

반응표면분석을 이용한 상황버섯 열수추출액의 최적 추출조건과 품질 특성

윤선주¹ · 조준구¹ · 권대준² · 최응규³ · 강선철^{4,*}

¹(주)바이오파머, ²아시아대학교 한약자원학과, ³아시아대학교 한방식품영양학과, ⁴대구대학교 생명공학과

Determination of Optimal Conditions by Response Surface Methodology and Quality Characteristics of Water Extracts of *Phellinus linteus*

Sun-Joo Youn¹, Jun-Gu Cho¹, Dae-Jun Kwoen², Ung-Kyu Choi³ and Sun-Chul Kang^{4,*}

¹Biofarmer Co. Ltd, Kyungsan, 712-714, Korea

²Department of Oriental Medicine Resource, Asia University, Kyungsan, 712-220, Korea

³Department of Oriental Medical Food and Nutrition, Asia University, Kyungsan, 712-220, Korea

⁴Department of Biotechnology, Daegu University, Kyungsan, 712-714, Korea

Received May 3, 2006; Accepted June 27, 2006

Response surface methodology was implemented to determine an optimal extraction condition in *Phellinus linteus* water extract. Extraction was performed on 10 experimental conditions including independent variables such as extraction time (1~5 hrs) and water volume over sample (sample : H₂O = 1 : 40~200, W/V), color browning, reducing and total sugar, that were based on the significant levels of 10% of central composition design. Color browning, reducing and total sugar contents were found to be more affected when the water volume was increased rather than extraction time. Maximum extraction condition was acquired at extraction time of 3.0~4.5 hrs and water volume of 40~58.2 ml. Being extracted at the optimal extraction condition two of the free sugars, sucrose (0.126%) and glucose (0.012%), were detected. Total content of the free amino acids was found to be 503.26 µg%. Among them, essential amino acid contents were revealed as 5.4%. One major peak from gel permeation chromatography contained polysaccharide(s) with the molecular weights of 10 KDa.

Key words: *Phellinus linteus*, response surface methodology, optimal condition, water extraction

서 론

버섯은 진균류에 속하는 담자균과 자낭균 중 자실체를 형성하는 고등균류로서 탄수화물, 단백질, 지질, 무기질 및 비타민 등의 영양소를 골고루 함유하고 있을 뿐만 아니라 독특한 맛과 향기를 지니고 있어 예로부터 식용 및 약용으로 널리 이용되어 왔으며 최근 들어 버섯의 항암작용, 생체기능조절 및 뇌졸중, 심장병 등 성인병에 대한 효능이 밝혀지면서 소비자들의 관심이 더욱 높아지게 되었다.¹⁾ 특히 상황버섯(*Phellinus linteus*)은 분류학적으로 소나무 비늘버섯과(*Hymenochaetaceae*), 진흙버섯속(*Phellinus*)에 속하는 백색부후균으로 항암력이 매우 우수한 버섯으로 알려져 있으며 한명(漢名)으로는 간황(幹黃)이라고 한다.^{2,4)} 약리작용으로는 소화기계통의 암인 위암, 식도암, 십이지

장암, 결장암, 직장암을 비롯한 간암수술 후 화학요법을 병행할 때 면역기능을 향진시키고, 자궁출혈 및 대하, 월경불순, 장출혈, 오장기능의 활성화 및 해독작용을 한다. 그러나 상황버섯은 자연계에서 분포 및 발생수가 극히 적어 자실체를 얻기 어려우며, 인공배양 역시 어려운 것으로 알려져 이에 대한 화학적, 생화학적 연구는 거의 이루어지지 못하였다. 1990년대 중반 균사체 배양기술과 인공재배법이 확립된 후 농가에서 대량생산되면서부터 가정에서 대체의학 또는 민간요법용으로 많이 사용되고 있다.

상황버섯에 대한 연구보고는 주로 상황버섯의 약리작용에 관한 연구가 대부분이며, 추출액의 품질 특성 및 최적 추출조건에 관한 연구보고는 송 등³⁾ 외에는 거의 없는 실정이며, 상황버섯을 이용한 건강보조식품이 판매되고 있으나 아직까지 혼합음료 등의 다양한 종류의 식가공품의 개발은 미흡한 실정이다. 본 연구에서는 반응표면분석법을 이용하여 상황버섯 최적 열수추출조건을 확립하며, 최적 열수추출조건에서 추출한 추출액의 품질 변화를 조사하고자 실험을 행하였다.

