

발간등록번호

11-1543000-000249-01

간 기능 개선 효능을 갖는 오가피 발효물 소재 개발 및
산업화

(Development of *Acanthopanax* sp. -Mushroom Fermented
Materials for Liver Function Improvement)

(주) 휴 립

농 립 축 산 식 품 부

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “간 기능 개선 효능을 갖는 오가피 발효물 소재 개발 및 산업화” 과제의 보고서로 제출합니다.

2013 년 09 월 30 일

주관연구기관명 : (주) 휴 럽

주관연구책임자 : 조 주 현

세부연구책임자 : 조 주 현

연 구 원 : 백 순 옥

연 구 원 : 김 봉 균

연 구 원 : 박 성 환

연 구 원 : 최 수 정

연 구 원 : 김 진 영

위탁연구기관명 : 충북대학교 산학협력단

위탁연구책임자 : 김 경 아

요 약 문

I. 제 목

간 기능 개선 효능을 갖는 오가피 발효물 소재 개발 및 산업화

II. 연구개발의 목적

- (1) 오가피를 기질로 한 미생물 발효물로부터 간 기능 개선 효능을 갖는 소재를 개발하여 산업화
 - 가. 미생물 발효기술을 통해 얻은 오가피-발효물 소재의 표준화 확립 및 안정성 확보
 - 나. 오가피-발효물소재의 체계적인 효능평가(*in vitro*, *in vivo*, 인체실험)
 - 다. 오가피-발효물소재의 안전성 확보
 - 라. 간 기능 개선에 효능을 갖는 오가피-발효물의 개별인정 신청
 - 마. 간 기능 개선에 도움을 주는 오가피-발효물 소재를 이용한 제품개발 및 산업화

III. 연구개발 내용

- (1) 오가피-발효물소재로부터 간 기능 개선 소재 개발 및 생산
 - 가. 오가피-발효물소재의 표준화작업(지표성분 또는 유효성분 분석)
 - 나. 오가피-발효물소재의 안정성 확보(지표성분분석, 물리적, 화학적 특성검토 등)
 - 다. 오가피-발효물소재의 산업화를 위한 대량생산기술 확립 및 생산
- (2) 오가피-발효물소재의 유효성 및 안전성확보를 통한 간 기능 개선제품 소재개발
 - 가. 오가피-발효물소재의 간 기능 개선효과 평가(*in vitro/in vivo*)
 - 나. 오가피-발효물 소재의 안전성 확보
- (3) 오가피-발효물소재를 이용한 제품의 인체실험 및 개별인정신청
 - 가. 오가피-발효물 소재를 이용한 제품의 인체실험을 통한 효능 확인
 - 나. 간 기능 개선에 대한 오가피-발효물의 개별인정 신청
- (4) 오가피-발효물소재를 이용한 시작품제작 및 산업화
 - 가. 오가피-발효물소재를 이용한 시작품제작
 - 나. 시작품 : 음료형 병제품, 정제품 등

IV. 연구개발결과

- (1) 오가피-발효물 소재 개발
 - 가. 오가피-발효물(고체)의 최적배양조건 확립 및 소재개발
 - 나. 오가피-발효물(액체)의 최적배양조건 확립 및 소재개발
- (2) 오가피-발효물의 지표성분 및 주요성분 분석

가. 오가피-발효물의 Eleutheroside B와 Eleutheroside E 함량 분석

나. 오가피-발효물의 베타글루칸(β -glucan) 함량

다. 오가피-발효물의 지표물질 선정

(3) 오가피 발효물의 간 기능 개선 검토 (1) : *IN VITRO*

(4) 오가피 발효물의 간 기능 개선 검토 (2) : *IN VIVO*

가. 사염화탄소로 유도된 급성 및 만성 간 장애 모델에서 간 기능 개선 효과

나. D-galactosamine로 유도된 급성 간 장애 모델에서 간 기능 개선 효과

다. 지방간 모델에서 오가피 발효물의 간 기능 개선 효과

(5) 오가피 발효물의 안전성 확보(독성시험) : *IN VIVO*

가. 단회 및 반복 투여 독성 시험

(6) 시작품제작 및 품질관리

가. 1차시작품 : 캡슐제품, 병 음료 제품

나. 2차시작품 : 병 음료 제품, 정제품

(7) 인체적용시험

가. 인체적용시험 제품제작 및 품질관리

나. 간 기능 개선을 위한 인체적용시험

V. 연구성과 및 성과활용 계획

(1) 특허 및 논문

가. 특허출원 3건, 특허등록 1건

나. 국외논문 1편 게재, 국내논문 3편 게재확정, 국내논문 2편 투고 심사중,
학술발표 2건, 석사학위논문 2편

다. 국내·외 박람회 참가 및 홍보

라. 개별인정형 추진

(2) ㈜ 휴림의 유통 및 마케팅

(3) 오가피 발효물소재를 이용한 제품의 산업화

SUMMARY

I. Title

Development of *Acanthopanax* sp.-Mushroom Fermented Materials for Liver Function Improvement

II. Objective of research

- (1) Commercialization of *Acanthopanax* sp.-mushroom fermented materials for liver function improvement
 - A. Standardization and stability establishment of *Acanthopanax* sp.-fermented materials by microbial fermentation technique
 - B. Efficacy evaluation of *Acanthopanax* sp.-fermented materials(in vitro, in vivo, clinical study)
 - C. Safety establishment of *Acanthopanax* sp.-fermented materials
 - D. Application of individual recognition for *Acanthopanax*-fermented materials improving liver function
 - F. Commercialization and development of products used *Acanthopanax*-fermented materials improving liver function

III. Content of research

- (1) Development and production of materials improving liver function from *Acanthopanax*-fermented materials
 - A. Standardization of *Acanthopanax*-fermented materials(analysis of indicator ingredient or effective component)
 - B. Stability establishment of *Acanthopanax* sp.-fermented materials(analysis of indicator ingredient, analysis of physical and chemical Characteristics)
 - C. Production and mass production technique establishment for Commercialization of *Acanthopanax* sp.-fermented materials
- (2) Development of producement improving liver function via establishment of effectiveness and safety
 - A. Efficacy evaluation for improving liver function of *Acanthopanax* sp.-fermented materials(*in vitro/in vivo*)
 - B. Research for mode of improving liver function action of *Acanthopanax* sp.-fermented materials
 - C. Establishment of safety of *Acanthopanax* sp.-fermented materials
 - D. A trial product production used *Acanthopanax* sp.-fermented materials

- (3) Application of individual recognition and clinical study of production used *Acanthopanax* sp.-fermented materials
 - A. Efficacy evaluation via clinical study of production used *Acanthopanax* sp.-fermented materials
 - B. Application of individual recognition for *Acanthopanax*-fermented materials improving liver function

IV. Results

- (1) Development of *Acanthopanax* sp.-fermented materials
 - A. Establishment of optimum culture condition for *Acanthopanax* sp.-fermented product(solid) and development of materials
 - B. Establishment of optimum culture condition for *Acanthopanax* sp.-fermented product(liquid) and development of materials
- (2) Analysis of indicator and principal ingredients in *Acanthopanax* sp.-fermented product
 - A. Analysis of content for Eleutheroside B and Eleutheroside E in *Acanthopanax* sp.-fermented product
 - ㄱ. Analysis of content for β -glucan in *Acanthopanax* sp.-fermented product
 - ㄷ. selection of indicator ingredients in *Acanthopanax* sp.-fermented product
- (3) Study of improving liver function of *Acanthopanax* sp.-fermented product : IN VITRO
- (4) Study of improving liver function of *Acanthopanax* sp.-fermented product : IN VIVO
 - A. The hepatoprotective effect of *Acanthopanax* sp.-fermented product in carbon tetrachloride induced acute and chronic hepatitis model
 - B. The hepatoprotective effect of *Acanthopanax* sp.-fermented product in D-galactosamine induced acute hepatitis model
 - C. The hepatoprotective effect of *Acanthopanax* sp.-fermented product in fatty liver model
- (5) Establishment of safety for *Acanthopanax* sp.-fermented product(toxicity test) : IN VIVO
 - A. Single- and repeat-dose toxicities test
- (6) A trial product production and quality control
 - A. Capsule producement
 - B. Drink producement
- (7) Clinical study

- A. Clinical study product production and quality control
- B. Clinical study for improving liver function

V. Accomplishment and its application plan

(1) Patent and paper

- A. Three patent application, one patent registration
- B. One foreign paper publication, five domestic paper submission, two academic publication, two master's thesis
- C. Participation of foreign and domestic exposition
- D. Application of individual recognition

(2) distribution and marketing of Hurum Co., Ltd.

(3) Commercialization of producement used *Acanthopanax*-fermented materials

CONTENTS

(영 문 목 차)

Chapter 1. INTRODUCTION

Chapter 2. STATE OF DOMESTIC AND FOREIGN ART

1. Domestic state
2. Foreign state

Chapter 3. CONTENT AND RESULTS OF RESEARCH

1. Research contents
2. Results

Chapter 4. ACHIEVEMENT OF OBJECTIVE

1. Achievement
2. Contribution to related fields

Chapter 5. APPLICATION OF RESULTS

1. Commercialization plan
2. Patent and paper
3. Application of individual recognition
4. Additional research and others research plan
5. The Others(exposition, etc.)

Chapter 6. INFORMATION OF FOREIGN SCIENCE

1. State of foreign health functional food technology

Chapter 7. STATE OF RESEARCH FACILITY AND EQUIPMENT

Chapter 8. REFERENCES

목 차

- 제 1 장 연구개발과제의 개요
- 제 2 장 국내외 기술개발 현황
 - 제 1 절 국내 기술개발 현황
 - 제 2 절 국외 기술개발 현황
- 제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과
 - 제 1 절 연구수행내용
 - 제 2 절 연구수행 결과
- 제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도
 - 제 1 절 연구개발목표의 달성도
 - 제 2 절 관련분야 기술발전 기여도
- 제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획
 - 제 1 절 실용화계획
 - 제 2 절 특허 및 논문
 - 제 3 절 개별인정형 신청
 - 제 4 절 추가연구 및 타 연구에 활용계획
 - 제 5 절 기타(박람회 참가 등 홍보)
- 제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보
 - 제 1 절 해외 건강기능식품기술 동향
- 제 7 장 연구시설·장비 현황
- 제 8 장 참고문헌

제 1 장 연구개발과제의 개요

제 1 절 연구개발의 필요성

1. 기술적인 측면(본 기술개발의 차별성 포함)

- 가. 건강과 관련된 보건산업에 대한 수요증가에 따라 세계 각국과 경쟁 할 수 있는 특성화된 기술력 확보에 큰 관심을 보이고 있으며, 또한 집중적인 투자가 이루어지고 있는 실정임. 특히 이 중에서도 건강기능식품분야의 경우, 생명공학기술 접목을 통한 경쟁력 강화는 물론이고 시장경쟁에서 우위를 점 할 수 있어 지속적인 연구가 이루어지고 있음.
- 나. 이에 본 연구진에서도 생명공학기술 중에 하나인 미생물발효기술을 이용하여 관련시장에서 우위를 점할 수 있으며, 차별화가 가능한 새로운 소재 개발에 대한 연구를 체계적으로 수행해오고 있으며, 이 중에서 오가피 기질로 버섯균주를 발효시킨 오가피-발효물(가시오가피-발효물; 이하 오가피-발효물)에 대해 간 기능 개선 효능을 갖는 소재개발에 관한 연구개발이 필요하게 되었음.
- 다. 본 연구진이 수행하는 오가피-발효기술의 특징은 첫째 오가피를 이용하여 신소재를 개발하기 위한 발효기술 공정은 천연물 소재를 고부가가치 소재로 개발하는데 다양하게 이용되고 있는 기술이며, 특히 본 연구에 사용한 미생물인 균류(약용버섯)의 경우 한국, 일본, 중국 등 아시아에서 주로 연구되는 분야로 오가피-발효기술에 대한 체계적인 연구를 통한 기술의 선점은 물론이고, 관련시장을 개척하는데 유용할 것으로 판단되는 기술이며, 둘째 오가피 발효기술은 고체발효기술과 액체발효기술로 나누어지며, 고체 오가피-발효기술은 순수하게 천연 오가피만을 천연배지로 사용하여 발효공정을 진행하는 것을 특징으로 하는 기술로, 오가피를 천연배지로 하여 영지버섯, 노루궁뎅이버섯 및 상황버섯 등의 약용버섯균을 고체 배양하는 과정을 거쳐 발효물을 수득하는 것을 특징으로 하는 기술이며, 액체 오가피-발효기술은 오가피추출물과 동아를 천연배지의 원료로 하여 발효공정을 진행하는 것을 특징으로 하는 기술로, 영지버섯, 노루궁뎅이버섯, 상황버섯, 밀리타리스 동충하초, 자포니카 동충하초, 아가리쿠스버섯 등의 약용버섯균을 액체(BIO-REACTOR) 배양하는 과정을 거쳐 발효물을 수득하는 것을 특징으로 하는 기술로 본 기술개발에 적용하고자 하였음.
- 라. 본 오가피-발효기술의 경우 『발효기술을 통한 휴럼 만의 특화된 소재 개발』로 체계적인 연구가 이루어지면, 그 응용분야가 다양할 것으로 기대된다. 우선적으로 본 연구과제의 최종목표인 오가피-발효물 소재를 간 기능을 개선시켜주는 건강식품 및 건강기능식품으로 이용이 가능하며, 또한 오가피-발효물 소재에 대한 추가 연구를 통하여 다양한 기능성 표현이 가능할 것으로 기대되어진 것으로 기술개발의 필요하였음.

2. 경제적 및 사회적 측면

- 가. 의·약학의 발달은 의·약학에 관련된 개념을 변화시켰고 의료도 질병을 중심으로 개체를 대상으로 질병을 진단하고 치료하는 협의의 뜻에서 질병예방, 건강증진 및 재활까지 포함하여 인간의 건강문제를 인식하고 해결하는 현대적 개념인 포괄적 보건의료로 바뀌

있음. 포괄적 보건의료는 개체를 대상으로 하는 광의의 의료개념으로 종래의 치료의학 위주에서 예방의학, 재활의학 및 보건증진의 학문으로 발전해가고 있으며, 그 대상도 개인의 치료에서 지역사회 인구집단의 보건의료로 확대되어가고 있음.

- 나. 이와 같은 시대상황에 맞추어 건강기능식품은 질병예방의 목적으로 건강보호를 추구함으로써 국민의 의료비 부담을 절감하는 차원에서 중요한 문제로 대두되고 있으며, 미국이나 유럽 등 선진국도 치료의학보다 예방의학을 중시하면서 건강 기능성식품을 육성하고 소비자들이 질병예방에 적극 활용하도록 하고 있음.
- 다. 이러한 세계적 추세에 따라 보다 과학적이고 체계적인 효능 및 효과를 검증하는 것이 중요하며, 특히 천연물을 이용한 신소재로 활용 및 개발을 촉진함으로써, 장기적으로는 소재의 활용을 통한 1차 산업의 활성을 기대하며, 궁극적으로는 국내 건강기능식품산업을 육성하여 경쟁력을 키울 수 있음.
- 라. 이러한 세계적 추세에 따라 보다 과학적이고 체계적인 효능 및 효과를 검증하는 것이 중요하며, 특히 천연물을 이용한 신소재로 활용 및 개발을 촉진함으로써, 장기적으로는 소재의 활용을 통한 1차 산업의 활성을 기대하며, 궁극적으로는 국내 건강기능식품산업을 육성하여 경쟁력을 키울 수 있음.
- 마. 우리나라의 40대 성인남자의 사망률이 세계1위로 그 주 사망원인이 만성질환으로 알려져 있으며, 특히 간질환의 경우, 한국인 남성의 사망원인 중 1위로 간염으로부터 시작되는 간경변과 간암으로 인한 사망이며, 현재 뚜렷한 치료제가 없는 질환이며 대중적인 치료만이 가능한 상태이며, 간 질환은 약물 작용부위가 손상된 간이고 장기간 약물 투여가 필수적이므로 유기화학제품보다는 인체에 무해하고 부작용이 적은 천연물질로부터 개발하는 것이 매우 필요한 실정임.
- 바. 이러한 간 관련 질병은 치료도 중요하겠지만 앞에서 서술한 바와 같이 예방차원에서 건강기능식품을 복용하는 것이 중요하다고 판단되어짐.
- 사. 이에 경제적 및 사회적인 관점에서 본 연구과제의 최종목표는 미생물을 이용한 발효기술을 통하여 간 기능 개선 효능을 갖는 소재개발 및 제품화함으로써 다양한 간과 관련된 질병을 예방하고, 치료를 보조하는 데 기여하는 것이며, 또한 질병예방 및 치료보조 기여에 따른 사회적 측면에 기여하는 것은 물론이고 이로 인한 질병예방을 통한 경제인구의 손실을 억제함으로써 경제적 측면에 기여하는 것을 목표로 하여 본 기술개발이 필요하였음.

2. 경제적 및 사회적 측면

- 가. 전국적으로 *Acanthopanax senticosus*(RUPR. et MAX.) HARMS(가시오갈피나무), *Acanthopanax senticosus* var. *subinermis* KITAGAWA(왕가시오갈피나무), *Acanthopanax sessiliflorus* (RUPR. et MAX.) SEEM.(오갈피나무), *Acanthopanax chiisanense* NAKAI(지리산오갈피나무), *Acanthopanax koreanum* NAKAI(섬오갈피나무), *Acanthopanax rufinerve* NAKAI(털오갈피나무), *Acanthopanax seoulense* NAKAI(서울오갈피나무), *Acanthopanax sieboldianum* MAKINO(오가나무) 등이 많은 양이 오가피가 재배되고 있으며, 특히 제주도의 경우 2000년대 들어서면서 섬(한라산)오가피를 대량 재배 되었으나. 그 활용이 미

비한 실정임.

