

Research Note

## 목이버섯으로부터 추출한 항혈전물질의 제품화와 동물실험을 통한 항혈전활성 검증

박영서\* · 최혁준<sup>1</sup>

경원대학교 식품생물공학과, <sup>1</sup>(주)비케이바이오

### Production of Antithrombotic Material Extracted from *Auricularia auricular-judae* and the Verification of Its Antithrombotic Activity via Animal Test

Young-Seo Park\* and Hyuk-Joon Choi<sup>1</sup>

Department of Food Science and Biotechnology, Kyungwon University

<sup>1</sup>BK bio Co., Ltd.

#### Abstract

Large-scale preparation steps of antithrombotic materials from wood ear mushroom (*Auricularia auricular-judae*) were established as follows. Grounded dry wood ear mushroom was extracted with 75% ethanol and its precipitate was extracted with 76°C water for 2 hr followed by filter pressing. The filtrate was then concentrated by vacuum and extracted with 80% ethanol, and the resulting precipitate was then freeze-dried. The formula of the product was determined using consumer susceptibility tests as follows; mushroom extract 90.5%, high fructose corn syrup 2.0%,  $\beta$ -cyclodextrin 1.5%, fructo-oligosaccharide 2.0%, pear puree 4.0%. When the packed products were stored at 25, 37, or 45°C for 8 weeks, there were no noticeable changes in water activity, moisture content, pH, and acidity. The viable cell number of total bacteria was slightly increased during the storage period at 25 and 37°C. The total bacteria were not detected in the product when stored at 45°C. When the product was injected intravenously into rat at the level of 1,000 mg/kg, antithrombotic activities such as activated partial thromboplastin time, thrombin time, prothrombin time, and FIB were increased when compared with the control group. When the product was administered orally into rat at the level of 500 mg/kg, it showed the same antiplatelet activity to aspirin.

**Key words:** *Auricularia auricular-judae*, antithrombotic activity, animal test

## 서 론

최근 10년간 뇌혈관 질환, 심장질환 및 고혈압성 질환 등 순환기 계통 질환에 의한 사망률 변화를 보면 인구 10만명 당 1998년 121.0명에서 2008년 109.5명으로 약간 감소하였는데, 지난 1998년에 비해 뇌혈관질환 사망률은 74.0명에서 56.5명으로 13.3명 감소한 반면, 고혈압성질환 사망률은 8.4명에서 9.6명으로 1.2명 증가하였고 심근경색 등 심장질환의 사망률은 38.6명에서 43.4명으로 4.8명 증가하는 경향을 나타내어, 심장질환 등 심혈관계 질환은 국민 건강에 심각한 문제를 야기시키는 질병으로 사회적 관심의

대상이 되고 있다(통계청, 2010). 심혈관계 질환의 예방과 치료에는 혈전용해제, 항혈소판제, 항응고제 등이 보편적으로 사용되고 있는데, 현재 임상에서는 심혈관계 환자의 경우 스타틴 계열의 콜레스테롤 저하제, coumadin 등의 항응고제, 아스피린 등의 항혈소판제를 장기 복용하도록 처방하여 혈관 협착을 억제하고 있다(Jaques, 1979). 그러나 이러한 약제들은 어디까지나 이미 심혈관질환이 발생한 환자를 대상으로 한 2차 예방을 위한 것이며, 세계적으로도 근원적인 예방을 위한 1차 예방제는 개발되지 못한 상황이다(McGinnis & Outschoom, 1991).

2010년 현재 혈전 예방 및 치료제의 세계 시장은 22조 원을 형성하고 있고 국내의 경우 4,000억원에 달하고 있으며 clopidogrel 제제인 플라빅스가 2009년 기준으로 1,126억 원의 매출을 올리고 있어 시장 점유율 1위를 지키고 있으며 플라빅스의 복제약인 플라비톨과 플래리스도 2009년도에 각각 391억원, 332억원의 매출을 올려 플라빅스 관련 제품만 2,000억원 규모의 시장을 형성하고 있다.

Corresponding author: Young-Seo Park, Department of Food Science and Biotechnology, Kyungwon University, Seongnam, Gyeonggi-do 461-701, Korea

