

GOVP1200211462

최 중
연구보고서

한방처방을 이용한 약용버섯의 기능성식품
개발연구

Development of Functional Food from Mushroom
and Oriental Herbs

연구기관
한국한의학연구원

농림부



제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “한방처방을 활용한 약용버섯의 기능성 식품 개발 연구에 관한 연구” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2001 년 12월

주관연구기관명 :

한국한의학연구원

총괄연구책임자 : 윤유식

세부연구책임자 : 윤유식

연구 원 : 성현제

연구 원 : 최선미

연구 원 : 강봉주

연구 원 : 박윤신

연구 원 : 김중학

연구 원 : 홍순복

연구 원 : 홍정미

위탁연구기관명 :

한국식품개발연구원

위탁연구책임자 : 오세욱

연구 원 : 이영철

연구 원 : 한대석

연구 원 : 김상희

연구 원 : 김영언

연구 원 : 김인호

연구 원 : 권은경

참여기업 :

파주임업영농조합법인

연구 원 : 고민규

연구 원 : 정광교

참여기업 :

(주) 조선내츄럴

연구 원 : 김현성

연구 원 : 이상익

요 약 문

I. 제 목

한방처방을 이용한 약용버섯의 기능성식품 개발연구

II. 연구개발의 목적 및 중요성

현재 우리 나라의 잎새버섯에 관한 연구로는 재배기술이 임업연구원을 통하여 일부 보급되어 있으나 소비시장이 형성되어 있지 않아 일반 농가에서는 잎새 버섯의 재배에 뛰어들지 못하고 있으며 가공제품의 개발은 아직 이루어지지 않고 있는 상황이다. 극소수의 재배농가에서 생산된 잎새버섯은 백화점 및 농협 하나로마트 등에서 Kg 당 23,000 -25,000원에 판매되고 있으나 지명도 및 홍보면에서 미약한 상태이다. 우리 농민에 의해 재배되는 버섯 및 한약재를 이용한 건강식품 개발은 개방화 시대를 맞이하여 저렴한 외국산 농산물이 유입됨으로써 고부가가치 작물을 재배해야하는 우리 농민의 소득향상에 크게 기여할 것이며 농산물 가공업계와 식품업계에도 활력을 주리라 기대된다.

III. 연구개발 내용 및 범위

본 연구는 우리 나라에서 재배되는 잎새버섯 및 한약재를 활용하여 고부가가치 기능성 식품을 개발함으로써 식품가공업계 및 재배농민의 수익향상에 기여하고자 기능성 식품 개발을 위한 기초 및 임상 생리활성 연구, 잎새버섯과 한약재를 조합한 가공방법 및 시제품 개발 연구와 아울러 원재료의 원활한 공급을 위하여 잎새버섯의 재배 및 유통(저장 및 포장)방법 연구가 수행되었다.

잎새버섯 및 식품원료용 한약재의 생리활성 규명 연구에서는 잎새버섯 및 한약재의 항암활성, 면역증강활성, 항암제 부작용 억제활성을 세포실험 및 동물실험을 통하여 규명하였으며 잎새버섯 및 한약재의 비만억제활성을 동물실험을 임상실험을 통하여 규명하였다.

잎새버섯 및 한약재의 가공방법 및 시제품 개발연구로는 최적 추출용매,

추출용매비, 추출시간이 확립되었고 시제품으로는 잎새버섯과 한약재를 이용한 음료 시제품 개발, 과립차 시제품 개발, 캡슐형 시제품 개발, 정제형 시제품 개발, 동결건조 시제품 개발이 수행되었다. 음료 및 과립차의 경우에는 소비자의 기호도에 맞는 상품성 있는 제품개발을 위해 관능검사에 의한 향료 및 첨가물 선별에 집중적인 연구가 이루어졌으며 동결건조 시제품 개발에 있어서는 생리효능을 위주로 시제품이 개발되어 임상효능평가에 사용되었다.

잎새버섯의 재배 및 유통 생산성 향상 연구로는 우수품종 선별, 최적 재배조건 확립, 최적 생육조건 확립, 최적 건조조건 확립, 최적 저장조건 확립, 최적 유통을 위한 포장방법 확립을 위한 연구가 수행되었다.

IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

○ 잎새버섯과 식품원료용 한약재의 생리효능 규명

- 1) 잎새버섯 및 사물탕 한약재는 뚜렷한 *in vivo* 암성장 억제효과를 나타내었으며 서로간의 조합에 의해 항암효능이 상승되었다.
- 2) 잎새버섯 및 사물탕 한약재는 *in vitro*에서 암세포에 직접 처리하였을 때 암성장 억제효과를 나타내지 않았으며 apoptosis 유도효과를 나타내지 않았다.
- 3) 잎새버섯 및 사물탕 한약재는 *in vivo* 면역기능 실험결과 세포성 면역과 체액성 면역 모두를 뚜렷하게 증강시켰다.
- 4) 잎새버섯은 가장 널리 쓰이는 화학요법제인 cisplatin의 조혈, 면역계 부작용, 신장계 부작용 등을 뚜렷이 억제하였다.
- 5) 잎새버섯과 한약재 조성물은 동물실험에서 체지방량을 뚜렷이 감소시켰으며 골밀도에는 영향을 미치지 않았다.
- 6) 잎새버섯과 한약재 조성물은 임상실험에서 체지방량과 피하지방 두께를 유의적으로 감소시키고 근육량을 유의적으로 증가시켰다.

○ 잎새버섯과 식품원료용 한약재의 가공방법 확립 및 시제품 개발

- 1) 잎새버섯은 증량에 대하여 30배의 물을 첨가하여 100℃, 3시간 추출하는 것이 가장 효율적인 추출 방법이었다.
- 2) 잎새버섯과 사물탕 원료(당귀, 천궁, 숙지황, 작약)를 따로 추출후 혼합하여 음료를 제조하기도 하였으며, 잎새버섯과 사물탕 원료(당귀, 천궁, 숙지황, 작약)를 혼합한후 추출하여 음료를 제조하기도 하였다. 두가지 추출방법에 따른 커다란 기호도 차이는 없었으며 오히려 원재료의 추출조건이나 방법보다는 식미 증진용으로 첨가되는 한약재 농축액과 구연산 등의 부재료에 의하여 음료의 기호도를 증진시킬 수 있었다.
- 3) 잎새버섯 추출액을 농축한 후 포도당을 캐리어로 사용하여 분말차를 제조하였다. 기호성을 증진시키기 위하여 첨가하는 잎새버섯 농축액의 함량을 조정하였으며 음료에 사용되는 여러 가지 부재료를 사용하여 향과 맛을 증진시켰다.
- 4) 다양한 형태의 제품개발을 위하여 캡슐형 제품과 정제형 제품으로의 가공방법 개발이 수행되었고 시제품이 개발되었다.
- 5) 음료제품과 과립차 제품이 기호도를 최우선적으로 하여 제조된 반면에 동결건조 제품 등은 기호도를 크게 고려하지 않고 잎새버섯 및 한약재의 생리활성을 위주로 하여 제조되었다. 동결건조 제품은 실제로 임상효능 평가에 활용되었다.

○ 잎새버섯 재배 및 유통 생산성 향상 연구

- 1) 농촌진흥청 잎새 1호와 파주임업영농조합법인에서 수집 보관 중인 YK 2100호의 우량 균주 선발 시험에서 YK 2100호가 선발되었다.
- 2) 최적 배지 조성은 다음과 같다.
 - 주재료(85%) : 참나무 50%, 자작나무 50%
 - 부재료(15%) : 옥수수피 5%, 미강 10%
 - 배지 초기습 : 55%
- 3) 최적 배양조건은 다음과 같다.

온도 22℃(배지 온도 25℃), 습도 70%, 광도 400 Lux, CO₂ 농도

2000ppm, 배양일수 35일

- 4) 최적 생육 조건은 다음과 같다.

온도 18℃, 습도 95 ~ 85%, 광도 500Lux, CO₂ 농도 1000ppm, 생육일수 16일

- 5) 최적 건조 조건은 다음과 같다.

예열(45℃) → 버섯을 건조기에 입상 → 예비 건조(배기창 2/3개방, 50℃, 흡입구 개방, 3시간) → 본건조(배기창/흡입구 개방, 16시간, 50℃) → 후기 건조(배기창 1/2 개방, 흡입구 개방, 50℃, 3시간) → 마지막 건조(60℃, 1시간)

- 6) 최적 저장 조건은 다음과 같다.

기존의 저온 저장 방식을 탈피 버섯 수확 후 급속히 1℃로 급랭시키는 예냉처리 후 3℃ 보관시 저장기간이 16일로 가장 선도가 높았다.

- 7) 최적 유통 선도 유지를 위한 포장 방법은 다음과 같다.

트레이 포장 시 pvc 필름으로 포장하고, 이산화탄소 농도 15 - 25%와 산소 9%(저장 최적 농도)를 포장과 동시에 주입 시 유통 품질이 양호하였다.

○ 연구결과의 활용

<참여기업 벤처 인증>

- 2001년 5월 참여기업인 (주) 조선내츄럴이 잇새버섯 다이어트 식품 등으로 한국보건산업진흥원에 벤처기업 평가 신청서 제출
- 2001년 6월 한국보건산업진흥원이 벤처기업 '사업성' 평가결과 '적격'으로 판정하였으며 '우수'로 중소기업청에 의견제출
- 2001년 6월 서울지방 중소기업청장이 벤처기업육성에 관한 특별조치법 제 25조의 규정에 의하여 벤처기업임을 확인

<특허출원>

- 잇새버섯 추출물을 포함하는 화학요법 항암제 시스플라틴의 부작용 억제제
출원번호 : 2000-49043, 출원일 : 2000. 8. 23, 출원인 : 한국한의학연구원
- 비만억제용 조성물 (Mixture for prevention of obesity)
출원번호 : 10-2001-0027144, 출원일 : 2001. 5. 18, 출원인 : 한국한의학연구원

<학술발표>

- 2000년도 한국식품과학회 추계학술대회, 건국대학교
P11-36S, 잇새버섯 열수추출물의 항암효과 및 cisplatin 부작용 억제효과
박윤신, 윤유식, 임신영, 홍순복, 안홍석, 김영언, 오세욱, 성현제
- 11th World Congress of Food Science and Technology, 2001.4.22-27,
COEX Convention Center, P14-93, Effects of Grifola frondosa on
cancer, immunity and side-effect of anticancer drug, Yoosik Yoon^a,
Yoon Shin Park^a, Soon Bok Hong^a, Young Eon Kim^b, Se Wook Oh^b,
Min Gyoo Ko^c, Kwang Kyo Jeong^c, Hyun Jea Sung^a

<활용계획>

- 참여기업인 (주) 조선내츄럴에서 상품화

SUMMARY

(영문요약문)

I. Title

Development of Functional Foods from Mushroom and Oriental Herbs

II. Purpose

In Korea, the cultivation of *Grifola frondosa* is in small scale because its market is small and no processed product exists. *Grifola frondosa* is not familiar to Korean consumers and only very small amount is sold in department store and Hanaro Mart at the price of 23,000 -25,000 won/Kg.

In Japan, the production of *Grifola frondosa* is 14,000 ton/year and it is sold at the price of 200,000 won/Kg. Many kinds of processed products is being sold in the market. In the U.S., various kinds of processed products is in the market from the year of 1992.

The development of functional food from *Grifola frondosa* oriental herbs will enlarge the market of *Grifola frondosa* and increase the income of Korean farmers.

III. Scope of the study

For the development of functional foods, cell culture (in vitro), animal (in vivo) and clinical experiments were done for anti-cancer and anti-obesity activity of *Grifola frondosa* and oriental traditional herbs. The processing methods for drink, tea, capsule, tablet and freed-dried product were established and trial products were manufactured. For the supply of good quality raw material of functional foods, cultivation, drying, wrapping methods of *Grifola frondosa* was studied

IV. Results and Future Plan

○ Evaluation of physiological activity of *Grifola frondosa* and oriental herbs

- 1) Anti-cancer and immune enhancing activity was evident from the results of cell culture and animal experiments.
- 2) Anti-obesity activity was evident from the results of animal and clinical experiments.

○ Establishment of processing methods of *Grifola frondosa* and oriental herbs, and development of trial products

- 1) Optimal extraction condition (solvent, time, ratio) was determined.
- 2) Drink form of trial products were developed.
- 3) Tea form of trial products were developed.
- 4) Capsule form of trial products were developed.
- 5) Tablet form of trial products were developed.
- 6) Freeze-dried trial products were developed.

○ Study on the cultivation, drying and storage methods

- 1) Yipsae 1 and YK2100 was compared, and YK2100 was selected.
- 2) Optimal cultivation medium was determined.
- 3) Optimal cultivation condition (temperature, moisture, light, CO₂ concentration, cultivation period) was determined.
- 4) Optimal growing condition (temperature, moisture, light, CO₂ concentration, growing period) was determined.
- 5) Optimal drying condition was determined.
- 6) Optimal storage condition was determined.
- 7) Optimal wrapping methods for the maintenance of best quality was determined.

CONTENTS

제 1 장 Preface	20
제 2 장 Studies on th physiological activities	23
제1절 Preface	23
제2절 Materials and Methods	24
1. Anticancer activity	24
2. Cytotoxicity	24
3. Apoptosis	25
4. Immune Function	26
5. Anti-metastasis	26
5. Reduction of the side effects of chemotherapy	27
6. Animal study on obesity	28
7. Clinical study on obesity	29
제3절 Results and Discussion	31
1. Anticancer activity	31
2. Synergistic effect	32
3. Cytotoxicity	34
4. Immune Function	35
5. Anti-metastasis activity	39
6. Apoptosis	40
7. Reduction of the side effect of chemotherapy	44
가. Renal function	45
나. Immune function	46
다. Gastrointestinal function	48
라. Hematopoietic function	49
8. Anti-obesity activity	51
가. Animal experiment	51
나. Clinical experiment	57
제4절 References	64
제 3 장 Studies on the processing methods	66

제1절 Preface	66
제2절 Materials and Methods	67
1. Selection of optimal extraction solvent	67
2. Selection of optimal extraction time	67
3. Selection of optimal extraction solvent ratio	67
4. Selection of optimal extraction conditions for oriental herbs	68
5. Development of drink products from <i>Grifola frondosa</i> and oriental herbs	68
6. Development of tea products from <i>Grifola frondosa</i> and oriental herbs	68
제3절 Results and Discussion	70
1. Optimization of extraction condition of <i>Grifola frondosa</i> and oriental herbs	70
가. Optimization of extraction condition of <i>Grifola frondosa</i>	70
1) Selection of optimal solvent	70
2) Selection of optimal extraction time	73
3) Selection of optimal solvent ratio	74
나. Optimization of extraction condition of oriental herbs	77
1) Optimization of extraction condition of ANGELICAE RADIX	77
2) Optimization of extraction condition of PAEONIAE RADIX ALBA	80
3) Optimization of extraction condition of CNIDII RHIZOMA	83
4) Optimization of extraction condition of REHMANNIAE RADIX PREPARAT	86
2. Development of processed products from <i>Grifola frondosa</i> and oriental herbs	89
가. Development of drink products	89
1) Development of drink products type A	89
가) Development of 1st product	89
나) Development of 2nd product	91
다) Development of 3rd product	92
라) Development of 4th product	94
마) Development of 5th product	96

마) Development of 6th product	99
사) Final recipe of type A drink product	100
2) Development of drink products type B	102
가) Development of 1st product	102
나) Development of 2nd product	103
다) Development of 3rd product	105
라) Final recipe of type B drink product	106
나. Development of tea products	109
1) Optimization of extraction condition	109
2) Optimization of mix ratio of raw materials	109
3) Optimization of granulation condition	110
4) Optimization of taste quality	110
5) Final recipe of Tea product	111
다. Development of capsule products	114
라. Development of tablet products	118
마. Development of freeze-dried products	121
제4절 Reference	123
제 4 장 Studies on cultivation and storage of <i>Grifola frondosa</i>	124
제1절 Preface	124
제2절 Scope of the study	125
제3절 Results of the study	126
1. Optimization of cultivation methods	126
2. Optimization of storage and wrapping methods	129
가. Optimization of drying methods	129
나. Optimization of storage methods	131
다. Optimization of wrapping methods	131
3. Determination of optimal cultivation, drying, storage and wrapping methods	133

목 차

제 1 장 서론	20
제 2 장 생리효능 연구분야	23
제1절 서 설	23
제2절 재료 및 방법	24
1. 항암효능연구	24
2. 암세포에 대한 Cytotoxicity 연구	24
3. Apoptosis 유도연구	25
가. Caspase 활성도 측정	25
나. Flow cytometer 분석	25
다. DNA 분절 분석	25
4. 면역증진 기능연구	26
5. 암 전이 억제효과 측정	26
6. 항암제 부작용 억제연구	27
가. 실험동물 및 시약	27
나. 실험동물의 처리	27
다. In situ hybridization	27
7. 비만 억제 동물 실험	28
8. 비만억제 임상실험	29
제3절 결과 및 고찰	31
1. 잎새버섯의 종양성장억제 효능	31
2. 잎새버섯과 한약제의 조합에 의한 효능 상승 연구	32
3. 암세포 억제효과 연구	34
4. 면역증강효능연구	35
5. 암전이 억제 효능 연구	39
6. Apoptosis 유도연구	40
7. 항암제 부작용 억제연구	44
가. 신장독성 억제효과	45
나. 면역계 부작용 억제효과	46
다. 소화기 독성 억제효과	48

라. 조혈계 부작용 억제효과	49
8. 비만억제 효능	51
가. 비만억제 동물 효능 연구	51
1) 잎새버섯 및 한약재의 비만억제 효능	51
2) 비만억제를 위한 잎새버섯과 한약재 최종 조성물 구성 및 동물효능 평가	53
나. 비만억제 임상효능 평가	57
제4절 참고문헌	64
제 3 장 가공방법 연구분야	66
제1절 서 설	66
제2절 재료 및 방법	67
1. 최적추출용매의 선정	67
2. 최적추출시간 선정	67
3. 최적 추출용매비 선정	67
4. 한약재의 최적추출조건 확립	68
5. 잎새버섯 및 한약재를 이용한 음료 개발	68
6. 잎새버섯 및 한약재를 이용한 과립차 개발	68
제3절 결과 및 고찰	70
1. 잎새버섯 및 한약재의 최적 추출 조건 확립	70
가. 잎새버섯의 최적추출조건 확립	70
1) 최적추출용매의 선정	70
2) 최적추출시간의 선정	73
3) 최적추출용매비의 선정	74
나. 한약재의 최적추출조건 확립	77
1) 당귀의 최적추출조건	77
2) 백작약의 최적추출조건	80
3) 천궁의 최적추출조건	83
4) 숙지황의 최적추출조건	86
2. 잎새버섯 및 한약재를 이용한 제품 개발	89
가. 잎새버섯과 한약재를 이용한 음료의 제조	89
1) 잎새버섯음료 A형의 제조	89
가) 1차 음료 제조	89
나) 2차 음료 제조	91

다) 3차 음료 제조	92
라) 4차 음료 제조	94
마) 5차 음료 제조	96
바) 6차 음료 제조	99
사) 잎새버섯 A형 음료의 최종배합비(13.3 °Brix)	100
아) 잎새버섯 음료 A형의 제조 공정도	101
2) 잎새버섯 음료 B형의 제조	102
가) 1차 음료 제조	102
나) 2차 음료 제조	103
다) 3차 음료 제조	105
라) 잎새버섯 B형 음료의 최종 배합비	106
마) 잎새버섯 음료 B형의 제조 공정도	106
나. 잎새버섯과 한약재를 이용한 과립차의 제조	109
1) 과립차 개발을 위한 추출조건 설정	109
2) 잎새버섯과 한약재의 배합비율 조사	109
3) 과립화 최적 조건 설정	110
4) 관능적 특성 조사	110
5) 잎새버섯 과립차의 최종 배합비와 공정도	111
가) 잎새버섯 과립차 최종 배합비	111
나) 잎새버섯 과립차 제조 공정도	112
다. 잎새버섯 및 한약재를 이용한 캡슐제품 개발	114
1) 적정 carrier의 선발	114
2) 캡슐포장 방법의 검토	114
3) 캡슐 제품의 물리화학적 특성 검토	115
4) 캡슐제품 제조 공정도	116
라. 잎새버섯 및 한약재를 이용한 정제(Tablet)제품 개발	118
1) 정제제품의 배합비	118
2) 정제제품의 제조 공정도	119
마. 잎새버섯과 한약재를 이용한 동결건조 제품	121
제4절 참고문헌	123
제 4 장 재배 및 유통 방법 연구분야	124
제1절 서 설	124
제2절 연구수행 내용	125

제3절 연구수행 결과	126
1. 잎새버섯의 재배기술 개발	126
2. 잎새버섯의 저장 및 유통방법의 개발 연구	129
가. 건조방법 설정	129
나. 저장 방법 설정	131
다. 포장방법 설정	131
3. 최적 재배 및 유통 방법 설정	133

표 목차

표 1. 잎새버섯의 in vivo 항암효능	31
표 2. 잎새버섯과 한약재의 조합에 의한 항암효능 상승	33
표 3. 잎새버섯과 사물탕이 T cell 증식능에 미치는 영향	37
표 4. 잎새버섯과 사물탕이 B cell 증식능에 미치는 영향	38
표 5. 잎새버섯 및 한약재의 압전이 억제효능	39
표 6. 잎새버섯의 cisplatin 신장독성 억제효과	45
표 7. 잎새버섯의 cisplatin 위장부작용 억제효과	48
표 8. 잎새버섯의 혈소판 회복효과	49
표 9. 잎새버섯의 비만억제효능	52
표 10. 의이인의 비만억제효능	52
표 11. 길경의 비만억제효능	53
표 12. 잎새버섯과 한약재 조성물의 체지방 감소효과	54
표 13. 잎새버섯 한약재 조성물의 콜밀도에 미치는 영향	56
표 14. 임상실험 참가자의 일반적 특징	57
표 15. 잎새버섯 한약재 조성물 섭취 전후 신체 수치의 변화	58
표 16. 잎새버섯조성물 섭취전후의 건강지표의 측정값	62
표 17. 잎새버섯 한약재 조성물 복용전후의 주된 영양소 섭취변화	63
표 18. 잎새버섯조성물 섭취전후의 미량영양소 섭취변화	63
표 19. 잎새버섯의 용매별 추출시 시간에 따른 가용성 고형분 함량의 변 화	72
표 20. 잎새버섯의 용매의 종류와 회석배수에 따른 추출 후 가용성 고형분 함량과 최종수율의 변화	75
표 21. 당귀의 회석배수별 가용성 고형분 함량의 변화	78
표 22. 백작약의 회석배수별 가용성 고형분 함량	81
표 23. 천궁의 회석배수별 가용성 고형분 함량	84
표 24. 숙지황의 회석배수별 가용성 고형분 함량	87
표 25. 잎새버섯 음료의 1차 제조 배합비	90
표 26. 잎새버섯 음료의 2차 제조 배합비	91
표 27. 잎새버섯 음료의 3차 제조 배합비	92
표 28. 3차 제조된 잎새버섯 음료의 관능검사 결과	93
표 29. 잎새버섯 음료의 4차 제조 배합비	94

표 30. 4차 제조된 잇새버섯 음료의 관능검사 결과	95
표 31. 잇새버섯 음료의 5차 제조 배합비	97
표 32. 5차 제조된 잇새버섯 음료의 관능검사 결과	98
표 33. 6차 제조된 잇새버섯 음료의 관능검사 결과	99
표 34. 잇새버섯 A형의 최종 배합비	100
표 35. 잇새버섯 음료 B형의 1차 제조 배합비	102
표 36. 잇새버섯 음료 B형의 2차 제조 배합비	103
표 37. 잇새버섯 음료 B형의 3차 제조 배합비	105
표 38. 잇새버섯 음료 B형의 최종 배합비	106
표 39. 잇새버섯 과립차의 배합비	110
표 40. 잇새버섯 과립차의 관능검사 결과	111
표 41. 경질 capsule의 크기와 충전량	115
표 42. 잇새버섯을 이용한 정제제품의 구성비	119
표 43. 균주 선정 시험	126
표 44. 최적 광도 설정	127
표 45. 최적 온도 설정	127
표 46. 배지의 주재료 함량설정	128
표 47. 최적 영양원 설정	128
표 48. 저장 조건설정	131
표 49. 이산화탄소 및 산소 농도별 품질 상태 조사	132

그림목차

그림 1. 잎새버섯의 in vivo 항암효능	32
그림 2. 잎새버섯과 사물탕 한약재의 조합에 의한 항암효능 증강	34
그림 3. 잎새버섯 및 한약재의 세포독성효과	35
그림 4. 잎새버섯과 사물탕이 T cell 증식능에 미치는 영향	37
그림 5. 잎새버섯과 사물탕이 B cell 증식능에 미치는 영향	38
그림 6. 잎새버섯 및 한약재의 암전이 억제효능	39
그림 7. 잎새버섯과 사물탕의 HL60 급성 백혈병 세포 apoptosis 유도활성	41
그림 8. 잎새버섯과 사물탕의 K562 만성 백혈병 세포 apoptosis 유도활성	41
그림 9. 잎새버섯과 사물탕을 처리한 HL 60 암세포의 flow cytometer 분석	42
그림 10. 잎새버섯 및 사물탕 처리후 HL60 암세포의 DNA fragmentation 분석	43
그림 11. 잎새버섯의 cisplatin 신장독성 억제효과	46
그림 12. Cisplatin 및 잎새버섯 투여에 의한 Spleen에서의 IL-2 발현 ...	47
그림 13. 잎새버섯의 cisplatin 위장부작용 억제효과	48
그림 14. 잎새버섯과 한약재 조성물의 체지방량 감소효과	55
그림 15. 잎새버섯과 한약재 조성물의 체지방률 감소효과	55
그림 16. 잎새버섯과 한약재 조성물의 꿀밀도에 미치는 영향	56
그림 17. 잎새버섯 한약재 조성물의 체지방량에 미치는 영향	59
그림 18. 잎새버섯 한약재 조성물의 체지방률에 미치는 영향	59
그림 19. 잎새버섯 한약재 조성물의 근육량에 미치는 영향	60
그림 20. 잎새버섯 한약재 조성물의 엉덩이둘레 미치는 영향	60
그림 21. 잎새버섯 한약재 조성물의 피하지방두께 미치는 영향	61
그림 22. 잎새버섯의 용매별 추출시 시간에 따른 가용성 고형분 함량의 변화	71
그림 23. 잎새버섯 추출시 시간에 따른 가용성 고형분 함량의 변화	73
그림 24. 잎새버섯의 용매의 종류와 희석배수에 따른 추출 후 최종수율의 변화	76
그림 25. 당귀의 희석배수별 가용성 고형분 함량의 변화	79

그림 26. 백작약의 회석배수별 가용성 고형분 함량	82
그림 27. 천궁의 회석배수별 가용성 고형분 함량	85
그림 28. 숙지황의 회석배수별 가용성 고형분 함량	88
그림 29. 앞새버섯 음료 시제품	108
그림 30. 앞새버섯 과립 시제품	113
그림 31. 앞새버섯 캡슐 시제품	117
그림 32. 앞새버섯 정제 시제품	120
그림 33. 앞새버섯 동결건조 시제품	122
그림 34. 건조된 앞새버섯	130

제 1 장 서 론

버섯 및 한약재는 특용작물로서 오래동안 국민들의 생활에 밀접하게 이용되어 왔으며 농가의 소득원으로 중요한 역할을 해 왔다. 1998년 5월 22일 고시된 농림부 채소특작과의 자료에 의하면, 약용작물로 분류되는 한약재의 경우 연간 수요량이 9만5천톤임에 비해, 97년 생산량이 4만톤, 재배면적이 1만4천 ha이며 94년까지 지속적인 생산증가 추세를 보이다가 95년부터 값싼 중국산 한약재가 수입되면서 생산감소 추세를 보이고 있어 국산 한약재를 이용한 고부가가치 상품의 개발이 요구되고 있다. 97년 한 해 버섯류의 생산량은 11만5천톤으로 양송이(1만3천톤), 느타리(8만4천톤), 팽이(1만 6천톤)를 포함하며, 재배면적에 있어서 90년 대비 240% 증가하였고 국민생활수준 향상에 따라 계속 수요량이 증가하고 있다. 그러나 국내에서 생산되고 있는 버섯의 종류는 일본, 중국에 비하면 종류상으로 상당히 단순성을 면치 못하고 있다. 표고, 느타리, 양송이, 팽이가 주종을 이루고 있으며 이외의 버섯은 생산량도 적지만 판매경로가 안정되어 있지 않아 상당히 고가의 버섯임에도 불구하고 재배농가가 많지 않은 요인이 되고 있다. 현재 일본에서 Kg 당 20만원의 고가에 거래되고 있는 약용/식용 버섯인 잎새버섯의 경우재배기술이 임업연구원을 통하여 일부 보급되어 있으나 소비시장이 형성되어 있지 않아 일반 농가에서는 잎새 버섯의 재배에 뛰어들지 못하고 있으며 가공제품의 개발은 아직 이루어지지 않고 있다. 극소수의 재배농가에서 생산된 버섯은 백화점 및 농협 하나로 마트 등에서 Kg 당 23,000 -25,000원에 판매되고 있으나 지명도 및 홍보면에서 미약한 상태이다.