- 나. 이에 산업적인 관점에서 본 연구과제의 최종목표는 간기능 개선 효능을 갖는 오가피-발효물 소재 개발을 통한 산업화를 추진함으로써, 관련기업의 매출 창출과 이에 따른 원료소재인 오가피의 사용량이 증대되어 궁극적으로 관련 농(임)산업의 발전에 이바지함과 동시에 생산농가의 이익창출을 기대됨.
- 다. 본 연구과제의 기술개발에 대한 산업화 시 매출창출이 기대되어지는 것은, 체계적인 연구를 통한 산업적으로 경쟁력 있는 특화된 우수한 소재 개발이 가능한 점, 개별인정을 통한 건강기능식품의 간 기능 개선분야 시장진입이 가능한 점, 특히 E-mart, 롯데마트 등 할인마트와 휴림 건강전문대리점(60호점)등 다양한 판매/유통망을 가지고 있어 매출창출이 기대되는 점임.

제 2 절 연구개발 목표 및 내용

1. 연구개발목표

가. 연구개발 최종목표 :

오가피를 기질로 한 미생물 발효물로부터 간 기능 개선 효능을 갖는 소재를 개발하여 체계적인 효능을 검토한 후 시작품을 제작하여 산업화를 추진하는 것.

나. 연구개발 세부적인 목표

- (1) 미생물 발효기술을 통해 얻은 오가피-발효물 소재의 표준화 확립 및 안정성확보
- (2) 오가피-발효물소재의 체계적인 효능평가(*in vitro*, *in vivo*)
- (3) 오가피-발효물소재의 안전성 확보
- (4) 오가피-발효물소재의 인체적용시험을 통한 효능검토 및 안전성확보
- (5) 간 기능 개선에 효능을 갖는 오가피-발효물의 개별인정 신청
- (6) 간 기능 개선에 도움을 주는 오가피-발효물 소재를 이용한 제품개발 및 시작품제조를 통한 산업화 추진

2. 연구개발내용

가. 오가피-발효물소재로부터 간 기능 개선 소재 개발 및 생산

- (1) 오가피-발효물소재의 최적발효조건 확립(최적배지조건 확립 등)
- (1) 오가피-발효물소재의 표준화작업(지표성분 분석 등)
- (2) 오가피-발효물소재의 안정성확보(가속시험 및 장기안정성시험 등)
- (3) 오가피-발효물소재의 산업화를 위한 대량생산기술 확립 및 생산

나. 유효성 및 안전성개발을 통한 간 기능 개선제품 개발

- (1) 발효물소재의 간 기능 개선효과 평가 : *In Vitro* test (양성대조군과 비교)
- (2) 발효물소재의 간 기능 개선효과 평가 : *In Vivo* test (양성대조군과 비교)
- (3) 발효물 소재의 안전성(독성)확보 : 단회 및 반복(4주)투여 독성

다. 발효물소재를 이용한 제품의 인체적용시험 및 개별인정신청

- (1) 오가피-발효물 소재를 이용한 제품의 인체시험을 통한 효능 확인
- (2) 간 기능 개선에 대한 오가피-발효물의 개별인정 신청

라. 발효물소재를 이용한 제품의 시작품제작 및 산업화추진

- (1) 발효물 소재를 이용한 시작품 제작
- (2) 산업화 추진

제 2 장 국내외 기술개발 현황

제 1 절 국내 기술개발 현황

1. 국내특허 현황

가. 연도별분류 : 간 기능 개선과 관련된 국내특허는 1986년도 1건을 시작으로 하여 2007년도까지 총 61건이 조사되었으며, 1992년도부터 1999년도 까지 매년 2~3건의 특허가 출원되었으며, 2000년도부터는 4건 이상 꾸준히 출원되고 있어 간 기능 개선과 관련된 꾸준한 연구가 이루어지고 있음.

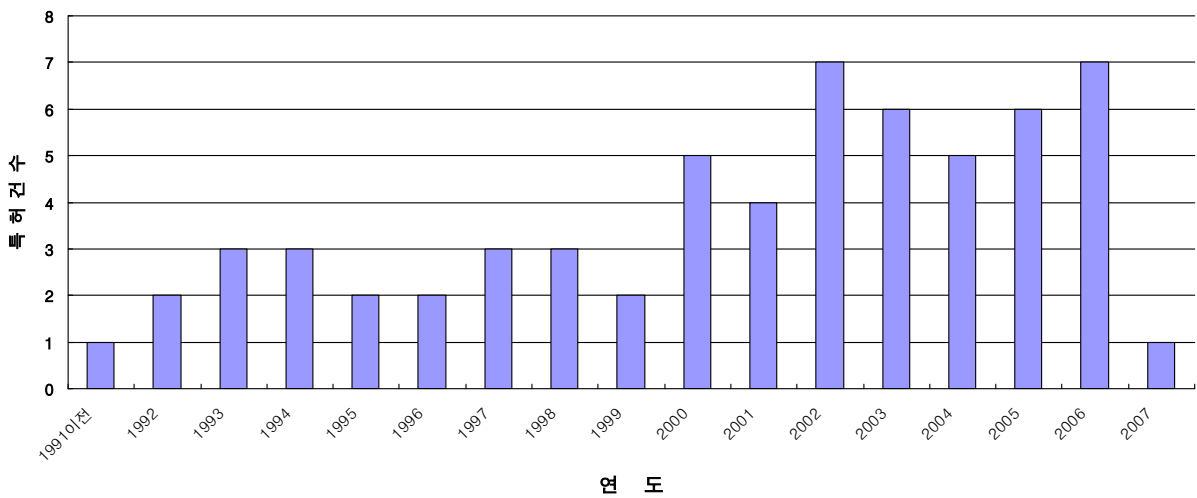


Fig. 2-1. 간 기능 개선 관련 국내특허 현황

나. 용도별분류 : 간 기능 개선과 관련된 61건의 국내특허 중 식품의 이용성에 관한 특허가 44건이며, 의약품으로 이용하는 것은 17건으로 조사되었음.

다. 소재 : 운지버섯, 인진쑥, 헛개나무, 땃땃이나무, 손바닥선인장, 오가피, 차가버섯, 아카시아나무, 갈화, 홍삼, 생맥산(오미자, 맥문동, 인삼), 동충하초, 키틴, 밀크씨즐, 결명자, 표고버섯, 오미자, 갈근, 감초, 황기, 다래, 음나무수피, 구름버섯, 영지버섯, 칩 등의 소재를 1개 또는 혼합추출물을 이용한 소재로의 이용성임.

라. 오가피 관련 국내특허는 총 39건으로 5건의 조직배양과 관련된 특허를 제외하고는 생리활성을 기반으로 한 가공[식품 및 화장품]에 관한 것임.

2. 간 기능 개선 소재에 대한 논문 현황

가. 간 기능 개선과 관련하여 국내학술지에 게재된 논문의 경우 총 62편으로, 1990년도 이전에 5편, 1991~2000년에 31편, 2001~2008년에 26편으로 조사되어 1990년도 후반에 가장 활발한 연구가 진행되었음.

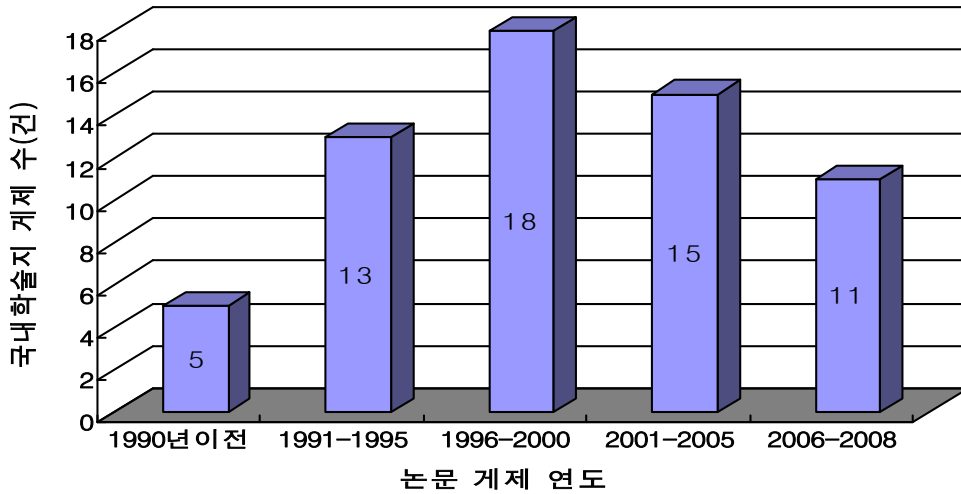


Fig. 2-2. 간 기능 소재에 대한 국내논문 현황

나. 분야별로는 천연물소재에 대한 간 기능 개선효과에 대한 연구가 76%로 가장 많이 이루어졌으며, 한방처방전을 이용한 간 기능 개선효과에 대한 연구가 5%, 기타(침 등) 연구가 19%로 조사되었음.

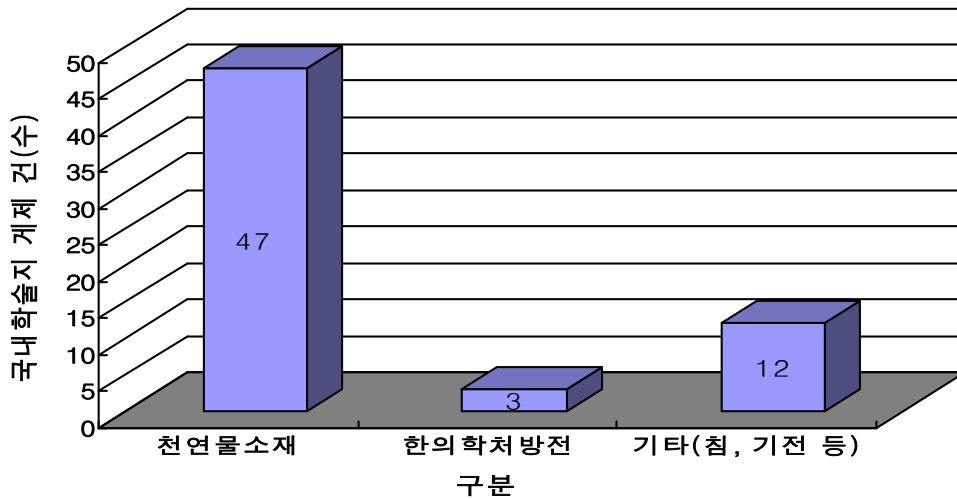


Fig. 2-3. 분야별 국내논문 현황

다. 간 기능 개선효과를 검토 한 천연물소재로는 갈근, 미나리, 동충하초, 울금, 영지버섯, 쑥, 시호, 오디, 당귀, 도라지, 표고버섯, 황기, 대추 등으로 다양하게 연구가 진행되었음.

3. 오가피 소재에 대한 논문 현황

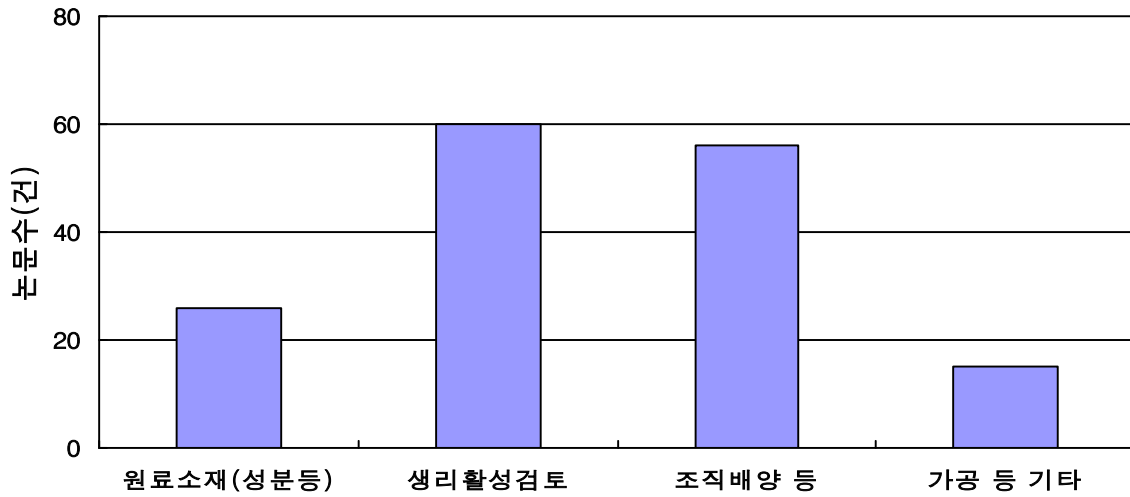


Fig. 2-4. 국내학술지 논문분석 : 한국과학기술정보원 자료조사의회 data 인용(2008,2)

- 가. 가시오가피 관련 국내 제출된 논문 건수는 157건으로[한국과학기술정보원, 2008], 크게 원료소재의 특성, 생리활성, 조직배양 등 품종에 관한 연구, 가공 등으로 구분하여 조사한 결과, 생리활성검토에 대한 연구가 60건으로 가장 높았으며, 그 다음으로는 세포배양 또는 조직배양에 대한 연구가 56건을 차지하였음.
- 나. 생리활성에 대한 연구로는 추출물의 항산화활성, 지구성운동에 미치는 효과, 다당체의 항암활성, 항돌연변이 효과, 비만세포의 의존적 알레르기 억제효과, 당뇨유발억제효과, 관절염에 미치는 효과, 다당체의 항종양면역유도 등에 관한 연구가 진행되었음.
- 다. 조직배양에 관한연구로는 생물반응기에 의한 가시오가피 유식물체 대량증식에 대한 연구, 부정근의 대량배양, 다 결실 우량개체 선발 및 재배법개발, 품종육성 등에 관한 연구가 진행되었음.

제 2 절 국외 기술개발 현황

1. 국외특허 현황

가. 연도별 분류 :

- (1) 간 기능 개선소재와 관련된 해외특허: 미국특허가 13건, 일본특허가 56건으로 조사
- (2) 미국특허의 경우 대부분 2000년대 초반에 특허를 출원한 것으로 조사되었음.
- (3) 일본특허의 경우, 1990년도부터 꾸준한 연구가 진행되어왔으며, 2000년대 초반에 가장 활발한 연구가 진행되었음.

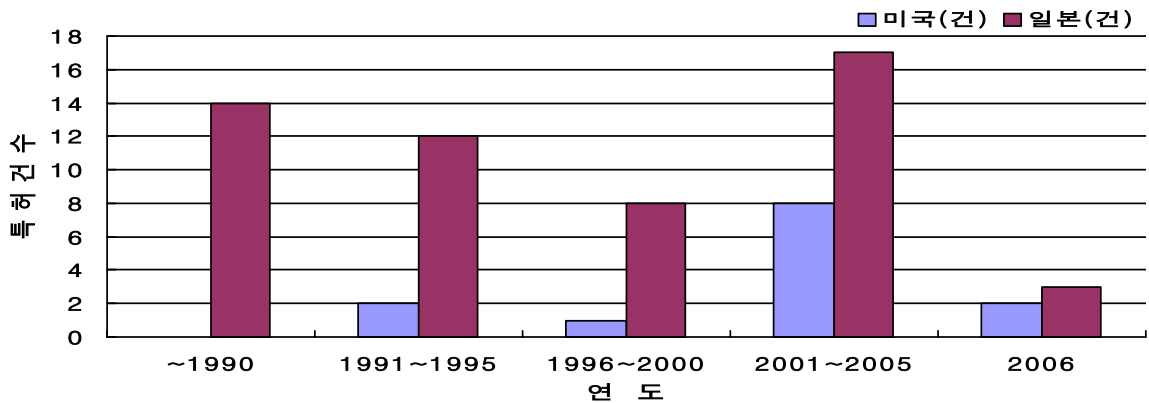


Fig. 2-5. 간 기능 개선소재 관련 국외특허 현황

나. 용도별 분류

- (1) 미국특허 13건 중 식품으로의 이용성이 5건이며, 의약품에 대한 이용성이 7건으로 조사되었음.
- (2) 일본특허 총 56건 중 식품으로의 이용성이 36건이며, 의약품으로의 이용성이 20건으로 조사되었음.

다. 소재별 분류

- (1) 미국특허의 경우, 아카시아, 복합한약제, 복합추출물(밀크씨즐외), lactoferrin, 간기능 개선조성물(셀레늄, 밀크씨즐외), 감초엑스 등
- (2) 일본특허의 경우, 간기능조성물(유산균, 토마토추출물, 브로컬리추출물 외), 우콘, 아가리쿠스버섯, 아스파라거스, 엉겅퀴, 리놀렌산, 느릅나무, 엉겅퀴종자추출물, 옥수수 단백질, 수용성포테이토펙타이드, 젯산발효물, 채소스테롤, 은행나무추출물 등

라. 오가피 소재에 대한 특허 현황

- (1) 오가피 관련 해외특허는 104건으로 가공 등 기타에 대한 특허가 50건으로 가장 많았으며, 그 다음으로는 생리활성을 통한 특허에 관한 연구가 28건임. 나라별로는 일본특허가 70건으로 가장 많았으며, 국제특허가 14건, 미국특허가 13건, 유럽특허가 7건으로 조사됨.

