

최 종
연구보고서

버섯균사체 액체배양추출물로부터
혈당강하 소재 개발

연구기관

경상대학교

농림부

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “버섯균사체 액체배양추출물로부터 혈당강하 소재 개발” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2005년 11월 일

주관연구기관명 : 경상대학교

총괄연구책임자 : 하 영 래

세부연구책임자 : 하 영 래

연 구 원 : 박철우,

김석중, 김영숙, 형석원, 김미숙, 장옥진, 정관주, 조미정, 김민석, 이금숙, 박여경, 로다메 세르보, 조일석, 이난경, 허성률, 김미영, 배세연, 박정은, 김혜영, 주희정, 강성대, 김유경

협동연구기관명 : 진주산업대

협동연구책임자 : 조 용 운

위탁연구기관명 : 인제대학교

위탁연구책임자 : 김 정 인

요 약 문

I. 제 목

버섯균사체 액체배양추출물로부터 혈당강하 소재 개발

II. 연구개발의 목적 및 필요성

1. 연구개발의 목적

“버섯균사체액체배양액으로부터 혈당저하능이 강한 소재의 개발”을 목적으로 한다.

2. 연구의 필요성

1) 기술적 측면

가) 부작용이 없으면서 효능이 우수한 혈당강하 소재의 개발

- (1) 현재 혈당강하 소재로 사용되는 소재는 혈당강하능은 우수하지만 여러 가지 부작용을 수반하고 있다.
- (2) 이와 같은 부작용 때문에 혈당강하 소재를 천연물이나 식물에서 유래한 식품에서 개발 할려는 많은 연구를 하고 있지만 경제성이나 효능 측면에서 그 가치가 떨어진다.
- (3) 버섯은 혈당강하능, 면역기능활성, 항암성, 혈중콜레스테롤감소성 등의 생리활성이 있음이 이미 알려져 있다. 특히 신령버섯(*Agaricus campestris*)와 같은 버섯은 혈당강하 목적으로 외국에서 오래 전부터 민간요법으로 사용해왔다.
- (4) 따라서 인간에게 익숙한 버섯을 이용하면 부작용이 없고, 혈당강하능이 우수한 소재를 만들 수 있을 것이다.

나) 지속적으로 저가로 공급이 가능한 혈당강하 소재

- (1) 현재 사용되고 있는 혈당강하 소재는 고가이기 때문에 환자가 지속적으로 복용하기에는 경제적인 부담이 있다.
- (2) 버섯을 이용할 경우 버섯자실체는 생육이 까다로울 뿐만 아니라 생육기간이 길어 지속적으로 대량생산이 어려워 원료의 공급에 제한이 있다. 그러나, 균사체는 배양기간이 짧고 (3-5일), 대량배양이 용이하며, 배지의 조성물에 따라 다양한 소재를 생산할 수 있어 특정 (항당뇨)소재를 대량으로 생산할 수 있는 장점이 있다.
- (3) 따라서 버섯균사체액체배양방법을 활용하면 이 목적에 맞는 혈당강하 소재를 개발할 수 있을 것이다.

다) 유효소재를 다량 함유하는 버섯균사체배양방법과 이들 소재의 추출방법 및 혈당강하 기전연구

- (1) 이 특정 유효소재를 다량 생산할 수 있는 버섯균의 선발 및 배지의 조성에 관한 연구가 필요하다.
- (2) 생산된 이들 소재의 분리·동정 및 혈당저하능의 검증과 그 기전에 관한 연구가 필요하다.

2) 경제·산업적 측면

가) 생산자는 부가가치가 높아 경제성이 있고, 소비자에게는 저렴한 가격의 제품개발

- (1) 지금까지 개발된 소재는 당뇨병환자가 지속적으로 복용하여야 되는데 비해 가격이 비교적 비싼 편이라, 혈당을 정상으로 유지하는데 지출되는 비용이 만만치 않다.
- (2) 제1형 당뇨병 (인슐린 의존)의 경우 지속적인 인슐린 투여가 요구되지만 가격이 비싸다.
- (3) 제2형 당뇨병 (인슐린 비 의존)의 경우 아직 정확한 원인이 밝혀지지 않고 비만과 다른 성인병과의 복합적인 요인으로부터 유래되는 것으로 보여 지고 있으며, 최근에는 이러한 환자의 수가 급격히 늘어나고 있어 전 세계적으로 심각한 문제로 대두되고 있다.

나) 당뇨병환자의 증가로 인한 생산성 저하현상의 개선을 위해 필요

- 당뇨의 경우 현재까지 뚜렷한 치료방법이 없으면서, 병이 진전됨에 따라 면역기능저하, 심혈관계질환과 같은 합병증이 나타나지만, 보통의 경우 활동성이 저하되고 무기력해짐으로써 생산성이 저하됨으로써, 경제/산업에 간접적인 악영향을 미친다.

다) 수입대체를 위한 국내에서 생산이 가능한 소재의 개발이 필요

- (1) 현재 사용되고 있는 약물치료제는 대부분 원료 또는 완제품을 외국으로부터 수입하고 있다.
- (2) 최근 국내 당뇨병환자가 급속히 늘어나는 만큼 외화유출이 심각하여 이를 대체할 수 있는 연구개발이 필요하다.

3) 사회·문화적 측면

가) 당뇨병환자의 수가 급격히 증가하고 있어 사회 문제가 됨

- (1) 당뇨병 환자는 우리나라에서 300-500만 명 정도로 예상되며, 전 세계적으로 1994년에 1억1천만 명 이었고, 2010년에는 2억3천9백만 명으로 추정되어 약 2.2배의 증가를 예상하고 있다.
- (2) 당뇨병 유병율은 현재 10%로 추정되며, 당뇨병은 한국인 사망요인 중 6위를 차지한다.

나) 부적절한 식생활습관, 운동부족, 스트레스를 많이 받는 현대인에게 발병하는 당뇨병의 예방 및 치료가 필요

- (1) 현대인이 음료, 주식 등 다양한 형태로 섭취하는 당의 양은 필요이상이다.
- (2) 미국의 경우 '생활습관 2000운동'을 시행하여 식이와 운동을 통해 당뇨병의 예방 및 치료에 보다 적극적인 대처를 하고 있다.
- (3) 당뇨병의 치료에서 식사요법은 아직까지 가장 중요한 치료수단으로 인정되고 있으나 실제 식사요법에 의한 치료효과는 경험적 방법에 불과하며 효과를 나타내는 기전은 구체적으로 알려져 있지 않다.
- (4) 식사요법을 보다 과학적이고 효과적으로 예방 및 치료를 도울 수 있는 소재의 개발이 절실히 필요하다.

다) 당뇨병으로 야기되는 합병증의 예방 및 치료가 필요

- (1) 당뇨병으로부터 유발된 합병증은 의료비의 증가와 환자의 삶의 질 저하로 이어지며 당뇨의 예방 및 치료제의 개발은 사회적인 측면에서도 꼭 필요하다.
- (2) 당뇨병과 당뇨병성 합병증은 개인적으로 신체와 정신의 피폐화를 일으킬 뿐만 아니라 사회적으로 미치는 영향이 심각하므로 다가오는 21C에 우리자신의 생존을 위해 시급한 대책이 필요하다.
- (3) 당뇨병 치료 및 합병증 예방에 있어서는 공복 및 식후혈당을 조절하고 당화 헤모글로빈 농도를 가능한 정상치에 가깝게 유지하는 것이 가장 중요하다.
- (4) 따라서 이의 예방 및 치료를 할 수 있는 천연소재의 개발이 필요하다.

Ⅲ. 연구개발 내용 및 범위

현재 유병율이 급격하게 증가되어 전 국민의 10% 정도가 갖고 있고 우리나라 국민의 여러 사망요인 중 4위를 차지하는 당뇨병을 갖는 당뇨환자들에게 버섯균사체액체배양 추출물로부터 부작용이 없고, 가격이 저렴하면서 환자의 혈당을 효율적으로 강하시키는 소재개발에 목적이 있다.

1. 기초연구 단계

가. 버섯균사체액체배양법을 이용한 혈당강하 소재 생산

- 1) 최적 버섯균의 선발
 - 신령버섯 (*Agaricus Blazei*: AB)
 - 번데기동충하초 (*Cordyceps militaris*: CM)
 - 느타리버섯 (*Pleurotus ostreatus*: PO)
- 2) 최적 배지조성의 개발
 - 기본배지에 여러 전구물질을 첨가하여 혈당강하 소재의 활력 및 수율을 높임
 - 혈당강하 소재의 대량 생산을 위해 최적배지에 균사체 액체배양 실시
- 3) 최적 배양조건의 설정
 - 배양온도 (항온/변온)
 - 통기량
 - 배양기간

나. 유용소재의 분리·동정 및 고농축액 조제

- 1) 유용소재의 분리 및 동정
 - β -Glucan, isoflavone 등과 기타 일반 성분 분리
 - NMR, GC-MS/MS, IR을 이용한 동정
- 2) 유용소재를 다량 함유한 분획 제조
 - 분자량에 의한 유용소재 다량 함유 분획 제조
- 3) 유용소재를 다량 함유한 농축액 제조

2. 응용연구 단계

가. 소재에 대한 *in vitro* 효능 연구

- 1) α -Glucosidase와 α -Amylase 활성 저해능
- 2) 세포실험 (HepG-2 간세포)

나. 소재에 대한 *in vivo* 효능 연구

- 1) 제1형 동물실험 (STZ 유발 흰쥐의 장기 기전연구, 단기 혈당조절연구)
- 2) 제2형 db/db mouse 실험

3. 제품화 단계

가. 제품화

- 1) 농축액 (파우치, 병)
- 2) 연질캡슐, 분말
- 3) 임상실험 (장기 기전연구)

나. 제품의 임상시험

- 1) 단기실험
- 2) 장기실험

다. 제품의 안정성 실험 (저장성 실험)

라. 제품의 안전성 실험 (급성실험)

IV. 연구개발 결과

1. 혈당강화 소재가 함유된 버섯균사체 배양물인 HEAB의 개발

가. 최적배지조성은 버섯균을 대두박분해물이 함유된 기본배지에 1% xylose와 1% proline이 첨가된 배지로 7일 동안 배양하였다.

나. 버섯균사체 배양물 중 **신령버섯균배양물의 열수추출물 (HEAB)**이 yeast 및 rat intestinal α -glucosidase 저해활성을 가장 강하게 저해하였다.

2. 신령버섯균사체배양물의 열수추출물 (HEAB)의 대량생산 및 분획

가. 버섯균사체배양 추출물의 대량생산 (5000 L)

- AB를 10배 scale-up하면서 3.5KL까지 배양하는 조건을 확립하였다.

나. HEAB를 동결건조하고, 이로부터 75% EtOH 침전물인 β -D-glucan과 Hexane, Chloroform, Ethylacetate, Butanol분획을 분획하였다.

3. HEAB 및 분획물의 효능검증

가. 용매분획 중 ethylacetate 분획이 α -glucosidase 활성을 강하게 저해하였다.

나. 동물실험:

○ STZ-유도 흰쥐 모델 (제1형 모델)

-단기실험 및 장기실험: 혈당을 감소하였고, GOT활성을 감소시켰다.

○ db/db mouse 모델 (제2형 모델)

-혈당을 감소시켰고, 인슐린의 요구도를 감소시켰다.

-Cholesterol 치를 감소시켰다.

-GOT활성을 감소시켰다.

-TBARS치를 감소시켰고, catalase의 활성을 증가시켰다.

-Glycogen의 분해나 당신생합성에는 영향을 미치지 않았다.

-소장의 amylase와 maltase의 활성을 감소시켰다.

-간과 지방조직의 GLUT4의 발현을 증가시켰다.

다. 간세포 (HepG-2세포)

-GLUT1의 발현은 증가시키지 않았으나, GLUT4의 발현은 증가시켰다.

-PEPCK의 발현을 감소하는 경향이였다.

4. 유효성분의 분리·동정

-분리된 유효성분은 isoflavonoids 계의 화합물이었고, 그 중에서 α -glucosidase의 활성을 강력하게 억제하는 물질은 isoflavone-O-glucan으로 그 분자량이 4,000-10,000 범위 내에 있는 것으로 동정되었다.

5. 제품화 연구

가. 제품화

- 제품명: 『당시러: Dangsiryee』
- 제품의 형태: 농축액, 정제, 분말
- 소재: HEAB

나. 임상시험

- 제2형 당뇨병 환자 단기실험: 혈당치를 감소시켰고, 인슐린농도 또한 감소시켰다.
- 제2형 당뇨병 환자 장기실험: 혈압개선효과 (수축기혈압감소), 혈당조절효과 (인슐린농도, 당화헤모글로빈 및 fructosamine 농도 감소), 지질대사개선효과 (TG, cholesterol, LDL-콜레스테롤 감소와 HDL-콜레스테롤 증가경향)를 나타내었다.

다. 제품의 안정성

- 3개월간 저장실험에서 생균수, 대장균수, POV, TBARS, COV 등에 영향을 미치지 않았다.

라. 제품의 안전성

- 급성실험에서 안전하였다.

V. 활용에 대한 건의

1. 본 연구결과는 원천성이 있는 연구로서 국내 및 국제특허를 출원할 것이다.
2. 본 연구결과를 바탕으로 버섯균사체를 활용할 경우 보다 많은 생물전환된 물질을 개발할 수 있는 교육용이나 홍보용으로 활용할 수 있을 것이다.
3. 소비자의 선호도가 높은 제품을 대량생산하고 참여업체인 (주)HK바이오텍에 기술이전을 할 것이다.
4. 산업화는 HK바이오텍의 영업망을 통하여 유통할 것이다. 또한 다른 국내외 회사에 기술이전 (기술료 징수)하여 산업화 할 것이다.

SUMMARY

This study was conducted to produce natural anti-diabetic materials and products by means of the submerged liquid cultures of mushroom strains in medium containing raw agricultural products. Hot-water extract (HE) of submerged-liquid culture of mushroom strains was prepared by extracting at 121 °C for 60 min and then, filtering through filter presser filled with diatomate. The HE was concentrate to Brix 50. When assayed by α -glucosidase activity, the inhibition of the α -glucosidase activity by a HE of the submerged-liquid culture of Synryeong (*Agaricus blazei*:AB) (designated to HEAB) was the best, followed by Neutari (*Pleurotus ostreatus*). Hence, of tested mushroom strains, Synryeong (*Agaricus blazei*) was selected for the production of materials for the reduction of blood glucose levels of diabetes.

The submerged-liquid culture of AB was established in 5 KL fermenter by means of 10 fold scale up manner. HEAB contained isoflavones, such as genestin, genestein, diazidin, and diazdein, and isoflavone-O-glucans with molecular weight ranging from 4,000 to 10,000 Da as active compounds. Such active compounds contained in ethylacetate fraction of HEAB. The products named as "**Dangsiryé**" was prepared from HEAB.

In STZ-induced diabetes rat model, the ingestion of HEAB significantly decreased postprandial increase of blood glucose at 30 and 60 min after administration of starch and AUC of postprandial glycemic response curve ($p < 0.05$), indicating α -glucosidase inhibitory activity *in vivo*. Furthermore, chronic consumption of HEAB significantly decreased fasting plasma glucose and GOT activity, suggesting that ingestion of HEAB results in glycemic control and liver protection effect.

In db/db mouse, chronic consumption of HEAB significantly decreased fasting plasma glucose and insulin. Chronic consumption of HEAB significantly decreased activities of α -amylase and α -glucosidase of small intestinal mucosa and significantly increased GLUT4 mRNA expression of liver and WAT.

GLUT4 protein expression of HepG-2 cell incubated with HEAB at the concentration of 25 and 50 mg/mL for 6 hr significantly increased.

Ingestion of "**Dangsirye**" product produced from HEAB in conjunction with rice significantly diminished the postprandial increase in plasma glucose and insulin levels measured at 60min after rice consumption and decreased AUC of postprandial glycemic response curve in the patients with type 2 diabetes. Consumption of "**Dangsirye**" significantly decreased plasma cholesterol and GOT activity and hepatic TBARS and increase hepatic catalase activity. The consumption of "**Dangsirye**" for 12 wk significantly decreased systolic blood pressure, fasting plasma glucose, insulin, fructosamine, HbA_{1c}, cholesterol, triglycerides, and LDL-cholesterol in patients with type 2 diabetes. "**Dangsirye**" contributed to controlling of hyperglycemia, blood pressure and dyslipidemia which are important goals of treatment of diabetes.

We conclude that feeding of HEAB or "**Dangsirye**" can improve glucose, lipid, and blood pressure control in patients with type 2 diabetes mellitus. These data suggest that HEAB or "**Dangsirye**" could be beneficial in reducing cardiovascular risk in type 2 diabetes. HEAB or "**Dangsirye**" appears to exert hypoglycemic effect by inducing gene expression of glucose transporter of the peripheral tissues.

CONTENTS

Chapter 1. Outlines	17
Session 1. Objectives	17
Session 2. Necessity	19
Session 3. Research Scopes	23
Session 4. Research Processing System	26
Session 5. Effects	28
Chapter 2. International and Domestic Technology Status	30
Session 1. Current Status	30
Session 2. Problems to be solves	32
Session 3. Solutions for the problems	32
Session 4. Perspectives	35
Chapter 3. Methods and Results	36
Session 1. Methods	36
1. Development of anti-diabetic liquid culture of mushroom strains	36
2. Screening of anti-diabetic activity of materials	38
3. Analysis of active compounds	46
4. Test of stability and safety for products	50
Session 2. Results	54
1. Development of anti-diabetic liquid culture of mushroom strains	54
2. Screening of anti-diabetic activity of materials	63
3. Analysis of active compounds	84
4. Development of antidiabetic activity tests of products	98

Chapter 4. Achievement and Contribution to related fields	121
Session 1. Achievements	121
Session 2. Contribution to related area	124
Chapter 5. Application of results	125
Chapter 6. Information collected from overseas	126
Chapter 7. References	127

목 차

제 1 장 연구개발의 개요	17
제 1 절 연구개발 목표	17
1. 최종목표	17
2. 주요 연구개발목표와 내용	18
제 2 절 연구개발 필요성	19
1. 연구개발의 필요성	19
가. 기술적 측면	19
나. 경제·산업적 측면	20
다. 사회·문화적 측면	21
제 3 절 연구개발 범위	23
1. 연차별 연구개발 목표와 내용	23
제 4 절 연구개발 추진체계	26
1. 추진체계도	26
2. 추진체계	27
가. 1차년도	27
나. 2차년도	27
다. 3차년도	27
제 5 절 기대효과	28
1. 기술적 측면	28
2. 경제·산업적 측면	28

제 2 장 국내·외 기술개발 현황	30
제 1 절 현황	30
제 2 절 문제점	32
제 3 절 문제점의 해결방안	32
제 4 절 앞으로 전망	35
제 3 장 연구개발 수행내용 및 결과	36
제 1 절 연구수행 방법	36
1. 항당뇨 버섯균사체 액체배양물 개발	36
가. 버섯균주 및 활성화	36
나. 버섯균사체배양용 배지조성	36
다. 버섯균의 선발	37
라. 액체배양조건 확립	37
마. 대량배양	37
바. 시료조제	38
2. 소재에 대한 항당뇨 효능 검증	38
가. α -Glucosidase 활성 억제에 의한 검증	38
나. Streptozotocin (STZ)-induced diabetes rat 실험 (제1형 당뇨쥐 모델)	40
다. db/db mouse 실험 (제2형 당뇨쥐 모델)	42
라. 간세포 모델에 있어서 혈당 조절효과	44
마. 임상시험	45
3. 유효성분 분석	46
가. 일반성분 분석	46
나. TLC 분석 및 open-column chromatography	49

다. HPLC 및 GC	49
라. Spectrophotometric 분석	49
4. 안정성 및 안전성 실험	50
가. 생균수 및 대장균	50
나. 점도 및 색소	50
다. 저장성	50
라. Mouse에 대한 급성실험	52
제 2 절 연구결과	54
1. 항당뇨성 버섯균사체 액체 배양물	54
가. 버섯균주 선발	54
나. 최적배지조성 및 배양방법 구명	55
다. 대량배양	56
라. 시료의 조제	60
2. 버섯균사체 액체배양물의 항당뇨성 효과	63
가. Rat intestinal α -glucosidase activity 저해	63
나. STZ-induced diabetes rat 실험 (제1형 당뇨병 모델)	66
다. db/db mouse 실험 (제2형 당뇨병 모델)	73
라. 간세포 모델에 있어서 혈당 조절효과	81
3. 유효성분	84
가. 일반성분	84
나. 유효성분 분석	87
4. 제품개발 및 효능	98
가. 제품	98
<input type="checkbox"/> Pouch:	98
<input type="checkbox"/> Bottle:	99

□ Tablet	99
□ Powder	100
나. 제품의 임상시험	101
다. 제품의 저장성	109
1) 생균수 및 대장균	109
2) 점도 및 색소	110
3) POV, COV 및 TBARS	112
라. 제품의 안전성 (mouse에 대한 급성시험)	113
제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도	121
제 1 절 목표달성도	121
1. 1차년도	121
2. 2차년도	122
3. 3차년도	123
제 2 절 관련분야 기여도	124
1. 기술적 측면	124
2. 경제 · 산업적 측면	124
제 5 장 연구개발결과의 활용계획	125
제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술 정보	126
제 7 장 참고문헌	127

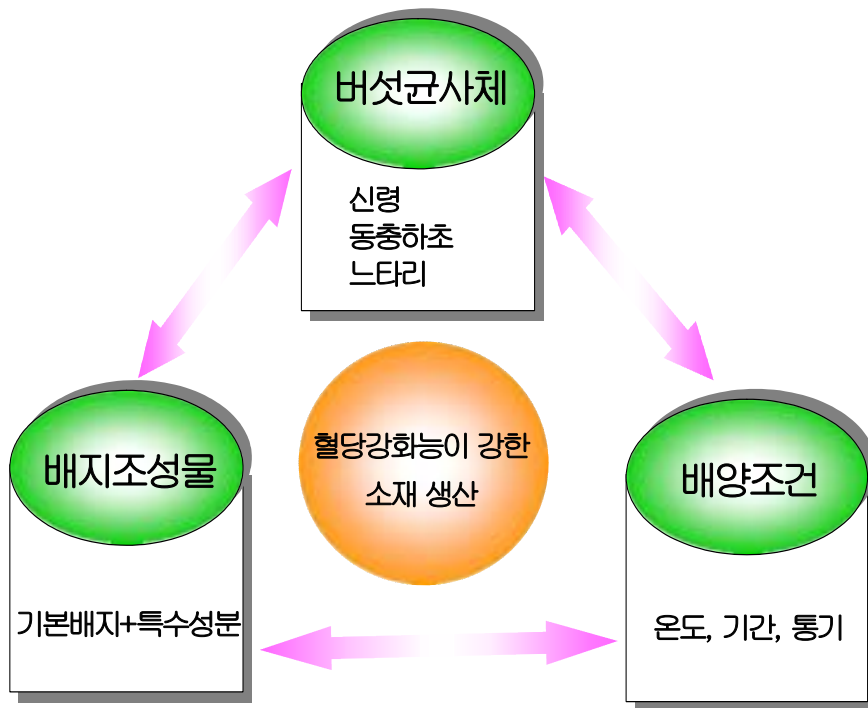
제 1 장 연구개발의 개요

제 1 절 연구개발 목표

1. 최종목표

본 연구에서는 “버섯균사체 액체배양법으로 부작용이 없고, 가격이 저렴하면서 혈당저하능이 강한 소재의 개발”을 목적으로 한다.

버섯균사체 액체배양법으로 부작용이 없고, 가격이
저렴하면서 혈당저하능이 강한 소재의 개발



2. 주요 연구개발목표와 내용

연구개발 목표	연구 내용
<input type="checkbox"/> 버섯균사체액체배양법을 이용한 혈당강하 소재 생산	<ul style="list-style-type: none"> ○ 최적 버섯균의 선발 ○ 최적 배지조성의 개발 ○ 최적 배양조건의 설정
<input type="checkbox"/> 유용소재의 분리·동정 및 고농축액 조제	<ul style="list-style-type: none"> ○ 유용소재의 분리 및 동정 ○ 유용소재를 다량 함유한 분획 제조 ○ 유용소재를 다량 함유한 농축액 제조
<input type="checkbox"/> 소재에 대한 효능 및 기전 시험 (<i>in vitro</i> 및 <i>in vivo</i>)	<ul style="list-style-type: none"> ○ α-glucosidase와 α-amylase 활성 저해능 ○ 세포실험 ○ 동물실험 (장기 기전연구, 단기 혈당조절연구) ○ 임상시험 (단기 혈당조절연구)
<input type="checkbox"/> 제품화	<ul style="list-style-type: none"> ○ 농축액 (파우치, 병) ○ Tablet, 분말 ○ 임상실험 (장기 기전연구)

제 2 절 연구개발 필요성

1. 연구개발의 필요성

- 부작용이 없고, 가격이 저렴하면서 당뇨병환자의 혈당을 효율적으로 강하할 수 있는 소재의 개발
- 천연물로부터 개발되어 당뇨에 의해 유발되는 합병증을 치유하는데 시너지효과를 갖는 소재
- 원천기술이 있어 국내 수요는 물론 외국으로 수출이 가능한 소재

∴ 버섯균사체액체배양 추출물로부터 개발되는 혈당강하 소재는
상기 조건을 충족시킬 수 있을 것이다.

가. 기술적 측면

- 1) 부작용이 없으면서 효능이 우수한 혈당강하 소재의 개발
 - 가) 현재 혈당강하 소재로 사용되는 소재는 혈당강하능은 우수하지만 여러 가지 부작용을 수반하고 있다.
 - 나) 이와 같은 부작용 때문에 혈당강하 소재를 천연물이나 식물에서 유래한 식품에서 개발 할려는 많은 연구를 하고 있지만 경제성이나 효능 측면에서 그 가치가 떨어진다.
 - 다) 버섯은 혈당강하능, 면역기능활성, 항암성, 혈중콜레스테롤감소성 등의 생리활성이 있음이 이미 알려져 있다. 특히 *Agaricus campestris*와 같은 버섯은 혈당강하 목적으로 외국에서 오래 전부터 민간요법으로 사용해왔다.
 - 라) 따라서 인간에게 익숙한 버섯을 이용하면 부작용이 없고, 혈당강하능이 우수한 소재를 만들 수 있을 것이다.
- 2) 지속적으로 저가로 공급이 가능한 혈당강하 소재
 - 가) 현재 사용되고 있는 혈당강하 소재는 고가이기 때문에 환자가 지속적으로 복용하기에는 경제적인 부담이 있다.

나) 버섯을 이용할 경우 버섯자실체는 생육이 까다로울 뿐만 아니라 생육기간이 길어 지속적으로 대량생산이 어려워 원료의 공급에 제한이 있다. 그러나, 균사체는 배양기간이 짧고 (3-5일), 대량배양이 용이하며, 배지의 조성물에 따라 다양한 소재를 생산할 수 있어 특정 (항당뇨)소재를 대량으로 생산할 수 있는 장점이 있다.

다) 따라서 버섯균사체액체배양방법을 활용하면 이 목적에 맞는 혈당강하 소재를 개발할 수 있을 것이다.

3) 유효소재를 다량 함유하는 버섯균사체배양방법과 이들 소재의 추출방법 및 혈당강하 기전연구

가) 이 특정 유효소재를 다량 생산할 수 있는 버섯균의 선발 및 배지의 조성에 관한 연구가 필요하다.

나) 생산된 이들 소재의 분리·동정 및 혈당저하능의 검증과 그 기전에 관한 연구가 필요하다.

나. 경제·산업적 측면

1) 생산자는 부가가치가 높아 경제성이 있고, 소비자에게는 저렴한 가격의 제품개발

가) 지금까지 개발된 소재는 당뇨병환자가 지속적으로 복용하여야되는데 비해 가격이 비교적 비싼 편이라, 혈당을 정상으로 유지하는데 지출되는 비용이 만만치 않다.

나) 제1형 당뇨병 (인슐린 의존)의 경우 지속적인 인슐린 투여가 요구되지만 가격이 비싸다.

다) 제2형 당뇨병 (인슐린 비 의존)의 경우 아직 정확한 원인이 밝혀지지 않고 비만과 다른 성인병과의 복합적인 요인으로부터 유래되는 것으로 보여 지고 있으며, 최근에는 이러한 환자의 수가 급격히 늘어나고 있어 전 세계적으로 심각한 문제로 대두되고 있다.

2) 당뇨병환자의 증가로 인한 생산성 저하현상의 개선을 위해 필요

- 현재까지 뚜렷한 치료방법이 없으면서, 병이 진전됨에 따라 면역기능저하, 심혈관계질환과 같은 합병증이 나타나지만, 보통의 경우 활동성이 저하되고

무기력해짐으로써 생산성이 저하됨으로써, 경제/산업에 악영향을 미친다.

3) 수입대체를 위한 국내에서 생산이 가능한 소재의 개발이 필요

가) 현재 사용되고 있는 약물치료제는 대부분 원료 또는 완제품을 외국으로부터 수입하고 있다.

나) **최근 국내 당뇨병환자가 급속히 늘어나는 만큼 외화유출이 심각하여 이를 대체할 수 있는 연구개발이 필요하다.**

다. 사회·문화적 측면

1) 당뇨병환자의 수가 급격히 증가하고 있어 사회 문제가 됨

가) 당뇨병 환자는 우리나라에서 300-500만 명 정도로 예상되며, 전 세계적으로 1994년에 1억1천만 명 이었고, 2010년에는 2억3천9백만 명으로 추정되어 약 2.2배의 증가를 예상하고 있다 (<http://biozine.kribb.re.kr/special/sp2.html>).

나) 당뇨병 유병율은 현재 10%로 추정되며, 당뇨병은 한국인 사망요인 중 6위를 차지한다.

2) 부적절한 식생활습관, 운동부족, 스트레스를 많이 받는 현대인에게 발병하는 당뇨병의 예방 및 치료가 필요

가) 현대인이 음료, 주식 등 다양한 형태로 섭취하는 당의 양은 필요이상이다.