잎새버섯을 비롯한 약용/식용 버섯의 생산 및 가공제품 개발은 재배농가의 판로확보를 통한 소득증대에 기여할수 있으며 수출전략품목으로 육성하여 재배 및 가공산업에 파급효과를 줄수 있다. 우리 농민에 의해 재배되는 버섯 및 한약재를 이용한 건강식품 개발은 개방화 시대를 맞이하여 저렴한 외국산 농산물이 유입됨으로써 고부가가치 작물을 재배해야하는 우리 농민의 소득향상에 크게 기여할 것이며 농산물 가공업체와 식품업체에도 활력을 주

리라 기대된다.

본 연구에서는 잎새버섯의 최적재배방법, 건조방법, 저장방법, 유통을 위한 포장방법이 확립되었으며, 잎새버섯 및 식품용 한약재의 추출방법 및 가공방법이 확립되어 음료 및 과립제품의 시제품이 개발되었다. 생리효능 연구는 항암활성 및 비만억제활성이 연구되었다. 암은 1990년대 후반인 현재 사망원인 1위를 차지하고 있으며 증가추세에 있다. 국내 50대, 60대 사망자의 30%가 암으로 죽어가고 있으며 암중에서도 위암, 간암, 폐암 순으로 사망빈도가 높다. 초기에 발견된 암일 경우 수술이나 방사선, 화학요법으로 치료가 가능하나 말기 암이나 전이된 암의 경우는 시한부 인생을 살아가야 하는 상황이며 방사선 요법, 화학요법의 부작용 또한 큰 문제로 대두되고 있다(1). 또한 최근 국내에서는 비만증이 전체 인구의 약 10%로 구미의 20%에 비하면 낮은 수준이나 생활 수준의 향상으로 인하여 영양소 섭취량은 증가하고 운동 부족에 의한 에너지 소비량은 감소됨에 따라 비만증은 증가 추세에 있다(2). 특히 도시의 국고생 가운데 비만율은 15-17%에 이르는 것으로 볼 때, 결코 간과해서는 안될 국민 건강 문제로 대두되고 있다. 비만에 해당되는 인구는 미국에서 3천5백만명 이상이고, 서유럽과 그밖의 지역을 포함하면 훨씬 많은 수에 달한다. 비만은 고혈압, 당뇨병 등 성인병 예방의 차원에서도 적극적으로 다루어져야 할 주요 건강관리 대상의 하나이다(3,4).

개방화시대를 맞이하여 우리 농촌이 경쟁력을 갖추고 살아남기 위해서는 고부가가치의 상품을 창출할 수 있는 기술이 무엇보다도 중요한 상황이다. 우리민족 고유의 한방과 최근 각광을 받고 있는 약용버섯의 조합은 효능과 국민정서 면에서 고부가가치 상품으로 실용화되어 농민소득 증진 및 농산물 가공 산업 발전에 크게 이바지 할 수 있다.

참고문헌

1. 대한병리학회, 병리학II, 서울, 고문사, pp679-685, 1995
2. '95 국민영양 조사결과보고서. 보건복지부 1997
3. 김선우, 비만의 약물요법, 대한비만학회지 2(1), 30-39, 1993
4. 이홍규. 비만과 관련된 질환. 대한 비만학회지 1:34, 1992

제 2 장 생리효능 연구분야

제1절 서 설

국내에서 고부가가치 농가 소득원의 하나로써 재배되고 있는 버섯은 항암효능, 항당뇨효능을 비롯한 여러 가지 효능으로 인체에 유익한 식품으로 알려져 있다. 잎새버섯(*Grifola frondosa*)은 물참나무, 밤나무, 너도밤나무 등의 활엽수의 고사목, 절주에서 늦가을에 자연발생하는 약용 및 식용 버섯으로 항암효과가 뛰어나 식용버섯중 가장 높은 종양저지율을 가지고 있다고 알려져 있으며 항종양 활성성분으로는 branched beta-1,3-glucan인 'grifolan LE'와 lectin이 알려져 있다 (1, 2). 잎새버섯은 암세포를 직접 공격하지 않고 면역기능을 활성화시켜 항암효과를 나타낸다고 알려져 있다 (3). 잎새버섯은 면역기능을 담당하는 대식세포에서 nitric oxide의 생산을 증가시키고 cytokine의 발현을 증강시킴으로써 면역기능을 증강시킴이 보고되었다 (4). 항암효능이외에도 다이어트 및 비만 치료에 효과가 있어 식사량의 20% 씩 1개월 투여시 20-30%의 체중감소효과가 있고, 그밖에 고혈압, 당뇨, AIDS, 변비 및 알레르기예의 효능이 알려져 있다. 고혈압 쥐 (spontaneous hypertensive rat)에서의 혈압강하 효과와 콜레스테롤 감소효과가 보고되었고(5), 유전성 당뇨병쥐에서의 혈당강하효과가 발견된 바 있다 (6).

본 연구에서는 기능성식품의 개발을 위해 잎새버섯의 항암효능과 비만억제 효능에 초점을 맞추었으며 관련된 국외에서의 연구와 차별화를 두기 위하여 전통한약재를 조합하여 기능성식품개발에 응용하고자 하였다. 생리효능 연구로는 항암효능에서는 in vitro 세포실험과 in vivo 동물실험이 수행되었으며 비만억제효능에서는 동물실험 및 임상실험을 통한 생리효능검사가 수행되었다.

제2절 재료 및 방법

1. 항암효능연구

C57BL/6 마우스에 B16 BL6 melanoma를 이식한 암동물모델이 이용되었다. C57BL/6 수컷 마우스의 옆구리 부분의 털을 깎은 후 10^6 개의 암세포를 이식하고 7일후 육안으로 보아 뚜렷한 종양형성이 보일 때 잎새버섯 및 한약재를 6일간 경구투여 하였다. 16시간 절식후 부검하여 종양의 무게를 측정하고 혈액 및 조직을 채취하였다. B16 BL6 세포주는 한국세포주은행에서 구입하였으며 5% Fetal Bovine Serum을 포함한 DMEM 배지에서 배양되었다.

2. 암세포에 대한 Cytotoxicity 연구

In vivo에서 발견되는 항암효능이 암세포에 대한 직접적인 성장억제로 인한 것인지 판별하기 위하여 in vitro에서 배양된 암세포에 다양한 농도의 추출물을 처리한 후 세포의 증식능을 측정하기 위하여 MTT assay와 SRB assay를 비교한 결과 재연성이 우수한 SRB assay를 채택하였다. SRB assay 방법은 다음과 같다. 96 well에 배양된 B16 암세포에 한약재 추출물을 처리한 후 2일간 배양하였다. 배양이 종료된 후 $50 \mu\text{l}$ 의 차가운 50% TCA 용액을 천천히 가하고 TCA가 바닥에 가라앉도록 기다린 후 4°C 에서 1시간동안 고정시켰다. 고정이 끝난 후에는 증류수로 5회 세척하여 상온에서 건조시키고 1% acetic acid에 녹인 0.1% SRB (Sulforhodamine B, Sigma S-9012) 용액 $100 \mu\text{l}$ 를 가한 후 상온에서 30분간 염색시킨 다음 1% acetic acid로 5회 세척하여 공기중에서 건조시켰다. 완전히 건조된 후 $100 \mu\text{l}$ 의 10 mM unbuffered Tris (pH 10.5) 용액을 각 well에 가하여 세포에 부착된 SRB dye를 균일하게 녹여내고 ELISA reader로 564 nm에서 흡광도를 측정하였다. 최종적으로 얻어지는 흡광도값은 각 well에 남아있는 총단백질양을 나타내며 생존세포의 수와 비례한다.

3. Apoptosis 유도연구

앞새버섯의 항암효능이 apoptosis 유도에 의한 것인지를 규명하기 위하여 apoptosis 과정에 필수적인 caspase-3의 활성도를 측정하였고, flow cytometer 분석 및 DNA 분석이 수행되었다.

가. Caspase 활성도 측정

Caspase 활성도 측정은 apoptosis 연구 중 가장 중요한 실험이라고 할 수 있다. 암세포에 여러 농도의 한약재 추출물을 적정 시간 동안 처리한 후 원심분리로 세포를 모아 20 mM Hepes (pH 7.4), 100 mM NaCl, 0.5 % NP-40, 10 mM DTT로 구성된 lysis buffer에 현탁시키고 얼음위에서 30분간 방치한 후 13,000 rpm으로 5분간 원심분리하여 상등액을 얻었다. 여기에 caspase의 특이적 기질인 Ac-DEVD-pNA (Calbiochem, USA)를 최종농도 500 μ M로 가하여 37°C에서 30 분간 반응시킨 후 405 nm에서의 흡광도를 측정하였다. 일정량의 pNA를 첨가한 standard 용액의 흡광도를 측정하여 standard curve를 그린 후, 각 시료의 흡광도를 pNA양으로 환산하였다.

나. Flow cytometer 분석

암세포에 여러 농도의 한약재 추출물을 적정 시간 동안 처리하여 원심분리로 세포를 모은 후 PBS로 1회 세척하였다. 이렇게 얻어진 세포를 50 μ g/ml의 propidium iodide, 0.1 % sodium citrate, 0.1 % NP-40에 현탁시킨 후 4 °C에서 15분 이상 방치하여 염색하였다. 염색된 세포를 flow cytometer (FACSCalibur, Beckton Dickinson, USA)로 분석하였다.

다. DNA 분절 분석

암세포에 여러 농도의 한약재 추출물 또는 순수 분리된 한약 성분 물질을 적정 시간 동안 처리한 후 원심분리로 세포를 모아서 20 mM Tris-HCl (pH 7.4), 4 mM EDTA, 0.4 % Triton X100, 10 μ g/ml digitonin

으로 구성된 lysis buffer에 넣어 얼음위에서 30분간 방치하였다. 13,000 rpm으로 5분간 원심분리하여 상등액을 모아 phenol로 3회, chloroform으로 1회 추출하고 여기에 1 μg 의 glycogen, 100 μl 의 5M NaCl 용액, 700 μl 의 isopropanol을 가하여 -80 °C에서 30분간 방치하여 DNA를 침전시킨후 70 % 에탄올로 1회 세척하였다. DNA 침전을 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 RNase A를 포함한 TE buffer에 녹인후 37 °C에서 30분간 방치한 다음 이 중 10 μl 를 1.8 % agarose gel에서 80 V로 전기영동 시킨후 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 EtBr로 염색하여 관찰하였다.

4. 면역증진 기능연구

ICR 수컷 마우스에 추출물을 14일간 경구 투여한 후 비장을 적출하여 ConA (T cell mitogen) 또는 LPS (B cell mitogen) 존재하에서의 비장세포 증식도를 측정하였다. ConA 존재하에서의 반응은 T cell의 증식도를, LPS 존재하에서의 반응은 B cell의 증식도를 나타내며 면역의 측정에 쓰인다. 채혈이 끝난 mouse의 복부를 alcohol로 완전히 도포하여 무균적으로 비장을 적출한 다음 비장 주위의 조직들을 조심스럽게 제거하고나서 차가운 RPMI-1640으로 세척하였다. 준비된 비장을 cell dissociation sieve-tissue grinder kit(Sigma U.S.A)로서 잘게 으갠 뒤 조직과편을 제거한 후 RPMI-1640으로 2회 세척하였다. 그 후 멸균된 증류수로서 hypotonic shock를 일으켜 적혈구를 파괴한 후 RPMI-1640으로 세척하여 10% fetal bovine serum (FBS) 가 첨가된 RPMI-1640배지에 비장임파구를 재부유하였다. 위의 방법으로 부유된 비장임파구를 1×10^6 cells/ml의 농도로 조정 한 뒤, T cell 분열 유도물질인 Concanavalin-A 또는 B cell 분열유도물질인 LPS를 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 또는 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 처리하고 96 well microplate에 well당 100 μl 씩 분주한 후, 37°C 5% CO₂ 배양기에서 72시간 배양하였다. 세포의 증식도는 BrdU labeling and detection kit (Roche, 1444 661)로 측정하였다.

5. 암 전이 억제효과 측정

C57BL/6 마우스를 대조군, 실험군으로 나누고 B16 melanoma 세포를 한 마리당 10^5 cell 씩 0.1 ml의 부피로 미정맥에 주사하였다. 24 시간 후부터 1일 1회 한약재를 경구 또는 복강 투여한다. 10일 경과한 후 마우스를 에테르로 치사시키고 폐를 부검하여 폐표면에 생긴 흑색종의 군락을 계수하였다.

6. 항암제 부작용 억제연구

가장 흔하게 쓰이는 항암제 중의 하나인 cisplatin (cis-platinum diamine dichloride; CDDP)의 부작용 억제 효능을 Sugiyama 등 (7)의 방법을 이용하여 측정하였다.

가. 실험동물 및 시약

실험동물은 3주령의 웅성 ICR 마우스를 대한실험동물로부터 구입하여 1주간 동물사육실에서 적응시킨 후 실험에 사용하였고 Cisplatin은 Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA)로부터 구입한 것을 사용 직전에 0.9% saline에 녹여서 사용하였다.

나. 실험동물의 처리

각각의 실험군은 10마리로 구성되었다. 각각의 마우스에 3 mg/Kg의 cisplatin을 매일 1회씩 8회 복강 투여한 후 하루동안 절식시켰다. 마우스를 마취시키고 심장으로부터 채혈하여 EDTA 처리된 시험관에 혈액을 받았다. 마우스의 전체 무게를 재고 간장, 위장, 비장, 신장을 떼어내어 각각의 무게를 측정하였다. Coulter counter (Coulter cooperation, USA)를 사용하여 적혈구 (RBC), 백혈구 (WBC), 혈소판(PLT)를 측정, 비교하였다. 신장독성의 지표로는 혈장중의 Blood Urea Nitrogen이 측정되었다. 소화기 독성의 지표로는 Ueda 등(8)의 연구결과를 바탕으로 위장중량을 측정하였다.

다. In situ hybridization

면역독성의 측정을 위하여서는 주요 면역인자인 Interleukin-2 (IL-2)의 mRNA 발현을 비장조직을 이용한 in situ hybridization 방법으로 측정하였다. 비장을 적출하여 무게를 평량하고, 드라이아이스에서 급속동결한 뒤 동결박절기(cryostat, Leica, Germany)를 이용하여 16 μ m의 두께로 연속관상절편을 제작하였다. 동결절편기로 제작한 slide를 4% paraformaldehyde 용액으로 조직을 고정시킨 후, proteinase K를 10분간 반응시켰다. 0.2% RNase blocked DW로 2회 세척 후, 다시 후 고정하였다. 미리 준비한 probe를 hybridization buffer에 희석한 뒤, 고정된 조직위에 도말하고, 85 $^{\circ}$ C에서 10분간 반응시킨 후, 37 $^{\circ}$ C에서 16시간 반응시켰다. 반응된 조직을 0.1%의 Tween 20 이 함유된 PBS로 세척하고 Strepto-avidin Horseadish peroxidase conjugase로 20분간 반응시킨 뒤, anti-fluorescein-Biotinylated로 다시 20분간 반응시켰다. 반응정도는 diaminobenzidine (DAB)에 의해 갈색으로 반응된 정도를 알아보았으며, probe는 다음과 같았다.

►IL2 5' TGT GCT TCC GCT GTA GAG CT 3'

비장 부위의 IL2 (Interleukin-2) mRNA는 DAB에 의해 갈색으로 나타났으며, Mayer's hematoxylin 용액으로 counter staining 하여, 광학현미경으로 관찰하였다.

7. 비만 억제 동물 실험

고지방, 고칼로리 섭취를 즐기는 비만인의 식생활과 유사한 상황을 만들기 위하여 사료의 전체 열량 중 지방으로부터 30%를 얻도록 사료를 구성하여 제작하였다. 실험기간 중 실험동물의 체중과 식이섭취량은 매주 측정하였다. 실험이 끝난 후 미정맥에서 채혈하여 원심분리한 후 얻어진 혈장을 혈중 지질농도 분석시료로 하였다. 모든 혈장시료는 분석직전까지 -80 $^{\circ}$ C에서 보관하였다. 혈중 총 콜레스테롤과 중성지질 함량은 아산제약에서 제조된 분석용 키트를 이용하였다. 실험동물을 ether로 전신마취시킨 후 개복하

여 복부의 피하지방조직(subcutaneous adipose tissue), 부고환지방조직(epididymal adipose tissue), 신장후 복막하 지방조직(retro-peritoneal adipose tissue)의 세 부위의 지방조직을 적출하여 무게를 측정하였다.

실험동물 사료의 구성

Control diet	
	(%)
Casein	15
Sucrose	10
Corn starch	49
Lard (80% contained)	19
Cellulose	2
Vitamin mix	1
Mineral mix	3.5
Choline bitartrate	0.2
DL-Methionine	0.3
Energy (Kcal/100g)	448
Energy from fat (%)	30.5
Energy from carbohydrate (%)	56.1
Energy from protein (%)	13.4

8. 비만억제 임상실험

30대 이상의 과체중 남녀 20명을 대상으로 8주간 잇새버섯제품을 하루 3회 씩 복용하도록 한 후 1주에 1회 본 연구원에 방문하여 신체계측 및 영양상담을 수행하도록 하였다. 모든 참여자들에게 절식이나 식이제한을 강제하지 아니하였으며 자연스러운 식생활을 유지하도록 권고하였다. 영양상담 결과는 CanPro 프로그램을 사용하여 분석하였으며 총열량, 탄수화물, 지방, 단백질 섭취량을 계산하였다. 신체계측은 허리둘레 및 엉덩이 둘레는 줄자를 사용하여 지정된 위치에서 측정하였고, 피하지방은 캘리퍼스를 이용하여 삼두박근 부위의 피부두께로서 측정하였다. 체지방량, 근육량, 체지방(lean body mass)은 체지방측정기 (Inbody 2.0, Biospace)을 사용하여 측정

하였다. 기타 혈액검사, 소변검사 및 상담을 통하여 부작용이 있는지 관찰하였다.

제3절 결과 및 고찰

생리활성 연구로는 1차년도에는 항암효능, 면역증강효능 및 항암제 부작용 억제 효능 연구위주로 in vitro 및 in vivo 연구가 수행되었으며 2차년도에는 최근 시장동향을 고려하여 비만억제 효능위주로 in vivo 동물실험 및 임상실험 연구가 수행되었다.

1. 잎새버섯의 종양성장억제 효능

잎새버섯은 B16 흑색종을 이식한 마우스에 7일간 경구투여시 0.5 g/Kg의 용량에서부터 뚜렷한 항암효능을 나타내어 종양의 크기를 55% 까지 감소시켰다.

표 1. 잎새버섯의 in vivo 항암효능

실험군	대조군	잎새버섯 (0.25 g/Kg)	잎새버섯 (0.5 g/Kg)	잎새버섯 (1.0 g/Kg)	잎새버섯 (2.0 g/Kg)
종양크기 (g)	3.58 ± 0.37	2.25 ± 0.51	1.80 ± 0.42*	1.62 ± 0.33**	2.20 ± 0.27*

평균 ± 표준오차

* P<0.05, ** P<0.01

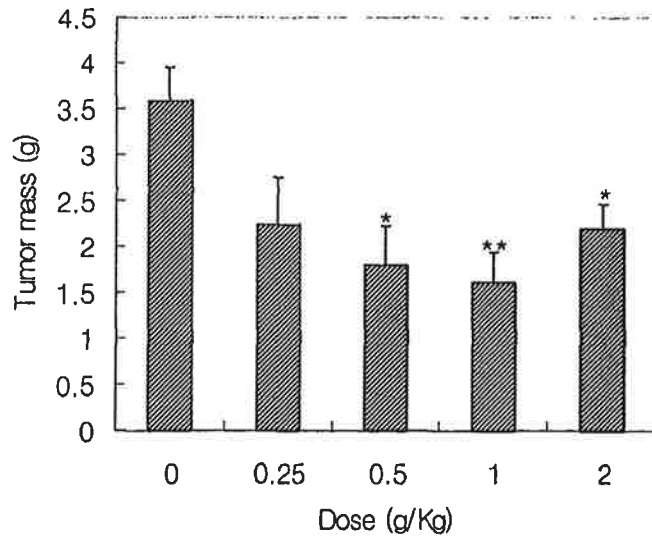


그림 1. 잎새버섯의 in vivo 항암효능
평균 ± 표준오차

2. 잎새버섯과 한약재의 조합에 의한 효능 상승 연구

잎새버섯과 조합할 한약재의 조합에 있어서는 연구자들간의 논의를 통하여 당귀, 천궁, 숙지황, 백작약 4가지 한약재로 구성된 사물탕 처방이 선정되었다. 사물탕은 태평혜미화제국방과 동의보감에 수록된 처방으로 보혈화혈(補血和血), 조경화어(調經化瘀)의 효능이 알려져 있는 대표적인 補血약이다. 혈에 대한 한의학적 개념은 혈액만을 의미하는 것이 아니라 각종 채액, 혈액내의 물질 및 호르몬, 영양물질을 포괄적으로 의미한다(9). 각각의 성분을 살펴보면 천궁은 혈약(血藥)이면서도 기약(氣藥)인데 간경(肝經)을 통하게 하며 맛이 맵고 흠어지게 하는 성질이 있기 때문에 피가 막힌 것을 잘 돌게 한다. 숙지황은 혈약 가운데서도 혈약인데 신경을 잘 통하게 하고 맛이 달며 성질이 차서 진음(眞陰)이 부족한 것을 생기게 한다. 당귀는 혈약 가운데서도 주약이다. 이것은 간경을 통하게 하는데 맛이 맵고 성질이

따뜻하다. 피가 잘 돌아 제각기 해당한 경맥에 가게 된다. 백작약은 음분약(陰分藥)이며 비경(脾經)을 통하게 하는데 맛이 시고 성질이 차서 피를 서늘하게 하고 피가 부족하여 배가 아픈 것을 낫게 한다(10). 이를 볼 때 사물탕은 혈액순환을 돕고 호르몬 및 영양물질 대사를 돕는 효능이 있으며 이는 온갖 스트레스에 노출된 현대인에게 적합한 처방이라고 할 수 있다. 또한 사물탕의 4가지 한약재는 모두 식품원료로 사용가능하므로 기능성식품 원료로서 적합하다.

항암효능에 있어서 잎새버섯과 사물탕 한약재의 배합에 의한 효능을 측정하였다. 실험동물에 사물탕만을 투여하였을 경우 암크기가 50% 감소하였다. 잎새버섯에 한약재를 1:1로 혼합할 경우 잎새버섯 또는 사물탕을 단독투여한 경우보다 암크기가 43% 감소하여 통계적으로 의미있는 항암 효능의 상승효과를 나타내었다. 이러한 결과는 잎새버섯과 한약재의 적절한 조합이 기능성 제품 개발을 위하여 필요함을 나타낸다.