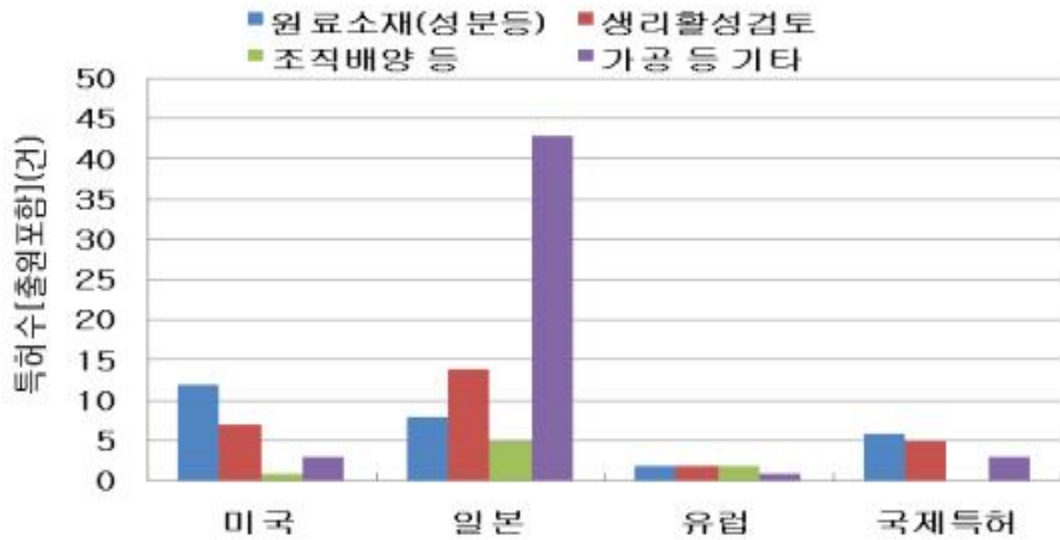


Fig. 2-6. 오가피 소재 관련 국외특허 현황

2. 간 기능 개선 소재에 대한 논문 현황

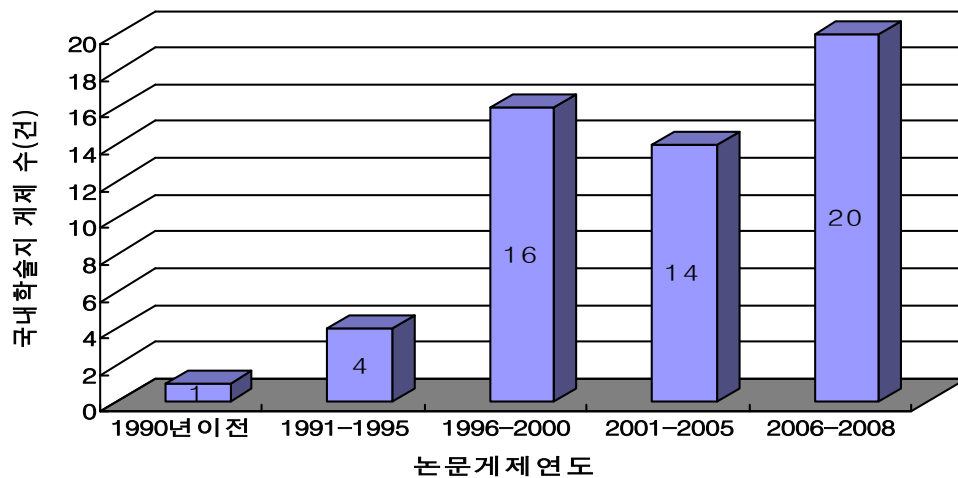


Fig. 2-7. 간 기능 개선 관련 국외논문 현황

가. 간 기능 개선과 관련하여 해외학술지에 게재된 논문의 경우 총 55편으로, 1990년도 이전에 1편, 1991~2000년에 20편, 2001~2008년에 34편으로 조사되어 1990년도 후반부터 최근까지 활발한 연구가 진행되고 있음.

나. 간 기능 개선효과에 대한 식품소재로의 이용성에 대한 연구는 물론이고 의약 및 약학 등에 가까운 연구 등 다양하게 이루어지고 있으며, 연구소재로는 genistein, melatonin, 동충하초, CLA 등이 진행되었음.

3. 오가피 소재에 대한 논문 현황

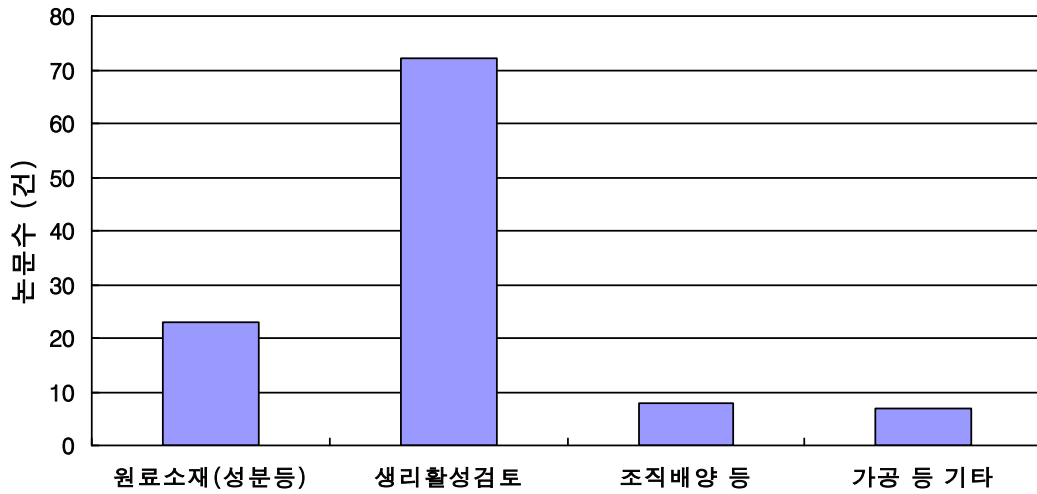


Fig. 2-8. 해외학술지 논문분석 : 한국과학기술정보원 자료조사의뢰 data 인용(2008,2)

- 가. 가시오가피 관련 해외학술지에 검색된 논문 건수는 110건으로[한국과학기술정보원, 2008], 크게 원료소재의 특성, 생리활성, 조직배양 등 품종에 관한 연구, 가공 등으로 구분하여 조사한 결과, 생리활성검토에 대한 연구가 72건으로 가장 높았으며, 그 다음으로는 소재(분리, 성분)에 대한 연구가 23건을 차지하였음.
- 나. 생리활성에 대한 연구로는 가시오가피로부터 트리터페노이드 사포닌의 활성, 지방간에 대한 연구, insulin resistance 개선에 관한 연구, 항암활성에 대한 연구 등에 관한 연구가 진행되었음.
- 다. 가시오가피의 소재에 관한 연구로는 가시오가피로부터 glycoprotein의 분리 등에 관한 연구가 진행되었음.

제 3 장 연구 개발 수행 내용 및 결과

제 1 절 연구수행내용

1. 오가피 발효물 소재 개발

가. 계획

(1) 개발목표

- (가) 간 기능 개선 효능을 갖는 소재로 활용하기 위하여, 순수한 오가피를 기질로 약 용버섯을 배양한 고체 발효물 소재를 개발하고자 함.
- (나) 또한 고체발효물소재의 최적배양조건확립 후에 오가피-발효물소재를 간기능 개선 효능을 갖는 산업화 소재로 활용하기 위하여, 대량배양시설에서 최적배양조건을 확보하고자 함.
- (다) 그리고 오가피 추출물을 이용한 액체발효물 소재를 개발하여 추후에 사용하고자 함.

(2) 개발내용

- (가) 오가피(줄기, 잎 등을 조합하여 최적조건 확립) 기질로 한 오가피-영지버섯발효물, 오가피-노루궁뎅이버섯발효물 및 오가피-상황버섯발효물 3종 시료를 확보하고자 함.
- (나) 오가피 발효물소재를 실험실내 성장상이 아닌 산업화를 위한 배양시설에서 대량 배양조건을 확립하고자 하는 것으로, 오가피-발효물 소재에 대한 최적배양조건을 통한 발효물을 확보하는 것.
- (다) 오가피 열수추출물을 이용하여 액체발효물소재를 확보하고자 함. (오가피 추출물과 천연물 및 천연물 추출물을 이용한 액체발효를 추진)

나. 연구수행방법

(1) 오가피-발효물(고체)의 최적배양조건 확립

- (가) 최적배양조건 확립방향 : 오가피-발효물의 최적배양조건을 확립하고자 하는 방향은 오가피 생산량의 대부분을 차지하는 것은 물론이고 원가 등 산업적인 경쟁력 등을 고려하여, 오가피 줄기를 주 기질로 하는 최적배양조건을 확립하고자 하였으며, 선행적으로 이루어진 연구사항 중 본 연구진이 보유한 균주특성 등에 대한 연구는 아래에 기술하지 않았음.

(나) 수행방법

- ① 균주 및 재료 : 본 연구에서 공시균주로 사용한 영지버섯(*Ganoderma lucidum*, KCTC 6729), 상황버섯(*Phellinus linteus*, KCTC 6719)은 생물자원센터 유전자은행으로부터 분양받아 사용하였으며, 노루궁뎅이버섯(*Hericium erinaceum*)의 경

우 충주대학교 식품공학과(Jeungpyeong, Korea)에서 분양받아 사용하였다. 각각의 균주를 본 연구에 사용하기 위하여 potato dextrose agar(PDA, Difco, USA) 배지에서 15일 간격으로 계대 배양하여 보관하면서 사용하였다. 각 균주를 접종할 기질로 사용하기 위해 오가피 줄기와 잎(강원도 원주)은 2010년도에 채취한 것을 구입하여 사용하였음.

- ② 버섯균주별 배양조건 및 종균제조 : 영지버섯, 상황버섯 종균(전배양액) 제조는 PDA 배지에 접종하고 28°C 에서 7일간 배양한 후 cork borer(φ 8 mm)로 절취하여 균주디스크를 만들어 potato dextrose broth(PDB, Difco, USA) 배지가 100 mL씩 분주되어 있는 삼각플라스크에 5~6개의 균주디스크를 접종하여 6일간 진탕배양(SI-400R, JEIOTECH, Korea)한 다음 분쇄기(Waring, USA)로 균질화하여 다시 PDB 배지가 100 mL씩 분주되어 있는 삼각플라스크에 9 mL를 접종하여 5일간(상황버섯은 6일) 배양하여 종균으로 사용하였다. 또한 노루궁뎅이버섯은 상기와 같은 방법으로 제조하되 배양온도를 24°C로 하였으며, 종균으로 사용하기 위한 배양일수는 6일임.
- ③ 오가피 천연배지 제조방법 : 오가피는 마쇄 단계를 거쳐 균일한 크기의 분쇄물을 얻은 후, 선행연구를 통하여 얻은 최적수분함량이 $63 \pm 3\%$ 가 되도록 정제수를 투입하고 121°C 에서 20분간 1차 멸균한 다음 배양이 진행될 배양용기에 혼합비율(줄기:잎)로 혼합하여 넣은 후 121°C 에서 30~40분간 2차 멸균을 실시하였다. 멸균 후 온도를 25°C 까지 급랭시켜 천연배지로 사용하였음.

(다) 컬럼테스트를 통한 1차 오가피 배지의 최적배양조건 확립 :

- ① 최적배지 배양조건을 확립하기 위하여, 오가피(줄기, 잎)를 천연배지로 버섯균사체를 배양 할 때에 오가피 줄기와 잎의 혼합비율에 따라 배양된 버섯균사체의 조밀도, 배양속도 등을 측정하였음.
- ② 오가피 줄기와 잎의 혼합비율은 아래의 Table 3-1과 같이 천연오가피배지를 제조하여 1차 멸균을 한 다음, 배양용 시험관(column, φ 35mm)에 일정량을 채우고 시험관을 실리스토퍼로 막은 후 121°C 에서 20분간 2차 멸균을 실시한 후 오가피 배지를 25°C 까지 급랭시켰음. 이것을 천연배지로 하여 각각의 버섯종균을 9%씩 접종하고 각각의 최적배양온도(영지버섯과 상황버섯은 28°C, 노루궁뎅이버섯은 24°C)에서 배양하며 24시간 마다 관찰하여 버섯균사체별 오가피 줄기와 잎의 비율에 대한 최적 배양조건을 확립하고자 하였음.
- ③ 버섯균사체별 혼합비율조건 시험관 중 2개 이상의 혼합조건에서 70% 이상 성장할 경우까지 상대적인 시험을 실시하여 1차적으로 버섯균사체별 가시오가피 줄기와 잎의 비율에 대한 최적 배양조건을 확인하였음.

Table 3-1. 최적배양조건확립을 위한 컬럼테스트 오가피 줄기와 잎 혼합비율

조 건	오가피 천연배지 혼합비율(%)	
	오가피 줄기	오가피 잎
1	100	0
2	80	20
3	60	40
4	40	60
5	0	100

(라) 배양포트 배양을 통한 2차 오가피 최적배지배양조건 확립 :

- ① 오가피의 줄기와 잎의 혼합비율에 따라 제조된 배지에 배양되는 3종의 버섯균 사체의 성장속도 및 균사의 조밀도 등을 관찰하여 최적배지배양조건을 확립하고자 하였음.
- ② 방법은 컬럼테스트에서 실시한 조건인 Table 3-2와 같이 5종류의 혼합비율로 배지를 제조하였다. 배양포트(500ml용량)에 2/3를 채우고 121℃에서 30분간 멸균을 실시한 다음 오가피 배지를 25℃까지 급랭시켜서 천연배지로 사용하였다. 이 천연배지에 각각의 버섯종균을 9%씩 접종하고 각각의 최적배양온도(영지버섯과 상황버섯은 28℃, 노루궁뎅이버섯은 24℃)에서 배양하며 24시간 마다 관찰하여 버섯균사체별 오가피 줄기와 잎의 혼합비율에 대한 최적배지배양조건을 확립하고자 하였음.

Table 3-2. 최적배양조건확립을 위한 실험용배양포트 오가피 줄기와 잎 혼합비율

조 건	오가피 천연배지 혼합비율(%)	
	오가피 줄기	오가피 잎
1	100	0
2	80	20
3	60	40
4	40	60
5	0	100

(마) 오가피-발효물(고체)의 대량배양 최적배양조건 확립

- ① 대량배양 조건 확립방향 : 오가피 발효물의 대량배양조건을 확립하고자 하는 방향은 산업화소재로 적용가능성 여부를 확인하고자 하는 것으로, 1차년도 실험실 내 기기인 성장상(Growth Chamber)에서 이루어진 최적배양조건이 산업화에 적합한 온습도가 자동조절 가능한 배양시설에서 대량배양을 진행하였음. 본 연구진이 사용한 대량배양시설은 고체발효를 위해 시설된 첨단배양시설로 (주)휴림과 협력체계를 구축하고 있는 기관에서 수행하였음.

- ② 수행방법 : 오가피(줄기와 잎)는 절단 및 분쇄 단계를 거쳐 균일한 크기의 분쇄물을 얻은 후, 각각 버섯균의 최적배양조건비율(영지버섯은 오가피의 줄기와 잎의 비율이 80:20, 노루궁뎅이버섯과 상황버섯은 50:50 비율)로 혼합한 다음 최적 수분함량이 63±3%가 되도록 정제수를 투입하고 121℃에서 40분간 1차 멸균한 다음 각각의 버섯종균을 접종한 다음 각각의 최적배양온도(영지버섯과 상황버섯은 28℃, 노루궁뎅이버섯은 24℃)에서 영지버섯은 14일, 노루궁뎅이버섯은 40일, 상황버섯은 30일 배양하여 각각의 오가피 발효물을 수득하였음.

(2) 오가피-발효물(액체)의 최적배양조건 확립

(가) 최적배양조건 확립방향

- ① 오가피추출물을 천연배지로 버섯균사체를 Bio-reactor에서 배양시키는 것으로 본 사업의 추진에 맞게 오가피 추출물을 주배지로하고 첨가되는 보조배지의 원료를 최소 첨가하는 배양조건 확립으로 추진하고자 함.
- ② 또한 고체발효기술에서 기술하였듯이 아래의 수행방법에 사용한 종균의 배양조건(온도, 배양일수 등) 등은 선행연구로 확립하여 본 연구에 사용한 것으로 각각의 특성을 기술하지 않았음.
- ③ 오가피추출물과 같이 발효에 사용한 천연물첨가배지는 동아를 비롯하여 다수의 천연물소재를 사용하여 그 발효조건을 검토하였으며, 그 천연물 중에서 동아를 이용한 발효조건이 우수하다고 판단되어 본 연구에서는 천연물첨가배지로 동아를 선택하여 연구를 수행하였다. 첨가배지로 사용한 동아는 선별-세척-절단-마쇄-추출-여과하여 사용하였으며, 동아를 천연배지로 사용하는 본 연구기간 중에 완료하여 특허 출원 및 등록하였음.