나) 미국의 경우 '생활습관 2000운동'을 시행하여 식이와 운동을 통해 당뇨병의 예방 및 치료에 보다 적극적인 대처를 하고 있다.

다) 당뇨병의 치료에서 식사요법은 아직까지 가장 중요한 치료수단으로 인정되고 있으나 실제 식사요법에 의한 치료효과는 경험적 방법에 불과하며 효과를 나타내는 기전은 구체적으로 알려져 있지 않다.

라) **식사요법을 보다 과학적이고 효과적으로 예방 및 치료를 도울 수 있는 소재의 개발이 절실히 필요하다.**

3) 당뇨병으로 야기되는 합병증의 예방 및 치료가 필요

가) 당뇨병으로부터 유발된 합병증은 의료비의 증가와 환자의 삶의 질 저하로 이어지며 당뇨의 예방 및 치료제의 개발은 사회적인 측면에서도 꼭 필요하다.

- 나) 당뇨병과 당뇨병성 합병증은 개인적으로 신체와 정신의 피폐화를 일으킬 뿐만 아니라 사회적으로 미치는 영향이 심각하므로 다가오는 21C에 우리자신의 생존을 위해 시급한 대책이 필요하다.
- 다) 당뇨병 치료 및 합병증 예방에 있어서는 공복 및 식후혈당을 조절하고 당화 헤모글로빈 농도를 가능한 정상치에 가깝게 유지하는 것이 가장 중요하다.
- 라) 따라서 이의 예방 및 치료를 할 수 있는 천연소재의 개발이 필요하다.

제 3 절 연구개발 범위

1. 연차별 연구개발 목표와 내용

구 분	연구개발 목표	연구개발 내용 및 범위
1차년도 (02-03)	<input type="checkbox"/> 혈당강하 소재가 함유된 버섯균사체배양물 개발	<ul style="list-style-type: none"> ○ 버섯균 선발 <ul style="list-style-type: none"> - 신령버섯, 느타리버섯, 동충하초버섯 ○ 최적배지조성 개발 <ul style="list-style-type: none"> - 기 개발제품에 사용된 기본배지에 탄소원과 질소원 등 첨가 ○ 최적배양조건 설정 (15L 용) <ul style="list-style-type: none"> - 온도, 시간, 진탕속도, 공기 공급량 ○ 효능검증 <ul style="list-style-type: none"> - α-glucosidase와 α-amylase 활성저해 및 동물실험 (SD rat: 단기 혈당조절 효과)
	<input type="checkbox"/> 버섯균사체배양물로부터 유용소재의 추출 (버섯균사체배양 추출물) 및 분획	<ul style="list-style-type: none"> ○ 유용소재 추출 방법 <ul style="list-style-type: none"> - 고온, 고압 (121℃, 90분) - Ethanol 추출 - 저온침전 (4C) - Thin-film evaporator ○ 유용소재의 분획 및 분리 <ul style="list-style-type: none"> - Prep-HPLC, TLC, Column chromatography
	<input type="checkbox"/> 버섯균사체배양 추출물 및 분획의 혈당저하능 실험	<ul style="list-style-type: none"> ○ <i>In vitro</i> 실험 <ul style="list-style-type: none"> - α-glucosidase 및 α-amylase 활성저해 ○ <i>In vivo</i> 실험 <ul style="list-style-type: none"> - 동물실험 (SD rat: 장기 기전연구) - 임상시험 (제2형 당뇨병환자; 단기 혈당조절효과 실험)
	<input type="checkbox"/> 버섯균사체배양 추출물 및 분획의 제품화	<ul style="list-style-type: none"> ○ 버섯균사체배양물의 대량생산 <ul style="list-style-type: none"> - 최적조건하에서 생산 ○ 원료 및 완제품의 제형 <ul style="list-style-type: none"> - 액상 <ul style="list-style-type: none"> · 파우치형, 병 - 고상 <ul style="list-style-type: none"> · 정제, 분말

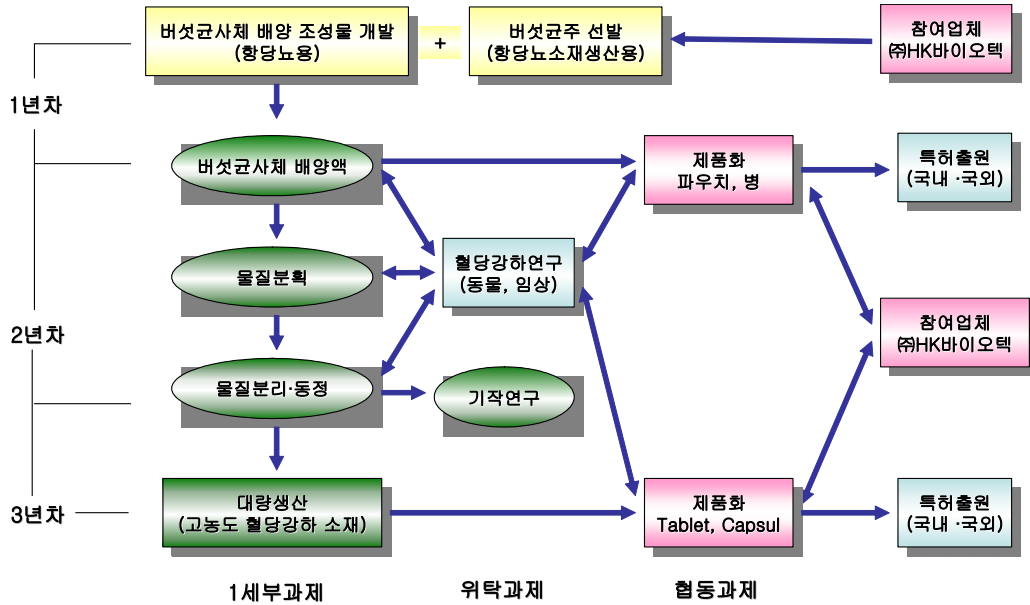
구 분	연구 개발 목표	연구개발 내용 및 범위
2차년도 (03-04)	<input type="checkbox"/> 버섯균사체배양 추출물의 대량생산 및 분획	<ul style="list-style-type: none"> ○ 혈당강하 성분이 함유된 버섯균사체배양 추출물의 대량생산 및 분획 (1차년도에 선정된 최적의 방법으로 생산)
	<input type="checkbox"/> 유효성분의 분리·동정	<ul style="list-style-type: none"> ○ 유효성분의 분리 및 동정 <ul style="list-style-type: none"> - 분리 <ul style="list-style-type: none"> · TLC, Column chromatography, Prep-HPLC 등 - 동정 <ul style="list-style-type: none"> · UV, IR, NMR, GC/MS 등의 기기분석
	<input type="checkbox"/> 성분의 효능연구	<ul style="list-style-type: none"> ○ <i>In vitro</i> 실험 <ul style="list-style-type: none"> - α-glycosidase 및 α-amylase 활성저해 ○ <i>In vivo</i> 실험 <ul style="list-style-type: none"> - 동물실험 (db/db mice: 장기 기전실험) - 임상시험 (제2형 당뇨병환자: 단기 혈당 조절효과 실험)

구 분	연구 개발 목표	연구개발 내용 및 범위
3차년도 (04-05)	<input type="checkbox"/> 제품의 효능 및 기전연구	<ul style="list-style-type: none"> ○ 세포실험 ○ 임상시험 (제2형 당뇨병환자; 장기 기전연구) ○ 안정성 및 안전성
	<input type="checkbox"/> 고농도 혈당강하성분 함유 버섯균사체 배양물, 추출물, 분획의 대량생산 조건 확립	<ul style="list-style-type: none"> ○ 1KL 배양조건 <ul style="list-style-type: none"> - 배지, 배양온도, 배양기간 ○ 배양물의 균사체 추출 및 분리 <ul style="list-style-type: none"> - 추출 - 균사체의 분리 ○ 배양물의 추출 (배양추출물) 및 농축 <ul style="list-style-type: none"> - 1차년도에 사용한 방법 중 가장 우수한 방법 사용 ○ 배양추출물의 분획 <ul style="list-style-type: none"> - 1차년도에 사용한 방법 중 가장 우수한 방법 사용 ○ 배양추출물 및 분획으로부터 유효성분 분리 <ul style="list-style-type: none"> - HPLC 등의 분석기기 사용
	<input type="checkbox"/> 제품화 및 산업화	<ul style="list-style-type: none"> ○ 내용물 성분분석 <ul style="list-style-type: none"> - 자체분석 (품질, 일반성분, 유효성분, 저장성) - 미국 FDA 품질분석 (미국 의뢰) ○ 제품의 형태 <ul style="list-style-type: none"> - 파우치 - 병 - 정제 - 분말 ○ 홍보 및 판매전략 <ul style="list-style-type: none"> - Internet 홍보 (주관연구기관, 참여회사) - 판매전략 (기술이전) ○ 기술이전 <ul style="list-style-type: none"> - (주)HK바이오텍

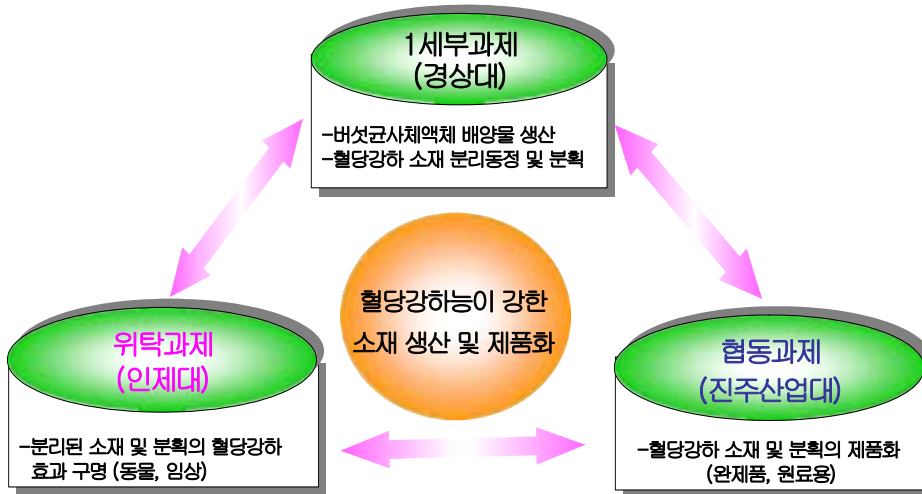
제 4 절 연구개발 추진체계

1. 추진체계도

□ 총괄



□ 과제간의 유기성



2. 추진체계

가. 1차년도

1) 1세부과제

버섯균사체배양조성물 (항당뇨용)을 개발하고, 여기에 선발된 버섯균주 (항당뇨 소재생산용)를 배양 (최적조건)하여 버섯균사체배양액 추출물을 조제 한다 [(주)HK바이오텍 참여].

2) 위탁과제

제조된 버섯균사체배양액 추출물에 대한 혈당강하효과를 α -glucosidase 및 α -amylase 활성저해, 동물실험 (장기) 및 임상(단기)시험을 통하여 조사한다.

3) 협동과제

위탁과제에서 수행한 혈당강하능이 강한 버섯균사체배양액 추출물을 제품화 한다 (농축액기스, 연질캡슐 등의 형태: 재단법인 바이오21센터 및 HK바이오텍 장비활용).

∴ 국내외 특허를 출원한다.

나. 2차년도

1) 1세부과제

개발된 버섯균사체배양액 추출물로부터 소재분획을 실시하고 각 분획에 함유된 일반성분을 분석하고 유효성분을 분리·동정한다.

2) 위탁과제

1세부과제에서 제조한 분획 및 분리·동정된 소재에 대하여 혈당강하효과를 α -glucosidase 및 α -amylase 활성저해, 동물실험 (장기)을 통하여 조사한다.

3) 협동과제

분리·동정된 소재에 대한 제품개발을 위한 연구를 수행 한다 (다양한 식품, 농축액기스, 연질캡슐 등의 형태: 재단법인 바이오21센터 및 HK바이오텍 장비활용).

다. 3차년도

1) 1세부과제

2차 년도에서 분리·동정된 활성성분을 대량으로 함유하는 분획을 대량생산하는

체제를 구축 한다 (참여업체 및 재단법인 바이오21센터의 발효장비 활용). 그리고 제품의 과학적인 근거를 마련하기 위하여 2차 년도에서 분리·동정된 유효성분의 작용기전을 연구 한다 (위탁과제의 협조).

2) 위탁과제

분리·동정된 소재에 대한 혈당강하효과를 α -glucosidase 활성저해, 임상시험 (장기)을 통하여 조사한다. 또한 1세부과제와 협조하여 세포모델을 사용하여 기전을 연구한다.

3) 협동과제

1세부과제에서 대량생산된 고농도 활성성분 함유 분획을 제품화 한다 (정제, 연질캡슐 등의 형태: 재단법인 바이오21센터 및 HK바이오텍의 장비활용).

∴ 제품에 대한 국내외 특허를 출원한다.

□ 산업화는 본 연구의 참여기업인 (주)HK바이오텍에 기술을 이전하는 것을 원칙으로 한다.

제 5 절 기대효과

1. 기술적 측면

- 가. 혈당강하 소재를 다량 생산할 수 있는 버섯균, 배지조성 및 배양기술의 개발 (특허출원 및 기술이전)
- 나. 증가하고 있는 당뇨병환자가 지속적으로 복용할 수 있는 부작용이 없고 값이 저렴한 혈당강하 소재 개발

2. 경제·산업적 측면

- 가. 개발된 기술의 이전에 따른 수익창출
 - 현재 국내 당뇨병 치료제 시장 규모는 경구용과 인슐린 주사제를 포함하여 년 간 약 1,200억원 수준으로 (www.biozine.kribb.re.kr), 이들의 약 5% 대체한다고 할 경우 약 60억원의 수익 창출
- 나. 수입되고 있는 혈당강하 소재의 대체로 인한 수입대체효과 창출
 - 현재 국내 당뇨병 치료제 시장은 거의 다국적 제약사가 거의 시장을 장악하고 있어

년 간 약 60억원의 수입대체 효과를 기대

다. 농가소득의 증대

- 버섯균사체배양물의 혈당강화 소재는 버섯자실체에도 함유되어 있기 때문에 버섯소비를 증가시켜 버섯재배농가의 소득증대에 기여 (10억원: 특정 버섯재배시장 (아가리쿠스, 느타리, 동충하초)이 년 간 약 1,000억원 규모로 이의 1% 증대효과)

라. 국민건강 유지

- 당뇨병환자가 본 연구에서 개발된 저가의 혈당강화 소재를 지속적으로 복용함으로써 건강을 유지

마. 경제성 증대 효과

- 우수한 당뇨병 치료제의 개발은 당뇨치료제의 수입 대체효과가 기대
- 원료 및 완제품의 수출로 외화획득
- 당뇨병환자의 치유는 국민 경제활동을 촉진시켜 경제성 증대효과가 기대

제 2 장 국내 · 외 기술개발 현황

제 1 절 현황

1. 당뇨병환자의 증가

가. 전 세계의 당뇨병 환자 증가 추세

- 전 세계적으로 1994년에 1억1천만 명 이었고, 2010년에는 2억3천9백만 명으로 약 2.2배의 증가를 예상하고 있다.

나. 한국의 당뇨병환자 증가 추세

- 1) 우리나라 당뇨병환자는 300-500만명 정도로 추정된다.
- 2) 당뇨병 유병율은 현재 10%로 추정되며, 당뇨병은 한국인 사망요인 중 6위를 차지하고 있다. 식생활 및 생활습관의 서구화와 관련하여 유병율이 급증하고 있다.

2. 당뇨병환자의 치료 방법

가. 민간식이요법

- 1) 보리, 두류와 같은 식이섬유를 많이 함유하는 식품의 섭취
 - 비수용성 섬유소의 과량섭취는 위장장애 및 복부 가스충진 등으로 불편감을 유발하며, 소화 장애가 있어, 당뇨병환자가 지속적으로 복용하는 데는 많은 문제점을 안고 있다.
- 2) 두류 (검정콩, 대두, 완두)의 투여는 쥐의 혈당을 저하시킨다고 하였으며, 이는 두류에 많이 함유되어있는 식이섬유가 당과 지질의 대사를 저해하기 때문이며, 특히 식이섬유가 이당류의 분해효소를 억제하기 때문으로 보고하였다. 그러나, 두류첨가군으로 부터 맹장비대 현상이 나타났으며, 이는 식이섬유소의 과량섭취로 인해 맹장내의 세균증식과 관계가 있을 것으로 고찰하였다.
- 3) 뽕나무 잎에서 추출한 물질이 당뇨병치료에 효과가 있어, 이를 약제화 하기 위해 연구한 바 있었으나, 효과는 적고 부작용은 많아 그 수요가 점점 줄어들고 있다. 또한 뽕잎을 먹은 누에가 당뇨병 치료에 특효가 있다고 크게 유행하고 있으나,

이에 대한 과학적인 근거가 불충분하다.

- 4) 수용성 식이섬유인 β -glucan은 탄수화물 및 지질대사 개선효과가 탁월한 것으로 보고되었으며, 점도가 높아 소화관에서 식이의 이동속도 및 탄수화물의 소화, 흡수 속도를 지연시켜 탄수화물 대사 개선효과가 탁월한 것으로 보고되었다. 버섯추출물은 β -glucan을 다량 함유하고 있어 혈당조절 효과가 있을 것으로 기대된다.

나. 약물요법

- 1) 설폰요소계 (chlorpropamide, glibenclamide, glipizide, gliclazide, gliquidone 등):
췌장의 베타세포 세포막에 있는 수용체와 결합하여 인슐린의 분비를 촉진한다.
- 2) Meglitinide: 췌장 베타세포의 K-ATP통로에 결합함으로써 인슐린 분비를 촉진시키는 기전으로 작용
- 3) Biuanide: 간에서 당 신생 (gluconeogenesis) 및 당원분해 (glycogenolysis) 를 억제하여 공복혈당을 감소시키고 말초조직에서 인슐린 저항성을 감소시키는 한편 혈청유리지방산 농도와 지질을 감소시킨다. 아울러 체중을 감소시키는 효과가 있어 주로 비만형 제2형 당뇨병환자에서 유용하게 사용되는 약물이다. 신장기능이 저하된 환자와 심혈관계 기능이 감퇴된 환자들에게서 유산혈증 (lactic acidosis)을 유발한다.
- 4) α -glucosidase억제제: 소장의 점막에 있는 소화효소를 억제하여 이당류가 단당류로 분해되는 과정이 억제됨으로써 탄수화물의 소화흡수가 지연되어 식후혈당의 상승을 저해한다. 제1형과 제2형 당뇨병환자들에게서 사용될 수 있으며 acarbose, voglibose, miglitol, emiglitate등이 있고 국내에서는 acarbose와 voglibose가 현재 사용되고 있다. Acarbose는 식사중간에 복용하면 식후 혈당을 30-60 ml/dL, 공복혈당을 15-20 ml/dL 정도 감소시킨다. 그러나 2-3년 동안 이 소재를 지속적으로 복용할 경우, 복부팽만, 구토, 복통 등의 부작용이 있다.
- 5) Thiazolidinedione: 세포의 핵 내에 위치하는 PPAR γ 와 결합하여 인슐린 저항성을 개선시키는 약리기전을 가지고 있다. 이들 약제는 지방세포에서 포도당 및 지방산의 섭취를 증가시키고, 근육조직에서 포도당의 섭취를 증가시켜 당원합성 및 포도당 이용율을 증가시키며 간에서 당합성을 감소시켜 증가된 혈당을 조절한다. 이것은 가장 최초로 상용화 된 약물이지만 최근 심각한 간독성의 부작용이 보고되어 사용이 유보된 상태이다.

제 2 절 문제점

1. 기존의 치료제는 가격이 비싸 지속적으로 복용하기 어렵다.

2. 부작용이 있다.

가. 지금까지 다양한 약제가 개발되어있지만, 약제로써의 장단점을 모두 가지고 있어, 작용기전이 서로 다른 여러 가지 약물들을 함께 투여하는 복합요법이 점점 많이 사용됨에 따라 당뇨병 환자들의 대사조절은 좋아지고 있지만 복용하는 약물들의 수가 증가하고 이에 따라 약물요법에 대한 환자들의 순응도가 감소 될 뿐만 아니라 의료비의 증가를 초래 할 수 있는 문제점 등이 지적되고 있다. 이러한 이유로 많은 당뇨환자들이 약물치료법 보다는 식이요법을 통한 혈당조절을 하고 있지만, 지금까지 당뇨병 치료를 목적으로 하는 식품소재에 관한 연구는 과학적 근거가 매우 부족한 상태이다.

나. 대부분의 당뇨환자가 경구 혈당강하 소재를 복용하고 있으나, 복통, 장내가스 발생 등 부작용이 나타날 수 있으며, 복용 기간이 지속됨에 따라 약물의 효능이 감소될 수 있다. 따라서 부작용 없는 천연물 유래 혈당조절 소재의 발굴이 절실하다.

3. 민간요법은 과학적인 근거가 부족하다.

가. 민간요법으로 이용되는 천연물로부터 효능이 우수한 소재의 개발과 함께 과학적인 기전의 구명이 절실히 필요하다.

제 3 절 문제점의 해결방안

현재의 당뇨치료제가 갖고 있는 여러 가지 문제점을 해결할 수 있는 방법으로써 버섯균사체배양액 추출물로부터 혈당강하 소재의 개발이 가장 적합

1. 부작용이 없는 천연 소재이다.

가. 버섯은 탄수화물 및 지질대사 개선효과가 탁월한 것으로 보고된 바 있는 수용성

식이 섬유인 β -glucan을 함유하고 있어, 혈당조절 효과가 있을 것으로 기대된다.
나. 아가리쿠스 속은 전통적으로 당뇨치료에 사용해 왔다 (Streptozotocin으로 당뇨를 유발한 생쥐에게 아가리쿠스버섯 속을 식이 또는 음용수에 가하여 섭취시킨 결과 혈당치가 조절되었다).

다. *in vitro* 실험에서 아가리쿠스버섯 속 추출물은 근육조직으로 glucose의 transport를 촉진함과 동시에 근육조직에서 glucose oxidation을 증가시켜 인슐린과 유사작용을 나타내었고, 또한 아가리쿠스버섯 속 추출물은 인슐린 분비를 촉진하였다.

라. 따라서 아가리쿠스버섯 속인 신령버섯균사체배양액 추출물에도 β -glucan 이외의 insulin 분비 촉진, insulin과 유사작용을 하는 성분이 존재할 가능성이 크며, 당뇨치료효과가 탁월할 것으로 예상되며, 실제 α -glucosidase 저해능 및 임상실험으로부터 탁월한 혈당저하 효과가 있음을 확인하였다.

2. 가격이 저렴하고 지속적으로 대량공급이 가능하다.

가. 버섯자실체는 당뇨병치료에 우수한 천연소재이지만 재배가 까다롭고 대량생산이 어려워, 가공품의 원료소재로 사용하기에는 제한이 있다.

나. 그러나 버섯균사체 액체배양물은 대량으로 년 중 생산이 가능하여 저렴한 원료를 지속적으로 공급할 수 있다.

3. 버섯균사체 액체배양으로 혈당강하성분이 다량 함유된 조성물을 공급할 수 있다.

○ 버섯균의 종류, 배지조성, 및 배양조건에 따라 특정성분을 생산할 수 있다.

4. 버섯은 다양한 생리활성 효과가 있어, 혈당강하효과 외에도 당뇨의 합병증을 개선할 수 있는 시너지효과가 있다.

가. 항암효과

1) 일반적으로 조개느타리, 표고버섯 등에 존재하는 단백질 다당체는 면역체계와 연결되어 간접적으로 종양 증식을 억제시키고 암세포나 유해 병원균을 사멸시키는 macrophage의 수를 증가시키는 것으로 알려져 있다.

2) β -1,3 glucan인 Lentinan은 mouse를 이용한 동물실험에서 5-FU 치료로 인한 체중감소를 억제시키고 종양에 의한 독성을 선택적으로 감소시키는 효과를 보였다고 발표되었다. 또한 위암환자를 대상으로 한 임상실험에서 생존기간을

연장하고 식욕부진, 권태감, 오심, 동통 등의 자각증상을 개선시켜준다고 확인되었다.

- 3) 상황버섯, 동충하초, 아가리쿠스 버섯은 최근 이들의 항암성에 대해 많은 주목을 받고 있다.

나. 면역증강효과

- 1) 표고버섯에 존재하는 β -1,3 glucan인 lentinan은 면역계의 host mediated immune response에 관여하여 손상된 면역기능을 회복시켜준다고 보고되었다. 또한 생체 내에서 감염방어 등의 면역기능을 나타내는 보체계 (complement system)를 활성화시킨다고 알려져 있다.
- 2) 느타리, 표고버섯 등에 존재하는 단백질 다당체는 인터페론생성을 촉진시키는 물질의 중양에 대한 생체 고유의 방어력을 높여줌으로써 인터페론의 유도를 활성화시킨다고 보고되었다.

다. 혈 중 콜레스테롤 강하 및 체지방감소효과

- 1) 쥐를 이용한 실험에서 표고의 엘리타데닌이 혈중 콜레스테롤과 혈압을 강하시키는 작용이 있음이 보고되었다.
- 2) 느타리버섯의 열수 추출물은 mouse의 체지방을 감소시키는 효과가 있었다.

라. 항바이러스작용

표고의 포자추출물에 인플루엔자 바이러스 저지효과가 있음이 알려져 있다.

제 4 절 앞으로 전망

1. 효과적인 혈당강하 소재를 다량 함유하는 버섯균사체배양 추출물을 대량으로 배양하여, 여기에 함유된 혈당강하 소재를 추출하는 기술을 개발하고, 그 유효성분을 분리/정제하여 구조를 동정하고, 이들의 혈당강하 효능을 검증 (*in vitro*, 임상, 및 동물실험) 할 것이다.
2. 과학적인 근거를 갖는 유효성분을 함유하는 조성물을 환자가 복용하기 편리한 형태로 제품화할 것이다.
3. 국가별 소비자 기호도에 따라 제품화하여, 내수 (캡슐, 고농축엑기스, 병 포장) 또는 미국 (캡슐), 일본 (고농축엑기스 또는 병 포장), 중국 (고농축엑기스 또는 병 포장)으로 수출할 것이다.

제 3 장 연구개발 수행내용 및 결과

제 1 절 연구수행 방법

1. 향당노 버섯균사체 액체배양물 개발

가. 버섯균주 및 활성화

1) 버섯균주

Table 1과 같이 AB (신령버섯), PO (느타리버섯), CM (번데기동충하초버섯)균을 사용하였다 (생육이 빨랐고, 예비실험에서 α -glucosidase의 활성을 강력히 억제하는 균주였음).

2) 버섯균주의 활성화

Table 1에 표시된 버섯균주 (AB, PO, CM)를 PDA배지 상에 접종하여 (접종량: 8 mm i.d. 원형) 24°C의 향온기에서 배양하면서 균주를 활성화하였다.

Table 1. Mushroom strains used in this study

Generic name	Systemic name
신령	<i>Agaricus Blazei</i> (AB)
느타리 (원형)	<i>Pleurotus ostreatus</i> (PO)
번데기동충하초	<i>Cordyceps militaris</i> (CM)

나. 버섯균사체배양용 배지조성

1) 기본 액체배지 (Know-How) 조성:

- 가) 이 배지의 주요 구성분은 농산물이었다.
- 나) 농산물을 효소로 처리하여 균사생장촉진물질 및 혈당강하 소재의 전구체를 생성하였다.
- 다) KH_2PO_4 , MgSO_4 등을 포함하는 다수의 무기성분을 첨가하였다.

2) 기본배지에 추가로 사용한 성분

- 가) 배지의 탄소원: glucose, fructose, xylose, rhamnose, ribose
- 나) 배지의 질소원과 sulfur원: Pro, Hpro, Ser, Thr, Cys, Phe, Leu

3) 최적배지조성

상기 기본배지에 여러 가지 전구물질을 첨가하여 최대량의 혈당강하 소재를 생성하도록 최적배지를 조제하였다.

다. 버섯균의 선발

상기 가. 2)의 균주를 나. 3)의 과정에서 개발된 배지에 배양하여 최종적으로 선발하였다.

라. 액체배양조건 확립

1) 배지조성 및 균주

배지조성과 균주는 상기 “다.” 항에서 선발된 것을 사용하였다.

2) 배양

- 가) 삼각플라스크 배양: 500 mL 분량의 삼각플라스크에서 5일 동안 배양하였다.
- 나) 5 L 규모 액체배양: 바이오21센터 보유 5 L 액체배양조 (Kobiotech)를 사용하여 배양하였다.

3) 배양조건 (5 L 배양조)

- 가) 배양 온도: 항온 (24℃)
- 나) 통기량: 1 v/v/m
- 다) 배양기간: 3일 - 5일

마. 대량배양

1) 500 L 실험실 규모 (Kobiotech)

500 mL 분량의 삼각플라스크에서 5일 동안 배양한 뒤 5 L, 50 L, 500 L 발효조를 이용하여 배양하였다.

2) 5KL 규모 (Kobiotech)

5000 L 발효조 [Bio21센터의 장비]를 이용하여 배양하였다.

바 시료조제

1) 열수추출시료

배양된 버섯균사체배양물을 121℃에서 60분간 열수추출하과 실온으로 냉각한 다음 구조토가 함유된 filter press를 통과한 여액을 농축한 것을 열수추출물시료 (Hot water extract: **HE**)로 사용하였다.

2) 건조 분말시료 : HE를 동결건조하여 건조 분말하였다.

3) 분획시료

가) 열수추출물의 용매분획

HE를 **Figure 1**과 같은 방법으로 용매의 극성에 따라 분획하여 용매분획시료로 사용하였다.

나) 건조분말시료의 분획

동결건조물 시료 50 g을 150 ml의 증류수에 첨가하여 시료를 용해하였다. 여기에 800 ml의 95% EtOH을 첨가하여 (75% EtOH 용액) 4℃ 냉장고에 하루 방치한 후 원심분리 (10,000 rpm, 10 min)하여 상등액과 침전물을 분리한 다음 그 각각을 **Figure 2**와 같이 분획하였다.

