

목질진흙버섯(*Phellinus linteus*)의 균주선발 및
산업적 이용연구

Study on industrial uses and fungi selection of
Phellinus linteus

주 관 기 관 : 주식회사 머쉬텍

공동연구기관 : 강원대학교

공동연구기관 : 숙명여자대학교

농 립 부

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “목질진흙버섯(*Phellinus linteus*)의 균주선발 및 산업적 이용연구과제 (제1세부과제 '목질진흙버섯의 산업적 이용 및 기능성제품의 생산에 관한 연구', 제2세부과제 '목질진흙버섯의 자실체 형성, 생리활성 탐색, 독성연구')”의 최종보고서로 제출합니다.

2004년 10월 12일

주관연구기관명 : (주) 머쉬텍

총괄연구책임자 : 김 호 경

세부연구책임자 : 김 호 경

연 구 원 : 이 준 호

협동연구기관명 : 강원대학교

협동연구책임자 : 김 태 응

연 구 원 : 박 정 희

협동연구기관명 : 강원대학교

협동연구책임자 : 성 재 모

연 구 원 : 이 원 호

협동연구기관명 : 숙명여자대학교

협동연구책임자 : 양 기 숙

연 구 원 : 강 은 영

요 약 문

I. 제 목

목질진흙버섯(*Phellinus linteus*)의 균주선발 및 산업적 이용연구

II. 연구개발의 목적 및 필요성

현재 우리 나라의 목질진흙버섯(*Phellinus linteus*)의 균주선발 및 산업적 이용연구는 목질진흙버섯의 우수 균주의 확보 및 보존을 통한 버섯 종자의 확보와 더불어 이 균주를 이용한 대량생산연구를 통한 산업화에 기틀을 마련하며, 우수 균주의 생리활성을 입증하는데 있다. 최근에 기존의 전통적인 3대 암치료법 즉 수술 요법(surgery), 약물 요법(chemotherapy), 그리고 방사 요법(radiotherapy)에 이어 새로이 각광을 받고 있는 제 4의 암치료 법인 면역 요법(immunotherapy)의 좋은 재료로 사용되어지고 있다. 하지만, 목질진흙버섯에 대한 연구는 현재까지, 항암 및 여러 생리활성이 연구되었지만, 아직 생화학적인 연구와 이용개발에 관한 연구는 기초단계라고 할 수 있으며, 본 연구는 생화학적인 연구와 더불어 목질진흙버섯의 질병 치료와 관련된 연구를 시도하려 하며, 또한 목질진흙의 부가 가치를 높일 수 있는 생리활성 물질의 제조 및 기능성 식품으로 먹을 수 있는 음료나 차를 개발하여 이제까지 산업화의 걸림돌이 되고 있는 식품 허가를 얻을 수 있도록 연구하려 한다. 그러나 목질진흙은 자연계에서 번식 잘 되지 않아 대단히 희귀하며, 진정한 목질진흙버섯(상품명 상황)이라고 하는 버섯은 뽕나무 고목에서 자생하는 이 버섯은 뽕나무에서 얻기에는 매우 어렵다. 이에 본 연구에서는 인공 배양된 목질진흙버섯 자실체로부터 생리활성을 연구(동맥경화, 항암, 항산화, 항동맥경화 및 항염효과, 이노, 알콜 해독)를 진행하였다. 이와 같은 본 연구의 결과는, 높은 부가가치의 먹을 수 있는 음료나 차를 만들므로 식품허가를 얻어 낼 수 있을 뿐만 아니라, 그로 인하여 산업화를 할 수 있어 이 연구는 현재, 국내외적으로 필요하다.

III. 연구개발 내용 및 범위

본 연구는 목질진흙버섯(*Phellinus linteus*)의 균주선발 및 산업적 이용연구는 수집된 목질진흙버섯 균주의 분류·동정과 유전자원 확보, 분류 동정된 균을 이용한

배양 시험을 통해 적정배지를 선발하고, 인공대량생산에 우수한 균주들을 선정하여, 형성 시험 후, 인공적으로 자실체를 안정적으로 생산하는 방법과, 이와 같은 대량생산된 목질진흙버섯의 자실체를 이용하여 여러 추출을 조제하여, 추출물의 생리활성(항염효과, 항암 효과, 항산화 효과, 항동맥경화)를 수행하며, 그 유효성분의 구조, 특성, 기능성을 생화학적인 차원에서 규명함과 동시에 추출물의 동물실험을 통한 in vivo 실험을 행한다. 또한 목질진흙버섯을 이용한 신기능성 제품연구를 통하여 앞의 연구들과 종합적인 데이터와 연계하여 제품의 생산을 시도한다.

IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

본 실험에서 채집된 *Phellinus*속균의 자실체는 강원도 일대의 산간 지역과 일본의 와가야마 지방에서 채집되었다. 채집된 *Phellinus*속균의 자실체는 다년생이므로 산림이 울창한 여름보다는 겨울에 채집이 용이하였다.

균사배양시에의 생리조건조사에서는 적정 온도 조사 결과 균사생장이 30℃이며, 최적 초기 적정 pH는 산성인 pH 5.0과 pH 6.0에서 생육상태가 양호한 것으로 조사되었다. 최적 영양원 조사 결과, 탄소원은 2 % Malt extract, 질소원은 0.2% Yeast extract, 무기염류 선발에서는 0.1 % KH₂PO₄ C/N율은 10:1로 했을 때 균사생장이 높게 나타났다. *Phellinus*속균의 의 액상배양은 공시균주 모두 용기부피 300ml의 Erlenmeyer flask와 Shake flask의 배양액 100ml로 20일 배양기간에서 생육이 우수하게 나타났다. 대량 액상배양시에는 통기량은 2.0vvm으로 12일간 배양, 접종원을 homogenization하며, 접종원을 100ml 접종하고, 수분함량을 180ml로 하였을 때 균사생장이 가장 좋았고 자실체 형성도 좋게 나타났다. 이때 배지량을 적게 하였을 때 균사생장이 빨리 이루어 졌고 자실체 형성도 배지의 함량이 많은 것 보다 높게 나타나는 것을 확인할 수 있었다. 원목재배있어서는 원목의 멸균을 기존의 다른 온도와 기압에서 즉 121℃, 1.2기압에서 살균하는 방법이 양호한 것으로 확인 하였으며, 균사생장은 오리나무와 참나무에서 가장 좋았지만, 자실체 형성에서는 참나무와 뽕나무에서 자실체 형성이 가장 좋게 나타났다. 이때 여러 균주로확인하였을 경우, 자실체 형성에서는 PH-211에서 가장 많은 자실체가 형성되는 것을 보았다. 현재까지 연구된 고체종균을 이용한 균사체 및 자실체 형성에 비해 액체종균을 이용하는 것이 균사생장 및 자실체 수량에 더 높은 영향을 주는 것을 확인할 수 있었고 특히 배양기간은 고체종균 보다 상당히 빠른 단축을 가져왔다. 이렇게 제조된 인공배양된 목질진흙버섯의 생리활성 연구를 진행하였다. 물, 에탄올, 메탄올 추출을 하였을 경우 메탄올 추출물이 약리 생리활성이 우수하였으며, 이 메탄올 추출물을 극성에 따라 분획하여 기초 생리활성 실험을 진

행하였다. 목질진흙버섯의 균주별 및 분획물을 DPPH법을 통해서 항산화 효과 조사하였을 경우 PH31번과 PH5번 균주가 제일 좋았으며, 현재 머쉬텍에서 생산되고 있는 목질진흙버섯의 분획한 분획물에서는 부탄올 분획물 > EA분획물 > 헥산분획물 > 물 분획물 순으로 나타났다. 목질진흙버섯의 균주별 및 분획물을 MTT를 통해서 암세포 사멸 효과를 조사한 결과 PH13, PH32 그리고 PH109에서 강한 효과가 있었으며, 전립선암과 흑색종에 48시간 72시간 분획물을 처리하고 세포사멸 효과를 보았을 경우 부탄올과 헥산 분획물에서 가장 좋은 효과가 있었으며, 정상세포에는 영향이 없었다. 또한 항염효과에서도 부탄올 분획물이 가장 효과가 좋았으며, 이 항염효과는 IkB의 인산화를 억제함으로써 염증 유발 물질인 NO, iNOS 그리고 COX-2의 발현을 억제함을 알 수가 있었다 항암물질의 분리정제에 있어서 SH2와 SH5를 정제하였지만, 양이 너무 작아서 구조분석을 수행하지 못하였다. 따라서 이러한 생리활성 물질의 정제는 계속 진행되고 있다. 또한 항산화 효과 및 항동맥경화 억제 효과를 관찰하였으며, 이에 정제작업을 다음과 같이 수행하였다. 배양목질진흙버섯(桑黃) *Phellinus linteus* (Berk. et Curt.) Teng 자실체의 항산화 활성을 평가하고자 DPPH method, TBARS assay 및 electrophoresis를 이용하여 activity guided fractionation 방법에 따라 실험을 실시하였다. MeOH ex.와 Water ex. 중 항산화 활성을 나타낸 MeOH ex.에 대하여 Precipitates, Water Insoluble fr., Water fr., Ether fr.으로 나누었고, 이들 분획에 대한 항산화 활성을 측정하여 활성을 나타낸 Water Insoluble fr.과 Ether fr.에서 7종의 화합물을 분리하여 항산화 활성을 검토하였다. 또한, 배양목질진흙버섯 자실체의 신기능에 미치는 영향을 알아보기 위하여 정상 및 승홍 투여에 의해 유발된 급성 신부전 흰쥐에 MeOH ex.를 투여하여 뇨량, 뇨 중 전해질 함량 및 혈청 중 creatinine, BUN, uric acid의 함량을 검토하였다. 항산화 효과는 Water Insoluble fr. (IC₅₀ 11.50 µg/ml)와 TBARS법에 의한 지질과산화 억제작용 Water Insoluble fr. (IC₅₀ 3.15 µg/ml) 나타났으며, 이에 Water Insoluble fr.과 Ether fr.에 대해서 silica gel column chromatography를 행하여 7종의 화합물을 분리하였다. 분리된 성분들은 기기분석 결과와 문헌과의 비교로 화합물 I은 linoleic acid methyl ester, 화합물 II는 palmitic acid, 화합물 III은 linoleic acid, 화합물 IV는 ergosta-5,7,22-triene-3-ol (ergosterol), 화합물 V는 5,8-epidioxyergosta-6,22-dien-3-ol (ergosterol peroxide), 화합물 VI은 3,4-dihydroxybenzoic acid methyl ester, 화합물 VII은 4-(3'4'-dihydroxyphenyl)-3-butene-2-one 으로 구조를 확인 동정하였다. 배양목질진흙버섯 자실체의 MeOH ex.는 지속적인 뇨량의 증가 및 총 뇨량에 있어서 양성대조군 보다 많은 뇨량의 증가를 나타내었다. 승홍 유발 급성 신독성에 의

해 억제된 뇨 중의 Na^+ 및 K^+ 의 함량에 대해서 유의성 있는 증가, 상승한 혈청 중 creatinine, BUN 및 uric acid의 함량에 대해 유의성 있는 감소, 급성 신독성에 의해 증가된 신장의 중량은 배양목질진흙버섯 자실체의 MeOH ex.에 의해 감소를 나타내었으나, 비장의 중량은 유의성 있는 변화를 나타내지 않았다. 배양목질진흙버섯 자실체의 항산화 효과는 지용성 분획에서 나타났고, 그 활성 성분은 페놀성 물질인 3,4-dihydroxybenzoic acid methyl ester와 4-(3'4'-dihydroxyphenyl)-butene -2-one으로 확인되었다. 또한 항산화 활성과 관련하여 신기능에 미치는 효과를 검토한 결과 우수한 활성을 나타내었다. 이상과 같이 본 실험을 통하여 우수 균주의 확보 및 종균의 보존하였으며, 인공적인 대량생산을 시도하였다. 또한 목질진흙버섯의 생리활성 연구를 통해서 항산화 항암, 및 항염증 효과를 확인하였으며, 배양목질진흙버섯 자실체의 항산화 활성 분획 및 그 성분을 규명하였고, 이노효과를 확인하였으며, 대량생산을 통하여 가격이 적절하고 품질이 균일한 배양목질진흙버섯 자실체를 이용하여 항산화제 및 이노제를 개발하는데 의의가 있다고 사료된다. 또한 Extruder를 통한 초미분 분말을 개발하여 상품화하여 현재 제품의 인지도를 높이기위해 계속적으로 홍보하고 있다.

본 연구를 통해서, 목질진흙버섯의 기능성 연구를 계속 진행하고 있으며, 좀 더 깊은 연구를 하기 위해서 기간 연장이 있었으며 좋았지만, 3년 내의 균주 선별, 대량생산, 생리활성 연구(*in vitro*, *in vivo*), 분리 및 정제에서 많은 연구 연구업적은 많은 결과를 얻었다고 자부하지만, 앞으로 미흡한 부분에 있어서는 계속적으로 연구를 수행하고 있습니다.

SUMMARY

(영문요약문)

Phellinus spp.(Hymenocetaceae) is a member of Basidiomycotina, which has been used for the treatment of gastric cancer, insulin nondependant diabetes, diarrhea, and menstrual irregularity. For their industrial uses, it is necessary to collect, isolate and identify their genetic diversity and select superior isolates for their mass artificial production. This research is concerned with the systematic and scientific study of their genetic diversity and their *in vitro* mass production, which will be useful for common mushroom cultivation technology.

It has been suggested that diseases related with aging, cancer, atherosclerosis, liver and kidney disorder result from free radicals, and antioxidants may prevent the abnormalities associated with free radical formation *via* its scavenging action. The antitumor and immunostimulating activities of the polysaccharide or protein-polysaccharide fraction of this mushroom have been mainly investigated. But, studies on the antioxidant and anti-inflammation activity of this mushroom was very scarce.

In this study, anticancer, antioxidative and anti-inflammation effects were examined. Thus, this study arried out to evaluate the antioxidant activity and to isolate active constituents from this mushroom for developing antioxidants from natural products.

the lipophilic fractions of cultivated fruit body of *Phellinus linteus* exhibited antioxidative activity and the active components were the phenolic compounds, 3,4-dihydroxybenzoic acid methyl ester and 4-(3'4'-dihydroxyphenyl)-3-butene-2-one. The butanol fraction of CPL was highly prohibited most of cancer cell lines and showed a strong antioxidant effect. There were significant differences among *phellinus* spp. on antioxidant and anticancer effect.

Precisely, macrophages play an important role in the regulation of inflammation and the immune response. We investigated the anti-inflammatory effect of the cultured fruitbody of *Phellinus linteus*(CPL) by measuring NO secretion and iNOS, COX-2 expression of activated macrophage. Furthermore,

MeOH ex.of it showed significant diuretic action. Also, Hoelen and Polyporus (Basidiomycotina) have been used as diuretics. Then, to investigate the diuretic action of *Phellinus linteus*, urinary volume, serum parameter and urinary electrolytes in normal and HgCl₂-induced acute renal failure rats in *in vivo* system were measured. The results showed that its MeOH ex. produced significant increases on urinary volume, sodium and potassium excretion, and showed effects on lowering the abnormally elevated BUN, creatinine and uric acid value in acute renal failure rats.

CONTENTS

(영 문 목 차)

Chapter 1	Introduction	10
	1. Summary of the research(Products)	10
Chapter 2	Industrilization of the research on domestic and foreign countries . . .	13
	1. Importance of the research	13
	2. Industrilization of the research on domestic and foreign countries	14
	3. The effect of the technique development	17
Chapter 3	Contents and Results of the research	18
Chapter 4	Achievements of the research and its dedications	179
Chapter 5	Utilizations of the research	183
Chapter 6	The abroad science and technical information collected from the research development course	185
Chapter 7	References	188

목 차

제 1 장 연구개발과제의 개요.....	10
제 1절 개발대상기술(또는 제품)의 개용.....	10
제 2 장 국내외 기술개발 현황.....	13
1. 개발대상기술의 중요성(필요성).....	13
2. 국내외 현황.....	14
3. 기술개발의 효과.....	17
Chapter 3 연구개발수행 내용 및 결과.....	18
제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도..	179
제 5 장 연구개발결과의 활용 계획.....	183
제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술 정보.....	185
제 7 장 참고문헌.....	188

제 1 장 연구개발과제의 개요

제 1 절 개발 대상기술(또는 제품)의 개요

1. 버섯류의 식품적 기능

특 징	특 성
1. 영 양 성	<ul style="list-style-type: none"> • 식품소재기능 • 단백질, 탄수화물, 지질 미네랄 및 비타민류등
2. 기 호 성	<ul style="list-style-type: none"> • 음식의 색택 • 향과 맛 • 감미료 등
3. 약리효능 (생체조절기능)	<ul style="list-style-type: none"> • 면역조절기능 • 체내 항상성 유지 • 항산화 효과(노화억제) • 성인병 예방(동맥경화등) 등

2. 연구 배경

가. 국내의 담자균류는 1990년 68과261속 885종으로 정리되었으며, 이들의 항암 성분에 관한 연구는 김 등이 구름버섯, 표고, 느타리의 자실체를 이용하여 열탕으로 얻은 추출물이 sarcoma 180에 대하여 저지 작용이 있음을 보고함으로써 시작되어 영지버섯(*Ganoderma lucidum*), 한입버섯(*Cryptoporus volvatus*), 뽕나무버섯(*Armillaria mellea*), 팽나무버섯(*Flammulina velutipes*), 표고(*Lentinus edodes*), 즐각버섯(*Laccaria laccata*), 산느타리(*P. pulmonarius*), 들버섯(*Agaricus campestris*)과 구름버섯(*Coriolus versicolor*)에서 항암 성분이 보고되는 등 활발한 연구가 진행되어 왔다.

나. 담자균문에 속하는 버섯 중에서 목질진흙버섯(*Phellinus linteus* 상품명 : 목질진흙버섯)은 Ikekawa등의 연구에서 종양 저지율이 96.7%로서 당시까지 항암력이 밝혀진 담자균문중 가장 높은 저지율을 나타내었다. 그러나 *Phellinus*속은 220종으로 형태가 비슷하여 목질진흙버섯을 동정

하는데 어려움이 있어 종이 정확하게 동정이 되지 않은 상태에서 재배되고 있다.

다. 따라서, 목질진흙버섯의 항암 성분들은 기존의 전통적인 3대 암치료법 즉 수술 요법(surgery), 약물 요법(chemotherapy), 그리고 방사 요법(radiotherapy)에 이어 새로이 각광을 받고 있는 제 4의 암치료 법인 면역 요법(immunotherapy)의 좋은 재료로 사용 할 수 있도록 연구를 하려고 한다.

라. 목질진흙버섯에 대한 연구는 현재까지, 항암 및 여러 생리활성이 연구되었지만, 아직 생화학적인 연구와 이용개발에 관한 연구는 기초단계라고 할 수 있으며, 본 연구는 생화학적인 연구와 더불어 목질진흙버섯의 질병 치료와 관련된 연구를 시도하려 하며, 또한 목질진흙의 부가 가치를 높일 수 있는 생리활성 물질의 제조 및 기능성 식품으로 먹을 수 있는 음료나 차를 개발하여 이제까지 산업화의 걸림돌이 되고 있는 식품 허가를 얻을 수 있도록 연구하려 한다.

3. 목질진흙버섯

가. 목질진흙버섯의 형태학적인 특징

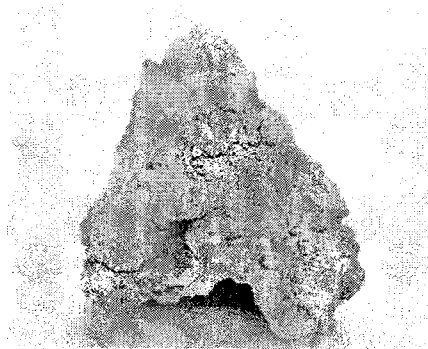
- 1) 목질진흙버섯은 소나무비늘버섯과 (Hymenochaetaceae)중의 진흙버섯속(*Phellinus* Quel. em, Imaz)에 속하며 같은 속에 속하는 버섯은 1년생 또는 다년생의 자실체를 갖고 줄기가 없고 갓(*pileus*)은 편평하거나 말굽형이다.
- 2) 버섯의 외부 표면은 단단한 목질조직으로 뚜렷하게 갈라진 직사각형의 갈라진 틈을 이루고 있으며 갓 주변부와 밑부분에 구멍이 나 있으며 여러 겹으로 되어 있고 포자는 타원형으로 담갈색이다.
- 3) 목질진흙버섯은 자실체가 희귀하여, 항암 성분에 대한 지속적인 연구가 이루어지지 않았다.

나. 진흙버섯의 종류

소나무비늘버섯과 진흙버섯속(*Phellinus*) 속하는 버섯으로 주요 종류로는 다음과 같다.

- 1) 마른 진흙 버섯 (*Phellinus gilvus*)
- 2) 말뚝 진흙 버섯 (*Phellinus ignarius*)
- 3) 참 진흙 버섯 (*Phellinus robustus*)
- 4) 목질진흙버섯 (*Phellinus linteus*)
- 5) 검은 진흙 버섯 (*Phellinus nigricans*)
- 6) 낙엽송 버섯 (*Phellinus pini*)

이중에서 목질 진흙 버섯 (*Phellinus linteus*)이 가장 효과가 좋으며 약효가 인정 된 목질진흙버섯이다.



자연산 목질진흙버섯(*Phellinus linteus*)

제 2 장 국내외 기술개발 현황

제 1 절 개발대상기술의 중요성(필요성)

1. 암은 화학요법, 방사선 요법 및 외과적 수술요법이 행해지고 있으나 치료의 한계성 및 부작용의 발현 등으로 그 사용에 있어 많은 제약을 받고 있다.
2. 따라서 인체에 무해하면서도 효과적으로 치료할 수 있는 새로운 암 치료 방법 개발의 관점에서 직접적인 세포독성을 가지는 기존의 불완전한 암을 치료하는데 병행하여, 생체의 방어 기능, 특히 숙주의 암세포에 대한 면역능력을 증강시켜 줄 수 있는 암을 저지하는 효과가 있는 연구가 보고되었다.
3. 이미, BCG(*Bacillus calmette*), *Corynebacterium*을 비롯한 세균제제와 효모로부터 얻은 Zymosan등의 polysaccharide가 숙주의 면역능력을 자극하여 종양을 저지하는 작용을 나타내는 것으로 알려지고 있다.
4. 또한, 한방에서 이용되어 온 균류 생약, 지의류 생약 및 각종 식물성 생약 으로부터 분리한 lipopolysaccharide, proteoglycan 및 hemicellulose 가 역시 宿主媒介性 抗腫瘍作用(직접적인 세포독성보다는 약해진 면역기능을 보강하는 면역증강 작용(immunopotention) 또는 면역회복 작용(immunorestoring action)을 통해 간접적으로 항암력을 발휘)을 한다는 것이 알려졌다.
5. 현재까지의 연구에 의하면, 버섯 중에서, 목질진흙버섯(*Phellinus linteus*)이 가장 강력한 宿主媒介性 抗腫瘍 效果를 가지는 것으로 보고되었다.
6. 그러나 목질진흙은 자연계에서 번식 잘 되지 않아 대단히 희귀하며, 진정한 목질진흙버섯(상품명 상황)이라고 하는 버섯은 뽕나무 고목에서 자생하는 이 버섯은 뽕나무에서 얻기에는 매우 어렵다.
7. 또한, 목질진흙버섯 균사체로부터 추출한 여러 단백다당체의 항암 활성화에 관하여는 연구보고는 최근, 되고 있으나, 이에 관한 생화학적 측면에서의

연구는 아직 초보 단계라고 할 수 있다.

8. 이에 본 연구에서는 인공 배양된 목질진흙버섯 균사체로부터 단백다당체를 추출하여 이들의 항암성을 비교하여 균사체의 생리활성(동맥경화, 항암, 항산화 및 면역 기작)을 확인하고자 한다.
9. 이와 같은 본 연구의 결과는, 높은 부가 가치의 생리활성 물질 제조에 의해, 국내 및 국외에서 아직 확실한 치료제가 없는 항암제의 개발을 시도하며, 높은 부가가치의 먹을 수 있는 음료나 차를 만들므로 식품허가를 얻어 낼 수 있을 뿐만 아니라 그로 인하여 산업화를 할 수 있어 이 연구는 현재, 국내외에서 절실하다 하겠다.

제 2 절 국내·외 현황

1. 국내현황

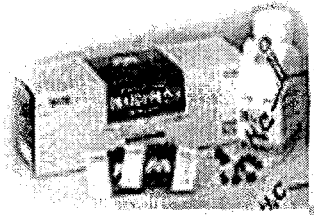
- 가. 국내의 담자균문은 1990년 68과261속 885종으로 정리되었으며 이들의 항암 성분에 관한 연구는 Kim등이 구름버섯, 표고, 느타리버섯 자실체의 열탕 추출물이 sarcoma 180에 대한 저지 작용이 있음을 보고함으로써 시작되었다
- 나. 영지(*Ganoderma lucidum*), 한입버섯(*Cryptoporus volvatus*), 뽕나무버섯(*Armillaria mellea*), 팽나무버섯(*F. velutipes*), 표고버섯(*L. ledodes*), 줄각버섯(*Laccaria laccata*), 산느타리(*P. pulmonarius*), 들버섯(*Agaricus campestris*), 구름버섯(*C. versicolor*)등의 항암 성분이 보고되는 등 활발한 연구가 진행되어 왔다.
- 다. 목질진흙버섯 균사체로부터 추출한 여러 단백다당체의 항암 활성에 관하여는 연구는 최근에 보고되고 있으나, 이에 관한 생화학적 측면에서의 연구는 아직 초보 단계라고 할 수 있다.
- 라. 아직 목질진흙버섯의 식품허가가 나오지 않아, 제품의 다양성이라든지 활발한 판매가 진행되고 있지 않다.
- 마. 목질진흙은 자연계에서 분포 및 발생수가 극히 적어 자실체를 얻기 어

려우며, 인공배양 역시 최근에야 이루어졌으며, 이에 대한 화학적, 생화학적 연구가 거의 이루어지지 못하였다.

바. 한국산 자연산 목질진흙버섯은 거의 99% 멸종된 상태이며 연간 약 10kg 채취가 되고있는데 가격은 kg당 약 1,000만원의 홑가한다

▶ 현재 시판되고 있는 제품

제품이름	회 사	Korean name
Mesima (1993)	한국신약	목질진흙(균사체)
Scientific name	구 조	복 용
<i>Phellinus linteus</i>	Heteroglycan	경구투여



코인텍	면역다당체를 주성분으로 하는 의약품중간체	<i>Phellinus linteus</i>
식품허가가 나지 않았으므로 의약품 중간원료허가 추진 중		

★ 국내현황

- 1) 버섯균주의 채집이나 분리동정 및 보존의 투자가 미흡하여 자연계에서 분포 및 발생수가 극히 적은 균주의 확보가 미흡하다.
- 2) 목질진흙버섯의 대량생산에 있어서 고품질 • 저가격의 생산법이 미흡하여 재배가 어렵다.
- 3) 다른 담자균류보다 목질진흙버섯의 경우는 생화학적 측면에서의 연구는 아직 초보 단계이다.
- 4) 식약청에서 식품허가가 나지 않았기 때문에, 제품의 다양성이 결여 되어 있다.
- 5) 따라서 국내에서의 목질진흙버섯의 연구는 절실히 필요한 시기라고 생각된다.

2. 국외현황

- 가. 버섯의 항종양 활성에 대한 많은 관심은 처음 1960년대에 일본에서 보고된 쥐에 대한 고형암 세포 sarcoma-180에 대한 저해활성이 보고되면서 높아졌으며, 일본에서는 꾸준한 연구가 계속되고 있다.
- 나. 인류의 3대 질병 중에 하나인 암에 대한 효능 연구가 일본, 중국, 그리고 한국에서 이루어져 왔으며, 최근 미국 및 구라파 등에서도 이에 대한 약리적인 작용기작 및 화학성분에 대한 구체적인 연구가 진행중이다.
- 다. 북미와 유럽지역에서 채집한 담자균문의 자실체와 이들로부터 분리한 균사배양물 7000여종에 대한 항암 실험을 시행하여 20 속에 걸쳐 50개의 배양물에서 항암력을 확인하였다.

▶ 버섯류의 항암면역조절 다당류 상품

특 징 \ 종 류	Sonifilan	Lentinan	Krestin
Common name	Schizophllan	Lentinan	Krestin(PSK)
Related company	Kaken, Taito	Aginomoto, Ymanouchi 등	Sonkyo, Kureha
date of issue	4, 1986	12, 1985	3, 1977
Scientic name	<i>Schizophyllum commure</i>	<i>Lentinan edodes</i>	<i>Coriolus versicolor</i>
Korea name	치마버섯(배양액)	표고버섯(자실체)	구름버섯(배양여액)
Structure	β -glucan	β -glucan	β -glucan-protein
Molecular weight	450kD	500kD	100kD
Administration route	i.p.	i.p.	oral
Curable cancer	uterine	stomach	stomach, lung

★ 국외현황

- 1) 자연산 목질진흙버섯 균주의 확보 및 생산방법이 어려워 많은 연구가 되어있지 않다.
- 2) 담자균문의 항암 성분을 추출하여 상품화되어 있지만, 목질진흙버섯의 경우는 상품화되어 의약품으로 상품화되고 있으나 아직 식용으로는 사용되고 있지 않다.
- 3) 중국 일본과 미국에서 새로운 기능성 버섯 종류의 탐색이 계속 진행되고 있다.
- 4) 따라서, 본 연구의 목질진흙버섯 균주를 많이 가지고 있으므로 이들 연구로 외국과 경쟁 할 수 있도록 이에 대한 연구는 절실히 필요하다고 사료된다.

제 3 절 기술개발의 효과

1. 기술개발에 따른 기대효과

- 가. 한국과 외국에 존재하는 목질진흙버섯의 우수 균주를 선발하여, 인공 대량생산화를 유도하여 항 중소기업에서의 대량 생산화를 기대할 수 있다.
- 나. 이에 의해 우수한 목질진흙버섯균의 새로운 재배법의 창출을 기대할 수가 있다.
- 다. 대량생산을 통한 부가가치를 증대시켜 벤처기업을 일으키므로 고용을 만들어 내고 좋은 제품을 개발함으로써 기업화에 의한 생산성 증대를 통해서 고용 창출을 기대할 수가 있다.
- 라. 천연자원인 목질진흙버섯의 유효성분을 추출 정제하여 생리활성을 규명함으로써 치료제 기능을 가진 신물질을 창조하여 한국인의 특성 및 체질에 맞는 치료제를 기업에서 생산할 수가 있다.
- 마. 이러한 연구결과를 통해서 얻어진 결과들은 목질진흙버섯의 이용에 적절한 근거를 제시함과 동시에 대체의약으로서의 정당성을 제공받게 된다.
- 바. 버섯의 항암 성분들은 기존의 전통적인 3대 암치료법 즉 수술 요법(surgery), 약물 요법(chemotherapy), 그리고 방사 요법(radiotherapy)에 이어 새로이 각광을 받고 있는 제 4의 암치료법인 면역 요법(immunotherapy)의 좋은 재료로 쓰일 수 있다.
- 사. 국내의 천연자원을 이용한 국산 먹을 수 있는 음료 및 신약제제를 개발함으로써 수입에 의존하는 외국산 치료제를 대체하여 경쟁력이 있는 국산 제품 개발에 의하여 비싼 기술료 및 외화를 절약할 수가 있게 되는 장점이 있다.
- 아. 목질진흙버섯에서 여러 치료제로서의 제약을 제조할 수 있는 기초자료를 조성함으로써, 부가가치가 높은 제약산업의 기반을 구축할 수가 있다.

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 1 절. 주요개발 내용

1. 연구개발 내용:

가. 본 연구는, 매년 고갈되어 가고 있는 천연 유전자원을 보존하며, 아울러 인공적으로 대량 생산하는 기술 개발함과 동시에 목질진흠버섯에 함유된 생리 활성물질의 이용, 기초자료를 조성함에 있다.

나. 또한 대량 생산된 목질진흠버섯(*Phellinus linteus*)을 이용하여 고혈압, 동맥경화, 항암, 항산화, 항염증 효과를 가진 생리활성 물질을 규명하며, 이러한 작용기전을 가지고 있는 생리활성 물질 연구와 안정성 실험 및 상품으로서의 가치 연구를 한다.

다. 이를 이용한 한국산 목질진흠버섯의 액체 배양액에서 생산된 다당류의 유효한 성분을 검색하여 활성이 높은 물질의 조제 및 새로운 제재, 신약의 이용할 수 있는 성질을 높이는 내용으로 하는, 유효 약효 성분 및 상품화 개발을 목적으로 한다.

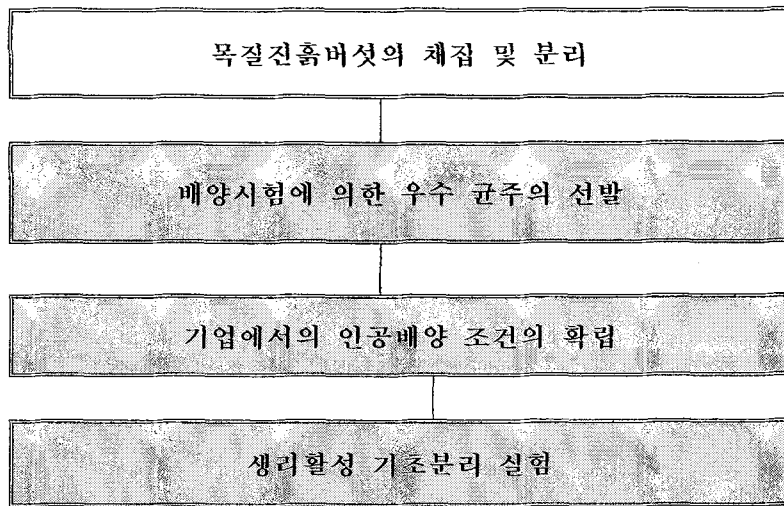
2. 1단계 개발내용 및 개발범위

가. 당해연도 개발목표

- 1) 목질진흠버섯의 균은 희귀하며, 매년 고갈되는 목질진흠버섯의 유전자원을 보존, 이용에 있어서 성재모 교수(협동 연구자)에 의해 채집, 분리 동정한 목질진흠버섯(상품명 목질진흠버섯: *Phellinus linteus*)의 대량으로 생산하는 법을 연구한다.
- 2) 대량생산방법에 있어서 쉽고 고품질 낮은 가격으로 생산할 수 있는 대량으로 생산하는 방법을 개발한다.
- 3) 이렇게 대량생산된 목질진흠을 가지고 기초 생화학적인 생리활성(특히, 항암 및 치료예방제)을 연구하여, 천연자원의 독성이 없는 제재의 개발을 도모하는데 있어서 기초자료를 조성한다. ,

나. 당해연도 개발내용 및 범위

- 1) 생리활성을 그대로 유지한 우수 목질진흙버섯균의 분리 및 동정
- 2) 고품질·저가격의 목질진흙버섯의 인공재배법 확립
- 3) 대량생산법의 개발로 인한 (주)머쉬텍에서의 대량 생산화 가능성 연구
- 4) 대량생산된 목질진흙버섯을 이용하여 여러 용매로 추출 및 분획물을 조제하여 목질진흙버섯의 생리활성 기초 실험을 한다.



다. 당해연도 개발기술의 평가방법 및 평가항목

구 분	평가의 착안점 및 척도	
	착 안 사 항	척 도 (%)
1차년도(100%)	○ 버섯(목질진흙버섯)의 확보	25
	○ 목질진흙버섯의 인공재배법 확립	25
	○ 기초적인 최적의 대량생산법 개발 연구	25
	○ 상항버섯의 생리활성물질의 추출 및 분획	25

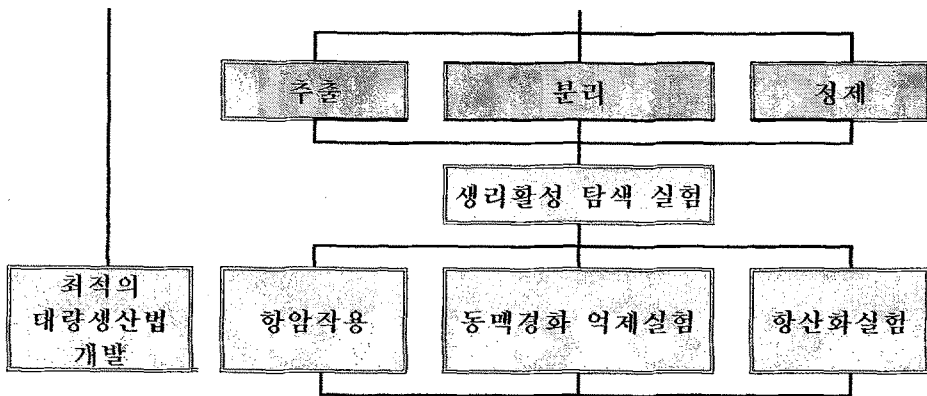
3. 2단계 개발내용 및 개발범위

가. 당해연도 개발목표

- 1) 제1차 년도의 연구를 통해서 얻어진 결과를 연장해서 목질진흙버섯의 생리활성 물질의 확인
- 2) 여러 가지 추출물을 대해서 생리활성이 있는 이용해서, 좀 더 높은 파급효과를 가지는 상품의 개발에 필요한 자료를 연구한다.
- 3) 최적의 대량생산법 개발연구

2. 당해연도 개발내용 및 범위

- 1) 목질진흙버섯의 생리활성 물질의 확인
- 2) 항암, 항산화, 동맥경화 억제, 면역력 증강 실험을 통해서 기능성 식품 및 화장품의 개발에 필요한 기초자료를 조성한다.



3) 당해연도 개발기술의 평가방법 및 평가항목

구분	평가의 착안점 및 척도	
	착안사항	척도(%)
2차년도(100%)	<ul style="list-style-type: none"> ○ 목질진흙버섯의 분획추출 및 분리 정제실험 ○ 목질진흙버섯의 생리활성 유효물질의 확인 ○ 항암, 동맥경화 억제, 항산화 효과(응용성 연구) 	30 40 40

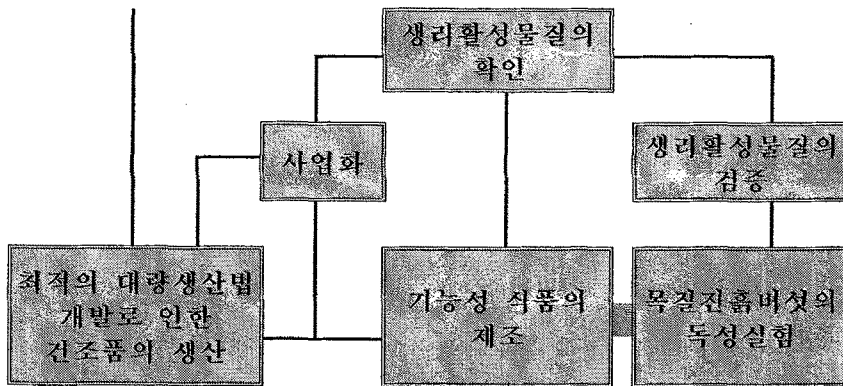
4. 3단계 개발내용 및 개발범위

가 당해연도 개발목표

- 1) 목질진흙버섯으로부터 얻어진 생리활성 물질을 동물실험을 통해서 독성검사를 통해서 식품으로서의 이용가치를 연구한다.
- 2) 생리활성 물질의 검증 및 확인을 통해서 의약 중간물질의 이용성을 연구한다.
- 3) 기능성 식음료의 제조

나. 당해 연도 개발내용 및 범위

- 1) 동물실험에 의한 독성실험
- 2) 생리활성물질의 검증 및 확인
- 3) 기능성 식음료의 제조
- 4) 최적의 대량생산법 개발로 인한 건조품의 생산



다. 당해연도 개발기술의 평가방법 및 평가항목

구분	평가의 착안점 및 척도	
	착안 사항	척도 (%)
3차년도(100%)	○ 최적의 대량생산법 개발	20
	○ 생리활성 물질의 검증 및 확인	25
	○ 동물실험에 의한 독성검사	25
	○ 기능성 식음료 제조	30

제 2 절 기술 개발 접근 방법

1. 목질진흙버섯의 상품화 개발 연구에 관한 구성을 보면,

구 분	과 제	전공분야	성 명	연구 접근 방법
세부 연구 책임자	목질진흙 버섯의 산업적 이용 및 제품생산	생화학	김호경	<ul style="list-style-type: none"> ○ 목질진흙버섯의 산업적인 이용연구. ○ 목질진흙버섯의 우수균주의 최적대량생산법 개발 ○ 추출물 및 분획물을 이용하여 기능성 식품의 제조 연구.
협동 연구 기관 및 책임자	목질진흙 버섯의 차질체 형성 및 생리활성 및 독성연구	생화학	김태웅	<ul style="list-style-type: none"> ○ 균주의 분리동정 및 인공적인 대량생산 최적 배양조건연구. ○ 총괄책임자에 자료 제공. ○ 생리활성 물질의 규명 및 신제품의 이용의 타당성 연구 ○ 생리활성 연구 및 동물실험을 통한 독성실험

2. 협동과제책임자는 총괄 책임자와 상호, 유기적인 관계로서, 총괄책임자의 기본 영역을 확장, 이용할 수 있도록, 서로의 기술을 적용하여, 목질진흙버섯의 생리활성 연구를 하며, 여기서 얻은 자료를 토대로 제품화를 시험하여, 본 연구의 최종 단계를 완성을 시킨다.

구 분	연구 개발 목표	연구개발 내용 및 범위
1차 년도 (기초연구)	<ul style="list-style-type: none"> * 우수 균주의 선발 * 목질진흙버섯 배양 및 대량생산 * 생리활성 기초실험 	<ul style="list-style-type: none"> ○ 우수 목질진흙버섯의 균주 선발 ○ 인공배양조건 연구 ○ 목질진흙버섯 추출물 및 분획물 조제 ○ 목질진흙버섯의 생리활성 기초 실험
2차 년도 (응용연구 및 시제품 제작)	<ul style="list-style-type: none"> * 대량생산 * 생리활성검색 * 생리활성 물질의 확인 	<ul style="list-style-type: none"> ○ 최적의 대량생산법 개발 ○ 항암, 항산화, 동맥경화 억제 효과 ○ 목질진흙버섯의 생리활성 물질의 확인
3차 년도 (사업화)	<ul style="list-style-type: none"> * 생리활성 물질의 검증 * 독성실험 * 기능성 식음료의 개발 	<ul style="list-style-type: none"> ○ 목질진흙버섯의 생리활성 물질의 검증 ○ 동물실험에 의한 독성실험 ○ 기능성 식음료의 조제

제 3 절 협동기술개발의 목표 및 내용

1. 협동기술의 목표

가. 목질진흙버섯의 대량생산법과 기업에서의 제1차 생산품 생산, 생리활성 물질 탐색과 독성 및 안정성 실험 그리고 식품으로서의 이용성에 관한 연구를 한다.

나. 협동책임자는, 총괄 책임자와 상호, 유기적인 관계로서, 총괄책임자의 기본 영역을 확장, 이용시킬 수 있도록, 서로의 기술을 적용하여, 목질진흙버섯의 생리활성 및 개발 이용 연구를 하며, 이상의 3개년 동안 얻은 자료를 토대로, 최종 상품화를 시도하여, 본 연구의 최종 단계를 완성시킨다.

2. 협동기술의 내용

협동과제의 연구 제목, 내용, 범위 및 방법은 다음과 같다.

가. 주관 연구과제(김호경 선임연구원):

- 1) 제 목 : 목질진흙버섯(*Phellinus linteus*)의 산업적 이용 및 제품의 생산
- 2) 협동과제책임자 : 김호경 선임연구원 (생화학 전공)
- 3) 내 용 : 수집된 목질진흙버섯 균주의 계대배양이 우수한 균주를 이용하여 안정적으로 자실체 형성하는 최적의 대량생산 체계를 갖추도록 한다. 이렇게 안정적으로 대량생산이 된 목질진흙버섯을 기능성 상품개발연구를 수행한다.
- 4) 범 위 : 목질진흙버섯의 채집, 분류동정 및 분류 동정된 균을 이용한 배양시험 및 인공배양을 통한 안정적 대량생산을 유도함과 동시에 기능성 제품의 개발한다.
- 5) 방 법 : 우수 균주의 선발
실험 인공 대량생산 시험
최적의 대량생산법 연구
기능성 제품의 개발

나. 협동과제(김태웅 교수):

1) 제 목 : 목질진흙버섯(*Phellinus linteus*)의 자실체 형성, 생리활성 탐색, 독성연구

2) 협동과제 책임자 : 김태웅 교수(생화학 전공)

3) 내 용 : 수집된 목질진흙버섯 균주의 분류·동정과 유전자원 확보, 분류 동정된 균을 이용한 배양 시험을 통해 적정배지를 선발하고, 인공생산에 우수한 균주들을 선정하여, 형성 시험 후, 인공적으로 자실체를 안정적으로 생산하는 방법(성재모 교수) 그리고 민간에서 항암 효과 등 면역활성 물질이 함유되어 있다는 것으로 알려졌다. 이와 같은 목질진흙버섯의 생리활성 물질을 여러 추출에 의해 조제하여, 당단백질의 특성을 중심으로, 동맥경화 억제 효과, 항암성 효과(김태웅 교수)를 수행하며, 생리활성 중에서 항산화 효과 및 그 유효성분의 구조, 특성, 기능성을 생화학적인 차원에서 규명함과 동시에 추출물의 독성실험을 수행한다.(양기숙 교수)

본 연구를 수행하여 얻어질 제품의 타당성과 정당성을 부여한다.

4) 범 위 : 목질진흙버섯의 우수유전자를 선발하여 자실체를 안정적으로 생산 방법을 연구한다. 또한 안정적으로 생산되는 목질진흙버섯으로부터 유효성분 추출 및 항동맥경화, 항암, 항산화 기작에 유효한 성분의 검증 및 확인, 동물실험을 통한 독성검사를 수행한다. 더 나아가 특수한 기기를 사용하여 구조를 규명하며, 유효성분 검증을 통해서 기능성 제품의 형성하는데 기초자료로 조성한다. .

5) 방 법 : • 목질진흙버섯의 채집 및 실험실내에서의 분류·동정

- 실험 배양시험에 의한 우수 균주 선발
- 실험인공 대량생산 시험
- 여러 용매에 의한 목질진흙버섯의 추출 실험
- 생리활성 탐색(항암 효과 실험, 항동맥경화 실험)
- 목질진흙버섯의 추출물의 분획 및 유효성분 분리
- 동물실험을 통한 독성검사.
- 목질진흙버섯의 응용성 연구

제 4 절 연구방법

1. 목질진흙버섯의 균주의 분리동정 대량생산법 개발 연구

가. 균주의 분리동정 및 균사배양

1) 공시 균주

본 실험에 사용한 균주는 강원대학교 균학실험실에서 채집·분리하여 보관 중인 *Phellinus linteus*(PH-1, PH-5, PH-195, PH-198)와 버섯농가에서 분양받은 *Phellinus baumii*(PH-211)를 공시균주로 사용하였다. 공시균주는 Malt배지에 접종하여 15일 마다 계대배양하면서 접종원으로 사용하였다.

2) 접종원

15ml의 Malt 배지를 petri-dish (직경 8.5cm)에 무균 상태에서 분주한 평판배지에 보존균을 접종하여 10일간 배양한 후 내경 6mm인 cork-borer로 균을 떼어내어 접종원으로 사용하였다.

나. 기본 적정배지의 선발 및 균사체 배양연구

1) 고체배지 선발 :

*Phellinus linteus*의 균사생육에 적합한 기본배지를 선발하기 위해서 Table1.의 조성을 갖는 배지를 조제하여 선발실험을 실시하였다.

2) 액체배지 선발 :

액체배지 상에서 *Phellinus linteus*의 균사생육에 적합한 기본배지를 선발하기 위하여 Table 1.의 배지에서 Agar을 제외하여 배지를 조제 후 선발실험을 실시하였다.

3) 적정 온도 조사

공시 균주의 균사생육 최적 온도를 규명하기 위하여 Malt을 기본배지로 하여 내경 6mm인 cork-borer로 PH-1과 PH-5균을 접종하고 배양온도를 15℃, 20℃, 25℃, 30℃, 35℃등 온도를 달리하여 균사 성장 길이를 측정하였다.

4) 초기 적정 pH조사

각 pH별로(4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0) 조사하여 121℃에서 20분간 고압살균한 후 petri-dish 에 분주하여 Malt에서 배양한 접종원을 접종한 후 24±1℃에서 14일간 배양하여 pH별로 균사 성장을 측정하였다.

Table 1. Composition of culture media

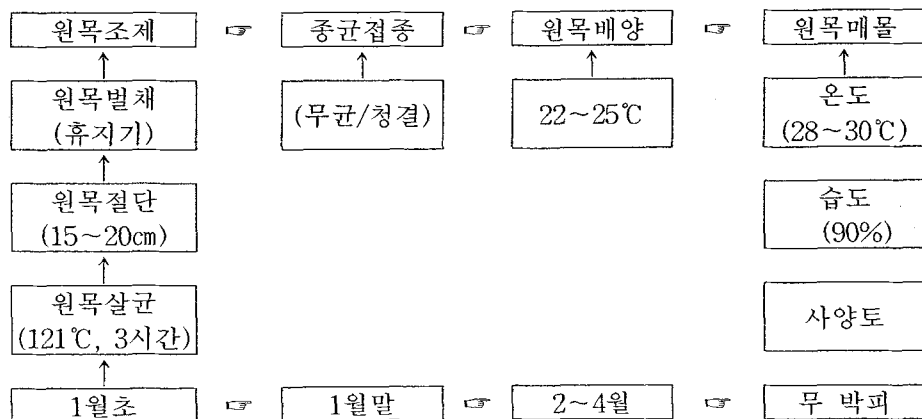
Nutritional reagents	Medium(g/ℓ)							
	^a MYA	BMYA	PDA	MYGS	GP	SMS	BMA	HMA
Potato			200					
Birch		200						
Dextrose	4	4	20					20
Malt extract	10	10		5		3		3
Yellow sugar						30	30	
Glucose				20	30			
Peptone					3	3		
Yeast extract	4	4		5		3	3	
Soybean flour						3		
MgSO ₄ · 7H ₂ O					1		1	
KH ₂ PO ₄					1		1	
Hypoxex								3
Ebiose								5
Agar	20	20	20	20	20	20	20	20

^aMYA : Malt extract yeast extract agar, BMYA : Birch malt extract agar, PDA : Potato dextrose agar, SMS : Soybean flour malt extract sugar, BMA : Basal medium

5) 영양원 선발

목질진흙버섯의 최적 탄소원, 질소원 및 무기염류를 선발하기 위하여 MYA배지를 기본배지로 하여 조사를 실시하였다. 탄소원은 2%(w/v), 질소원은 0.2%(w/v), 무기염류는 0.1%(w/v)씩 각각 첨가하여 영양원을 선발하였다.

다. 인공자실체 배양과정



라. 원목재배 기술

1) 원목 살균시간에 따른 오염을 조사

가) 사용 수종은 뽕나무, 참나무, 오리나무, 자작나무, 은사시나무, 밤나무를 이용하였다. 원목벌채는 수액의 이동이 정지된 시기이며 저장양분이 가장 많은 11월에서 이듬해 2월 휴면기에 벌목하여 음지에서 자연건조하였다. 원목절단은 수분함량 40~50%일 때 직경 10~20cm, 길이 15~20cm로 토막내어 사용하였다.

나) 절단된 원목은 Polypropylene bag에 넣어 밀봉한 후 121℃, 1.2psi에서 30분, 60분, 90분, 120분, 150분, 180분으로 살균을 달리하였을 때 오염률을 조사하였다.

2) 원목에 따른 균사배양 조사

사용 수종에 따른 균사생장율을 조사하기 위하여 뽕나무, 참나무, 오리나무, 자작나무, 은사시나무, 밤나무를 이용하여 균사생장율을 조사하였다.

마. 대량배양을 위한 삼각플라스크 배양 조사

1) 배양액량 및 삼각플라스크의 종류에 따른 균사의 생육조사

- 각 공시균주들의 기본배지로 선발된 배지를 이용하여 250ml의 Erlenmeyer flask와 Shake flask 에 50~200ml 배양액을 분주하여 silicon plug를 채운 후 121℃, 15psi(1.2kg/cm²)에서 20분간 가압 살균하여 배지를 조제하였으며, petri-dish에서 배양된 균총의 선단을 내경 6mm의 cork borer로 취하여 삼각플라스크배양의 접종원으로 사용하였다. 접종 후 shaker incubator에서 25℃ 125rpm으로 14일간 진탕 배양 하였다. 삼각플라스크에서의 생육측정은 filter paper(Whatman N0.2)에 여과시킨 후 80℃의 dry oven에서 항량·건조하여 균사체의 건조중량을 측정하였다.

2) 접종량에 따른 균체 건조량 조사

- 각 공시균주들의 균사체 생산에 미치는 접종량의 영향을 조사하기 위하여 배양액량 100ml의 250ml 삼각플라스크에 균사절편(내경 6mm)의 접종량을 3~8개씩 1개 간격으로 달리하여 실험을 실시하였다.

3) 배양기간에 따른 균체 건중량 조사

각 공시균주들의 배양기간에 따른 균체량 조사를 위해 배양중인 플라스크를 1일 간격으로 회수하여 균체량을 조사하였다.

라. 대량(8ℓ)배양 환경 조사

대량배양 시 배양기간에 따른 공시균주의 생육을 알아보기 위하여 접종량은 100ml로 조절하고 통기량을(vvm : volume per volume & minutes)은 2vvm으로 배양하여 1일 간격으로 배양 중인 배양기를 회수하여 균체량을 조사하였다.

마. 현미균사체 배양

현미균사체에 적정 접종량을 조사하기 위하여 1000cc pp(polypropylene)병에 현미 200g을 넣은 후 살균하여 접종량을 40ml, 60ml, 80ml, 100ml 달리하여 접종 후 현미 균사체를 형성하여 비교하였다.

2. 목질진흙버섯의 추출 및 분획물의 생리활성

가. 지방산 분석

hexane 용매로 하여 목질진흙버섯의 지질을 추출한 후 GC (Hewlett packerd 6890 GC)를 이용하여 지방산을 분석하였다. column은 HP-INNOWAX을 사용하였다. injector의 온도는 250℃로 하였고, detector의 온도는 280℃로 하였다. column의 조건은 constant flow로 하고, oven의 온도는 최초 120℃에서 210℃까지 14℃/min로 올리고 210℃에서 250℃까지 7℃/min 승온하였다

나. 단백질의 함량 비교실험

▶ 목질진흙버섯의 물추출방법 :

목질진흙버섯을 건조시킨다. → 분쇄 → 각 시료 1g을 PBS buffer 20ml에 4℃ / 3hr 추출 → 3,000이나 3,800rpm / 30min , centrifuge → Filtering → 50ml tube에 넣고 deep freezer → freezer drier → 다 건조 → 10mg/ml로 sample을 만든 후에 lowry 정량.

▶ lowry Method

Standard와 Sample을 준비 →

- 각각에 A시약 360ul 를 첨가하고, Water Bath에 50°C, 10min 방치
- 상온에서 식힌 후에 B시약 40ul를 넣고 상온에서 20분간 방치
- C시약 1200ul 를 넣고, Water Bath에 50°C, 10min 방치 → 상온까지 식힘. → 650nm 에서 흡광 측정

	1	2	3	4	5	6		1
BSA 10mg/ml	0	20	40	60	80	100	Sample 10mg/ml	60
Buffer	500	480	460	440	420	400	Buffer	440
희석배수	1	1/25	4/50	6/50	8/50	1/5	희석배수	6/50

다. 추출 및 분획

현미를 배지로 배양한 상황균사체를 음건한 후 조말로하여 3kg을 달고 이것을 열 MeOH 30ℓ로 추출한 후 60°C이하에서 5/1로 감압농축하였다. 다음으로 농축된 액을 방치하여 황색의 난용성 침전 24.9g을 얻었으며, 이것을 여과한 여액을 위와 같은 방법으로 완전 농축하여 MeOH 엑스 260g을 얻었다

라. HPLC를 이용한 각 분획물의 구조형태 분석:

유기용매로 추출한 목질진흙버섯을 50mg/ml의 농도로 20μℓ 주입하여 각 분획물의 차이를 HPLC로 분석하였다. column은 Waters μbondapak C18을 이용하였다. Detectors는 269nm, 280nm, 385nm의 3파장에서 측정하였고, column의 내부온도는 35°C로 유지하였다. 사용한 Buffer로는 무기용매성인 Buffer A와 유기용매성인 buffer B를 1ml/min의 속도로 A에서 B로 100분간 변화시켰다.

Buffer A : 3차 증류수/TFA = 1000/1

Buffer B : CH₃CN/3차 증류수/TFA = 1900/100/1.6

마. TLC

우선 silica gel을 100℃에서 건조를 한 후에 각각의 목질진흙버섯 추출물 100mg/ml짜리를 10μl spotting을 한 후에 Polarity에 따라 전개를 시킨 후에, 전개가 끝난 gel을 35℃에서 건조를 시킨 후에 1 0% H₂SO₄ 에 GEL을 담근 후에 100℃ incubator에서 5분간 방치를 하여 detection한다.

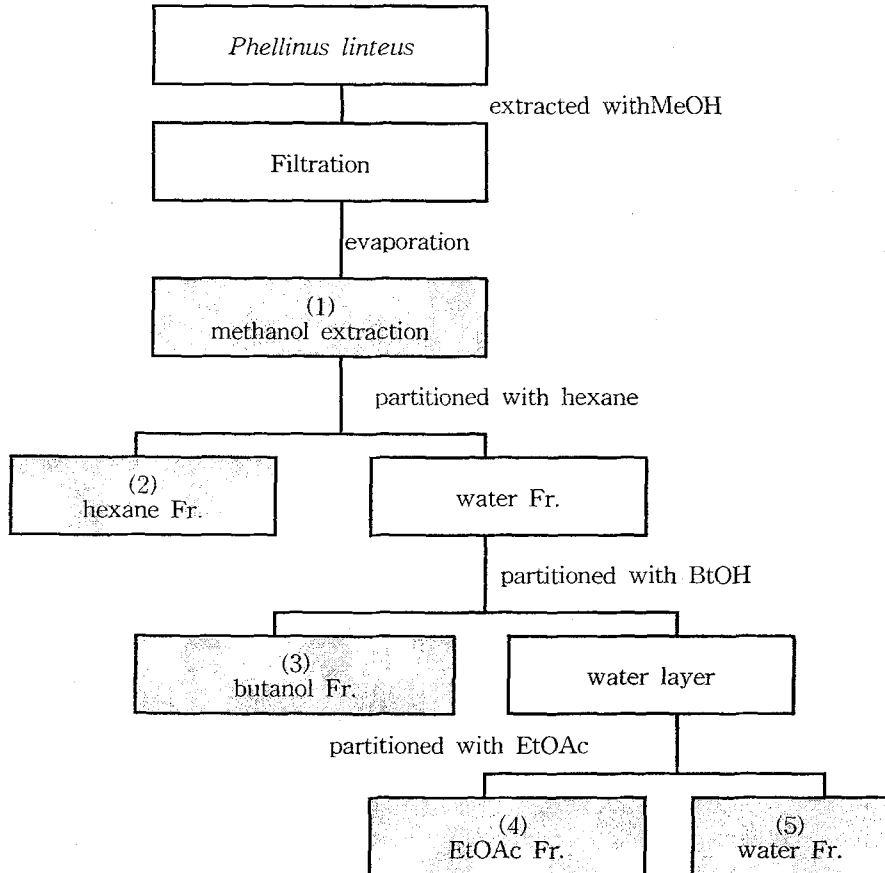


Fig 1. Fraction of *Phellinus linteus*

바. DPPH에 의한 항산화 효과

1) 시료의 항산화 효과를 측정하기 위하여 0.1mM DPPH 용액 1.9ml를 50% 환원시키는데 필요한 시료의 농도(IC₅₀)로 항산화능을 표시하였다.

- 3) 각 시료를 농도별로 조제한 후 각 시료 100 μ l에 0.1mM DPPH용액 1.9ml을 가한 후 vortex로 10초간 진탕한 후 37 $^{\circ}$ C에서 30분 동안 incubation시킨다. 이후 spectrophotometer를 이용하여 515nm에서 흡광도를 측정하였다.
- 2) 양성 대조약물로는 Ascorbic acid를 농도별로 조제하여 사용하였으며, 항산화능의 정도를 0.1mM DPPH용액 1.9ml를 50%환원시키는데 필요한 시료의 농도로 항산화능을 측정하였다.

$$\text{EDA}(\%) = \frac{\text{Control O.D.} - \text{Sample O.D.}}{\text{Control O.D.}}$$

사. Anticancer effect

1) Cell culture

cancer cell line 은 B16F10(melanoma); 흑색종, HeLa(carcinoma);자궁경부암, SK-OV3(adenocarcinoma);난소암, DU145(carcinoma);전립선암, K562(lymphoma);백혈병, HepG2(hepato blast oma);간암, MKN-45(stomach adenocarcinoma);위암 그리고 A549(lung carcinoma);폐암세포주를 사용하였다. 정상세포로는 NIH3T3 (fibroblast),피부, 293(embryonal kidney)신장, CHO-K1(hamster ovary); 햄스터 난소 세포주를 사용 하였다. 모든 cell line 은 10% FBS DMEM 또는 RPMI1640 medium [penicillin (100 units/ml), streptomycin (100 μ g/ml)] 으로 키웠으며 배양 조건은 5% CO₂, 37 $^{\circ}$ C로 유지되는 incubator에서 배양하였다. 모든 세포주 들은 서울대 세포주 은행 및 ATCC에서 구입 하였다.

2) Cytotoxicity assay - MTT assay

목적진흠버섯의 분획이나. 정제된 물질을 DMSO 에 녹여, DMEM 이나 RPMI1640 medium으로 희석하여 최종농도가 5, 10, 50, 100, 200 ug/ml이 되게 만든다. 세포의 증식억제 실험을 하기 위해 부착성 세포주 및 비부착성세포주를 96-well plate에 1 \times 10⁴ cells/well 이 되도록 배양한다. 1일 후, 0.5% medium으로 24시간 동안 starvation 시킨 후에 sample을 첨가하고 1일,2일,3일 후 3mg/ml MTT 시약 (pH7.4 PBS에 용해)을 주입한 후 3시간 동안 37 $^{\circ}$ C에서 방치후 이소

프로판올로(100ul) 세포를 용해 시킨 후 세포의 증식 억제정도를 570nm에서 ELISA로 확인하였다. 항암 활성은 다음 과 같은 방식으로 계산하였다: 항암(%)=100*OD570 of test/ OD570 of control.