(나) 수행방법

- ① 균주 및 재료 : 본 연구에서 공시균주로 사용한 영지버섯(*Ganoderma lucidum*; KCTC 6729), 상황버섯(*Phellinus linteus*; KCTC 6719)은 생물자원센터 유전자은행으로부터 분양받아 사용하였으며, 노루궁뎅이버섯(*Hericium erinaceum*)의 경우 충주대학교 식품공학과(Jeungpyeong, Korea)에서 분양받아서 사용하였다. 각각의 균주를 본 연구에 사용하기 위하여 potato dextrose agar(PDA, Difco, USA) 배지에서 15일 간격으로 계대 배양하여 보관하면서 사용하였다. 각 균주를 접종할 기질로 사용하기 위해 오가피 줄기와 잎은 강원도 원주에서 구입하여 사용하였음.
- ② 버섯균주별 배양조건 및 종균제조 : 영지버섯, 상황버섯 종균(전배양액) 제조는 PDA 배지에 접종하고 28℃에서 7일간 배양한 후 cork borer(φ 8 mm)로 절취

하여 균주디스크를 만들어 potato dextrose broth(PDB, Difco, USA) 배지가 100 mL씩 분주되어 있는 삼각플라스크에 5~6개의 균주디스크를 접종하여 6일간 진탕배양(SI-400R, JEIOTECH, Korea)한 다음 분쇄기(Waring, USA)로 균질화하여 다시 PDB 배지가 100 mL씩 분주되어 있는 삼각플라스크에 9 mL를 접종하여 5일간(상황버섯은 6일) 배양하여 종균으로 사용하였다. 또한 노루궁뎅이버섯은 상기와 같은 방법으로 제조하되 배양온도를 24℃로 하였으며, 종균으로 사용하기 위한 배양일수는 6일임.

- ③ 오가피 천연배지 제조방법 : 오가피줄기의 마쇄 단계를 거쳐 균일한 크기의 분쇄물을 얻은 후, 압력 하에 85℃에서 24시간 추출한 다음 여과하여 얻은 추출액을 2 brix로 보정하여 오가피 추출물을 준비한다. 오가피 추출물의 중량%와 동아추출액의 중량%로 발효조에 투입한 다음 120℃에서 40분간 멸균한 다음 온도를 25℃까지 급랭하여 천연배지로 준비하였음.

2. 오가피 발효물의 지표성분 및 주요성분 분석

가. 계획

(1) 개발목표 :

(가) 오가피-발효물의 발효상태 및 발효물의 품질을 확인할 수 있는 지표물질 함량을 설정함으로써, 발효물을 식품원료로 사업화시 품질을 관리할 수 있는 기준으로 선택하고자 함.

(나) 산업화를 목적으로 대량배양 생산된 오가피-발효물소재의 지표성분과 주요성분을 분석하여 표준화된 건강기능식품원료로 개발하고자 함.

(2) 개발내용 :

(가) 천연물인 오가피와 오가피-발효물의 지표물질 분석비교에 따른 차별성 확보

(나) 오가피-발효물의 지표기준설정 및 실험방법 확립(표준화작업)

(다) 오가피-발효물이 가지는 특성 검토 : 아미노산, 지방산 등 성분분석을 통한 특성 검토

(라) 대량 배양한 오가피 발효물(고체)의 Eleutheroside B와 E 함량 분석

(마) 대량배양 한 오가피-발효물(고체발효물)의 베타글루칸(β -glucan) 함량 분석

나. 연구수행방법

(1) 오가피-발효물(고체발효물)소재의 수율 및 일반성분분석

(가) 오가피-발효물(고체발효물)의 수율측정 : 각각의 오가피-버섯발효물에 H₂O를 10배수로 공급하고 환류 추출장치에서 95℃의 온도로 6시간동안 추출하는 방법을 2회 반복하여 합친 추출물을 filter paper(ADVANTEC 5A, Japan)로 여과한 다음 10 brix 농도까지 농축하여 동결건조(Ilisin, Korea)하여 H₂O추출분말과 70%Ethanol추출 분말을 얻었음.

(나) 오가피-발효물(고체)의 일반 성분분석 : 식품공전에 제시한 방법으로 수행

(2) 오가피-발효물(고체발효물)소재의 시료구분

Table 3-3. 실험 재료로 사용한 오가피 원물과 오가피 버섯 균사체 발효물의 분류

대분류	줄기 : 잎	용매/시료화	sample number
오가피 원물	8 : 2	Water로 추출/ 동결건조물	NR-5011
	5 : 5	Water로 추출/ 동결건조물	NR-5021
	8 : 2	70%EtoH로 추출/ 동결건조물	NR-5012
	5 : 5	70%EtoH로 추출/ 동결건조물	NR-5022
오가피-영지버섯발효물	8 : 2	발효물원물	FM-5110
오가피-노루궁뎅이버섯발효물	5 : 5	발효물원물	FM-5120
오가피-상황버섯발효물	5 : 5	발효물원물	FM-5130
오가피-영지버섯발효물	8 : 2	Water로 추출/ 동결건조물	FM-5111
오가피-노루궁뎅이버섯발효물	5 : 5	Water로 추출/ 동결건조물	FM-5121
오가피-상황버섯발효물	5 : 5	Water로 추출/ 동결건조물	FM-5131
오가피-영지버섯발효물	8 : 2	70%EtoH로 추출/ 동결건조물	FM-5112
오가피-노루궁뎅이버섯발효물	5 : 5	70%EtoH로 추출/ 동결건조물	FM-5122
오가피-상황버섯발효물	5 : 5	70%EtoH로 추출/ 동결건조물	FM-5132

* NR : 천연물, * FM : 발효물

(3) Eleutheroside B와 Eleutheroside E 함량

(가) 표준용액과 시험용액의 조제 : Eleutheroside B(분자량 372.37, ChromaDex, USA)와 Eleutheroside E(분자량 742.72, ChromaDex, USA)를 각각 2.5 mg씩을 취하여 증류수 20mL로 용해한 다음 methanol(100%, J.T.baker, USA)을 가해 100 mL로 하여 각각의 표준원액으로 하였다. 표준원액에서 0.25, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5 mL씩 취하고 정확히 10.0 mL가 되도록 methanol을 가하여 정용하여 Eleutheroside B와 Eleutheroside E가 혼합된 표준액을 제조하였다. 시료 100mg들은 각각 10mL Volumetric flask에 넣고 Water 2mL를 넣은 후 Methanol로 용해하여 10mL이 되게 한 뒤 ultrasonic cleaner(powersonic 420, hwashin tech, korea)에서 40분 동안 추출한 후 최종 10mL로 한 것을 0.45 μ m membrane filter(ADVANTEC, JAPAN)로 여과하여 시험용액으로 하였음.

(나) High Performance Liquid Chromatography에 의한 정량 : 상기 조제된 표준용액과 시험용액을 고속액체 크로마토그래피(HPLC, WATERS 2695, USA), Photodiode Array Detector (PDA, WATERS 996, USA)를 사용하여 Capcell Pak C₁₈ Column(5 μ m, 4.6mm I.D.×250mm, Shiseido, Japan) 고정상에 이동상은 Acetonitrile과 Water가 15 : 85의 비율로 isocratic flow가 되게 1.0 mL/min 유속으로 하고 220 nm파장에서 제조된 표준액과 시험용액을 주입하여 흡광분석 하였다. 이 결과에서 Eleutheroside peak 면적을 y축으로 Eleutheroside의 농도를 x축으로 하여 Eleutheroside B와 Eleutheroside E의 검량선을 작성하고 시험용액에 함유된 함량을 계산하였음.

(4) 베타글루칸(β -glucan) 함량 분석

(가) β -glucan 분석은 Mushroom and Yeast beta-glucan kit(Megazyme, K-YBGL, Wicklow, Ireland)를 사용하여 β -glucan 분석법에 따라 실험하였음.

(나) 시료 100 mg을 50 mL 용량의 glass test tube에 넣고 1.5 mL의 37% 염산을 넣어 30 $^{\circ}$ C 수욕조에서 45분간, 15분마다 교반하면서 반응시킨 다음 10 mL의 증류수를 첨가하고 혼합한 후 끓는 물에서 cap을 느슨하게 열어놓은 상태에서 5분간 반응시킨 다음, cap을 단단히 닫고 100 $^{\circ}$ C 수욕조에서 2시간 동안 교반시킨 다음 냉각시키고 10 mL의 2 N KOH를 넣고 혼합한 다음 원심분리(1,500 rpm, 10 min)하여 상등액을 얻었음.

(다) 상등액 0.1 mL에 각각 0.1 mL씩의 exo-1,3- β -glucosidase를 첨가한 후 40 $^{\circ}$ C에서 60분 간 반응시켜 Total glucan 분석에 사용하였다. 또한 100 mg의 시료를 50 mL 용량의 glass test tube에 담아 2 mL의 2 M KOH를 넣어 얼음 수욕조에서 20분 동안 교반시킨 다음 8 mL의 1.2 M sodium acetate buffer(pH 3.8)와 0.2 mL의

amyloglucosidase plus invertase를 넣고 혼합한 후 40°C 수욕조에서 30분간 반응시킨 후 원심분리 (1,500rpm, 10min)하여 상등액에 0.1mL의 200mM sodium acetate buffer(pH5.0)를 가한 것을 α -glucan 분석에 사용하였다. Total glucan과 α -glucan 분석용 시료에 3 mL의 glucose oxidase/peroxidase/4-amino-anipyrine(GOPOD) 시약을 넣어 40°C 수욕조에서 20분간 반응시킨 후 UV-Vis Spectrophotometer(UV-1650PC)를 이용하여 510 nm에서 흡광도를 측정하고 (A)식에 따라 β -glucan 함량(%)으로 나타내었음.

$$\beta\text{-glucan함량 (\%)} = \text{Total glucan 함량} - \alpha\text{-glucan 함량} \quad (\text{A) 식}$$

(5) 지방산(Fatty acid) 함량 분석

(가) 오가피-발효물 시료를 원통여지에 넣고 diethyl ether를 가하여 Soxhlet 추출법으로 16시간 추출하여 조지방질을 얻은 다음 Metcalf 등의 방법(60)에 준하여 0.5 N sodium hydroxide/methanol solution으로 가수분해 시킨 후, boron trifluoride methanol을 가하여 methyl ester화시킨 다음 GC로 분석하였음.

(나) 이때 사용한 GC는 Hewlett Packard 5890 series II를 사용하였고 integrator는 Hewlett Packard 3396 series II를 사용하였다. GC column은 SP 2340 fused silica capillary(30m×0.25mm I.D)를 사용하였고, 오븐 온도는 160°C에서 3분간 유지 시킨 후, 분당 3°C의 비율로 220°C까지 승온하였다. GC 주입구 및 검출기(FID)의 온도는 240°C 및 250°C로 하고 운반기체는 질소가스, 유속을 0.8 mL/min로 하여 split mode(split ratio = 60 : 1)로 주입하였다. 상기와 같은 조건으로 지방산을 분석하고 함량을 계산하였음.

(6) 유리아미노산 함량 분석

(가) 시료의 유도체화 : 오가피 발효물의 유리 아미노산 분석을 위한 시료의 유도체화는 waters의 AccQ tag method에 따라 Waters AccQ · Chemistry package(waters Co., U.S.A)를 구입하여 사용하였는데 먼저 Kit에 구성된 6-aminoquinoly-N-hydroxysuccinimidly carbamate(AQC)에 acetonitrile 1mL를 넣고 55°C의 heating block에서 10분간 가열 용해 하여 유도체화 반응시약을 조제하였다. 시료의 유리 아미노산 분석을 위해 전 처리된 시료 10 μ L를 sample tube로 옮긴 후 Borate buffer 70 μ L 넣고 빠르게 혼합한 후 조제해놓은 AQC용액 20 μ L를 첨가하여 상온에서 수 분간 방치하였다. 그 후 55°C에서 10분간 반응 시킨 후 HPLC로 분석하였으며 분석에 사용된 분석기기와 분석조건은 Table 3-8과 같으며 standard로는 Waters amino acid hydrolysate 40 μ L와 water 960 μ L를 혼합한 후 시료와 같은 방법으로 처리하여 측정하였음.

(나) 분석기기 및 분석조건

Table 3-4. 분석기기 및 분석조건

Pump	waters 1525 binary HPLC Pump			
Injector	waters 717Plus Auto sampler			
Column oven	waters column heater module			
Detector	waters 2475 multi λ Fluorescence detector Ex : 250nm Em : 395nm			
Column	AQC-Tag C18, 3.9 \times 150mm			
Mobile phase	A : AQC-tag Eluent concentrate A 100mL : water 900mL (v/v) B : 60% acetonitrile			
Flow rate	1 mL/min			
Injection Volume	5 μ L			
Temperature	37 $^{\circ}$ C			
Software	Breeze system Ver 3.20			
Gradient	Time	Flow rate	%A	%B
	Initial	1.0	100	0
	0.5	1.0	98	2
	15.0	1.0	93	7
	19.0	1.0	90	10
	32.0	1.0	67	33
	33.0	1.0	67	33
	34.0	1.0	0	100
	37.0	1.0	0	100
	38.0	1.0	100	0
45.0	1.0	100	0	

3. 오가피 발효물의 간기능개선 검토 (1) : *IN VITRO*

가. 계획

(1) 개발목표 :

- (가) 오가피-발효물이 가지는 간 기능 개선능력(또는 간보호효과)을 평가하기 위한 1차 screening test 임.
- (나) 오가피 발효물 3종 : 오가피-영지버섯발효물, 오가피-노루궁뎅이버섯발효물, 오가피-상황버섯발효물

(2) 개발내용 :

- (가) 최적배양조건으로 배양된 오가피 발효물의 3종에 대하여 간세포를 이용한 간기능개선 효능을 검토하였음.
- (나) 개발내용은 사염화탄소(CCl₄, carbon tetrachloride)에 의한 간세포의 독성유도방법으로 Microculture tetrazolium(MTT) assay, ALT, AST 및 LDH 활성의 측정을 통한 오가피-버섯발효물 시료의 간 기능개선 효능을 1차로 확인하고자 하였음.

나. 연구수행방법

(1) 균주 및 재료

- (가) 간 기능 개선 연구에 사용한 'HepG2'(HC18302)는 생물자원센터 유전자은행으로부터 분양받아 사용하였고, 시료 양성대조군으로 Silymarin(S0292)을 Sigma(USA)에서 구입하여 사용하였음.
- (나) 시약들은 FBS Gold(PAA, A15-751), DMEM(#30-2003, ATCC), DPBS 1X(H15-002, 500ml, PAA), Trypsin-EDTA,0.25%(L11-002, 100ml, PAA), DMSO(BIP-1, 50ml, Bioniche), Penicillin-Streptomycin,100x(P11-010, 100ml, PAA), Trypan blue(T8154-100ML, sigma), HBSB(H6648-500ML, sigma), MTT(M2128-250MG, sigma), ALT(GOT) detection Kit(영동제약), AST(GPT) detection Kit(영동제약), LDH detection Kit(영동제약)를 사용하였음.

(2) 시료 및 시료제조

- (가) 최적발효조건으로 제조된 오가피-발효물을 사용하였음(Table 3-5).

Table 3-5. 오가피 최적발효조건으로 배양된 발효물의 시료

시료 No.	설명
NR 5100	오가피가지와 잎을 5:5로 혼합하여 물로 추출하여 동결건조 분말화한 시료
FM 5111	오가피(가지:잎=8:2)-영지버섯발효물을 물로 추출하여 동결건조 분말화한 시료
FM 5112	오가피(가지:잎=8:2)-영지버섯발효물을 70%EtOH로 추출하여 동결건조 분말화한 시료
FM 5121	오가피(가지:잎=5:5)-노루궁뎅이버섯발효물을 물로 추출하여 동결건조 분말화한 시료
FM 5122	오가피(가지:잎=5:5)-노루궁뎅이버섯발효물을 70%EtOH로 추출하여 동결건조 분말화한 시료
FM 5131	오가피(가지:잎=5:5)-상황버섯발효물을 물로 추출하여 동결건조 분말화한 시료
FM 5132	오가피(가지:잎=5:5)-상황버섯발효물을 70%EtOH로 추출하여 동결건조 분말화한 시료

- (나) 각각의 오가피버섯발효물에 H₂O를 10배수로 공급하고 환류 추출장치에서 95°C의 온도로 6시간동안 추출한것과 70%Ethanol를 10배로 공급하고 환류 추출장치에서 85°C의 온도로 6시간동안 환류 추출하였다. 이것들을 filter paper(ADVANTEC 5A, Japan)로 여과한 다음 일정농도까지 농축하여 동결건조(Il-sin, korea)하여 H₂O추출분말 시료와 70%Ethanol추출분말 시료를 얻었음.
- (다) 각각 얻어진 시료를 H₂O와 70%Ethanol 각각의 해당 용매에 10mg/ml의 농도로 녹인 후 0.2 μ m Syringe filter(431219, Corning)로 여과하고 HBSS에 일정 농도로 희석하여 간기능 개선효과 검토를 위한 간세포시험의 시료로 사용하였음.
- (3) 간세포 배양
- (가) 실험에 사용되는 간세포는 생물자원센터 유전자은행(KCTC)에서 HepG2 (HC18302)를 분양받아서 배양하였다. 배양배지는 10%의 FBS(fetal bovine serum)가 포함되어 있는 DMEM(TCC, Catalog No. 30-2003)를 배지로 하며 37.0° C에서 5% CO₂(carbon dioxide)를 공급하여 배양하였다. Subcultivation은 1:4~1:6 비율로 진행하였으며, 배양 동안 배지는 일주일에 2회 깨끗한 배지로 교체해주어 유지하였음.
- (나) HepG2가 면적의 80%로 배양이 이루어졌을 때 0.25% Trypsin-EDTA를 처리하여 세포를 바닥에서 떼어 1x10⁵ cells/mL로 10%FBS가 포함된 DMEM에 현탁하고 96well tissue culture plate(30096, SPL)에 각 well에 100 μ L씩 분주하여 seeding 하여 24시간 후 세포가 plate 바닥에 잘 부착되었는지 확인하고 간세포 시험 균주로 사용하였음.
- (4) 시료의 간세포 처리 : 96well plate에서 24시간 배양된 HepG2세포에 배양 배지를 DMEM(serum free)로 갈아주고 준비된 오가피버섯발효추출물과 양성대조군 시료를 각각 1.0, 0.5, 0.25, 0.125, 0.063 mg/mL의 농도로 연속희석하여 well 당 10 μ L씩 첨가하고 6, 12, 18시간 동안 처리하였음.
- (5) 사염화탄소(CCl₄, carbon tetrachloride)에 의한 간세포의 독성유도 : 각 시간동안 시료가 처리가 완료된 후 10mM의 CCl₄를 함유한 DMEM(serum free)으로 갈아주고 그 다음 2시간 동안 세포를 배양하여 세포독성을 유도하였음.
- (6) Microculture tetrazolium(MTT) assay : 10mM의 CCl₄를 처리하여 간세포의 독성유도가 완료된 후 5mg/mL의 농도로 DPBS에 녹인 MTT(M2128, sigma) stock solution을 각 well에 100 μ L씩 넣어주고 2시간 동안 다시 CO₂ incubator에 넣어 배양하였음. Well을 조심스럽게 꺼내어 보라색 결정(formazan)이 바닥에서 떨어지지 않도록 well의 용액을 완전히 제거 한 후 100 μ L의 DMSO를 넣어 보라색 결정을 녹였음. 결정이 녹은 보라색의 용액을 96well에 옮겨 ELISA reader(Bio-Tek, powerwave XS)로 540nm의 파장에서 흡광도를 측정하였음.
- (7) ALT, AST 및 LDH 활성의 측정 : 세포 독성이 유도된 간세포의 배양액을 취해 ALT,