표 2. 잎새버섯과 한약재의 조합에 의한 항암효능 상승

	대조군	잎새 (0.5 g/Kg)	사물탕 (0.5 g/Kg)	Mix 1 (0.25+0.25 g/KG)	Mix 2 (0.5+0.5 g/KG)
종양 (g)	1.444± 0.197	0.716± 0.048	0.718± 0.061	0.411± 0.080*	0.403± 0.029**

* 잎새버섯 군에 비하여 통계적으로 의미있는 차이가 있음 (P<0.05)

** 잎새버섯 군에 비하여 통계적으로 의미있는 차이가 있음 (P<0.01)

평균±표준오차

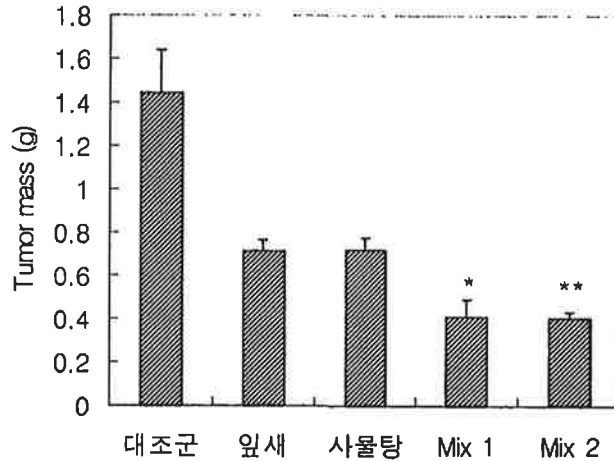


그림 2. 잎새버섯과 사물탕 한약제의 조합에 의한 항암효능 증강
평균±표준오차

3. 암세포 억제효과 연구

동물실험에서 효과를 보인 잎새버섯 및 사물탕에 대하여 암세포에 대한 직접적인 억제효과가 있는지 실험하였다. 암세포에 대한 억제효과 (세포독성) 연구에는 MTT assay와 SRB assay가 주로 활용되고 있다. MTT assay는 Moseman(11)이 항암제의 세포독성연구에 처음사용한 방법으로 생존세포의 미토콘드리아 내에 있는 succinate dehydrogenase 활성에 의해 황색의 tetrazolium 염이 환원되어 청색의 formazan crystal로 침전되는 정도를 540 nm에서의 흡광도를 측정함으로써 정량하는 방법이다. MTT assay는 신속하지만 pH 변화에 매우 민감하고 반응종말점이 분명하지 않으며 또한 세포의 종류와 배양기간에 영향을 받는다는 단점이 있다. 이러한 단점을 보완할 수 있는 SRB 검색법은 생존세포의 단백질을 sulforhodamine B dye로 염색하여 흡광도를 측정함으로써 생존세포수를 추산하는 방법이다(12). 대량검색에 유리하므로 미국의 NCI에서도 항암활

성물질 대량검색에 이용하고 있다. 본 연구자들도 SRB assay 방법과 MTT assay 방법을 비교한 결과 MTT assay에서 background가 높게 나타나고 SRB assay 방법이 보다 재연성이 높았으므로 SRB assay법이 사용하였다.

B16 흑색종 세포를 *in vitro*에서 배양하여 잎새버섯 및 사물탕을 암세포에 직접 처리하였을 경우 1000 ug/ml에 이르기까지 암세포성장 억제효과가 관찰되지 않았다 (그림 3). HepG2 인간 간암세포와 AGS 인간위암세포에 처리한 경우도 유사한 결과를 얻었다. 이와 같은 현상은 잎새버섯 및 한약재 조성물이 암세포의 성장 및 사멸에 직접 영향을 미치지 않음을 보여주고 있으며 다른 버섯류 및 많은 한약재와 마찬가지로 면역력의 증가에 의한 효과를 나타냄을 암시하고 있다.

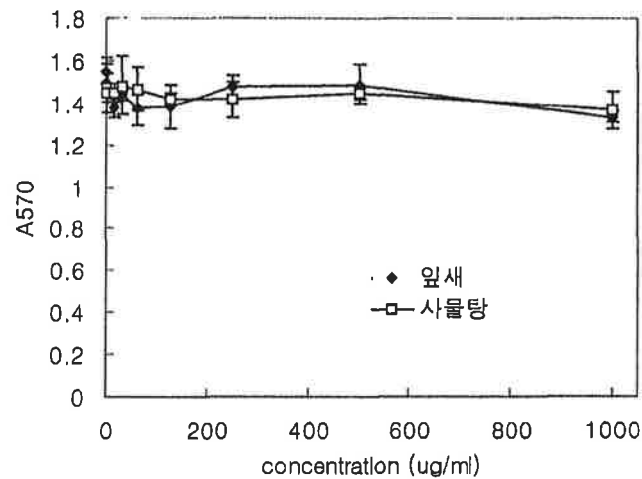


그림 3. 잎새버섯 및 한약재의 세포독성효과
평균 ± 표준편차

4. 면역증강효능연구

In vivo에서 종양억제 효과가 관찰되었으나 in vitro에서 암세포에 직접 처리하였을 경우에는 종양억제 효과가 관찰되지 않았음은 잇새버섯 및 사물탕이 암세포를 직접 억제하지 아니하고 생체내에서의 간접적인 경로에 의해 종양억제 효과를 나타냄을 제시하고 있다. 생체 밖에서는 존재하지 않으면서 생체내에서만 존재하는 종양억제 방법으로는 면역계의 작용을 들 수 있다. 면역계에는 B 면역세포에 의한 항체형성에 의해 이루어지는 세포성 면역과 T 면역세포에 의한 탐식작용 등에 의한 세포성 면역으로 이루어진다. 면역기능을 측정하는 방법에는 여러 가지가 있지만 본 연구에서는 비장세포(splenoocyte)를 분리하여 B cell 증식유도인자인 LPS (lipopolysaccharide)에 의한 반응도를 정량함으로써 체액성면역을 측정하였으며, T cell 증식유도인자인 Con A(Concanavalin A)에 의한 반응도를 정량함으로써 세포성 면역을 측정하였다.

연구결과는 잇새버섯의 경우 T cell 증식능을 최대 166% 증가시켰으며 B cell 증식능을 최대 247% 증가시켰다. 사물탕 한약재의 경우에는 T cell 증식능을 최대 150% 증가시켰으며 B cell 증식능은 최대 247% 증가시켰다 (표 3, 4). 결과적으로 잇새버섯과 한약재는 T cell과 B cell을 모두 활성화시켰으며 B cell의 활성화 정도가 좀더 높았다. 잇새버섯과 한약재 모두 암세포에 대한 직접적인 억제효과가 없는 것을 고려할 때 이들의 항암효과는 생체면역체계의 활성화에 의한 간접적인 방법임을 결론내릴 수 있다.

표 3. 잎새버섯과 사물탕이 T cell 증식능에 미치는 영향

	대조군	잎새버섯(0.5g/Kg)	사물탕(0.5g/Kg)
Con A 1 ug/ml	0.182±0.012 (100±6.6%)	0.302±0.034** (165.9±18.7%)	0.272±0.032 (149.5±17.6%)
Con A 10 ug/ml	0.284±0.101 (100±35.6%)	0.451±0.192* (158.8±67.6%)	0.449±0.207* (158.1±72.9)

평균 ± 표준편차

* P<0.05, ** P<0.01

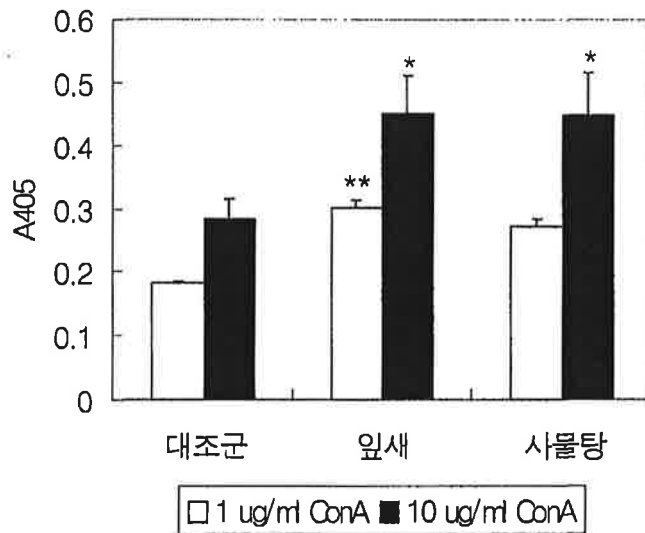


그림 4. 잎새버섯과 사물탕이 T cell 증식능에 미치는 영향

평균±표준오차

표 4. 잎새버섯과 사물탕이 B cell 증식능에 미치는 영향

	대조군	잎새버섯(0.5g/Kg)	사물탕(0.5g/Kg)
LPS 1 ug/ml	0.228±0.122 (100±53.5%)	0.562±0.402* (246.5±176.3%)	0.562±0.392* (246.5±171.9%)
LPS 10 ug/ml	0.41±0.073 (100±17.8%)	0.846±0.306** (206.3±74.6%)	0.65±0.281* (158.5±68.5%)

평균 ± 표준편차

* P<0.05, ** P<0.01

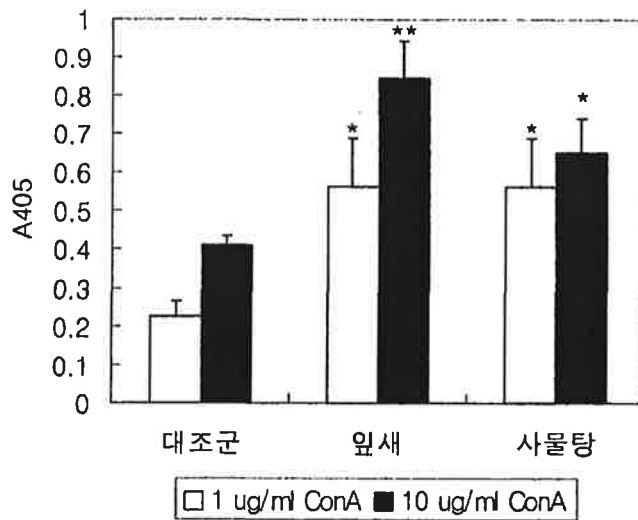


그림 5. 잎새버섯과 사물탕이 B cell 증식능에 미치는 영향
평균±표준오차

5. 암전이 억제 효능 연구

흑색종 세포를 혈관에 주사한 후 혈액에서 폐로 전이되어 생긴 흑색종 콜로니 수를 계수한 결과는 표 5와 같다. 잎새버섯은 44%의 전이억제 효능을 보였으며 사물탕은 25%의 억제효능을 보였다. 잎새버섯 및 사물탕이 암세포에 대한 직접적인 억제작용이 없는 것으로 볼아 전이억제효과 역시 혈액중에서 면역세포인 T cell 및 B cell에 의한 암세포의 불활성화에 기인한다고 생각되어진다.

표 5. 잎새버섯 및 한약재의 암전이 억제효능

	대조군	잎새버섯(0.5g/Kg)	사물탕(0.5g/Kg)
폐의 전이암 colony수	32.5±8.3	20.5±9.7	25.3±8.6

평균±표준편차

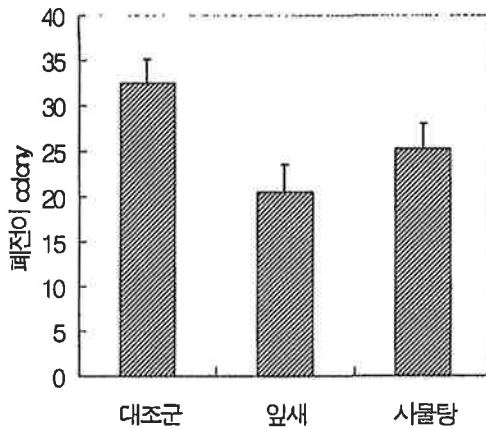


그림 6. 잎새버섯 및 한약재의 암전이 억제효능
평균±표준오차

6. Apoptosis 유도연구

Apoptosis는 세포내의 유전자에 내재된 program에 의해 진행되어지는 자발적인 세포의 죽음을 말한다. 최근들어 암의 발생과정에서 정상적인 apoptosis의 조절기작이 손상된다는 증거들이 제시되고 있다. 암세포는 여러 누적된 유전자의 손상에 의해 증식능이 증가한 반면 apoptosis에 대한 민감도는 감소되어 있다. 최근들어 cisplatin, etoposide, vinca alkaloid 등의 항암제의 항암효과가 종양세포의 apoptosis 유도에 있다고 알려지면서 이에 대한 관심이 집중되고 있다. Apoptosis의 측정방법으로는 DNA fragmentation과 flow cytometer 분석 방법이 전통적으로 활용되었으나 최근 들어 이러한 현상이 apoptosis에 특이적이지 않고 세포 독성의 결과로 나타날 수 있음을 밝혀지면서 활용도가 감소하였다. 현재는 apoptosis의 핵심조절자인 단백질 분해효소 (caspase) 활성의 증가를 apoptosis의 가장 정확한 정량방법으로 인정하고 있다. 따라서 본 연구에서도 apoptosis의 정량 방법으로 caspase의 활성을 특이적 기질을 활용하여 측정하였다.

잎새버섯 및 사물탕(당귀, 천궁, 숙지황, 백작약)을 HL60 acute leukemia 암세포에 1000 ug/ml까지의 다양한 농도로 처리하였을 경우 apoptosis 현상의 가장 핵심적인 특징인 caspase-3의 효소활성도가 증가되지 않았다 (그림 7). K562 chronic myelogenous leukemia 암세포의 경우에도 1000 ug/ml의 고농도에 이르기까지 apoptosis의 특이적인 양상인 caspase-3의 효소활성도가 증가되지 않았다 (그림 8). B16을 비롯한 다른 암세포에 처리한 경우에도 유사한 결과를 얻었다.

암세포에 대한 유세포(Flow cytometer) 분석과 DNA fragmentation 분석에서도 잎새버섯과 사물탕모두 1000 ug/ml까지 apoptosis의 특징이 나타나지 않았으므로 연구자들은 이들의 생리활성 중에 암세포의 apoptosis 유도활성은 보유하지 않은 것으로 결론을 내렸다.

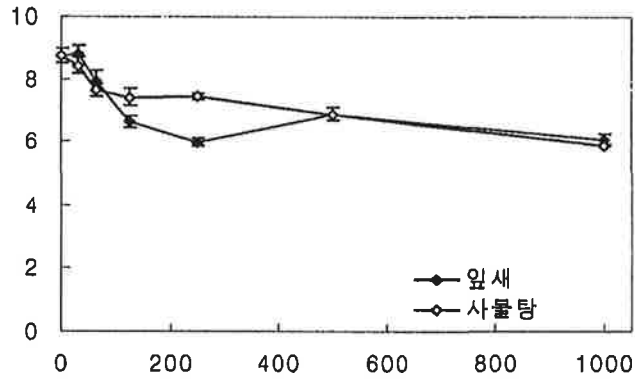


그림 7. 잎새버섯과 사물탕의 HL60 급성 백혈병 세포 apoptosis 유도활성

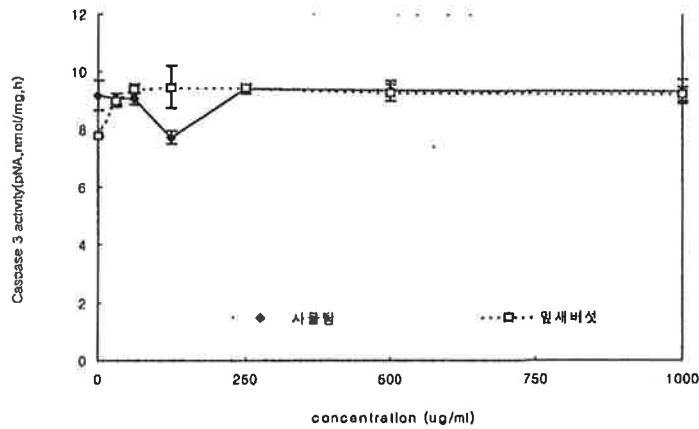
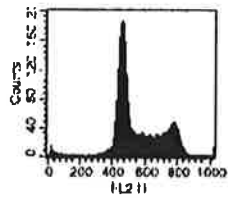
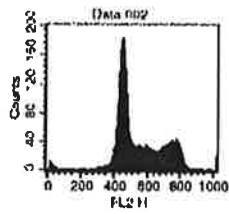


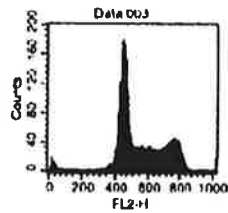
그림 8. 잎새버섯과 사물탕의 K562 만성 백혈병 세포 apoptosis 유도활성



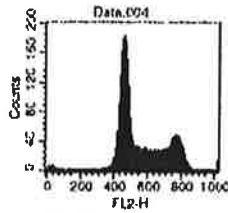
대조군



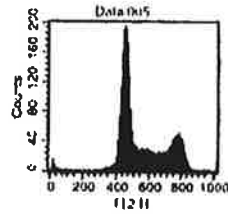
잎새버섯 500 ug/ml



잎새버섯 1000 ug/ml



사물탕 500 ug/ml



사물탕 1000 ug/ml

그림 9. 잎새버섯과 사물탕을 처리한 HL 60 암세포의 flow cytometer 분석

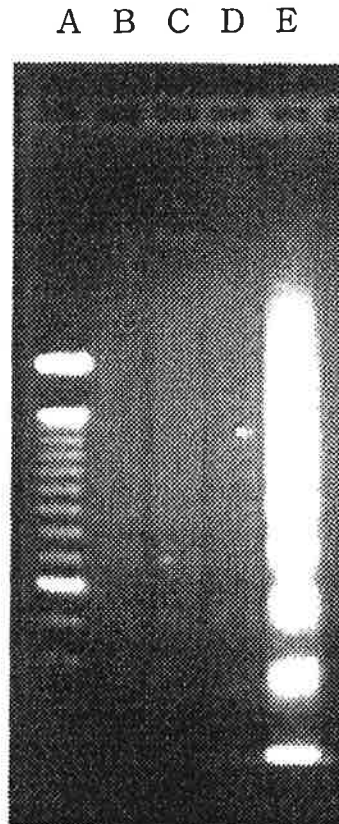


그림 10. 잎새버섯 및 사물탕 처리후 HL60 암세포의 DNA fragmentation
분석

A: Size Marker, B: 대조군, C: 잎새버섯 1000 ug/ml
D: 사물탕 1000 ug/ml, E: camptothecin 0.1 ug/ml (양성대조군)

7. 항암제 부작용 억제연구

수많은 연구의 결과 화학합성 또는 천연물 분리의 방법에 의해 많은 우수한 항암제가 개발되었고 이러한 연구경향은 국내 연구계에도 영향을 미쳐 SK에서 선플라주 화학요법제를 국내신약 1호로 개발한 바 있다. 이러한 노력에 의해 지난 수십 년간 암의 치료율이 향상되었으나 국소적인 암 병소의 제거에만 초점을 맞춘 기존 암 치료법은 환자의 삶의 질 저하라는 큰 문제를 야기하여 최근에는 항암제의 부작용으로 인한 삶의 질 저하를 개선해야할 필요성이 시급히 대두되고 있다.

대부분의 항암제에 공통되는 급성 부작용으로는

1. 조혈기능억제 : 백혈구감소, 혈소판감소, 빈혈
2. 메스꺼움 및 구토
3. 점막 궤양
4. 탈모증

등이 있다. 이러한 부작용들은 화학요법제들이 암세포와 활발하게 자라는 정상세포 (골수조혈세포 및 점막, 피부, 모근의 상피세포)에 구별됨이 없이 작용하기 때문이다.

본 연구에서는 화학요법제 중에 가장 광범위하게 활용되는 cisplatin의 부작용에 대하여 잎새버섯추출물의 효과를 평가하였다. 백금착화합물로서 알킬화제인 Cisplatin (*cis*-diaminedichloro platinum (II); CDDP)은 고환암, 난소암, 방광암의 치료를 위하여 FDA의 공인을 받은 후로 뇌, 부신 피질, 유방, 자궁, 자궁경부, 자궁내막, 머리, 목, 식도, 폐, 피부, 전립선, 위, 뼈, 임파선, 영양세포(trophoblast)의 종양에 광범위하게 이용되고 있다. 특징적인 부작용으로 급성의 때로는 회복 불가능한 신장손상이 초래되므로 환자에게 충분한 수분공급과 배설이 수행되어야 한다. 고용량의 cisplatin 처리 시에는 회복 불가능한 renal tubule의 손상이 발생할 수 있으므로 대단히 조심하여야 한다. 환자의 신장기능이 지속적으로 점검되어야 하고 신장기능을 나타내는 지표인 혈청 creatinin이 1.5 mg/dL 이상으로 올라가는 경우에는 cisplatin 투여가 불가능하다. 그 밖의 부작용으로는 백혈구감소증, 혈소판 감소증, 빈혈 등의 조혈계 부작용, 메스꺼움, 구토, 식욕부진, 설사 등의 소화관계 부작용, 신장독성, 간독성, 신

경계 부작용, 청력손상 등이 알려져 있다 (13). 이러한 부작용은 실험동물을 이용한 기초연구를 통하여서도 잘 알려져 있다. 일본에서 수행된 Ueda 등(8)에 의한 연구 결과에 의하면 cisplatin을 마우스에 투여한 경우 blood urea nitrogen (BUN)의 4배 증가가 관찰되어 신독성이 심각함이 관찰되었다. 또한 백혈구 치의 60% 감소, 혈소판의 70% 감소가 관찰되고 흉선과 비장의 중량이 크게 감소하여 조혈, 면역계의 부작용 역시 심각함이 판명되었다.

가. 신장독성 억제효과

먼저 cisplatin의 특징적인 부작용인 신장독성에 대한 잎새버섯의 효과를 측정하였다. 혈액중의 BUN(Blood Urea Nitrogen) 수치는 신장기능 이상의 대표적인 지표로 이용되고 있다. BUN은 생리적인 비단백질소의 50%를 차지하고 신기능부전시에는 크게 증가하여 비단백질소의 80-90%를 차지한다고 알려져 있다. 정상치는 인간에서 8-20 mg/dL이며 40 mg/dL이면 신부전이 의심된다. 100 mg/dL이상이면 투석요법을 적용해야 한다 (14). 측정 결과 cisplatin처리군에서 급격한 BUN 증가가 관찰되었고, 1.0 g/Kg 잎새버섯을 병용처리하였을 경우 정상수준까지는 아니었으나 BUN 수치가 38% 감소하여 통계적으로 의미있는 신장 손상 억제 효과가 관찰되었다(표 6).

표 6. 잎새버섯의 cisplatin 신장독성 억제효과

	Control	cisplatin	cisplatin + 0.5 g/Kg	cisplatin + 1.0 g/Kg
BUN (mg/dL)	23.3 ± 4.9 ^{a)}	193.8 ± 38.1	154.4 ± 57.8	120.0 ± 21.9**

a) : 평균 ± 표준편차

** : 스튜던트 T 테스트 결과 cisplatin 군에 비해 통계적으로 유의적인 감소를 보임 (p<0.01).

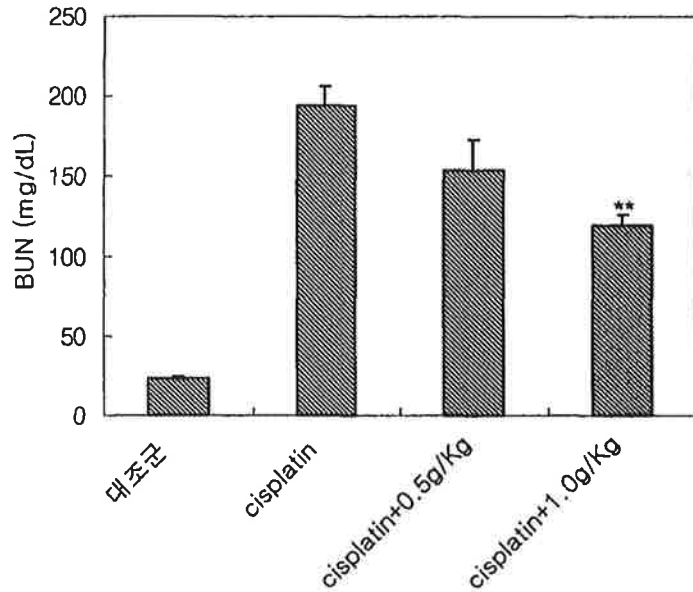
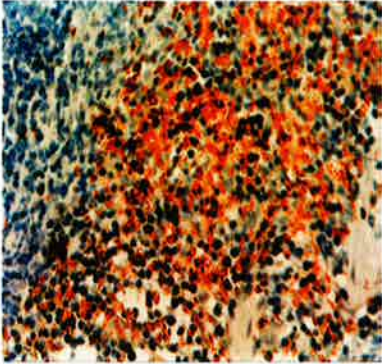


그림 11. 잇새버섯의 cisplatin 신장독성 억제효과
평균±표준오차

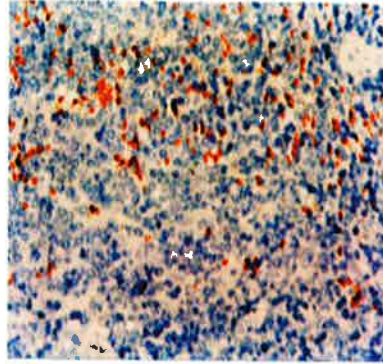
나. 면역계 부작용 억제효과

IL-2(interleukin-2)는 면역을 담당하는 임파구의 분화 및 증식에 필수적인 주요한 면역조절인자(cytokine)로서 cisplatin의 면역독성을 측정하기 위해 비장조직내의 IL-2발현이 관찰되었다. 푸른색의 대조염색을 바탕으로 IL-2를 발현하는 세포는 갈색으로 염색된다. Cisplatin 투여시 비장내의 IL-2 발현이 급감하지만 1.0 g/Kg의 잇새버섯을 cisplatin과 동시에 투여한 경우에는 IL-2의 발현이 회복됨을 보여주고 있다(그림 12).