2. 소재에 대한 항당뇨 효능 검증

가. α -Glucosidase 및 α -amylase 활성 억제에 의한 검증

α -glucosidase 저해활성은 yeast α -glucosidase (Sigma, USA; 0.7 U/mL)를 효소로, p-nitrophenyl- α -D-glucopyranoside를 기질로 사용하여 측정하였다. α -amylase 저해활성은 porcine pancreatic α -amylase (Sigma, USA; 100 U/mL)를 효소로, p-nitrophenyl- α -maltoheptaoside를 기질로 사용하여 측정하였다. 샘플 및 acarbose는 5 mg/mL의 농도로 DMSO에 용해하여 사용하였다. 효소와 시료를 첨가하여 OD₄₀₅를 측정하였다. 5분 후에 기질을 첨가하고 실온에서 5분간 반응시킨 후 OD₄₀₅를 측정하여 흡광도 변화로부터 효소저해활성을 계산하였다.

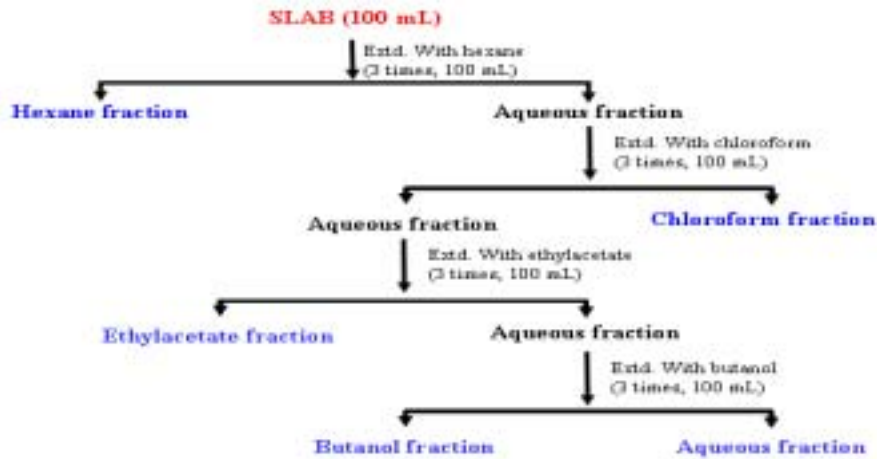


Figure 1. A flow diagram for the fractionation of HE from submerged liquid culture of mushroom strains.

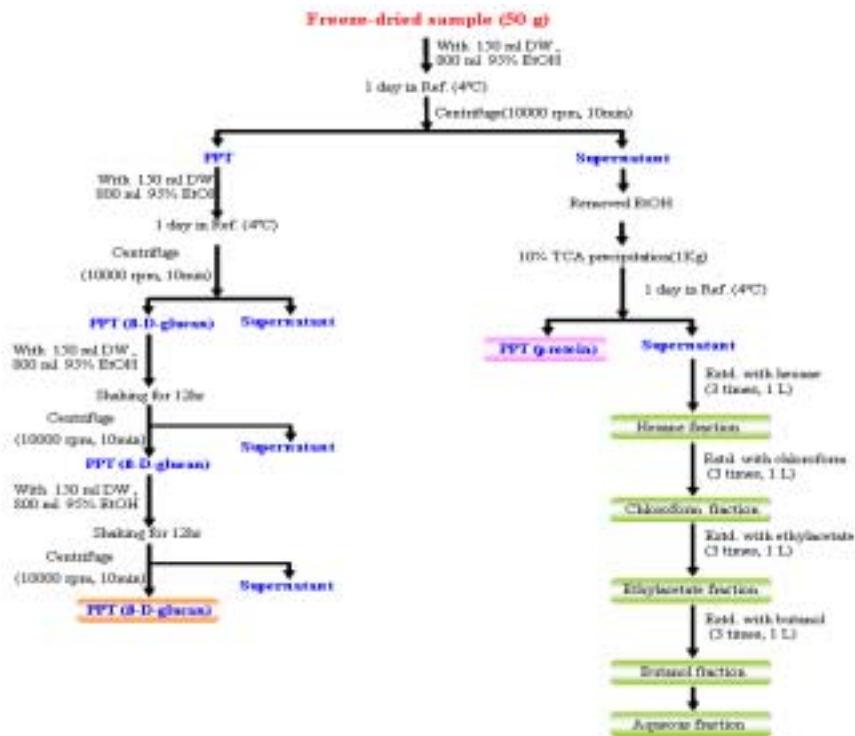


Figure 2. A flow diagram for the fractionation of freeze-dried materials from HE from submerged liquid culture of mushroom strains.

나. Streptozotocin (STZ)-induced diabetes rat 실험 (제1형 당뇨병 모델)

1) 단기 실험

가) 실험동물의 당뇨 유발

체중 230 g ~ 270 g의 흰쥐 (SD)에게 0.1 M citrate buffer (pH 4.5)에 용해시킨 streptozotocin (STZ, Sigma Co., USA, 65 mg/kg)을 복강에 주사하여 당뇨를 유발하였다. STZ 투여 1주일 후 공복상태의 동물의 꼬리정맥으로부터 채혈하여 간이 혈당계 (Glucotrend, Germany)로 측정된 혈당이 200 mg/dL 이상일 때 당뇨병이 유발된 것으로 간주하여 실험에 사용하였다.

나) 실험동물 식이

실험동물식은 AIN-93 basal diet를 사용하였다(Table 2).

다) 시료

HE의 freeze-dried 분말 (FD)시료

라) 당뇨병에 있어서 시료의 혈당강하 효과

당뇨가 유발된 쥐를 난괴법으로 두 군으로 나눈 후, 밤 동안 12시간 절식시킨 후, 꼬리정맥에서 채혈하여 혈당을 간이혈당계로 측정하였다. 대조군 (n=7)은 soluble starch (1 g/kg, Sigma Co., USA)를, 시료 투여군 (n=7)은 soluble starch (1 g/kg) 및 시료 (500 mg/kg)을 생리적 식염수에 용해하여 gastric intubation 하였다. 투여 후 30, 60, 90, 120, 180, 240분에 꼬리 정맥에서 채혈하여 혈당을 측정하였다. 각 시점의 혈당 증가치를 계산하여 혈당증가곡선을 구하고, 혈당증가곡선의 면적 (area under the curve, AUC)를 계산하였다.

마) 통계처리

실험의 분석결과는 평균±표준오차 (mean±SEM)로 표시하였다. 동물실험에 있어서 두 군사이의 측정치에 대한 유의성 검정은 Student's t-test로 분석하였다 ($p < 0.05$).

Table 2. Composition of basal and HE diets

Ingredient	Basal diet (%) ¹⁾	10% HE (%) ²⁾
Corn starch	39.75	37.79
Casein	20.00	16.66
Dextrinized cornstarch	13.20	13.20
Sucrose	10.00	9.42
Alpha-cellulose	5.00	4.00
Mineral mixture	3.50	3.50
Vitamin mixture	1.00	1.00
L-cystine	0.30	0.30
Choline bitartrate	0.25	0.25
Tert-butyl hydroquinone	0.0014	0.0014
Soybean oil	7.00	5.16
HE sample	-	10.0

¹⁾AIN-93G basal diet. ²⁾Hot water extract of submerged liquid culture of mushroom strains.

2) 장기 실험

가) 실험동물 및 식이조성

체중 220~250 g의 수컷 흰쥐에게 STZ (65 mg/kg)를 복강에 주사하여 당뇨를 유발시키고, STZ 투여 1주일 후 공복상태의 동물의 꼬리정맥으로부터 채혈하여 측정된 혈당이 200 mg/dL 이상일 때 당뇨병이 유발된 것으로 간주하여 실험에 사용하였다. 난괴법으로 동물을 두 군으로 나눈 후, 대조군에게는 AIN-93G basal diet를, 실험군에게는 HE 동결건조시료를 10% 함유한 diet를 자유급식으로 8주간 섭취시켰다. 대조군과 실험군의 식이별 탄수화물, 단백질, 지방, 식이섬유의 함량을 동일하게 하였고, 복합당과 단순당의 섭취 비율도 유사하도록 하였다 (**Table 2**).

나) 혈액 및 혈장 분석

실험 동물의 체중과 식이 섭취량은 매주 2회 측정하였다. 해당식이 섭취 8주째, 동물을 12시간 절식 시킨 후 heart puncture로 실험동물을 희생시켰다, 혈액으로부터 혈장을 분리하여 실험에 사용하였다. 혈액 당화헤모글로빈은 크로마토그래피법으로 측정하였고, 혈장 포도당, 중성지방, 콜레스테롤, BUN 농도는 효소법으로 측정하였고, GOT 및 GPT 활성을 측정하였다.

다. db/db mouse 실험 (제2형 당뇨병 모델)

1) 실험동물 및 식이조성

생후 4주된 제2형 당뇨병 모델 수컷 db/db mouse (n = 16)를 두 군으로 나누어, AIN-93G basal 식이 및 10% HE 동결건조 시료를 첨가한 식이를 6주간 섭취시켰다. 식이별 탄수화물, 단백질, 지방, 식이섬유의 함량을 동일하게 하였고, 복합당과 단순당의 섭취 비율도 유사하도록 하였다 (Table 2). 동물에게 식이는 *ad libitum*으로 공급하였고, 사육실의 온도 및 습도는 20~25°C, 50~60%로 유지하였고, 명암은 12시간 간격으로 점등 및 소등하였다.

2) 혈액 및 혈장 분석

실험동물의 체중 및 식이 섭취량은 일주일에 두 번 측정하였다. 해당 식이 섭취 6주째 14시간 절식시킨 동물을 심장 채혈법으로 희생시켜 혈액 및 장기를 수집하였고, 혈액으로부터 혈장을 분리하여 실험에 사용하였다. 혈액 당화헤모글로빈은 크로마토그래피법에 의해 측정하였고, 혈장 포도당, 중성지방, 콜레스테롤, BUN, creatinine 농도 및 GOT, GPT 활성은 효소법으로 측정하였다. 인슐린 농도는 radioimmunoassay법으로 측정하였다.

3) 간조직의 지질과산화물 및 catalase 활성 측정

간 조직의 지질과산화물의 측정은 Ohkawa 등의 방법을 (1979) 이용하여, thiobarbituric acid (TBA)와 반응하는 malondialdehyde (MDA)의 함량을 측정하였고 표준용액으로는 1,1,3,3-tetramethoxypropane (TMP)을 사용하였다. 간조직의 catalase 활성은 Abei법으로 측정하였으며, 효소 활성은 1분 동안 1 μ mole의 기질을 분해시키는 효소의 양을 1unit로 하였다.

4) 간 지질농도 측정

간 조직의 지질 추출은 Folch 등의 방법을 (1956) 이용하였으며, 간지질 추출액의 총 콜레스테롤과 중성지방 농도는 효소법으로 측정하였다.

5) 간 조직의 glycogen 농도 및 PEPCK 측정

간 조직의 glycogen 농도는 Hassid와 Abraham의 방법으로 (1957) 측정하였다.

PEPCK 활성은 Chang과 Lane의 방법으로 (1966) 측정하였으며, 효소 활성은 1분동안 1 μ mole의 기질을 분해시키는 효소의 양을 1unit로 하였다.

6) 혈당조절 기전연구

당뇨동물모델계에 있어서 시료의 활성성분의 혈당조절 기전을 연구하기 위하여 생후 4주된 수컷 db/db mouse (n=16)를 두 군으로 나누어, AIN-93G basal 식이 및 HE 10 % 첨가식이 (**Table 2**)를 6주간 섭취시킨 후, 14시간 절식시키고 희생시켰다. 소장 점막을 채취하여 탄수화물 소화효소 활성을 측정하였고, 간 및 서혜부 백색지방조직 (white adipose tissue, WAT)을 채취하여 insulin receptor 및 glucose transporter (GLUT4)의 gene expression에 미치는 영향을 northern blot을 이용하여 조사하였다.

가) 소장효소 활성측정

소장에서 α -amylase 활성은 Bernfeld법을 (1955) 이용하여 가용성 전분으로부터 효소에 의해서 유리된 전체 환원당의 함량으로 측정하였다. 효소 활성은 1분 동안 1 μ mole의 maltose를 유리시키는 효소 양을 1unit로 하였다. 소장의 α -glucosidase (maltase) 및 sucrase 활성은 Dahqvist의 방법으로 (1964) 측정하였으며, 효소 활성은 1분 동안 1 μ mole의 기질을 분해된 이당류의 양을 1unit로 하였다.

나) 동물의 간 및 지방조직의 glucose transport 및 insulin receptor 발현수준

시료의 장기적인 섭취가 insulin receptor, glucose transporter (GLUT4)의 gene expression에 미치는 영향을 조사하였다. 동물의 간, 지방조직 (WAT)의 total RNA를 TRI reagent (Sigma, St Louise, U.S.A.)를 사용하여 분리하였다. 분리된 total RNA를 1.2% formaldehyde-agarose gel에 fractionation한 후 Hybond N+ nylon membrane (Amersham pharmacia, USA)에 transfer 하였다. Target gene의 ³²P-labeled cDNA를 probe로 사용하여 northern blot hybridization을 실시하였다.

7) 통계분석

실험의 분석결과는 평균 \pm 표준오차 (mean \pm SEM)로 표시하였다. 동물실험에 있어서 두 군사이의 측정치에 대한 유의성 검정은 Student's t-test로 분석하였다 (p < 0.05).

라. 간세포 모델에 있어서 혈당 조절효과

1) 세포배양 및 시료처리

간세포 (HepG-2 cell)를 사용하여 간세포의 당신생반응 효소 (phosphoenolpyruvate carboxykinase, PEPCK) 및 glucose transporter 발현 정도를 western blot으로 측정하였다.

HepG-2 cell은 한국세포주 은행에서 분양받아 DMEM배지를 사용하였다. HepG-2세포를 6-well로 옮긴 후 시료를 10, 25, 50 mg/mL의 농도로 1시간 또는 6시간 처리하였다.

간세포를 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na₂PO₄, 2 mM KH₂PO₄ (pH7.4)가 함유된 PBS로 씻은 후 50-200 uL의 triton lysis buffer (20 mM Tris, pH 7.4, 137 mM NaCl, 25 mM β-glycerophosphate, pH 7.14, 2 mM sodium pyrophosphate, 2 mM EDTA, 1 mM Na₃VO₄, 1% Triton X-100, 10% glycerol, 5 ug/mL leupeptin, 5 ug/ml aprotinin, 3 uM benzamidin, 0.4 mM DTT, 1 mM PMSF)에 담귀 초음파 분해하였다. 그 후 각 sample에 대한 단백질을 정량하였으며, 그 중 10 ug의 단백질의 발현은 anti-GLUT1, anti-GLUT4 antibody 및 anti-PEPCK1을 이용하여 확인 하였다. Membrane protein을 12% SDS-PAGE 상에서 전기영동 시킨 후 PVDF membrane에 전기이동 시켰다. Antibody와의 비특이적 결합을 막기위해 3% BSA, 0.1% Tween 20을 함유하고 있는 TBS buffer에서 membrane을 1시간 동안 상온 반응시키고 4°C에서 16시간 동안 반응시켰다. 반응을 끝낸 membrane을 washing한 후 rat GLUT-4의 C-terminal에 특이적인 polyclonal antibody를 Blocking buffer에 1:1000의 비율로 희석하여 상온에서 30분 동안 반응시켰다. membrane을 씻어내고 anti-rabbit IgG가 결합되어 있는 horseradish peroxidase를 1대 1000의 비율로 희석하여 상온에서 30분 동안 처리하고 다시 washing하였다. Membrane에 부착된 단백질을 Western blotting detection system을 이용하여 측정하였다.

2) 통계처리

실험의 분석결과는 평균±표준오차 (mean±SEM)로 표시하였다. 측정치에 대한 유의성 검정은 ANOVA를 사용하여 실시하였고, Tukey's test를 follow-up test로 사용하였다 (p < 0.05).

마. 임상시험

1) 제 2형 당뇨병환자 단기치리에 의한 혈당 개선효과

가) 환자

당뇨환자에 있어서 “당시러”의 α -glucosidase 저해활성을 규명하기 위하여, 경구 혈당 강하제인 설포닐유레아계 약물을 복용하고 있는 제 2형 당뇨병환자를 모집하였다. 평균 연령 35-75세, 공복혈당 127-270 mg/dL이며, 당화헤모글로빈 수치가 6.5% 이상인 당뇨병환자 9명 (여)을 선별하였다.

나) 식후혈당 개선효과 검증

시료의 단기 복용이 식후 혈당에 미치는 영향을 조사하기 위하여 쌀밥 (쌀중량 64.2 g)을 섭취시키거나 (대조군), 쌀밥과 함께 “당시러” 200 mL (고형물 2.44 g, 유리당 함량 0.69%)를 동시 또는 1시간 전에 섭취시켰다. 각 부하시험시 가용성 탄수화물 (흡수 가능한 탄수화물, available carbohydrates)의 섭취량은 50 g으로 하였다. 식후 0, 60, 120분에 정맥 혈액을 채취하고, 원심분리하여 혈장을 분리하였다. 포도당 농도는 효소법으로 측정하였다. 각 시점의 혈당 증가치를 계산하여 혈당증가곡선을 구하고, 혈당증가곡선의 면적 (AUC)을 계산하였다. 인슐린 농도는 radioimmunoassay 법으로 측정하였다. 실험은 적어도 2주 이상의 간격을 두고 실시하였고, 당뇨병환자들은 실험 실시 전 3일간 약물 복용을 중지하고 실험을 실시하였다.

다) 통계분석

실험의 분석결과는 평균±표준오차 (mean±SEM)로 표시하였다. 세 군사이의 측정치에 대한 유의성 검정은 ANOVA를 사용하여 실시하였고, Tukey's test를 follow-up test로 사용하였다 ($p < 0.05$).

2) 제 2형 당뇨병환자 장기치리에 의한 혈당 개선효과

가) 환자

당뇨환자에 있어서 시료의 혈당조절 효과를 규명하기 위해 제2형 당뇨병환자 20명 (남 12명, 여 8명)을 random하게 두 군으로 나누었다.

나) 혈당개선 검증

실험군은 시료를 12주간 섭취하도록 하였다. 환자들은 활성성분 건조중량 1.22g이 함유된 “당시러” 100 mL을 매일 3회 식사와 함께 복용하였다. 대조군은 placebo (1.22 g의 유당이 함유된 액상제품 100 mL)를 매일 3회 복용하였다. 실험시작 전, 후에 환자의 신장과 체중을 측정하여 체질량지수 (body mass index, BMI,

kg/m²)를 계산하였고 혈압과 체지방 양 (Bioimpedance analyzer, TANICA, Japan)을 측정하였다. 섭취기간 시작 전 및 종료 후 공복상태에서 정맥으로부터 채혈하였다. 혈액 당화헤모글로빈 농도는 크로마토그래피법으로 측정하였고, 혈당 및 혈장 프락토사민, 콜레스테롤, 중성지방, HDL-콜레스테롤, LDL-콜레스테롤, BUN (blood urea nitrogen), creatinine 농도를 효소법으로 측정하였다. 혈장 GOT (glutamate oxaloacetate transaminase), GPT (glutamate pyruvate transaminase) 활성을 측정하였고 인슐린 농도는 radioimmunoassay법으로 측정하였다. 포도당 부하검사는 실험 기간 전과 후에 공복시에 75 g의 포도당을 섭취시킨 후, 포도당 부하 0, 60, 120, 240분에 정맥에서 채혈하여 혈당 및 인슐린을 측정하였고, 혈당 및 인슐린 변화곡선의 AUC를 구하였다.

환자들은 실험 기간동안 일상적인 식생활 및 생활습관을 유지하도록 하였으며, 오심, 구토, 복부팽만감 등 부작용을 보고하도록 하였다.

다) 통계처리

시료 섭취기간 전 및 12주간의 섭취기간 종료 후의 측정치의 차이 (difference)를 구하고, difference간의 유의성 검증은 t-test를 사용하여 실시하였다 ($p < 0.05$).

3. 유효성분 분석

가. 일반성분 분석

1) 고형분함량

HE 시료를 진공농축 (50~60°C)한 다음 동결하여 고형분 함량을 측정하였다.

2) 탄수화물 함량

가) 총 당함량

총 당함량 분석은 Dubois 등의 방법에 따라 glucose를 표준으로 페놀-황산과 반응하여 발색된 색도의 흡광값을 이용하여 분석하였다. PO (1 ml)에 5% phenol (1 ml)과 conc.-H₂SO₄ (5 ml)을 직접 액표면에 가하여 반응시켰다. Glucose (25, 50, 75, 100 $\mu\text{g/ml}$)를 표준당으로 하여 표준곡선을 정량하였다. 시료의 반응은 실온에서 30분간 방치하였다가 470 nm의 spectrophotometer (Backman C-680 series)에서 흡광도를 측정하였다.

나) 환원당

SOMOGYI-NELSON법을 이용하였다.

(1) 시약의 조제

구리시약 : 제이인산나트륨 ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$) 71g, 주석산칼륨나트륨 ($\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) 40g을 400ml의 물에 녹인 다음 1N NaOH용액 100ml과 10%황산동 용액 ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) 80ml을 첨가한다. 여기에 황산나트륨 ($\text{Na}_2\text{SO}_4 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$) 410g을 가하여 녹인 다음 1N 요오드화칼륨용액 25ml을 첨가하고 증류수를 추가하여 1,000ml로 조정한다. 이것을 1~2시간 방치한 다음 여과하여 갈색병에 보관하여 사용하였다.

(2) 시험방법

시료액 및 대조액 (증류수) 5 g를 각 시험구에 취하여 구리시약 5ml을 각각 가하고 마개를 한 후 끓는 수욕조에서 15분간 가열하였다. 찬물로 식힌 후 2.5% KI용액 2ml을 천천히 넣고, 이어 2N 황산용액 1.5ml을 빨리 넣고 흔들어 섞었다. 5분 후 0.005N $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 용액으로 적정하였다. 액이 담황색으로 변하였을 때 1% 전분지시약 2방울을 가하여 보라색이 없어지는 점을 종말점으로 하였다.

(3) 계산법

$$\text{당량}(\%) = \frac{-(B-A) \times f \times D \times 1.55}{S} \times 100$$

A: 시료액의 적정값 (ml)

B: 대조액의 적정값 (ml)

f: 0.005N $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 액의 역가

D: 희석배수

1.55 : 0.005N $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$, 1ml = glucose (mg/5ml)

S: 시료량(g)

3) 단백질함량

가) 조단백질분리

HE 시료 (100 ml)에 10 g의 trichloroacetic acid (TCA, 10%)를 첨가하여 4°C에서 12시간 방치하여 단백질을 침전시켜 분리하였다. 침전된 단백질은 원심분리 (10,000 rpm, 10min)하여 회수하고, 반투막에 넣어 0.2 M boric acid borax buffer (pH 9.0)로 24시간 동안 투석하였다.

나) 단백질함량

시료에 존재하는 단백질함량은 Bradford 방법에 준하여 Bio-RAD사의 단백질분석 시약으로 측정하였다. Dye Reagent와 3차 증류수로 희석 (1:4, v/v)하여 여과하였고, bovine serum albumin (BSA)을 standard로 사용하여 510 nm에서 흡광값으로 단백질함량을 측정하였다.

다) 구성아미노산함량

동결건조시료 4 mg을 6N-HCl 1 ml를 가한 다음 N₂ gas를 충전시킨 후 신속하게 밀봉하였다. 이를 110°C 오븐에서 24시간 가수분해시킨 뒤 냉각한 후 탈이온수 (DDW) 3 ml를 첨가한 다음 HCl을 감압으로 제거 (3회 반복 세척)한 다음 건조시켰다. 이 시료를 0.3 M lithium hydroxide (pH 2.2)에 용해하고 여과한 다음, 5 ml로 정용한 뒤 0.22 µm membrane filter로 여과하고, 여액을 아미노산 분석기 (Hisashia Hirano)로 분석하였다 [Column, Ultrapac 11 cation exchange resin (6 mm × 200 mm); Buffer flow, 45 ml/hr; Ninhydrin flow, 35 ml/hr; Column temp, 50~80°C; Buffer step, 4 step; Reaction bath temp., 130°C; Buffer pH range, 3.2~10.0; Injection volume, 40 µl].

4) 지방산함량

지방산은 Folch의 방법에 준하여 분리하였다. 4% H₂SO₄/MeOH로 methylester화시킨 다음 GC [Hewlett Packard 5890 GC {Column, Supelcowax-10 (60 m×0.32 mm); Detector, FID; Carrier gas, N₂ gas (2 ml/min); oven 온도, 180°C (5 min)에서 분당 5°C상승시키고 최종온도 220°C (20 min)}]를 이용하여 분석하였다.

5) 무기물 함량

무기원소는 AOAC의 방법에 따라 건조시료 1 g을 conc. HNO₃ 5 ml로 분해시키고, 다시 ternary solution [HNO₃:H₂SO₄: HClO₄=10:1:4 (v/v)] 10 ml로 반응시켰다. 여기에 hot water를 첨가하여 100 ml mess flask에 정용한 다음, 이것을 다시 여과 (Whatman NO.2 filter paper)하여 무기성분을 ICP spectrometer [Atomscan 25 (TJA)]를 이용하여 분석하였다.

나. TLC 분석 및 open-column chromatography

1) TLC

TLC (Silica 60 F-254 plate, 5 × 10 cm)를 사용하여 분리하였다. 전개 후 당화합물임을 확인하기 위해서 DAP로 분리된 band를 발색시켰으며, UV 흡광물질의 존재를 확인하기 위해서는 UV lamp (short wave)하에서 band를 관찰하였다.

2) Open-column chromatography

직경 2 cm의 open column에 silica gel column (Silica gel 60, 230~400 mesh ASTM, Merck, 5.0×80 cm)으로 충전한 후 전개용매로 elution하였다.

다. HPLC 및 GC

1) HPLC

C₁₈ column (mobile phase; MeOH: 1mM ammonium acetate 6:4)을 사용하였다. Flow rate는 1ml/min, peak의 detection은 PDA (257, 267 280)와 RI detector 사용하였다.

2) GC

시료를 1.0N-H₂SO₄/methanol로 methylation 시킨 다음 GC를 이용하여 hexane fraction 조성물의 성분분석을 확인하였다. 분석조건은 Hewlett Packard 5890 GC에 Supelcowax-10 (60 m×0.32 mm) 컬럼으로 FID detector로 N₂ gas을 분당 2 ml 흐르게 하였다. 최초 오븐 온도는 180℃였으며 최종 컬럼온도는 200℃ (10 min)였고 분당 3℃씩 올리는 프로그램이었다.

라. Spectrophotometric 분석

1) NMR

Bruker 500 MHz를 사용하였다.

2) UV

시료를 정당한 용매에 용해하여 UV/Vis 흡수 pattern을 Beckman C-680 model UV/Vis spectrophotometer를 이용하여 225~445 nm scan하였다.

4. 안정성 및 안전성 실험

가. 생균수 및 대장균

각각의 다른 환경에 저장 되어 있는 시료 (4°C, 실온, 50°C, 햇빛) 를 희석한 후 NA, EMB Agar에 각각 시료의 원액과 10배 희석한 시료를 100 μ l 접종하고 도말을 한다. 도말 후 NA는 30°C, EMB Agar는 37°C incubator에 넣고 24시간 배양 후 관찰하였다.

나. 점도 및 색소

Brookfield Viscosity meter (DV-1 Viscometer spindle No.1)를 이용하였고 색도는 색차계 (Colorimeter, MINOLTA-CT310)를 이용하여, L, a, b 값으로 색도 측정하였다.

다. 저장성

1) POV

시료 약 5 g (정확한 무게 측정)을 달아 초산:클로로포름 (3:2, v/v) 혼합액 25ml에 녹이고 포화요오드칼륨 용액 1ml (실험전 바로 만들어진 것을 사용)을 가볍게 흔들어 섞은 다음 어두운 곳에서 10분간 방치한 다음, 물 30 ml을 가하여 강하게 흔들어 섞은 다음 전분시액 1 ml를 지시약으로 하여 0.01N 티오황산나트륨액으로 적정하였다. 따로 공시험을 하여 보정하였다.

$$\text{과산화물가 (meq/kg)} = \frac{(a-b) \times f}{\text{검체의 채취량 (g)}} \times 10$$

a : 0.01N 티오황산나트륨액의 적정 수 (ml)

b : 공시험에서의 0.01N 티오황산나트륨의 소비량 (ml)

f : 0.01N 티오황산나트륨의 역가

3) TBARS

가) 시약의 조제

10% BHT (Butyl Hydroxy Toluene)/에탄올을 조제하였다. TBA (Thiobarbituric acid) 2.883g을 100ml의 증류수에 녹이고 TCA (Trichloroacetic acid) 150 g을 증류수 750ml에 각각 녹인후 두용액을 혼합하여 증류수를 첨가하여 1,000ml로 보정시켰다.

나) 시험방법

시료용액 5g에 10% BHT/ethanol 50 μ l와 증류수 15ml을 혼합하여 homogenizing (14,000 rpm, 30sec)시켰다. 이 균질액 2ml와 TBA/TCA 혼합액 4ml을 혼합하여 vortex 시켰다. 공시험구는 증류수 2ml과 TBA/TCA 4ml을 혼합하여 vortex 하였다. Vortex 시킨후 heating block에서 heating (90 $^{\circ}$ C, 15min)시키고 흐르는 물에 약 5분간 방냉시킨 다음 원심분리 (3,000rpm, 10min)하여 상층만 회수하여 spectrophotometer 531nm에서 흡광도를 측정하였다.

다) 계산법

$$TBARS \text{ (mg/kg)} = \text{Absorbance} \times 5.88$$

라. Mouse에 대한 급성실험

- 1) 처리농도: 10 mg, 16.3 mg, 25 mg, 37.3 mg/30 g, control (saline 투여)이었다.
- 2) 처리방법: 각 처리구는 멸균 증류수를 사용하여 stock을 만들어서 희석하여 사용 (autoclave)하였고, ICR male과 female 각 10마리에 경구투여 (0.2ml: 1회 경구투여)하였다.

