단위포장과 적정 살균조건을 설정하였다. 확립된 침지조건, 곡물의 양, 적정 살균조건을 토대로 *Paecilomyces japonica*의 최적 배양조건을 확립하기 위하여 침지시 당과 유지를 혼합한 후 균사를 접종하고 3주간 배양하였을 때의 성장정도 등을 조사한 결과 침지시 설탕을 혼합함으로써 대조구에 비해 균체량이 약 190% 증가하는 것으로 나타났다. 그리고 혈당강하 효능이 우수한 것으로 확인된 *Paecilomyces japonica*와 *Phellinus linteus*를 배양한 버섯배양쌀을 제조하여 무기질, 아미노산, 식이섬유 등의 식품학적 특성을 현미와 비교하였고, 또한 배양기간별 버섯배양쌀을 제조하여 식품학적 특성을 비교하였다.

#### 4. 버섯배양곡물의 식품 소재화 및 가공제품 개발

혈당강하 효과가 있는 것으로 조사된 버섯배양현미로부터 활성획분을 분리하였고 *in vitro*에서의 포도당 투과지연 효과 시험과 당부하시험을 통하여 이 획분의 혈당강하 효능을 조사한 결과 활성획분이 pectin보다 혈당강하 효과가 월등히 우수한 것으로 나타났다. 또한 활성획분의 수율, 균체량, 용해도, 점도 등의 이화학적 특성을 조사한 결과 수율은 2.1%, 단백질 함량은 0.85%, 그리고 전분과의 요오드 반응은 음성으로 나타나 매우 순수하게 분리된 다당이었으며, 5.7%의 균체를 함유하고 있으며, 냉수에서의 용해도가 매우 높은 것으로 나타났다.

버섯배양곡물의 볶음조건에 따른 곡물 및 추출물의 이화학적 그리고 관능적 특성 조사를 통하여 적정 볶음조건을 확립하였고, 또한 이들 버섯배양곡물을 이용한 현미녹차, 보리차 및 선식중간소재를 개발하였다. 그리고 전통 메주와 상황 버섯 배양콩의 적정 혼합비율을 설정하고, 적정 혼합비율로 제조된 된장의 숙성 중 이화학적 특성 변화를 조사하였으며, 기호성 향상을 위한 된장, 고추장의 최적 배합비와 제조공정을 확립하였다.

# SUMMARY

## I. Title

Development of Basidiomycetes-Fermented Cereals with Hypoglycemic and Anti-dementia Property and Their Products

## II. Objectives and Significance

The main objective of this project is to develop Basidiomycetes-fermented cereals with hypoglycemic and anti-dementia property. To achieve this objective, screening of Basidiomycetes strains and Basidiomycetes-fermented cereals with hypoglycemic and anti-dementia property (*in vivo and vitro*) was performed, and physicochemical properties of selected Basidiomycetes-fermented cereals were also investigated. Finally an optimum processing condition of Basidiomycetes-fermented cereals as a food material was established.

## III. Scope

### 1. Screening of Basidiomycetes strains and Basidiomycetes-fermented cereals with hypoglycemic and anti-dementia property

- Cultivation and extraction of Basidiomycetes strains
- Preparation of Basidiomycetes-fermented cereals and their extracts
- Investigation of hypoglycemic and anti-dementia property of Basidiomycetes strains and Basidiomycetes-fermented cereals



**2. Investigation of hypoglycemic and anti-dementia property of Basidiomycetes-fermented cereals in vivo**

- Preparation of Basidiomycetes-fermented cereals
- Investigation of hypoglycemic and anti-dementia property of Basidiomycetes-fermented cereals *in vivo*

**3. Optimization of processing condition of Basidiomycetes-fermented cereals and investigation of their physicochemical properties**

- Establishment of pretreatment condition of cereals for their solid state fermentation
- Optimization of solid state fermenting condition of Basidiomycetes strains
- Physicochemical properties of Basidiomycetes-fermented cereals

**4. Utilization of Basidiomycetes-fermented cereals as food material and Development of their processed products**

- Characteristics of active fraction prepared from Basidiomycetes-fermented cereals
- Development of processed products using Basidiomycetes-fermented cereals

**IV. Major Results and Conclusion**

**1. Screening of Basidiomycetes strains and Basidiomycetes-fermented cereals with hypoglycemic property**

The inhibitory effect of extracts of Basidiomycetes mycelia on  $\alpha$ -glucosidase activity from small intestinal mucosa was investigated, most of their extracts did not have inhibitory effect on  $\alpha$ -glucosidase activity. *In vitro* effect of Basidiomycetes mycelia on retarding the membrane transport of glucose was compared with pectin and guar gum. For Basidiomycetes

mycelia, 13.1~41.8% of total glucose remained in inner solution of dialysis membrane, indicating that most mycelia of Basidiomycetes might effectively retard membrane transport of glucose. Especially addition of *Phellinus linteus* made 41.8% of glucose remain in retentate. The effect of Basidiomycetes mycelia on postprandial glucose was investigated with streptozotocin-induced diabetic rats. Most of Basidiomycetes mycelia showed better postprandial glucose lowering effect than pectin. Blood glucose level increased to 145.7% and 143.2% in *Phellinus linteus* and *Paecilomyces japonica* added groups, respectively, at 30 minutes after maltose administration, They showed lower postprandial glucose value than other Basidiomycetes mycelia added groups. Hypoglycemic property of rice fermented with *Paecilomyces japonica* was investigated in comparison to barley and rice. Rats fed with rice fermented with *Paecilomyces japonica* showed lower blood glucose than other rats and significantly lower plasma cholesterol content than control and rats fed with rice.

## **2. Screening of Basidiomycetes strains and Basidiomycetes-fermented cereals with anti-dementia property**

In order to screen Basidiomycetes of protecting against  $\beta$ -amyloid-induced neuronal toxicity and dementia, extracts of Basidiomyces were evaluated for their effects on cell viability, generation of reactive oxygen species, and lipid peroxidation in  $\beta$ -amyloid-treated neuronal cells. Among the Basidiomycetes, extracts of *Cordyceps ophioglossoides*, *Peniophora quercuna*, *Hypocrea citrina* var. *citrina* prevented the cell death induced by  $\beta$ -amyloid. Cell viability of 84~92% was observed in the cells co-treated with extracts of *Cordyceps ophioglossoides* and  $\beta$ -amyloid while 55% viability in the cells treated with  $\beta$ -amyloid alone. In addition, the generation of reactive oxygen species in  $\beta$ -amyloid-treated cells was significantly suppressed by the treatment with extract of *Cordyceps ophioglossoides* but not by the extracts of *Peniophora quercuna* and *Hypocrea citrina* var. *citrina*.

To analyze physicochemical characteristics of the extract of *Cordyceps ophioglossoides* further, extracts fractionated with hexane, chloroform, ethylacetate, butanol and water were tested for cell viability. Increased viability of  $\beta$ -amyloid-treated cells was observed only in the cells pretreated with butanol fraction of *Cordyceps ophioglossoides*. Next step was done to investigate the effects of barley extracts inoculated and fermented with *Cordyceps ophioglossoides* on the memory amelioration of animal model of Alzheimer's disease. The rats treated with  $\beta$ -amyloid intracranially showed significant memory loss in water maze task. However, the rats pretreated with extract of barley fermented with *Cordyceps ophioglossoides* intraperitoneally for 4 weeks significantly improved memory in water maze task. The results suggest that *Cordyceps ophioglossoides* possesses active compounds which play important roles in preventing  $\beta$ -amyloid-induced cell death and memory loss.

### **3. Optimization of processing condition of Basidiomycetes-fermented cereals and Investigation of their physicochemical properties**

To optimize moisture content in fermenting cereals (brown rice, barley, soybean, Job's tears and red bean) inoculated by Basidiomycetes in large scale, changes in moisture content of cereals before and after autoclaving soaked cereals were investigated. Loss in moisture of all cereals after autoclaving was observed. Moisture loss in brown rice was the severest. Therefore, moisture loss after autoclaving should be considered in establishing optimum processing condition for Basidiomycetes-fermented cereals. To establish optimum autoclaving condition and packing size of soaked cereals in vinyl bag, mycelial growth and contamination of cereals were investigated under various heating, fermenting and autoclaving conditions, with various packing sizes. To establish optimum fermentation condition for *Paecilomyces japonica* on cereals in regarding to soaking and autoclaving conditions, and packing, mycelial growth and contamination of cereals were investigated after

fermented for 3 weeks at different mixing conditions mixed with sucrose and oil in soaking. Soaking with sucrose increased mycelial weight of cereals by 190%. Brown rices fermented with *Paecilomyces japonica* and *Phellinus linteus* with superior hypoglycemic property were prepared and their physicochemical properties were compared to those of brown rice. Brown rices fermented with *Phellinus linteus* in different fermenting periods were prepared and their physicochemical properties were investigated.

#### **4. Utilization of Basidiomycetes-fermented cereals as food material and Development of their products**

Active fraction with hypoglycemic property was isolated from brown rice fermented with *Paecilomyces japonica* and purified. Effect of active fraction on retarding membrane transport of glucose(*in vitro*) and glucose tolerance(*in vivo*) were investigated. Active fraction had more higher hypoglycemic property than pectin. According to the physicochemical properties of active fraction, its yield was 2.1% and protein content and mycelial weight were 0.85% and 5.7%, respectively, having negative iodine binding capacity with starch. And it had high solubility in cold water and higher viscosity than pectin.

The physicochemical and sensory properties of Basidiomycetes-fermented cereals and their extract, which was prepared by different roasting conditions, were investigated. Their optimum roasting condition was established and processing protocols for products(brown rice-green tea, barley tea, parched cereal powder) were developed. The physicochemical properties of *Doenjang* prepared by different mixing ratio of *Meju* and soybean fermented with *Phellinus linteus* were investigated and optimum mixing ratio was established. The optimum formula and process of *Doenjang* and *Kochujang* to increase sensory palatability were also established.

# Contents

<b>Chapter 1. Introduction</b> .....	
<b>Chapter 2. Current Status on Domestic and Foreign Technology</b> ...	
<b>Chapter 3. Experience and Results</b> .....	
<b>I. Materials and Methods</b> .....	
A. Screening of Basidiomycetes strains with hypoglycemic property .....	
1. Inhibitory effect of extracts of Basidiomycetes mycelia on $\alpha$ -glucosidase activity .....	
1-1. Cultivation of Basidiomycetes mycelia and preparation of their extracts .....	
1-2. Isolation of $\alpha$ -glucosidase from small intestinal mucosa of rats .....	
1-3. Activity of isolated $\alpha$ -glucosidase .....	
1-4. Inhibitory effect of extracts of Basidiomycetes mycelia on $\alpha$ -glucosidase activity .....	
2. Inhibitory effect of Basidiomycetes mycelia on postprandial glucose ...	
2-1. Effect of Basidiomycetes mycelia on retarding the membrane transport of glucose <i>in vitro</i> .....	
2-2. Glucose tolerance test of Basidiomycetes mycelia .....	
B. Screening of Basidiomycetes-fermented cereals with hypoglycemic property .....	
1. Inhibitory effect of extracts of Basidiomycetes-fermented cereals on $\alpha$ -glucosidase activity .....	
1-1. Preparation of Basidiomycetes-fermented cereals and their extracts .....	
1-2. Total polyphenol of Basidiomycetes-fermented cereals .....	
1-3. Preparation of polyphenol extracts .....	

1-4. Inhibitory effect of polyphenol extracts of Basidiomycetes-fermented cereals for $\alpha$ -glucosidase activity .....	
2. Inhibitory effect of Basidiomycetes-fermented cereals on postprandial glucose .....	
2-1. Mycelial weight .....	
2-2. Effect of Basidiomycetes-fermented cereals on retarding the membrane transport of glucose <i>in vitro</i> and their glycemic response <i>in vivo</i> .....	
C. Establishment of optimum processing condition of Basidiomycetes-fermented cereals and investigation of physicochemical properties of them .....	
1. Establishment of optimum processing condition of Basidiomycetes-fermented cereals .....	
1-1. Optimum pretreatment and fermentation condition of raw cereals ..	
1-2. Physicochemical properties of Basidiomycetes-fermented cereals .....	
2. Properties of Basidiomycetes-fermented cereals under various strains and fermentation periods .....	
2-1. Preparation of Basidiomycetes-fermented cereals under various strains and fermentation period .....	
2-2. Properties of Basidiomycetes-fermented cereals .....	
D. Hypoglycemic property of Basidiomycetes-fermented cereals <i>in vivo</i> .....	
1. Experimental rats and diet .....	
2. Sampling .....	
3. Analysis of components in blood and liver .....	
E. Utilization of Basidiomycetes-fermented cereals as food material and development of their products .....	
1. Properties of active fraction with hypoglycemic property .....	
1-1. Isolation and purification of active fraction with hypoglycemic property from Basidiomycetes-fermented cereals .....	

1-2. Effect of active fraction on retarding the membrane transport of glucose <i>in vitro</i> and its glucose tolerance .....	
1-3. Viscosity of active fraction .....	
1-4. Mycelial weight, solubility and iodine binding capacity of active fraction .....	
2. Development of processed products using Basidiomycetes-fermented cereals .....	
2-1. Teas .....	
2-2. Soybean products .....	

## II. Results and Discussion .....

A. Screening of Basidiomycetes strains with hypoglycemic property .....	
1. Inhibitory effect of extracts of Basidiomycetes mycelia on $\alpha$ -glucosidase activity .....	
2. Inhibitory effect of Basidiomycetes mycelia on postprandial glucose ...	
2-1. Effect of Basidiomycetes mycelia on retarding the membrane transport of glucose <i>in vitro</i> .....	
2-2. Glucose tolerance of Basidiomycetes mycelia .....	
B. Screening of Basidiomycetes-fermented cereals with hypoglycemic property .....	
1. Inhibitory effect of extracts of Basidiomycetes-fermented cereals for $\alpha$ -glucosidase activity .....	
2. Inhibitory effect of Basidiomycetes-fermented cereals on postprandial glucose .....	
C. Establishment of optimum processing condition of Basidiomycetes-fermented cereals and investigation of physicochemical properties of them .....	
1. Establishment of optimum processing condition of Basidiomycetes-fermented cereals .....	
2. Properties of Basidiomycetes-fermented cereals under various strains and fermentation periods .....	

D. Hypoglycemic property of Basidiomycetes-fermented cereals in vivo .....	
1. Hypoglycemic property .....	
1-1. Weight and food efficiency ratio .....	
1-2. Blood glucose, $\alpha$ -glucosidase activity and liver weight .....	
2. Cholesterol and triglyceride in plasma .....	
E. Utilization of Basidiomycetes-fermented cereals as food material and development of their products .....	
1. Physicochemical properties of active fraction with hypoglycemic property .....	
2. Development of various products using Basidiomycetes-fermented cereals .....	
2-1. Teas .....	
2-2. Soybean products .....	
<b>Chapter 4. Future plan .....</b>	
<b>Chapter 5. References .....</b>	



# 목 차

제 1 장 연구개발과제의 개요 .....	
제 2 장 국내외 기술개발 현황 .....	
제 1 절 당뇨병 .....	
제 2 절 노인성 치매 .....	
제 3 절 고체배양기술 .....	
제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과 .....	
제 1 절 재료 및 방법 .....	
1. 혈당강하 기능 버섯균 탐색 .....	
가. 균사체 추출물의 $\alpha$ -glucosidase 활성 저해효과 조사 .....	
1) 균사체 배양 및 추출물 제조 .....	
2) 쥐 소장점막으로부터의 $\alpha$ -glucosidase의 분리 .....	
3) 분리 $\alpha$ -glucosidase의 활성 측정 .....	
4) 균사체 추출물의 $\alpha$ -glucosidase에 대한 저해 활성 .....	
나. 균사체의 식후 혈당상승억제 효과 조사 .....	
1) 균사체의 <i>in vitro</i> 에서의 포도당 투과지연 효과 .....	
2) 균사체의 당부하시험 .....	
2. 혈당강하 기능 버섯배양곡물 탐색 .....	
가. 버섯배양곡물 추출물의 $\alpha$ -glucosidase 활성저해효과 조사 .....	
1) 버섯배양곡물 및 추출물 제조 .....	
2) 버섯배양곡물페놀화합물 정량 .....	

- 3) 폴리페놀 추출물의 조제 .....
- 4) 폴리페놀 추출물의  $\alpha$ -glucosidase에 대한 저해활성 .....
- 나. 버섯배양곡물의 식후 혈당상승억제 효과 조사 .....

  - 1) 균체량 .....
  - 2) 버섯배양곡물의 *in vitro*에서의 포도당 투과지연효과 및 섭취에 의한 식후혈당 변화 .....

- 3. 버섯배양곡물의 최적 제조조건 확립 및 식품학적 특성 조사 .....

  - 가. 버섯배양곡물의 최적 제조조건 확립 .....

    - 1) 곡물의 적정 전처리 및 배양조건 설정 .....
    - 2) 버섯배양곡물의 식품학적 특성 .....

      - 가) 균체량 .....
      - 나) 식이섬유 .....
      - 다) 수분흡수율 .....
      - 라) 용해도 및 팽윤력 .....
      - 마) 수분결합력 .....

  - 나. 균종별, 배양기간별 버섯배양곡물의 식품학적 특성 .....

    - 1) 균종별, 배양기간별 버섯배양곡물 제조 .....
    - 2) 버섯배양곡물의 식품학적 특성 조사 .....

      - 가) 균체량 .....
      - 나) 식이섬유 .....
      - 다) 무기질 .....
      - 라) 지방산 .....
      - 마) 아미노산 .....

- 4. 버섯배양곡물의 *in vivo*에서의 혈당강하 기능성 확인 .....

  - 가. 실험동물 및 식이 .....
  - 나. 시료채취 및 처리 .....

- 다. 혈액 및 간의 성분분석 .....
- 5. 버섯배양곡물의 식품소재화 및 가공제품 개발 .....
- 가. 혈당강하 활성획분의 특성 조사 .....
- 1) 혈당강하 활성획분의 분리, 정제 .....
- 2) 활성획분의 *in vitro*에서의 투과지연 효과 및 당부하 시험 .....
- 3) 활성획분의 점도 .....
- 4) 활성획분의 균체량, 용해도 및 요오드 반응성 .....
- 나. 버섯배양곡물을 이용한 가공제품 개발 .....
- 1) 차류제품 .....
- 가) 현미녹차 .....
- 나) 보리차 .....
- 다) 선식중간소재 .....
- 2) 장류제품 .....
- 가) 메주와 버섯배양콩의 혼합비율별 된장 제조 .....
- (1) 된장제조 .....
- (2) 된장 숙성중 이화학적 특성 변화 조사 .....
- 나) 청국장 및 보리밥 제조 .....
- 다) 된장, 고추장의 최적배합비 시험 .....

## 제 2 절 결과 및 고찰 .....

- 1. 혈당강하 기능 버섯균 탐색 .....
- 가. 균사체 추출물의  $\alpha$ -glucosidase 활성 저해 효과 .....
- 나. 균사체의 식후 혈당상승 억제 효과 .....
- 1) 균사체의 *in vitro*에서의 포도당 투과지연 효과 .....
- 2) 균사체의 내당능 .....

2. 혈당강하 기능 버섯배양곡물 탐색 .....	
가. 버섯배양곡물 추출물의 $\alpha$ -glucosidase 활성 저해 효과 .....	
나. 버섯배양곡물의 식후 혈당상승 억제 효과 .....	
3. 버섯배양곡물의 최적 제조조건 확립 및 식품학적 특성 조사 .....	
가. 버섯배양곡물의 최적 제조조건 확립 .....	
나. 균종별, 배양기간별 버섯배양곡물의 식품학적 특성 조사 .....	
4. 버섯배양곡물의 <i>in vivo</i> 에서의 혈당강하 기능성 확인 .....	
가. 혈당강하 .....	
1) 체중변화와 식이효율 .....	
2) 혈당, 소장점막의 $\alpha$ -glucosidase 활성, 간 중량 .....	
나. 혈중 콜레스테롤 및 중성지방 .....	
5. 버섯배양곡물의 식품소재화 및 가공제품 개발 .....	
가. 혈당강하 활성획분의 특성 조사 .....	
나. 버섯배양곡물을 이용한 가공제품 개발 .....	
1) 차류제품 및 선식제품 중간소재 .....	
가) 현미녹차 .....	
나) 보리차 .....	
다) 선식중간소재 .....	
2) 장류제품 .....	
가) 된장의 숙성중 식품학적 특성 변화 .....	
(1) 이화학적 특성 .....	
(2) 관능적 기호도 .....	
나) 최적 배합비 시험 .....	
(1) 된장의 최적 배합비 시험 .....	
(2) 고추장의 최적 배합비 시험 .....	

제 4 장 연구개발결과의 활용계획 .....

제 5 장 참고문헌 .....

## 제 1 장 연구개발과제의 개요

당뇨병으로 인한 대사 이상과 합병증을 예방하기 위해서는 고혈당 상태를 정상 혈당으로 유지하여야 하지만 현재 사용중인 혈당강하제인 인슐린 제제, sulfonylurea 제제, biguanide 제제 등은 독성문제와 내성문제 등의 부작용이 대두되고 있다<sup>(1)</sup>. 따라서 근래에는 약물치료 이외에 민간요법이나 자연식품 등을 통해 혈당을 정상상태로 유지하고자 하는 경향이 두드러지고 있다. 노인성 치매는 환자의 뇌에서  $\beta$ -amyloid peptide가 노인반과 신경섬유다발을 형성하여 choline성 신경계 등 여러 신경계의 퇴행성 병변을 진행시키는 것으로 확인되고 있다. Tacrine, ENA 713과 같은 치매치료제가 개발되어 있으나 그 효과가 크지 않고 일시적으로 일부 증상을 호전시키는 정도의 효과를 내며, 이외의 약제는 심각한 부작용 때문에 사용이 제한되는 등 근본적인 치료제가 거의 전무한 실정이다. 또한 중추신경계의 손상은 복구가 거의 불가능한 점 등을 감안하면 노인성 치매의 발병 후 치료 보다는 이의 발병을 예방하는 것이 가장 바람직하기 때문에 부작용 없이 항시 섭취하여 온 천연물이나 식품으로부터 치매예방 및 완화에 효과가 있는 물질을 분리하고자 하는 연구가 많이 수행되고 있다.

고등균류 중 버섯자원은 8,000여종으로 그 중에서 20여종은 옛부터 식용과 약용으로 활용되어 왔으며 최근에는 전 세계적으로 버섯균의 생리활성 물질이나 기능성 성분에 대한 연구가 활발히 진행되어 항암성<sup>(2,3)</sup>, 면역활성증강<sup>(4,5)</sup>, 혈압강하<sup>(6)</sup>, 혈전용해<sup>(7)</sup>, 혈중 콜레스테롤 저하작용<sup>(8-11)</sup> 등이 과학적으로 입증되어 일부 기능성 물질을 추출, 정제하여 의약품으로 상품화되기도 하였다. 버섯류의 세포벽 구성물질인  $\beta$ -glucan은 혈당강하에 우수한 효능<sup>(12-14)</sup>을 나타내며, 또한 버섯에서 추출한 지용성 분획이 치매발생기전에 관여하는 효소를 억제하는 것으로 보고<sup>(15)</sup>되어 향후 이에 관한 연구가 활발히 진행될 것으로 예견된다.

그러나 현재까지의 버섯 활용방법으로는 자실체를 이용하거나 균사체를 액체배양하여 유용성분을 분리, 정제하는 방법들이 있는데, 자실체를 이용하는 경우 일부 버섯은 자실체로의 인공재배가 불가능하거나 가격이 비싸기 때문에 산업적으로 대중화하기에는 한계가 있으며, 균사체를 액체배양하는 경우 유용성분을 분리, 정제하는데 많은 비용이 소요되는 문제점이 있다. 본 과제에서 시도하는 고체배양기술은

기능성을 나타내는 버섯균을 곡물에 배양하는 기술로서 곡물에 특정 버섯균을 고체 배양할 경우 유용성분을 얻기 위한 별도의 추출, 정제공정이 필요없으며, 배양물 전체를 일반 곡물처럼 손쉽게 섭취할 수 있기 때문에 소비자의 건강증진에 기여함은 물론 국내산 곡물의 부가가치를 크게 증대시킬 수 있다. 또한 버섯균은 균종에 따라 항종양, 면역증진, 혈압강하, 항혈전 등의 다양한 기능성을 발현하기 때문에 특정 기능성을 갖는 버섯균을 일반 곡물에 고체배양할 경우 특정 기능성을 갖는 곡물을 제조할 수 있다. 따라서 본 과제에서 목적으로 하고 있는 혈당강하와 치매예방 기능을 가진 버섯배양 곡물을 제조하기 위해서는 먼저 이러한 기능성을 갖는 버섯균을 탐색하여 선발하고 이를 곡물에 고체배양 함으로써 이를 달성할 수 있을 것이다.

## 제 2 장 국내외 기술개발 현황

### 제 1 절 당뇨병

현대의학으로 당뇨병을 근원적으로 치료할 수 있는 방법은 아직 개발되지 않은 실정이며, 혈당을 정상적인 수준으로 유지되도록 하는 것이 최선의 치료방법으로 알려져 있다<sup>(16)</sup>.

현재 당뇨병의 치료방법으로는 식이요법, 운동요법과 함께 약물요법이 시도되고 있고 임상에서 사용되고 있는 약물로는 인슐린 제제, sulfonylurea 제제, biguanide 제제, troglitazone 제제 등이 있다. 경구용 혈당강하제로 주로 쓰이는 sulfonylurea 제제는 장기적으로 사용할 때  $\beta$ -세포의 탈진을 일으킬 수 있고 부작용으로 저혈당의 위험이 따르며, biguanide계의 metformin도 우수한 약제이지만 간혹 유산증이라는 치명적인 부작용을 가져올 수 있다<sup>(1)</sup>. 또한 인슐린 주사요법은 환자에게 불편할 뿐 아니라 저혈당의 위험성이 따르고 장기 사용시 비만을 촉진시켜 인슐린 비의존형 당뇨병 환자의 경우 장기적인 혈당 관리에 어려움을 줄 수 있다<sup>(17)</sup>. 또다른 혈당관리 방법은 섭취한 식이 중의 탄수화물의 소화와 흡수를 지연시켜 식후 혈당 및 혈중 인슐린의 상승을 감소시킴으로써 당뇨병의 치료효과를 나타내는 것으로서, 이러한 물질로는 식이섬유<sup>(18,19)</sup>와 장내 소화효소인  $\alpha$ -glucosidase 억제제<sup>(20)</sup>가 있다. 현재 임상에서 사용되고 있는  $\alpha$ -glucosidase 억제제인 acarbose는 *Actinoplanes*가 발효하여 생산하는 2차 대사산물로서 유럽 등 여러 국가에서 이용되고 있으며, 인슐린 비의존형 당뇨병 환자의 식후 혈당과 식후 혈중 인슐린을 감소시키는 것으로 밝혀져 있고 인슐린 의존형 당뇨병 환자에서도 유사한 효과가 있음이 알려져 있다<sup>(21,22)</sup>.

최근에는 부작용이 우려되는 약물치료 이외에 민간요법이나 자연식품 등을 통해 혈당을 정상상태로 유지하고자 하는 경향이 두드러져 천연물 및 식품원료로부터 혈당강하 소재를 개발하고자 하는 연구가 활발히 진행되고 있다. 민간요법에서 효능이 있는 것으로 알려져 많이 이용되어 오던 작물인 닭의장풀 추출액<sup>(23)</sup>, 두릅나무와 현삼<sup>(24)</sup>이 정상 또는 고혈당이 유발된 마우스에서 혈당강하작용이 있음이 확인되었고, 갈근의 물추출물, 음양곽 추출물, 달게비폴<sup>(25)</sup> 등도 효과가 확인된 바 있다. 또 상엽수층이 혈당상승 억제작용이 있으며<sup>(26)</sup>  $\alpha$ -glucosidase에



작용함으로써 식후의 급격한 혈당 증가를 억제하는 것이며, 그 유효성분은 galactopyranosyl deoxynojirimycin과 fagomine임이 밝혀진 바 있다<sup>(27)</sup>. 상백피가 streptozotocin에 의한 당뇨유도 마우스에서 혈당강하 작용이 있고<sup>(28)</sup> 그 유용물질이 glycoprotein인 Moran A 임이 보고된 바 있다<sup>(29)</sup>. 이외에도 인삼, 하늘타리, 우영, 메밀, 미강 등 다양한 작물을 대상으로 혈당강하 효과에 대하여 활발히 연구되고 있다.

버섯은 항암활성, 면역증강 효과 및 항산화 효과 등의 약리성 때문에 최근 건강식품 또는 의약품 소재로 많이 이용되는데 이와 같은 효능을 나타내는 성분은  $\beta$ -glucan 등의 다당류로서 구름버섯으로부터 분리한 krestin, 표고버섯으로부터 분리한 lentinan 등이 항암치료제 또는 보조제로서 개발되어 시판되고 있다. 이외에 최근에 신령버섯 자실체, 상황버섯 균사체, 장수버섯 자실체로부터 면역증강 기능을 갖는 heteroglycan, galactan 등이 보고되었다. 한편 버섯에 함유된  $\beta$ -glucan, heteroglycan 등의 다당은 분자량이  $10^6$  이상의 거대분자인 비소화성의 수용성 다당류이면서 건물량으로 버섯의 약 10% 이상을 차지하기 때문에 앞서 언급한 항암, 면역증강 등의 효능 이외에 혈당강하, 항고지혈증 효능도 상당히 우수할 것으로 기대되며, 이에 대한 연구 결과도 다수 보고되어 있다. 버섯 다당류는 소장에서 탄수화물의 소화 및 흡수를 억제하고 인슐린에 대한 감수성의 상승으로 인하여 전반적인 혈당조절을 개선시킬 수 있으며, 이에 따라 간에서 중성지방 합성이 감소하여 혈청 중성지방의 상승이 억제되는 것으로 보고되어 있다.

## 제 2 절 노인성 치매

치매는 크게 혈관성 치매와 노인성 치매로 나눌 수 있는데, 혈관성 치매는 주로 혈관 내에 형성된 혈전에 의해 뇌출혈, 뇌졸중 등이 발생하는 경우 발병 주변의 뇌세포가 상해를 입어 기억력 상실 등의 증상이 유발되는 것으로 알려져 있다. 노인성 치매는 환자의 뇌에서  $\beta$ -amyloid가 노인반과 신경섬유다발을 형성하여 choline성 신경계를 비롯한 glutamate 신경계 등 여러 신경계의 퇴행성 병변을 진행시키는 것으로 확인되었으며 환자의 일부에서는  $\beta$ -amyloid의 축적이 유전적 요인과 관계되기도 하는 것으로 밝혀졌으며, 최근 알루미늄(Al)이  $\beta$

-amyloid의 뇌 축적을 유발하여  $\beta$ -amyloid의 독성 발현을 촉진하는 것으로 확인되었다.