아. 목질진흙버섯 fraction들의 항염증 효과 측정

1) Cell culture -

대식세포인 RAW 264.7세포는 ATCC에서 구입 하였으며, 10% FBS DMEM medium [penicillin (100 units/ml) plus streptomycin (100 µg/ml)] 으로 키웠으며 배양 조건은 5% CO₂, 37°C로 유지되는 incubator에서 배양하였다. 그 후 60mm culture dish에 (2X10⁶)개의 세포를 키웠다 그런 다음 목질진흙버섯 추출물 및 분획물을 100mg/ml로 녹인 후 각각의 최종 동도가 되도록 배지로 희석 한다. 그리고 각각의 시료를 세포에 가하기 전에 LPS(1ug/ml), IFN- γ (50U/ml)을 세포에 가한 후 각각의 시료를 세포에 투여 하였다.

2) Measurement of nitrite-

NO의 생성은 Nitrite 측정으로 간접적으로 확인 하였다. 실험 과정은 다음 과 같다. 세포에 시료를 투여한지 16시간 후에 배지를 걸어서 (100ul) A,B 의 Griess reagent(A;1% sulfanilamide , B;0.1% naphthylenediamine in 5% phosphoric acid)를 섞은 시약 (50ul+50ul=100ul)과 반응시킨 후 550nm에서 측정하였다. 이때 nitrite 기준물질로 sodium nitrite를 사용하여 Raw264.7세포의 nitrite의 분비를 측정하였다. ,

3) Western blotting

대식세포에서 NO의 생성 단백질인 COX-2 및 iNOS를 다음과 같이 측정하였다. 최초 얻어진 세포들을 PBS(PBS, Sigma Chemical Company, USA)로 2회 가볍게 세척한다. 그후 PBS를 완전히 제거 후 세포용해 및 염색시약인 phospho sample buffer을 200ul를 각각의 dish에 넣고 스크래퍼로 긁는다. 그 후 7%의 SDS-PAGE를 통하여 전기이동 하였다. 전기 이동한 SDS-PAGE젤의 단백질을 PVDF막으로 이동 시킨다. 단백질 이동이 완료된 PVDF막을 상온에서 PBS-T(in 100 mM NaCl, 10 mM Tris, 0.1% (v/v) Tween-20, pH 7.4 (PBS-T) containing 5% milk)로 blocking한다. 그 후 PBS-T를 사용하여 5분간 세 번 세척한 후 5%탈지분유 PBS-T에 녹인 1차 항체를 붙인다. 그리고 2차 항체를 붙이기 전 PBS-T로 충분히 세척한

다. 40분간 방치한 후 역시 PBS-T로 20분씩 3번 세척한다. 마지막으로 ECL detection system (Amersham, England) 을 사용하여 특정 단백질의 양 및 위치를 확인한다. 단백질양의 보정은 PVDF막을 재활용(stripping)하여 actin 단백질의 양을 확인함으로써 동량임을 보여주었다. 각각의 항체는 BD co 및 Cayman co에서 구입 하였다.

3. 목질진흙버섯의 생리활성물질의 분리정제

가. 추출 및 분획

현미 배지로 배양한 목질진흙버섯 자실체를 음건한 후 조말로 하여 3 kg을 취하여, 열 MeOH 30 l로 추출한 후 60 °C이하에서 1/5로 감압 농축한다. 다음으로 농축된 액을 방치하여 미황색의 난용성 침전(Precipitates) 24.9 g을 얻었으며, 이것을 여과한 여액을 위와 같은 방법으로 완전 농축하여 MeOH ex. 260 g을 얻었다. 그 후 MeOH ex.를 열수에 녹여 물 가용분획 (Water Soluble fr.) 190 g과 물 불용분획 (Water Insoluble fr.) 60 g으로 나누었다. 물 가용분획은 다시 ether로 분배하여 물 분획 (Water fr.) 128 g과 ether 분획 (Ether fr.) 12 g을 얻었다 (Scheme 1). 한편, 항산화 활성 비교검색을 위해 배양목질진흙버섯 자실체 100 g에 증류수 약 2 l를 가하여 90-100 °C의 수욕상에서 4시간씩 3회 추출 후, 여과한 여액을 감압 농축하여 Water ex. 11.9 g을 얻었다.

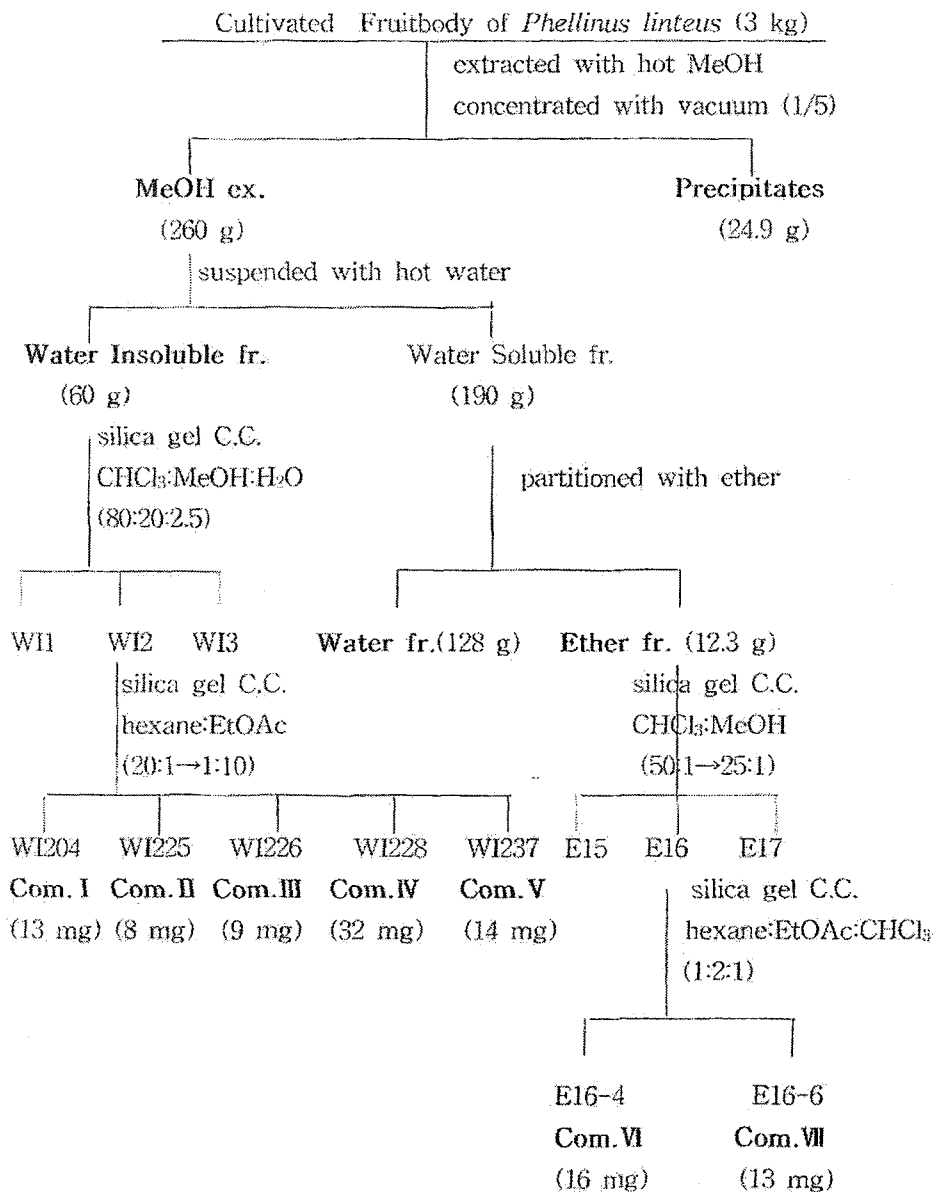


Fig.2 Extraction and isolation of Compound I ~ VII from cultivated fruit body of *Phellinus linteus*

나. 새액의 조제

1) 양성 대조 약물 제조

가) DPPH를 이용한 항산화 실험에 있어서는 ascorbic acid를 EtOH에 녹여 0.5 mg/ml이 되도록 조제한다.

나) LDL 산화억제 실험에서는 ascorbic acid를 phosphate buffered saline에 녹여 0.5 mg/ml이 되도록 조제한다.

다) 신기능 실험에서는 furosemide를 0.05% Na-CMC에 현탁시켜 20 mg/ml이 되도록 조제한다.

2) 0.1 mM DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) : DPPH 39.4mg을 EtOH에 용해시켜 1000 ml이 되도록 용시 조제한다.

3) 10 nM 1,1,3,3-Tetraethoxypropane 용액 : (TBARS 시험용 MDA 표준용액) : 1,1,3,3-Tetraethoxypropane 0.022 g에 phosphate buffered saline을 가해 10 ml이 되도록 한 후, 이 용액의 0.1 ml을 취하여 phosphate buffered saline으로 희석시켜 100 ml이 되도록 하며 항시 조제한다.

4) 0.2 M Sodium phosphate buffer (pH 7.4) : 0.2 M Sodium dihydrogen phosphate 60 ml에 0.2 M disodium hydrogen phosphate를 가하여 500 ml이 되도록 조제한다.

5) 0.15 M KCl : KCl 11.2 g을 증류수에 녹여 1000 ml이 되도록 조제한다.

6) 0.05% Na-CMC : Na-carboxymethylcellulose 0.05 g을 소량의 증류수를 넣어 교반하면서 균일하게 현탁시켜 100 ml이 되게 조제한다.

7) LDL 실험용 1% TBA 시액 : Thiobarbituric acid 1 g에 0.05 N NaOH를 가하여 100 ml이 되도록 조제한다.

8) 25% TCA 시액 : Trichloroacetic acid 25.0 g에 증류수를 가하여 100 ml이 되도록 조제한다.

- 9) Phosphate buffered saline (PBS : pH 7.4) : Na_2HPO_4 3.58 g, NaCl 8.77 g, NaN_3 0.20 g에 증류수를 가하여 1000 ml이 되도록 조제한다.
- 10) 1 mM CuSO_4 용액 : CuSO_4 0.025 g에 증류수를 가하여 100 ml이 되도록 조제한다.
- 11) 1 mM EDTA 용액 : EDTA-2Na 0.029 g에 증류수를 가하여 100 ml이 되도록 조제한다.
- 12) TBE buffer : Tris base 10.8 g, boric acid 5.5 g, 0.05 M EDTA 20 ml에 증류수를 가하여 1000 ml이 되도록 조제한다.
- 13) Electrophoresis용 sample buffer : 1 M Tris base 0.26 ml, glycerol 1 ml, 1% bromophenol blue 0.5 ml에 증류수를 가하여 10 ml이 되도록 조제한다.
- 14) Staining 시액 : MeOH 250 ml, HOAc 50 ml, coomassie brilliant blue 0.250 g에 증류수를 가하여 500 ml이 되도록 조제한다.
- 15) 승홍 (HgCl_2) 주사액 : HgCl_2 100 mg을 주사용 생리식염수에 녹여 100 ml이 되도록 조제한다.

다. 항산화 효과 측정

1) DPPH를 이용한 항산화능 측정

각 시료를 농도별로 조제한 후 각 시료 100 μl 에 0.1 mM DPPH 용액(99.5% EtOH에 용해) 1.9 ml을 가한 후 vortex mixer로 10초간 진탕한 후 37 $^{\circ}\text{C}$ 에서 30분 동안 배양시켰다. 이후 spectrophotometer를 이용하여 515 nm에서 흡광도를 측정하였다.

시료의 항산화 효과를 측정하기 위하여 전자공여능(electron donating ability, EDA %)에 의한 환원력으로 항산화능을 표시하였다.⁷⁰⁾

양성 대조약물로는 아스코르빈산을 농도별로 용시 조제하여 사용하였다.

$$\text{EDA}(\%) = \frac{\text{Control O.D.} - \text{Sample O.D.}}{\text{Control O.D.}} \times 100$$

Sample O.D. : 시료를 가한 시험액의 흡광도

Control O.D. : 시료 대신 EtOH를 가한 시험액의 흡광도

각 시료의 항산화능을 비교 검토하기 위해서 EDA가 50%에 이르도록 하는데 필요한 시료의 농도(IC₅₀)를 측정하였다.

2) LDL 산화에 대한 억제 효과 측정

가) LDL의 분리 및 정제

Human plasma에 aprotinine 0.002%, EDTA, NaN₃를 각각 0.05%씩 가해 천천히 혼화한 후 KBr를 가해 density를 조정(d=1.006→1.025)하여 1차 초원심분리(40,000 rpm, 4 °C, 16 hr)하였다. 이때 분리된 VLDL을 제거하고 LDL이 포함된 분획을 취한 후 KBr를 가하여 density를 조정(d=1.026→1.055)한 후 2차 초원심분리(40,000 rpm, 4 °C, 24 hr)하여 LDL을 분리하였다.⁷¹⁾분리한 LDL을 pH 7.4의 phosphate buffered saline(PBS)으로 4 °C에서 48시간 동안 투석하였다.

나) LDL중 단백질 정량 및 순수도 확인

LDL중 단백질 농도는 bovine serum albumin을 표준으로 하는 Lowry's method⁷²⁾에 의해 결정하였고, LDL의 순수도는 SDS-PAGE 로써 확인하였다 (Scheme II).

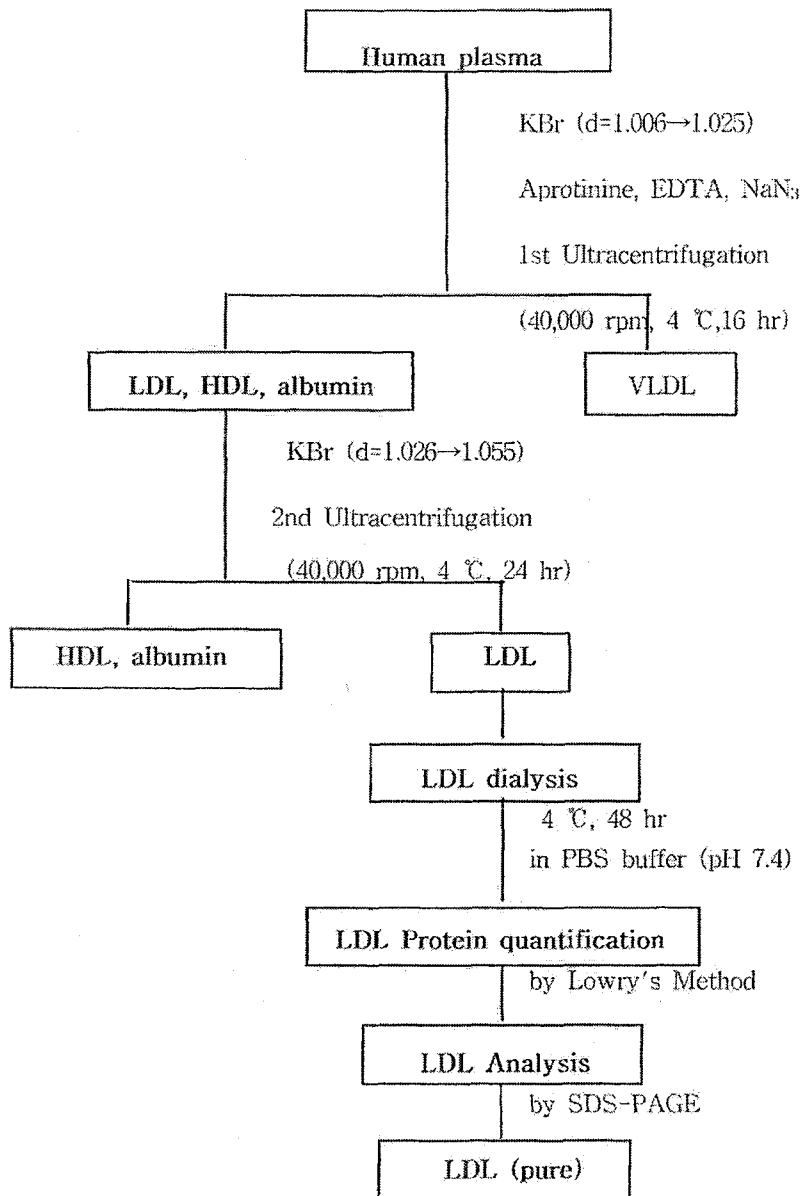


Fig. 3.. Isolation of LDL from human plasma

3) Cu²⁺ - induced LDL Oxidation

LDL(400 μ g 단백질), 1 mM CuSO₄ 16 μ l, 농도별로 조제한 각 시료 100 μ l에 PBS(pH 7.4)를 섞어 전체 부피가 1 ml이 되도록 하였다. Vortex mixer로 혼화하여 37 °C 수욕상에서 4시간 동안 진탕 배양하여 산화시킨 후 1 mM EDTA 20 μ l를 첨가하여 산화를 중지시켰다.⁷³⁾

4) TBARS assay

상기(1.2.3)의 산화된 LDL 용액에 25% trichloroacetic acid 1 ml을 넣어 단백질을 침전시킨 후 그 상등액에 1% thiobarbituric acid 1 ml을 첨가하여 95 °C에서 발색시킨 후 냉각시켰다. 생성된 MDA의 양을 532 nm에서 spectrophotometer를 이용하여 측정하였다 (Scheme III).⁷⁴⁾ MDA 표준시료로는 10 nM 1,1,3,3-Tetraethoxypropane 용액을 용시 조제하여 사용하였다.

$$\text{MDA 농도 (nM/ml)} = (f/F) \times 10$$

F: 표준시료의 흡광도 (532 nm)

f: 검체의 흡광도 (532 nm)

각 시료의 LDL 지질과산화 억제효과를 비교검토하기 위해서 Cu²⁺에 의해 유도되는 과산화지질의 생성을 50% 억제하는데 필요한 시료의 농도(IC₅₀)을 측정하였다.

5) Agarose gel electrophoresis

상기(1.2.3)의 산화된 LDL 용액을 speedvac concentrator에서 농축하고 sample beffer와 3:1로 섞어 0.7% agarose gel에 20 μ l 정도를 loading하였다. TBE 완충액(pH 7.4)을 loading buffer로 사용하여 20 mA의 전류로 agarose gel electrophoresis를 시행한 후에 staining 시액으로 30분간 염색한 후 4 °C에서 수일간 탈염을 실시하였다.^{75,76)}

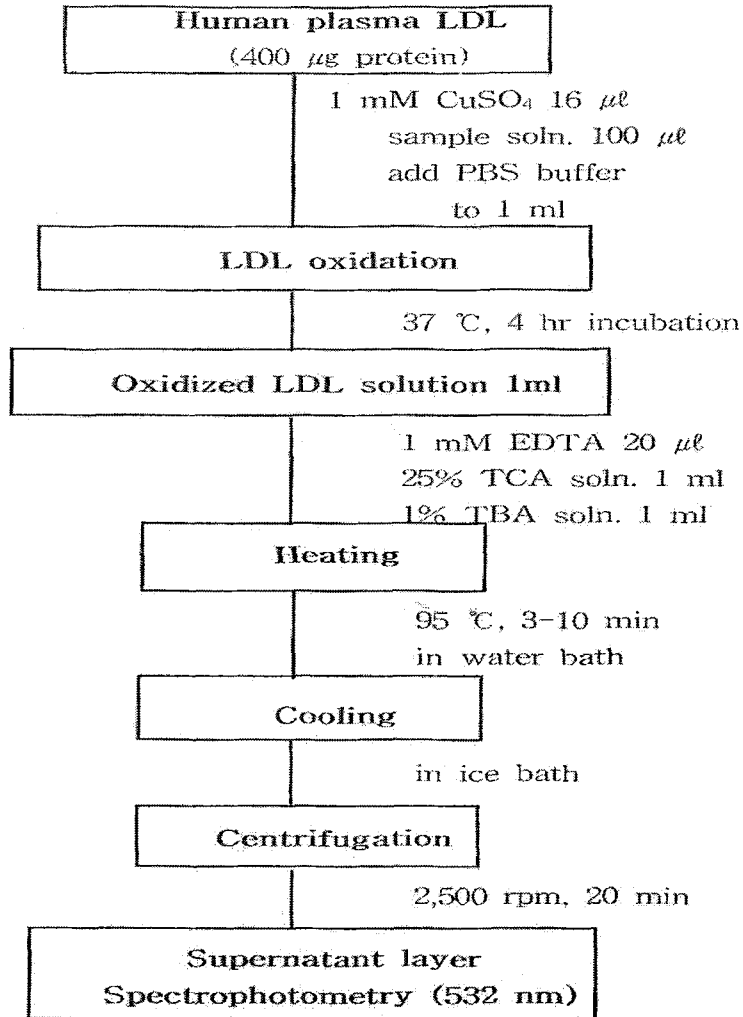


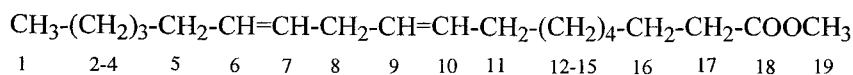
Fig. 4. Procedure of TBARS assay on Cu^{2+} -induced oxidized LDL

라. 성분의 분리

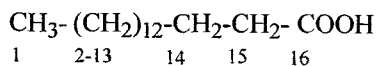
배양목질진흙버섯 자실체의 항산화 활성을 검토하고 그 활성성분을 추적하고자 activity guided fractionation 방법에 따라 실험을 실시했다.

먼저 MeOH ex.와 Water ex.에 대해 항산화 활성실험을 실시한

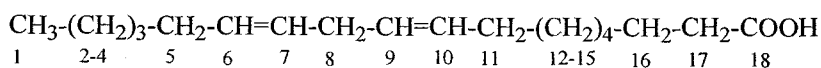
결과 MeOH ex.가 활성을 나타내었다. 활성을 나타낸 MeOH ex.를 Precipitates, Water Insoluble fr. (물 불용분획), Water fr., Ether fr.으로 나누어 항산화 실험을 실시한 결과 Water Insoluble fr.과 Ether fr.이 활성을 나타내었다. 활성분획인 Water Insoluble fr.과 Ether fr.에 대해 각각 column chromatography를 반복 실시하여 7개의 화합물을 단리 하였다.



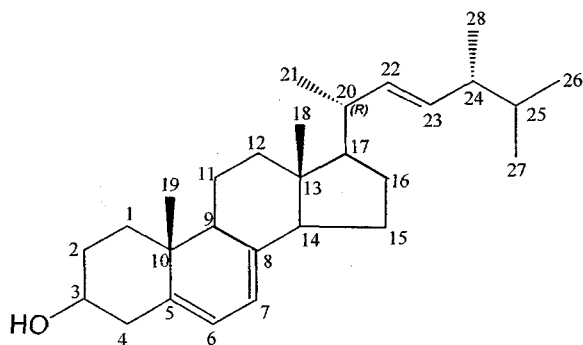
Compound I : Linoleic acid methyl ester



Compound II : Palmitic acid

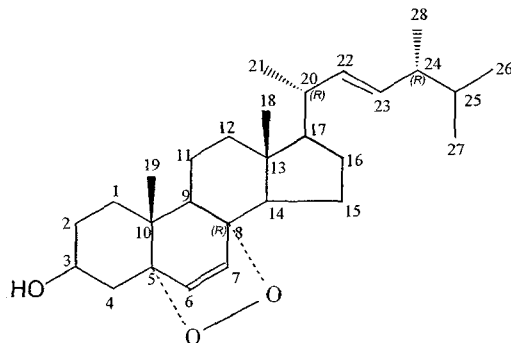


Compound III : Linoleic acid

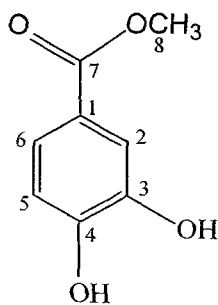


Compound IV : Ergosta-5,7,22-triene-3-ol (ergosterol)

Fig. 5.. Structures of the compound I ~ IV from cultivated fruit body of *Phellinus linteus*



Compound V: 5,8-Epidioxyergosta-6,22-dien-3-ol (ergosterol peroxide)



Compound VI : 3,4-Dihydroxybenzoic acid methyl ester

Compound VII : 4-(3',4'-Dihydroxyphenyl)
-3-butene-2-on

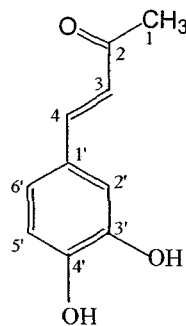


Fig. 6. Structures of the compound V ~ VII from cultivated fruit body of *Phellinus linteus*

1) MeOH 엑스의 물 불용분획 (Water Insoluble fr.)으로부터 화합물 I ~ V의 분리

항산화 활성을 나타낸 Water Insoluble fr. 30 g을 silica gel column에 걸고 $\text{CHCl}_3 : \text{MeOH} : \text{H}_2\text{O}$ 의 혼합용매 (80 : 20 : 2.5)를 이용 column chromatography를 실시하여 8개의 분획 (WI1 fr. ~ WI8 fr.)으로 나누었다. 이 중 WI2 fr.을 hexane : EtOAc (20:1→1:10) 혼합용매로 column chromatography를 실시하여 56개의 분획 (WI201~WI256)으로 나누었고, 이 중 5개의 조결정 (WI204, WI225, WI226, WI228, WI237)을 얻었으며, 이를 다시 재결정하여 화합물 I (13 mg), 화합물 II (8 mg), 화합물 III (9 mg), 화합물 IV (32 mg) 및 화합물 V (14 mg)를 각각 분리하였다.

2) 화합물 I의 물리화학적 성상

IR ν_{max} (KBr, cm^{-1})

2929 (aliphatic C-H), 1739 (C=O), 1172 (C-O),
771 ($[\text{CH}_2]_n$)

EI-MS (m/z): 294 $[\text{M}]^+$, 263 $[\text{M}-\text{CH}_3\text{O}]^+$

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ :

0.82 (3H, t, 1- CH_3)
1.18-1.23 (14H, 2~4, 12~15- CH_2)
1.54 (2H, 16- CH_2)
1.97-2.10 (4H, 5, 11- CH_2)
2.23 (2H, 17- CH_2)
2.69 (2H, 8- CH_2)
3.60 (3H, 19- CH_3)
5.28 (4H, 6, 7, 9, 10- CH)

$^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, CDCl_3) δ :

14.04 (C-1)
22.54~34.09 (aliphatic CH_2)
51.43 (C-19)
127.86 (C-6), 128.00 (C-9), 130.01 (C-7), 130.18
(C-10) 174.33 (C-18)

3) 화합물 II의 물리화학적 성상

white, crystal

m.p. : 63-64 °C

IR ν_{\max} (KBr, cm^{-1}) :

2917 (aliphatic C-H), 1704 (C=O), 1296 (C-O)

717 ($[\text{CH}_2]_n$)

EI-MS (m/z) :

256 $[\text{M}]^+$, 213, 129

$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, CDCl_3) δ :

0.81 (3H, t, 1- CH_3)

1.19~1.26 (24H, 2~13- CH_2)

1.56 (2H, t, 14- CH_2)

2.28 (2H, t, 15- CH_2)

7.19 (1H, 16-COOH)

$^{13}\text{C-NMR}$ (150 MHz, CDCl_3) δ :

14.10 (C-1)

22.68~31.92 (aliphatic CH_2)

24.68 (C-14), 33.98 (C-15)

179.73 (C-16)

4) 화합물 III의 물리화학적 성상

IR ν_{\max} (KBr, cm^{-1}) :

2916 (aliphatic C-H), 1704 (C=O), 1285 (C-O)

EI-MS (m/z) : (Fig. 3.2)

280 $[\text{M}]^+$, 256, 213, 171, 129

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) δ :

0.81 (3H, t, 1- CH_3)

1.19-1.23 (14H, 2~4, 12~15- CH_2)

1.55 (2H, 16- CH_2)

1.98 (4H, 5, 11- CH_2)

2.28 (2H, t, 17- CH_2)

2.69 (2H, 8- CH_2)

5.29 (4H, 6, 7, 9, 10-CH)

$^{13}\text{C-NMR}$ (75.5 MHz, CDCl_3) δ :

14.18 (C-1)

22.66~34.15 (aliphatic CH_2)

128.19 (C-6), 128.35 (C-9), 130.30 (C-7), 130.50

(C-10) 180.29 (C-18)

5) 화합물 IV의 물리화학적 성상

White needles

m.p. : 168-170 $^{\circ}\text{C}$

IR ν_{max} (KBr, cm^{-1}) :

3425 (O-H), 2955 (aliphatic C-H), 1652 (C=C), 1038 (C-O)

EI-MS (m/z) :

396 $[\text{M}]^+$, 363 $[\text{M}-\text{CH}_3-\text{H}_2\text{O}]^+$, 271 $[\text{M}-\text{C}_9\text{H}_{17}-\text{H}_2]^+$,

253 $[\text{M}-\text{C}_9\text{H}_{17}-\text{H}_2\text{O}]^+$

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) δ :

0.62 (3H, s, 18- CH_3)

0.81 (3H, d, $J=6.9\text{Hz}$, 27- CH_3)

0.82 (3H, d, $J=6.9\text{Hz}$, 26- CH_3)

0.90 (3H, d, $J=6.9\text{Hz}$, 28- CH_3)

0.93 (3H, s, 19- CH_3)

1.02 (3H, d, $J=6.6\text{Hz}$, 21- CH_3)

3.63 (1H, m, 3-H)

5.19 (2H, m, 22,23-H)

5.38 (1H, m, 7-H)

5.56 (1H, m, 6-H)

$^{13}\text{C-NMR}$ (75.5 MHz, CDCl_3) δ :

38.50 (C-1), 32.10 (C-2), 70.64 (C-3), 40.92 (C-4), 140.09

(C-5), 119.86 (C-6), 116.55 (C-7), 141.65 (C-8), 46.39 (C-9),

37.15 (C-10), 21.20 (C-11), 39.21 (C-12), 42.96 (C-13), 54.71

(C-14), 23.09 (C-15), 28.39 (C-16), 55.89 (C-17), 12.12 (C-18),

16.36 (C-19), 40.54 (C-20), 19.73 (C-21), 135.86 (C-22),

132.27 (C-23), 42.96 (C-24), 33.20 (C-25), 20.04 (C-26), 21.20

(C-27), 17.69 (C-28)

6) 화합물 V의 물리화학적 성상

White needles

m.p. : 173-175 °C

IR ν_{\max} (KBr, cm^{-1}) :

3284 (O-H), 2959 (aliphatic C-H), 1038 (C-O)

EI-MS (m/z) : 428 $[\text{M}]^+$, 410 $[\text{M}-\text{H}_2\text{O}]^+$, 396 $[\text{M}-\text{O}_2]^+$, 363

$[\text{M}-\text{O}_2-\text{H}_2\text{O}-\text{CH}_3]^+$ 271 $[\text{M}-\text{C}_9\text{H}_{17}-\text{O}_2]^+$

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) δ :

0.75 (3H, s, 18- CH_3)

0.75 (3H, d, $J=7.0\text{Hz}$, 27- CH_3)

0.76 (3H, d, $J=6.9\text{Hz}$, 26- CH_3)

0.81 (3H, s, 19- CH_3)

0.84 (3H, d, $J=6.8\text{Hz}$, 28- CH_3)

0.93 (3H, d, $J=6.6\text{Hz}$, 21- CH_3)

3.90 (1H, m, 3-H)

5.07 (1H, dd, $J=8.4, 15.3\text{Hz}$, 23-H)

5.15 (1H, dd, $J=7.5, 15.3\text{Hz}$, 22-H)

6.17 (1H, d, $J=8.5\text{Hz}$, 6-H)

6.44 (1H, d, $J=8.5\text{Hz}$, 7-H)

$^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, CDCl_3) δ : (Fig. 5.4)

34.65 (C-1), 30.67 (C-2), 66.42 (C-3), 36.88 (C-4), 79.40 (C-5), 130.71 (C-6), 135.36 (C-7), 82.14 (C-8), 51.03 (C-9), 36.92 (C-10), 20.85 (C-11), 39.30 (C-12), 44.52 (C-13), 51.64 (C-14), 23.37 (C-15), 28.63 (C-16), 56.14 (C-17), 12.84 (C-18), 18.15 (C-19), 39.72 (C-20), 20.60 (C-21), 135.17 (C-22), 132.30 (C-23), 42.73 (C-24), 33.03 (C-25), 19.93 (C-26), 19.61 (C-27), 17.53 (C-28)

7) MeOH 액스의 물 가용분획(Water Soluble fr.)중 Ether fr.으로부터 화합물 VI 및 VIII의 분리

배양목질진흙버섯 자실체의 MeOH ex.의 분획 중 항산화 활성을 나타낸 Ether fr.에 대하여 silica gel column chromatography를 이동상 CHCl_3 : MeOH (50:1→25:1)로 실시하

여 20개의 분획 (E01 fr.~E20 fr.)으로 나누고, E16 fr.을 다시 silica gel과 용매 hexane : EtOAc : CHCl₃ (1:2:1)로 column chromatography를 실시하여 15개의 분획 (E16-1~E16-15)으로 나누었고, 그 중에서 E16-4와 E16-6을 각각 농축하여 화합물 VI (13 mg)과 화합물 VII (16 mg)을 단리 하였다.

8) 화합물 VI의 물리화학적 성상

yellow amorphous powder

IR ν_{\max} (KBr, cm^{-1}) :

3412 (phenolic O-H), 1692 (C=O), 1600 and 1444 (aromatic C=C), 1301(C-O)

EI-MS (m/z) :

168 [M]⁺, 137 [M-OCH₃]⁺, 109 [M-OCH₃-CO]⁺,

81 [M-OCH₃-CO-CO]⁺, 63, 53

¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD) δ :

3.82 (3H, s, H-8)

6.79 (1H, d, $J=7.2\text{Hz}$, H-5)

7.40 (1H, dd, $J=7.2, 2.0\text{Hz}$, H-6)

7.41 (1H, d, $J=2.0\text{Hz}$, H-2)

¹³C-NMR (100 MHz, CD₃OD) δ :

122.57 (C-1), 117.40 (C-2), 146.19 (C-3), 151.70 (C-4),

115.83 (C-5), 123.61 (C-6), 168.85 (C-7), 52.27 (C-8)

9) 화합물 VII의 물리화학적 성상

yellow amorphous powder

IR ν_{\max} (KBr, cm^{-1}) :

3420 (phenolic O-H), 1596 (C=O), 1520 (aromatic C=C),

1288 (C-O)

EI-MS (m/z) :

178 [M]⁺, 163 [M-CH₃]⁺, 135 [M-CH₃-CO]⁺,

117 [M-CH₃-CO-H₂O]⁺

¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD) δ :

2.33 (3H, s, CH₃)

6.54 (1H, d, $J=16.0\text{Hz}$, H-3)

6.78 (1H, d, $J=8.0\text{Hz}$, H-5')

6.98 (1H, dd, $J=1.6, 8.0\text{Hz}$, H-6')

7.07 (1H, d, $J=1.6\text{Hz}$, H-2')

7.51 (1H, d, $J=16.0\text{Hz}$, H-4)

¹³C-NMR (100 MHz, CD₃OD) δ :

27.00 (C-1), 201.60 (C-2), 116.57 (C-3), 146.94 (C-4),

127.68 (C-1'), 115.26 (C-2'), 147.34 (C-3'), 150.09 (C-4'),

116.31 (C-5'), 123.57 (C-6')

마. 신기능에 미치는 작용 측정

1) 약물의 투여

정상군은 생리식염주사액을, 양성대조군, 음성대조군, 시료투여군은 승홍을 2 mg/kg 피하주사하여 급성 신부전을 야기시키고, 24시간 절식시킨 후 시료투여군은 각 시료를 농도별(125 mg/kg, 250 mg/kg, 500 mg/kg)로 0.05% Na-CMC에 현탁시켜 경구투여 하였다. 정상군과 음성대조군은 시료대신에 동량의 0.05% Na-CMC액을, 양성대조군은 furosemide 20 mg/kg을 각각 경구투여 하였다.

2) 뇨량의 측정

시료투여 후 흰쥐를 한 마리씩 aluminum screen wire bottom metabolism cage에 수용하고, 1시간 간격으로 5시간 동안 뇨를 채취 하였다.^{77,78)} 고형사료와 물은 자유롭게 섭취할 수 있도록 하였다.

3) 뇨중 전해질의 측정

정상군, 양성대조군, 음성대조군, 시료투여군의 뇨중에 존재하는 Na^+ , K^+ 의 함량은 ion selective method⁷⁹⁾로, Cl^- 의 함량은 coulometric titration method⁸⁰⁾에 준하여 자동화학분석기로 측정하였다.

4) 혈청중 creatinine, BUN, uric acid의 함량 측정

채뇨가 끝난 흰쥐를 ether로 가볍게 마취시키고 cardiac puncture를 실시하여 채취한 혈액을 3,000 rpm에서 30분간 원심 분리하여 혈청을 분리하였다. 정상군, 양성대조군, 음성대조군, 시료투여군으로부터 채취한 혈청중의 creatinine함량은 Jaffe-method⁸¹⁾로, BUN함량은 Urease-glutamate dehydrogenase method⁸⁰⁾로, uric acid 함량은 Urinase-PAP method⁸⁰⁾에 준하여 혈액자동화학분석기로 측정하였다.

5) 신장 및 비장의 중량 측정

정상군, 양성대조군, 음성대조군, 시료투여군으로부터 얻은 신장의 중량 및 비장의 중량을 측정하고 체중에 대한 백분율을 구하였다.

제 5 절 연구결과

1. 기본 적정배지 선발

가. 고체배지 선발 -

목걸진흙버섯(*Phellinus linteus*)의 생육환경 및 영양원 선발 시험의 기본배지를 선발하기 위하여 실험을 실시한 결과, 5개 군주에서 MYA배지와 SMS배지에서 우수한 균사생장을 나타냈고 높은 밀도를 보였다. 다른배지에서도 높은 균사생장을 보였지만 밀도에서는 낮게 나타나는 것을 확인할 수 있었다.

Table 2. Selection of the stock culture medium for the *P. linteus*.

Media	Colony diameter(mm/15days)					Mycelial density				
	PH-1	PH-5	PH-195	PH-198	PH-211	PH-1	PH-5	PH-195	PH-198	PH-211
PDA	59.7	64.8	65.7	67.7	70.1	++	+++	++	++	+++
MYA	58.1	65.8	67.8	68.4	72.5	+++	+++	+++	+++	+++
BMYA	57.8	62.2	63.5	67.5	69.5	+++	+++	++	++	+++
MYSG	65.7	73.3	70.4	69.8	69.8	++	++	+	++	+
GP	60.8	65.7	64.2	62.5	69.9	+	+	+	+	+
SMS	71.6	69.2	72.6	73.5	74.6	++	+++	+++	++	+++
BMA	63.2	69.8	64.2	68.9	67.8	+	+	+	+	+
HMA	41.2	49.4	52.2	57.5	55.6	+	+	+	++	+

나. 액체배지 선발 -

Agar를 제외한 액체 기본배지 선발에서 SMS에서 높은 균체건중량을 나타내는 것을 확인할 수 있었다.(Table 3.)

Table 3. Dry weight of mycelium of *P. linteus* on liquid media.

Media	PH-1	PH-5	PH-195	PH-198	PH-211
PDB	0.14	0.22	0.23	0.25	0.22
MYB	0.15	0.14	0.17	0.19	0.32
BMYB	0.13	0.14	0.15	0.19	0.22
MYSG	0.17	0.14	0.16	0.18	0.21
GP	0.10	0.12	0.11	0.16	0.19
SMS	0.38	0.43	0.48	0.52	0.49
BM	0.22	0.20	0.22	0.33	0.31
HM	0.31	0.27	0.25	0.31	0.28

2. 균사체의 배양환경

가. 적정 온도 조사

목질진흙버섯균의 균사배양 최적온도를 조사하기 위하여 MYA배지에 균종 6mm를 접종한 후 15℃부터 35℃까지 각 5℃범위로 실험을 실시하였다. 실험한 결과 30℃에서 가장 우수한 생장을 나타냈다.

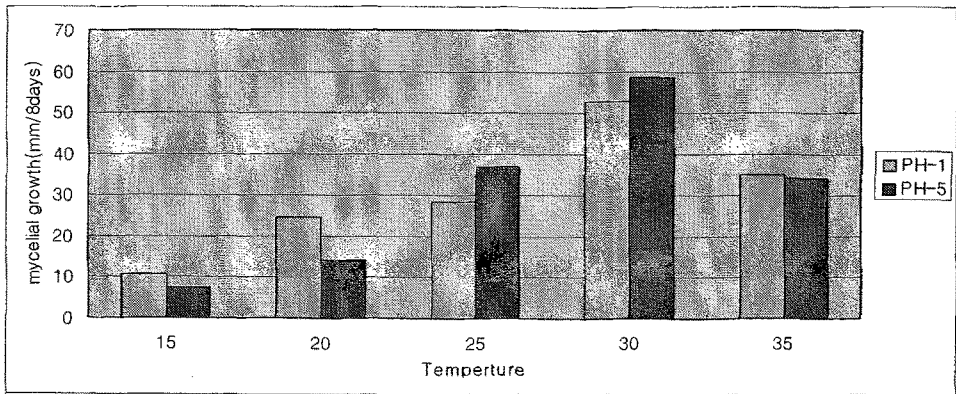


Fig. 7. Effect of temperature on the mycelial growth of *P. linteus*.

나. 초기 적정 pH조사

균사생장에 적합한 초기 적정 pH를 규명하기 위해서 실험한 결과 5개 균주에서 pH4.0과 pH 5.0의 산성에서 균사생장이 양호한 것으로 조사되었다.

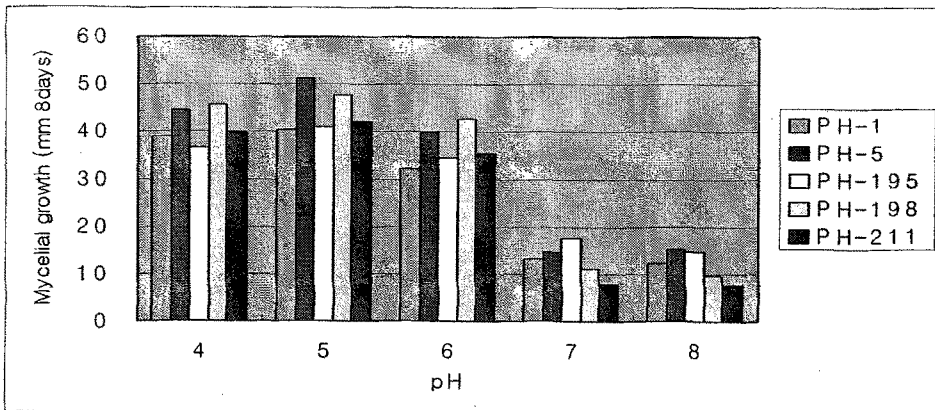


Fig. 8. Effect of initial pH on the mycelial growth of *P. linteus*.

다. 영양원 선발

목질진흙버섯균의 생육에 적합한 탄소원을 선발하기 위하여 Malt extract를 비롯한 7종의 탄소원을 실험한 결과, C7인 Malt extract에서 양호한 생육을 나타내었다. 질소원선발 실험을 위해서 탄소원은 Malt extract로 고정

하고 질소원을 달리하여 실험한 결과 Yeast extract에서 우수한 균사생육을 나타내었다. 목질진흠버섯의 무기염류의 이용성을 조사하고자 Malt extract와 Yeast extract를 10:1의 비율로 첨가한 후 무기염류 선발실험을 한 결과 첨가효과가 뚜렷이 나타나진 않았다.

Table 4. Effect of various carbon sources on the mycelial growth of *P. linteus* at the petri-dish culture, incubated at 25°C for 10days.

Carbon source	Colony diameter(mm/10days)					Mycelial density				
	PH-1	PH-5	PH-195	PH-198	PH-211	PH-1	PH-5	PH-195	PH-198	PH-211
C-1	36.8	30.4	35.0	31.8	37.8	+	+	+	+	+
C-2	16.1	27.4	20.1	7.5	34.0	++	++	++	+	++
C-3	37.5	32.4	31.5	29.6	40.5	++	++	+++	+++	+++
C-4	35.7	31.3	34.5	31.5	41.4	++	++	++	+++	++
C-5	34.5	25.2	39.4	27.6	37.6	+	+	+	+	+
C-6	31.4	28.8	33.8	28.2	38.0	+	++	++	+	+
C-7	36.6	33.6	36.9	33.6	39.6	+++	+++	++	+++	++

C-1 : Control, C-2 : Xylose, C-3 : Glucose, C-4 : Fructose, C-5 : Sucrose, C-6 : Soluble starch, C-7 : Malt extract

+ : thin, ++ : moderate, +++ : compact

Table 5. Effect of various nitrogen sources on the mycelial growth of *P. linteus* at the petri-dish culture, incubated at 25°C for 10days.

Nitrogen sources	Colony diameter(mm/10days)					Mycelial density				
	PH-1	PH-5	PH-195	PH-198	PH-211	PH-1	PH-5	PH-195	PH-198	PH-211
N-1	37.7	40.1	44.8	40.3	35.3	+	+	+	+	+
N-2	36.6	27.2	34.0	35.7	32.5	+++	++	+++	+++	++
N-3	41.5	40.5	42.6	40.6	40.4	+++	+++	+++	+++	+++
N-4	40.5	29.9	39.5	43.2	36.2	+	++	++	++	+
N-5	40.9	36.6	41.5	40.6	28.3	+	++	+	+	+
N-6	40.7	35.0	40.3	42.7	26.7	+	+	+	+	+
N-7	30.7	27.2	25.1	36.8	29.3	++	++	++	++	++

N-1 : Control, N-2 : Peptone, N-3 : Yeast, N-4 : Asparagine, N-5 : NaNO₃, N-6 : KNO₃, N-7 : NH₄NO₃

+ : thin, ++ : moderate, +++ : compact

Table 6. Effect of various mineral sources on the mycelial growth of *P. linteus* at the petri-dish culture, incubated at 25°C for 14days.

Mineral sources	Colony diameter(mm/14days)					Mycelial density				
	PH-1	PH-5	PH-195	PH-198	PH-211	PH-1	PH-5	PH-195	PH-198	PH-211
M-1	60.4	63.3	65.1	67.8	67.7	+++	+++	+++	+++	++
M-2	60.8	65.0	64.8	67.5	69.1	+++	++	+++	+++	+++
M-3	65.5	65.2	65.5	64.5	68.4	+++	+++	+++	++	+++
M-4	56.4	63.6	63.1	62.9	65.6	++	+++	++	+++	+++
M-5	62.1	63.3	64.4	67.4	70.5	+++	+++	+++	+++	++
M-6	64.9	65.3	65.5	65.9	70.6	+++	+++	+++	+++	+++
M-7	60.5	65.2	65.5	66.6	71.4	++	++	++	++	+++

M-1 : Control, M-2 : $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, M-3 : KCl, M-4 : $CaCl_2$, M-5 : KH_2PO_4 , M-6 : K_2HPO_4 , M-7 : NaCl

+ : thin, ++ : moderate, +++ : compact

라. 삼각플라스크 배양 환경조건 조사

1) 삼각플라스크에서의 접종원의 접종량조사

접종원의 접종량 변화에 따른 균사체 증식을 조사하기 위하여 PH-198의 균사절편(직경 5mm)을 3~8개까지 한 개 간격으로 접종개수를 달리하여 삼각플라스크에서 배양한 결과, PH-198은 균사절편의 접종량이 증가할수록 초기 균사체 생장은 좋지만 건조 균체량의 큰 증가는 보이지 않았다. 목질진흠버섯균의 균사절편은 5개에서 6개 절편을 접종하는 것이 삼각플라스크 배양에 적당한 것으로 나타났다. 또한 균사의 형태가 pellet형태로 생장이 되었다. 본 연구에서는 삼각플라스크에 균사절편(직경 5mm) 5개를 접종하여 목질진흠버섯균 대량배양의 전 배양으로 사용하였다.

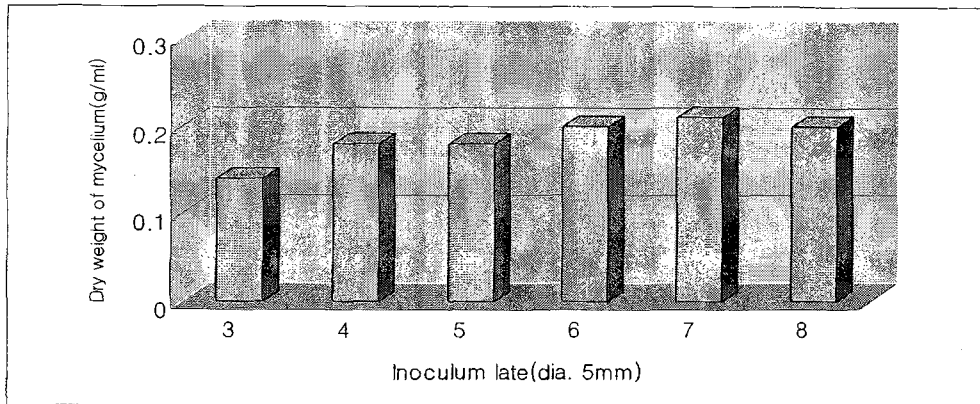


Fig. 9. Effect of inoculum rate on the mycelial growth of PH-198.

2) 삼각플라스크에서 액체배양 시 배양기간에 따른 균사생장을 조사
 겉 중 후 16일 이후에는 커다란 건조균체량의 증가가 보이지 않았다.
 pellet형성 역시 16일 이후에는 size의 차이가 나타나지 않았다.
 목질진흙버섯균의 삼각플라스크 액체배양시 배양기간은 16일이 적당
 할 것으로 사료된다.

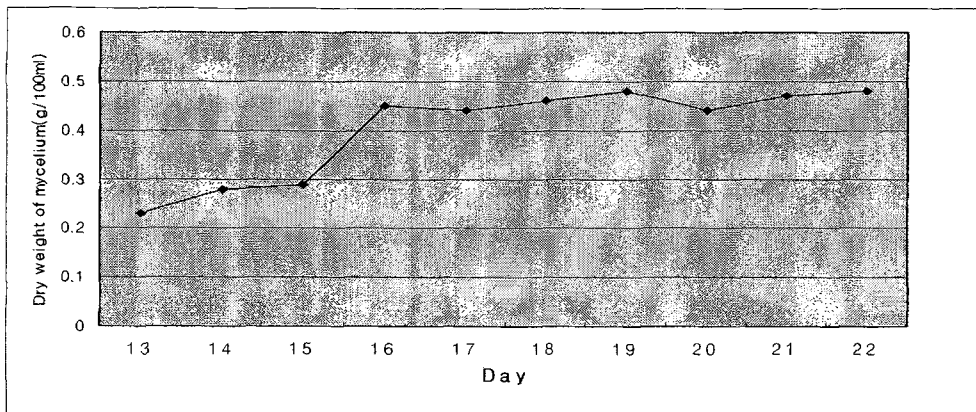


Fig. 10. Time culture of mycelial growth of PH-5, incubated at 25°C, 120rpm

마. 현미균사체 배양

현미균사체에 적정 수분함량을 조사하기 위하여 1000cc pp(polypropylene)병에 현미 200g을 넣은 후 증류수를 140ml, 160ml, 180ml, 200ml, 220ml 달리하여 현미 균사체를 형성하여 비교하였을 때 수분의 함량을 180ml로 하였을 때 높은 균사생장율을 보이는 것을 확인할 수 있었다.

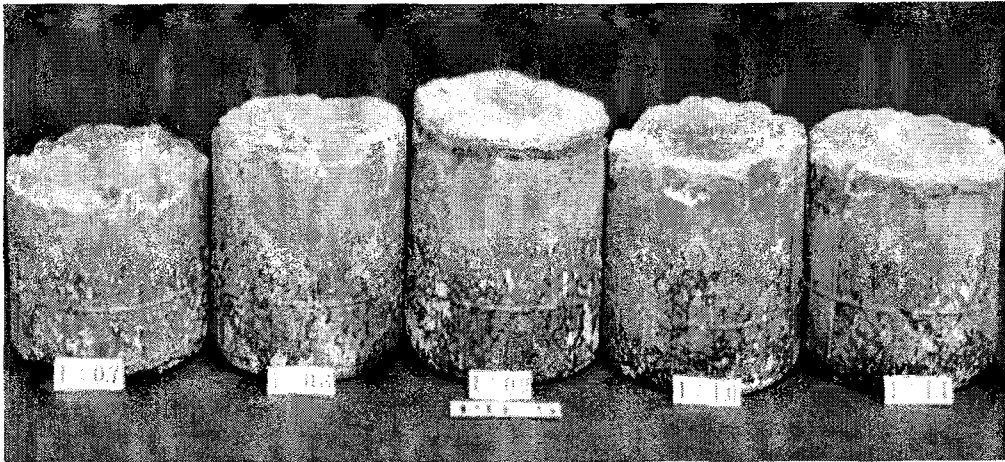


Fig. 11. Effect of water potential on the mycelial growth of PH-5.

바. 원목재배 기술

1) 원목 살균시간에 따른 오염을 조사

- ▶ 사용 수종은 뽕나무, 참나무, 오리나무, 자작나무, 은사시나무, 밤나무를 이용하였다. 원목벌채는 수액의 이동이 정지된 시기이며 저장양분이 가장 많은 11월에서 이듬해 2월 휴면기에 벌목하여 음지에서 자연건조하였다. 원목절단은 수분함량 40~50%일 때 직경 10~20cm, 길이 15~20cm로 토막내어 사용하였다.

- ▶ 절단된 원목은 Polypropylene bag에 넣어 밀봉한 후 121℃, 1.2psi에서 30분, 60분, 90분, 120분, 150분, 180분으로 살균을 달리하여 오염을 조사해본 결과 121℃, 1.2psi에서 180분 살균한 것에서 오염율이 낮게 나타나는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 7).

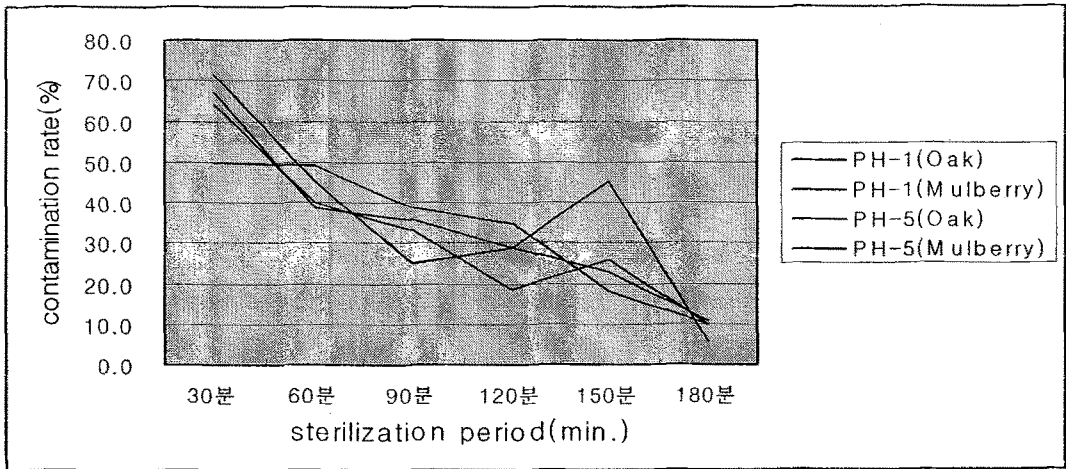
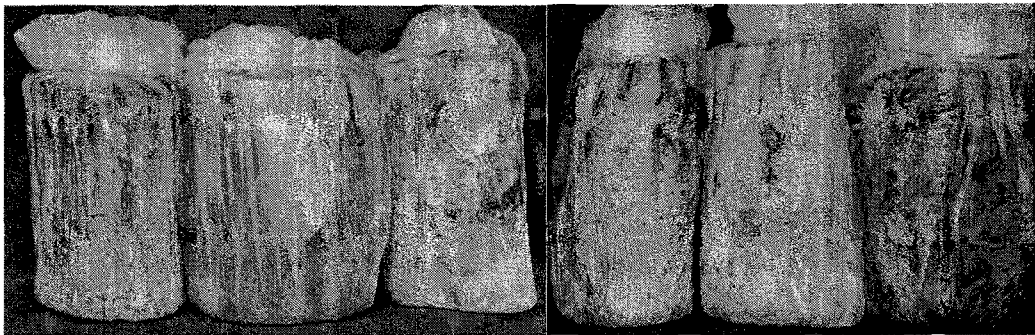


Fig. 12. Effect of sterilization period on contamination rate of *P. linteus*.

2) 원목에 따른 균사배양 조사

사용 수종에 따른 균사생장율을 조사하기 위하여 뽕나무, 참나무, 오리나무, 자작나무, 은사시나무, 밤나무를 이용하여 균사생장율을 조사해 본 결과 참나무와 오리나무에서 높은 균사생장율을 보이는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 8).



a) Oak b) Chestnut c) Birch d) Alder e) Mulberry f) Aspen

Fig. 13 Effect of medium (tree stump) on mycelial growth of *P. linteus*.

사. 최적의 대량생산법

1) 플라스크 배양환경 조사

가) 배양액량 및 삼각플라스크의 종류에 따른 균사의 생육조사

- 삼각플라스크에서 배양액량 및 플라스크형태에 따른 공시균주 균사체의 생육효과를 조사하기 위하여 플라스크 형태에 따라 배지 액량을 배양용기 부피의 20~80%로 달리하여 배양한 결과, 250ml의 Erlenmeyer flask와 shake flask의 배양액 100ml(용기대 배양액량의 부피비 40%)에서 생육이 우수하게 나타났다. 플라스크 형태에 따른 공시균주의 생육결과를 보면 shake flask가 Erlenmeyer flask보다 건조 균체량이 높게 나타났다. 따라서 본 연구에서는 250ml의 진탕배양용 삼각플라스크에 배양액량을 100ml하여 목질진흠버섯균의 대량배양의 전 배양으로 사용하였다.

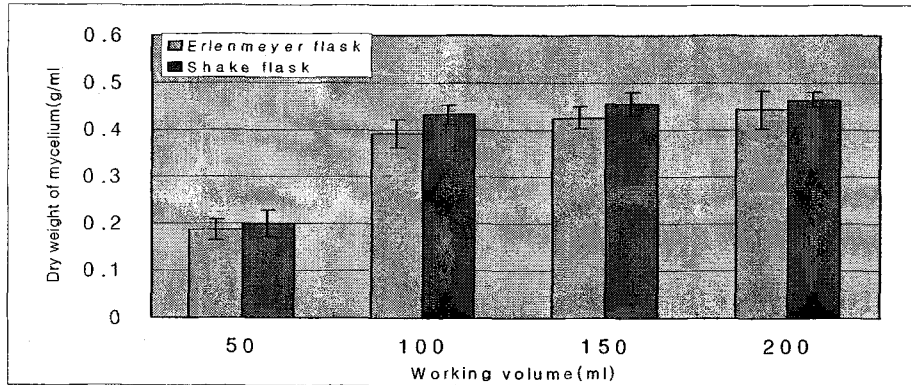


Fig. 14. Effect of working volume and different flask on the mycelial growth of PH-1, incubated at 25°C, 125rpm for 14days.

나) 접종량에 따른 균체 건조량 조사

- 접종원의 접종량 변화에 따른 균사체 증식을 조사하기 위하여 각각의 공시균주의 균사절편을 3~8개까지 한 개 간격으로 접종개수를 달리하여 삼각플라스크에서 배양한 결과, 접종량이 증가할수록 초기 균사체 생장은 좋지만 건조 균체량의 큰 증가는 보이지 않았다. 목질진흠버섯 공시균 모두 균사절편 6~7개절편을 접종하는 것이 삼각플라스크 배양에 적당한 것으로 나타났다.

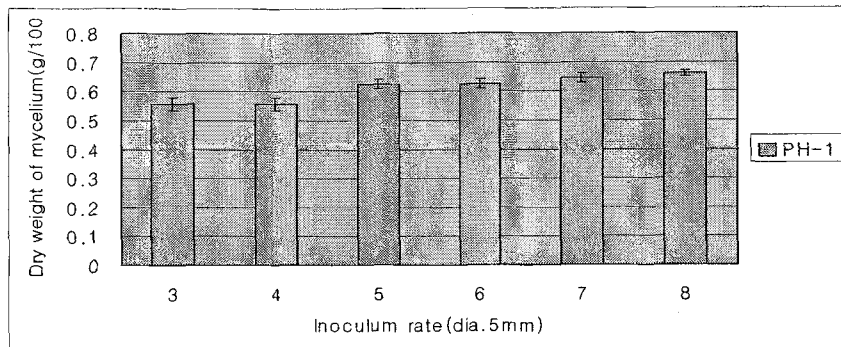


Fig. 15. Effect of inoculum rate on the mycelial growth of PH-1.

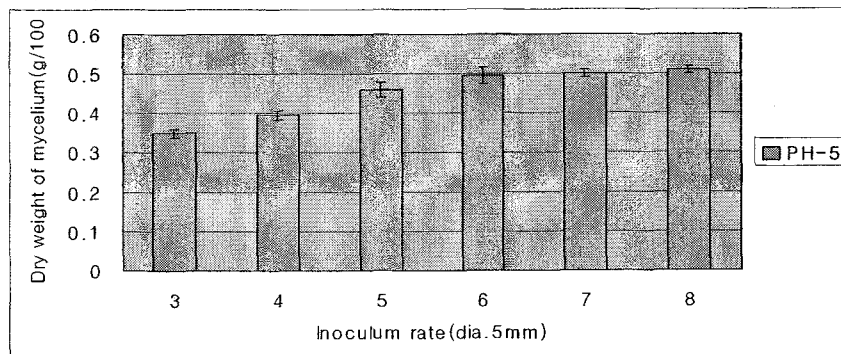


Fig. 16. Effect of inoculum rate on the mycelial growth of PH-5.