Control



Cisplatin



Cisplatin + 잎새버섯 (1.0 g/Kg)

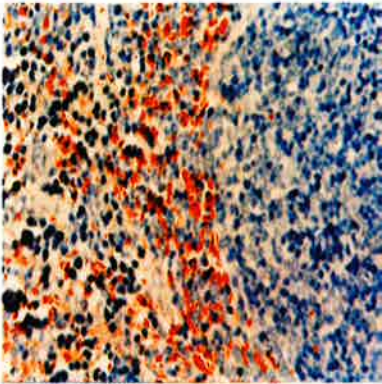
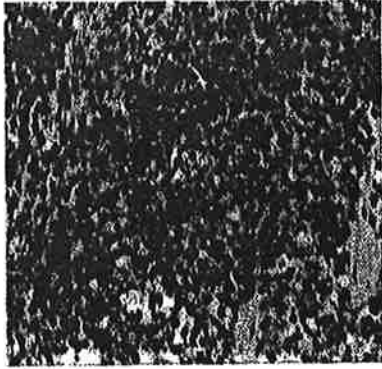
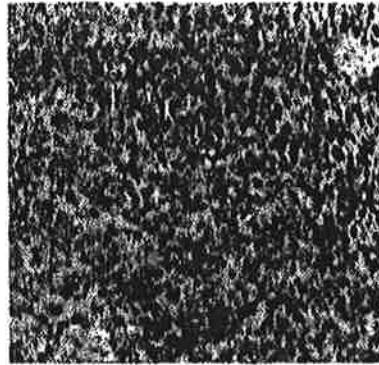


그림 12. Cisplatin 및 잎새버섯 투여에 의한 Spleen에서의 IL-2 발현

Control



Cisplatin



Cisplatin + 잎새버섯 (1.0 g/Kg)

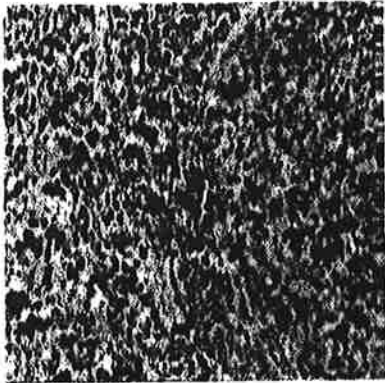


그림 12. Cisplatin 및 잎새버섯 투여에 의한 Spleen에서의 IL-2 발현

다. 소화기 독성 억제효과

소화기독성은 Ueda (8)의 방법을 활용하여 위장 중량의 증가로 측정하였다. 부검시 채취한 위장을 saline으로 세척한 후 정밀저울로 무게를 측정하였다. 측정결과 Ueda의 보고와 같이 cisplatin처리군에서 급격한 위장중량 증가가 관찰되었고, 1.0 g/Kg 잇새버섯을 병용처리하였을 경우 통계적으로 의미있는 위장중량 증가억제 효과가 관찰되었다(표 7).

표 7. 잇새버섯의 cisplatin 위장부작용 억제효과

실험군	대조군	cisplatin	cisplatin + 0.5 g/Kg	cisplatin + 1.0 g/Kg
위장중량 (g)	0.62 ± 0.10 ^{a)}	1.75 ± 0.19	1.45 ± 0.91	1.17 ± 0.32**

a) : 평균 ± 표준편차

** : 스튜던트 T 테스트 결과 cisplatin 군에 비해 통계적으로 유의적인 감소를 보임 (p<0.01).

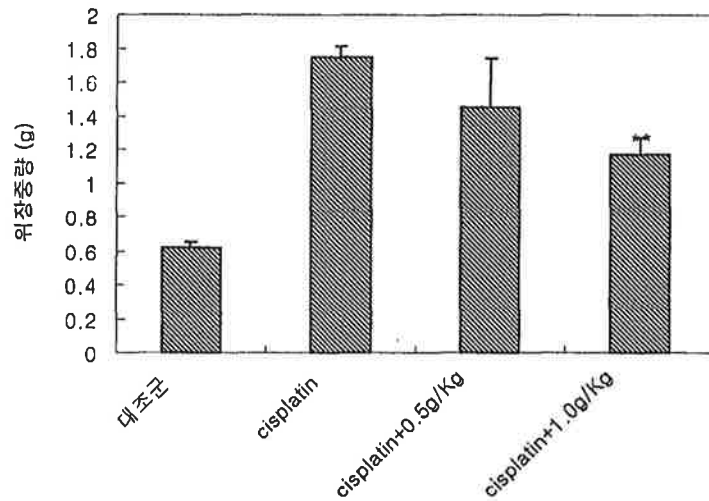


그림 13. 잇새버섯의 cisplatin 위장부작용 억제효과
평균±표준오차

라. 조혈계 부작용 억제효과

마우스에서 혈액을 채취하여 잘 섞은후 혈구분석기(Coulter JT)로 혈액 중 혈소판을 측정하였다. 측정결과 cisplatin처리군에서 급격한 혈소판 감소가 관찰되었고, 1.0 g/Kg의 잎새버섯을 병용처리하였을 경우 작지만 통계적으로 의미있는 혈소판 감소 억제효과가 관찰되었다 (표 8).

표 8. 잎새버섯의 혈소판 회복효과

실험군	대조군	cisplatin	cisplatin + 0.5 g/Kg	cisplatin + 1.0 g/Kg
혈소판 (10 ³ /mm ³)	142 ± 21.6 ^{a)}	10 ± 3.4	20.8 ± 19.5	28.3 ± 6.7**

a) : 평균 ± 표준편차

** : 스튜던트 T 테스트 결과 cisplatin 군에 비해 통계적으로 유의적인 증가를 보임 (p<0.01).

본 연구에서는 잎새버섯의 화학요법제 cisplatin 부작용 억제 효능을 세계 최초로 규명하였으며 이에 따라 특허를 출원하였다(출원번호 제 2000-49043). 현재 잎새버섯관련 특허로는 항암효과에 관한 국제특허가 공개되어 있으며(YUKIGUNI MAITAKE CO., LTD., 출원번호 : 9700728, 공개번호 : WO 9732896 A1), 캄프토테신(camptothecin) 및 그 유도체(일본에서 최근 개발된 항암제)의 부작용 경감 효과에 관한 일본 특허 공개 공보 제 평11-318388 호가 유일하다. 그러나 캄프토테신은 임상 암치료에 있어서 사용이 그다지 많지 않고, 실제로 광범위하게 쓰이는 시스플라틴 등의 항암제의 부작용 억제에 관련하여서는 논문 및 특허로서 보고된 바가 없는 상황이다. 시스플라틴은 정소암, 난소암, 자궁암, 방광암, 두부 또는 경부의 암, 위암, 폐암, 연조직암, 임파선암 등에 널리 사용되고 있는 항암제로 빈혈, 구토, 메스꺼움, 콩팥세뇨관 손상, 난청, 체내 전해질 이상, 쇼크, 말초신경이상 등의 부작용이 임상경험을 통해 보고되고 있는 상황이다.

본 연구결과 잎새버섯의 열수 추출물은 시스플라틴의 부작용인 BUN 증가(신장독성), 비장내 IL-2발현감소(면역독성), 위장중량 증가(소화기독성), 혈소판감소(조혈독성)를 통계적으로 유의하게 억제하였다. 잎새버섯은 화학요법을 받고있는 암환자의 부작용을 줄여 삶의 질을 향상시키기 위한 기능성 식품으로 개발될 수 있다.

8. 비만억제 효능

본 연구에서는 제 1차년도 과제를 수행하면서 잎새버섯의 항암효능에 주 관점을 맞추어 연구를 수행하였고 그 결과 잎새버섯의 화학항암제 Cisplatin 부작용 억제 효능을 세계최초로 규명하여 특허를 출원하였다. 그러나 국내외 환경은 항상 변화하고 있으며 연구개발은 국내외 시장환경의 변화에 따라 유동성을 유지하여야 할 필요가 있다. 최근 국내외 기능성 식품 시장의 주요한 변화중의 하나는 비만 및 다이어트 시장의 급격한 신장세이다. 최근 국내에서는 비만증이 전체 인구의 약 10%로 구미의 20%에 비하면 낮은 수준이나 생활 수준의 향상으로 인하여 영양소 섭취량은 증가하고 운동 부족에 의한 에너지 소비량은 감소됨에 따라 비만증은 증가 추세에 있다(15). 특히 도시의 국교생 가운데 비만율은 15-17%에 이르는 것으로 볼 때, 결코 간과해서는 안될 국민 건강 문제로 대두되고 있다. 비만에 해당되는 인구는 미국에서 3천5백만명 이상이고, 서유럽과 그밖의 지역을 포함하면 훨씬 많은 수에 달한다. 비만은 고혈압, 당뇨병등 성인병 예방의 차원에서라도 적극적으로 다루어져야할 주요 건강관리 대상의 하나이다 (16, 17).

잎새버섯의 비만 및 고지혈증 관련 효능으로는 국외에서의 연구결과가 보고된 바 있다. Kubo 와 Nanba(18)는 잎새버섯 추출물을 래트에 경구투여 할 경우 혈중 콜레스테롤을 낮추고 복부지방을 줄인다고 보고하였다. 이와 관련하여 미국 등지에서는 잎새버섯 제품의 비만치료 효능을 표방하며 이를 제품광고에 활용하고 있다 (www.maitake.com).

본 연구에서도 시장성이 높은 기능성 식품개발을 위하여 항암효능이외에 추가적으로 항비만 효능을 연구하여 제품개발에 응용하였다. 수요층이 넓은 항비만 효능 연구에 있어서 in vivo 동물실험을 통한 기초연구 및 자원자를 대상으로한 임상연구를 통하여 효능을 검증하고 이를 통해 제품의 부가가치를 높여야 성공적인 연구성과의 실용화가 가능하다고 생각된다.

가. 비만억제 동물 효능 연구

1) 잎새버섯 및 한약재의 비만억제 효능

잎새버섯 및 각각의 한약재에 대하여 개별적인 비만억제효능을 측정하여 본 결과는 다음과 같다. 마우스에 고지방 식이를 투여하면서 잎새버섯 0.5

g/Kg을 6주간 투여한 후 부검하여 복부의 지방조직을 분리하여 무게를 재고 심장에서 채혈하여 혈중의 중성지방과 콜레스테롤을 정량한 결과는 표 9와 같다. 잎새버섯 추출물은 혈중 중성지방을 47% 감소시켰으며 복부지방 조직을 19% 감소시켰다.

표 9. 잎새버섯의 비만억제효능

	대조군	잎새버섯 투여군
복부지방조직 (g/mouse)	0.085 ± 0.082	0.069 ± 0.043
혈중 중성지방 (mg/dL)	66.21 ± 8.37	34.81 ± 7.49
혈중 콜레스테롤 (mg/dL)	151.69 ± 13.44	149.16 ± 11.54

Mean ± SD

잎새버섯과 조합할 한약재를 선별하기 위해 Rat를 활용한 동물실험을 수행하여 최종적으로 의이인과 길경의 2가지 한약재를 선별하였다. 한약재 의이인은 복부지방조직을 53% 감소시켰으며 혈중콜레스테롤을 38% 감소시켜 비만억제에 탁월한 효능이 있음을 확인하였다.

표 10. 의이인의 비만억제효능

	대조군	한약재 투여군
지방조직 (g/rat)	20.98 ± 9.64	9.95 ± 6.92
혈중 중성지방 (mg/dL)	50.67 ± 8.78	41.01 ± 13.99
혈중 콜레스테롤 (mg/dL)	282.34 ± 83.21	174.22 ± 62.11

Mean ± SD

길경은 복부지방조직을 34% 감소시켰으며 혈중콜레스테롤을 44% 감소시키고 혈중중성지방을 14% 감소시켜 비만억제에 탁월한 효과가 있음이 확인되었다.

표 11. 길경의 비만억제효능

	대조군	길경 투여군
지방조직 (g/rat)	20.98±9.64	13.89±7.76
혈중 중성지방 (mg/dL)	70.67±18.78	60.67±23.21
혈중 콜레스테롤 (mg/dL)	224.77±72.09	125.48±38.43

Mean ± SD

2) 비만억제를 위한 잎새버섯과 한약재 최종 조성물 구성 및 동물효능 평가

위의 실험의 결과를 바탕으로 최종적으로 잎새버섯과 한약재(숙지황, 천궁, 의이인, 길경)의 조합을 구성하였다. 한약재는 사물탕 한약재 (당귀, 천궁, 숙지황, 백작약)에서 비만에의 효능이 본 연구진에서의 기존연구를 통해 밝혀진 숙지황과 혈액순환을 도와주는 천궁을 남겨두고 당귀와 백작약을 의이인과 길경으로 대체하였다. 최종조성물에 대한 동물실험 결과는 다음과 같다.

40마리의 웅성 SD rat를 대조군, 1X 용량군(인간용량 기준), 3X 용량군, Xenical(Roche) 투여군으로 나누어 12주간 고지방 식이를 급여하면서 하루 1회 경구투여하였다. 실험이 끝난 후 Ketamine HCl(유한양행)과 Xylazine HCl(바이엘코리아)를 각각 100g 당 0.15 ml 씩 근육주사하여 마취시킨 후 LUNAR pixi #51041 (Lunar corporation, Madison, WI, USA) 기기를 이용하여 복부의 지방량과 지방률을 측정하였다. 실험결과 체지방량에 있어서는 전반적인 감소경향을 보였으며 3X 용량군에 있어서는 통계적으로 유의

적인 감소를 보여주었다. 체지방률에 있어도 감소경향이 나타났다 (표 12).

많은 경우에 무리한 다이어트시에 에너지대사의 변동에 의한 골밀도 감소현상이 일어날 수 있으므로 참고적으로 각 실험군 동물의 척추 골밀도를 측정하여 보았다 (표 13). 잇새버섯 한약재 조성물 투여군의 경우 골밀도에서 유의한 변화는 관찰되지 않았으며 오히려 1X 용량군에서는 골밀도가 약간 증가되는 경향을 보였다.

표 12. 잇새버섯과 한약재 조성물의 체지방 감소효과

실험군	체지방량 (g)	체지방률 (%)
대조군	15.6±1.59 ^a	17.3±2.08 ^a
잇새버섯조성물 1X 용량군	13.9±3.36 ^{ab}	16.7±3.07 ^a
잇새버섯조성물 3X 용량군	11.6±1.85 ^b	15.6±2.12 ^a
Xenical 투여군	11.8±1.13 ^b	16.8±2.20 ^a

평균 ± 표준편차

One-way ANOVA로 통계분석

서로 다른 알파벳으로 표시된 실험군은 의미 있는 차이를 나타냄 (P<0.05)

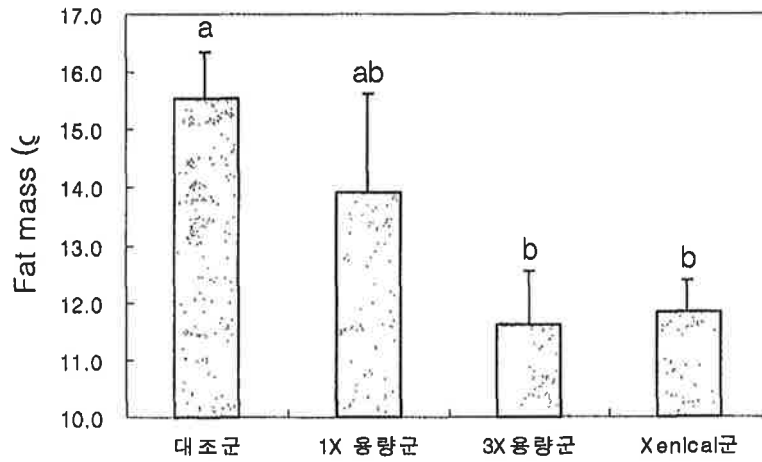


그림 14. 잇새버섯과 한약제 조성물의 체지방량 감소효과
평균 ± 표준오차 (SE)로 나타냄.

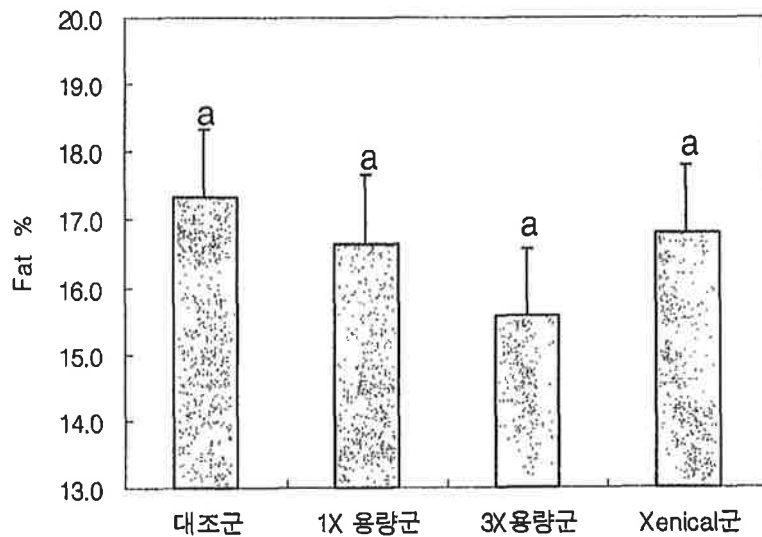


그림 15. 잇새버섯과 한약제 조성물의 체지방률 감소효과
평균 ± 표준오차 (SE)로 나타냄.

표 13. 잇새버섯 한약제 조성물의 골밀도에 미치는 영향

실험군	골밀도 (g/cm ³)
대조군	0.1761 ± 0.0082 ^a
잇새버섯조성물 1X 용량군	0.1858 ± 0.0076 ^a
잇새버섯조성물 3X 용량군	0.1711 ± 0.0064 ^a
Xenical 투여군	0.1742 ± 0.0156 ^a

평균 ± 표준편차

One-way ANOVA로 통계분석

서로 다른 알파벳으로 표시된 실험군은 의미 있는 차이를 나타냄 (P<0.05)

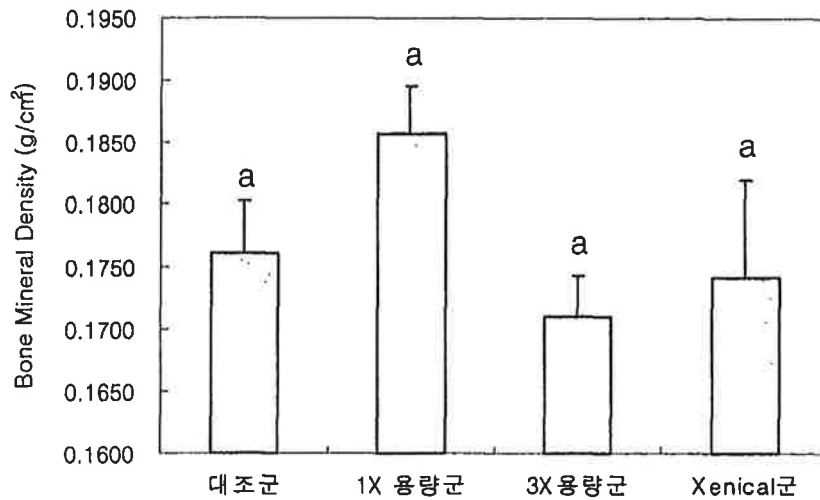


그림 16. 잇새버섯과 한약제 조성물의 골밀도에 미치는 영향

평균 ± 표준오차 (SE)로 나타냄.

나. 비만억제 임상효능 평가

동물실험결과 체지방 감소 효능이 발견되었으므로 사람을 대상으로한 임상효능평가를 수행하였다. 기능성식품의 최종 목표는 사람이 일정기간 복용하여서 건강상의 유익을 얻는 것이니 만큼 임상효능연구는 전체연구에 있어서 가장 핵심적인 부분이라고 할 수 있다.

임상실험에 참가한 피험자의 일반적인 특징은 표 14에 표시하였다.

표 14. 임상실험 참가자의 일반적 특징

특징	분포
Number	20
Age (yrs)	47.85±2.37 [†]
Sex	
Female (%)	17 (85)
Male (%)	3 (15)

† : 평균 ± 표준오차

임상실험 결과를 요약하면 다음과 같다.

비만관련 신체 수치의 변화는 표 15에 나타내었다.

표 15. 잇새버섯 한약재 조성물 섭취 전후 신체 수치의 변화

측정항목	복용전	복용후
체지방량 (Kg)	29.09±7.56	26.49±5.99*
체지방률 (%)	39.82±6.56	36.03±5.16**
근육량 (Kg)	41.00±6.65	44.03±5.70**
엉덩이둘레 (cm)	104.46±5.39	102.54±5.66***
피하지방두께 (mm)	32.09±9.05	24.30±3.14*
WHR	0.942±0.043	0.938±0.042

평균±표준편차

* : P<0.05 by paired t-test

** : P<0.01 by paired t-test

*** : P<0.001 by paired t-test

잇새버섯 한약재 조성물은 체지방을 2.6 kg 유의적으로 감소시키고 체지방률을 3.79% 유의적으로 감소시켰다. 반대로 근육량은 3.03 kg 유의적으로 증가시켰다. 또한 피하지방 두께를 7.79 mm, 엉덩이둘레를 1.92 cm 유의적으로 감소시켜 비만증의 감소에 뚜렷한 효과가 있는 것으로 판명되었다.

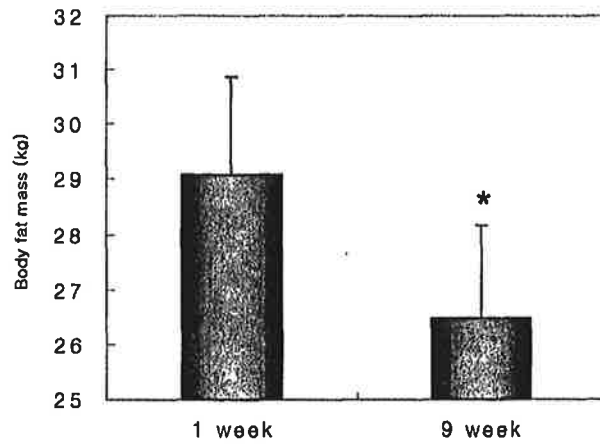


그림 17. 잇새버섯 한약제 조성물의 체지방량에 미치는 영향
 평균±표준오차, * : P<0.05 by paired t-test

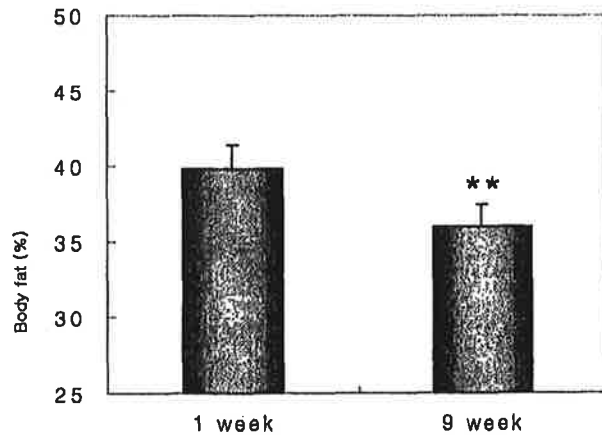


그림 18. 잇새버섯 한약제 조성물의 체지방률에 미치는 영향
 평균±표준오차, **: P<0.01 by paired t-test

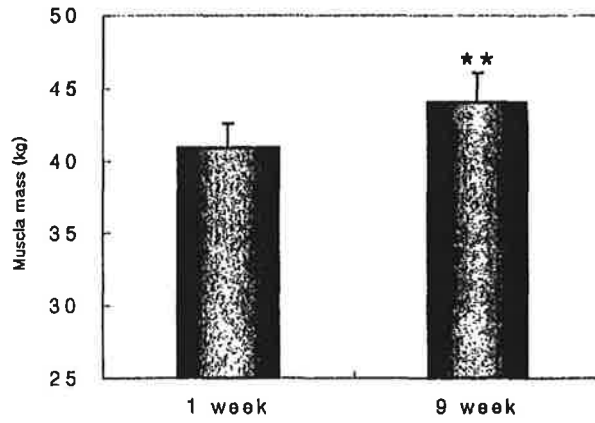


그림 19. 잎새버섯 한약재 조성물의 근육량에 미치는 영향
 평균±표준오차, **: P<0.01 by paired t-test

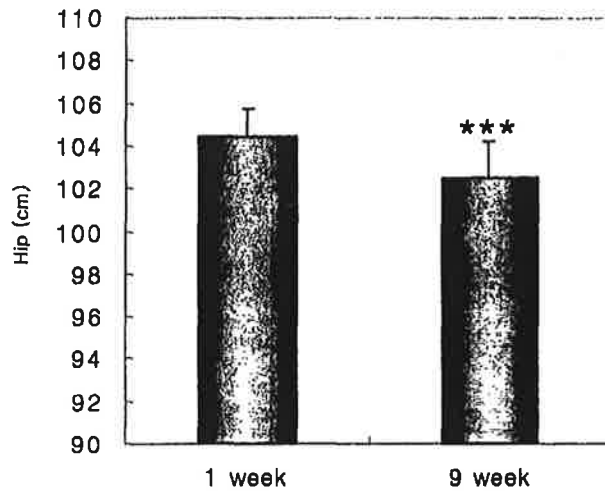


그림 20. 잎새버섯 한약재 조성물의 엉덩이둘레 미치는 영향
 평균±표준오차, ***: P<0.001 by paired t-test

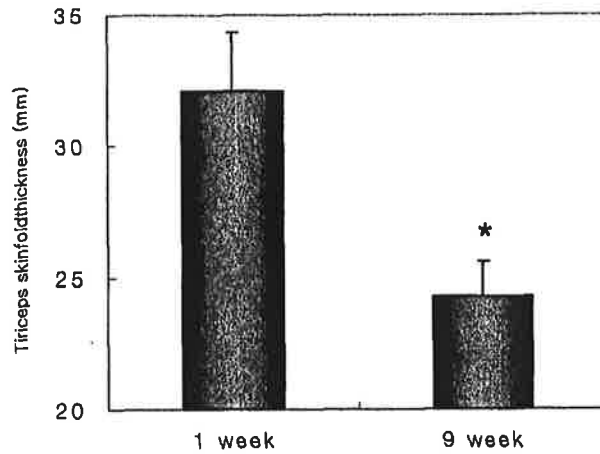


그림 21. 잎새버섯 한약제 조성물의 피하지방두께 미치는 영향
 평균±표준오차, *: P<0.05 by paired t-test

복용기간중에 변비가 크게 개선되는 현상이 관찰되었고 특별한 부작용을 호소한 경우는 1례도 없었다. 복용전후의 기타 건강지표의 측정값은 표 16에 나타나있다. 잎새버섯 한약제 조성물은 혈압, 맥박, 혈당 등 건강지표에 영향을 미치지 아니하였다. 또한 간기능(GPT)에 영향을 미치지 아니하였다. 따라서 본 잎새버섯 한약제 조성물은 일반적인 건강지표에 영향을 미치지 않음으로써 부작용이 없다고 보여지며 한약제가 간기능을 저해한다는 일반적인 속설이 있는데 본 실험결과는 이에 대한 우려를 제거하고 있다. 또한 혈중 지질 분석결과 혈중 콜레스테롤을 유의적으로 감소시킴이 관찰되었다.

표 16. 잇새버섯조성물 섭취전후의 건강지표의 측정값

	복용전	복용후
Systolic blood pressure (mmHg)	129.00±1.77 [†]	129.25±5.17
Diastolic blood pressure (mmHg)	80.53±2.71	80.75±3.34
Pulse (time/min)	70.24±1.72	71.81±1.62
Blood glucose (mg/dl)	101.05±7.24	105.20±10.96
Total cholesterol (mg/dl)*	216.72±7.95	188.42±11.11
Triglyceride(mg/dl)*	112.08±9.92	146.55±19.06
GPT (U/L)	14.91±2.22	15.68±2.39

* : Significant at p < 0.05

† : 평균 ± 표준오차

복용전후의 영양소 섭취의 변화를 나타낸 결과는 표17과 18에 나타내었다. 복용전에 비교하여 복용후에 전반적으로 영양소섭취가 약간 감소하는 경향을 보였으나 통계적으로 유의적인 변화는 없었다. 콜레스테롤 섭취도가 크게 감소되는 경향을 보였으나 개개인간의 변동폭이 심하여 통계적인 유의성은 없었다.