현재 개발되어 있는 치매치료제로는 뇌 내의 choline성 기능을 향진시켜 acetylcholine 등의 신경전달물질의 감소를 억제시키려는 목적으로 acetylcholine esterase(AChE)의 저해제인 tacrine, ENA 713 등이 있으나 일부 증상을 호전시킬 뿐 그 효과가 크지 않다. FDA에서 허가된 약품은 AChE 저해제로서 Cognex와 Aricept 2 종류인데 Cognex의 경우 치매 초기 또는 중간단계 환자에게 효과가 있는 것으로 알려져 있으나 떨림증, 현기증, 구토증, 간독성 등의 부작용이 매우 심한 것으로 알려져 있다. Aricept는 Cognex 보다 훨씬 선택성이 우수하여 부작용이 적어졌으나 이 약품 역시 현기증, 구토증, 설사 등의 부작용이 있는 것으로 보고되고 있다.

이상에서 보는 바와 같이 여러 가지 치매치료제가 개발되어 있지만 효과가 크지 않거나 부작용이 심하기 때문에 항시 섭취하여 온 부작용 없는 생약제나 식품 원료로부터 치매예방 및 완화에 효과가 있는 물질을 분리하고자 하는 연구가 많이 수행되어 베이어 제약의 Metrifonate, Forest사의 physostigmine, Astra Arcus사의 NXX-066, Jassen사의 galanthamine 등 여러 제품이 개발되고 있다. 또 은행잎 추출물이 뇌일혈 환자의 회복 및 치매 치료에 효과가 있다고 여러 연구에서 보고되고 있고 또 현재 사용 중에 있다. 일본에서는 아직 상품화되어 나온 제품은 없지만 천연물을 대상으로 탐색한 결과 원지의 효능이 우수하며 유용물질은 계피산 유도체를 함유하는 사포닌류, 페놀 배당체류 등이라고 보고한 바 있다.

우리나라에서도 아직은 낮은 수준이지만 여러 천연물을 대상으로 탐색 중에 있고 원광대학교에서 개발한 생약제로부터 추출한 ‘치매단’이라는 제품이 있으며 임상실험 결과 간독성이 나타나지 않았고 어지럼증, 떨림증, 구토증과 같은 부작용이 전혀 나타나지 않는 것으로 보고하여 우리나라에서의 치매 치료 및 예방에 있어 새로운 가능성을 제시한 바 있음. 최근에는 버섯의 지용성 분획이 치매관련 효소류에 대한 저해 활성이 보고되어 치매예방에 대한 버섯의 활용 가능성이 제시되었다.

### 제 3 절 고체배양기술

고체배양 기술은 버섯균을 곡류와 같은 고체재료에 직접 배양한 후 고체 배양물 전체를 기능성 식품으로 개발하는 것으로 액체탱크배양을 통하여 균사체를 배양한 다음 유용성분을 추출하여 제품화하는 기존의 제품과는 전혀 다른 개념의 기술이다. 이 기술에 의해 제조된 곡물은 치료제로서의 기능보다는 평소 식품으로 섭취함으로써 생활에서 질환유발물질 또는 환경에 노출되었을 때 이에 대한 저항성을 높이는 건강식품의 개념이다. 또한 이 기술은 버섯균으로부터 유래되는 기능성을 곡물에 부여할 수 있을 뿐만 아니라 다양한 기능성을 가진 현미, 콩, 보리 등의 기존의 기능성과 상승작용을 기대할 수 있으며, 버섯균의 효소작용에 의하여 곡물의 가공적성이 변화하여 새로운 형태의 가공제품 개발이 가능하고, 소화율이 낮은 곡물의 소화율이 향상되는 장점이 있다. 또한 버섯균의 작용에 의하여 전혀 새로운 유용물질의 생성을 기대할 수 있다. 본 연구의 참여업체인 (주)미농에서 동충하초 또는 상황버섯을 배양한 현미제품 등을 판매하고 있으나 현재까지의 고체배양 기술은 쌀, 보리 등 곡물 원료의 변화에 따른 버섯균의 성장조건이 적절히 설정되지 않아 원료간 성장 차이가 크고, 동충하초, 상황버섯 등 극히 제한된 버섯균에 대해서만 적용되고 있으며, 또한 동일 곡물에서의 버섯균종의 차이에 따른 성장 차이를 해결할 수 있는 기술이 개발되지 못한 실정이다. 그리하여 버섯균의 생장이 느릴 경우 배양기간이 길어져 곡물의 오염이 발생하고 또한 제조공정이 균일화되지 못하여 처리구마다 제품간 품질의 편차가 심한 문제점이 있다.

## 제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

### 제 1 절 재료 및 방법

#### 1. 혈당강하 기능 버섯균 탐색

##### 가. 균사체 추출물의 $\alpha$ -glucosidase 활성 저해 효과 조사

###### 1) 균사체 배양 및 추출물 제조

본 연구에 사용한 버섯 균사체는 생명공학연구원 유전자은행(KCTC)으로부터 분양받은 균주와 참여업체에서 보관하고 있는 균주로서 Table 1의 조건으로 한천 평판배지 상에서 일정시간 배양후 약  $1\text{cm}^2$ 의 크기로 절편을 떼어내 액체배지에 옮기고 회전 진탕 배양기에서 100rpm으로 압조건 하에서 배양하였다. 균사체가 충분히 성장한 후 여과지로 감압여과하여 균사체와 배양액을 분리하였다. 회수한 균사체는 동결건조한 후 75% 메탄올 용액으로 환류 냉각기로  $85^\circ\text{C}$ 의 온도에서 3시간씩 2회 반복 추출하였다. 균사체 추출물을 감압건조하여 건조시킨 후 DMSO로 용해하여 시료로 사용하였다.

###### 2) 쥐 소장점막으로부터의 $\alpha$ -glucosidase 분리<sup>(30)</sup>

체중이 약 200g인 Sprague Dawley rats의 소장으로부터 점막을 분리하였고 분리한 점막에 5배(w/v)의 0.5M NaCl, 0.5M KCl, 5mM EDTA (pH 7.0) 용액을 가한 후 균질화하고  $10,000\times\text{g}$ 에서 원심분리하였다. 침전에 다시 EDTA 용액을 가하여 원심분리하는 과정을 3회 반복하여 얻은 침전에 5배의 0.9% NaCl 용액을 가하여 균질화한 후  $1,000\times\text{g}$ 에서 원심분리하여 얻은 상정액을 효소원으로 하였다.

Table 1. Mycelial culture conditions of various Basidiomycetes strains

Strain	KCTC No.	Medium	Temp. (°C)	pH
<i>Agaricus arvensis</i> (아가리쿠스)	6851	PDA	21	5.8
<i>Agaricus blazei</i> (아가리쿠스)		PDA	21	5.8
<i>Amanita aspera</i> (광대버섯속)	6490	PDA	26	5.6
<i>Bondarzewia montana</i>	6715	PDA	26	6.0
<i>Clavicornia pyxidata</i> (좁나무싸리버섯)	16042	MEA	21	6.0
<i>Clitocybe clavipes</i> (갈때기버섯속)	6727	PDA	26	5.6
<i>Cordyceps militaris</i> (동충하초)	16932	YMB	26	5.6
<i>Cordyceps ophioglossoides</i> (동충하초속)	6473	PSA	23	5.6
<i>Cordyceps sinensis</i> (동충하초)	26137	MEA	26	5.6
<i>Coriolus azureus</i> (구름버섯속)	16000	MEA	21	6.0
<i>Flammulina velutipes</i> (팽나무버섯)	6367	PDA	23	5.6
<i>Fomes fomentarius</i> (말굽버섯)	6363	PDA	23	5.6
<i>Ganoderma applanatum</i> (영지버섯)	16800	MEA	24	5.8
<i>Ganoderma lucidum</i> (영지버섯)		MEA	24	5.8
<i>Ganoderma valesiacum</i> (영지버섯)	6513	MEA	24	5.8
<i>Gloeophyllum abietinum</i> (조개버섯속)	6356	YMB	26	6.2
<i>Grifora frondosa</i> (잎새버섯)	26153	MEA	21	5.6
<i>Hypocrea citrina</i> var. <i>citrina</i>	6863	CHA	21	6.2
<i>Hypocrea lactea</i>	6518	OMA	21	5.6
<i>Hypocrea muroiana</i>	6743	CMA	27	5.6
<i>Hypocrea nigricans</i>	16946	CMA	26	5.6
<i>Laetiporus sulphureus</i> (덕다리버섯)	6358	YMB	23	6.2
<i>Lentinus edodes</i> (표고버섯)	6733	PDA	26	5.6
<i>Lenzites betulina</i> (조개껍질버섯)	6354	YMB	26	6.2
<i>Leucogyrophana mollusca</i>	6768	OMA	21	5.6
<i>Merulius tremellosus</i> (아교버섯)	6762	MEA	21	6.0

Table 1. (continued)

Strain	KCTC No.	Medium	Temp. (°C)	pH
<i>Mycoacia fuscoatra</i> (송곳버섯속)	6756	MEA	21	6.0
Mitake		PDA	26	6.0
<i>Oxyporus latemarginata</i> (흰살버섯속)	6661	YMB	26	6.2
<i>Paecilomyces japonica</i> (동충하초)		MEA	23	6.0
<i>Peniophora quercina</i> (분홍껍질고약버섯)	6758	MEA	21	6.0
<i>Phanerochaete sordida</i>	6757	MEA	21	6.0
<i>Phellinus baumi</i> (장수진흙버섯)		MEA	21	6.0
<i>Phellinus chrysoloma</i> (진흙버섯속)	16884	MEA	23	6.2
<i>Phellinus igniarius</i> (진흙버섯속)		PDA	26	6.0
<i>Phellinus japonica</i> (진흙버섯속)		PDA	26	6.0
<i>Phellinus linteus</i> (진흙버섯속)	6719	PDA	26	6.0
<i>Phlebia radiata</i> (가는주름버섯속)	6759	MEA	21	6.0
<i>Phlebiopsis gigantea</i>	6706	PDA	26	6.0
<i>Pleurotus ostreatus</i> (느타리버섯)		PDA	26	6.0
<i>Poria cocos</i>	6294	YMB	26	6.0
<i>Pycnoporus cinnabarinus</i> (주걱간버섯)	6725	PDA	26	5.6
<i>Rigidoporus vinctus</i>	6672	YMB	26	6.2
<i>Stereum gausapatum</i> (흰테꽃구름버섯)	6709	PDA	26	5.6
<i>Trametes versicolor</i> (송편버섯속)	6714	PDA	26	5.6
<i>Wolfiporia cocos</i> (복령)	6480	PSA	26	6.0
<i>Wolfiporia extensa</i> (복령속)	6663	MEA	26	6.2
<i>Xylaria sicula f. major</i>	6578	YMB	21	6.0

### 3) 분리한 $\alpha$ -glucosidase의 활성 측정

얻어진 쥐 소장점막의  $\alpha$ -glucosidase의 활성 및 기질 특이성을 확인하기 위하여 분리한  $\alpha$ -glucosidase를 14mM의 각각의 기질(maltose, sucrose, lactose)과 37°C, pH 6.0에서 60분간 반응시킨 후 생성된 포도당을 glucose oxidase/peroxidase를 이용한 분석 kit (Megazyme Pty, Ltd., Ireland)를 사용하여 측정하고 효소활성을 계산하였으며, 1 unit는 실험조건에서 1분 동안 기질 1mole을 분해하는 효소의 양으로 정의하였다.

### 4) 균사체 추출물의 $\alpha$ -glucosidase에 대한 저해 활성<sup>(31)</sup>

균사체 추출물의  $\alpha$ -glucosidase에 대한 저해활성은 *p*-nitrophenyl  $\alpha$ -D-glucopyranoside (6mM)를 기질로 하여  $\alpha$ -glucosidase (1.4mU/mL)와 균사체 추출물 (1.0mg/mL)을 혼합하여 37°C에서 30분간 반응시킨 후 0.4M glycine buffer (pH 10.4)를 가하고 원심분리한 후 400nm에서 흡광도를 측정하였다. 균사체 추출물은 DMSO에 용해하여 첨가하였으며 반응시간 동안의 흡광도의 변화를 DMSO를 첨가한 대조군의 흡광도의 변화와의 비로부터 저해율을 계산하였다. 이때 대표적인  $\alpha$ -glucosidase 저해제인 acarbose를 기준물질로 하여 균사체 추출물에 대해 농도별 저해율을 조사하였다.

## 나. 균사체의 식후 혈당상승억제 효과 조사

### 1) 균사체의 *in vitro*에서의 포도당 투과지연 효과<sup>(32)</sup>

균사체의 *in vitro*에서의 포도당 투과지연 효과는 dialysis membrane (MWCO 6000~8000, Spectrum Medical Industries, Inc., USA)을 사용하여 투석막 내액의 포도당이 투석막 외액으로 빠져나오는 양에 균사체가 미치는 영향을 조사하였다. 투석막 내에 300ppm 농도의 균사체와 1% 농도의 포도당을 용해시킨 혼합용액 10mL를 넣은 다음 이를 500mL 용량의 비이커에 담고 25°C의 shaking incubator에서 100rpm의 속도로 shaking하면서 일정시간 간격(30~120분)으로 투석막 외액에서 0.1mL 씩을 취하여 포도당 농도를 측정하였으며, 이를 투석막 내액에 잔존하는 포도당의 양으로 환산하였다. 포도당 농도는 glucose

oxidase/peroxidase를 이용한 assay kit (Megazyme Pty, Ltd., Ireland)를 사용하여 측정하였으며 이때 대조구로서 pectin (Sigma Chemical Co., USA)과 guar gum (Sigma Chemical Co., USA)을 동일 농도로 사용하여 비교하였다.

## 2) 균사체의 당부하 시험

균사체의 *in vivo* 상에서의 식후 혈당상승에 대한 억제 효과를 조사하기 위하여 streptozotocin(40mg/kg b.w)으로 당뇨를 유발하여 혈당치가 250mg/100mL 이상인 쥐들만 선별하여 사용하였다. 16시간 절식시킨 당뇨쥐에 maltose 용액 (0.35g/ml)을 sonde로 2mL 경구투여하고, 곧바로 균사체 (300mg/kg b.w)를 투여하였다. Maltose 용액을 투여하기 전 그리고 투여 후 30분, 60분, 90분, 120분에 각각 혈액을 채취하여 혈당을 측정하였으며, 혈당 측정은 Precision Plus Electrodes (Medisense Contract Manufacturing Ltd., UL)를 사용하였다. 이때 대조구로서 pectin (Sigma Chemical Co., USA)을 사용하여 비교하였다.

## 2. 혈당강하 기능 버섯배양곡물 탐색

### 가. 버섯배양곡물 추출물의 $\alpha$ -glucosidase 활성 저해 효과 조사

#### 1) 버섯배양곡물 제조 및 추출

식후 혈당상승 억제 효과 측정에 의해 가장 우수한 효과를 나타낸 버섯균인 *Paecilomyces japonica*를 이용하여 버섯배양곡물을 제조하였다. 현미, 보리, 콩, 울무, 팥 등의 곡물을 하룻밤 동안 물에 침지한 후 물을 빼고 비닐봉지에 수침한 곡물을 담고 autoclave로 고압 살균처리하였으며, 액체배양한 *Paecilomyces japonica*를 고압살균한 곡물에 접종한 후 28°C로 고정된 배양실에서 3주간 배양하였다. 제조한 버섯배양곡물을 분쇄한 후 10배량의 75% (v/v) 에탄올 용액으로 3시간씩 2회 반복 추출하였으며, 이를 40°C의 온도에서 감압농축하여 건조시킨 후 실험에 사용하였다.



## 2) 버섯배양곡물의 페놀화합물 정량

버섯배양곡물의 총 폴리페놀 함량은 Folin-Denis 방법<sup>(33)</sup>을 변형하여 측정하였다. 제조한 추출물을 일정 농도로 용해시킨 다음 시료 5mL에 Folin-Denis 시약(1/3 희석액) 5mL를 가하고 3분후 10% sodium carbonate 용액 5mL를 넣어 실온에서 1시간 방치시킨 후 700nm에서의 흡광도를 측정하였다. 대조구로서는 검액 대신 물을 사용하였고 미리 (+)-catechin을 사용하여 구한 검량곡선으로부터 시료중의 폴리페놀 함량을 측정하였다.

## 3) 폴리페놀 추출물의 조제

버섯배양곡물로부터 폴리페놀 추출물은 Tamagawa 등<sup>(34)</sup>의 방법에 따라 다음과 같이 조제하였다. 75% 에탄올 용액으로 추출하여 건고한 추출물을 증류수에 용해하여 불용성 물질은 원심분리하여 제거하고 상정액은 Sepabeads SP-850 수지를 탈이온수로 평형화시킨 컬럼(210x30mm)에 유량 10mL/min의 속도로 흡착시켰다. 흡착된 컬럼은 당류, 아미노산을 Molish 반응 및 닌하이드린 반응이 음성이 될 때까지 탈이온수로 유량 10mL/min의 속도로 세정하였다. 이어서 흡착물(폴리페놀 획분)을 2L의 75% 에탄올로 용출시켜 30℃ 이하에서 감압농축후 동결건조하여 폴리페놀 추출물을 얻었다.

## 4) 폴리페놀 추출물의 $\alpha$ -glucosidase에 대한 저해 활성

버섯배양곡물로부터 분리한 폴리페놀 추출물의  $\alpha$ -glucosidase에 대한 저해 활성은 앞에 기술한 균사체 추출물의  $\alpha$ -glucosidase에 대한 저해 활성 측정 방법과 동일한 방법으로 측정하였다.

# 나. 버섯배양곡물의 식후 혈당상승 억제 효과 조사

## 1) 균체량

*Paecilomyces japonica*를 접종하여 3주간 배양한 버섯배양곡물의 균체량은 균사체 세포벽 성분의 주요한 성분인 glucosamine의 양으로 측정하였고 Sakurai

등<sup>(35)</sup>의 방법을 사용하였다. 버섯배양곡물 분말 0.5g을 시험관에 취하고 60%(v/v) H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2mL를 넣고 실온에서 가끔씩 흔들며 주면서 24시간 방치하였다. 이를 100mL 삼각 플라스크에 옮긴 후 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 농도가 1N이 되도록 물로 희석하고 밀봉한 후 autoclave로 열처리하였다. NaOH 용액으로 중화하고 물을 첨가하여 50mL로 정용한 후 시료용액으로 하였으며, 시료용액 0.5mL를 시험관에 취하고 acetyl acetone 시약 0.5mL를 첨가하고 90℃로 1시간 가열한 후 물로 냉각하고 EtOH 용액 5mL를 서서히 첨가하였다. 여기에 ERLICH 시약 0.5mL를 첨가하여 교반하고 실온에서 1시간 방치후 530nm에서 비색정량하였다. 이때 glucosamine을 표준물질로 하였다.

## 2) 버섯배양곡물의 *in vitro*에서의 포도당 투과지연 효과 및 섭취에 의한 식후 혈당 변화

버섯배양곡물의 *in vitro*에서의 포도당 투과지연 효과는 앞에 기술한 군사체의 포도당 투과지연 효과와 동일한 방법으로 측정하였으며, 포도당 투과지연 효과 측정시 우수한 결과를 나타낸 버섯배양현미와 버섯배양보리를 이용하여 이를 섭취하였을 때의 식후 혈당 변화를 버섯배양하지 않은 현미, 보리와 비교하였다. 50mg/mL 농도의 버섯배양곡물 현탁액을 4mL씩 당뇨쥐에 강제투여하였으며, 버섯배양곡물을 강제투여하기 전 그리고 투여후 30분, 60분, 90분, 120분에 각각 혈액을 채취하여 혈당을 측정하였다.

# 3. 버섯배양곡물의 최적 제조조건 확립 및 식품학적 특성 조사

## 가. 버섯배양곡물의 최적 제조조건 확립

### 1) 곡물의 적정 전처리 및 배양조건 설정

버섯배양곡물 제조를 위한 원료인 현미, 보리, 콩, 울무, 팥 등의 곡물의 적정 침지조건을 확립하기 위하여 이들 곡물의 침지시간 경과에 따른 수분함량의 변화를 조사하여 적절한 침지조건을 설정하였다. 또한 참여업체에서 사용하고 있는 비닐봉지(30×45cm)에 수침한 곡물을 500~2,500g 씩 담고 autoclave로 살균

처리한 후 *Paecilomyces japonica*의 배양액을 접종하고 3주간 배양한 후 제조한 버섯배양곡물의 오염정도와 균사 성장 정도 등을 조사하여 적절한 곡물의 양과 적정 살균조건을 조사하였다. 또한 배양중 균사가 성장하기에 적합한 조건을 부여하기 위하여 현미를 침지할 때 버섯균이 성장할 때 이용할 수 있는 영양소로서 당(설탕 0.5, 1.0, 1.5% 용액)과 유지(0.1%)를 혼합하여 침지한 후 비닐봉지에 담고 autoclave로 살균처리하고 *Paecilomyces japonica*의 배양액을 접종하고 3주간 배양한 후 제조한 버섯배양곡물의 관능적 특성과 균체량을 측정하여 적절한 당과 유지 혼합조건을 설정하였다.

## 2) 버섯배양곡물의 식품학적 특성

현미를 이용하여 앞서 확립된 침지조건으로 침지하고 *Paecilomyces japonica*를 접종하여 3주간 배양한 후 제조한 버섯배양현미의 식품학적 특성을 조사하였으며, 이를 기존의 방법으로 제조한 버섯배양현미과 비교하였다.

### 가) 균체량

앞의 버섯배양곡물의 균체량 측정방법과 동일한 방법으로 측정하였다.

### 나) 식이섬유

식이섬유 함량은 AOAC 방법에 따라 total dietary fiber assay kit (Sigma TDF 100A)로 정량하였다.

### 다) 수분흡수율

버섯배양현미 5g을 증류수 40mL에 침지시킨 후 여과지 위에 깔려서 표면의 물을 제거하고 무게 증가량으로부터 건물 1g당 수분흡수량을 계산하였다.

### 라) 용해도 및 팽윤력

버섯배양현미의 용해도와 팽윤력은 Schoch의 방법<sup>(36)</sup>을 보완하여 분말시료 0.5g을 증류수 30mL에 분산시킨 후 80℃에서 20분간 교반하면서 가열하고 3,000rpm으로 30분간 원심분리하였다. 그 상정액을 취하여 페놀-황산법으로 총당량을 구한 후 용해도를 계산하고, 침전물의 무게로부터 다음식에 의하여 팽윤력

을 구하였다.

$$\% \text{ 용해도} = \frac{\text{상징액의 총당 함량}}{\text{시료의 무게 (건량기준)}} \times 100$$

$$\text{팽윤력} = \frac{\text{침전물의 무게}}{\text{시료의 무게 (건량기준)} \times (100 - \% \text{용해도})} \times 100$$

#### 마) 수분결합력

버섯배양현미 분말 1.5g을 50mL 원심분리 튜브에 넣고 증류수 20mL를 가하여 분산시킨 후 30℃에서 30분간 방치한 다음 25,000×g에서 30분간 원심분리하였다. 원심분리하여 침전된 침전물의 무게를 측정하여 건조시료 1g에 함유된 수분 무게로 나타내었다.

### 나. 균종별, 배양기간별 버섯배양곡물의 식품학적 특성

#### 1) 균종별, 배양기간별 버섯배양곡물 제조

현미를 앞서 확립된 전처리 및 배양조건으로 *Paecilomyces japonica*와 *Phellinus linteus*를 이용하여 3주간 배양한 후 각각 버섯배양현미를 제조하였으며, 이들 버섯배양현미의 식품학적 특성을 조사하였다. 또한 *Phellinus linteus*를 이용하여 2~4주간 배양하여 각각의 버섯배양현미를 제조한 후 이들의 버섯배양현미의 식품학적 특성을 조사하였다.

#### 2) 버섯배양곡물의 식품학적 특성 변화 조사

##### 가) 균체량

앞의 버섯배양곡물의 균체량 측정방법과 동일한 방법으로 측정하였다.

##### 나) 식이섬유

앞의 버섯배양곡물의 식이섬유 측정방법과 동일한 방법으로 측정하였다.

#### 다) 무기질

버섯배양현미를 예비탄화한 후 550°C 회화로에서 회화시키고 회화시킨 회분에 염산을 가하여 용해시키고 일정량으로 정용한 후 ICP-AES (Inductively coupled plasma, JA38 PLUS, ISA Instrument S.A., France)로 분석하였다. ICP-AES의 작동조건은 power: 1 kW for aqueous, nebulizer pressure: 3.5 bars for meinhasd type C, aerosol flow rate: 0.3 L/min이었으며, 각 무기질의 검출과장은 Ca: 393.366, Mg: 279.553, Na: 588.995, K: 766.490, P: 213.618 nm이었다.

#### 라) 지방산

n-Hexane으로 추출하여 얻은 지질 200mg에 0.5N NaOH/MeOH 5mL를 가하여 분해시킨 다음 BF<sub>3</sub> 촉매 하에 메틸에스터를 만들어 GC (HP5890, Hewlett-Packard Company, CA, USA)로 분석하였다.

#### 마) 아미노산

시료 일정량을 분해관에 넣어 6N 염산용액을 가하고 질소가스를 5분간 통과시키고 나서 밀봉하여 110°C에서 가수분해시킨 다음 감압농축시켜 염산을 제거하였다. 이를 membrane filter로 여과하고 여액 중 일부를 취해 건조 tube에 넣고 유도체시약 (methanol:water:triethylamine:PITC=7:1:1:1 혼합시약, v/v)을 첨가하여 유도체화시킨 다음 이를 감압건고하였다. 건고물을 시료회석액에 용해시킨 후 상법에 따라 HPLC로 분석하였다. 유리아미노산은 75% EtOH 용액으로 추출한 후 여과하고 상기 방법과 동일하게 분석하였다.

## 4. 버섯배양곡물의 *in vivo*에서의 혈당강하 기능성 확인

### 가. 실험동물 및 식이

본 실험에 사용한 실험동물은 4주령 Sprague-Dawley종 수컷 흰쥐를 분양받아 1주일간 고형사료로 적응기간을 가진 후 당뇨를 유발하였다. 당뇨 유발은 0.01M citrate buffer(pH 4.5)에 용해시킨 streptozotocin을 1회(45mg/kg b.w) 복강주사하여 인슐린의존형(insulin dependent diabetes mellitus, IDDM) 당뇨병을

유발시켰다. 당뇨의 확인은 혈당측정계를 이용하여 16시간 절식시킨 후 안와채혈하여 공복시 혈당을 측정하고 혈당농도가 200mg/dL 이상인 것만 당뇨병이 유발된 것으로 간주하였다.

실험군은 정상대조군, 당뇨대조군, 당뇨쥐에 백미를 50% 혼합한 식이를 공급한 백미군, 당뇨쥐에 보리를 50% 혼합한 식이를 공급한 보리군, 백미에 *Paecilomyces japonica*를 접종, 배양한 버섯배양백미를 식이에 25% 혼합한 식이를 당뇨쥐에 공급한 버섯배양백미(25%)군, 당뇨쥐에 버섯배양백미를 50%를 혼합한 식이를 공급한 버섯배양백미(50%)군의 6가지 처리군으로 나누어 6주간 사육하였으며 이때 물과 식이는 자유로이 섭취하도록 공급하였고 식이는 4℃에서 보관하며 사용하였다. 실험동물들은 환경조절된 사육실(조명 6:00 pm~6:00 am, 온도 22±2℃)에서 분리사육하였다.

본 실험에서 사용한 버섯배양백미는 혈당강하에 효과가 있는 것으로 조사된 *Paecilomyces japonica*를 백미에 3주간 배양하여 건조한 것으로 이를 사용하여 제조한 실험식이의 조성은 Table 3과 같다. 정상대조군과 당뇨대조군은 표준식으로 동일하게 공급하였고, 백미군, 보리군, 버섯배양백미군들은 이들 원료의 열량과 식이섬유량을 고려하여 식이배합을 조정하였다.

Table 2. Composition of experimental diets

	(g/kg)					
	Normal	Control	Rice	Barley	RFP25 <sup>1)</sup>	RFP50 <sup>2)</sup>
Casein	200	200	162	149	180	160
DL-methionine	3	3	3	3	3	3
Corn starch	487	487	27.5	106	264.8	42.5
Sucrose	150	150	150	150	150	150
Cellulose	63	63	60.5	-	57.2	51.5
Corn oil	50	50	46.5	45	48	46
Vitamin mix <sup>3)</sup>	10	10	10	10	10	10
Mineral mix <sup>4)</sup>	35	35	35	35	35	35
Choline bitartrate	2	2	2	2	2	2
Rice			500			
Barley				500		
Rice fermented with <i>P. japonica</i>					250	500

1) RFP25 : Group fed with diet containing 25% rice fermented with *Paecilomyces japonica*.

2) RFP50 : Group fed with diet containing 50% rice fermented with *Paecilomyces japonica*.

3) AIN vitamin mixture(g/kg mixture) : thiamine HCl 600, riboflavin 600, pyridoxine HCl 700, nicotinic acid 3000, D-calcium pantothenate 1600, folic acid 200, D-biotin 20, cyanocobalamin 1, retinyl palmitate 120,000 retinol equivalents, dl- $\alpha$ -tocophenyl acetate 5,000IU vitamin E activity, cholecalciferol 2.5, menadione 5.0, sucrose finely powdered, to make 1,000gram.

4) AIN mineral mixture(g/kg mixture) : calcium phosphate, dibasic 500, sodium chloride 74, potassium citrate, monohydrate 220, potassium sulfate 52, magnesium oxide 24, manganous carbonate 2.5, ferric citrate 6, zinc carbonate 1.6, cupric carbonate 0.3, potassium iodate 0.01, sodium selenite 0.01, chromium potassium sulfate 0.55, sucrose, finely powdered , to make 1000gram.

## 나. 시료 채취 및 처리

사육기간중 실험동물의 체중은 매일 식이급여전 일정시간에 측정하였으며, 식이섭취량은 매일 일정시간에 식이급여량과 잔량을 측정하여 산출하였다. 식이 효율(feeding efficiency ratio : FER)은 6주간의 총 식이섭취량에 대한 체중증가량의 비( $FER = \text{body weight gain(g)} / \text{food intake(g)}$ )로 계산하였다. 그리고 매주 1회 공복시 안와채혈하여 Precision Plus Electrodes (Medisense Contract Manufacturing Ltd., UL)를 사용하여 혈당을 측정하였다. 사육 6주간의 최종일에 16시간 절식시킨 후 에테르 마취하에서 심장채혈법으로 채혈하였다. 채혈한 혈액은 3,000rpm에서 15분간 원심분리후 혈장을 분리하여 분석시료로 사용하였고, 간장과 소장은 채혈후 즉시 적출하여 생리식염수로 세척하고 여과지로 표면의 수분을 제거한 후 무게를 측정하였으며,  $-50^{\circ}\text{C}$  냉동고에 보관하면서 실험에 사용하였다.