*Corresponding author
Phone: +82-53-850-6553; Fax: +82-53-850-6559
E-mail: sckang@daegu.ac.kr

재료 및 방법

재료. 상황버섯은 경북 경산시 소재 버섯재배농가로부터 자실체를 구매하여 5~10 mm의 크기로 분쇄 후 실험에 이용하였다.

열수추출. 열수추출조건을 확립하고자 추출온도를 100°C로 고정하였고, 추출시간(1, 2, 3, 4 and 5 hrs)과 상황버섯 1g 당 가수량(40, 80, 120, 160 and 200 ml)을 달리하여 추출액을 제조하였으며 제조한 추출액은 부직포로 1차 여과한 다음 Whatman No. 2 filter paper로 감압 여과하여 실험에 사용하였다.

반응표면 분석. 최적 열수추출조건은 중심합성 계획법(central composite design)으로 설계하였고,⁶⁾ 반응표면 회귀식을 위해서 statistical analysis system(SAS) program을 사용하였다.⁷⁾ 중심합성계획에 의한 열수추출 시 추출온도를 100°C로 고정하고 추출시간(X_1 : 1, 2, 3, 4 and 5 hrs)과 상황버섯 1g 당 가수량(X_2 : 40, 80, 120, 160 and 200 ml)를 독립변수로 하여 Table 1과 같이 5단계로 부호화(-2, -1, 0, 1 and 2)하여 10개의 실험군으로 설정하여 실시하였고, 그 실험값은 Table 2에 나타내었다. 또한 실험 중의 종속변수(Y_n)는 갈색도(Y_1), 환원당(Y_2) 및 총당(Y_3) 함량을 3회 반복 측정하여 평균값을 회귀분석에 사용하였다. 이때 두개의 독립변수와 종속변수에 대한 2차 회귀모형식은 식 (1)과 같다.

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_{11} X_1^2 + \beta_{22} X_2^2 \quad (1)$$

여기서 Y 는 종속변수이며, X_1 과 X_2 는 독립변수, β_0 는 절편, β_n 은 회귀계수이다. 회귀분석에 의한 모델식의 예측에는 SAS program이 사용되었고, 회귀분석의 결과 임계점이 최대점이거나 최소점이 아닌 안장점의 경우에는 능선분석을 하여 최적점을 구하였다. 또한 추출조건에 대한 품질특성의 모니터링은 SAS에서 예측된 모델식을 이용하여 3차원 반응표면분석으로 해석하였다.

갈색도. 갈색도는 추출액을 증류수로 일정량 희석하여 UV-spectrophotometer(UV-1601, SHIMADZU, Japan)로 420 nm에서 흡광도를 측정하였다.

환원당 및 총당 함량. 환원당은 DNS법⁸⁾에 준하여 실험하였다. 총당 함량은 phenol-sulfuric acid법⁹⁾에 준하여 실시하였으며, 이들 당류의 정량은 glucose를 표준물질로 사용하여 시험한 후 표준곡선으로부터 환산하여 시료의 환원당 및 총당 함량을 정량하였다.

무기원소 함량. 상황버섯 추출액 10 ml을 Kjeldahl flask에 넣고 열판 위에서 완전히 건조시킨 후 냉각시킨 다음 5 ml의 H_2SO_4 를 첨가하여 10분간 가열한다. 여기에 H_2O_2 를 소량 첨가하면서 완전 백색이 될 때까지 분해하고, 증류수로 희석한 후 Toyo No. 2 filter paper로 여과시킨다. 여과한 분획액을 적당한

농도로 희석한 뒤 원자흡광분석기(Perkin-Elmer 2380)를 이용하여 K, Ca, Mg, Na 등의 원소를 분석하고,¹²⁾ N은 Indophenol 법, P는 ammonium meta vanadate법으로 분석하였다.