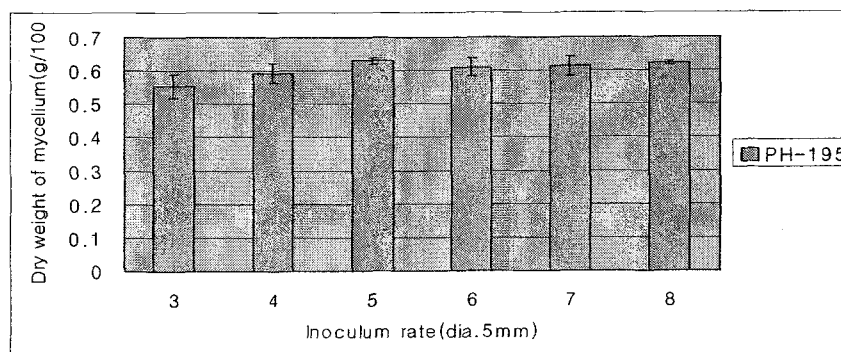


Fig. 17. Effect of inoculum rate on the mycelial growth of PH-195

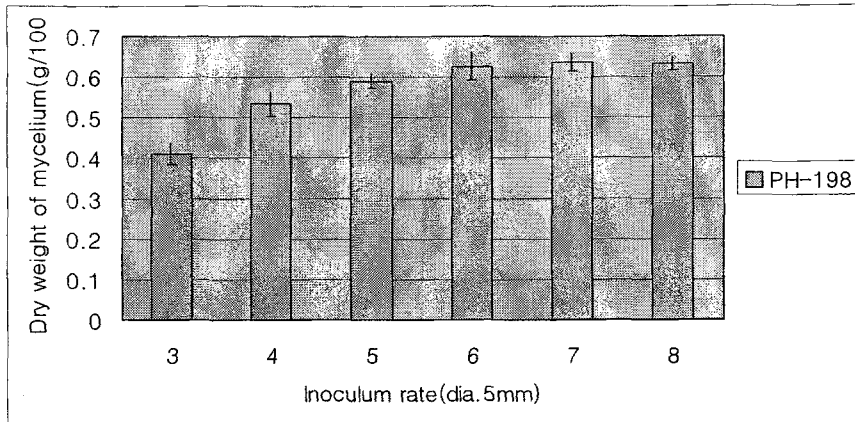


Fig. 18. Effect of inoculum rate on the mycelial growth of PH-198.

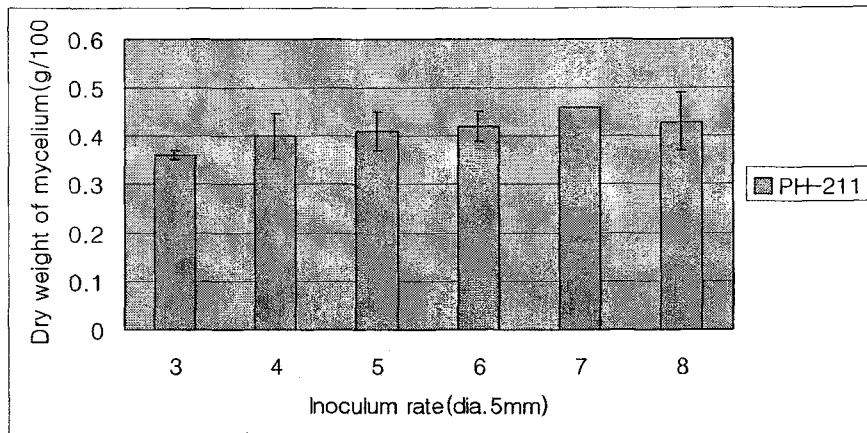


Fig. 19. Effect of inoculum rate on the mycelial growth of PH-211.

다) 배양기간에 따른 균체 건조량 조사

- 각 공시균주들의 삼각플라스크에서 액체배양 시 배양기간에 따른 균사생장을 조사한 결과, 접종 후 21일 이후에는 커다란 건조 균체량이 증가가 보이지 않았다. 목질진흠버섯균의 삼각플라스크 액체배양 시 배양기간은 0일에서 22일이 적당할 것으로 사료된다.

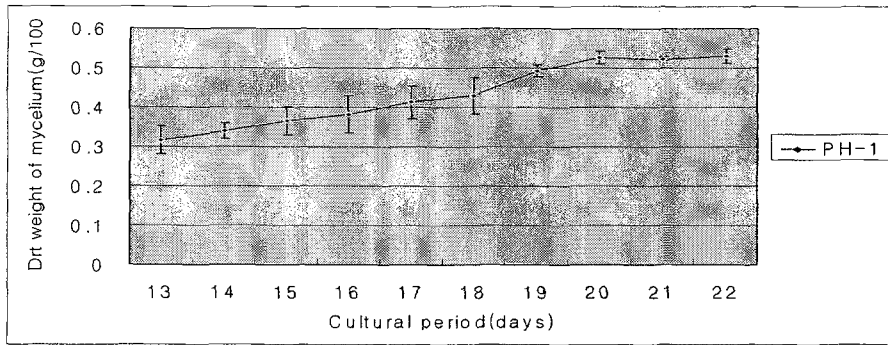


Fig. 20. Time course of mycelial growth of PH-1.

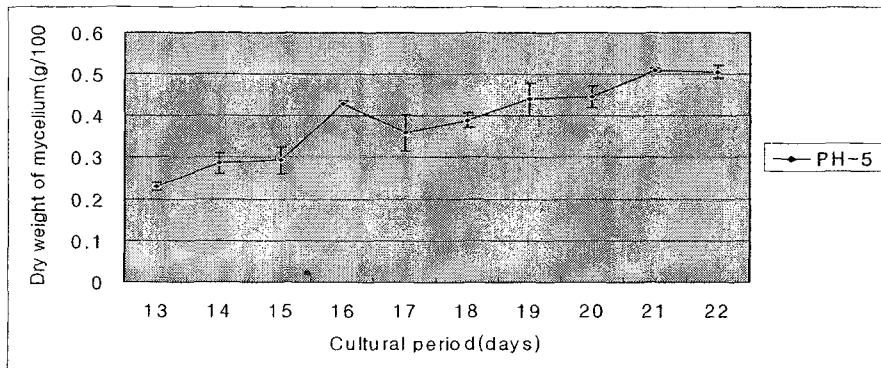


Fig. 21. Time course of mycelial growth of PH-5.

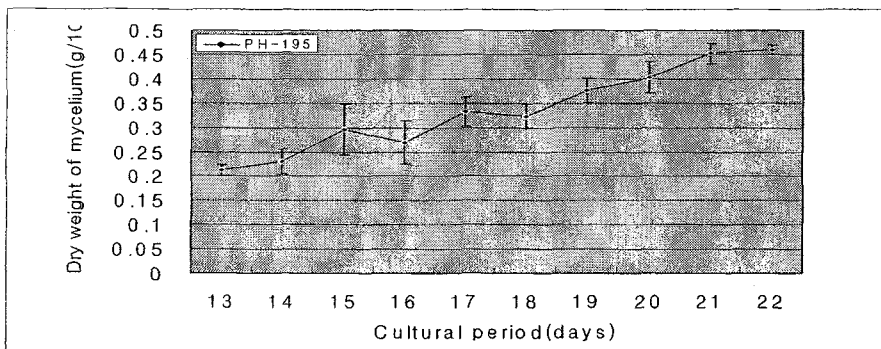


Fig. 22. Time course of mycelial growth of PH-195.

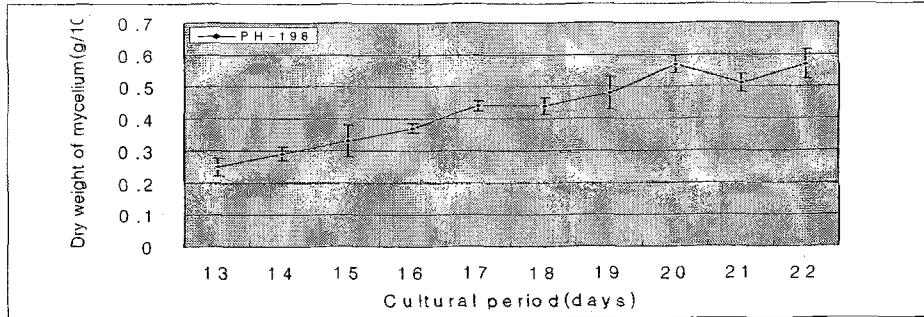


Fig. 23. Time course of mycelial growth of PH-198.

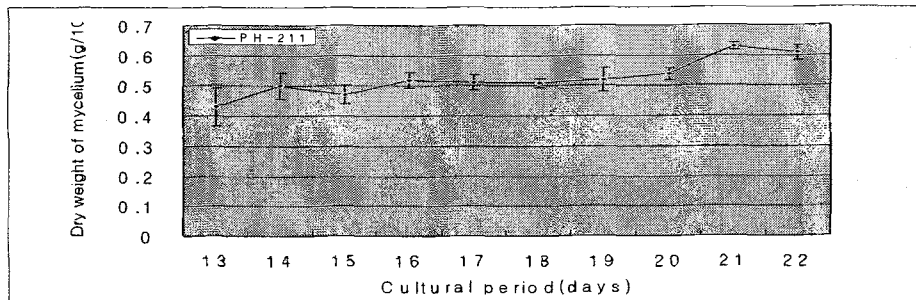


Fig. 24. Time course of mycelial growth of PH-211.

2) 대량(8ℓ)배양 환경 조사

- 대량배양 시 배양기간에 따른 공시균주의 생육을 알아보기 위하여 접종량은 100ml로 조절하고 통기량을(vvm : volume per volume & minutes)은 2vvm으로 배양하여 1일 간격으로 배양 중인 배양기를 회수하여 균체량을 조사하여 본 결과 12일 정도 되었을 때 균사 건중량이 높게 나타났고 그 이후에는 큰 증가량을 보이지 않았다.

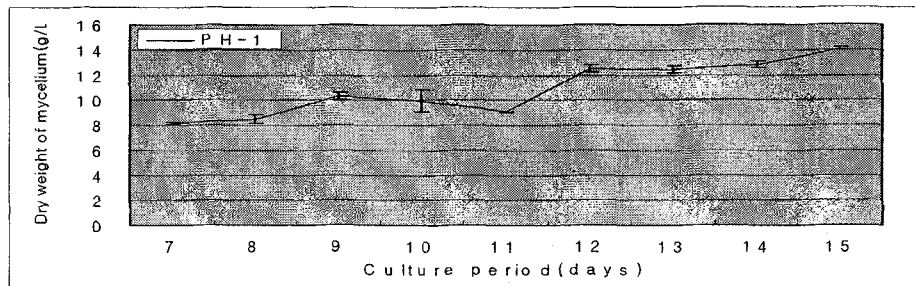


Fig. 25. Time course of mycelial growth of PH-1 at the mass culture.

3) 현미균사체 배양

-현미균사체에 적정 접종량을 조사하기 위하여 1000cc pp(polypropylene)병에 현미200g을 넣은 후 살균하여 접종량을 40ml, 60ml, 80ml, 100ml 달리하여 접종후 현미 균사체를 형성하여 비교해 본 결과 접종량을 100ml 하였을 때 균사생장이 가장 잘 되었다.

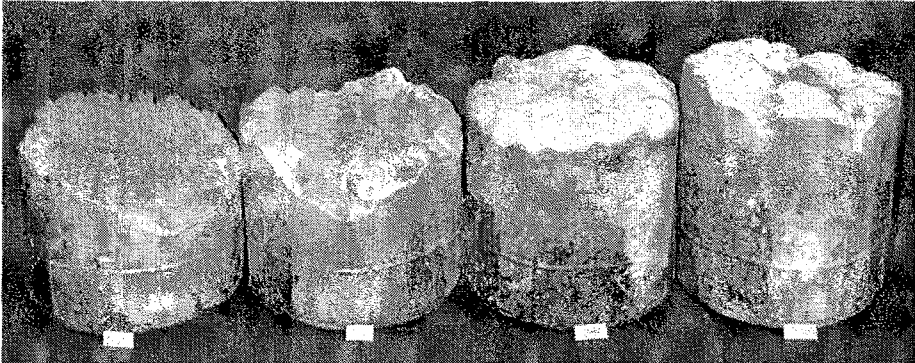


Fig. 26. Effect of inoculum rate on the mycelial growth of PH-1.

4) 원목자실체 형성

- 대량배양으로 만든 종균을 이용하여 원목에 접종 후 자실체를 형성해 보았다.



Fig. 27. Photograph of basidiocarp of PH-211.

2. 목질진흙버섯의 추출 및 분획물의 생리활성

가. 목질진흙버섯의 지방산 분석

▶ STANDARD

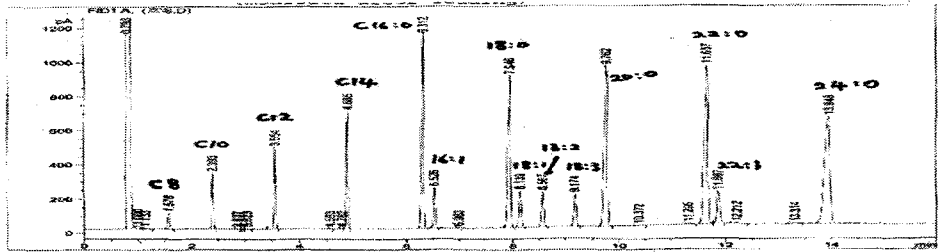


Figure 28. GC standard

▶ 목질진흙버섯의 Hexane 추출

hexane 추출에 의한 목질진흙버섯의 지방산 조성은 18:2 > 16:0 > 18:1 > 18:0 > 18:3 > 14:0의 순서로 특히 불포화 지방산의 함량이 높은 것으로 나타났으며, 필수 지방산인 18:2, 18:1 및 18:3 함량이 많았다. 따라서 인체에서 요구하는 필수지방산을 수급 하여주는 좋은 자원이다.

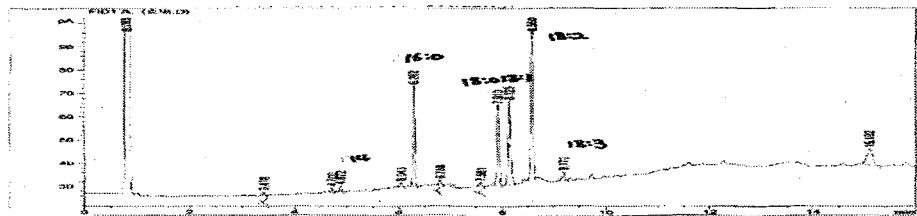


Figure 28. Gas chromatography for the analysis of fatty acid composition of *Phellinus linteus*

나. 목질진흙버섯 분획물의 추출양

목질진흙버섯을 메탄올 추출을 한 후에 다시 Polarity의 차이에 의해서 분획을 하여 다음과 같은 양을 얻었으며, 이 분획물에 대한 항산화 항암효과를 알아보았다.

Table 7. Yeild of *Phellinus linteus* extracts and fractions

		함량기준 (g)	추출용매 (L)	비율 시간	추출양 (g)	Yield (%)	Total Loss(%)	
PH-1 머쉬택 상품	MeOH 추출물	250	15 l	3	35.13	14.1	4.26%	
	MeOH 50g	Hexane		7.5 l	3	6.5		13
		Butanol		7.5 l	3	11.2		22.4
		EA		7.5 l	3	1.02		2.04
		Water		3 l	1	29.15		58.3

다. 추출용매 및 시간에 따른 HPLC Pattern 비교

천연물에 관련된 많은 논문을 본 결과 추출시간이 모두 다른 것을 알 수가 있었다. 이에 관련되어 추출시간에 따라 생리활성 물질의 추출 정도를 확인한 결과 시간에 따라 큰 차이는 없었으며, 3시간 추출을 하여도 무관한 것을 알 수있었으며, 또한 항산화능에도 큰 변화가 없었다. PH-1균주의 분획물과 목질진흠버섯 균주별로 항산화능을 실험한 결과 분획물중 Butanol 이 항산화능이 가장 좋았으며, PH-5번과 PH-32균주가 효과가 가장 좋은 것을 알 수가 있었다.

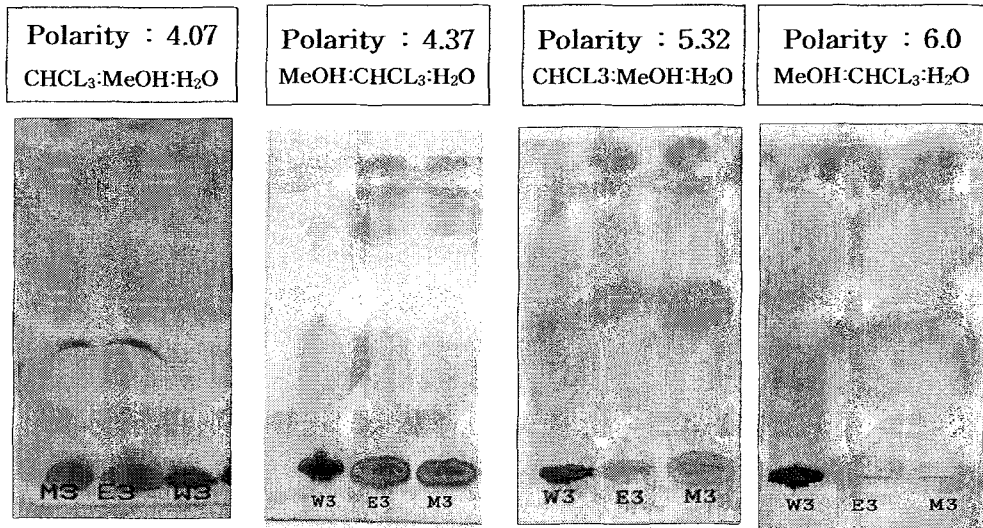


Fig. 29. TLC pattern of *Phellinus linteus* extract after an interval of three time

라. 추출용매 따른 추출물의 TLC Pattern 비교

추출용매에 따라서 추출되는 물질의 차이를 알아본 결과 HPLC상과 거의 마찬가지로 MeOH와 EtOH의 추출물은 큰 변화를 볼 수가 없었지만 water 추출물의 경우에 있어서는 유기용매 추출물과 큰 차이를 볼 수가 있었다.

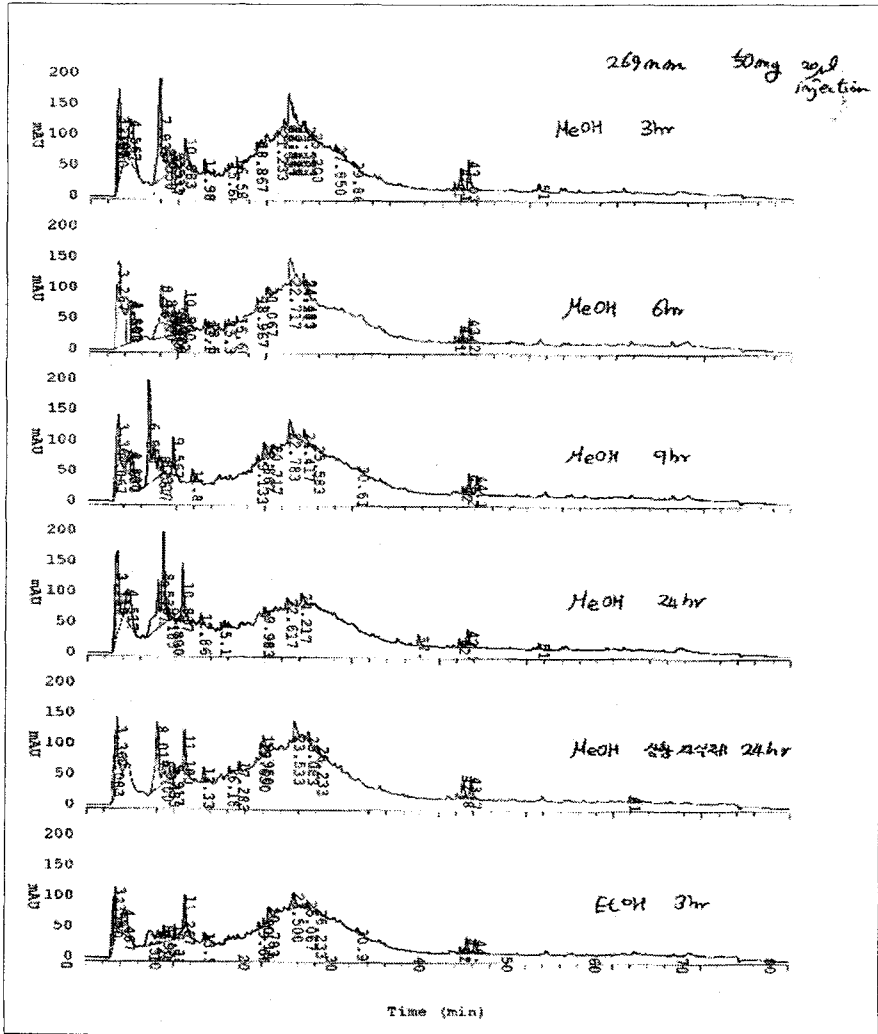


Fig .30. HPLC pattern of *Phellinus linteus* extract after an interval of three times and other solvent

마. 목질진흙버섯의 단백질 조사

▶ Standard (1mg/ml BSA를 이용하였다)

균주별 및 재배방법에 의해서 생산된 목질진흙버섯의 물추출물에서 단백질의 함량을 비교하였을 경우 오리나무, 참나무, 현미재배에서는 별 차이가 없었지만, 자연산 목질진흙버섯의 경우는 단백질의 함량이 낮을 것을 볼 수가 있었다. 또한 PH1균주를 대량생산한 머쉬택과 PH1과 비교하였을 경우 단백질의 변화가 없는 것을 볼 수가 있었다.

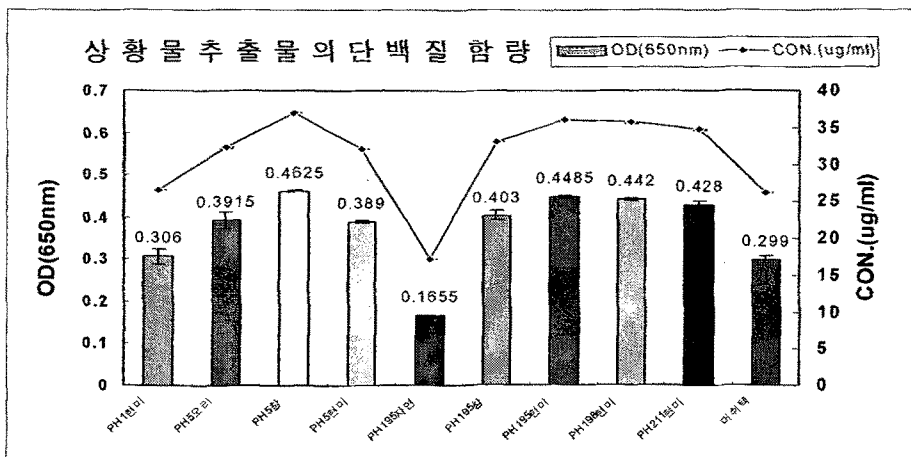
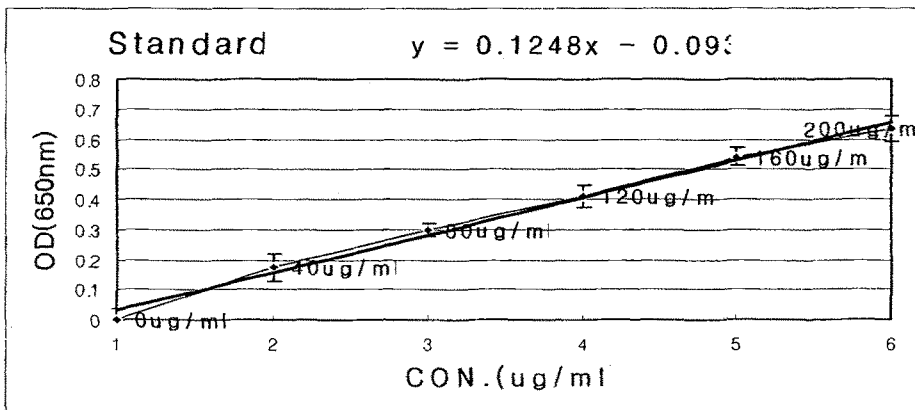


Fig. 31. Comparison of protein concentration of *Phellinus* species

바. 분획추출법에 의해 얻어진 상향 추출물의 효과

1) 분획추출물들의 항산화 효과

목질진흙버섯의 분획추출물들의 항산화 효과를 비교하였을 경우 Butanol이 가장 좋았으며, 그외의 추출물은 거의 유사하였다. 따라서 추출물에서 정제작업을 행할 경우에 있어서 Butanol분획이 가장 좋은 것을 알 수가 있었다.

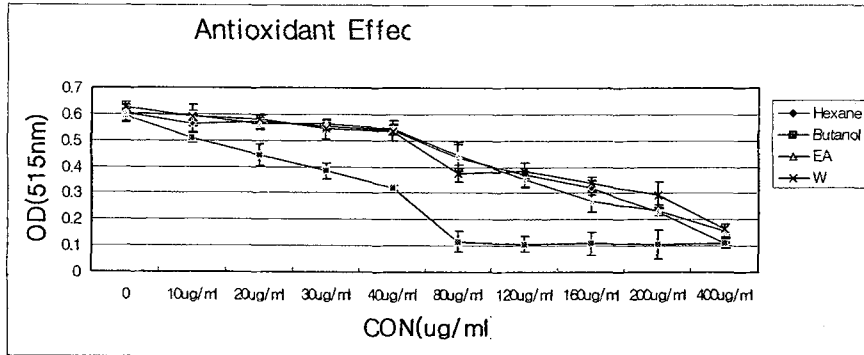
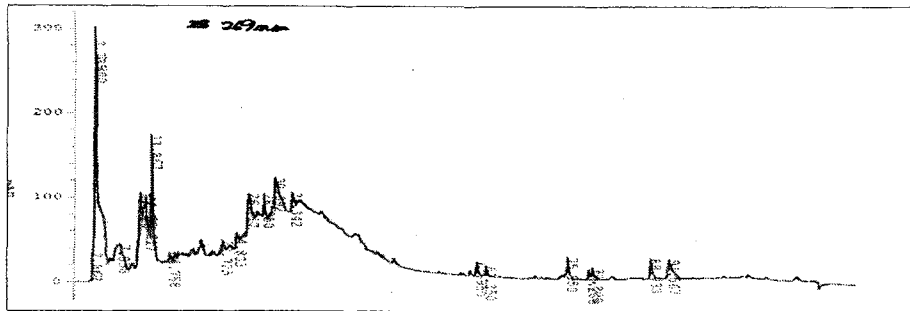


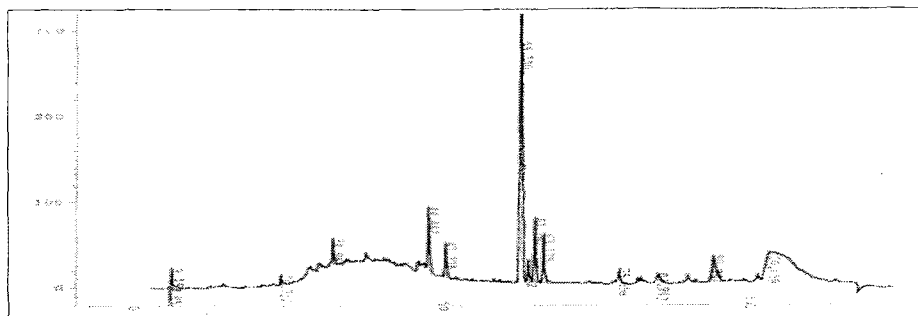
Fig. 32. Radical scavenging effects of cultured mycelia *Phellinus linteus* fractions

2) 균주에 따른 MeOH 추출물에 따른 HPLC Pattern 비교

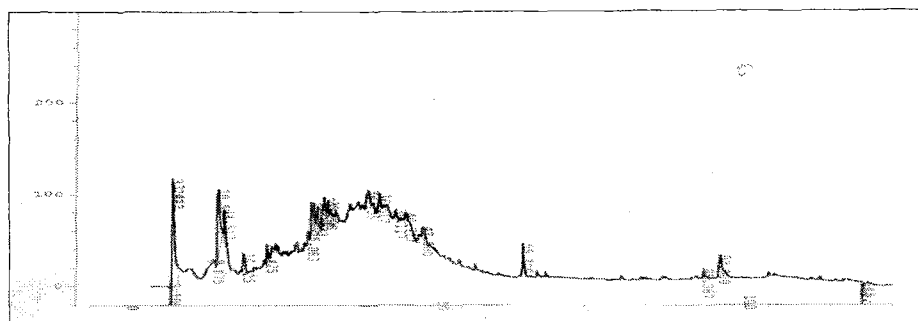
파쇄된 목질진흙버섯 가루를 75°C에서 MeOH 추출을 한 후에, evaporation을 통해서 고형화로 만들었다. 그런 다음에 20mg/ml의 농도로 하여 20 μ l injection하여 269nm(당), 280nm(단백질), 385nm(목질진흙버섯 색소)의 3파장을 HPLC로 분석하였다.



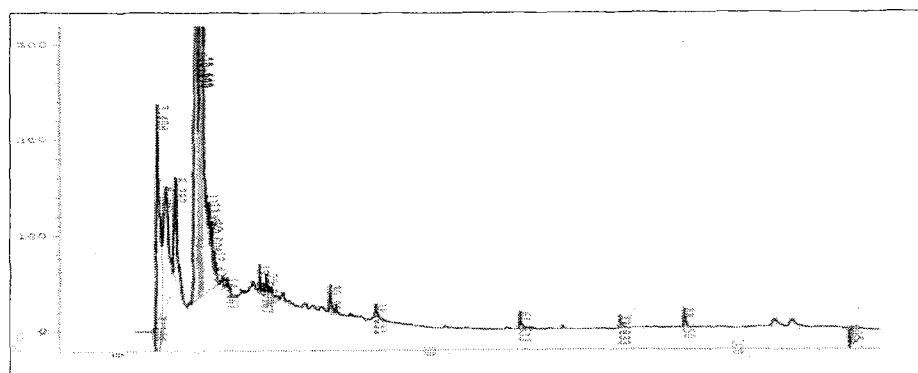
MeOH 추출물의 당 분포(269nm)



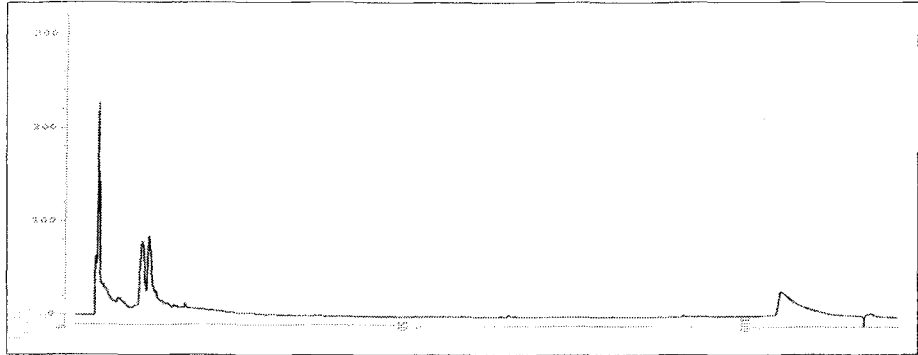
MeOH 추출물의 Hexane 분획물(269nm)



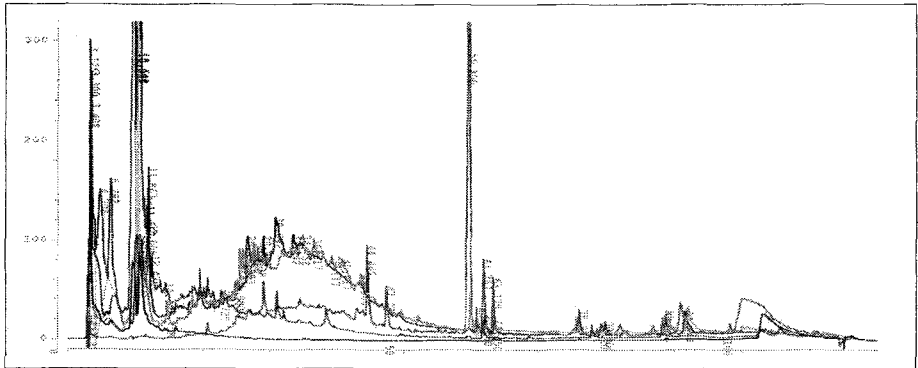
MeOH 추출물의 Butanol 분획물(269nm)



MeOH 추출물의 EA 분획물(269nm)



MeOH 추출물의 Water 분획물(269nm)



분획추출물의 당분포

(파란색: MeOH, 빨간색: Hexane, 연두색: Butanol, 분홍색: EA, 보라색: Water)

Fig. 33. Comparison of HPLC pattern of *Phellinus lineteus* fractions

위에서 보는 바와 같이 가온추출한 MeOH 분획물을 다시 non-polar에서 polar로 분획추출하였을 경우 각각의 성분들이 극성에 따라서 분획되는 것을 알 수가 있었으며 특히 Butanol층은 색소를 가장 많이 함유하고 있는 것을 볼 수가 있었다. 또한 앞에서 진행된 실험결과를 보면 Butanol이 제일 좋은 항산화 효과가 있었다.

3) 목질진흙버섯 분획물의 TLC Pattern 비교

분획추출물들의 TLC상에서의 추출분획이 잘되었는지와 갖기 다른 생리활성 물질을 함유하고 있다는 것을 알 수가 있었다. 또한 정제 작업에서 사용될 butanol층의 가장 적합한 전개용매 방식은 MeOH : CHCl₃ : H₂O의 비율을 64 : 14 : 1.2로 Polarity는 약 4.37로 detection하는 것이 가장 좋은 것을 알 수가 있었다. (Fig. 19.)

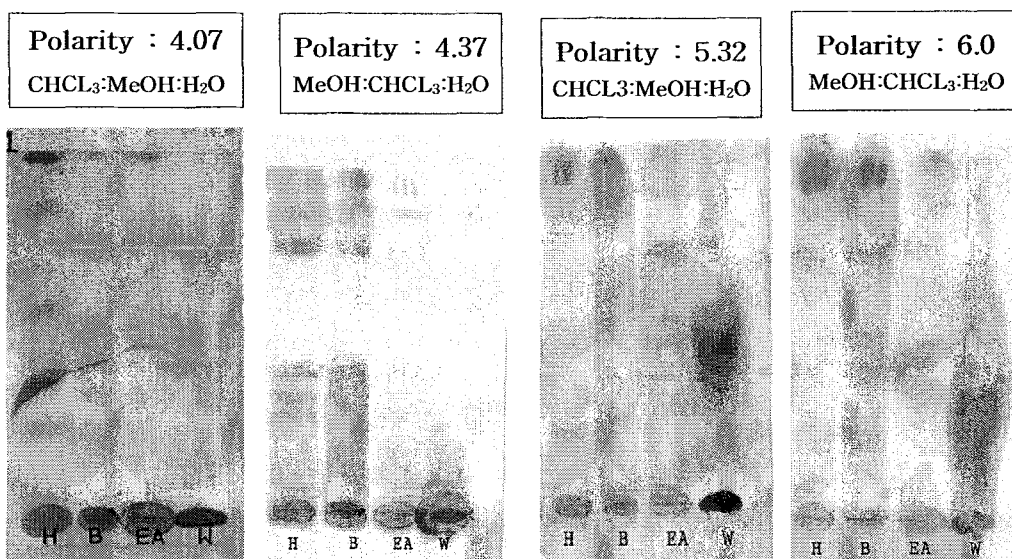


Fig. 34. Comparison of TLC pattern for *Phellinus linteus* fractios

사. 균주별 기초생화학적인 특징 조사

1) 균주에 따른 MeOH 추출물의 항산화 효과

균주별 DPPH 방법에 의해서 항산화능을 비교하였을 경우 자연산 목질진흙버섯인 PH-195균주가 제일 좋았으며, 그 뒤로 PH-5, PH-195, PH-1, PH-198, 바우미 일종인 PH-211이 제일 안 좋은 효과를 보였다. 따라서 PH-5번 균주를 이용해서 대량생산화를 시도하는 것이 가장 좋을 것이다. (Fig. 20.)

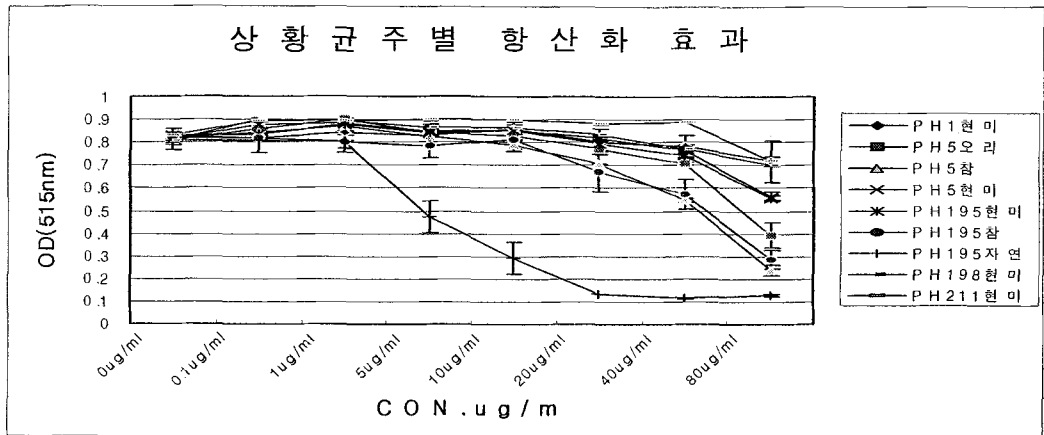
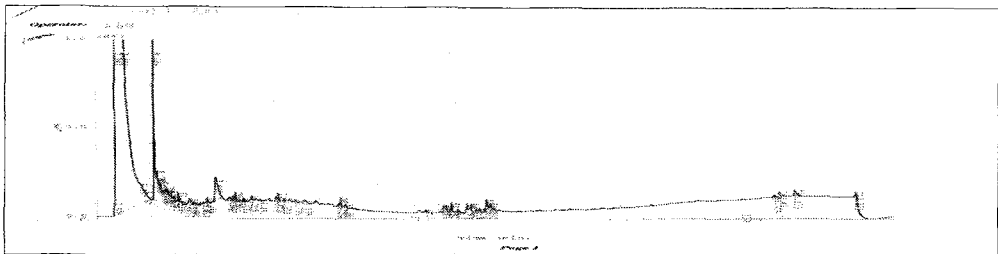
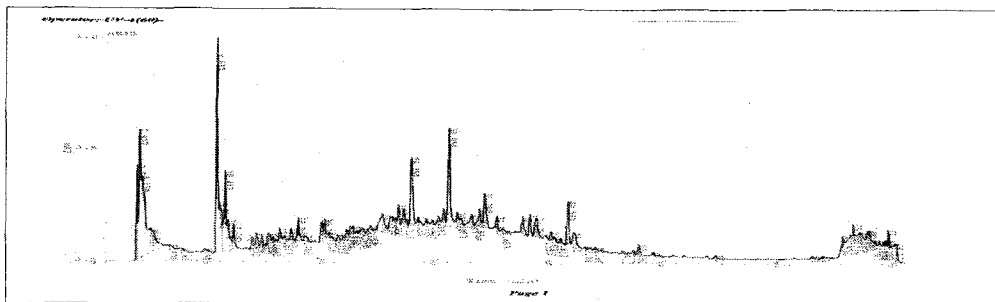


Fig. 35. Comparison of radical scavenging effects of cultured mycelia *Phellinus linteus* spaces

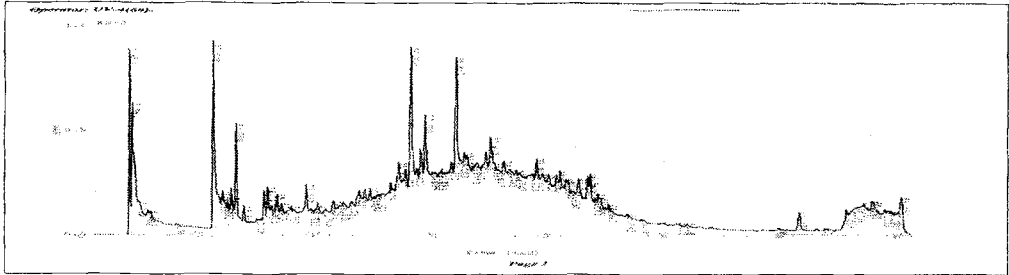
▶ 균주에 따른 MeOH 추출물에 따른 HPLC Pattern 비교



현미에서 재배된 PH-1추출물의 269nm



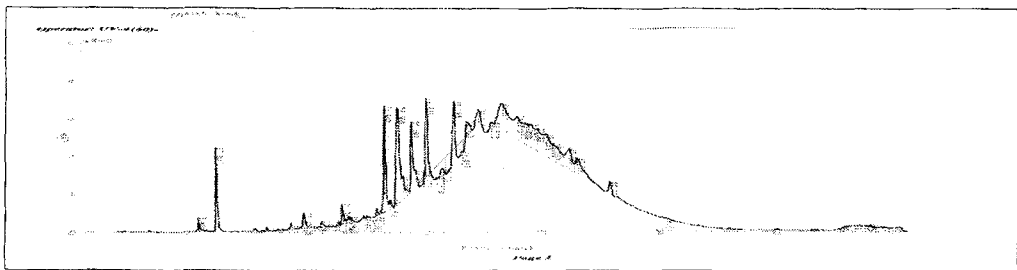
오리나무에서 재배된 PH-5추출물의 269nm



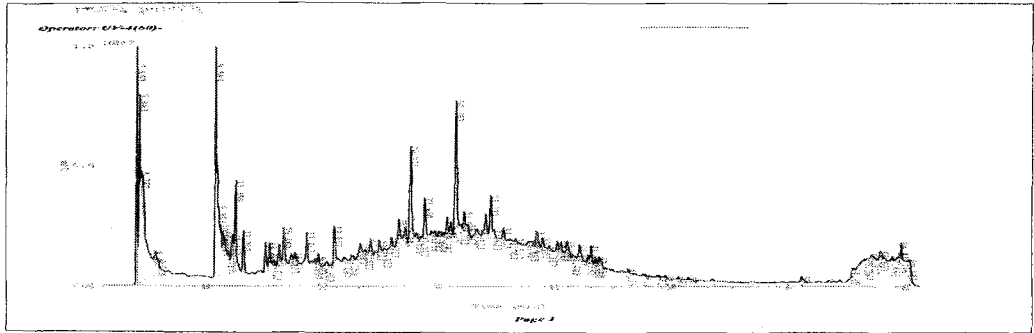
참나무에서 재배된 PH-5추출물의 269nm



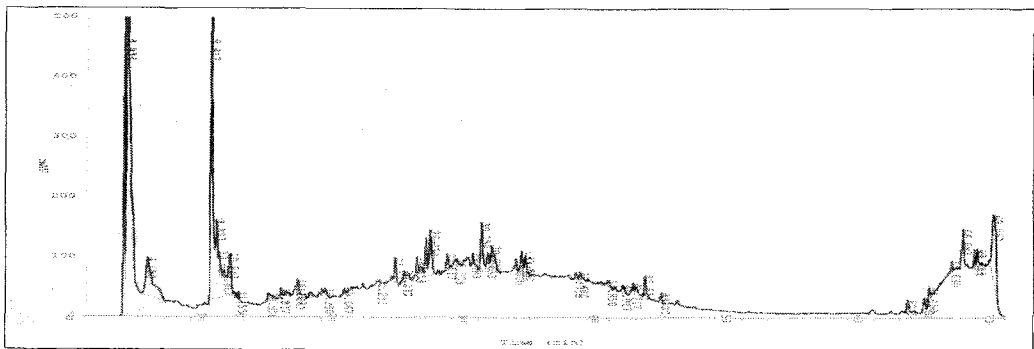
현미에서 재배된 PH-5추출물의 269nm



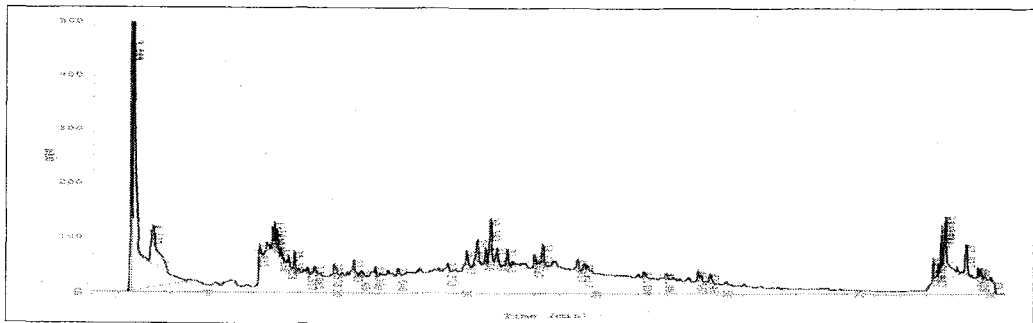
자연산 PH-195추출물의 269nm



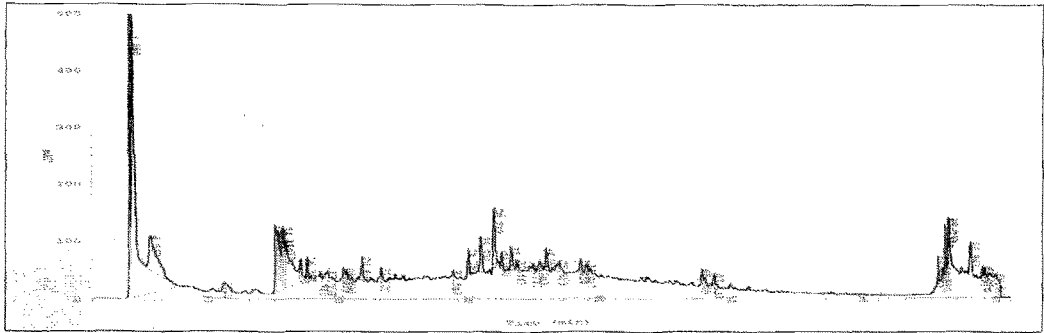
참나무에서 재배된 PH-195추출물의 269nm



현미에서 재배된 PH-195추출물의 269nm



현미에서 재배된 PH-198추출물의 269nm



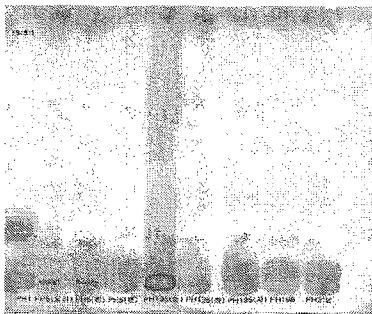
현미에서 재배된 PH-211추출물의 269nm

Fig. 36. Comparison of HPLC pattern for cultured mycelia *Phellinus linteus spaces*

2) 균주에 따른 MeOH 추출물의 TLC Pattern 비교

HPLC의 경우에는 자연산 목질진흙버섯인 PH-195은 다른 목질진흙버섯 균주들과 많은 차이를 보였지만, TLC상에는 특히 현미로 재배된 목질진흙버섯인 PH-195은 다른 목질진흙버섯 균주들 보다는 노란색을 가진 물질이 가장 많이 함유하고 있음을 알 수가 있었다. 따라서 균주의 재배 형태나 균주에 따라서 생성되는 물질을 비롯한 생리활성 물질이 형성되는 것이 다르다는 것을 HPLC와 TLC로 알 수가 있었다. (Fig. 22)

Polarity : 5.16
CHCL₃ : MeOH : H₂O



Polarity : 4.37
CHCL₃ : MeOH : H₂O

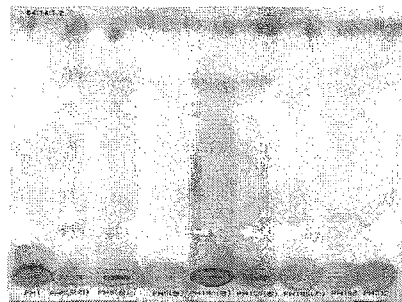


Fig. 37. Comparison of TLC pattern

for cultured mycelia *Phellinus linteus* spaces

아. 목질진흙버섯의 항산화 효과

본 실험에서 이용한 DPPH(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl)의 hydrazyl은 질소원자가 불안정한 상태에 있으므로 쉽게 수소원자를 받아들이는 성질을 가지고 있어 항산화성 물질과 반응하여 수소원자를 받아들임으로써 자체의 정색성을 잃는다. 이러한 성질을 이용하여 배양목질진흙버섯 자실체의 항산화능의 정도를 측정하고, activity guided fractionation 방법에 따라 그 활성성분을 추적하는데 이용하였다. 이 방법을 통해서 균주별로 인공재배된 목질진흙버섯 균주와 PH-1번 균주의 분획에 대한 항산화능의 정도를 DPPH에 대한 전자공여능 (electron donating ability, EDA %)으로 측정한 결과와 시료 무첨가의 control (0.1 mM DPPH 용액 1.9 ml)을 50% 환원시키는데 필요한 시료의 농도 (IC₅₀)를 측정한 결과는 다음과 같다. 목질진흙버섯을 추출용매에 따라서 그리고 시간에 따라 그 활성물질의 함유정도를 간접적으로 알아보기 위해서 다음과 같이 실험을 하였을 경우 매탄을 추출물이 가장 좋은 효과를 보였으며, 3시간 정도 추출하는 것이 좋기 때문에 모든 추출용매는 매탄을 3시간으로 하였다.

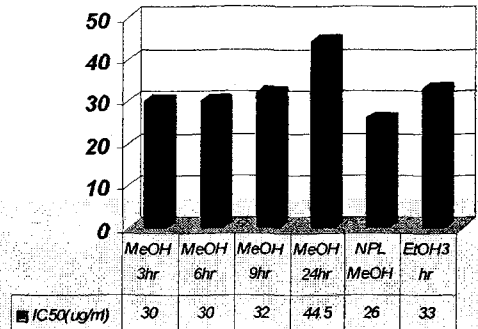
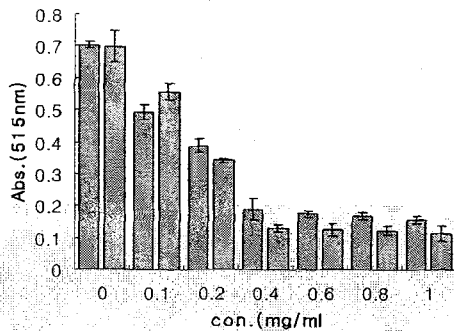


Fig. 38 Comparison of radical scavenging effects of cultured mycelia CPL extracted at time interval.

IC₅₀* :The value indicated of 50% decrease of DPPH radical at 515nm and are mean triplicate data.

NPL MeOH 24hr > CPL MeOH3hr = CPL MeOH6hr > CPL MeOH9hr

≒EtOH3hr > CPL MeOH24hr > Water3hr > Water24hr

1) 추출용매와 시간에 따른 추출물의 분포 및 항산화 효과

MeOH의 추출물의 시간에 따라 추출을 하였을 경우 항산화능에 대한 변화를 알아본 결과 큰 차이를 보이지 않았으나, HPLC를 통한 추출물의 pattern를 비교하였을 경우는 추출 시간이 길어질수록 구조변화가 일어나는 것을 알 수가 있었다. (Fig. 13.)

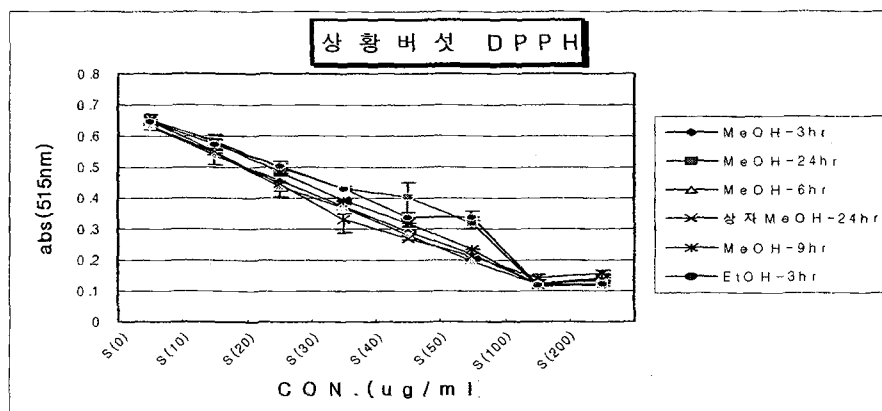
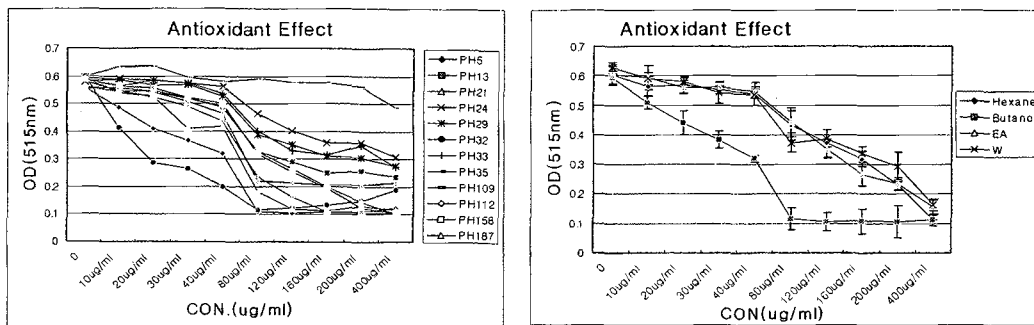


Figure 39. Comparison of radical scavenging effects of cultured mycelia *Phellinus linteus* after an interval of three time

2) 균주별 그리고 분획물의 항산화 효과

PH-1균주의 분획물과 목질진흠버섯 균주별로 항산화능을 실험한 결과 분획물중 Butanol 이 항산화능이 가장 좋았으며, PH-5번과 PH-32균주가 효과가 가장 좋은 것을 알 수가 있었다.

	Hexane Frac.	Butanol Frac.	EA Frac	WaterFAC.
IC50* (ug/ml)	140	35	120	150



Sample		IC50*
Isolate number	species	(ug/ml)
PH-05	<i>Phellinus spp.</i>	35
PH-13	<i>Phellinus spp.</i>	80
PH-21	<i>Phellinus spp.</i>	61
PH-24	<i>Phellinus spp.</i>	111
PH-29	<i>Phellinus spp.</i>	125
PH-32	<i>Phellinus spp.</i>	15
PH-33	<i>Phellinus spp.</i>	>400
PH-35	<i>Phellinus spp.</i>	291
PH-109	<i>Phellinus spp.</i>	60
PH-112	<i>Phellinus spp.</i>	79
PH-158	<i>Phellinus spp.</i>	79
PH-187	<i>Phellinus spp.</i>	55

Fig. 40 Comparison of radical scavenging effects of cultured mycelia *Phellinus spp.* and CPL fraction

IC50* :The value indicated of 50% decrease of DPPH radical at 515nm and are mean triplicate data.

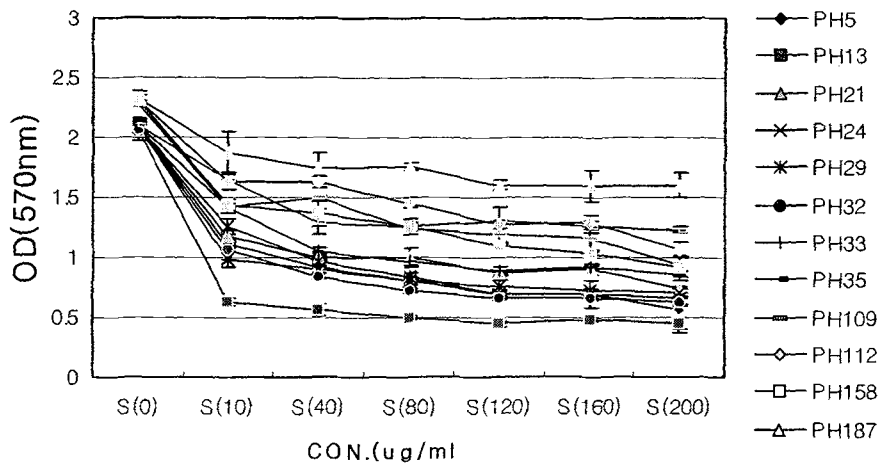
자. 목질진흙버섯의 항암효과

목질진흙버섯의 분획이나, 정제된 물질을 DMSO 에 녹여, DMEM이나 RPMI1640 medium으로 희석하여 최종농도가 5, 10, 50, 100, 200ug/ml이 되게 만든다. 세포의 증식억제 실험을 하기 위해 부착성 세포주 및 비부착성 세포주일 96-well plate에 1×10^4 cells/well 이 되도록 배양한다. 1일 후, 0.5% medium으로 24시간 동안 starvation시킨 후에 sample을 첨가하고 1일,2일,3일 후 3mg/ml MTT 시약(pH 7.4 PBS에 용해)을 주입한 후 3시간 동안 37°C에서 방치 후 이소프로판올로(100ul) 세포를 용해시킨 후 세포의 증식 억제정도를 570nm에서 ELISA로 확인하였다. 항암 활성은 다음 과 같은 방식으로 계산하였다:

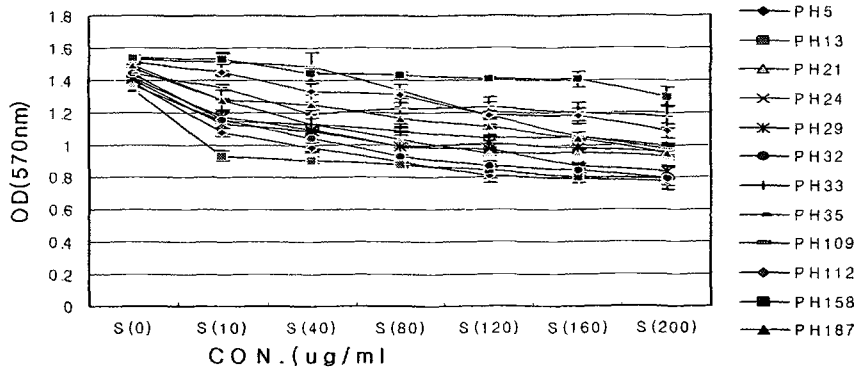
$$\text{항암(\%)} = 100 * \text{OD}_{570} \text{ of test} / \text{OD}_{570} \text{ of control.}$$

이와같은 방법으로 균주별 목질진흙버섯의 항암효과를 실험한 결과 다른 암세포에 비해서 전립선암에 효과가 좋은 것으로 나타났으며, 그 중에서 PH-13 > PH-32 > PH-5이 효과가 좋은 것으로 나타났다.

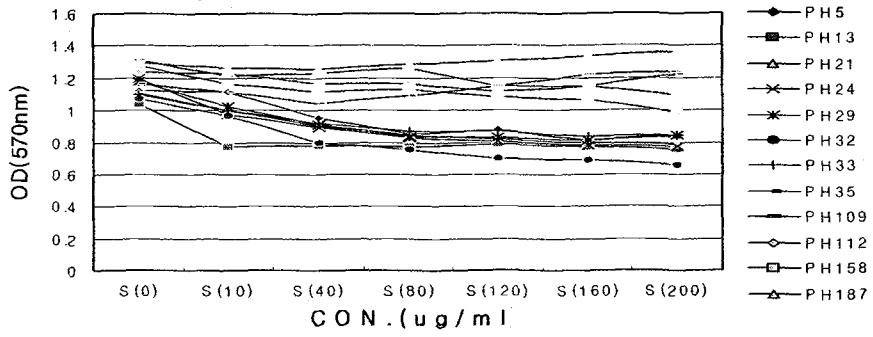
DU145(proatate carcinoma)



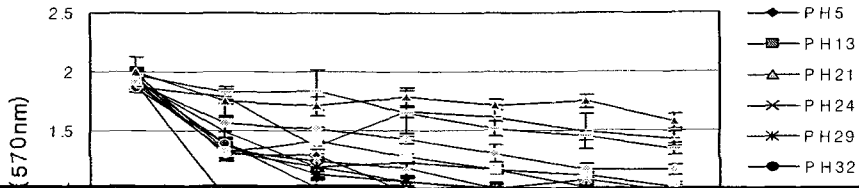
Hela(certex carcinoma, cervix)



A549(lung carcinoma)



SK-OV3(adenocarcinoma)



Sample			Sample		
Isolate number	species	IC50* (ug/ml)	Isolate number	species	IC50* (ug/ml)
PH-05	<i>Phellinus spp.</i>	53.5	PH-158	<i>Phellinus spp.</i>	92.4
PH-5 Alder	<i>Phellinus spp.</i>	76.1	PH-187	<i>Phellinus spp.</i>	57.8
PH-5 Oak	<i>Phellinus spp.</i>	72.3	PH-195	<i>Phellinus spp.</i>	>200
PH-13	<i>Phellinus spp.</i>	12.4	PH-195 Oak	<i>Phellinus spp.</i>	75.4
PH-21	<i>Phellinus spp.</i>	158.1	NPL PH- 198*	<i>Phellinus spp.</i>	36.2
PH-24	<i>Phellinus spp.</i>	83.1	PH-198	<i>Phellinus spp.</i>	>200
PH-29	<i>Phellinus spp.</i>	92.8	PH-211	<i>Phellinus baumi</i>	>200
PH-32	<i>Phellinus spp.</i>	47.8	CPL Fraction		
PH-33	<i>Phellinus spp.</i>	128.9	Hexane Fraction		21.2
PH-35	<i>Phellinus spp.</i>	149.8	Butanol Fraction		24.5
PH-109	<i>Phellinus spp.</i>	52.8	Ethylacetate Fraction.		114.3
PH-112	<i>Phellinus spp.</i>	63.2	Water Fraction.		>200

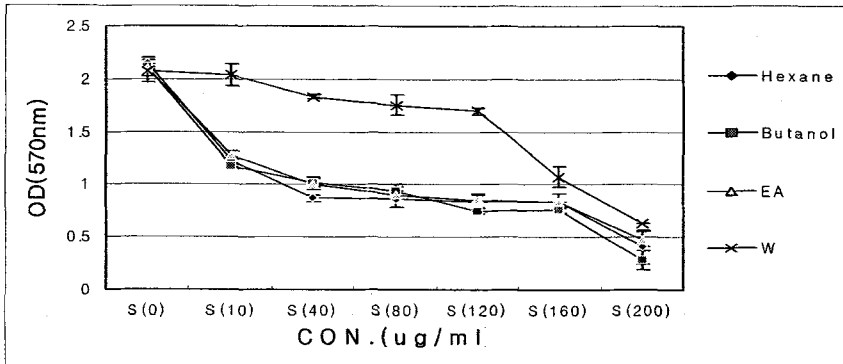
Fig 41 Anticancer effect of *Phellinus spp.* on cancer cell line.

피부암세포인 B₁₆F₁₀ cell에 대한 균주별 항암효과를 통해서 우수 균주의 선발 실험을 한 결과 PH-13, PH-198, PH-32, PH-109와 PH-05균주가 다른 균주에 비해서 생리활성이 높은 것을 알 수가 있었다.