## 다. 혈액 및 간의 성분분석

분리한 혈액으로부터 제조한 혈장 중의 중성지질은 GPO-PAP법을 이용한 kit(영동제약)로 546nm에서, 총 콜레스테롤 농도는 cholesterol hydrolase를 이용한 효소법 kit(영동제약)로 500nm에서, HDL-cholesterol 농도는 cholesterol esterase를 이용한 효소법 kit(아산제약)로 500nm에서 spectrophotometer를 사용하여 비색정량하였다.

## 5. 버섯배양곡물의 식품 소재화 및 가공제품 개발

### 가. 혈당강하 활성 획분의 특성 조사

#### 1) 혈당강하 활성획분의 분리, 정제

*Paecilomyces japonica*로 배양한 버섯배양현미 분말을 증류수에 현탁시키고 20%(w/v) sodium carbonate로 pH를 10으로 조정후 다당을 추출하고 원심분리하여 상정액은 모으고 침전물에 대하여 위의 알칼리 추출을 2회 반복하였다.



2M HCl로 상징액의 pH를 4로 조정하여 단백질을 침전시킨 다음 상징액에 isopropyl alcohol을 50%가 되도록 첨가하여 방치한 후 원심분리하여 침전물을 회수하고 건조하여 crude 상태의 다당을 얻었다. 분리한 crude 다당을 증류수에 1% (w/v) 되도록 분산시키고 가열하여 용해시킨 후 원심분리하여 상징액을 얻고 이를 pH 6.9로 조정하고  $\alpha$ -amylase (1,013U/100mL solution)를 첨가하여 40°C에서 1시간 반응시키고, pH를 다시 7.5로 조정한 후 pronase (70U/100mL solution)를 첨가하여 40°C에서 1시간 반응시켰다. 반응 후 가열하여 효소를 불활성화시키고 원심분리로 상징액만을 분리해 증류수에 대하여 투석을 실시하였으며, 투석액을 동결건조하여 정제된 다당을 얻었다. 투석은 MWCO 6,000~8,000 (Spectrum Medical Industry, U.S.A)의 막을 사용하여 실시하였다.

## 2) 활성획분의 *in vitro*에서의 포도당 투과지연효과 및 당부하 시험

균사체의 *in vitro*에서의 투과지연 효과 및 당부하 시험과 동일한 방법으로 측정하였다.

## 3) 활성획분의 점도

활성획분을 1N KOH 용액에 용해시키고 이를 0.45 $\mu$ m membrane filter로 여과한 후 0.1~2%(w/w)의 농도범위에서 Cannon-Fenske 모세관 점도계 (No. 100)를 사용하여 28°C의 항온수조에서 점도를 측정하였으며, 이를 pectin과 비교하였다.

## 4) 활성획분의 균체량, 용해도 및 요오드 반응성

활성획분의 균체량 측정은 앞의 버섯배양곡물의 균체량 측정방법과 동일한 방법으로 측정하였으며, 활성획분의 용해도는 활성획분 1g을 물에 용해시킨 후 원심분리하여 상징액을 분리한 후 상징액에 함유된 당의 함량을 페놀-황산법으로 정량하여 전체 활성획분의 무게로 나누어 계산하였다. 활성획분의 요오드 반응성은 활성획분 용액에 요오드 용액(0.2% I<sub>2</sub> + 2% KI)을 떨어뜨려 전분과 요오드와의 반응에 의한 색깔 변화를 조사하였다.

## 나. 버섯배양곡물을 이용한 가공제품 개발

### 1) 차류제품

#### 가) 현미녹차

바람직한 향미를 나타내는 전처리 조건을 확립하기 위해 현미에 *Paecilomyces japonica*를 배양한 버섯배양현미를 후라이팬에서의 볶음(약한불), 압력을 이용한 퍼핑, 퍼핑후 볶음(약한불) 등의 3가지 방법으로 볶음처리한 후 이를 분쇄하여 색도, 용해도, 팽윤력 등을 조사하였으며, 시판 녹차잎(T사)과 전처리한 버섯배양현미를 일정비율(녹차잎 : 현미 = 6 : 4)로 혼합하여 티백포장한 후 끓는물에서 일정시간 담구어(현미녹차 : 물 = 2g : 100mL) 이를 관능적으로 비교하여 적절한 전처리 방법을 설정하였다. 이상의 결과 확립된 전처리 방법에 의한 현미녹차와 시판 현미녹차(T사)를 관능적으로 비교하였다.

#### 나) 보리차

버섯배양보리를 이용한 보리차를 제조하기 위해 보리의 바람직한 볶음 향미를 발현하기 위한 전처리 조건을 조사하였다. 보리에 *Paecilomyces japonica*를 배양한 버섯배양보리를 후라이팬에서의 볶음(중불), 압력을 이용한 퍼핑, 퍼핑후 볶음(중불) 등의 3가지 방법으로 볶음처리한 후 이를 분쇄하여 색도, 용해도, 팽윤력 등을 조사하였다. 그리고 버섯배양보리와 물을 일정비율(버섯배양보리 : 물 = 5g : 1L)로 혼합한 후 끓는물에서 10분간 가열처리한 후 여러 가지 볶음조건에 따른 보리차의 이화학적 특성과 관능적 기호도를 조사하여 적정 볶음조건을 확립하였으며, 확립된 볶음조건에서의 버섯배양보리를 이용한 보리차와 시판 보리차를 관능적으로 비교하였다.

#### 다) 선식중간소재

선식원료로 사용하기에 적합한 향미를 발현하기 위한 볶음조건을 확립하기 위해 현미에 *Paecilomyces japonica*를 배양한 버섯배양현미를 후라이팬에서의 볶음(약한불), 압력을 이용한 퍼핑, 퍼핑후 볶음(약한불) 등의 3가지 방법으로 볶음처리하고 분쇄한 후 물에 현탁시킨 후 관능검사를 통하여 선식소재로 사용하기에 적합한 향미를 발현하는 적정 볶음조건을 조사하였다. 원료 곡물을 사용

한 미숫가루와 버섯배양곡물을 사용한 미숫가루의 기호도를 비교하기 위하여 현미, 보리, 콩, 율무, 팥에 *Paecilomyces japonica*를 배양한 버섯배양곡물을 확립된 볶음조건을 이용하여 볶은 후 분쇄하여 현미 30%, 보리 30%, 콩 10%, 율무 20%, 팥 10%의 배합비로 혼합한 후 관능적 기호도를 비교하였다.

## 2) 장류제품

### 가) 메주와 버섯배양콩의 혼합비율별 된장 제조

#### (1) 된장제조

메주 100% 처리구와 메주와 *Phellinus linteus*를 접종, 배양한 버섯배양콩의 혼합비율을 2:1, 1:1, 1:2로 조정하여 처리구를 hobart mixer에서 물과 혼합하였으며, 이때 소금의 양은 18%로 동일하게 첨가하였다. 상세한 배합비는 Table 3과 같다.

Table 3. Formula of *Doenjang* prepared in different mixing ratio of *Meju* and soybean fermented with *Phellinus linteus*

	(%)			
	A ( <i>Meju</i> 100%)	B ( <i>Meju</i> 67% : SP* 33%)	C ( <i>Meju</i> 50% : SP* 50%)	D ( <i>Meju</i> 33% : SP* 67%)
<i>Meju</i>	26.5	17.6	13.2	8.8
Soybean fermented with <i>P. linteus</i>	-	8.6	12.9	17.2
Salt	18.0	18.0	18.0	18.0
Water	55.5	55.8	55.9	56.0
Total	100.0	100.0	100.0	100.0

\* : Soybean fermented with *Phellinus linteus*

(2) 된장 숙성중 이화학적 특성 변화 조사

(가) 식염

시료 5g을 증류수 100mL에 넣고 혼합한 뒤 250mL로 정용한 뒤 5mL에 5%의  $K_2CrO_4$  1mL를 가한 후 0.1N  $AgNO_3$ 로 미적색이 나타날 때까지 적정하여 염분의 함량을 계산하였다.

$$NaCl(\%) = \frac{0.1N \text{ } AgNO_3 \text{의 적정량} \times F \times 0.00585}{\text{시료의 무게} \times \text{희석배수}} \times 100$$

F : 0.1N  $AgNO_3$ 의 농도계수(Factor)

(나) pH

시료 10g에 증류수 50mL를 가하여 균질화시킨 후 pH meter (Orion, U.S.A)로 측정하였다.

(다) 적정산도

시료 10g에 증류수 40mL를 가하여 교반하면서 0.1N NaOH용액으로 pH가 8.4가 될 때까지 적정하여 이에 소비된 mL수를 적정산도로 표시하였다.

(라) 조단백질

시료 0.2g을 정확히 취하여, 진한  $H_2SO_4$  5mL와 분해촉진제 1 tablet (Kjeltabs Auto, tecator, Sweden)을 넣고 heating block (Digestion system 40, 1016 digester, tecator, Sweden)에서 분해한 후, 35% NaOH와 0.1% boric acid를 사용하여 Kjeltec auto 1030 analyzer(tecator, Sweden)로 총질소함량을 구하였다. 총질소함량에 질소계수 6.25를 곱하여 조단백질 함량으로 하였다.

(마) 포르몰태 질소

포르몰태 질소는 시료 10g에 증류수 40mL를 가하여 0.1N NaOH로 pH 8.4가 되도록 조절한 뒤 중성 포르말린 20mL을 넣고, 다시 0.1N NaOH로 pH 8.4까지 적정하여 이때 소비된 0.1N NaOH mL를 아래의 계산식에 대입하여

그 함량을 산출하였다. 여기에서 상수 1.4는 0.1N NaOH mL에 해당하는 포르몰데 질소의 mg이다.

$$\text{포르몰데 질소(mg\%)} = \frac{(\text{시료적정mL} - \text{공시험mL}) \times 1.4 \times F}{\text{시료(g)}} \times 100$$

F : 0.1N NaOH의 factor

#### (바) 수용성 단백질

시료 5g을 정확히 취하여 마쇄한 후, 이를 비이커에 옮기고 물 100mL를 가하여 1시간 진탕하고 여과후 메스플라스크(200mL)에 옮겨 물을 가하여 정용하고 여과하였다. 여과액 중에서 0.2mL를 취하여 Micro protein determination kit(Sigma 690)를 이용하여 수용성 단백질양(mg%)을 구하였다.

#### (사) 환원당

시료 5g에 증류수 100mL를 가한 후 당성분이 용출되도록 3시간 진탕 추출시킨후 여과하여 Somogyi-Nelson법으로 측정하였다.

#### (아) 색도

된장 숙성과정 중 색의 변화는 색차계 (ColorQUEST II, HunterLab, U.S.A)를 사용하여 L, a, b 및 ΔE-value를 측정하였다.

#### 나) 청국장 및 보리밥 제조

콩 2kg을 8시간 수침하여 불린 후 물 3.7kg을 첨가하고 콩이 붉은색을 띠기 전까지 약한 불로 삶았다. 삶은 후 콩의 밑과 위에 짚을 깔고 35℃에서 3일간 발효시켜 청국장을 제조하였다. 이때 젖은 수건을 덮어 수분이 마르지 않게 하였으며, 발효 종료후 이를 chopper로 마쇄하여 시료로 사용하였다.

보리밥은 보리쌀을 수침하여 수분함량이 50% 정도 되도록 흡수시킨 후 3~4배의 물을 가수하여 보온밥통에서 취반하였으며 이를 chopper로 마쇄하여 시료로 사용하였다.

다) 된장, 고추장의 최적배합비 시험

된장의 최적배합비를 결정하기 위하여 메주와 *Phellinus linteus*로 배양한 버섯배양콩의 혼합비율별, *Paecilomyces japonica*를 배양한 버섯배양현미의 첨가유무, *Phellinus linteus*를 배양한 버섯배양보리 그리고 청국장, 보리밥, 소금 등의 부원료의 첨가량에 따라 된장을 제조하고 실온에서 약 70일 숙성 후 관능검사를 실시하였다. 또 고추장의 최적배합비를 결정하기 위하여 버섯배양콩 또는 버섯배양현미의 첨가유무 및 비율별, 맥아 착즙액 또는 맥아 찹쌀 농축액의 첨가유무 그리고 물엿, 고춧가루, 소금 등의 부원료의 첨가량에 따라 고추장을 제조하고 실온에서 약 70일 숙성 후 관능검사를 실시하였다.

## 제 2 절 결과 및 고찰

### 1. 혈당강하 기능 버섯균 탐색

#### 가. 균사체 추출물의 $\alpha$ -glucosidase 활성 저해 효과

유전자은행으로부터 분양받은 균주와 참여업체에서 보관중인 총 48종의 버섯균을 수집하여 균사체 배양을 한 후 균사체를 회수하고 이를 동결건조하여 균체량을 구하였으며, 그리고 회수한 균사체를 75% 메탄올 용액으로 가온 추출하여 추출물을 얻었다. 균사체 배양후 균사체를 회수한 결과 *Fomes fomentarius*와 *Phellinus chrysoloma*의 회수율이 우수하였고, *Flammulina velutipes*(64.0%), *Peniophora quercina*(56.8%), *Pycnoporus cinnabarinus*(52.5%) 등의 추출 수율이 높은 것으로 나타났다.(Table 4)

분리한  $\alpha$ -glucosidase 효소계의 단백질 함량은 0.5mg/mL이었으며 각 기질을 사용하여 활성을 측정된 결과 maltase의 활성 2.04U/mg protein, sucrase의 활성 0.36U/mg protein, lactase의 활성 0.04U/mg protein으로 maltase의 활성이 가장 높았다.

대표적인  $\alpha$ -glucosidase 저해제인 acarbose를 기준물질로 하여 버섯균사 추출물(1mg/mL)의  $\alpha$ -glucosidase에 대한 저해율을 조사하였으며 결과는 Table 4와 같다. 대부분의 버섯균사 추출물이  $\alpha$ -glucosidase에 대한 저해효과를 나타내지 않았으며, *Cordyceps militaris* 같은 동충하초, 상황버섯 등이 저해효과를 나타내었으나 상당히 높은 균사체 농도(1mg/mL)에서 10~20% 정도의 비교적 낮은 저해율을 나타내었다. 비록 낮은 저해율을 나타내었지만 저해효과를 나타낸 대부분의 균종들이 문헌상으로 *in vivo* 시험에서도 혈당강하 효과를 나타내는 균종들이므로 보아 전혀 근거없는 결과는 아닌 것으로 판단되었다. 그러나 단순히  $\alpha$ -glucosidase 활성에 대한 저해효과 분석 결과만으로 버섯균사체의 혈당강하 효과를 판정하기에는 다소 무리가 있는 것으로 판단되었기 때문에 비교적 우수한 결과를 나타낸 균종을 중심으로 *in vitro*에서의 포도당 투과지연 효과 분석과 *in vivo*에서의 당부하 시험을 병행하여 판단하기로 하였다.

Table 4. Extraction yield and inhibitory effect of extracts of Basidiomycetes strains for  $\alpha$ -glucosidase activity

Strain	Wt. of mycelia(g)	Extraction yield(%)	Inhibition (%)
<i>Agaricus arvensis</i> (아가리쿠스)	2.20	25.3	-
<i>Agaricus blazei</i> (아가리쿠스)	1.48	30.5	10.5±2.1
<i>Amanita aspera</i> (광대버섯속)	2.52	42.8	-
<i>Bondarzewia montana</i>	1.88	20.1	-
<i>Clavicornia pyxidata</i> (좁나무싸리버섯)	0.76	29.2	-
<i>Clitocybe clavipes</i> (갈매기버섯속)	0.90	27.2	-
<i>Cordyceps militaris</i> (동충하초)	3.70	32.0	17.2±3.3
<i>Cordyceps ophioglossoides</i> (동충하초속)	1.00	32.3	-
<i>Cordyceps sinensis</i> (동충하초)	1.57	8.1	20.5±7.4
<i>Coriolus azureus</i> (구름버섯속)	0.62	27.1	-
<i>Flammulina velutipes</i> (팽나무버섯)	1.73	64.0	-
<i>Fomes fomentarius</i> (말굽버섯)	3.11	23.6	-
<i>Ganoderma applanatum</i> (영지버섯)	1.23	12.4	-
<i>Ganoderma lucidum</i> (영지버섯)	0.94	31.3	15.8±2.5
<i>Ganoderma valesiacum</i> (영지버섯)	-	-	-
<i>Gloeophyllum abietinum</i> (조개버섯속)	1.24	6.4	-
<i>Grifora frondosa</i> (잎새버섯)	0.30	37.7	-
<i>Hypocrea citrina</i> var. <i>citrina</i>	1.22	26.5	5.2±1.1
<i>Hypocrea lactea</i>	0.69	43.6	-
<i>Hypocrea muroiana</i>	6.39	4.4	-
<i>Hypocrea nigricans</i>	2.33	10.8	-
<i>Laetiporus sulphureus</i> (떡다리버섯)	0.47	30.0	-
<i>Lentinus edodes</i> (표고버섯)	1.76	20.7	9.3±5.5
<i>Lenzites betulina</i> (조개껍질버섯)	1.09	5.4	-
<i>Leucogyrophana mollusca</i>	3.61	14.4	-
<i>Merulius tremellosus</i> (아교버섯)	1.4	15.7	-



Table 4. (continued)

Strain	Wt. of mycelia(g)	Extraction yield(%)	Inhibition (%)
<i>Mycoacia fuscoatra</i> (송곳버섯속)	3.6	10.5	18.8±3.5
<i>Mitake</i>	0.23	34.2	-
<i>Oxyporus latemarginata</i> (흰살버섯속)	1.03	20.4	-
<i>Paecilomyces japonica</i> (동충하초)	4.22	42.3	-
<i>Peniophora quercina</i> (분홍껍질고약버섯)	0.93	56.8	-
<i>Phanerochaete sordida</i>	0.92	32.1	-
<i>Phellinus baumi</i> (장수진흙버섯)	1.62	15.5	-
<i>Phellinus chrysoloma</i> (진흙버섯속)	3.66	14.6	13.6±2.2
<i>Phellinus igniarius</i> (진흙버섯속)	1.16	26.8	-
<i>Phellinus japonica</i> (진흙버섯속)	3.85	27.3	-
<i>Phellinus linteus</i> (진흙버섯속)	1.08	10.7	15.9±3.6
<i>Phlebia radiata</i> (가는주름버섯속)	0.83	22.2	-
<i>Phlebiopsis gigantea</i>	2.22	21.3	-
<i>Pleurotus ostreatus</i> (느타리버섯)	2.76	11.4	10.7±1.4
<i>Poria cocos</i>	0.7	31.4	-
<i>Pycnoporus cinnabarinus</i> (주걱간버섯)	1.57	52.5	-
<i>Rigidoporus vinctus</i>	1.52	44.1	-
<i>Stereum gausapatum</i> (흰테꽃구름버섯)	0.88	10.4	-
<i>Trametes versicolor</i> (송편버섯속)	1.10	27.6	-
<i>Wolfiporia cocos</i> (복령)	1.7	10.5	-
<i>Wolfiporia extensa</i> (복령속)	1.95	11.9	-
<i>Xylaria sicula f. major</i>	1.66	15.8	-

## 나. 균사체의 식후 혈당상승 억제 효과 조사

### 1) 균사체의 *in vitro*에서의 포도당 투과지연 효과

균사체의 포도당의 투과막을 통한 통과속도에 미치는 영향을 조사하기 위하여 균사체 존재시 투석막 내의 포도당이 투석막 외액으로 투과되는 정도를 대표적인 수용성 식이섬유인 pectin, guar gum과 비교하였으며, 그 결과는 Table 5와 같다. Pectin과 guar gum의 경우 120분 동안 투석을 실시하였을 때 투석막 내의 전체 포도당 중에서 각각 8.5%와 14.5%의 포도당만 투석막 내액에 존재하고 나머지는 외액으로 전부 용출된 반면 균사체의 경우에는 전체 포도당 중 13.1~41.8%의 포도당이 투석막 내액에 잔존하는 것으로 나타나 시험한 대부분의 균사가 pectin과 guar gum 보다 포도당의 투석막 밖으로의 투과를 지연시키는 효과가 큼을 알 수 있었다. 특히 *Phellinus linteus*의 경우 전체 포도당 중 41.8%의 포도당이 투석막 내액에 잔존하는 것으로 나타나 그 효과가 가장 컸고, 이외에 *Cordyceps ophioglossoides*(28.9%), *Pleurotus ostreatus*(28.9%), *Paecilomyces japonica*(28.1%) 등이 *in vitro*에서의 포도당 투과지연 효과가 우수한 것으로 나타났다. 포도당 투과지연 효과는 수용성 식이섬유의 함량과 용액의 점도와 직접적인 관련이 있는 것으로 알려져 있다<sup>(37,38)</sup>. 이는 수용성 식이섬유가 점성이 높은 gel을 형성하여 포도당을 포집함으로써 포도당이 확산되는 것을 억제하기 때문인 것으로 보고된다. 한편 Kato 등은 무, 양배추, 대나무 등으로부터 분리한 불용성 식이섬유가 *in vitro*에서의 포도당의 투과 지연에 미치는 영향을 조사하여 불용성 식이섬유가 포도당의 투과속도를 크게 지연시키며, 이 현상은 수용성 식이섬유에서의 흡착작용에 의한 것이 아니라 불용성 식이섬유의 망목(network)에 일시적으로 포집하여 포도당의 이동이 방해받기 때문이라고 하였다<sup>(39,40)</sup>.

Table 5. Effect of Basidiomycetes mycelia on retarding the membrane transport of glucose *in vitro*

Strain	Glucose in inner solution (%)		
	Dialysis time		
	0 min	30 min	120 min
<i>Ganoderma applanatum</i>	100	55.6	24.5
<i>Hypocrea citrina</i> var. <i>citrina</i>	100	47.4	25.4
<i>Cordyceps sinensis</i>	100	54.9	26.1
<i>Cordyceps ophioglossoides</i>	100	50.6	28.9
<i>Phellinus igniarius</i>	100	45.4	13.1
<i>Pleurotus ostreatus</i>	100	52.8	28.9
<i>Ganoderma lucidum</i>	100	52.1	13.4
<i>Phellinus baumi</i>	100	55.0	27.4
<i>Leucogyrophana mollusca</i>	100	50.1	15.2
<i>Lentinus edodes</i>	100	56.8	27.0
<i>Phellinus linteus</i>	100	66.5	41.8
<i>Paecilomyces japonica</i>	100	52.1	28.1
Pectin	100	40.7	8.5
Guar gum	100	57.3	14.5

## 2) 균사체의 내당능

균사체의 *in vivo* 상에서의 식후 혈당에 대한 억제 효과를 조사하기 위하여 *in vitro*에서의 포도당 투과지연 효과가 우수한 것으로 확인된(Table 5) 균사체를 이용하여 streptozotocin (40mg/kg b.w)으로 당뇨 유발된 당뇨쥐에 맥아당을 섭취시킨 후 경과시간별로 혈액을 채취하여 혈당을 측정하고 이를 균사체를 투여하지 않은 대조구, pectin을 투여한 pectin 처리구의 경우와 비교하였으며 그 결과는 Table 6 및 Fig. 1과 같다. Table 6에서 보는 바와 같이 대조구의 경우

포도당 경구투여 후 30분 경과하였을 때 194.1%로 급격히 증가하였다가 감소한 후 120분 경과하였을 때에도 141.3%를 나타내어 혈당이 여전히 높은 값을 유지하였고 pectin 투여구의 경우에도 30분 경과시 165.3%로 크게 증가하였다가 그후 감소하여 120분 경과시에는 105.1%를 나타내었다. 한편 균사체 투여시에는 30분 경과시 143.2~154.4%로 대조구와 pectin 투여구에 비해 상당히 낮은 값을 나타내어 버섯균사체가 pectin 보다 식후 혈당상승을 억제하는 효과가 월등히 우수한 것으로 판단되었다. 특히 *Phellinus linteus*와 *Paecilomyces japonica*의 경우 30분 경과시 각각 145.7%와 143.2%로 기타 균사체에 비해서도 다소 낮은 식후 혈당값을 나타내었고 120분 경과시에는 95.4~104.1%로 맥아당 투여전의 초기 혈당값으로 낮아진 것으로 나타나 이들 균주가 식후 혈당상승 억제 효과가 매우 우수함을 알 수 있었다.

Table 6. Effect of Basidiomycetes mycelia on relative blood glucose level after maltose administration in diabetic rats

Strain	Relative blood glucose level (%)				
	Time after maltose administration				
	0 min	30 min	60 min	90 min	120 min
<i>Ganoderma applanatum</i>	100	154.4	140.0	126.6	127.3
<i>Hypocrea citrina</i> var. <i>citrina</i>	100	151.0	128.7	133.5	114.3
<i>Cordyceps sinensis</i>	100	148.9	128.8	131.4	115.5
<i>Cordyceps ophioglossoides</i>	100	150.6	140.8	135.4	126.2
<i>Pleurotus ostreatus</i>	100	147.8	157.6	125.5	128.7
<i>Phellinus linteus</i>	100	145.7	129.1	110.8	104.1
<i>Paecilomyces japonica</i>	100	143.2	129.9	118.3	95.4
Control	100	194.1	157.8	150.4	141.3
Pectin	100	165.3	141.8	118.5	105.1

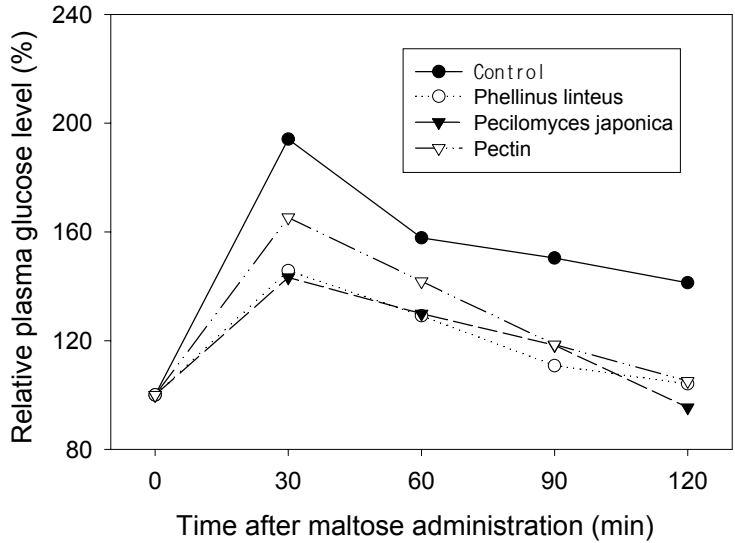


Fig. 1. Changes in relative plasma glucose level after maltose administration in diabetic rats

당뇨에서의 식이섬유 역할은 식후 혈당상승과 인슐린 분비를 억제하는 것으로<sup>(41)</sup> 수용성, 불용성 식이섬유 모두 내당능 증진에 기여한다<sup>(42)</sup>. 수용성 식이섬유는 소장내 내용물의 점도를 높여 포도당의 혈액으로의 release를 지연시키고 또한 효소와 기질에 흡착하여 효소작용 속도를 느리게 한다. 또한 내용물의 점도를 증가시켜 gastric emptying time과 intestinal transit time을 길게 한다<sup>(43,44)</sup>. 그리고 불용성 식이섬유는 효소의 탄수화물 기질로의 접근을 방해하여 탄수화물의 소화를 느리게 한다<sup>(41)</sup>. 점성이 높은 식이섬유에 의한 식후혈당상승억제는 amylase의 활성감소<sup>(45,46)</sup>와 소화최종산물의 lumen 내로의 diffusion 변화에 의한 소장관에서의 포도당 흡수의 지연<sup>(47,48)</sup>에 기인하는 것이다. Guar gum이나 pectin 같은 고점도 수용성 식이섬유가 식품에 첨가될 때 gastric emptying time을 증가시키고 소장에서의 소화와 탄수화물의 흡수를 억제하고 지연시키는 것으로 보고되고 있다<sup>(49,50)</sup>.

## 2. 혈당강하 기능 버섯배양곡물 탐색

### 가. 버섯배양곡물 추출물의 $\alpha$ -glucosidase 활성 저해 효과

식후 혈당 상승 억제에 효과적인 것으로 확인된 *Paecilomyces japonica*를 이용하여 3주간 배양하여 버섯배양곡물을 제조한 후 이들 곡물에 함유된 총 폴리페놀 함량을 구한 결과 Table 7에서 보는 바와 같이 버섯배양콩이 507.9mg%로 가장 높은 폴리페놀 함량을 나타내었고 보리가 62.9mg%로 가장 낮은 함량을 나타내었다. 또 이들 곡물로부터 폴리페놀 추출물을 제조하고 2mg/mL의 농도에서  $\alpha$ -glucosidase에 대한 저해효과를 측정된 결과 Table에서 보는 바와 같이 현미(24.3%)를 제외하고는 저해효과를 나타내지 않았다.

Table 7. Total polyphenol content and inhibitory activity of extract of cereals fermented with *Paecilomyces japonica* for  $\alpha$ -glucosidase

	Total polyphenol (mg%)	Inhibition for $\alpha$ -glucosidase (%)
Brown rice	100.0	24.3
Barley	62.9	-
Soybean	507.9	-
Job' tears	119.8	-
Red bean	233.9	-

현재까지 당뇨병 치료제로서 연구되어진  $\alpha$ -glucosidase 저해제는 저분자의 당유도체이며, 그 구조에 치환된 cyclohexene ring과 4,6-di-deoxy-4-amino-D-glucose를 가진다. 이 구조의 secondary amino group이 기질인 이당류의 oxygen bond를 가수분해하는  $\alpha$ -glucosidase의 carboxyl group을 방해함으로써  $\alpha$ -glucosidase를 저해한다<sup>(51)</sup>. 당유도체 이외의 성분으로는 녹차의 폴리페놀 성분인 theaflavin digallate, theaflavin monogallate, epicatechin gallate 등이  $\alpha$

-glucosidase를 저해하는 것으로 보고되어 있다<sup>(52)</sup>. 이상의 결과로 추론하여 볼 때 버섯배양현미의 폴리페놀 중에는  $\alpha$ -glucosidase의 활성을 저해하여 식후 혈당의 급격한 상승을 억제할 수 있는 폴리페놀이 일부 함유되어 있는 것으로 판단된다.

## 나. 버섯배양곡물의 식후 혈당상승 억제 효과

제조한 버섯배양곡물의 균체량을 측정한 결과 Table 8에서 보는 바와 같이 현미와 보리는 각각 0.95%와 1.18%로 다소 낮게 나타난 반면 율무, 콩, 팥 등은 4.07~1.82%로 높은 값을 나타내어 율무, 콩, 팥에 *Paecilomyces japonica*가 잘 성장함을 알 수 있었다.