Tel: +82-31-750-5378; Fax: +82-31-750-5273

E-mail: ypark@kyungwon.ac.kr

Received November 8, 2010; revised November 22, 2010; accepted November 23, 2010

최근 보건복지가족부는 ‘요양급여 적용기준 및 방법에 관한 세부사항’을 개정 고시하여 2010년 3월부터 심혈관, 뇌혈관, 말초동맥성 질환 혈전 예방 및 치료에 아스피린제 제만을 1차적으로 사용하게 제한하였다. 다른 계열 치료제를 1차 약제로 사용할 경우 건강보험에 적용되지 않으며, 아스피린의 효과가 없거나, 위장관 출혈 등 부작용이 있거나, 고위험군 환자에게만 사용할 수 있도록 하였다. 이로써 항혈전제 시장 뿐 아니라 전체 처방약 시장에서 수년째 매출 1위를 고수하고 있는 clopidogrel 제제 항혈전제의 매출이 대폭 하락할 것으로 예상되며, 반면, 1차 치료제로 단독 인정받게 된 아스피린제제의 매출은 상승할 것으로 전망된다. 그러나 아스피린은 혈전 생성단계 중 단지 1단계만 억제하는 관계로 항혈전 효과에 한계가 있고, 트롬빈 등에 의해 항혈전 효과는 크게 감소되며, 투여량이 높을 경우 장 출혈의 원인이 되고, 심한 발적이나 설사를 유발시키기도 하는 문제점이 있다. 이러한 항혈전제 시장의 변화에 따라 혈행개선효과를 지니는 건강기능식품의 시장이 상대적으로 증가할 것으로 예측되며 혈전 예방 및 치료제 시장의 상당부분을 가져올 것을 예상된다.

목이버섯(*Auricularia auricula* (L. et Hook) Underw.)은 담자균류(Basidiomycetes)의 목이과(Auriculariales) 진균으로, 한약제로서 각종 약리작용에 의한 민간요법제로 사용되어 왔고, 특히 피를 활성화시키는 등 피를 맑게 하는 작용이 뛰어나다고 알려져 있다(Lee et al., 1981; Kim & Kim, 1995). 본 연구팀에서는 목이버섯을 여러 가지 용매로 분획 추출하여 이들 추출물의 항혈전효과를 조사함으로써 심혈관계질환을 예방할 수 있는 기능성 식품원료로서의 개발 가능성을 확인한 바 있다(Park et al., 2009). 따라서 본 연구에서는 목이버섯 추출물의 산업화를 위하여 제품화 공정을 확립하고 동물실험을 통하여 제품의 항혈전효과를 검증하고자 하였다.

## 실험 재료 및 방법

### 버섯 시료

본 실험에 사용한 버섯은 경동시장에서 건조된 것을 구입하여 사용하였다.

### 버섯 시료의 전처리와 추출

버섯 시료의 전처리와 열수 추출, 알칼리 추출, 메탄올 및 에탄올 추출 등 항혈전물질의 추출은 전보와 동일하게 수행하였다(Park et al., 2009).

### 혈행 개선 활성 측정

제품의 activated partial thromboplastin time(APTT), thrombin time(TT), prothrombin time(PT), FIB(fibrinogen) 등의 항응고활성과 혈전 용해 활성 측정 및 항혈소판응집능

의 측정은 전보와 동일하게 수행하였다(Park et al., 2009).

### 제품화를 위한 부재료 첨가와 관능검사

항혈전활성을 지니고 있는 목이버섯 추출물을 이용하여 소비자 기호도가 높은 분말제품의 제조를 위해 부재료를 선정하여 배합비 결정과 기호도 조사를 병행하였다.

#### (1) 1차 소비자 기호도 검사

패널 대상은 경원대학교 20대 대학원생과 대학생 30명으로 하였다. 첨가되는 부재료는 액상 고과당(high fructose corn syrup, HFCS),  $\beta$ -cyclodextrin, 올리고당을 사용하였고 액상 고과당과 올리고당을 각각 1.0%씩 첨가하고  $\beta$ -cyclodextrin의 농도를 달리하여 용수에 용해한 후 동결건조한 다음 목이버섯의 에탄올 추출 침전물의 동결건조분말을 90% 되도록 첨가하였다. 시료는 용기에 1g씩 담아 패넬에 제공하였고 각 시료의 용기에는 난수표에서 선택한 세 자리 숫자를 표시하였다. 시료와 시료 사이에 입을 헹굴 수 있도록 정수된 물( $20 \pm 2^\circ\text{C}$ )과 뺀 컵을 함께 제공하여 시료를 평가하기 전에 시료의 강한 특성에 따른 전 시료와의 혼란과 감각의 둔화를 줄이기 위해, 2-3번 정도 충분한 입 헹굼을 하도록 하였다. 입 헹굼을 하면서 네 가지 시료를 다 맛본 후, 전반적인 기호도가 높은 순으로 점수를 매겨 해당하는 칸에 시료의 번호를 적도록 하였으며, 한 칸에 하나의 시료 번호만을 쓰도록 하였다. 평가는 소비자 패넬과 1:1 면접 방식으로 실시하였으며, 전반적인 기호도를 평가하게 하였다. 전반적인 기호도는 15점 척도의 rank-rating scale를 사용하여 1점은 ‘매우 좋지 않다’, 15점은 ‘매우 좋다’로 평가하였다.

#### (2) 2차 소비자 기호도 검사

패널 대상은 경원대학교 20대 대학원생과 대학생 30명으로 하였다. 이 단계에서는 액상 고과당의 함량을 결정하기 위하여  $\beta$ -cyclodextrin을 1.5%, 올리고당을 1.0%로 고정된 뒤, 액상 고과당의 첨가 비율을 다르게 하여 각각 4가지의 시료를 준비하였다. 평가 절차는 1차 소비자 기호도 검사와 동일하였다.