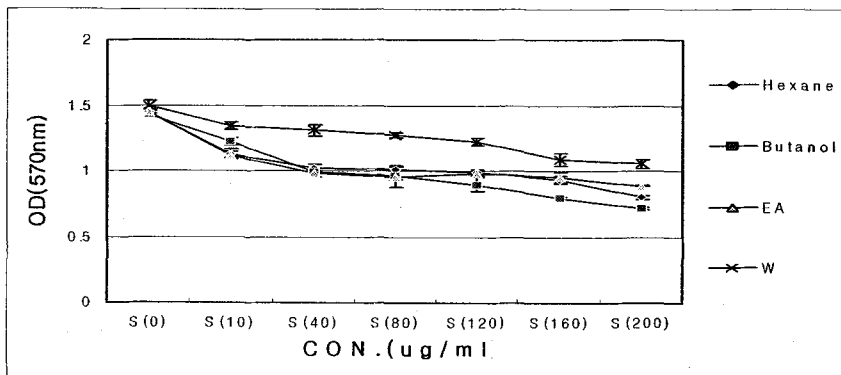
Table 8 Comparison of anticancer effects of cultured mycelia *Phellinus spp.* and CPL fraction

PH-1번 목질진흙버섯의 분획물에 대한 항암효과를 실험한 결과 Butanol Fraction이 가장 좋은 효과를 보였다. 이에 항암물질의 정제작업에는 Butanol분획물을 이용하여 여러 가지 컬럼을 이용하여 생리활성 물질을 정제하려한다.

DU145(proatate carcinoma)



Hela(certex carcinoma, cervix)



SK-OV3(adenocarcinoma)

A549(lung carcinoma)

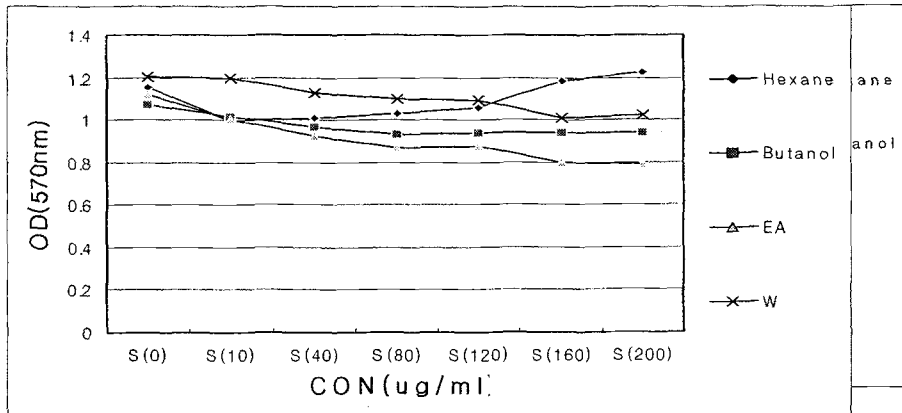


Fig. 42 Anticancer effect of CPL fractions on MTT assay on cancer cell line.

DU145(prostate carcinoma), A549(lung carcinoma), Hela(cervix carcinoma, cervix), SK-OV3(adenocarcinoma),

목질진흙버섯의 분획물인 Butanol Fraction은 정상세포인 NIH3T3와 CHO-K1 cell에는 세포손상을 주지않고 특이적으로 암세포에만 사멸효과가 있는 것으로 나타났으며, 또한 여러 암세포 중에서 피부암세포(B₁₆F₁₀)와 전립선암 (Du145)에 효과가 좋은 것을 알 수가 있었다.

Table 9. Antiproliferative activity CPL butanol fraction on various cancer cell lines

Cell lines	Cancer cell lines						Normal cells	
	B ₁₆ F ₁₀	Hela	SK-OV3	Hep-G2	Du145	A549	NIH3T3	CHO-K1
IC50 (48hr)	24	180	>200	>200	40	>200	>200	>200
IC50 (72hr)	12	--	>200	--	8	>200	>200	>200

카. 목질진흙버섯의 항암증효과

일반적으로 외부감염 상황에서 LPS 및 여러 가지 면역 유발 물질에 의해 대식세포의 활성화가 진행되게 된다. 이때 대식세포에서 분비되는 prostaglandin, NO 및 cytokine을 통하여 1차적인 면역작용이 일어나게 된다. 그러나 이러한 1차적인 면역작용은 외부 항원에만 영향을 주는 것이 아니라 생체 자신 또한 손상을 받게 되는데, 이러한 단점을 보완하기 위하여 생체는 좀더 항원에 특이적인 2차적인 면역반응이 일어나게 된다. 그러나 종종 1차적인 면역작용이 지속되게 되는 경우가 생기는데 이러한 것을 염증이라한다(inflammation).

본 실험에서는 목질진흠버섯의 항염증 효과를 확인하기 위하여 LPS 및 IFN γ 를 목질진흠버섯 분획물과 함께 처리하였을 때 감소되는 염증인자(NO)를 측정하였다. 또한 좀더 확실한 결과를 얻기 위해 활성이 강한 분획 및 단일물질에 한해 NO생성효소인 iNOS, PGE2생성효소인 COX-2의 발현양 또한 확인하였다. 실험 결과는 다음과 같다.

최초 5가지 분획(메탄올, 헥산, 부탄올, 에틸아세테이트, 물) RAW264.7 세포에 처리하였을 때 NO부산물인 nitrite를 측정하였을 때 부탄올 헥산 분획물이 가장 효과있는 것을 확인하였다. 이 때 부탄올 분획물의 항염증 효과를 좀 더 자세히 세포신호전달 과정을 Screening 하였다. 염증 유발 인자인 LPS를 처리하였을 경우 I κ B의 인산화를 억제함으로써 NF κ B의 활성을 억제함으로써 NO 생성 단백질은 INOS를 억제함을 알 수가 있었으며, IFN의 경우에 있어서는 추출물 및 분획물에 대한 염증 유발 인자의 억제는 효과가 없었다. 이에 부탄올 분획물은 LPS에서 유도되는 대식세포의 활성화를 억제함을 알 수가 있었다.

또한 다음으로 1차실리카겔 크로마토그래피를 통하여 얻은 분획을 같은 실험을 통하여 각 분획의 항염 활성을 확인하였으며, 계속적으로 정제실험을 진행하였다.

Signaling by lipopolysaccharide (LPS)

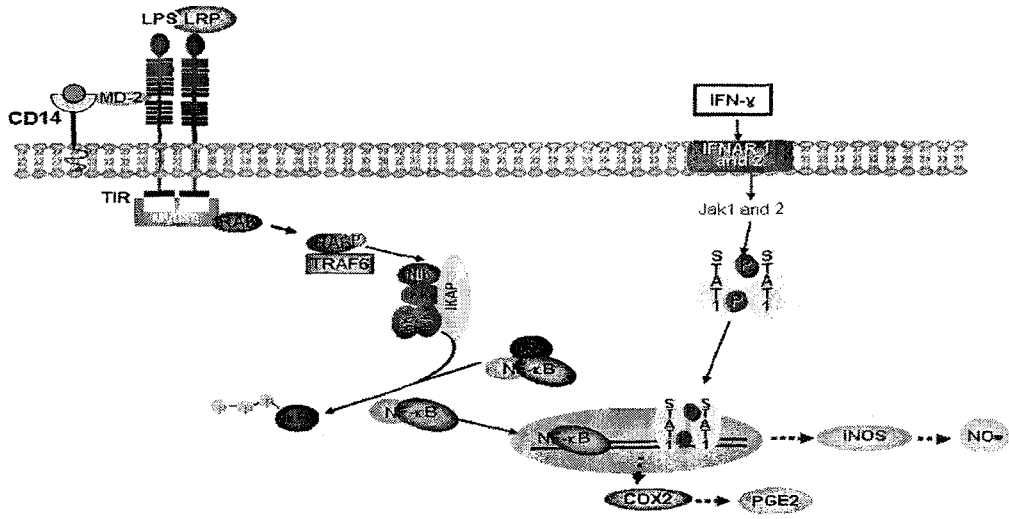


Fig. 43 Comparison of inflammation pathway of LPS or IFN induction macrophage

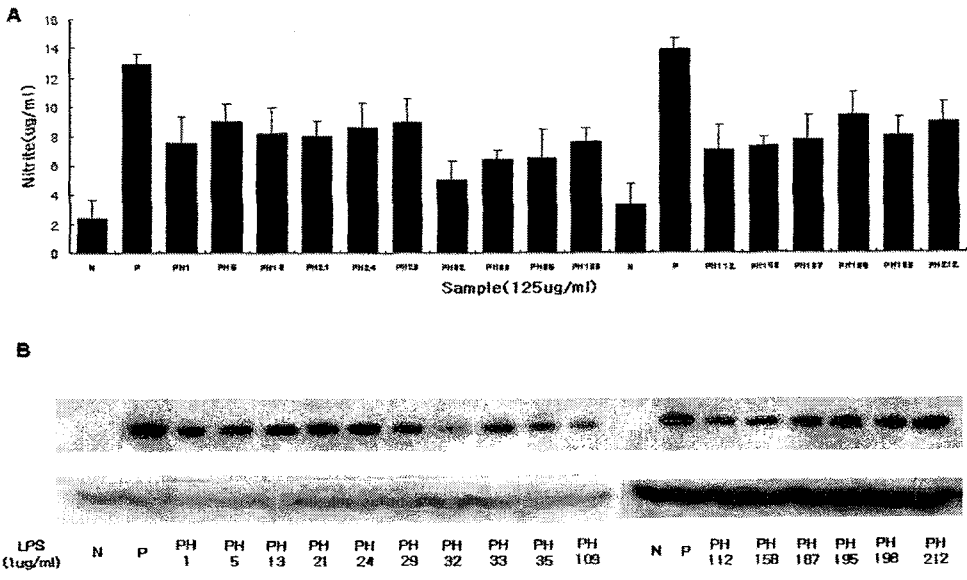


Fig 44. Inhibition of NO generation and iNOS protein expression of Cultured of *Phellinus* spp.

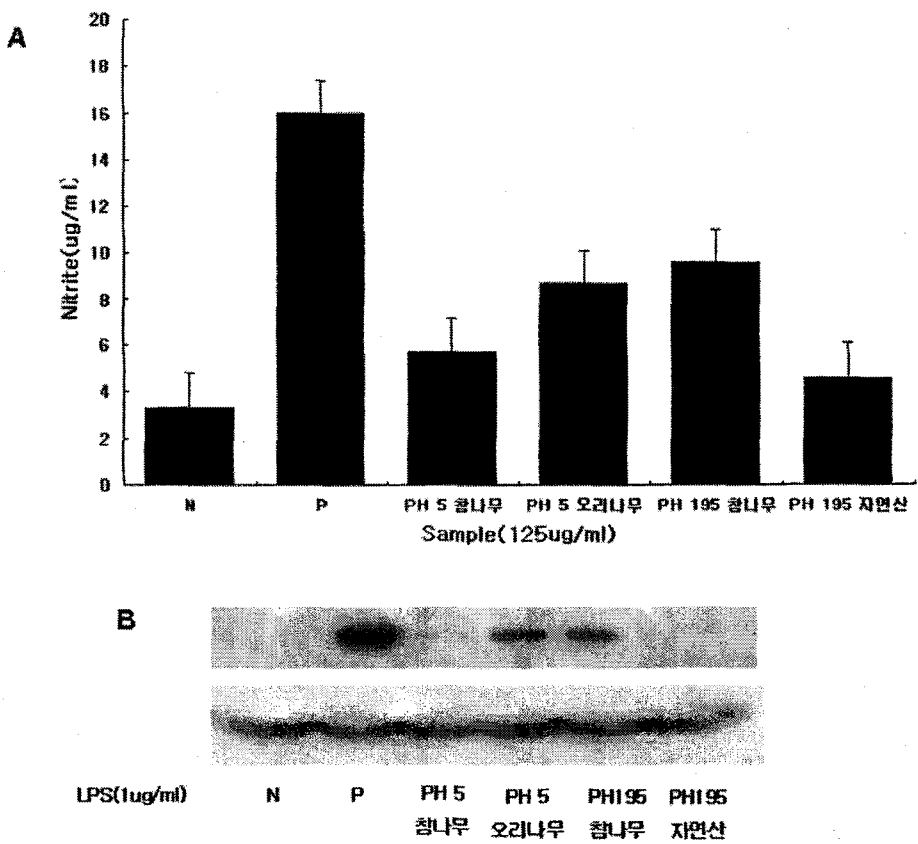


Fig 45. Effect of NO generation and iNOS protein expression of timer log culture of *Phellinus linteus*

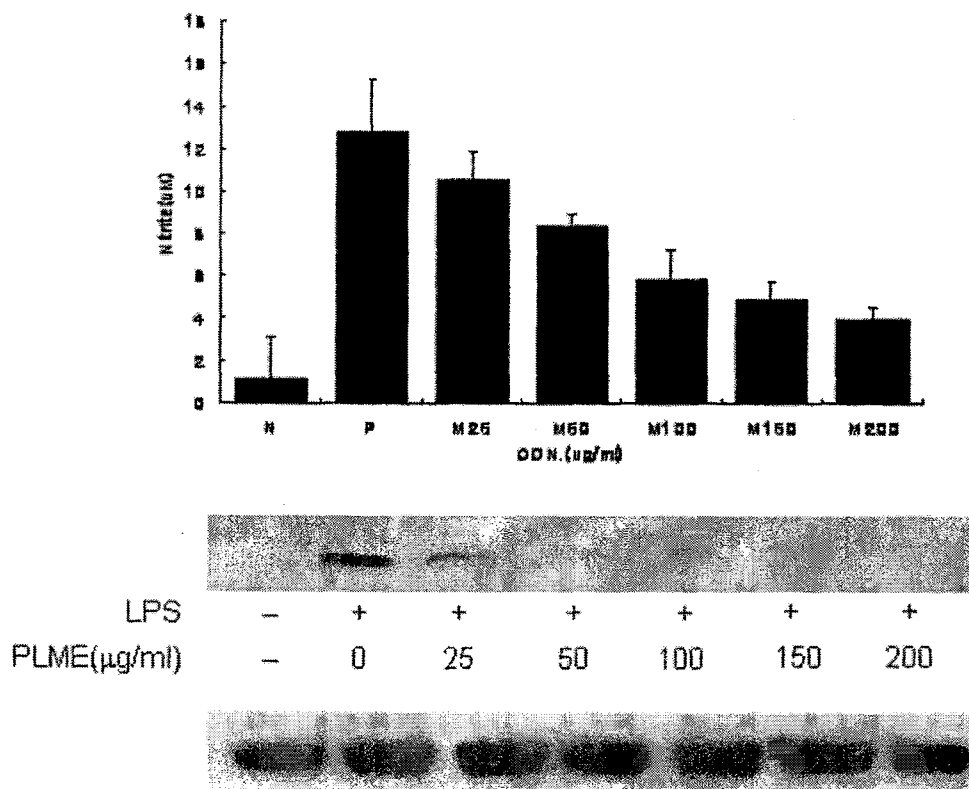


Fig 46. Inhibition of NO generation of Cultured of *Phellinus linteus* (CPL)
 Raw264.7 cells were treated with LPS (1 µg/ml) in the presence of CPLME. Nitrite as a stable oxidized product of NO was measured in culture media of LPS-stimulated cells for 18h by the Griess reaction (CPLME; cultured of *phellinus linteus* methanol extracts)



Fig..47. inhibition of NO generation of LPS and IFN induction macrophage of treatment with *Phellinus linteus* extracts and fractions

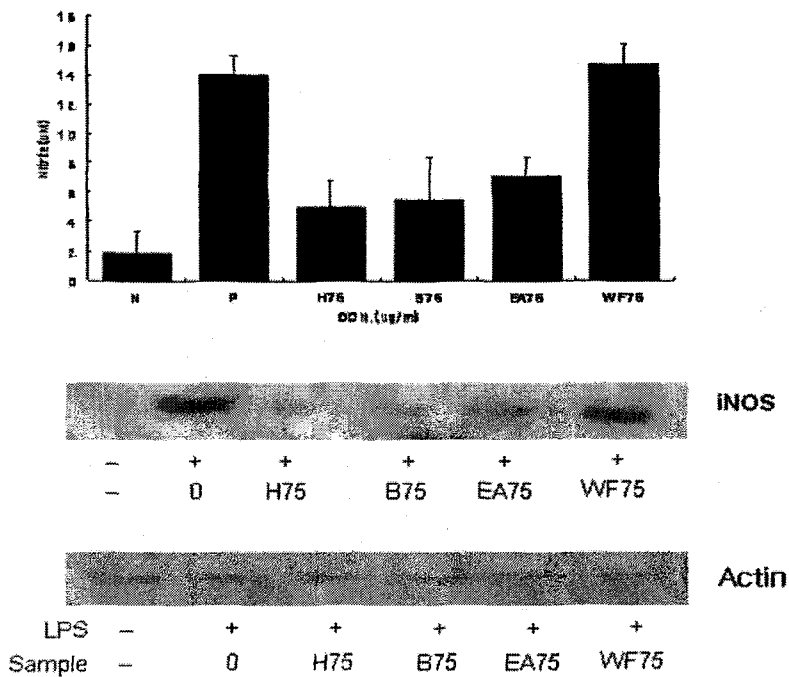


Fig..48. inhibition of NO generation and iNOS protein expression of LPS induction macrophage of treatment with *Phellinus linteus* fractions

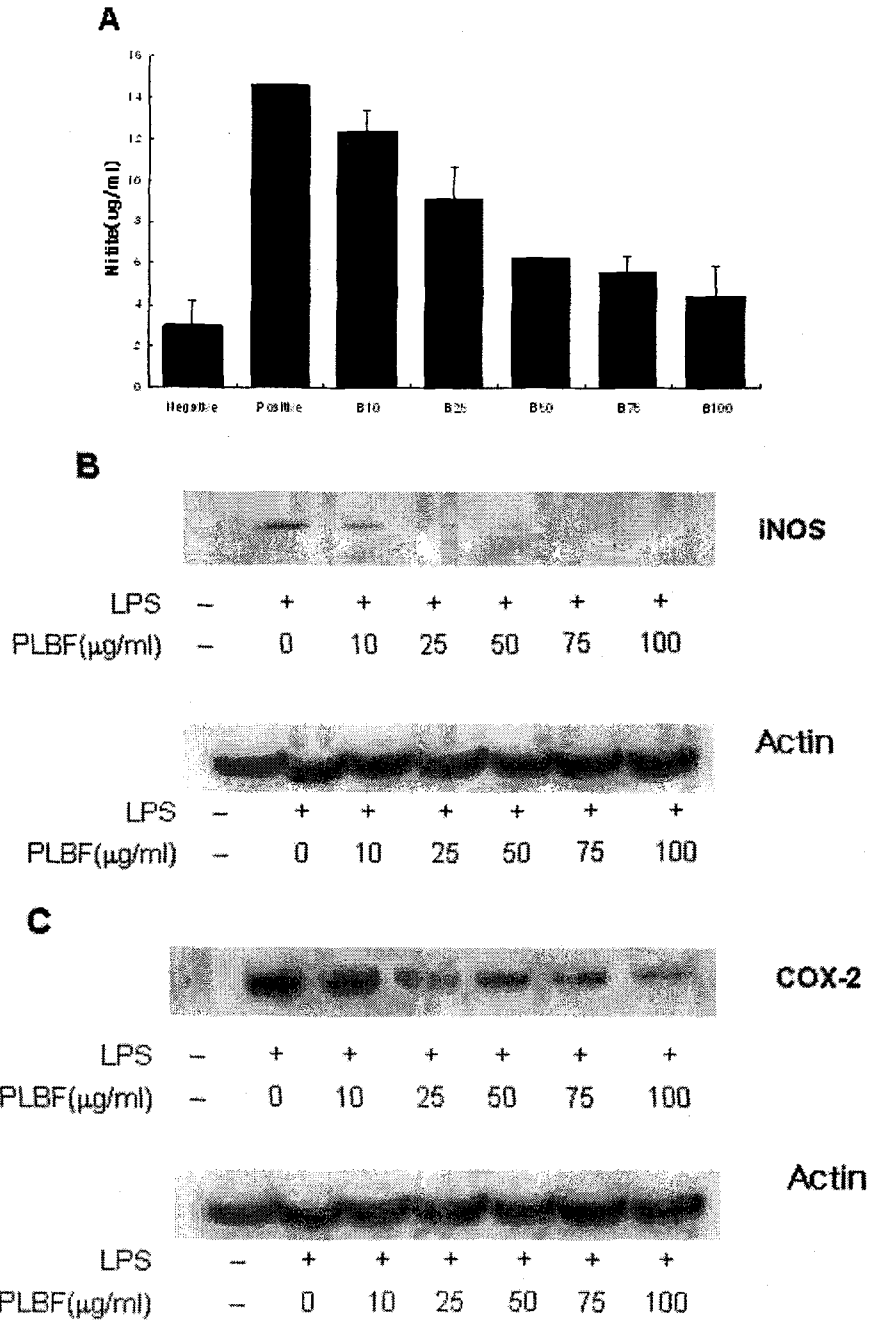
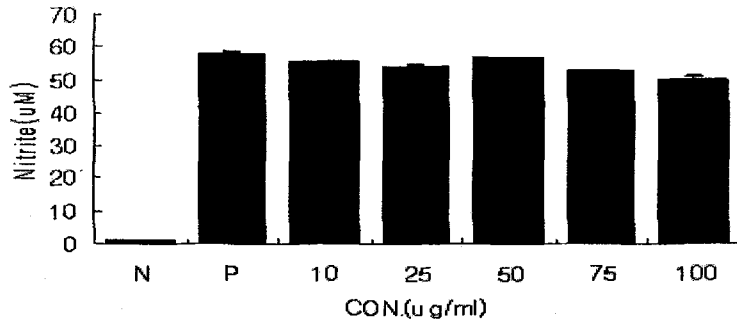
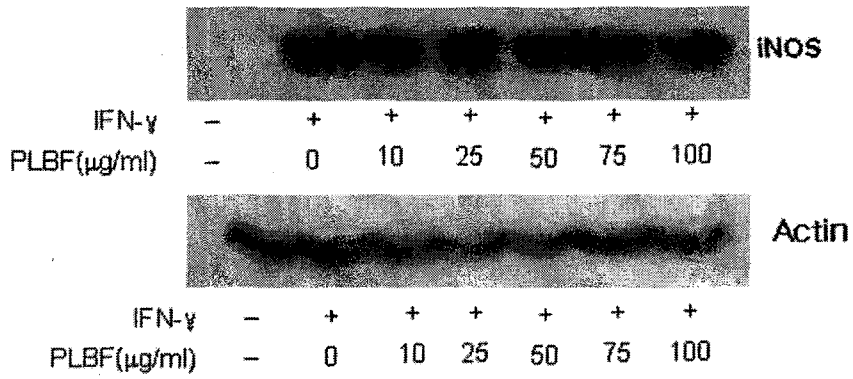


Fig..48. Effect of PLBF on nitrite release of in culture medium(A) or on the level of iNOS (B) and COX-2(C) of LPS-activated macrophage.



B



C

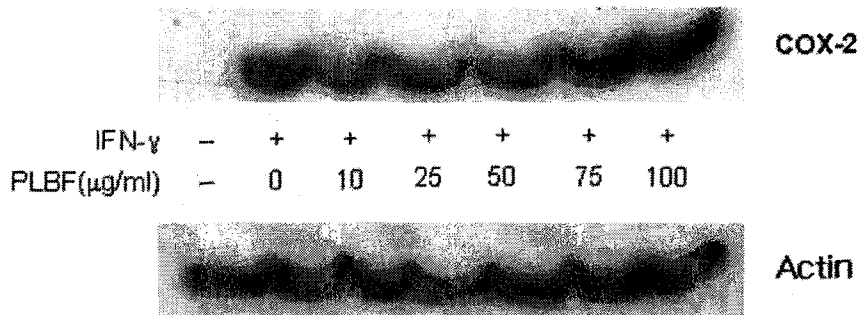


Fig..49. Effect of PLBF on nitrite release of in culture medium(A) or on the level of iNOS (B) and COX-2(C) of IFN-activated macrophage.

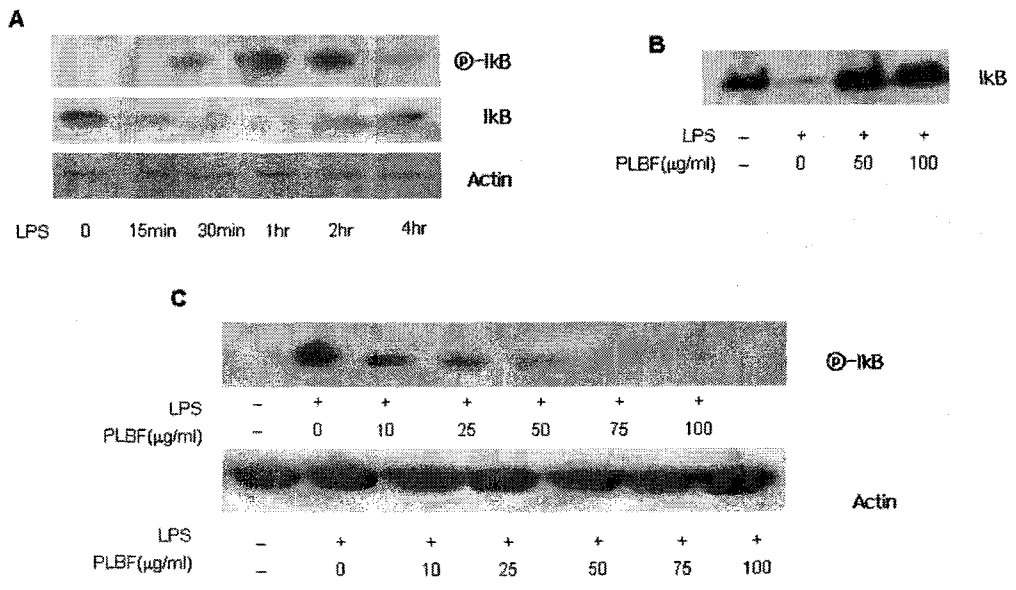


Fig. 50 The effect of PLBF on the activation of NFκB in LPS-stimulated RAW cells

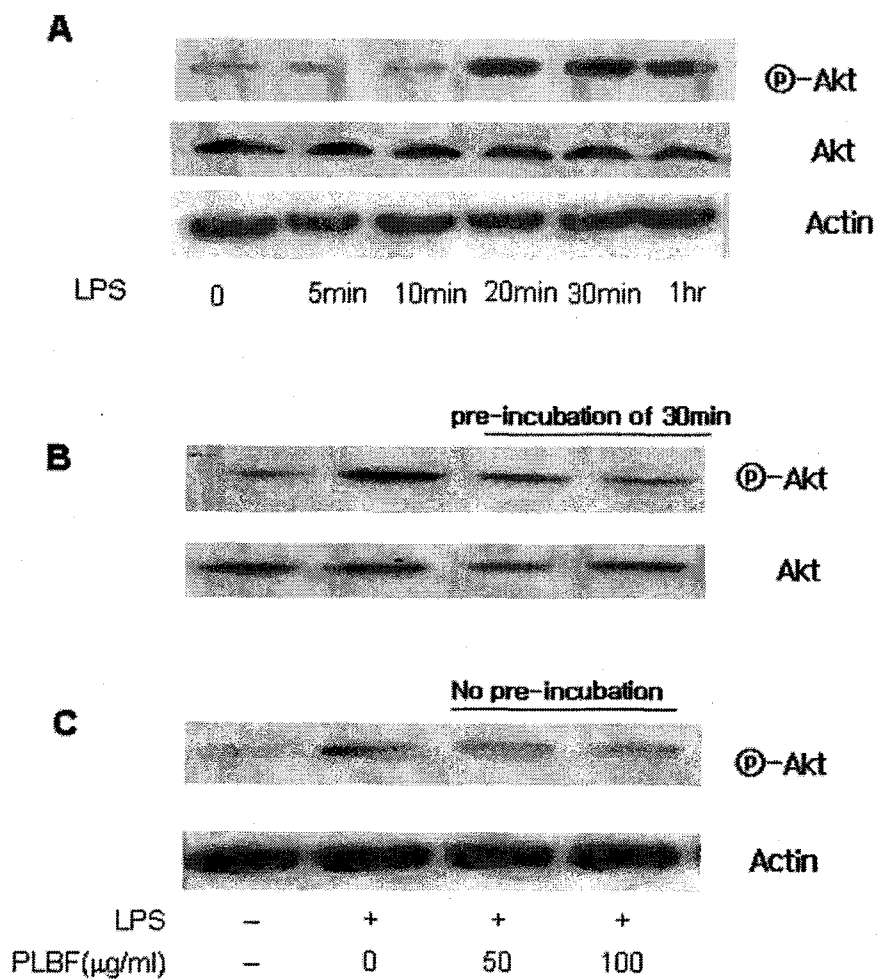


Fig. 51 The effect of PLBF on the activation of AKT in LPS-stimulated RAW cells

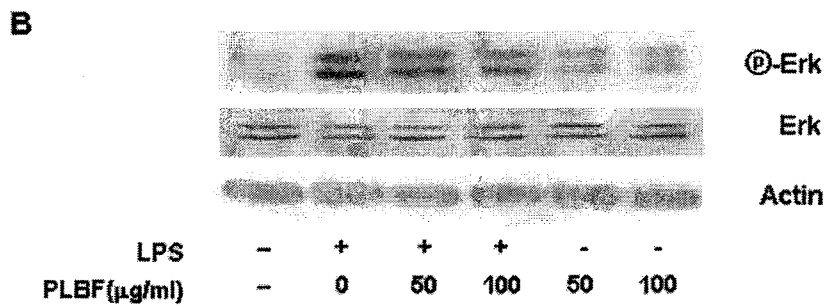
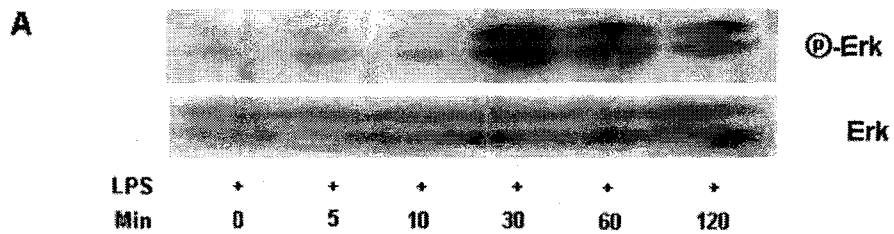
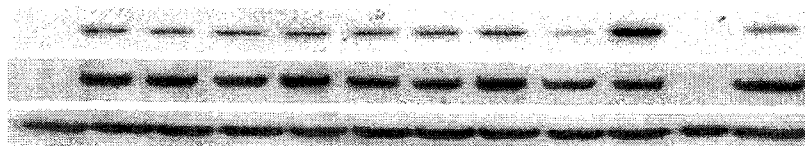
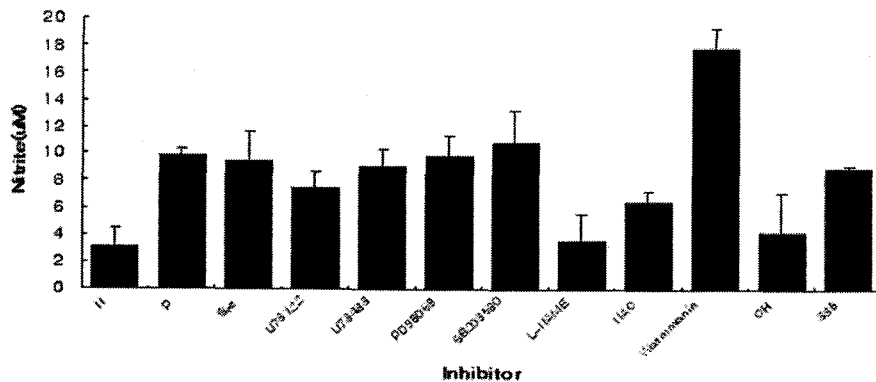


Fig. 52 The effect of PLBF on the activation of Erk phosphorylation in LPS-stimulated RAW cells



LPS(1µg/ml)	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Ppi(5µM)	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
U73122(5µM)	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
U73343(5µM)	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
PD98059(5µM)	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
SB203580(1µM)	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
NAME(1mM)	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
NAC(40mM)	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
Wortmannin(100nM)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
CH(10µM)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
336(10µM)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+

Fig 53 Effect of various inhibitors on LPS-induced nitrite release and iNOS expression in RAW 264.7 macrophages

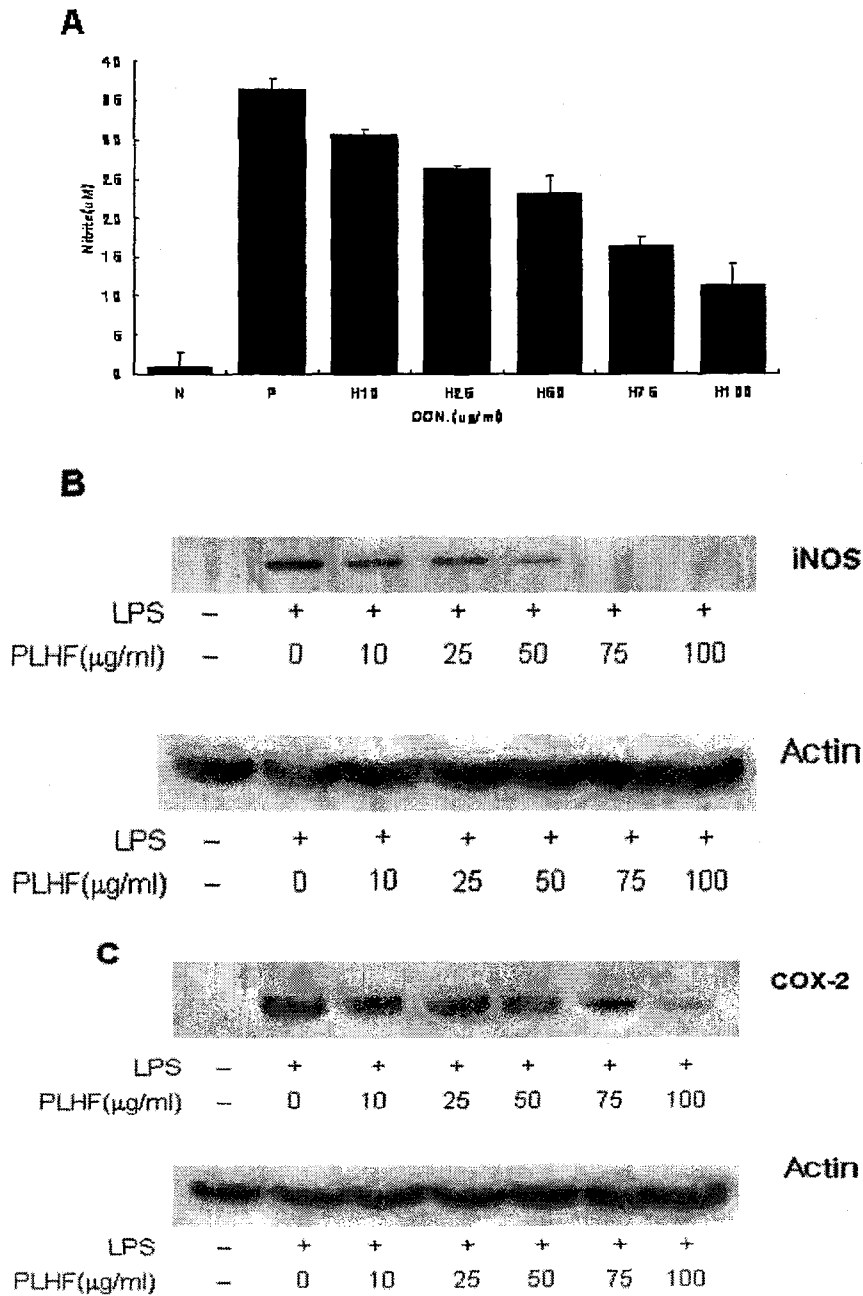


Fig..54. Effect of PLHF on nitrite release of in culture medium(A) or on the level of iNOS (B) and COX-2(C) of IFN-activated macrophage.

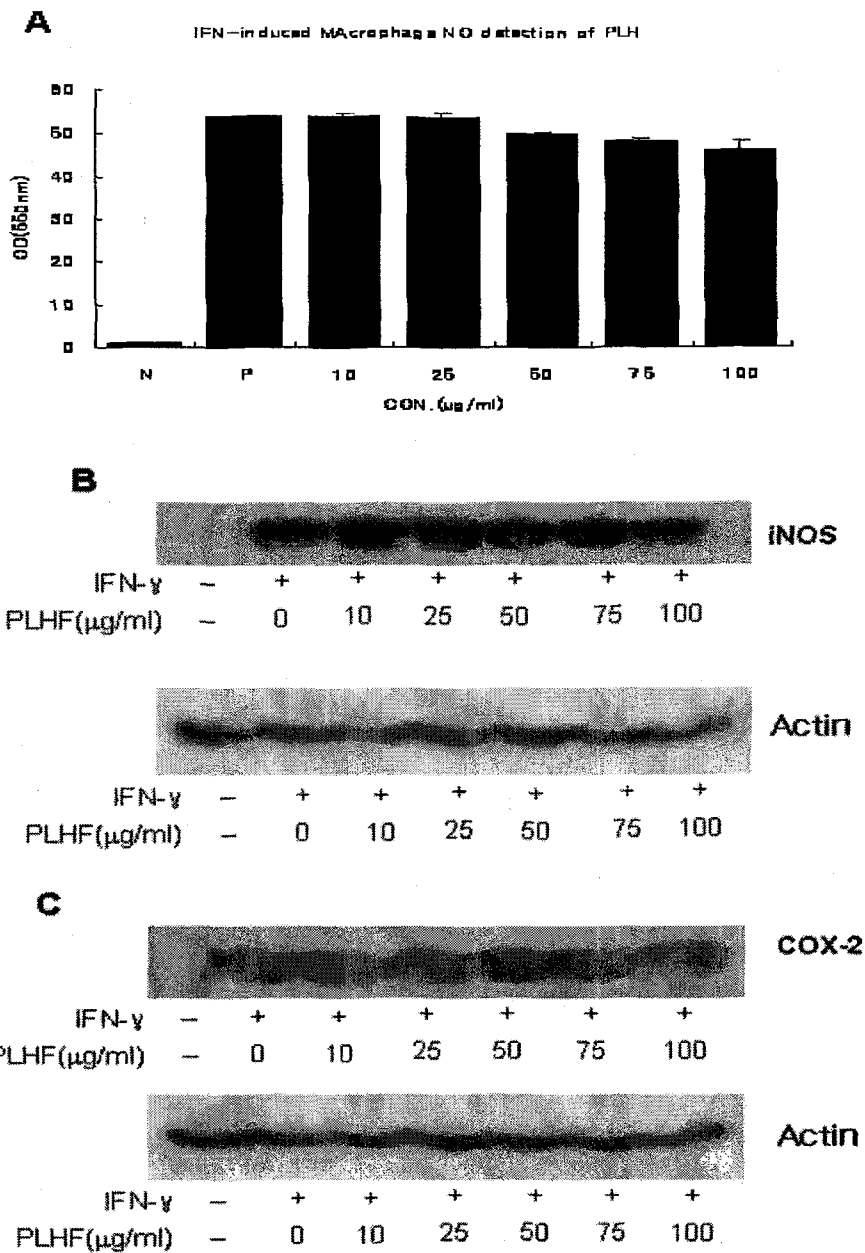


Fig..55. Effect of PLHF on nitrite release of in culture medium(A) or on the level of iNOS (B) and COX-2(C) of IFN-activated macrophage.

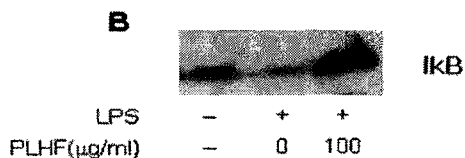
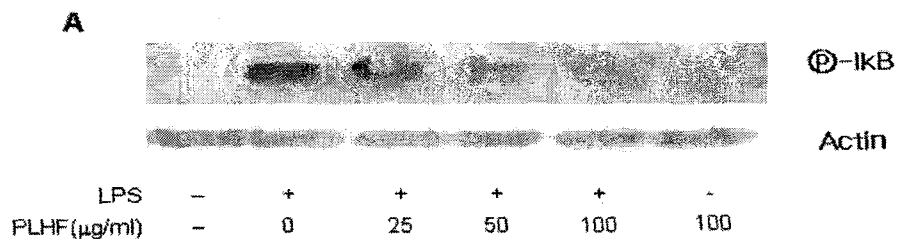


Fig. 56 The effect of PLHF on the activation of NFκB in LPS-stimulated RAW cells

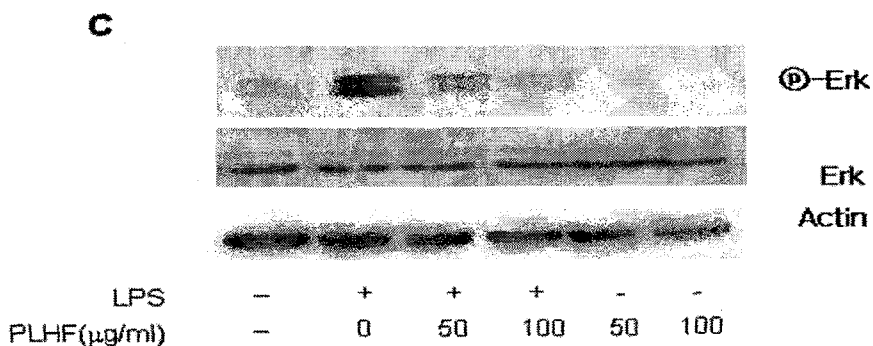


Fig. 57 The effect of PLHF on the activation of Erk phosphorylation in LPS-stimulated RAW cells

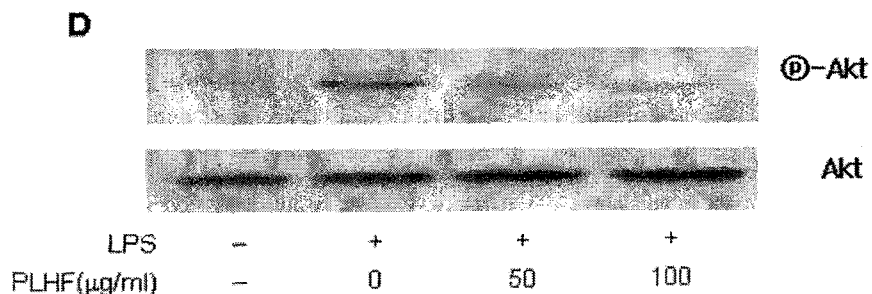


Fig. 58 The effect of PLHF on the activation of AKT in LPS-stimulated RAW cells.

태국 상황 시료와 머쉬텍 상황 시료의 NO 비교

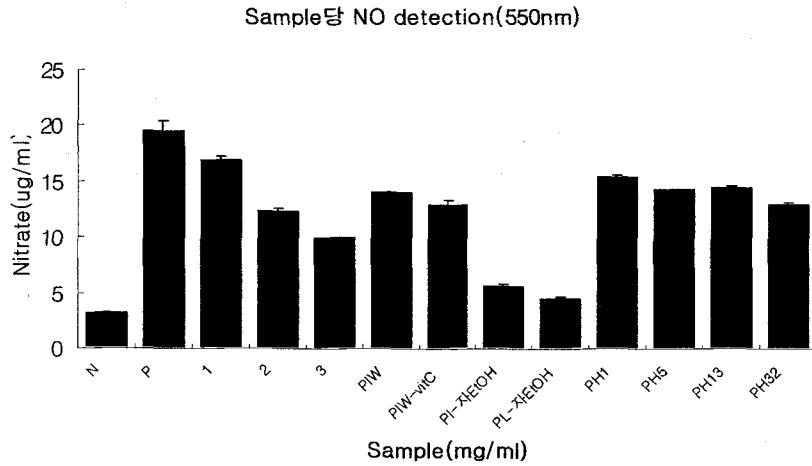


Fig..59. Comparison of thiland and mushtech products on LPS-induced nitrite release in RAW 264.7 macrophages

타. 항암 및 항염증 생리활성물질의 정제

목질진흙버섯 메탄올 추출물을 다시 극성의 차이에 의해서 분획을 하여 항산화 및 항암효과로 생리활성을 비교하였을 경우 Butanol fraction 이 가장 좋은 효과를 보였기 때문에 이 분획물을 정제하기 위해서 silica chromatography를 1차 정제를 하였다. 이때 얻어진 fraction들에 대한 항산화 항암효과를 비교실험하였다. 또한 TLC로 부분정제된 물질을 비교하여 실험하였다.

이 때 항산화 효과는 극성이 있는 60%CHCL₃, 40%CHCL₃, 20%CHCL₃에서 효과가 좋았으며, 정제된 양도 항암효과가 있는 Fraction에 비해서 많은 화합물이 있는 것을 알 수가 있었다. 항암효과는 비극성 성질이 강한 97%CHCL₃ 96%CHCL₃, 95%CHCL₃에서 효과가 좋은 것으로 나타났다. 이에 TLC로 부분정제된 정도를 알아 보았다.

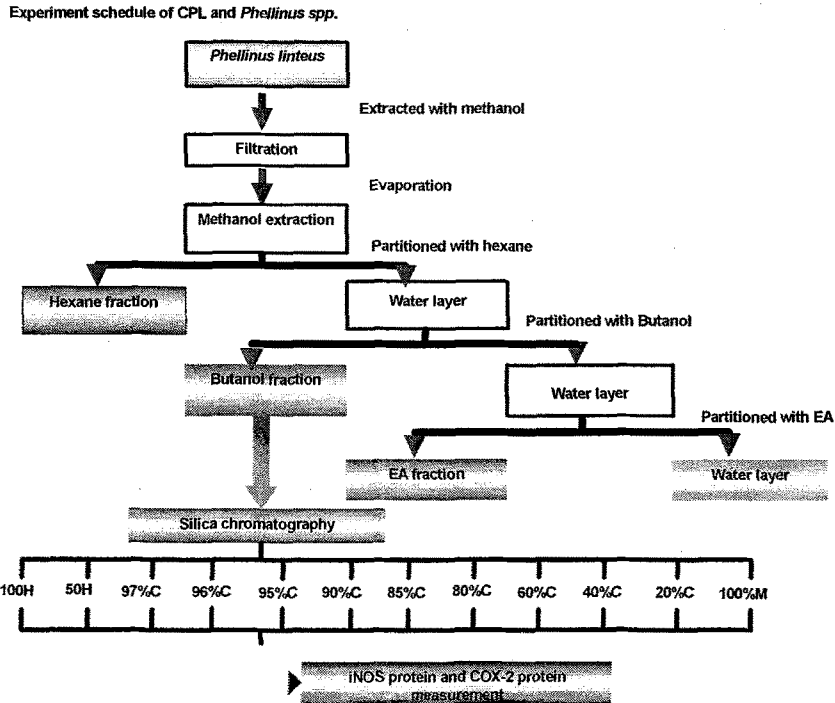


Fig. 60 Extraction and purification of cultivated fruit body of *Phellinus linteus*

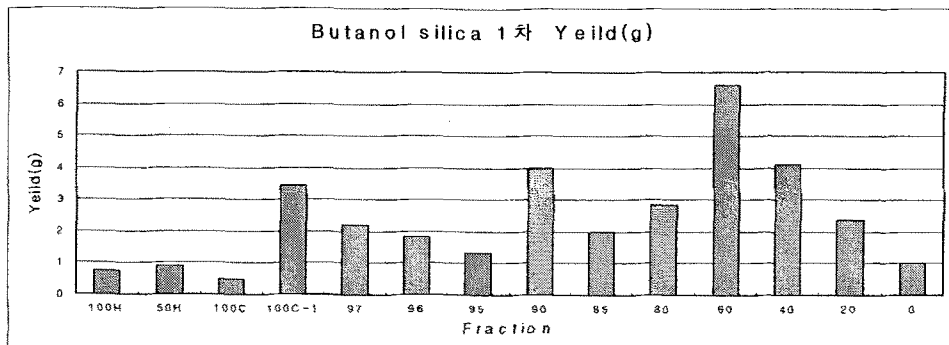


Fig 61 Yelid of silica chromatography on butanol fraction

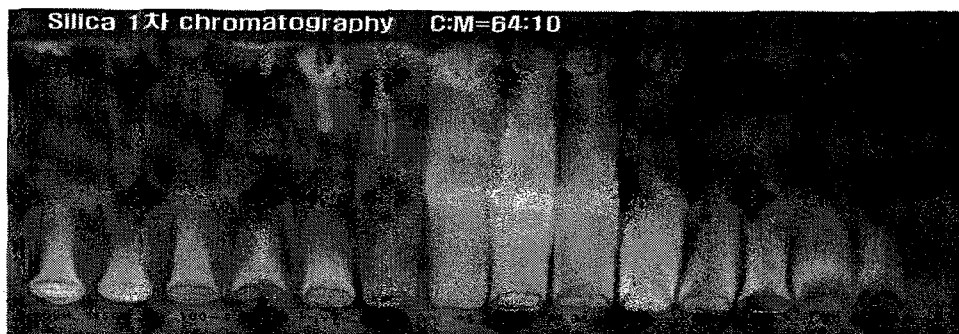
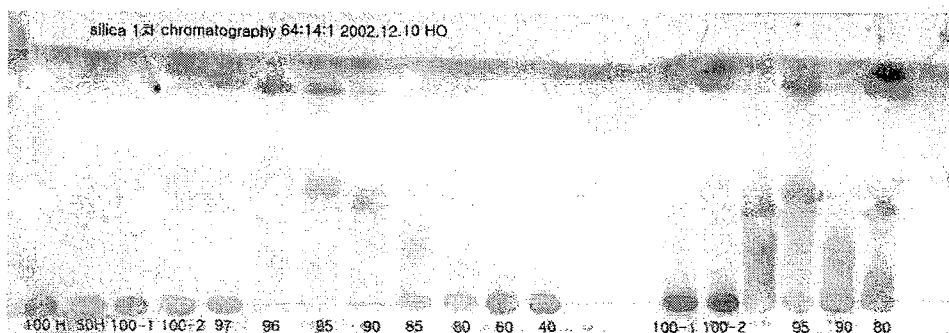


Fig 62. TLC detection of silica chromatography fractions

Elution Solution : CHCL₃ and MeOH Step gradient

Sample : Butanol Fraction을 Silica chromatography한 Sample

TLC 조건 : CHCL₃ : MeOH : H₂O = 64 : 14 : 1.2

Detection 방법 : 10% sulfuric acid

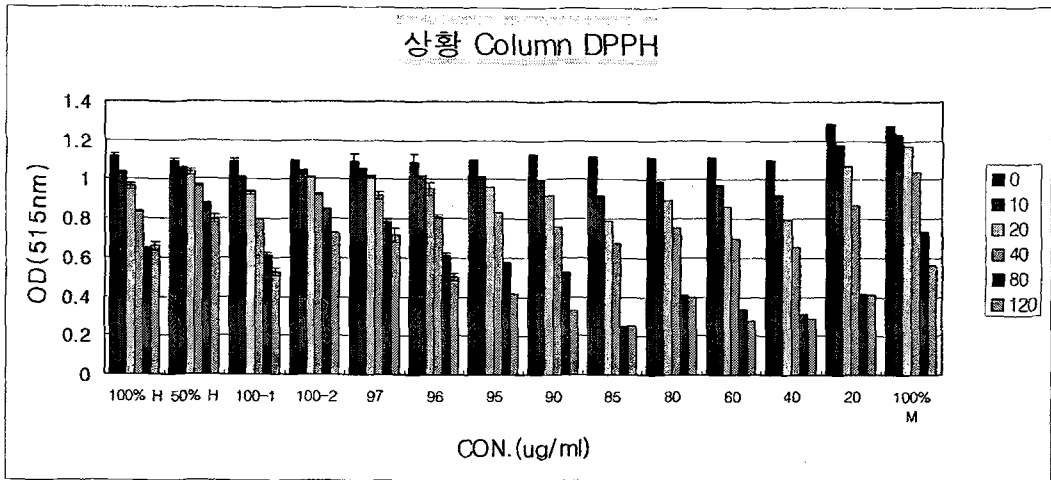


Fig 63 Antioxidant effect of silica chromatography fractions on DPPH assay

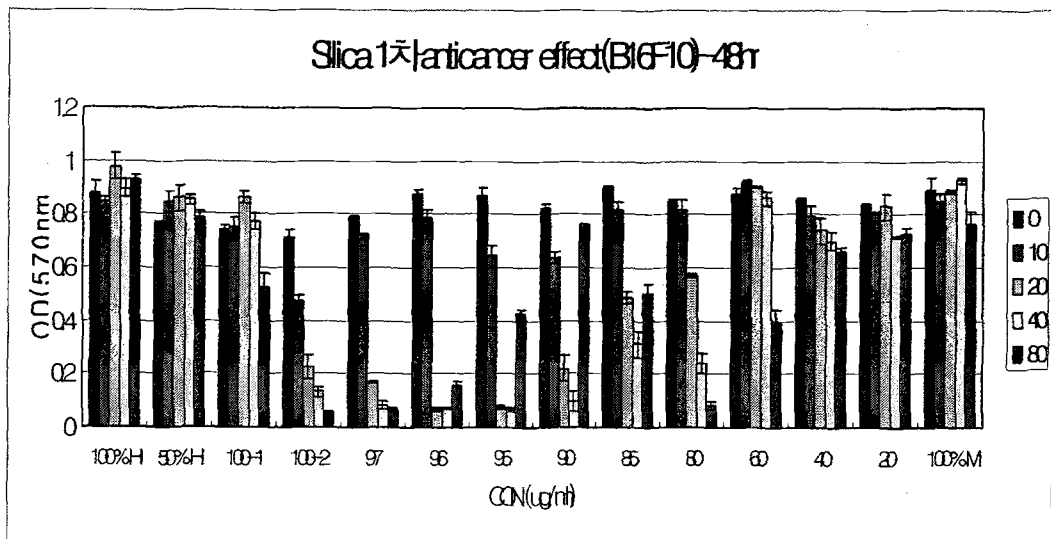


Fig 64 Anticancer effect of silica chromatography fractions on B₁₆F₁₀ cell assay

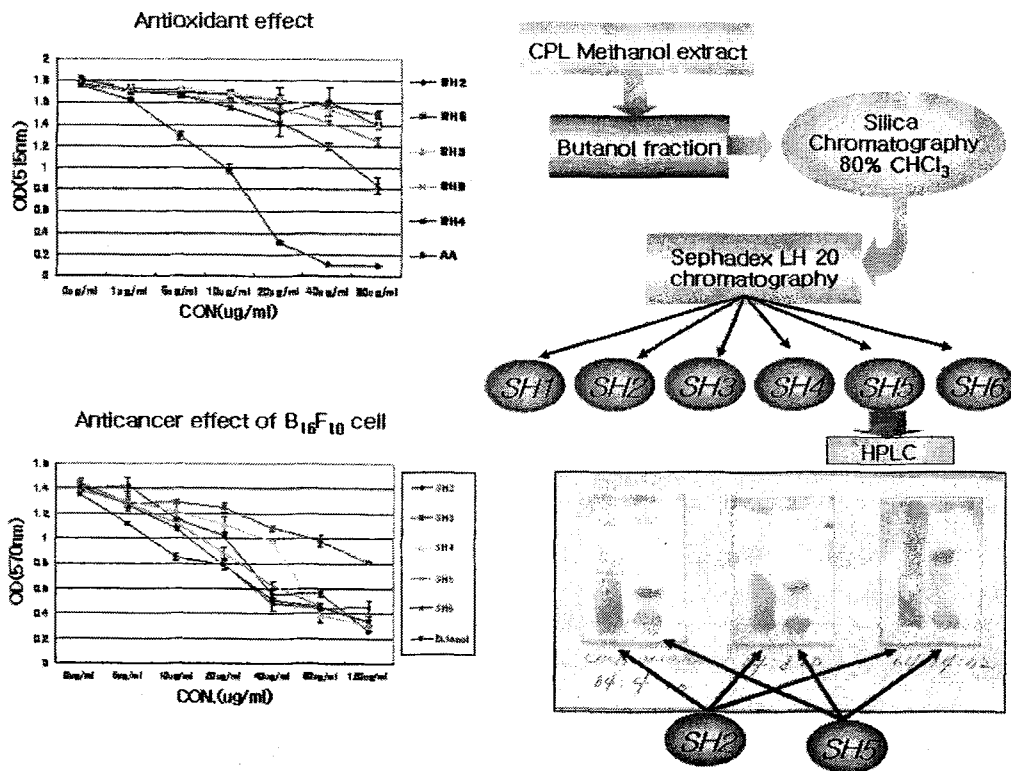
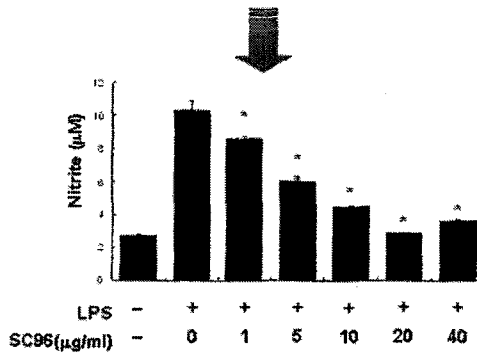
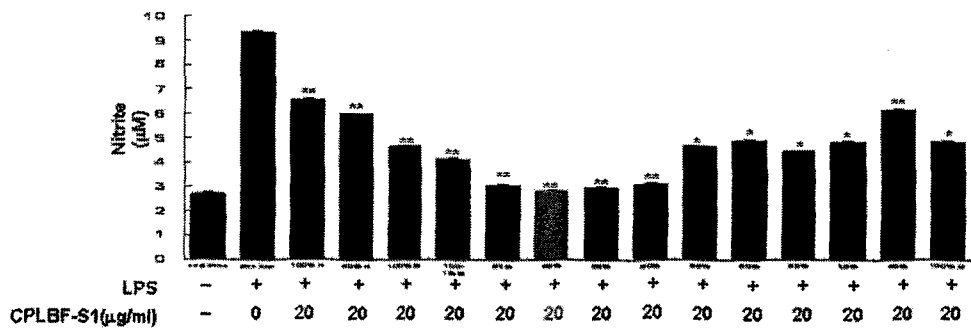


Fig. 65. Isolation of SH2 and SH5 from cultivated fruit body of *Phellinus linteus*



CPLBF-S1 ; cultured phellinus linteus butanol fraction silica gel chromatography 1st

Fig. 66 .Anti-inflammation of component of CPLBF 1st silica chromatography (LPS0induced macrophage NO detection)

3. 목질진흙버섯의 생리활성 물질 중 항산화 물질의 분리정제

가. DPPH를 이용한 항산화능에 미치는 영향

인간을 포함한 모든 호기성 생물체는 산소를 이용하여 에너지 대사를 진행하며 그 과정에서 부산물로 발생하는 활성산소의 상해에 대하여 생체는 자기방어기구(scavenger system)를 구비하고 있지만 조직의 방어능을 초월한 활성산소의 생성은 최근 성인병이라 불리워지는 관절염, 순환기장애 뿐만 아니라 암 등과 같은 여러 질환의 원인이 되고 있다. 흔히 유해산소라 불리워지는 활성산소는 가장 안정한 형태의 산소인 triplet oxygen(3O_2)이 산화, 환원과정에서 환원을 받아 생성되는 singlet oxygen(1O_2)인 superoxide anion(O_2^-), hydrogen peroxide (H_2O_2)과 hydroxyl radical ($\cdot OH$) 과 같은 유리기로서, 이들이 단백질, DNA, 효소 및 T-Cell과 같은 면역계의 인자를 손상시켜 각종 질환을 일으키며, 특히 문제가 되는 것은 활성산소가 세포 생체막의 구성성분인 다가 불포화지방산을 공격하여 지질과산화 반응을 일으켜 체내 과산화지질을 축적하고, 이로 인해 생체기능이 저하됨으로써 노화 및 성인병 질환을 유발하는 것으로 알려져 있다.⁵⁸⁻⁶³⁾

최근 노화와 성인병 질환의 원인이 활성산소에 기인된 것이라는 학설이 점차 인정되어짐에 따라 체내에서 활성산소를 조절하는 SOD (superoxide dismutase), catalase, glutathione peroxidase 등의 효소에 대한 연구와 천연 항산화제인 셀레늄, 토코페롤, 아스코르빈산, 베타카로틴, 글루타치온 및 합성 항산화제인 BHA, BHT를 필두로 많은 항산화제의 개발 연구가 보고되어져 있다.⁸²⁻⁸⁷⁾

최근 들어 천연물의 항산화 효과에 관한 연구가 활발히 진행되고 있는데, 양파,⁸⁸⁾ nut류⁸⁹⁾등과 같은 식용으로 쓰이는 식물을 비롯하여 어성초,⁹⁰⁾ 흰털오갈피,⁹¹⁾ 해당화⁹²⁾등 약용으로 이용되는 다양한 생약추출물에 대한 연구가 보고되어져 있다. 버섯추출물⁹³⁾에 대한 항산화 활성도 보고되어 있으나, 목질진흙버섯⁹⁴⁾의 항산화 효과에 대한 연구보고는 항암이나 면역활성에 대한 연구에 비하여 미미한 실정이다. 이에 본 연구에서는 목질진흙버섯의 항암이나 면역활성에 국한되지 않는 항산화 효과를 밝힘으로서 지금까지 알려진 천연 항산화제보다 더 안전하고 효과가 우수한 항산화제를 개발하고자 하였다.

항산화 효과를 측정하는 방법에는 과산화(peroxide value, POV), 산가(acid value, AV), 카보닐가(carbonyl value, COV), 요드가(iodine value, IV)를 구하는 방법과 DPPH의 환원성을 이용하여 구하는 방법 등이 있다.⁹⁵⁾

본 실험에서 이용한 DPPH(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl)의 hydrazyl은 질소원자가 불안정한 상태에 있으므로 쉽게 수소원자를 받아들이는 성질을 가지고 있어 항산화성 물질과 반응하여 수소원자를 받아들임으로써 자체의 정색성을 잃는다.

이러한 성질을 이용하여 배양목질진흙버섯 자실체의 항산화능의 정도를 측정하고, activity guided fractionation 방법에 따라 그 활성성분을 추적하고자 자연산 상황과 배양목질진흙버섯 자실체, 배양목질진흙버섯 자실체의 Water ex.와 MeOH ex, 배양목질진흙버섯 자실체의 MeOH ex.의 각 분획 (MeOH ex., Precipitates, Water Insoluble fr., Water fr. Ether fr.)에 대한 항산화능의 정도를 DPPH에 대한 전자공여능 (electron donating ability, EDA %)으로 측정한 결과와 시료 무첨가의 control (0.1 mM DPPH 용액 1.9 ml)을 50% 환원시키는데 필요한 시료의 농도(IC₅₀)를 측정한 결과는 다음과 같다 (Table 1.1, 1.2, Fig.V).