버섯배양곡물의 포도당의 투과막을 통한 통과속도에 미치는 영향을 조사하기 위하여 버섯배양곡물 존재시 투석막 내의 포도당이 투석막 외액으로 확산되는 정도를 조사한 결과는 Table 9와 같다. *Paecilomyces japonica*를 배양한 버섯배양현미와 버섯배양보리를 120분 동안 투석을 실시하였을 때 투석막 내의 전체 포도당 중에서 각각 43.8%, 40.1%의 포도당이 투석막 내액에 존재한 반면 콩, 율무, 팥의 경우 120분 경과시 각각 19.9%, 23.2%, 30.7%의 포도당이 투석막 내액에 잔존하는 것으로 나타나 버섯배양현미와 버섯배양보리가 기타 곡물에 비해 포도당 투과지연 효과가 월등히 우수한 것으로 나타났다.

Table 8. Mycelial weight of cereals fermented with *Paecilomyces japonica* for 3week.

cereals	Mycelial weight (%)
Brown rice	0.80
Barley	1.18
Soybean	2.39
Job' tears	4.07
Red bean	1.92

Table 9. Effect of cereals fermented with *Paecilomyces japonica* on retarding the membrane transport of glucose *in vitro*

cereals	Glucose in inner solution (%)		
	Dialysis time		
	0 min	60 min	120 min
Brown rice	100	53.5	43.8
Barley	100	60.7	40.1
Soybean	100	25.9	19.9
Job's tears	100	30.1	23.2
Red bean	100	30.1	30.7

당뇨유발쥐를 대상으로 버섯배양곡물을 일정농도 강제투여한 후 경과시간별로 혈당변화를 측정된 결과는 Fig. 2와 같다. 현미의 경우 경구투여후 시간이 경과(30분~120분)함에 따라 경구투여 전에 비해 각각 45.2, 57.5, 83.2, 52.0mg/dL의 혈당이 증가하는 것으로 나타난 반면 버섯배양현미는 각각 53.5, 73.7, 49.2, 43.3mg/dL의 혈당이 증가하는 것으로 나타나 버섯배양현미가 현미에 비해 식후 혈당상승 증가가 낮게 나타남을 알 수 있었다. 보리의 경우에는 경구투여후 시간이 경과함에 따라 각각 50.8, 64.6, 52.4, 43.8mg/dL의 혈당이 증가하여 현미와 버섯배양현미에 비해 식후 혈당상승이 둔화되는 것으로 나타났으며, 버섯배양보리의 경우에는 각각 16.5, 31.8, 47.9, 20.5mg/dL의 혈당이 증가하여 식후 혈당상승이 크게 낮은 것으로 나타났다.



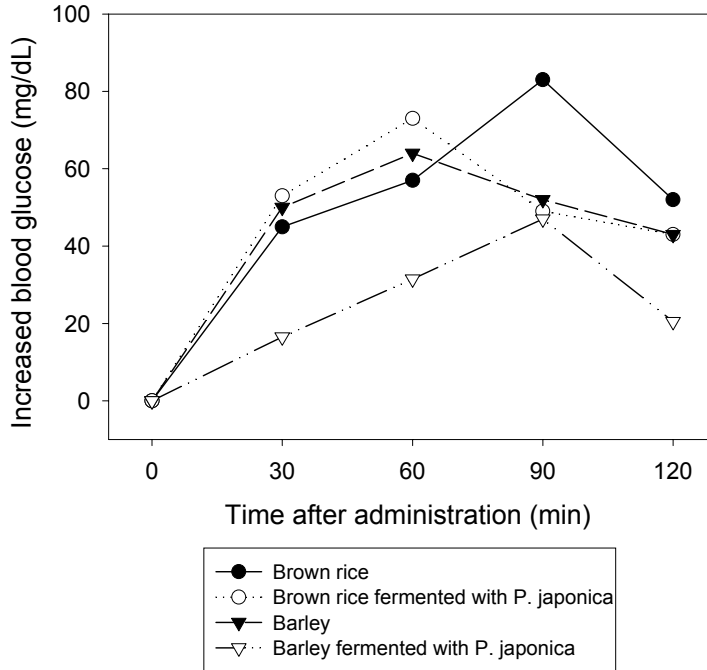


Fig. 2 . Effect of cereals fermented with *Paecilomyces japonica* on glycemic response in diabetic rats

인체내에서의 혈당반응은 식품에 따라 다르게 나타나 일반적으로 같은 양의 탄수화물 식품을 섭취하더라도 서로 다른 속도로 소화·흡수된다. 소화흡수가 느린 식품은 혈당반응이 느린데 비해서 소화흡수가 빠른 식품은 혈당반응이 급격히 증가하였다가 감소할 뿐만 아니라 인슐린 및 다른 내분비물의 반응도 상승시킨다<sup>(53)</sup>. Jenkins 등<sup>(54)</sup>은 어떤 식품을 섭취했을 때 나타나는 혈당반응과 포도당 섭취시의 혈당반응과 비교하여 나타낸 glycemic index(GI)를 보고하였으며 이는 당뇨병자 및 고지혈증 환자의 식이요법에 임상적으로 이용되고 있다. 또한 Lee 등<sup>(55)</sup>은 국내산 곡물(보리, 현미, 율무, 수수 등)을 이용하여 포도당을 기준으로 한 GI를 구한 결과 보리가 57±7%로서 가장 낮은 값을, 현미찹쌀이 110±8%로

서 가장 높은 값을 나타내었으며, 찹쌀군에 비해 멥쌀군의 GI가 낮고 혈당반응도 완만하여 혈당조절에 유리한 것으로 밝혀졌으며, 보리가 GI와 최고 혈당값이 가장 낮아서 바람직한 당뇨식이소재라 하였다. GI가 낮은 식품은 인슐린 민감도를 증가시키고<sup>(56)</sup> 간의 중성지방 합성을 감소시킴으로써 혈당조절 및 혈청지방 조절에 효과가 있으므로<sup>(57)</sup> 당뇨환자 뿐만 아니라 고지혈증 환자에게 임상적으로 이용되고 있다.

### 3. 버섯배양곡물의 최적 제조조건 확립 및 식품학적 특성 조사

#### 가. 버섯배양곡물의 최적 제조조건 확립

고체배양을 위한 원료는 주성분이 서로 다르기 때문에 수분흡수특성이 다르고 수분흡수 후 살균과정에서도 서로 다른 물리적 특성을 나타내기 때문에 개별 곡물에 적합한 수침 및 살균조건이 확립되어야 한다.

현미, 보리, 콩, 울무, 팥 등의 곡물을 고체배양의 재료로 하여 대량 배양할 때 적합한 수분함량을 설정하기 위하여 비닐봉지에 수침하여 수분함량이 평형에 도달한 곡물을 담고 121℃에서 60분간 고압살균하여 살균 전후의 수분함량 변화를 조사한 결과는 Table 10과 같다. 각 원료간에 차이는 있으나 살균 후 모든 원료에서 수분함량이 감소하였다. 특히 현미의 수분감소량이 상대적으로 많았으며 따라서 버섯배양시 고압살균후 감소되는 수분량을 고려하여 그에 적절한 배양방법이 강구되어야 할 것으로 판단되었다.

Table 10. Changes in moisture content of soaked cereals after autoclaving (%)

	Brown rice	Barley	Soybean	Job's tears	Red bean
Before autoclaving	41.5	55.8	65.4	45.3	60.7
After autoclaving	36.7	52.7	61.3	41.0	57.3

버섯배양곡물 제조를 위한 살균조건을 확립하기 위하여 비닐봉지에 수침한 콩과 현미를 500~2500g씩 담고 121℃에서 15~120분간 열처리한 후 배양하여 배양속도, 오염정도 등을 조사한 결과는 Table 11과 같다. 현미의 경우에는 90분간 열처리하면 2000g 까지 담았을 때도 오염이 발생하지 않았지만 버섯균이 전체적으로 고르게 성장하지 못하고 배양기간이 오래 걸리고 일부 건조현상이 발견되었기 때문에 현미 1500g을 비닐봉지에 담아 121℃에서 120분간 열처리하는

것을 적정 살균조건으로 하였다. 또 콩의 경우 2500g 처리할 때는 오염은 문제가 없었지만 접종 후 혼합이 용이하지 않고 배양속도가 늦었기 때문에 수침한 콩 2000g을 비닐봉지에 담아 121℃에서 60분간 열처리하는 것을 적정 살균조건으로 하였다. 이와 같은 실험을 통해 설정된 각 곡물의 적정 포장 단위 및 고압살균시간은 Table 12와 같다.

Table 11. Optimum autoclaving condition of brown rice and soybean in vinyl bag during solid state fermentation

	Autoclaving time (min)	Weight of cereals (g)				
		500	1000	1500	2000	2500
Brown rice	15	-	-	-	-	-
	30	+	-	-	-	-
	60	+	+	-	-	-
	90	+	+	+	+	-
	120	+	+	+	+	+
Soybean	15	-	-	-	-	-
	30	+	-	-	-	-
	60	+	+	+	+	+
	90	+	+	+	+	+
	120	+	+	+	+	+

Table 12. Optimum condition of solid state fermentation of various cereals

	Soaking time (hr)	Weight (g)	Autoclaving time (min)
Brown rice	10	1,500	120
Barley	8	2,000	120
Soybean	12	2,000	60
Job's tears	6	1,500	90
Red bean	12	1,500	60

확립된 침지조건, 곡물의 양, 적정 살균조건을 토대로 *Paecilomyces japonica*의 최적 배양조건을 확립하기 위하여 침지시 당과 유지를 혼합한 후 균사를 접종하고 3주간 배양하였을 때의 성장경도와 취반후 관능적 특성을 조사한 결과는 Table 13과 같다. 수침시 sucrose를 일부 혼합함으로써 대조구에 비해 균체량이 크게 증가함을 알 수 있었고 sucrose 0.5% 혼합의 경우 제조한 버섯배양 쌀의 기호도도 대조구와 차이가 없는 것으로 나타났다. 반면 유지 첨가의 경우 균체량 증가에 거의 효과가 없었으며, 기호적으로도 그다지 좋지 않은 것으로 나타났다.

Table 13. Changes in mycelial weight and sensory characteristics of brown rice fermented *Paecilomyces japonica* by mixing of sucrose and oil

	Mycelial weight (%)	Sensory characteristics
Control	0.92	+++
0.5%	1.53	+++
Sucrose 1.0%	1.45	++
1.5%	1.45	++
Oil (0.1%)	1.14	++

+ : bad, +++ : good

확립된 전처리 및 배양조건에 의한 버섯배양현미와 기존의 조건에 의한 버섯배양현미의 외관을 비교한 결과 Fig. 3에서 보는 바와 같이 기존제품에 비해 훨씬 많은 균사가 외부에 부착되어 있음을 알 수 있었고, 이들의 이화학적 특성을 비교한 결과는 Table 14, Fig. 4와 같다. 기존제품의 경우 균체량 0.81%에서 개발제품의 균체량 1.53%로 크게 증가하였으며, 총 식이섬유 함량은 3.86%에서 3.83%로 거의 변화가 없었다. 80℃에서 20분간 처리하였을 때 용해도가 기존제품의 14.3%에서 개발제품의 69.6%로 크게 증가하였고, 수분결합력도 15.6%에서 22.3%로 크게 증가하는 것으로 나타나 균사체 생장에 의해 이화학적 특성이 크게 변함을 알 수 있었다. 수분흡수속도도 Fig. 4에서 보는 바와 같이 개발제품이 기존제품에 비해 수분흡수량이 월등히 크고 또한 평형에 도달하는 시간도 훨씬 빠른 것으로 나타났다.



Fig. 3. Appearance of commercial(left) and newly developed product(right)

Table 14. Physicochemical properties of commercial and newly developed product

	Commercial product	Newly developed product
Mycelial weight (%)	0.81	1.53
Total dietary fiber (%)	3.86	3.83
Swelling power (80°C, 20min)	9.6	9.2
Solubility (% , 80°C, 20min)	14.3	69.6
Water holding capacity (%)	15.6	22.3

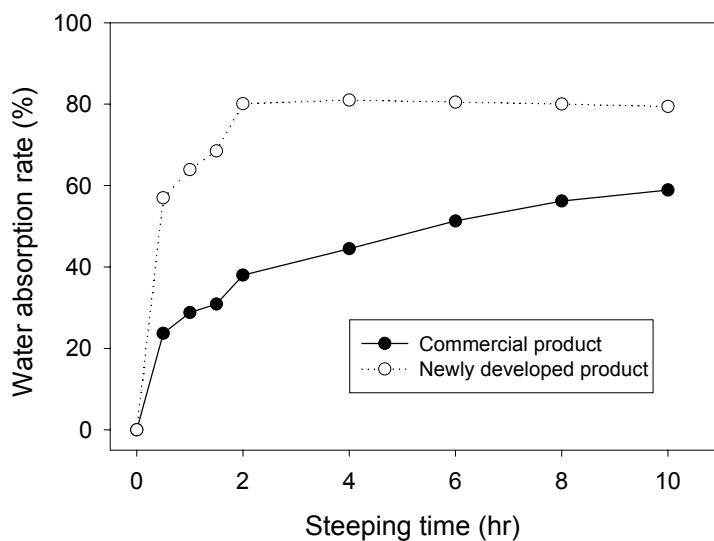


Fig. 4. Water absorption rate of commercial and newly developed product

#### 나. 균종별, 배양기간별 버섯배양곡물의 식품학적 특성 조사

혈당강하에 효과가 있는 것으로 조사된 *Paecilomyces japonica*와 *Phellinus linteus*를 이용하여 앞서 확립된 전처리 및 배양조건으로 현미를 처리하고 3주간 배양하여 버섯배양현미를 제조한 후 이들 버섯배양현미의 여러 가지 이화학적 특성을 현미와 비교한 결과는 Table 15~18과 같다. Table 15에 의하면 현미가 이들 균종에 의해 버섯배양됨에 따라 균체량이 각각 1.61%와 1.82%로 증가하였으며, 총 식이섬유 함량도 현미의 3.33%에서 각각 3.94%와 3.96%로 약간 증가함을 알 수 있었다. 한편 *Phellinus linteus*는 세포벽 성분을 분해하는 특성이 강하기 때문에 환원당이 상당히 많이 생성되었고 무기질의 경우 큰 변화는 없었지만 버섯배양현미가 현미에 비해 K의 양이 감소하는 반면 Ca의 양이 다소 증가하는 것으로 나타났다.

Table 15. Physicochemical properties of brown rice and brown rice fermented with *Paecilomyces japonica* and *Phellinus linteus*

	Brown rice	Brown rice fermented with <i>P. japonica</i>	Brown rice fermented with <i>P. linteus</i>	
Mycelial weight (%)	-	1.61	1.85	
Reducing sugar (mg%)	47.8	256.3	1240.9	
Total dietary fiber (%, Dry basis)	3.33	3.94	3.96	
	Ca	10.4	16.8	24.5
	Mg	116.2	105.0	111.3
Mineral (mg%, Dry basis)	Na	44.1	61.8	34.0
	P	316.4	301.6	304.3
	K	353.4	332.0	244.5
	Fe	1.36	1.14	1.46



Table 16은 이들 버섯배양현미의 지방산 조성을 현미와 비교한 것으로서 조성에 거의 차이가 없는 것으로 나타났으며, Table 17은 총 아미노산 조성을 현미와 비교한 것으로서 버섯균사의 분해작용에 의해 현미의 총 아미노산 함량 6,444.9mg%에서 *Paecilomyces japonica*와 *Phellinus linteus*를 배양한 버섯배양 쌀에서 각각 5,111.2mg%, 5,400.6mg%로 상당히 감소함을 알 수 있었다. 한편 Table 18은 유리 아미노산의 조성을 비교한 것으로서 현미의 50.1mg%에서 버섯배양현미의 경우 각각 194.8mg%, 145.5mg%로 크게 증가하는 것으로 나타나 버섯균사의 작용에 의해 단백질이 상당히 분해되어 유리형태의 아미노산이 크게 증가함을 알 수 있었다.

Table 16. Fatty acid composition of brown rice and brown rice fermented with *Paecilomyces japonica* and *Phellinus linteus*

Fatty acid	Brown rice	(%)	
		Brown rice fermented with <i>P. japonica</i>	Brown rice fermented with <i>P. linteus</i>
Myristic acid (14:0)	0.6	0.4	0.3
Palmitic acid (16:0)	19.0	17.9	17.8
Palmitoleic acid (16:1)	0.1	0.2	0.2
Stearic acid (18:0)	2.1	2.0	2.2
Oleic acid (18:1)	38.8	37.8	38.1
Linoleic acid (18:2)	36.4	38.7	38.4
Linolenic acid (18:3)	1.3	1.2	1.1
Arachidic acid (20:0)	0.5	0.6	0.6
Eicosenoic acid (20:1)	0.5	0.5	0.5
Behenic acid (22:0)	0.2	0.3	0.3
Lignoceric acid (24:0)	0.5	0.4	0.5

Table 17. Total amino acid composition of brown rice and brown rice fermented with *Paecilomyces japonica* and *Phellinus linteus*

Total amino acid	(mg%)		
	Brown rice	Brown rice fermented with <i>P. japonica</i>	Brown rice fermented with <i>P. linteus</i>
CYA	0	0	0
ASX	669.6	548.5	551.1
GLX	1248.6	954.5	1022.5
SER	295.3	239.3	250.8
GLY	482.4	385.7	410.8
ARG	510.6	367.3	412.8
THR	229.0	183.6	194.2
ALA	407.4	332.6	344.0
PRO	360.9	310.9	293.8
TYR	147.6	134.0	157.5
VAL	467.3	371.5	391.8
MET	150.9	122.6	134.3
ILE	308.1	249.0	265.4
LEU	592.8	468.2	508.4
PHE	364.4	287.0	306.3
LYS	210.0	156.5	156.9
Total	6,444.9	5,000.2	5,400.6

Table 18. Free amino acid composition of brown rice and brown rice fermented with *Paecilomyces japonica* and *Phellinus linteus*

(mg%)

Free amino acid	Brown rice	Brown rice fermented with <i>P. japonica</i>	Brown rice fermented with <i>P. linteus</i>
CYA	0	0.0	0
ASX	8.9	8.5	7.3
GLX	11.4	20.6	15.3
SER	3.2	8.1	9.9
GLY	1.8	3.9	3.4
HIS	1.4	5.6	5.6
ARG	3.0	12.4	31.2
THR	1.4	7.7	5.8
ALA	6.0	29.4	11.1
PRO	1.9	54.0	6.8
TYR	1.5	6.9	8.5
VAL	1.5	7.1	6.1
MET	0.5	1	0.8
ILE	0.9	4.5	3.2
LEU	1.1	7.0	5.8
PHE	0.9	5.8	4.8
TRP	4.0	6.9	13.6
LYS	0.7	5.4	6.3
Total	50.1	193.9	145.5

*Phellinus linteus*를 이용하여 앞서 확립된 전처리 및 배양조건으로 현미를 처리하고 2~4주간 배양한 후 이들 버섯배양현미의 여러 가지 이화학적 특성을 현미와 비교한 결과는 Table 19~21과 같다. Table 19에 의하면 배양기간이 증가함에 따라 균체량이 2주째의 1.44%에서 4주째의 2.12%로, 환원당도 437.9mg%에서 1497.5mg%로 크게 증가하였으며 이때 현미는 47.8mg%이었다. 식이섬유도 2주째의 3.68mg%에서 4주째의 4.16mg%로 증가하는 것으로 나타났다. 그리고 이들의 무기질 조성을 조사한 결과 앞의 결과에서와 마찬가지로 버섯배양현미가 현미에 비해 K의 함량은 감소하는 반면 Ca의 함량은 증가하는 것으로 나타났으며 배양기간에 따른 차이는 거의 없는 것으로 나타났다.

Table 19. Physicochemical properties of brown rice and brown rice fermented with *Phellinus linteus* in different fermentation time

	Brown rice	Brown rice fermented with <i>P. linteus</i>			
		2 weeks	3 weeks	4 weeks	
Mycelial weight (%)	-	1.44	1.85	2.12	
Reducing sugar (mg%)	47.8	437.9	1240.9	1497.5	
Total dietary fiber (% dry basis)	3.33	3.68	3.96	4.16	
Ca	10.4	20.3	24.5	24.1	
Mg	116.2	110.8	111.3	110.5	
Mineral (mg%, dry basis)	Na	44.1	40.5	34.0	23.2
	P	316.4	301.3	304.3	309.1
	K	353.4	269.6	244.5	254.3
	Fe	1.36	1.44	1.46	1.38

Table 20은 이들 버섯배양현미의 지방산 조성을 비교한 것으로서 조성에 거의 차이가 없으며 linoleic acid와 linolenic acid가 각각 37.7~38.5%와 37.4~39.2%로 거의 비슷한 조성을 갖는 것으로 나타났다. Table 21은 유리 아미노산의 조성을 비교한 것으로서 현미의 50.1mg%에서 2~4주째의 버섯배양현미의 경우 각각 69.9mg%, 145.5mg%, 243.3mg%로 증가하는 것으로 나타나 2주째까지는 현미와 비교하여 유리 아미노산의 함량이 거의 차이가 없으나 3주째부터 크게 증가하는 것으로 나타났다.

Table 20. Fatty acid composition of brown rice and brown rice fermented with *Phellinus linteus* in different fermentation time

Fatty acid	(%)			
	Brown rice	Brown rice fermented with <i>P. linteus</i>		
		2 weeks	3 weeks	4 weeks
Myristic acid (14:0)	0.6	0.4	0.3	0.3
Palmitic acid (16:0)	19.0	18.3	17.8	17.3
Palmitoleic acid (16:1)	0.1	0.2	0.2	0.2
Stearic acid (18:0)	2.1	2.1	2.2	2.3
Oleic acid (18:1)	38.8	38.5	38.1	37.7
Linoleic acid (18:2)	36.4	37.4	38.4	39.2
Linolenic acid (18:3)	1.3	1.2	1.1	1.0
Arachidic acid (20:0)	0.5	0.6	0.6	0.6
Eicosenoic acid (20:1)	0.5	0.5	0.5	0.6
Behenic acid (22:0)	0.2	0.3	0.3	0.3
Lignoceric acid (24:0)	0.5	0.5	0.5	0.5

Table 21. Free amino acid composition of brown rice and brown rice fermented with *Phellinus linteus* in different fermentation time

Free amino acid	Brown rice	Brown rice fermented with <i>P. linteus</i>		
		2 weeks	3 weeks	4 weeks
CYA	0	0	0	0
ASX	8.9	6.3	7.3	9.1
GLX	11.4	3.3	15.3	19.4
SER	3.2	5.3	9.9	17.9
GLY	1.8	2.3	3.4	6.7
HIS	1.4	1.9	5.6	7.1
ARG	3.0	12.2	31.2	42.7
THR	1.4	2.8	5.8	11.4
ALA	6.0	8.0	11.1	19.0
PRO	1.9	3.4	6.8	13.3
TYR	1.5	4.1	8.5	18.3
VAL	1.5	3.2	6.1	11.9
MET	0.5	0.5	0.8	1.7
ILE	0.9	1.8	3.2	6.5
LEU	1.1	2.9	5.8	11.2
PHE	0.9	2.6	4.8	11.3
TRP	4.0	6.6	13.6	23.9
LYS	0.7	2.7	6.3	11.9
Total	50.1	69.9	145.5	243.3

## 4. 벼싹배양곡물의 *in vivo*에서의 혈당강하 기능성 확인

### 가. 혈당강하

#### 1) 체중변화와 식이효율

당뇨쥐를 이용한 당뇨대조군, 백미군, 보리군, 벼싹배양백미 25%군(RFP25%군), 벼싹배양백미 50%군(RFP50%군) 그리고 정상쥐를 이용한 정상대조군의 6가지 처리군으로 나누어 6주간 사육후 이들의 체중변화와 식이효율을 조사한 결과는 Table 22와 같다. 식이섭취량은 당뇨유발로 인슐린이 결핍된 쥐에게서 NPY (neuropeptide Y) mRNA 증가와 시상하부 NPY receptor 작용저하로 식이섭취량이 현저히 증가하였다는 Malabu 등<sup>(58)</sup>의 결과와 마찬가지로 당뇨대조군의 식이섭취량이 256.4±27.6g/week로 기타 처리군에 비해 월등히 높은 섭취량을 나타내었으며, 백미군이 이와 유사한 값을 나타내었다. 한편 보리군, RFP25%군, RFP50%군의 경우 191.4±7.4~233.9±13.6g/week의 식이섭취량으로 정상군(209.7±13.9g/week)과 유사한 식이섭취량을 나타내었으며, 특히 RFP군의 경우 보리군보다 더 낮은 식이섭취량을 나타내었다. 당뇨유발된 당뇨쥐의 경우 체중감소가 일어나는데 이는 인슐린의 기능저하로 세포내 포도당의 이용률이 감소하면서 간, 근육, 지방조직의 지방과 단백질이 부족한 에너지를 생산하는데 이용되기 때문인 것으로 보고되는데<sup>(59)</sup> 본 연구에서는 체중감소가 발생하지는 않았지만 기타 처리군에 비해 체중증가가 적은 것으로 나타났다. 보리군의 경우 체중증가가 가장 적었고 백미군이 당뇨대조군과 비슷한 체중증가를 나타내었다. 특히 RFP50%군의 경우 107±61.9g의 체중증가를 나타내어 정상군과 거의 유사한 체중증가를 나타내었으며, 191.4±7.4g/week의 매우 적은 양의 식이를 섭취하였음에도 불구하고 107.7±61.9g의 체중증가를 나타내어 정상군의 11.2±6.1% 보다도 높은 18.0±10.3%의 식이효율을 나타내었다.

Table 22. Body weight, food intakes and food efficiency ratio in diabetic rats fed with experimental diets for 6 weeks

	Food intake (g/week)	Body weight (g)			FER (%) <sup>3)</sup>
		Initial	Final	gain	
Normal	209.7±13.9bc <sup>4),5)</sup>	273.7±12.4a	385.8±40.3a	112.1±38.0a	11.2±6.1ab
Control	256.4±27.6a	234.1±10.1b	274.7±38.5bc	40.6±29.2b	6.8±4.9b
Rice	260.4±29.2a	233.4±12.8b	278.3±48.9bc	44.9±45.3b	7.5±7.5b
Barley	233.9±13.6ab	245.5±21.6b	269.6±38.4c	17.1±18.8b	2.9±3.1b
RFP25 <sup>1)</sup>	221.0±18.4b	233.7±18.0b	282.3±56.9bc	48.6±40.6b	8.1±6.8b
RFP50 <sup>2)</sup>	191.4±7.4c	239.5±21.9b	347.2±81.6ab	107.7±61.9a	18.0±10.3a

1) RFP25 : Group fed with diet containing 25% rice fermented with *Paecilomyces japonica*.

2) RFP50 : Group fed with diet containing 50% rice fermented with *Paecilomyces japonica*.

3) FER (food efficiency ratio) : body weight gain(g/week)/food intake(g/week)

4) Each value represents mean±S.D.

5) Values with the same letter in the same column are not significantly different (p<0.05).

## 2) 혈당, 소장점막의 α-glucosidase 활성, 간중량

당뇨쥐의 경우 인슐린 기능 부진으로 인하여 혈액에서 각 조직으로 유입되는 당이 감소하고 간에서 당 생성작용에 의하여 혈액내로 배출되는 당이 증가하여 고혈당이 초래된다. Wittmers와 Haller<sup>(60)</sup>는 당뇨쥐의 경우 포도당이 체내로 유입된 후 혈액으로의 당 제거기능 저하보다는 간에서의 당배출억제가 제대로 되지 못하는 것이 고혈당 초래의 주원인이라 하였다. 또한 당뇨시 α-glucosidase의 활성이 증가하여 포도당의 흡수가 더 촉진되어 혈당이 더욱 증가하는 것으로 보고되고 있다<sup>(61)</sup>.

식이섬유의 경우 소장점막에서 영양소의 흡수를 제한하는 diffusion barrier로 작용하는 mucin (UWL의 주된 성분)의 분비를 증가시켜 UWL (unstirred



water layer) 두께를 증가시키고 당뇨시 증가하는  $\alpha$ -glucosidase의 활성을 감소시키기 때문인 것으로 추정된다. Flourie 등<sup>(62)</sup>에 의하면 oat gum 등의 수용성식이섬유가 소장점막의 UWL의 두께를 증가시켜 포도당의 장 흡수를 지연시켰다고 하였으며, Lee 등<sup>(63)</sup>의 결과에서도 당뇨쥐에게서  $\alpha$ -glucosidase의 활성이 증가하였는데 당뇨군중 펙틴을 섭취한 군에서 유의적으로 당뇨대조군보다 이 효소활성이 감소하였다고 하여, 식이섬유가 UWL의 두께와  $\alpha$ -glucosidase의 활성에 관여하여 혈당을 감소시킨다고 보고하였다.

실험동물의 초기 및 2주 경과, 6주 경과 시점의 혈당, 소장점막으로부터 분리한  $\alpha$ -glucosidase의 활성 그리고 체중 100g당 간의 무게를 조사한 결과는 Table 23과 같다. 당뇨대조군의 혈당은 초기  $240.0 \pm 28.7 \text{mg/dL}$ 에서 2주 경과, 6주 경과시 각각  $444.0 \pm 41.0 \text{mg/dL}$ ,  $455.2 \pm 47.8 \text{mg/dL}$ 로 급격히 증가하였으며, 보리의 경우 6주 경과시  $393.6 \pm 20.9 \text{mg/dL}$ 로 당뇨대조군에 비해 다소 낮은 값을 나타내었지만 유의적인 차이를 나타내지는 않았다. 한편 RFP25%군과 RFP50%군의 경우 6주 경과시 각각  $328.8 \pm 116.8 \text{mg/dL}$ 과  $222.8 \pm 177.0 \text{mg/dL}$ 의 혈당값으로 당뇨대조군에 비해 상당히 낮은 값을 나타내었으며 특히 RFP50%군의 경우 급격히 저하된 혈당값을 나타내어 이를 장기적으로 섭취할 경우 상당한 혈당강하를 기대할 수 있을 것으로 기대된다.

소장점막으로부터 분리한  $\alpha$ -glucosidase의 활성을 측정된 결과 정상군의 경우  $0.98 \text{U/mg protein}$ , 당뇨대조군은  $1.13 \text{U/mg protein}$ 으로 나타나 당뇨유발에 의해  $\alpha$ -glucosidase의 활성이 증가되는 것으로 나타났다. 백미군과 보리군은 당뇨대조군보다 유의적인 수준은 아니지만 다소 낮은 값을 나타내었고, 특히 RFP25%군 RFP50%군은  $\alpha$ -glucosidase의 활성이 크게 감소하여 정상군의 활성보다 더 낮은 값을 나타내었다. 이러한 결과로 볼 때 버섯균을 접종, 배양한 백미를 장기적으로 섭취하였을 때  $\alpha$ -glucosidase의 활성이 저하되어 포도당의 체내 흡수가 지연되므로써 급격한 식후 혈당 상승이 억제될 수 있을 것으로 기대된다.