#### (3) 3차 소비자 기호도 검사

패널 대상은 경원대학교 20대 대학원생과 대학생 30명으로 하였다. 이 단계에서는 올리고당의 함량을 결정하기 위하여  $\beta$ -cyclodextrin을 1.5%, 액상과당을 2.0%로 고정된 뒤, 올리고당의 첨가 비율을 다르게 하여 각각 4가지의 시료를 준비하였다. 평가 절차는 1차 소비자 기호도 검사와 동일하였다.

#### (4) 통계 분석

시료 간의 전반적인 기호도에 대한 유의적 차이를 검증

하기 위하여 분산 분석(analysis of variance, ANOVA)을 수행하였으며, 그 결과에 따라 Duncan's multiple range test ( $\alpha=0.05$ )를 수행하였다. 단맛의 정도, 버섯 향미의 정도는 just about right는 0점으로, much too weak는 -5점, much too strong은 +5점으로 환산하여 시료 간의 평균값을 계산하였다. 통계 분석에는 SPSS for Windows 14.0(SPSS Inc., Chicago, IL, USA)을 사용하였다.

### 제품의 이화학적 미생물학적 특성 분석

#### (1) 수분활성도와 수분함량

수분활성도는 Water Activity Meter(Aqualab lite, Decagon Devices, Inc, Pullman, WA, USA)로 측정하였고, 수분함량은 IR Moisture meter(Kett Electric Lab, Tokyo, Japan)로 물의 끓는점보다 높은 105°C에서 건조시켜 증발된 수분의 함량(%)을 측정하였다.

#### (2) pH와 산도 측정

pH는 pH meter(Orion model 310, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA)를 사용하여 실온에서 측정하였다. 적정산도는 시료 10 mL에 증류수 20 mL를 가하고 0.1% phenolphthalein 2-3방울을 가하고 0.1 N NaOH로 pH가 8.3이 될 때까지 적정하고, 이 때 소비된 0.1 N NaOH의 부피로부터 아래의 식을 이용하여 산도를 계산하였다.

#### (3) 미생물 생균수 측정

총균, 효모와 곰팡이의 생균수는 표준한천배양법으로 측정하였으며, 시료를 0.9%(w/v) NaCl 용액을 이용하여 10<sup>9</sup>까지 십진 희석하여 고체배지에 1 mL씩 분주하였다. 총균은 plate count agar(PCA, Difco, Co., Detroit, MI, USA) 배지를 사용하여 37°C에서 24시간 배양하였고, 효모는 yeast extract malt extract(YM) agar(Difco, Co., USA)를 사용하여 30°C에서 3-4일간 배양하였으며, 곰팡이는 potato dextrose agar(PDA, Difco, Co., USA)를 사용하여 30°C에서 4-5일간 배양하였다. 배양 후 colony 수가 100-300개인 평판을 택하여 colony 수를 측정하고 희석배수를 곱하여 단위부피 당 생균수(CFU/mL)를 산출하였다.

### 동물실험을 통한 항혈전능 평가

제품의 항혈전능과 항혈소판응집능을 측정하기 위하여 6주령 ICR mouse를 구입하여 동물실험실에서 1주간 순화시켰다. 실험 동물의 평균 몸무게는 약 30 g이었고, 투여 용량은 250, 500, 1,000 mg/kg의 3가지로 결정하였다. 각 투여용량 group 당 4마리의 mouse를 사용하였고, 대조군은 개발 제품 대신 saline을 투여하였으며 3마리를 사용하였다. 투여는 꼬리정맥에 단회 투여하였고, 투여 후 15분 뒤에 gas 마취하여 복강을 열고, 복대정맥에서 0.8 mL를

주사기로 채혈하여 바로 sodium citrate tube에 옮겨 담은 다음, 원심분리하여 혈장을 냉동 보관하였다. 냉동된 혈장은 항혈전능 검사를 측정하기 직전에 37°C 항온수조에서 녹여 항응고 검사장비(Stago, Parsippany, NJ, USA)로 측정하였다.

또한 체중이 200-250 g인 수컷 SD rat 15마리를 3그룹으로 나눈 다음 zoletil 복강 내 마취하에 개복하지 않고 26 G 바늘을 이용하여 심장에서 2 mL씩 채혈하였다. 채혈한 혈액중 전혈 450  $\mu$ L를 사용하여 각 개체의 초기 항혈소판활성치를 측정하였다. 초기 항혈소판활성치를 측정 후 마취에서 깨어난 쥐들 중 제1그룹의 쥐들에게는 아무 것도 투여하지 않고 방치하였다. 제2그룹은 비교를 위하여 아스피린을 매일 100 mg/kg씩 경구투여하였고, 제3그룹은 본 개발제품을 매일 250 또는 500 mg/kg씩 경구투여하였다. 6일 동안 투여한 후 실험동물들을 zoletil 복강 내 마취하에 개복하여 심장구멍(heart puncture)을 통해 혈액을 채취하여 항혈소판활성을 측정하였다.

### 통계분석

모든 실험은 최소 3번 반복하여 평균과 표준편차를 구하였으며, 얻은 실험값의 통계분석은 Windows 용(ver. 16.0) SPSS(statistical package for the social science, SPSS Inc., Chicago, IL, USA) 통계 package를 이용하였으며 Duncan의 다중범위검정( $\alpha=0.05$ )을 실시하여 유의차를 분석하였다.