AST 및 LDH의 활성을 영동제약에서 구매한 Kit를 사용하여 측정하였음. 측정치(흡광도)를 계산식 1에 따라 unit/L로 수치를 계산하고, 음성대조군의 활성을 100% 활성으로 하여 CCl₄에 의한 간세포의 독성유도 시 시료처리 및 양성대조군이 ALT 및 AST 생성을 억제하는 효과(%)를 수치화하여 비교하였음.

$$(계산식 1) \quad U/L = \frac{\text{반응액 전체의 부피}}{\text{반응액 중 검체의 부피}} \times \frac{1000}{6.22} \times \frac{\Delta A}{\text{min}}$$

6.22는 340nm에서 NADH의 밀리몰 흡광계수

1000은 U/mL를 U/L로 바꾸는 상수

ΔA는 (초기흡광도 a - 후기흡광도 b)

4. 오가피 발효물의 간기능개선 검토 (2) : *IN VITRO*

가. 계획

(1) 개발목표 :

(가) 시판중인 간 기능 개선제품, 오가피 원물 추출물과 오가피 발효물의 효능을 비교 평가하고자 함.

(2) 개발내용 :

(가) 1차 in vitro test 후, 시판중인 간 건강 기능식품과 오가피 원물소재 등과 본 연구에서 개발된 오가피 발효물 소재와의 효능을 비교 검토하고자 함.

(나) 개발내용은 사염화탄소(CCl₄, carbon tetrachloride)에 의한 간세포의 독성유도방법으로 Microculture tetrazolium(MTT) assay, ALT, AST 및 LDH 활성의 측정을 통한 오가피-버섯발효물 시료의 간 기능개선 효능을 2차로 확인하고자 하였음.

나. 연구수행방법

(1) 균주 및 재료

(가) 간 기능 개선 연구에 사용한 'HepG2'(HC18302)는 생물자원센터 유전자은행으로부터 분양받아 사용하였고, 시료 양성대조군으로 Silymarin(S0292)을 Sigma(USA)에서 구입하여 사용하였음.

(나) 시약들은 FBS Gold(PAA, A15-751), DMEM(#30-2003, ATCC), DPBS 1X(H15-002, 500ml, PAA), Trypsin-EDTA,0.25%(L11-002, 100ml, PAA), DMSO(BIP-1, 50ml, Bioniche), Penicillin-Streptomycin,100x(P11-010, 100ml, PAA), Trypan blue(T8154-100ML, sigma), HBSB(H6648-500ML, sigma), MTT(M2128-250MG, sigma), ALT(GOT) detection Kit(영동제약), AST(GPT) detection Kit(영동제약), LDH detection Kit(영동제약)를 사용하였음.

(2) 시료 및 시료제조

(가) 타사 제품, 오가피 원물 소재 및 오가피-버섯발효물 등을 사용하였음(Table 3-6).

Table 3-6. 오가피 최적발효조건으로 배양된 발효물의 시료

시료 No.	설명
FM 5111	오가피(가지:잎=8:2)-영지버섯발효물을 물로 추출하여 동결건조 분말화한 시료
FM 5112	오가피(가지:잎=8:2)-영지버섯발효물을 70%EtOH로 추출하여 동결건조 분말화한 시료
FM 5121	오가피(가지:잎=5:5)-노루궁뎅이버섯발효물을 물로 추출하여 동결건조 분말화한 시료
FM 5122	오가피(가지:잎=5:5)-노루궁뎅이버섯발효물을 70%EtOH로 추출하여 동결건조 분말화한 시료
FM 5131	오가피(가지:잎=5:5)-상황버섯발효물을 물로 추출하여 동결건조 분말화한 시료
FM 5132	오가피(가지:잎=5:5)-상황버섯발효물을 70%EtOH로 추출하여 동결건조 분말화한 시료
양성대조군	Silymarin(S0292)
타사 1	시판제품 1
타사 2	시판제품 2
타사 3	시판제품 3
타사 5	시판제품 5
오가피 원물	오가피원물(줄기 : 잎 = 5 : 5) 열수 추출물

(3) 간세포 배양

(가) 실험에 사용되는 간세포는 생물자원센터 유전자은행(KCTC)에서 HepG2 (HC18302)를 분양받아 배양하였다. 배양배지는 10%의 FBS(fetal bovine serum)가 포함되어 있는 DMEM(TCC, Catalog No. 30-2003)를 배지로 하며 37.0° C에서 5% CO₂(carbon dioxide)를 공급하여 배양하였다. Subcultivation은 1:4~1:6 비율로 진행하였으며, 배양 동안 배지는 일주일에 2회 깨끗한 배지로 교체해주어 유지하였음.

(나) HepG2가 면적의 80%로 배양이 이루어졌을 때 0.25% Trypsin-EDTA를 처리하여 세포를 바닥에서 떼어 1x10⁵ cells/mL로 10%FBS가 포함된 DMEM에 현탁하고 96well tissue culture plate(30096, SPL)에 각 well에 100 μL씩 분주하여 seeding 하여 24시간 후 세포가 plate 바닥에 잘 부착되었는지 확인하고 간세포 시험 균주로 사용하였음.

(4) 시료의 간세포 처리 : 96well plate에서 24시간 배양된 HepG2세포에 배양 배지를 DMEM(serum free)로 갈아주고 준비된 시료를 각각 0.5, 0.25, 0.1 mg/mL의 농도로 연속희석하여 처리하였음.

(5) 사염화탄소(CCl₄, carbon tetrachloride)에 의한 간세포의 독성유도 : 각 시간동안 시료가 처리가 완료된 후 10mM의 CCl₄를 함유한 DMEM(serum free)으로 갈아주고 그 다음 2시간 동안 세포를 배양하여 세포독성을 유도하였음.

(6) ALT, AST 및 LDH 활성의 측정 : 세포 독성이 유도된 간세포의 배양액을 취해 ALT, AST 및 LDH의 활성을 영동제약에서 구매한 Kit를 사용하여 측정하였음. 측정치(흡광도)를 계산식 2에 따라 unit/L로 수치를 계산하였음.

$$(계산식 2) \quad U/L = \frac{\text{반응액 전체의 부피}}{\text{반응액 중 검체의 부피}} \times \frac{1000}{6.22} \times \frac{\Delta A}{\text{min}}$$

6.22는 340nm에서 NADH의 밀리몰 흡광계수

1000은 U/mL를 U/L로 바꾸는 상수

ΔA 는 (초기흡광도 a - 후기흡광도 b)

5. 오가피 발효물의 간기능개선 검토 (3) : *IN VIVO*

가. 계획

(1) 개발목표 :

- (가) 오가피-발효물소재가 급성 간 장애 및 만성 간 장애 모델에서의 간 기능개선에 대한 유효성을 확인
- (나) 오가피-발효물소재가 지방간 모델에서 간 기능개선에 대한 유효성을 확인

(2) 개발내용 :

- (가) CCl₄와 D-galactosamine 이용한 급성간장애 모델
- (나) CCl₄를 이용한 만성 간 장애 모델
- (다) Ethionine을 이용한 지방간 모에서 오가피-발효물의 간 기능 개선효능을 검토하고자 함.
- (라) ethanol을 이용한 지방간 모에서 오가피-발효물의 간 기능 개선효능을 검토하고자 함.

나. 연구수행방법

(1) 사염화탄소로 유도된 급성 및 만성 간 장애 모델에서 간 기능 개선 효과

(가) 사염화탄소에 의한 급성 간 장애 모델 유발

- ① 5주령 Sprague-Dawley (SD) rats 수컷을 (주)대한바이오링크(충북, 한국)에서 공급 받았고, 입수동물은 1주일간 동물실에서 순화시킨 후 시험에 사용하였음. 사육 상자 당 2수의 rats를 사육하였고, 사육환경은 자동환경조절장치로 다음과 같이 조절하였음 (온도 : 22 ± 3 ° C, 상대습도 : 50 % ± 10 %, 조도 : 200-300 Lux, 명암주기 : 12시간 점등/12시간 소등, 조명시간 : 오전 8시 ~ 오후 8시). 실험동물을 1개의 정상시험군(급성 간 장애 비유발), 1개의 음성대조군(급성 간 장애 유발), 1개의 양성대조군(급성 간 장애 유발, silymarin 25 mg/kg 투여), 3개의 FM-5111 투여시험군(급성 간 장애 유발, FM-5111-L ; 50 mg/kg, FM-5111-M ; 150 mg/kg, FM-5111-H ; 300 mg/kg), 3개의 FM-5131 투여시험군 (급성 간 장애 유발, FM-5131-L ; 50 mg/kg, FM-5131-M ; 150 mg/kg, FM-5131-H ; 300 mg/kg)으로 설정하였고, 각 군 당 8수의 rats를 공시하였음.
- ② 사염화탄소(CCl₄)에 의한 급성 간 장애 모델에서 오가피 발효물의 간 기능 개선 효능평가는 SD rat 수컷을 12시간을 절식시킨 뒤 Silymarin (Sigma, Steinheim, USA) 또는 오가피 발효물 추출물(FM-5111 또는 FM-5131)을 zonde를 이용하여 경구 투여하고, 4시간 후에 CCl₄ (Kanto, Tokyo, Japan)를 olive oil에 1:4 (v:v)의 비율로 희석하여 636.8 mg/kg의 용량으로 1회 복강 내 주사하여 간 손상을 유발 하였음. 급성 간 장애를 유발한 후, 6시간 뒤에 Silymarin 또는 오가피 발효물 추출물(FM-5111 또는 FM-5131)을 경구투여 하였음. 투여 후, 48시간 뒤에 ethyl

ether (Duksan, Gyeonggi, Korea)마취하여 개복하여 복부대동맥에서 채혈하여 혈청내 aspartate aminotransferase (AST)와 alanine aminotransferase (ALT) 활성을 측정 하였음.

(나) 사염화탄소에 의한 만성 간 장애 모델 유발

- ① 실험동물 시험군 설정은 급성 간 장애 모델에서의 효능평가와 동일하게 설정하였음.
- ② 사염화탄소(CCl₄)에 의한 만성 간 장애 모델에서 오가피 발효물의 간 기능 개선 효능평가는 SD rat 수컷을 12시간을 절식시킨 뒤 Silymarin (Sigma, Steinheim, USA) 또는 오가피 발효물 추출물(FM-5111 또는 FM-5131)을 zonde를 이용하여 경구 투여하고, 4시간 후에 CCl₄ (Kanto, Tokyo, Japan)를 olive oil에 2:3 (v:v)의 비율로 희석하여 318.4 mg/kg의 용량으로 1회 복강 내 주사하여 간 손상을 유발 하였음. 그 후, 6시간 뒤에 Silymarin 또는 오가피 발효물 추출물(FM-5111 또는 FM-5131)을 경구투여 하였다. 이 과정을 15일간 반복 수행한 후, ethyl ether (Duksan, Gyeonggi, Korea)마취하여 개복하여 복부대동맥에서 채혈하여 혈청내 AST와 ALT 활성을 측정 하였음.

(다) 체중, 음수 섭취량, 사료 섭취량, 간 중량 측정 및 간 지수 산정

- ① 체중, 음수 섭취량 및 사료 섭취량은 매일 오전 1회 실험 종료 시까지 측정하였음.
- ② 모든 실험동물의 간 중량은 시험 종료 직후 실험동물 희생 후, 복강을 절개하여 무균적으로 간장을 적출하고 생리식염수로 씻어내어 수분을 여과지로 제거하여 무게를 측정하였음.
- ③ 간장지수는 실험동물 체중 차이에 따른 변이를 없애고 이를 표준화하기 위하여 적출된 간장 무게와 rat 체중을 바탕으로 아래 공식에 따라 간장 지수를 산정 하였음.

$$\text{간장지수(Liver index)} = \text{liver weight(g)} / \text{rats body weight(g)} \times 100$$

(라) 혈액생화학적 검사 : 시험이 종료된 후, ethyl ether로 마취하여 개복하여 복부대동맥에서 채혈한 혈액을 원심분리(3000rpm, 15분)한 후, 혈청을 취하여 혈청자동분석기(Hitachi7060, Japan)를 이용하여, AST와 ALT를 측정하였음.

(마) 통계 분석 : 실험결과는 평균과 표준편차로 나타내었으며 SPSS program (SPSS INC,ver.19.0)을 이용하여 일원배치 분산분석(one-way ANOVA)을 실시하였으며, 유의성이 관찰되면 대조군과 유의차가 있는 시험군을 확인하기 위해 Dunnett's t-test의 다중검정을 실시하였음.

(2) D-galactosamine로 유도된 급성 간 장애 모델에서 간 기능 개선 효과

(가) D-galactosamine로 유도된 급성 간 장애 유발

- ① 5주령 Sprague-Dawley (SD) rats 수컷을 (주)대한바이오링크(충북, 한국)에서 공급 받았고, 입수동물은 1주일간 동물실에서 순화시킨 후 시험에 사용하였다. 사육 상자 당 2수의 rats를 사육하였고, 사육환경은 자동환경조절장치로 다음과 같이 조절하였음 (온도 : 22 ± 3 °C, 상대습도 : $50 \% \pm 10 \%$, 조도 : 200-300 Lux, 명암주기 : 12시간 점등/12시간 소등, 조명시간 : 오전 8시 ~ 오후 8시). 실험동물을 1개의 정상시험군(급성 간 장애 비유발), 1개의 음성대조군(급성 간 장애 유발), 1개의 양성대조군(급성 간 장애 유발, silymarin 25 mg/kg 투여), 3개의 FM-5111 투여시험군(급성 간 장애 유발, FM-5111-L ; 50 mg/kg, FM-5111-M ; 150 mg/kg, FM-5111-H ; 300 mg/kg), 3개의 FM-5131 투여시험군(급성 간 장애 유발, FM-5131-L ; 50 mg/kg, FM-5131-M ; 150 mg/kg, FM-5131-H ; 300 mg/kg)으로 설정하였고, 각 군 당 8수의 rats를 공시하였음.
- ② D-galactosamine에 의한 급성 간 장애 모델에서 오가피 발효물의 간 기능 개선 효능평가는 D-galactosamine은 saline에 5%로 용해시킨 D-galactosamine*HCL을 650mg/kg으로 복강투여하고, silymarin과 시험물질을 3일간 투여한 후 4일째 되는 날 silymarin과 오가피 발효물 추출물(FM-5111 또는 FM-5131)을 투여한 후 D-galactosamine을 투여한 다음 D-galactosamine 투여하였음. 투여 후 24시간 경과 후 ethyl ether (Duksan, Gyeonggi, Korea)마취하에 개복하여 복부대동맥에서 채혈하여 혈청내 aspartate aminotransferase (AST)와 alanine aminotransferase (ALT) 활성을 측정 하였음.

(나) 체중, 음수 섭취량, 사료 섭취량, 간 중량 측정 및 간 지수 산정

- ① 체중, 음수 섭취량 및 사료 섭취량은 매일 오전 1회 실험 종료 시까지 측정함.
- ② 모든 실험동물의 간 중량은 시험 종료 직후 실험동물 희생 후, 복강을 절개하여 무균적으로 간장을 적출하고 생리식염수로 씻어내어 수분을 여과지로 제거하여 무게를 측정하였음.
- ③ 간장지수는 실험동물 체중 차이에 따른 변이를 없애고 이를 표준화하기 위하여 적출된 간장 무게와 rat 체중을 바탕으로 아래 공식에 따라 간장 지수를 산정 하였음.

$$\text{간장지수(Liver index)} = \text{liver weight(g)} / \text{rats body weight(g)} \times 100$$

(다) 혈액생화학적 검사 : 상기방법과 같음

(라) 통계 분석 : 실험결과는 평균과 표준편차로 나타내었으며 SPSS program을 이용하여 일원배치 분산분석을 실시하였으며, 유의성이 관찰되면 대조군과 유의차가 있는 시험군을 확인하기 위해 Dunnett's t-test의 다중검정을 실시하였음.