3) 조사항목

- 가) 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.
- 나) 체중측정: 급성독성시험에 사용된 모든 시험동물의 체중은 시험기간 중 0, 4, 7일 측정하였다 (시험물질 투여 전 및 부검시 체중도 각각 측정 기록).
- 다) 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 마취 하에 방혈 치사시킨 후 육안으로 모든 장기를 검사를 하였다.

라) 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)를 측정하였다.

마) 혈액생화학적 검사: 복부 대동맥에서 채혈한 혈액 중 일부를 혈액학적검사로 이용하고 나머지 혈액은 4℃ 냉장 보관 후 원심분리(3000rpm, 10min)하여 자동생화학검사를 이용하여 총단백질 (TPROT), albumin (ALB), lactic dehydrogenase activity (LDH), aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), alkaline phosphatase (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.

4) 통계학적 분석: 자료에 대한 통계학적인 분석은 Duncan's Multiple range test와 Student's t-test를 이용하여 유의성을 검정하였다.

제 2 절 연구결과

1. 항당뇨성 버섯균사체 액체 배양물

- HEAB (신령버섯균사체액체배양물의 열수추출물)이 가장 우수한 α -glucosidase 저해율을 나타내었다.
- 따라서 혈당저하용 버섯균으로 신령버섯 (AB)를 선별하고 AB의 액체배양물에 대한 집중적인 연구를 수행하였다.

가. 버섯균주 선별

1) 혈당강하능이 강한 버섯균사체배양물의 생산

가) 버섯균주의 활성화

예비실험에서 얻은 결과 (생육이 빠르면서 α -glucosidase의 활성을 강력히 억제)를 바탕으로 **Table 1** 표시된 버섯균주를 선정, PDA배지 상에 접종하여 (접종량: 8mm i.d. 원형) 24℃의 항온기에서 배양하면서 균주를 활성화 시켰다.

Table 3에서는 AB (신령버섯), PO (느타리버섯), CM (번데기둥충하초버섯) 균주가 PDA배지 상에서 생육하는 정도를 3, 7, 10, 14일 간격으로 측정하였다. PDA 배지상에서 생육정도는 버섯균에 따라 상이하였으나, 큰 차이는 없었다. 가장 생육이 빠른 균은 PO로서 10일 만에 plate를 완전히 덮었고, AB는 약 14일 만에, 마지막으로 CM은 18일만에 plate를 완전히 덮을 정도로 생육하였다. 본 연구에서 이런 결과는 큰 의미는 없지만 대량배양 (15 L 이상)을 하기 위해 버섯균을 활성화하여야 하기 때문에 그 생육정도를 측정하였다.

대량배양을 위한 전 배양에는 plate를 약 70% 덮을 정도로 생육한 버섯균을 전 배양 원균으로 사용하였다.

Table 3. Growth of mushroom strains (mm) on PDA medium

Mushroom strain ¹⁾	Incubation (days ¹⁾)			
	3	7	10	14
AB	10.3	32.0	51.2	78.3
CM	11.2	29.1	40.8	60.8
PO	16.6	56.7	85.0 ²⁾	

¹⁾AB; *Agaricus blazei* (Sginryeong), CM; *Cordyceps militaris* (Dongchoonghacho), PO; *Pleurotus ostreatus* (Neutari).

나. 최적배지조성 및 배양방법 구명

Plate를 약 70% 덮을 정도로 생육한 AB, CM, PO균을 대두박분해물이 함유된 기본배지에 1% xylose와 1% proline이 첨가된 배지에 7일동안 배양 (22°C, 120 rpm)하였다. 이들 버섯균사체배양물의 HE를 동결건조 한 다음 α -glucosidase의 활성을 측정한 결과는 **Table 4**와 같다.

AB의 α -glucosidase 활성저해는 30.4% 였고, PO는 23.9%, CM은 20.5%로 AB의 HE (HEAB)가 α -glucosidase 활성을 가장 강하게 저해하였다. 또한 이들 버섯균의 고형분은 약 2%정도로서 버섯균 간에 차이가 없었다.

Table 4. Inhibition of rat intestinal α -glucosidase activity by the HE of submerged liquid culture of mushroom strains¹⁾

Mushroom strain ²⁾	Solid material ⁴⁾ (%)	Inhibition (%) ³⁾
AB	2.5 ± 0.3 ^a	30.4 ± 2.6 ^{5)a}
CM	2.1 ± 0.7 ^a	20.5 ± 2.4 ^b
PO	2.3 ± 0.6 ^a	23.9 ± 1.2 ^b

¹⁾Submerged liquid culture incubated at 22°C for 7 days and evaporated.

²⁾AB; *Agaricus blazei* (Sginryeong), CM; *Cordyceps militaris* (Dongchoonghacho), PO; *Pleurotus ostreatus* (Neutari).

³⁾% of Mushroom strains were α -glucosidase inhibitory activities.

⁴⁾Freezed-dried.

⁵⁾Mean ± SD of triplication. Means with same superscript small letters represent significantly different at p<0.05 by Duncan's multiple range test.

가장 활성이 뛰어난 HEAB의 yeast 및 rat intestinal α -glucosidase 저해활성을 *in vitro*에서 조사한 결과, HEAB 5 mg/mL 농도에서 yeast 및 rat intestinal α -glucosidase 저해활성이 각각 27.6%, 15.5%로 나타났다 (Table 5). 표준품으로 사용한 acarbose의 yeast α -glucosidase 저해활성은 29.9%로 나타났다. *In vitro*에서 α -amylase 저해활성을 측정한 결과 HEAB는 46.8%, acarbose는 90.1%의 저해활성을 나타내었다 (Table 5). HEAB배양물의 yeast α -glucosidase 저해활성은 현재 당뇨병 치료제로 사용되고 있는 acarbose와 유사한 저해활성을 나타내어 식후 혈당조절에 효과가 있을 것으로 사료된다.

따라서 본 연구에서는 HEAB를 혈당강하용 버섯균으로 선정하고 다음 연구를 계속하였다.

Table 5. Inhibitory activities of yeast and rat intestinal α -glucosidase and porcine pancreatic α -amylase by HEAB

Sample (5 mg/mL)	Inhibition (%)		
	Yeast α -glucosidase	Rat intestinal α -glucosidase	Porcine pancreatic α -amylase
HEAB	27.6	15.4	46.8
Acarbose	29.9	91.9	90.1

다. 대량배양

1) 삼각플라스크 배양 (500 ml)

대두박분해물 0.4%, prolin 1%, xylose 1%, 황백당 2%, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.05%, KH_2PO_4 0.05%로 조제된 액체배지 (300 ml)를 삼각플라스크 (500 ml)에 첨가하고 고압멸균 (121°C, 30분)한 다음, 실온으로 냉각한 후 PDA배지에서 생육한 *Agaricus blazei* (신령버섯; 아가리쿠스) 버섯균주 (1/4 petri dish/ Δ flask)를 지름 7 mm이하로 잘게 잘라 접종하고 shaking incubator (130 rpm, 25°C, 8일)에서 배양하였다 (Figure 3).



Figure 3. Submerged-liquid culture (250 ml) of *Agaricus blazei* in a controlled room.

2) Jar-fermenter (5 ℓ)

□□다. 1)□□의 방법과 동일한 배지 (3 ℓ)를 5 ℓ 용량의 J-fermenter에 첨가한 후 고압멸균 (121℃, 20 min)한 후 충분히 실온에서 냉각시킨 다음, □□다. 1)□□의 방법에 의하여 배양된 AB 접종원 (300 ml)을 접종하여 배양 (130 rpm, 25℃, 1v/v/m, 5일) 하였다. 배양이 완료된 버섯균사체 액체배양물은 접종원 시료로 사용하였다 (**Figure 4**).



Figure 4. Submerged-liquid culture of *Agaricus blazei* in the 5 ℓ Jar-fermenter.

3) 50 ℓ 배양

□□다. 1)□□의 방법과 동일한 배지 (30 ℓ)를 50 ℓ 용량의 fermenter에 첨가한 후 고압멸균 (121℃, 60 min)한 후 충분히 실온에서 냉각시킨 다음, □□다. 2)□□의 방법에 의하여 배양된 AB 접종원 (300 ml)을 접종하여 배양 (130 rpm, 25℃, 1v/v/m, 3일) 하였다. 배양이 완료된 버섯균사체 액체배양물은 접종원 시료로 사용하였다 (Figure 5).



Figure 5. Submerged-liquid culture of *Agaricus blazei* in the 50 ℓ fermenter.

4) 500 ℓ 배양

□□다. 1)□□의 방법과 동일한 배지 (300 ℓ)를 500 ℓ 용량의 fermenter에 첨가한 후 고압멸균 (121℃, 60 min)한 후 충분히 실온에서 냉각시킨 다음, □□다. 3)□□의 방법에 의하여 배양된 AB 접종원 35 ℓ 배양액을 접종하여 배양 (130 rpm, 25℃, 1v/v/m, 3일) 하였다 (Figure 6).



Figure 6. Submerged-liquid culture of *Agaricus blazei* in the 500 ℓ fermenter.

5) 5 kℓ 배양

□□다. 1)□□의 방법과 동일한 액체배지 (3,500 ℓ)를 대량배양조 (5,000 ℓ)에 첨가하고 고압멸균 (121℃, 60분)한 다음, 냉각조를 이용하여 충분히 식힌 후 상기□□다. 4)□□의 방법으로 배양한 아가리쿠스 배양물 300 ℓ를 접종한 후 5 kℓ 배양조 (75 rpm, 25℃, 3일) 배양하여 배양물을 얻었다 (**Figure 7**).



Figure 7. Submerged-liquid culture of *Agaricus blazei* in the 5 kℓ fermenter.

이 배양물을 동결건조 (FD) 한 것과 spray-dry (SD)한 것의 고형물과 rat-intestinal α -glucosidase의 활성을 비교하였다 (Table 7). FD와 SD의 겨우 고형물은 각각 2.5, 2.3%였고, rat-intestinal α -glucosidase 저해도는 각각 30.4%, 25.5%였다. 두 시료간에 고형물이나 α -glucosidase의 저해는 차이가 없었다. 따라서 분석 및 시험시료는 FD하여 사용하였다.

Table 6. Comparison of the inhibition rat intestinal α -glucosidase activity by spray-dried and freeze-dried the HEAB¹⁾

Method to drying	Solid material content (%)	Inhibition (%) ²⁾
Freeze dry	2.5 ± 0.3 ^a	30.4 ± 2.6 ^{3)a}
Spray dry	2.3 ± 0.9 ^a	29.5 ± 1.8 ^a

¹⁾AB; Agaricus blazei (Sginryeong). AB was extracted at high pressure after cultured for 7 days.

²⁾ α -glucosidase inhibitory activities.

³⁾Mean ± SD of triplication. Means with same superscript small letters represent significantly different at p<0.05 by t-test.

라. 시료의 조제

1) FD 시료

이 HEAB 350 ℓ 를 ultra-membrane filter로 여과하여 찌거기와 배양여액을 분리하였다. 또, 분리된 배양 여액을 1,000 ℓ 농축조 (75℃)에서 약 20배 정도로 (Brix 50) 감압 농축하여 15 ℓ 의 농축액을 얻었다. 이상의 배양방법과 농축기술로 얻어진 배양농축액을 동결건조기 (일신사)를 이용해 동결건조하여 건조중량 596 g/1 ℓ 의 시료를 얻어 분석 및 임상용 시료로 활용하였다 (Tables 7, 8).

Table 7. Brix of the concentrate from HEAB

HEAB (ℓ)	Concentrate (ℓ)	Brix
350	15	50

Table 8. Dry weight of the concentrate from HEAB

HEAB (ℓ)	Concentrate (ℓ)	Dry weight (Kg)	% Dry weight against	
			HEAB	Concentrate
350	15	8.94	2.55	59.6

2) 용매 분획물

동결건조물 50 g로부터 EtOH 침전물 (β -D-Glucan, 약간의 다른 다당체 포함됨)을 10.4 g, 상등액에 10% TCA를 첨가하여 단백질 0.3 g을 얻었다. 이후의 유기용매의 순차적 분획법에 의하여 hexane, chloroform, ethylacetate, butanol, 수용성 분획을 각각 0.6, 4.8, 7.9, 12.1, 13.9 g을 얻었다 (**Table 9**). 분석용 시료는 건조물 50 g 으로부터 얻은 분획을 사용하였다.

다) 시료의 α -glucosidase 활성 억제 검증

분획물의 α -glucosidase의 저해율을 **Figure 8**에 나타내었다. Hexane (HX), chloroform (CL), ethylacetate (EA), butanol (BT), 75% EtOH 침전물 (EtOH), 10% TCA 침전물을 각각 0.5 mg 처리한 결과를 Acarbose (AC) 0.5 mg의 저해율과 비교하였다. Acarbose가 34% 저해를 나타내었고, Hexane (HX), chloroform (CL), ethylacetate (EA), butanol (BT), 75% EtOH 침전물 (EtOH), 10% TCA 침전물은 각각 1.8±0.2, 2.9±0.2, 29.0±3.4, 11.1±1.7%, 18.7±2.4, 3.8±0.4의 저해율을 나타내어 ethylacetate 분획물이 29.0%, 75% EtOH 침전물이 19%로 높은 저해 효과를

나타내었다. 이것은 순수한 시약 acarbose을 0.5 mg 처리 34%의 저해율과 비교할 때 높은 저해율이다.

Table 9. Amount of principal fractions of freeze-dried materials (50 g) from HEAB

Fraction	Amount (g)	Composition (%)
β -D-Glucan (75% EtOH ppt)	10.4	20.8
Protein (10% TCA ppt)	0.3	0.6
Hexane	0.6	1.2
Chloroform	4.8	9.6
Ethylacetate	7.9	15.8
Butanol	12.1	24.2
others (water sol. fraction)	13.9	27.8
Total	50	100

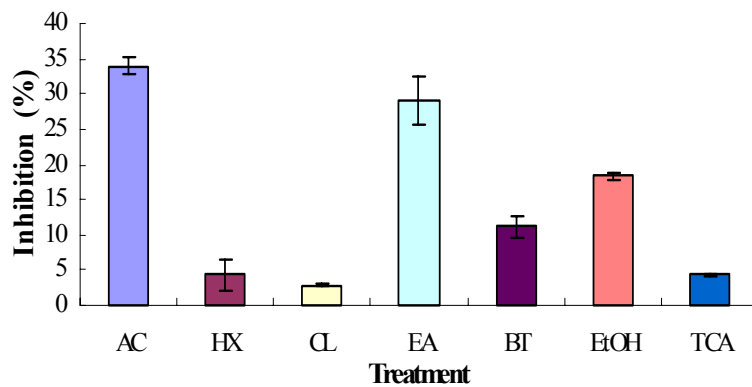


Figure 8. Inhibition of rat-intestinal α -glucosidase activity by fractions of freeze-dried materials from HEAB.

2. 버섯균사체 액체배양물의 항당뇨성 효과

가. Rat intestinal α -glucosidase activity 저해

□ HEAB는 α -glucosidase 활성을 강력히 저해하였고, Ethylacetate fraction이 가장 강한 저해율을 나타내었다.

1) 분획물의 Rat intestinal α -glucosidase 활성 저해

HEAB의 FD시료 (10 g)를 증류수 100 mL에 녹인 다음 **Figure 1**과 같이 극성에 따라 hexane, chloroform, ethylacetate, butanol, aqueous fraction으로 분획 하였다. **Table 7**에서는 각 FD시료와 FD 분획물의 양과 α -glucosidase 활성저해 정도를 비교하였다. 각 분획물의 량은 큰 차이가 있었다. 가장 많은 분획은 aqueous 층으로 전체의 약 80%였다. 그 다음이 butanol, ethylacetate 층으로 각각 10%, 5%였다. Chloroform 및 hexane층의 함량은 아주 낮았다. Acarbose 25, 50 μ g의 억제능이 각각 23 및 30% 였다. 그리고 이들 각 분획의 α -glucosidase 활성억제능은 ethylacetate, hexane, butanol, chlorform 분획이 각각 62, 59, 38, 17%로서 ethylacetate와 hexane 분획에서 높은 활성이 나타났다.

Figure 9는 각 분획의 α -glucosidase 활성 억제능을 Acarbose와 비교하여 검토하였다. Ethylacetate 분획과 hexane 분획의 100 μ g은 Acarbose 50 μ g 보다 각각 187%와 170%의 효과를 나타내었고 Acarbose 25 μ g 보다 271%, 260%의 효과를 나타내었다. 이 결과는 단위 량으로 계산할 때 이들 분획의 활성은 Acarbose의 효과와 거의 동일하였다. 이들 분획물에는 실제 유효성분이 있는 반면 in vitro 효소 억제 assay에서 default result 즉 실제 효소작용을 억제하는 것이 아니라, 효소활성을 방해하는 물질이 존재할 가능성이 있기 때문에 순수한 물질을 분리·동정하여야 할 것이다. Ethylacetate 분획과 hexane 분획 이외의 분획물에서도 상당한 α -glucosidase 활성을 억제하였지만 이들 분획보다 훨씬 낮았다.

Table 10. Inhibition of rat-intestinal α -glucosidase activity by fractions of freeze-dried materials from HEAB

Fraction ¹⁾	Amount used for test (μg) ²⁾	Inhibition (%) ³⁾
Acarbose ⁴⁾	25	22.7 \pm 0.9 ^{5)c}
	50	39.5 \pm 0.9 ^b
Crude extract	100	32.9 \pm 1.0
Ethylacetate	100	61.6 \pm 0.5 ^a
Hexane	100	59.0 \pm 0.8 ^a
Butanol	100	37.9 \pm 1.3 ^b
Chloroform	100	17.0 \pm 0.3 ^c

¹⁾The fractionation of spray-dried materials from submerged liquid culture of AB.

²⁾Concentration of Acarbose 25 and 50 μg was 2.5 and 5.0 mg/mL, respectively, and of crude extract or fraction was 10 mg/mL.

³⁾ α -glucosidase inhibitory activities.

⁴⁾Positive control

⁵⁾Mean \pm SD of triplication. Means with same superscript small letters represent significantly different at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test.

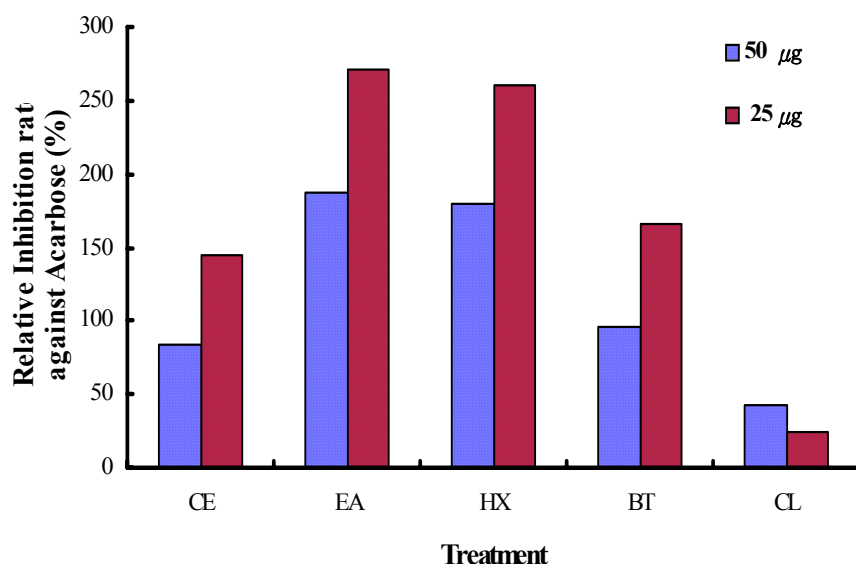


Figure 9. Relative inhibition of rat-intestinal α -glucosidase activity against Acarbose (25 and 50 μg) by the fractions from submerged liquid culture of AB (100 μg). CE, crude extract; EA, ethylacetate fraction; HX, hexane fraction; BT, butanol fraction; CL, chloroform fraction.

2) Ethylacetate 분획으로부터 α -glucosidase 활성물질의 분리

Ethylacetate 분획에 함유된 α -glucosidase 활성억제 물질을 분리하기 위하여 ethylacetate 분획을 C₁₈ reversed phase column으로 분리하고 Dual UV detector (220과 280 nm)에서 검출한 결과 10개의 peak가 분리되었다 (**Table 11**). 이들을 반복하여 collection한 다음 농축하여 이들의 α -glucosidase 활성 저해능을 측정하였다. 그 결과 가장 활성이 높은 peak는 3번으로 α -glucosidase 활성을 약 70% 저해하였다. 그 외 peak는 다소 낮은 저해율을 나타내었다.

따라서 Peak 3번을 UV, TLC 및 IR 등으로 임시적으로 분리·동정한 결과 Isoflavone의 배당체 (여러 개의 단당이 결합되어 있음)로 밝혀짐에 따라 이와 관련되는 isoflavone을 구입하여 α -glucosidase의 활성 억제능을 측정하였다 (**Figure 10**). 그 결과 daidzein이 33.9% genestein이 85%, genistin이 15%의 저해 효과가 있어, 배당체가 아닌 genestein의 효과가 가장 탁월하였다.

Table 11. Peaks separated from ethylacetate fraction by reversed-phase HPLC¹⁾

Peak No.	Relative area (%)	Inhibition of α -glucosidase activity (%) ²⁾
1	6.3	10.8 ± 0.7
2	5.5	15.5 ± 0.9
3	20.1	70.1 ± 1.4
4	9.9	18.6 ± 0.3
5	5.8	19.4 ± 0.8
6	12.3	25.5 ± 0.6
7	9.5	30.7 ± 0.4
8	13.2	14.5 ± 0.7
9	9.6	17.4 ± 0.4
10	7.8	20.1 ± 0.4
Total relative area	100	

¹⁾C₁₈ column (Young Lin Instrument CO., LTD; Mobile phase, MeOH:1 mM ammonium acetate=6:4).

²⁾Injection content: 100 μ g.

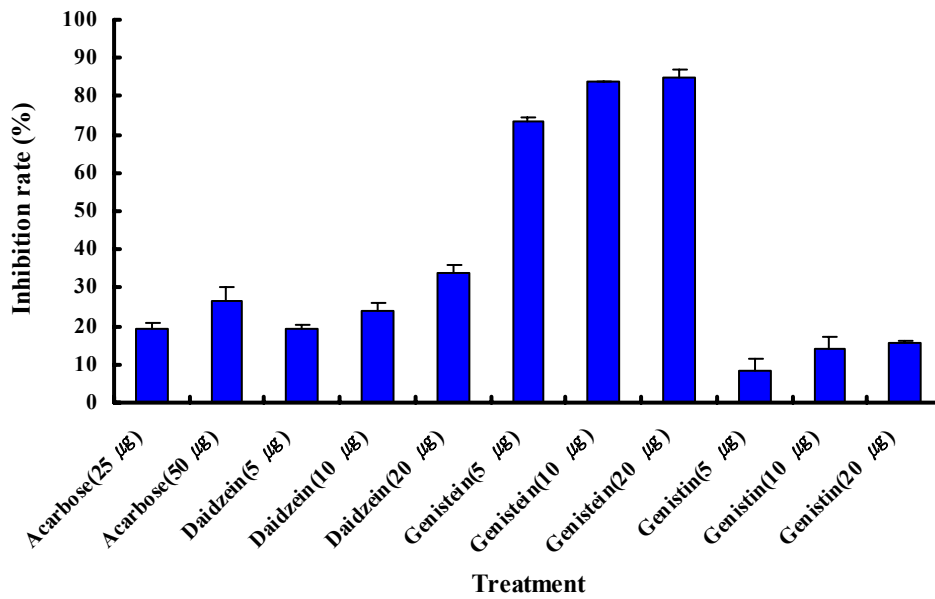


Figure 10. The inhibition of rat-intestinal α -glucosidase activity by isoflavones (Daidzein, Genistein, and Genistin).

나. STZ-induced diabetes rat 실험 (제1형 당뇨병 쥐 모델)

HEAB는 STZ로 당뇨병을 유발한 제1형 당뇨병동물모델에 있어서 혈당강하 효과를 나타내었으며, GOT 활성을 감소시켜 간 손상을 완화하는 효과를 나타내었다

1) 단기 섭취

가) 시료 조성

동결건조 신령버섯균사체 배양물의 일반성분 함량은 **Table 12**에 나타내었다. HEAB의 수분함량은 3.8%, 단백질은 33.4%, 지방은 18.4%, 회분은 9.0% 그리고 총식이섬유는 10.0%이었다.

Table 12. Proximate composition of freeze-dried HEAB

Ingerdients	Composition (%)
Moisture	3.8
Crude protein	33.4
Crude lipid	18.4
Crude ash	9.0
Total dietary fiber	10.0
Carbohydrate	25.4

나) 혈당저하

*In vitro*에서 yeast α -glucosidase 저해활성이 시판되고 있는 Acarbose의 저해활성과 유사한 것으로 확인된 HEAB의 식후 혈당 개선효과를 측정하기 위해 STZ로 당뇨를 유발한 흰쥐에게 HEAB의 FD시료를 경구 투여한 후 혈당변화를 관찰하였다. 그 결과는 **Figure 11**에 나타내었다. 공복 상태의 대조군에게 전분 (1 g/kg)을 투여한 후의 혈당 증가는 30, 60분에 각각 128.6 ± 14.0 , 140.6 ± 15.7 mg/dL으로 나타났다. 전분과 함께 HEAB의 FD시료 (500 mg/kg)을 투여한 경우 30, 60분에 혈당 증가가 각각 76.7 ± 5.1 , 101.0 ± 10.6 mg/dL로 나타나, 대조군에 비해 유의적으로 낮게 나타났다 ($P < 0.05$).

다) AUC

또한 HEAB의 FD시료의 식후혈당증가곡선의 area under the curve (AUC)는 $10,027 \pm 944$ mg · min/dL로 나타나, 대조군 ($13,381 \pm 1,306$ mg · min/dL)에 비해 유의적으로 작았다 ($P < 0.05$, **Table 13**). 따라서 HEAB의 FD시료의 당뇨쥐에 있어서 식후 혈당증가를 저하하는 효과가 있음을 확인할 수 있었다.

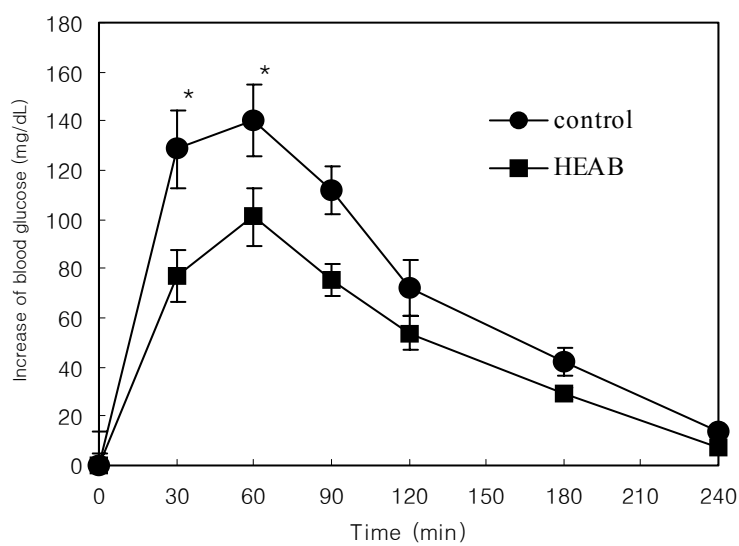


Figure 11. Increase of blood glucose after the administration of the HEAB in STZ-induced diabetic rats.

Table 13. Area under the curve (AUC) of postprandial glucose responses of STZ-induced diabetic rats

Group	AUC (mg · min/dL)
Control	13,381 ± 1,306
HEAB ¹⁾	10,027 ± 944 ²⁾

¹⁾ Submerged liquid culture of AB.

²⁾ significantly different at $p < 0.05$.

2) 장기 섭취효과

가) 체중 및 식이 섭취량

Table 14은 각 실험식이를 8주간 섭취시킨 후 대조군과 HEAB의 FD시료군의 체중 및 식이섭취량을 나타낸 것으로 유의적인 차이가 없었다.

HEAB의 장기간 섭취는 식이섭취 효율 (food efficiency ratio, FER)에 유의적인 영향을 주지않았다.

Table 14. Body weight, food intake and food efficiency ratio in STZ-induced diabetic rats fed control and HEAB diet

Item to be measure	Treatment	
	Control	FD of HEAB
Final body weight (g)	251.6 ± 10.0	242.9 ± 10.9
Food intake (g/day)	19.4 ± 1.1	17.9 ± 1.4
Food efficiency ratio (%)	2.3 ± 0.9	2.1 ± 0.6

나) 혈액 당화 헤모글로빈

주간 대조식이 및 HEAB의 FD시료를 섭취시킨 결과 대조군 및 HEAB의 FD시료군의 혈액 당화헤모글로빈의 농도는 각각 $6.9 \pm 0.4\%$, $6.2 \pm 0.3\%$ 로 HEAB의 FD시료군의 당화헤모글로빈 농도가 낮은 경향을 나타내었다 (**Figure 12**). 당화헤모글로빈은 당뇨병 환자에게서 3-4개월 전의 평균 혈당을 알 수 있는 방법으로 중요한 혈당 조절 지표로 이용되고 있다. 따라서 HEAB의 장기간 섭취는 당화 헤모글로빈 농도를 감소시켜 장기간 혈당조절에 효과가 있을 것으로 사료된다.

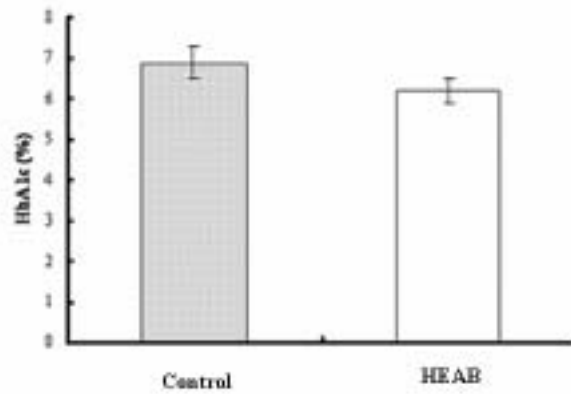


Figure 12. Blood glycated hemoglobin levels of control and HEAB groups.