유리당의 종류 및 함량. 추출액 또는 농축액을 0.45 μ m Millipore filter와 Sep-Pak C₁₈ resin으로 여과 후 HPLC로 분석하였다. HPLC 조건은 mobil phase; 3rd H_2O , injection volume; 20 μ l, column temperature; 85°C, flow rate; 0.5 ml/min로 하여 RI detector(RI 410, Waters, USA)로 carbohydrate column을 사용하였다.

유리아미노산 분석. 일정량의 추출액에 75% 에탄올을 가하여 균질화한 후 3,000 g에서 30분간 원심분리하고 얻은 상정액을 취하여 동일한 방법으로 3회 반복하여 얻은 상정액을 40°C에서 감압농축한 후 0.2 N lithium citrate buffer(pH 2.2)로 용해하고 SSA(5-sulfonyl salicylic acid dihydrate)를 첨가하여 4°C에서 90분간 반응시킨 후 0.25 μ m Millipore filter로 여과하여 자동 아미노산 분석기(Biochrom-20, Pharmacia, USA)로 분석하였다.

β -glucan성 다당류의 분리 및 분자량 측정. β -glucan 다당류는 류 등¹³⁾과 이 등¹⁴⁾의 방법을 수정하여 행하였다. 시료를 동결건조한 후 동결건조 시료에 2 N NaOH를 첨가한 후 상온에서 교반하면서 1시간 방치 후 10,000 g에서 10분간 원심분리하였다. 상등액을 취하여 2 N HCl으로 중화하고 다시 10,000 g로 10분간 원심분리하였다. 침전물을 증류수로 용해하고 투석(MW: 10,000) 후 동결건조하여 분자량 10 KDa 이상의 다당류를 얻었으며, 이들의 분자량을 확인하기 위하여 column chromatography를 실시하였다. Column chromatography는 Sepharose CL-40으로 충전한 1.6 cm \times 50 cm의 column에 5 mg/ml 농도로 만든 시료를 500 μ l를 loading하였다. 이때 유속은 2 ml/10 min, loading buffer는 3rd H_2O , fraction volume은 2 ml로 하였다. 용출된 분획들은 phenol-sulfuric acid법을 이용하여 당을 측정하였으며, 표준품(10, 64~76 and 500 KDa)의 dextran을 이용하여 분자량을 확인하였다.

결과 및 고찰

상황버섯 열수추출액의 최적화. 상황버섯의 최적 열수추출 조건을 탐색하기 위하여 Table 1과 같이 5단계로 나누어 추출조건을 설정하고 추출온도는 100°C로 고정하였다. Table 2는 추출액의 갈색도, 환원당 및 총당 함량을 조사한 결과이며, Table 3은 독립변수에 대한 종속변수(Y_n)에 반응정도를 RSM program을 이용하여 2차 다항방정식으로 나타낸 것이고, Table 4는 통계적 유의성을 나타내는 것으로 갈색도(Y_1), 환원당(Y_2) 및 총당 함량(Y_3)은 10% 내에서 유의성이 인정되었다. 반응표면분석

Table 1. Levels of experimental conditions for water extraction of *Phellinus linteus*

X_i	Boiling condition	Level				
		-2	-1	0	1	2
X_1	Extraction time (hr)	1	2	3	4	5
X_2	Water volume ¹⁾ (ml)	40	80	120	160	200

¹⁾Water volume (ml) on 1 g of *Phellinus linteus*.

Table 2. Experimental conditions on central composite for response surface methodology (RSM)

Exp. No.	Extraction time (hr)	Water volume ¹⁾ (ml)	Color browning (OD ₄₂₀)	Reducing sugar (mg%)	Total sugar (mg%)
1	4(1)	160(1)	1.903	24.3	28.6
2	4(1)	80(-1)	3.084	39.2	66.4
3	2(-1)	160(1)	2.092	24.8	28.4
4	2(-1)	80(-1)	3.182	40.6	58.5
5	3(0)	120(0)	2.209	27.3	36.7
6	3(0)	120(0)	2.056	25.6	32.5
7	5(2)	120(0)	3.273	43.6	39.4
8	1(-2)	120(0)	2.636	29.8	31.0
9	3(0)	200(2)	1.506	19.1	20.2
10	3(0)	40(-2)	2.990	62.4	150.3

¹⁾Water volume (ml) on 1 g of *Phellinus linteus*.