(3) 지방간 모델에서 간 기능 개선 효과

(가) DL-ethionine과 ethanol 지방간 모델 유발

- ① 5주령 Sprague-Dawley(SD) rats 수컷을 (주)대한바이오링크(Eumsung, Korea)에서 공급받았고, 입수동물은 1주일간 동물실에서 순화시킨 후 시험에 사용하였음. 사육상자 당 2수의 rats를 사육하였고, 사육환경은 자동환경조절장치로 다음과 같이 조절하였음 (온도 : 22 ± 3 °C, 상대습도 : $50 \% \pm 10 \%$, 조도 : 200-300 Lux, 명암주기 : 12시간 점등/12시간 소등, 조명시간 : 오전 8시 ~ 오후 8시). 실험동물을 1개의 정상시험군(normal; 지방간 비유발), 1개의 음성대조군(control; 지방간 유발), 1개의 양성대조군(지방간 유발, ursodeoxycholic acid 30 mg/kg 투여) (ursodeoxycholic acid; Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA), 3개의 FM-5111 투여시험군(지방간 유발, FM-5111-L; 50 mg/kg, FM-5111-M; 150 mg/kg, FM-5111-H; 300 mg/kg), 3개의 FM-5131 투여시험군(지방간 유발, FM-5131-L; 50 mg/kg, FM-5131-M; 150 mg/kg, FM-5131-H; 300 mg/kg)으로 설정하였고, 각 군 당 8수의 rats를 공시하였음.
- ② DL-ethionine 지방간 모델에서의 오가피 발효물 효능평가를 위해, 시험물질인 FM-5111과 FM-5131을 DL-ethionine (ethionine; Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) 투여일과 투여 하루 전, 후에 오전, 오후 두 번씩 총 6회에 걸쳐 위에서 언급한 농도로 경구투여 하였으며, ethionine은 생리식염수에 2%(w/v)로 녹여 200 mg/kg으로 경구투여 하였음.
- ③ Ethanol (Duksan, Seoul, Korea)지방간 모델에서의 오가피 발효물 효능평가를 위해, 30% ethanol을 10 mL/kg으로 오전, 오후 같은 시각에 매일 2회에 걸쳐 28일 동안 경구투여 하였으며, 시험물질은 ethanol 투여 15일째 부터 14일 동안 위에서 언급한 농도로 경구투여 하였음.

(나) 지방간 모델의 체중 측정 및 혈액생화학적 분석

- ① Ethionine 지방간 모델의 체중은 매일 한번씩, ethanol 지방간 모델의 체중은 매주 1회 일정한 시간에 동물용 체중계를 이용하여 측정하였음.
- ② 시험이 종료된 후, 시험동물을 ethyl ether (Duksan, Seoul, Korea)로 마취하여 복부대동맥으로부터 채혈하였음. 혈액은 원심분리(3,000 rpm, 15분)한 후, 혈청을 회수 하여 혈청자동분석기(Hitachi7060, Hitachi, Tokyo, Japan)를 이용하여 aspartate aminotransferase (AST)와 alanine aminotransferase (ALT)를 측정하였음.

(다) 간 지질 분석

- ① 시험 종료 후, 시험동물의 간을 적출하여 무게를 측정하고 다음 시험에 사용할 때까지 -70°C 에 보관하였음. 냉동된 간을 4°C 에서 O/N 해동하여 차가운 1.15%

KCl (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) 용액으로 10%(w/v)가 되도록 잘라 homogenizer (X520, Finemech, Portola Valley, CA, USA)로 균질화하였음. 3,000rpm, 15min으로 원심분리 후 상층액을 얻어 간 지질 분석에 사용하였음.

② 총 지질 분석은 상층액에 H₂SO₄ (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA)를 가해 끓는 물에 10분간 가온한 후, 얼음물에 냉각시켜 phospho-vanillin 용액을 가하여 37°C에서 15분간 반응시키고 상온에서 5분간 냉각하였음. 이 반응액을 Spectrophotometer (UV 1601, Shimadzu, Kyoto, Japan)를 이용하여 540nm로 흡광도를 측정하고, olive oil (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA)을 working standard solution으로 사용하여 지질의 양을 정량하였음.

③ 중성지방 분석은 1.15% KCl 용액으로 10%(w/v)가 되도록 잘라 균질화 한후, 원심분리하여 얻어진 상층액을 Cleantech TG-S (Asanparm, Seoul, Korea)를 이용하여 분석하였음.

(라) 통계 분석 : 실험결과는 평균과 표준편차로 나타내었으며 SPSS program (SPSS INC,ver.19.0)을 이용하여 일원배치 분산분석(one-way ANOVA)을 실시하였으며, 유의성이 관찰되면 대조군과 유의차가 있는 시험군을 확인하기 위해 Dunnett's t-test의 다중검정을 실시하였음.

6. 오가피 발효물의 안전성 확보(독성시험) : IN VIVO

가. 계획

(1) 개발목표

(가) 오가피-발효물소재의 안전성을 확보하고자 단회투여독성평가 및 반복투여독성평가를 실시하여 안전성을 확보하여 건강기능식품소재를 신청하는데 활용하고자 함.

(나) 오가피-발효물소재 : FM-5111, FM-5131

(2) 개발내용 : 단회투여 독성시험, 4주 반복투여 독성시험.

나. 연구수행방법

(1) 단회투여 독성시험

(가) 단회투여 독성 시험은 6주령 Sprague-Dawley (SD) rats 암컷과 수컷을 (주)대한바이오링크(충북, 한국)에서 공급받았고, 입수동물은 1주일간 동물실에서 순화시킨 후 시험에 사용하였음. 사육상자 당 3수의 rats를 사육하였고, 사육환경은 자동환경조절장치로 다음과 같이 조절하였음 (온도 : 22 ± 3 °C, 상대습도 : $50 \% \pm 10$ %, 조도 : 200-300 Lux, 명암주기 : 12시간 점등/12시간 소등, 조명시간 : 오전 8시 ~ 오후 8시).

(나) 실험동물을 1개의 용매대조군(G1; 멸균 증류수)과 3개의 FM-5111 시험군(G2; 0.5 g/kg, G3; 1.0 g/kg, G4; 2.0 g/kg)과 3개의 FM-5131 시험군(G5; 0.5 g/kg, G6; 1.0 g/kg, G7; 2.0 g/kg)으로 설정하였고, 각 군당 암컷, 수컷 각 5수씩, 총 10수씩 구성하였음. FM-5111과 FM-5131 투여 시험군은 시료를 1회 투여하여 7일간 관찰하였음. 모든 실험동물은 사육기간 동안 매일 임상증상 및 사망 유무를 확인하였고, 하루에 한번씩 체중을 측정하였음. 7일간 사육 후, 실험동물을 부검하여 장기조직들의 이상 유무를 검사하였음.

(2) 반복투여 독성시험

(가) 반복투여 독성 시험은 단회독성 시험에서 언급한 실험동물 사육방법들을 동일하게 적용하여 수행하였음. 실험동물을 1개의 용매대조군(G1; 멸균 증류수)과 3개의 FM-5111 시험군(G2; 0.25 g/kg, G3; 0.5 g/kg, G4; 1.0 g/kg)과 3개의 FM-5131 시험군(G5; 0.25 g/kg, G6; 0.5 g/kg, G7; 1.0 g/kg)으로 설정하였고, 각 군당 암컷, 수컷 각 5수씩, 총 10수씩 구성하였음.

(나) FM-5111과 FM-5131 투여 시험군은 시료를 매일 동일한 시간에 1회씩 28일간 투여하였으며, 투여기간동안 모든 실험동물은 매일 임상증상 및 사망 유무를 확인하였고, 주 1회 체중을 측정하였다. 28일간 사육 후, 혈액학적 검사와 혈액생화학 적 검사를 수행하였으며, 부검을 통한 장기조직들의 이상 유무를 검사하였고, 장기 중량을 측정하였음.

- (3) 혈액학적 검사 : 반복투여 독성 시험에서, 28일간 시험물질(FM-5111, FM-5131)을 투여한 후, 실험동물을 ether로 마취하고 복부대동맥으로부터 채혈하여 혈구자동측정기(Hemavet, Japan)로 총백혈구수(Total leucocyte count, WBC), 중성호성 백혈구(neutrophil, NEUT), 림프구(lymphocyte, LYMP), 단핵구(monocyte, MONO), 산호성백혈구 (eosinophil, EOS), 염기호성백혈구 (basophil, BASO), 총적혈구수(total erythrocyte count, RBC), 혈색소량(hemoglobin concentration, HGB), 헤마토크리트치(hematocrit, HCT), 평균적혈구용적(mean cell volume, MCV), 평균헤모글로빈양(mean cell hemoglobin, MCH), 평균적혈구헤모글로빈농도(mean cell hemoglobin concentration, MCHC), 혈소판수 (platelet, PLT)를 측정하였음.
- (4) 혈액생화학적 검사 : 채혈한 전혈 일부를 원심분리(3000rpm, 15분)한 후 혈청을 취하여 혈청자동분석기(Hitachi7060, Japan)를 이용하여, 총단백질(Total protein: TP), 알부민(Albumin: ALB), 알칼라인포스파타제(Alkaline phosphatase: ALP), 아스파테이트 아미노기전이효소(Aspartate aminotransferase: AST), 알라닌 아미노기전이효소(Alanine aminotransferase: ALT), 크레아티닌(Creatinine: CRE), 혈액요소질소(Blood Urea nitrogen: BUN), 총콜레스테롤(Total cholesterol: TC), 혈당(Glucose: GLU), 트리글리세라이드(Triglycerides: TG)을 측정하였음.
- (5) 통계 분석 : 체중, 혈액 및 혈액생화학적 검사 및 장기 중량 측정에서 얻어진 모든 자료들은 평균과 표준편차로 나타내었으며, SPSS program (SPSS INC, Chicago, Illinois, USA)을 사용하여 통계분석을 실시하였음. One-way analysis of variation(ANOVA)를 실시하여 유의성이 관찰되면 대조군과 유의차가 있는 시험군을 확인하기 위해 Dunnett's t-test의 다중검정을 실시하였음.

7. 시작품제작 및 안정성 평가 : 1차

가. 계획

- (1) 개발목표 : 1차적으로 오가피-발효물 소재를 이용하여 안정성평가를 위한 시험용 시작품을 제작하고 가학조건에서의 품질관리를 통한 안정성을 확보하고자 하였으며, 인체적용시험용 제품제작 및 2차 시작품제작 및 상품화 준비에 활용하고자 하였음.
- (2) 개발내용 : 오가피-발효물 소재(FM-5111)를 주원료로 하여 안정성평가를 위한 1차적으로 시작품 2종을 제작하였음. 시작품의 제형은 건강기능식품으로 가장 많은 형태로 판매되어지고 있는 캡슐과 가장 일반적으로 선호하고 있는 음료형태로 안정성평가를 위한 시작품을 제작하였음.

나. 연구수행방법

(1) 시작품제작

- (가) 오가피-발효물을 이용한 시작품제작은 (주)휴럽의 신제품개발에 따른 자체 메뉴얼에 따라 조성비를 선정하였음. ㉠ 중앙연구소 제품개발부에서 제품의 특성, 제품의 목적, 소비자 타겟, 제품의 제형 등을 고려하여 3~5종의 레시피를 개발하여 신제품의 시작품을 제작하고, ㉡ 마케팅본부에서 소비자 및 전문가의 의견을 수렴하여 다시 논의한 다음 ㉢ 다시 레시피를 조정하여 다시 만들어 평가하는 과정을 3~5회 걸쳐서 1단계로 완성하여 시작품을 제작하였음. 실제로 제품이 출시할 경우, 1단계로 제작된 시작품을 2단계 작업을 걸쳐서 최종제품을 완성하여 상품화 함.
- (나) 1차 시작품 제품명으로 자체프로젝트 명칭인 ELEU-F를 사용 : 중앙연구소에서 제품명을 자체 프로젝트 명칭을 임시제품명으로 부여하여 시작품제작 및 안정성 시험을 진행하였음.
- (다) 시작품제작 : 병제품은 100ml / 1병로 제작하였으며, 캡슐제품은 60캡슐/1병로 제작하였음.

(2) 개발한 시작품의 안정성 확보

(가) 가속시험

- 가속시험기간 : 6개월간 실시(제조후, 1, 2, 3, 4, 5, 6월)
- 보존조건 : 38℃, 80% RH 이상
- 시험항목 및 시험방법 : 성상, 표준물질, 미생물(대장균 및 세균) 등 필요항목

(나) 장기안정성시험

- 장기안정성시험기간 : 24개월(또는 12개월) 이상(3개월 단위 측정)

○ 보존조건 : 실온

○ 시험항목 및 시험방법 : 성장, 표준물질, 미생물(대장균군)등 필요항목

(다) 시험방법

시험항목	시험방법	비 고
성장	갈색분말 / 짙은갈색액상	
Eleutheroside B와 E 함량	상기에 기술된 분석방법	
베타글루칸 함량	상기에 기술된 분석방법	
대장균군	식품공전	
붕해도	식품공전	

8. 인체적용시험

가. 인체적용시험 수행기관 선정

- (1) 인체적용시험 총괄운영 : 주식회사 휴림
 - (가) 기관명 : 주식회사 휴림
 - (나) 수행책임자 : 조주현 책임연구원
 - (다) 수행범위 : 인체적용시험에 대한 전반적인 협의 및 조율
- (2) 인체적용시험 CRO
 - (가) 기관명 : M 社 (서울시 소재)
 - (나) 수행범위 : 프로토콜개발, 통계분석 등
- (3) 인체적용시험 수행기관
 - (가) 기관명 : 충북소재 S 병원 (인체적용시험 전문기관)
 - (나) 수행범위 : 피험자 모집, 피험자 검진 등 인체적용시험 직접수행

나. 인체적용시험 추진방향

- (1) 인체적용시험의 경우, 알코올성 지방간질환과 비알코올성 지방간질환에 대하여 추진하고자 함.
- (2) 본 사업을 통하여 우선 비 알코올성 지방간질환에 대하여 인체적용시험을 추진하고자 함.
- (3) 인체적용시험기간의 설정 : 인체적용시험기간의 경우 4주에서 8주까지 진행하는 것으로 자료가 조사되었으며, 4주에 중점을 두어 8주까지 실시하는 것으로 1차로 설정하였으며, 2차로 진행할 경우에는 1차로 진행한 인체적용시험을 참고하여 진행하도록 함. 자 하며, 추후에 알코올성 지방간질환에 대한 인체적용시험을 추가적으로 추진하고자 함.

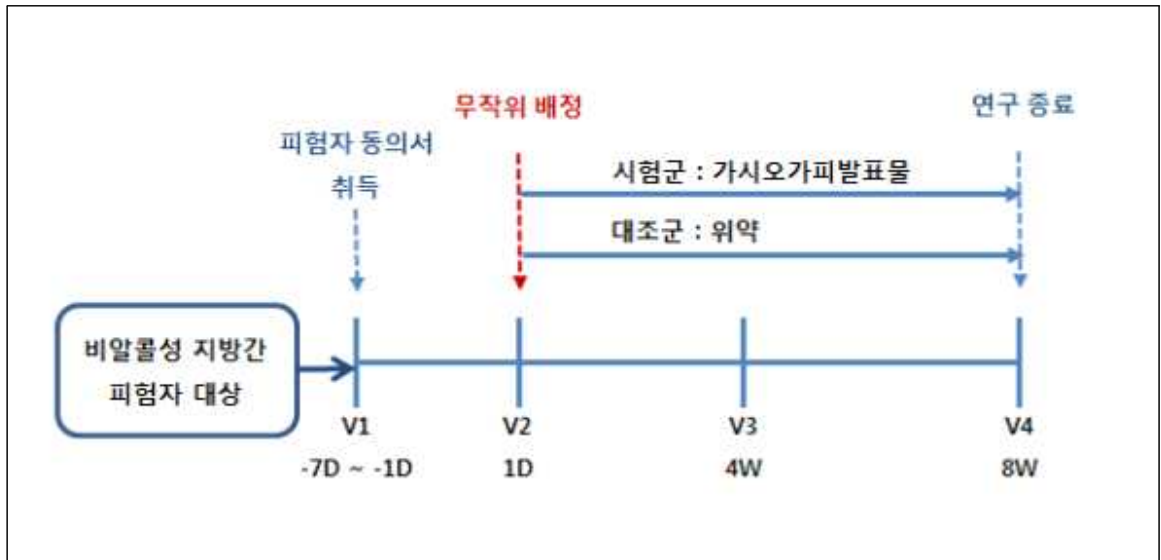
다. 인체적용시험용 시작품제작

- (1) 인체적용시험용 유효용량 및 제형 선택
 - (가) 오가피발효물 추출분말 기준 : 1~1.g / 1일
 - (나) 피험자를 고려한 제형선택(음료선택)
 - (다) 피험자를 고려한 용기선택 : 용기가 병일 경우 복용은 편리하지만 운반 및 휴대성에서 단점을 가지고 있으며, 파우치 제품의 경우 복용하는데 있어서 일부 불편함을 가지고 있어서 본 인체적용시험에서는 상기 두 용기의 단점을 보완하여 치어백 형태의 인체적용시험용 제품을 제작하였음.
 - (라) 오가피 발효물의 정확한 기능성평가를 위하여 피험자가 시험제품을 복용하기에 적합한 최소한의 부재료외에 레시피에서 제외하였음.
- (2) 인체적용시험용 제품제작
 - (가) 인체적용시험용 레시피

- (나) 인체적용시험용 용기 및 박스
- (다) 인체적용시험용 시작품제작
- (라) 인체적용시험용 시작품의 품질검사

라. 인체적용시험 프로토콜 요약

- (1) 인체적용시험제목 : A single-center, randomized, placebo-controlled, double-blind clinical trial to evaluate the efficacy and safety after 8-week of fermented *Acanthopanax Senticosus* in patients with non-alcoholic fatty liver disease
- (2) 시험기관 : 충북소재 S병원 (인체적용시험 전문기관)
- (3) 대상 : 비알콜성 지방간질환
- (4) 시험단계 및 디자인 : 이중맹검, 무작위배정, 위약대조, 단일기관
- (5) 인체적용시험의 목적
 - (가) 1차 목적 : 간기능이 저하된 비알콜성 지방간질환 피험자를 대상으로 오가피발효물을 8주간 복용 후 ALT를 평가하여 시험군과 대조군 간의 간기능 개선 효능을 비교함.
 - (나) 2차 목적 :
 - ① 비알콜성 지방간질환 피험자를 대상으로 4주 및 8주간 복용 후 AST, Gamma GPT, Alkaline phosphatase, Fasting Blood Sugar (FBS), Total cholesterol, Triglyceride, HDL-cholesterol, LDL-cholesterol를 측정하여 시험군과 대조군간 효능을 비교함.
 - ② 비알콜성 지방간질환 피험자를 대상으로 4주 및 8주간 복용 후 이상반응, 실험실적 검사 등에 대한 안전성을 평가함.
- (6) 시험제품 :
 - (가) 시험군 : 오가피발효물
 - (나) 대조군 : 위약
- (7) 투약 및 용량 : 1일 1회(치어파우치 1팩) 경구복용
- (8) 시험방법



(가) 본 연구는 이중맹검, 무작위배정, 위약 대조로 진행됨.