한편 체중 100g당 간의 무게를 측정된 결과 당뇨대조군은  $3.64 \pm 0.25 \text{g}$ 으로 정상군에 비해 유의적으로 높은 값을 나타내었으며, RFP50%군의 경우  $2.89 \pm 0.19 \text{g}$ 을 나타내어 기타 군에 비해 유의적으로 낮은 값을 나타내었다. 일반적으로 당뇨에 의해 인슐린의 기능 저하로 체지방의 분해가 증가되고, 증가된 유리지방

산이 간으로 가서 중성지방 합성에 이용되어 간의 지방축적으로 인해 간이 비대해지거나<sup>(64)</sup> 또는 현저한 체중감소로 인해 체중 100g당 간무게가 증가한다. 그러나 RFP50%군의 경우 기타 처리군에 비해 유의적으로 낮은 값으로 정상군에 가까운 값을 나타내었는데 이는 간의 지방축적에 의해 간이 비대해지지 않았고 또한 체중감소도 전혀 일어나지 않았음을 나타내는 것으로 판단되었다.

Table 23. Blood glucose,  $\alpha$ -glucosidase activity and liver weight in diabetic rats fed with experimental diets for 6 weeks

	Blood glucose (mg/dL)			Maltase activity (U/mg protein)	Liver weight (g/100g B.W)
	0 week	2 week	6 weeks		
Normal	122.2±6.5b <sup>3,4)</sup>	132.6±10.8c	114.6±4.2c	0.98	2.64±0.38b
Control	240.0±28.7a	444.0±41.0a	455.2±47.8a	1.13	3.64±0.25a
Rice	271.3±37.7a	379.5±109.9ab	335.3±103.1ab	1.05	3.43±0.29a
Barley	249.0±41.1a	453.4±82.6a	393.6±20.9a	1.07	3.70±0.09a
RFP25 <sup>1)</sup>	269.5±52.6a	354.5±120.4ab	328.8±116.8ab	0.76	3.56±0.74a
RFP50 <sup>2)</sup>	242.4±33.4a	269.0±172.1bc	222.8±177.0bc	0.95	2.89±0.19b

1) RFP25 : Group fed with diet containing 25% rice fermented with *Paecilomyces japonica*.

2) RFP50 : Group fed with diet containing 50% rice fermented with *Paecilomyces japonica*.

3) Each value represents mean±S.D.

4) Values with the same letter in the same column are not significantly different ( $p < 0.05$ ).

#### 나. 혈중 콜레스테롤 및 중성지방

당뇨병에서 가장 빈번하게 관찰되는 혈중 중성지방과 콜레스테롤의 증가, HDL-콜레스테롤의 감소 및 LDL-콜레스테롤의 조직으로의 이동속도의 감소 등

을 들수 있으며<sup>(65)</sup>, 당대사 이상에 의해 acetyl-Co A가 축적되고 지방합성이 증가되어 혈액중에 총지질과 중성지방이 증가한다.

실험동물의 혈중 총 콜레스테롤, HDL, LDL-콜레스테롤 및 중성지방 함량을 조사한 결과는 Table 24와 같다. 중성지방의 경우 당뇨대조군의  $72.4 \pm 20.7 \text{mg/dL}$ 에 비해 처리군의 경우  $44.8 \pm 5.1 \sim 61.0 \pm 37.7 \text{mg/dL}$ 로 유의적으로 감소하여 버섯 배양백미의 처리에 의해 중성지방이 감소될 수 있음을 알 수 있었다. 혈중 콜레스테롤의 경우에는 보리, 버섯배양백미 등의 식이 차이에 의해 총 콜레스테롤과 HDL-콜레스테롤이 유의적으로 감소하였는데, 혈중 총 콜레스테롤의 경우 당뇨대조군의  $77.4 \pm 15.8 \text{mg/dL}$ 에서 식이 차이에 의해  $53.0 \pm 10.0 \sim 70.8 \pm 18.0 \text{mg/dL}$ 로 유의적으로 감소하였으며, 특히 보리군의 경우  $53.0 \pm 10.0 \text{mg/dL}$ 로 크게 감소하였다. 또한 HDL-콜레스테롤의 경우에도 당뇨대조군의  $27.8 \pm 5.4 \text{mg/dL}$ 에서 식이 차이에 의해  $18.2 \pm 2.2 \sim 19.0 \pm 5.2 \text{mg/dL}$ 로 유의적으로 감소하였다. 반면 LDL-콜레스테롤은 처리군간 유의적인 차이를 거의 나타내지 않았다.

수용성 식이섬유의 콜레스테롤 저하작용에 대한 몇가지 기작이 보고되었다. 첫째, 소장에서 콜레스테롤 및 중성지방과 결합하여 흡수를 저해하고 배설을 촉진한다는 것이며 이는 점성이 큰 식이섬유일수록 효과적이라고 하였다<sup>(66)</sup>. 둘째 담즙산의 소장에서의 재흡수 억제 및 배설증가에 의한 것으로, 담즙산은 콜레스테롤로부터 합성되는 물질이므로 체내 콜레스테롤을 체외로 배설하는 효과를 나타낸다는 것이다<sup>(67)</sup>. 셋째, 대장의 미생물에 의해 생성된 식이섬유의 발효부산물인 acetate, propionic acid 등 짧은 사슬 지방산들이 간에서 HMG-Co A reductase 활성 및 콜레스테롤 합성능을 저해한다는 것이다<sup>(68)</sup>. 근래에는 HDL 수용체 활성의 증가, 저하된 insulin response로 인한 간지질 합성 감소 등 여러 기작이 제시되기도 하였다. 본 연구결과 보리의 총 콜레스테롤 및 HDL-콜레스테롤의 감소효과가 기타 처리군에 비해 월등히 우수함을 알 수 있었고 이는 보리내의 대표적 수용성 식이섬유인  $\beta$ -glucan이 다량 함유되어 있기 때문인 것으로 판단된다.

Table 24. Triglyceride, total cholesterol, HDL-,LDL-cholesterol in diabetic rats fed with experimental diets for 6 weeks

	Triglyceride (mg/dL)	Cholesterol (mg/dL)		
		Total	HDL	LDL
Normal	70.3±21.8a <sup>3,4)</sup>	60.6±14.1ab	11.4±2.3c	7.8±0.8b
Control	72.4±20.7a	77.4±15.8a	27.8±5.4a	12.8±3.3a
Rice	48.5±20.0b	76.3±6.1a	25.3±6.1a	14.3±1.9a
Barley	53.2±24.5b	53.0±10.0b	18.2±2.2b	11.6±2.5a
RFP25 <sup>1)</sup>	44.8±5.1b	61.8±10.1ab	18.3±2.6b	12.8±3.2a
RFP50 <sup>2)</sup>	61.0±37.7ab	70.8±18.0ab	19.0±5.2b	11.0±3.2ab

1) RFP25 : Group fed with diet containing 25% rice fermented with *Paecilomyces japonica*.

2) RFP50 : Group fed with diet containing 50% rice fermented with *Paecilomyces japonica*.

3) Each value represents mean±S.D.

4) Values with the same letter in the same column are not significantly different (p<0.05).

## 5. 버섯배양곡물의 식품 소재화 및 가공제품 개발

### 가. 혈당강하 활성 획분의 특성 조사

*Paecilomyces japonica*를 배양한 현미로부터 분리한 활성획분의 포도당의 투석막을 통한 투과속도에 미치는 영향을 조사하기 위하여 활성획분 존재시 투석막 내의 포도당이 투석막 외액으로 확산되는 정도를 pectin과 비교한 결과는 Fig. 5와 같다. Pectin의 경우 120분 동안 투석을 실시하였을 때 투석막 내의 전체 포도당 중에서 12.8%의 포도당이 투석막 내액에 존재하고 나머지는 외액으로 전부 용출된 반면 활성획분의 경우에는 전체 포도당 중 41.4%의 포도당이 투석막 내액에 잔존하는 것으로 나타나 pectin 보다 포도당의 투석막 밖으로의 투과를 지연시키는 효과가 월등히 큰 것은 물론 *Paecilomyces japonica* 균사체 보다도 효과가 더 크음을 알 수 있었다.

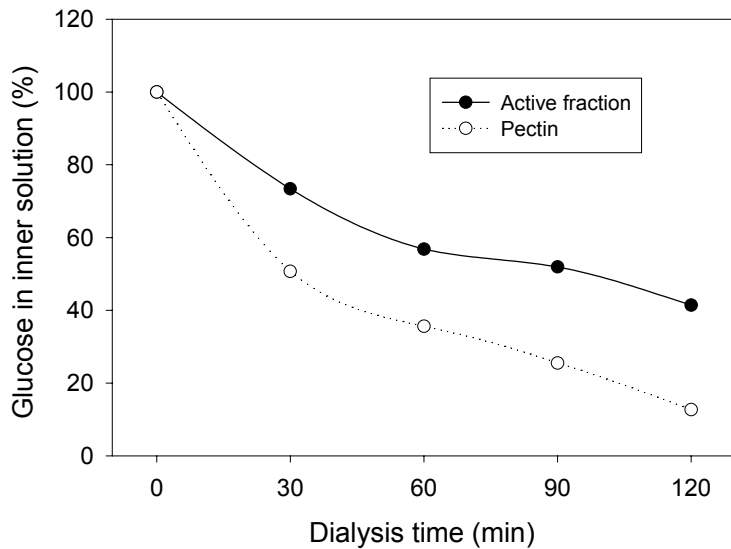


Fig. 5. Effect of active fraction from brown rice fermented with *Paecilomyces japonica* on retarding the membrane transport of glucose *in vitro*

또한 활성획분의 *in vivo*에서의 식후 혈당에 대한 효과를 조사하기 위하여 당뇨 쥐에 활성획분과 맥아당을 경구투여한 후 경과시간별로 혈액을 채취하여 혈당을 측정하였고 이를 pectin 투여구와 비교한 결과는 Fig. 6과 같다. Pectin 투여구의 경우 30분 경과시 165.3%로 크게 증가하였다가 그후 감소하여 120분 경과시에는 105.1%를 나타낸 반면 활성획분 투여시에는 30분 경과시 125.0%, 60분 경과시 134.6%로 최고값을 나타내었다가 120분 경과시 100.2%로 낮아져 활성획분이 pectin 보다 식후 혈당상승을 억제하는 효과가 월등히 우수한 것으로 나타났다.

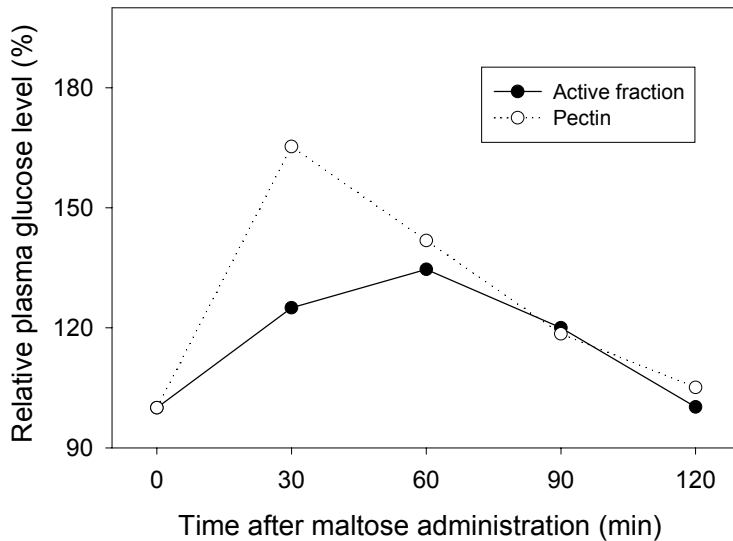


Fig. 6. Effect of active fraction from brown rice fermented with *Paecilomyces japonica* on relative plasma glucose level in diabetic rats

버섯배양현미로부터 분리한 활성획분의 수율, 단백질 함량, 용해도, 균체량 등의 이화학적 특성을 조사한 결과는 Table 25와 같다. 활성획분의 수율은 2.1%이었으며, 단백질 함량은 0.85%, 그리고 전분과의 요오드 반응은 음성으로 나타나 매우 순수하게 분리된 다당임을 알 수 있었다. 활성획분에 함유된 균체량은

5.7%로서 다량의 균체가 함유되어 있었고, 냉수에서의 용해도가 56.8%로 용해성이 상당히 높아 식품소재로서의 가공적성이 우수할 것으로 판단된다. 그리고 활성획분의 점도를 pectin과 비교한 결과 Fig. 7에서 보는 바와 같이 1%의 농도에서 pectin의 경우 0.98cP인 반면 활성획분은 1.11cP로서 활성획분의 점도가 pectin에 비해 훨씬 컸으며, 또한 농도변화에 따른 점도변화의 기울기가 pectin의 경우 0.100, 활성획분의 경우 0.223으로서 활성획분의 농도변화에 따른 점도변화가 pectin에 비해 급격히 일어남을 알 수 있었다.

Table 25. Physicochemical properties of active fraction from brown rice fermented with *Paecilomyces japonica*

	Active fraction
Yield (%)	2.1
Protein content (%)	0.85
Iodine binding property	negative
Mycelial weight (%)	5.7
Solubility (%)	56.8

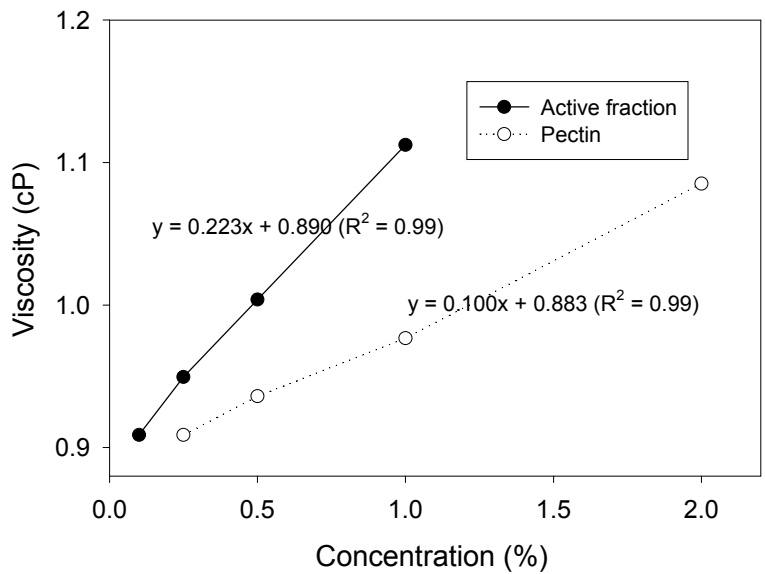


Fig. 7. Changes in viscosity of active fraction and pectin in different concentrations.



## 나. 버섯배양곡물을 이용한 가공제품 개발

### 1) 차류제품 및 선식제품 중간소재

#### 가) 현미녹차

바람직한 향미를 나타내는 전처리 조건을 확립하기 위해 *Paecilomyces japonica*를 배양한 버섯배양현미를 후라이팬에서의 볶음, 압력을 이용한 퍼핑, 퍼핑후 볶음 등의 3가지 방법으로 볶음처리한 후 이를 분쇄하여 색도, 가용성 총당과 환원당 등의 이화학적 특성을 조사한 결과는 Table 26과 같다. 볶음처리에 의해 유리형태의 환원당이 마이알반응에 소비됨에 의해 퍼핑방법보다 크게 낮은 환원당 값을 나타내었으며 이에 따라 색도도 볶음 및 퍼핑 & 볶음처리에 의한 현미가 퍼핑방법에 의한 현미에 비해 높은 L값과 높은 a값, 낮은 b값을 나타내었다.

Table 26. Physicochemical properties of Basidiomycetes-fermented brown rices in different roasting conditions

		Roasting	Puffing	Puffing & Roasting
Color	L	50.49	61.79	55.66
	a	6.36	5.81	6.72
	b	12.93	15.39	14.80
	$\Delta E$	44.52	34.82	40.32
Soluble sugar (g/100g)		6.49	39.52	2.71
Reducing sugar (mg/g)		1.97	4.28	0.27

시판되고 있는 티백형태의 녹차제품으로부터 녹차잎을 분리하고 이와 전처리한 버섯배양현미를 일정비율 (녹차잎 : 현미 = 6 : 4)로 혼합하여 티백포장한

후 뜨거운 물에서 일정시간 담구어 녹차를 제조한 후 이들의 이화학적 특성을 조사하고 관능적으로 비교한 결과는 Table 27, 28과 같다. 전처리한 현미를 비교한 결과와 유사하게 볶음 및 퍼핑 & 볶음처리한 현미를 이용한 녹차가 퍼핑처리한 현미를 이용한 녹차보다 낮은 환원당, 낮은 L값, 높은 a값, 낮은 b값을 나타내는 것으로 나타났다. 전처리한 현미를 이용하여 녹차제조후 관능적으로 이들을 비교한 결과 색, 향, 맛, 전체적인 기호도 등 모든 기호도 항목에서 볶음처리에 의한 현미를 이용한 녹차의 기호도가 가장 높은 것으로 나타났다. 볶음처리한 현미를 이용한 녹차의 경우 은은한 녹차의 맛 이외에는 특별한 맛이 거의 느껴지지 않은 반면 퍼핑처리한 현미를 이용한 녹차의 경우 녹차 고유의 비린향과 맛이 강하게 느껴졌으며, 퍼핑 & 볶음처리한 현미를 이용한 녹차의 경우에는 퍼핑처리한 현미에 비해서는 비린맛이 다소 완화되었으나 뚝은맛이 강하게 느껴졌다. 이상의 결과 볶음처리에 의한 현미가 볶음과정중 마이알반응이 강하게 일어나 기타 전처리방법에 비해 다양한 향미가 많이 생성되어 녹차의 좋지 않은 향미를 상당히 완화시킬 수 있는 것으로 판단할 수 있었다.

Table 27. Physicochemical properties of extracts of Basidiomycetes-fermented brown rice-green teas in different roasting conditions

		Roasting	Puffing	Puffing & Roasting
Color	L	47.81	54.96	41.45
	a	-4.17	-5.48	-3.86
	b	12.21	14.06	8.60
	$\Delta E$	53.75	47.49	59.29
	pH	5.88	5.82	5.82
	Soluble sugar (mg/100mL)	118.24	106.76	91.64
	Reducing sugar (mg/100mL)	57.86	76.42	57.79

Table 28. Sensory evaluation of extracts of Basidiomycetes-fermented brown rice-green teas in different roasting conditions

	Roasting	Puffing	Puffing & Roasting
Color	6.1±1.5a	4.7±1.6a	5.6±1.4a
Flavor	6.4±0.9a	4.3±0.8b	5.5±1.3a
Taste	6.7±0.9a	4.3±0.9c	5.2±1.0b
Overall acceptability	6.6±0.9a	4.4±0.9c	5.3±0.9b

이상의 결과 결정된 전처리 방법, 즉 볶음처리에 의한 현미를 이용한 현미녹차의 기호도를 높이기 위하여 시판 현미녹차에 비해 다소 약한 것으로 판단되는 고소한 맛을 보강하기 위해 쌀에서 유래하는 구수한 향을 낼 수 있는 시판 분말향을 혼합한 후 시판 현미녹차(T사)와 관능적으로 기호도를 비교한 결과는 Table 29와 같다. 관능검사 결과 색을 제외한 향, 맛, 전체적인 기호도 등의 전체 항목에서 기호성이 유의성 있는 정도는 아니지만 개발 시제품의 높은 것으로 나타났다.

Table 29. Sensory evaluation of commercial and newly developed brown rice-green tea

	Commercial brown rice-green tea	Newly developed brown rice-green tea
Color	6.1±0.9a	4.6±0.9b
Flavor	5.4±0.9a	5.8±0.9a
Taste	5.5±0.9a	6.4±0.9a
Overall acceptability	5.5±0.9a	6.3±0.9a

나) 보리차

버섯배양보리를 이용한 보리차를 제조하기 위해 보리의 바람직한 볶음 향미를 발현하기 위한 볶음조건을 조사하기 위하여 보리에 *Paecilomyces japonica*를 배양한 버섯배양보리를 후라이팬에서의 볶음(중불), 압력을 이용한 퍼핑, 퍼핑후 볶음(중불) 등의 방법으로 볶음처리한 후 이를 분쇄하여 색도, 용해도, 팽윤력 등의 이화학적 특성을 조사한 결과는 Table 30과 같다. 현미의 경우와 마찬가지로 볶음처리에 의해 유리형태의 환원당이 마이알반응에 소비됨에 의해 퍼핑방법보다 크게 낮은 환원당 값을 나타내었으며 색도도 유사한 경향을 나타내었다.

Table 30. Physicochemical properties of Basidiomycetes-fermented barleys in different roasting conditions

		Roasting	Puffing	Puffing & Roasting
Color	L	53.01	52.73	48.03
	a	5.43	6.17	5.74
	b	12.39	12.73	11.18
	$\Delta E$	41.83	42.31	46.30
Soluble sugar (g/100g)		46.00	38.28	8.07
Reducing sugar (mg/g)		1.68	33.91	23.34

그리고 버섯배양보리와 물을 일정비율(버섯배양보리:물 = 5g:1L)로 혼합한 후 끓는물에서 10분간 가열처리한 후 전처리 조건에 따른 보리차의 이화학적 특성을 조사한 결과는 Table 31과 같으며, 이들의 관능적 기호도를 비교한 결과는 Table 32와 같다. 전처리 방법에 의해 보리차의 pH가 다소 다르게 나타났으며, 볶음처리에 의한 보리를 이용한 보리차의 경우 기타 전처리 방법에 의한 보리차에 비해 훨씬 낮은 환원당과 가용성 총당 함량을 나타내었고 낮은 명도, 높

은 a값, 높은 ΔE 값을 나타내었다. 그리고 이들을 관능적으로 비교한 결과 유의적인 수준은 아니지만 볶음처리에 의한 보리를 이용한 보리차가 가장 높은 기호성을 나타내었다. 볶음처리에 의한 보리를 이용한 보리차의 경우 보리차 고유의 구수한 맛 이외에는 특별한 맛이 거의 느껴지지 않은 반면 퍼핑처리한 보리를 이용한 보리차의 경우 약간의 아린맛이 강하게 느껴졌으며, 퍼핑 & 볶음처리한 보리를 이용한 보리차의 경우에는 퍼핑처리한 현미 보라도 강한 아린맛과 다량의 당 용출에 의한 미끈거림이 혀에 느껴졌다.

Table 31. Physicochemical properties of extracts of Basidiomycetes-fermented barleys in different roasting conditions

		Roasting	Puffing	Puffing & Roasting
Color	L	12.12	17.60	16.93
	a	-0.07	-0.60	-0.47
	b	0.21	-0.15	1.35
	ΔE	87.87	82.39	83.08
	pH	6.11	5.68	5.48
	Soluble sugar (mg/100mL)	29.46	69.01	99.29
	Reducing sugar (mg/100mL)	2.06	9.03	8.07

Table 32. Sensory evaluation of extracts of Basidiomycetes-fermented barleys in different roasting conditions

	Roasting	Puffing	Puffing & Roasting
Color	5.2±0.8b	6.1±1.1a	6.8±1.1a
Flavor	5.8±1.7b	6.1±1.2a	6.8±1.3a
Taste	5.9±1.7a	5.5±1.4a	5.3±1.6a
Overall acceptability	5.8±1.3a	5.5±1.0a	5.2±1.8a

확립된 볶음조건에서 제조한 버섯배양보리를 이용한 보리차와 시판 보리차를 관능적으로 비교한 결과 Table 33에서 보는 바와 같이 색을 제외한 향, 맛, 전체적인 기호도 등의 전체 항목에서 유의성 있는 정도는 아니지만 개발 시제품의 기호성이 높은 것으로 나타났다.

Table 33. Sensory evaluation of commercial and newly developed barley tea

	Commercial barley tea	Newly developed barley tea
Color	6.1±0.7a	4.5±0.7b
Flavor	6.0±0.7a	5.8±1.3a
Taste	5.5±0.7a	6.2±0.9a
Overall acceptability	5.5±1.6a	6.1±0.9a

다) 선식중간소재

선식원료로 사용하기에 적합한 향미를 발현하기 위한 볶음조건을 확립하기 위해 현미에 *Paecilomyces japonica*를 배양한 버섯배양현미를 후라이팬에서의 볶음(약한불), 압력을 이용한 퍼핑, 퍼핑후 볶음(약한불) 등의 3가지 방법으로 볶음처리하고 분쇄한 후 물에 현탁(버섯배양현미 : 물 = 15 : 115)시킨 후 관능검사를 실시하였으며, 그 결과는 Table 34와 같다. 볶음처리에 의한 현미 분말의 기호성이 기타 방법에 의한 현미 분말의 기호성보다 모든 항목에서 유의적으로 높은 것으로 나타났다.

Table 34. Sensory evaluation of Basidiomycetes-fermented brown rices in different roasting conditions for manufacturing parched cereal powder

	Roasting	Puffing	Puffing & Roasting
Color	5.7±1.5a	6.6±0.8a	4.1±1.1b
Flavor	6.9±1.6a	5.0±1.8b	5.7±1.9ab
Taste	6.2±1.5a	4.7±1.9b	4.8±1.9b
Overall acceptability	6.2±1.5a	5.1±1.4b	4.8±1.8b

원료 곡물을 볶아 제조한 미숫가루와 버섯배양곡물을 볶아 제조한 미숫가루의 기호도를 비교하기 위하여 현미, 보리, 콩, 율무, 팥에 *Paecilomyces japonica*를 배양한 버섯배양곡물을 확립된 볶음조건을 이용하여 볶음처리 후 분쇄하여 일정 배합비율에 따라 혼합한 후 관능적 기호도를 비교한 결과는 Table 35와 같다. 관능검사 결과 유의적인 수준은 아니지만 버섯배양곡물을 이용한 미숫가루가 버섯배양하지 않은 곡물을 이용한 미숫가루보다 기호도가 약간 높게 나타나 버섯배양에 의해 기호도가 저하되지 않으면서 약간의 상승작용이 있는 것으로 판단된다.

Table 35. Sensory evaluation of parched cereal powders prepared using raw cereals and Basidiomycetes-fermented cereals

	Raw cereals	Basidiomycetes-fermented cereals
Color	5.7±1.6a	5.0±1.3a
Flavor	5.1±1.2a	5.3±1.9a
Taste	4.8±1.5a	5.2±1.9a
Overall acceptability	4.9±1.4a	5.1±1.7a

## 2) 장류제품

### 가) 된장의 숙성중 식품학적 특성 변화

#### (1) 이화학적 특성

메주와 *Phellinus linteus*를 배양한 버섯배양콩(이하 상황버섯배양콩)의 혼합비율을 달리하여 제조한 된장의 숙성기간 중 수분, 염도, pH 및 적정산도의 변화를 조사한 결과는 Fig. 8과 같다. 수분함량의 경우 담금직후에는 58.9~59.8%이었으나 숙성과정 중 서서히 감소하여 숙성 90일에는 44.0~51.3%를 나타내었다. 일반적으로 된장 숙성 중 전분질 원료가 미생물의 대사작용에 의하여 포도당이 유기산이나 알콜 등으로 전환되면서 생성되는 물의 증가에 의해 수분함량이 증가하게 되는데 본 연구에서는 open된 상태에서 숙성하였기 때문에 생성되는 물의 양보다 증발되는 물의 양이 훨씬 많았기 때문에 수분함량이 감소한 것으로 사료된다. 염도는 담금직후 17.6~18.3%이었으나 숙성과정 중 서서히 증가하여 숙성 90일에는 18.8~25.8%를 나타내었다. pH는 담금직후 5.46~5.53에서 숙성기간 중 약간 감소하여 숙성 90일에 5.11~5.20을 나타내어 처리구 간에 거의 차이가 없었으며, 적정산도는 담금직후 17.6~18.0mL에서 서서히 증가하여 숙성 90일에는 18.8~25.8mL을 나타내었다. 된장 숙성 중 pH는 염도와 숙성온도 등 젖산균 및 기타 산 생성균의 생육에 의한 유기산의 생성과 관계가 있으며 이에 의해 적정산도가 증가한다. 본 연구에서는 숙성 30~45일까지 적정산도가 증가하다가 그후 다소 감소하는 경향을 나타내었는데 이는 숙성 중 미생물 작용에 의해 생



성된 유기산이 효모발효에 의해 생성되는 알콜과 결합하여 ester 등을 형성하는데 이용되기 때문인 것으로 사료되며, 다양한 미생물이 존재하는 메주의 혼합비율이 높을수록 이와 같은 경향이 커져 숙성 90일 쯤의 적정산도 값이 낮은 것으로 판단된다.

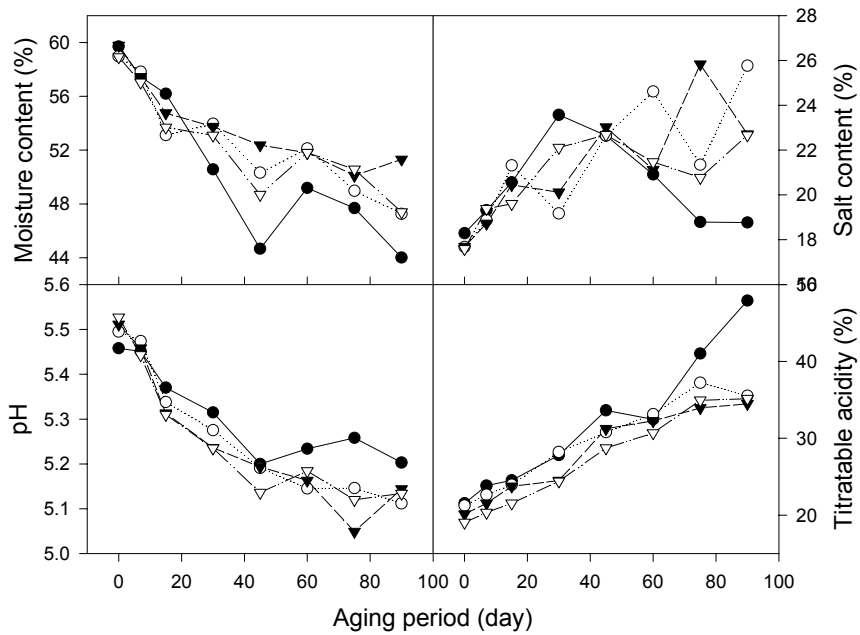


Fig. 8. Changes in moisture, salt, pH and titratable acidity of *Doenjang* prepared in different mixing ratio of *Meju* and soybean fermented with *Phellinus linteus* during aging period.