표 17. 잇새버섯 한약제 조성물 복용전후의 주된 영양소 섭취변화

		복용전	복용후
Energy	(Kcal)	1289.91 ± 104.26 [†]	1202.31 ± 101.54
Protein	(g)	50.91 ± 4.65	47.77 ± 11.85
Carbohydrate	(g)	198.16 ± 18.43	202.16 ± 21.90
Fat	(g)	30.95 ± 3.69	27.09 ± 3.99
P:C:F		15.79 : 64.45 : 21.59	14.81 : 62.69 : 18.90
Fiber	(g)	3.62 ± 0.40	3.35 ± 0.58
Cholesterol	(mg)	254.38 ± 34.54	133.11 ± 41.75

† : 평균 ± 표준오차

P:C:F : Percentage energy intakes ratio of Protein, carbohydrate and fat

표 18. 잇새버섯조성물 섭취전후의 미량영양소 섭취변화

		복용전	복용후
Calcium	(mg)	310.82 ± 45.10 [†]	270.99 ± 41.65
Phosphorus	(mg)	1050.26 ± 376.56	600.95 ± 72.87
Mineral	Ferrous (mg)	8.18 ± 0.81	7.02 ± 0.77
	Sodium (mg)	2767.83 ± 364.75	2297.20 ± 262.29
	Potassium (mg)	1596.17 ± 164.09	1480.30 ± 131.07
Vitamin	Vitamin A (mg)	567.05 ± 85.52	289.99 ± 73.42
	Vitamin C (mg)	74.23 ± 13.64	57.17 ± 13.18

† : 평균 ± 표준오차

제4절 참고문헌

1. Ohno N, Adachi Y, Suzuki I, Oikawa S, Sato K, Ohsawa M, Yadomae T Antitumor activity of a beta-1,3-glucan obtained from liquid cultured mycelium of *Grifola frondosa*. *J Pharmacobiodyn* 1986 Oct;9(10):861-4
2. Kawagishi H, Nomura A, Mizuno T, Kimura A, Chiba S Isolation and characterization of a lectin from *Grifola frondosa* fruiting bodies. *Biochim Biophys Acta* 1990 Jun 20;1034(3):247-52
3. Suzuki I, Itani T, Ohno N, Oikawa S, Sato K, Miyazaki T, Yadomae T Effect of a polysaccharide fraction from *Grifola frondosa* on immune response in mice. *J Pharmacobiodyn* 1985 Mar;8(3):217-26
4. Adachi Y, Ohno N, Yadomae T Activation of murine kupffer cells by administration with gel-forming (1-->3)-beta-D-glucan from *Grifola frondosa*. *Biol Pharm Bull* 1998 Mar;21(3):278-83
5. Kabir Y, Yamaguchi M, Kimura S Effect of shiitake (*Lentinus edodes*) and maitake (*Grifola frondosa*) mushrooms on blood pressure and plasma lipids of spontaneously hypertensive rats. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)* 1987 Oct;33(5):341-6
6. Kubo K, Aoki H, Nanba H Anti-diabetic activity present in the fruit body of *Grifola frondosa* (Maitake). I. *Biol Pharm Bull* 1994 Aug;17(8):1106-10
7. Sugiyama,K., Ueda,H., Ichio,Y., and Yokota,M., 1995a, Improvement of cisplatin toxicity and lethality by Juzen-taiho-to in mice. *Biol. Pharm. Bull.* 18(1), 53-58
8. Ueda H, Sugiyama K, Yokota M, Matsuno K, and Ezaki T. Reduction of cisplatin toxicity and lethality by sodium malate in mice. *Biol.Pharm.Bull.* 21(1) 34-43, 1998
9. 김완희, 사물탕에 대한 고찰, 대한한의학회지, 4(4), 35-41, 1996
10. 허준, 동의보감

11. Moseman T, Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application of proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods*, 65, 55, 1983
12. Skehan P, Storeng R, Scudiero DA et al., New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer drug screening. *J. Natl. Cancer Inst.* 82, 1107, 1990
13. Skeel RT, *Handbook of Cancer Chemotherapy Fifth Ed.* 1999, Lippincott Williams & Wilkins, pp89-91
14. 金井 泉, 金井 正光 , *임사검사법제요*, p.776, 고문사, 1984
15. 보건복지부, '95 국민영양 조사결과보고서, 1997
16. 김선우, 비만의 약물요법, *대한비만학회지* 2(1), 30-39, 1993
17. 이홍규. 비만과 관련된 질환. *대한 비만학회지* 1:34, 1992
18. Kubo K, and Nanba, H. Anti-hyperliposis effect of maitake fruit body (*Grifola frondosa*). *I. Biol.Pharm.Bull.* 20(7):781-785, 1997

제 3 장 가공방법 연구분야

제1절 서 설

기능성 식품의 개발에 있어서는 고품질의 원재료 공급 및 생리 효능뿐만 아니라 소비자의 기호에 맞는 가공방법의 연구가 시장에서 제품의 성패를 좌우하는 중요한 요인임에 틀림없다. 본 가공방법 연구에서는 다양한 방법의 가공 이후 훈련된 인력에 의한 기호도 검사를 통하여 제품의 기호도를 높이고자 주력하였다. 국내의 건강식품 시장 동향은 일본 시장을 답습하는 경향이 있으므로 일본에서의 앞새버섯 소재 동향을 살펴보면 앞새버섯은 식용으로도 널리 보급돼 있고 인지도도 높은 편인 앞새버섯이 함유되어있는 베타-D-글루칸 성분의 유용성이 연구결과 밝혀져 건강소재로서도 수요가 늘어나고 있다. 일본 앞새버섯시장에서 압도적으로 높은 점유율을 차지하고 있는 유키구니(霧隠) 마이타케사와 다나베계약의 합작회사인 다나베-유키구니-어소시에이트사에선 지난해부터 앞새버섯가공품 'MD 프랙션' 시리즈를 미국과 중국시장에서도 판매하기 시작했다.

일본에선 아직 건강식품으로서의 앞새버섯의 시장규모가 25억엔 정도에 불과하나 미국에선 최근 앞새버섯이 주목을 받으면서 해마다 시장이 신장되고 있으며 국내에서도 앞새버섯의 재배가 여러곳에서 성공하고 있으며 생식용으로 시장에 출하되기도 하고 있으며 특히 건강식품으로서의 확실한 위치를 점해가고 있는 실정으로 앞새버섯을 이용한 다양한 건강기능성 식품 개발은 현 시점에서 매우 의미 있는 일이라고 생각되어진다.

제2절 재료 및 방법

1. 최적추출용매의 선정

잇새버섯을 추출하기 위한 용매로는 식품에 사용 가능한 용매인 물과 에탄올을 이용하여 추출하였다. 잇새버섯의 추출은 잇새버섯 16.7g에 용매 500 mL을 가하여 잇새버섯과 용매의 비율이 1:30(w/w)으로 되게 한 후 열을 가하여 끓기 시작하는 시간부터 5시간동안 열수추출하였다. 추출하는 동안 매 30분마다 시료를 채취하여 가용성 고형분 함량을 측정하였다.

2. 최적추출시간 선정

잇새버섯을 물로 추출시 적당한 추출시간 선정을 위하여 추출시간 30분부터 5시간까지 잇새버섯 추출물의 가용성 고형분 함량의 변화를 조사하였다. 잇새버섯과 물의 비율을 1:30으로 하여 끓기 시작한 후부터 매 30분마다 약 10 mL 정도의 sample을 취하여 와트만 여과지 2번으로 여과후 가용성 고형분 함량을 측정하였다.

3. 최적 추출용매비 선정

잇새버섯의 용매에 따른 최적 용매비율을 선정하기 위하여 추출한 후 가용성고형분 함량과 여과후 총량을 측정하여 최종수율을 계산하였다. 추출용매로는 물, 99.9% 에탄올, 80% 에탄올, 60% 에탄올, 50% 에탄올 등 5가지를 비교하였고 잇새버섯에 대한 용매비율은 1:10부터 1:50까지로 하였다.

잇새버섯의 추출은 일정량의 잇새버섯에 용매 500 mL를 가하여 열을 가하고 끓기 시작하는 시간부터 3시간동안 열수추출하였다. 추출이 끝난 시료는 바로 식힌 후에 와트만 여과지 2번으로 여과하고 여과후 총량과 가용성 고형분 함량을 측정하였다. 측정된 가용성 고형분 함량과 여과후 총량을 가지고 추출 수율을 계산하였다.

$$\text{추출 수율(\%)} = \frac{\text{고형분함량(° Brix)} \times \text{추출물의 총부피(ml)}}{\text{사용된 시료의 건물량(g)}}$$

4. 한약재의 최적추출조건 확립

잇새버섯을 이용한 음료를 개발하는 과정에서 음료의 맛과 기능성을 높이기 위하여 사물탕 재료를 첨가하여 제조하기로 하였다. 사물탕의 원료인 당귀, 백작약, 천궁, 숙지황 등의 4가지 한약재에 대한 최적추출조건을 선정하고자 하였다. 당귀, 백작약, 천궁, 숙지황 등의 4가지 한약재를 추출 시간 30분부터 5시간까지의 가용성 고형분 함량의 변화를 조사하였다. 한약재와 물의 비율을 1:10 ~ 1:50으로 하였고 끓기 시작한 후부터 매 30분마다 약 10 mL 정도의 sample을 취하여 와트만 여과지 2번으로 여과한 후 가용성 고형분 함량을 측정하였다. 여과가 끝난 후에는 총 부피를 측정하여 추출수율을 계산하였다.

5. 잇새버섯 및 한약재를 이용한 음료 개발

잇새버섯 추출물 및 사물탕에 사용되는 한약재 추출물을 이용하여 음료를 개발하고자 하였으며(A형) 기호도 증진을 위해서는 시판되는 한약재 농축액을 첨가하여 음료(B형)를 개발하고자 하였다. 각 음료의 음료적 기호도 증진을 위해서 고과당, 사과산, 구연산 등을 사용하였으며 허브 향을 첨가하여 향이 개선된 음료를 개발하고자 하였다. 음료에 첨가되는 부재료는 기호도 증진을 위하여 한약재 농축액과 기타 음료제조에 사용되는 부재료를 적극 활용하였다. 개발 음료의 기호도 조사는 훈련된 전문 관능검사 요원을 대상으로 실시하였으며 7점 평점법으로 실시하였다.

6. 잇새버섯 및 한약재를 이용한 과립차 개발

잇새버섯 추출물을 이용하여 과립차를 개발하고자 하였다. 1차년도에서

확립된 잎새버섯의 최적 추출조건에서 추출을 실시하였으며 이를 Rotary evaporator를 이용하여 농축하였다. 부용제로는 정제 포도당을 이용하였으며 기호도 증진을 위하여 오미자 농축액, 당귀 농축액, 천궁 농축액, 쌍화 농축액을 첨가하였으며 허브향을 첨가하여 맛과 향을 개선하고자 하였다. 개발 제품의 관능검사는 전문 요원을 활용하여 실시하였다.

제3절 결과 및 고찰

1. 잎새버섯 및 한약재의 최적 추출 조건 확립

가. 잎새버섯의 최적추출조건 확립

1) 최적추출용매의 선정

물과 99.9% 에탄올, 80% 에탄올, 60% 에탄올, 50% 에탄올을 각각 추출용매로 하여 잎새버섯과 용매를 1:30의 비율로 추출하여 가용성 고형분 함량의 변화를 측정하여 그 결과를 표 19에 나타내었다. 물로 추출한 경우에 추출하기 시작한 후 90분 경과후 부터는 1.6° Brix로 계속 일정하게 유지되었다. 99.9% 에탄올은 추출후 한시간 후부터 0.5° Brix로 더 이상의 가용성 고형분 함량은 증가하지 않았으며, 80% 에탄올은 추출시간 5시간 동안 조금씩 계속 증가하여 5시간 후에는 1.9° Brix로 나타났다. 60% 에탄올로 추출한 경우에는 2시간 30분 이후에는 더 이상 증가하지 않고 2.1° Brix를 유지하였다. 50% 에탄올로 추출하였을 때는 60% 에탄올과 마찬가지로 2시간 30분 이후에는 가용성 고형분의 함량이 더 이상 증가하지 않았으며, 추출이 끝나는 5시간까지 1.8° Brix를 유지하였다. 이상의 결과에서 보면, 99.9% 에탄올의 경우에는 물이나 희석된 에탄올로 추출한 것에 비해 수용성 성분은 거의 용출이 되지 않는다고 할 수 있다. 실험결과를 볼 때 50% 또는 60% 에탄올로 추출한 경우와 물로 추출한 경우에 가용성 고형분 함량이 높았으므로 이 3가지 추출용매 중에서 제품 제조에 대한 경제성을 고려하여 물을 추출용매로 선정하였다.

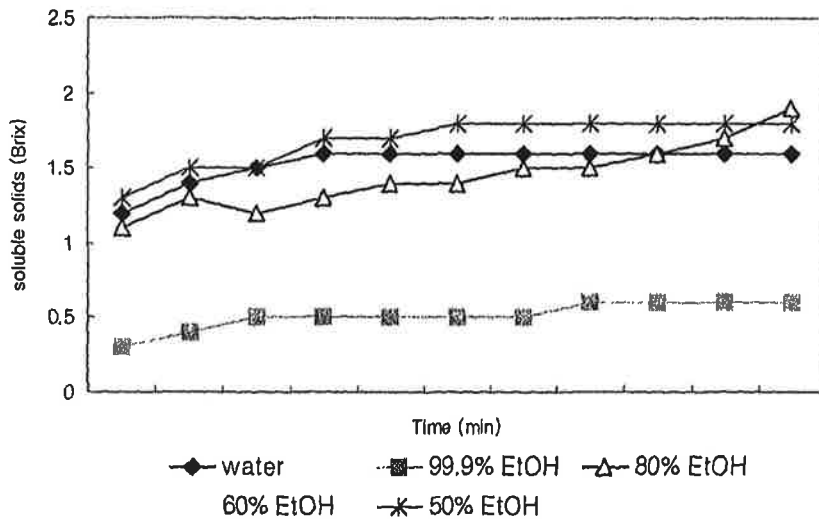


그림 22. 잎새버섯의 용매별 추출시 시간에 따른 가용성 고형분 함량의 변화

표 19. 잇새버섯의 용매별 추출시 시간에 따른 가용성 고형분 함량의 변화

추출용매 추출시간(분)	물 (1:30) (° Brix)	EtOH 99.9% (1:30) (° Brix)	EtOH 80% (1:30) (° Brix)	EtOH 60% (1:30) (° Brix)	EtOH 50% (1:30) (° Brix)
0	1.2	0.3	1.1	1.7	1.3
30	1.4	0.4	1.3	1.7	1.5
60	1.5	0.5	1.2	1.8	1.5
90	1.6	0.5	1.3	1.9	1.7
120	1.6	0.5	1.4	2.0	1.7
150	1.6	0.5	1.4	2.1	1.8
180	1.6	0.5	1.5	2.1	1.8
210	1.6	0.6	1.5	2.1	1.8
240	1.6	0.6	1.6	2.1	1.8
270	1.6	0.6	1.7	2.1	1.8
300	1.6	0.6	1.9	2.1	1.8

2) 최적추출시간의 선정

최적 추출 용매로 선정된 물을 이용하여 잎새버섯의 시간에 따른 추출 특성을 파악하기로 하였다. 잎새버섯과 물을 1:30의 비율로 하여 5시간 동안 추출하면서 가용성 고형분 함량의 변화를 측정된 결과는 그림 23과 같다. 추출후 90분 경과시까지의 가용성고형분의 함량이 지속적으로 증가하다가 그 이후에서는 1.6° Brix로 더 이상 증가하지 않는 경향을 보였다. 따라서 잎새버섯의 물추출시 최소한의 추출시간은 90분이라고 생각된다.

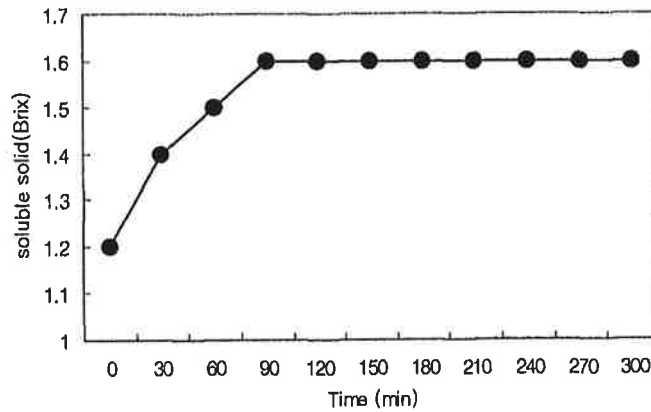


그림 23. 잎새버섯 추출시 시간에 따른 가용성 고형분 함량의 변화
(잎새버섯 : 물 = 1 : 30)

3) 최적추출용매비의 선정

잎새버섯과 추출용매의 최적 추출용매비를 선정하기 위하여 물과 99.9% 에탄올, 80% 에탄올, 60% 에탄올, 50% 에탄올을 각각 추출용매로 하여 회석배수 1:10, 1:20, 1:30, 1:40, 1:50의 비율로 각각 3시간 동안 추출한 후 가용성 고형분 함량을 측정하고 최종수율을 계산한 결과는 표 20와 그림 24에 나타내었다. 그림에서 알 수 있듯이 물과 에탄올을 비교했을 때는 물이 훨씬 추출수율이 높은 것으로 나타났으며, 에탄올 중에서는 60% 에탄올이 추출수율이 가장 좋았으며, 그 다음으로 80% 에탄올, 50% 에탄올 순이었으며 99.9% 에탄올이 추출수율이 가장 낮은 것으로 측정되었다.

물의 경우 회석배수에 따른 추출수율을 살펴보면, 잎새버섯과 물의 회석비율이 1:10(w/w) 일때 추출수율이 33.63%이고 1:20(w/w) 일때는 34.72%이고 1:30(w/w) 일때는 37.65%이고 1:40(w/w) 일때는 41.44%이며, 1:50(w/w)일 때 53.20% 이었다. 즉 회석배수가 증가할수록 추출수율이 증가하는 것으로 나타났다. 이러한 경향은 50% 에탄올의 경우에도 거의 유사하게 나타났다. 그러나 60% 에탄올과 80% 에탄올과 99.9% 에탄올의 경우에는 잎새버섯과 용매의 회석비율이 1:10에서부터 1:30으로 증가할때까지는 추출수율이 증가하다가 그이후의 1:40과 1:50으로 회석비율이 커지게 되면서 추출수율이 오히려 조금씩 감소하는 경향을 보였다. 추출 용매비가 증가할수록 추출되는 가용성 고형분 함량이 증가하여 최종 수율은 증가하는 것으로 나타났으나, 추출 용매비가 너무 높은 경우, 제품을 제조하기 위해서 다시 농축해서 사용해야 하기 때문에, 경제적으로 다시 한번 에너지를 소요해야만 하는 부담을 가질 수 있다. 따라서 제조하고자 하는 제품의 형태 및 첨가하고자 하는 가용성 고형분 함량을 면밀히 계산한 후 최종 용매비를 결정해야 할 것으로 사료된다.

표 20. 잎새버섯의 용매의 종류와 희석배수에 따른 추출 후 가용성 고형분 함량과 최종수율의 변화

용 매	용매비	여과후 총량 (mL)	가용성 고형분 함량(° Brix)	최종수율 (%)
물	1:10	285	5.9	33.63
	1:20	310	2.8	34.72
	1:30	393	1.6	37.65
	1:40	370	1.4	41.44
	1:50	380	1.4	53.20
EtOH 99.9%	1:10	380	0.9	6.84
	1:20	430	0.6	10.32
	1:30	440	0.6	15.81
	1:40	475	0.4	15.20
	1:50	480	0.3	14.40
EtOH 80%	1:10	355	2.8	19.88
	1:20	425	1.6	27.50
	1:30	435	1.2	31.27
	1:40	450	0.8	28.80
	1:50	435	0.7	30.45
EtOH 60%	1:10	380	3.4	25.84
	1:20	405	2.1	34.02
	1:30	420	1.8	45.27
	1:40	455	1.0	36.40
	1:50	455	0.7	31.85
EtOH 50%	1:10	230	3.2	14.72
	1:20	380	1.9	28.22
	1:30	415	1.3	32.31
	1:40	410	1.0	32.80
	1:50	435	0.9	39.15

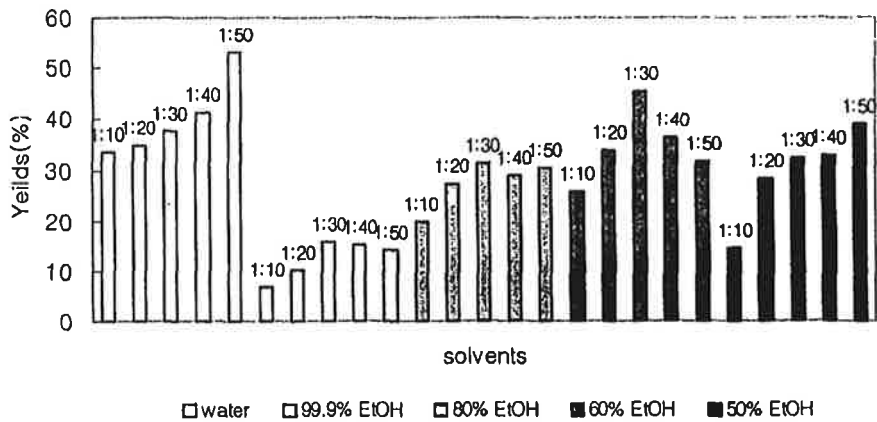


그림 24. 잎새버섯의 용매의 종류와 희석배수에 따른 추출 후 최종수율의 변화

이상의 결과를 종합해보면 다음과 같다. 잎새버섯의 추출 용매들을 비교시에 물과 50% - 60%의 에탄올로 추출시 수율이 더 높은 것으로 나타났으나 경제적인 면을 고려할 때 물이 좋은 용매라고 생각된다. 또한 에탄올로 추출시에는 99.9% < 80% < 60% < 50%의 순서로 수율이 높아 잎새버섯에는 alcohol-soluble 성분보다는 water-soluble 성분이 많은 것으로 생각되었다. 추출시에 잎새버섯과 용매의 비율에 있어서는 일반적으로 용매의 비율이 높을수록 수율이 높아지지만 용매가 지나치게 많아지면 향 후에 농축시켜야 하는 경제적인 부담이 생기므로 수율과 경제적인 면을 모두 고려하여야 한다고 생각된다.

나. 한약재의 최적추출조건 확립

당귀, 백작약, 천궁, 숙지황 등의 한약재에 대하여 물을 추출용매로 하여 각 한약재의 최적 추출 조건을 설정하고자 하였다.

1) 당귀의 최적추출조건

당귀를 물로써 추출할 때 회석배수와 추출시간에 따른 가용성 고형분 함량의 변화를 측정된 후 최종수율을 계산하여 그 결과를 표 21에 나타내었다. 당귀와 물을 1:10(w/w)의 비율로 회석한 경우에는 수율이 50.05% 이었고, 1:20(w/w)의 비율로 회석한 경우에는 60.68%로 다소 낮은 편이었고 1:30 (w/w)의 비율로 회석한 경우에는 67.98%, 1:40(w/w)은 67.64%, 1:50(w/w)은 66.75%로 높은 수율을 보였다. 추출시간은 1:10(w/w)의 경우에는 추출하는 5시간 내내 조금씩 계속해서 가용성 고형분의 함량이 증가하였으며, 1:20(w/w), 1:30(w/w), 1:40(w/w), 1:50(w/w)의 비율로 회석한 경우에는 추출을 시작한지 1시간에서 1시간 30분 이후에는 가용성 고형분의 함량이 거의 증가하지 않고 일정하게 유지되었다. 따라서 최적 용매비는 1:30이 적절하며 추출시간은 1시간 30분 이상으로 잡아야 할 것으로 보인다.

표 21. 당귀의 회석배수별 가용성 고형분 함량의 변화

회석배수 추출시간(분)	물 (1:10) (° Brix)	물 (1:20) (° Brix)	물 (1:30) (° Brix)	물 (1:40) (° Brix)	물 (1:50) (° Brix)
0	3.6	1.5	1.4	1.2	0.7
30	6.0	3.2	2.2	1.7	1.3
60	6.4	3.5	2.4	1.8	1.3
90	6.5	3.5	2.3	1.9	1.4
120	6.6	3.5	2.4	1.8	1.4
150	6.7	3.5	2.4	1.9	1.5
180	6.8	3.6	2.5	1.9	1.5
210	6.9	3.6	2.6	1.9	1.5
240	7.0	3.6	2.4	1.9	1.5
270	7.1	3.6	2.5	1.9	1.5
300	7.1	3.7	2.5	1.9	1.5
여과후 (mL) 총량	715	870	870	890	890
여과후 Brix	7.0	3.7	2.6	1.9	1.5
최종수율(%)	50.05	60.68	67.93	67.64	66.75

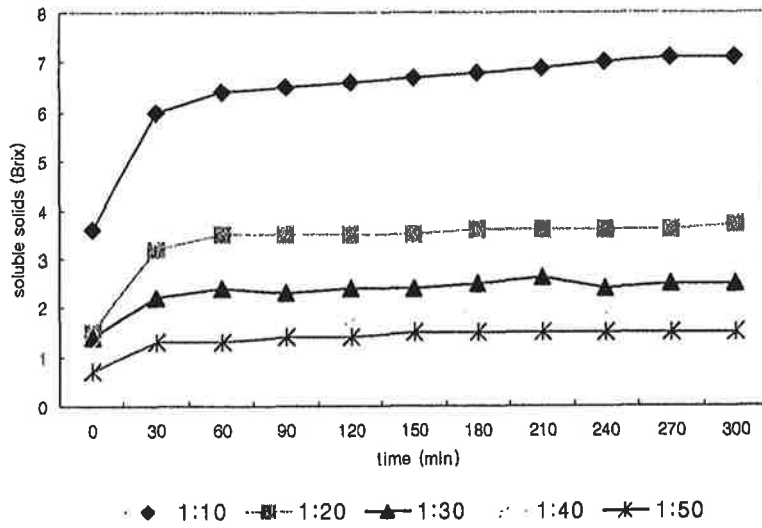


그림 25. 당귀의 회석배수별 가용성 고형분 함량의 변화

2) 백작약의 최적추출조건

백작약을 물로써 추출할 때 회석배수와 추출시간에 따른 가용성 고형분 함량의 변화를 측정하고 최종수율을 계산하여 그 결과를 표 22에 나타내었다. 백작약과 물을 1:10(w/w)의 비율로 회석해서 추출한 경우, 수율은 24.75% 이었고, 1:20(w/w)은 28.90%, 1:30(w/w)은 26.43%, 1:40(w/w)은 29.12%, 1:50(w/w)은 31.85%로 측정되었다. 1:10(w/w)이 가장 수율이 낮았으며, 그 다음으로 1:30(w/w), 1:20(w/w), 1:40(w/w)의 순이었고, 1:50(w/w)의 경우가 가장 높은 수율을 나타내었다. 백작약의 추출시간별 가용성 고형분 함량의 변화는 그림 26에 나타내었다. 당귀의 경우와 마찬가지로 1:10(w/w)의 경우에는 추출시간 내내 가용성 고형분 함량이 계속해서 증가하였으며, 1:20(w/w)은 처음 1시간 동안에는 급격하게 증가하다가 1시간 이후에서부터는 완만한 증가경향을 나타내었다. 그 외에 1:30(w/w), 1:40(w/w), 1:50(w/w)은 1시간 반에서 2시간 반 이후에는 가용성 고형분 함량이 거의 증가하지 않았다. 따라서 최적 추출용매비는 1:50이며 추출시간은 최소 2시간 반 이상 되어야 할 것으로 보인다.

