최 종
연구보고서

버섯균사체 액체배양액을 이용한 고부가 천연향료 생산

연구기관

(주)HK바이오텍

농림부

주 의

1. 이 보고서는 농림부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구보고서입니다.

2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.

3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니 됩니다.

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 **"버섯균사체 액체배양액을 이용한 고부가 천연향료 생산에 관한 연구"** 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2003 년 7 월 일

주관연구기관명 : (주)HK 바이오텍
총괄연구책임자 : 김 정 옥
연 구 원 : 하 동 수
연 구 원 : 정 영 태
연 구 원 : 안 종 태
협동연구기관명 : 경상대학교
협동연구책임자 : 하 영 래

요 약 문

Ⅰ. 제 목

버섯균사체 액체배양을 이용한 고부가 천연향료 생산

Ⅱ. 연구개발의 목적 및 필요성

1. 연구개발 목적

가. 최종목적

버섯균사체의 액체배양물을 이용한 meat flavor (육고기향; MF), Songyee flavor (송이향; SF), rose flavor (장미향; RF)의 개발

나. 단계별 목표

1) 버섯균사체를 이용한 천연향 생산조건 구명
2) 육고기향 생산
3) 송이향 생산
4) 장미향 생산
5) 산업화전략 확립

2. 필요성

가. 국산 향료소재 생산 기술개발이 요구된다.

1) 현재 국내 향료시장은 약 1천억원으로 추정되고있으나, 국내 향료소비량의 90% 이상이 일본, 유럽, 미국 등지로부터 수입된다는 사실은 그 만큼 우리나라의 향료 생산기술이 부족하기 때문이다.

2) 국내 향료업체로서는 서울향료, 한불화농, ㈜보락 등의 몇몇 중견업체와 2백~3백여 개에 이르는 영세업체들이 향료를 생산·판매하고있으나, 대부분이 미국의 Firmenich, 프랑스의 지보단루이, 독일의 HNR, 일본의 다카사코 등 50여 개의 외국회사로부터 기초원료를 수입하여 단순 가공하는 정도이다.

3) 더욱이, 외국기업의 국내시장진출이 용이해짐에 따라 이들 외국회사의 국내 대리점 개설과 함께 향료의 수입량은 점점 늘어가고 있다.

4) 따라서 수입대체와 수출이 가능한 향료의 개발이 시급하다.

나. 천연향 생산기술 개발이 요구된다.

1) 합성향은 값이 싸고 변성이 잘 일어나지 않는 반면 향이 부드럽지 않고 독하게 느껴지는 것이 단점이다. 더욱이 합성 시에 생성되는 racemic mixture는 인체에 미치는 유해성 문제가 논란이 되고있다.

2) 이에 비해 천연향은 여러 가지 향기성분이 복합적으로 섞여있어 부드럽고 대체로 인체에 유해성이 없다.

3) 미국, 유럽, 일본과 같은 나라에서는 천연향에 대한 소비자의 인식도가 높아 천연향을 사용한 식품의 포장지에 "**천연향 사용** (natural flavor)" 이라는 표시를 함으로써 합성향을 사용한 제품과 구별하여 고가로 판매한다.

4) 이러한 관점에서 천연향 생산기술의 개발은 필요하다.

다. 버섯균사체 액체배양으로 천연향 생산이 용이하다.

1) 천연향은 회수율이 낮기 때문에 값이 비싸고 또한 식물을 재료로 사용할 경우 재배시기와 재배조건에 따라 향료수급과 품질에 많은 영향을 받는다.

2) 그러나, 버섯균사체 액체배양을 이용하면 향기성분 함량과 구성이 일정하고 안정된 수급이 가능하며, 천연향료를 다량으로 계절에 구애받지 않고 생산할 수 있다. 또한 버섯균을 이용한 천연향 생산 기술개발은 농산부산물을 이용하여 고부가가치의 향료를 생산할 수 있다는 관점에서 매우 중요하다.

3) 현재까지 알려져 있는 10,000여종의 버섯 중에 약 80여종이 식용 또는 의약용으로 사용되고 있으며 이들은 품종에 따라 향미 성분 생성에 관계하는 다양한 효소를 분비하므로, 이들 효소작용을 이용하면 아주 다양한 향료를 생산할 수 있다.

4) 따라서, 배지조성과 생육조건을 달리하여 버섯균사체를 배양하여 다양한 향기성분을 생성시키고 여기에 적합한 향료 추출기술을 연결시키면 고부가 천연향을 생산할 수 있다.

2. 개발대상 기술의 특징

가. 천연향이다.

천연향은 합성향에 비해 향이 우수할 뿐만 아니라 인체에 대체로 안전하기 때문에 식품, 의약품, 화장품 등에 많이 사용되고있지만 다량의 천연소재로부터 소량의 향이 추출되기 때문에 값이 비싸다. 또한 식물의 경우 재배시기에 따라 향료수급에 많은 영향을 받는다.

나. 대량생산이 가능하다.

천연향의 주 소재로 사용되어온 동・식물체와는 달리, 버섯균사체의 액체배양은 짧은 기간에 이루어짐으로 연중 대량생산이 가능하다. 또한 지속적인 공급이 가능하다.

다. 기능성을 겸하고 있다.

버섯균사체는 항암성을 비롯한 생리활성이 있다. 따라서 이 향료들은 여러 가지 생리활성이 기대된다.

라. 개발대상 기술의 용도

각 종 천연향 (meat, fruit, floral, dairy, cocoa 및 mushroom flavor 등)의 base로 이용된다. 또한 식품, 의약품, 화장품 등의 가향에 이용된다.

Ⅲ. 연구개발 내용 및 범위

1. 목표향료 (육고기향, 송이향 및 장미향)생산에 적합한 버섯균주의 선발

목표 향기성분을 생성하는 버섯균주를 본 회사에서 보관 중 버섯균주 pool (70여 종)로부터 선발한다.

2. 목표향료 생산에 적합한 배지조성 및 배양조건 확립

○ 선발된 버섯균이 액체배지에서 특정 향기성분을 최대로 생산할 수 있도록 최적 배지조성을 개발한다. ○ 이 액체배양액은 본 사가 향료 생산을 위해 이미 개발한 액체배지를 기본배지로 하여 여러 가지 특정향 전구물질을 첨가하여 목표향료 생산을 위한 최적 액체배양액으로 개발한다.

가. 본 사가 향료생산을 위해 개발한 기본 액체배지

1) 이 배지는 농산부산물을 기본으로 구성되어있다.
2) 농산부산물의 효소처리로 전구물질생성을 유도한다.
3) KH_2PO_4, $MgSO_4$ 등의 무기 성분을 포함한 다수의 성분으로 구성됨

나. 배지조성을 위한 물질

1) 배지의 탄소원: Glucose, fructose, xylose, rhamnose, ribose
2) 배지의 질소원과 sulfur원: Proline, hydroxyproline, serine, threonine, cystine, cysteine, phenylalanine, leucine, glycine등
3) 기타 배지성분: Lignine, phenol 화합물, sesquiterpenes 등

다. 배지조성

본 사가 개발한 기본배지에 상기 “나”에 열거된 여러 가지 향미 성분의 전구물질을 첨가하여 특정한 버섯균이 생육하면서 특정 목적향료를 최대로 많이 생산할 수 있도록 최적배지를 조제한다.

라. 최적배양조건

1) 배양온도:
항온 (20, 25, 30℃), 변온 (20, 25, 30℃ → 2, 4, 10℃)

2) 통기량:
0.5, 1, 2 v/v/m

3) 배양기간:
항온 (3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19일), 변온 (각 항온배양 완료 후 2, 4, 10℃에서 배양하며, 이때 배양기간은 3~9일로 한다: 예비실험으로부터 얻은 결과를 기준으로 하여 설정하였으나, 버섯균종에 따라 배지조성에 따라 변경 됨).

3. 개발된 향료의 관능검사 및 성분분석

관능검사와 향미 성분의 분석은 액체배양액 원액과 액체배양액 원액으로부터 조제된 essential oil, oleoresin, column 추출물, 농축엑기스, 시제품, 대량생산된 제품 등에 실시한다.

가. 관능검사

개발된 향료의 품질평가 및 향의 특성을 알기 위해 미리 훈련된 penalist로 하여금 향의 특징을 description하게 하고 그 중 많은 description을 얻은 향의 특징에 대해 품질을 descriptive sensory analysis 평가법에 의해 다시 측정한다. 기본적인 description의 정리법은 Harper scale로 나타내며 본 연구로부터 개발되는 향의 종류에 따라 quality description은 다르게 표현될 수 있다.

나. 향기성분의 분석

1) Tenax trap method:
2) Simultaneous distillation extractor (SDE)
3) 용매추출법
4) 제제된 시료는 GC sniffing test, GC-Mass, GC-FT/IR, NMR을 이용하여 향의 특성, 구조를 해석한다.

다. 맛 성분의 분석

1) 유리당
2) 유리아미노산
3) 유기산
4) 페놀화합물의 추출 및 정량 (쓴맛, 떫은맛)

4. WONF의 제조

가. 배양액으로부터 반응 flavor 제조

배양액을 그대로 가열시키거나 향의 강화를 위해 아미노산과 당을 추가로 첨가한다. 이때 반응온도는 55, 60, 100℃로 한다.

나. WONF제조

1) 추출된 향 base만으로는 향이 약할 경우 향 화합물을 첨가한다. 제품의 품질재현성에 문제가 있을 경우에 대비하여 구명된 부족한 향 화합물을 첨가하여 WONF를 제조한다.
2) 적용성 조사는 식품, 의약품, 화장품, 방향제 등에 적용하여 선발된 panelist로 하여금 향의 특성에 따라 의견을 조합하여 Harper scale로 나타내어 통계 처리한 결과를 품질평가의 기준으로 한다.

5. 독성검사

식품의약안정청 고시 제1999-61호 의약품 등의 독성시험기준에 따라 시행 (단회투여 독성시험, 반복투여독성시험)

6. 산업화전략

가. 대량생산

Spray dryer, freeze dryer, vacuum evaporator, supercritical CO_2 extractor등을 사용하여 대량생산하였다.

나. 산업화 방안

1) 식품, 의약품, 화장품원료 소재회사를 통한 유통망 구축한다. 관계회사의 개발부에 향 시료를 직접 보내어 test받는다.
2) Internet을 활용하여 홍보하고 판매한다.
3) 미국 및 일본 등의 향료회사에 판매를 위해 홍보한다.

Ⅳ. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

1. 목표향료 (육고기향, 송이향 및 장미향)생산에 적합한 버섯균주 선발

가. 목표향인 육고기향 (표고버섯균; *Lentinus edodes*, LE), 수프 base (느타리버섯균; *Pleurotus ostreatus*, PO), 코코아향 (잎새버섯균; *Grifola frondosa*, GF), floral 장미 (잣버서섯균; *Lentinus lepideus, LL),* 송이향 (느타리버섯균; *Pleurotus ostreatus*, PO), 새우향 (신령버섯균; Agaricus blazei, AB)을 생산할 수 있는 배양조건을 구명하였다.

나. 이들 버섯균은 pH가 5.5인 기본배지에 특수한 전구체를 첨가한 배지에 버섯액체균사체를 접종하여 25℃, 120 rpm, 7일 배양하는 것이 향 생성에 우수하였다.

다. 특히 표고, 느타리, 신령, 잣 버섯균사체의 액체배양을 이용하여, MF, SF, RF를 생성하고자, 이에 적합한 균주를 선별하고, 균주의 특성에 따른 배양조건과 배지조성을 구명하였다. 이들 목표향에 대해서는 **제3장의 제2절 (육고기향), 제3절 (송이향), 제4절 (장미향)**에서 구체적으로 이들 향의 생산에 관한 연구를 수행하였다.

2. 육고기향 (MF)

가. MF 생산

1) 버섯균주의 선발

느타리, 신령 및 표고버섯균을 선발하여 육고기향 생성 연구를 한 결과 느타리버섯균이 가장 우수하였다.

2) 배지조성 및 배양조건

가) 배지조성: 기본배지에 cysteine과 riobse를 각각 0.3% 첨가한 배지

나) 배양조건: 배양온도 25℃, pH 5.5, 진탕속도 120 rpm에서 7일간 배양

3) 육고기향 생성 강화

관능검사에서 cysteine과 Ribose가 첨가된 기본배지에 PO를 배양한 다음 배양액을 가열하면 육고기향이 강화되었다.

4) 주요 휘발성 향기성분

육고기를 가열할 때 생성되는 thiophene류의 화합물 인 2-formyl-5-methyl-thiophene, dimethylformyl- thiophene이 동정되었고, 1-tetradecene, 2-furancarboxaldehyde, furfuryl alcohol 등이 동정되었다.

5) 독성시험

가) 급성독성실험

사망, 임상증상, 체중, 육안적 해부, 혈액학적 검사, 혈액 생화학적 검사에서 아무런 이상이 없었다.

나) 아 급성 독성실험

사망, 임상증상, 체중, 혈액학적 검사, 혈액생화학적 검사, 육안적 해부, 장기중량, 조직검사에서 아무런 이상이 발견되지 않았다.

나. MF-WONF (meat flavor with other natural flavor)제조

Chicken, beef, pork fats을 여러 가지 온도별로 가열하고 rendering하면서 MF를 일정량 첨가하여 제조하고 관능검사를 수행한 결과 MF 향의 농도가 높아질수록 돼지기름, 닭기름, 쇠고기 기름 모두 각각 특유의 off-flavor는 없어지고 달콤하고, 고소한 향이 강해졌다. 그러나 10%에서는 각각의 특유의 species-specific flavor는 없어지고, MF가 나타내는 향이 강해 졌으므로, 고유의 향을 살리면서 MF를 강화시키기 위해서는 1%~5%가 MF-WONF제조에 가장 적합하였다.

3. 송이향(SF)

가. 배양액을 이용한 SF 제조

기본배지(대두박 10%, 황백당 2.7%, KH_2PO_4 0.5%, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5%)에 계피 cinnanic acid, tannin, 솔잎추출물, 감잎추출물을 혼합액을 첨가한 배지(pH 5.5)에 느타리버섯균사체 25 ㎖접종하여 25℃에서 진탕(120 rpm) 7 - 60일간 배양하여 느타리버섯균사체 액체 배양 물을 제조하였다.

나. 향기 성분 분석

송이향이 가장 강하게 생성된 배지로부터 추출된 향기성분은 methyl cinnamate와 3-octene-ol이 함량이 높았다. 또한 3-Octen-2-ol, 3-Octanol, 4-Hepten-3-one, (Z)-1-Octen-3-ol, 2-octenal, 2-Octen-1-ol, Octen-1-ol, acetate, 3-Octanone, 2-Propenoic acid, 3-phenyl- methyl ester, 2-Propenoic acid, 3-phenyl-methyl ester, 1-Butanone, 2-methyl-1-phenyl-, beta-ionone 등의 화합물도 검출되었다.

다. 독성시험

1) 급성독성실험

사망, 임상증상, 체중, 육안적 해부, 혈액학적 검사, 혈액 생화학적 검사에서 아무런 이상이 없었다.

2) 아급성 독성실험

사망, 임상증상, 체중, 혈액학적 검사, 혈액생화학적 검사, 육안적 해부, 장기중량, 조직검사에서 아무런 이상이 발견되지 않았다.

라. SF의 적응성 조사

1) Mush-go plus (숙취해소 음료에 적용)

2) 송이향 버섯 글루칸 비누

4. 장미향 (RF)

가. 배양액을 이용한 RF 제조

기본 액체배지에 β-carotene을 0.1% 또는 0.2%를 첨가하여 잦버섯 (LL)을 1주일간 배양한 결과 0.2%에서 뚜렷한 장미향이 생성되었다. 이 균의 생육은 왕성하였으며 버섯이 생장을 하면서 β-carotene을 생물 전환하여 초기의 붉은 배지색이 점점 원래 배지색처럼 맑아짐을 관찰하였다. 1주일간 배양한 배지를 가열해 보았더니 향이 더 진해진 경향은 있었으나 상쾌한 향이 감소되는 것 같았다.

나. 주요 화합물

Butanoic acid, 3-methyl-, 2, propenyl ester; 4-Heptanol, 2,6-dimethyl-; Dihydro-citronellol; Benzaldehyde, 4-(1-methylethyl); 2-Heptanone, 6-methyl; 1-Octanol, 2-butyl; Isogeraniol; beta-Cyclocitral; Citronelia; Dleta-4-carene; Dihydro-beta-ionone; trans-beta-Ionone; gamma.-Ionone; 3-Carene, 2-alpha -isopropenyl

다. 독성 실험

1) 급성독성실험

사망, 임상증상, 체중, 육안적 해부, 혈액학적 검사, 혈액 생화학적 검사에서 아무런 이상이 없었다.

2) 아 급성 독성실험

사망, 임상증상, 체중, 혈액학적 검사, 혈액생화학적 검사, 육안적 해부, 장기중량, 조직검사에서 아무런 이상이 발견되지 않았다.

5. 산업화전략

가. 제품의 규격서

□ 버섯균사체 액체배양액을 이용한 향료제품을 대량생산하고 다양한 제품을 생산하였다.

1) Natural Meat Flavor HK (No. 1)

-Definition

Meat flavor extracts is prepared from the liquid culture of mushroom mycelia (*Pleuoroteus ostreous*) in a typical medium with composition of amino acids and monosaccharides.

2) □□Roasted Meat Flavor (watery)

-Definition

Meat flavor extracts is prepared from the liquid culture of mushroom mycelia (*Pleuoroteus ostreous*) in a typical medium with composition of amino acids and monosaccharides.

3) Beef Flavor (Oily)

-Definition

Beef flavor is prepared from the liquid culture of mushroom mycelia (*Pleuoroteus ostreous*) in a typical medium with composition of amino acids and monosaccharides and solubilized in beef fat.

4) Tricholoma Matsutake Flavor: TMF-08291 (송이향)

-Definition

Tricholoma matsutake flavor extracts is prepared from the liquid culture of mushroom mycelia (*Tricholoma matsutake*) in a typical medium with composition of amino acids ,monosaccharides, and precursor to produce *Tricholoma matsutake* flavor.

5) Natural Rose Flavor)

- Definition

Tricholoma matsutake flavor extracts is prepared from the liquid culture of mushroom mycelia (*Tricholoma matsutake*) in a typical medium with composition of amino acids ,monosaccharides, and precursor to produce *Tricholoma matsutake* flavor.

6) Pork Flavor (Oily)

- Definition

Pork flavor is prepared from the liquid culture of mushroom mycelia (*Pleuoroteus ostreous*) in a typical medium with composition of amino acids and monosaccharides and solubilized in pork fat.

7) Chicken Flavor (Oily)

- Definition

Chicken flavor is prepared from the liquid culture of mushroom mycelia (*Pleuoroteus ostreous*) in a typical medium with composition of amino acids and monosaccharides and solubilized in chicken fat.

나. 국내···외 향료업체를 통한 산업화 모색

1) 국내의 향료업체를 통해 산업화를 실시하고자 상의 한 업체는 다음과 같다.
롯데음료중앙연구소, 주식회사 보락, (주)엔비텍, KBF, 양파시험장

2) 외국 향료업체를 통해 산업화를 실시하고자 상의 한 업체는 다음과 같다.
GENEVA (미국 위스칸신 매디슨시), Whole Flavors, LLC. (미국 위스칸신 매디슨시). Firmenich (미국 N.J.), Givaudan Roure (미국 오하이오주), V&R (미국), KLAFIR 및 (주)Best Denso사 (일본)

다. 기술이전

한국산업기술센터와 같은 기술이전 전문기관에 의뢰하였다.

SUMMARY

This study was conducted to produce natural meat, songyee, and rose flavors by means of the submerged liquid cultures of mushroom strains in medium containing their precursor compounds or raw agricultural products.

Of test mushroom strains, Poygo (*Lentinus edodes),* Neutari (*Pleurotus ostreatus),* Jhat (*Lentinus lepideus),* Ipsae (*Lentinus lepideus),* Songyee (*Tricholoma matsutake)* and Synryeong (*Agaricus blazei*) were suitable for the production of beef and pyogo, soup base, cocoa, floral, songyee and shrimp flavors, respectively, in basal medium developed in the HK Biotech., Co. LTD. Because meat, songyee and rose flavors are of significance in the world flavor market, herein, this study was focussed on the production of these flavors.

Strong meat flavor was generated in a Neutari submerged liquid culture in basal medium containing 1% cysteine and 2% ribose, which was incubated in a shaking incubator (25℃, pH 5.5, 120 rpm) for 7 days. Meat flavor was strengthened by heating the liquid culture of Neutari. Unfortunately, this flavor was not produced by other mushroom strains such as Pyogo and Synryeong. Important flavor compounds identified in the meat flavor produced were 2-formyl-5-methyl-thiophene and dimethylformyl-thiophene, which are ample compounds in cooked beef, and other compounds identified was 1-tetradecene, 2-furancarboxaldehyde, and furfuryl alcohol. This flavor did not show any adverse effect on markers of chronic and acute toxicity tests in ICR male and female mice.

Strong songyee flavor was produced in a Pyogo submerged liquid culture in basal medium containing cinnanone, cnnamic acid, tannin and extracts of pine tree leaves, which was incubated in a shaking incubator (25℃, pH 5.5, 120 rpm) for 7 days. Important volatile compounds identified in the rose flavor produced were methyl cinnamate and 3-octene-ol. Other compounds isolated were 3-Octen-2-ol, 3-Octanol, 4-Hepten-3-one, (Z)-1-Octen-3-ol, 2-octenal, 2-Octen-1-ol, Octen-1-ol, acetate, 3-Octanone, 2-Propenoic acid, 3-phenyl- methyl ester, 2-Propenoic acid, 3-phenyl-methyl ester, 1-Butanone, 2-methyl-1-phenyl-, and beta-ionone. This flavor

did not show any adverse effect on markers of chronic and acute toxicity tests in ICR male and female mice.

Strong rose flavor was generated in a Jhat submerged liquid culture in basal medium containing β-carotene (0.2%), incubated in a shaking incubator (25℃, pH 5.5, 120 rpm) for 7 days. Important flavor compounds identified were butanoic acid, 3-methyl-, 2, propenyl ester; 4-heptanol, 2,6-dimethyl-; dihydro-citronellol; benzaldehyde, 4-(1-methylethyl); 2-heptanone, 6-methyl; 1-octanol, 2-butyl; isogeraniol; beta-byclocitral; citronelia; dleta-4-carene; dihydro-beta-ionone; trans-beta-ionone; and gamma.-ionone The rose flavor did not show any adverse effect on markers of chronic and acute toxicity tests in ICR male and female mice.

Various natural flavor products produced by means of submerged liquid culture of mushrooms were readily available in flavor market. These are Natural meat flavor HK (No. 1), □□Roasted meat flavor (watery), Beef Flavor (Oily), Tricholoma matsutake flavor (TMF-08291), Natural rose flavor, Pork Flavor (Oily), Chicken Flavor (Oily).

CONTENTS

Chapter 1. Summary of Research ····· 22
Session 1. Objectives ····· 22
1. Final Goal ····· 22
2. Yearly Goal ····· 22
Session 2. Necessity ····· 22
Session 3. Characteristics of Technologies to be developed ····· 24

Chapter 2. International and Domestic Technology Status ····· 25
Session 1. Status and Problems ····· 25
1. Status ····· 25
2. Problems ····· 26
Session 2. Perspectives ····· 27

Chapter 3. Methods and Results ····· 28
Session 1. Production of Goal Flavors ····· 28
1. Methods ····· 28
2. Results ····· 30
Session 2. Meat Flavor Production ····· 38
1. Methods ····· 38
2. Results ····· 46
Session 3. Songyee Flavor Production ····· 90
1. Methods ····· 90
2. Results ····· 92

Session 4. Rose Flavor Production ····· 118
1. Methods ····· 118
2. Results ····· 119
Session 5. Marketing Strategies ····· 147
1. Specification of Flavor Products ····· 147
2. Marketing in Domestic ····· 154
3. Marketing in overseas ····· 154

Chapter 4. Achievement and Contribution to related fields ····· 156
Session 1. Yearly Achievement ····· 156
1. First Year ····· 156
2. Second Year ····· 157
3. Third Year ····· 157
Session 2. Contribution to Related Fields ····· 158
1. Technologically ····· 158
2. Economic and Industrially ····· 158

Chapter 5. Application of results ····· 160
Session 1. Flavor Additives ····· 160
Session 2. Industry ····· 161
Session 3. Flavor Production and Commercialization ····· 161

Chapter 6. Information collected from overseas ····· 162
Session 1. Preference of Foreigners for Mushroom Flavors ····· 162
Session 2. Personals ····· 163

Chapter 7. References ····· 164

목 차

제 1장 연구개발과제의 개요 ····· 22

제 1절 연구개발 목적 ····· 22
1. 최종목적 ····· 22
2. 단계별 목표 ····· 22

제 2절 필요성 ····· 22

제 3절 개발대상 기술의 특징 ····· 24

제 2장 국내외 기술개발 현황 ····· 25

제 1절 국내·외 관련기술의 현황 및 문제점 ····· 25
1. 현황 ····· 25
2. 문제점 ····· 26

제 2절 앞으로의 전망 ····· 27

제 3장 연구수행내용 및 결과 ····· 28

제 1절 목표향 생산 ····· 28
1. 연구수행 방법 ····· 28
2. 연구수행 내용 및 결과 ····· 30
가. 목표향료 생산 버섯균주 선발 ····· 30
나. 목표향 생성 조건 연구 ····· 31
다. 목표향료 생산을 위한 최적배양조건 규명 연구결과 ····· 31
라. 향료의 최적추출방법 연구결과 ····· 33

마. 품질의 재현성조사 ····· 34
바. 성분 분석 ····· 34
사. 결론 ····· 37

제 2절 버섯균사체배양액을 이용한 육고기향 생산 ····· 38
1. 연구수행 방법 ····· 38
가. 배양액을 이용한 meat flavor (MF) 생산 ····· 38
나. MF-WONF (meat flavor, with other natural flavor)제조 ····· 39
다. MF의 적용성 조사 ····· 39
라. MF의 시제품 생산 ····· 40
마. MF의 평가 ····· 40
바. MF의 독성검사 ····· 43
2. 연구수행 결과 ····· 46
가. 배양액을 이용한 반응 MF제조 ····· 46
나. MF생성 배지 ····· 50
다. MF 생산 및 평가 (관능검사, 성분검사) ····· 57
바. MF의 독성검사 ····· 68
1) 급성독성실험 ····· 68
2) 아급성 독성실험 ····· 76
마. MF-WONF (meat flavor with other natural flavor)제조 ····· 87
바. MF의 시제품 ····· 89

제 3절 버섯균사체 배양액을 이용한 송이향 생산 ····· 90
1. 연구수행 방법 ····· 90
가. 액체배양물을 이용한 SF (songyee flavor) 제조 ····· 90
나. SF-WONF (songyee flavor with other natural flavor) ····· 90
다. SF의 적용성 조사 ····· 91
라. SF의 시제품 생산 ····· 91
마. SF의 평가 ····· 91
바. SF (songyee flavor)의 독성검사 ····· 91

2. 연구수행 내용 및 결과 ····· 92
가. 액체배양액을 이용한 SF 제조 ····· 92
나. SF 평가 ····· 92
다. SF의 독성검사 ····· 97
1) 급성독성실험 ····· 97
2) 아급성 독성실험 ····· 106
라. SF의 적응성 연구 ····· 116
마. SF시제품 생산 ····· 117

제 4절 버섯균사체 배양을 이용한 장미향생산 ····· 118
1. 연구수행 방법 ····· 118
가. 액체배양을 이용한 RF (rose flavor) 제조 ····· 118
나. RF-WONF제조 ····· 118
다. RF의 시제품생산 ····· 119
라. RF의 평가 ····· 119
마. RF의 독성실험 ····· 119
2. 연구수행 내용 및 결과 ····· 119
가. 배양액을 이용한 RF 제조 ····· 119
나. RF의 독성 실험 ····· 127
1) 급성독성실험 ····· 127
2) 아급성 독성실험 ····· 135
다. RF의 시제품 ····· 146

제 5절 육고기향, 송이향 및 장미향의 산업화 ····· 147
1. 제품 설명서 ····· 147
2. 국내 향료업체를 통한 산업화 ····· 154
3. 외국 향료업체를 통한 산업화 ····· 154

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도 ····· 156

제 1절 연차별 연구개발 목표와 달성도 ····· 156
1. 1차년도 ····· 156
2. 2차년도 ····· 157
3. 3차년도 ····· 157

제 2절 관련분야 기여도 ····· 158
1. 기술적 측면 ····· 158
2. 경제・산업적 측면 ····· 158

제 5장 연구개발결과의 활용계획 ····· 160

제 1절 가향제로 활용 ····· 160
1. 식품향 ····· 160
2. 담배향 ····· 160
3. 의약품 ····· 160
4. 화장품 ····· 160
5. 기타 ····· 160

제 2절 산업화에 활용 ····· 161

제 3절 버섯균사체를 이용한 향료생산과 상품화 ····· 161

제 6 장 수집한 해외과학기술정보 ····· 162

제 1절 외국인의 버섯향에 대한 기호도 조사 ····· 162

제 2절 해외 시장개척을 위해 면담한 유명인사 ····· 163

제 7장 참고문헌 ····· 164

제 1장 연구개발과제의 개요

제 1절 연구개발 목적

1. 최종목적

버섯균사체의 액체배양물을 이용한 meat flavor (육고기향), songyee flavor (송이향)와 rose flavor (장미향)의 개발

2. 단계별 목표

가. 버섯균사체를 이용한 천연향 생산조건 구명

나. 육고기향 생산

다. 송이향 생산

라. 장미향 생산

마. 산업화전략 확립

제 2절 필요성

1. 국산 향료소재 생산 기술개발이 요구된다.

가. 현재 국내 향료시장은 약 1천억원으로 추정되고있으나, 국내 향료소비량의 90% 이상이 일본, 유럽, 미국 등지로부터 수입된다는 사실은 그만큼 우리나라의 향료 생산기술이 부족하기 때문이다.

나. 국내 향료업체로서는 서울향료, 한불화농, ㈜보락 등의 몇몇 중견업체와 2백~3백여 개에 이르는 영세업체들이 향료를 생산·판매하고있으나, 대부분이 미국의 Firmenich, 프랑스의 지보단루이, 독일의 HNR, 일본의 다카사코 등 50여 개의 외국회사로부터 기초원료를 수입하여 단순 가공하는 정도이다.

다. 더욱이, 외국기업의 국내시장진출이 용이해짐에 따라 이들 외국회사의 국내 대리점 개설과 함께 향료의 수입량은 점점 늘어가고 있다.

라. 따라서 수입대체와 수출이 가능한 향료의 개발이 시급하다.

2. 천연향 생산기술 개발이 요구된다.

가. 합성향은 값이 싸고 변성이 잘 일어나지 않는 반면 향이 부드럽지 않고 독하게 느껴지는 것이 단점이다. 더욱이 합성 시에 생성되는 racemic mixture는 인체에 미치는 유해성 문제가 논란이 되고있다.

나. 이에 비해 천연향은 여러 가지 향기성분이 복합적으로 섞여있어 부드럽고 대체로 인체에 유해성이 없다.

다. 미국, 유럽, 일본과 같은 나라에서는 천연향에 대한 소비자의 인식도가 높아 천연향을 사용한 식품의 포장지에 "**천연향 사용** (natural flavor)" 이라는 표시를 함으로써 합성향을 사용한 제품과 구별하여 고가로 판매한다.

라. 이러한 관점에서 천연향 생산기술의 개발은 필요하다.

3. 버섯균사체 액체배양으로 천연향 생산이 용이하다.

가. 천연향은 회수율이 낮기 때문에 값이 비싸고 또한 식물을 재료로 사용할 경우 재배시기와 재배조건에 따라 향료수급과 품질에 많은 영향을 받는다.

나. 그러나, 버섯균사체 액체배양을 이용하면 향기성분 함량과 구성이 일정하고 안정된 수급이 가능하며, 천연향료를 다량으로 계절에 구애받지 않고 생산할 수 있다. 또한 버섯균을 이용한 천연향 생산 기술개발은 농산부산물을 이용하여 고부가가치의 향료를 생산할 수 있다는 관점에서 매우 중요하다.

다. 현재까지 알려져 있는 10,000여종의 버섯 중에 약 80여종이 식용 또는 의약용으로 사용되고 있으며 이들은 품종에 따라 향미 성분 생성에 관계하는 다양한 효소를 분비하므로, 이들 효소작용을 이용하면 아주 다양한 향료를 생산할 수 있다.

라. 따라서, 배지조성과 생육조건을 달리하여 버섯균사체를 배양하여 다양한 향기성분을 생성시키고 여기에 적합한 향료 추출기술을 연결시키면 고부가 천연향을 생산할 수 있다.

제 3절 개발대상 기술의 특징

1. 천연향이다.

가. 천연향은 합성향에 비해 향이 우수할 뿐만 아니라 인체에 대체로 안전하기 때문에 식품, 의약품, 화장품 등에 많이 사용되고있지만 다량의 천연소재로부터 소량의 향이 추출되기 때문에 값이 비싸다.

나. 또한 식물의 경우 재배시기에 따라 향료수급에 많은 영향을 받는다.

2. 대량생산이 가능하다.

가. 천연향의 주 소재로 사용되어온 동·식물체와는 달리, 버섯균사체의 액체배양은 짧은 기간에 이루어짐으로 연중 대량생산이 가능하다.

나. 지속적인 공급이 가능하다.

3. 기능성을 겸하고 있다.

가. 버섯균사체 배양액에는 다양한 생리활성 물질을 함유하고있다.

나. 따라서 이 향료들은 여러 가지 생리활성이 기대된다.

4. 개발대상 기술의 용도가 다양하다.

가. 각종 천연향 (meat, fruit, floral, dairy, cocoa 및 mushroom flavor 등)의 base로 이용된다.

나. 식품, 의약품, 화장품 등의 가향에 이용된다.

제 2장 국내외 기술개발 현황

제 1절 국내·외 관련기술의 현황 및 문제점

1. 현황

가. 버섯균사체의 액체배양기술이 개발되고 있다.

1) 국내에서는 최근 버섯자실체 생산용 배지제조를 위한 느타리, 팽이버섯균 등의 액체배양기술이 개발되어있다. 본 업체는 버섯종균생산업체로서 느타리, 팽이, 표고, 신령을 비롯한 여러 가지 품종의 버섯균사체를 종균생산용으로 액체배양할 수 있는 기술을 보유하고 있다.
2) 일부 식품, 의약품 및 화장품의 생리활성물질 생산을 위한 영지, 상황, 신령 버섯이 액체배양으로 생산되고있다.
3) 일본의 경우 표고버섯균사체를 액체배양하여 생리활성물질을 생산하는 기술이 활용되고있다.

나. 천연향료의 생산기술이 개발되고 있다.

1) 국내의 천연향 원료생산 기술은 외국에 비해 매우 부족하여, 대부분이 수입원료에 의존하고 있는 실정이다.
2) 외국의 경우 향료생산기술은 우리나라에 비해 매우 앞서있는 편이며, 이들 나라 역시 합성향을 천연향으로 대체하기 위한 연구가 활발히 수행되고 있다.
3) 특히 버섯균을 이용한 천연향 생산은 향료생산 분야의 첨단기술 개발로 취급되고 있다. 특정 향료생산에 적합한 버섯균의 발굴, 높은 수율을 얻을 수 있는 배지 조성 등을 중심으로 연구되고 있다.
4) 버섯균을 이용한 향기성분의 합성에 관한 지적권을 대부분이 연구, 개발한 나라 또는 개인이 가지고있어, 이를 이용하는데는 많은 royalty를 지불해야 하는 실정에 놓여있다. 그러나 아직 미 개발된 부분이 많이 남아있으며, 우리나라 자체의 기술개발이 필요하다.

다. 버섯균사체액체 배양액으로부터 다양한 천연향료를 생산할 수 있다.

1) 액체배양법에 의해서 배양된 120여종 버섯균의 배양액으로부터 약 50여종이상의 향기성분이 분리 동정되었다.
2) 버섯균이 생성하는 주요 향기성분으로는 terpene류 (장미향, 은방울꽃 향기와 같은 꽃향기 화합물), alcohol류 (C8 alcohol: 버섯향), ester (과일향, 꽃향기), lactones (과일향, 코코아향, 버터향, nut향), pyrazines (roasted or nutty 향, 카라멜향, 갈변반응 향, bell pepper, peas, popcorn, pineapple, grassy, earthy), sulfur류 (표고향, 육고기향)가 있으며, 그 외에도 ketone, aldehyde등이 있다.
3) 따라서, 버섯균의 특성을 잘 이용하면 다양한 천연향을 생산 할 수 있을 것이다. 이를 위해 버섯균이 생성하는 효소계가 다양한 향기성분을 생성할 수 있는 배지개발이 요구된다.

라. 여러 가지 향미 성분 추출방법이 이용된다

1) 저분자 휘발성 향기성분의 추출은 매우 까다로워 세심한 기술이 필요하다.
2) 천연향의 제조는 천연물로부터 저분자 향기성분을 추출하는 기술에 의해 이루어지며, 추출방법에 따라 essential oil (terpenes, terpeneless oil), oleoresin, extracts (진공농축, supercritical CO_2 extraction)를 제조한다. 우리나라에서는 이들 가공된 제품을 원료의 주산지로부터 수입하여 복합향료 제조 시에 기초원료로 사용하고 있다.

2. 문제점

가. 국산향료소재 생산기술의 부족으로 외화 낭비가 심하다. 그러나, 기후 등의 재배조건과는 별개로 연중생산조절이 가능한 버섯균을 이용한 국산 향료 소재의 생산으로 향료 기본 소재의 많은 부분이 수입대체 될 수 있다

나. 값이 싼 합성향료를 천연향료 대신 수입하여 사용하고 있어 국민의 건강보존에 문제가 있다. 그러나, 건강에 유익한 활성물질을 생성하는 버섯균을 이용하여 천연향을 제조함으로써 이러한 문제를 감소시킬 수 있다.

다. 대부분의 천연향의 단점이 되는 향의 강도는 버섯균사 배양조건 조절과 배양액에 향미 성분 전구물질의 첨가에 의한 향미 강화기술개발로 해결될 수 있다.

제2절 앞으로의 전망

1. 버섯균사체를 액체배양에 의한 향료생산기술과 향료추출기술을 접목하여 국산 천연향을 생산함으로써 향료의 수입대체효과를 증대시킬 것이다.

2. 수입합성향료 대신 국산 천연향료의 사용량을 증가시킴으로서 국민의 건강을 증진시킬 것이다.