●-●: *Meju*,                                      ○-○: *Meju* 2 : Soybean 1  
 ▼-▼: *Meju* 1 : Soybean 1,                  ▽-▽: *Meju* 1 : Soybean 2

메주와 상황버섯배양콩의 혼합비율을 달리하여 제조한 된장의 숙성기간 중 조단백과 포르몰데 질소의 변화를 조사한 결과는 Fig. 9와 같다. 조단백의 경우 담금직후의 10.7~11.9%에서 숙성기간 중 증가하여 숙성 90일에 15.1~

20.6%을 나타내었는데 이는 미생물 대사 및 수분증발 등에 의한 전체 고형분 양의 증가와 관련이 있는 것으로 판단된다. 포르몰태 질소는 초기 127.7mg에서 숙성 90일째 232.6~354.6mg으로 그 함량이 크게 증가하였는데 이는 미생물의 protease 작용에 의하여 원료 중의 단백질이 아미노산으로 분해되었기 때문이며 메주 100% 처리구의 포르몰태 질소 함량이 크게 높은 것은 메주의 protease 활성이 상황버섯배양균의 protease 활성보다 크기 때문인 것으로 사료된다.

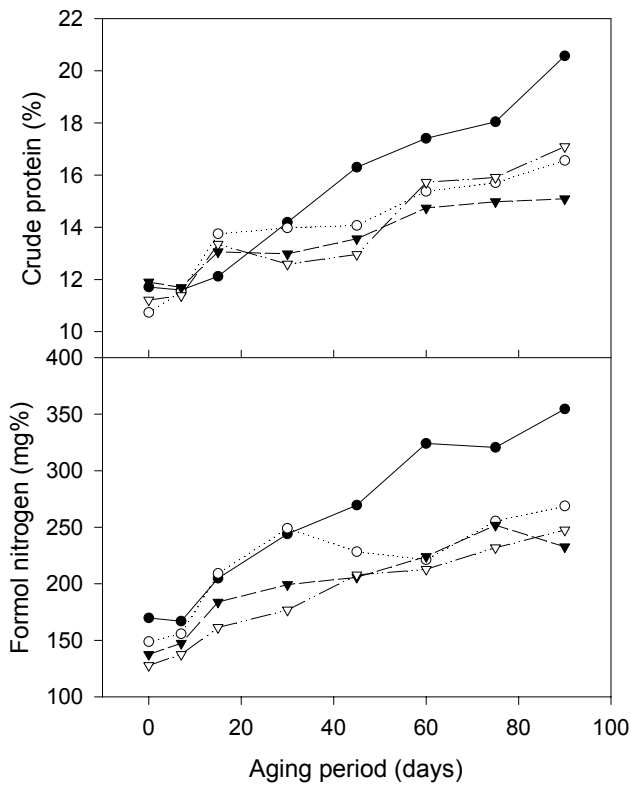


Fig. 9. Changes in crude protein and formol nitrogen of *Doenjang* prepared in different mixing ratio of *Meju* and soybean fermented with *Phellinus linteus* during aging period.

- : *Meju*,                                  ○-○: *Meju* 2 : Soybean 1
- ▼-▼: *Meju* 1 : Soybean 1,                ▽-▽: *Meju* 1 : Soybean 2

메주와 상황버섯배양콩의 혼합비율을 달리하여 제조한 된장의 숙성기간 중 색도 변화는 Fig. 10에 나타내었다. 명도를 나타내는 L 값은 담금직후 38.91~42.47에서 숙성기간 중 감소하여 숙성 90일에 36.89~39.33을 나타내어 처리구 간 큰 차이가 없었다. 일반적으로 된장의 색도는 원료로 사용하는 콩 및 밀가루의 증자시간, 온도 및 메주의 색상에 기인하며, 숙성기간이 경과함에 따라 온도나 산소 및 미생물 작용 등의 영향으로 갈변되어 색상에 변화가 일어나게 된다. 적색도를 나타내는 a 값은 담금직후 7.18~7.71에서 숙성 90일에 6.24~7.78을 나타내었으며, 황색도를 나타내는 b 값은 담금직후 12.90~14.26에서 숙성 90일에 10.39~12.77로 약간 감소하였다. 전체적인 색상차를 나타내는  $\Delta E$  값은 담금직후 52.67~55.68에서 숙성기간 중 약간 증가하여 숙성 90일에 55.44~57.15를 나타내었다.  $\Delta E$  값은 일반적으로 3 이상 차이가 나면 육안으로 색 구별이 확실해지고 12 이상 차이가 나면 별도의 색 계통으로 구분지을 수 있는데 본 연구에서는 처리구 간에 큰 차이를 보이지 않았으며 또한 숙성중에도 큰 변화가 없는 것으로 나타났다.

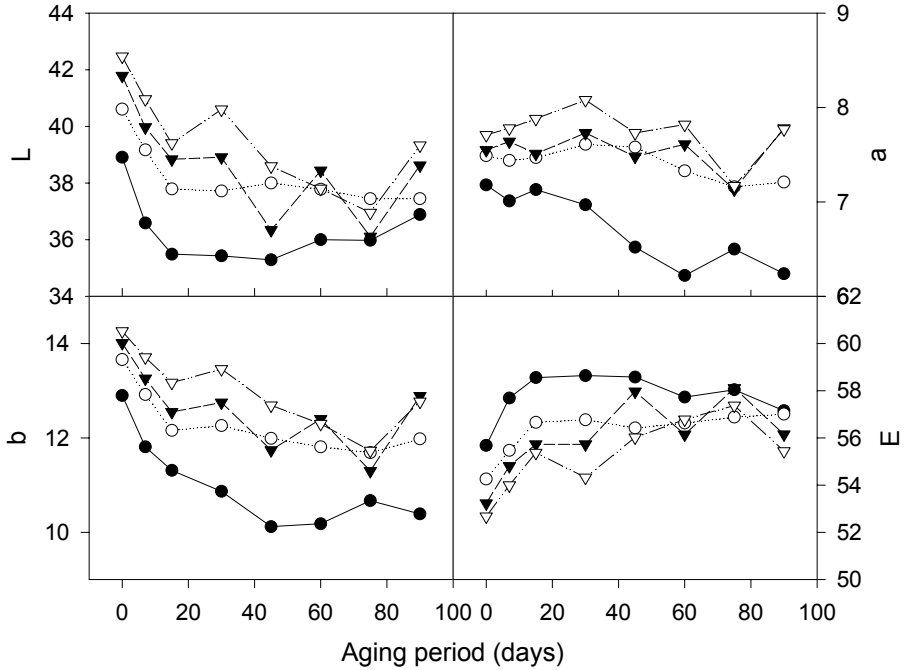


Fig. 10. Changes in color of *Doenjang* prepared in different mixing ratio of *Meju* and soybean fermented with *Phellinus linteus* during aging period.

●-●: *Meju*,                                      ○-○: *Meju* 2 : Soybean 1  
 ▼-▼: *Meju* 1 : Soybean 1,                ▽-▽: *Meju* 1 : Soybean 2

## (2) 관능적 기호도

메주와 상황버섯배양콩의 혼합비율을 달리하여 된장을 제조하고 90일간 숙성한 후 관능적 기호도를 실시한 결과 Table 36에서 보는 바와 같이 메주만으로 제조한 된장보다는 상황버섯배양콩이 혼합된 된장이 색, 향, 맛, 종합적 기호도 등 모든 항목에서 월등히 높은 기호도를 나타내었다. 그리고 메주와 상황버섯배양콩의 혼합비율이 2:1, 1:1인 된장이 높은 기호도를 나타내었으며 상황버섯배양콩의 혼합비율이 높아질수록 담백한 맛이 증가하는 경향이였다.

Table 36. Sensory evaluation of *Doenjang* prepared in different mixing ratio of *Meju* and soybean fermented with *Phellinus linteus*

	A ( <i>Meju</i> )	B ( <i>Meju</i> 2 : Soybean 1)	C ( <i>Meju</i> 1 : Soybean 1)	D ( <i>Meju</i> 1 : Soybean 2)
Color	5.5±1.2b	6.4±1.1a	6.5±0.8a	5.5±0.9b
Flavor	5.2±0.9b	5.6±1.5b	6.2±0.7a	5.9±0.9a
Taste	4.9±0.5b	6.2±1.2a	5.6±0.6a	5.6±0.8a
Overall acceptability	5.2±0.4b	6.4±0.7a	6.2±1.3a	5.8±1.1ab

이상의 결과에서 보는 바와 같이 상황버섯배양콩을 메주와 혼합하여 된장을 제조할 때 숙성 중 적정산도, 수용성 단백질, 포르몰태 질소 등의 이화학적 성분 함량이 메주만으로 제조한 된장에 비해 다소 낮은 값을 나타내었지만 기호적으로는 오히려 높은 값을 나타내었다. 따라서 메주와 상황버섯배양콩의 혼합비율을 2:1 ~ 1:1로 조정하여 된장을 제조할 경우 발효에 의한 풍부한 향미 발현은 물론 메주만으로 제조한 된장보다 기호적으로 우수한 된장을 제조할 수 있을 것으로 판단된다.

#### 나) 최적 배합비 시험

##### (1) 된장의 최적 배합비

된장의 최적배합비를 결정하기 위하여 메주와 버섯배양곡물의 혼합비율을 1:1로 유지하고 청국장, 보리밥, 소금 등의 부원료를 변화시키면서 Table 37과 38에 나타난 바와 같은 배합으로 된장을 제조한 후 관능검사를 실시하였다. 70일 경과시 대체적으로 충분히 숙성이 이루어져 된장의 깊은 맛이 나타났으며, 소금의 함량이 높은 A, B 처리구를 제외하고는 짠맛이 크게 나타나지 않았으며, *Paecilomyces japonica*를 배양한 현미찹쌀(이하 동충하초 배양 현미찹쌀)이 혼합된 C, G, H 처리구의 경우 구수한 맛이 강하고 뽕은맛이 나지 않는 특징이 있었

다. 그리고 전반적으로 물의 양이 부족하여 된장의 표면이 상당히 건조한 상태를 유지하였다. 따라서 이상의 결과를 토대로 Table 39와 같이 배합비를 조정하여 된장을 제조한 후 숙성시켜 관능검사한 결과 동충하초 배양 현미찰쌀이 혼합된 K, L 처리구가 관능적으로 우수한 것으로 나타났다. 이에 따라 버섯배양곡물을 이용한 된장의 최적배합비는 Table 40의 배합으로 결정하였다.

Table 37. Blending test for determining optimum formula of *Doenjang*( I )

	A	B	C	D
<i>Meju</i>	100g(2.92)	200g(5.26)	240g(7.04)	50g(3.16)
Soybean fermented with <i>Phellinus linteus</i>	250g(7.29)	250g(6.58)	-	100g(6.33)
Glutinous brown rice fermented with <i>Paecilomyces japonica</i>	-	-	240g(7.04)	-
<i>Chunggukjang</i>	580g(16.91)	850g(22.37)	830g(24.34)	550g(34.81)
Cooked barley	1000g(29.15)	1000g(26.32)	1000g(29.33)	500g(31.65)
Salt	600g(17.49)	600g(15.79)	400g(11.73)	180g(11.39)
Water	900g(26.24)	900g(23.68)	700g(20.53)	200g(12.66)
Total	3430g(100.0)	3800g(100.0)	3410g(100.0)	1580g(100.0)

Table 38. Blending test for determining optimum formula of *Doenjang*(II)

	E	F	G	H
<i>Meju</i>	50g(2.05)	110g(3.86)	100g(6.00)	100g(3.58)
Soybean fermented with <i>Phellinus linteus</i>	-	-	-	-
Glutinous brown rice fermented with <i>Paecilomyces japonica</i>	-	-	100g(6.00)	250g(8.96)
Soybean fermented with <i>Phellinus linteus</i>	130g(5.33)	200g(7.02)	-	-
<i>Chunggukjang</i>	830g(34.02)	830g(29.14)	880g(52.76)	780g(27.96)
Cooked barley	750g(30.74)	750g(26.33)	-	1000g(35.84)
Salt	260g(10.66)	360g(12.59)	190g(11.27)	260g(9.32)
Water	400g(16.39)	600g(21.06)	400g(23.98)	400g(14.34)
Total	2440g(100.0)	2850g(100.0)	1670g(100.0)	2790g(100.0)

Table 39. Blending test for determining optimum formula of *Doenjang*(III)

	I	J	K	L
<i>Meju</i>	80g(2.40)	200g(5.00)	180g(4.50)	100g(2.40)
Soybean fermented with <i>Phellinus linteus</i>	250g(7.60)	200g(5.00)	180g(4.50)	180g(4.32)
Glutinous brown rice fermented with <i>Paecilomyces japonica</i>	-	-	120g(3.00)	200g(4.80)
<i>Chunggukjang</i>	640g(19.50)	940g(23.50)	790g(19.75)	940g(22.54)
Cooked barley	1000g(30.60)	1000g(25.00)	1000g(25.00)	1000g(23.98)
Salt	500g(15.30)	600g(15.00)	580g(14.50)	600g(14.39)
Water	800g(24.50)	1060g(26.50)	1150g(28.75)	1150g(27.58)
Total	3270g(100.0)	4000g(100.0)	4000g(100.0)	4000g(100.0)

Table 40. Optimum formula of *Doenjang* prepared using Basidiomycetes-fermented cereals

	Adding weight(g)	(%)
Soybean fermented with <i>Phellinus linteus</i>	180	4.5
Glutinous brown rice fermented with <i>Paecilomyces japonica</i>	120	3.0
<i>Meju</i>	180	4.5
Cooked barley	1000	25.0
<i>Chunggukjang</i>	800	20.0
Salt	580	14.5
Water	1140	28.5
Total	4000	100.0

(나) 고추장의 최적 배합비

고추장의 최적배합비를 결정하기 위하여 메주의 첨가량을 5% 내외로 고정하고 상황버섯 배양콩과 동충하초 배양 현미참쌀의 첨가유무, 보리밥, 참쌀가루의 첨가유무 그리고 고추가루, 맥아, 소금의 첨가량을 변화시키면서 Table 41과 42에 나타난 바와 같은 배합으로 고추장을 제조한 후 관능검사를 실시하였다. 이때 찐참쌀가루는 참쌀가루에 물을 30% 가수하여 증자하였으며, 맥아 참쌀농축액은 맥아 80g을 물 1.5L로 추출하여 착즙한 착즙액에 찐참쌀가루를 침지하여 보온밥통에서 1시간 당화시킨 다음 가열하여 50 Brix까지 농축하였다. 70일 경과시 대체적으로 충분히 숙성이 이루어져 고추장의 깊은 맛이 나타났으며, 고추가루의 비율이 높은 C, D, E 처리구의 경우 상당히 매운 맛을 나타내었다. 맥아 참쌀 농축액과 전분질 원료를 함께 사용한 B, D 처리구의 경우 당화가 잘 일어나지 않았으며, 보리밥을 첨가한 A, B 처리구는 색택이 다소 어두워지는 것으



로 나타났다. 물엿 첨가는 고추장에 밝은 윤기와 단맛을 부여하여 기호성을 높이는 것으로 나타났다. 따라서 이상의 결과를 토대로 Table 43과 같은 버섯배양곡물을 이용한 고추장의 최적배합비를 결정하였다.

Table 41. Blending test for determining optimum formula of *Kochujang*( I )

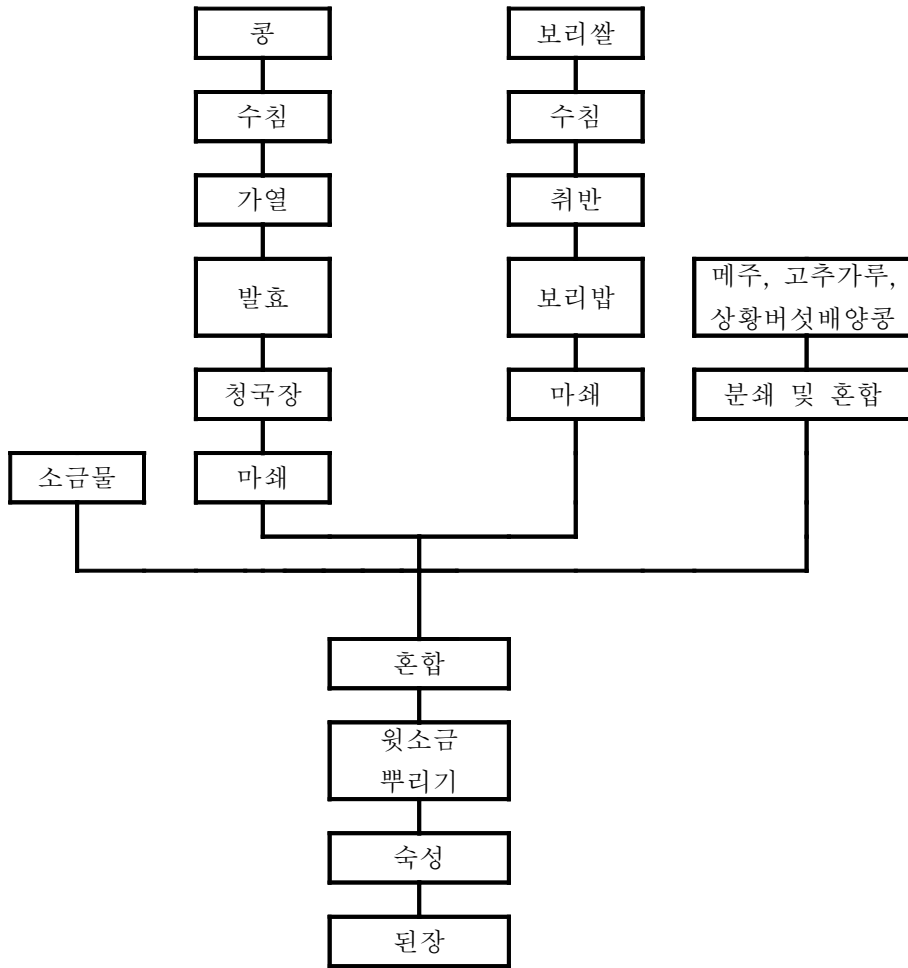
	A	B	C
<i>Meju</i>	100g(5.00)	100g(6.64)	140g(4.19)
Soybean fermented with <i>Phellinus linteus</i>	100g(5.00)	-	-
Glutinous brown rice fermented with <i>Paecilomyces japonica</i>	-	100g(6.64)	253g(7.57)
Cooked glutinous rice	-	-	660g(19.76)
Cooked barley	250g(12.50)	250g(16.61)	-
Concentrate of glutinous rice saccharified by malt	1110g(55.50)	615g(40.86)	-
Malt extract	-	-	1350g(40.42)
Red pepper	250g(12.50)	250g(16.61)	633g(18.95)
Salt	120g(6.00)	120g(7.97)	304g(9.10)
Corn syrup	70g(3.50)	70g(4.65)	-
Total	2000g(100.0)	1505g(100.0)	3340g(100.0)

Table 42. Blending test for determining optimum formula of *Kochujang*(II)

	D	E	F
<i>Meju</i>	110g(4.34)	150g(4.44)	150g(4.70)
Brown rice fermented with <i>Paecilomyces japonica</i>	200g(7.89)	250g(7.40)	250g(7.83)
Cooked glutinous rice	-	506g(14.98)	427g(13.37)
Concentrate of glutinous rice saccharified by malt	1260g(49.70)	-	-
Malt extract	-	1440g(42.63)	1477g(46.24)
Red pepper	500g(19.72)	630g(18.65)	443g(13.87)
Salt	240g(9.47)	254g(7.52)	300g(9.39)
Water	115g(4.54)	-	-
Corn syrup	110g(4.34)	148g(4.38)	147g(4.60)
Total	2535g(100.0)	3378g(100.0)	3194g(100.0)

Table 43. Optimum formula of *Kochujang* prepared using Basidiomycetes-fermented cereals

	Added weight(g)	%
Glutinous brown rice fermented with <i>Paecilomyces japonica</i>	250	7.44
Cooked glutinous rice	450	13.39
Red pepper	550	16.37
<i>Meju</i>	150	4.46
Salt	300	8.93
Corn syrup	160	4.76
Malt extract	1500	44.65
Total	3765	100



벼싯배양 곡물을 이용한 된장 제조공정도

## 청국장 제조

콩을 세척하고 8시간 수침후 콩이 붉은색을 띠 때까지 약한불로 4~5시간 삶은후 밀과 위에 짚을 깔고 35℃에서 3일간 발효한다. 이때 수분이 마르지 않도록 때때로 물을 뿌려준다. 발효후 chopper로 마쇄하고 보리밥과 혼합한 후 된장 제조에 사용한다.

## 보리밥 제조

보리쌀을 세척하고 4~5시간 수침후 3~4배의 물을 가하여 취반한 후 chopper로 마쇄하고 청국장과 혼합한 후 된장 제조에 사용한다.

## 분쇄 및 원료 준비

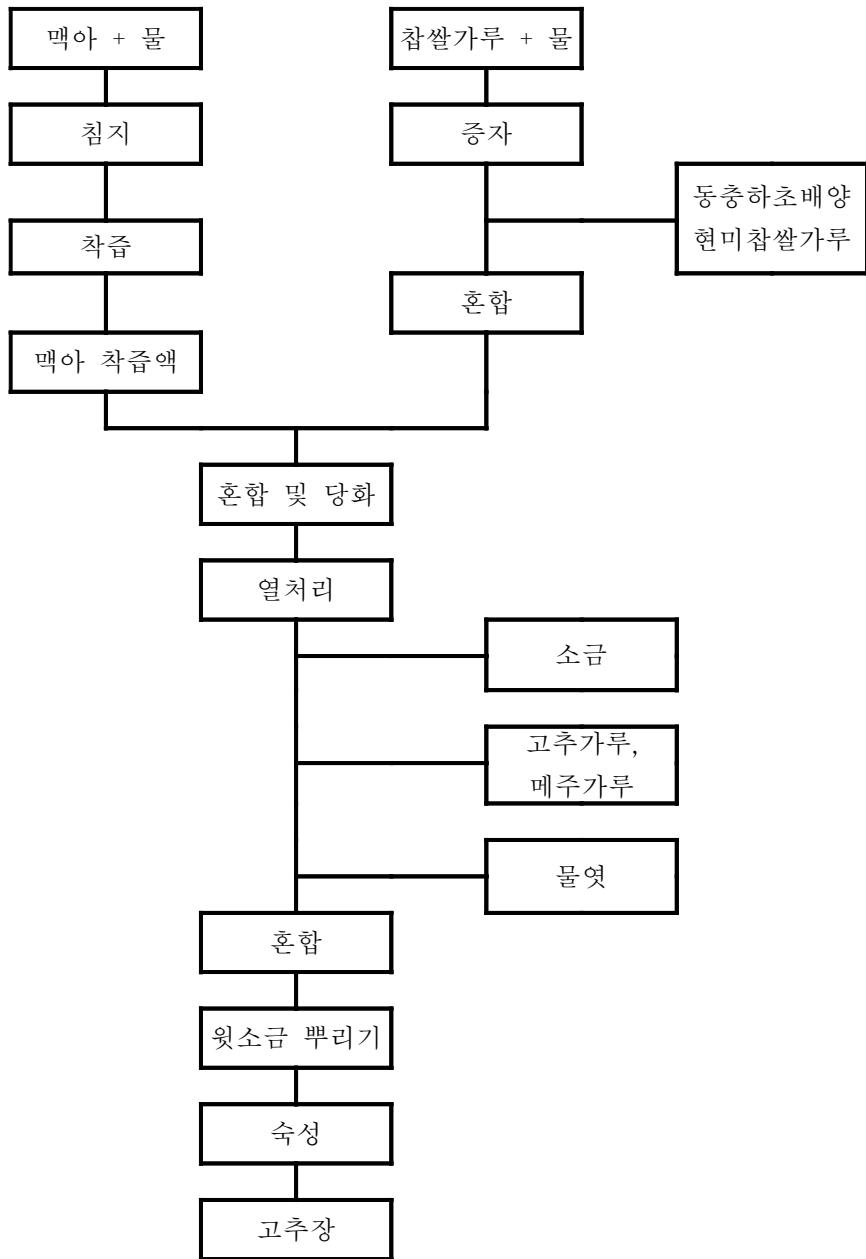
소금물과 청국장, 보리밥 혼합물 그리고 메주가루, 상황버섯배양콩, 고추가루 혼합물을 미리 제조한다. 메주가루, 상황버섯배양콩, 고추가루는 roller mill 또는 pin mill 등으로 분쇄한 후 혼합한다.

## 혼합

Hobart mixer에 소금물을 넣고 먼저 청국장, 보리밥 혼합물을 넣어 혼합한 후 메주가루, 상황버섯배양콩, 고추가루 혼합물을 넣어 혼합한다. 이때 소금물 또는 물의 첨가량을 조절하여 반죽물의 물성을 조절한다.

## 윗소금 뿌리기 및 숙성

혼합 반죽물을 항아리에 담은 후 잡균의 혼입을 억제하기 위하여 윗소금을 뿌린 후 30℃ 내외로 유지되는 숙성실에서 약 3개월간 숙성한다.



버섯배양곡물을 이용한 고추장 제조공정도

## 맥아 착즙액 제조

맥아 80g에 물 1.5L를 가하고 2시간 침지한 후 여과포에 넣고 주물러서 착즙한다.

## 찜쌀가루 제조

분쇄한 찰쌀가루 300g에 물을 30%(90g) 가하여 혼합한 후 1시간 증자한다.

## 분쇄 및 시료준비

동충하초 배양 현미찰쌀가루, 고추가루, 메주는 roller mill 또는 pin mill 등으로 분쇄한 후 고추가루와 메주가루는 미리 혼합한다.

## 당화

맥아 착즙액에 동충하초 배양 현미찰쌀가루와 찜쌀가루를 혼합하고 60℃에서 1시간 당화시킨 후 효소 불활성화를 위해 가열한다.

## 혼합

Hobart mixer에 당화액을 넣고 먼저 소금을 넣어 용해시키고 고추가루, 메주가루 혼합물을 넣어 충분히 혼합한 후 물엿을 첨가하여 혼합한다.

## 윗소금 뿌리기 및 숙성

혼합 반죽물을 항아리에 담은 후 잡균의 혼입을 억제하기 위하여 윗소금을 뿌린 후 30℃ 내외로 유지되는 숙성실에서 약 3개월간 숙성한다.

## 제 4 장 연구개발결과의 활용계획

본 연구과제의 수행 결과 얻어진 성과는 다음과 같이 활용할 계획이다.