## 실험 결과

### 항혈전물질의 산업화 생산 공정 확립

본 연구팀은 전보(Park et al., 2009)에서 목이버섯으로부터 항혈전물질을 추출 정제하여 그 구조와 특성을 분석한 바 있다. 항혈전물질의 구조 분석을 위한 추출과정에는 NaOH와 methanol에 의한 추출공정이 포함되는데 항혈전물질을 제품화하여 식용할 경우에는 methanol의 독성에 따른 안전성의 문제가 있기 때문에 안전성을 고려한 제품 생산을 위하여 제품화를 위한 대량생산 공정에는 NaOH와 methanol에 의한 추출공정을 생략하고 대신 ethanol 추출공정과 열수추출공정을 도입하고자 다음과 같은 최적 추출조건 실험을 수행하였다.

건조된 목이버섯 400 g을 분쇄하여 75% ethanol을 2 L 첨가한 후 상온에서 24시간 교반하였다. 교반이 끝난 혼합물을 원심분리하여 ethanol을 제거한 후 침전물을 회수하여 10 L의 증류수를 첨가하고 40-100°C의 범위에서 각각 다른 온도로 가열하면서 추출기를 사용하여 추출하였다. 추출액을 여과기로 압착여과하여 여과액을 얻은 후 각 여과액의 고형분 함량을 측정된 결과를 Table 1에 나타내었다. 열수 추출 시 열수의 온도가 70°C보다 낮은 경우 추출 고형분의 함량이 현저히 감소하는 것을 알 수 있었는데 이

**Table 1. Effect of extraction temperature and ethanol concentration on the solid content from *Auricularia auricula***

Water extraction temperature (°C)	Solid content (%)	Ethanol concentration (%)	Solid content (%)
40	0.30	40	4
		60	8
		70	23
		80	26
		90	27
50	0.35	40	6
		60	11
		70	27
		80	30
		90	32
60	0.45	40	10
		60	12
		70	36
		80	43
		90	44
70	0.69	40	30
		60	50
		70	65
		80	64
		90	68
80	0.74	40	34
		60	54
		70	70
		80	74
		90	74
90	0.78	40	41
		60	54
		70	75
		80	75
		90	76
100	0.79	40	42
		60	54
		70	73
		80	75
		90	75

는 목이버섯으로부터 추출하고자 하는 항혈전성분은 분자량이 큰 고분자 다당류로 저온에서는 잘 침출되지 않는다는 것을 의미한다.

각 여과액을 고형분 함량이 10%될 때까지 50°C에서 감압농축하고 각 농축 추출물에 ethanol을 최종 농도가 40-90% 첨가한 후 4°C에서 24시간 방치하였다. 정지 후 생성된 ethanol 침전물을 여과기로 압착 여과한 후 얻어진 침전물의 건조 질량을 측정된 결과, ethanol 침전물의 고형분 함량은 ethanol 혼합 후의 최종 ethanol 농도가 70% 미만인 경우 그 수율이 현저히 낮은 것을 알 수 있었다.

목이버섯 분쇄물로부터 ethanol을 첨가하여 추출할 경우 분리된 추출액에는 목이버섯 분쇄물로부터 추출된 색소 성분을 포함한 저분자 물질, 저분자 당당류 및 목이버섯 표면의 오염물질 등의 가용성 성분이 함유되어 있다. 이러한 가용성 성분을 제거하기 위해서는 ethanol과 목이버섯 분쇄물의 비율이 100:1-200:1(v/w)인 것이 효율적인 것으로 확인되었다(결과 미제시). Ethanol의 첨가량이 많을수록 그 가용성 성분의 추출은 용이하나 ethanol의 분리 및 회수 공정에 많은 비용이 들어가고 ethanol 함량이 너무 낮은 경우는 가용성 성분의 추출 수율이 낮아지는 문제점이 있다.

열수를 이용한 추출 도중 수분의 증발을 막기 위하여 환류냉각기가 장착된 추출기를 사용하는 것이 적당하다고 판단된다. 열수 추출물은 원심분리 또는 필터프레스를 이용하여 상등액만을 분리하고, 분리한 상등액을 건조하면 항혈전 성분을 얻을 수 있다. 이 때 사용 가능한 건조 방법으로는 분무건조, 동결건조, 드럼건조 등이 있으며 건조공정을 용이하게 하기 위하여 감압농축하여 고형분의 함량을 높이는 것이 좋다.

이상의 결과로부터 다음과 같은 항혈전물질의 대량 생산 공정을 확립하였다. 즉, 건조된 목이버섯 500 g을 40 mesh 이하로 분쇄하여 75% ethanol 10 L를 첨가한 후 상온에서 24시간 교반한다. 교반이 끝난 혼합물을 원심분리하여 침전물을 회수하여 20 L의 증류수에 첨가한 후 76°C의 온도로 가열하면서 2시간 추출한 후 압착여과하여 여과액 15 L를 얻는다. 이 추출물을 고형분 함량이 10%가 되도록 감압농축한 후 여기에 최종 농도가 80%가 되도록 ethanol을 첨가하고 4°C에서 24시간 방치한다. Ethanol 침전물을 압착여과하여 ethanol에 의한 침전물을 회수한 후 잔류 ethanol을 50°C 진공오븐에서 완전히 제거하고 잔류 수분은 동결건조하여 수분함량 4%의 수용성 추출물을 얻는다.