3. 시장성(시장규모)이 크다.
   가. 향은 식품, 의약품, 문구, 섬유, 건축물의 향 공조 system에 이르기까지 광범위한 분야에 사용되고 있는 소재이다.
   나. 기능과 디자인 외에 향기가 새로운 판촉요소로 등장하면서 국내 향료의 소비량은 증가되고있으며, 국내 향료 시장은 날로 확대되고있다.
   다. 현재 국내 향료시장은 약 1천억원으로 추정되고있으나, 국내 향료소비량 90%이상이 일본, 유럽, 미국 등지로부터 수입된다.
   라. 더욱이, 외국기업의 국내시장진출이 용이해짐에 따라 이들 외국회사의 국내 대리점개설과 함께 년 간 유출되는 외화는 증가하고있다.
   마. 라면스프, 다시다 등의 소재로 사용되고있는 버섯향 base는 현재 자실체로부터 추출하여 사용하고있으며. 이를 대체할 수 있는 향 base의 시장은 매우 크다.
   바. 이외에도 단향 성분은 고 부가가치를 가진 상품으로 한가지 예로써 육고기향의 원료로 사용되는 pyrazine류와 같이 kg당 1억원을 호가하는 것들도 많이 있어 향 소재의 시장성은 매우 크다.

제 3장 연구수행내용 및 결과

제 1절 목표향 생산

1. 연구수행 방법

가. 버섯균주 선발 및 개발

1) 본사가 보관 중 버섯균주 pool (약 70여 종)로부터 선발된 몇 균주를 사용하였다.
2) 본사에 없는 균주는 야생 균 (송이 등)을 이용하여 선발하였다.

나. 배지조성 개발

1) 본 사가 향료생산을 위해 개발한 액체배지(Know-How)에 무기 성분 (KH_2PO_4, $MgSO_4$ 등)을 첨가한 기본 배지를 사용하였다.
2) 사용된 전구물질
   가) 탄소원: glucose, fructose, xylose, rhamnose, ribose
   나) 질소원과 sulfur원: proline, hydroxyproline, serine, threonine, cystine, cysteine, phenylalanine, leucine, glycine 등
   다) 기타 성분: lignin, phenol (veratoryl alcohol, tannins), terpenes 등
3) 배지 조성
   가) 버섯균주: 특정 향료 생산을 위해 선발된 균주를 사용하였다.
   나) 배지조성: 기본배지에 나-2)에 열거된 여러 가지 향미 성분의 전구물질을 첨가하여 특정한 버섯균이 생육하면서 특정 목적향료를 최대로 많이 생산할 수 있도록 최적배지 조제하였다.

다. 최적배양조건 구명

1) 배양온도: 항온 (20, 25, 30℃), 변온 (20, 25, 30℃ -> 2, 4, 10℃)
2) 통기량: 0.5, 1, 2 v/v/m
3) 배양기간:
   (가) 항온: 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 35일
   (나) 변온: 항온배양 완료 후 2, 4, 10℃에서 재 배양하며, 이때 배양기간은 3 ~ 9일 (버섯균종에 따라 배지조성에 따라 수정될 수 있음)

라. 추출방법 연구

1) Steam distillation (essential oil 생산)
2) Solvent extraction (Oleoresin의 생산)
3) Adsorption column을 이용
4) Supercritical CO_2 extraction
5) Vacuum evaporation (향 base용 농축엑기스 제조)

마. 향료의 관능검사 및 성분분석

1) 관능검사:

개발된 향료의 품질평가 및 향의 특성을 알기 위해 미리 훈련된 7-30명의 penalist로 하여금 향의 특징을 description하게 하고 그 중 많은 description을 얻은 향의 특징에 대해 품질을 descriptive sensory analysis 평가법에 의해 다시 측정한다.

기본적인 description의 정리법은 Harper scale로 나타내며 본 연구로부터 개발되는 향의 종류에 따라 quality description은 다르게 표현하였다.

2) 향기성분의 분석

가) Tenax trap method
나) Simultaneous distillation extractor (SDE)
다) Solvent extraction
마) GC sniffing test, GC-MS, GC-FT/IR, NMR

3) 맛 성분의 분석

가) 유리당
나) 유리아미노산
다) 핵산
라) 유기산
마) 페놀화합물

2. 연구수행 내용 및 결과

가. 목표향료 생산 버섯균주 선발

1) 본사에 보관 중인 균을 사용하여 meat, fruit, floral, dairy, cocoa향의 대표적인 향기성분을 생성하는 버섯균주를 선발하였다. 단 송이버섯균주는 경남 하동군 옥종면 두양리 (지리산)에서 채취한 야생 송이 (HKTM 1호)를 선발하였다.
2) 목표향 생산을 위해 선발된 균주는 **Table 1**과 같다.

Table 1. Mushroom strains used for the production of goal flavors

Mushroom strain[1)]	Goal flavor	Remarks[2)]
Pyogo	Meat, Pyogo	- Methionine and/or ribose
Neutari	Soup base	- Methionine and/or glutathione
Ipsae	Cocoa, butter, roast	- Fructose and/or methionine
Songyee	Songyee	- Vitamin B1 and/or B6
Jhat	Fruit	- Glutamine, cysteine, glutathione etc.
Synryeong	Shrimp	- Methionine and/or glutathione
Gombo	Kukuma	- American and European people's favor mushroom

[1)]Pyogo (*Lentinus edodes*), Neutari (*Pleurotus ostreatus),* Ipsae (*Lentinus lepideus)*, Songyee (*Tricholoma matsutake*), Jhat (*Lentinus lepideus*), Synryeong (*Agaricus blazei), and* Gombo (Morrel),
[2)]Specific compounds required for the production of given goal flavor(s).

나. 목표향 생성 조건 연구

1) 목표향 생산

상기 "2-가"에서 선발된 버섯균주를 사용하여 주어진 목표향 생산을 위한 조건을 요약하면 Table 2와 같다.ÅÅ 이 배지를 목표향 생산에 사용하였다.

다. 목표향료 생산을 위한 최적배양조건 규명 연구결과

1) 배양조건

20 L 용량의 배양조에서 항온배양은 20℃, 25, 30℃℃℃℃에서 shaking (120 rpm) 하면서 일정 기간 배양하면서 향의 생성정도를 확인 (관능검사)하였다. 변온배양의 경우 20, 25, 30℃에서 각각 배양한 배양체를 다시 4, 10, 15℃에서 24시간 동안 배양한 다음, 다시 25℃에서 24시간 동안 배양한 것을 시료로 사용하였다. 이 경우 변온배양은 향의 생성에 크게 영향을 미치지 않아 본 연구에서는 항온배양을 택하였다.

2) Aeration

20 L용량의 반응조에서 폭기식 배양으로 향 생성정도를 배양기의 공기 배출구로부터 24시간 간격으로 관능검사 하였으며, 배양완료 후의 액으로부터 향의 특성과 강도를 최종 확정하였다. 그 결과, 통기량 설정에서는 0.5 v/v/m보다 1 v/v/m으로 배양했을 때, 향의 생성이 활발할 뿐만 아니라, 배양액의 향이 우수하였다. 그러나 1.5 v/v/m 에서는 배기량이 지나치게 많아 당초 우려했던 대로 배양액 중의 향기성분 손실이 큼으로, 향의 강도가 오히려 낮아지는 경향이었다.

3) 배양기간

배양기간 설정은 적정온도에서 1 v/v/m로 배양하면서 공기배출구로부터 sniffing하여 향의 생성정도를 측정하여 적정배양기간을 설정하였다. 그 결과 느타리와 신령은 3일, 표고는 7일, 송이는 15일 이상 배양에서 향을 생성하기 시작하였다. 송이의 경우 자실체가 고가이므로 충분한 향기성분이 생성되는 배양기간 35일임을 감안하더라도 버섯균사체를 이용한 향료제조는 고부가 산업이라는데 대해 확신을 가질 수 있었다.

Table 2. Conditions for the production of goal flavor using given mushroom strain

Goal flavor	Mushroom strain[1)]	Specific constituents of medium	Culture condition	Sensory test
Meat	Pyogo	-Basal medium (BM)[2)] + Nut flake (tannin)+ Cys (0.1%) + Ribose(2%) -pH : 5.26	-Temp.: 24℃℃C℃ ℃ -Aeration:1 v/v/m -Culture: 14 days	-Cooked meaty
Pyogo	Pyogo	-BM + Nut flake (tannin) + Met (2%) + Ribose (2%) + GSH(0.1%) -pH : 5.45	-Temp.: 24C℃ -Aeration: 1 v/v/m -Culture: 14 days	-Mixture of floral salad, cooked meat, and pyogo flavors
Soup base	Neutari	-BM + Nut flake (tannin) + Met (2%) +GSH(2%) -pH : 5.70	-Temp.: 25C -Aeration:0.3 v/v/m -Culture: 7 days	-Cooke radish and dried mushroom
Cocoa	Ipsae	-BM + Nut flake (tannin) + Fru (2%) + Met(2%) -pH : 5.64	-Temp.: 24C -Aeration:120 rpm -Culture: 7 days	-Dried mushroom and cooked fish
Floral	Jhat	-BM + Nut flake (tannin) + Gln (2%) + Cys (0.1%) + GSH(0.1%) -pH : 5.50	-Temp.: 24C -Aeration:120 rpm -Culture: 7 days	-Grain burning, i.e., barley burning
Songyee	Songyee	-BM + Vitamin B1, B6 -pH : 5.00	-Temp.: 20C -Aeration:0.5 v/v/m -Culture: 35 days	-Songyee flavor harmonized with fine tree, soil, and compost flavors
Shrimp	Synryeong	-BM + Nut flake(tannin)+ Met(2%) -pH : 5.22	-Temp.: 35C -Aeration:120 rpm -Culture: 7 days	-Cooked shrimp

[1)]Pyogo (*Lentinus edodes*), Neutari (*Pleurotus ostreatus),* Ipsae (*Grifola frondosa)*, Songyee (*Tricholoma matsutake*), Jhat (*Lentinus lepideus*), Synryeong (*Agaricus blazei),* and Gombo (Morrel).

[2)]BM: Basal medium [soyflake(80 g/L; barley starch for songyee flavor), KH_2PO_4 (7 g/L), $MgSO_4$ (7 g/L), sugar (28 g/L)].

라. 향료의 최적추출방법 연구결과

1) 목표향의 적절한 추출방법을 연구하기 위하여 최적 조건에서 목표향을 생산한 후 경제적으로 활용가능성이 있는 steam distillation (essential oil), 용매 (pentane 또는 ethanol) 추출 (oleoresin), 향 base 추출법을 이용하여 목표향을 추출하였다. 이 추출물에 대하여 관능검사를 실시하여 가장 강한 목표향을 나타내는 방법을 그 목표향 추출방법으로 선정하였다 (**Table 3**).

Table 3. Sensory evaluation of goal flavors prepared from fruit bodies of mushrooms by various extraction methods

Goal flavor (Mushroom)	Extraction method		
	Essential oil[1)]	Oleoresin[2)]	Base flavor[3)]
Meat (Pyogo)	- Beef flavor, but weak, relative to the base flavor	- A little amount of meat flavor by pentane and very little meat flavor by ethanol, too.	- Strong cooked beef flavor
Soup (Neutari)	- Very weak soup flavor	- A little amount of soup flavor by ethanol	- Strong radish extract
Fruit (Jhat)	- Very weak fruit flavor	- Very little fruit flavor by ethanol	- Weak fruit flavor
Songyee (Songyee)	- Weak Songyee flavor	- Strong flavor by ethanol	- Weak Songyee flavor
Shrimp (Shinryeong)	- Weak shrimp flavor	- Weak shrimp flavor by ethanol	- Strong shrimp flavor

[1)]Essential oil: prepared by collecting flavor compounds in glycerin, vapourized from a mixture of the mushroom culture (20 ml) and distilled water (180 ml) by steam distillation.
[2)]Pentane oleoresin: prepared by extracting mushroom culture (30 ml) with pentane (30 ml), concentrating, and dissolving in small amount of ether. Ethanol oleoresin: prepared by extracting mushroom culture (30 ml) with ethanol (70 ml), concentrating under vacuum, and then dissolving in small amount of ether.
[3)]Base flavor: prepared by a sequential processes of heating (100℃, 15 min), filtering, and concentrating mushroom culture (20 ml).

2) 그 결과 배양액을 가열한 후 농축하는 과정을 거쳐서 제조된 향 base는 meat향 (표고)과 수프향 (느타리균), 새우향 (신령)의 향료제조에 적합하였으며, 송이향 (송이)과 fruit향 (잣) 제조에는 ethanol을 이용한 oleoresin이 가장 적합하였다.

마. 품질의 재현성조사

1) 동일 처리구 시료로부터 제조된 향료의 관능검사와 성분분석을 반복하여 실시한 결과, 동일한 배지조성과 배양조건 하에서 배양된 시료의 경우 큰 차이가 없었다.
2) 배양조건 중 aeration 량에 따라 향의 조성이 크게 영향을 받는 것으로 나타났으나, 배양기별로 압력조절기를 장착함으로써 품질의 재현성에는 문제가 없었다.

바. 성분 분석

1) 향기 성분분석

가) 추출

배양액과 상기 **Table 3**에 명시된 적정한 방법으로 제조된 목표향료중의 향기성분을 diethyl ether로 추출하여 분석에 사용하였다.

나) GC-MS 분석 조건

GC-MS의 분석은 Jeol JMS-700 mass spectrometer를 사용하였다. DB-5 (fused silica capillary column, 60 m × 0.32 mm × 0.25 μm)를 장착한 후 column의 온도는 50℃에서 10분간 유지한 다음 200℃까지 3℃/min속도로 온도를 상승시켰다. Carrier gas는 helium을 사용하였고, ionization voltage는 70 eV, ion source temp는 250℃이었다.

다) 동정 및 향 성분

(1) GC-MS에 의한 화합물은 WILEG D6 & NIST의 data base를 이용하여 동정하였다. **Figure 1**은 표고버섯 균사체를 사용하여 생산한 meat향 화합물의 GC chromatogram, **Figure 2** 표고버섯 자실체로부터 추출한 표고버섯향이다.

(2) **Figure 1과 Figure 2**에서와 같이 균사체 배양물에서 얻은 meat 향 성분은 meat의 주된 화합물이 생성이 되었고, 자실체 추출물에서 얻은 향 성분에는 표고버섯향의 성분이 함유되어 있었다. 단지, 표고향의 주요성분으로 알려져

있는 lenthionine은 이미 다른 연구자들이 보고한 바와 같이 고온에서 쉽게 파괴되는 특성상 chromatogram상에 나타나지 않았다.

(3) GC-MS data를 기준으로 조사한 목표향에는 **Table 4와** 같이 그 목표향이 갖는 전형적인 화합물들이 생성되었다.

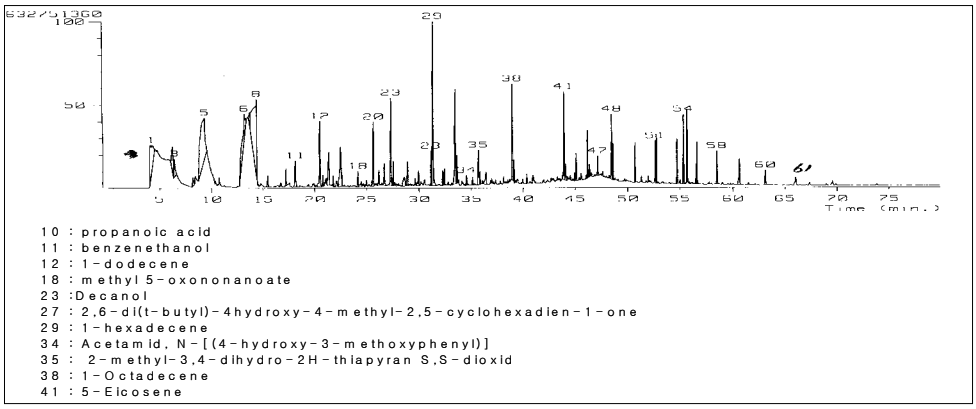


Figure 1. GC chromatograms of flavor constituents from extracts of submerged liquid culture of Pyogo mycelia.

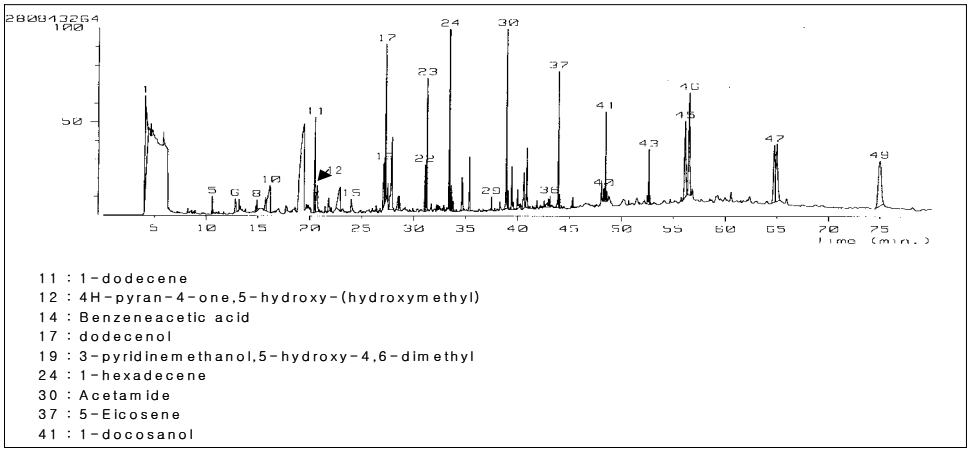


Figure 2. GC chromatogram of flavor constituents from extracts of fruit bodies of Pyogo mushroom.

Table 4. Principle flavor compounds of goal flavor[1)]

Goal flavor		Representative compound
Meat flavor (Pyogo mycelial culture)		- Propanoic acid, benzenethanol, 1-dodecene, methyl 5-oxononanoate, decanol, 1-octadecene, 5-eicosene 2,6-di(t-butyl)-4hydroxy-4-methyl-2,5-cyclohexadien-1-one, 1-hexadecene, acetamid, N-[(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)] 2-methyl-3,4-dihydro-2H-thiapyran-S,S-dioxide
Pyogo	Pyogo mycelial culture	- 3-Octenol, pyrazine, dimethyldisulfide, 1-phenylethanol, 1-octen-3-ol, methional, benzothiazole, benzenethanol, 2,5-dimethyl-2,4dihydroxy-3(2H)-thiophenone
	Fruit body of Pyogo	- 1-dodecene, Acetamide, 1-hexadecene, 5-eicosene, 4H-pyran-4-one,5-hydroxy-(hydroxymethyl), benzeneacetic acid, dodecenol, 1-docosanol, 3-pyridinemethanol,5-hydroxy-4,6-dimethyl
Soup base	Neutari mycelial culture	- 1-Octene-3-ol, benzylacetate, c,t-linalooloxide
Neutri	Fruit body of Neutari	- Hexyl aldehyde, benzaldehyde, 1-octen-3-ol, 3-octanone, 3-octanol, phenylacetaldehyde, octyl alohol
Cocoa (Ipsae)		- 3,4-Dimethoxyphenyl methanol, furfural, pyrazine, coumarine, vanillin, 6-pentyl-2-pyrone, 3,4-dimethoxy benzaldehyde
Floral (Jhat)		- Methyl cinnamate, cadinols, cubenols, farnesol, drimenol, terrestrol, linalool, geraniol, β-ionone, α-pinene, citronelly acetate, linalooloxide, limonene
Songyee		- 1-Octene-3-ol, methoxypyrazine, α-pinene, limonene, 3-octanone, *p*-cymene, 1-octen-3-one, 3-octenal, 1-octen-3-ol, methyl trans-cinnamate
Shrimp (Shynryeong)		- Pyrazines, methyl pyrazine, methoxypyrazine, ethyl pyrazine, hexanol, decanol, 1-heptenol

[1)]Flavor compounds were derived from submerged liquid culture of mushroom strains for goal flavor production (Table 2).

2) 맛 성분 분석

가) 목표향에 미치는 맛 성분의 영향을 연구하기 위하여 생성한 목표향 (meat, fruit, cocoa, 송이, 스푸향 base, 새우)을 적정한 방법으로 추출한 다음 맛 성분에 관련되는 유리당 (환원당), 유리 아미노산, 핵산 (IMP, GMP), 유기산 (citric acid, lactic acid를 비롯한 titratable acidity)을 측정한 결과 열수추출물인 향 base의

경우를 제외하고 ethanol oleoresin에서는 이들이 검출되지 않았다.

나) 열수로 추출한 향 base의 경우, 균사체 배양물의 유리아미노산 함량은 균주의 종류에 관계없이 모두 유사하였으며, 느타리버섯균사체 배양물중의 유리 아미노산 함량은 Table 5와 같다. 특정아미노산을 첨가하여 배양한 경우에는 그 특정 아미노산이 배양이 완료된 후에도 유리상태로 남아있었다.

Table 5. Free amino acid content in Neutari soup base flavor

Amino acid	Content (mg/Solid g)	Amino acid	Content (mg/Solid g)
Aspartic acid	12.3	Methionine	2.3
Threonine	4.6	Isoleucine	3.9
Serine	6.2	Leucine	5.3
Glutamic acid	13.4	Tyrosine	4.0
Proline	8.9	Phenylalanine	7.4
Glycine	5.8	Histidine	2.6
Alanine	6.8	Lysine	6.3
Cysteine	3.0	Arginine	2.2
Valine	5.1		

사. 결론

□ 여러 가지 목표향 (육고기향-표고버섯균; 표고향-표고버섯균; 수프 base-느타리버섯균; 코코아향-잎새버섯균; floral 장미-잣버섯균; 송이향-송이향; 새우향-신령버섯균)을 생산할 수 있는 배양조건을 구명하였다.

□ 그 결과 이들 버섯균은 pH가 5.5인 기본배지에 특수한 전구체를 첨가한 배지에 버섯액체균사체를 접종하여 25℃, 120 rpm, 7일 배양하는 것이 향 생성에 우수하였다.

□ 특히 표고, 느타리, 신령, 잣버섯균사체의 액체배양을 이용하여, meat flavor (MF), songyee flavor(SF), floral (rose flavor: RF)을 생성하고자, 이에 적합한 균주를 선별하고, 균주의 특성에 따른 배양조건과 배지조성을 구명하였다. 이들 목표향에 대해서는 **제2절 (육고기향), 제3절 (송이향)과 제4절 (장미향)**에서 구체적으로 이들 향의 생산에 관한 연구를 수행하였다.

제 2절 버섯균사체배양액을 이용한 육고기향 생산

1. 연구수행 방법

가. 배양액을 이용한 MF (meat flavor) 제조

1) 버섯균사체 액체배양

가) 기본배지 : 대두박 10% (w/v), 황백당 2.7% (w/v), KH_2PO_4 0.5% (w/v), $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5% (w/v)를 증류수 225 ㎖에 녹여서 멸균한 다음 사용하였다.

나) 기본 배양조건 : Poygo (*Lentinus edodes:* LE), Neutari (*Pleurotus ostreatus:* PO), Synryeong (*Agaricus blazei:* AB)버섯을 기본배지에 접종 (버섯액체균사체, 25 ㎖)하고 온도 (20, 25, 30℃), pH (4.5, 5.5, 6.5, 7.5), 진탕 속도 (60, 120, 220 rpm), 배양기간 (3, 7, 10일)에 따라 배양하였다. 버섯균사체 배양 전·후 배지의 pH를 측정하였다. 버섯균사체 배양액 100 ㎖를 여과지 (Whatman No.2)에 진공 여과하여 80℃에서 5시간 건조하고 버섯균사체의 무게를 측정하였다.

2) MF생성 배지 :

MF생성을 위한 배지 조성은 상기 기본배지 (250 ㎖)에 (1) 아미노산 (cysteine, Cys; glutamine, Gln; methionine, Met) 1% 첨가, (2) 당 (fructose, Fru; galactose, Gal; ribose, Rib; xylose, Xyl) 2% 첨가, (3)아미노산 1%와 당 2%를 혼합하여 첨가하였다. 각 처리구를 살균하여 버섯액체균사체 (25 ㎖)를 접종한 다음, 상기 1)-나)의 방법으로 배양하였다. 배양액은 가열하여 관능검사 하였다.

3) MF생성 배양조건

MF생성에 대해 구체적으로 연구하기 위해 (1) 기본배지, (2) Cys 1%와 Rib 2%가 첨가된 기본배지, (3) 기본배지에 PO 배양, (4) Cys 1%와 Rib 2%가

첨가된 기본배지에 PO 배양, (5) 기본배지에 PO를 배양하고 난 후 Cys 1%와 Rib 2%를 첨가하였다. 위 처리구의 배양은 상기 1)-나)의 방법으로 배양하였다.
배양액을 여과지 (Whatman No.2)로 진공 여과하여 가열하지 않은 것과, 가열한 것을 관능검사하고 가열 처리된 배양액을 ether로 추출하여 GC-MS로 분석하였다.

4) 반응 flavor의 생성조건 (Maillard reaction반응)
각각의 배양액 10 ㎖에 Rib (2%)와 Cys (1%)를 첨가한 용액을 test tube에 넣고 heating block에서 반응 온도별 (60, 100, 121℃), 시간 (0, 1, 3, 6, 12hr)별로 반응시켜 관능 검사를 실시하여 최상의 향이 생성되는 조건을 찾았다.

나. MF-WONF (meat flavor with other natural flavor)제조

추출된 향 base만으로는 향이 약할 경우 향 화합물을 첨가하였다. 먼저 각각의 sample (chicken fat, beef fat, pork fat)을 약한 열에서 rendering한 base와 meat flavor를 일정 비율로 혼합하여 다음과 제조하였다.

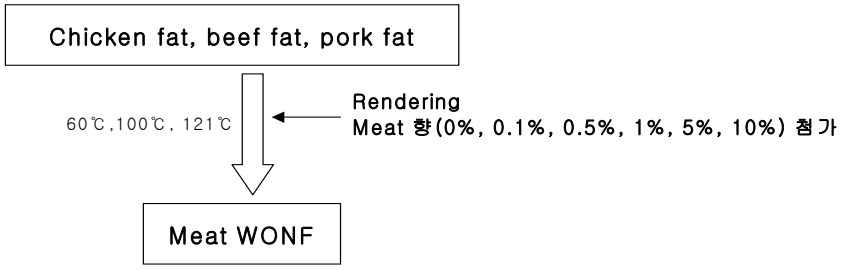


Figure 1. Flow diagram for the preparation of meat WONF.

다. MF의 적용성 조사:

1) 농도별 (0.1%, 0.5%, v/v)로 적용성을 조사하였다.
2) 적용범위: 콩국, 스넥, 기능성 음료, 라면, 튀김 등에 적용성을 조사하였다.

라. MF의 시제품 생산:

품질평가 결과 우수하다고 판정된 향료를 엑기스 (진공농측) 형태로 시제품을 생산하였다.

마. MF의 평가

1) 관능 평가:

제조된 향의 특성을 알기 위해 미리 훈련된 7~10명의 panelist가 향의 특징을 관능검사 하였다.

2) 향기성분 분석:

시료 50 ㎖을 ether 20 ㎖로 2분간 추출하여 실온에 5분간 방치한 다음 ether층과 물층이 분리되면 물층을 제거하였다. Ether층에 Na_2SO_4를 일정량 첨가하여 탈수시켰다. Ether층에 추출된 향기성분을 N_2 gas하에서 농축튜브에 농축하여 GC를 이용하여 **Table 1**의 조건으로 분석하였다. GC-MS는 GC와 동일한 조건으로 분석하였으며 carrier gas는 helium (2 ㎖/min)을 사용하였고, ionization voltage는 70 eV, ion source temperature는 250℃이었다. GC-MS에 의해 분석된 향기화합물은 WILEG D6 & NIST의 data base를 이용하여 동정하였다.

Table 1. GC-operating condition for the analysis of flavor compounds

Item	Condition of HEWLETT PACKARD 5890
Oven temperature	50~200℃ (4℃/min)
Initial temperature	50℃
Final temperature	200℃
Injector temperature	260℃
Detecter temperature	260℃
Column	Supelcowax-10 : 60 m × 0.32 ㎜, i.d
Detecter	FID
Carrier Gas	N_2 (Flow rate : 2 ㎖/min)

3) 맛 성분의 분석

가) 지방산: 시료 50 g을 취하여 hexane:isopropanol (3:2, v/v) 추출용매 50 ㎖과 internal standard (C17:0) 1 ㎎을 넣고 2분간 강하게 흔들어 추출한 후 원심분리(4,000 rpm, 10 min)하였다. 이 과정을 2회 반복하였다. 용매층을 물로 3회 세척한 다음 Na_2SO_4로 수분을 제거한 후 농축하였다. 추출된 지방에 1N-H_2SO_4/MeOH 3 ㎖을 넣고 methylation (100℃, 5 min)하여 GC에 injection하여 분석하였다. 이때, 분석 조건은 **Table 1과** 같다.

나) 유리당: 시료 10 g을 취하여 25 ㎖의 mess flask에 취하고 99.5% EtOH 5 ㎖과 80% EtOH 5 ㎖를 가하여 혼합시키고 20℃의 항온 상태에서 80% EtOH로 보정하였다. 보정액 3 ㎖을 Sep pak C_{18}로 1차 filtering하여 색소와 고분자물질을 제거시키고, membrane filter (0.2 ㎛)로 2차 filtering하여 HPLC에 injection하여 **Table 2**의 조건으로 분석하였다. 표준물질로는 arabinose (Ara), Fru, Gal, glucose (Glc), lactose (Lac), maltose (Mal), mannose (Man), Rib, sucrose (Suc), Xyl 혼합물을 사용하였다.

다) 유기산: 시료 5 g을 증류수로 5배 희석하여 Sep pak C_{18}로 1차 filtering하여 색소와 고분자물질을 제거시키고, membrane filter (0.2 ㎛)로 2차 filtering하여 HPLC에 injection하여 **Table 3**의 조건으로 분석하였다. 표준물질로는 acetic, adipic, ascorbic, benzoic, butyric, citric, formic, fumaric, isobutyric, isocitric, lactic, maleic, malic, malonic, oxalic, propionic, pyroglutamic, succinic acid 혼합물을 사용하였다.

Table 2. HPLC-operating condition for the analysis of free sugars

Item	Condition of Shimadzu LC-10A
Column	Supelcogel Ca (7.8 ㎜ I.D × 300 ㎜)
Column temperature	80℃
Mobile phase	Deionized water
Detector	RID-10A
Flow rate	0.5 ㎖/min.

Table 3. HPLC-operating condition for the analysis of organic acids

Item	Condition of Shimadzu LC-10A
Column	Supelcogel C-610H(7.8 ㎜ I.D × 300 ㎜)(Hydrogen-form resin)
Column temperature	30℃
Mobile phase	0.1% Phosphoric acid
Detector	SPD-10A, 210 ㎚
Flow rate	0.5 ㎖/min.
Injection volume	20 ㎕

라) 유리아미노산: 시료의 단백질을 제거하기 위해 conical centrifuge tube에 sulphosalicylic acid 50 ㎎을 넣고 4℃로 냉각하였다 (1 hr). 이렇게 준비된 tube에 시료 1 ㎖을 첨가한 후 4℃에서 1시간 동안 정치시켰다. 4℃에서 상등액이 완전히 맑게 변할 때까지 전물을 원심분리 (14,000 rpm, 15 min) 하였다. 상등액 일정량을 취하여 0.3 M lithium hydroxide를 이용하여 pH를 2.2로 맞추었다. 이때 첨가하는 0.3 M lithium hydroxide의 양은 시료 20 ㎕에 대하여 10~20 ㎕ 정도가 적당하였다. 또한 pH의 측정은 시료의 양이 너무 작아 pH meter나 pH paper를 할 수 없었으므로 시료 20 ㎕에 대하여 0.3M lithium hydroxide를 15 ㎕정도 첨가하여 적당한 pH로 맞추었다. pH가 보정된 시료를 0.2 ㎛ membrane filtering하여 아미노산 분석기로 **Table 4**의 조건으로 분석하였다.

Table 4. Operating condition of amino acid analyzer condition for the analysis of free amino acids

Item	Condition of Hisashia Hirano
Column	Ultrapac 11 cation exahange resin (6 ㎜×200 ㎜)
Buffer flow	45 ㎖/hr
Ninhydrin flow	35 ㎖/hr
Column temp	50~80℃
Buffer step	4 step
Reaction bath temp	130℃
Buffer pH range	3.2~10.0
Injection volume	40 ㎕

바. MF의 독성검사

1) 급성 (단회투여) 독성실험

가) 처리농도: 500 ㎎/㎏ (15 ㎕/30 g); 710 ㎎/㎏ (21.3 ㎕/30 g); 1,000 ㎎/㎏ (30 ㎕/30 g); 1,410 ㎎/㎏ (42.3 ㎕/30 g); 2,000 ㎎/㎏ (60 ㎕/30 g); Control (saline 투여)이었다.

나) 처리방법: 각 처리구는 멸균 증류수를 사용하여 stock을 만들어서 희석하여 사용 (autoclave)하였고, ICR male과 female 각 5마리에 경구투여 (0.2㎖: 1회 경구투여)하였다.

다) 관찰 항목

(1) 일반증상 및 사망동물의 관찰: 투여당일은 1시간에서 6시간 동안 확인하고, 이후로는 하루에 1회씩 일정시간 관찰하여 7일 동안 일반상태의 변화, 중독증상발현, 사망동물의 유무 및 시험물질투여 후 시험 물질에 의해 나타날 가능성이 있는 증상에 대하여 주의 관찰하였다.

(2) 체중측정: 급성독성시험에 사용된 모든 시험동물의 체중은 시험기간 중 0, 4, 7일 측정하였다 (시험물질 투여 전 및 부검시 체중도 각각 측정 기록).

(3) 부검: 급성독성시험에서 사망 예가 있을 경우에는 즉시 부검을 실시하여 육안적으로 검사를 실시하고, 모든 시험군의 생존 예는 투여 개시일로부터 7일 후에 부검을 실시하였다. 생존 예는 부검 전에 체중을 측정하고 ether로 마취하에 방혈 치사시킨 후 육안으로 모든 장기를 검사를 하였다.

(4) 혈액학적 검사: 부검 1일전 절식시킨 후, ether로 마취시켜 복부대동맥에서 채혈, 채혈한 혈액은 항응고제가 들어있는 채혈병에 넣어 자동혈액검사기기를 이용하여 혈액학적 백혈구 (WBC), 적혈구 (RBC), 헤모글로빈 (Hb), hematocrit (Hct), blood platelet (BLP), mean corpuscular volume (MCV), mean corpuscular hemoglobin (MCH), mean corpuscular hemoglobin concentration (MCHV).

(5) 혈액생화학적 검사: 복부 대동맥에서 채혈한 혈액 중 일부를 혈액학적검사로 이용하고 나머지 혈액은 4℃ 냉장 보관 후 원심분리(3000rpm, 10min)하여 자동생화학검사기를 이용하여 총단백질 (TPROT), albumin (ALB), lactic

dehydrogenase activity (LDH), aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), alkaline phosphotase (ALP), glucose (GLU), cholesterol (CHOL), triglyceride (TRIG), creatine (CREAT), blood urea nitrogen (BUN), creatine phosphate kinase (CPK), calcium (CA), phosphorous (P), gamma-glutamyltransferase (GGT), uric acid (UV)를 측정하였다.

(6) 통계학적 분석: 자료에 대한 통계학적인 분석은 Duncan′ds Multiple range test와 Student′s t-test를 이용하여 유의성을 검정하였다.

2) 아급성 독성시험

가) 처리농도: 500 ㎎/㎏ (15 ㎕/30 g); 710 ㎎/㎏ (21.3 ㎕/30 g); 1,000 ㎎/㎏ (30 ㎕/30 g); 1,410 ㎎/㎏ (42.3 ㎕/30 g); 2,000 ㎎/㎏ (60 ㎕/30 g); Control (saline 투여)이었다.

나) 처리방법: 각 처리구는 멸균 증류수를 사용하여 stock을 만들어서 희석하여 사용 (autoclave)하였고, ICR male과 female 각 10마리에 시료를 경구투여 (총 부피: 0.2 ㎖; 30일 동안 1 주일에 5회 투여)하였고 몸무게는 화요일과 금요일에 측정하였으며 부검 24시간 전에 절식하였다.

다) 관찰항목:

(1) 일반증상 및 사망동물의 관찰: 임상증상은 모든 시험동물에 대한 상태를 매회 1회 이상씩 일정시간에 관찰하여 일반상태의 변화, 중독증상발현, 사망동물의 유무 및 시험물질 투여 후 시험물질에 의해 나타날 가능성이 있는 증상에 대하여 주의하여 관찰하였다.

(2) 체중측정: 시험 기간 중 매주 2회 (월, 목) 측정하고, 시험물질투여 전 및 부검 시 체중을 각각 측정 기록하였다.

(3) 사료 섭취량 및 물 섭취량 (주 2회-화, 금): 사료 섭취량 및 물 섭취량은 주 2회 측정하였다. 사료 섭취량은 각 사육상자별로 1일 1회 공급한 사료량에서 남은 잔여량을 감하여 측정하였으며, 물 섭취량은 물 공급 시 최초 공급량에서 줄어든 분량을 계측하고 다시 새로운 물병에 채우는 방법으로 측정하였다.

(4) 뇨검사: 부검 전일 채뇨하여 pH, protein, glc, ketone체, urobilinogen, bilirubin, leukocyte, occult bloob, nitrite, specific gravity을 검사하기 위해 뇨검사용 시험지(MULTISTIX, AMES사)에 뇨를 침적시켜 측정하였다.

(5) 혈액학적 검사: 부검 1일전 절식시킨 후, ether로 마취시켜 복부대동맥에서 채혈, 채혈한 혈액은 항응고제가 들어있는 채혈병에 넣어 자동혈액검사기기를 이용하여 혈액학적 WBC, RBC, Hb, Hct, BLP, MCV, MCH, MCHC등을 측정하였다.

(6) 혈액생화학적 검사: 복부대동맥에서 채혈한 혈액 중 일부를 혈액학적검사로 이용하고 나머지 혈액은 4℃ 냉장 보관 후 원심분리(3000rpm, 10min)하여 자동생화학검사기를 이용하여 TPROT, ALB, LDH, AST, ALT, ALP, GLU, CHOL, TRIG, CREAT, BUN, CPK, CA, P, GGT, UA를 측정하였다.

(8) 장기 적출 및 병리학적 소견: 모든 시험군의 전 동물에 대하여 신장, 간장, 비장, 심장, 흉선, 부신, 뇌, 뇌하수체, 정소, 전립선, 난소 및 육안적 병변 부위를 적출하였다. 모든 시험군의 생존동물에 대하여 시험물질 투여 개시일로부터 4주 후에 부검을 실시하였다. 부검 전에 체중을 측정하고 ether마취하여 방혈치사시킨 후 육안적으로 모든 장기 검사하였다.

(9) 장기중량: 모든 시험군의 신장, 간장, 비장, 심장, 흉선, 부신, 뇌, 뇌하수체, 정소, 전립선, 난소 중량을 측정하였다.

(10) 조직병리 검사: 모든 시험군의 전 동물에 대하여 다음의 장기를 10% 중성 포르말린으로 고정시켰다. 고정장기로는 신장, 간장, 비장, 심장, 흉선, 부신, 뇌, 뇌하수체, 정소, 전립선, 난소 등의 병변이 있는 장기의 경우와 대조군 및 최고용량군 및 중간용량군에서는 상기장기를 전례에 대해서 실행하고 저용량군 및 중간용량군에서는 육안적 부검소견이 인정되는 장기에 대해 병리조직학적 검사를 시행하였다.