자연산 상황의 활성 (IC₅₀ 13.07)이 배양목질진흙버섯 자실체의 활성 (IC₅₀ 101.20)보다 대체로 강하였다. 배양목질진흙버섯 자실체의 MeOH ex.의 활성 (IC₅₀ 101.20)이 Water ex. 활성 (IC₅₀ 268.70)보다 우수하였고, 배양목질진흙버섯 자실체의 MeOH ex.의 분획중에서는 Water Insoluble fr. (IC₅₀ 11.50)과 Ether fr. (IC₅₀ 43.36)이 강한 항산화 활성을 보였다. 자연산 상황의 MeOH ex.와 배양목질진흙버섯 자실체 중 Water Insoluble fr.은 항산화제로 잘 알려진 아스코르빈산 (IC₅₀ 8.50)과 대등한 정도의 우수한 항산화능을 보였다.

이는 상황의 항암 활성 및 면역증강 효과에 대한 연구보고가 고분자 다당체를 중심으로 이루어진 것과는 달리,^{42,47-49,52-54)} 배양목질진흙버섯 자실체의 항산화 효과는 지용성 분획의 저분자 물질에 기인 하는 것으로 사료된다.

Table 10 The radical scavenging effects of extracts and fractions from cultivated fruitbody of *Phellinus linteus* and methanol extract from natural fruitbody of *Phellinus linteus*

Sample	EDA %					
	62.5	125	250	500	1000	2000(ppm)
Ascorbic acid	38.30±2.71	74.20±1.09	97.10±0.58	—	—	—
CPL MeOH Ex.	12.33±3.73	14.73±2.91	19.07±3.19	30.83±4.19	49.87±3.42	88.73±1.88
Precipitates	7.60±1.75	8.07±1.45	10.01±0.08	13.90±1.55	22.87±2.54	45.53±4.85
Water Insoluble Fr.	33.77±0.85	55.46±1.99	67.75±5.41	78.60±8.72	88.36±0.47	97.57±1.15
Water Fr.	9.13±0.49	9.23±0.12	11.73±1.95	19.67±1.50	31.57±0.91	61.80±2.26
Ether Fr.	20.47±0.71	31.57±0.86	48.00±1.57	69.87±9.05	87.80±1.51	96.05±1.15
CPL Water Ex.	2.53±0.32	4.60±0.26	5.50±0.36	11.17±0.81	21.10±1.41	37.97±1.31
NPL MeOH Ex.	34.67±1.76	55.67±6.16	84.23±3.88	87.10±1.55	96.10±0.80	98.03±0.86

$$\text{EDA}(\%) = (\text{Control O.D.} - \text{Sample O.D.}) / \text{Control O.D.} \times 100$$

EDA : Electron donating ability)

sample O.D. : 시료를 가한 시험액의 흡광도

control O.D. : 시료대신 EtOH를 가한 시험액의 흡광도

CPL : Cultivated fruitbody of *Phellinus linteus*

NPL : Natural fruitbody of *Phellinus linteus*

CPL Water ex. : 배양상황 자실체의 물 엑스

NPL MeOH ex. : 자연산 상황의 MeOH 엑스

북한산 자연상황 유통품(서울 경동시장)

Each value represents the mean ± S.D. (n=3)

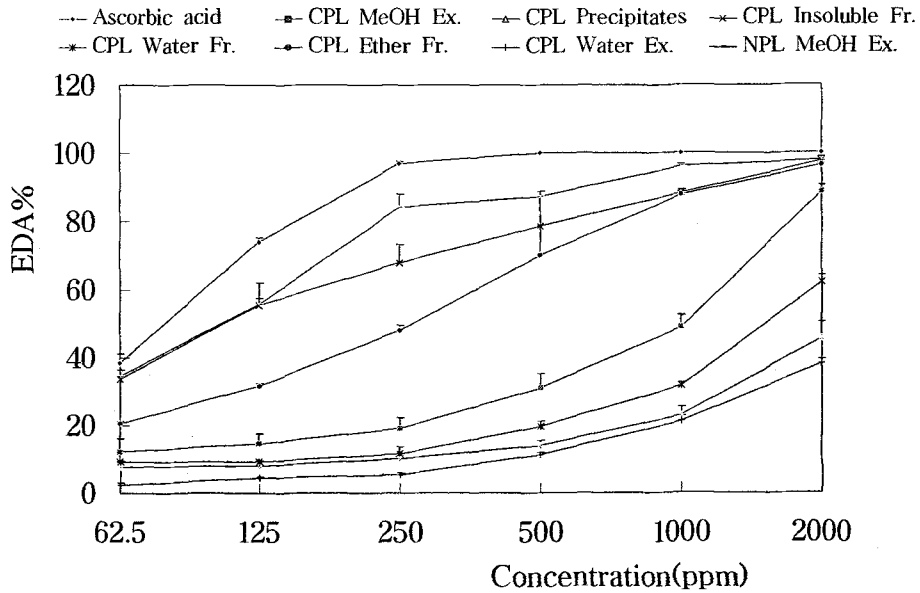


Fig.. 67. The radical scavenging effects of extracts and fractions from cultivated fruit body of *Phellinus linteus* and methanol extract from natural fruit body of *Phellinus linteus*

$$\text{EDA}(\%) = (\text{Control O.D.} - \text{Sample O.D.}) / \text{Control O.D.} \times 100$$

EDA (electron donating ability)

Sample O.D : 시료를 가한 시험액의 흡광도

Control O.D : 시료대신 EtOH를 가한 시험액의 흡광도

CPL : Cultivated fruit body of *Phellinus linteus*

NPL : Natural fruit body of *Phellinus linteus*

CPL Water ex. : 배양목질진흙버섯 자실체의 물 엑스

NPL MeOH ex. : 자연산 상황의 MeOH 엑스

북한산 자연상황 유통품 (서울 경동시장)

내용누락

Table 11. Antioxidative activity of extracts and fractions from ultivated fruit body of *Phellinus linteus* and methanol extract from natural fruit body of *Phellinus linteus*

Sample	IC ₅₀ (μg/ml)
Ascorbic acid	8.50
CPL MeOH ex.	101.20
Precipitates	227.27
Water Insoluble fr.	11.50
Water fr.	160.16
Ether fr.	43.36
CPL Water ex.	268.70
NPL MeOH ex.	13.07

IC₅₀: Required sample concentration (μg/ml) for 50% reduction of 0.1 mM DPPH solution 1.9 ml

CPL : Cultivated fruit body of *Phellinus linteus*

NPL : Natural fruit body of *Phellinus linteus*

CPL Water ex. : 배양목질진흙버섯 자실체의 물 엑스

NPL MeOH ex. : 자연산 상황의 MeOH 엑스

북한산 자연상황 유통품(서울 경동시장)

나. LDL 산화에 미치는 영향

활성산소와 과산화지질은 죽상동맥경화증(atherosclerosis), 암, 간장질환, 그리고 노화의 주된 원인으로 인식되어져 왔으며 특히 저밀도지단백(low density lipoprotein, LDL)의 oxidative modification은 죽상동맥경화증의 주된 과정으로 알려졌다.^{66,96)}

지질 대사과정에서 정상적인 LDL입자는 endothelial border을 통해 이동되며 arterial subendothelial space로 들어간다. 그러나 LDL이 과도하게 존재하거나 어떤 다른 요인에 의해 LDL이 oxidative modification되면 plasma에서 순환하기 보다는 subendothelium 안에서 변화하기 쉬운 상태로 전환된다. 이와 같은 LDL의 이상대사는 동맥경화와 깊은 관련이 있으며 특히 죽상동맥경화증으로 인한 심장질환의 발병에 중요한 위험인자로 작용하고 있다.

LDL은 혈장단백(plasma protein) 중 밀도가 1.025에서 1.058에 해당하는 지단백(lipoprotein)으로 중심부는 소수성(疏水性)인 triglyceride(TG), cholesterol ester(CE)로 이루어져 있으며 극성인 인지질과 유리 cholesterol로 둘러싸여 있다. 외부는 Apo-lipoprotein(Apo B-100)이라 불리는 특수 단백질로 구성되어 있다. Apo B-100은 LDL-receptor에 결합하는 ligand로 작용한다.^{97,98)}

정상적인 LDL이 활성산소에 의해 산화되면 LDL-receptor와 결합하지 못하게 된다. 산화된 LDL은 혈액내의 단핵구(monocyte)에 의해 탐식되며, 단핵구는 조직내에서 대식세포(macrophage)로 된다.^{99,100)} 대식세포는 정상 LDL에 대해서는 세포내 cholesterol의 농도를 조절하여 받아 들임으로써 세포내 cholesterol량을 항상 일정하게 유지시킬 수 있으나, 산화된 LDL에 대해서는 조절능력을 상실하여 과산화지질과 cholesterol에 대한 집요한 탐식작용이 일어나 대식세포는 포말세포(foam cell)가 될 때까지 팽창한다. 산화된 LDL의 과다한 침착으로 유도된 포말세포는 죽상동맥경화증의 초기 병변이라고 생각되는 지방반(fatty streak), 섬유판(fibrous plaque)의 형성을 야기시킬 수 있다. 또한 산화된 LDL은 높은 세포내 화학적 독성을 지니므로써 혈관 내피세포와 평활근세포의 국소적인 손상을 일으켜 죽상동맥경화증의 병변으로 작용하기도 한다.¹⁰¹⁻¹⁰³⁾

이러한 결과들은 산화된 LDL이 죽상동맥경화증의 중요한 유발인자임을 말해주며 합성 또는 천연 항산화제의 LDL 산화 저해제로서의 역

할과 그들의 죽상동맥경화증 예방과 치료효과에 대해 지대한 관심을 불러 일으켰으며, 은행잎, 어성초, 흰털오갈¹⁾ 등 천연물의 지질과산화 억제 효과에 관한 연구가 활발히 진행되고 있다. 이에 본 연구에서도 목질진흠버섯의 지질과산화에 미치는 효과를 측정하여 항산화제로서의 가능성을 밝히고자 하였다. LDL oxidative modification은 lipid peroxide의 증가 (TBARS activity의 증가)와 surface negative charge의 증가 (electrophoretic mobility의 증가)에 의해 평가될 수 있다고 보고되었다. 본 실험에서는 배양목질진흠버섯 자실체의 LDL 산화에 미치는 영향을 알아보려고 LDL에 각 시료를 농도별로 가하고 Cu²⁺-induced oxidation을 실시 후, TBARS assay와 agarose gel electrophoretic mobility를 측정하였다.

1) TBARS assay를 이용한 LDL 지질과산화에 미치는 영향

LDL oxidative modification은 lipid peroxide의 증가에 의해 평가될 수 있으며 본 실험에서는 지질의 산화 정도를 측정하는 방법 중에서 가장 간단한 방법인 MDA를 표준시료로 하는 TBARS assay⁷⁴⁾를 실시한 결과와 지질과산화를 50% 억제하는데 필요한 시료농도(IC₅₀)을 측정한 결과는 다음과 같다 (Table 2.1, 2.2, Fig. VI).

상황의 LDL 지질과산화에 대한 억제활성은 우수하였으며, 자연산 상황 (IC₅₀ 2.49)이 배양목질진흠버섯 자실체 (IC₅₀ 4.39)의 활성에 비해 우수하였다.

배양목질진흠버섯 자실체의 MeOH ex.의 활성 (IC₅₀ 4.39)이 Water ex. 활성 (IC₅₀ 31.62)보다 강하였으며, 배양목질진흠버섯 자실체의 MeOH ex. 분획 중에서는 Water Insoluble fr. (IC₅₀ 3.15)에서 강력한 억제효과를 보였고, Ether fr. (IC₅₀ 6.67)에서도 상당한 억제효과를 보였다.

자연산 상황의 MeOH ex.와 배양목질진흠버섯 자실체의 MeOH ex. 분획 중 Water Insoluble fr.은 양성대조약물로 사용한 아스코르빈산 (IC₅₀ 3.71)보다 강한 항산화능을 보였고, 배양목질진흠버섯 자실체의 MeOH ex.와 Ether fr.은 아스코르빈산과 유사한 항산화능을 보였다.

DPPH를 이용한 radical 소거작용에서 측정한 결과와 마찬가지로

과산화지질 억제효과도 배양목질진흙버섯 자실체의 지용성 분획에서 나타났다.

Table 12 Effects of extracts and fractions from cultivated fruitbody of *Phellinus linteus* and methanol extract from natural fruitbody of *Phellinus linteus* on Cu²⁺- induced LDL lipid peroxidation

Sample	MDA(nmol/mg protein)				
	12.5	25	50	100	200
LDL			0.87±0.06		
Ox-LDL			20.89±0.85		
Ascorbic acid	20.08±0.22	8.19±2.23*	2.60±0.38***	1.84±0.06***	-
CPL MeOH Ex.	-	14.83±2.69	9.34±1.72*	1.93±0.24***	-
Precipitates	-	20.03±0.46	18.95±1.52	18.06±0.73*	-
Water Insoluble Fr.	18.28±1.01	2.86±1.46**	1.67±0.52***	0.92±0.04***	-
Water Fr.	-	20.45±0.50	19.46±0.61	18.97±0.36	-
Ether Fr.	-	19.97±1.04	15.82±1.59*	2.78±0.40***	-
CPL Water Ex.		20.41±0.55	19.33±0.47	17.96±1.30	4.68±2.46*
NPL MeOH Ex.	15.11±2.05	2.15±0.40***	1.27±0.27***	0.89±0.05***	-

LDL : unoxidized LDL
 Ox-LDL : Cu²⁺-induced oxidized LDL
 CPL : Cultivated fruitbody of *Phellinus linteus*
 NPL : Natural fruitbody of *Phellinus linteus*
 CPL Water ex. : 상황 배양 균사체의 물 엑스
 NPL MeOH ex. : 자연산 상황의 MeOH 엑스
 북한산 자연상황 유통품(서울 경동시장)

Each value is mean ± S.D. (n=3)

Significantly different from negative control :

p<0.01 ** p<0.001 *** p<0.0001

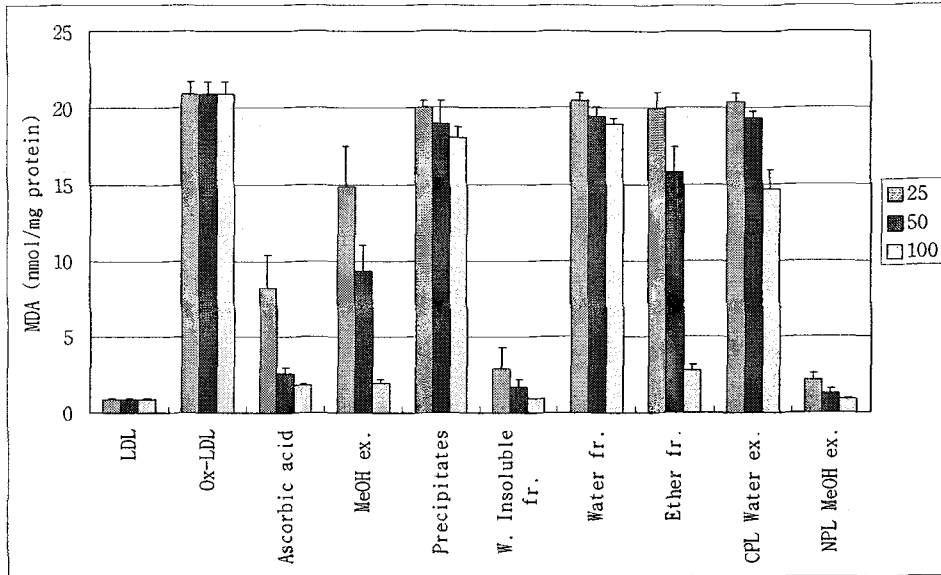


Fig. 68. Effects of extracts and fractions from cultivated fruit body of *Phellinus linteus* and methanol extract from natural fruit body of *Phellinus linteus* on Cu^{2+} -induced LDL lipid peroxidation

LDL : unoxidized LDL

Ox-LDL : Cu^{2+} -induced oxidized LDL

MDA 농도 (nmol/mg protein) = (f/F) × 10

F : 표준시료의 흡광도 (532 nm)

f : 검체의 흡광도 (532 nm)

CPL : Cultivated fruit body of *Phellinus linteus*

NPL : Natural fruit body of *Phellinus linteus*

CPL Water ex. : 배양목질진흙버섯 자실체의 물 엑스

NPL MeOH ex. : 자연산 상황의 MeOH 엑스

북한산 자연상황 유통품 (서울 경동시장)

Each value represents the mean ± S.D. (n=3)

Significantly different from negative control : * p<0.01, ** p<0.001, ***

p<0.0001

Table 13. Effects of extracts and fractions from cultivated fruit body of *Phellinus linteus* and methanol extract from natural fruit body of *Phellinus linteus* on Cu²⁺- induced LDL lipid peroxidation

Sample	IC ₅₀ (μg/ml)
Ascorbic acid	3.71
CPL MeOH ex.	4.39
Precipitates	36.46
Water Insoluble fr.	3.15
Water fr.	46.88
Ether fr.	6.67
CPL Water ex.	31.62
NPL MeOH ex.	2.49

$$\text{Inhibition(\%)} = \frac{[\text{Ox-LDL}] - [\text{Sample LDL}]}{[\text{Ox-LDL}] - [\text{LDL}]} \times 100$$

[Ox-LDL] : MDA of Cu²⁺- induced oxidized LDL

[Sample LDL] : MDA of sample added oxidized LDL

[LDL] : MDA of unoxidized LDL

IC₅₀ : Required sample concentration (μg/ml) for 50% inhibition
Cu²⁺- induced LDL (mg protein) lipid peroxidation

CPL : Cultivated fruit body of *Phellinus linteus*

NPL : Natural fruit body of *Phellinus linteus*

CPL Water ex. : 배양목질진흙버섯 자실체의 물 엑스

NPL MeOH ex. : 자연산 상황의 MeOH 엑스

북한산 자연상황 유통품 (서울 경동시장)

2) Electrophoretic mobility에 미치는 영향

LDL에 CuSO_4 를 가하여 4시간 동안 산화시킨 후 agarose gel상에 서 mobility를 관찰한 결과 그 mobility가 증가하였다. 그것은 산화에 의해 LDL의 surface negative charge가 증가되었음을 의미하며 이는 LDL중 apoprotein B의 lysine잔기의 derivatization에 기인한다고 할 수 있다.¹⁰⁵⁾

LDL에 자연산 상황의 MeOH ex.와 배양목질진흙버섯 자실체의 Water ex.와 MeOH ex. 및 MeOH ex.의 각 분획을 100 ppm씩 가한 후 CuSO_4 를 가하여 산화시킨 후 agarose gel electrophoresis를 행하여 mobility를 측정하였으며, 시료를 가하지 않고 산화 시킨 LDL의 mobility와 비교한 결과는 다음과 같다 (Table 2.3).

상황은 산화 LDL에 대한 mobility의 증가에 대해 억제효과를 나타내었고, 배양목질진흙버섯 자실체보다 자연산 상황이 현저히 억제되었다. 배양목질진흙버섯 자실체의 MeOH ex. 분획 중에서는 대체로 모든 시료에서 산화 LDL에 대한 mobility의 증가 억제를 확인하였고, 이 중 Water Insoluble fr.과 Ether fr.에서 유의성 있는 증가억제를 확인하였으며, 이로써 산화 LDL에 대한 항산화효과를 확인하였다.

생체내에서 생성된 지질과산화물은 간장질환, 혈전증, 심장병, 미숙아의 망막증 등의 질병과 노화 및 암 등의 원인물질로 규명됨에 따라 많은 관심이 집중되고 있다.¹⁰⁶⁾ 지질과산화물은 세포내의 단백질 또는 지질 등과 같은 거대분자들과 결합하여 세포를 괴사시키며, 간장과 관련하여 간세포의 괴사를 야기시켜, 세포내의 효소가 방출되어 혈중의 GOT 및 GPT의 수치가 높아진다.⁸²⁾ Sawaki 등⁸²⁾은 간염, 지방간 및 간경화증 환자들에 있어서 지질과산화의 지표인 혈중 내 MDA치가 상승하는 것을 보고함으로써, 자연 상황 및 배양목질진흙버섯 자실체에서 나타나는 지질과산화 억제능은 산화적 손상에 대한 보호효과 및 간 보호작용을 나타내는 것으로 사료된다.

Table 14. Effects of extracts and fractions from cultivated fruit body of *Phellinus linteus* and methanol extract from natural fruit body of *Phellinus linteus* on electrophoretic mobility changes by Cu^{2+} -induced LDL oxidation

Sample	Electrophoretic mobility (cm)	REM%
LDL	4.77±1.10	0
Ox-LDL	6.90±0.36	100
Ascorbic acid	5.57±0.06**	40.6
CPL MeOH ex.	6.30±0.62	71.9
Precipitates	6.37±0.61	75.0
Insoluble fr.	4.97±0.85*	9.4
Water fr.	6.30±0.75	71.9
Ether fr.	5.67±0.15**	42.2
CPL Water ex.	6.67±0.47	89.1
NPL MeOH ex.	5.50±1.25	34.4

$$\text{REM (\%)} = \frac{[\text{Sample}] - [\text{LDL}]}{[\text{Ox LDL}] - [\text{LDL}]} \times 100$$

[Sample LDL] : Electrophoretic mobility of sample added oxidized LDL

[LDL] : Electrophoretic mobility of unoxidized LDL

[Ox-LDL] : Electrophoretic mobility of Cu^{2+} - induced oxidized LDL

*REM (relative electrophoretic mobility) regarded as sample added oxidized LDL migration compared with unoxidized LDL mobility

CPL : Cultivated fruit body of *Phellinus linteus*

NPL : Natural fruit body of *Phellinus linteus*

CPL Water ex. : 배양목질진흠버섯 자실체의 물 엑스

NPL MeOH ex. : 자연산 상황의 MeOH 엑스, 북한산 자연상황 유통품

Each value represents the mean ± S.D. (n=3)

Significantly different from negative control : * p<0.02, ** p<0.01

다. 활성 분획에서 분리된 물질의 확인동정

1) . 화합물 I 의 확인동정

화합물 I 은 미황색의 액체로서 IR spectrum에서 2929 cm^{-1} 에서 aliphatic C-H, 1739 cm^{-1} 에서 $=\text{O}$, 1172 cm^{-1} 에서 C-O, 771 cm^{-1} 에서 long chain CH_2 에 의한 강한 흡수를 나타내고 있어 지방족 ester 화합물임을 추정할수 있었다 (Fig. 1.1).

EI-Mass spectrum에서 m/z 294에서 molecular ion peak [M^+]를, 그리고 m/z 263에서 CH_3O 가 탈락된 fragment ion peak를 관찰할 수 있었다 (Fig. 1.2).

^1H -NMR spectrum에서는 $\delta 0.82$ (3H)에서 1번 methyl proton이 triplet signal로 나타나고 있으며, $\delta 1.54$ (2H)에서 16번 methylene protone의 signal, $\delta 1.97\sim 2.10$ (4H)에서 5, 11번, $\delta 2.23$ (2H)에서 17번, $\delta 2.69$ (2H)에서 8번 methylene protone의 signal을, $\delta 1.18\sim 1.23$ (14H)에서 나머지 methylene protone의 signal을 관찰 할 수 있었다. 또한, $\delta 3.60$ (3H)에서 carbonyl에 결합되어 있는 19번 methyl proton을 확인 할 수 있었으며, 이중결합에 기인하는 methine proton signal이 $\delta 5.28$ (4H, 6, 7, 9, 10-CH)에서 multiplet으로 나타났다 (Fig. 1.3).

한편 ^{13}C -NMR spectrum에서는 총 19개의 signal을 나타내었고, 각각의 다중도는 DEPT experiment에 의하여 결정하였는데, 2개의 methyl carbon, 12개의 methylene carbon, 4개의 methine carbon 및 1개의 quarternary carbon의 존재를 확인 할 수 있었다 (Fig. 1.5, 1.6).

^{13}C -NMR spectrum에서는 $\delta 14.04$ (C-1)과 $\delta 51.43$ (C-19)에서 methyl 및 OCH_3 carbon signal들이 관측되었다. $\delta 22.54$ 에서 $\delta 34.09$ 사이에서 aliphatic group의 methylene carbon signal을 관찰 할 수 있었고, 이중결합이 있는 탄소에 기인하는 signal을 $\delta 127.86$ (C-6), 128.00 (C-9), 130.01 (C-7) 및 130.18 (C-10)에서 관찰할 수 있어 이중결합이 2개인 것을 추정할 수 있었고, 또한 지방산의 ester carboxyl기에 기인하는 carbon signal이 $\delta 174.33$ (C-18)에서 관측되었다 (Fig. 1.4).

이상의 기기분석 결과 및 문헌과의 비교로 화합물 I 은 분자량 294, 분자식 $C_{19}H_{34}O_2$ 인 linoleic acid methyl ester로 확인 동정하였다.¹⁰⁷⁾ 그러나 EI-Mass spectrum에서 m/z 270, 227, 143, 87, 74, 55 peak가 나타나는 것으로 보아 linoleic acid methyl ester외에 palmitic acid methyl ester가 혼입되어 있음을 추정할 수 있었다.¹⁰⁸⁾

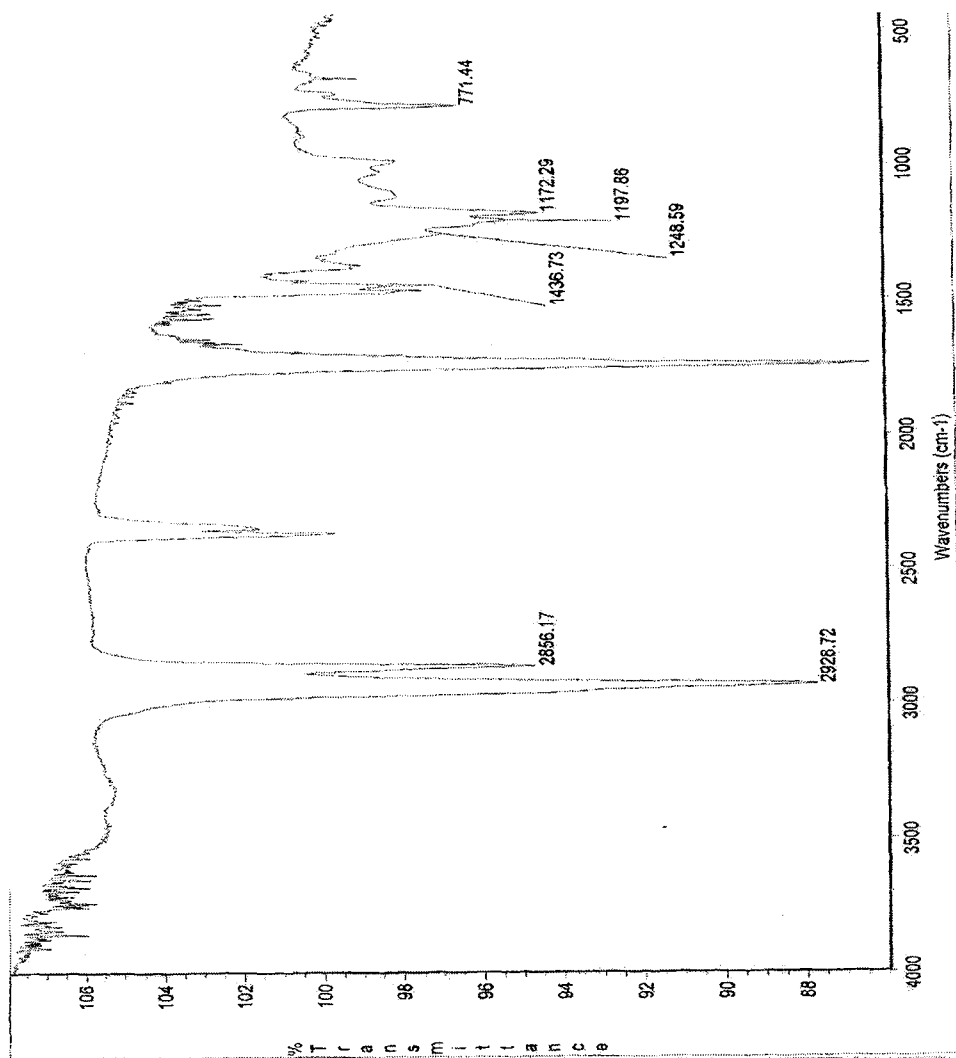


Fig. 69-1. IR spectrum of Compound I

Fig. 69-2. EI-MS spectrum of Compound I

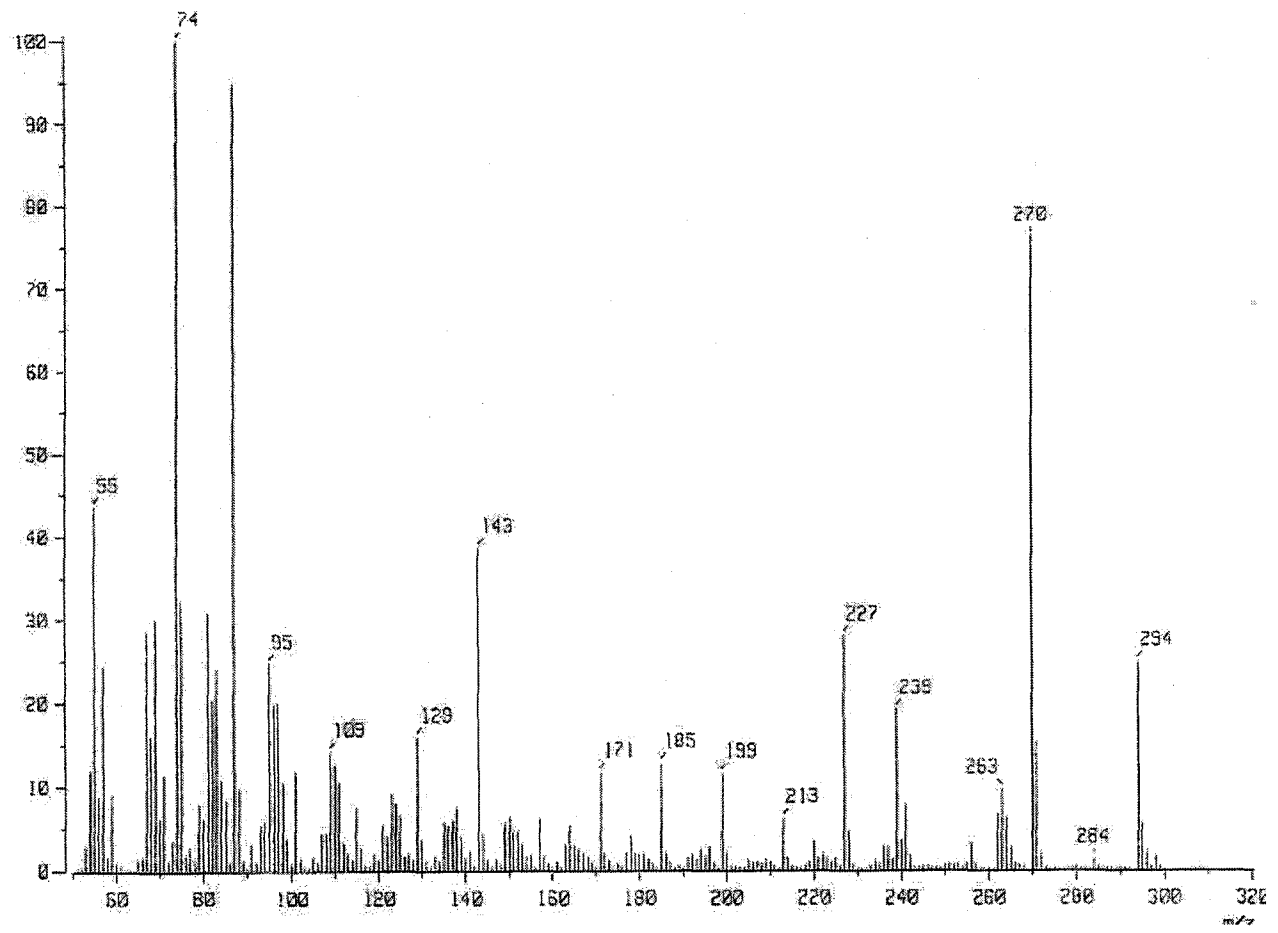
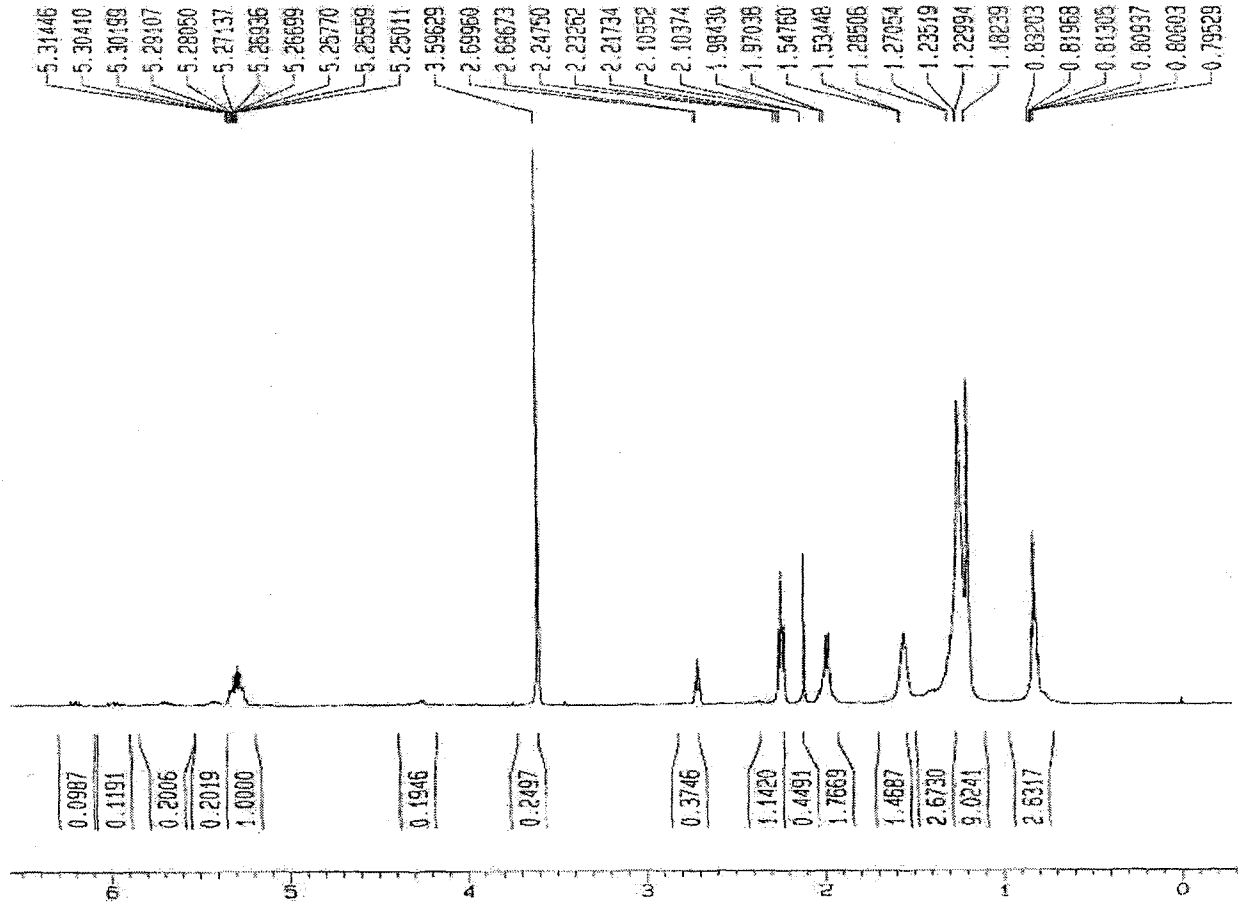


Fig. 69-3. $^1\text{H-NMR}$ spectrum of Compound I (500 MHz, CDCl_3)



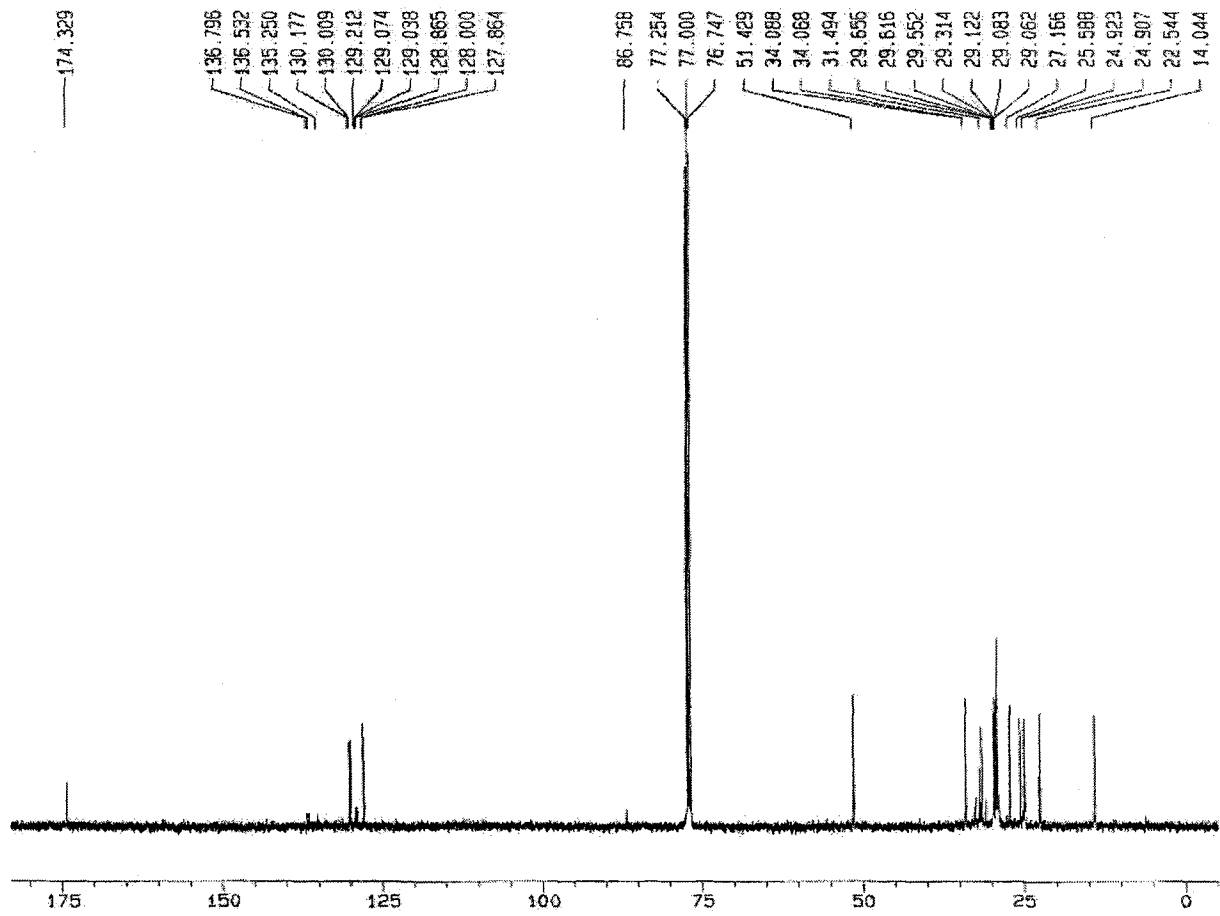


Fig. 69-4. ^{13}C -NMR spectrum of Compound 1 (125 MHz, CDCl_3)

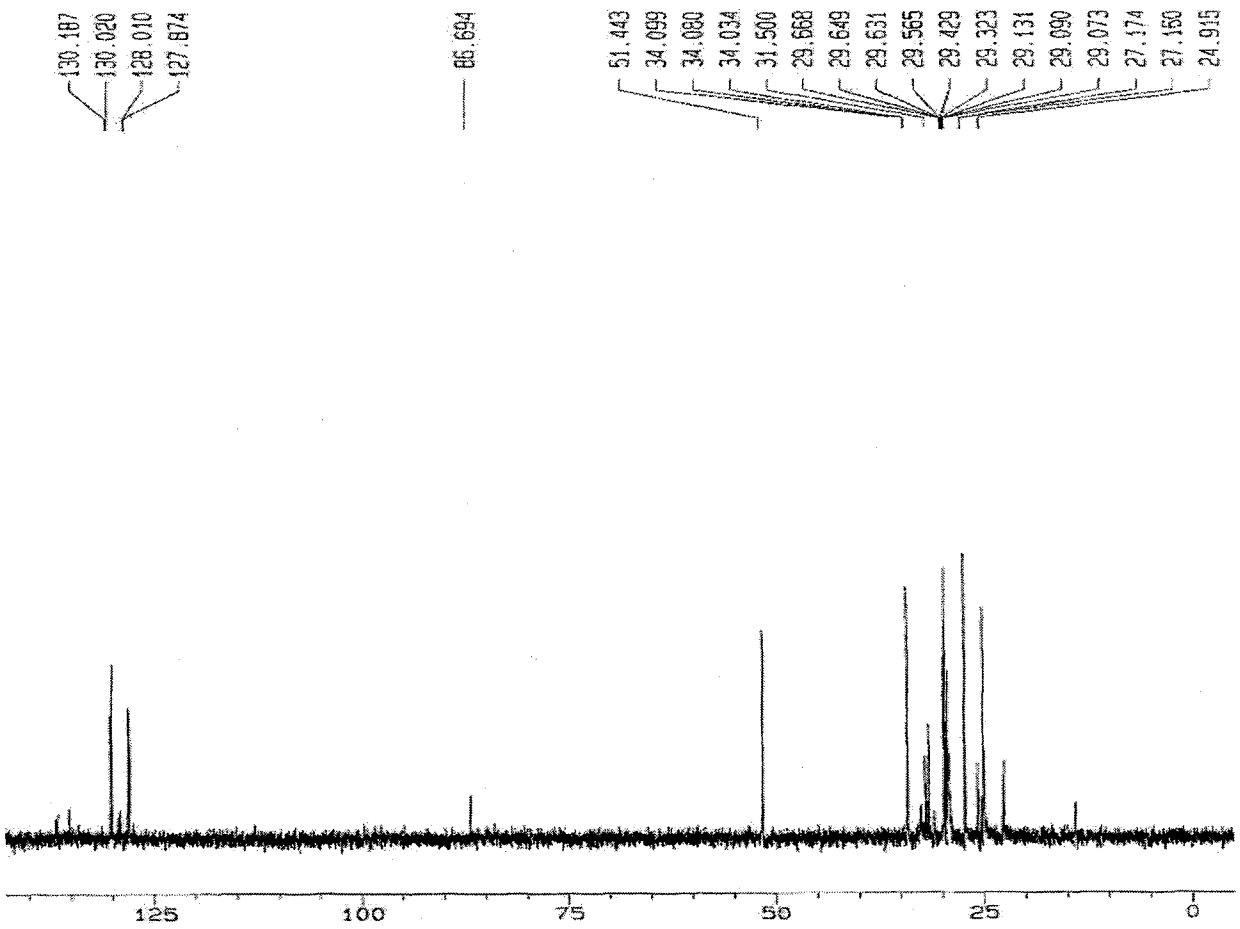


Fig. 69-5. DEPT 45° spectrum of Compound I

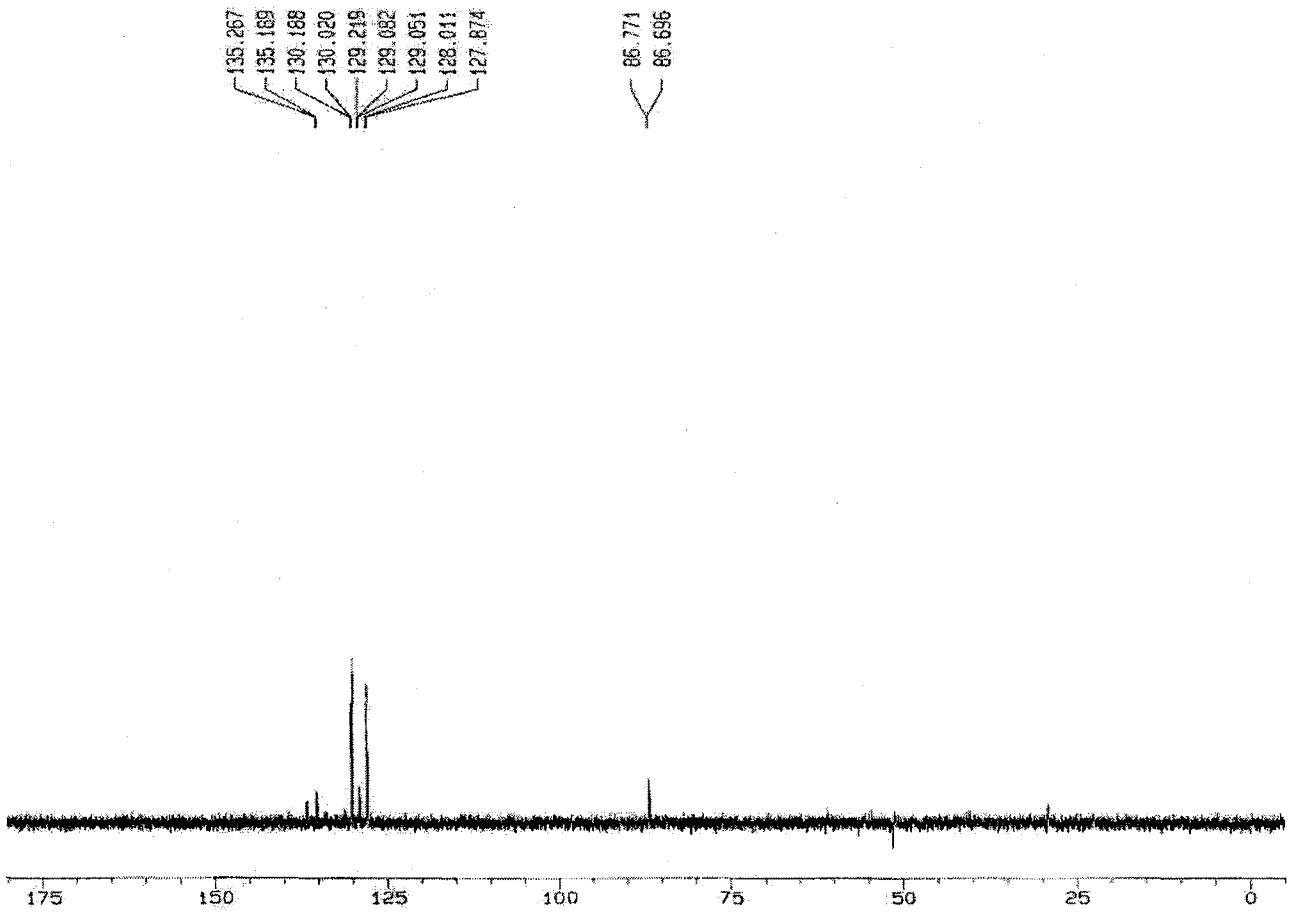


Fig. 69-6. DEPT 90° spectrum of Compound I

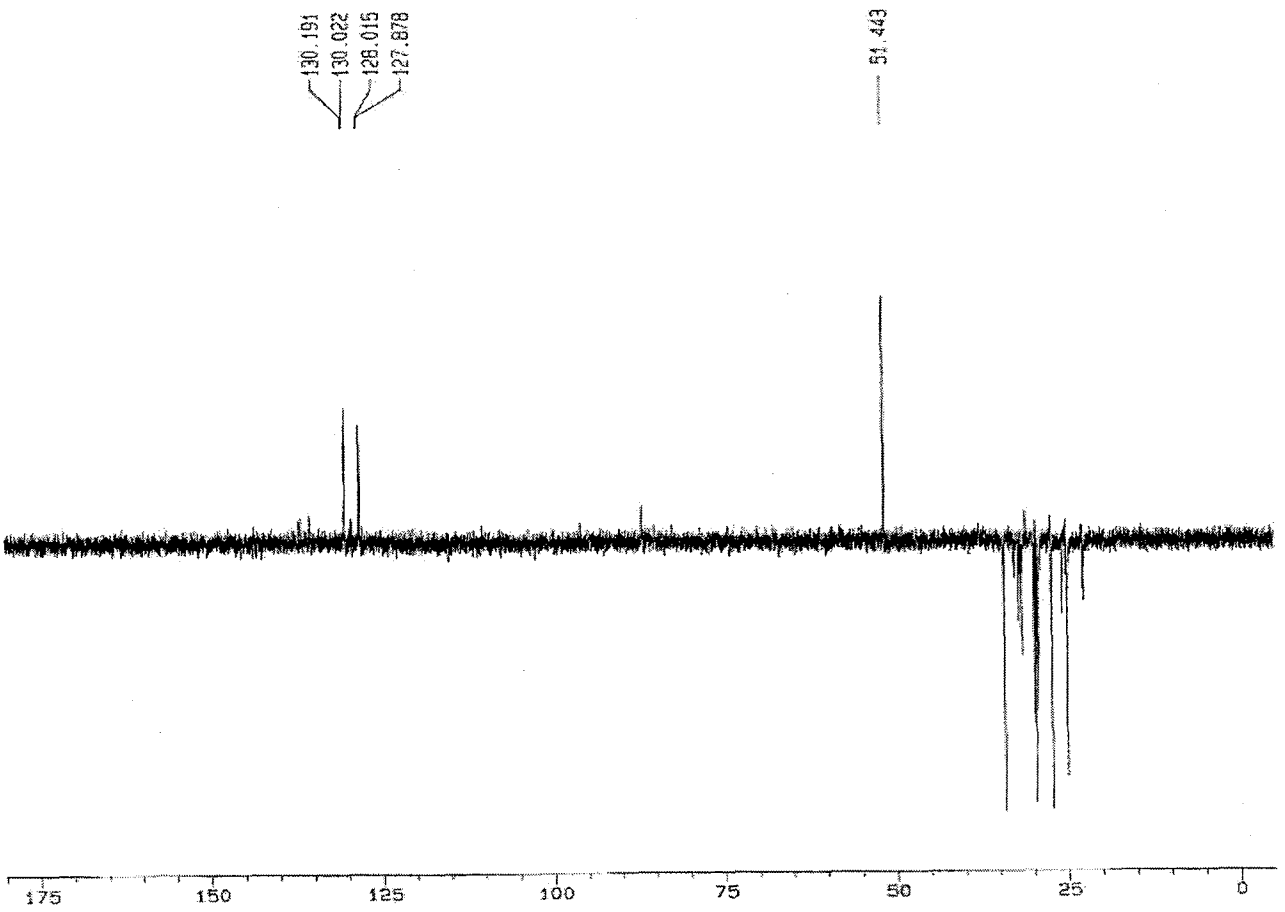


Fig. 69-7. DEPT ^{13}C NMR spectrum of Compound I

2) 화합물 II의 확인동정

화합물 II는 IR spectrum에서 2917 cm^{-1} 에서 aliphatic C-H, 1704 cm^{-1} 에서 C=O, 1296 cm^{-1} 에서 C-O, 717 cm^{-1} 에서 long chain CH_2 의 흡수를 나타내고 있어 지방족 화합물임을 추정할 수 있었다 (Fig. 2.1).

EI-Mass spectrum에서 m/z 256에서 molecular ion peak $[\text{M}^+]$ 를, 그리고 m/z 213, 129에서 fragment ion peak를 관찰할 수 있었다 (Fig. 2.2).

$^1\text{H-NMR}$ spectrum에서 $\delta 0.81$ (3H, 1- CH_3)에서 terminal methyl proton이 triplet signal로 나타나고 있으며, $\delta 1.19$ 와 1.26 사이 (24H)에서 2번에서 13번의 methylene proton signal을 관찰할 수 있었으며, carboxyl group에 대해 α 및 β position에 해당하는 methylene proton을 각각 $\delta 2.28$ (2H, 15- CH_2)과 $\delta 1.56$ (2H, 14- CH_2)에서 triplet signal로 확인할 수 있었다. 그러나, Compound I 과는 달리 이중결합에 기인하는 methine proton signal은 관측되지 않았다 (Fig. 2.3).

한편 $^{13}\text{C-NMR}$ spectrum에도 역시 Compound I 과 같이 지방족 직쇄화합물의 aliphatic group에 해당하는 carbon signal이 $\delta 14.10$ 에서 $\delta 33.98$ 사이에서 관측되며, $^1\text{H-NMR}$ spectrum에서와 마찬가지로 이중결합에 기인하는 methine carbon signal은 관측되지 않고, 지방산의 carboxyl group에 기인하는 carbon signal만이 $\delta 179.73$ (C-16)에서 관측되어 포화 지방족화합물임을 추정할 수 있었다 (Fig. 2.4).

이상의 기기분석 결과 및 문헌과의 비교로 화합물 II는 분자량 256, 분자식 $\text{C}_{16}\text{H}_{32}\text{O}_2$ 인 palmitic acid로 확인 동정하였다.^{107,108)}

그러나 EI-Mass spectrum에서 m/z 284, 312, 340 등에서도 peak들이 나타나는 것으로 보아 palmitic acid 외에 stearic acid, arachidonic acid, behenic acid 등도 미량 함유되어 있음을 추정할 수 있었다(Fig. 2.2).

Almeida 등¹⁰⁸⁾은 강력한 lymphocyte suppressive activity를 갖는 *Kalanchoe pinnata*의 매탄올 엑스 분획에서 지방산을 분리하여,

$^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$, IR 및 methylated sample에 대한 GC-MS를 통하여, 89.3%의 palmitic acid(C_{16})와 10.7%의 stearic acid(C_{18}), 미량의 arachidonic acid(C_{20})와 behenic acid(C_{22})로 이루어져 있으며, 이들 지방산이 면역억제 효과를 나타내는 데 일부 관여한다고 보고한 바 있다.

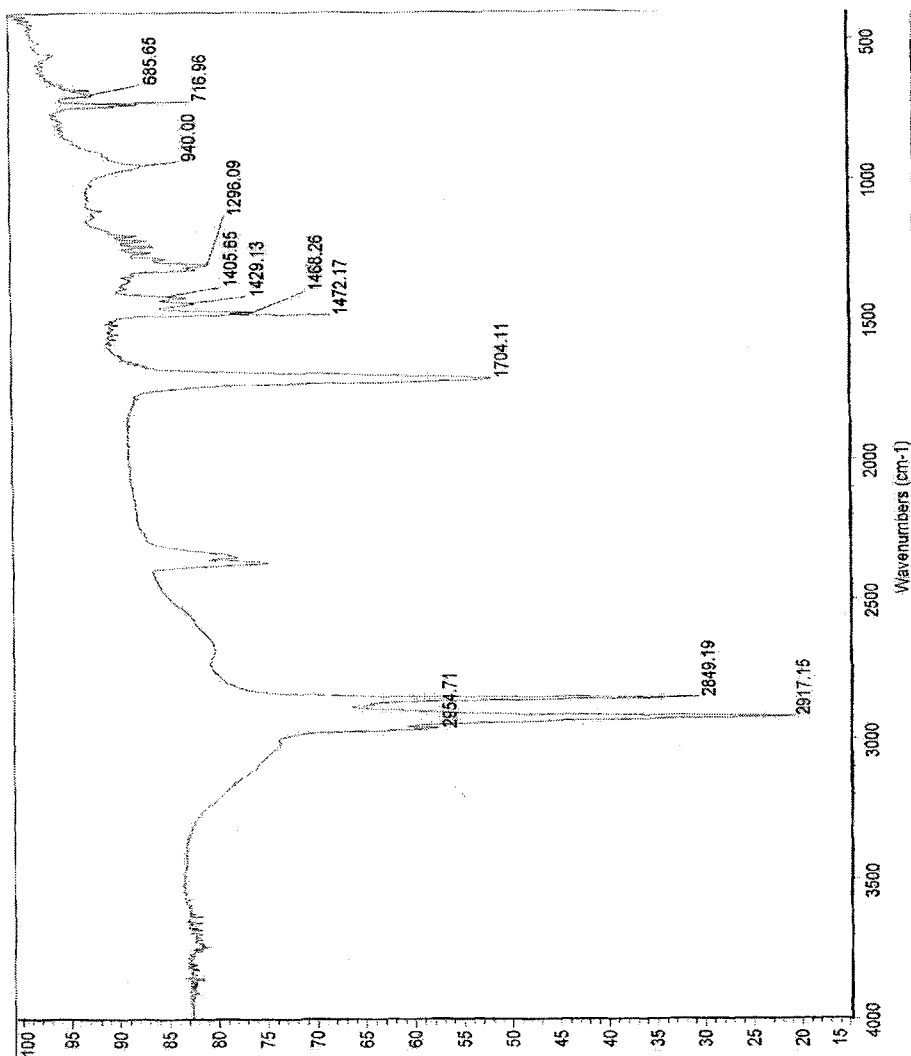


Fig. 70-1. IR spectrum of Compound II

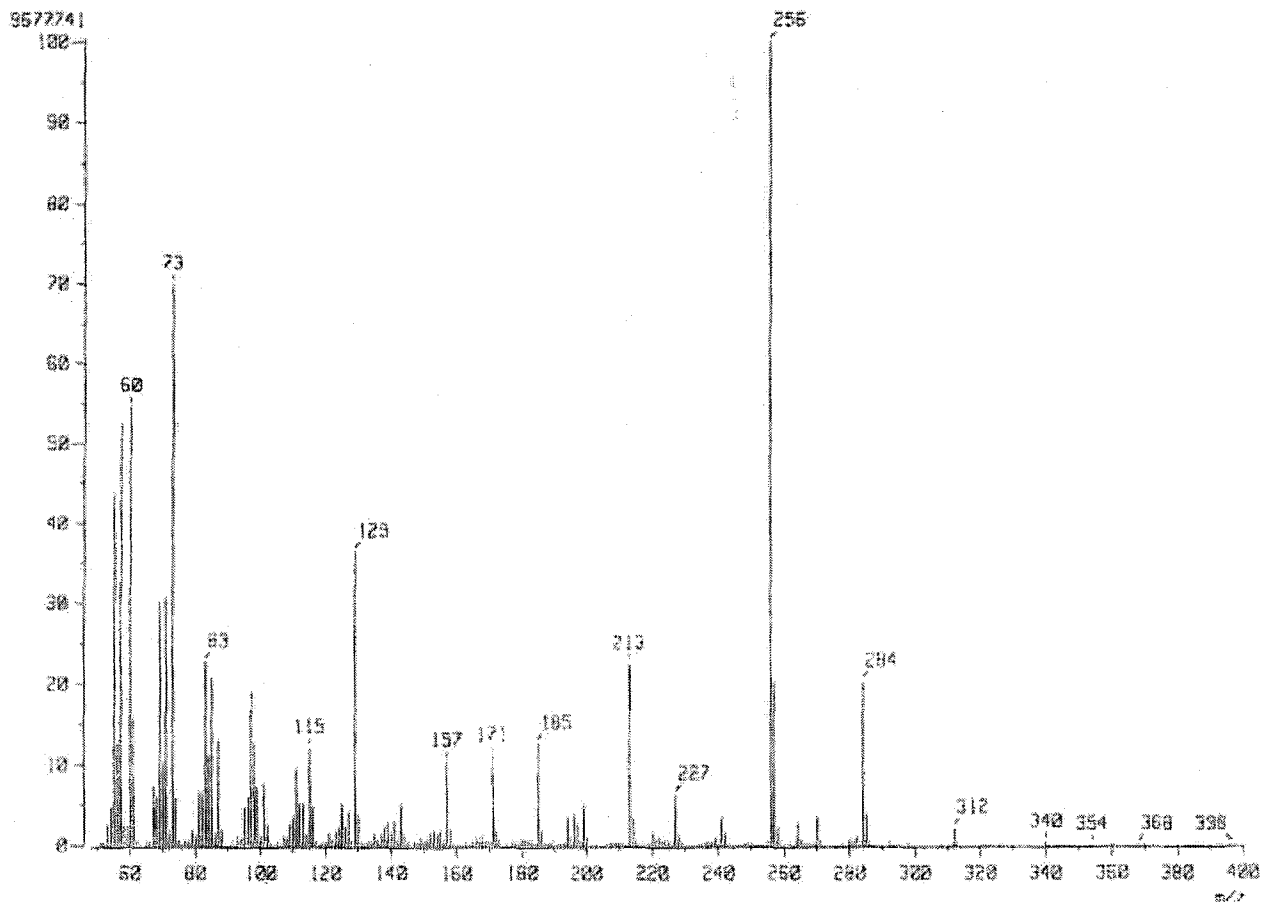


Fig. 70-2. EI-MS spectrum of Compound II

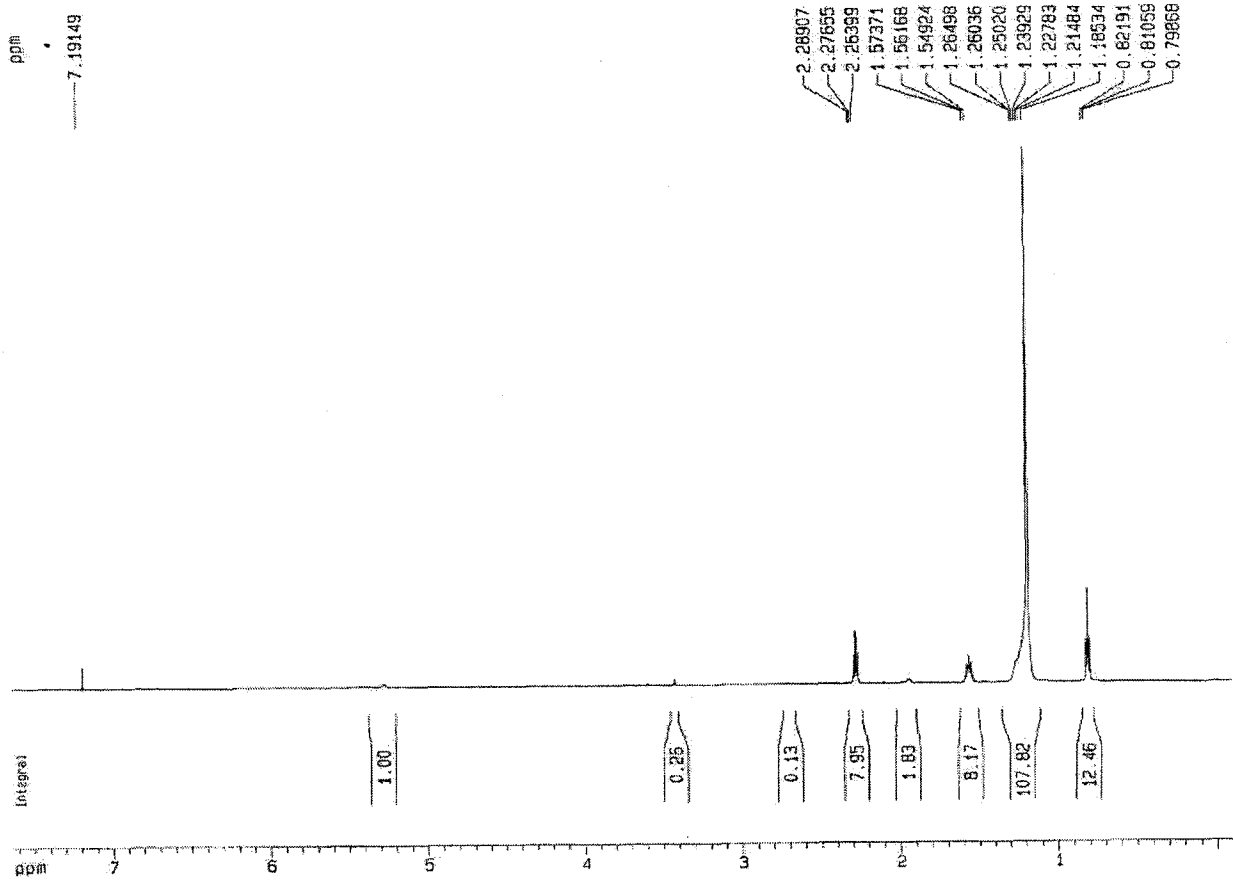


Fig. 70-3. $^1\text{H-NMR}$ spectrum of Compound II (600 MHz, CDCl_3)

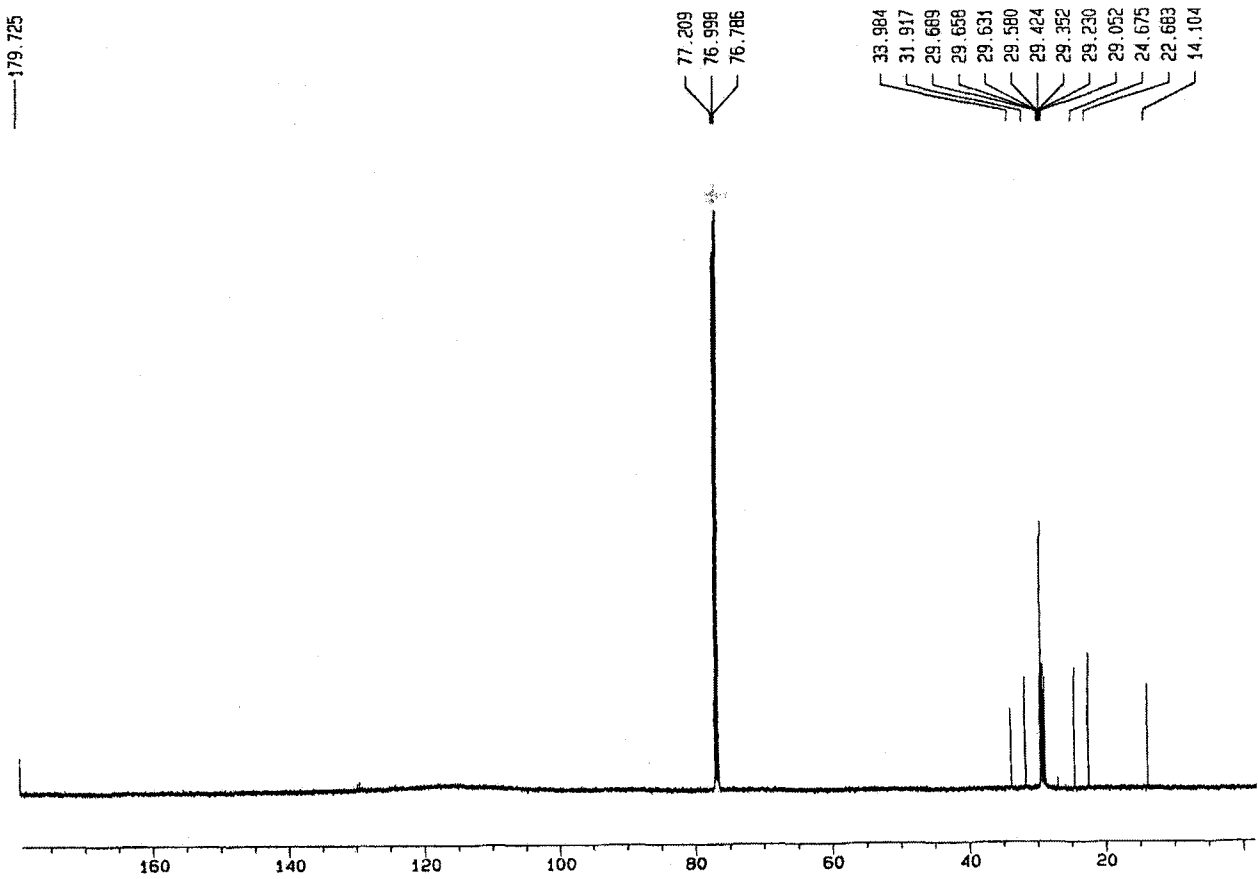


Fig. 70-4. ^{13}C -NMR spectrum of Compound II (150 MHz, CDCl_3)

3) 화합물 III의 확인동정

Compound III은 IR spectrum에서 2916 cm^{-1} 에서 aliphatic C-H, 1704 cm^{-1} 에서 C=O, 1285 cm^{-1} 에서 C-O에 의한 강한 흡수를 나타내고 있어 지방족 화합물임을 추정할 수 있었다 (Fig. 3.1).