### 0 연구결과 및 결과별 활용가능영역

#### 1) 특허출원

- . ‘노인성 치매에 대한 신경세포 손상 억제 및 기억력 개선능을 갖는 균핵 동충하초 추출물’ (출원번호 10-2003-0064632)
- . ‘식후 혈당강하 및 당뇨 개선 기능을 갖는 버섯균’ 출원 예정

#### 2) 국내외 관련 학회 논문 게재

- . ‘식후 혈당강하 기능을 갖는 버섯균 탐색 및 이를 이용하여 제조한 버섯배양곡물의 혈당강하 효능’ 투고 예정
- . ‘균종별, 배양기간별 버섯배양곡물의 식품학적 특성’ 투고 예정
- . ‘버섯배양곡물이 당뇨쥐의 혈당 및 지질대사에 미치는 영향’ 투고 예정
- . ‘버섯배양곡물로부터 분리한 혈당강하 효능 활성획분의 특성’ 투고 예정
- . ‘노인성 치매에 대한 신경세포 손상 억제 효능 갖는 버섯균 탐색’ 투고 예정
- . ‘균핵 동충하초의 노인성 치매에 대한 기억력 개선능’ 투고 예정

#### 3) 관련기술의 기업체 기술이전 추진

- . ‘혈당강하 및 치매예방 기능을 갖는 버섯배양곡물 제조기술’
- . ‘버섯배양곡물로부터 분리한 혈당강하 효능 활성획분의 기능성 식품 소재화 기술’
- . ‘버섯배양곡물을 이용한 다양한 가공제품 제조기술’

## 제 5 장 참고문헌

1. Groop, L.C. Sulfonyl ureas in NIDDM. *Diabetes Care* 15: 737-754 (1992)
2. Lucas, E.H. and Ringler, R.L. Tumor inhibitors in *Boletus edulis* and other holobasidiomycetes. *Antibiotics and Chemotherapy* 7: 1-4 (1957)
3. Chihara, G., Hamuro, H., Maeda, Y., Arai, Y. and Fukuoka, K. Fractionation and purification of the polysaccharides with marked antitumor activity, especially lentinan from *Lentinus edodes*. *Cancer Res.* 30: 2776-2781 (1970)
4. Nagata, J., Higashiuesato, Y., Maeda, G., Chinen, I., Saito, M., Iwabuchi, K. and Onoe, K. Effects of water-soluble hemicellulose from soybean hull on serum antibody levels and activation of macrophages in rats. *J. Agric. Food Chem.* 49: 4965-4970 (2001)
5. Zhuang, C., Mizuno, T., Ito, H., Shimura, K., Sumiya, T. and Kawade, M. Antitumor activity and immunological property of polysaccharides from the mycelium of liquid-cultured *Grifola frondosa*. *J. Jpn. Soc. Food Sci. Technol.* 41: 724-732 (1994)
6. Watanabe, T., Yamada, T., Tanaka, H., Jiang, S., Mazumder, T.K., Nagai, S. and Tsuji, K. Antihypertensive effect of gamma-aminobutyric acid-enriched *Agaricus blazei* on spontaneously hypertensive rats. *J. Jap. Soc. Food Sci. Technol.* 49: 166-173 (2002)
7. Sumi, H., Yatagai, C. and Matsubara, K. Anti-platelet aggregation and plasma fibrinolysis accelerating activities in mushroom extracts (*Pleurotus ostreatus* and *Lentinus edodes*). *J. Jpn. Soc. Food Sci. Technol.* 43: 318-321 (1996)
8. Cheung, P.C.K. The hypocholesterolemic effect of extracellular polysaccharide from the submerged fermentation of mushroom. *Nutr. Res.* 16:



1953-1957 (1996)

9. Sugiyama, K., Saeki, S., Tanaka, A., Yoshida, S., Sakamoto, H. and Ishiguro, Y. Hypocholesterolemic activity of ningyotake (*Polyporus confluens*) mushroom in rats. J. Jap. Soc. Nutr. Food Sci. 45: 265-270 (1992)
10. Kurasawa, S.I., Sugahara, T. and Hayashi, J. Studies on dietary fiber of mushrooms and edible wild plants. Nutr. Reports International 26: 167-173 (1982)
11. Ukawa, Y., Furuichi, Y., Kokean, Y., Nishii, T. and Hisamatsu, M. Effect of hatakeshimaji (*Lyophyllum decastes* Sing.) mushroom on serum lipid levels in rats. J. Nutr. Sci. Vit. 48: 73-76 (2002)
12. Yuan, Z., He, P., Cui, J. and Takeuchi, H. Hypoglycemic effect of water-soluble polysaccharide from *Auricularia-judae* Quel. on genetically diabetic KK-A mice. Biosci. Biotechnol. Biochem. 62: 1898-1903 (1998)
13. Kiho, T., Sobue, S. and Ukai, S. Structural features and hypoglycemic activities of two polysaccharides from a hot-water extract of *Agrocybe cylindracea*. Carbohydr. Res. 251: 81-87 (1994)
14. Kiho, T., Tsujimura, Y., Sakushima, M., Usui, S. and Ukai, S. Polysaccharides in fungi. XXXIII Hypoglycemic activity of an acidic polysaccharide (AC) from *Tremella fuciformis*. Yakugaku Zasshi 114: 308-315 (1994)
15. 이현진, 김종식, 허건영, 이경복, 이인구, 송경식 : 담자균 추출물의 propyl endopeptidase, acetylcholine esterase 저해 및 항혈전 응고활성. 한국농화학회지 42(4): 336-343 (1999)
16. Strowig, S. and Raskin, P. Glycemic control and diabetic complication. Diabetes Care 15: 1126 (1992)
17. Koivisto, V.A. Insulin therapy on type II diabetes. Diabetes Care 16: 29-9 (1993)

18. Torsdottir, I., Alpsten, M., Andersson, H. and Einasson, S. Dietary guar gum effects on postprandial blood glucose, insulin and hydroxyproline in humans. *J. Nutr.* 119: 1925–1931 (1989)
19. Blackburn, N.A., Redfern, J.S., Jaris, H., Holgate, A.M., Hanning, I., Scarpello, J.H.B., Johnson, I.T. and Read, N.W. The mechanism of action of guar gum in improving glucose tolerance in man. *Clin. Sci.* 66: 329–336 (1984)
20. Puls, H.P., Krause, L., Muller, H., Schutt, R. and Thomas, G. Inhibitors of the rate of carbohydrate and lipid absorption by the intestine. *Int. J. Obesity* 8: 181 (1984)
21. Cauderay, M., Tappy, L., Temier, E., Jequier, E., Hillebrand, I. and Felber, J.P. : Effect of alpha-glycohydrolase inhibitors on sucrose metabolism in normal men. *Metabolism*, 35: 472 (1985)
22. Buhler, F.R., Julius, S. and Reaven, G.M. A new dimension in hypertension: role of insulin resistance. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 15, S1 (1990)
23. Kim, O.K. Effect of *Commelina communis* extract on blood glucose level and changes in enzymatic activity in alloxan-diabetes rats. *Kor. J. Pharmacogn.* 22: 225–232 (1991)
24. Kim, O.K. The screening of plants for hypoglycemic action in normal and alloxan-induced hypoglycemic rats. *Kor. J. Pharmacogn.* 23: 117–119 (1992)
25. Kim, J.Y. The diabetes and traditional medicine. *J. K. Diabetes Assoc.* 18: 377–381 (1994)
26. Lee, J.S. Blood glucose-lowering effect of *Mori Folium*. *Yakhakhoeji* 39: 367 (1995)
27. Kimura, M. Antihyperglycemic effects of N-containing sugars derived from the leaves of *Morus Bombycis*. *Carbohydr. Res.* 253: 235–245 (1994)
28. Chen, F., Nakashima, N. and Kimura, I. Hypoglycemic activity &

- mechanism of extracts from Mulberry leaves & Cortex *Mori radics* in streptozotocin-induced diabetic mice. *Yakugaku Zasshi* 115: 476-482 (1995)
29. Hikino, H. and Oshima, Y. Isolation and hypoglycemic activity of Moran A, a glycoprotein of *Morus Alba* Root Bark. *Planta Medica* 159-160 (1985)
30. Rhinehart, B.L., Robinson, K.M., Liu, P.S., Payne, A.J., Wheatley, M.E. and Wagner, S.R. Inhibition of intestinal disaccharidases and suppression of blood glucose by a new  $\alpha$ -glucohydrolase inhibitor-MDL 25,637. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 241: 915 (1987)
31. Pan, Y.T., Ghidon, J. and Elbein, A.D. The effects of castanospermine and swainsonine on the activity and synthesis of intestinal sucrase. *Arch. Biochem. Biophys.* 303: 134 (1993)
32. Kato, Y. Influence of water-insoluble dietary fiber on *in vitro* glucose diffusion speed. *J. Jpn. Soc. Nutr. Food Sci.* 46: 351-355 (1993)
33. AOAC. Official Methods of Analysis. 8th ed. Association of Official Analytical Chemists. Washington D.C. USA. p. 114 (1955)
34. Tamagawa, K., Fukushima, S., Kobori, M., Shinmoto, H. and Tsushida, T. Proanthocyanidins from barley bran potentiate retinoic acid-induced granulocytic and sodium butyrate-induced monocytic differentiation of HL60 cells. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 1483-1487 (1998)
35. Sakurai, Y., Lee, T.H. and Shiota, H. On the convenient method for glucosamine estimation in koji. *Agric. Biol. Chem.* 41: 619-624 (1977)
36. Schoch, T.J. Swelling power and solubility of granular starches. p.106, In: *Methods in Carbohydrate Chemistry*, Vol. IV, Academic Press (1964)
37. Rainbird, A.L., Low, A.G. and Zebrowska, T. Effect of guar gum on glucose and water absorption from isolated loops of jejunum in conscious growing pigs. *Br. J. Nutr.* 52: 489-498 (1984)
38. Ebihara, K. and Kiriyaama, S. Comparative effects of water-soluble and water-insoluble dietary fibers on various parameters relating to glucose tolerance in rats. *Nutr. Rep. Int.* 26: 193-201 (1982)
39. Kato, Y. and Akiyama, M. Gel-filtration chromatography of dextrans and

- maltodextrins on a water-insoluble dietary fiber column. J. Jpn. Soc. Nutr. Food Sci. 46: 161-166 (1993)
40. Kato, Y. Influence of water-insoluble dietary fiber on *in vitro* glucose diffusion speed. J. Jpn. Soc. Nutr. Food Sci. 46: 351-355 (1993)
41. Anderson, J.W. Physiological and metabolic effects of dietary fiber. Fed. Proc. 44: 2902 (1985)
42. Wolever, T.M.S. Relationship between dietary fiber content and composition in foods and the glycemic index. Am. J. Clin. Nutr. 51: 72 (1990)
43. Battilana, P., Ornstein, K., Minehira, K., Schwarz, J.M., Acheson, K., Schneiter, P., Burri, J., Jequier, E. and Tappy, L. Mechanisms of action of  $\beta$ -glucan in postprandial glucose metabolism in healthy men. Eur. J. Clin. Nutr. 55: 327-333 (2001)
44. Johansen, H.N., Knudsen, K.E., Sandstrom, B. and Skjoth, F. Effects of varying content of soluble dietary fiber from wheat flour and oat milling fractions on gastric emptying in pigs. Br. J. Nutr. 75: 339-351 (1996)
45. Isabsson, G., Lundquist, I. and Ihse, I. Effect of dietary fiber on pancreatic enzyme activity *in vitro*. The importance of viscosity, pH, ionic strength, adsorption and time of incubation. Gastroenterology 82: 918-924 (1982)
46. Dunaif, G. and Schneeman, B.O. The effect of dietary fiber on human pancreatic enzyme activity *in vitro*. Am. J. Clin. Nutr. 34: 1034-1035 (1981)
47. Blackburn, N.A., Redfern, J.S., Jaris, H., Holgate, A.M., Hanning, I., Scarpello, J.H.B., Johnson, I.T. and Read, N.W. The mechanism of action of guar gum in improving glucose tolerance in man. Clin. Sci. 66: 329-336 (1984)
48. Wood, P.J., Braaten, J.T., Scott, F.W., Riedel, D. and Poste, L.M. Comparisons of viscous properties of oat and guar gum and the effects of these and oat bran on glycemic index. J. Agric. Food Chem. 38: 753-757 (1990)
49. Johnson, I.T. The biological effects of dietary fiber in the small intestine. In "Dietary Fiber: Chemical and Biological Aspects" eds. Southgate, A.T., Waldron, K., Johnson, I.T. and Fenwick, G.R. The Royal Society of

Chemistry, London. p. 151-163 (1991)

50. Johnson, I.M. and Gee, J.M. Effect of gel-forming gums on the intestine unstirred layer and sugar transport in vitro. *Gut* 22: 398-403 (1981)
51. William-Olsson, T.  $\alpha$ -Glucosidase inhibition in obesity. *Acta Med. Scand. Suppl.* 706: 5 (1985)
52. Honda, M. and Hara, Y. Inhibition of rat small intestinal sucrase and  $\alpha$ -glucosidase activities by tea polyphenols. *Biosci. Biotech. Biochem.* 57: 123 (1993)
53. Coulston, A.M., Hollenbeck, C.B., Liu, G.C., William, R.A., Starich, G.H., Mazzaferri, E.L. and Reaven, G.M. Effect of source of dietary carbohydrate on plasma glucose, insulin and gastric inhibitory polypeptide responses to test meals in subjects with noninsulin-dependent diabetes mellitus. *Am. J. Clin. Nutr.* 40: 965-970 (1984)
54. Jenkins, D.J.A., Wolever, T.M.S., Taylor, R.H., Barker, H., Feieiden, H., Baldwin, J.M., Bowling, A.C., Newman, H.C., Jenkins, A.L. and Goff, D.V. Glycemic indexes of foods: A physiological basis for carbohydrate exchange. *Am. J. Clin. Nutr.* 34: 362-366 (1981)
55. Lee, J.S., Lee, J.S., Yang, C.B. and Shin, H.K. Blood glucose response to some cereals and determination of their glycemic index to rice as the standard food. *Kor. J. Nutr.* 30: 1170-1179 (1997)
56. Fukagawa, N.K., Anderson, J.W., Hageman, G., Young, V.R. and Minaker, K.L. High-carbohydrate, high-fiber diets increase peripheral insulin sensitivity in health young and old adults. *Am. J. Clin. Nutr.* 52: 524-528 (1990)
57. Jenkins, D.J.A., Wolever, T.M.S., Taylor, R.H., Griffiths, C., Krzeminska, K., Lawrie, J.A., Bennett, C.M., Goff, D.V. and Sarson, D.L. Slow release dietary carbohydrate improves second meal tolerance. *Am. J. Clin. Nutr.* 35: 1339-1346 (1982)
58. Malabu, U.H., Dryden, S., Maccarthy, H.D., Kilpatric, A. and Williams, G. Effects of chronic vanadate administration in the STZ-induced diabetic rats. *Diabetes* 43: 9-15 (1994)

59. 김미현, 김혜영, 김우경, 김지영, 김숙희. 대두올리고당이 당뇨유발 흰쥐의 혈당 및 지질대사에 미치는 영향. 한국영양학회 34: 3-13 (2001)
60. Wittmers, L.E.Jr. and Haller, E.W. Effects of adrenalectomy on the metabolism of glucose in C57BL/6J(ob/ob) mice. *Metabolism* 32: 1093-1100 (1983)
61. Thomsen, L.L. Disaccharidase levels of the rat jejunum are altered by dietary fiber. *Digestion* 23: 253-258 (1982)
62. Flourie, B., Vidon, N., Florent, C.H. and Bernier, J.J. Effect of pectin on jejunal glucose absorption and unstirred layer thickness in normal man. *Gut* 25: 936-941 (1984)
63. Lee, H.S., Choi, M.S., Lee, Y.K., Park, S.H. and Kim, Y.J. A study on the development of high-fiber supplements for the diabetic patients: effect of seaweed supplementation on the lipid and glucose metabolism in streptozotocin-induced diabetic rats. *Kor. J. Nutr.* 29: 296-306 (1996)
64. Goldberg, R.B. Lipid disorders in diabetes. *Diabetes Care* 4: 561-572 (1981)
65. Reaven, K.M. Abnormal lipoprotein metabolism in non-insulin dependent diabetes mellitus. *Am. J. Med.* 83: 31-40 (1987)
66. Vahouny, G.V., Roy, T., Gallo, L.L., Story, J.A., Kritchevsky, D. and Cassidy, M.M. Dietary fiber III. Effect of chronic intake on cholesterol absorption and metabolism in the rat. *Am. J. Clin. Nutr.* 33: 2182-2188 (1980)
67. Ikegami, S., Tsuchihashi, F., Harada, H., Tsuchidashi, N., Nishide, E. and Innami, S. Effect of viscous indigestible polysaccharides on pancreatic-biliary secretion and digestive organs in rats. *J. Nutr.* 120: 353-360 (1990)
68. Anderson, J.W. and Bridges, S.R. Plant fiber metabolites after hepatic glucose and lipid metabolism. *Diabetes* 30(suppl): 133-139 (1981)
69. Halliwell, B. and Gutteridge, J.M.C. Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochem. J.* 219: 1-14 (1984)

## 협 동 과 제

치매예방 기능 버섯배양곡물 탐색 및  
유용물질 특성 규명

연구기관 : 영남대학교

연구책임자 : 김정애

# 제 1 장 서 론

노인성 치매는 환자의 뇌에서  $\beta$ -amyloid peptide가 노인반과 신경섬유다발을 형성하여 choline성 신경계 등 여러 신경계의 퇴행성 병변을 진행시키는 것으로 미국 치매협회와 국립 노화연구원이 발표한 통계에 의하면 약 400만명의 미국인이, 65세 이상의 노인 중 약 10.3%가 치매를 앓고 있고, 치료 및 간호에 소요되는 비용이 연간 약 950억 달러이며 환자수는 매년 증가할 것으로 예상하고 있다. 국내의 경우 1998년 한국보건사회연구원의 보고에 의하면 고령화에 의해 치매인구가 급증하여 1995년 치매 유병률이 65세 이상 노인 중 8.3%이었으며, 2000년 27만 8천명(65세 이상 노인인구의 8.3%), 2015년 52만 8천명(9%), 2020년 62만명(9%)에 이를 것으로 예상하고 있다.

치매치료제로 Tacrine, ENA 713 등이 개발되어 있으나 그 효과가 크지 않고 일시적으로 일부 증상을 호전시키는 정도의 효과를 내며, 이외의 약제는 심각한 부작용 때문에 사용이 제한되는 등 근본적인 치료제가 거의 전무한 실정이다. 또한 중추신경계의 손상은 복구가 거의 불가능한 점 등을 감안하면 노인성 치매의 발병 후 치료 보다는 이의 발병을 예방하는 것이 가장 바람직하기 때문에 부작용 없이 항시 섭취하여 온 천연물이나 식품으로부터 치매예방 및 완화에 효과가 있는 물질을 분리하고자 하는 연구가 많이 수행되고 있다.

고등균류 중 버섯자원은 8,000여종으로 그 중에서 20여종은 예로부터 식용과 약용으로 활용되어 왔으며 최근에는 전 세계적으로 버섯균의 생리활성 물질이나 기능성 성분에 대한 연구가 활발히 진행되어 항암성, 면역활성증강, 혈압강하, 혈전용해, 혈중 콜레스테롤 저하작용 등이 과학적으로 입증되어 일부 기능성 물질을 추출, 정제하여 의약품으로 상품화되기도 하였으나 치매와 관련한 활성에 대한 연구가 acetylcholinesterase 효소 억제 작용을 중심으로 in vitro 실험 결과가 보고된 바 있다.

본 연구에서는 30여종의 버섯 균사체 추출물 및 배양액에 대하여 사람 뇌세포주



에 치매의 원인물질인  $\beta$ -amyloid peptide( $\beta$ A)를 처리하여 노인성 치매의 신경 독성을 유발하고 이를 예방 및 차단하는 버섯류를 탐색하고, 사람 세포주를 이용한 세포모델에서 선발된 버섯류에 대하여 쥐를 이용한 생체내 실험으로  $\beta$ A에 의한 기억력 감퇴를 억제 또는 호전 시키는 효능을 검증하여 노인성 치매를 예방 및 치료 할 수 있는 버섯류를 확인하는 것이다. 뿐만 아니라 효능이 입증된 버섯을 곡물에 접종 배양하여 치매 예방 기능성 버섯 배양 곡물의 생산을 목표로 하고 있다.

## 제 2 장 연구수행 내용 및 결과

### 제 1 절 재료 및 방법

#### 1. 시료의 제조

본 연구에 사용한 버섯 균사체는 생명공학연구원 유전자은행(KCTC)으로부터 분양받은 균주로서 한천 평판배지 상에서 일정시간 배양 후 약  $1\text{cm}^2$ 의 크기로 절편을 떼어내 액체배지에 옮기고 회전 진탕 배양기에서 100 rpm으로 암조건 하에서 배양하였다. 균사체가 충분히 성장한 후 여과지로 감압 여과하여 균사체와 배양액을 분리하였으며, 회수한 균사체는 동결건조한 후 75% 메탄올 용액으로 환류 냉각기로  $85^\circ\text{C}$ 의 온도에서 3시간씩 2회 반복 추출하였다. 균사체 추출물을 감압건조하여 건조시킨 후 시료로 사용하였다.

#### 2. 세포배양

뇌신경암 유래 세포주 SK-N-SH 10% fetal bovine serum (FBS), 1mM sodium pyruvate 및 1% penicillin-streptomycin을 첨가한 Dulbecco's modified Eagle's minimum essential medium (DMEM)으로 세포수가  $5 \times 10^5$  cells/mL가 되도록 하여 배양한다. 배양용기는  $25\text{mm}^2$  flask를 사용하며 5-7mL의 배지로  $37^\circ\text{C}$ , 포화습도로 유지되는 5%  $\text{CO}_2$  배양기에서 단층 배양한다. 배지는 일주일에 두 번씩 갈아주고, confluency에 도달한 세포는 0.05% trypsin-EDTA를 사용하여 trypsinization한 후 계대 배양하여 유지한다.

#### 3. MTT 분석법에 의한 살아있는 세포 수 측정

살아있는 세포는 미토콘드리아에 존재하는 탈수소 효소에 의해 MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromide)가 MTT-formazan으로 전환 되므로 이것의 양을 재면 살아있는 세포의 수를 측정할 수 있다. 세포는 1mL 배지에 여러 가지 약물 또는 약물을 녹인 용매만을 처리하여 24-well multiwell plate에서 48 시간 동안 배양한다. 배양이 끝난 세포에 MTT 용액 (2.5mg/mL  $\text{H}_2\text{O}$ ) 100uL를 첨가하여  $37^\circ\text{C}$ 에서 4시간 동안 반응시킨

다. 생성된 MTT-formazan 결정체를 분리하기 위하여 처리된 세포 현탁액을 eppendorf tube에 옮겨 원심분리 (1500 rpm, 4 분) 한다. 상정액을 조심스럽게 제거하고 dimethyl sulfoxide (DMSO) 100uL를 첨가하여 결정체를 용해시킨 후 540nm 에서 ELISA reader로 흡광도를 측정한다.

#### 4. Cytochrome C reduction assay

활성산소종의 생성을 측정하기 위하여 Babior 등의 방법을 이용하여 cytochrome C의 환원 정도를 측정한다. Tris-KCl buffer (0.05M Tris, 1.15% KCl, pH 7.4) 200uL의 차가운(4°C) 세포 현탁액에 2mL PBS (pH7.2)와 45nmol cyt C를 첨가하고 37°C에서 15분간 배양하고 얼음에 방치하여 반응을 종료시키고 550nm에서 흡광도를 측정한다. 흡광도에  $2.1 \times 10^4 \text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$  (extinction factor)를 곱하여 1분당 환원되는 cyt C의 양을 환산한다.

#### 5. 과산화지질 함량 측정

과산화지질 함량 측정은 Ohkawa 등의 방법에 준해 배양세포의 마쇄균질액 일정량에 8.1% sodium dodesyl sulfate, 20% acetate buffer (pH 3.5) 및 0.8% thiobarbituric acid(TBA)용액을 가해 95°C에서 1시간동안 반응시키고 실온으로 냉각한 다음 생성된 홍색의 TBA reactive substance를 n-Butanol:Pyridine (15:1) 혼액으로 이행시켜 과장 532nm에서 흡광도의 변화를 측정하여 정량한다. 한편 *in vitro* 실험에서는 xanthine-xanthine oxidase system을 이용하여 malondialdehyde(MDA)의 함량을 측정한다. 과산화지질의 함량은 단백질 1mg당 MDA의 양을 nmole로 나타낸다.

#### 6. 알츠하이머성 치매 쥐 모델용 $\beta$ -amyloid 투여

250-300g 사이의 웅성 흰쥐 (Sprague-Dawley)를 50mg/kg 용량의 sodium pentobarbital을 복강주사하여 마취시키고 stereotaxic frame에 고정시킨다. Kofe microinjector가 부착된 stereotaxic frame에 Hamilton syringe를 부착하고 incisor바를 lamda skull point와 bregma skull point의 높이가 일치할 때까지 조절한 후 Hamilton syringe를 이용하여 멸균 증류수에 1mg/ml로 희석하여 37°C에서 5일 동안 숙성한  $\beta$ -amyloid fragment(25-35)를 nucleus basalis coordinate

(AP -1.5 ML -1.2 DV -6.5)에 5분(1uL/min)에 걸쳐 5uL를 주입한다.  $\beta$ -amyloid를 주입 후 Hamilton syringe를 바로 제거하지 않고 5분 정도 기다린 뒤에 제거하고 수술부위를 봉합한다.

#### 7. Water maze test (Morris 수중 미로)

지름 80cm, 깊이 50cm의 수조에 무해한 milk power를 풀어 platform이 보이지 않도록 하고 수면에서 1.5cm되는 위치에 platform을 설치한다. 실험 쥐가 platform을 찾는 훈련을 하루에 동서남북의 각 시발점에서 4회 실시하여 7일간에 걸쳐 시행한다. 180초 이내에 platform을 찾지 못하는 쥐는 실험에서 제외한다. 쥐의 움직임 및 platform을 찾는 시간을 video image motion analyzer (Ethovision)로 측정 분석한다.

#### 8. 버섯균사로부터의 획분 제조를 위한 순차분획

동결건조한 100g의 *Cordyceps ophioglossoides* 균사를 500mL의 75% MeOH 용액으로 환류 냉각기로 85°C의 온도에서 3시간씩 3회 반복 추출하여 추출물을 제조하였으며 추출물을 여과하고 추출물이 200mL 될 때까지 감압농축하였다. 농축된 추출물에 각각 600mL의 hexane, chloroform, ethylacetate, butanol 및 물로 극성이 낮은 용매에서 극성이 높은 용매로 순차적으로 계통분획하여 각각의 획분을 얻었으며, 이를 감압농축하여 건조시킨 후 치매예방 효능 분석을 위한 시료로 사용하였다.

## 제 2 절 결과 및 고찰

### 1. 버섯추출물의 신경세포 생존률 감소 및 활성산소종, 지질과산화 억제 효능

노인성 치매를 유발하는 원인물질인  $\beta$ -amyloid peptide<sub>1-42</sub>( $\beta$ A)를 농도별로 처리하였을 때 40 $\mu$ m에서 유의한 신경세포 생존률 감소 (Fig.1)와 지질과산화의 증가 (Fig.2)를 나타내었다.

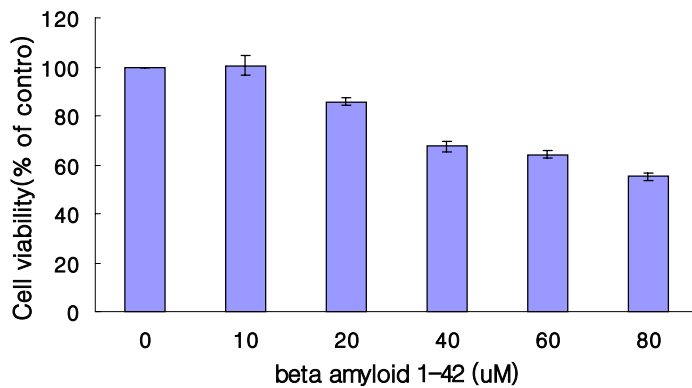


Fig. 1. Cytotoxic effect of  $\beta$ -amyloid peptide on SK-N-SH human neuronal cells

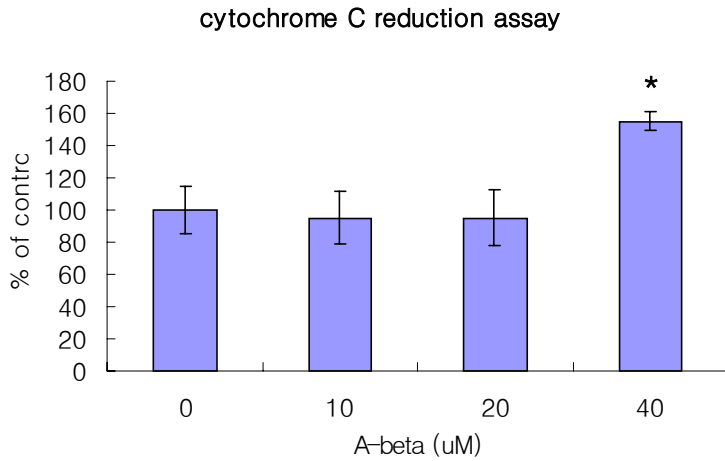
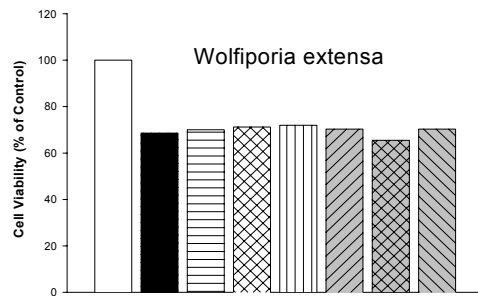
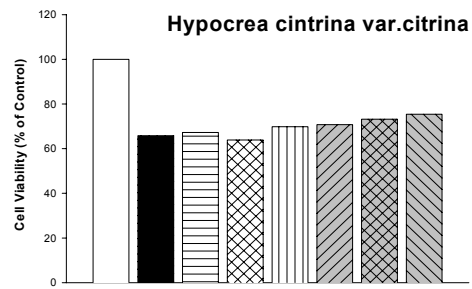
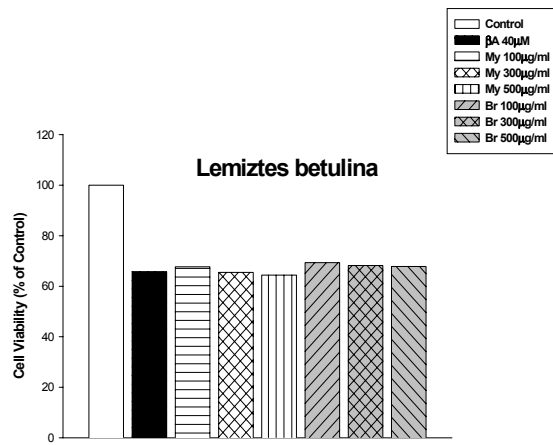
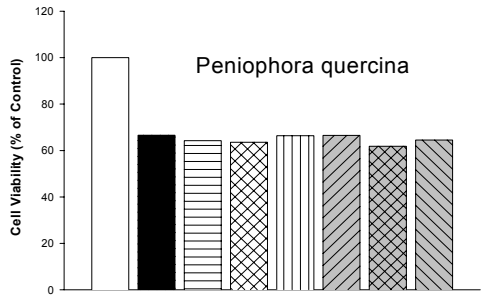
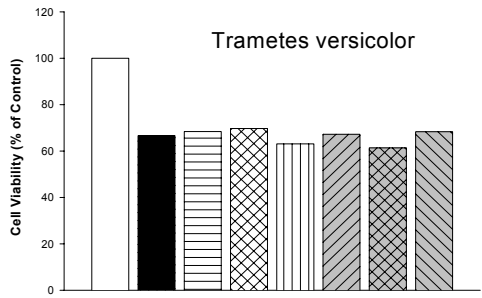
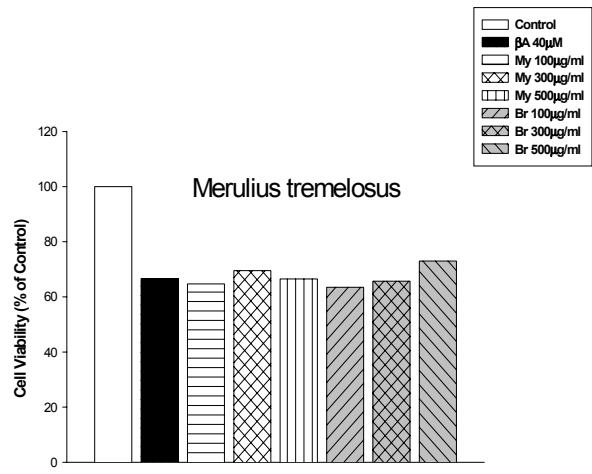


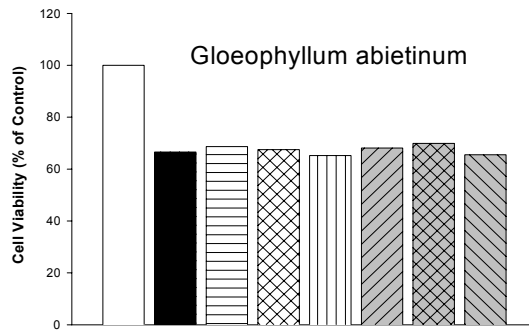
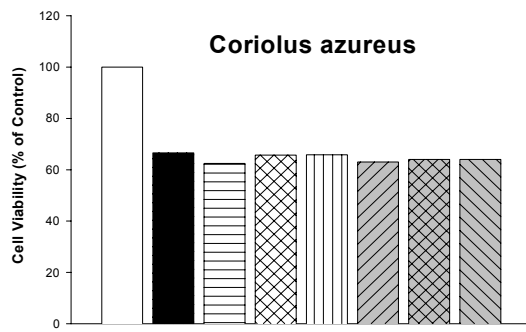
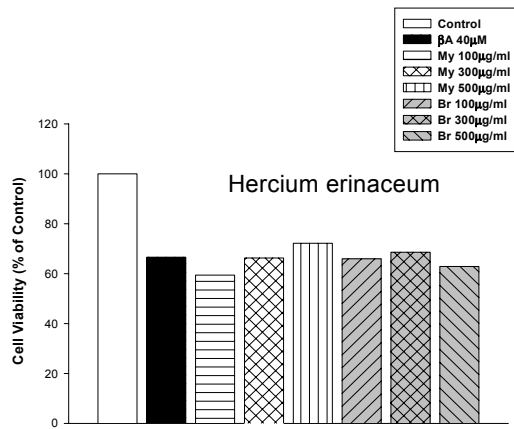
Fig 2. Increased lipid peroxidation by  $\beta$ -amyloid peptide in SK-N-SH human neuronal cells

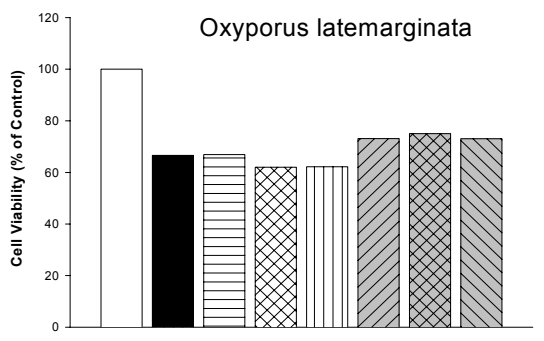
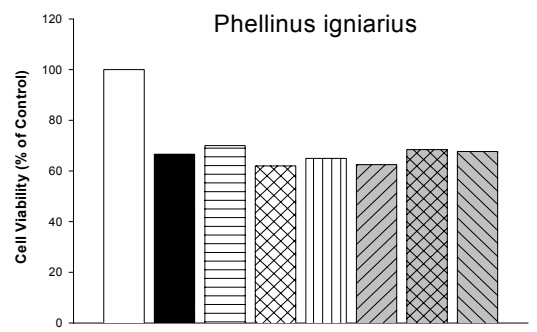
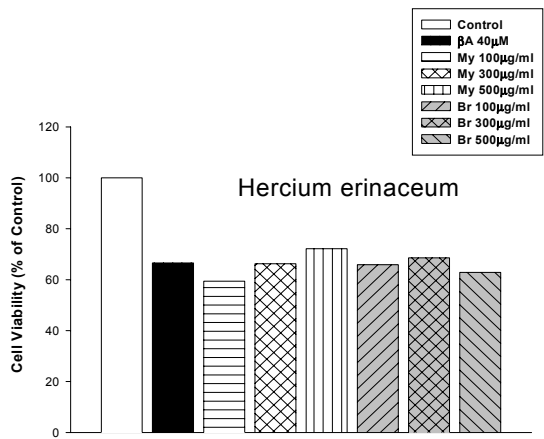
$\beta$ A의 독성에 대한 버섯 균사체 (My) 및 배양액 추출물 (Br)의 예방 효과에 대해 다음의 14종의 버섯을 대상으로 실험한 결과 유의한 차이를 확인하지 못하였다. (Fig.3). 그러나, 버섯 추출물을 DMSO용액에 녹여 조사한 결과 (Table 1),  $\beta$ A 단독 처리시 세포 생존률이 대조군에 비해  $54 \pm 8.0\%$ 로 감소하였고 버섯 추출물의 DMSO 용액 ( $0.1\text{mg/mL}$ )을 24시간 전처리 하고  $\beta$ A의 독성을 조사하였을 경우 6473은  $84 \pm 6.9\%$ 의 생존률, 6758의 경우는  $87 \pm 11.8\%$ , 6863의 경우  $92 \pm 6.2\%$ 의 생존률을 나타내어  $\beta$ A의 독성을 현저하게 감소시킴을 확인하였다.