(나) 자의에 의해 피험자 동의서에 서명한 피험자는 스크리닝 검사를 실시하여 피험자 선정 및 제외기준에 적합 여부를 평가함. 적합한 피험자는 무작위배정표에 따라 시험군과 대조군 중 한 군으로 배정됨.

(다) 피험자는 4주 및 8주간 시험제품을 1일 1회, 정해진 용량을 복용하며, 시험제품 복용 시작 시점을 기준으로 4주, 8주에 외래방문을 통하여 활력징후, 유해사례와 병용약물, 실험실적 검사 등을 실시함.

(9) 피험자수 : 30명

(10) 선정기준 :

(가) 만 18세 이상 70세 이하인 자

(나) ALT 값이 45IU/L 이상 300IU/L미만인 자

(다) 본 인체적용시험에 대한 설명을 듣고 자발적으로 결정하여 서면 동의한 자

(11) 제외기준 :

(가) 알코올 섭취량이 1일 20g이상인 자(소주 3잔, 맥주 1병)

(나) 약물 치료를 요하는 고지혈증인 자(Triglyceride 400mg/dL 이상)

(다) 최근 1개월 이내 고지혈증약을 복용한 자

(라) 최근 5년간 악성종양 경험이 있는 자

(마) 임신 또는 수유 중인 자

(바) 최근 3개월 이내 다른 임상시험에 참여한 자

(사) 치매나 간질을 포함하는 정신과적 또는 신경과적 병력이 있는 자

(아) 기타 시험자가 신체적, 정신적으로 임상시험 참여가 적합하지 않다고 판단하는 자

(12) 중지 및 탈락 기준 :

(가) 피험자 서면 동의서 철회

(나) 선정/제외 기준에 적합하지 않은 피험자를 등록시킨 경우

(다) 중대한 이상반응(SAE)의 발생으로 인하여 본 인체적용시험에 더 이상 참여하기 어려운 경우

(라) 인체적용시험을 위한 방문이나 인체적용시험 계획서 상에 명시된 절차에 순응하지 않은 경우

(마) 인체적용시험 계획서의 중대한 위반으로 유효성 변수의 평가나 다른 피험자에게 영향을 미칠 수 있는 경우

(바) 시험자/인체적용시험 의뢰자의 판단에 근거하여 본 인체적용시험을 더 이상 지속하기 어려운 경우

(13) 병용요법 : 간기능 개선을 목적으로 하는 약물 또는 건강기능식품을 섭취하지 않도록 함.

9. 시작품제작 및 품질검사 : 2차(산업화 준비)

가. 계획

(1) 개발목표 :

- (가) 1차적으로 오가피-발효물 소재를 이용하여 시작품을 제작하고 안정성평가를 위한 데이터를 자료로 2차 시작품을 제작하고 가학조건에서의 품질관리를 통한 안정성을 확보하고자 하였음.
- (나) 인체적용시험에 사용한 레시피를 기준으로 약간의 선호도를 보완하여 제작하였음.

(2) 개발내용 :

- (가) 인체적용시험에 사용한 오가피-발효물 소재(FM-5111)를 주원료로 하여 2차적인 시작품을 제작하여 제품의 안정성을 평가하였음.
- (나) 시작품의 제형은 1차로 제작한 시작품 중 소비자가 가장 일반적으로 선호하고 있는 음료형태인 병 제품과 고급화 전략으로 정제품을 선택하여 시작품을 제작하고 안정성평가를 실시하였음.

나. 연구수행방법

(1) 시작품제작

(가) 레시피 개발

- ① 오가피-발효물을 이용한 시작품제작은 (주)휴림의 신제품개발에 따른 자체 메뉴얼에 따라 조성비를 선정하였음.
- ② 병음료제품 : 인체적용시험에 사용한 레시피를 기본으로 하여 레시피를 개발하였으며, 제품의 안정성확보를 목적으로 실시한 1차 시작품 결과를 일부 반영하였음.
- ③ 정제품 : 기존의 홍삼제품 등 일부 제품만이 산업화 되었던 제형으로 고급화 전략을 추진하기 위하여 선택하였음.
- ④ 기타 : 1차에 제작하였던 캡슐형태의 제형은 추후 산업화를 추진하는데 사용할 것임.

(나) 디자인 개발

- ① 방향 : 전통적인 소재인 오가피를 잘 반영이 될수 있는 방향과 소비자에게 친근하면서 접근이 가능한 디자인, 그리고 고급화 및 차별화가 가능한 방향
- ② 개발내용 : 병제품디자인(라벨 및 박스), 정제품디자인(라벨 및 박스)

(다) 시작품제작

- ① 병제품 : 100ml / 1병

② 정제품 : 240g/1병.

(2) 개발한 시작품의 안정성 확보

(가) 가속시험

- 가속시험기간 : 6개월간 실시(제조후, 1, 2, 3, 4, 5, 6월)
- 보존조건 : 38℃, 80% RH 이상
- 시험항목 및 시험방법 : 성장, 표준물질, 미생물(대장균 및 세균) 등 필요항목

(나) 장기안정성시험

- 장기안정성시험기간 : 24개월(또는 12개월) 이상(3개월 단위 측정)
- 보존조건 : 실온
- 시험항목 및 시험방법 : 성장, 표준물질, 미생물(대장균)등 필요항목

(다) 시험방법

시험항목	시험방법	비고
성장	갈색분말 / 짙은갈색액상	
Eleutheroside B와 E 함량	상기에 기술된 분석방법	
베타글루칸 함량	상기에 기술된 분석방법	
대장균균	식품공전	
붕해도	식품공전	

제 2 절 연구수행 결과

1. 오가피-발효물 소재 개발

가. 오가피-발효물(고체)의 최적배양조건 확립 및 소재개발

(1) 최적배양조건 확립방향 : 오가피 발효물의 최적배양조건을 확립하고자 하는 방향은 오가피 생산량의 대부분을 차지하는 것은 물론이고 원가 등 산업적인 경쟁력 등을 고려하여, 오가피 줄기를 주 기질로 하는 최적배양조건을 확립하고자 하였으며, 선행적으로 이루어진 연구사항 중 본 연구진이 보유한 균주특성 등에 대한 연구는 본 연구 개발보고서에 별도로 기술하지 않았음.

(2) 컬럼테스트를 통한 1차 오가피 배지의 최적배양조건 확립

(가) 오가피 줄기와 잎의 혼합비율에 따라 배양되는 버섯균사체의 성장속도와 조밀도 면에서 각각 많은 차이점이 관찰되었음. 특히 버섯균의 생육속도 및 발효물의 균사조밀도 등을 종합적으로 판단할 때 오가피를 기질로 한 버섯균사체 발효물 생산에 있어서는 영지버섯균사체가 가장 우수하였으며, 상황버섯, 노루궁뎅이버섯 순으로 나타났음.

(나) 영지버섯균사체 배양조건 및 발효물의 특성 : 배양용시험관(column, ϕ 35mm)에 영지버섯균사체를 접종한 혼합배지 중 2개 이상의 시험관에서 70% 성장이 이루어진 기간은 14일이며, 이때 100:0(줄기:잎)의 혼합비율로 제조된 배지가 $80\pm 3\%$ 이며, 80:20 배지는 $75\pm 5\%$, 그리고 60:60, 40:60, 0:100의 혼합비율로 제조된 배지에서는 각각 $61\pm 2\%$, $60\pm 3\%$, $52\pm 3\%$ 깊이까지 성장하는데 그쳤다. 그러나 혼합배지의 균사체의 조밀도 부분에 있어서는 Table 3에서 보는바와 같이 80:20의 혼합비율에서 배양된 영지버섯균사체가 100:0에서 배양된 것 보다 더욱 조밀하게 자랐다. 이에 성장속도와 조밀도 등을 고려하여 비교한 결과 영지버섯균사체 배양배지는 80:20의 혼합비율을 적절할 것으로 판단되었다.

(다) 노루궁뎅이버섯균사체 배양조건 및 발효물의 특성 : 배양용시험관(column, ϕ 35mm)에 노루궁뎅이버섯균사체를 접종한 혼합배지 중 2개 이상의 시험관에서 70% 성장이 이루어진 기간은 40일이며, 이때 100:0(줄기:잎)와 80:20의 혼합비율로 제조된 배지가 $75\pm 3\%$ 이며, 60:40과 40:60의 혼합비율로 제조된 배지는 $73\pm 2\%$, 그리고 0:100의 혼합비율로 제조된 배지는 $50\pm 5\%$ 의 깊이까지 성장하였다. 그러나 혼합배지의 균사체 조밀도에 있어서는 Table 3에서 보는바와 같이 60:40과 40:60의 혼합비율로 제조된 배지에서 가장 우수하였으며, 그 다음으로는 0:100이 우수하였으며 100:0과 80:20의 혼합배지는 상대적으로 조밀도가 낮았다. 이에 노루궁뎅이버섯 균사체의 최적배지혼합비율을 성장속도와 균사생육의 조밀도를 고려하여 가시오가피의 줄기와 잎의 비율이 60:40 ~ 40:60 비율이 적절할 것으로 판단되어 본 연구에서는 노루궁뎅이버섯균사체 배양배지는 가시오가피 줄기와 잎

의 혼합비율을 50:50으로 선정하였다.

(라) 상황버섯균사체 배양조건 및 발효물의 특성 : 상황버섯균사체를 접종한 혼합배지 경우는 70% 이상 성장이 이루어진 기간은 30일이며, 100:0(줄기:잎)와 80:20의 혼합비율로 제조된 배지가 $76 \pm 3\%$ 이며, 60:40과 40:60의 혼합비율로 제조된 배지는 $72 \pm 2\%$, 그리고 0:100의 혼합비율로 제조된 배지는 $50 \pm 5\%$ 의 깊이까지 성장하였다. 그러나 혼합배지의 균사체 조밀도에 있어서는 Table 3에서 보는바와 같이 60:40과 40:60의 혼합비율로 제조된 배지에서 가장 우수하였으며, 그 다음으로는 0:100이 우수하였으며 100:0과 80:20의 혼합배지는 상대적으로 조밀도가 낮았다. 이에 상황버섯 균사체의 최적배지혼합비율을 성장속도와 균사생육의 조밀도를 고려하여 가시오가피의 줄기와 잎의 비율이 60:40 ~ 40:60 비율이 적절할 것으로 판단되어, 본 연구에서는 상황버섯균사체 배양배지는 가시오가피 줄기와 잎의 혼합비율을 50:50으로 선정하였다.

Table. 3-7. 오가피(가지와 잎)의 혼합비율이 버섯균사체밀도에 미치는 영향

천연배지 혼합비율 (오가피줄기:잎)	Mycelial density ^{a)}		
	<i>G. lucidum</i> ^{b)}	<i>H. erinaceum</i> ^{c)}	<i>P. linteus</i> ^{d)}
100:0	+++	+++	+++
80:20	+++++	+++	+++
60:40	+++	++++	++++
40:60	+++	++++	++++
0:100	+++	++++	++++

^{a)} +은 균사체생육에 대한 조밀도 정도를 표현한 것으로 +++++가 가장 우수한 조밀도를 나타냄.

^{b)} 오가피 천연배지 각각의 혼합비율로 영지버섯을 14일간 배양한 오가피-영지버섯발효물

^{c)} 오가피 천연배지 각각의 혼합비율로 노루궁뎅이버섯을 40일간 배양한 오가피-노루궁뎅이버섯발효물

^{d)} 오가피 천연배지 각각의 혼합비율로 상황버섯을 30일간 배양한 오가피-상황버섯발효물

(3) 배양포트 배양을 통한 2차 오가피 최적배지배양조건 확립

Table. 3-8. 오가피의 혼합비율에 따른 오가피-버섯균사체 발효물의 균사체밀도

천연배지 혼합비율 (오가피:줄기:잎)	Mycelial density ^{a)}		
	<i>G. lucidum</i> ^{b)}	<i>H. erinaceum</i> ^{c)}	<i>P. linteus</i> ^{d)}
100:0	+++	+++	+++
80:20	+++++	+++	+++
60:40	+++++	++++	++++
40:60	++++	++++	++++
0:100	++++	++++	++++

^{a)} +은 균사체생육에 대한 조밀도 정도를 표현한 것으로 +++++가 가장 우수한 조밀도를 나타냄.

^{b)} 오가피 천연배지 각각의 혼합비율로 영지버섯을 14일간 배양한 오가피-영지버섯발효물

^{c)} 오가피 천연배지 각각의 혼합비율로 노루궁뎅이버섯을 40일간 배양한 오가피-노루궁뎅이버섯발효물

^{d)} 오가피 천연배지 각각의 혼합비율로 상황버섯을 30일간 배양한 오가피-상황버섯발효물

(가) 오가피 줄기와 잎의 혼합비율에 따라 배양되는 버섯균사체의 성장속도와 조밀도를 관찰한 결과 컬럼테스트와 마찬가지로 버섯균의 생육측면이나 균사의 조밀도면에서 영지버섯이 가장 우수하였고, 상황버섯, 노루궁뎅이버섯 순으로 나타났음.

(나) 영지버섯 배양조건 및 발효물의 특성 : Fig. 3-1의 (a)는 오가피 혼합배지에 영지버섯 종균 접종 후 14일간 배양한 발효물로, 발효물에 대한 영지버섯 균사체의 생육정도 및 조밀도를 관찰하기 위하여 발효물의 바닥면과 절단면부분을 사진 찍어 관찰한 것임. 모든 배합비율에서 균사체의 생육은 양호한 편이었으나, 각각 발효물의 조밀도면에서 차이가 있었다. 줄기와 잎의 혼합비율이 80:20인 배지에서의 조밀도가 가장 우수하였으며, 그 다음으로 혼합비율이 60:40과 40:60 순으로 나타났다. 이에 배양포트를 이용한 2차 영지버섯균사체에 적합한 오가피 천연배지 혼합비율은 가지:잎의 비율이 80:20으로 선정하였음.

(다) 노루궁뎅이버섯 배양조건 및 발효물의 특성 : Fig. 3-1의 (b)는 오가피 혼합배지에 노루궁뎅이버섯 종균 접종 후 40일간 배양한 발효물로, 발효물에 대한 노루궁뎅이버섯 균사체의 생육정도 및 조밀도를 관찰하기 위하여 발효물의 바닥면과 절단면부분을 사진 찍어 관찰한 것임. 모든 배합비율에서 노루궁뎅이버섯 균사체의 생육은 양호한 편이었으나, 각각 발효물의 노루궁뎅이버섯균사체의 조밀도면에서 차이가 있었다. 줄기와 잎의 혼합비율이 60:40인 배지와 40:60인 배지가 조밀도가

가장 우수하였으며, 그 다음으로 혼합비율이 80:20과 0:100 순으로 나타났다. 이에 배양포트를 이용한 2차 노루궁뎅이버섯에 적합한 오가피 천연배지는 가지:잎의 비율이 60~40 : 40:60으로 나타나 50:50 비율로 선정하였음.

- (다) 상황버섯 배양조건 및 발효물의 특성 : Fig. 3-1의 (c)는 오가피 혼합배지에 상황버섯 종균 접종 후 30일간 배양한 발효물로, 발효물에 대한 상황버섯 균사체의 생육정도 및 조밀도를 확인하기 위하여 발효물의 바닥면과 절단면부분을 사진 찍어 관찰한 것임. 모든 배합비율에서 상황버섯 균사체의 생육은 양호한 편이었으나, 각각 발효물의 상황버섯균사체의 조밀도면에서 차이가 있었다. 노루궁뎅이버섯과 마찬가지로 줄기와 잎의 혼합비율이 60:40인 배지와 40:60인 배지가 조밀도가 가장 우수하게 관찰되었으며, 그 다음으로 혼합비율이 0:100과 80:20 순으로 나타났다. 이에 배양포트를 이용한 2차 상황버섯균사체에 적합한 오가피 천연배지는 가지:잎의 비율이 60~40 : 40:60으로 나타나 50:50 비율로 선정하였음.