상기 제조공정을 이용하여 생산된 동결건조물은 총균수가 1.25 log CFU/g의 수준으로 검출되었고 효모나 곰팡이는 검출되지 않았다. 이는 제조공정 상 ethanol과 열수추출에 의해 목이버섯에 존재하는 미생물이 대부분 사멸한 것으로 보이며, 따라서 추가적인 살균공정은 필요하지 않은 것으로 판단되었다.

#### 제품 형태 개발과 소비자 기호도 조사

목이버섯으로부터 추출한 항혈전물질의 제품 형태는 음료 형태, 분말 형태, 환 형태 등이 가능하지만 목이버섯 추출물 자체의 맛이나 향기에 대한 기호도가 근본적으로 낮기 때문에 음료 형태로 제품화하기에는 무리가 있을 것으로 판단되었으며 환 형태의 경우 섭취 시 거부감이 있을 것으로 예상되었다. 또한 제조공정 상 최종 단계에서 동결건조에 의해 분말화가 되므로 기호성과 제조공정 상의 단순화를 고려하여 최종적인 제품 형태는 분말 형태로 결정하였다.

**Table 2. Recipe of ethanol extract solution overall liking scores**

Number	HFCS (%)	$\beta$ -Cyclodextrin (%)	Oligosaccharide (%)	Overall liking	Sweetness	Mushroom flavor
1st test						
T-1	1.0	0.2	1.0	5.12 <sup>b*</sup>	-2.01	2.03
T-2	1.0	0.5	1.0	4.06 <sup>b</sup>	-1.79	1.67
T-3	1.0	1.0	1.0	4.99 <sup>b</sup>	-1.83	2.46
T-4	1.0	1.5	1.0	7.11 <sup>a</sup>	-1.72	0.67
T-5	1.0	2.0	1.0	6.53 <sup>a</sup>	-1.43	0.72
2nd test						
S-1	0.5	1.5	1.0	7.64 <sup>a</sup>		
S-2	1.0	1.5	1.0	7.32 <sup>a</sup>		
S-3	1.5	1.5	1.0	8.21 <sup>a</sup>		
S-4	2.0	1.5	1.0	8.52 <sup>a</sup>		
3rd test						
P-1	2.0	1.5	0.5	8.20 <sup>c</sup>		
P-2	2.0	1.5	1.0	9.04 <sup>b</sup>		
P-3	2.0	1.5	2.0	11.21 <sup>a</sup>		
P-4	2.0	1.5	4.0	10.64 <sup>a</sup>		

\*Mean scores of 30 consumers.

\*Values within a row not sharing a superscript letter are significantly different ( $p < 0.05$ , Duncan's multiple range test).

분말화된 제품의 포장을 위해서 여러 가지 포장재를 검토하였다. Aluminium foil은 산소투과도가 낮고 비틀림에 견고하다는 장점 때문에 과자, 인스턴트 식품, 커피, 차, 버터, 치즈 등의 포장재로 많이 이용되므로 aluminium foil을 포장재의 기본재로 사용하였다. 분말제품은 수분에 대한 차단성이 중요하므로 수분차단성과 내화학적 및 가격이 저렴한 장점이 있고, 열접착성이 없어서 밀봉이 어려운 aluminium foil의 단점을 보완할 수 있는 polyethylene(PE)을 aluminium foil 포장재의 안쪽에 적층시키고, 기계적 강도와 질감성, 차단성이 좋은 polyethylene terephthalate (PET)를 바깥면에 라미네이팅시킨 파우치(PE-Al-PET)를 이용하여 분말제품을 포장하였다. Al foil은 산소투과도가 낮고 비틀림에 견고하다는 장점 때문에 과자, 인스턴트 식품, 커피, 차, 버터, 치즈 등의 포장재로 이용된다.

제품의 기호성 향상을 위하여 소비자 검사를 3차에 걸쳐 수행하였다. 사용한 부재료는 액상과당(HFCS, high fructose corn syrup),  $\beta$ -cyclodextrin, 올리고당(fructo-oligosaccharide)을 사용하였다. 1차 소비자 검사를 위해 목이버섯 추출 침전액 특유의 맛을 제거하고 제품의 맛을 부드럽게 하기 위해서  $\beta$ -cyclodextrin을 목이버섯 추출 침전액에 용해한 후 동결건조하였다.  $\beta$ -Cyclodextrin은 포접 화합물을 형성함으로써 탈취, 냄새 은폐, 이미 제거, 용해도 개선, 향미의 안정화 등의 작용을 한다고 알려져 있다. 단맛의 경우 설탕 대신 액상과당을 사용한 것은 좀 더 풍부하고 부드러운 감미를 주기 위해서이며, 액상과당은 특히 미생물에 대한 우수한 안정성을 가지고 있기 때문이다.  $\beta$ -Cyclodextrin의 이취제거 효과를 알아보기 위해  $\beta$ -cyclodextrin을 0.2-2.0%까