다) 공복 혈당

당뇨동물의 공복 혈당은 **Figure 13**에 나타내었다. 10% HEAB의 FD치료군의 공복혈당은 295.7 ± 14.4 mg/dL로 대조군 (341.6 ± 14.6 mg/dL)에 비해 유의적으로 낮았다 ($p < 0.05$). 따라서 *in vitro* 및 *in vivo*에서 α -glucosidase 저해활성을 나타낸 HEAB의 FD치료는 STZ로 당뇨병을 유발한 제1형 당뇨동물모델에 있어서도 혈당강하 효과를 나타내었다. 당뇨병 치료에 있어서 가장 중요한 목표는 혈당 조절이며 혈당 조절은 당뇨환자의 주요 사망요인인 합병증의 예방 및 치료에 있어서도 가장 중요한 요인으로 알려져 있다. 따라서 아가리쿠스 활성성분의 장기간 섭취는 식후 혈당 뿐 아니라 공복 혈당 또한 감소시켜 당뇨 치료에 효과가 있음을 나타내었다.

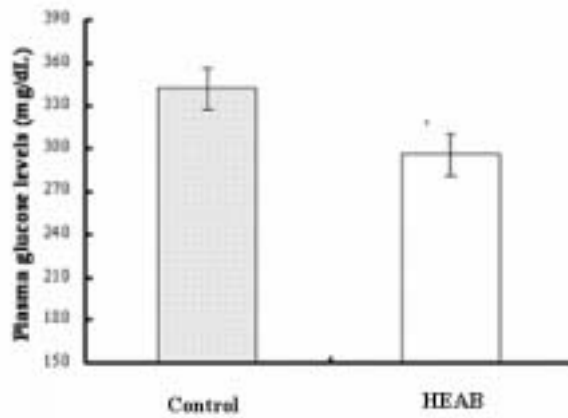


Figure 13. Fasting plasma glucose levels of control and HEAB groups.

라) 혈장 중성지방 및 콜레스테롤 농도

혈장 중성지방 농도 및 콜레스테롤 농도는 HEAB의 FD치료군에서 낮은 경향을 나타내었다 (Table 15). 당뇨상태의 지질 농도 감소는 신장의 병변 및 관상동맥질환 등의 당뇨합병증 예방에 도움이 된다고 알려져 있다. 따라서 HEAB의 섭취는 당뇨 합병증인 심혈관계질환 및 신장의 병변 예방에 중요한 역할을 할 것으로 사료된다.

Table 15. Fasting plasma triglyceride and cholesterol levels of control and HEAB groups

Treatment	Triglyceride (mg/dL)	Cholesterol (mg/dL)
Control	142.7 ± 40.7	143.7 ± 17.8
HEAB	135.2 ± 45.4	129.1 ± 33.2

마) Glutamic oxaloacetic transaminase (GOT), Glutamic pyruvate transaminase (GPT) 활성

혈장 중의 GOT의 활성은 HEAB의 FD시료군이 161.0 ± 7.6 U/L로 대조군 (203.8 ± 18.4 U/L)에 비해 유의적으로 낮았다 (**Table 16**). 혈장 GPT의 활성은 HEAB의 FD시료군이 대조군에 비해 낮은 경향을 나타내었다. GOT, GPT는 간세포에 다량으로 존재하는 효소로서 지방간이 유발되거나 간이 손상되었을 때 혈액속으로 유출되어 효소활성도가 높아진다. 따라서 HEAB의 FD시료 섭취는 당뇨로 인한 간기능 손상을 억제할 수 있다는 가능성을 나타내었다.

Table 16. GOT and GPT activities of control and HEAB groups

Treatment	GOT (U/L)	GPT (U/L)
Control	$203.8 \pm 18.4^{a*}$	162.7 ± 36.7
HEAB	161.0 ± 7.6^b	137.6 ± 20.2

* Significantly different at $p < 0.05$

바) 혈장 blood urea nitrogen (BUN)

대조군 및 HEAB의 FD시료군의 신장 기능지표인 혈장 BUN 농도는 유의적 차이가 없었다 (**Figure 14**).

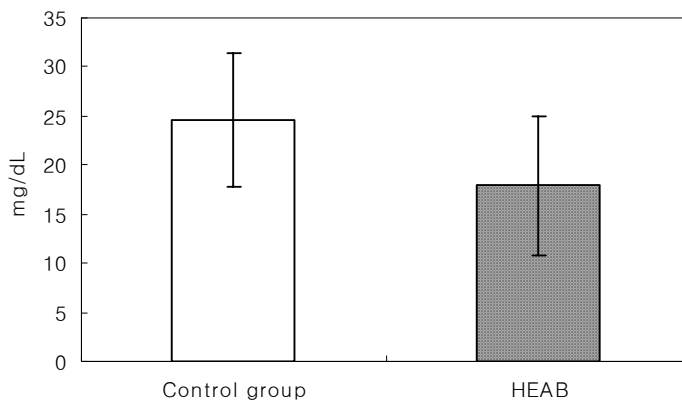


Figure 14. Fasting plasma blood urea nitrogen levels of control and HEAB groups.

다. db/db mouse 실험 (제2형 당뇨병 쥐 모델)

- HEAB는 db/db mouse에서
- 혈당을 저하하여 insulin의 요구도를 감소시켰다
 - Cholesterol 치를 감소시켜 동맥경화 예방효과를 나타내었다.
 - GOT 활성을 감소시켜 간기능을 개선하였다.
 - TBARS를 감소시키고, catalase를 증가하여 합병증 예방에 도움이 된다
 - Glycogen분해나 당신생합성반응에는 영향을 주지 않았다.
 - 소장의 amylase와 maltase 활성을 감소시켜 탄수화물 흡수지연 효과가 있다
 - 간과 지방조직의 GLUT4의 발현을 촉진시켜 당의 흡수를 촉진한다

1) 장기간 섭취효과

가) 체중 및 식이섭취량

식이의 성분 조성은 Table 2와 같다. HEAB군의 체중은 41.8 ± 0.9 g/day, 식이섭취량은 5.14 ± 0.18 g/day로, 대조군과 유의적 차이가 없었다 (Table 17).

Table 17. Body weight gain and food intake of control and HEAB groups

	Control group	HEAB group
Body weight (g)	42.7 ± 1.0	41.8 ± 0.9
Food intake (g/day)	4.88 ± 0.34	5.14 ± 0.18

나) Db/db mouse에서 혈당조절

혈액 당화헤모글로빈, 혈장 포도당 및 혈장 인슐린 농도를 Table 18에 나타내었다. Db/db mouse에 있어서 HEAB의 FD시료의 장기간 섭취는 공복혈당과 혈장 인슐린 농도를 유의적으로 감소시켰다 ($P < 0.05$). 당화헤모글로빈 농도는 HEAB의 FD시료군이 감소하는 경향을 나타내었다. 당뇨치료에 있어서 가장 중요한 목표는 혈당조절로 HEAB의 FD시료 활성성분은 공복 혈당을 낮추어 당뇨치료에 효과가 있음을 나타내었으며, HEAB의 FD시료 활성성분의 섭취로 인한 혈당의 저하는 인슐린 요구도를 감소시켜 인슐린 농도를 감소시킨 것으로 사료된다. 혈액

당화헤모글로빈은 장기간의 혈당 변화를 나타내는 지표이므로, HEAB의 FD치료 활성성분을 좀 더 장기간 섭취할 경우 유의적인 변화를 나타낼 것으로 기대된다.

Table 18. Fasting blood glycated hemoglobin, plasma glucose and insulin levels of control and HEAB groups

Treatment	HbA _{1c} (%)	Glucose (mg/dL)	Insulin (ng/mL)
Control	8.5 ± 0.3	328.7 ± 28.1	4.2 ± 1.1
HEAB	8.2 ± 0.5	210.9 ± 17.5*	2.8 ± 0.8*

*Significantly different at p<0.05

다) 혈액 지질 profile 개선

HEAB의 FD치료군의 총 콜레스테롤 농도는 178.0±9.3 mg/dL로 나타나, 대조군 (231.8± 9.9 mg/dL)보다 유의적으로 낮게 나타났다 (P<0.05). 대조군과 HEAB의 FD치료군의 혈장 중성지방 농도는 유의적인 차이가 없었다 (**Figure 15**). 장기간의 HEAB의 FD치료 활성성분의 섭취는 고콜레스테롤혈증을 개선하여, 동맥경화증을 포함한 심혈관계 합병증 예방에 기여하리라고 사료된다.

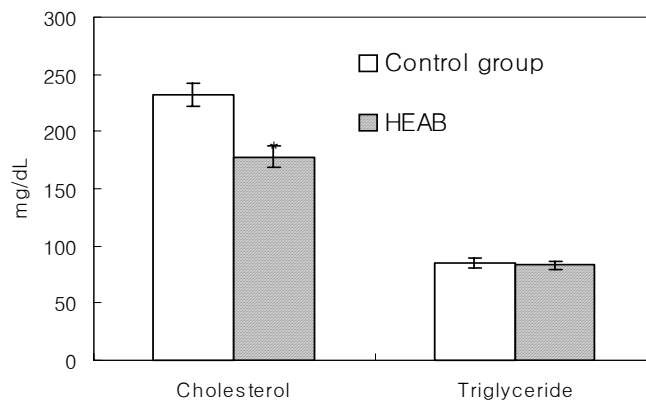


Figure 15. Fasting plasma cholesterol and triglyceride levels of control and HEAB groups.

라) 혈장 GOT, GPT 활성

혈장 GOT 활성은 아가리쿠스군이 324.6±12.8 U/L로 대조군 (399.4±32.8 U/L)에 비해 유의적으로 낮았다 (P<0.05). 혈장 GPT 활성은 HEAB의 FD시료군 (111.2±14.0 U/L)이 대조군 (146.6±31.3 U/L)에 비해 낮은 경향을 나타내었다 (Figure 16). GOT, GPT는 간세포에 다량으로 존재하는 효소로서 지방간이 유발되거나 간이 손상되었을 때 혈액 속으로 유출되어 효소활성도가 높아진다. HEAB의 FD시료의 섭취는 당뇨로 인한 간기능 손상을 억제할 수 있다는 가능성을 나타내었다.

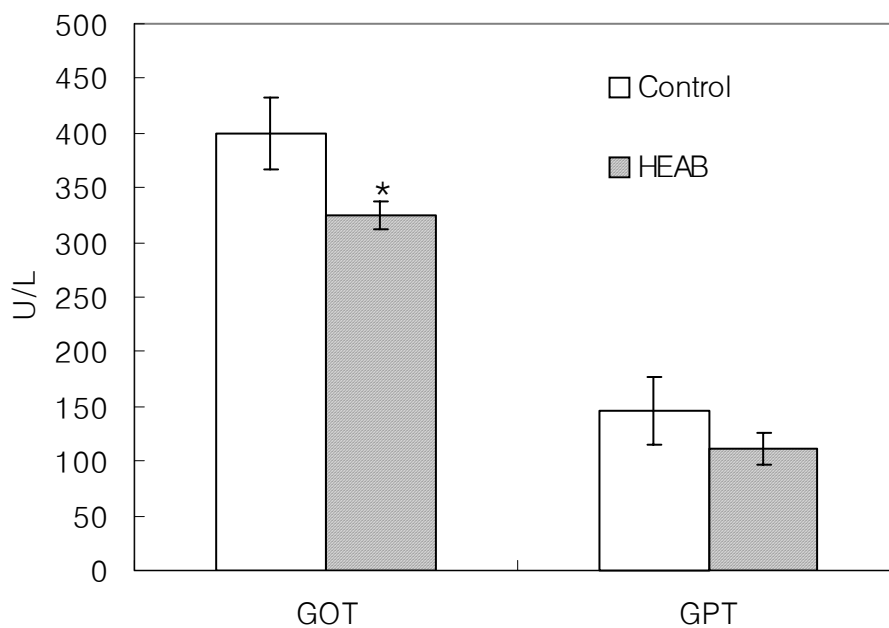


Figure 16. Plasma GOT and GPT activities of control and HEAB groups.

마) 혈장 BUN 및 크레아티닌 농도

대조군 및 HEAB의 FD시료군의 혈장 BUN 및 크레아티닌 농도는 유의적 차이가 없어 두 군의 신기능에는 큰 차이가 없었다 (Table 19).

Table 19. Fasting plasma blood urea nitrogen and creatinine levels of control and HEAB groups

Treatment	BUN (mg/dL)	Creatinine (mg/dL)
Control	25.8 ± 2.6	0.5 ± 0.2
HEAB	24.3 ± 4.2	0.4 ± 0.1

바) 간 조직의 지질과산화물 및 catalase 활성 측정

HEAB의 FD치료군 간 조직의 TBARS 함량 (2.58 ± 0.09 nmol MDA/mg protein)은 대조군 (5.20 ± 0.18 nmol MDA/mg protein)에 비해 유의적으로 감소하여, 지질과산화물의 생성이 억제된 것으로 나타났다 (**Figure 17**, $P < 0.05$). HEAB의 FD치료군의 catalase 활성은 2.84 ± 0.18 U/mg protein으로 대조군 (2.33 ± 0.04 U/mg protein)에 비해 유의적으로 증가하였다 (Fig. 6, $P < 0.05$). 당뇨병 동물에서는 유리자유기 생성계가 촉진됨으로써 지질과산화가 가속화되고, 따라서 조직의 과산화적 손상이 쉽게 초래된다. Catalase는 지질과산화물을 산소와 물로 전환시켜 조직을 과산화로부터 보호한다. 따라서 당뇨병 동물에 있어서 아가리쿠스 활성성분의 섭취는 catalase 활성을 증가시켜, 조직의 지질과산화를 억제하며 당뇨병 합병증 개선효과를 나타낼 것으로 사료된다. 아가리쿠스 활성성분의 장기간 섭취는 당뇨병 동물을 산화적 스트레스로부터 보호하여 당뇨병을 개선하는 효과가 있는 것으로 사료된다.

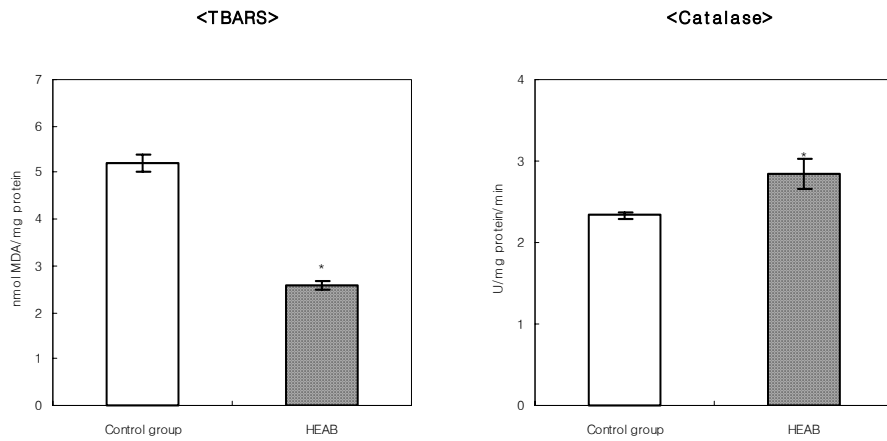


Figure 17. Hepatic TBARS level and catalase activity of control and HEAB groups.
*significantly different at $P < 0.05$.

사) 간 지질농도

HEAB의 FD치료군의 간 조직 콜레스테롤 및 중성지방 농도는 각각 43.0 ± 1.9 mg/g protein, 73.1 ± 5.9 mg/g protein으로 대조군과 유의적 차이가 없었다 (**Table 20**).

Table 20. Hepatic cholesterol and triglyceride level of control and HEAB groups

Treatment	Cholesterol (mg/g liver)	Triglyceride (mg/g liver)
Control	46.8 ± 3.7	77.4 ± 3.3
HEAB	43.0 ± 1.9	73.1 ± 5.9

아) 간 조직의 glycogen 농도 및 PEPCK 활성 측정

대조군 및 HEAB의 FD치료의 간 조직 glycogen 농도 및 PEPCK 활성은 유의적 차이가 없었다 (**Table 21**). 당뇨 동물의 경우 간에서 글리코겐의 분해가 촉진되고 당신생반응 또한 촉진되어 고혈당을 악화시키게 되는데, 아가리쿠스 활성성분의 섭취는 글리코겐 분해 및 당신생반응에는 유의적인 영향을 주지 않는 것으로 사료된다.

Table 21. Hepatic glycogen level and PEPCK activity of control and HEAB groups

Treatment	Glycogen (mg/g liver)	PEPCK activity (U/g protein)
Control	35.3 ± 5.1	26.6 ± 1.3
HEAB	34.6 ± 2.4	25.6 ± 1.5

자) 혈당조절 관련 기전 연구

(1) 소장효소 활성 측정

공복시 소장 점막의 α -amylase 활성은 HEAB의 FD시료군이 0.69±0.15 U/mg protein으로 대조군에 비해 유의적으로 낮았다 (Table 31, P<0.05). HEAB의 FD시료군의 소장내 α -glucosidase (maltase) 활성은 276.6±11.7 U/g protein으로 대조군 (304.4±5.3 U/g protein)에 비해 유의적으로 낮았으며 (P<0.05), sucrase 활성은 HEAB의 FD시료군 (157.1±14.8 U/g protein)이 대조군 (190.5±8.4 /g protein)에 비해 낮은 경향을 나타내었다 (Figure 18).

식이중의 탄수화물은 아밀라제 및 이당류 분해효소의 작용에 의해 포도당으로 소화되어 흡수된다. 따라서 HEAB의 장기간 섭취는 α -amylase 및 maltase 활성을 저해하여, 탄수화물 소화를 지연시킴으로써 식후 혈당 증가를 억제하고 이는 인슐린 요구도를 감소시키고 또한 인슐린 민감도를 개선하여 공복 혈당조절 효과를 나타내는 것으로 사료된다.

Table 22. α -Amylase activity of control and HEAB groups

Treatment	Amylase activity (U/mg protein)
Control	1.07 ± 0.07
HEAB	0.69 ± 0.15*

* Significantly different at p<0.05

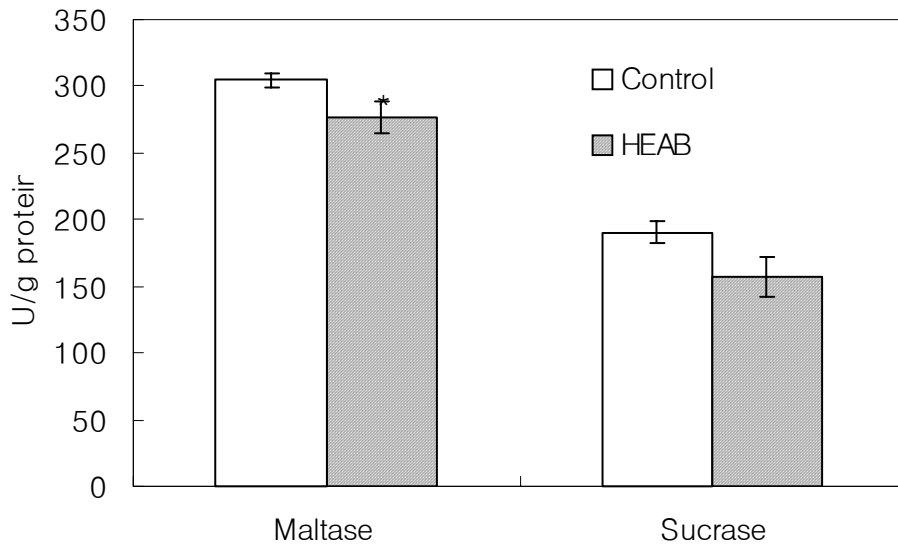


Figure 18. Disaccharidase activities of control and HEAB groups.

2) 간 및 지방조직의 glucose transporter 및 insulin receptor 발현수준

HEAB의 FD시료 활성성분의 장기적인 섭취가 insulin receptor 및 glucose transporter (GLUT4)의 gene expression에 미치는 영향을 조사한 결과는 다음과 같다. HEAB의 FD시료군의 GLUT4 mRNA expression은 간 조직에서 대조군에 비해 2.6 ± 0.2 배 수준으로 유의적으로 증가되었으며 (**Figure 21**, $P < 0.001$), 지방조직에서도 대조군에 비해 1.3 ± 0.1 배 수준으로 유의적으로 증가되었다 (**Figure 18**, $P < 0.05$). 간조직 및 지방조직의 insulin receptor의 gene expression은 HEAB의 FD시료군과 대조군 사이에 유의적 차이가 없었다 (**Figure 22**). 따라서 HEAB의 활성성분의 섭취는 GLUT4의 gene expression을 증가시켜, 말초조직에서 glucose transport를 증가시켜 혈당 개선효과를 나타내는 것으로 사료된다.

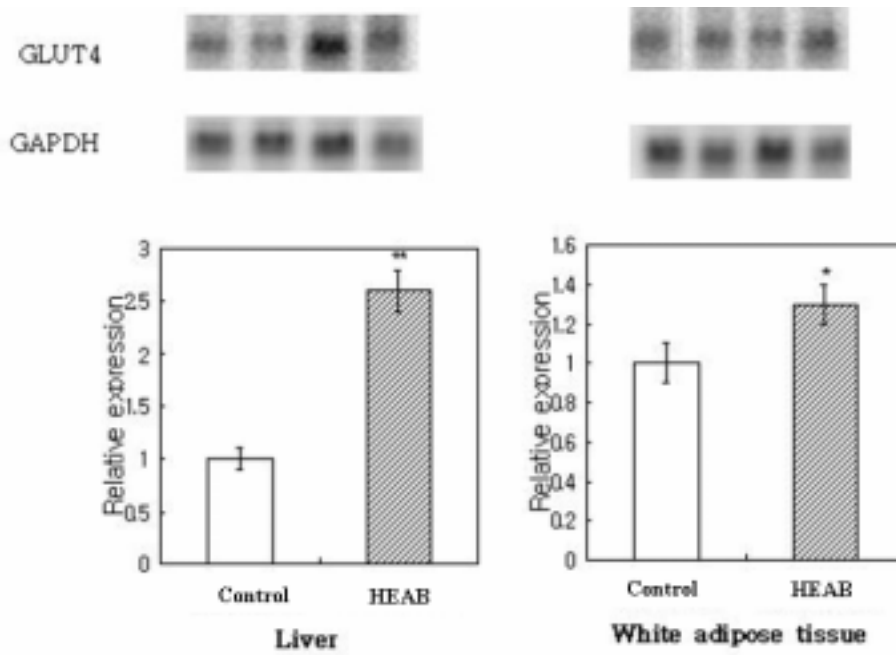


Figure 19. Expression of GLUT4 mRNA in liver and white adipose tissue of control and HEAB groups.

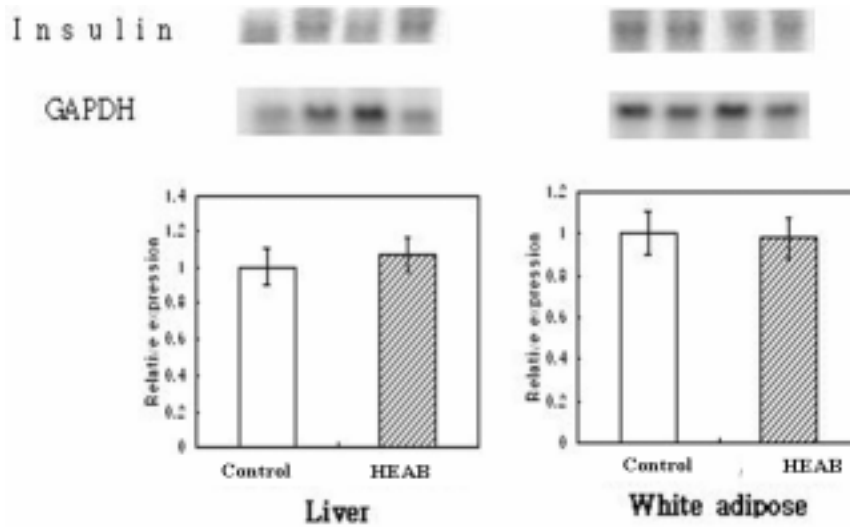


Figure 20. Expression of insulin receptor mRNA in liver and white adipose tissue of control and HEAB groups.

라. 간세포 모델에 있어서 혈당 조절효과

HepG-2 간세포에서

□ GLUT1의 증가시키지 않았으나 GLUT4는 증가시켰다.

□ PEPCK의 농도는 감소하는 경향이였다

1) 간세포 모델에 있어서 혈당 조절효과

HEAB의 FD시료 활성성분이 glucose transporter 1 (GLUT1)의 발현에 미치는 영향을 조사한 결과는 다음과 같다 (**Figure 21**). 간세포 (HepG-2 cell)를 HEAB의 FD시료에 1시간 및 6시간 동안 노출시킨 경우, HEAB의 FD시료군의 GLUT1 protein expression은 10, 25, 50 mg/mL의 농도에서 대조군에 비해 증가하는 경향을 나타내었으나 유의적인 차이는 없었다.

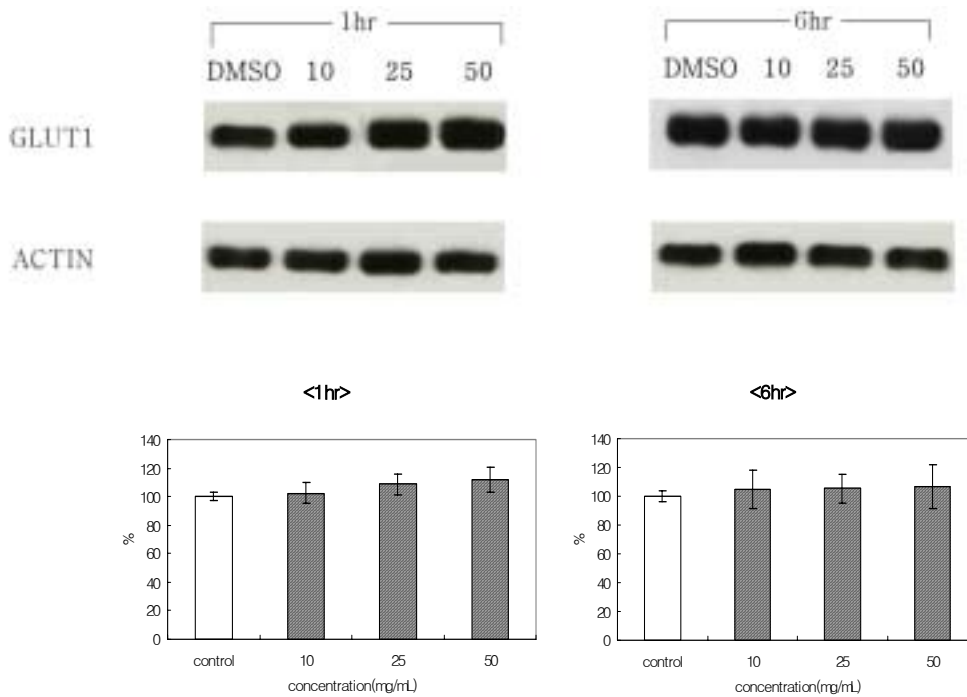


Figure 21. Effect of HEAB on the abundance of GLUT-1 protein in HepG-2 cell.

HEAB의 FD시료 활성성분이 간세포 (HepG-2 cell)의 glucose transporter 4 (GLUT4)의 발현에 미치는 영향을 조사한 결과는 다음과 같다 (Figure 22). HEAB의 FD시료 활성성분에 1시간 노출시킨 경우 GLUT4 protein expression은 10, 25, 50 mg/mL의 농도에서 대조군 (actin)에 비해 증가하는 경향을 나타내었으나 유의적인 차이는 없었다. HEAB의 FD시료 활성성분에 6시간 노출시킨 경우 GLUT4 protein expression은 25 및 50 mg/mL의 농도에서 대조군에 비해 유의적으로 증가하였다 ($p < 0.05$). 따라서 HEAB의 FD시료 활성성분은 GLUT4 발현을 증가시켜, 혈당 조절효과를 나타내는 것으로 사료된다.

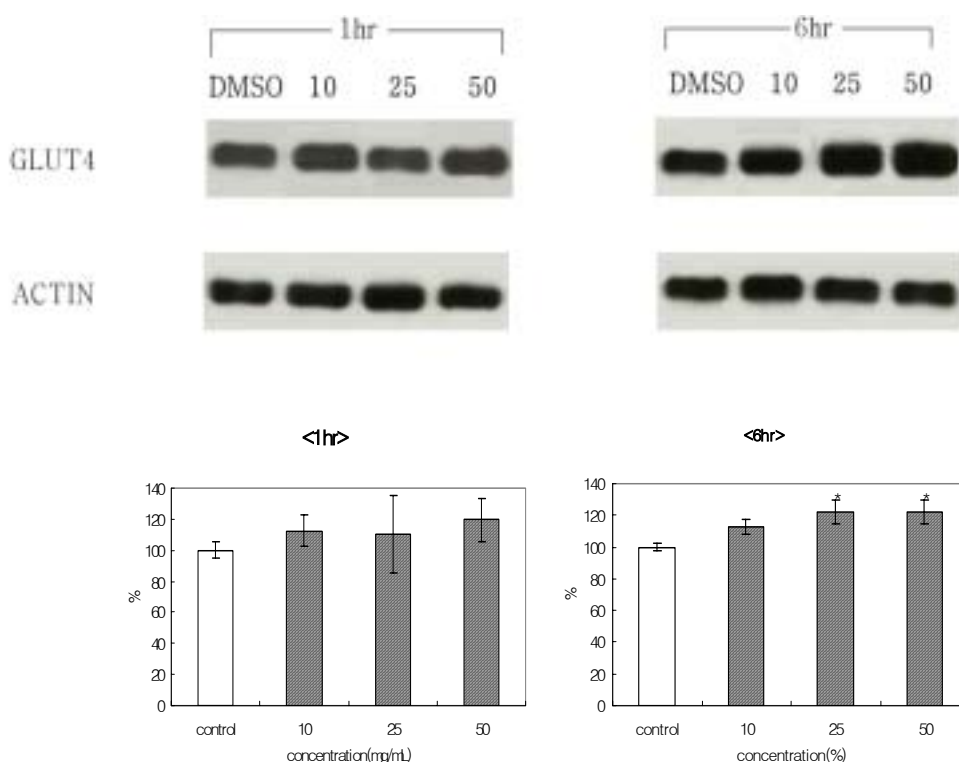


Figure 22. Effect of HEAB on the abundance of GLUT-4 protein in HepG-2 cell.