(6) 통계학적 분석: 자료에 대한 통계학적인 분석은 Duncan′s Multiple range test와 Student ′ s t-test를 이용하여 유의성을 검정하였다.

2. 연구수행 결과

가. 배양액을 이용한 반응 MF제조

1) 온도

PO, AB, LE를 기본배지에 접종하여 각각 다른 배양온도 (20, 25, 30℃)에서 배양하여 균사체 생장량을 관찰하였다 (**Table 5**). 각 균사체의 건물중은 PO가 5.67~6.08 g/100 ㎖, AB가 5.20~5.78 g/100 ㎖, LE가 4.08~4.58 g/100 ㎖이었다. 또한, 25℃에서 모든 버섯균사체들이 최대로 생장하였다. 따라서 최적배양온도를 25℃로 결정하고 차기 실험에 이용하였다.

Table 5. Effect of temperature on the growth of mushroom mycelia in the submerged liquid culture[1)]

Temperature (℃)	Mycelia (g/100 ㎖)[2)]		
	PO	AB	LE
20	5.67±0.2[3)a]	5.50±0.1[a]	4.08±0.5[a]
25	6.08±0.1[b]	5.78±0.4[a]	4.58±0.4[a]
30	5.68±0.3[a]	5.20±0.2[a]	4.25±0.2[a]

[1)]The mycelia was incubated (120 rpm, 7days) in basal medium.
[2)]PO; *Pleurotus ostreatus,* AB; *Agaricus blazei,* LE; *Lentinus edodes.* Mycelia filtered through filter paper (No.2) under vacuum was dried in a dry oven (80℃, 5 hrs).
[3)]Mean±S.D. of triplication. Means with different small superscript letters in same column represent significantly different at $p<0.05$ by Duncan's multiple range test.

2) pH

0.1 N-HCl 또는 0.1 N-NaOH로 pH가 조절 (4.5, 5.5, 6.5, 7.5)된 기본배지에 PO, AB, LE를 배양하여 균사체 생장량을 관찰하였다 (**Table 6**). 각 균사체의 건물중은 PO가 4.75~6.28 g/100 ㎖, AB가 5.08~6.54 g/100 ㎖, LE가 3.05~4.58 g/100 ㎖이었다. 또한, 배지의 pH가 5.5에서 버섯균사체가 가장 활발하게 성장하는 것을 확인하였다. 따라서 pH 5.5를 최적 pH로 결정하고 차기 실험에 이용하였다.

Table 6. Effect of pH on the growth of mushroom mycelia in the submerged liquid culture[1)]

pH	Mycelia (g/100 ㎖)[2)]		
	PO	AB	LE
4.5	4.75±0.5[3)a]	5.08±0.1a	3.94±0.1[a]
5.5	6.28±0.4[b]	6.54±0.5[b]	4.58±0.5[b]
6.5	6.07±0.2[b]	6.12±0.5[b]	4.04±0.2[b]
7.5	5.04±0.5[a]	5.15±0.3[a]	3.05±0.3[a]

[1)]The mycelia was incubated (25℃, 120 rpm, 7days) in basal medium.
[2)]PO; *Pleurotus ostreatus,* AB; *Agaricus blazei,* LE; *Lentinus edodes.* Mycelia filtered through filter paper (No.2) under vacuum was dried in a dry oven (80℃, 5hrs).
[3)]Mean±S.D. of triplication. Means with different small superscript letters in same column represent significantly different at $p<0.05$ by Duncan's multiple range test.

3) 진탕 속도

PO, AB, LE를 pH가 5.5로 조절된 기본배지에 접종하여 각각 60, 120, 220 rpm의 속도로 25℃에서 배양하여 균사체 생장량을 관찰하였다 (**Table 7**). 각 균사체의 건물중은 PO가 1.05~6.58 g/100 ㎖, AB가 1.20~5.87 g/100 ㎖, LE가 1.32~4.98 g/100 ㎖로 생장하였는데, 120 rpm에서 버섯균사체의 성장이 가장 활발하였다. 60 rpm과 220 rpm에서는 120 rpm에 비해 균사생장정도가 저조하였다. 특히 220 rpm에서는 120 rpm에 비하여 균사생장이 약 70~80%정도 저하되었다.

이상의 결과로 볼 때, 120 rpm 이하에서는 흔들림이 적어 (공기와의 접촉) 균사의 pellet가 생장하는데 적합하지 못하고 120 rpm 이상에서는 심한 흔들림으로 인하여

균사가 자극을 받아 균사생장이 저해된 것으로 보인다. 따라서 최적 진탕 속도를 120 rpm으로 결정하였다.

4) 배양기간

PO, AB, LE를 pH가 5.5로 조절된 기본배지에 접종하여 25℃, 120 rpm에서 배양하는 동안 배양기간 (3, 7, 10 일)에 따라 균사체 생장량을 관찰하였다 (**Table 8**). 각 균사체의 건물중은 PO가 4.12~12.21 g/100 ㎖, AB가 4.13~13.05 g/100 ㎖, LE가 3.10~10.52 g/100 ㎖이었다. 배양기간이 3일인 경우는 균사체의 생장이 저조하였고, 10일인 경우는 균사체가 본 연구에서 얻고자 하는 MF를 얻을 수 없을 정도로 과잉 생장하였다. **따라서 7일을 MF를 최대로 생산할 수 있는 최적 배양기간으로 결정하였다.**

또한, 배양기간에 따른 배양액의 pH는 크게 변화지 않았다 (**Figure 2**).

Table 7. Effect of the shaking speed on the growth of mushroom mycelia in the submerged liquid culture[1)]

Shaking speed (rpm)	Mycelia (g/100 ml)[2)]		
	PO	AB	LE
60	4.05±0.1[3)a]	4.80±0.2[a]	4.15±0.1[a]
120	6.58±0.2[b]	5.87±0.3[b]	4.98±0.3[b]
220	1.05±0.2[c]	1.20±0.1[c]	1.32±0.5[c]

[1)]The mycelia was incubated (25℃, 7days) in basal medium (pH 5.5).
[2)]PO; *Pleurotus ostreatus,* AB; *Agaricus blazei,* LE; *Lentinus edodes.* Mycelia filtered through filter paper (No.2) under vacuum was dried in a dry oven (80℃, 5hrs).
[3)]Mean±S.D. of triplication. Means with different small superscript letters in same column represent significantly different at $p<0.05$ by Duncan's multiple range test.

Table 8. Effect of incubation time on the growth of mushroom mycelia in the submerged liquid culture[1)]

Time (day)	Mycelia (g/100 mℓ)[2)]		
	PO	AB	LE
3	4.12±0.1[3)]	4.13±0.1[a]	3.10±0.2[a]
7	6.85±0.1[b]	6.87±0.1[b]	4.58±0.4[b]
10	12.21±0.1[c]	13.05±0.1[c]	10.52±0.2[c]

[1)]The mycelia was incubated (25℃, 120 rpm) in basal medium (pH 5.5).
[2)]PO; *Pleurotus ostreatus,* AB; *Agaricus blazei,* LE; *Lentinus edodes.* Mycelia filtered through filter paper (No.2) under vacuum was dried in a dry oven (80℃, 5hrs).
[3)]Mean±S.D. of triplication. Means with different small superscript letters in same column represent significantly different at $p<0.05$ by Duncan's multiple range test.

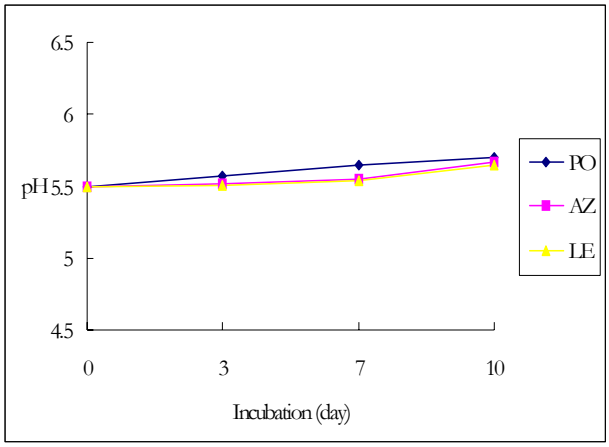


Figure 2. Changes in pH of the medium during the incubation of the mushroom strains.

나. MF생성 배지

1) 아미노산

아미노산 (Cys, Gln, Met)을 기본배지 (250 ㎖)에 1% (w/v)의 농도로 첨가하여 PO, AB, LE를 배양 (25℃, 120 rpm, 7일)하여 그 배양액을 가열하여 관능검사 하였다. 각 향의 특징과 강도를 + (weak), +++ (moderate), +++++ (strong)로 표시하였다.

아미노산을 기본배지에 첨가하여 PO를 배양한 결과 Cys를 첨가한 배양액에서는 sulfuric pungent, Gln을 첨가한 배양액에서는 달콤한 향, Met을 첨가한 배양액에서는 무향 이였다. AB를 배양한 결과, Cys을 첨가한 배양액에서는 sulfuric pungent, Gln, Met을 첨가한 배양액에서는 곰팡이 냄새가 났다. LE를 배양한 결과는 Cys을 첨가한 배양액에서 sulfuric pungent, Gln을 첨가한 배양액에서 곰팡이 냄새, Met을 첨가한 배양액에서는 무향 이였다 (**Table 9**).

여러 가지 아미노산을 첨가한 기본배지에 버섯균사체가 생육하는 동안의 pH변화를 관찰하였다 (**Table 10**). pH의 변화는 아미노산을 기본배지에 첨가하였을 경우 기본배지와 크게 변화는 없었으나 버섯균사체를 배양시킨 후에는 배양전보다 0.1~0.3이상 높아졌다. 특히 Gln이 첨가된 배양액은 pH가 6이상으로 높아졌다.

이상의 결과로 볼 때, 아미노산을 첨가한 기본배지에 버섯균사체를 배양했을 때 다른 향을 기대하였으나 대조구와 거의 차이가 없었다. 따라서 MF를 생성하는데 있어 아미노산을 단독으로 첨가하였을 경우 크게 영향을 미치지 않았다

2) 당

당 (Fru, Gal, Rib, Xyl)을 기본배지 (250 ㎖)에 2% (w/v)의 농도로 첨가하여 PO, AB, LE를 배양 (25℃, 120 rpm, 7일)한 후 그 배양액을 가열하여 관능검사 하였다. 각 향의 특징과 강도를 + (weak), +++ (moderate), +++++ (strong)로 표시하였다.

당을 기본배지에 첨가하여 PO를 배양한 결과 모든 당에서 달콤한 향이 났다. AB를 배양한 결과는 Fru와 Xyl를 첨가한 배양액에서는 곰팡이 냄새가 났고, Gal을 첨가한 배양액에서는 흙 냄새가 났고, Rib를 첨가한 배양액에서는 달콤한 향이 났다.

Table 9. Effect of amino acids on the sensory characteristics of the liquid cultured with mushroom strains

Mushroom strain	Amino acid[1)]	Sensory characteristics					
		Meaty	Sweety	Earthy	Musty	Sulfuric pungent	Burnt sugar
PO	Control		+++[2)]				
	Cys					+++++	
	Gln		+++				
	Met			+	+		
AB	Control				+++		
	Cys					+++++	
	Gln				+++		
	Met				+++		
LE	Control		+	+++			
	Cys					+++++	
	Gln			+	+++		
	Met			+	+		

[1)]amino acid; 1%.
[2)] +; Weak, +++; moderate, +++++; strong.

Table 10. Changes in pH of the medium added with various amino acids and sugars during incubation of the mushroom strains

Treatment		PO		AB		LE	
		Pr[1)]	Po[2)]	Pr	Po	Pr	Po
Amino acids[3)]	Cys	5.52	5.50	5.51	5.54	5.52	5.32
	Gln	5.56	6.33	5.58	5.84	5.56	5.67
	Met	5.57	5.62	5.54	5.52	5.55	5.27

[1)]Prior to incubation.
[2)]Post incubation of 7 days.
[3)]Amino acid; 1%.

LE를 배양한 결과는 Fru을 첨가한 배양액에서는 달콤한 향, Gal을 첨가한 배양액에서는 곰팡이 냄새가 났고, Rib, Xyl를 첨가한 배양액에서는 무향 이였다 (**Table 11**). 여러 가지 당이 첨가된 기본배지에 버섯균사체가 생육하는 동안의 pH변화를 관찰하였다 (**Table 12**). pH는 버섯균사체 배양 전·후 큰 변화는 없었으나 균사체를 배양한 후 0.1~0.2정도 높아졌다. PO가 배양된 배지는 다른 균사체가 배양된 배지보다 pH가 0.5이상 높아졌다.

이상의 결과로 볼 때, 당을 첨가한 기본배지에 버섯균사체를 배양했을 때 다른 향을 기대하였으나 대조구와 거의 차이가 없었다. 따라서 MF를 생성하는데 있어 당을 단독으로 첨가하였을 경우 크게 영향을 미치지 않았다.

Table 11. Effect of sugars on the sensory characteristics of the liquid cultured with mushroom strains

Mushroom strains	Sugar[1)]	Sensory characteristics					
		Meaty	Sweety	Earthy	Musty	Sulfuric pungent	Burnt sugar
PO	Control		+++[2)]				
	Fru		+++		+		
	Gal		+++		+		
	Rib		+++				
	Xyl		+++		+		
AB	Control				+++		
	Fru			+	+++		
	Gal			+++	+		
	Rib		+++	+	+		
	Xyl			+	+++		
LE	Control		+	+++			
	Fru		+++		+		
	Gal			+	+++		
	Rib		+				
	Xyl		+		+		

[1)]Sugar; 2%.
[1)]+; Weak, +++; moderate, +++++; strong.

Table 12. Changes in pH of the medium added with various amino acids and sugars during incubation of the mushroom strains

Treatment		PO		AB		LE	
		Pr[1)]	Po[2)]	Pr	Po	Pr	Po
Sugar[3)]	Fru	5.68	5.95	5.62	5.68	5.58	5.54
	Gal	5.54	5.97	5.56	5.54	5.52	5.52
	Rib	5.54	5.72	5.54	5.65	5.56	5.45
	Xyl	5.22	5.81	5.28	5.68	5.34	5.25

[1)]Prior to incubation.
[2)]Post incubation of 7 days.
[3)]Sugar; 2%.

3) 아미노산과 당

가) 느타리버섯균사체

아미노산 (Cys, Gln, Met) 1%와 당 (Fru, Gal, Rib, Xyl) 2%를 기본배지 (250 ㎖)에 첨가하여 PO를 배양 (25℃, 120 rpm, 7일)한 배양액을 가열하여 관능검사 하였다 (**Table 13**). 각 향의 특징과 강도를 + (weak), +++ (moderate), +++++ (strong)로 표시하였다.

Cys와 Fru, Gal, Xyl를 첨가한 배양액에서는 sulfuric pungent의 특징을 가졌고, Cys과 Rib를 첨가한 배양액에서는 강한 Meat 향이 났다. Gln과 Fru, Gal, Xyl를 첨가한 배양액에서는 무향 이였다. Gln과 Rib를 첨가한 배양액에서는 달콤한 향이 났다. Met와 Fru, Gal를 첨가한 배양액에서는 곰팡이 냄새, Met과 Rib를 첨가한 배양액에서는 달콤한 향이 났고, Met과 Xyl를 첨가한 배양액에서는 흙 냄새가 났다. pH의 변화는 배양 전·후 큰 변화는 없었으나, Gln이 첨가된 배양액에서 0.3~0.5정도 높아졌다 (**Table 14**).

이상의 결과로 볼 때, 본 실험에서 사용된 배지조성 중 Cys과 Rib를 첨가한 배지에 PO를 배양하였을 때만 강한 MF가 생성되었다.

Table 13. Effect of amino acids and sugars on the sensory characteristics of the liquid cultured with *Pleurotus ostreatus*

Amino acid[1)]	Sugar[2)]	Sensory characteristics					
		Meaty	Sweety	Earthy	Musty	Sulfuric pungent	Burnt sugar
Cys	Fru				+[3)]	+++	
	Gal				+	+++	
	Rib	+++++	+				
	Xyl		+		+	+++	
Gln	Fru		+		+		
	Gal		+		+		
	Rib		+++		+		+
	Xyl		+		+		
Met	Fru				+++		
	Gal				+++		
	Rib		+++				+
	Xyl			+++			

[1)]Amino acid; 1%.
[2)]Sugar; 2%.
[3)]+; Weak, +++; moderate, +++++; strong.

Table 14. Changes in pH of the medium added with various amino acids and sugars during incubation of given mushroom strain

Amino acids[1)]	Sugars[2)]	PO		AB		LE	
		Pr[3)]	Po[4)]	Pr	Po	Pr	Po
Cys	Fru	5.60	5.73	5.57	5.65	5.55	5.43
	Gal	5.53	5.74	5.54	5.52	5.52	5.42
	Rib	5.55	5.61	5.53	5.46	5.43	5.29
	Xyl	5.37	5.66	5.40	5.59	5.43	5.29
Gln	Fru	5.62	6.14	5.6	5.48	5.57	5.61
	Gal	5.55	6.15	5.55	5.41	5.54	5.6
	Rib	5.55	6.03	5.56	5.46	5.50	5.56
	Xyl	5.39	6.07	5.43	5.48	5.45	5.46
Met	Fru	5.63	5.70	5.58	5.60	5.57	5.53
	Gal	5.56	5.58	5.55	5.53	5.54	5.40
	Rib	5.56	5.67	5.54	5.59	5.56	5.49
	Xyl	5.40	5.63	5.41	5.60	5.45	5.39

[1)]Amino acid; 1%.
[2)]Sugar; 2%.
[3)]Prior to incubation.
[4)]Post incubation of 7 days.

나) 신령버섯균사체

아미노산 (Cys, Gln, Met) 1%와 당 (Fru, Gal, Rib, Xyl) 2%를 기본배지 (250 ㎖)에 첨가하여 AB를 배양 (25℃, 120 rpm, 7일)한 배양액을 가열하여 관능검사 하였다 (**Table 15**). 각 항의 특징과 강도를 + (weak), +++ (moderate), +++++ (strong)로 표시하였다.

Cys과 Fru, Gal, Xyl를 첨가한 배양액에서는 sulfuric pungent의 특징을 가졌고, Cys과 Rib를 첨가한 배양액에서는 무향이었다. Gln과 Fru를 첨가한 배양액에서는 흙 냄새, Gln과 Gal를 첨가한 배양액에서는 곰팡이 냄새가 났고, Gln과 Rib, Xyl를 첨가한 배양액에서는 달콤한 향이 났다. Met과 Fru, Rib, Xyl를 첨가한 배양액에서는 곰팡이 냄새가 강하게 났고, Met과 Gal를 첨가한 배양액에서는 무향이였다. pH의 변화는 배양 전·후 큰 변화가 없었다 (**Table 14**).

이상의 결과로 볼 때, 아미노산과 당을 첨가한 기본배지에 AB를 배양한 배양액은 향의 특성에 있어서 대조구와 거의 차이가 없었다. 따라서 **MF를 생성하기 위해서는 AB는 적합하지 않았다.**

Table 15. Effect of amino acids and sugars on the sensory characteristics of the liquid cultured with *Agaricus blazei*

Amino acid[1)]	Sugars[2)]	Sensory characteristics					
		Meaty	Sweety	Earthy	Musty	Sulfuric pungent	Burnt sugar
Cys	Fru				+[3)]	+++	
	Gal				+	+++	
	Rib		+				+
	Xyl		+			+++	
Gln	Fru			+++++			
	Gal				+++++		
	Rib		+++		+		+
	Xyl		+++		+		
Met	Fru			+	+++		
	Gal			+	+		
	Rib		+	+	+++		
	Xyl			+	+++		

[1)]Amino acid; 1%.
[2)]Sugar; 2%.
[3)]+; Weak, +++; moderate, +++++; strong.

다) 표고버섯균사체

아미노산 (Cys, Gln, Met) 1%와 당 (Fru, Gal, Rib, Xyl) 2%를 기본배지 (250 ㎖)에 첨가하여 LE를 배양 (25℃, 120 rpm, 7일)한 배양액을 가열하여 관능검사 하였다(**Table 16**). 각 향의 특징과 강도를 + (weak), +++ (moderate), +++++ (strong)로 표시하였다.

Cys과 Fru, Gal, Xyl를 첨가한 배양액에서는 sulfuric pungent의 특징을 가졌고, Cys, Rib가 첨가한 배양액에서는 무향이었다. Gln과 Rib, Xyl를 첨가한 배양액에서는 달콤한 향이 났고, Gln과 Fru를 첨가한 배양액에서는 무향 이였다. Gln과 Gal를 첨가한 배양액에서는 곰팡이 냄새가 났다. Met과 Rib, Xyl를 첨가한 배양액에서는 흙 냄새가 났고, Met과 Fru를 첨가한 배양액에서는 곰팡이 냄새가 났다. Met과 Gal를 첨가한 배양액에서는 무향 이였다. pH의 변화는 배양 전・후 큰 변화가 없었다 (**Table 14**).

이상의 결과로 볼 때, 아미노산과 당을 첨가한 기본배지에 LE를 배양하면 대조구와 거의 차이가 없었다. **따라서 MF를 생성하기 위해서는 LE는 적합하지 않았다.**

Table 16. Effect of amino acids and sugars on the sensory characteristics of the liquid cultured with *Lentinus edodes*

Amino acid[1)]	Sugars[2)]	Sensory characteristics					
		Meaty	Sweety	Earthy	Musty	Sulfuric pungent	Burnt sugar
Cys	Fru					+++[3)]	
	Gal					+++	
	Rib				+		
	Xyl					+++	
Gln	Fru						
	Gal				+++		
	Rib		+++	+			
	Xyl		+++				
Met	Fru				+++		
	Gal				+		
	Rib		+	+++			+
	Xyl			+++	+		

[1)]Amino acid; 1%.
[2)]Sugar; 2%.
[3)]+; weak, +++; moderate, +++++; strong.

다. MF 생산 및 평가 (관능검사, 성분검사)

1) 관능검사

상기에서 PO가 Cys (1%)와 Rib (2%)가 함유된 배지에서 가장 우수한 MF를 생성하였다. 따라서 이러한 조건에서 배양한 배양물로부터 향기성분이 강화된 MF를 생성하기 위한 조건을 연구하였다 (**Table 17**).

배양한 PO 배양물을 여러 조건으로 처리한 다음 MF의 생성에 미치는 영향을 연구하기 위하여 먼저 관능검사를 실시하였다 (**Table 17**). 기본배지를 가열한 액으로부터는 달콤한 향이 약하게 감지되었다. 기본배지에 PO를 배양한 배양액으로부터는 흙 냄새가 났다.

그러나 배양액을 가열하였더니 달콤한 향으로 변하였다. Cys과 Rib를 첨가한 기본배지를 가열 또는 무 가열한 액으로부터는 sulfuric pungent의 특징을 가진 향이 감지되었다. Cys과 Rib를 첨가한 기본배지에 PO를 배양하여 배양액을 관능검사 한 결과 sulfuric pungent의 특징을 가진 향이 감지되었다. 그러나 배양액을 가열하였더니 강한 MF가 생성되었다. 기본배지에 PO를 배양하여 배양액에 Cys과 Rib를 첨가하여 가열한 액으로부터는 sulfuric pungent의 특징을 가진 향이 감지되었다.

이상의 결과로 볼 때, Cys과 Rib가 첨가된 기본배지에 PO를 배양한 다음, 배양액을 가열하면 MF가 생성된다는 것을 확인할 수 있었다. 따라서 **MF생성을 위해서는 PO, Cys, Rib, heat의 네 가지가 필수적이었다.**

2) 휘발성향기성분

Table 17에서 사용된 시료를 ether로 추출하여 GC와 GC-MS로 분석하였다. 기본배지로부터는 1-tetradecene, 2-furancarboxaldehyde, furfuryl alcohol, 3-(1-ethoxyethoxy)-butanol이 동정되었다 (**Figure 3**).

Cys와 Rib를 첨가한 기본배지로부터는 1-tetradecene, 2-furan -carbox -aldehyde, furfuryl alcohol, 3-(1-ethoxyethoxy)-butanol, 1,2-benzisothiazol-3-(2H), thiono[2,3,C]pyridine, 1H-4-methyl-2,3,4,5 -tetra-hydrobenz[c]azepine-1-one이 동정되었다 (**Figure 4**).

기본배지에 PO를 배양한 배양액으로부터는 1-tetradecene, 2-furancarbox

-aldehyde, furfuryl alcohol, 1-[13C]-phenylacetamide, 6-di(t-butyl)-4-hydroxy -4-methyl- 2,5-cyclohexadien-1-one이 동정되었다 (**Figure 5**).

Cys과 Rib를 첨가한 기본배지에 PO를 배양한 배양액으로부터는 1-tetradecene, 2-furancarboxaldehyde, furfuryl alcohol, 2-formyl-5-methylthiophene, 3-(1-ethoxyethoxy)-butanol, dimethylformy- lthiophene, 1,2-benzisothiazol-3-(2H), 2,6-di(t-butyl)-4-hydroxy- 4-methyl- 2,5-cyclohexadien-1-one, thiono[2,3,C] -pyridine, formanilide, 1H-4-methyl-2,3,4,5 -tetrahydrobenz[c]azepine이 동정되었다 (**Figure 6**). 기본배지에 PO를 배양한 다음 Cys과 Rib를 첨가하여 가열한 배양액으로부터는 1-tetradecene, furancarboxaldehyde, furfuryl alcohol, 1-[13C]-phenylacetamide, dimethylformylthiophene, 1,2-benziso- thiazol -3-(2H), 2,6-di(t-butyl)-4-hydroxy- 4-methyl-2,5-cyclohexadien-1-one, thiono[2,3,C]pyridine, formanilide, 1H-4-methyl- 2,3,4,5-tetrahydrobenz[c]azepine이 동정되었다 (**Figure 7**).

이상의 결과에서 1-tetradecene, 2-furancarboxaldehyde은 모든 시료에서 생성되었고 특히 Cys과 Rib를 첨가한 시료에 높은 농도로 존재하였다. Furfuryl alcohol은 Rib를 첨가한 기본배지에 PO를 배양하였을 때 많이 생성되었다. Cys과 Rib를 첨가한 기본배지에 PO를 배양하면 2-formyl-5-methyl- thiophene, dimethylformyl- thiophene이 생성되었으며, 이들은 쇠고기를 가열할 때 생성되는 thiophene류의 화합물로써 MF생성에 매우 중요한 역할을 하는 향기성분으로 생각된다 (**Table 18**). 이들 화합물의 MS spectrum은 **Figure 8, 9**에 보는 바와 같이 data base의 MS spectrum과 거의 동일하였다.

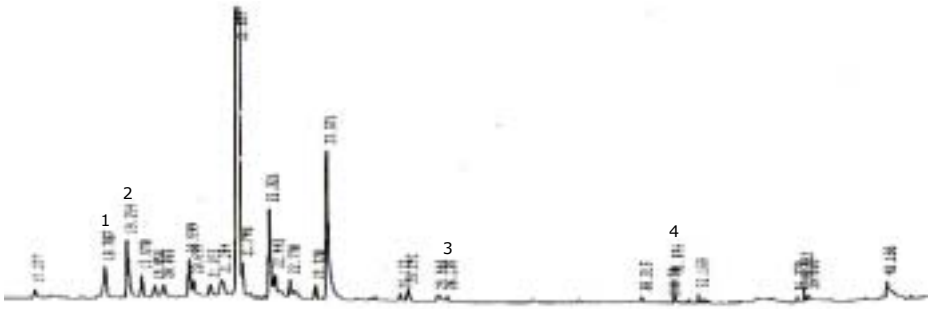


Figure 3. GC chromatogram of the volatile flavor compounds isolated from Basal medium. Peak identification: 1, 1-Tetradecene; 2, 2-Furancarboxaldehyde; 3, Furfuryl alcohol; and 4, 3-(1-Ethoxy- ethoxy)-butanol.

Table 17. Effect of the heat treatment on the sensory characteristics of the liquid cultured with *Pleurotus ostreatus*

Treatment		Sensory characteristics					
		Meaty	Sweety	Earthy	Musty	Sulfuric pungent	Burnt sugar
Heat	Basal medium[1)]		+[2)]				+
	Cys+Rib[3)]					+++++	
	PO[4)]		+++				
	PO+Cys+Rib[5)]	+++++				+	+
	PO+Cys+Rib[6)]					+++	+
No Heat	Basal medium						
	Cys+Rib					+++++	
	PO		+	+++			
	PO+Cys+Rib		+		+	+++	

[1)]Autoclaved culture medium contained soybean cake, yellow sugar, KH_2PO_4 and $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ in distilled water.

[2)]+; weak, +++; moderate, +++++; strong.

[3)]Autoclaved culture medium containing basal medium, Cys (1%) and Rib (2%).

[4)]Autoclaved basal medium cultured with PO.

[5)]Autoclaved medium cultured with PO in the medium containing basal medium, Cys (1%) and Rib (2%).

[6)]Autoclaved medium containing Cys (1%), Rib (2%) and the medium cultured with PO.

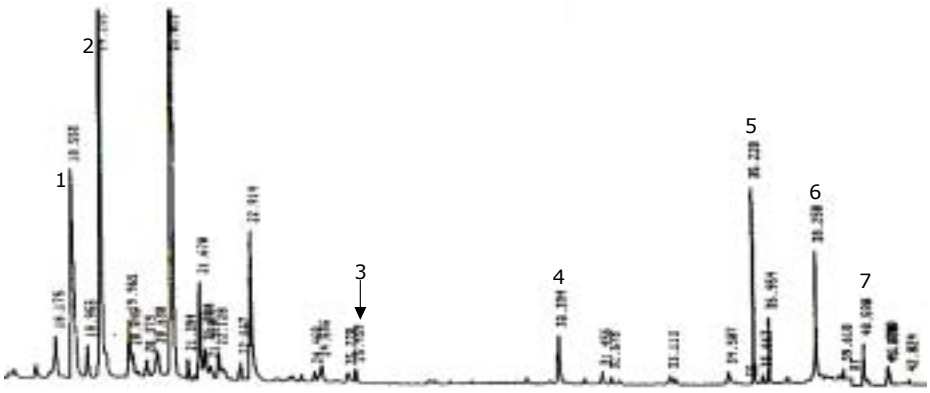


Figure 4. GC chromatogram of the volatile flavor compounds isolated from Basal medium containing Cys (1%) and Rib (2%).Peak identification: 1, 1-Tetradecene; 2, 2-Furancarboxaldehyde; 3, Furfuryl alcohol; 4, 3-(1-Ethoxyethoxy)-butanol; 5, 1,2-Benziso-thiazol-3-(2H); 6, Thiono[2,3,C]-pyridine; and 7, 1H-4-Methyl- 2,3,4,5-tetrahydrobenz[c]azepine-1-one.

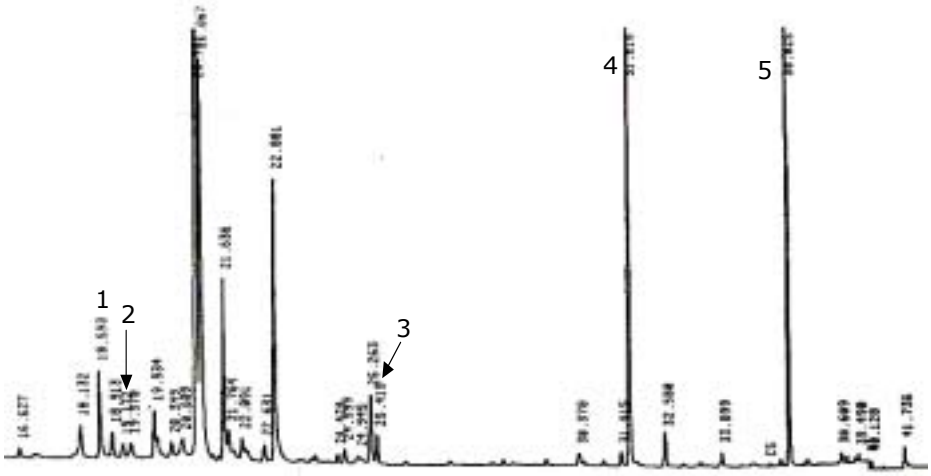


Figure 5. GC chromatogram of the volatile flavor compounds isolated from Basal medium cultured with PO. Peak identification: 1, 1-Tetradecene; 2, 2-Furancarboxaldehyde; 3, Furfuryl alcohol; 4, 1-[13C]-Phenylacetamide; and 5, 2,6-Di(t-butyl)-4-hydroxy-4- methyl-2,5-cyclo -hexadien-1-one.

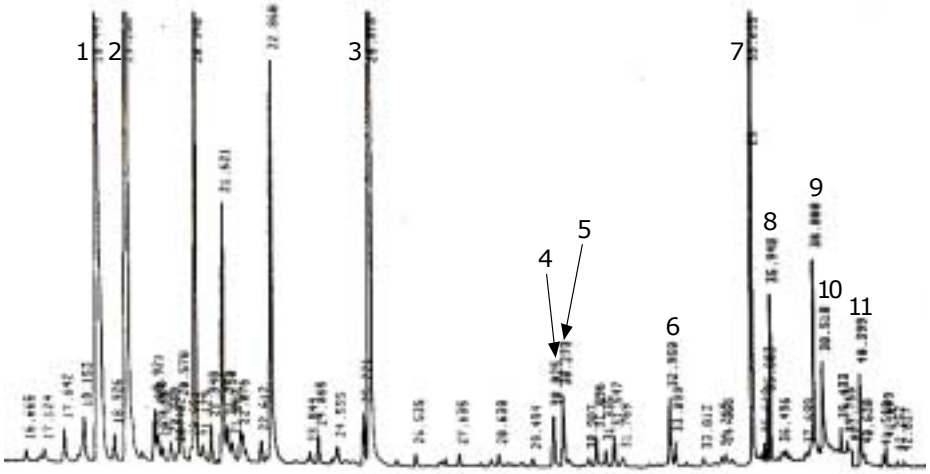


Figure 6. GC chromatogram of the volatile flavor compounds isolated from Basal medium containing Cys (1%) and Rib (2%) cultured with PO. Peak identification: 1, 1-Tetradecene; 2, 2-Furancarboxaldehyde; 3, Furfuryl alcohol; 4, 2-Formyl-5- methyl-thiophene; 5, 3-(1-Ethoxy ethoxy) -butanol; 6, Dimethyl-formylthiophene; 7, 1,2-Benzisothiazol-3-(2H); 8, 2,6-Di(t-butyl)-4-hydroxy-4-methyl-2,5- cyclohexadien -1-one; 9, Thiono[2,3,C]- pyridine; 10, Formanilide; and 11, 1H-4-Methyl-2,3,4,5 -tetrahydro benz[c]azepine-1-one.

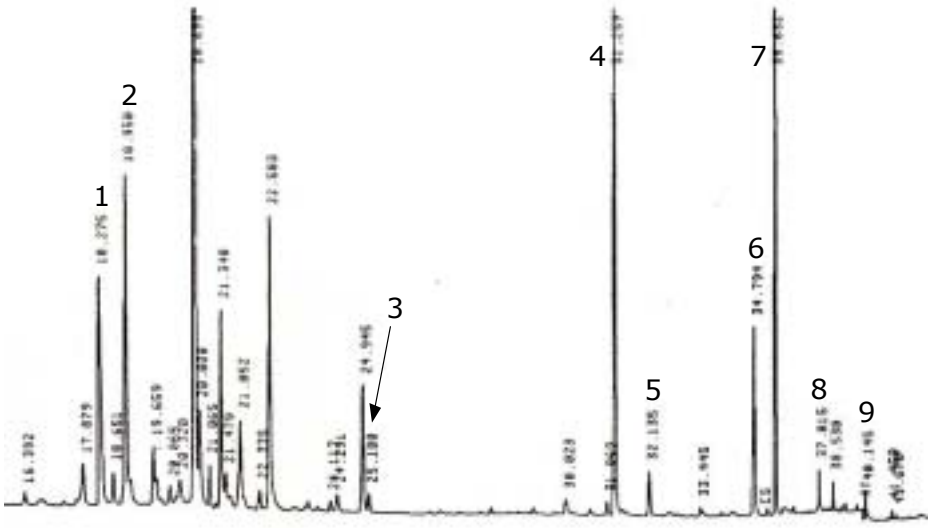


Figure 7. GC chromatogram of the volatile flavor compounds isolated from Basal medium cultured with PO, followed by adding containing Cys (1%) and Rib (2%). Peak identification: 1, 1-Tetradecene; 2, 2-Furan-carboxaldehyde; 3, Furfuryl alcohol; 4, 1-[13C]-Phenyla -cetamide; 5, Dimethylformylthiophene; 6, 1,2-Benzisothiazol-3-(2H); 7, 2,6-Di(t-butyl)- 4-hydroxy-4-methyl-2,5-cyclohexadien-1-one; 8, Thiono[2,3,C]pyridine; and 9, 1H-4- Methyl-2,3,4,5-tetrahydro-benz[c]azepine-1-one.

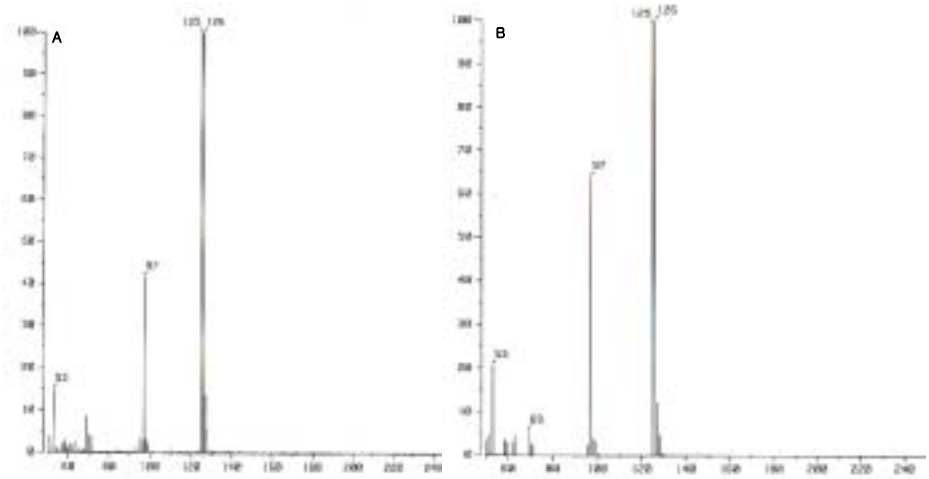


Figure 8. MS spectrum of the 2-formyl-5-methylthiophene. Mass spectrum; A, Figure 6 peak no 4 and B, Standard.