표 22. 백작약의 희석배수별 가용성 고형분 함량

희석배수 추출시간(분)	물 (1:10) (° Brix)	물 (1:20) (° Brix)	물 (1:30) (° Brix)	물 (1:40) (° Brix)	물 (1:50) (° Brix)
0	1.3	0.4	0.3	0.3	0.2
30	1.9	0.9	0.7	0.6	0.4
60	2.5	1.3	0.8	0.7	0.6
90	2.7	1.4	0.9	0.8	0.6
120	2.9	1.5	1.0	0.8	0.7
150	2.9	1.6	1.1	0.8	0.7
180	3.0	1.7	1.1	0.8	0.7
210	3.1	1.7	1.1	0.8	0.7
240	3.2	1.8	1.1	0.8	0.7
270	3.3	1.8	1.1	0.8	0.7
300	3.3	1.8	1.1	0.8	0.7
여과후 총량(ml)	750	850	880	910	910
여과후 Brix	3.3	1.7	1.0	0.8	0.7
최종수율(%)	24.75	28.90	26.43	29.12	31.85

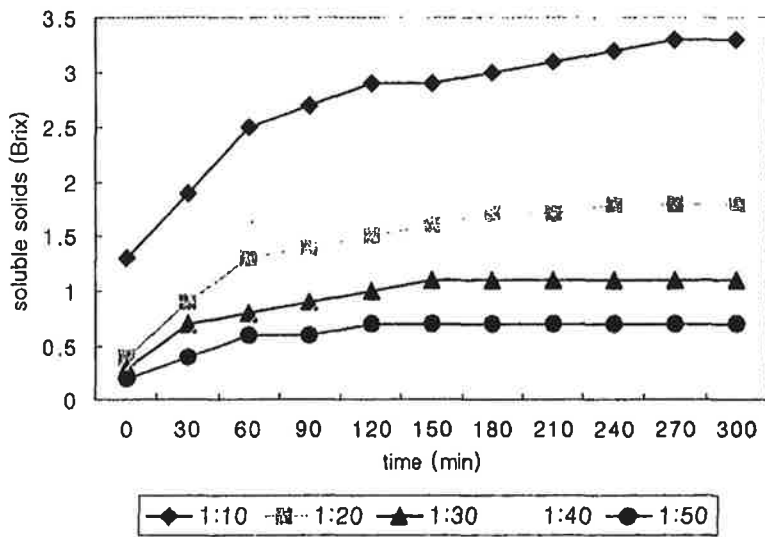


그림 26. 백작약의 희석배수별 가용성 고형분 함량

3) 천궁의 최적추출조건

천궁을 물로써 추출할 때 회석배수와 추출시간에 따른 가용성 고형분 함량의 변화를 측정하고 최종수율을 계산한 결과는 표 23와 같다. 천궁과 물의 비율이 1:10(w/w)인 경우에 추출수율은 34.17%였고, 1:20(w/w)이 43.16%, 1:30(w/w)이 43.39%, 1:40(w/w)인 경우에 45.76%, 1:50(w/w)인 경우에는 45.25%로 나타났다. 1:40(w/w)과 1:50(w/w)일 때의 추출수율이 가장 높았으며, 1:10(w/w)인 경우에 가장 낮은 추출수율을 나타내었다. 천궁의 추출시간에 따른 가용성 고형분 함량의 변화를 측정하여 그 결과를 그림 27에 나타내었다. 1:10(w/w)의 비율로 추출한 경우에는 추출을 시작한지 3시간까지는 계속해서 증가하였고 그 이후에서는 일정하게 유지되었다. 1:20(w/w), 1:30(w/w), 1:40(w/w), 1:50(w/w)은 추출후 1시간에서 1시간 30분 정도까지는 가용성 고형분의 함량이 증가하다가 그 이후부터는 가용성 고형분 함량의 변화가 거의 없는 것으로 측정되었다. 따라서 최적 추출용매비는 1:40이며 최적 추출시간은 1시간 30분 이상 되어야 할 것으로 보인다.

표 23. 천공의 회석배수별 가용성 고형분 함량

회석배수 추출시간(분)	물 (1:10) (° Brix)	물 (1:20) (° Brix)	물 (1:30) (° Brix)	물 (1:40) (° Brix)	물 (1:50) (° Brix)
0	1.2	0.5	0.6	0.3	0.2
30	3.0	1.5	1.0	0.7	0.5
60	3.9	2.0	1.2	0.9	0.7
90	4.2	2.2	1.4	1.0	0.8
120	4.6	2.4	1.5	1.1	0.8
150	4.9	2.5	1.5	1.1	0.9
180	4.9	2.5	1.6	1.2	0.9
210	5.1	2.6	1.6	1.3	0.9
240	5.1	2.6	1.7	1.3	0.9
270	5.1	2.6	1.7	1.3	0.9
300	5.1	2.6	1.7	1.3	1.0
여과후 총량(ml)	670	830	850	880	905
여과후 Brix	5.1	2.6	1.7	1.3	1.0
최종수율(%)	34.17	43.16	43.39	45.76	45.25

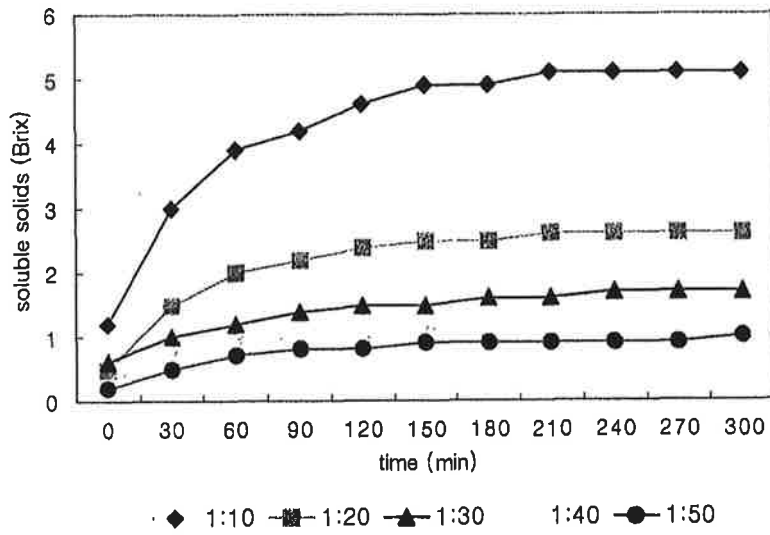


그림 27. 천궁의 회석배수별 가용성 고형분 함량

4) 숙지황의 최적추출조건

숙지황을 물로써 추출할 때 회석배수와 추출시간에 따른 가용성 고형분 함량의 변화를 측정하고 최종수율을 계산한 결과를 표 24에 나타내었다. 숙지황과 물을 1:10(w/w)의 비율로 회석하여 추출한 경우에는 43.12%, 1:20(w/w)은 52.08%, 1:30(w/w)은 58.14%, 1:40(w/w)은 64.08%, 1:50(w/w)은 55.20%로 1:10(w/w)에서 1:40(w/w)까지는 회석배수가 증가할수록 추출수율이 증가하는 경향을 보였으나, 1:50(w/w)으로 회석한 경우에는 오히려 추출수율이 감소하는 것으로 측정되었다. 숙지황의 추출시간에 따른 가용성 고형분 함량의 변화를 측정하여 그 결과를 그림 28에 나타내었다. 1:10(w/w)의 비율로 추출한 경우에는 추출하는 5시간 내내 계속해서 증가하는 경향을 나타내었으며, 1:20(w/w), 1:30(w/w), 1:40(w/w), 1:50(w/w)의 경우에도 가용성 고형분의 함량이 계속적으로 증가하였으나, 약 2시간 30분에서 3시간 이후에는 추출되는 가용성 고형분 함량의 변화량이 매우 작은 것으로 나타났다. 따라서 최적 추출용매비는 1:40이고 추출시간은 3시간 이상되어야 할 것으로 보인다.

표 24. 숙지황의 회석배수별 가용성 고형분 함량

회석배수 추출시간(분)	물 (1:10) (° Brix)	물 (1:20) (° Brix)	물 (1:30) (° Brix)	물 (1:40) (° Brix)	물 (1:50) (° Brix)
0	1.2	0.5	0.5	0.4	0.5
30	2.9	1.3	1.2	0.9	0.7
60	3.5	1.8	1.5	1.2	0.9
90	4.1	2.3	1.8	1.3	1.0
120	4.7	2.4	1.9	1.4	1.0
150	5.0	2.7	2.0	1.5	1.1
180	5.2	2.8	2.1	1.6	1.2
210	5.3	2.9	2.1	1.6	1.2
240	5.5	3.0	2.2	1.7	1.2
270	5.6	3.1	2.2	1.7	1.2
300	5.6	3.1	2.2	1.8	1.2
여과후 총량(ml)	770	840	880	890	920
여과후 Brix	5.6	3.1	2.2	1.8	1.2
최종수율(%)	43.12	52.08	58.14	64.08	55.20

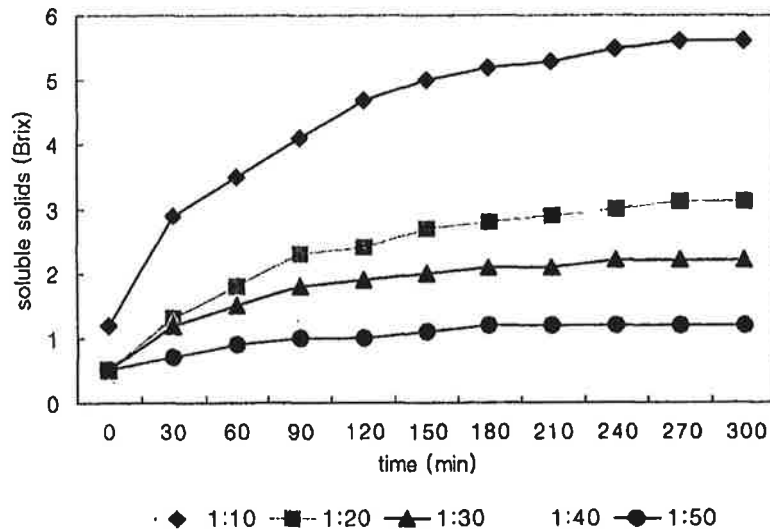


그림 28. 숙지황의 회석배수별 가용성 고형분 함량

잎새버섯 및 한약재의 추출조건실험 결과를 정리하면 다음과 같다.

- 잎새버섯과 한약재의 추출 실험 결과는 최적 추출용매로는 물과 50~60% 에탄올 중 경제성을 고려하여 물이 선정되었다.
- 최적 추출용매비는 잎새버섯 및 한약재에 따라 다르게 관찰되었으나 1:30~1:50 의 범위로 나타났다. 그러나 지나치게 추출용매비가 높은 경우 추출액이 지나치게 묽어져서 농축해야하는 번거로운 과정과 비용이 소비되므로 1:40 이상의 추출용매비는 적합하지 않게 보인다.
- 최적 추출시간은 물 추출의 경우 잎새버섯 및 한약재의 종류에 따라서 1.5~3 시간 이상인 것으로 관찰되었다.

2. 잎새버섯 및 한약재를 이용한 제품 개발

가. 잎새버섯과 한약재를 이용한 음료의 제조

잎새버섯과 한약재를 이용한 음료는 일반 음료에 사용되는 기본 recipe를 기준으로 하여 최초의 시제품을 만들었다. 제조된 음료에 대한 전문적인 관능검사를 실시하여 개선점을 발굴하고자 하였으며 이를 보완, 보강하면서 최종적인 제품을 제조하고자 하였다.

1) 잎새버섯음료 A형의 제조

잎새버섯 음료 A는 일반적인 기호성보다는 한방음료의 개념으로 한약재의 맛을 강하게 나도록 제조하였다.

가) 1차 음료 제조

일반 음료에 사용되는 기본 recipe를 기준으로 하여 잎새버섯 추출액과 한약재 추출액의 첨가량을 달리한 3가지의 샘플을 만들었다. 잎새버섯 추출액과 한약재 추출액은 각각 20배 량의 증류수를 가하여 끓기 시작한 후 4시간 동안 가열하여 추출하였으며, 추출이 끝난 후에는 와트만 여과지 No. 2로 여과하였다. 각 재료들을 표25에 서술한 배합비에 따라 섞은 다음, 최종적으로 증류수를 사용하여 기준 용량을 제조하였다.

훈련된 panel을 이용한 관능검사 결과, 잎새버섯 추출액의 농도가 너무 낮아 특징적인 음료의 맛이 제대로 나지 않았기 때문에 다음의 실험에서는 추출용매비를 1:10(w/w)으로 낮추고 추출액의 첨가량도 증가시키기로 하였다. 그리고 잎새버섯과 한약재들을 따로 따로 추출하여서 섞는 것은 실제 공장에서의 생산성 향상 측면에서 비효율적이므로 배합비를 결정 한 후에는 한꺼번에 추출하기로 하였다.

표 25. 잇새버섯 음료의 1차 제조 배합비

(100 mL 기준시)

음료 첨가물		A type	B type	C type
잇새버섯추출물	2.9 °Bx	1.89 mL	2 mL	10 mL
한약재 추출물	2.9 °Bx	.	1.39 mL	18 mL
영지 extract	53 °Bx, 다송산업	3.5 mL	2 mL	1g
고과당	71 °Bx	16g	18g	18g
구연산		0.36g	0.36g	0.36g
Forest extract	삼정향료, 77.052	0.3g	0.3g	0.3g
Mushroom flavour	삼정향료, 181081	0.08g	0.08g	0.08g
사과농축액	72 °Bx, SA-72, 경북능금영농조합	2g	2g	2g
안식향산나트륨		0.05g	0.05g	0.05g

나) 2차 음료 제조

제조방법과 재료는 1차와 동일하고 잎새버섯과 한약재 추출물의 첨가량을 상향조정하여 잎새버섯의 특징적인 느낌을 부여하기로 하였다. 한편, 향과 맛을 개선하기 위해서 forest extract와 허브추출물을 각각 첨가하여 향과 맛을 보강하기로 하였다.

관능검사를 실시한 결과 허브추출액을 넣은 것보다는 forest extract를 첨가한 것이 선호도가 높은 것으로 판단되었다. 그러나 음료 자체의 뒷맛이 좋지 않다는 지적이 많았으며 이는 잎새버섯 자체의 맛이 너무 강하기 때문인 것으로 결론지었으며, 따라서, 잎새버섯 추출액의 첨가량을 다시 조절하기로 하였다.

표 26. 잎새버섯 음료의 2차 제조 배합비

조성물		D	E
잎새버섯 추출물	2.9 °Bx	20 mL	20 mL
한약재 추출물	2.9 °Bx	20 mL	20 mL
영지 extract	53 °Bx, 다송산업	1g	1g
고과당	71 °Bx	16g	16g
구연산		0.36g	0.36g
Forest extract	삼정향료, 77.052	0.3g	
허브추출액			0.3g
Mushroom flavour	삼정향료, 181081	0.08g	0.08g
사과농축액	72 °Bx, SA-72, 경북농금영농조합	2g	2g
안식향산나트륨		0.05g	0.05g

다) 3차 음료 제조

잎새버섯과 한약재의 추출방법을 달리한 2가지의 샘플을 만들었다. 먼저 sample 1은 잎새버섯과 한약재들을 각각 따로 추출하고 여과하였으며 각각의 여과된 추출액을 동량씩 혼합하여 음료의 base로 사용하였다. Sample 2는 잎새버섯 25g, 4가지 한약재 각 6.25g(총 25g)을 동시에 넣고 증류수 1 L를 가하여 끓기 시작한 후 4시간 동안 가열하여 추출하였으며, 추출이 끝난 후에는 와트만 여과지 No. 2로 여과하여 음료의 base로 사용하였으며 배합비대로 첨가물들을 가하고 서로 다른 2가지 추출액으로 기준 용량만큼 채웠다.

표 27. 잎새버섯 음료의 3차 제조 배합비

(100 mL 기준시)

음료용 첨가물		첨가량
잎새버섯과 한약재 추출액①	2.9 °Bx	100 mL로 fill up
잎새버섯과 한약재 추출액②	3.2 °Bx	100 mL로 fill up
벌꿀	동서벌꿀	2g
고과당	71 °Bx	14g
오미자 ex.	63 °Bx 한솔향료	0.2g
사과산		0.05g
구연산		0.05g

2가지 시료에 대한 향, 맛, 종합적 기호도에 대하여 숙련된 panel들에 의한 7점 척도법 관능검사를 실시한 결과는 다음과 같다.

표 28. 3차 제조된 잎새버섯 음료의 관능검사 결과

조사항목	sample①	sample②
향	3.6	5.1
맛	4.1	4.6
종합적 기호도	3.7	5.0

매우 나쁘다: 1점, 보통: 4점, 매우 좋다: 7점(7점 척도법)

관능검사를 실시한 결과, 향과 맛, 종합적 기호도에서 한약재와 잎새버섯을 동시에 넣고 추출한 sample 2에 더 좋은 점수를 주었다. 음료의 전반적인 향을 개선하기 위해서는 여러 한약재 농축액이나 향료를 사용해야 할 것이며 단맛이 강한 것을 보완하기 위해 구연산의 첨가량을 약간 높이거나 고과당의 함량을 14%에서 13%정도로 낮추는 방법을 강구하기로 하였으며, 앞으로의 음료 제조에 관한 실험은 모두 잎새버섯과 한약재를 동시에 추출하여 추출액을 기본 음료 base로 사용하기로 하였다.

라) 4차 음료 제조

3차 제조시에 관능검사 결과가 좋게 평가된 sample 2를 대상으로 하여 오미자농축액과 forest extract를 넣은 2종류의 음료를 만들어 맛과 향을 평가하고자 하였다. 잎새버섯과 한약재의 추출액은 이전 연구에서 좋은 점수를 받은 동시 추출 방법으로 하여 추출하였다. 3차 관능검사 결과에 따라 고과당의 첨가량은 14%에서 13%로 줄였으며, 나머지 첨가물은 이전과 동일하게 하였다. 잎새버섯의 추출은 잎새버섯 25g, 4종 한약재 각 6.25g(총 25g)을 동시에 넣고 증류수 1 L를 가하고 끓기 시작한 후 4시간 동안 가열하여 추출하였으며, 추출이 끝난 후에는 와트만 여과지 No.2로 여과하여 음료 base로 사용하였다. 표 29은 잎새버섯 음료의 4차 recipe를 나타내었다.

표 29. 잎새버섯 음료의 4차 제조 배합비

(100 mL 기준시)

음료용 첨가물			첨가량
잎새버섯과 사물탕 추출액②	3.2 °Bx		100 mL로 fill up
벌꿀	동서벌꿀		2g
고과당	71 °Bx		13g
사과산			0.05g
구연산			0.05g
Sample O	오미자 ex.	63 °Bx 한솔향료	0.2g
Sample F	Forest ex.	삼정향료, 77.052	0.2g

4차 제조된 잎새버섯 음료에 대한 관능검사를 실시하였으며 그 결과를 표 30에 나타내었다.

표 30. 4차 제조된 잎새버섯 음료의 관능검사 결과

조사항목	sample O	sample F
향	3.9	3.4
맛	3.7	5.1
종합적 기호도	4.1	4.9

매우 나쁘다: 1점, 보통: 4점, 매우 좋다: 7점(7점 척도법)

관능검사를 실시한 결과, 향은 오미자 농축액을 넣은 것을 더 선호했지만 맛과 종합적 기호도에서는 forest extract를 넣은 것을 더 선호하는 것으로 나타났다. 또한 개선할 점으로는 2가지 sample 모두 맛이 너무 진하다는 의견이 나와 추출액을 희석하여 5차 음료 제조에 공시하기로 하였다.

마) 5차 음료 제조

5가지의 서로 다른 향을 첨가하여 향이 개선된 음료를 제조하고자 하였다. 4차 제조된 잎새버섯 음료에 대한 관능검사 결과, 음료의 농도가 너무 진하였다는 의견에 따라 잎새버섯과 한약재의 추출시 이전에 비해 2배로 희석하여 추출하였다. 또한, 오미자 엑기스를 넣은 것보다 forest extract를 넣은 것을 더욱 선호하였기 때문에 오미자 엑기스와 forest ex.를 넣되 forest ex.의 양을 더 많이 넣기로 하였다. 잎새버섯의 추출은 잎새버섯 25g, 4종의 한약재 각 6.25g(총 25g)을 동시에 넣고 증류수 2 L를 가하고 끓기 시작한 후 4시간 동안 가열하여 추출하였으며, 추출이 끝난 후에는 와트만 여과지 No. 2로 여과하여 음료 제조용 base로 사용하였다.

표 31의 배합비대로 첨가물들을 가한 후 각각의 추출액으로 기준 용량만큼 채웠다.

표 31. 잎새버섯 음료의 5차 제조 배합비

(100 mL 기준시)

음료 첨가물		첨가량
잎새버섯과 사물탕 추출액	1.6 °Bx	100 mL로 fill up
벌꿀	동서벌꿀	2g
고과당	71 °Bx	14g
사과산		0.05g
구연산		0.05g
오미자 ex.	63 °Bx 한솔향료	0.1g
Forest ex.	삼정향료, 77.052	0.2g
Sample 1	Herb flavor Hagelin, 591024	0.08g
Sample 2	드링크향 삼정향료, 1901001	0.08g
Sample 3	Herb flavor Hagelin, 591077	0.08g
Sample 4	Herb flavor Hagelin, 591078	0.08g
Sample 5	Herb flavor Hagelin, 591079	0.08g

4차 음료의 제조 및 관능검사 결과에 따라, 잎새버섯 및 한약재의 농도를 희석하였으며, 당도를 줄인 음료에 향을 강화하기 위하여 5종의 향을 첨가한 후 이에 대한 관능검사를 실시하여 그 결과를 표 32에 나타내었다.

표 32. 5차 제조된 잎새버섯 음료의 관능검사 결과

조사항목	1 ¹⁾	2 ²⁾	3 ³⁾	4 ⁴⁾	5 ⁵⁾
향	4	3.4	4.4	4.8	4
맛	4.4	4	5	4.2	3.2
종합적 기호도	4	3.8	4.8	4.2	3.4

매우 나쁘다: 1점, 보통: 4점, 매우 좋다: 7점(7점 척도법)

¹⁾Herb flavor (Hagelin, 591024)

²⁾드링크향 (삼정향료, 1901001)

³⁾Herb flavor (Hagelin, 591077)

⁴⁾Herb flavor (Hagelin, 591078)

⁵⁾Herb flavor (Hagelin, 591079)

관능검사 결과 음료의 농도가 적당하다는 의견은 panel 간에 거의 일치했으나 향과 맛에 대해서는 검사자들의 의견이 서로 상이한 것으로 측정되었다. 향에 따라 맛의 변화가 크고 개개인마다 향에 대한 기호성이 서로 차이가 있기 때문인 것으로 사료되었다. 전반적으로 첨가된 향이 미량이어서 향료별의 차이가 많이 나지 않은 것으로 판단되었으므로, 다음의 실험에서는 sample의 수를 줄이는 동시에 첨가하는 향의 양을 증가시키기로 하였다.

바) 6차 음료 제조

5차 음료 제조 및 관능검사 결과 관능검사에 공시된 향의 종류가 너무 많아 효율적인 관능검사가 이루어지지 않았으므로 앞에서 비교한 5가지의 향료를 임의로 2가지씩 나누어 음료를 제조하여 맛과 향을 비교, 평가하였다. 5차 음료의 제조 및 관능검사시 향이 약하다는 의견에 따라 향의 첨가량을 2배씩 증가시켰으나 자체의 향이 강한 drink향은 그대로 사용하였다. 제조된 음료의 관능결과 결과를 표 33에 나타내었다.

표 33. 6차 제조된 잎새버섯 음료의 관능검사 결과

조사항목	2 ²⁾	3 ³⁾	1 ¹⁾	4 ⁴⁾	2 ²⁾	5 ⁵⁾
향	4.8	5.3	4.3	4.8	4.9	4.1
맛	5.5	4	5	4.4	5.3	3.8
종합적 기호도	5.5	4	5.1	4.5	5.1	3.8

매우 나쁘다: 1점, 보통: 4점, 매우 좋다: 7점(7점 척도법)

¹⁾Herb flavor (Hagelin, 591024)

²⁾Herb flavor (Hagelin, 591077)

³⁾Herb flavor (Hagelin, 591078)

⁴⁾Herb flavor (Hagelin, 591079)

⁵⁾드링크향 (삼정향료, 1901001)

향료 2(591077)와 3(591078)을 비교하였을때 2번 향료가 더 좋았고, 1(591024)과 4(591079)를 비교하였을 때는 1번 향료가 더 좋았으며, 2(591077)와 5(drink향)를 비교했을 때는 2번 향료가 더 좋았다고 평가하였다. 이 결과는 앞에서 5가지를 한꺼번에 비교했을 때의 순위인 591077 > 591078 > 591024 > drink향 > 591079와 대체적으로 일치하는 경향을 보였다. 결론적으로 검사자들이 가장 선호하는 향은 591077이었다고 말할 수 있다.