EI-Mass spectrum에서 m/z 280에서 molecular ion peak $[M^+]$ 를, 그리고 m/z 256, 213, 171 및 129에서 fragment ion peak를 관찰할 수 있었다 (Fig. 3.2).

$^1\text{H-NMR}$ spectrum에서는 $\delta 0.81$ (3H)에서 1번 methyl proton이 triplet signal로 나타나고 있으며, $\delta 1.55$ (2H)에서 16번 methylene proton의 signal, $\delta 1.98$ (4H)에서 5, 11번, $\delta 2.28$ (2H)에서 17번, $\delta 2.69$ (2H)에서 8번 methylene proton의 signal을, $\delta 1.19$ 와 1.23 사이 (14H)에서 나머지 methylene proton의 signal을 관찰할 수 있었다. 이중결합에 기인하는 olefinic proton signal이 $\delta 5.28$ (4H, 6, 7, 9, 10-CH)에서 multiplet으로 나타났다 (Fig. 3.3).

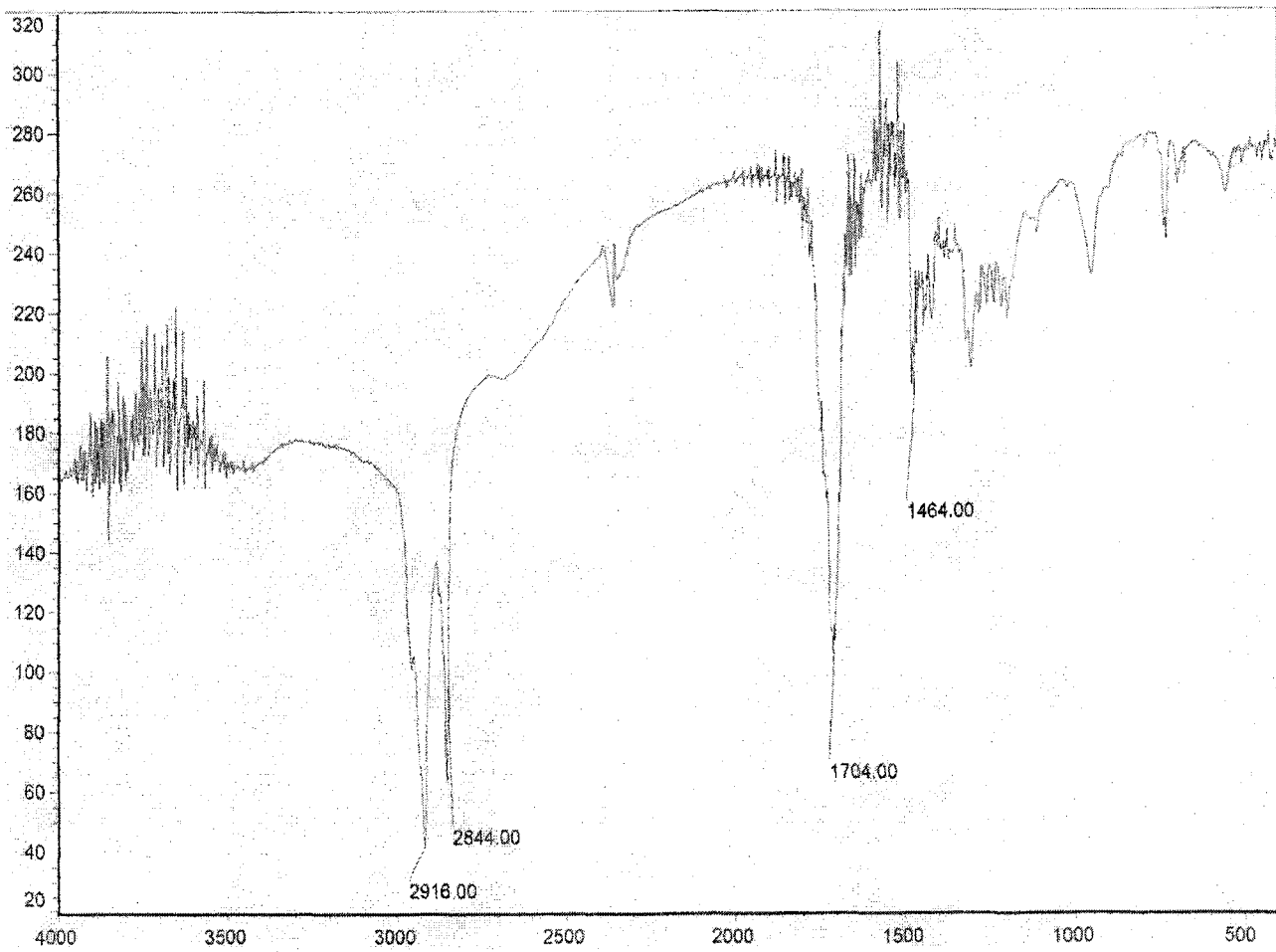
한편 $^{13}\text{C-NMR}$ spectrum에서는 terminal methyl carbon signal이 $\delta 14.18$ (C-1)에서 나타났으며, long chain의 methylene carbon signal들이 $\delta 22.66$ 에서 $\delta 34.15$ 사이에서 관측되었으며, 이중결합이 있는 탄소에 기인하는 carbon signal을 $\delta 128.19$ (C-6), 128.35 (C-9), 130.30 (C-7) 및 130.50 (C-10)에서 관찰할 수 있어 이중결합이 2개인 것을 추정할 수 있었다 (Fig. 3.4).

이상의 기기분석 결과 및 문헌과의 비교로 화합물 III은 분자량 280, 분자식 $\text{C}_{18}\text{H}_{32}\text{O}_2$ 인 linoleic acid로 확인 동정하였다.^{107,108)}

인간과 쥐의 식이에서 소비하는 지방의 양(level)과 성분이 면역계에 미치는 영향에 대한 연구가 이루어지고 있으며,^{109,110)} 인간과 쥐의 lymphocyte 억제효과는 불포화지방산이 palmitic acid나 stearic acid와 같은 포화지방산보다 우수한 것으로 보고되었다.^{111,112)}

Kapich 등¹¹³⁾은 linoleic acid는 목재 백색 부후성 버섯의 지질 중 중요한 불포화지방산으로 peroxidation mechanism을 통하여 *Phlebia radiata*의 manganese peroxidase에 의해 산화되는데, 이러한 지질 과산화는 목재 부후성 담자균류의 lignin 미생물 분해에 중요한 역할을 한다고 보고하고 있다.

Fig. 71-1. IR spectrum of Compound III



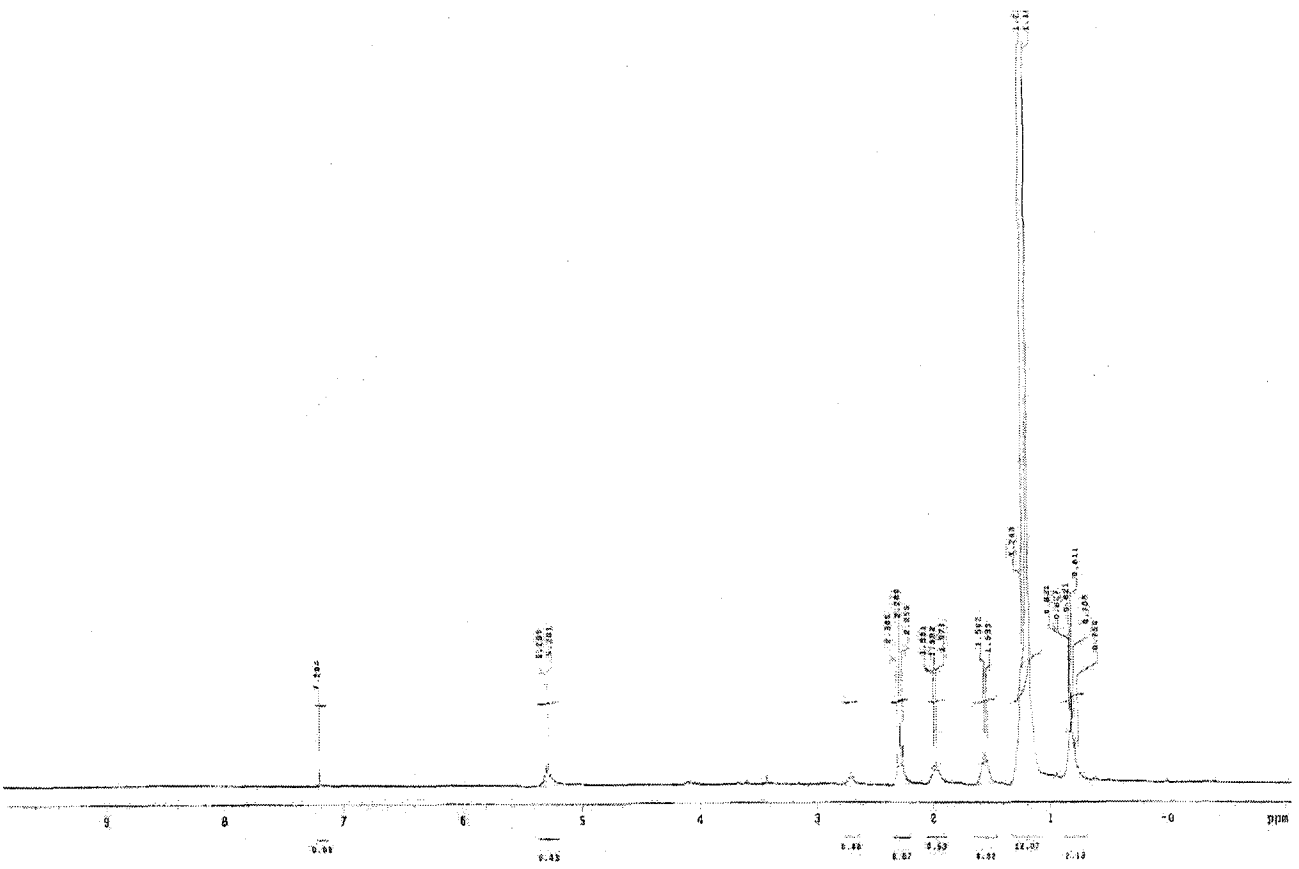
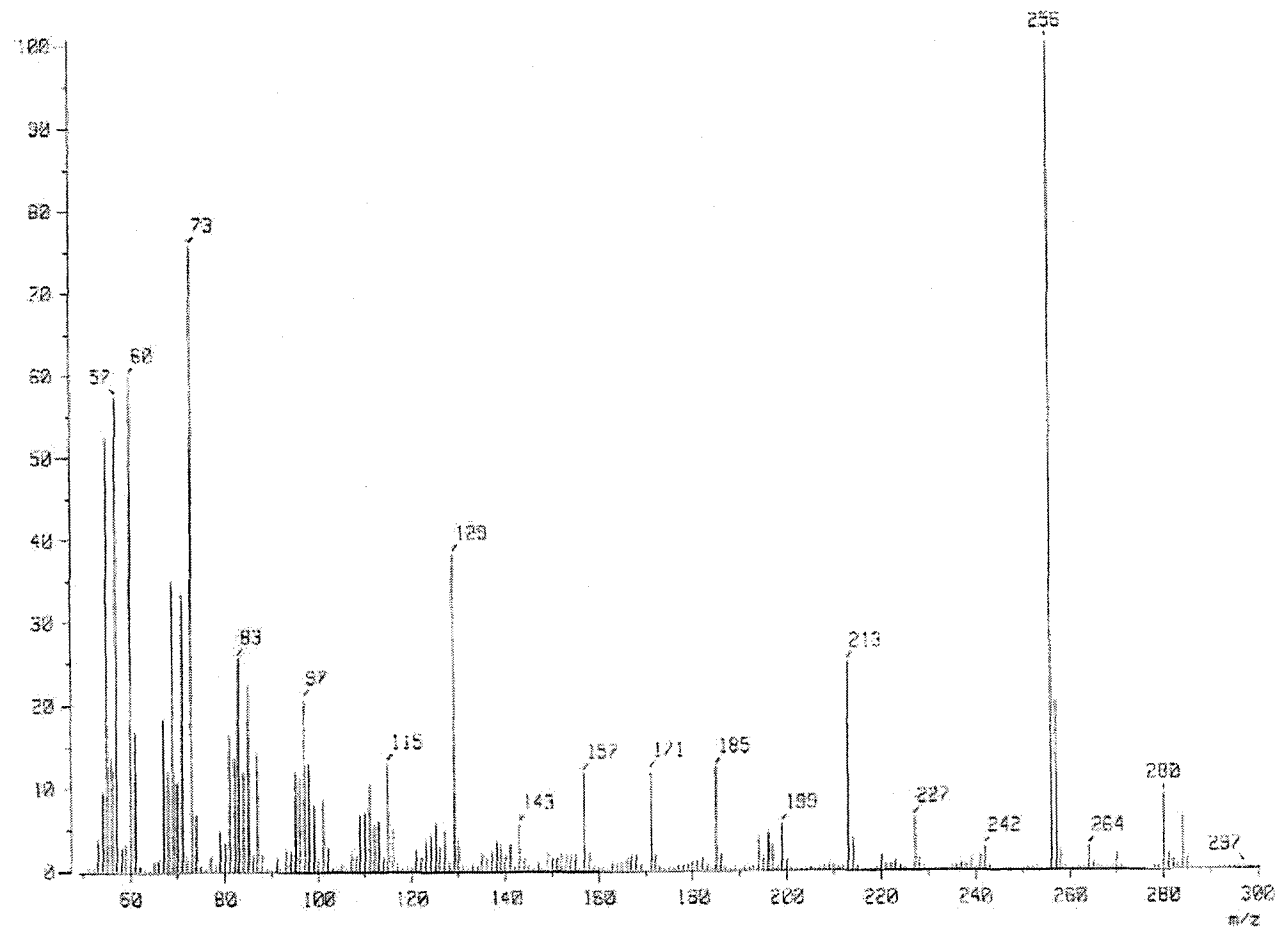
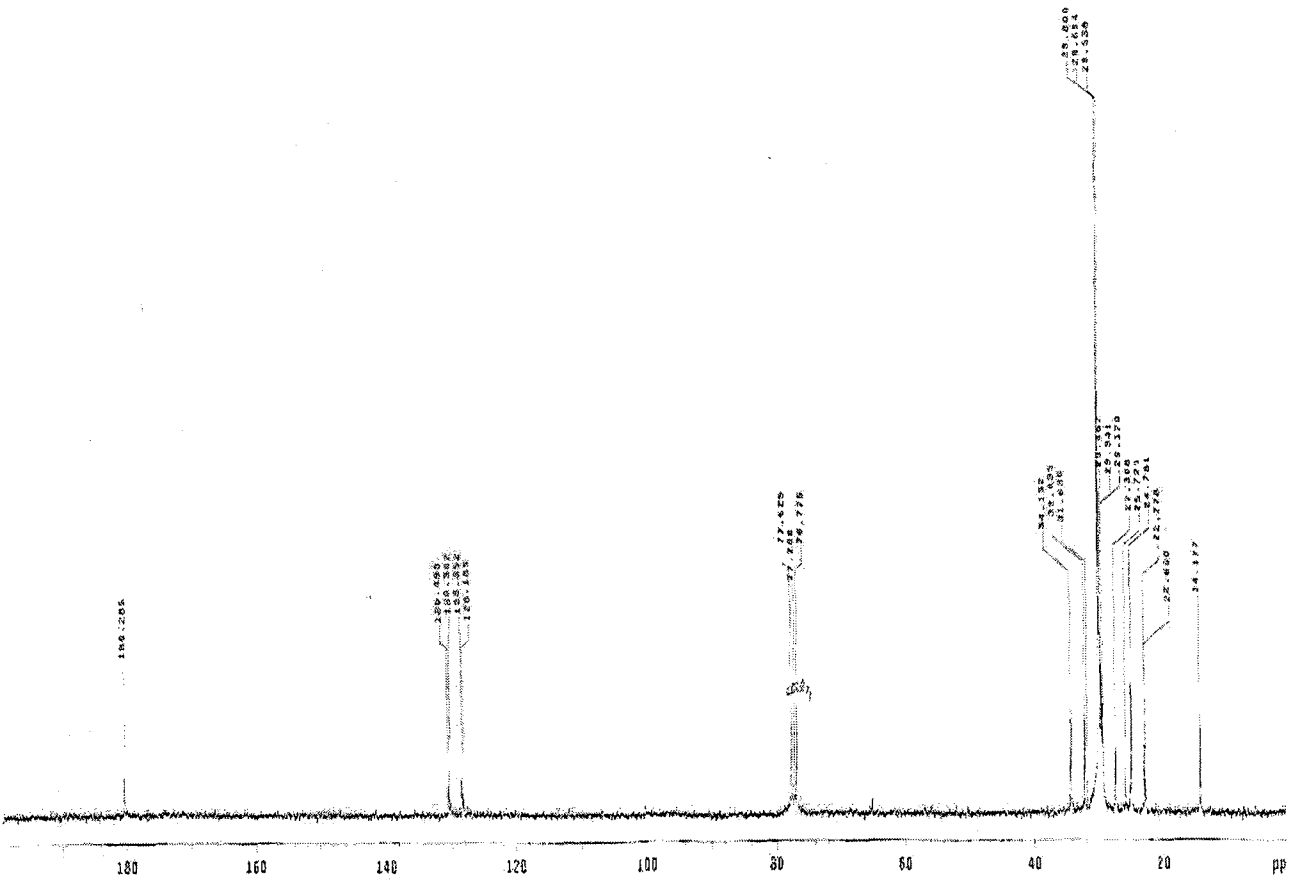


Fig. 71-2. EI-MS spectrum of Compound III

Fig. 71-3. $^1\text{H-NMR}$ spectrum of Compound III (300 MHz, CDCl_3)





4) . 화합물 IV

화합물 IV는 백색의 침상결정으로 IR spectrum에서는 3425 cm^{-1} 에서 O-H, 2955 cm^{-1} 에서 aliphatic C-H, 1652 cm^{-1} 에서 C=C, 1038 cm^{-1} 에서 C-O에 기인하는 흡수를 나타내고 있어 지방족 화합물임을 추정할 수 있었다 (Fig. 4.1).

EI-Mass spectrum에서 m/z 396에서 molecular ion peak $[M^+]$ 를, 그리고 m/z 363, 271 및 253에서 분자이온으로부터 각각 $[\text{CH}_3+\text{H}_2\text{O}]$, $[\text{C}_9\text{H}_{17}+\text{H}_2]$ 및 $[\text{C}_9\text{H}_{17}+\text{H}_2\text{O}]$ 가 탈리된 fragment ion peak를 관찰할 수 있었다. 또한 C20과 C22 bond의 개열로 인한 17 α proton의 이동으로 생성되는 m/z 300 peak와 $[\text{M-side chain}-2\text{H}]^+$ 로 인해 나타나는 m/z 271 peak는 C22가 불포화된 free sterol의 특징적인 peak이다 (Fig. 4.2).¹¹⁴⁾

$^1\text{H-NMR}$ spectrum에서는 $\delta 0.62$ (3H, 18- CH_3) 및 $\delta 0.93$ (3H, 19- CH_3)에서 angular methyl group의 singlet signal들이 나타나고 있으며, $\delta 0.81$ (3H, 27- CH_3 , $J=6.9\text{Hz}$), $\delta 0.82$ (3H, 26- CH_3 , $J=6.9\text{Hz}$), $\delta 0.90$ (3H, 28- CH_3 , $J=6.9\text{Hz}$) 및 $\delta 1.02$ (3H, 21- CH_3 , $J=6.6\text{Hz}$)에서 secondary methyl group의 doublet signal들을 관찰할 수 있었다. 또한 $\delta 3.63$ (1H)에서 3-H의 multiplet signal이 관측되며, 이중결합에 기인하는 olefinic proton signal이 $\delta 5.19$ (2H, 22, 23-H), $\delta 5.38$ (1H, 7-H) 및 $\delta 5.56$ (1H, 6-H)에서 multiplet으로 관측되어 sterol중 2중결합을 3개 가지는 ergosterol임을 추정할 수 있었다 (Fig. 4.3).

한편 $^{13}\text{C-NMR}$ spectrum에서는 총 28개의 signal을 나타내었고, 각각의 다중도는 DEPT experiment에 의하여 결정하였는데, 6개의 methyl carbon, 7개의 methylene carbon, 11개의 methine carbon 및 4개의 quaternary carbon의 존재를 확인할 수 있었다. $\delta 21.20$ (C-27), 17.69 (C-28), 19.73 (C-21), 12.12 (C-18), 16.36 (C-19) 및 20.04 (C-26)에서 methyl carbon signal이 관측되었고, $\delta 70.64$ 에서 C-3 carbon signal이 나타나고 있는 것으로 보아, 3번 위치가 hydroxylation되어 있는 것을 추정할 수 있었다. 2개의 olefinic proton과 결합된 carbon들을 $\delta 119.86$ (C-6)과 $\delta 116.55$ (C-7)에서 관측할 수 있었고, exo double bond에 의한 carbon이 $\delta 135.86$ (C-22) 및

δ132.27 (C-23)에서 관측되어 ergostane계 화합물 중 환내에 2개, side chain에 1개를 갖는 ergosterol로 추정하였다 (Fig. 4.4, 4.5).

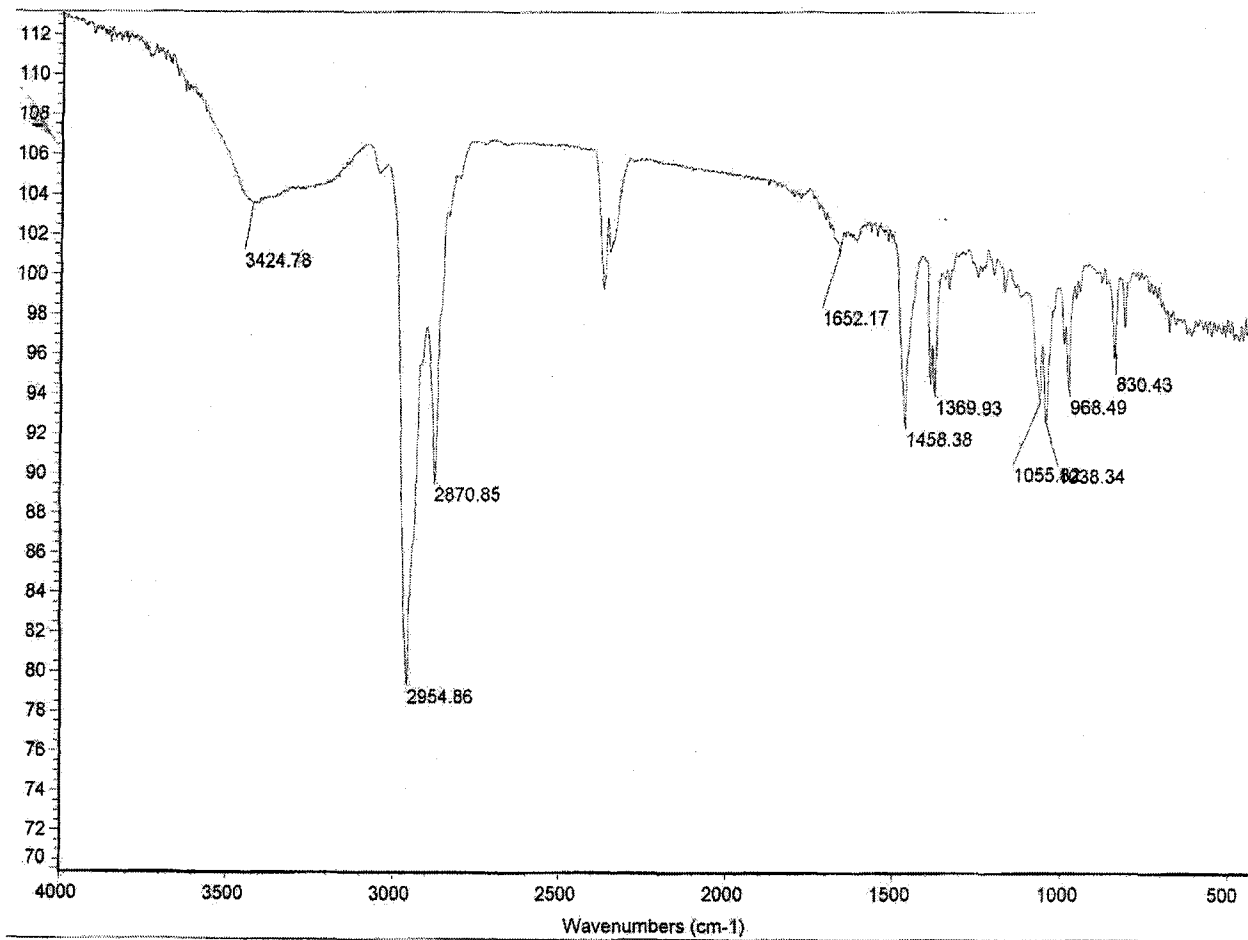
이상의 실험결과 및 문헌과의 비교로 화합물 IV를 분자량 396, 분자식 $C_{28}H_{44}O$ 의 ergosta-5,7,22-triene-3-ol인 ergosterol로 확인 동정하였다.^{107, 115-120)}

Ergosterol은 효모와 버섯(Fungi)에 널리 분포하며, 버섯의 주된 steroid로서, 고등식물에서도 소량 발견되었다.¹²¹⁾

가장 중요한 provitamin D로, 자외선 조사에 의해 강력한 Vitamin D_2 활성(hormonal activity)을 나타내며, 산소와 결합하여 peroxide화합물을 형성하고, hydrogen과 결합하여 polyhydro 화합물을 형성한다고 알려지고 있다.¹²²⁾

Yasuharu 등¹⁰⁾은 복령의 ergosterol이 방광암 유발 흰쥐에 대해 강한 억제효과를 나타냈다고 보고했다.

Fig. 72-1. IR spectrum of Compound IV



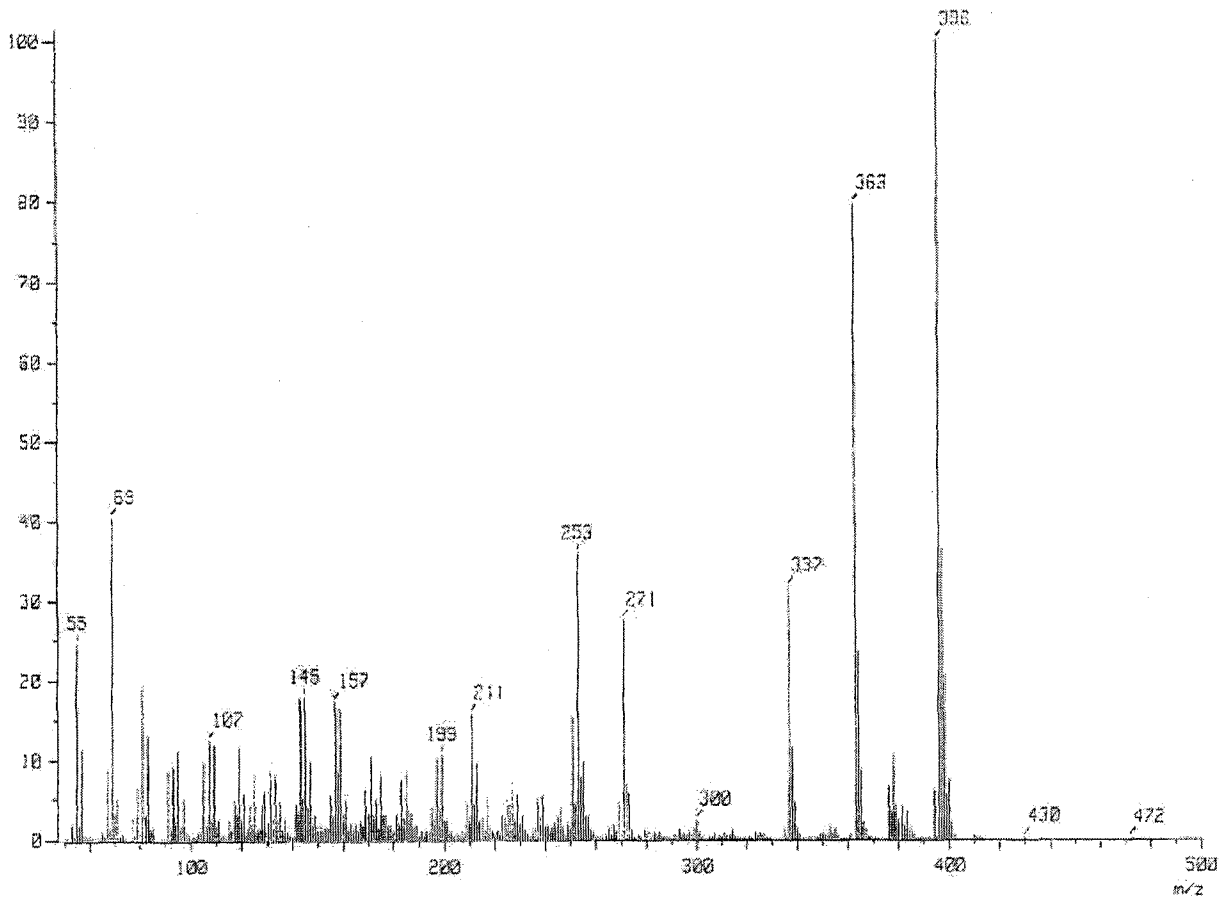


Fig. 72-2. EI-MS spectrum of Compound IV

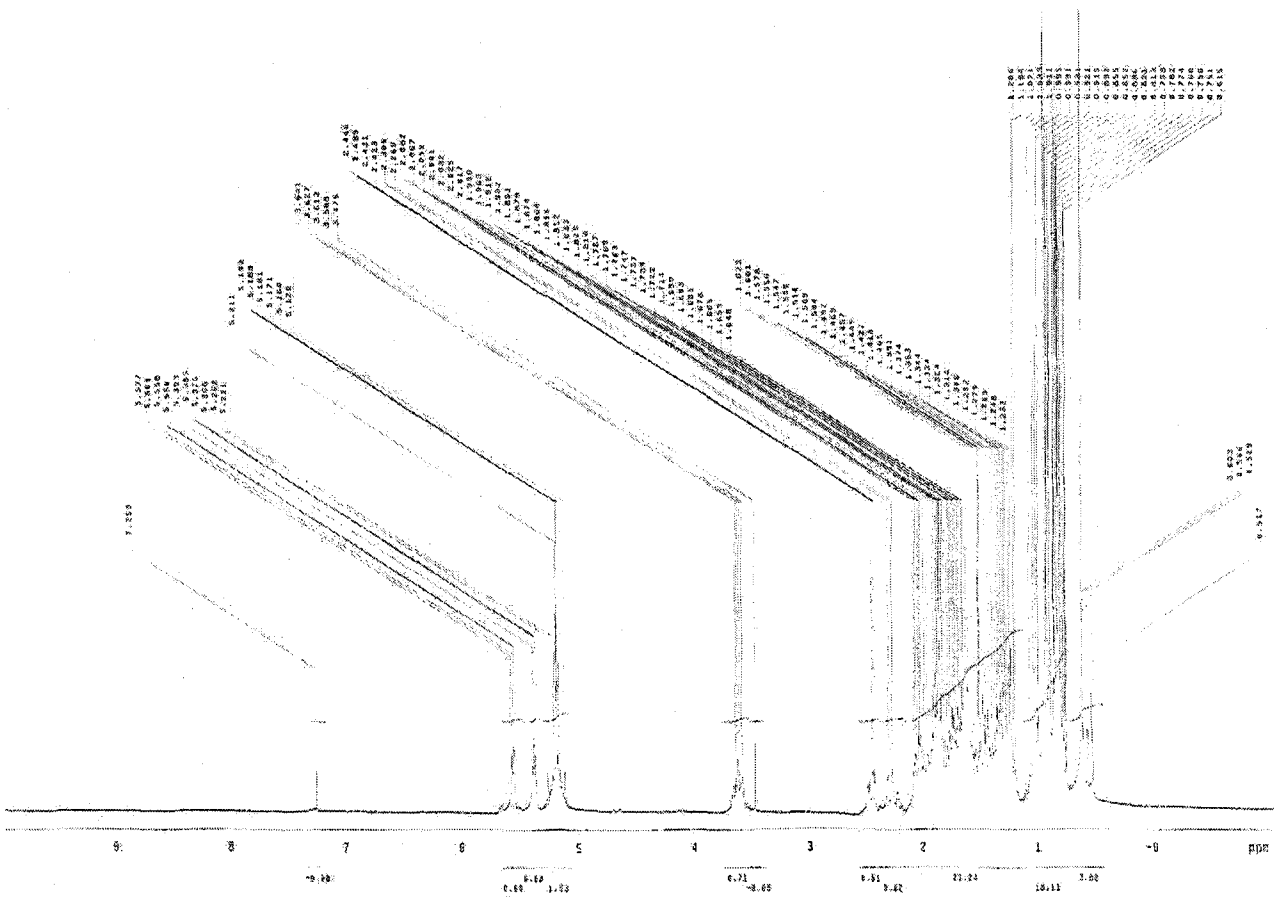


Fig. 72-3. ^1H -NMR spectrum of Compound IV (300 MHz, CDCl_3)

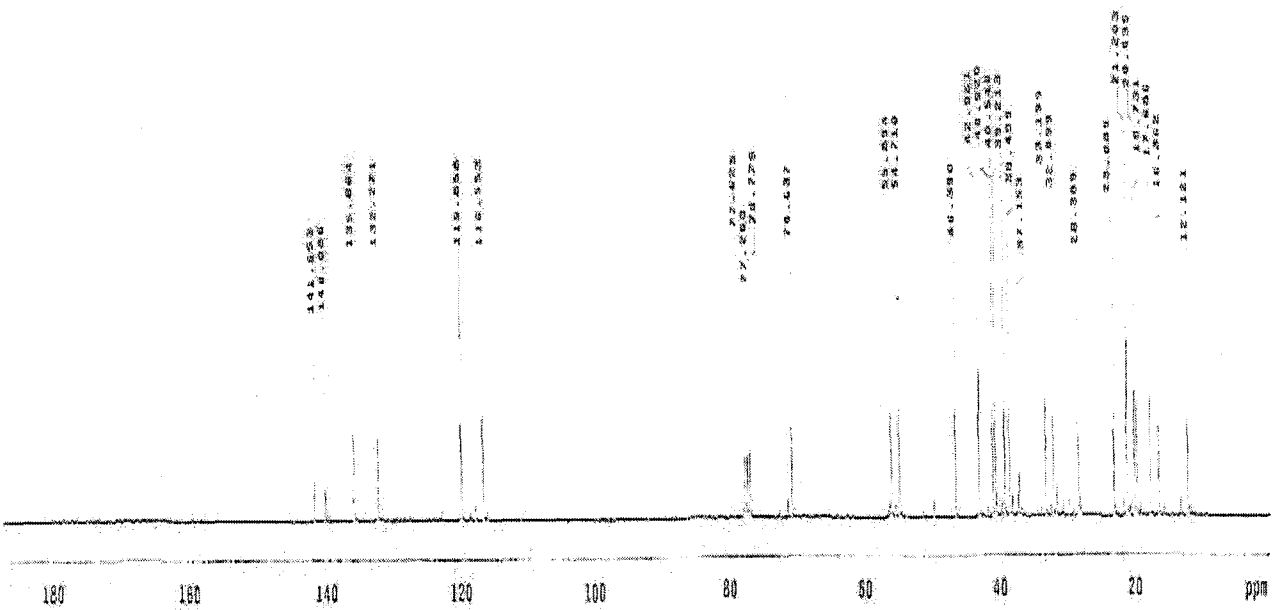


Fig. 72-4 ^{13}C -NMR spectrum of Compound IV (75.5 MHz, CDCl_3)

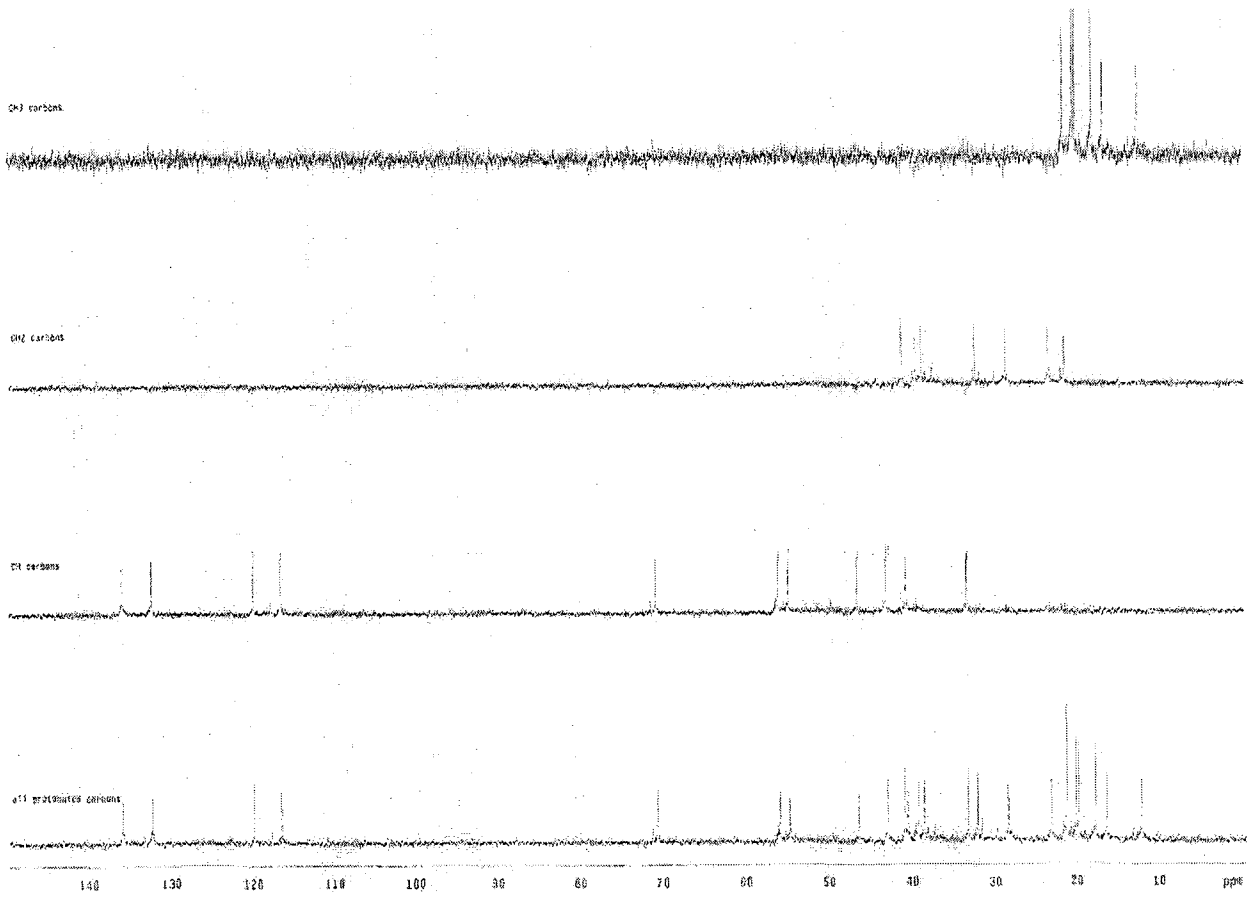


Fig. 72-5 Edited DEPT spectrum of Compound IV

5) 화합물 V

화합물 V는 백색의 침상결정으로 IR spectrum에서 3284 cm^{-1} 에서 O-H, 2959 cm^{-1} 에서 aliphatic C-H, 1038 cm^{-1} 에서 C-O에 기인하는 흡수를 나타내고 있어 지방족 화합물임을 추정할 수 있었다 (Fig. 5.1).

EI-Mass spectrum에서 m/z 428에서 molecular ion peak [M^+]를, 그리고 m/z 410, 396, 363에서 분자이온으로부터 각각 H_2O , O_2 , [$\text{O}_2+\text{H}_2\text{O}+\text{CH}_3$]가 탈리된 fragment ion peak들을 관찰할 수 있었다 (Fig. 5.2).

$^1\text{H-NMR}$ spectrum에서는 $\delta 0.75$ (3H, 18- CH_3) 및 $\delta 0.81$ (3H, 19- CH_3)에서 angular methyl group의 singlet signal들이 나타나고 있으며, $\delta 0.75$ (3H, 27- CH_3 , $J=7.0\text{Hz}$), $\delta 0.76$ (3H, 26- CH_3 , $J=6.9\text{Hz}$), $\delta 0.84$ (3H, 28- CH_3 , $J=6.8\text{Hz}$) 및 $\delta 0.93$ (3H, 21- CH_3 , $J=6.6\text{Hz}$)에서 secondary methyl group의 doublet signal을 관찰할 수 있었다. $\delta 3.90$ (1H)에서 3-H의 multiplet signal이 관측되었는데, 이는 인접한 dioxy group의 탈가림 효과에 의해 free sterol인 화합물 IV (ergosterol)에 비해 저자장에서 나타나고 있다. 이중결합에 기인하는 olefinic proton signal이 $\delta 6.17$ (1H, 6-H) 및 $\delta 6.44$ (1H, 7-H)에서 $J=8.5\text{Hz}$ 로 doublet으로 관측되었는데, 이것 역시 인접한 dioxy group의 탈가림 효과에 의해 화합물 IV에 비해 저자장에서 나타나며, 특히 $^1\text{H-}^1\text{H}$ COSY spectrum에서 이 두 signal들이 서로 correlation하는 것을 알 수 있었다. 이상의 결과로 peroxide group은 C5 및 C8 위치에 결합되어 있음을 알 수 있었다. 한편 side chain의 이중결합에 기인한 signal이 $\delta 5.07$ (1H, 23-H, $J=8.4$, 15.3Hz)과 $\delta 5.15$ (1H, 22-H, $J=7.5$, 15.3Hz)에서 각각 doublets of doublet으로 관측되었다. Mass spectrum의 m/z 396 peak와 $^1\text{H-NMR}$ spectrum의 $\delta 6.17$ 및 $\delta 6.44$ 의 signal은 ergosterol peroxide의 특징적인 peak들이다 (Fig. 5.3, 5.7).¹²⁰⁾

$^{13}\text{C-NMR}$ spectrum에서는 총 28개의 signal을 나타내었고, 각각의 다중도는 DEPT experiment에 의하여 결정하였는데, 6개의 methyl carbon, 7개의 methylene carbon, 11개의 methine carbon 및 4개의 quaternary carbon의 존재를 확인할 수 있었다 (Fig. 5.4, 5.5). $\delta 12.84$ (C-18), 17.53 (C-28), 18.15 (C-19), 19.61 (C-27), 19.93 (C-26) 및 20.60 (C-21)에서 methyl carbon signal이 관측되었고, $\delta 66.42$ 에서 C-3 carbon signal이 down field shift 하여 나타나고 있는 것으로 보아 3번 위치가 hydroxylation되어 있는 것을 추정할 수 있었다. 한편 1개의 olefinic proton의 결합에 의한 carbon signal들이 $\delta 130.71$ (C-6) 및 $\delta 135.36$ (C-7)에서 관측되고 있고, 이외에도

oxygenated quaternary carbon signal들이 $\delta 79.40$ (C-5)과 $\delta 82.14$ (C-8)에서 각각 나타남을 알았다. 또한 side chain의 double bond에 의한 carbon이 $\delta 135.17$ (C-22) 및 $\delta 132.30$ (C-23)에서 관측되어 환내에 1개, 환밖에 1개를 갖는 peroxyergosterol 유도체로 추정하였다 (Fig. 5.4~5.6).

이상의 실험결과 및 문헌과의 비교로 화합물 V를 분자량 428, 분자식 $C_{28}H_{44}O_3$ 인 5,8-epidioxyergosta-6,22-dien-3-ol인 ergosterol peroxide로 확인 동정 하였다.^{119,120)}

Ergosterol peroxide는 *Lasiosphaera nipponica*,¹²⁰⁾ *Lepiota americana*,³⁰⁾ *Cordyceps sinensis*³¹⁾ 등 많은 fungus로부터 분리되었다.

이들은 유리형^{30,120)} 또는 배당체 형태³¹⁾로 분리되었으며, 자연 상황 자실체⁵⁷⁾에서도 보고된 바 있고, 면역조절작용,³⁰⁾ 항암^{30,31)} 및 항바이러스 작용³²⁾ 등의 활성이 있음이 보고 되었다.

Ergosterol peroxide는 생화학적으로 효소산화에 의해 생성되거나¹²³⁾ 또는 광산화에 의해 생성되는 것으로 보고되어 있으며¹¹⁹⁾, 병원성 균류인 *Sporothrix schenckii*의 효모로부터 분리된 ergosterol peroxide는 이 균류의 독성에 관여하며,¹²³⁾ 조류인 *Dunaliella salina*의 plasma membrane으로부터 분리된 sterol peroxide (ergosterol peroxide, 7-dehydroporiferasterol peroxide)는 plasma membrane의 막투과성에 관여하는 것으로 보고되어 있다.¹¹⁹⁾

Fig. 73-1. IR spectrum of Compound V

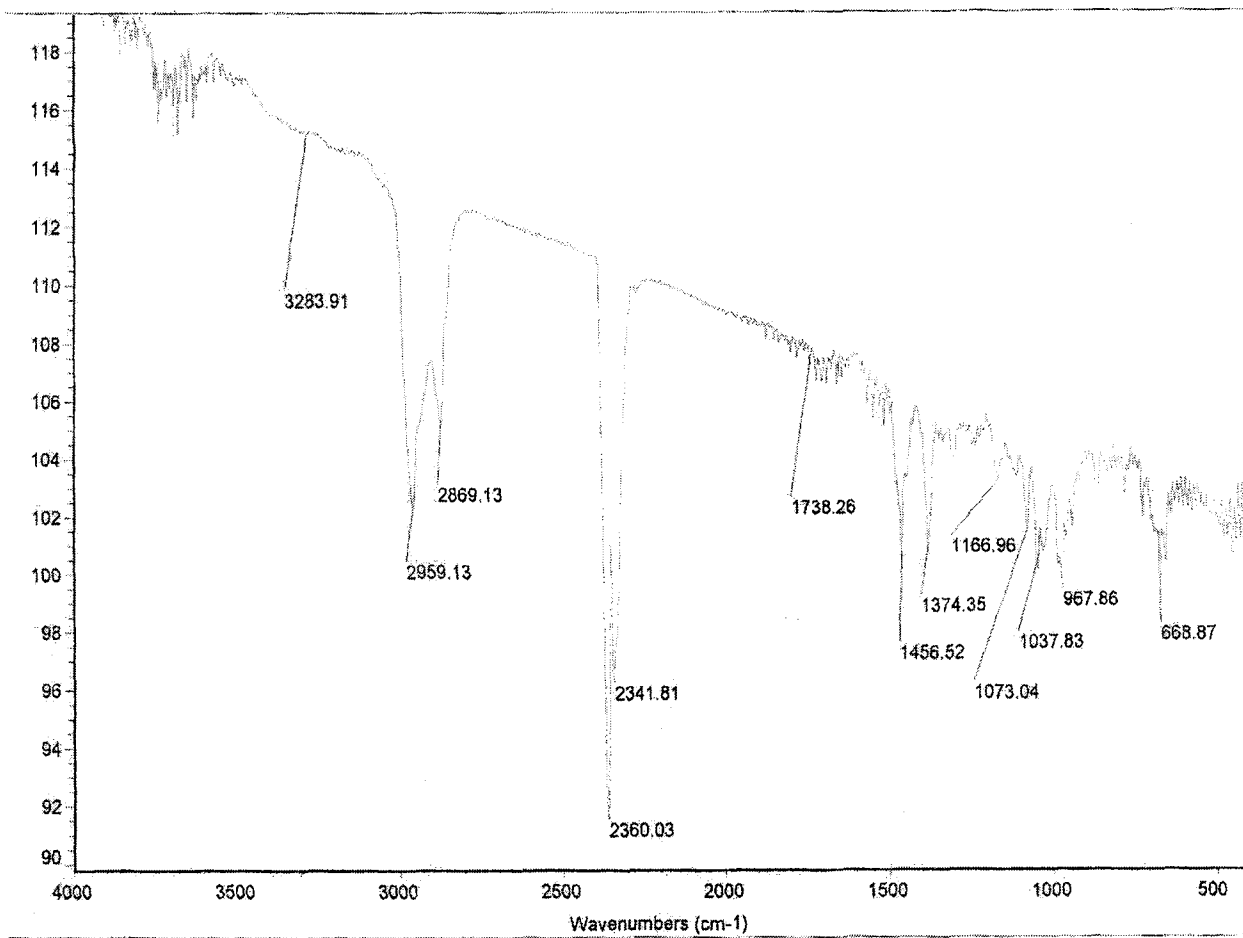


Fig. 73-2. EI-MS spectrum of Compound V

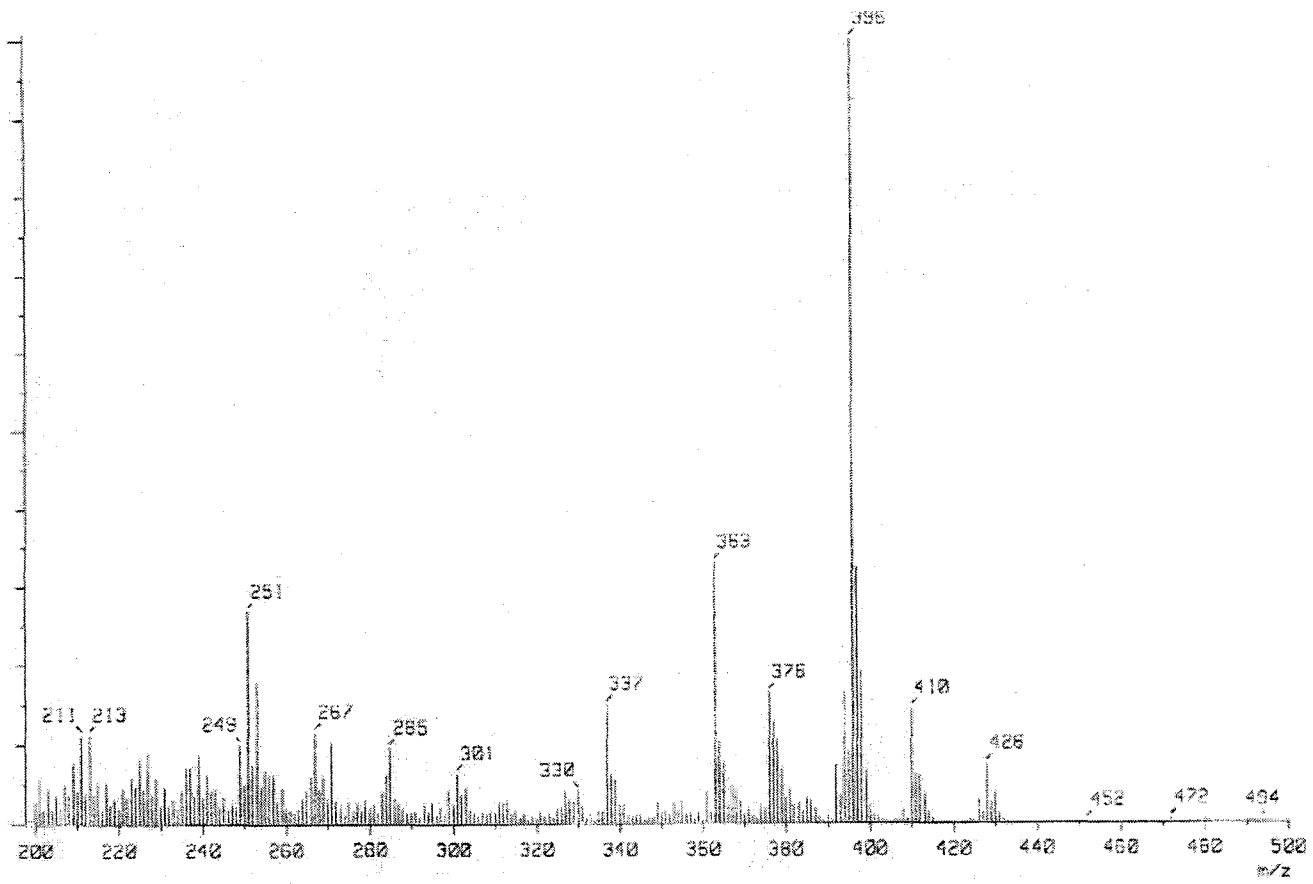
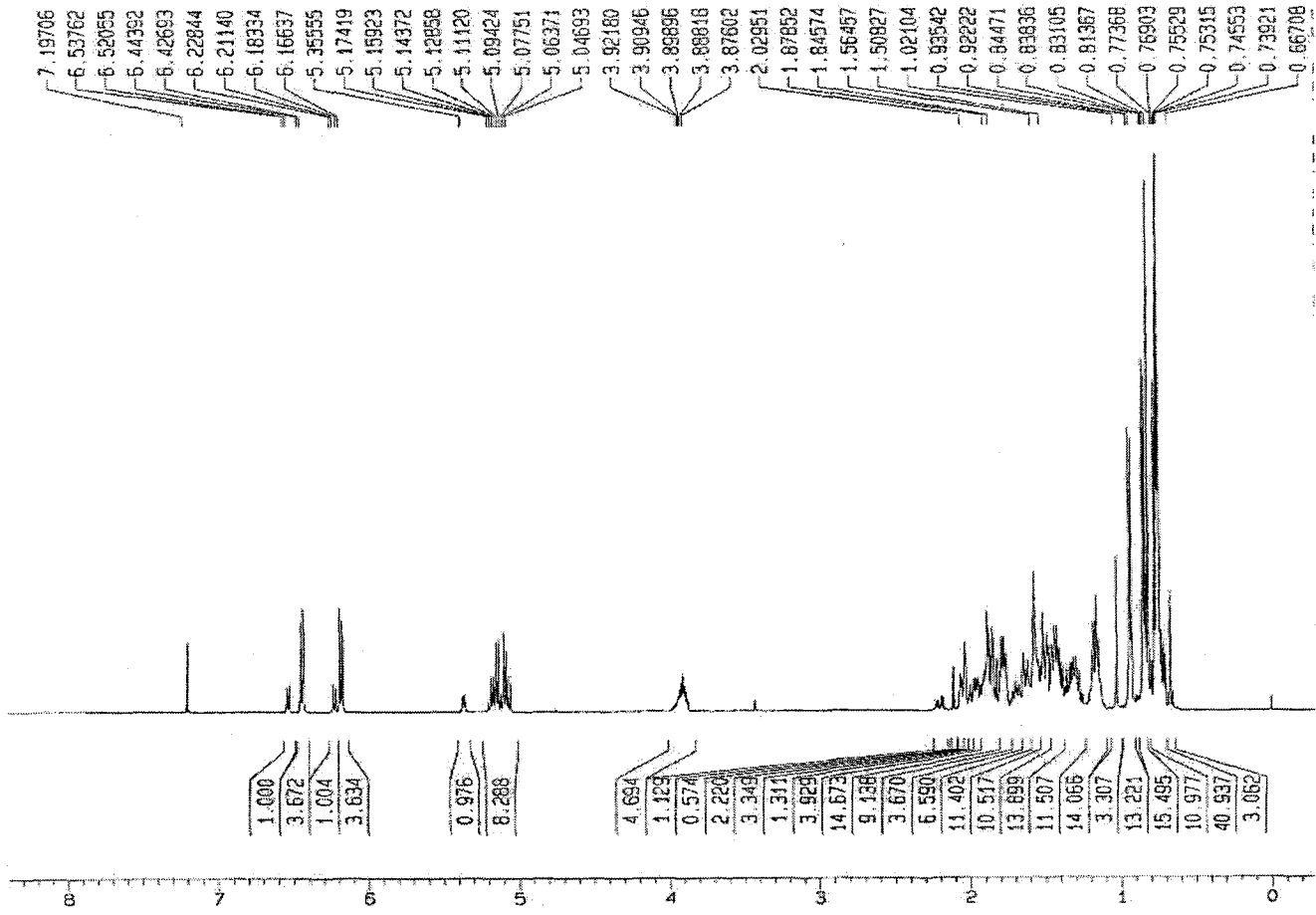


Fig. 73-3. $^1\text{H-NMR}$ spectrum of Compound V (500 MHz, CDCl_3)