Table 18. Volatile flavor compounds of culture mediums identified by GC-MS

RRT	Compound	Treatment				
		Basal medium[1]	Cys+ rib[2]	PO[3]	PO+cys+rib[4]	PO+cys+rib[5]
0.727	1-Tetradecene	0.187[6]	1.182	0.135	2.719	0.716
0.756	2-Furancarboxaldehyde	0.126	1.988	0.083	7.278	0.805
I.S[7]	Furfuryl alcohol	tr[8]	tr	0.076	12.802	0.042
1.183	2-Formyl-5-methylthiophene	ND[9]	ND	ND	0.175	ND
1.193	3-(1-Ethoxyethoxy)-butanol	tr	0.191	ND	0.215	ND
1.243	1-[13C]-Phenylacetamide	ND	ND	1.075	0.089	1.040
1.298	Dimethylformylthiophene	ND	ND	ND	0.217	tr
1.381	1,2-Benziothiazol-3(2H)-one	ND	0.683	ND	8.026	0.386
1.417	2,6-Di(t-butyl)-4-hydroxy-4-methyl-2,5-cyclohexadien-1-one	ND	0.214	4.886	0.484	3.089
1.501	Thieno[2,3,C]pyridine	ND	0.628	ND	0.710	0.139
1.518	Formanilide	ND	ND	ND	0.530	ND
1.592	1H-4-Methyl-2,3,4,5-tetrahydroben[c]azepino-1-thione	ND	0.473	ND	0.790	0.196

[1] Autoclaved culture medium contained soybean cake, yellow sugar, KH_2PO_4 and $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ in distilled water.
[2] Autoclaved culture medium containing basal medium, Cys (1%) and Rib (2%).
[3] Autoclaved basal medium cultured with PO.
[4] Autoclaved medium cultured with PO in the medium containing basal medium, Cys (1%) and Rib(2%).
[5] Autoclaved medium containing Cys (1%), Rib (2%) and the medium cultured with PO.
[6] Area percent (%) of total volatiles in ether extract appeared on GC chromatogram.
[7] Internal standard for the calculation of RRT; Furfuryl alcohol present inherently in all samples.
[8] Trace.
[9] Not detected.

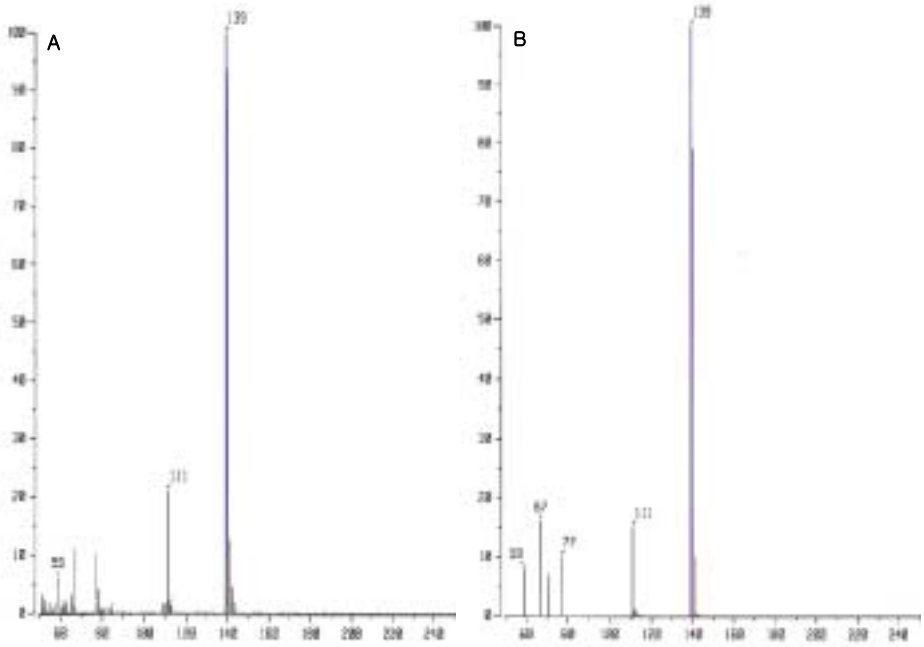


Figure 9. MS spectrum of the dimethylformylthiophene. Mass spectrum; A, Figure 6 peak no 6 and B, Standard.

3) 지방산

Table 19에서는 **Table 18**에서와 동일한 시료의 지방산 조성을 나타낸 것이다. C13:0, C14:0, C15:0, C16:0, C18:0, C20:0, C20:1,C21:0는 모든 시료에 비슷한 ppm농도로 함유되어 있었다. C15:0는 기본배지와 Cys과 Rib가 첨가된 기본배지에 1.4 ppm이상 함유되어 있었다. C16:1은 Cys과 Rib가 첨가된 액에서 2ppm이상 함유되어 있었다. C18:1은 기본배지에 PO를 배양한 액에서 4.61 ppm, 기본배지에 Cys과 Rib가 첨가된 배지로부터는 2 ppm이상 함유되어 있었다. γ-LN은 Cys과 Rib를 첨가한 기본배지에 6.27 ppm 함유되어 있었다. 기본배지에 Cys과 Rib를 첨가하여 PO를 배양한 배양액으로부터는 4.02 ppm 함유되어 있었다.

Table 19. Compositions of free fatty acids in the various liquid culture medium

Fatty acid	Free fatty acid content (ppm)[1]				
	Basal medium[2]	Cys+rib[3]	PO[4]	PO+cys+rib[5]	PO+cys+rib[6]
C13:0	0.08	0.09	0.07	0.05	0.07
C14:0	0.11	0.08	0.26	0.18	0.31
C15:0	1.40	1.47	0.11	0.04	0.09
C15:1	0.08	0.07	0.01	0.07	0.11
C16:0	0.17	0.11	0.15	0.09	0.19
C16:1	0.96	2.12	1.47	2.18	1.88
C18:0	0.31	0.66	0.56	0.76	0.65
C18:1	0.65	1.98	4.61	2.77	2.26
¥-LN	1.89	6.27	0.52	4.02	1.96
C20:0	0.18	0.54	0.43	0.39	0.16
C20:1	0.06	0.06	0.27	0.03	0.14
C21:0	0.24	0.24	0.29	0.24	0.29

[1]Sample area/Internal standard area×weight of sample (50 g)×10^6; I.S, heptadecanoic acid, 1 ㎎.
[2]Autoclaved culture medium contained soybean cake, yellow sugar, KH_2PO_4 and $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ in distilled water.
[3]Autoclaved culture medium containing basal medium, Cys (1%) and Rib (2%).
[4]Autoclaved basal medium cultured with PO.
[5]Autoclaved medium cultured with PO in the medium containing basal medium, Cys (1%) and Rib (2%).
[6]Autoclaved medium containing Cys (1%), Rib (2%) and the medium cultured with PO.

4) 유리당

Table 20에서는 Table 17에서와 동일한 시료의 유리당 조성을 나타낸 것이다. Fru는 기본배지에 9.73 ppm, PO 배양액에 2.09 ppm, Cys과 Rib가 첨가된 시료에 20 ppm이상 함유되어 있었다. Gal와 Mal는 모든 시료에 비슷한 ppm농도로 함유되어 있었다. Glc는 기본배지에 10.31 ppm, PO 배양액에 0.94 ppm, Cys과 Rib가 첨가된 시료에 24 ppm이상 함유되어 있었다. Rib는 ribose가 첨가된 시료에서만 10 ppm이상 함유되어 있었다. Suc는 기본배지와 PO 배양액에서 100 ppm, Cys과 Rib가 첨가된 시료에 30 ppm 이상 함유되어 있었다.

Table 20. Compositions of free sugars in the various liquid culture medium

Free sugars	Free sugar content (ppm)[1]				
	Basal medium[2]	Cys+rib[3]	PO[4]	PO+cys+rib[5]	PO+cys+rib[6]
Fru	9.73	32.95	2.09	29.54	23.68
Gal	0.74	1.59	0.80	1.20	1.08
Glc	10.31	33.79	0.94	30.32	24.16
Mal	0.91	0.19	1.11	2.14	1.16
Rib	ND[7]	10.65	ND	10.23	10.21
Suc	108.13	38.58	112.76	38.42	51.99

[1]Free sugar cont.(ppm)=(Sample area×Standard 100 ppm)/Standard Area.
[2]Autoclaved culture medium contained soybean cake, yellow sugar, KH_2PO_4 and $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ in distilled water.
[3]Autoclaved culture medium containing basal medium, Cys (1%) and Rib (2%).
[4]Autoclaved basal medium cultured with PO.
[5]Autoclaved medium cultured with PO in the medium containing basal medium, Cys (1%) and Rib (2%).
[6]Autoclaved medium containing Cys (1%), Rib (2%) and the medium cultured with PO.
[7]Not detected.

5) 유기산

Table 21에서는 Table 17에서 사용한 시료의 유기산 조성을 나타낸 것이다. Ascorbic acid는 기본배지에서 1.92 ppm, PO 배양액에서 2.69 ppm 함유되어 있었다. Benzoic acid, citric acid, isobutyric acid, lactic acid, maleic acid, malic acid는 모든 시료에 함유되어 있었다. Formic acid는 Cys과 Rib가 첨가된 기본배지에 PO를 배양한 배양액에서 27.13 ppm, PO를 배양한 후 배양액에 Cys과 Rib를 첨가하여 가열한 액에서 19.89 ppm 함유되어 있었다. Fumaric acid는 기본배지에 0.41 ppm, Cys과 Rib가 첨가된 기본배지에 0.65 ppm 함유되어 있었다. Malonic acid는 기본배지와 PO 배양액을 제외한 시료에서 9 ppm이상 함유되어 있었다. Oxalic acid는 Cys 과 Rib가 첨가된 기본배지에 PO를 배양한 배양액을 제외한 모든 시료에 함유되어 있었는데, PO 배양한 배양액에 Cys과 Rib를 첨가한 시료에서 38.68 ppm으로 높은 농도로 함유되어 있었다.

Table 21. Compositions of organic acids in the various liquid culture medium

Organic acids	Organic acid content (ppm)[1]				
	Basal medium[2]	Cys+rib[3]	PO[4]	PO+cys+rib[5]	PO+cys+rib[6]
Ascorbic acid	1.92	ND[7]	2.69	ND	ND
Benzoic acid	8.45	6.25	10.54	11.26	6.89
Citric acid	2.27	5.10	2.58	4.27	7.65
Formic acid	ND	ND	ND	27.13	19.89
Fumaric acid	0.41	ND	0.65	ND	ND
Isobutyric acid	2.44	0.21	2.04	0.68	2.54
Lactic acid	6.34	38.13	2.81	82.55	35.28
Maleic acid	0.09	0.65	0.79	0.66	2.16
Malic acid	12.40	173.74	42.59	291.38	251.23
Malonic acid	ND	9.02	ND	13.90	13.44
Oxalic acid	3.80	9.22	19.80	ND	38.68

[1]Organic acid cont.(ppm)=(Sample area×Standard 100 ppm)/Standard Area.
[2]Autoclaved culture medium contained soybean cake, sugar, KH_2PO_4 and $MgSO_4$ in distilled water.
[3]Autoclaved culture medium containing basal medium, Cys (1%) and Rib(2%).
[4]Autoclaved basal medium cultured with PO.
[5]Autoclaved medium cultured with PO in the medium containing basal medium, Cys (1%) and Rib (2%).
[6]Autoclaved medium containing Cys (1%), Rib (2%) and the medium cultured with PO.
[7] Not detected.

6) 유리아미노산

Table 22에서는 Table 17에서 사용한 시료의 유리아미노산 조성을 나타낸 것이다. Phosphoserine, hydroxyproline, threonine, serine, asparagine, glycine, alanine, cituline, valine, methionine, isoleucine, leucine, tyrosine, phenylalaine, ß-aminoisobutyric acid, ornithine, lysine, arginine은 모든 시료에 함유되어 있었다. Glutamic acid는 기본배지에 2.1 ㎍/g,과 PO 배양액에 1.5 ㎍/g이 함유되어 있었다. Cys은 Cys이 첨가된 시료에 45.5, 54.7, 41.0 ㎍/g이 함유되어 있었다.

Table 22. Compositions of amino acids in the various liquid culture medium

Amino acids	Amino acid content (㎍/g)[1]				
	Basal medium[2]	Cys+rib[3]	PO[4]	PO+cys+rib[5]	PO+cys+rib[6]
Phosphoserine	4.4	15.3	4.8	14.8	15.5
Hydroxyproline	7.2	92.7	3.6	55.7	6.1
Threonine	0.5	1.0	0.9	2.5	2.0
Serine	1.8	2.1	0.5	3.8	1.7
Asparagine	2.4	11.5	3.3	3.4	3.8
Glutamic acid	2.1	ND[7]	1.5	ND	ND
Glycine	0.4	0.6	4.4	1.5	0.9
Alanine	1.3	1.7	0.6	4.4	1.7
Cituline	1.9	1.2	2.0	0.6	ND
Valine	1.0	1.6	2.8	2.0	2.5
Cystine	ND	45.5	ND	54.7	41.0
Methionine	1.2	2.2	1.5	2.5	0.6
Isoleucine	0.3	1.5	3.0	2.8	3.2
Leucine	3.7	4.8	5.8	8.8	2.0
Tyrosine	5.0	5.1	2.2	6.2	5.3
Phenylalaine	2.5	3.6	1.5	4.2	3.4
ß-Aminoisobutyric acid	3.5	0.9	4.8	1.2	2.3
Ornithine	2.5	0.5	5.1	0.9	0.8
Lysine	2.6	3.3	2.8	4.5	1.5
Arginine	3.1	4.6	2.9	5.3	1.7

[1] Amino acid cont.(㎍/g)=Area×10×M.W×Dilution/1,000,000.
[2] Autoclaved culture medium contained soybean cake, sugar, KH_2PO_4 and $MgSO_4$ in distilled water.
[3] Autoclaved culture medium containing basal medium, Cys(1%) and Rib(2%).
[4] Autoclaved basal medium cultured with PO.
[5] Autoclaved medium cultured with PO in the medium containing basal medium, Cys (1%) and Rib.
[6] Autoclaved medium containing Cys (1%), Rib (2%) and the medium cultured with PO.
[7] Not detected.

바. MF의 독성검사

상기 MF의 최적 생성조건에서 생산한 MF는 식용으로 사용되고 있는 PO 버섯(느타리버섯)을 Cys과 Rib가 함유된 배지에서 배양한 다음 가열하여 생산하였다. 이 MF는 모두 식용 가능한 원료로부터 생산하였지만, 배양과정에서 또는 가열에 의해 생성되는 물질의 독성을 의심하여 급성독성과 아 급성 독성 및 혈액 중 변화될 것이라 생각되는 생화학적인 인자의 변화를 측정하였다.

1) 급성독성실험

가) 사망 및 임상증상 관찰

시료를 농도별 (0, 15, 21.3, 30, 42.3, 60 ㎕/30g mouse body weight)로 ICR 암수 각 5마리에 경구투여 하여 급성독성시험을 수행하면서 7일간 사망수를 조사하였고 (**Table 23**), 또한 여러 가지 임상학적인 변화를 관찰하였다 (**Table 24**). 투여 당일부터 7일 동안 사망한 동물은 암수 모두에서 없었다. 임상증상 관찰에서는 시료 투여 직후 암수는 약간의 행동저하 증상을 보였으나, 투여당일 6시간 관찰한 결과 점차적으로 행동이 정상적으로 회복되었다. 이 결과는 시료 MF가 경구 급성독성실험에서 아무런 독성을 보이지 않았다는 것을 의미한다.

Table 23. Mortality of mice treated orally with MF for 7 days

Sex	Dosage (㎕/30 g)	Days after treatment								Final mortality
		0	1	2	3	4	5	6	7	
Male	0	0/5[1)]	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
	15	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
	21.3	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
	30	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
	42.3	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
	60	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
Female	0	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
	15	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
	21.3	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
	30	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
	42.3	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
	60	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5

[1)]Values are expressed as animal numbers (cumulative mortality number of mouses/total number of mouses).

Table 24. Clinical signs in mice treated, orally with MF for 7 days[1)]

Sex	Dosage (㎕/30 g)	Clinical sign	Duration (days)							
			0	1	2	3	4	5	6	7
Male	0	NAD[2)]	5	5	5	5	5	5	5	5
	15	NAD[3)]	5	5	5	5	5	5	5	5
		DMA	5	5	5	5	5	5	5	5
	21.3	NAD	5	5	5	5	5	5	5	5
		DMA	5	5	5	5	5	5	5	5
	30	NAD	5	5	5	5	5	5	5	5
		DMA	5	5	5	5	5	5	5	5
	42.3	NAD	5	5	5	5	5	5	5	5
		DMA	5	5	5	5	5	5	5	5
	60	NAD	5	5	5	5	5	5	5	5
		DMA	5	5	5	5	5	5	5	5
Female	0	NAD	5	5	5	5	5	5	5	5
	15	NAD	5	5	5	5	5	5	5	5
		DMA	5	5	5	5	5	5	5	5
	21.3	NAD	5	5	5	5	5	5	5	5
		DMA	5	5	5	5	5	5	5	5
	30	NAD	5	5	5	5	5	5	5	5
		DMA	5	5	5	5	5	5	5	5
	42.3	NAD	5	5	5	5	5	5	5	5
		DMA	5	5	5	5	5	5	5	5
	60	NAD	5	5	5	5	5	5	5	5
		DMA	5	5	5	5	5	5	5	5

[1)]5 mice were used in all treatments.
[2)]NAD: not abnormalities detected.
[3)]DMA: decrease of motor activity.

나) 체중측정

시료를 농도별(0, 15, 21.3, 20, 42.3, 60 ㎕/30 g mouse body weight)로 ICR 암수 각 5마리에 경구투여 하여 급성독성시험을 수행하면서 7일간 몸무게의 변화를 측정하였다 (**Table 25**). 투여 후 7일 동안 증가한 몸무게는 수컷에서 대조구에 비해 증가하였지만 유의성은 없었다. 즉 대조구는 2.9 g이 증가하였고, 처리농도 15, 21.3, 20, 42.3, 60 mg에 따라 각각 3.6, 4.2, 3.7, 3.7, 3.4 g이 증가하여 21.3 mg 처리농도에서 몸무게가 가장 많이 증가하였다. 또한 암컷에서도 대조구에 비해 증가하였지만 유의성은 없었다. 즉 대조구는 1.9 g이 증가하였고, 처리농도에 따라 각각 2.5, 2.3, 2.1, 1.7, 1.0 g이 증가하여 15 mg 처리농도에서 몸무게가 가장 많이 증가하였고, 42.3과 60 mg 처리구에서 몸무게의 증가가 대조구보다 다소 낮았다.

따라서 이 MF는 ICR mouse 암수의 체중을 감소시키지 않고 오히려 수컷에서는 증가시키는 경향이 있었다.

Table 25. Body weights in mice treated orally with MF for 7 days[1)]

Sex	Dosage (㎕/30 g)	Days after treatment			
		0	4	7	Gain
Male	0	33.2±1.0[2)]	34.9±1.3	36.1±1.6	2.9
	15	32.1±1.3	33.6±1.2	35.7±1.6	3.6[3)a]
	21.3	31.7±1.6	33.5±1.6	35.8±1.4	4.2[a]
	30	32.9±1.0	34.7±0.9	36.6±0.8	3.7[a]
	42.3	32.9±1.0	34.7±1.3	36.6±1.7	3.7[a]
	60	31.9±1.2	33.5±1.3	35.3±1.3	3.4[a]
Female	0	26.2±1.1	27.5±1.3	28.1±1.2	1.9
	15	26.9±1.0	28.0±0.8	29.4±0.9	2.5[a]
	21.3	23.1±0.8	24.3±1.2	25.3±0.8	2.3[a]
	30	26.6±0.8	27.9±0.9	28.7±1.6	2.1[a]
	42.3	23.1±1.0	24.7±1.7	24.8±0.4	1.7[a]
	60	26.7±0.8	28.0±1.6	29.1±1.2	1.0[a]

[1)]5 mice were used in all treatments
[2)]Mean ± SD.
[3)]No significantly different from control at $p<0.05$ by t-test.

다) 육안적 해부소견

시료를 농도별 (0, 15, 21.3, 30, 42.3, 60 ㎕/30 g mouse body weight)로 ICR 암수 각 5마리에 경구투여 하여 급성독성시험을 수행하면서 장기(cecum, intestine, stomach, adr. gland, brain, heart, liver, kidney, spleen, testis, thymus)의 정상/이상 증상을 육안적으로 조사하였다 (**Table 26, 27**). 시료 투여 후 7일 후 장기를 적출하여 유착, 확장, 종대를 조사한 결과 아무런 이상적인 증상은 관찰되지 않았다.

따라서 이 MF는 ICR mouse 장기의 유착이나, 확장 및 종대 등에는 암수의 체중을 감소시키지 않고 오히려 수컷에서는 증가시키는 경향이 있었다.

Table 26. Gross findings in male mice treated orally with MF for 7 days

Organ	Clinical sign	Dosage (㎕/30 g)					
		0	15	21.3	30	42.3	60
Organ	Adhesion	–	–	–	–	–	–
	NGF[1)]	5(100%)[2)]	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)
Cecum	Enlargement	–	–	–	–	–	–
	NGF	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)
Intestine	Enlargement	–	–	–	–	–	–
	NGF	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)
Stomach	Enlargement	–	–	–	–	–	–
	NGF	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)
Adr. gland	Enlargement	–	–	–	–	–	–
	NGF	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)
Brain	Enlargement	–	–	–	–	–	–
	NGF	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)
Heart	Enlargement	–	–	–	–	–	–
	NGF	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)
Liver	Enlargement	–	–	–	–	–	–
	NGF	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)
Kidney	Enlargement	–	–	–	–	–	–
	NGF	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)
Spleen	Enlargement	–	–	–	–	–	–
	NGF	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)
Testis	Enlargement	–	–	–	–	–	–
	NGF	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)
Thymus	Enlargement	–	–	–	–	–	–
	NGF	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)

[1)]NGF: No gross finding. [2)]( ) : % of finding from animal number 5.

Table 27. Gross findings in female mice treated orally with MF for 7 days

Organ	Clinical sign	Dosage (㎕/30 g)					
		0	15	21.3	30	42.3	60
Organ	Adhesion	-	-	-	-	-	-
	NGF[1)]	5(100%)[2)]	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)
Cecum	Enlargement	-	-	-	-	-	-
	NGF	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)
Intestine	Enlargement	-	-	-	-	-	-
	NGF	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)
Stomach	Enlargement	-	-	-	-	-	-
	NGF	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)
Adr. gland	Enlargement	-	-	-	-	-	-
	NGF	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)
Brain	Enlargement	-	-	-	-	-	-
	NGF	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)
Heart	Enlargement	-	-	-	-	-	-
	NGF	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)
Liver	Enlargement	-	-	-	-	-	-
	NGF	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)
Kidney	Enlargement	-	-	-	-	-	-
	NGF	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)
Spleen	Enlargement	-	-	-	-	-	-
	NGF	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)
Testis	Enlargement	-	-	-	-	-	-
	NGF	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)
Thymus	Enlargement	-	-	-	-	-	-
	NGF	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)

[1)]NGF: No gross finding. [2)]( ) : % of finding from animal number 5.

라) 혈액학적 검사

시료를 농도별 (0, 15, 21.3, 30, 42.3, 60 ㎕/30 g mouse body weight)로 ICR 암수 각 5마리에 경구투여 하여 급성독성시험을 수행하면서 7일 후에 혈액중의 WBC, RBC, Hb, Hct, BLP, MCV, MCH, MCHC를 측정하였다 (**Table 28**). 수컷에서 대조구에 비해 42.3 mg까지 RBC, Hb, Hct 및 BLP가 증가하였다. 또한 암컷에서도 RBC, Hb, Hct, 및 BLP가 증가하였다.

따라서 이 MF는 mouse의 암수 혈액학적인 인자에 영향을 미치지 않는 것으로 확인되었다.

Table 28. Hematological findings in mice treated orally with MF for 7 days

Item[1)]	Male (㎍/30 g)						Female (㎍/30 g)					
	0	15	21.3	30	42.3	60	0	15	21.3	30	42.3	60
WBC ($\times 10^6/\mu\ell$)	9.4	11	8.3	8.3	8.6	6	1.3	0.5	0.5	1.2	0.4	0.1
RBC ($\times 10^3/\mu\ell$)	7.6	7.6	9.7	11.3	11.7	7.7	8.1	6.4	8.4	8.0	8.9	8.1
Hb (g/dℓ)	13.8	14.2	17	20.1	21	14.6	15.2	13.3	16.0	16.0	16.3	15.7
Hct (%)	38.4	40.3	48.8	59	60.6	39.6	40.8	31.9	43.2	42.6	44	40.1
BLP ($\times 10^3/\mu\ell$)	1281	1175	1560	1511	1451	1288	769	1142	1105	1147	1125	987
MCV	51	53	50	52	52	52	51	50	51	53	50	50
MCH	18.1	18.6	17.5	17.8	17.9	19	18.9	20.9	19	20	18.4	19.5
MCHC	3.8	35.1	34.8	34.1	34.6	36.8	37.2	41.6	37	37	37	39.3

[1)]WBC; white blood cell, RBC; red blood cell, Hb; hemoglobin, Hct; hematocrit, BLP; blood platelet, MCV; mean corpuscular volume, MCH; mean corpuscular hemoglobin, MCHC; mean corpuscular hemoglobin concentration.

5) 혈액 생화학적 검사

시료를 농도별(0, 15, 21.3, 30, 42.3, 60 ㎕/30 g mouse body weight)로 ICR 암수 각 5마리에 경구투여 하여 아급성 독성시험을 7일 후에 혈액중의 lactic dehydrogenase, aspartate aminotransferase, alanine aminotransferase, alkaline phosphatase, creatine phosphate kinase의 활성과 total protein, albumin, glucose, cholesterol, triglyceride, creatinine, blood urea nitrogen, calcium, phosphorus, uric acid의 함량을 측정하였다 (**Table 29, 30**). 수컷에서는 대조구에 비해 처리구에서 lactic dehydrogenase, creatine phosphate kinase, gamma-glutamyl transferase의 활성이 감소되었고, glucose함량도 낮아졌지만 alanine aminotransferase의 활성은 다소 높아졌고 지방대사와 관련되는 cholesterol과 triglyceride함량과는 관계가 없었다 (**Table 29**). 또한 암컷에서는 거의 모든 인자가 처리에 의해 영향을 받지 않았다 (**Table 30**).

Table 29. Biochemical findings in male mice treated orally with MF for 7 days

Item[1)]	Dosage (㎕/30 g)					
	0	15	21.3	30	42.3	60
TPROT (g/dℓ)	5.3	5.6	5.7	5.8	5.8	5.8
ALB (g/dℓ)	3.1	3.2	3.4	3.5	3.4	3.6
LDH (U/L)	1,392	354	504	552	594	444
AST (U/L)	67.9	78.9	104	79.6	63.3	103
ALT (U/L)	22.8	27.7	36.6	31.1	25.7	34.9
ALP (U/L)	90	80	110	117	127	104
GLU (mg/dℓ)	186	181	195	232	211	191
CHOL (mg/dℓ)	182	197	200	229	232	181
TRIG (mg/dℓ)	176	319	301	255	343	244
CREAT(mg/dℓ)	0.4	0.4	0.3	0.3	0.4	0.4
BUN (mg/dℓ)	24.3	29.2	25.6	25.2	23.7	29.6
CPK (U/L)	5772	450	757	522	879	468
Ca (mg/dℓ)	16.9	16.6	16.5	16.7	16.7	15.8
P (mg/dℓ)	13	14.7	13.3	13.6	13.6	13
GGT (U/L)	6	0	0	2	1	6
Uric acid (mg/dℓ)	4.8	4.2	3	3	3	4.2

[1)]TPROT; total protein, ALB; albumin, LDH; Lactic dehydrogenase, AST; aspartate aminotransferase, ALT; alanine aminotransferase, ALP; alkaline phosphatase, GLU; glucose, CHOL; cholesterol, TRIG; triglyceride, CREAT; creatinine, BUN; blood urea nitrogen, CPK; Creatine phosphate kinase, Ca; calcium, P; phosphorus, GGT; gamma-glutamyl transferase.

Table 30. Biochemical findings in female mice treated orally with MF for 7 days

Item[1)]	Dosage (㎕/30 g)					
	0	15	21.3	30	42.3	60
TPROT (g/dℓ)	5.4	6	6	6	6.6	6
ALB (g/dℓ)	3	3	3.6	3.6	3.6	3
LDH (U/L)	443	390	461	388	299	404
AST (U/L)	361	100	152	117	154	109
ALT (U/L)	70.2	25	24.6	19.2	37.8	21
ALP (U/L)	114	138	174	150	150	138
GLU (mg/dℓ)	198	210	222	234	216	288
CHOL (mg/dℓ)	180	168	162	168	120	180
TRIG (mg/dℓ)	54	66	36	42	60	54
CREATIN (mg/dℓ)	0.6	0	0	0	0	0
BUN (mg/dℓ)	26	32	42	38	51	25
CPK (U/L)	201	171	300	204	151	157
Ca (mg/dℓ)	12	10	11	11	12	11
P (mg/dℓ)	13	12	12	12	12	12
GGT (U/L)	1	0	0	1	0	0
Uric acid (mg/dℓ)	2	2	3	2	2	2

[1)]TPROT; total protein, ALB; albumin, LDH; Lactic dehydrogenase, AST; aspartate aminotransferase, ALT; alanine aminotransferase, ALP; alkaline phosphatase, GLU; glucose, CHOL; cholesterol, TRIG; triglyceride, CREAT; creatinine, BUN; blood urea nitrogen, CPK; Creatine phosphate kinase, Ca; calcium, P; phosphorus, GGT; gamma-glutamyl transferase.

2) 아 급성 독성실험

가) 사망 및 임상증상 관찰

시료를 농도별(0, 15, 30, 60 ㎕/30 g mouse body weight)로 ICR 암수 각 10마리에 경구투여 하여 아급성 독성시험을 4주간 수행하면서 mouse 사망수를 조사하였고 (**Table 31**), 여러 가지 임상학적인 변화를 관찰하였다 (**Table 32**). 투여 당일부터 4주 동안 사망한 동물은 암수 모두에서 없었다. 임상증상 관찰에서는 시료 투여 직후 암수는 약간의 행동저하 증상을 보였으나, 곧 회복하여 행동이 정상적으로 회복되었다. 이 결과는 시료 MF가 경구 아급성 독성시험에서 아무런 독성을 보이지 않았다는 것을 의미한다.

Table 31. Mortality of mice treated orally with MF 4 weeks

Sex	Dosage (㎕/30 g)	Week after treatment					Final mortality
		0	1	2	3	4	
Male	0	0/10[1)]	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
	15	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
	30	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
	60	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
Female	0	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
	15	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
	30	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
	60	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10

[1)]Values are expressed as animal numbers: (observed/treated)

Table 32. Clinical signs in mice treated orally with MF for 4 weeks

Sex	Dosage (㎕/30 g)	Clinical signs	Days after treatment											
			0	1	2	3	5	6	7	11	15	19	23	27
Male	0	NAD[1)]	10[2)]	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
	15	NAD	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
	30	NAD	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
	60	NAD	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
Female	0	NAD	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
	15	NAD	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
	30	NAD	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
	60	NAD	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10

[1)]NAD : not abnormalities detected.
[2)]Values are expressed as animal numbers treated.

나) 체중측정

MF 시료를 농도별(0, 15, 30, 60 ㎕/30 g mouse body weight)로 ICR 암수 각 10 마리에 경구투여 하여 아급성 독성시험을 4주간 수행하면서 몸무게의 변화를 측정하였다 (**Table 33**). 투여 후 4주간 증가한 몸무게는 수컷에서 대조구에 비해 증가하였지만 유의성은 없었다. 즉 대조구는 6.1 g이 증가하였고, 처리농도 15, 30, 60 mg에 따라 각각 7.2, 6.4, 8.2 g이 증가하여 60 mg 처리농도에서 몸무게가 가장 많이 증가하였다. 또한 암컷에서도 대조구에 비해 증가하였지만 유의성은 없었다. 즉 대조구는 5.5 g이 증가하였고, 처리농도에 따라 각각 4.4, 6.4, 6.0 g이 증가하여 30 mg 처리농도에서 몸무게가 가장 많이 증가하였다.

따라서 이 MF는 ICR mouse 암수의 체중을 감소시키지 않고 오히려 수컷에서는 증가시키는 경향이 있었다.

Table 33. Body weights in mice treated orally with MF for 4 weeks

Sex	Dosage (㎕/30 g)	Days after treatment									
		0	3	7	10	13	16	19	23	27	Gain
Male	0	33.6 ±1.5[1)]	34.2 ±1.6	36.2 ±1.4	36.0 ±1.5	38.1 ±1.9	38.1 ±2.1	39.1 ±1.9	38.6 ±2.0	39.7 ±2.2	6.1
	15	32.8 ±1.4	34.2 ±2.0	36.1 ±1.7	35.7 ±1.6	37.5 ±1.6	38.3 ±1.6	39.3 ±2.1	39.1 ±1.7	40.2 ±1.8	7.4[2)]
	30	32.7 ±2.1	33.8 ±2.1	35.3 ±2.5	34.5 ±4.0	36.9 ±3.0	36.6 ±2.9	38.6 ±3.0	38.0 ±3.0	38.6 ±3.1	6.2[a]
	60	32.2 ±1.8	34.0 ±2.0	35.6 ±2.3	36.1 ±2.3	37.8 ±2.8	38.1 ±2.8	39.3 ±3.0	39.2 ±2.6	40. 6±2.8	8.4[a]
Female	0	24.7 ±1.2	25.6 ±1.1	27.2 ±1.5	27.0 ±1.7	28.4 ±1.5	28.8 ±1.1	29.3 ±1.3	29.4 ±2.2	30.2 ±2.2	5.5
	15	25.7 ±1.5	26.9 ±1.3	28.3 ±1.4	27.8 ±0.7	28.7 ±1.0	28.8 ±1.5	29.6 ±1.6	29.2 ±1.3	30.0 ±1.4	4.4[a]
	30	25.67 ±1.0	26.7 ±0.9	27.6 ±1.0	27.9 ±1.3	28.3 ±1.5	28.6 ±1.0	30.6 ±2.3	30.6 ±2.5	31.7 ±2.5	6.0[a]
	60	25.4 ±1.4	26.9 ±1.3	28.5 ±1.3	28.2 ±1.4	29.4 ±1.5	29.6 ±1.4	30.5 ±1.5	31.0 ±1.7	32.0 ±2.1	6.6[a]

[1)]Mean ± S.D of 10 mice.
[2)]Average weight difference: 27 day's weight - 0 day's weight.

다) 사료 섭취량 및 물 섭취량

MF 시료를 농도별(0, 15, 30, 60 ㎕/30 g mouse body weight)로 ICR 암수 각 10 마리에 경구투여 하여 아급성 독성시험을 4주간 수행하면서 사료와 물의 섭취량을 측정하였다. 투여 후 4주간 암수 모두 시료 처리농도에 따라 사료섭취량 (**Table 34**)과 물 섭취량 (**Table 35**)은 증가하는 경향이었다. 10마리 mouse이 총 사료 섭취량에서 수컷의 마지막 주 섭취량은 대조구의 118 g에서 농도에 따라 각각 130, 140, 135 g이 었고, 암컷은 103 g에서 156, 105, 150 g으로 증가하였다. 이와 마찬가지로 물의 섭취량도 증가하였다. 따라서 이 MF는 ICR mouse 암수의 사료와 물의 섭취량을 증가시켰다. 이 결과는 몸무게의 증가와 일치하는 경향이었다.

Table 34. Food consumption of mice treated orally with MF for 4 weeks

Sex	Dosage (㎕/30 g)	Days after treatment							
		3	5	10	13	17	20	23	27
Male	0	116[1)]	181	137	173	137	228	102	118
	15	117	168	344	187	128	227	108	130
	30	115	164	323	180	111	234	101	140
	60	120	172	129	187	123	239	11	135
Female	0	98	142	117	133	102	174	69	103
	15	101	136	177	132	93	174	65	156
	30	97	133	222	138	93	202	77	105
	60	98	134	97	138	105	190	75	150

[1)]Data expressed as total amount of food consumed by 10 mice.

Table 35. Water consumption of mice treated orally with MF for 4 weeks

Sex	Dosage (㎕/30 g)	Days after treatment							
		3	5	10	13	17	20	23	27
Male	0	170[1)]	220	185	100	210	235	155	140
	15	170	220	185	200	100	165	175	155
	30	165	270	210	150	310	180	180	210
	60	180	240	230	215	285	170	175	250
Female	0	140	200	180	180	225	255	125	130
	15	155	240	170	250	330	200	170	145
	30	155	210	190	240	330	160	170	170
	60	150	230	175	210	330	175	180	180

[1)]Data expressed as total amount of water consumed by 10 mice.

라) 뇨검사

MF 시료를 농도별(0, 15, 30, 60 ㎕/30 g mouse body weight)로 ICR 암수 각 10 마리에 경구투여 하여 아급성 독성시험을 4주간 수행하면서 뇨 중의 여러 가지 이화학적 특성 (pH, Protein, Glucose, Ketone, Urobilinogen, Bilirubin, Leukocyte, Occult blood, Nitrite, Specific Gravity)을 측정하였다 (**Table 36**). 처리 4주 후 암수 모두 뇨 중의 상기 이화학적 특성은 MF 처리에 의해 영향을 받지 않았다.

Table 36. Urinalysis in mice treated orally with MF for 4 weeks[1)]

Item	Range	Male (㎕/30 g)				Female (㎕/30 g)			
		0	15	30	60	0	15	30	60
pH	5	2	1	0	7	0	1	1	3
	6	3	4	6	3	9	5	7	4
	7	1	4	4	0	0	1	0	3
	8	4	1	0	0	1	3	2	0
Protein (㎎/dℓ)	-	2	0	0	0	4	1	0	0
	Tr	4	0	0	0	1	5	2	3
	30	2	1	3	2	2	2	8	3
	100	2	8	5	8	3	1	0	4
	300	0	1	2	0	0	0	0	0
Glucose (㎎/dℓ)	-	7	10	10	10	8	9	7	9
	Tr	3	0	0	0	2	0	3	1
	100	0	0	0	0	0	0	0	0
	250	0	0	0	0	0	0	0	0
	500	0	0	0	0	0	0	0	0
	2,000	0	0	0	0	0	0	0	0
Ketone	-	5	4	1	8	3	1	0	0
	+	5	6	9	2	7	7	8	7
	++	0	0	0	0	0	1	1	3
	+++	0	0	0	0	0	0	1	0
Urobilinogen (㎎/dℓ)	-	0	0	0	0	1	0	0	0
	Normal	3	10	10	10	7	9	8	2
	1	6	0	0	0	2	0	2	8
	4	1	0	0	0	0	0	0	0
	8	0	0	0	0	0	0	0	0
	12	0	0	0	0	0	0	0	0
Bilirubin	-	3	6	8	4	3	4	0	1
	+	7	4	2	2	7	4	7	5
	++	0	0	0	4	1	1	2	4
	+++	0	0	0	0	0	0	1	0
Leukocyte	-	0	5	1	0	3	0	1	0
	+	9	4	8	10	7	7	4	4
	++	1	1	1	0	0	2	5	6
	+++	0	0	0	0	0	0	0	0
Occult blood	-	6	9	9	8	6	3	2	2
	+	0	1	1	1	1	1	2	4
	++	2	0	0	0	2	5	4	1
	+++	2	0	0	1	1	1	2	2
Nitrite	-	1	0	0	2	2	0	1	0
	Post-weak	9	10	10	8	8	9	9	10
	Post-Strong	0	0	0	0	0	0	0	0
Specific Gravity	1.000	2	0	0	2	0	1	2	0
	1.015	3	0	0	1	3	3	4	5
	1.020	1	3	1	0	2	2	3	2
	1.025	3	4	3	4	3	3	0	3
	1.030	1	3	6	3	2	0	1	0

[1)]Measured 4 weeks after treatment.