HEAB의 FD시료가 PEPCK의 발현에 미치는 영향을 조사한 결과는 다음과 같다 (Figure 23). 간세포 (HepG-2 cell)를 HEAB의 FD시료 활성성분에 1시간 및 6시간 동안 노출시킨 경우, HEAB의 FD시료군의 PEPCK protein expression은 10, 25, 50 mg/mL의 농도에서 대조군에 비해 감소하는 경향을 나타내었으나 유의적인 차이는 없었다.

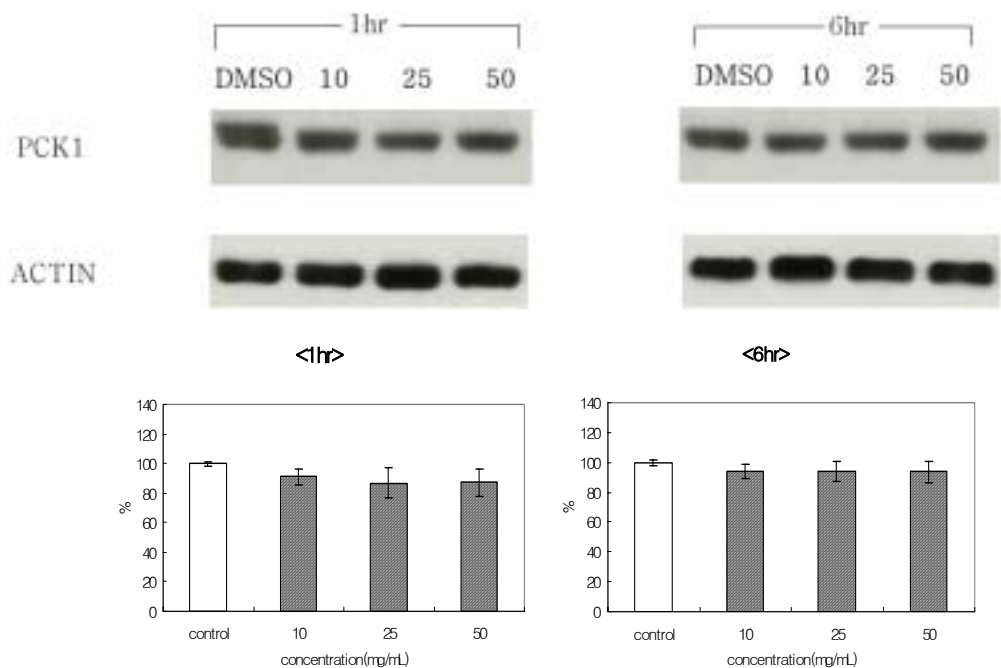


Figure 23. Effect of HEAB on the abundance of PEPCK1 protein in HepG-2 cell.

3. 유효성분

가. 일반성분

1) 고형분함량

시료를 진공농축 (50~60℃)한 후 동결건조시킨 결과 건조물 함량은 2.01 g/100 ml 였다.

2) 총탄수화물함량

총당 함량분석은 페놀-황산법을 이용하여 Beckman C-680 series spectrophotometer (470 nm)에서 흡광도를 측정하여 계산한 결과 총당함량은 994 mg/100 ml (고형분의 49.7%)였다.

3) 단백질 함량

가) 조단백함량

시료 100 ml에 10%의 TCA를 4℃에서 12시간 방치한 후 원심분리하여 946 mg/100 ml (고형분의 47.3%)의 조단백질을 얻었다.

나) 단백질함량

상기의 조단백질을 Bradford 방법으로 BSA를 표준물질로 사용하여 분석한 결과 단백질 함량은 460 mg/100 ml이었다.

4) 지방산함량

Folch의 방법에 준하여 분리하고 4% H₂SO₄/methanol로 methylester화시킨 다음 GC를 이용하여 분석한 결과 총지질 함량은 20.5 mg/100 ml (고형분의 0.1%)이었다.

Table 23. Composition of some chemical compounds in HEAB

Chemical compound	Content (unit/100 mL)
Solid material	2.01 g
Total sugar	994 mg
Crude protein (TCA ppt)	946 mg
Total protein	460 mg
Fat	20.5 mg

5) 구성아미노산

건조시료 4 mg을 6N-HCl로 가수분해시킨 다음 HCl을 감압으로 제거하여 아미노산 분석기 (Hisashia Hirano)로 분석한 결과 **Table 24**에 나타내었다.

Table 24. Amino acids composition of HEAB

Amino acid	Content(%)
Aspartic acid	12.31
Threonine	4.60
Serine	6.18
Glutamic acid	13.35
Proline	8.91
Glycine	5.76
Alanine	6.75
Cysteine	3.04
Valine	5.07
Methionine	2.27
Isoleucine	3.93
Leucine	5.33
Tyrosine	4.01
Phenylalanine	7.38
Histidine	2.60
Lysine	6.29
Arginine	2.22

6) 무기물 함량

건조시료 1 g을 conc.-HNO₃로 분해시키고, 다시 ternary solution으로 반응시키고 여과하여 무기성분을 ICP를 이용하여 분석하였다 (Table 25). 배양물중의 총 무기물함량은 318.24 mg/ℓ 이었고, 주요 무기성분인 K, Ca, Mg, P는 각각 96.8, 31.6, 65.2, 19.3 mg/ℓ 이었다. 이것은 배지에 첨가한 무기염료인 MgSO₄ · 7H₂O와 KH₂PO₄를 버섯균사체가 이용하여 흡수한 것으로 생각된다. Mn, Fe, Zn, Cu, Na는 각각 0.1, 0.6, 0.04, 14.4 mg/ℓ 이었으며 독성을 나타내는 중금속인 Cr, Cd, Pb, Hg, As는 검출되지 않았다.

Table 25. Contents of inorganic elements in HEAB

Inorganic element	Concentration (mg/ℓ)
K	96.8
Ca	31.6
Mg	65.2
Na	14.3
P	109.3
Mn	0.1
Fe	0.6
Zn	0.3
Cu	0.04
Total	318.24

* Cr Cd, Pb, Hg, As: not detected

나. 유효성분 분석

- 상기 연구에서 ethylacetate와 hexane fractions과 80% ethanol 침전물에서 α -glucosidase 활성을 저해하는 효과가 강하였다.
- 그 결과 isoflavonoids와 isoflavone-O-glucan인 당화합물이 주성분으로 밝혀졌다.

1) Ethylacetate fraction

가) TLC 및 column chromatography에 의한 분리

Ethylacetate fraction을 TLC (Silica 60 F-254 plate, 5 × 10 cm)로 분리하였다 [전개용매는 BuOH:EtOH:DDW (5:3:3; v/v/v)]. 그 결과 Rf가 0.31, 0.42, 0.50, 0.56, 0.63, 0.69의 6개 화합물의 band를 DAP로 발색하여 확인하였다. Rf 0.42는 주요 성분인 HK-1인 것으로 생각되며 순수분리에 의하여 ethylacetate에 용해되는 Rf 0.50, 0.56, 0.63, 0.69대의 4개의 물질이 과량 농축됨을 알 수가 있었다. 이상의 결과로 볼때, Ethylacetate fraction에 존재하는 이들 여러 가지 물질들이 α -glucosidase의 활성저해 작용에 관여하는 것으로 생각된다 (Figure 24).

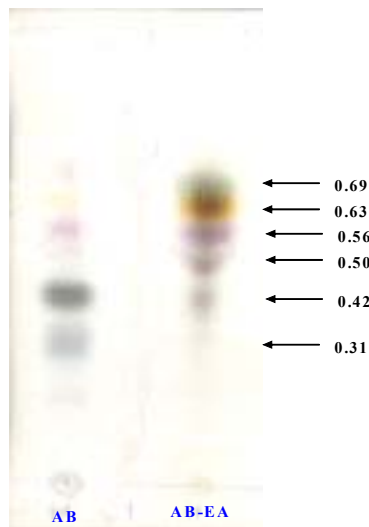


Figure 24. TLC pattern of ethylacetate fraction. AB, Crude extract solution; AB-EA, ethylacetate fraction. Solvent; BuOH:EtOH:DDW (5:3:3; v/v/v).

Ethylacetate 분획물 1 g을 hexane:ethylacetate (1:9, v/v) 혼합용액으로 충전된 silica gel column (Silica gel 60, 230~400 mesh ASTM, Merck, 5.0×80 cm)에 loading 하여 동일 용매로 elution하여 20 ml씩 분획하였다. 이들 분획들을 tube 10개 단위로 합쳐 진공농축한 후 TLC (Silica 60 F-254 plate, 5 × 10 cm)로 확인하였다 (**Figure 25**). Fraction 7과 8번에 가장 많은 양이 있었다.

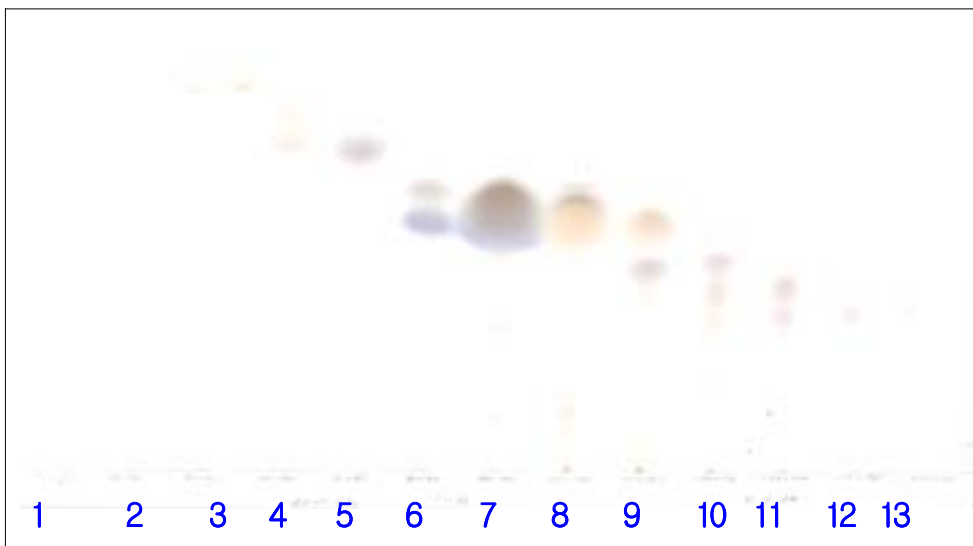


Figure 25. TLC pattern of ethylacetate subfraction. Solvent; hexane:ethylacetate (1:9, v/v).

나) 각 subfraction에 대한 α -glucosidase의 활성 저해

Ethylacetate subfraction 0.5 mg의 α -glucosidase의 저해율을 **Figure 26**에 나타내었다. 각 fraction의 α -glucosidase의 저해율은 5~8 fraction에서 강한 활성을 나타내었다. 이들의 활성은 각각 13.8, 34.9, 41.1, 17.8%로 7번 fraction에서 가장 높은 저해율을 나타내었다.

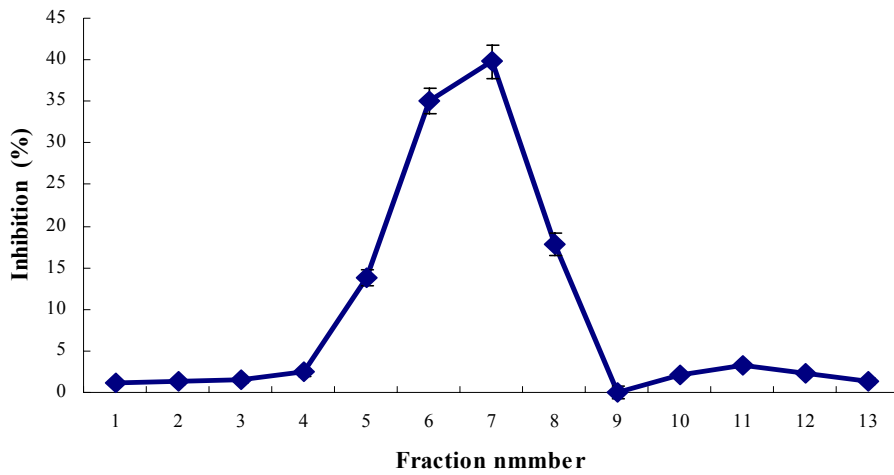


Figure 26. Inhibition of rat-intestinal α -glucosidase activity against the activity of 25 mg Acabose by subfractions of ethylacetate fraction.

다) UV 분석

Figure 27의 7번 fraction을 UV/Vis 흡수 pattern을 확인하기 위하여 225~400 nm scan하였다. 이 분획물로부터 267 nm에서 최대 흡광도를 나타내었다. 이런 물질들은 isoflavone의 back-born으로부터 유래한 것 (산화물)으로 추정하고 있다 (**Figure 26**).

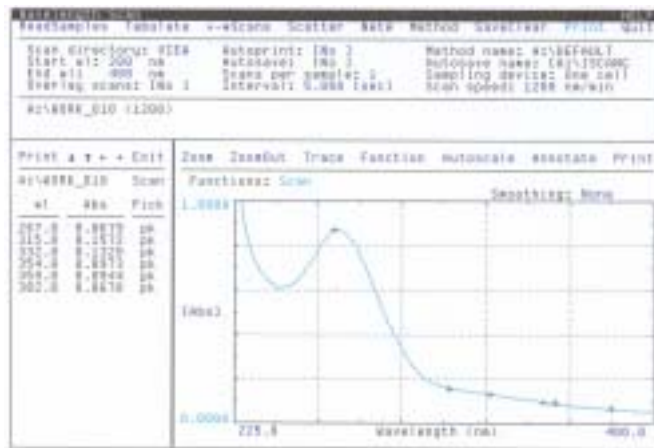


Figure 27. UV spectrum of #7 fraction of ethylacetate fraction shown in Figure 26.

라) HPLC 분석

Figure 26의 7번 fraction을 C₁₈ column (mobile phase; MeOH:1mM ammonium acetate = 1:3)을 사용하여 분리하였다 (**Figure 28**). Flow rate는 1ml/min, peak의 detection은 PDA (254, 267, 280)을 사용하였다. 표준물질로 isoflavone과 단당의 결합으로 된 daidzine, genistine을 사용하였고, 이들의 RT는 10.865, 18.543으로 7번 sample속에 함유되어있는 것으로 나타났다. 하지만 **Figure 10**에서 daidzine, genistine은 α -glucosidase inhibition이 높지 않은 것으로 나타났다. 7번 fraction의 HPLC chromatogram을 보고 이러한 결과를 종합해 보면 α -glucosidase inhibition activity를 갖는 물질은 당이 최소한 두 개 이상이 결합된 isoflavone back-bone을 가진 물질임을 알 수 있었다. 따라서 daidzine, genistine을 제외한 후 major compound를 분리하였다.

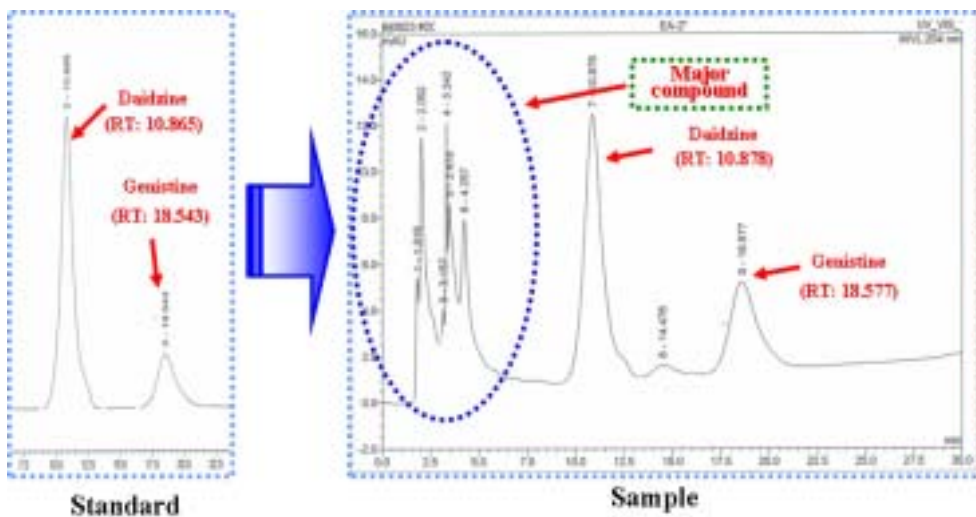


Figure 28. HPLC chromatogram (Left: Standard, Right: #7 fraction of ethylacetate fraction).

마) NMR 분석

Figure 26의 major compound fraction을 CDCl_3 에 용해하여 ^1H -NMR과 ^{13}C -NMR (Bruker-AM 500) (**Figure 29**)을 내부표준물질 tetramethylsilane (TMS)를 사용하여 분석하였다. 탄소수는 15개이고 chemical shift는 1-C (52.206), 2-C (34.432), 3-C (130.532), 4-C (155.324), 5-C (25.345), 6-C (25.321), 7-C (25.121), 8-C (132.123), 9-C (39.048), 10-C (38.231), 11-C (35.349), 12-C (70.287), 13-C (120.892), 14-C (34.769), 15-C (20.456)으로 확인되었다. 보다 정확한 구조는 C-C NMR (Homo cosy), H-C NMR (hetero cosy) 등을 분석하고 있기 때문에 이들의 data를 종합하면 알 수 정확한 구조를 알 수 있을 것이다 (추후 보고할 것임).

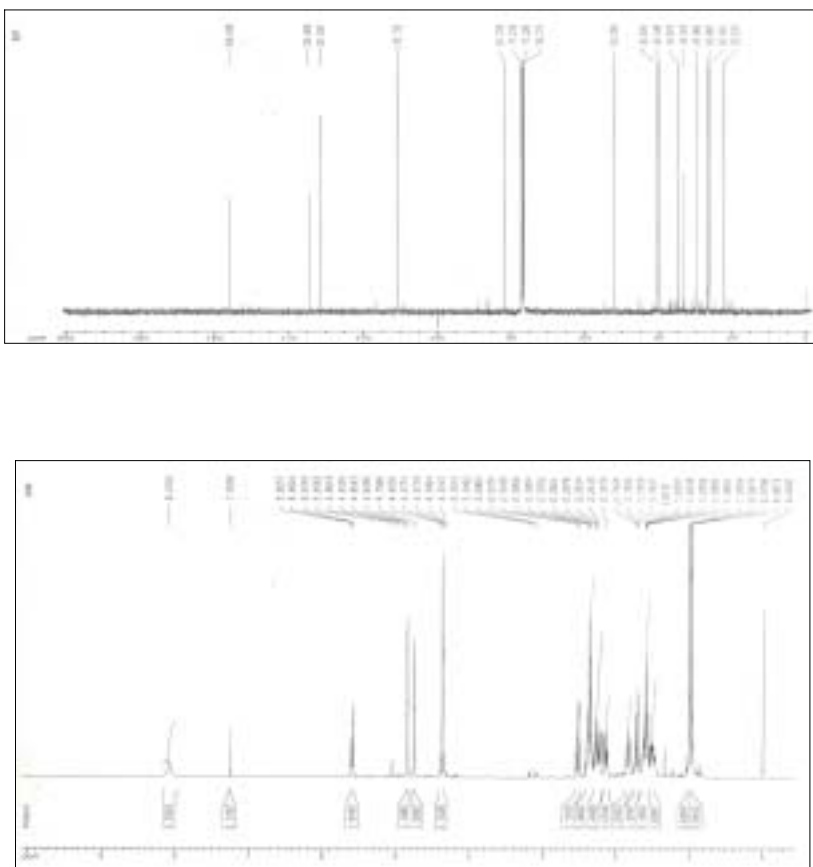


Figure 29. ^{13}C -NMR (top panel) and ^1H -NMR (bottom panel) spectra of fraction #7 in Figure 26.

2) Hexane fraction

가) TLC 분석

Hexane fraction의 성분분석을 위하여 TLC (Silica 60 F-254 plate, 5 × 10 cm)를 실시하였다. 용매의 전개 조건은 BuOH:EtOH:DDW (5:3:3; v/v/v) 이었다. 화합물을 확인하기 위해서 DAP로 발색하여 band를 발색 시켰다. Rf 0.65, 0.76, 0.84대 3개의 band를 확인하였다 (**Figure 30**).

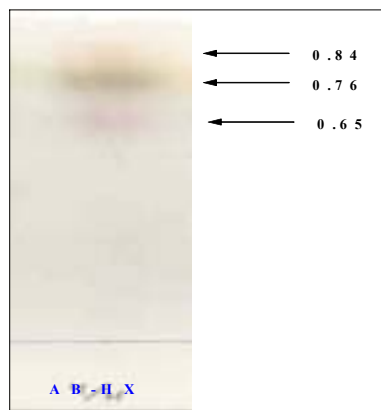


Figure 30. TLC pattern of Hexane fraction from freeze-dried materials of HEAB. Mobile solvent; BuOH:EtOH:DDW (5:3:3; v/v/v).

나) UV scan

또한 hexan fraction의 UV/Vis 흡수 pattern을 225~445 nm까지 scan하였다. 분리된 hexan분획물 244 nm에서 최대 흡광값을 나타내었다 (**Figure 31**).

다) GC 분석

Hexane fraction (지방)을 1.0N-H₂SO₄/methanol로 methylation 시킨 다음 GC를 이용하여 분석하였다. 지방산 조성은 Myristic acid, Palmitic acid, CLA, Oleic acid, Oleic acid, Linoleic acid, Others가 각각 16.37, 7.48, 3.90, 24.04, 38.79%로 나타났다 (**Table 26**).



Figure 31. UV spectrum of Hexane fraction.

Table 26. Fatty acid distribution with respect to total lipid content of the hexane fraction

Fatty acid	Composition (%)
Myristic acid	16.37
Palmitic acid	7.48
CLA	3.90
Oleic acid	24.04
Linoleic acid	38.79
Others	9.42
Total	100

3) Chloroform

가) TLC

Chloroform fraction을 TLC (Silica 60 F-254 plate, 5 × 10 cm)로 분리하였다. Hexane:ethylacetate (1:3; v/v)로 전개하고, 10% H₂SO₄로 발색시켜 R_f 0.30, 0.45, 0.64, 0.76대 4개의 band를 확인하였다 (Figure 32).

나) UV scan

chloroform fraction의 UV/Vis 흡수 pattern을 225~445 nm까지 scan하였다. 분리된 핵산분획물 244 nm에서 최대 흡광값을 나타내었다 (Figure 33).

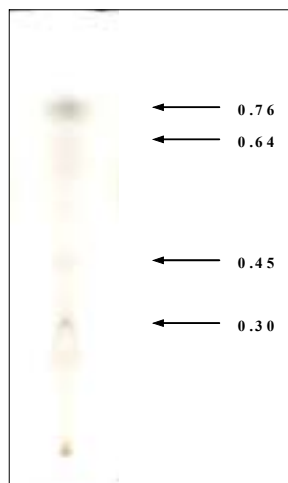


Figure 32. TLC pattern of Chloroform fraction. Solvent; hexane:ethylacetate (1:3; v/v).



Figure 33. UV spectrum of Chloroform fraction.

4) 75% EtOH 침전 fraction

가) TLC

Figure 2과 8, Table 9에서 보인 α -glucosidase 활성을 강력히 저해한 75% EtOH 침전물을 분석을 위하여 TLC (Silica 60 F-254 plate, 5 × 10 cm)를 실시하였다. 용매의 전개 조건은 BuOH:EtOH:DDW (5:3:3; v/v/v) 이었다. 당화합물임을 확인하기 위해서 DAP로 발색하여 band를 발색 시켰다. Rf 0.33대와 Rf 0.42대에서 2개의 고분자 다당체가 확인었다. 두개의 고분자다당체중 Rf 0.42는 이미 그 기능이 인정되고 분자량이 9,700인 isoflavone과 β -glucan이 결합된 HK-1임을 알 수 있었다 (Figure 34). Rf 0.33은 분자량이 HK-1보다 작은 글루칸이었다. 이것의 구성분을 아래와 같이 연구하였다.

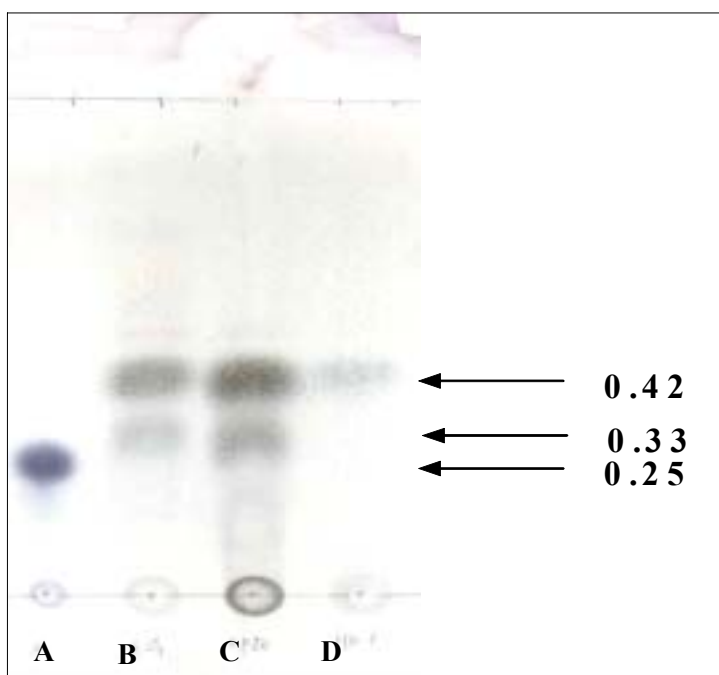


Figure 34. TLC pattern of 75% EtOH precipitate (β -D-glucan fraction) from HEAB. A, Acarbose; B, Crude extract solution; C, 80% EtOH ppt; and D, HK-1. Mobile Solvent; BuOH:EtOH:DDW (5:3:3; v/v/v).

나) UV scan

분리된 Rf 0.33의 UV/Vis 흡수 pattern을 225~445 nm까지 scan하였다. 237과 292에서 흡광도를 나타내었으며 292 nm에서 최대 흡광값을 나타내었다 (Figure 35). 이 분획은 isoflavone (genestein 및 diazdein)을 함유하고 있는 물질임을 알 수 있었다.

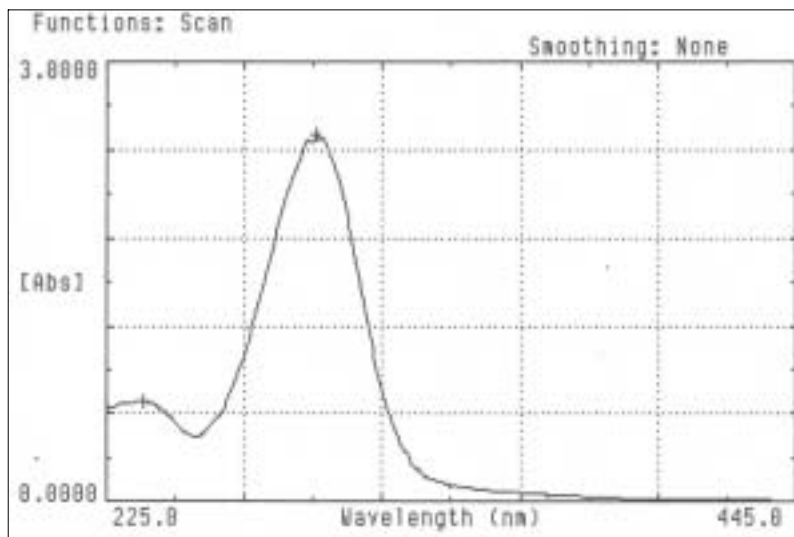


Figure 35. UV spectrum of 75% EtOH ppt fraction.

다) HPLC

75% EtOH fraction을 산 가수분해하고 (6N-HCl), Dionex HPLC로 표준물질 arabinose, fructose, galactose, glucose, lactose, maltose, mannose, ribose, sucrose, xylose을 이용하여 표준물질의 retention time과 비교하여 구성당을 분석하였다 (Figure 36). RT 11분대에 β -D-glucose가 나타났으며, RT 18분대에 fructose, RT 33분대에 ribose을 확인하였다. 이들을 표준물질 함량과 비교하였을 때 이들 구성당의 구성몰비는 220 : 46 : 1 이었다.

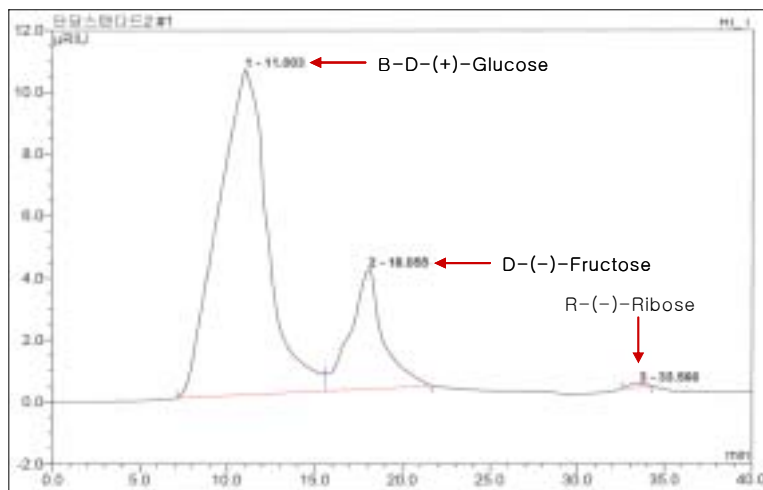


Figure 36. HPLC chromatogram of 75% EtOH fraction with Rezex RCM-Monosaccharide column (200 ×10 mm).