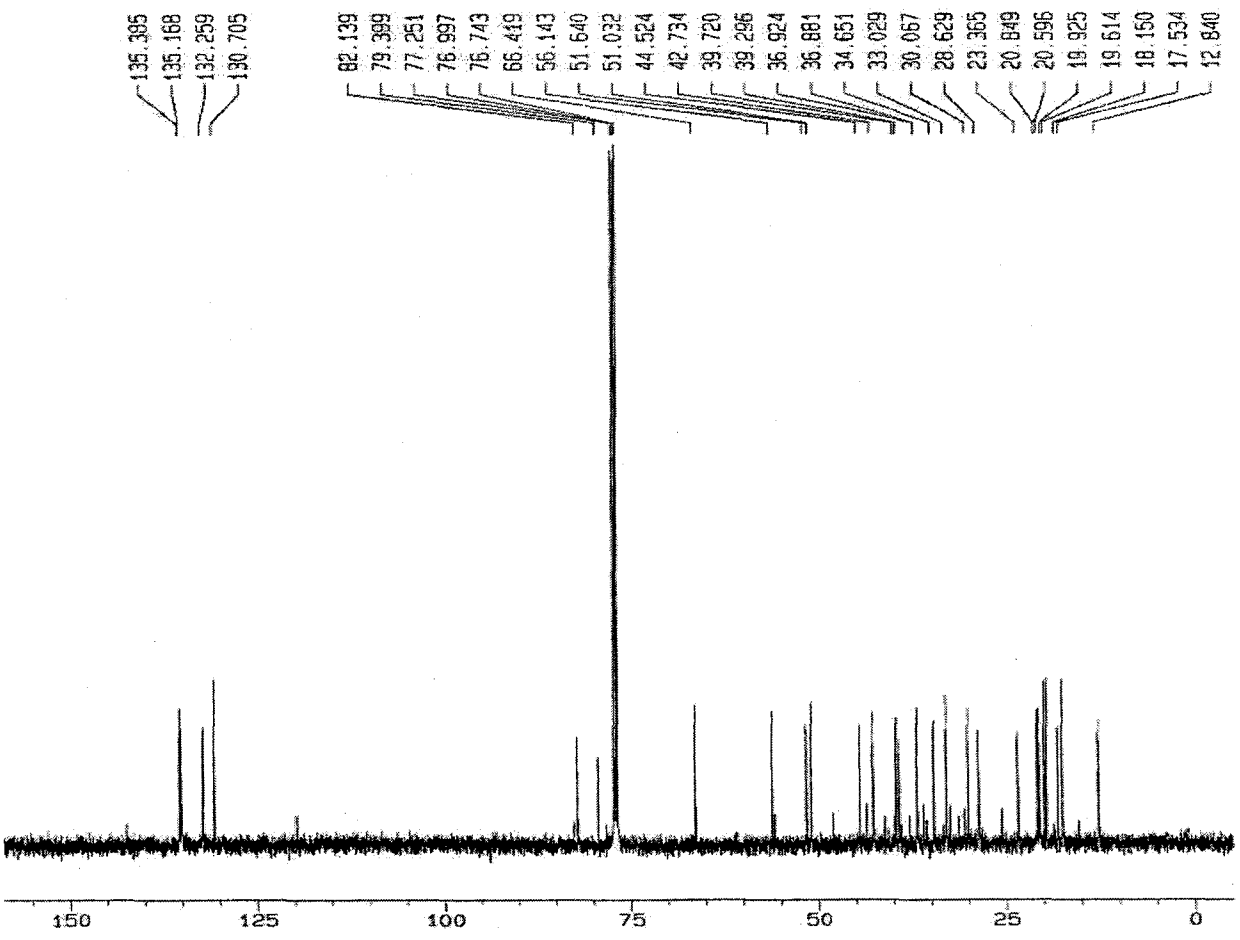


Fig. 73-4. ^{13}C -NMR spectrum of Compound V (125 MHz, CDCl_3)

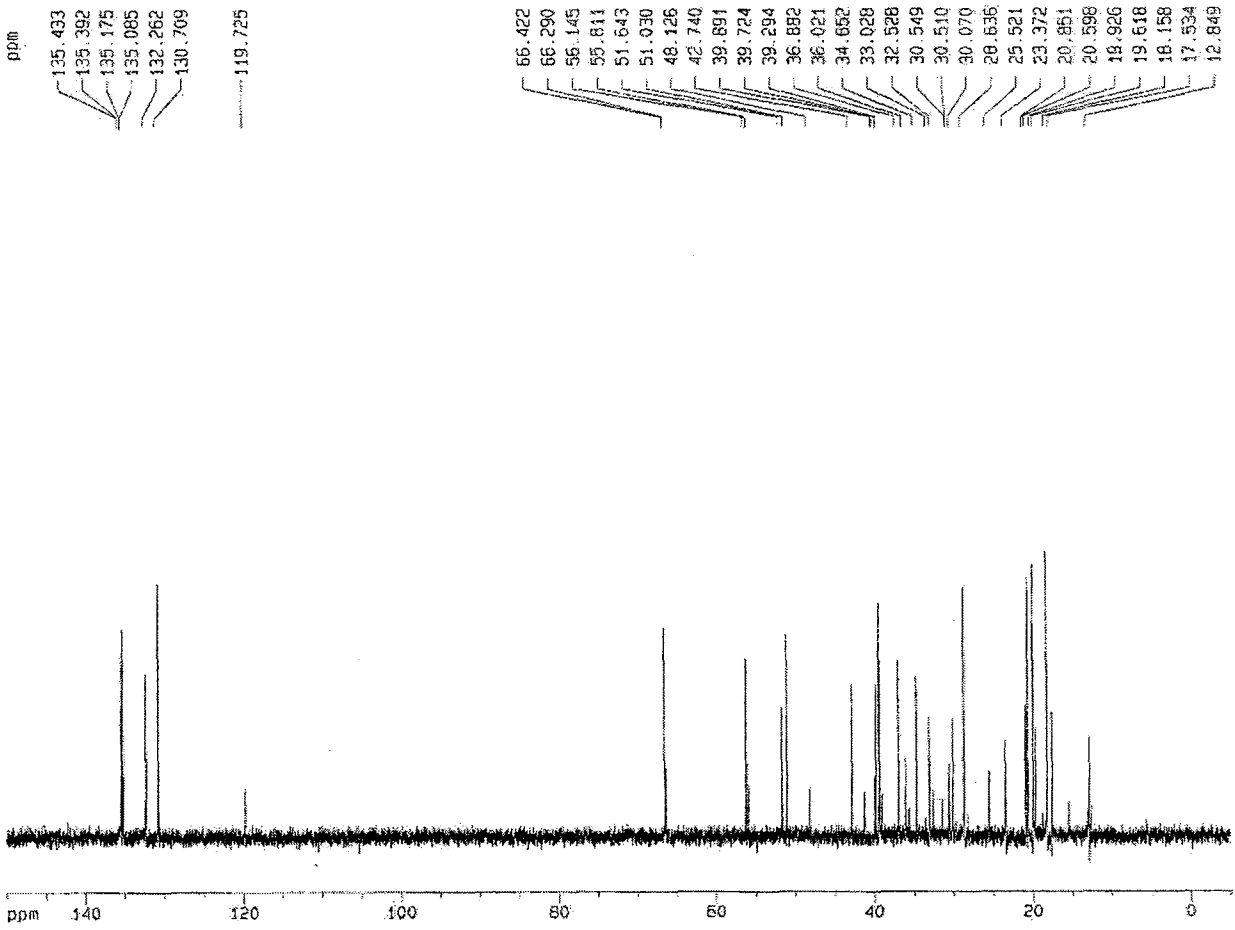


Fig. 73-5. DEPT 45° spectrum of Compound V

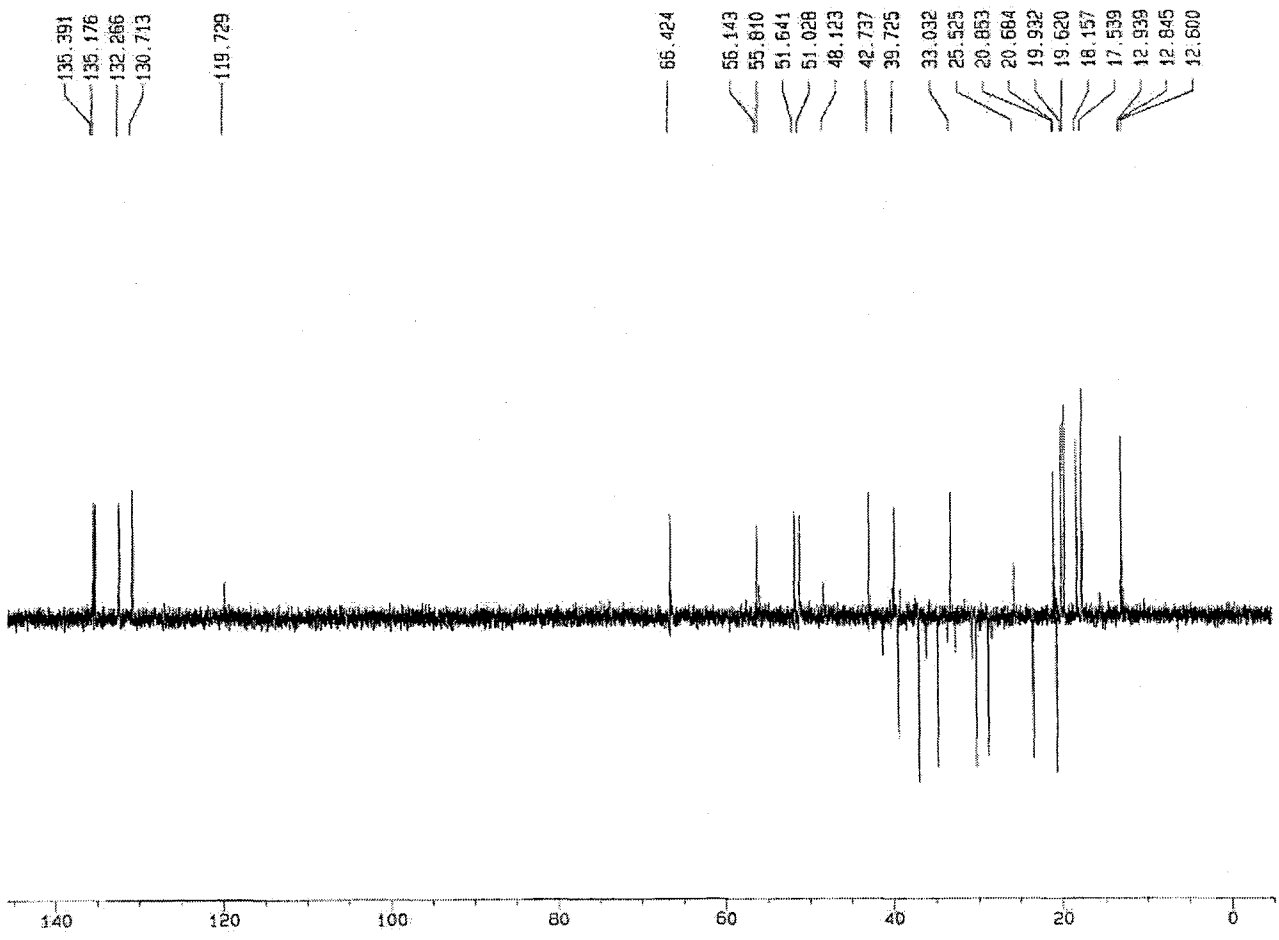


Fig. 73-6. DEPT ¹³⁵C spectrum of Compound V

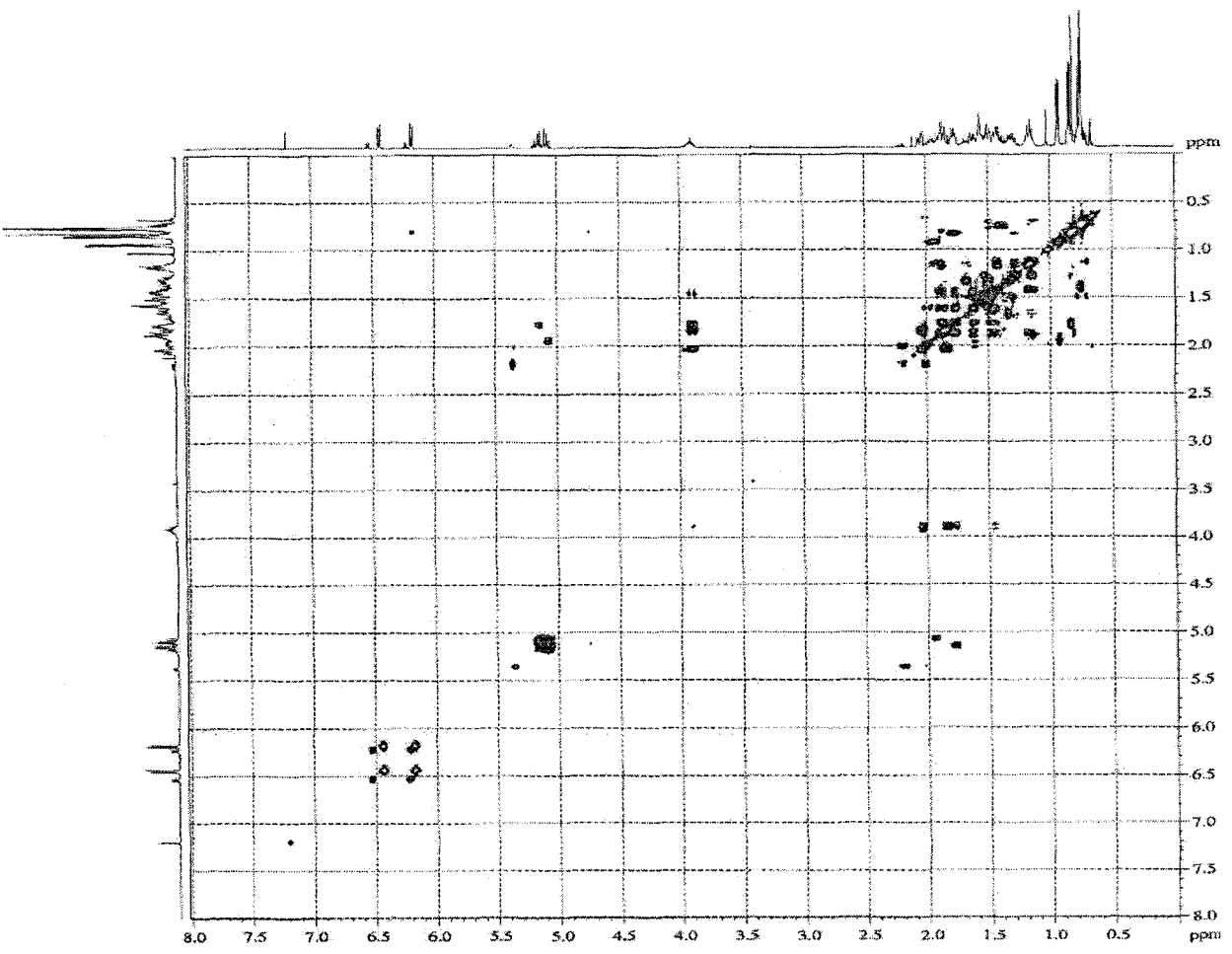


Fig. 73-7. ¹H-¹H COSY spectrum of Compound V

6) 화합물 VI의 확인동정

화합물 VI는 황색 무정형 분말로 IR spectrum에서 3412 cm^{-1} 에서 O-H, 1692 cm^{-1} 에서 C=O, 1600 및 1444 cm^{-1} 에서 aromatic C=C, 1301 cm^{-1} 에서 C-O 에 기인하는 흡수를 나타내고 있어 carbonyl기를 포함하는 페놀성 화합물임을 추정할 수 있었다 (Fig. 6.1).

EI-Mass spectrum에서 m/z 168에서 molecular ion peak $[M]^+$ 를, 그리고 m/z 137, 109, 81에서 분자이온으로부터 각각 OCH_3 , $[\text{OCH}_3+\text{CO}]$, $[\text{OCH}_3+\text{CO}+\text{CO}]$ 가 탈리된 fragment ion peak를 관찰할 수 있었다 (Fig. 6.2).

$^1\text{H-NMR}$ spectrum에서 aromatic ring의 proton을 보면 $\delta 6.79$ 의 경우 $J=7.2\text{Hz}$ 로 doublet로, 그리고 $\delta 7.40$ 에서는 $J=7.2$, 2.0Hz 로 doublets of doublet으로, 또 $\delta 7.41$ 의 경우는 $J=2.0\text{Hz}$ 로 coupling하고 있어 각각 ortho, ortho-meta 및 meta coupling하는 것을 알 수 있어 각각의 proton을 C-5, 6 및 2로 귀속시켰다. 또한 $\delta 3.82$ 에 나타나는 singlet signal은 methyl ester의 proton으로 추정하였다 (Fig. 6.3).

한편 $^{13}\text{C-NMR}$ spectrum에서 aromatic ring에 기인하는 carbon 이 $\delta 122.57$ (C-1), 117.40 (C-2), 146.19 (C-3), 151.70 (C-4), 115.83 (C-5) 및 123.61 (C-6)등에서 관찰되며, 특히 이들은 DEPT 135° spectrum에서 CH carbon signal이 $\delta 117.40$, 115.83 및 123.61 으로 확인되어 위의 사실을 뒷받침해주고 있다. 또한 ester carbonyl의 carbon이 $\delta 168.85$ (C-7)에서, 그리고 이에 결합하고 있는 methyl ester의 CH_3 의 carbon signal이 $\delta 52.27$ (C-8)에서 관측되고 있다 (Fig. 6.5, 6.6).

이상의 기기분석 결과 및 문헌과의 비교로 화합물 VI는 분자량 168, 분자식 $\text{C}_8\text{H}_8\text{O}_4$ 인 3,4-dihydroxybenzoic acid methyl ester로 확인 동정하였다.⁵⁷⁾

일반적으로 페놀성 물질들이라 함은 하나 또는 둘 이상의 수산기로 치환된 방향족환을 가지고 있는 성분을 말하는 것으로, 자연에는 수많은 페놀성 물질들이 밝혀져 있다. 그 중 flavonoid가 대부

분이나 단순한 monocyclic phenol류, phenyl propanoid류, phenol성 quinone류도 상당수 알려져 있으며, lignin류, melanin류 및 tannin류 등도 polyphenol성 물질이다. 페놀성 물질 중 몇 가지 종류에 대해서는 작용이 잘 설명되어 있으나, 대부분 다른 물질에 대해서는 그 역할을 아직 확실히 설명할 수 없다.¹²⁴⁾

최근 페놀성 물질의 생리활성으로는 항변이원성작용(ellagic acid),¹²⁵⁾ 항염작용(magnolol),^{33,126)} 철소판응집억제작용(imperanene)¹²⁷⁾ 및 보체저해 작용(roamarinic acid)¹²⁸⁾ 등이 밝혀지고 있다.

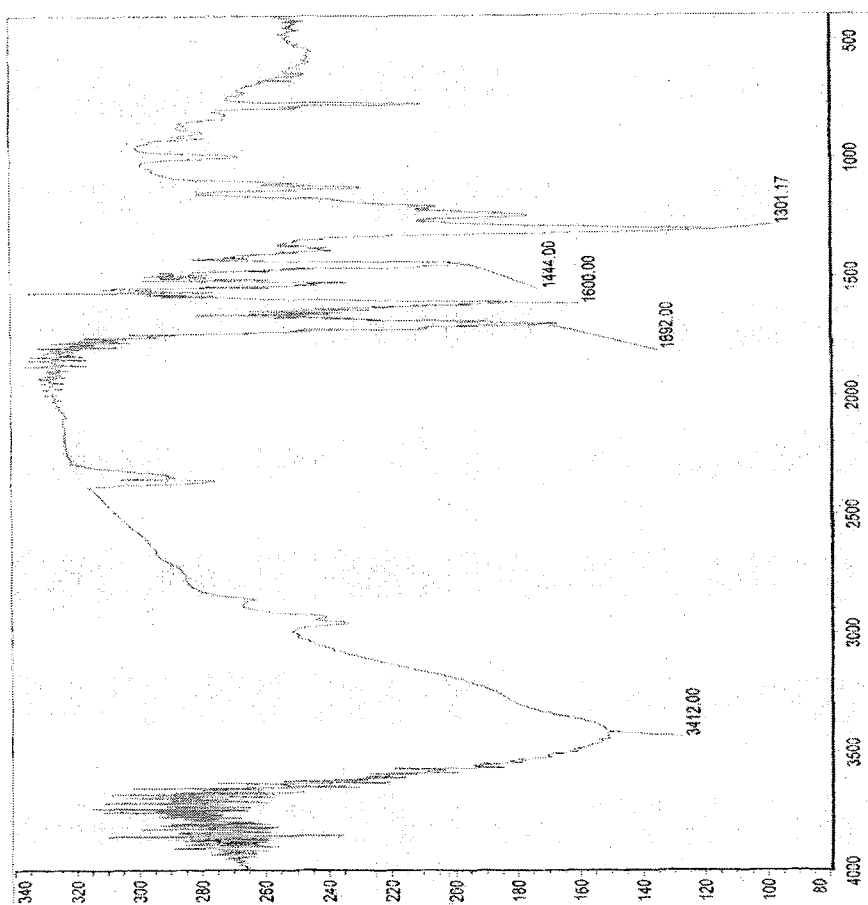


Fig. 74-1. IR spectrum of Compound VI

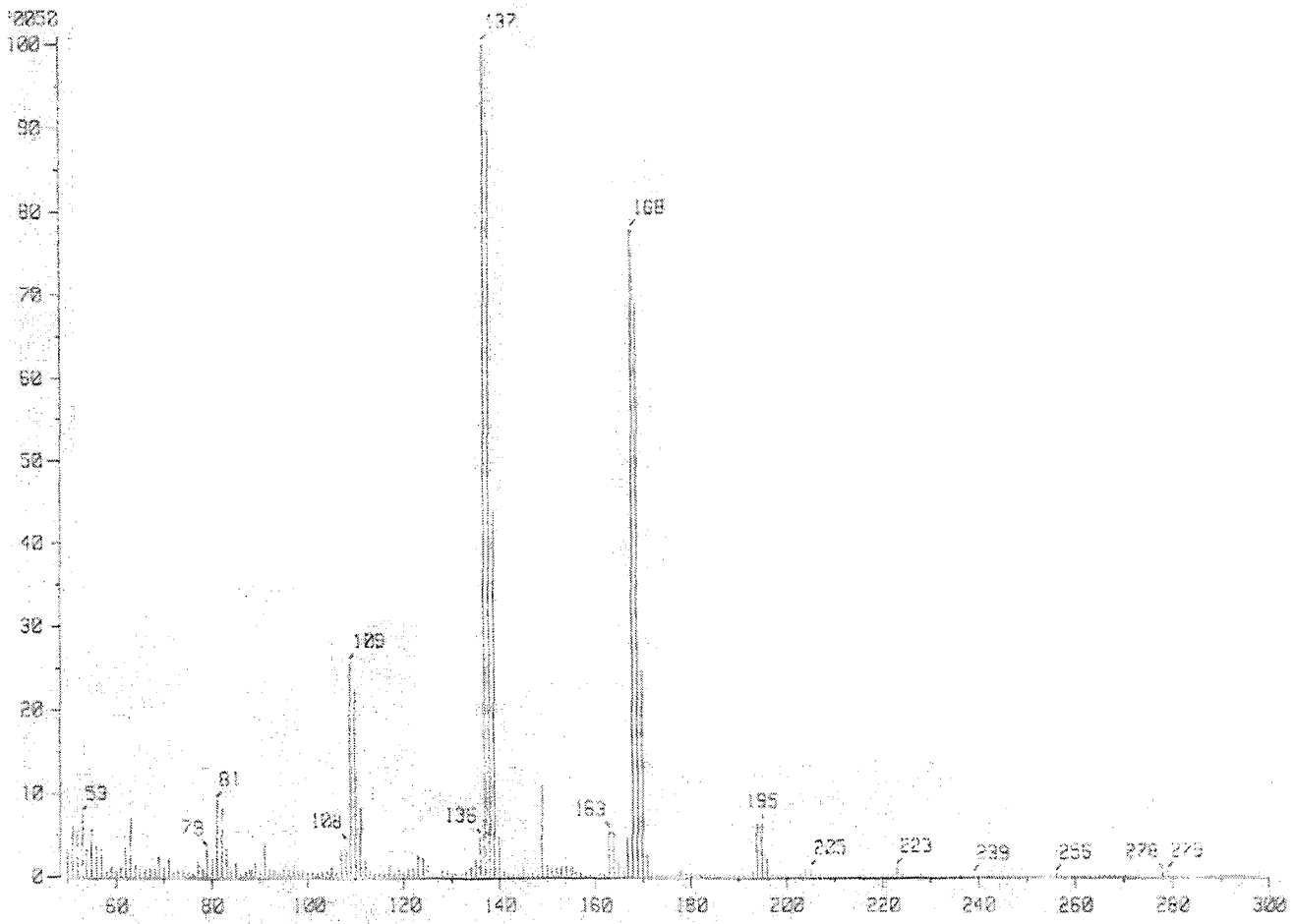


Fig. 74-2. EI-MS spectrum of Compound VI

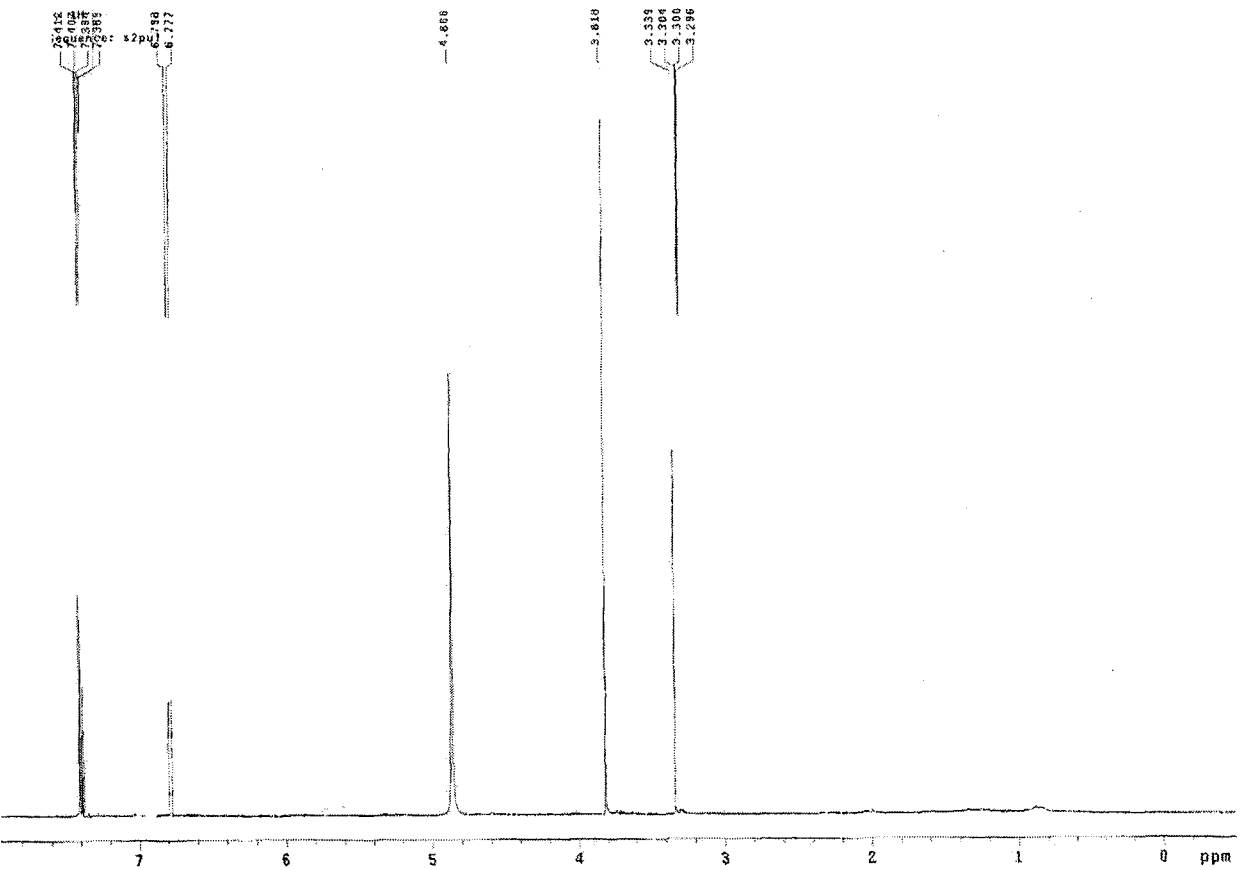


Fig. 74-3. $^1\text{H-NMR}$ spectrum of Compound VI (400 MHz, CD_3OD)

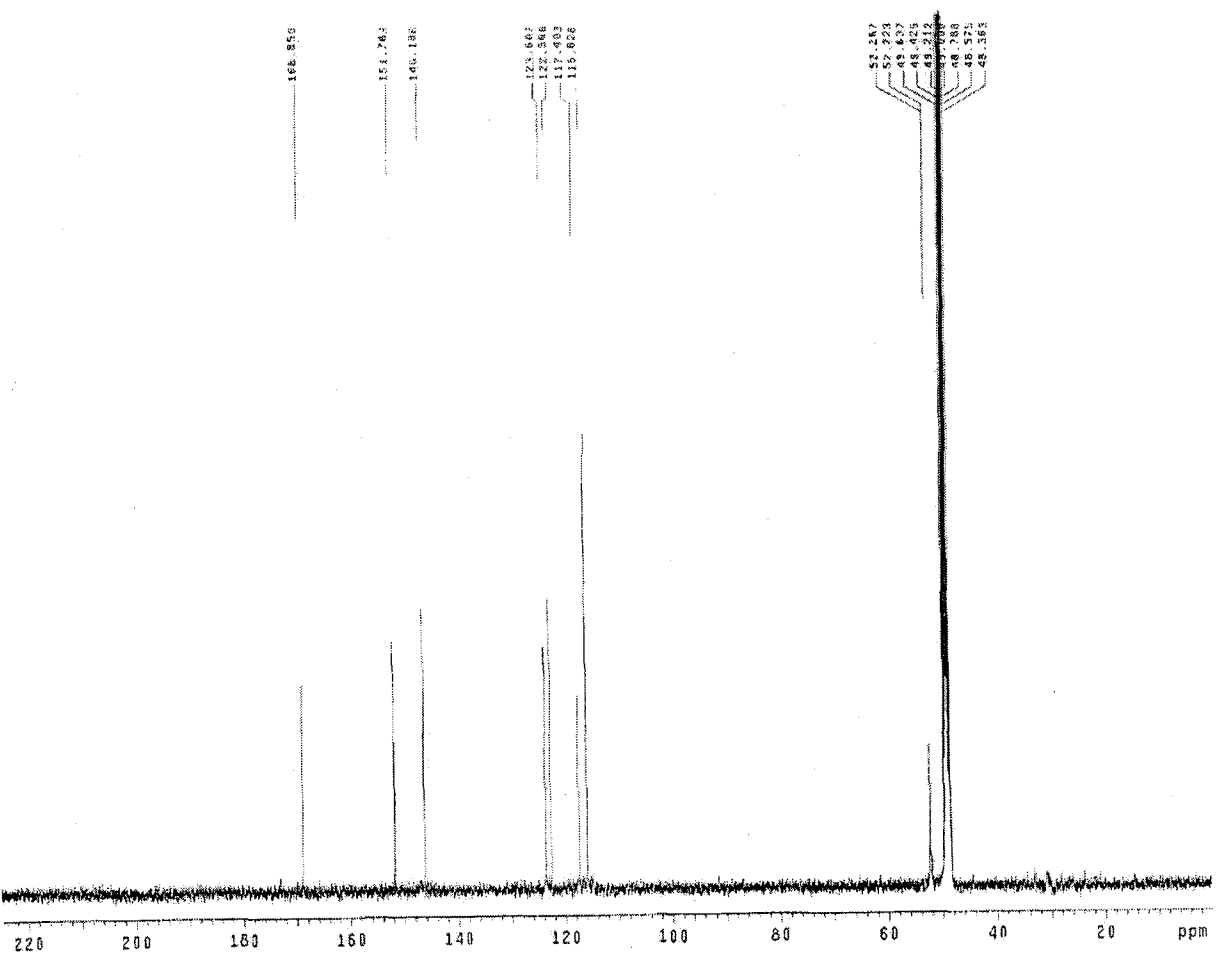


Fig. 74-4. ^{13}C -NMR spectrum of Compound VI (100 MHz, CD_3OD)

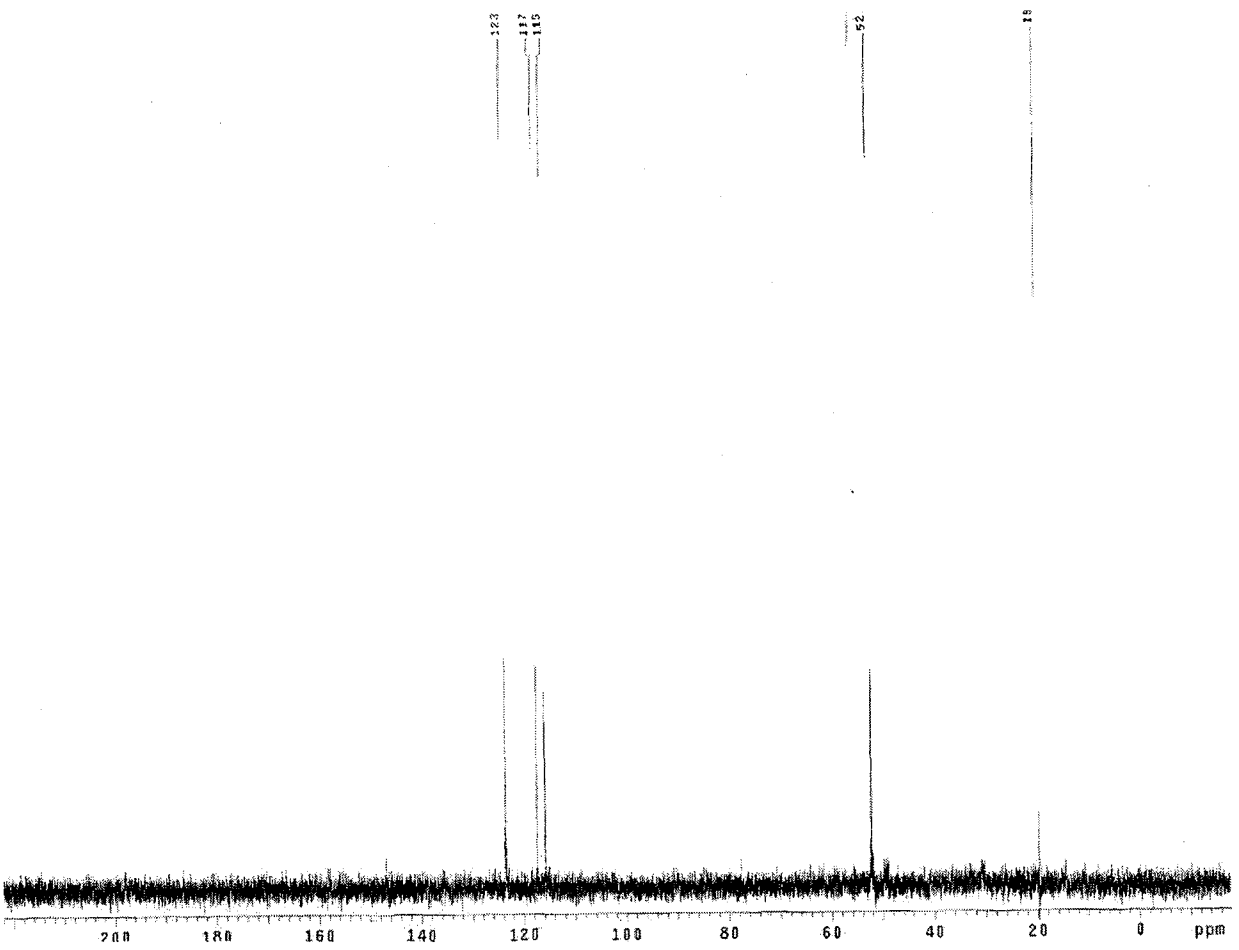


Fig. 74-5. ^{13}C -NMR spectrum of Compound VI (100 MHz, CD_3OD)

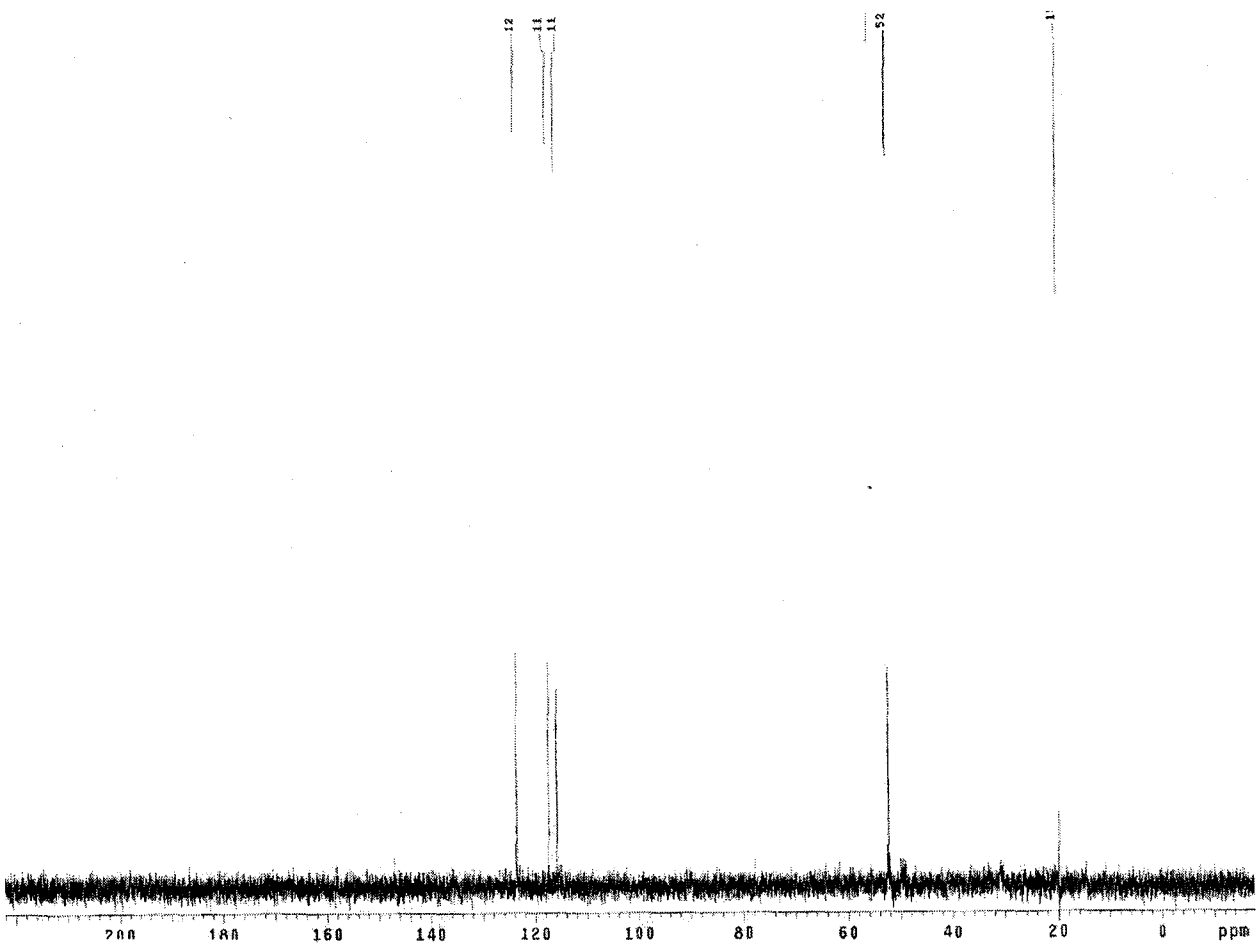


Fig. 74-6. DEPT 135° spectrum of Compound VI

7) . 화합물 VII의 확인동정

화합물 VII는 황색 무정형 분말로 IR spectrum에서 3420 cm^{-1} 에서 phenolic O-H, 1596 cm^{-1} 에서 C=O, 1520 cm^{-1} 에서 aromatic C=C, 1288 cm^{-1} 에서 C-O 에 기인하는 흡수를 나타내고 있어 페놀성 OH 를 가지는 화합물임을 추정할 수 있었다 .

EI-Mass spectrum에서 m/z 178에서 molecular ion peak [M^+]를, 그리고 m/z 163, 135, 117에서 분자이온으로부터 각각 CH_3 , CH_3CO , [$\text{CH}_3+\text{CO}+\text{H}_2\text{O}$]가 탈리된 fragment ion peak들을 관찰할 수 있었다 $^1\text{H-NMR}$ spectrum에서 phenylpropanoid중 trans configuration하는 proton이 각각 $\delta 6.54$ 및 7.51 에서 $J=16.0\text{Hz}$ 로 서로 doublet coupling 하고 있다. 또한 aromatic ring의 proton을 보면 $\delta 6.78$ 의 경우 $J=8.0\text{Hz}$ 로 doublet으로 그리고 $\delta 6.98$ 에서는 $J=1.6, 8.0\text{Hz}$ 로 doublets of doublet으로, 또 $\delta 7.07$ 의 경우는 $J=1.6\text{Hz}$ 로 double coupling하고 있어 1, 3, 4- trisubstituted aromatic ring임을 알 수 있어 각각의 proton 을 C-5', 6' 및 2'로 귀속시켰다. 또한 $\delta 2.33$ 에 나타나는 signal은 ketone에 결합되어 있는 methyl proton으로 추정하였다 (Fig. 7.3). 한편 $^{13}\text{C-NMR}$ spectrum에서 phenylpropanoid골격 중의 aromatic ring 에 기인하는 carbon이 $\delta 127.68$ (C-1'), 115.26 (C-2'), 147.34 (C-3'), 150.09 (C-4'), 116.31 (C-5') 및 123.57 (C-6') 등에서 관찰되며 특히 이들은 DEPT 135° spectrum의 관측결과 CH carbon signal이 $\delta 115.26, 116.31$ 및 123.57 으로 증명되어 위의 내용을 뒷받침해 주고 있다. 다음으로 trans 결합을 하는 C-3 및 C-4 carbon이 각각 $\delta 116.57$ 과 $\delta 146.94$ 에서 관측되고 있으며, 또한 acetyl group의 carbon이 $\delta 201.60$ 에서, CH_3 signal이 $\delta 27.00$ 에서 관측되고 있다 (Fig. 7.4~7.6). 이상의 기기분석 결과 및 문헌과의 비교로 화합물 VII는 분자량 178, 분자식 $\text{C}_{10}\text{H}_{10}\text{O}_3$ 인 4-(3'4'-dihydroxyphenyl)-3-butene-2-one로 확인 동정하였다.⁵⁷⁾

화합물 VI (3,4-dihydroxybenzoic acid methyl ester)과 화합물 VII (4-(3'4'-dihydroxyphenyl)-3-butene-2-one)은 *Phellinus ribis*¹²⁹⁾와 자연산 상황 자실체에서 보고되어 있으며, 김⁵⁷⁾은 zymosan-stimulated RAW (PMN leukocytes)에 대한 ROS (reactive oxygen species)생성에 비교적 유의한 저해활성을 보였다고 보고하였다.

Fig. 75-1. IR spectrum of Compound VII

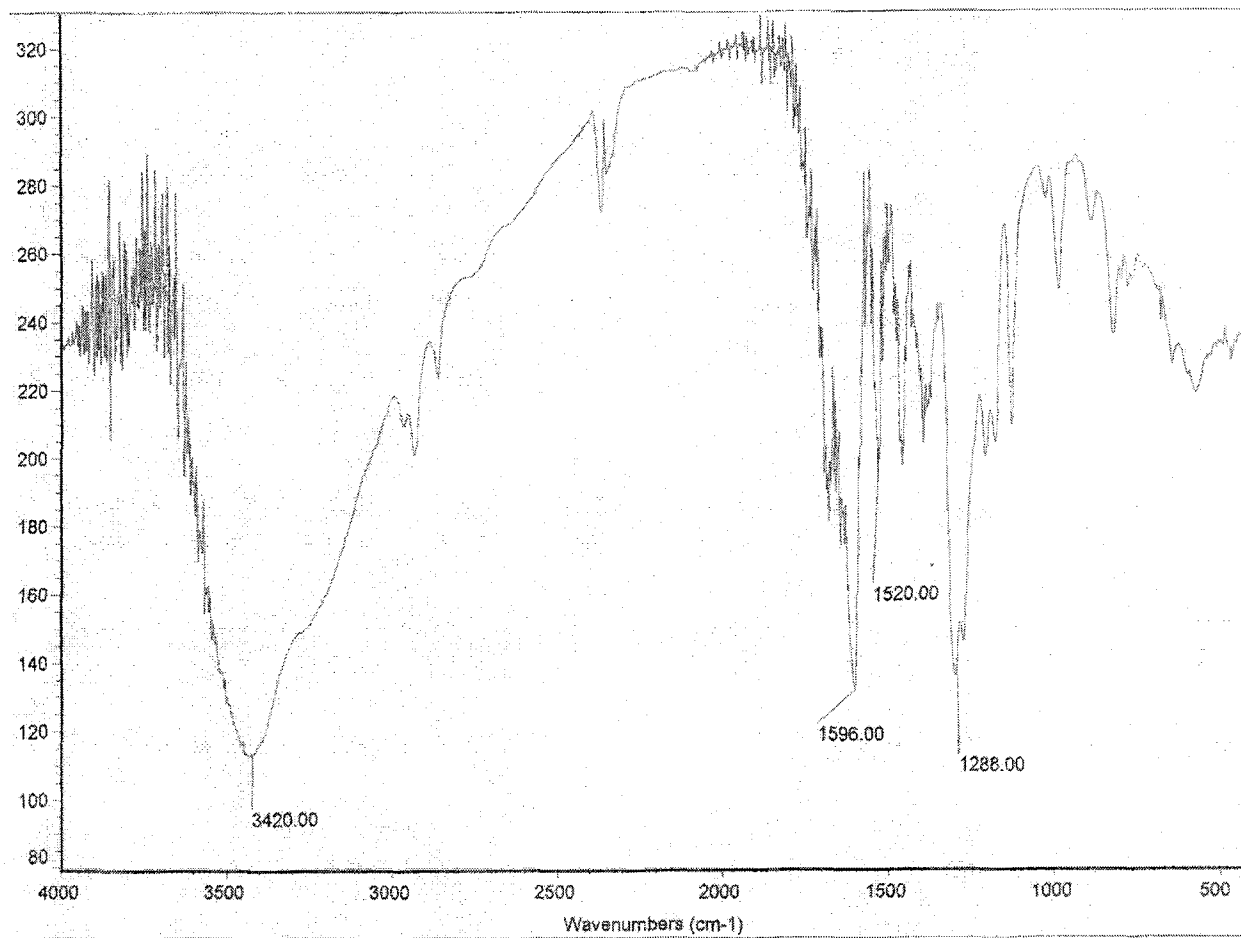
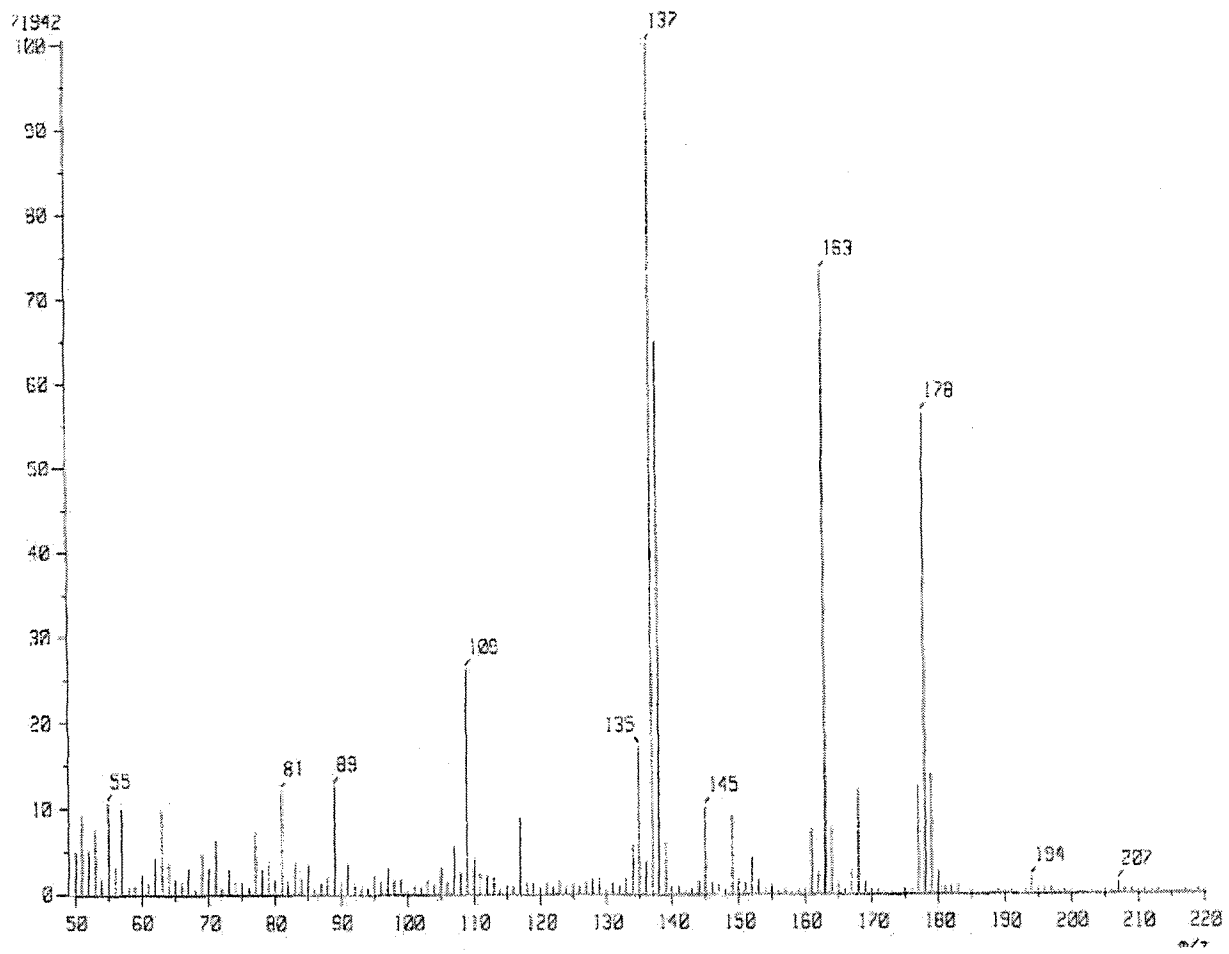


Fig. 75-2. EI-MS spectrum of Compound VII



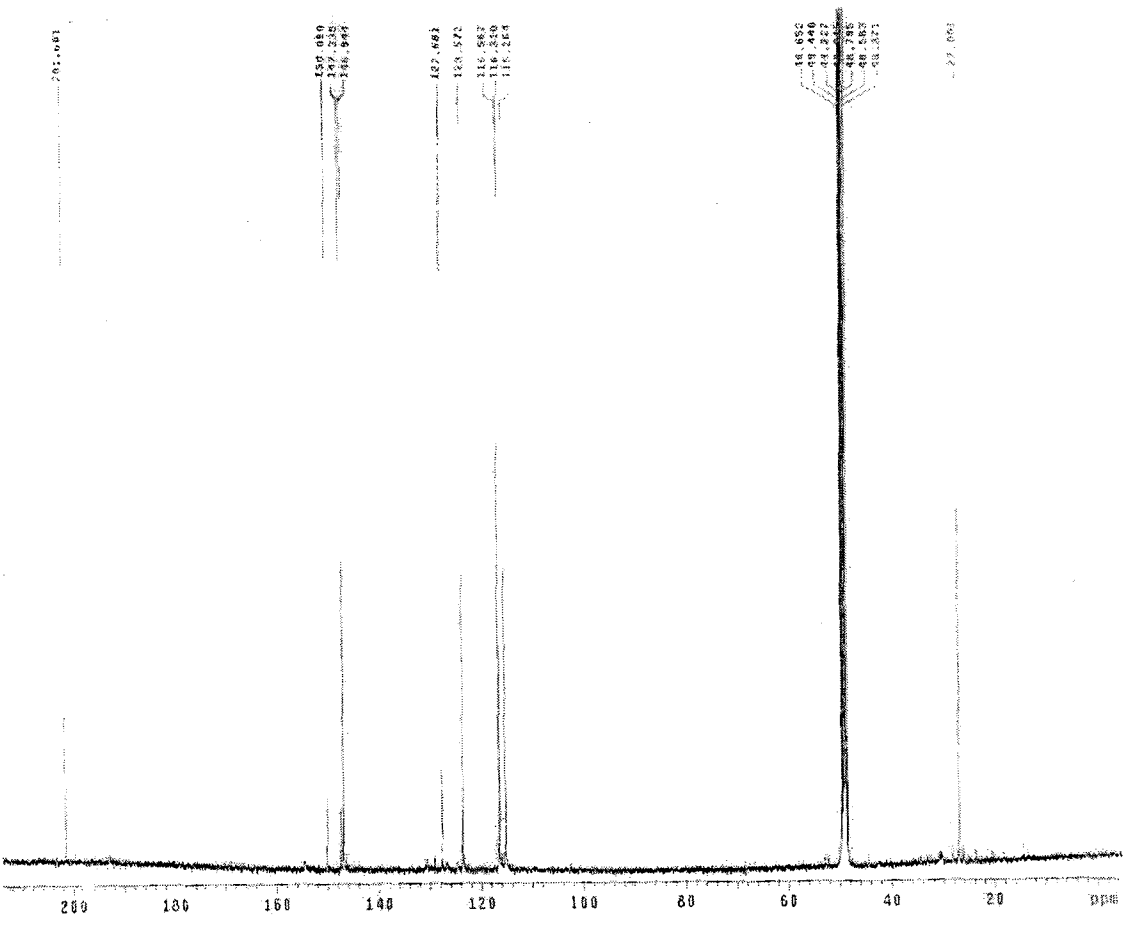


Fig. 75-3. ¹H-NMR spectrum of Compound VII (400 MHz, CD₃OD)

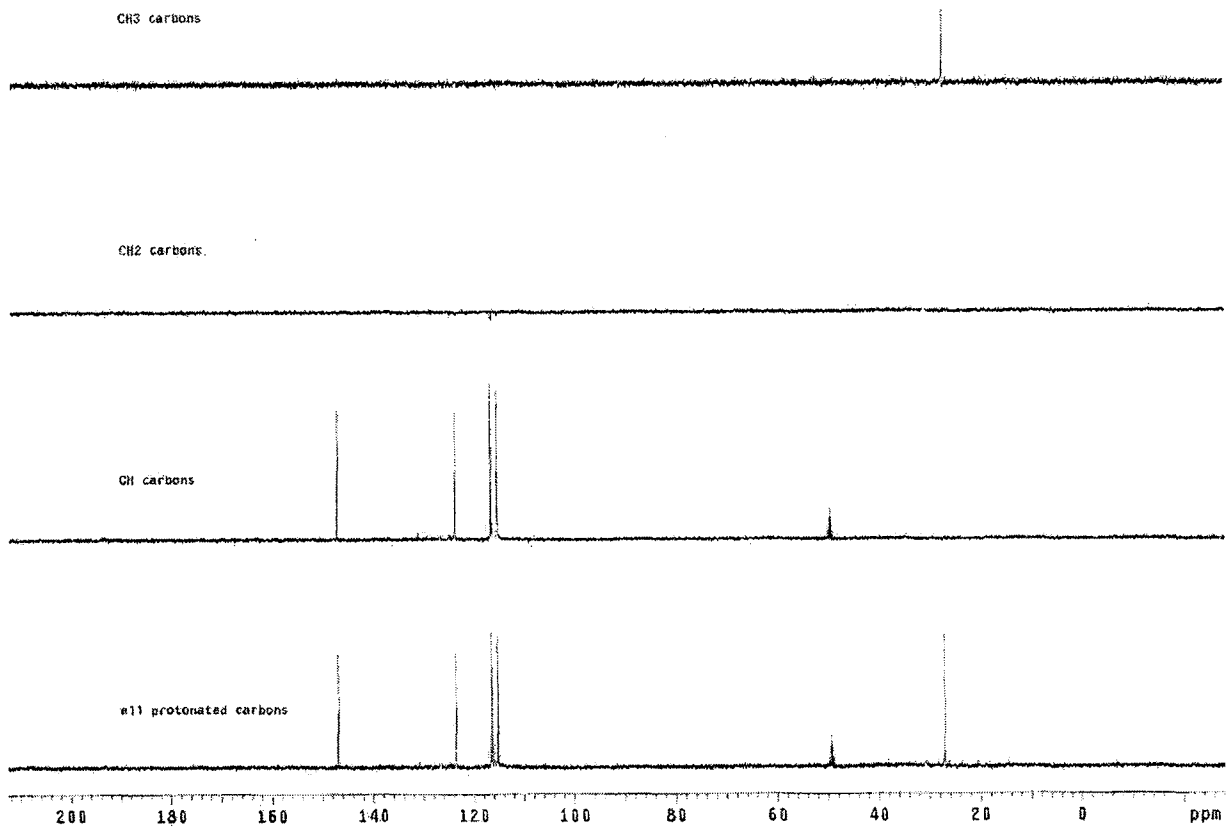


Fig. 75-5. Edited DEPT spectrum of Compound VII

라. 분리한 물질의 항산화 효과에 미치는 영향

1) DPPH를 이용한 항산화능에 미치는 영향

배양목질진흙버섯 자실체의 항산화 활성을 검토하기 위해 activity guided fractionation에 따라 실험을 실시한 결과 MeOH ex. 가 Water ex. 보다 항산화 활성이 우수하였다. 따라서 MeOH ex. 를 Precipitates, Water Insoluble fr., Water fr. 및 Ether fr.으로 나누어 항산화 실험을 실시하여 활성을 나타낸 Water Insoluble fr. 및 Ether fr.에 대하여 column chromatography를 반복 실시하였다. 그리하여 Water Insoluble fr.으로부터 3종의 지방산 화합물인 화합물 I (linoleic acid methyl ester), 화합물 II (palmitic acid), 화합물 III (linoleic acid)과 2종의 ergosterol계 화합물인 화합물 IV (ergosta-5,7,22-triene-3-ol (ergosterol)), 화합물 V (5,8-epidioxyergosta-6,22-dien-3-ol (ergosterol peroxide))을 얻었고, Ether fr.로부터 2종의 페놀성 화합물인 화합물 VI (3,4-dihydroxybenzoic acid methyl ester)와 화합물 VII (4-(3'4'-dihydroxyphenyl)-3-butene-2-one)를 얻었다. 이들 7개의 화합물들에 대한 항산화능의 정도를 DPPH에 대한 전자공여능 (electron donating ability, EDA %)으로 측정된 결과와 시료 무첨가의 control의 흡광도(control O.D)를 50% 감소시키는데 필요한 시료의 농도(IC₅₀)을 측정된 결과는 다음과 같다 (Table 3.1, 3.2).

지방산 화합물인 화합물 I ~ III 및 ergosterol계 화합물인 화합물 IV, V의 항산화 활성은 MeOH ex. 및 그 분획에 미치지 못하였고, Ether fr.에서 단리한 페놀성 화합물인 화합물 VI, VII은 양성 대조약물로 사용한 아스코르빈산보다 우수한 항산화 활성을 나타내었다.

김⁵⁷⁾은 3,4-dihydroxybenzoic acid methyl ester와 4-(3'4'-dihydroxyphenyl)-3-butene-2-one가 zymosan-stimulated RAW (PMN leukocytes)에 대한 ROS (reactive oxygen species)생성에 비교적 유의한 저해활성을 보였다고 보고했는데, 항산화 활성 역시 우수한 것으로 나타났다.

따라서 이들 페놀성 화합물을 항산화제로서 개발하기 위해서는 생물학적인 검토 등 다양한 연구가 이루어져야 할 것으로 사료되었다.

Table 15 Radical scavenging effects of compounds I ~ VII from cultivated fruit body of *Phellinus linteus*

Sample	EDA %				
	12.5	25	50	100	200 (ppm)
Ascorbic acid	18.68±1.95	28.49±5.17	43.18±7.79	68.15±7.23	92.16±1.70
Compound VI	24.50±0.93	37.75±3.66	64.97±0.38	82.21±1.07	90.18±0.07
Compound VII	20.75±2.40	32.63±1.64	50.81±0.93	85.54±0.89	94.67±1.27

Sample	EDA %				
	625	1250	2500	5000	10000(ppm)
Compound I	-	8.30±0.65	9.76±1.84	12.17±0.76	14.97±2.12
Compound II	-	6.01±0.02	6.94±0.60	7.99±0.10	12.00±1.36
Compound III	-	8.09±0.92	8.90±1.18	10.32±1.77	11.89±0.18
Compound IV	6.23±1.26	8.28±1.12	13.28±1.70	14.34±0.94	-
Compound V	6.25±0.23	6.83±0.60	9.06±0.83	12.97±1.46	-

- Compound I : Linoleic acid methyl ester
 Compound II : Palmitic acid
 Compound III : Linoleic acid
 Compound IV : Ergosta-5,7,22-triene-3-ol (ergosterol)
 Compound V : 5,8-Epidioxyergosta-6,22-dien-3-ol
 (ergosterol peroxide)
 Compound VI : 3,4-Dihydroxybenzoic acid methyl ester
 Compound VII : 4-(3'4'-Dihydroxyphenyl)-3-butene-2-on
- EDA(%)= (Control O.D.-Sample O.D.)/Control O.D. × 100
 EDA : Electron donating ability
 Sample O.D : 시료를 가한 시험액의 흡광도
 Control O.D : 시료 대신 MeOH을 가한 시험액의 흡광도

Table 16 Radical scavenging effects of compounds I ~ VII from cultivated fruit body of *Phellinus linteus*

Sample	IC ₅₀ (μg/ml)
Ascorbic acid	7.69
Compound I	5519.68
Compound II	6554.77
Compound III	9651.71
Compound IV	1997.78
Compound V	2848.64
Compound VI	5.40
Compound VII	6.26

IC₅₀ : Required sample concentration (μg/ml) for 50% reduction of 0.1 mM DPPH solution 1.9 ml

Compound I : Linoleic acid methyl ester

Compound II : Palmitic acid

Compound III : Linoleic acid

Compound IV : Ergosta-5,7,22-triene-3-ol (ergosterol)

Compound V : 5,8-Epidioxyergosta-6,22-dien-3ol
(ergosterol peroxide)

Compound VI : 3,4-Dihydroxybenzoic acid methyl ester

Compound VII : 4-(3'4'-Dihydroxyphenyl)-3-butene-2-one

2) LDL 산화에 미치는 영향

DPPH법에 의해 우수한 항산화 효과를 나타낸 화합물 VII의 LDL 산화에 미치는 영향을 측정하였다. LDL에 화합물 VII을 농도별로 가하고 Cu^{2+} -induced oxidation을 실시 후, TBARS assay를 측정한 결과 화합물 VII은 LDL 산화에 대해 아스코르빈산보다 더 우수한 지질 과산화 억제작용을 보였다 (Table 4).