마) 혈액학적 검사

시료를 농도별 (0, 15, 30, 60 ㎕/30 g mouse body weight)로 ICR 암수 각 10 마리에 경구투여 하여 아성독성시험을 4주간 수행하면서 혈액중의 WBC, RBC, Hb, Hct, BLP, MCV, MCH, MCHC를 측정하였다 (**Table 37**). 암수 모두 MF의 처리에 의해 상기 조사항목에 영향을 미치지 않았다.

Table 37. Hematological findings in mice treated orally with MF for 4 weeks[1)]

Item[2)]	Male (㎕/30 g)				Female (㎕/30 g)			
	0	15	30	60	0	15	30	60
WBC ($\times 10^6$/㎕)	7.2	7.5	11.2	9.6	7.4	6.1	8.8	8.6
RBC ($\times 10^3$/㎕)	8.97	8.81	8.56	8.36	8.95	9.21	8.95	9.52
Hb (g/dℓ)	15.2	15.5	15.1	14.2	15.3	16	15.4	16
Hct (%)	46.3	44.5	43.5	41.2	46.7	49.3	46.2	48.7
BLP ($\times 10^3$/㎕)	1249	1441	1468	1480	923	1072	1020	969
MCV	52	51	51	49	52	54	52	51
MCH	16.9	17.6	17.6	17	17	17.4	17.3	16.8
MCHC	32.8	34.8	34.6	34.6	32.6	31.4	33.4	32.9

[1)]Measured in samples from 4 weeks after treatment.
[2)]WBC; white blood cell, RBC; red blood cell, Hb; hemoglobin, Hct; hematocrit, BLP; blood platelet, MCV; mean corpuscular volume, MCH; mean corpuscular hemoglobin, MCHC; mean corpuscular hemoglobin concentration.

바) 혈액생화학적 검사

MF 시료를 농도별 (0, 15, 30, 60 ㎕/30 g mouse body weight)로 ICR 암수 각 10 마리에 경구투여 하여 아성독성시험을 4주간 수행하면서 처리 4주 후의 혈액 중 lactic dehydrogenase, aspartate aminotransferase, alanine aminotransferase, alkaline phosphatase, creatine phosphate kinase, gamma-glutamyl transferase의 활성과 total protein, albumin, glucose, cholesterol, triglyceride, creatinine, blood urea nitrogen, calcium, phosphorus, uric acid의 함량을 측정하였다 (**Table 38, 39**). 수컷에서는 대조구에 비해 처리구에서 aspartate aminotransferase, alanine aminotransferase, creatine phosphate kinase의 활성이 증가하였고, glucose의 함량은 낮아졌고 그 외 항목은 영향을 받지 않았다 (**Table 38**). 암컷에서는 거의 모든 항목이 영향을 받지 않았다 (**Table 39**).

Table 38. Biochemical findings in male mice treated orally with MF for 4 weeks[1)]

Item[2)]	Dosage (㎕/30 g)			
	0	10	30	60
TPROT (g/dℓ)	5.7	5.5	5.5	5.3
ALB (g/dℓ)	3.1	3.5	3.6	3.2
LDH (U/L)	929	788	926	908
AST (U/L)	95.1	110	133	108
ALT (U/L)	32	39	52	39
ALP (U/L)	53	65	58	59
GLU (mg/dℓ)	148	137	103	90
CHOL (mg/dℓ)	190	192	175	178
TRIG (mg/dℓ)	146	110	138	126
CREATIN (mg/dℓ)	0.4	0.4	0.4	0.4
BUN (mg/dℓ)	26.2	30.7	24.5	29.2
CPK (U/L)	323	526	573	409
Ca (mg/dℓ)	14.6	14	14.1	14.3
P (mmol/ℓ	14.7	13.4	13.1	12.5
GGT (U/L)	0	0	1	1
Uric acid (mg/dℓ)	3.8	3.2	3.4	3

[1)]Measured in samples collected from 10 mice 4 weeks after treatment.
[2)]TPROT; total protein, ALB; albumin, LDH; Lactic dehydrogenase, AST; aspartate aminotransferase, ALT; alanine aminotransferase, ALP; alkaline phosphatase, GLU; glucose, CHOL; cholesterol, TRIG; triglyceride, CREAT; creatinine, BUN; blood urea nitrogen, CPK; Creatine phosphate kinase, Ca; calcium, P; phosphorus, GGT; gamma-glutamyl transferase.

Table 39. Biochemical findings in female mice treated orally with MF for 4 weeks[1)]

Item[2)]	Dosage (㎕/30 g)			
	0	15	30	60
TPROT (g/d ℓ)	5.8	6	6	6
ALB (g/d ℓ)	4.4	3.5	3.6	3.7
LDH (U/L)	869	871	963	934
AST (U/L)	129	126	116	122
ALT (U/L)	32	40	31	33
ALP (U/L)	114	128	110	110
GLU (mg/d ℓ)	139	88	82	128
CHOL (mg/d ℓ)	140	154	155	170
TRIG (mg/d ℓ)	130	133	134	153
CREATININ (mg/d ℓ)	0.5	0.5	0.5	0.5
BUN (mg/d ℓ)	22.19	10.2	19.7	21.8
CPK (U/L)	559	497	446	453
Ca (mg/d ℓ)	14	14.9	14.8	15.5
P (mg/d ℓ)	16.7	15.9	17	16
GGT (U/L)	1	1	1	1
Uric acid (mg/d ℓ)	3	2.9	3	3.3

[1)]Measured in samples collected from 10 mice 4 weeks after treatment.
[2)]TPROT; total protein, ALB; albumin, LDH; Lactic dehydrogenase, AST; aspartate aminotransferase, ALT; alanine aminotransferase, ALP; alkaline phosphatase, GLU; glucose, CHOL; cholesterol, TRIG; triglyceride, CREAT; creatinine, BUN; blood urea nitrogen, CPK; Creatine phosphate kinase, Ca; calcium, P; phosphorus, GGT; gamma-glutamyl transferase.

사) 육안적 부검소견

MF 시료를 농도별 (0, 15, 30, 60 ㎕/30 g mouse body weight)로 ICR 암수 각 10 마리에 경구투여 하여 아성독성시험을 4주간 수행하면서 장기(간, 위, 지라, 콩팥, 허파)의 정상/이상 증상을 육안적으로 조사하였다 (**Table 40, 41**). 시료 투여 후 4주 후 장기를 적출하여 이상 유무를 조사한 결과 암수 모두에서 아무런 이상적인 증상은 관찰되지 않았다.

따라서 이 MF는 4주간의 아급성 독성시험에서 ICR mouse 장기의 육안적 소견에 아무런 영향을 미치지 않았다.

Table 40. Gross finding in mice treated orally with MF for 4 weeks

Organ		Male				Female			
		0	15	30	60	0	15	30	60
Liver	NGF[1)]	10[2)] (100%)	10 (100%)	10 (100%)	10 (100%)	10 (100%)	10 (100%)	10 (100%)	10 (100%)
Stomach	NGF	10 (100%)	10 (100%)	10 (100%)	10 (100%)	10 (100%)	10 (100%)	10 (100%)	10 (100%)
Spleen	NGF	10 (100%)	10 (100%)	10 (100%)	10 (100%)	10 (100%)	10 (100%)	10 (100%)	10 (100%)
Kidney	NGF	10 (100%)	10 (100%)	10 (100%)	10 (100%)	10 (100%)	10 (100%)	10 (100%)	10 (100%)
Lung	NGF	10 (100%)	10 (100%)	10 (100%)	10 (100%)	10 (100%)	10 (100%)	10 (100%)	10 (100%)

[1)]NGF: No gross finding.
[2)]Values are expressed as animal numbers. ( ): % of finding.

아) 장기중량측정

MF 시료를 농도별(0, 15, 30, 60 ㎕/30 g mouse body weight)로 ICR 암수 각 10 마리에 경구투여 하여 아성독성시험을 4주간 수행하면서 처리 4주 후의 장기(간, 위, 지라, 콩팥, 허파)의 무게를 측정하였다 (**Table 41, 42**). 수컷과 암컷의 간, 위, 지라 및 왼·오른쪽 콩팥의 무게에는 아무런 영향을 미치지 않았다.

Table 41. Organ weights in male mice treated orally with MF for 4 weeks

Organ	Dosage (㎕/30 g)			
	0	15	30	60
Liver	2.06±0.23[1)]	1.79±0.17	1.82±0.18	1.78±0.23
Stomach	0.43±0.13	0.43±0.04	0.50±0.09	0.55±0.09
Spleen	0.16±0.03	0.14±0.03	0.19±0.05	0.18±0.05
Kidney L.	0.34±0.05	0.31±0.06	0.30±0.06	0.31±0.06
Kidney R.	0.33±0.05	0.30±0.06	0.30±0.06	0.30±0.06
Lung	0.25±0.03	0.24±0.06	0.49±0.71	0.28±0.02

[1)]Mean ± SD of 10 mice 4 weeks after treatment.

Table 42. Organ weights in female mice treated orally with MF for 4 weeks

Organ	Dosage (㎕/30 g)			
	0	15	30	60
Liver	1.32±0.19[1)]	1.29±0.17	1.34±0.18	1.44±0.12
Stomach	0.44±0.11	0.42±0.07	0.43±0.06	0.55±0.10
Spleen	0.12±0.04	0.11±0.03	0.12±0.02	0.14±0.03
Kidney L.	0.19±0.04	0.20±0.05	0.20±0.04	0.20±0.03
Kidney R.	0.19±0.04	0.19±0.05	0.20±0.04	0.20±0.03
Lung	0.19±0.02	0.19±0.01	0.20±0.01	1.44±0.12

[1)]Mean ± SD of 10 mice 4 weeks after treatment..

자) 조직병리 검사

MF 시료를 농도별 (0, 15, 30, 60 ㎕/30 g mouse body weight)로 ICR 암수 각 10 마리에 경구투여 하여 아성독성시험을 4주간 수행하면서 Adrenal gland의 Subcellular cell hyperplasia, Accessory adrenal, Hyperplasia 및 Cortical cell; Heart의 Hyperplasia, Mesenterical cell, 및 Peritoneum; Liver의 Chronic inflammation, Hepatocellular hypertrophy, Centrilobule, Hyperplasia, Mesothelial cell, 및 Peritoneum; Kidney의 Hyperplasia, Transitional cell, Pelvis, Protein cast, Infiltration, 및 LC. interstitium; Spleen의 Hyperplasia, Mesothelial cell, Peritoneum, Extramedullary hematopoiesis 및 Congestion을 조사하였고, Brain, Pituitary gland, Testis, Prostate, Ovary, Thymus의 병리학적인 검사를 하였다 (**Table 43**). 시료 투여 후 4주 후 장기를 적출하여 병리학적인 검사를 한 결과 암수 모두에서 아무런 이상적인 증상은 관찰되지 않았다. 따라서 이 MF는 4주간의 아급성 독성시험에서 ICR mouse 장기의 병리 조직학적 측면에서 독성으로 의심되는 변화가 관찰되지 않았다.

Table 43. Histopathologic incidence in mice treated orally with MF for 4 weeks

Item examined	Male (㎕/30 g)		Female (㎕/30 g)	
	0	60	0	60
Adrenal gland[1)]	n.f. *	n.f.	n.f.	n.f.
Brain	n.f.	n.f.	n.f.	n.f.
Pituitary gland	n.f.	n.f.	n.f.	n.f.
Heart[2)]	n.f.	n.f.	n.f.	n.f.
Liver[3)]	n.f.	n.f.	n.f.	n.f.
Kidney[4)]	n.f.	n.f.	n.f.	n.f.
Spleen[5)]	n.f.	n.f.	n.f.	n.f.
Testis	n.f.	n.f.		
Prostate	n.f.	n.f.		
Ovary			n.f.	n.f.
Thymus	n.f.	n.f.	n.f.	n.f.

[1)]Subcapsular cell hyperplasia, Accessory adrenal, Hyperplasia, Cortical cell
[2)]Hyperplasia, Mesothelial cell, Peritoneum, Chronic inflammation
[3)]Hepatocellular hypertrophy, Centrilobule, Hyperplasia, Mesothelial cell, Peritoneum
[4)]Hyperplasia, Transitional cell, Pelvis, Protein cast, Infiltration, LC. interstitium
[5)]Hyperplasia, Mesothelial cell, Peritoneum, Extramedullary hematopoiesis, Congestion
[6)]n.f.: no finding.

마. MF-WONF제조

1) MF-WONF 제조

Chicken, beef, pork fats을 여러 가지 온도별로 가열하고 rendering하면서 meat 향을 농도 별로 (0, 0.1, 0.5, 1.0, 5.0, 10 v/v)첨가하여 제조하였다 (**Figure 1**).

2) 관능검사

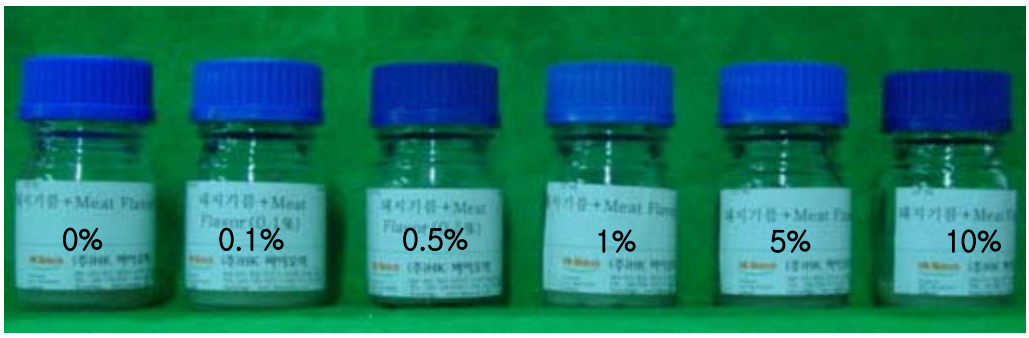
MF-WONF를 제조하여 관능검사를 수행한 결과를 **Table 44**에 나타내었다. MF 향의 농도가 높아질수록 돼지기름, 닭기름, 쇠고기 기름 모두 각각 특유의 off-flavor는 없어지고 달콤하고, 고소한 향이 강해졌다. 그러나 10%에서는 각각의 특유의 species-specific flavor는 없어지고, meat flavor가 나타내는 향이 강해졌으므로, 고유의 향을 살리면서 meat flavor를 강화시키기 위해서는 1%와 5%의 MF를 가하여 제조한 MF-WONF가 가장 양호하였다 (**Figure 3**).

Table 44. Sensory analysis of meat WONF

Concentration (%)[1)]	Flavor description		
	pork fat	Chicken fat	Beef tallow
0[2)]	-Lard flavor	- Greeny chicken flavor	-Beef smell
0.1	-No lard smell -Sweety and roasty	-Chicken meaty, sweety and roasty	-Reduced unpleasant flavor
0.5	-Strong in sweety and roasty smell	-Fried chicken flavor	-Phenolic flavor
1	-Strong in sweety and roasty	-Sweety and roasted fried chicken flavor	-Phenolic flavor, but weak sweety and roasty
5	-Very strong in sweety and roasty	-Strong roasted flavor	-No phenolic flavor -Sweety and roasty flavor
10	-Very strong in sweety and roasty	-Sweety and strong roasted flavor	-Strong sweety and roasty

[1)]MF prepared from submerged liquid culture of PO in basal medium 1% cys + 2% rib, followed by heating in an autoclave.
[2)]MF was not added.

0% 0.1% 0.5% 1% 5% 10%



0% 0.1% 0.5% 1% 5% 10%

Figure 3. MF-WONF sample of beef (Top panel), pork (Middle panel) and chicken (Bottom panel) flavors.

바. MF의 시제품

MF 시제품에 대한 상세한 제품 설명은 제 5절 산업화에서 상세히 기술되어 있습니다.

Figure 3. Product of MF prepared from the submerged liquid culture of PO.

제 3절 버섯균사체 배양액을 이용한 송이향 생산

1. 연구수행 방법

가. 액체배양물을 이용한 SF (songyee flavor) 제조

1) 기본배지 :
대두 박 10% (w/v), 황백당 2.7% (w/v), KH_2PO_4 0.5% (w/v), $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5% (w/v)를 증류수 225 ㎖에 녹여서 멸균한 다음 사용하였다.

2) 배양조건 :
기본배지에 계피, cinnanic acid, tannin, 솔잎 추출물을 혼합액을 첨가한 배지 (pH 5.5)에 느타리버섯 (PO) 액체균사체 25 ㎖를 접종하여 25℃에서 진탕 (120 rpm)하면서 7일간 배양하였다.

나. SF-WONF (songyee flavor with other natural flavor)

1) 느타리균사체 배양물을 추출한 다음 송이향을 가향.
2) 아가리쿠스 균사체 배양물을 추출한 다음 송이향을 가향.
3) 느타리균사체 배양액에 계피 추출물과 솔잎 추출물을 첨가하여 송이향 WONF를 제조하였다.

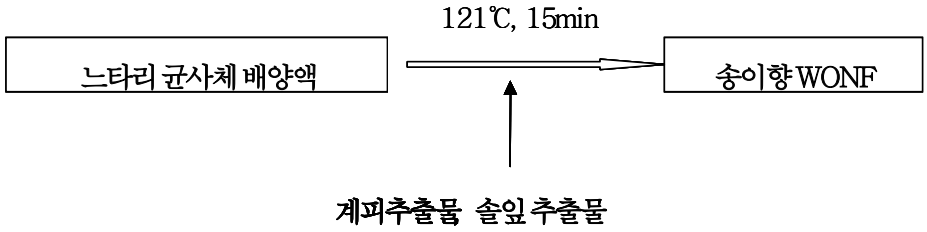


Figure 1. Schematic flow diagrams of the production of WONF of SF.

다. SF의 적용성 조사

1) 음료:

버섯균사체 배양물을 이용한 숙취해소제 (Mush-go plus)에 사용하였을 때 적용성이 매우 좋았으며, 제품화되어 시중에 판매되고 있으며, 특히 일본인들에게 커다란 호응을 얻고있다.

2) 비누:

버섯 글루칸을 이용한 기능성 미용비누에 사용하였을 때 적용성이 매우 좋음.

라. SF의 시제품 생산

SF를 생성하기에 PO균을 사용하여 가장 적합한 배지에서 배양한 다음 살균 및 여과한 후 시제품을 생성하였다.

마. SF의 평가

1) 관능검사:

관능검사는 제3장 2절의 MF 생산에서 사용한 방법을 그대로 적용하였다.

2) 향기 성분 분석:

향기성분의 분석은 제3장 2절의 MF 생산에서 사용한 방법을 그대로 적용하였다.

바. SF의 독성검사

1) 급성 (단회투여) 독성실험

SF의 급성 독성실험 방법은 MF의 급성 독성실험 방법에 준하였다.

2) 아 급성 독성시험

SF의 아 급성 독성실험 방법은 MF의 아 급성 독성실험 방법에 준하였다.

2. 연구수행 내용 및 결과

가. 액체배양액을 이용한 SF 제조

기본배지 (대두박 10%, 황백당 2.7%, KH_2PO_4 0.5%, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5%)에 계피추출물과 솔잎추출물의 혼합액 (1:1, v/v)을 첨가한 배지 (pH 5.5)에 PO 균사체 25 ㎖접종하여 25℃에서 7~60일간 진탕(120 rpm) 배양하여 SF를 제조하였다.

나. SF 평가

1) 관능검사

PO 버섯균사체를 접종한 배양액 (기본배지 + 계피추출물 5% + 솔잎추출물 5%)을 7, 15, 30, 60일간 배양한 결과 계피 추출물 첨가구에서 배양 기간이 길수록 강한 송이향을 생성하였다.

2) 향기 성분 분석

송이향이 가장 강하게 생성된 배지로부터 추출된 향기성분의 GC chromatogram은 **Figure 2-13과 Table 1**에서 보는 바와 같이 methyl cinnamate와 3-octene-ol과 같은 화합물이 동정되었다.

가) GC chromatogram

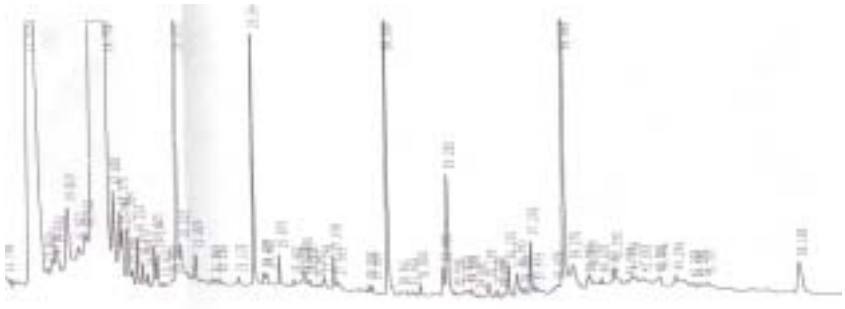


Figure 2. GC chromatography of volatile flavor compound isolated from the liquid medium cultured with PO for the production of SF.

나) GC-MS spectra

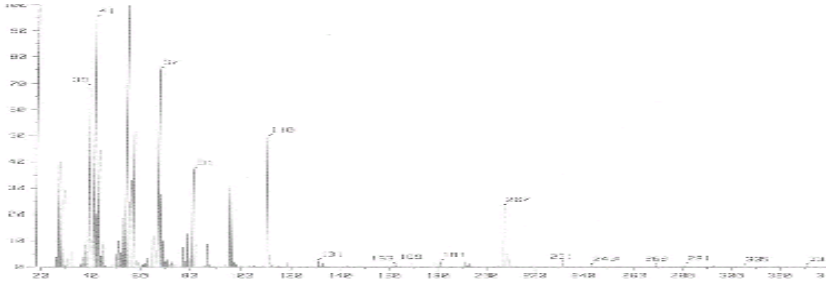


Figure 3. GC-MS spectra of 3-octen-2-ol identified from SF.

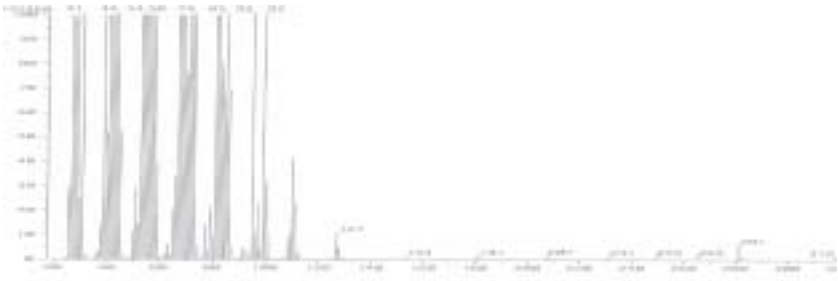


Figure 4. GC-MS spectra of 3-octanol identified from SF.

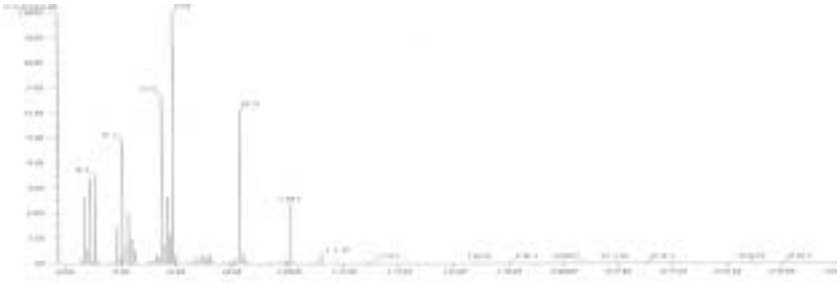


Figure 5. GC-MS spectra of 4-hepten-3-one, 5-methyl identified from SF.

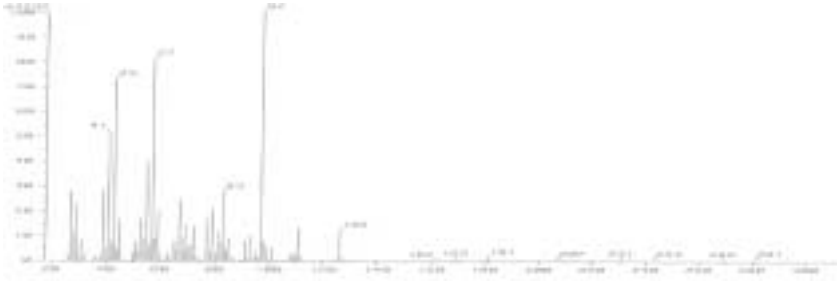


Figure 6. GC-MS spectra of 1-octen-3-ol identified from SF.

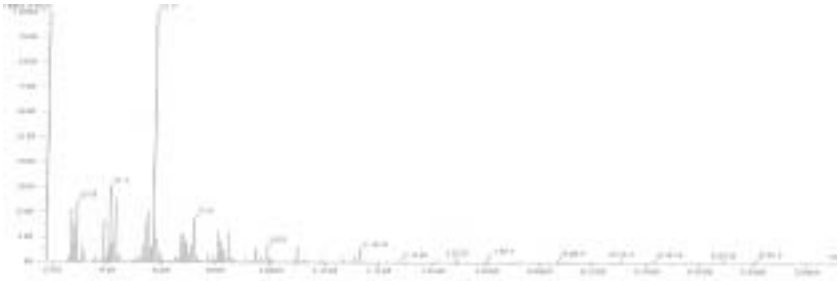


Figure 7. GC-MS spectra of 2-octenal identified from SF.

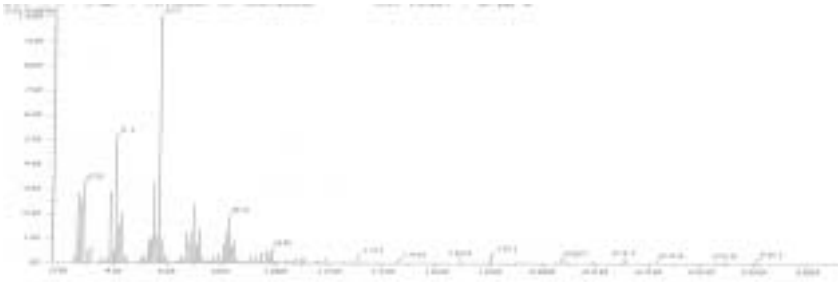


Figure 8. GC-MS spectra of 2-octen-1-ol identified from SF.

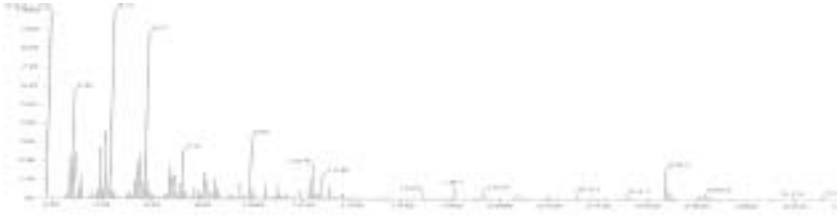


Figure 9. GC-MS spectra of 3-octanone identified from SF.

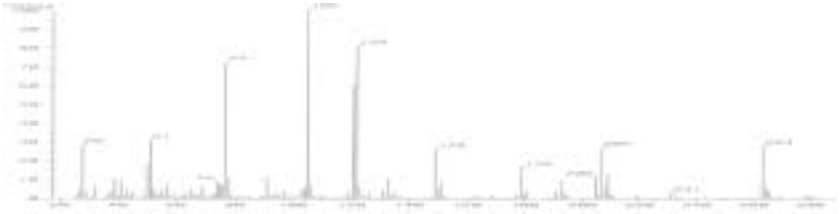


Figure 10. GC-MS spectra of 2-propenoic acid, 3-phenyl, methyl ester from SF.

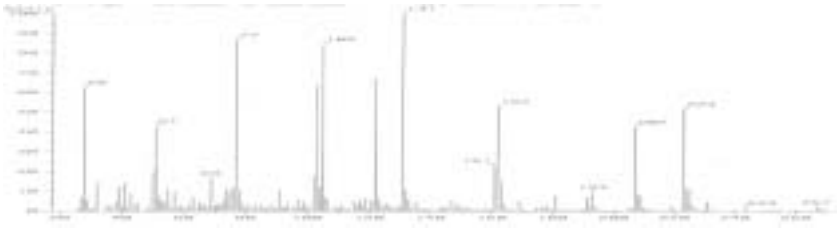


Figure 11. GC-MS spectra of 1-butanone, 2-methyl-1-phenyl identified from SF.

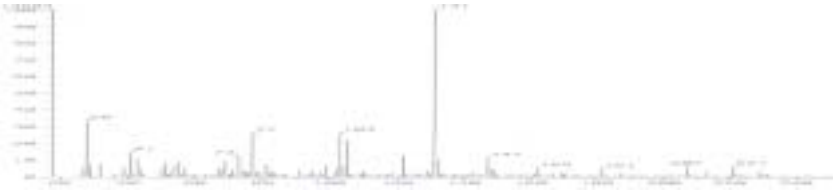


Figure 12. GC-MS spectra of beta, ionone identified from SF.

Table 1. Volatile compounds dentified from SF

Peak no	RT	Compounds
1	6.50	Hexanal
2	6.68	Acetic acid, butyl ester
3	7.66	3- Octen -2-ol
4	8.11	1-Hexanol
5	10.41	1-Octanol , 2, 7-dimethyl-
6	10.76	Benzaldehyde
7	11.87	Decanal
8	13.29	3-Octanol
9	13.36	4-Hepten-3-one, 5-methyl-, (Z)-
10	13.66	1-Octen-3-ol
11	14.31	2-Octenal, (E)-
12	14.52	2-Octen-1-ol, (E)-
13	14.74	4,5-Dimethyl-2-formylfuran
14	14.99	E-2-undecenal
15	15.29	Benzoic acid, methyl ester
16	15.54	Octen-1-ol, acetate
17	16.22	3-Octanone
18	16.50	2-Pentyl-3,4-dihydro-2H-pyran
19	16.85	Hexanoic acid, 2-propenyl ester
20	17.24	Benzoic acid
21	22.41	Ethanone, 1,2-diphenyl-
22	22.81	Benzoic acid, ethyl ester
23	22.98	Benzoic acid, 2-formyl-
24	23.70	2-Propenoic acid, 3-phenyl-, methyl ester
25	24.90	Benzenepropanoic acid, .aipha.-methylene-, methyl ester
26	24.98	Cyclohexane, (3-ethoxy-1-propenyl)-, (Z)-
27	25.38	(Z)-3-phenyl-2-propenoic acid, methyl ester
28	25.93	Cyclohexane, (3-ethoxy-1-propenyl)-, (Z)-
29	26.36	2-Propenoic acid, 3-phenyl-, methyl ester
30	29.87	1-Butanone, 2-methyl-1-phenyl-
31	35.43	Decanoic acid, methyl ester
32	35.83	Delta. undecalactone
33	43.98	Beta. ionone

다. SF의 독성검사

상기 SF의 최적 생성조건에서 생산한 SF는 식용으로 사용되고 있는 PO 버섯(느타리버섯)을 기본배지에 계피추출물과 솔잎 출출물을 혼합한 다음 7일 이상 배양하여 가열 한 다음 SF를 생산하였다. 이 SF는 모두 식용 가능한 원료로부터 생산하였지만, 배양과정에서 또는 가열에 의해 생성되는 물질의 독성여부를 급성과 아급성 및 혈액 중의 생화학적인 인자의 변화를 측정하였다.

1) 급성독성실험

가) 사망 및 임상증상 관찰

시료를 농도별 (0, 15, 21.3, 30, 42.3, 60 ㎕/30 g mouse body weight)로 ICR 암수 각 5마리에 경구투여 하여 급성독성시험을 수행하면서 7일간 사망수를 조사하였고 (Table 2), 또한 여러 가지 임상학적인 변화를 관찰하였다 (Table 3). 투여 당일부터 7일 동안 사망한 동물은 암수 모두에서 없었다. 임상증상 관찰에서는 시료 투여 직후 암수는 약간의 행동저하 증상을 보였으나, 투여당일 6시간 관찰한 결과 점차적으로 행동이 정상적으로 회복되었다. 이 결과는 시료 SF가 경구급성독성시험에서 아무런 독성을 보이지 않았다는 것을 의미하였다.

Table 2. Mortality of mice treated orally with SF for 7 days

Sex	Dosage (㎕/30 g)	Days after treatment								Final mortality
		0	1	2	3	4	5	6	7	
Male	0	0/5[1)]	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
	15	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
	21.3	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
	30	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
	42.3	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
	60	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
Female	0	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
	15	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
	21.3	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
	30	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
	42.3	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
	60	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5

[1)]Values are expressed as animal numbers (cumulative mortality number/total number of mouses).

Table 3. Clinical signs in mice treated orally with SF for 7 days[1)]

Sex	Dosage (㎕/30 g)	Clinical sign	Duration (days)							
			0	1	2	3	4	5	6	7
Male	0	NAD[2)]	5	5	5	5	5	5	5	5
	15	NAD[3)]	5	5	5	5	5	5	5	5
		DMA	5	5	5	5	5	5	5	5
	21.3	NAD	5	5	5	5	5	5	5	5
		DMA	5	5	5	5	5	5	5	5
	30	NAD	5	5	5	5	5	5	5	5
		DMA	5	5	5	5	5	5	5	5
	42.3	NAD	5	5	5	5	5	5	5	5
		DMA	5	5	5	5	5	5	5	5
	60	NAD	5	5	5	5	5	5	5	5
		DMA	5	5	5	5	5	5	5	5
Female	0	NAD	5	5	5	5	5	5	5	5
	15	NAD	5	5	5	5	5	5	5	5
		DMA	5	5	5	5	5	5	5	5
	21.3	NAD	5	5	5	5	5	5	5	5
		DMA	5	5	5	5	5	5	5	5
	30	NAD	5	5	5	5	5	5	5	5
		DMA	5	5	5	5	5	5	5	5
	42.3	NAD	5	5	5	5	5	5	5	5
		DMA	5	5	5	5	5	5	5	5
	60	NAD	5	5	5	5	5	5	5	5
		DMA	5	5	5	5	5	5	5	5

[1)]5 mice were used in all treatments.
[2)]NAD: not abnormalities detected.
[3)]DMA: decrease of motor activity.

나) 체중측정

시료를 농도별 (0, 15, 21.3, 30, 42.3, 60 ㎕/30 g mouse body weight)로 ICR 암수 각 5마리에 경구투여 하여 급성독성시험을 수행하면서 7일간 몸무게의 변화를 측정하였다 (**Table 4**). 투여 후 7일 동안 증가한 몸무게는 수컷에서 대조구에 비해 증가하였지만 유의성은 없었다. 즉 대조구는 2.9 g이 증가하였고, 처리농도 15, 21.3, 20, 42.3, 60 mg에 따라 각각 4.8, 4.8, 3.4, 5.3, 3.0 g이 증가하여 42.3 mg 처리농도에서 몸무게가 가장 많이 증가하였다. 또한 암컷에서도 대조구에 비해 증가하였지만 유의성은 없었다. 즉 대조구는 1.9 g이 증가하였고, 처리농도에 따라 각각 1.8, 1.6, 2.0, 2.0, 1.5 g이 증가하여 15 mg 처리농도에서 몸무게가 가장 많이 증가하였고, 21.3과 60 mg 처리구에서 몸무게의 증가가 대조구 보다 다소 낮았다.

따라서 이 SF는 ICR mouse 암수의 체중을 감소시키지 않고 오히려 수컷에서는 증가시키는 경향이 있었다.

Table 4. Body weights in mice treated orally with SF for 7 days[1)]

Sex	Dosage (㎕/30 g)	Days after treatment			
		0	4	7	Gain
Male	0	33.2±1.0[2)]	34.9±1.3	36.1±1.6	2.9
	15	31.0±0.9	34.8±1.3	35.7±1.0	4.8[a3)]
	21.3	31.6±0.5	34.7±1.0	36.4±1.3	4.8[a]
	30	32.2±0.9	34.1±0.8	35.5±0.6	3.4[a]
	42.3	31.3±0.8	35.5±1.0	36.6±1.2	5.3[a]
	60	32.5±1.2	33.7±1.1	35.5±1.9	3.0[a]
Female	0	26.2±1.1	27.5±1.3	28.1±1.2	1.9
	15	26.7±0.8	27.6±1.4	28.4±1.3	1.8[a]
	21.3	26.2±0.9	28.0±0.6	27.8±1.5	1.6[a]
	30	26.1±0.5	28.1±2.0	28.1±1.8	2.0[a]
	42.3	26.4±1.2	27.9±1.1	28.3±2.1	2.0[a]
	60	26.3±1.2	27.8±1.4	27.8±1.9	1.5[a]

[1)]5 mice were used in all treatments
[2)]Mean of body weight (g) ± SD.
[3)]No significantly different from control at $p<0.05$ by t-test.

다) 육안적 해부소견

시료를 농도별 (0, 15, 21.3, 30, 42.3, 60 ㎕/30 g mouse body weight)로 ICR 암수 각 5마리에 경구투여 하여 급성독성시험을 수행하면서 장기 (cecum, intestine, stomach, adr. gland, brain, heart, liver, kidney, spleen, testis, thymus)의 정상/이상 증상을 육안적으로 조사하였다 (**Table 5, 6**). 시료 투여 후 7일 후 장기를 적출하여 유착, 확장, 종대를 조사한 결과 아무런 이상적인 증상은 관찰되지 않았다.

따라서 이 SF는 ICR mouse 장기의 유착이나, 확장 및 종대 등에는 암수의 체중을 감소시키지 않고 오히려 수컷에서는 증가시키는 경향이 있었다.

Table 5. Gross findings in male mice treated orally with SF for 7 days

		Dosage (㎕/30 g)					
Organ	Clinical sign	0	15	21.3	30	42.3	60
Organ	Adhesion	-	-	-	-	-	-
	NGF[1)]	5(100%)[2)]	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)
Cecum	Enlargement						
	NGF	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)
Intestine	Enlargement						
	NGF	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)
Stomach	Enlargement						
	NGF	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)
Adr. gland	Enlargement						
	NGF	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)
Brain	Enlargement						
	NGF	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)
Heart	Enlargement						
	NGF	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)
Liver	Enlargement						
	NGF	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)
Kidney	Enlargement						
	NGF	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)
Spleen	Enlargement						
	NGF	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)
Testis	Enlargement						
	NGF	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)
Thymus	Enlargement						
	NGF	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)

[1)]NGF: No gross finding.
[2)]Values are expressed as animal numbers. ( ): % of finding.