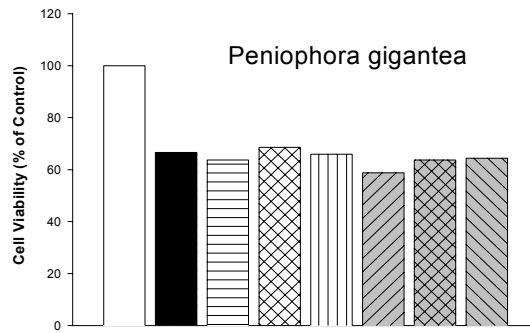
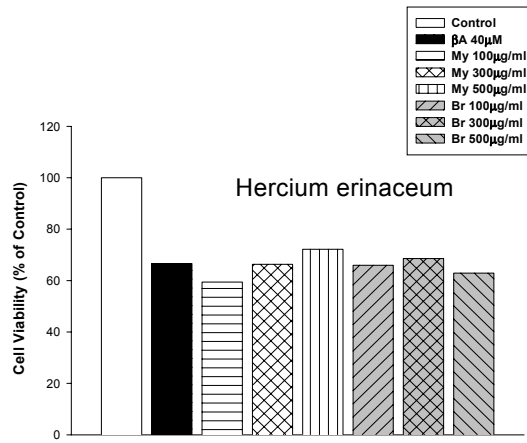












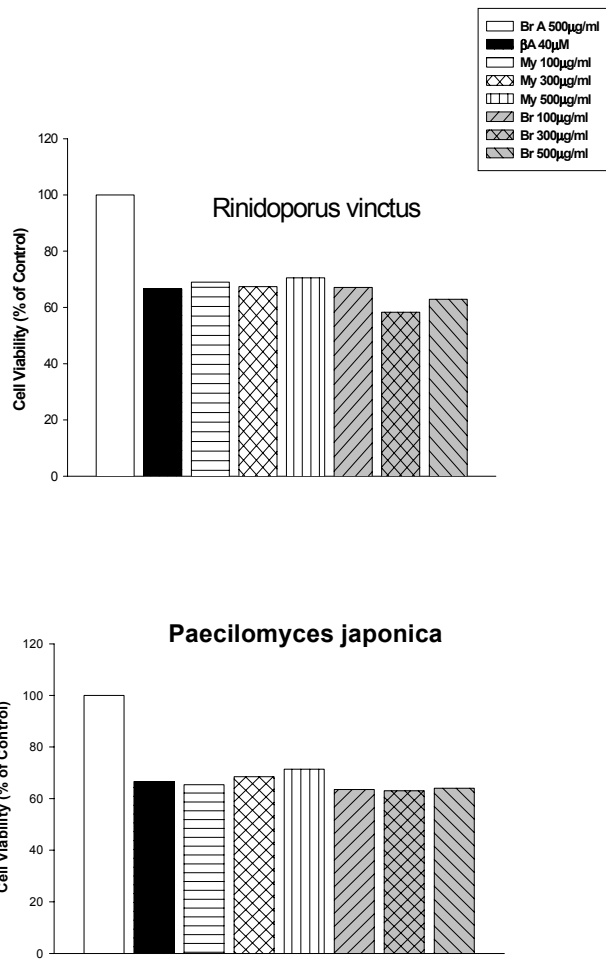


Fig. 3. Effects of water extracts from Mycelium (My) and Broth (Br) on the  $\beta$ A-induced neurotoxicity.

Table 1. Effects of mushroom extracts on the  $\beta$ A-induced neurotoxicity

Treatment	Cell viability (% of control)
<b><i><math>\beta</math>-amyloid alone</i></b>	54±8.0
<b><i>Extract of Basidiomycetes + <math>\beta</math>-amyloid treatment</i></b>	
<i>Gloeophyllum abietinum</i> (조개버섯속)	52±7.7
<i>Laetiporus sulphureus</i> (덕다리버섯)	54±10
<i>Wolfiporia extensa</i> (복령속)	52±8.5
<i>Lenzites betulina</i> (조개껍질버섯)	52±12
<i>Clavicornia pyxidata</i> (좁나무싸리버섯)	52±8.6
<i>Phlebiopsis gigantea</i>	52±13.3
<i>Merulius tremellosus</i> (아교버섯)	52±6.5
<i>Peniophora quercina</i> (분홍껍질고약버섯)	<b>87±11.8 *</b>
<i>Grifora frandosa</i>	53±6.9
<i>Cordyceps ophioglossoides</i> (동충하초속)	<b>84±6.9 *</b>
<i>Hypocrea citrina</i> var. <i>citrina</i>	<b>92±6.2 *</b>
<i>Phellinus linteus</i> (진흙버섯속)	48±0.9
<i>Ganoderma lucidum</i>	53±10
<i>Paecilomyces japonica</i>	56±4
<i>Phellinus igniarius</i>	53±10
<i>Lentinus edodes</i> My	54±5
<i>Inonotus obliquus</i>	53±6
<i>Lentinus edodes</i> My	52±10
<i>Bondarzewia montana</i> My	51±12
<i>Phlebia radiata</i> (가는주름버섯속) My	51±10
<i>Phlebia radiata</i> (가는주름버섯속) Br	53±8
<i>Hypocrea lactea</i> My	53±8
<i>Hypocrea lactea</i> Br	53±8
<i>Cordyceps militaris</i> (동충하초) Br	52±8
<i>Cordyceps militaris</i> (동충하초) My	53±5
<i>Hypocrea nigricans</i> Br	52±9
<i>Hypocrea nigricans</i> My	55±12

분홍곶질고약버섯(*Peniophora quercina*), 균핵동충하초(*Cordyceps ophioglossoides*), 노란점버섯(*Hypocrea citrina* var. *citrina*) 추출물 DMSO 용액을 전처리할 경우  $\beta$ A에 의해 유발되는 활성산소종 증가를 유의하게 감소시키는 경향을 보였으며 특히, 균핵동충하초(*Cordyceps ophioglossoides*, 6473)의 경우는 신뢰도 5% 구간에서 유의한 감소를 보였다 (Fig. 4). 뿐만아니라, 지질과산화의 정도를 확인한 결과, 대조군 (3.04nmole/mg protein)에 비해  $\beta$ A 단일 처리군에서는 3.81nmole/mg protein으로 현저히 증가하였다. 3종의 분홍곶질고약버섯(*Peniophora quercina*), 균핵동충하초 (*Cordyceps ophioglossoides*), 노란점버섯(*Hypocrea citrina* var. *citrina*) 추출물의 DMSO 용액을 전처리한 군에서는 각각 3.70, 3.79, 3.59nmole/mg protein를 나타내어 통계적 유의성은 없으나, 지질과산화를 감소시키는 경향을 나타내었다 (Fig. 5).

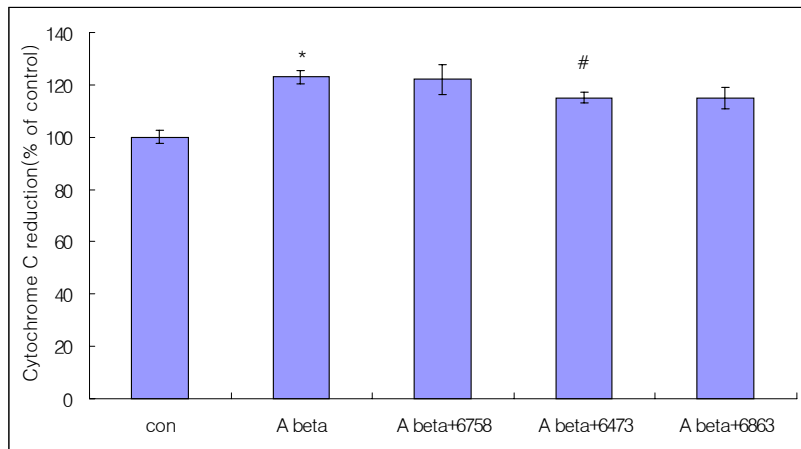


Fig. 4. Preventive effects of mushroom extracts 6473 on the  $\beta$ A-induced production of reactive oxygen species. \* $p < 0.05$ , compared to control group. # $p < 0.05$ , compared to  $\beta$ A-treated group.

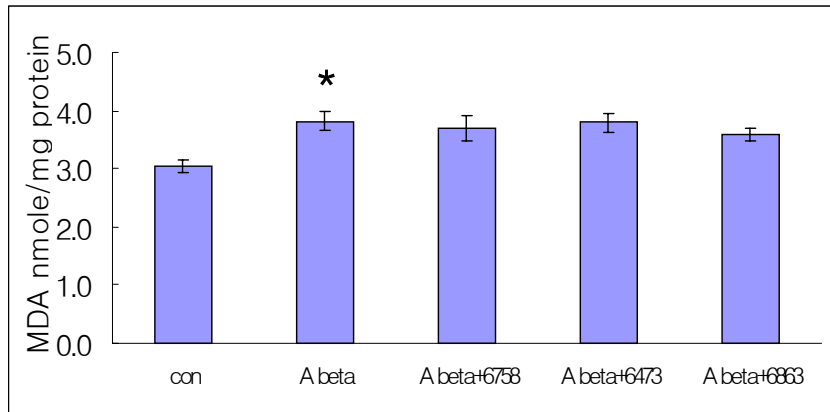


Fig. 5. Effects of mushroom extracts on the  $\beta$ A-induced lipid peroxidation. \* $p < 0.05$ , compared to control group. \* $p < 0.05$ , compared to control group.

## 2. 버섯 추출물의 치매동물모델에서의 기억력 개선 시험

이상의 실험 결과로부터 알츠하이머성 치매의 예방 및 치료효능이 있는 분홍 껌질고약버섯(*Peniophora quercina*), 균핵동충하초(*Cordyceps ophioglossoides*), 노란점버섯(*Hypocrea citrina* var. *citrina*)의 추출물을 대상으로 동물모델에서의 기억력 개선 시험을 실시하였다. 치매동물모델은  $\beta$ -amyloid fragment (25-35)를 쥐의 뇌 nucleus basalis coordinate (AP -1.5 ML -1.2 DV -6.5)에 주입하여 알츠하이머성 치매를 유도하였으며 수술 전 3주 및 수술 후 일주일간 매일 버섯 추출물 용액을 50mg/mL의 농도가 되도록 하여 복강주사하고 대조군에는 vehicle로 생리식염액을 복강주사 하였다. 쥐들은 saline 복강주사와 vehicle을 뇌 중 삽입한 그룹 (sal+vehicle), saline 복강주사와  $\beta$ -amyloid 뇌 중 삽입한 그룹 (sal+ $\beta$ A), 버섯 추출물을 복강 주사하고 vehicle을 뇌 중 삽입한 그룹 (버섯 #+vehicle), 버섯 추출물을 복강 주사하고  $\beta$ -amyloid를 뇌 중 삽입한 그룹 (버섯 #+ A)의 4그룹으로 나누어 분석한 결과, sal+vehicle그룹에 비하여 sal+ $\beta$ A 그룹은 현저한 기억력의 감퇴를 초래하였다. *Cordyceps ophioglossoides* 추출물의 복강 주사는 정상군의 기억에는 유의한 영향을 미치지 않았으나,  $\beta$ -amyloid에 의한 기억력 감퇴를 현저히 개선시킴을 확인하였다(Fig. 6). *Hypocrea citrina* var. *citrina* 추출물의 경우는  $\beta$ -amyloid에 의한 기억력 감퇴를 개선시키지 못하였다 (Fig. 7).



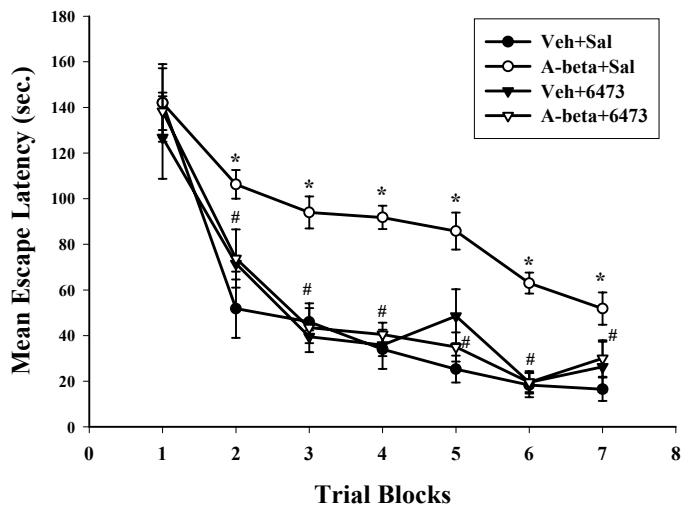


Fig. 6. Water-maze performance of  $\beta$ -amyloid peptide-(25-35) or mushroom 6473 extracts-treated rats. \* $p < 0.05$ , compared to vehicle+vehicle-treated control group. # $p < 0.05$ , compared to  $\beta$ A+vehicle-treated group.

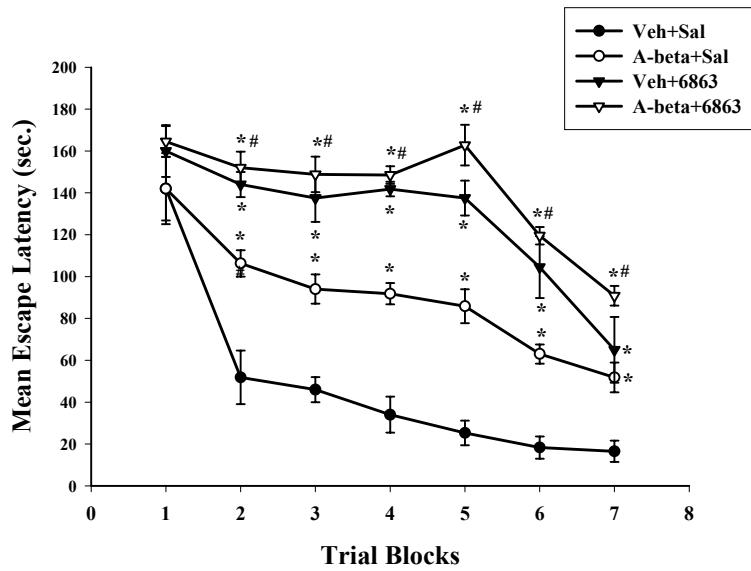


Fig. 7. Water-maze performance of  $\beta$ -amyloid peptide- (25-35) or mushroom 6863 extracts-treated rats. \* $p < 0.05$ , compared to vehicle+saline-treated control group. # $p < 0.05$ , compared to  $\beta$ A+saline-treated group.

### 3. 균핵동충하초 추출물 분획의 $\beta$ -amyloid peptide<sub>25-35</sub>( $\beta$ A)로 인한 신경세포 독성 억제 효과

균핵동충하초(*Cordyceps ophioglossoides*) 추출물이  $\beta$ -amyloid peptide<sub>25-35</sub>( $\beta$ A)로 인한 신경세포 독성을 억제하는 효과를 나타낼 뿐 아니라 치매 유도 동물 모델에서 치매 쥐의 기억력 감퇴를 현저하게 개선하는 효과를 나타내고 있기 때문에 치매의 신경세포 손상 또는 기억력 감퇴를 개선하는 버섯의 유효 성분을 추적하기 위해 균핵동충하초(*Cordyceps ophioglossoides*)의 농축된 추출물에 극성이 높은 용매로 순차적으로 계통분획한 hexane, chloroform, butanol 및 물의 획분을 얻어 치매예방 효능 분석의 방법으로  $\beta$ A로 인한 신경세포 독성을 억제하는 효과를 측정하여 그 결과를 각각의 그림으로 표시하였다. Chloroform 분획 (Fig. 8)과 Hexane 분획 (Fig. 9)의 경우는 분획농도 0.1mg/mL에서는  $\beta$ A의 독성에 의한 세포 사멸을 억제하는 것 같으나 유의성이 나타나지 않았다. 반면 분획 1mg/mL의 경우는 그 자체가 세포 독성을 나타내었다. 이는 분획 제조 과정 상의 용매의 휘산이 불충분한 것으로 사료된다. 물 분획 (Fig. 10)의 경우는 분획 농도 0.1-1.0mg/mL 모두에서 유의성은 확보되지 않았지만  $\beta$ A의 독성에 의한 세포 사멸을 억제하였다. 그러나, butanol 분획(Fig. 11)의 경우는 분획 농도 0.1-1.0mg/mL 모두에서 유의성 있는  $\beta$ A의 독성에 의한 세포 사멸을 억제하는 효과를 확인하였다. 부탄올 분획 1 mg/ml의 농도는 그 자체로도 세포 독성이 전혀 나타나지 않음을 나타내므로 부탄올 층에 유효 활성 물질이 함유되어 있음을 확인할 수 있었다.

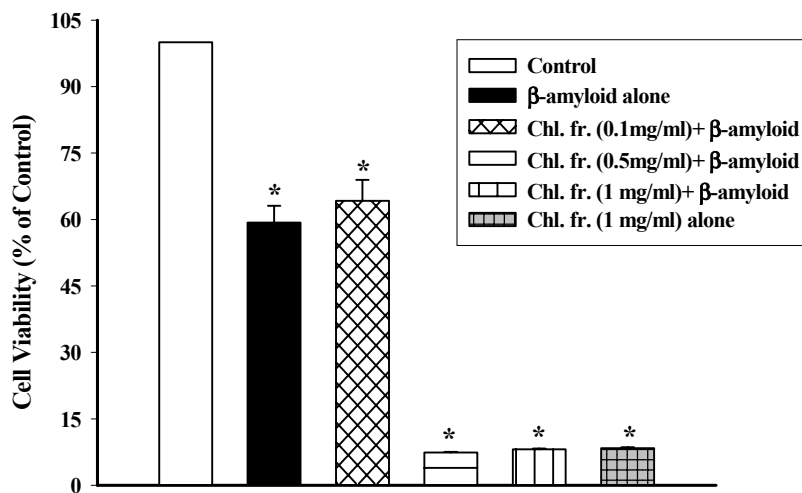


Fig. 8. Effects of chloroform extracts from *Cordyceps ophioglossoides* on the  $\beta$ A-induced neurotoxicity. \* $p < 0.05$ , compared to control group.

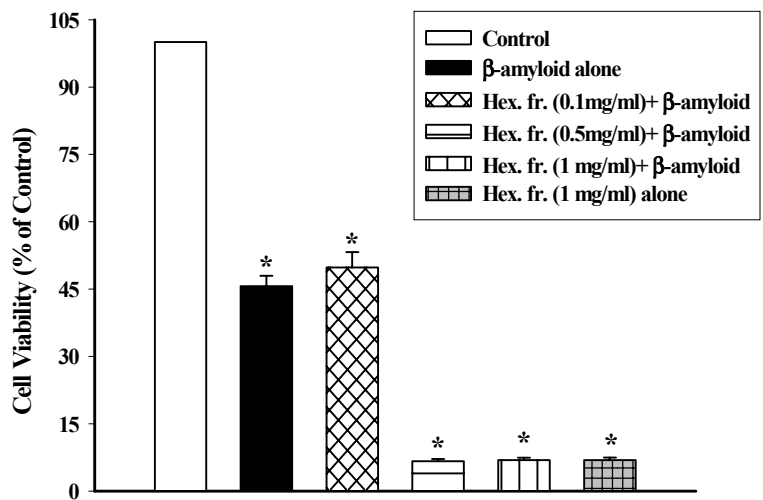


Fig. 9. Effects of hexane extract from *Cordyceps ophioglossoides* on the  $\beta$ A-induced neurotoxicity. \* $p < 0.05$ , compared to control group.

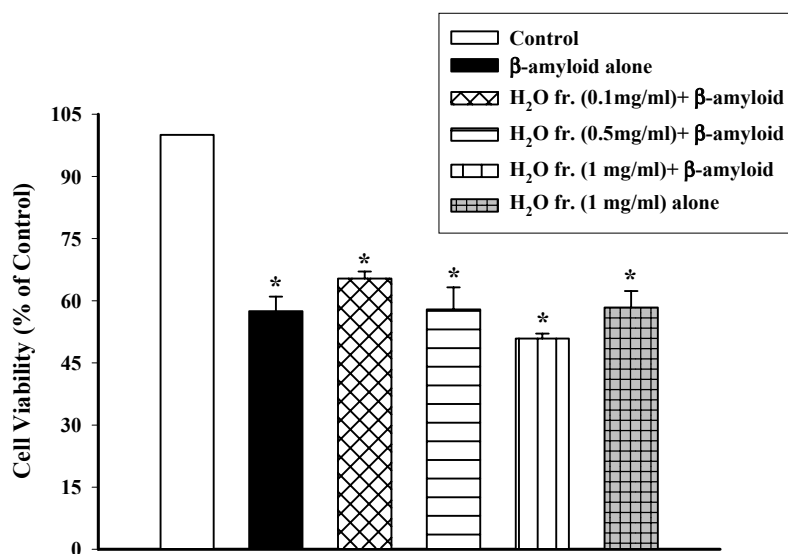


Fig. 10. Effects of water extract from *Cordyceps ophioglossoides* on the  $\beta$ A-induced neurotoxicity. \* $p < 0.05$ , compared to control group.

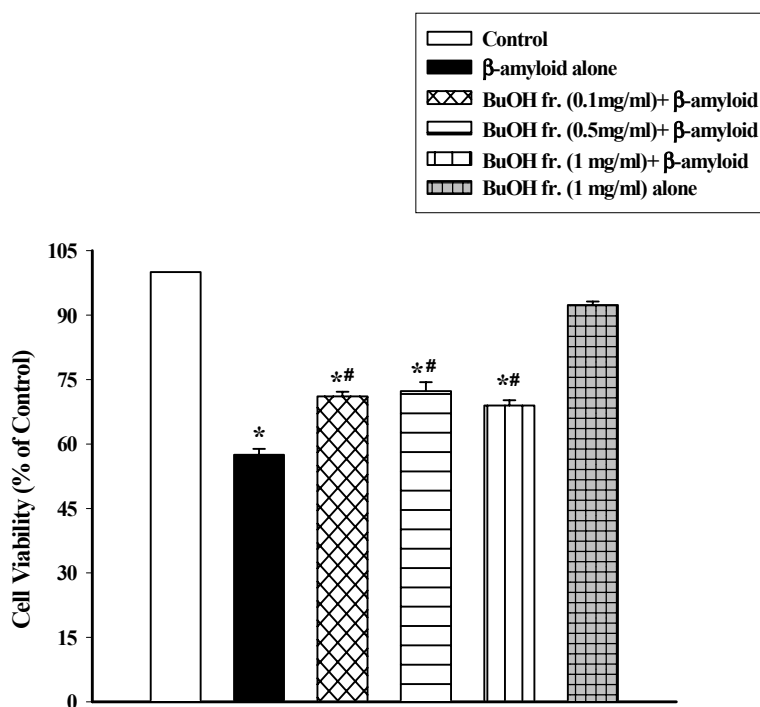


Fig. 11. Effects of butanol extract from *Cordyceps ophioglossoides* on the  $\beta$ A-induced neurotoxicity. \* $p < 0.05$ , compared to control group. \*\* $p < 0.05$ , compared to  $\beta$ A-treated group.

#### 4. 버섯배양곡물의 치매동물모델에서의 기억력 개선 시험

동물모델에서의 결과로부터  $\beta$ -amyloid에 의한 기억력 감퇴를 개선시키는 능력이 있는 버섯으로 균핵동충하초(*Cordyceps ophioglossoides*) 만을 선별하였다. 곡물로 찰보리를 선정하고 균핵동충하초(*Cordyceps ophioglossoides*) 접종 및 4주간 배양한 후 메탄올 추출물을 얻은 시료를  $\beta$ -amyloid를 주사한 치매 쥐의 기억력 개선 능력을 시험하여 다음의 결과를 얻었다 (Fig. 12). 찰보리 (glutinous barley) 추출물을 복강 투여한 경우는 saline을 투여한 정상 대조군에 비해 학습 및 기억력이 현저히 떨어지는 반면 균핵동충하초(*Cordyceps ophioglossoides*) 버섯을 배양한 찰보리 추출물은  $\beta$ -amyloid에 의한 학습 및 기억력을 회복하는 것을 보여 주고 있다.

이상의 연구결과  $\beta$ -amyloid의 독성에 의한 신경세포의 사멸을 억제하는 버섯 추출물을 선별하였으며 그 중 균핵동충하초(*Cordyceps ophioglossoides*) 추출물을 장기간 복강 투여한 쥐에서  $\beta$ -amyloid에 의해 나타나는 뇌의 병변을 억제하고 학습 및 기억력 감퇴를 개선하여 정상 수준으로 회복하는 것을 확인하였다. 이는 복강으로 투여한 균핵동충하초 추출물에는 뇌에 도달하여 효능을 나타내는 약리활성 물질을 내포하고 있음을 의미하므로 건강보조식품으로 뿐만 아니라 알츠하이머성 치매의 예방 및 치료제로서 개발 가능성이 충분하다고 판단된다. 또한 본 연구에서 버섯 배양 곡물로 제작한 *Cordyceps ophioglossoides* 배양 찰보리의 경우도  $\beta$ -amyloid에 의해 나타나는 학습 및 기억력 감퇴를 개선하여 정상 수준으로 회복하는 것을 확인하였는 바, 장기 복용하여 알츠하이머성 치매를 예방 및 치료할 수 있는 버섯 배양식품을 도출하였다.



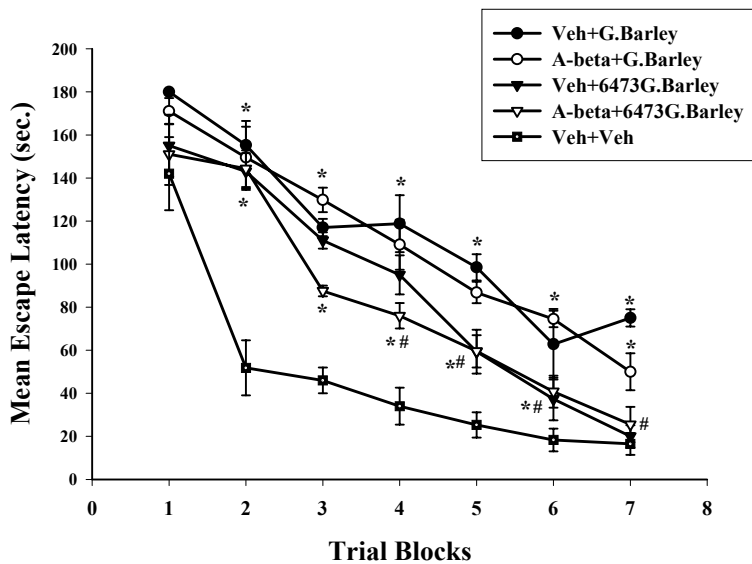


Fig. 12. Water-maze performance of  $\beta$ -amyloid peptide- (25-35), glutinous barley- or mushroom 6473-inoculated glutinous barley-treated rats. \* $p < 0.05$ , compared to vehicle-treated control group. # $p < 0.05$ , compared to  $\beta$ A+glutinous barley-treated group.

## 제 5 장 참고문헌

1. 통계청 : 1999년 인구주택 총조사보고서. 통계청(2000)
2. Levy, R. Aging-associated cognitive decline. *International Psychogeriatrics* 6:63-68 (1994)
3. Park, J., Ko, H.J. and Park, Y.N. Dementia among the elderly in a rural Korean community. *Br J Psychiatry* 164: 796-801 (1994)
4. Chang R. Functional properties of edible mushrooms. *Nutr Rev.* 54(11 Pt 2):S91-93 (1996)
5. Patocka J. Anti-inflammatory triterpenoids from mysterious mushroom *Ganoderma lucidum* and their potential possibility in modern medicine. *Acta Medica (Hradec Kralove)*. 42(4):123-125 (1999)
6. Wasser SP. Medicinal mushrooms as a source of antitumor and immunomodulating polysaccharides. *Appl Microbiol Biotechnol.* 60: 258-274 (2002)
7. 이현진, 김종식, 허건영, 이경복, 이인구, 송경식 : 담자균 추출물의 propyl endopeptidase, acetylcholine esterase 저해 및 항혈전 응고활성. *한국농화학회지* 42(4): 336-343 (1999)