5) 분자량, 조성 및 구성분

TSK column이 장착된 HPLC (Dionex사 PDA-100 UV detector와 RI detector, P-680 pump, ASI-100 fraction collector)에서 분자량을 측정하였다. 이 때의 mobile phase는 3차 증류수를 사용하였으며, flow rate은 1.0 ml/min이었다. Dextran 표준품 (MW 5,000, 12,000, 25,000)과 비교하여 log scale로 계산하였다. TSK column을 이용하여 분자량을 측정한 결과 분자량이 약 4,000 정도로 나타났다.

∴ 따라서 이 물질은 Isoflavone-O-β-D-glucan (분자량: 약 4,000)으로 동정되었다.

4. 제품개발 및 효능

가. 제품

- 1) 제품명: 『당시러 (Dangsirye)』
- 2) 내용물 형태: 액상, tablet, 분말
- 3) 제품 형태

□ Pouch:

- **성상:** HEAB (신령버섯균사체액체배양물을 고압열수추출, 121℃에서 1시간 추출)으로 배양액의 유효성분을 추출한 다음, 0.45 μm membrane filter가 장착된 진동막여과장치 (Vibration filter system)로 여과한 농축액
- 용량: 100 mL/파우치, 30포/박스
- Brix: 4
- 주요성분: isoflavone-O-glucan (Gluvone)



Figure 37. A typical pouch product of HEAB concentrate.

□ **Bottle:**

- **성상:** HEAB (신령버섯균사체액체배양물을 고압열수추출, 121℃에서 1시간 추출)으로 배양액의 유효성분을 추출한 다음, 0.45 μm membrane filter가 장착된 진동막여과장치 (Vibration filter system)로 여과한 농축물
- 용량: 20 mL, 50 mL
- Brix: 4, 50
- 주요성분: isoflavone-O-glucan (Gluvone)

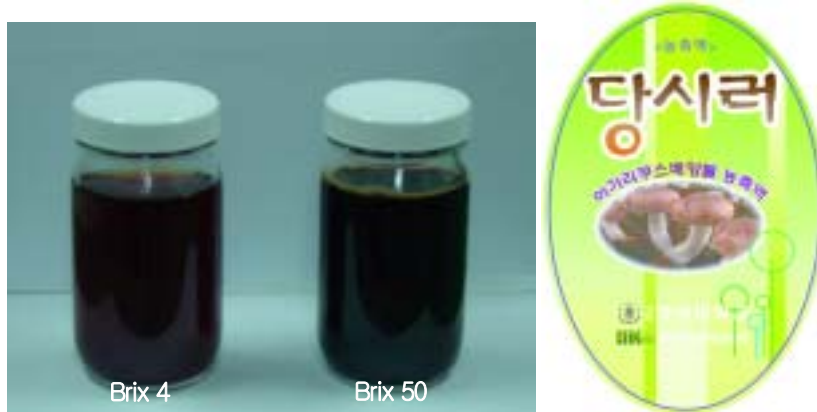


Figure 38. A typical liquid concentrate product of HEAB.

□ **Tablet**

- **성상:** HEAB (신령버섯균사체액체배양물을 고압열수추출, 121℃에서 1시간 추출)으로 배양액의 유효성분을 추출한 다음, 0.45 μm membrane filter가 장착된 진동막여과장치 (Vibration filter system)로 여과한 농축물에 정제고형제인 하이드록시프로메틸셀룰로오스(HPMC) 1%, 자당지방산에스테르 0.7%, 실리콘알루미늄산나트륨 0.7%, 스테아린산마그네슘 0.7%, PG 0.2%를 첨가하여 황색의 원형정제
- 용량: 100정/병
- 주요성분: isoflavone-O-glucan (Gluvone)



Figure 39. A typical tablet products of HEAB.

□ Powder

- **성상: HEAB** (신령버섯균사체액체배양물을 고압열수추출, 121℃에서 1시간 추출)으로 배양액의 유효성분을 추출한 다음, 대두분 2%를 첨가한 다음, spray dry하여 제조한 황색의 원형파우더
- 용량: 10g, 50g/포
- 주요성분: isoflavone-O-glucan (Gluovone)



Figure 40. A typical powder product of HEAB.

나. 제품의 임상시험

시제품 “당시러”에 대한 임상시험 결과는

제2형 단기시험

-혈당치 감소와 인슐린농도 감소

제2형 장기시험

-혈압개선효과: 수축기혈압 감소

-혈당조절효과: 인슐린, 당화해모글로빈, 및 fructosamine의 감소

-지질대사효과: TG, 콜레스테롤, LDL-콜레스테롤 감소, HDL-콜레스테롤 증가경향

1) 제 2형 당뇨병환자의 혈당 개선효과 (단기)

가) 시료

임상시험에는 시제품으로 제조한 “당시러” (액상, 파우치)를 시료로 사용하였다.

나) 실험대상자

실험대상자의 일반사항은 **Table 27**에 나타내었다. 환자의 평균연령은 67.9 ± 3.0세, 유병기간은 9.0 ± 2.4년, 체질량지수는 24.9 ± 1.2 kg/m², 당뇨병환자의 공복 정맥 혈당은 139.2 ± 8.3 mg/dL, 당화해모글로빈 수치는 6.8 ± 0.4% 이었으며, 인슐린농도는 13.4 ± 2.1 μU/mL이었다.

Table 27. Characteristics of the patients with type 2 diabetes mellitus

Age (yr)	BMI (kg/m ²)	Body fat (%)	Blood glucose (mg/dL)	HbA1c (%)	Insulin (μU/mL)
67.9±3.0	24.9±1.2	33.8±1.9	139.2±8.3	6.8±0.4	13.4±2.1

다) “당시러” 단기 섭취효과

당뇨환자에게 쌀밥만 섭취시킨 경우, 또는 쌀밥과 함께 “당시러” 활성성분 200 mL을 먼저 섭취시키고, “당시러” 활성성분을 먼저 섭취시킨 후 1시간 후에 쌀밥을 섭취시킨 경우의 혈당증가치 변화곡선을 **Figure 41**에 나타내었다. 당뇨병환자가 쌀밥

섭취 1시간 전에 “당시리” 활성성분을 섭취한 경우 식후 60분의 혈당 증가치가 쌀밥만 섭취한 경우 또는 쌀밥 섭취 1시간 전에 “당시리” 활성성분을 섭취한 경우에 비해 유의적으로 작게 나타났다 ($P < 0.05$). 식후 혈당증가곡선의 면적 (AUC)은 쌀밥을 섭취한 경우 $14,700 \pm 1,444 \text{ mg} \cdot \text{min/dL}$, “당시리” 활성성분을 동시에 섭취한 경우 $11,581 \pm 1,038 \text{ mg} \cdot \text{min/dL}$, “당시리”를 1시간 전에 섭취한 경우 $13,900 \pm 1,725 \text{ mg} \cdot \text{min/dL}$ 으로 나타나, 쌀밥과 “당시리” 활성성분을 동시에 섭취한 경우 AUC가 유의적으로 낮게 나타났다 (Table 28). 따라서 당뇨병자에 있어서 “당시리” 활성성분을 식사와 함께 섭취하는 것이 postprandial hyperglycemia 조절효과가 큰 것으로 사료된다.

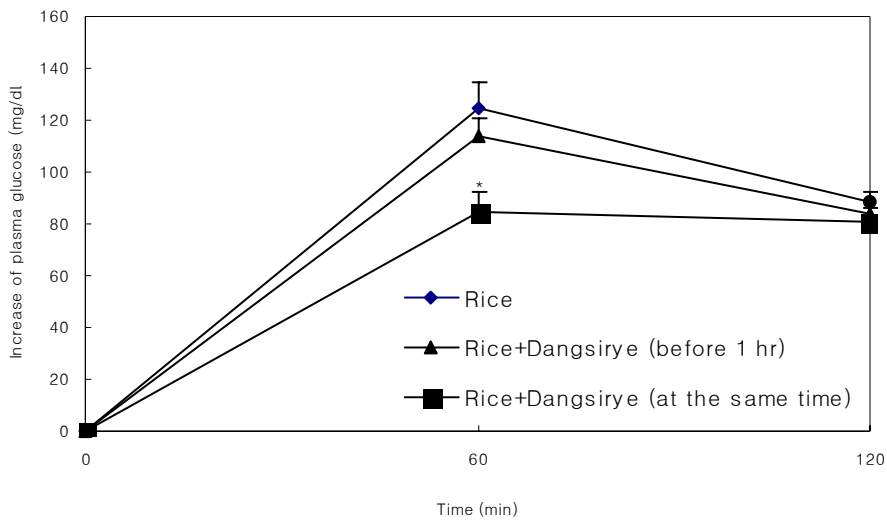


Figure 41. Increase of blood glucose after administration of Dangsirye in type 2 diabetes mellitus. * significantly different at $P < 0.05$.

Table 28. Area under the curve (AUC) of postprandial glucose responses of type 2 diabetes mellitus

	AUC (mg · min/dL)
Rice	14,700±1,444
Rice+Agaricus (before 1hr)	13,900±1,725
Rice+Agaricus (at the same time)	11,581±1,038*

*significantly different at $P < 0.05$.

당뇨환자에 있어서 식후 인슐린 증가치를 조사한 결과 (Figure 42), “당시리”를 쌀밥과 함께 섭취한 경우 식후 60분에 인슐린 증가치가 쌀밥만 섭취한 경우 및 쌀밥 섭취 1시간 전에 “당시리”를 섭취한 경우에 비해 유의적으로 억제되었다 ($P < 0.05$). 따라서 당뇨환자에 있어서 “당시리”활성성분을 식사와 함께 섭취할 경우 인슐린 저항성 개선효과가 있는 것으로 사료된다.

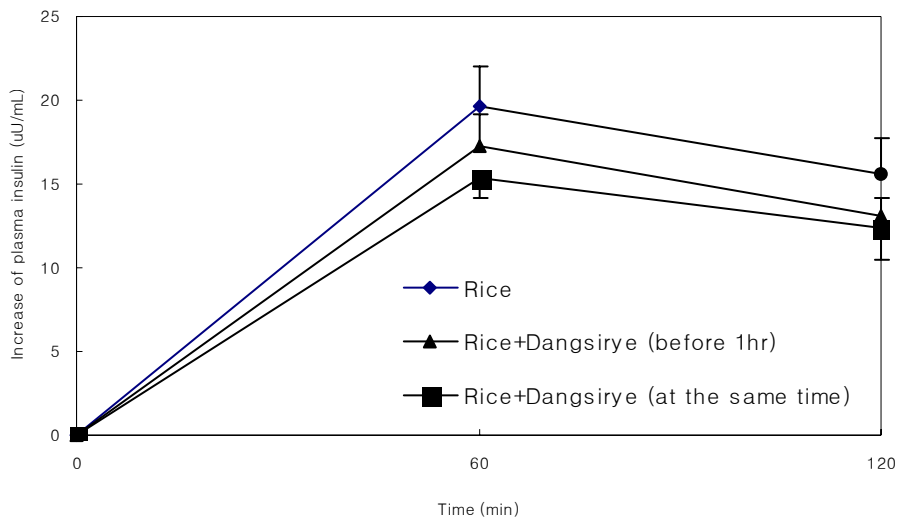


Figure 42. Increase of blood insulin after administration Dangsirye in type 2 diabetes mellitus. *significantly different at $P < 0.05$.

2) 제 2형 당뇨병환자의 혈당 개선효과 (장기)

가) 시료

단기 실험에 사용한 시료와 동일한 시료 “당시리”를 사용하였다.

나) 신체계측치

실험대상자의 신체계측치는 **Table 29**에 나타내었다. 대조군의 평균연령은 62.1 ± 1.7 세, 평균 유병기간은 6.3 ± 1.5 년이었다. “당시리”의 평균연령은 59.4 ± 2.3 세, 유병기간은 6.4 ± 1.5 년이었다. 당뇨병환자는 모두 설포닐유레아계 형구혈당강하제를 복용하고 있었다. 실험대상자의 평균 체질량지수 (BMI)는 “당시리”활성성분 섭취 전 $23.8 \pm 0.7 \text{ kg/m}^2$, 섭취 후 $23.5 \pm 0.8 \text{ kg/m}^2$ 로 감소하는 경향을 나타내었다 ($0.3 \pm 0.2 \text{ kg/m}^2$). 실험대상자의 “당시리” 활성성분 섭취 전 체지방 양은 26.3 ± 1.8 %이었으며, 섭취 후 25.9 ± 1.7 %를 나타내어 감소하는 경향을 나타내었다 (-0.4 ± 0.2 %). 체중 및 허리둘레는 섭취 전 각각 $61.2 \pm 3.3 \text{ kg}$, $85.5 \pm 1.8 \text{ cm}$ 이었으며, 섭취 후 각각 $60.4 \pm 3.3 \text{ kg}$, $85.0 \pm 6.6 \text{ cm}$ 로 감소하는 경향을 나타내었다. 대조군의 체중, 체질량지수, 체지방 및 허리둘레는 실험기간 전과 후에 유의적인 차이가 없었다.

Table 29. Characteristics of patients with type 2 diabetes mellitus

Parameters	Control group			Dangsirye group		
	Pre	Post	Difference	Pre	Post	Difference
Age (yr)	62.1 ± 1.7	62.1 ± 1.7	-	59.4 ± 2.3	59.4 ± 2.3	-
Duration (yr)	6.3 ± 1.5	6.3 ± 1.5	-	6.4 ± 1.5	6.4 ± 1.5	-
Body weight (g)	62.8 ± 1.4	63.2 ± 1.5	0.4 ± 0.5	61.2 ± 3.3	60.4 ± 3.3	-0.8 ± 0.4
BMI (kg/m^2)	24.2 ± 0.6	24.4 ± 0.7	0.2 ± 0.2	23.8 ± 0.7	23.5 ± 0.8	-0.3 ± 0.2
Body fat (%)	28.5 ± 1.5	28.7 ± 1.3	0.2 ± 1.2	26.3 ± 1.8	25.9 ± 1.7	-0.4 ± 0.2
Waist circumference(cm)	90.0 ± 1.5	90.4 ± 1.6	0.4 ± 0.7	85.5 ± 1.8	85.0 ± 6.6	-0.5 ± 0.3

다) 혈압강하효과

“당시리” 활성성분 섭취 전 수축기 혈압은 148.5 ± 6.2 mmHg, 섭취 후 140.2 ± 4.9 mmHg로 유의적으로 감소하였으며 (-8.3 ± 2.2 mmHg, $P < 0.05$), 이완기 혈압은 섭취 전, 후 각각 89.6 ± 6.3 mmHg, 85.6 ± 5.2 mmHg로 감소하는 경향을 나타내었다 (-4.0 ± 2.0 mmHg, **Table 30**). 대조군의 수축기 혈압 및 이완기 혈압은 실험기간 전과 후에 유의적 차이가 없었다. 당뇨병환자에 있어서 혈압의 감소는 심혈관계 합병증을 감소시키는 것으로 보고되었다. 따라서 “당시리” 활성성분의 섭취는 혈압을 조절하고 심혈관계 합병증을 예방하고 개선하는데 도움이 될 것으로 사료된다.

Table 30. Blood pressure of patients with type 2 diabetes mellitus

Parameters	Control group			Dangsirye group		
	Pre	Post	Difference	Pre	Post	Difference
Systolic blood pressure (mmHg)	133.5 ± 7.7	135.2 ± 6.4	1.7 ± 2.8	148.5 ± 6.2	140.2 ± 4.9	$-8.3 \pm 2.2^*$
Diastolic blood pressure (mmHg)	82.9 ± 2.8	83.6 ± 2.4	0.7 ± 3.2	89.6 ± 6.3	85.6 ± 5.2	-4.0 ± 2.0

*Significantly different at $P < 0.05$

라) 내당능 개선효과

실험 시작 전, 후에 실시된 경구 당부하 검사 후 혈당 증가곡선 면적 및 인슐린 면적 결과는 **Table 31**에 나타내었다. “당시리” 활성성분의 장기간 섭취는 포도당 부하시 혈당 증가곡선 면적 및 인슐린 증가곡선 면적을 감소시키는 경향을 나타내었다.

Table 31. Area under the glycemic and insulin response curves (AUC) after administration of glucose (75g) to the patients with type 2 diabetes mellitus.

AUC (Group)	Control group			Dangsirye group		
	Pre	Post	Difference	Pre	Post	Difference
AUC of glucose response curve (mg · min/dL)	21,525 ± 960	22,801 ± 1,814	1,276 ± 2,055	22,450 ± 1,286	20,697 ± 1,045	-1,753 ± 1,881
AUC of insulin response curve (μ U · min/mL)	2,029 ± 340	2,166 ± 189	138 ± 337	2,117 ± 273	1,906 ± 142	-211 ± 287

마) 혈당 조절 효과

“당시러” 활성성분 섭취 전, 후의 혈액 당화헤모글로빈 및 혈장 포도당, 프락토사민, 인슐린 농도를 **Table 32**에 나타내었다. 혈액 당화헤모글로빈 농도는 “당시러” 활성성분 섭취 전에 $8.5 \pm 0.5 \%$ 이었으나 섭취 후 $7.9 \pm 0.5 \%$ 로 유의적으로 감소하였다 (-0.6 ± 0.1 , $P < 0.01$). 당뇨병자의 공복 혈장 포도당은 “당시러” 활성성분 섭취 전에 172.1 ± 14.0 mg/dL이었으나, 12주간 “당시러”를 섭취한 후에 유의적으로 감소 (-22.8 ± 2.8 mg/dL)하여 149.3 ± 12.4 mg/dL로 나타났다 ($P < 0.001$). 당뇨병자의 혈당 조절에 있어서 공복 혈당치의 조절도 중요하지만, 최근 2-3개월간의 평균 혈당을 나타내는 당화헤모글로빈의 농도 또한 중요성이 크다. 이는 당화헤모글로빈 수치가 합병증의 발병 및 진단과 상관관계가 크기 때문이다. 프락토사민은 아가리쿠스 활성성분 섭취 전, 후에 각각 399.2 ± 7.4 μ mol/L 및 382.9 ± 6.9 μ mol/L로 나타나 “당시러” 활성성분의 섭취로 인해 유의적으로 감소하였다 (-16.3 ± 3.0 μ mol/L, $P < 0.05$). 프락토사민은 최근 2~3주간의 혈당 조절 정도를 나타내는 수치이다. 혈장 인슐린 농도는 “당시러” 활성성분 섭취 전에 17.8 ± 0.8 uU/mL이었으나, 12주간 “당시러” 활성성분을 섭취한 후에 유의적으로 감소 (-2.1 ± 0.4 uU/mL)하여 15.7 ± 0.9 uU/mL로 나타났다 ($P < 0.05$). 아가리쿠스 활성성분의 섭취는 혈당농도를 감소시키고, 따라서 인슐린 요구도를 감소시켜 인슐린 분비량을 조절하여 인슐린 저항성 개선에 도움을 줄 것으로 사료된다. 따라서 “당시러” 활성성분의 섭취는 당뇨 환자에 있어서 혈당 조절 및 인슐린 저항성 개선에 크게 도움이 되는 것으로 나타났다. 대조군의 혈액 당화헤모글로빈 및 혈장 포도당, 프락토사민, 인슐린 농도는 유의적인 차이가 없었다.

Table 32. Glycemic control of patients with type 2 diabetes mellitus

Parameters	Control group			Dangsirye group		
	Pre	Post	Difference	Pre	Post	Difference
Plasma glucose (mg/dL)	165.6 ± 8.2	163.5 ± 7.1	-2.1 ± 4.0	172.1 ± 14.0	149.3 ± 12.4	-22.8 ± 2.8***
HbA1c (%)	8.20 ± 0.57	8.17 ± 0.51	-0.03 ± 0.16	8.47 ± 0.51	7.85 ± 0.51	-0.62 ± 0.07**
Fructosamine (μmol/L)	386.3 ± 10.4	381.6 ± 10.0	-4.7 ± 3.2	399.2 ± 7.4	382.9 ± 6.9	-16.3 ± 3.0*
Insulin (μU/mL)	17.4 ± 2.0	17.2 ± 2.1	-0.2 ± 0.6	17.8 ± 0.8	15.7 ± 0.9	-2.1 ± 0.4*

*Significantly different at $P < 0.05$

**Significantly different at $P < 0.01$

***Significantly different at $P < 0.001$

바) 지질대사 개선 효과

“당시러” 활성성분 섭취 전, 후의 지질 profile은 **Table 33**에 나타내었다. 혈장 중성지방 농도는 “당시러” 활성성분 섭취 전에 169.2 ± 25.2 mg/dL이었으나 섭취 후 154.4 ± 24.4 mg/dL로 유의적으로 감소하였다 (-14.8 ± 3.7 , $P < 0.05$). 당뇨병 환자의 혈장 콜레스테롤 농도는 “당시러” 활성성분 섭취 전에 213.8 ± 12.0 mg/dL이었으나, 12주간 “당시러” 활성성분을 섭취한 후에 유의적으로 감소 (-22.1 ± 7.4 mg/dL)하여 191.7 ± 9.9 mg/dL로 나타났다 ($P < 0.05$). LDL-콜레스테롤 농도는 “당시러” 활성성분 섭취 전, 후에 각각 146.8 ± 8.9 mg/dL 및 138.4 ± 8.9 mg/dL로 나타나 “당시러”의 섭취로 인해 유의적으로 감소하였다 (-8.4 ± 2.1 mg/dL, $P < 0.05$). HDL-콜레스테롤 농도는 섭취 전, 후 각각 44.4 ± 1.8 mg/dL 및 45.8 ± 1.5 mg/dL로 증가하는 경향을 나타내었다. 대조군의 지질 profile은 실험기간 전, 후에 유의적 차이가 없었다. 제 2형 당뇨병 환자는 중성지방 및 LDL-콜레스테롤의 증가 및 HDL-콜레스테롤이 감소하는 지질이상 (dyslipidemia)이 일어나며, 이러한 변화는 당뇨 합병증인 관상동맥 질환의 원인이 된다고 알려져있다. 따라서 “당시러” 활성성분의 섭취는 지질 profile을 개선시켜 당뇨 합병증을 예방하는데 도움을 줄 것으로 기대된다.

Table 33. Lipid profile of patients with type 2 diabetes mellitus

Parameters	Control group			Dangsirye group		
	Pre	Post	Difference	Pre	Post	Difference
Triglyceride (mg/dL)	178.8 ± 24.5	175.0 ± 22.3	-3.8 ± 3.2	169.2 ± 25.2	154.4 ± 24.4	-14.8 ± 3.7*
Cholesterol (mg/dL)	216.3 ± 12.1	215.0 ± 10.9	-1.3 ± 2.6	213.8 ± 12.0	191.7 ± 9.9	-22.1 ± 7.4*
HDL-cholesterol (mg/dL)	43.1 ± 3.1	43.4 ± 2.2	-0.3 ± 1.3	44.4 ± 1.8	45.8 ± 1.5	1.4 ± 1.1
LDL-cholesterol (mg/dL)	149.2 ± 8.0	149.0 ± 7.3	-0.2 ± 3.3	146.8 ± 8.9	138.4 ± 8.9	-8.4 ± 2.1*

*Significantly different at P < 0.05

사) 간기능 및 신장기능 개선효과

당뇨환자의 간기능 정도를 나타낼 수 있는 지표인 GOT, GPT 농도는 “당시러” 섭취 전, 후 유의적인 차이를 나타내지 않았다 (Table 34). 신장기능을 나타낼 수 있는 지표인 BUN, creatinine 농도를 조사한 결과, “당시러” 섭취 전, 후 유의적인 차이를 나타내지 않았다.

Table 34. GOT, GPT, BUN and creatinine of patients with type 2 diabetes mellitus

Parameters	Control group			Dangsirye group		
	Pre	Post	Difference	Pre	Post	Difference
GOT (U/L)	25.70 ± 1.87	25.50 ± 1.60	-0.20 ± 1.60	26.70 ± 2.33	23.50 ± 2.41	-3.20 ± 1.30
GPT (U/L)	22.90 ± 1.78	23.70 ± 1.34	0.80 ± 1.14	24.80 ± 1.62	22.80 ± 1.96	-2.00 ± 2.00
BUN (mg/dL)	22.26 ± 2.72	23.89 ± 1.78	1.63 ± 1.15	18.88 ± 1.12	19.58 ± 0.74	-0.70 ± 0.88
Creatinine (mg/dL)	1.17 ± 0.07	1.14 ± 0.07	-0.03 ± 0.08	0.99 ± 0.06	0.92 ± 0.06	-0.07 ± 0.04

따라서 제2형 당뇨병환자에 있어서 “당시러” 장기간 섭취는 수축기 혈압을 유의적으로 감소시키고, 공복 혈당 및 당화혈색소, 프락토자민 및 인슐린 농도를 감소시켜 강력한 혈당 조절효과를 나타내었다. 또한 “당시러” 활성성분의 섭취는 혈중 중성지방 및 콜레스테롤, LDL-콜레스테롤 농도를 유의적으로 감소시켜, dislipidemia 개선효과를 나타내었다. 따라서 “당시러” 활성성분은 당뇨병환자의 혈당을 조절하고 당뇨합병증을 개선하는데 기여하는 것으로 사료된다.

다. 제품의 저장성

“당시러”제품에 대한 저장성에서 -미생물수 및 색깔의 변화 POV, TBARS 등에서 저장기간동안 큰 차이는 없었다.

1) 생균수 및 대장균

각각의 다른 환경에 저장 되어 있는 시료 (4°C, 실온, 50°C, 햇빛)를 희석한 후 NA, EMB Agar에 각각 시료의 원액과 10배 희석한 시료를 100 μ l 접종하고 도말 후 NA는 30°C, EMB Agar는 37°C incubator에 넣고 24시간 배양 후 관찰한 결과 **Table 35, 36**과 같이 모두 음성으로 나타나 생균과 대장균이 검출되지 않았다.

Table 35. Total number of microorganisms in pouch products of Dangsirye during storage

Date	Store time (day)	4°C	25 °C	Sunlight	50 °C
05-12	0	- ¹⁾	-	-	-
05-27	15	-	-	-	-
06-11	30	-	-	-	-
06-26	45	-	-	-	-
07-11	60	-	-	-	-
07-26	75	-	-	-	-
08-10	90	-	-	-	-
08-25	105	-	-	-	-
09-09	120	-	-	-	-

¹⁾ Not detected.

Table 36. Total number of *E. coli* in the pouch product of Dangsirye during storae

Date	Store time (day)	4℃	25 ℃	Sunlight	50 ℃
05-12	0	- ¹⁾	-	-	-
05-27	15	-	-	-	-
06-11	30	-	-	-	-
06-26	45	-	-	-	-
07-11	60	-	-	-	-
07-26	75	-	-	-	-
08-10	90	-	-	-	-
08-25	105	-	-	-	-
09-09	120	-	-	-	-

¹⁾ Not detected.

2) 점도 및 색소

가) 점도

Brookfield Viscosity meter (DV-1 Viscometer spindle No.1)를 이용하여 점도를 측정 한 결과 **Figure 38**과 같았다. 점도 또한 환원당과 거의 유사하게 저장기간이 길어져도 점도의 변화가 없음을 알 수 있었다.

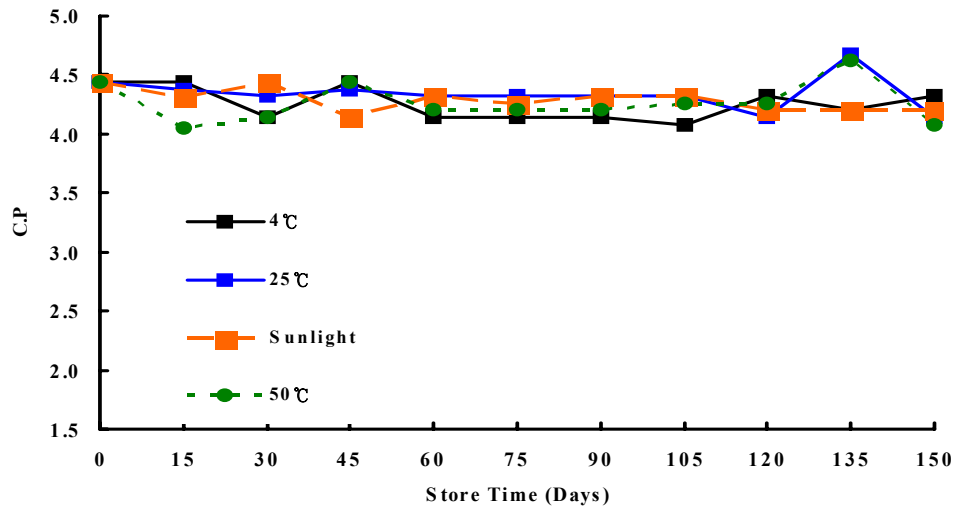


Figure 43. Changes in the viscosity of the pouch product of Dangsirye during storage.

다) 색도

색도는 색차계 (Colorimeter, MINOLTA-CT310)를 이용하여, L (명도)(Figure 44), b (채도) (Figure 45)값으로 색도 측정하였다. Luminosity (명도)는 50℃에서 장기간 보관하였을 때 17.22%로 가장 낮게 나타났으며, 다른 온도에서는 별 차이가 없었다. 채도 또한 마찬가지로 50℃에서는 28.88%로 가장 낮게 나타났으며 다른 온도에서는 별 차이가 없었다.