Table 3. RSM-based polynomial equation of water extracts of *Phellinus linteus*

Dependent variable (Y _n)	The second order polynomial	R ²	Pro > F
Color browning (Y ₁)	$Y_1 = 4.958429 - 0.997482X_1 - 0.011414X_2 + 0.19133X_1^2 - 0.000569X_1X_2 - 0.000009X_2^2$	0.8995	0.0398
Reducing sugar (Y ₂)	$Y_2 = 106.871429 - 14.06369X_1 - 0.801384X_2 + 2.588393X_1^2 + 0.005625X_1X_2 + 0.002251X_2^2$	0.9536	0.0089
Total sugar (Y ₃)	$Y_3 = 209.741429 + 6.119643X_1 - 2.459301X_2 + 0.288393X_1^2 - 0.048125X_1X_2 + 0.008001X_2^2$	0.9497	0.0105

Table 4. Analysis of variance for regression model of water extraction conditions of *Phellinus linteus*

Variance	F-ratio	
	Extraction time (X ₁)	Water volume ¹⁾ (X ₂)
Browning color (Y ₁)	2.65	8.81
Reducing sugar (Y ₂)	3.20	36.21
Total sugar (Y ₃)	0.14	23.57

¹⁾Water volume (ml) on 1 g of *Phellinus linteus*.

을 이용한 팽이버섯의 추출조건 최적화에서 김 등¹⁵⁾은 종속변수(Y_n) 6개 항목 중 갈변도, 아질산염 소거능 및 tyrosinase 소거능의 R²는 각각 0.2759, 0.6720 및 0.3859로 매우 낮아 유의성이 인정되지 않았다고 하였으며, 최 등¹⁶⁾이 노루궁뎅이버섯을 이용한 실험에서는 종속변수(Y_n) 5개 항목이 모두 10% 이내에서 유의성이 인정되는 등 실험조건 및 재료의 고유 특성에 따라 종속변수의 유의성이 매우 다양하다고 할 수 있는데, 이것은 반응표면분석에서 R²는 가정된 모형이 실험한 자료 즉 분석치에 얼마나 잘 적합되는지를 수량화한 통계량을 나타내기 때문인 것으로 사료된다.

갈색도, 환원당 및 총당을 종속변수로 설정하여 Table 2의 실

험결과를 얻었으며, 이 결과로부터 RSM 기법으로 예측된 최적 추출조건은 Table 5와 Fig. 1에서 보여주는 바와 같이 추출물의 갈색도는 추출시간 4.65시간, 가수량 74.71 ml에서 가장 높았으며, 추출시간보다 가수량의 영향을 크게 받는 것으로 나타났다. 환원당은 추출시간 3.24시간, 가수량 40.60 ml에서 60.40 mg%로 가장 높았으며, 추출시간에 비해 가수량의 영향을 많이 받는 것으로 나타났다. 또한 총당 함량은 추출시간 3.15시간, 가수량 40.23 ml에서 139.83 mg%로 가장 높았으며, 이 결과는 갈색도 및 환원당 함량에서와 유사하게 추출시간에 비해 가수량이 더 큰 영향을 주는 것으로 나타났다. 윤 등¹⁷⁾은 동충하초를 대상으로 열수추출 시 최적 추출조건을 확립한 실험에서 총당 및 환원당은 낮은 농도에서 추출수율이 좋다고 보고하여 본 결과와는 상이한 결과를 보고하였다.

이상의 결과를 종합해 보면 상황버섯을 이용한 최상의 품질을 가진 추출액을 생산하기 위해서는 온도를 100°C로 고정했을 때 추출시간보다 가수량이 추출에 가장 큰 영향을 미치는 것을 알 수 있었다. Fig. 2와 Table 6은 상황버섯 열수추출의 최적화를 목적으로 추출온도를 100°C로 고정하고 각 종속변수들의 등고선도를 겹쳐서 추출물의 갈색도, 환원당 및 총당의 특성을 모두 만족시켜주는 추출조건의 범위를 나타내는 것이다.