Table 6. Gross findings in female mice treated orally with SF for 7 days

Organ	Clinical sign	Dosage (㎕/30 g)					
		0	15	21.3	30	42.3	60
Organ	Adhesion	-	-	-	-	-	-
	NGF[1)]	5(100%)[2)]	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)
Cecum	Enlargement						
	NGF	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)
Intestine	Enlargement						
	NGF	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)
Stomach	Enlargement						
	NGF	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)
Adr. gland	Enlargement						
	NGF	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)
Brain	Enlargement						
	NGF	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)
Heart	Enlargement						
	NGF	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)
Liver	Enlargement						
	NGF	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)
Kidney	Enlargement						
	NGF	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)
Spleen	Enlargement						
	NGF	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)
Testis	Enlargement						
	NGF	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)
Thymus	Enlargement						
	NGF	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)

[1)]NGF: No gross finding.
[2)]Values are expressed as animal numbers. ( ): % of finding.

라) 혈액학적 검사

시료를 농도별 (0, 15, 21.3, 30, 42.3, 60 ㎕/30 g mouse body weight)로 ICR 암수 각 5마리에 경구투여 하여 급성독성시험을 수행하면서 7일 후에 혈액중의 WBC, RBC, Hb, Hct, BLP, MCV, MCH, MCHC를 측정하였다 (**Table 7**). 수컷에서 대조구에 비해 42.3 mg까지 WBC, RBC, Hb, Hct, BLP, MCV, 및 MCHC가 증가하였다. 또한 암컷에서도 RBC, BLP, MCH, 및 MCHC가 증가하였다.

따라서 이 SF는 mouse의 암수 혈액학적인 인자에 영향을 미치지 않는 것으로 확인되었다.

Table 7. Hematological findings in mice treated orally with SF for 7 days

Item[1)]	Male (㎍/30 g)						Female (㎍/30 g)					
	0	15	21.3	30	42.3	60	0	15	21.3	30	42.3	60
WBC ($\times10^6/\mu\ell$)	9.4	8.5	9	11.4	10.3	1	1.3	0.9	0.9	0.1	0.8	0.1
RBC ($\times10^3/\mu\ell$)	7.58	12.7	11.38	13.29	11.72	1.42	8.02	7.84	8.93	8.29	7.56	7.5
Hb (g/dℓ)	13.8	21.7	17.8	22.8	21.3	2.8	15.2	14.5	17.1	15.8	15.2	14.5
Hct (%)	38.4	64.5	57	67.2	60.9	7	40.8	38	44.9	42.1	38.2	38.5
BLP ($\times10^3/\mu\ell$)	1281	1465	1466	1328	1340	196	769	561	812	1136	1141	492
MCV	51	51	50	51	52	49	51	48	50	51	50	51
MCH	18.1	17.1	17.4	17.2	18.1	19.8	18.9	18.5	19.2	19.1	20.1	19.4
MCHC	3.8	33.6	34.6	34	34.2	40.2	37.2	38.1	38.1	37.6	39.8	37.7

[1)]WBC; white blood cell, RBC; red blood cell, Hb; hemoglobin, Hct; hematocrit, BLP; blood platelet, MCV; mean corpuscular volume, MCH; mean corpuscular hemoglobin, MCHC; mean corpuscular hemoglobin concentration.

마) 혈액생화학적 검사

시료를 농도별(0, 15, 21.3, 30, 42.3, 60 ㎕/30 g mouse body weight)로 ICR 암수 각 10 마리에 경구투여 하여 아급성 독성시험을 7일 후에 혈액중의 lactic dehydrogenase, aspartate aminotransferase, alanine aminotransferase, alkaline phosphatase, creatine phosphate kinase, gamma-glutamyl transferase의 활성과 total protein, albumin, glucose, cholesterol, triglyceride, creatinine, blood urea nitrogen, calcium, phosphorus, uric acid의 함량을 측정하였다 (**Table 8, 9**). 수컷에서는 대조구에 비해 처리구에서 total protein, albumin, aspartate aminotransferase, alanine aminotransferase, alkaline phosphatase, glucose, cholesterol, triglyceride, blood urea nitrogen, phosphorus, uric acid의 활성이 증가하였고, lactic dehydrogenase, creatine phosphate kinase, gamma-glutamyl transferase의 함량은 낮아졌고 그 외 항목은 영향을 받지 않았다 (**Table 8**). 암컷에서는 total protein, albumin, alkaline phosphatase, glucose, blood urea nitrogen, creatine phosphate kinase, phosphorus, uric acid는 증가하였고, lactic dehydrogenase, aspartate aminotransferase, alanine aminotransferase, cholesterol은 감소하였으며 나머지 항목은 영향을 받지 않았다 (**Table 9**).

Table 8. Biochemical findings in male mice treated orally with SF for 7 days

Item[1)]	Dosage (㎕/30 g)					
	0	15	21.3	30	42.3	60
TPROT (g/dℓ)	5.3	5.3	5.5	5.3	8.8	5.7
ALB (g/dℓ)	3.1	3.2	3.3	3	3.4	3.4
LDH (U/L)	1,392	318	636	828	780	468
AST (U/L)	67.9	94.7	72.9	83.3	92	74.7
ALT (U/L)	23	38	26	27	27	24
ALP (U/L)	90	93	117	68	95	113
GLU (mg/dℓ)	186	182	180	166	194	200
CHOL (mg/dℓ)	182	193	223	189	208	198
TRIG (mg/dℓ)	176	276	193	180	171	199
CREAT (mg/dℓ)	0.4	0.3	0.4	0.4	0.4	0.4
BUN (mg/dℓ)	24.3	26.6	25.2	25.9	26.3	30
CPK (U/L)	5772	265	559	248	245	265
Ca (mg/dℓ)	16.9	17.7	16.1	16.4	16.1	16.8
P (mg/dℓ)	13	10.8	13.8	14.3	12.6	14.5
GGT (U/L)	6	3	0	0	2	2
Uric acid (mg/dℓ)	5	2	3	7	5	6

[1)]TPROT; total protein, ALB; albumin, LDH; Lactic dehydrogenase, AST; aspartate aminotransferase, ALT; alanine aminotransferase, ALP; alkaline phosphatase, GLU; glucose, CHOL; cholesterol, TRIG; triglyceride, CREAT; creatinine, BUN; blood urea nitrogen, CPK; Creatine phosphate kinase, Ca; calcium, P; phosphorus, GGT; gamma-glutamyl transferase.

Table 9. Biochemical findings in male mice treated orally with SF for 7 days

Item[1)]	Dosage (㎕/30 g)					
	0	15	21.3	30	42.3	60
TPROT (g/dℓ)	5.4	6	6.6	6.6	6	6
ALB (g/dℓ)	3	3.6	3.6	3.6	3.6	3.6
LDH (U/L)	443	602	336	434	445	393
AST (U/L)	361.2	83.4	126	98.4	107.4	91.2
ALT (U/L)	70.2	20.4	25.8	31.8	47.4	30
ALP (U/L)	114	168	168	132	138	150
GLU (mg/dℓ)	198	174	126	228	186	240
CHOL (mg/dℓ)	180	168	186	192	174	174
TRIG (mg/dℓ)	54	30	54	90	48	54
CREAT (mg/dℓ)	0.6	0	0	0.6	0	0
BUN (mg/dℓ)	26	41.1	44.4	37.8	31.2	34.2
CPK (U/L)	201	294	266	320	299	235
Ca (mg/dℓ)	12	10.8	12	12.6	12	12
P (mg/dℓ)	13.2	13.8	14.4	12.6	14.4	16.8
GGT (U/L)	1	0	3	1	0	1
Uric acid (mg/dℓ)	2.4	5	2.1	2.6	3.3	3.1

[1)]TPROT; total protein, ALB; albumin, LDH; Lactic dehydrogenase, AST; aspartate aminotransferase, ALT; alanine aminotransferase, ALP; alkaline phosphatase, GLU; glucose, CHOL; cholesterol, TRIG; triglyceride, CREAT; creatinine, BUN; blood urea nitrogen, CPK; Creatine phosphate kinase, Ca; calcium, P; phosphorus, GGT; gamma-glutamyl transferase.

2) 아 급성 독성실험

가) 사망동물 및 임상증상의 관찰

시료를 농도별 (0, 15, 30, 60 ㎕/30 g mouse body weight)로 ICR 암수 각 10마리에 경구투여 하여 아급성 독성시험을 4주간 수행하면서 mouse 사망수를 조사하였고 (**Table 10**), 여러 가지 임상학적인 변화를 관찰하였다 (**Table 11**). 투여 당일부터 4주 동안 사망한 동물은 암수 모두에서 없었다. 임상증상 관찰에서는 시료 투여 직후 암수는 약간의 행동저하 증상을 보였으나, 곧 회복하여 행동이 정상적으로 회복되었다. 이 결과는 시료 SF가 경구 아급성 독성시험에서 아무런 독성을 보이지 않았다는 것을 의미한다.

Table 10. Mortality of mice treated orally with SF 4 weeks

Sex	Dosage (㎕/30 g)	Week after treatment					Final mortality
		0	1	2	3	4	
Male	0	0/10[1)]	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
	15	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
	30	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
	60	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
Female	0	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
	15	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
	30	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
	60	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10

[1)]Values are expressed as animal numbers; (observed/treated)

Table 11. Clinical signs in rats treated orally with SF for 4 weeks

Sex	Dosage (㎕/30 g)	Clinical signs	Days after treatment											
			0	1	2	3	5	6	7	11	15	19	23	27
Male	0	NAD[1)]	10[2)]	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
	15	NAD	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
	30	NAD	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
	60	NAD	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
Female	0	NAD	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
	15	NAD	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
	30	NAD	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
	60	NAD	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10

[1)]NAD : Not abnormalities detected.
[2)]Values are expressed as animal numbers treated.

나) 체중측정

SF 시료를 농도별 (0, 15, 30, 60 ㎕/30 g mouse body weight)로 ICR 암수 각 10 마리에 경구투여 하여 아 급성 독성시험을 4주간 수행하면서 몸무게의 변화를 측정하였다 (Table 12). 투여 후 4주간 증가한 몸무게는 수컷에서 대조구에 비해 증가하였지만 유의성은 없었다. 즉 대조구는 6.1 g이 증가하였고, 처리농도 15, 30, 60 mg에 따라 각각 6.8, 6.8, 7.1 g이 증가하여 60 mg 처리농도에서 몸무게가 가장 많이 증가하였다. 또한 암컷에서도 대조구에 비해 증가하였지만 유의성은 없었다. 즉 대조구는 5.5 g이 증가하였고, 처리농도에 따라 각각 4.8, 5.1, 5.4 g이 증가하여 60 mg 처리농도에서 몸무게가 가장 많이 증가하였다. 따라서 이 SF는 ICR mouse 암수의 체중을 감소시키지 않고 오히려 수컷에서는 증가시키는 경향이 있었다.

Table 12. Body weights in mice treated orally with SF for 4 weeks

Sex	Dosage (㎕/30 g)	Days after treatment									
		0	3	7	10	13	16	19	23	27	Gain
Male	0	33.6± 1.5[1)]	34.2 ±1.6	36.2 ±1.4	36.0 ±1.5	38.1 ±1.9	38.1 ±2.1	39.1± 1.9	38.6± 2.0	39.7± 2.2	6.1
	15	32.1 ±1.3	33.8 ±1.3	35.6 ±1.9	35.4 ±2.3	37.1 ±2.0	37.3 ±1.7	37.9± 2.1	37.9± 1.8	39.0± 2.2	6.8[a2)]
	30	32.2 ±1.7	34.4 ±1.6	36.3 ±1.6	35.7 ±1.5	37.2 ±1.8	37.7 ±1.1	38.1± 1.6	37.9± 1.7	38.9± 1.9	6.8[a]
	60	32.2 ±1.4	34.2 ±1.5	35.9 ±1.8	35.8 ±1.8	37.4 ±2.3	37.3 ±2.8	38.3± 2.7	38.3± 3.0	39.3± 3.2	7.1[a]
Female	0	24.7 ±1.2	25.6 ±1.1	27.2 ±1.5	27.0 ±1.7	28.4 ±1.5	28.8 ±1.1	29.3± 1.3	29.4± 2.2	30.2± 2.2	5.5
	15	25.8 ±1.7	27.6 ±1.6	28.6 ±1.6	27.5 ±1.5	31.0 ±1.8	29.7 ±1.1	30.1± 1.6	29.9± 1.7	30.6± 1.9	4.8[a]
	30	25.8 ±0.6	27.4 ±1.1	28.1 ±1.4	28.3 ±1.6	29.3 ±1.3	28.5 ±1.7	30.0± 1.9	30.2± 1.7	30.9± 1.9	5.1[a]
	60	25.7 ±1.2	28.0 ±1.7	30.2 ±1.4	28.8 ±1.6	29.9 ±1.7	30.3 ±2.1	31.4± 2.4	30.3± 1.1	31.1± 1.1	5.4[a]

[1)]Mean ± S.D of 10 mice.
[2)]Average weight difference: 27 day's weight - 0 day's weight.

다) 사료 섭취량 및 물 섭취량

SF 시료를 농도별 (0, 15, 30, 60 ㎕/30 g mouse body weight)로 ICR 암수 각 10 마리에 경구투여 하여 아급성 독성시험을 4주간 수행하면서 사료와 물의 섭취량을 측정하였다. 투여 후 4주간 암수 모두 시료 처리농도에 따라 사료섭취량 (**Table 13**)과 물 섭취량 (**Table 14**)은 증가하는 경향이었다. 10마리 mouse이 총 사료 섭취량에서 수컷의 마지막 주 섭취량은 대조구의 168 g에서 농도에 따라 각각 246, 240, 170 g이었고, 암컷은 103 g에서 135, 110, 95 g로 증가하였다. 이와 마찬가지로 물의 섭취량도 증가하였다.

따라서 이 SF는 ICR mouse 암수의 사료와 물의 섭취량을 증가시켰다. 이 결과는 몸무게의 증가와 일치하는 경향이었다.

Table 13. Food consumption in mice treated orally with SF for 4 weeks

Sex	Dosage	Days after treatment							
	(㎕/30 g)	3	5	10	13	17	20	23	27
Male	0	116[1)]	181	137	173	137	228	102	168
	15	116	168	126	171	130	224	274	246
	30	130	172	129	181	131	229	106	240
	60	118	163	118	160	124	220	101	170
Female	0	98	142	117	133	102	174	69	103
	15	77	171	88	134	105	174	71	135
	30	88	120	93	132	86	175	72	110
	60	117	151	90	136	101	187	60	95

[1)]Data expressed as total amount of food (g) consumed by 10 mice.

Table 14. Water consumption(㎖) in mice treated orally with SF for 4 weeks

Sex	Dosage	Days after treatment							
	(㎕/30 g)	3	5	10	13	17	20	23	27
Male	0	170[1)]	220	185	100	210	235	155	140
	15	200	220	185	200	300	160	110	150
	30	200	235	230	170	270	120	180	160
	60	210	260	190	235	290	190	160	240
Female	0	140	200	180	180	225	255	125	130
	15	140	200	150	280	365	240	150	300
	30	130	210	150	250	340	220	135	125
	60	150	200	130	265	345	220	115	210

[1)]Data expressed as total amount of water (ml) consumed by 10 mice.

라) 뇨검사

SF 시료를 농도별 (0, 15, 30, 60 ㎕/30 g mouse body weight)로 ICR 암수 각 10 마리에 경구투여 하여 아급성 독성시험을 4주간 수행하면서 뇨 중의 여러 가지 이화학적 특성 (pH, Protein, Glucose, Ketone, Urobilinogen, Bilirubin, Leukocyte, Occult blood, Nitrite, Specific Gravity)을 측정하였다 (**Table 15**). 처리 4주 후 암수 모두 뇨 중의 상기 이화학적 특성은 SF 처리에 의해 영향을 받지 않았다.

마) 혈액학적 검사

시료를 농도별 (0, 15, 30, 60 ㎕/30 g mouse body weight)로 ICR 암수 각 10 마리에 경구투여 하여 아성독성시험을 4주간 수행하면서 혈액중의 WBC, RBC, Hb, Hct, BLP, MCV, MCH, MCHC를 측정하였다 (**Table 16**). 암수 모두 SF의 처리에 의해 상기 조사항목에 영향을 미치지 않았다.

바) 혈액생화학적 검사

SF 시료를 농도별 (0, 15, 30, 60 ㎕/30 g mouse body weight)로 ICR 암수 각 10 마리에 경구투여 하여 아성독성시험을 4주간 수행하면서 처리 4주 후의 혈액 중 lactic dehydrogenase, aspartate aminotransferase, alanine aminotransferase, alkaline phosphatase, creatine phosphate kinase, gamma-glutamyl transferase의 활성과 total protein, albumin, glucose, cholesterol, triglyceride, creatinine, blood urea nitrogen, calcium, phosphorus, uric acid의 함량을 측정하였다 (**Table 17, 18**). 수컷에서는 대조구에 비해 모든 처리구의 함량이 전체적으로 증가하였다 (**Table 17**). 암컷에서는 거의 처리구에서는 total protein의 활성이 증가하였고, alkaline phosphatase, glucose의 함량은 낮아졌고 그 외 항목은 영향을 받지 않았다 (**Table 18**).

Table 15. Urinalysis in mice treated orally with SF for 4 weeks[1)]

Item	Range	Male (㎕/30 g)				Female (㎕/30 g)			
		0	15	30	60	0	15	30	60
pH	9	2	1	0	0	0	0	4	1
	6	3	7	8	7	9	8	2	6
	7	1	2	2	3	0	2	2	1
	8	4	0	0	0	1	0	2	2
Protein (㎎/dℓ)	-	2	0	0	0	4	0	0	0
	Trace	4	0	0	0	1	1	2	0
	30㎎/dℓ	2	1	1	1	2	1	6	0
	100㎎/dℓ	2	9	9	8	3	6	1	9
	300㎎/dℓ	0	0	0	1	0	2	1	1
Glucose (㎎/dℓ)	-	7	10	10	10	8	10	10	8
	Trace	3	0	0	0	2	0	0	2
	100mg/d ℓ	0	0	0	0	0	0	0	0
	250mg/d ℓ	0	0	0	0	0	0	0	0
	500mg/d ℓ	0	0	0	0	0	0	0	0
	2,000mg/d ℓ	0	0	0	0	0	0	0	0
Ketone	-	5	10	10	10	3	0	0	0
	+	5	0	0	0	7	10	8	10
	++	0	0	0	0	0	0	2	0
	+++	0	0	0	0	0	0	0	0
Urobilinogen (㎎/dℓ)	-	0	0	0	0	1	0	0	0
	Normal	3	10	10	10	7	10	10	10
	1 mg/d ℓ	6	0	0	0	2	0	0	0
	4 mg/d ℓ	1	0	0	0	0	0	0	0
	8 mg/d ℓ	0	0	0	0	0	0	0	0
	12 mg/d ℓ	0	0	0	0	0	0	0	0
Bilirubin	-	3	8	9	10	3	0	0	5
	+	7	2	1	0	7	2	3	5
	++	0	0	0	0	0	8	6	0
	+++	0	0	0	0	0	0	1	0
Leukocyte	-	0	10	7	10	3	0	0	0
	+	9	0	2	0	7	6	1	8
	++	1	0	1	0	0	4	9	2
	+++	0	0	0	0	0	0	0	0
Occult blood	-	6	10	10	10	6	10	9	10
	+	0	0	0	0	1	0	0	0
	++	2	0	0	0	2	0	1	0
	+++	2	0	0	0	1	0	0	0
Nitrite	-	1	2	3	0	2	4	0	8
	Post-weak	9	8	7	10	8	6	10	2
	Post-strong	0	0	0	0	0	0	0	0
Specific Gravity	1.010	2	0	0	0	0	0	3	0
	1.015	3	1	4	0	3	0	3	0
	1.020	1	2	0	2	2	1	1	0
	1.025	3	3	6	3	3	4	0	8
	1.030	1	4	0	5	2	5	3	2

[1)]Measured 4 weeks after treatment.

Table 16. Hematological findings in mice treated orally with SF for 4 weeks[1)]

Item	Male (㎕/30 g)				Female (㎕/30 g)			
	0	15	30	60	0	15	30	60
WBC ($\times 10^6/\mu\ell$)	9.2	1.1	9.5	10.2	7.4	10.8	9	6.9
RBC ($\times 10^3/\mu\ell$)	8.97	5.01	10.05	9.77	8.95	9.63	9.85	9.5
Hb (g/dℓ)	15.2	8.8	16.9	16.1	15.3	16.1	16.8	16.7
Hct (%)	46.3	24.1	49.6	48.4	46.7	47.6	49.5	47.6
BLP ($\times 10^3/\mu\ell$)	1249	86	1481	1100	923	1060	1079	1286
MCV	52	48	49	50	52	49	50	50
MCH	16.9	17.35	16.8	16.4	17	16.7	17.1	17.6
MCHC	32.8	36.4	34	33.2	32.6	33.9	34	35.1

[1)]Measured in sample from 4 weeks after treatment.
[2)]WBC; white blood cell, RBC; red blood cell, Hb; hemoglobin, Hct; hematocrit, BLP; blood platelet, MCV; mean corpuscular volume, MCH; mean corpuscular hemoglobin, MCHC; mean corpuscular hemoglobin concentration.

Table 17. Biochemical findings in male mice treated orally with SF for 4 weeks[1)]

Item	Dosage (㎕/30 g)			
	0	15	30	60
TPROT (g/dℓ)	5.7	5.7	5.8	6.1
ALB (g/dℓ)	3.1	3.3	3.3	3.4
LDH (U/L)	929	1,085	1,044	967
AST (U/L)	95.1	130	132	114
ALT (U/L)	32	35	48	37
ALP (U/L)	53	55	58	86
GLU (mg/dℓ)	148	124	148	99
CHOL (mg/dℓ)	190	196	195	231
TRIG (mg/dℓ)	146	116	138	166
CREATIN (mg/dℓ)	0.4	0.5	0.4	0.5
BUN (mg/dℓ)	26.2	27.8	30.8	30.5
CPK (U/L)	323	635	492	464
Ca (mg/dℓ)	14.6	14.4	14.9	15.1
P (mg/dℓ)	14.7	139	13.2	15.2
GGT (U/L)	0	0	0	0
Uric acid (mg/dℓ)	3.8	3.8	5.1	5.1

[1)]Measured in sample from 4 weeks after treatment.
[2)]TPROT; total protein, ALB; albumin, LDH; Lactic dehydrogenase, AST; aspartate aminotransferase, ALT; alanine aminotransferase, ALP; alkaline phosphatase, GLU; glucose, CHOL; cholesterol, TRIG; triglyceride, CREAT; creatinine, BUN; blood urea nitrogen, CPK; Creatine phosphate kinase, Ca; calcium, P; phosphorus, GGT;gamma-glutamyl transferase.

Table 18. Biochemical findings in female mice treated orally with SF for 4 weeks[1)]

Item[2)]	Dosage (㎕/30 g)			
	0	15	30	60
TPROT (g/d ℓ)	5.8	6.1	6	6
ALB (g/d ℓ)	4.4	3.7	3.9	3.9
LDH (U/L)	458	424	397	432
AST (U/L)	129	110	137	124
ALT (U/L)	32	31	34	38
ALP (U/L)	114	120	135	18
GLU (mg/d ℓ)	139	86	107	126
CHOL (mg/d ℓ)	140	152	135	145
TRIG (mg/d ℓ)	130	160	135	159
CREAT (mg/d ℓ)	0.5	0.5	0.4	0.5
BUN (mg/d ℓ)	22.9	22.2	23.5	23.7
CPK (U/L)	559	513	656	549
Ca (mg/d ℓ)	14	14.9	14.7	15
P (mg/d ℓ)	16.7	15.2	135	15
GGT (U/L)	1	0	4	0
Uric acid (mg/d ℓ)	3	2.6	2.7	3.3

[1)]Measured in sample from 4 weeks after treatment.
[2)]TPROT; total protein, ALB; albumin, LDH; Lactic dehydrogenase, AST; aspartate aminotransferase, ALT; alanine aminotransferase, ALP; alkaline phosphatase, GLU; glucose, CHOL; cholesterol, TRIG; triglyceride, CREAT; creatinine, BUN; blood urea nitrogen, CPK; Creatine phosphate kinase, Ca; calcium, P; phosphorus, GGT;gamma-glutamyl transferase.

사) 육안적 부검소견

SF 시료를 농도별 (0, 15, 30, 60 ㎕/30 g mouse body weight)로 ICR 암수 각 10 마리에 경구투여 하여 아성독성시험을 4주간 수행하면서 장기(간, 위, 지라, 콩팥, 허파)의 정상/이상 증상을 육안적으로 조사하였다 (**Table 19**). 시료 투여 후 4주 후 장기를 적출하여 이상 유무를 조사한 결과 암수 모두에서 아무런 이상적인 증상은 관찰되지 않았다.

따라서 이 SF는 4주간의 아급성 독성시험에서 ICR mouse 장기의 육안적 소견에 아무런 영향을 미치지 않았다.

Table 19. Gross finding in mouses treated orally with SF for 4 weeks

Organ		Male (㎕/30 g)				Female (㎕/30 g)			
		0	15	30	60	0	15	30	60
Liver	NGF[2)]	10[1)] (100%)	10 (100%)	10 (100%)	10 (100%)	10 (100%)	10 (100%)	10 (100%)	10 (100%)
Stomach	NGF	10 (100%)	10 (100%)	10 (100%)	10 (100%)	10 (100%)	10 (100%)	10 (100%)	10 (100%)
Spleen	NGF	10 (100%)	10 (100%)	10 (100%)	10 (100%)	10 (100%)	10 (100%)	10 (100%)	10 (100%)
Kidney	NGF	10 (100%)	10 (100%)	10 (100%)	10 (100%)	10 (100%)	10 (100%)	10 (100%)	10 (100%)
Lung	NGF	10 (100%)	10 (100%)	10 (100%)	10 (100%)	10 (100%)	10 (100%)	10 (100%)	10 (100%)

[1)]NGF: No gross finding.
[2)]Values are expressed as animal numbers. ( ): % of finding.

아 장기중량측정

SF 시료를 농도별 (0, 15, 30, 60 ㎕/30 g mouse body weight)로 ICR 암수 각 10 마리에 경구투여 하여 아성독성시험을 4주간 수행하면서 처리 4주 후의 장기(간, 위, 지라, 콩팥, 허파)의 무게를 측정하였다 (**Table 20, 21**). 수컷과 암컷의 간, 위, 지라 및 왼·오른쪽 콩팥의 무게에는 아무런 영향을 미치지 않았다.

Table 20. Organ weights in male mice treated orally with SF for 4 weeks

Organ	Dosage (㎕/30 g)			
	0	15	30	60
Liver	2.06±0.23[1)]	1.65±0.21	1.65±0.17	1.64±0.18
Stomach	0.43±0.13	0.57±0.12	0.57±0.13	0.52±0.12
Spleen	0.16±0.03	0.14±0.04	0.16±0.04	0.13±0.01
Kidney L.	0.34±0.05	0.29±0.05	0.31±0.05	0.30±0.13
Kidney R.	0.33±0.05	0.28±0.05	0.30±0.05	0.29±0.13
Lung	0.25±0.03	0.24±0.02	0.30±0.09	0.24±0.05

[1)]Means±SD of 10 mice weeks after treatment.

Table 21. Organ weights in female mice treated orally with SF for 4 weeks

Organ	Dosage (㎕/30 g)			
	0	15	30	60
Liver	1.32±0.19[1)]	1.25±0.22	1.24±0.07	1.38±0.17
Stomach	0.44±0.11	0.57±0.11	0.48±0.07	0.54±0.16
Spleen	0.12±0.04	0.14±0.03	0.13±0.02	0.15±0.03
Kidney L.	0.19±0.04	0.21±0.07	0.20±0.05	0.22±0.05
Kidney R.	0.19±0.04	0.20±0.07	0.20±0.05	0.21±0.05
Lung	0.19±0.02	0.24±0.03	0.24±0.04	0.25±0.03

[1)]Means±SD of 10 mice weeks after treatment.

자) 조직병리 검사

SF 시료를 농도별 (0, 15, 30, 60 ㎕/30 g mouse body weight)로 ICR 암수 각 10 마리에 경구투여 하여 아성독성시험을 4주간 수행하면서 Adrenal gland의 Subcapsular cell hyperplasia, Accessory adrenal, Hyperplasia 및 Cortical cell; Heart의 Hyperplasia, Mesothelial cell, 및 Peritoneum; Liver의 Chronic inflammation, Hepatocellular hypertrophy, Centrilobule, Hyperplasia, Mesothelial cell, 및 Peritoneum; Kidney의 Hyperplasia, Transitional cell, Pelvis, Protein cast, Infiltration, 및 LC. interstitium; Spleen의 Hyperplasia, Mesothelial cell, Peritoneum, Extramedullary hematopoiesis 및 Congestion을 조사하였고, Brain, Pituitary gland, Testis, Prostate, Ovary, Thymus의 병리학적인 검사를 하였다 (**Table 22**). 시료 투여 후 4주 후 장기를 적출하여 병리학적인 검사를 한 결과 암수 모두에서 아무런 이상적인 증상은 관찰되지 않았다. 따라서 이 SF는 4주간의 아급성 독성시험에서 ICR mouse 장기의 병리 조직학적 측면에서 독성으로 의심되는 변화가 관찰되지 않았다.

Table 22. Histopathologic incidence in mice treated orally with SF for 4 weeks

Item examined	Male (㎕/30 g)		Female (㎕/30 g)	
	0	60	0	60
Adrenal gland[1)]	n.f. *	n.f.	n.f.	n.f.
Brain	n.f.	n.f.	n.f.	n.f.
Pituitary gland	n.f.	n.f.	n.f.	n.f.
Heart[2)]	n.f.	n.f.	n.f.	n.f.
Liver[3)]	n.f.	n.f.	n.f.	n.f.
Kidney[4)]	n.f.	n.f.	n.f.	n.f.
Spleen[5)]	n.f.	n.f.	n.f.	n.f.
Testis	n.f.	n.f.		
Prostate	n.f.	n.f.		
Ovary			n.f.	n.f.
Thymus	n.f.	n.f.	n.f.	n.f.

[1)]Subcapsular cell hyperplasia, Accessory adrenal, Hyperplasia, Cortical cell
[2)]Hyperplasia, Mesothelial cell, Peritoneum, Chronic inflammation
[3)]Hepatocellular hypertrophy, Centrilobule, Hyperplasia, Mesothelial cell, Peritoneum
[4)]Hyperplasia, Transitional cell, Pelvis, Protein cast, Infiltration, LC. interstitium
[5)]Hyperplasia, Mesothelial cell, Peritoneum, Extramedullary hematopoiesis, Congestion
[6)]n.f.: no finding

라. SF의 적응성 연구

1) Mush-go plus

Figure 13. Mush-go plus(sobering drink)

2) 버섯 글루칸 비누

Figure 14. Soap prepared with β-D-glucan of SF.

마. SF시제품 생산

- 상세한 제품의 description과 규격서는 제 5절의 산업화 방안에 상세히 설명되어 있습니다.

Figure 15. Product of SF prepared from submerged culture of PO.

제 4절 버섯균사체 배양을 이용한 장미향생산

1. 연구수행 방법

가. 액체배양을 이용한 RF (rose flavor) 제조

1) 버섯균사체 액체배양

(1) 기본배지 : 대두박 10% (w/v), 황백당 2.7% (w/v), KH_2PO_4 0.5% (w/v), $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5% (w/v)를 증류수 225 ㎖에 녹여서 멸균한 다음 사용하였다.

(2) 배양조건 : LL (*Lentinus lepideus:* 잣버섯)를 기본배지 (pH 5.5)에 접종 (버섯액체균사체, 25 ㎖)하고 25℃에서 7일간 진탕 배양 (120 rpm)하였다. 장미향을 만들기 위해 전구물질로 β-carotene (0.1%, 0.2%), astaxanthin (0.1%, 0.2%, 1%), 시판 당근 주스 (100%, 50%), 시판 토마토 주스 (100%, 50%), 당근 즙 (100%, 50%), 토마토 즙 (100%, 50%), 귤껍질 즙 (100%), 귤 알맹이 즙 (50%)중 시판 당근 주스와 토마토는 그대로 사용하고, 당근, 토마토와 귤은 믹서기로 갈거나 또는 배지와 일정 비율로 섞어서 autoclave 한 후 기본배지와 혼합하여 잣 버섯균사체를 접종하여 배양하였다.

나. RF-WONF(rose flavor with other natural flavor)제조

잣버섯 균사체 배양물을 autoclave (121℃, 15 min)한 다음, ionone과 methylionone을 가향.

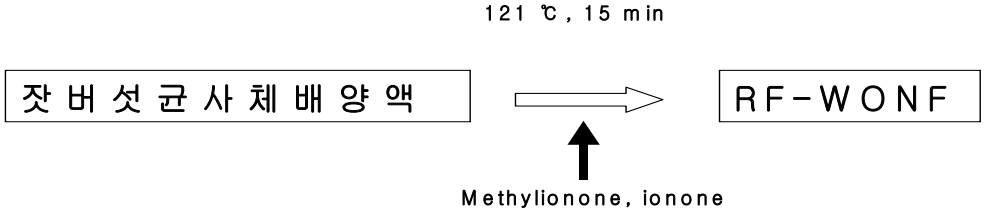


Figure 1. Schematic flow diagrams of the production of RF-WONF.

다. RF의 시제품생산

1) RF제조: β-carotene 0.2%를 첨가하여 배양한 잣버섯균사체 액체배양물을 121℃에서 15분간 가열하고 여과하여 제조하였다.

2) RF essence 제조: 1)을 증류하여 RF essence oil을 제조하였다.

라. RF의 평가

1) 향기성분분석:

향기성분의 분석은 제 3장 2절의 MF생산에서 사용한 방법을 그대로 적용하였다.

마. RF의 독성실험

1) 급성 (단회투여) 독성실험

RF 급성독성실험은 MF의 급성독성실험 방법에 준하였다.

2) 아급성 (반복투여) 독성시험

RF의 아급성독성실험은 MF의 아급성 독성실험방법에 준하였다.

2. 연구수행 내용 및 결과

가. 배양액을 이용한 RF 제조

기본 액체배지에 β-carotene과 같은 전구체를 첨가하여 잣버섯 (*Lentinus lepideus*)을 1주일간 배양 한 결과 0.2% 첨가구에서 뚜렷한 장미향이 생성되었다. 잣버섯균의 생육은 왕성하였으며 버섯이 생장을 하면서 β-carotene을 흡수하는 것 같이 초기의 붉은 배지색이 점점 원래 배지색처럼 맑아짐을 관찰하였다. 1주일간 배양한 배지를 가열해 보았더니 향이 더 진해진 경향은 있었으나 상쾌한 향이 감소되었다.

Table 1. Production of rose flavor from the liquid medium cultured with various substrates

Ingredient (%) in medium		Aroma production	Aroma characteristic
Carrot juice	100	X	-
	50	X	-
Carrot extract	100	△	cooked pumpkin
	50	X	-
Tomato juice	100	X	-
	50	X	-
Tomato extract	100	X	-
	50	X	-
Citrus peel	100	X	-
	50	X	-
β-carotene	0.1	○	weak rose
	0.2	○	strong rose
Astaxanthin	0.1	X	red pepper
	0.2	X	red pepper
	1	X	red pepper
Mushroom (Jhat; control)		X	-

○,: Strong aroma, △: Weak aroma, X: No aroma.
-: No characteristic aroma.

2) 향기성분 분석

잣 버섯균사체 배양액으로부터 제조 된 RF에 함유 된 향기성분을 분석한 GC chromatogram은 Figure 2~4와 같고 Figure 4의 A peak가 장미향과 관련이 있는 isogeraniol로 GC/MS에 의해 입증되었다 (Figure 5). 그 외 화합물은 Figure 5~18에서 동정하여 Table 2에 나타내었다.

가) GC chromatograms

Figure 2. GC chromatogram of volatile flavor compounds isolated from the liquid medium cultured with *Lentinus lepideus*.

Figure 3. GC chromatogram of volatile flavor compounds isolated from the liquid medium containing β-carotene.

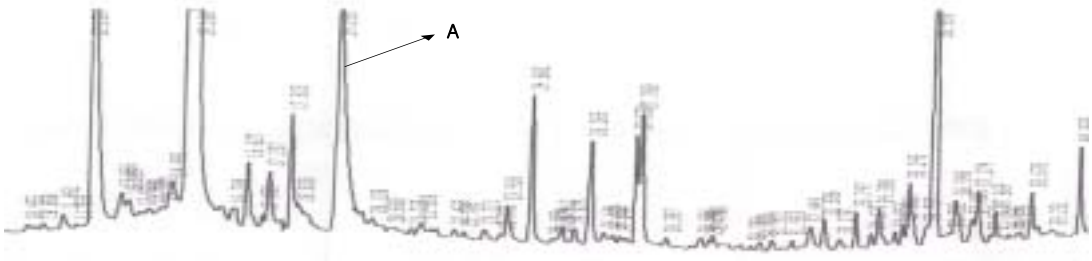


Figure 4. GC chromatogram of volatile flavor compounds isolated from the liquid medium containing β-carotene cultured with *Lentinus lepideus*. Peak A: compound deduced from (culture medium + LL + β-carotene) - (culture medium + LL) - (culture medium +β-carotene) identified as isogeraniol, by GC-MS.

나) RF로부터 분리된 향기성분의 GC-MS

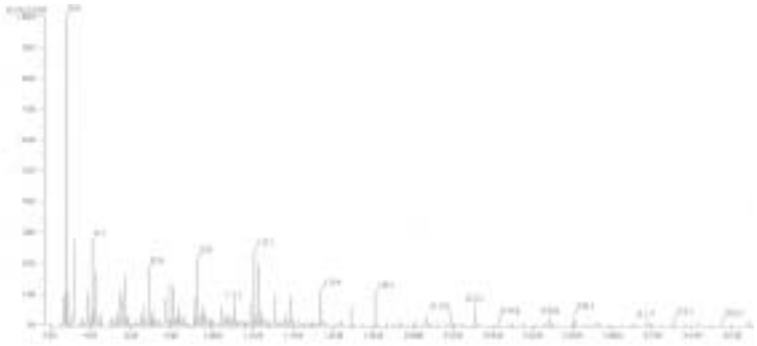


Figure 5. GC-MS spectra of isogeraniol identified from RF.

Figure 6. GC-MS spectra of butanoic acid, 3-methyl-, 2, propenyl ester from RF.

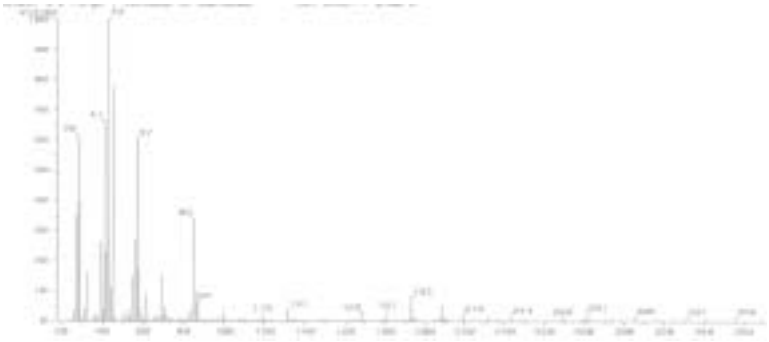


Figure 7. GC-MS spectra of 4-heptanol, 2, 6-dimethyl identified from RF.