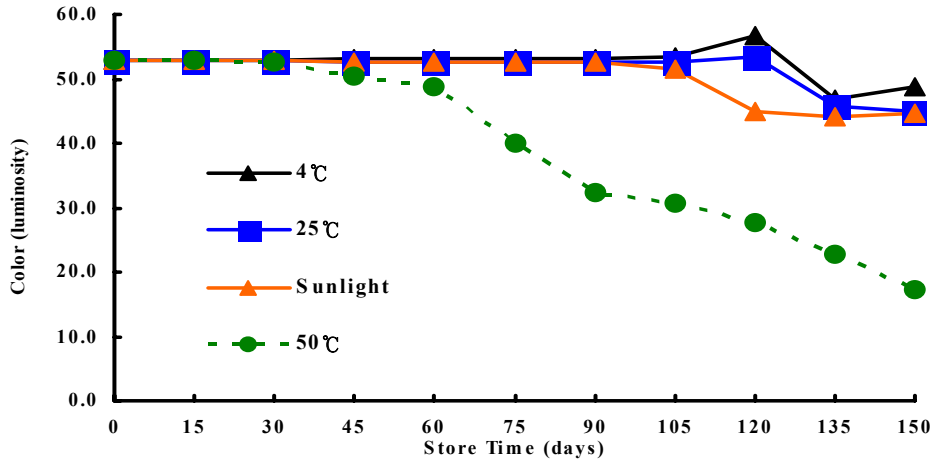


Figure 44. Changes in the brightness (L value) of the pouch product of Dangsirye during storage.

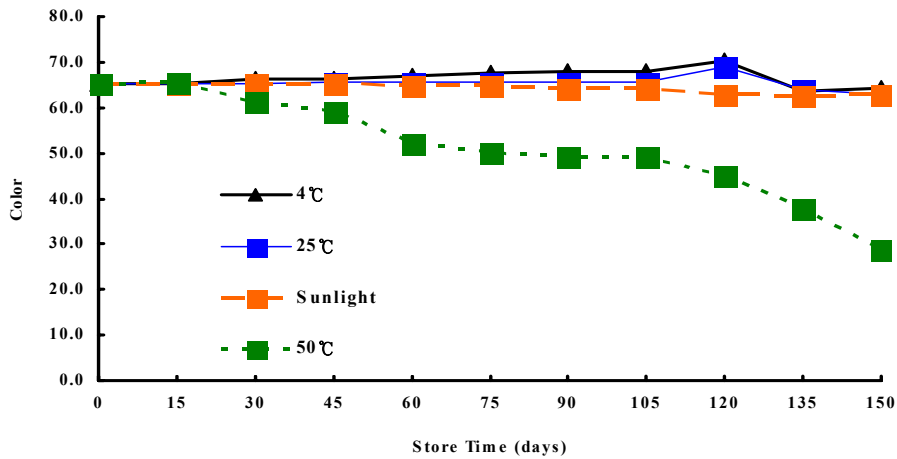


Figure 45. Changes in the b value of the pouch product of Dangsirye during storage.

3) POV, COV 및 TBARS

파우치 제품을 앞의 저장성 실험을 수행하면서 동시에 POV (Table 37), COV (Table 38), 및 TBARS (Table 39)의 함량을 정량하였다. 그 결과 안정성을 위한 세 지표에서는 크게 변화되지 않았다. 따라서 이 제품의 안정성에는 아무런 문제가 없었다.

Table 37. Changes in the POV value of the pouch product of Dangsirye during storage

Store time (days)	4°C	25 °C	Sunlight	50 °C
0	- ¹⁾	-	-	-
15	-	-	-	-
30	-	-	-	-
45	-	-	-	-
60	-	-	-	-
75	-	-	-	-
90	-	-	-	-
105	-	-	-	-
120	-	-	-	-

¹⁾ Detection limit.

Table 38. Changes in COV value of the pouch product of Dangsirye during storage

Store time (days)	4°C	25 °C	Sunlight	50 °C
0	- ¹⁾	-	-	-
15	-	-	-	-
30	-	-	-	-
45	-	-	-	-
60	-	-	-	-
75	-	-	-	-
90	-	-	-	-
105	-	-	-	-
120	-	-	-	-

¹⁾ Detection limit.

Table 39. Changes in TBARS value of the pouch product of Dangsirye during storage

Store time (days)	4℃	25 ℃	Sunlight	50 ℃
0	- ¹⁾	-	-	-
15	-	-	-	-
30	-	-	-	-
45	-	-	-	-
60	-	-	-	-
75	-	-	-	-
90	-	-	-	-
105	-	-	-	-
120	-	-	-	-

¹⁾ Detection limit.

라. 제품의 안전성 (mouse에 대한 급성시험)

“당시러”에 대한 안전성의 경우
-급성 실험에서 안전하였다.

1) 사망 및 임상증상

“당시러” 시료를 농도별 (0, 10, 16.3, 25, 37.3 mg/30 g mouse body weight)로 ICR 암수 각 10마리에 경구투여 하여 급성독성시험을 수행하면서 7일간 사망수를 조사하였고 (Table 40), 또한 여러 가지 임상학적인 변화를 관찰하였다 (Table 41). 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 “당시러”가 경구 급성독성실험에서 아무런 독성을 보이지 않았다는 것을 의미한다.

Table 40. Mortality of mice treated orally with Dangsirye for 7 days

Sex	Dosage (mg/30 g)	Days after treatment								Final mortality
		0	1	2	3	4	5	6	7	
Male	0	0/10 ¹⁾	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
	10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
	16.3	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
	25	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
	37.3	0/10	0/10	0/10	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	0/10	0/10	0/10
	10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
	16.3	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
	25	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
	37.3	0/10	0/10	0/5	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10

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

Table 41. Clinical signs in mice treated, orally with Dangsirye for 7 days¹⁾

Sex	Dosage (mg/30 g)	Clinical sign	Duration (day)							
			0	1	2	3	4	5	6	7
Male	0	NAD ²⁾	10	10	10	10	10	10	10	10
		NAD ³⁾	10	10	10	10	10	10	10	10
	10	DMA	10	10	10	10	10	10	10	10
		NAD	10	10	10	10	10	10	10	10
	16.3	DMA	10	10	10	10	10	10	10	10
		NAD	10	10	10	10	10	10	10	10
	25	DMA	10	10	10	10	10	10	10	10
		NAD	10	10	10	10	10	10	10	10
	37.3	DMA	10	10	10	10	10	10	10	10
		NAD	10	10	10	10	10	10	10	10
Female	0	NAD	10	10	10	10	10	10	10	10
		NAD	10	10	10	10	10	10	10	10
	10	DMA	10	10	10	10	10	10	10	10
		NAD	10	10	10	10	10	10	10	10
	16.3	DMA	10	10	10	10	10	10	10	10
		NAD	10	10	10	10	10	10	10	10
	25	DMA	10	10	10	10	10	10	10	10
		NAD	10	10	10	10	10	10	10	10
	37.3	DMA	10	10	10	10	10	10	10	10
		NAD	10	10	10	10	10	10	10	10

¹⁾Mice were used in all treatments.

²⁾NAD: not abnormalities detected.

³⁾DMA: decrease of motor activity.

2) 체중

“당시러” 시료를 농도별 (0, 10, 16.3, 25, 37.3 mg/30 g mouse body weight)로 ICR 암수 각 10마리에 경구투여 하여 급성독성시험을 수행하면서 7일간 몸무게의 변화를 측정하였다 (Table 42). 투여 후 7일 동안 증가한 몸무게는 수컷에서 대조구에 비해 증가하였지만 유의성은 없었다. 즉 대조구는 2.9 g이 증가하였고, 처리농도 10, 16.3, 25, 37.3 mg에 따라 각각 3.6, 4.2, 3.7, 3.7 g이 증가하여 16.3 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 10 mg 처리농도에서 몸무게가 가장 많이 증가하였고, 37.3 mg 처리구에서 몸무게의 증가가 대조구보다 다소 낮았다.

따라서 이 “당시러”는 ICR mouse 암컷의 체중을 감소시키지 않고 오히려 수컷에서는 증가시키는 경향이 있었다.

Table 42. Body weights in mice treated orally with Dangsirye for 7 days¹⁾

Sex	Dosage (mg/30 g)	Days after treatment			Gain
		0	4	7	
Male	0	33.2±1.0 ²⁾	34.9±1.3	36.1±1.6	2.9
	10	32.1±1.3	33.6±1.2	35.7±1.6	3.6 ^{3)a}
	16.3	31.7±1.6	33.5±1.6	35.9±1.4	4.2 ^a
	25	32.9±1.0	34.7±0.9	36.6±0.8	3.7 ^a
	37.3	32.9±1.0	34.7±1.3	36.6±1.7	3.7 ^a
Female	0	26.2±1.1	27.5±1.3	28.1±1.2	1.9
	10	26.9±1.0	28.0±0.8	29.4±0.9	2.5 ^a
	16.3	23.1±0.8	24.3±1.2	25.3±0.8	2.3 ^a
	25	26.6±0.8	27.9±0.9	28.7±1.6	2.1 ^a
	37.3	23.1±1.0	24.7±1.7	24.8±0.4	1.7 ^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.

3) 육안적 해부소견

“당시러” 시료를 농도별 (0, 10, 16.3, 25, 37.3 mg/30 g mouse body weight)로 ICR 암수 각 10마리에 경구투여 하여 급성독성시험을 수행하면서 장기 (cecum, intestine, stomach, adr. gland, brain, heart, liver, kidney, spleen, testis, thymus)의 정상/이상 증상을 육안적으로 조사하였다 (Table 43, 44). 시료 투여 후 7일 후 장기를 적출하여 유착, 확장, 종대를 조사한 결과 아무런 이상적인 증상은 관찰되지 않았다. 따라서 이 “당시러”는 ICR mouse 장기의 유착이나, 확장 및 종대 등에는 암수의 체중을 감소시키지 않고 오히려 수컷에서는 증가시키는 경향이 있었다.

Table 43. Gross findings in male mice treated orally with Dangsirye for 7 days

Organ	Clinical sign	Dosage (mg/30 g)				
		0	10	16.3	25	37.3
Organ	Adhesion	-	-	-	-	-
	NGF ¹⁾	10(100%) ²⁾	10(100%)	10(100%)	10(100%)	10(100%)
Cecum	Enlargement	-	-	-	-	-
	NGF	10(100%)	10(100%)	10(100%)	10(100%)	10(100%)
Intestine	Enlargement	-	-	-	-	-
	NGF	10(100%)	10(100%)	10(100%)	10(100%)	10(100%)
Stomach	Enlargement	-	-	-	-	-
	NGF	10(100%)	10(100%)	10(100%)	10(100%)	10(100%)
Adr. gland	Enlargement	-	-	-	-	-
	NGF	10(100%)	10(100%)	10(100%)	10(100%)	10(100%)
Brain	Enlargement	-	-	-	-	-
	NGF	10(100%)	10(100%)	10(100%)	10(100%)	10(100%)
Heart	Enlargement	-	-	-	-	-
	NGF	10(100%)	10(100%)	10(100%)	10(100%)	10(100%)
Liver	Enlargement	-	-	-	-	-
	NGF	10(100%)	10(100%)	10(100%)	10(100%)	10(100%)
Kidney	Enlargement	-	-	-	-	-
	NGF	10(100%)	10(100%)	10(100%)	10(100%)	10(100%)
Spleen	Enlargement	-	-	-	-	-
	NGF	10(100%)	10(100%)	10(100%)	10(100%)	10(100%)
Testis	Enlargement	-	-	-	-	-
	NGF	10(100%)	10(100%)	10(100%)	10(100%)	10(100%)
Thymus	Enlargement	-	-	-	-	-
	NGF	10(100%)	10(100%)	10(100%)	10(100%)	10(100%)

¹⁾NGF: No gross finding.

²⁾() : % of finding from animal number 5.

Table 44. Gross findings in female mice treated orally with Dangsirye for 7 days

Organ	Clinical sign	Dosage (mg/30 g)				
		0	10	16.3	25	37.3
Organ	Adhesion	-	-	-	-	-
	NGF ¹⁾	10(100%) ²⁾	10(100%)	10(100%)	10(100%)	10(100%)
Cecum	Enlargement	-	-	-	-	-
	NGF	10(100%)	10(100%)	10(100%)	10(100%)	10(100%)
Intestine	Enlargement	-	-	-	-	-
	NGF	10(100%)	10(100%)	10(100%)	10(100%)	10(100%)
Stomach	Enlargement	-	-	-	-	-
	NGF	10(100%)	10(100%)	10(100%)	10(100%)	10(100%)
Adr. gland	Enlargement	-	-	-	-	-
	NGF	10(100%)	10(100%)	10(100%)	10(100%)	10(100%)
Brain	Enlargement	-	-	-	-	-
	NGF	10(100%)	10(100%)	10(100%)	10(100%)	10(100%)
Heart	Enlargement	-	-	-	-	-
	NGF	10(100%)	10(100%)	10(100%)	10(100%)	10(100%)
Liver	Enlargement	-	-	-	-	-
	NGF	10(100%)	10(100%)	10(100%)	10(100%)	10(100%)
Kidney	Enlargement	-	-	-	-	-
	NGF	10(100%)	10(100%)	10(100%)	10(100%)	10(100%)
Spleen	Enlargement	-	-	-	-	-
	NGF	10(100%)	10(100%)	10(100%)	10(100%)	10(100%)
Testis	Enlargement	-	-	-	-	-
	NGF	10(100%)	10(100%)	10(100%)	10(100%)	10(100%)
Thymus	Enlargement	-	-	-	-	-
	NGF	10(100%)	10(100%)	10(100%)	10(100%)	10(100%)

¹⁾NGF: No gross finding.

²⁾() : % of finding from animal number 5.

4) 혈액학적 검사

“당시러” 시료를 농도별 (0, 10, 16.3, 25, 37.3 mg/30 g mouse body weight)로 ICR 암수 각 10마리에 경구투여 하여 급성독성시험을 수행하면서 7일 후에 혈액중의 WBC, RBC, Hb, Hct, BLP, MCV, MCH, MCHC를 측정하였다 (Table 45).

수컷에서 대조구에 비해 37.3 mg까지 RBC, Hb, Hct 및 BLP가 증가하였다. 또한 암컷에서도 RBC, Hb, Hct, 및 BLP가 증가하였다.

따라서 이 “당시러”는 mouse의 암수 혈액학적인 인자에 영향을 미치지 않는 것으로 확인되었다.

Table 45. Hematological findings in mice treated orally with Dangsirye for 7 days

Item ¹⁾	Male (mg/30 g)					Female (mg/30 g)				
	0	10	16.3	25	37.3	0	10	16.3	25	37.3
WBC ($\times 10^6/\mu\ell$)	9.4	11	8.3	8.3	8.6	1.3	0.5	0.5	1.2	0.4
RBC ($\times 10^3/\mu\ell$)	7.6	7.6	9.7	11.3	11.7	8.1	6.4	8.4	8.0	8.9
Hb (g/dℓ)	13.8	14.2	17	20.1	21	15.2	13.3	16.0	16.0	16.3
Hct (%)	38.4	40.3	48.8	59	60.6	40.8	31.9	43.2	42.6	44
BLP ($\times 10^3/\mu\ell$)	1281	1175	1560	1511	1451	769	1142	1105	1147	1125
MCV	51	53	50	52	52	51	50	51	53	50
MCH	18.1	18.6	17.5	17.8	17.9	18.9	20.9	19	20	18.4
MCHC	3.8	35.1	34.8	34.1	34.6	37.2	41.6	37	37	37

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

“당시리” 시료를 농도별 (0, 10, 16.3, 25, 37.3 mg/30 g mouse body weight)로 ICR 암수 각 10마리에 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 46, 47). 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 46). 또한 암컷에서는 거의 모든 인자가 처리에 의해 영향을 받지 않았다 (Table 47).

Table 46. Biochemical findings in male mice treated orally with Dangsirye for 7 days

Item ¹⁾	Dosage (mg/30 g)				
	0	10	16.3	25	37.3
TPROT (g/d ℓ)	5.3	5.6	5.7	5.8	5.8
ALB (g/d ℓ)	3.1	3.2	3.4	3.5	3.4
LDH (U/L)	1,392	354	504	552	594
AST (U/L)	67.9	78.9	104	79.6	63.3
ALT (U/L)	22.8	27.7	36.6	31.1	25.7
ALP (U/L)	90	80	110	117	127
GLU (mg/d ℓ)	186	181	195	232	211
CHOL (mg/d ℓ)	182	178	172	166	159
TRIG (mg/d ℓ)	176	168	160	155	147
CREAT(mg/d ℓ)	0.4	0.4	0.3	0.3	0.4
BUN (mg/d ℓ)	24.3	29.2	25.6	25.2	23.7
CPK (U/L)	5772	450	757	522	879
Ca (mg/d ℓ)	16.9	16.6	16.5	16.7	16.7
P (mg/d ℓ)	13	14.7	13.3	13.6	13.6
GGT (U/L)	6	0	0	2	1
Uric acid (mg/d ℓ)	4.8	4.2	3	3	3

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 47. Biochemical findings in female mice treated orally with Dangsirye for 7 days

Item ¹⁾	Dosage (mg/30 g)				
	0	10	16.3	25	37.3
TPROT (g/dℓ)	5.4	6	6	6	6.6
ALB (g/dℓ)	3	3	3.6	3.6	3.6
LDH (U/L)	443	390	461	388	299
AST (U/L)	361	100	152	117	154
ALT (U/L)	70.2	25	24.6	19.2	37.8
ALP (U/L)	114	138	174	150	150
GLU (mg/dℓ)	198	210	222	234	216
CHOL (mg/dℓ)	180	168	162	157	148
TRIG (mg/dℓ)	54	49	42	37	33
CREATIN (mg/dℓ)	0.6	0	0	0	0
BUN (mg/dℓ)	26	32	42	38	51
CPK (U/L)	201	171	300	204	151
Ca (mg/dℓ)	12	10	11	11	12
P (mg/dℓ)	13	12	12	12	12
GGT (U/L)	1	0	0	1	0
Uric acid (mg/dℓ)	2	2	3	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.

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

제 1 절 목표달성도

1. 1차년도

(점선: 계획, 실선: 달성도)

개발내용	구분		연구 개발 기간											결과(%)
	8	9	10	11	12	1	2	3	4	5	6	7		
제 1세부과제:														
○혈당강하 소재가 함유된 버섯균사체배양물 개발														
-버섯균 선발														
-최적배지조성 개발														
-최적배양조건 설정														
○버섯균사체 배양물로부터 유용소재의 추출 (버섯균사체배양 추출물) 및 분획														
-유용소재 추출 방법														
-유용소재의 분획 및 분리														
○버섯균사체배양물의 대량생산														
위탁과제:														
○혈당강하 소재가 함유된 버섯균사체배양 추출물의 효능검증시험														
-효소저해														
-동물 (단기 혈장조질)														
○버섯균사체배양 추출물 및 분획의 혈당저하능 실험														
-In vitro 실험 (효소저해)														
-In vivo 실험														
· 동물실험 (장기)														
· 임상실험 (단기)														
총진도율														100

2. 2차년도

(점선: 계획, 실선: 달성도)

개발내용	구분	연구 개발 기간											결과(%)	
		8	9	10	11	12	1	2	3	4	5	6		7
제 1세부과제:														
○ 버섯균사체배양 추출물 제조														100
○ 버섯균사체배양 추출물 분획														100
○ 유효성분 분리, 동정														100
위탁과제:														
○ 동물실험 - db/db mouse 장기실험														100
○ 임상시험 - 당뇨병환자의 혈당조절														100
○ 기전연구 - 소장의 소화효소 활성화 - GLUT4, insulin receptor 유전자 발현														100
협동과제:														
○ 혈당강하 효능성분 함유분획의 제품화(농축엑기스, 연질캡슐, 분말등)														100
총 진도율													100	

3. 3차년도

(점선: 계획, 실선: 달성도)

개발내용	구분												결과(%)
	연구 개발 기간												
	8	9	10	11	12	1	2	3	4	5	6	7	
제 1세부과제:													
○ 버섯균사체배양 추출물 제조													100
○ 버섯균사체배양 추출물 분획													100
○ 활성성분함유 분획물의 대량생산													100
○ 유효성분의 작용기전연구													100
위탁과제:													
○ 당뇨병자 대상 임상시험													100
○ 세포모델계에서 작용 메카니즘 규명													100
○ 통계처리													100
협동과제:													
○ 분리동정된 소재를 고농도로 함유하는 분획의 제품화 (정제 등)													100
총 진도율													100

제 2 절 관련분야 기여도

1. 기술적 측면

- 가. 혈당강하 소재를 다량 생산할 수 있는 버섯균, 배지조성 및 배양기술 개발이 개발되었다 (특허출원 및 기술이전)
- 나. 증가하고 있는 당뇨병환자가 지속적으로 복용할 수 있는 부작용이 없고 값이 저렴한 혈당강하 소재가 개발되었다.

2. 경제 · 산업적 측면

- 가. 개발된 기술의 이전에 따른 수익창출: 국내 당뇨병 치료제 시장 규모는 경구용과 인슐린 주사제를 포함하여 년 간 약 1,200억원 수준으로 이들의 약 5% 대체한다고 할 경우 약 60억원의 수익이 창출될 수 있다.
- 나. 수입되고 있는 혈당강하 소재의 대체로 인한 수입대체효과 창출: 현재 국내 당뇨병 치료제 시장은 거의 다국적 제약사가 거의 시장을 장악하고 있어 년 간 약 60억원의 수입대체 효과를 기대할 수 있다.
- 다. 농가소득의 증대: 버섯균사체배양물의 혈당강하 소재는 버섯자실체에도 함유되어 있기 때문에 버섯소비를 증가시켜 버섯재배농가의 소득이 증대될 수 있다 (10억원: 특정 버섯재배시장 (신령, 느타리, 동충하초)이 년 간 약 1,000억원 규모로 이의 1% 증대효과)).
- 라 국민건강 유지: 당뇨병환자가 본 연구에서 개발된 저가의 혈당강하 소재를 지속적으로 복용함으로써 건강을 유지할 수 있다.
- 마. 경제성 증대 효과: 우수한 당뇨병 치료제의 개발은 당뇨치료제의 수입 대체효과를 기대할 수 있다. 또한 원료 및 완제품의 수출로 외화획득을 할 수 있다. 당뇨병환자의 치유는 국민 경제활동을 촉진시켜 경제성 증대효과를 기대 할 수 있다.

제 5 장 연구개발결과의 활용계획

1. 버섯균사체를 이용하여 다른 생물전환된 기능성소재를 생산하는 방법으로 활용.
2. 가격이 저렴하고 부작용이 없는 당뇨치료제로 개발개발
3. 혈당강하 소재는 자료로 활용 (버섯자실체에도 함유되어 있기 때문)
4. 버섯의 항당뇨성 자료임을 홍보하여 버섯 소비촉진 자료로 활용

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술 정보

1. 우리나라에 뿐만 아니라 전 세계적으로 당뇨병환자 증가율이 지속적으로 증가하여 전세계적으로 당뇨치료제 개발에 많은 연구가 진행되고 있다.
2. 당뇨치료제의 개발은 합성물질 보다 가격이 저렴하고 부작용이 없는 천연물로부터 GLUT4 유전자 등의 발현을 증가시키는 물질을 개발하는 것이 중요하다는 사실을 알았다.
3. 당뇨치료제의 개발은 제1형 보다 제2형 동물모델을 활용하여 개발이 주로 이루어지고 있어, 앞으로 당뇨치료제를 개발 할 경우 2형 모델을 사용하여야 할 것이다.
4. 선진국에 비해 우리나라에서도 많은 과학자들이 당뇨치료제에 관한 연구를 수행하고 있다는 사실은 고무적이었다.

제 7 장 참고문헌

1. Akiyoshi, H., and Nakaya, Y. Effect of PKC on glucose-mediated insulin secretion in HIT-T15 cells. *J. Pancreas*, 1, 49-57 (2000).
2. Aman, P., and Graham, H. Analysis of total and insoluble mixed-linked (1→3),(1→4)- β -D-glucans in barley and oats. *J. Agric. Food Chem.*, 35, 704 (1987).
3. A.O.A.C. Official method of analysis. 14th ed. Association of official analytical chemist. Washington, DC., p 233 (1980)
4. Bradford, M.M. A Rapid and sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254 (1976).
5. Davies, G.F., Khandelwal, R.L., and Roesier, W.J. Troglitazone inhibits expression of the phosphoenolpyruvate carboxykinase gene by an insulin-independent mechanism. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1451, 122-131 (1999).
6. Gray, A.M., and Flatt, P.R. Insulin-releasing and insulin-like activity of *Agaricus campestris* (mushroom). *J. Endocrinology*, 157, 259-266 (1998).
7. Guillon, F., and Champ, M. Structural and physical properties of dietary fibres, and consequences of processing on human physiology. *Food Research International*, 33, 233-245 (2000).
8. Ha, A.W., and Kim, H.M. The study of lipid-peroxidation, antioxidant enzymes, and the antioxidant vitamins in NIDDM patients with microvascular-diabetic complications. *Korean J, Nutr.*, 32 (1), 17-23 (1999).

9. Jaouhari, J.T., Lazrek, H.B., Seddik, A., and Jana, M. Hypoglycaemic response to *Zygophyllum baetulum* extracts in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *J. Ethnopharm.*, 64, 211-217 (1999).
10. Jenkins, D.J.A., Wolever, T.M.S., Taylor, R.H., Barker, H., Feienden, H., Baldwin, J.M., Bowling, A.C., Newman, H.C., Kenkins, A.L., and Goff, D.V. Glycemic index of foods: A physiological basis for carbohydrate exchange. *Am J. Clin. Nutr.*, 34, 362 (1981).
11. Jordi Folch, Lees, M., and Sloane Stanley, G.H. A simple method for the isolation and purification of normal lipids from animal tissues. *J. Bio. Chem.* 497-509 (1956).
12. Jun, D.W., Kim, S.H., Lee, H.J., Choi, W.H., Park, Y.S., and Kim, T.H. Serum plasma leptin levels, abdominal obesity, and insulin resistance in type 2 diabetic patients. *한양대학병원 내과*, 216-224 (2000).
13. Lee, B.R., Cha, J.H., Park, J.Y., Park, Y.J., and Park, P.S. Effects of dietary restriction on the body weight and antioxidant enzymes in various organs of diabetic rats. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, 30 (3), 521-527 (2001).
14. Masato K. Cellular mechanisms of insulin action: Downstream effectors of PI-3 kinase. *Diabets (suppl)*, 24 (2), 32-33 (2000).
15. McCleary, B.V., and Holmes, G. Enzymic quantification of (1→3),(1→4)- β -Glucan in barley and malt. *J. Inst. Breu.*, 91, 285-295 (1985).
16. Park, S.H., and Lee, H.S. Effects of legume supplementation on the gastrointestinal function and diabetic symptoms in streptozotocin-induced diabetic rats. *Korean J. Nutr.*, 32 (6), 617-327 (1999).
17. Pazur J. H., Carbohydrate analysis. *A Practical Approach Second Edition.*, 295-317 (2000).

18. Ritzel U, Leonhardt U, Ottleben M, Ruhmann A, Eckart K, Spiess J, Ramadori G :
A synthetic glucagon-like peptide-1 analog with improved plasma stability. *J. Endocrin.* 150, 93-102 (1998)
19. Slaughter, S.L., Ellis, P.R., and Butterworth, P.J. An investigation of the action of porcine pancreatic α -amylase on native and gelatinised starches. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1525, 29-36 (2001).
20. Song, J.H., Yim, S.H., Han, B.G., Lee, H.K., Kim, Y.M., Park, K.S., and Suzuki, S. Decrease of mitochondrial DNA content in non-insulin dependent diabetic rat. *국립보건원 특수질환부 대사질환과*, 202-215 (2000).
21. Swanston-Flatt, S.K., Day, C., Flatt, P.R., Gould, B.J., and Balley, C.J. Glycaemic effects of traditional European plant treatments for diabetes. Studies in normal and streptozotocin diabetic mice. *Diabetes Research*, 10 (2), 69-73 (1989).
22. Torrance, C.J., Devente, J.E., Jones, J.P., and Dohm, G.L. Effects of thyroid hormones on GLUT4 glucose transporter gene expression and NIDDM in rats. *Endocrin.*, 138, 1204-1214 (1997).
23. Worsch, P., and PI-Sunyer, F.X. The role of viscous soluble fiber in the metabolic control of diabetes. A review with special emphasis on cereals rich in beta-glucan. *Diabetes Care*, 20 (11), 1774-1780 (1997).
24. 김덕희. 제1형 당뇨병의 진단 및 치료. *제5회 대한당뇨병학회 연수강좌*, 1-15.
25. 김성연. 약물과 당뇨병. *당뇨병*, 17 (2), 19-24 (1993).
26. 김용현, 오정현, 김난희, 최경목, 김상진, 백세현, 이용석, 김민철, 최동섭. 저용량 스트렙토조토신 유발 당뇨병 생쥐에서 인슐린 및 비타민 E 투여가 췌장 소도세포의 세포자연사 (Apoptosis)에 미치는 영향. *당뇨병*, 23 (6), 757-767 (1999).

27. 김윤수. Biochemistry of diabetes. **당뇨병**, 1 (1), 5-6 (1999).
28. 김은영, 김경원, 정규영, 최정호, 구영훈, 이형걸, 김미경, 최신영. 2형 당뇨병에서 당뇨병성 망막병증과 Plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) 및 Lipoprotein (a)와의 상관관계. **당뇨병**, 23 (4), 552-561 (1999).
29. 김웅진. Current therapy of diabetes with oral antidiabetogenic agents. **당뇨병**, 1 (1), 13-15 (2000).
30. 김인주. 새로 개발된 인슐린 제제들. 8-10 (2001).
31. 김종연, 김용운, 이석강, Streptozotocin-유도 당뇨병 흰쥐에서 수용체 및 수용체 후 과정의 인슐린 저항성의 기전. **당뇨병**, 15 (1), 53-62 (1991).
32. 박정현. 당뇨병 환자의 치료에 최근 새로이 사용되는 약물들. **Korean diabetes Assoc.**, 139-144 (1999).
33. 박중열. 당뇨병성 혈관기능이상의 발생에 있어 고혈당 및 인슐린저항성의 역할 (세포내 신호전달체계의 이상을 중심으로). **당뇨병**, 23 (3), 223-229 (1999).
34. 손현식. SHIP and insulin signaling pathways. **당뇨병**, 24 (2), 39-44 (2000).
35. 우정택. 한국인에서의 인슐린 비의존성 당뇨병과 유전. **제1회 대한당뇨병학회 연수강좌**, 45-53 (1996).
36. 이관우. G protein and insulin signalin. **당뇨병**, 24 (2), 34-38 (2001).