Table 5. Predicted levels of water extraction conditions for the maximum and minimum responses by the ridge analysis

Response		X ₁	X ₂	Response	Stationary point
		Extraction time (hr)	Water volume ¹⁾ (ml)		
Browning color (Y ₁)	Maximum	4.65	74.71	3.46	Max.
	Minimum	2.94	199.96	1.43	
Reducing sugar (Y ₂)	Maximum	3.24	40.60	60.40	19.030
	Minimum	2.55	173.03	19.04	
Total sugar (Y ₃)	Maximum	31.5	40.23	139.83	18.893
	Minimum	3.44	164.73	18.95	

¹⁾Water volume (ml) on 1 g of *Phellinus linteus*.

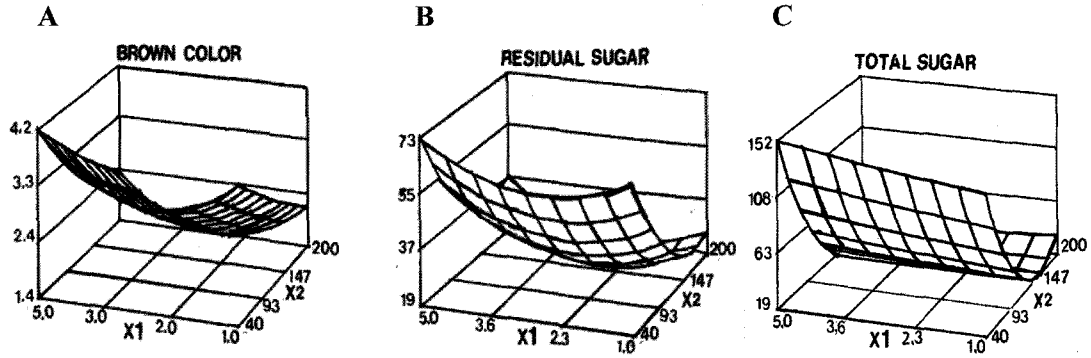


Fig. 1. Response surface of pH, browning color, soluble solids, crude protein, °Brix, reducing sugar and total sugar in water extracts of *Phellinus linteus*. A: color browning, B: reducing sugar, C: total sugar.

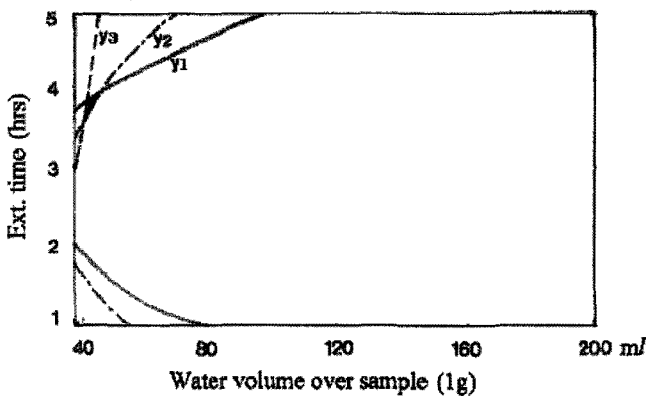


Fig. 2. Superimposed contour map for optimal qualities of *Phellinus linteus* extracts. y_1 : color browning, y_2 : reducing sugar, y_3 : total sugar.

Table 6. Optimum range of *Phellinus linteus* water extraction by superimposed contour map

	Extraction time (hr)	Water volume ¹⁾ (ml)
Optimum range	3.0~4.5	40.0~58.2

¹⁾Water volume (ml) on 1 g of *Phellinus linteus*.

추출시간은 3.0~4.5시간, 가수량은 상황버섯 1g 당 40.0~58.2 ml를 첨가하는 것이 가장 좋을 것으로 예측되었다. 송 등⁵⁾은 인공재배 상황버섯 액상추출 시 최적 조건을 추출온도 100°C, 추출시간 3.0시간 이내, 추출농도는 5% 즉 20배의 가수량을 제시하여 추출온도와 시간은 유사하나 가수량은 다소 차이가 있는 결과를 보고하였다.