지 목이버섯 추출 침전액에 첨가하여 측정해 본 결과, 1.50% 이상이 되었을 때부터 소비자들은 버섯 냄새가 감소되어 전체적인 기호도가 상승함을 알 수 있었다(Table 2). 1차 소비자 검사의 결과를 이용하여 2차 검사에서는 버섯 특유의 냄새를 억제시키기 위해  $\beta$ -cyclodextrin의 함량을 늘리고, 단맛을 높이기 위해 액상과당(HFCS)의 함량도 늘렸다. 2차 기호도 검사 결과 1차 기호도 검사 결과와 비교하여 소비자의 전체적인 기호도 평균값은 올라갔다(Table 2). 기호도의 평균값이 가장 높았던 시료는 S-4였지만, S-1, S-2 및 S-3 시료와는 유의적인 차이가 없는 것으로 나타났다. 이 실험을 통해 단맛이 아직 약한 것으로 판단되어 단맛을 조금 더 올려 3차 실험을 수행하였다. 다른 재료의 비율은 동일하게 하고 올리고당의 비율만 각각 0.5, 1.0, 2.0, 4.0%로 다르게 하여 올리고당의 차이에 따른 기호도를 조사한 결과 기호도 평균값은 올리고당을 2, 4% 넣은 시료가 다른 시료들에 비해 높았으며, 4가지 시료 모두 유의적인 차이가 있는 것으로 나왔다. 1-3차 소비자 검사 결과를 살펴보면 소비자 기호도는 단맛이 강해질수록 기호도가 올라가는 것으로 보였지만, 단맛이 어느 정도 이상이 되면 소비자들의 기호도가 낮아지는 것을 알 수 있었다. 전체적인 기호도가 가장 높았던 시료는 P-3이었으며, 배합비는 HFCS 2.0%,  $\beta$ -cyclodextrin 1.5%, 올리고당 2.0%였다. 이 외에도 배농추출액을 4% 첨가하여 버섯 고유의 이취를 masking하였다. 이상의 소비자 기호도 조사 결과에 따라 본 개발 제품에 첨가하는 부재료의 함량을 결정하여 목이버섯 추출물 90.5%, 고과당(HFCS) 2.0%,  $\beta$ -cyclodextrin 1.5%, 올리고당(fructo-oligosaccharide) 2.0%,

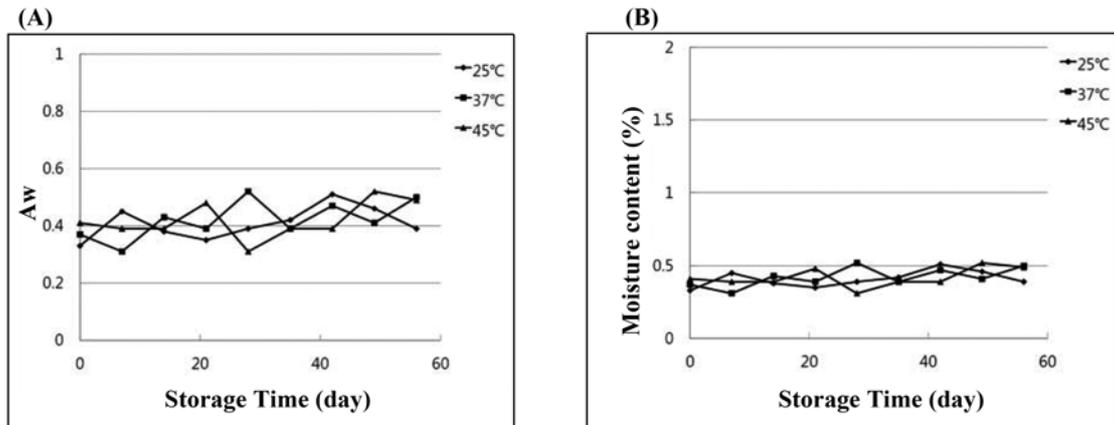


Fig. 1. Change in water activity (A) and moisture content (B) during storage at different temperatures.