사) 잎새버섯 A형 음료의 최종배합비(13.3 °Brix)

잎새버섯 음료의 제조 및 이에 동반되는 관능검사를 계속적으로 실시하였으며 도출된 문제점 및 보완점에 대하여 음료 recipe를 수정해온 결과 최종적으로 표 34과 같은 최종 배합비를 결정하였다.

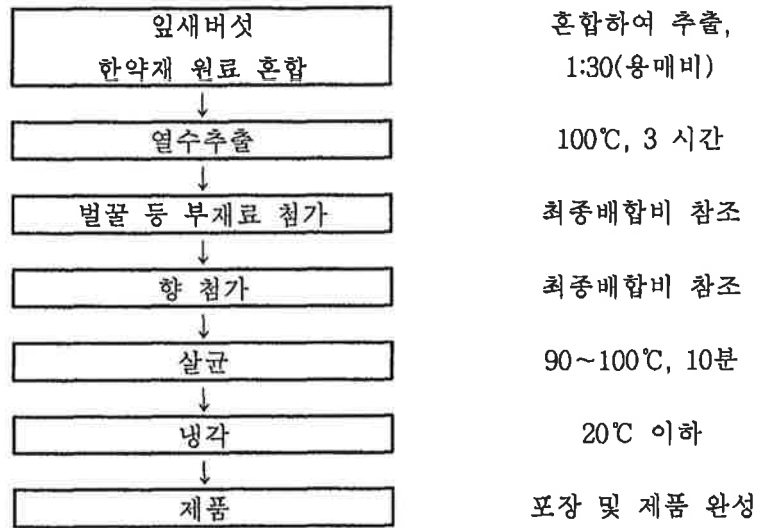
표 34. 잎새버섯 A형의 최종 배합비

(100 mL 기준시)

음료용 첨가물		첨가량
잎새버섯과 한약재 추출액	1.6 °Bx	100 mL로 fill up
벌꿀	동서벌꿀	2g
고과당	71 °Bx	13g
사과산		0.05g
구연산		0.05g
오미자 ex.	63 °Bx 한솔향료	0.1g
Forest ex.	삼정향료, 77.052	0.2g
Herb flavor	Hagelin, 591077	0.16g

아) 잇새버섯 음료 A형의 제조 공정도

최종 조성이 결정된 잇새버섯 음료 A형의 제조 공정도는 다음과 같다.



2) 잎새버섯 음료 B형의 제조

한방음료 개념으로 한약맛이 강한 A형 음료와 대조적으로 B형 음료는 한약맛을 최소화하고 일반적인 맛과 향에 있어서의 기호도를 최대화 하려는 목적으로 제조되었다.

가) 1차 음료 제조

잎새버섯 추출액에 당귀, 천궁, 백작약 등 한약재 농축액 및 대추, 생강 농축액을 첨가하여 기호성이 높은 새로운 타입의 음료를 제조하고자 하였다. 먼저 잎새버섯 추출액은 물과 잎새버섯의 비율을 1:30(50g:1500 mL)로 하여 3시간동안 가열추출한 후 와트만 여과지 No. 2로 여과하였다. 여과후 총부피는 1180 mL, 1.6 °Brix 이었다. 표 35은 잎새버섯 추출액에 당귀 농축액, 천궁 농축액 및 대추 농축액, 생강 농축액을 첨가하여 1차로 제조한 음료의 recipe이다.

표 35. 잎새버섯 음료 B형의 1차 제조 배합비

	재 료	첨가량
	잎새버섯 추출액	1.6 °Bx 100 mL로 fill up
	벌꿀	동서벌꿀 2g
	고과당	71 °Bx 13g
	사과산	0.05g
①	구연산	0.05g
	Herb flavor	Hagelin, 591077 0.16g
	오미자 extract	다송향료 0.1g
	당귀 extract	다송향료 0.1g
	천궁 extract	다송향료 0.1g
②	대추 extract	다송향료 0.1g
③	생강 extract	다송향료 0.1g
④	쌍화 extract	다송향료 0.1g

종전의 잇새버섯 음료 A형 제조에 사용된 배합비에 기준해서 벌꿀과 고과당의 첨가량을 결정하고 당귀와 천궁 농축액을 첨가한 것을 기본으로 해서 대추, 생강, 쌍화 농축액을 첨가했을 때의 맛을 비교하고자 하였다. 대부분의 관능검사 요원이 첨가물로써, 대추와 쌍화 농축액을 넣은 것을 선호하였으며, 생강 농축액을 넣은 것은 특유의 향이 너무 강하기 때문에 좋아하지 않았다. 최종적으로 잇새버섯의 함량이 종전보다 많은 관계로 잇새버섯의 좋지 않은 향이 너무 강하기 때문에 추출액의 첨가량을 줄여서 음료를 제조하기로 하였다.

나) 2차 음료 제조

잇새버섯 자체의 향이 강하므로 다른 한약재 농축액의 첨가량을 증가시켜 잇새버섯의 이미, 이취를 마스킹 하고자 하였다. 또한 첨가되는 향의 양을 증가시켜 맛과 향에 미치는 영향을 조사하기로 하였다.

표 36. 잇새버섯 음료 B형의 2차 제조 배합비

음료용 첨가물		첨가량			
잇새버섯 추출액	1.6 °Bx	50 mL			
나머지는 증류수로 100 mL fill up					
벌꿀	동서벌꿀	2g			
고과당	71 °Bx	13g			
사과산		0.05g			
구연산		0.05g			
오미자 extract	다송향료	0.1g			
당귀 extract	다송향료	0.2g			
천궁 extract	다송향료	0.2g			
Herb flavor	Hagelin, 591077	0.16g	0.16g	0.2g	0.2g
대추 extract	다송향료	0.2g	×	0.2g	×
쌍화 extract	다송향료	×	0.2g	×	0.2g
		①	②	③	④

한약재 농축액의 첨가량을 2배 증가하였을 경우, 쓴맛이 너무 강한 것으로 판단되었다. 한약재 농축액의 향이 너무 강하여 별도로 첨가한 향은 함량을 증가하여도 잘 인지하지 못하는 것으로 판단되었으며, 전반적으로 쌍화 농축액을 첨가한 것을 더욱 선호하였다.

따라서, 3차 제조시에는 한약재 농축액을 첨가량은 이전의 0.1g으로 줄이고(특히 당귀와 천궁 농축액), 대추와 쌍화 농축액을 첨가하기로 하였다.

다) 3차 음료 제조

음료제조시 사용하는 향료를 Hagelin(社)과 Sakae aromatics(社)에서 생산되는 향을 첨가하여 가장 적합한 향을 선별하기로 하였다. 2차 음료 제조시 도출된 결과에 따라 한약재 농축액의 첨가량을 줄여서 쓴맛을 줄이고 단맛을 조금 감소시켜 음료를 제조하기로 하였다(표 37).

표 37. 잎새버섯 음료 B형의 3차 제조 배합비

음료용 첨가물		첨가량			
잎새버섯 추출액	2.2 °Bx	50 mL			
나머지는 증류수로 100 mL fill up					
별꽃	동서별꽃	2g			
고과당	71 °Bx	11g			
사과산		0.05g			
구연산		0.05g			
오미자 extract	다송향료	0.1g			
당귀 extract	다송향료	0.1g			
천궁 extract	다송향료	0.1g			
Herb flavor	Hagelin, 591077	0.16g	0.16g	×	×
Sakae flavor		×	×	0.16g	0.16g
대추 extract	다송향료	0.2g	×	0.2g	×
쌍화 extract	다송향료	×	0.2g	×	0.2g
		①	②	③	④
음료의 당도(°Brix)		11.0	11.5	11.4	11.3

Sakae aromatics(社)에서 생산되는 향은 잎새버섯 음료와 어울리지 않아서 대부분 좋지 않다고 하였고 때문에 Hagelin(社)의 향료를 계속 쓰기로 하

였다. 그리고 대추와 쌍화 농축액 첨가에 대한 기호도를 조사하였을 때 앞의 결과와 마찬가지로 쌍화 농축액을 넣은 것을 선호하였다.

라) 잇새버섯 B형 음료의 최종 배합비

잇새버섯 추출물과 다양한 한약재 농축액을 이용하여 제조한 잇새버섯 음료 B형의 최종 recipe를 표 38에 나타내었다.

표 38. 잇새버섯 음료 B형의 최종 배합비

음료용 첨가물		첨가량
잇새버섯 추출액	2.2 °Bx	50 mL
나머지는 증류수로 100 mL fill up		
별꽃	동서별꽃	2g
고과당	71 °Bx	11g
사과산		0.05g
구연산		0.05g
오미자 extract	다송향료	0.1g
당귀 extract	다송향료	0.1g
천궁 extract	다송향료	0.1g
Herb flavor	Hagelin, 591077	0.16g
쌍화 extract	다송향료	0.2g

마) 잇새버섯 음료 B형의 제조 공정도

최종조성이 결정된 잇새버섯 음료 B형의 제조 공정도를 정리하면 다음과 같다.

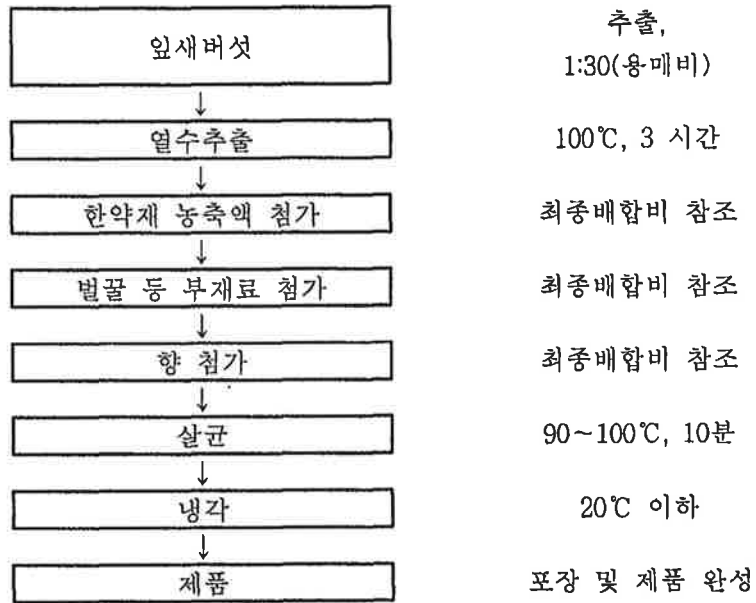




그림 29. 앞새버섯 음료 시제품

TYPE A : 한방음료개념으로 한약맛이 나게 제조
TYPE B : 한약맛을 줄이고 일반적 기호도 위주로 제조



그림 29. 잇새버섯 음료 시제품

TYPE A : 한방음료개념으로 한약맛이 나게 제조
TYPE B : 한약맛을 줄이고 일반적 기호도 위주로 제조

나. 잎새버섯과 한약재를 이용한 과립차의 제조

1) 과립차 개발을 위한 추출조건 설정

잎새버섯을 이용한 과립차를 제조를 위하여 우선, 잎새버섯의 최적 추출 조건을 설정해야 한다. 잎새버섯 추출액의 제조는 음료제조시에 검색되었던 용매인 물과 적정 용매비인 1:30 조건에서 추출을 실시하였다. 3시간 가열 추출 후 와트만 No. 2 여과지로 감압여과한 후 rotary evaporator를 이용하여 감압 농축을 실시하였다. 추출시 증류수 1500 mL에 잎새버섯을 50g을 가하여 3시간 추출후 여과하였을 때의 총부피는 1170 mL이었으며 가용성 고형분 함량은 2.0 °Brix이었다. 이를 사용하여 감압농축하였을 경우 부피는 150 mL 이었으며 가용성 고형분 함량은 23.8 °Brix이었다.

2) 잎새버섯과 한약재의 배합비율 조사

감압 여과후 23.8 °Brix로 농축된 추출액에 캐리어로 정제포도당을 사용하여 과립차를 제조하고자 하였다. 또한 잎새버섯 특유의 이미, 이취를 제거하기 위하여 음료 제조시 사용되었던 당귀 농축액, 천궁 농축액, 쌍화 농축액, 오미자 농축액 및 향료를 첨가하여 과립차를 제조하여 기호도를 조사한 결과 잎새버섯의 이미, 이취가 여전히 강한 것으로 측정되었다. 따라서 최종적으로는 잎새버섯 농축액의 함량을 10%(w/w)에서 7%(w/w)로 조정하여 최종 과립차 배합비로 하였다. 과립차의 제조시 1회의 사용량은 100 mL당 10g을 첨가하여 응용하는 것을 기준으로 하였다.

표 39. 잎새버섯 과립차의 배합비

첨가물	1차	2차(최종)
정제포도당	85.7%	88.7%
잎새버섯 농축액(23.8 °Brix)	10%	7%
당귀 농축액	1%	1%
천궁 농축액	1%	1%
쌍화 농축액	1%	1%
오미자 농축액	1%	1%
향료	0.3%	0.3%

3) 과립화 최적 조건 설정

과립차는 공정상의 문제점이 있기 때문에 첨가되는 액상이 10% 정도가 되도록 해야 한다. 첨가하는 한약재는 앞서에 만든 음료에 첨가한 것을 기본으로 하여 첨가하도록 하였다. 정제포도당에 잎새버섯 농축액과 각종 한약재 농축액을 첨가한 후 믹서로 잘 섞어 준 다음, 수분이 날라가지 않도록 보관하면서 과립차를 제조하였다. 과립차는 실험실적인 조건으로 제조하였는데, 잘 혼합된 재료를 sieve No. 35를 사용하여 성형하였으며, 40~50℃ 열풍건조기에서 완전히 건조시켰다. 건조시킨 과립차는 공기가 들어가지 않도록 잘 밀봉하여 보관하면서 관능적 특성 파악에 사용하였다.

4) 관능적 특성 조사

1차 제조된 과립차 및 잎새버섯 추출물의 함량을 낮춘 2차 제조된 과립차에 대한 관능검사를 실시하여 그 결과를 표 40에 나타내었다. 1차 제조된 과립차의 경우 대체적으로 보통이라는 응답이 많았으며 이를 개선한 2차 제조된 과립차의 경우 향과 맛이 좋다는 응답이 많았으며 종합적 기호도도 증가하는 것으로 측정되어 맛과 향이 개선되는 것으로 나타났다. 전

반적으로 잎새버섯 농축액의 함량을 낮추었을 때 기호도는 증가하는 것으로 나타났다.

표 40. 잎새버섯 과립차의 관능검사 결과

조사항목	1차	2차(최종)
향	4.7	5.2
맛	4.9	6.3
종합적 기호도	4.4	6.1

매우 나쁘다: 1점, 보통: 4점, 매우 좋다: 7점(7점 척도법)

5) 잎새버섯 과립차의 최종 배합비와 공정도

가) 잎새버섯 과립차 최종 배합비

(100g 기준시)

첨가물	첨가량
정제포도당	88.7%
잎새버섯 농축액	23.8 °Brix 7%
오미자 extract	65 °Brix 다송산업 1%
당귀 extract	65 °Brix 다송산업 1%
천궁 extract	65 °Brix 다송산업 1%
쌍화 extract	72 °Brix 다송산업 1%
Herb flavor 591077	Hagelin 0.3%

나) 잇새버섯 과립차 제조 공정도

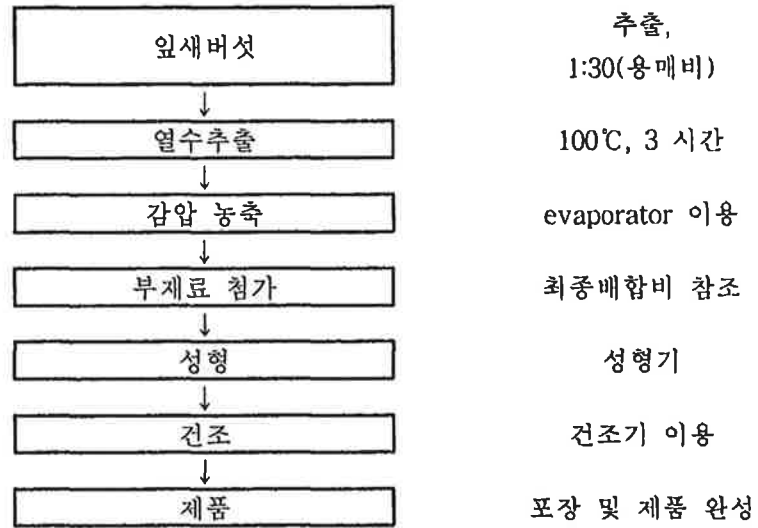




그림 30. 잎새버섯 과립 시제품

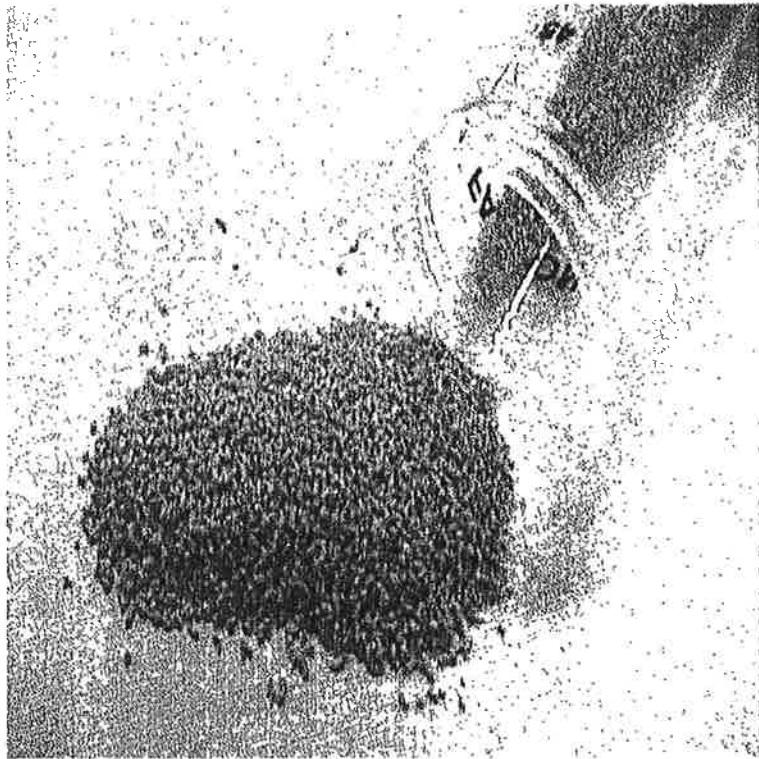


그림 30. 앞세버섯 과립 시제품

다. 잎새버섯 및 한약재를 이용한 캡슐제품 개발

캡슐제는 식품의 원료를 액상, 현탁상, paste상, 분말상 또는 과립상 등의 형태로 캡슐에 충전하던가 또는 캡슐기제로 피포를 형성하여 만든 것으로 경질캡슐과 연질캡슐이 있다. 본 과제에서는 분말상의 잎새버섯을 포장하고자 하였으므로 경질 캡슐을 사용하고자 하였다.

1) 적정 carrier의 선발

잎새버섯 및 한약재를 이용한 캡슐제품 개발시 잎새버섯 자체의 비중이 낮은 특성이 있으므로 이를 경질캡슐용기에 포장하기가 매우 어려운 것으로 판단되었다. 따라서 먼저 잎새버섯 분말의 과립화를 제조하기 위한 조건을 탐색하였으며 최종적으로 과립화 조건을 설정하였다. 과립화 방법은 우선 잎새버섯과 한약재 시료를 건조하여 hammer mill 등을 이용하여 미분쇄하였으며 이를 진동체를 이용하여 60 mesh 이하의 분말만을 취하였다. 캐리어로는 덱스트린을 사용하였으며 그 방법은 잎새버섯 및 한약재 분말 100g에 대하여 덱스트린을 30g 혼합하여 균일하게 섞은 후 100% 에탄올 55g에 물을 10g 혼합한 희석 에탄올 용액을 넣어주면서 혼합기를 이용하여 단시간내에 균질하게 혼합하고 sieve를 이용하여 과립을 내려 알루미늄호일에 받아 골고루 퍼준 후 이를 열풍건조하여 과립을 제조하였다. 이후 과립상태가 불량하면 덱스트린 함량을 증가시키거나 다른 carrier를 사용하였다.

2) 캡슐포장 방법의 검토

경질캡슐(hard gelatin capsule)은 보통 캡슐에 식품의 원료 또는 식품의 원료에 적당한 부형제 등의 첨가제를 고르게 섞은 것 또는 적당한 방법으로 입상으로 한 것 또는 입상으로 한 것에 적당한 제피제로 제피한 것을 그대로 또는 가볍게 성형하여 충전하여 만든다. 반면에 연질캡슐(soft gelatin capsule)은 보통 식품의 원료 또는 식품의 원료에 적당한 부형제 등을 넣은 것을 gelatin에 glycerin 또는 sorbitol 등을 넣어 소성을 높인 캡슐기제로 피포하여 일정한 형상으로 성형하여 만든다. 따라서 본 실험에서는 경질캡슐이 잎새버섯의 포장방법으로 적당한 것으로 판단되었다.

3) 캡슐 제품의 물리화학적 특성 검토

경질캡슐의 특징으로는 흡입제의 소량 충전에 유리하며 가로, 세로 어느 방향으로든 인쇄할 수 있고 인쇄면적이 크며, 분말, 과립, pellet 정제 또는 그 조합물을 충전할 수 있다. 공캡슐의 제조는 차가운 stainless 제형 (mold)을 따뜻한 젤라틴 액에 침적시켜 꺼내면, 형의 표면에 젤라틴이 얇은 막으로 되어 부착한다. 이것을 일정 조건하에서 건조하여 절단하고 길이를 가지런히 한 후, 캡슐을 형으로부터 빼내어 캡과 몸체를 결합한다. 캡슐의 두께는 젤라틴액의 점도 및 형의 침적속도에 의해 조절된다. 또 막의 품질은 건조조건 즉, 건조속도에 따라 크게 좌우된다.

경질캡슐의 크기와 충전량은 다음의 표에 나타내었다.

표 41. 경질 capsule의 크기와 충전량

호수	000	00	0	1	2	3	4	5
중량(mg)	163.0	122.0	103.0	9.0	5.0	0.0	0.0	0.0
body 용적(ml)	1.37	0.95	0.68	0.47	0.38	0.27	0.20	0.13
충전량(mg)	822	577	408	300	222	180	126	78

현재, 캡슐제품은 고가 의약품의 경우 연질캡슐이 선호되고 있으며 경질캡슐의 경우 값이 싼 이미지 때문에 현재 이용이 제한되고 있는 실정이다. 따라서 본 과제에서는 잇새버섯의 가장 효율적인 포장 방법으로서 검토한 결과 잇새버섯의 캡슐 제품보다는 정제(tablet)가 비교적 우위에 있는 것으로 판단되었다. 정제제품은 현재 일본, 미국 및 국내에서 건강식품의 포장 방법으로 널리 사용되고 있으며 고가의 제품의 포장 방법으로 각광 받고 있으나 건강보조식품이나 특수용도용 식품에만 사용할 수 있으므로 잇새버섯을 정제제품이나 캡슐제품으로 가공하고자 할 때는 건강보조식품군에 포함될 수 있도록 칼슘이나 키토산 등을 첨가하여 적합한 식품군에 포함되도록 가공하여야 한다.

4) 캡슐제품 제조 공정도

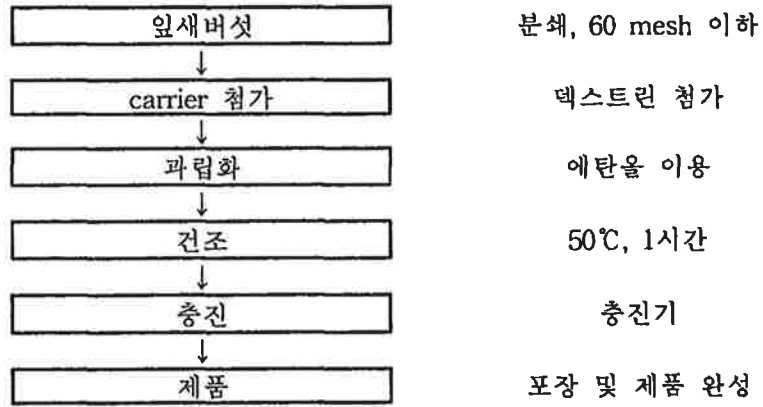




그림 31. 잇새버섯 캡슐 시제품

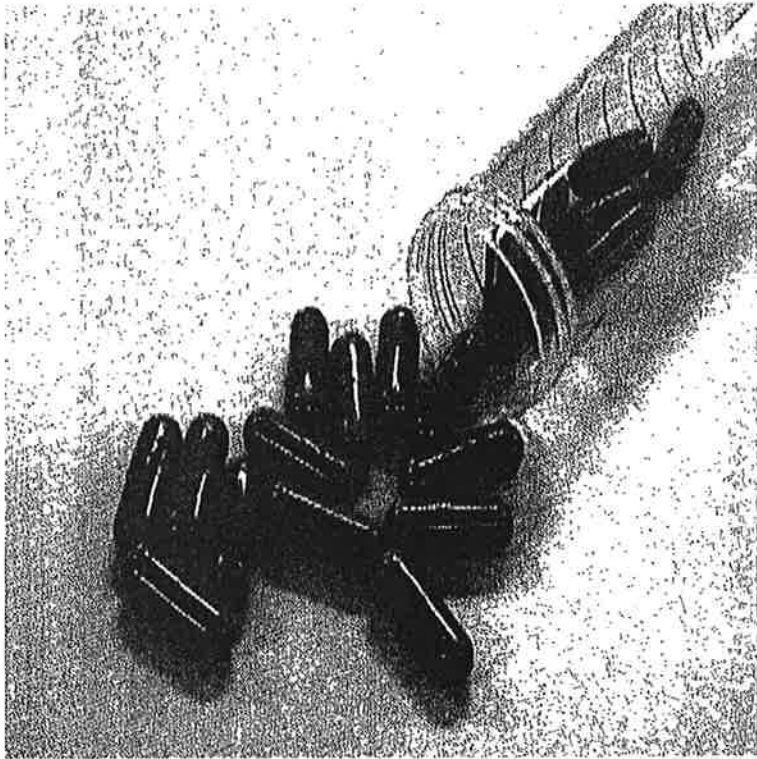


그림 31. 앞새버섯 캡슐 시제품

라. 앞새버섯 및 한약재를 이용한 정제(Tablet)제품 개발

고형제중 정제는 가장 생산량이 많은 제형중의 하나이다. 정제가 많이 사용되는 이유는 이 제형이 1개의 계량단위로서 취급하기 쉽고 복용하기 용이하며 그 제법이 비교적 간단하기 때문이다. 그리고 필요에 따라 coating하여 보통의 속용성 이외에 장용성, 지속성 등 기능을 부여할 수 있고 고미, 냄새, 자극에 대한 masking 및 제품의 안정화 등이 타제형에 비해 용이하기 때문이라 생각된다.