반응표면 추출조건을 기초로 한 추출액의 품질 특성. 반응표면 분석에서 상황버섯의 열수추출 시 최적 조건은 추출온도 100°C, 추출시간 3.0~4.5시간, 가수량 1g 당 40.0~58.2 ml의 범위에서 최고의 품질을 가진 추출액을 만들 수 있었다. 그러므로 원료가 고가인 상황버섯을 이용하여 고품질의 추출액을 더 많이 생산하기 위해서 최적 조건인 추출온도 100°C, 추출시간 4.0시간, 가수량 1g 당 50 ml(20 g/l)으로 하여 추출된 상황추출액의 품질특성을 조사하였다. 상황추출물의 N, P, K, Ca, Mg 및 Na 등에 대한 무기원소 함량 분석 결과 Fig. 3에서와 같이 N, K가 다른 무기원소보다 많은 경향을 보였다.

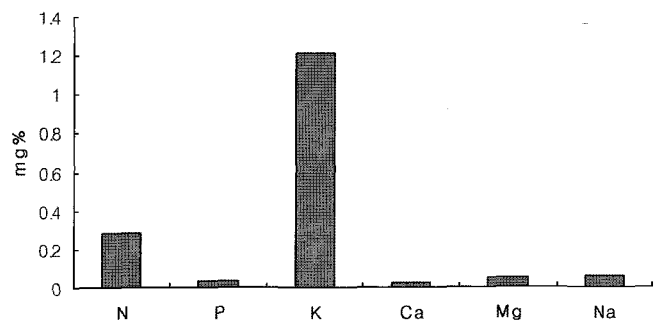


Fig. 3. Content of mineral elements in *Phellinus linteus* water extracts.

Table 7. Comparative analysis of free sugar contents in *Phellinus linteus* water extracts

Peak No.	Retention time (min)	Peak area (%)	Kinds of sugar	Contents of sugar determined (%)
1	5.733	2.1	ND ¹⁾	ND ¹⁾
2	6.567	8.7	ND ¹⁾	ND ¹⁾
3	7.467	6.5	ND ¹⁾	ND ¹⁾
4	8.255	3.6	ND ¹⁾	ND ¹⁾
5	11.443	16.1	Sucrose	0.126
6	13.700	1.4	Glucose	0.012
7	20.698	61.6	ND ¹⁾	ND ¹⁾

¹⁾ND means "not determined".

추출원액의 HPLC chromatogram으로 유리당의 종류 및 함량을 분석한 결과는 Table 7에서와 같다. HPLC를 이용한 정밀분석에서 7개의 peak를 확인할 수 있었으며, 이들 peak를 표준물질 당류와 retention time을 상호 비교하였을 때 peak 5(RT: 11.4 min)는 sucrose, peak 6(RT: 13.7)은 glucose로 판정되었으며, 각각의 농도는 0.126, 0.012%로 나타났다. Carbohydrate column의 특성상 retention time(RT)이 빠르면 분자량이 크고, 늦으면 분자량이 적은 당류가 나타나는데 상황버섯 추출액은 당의 종류는 알 수 없지만, 고분자 및 저분자의 당류가 많이 존재함을 알 수 있었다. Table 8은 펠수아미노산을 포함한 유리 아미노산의 종류를 조사한 것이다. 총 함량 503.26 µg% 중 펠수아미노산이 27.32 µg%로 isoleucine, leucine, lysine, methionine 및 threonine이 존재하였으며, 이 중에서도 특히

Table 8. Content analysis of free amino acids in *Phellinus linteus* water extracts

Amino acid	Content of amino acid ($\mu\text{g}\%$)
Isoleucine	2.22
Leucine	2.83
Lysine	2.54
Methionine	7.77
Threonine	11.96
Phosphoserine	36.82
Taurine	27.86
Phosphoethanolamine	0.34
Urea	16.63
Aspartic acid	55.11
Hydroxy-proline	21.97
Serine	16.31
Glutamic acid	34.12
Proline	-
Alanine	0.94
Citrulline	25.90
α -Amino-n-butyric acid	27.20
Cystine	11.21
Tyrosine	54.07
β -Aminoisobutyric acid	1.10
Ammonium Chloride	1.40
δ -Hydroxylysine	143.0
1-Methylhistidine	1.96
Total	503.26

threonine, methionine이 19.73 $\mu\text{g}\%$ 로 거의 대부분을 차지하였다. 그 외에도 17종의 유리 아미노산이 탐색되었으며 이들의 총 함량은 475.94 $\mu\text{g}\%$ 이었으며, 이들 중 δ -hydroxylysine(143.0 $\mu\text{g}\%$), aspartic acid(55.11 $\mu\text{g}\%$), tyrosine(54.07 $\mu\text{g}\%$) 순으로 많았다.