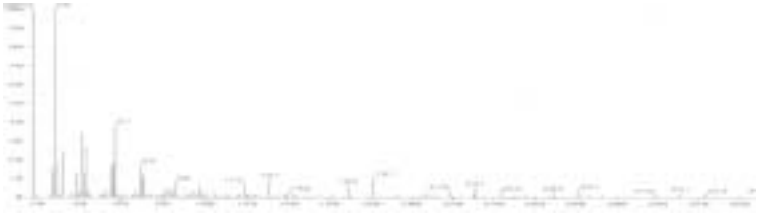


Figure 8. GC-MS spectra of dihydro-citronellol identified from RF.

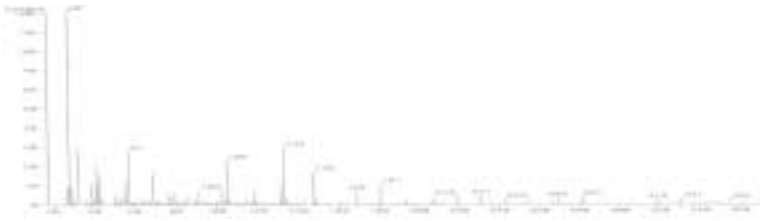


Figure 9. GC-MS spectra of benzaldehyde, 4-(1-methylethyl) identified from RF.

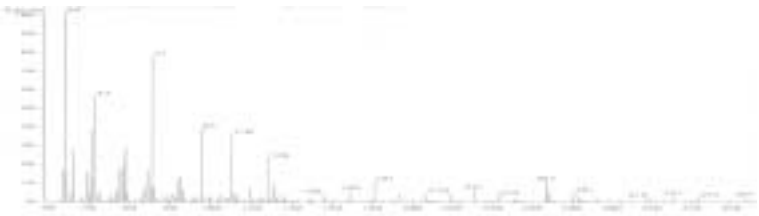


Figure 10. GC-MS spectra of 2-heptanone, 6-methyl identified from RF.

Figure 11. GC-MS spectra of 1-octanol, 2-butyl identified from RF.

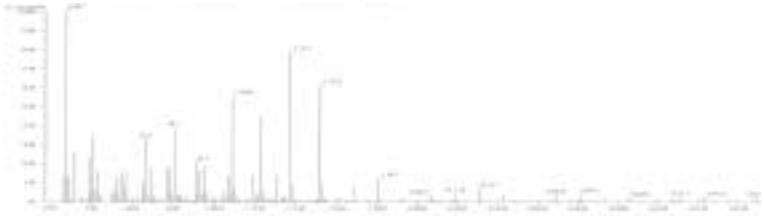


Figure 12. GC-MS spectra of beta-cyclocitral identified from RF.

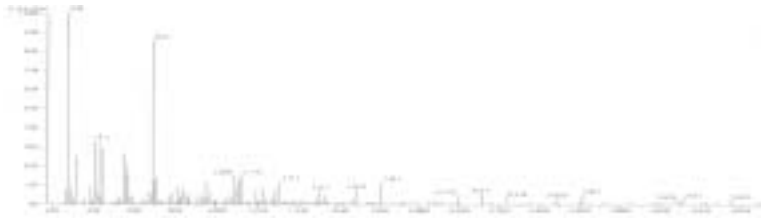


Figure 13. GC-MS spectra of citronelal identified from RF.

Figure 14. GC-MS spectra of delta-4-carene identified from RF.

Figure 15. GC-MS spectra ofdihydro-beta-ionone identified from RF.

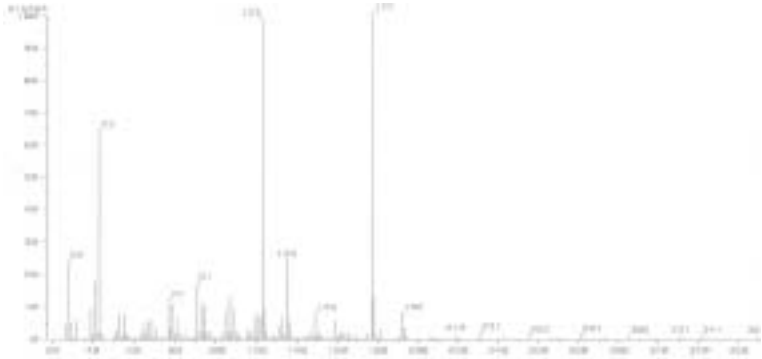


Figure 16. GC-MS spectra of trans-beta-ionone identified from RF.

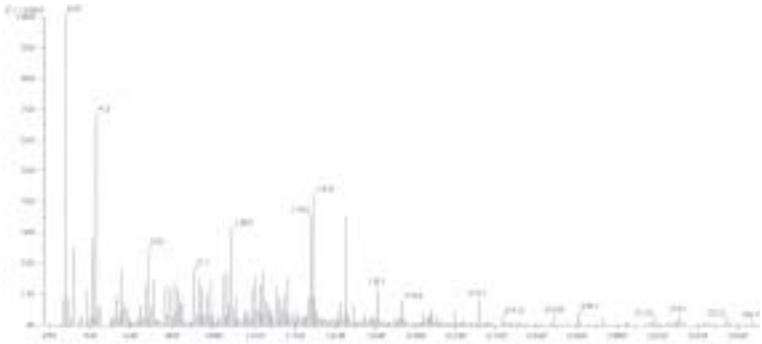


Figure 17. GC-MS spectra of gamma-ionone identified from RF.

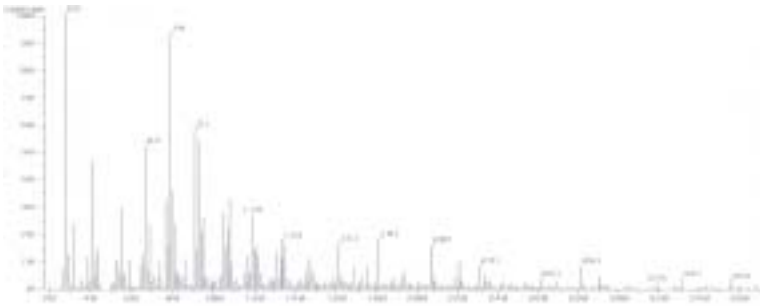


Figure 18. GC-MS spectra of 3-carene, 2-alpha-isopropenyl identified from RF.

Table 2. Volatile compounds identified from RF

Peak no	RT	Compounds
1	6.63	Acetic acid, butyl ester
2	10.14	Butanoic acid, 3-methyl-, 2,propenyl ester
3	10.43	4-Heptanol, 2,6-dimethyl-
4	12.67	Dihydro-citronellol
5	12.92	1-Octene, 2,6-dimethyl-
6	13.32	Hexanal, 5,5-dimethyl-
7	13.67	2-Penten-1-ol, 2-methyl-
8	14.69	Benzaldehyde, 4-(1-methylethyl)
9	14.97	Furan, 4,5-diethyl-2,3-dihydro-2,3-dimethyl
10	15.19	2-Heptanone, 6-methyl
11	15.47	2-Undecen, 7-methyl, cis/trans
12	16.04	1H-Indene, 1-ethylideneoctahydro-7a-methyl-, cis
13	17.07	9-Undecen-2-one, 6, 10-dimethyl
14	17.67	Benzoic acid, 4-(1-methylethyl)-
15	17.80	1-Octanol, 2-butyl
16	18.25	Isogeraniol
17	18.55	Beta-cyclocitral
18	19.27	5-Undecene, 5-methyl
19	20.88	trans-1,10-Dimethyldecalone-2
20	21.00	trans-DL-Chrysanthemumic acid
21	21.45	6-Methyl-hept-5-en-2-ol
22	21.86	Citronelal
23	23.40	dleta-4-Carene
24	24.01	Dihydro-beta-ionone
25	25.74	trans-Beta-Ionone
26	27.06	2(4H)-Benzofuranone,5,6,7,7a-tetrahydro-4,4,7a-trimethyl
27	27.44	2-Methylbenzo(f)Quinoline
28	28.28	2-Cyclopenten-1-one, 4-hydroxy-3-methyl-2-(2-propeny)
29	30.41	Gamma.-ionone
30	35.42	Decanoic acid, methyl ester
31	37.08	9-Undecen-2-one, 6, 10-dimethyl
32	38.71	3-Carene, 2-Alpha-Isopropenyl
33	39.05	4-Nonenoic acid, methyl ester

나. RF의 독성 실험

상기 RF의 최적 생성조건에서 생산한 RF는 식용으로 사용되고 있는 LL 버섯(잣 버섯)을 녹황색 채소에 많이 함유되어 있는 β-carotene을 넣은 배지에서 배양한 다음 가열하여 생산하였다. 이 RF는 모두 식용 가능한 원료로부터 생산하였지만, β-carotene이나 배양과정에서 또는 가열에 의해 생성되는 물질의 독성을 의심하여 급성독성과 아급성 독성 및 혈액 중 변화될 것이라 생각되는 생화학적인 인자의 변화를 측정하였다.

1) 급성독성실험

가) 사망 및 임상증상 관찰

시료를 농도별 (0, 15, 21.3, 30, 42.3, 60 ㎕/30 g mouse body weight)로 ICR 암수 각 5마리에 경구투여 하여 급성독성시험을 수행하면서 7일간 사망수를 조사하였고 (**Table 3**), 또한 여러 가지 임상학적인 변화를 관찰하였다 (**Table 4**). 투여 당일부터 7일 동안 사망한 동물은 암수 모두에서 없었다. 임상증상 관찰에서는 시료 투여 직후 암수는 약간의 행동저하 증상을 보였으나, 투여당일 6시간 관찰한 결과 점차적으로 행동이 정상적으로 회복되었다. 이 결과는 시료 RF가 경구급성독성시험에서 아무런 독성을 보이지 않았다는 것을 의미한다.

Table 3. Mortality of mice treated orally with RF for 7 days

Sex	Dosage (㎕/30 g)	Days after treatment								Final mortality
		0	1	2	3	4	5	6	7	
Male	0	0/5[1)]	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
	15	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
	21.3	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
	30	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
	42.3	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
	60	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
Female	0	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
	15	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
	21.3	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
	30	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
	42.3	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
	60	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5

[1)]Values are expressed as animal numbers(cumulative mortality number/total number of mouses).

Table 4. Clinical signs in mice treated orally with RF for 7 days[1)]

Sex	Dosage (㎕/30 g)	Clinical sign	Duration (days)							
			0	1	2	3	4	5	6	7
Male	0	NAD[2)]	5	5	5	5	5	5	5	5
	15	NAD[3)]	5	5	5	5	5	5	5	5
		DMA	5	5	5	5	5	5	5	5
	21.3	NAD	5	5	5	5	5	5	5	5
		DMA	5	5	5	5	5	5	5	5
	30	NAD	5	5	5	5	5	5	5	5
		DMA	5	5	5	5	5	5	5	5
	42.3	NAD	5	5	5	5	5	5	5	5
		DMA	5	5	5	5	5	5	5	5
	60	NAD	5	5	5	5	5	5	5	5
		DMA	5	5	5	5	5	5	5	5
Female	0	NAD	5	5	5	5	5	5	5	5
	15	NAD	5	5	5	5	5	5	5	5
		DMA	5	5	5	5	5	5	5	5
	21.3	NAD	5	5	5	5	5	5	5	5
		DMA	5	5	5	5	5	5	5	5
	30	NAD	5	5	5	5	5	5	5	5
		DMA	5	5	5	5	5	5	5	5
	42.3	NAD	5	5	5	5	5	5	5	5
		DMA	5	5	5	5	5	5	5	5
	60	NAD	5	5	5	5	5	5	5	5
		DMA	5	5	5	5	5	5	5	5

[1)]5 mice were used in all treatments.
[2)]NAD: not abnormalities detected.
[3)]DMA: decrease of motor activity.

나) 체중측정

시료를 농도별 (0, 15, 21.3, 30, 42.3, 60 ㎕/30 g mouse body weight)로 ICR 암수 각 5마리에 경구투여 하여 급성독성시험을 수행하면서 7일간 몸무게의 변화를 측정하였다 (**Table 5**). 투여 후 7일 동안 증가한 몸무게는 수컷에서 대조구에 비해 증가하였지만 유의성은 없었다. 즉 대조구는 2.9 g이 증가하였고, 처리농도 15, 21.3, 20, 42.3, 60 mg에 따라 각각 4.1, 3.0, 3.1, 4.0, 4.3 g이 증가하여 62 mg 처리농도에서 몸무게가 가장 많이 증가하였다. 또한 암컷에서도 대조구에 비해 증가하였지만 유의성은 없었다. 즉 대조구는 1.9 g이 증가하였고, 처리농도에 따라 각각 2.1, 0.8, 0.9, 0.7, 0.8 g이 증가하여 15 mg 처리농도에서 몸무게가 가장 많이

증가하였고, 21.3, 30, 42.3, 60 mg처리구에서 몸무게의 증가가 대조구보다 다소 낮았다.

따라서 이 RF는 ICR mouse 암수의 체중을 감소시키는 경향이 있었다. 그러나 수컷에서는 ICR mouse 암수의 체중을 증가시키는 경향이 있었다.

Table 5. Body weights in mice treated orally with RF for 7 days[1)]

Sex	Dosage (㎕/30 g)	Days after treatment			
		0	4	7	Gain
Male	0	33.2±1.0[2)]	34.9±1.3	36.1±1.6	2.9
	15	31.5±1.6	33.8±1.4	35.6±0.8	4.1[a3)]
	21.3	32.0±1.2	34.1±1.2	35.0±1.1	3.0[a]
	30	32.1±0.6	34.4±0.9	35.2±0.9	3.1[a]
	42.3	31.5±1.4	34.2±1.2	35.5±1.3	4.0[a]
	l60	31.5±0.4	34.8±0.6	35.8±1.2	4.3[a]
Female	0	26.2±1.1	27.5±1.3	28.1±1.2	1.9
	15	26.5±0.4	28.0±0.7	28.5±0.9	2.1[a]
	21.3	22.8±1.2	23.0±1.2	23.6±1.2	0.8[a]
	30	22.3±0.7	23.2±0.7	23.2±1.4	0.9[a]
	42.3	26.9±0.1	27.1±0.9	27.5±0.7	0.7[a]
	60	22.9±0.1	23.7±0.9	23.7±1.5	0.8[a]

[1)]10 mice were used in all treatments
[2)]Mean ± SD.
[3)]No significantly different from control at $p<0.05$ by t-test. Mean ± SD.

다) 육안적 해부소견

시료를 농도별 (0, 15, 21.3, 30, 42.3, 60 ㎕/30 g mouse body weight)로 ICR 암수 각 5마리에 경구투여 하여 급성독성시험을 수행하면서 장기 (cecum, intestine, stomach, adr. gland, brain, heart, liver, kidney, spleen, testis, thymus)의 정상/이상 증상을 육안적으로 조사하였다 (**Table 6, 7**). 시료 투여 후 7일 후 장기를 적출하여 유착, 확장, 종대를 조사한 결과 아무런 이상적인 증상은 관찰되지 않았다.

따라서 이 RF는 ICR mouse 장기의 유착이나, 확장 및 종대 등에는 암수의 체중을 감소시키지 않고 오히려 수컷에서는 증가시키는 경향이 있었다.

Table 6. Gross findings in male mice treated orally with RF for 7 days

Organ	Clinical sign	Dosage (㎕/30 g)					
		0	15	21.3	30	42.3	60
Organ	Adhesion	-	-	-	-	-	-
	NGF[1)]	5(100%)[2)]	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)
Cecum	Enlargement						
	NGF	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)
Intestine	Enlargement						
	NGF	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)
Stomach	Enlargement						
	NGF	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)
Adr. gland	Enlargement						
	NGF	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)
Brain	Enlargement						
	NGF	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)
Heart	Enlargement						
	NGF	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)
Liver	Enlargement						
	NGF	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)
Kidney	Enlargement						
	NGF	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)
Spleen	Enlargement						
	NGF	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)
Testis	Enlargement						
	NGF	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)
Thymus	Enlargement						
	NGF	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)

[1)]NGF: No gross finding.
[2)]Values are expressed as animal numbers. ( ): % of finding.

Table 7. Gross findings in female mice treated orally with RF for 7 days

Organ	Clinical sign	Dosage (㎕/30 g)					
		0	15	21.3	30	42.3	60
Organ	Adhesion	-	-	-	-	-	-
	NGF[1]	5(100%)[2]	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)
Cecum	Enlargement						
	NGF	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)
Intestine	Enlargement						
	NGF	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)
Stomach	Enlargement						
	NGF	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)
Adr. gland	Enlargement						
	NGF	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)
Brain	Enlargement						
	NGF	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)
Heart	Enlargement						
	NGF	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)
Liver	Enlargement						
	NGF	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)
Kidney	Enlargement						
	NGF	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)
Spleen	Enlargement						
	NGF	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)
Testis	Enlargement						
	NGF	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)
Thymus	Enlargement						
	NGF	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)	5(100%)

[1]NGF: No gross finding.
[2]Values are expressed as animal numbers. ( ): % of finding.

라) 혈액학적 검사

시료를 농도별 (0, 15, 21.3, 30, 42.3, 60 ㎕/30 g mouse body weight)로 ICR 암수 각 5마리에 경구투여 하여 급성독성시험을 수행하면서 7일 후에 혈액중의 WBC, RBC, Hb, Hct, BLP, MCV, MCH, MCHC를 측정하였다 (**Table 28**). 수컷에서 대조구에 비해 42.3 mg까지 WBC, RBC, Hb, Hct 및 MCHC가 증가하였다. 또한 암컷에서도 WBC, MCH, 및 MCHC가 증가하였다.

따라서 이 RF는 mouse의 암수 혈액학적인 인자에 영향을 미치지 않는 것으로 확인되었다.

Table 8. Hematological findings in mice treated orally with RF for 7 days

Item[1)]	Male (㎕/30 g)						Female (㎕/30 g)					
	0	15	21.3	30	42.3	60	0	15	21.3	30	42.3	60
WBC ($\times10^6$/㎕)	9.4	10.4	10.1	14.2	14.1	13.4	1.3	4.1	3.7	1.9	4.9	0
RBC ($\times10^3$/㎕)	7.58	12.44	13	12.35	12.99	13.9	8.02	7.06	7.08	6.85	7.48	2.69
Hb (g/dℓ)	13.8	21.1	22.7	22.4	22.6	23.9	15.2	13.3	13.2	12.9	14.4	5.5
Hct (%)	38.4	62.3	65.2	64.3	65.3	68.5	40.8	35.9	36.5	34	37.9	13.1
BLP ($\times10^3$/㎕)	1281	1280	1250	1208	1367	1074	769	54	314	129	756	179
MCV	51	50	50	52	50	49	51	51	51	50	51	49
MCH	18.1	17	17.4	18.1	71.4	17.2	18.9	18.9	18.6	18.9	19.3	20.6
MCHC	3.8	33.9	34.8	34.8	34.6	35	37.2	37.1	36.2	38	38.1	42.4

[1)]WBC; white blood cell, RBC; red blood cell, Hb; hemoglobin, Hct; hematocrit, BLP; blood platelet, MCV; mean corpuscular volume, MCH; mean corpuscular hemoglobin, MCHC; mean corpuscular hemoglobin concentration.

마) 혈액생화학적 검사

시료를 농도별 (0, 15, 21.3, 30, 42.3, 60 ㎕/30 g mouse body weight)로 ICR 암수 각 10 마리에 경구투여 하여 아급성 독성시험을 7일 후에 혈액중의 lactic dehydrogenase, aspartate aminotransferase, alanine aminotransferase, alkaline phosphatase, creatine phosphate kinase, gamma-glutamyl transferase의 활성과 total protein, albumin, glucose, cholesterol, triglyceride, creatinine, blood urea nitrogen, calcium, phosphorus, uric acid의 함량을 측정하였다 (**Table 9, 10**). 수컷에서는 대조구에 비해 처리구에서 aspartate aminotransferase, alanine aminotransferase, glucose, cholesterol, triglyceride의 활성이 증가하였고, lactic dehydrogenase, alkaline phosphatase, creatine phosphate kinase, uric acid의 함량은 낮아졌고 그 외 항목은 영향을 받지 않았다 (**Table 9**). 암컷에서는 alkaline phosphatase, blood urea nitrogen, creatine phosphate kinase, uric acid는 증가하였고, lactic dehydrogenase, aspartate aminotransferase, alanine aminotransferase는 감소하였으며 나머지 항목은 영향을 받지 않았다 (**Table 10**).

Table 9. Biochemical findings in male mice treated orally with RF for 7 days

Item[1)]	Dosage (㎕/30 g)					
	0	15	21.3	30	42.3	60
TPROT (g/dℓ)	5.3	6	5.4	5.8	5.8	5.9
ALB (g/dℓ)	3.1	3.3	3.2	3.4	3.4	3.3
LDH (U/L)	1,392	828	828	1,272	1194	1,212
AST (U/L)	67.9	75.7	88.9	77	75.7	92
ALT (U/L)	22.8	31.8	28.9	34.2	37.4	29.4
ALP (U/L)	90	138	104	134	116	81
GLU (mg/dℓ)	186	249	204	201	190	209
CHOL (mg/dℓ)	182	222	191	213	196	209
TRIG (mg/dℓ)	176	193	228	203	227	360
CREAT (mg/dℓ)	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4
BUN (mg/dℓ)	24.3	24.1	24.7	23.9	28.9	26
CPK (U/L)	5,772	3,702	948	2,094	3,774	1,212
Ca (mg/dℓ)	16.9	17	16.3	16	16.4	17
P (mg/dℓ)	13	13.5	13.8	14.9	14.3	13.9
GGT (U/L)	6	6	0	6	6	0
Uric acid (mg/dℓ)	4.8	5.4	6.6	7.2	6.6	3.6

[1)]TPROT; total protein, ALB; albumin, LDH; Lactic dehydrogenase, AST; aspartate aminotransferase, ALT; alanine aminotransferase, ALP; alkaline phosphatase, GLU; glucose, CHOL; cholesterol, TRIG; triglyceride, CREAT; creatinine, BUN; blood urea nitrogen, CPK; Creatine phosphate kinase, Ca; calcium, P; phosphorus, GGT; gamma-glutamyl transferase.

Table 10. Biochemical findings in female mice treated orally with RF for 7 days

Item[1)]	Dosage (㎕/30 g)					
	0	15	21.3	30	42.3	60
TPROT (g/dℓ)	5.4	6	5.4	6	6	5.4
ALB (g/dℓ)	3	3	3	3	3.6	3.6
LDH (U/L)	443	373	387	339	334	415
AST (U/L)	361.2	205.8	93.6	109.8	369	151.8
ALT (U/L)	70.2	33.6	23.4	27.6	48	43.2
ALP (U/L)	114	162	156	156	126	132
GLU (mg/dℓ)	198	198	132	198	222	204
CHOL (mg/dℓ)	180	216	132	204	210	180
TRIG (mg/dℓ)	54	150	42	90	42	60
CREAT (mg/dℓ)	0.6	0	0	0	0.6	0.6
BUN (mg/dℓ)	26	26.4	42.6	24.6	33	32.4
CPK (U/L)	201	219	277	268	160	252
Ca (mg/dℓ)	12	12	10.2	10.8	13.2	12.6
P (mg/dℓ)	13.2	12.6	12.6	10.2	16.2	16.8
GGT (U/L)	1	1	1	1	0	0
Uric acid (mg/dℓ)	2.4	3.3	2.4	3	2.1	3.2

[1)]TPROT; total protein, ALB; albumin, LDH; Lactic dehydrogenase, AST; aspartate aminotransferase, ALT; alanine aminotransferase, ALP; alkaline phosphatase, GLU; glucose, CHOL; cholesterol, TRIG; triglyceride, CREAT; creatinine, BUN; blood urea nitrogen, CPK; Creatine phosphate kinase, Ca; calcium, P; phosphorus, GGT; gamma-glutamyl transferase.

2) 아 급성 독성실험

가) 사망 및 임상증상 관찰

시료를 농도별 (0, 15, 30, 60 ㎕/30 g mouse body weight)로 ICR 암수 각 10마리에 경구투여 하여 아급성 독성시험을 4주간 수행하면서 mouse 사망수를 조사하였고 (**Table 11**), 여러 가지 임상학적인 변화를 관찰하였다 (**Table 12**). 투여 당일부터 4주 동안 사망한 동물은 암수 모두에서 없었다. 임상증상 관찰에서는 시료 투여 직후 암수는 약간의 행동저하 증상을 보였으나, 곧 회복하여 행동이 정상적으로 회복되었다.

이 결과는 시료 RF가 경구 아 급성 독성시험에서 아무런 독성을 보이지 않았다는 것을 의미한다.

Table 11. Mortality of mice treated orally with RF 4 weeks

Sex	Dosage (㎕/30 g)	Week after treatment					Final mortality
		Start	1	2	3	4	
Male	0	0/10[1)]	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
	15	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
	30	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
	60	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
Female	0	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
	15	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
	30	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
	60	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10

[1)]Values are expressed as animal numbers; (observed/treated)

Table 12. Clinical signs in mice treated orally with RF for 4 weeks

Sex	Dosage (㎕/30 g)	Clinical signs	Days after treatment											
			0	1	2	3	5	6	7	11	15	19	23	27
Male	0	NAD[1)]	10[2)]	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
	15	NAD	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
	30	NAD	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
	60	NAD	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
Female	0	NAD	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
	15	NAD	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
	30	NAD	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
	60	NAD	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10

[1)]NAD : Not abnormalities detected.
[2)]Values are expressed as animal numbers treated.

나) 체중측정

RF 시료를 농도별 (0, 15, 30, 60 ㎕/30 g mouse body weight)로 ICR 암수 각 10 마리에 경구투여 하여 아급성 독성시험을 4주간 수행하면서 몸무게의 변화를 측정하였다 (**Table 13**). 투여 후 4주간 증가한 몸무게는 수컷에서 대조구에 비해 증가하였지만 유의성은 없었다. 즉 대조구는 6.1 g이 증가하였고, 처리농도 15, 30, 60 mg에 따라 각각 7.1, 6.9, 6.9 g이 증가하여 15 mg 처리농도에서 몸무게가 가장 많이 증가하였다. 또한 암컷에서도 대조구에 비해 증가하였지만 유의성은 없었다. 즉 대조구는 5.5 g이 증가하였고, 처리농도에 따라 각각 5.6, 4.8, 5.0 g이 증가하여 15 mg 처리농도에서 몸무게가 가장 많이 증가하였다.

따라서 이 RF는 ICR mouse 암수의 체중을 감소시키지 않고 오히려 수컷에서는 증가시키는 경향이 있었다.

Table 13. Body weights in mice treated orally with RF for 4 weeks

Sex	Dosage (㎕/30 g)	Days after treatment									
		0	3	7	10	13	16	19	23	27	Gain
Male	0	33.6 ±1.5[1)]	34.2 ±1.6	36.2 ±1.4	36.0 ±1.5	38.1 ±1.9	38.1 ±2.1	39.1 ±1.9	38.6 ±2.0	39.7 ±2.2	6.1
	15	32.5 ±1.0	34.7 ±1.5	37.5 ±2.0	36.8 ±1.5	37.8 ±2.3	37.9 ±2.1	39.1 ±2.2	38.6 ±2.3	39.6 ±2.5	7.1[a2)]
	30	32.6 ±1.2	33.8 ±1.5	35.9 ±1.5	36.2 ±1.4	37.3 ±2.1	37.8 ±2.1	38.5 ±1.8	38.5 ±1.9	39.5 ±2.1	6.9[a]
	60	32.3 ±1.5	34.1 ±1.7	35.6 ±2.1	35.7 ±1.5	36.9 ±2.8	37.1 ±1.9	38.3 ±2.1	38.2 ±2.1	39.2 ±2.3	6.9[a]
Female	0	24.7 ±1.2	25.6 ±1.1	27.2 ±1.5	27.0 ±1.7	28.4 ±1.5	28.8 ±1.1	29.3 ±1.3	29.4 ±2.2	30.2 ±2.2	5.5
	15	25.4 ±1.0	26.8 ±1.0	27.6 ±1.3	28.6 ±1.8	29.7 ±1.1	29.8 ±1.5	30.7 ±1.6	30.3 ±1.5	30.9 ±1.8	5.6[a]
	30	25.5 ±1.0	27.5 ±1.3	28.9 ±1.4	29.0 ±1.7	29.7 ±1.6	29.7 ±1.7	30.8 ±1.7	29.7 ±2.0	30.3 ±2.0	4.8[a]
	60	26.6 ±1.1	27.4 ±1.0	28.6 ±1.5	28.6 ±1.4	29.7 ±1.6	29.5 ±2.1	31.7 ±2.3	30.8 ±2.5	31.5 ±2.7	5.0[a]

[1)]Mean ± S.D of 10 mice.
[2)]Average weight difference: 27 day's weight - 0 day's weight.

다) 사료 섭취량 및 물 섭취량

RF 시료를 농도별 (0, 15, 30, 60 ㎕/30 g mouse body weight)로 ICR 암수 각 10 마리에 경구투여 하여 아급성 독성시험을 4주간 수행하면서 사료와 물의 섭취량을 측정하였다. 투여 후 4주간 암수 모두 시료 처리농도에 따라 사료섭취량 (**Table 14**)은 감소하였으나, 물의 섭취량 (**Table 15**)은 증가하는 경향이었다. 10마리 mouse이 총 사료 섭취량에서 수컷의 마지막 주 섭취량은 대조구의 168 g에서 농도에 따라 각각 126, 189, 130 g이였고, 암컷은 103 g에서 98, 86, 98 g로 감소하였으며, 물의 섭취량은 전체적으로 모든 처리구에서 증가하였다.

Table 14. Food consumption in mice treated orally with RF for 4 weeks

Sex	Dosage (㎕/30 g)	Days after treatment							
		3	5	10	13	17	20	23	27
Male	0	116	181	137	173	137	228	102	168
	15	126	166	125	171	116	210	92	126
	30	120	178	137	190	134	237	107	189
	60	120	159	119	165	113	211	94	130
Female	0	98	142	117	133	102	174	69	103
	15	98	130	103	142	96	188	73	98
	30	107	142	98	142	91	191	67	86
	60	91	134.	96	142	88	197	65	98

Data expressed as total amount of food consumed by 10 mice.

Table 15. Water consumption in mice treated orally with RF for 4 weeks

Sex	Dosage (㎕/30 g)	Days after treatment							
		3	5	10	13	17	20	23	27
Male	0	170	220	185	100	210	235	155	140
	15	160	230	170	235	325	210	330	250
	30	220	320	260	155	260	70	230	210
	60	200	250	160	245	320	190	155	150
Female	0	140	200	180	180	225	255	125	130
	15	160	210	160	195	330	180	130	150
	30	150	220	140	260	350	200	150	145
	60	150	220	140	260	370	230	130	140

Data expressed as total amount of food consumed by 10 mice.

라) 뇨검사

RF 시료를 농도별 (0, 15, 30, 60 ㎕/30 g mouse body weight)로 ICR 암수 각 10 마리에 경구투여 하여 아급성 독성시험을 4주간 수행하면서 뇨 중의 여러 가지 이화학적 특성 (pH, Protein, Glucose, Ketone, Urobilinogen, Bilirubin, Leukocyte, Occult blood, Nitrite, Specific Gravity)을 측정하였다 (**Table 16).** 처리 4주 후 암수 모두 뇨 중의 상기 이화학적 특성은 RF 처리에 의해 영향을 받지 않았다.

마) 혈액학적 검사

시료를 농도별 (0, 15, 30, 60 ㎕/30 g mouse body weight)로 ICR 암수 각 10 마리에 경구투여 하여 아성독성시험을 4주간 수행하면서 혈액중의 WBC, RBC, Hb, Hct, BLP, MCV, MCH, MCHC를 측정하였다 (**Table 17**). 암컷의 BLP의 함량이 증가하는 경향 이외에는 암수 모든 항목에서 별다른 경향을 볼 수 가 없었다. RF의 처리에 의해 상기 조사항목에 영향을 미치지 않았다.

바) 혈액생화학적 검사

RF 시료를 농도별 (0, 15, 30, 60 ㎕/30 g mouse body weight)로 ICR 암수 각 10 마리에 경구투여 하여 아성독성시험을 4주간 수행하면서 처리 4주 후의 혈액 중 lactic dehydrogenase, aspartate aminotransferase, alanine aminotransferase, alkaline phosphatase, creatine phosphate kinase, gamma-glutamyl transferase의 활성과 total protein, albumin, glucose, cholesterol, triglyceride, creatinine, blood urea nitrogen, calcium, phosphorus, uric acid의 함량을 측정하였다 (**Table 18, 19**). 수컷에서는 대조구에 비해 처리구에서 lactic dehydrogenase, aspartate aminotransferase, alanine aminotransferase, alkaline phosphatase는 활성이 증가하였으며, glucose, cholesterol의 함량은 낮아졌고 그 외 항목은 영향을 받지 않았다 (**Table 18**). 암컷에서는 lactic dehydrogenase, aspartate aminotransferase, alanine aminotransferase 및 cholesterol함량도 증가하였다. glucose, creatine phosphate kinase가 감소하였으며 나머지 항목은 영향을 받지 않았다(**Table 19**).

Table 16. Urinalysis in mice treated orally with RF for 4 weeks[1)]

Item		Male (㎕/30 g)				Female (㎕/30 g)			
	Range	0	15	30	60	0	15	30	60
pH	5	2	0	0	0	0	0	1	1
	6	3	8	5	2	9	8	8	4
	7	1	2	5	6	0	1	1	4
	8	4	0	0	2	1	1	0	1
Protein	-	2	0	0	0	4	0	0	0
	Trace	4	2	2	1	1	3	2	1
	30 ㎎/dℓ	2	4	1	3	2	5	7	8
	100 ㎎/dℓ	2	3	3	2	3	2	1	1
	300 ㎎/dℓ	0	1	4	4	0	0	0	0
Glucose	-	7	10	10	10	8	10	10	10
	Trace	3	0	0	0	2	0	0	0
	100 mg/dℓ	0	0	0	0	0	0	0	0
	250 mg/dℓ	0	0	0	0	0	0	0	0
	500 mg/dℓ	0	0	0	0	0	0	0	0
	2,000 mg/dℓ	0	0	0	0	0	0	0	0
Ketone	-	5	4	1	2	3	1	1	2
	+	5	6	9	8	7	8	9	8
	++	0	0	0	0	0	1	0	0
	+++	0	0	0	0	0	0	0	0
Urobilinogen	-	0	0	0	0	1	0	2	0
	Normal	3	8	7	10	7	2	0	10
	1 mg/dℓ	6	2	3	0	2	8	8	0
	4 mg/dℓ	1	0	0	0	0	0	0	0
	8 mg/dℓ	0	0	0	0	0	0	0	0
	12 mg/dℓ	0	0	0	0	0	0	0	0
Bilirubin	-	3	5	4	5	3	0	0	2
	+	7	5	6	3	7	7	8	8
	++	0	0	0	2	0	3	2	0
	+++	0	0	0	0	0	0	0	0
Leukocyte	-	0	3	1	3	3	0	0	9
	+	9	6	8	5	7	8	7	0
	++	1	1	1	2	0	2	3	1
	+++	0	0	0	0	0	0	0	0
Occult blood	-	6	5	7	5	6	5	5	3
	+	0	5	1	3	1	4	5	3
	++	2	0	0	1	2	0	0	3
	+++	2	0	2	1	1	1	0	1
Nitrite	-	1	0	0	0	2	0	0	0
	Post-week	9	10	10	10	8	10	10	10
	Post-Strong	0	0	0	0	0	0	0	0
Specific Gravity	1.000	2	0	0	0	0	3	0	0
	1.015	3	0	0	4	3	4	4	1
	1.020	1	2	0	0	2	2	0	1
	1.025	3	4	3	4	3	0	5	3
	1.030	1	4	7	2	2	1	1	5

[1)]Measured 4 weeks after treatment.

Table 17. Hematological findings in mice treated orally with RF for 4 week[1)]

Item[2)]	Male (㎕/30 g)				Female (㎕/30 g)			
	0	15	30	60	0	15	30	60
WBC ($\times 10^6/\mu\ell$)	9.2	9.2	10	7.1	7.4	10.3	10.7	10.1
RBC ($\times 10^3/\mu\ell$)	8.97	9.95	9.47	8.69	8.95	9.06	8.94	9.91
Hb (g/dℓ)	15.2	15.1	15.7	14.7	15.3	16.1	15.6	16.7
Hct (%)	46.3	44.7	47.2	44.2	46.7	46.7	46.4	50
BLP ($\times 10^3/\mu\ell$)	1249	1219	1045	1464	923	1068	999	1104
MCV	52	50	50	51	52	52	52	50
MCH	16.9	16.9	16.6	17	17	17.8	17.4	16.9
MCHC	32.8	33.8	33.3	33.3	32.6	34.5	33.6	33.4

[1)]Measured 4 weeks after treatment.
[2)]WBC; white blood cell, RBC; red blood cell, Hb; hemoglobin, Hct; hematocrit, BLP; blood platelet, MCV; mean corpuscular volume, MCH; mean corpuscular hemoglobin, MCHC; mean corpuscular hemoglobin concentration.

Table 18. Biochemical findings in male mice treated orally with RF for 4 weeks[1)]

Item[2)]	Dosage (㎕/30 g)			
	0	15	30	60
TPROT (g/dℓ)	5.7	6.3	6.2	6.3
ALB (g/dℓ)	3.1	3.5	3.6	3.6
LDH (U/L)	929	898	1,060	1,050
AST (U/L)	95.1	153	140	151
ALT (U/L)	32	53	48	50
ALP (U/L)	53	69	60	67
GLU (mg/dℓ)	148	109	32	110
CHOL (mg/dℓ)	190	247	230	138
TRIG (mg/dℓ)	146	147	119	136
CREAT (mg/dℓ)	0.4	0.5	0.5	0.5
BUN (mg/dℓ)	26.2	25.4	29.6	31.3
CPK (U/L)	323	455	490	328
Ca (mg/dℓ)	14.6	15.1	14.8	14.7
P (mg/dℓ)	14.7	17.2	16.1	17.3
GGT (U/L)	0	1	0	0
Uric acid (mg/dℓ)	3.8	4.2	4.6	4.2

[1)]Measured 4 weeks after treatment.
[2)]TPROT; total protein, ALB; albumin, LDH; Lactic dehydrogenase, AST; aspartate aminotransferase, ALT; alanine aminotransferase, ALP; alkaline phosphatase, GLU; glucose, CHOL; cholesterol, TRIG; triglyceride, CREAT; creatinine, BUN; blood urea nitrogen, CPK; Creatine phosphate kinase, Ca; calcium, P; phosphorus, GGT; gamma-glutamyl transferase.