1) 정제제품의 배합비

정제제품 제조에는 직접분말압축법과 과립압축법이 사용되고 있으며 현재 기술의 발달로 직접분말압축법이 널리 이용되고 있어 본 과제에서도 이 방법을 이용하여 정제제품을 개발하고자 하였다. 일반적으로 정제는 몇 가지 종류의 물질로 구성되어 있다. 이들의 첨가제는 무해하고 효과에 영향을 미치지 않고 또 규정된 여러 가지 시험에 지장을 주어서는 안된다. 첨가물질은 그 기능에 따라서 부형제, 결합제, 붕해제, 활택제 등으로 분류된다. 앞새버섯 정제제품은 먼저 앞새버섯을 미분쇄하여 텍스트린과 에탄올을 이용하여 과립화하여 직접분말압축법에 의한 타정에 적합한 물성을 지니게 제조한 후 여기에 카르니틴, 타우린 등의 성분을 혼합하여 제조하였으며 정제제품 제조에 적합하게 특수영양식품 품목군에 위치할 수 있도록 해조칼슘(칼슘함량 32% 이상)을 17% 첨가하여 타정을 실시하였다. 타정 크기는 요즘 유행하고 있는 300mg을 기준으로 하였다. 이럴 경우 칼슘의 하루 섭취 권장량인 700 mg의 15% 이상만 되면 칼슘함유제품으로 분류할 수 있기 때문에 타정된 앞새버섯 정제를 하루에 7개 이상만 섭취하도록 하면 된다.

표 42. 잎새버섯을 이용한 정제제품의 구성비

구성성분	비율
잎새버섯	35%
카르니틴	10%
타우린	10%
페닐알라닌	5%
헤조칼슘	17%
맥주효모	10%
기타 결착제	나머지

2) 정제제품의 제조 공정도

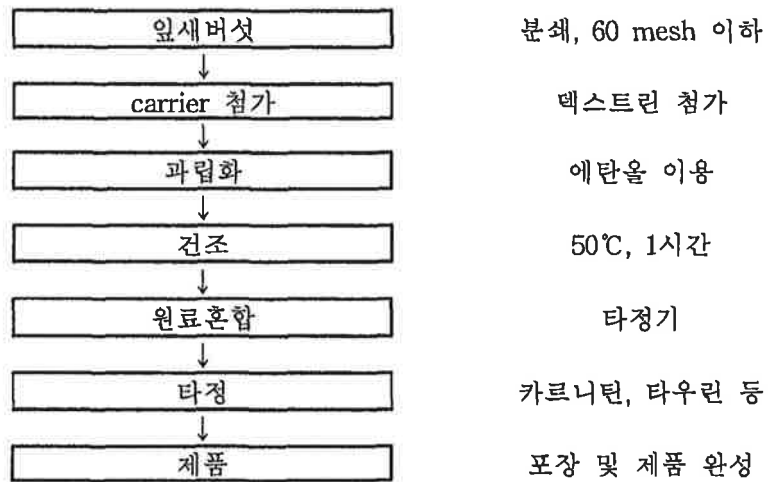




그림 32. 잇새버섯 정제 시제품

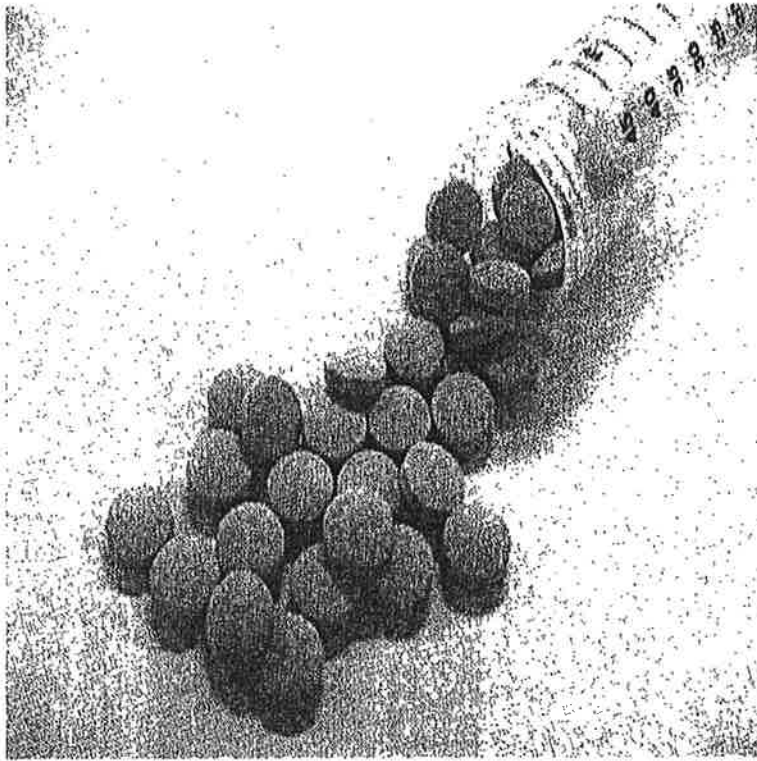


그림 32. 잇세버섯 정제 시제품

마. 앞새버섯과 한약재를 이용한 동결건조 제품

음료제품과 과립차 제품이 기호도를 최우선적으로 하여 제조된 반면에 동결건조 제품 등은 기호도보다는 기능성(생리활성)을 위주로 하여 제조되었다. 특별히 동결건조 제품은 기능성식품으로 건강증진 효과를 충분히 나타내기 위하여 한약재의 조성 및 1회 복용량 산정에 있어서 본 연구기관에서 축적된 한약재의 생리활성관련 지식과 한방 임상전문가 인력의 한방전문지식이 활용되었다. 동결건조 제품은 실제로 자원자들에 지급되어 임상 효능 평가에 활용되었다.

앞새버섯 동결건조 제품 제조 공정도

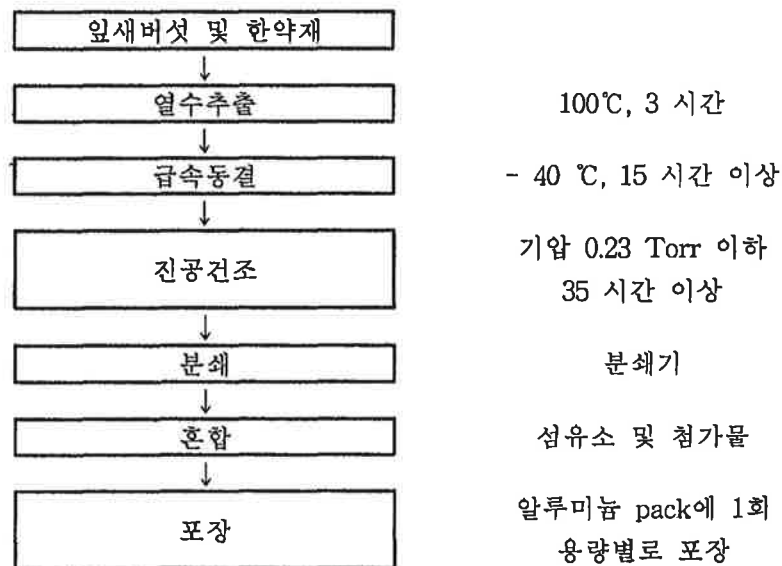




그림 33. 앞새버섯 동결건조 시제품

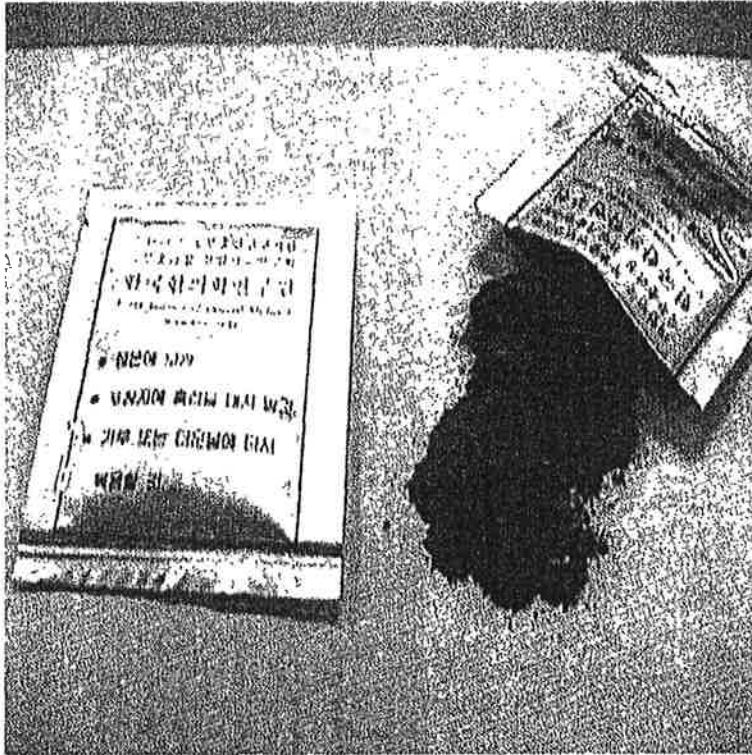


그림 33. 잎새버섯 동결건조 시제품

제4절 참고문헌

1. 古川久彦. 1992. 버섯학 공립출판 주식회사
2. 일본농촌 문화사. 1991. 버섯의 기초과학과 최신기술
3. 차동열. 1989. 최신버섯재배기술
4. 한국관광음료학회편. 1999. 음료학개론
5. 지성규. 2000. 최신식품첨가물
6. Kaul, T.N. : Introduction to mushroom science. Enfield, NH : Science Publishers, Inc., 1997
7. Jong, S.C. Birmingham J.M. Medicinal benefits of the mushroom *Ganoderma*. *Adv. Appl. Microbiol.* 37: 101-134, 1992
8. Ohno, N., Adachi, Y., Suzuki, I., Sato, K., Oikawa, S. and Yandomae, T., Characterization of the antitumor glucan obtained from liquid-cultured *Grifola frondosa*, *Chem. Pharm. Bull.*, 34:1709-1715, 1986
9. Adachi, Y., Okazaki, M., Ohno, N. and Yadomae, T., Enhancement of cytokine production by macrophage stimulated with(1→3)- β -D-glucan, grifolan, isolated from *Grifola frondosa*. *Biol. Pharm. Bull.*, 17: 1554-1560, 1994
10. Nono, I., Ohno, N, Masuda, A., Oikawa, S. and Yadomae, T. Oxidative degradation of an antitumor (1→3)- β -D-glucan, grifolan, *J. pharmcobiodyn*, 14: 9-19, 1995
11. Mizune, T., Saito, H., Nishitoba, T. and Kawagishi, H. Antitumor-active substrates from mushrooms. *Food Rev. Int.* 11: 23-61, 1995
12. Chang, S.T. and Miles, P.G. *Edible mushrooms and their cultivation*. Boca, Raton, FL: CRC press. Inc., 1989

제 4 장 재배 및 유통 방법 연구분야

제1절 서 설

잎새버섯(*Grifola frondosa*)은 분류학적으로 민주름버섯목(*Aphylophorales*), 구멍장이버섯과(*Polyporaceae*), 잎새버섯속(*Grifola*)에 해당하는것으로 잎새버섯(*G. frondosa*), 다박잎새버섯(*G. albicance*), 왕잎새버섯(*G. gigantea*) 등이 알려져 있으며 식용 및 약용버섯으로 이용되고 있는데 그중에서도 맛과 형태가 뛰어난 것이 잎새버섯이다. 잎새버섯은 사물기생균(死物寄生菌)으로 물참나무, 밤나무, 너도밤나무 등의 활엽수(闊葉樹)의 고사목(枯死木), 절주(切株)에서 늦가을에 자연발생하는 버섯이나 근래에 일본에서는 인공재배 되고 있는 버섯중 가장 고가의 버섯이다.

국제적으로는 일본의 경우 톱밥재배 및 일부 원목재배를 통하여 연간 14,000 톤을 생산, 건강식품으로 Kg당 20만원의 고가에 거래되고 있으며 기존 느타리 및 팽이버섯 재배 농가의 경쟁력 저하로 인하여 애린기(새송이) 및 잎새버섯 재배로의 전환이 이루어지고 있어 생산량이 매년 증가하고 있다. 또한 가공식품, 의약품, 화장품 등의 개발이 다각도에서 진행되고 있다. 현재 일본은 자국생산은 물론 인건비가 싼 중국이나 인도네시아의 자바섬 등지에서 현지 생산하여 자국시장에 들여오고 있으며 다양한 종류의 가공제품들이 상품화 되어있다. 시중에 유통되고 있는 가공제품으로는 분말차, Tea-Bag 형태의 차, 버섯자숙제품 등이 있으며 건조 및 생버섯이 유통되고 있다.

미국의 경우에는, 톱밥재배로 연간 2,000 톤이 생산되고 있으며 Maitake Products, Inc. 등의 기업을 통하여 1992년부터 건조 잎새버섯 가루를 이용한 제품, 잎새버섯 추출물을 이용한 캡슐형 제품, 잎새버섯 추출물을 이용한 액상 제품, 잎새버섯 추출물, 녹차 추출물, 호박씨 가루 등을 배합한 제품, 잎새버섯과 녹차 등을 배합한 차 등의 제품이 생산되어 건강관리 전문가, 대체의학 의사, 비타민 샵, 건강식품 샵 등에서 좋은 반응을 얻고 있다.

국내에서는 현재 재배기술이 임업연구원을 통하여 일부 보급되어 있으나 소비시장이 형성되어 있지 않아 일반 농가에서는 잎새 버섯의 재배에

뛰어들지 못하고 있으며 가공제품의 개발은 아직 이루어지지 않고 있다. 극소수의 재배농가에서 생산된 버섯은 백화점 및 농협 하나로 마트 등에서 Kg당 23,000 -25,000원에 판매되고 있으나 지명도 및 홍보면에서 미약한 상태이다.

제2절 연구수행 내용

본 연구에서는 기능성 식품 생산을 위한 양질의 원재료 확보 및 재배 농민 소득증대를 위하여 잎새버섯의 재배기술 및 저장,유통기술이 연구되었다.

1. 잎새버섯의 재배기술 개발

균주별 생리·생태 시험, 배양 및 재배조건별 수확량 조사, 주재료 함량별 생산성 향상 시험, 최적 영양원 첨가 조건 구명, 균주별 품질 및 수확량 조사에 의한 우수 균주 선발 시험이 수행되었다.

2. 잎새버섯의 저장,유통방법의 개발 연구

건조조건별 버섯 품질조사, 저장환경 조건별 품질조사, 유통방법에 있어서 최적조건 설정 등이 수행되었다.

제3절 연구수행 결과

1. 잎새버섯의 재배기술 개발

잎새버섯의 균주별 비교를 위하여 농촌진흥청에서 개발한 잎새 1호와 1차년도 참여기업인 파주임업영농조합법인에서 수집 보관 중인 YK 2100호의 최적 생육조건을 비교하였다. 각 균주에 적합한 생육조건에서 각 균주들을 배양하여 수확량 및 품질을 비교하여 본 결과 YK2100이 배지당 125g 인데 반하여 잎새1호는 73g으로 배지당 수확량에 있어서 YK2100이 우수하였으며 맛, 향, 모양새 등 품질에 있어서도 YK2100의 품질이 보다 우수하였다.

표 43. 균주 선정 시험

균주	배지당 수확량 (g/병)	품질(모양새, 향, 맛)
YK 2100	125	양호
잎새 1호	73	보통

위의 연구를 통하여 YK2100이 보다 우수한 균주로 나타났으므로 향후의 연구는 YK2100을 사용하여 수행되었다. 먼저 최적 배양조건설정을 위한 연구가 수행되었다. 최적 광도설정에 있어서는 200~400 Lux의 광도에서 균사밀도가 높게 관찰되었다. 100 Lux 이하의 광도에서는 배양일수도 오래 걸리고 균사밀도도 낮게 관찰되었다.

표 44. 최적 광도 설정

배양 광도 (Lux)	배양 습도(%)	배양 온도(℃)	배양 일수	균사밀도
0	70	22	60	+
100	70	22	43	++
200	70	22	35	+++
300	70	22	35	+++
400	70	22	35	+++

최적 온도 설정에 있어서는 16~18℃에 있어서 수확량 및 품질이 우수하였다. 20℃ 이상의 온도에서는 생육속도가 빨라져 생육에 소요되는 시간은 감소하였으나 품질(모양새, 향, 맛)이 떨어져 바람직하지 못하게 관찰되었다.

표 45. 최적 온도 설정

생육 온도(℃)	생육 습도(%)	광도 (Lux)	생육 CO ₂ 농도(ppm)	자실체 생육일수	수확량 (g/병)	품질
14	95 → 85	400~500	1000ppm	20	120	보통
16	95 → 85	400~500	1000ppm	18	125	양호
18	95 → 85	400~500	1000ppm	16	125	양호
20	95 → 85	400~500	1000ppm	13	118	보통
22	95 → 85	400~500	1000ppm	10	112	불량

참나무톱밥, 자작나무톱밥, 먼자각 등을 이용한 배지의 주재료 함량 설정실험결과 참나무 톱밥과 자작나무 톱밥을 50:50으로 혼합한 경우의 수확량이 가장 높았고 먼자각이 혼합된 경우는 혼합량에 비례하여 수확량이 감소하는 결과가 관찰되었다.

표 46. 배지의 주재료 함량설정

배지 재료 혼합 비율(%)			수확량(g/병)
참나무톱밥	자작나무톱밥	면자각	
100	-	-	115
75	25	-	121
50	50	-	125
25	75	-	120
-	-	100	-
25	-	75	25
50	-	50	58
75	-	25	70

균사배양을 위한 영양원 선택 실험에서는 기존 버섯 재배에 영양원으로 쓰이는 미강, 탈지강, 옥수수피, 비트밀 및 이들의 혼합에 있어서 수확량이 비교되었다. 실험결과는 미강 15% 인 경우와 미강 10%, 옥수수피 5%인 경우에 수확량이 가장 높게 관찰되어서 미강이 있새 버섯에 좋은 영양원으로 판명되었다.

표 47. 최적 영양원 설정

영양원	미강 15%	탈지강 15%	옥수수피 15%	비트밀 15%	탈지강 5% 미강 10%	옥수수피 5% 미강 10%	비트밀 5% 미강 10%
수확량	125g	118g	115g	105g	122g	125g	123g

2. 앞새버섯의 저장 및 유통방법의 개발 연구

- 생산된 앞새버섯을 고품질 및 신선도를 유지하면서 생산공장 및 소비자에게 공급하기 위하여 건조방법, 저장방법, 유통방법의 설정을 위한 연구가 수행되었다.

가. 건조방법 설정

건조버섯 유통을 위한 건조방법으로서 자연건조와 송풍기건조가 비교되었다.

1) 자연건조

직사광선으로 건조시 수분함량이 12-17%로 건조되는데 7일 정도가 소요되었다. 또한 색깔, 모양, 향기가 떨어져 품질이 저조하였다.

2) 송풍기건조

일반적으로 버섯 건조에 많이 사용하고 있는 간접가열 방식인 송풍식 건조 방식으로 건조하였다. 초기 가열시 앞새버섯의 자가 소화를 방지하기 위하여 건조기 내의 온도를 45℃까지 올린 다음 앞새버섯을 입상하여 50℃에서 16시간동안 다음과 같은 방법으로 건조하였을 때 최종 수분함량 10 - 13%로 잘 건조되었으며 앞새버섯고유의 모양새와 향이 잘 유지되었다.

예열(45℃) → 버섯을 건조기에 입상 → 예비 건조(배기창 2/3개방, 50℃, 흡입구 개방, 3시간) → 본건조(배기창/흡입구 개방, 16시간, 50℃) → 후기 건조(배기창 1/2 개방, 흡입구 개방, 50℃, 3시간) → 마지막 건조(60℃, 1시간)



그림 34. 건조된 앞새버섯

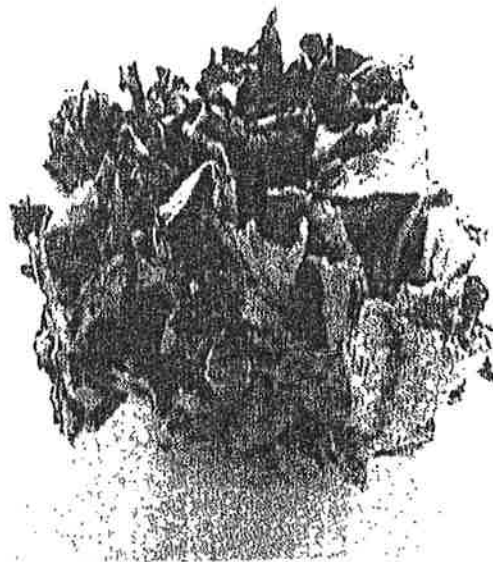


그림 34. 건조된 잎새버섯

나. 저장 방법 설정

생버섯의 유통을 위한 저장방법 설정 연구가 수행되었다. 버섯 수확 후 급속히 1℃로 급냉시키는 예냉처리에 따른 저장기간 및 실온노출시의 품질 변화를 비교한 결과 예냉 미처리시의 저장기간이 8~13일인데 반하여 예냉 처리시의 저장기간은 10~16일로 관찰되어 예냉처리에 의해 평균적으로 3일 정도 저장기간이 연장되는 효과가 있었다. 저장온도 설정실험에서는 저장온도가 4℃ 이상에서는 저장기간이 감소함이 관찰되어 1~3℃가 보다 적합하였으나, 실온 노출시에 3℃ 저장 조건에서 품질이 가장 양호하게 보존되었고 저장온도가 낮을수록 실온노출시 급속한 신선도의 변화가 관찰되었다. 따라서 최적 저장조건은 버섯 수확 후 1℃로 급냉시키는 예냉처리를 하고 3℃에 저장시에 가장 저장기간이 길고 품질보존상태가 우수한 것으로 판명되었다.

표 48. 저장 조건설정

저장 온도(℃)	예냉 미처리시 저장기간	예냉 처리시 저장기간	실온 노출시 품질변화
1	13일	16일	급속히 선도변화
2	13일	16일	양호
3	13일	16일	가장 양호
4	10일	13일	양호
5	10일	12일	보통
6	8일	10일	보통

다. 포장방법 설정

생버섯의 유통을 위한 포장방법 설정연구가 수행되었다. 적합한 재질의 포장재료 선정을 위하여 여러 크기의 종이 Box, 소형 트레이, 대나무 트레이 등이 비교되었다. 종이 Box 포장보다는 트레이 포장이 품질유지에 우수하였다.

- 1) 기존 BOX포장 유통 : 버섯 송이가 겹쳐져서 포장되므로 유통시 버섯
갓의 파손으로 상품성이 저하되었다.
- 2) 납작한 BOX포장 유통 : 버섯 송이 크기의 BOX를 제작하여 포장 유통
시 버섯갓의 파손 현상이 감소되었다.
- 3) 소형 트레이 포장 유통 : 1가구의 1회 식단용으로 100g 단위 포장으로
소비자들에게 좋은 호응을 받았다.
- 4) 대나무 트레이 포장 유통: 선물용으로 시각적으로 소비자들 선호도가
높았고, 대나무 재질의 통기성으로 인하여 저장도도 높았다.

포장재로 트레이 포장이 가장 우수하게 관찰되었으므로 트레이포장의 저장도를 한층 높이기 위하여 저장가스를 주입하는 방법을 활용하였다. 트레이를 pvc 필름으로 포장하고, 여러 조성비의 이산화탄소와 산소를 포장과 동시에 주입하여 최적 저장가스의 조성을 설정하였다. 실험결과 이산화탄소 농도 15 - 25%와 산소 9%를 포장과 동시에 주입시 유통 품질이 가장 양호하였다.

표 49. 이산화탄소 및 산소 농도별 품질 상태 조사

CO2 농도	O2 농도	유통 16일 후 품질(색깔, 모양, 향)
0	0	+
5	9	+
10	9	++
15	9	++
20	9	+++
25	9	+++
30	9	++
35	9	++
40	9	++

3. 최적 재배 및 유통 방법 설정

위의 연구결과를 정리하면 다음과 같다.

- 1) 농촌진흥청 잎새 1호와 파주임업영농조합법인에서 수집 보관 중인 YK 2100호의 우량 균주 선발 시험에서 YK 2100호가 선발되었다.
- 2) 최적 배지 조상은 다음과 같다.
 - 주재료(85%) : 참나무 50%, 자작나무 50%
 - 부재료(15%) : 옥수수피 5%, 미장 10%
 - 배지 초기습 : 55%
- 3) 최적 배양조건은 다음과 같다.

온도 22℃(배지 품온 25℃), 습도 70%, 광도 400 Lux, CO₂ 농도 2000ppm, 배양일수 35일
- 4) 최적 생육 조건은 다음과 같다.

온도 18℃, 습도 95 ~ 85%, 광도 500 Lux, CO₂ 농도 1000ppm, 생육일수 16일
- 5) 최적 건조 조건은 다음과 같다.

예열(45℃) → 버섯을 건조기에 입상 → 예비 건조(배기창 2/3개방, 50℃, 흡입구 개방, 3시간) → 본건조(배기창/흡입구 개방, 16시간, 50℃) → 후기 건조(배기창 1/2 개방, 흡입구 개방, 50℃, 3시간) → 마지막 건조(60℃, 1시간)
- 6) 최적 저장 조건은 다음과 같다.

기존의 저온 저장 방식을 탈피 버섯 수확 후 급속히 1℃로 급냉시키는 예냉처리 후 3℃ 보관시 저장기간이 16일로 가장 선도가 높았다.
- 7) 최적 유통 선도 유지를 위한 포장 방법은 다음과 같다.

트레이 포장시 pvc 필름으로 포장하고, 이산화탄소 농도 15 - 25%와 산소 9%(저장 최적 농도)를 포장과 동시에 주입시 유통 품질이 양호하였다.