Fig. 4는 Sepharose CL-40(sigma, USA)으로 충전된 Gel permeation column chromatography를 실행하여 표준품과 비교한 결과 10 KDa 부근의 분자량 다당류가 main peak를 이루고 있음을 알 수 있었다. 이 등¹⁸⁾은 상황버섯 자실체를 110°C에서 30분간 3회 반복 열수추출 시 7.2 KDa 부근의 분자량을 가진 다당류가 main peak를 보였다고 보고하여 다소 상이한 결과를 보고하였다. 지금까지 담자균류의 다당류는 저분자 분획보다 고분자 분획에서 높은 약리 작용을 보이는 경우가 많은 것으로 보고되고 있는데,¹⁸⁾ 4시간 추출 시 분자량이 큰 10 KDa의 다당류가 주류를 이루므로 상황버섯 열수추출 시 추출시간을 길게 하는 것이 좋을 것으로 사료된다.

초 록

반응표면분석법을 이용하여 상황버섯의 열수추출을 위한 최적조건을 결정하였다. 추출특성을 조사하기 위하여 추출시간(1~5시간) 및 가수량(0.02~0.10%(W/V))을 중심으로 10개 종속변수 구간을 설정하여 갈색도, 환원당 및 총당 함량 등을 반응표면분석법으로 모니터링하였다. 그 결과 갈색도(Y_1), 환원당(Y_2) 및 총당 함량(Y_3)은 10% 내에서 유의성이 인정되었고, 갈

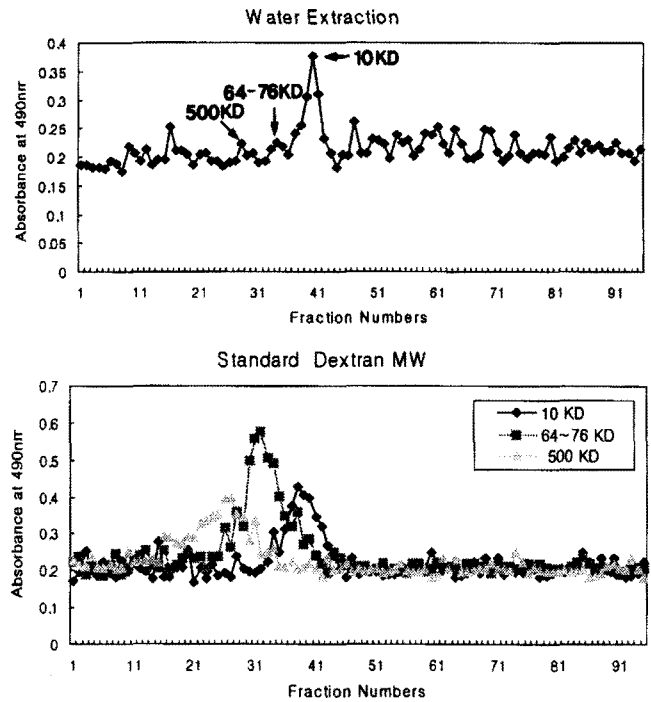


Fig. 4. Gel permeation chromatograph of β -glucan from *Phellinus linteus* water extracts.