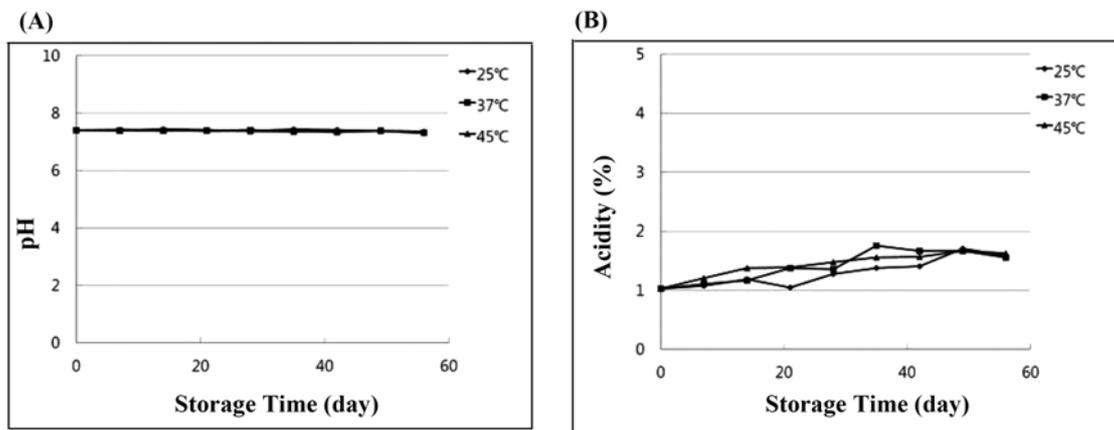


Fig. 2. Change in pH (A) and acidity (B) during storage at different temperatures.

배 농축액 4.0%로 제품의 최적 배합비를 확립하였다.

#### 제품의 저장성 검토

포장된 분말제품의 저장성을 여러 가지 온도에서 일정기간 저장하면서 제품의 이화학적 특성과 미생물 생균수를 조사하였다. 분말제품은 온도뿐만 아니라 수분 또한 중요한 품질열화요인이므로 저장온도와 저장기간에 따른 수분활성도와 수분함량의 변화를 관찰하였다. 분말제품을 25, 37, 45°C에서 2달간 저장하면서 7일 간격으로 수분활성도, 수분함량, pH, 산도를 측정하였으며 저장기간과 온도에 따른 변화를 관찰하였다. 저장온도에 따른 수분활성도의 값은 저장초기 0.33-0.41이었고 저장기간이 경과해도 유의적인 변화가 관찰되지 않았으며 저장온도에 따른 유의적인 차이도 없었다(Fig. 1). 고형분에 함유되어 있는 수분을 105°C에서 건조시켜 측정된 수분함량도 저장기간에 관계없이 0.5% 미만의 값을 갖으며 저장온도에 따른 변화를 나타내지 않았다(Fig. 1).

pH는 25, 37, 45°C 모든 온도에서 저장기간 동안 7.4의

일정한 값을 유지하였고(Fig. 2), 산도는 저장초기의 1.03%에서 2개월 경과 후 25, 37, 45°C에서 각각 1.59, 1.56, 1.63으로 약간 증가하는 경향을 나타내었다(Fig. 2).

분말제품 내 존재하는 미생물 생균수를 측정한 결과 총균은 Fig. 3과 같이 초기에 1.3 log CFU/mL로 존재하였는데 25°C와 37°C에서 저장하였을 경우 저장기간이 지남에 따라 약간 증가하여 저장 2개월 후에는 각각 1.94와 1.98 log CFU/mL의 생균수를 나타내었다. 반면에 45°C에서 저장하였을 경우에는 저장 21일째부터 감소하기 시작하여 저장 2개월 후에는 대부분 사멸하는 것으로 나타났다. 효모와 곰팡이는 저장기간 동안 관찰되지 않았다.

#### 동물실험을 통한 항혈전능 평가

실험방법에 기술한 바와 같이 쥐에 본 개발제품을 투여한 후 항혈전활성과 항혈소관활성을 측정한 결과 Fig. 4와 같이 제품을 250 mg/kg 투여하였을 때 APTT 활성은 55 sec로 대조구의 53 sec와 유의적인 차이가 없었으며 TT와 PT 활성도 각각 28.5 sec, 13.5 sec로 대조구의 26.8 sec,

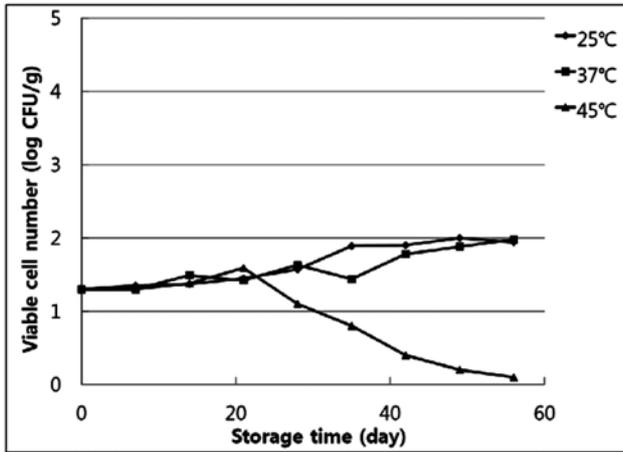


Fig. 3. Change in viable cell number of total bacteria during storage at different temperatures.

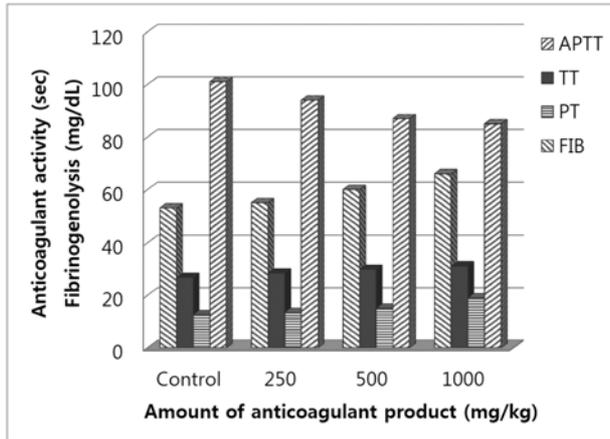


Fig. 4. In vivo test of anticoagulant activity of the product.