Table 19. Biochemical findings in female mice treated orally with RF for 4 weeks[1)]

Item[2)]	Dosage (㎕/30 g)			
	0	15	30	60
TPROT (g/dℓ)	5.8	6.3	6.3	6.3
ALB (g/dℓ)	4.4	3.9	3.9	3.9
LDH (U/L)	869	1,041	922	949
AST (U/L)	129	121	118	137
ALT (U/L)	32	35	38	49
ALP (U/L)	114	115	142	106
GLU (mg/dℓ)	139	81	40	111
CHOL (mg/dℓ)	140	157	163	199
TRIG (mg/dℓ)	130	145	129	123
CREAT (mg/dℓ)	0.5	0.5	0.6	0.6
BUN (mg/dℓ)	22.9	24.7	24.3	25
CPK (U/L)	559	604	323	399
Ca (mg/dℓ)	14	15	15.3	15.3
P (mg/dℓ)	16.7	16.8	16.4	18.2
GGT (U/L)	1	0	1	1
Uric acid (mg/dℓ)	3	2.6	3.1	3.5

[1)]Measured 4 weeks after treatment.
[2)]TPROT; total protein, ALB; albumin, LDH; Lactic dehydrogenase, AST; aspartate aminotransferase, ALT; alanine aminotransferase, ALP; alkaline phosphatase, GLU; glucose, CHOL; cholesterol, TRIG; triglyceride, CREAT; creatinine, BUN; blood urea nitrogen, CPK; Creatine phosphate kinase, Ca; calcium, P; phosphorus, GGT; gamma-glutamyl transferase.

사) 육안적 부검소견

RF 시료를 농도별 (0, 15, 30, 60 ㎕/30 g mouse body weight)로 ICR 암수 각 10 마리에 경구투여 하여 아성독성시험을 4주간 수행하면서 장기 (간, 위, 지라, 콩팥, 허파)의 정상/이상 증상을 육안적으로 조사하였다 (**Table 20**). 시료 투여 후 4주 후 장기를 적출하여 이상 유무를 조사한 결과 암수 모두에서 아무런 이상적인 증상은 관찰되지 않았다.

따라서 이 RF는 4주간의 아급성 독성시험에서 ICR mouse 장기의 육안적 소견에 아무런 영향을 미치지 않았다.

Table 20. Gross finding in mice treated orally with RF for 4 weeks

Organ		Male (㎕/30 g)				Female (㎕/30 g)			
		0	15	30	60	0	15	30	60
Liver	NGF[2)]	10[1)] (100%)	10 (100%)	10 (100%)	10 (100%)	10 (100%)	10 (100%)	10 (100%)	10 (100%)
Stomach	NGF	10 (100%)	10 (100%)	10 (100%)	10 (100%)	10 (100%)	10 (100%)	10 (100%)	10 (100%)
Spleen	NGF	10 (100%)	10 (100%)	10 (100%)	10 (100%)	10 (100%)	10 (100%)	10 (100%)	10 (100%)
Kidney	NGF	10 (100%)	10 (100%)	10 (100%)	10 (100%)	10 (100%)	10 (100%)	10 (100%)	10 (100%)
Lung	NGF	10 (100%)	10 (100%)	10 (100%)	10 (100%)	10 (100%)	10 (100%)	10 (100%)	10 (100%)

[1)]Value are expressed as animal numbers.
[2)]No gross finding.,( ); % of finding.

아) 장기중량측정

RF 시료를 농도별 (0, 15, 30, 60 ㎕/30 g mouse body weight)로 ICR 암수 각 10 마리에 경구투여 하여 아성독성시험을 4주간 수행하면서 처리 4주 후의 장기 (간, 위, 지라, 콩팥, 허파)의 무게를 측정하였다 (**Table 21, 22**). 수컷과 암컷의 간, 위, 지라 및 왼·오른쪽 콩팥의 무게에는 아무런 영향을 미치지 않았다.

Table 21. Organ weights in male mice treated orally with RF for 4 weeks

Organ	Dosage (㎕/30 g)			
	0	15	30	60
Liver	2.06±0.23[1)]	1.82±0.19	1.93±0.13	1.60±0.19
Stomach	0.43±0.13	0.47±0.08	0.46±0.06	0.48±0.13
Spleen	0.16±0.03	0.14±0.05	0.15±0.03	0.16±0.09
Kidney L.	0.34±0.05	0.29±0.07	0.32±0.07	0.27±0.06
Kidney R.	0.33±0.05	0.29±0.07	0.31±0.07	0.27±0.06
Lung	0.25±0.03	0.21±0.02	0.23±0.02	0.48±0.13

[1)]Means ± SD of mice 4 weeks after treatment.

Table 22. Organ weights in female mice treated orally with RF for 4 weeks

Organ	Dosage (㎕/30 g)			
	0	15	30	60
Liver	1.32±0.19[1)]	1.37±0.17	1.14±0.13	1.53±0.20
Stomach	0.44±0.11	0.52±0.12	0.47±0.09	0.45±0.09
Spleen	0.12±0.04	0.13±0.03	0.12±0.03	0.14±0.03
Kidney L.	0.19±0.04	0.20±0.04	0.20±0.03	0.22±0.03
Kidney R.	0.19±0.04	0.19±0.04	0.20±0.03	0.20±0.03
Lung	0.19±0.02	0.21±0.02	0.21±0.02	0.21±0.02

[1)]Means ± SD of mice 4 weeks after treatment.

자) 조직병리 검사

RF 시료를 농도별 (0, 15, 30, 60 ㎕/30 g mouse body weight)로 ICR 암수 각 10 마리에 경구투여 하여 아성독성시험을 4주간 수행하면서 Adrenal gland의 Subcapsular cell hyperplasia, Accessory adrenal, Hyperplasia 및 Cortical cell; Heart의 Hyperplasia, Mesothelial cell, 및 Peritoneum; Liver의 Chronic inflammation, Hepatocellular hypertrophy, Centrilobule, Hyperplasia, Mesothelial cell, 및 Peritoneum; Kidney의 Hyperplasia, Transitional cell, Pelvis, Protein cast, Infiltration, 및 LC. interstitium; Spleen의 Hyperplasia, Mesothelial cell, Peritoneum, Extramedullary hematopoiesis 및 Congestion을 조사하였고, Brain, Pituitary gland, Testis, Prostate, Ovary, Thymus의 병리학적인 검사를 하였다 (**Table 23**). 시료 투여 후 4주 후 장기를 적출하여 병리학적인 검사를 한 결과 암수 모두에서 아무런 이상적인 증상은 관찰되지 않았다.

따라서 이 RF는 4주간의 아급성 독성시험에서 ICR mouse 장기의 병리 조직학적 측면에서 독성으로 의심되는 변화가 관찰되지 않았다.

Table 23. Histopathologic incidence in mice treated orally with RF for 4 weeks

Item examined	Male (㎕/30 g)		Female (㎕/30 g)	
	0	60	0	60
Adrenal gland[1)]	n.f. *	n.f.	n.f.	n.f.
Brain	n.f.	n.f.	n.f.	n.f.
Pituitary gland	n.f.	n.f.	n.f.	n.f.
Heart[2)]	n.f.	n.f.	n.f.	n.f.
Liver[3)]	n.f.	n.f.	n.f.	n.f.
Kidney[4)]	n.f.	n.f.	n.f.	n.f.
Spleen[5)]	n.f.	n.f.	n.f.	n.f.
Testis	n.f.	n.f.		
Prostate	n.f.	n.f.		
Ovary			n.f.	n.f.
Thymus	n.f.	n.f.	n.f.	n.f.

[1)]Subcapsular cell hyperplasia, Accessory adrenal, Hyperplasia, Cortical cell
[2)]Hyperplasia, Mesothelial cell, Peritoneum, Chronic inflammation
[3)]Hepatocellular hypertrophy, Centrilobule, Hyperplasia, Mesothelial cell, Peritoneum
[4)]Hyperplasia, Transitional cell, Pelvis, Protein cast, Infiltration, LC. interstitium
[5)]Hyperplasia, Mesothelial cell, Peritoneum, Extramedullary hematopoiesis, Congestion
[6)]n.f.: no finding.

다. RF의 시제품

- 이 제품의 규격서는 제 5절 산업화 방안에서 상세히 설명되어 있습니다.

Figure 19. Top: RF and Bottom: rose essences.

제 5절 육고기향, 송이향 및 장미향의 산업화

1. 제품 설명서

□ Natural meat flavor HK (No. 1)

- Definition

Meat flavor extracts is prepared from the liquid culture of mushroom mycelia (*Pleuoroteus ostreous*) in a typical medium with composition of amino acids and monosaccharides.

- Specification

◇ Appearance : Brownish-yellow solution
◇ Odor : Strong cooked beef-like
◇ Solubility : Water soluble
◇ Physical properties : pH : 6.2-7.2
Heavy metals : Max. 20 ppm
As : Max. 2 ppm

- Packing

◇ Unit of packing : 100 g, 1 kg, bulk
◇ Contents to sticker : The contents will be described in buyer's requested contents.

- Storage

Date of Expiration : 1 year from M. Date
This product can be stored at room temperature in a container without a direct ray of light.

- Volatile flavor compounds analyzed by GC-MS

RT	Compounds	RT	Compounds
8.36	2-Furancarboxaldehyde	22.85	Benzaldehyde
9.13	2-Furanmethanol	27.21	1-Dodecanol
10.26	1,2,3-Trimethoypentane	29.86	2,6-Di(t-butyl)-4-hydroxy-4-methyl-2,5- cyclohexadian-1-one
10.61	1,3-Dioxan-5-ol	33.37	Cyclohexadecane
12.62	2-Mercaptothiophene	38.86	1-Octadecene
12.64	3-Thiophenethiol	40.09	2,4-Diethoxy-5-methoxy-1-(2-propenyl)benzene
14.11	3,6-Pyridazinedione	43.11	Thiophene
18.02	2-Formyl-5-methylthiophene	43.86	5-Eicosene
18.57	2-Furanacetic acid		

▶ Sample strip

□□ □□Roasted meat flavor (water)

- Definition

Meat flavor extracts is prepared from the liquid culture of mushroom mycelia (*Pleuoroteus ostreous*) in a typical medium with composition of amino acids and monosaccharides.

- Specification

◇ Appearance : Brownish-yellow solution

◇ Odor : Strong cooked beef-like

◇ Solubility : Water soluble

◇ Physical properties : pH : 6.2-7.2

Heavy metals : Max. 20 ppm

As : Max. 2 ppm

- Packing

◇ Unit of packing : 100 g, 1 kg, bulk

◇ Contents to sticker : The contents will be described in buyer's requested contents.

- Storage

◇ Date of Expiration : 1year from M. Date

◇ This product can be stored at room temperature in a container without a direct ray of light.

- Volatile flavor compounds analyzed by GC-MS

RT	Compounds	RT	Compounds
8.36	2-Furancarboxaldehyde	22.85	Benzaldehyde
9.13	2-Furanmethanol	27.21	1-Dodecanol
10.26	1,2,3-Trimethoypentane	29.86	2,6-Di(t-butyl)-4-hydroxy-4-methyl-2,5-cyclohexadian-1-one
10.61	1,3-Dioxan-5-ol	33.37	Cyclohexadecane
12.62	2-Mercaptothiophene	38.86	1-Octadecene
12.64	3-Thiophenethiol	40.09	2,4-Diethoxy-5-methoxy-1-(2-propenyl)benzene
14.11	3,6-Pyridazinedione	43.11	Thiophene
18.02	2-Formyl-5-methylthiophene	43.86	5-Eicosene
18.57	2-Furanacetic acid		

□ Beef Flavor (Oil)

- Definition

Beef flavor is prepared from the liquid culture of mushroom mycelia (*Pleuoroteus ostreous*) in a typical medium with composition of amino acids and monosaccharides and solubilized in beef fat.

- Specification

◇ Appearance : Slightly brownish solid at room temperature

◇ Odor : Roasted and cooked beef-like

◇ Solubility : Oil soluble

◇ Physical properties :

pH : 6.2-7.2,

Heavy metals : Max. 20 ppm

As : Max. 2 ppm

- Packing

◇ Unit of packing : 100 g, 1 kg, customer oder

◇ Contents to sticker : The contents will be described in buyer's requested contents.

- Storage

◇ Date of Expiration : 1 year from M. Date

◇ This product can be stored at room temperature in a container without a direct ray of light.

☐ Tricholoma matsutake flavor (TMF-08291)

- Definition

Tricholoma matsutake flavor extracts is prepared from the liquid culture of mushroom mycelia (*Tricholoma matsutake*) in a typical medium with composition of amino acids, monosaccharides, and precursor to produce *Tricholoma matsutake* flavor.

- Specification

◇ Appearance : Brownish-yellow solution

◇ Odor : Strong *Tricholoma matsutake* flavor (Korean wild type)

◇ Solubility : Water soluble

◇ Physical properties :

pH : 6.2-7.2

Heavy metals : Max. 20 ppm

As : Max. 2 ppm

- Packing

◇ Unit of packing : 100 g, 1 kg, customer required

◇ Contents to sticker : The contents will be described in buyer's requested contents.

- Storage

◇ Date of Expiration : 1year from M. Date

◇ This product can be stored at room temperature in a container without a direct ray of light.

- Volatile flavor compounds analyzed by GC-MS

No	Compounds	No	Compounds
1	2-Propanol	8	3-Octanone
2	n-Hexanal	9	1-Octen-3-one
3	n-Butanol	10	1-Octene-3-ol
4	2-Heptanone	11	Benzaldehyde
5	Methyl hexanoate	12	Phenylacetaldehyde
6	2-Pentylfuranl	13	Methyl *trans-cinnamate*
7	n-Pentanol		

▶ Sample strip

☐ Natural RF

- Definition

Tricholoma matsutake flavor extracts is prepared from the liquid culture of mushroom mycelia (*Tricholoma matsutake*) in a typical medium with composition of amino acids ,monosaccharides, and precursor to produce *Tricholoma matsutake* flavor.

- Specification

◇ Appearance : Brownish-yellow solution

◇ Odor : Strong *Tricholoma matsutake* flavor (Korean wild type)

◇ Solubility : Water soluble

◇ Physical properties :

pH : 6.2-7.2

Heavy metals : Max. 20 ppm

As : Max. 2 ppm

- Packing

◇ Unit of packing : 100 g, 1 kg, customer required

◇ Contents to sticker : The contents will be described in buyer's requested contents.

- Storage

◇ Date of Expiration : 1year from M. Date

◇ This product can be stored at room temperature in a container without a direct ray of light.

- Volatile flavor compounds analyzed by GC-MS

No	Compounds	No	Compounds
1	2-Propanol	8	3-Octanone
2	n-Hexanal	9	1-Octen-3-one
3	n-Butanol	10	1-Octene-3-ol
4	2-Heptanone	11	Benzaldehyde
5	Methyl hexanoate	12	Phenylacetaldehyde
6	2-Pentylfuranl	13	Methyl *trans-cinnamate*
7	n-Pentanol		

▶ Sample strip

☐ Pork Flavor (Oil)

- Definition

Pork flavor is prepared from the liquid culture of mushroom mycelia (*Pleuoroteus ostreous*) in a typical medium with composition of amino acids and monosaccharides and solubilized in pork fat.

- Specification

◇ Appearance : Slightly brownish solid at room temperature

◇ Odor : Roasted and cooked pork-like

◇ Solubility : Oil soluble

◇ Physical properties :

pH : 6.2-7.2

Heavy metals : Max. 20 ppm

As : Max. 2 ppm

- Packing

◇ Unit of packing : 100g, 1 kg, customer oder

◇ Contents to sticker : The contents will be described in buyer's requested contents.

- Storage

◇ Date of Expiration : lyear from M. Date

◇ This product can be stored at room temperature in a container without a direct ray of light.

□ Chicken Flavor (Oil)

- Definition

Chicken flavor is prepared from the liquid culture of mushroom mycelia (*Pleuoroteus ostreous*) in a typical medium with composition of amino acids and monosaccharides and solubilized in chicken fat.

- Specification

◇ Appearance : Slightly brownish solid at room temperature

◇ Odor : Roasted and cooked chicken-like

◇ Solubility : Oil soluble

◇ Physical properties :

pH : 6.2-7.2

Heavy metals : Max. 20 ppm

As : Max. 2 ppm

- Packing

◇ Unit of packing : 100 g, 1 kg, customer oder

◇ Contents to sticker : The contents will be described in buyer's requested contents.

- Storage

◇ Date of Expiration : lyear from M. Date

◇ This product can be stored at room temperature in a container without a direct ray of light.

2. 국내 향료업체를 통한 산업화

가. 롯데음료중앙연구소

롯데중앙연구소에서 본 기술의 이전제안 및 원료공급을 위해 세미나 개최함

나. 주식회사 보락

향료제조 시에 원료로 사용할 것을 검토

다. (주)엔비텍

기술이전 및 원료 구입건으로 몇 차례 당사를 방문하여 논의함

라. KBF

라면스프등의 seasoning소재를 전문으로 생산하는 업체로 육고기향에 대한 원료공급에 관심이 큼

마. 양파시험장

양파추출물을 기능성소재로 하는 음료를 비롯한 여러 가지 식품을 개발하여 관련업체에 기술이전을 주요 사업으로 하고있는 데, 양파를 소재로 한 제품의 가장 큰 문제는 양파냄새로 인한 기호도의 저하이다. 양파시험장은 버섯균사체추출물을 이용하여 개발된 송이향의 첨가로 인해 양파냄새를 줄일 수 있으며 신선한 송이향 가향효과를 낼 수 있는 향료로 사용하기 위해 시험 중에 있다.

3. 외국 향료업체를 통한 산업화

가. 외국인의 버섯향에 대한 기호도

1) 버섯향에 대한 해외시장성 및 외국인의 기호도 조사

가) 버섯자실체 추출물 및 균사체를 이용한 향료의 개발 및 이용은 아직 미개척 분야이며, 소규모 유럽 향료회사에서 Bolex라는 버섯자실체 추출물을 이용한 향 base를 판매하고 있지만 그 외에는 제품이 없다.

나) 버섯의 좋은 이미지와 천연소재라는 점에서 우수성을 인정받을 수 있을 것이라는 전문가들의 견해이며, 미국시장에서 버섯균을 이용한 천연향의 제품개발이 아직 이루어지지 못한 것은 미생물배양과 향료화학의 접목이 아직 원활하지 못했기 때문이라는 결론을 얻었다.

나. 외국의 제휴 및 수출가능 업체

1) GENEVA: 미국 위스칸신에 소재하는 업체로써 육고기향을 전문으로 생산 판매하고있는 회사이다. 본 연구진이 직접 방문하여, GENEVA의 R&D부 manager인 Shane T. McDonald박사와 본 기술의 결과물인 버섯균사체육고기향의 산업화에 대해 논의하였으며, 기능성소재함유 식물성 육고기향이라는 점에서 커다란 기대를 하였으며, 시료를 보내 줄 것을 요청 받았다.
2) Whole Flavors, LLC.: 미국 위스칸신 메디슨에 소재하는 회사로써 치즈가공 후에 나오는 슬러지를 이용하여 flavor enhancer를 개발하여 시판하는 회사로써, 그 회사의 Managing Director인 Christopher G. Gilmore는 Whole Flavor에서 생산하는 meat flavor enhancer와 버섯균사체육고기향을 혼합함으로써 새로운 flavor enhancer를 제조하고자 시료를 요청하였다.
3) Firmenich: 미국의 N.J.에 지사를 두고있는 세계적인 다국적 flavor회사로써 senior scientist인 Charlene Zeng, Ph D. 와 vice president 인 Dr. Carol Karaheidien과 상담하였으며 시료요청을 받았다.
4) Givaudan Roure: 미국의 오하이오주에 있는 향료회사로써 principal flavorist인 Dr. David B. Josephson과 상의하였으며, 장미향에 대한 관심이 높았으며, 시료를 송부할 예정임
5) V&R: Morell버섯추출물로 식품첨가물을 제조하는 회사로써 버섯균사체배양추출물을 버섯향의 base로 사용하고자 시료를 송부하기로 함
6) KLAFIR, ToKyo등의 일본 식품회사: 주로 송이향에 관심이 많았으며, (주)Best Denso사는 송이향을 첨가하여 제조한 머쉬-고 plus에 많은 관심을 가지고 수입을 위해 통관절차를 밟고 있다.

4. 기술이전

한국산업기술센터와 같은 기술이전 전문기관에 의뢰 할 것이다.

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

제 1절 연차별 연구개발 목표와 달성도

1. 1차년도

연구 개발 목표	추 진 일 정												결과(100%)
	8	9	10	11	12	1	2	3	4	5	6	7	
○ 목표향료 생산용 버섯균주 선발													100%
○ 목표향료 생산용 최적 액체배지조제													100%
○ 목표향료 생산을 위한 최적배양조건 구명													100%
○ 버섯균사체와 자실체로부터 목표향료 추출방법 연구													100%
○ 품질 재현성조사 ○ 생산된 향료의 평가(관능검사, 성분분석) ○ 목표향의 독성검사													100%
													100%

_____ : 계획 ..... : 달성도

2. 2차년도

연구 개발 목표	추 진 일 정												결과(100%)
	8	9	10	11	12	1	2	3	4	5	6	7	
○ 배양액을 이용한 반응 flavor 제조													100%
○ WONF제조													100%
○ 생산된 목표향의 적용성 조사													100%
○ 목표향 시제품 생산													100%
○ 생산된 향료의 평가 (관능검사, 성분분석)													100%
○ 목표향의 독성검사													100%

_____ : 계획 ..... : 달성도

3. 3차년도

연구 개발 목표	추 진 일 정												결과(100%)
	8	9	10	11	12	1	2	3	4	5	6	7	
○ 향료의 대량생산													100%
○ 산업화													100%
○ 생산된 향료의 평가 (관능검사, 성분분석)													100%
○ 목표향의 독성검사													100%

_____ : 계획 ..... : 달성도

제 2절 관련분야 기여도

1. 기술적 측면

가. 버섯균사체를 액체배양에 의한 향료생산기술과 향료추출기술을 접목하여 국산천연향을 생산하는 기술이 개발되었다.

나. 라면스프, 다시다 등의 소재로 사용되고있는 버섯향 base는 현재 자실체로부터 추출하여 사용하고있으며. 이를 대체할 수 있는 향 base를 생산하는 기술이 개발되었다.

다. 국산향료소재 생산기술의 부족으로 외화 낭비가 심하다. 그러나, 기후 등의 재배조건과는 별개로 연중생산조절이 가능한 버섯균을 이용한 국산 향료 소재 생산으로 향료 기본 소재의 많은 부분이 수입대체 될 수 있는 기술이 개발되었다.

라. 대부분의 천연향에 있어 단점이 되는 향의 강도는 버섯균사 배양조건 조절과 배양액에 향미 성분 전구물질의 첨가에 의한 향미 강화기술이 개발되었다.

2. 경제·산업적 측면

가. 향료의 수입대체효과 (수 백억원)

1) 한국 향료시장규모 약 1천억원 중 90%가 외국으로부터 수입되고 있는데 이의 대체효과를 얻을 수 있다.

2) 담배의 가향에 사용되는 장미향은 하나의 단일 향으로 년 간 1억원 어치를 수입하고있고, 이와 유사하게 음료수, 빙과, 과자류, 비누, 샴푸 등에 사용되는 수입향료에 지출되는 비용이 많다. 본 기술개발로 이를 크게 줄일 수 있다.

나. 농산물 수입억제

1) 라면스프와 다시다 등의 향미소재로 사용되는 표고버섯 엑기스는 값이 싼 중국산 표고를 원료로 사용하는데 년 간 10억원 정도가 된다.

2) 표고버섯균사체 엑기스로부터 제조되는 향 base는 이를 대체할 수 있다.

다. 수출효과

한국에서 자생하는 송이, 표고와 같은 버섯균의 독특한 맛과 향을 즐기는 일본, 유럽, 미국 등지에 수출함으로써 외화획득을 기대할 수 있다.

라. 국산품의 소비촉진

제품의 상품성이 향에 의해 결정되고, 폭발적인 판매고를 유발하는 경우가 많으므로, 국산제품의 상품성을 높이는데 필요한 국산 향료개발은 외국상품의 소비억제와 국산품의 소비촉진에 기여 할 수 있다.

마. 산업발전 기여

향료는 생산비가 판매가의 20~30% 밖에 안 되는 고부가가치 상품인데, 이는 원료비보다 제조기술의 know how가 향료생산에 매우 중요한 역할을 하기 때문에 기술개발은 곧 경제와 산업의 발전과 직결된다.

제 5장 연구개발결과의 활용계획

제 1절 가향제로 활용

1. 식품향

   가. 배양액의 농축액은 라면스프, 다시다 등의 가향제로 사용되는 버섯향, 육고기향, 코코아향, 치즈향, 과일향 제조 시에 향 base로 활용될 것이다.

   나. Essential oil, oleoresin, supercritical CO_2 extract는 음료수, 술, 빙과, 아이스크림 등의 가향제로 활용될 것이다.

2. 담배향

   담배의 향base로의 사용된다. 담배의 가향에 사용되는 성분들 (vanilla, benzaldehyde, geraniol등)이 버섯균사체에 의해 대량으로 합성될 수 있다.

3. 의약품

   의약품의 가향에 사용될 수 있으며, 본 기술에 의해 개발된 향료를 사용할 경우, 추가적인 생리활성 기능성도 기대된다.

4. 화장품

   버섯균에 의해 생성되는 항산화물질 (retinol, polyphenol), 노화억제물질이 동시에 추출되는 향료 추출방법 (용매추출법)을 이용함으로서 기능성을 가진 향료로 활용될 수 있다.

5. 기타 방향제 등의 소재로 사용될 수 있다.

제 2절 산업화에 활용

1. 식품소재회사에 향료 base로 판매한다.

2. 식품, 의약품, 화장품회사에 향료 (essential oil, oleoresin, supercritical CO_2 extract)로 판매한다.

3. 현재, ㈜고려식료, ㈜거성식품과는 표고버섯 향 base, 느타리버섯향 base의 활용에 관한 구체적인 논의가 진행되고 있다.

4. 세계 최대향료회사인 Firmanech (Dr. Carol Karahedian, Dr. David Josephson)로부터는 시제품을 보낼 것을 요청 받았다.

제 3절 버섯균사체를 이용한 향료생산과 상품화

1. 목적향과 향 base는 대량생산하여 산업화 할 것이다.

2. 단향은 더욱 연구를 진행하여 수율을 높이는 연구를 수행할 것이다.

제 6 장 수집한 해외과학기술정보

제 1절 외국인의 버섯향에 대한 기호도 조사

1. 버섯자실체 추출물 및 균사체를 이용한 향료의 개발 및 이용은 아직 미개척 분야이며, 소규모 유럽 향료회사에서 Bolex라는 버섯자실체 추출물을 이용한 향 base를 판매하고 있지만 그 외에는 제품이 없다.

2. 버섯의 좋은 이미지와 천연소재라는 점에서 우수성을 인정받을 수 있을 것이라는 전문가들의 견해이며, 미국시장에서 버섯균을 이용한 천연향의 제품개발이 아직 이루어지지 못한 것은 미생물배양과 향료화학의 접목이 아직 원활하지 못했기 때문이라는 결론을 얻었다.

3. 또한, 한국인과 일본인이 매우 좋아하는 송이버섯과 같은 품종이 미국인에게는 Morell 버섯이며, 우리나라에서도 자생하는 품종으로 우리나라에서는 곰보버섯이라고 불린다는 사실을 알았으며, 곰보버섯 역시 송이버섯과 마찬가지로 인공재배가 불가능한 버섯으로 미국에서는 야생에서 채취한 곰보버섯이 파운드 당 50달러를 상회한다는 사실도 알았다.

4. 미국시장에 내놓을 버섯균사체 향은 곰보버섯, 일본시장에는 송이버섯, 한국과 중국시장에는 표고버섯 배양체로부터 버섯향 생산을 1차 목표로 하여 연구 및 제품개발에 착수하기로 결론을 얻었다.

5. 한편, 외국의 여러 전문가들의 견해를 미리 수렴함으로서 해외시장이 요구하는 제품을 주요 개발품목으로 설정함으로써, 목표를 더욱 명확히 할 수 있게 되었다. 곰보버섯향과 송이버섯향의 경우는 미국의 e-flavorchem과 Whole flavors와 공동으로 판매할 것을 논의하였다.

제 2절 해외 시장개척을 위해 면담한 유명인사

1. Shane T. McDonald, Ph.D.
   - Manager at Geneva Ingredients, Inc. Waunakee, WI 53597 USA
   - 버섯균사체배양물의 천영향료 base 활용 논의 (원료수출의 가능성 논의)

2. Christopher G. Gilmore, Ph.D.
   - Managing Director at Whole Flavors, LLC, Madison, WI 53704, USA
   - 버섯균사체배양물을 이용한 flavor enhancer 활용성 검토 (원료의 미국시장진출)

3. Robert C. Lindsay, Ph.D.
   - Professor, Department of Food Science, University of Wisconsin- Madison, Madison, WI 53706, USA
   - 버섯균사체배양물 (Morell 버섯균사체 배양물)의 미국인 기호도와 느타리 표고버섯균사체 배양물을 이용한 향료 base의 활용성 및 미국시장성 검토

4. Carol Karaheidien, Ph.D.
   - R&D manager at Firmenich, Princeton, NJ 08543, USA,
   - 버섯균사체 배양물의 천연향료소재로써의 활용성검토

5. Jaehyuk Yu, Ph.D.
   - Professor, Food Microbiology & Toxicology, University of Wisconsin-Madison, Madison, WI 53706
   - 향기성분생성을 위한 버섯균주의 유전자조작 가능성 검토

6. David B. Josephson, Ph.D.
   - Principle Flavorist at Givaudan Roure, Cincinnati, OH 45216
   - 본 연구과제의 수행결과 상품화가 가능한 제품에 대해 공동판매 논의 (미국, 유럽, 아시아지역)

제 7장 참고문헌

1. Park,H.M., Shin,H.D., Oh,D.C., Yun,K.S., and Lee,C.K. Fundamentals of the Fungi. ***The World Science. Seuol. Korea.*** (2000)

2. Sung,J.M., Yu,Y.B., and Cha,D.L. Mushroom Science. ***Kyohak. Seuol. Korea.*** (1998)

3. Hong,J.S., and Kim,T.Y. Composition of organic sugar and sugar alcohol in *Pleurotus ostreatus, Lentinus edodes and Agaricus bisporus*. ***Kor. J. Food Sci. Tech.*** 20:459-462 (1988)

4. Hwang,S.H., Kim,J.I., and Sung,C.J. Analysis of dietary fiber content of some vegetables, mushrooms, fruits and seaweeds. ***J. Kor. Soc. Food Nutr.*** 29:89-96 (1996)

5. Hong,J.S., Kim,Y.H., Lee,K.R., Kim,M.K., Cho,J.S., Park,K.H., Choi,Y.H., and Lee,J.B. Composition of organic acid and fatty acid in *Pleurotus ostreatus, Lentinus edodes and Agaricus bisporus*. ***Kor. J. Food Sci. Tech.*** 20:100-105 (1989)

6. Kwon,Y.J., and Uhm,T.B. A study on the lipid components in oyster mushroom (*Pleurotus florida*). ***J. Kor. Soc. Food Nutr.*** 13:175-180 (1984)

7. Bano,Z., and Rajarathnam,S. *Pleurotus* mushroom. Part Ⅲ. Chemical composition, nutritional value, postharvest physiology, preservation, and role as human food. ***CRC Rev. Food Sci. Nutri.*** 27:87-158 (1988)

8. Jung,S.T., and Hong,J.S. Volatile components of oyster mushroom (*Pleurotus sp.*) cultivated in korea. ***Kor. J. Mycol.*** 19:299-305 (1991)

9. Jung,I.C., Park,S., Park,K.S., and Ha,C.H. Antioxidative effect of fruit body and mycelia extracts of *Pleurotus ostreatus*. ***Kor. J. Food Sci. Tech.*** 28:464-469 (1996)

10. Kim,G.J., Kim,H.S., and Chung,S.Y. Effects of varied mushroom on lipid compositions in dietary hypercholestrolemic rats. ***J. Kor. Soc. Food Nutr.*** 21:131-135, (1992)

11. Flores J. Medierranean vs northera european meat products. Processing technologies and main differences. ***Food Chem.*** 59:505-510 (1997)

12. Picardi,S.M., and Issenberg,P. Investigation of some volatile constituents of mushroom (*Agaricus bisporus*); Change which occur during heating. ***J. Agric. Food Chem.*** 21:959-962 (1973)

13. Cronin,D.A., and Ward,M.K. The characterization of some mushroom volatile. ***J. Sci. Fd. Agric.*** 22:447-480 (1971)

14. Mega,J.A. Mushroom flavor. ***J. Agric. Food Chem.*** 29:1-4 (1981)

15. Tressl,R., Bahri,D., and Engel,K.H. Formation of eight-carbon components in mushroom (*Agaricus bisporus*). ***J. Agric. Food Chem.*** 30:89-93 (1982)

16. Chen, C.C., and Wu, C.M. Volatile components of mushroom (*Agaricus subrufecens*). ***J. Food Sci.*** 49:1208-1210 (1984)

17. Ahn,J.S., and Lee,K.H. Studies on the volatile aroma components of edible mushroom (*Pleurotus ostreatus*) of Korea. ***J. Kor. Soc. Food Nutr.*** 15:258-262 (1986)

18. Mottram,D.S. Flavour formation in meat and meat products: a review. ***Food Chem.*** 62:415-424 (1998)

19. Hong,J.S. Studies on the physio-chemical properties and the cultivation of oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*). ***J. Kor. Agric. Chem. Soc.*** 21:150-184 (1978)

20. Sensory and chemistry analysis of cooked porcine meat patties in relation to warmed-over flavour and pre-slaughter stress. ***Meat Sci.*** 59:229-249 (2001)

21. Ko,S.N., Yoon,S.H., Yoon,S.K., and Kim,W.J. Development of meat-like flavor by maillard reaction of model system with amino acids sugars. ***Kor. J. Food. Tech.*** 29:827-838 (1997)

22. Farmer,L.J., Ronald,L.S., and Patterson. Compounds contributing to meat flavor. ***Chem.*** 40:201-205 (1991)

23. Hackerman,R.H. Studies on chitin 1. Enzyme degradation of chitin and chitin esters. ***J. Biol. Sci.*** 7:168-170 (1954)

24. Hong,J.S., Lee,J.Y., Kim,H.K., Kim,M.K., Jung,G.T., and Lee,K.R. Studies on the volatile aroma components of *Pleurotus ostreatus*. ***Kor. J. Mycol.*** 14;31-36 (1986)

25. Kim,J.O, Park,C.W., Kim.J.M., and Ha,Y.L. Reduction of mouse body fats by water extract of *Pleurotus ostratus*. ***Kor. J. Food Sci.*** (1999).

26. Park,M.H., Oh,K.Y., and Lee,B.W. Anti-cancer activity of *Letinus edoeds* and *Pleurotus astreatus*. ***Kor J. Food Sci. Tech.*** 30:702-708 (1998)

27. Spackerman,D.H., Stein,W.H., and Moore,S. Automatic recording apparatus for use in the chromatography of amino acid. ***Anal. Chem.*** 30:1190 (1958)

28. You,C.H., Yoo,Y.B., and Park,Y.H. Studies on protoplast formation and reversion of *Pleurotus sapidus*. ***Kor. J. Mycol.*** 16:214-219 (1988)

29. Meynier,A., and Mottram,D.S. The effect of pH on the formation of volatile compounds in meat-reacted model systems. ***Food Chem.*** 52:361-365 (1995)

30. Molly,K., Demeyer,D., Johansson,G., Raemaekers,M., Ghistelinck,M., and Geenen,I. The importance of meat enzymes in ripening and flavour generation in dry fermented sausages. First results of a European project. ***Food Chem.*** 59:539-545 (1997)

31. Montel,M.C., Masson,F., and Talon,R. Bacterial role in flavour development. ***Meat Sci.*** 49:111-123 (1998)

32. Leod,G.M., and Ames,J.M. Capillary gas chromatography-mass spectrometric analysis of cooked ground beef aroma. ***J. Food Sci.*** 51:1472-1434 (1986)

33. Yoo,S.S., Min,S.S., and Kim,T.H. The study on the formation of sulfur-containing compounds responsible for meat flavor generated by the maillard reaction. ***Food Sci. Biotech.*** 7:122-126 (1998)

34. Lomascolo,A., Stentelaire,C. Marcel Asther and Laurence Lesage-Meessen. Basidiomycetes as new biotechnological tools to generate natural aromatic flavours for the food industry. ***Trends in Biotech.*** 17; 282-289(1999)

35. Wilkes,J., Conte,E.D., Kim,Y.K., Holcomb,M., Sutherland,J.B. and Miller,D.W. Sample preparation for the analysis of flavors and off-flavors in foods. ***J. Chromatography A***, 880: 3-33(2000)

36. Ruth.,J.D., Natural flavours. Overviews and applications of analytical methods and microbial production. ***Biomolecular Eng.*** 17; 119(2001)

37. Mau,J.L., Lin,H.C. and Chen,C.C. Non-volatile components of several medicinal mushrooms. ***Food Res. International*** 34; 521-526(2001)

38. Chang,H.L., Chao,G.R., Chen, C.C. and Mau,J.L. Non-volatile taste components of Agaricus blazei, Antrodia camphorata and Cordyceps militaris mycelia. ***Food Chem.*** 74: 203-207 (2001)

39. Raes,K., Balcaen,A., Dirinck,P., Winne,A. D., Claeys,E., Demeyer,D. and Smet., S. D. Meat quality, fatty acid composition and flavour analysis in Belgian retail beef. ***Meat Sci.*** 65: 1237-1246 (2003)

40. O'Sullivan,M.G., Byrne,D.V., Jensen,M.T., Andersen,H.J. and Vestergaard,J. A comparison of warmed-over flavour in pork by sensory analysis, GC/MS and the electronic nose. ***Science*** 65: 1125-1138(2003)

41. Pastorelli,G., Magni,S., Rossi,R., Pagliarini,E., Baldini,P., Dirinck,P., Opstaele,F.Van and Corino.,C. Influence of dietary fat, on fatty acid composition and sensory properties of dry-cured Parma ham. ***Science*** 65: 571-580(2003)

42. Wiklund,E., Johansson,L. and Malmfors,G. Sensory meat quality, ultimate pH values, blood parameters and carcass characteristics in reindeer (Rangifer tarandus tarandus L.) grazed on natural pastures or fed a commercial feed mixture. ***Food Qual. Preser.*** 14: 573-581 (2003)

43. Shovkovy,I. and Huang,M. Gapless two-flavor color superconductor. ***Physics Letters*** B, 564: 205-211 (2003)

44. Blaek,T. and King,S.F. Lepton flavour violation in the constrained MSSM with natural neutrino mass hierarchy. ***Nuclear Physics*** B, 662: 359-378(2003)