Table 17. Effects of Compound VII from *Phellinus linteus* on LDL lipid peroxidation

Sample	IC ₅₀ ($\mu\text{g}/\text{ml}$)
Ascorbic acid	3.87
Compound VII	2.34

IC₅₀ : Required sample concentration ($\mu\text{g}/\text{ml}$) for 50% inhibition of Cu^{2+} -induced LDL (mg protein) lipid peroxidation

Compound VII : 4-(3'4'-Dihydroxyphenyl)-3-butene-2-one

4. 신기능에 미치는 영향

이뇨제는 임상적으로는 울혈성심부전, 간경변 및 여러 가지의 신질환에 따르는 부종의 치료에 이용되고 있지만 이 중에서 신질환, 특히 급성 혹은 만성 신부전시에 이용된 경우, 약물의 작용점인 신뇨세관 부위가 장애를 받기 때문에 이뇨효과를 충분히 발휘되지 못할 경우가 많다.

승홍은 실험적으로 신장장애를 유발하는 독성의 무기수은화합물로서 흡수된 후 배설되는 과정에서 신장에 다량 축적되어 신장장애를 유발한다.¹³⁰⁾ 이 물질의 신장 독성작용에 관한 연구로서 Biber 등¹³¹⁾은 신세뇨관 특히 근위세뇨관의 혈관수축작용과 세포에 대한 직접작용에 의하여 세뇨관 기능에 장애를 주는 것으로 밝힌 바 있고, Ganote 등¹³²⁾은 수은 화합물이 선택적으로 근위세뇨관 세포의 괴사를 초래하므로 신세뇨관에 장애를 일으

키는 것으로 보고하였다. Huang 등¹³³⁾은 흰쥐에 승홍 투여시 간, 신장, 폐, 고환 조직내에 MDA 농도가 증가되며, 이것은 항산화제나 착화합물을 먼저 투여한 다음 승홍을 투여한 경우에 이들 조직내의 MDA 농도가 감소 되는 것으로 보아 지질과산화가 승홍에 의한 세포상해의 기전의 하나라고 보고했다.

한편, Shan 등⁶⁷⁾은 사구체에 침윤된 세포로부터 H_2O_2 가 다량으로 생성되어 활성산소에 의한 신 손상을 유발한다고 보고하였고, Mitch 등⁶⁸⁾은 α -keto acids 같은 H_2O_2 의 소거제를 투여함으로써 활성산소에 의한 신 질환의 진행을 막을 수 있다고 보고하였으며, Park⁶⁹⁾은 인삼의 maltol 성분이 hydroxyl radical 제거 기능에 의한 항산화 효과가 있어 활성산소에 의한 조직 손상을 보호하는 작용이 있다고 보고하였다. 이에 배양목질진흙버섯 자실체의 항산화 활성에 관한 연구를 진행하는 중 이런 효과 역시 활성산소에 의한 신 질환의 진행을 막는데 도움을 줄 것으로 사료되었다.

또한 담자균류인 복령과 저령이 한방에서 이뇨제로 처방되어 오고 있고, Lee 등¹¹⁾은 복령에 대한 이뇨작용을 보고하였고, Kang 등¹²⁾은 저령에 대한 이뇨작용을 보고하였다. 따라서 본 논문에서는 복령이나 저령과 마찬가지로 담자균류에 속하는 상황 역시 이뇨효과가 있을 것으로 추정하고 실험을 실시하였다.

뇨세관장애를 일으킨 급성 신부전에 대해 효과가 있는지를 알아보기 위해 승홍을 투여하여 급성 신 독성을 유도한 후, 배양목질진흙버섯 자실체의 MeOH ex. 및 자연산 상황의 MeOH ex.를 농도별로 경구 투여한 후 신기능의 생화학적 지표인 혈청인자 및 전해질을 측정하였으며 이뇨작용을 관찰하였다.

가. 뇨량에 미치는 영향

양성 대조물질로 사용한 furosemide는 현재 이뇨제로 사용하는 약물로 Henle 고리 상행각에서 Na^+ 및 Cl^- 의 재흡수를 억제하여 이뇨효과를 나타낸다.¹³³⁾

승홍을 투여하여 급성 신독성을 유도한 후, 배양목질진흙버섯 자실체 및 자연산 상황의 MeOH ex.를 농도별로 경구 투여한 후 시료의 이뇨효과를 furosemide 투여군과 비교 관찰한 결과는 다음과 같다 (Table 5.1, 5.2).

승흥에 의해 신독성이 유발된 음성대조군은 정상군에 비해 현저한 뇨량의 감소를 나타내었다. Furosemide를 투여한 양성대조군에서는 0-2시간 사이에서 현저한 뇨량의 증가를 나타내고, 그 후에는 급격한 뇨량의 감소를 나타냄으로써 합성약품의 강압적이고도 일시적인 이뇨 효과를 볼 수 있었다. 이에 반해, 배양목질진흙버섯 자실체 및 자연산 상황의 투여군에서는 대체로 농도 의존적으로 뇨량의 증가를 보였으며, 완만하면서 지속적인 뇨량의 증가를 나타내었다.

총 뇨량은 배양목질진흙버섯 자실체 및 자연산 상황의 모든 농도에 서 유의성 있는 뇨량의 증가를 보였고, 배양목질진흙버섯 자실체의 500 mg/kg/day 투여군과 자연산 상황의 250 mg/kg/day 투여군과 500 mg/kg/day 투여군에서는 furosemide를 투여한 양성대조군 보다 우수한 이뇨 효과를 나타내었다.

이로써 상황은 복령이나 저령과 마찬가지로 이뇨 작용을 가지고 있는 것으로 사료된다.

Table 18 Effects of methanol extracts from cultivated and natura fruit body of *Phellinus linteus* on urinary volume of HgCl₂-intoxicated rats

Group	0-1	1-2	2-3	3-4	4-5 (ml/hr)
Normal	1.49±0.37	0.60±0.49	0.67±0.40	0.74±0.67	0.60±0.34
N.C	0.45±0.12	0.16±0.08	0.20±0.24	0.38±0.04	0.42±0.06
P.C	1.27±0.34*	1.30±0.26**	0.28±0.21	0.43±0.26	0.43±0.18
CPL I	0.55±0.10	0.65±0.13**	0.57±0.12*	0.70±0.20	0.43±0.10
CPL II	0.58±0.02	0.67±0.15**	0.73±0.32*	1.03±0.35*	0.67±0.15*
CPL III	0.68±0.06*	0.80±0.10***	0.75±0.15**	1.03±0.15**	0.97±0.15**
NPL I	0.22±0.16	0.78±0.25*	0.60±0.22*	0.63±0.15*	0.45±0.31
NPL II	0.59±0.25	0.99±0.31**	0.60±0.32*	1.37±0.30***	1.12±0.39**
NPL III	0.98±0.25*	1.42±0.15***	0.82±0.34*	0.93±0.31*	1.45±0.17**

N.C : Negative control, 1 ml/kg/day of 0.05% CMC soln.

P.C : Positive control, 20 mg/kg/day of furosemide

CPL : Cultivated fruit body of *Phellinus linteus*

NPL : Natural fruit body of *Phellinus linteus*

I : 125 mg/kg/day II : 250 mg/kg/day III : 500 mg/kg/day

The drugs were administrated into p.o. after HgCl₂ (2 mg/kg/day, s.c.) administration for 1 day.

Each value represents the mean ± S.D. of 5 rats.

Significantly different from negative control :

* p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001

Table 19. Effects of methanol extracts from cultivated and natural fruit body of *Phellinus linteus* on total urinary volume of HgCl₂-intoxicated rats

Group	Total urinary volume (ml)
Normal	4.10±0.57
N.C	1.61±0.51
P.C	3.72±0.63**
CPL I	2.90±0.43**
CPL II	3.68±0.68**
CPL III	4.23±0.14***
NPL I	2.68±0.64*
NPL II	4.67±1.14***
NPL III	5.60±0.22***

N.C : Negative control, 1 ml/kg/day of 0.05% CMC soln.

P.C : Positive control, 20 mg/kg/day of furosemide

CPL : Cultivated fruit body of *Phellinus linteus*

NPL : Natural fruit body of *Phellinus linteus*

I : 125 mg/kg/day II : 250 mg/kg/day III : 500 mg/kg/day

The drugs were administrated into p.o. after HgCl₂ (2 mg/kg/day, s.c.) administration for 1 day.

Each value represents the mean ± S.D. of 5 rats.

Significantly different from negative control :

* p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001

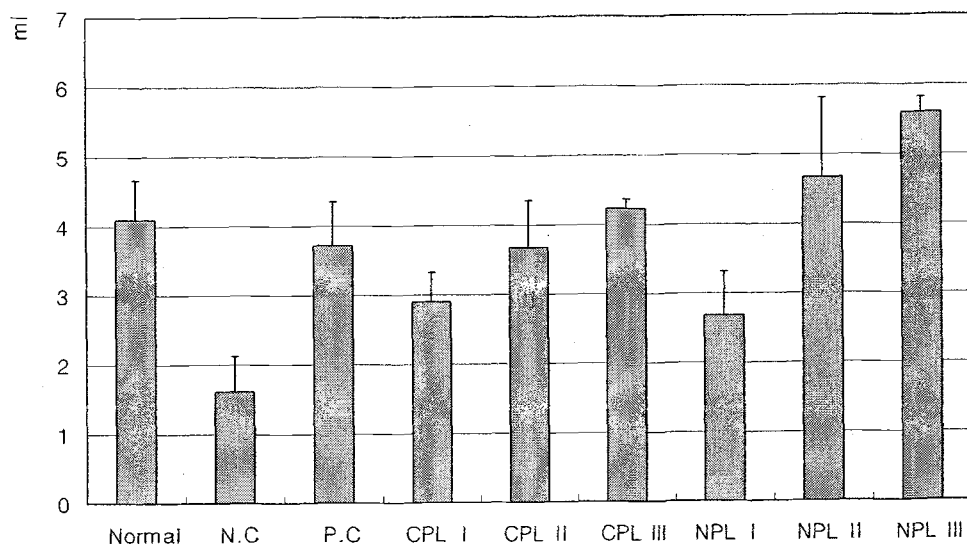


Fig. 76. Effects of methanol extracts from cultivated and natural fruit body of *Phellinus linteus* on total urinary volume of $HgCl_2$ -intoxicated rats

N.C : Negative control, 1 ml/kg/day of 0.05% CMC soln.

P.C : Positive control, 20 mg/kg/day of furosemide

CPL : Cultivated fruit body of *Phellinus linteus*

NPL : Natural fruit body of *Phellinus linteus*

I : 125 mg/kg/day II : 250 mg/kg/day III : 500 mg/kg/day

The drugs were administrated into p.o. after $HgCl_2$ (2 mg/kg/day, s.c.) administration for 1 day.

Each value represents the mean \pm S.D. of 5 rats.

Significantly different from negative control :

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$

나. 뇨중 전해질에 미치는 영향

신기능의 장애가 전해질 불균형과 연관이 있다는 사실은 널리 알려져 있다. 임상에서 가장 흔한 전해질 이상질환인 저칼륨혈증은 완하제와 이뇨제의 남용과 신경성 식욕부진에 주로 기인되며, 여러 신장 질환의 발현과 관련이 있다.¹³⁴⁾

승홍을 투여하여 급성 신부전을 일으킨 후, 배양목질진흙버섯 자실체의 MeOH ex.와 자연산 상황의 MeOH ex.를 농도별로 경구 투여하여 뇨중의 전해질의 함량을 측정된 결과는 다음과 같다 (Table 5.3).

승홍에 의해 신독성이 유발된 음성대조군은 정상군에 비해 Na^+ , K^+ , Cl^- 의 함량이 감소하였고, furosemide를 투여한 양성대조군에서는 모든 전해질의 함량이 정상군보다 더 높게 상승되었다.

Na^+ 및 K^+ 의 함량은 각 시료의 모든 농도에서 대체로 유의성 있는 증가를 보였고, Cl^- 함량은 자연산 상황의 125 mg/kg/day 투여군에서만 유의성 있는 증가를 보였다.

Table 20. Effects of methanol extracts from cultivated and natural fruit body of *Phellinus linteus* on Na⁺, K⁺ and Cl⁻ excretion of HgCl₂-intoxicated rats

Group	Na ⁺ (mEq/l)	K ⁺ (mEq/l)	Cl ⁻ (mEq/l)
Normal	22.17±4.40	59.70±7.60	24.62±6.32
N.C	7.95±0.85	37.50±4.90	9.57±0.75
P.C	45.6±7.45 ^{***}	62.70±5.70 ^{***}	38.33±7.90 ^{**}
CPL I	10.27±1.02 [*]	64.75±8.75 ^{**}	8.50±2.50
CPL II	17.50±2.90 [*]	53.03±7.94 [*]	14.05±7.15
CPL III	14.50±1.51 [*]	48.83±4.13 ^{**}	10.70±1.88
NPL I	25.30±4.06 ^{**}	97.33±3.01 ^{***}	22.90±7.16 [*]
NPL II	9.60±1.43	64.14±7.28 ^{**}	9.95±1.47
NPL III	6.53±0.40	46.30±4.20 [*]	7.95±2.25

N.C : Negative control, 1 ml/kg/day of 0.05% CMC soln.

P.C : Positive control, 20 mg/kg/day of furosemide

CPL : Cultivated fruit body of *Phellinus linteus*

NPL : Natural fruit body of *Phellinus linteus*

I : 125 mg/kg/day II : 250 mg/kg/day III : 500 mg/kg/day

The drugs were administrated into p.o. after HgCl₂ (2 mg/kg/day, s.c.) administration for 1 day.

Each value represents the mean ± S.D. of 5 rats.

Significantly different from negative control :

* p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001

다. 혈청인자에 미치는 영향

BUN은 신장기능 장애로 상승되므로 진단의 지표가 되고, creatinine 역시 신장기능 장애시 증가한다. uric acid는 통풍, 신장독성 특히 수은, 납중독 등에서 병적으로 증가한다.¹³⁰⁾

승홍을 투여하여 신독성을 유도한 후, 배양목질진흙버섯 자실체와 자연산 상황의 메탄올 엑스를 농도별로 경구 투여한 후 신장 기능 검사의 지표 항목인 혈청 중 creatinine, BUN, uric acid치를 furosemide 투여군과 비교 관찰한 결과는 다음과 같다 (Table 5.4).

승홍에 의해 신독성이 유발된 음성대조군의 혈청 creatinine, BUN 및 uric acid의 함량이 정상군에 비해 현저히 증가하였으므로 신손상이 현저히 일어나 있음을 알 수 있었으며, furosemide를 투여한 양성대조군에서 creatinine, BUN 및 uric acid의 함량이 유의성 있는 감소를 보였다.

배양목질진흙버섯 자실체의 메탄올 엑스와 자연산 상황의 메탄올 엑스는 승홍에 의해 유발된 신독성에 의해 상승한 혈청 creatinine, BUN 및 uric acid의 함량을 250 mg/kg/day 및 500 mg/kg/day군에서 유의성 있게 감소시켰으며, uric acid치 역시 모든 농도에서 감소를 나타내 신기능의 회복을 보였다.

Table 21. Effects of methanol extracts from cultivated and natural fruit body of *Phellinus linteus* on serum chemical parameters of HgCl₂-intoxicated rats

Group	Creatinine (mg/dl)	BUN (mg/dl)	Uric acid (mg/dl)
Normal	0.52±0.04	6.32±0.69	1.40±0.28
N.C	3.13±0.22	76.98±7.03	2.01±0.26
P.C	1.63±0.75*	41.43±6.45***	1.56±0.52*
CPL I	2.60±0.14*	72.90±14.16	1.63±0.15*
CPL II	2.43±0.40*	61.70±7.36*	1.58±0.56*
CPL III	2.23±0.25**	57.27±5.13**	1.30±0.29**
NPL I	2.83±0.60	68.23±10.97	1.73±0.06
NPL II	2.20±0.46*	58.10±13.61*	1.50±0.10*
NPL III	2.05±0.35*	53.90±4.53**	1.30±0.28*

N.C : Negative control, 1 ml/kg/day of 0.05% CMC soln.

P.C : Positive control, 20 mg/kg/day of furosemide

CPL : Cultivated fruit body of *Phellinus linteus*

NPL : Natural fruit body of *Phellinus linteus*

I : 125 mg/kg/day II : 250 mg/kg/day III : 500 mg/kg/day

The drugs were administrated into p.o. after HgCl₂ (2 mg/kg/day, s.c.) administration for 1 day.

Each value represents the mean ± S.D. of 5 rats.

Significantly different from negative control :

* p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001

라. 신장 및 비장 중량에 미치는 영향

Natochin 등¹³⁵⁾은 glycerol, cisplatin, uranyl acetate, sodium dichromate 및 mercuric chloride (승홍)와 같은 신독성 약물을 주사하면, 신조직의 종창에 의해 신장 중량이 24-57%까지 증가한다고 보고한 바 있으며, Huang 등¹³³⁾은 승홍 투여 흰쥐에 대한 MDA 농도 측정 시 그 표적기관인 간, 신장, 폐, 고환 및 혈장에서 지질과산화이 증가되었고, 심장, 비장 및 근육에서는 지질과산화이 증가가 보이지 않았다고 보고한 바 있다.

승홍을 투여하여 신기능장애를 일으킨 흰쥐에 농도별로 조제한 시료를 경구투여한 후, 신장의 중량과 비장의 중량을 체중에 대한 백분율로 구한 결과는 다음과 같다 (Table 5.5).

정상군에 비해 음성대조군의 신장 중량(%)은 27.8% 증가하였고, 이는 신독성 약물인 승홍에 의한 신조직의 종창에 기인한 것으로 보이며, 배양목질진흙버섯 자실체 및 자연산 상황의 투여군에서 모두 유의한 감소를 보였다. 비장 중량에 있어서는 모든 투여군에서 유의성 있는 변화를 보이지 않았다.

Table 22. Effects of methanol extracts from cultivated and natural fruit body of *Phellinus linteus* on kidney and spleen weights

Group	Kidney/Body weight(%)	Spleen/Body weight(%)
Normal	0.97±0.08	0.31±0.03
N.C	1.24±0.06	0.32±0.03
P.C	1.10±0.12*	0.31±0.06
CPL I	1.20±0.10	0.35±0.01
CPL II	1.15±0.01*	0.32±0.01
CPL III	1.09±0.08*	0.31±0.02
NPL I	1.18±0.03	0.34±0.01
NPL II	1.14±0.02*	0.32±0.04
NPL III	1.12±0.02*	0.31±0.03

N.C : Negative control, 1 ml/kg/day of 0.05% CMC soln.

P.C : Positive control, 20 mg/kg/day of furosemide

CPL : Cultivated fruit body of *Phellinus linteus*

NPL : Natural fruit body of *Phellinus linteus*

I : 125 mg/kg/day II : 250 mg/kg/day III : 500 mg/kg/day

The drugs were administrated into p.o. after HgCl₂ (2 mg/kg/day, s.c.) administration for 1 day.

Each value represents the mean ± S.D. of 5 rats.

Significantly different from negative control : * p<0.05

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

제 1 절 연구개발목표 달성도

연구개발목표	연구개발 내용 및 범위	달성도 (%)
우수 균주의 선발	우수 목질진흙버섯의 균주 선발하였다.	100
목질진흙버섯의 인공자실체 형성	액체 배양하여 배지에서 여러 가지 생리적 특성조건을 확립하였으며, 여러 균주를 통한 자실체 형성이 높은 균주를 확보하였다.	100
목질진흙버섯 배양 및 대량생산	목질진흙버섯의 현미 인공배양 및 원목배양을 통한 대량생산연구를 진행하였다.	100
목질진흙버섯의 생리활성 연구(항산화, 항암, 항동맥경화, 항염효과)	목질진흙버섯 추출물 및 분획물들은 기초생리활성에 효과가 있었다.	100
목질진흙버섯의 약리생리활성 연구(이뇨, 알콜해독 작용, 독성실험)	목질진흙버섯의 추출물을 가지고 in vivo 실험을 통하여 약리생리활성을 확인하였다.	100
생리활성물질의 분리정제	항산화 물질을 분리정제하였으며, Vitamin C보다 효과가 뛰어난 4-(3', 4'-dihydroxyphenyl)-3-butene-2-one을 분리하였다.	100
기능성 식음료의 개발	기존의 Teabag 제조의 분쇄방법이 아닌 새로운 기기를 이용한 분쇄를 통한 즉 Extruder를 이용한 기능성 분말차를 제조하였다.	100
제품의 홍보 및 생산	제품을 춘천시 허가를 받았으며, 2004년 산업기술대전 및 2005년 2월 인사동에서 홍보활동을 하고 있으며, 진행될 것이다.	100

제 2 절 : 평가방법 및 평가항목

구 분	평가의 착안점 및 적도	
	착 안 사 항	적도(%)
1차년도 (100%)	<ul style="list-style-type: none"> ○ 버섯(목질진흙버섯)의 확보 ○ 목질진흙버섯의 인공배양 ○ 생리활성물질의 추출 및 분획 	<p>40</p> <p>40</p> <p>20</p>
2차년도 (100%)	<ul style="list-style-type: none"> ○ 최적의 대량생산법 연구 ○ 목질진흙버섯의 생리활성물질의 확인 ○ 항암, 항동맥경화, 항산화, 항염 효과 연구 	<p>30</p> <p>30</p> <p>40</p>
3차년도 (100%)	<ul style="list-style-type: none"> ○ 동물실험에 의한 독성검사 ○ 기능성 식음료 제조 ○ 목질진흙버섯의 생리활성물질 검증 	<p>40</p> <p>40</p> <p>20</p>
최종평가 (100%)	<ul style="list-style-type: none"> ○ 목질진흙버섯의 대량생산 ○ 생리활성 물질의 규명 ○ 기능성 식음료의 조제 	<p>30</p> <p>30</p> <p>40</p>

제 3 절 연구개발 대외기여도

1. 버섯의 활용도를 증진하기 위해서는 버섯 자원의 종 다양성과 유전자원의 확보 및 보존에 관한 연구를 수행하였다.
2. 액체종균을 체계적으로 배양할 수 있는 기술을 전수시키면 버섯의 퇴화를 막을 수 있고 재배농민이 버섯 균에 대한 지식의 축적으로 적극적인 버섯재배의 효율이 증대된다.

- 3 생리활성이 우수한 목질진흙버섯과 밀리타리스동충하초의 현미를 이용하여 대량 생산화로 농민이나 기업에서 대량 생산화를 기대할 수 있으며, 이에 의해 목질진흙버섯과 밀리타리스동충하초의 분리·동정으로 인한 새로운 재배법의 창출을 기대할 수 있어 버섯농가에 도움을 준다.
- 4 천연 자원인 목질진흙버섯과 밀리타리스동충하초의 유효성분을 추출 정제하여 생리활성 물질을 규명함으로써, 한국인의 특성 및 체질에 맞는 기능성 제품을 기업에서 생산할 수 있다.
- 5 현미로 만든 목질진흙버섯과 밀리타리스동충하초의 자실체를 이용하여 extruder를 이용하여 초미분 분말을 제조함으로써 함으로 식이섬유를 직접 섭취하므로 국민보건은 물론 재배하는 농가에 소득이 증대하고 고용을 증대시킬 수 있다.
- 6 목질진흙버섯과 밀리타리스동충하초에서 여러 치료제로서의 제약을 제조할 수 있는 기초 자료를 조성하므로, 부가가치가 높은 제약산업의 기반을 구축할 수 있게 되었다.
- 7 이것을 토대로 국내의 천연자원을 이용한 국산 기능성 식품과 음료 개발, 기능성 음료 개발 및 유통으로 관련 산업 발전 유도 및 경쟁력이 있는 국산제품 개발에 의하여, 국내산업 육성의 기초가 되었다.

제 5 장 연구개발결과의 활용계획

제 1 절 향후 연구 수행 계획

1. 목질진흙버섯의 우수 유전자원의 확보 및 종 다양성을 유지 발전시키기 위해 계속적으로 연구를 진행하고자 한다.
2. 목질진흙버섯의 생리활성 연구를 진행하면서 항암물질을 정제하였지만, 양이 적어서 다시 정제작업을 수행할 것이며, 항암제 제조를 위한 순수한 항암물질의 정제를 시도하고 있다.
3. 목질진흙버섯의 분획물에서 항염효과를 확인하여, 세포신호전달면으로 연구한 결과 NF κ B 경로를 통한 염증물질의 생성을 억제함을 확인하였으며, 이에 대한 분리정제 연구가 진행되기 위한 추가 연구를 진행하고자 한다.
4. 목질진흙버섯의 기능성 연구로 Extruder를 통한 초미분분말을 제조하였으며, 이에 대한 좀 더 많은 생리활성 연구를 진행하여 타 제품과의 차이점을 수행이 필요하다.

제 2 절 연구개발에 의한 향후 학술적 계획

1. 목질진흙버섯의 세계화를 위한 상호 연구팀의 구축
2. “ 목질진흙버섯 분획물의 NF κ B 경로를 통한 항염효과“, 논문 투고 예정
3. ”목질진흙버섯의 균주별 기초생리활성 Screening“ 논문 투고 예정

제 3 절 연구개발에 의한 향후 산업화 계획

1. 특허출원

가. “동방향 이축 압출 성형기를 이용한 목질진흙 버섯의 가공법” 특허출원 예정

2. 기술이전

- 가. 목질진흙버섯의 우수 균주의 제공
- 나. 목질진흙버섯의 안정적인 자실체 형성을 위한 기술이전
- 다. 원목을 이용한 목질진흙버섯의 대량생산법 기술이전
- 라. 목질진흙버섯의 생리활성 및 정제법의 기술이전

3. 제품연구

- 가. Extruder를 이용한 목질진흙버섯 제품의 다양화 추진한다.
- 나. 기능성 신제품의 생리활성 연구를 수행한다.
- 다. 본 연구의 결과로서, 주관연구기관인 (주) 머쉬텍은 상황 분말차를 현재 시판 중에 있으며, 지속적인 홍보활동이 요구되어진다.
- 라. 안정적인 유통라인의 확보가 요구가 필요하다.
- 마. 향후계획은 이제까지 나온 결과를 토대로 더욱 더 발전시킬 연구를 위하여 농림기술관리센터에 기획과제로 과제계획서를 제출하여 연구를 수행하므로 앞으로 세계 일류 상품을 만들려고 한다.

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술 정보

제 1 절 학술적인 면(논문)

현재, 목질진흙버섯을 이용한 항염증 연구결과에 대한 논문은, 아직 국내외에 투고되어 있지 않으며, 항산화 물질의 정제 구조 확인에 대해서도 아직 보고되어 있지 않다.

1. Gi-Young Kim, Gap-Seong Choi, Sang-Hee Lee and Yeong-Min Park, Acidic polysaccharide isolated from *Phellinus linteus* enhances through the up-regulation of nitric oxide and tumor necrosis factor- α from peritoneal macrophages, *Journal of Ethnopharmacology*, Volume 95, Issue 1, November 2004, Pages 69-76 .
2. Gi-Young Kim, Won-Kyo Oh, Byung-Cheul Shin, Yong-Il Shin, Young-Chul Park, Soon-Cheol Ahn, Jae-Dong Lee, Yoe-Sik Bae, Jong-Young Kwak and Yeong-Min Park, Proteoglycan isolated from *Phellinus linteus* inhibits tumor growth through mechanisms leading to an activation of CD11c⁺CD8⁺ DC and type I helper T cell-dominant immune state, *FEBS Letters*, In Press, Uncorrected Proof, Available online 5 October 2004,
3. S.H. Kim, H.S. Lee, S. Lee, J. Cho, K. Ze, J. Sung and Y.C. Kim, Mycelial culture of *Phellinus linteus* protects primary cultured rat hepatocytes against hepatotoxins, *Journal of Ethnopharmacology*, In Press, Corrected Proof, Available online 25 September 2004,
4. Ge Li, Dong-Hee Kim, Tae-Dong Kim, Byoung-Jeon Park, Hae-Duck Park, Jong-Il Park, Min-Kyun Na, Hwan-Chul Kim, Nam-Doo Hong, Kyu Lim et al., Protein-bound polysaccharide from *Phellinus linteus* induces G₂/M phase arrest and apoptosis in SW480 human colon cancer cells, *Cancer Letters*, In Press, Corrected Proof, Available online 3 September 2004,
5. Jong-Moon Hur, Chun-Ho Yang, Seung-Ho Han, Sook-Hee Lee, Yong-Ouk You, Jong-Cheol Park and Kang-Ju Kim, Antibacterial effect of *Phellinus linteus* against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, *Fitoterapia*, Volume 75, Issue 6, September 2004, Pages 603-605

6. Kyungah Jung, In-Ho Kim and Daeseok Han, Effect of medicinal plant extracts on forced swimming capacity in mice, *Journal of Ethnopharmacology*, Volume 93, Issue 1, July 2004, Pages 75-81
7. Akito Nagatsu, Shizue Itoh, Rie Tanaka, Setsuko Kato, Mitsumasa Haruna, Keiichi Kishimoto, Hideki Hirayama, Yukihiro Goda, Hajime Mizukami and Yukio Ogihara, Identification of novel substituted fused aromatic compounds, meshimakobnol A and B, from natural *Phellinus linteus* fruit body, *Tetrahedron Letters*, Volume 45, Issue 30, 19 July 2004, Pages 5931-5933
8. Sun-Hyoung Kim, Yun-Seon Song, Seung-Kook Kim, Byung-Chul Kim, Chang-Jin Lim and Eun-Hee Park, Anti-inflammatory and related pharmacological activities of the *n*-BuOH subfraction of mushroom *Phellinus linteus*, *Journal of Ethnopharmacology*, Volume 93, Issue 1, July 2004, Pages 141-146
9. Soon-Kew Park, Gi-Young Kim, Jae-Young Lim, Jong-Young Kwak, Yoe-Sik Bae, Jae-Dong Lee, Yang-Hyo Oh, Soon-Cheol Ahn and Yeong-Min Park, Acidic polysaccharides isolated from *Phellinus linteus* induce phenotypic and functional maturation of murine dendritic cells, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, Volume 312, Issue 2, 12 December 2003, Pages 449-458
10. Gi-Young Kim, Yang-Hyo Oh and Yeong-Min Park, Acidic polysaccharide isolated from *Phellinus linteus* induces nitric oxide-mediated tumoricidal activity of macrophages through protein tyrosine kinase and protein kinase C, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, Volume 309, Issue 2, 19 September 2003, Pages 399-407
11. Yun Seon Song, Sun-Hyoung Kim, Jae-Hoon Sa, Changbae Jin, Chang-Jin Lim and Eun-Hee Park, Anti-angiogenic, antioxidant and xanthine oxidase inhibition activities of the mushroom *Phellinus linteus*, *Journal of Ethnopharmacology*, Volume 88, Issue 1, September 2003, Pages 113-116
12. Gi-Young Kim, Soon-Kew Park, Min-Ki Lee, Sang-Hwa Lee, Yang-Hyo Oh, Jong-Young Kwak, Sik Yoon, Jae-Dong Lee and Yeong-Min Park, Proteoglycan isolated from *Phellinus linteus* activates murine B lymphocytes via protein kinase C and protein tyrosine kinase, *International Immunopharmacology*, Volume 3, Issue 9, September 2003, Pages 1281-1292

13. Hye-Jin Hwang, Sang-Woo Kim, Jang-Won Choi and Jong-Won Yun, Iroduction and characterization of exopolysaccharides from submerged culture of *Phellinus linteus* KCTC 6190, *Enzyme and Microbial Technology*, Volume 33, Issues 2-3, 13 August 2003, Pages 309-319
14. Gi-Young Kim, Hyung-Sik Park, Byong-Hyok Nam, Sang-Jun Lee and Jae-Dong Lee, Purification and characterization of acidic proteo-heteroglycan from the fruiting body of *Phellinus linteus* (Berk. &M.A. Curtis) Teng, *Bioresource Technology*, Volume 89, Issue 1, August 2003, Pages 81-87
15. Yun-Hee Shon and Kyung-Soo Nam, Antimutagenicity and induction of anticarcinogenic phase II enzymes by basidiomycetes, *Journal of Ethnopharmacology*, Volume 77, Issue 1, September 2001, Pages 103-109
16. Sang Bae Han, Chang Woo Lee, Young Jin Jeon, Nam Doo Hong, Ick Dong Yoo, Kyu-Hwan Yang and Hwan Mook Kim, The inhibitory effect of polysaccharides isolated from *Phellinus linteus* on tumor growth and metastasis , *Immunopharmacology*, Volume 41, Issue 2, February 1999, Pages 157-164.
17. Hwan Mook Kim, Sang Bae Han, Goo Taeg Oh, Young Hee Kim, Dong Ho Hong, Nam Doo Hong and Ick Dong Yoo, Stimulation of humoral and cell mediated immunity by polysaccharide from mushroom *phellinus linteus*, *International Journal of Immunopharmacology*, Volume 18, Issue 5, May 1996, Pages 295-303
18. Kimura T., S. Hayashi, S. Ueda and H. Nishioka, Implication of active oxygen scavenging effect on antimutagenesis of a medicinal mushroom, *Phellinus linteus* Teng, *Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects*, Volume 334, Issue 3, June 1995, Pages 401-402

제 2 절 산업적인 면

1. 현재, 건강식품에 대한 국민들의 호흥이 증대되고 있으며, 단편적인 예로 주가조선 2004-10-04 14:17 건강식품, 웰빙바람 타고 호황 ‘날개’라는 기사화된 적이 있다. 하지만 본 연구에서 시작품으로 개발한 Extruder를 이용한 초미분분말의 목질진흙버섯을 이용한 제품은 보고되지 않고 있어 본 연구 결과로서 시판되는 상황의 초미분 분말 제품은 혁신적이라고 할수 있겠다.

제 7 장 참고문헌

1. 朴婉熙, 李虎得 (1999) 韓國藥用버섯圖鑑. 504-505, 528-529, 557-563. 교학사.
2. 成煥吉 (2000) 지리산의 약용식물. 91. 신진사진인쇄공사. 산청구청.
3. Ying, J., Mao, X., Ma, Q., Zong, Y. and Wen, H. (1987) *Icones of medicinal fungi from China*. 182-183. Science Press. Beijing. China.
4. 三橋 博 (1988) 原色牧野和漢藥草大圖鑑. 700. 北隆館. Hokuryukan.
5. 김창민, 신민교, 이경순, 안덕균 (1998) *완역중약대사전*. 2836-2837. 도서출판 정담.
6. 허준 (1995) *국역 한글초판 동의보감*. 195, 555, 924, 1400. 한국교육문화사.
7. 難波恒雄 (1995) *和漢藥百科圖鑑(II)*. 244-247. 保育社. 大阪.
8. 水野卓, 川合正允 (1992) *きのこの 化學と 生化學*. 13-91, 560-561. 學會出版センター. 東京.
9. 申載鏞 편저 (1989) *方藥合編解說*. 585, 586. 成輔社.
10. Yazawa, Y., Yokota, M. and Sugiyama, K. (2000) Antitumor promoting effect of an active component of Polyporus, ergosterol and related compounds on rat urinary bladder carcinogenesis in a short-term test with Concanavalin A. *Biol. Pharm. Bull.* 23(11): 1298-1302.
11. Lee, D. I., Ko, S. T. and Moon, Y. H. (1974) Diuretic action of Hoelen in the dog. *Yakhak Hoeji* 18(1): 39-48.
12. 강형용, 고석태 (1975) 저령의 개의 신장기능에 미치는 영향. *약제학회지* 5(1): 28-40.
13. Roland, J. F., Chmielwewicz, Z. F., Weiner, B. A., Gross, A. M., Boening, O. P., Luck, J. V., Bardos, T. J., Really, H. C., Sugiura, K., Stock, C. C., Lucas, E. H., Byerrum, R. U. and Stevens, J. A. (1960) Calvacine, a new antitumor agent. *Science* 132 : 1987.
14. Chihara, G., Hamuro, J., Maeda, Y., Arai, Y. and Fukuoka, F. (1970) Fractionation and purification of the polysaccharides with marked antitumor activity, especially lentinan, from *Lentinus edodes* (Berk.) Sing. (an edible mushroom). *Cancer Res.* 30(11): 2776-2781.
15. Tsukagoshi, S., Hashimoto, Y., Fujii, G., Kobayashi, H., Nomoto, K. and

- Orita, K. (1984) Krestin (PSK). *Cancer Treat. Rev.* 11(2): 131-155.
16. Moon, C. K., Lee, S. H., Mock, M. S. and Kim, D. O. (1987) Antitumor activity of the polysaccharide-fraction (Copolang) from *Coriolus versicolor* and its effects on the immune function. *Yakhak Hoeji* 31(2): 126-132.
 17. Park, Y. M., Yoon, S. K., Park, S. H., Baeg, N. J. and Kim, B. S. (1993) Efficacy and safety of *Coriolus versicolor* polysaccharide (Licovek) in the treatment of chronic type B hepatitis. *Kor. J. Phamacol. Ther.* 1: 45.
 18. Komatsu, N., Okubo, S., Kikumoto, S., Kimura, K. and Saito, G.(1969) Host-mediated antitumor action of schizophyllan, a glucan produced by *Schizophyllum commune*. *Gann* 60(2): 137-144.
 19. Han, M. W., Ko, K. S. and Chung, K. S. (1995) Liquid cultivation of *Phellinus linteus* mycelium and preparation of antitumor and immunostimulating substance. *Korea Patent Open* No. 95-7860.
 20. Li, X. Y., Wang, J. F., Zhu, P. P., Liu, L., Ge, J. B. and Yang, S. X. (1990) Immune enhancement of a polysaccharides peptides isolated from *Coriolus versicolor*. *Zhongguo Yao Li Xue Bao* 11(6): 542-545.
 21. Anai, H., Sakaguchi, Y., Emi, Y., Kohnoe, S., Maehara, Y. and Sugimachi, K. (1991) A protein-bound polysaccharide immunomodulator, PSK, does not suppress the conversion from 1-(2-tetrahydrofuryl)-5-fluorouracil to 5-fluorouracil in patients with gastric cancer. *Anticancer Drugs* 2(3): 275-278.
 22. Kobayashi, H., Matsunaga, K. and Fujii, M. (1993) PSK as a chemopreventive agent. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2(3): 271-276.
 23. Hayashi, T., Kanetoshi, A., Ikura, M. and Shiirahama, H. (1989) Bolegrevilol, a new lipid peroxidation inhibitor from the edible mushroom *Suillus grevillei*. *Chem. Pharm. Bull.* 37: 1472.
 24. 정동욱 (1992) 영지의 항균성 및 항산화성 물질에 관한 연구. 박사학위 논문. 전남대학교.
 25. 이기동, 장학길, 김현구 (1997) 버섯류의 항산화성 및 아질산염 소거작용. 한국식품과학회지 29(3): 432-436.
 26. Tsuchida, K., Aoyagi, Y., Odani, S., Mita, T. and Isemura, M.(1995) Isolation of a novel collagen-binding protein from the mushroom,

- Hypsizigus marmoreus*, which inhibits the Lewis lung carcinoma cell adhesion to type IV collagen. *J. Biol. Chem.* 270(4): 1481-1484.
27. Sugiyama, K., Kawagishi, H., Tanaka, A., Saeki, S., Yoshida, S., Sakamoto, H. and Ishiguro, Y. (1992) Isolation of plasma cholesterol-lowering components from ningyotake (*Polyporus confluens*) mushroom. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* 38(4): 335-342.
28. Jacobsohn, M. K., Byler, D. M. and Jacobsohn, G. M. (1991) Isolation of estradiol-2,3-quinone and its intermediary role in melanin formation. *Biochim. Biophys. Acta* 1073(1): 1-10.
29. Atsumi, S., Nosaka, C., Ochi, Y., Iinuma, H. and Umezawa, K., (1993) Inhibition of experimental metastasis by an alpha-glucosidase inhibitor, 1,6-epi-cyclophellitol. *Cancer Res.* 53(20): 4896-4899.
30. Kim, D. S., Jeong, H. J., Bhat, K. P. L., Park, S. Y., Kang, S.H., Yoo, E. H., Lee, M., Lee, H. W., Krueger, R. J. and Kim, D. S. H. L. (2000) Aromatase and sulfatase inhibitors from *Lepiota americana*. *Planta Med.* 66(1): 78-79.
31. Bok, J. W., Lerner, L., Chilton, J., Klingeman, H. G. and Neil Towers, G. H. (1999) Antitumor sterols from the mycelia of *Cordyceps sinensis*. *Phytochemistry* 51(7): 891-898.
32. Lindequist, U., Lesnau, A., Teuscher, E. and Pilgrim, H. (1989) The antiviral action of ergosterol peroxide. *Pharmazie* 44(8): 579-580.
33. Min, T. J. and Bea, K. G. (1996) The structure of phenolic compounds and their antibiotic activities in *Umbilicaria vellea*. *J. Kor. Chem. Soc.* 40(9): 623-629.
34. Wood, K. A., Kau, D. A., Wrigley, S. K., Beneyto, R., Renno, D. V., Ainsworth, A. M., Penn, J., Hill, D., Killacky, J. and Depledge, P. (1996) Novel β -methoxyacrylates of the 9-methoxystrobilurin and oudemansin classes produced by the Basidiomycetes *Favolaschia pustulosa*. *J. Nat. Prod.* 59: 646-649.
35. Hwang, E. I., Yun, B. S., Kim, Y. K., Kwon, B. M., Kim, H. G., Lee, H. B., Jeong, W. J. and Kim, S. U. (2000) Phellinsin A, a novel chitin synthases inhibitor produced by *Phellinus* sp. PL3. *J. Antibiot.* 53(9):

903-911.

36. Withers, S. G. and Umezawa, K. (1991) Cyclophellitol : a naturally occurring mechanism-based inactivator of beta-glucosidases. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 177(1): 532-537.
37. Kim, J. H. and Kim, Y. S. (1998) Purification and characterization of fibrinolytic enzyme from *Armillariella mellea*, *Kor. J. Mycol.* 26(4): 583-588.
38. Choi, K. Y. (1998) Analysis of cerebroside components of a mushroom, *MS thesis of Chungbuk National Univ.*
39. Moon, D. C., Hwang, K. H., Choi, G. R., Lee, Y. M., Kim, J. H., Kim, J. G., Park, Y. H., Kim, M. R. and Zee, O. P. (1994) Constituents of ceramide of a native mushroom, "*Phellinus ribis*" in Korea. *Anal. Sci. & Tech.* 7(4): 547.
40. Ikegawa, T., Nakanishi, M., Uehara, N., Chihara, G. and Fukuoka, F. (1968) Antitumor action of some Basidiomycetes, especially *Phellinus linteus*. *Gann* 59(2): 155-157.
41. Song, C. H., Moon, H. Y. and Ryu, C. H. (1977) Artificial cultivation of *Phellinus linteus*. *Kor. J. Mycol.* 25(2): 130-132.
42. 山名征三 (1988) 진단과 치료. 25(11): 2239.
43. Lee, J. H., Cho, S. M., Ko, K. S. and Yoo, I. D. (1995) Effect of cultural conditions on polysaccharide production and its monosaccharide composition in *Phellinus linteus* L13202. *Kor. J. Mycol.* 23(4): 154.
44. Kim, H. M., Han, S. B., Oh, G. T., Kim, Y. H., Hong, D. H., Hong N. D. and Yoo, I. D. (1996) Stimulation of humoral and cell mediated immunity by polysaccharide from mushroom *Phellinus linteus*. *Int. J. Immunopharmacol.* 18(5): 295-303.
45. Han, S. B., Lee, C. W., Jeon, Y. J., Hong, N. D., Yoo, I. D., Yang, K. H. and Kim, H. M. (1999) The inhibitory effect of polysaccharides isolated from *Phellinus linteus* on tumor growth and metastasis. *Immunopharmacol.* 41(2): 157-164.
46. Oh, G. T., Han, S. B., Kim, H. M., Han, M. W. and Yoo, I. D. (1992) Immunostimulating activity of *Phellinus linteus* extracts to

- B-lymphocyte. *Arch. Pharm. Res.* 15(4): 379-381.
47. Song, K. S., Cho, S. M., Lee, J. H., Kim, H. M., Han, S. B., Ko, K. S. and Yoo, I. D. (1995) B-lymphocyte-stimulating polysaccharide from mushroom *Phellinus linteus*. *Chem. Pharm. Bull.* 43(12): 2105-2108.
 48. Lee, J. H., Cho, S. M., Song, K. S., Hong, N. D. and Yoo, I. D.(1996) Characterization of carbohydrate-peptide linkage of acidic heteroglycopeptide with immuno-stimulating activity from mycelium of *Phellinus linteus*. *Chem. Pharm. Bull.* 44(5): 1093-1095.
 49. Lee, J. H., Cho, S. M., Song, K. S., Han, S. B., Kim, H. M., Hong, N. D. and Yoo, I. D. (1996) Immunostimulating activity and characterization of polysaccharide from mycelium of *Phellinus linteus*. *J. Microbiol. Biotechnol.* 6(3): 213-218.
 50. Chung, K. S., Kim, S. S., Kim, H. S., Kim, K. Y., Han, M. W. and Kim, K. H. (1993) Effect of Kp, an antitumor protein-polysaccharide from mycelial culture of *Phellinus linteus* on the humoral immune response of tumor-bearing ICR mice to sheep red blood cell. *Arch. Pharm. Res.* 16(4): 336-338.
 51. 정경수, 김신숙, 김희수, 한만우, 김병각 (1994) *Phellinus linteus* 균사배양물로부터 분리한 단백다당체 Kp의 항암활성. *약학회지* 38(2): 158-165.
 52. Kong, Y. Y., Lee, K. K., Nam, S. Y. and Hong N. D. (1991) Experimental studies on activity of the cultivated mycelia of *Phellinus linteus* (I). *Kor. J. Pharmacogn.* 22(4): 233-239.
 53. 한용석, 박순영, 최병기, 정세영 (2001) 재배 목질진흙버섯 추출물의 경구투여 급성독성 연구. *응용약물학회지* 9: 46-50.
 54. Song, C. H., Ra, K. S. Yang, B. K. and Jeon, Y. J. (1998) Immuno-stimulating activity of *Phellinus linteus*. *Kor. J. Mycol.* 26(1): 86-90.
 55. Okuda, T., Yoshioka, Y., Ikekawa, T., Chihara, G. and Nishioka, K.(1973) Anti-complementary activity of antitumor polysaccharides. *Nature* 238: 290-291.
 56. Song, K. S., Cho, S. M., Ko, K. S., Han, M. W. and Yoo, I. D.(1994) Secondary metabolites from the mycelial culture broth of *Phellinus linteus*.

- Kor J. Agric. Chem. & Biotechnol.* 37(2): 100.
57. 金昌洙 (1997) 목질진흙버섯(*Phellinus linteus*)의 성분분석. 충북대학교 석사 학위논문.
 58. 大柳善彦 (1989) 活性酸素と病氣. 化學同人. Japan.
 59. 오유진 (1997) 활성산소(유해산소)가 질병의 원인이었다. 이화문화출판사. 서울.
 60. Ray, G., Batra, S., Shukla, N. K., Deo, S., Raina, V., Ashok, S. and Husain, S. A. (2000) Lipid peroxidation, free radical production and antioxidant status in breast cancer. *Breast Cancer Res. Treat.* 59(2): 163-170.
 61. 정해영 (1992) Free Radical에 의한 노화 및 발암기전. 한국노화학회지 2(1): 1-11.
 62. Halliwell, B. (1991) Drug antioxidant effects. A basis for drug selection? *Drugs* 42(4): 569-605.
 63. Shils, M. E., Olson, J. A. and Shike, M. (1994) Modern nutrition in health and disease, 8th. 329-330, 510-511, 957, 1389, 1596. Lea & Febiger. Philadelphia.
 64. Tuppo, E. E., Forman, L. J., Spur, B. W., Chan-Ting, R. E., Chopra, A. and Cavalieri, T. A. (2001) Sign of lipid peroxidation as measured in the urine of patients with probable Alzheimer's disease. *Brain Res. Bull.* 54(5): 565-568.
 65. Ginter, E. (1992) A new concept of atherogenesis : the role of oxygen radicals. *Vnitř. Lek.* 38(11): 1096-1104.
 66. Aviram, M. (2000) Review of human studies on oxidative damage and antioxidant protection related to cardiovascular diseases. *FreeRadic. Res.* 33: 85-97.
 67. Shan, S. V. (1983) Role of reactive oxygen metabolites in experimental glomerular disease. *Kidney Int.* 35(5): 1093-1106.
 68. Mitch, W. E, Walsel, M., Steinman, T. I, Hill, S., Zeger, S. and Tungsanga, K. (1984) The effect of keto acid-amino acid supplement to a restricted diet on the progression of chronic renal failure. *N. Engl. J. Med.* 311(10): 623-629.

69. Park, C. W. (1992) *Kor. J. Ginseng Sci.* 16: 69.
70. Inkeda, N. and Fukuzume, K. (1977) Tocopherols as antioxidants in oxidation of methyl linolate. *J. Japan Oil Chem. Soc.* 26: 343.
71. Converse, C. A. and Skinner, E. R. (1992) Lipoprotein analysis, A practical approach. 113. Oxford university. New York.
72. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J. (1951) Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275.
73. Choi, J. H., Park, Y. J., Son, H. S., Yang, K. S. and Kim, T. W. (1995) Functional properties of modified low density lipoprotein and degradation of modified LDL by human monocyte macrophage. *J. Kor. Soc. Food Nutr.* 24(3): 362-370.
74. Chiu, H. C., Jeng, J. R. and Shieh, S. M. (1994) Increased oxidizability of plasma low density lipoprotein from patients with coronary artery disease. *Biochim. Biophys. Acta* 1225(2): 200-208.
75. Park, Y. J., Yang, K. S., Kim, T. H. and Kim, T. W. (1995) Effect of glucose and nonenzymatic glycation on LDL oxidation. *Kor. J. Lipidology* 5: 249-253.
76. Yang, K. S. and Sim, S. M. (1997) Effect of Arctii Fructus on low density lipoprotein oxidation. *Kor. J. Pharmacogn.* 28(4): 275-279.
77. Kim, T. H., Yang, K. S. and Park, J. Y. (1998) Effect of processed Cyperi Rhizoma on rat kidney function. *Yakhak Hoeji* 42(1): 70-74.
78. Yang, K. S., Yoon, W. Y. and Lee, D. H. (1986) Effect of Ohryungsan on renal function in the HgCl₂ intoxicated rats. *Report of S.I.H.E.* 22: 6-10.
79. 이창규외 16인 (1994) 최신 임상화학. 229. 대학서림. 서울.
80. 이규녕, 김진규 (1988) 임상화학. 88, 201. 의학문화사. 서울.
81. Bauer, J. D. (1982) Clinical laboratory method. *The C. V, Mosby Co. S. C. L.* 489-491.
82. Sawaki, S., Inagaki, T., Kato, K., Ito, R., Koike, M., Takiya, S., Matsuura, M., Sugiura, M., Ito, Y. and Hirano, K. (1982) Biological and immunological activities of superoxide dismutase in human serum with various hepatic

- disease. *IyakunoAyumi* 122: 1136-1137.
83. Lankin, V. J. and Tikhaze, A. K. (1980) Glutathion peroxidase IIactivity in the blood of hypercholesteremic mammals. *Biull. Eksp.Biol. Med.* 89(5): 554-556.
 84. Karakucuk, S., Ertugrul Mirza, G., Faruk Ekinciler, O., Saraymen R., Karakucuk, I. and Ustdal, M. (1995) Selenium concentrations in serum, lens and aqueous humour of patients with senile cataract. *Acta. Ophthalmol. Scand.* 73(4): 329-332.
 85. Horvath, M. E., Faux, S. P., Smith, A. G., Blazovics, A., van der Looij, M., Feher, J. and Cheeseman, K. H. (2001) Vitamin E protects against iron-hexachlorobenzene induced porphyria and formation of 8-hydroxydeoxyguanosine in the liver of C57BL/10ScSn mice. *Toxicol. Lett.* 122(1): 97-102.
 86. Liang, W. J., Johnson, D. and Jarvis, S. M. (2001) Vitamin C transport systems of mammalian cells. *Mol. Membr. Biol.* 18(1): 87-95.
 87. Young, A. J. and Lowe, G. M. (2001) Antioxidant and prooxidant properties of carotenoids. *Arch Biochem. Biophys.* 385(1): 20-27.
 88. 정명현, 이병주, 김경완 (1997) 양파(*Allium cepa* L.)의 항고지혈 및 항산화 활성에 관한 연구. *생약학회지.* 28(4): 198-208.
 89. 차배천, 이해원, 최무영 (1998) Nut류의 항산화 및 항균효과. *생약학회지.* 29(1): 28-34.
 90. 김주향 (1998) 어성초의 항산화작용 및 활성성분. 숙명여자대학교 석사학위 논문.
 91. 김지연 (1999) 흰털오갈피의 활성성분 및 항산화작용. 숙명여자대학교 석사학위 논문.
 92. Choi, Y. H., Kim, M. J., Lee, H. S., Changxu Hu and Kwak, S. S.(1997) Antioxidants in leaves of *Rosa rugosa*. *Kor. J.Pharmacogn.* 28(4): 179-184.
 93. Park, S. S., Yu, K. H. and Min, T. J. (1998) Antioxidant activities of extracts from fruiting bodies of mushrooms. *Kor. J. Mycol.* 26(1): 69-77.
 94. Lee, J. W., Baek, S. J., Bang, K. W., Kang, S. W., Kang, S. M., Kim, B. Y. and Ha, I. S. (2000) Biological activities of polysaccharide

- extracted from the fruit body and cultured mycelia of *Phellinus linteus* IY001. *Kor. J. Food Sci. Technol.* 32(3):726-735.
95. Bindoli, A., Cavallini, L. and Siliprandi, N. (1977) Inhibitory action of silymarin on lipid peroxide formation in rat liver mitochondria and microsomes. *Biochem. Pharmacol.* 26(24): 2405-2409.
 96. Ide, N., Nelson, A. B. and Lau, B. H. (1997) Aged garlic extract and its constituents inhibit Cu^{2+} -induced oxidative modification of low density lipoprotein. *Planta Medica* 63(3): 263-264.
 97. Chen, G. C., Hardman, D. A., Hamilton, R. L., Mendel, C. M., Schilling, J. W., Zhu, S., Lau, K., Wong, J. S. and Kane, J. P. (1989) Distribution of lipid binding regions in human apolipoprotein B-100. *J. Biochem.* 28(6): 2477-2484.
 98. Choi, J. H., Son, H. S. and Kim, T. W. (1994) Fatty acid composition and functional properties of low density lipoprotein and oxidized LDL from human plasma. *J. Kor. Soc. Food Nutr.* 23(3): 402-408.
 99. Luc, G. and Fruchart, J. C. (1991) Oxidation of lipoproteins and atherosclerosis. *Am. J. Clin. Nutr.* 53(1): 206-209.
 100. Zhang, H., Yang, Y. and Steinbrecher, U. P. (1993) Structural requirements for the binding of modified proteins to the scavenger receptor of macrophages. *J. Biol. Chem.* 268(8): 5535-5542.
 101. Palinski, W., Rosenfeld, M. E., Yla-Herttuala, S., Gurtner, G. C., Socher, S. S., Butler, S. W., Parthasarathy, S., Carew, T. E., Steinberg, D. and Witztum, J. L. (1989) Low density lipoprotein undergoes oxidative modification *in vivo*. *Proc. Nat. Acad. Sci. (U.S.A.)* 86(4): 1372-1376.
 102. Hodis, H. N., Kramsch, D. M., Avogaro, P., Bittolo-Bon, G., Cazzolato, G., Hwang, J., Peterson, H. and Sevanian, A. (1994) Biochemical and cytotoxic characteristics of an *in vivo* circulating oxidized low density lipoprotein. *J. Lipid Res.* 35(4): 669-677.
 103. Chisolm, G. M., Irwin, K. C. and Penn, M. S. (1992) Lipoprotein oxidation and lipoprotein-induced cell injury in diabetes. *Diabetes* 41(2): 61-66.
 104. Yan, L. J., Droy-Lefaix, M. T. and Packer, L. (1995) *Ginkgo biloba* extract (EGb 761) protects human low density lipoproteins against

- oxidative modification mediated by copper. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 212(2): 360-366.
105. Jialal, I., Norkus, E. P., Cristol, L. and Grundy, S. M. (1991) β -Carotene inhibits the oxidative modification of low-density lipoprotein. *Biochim. Biophys. Acta* 1086(1): 134-138.
106. Mihara, M. and Uchiyama, M. (1981) Evaluation of thiobarbituric acid(TBA) value as an index of lipid peroxidation in CCl₄-intoxicated rat liver. *Yakugaku Zasshi* 101(3): 221-226.
107. Keller, R. J. : The sigma Library of FT-IR spectra, Edition 1, 2: 1243, 1413-5, 1448. Sigma Chemical Company, Inc.
108. Almeida, A. P., Da Silva, S. A., Souza, M. L., Lima, L. M., Rossi-Bergmann, B., Moraes, V. L. and Costa, S. S. (2000) Isolation and chemical analysis of a fatty acid fraction of *Kalanchoe pinnata* with a potent lymphocyte suppressive activity. *Planta Med.* 66(2): 134-137.
109. Yaqoob, P. (1998) Monounsaturated fats and immune function, *Brazil. J. Med. Biol. Res.* 31(4): 453-465.
110. Calder, P. C. (1998) Fat chance of immunomodulation. *Immunol. Today* 19(6): 244-247.
111. Jeffery, N. M., Cortina, M, Newsholme, E. A. and Calder, P. C. (1997) Effects of variations in the proportions of saturated, monounsaturated and polyunsaturated fatty acids in the rat diet on spleen lymphocyte functions. *Brit. J. Nutr.* 77(5): 805-823.
112. Yaqoob, P. and Calder, P. C. (1993) The effects of fatty acids on lymphocyte functions. *Int. J. Biochem.* 25(12): 1705-1714.
113. Kapich, A., Hofrichter, M., Vares, T. and Hatakka, A. (1999) Coupling of manganese peroxidase-mediated lipid peroxidation with destruction of nonphenolic lignin model compounds and ¹⁴C-labeled lignins. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 259(1): 212-219.
114. Goad, L. J. and Akihisa, T. (1997) Analysis of sterols, 170-172, 377. Blackie Academic & Professional.
115. Pouchert, C. J. and Behnke, J. (1993) The Aldrich Library of ¹³C and ¹H FT NMR Spectra. Ed. 1. Vol. 1. 785. Aldrich Chemical Company, Inc..

116. 東京化學同人 (1982) ビタミン學[I] 脂溶性 ビタミン. 105-106.
117. Berman, E., Luz, Z., Mazur, Y. and Sheves, M. (1977) Conformational analysis of vitamin D and analogues. ^{13}C and ^1H nuclear magnetic resonance study. *J. Org. Chem.* 42(21): 3325-3330.
118. Wehrli, F. W. and Nishida, T. (1979) The use of carbon-13 nuclear magnetic resonance spectroscopy in natural products chemistry. *Prog. Chem. Org. Nat. Prod.* 36: 1-229.
119. Sheffer, M., Fried, A., Gottlieb, H. E., Tietz, A. and Avron, M. (1986) Lipid composition of the plasma-membrane of the halotolerant alga, *Dunaliella salina*, *Biochimica et Biophys. Acta* 857: 165-172.
120. Takaishi, Y., Adachi, R., Murakami, Y., Ohashi, T., Nakano, K. and Tomimatsu, T. (1992) A polyoxygenated steroid from *Lasiosphaera nipponica*, *Phytochemistry* 31(1): 243-246.
121. Djerassi, C., Connolly, J. D., Faulkner, D. J., Nakanishi, K., Ourisson, G., Raphael, R. A., Shamma, A. and Tamm, Ch. (1992) Dictionary of Natural products. Vol. 4. 2237-2238. Chapman & Hall. Great Britain.
122. The Merck Index (1983) Tenth Edition. 3602. Merck & Co., Inc. Rahway, N. J., U.S.A.
123. Sgarbi, D. B., da Silva, A. J., Carlos, I. Z., Silva, C. L., Angluster, J. and Alviano, C. S. (1997) Isolation of ergosterol peroxide and its reversion to ergosterol in the pathogenic fungus *Sporothrix schenckii*. *Mycopathologia* 139(1): 9-14.
124. 우원식 (1996) 천연물화학 연구법. 61. 서울대학교 출판부. 서울.
125. Loarca-Pina, G., Kuzmicky, P. A., Mejia, E. G and Kado, N.Y. (1998) Inhibitory effects of ellagic acid on the direct-acting mutagenicity of aflatoxin B1 in the Salmonella microsuspension assay. *Mutat. Res.* 398(1-2): 183-187.
126. Wang, J. P., Ho, T. F., Chang, L. C. and Chen, C. C. (1995) Anti-inflammatory effect of magnonol, isolated from *Magnolia officinalis* on A23187-induced pleurisy in mice. *J. Pharm. Pharmacol.* 47(10): 857-860.
127. Matsunaga, K., Shibuya, M. and Ohizumi, Y. (1995) Imperanene, a novel phenolic compound with platelet aggregation inhibitory activity from

- Imperata cylindrica*. *J. Nat. Prod.* 58(1): 138-139.
128. Lasure, A., Van Poel, B., Pieters, L., Claeys, M., Gupta, M., Vanden Berghe, D. and Vlietinck, A. J. (1994) Complement-inhibiting properties of *Apeiba tibourbou*, *Planta Med.* 60(3): 276-277.
129. 최동철 (1997) *Phellinus ribis* 중의 페놀성 성분. 충북대학교 석사학위 논문.
130. 서화중, 김영수, 김경수, 정두례 (1994) 마늘즙 투여가 흰쥐의 수은독성에 미치는 영향. *J. Kor. Soc. Food Nutr.* 23(6): 908-915.
131. Biber, T. U., Mylle, M., Baines, A. D., Gottschalk, C. W., Oliver, J. R. and MacDowell, M. C. (1968) A study in micropuncture and microdissection of acute renal damage in rats. *Am. J. Med.* 44(5): 664-705.
132. Ganote, C. E., Reimer, K. A., and Jennings, R. B. (1974) Acute mercuric chloride nephrotoxicity; An electron microscopic and metabolic study. *Lab. Invest.* 31(6): 633-647.
133. Huang, Y. L., Cheng, S. L. and Lin, T. H. (1996) Lipid peroxidation in rats administrated with mercuric chloride. *Biol. Trace Elem. Res.* 52(2): 193-206.
134. Tsuchiya, K., Nakauchi, M., Hondo, I. and Nihei, H. (1995) Nephropathy associated with electrolyte disorders. *Nippon Rinsho-Japanese J. Clin. Med.* 53(8): 1995-2000.
135. Natchin, Y. V., Bakhteeva, V. T. and Karpenko, L. A. (1994) Renal failure and nephrotoxic drug-induced disturbances in rat kidney tissue. *Ren. Fail.* 16(6): 687-696.