12.6 sec와 차이를 나타내지 않았다. 또한 FIB 활성도 대조구의 101 mg/dL와 비교할 때 큰 차이를 나타내지 않았다. 제품을 500 mg/kg 투여한 결과 APTT 활성은 60 sec, TT 활성과 PT 활성도 각각 29.9 sec, 15.0 sec로 대조구와 유의적인 차이를 나타내었으나 크게 증가하지는 않았다. 제품을 1,000 mg/kg 투여한 결과 APTT 활성은 66 sec, TT 활성과 PT 활성도 각각 31.1 sec, 19 sec, FIB 활성은 85 101 mg/dL로 대조구와 비교하였을 때 유의적으로 높은 결과를 나타내었다. 항혈소판활성의 경우에는 250 mg/kg, 500 mg/kg을 투여한 결과 각각 32%, 33.6%의 활성을 나타내어 현재 혈소판응집억제제로 널리 사용되고 있는 아스피린을 투여한 쥐와 유사한 항혈소판활성을 나타내었다 (Table 3).

이상의 결과로부터 목이버섯의 항혈전물질을 추출하여 동결건조하였을 경우 저장성이 높고 항혈전활성과 항혈소판활성이 우수한 제품을 생산할 수 있었으며 특히 동물실

Table 3. Antiplatelet activity of the product

Group	Antiplatelet activity(%)
Control	ND <sup>1)</sup>
Aspirin (100 mg/kg)	35.28±1.13 <sup>2)</sup>
Product (250 mg/kg)	31.98±0.98 <sup>b</sup>
Product (500 mg/kg)	33.62±1.02 <sup>a</sup>

<sup>1)</sup>Not detected.

<sup>2)</sup>Values within a row not sharing a superscript letter are significantly different ( $p < 0.05$ , Duncan's multiple range test).

험 결과 500 mg/kg 투여 시 기존의 항혈소판제제로 상용 중인 아스피린과 동일한 항혈소판 활성을 나타냄을 검증함으로써 본 제품이 아스피린의 대체제로 사용 가능성을 확인하였다.

### 요 약

목이버섯으로부터 항혈전물질을 추출하여 제품화하기 위한 대량생산공정을 다음과 같이 확립하였다. 즉, 건조된 목이버섯을 분쇄하여 75% ethanol로 추출하여 원심분리한 침전물에 증류수에 첨가한 후 76°C에서 2시간 추출한 후 압착여과하여 여과액을 얻는다. 이를 감압농축한 후 여기에 최종 농도가 80%가 되도록 ethanol을 첨가하여 추출한 침전물을 동결건조한다. 제품의 소비지 기호도 조사를 통해 부재료의 종류와 첨가량을 결정하여 배합비를 목이버섯 추출물 90.5%, 고과당 2.0%, β-cyclodextrin 1.5%, 올리고당 2.0%, 배 농축액 4.0%로 결정하였다. 제품을 포장하여 25, 37, 45°C에서 저장하였을 경우 저장 8주에서도 수분활성도, 수분함량, pH, 산도에 큰 변화가 없었다. 미생물 생균수는 25°C와 37°C에서 저장하였을 경우 저장기간이 지남에 따라 약간 증가한 반면, 45°C에서 저장하였을 경우에는 저장 2개월 후에는 대부분 사멸하였다. 제품을 쥐에 정맥투여하였을 경우 1,000 mg/kg 투여 시 APTT 활성, TT 활성, PT 활성, FIB 활성이 대조구와 비교하여 유의적으로 높았으며 500 mg/kg을 경구투여하였을 경우 항혈소판활성이 아스피린과 동일한 수준을 나타내었다.

### 감사의 글

이 연구는 2008년도 중소기업청 산학협력실 지원사업에 의해 수행되었으며 2010년도 경원대학교 지원에 의한 결과임.

### 참고문헌

Jaques LB. 1979. Heparin: an old drug with a new paradigm. Sci. 206: 528-533.

- Kim SS, Kim YP. 1995. Korean mushrooms. Yu-Pung Co. Ltd., Seoul, Korea, p. 321.
- Lee SA, Jung KS, Shim MJ, Choi OC, Kim PK. 1981. The study on anticancer component of Korea Basidiomycetes (II), *Schizophyllum* and *Auricularia auricula-judae-judae*. Korean Soc. Mycol. 9: 25-32.
- McGinnis DM, Outchoorn AS. 1991. Problems of component activities of heparin. Pharmacop. Forum 5: 2438-2441.
- Park YS, Choi HJ, Choi TH. 2009. Purification of antithrombotic material from *Auricularia auricular-judae* extracts and its anti-thrombotic activity. Food Eng. Prog. 13: 326-334.
- 통계청. 2010. 2008년 사망원인통계. 통계연감.