색도, 환원당 및 총당 함량은 추출시간보다 가수량에 의해 영향을 더 많이 받는 것으로 나타났다. 이상의 결과를 이용하여 contour map을 superimposing 하여 추출물의 특성을 모두 만족시켜주는 최적추출 조건의 범위를 결정한 결과 추출시간은 3.0~4.5시간, 가수량은 상황버섯 1g 당 40.0~58.2 ml이었다. 최적 추출조건에서의 상황추출물의 품질특성은 무기원소는 N, K가 다른 무기원소보다 많은 경향을 보였고, 유리당은 sucrose와 glucose가 각각 0.126, 0.012% 존재하는 것으로 확인되었다. 유리아미노산은 총함량이 503.26 $\mu\text{g}\%$ 이었으며, 이 중에서 필수아미노산은 유리아미노산 전체의 5.4%를 차지하였다. 또한 다당류의 분자량은 10 KDa 부근의 분자량이 main peak를 이루고 있었다.

Key words: *Phellinus linteus*, 반응표면분석법, 최적조건, 열수추출

감사의 글

본 연구는 경상북도/안동시 바이오산업기술개발사업의 연구비 지원에 의한 것임으로 이에 감사드립니다.

참고문헌

- Kim, G. H. and Han, H. K. (1998) The effect of mushroom extracts on carbon tetrachloride induced hepatotoxicity in rats. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 27, 326-332.
- Yamada, S. (1994) Mycelial culture method of *Phellinus linteus*. *Korean Patent.* 92-1194.

3. Choi, J. H., Ha, T. H. and Rho, Y. D. (1996) Studies on the main factors affecting the mycelial growth of *Phellinus linteus*. *Kor. J. Mycol.* **24**, 214-222.
4. Ji, J. H., Kim, M. N., Chung, C. K. and Ham, S. S. (2000) Antimutagenic and cytotoxicity effects of *Phellinus linteus* Extracts. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **29**, 322-328.
5. Song, H. N. and Oh, S. W. (2002) Optimization of extraction and clarification condition for preparation of liquid extract eea from artificially cultivated *Phellinus linteus*. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **31**, 636-641.
6. Floros, J. D. and Chinnan, M. S. (1987) Optimization of pimento pepper lye peeling process using response surface methodology. *Tras. ASEA* **30**, 560-566.
7. SAS (1990) SAS/STAT user's Guide, version 6.0, (4th ed.), Vol. 2, SAS Institute Inc. pp. 1-1457.
8. Miller, G. L. (1959) Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.* **31**, 426-428.
9. Dubolis, M., Gillers, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A. and Smith, J. (1956) Colorimetric method for determination of sugar and related substance. *Anal. Chem.* **28**, 350-352.
10. Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for quantification of microgram quantitative of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248-254.
11. A.O.A.C. (1990) In *Official Methods of Analysis*, (15th ed.) Association of Official Analytical Chemists. Washington D.C.
12. Perkin-Elmer Corporation (1968) Analytical methods for atomic absorption spectroscopy. Perkin-Elmer Corporation, Norwork Conn.
13. Ryu, K., Lee, K. Y. and Lee, E. K., (2001) The structure analysis and biosynthesis of β -glucan by *Alcaligenes faecalis*. *Korean J. Biotechnol. Bioeng.* **16**, 409-414.
14. Lee, J. W., Baek, S. J., Bang, K. W., Kim, Y. S., Han, M. D. and Ha, I. S. (1999) Characteristics of polysaccharides isolated from the fruit body and cultured mycelia of *Phellinus linteus* IY001. *Korean J. Mycol.* **27**, 424-429.
15. Kim, H. K., Kim, M. O., Choi, M. G. and Kim, K. H. (2003) Optimization of microwave extraction conditions for *Flammulina velutipes* by response surface methodology. *Korean J. Food Sci. Technol.* **35**, 222-228.
16. Choi, M. A., Park, N. Y., Woo, S. M. and Jeong, Y. J. (2003) Optimization of extraction conditions from *Hericium erinaceus* by response surface methodology. *Korean J. Food Sci. Technol.* **35**, 777-782.
17. Youn, K. S., Jeong, Y. J., Lee, G. D., Shin, S. R. and Ku, J. G. (2002) Optimization for hot water extraction process of *Cordyceps militaris* using response surface methodology. *Korean J. Food Preserv.* **9**, 184-188.
18. Lee, J. W. and Bang, K. W. (2001) Biological activity of *Phellinus linteus*. *Food Ind. and Nutr.* **6**, 25-33.