Fig. 3-1. 오가피 줄기와 잎의 배합비율에 따른 버섯균사체의 발효물

- (a) 오가피 줄기와 잎의 배합비율에 따른 영지버섯균사체를 14일간 배양한 발효물사진
- (b) 오가피 줄기와 잎의 배합비율에 따른 노루궁뎅이버섯균사체를 40일간 배양한 발효물사진
- (c) 오가피 줄기와 잎의 배합비율에 따른 상황버섯균사체를 30일간 배양한 발효물사진

(4) 컬럼테스트 및 배양포트 배양을 통한 오가피 배지의 최적배양조건 확립 및 특징

(가) 영지버섯균사체 최적배지배양조건 선택 : 영지버섯은 1차 컬럼테스트 및 2차 배양포트 테스트에서 공통적으로 오가피가지:잎의 비율이 80:20 조건에서 가장 우수하게 나타나 최적배양배지로 선정하였으며, 특히 노루궁뎅이버섯 및 상황버섯과 비교하였을때 균사체의 생육정도도 빨랐으며, 균사체의 조밀도도 우수한 결과를 얻었음.

(나) 노루궁뎅이버섯균사체 최적배지배양조건 선택 : 1차 및 2차의 테스트에서 60~40:40~60의 비율에서 조밀도가 우수하게 나타나 최적배지를 50:50으로 선정하였음. 그러나 노루궁뎅이버섯의 배양기간이 40일로 영지버섯의 2.6배나 긴 단점을 가지고 있음.

(다) 상황버섯균사체 최적배지배양조건 선택: 1차 및 2차 테스트를 거쳐 노루궁뎅이버섯과 마찬가지로 60~40:40~60의 비율에서 조밀도가 우수하게 나타나 최적배지를 50:50으로 선정하였으며, 발효기간이 30일로 영지버섯의 2배로 나타난 것이 단점임.

(5) 최적배지로 발효물 제조방법

(가) 방법 : 산업용 배양포트(2000ml)에 영지버섯은 오가피의 줄기와 잎의 비율이 80:20, 노루궁뎅이버섯과 상황버섯은 50:50 비율에 따라 배지를 제조하여 배양포트 2/3를 채우고 121℃에서 40분간 멸균을 실시한 다음 오가피 배지를 25℃까지 급랭시켰음. 이것을 천연배지로 하여 각각의 버섯종균을 9%씩 접종하고 각각의 최적배양온도(영지버섯과 상황버섯은 28℃, 노루궁뎅이버섯은 24℃)에서 영지버섯은 14일, 노루궁뎅이버섯은 40일, 상황버섯은 30일 배양하여 각각의 오가피 발효물을 수득하였음.

(나) 결과



Fig. 3-2. 최적배지조건으로 배양한 오가피-발효물

- Fig. 3-2. 은 각각의 버섯균류의 종균을 접종한 다음 각각의 배양일수에 따라 얻는 발효물로 균사의 생육상태나, 조밀도가 우수하였음.

(6) 오가피-발효물(고체)의 대량배양 최적배양조건 확립

(가) 대량배양 조건 확립방향 : 오가피 발효물의 대량배양조건을 확립하고자 하는 방향은 산업화소재로 적용가능성 여부를 확인하고자 하는 것으로, 1차년도 실험실 내 기기인 성장상(Growth Chamber)에서 이루어진 최적배양조건이 산업화에 적합한 온습도가 자동조절 가능한 배양시설에서 대량배양을 진행하였음. 본 연구진이 사용한 대량배양시설은 고체발효를 위해 시설된 첨단배양시설로 (주)휴림과 협력체계를 구축하고 있는 기관에서 수행하였음.

(나)



Fig. 3-3. 오가피 천연배지를 이용하여 대량배양한 오가피-버섯발효물

- ㉓ 오가피-영지버섯 발효물(FM-5110) : 오가피의 줄기와 잎의 비율이 80:20으로 혼합한 천연배지에서 14일간 배양하면서 균사체의 밀도를 확인하여 발효기간을 확인하였으며, 최종적으로 오가피-영지버섯 발효물을 수득하였음(Fig. 3-3, Table 3-9).
- ㉔ 오가피-노루궁뎅이버섯 발효물(FM-5120) : 오가피의 줄기와 잎의 비율을 50:50으로 혼합한 천연배지에서 40일간 배양하면서 균사체의 밀도를 확인하여 발효기간을 확인하였으며, 최종적으로 오가피-노루궁뎅이버섯 발효물을 수득하였음(Fig. 3-3, Table 3-9).
- ㉕ 오가피-상황버섯 발효물(FM-5130) : 오가피의 줄기와 잎의 비율을 50:50으로 혼합한 천연배지에서 30일간 배양하면서 균사체의 밀도를 확인하여 발효기간을 확인하였으

며, 최종적으로 오가피-상황버섯 발효물을 수득하였음(Fig. 3-3, Table 3-9).

Table. 3-9. 발효일수에 따른 오가피-버섯균사체 발효물의 균사체밀도

발효일수	Mycelial density ^{a)}		
	<i>G. lucidum</i> ^{b)}	<i>H. erinaceum</i> ^{c)}	<i>P. linteus</i> ^{d)}
5일	+	-	-
10일	+++	+	+
15일(14일)	+++++	+	++
20일		++	+++
25일		+++	++++
30일		++++	+++++
35일		++++	
40일		+++++	

^{a)} +은 균사체생육에 대한 조밀도 정도를 표현한 것으로 +++++가 가장 우수한 조밀도를 나타냄.

^{b)} 오가피 천연배지 각각의 혼합비율로 영지버섯을 14일간 배양한 오가피-영지버섯발효물

^{c)} 오가피 천연배지 각각의 혼합비율로 노루궁뎅이버섯을 40일간 배양한 오가피-노루궁뎅이버섯발효물

^{d)} 오가피 천연배지 각각의 혼합비율로 상황버섯을 30일간 배양한 오가피-상황버섯발효물

나. 오가피-발효물(액체)의 최적배양조건 확립 및 소재개발

(1) 오가피-발효물(액체)의 최적배지조건 확립 : 오가피추출물과 동아추출물의 혼합비율

(가) 방법 : 상기의 오가피 추출물과 동아추출물을 각각 90중량%: 10중량%, 70중량%:30중량%, 50중량%: 50중량% 배지로 하여 버섯균사체를 배양 할 때에 균체량 측정 및 생육상태를 관찰하여 최적배양조건을 확립하고자 하였다.

(나) 결과 :

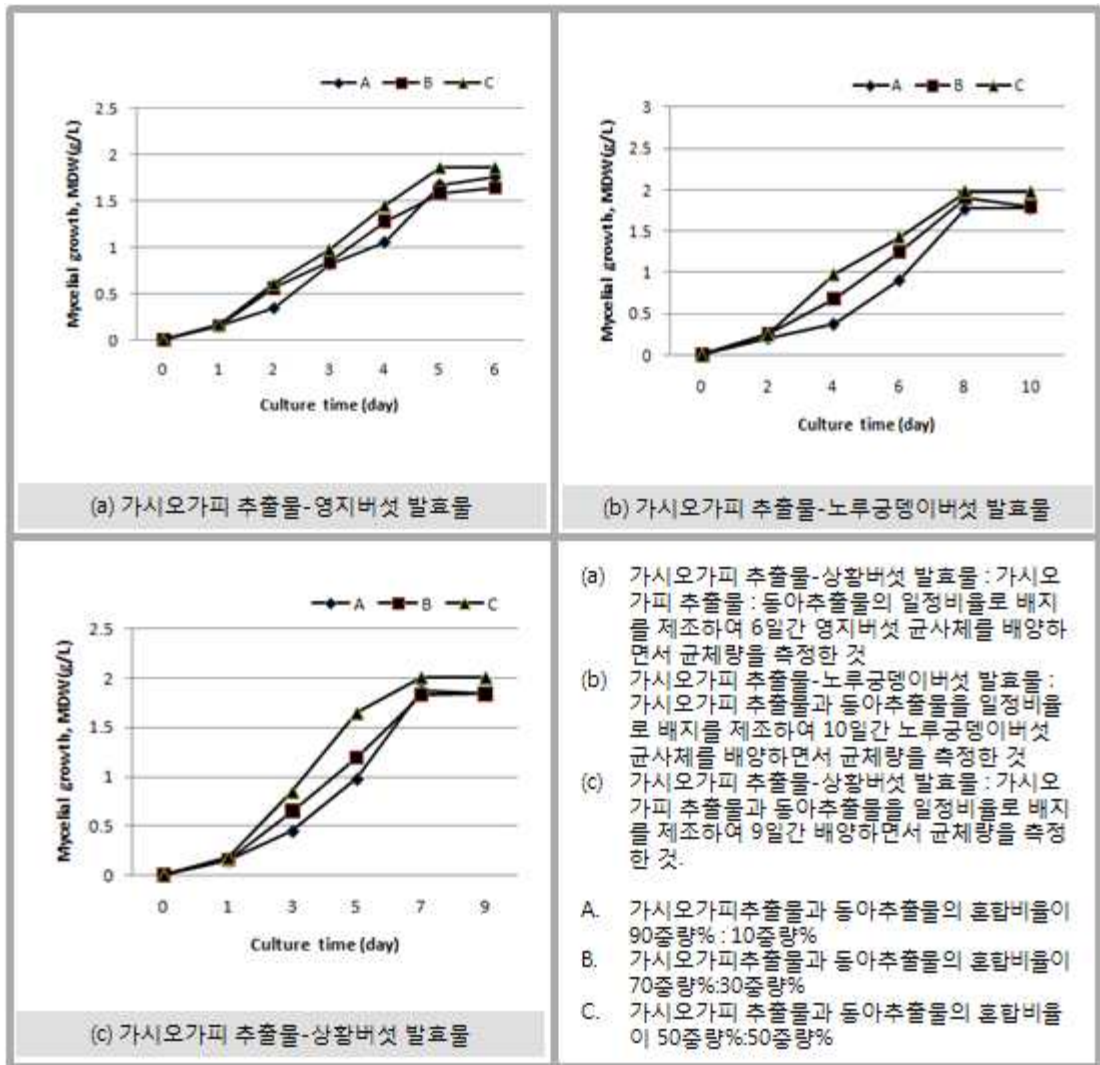


Fig. 3-4. 오가피 추출물과 동아추출물의 버섯균주(영지버섯, 노루궁뎅이버섯, 상황버섯)에 배양에 일수별 균체량 측정

① 고체발효의 경우, 순수한 오가피를 기질로 사용하여 버섯발효물 생산이 가능하지만, 오가피추출물을 이용한 액체발효의 경우 순수한 오가피 추출물만 사용해서는 거의 발효가 진행되지 않는다, 그래서 본 연구에서는 오가피추출물에 동아추출물을 중량%로 첨가하여 발효를 진행시켰음.

- ② 오가피추출물과 동아추출물의 혼합비율에 따라 버섯균사체의 생육에 약간의 차이가 있었으나, 전체적으로 3개의 실험군이 모두 유의적으로 활용가능한 결과를 얻었음.
- ③ 오가피추출물-영지버섯발효물의 경우, 6일간 배양하면서 혼합비율별 균체량을 측정한 결과 5일째의 균체량이 1.59~1.89 g/L의 결과를 얻었음.
- ④ 오가피추출물-노루궁뎅이버섯발효물의 경우, 10일간 배양하면서 혼합비율별 균체량을 측정한 결과 8일째의 균체량이 1.77~1.98 g/L의 결과를 얻었음.
- ⑤ 오가피추출물-상황버섯버섯발효물의 경우, 9일간 배양하면서 혼합비율별 균체량을 측정한 결과 7일째의 균체량이 1.88~2.01 g/L의 결과를 얻었음.
- ⑥ 상기결과로 3종류의 혼합비율을 모두 사용이 가능하나, 본 연구의 목적에 맞게 오가피 추출물대 동아추출물의 비가 90중량%대 10중량%인 것을 선택하였음.

(2) 최적배지배양조건으로 오가피추출물 발효물 제조방법

(가) 방법 : 상기의 방법에서 선택된 오가피 추출물과 동아추출물이 각각 90중량%: 10중량%로 제조한 천연배지를 BIO-REACTOR 넣은 다음 120℃에서 40분간 멸균한 다음 온도를 25℃까지 급랭하여 천연배지를 준비한 후, 각각의 종균을 접종하여 영지버섯과 상황버섯은 28℃에서, 노루궁뎅이버섯은 24℃에서 배양하였다.

(나) 결과 :

- ① Fig. 3-5은 오가피추출물의 최적배지에 의한 영지버섯, 노루궁뎅이버섯 및 상황버섯 각각의 bio reactor 배양으로 얻어진 배양물을 사진으로 찍어서 나타난 것임.
- ② 영지버섯의 경우 5일간 배양하였으며, 노루궁뎅이버섯과 상황버섯은 각각 8일과 7일간 배양한 발효물임.
- ③ 3종류의 발효물중 가장 우수한 것은 오가피추출물-상황버섯발효물로 상황버섯균사체의 생육정도나 균체량 등에서 가장 좋은 결과를 얻었음.



(a) 오가피추출물-영지버섯 발효물(오가피추출물:동아추출물=90:10)



(b) 오가피추출물-노루궁뎅이버섯 발효물(오가피추출물:동아추출물=90:10)



(c) 오가피추출물-상황버섯 발효물(오가피추출물:동아추출물=90:10)

Fig. 3-5. 오가피 추출물의 최적배지조건으로 배양된 발효물

(3) 오가피-발효물(액체)의 pilot 배양 조건 확립

(가) 대량배양 조건 확립방향

- ① 1차년도에 선택된 오가피 추출물과 동아추출물이 각각 90중량%: 10중량%로 제조한 천연배지를 이용하여 파일럿 수준의 발효조건을 확립하는 단계임.
- ② 본 사업에서 추진하는 개별인정을 추진하는 소재는 오가피-버섯발효물(고체)이며, 본 액체발효물의 경우 발효조건 확립을 통한 사업성 및 산업화 가능성 확인하고자 함.

(나) 수행방법

- ① 오가피 천연배지 제조방법 : 오가피줄기의 마쇄 단계를 거쳐 균일한 크기의 분쇄물을 얻은 후, 압력 하에 85℃에서 24시간 추출한 다음 여과하여 얻은 추출액을 2 brix로 보정하여 오가피 추출물을 준비한다. 오가피 추출물 중량%: 동아추출액 중량% = 90:10 비율로 300L 발효조에 200L를 투입한 다음 멸균한 다음 25℃까지 냉각시켜 천연배지를 준비한다.
- ② 종균배양 : 30L종균배양기에 20L배지를 조성하고, 준비된 1.8L종균을 각각 접종하여 영지버섯의 경우 4일간, 노루궁뎅이버섯의 경우 5일간, 상황버섯의 경우 5일간 배양하여 300L 발효기에 접종한다.
- ③ 발효 및 배양 : 영지버섯과 상황버섯은 배양온도를 24℃, 노루궁뎅이버섯은 28℃로 하여 각각 배양하며 최적발효기간을 검토하였음.

(다) 수행결과

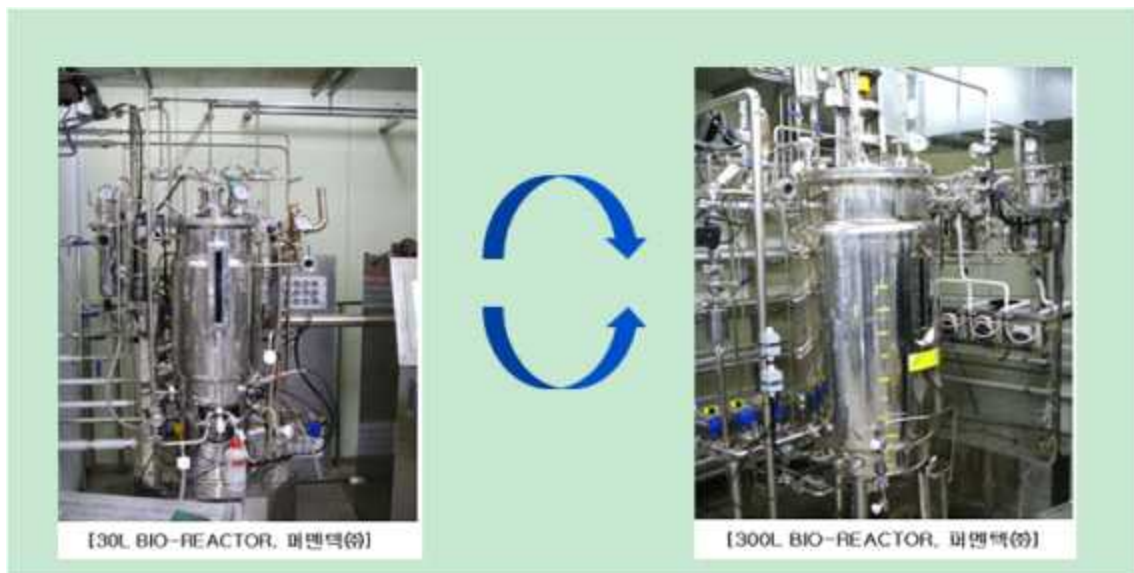


Fig. 3-6. 오가피추출물을 천연배지한 버섯균사체의 파일럿단계(300L)의 액체발효

- ① 파일럿(300L) 및 Scale Up(3000L) 급의 발효기는 (주)휴림중앙연구소(충북 오창) 인근 정부투자기관에 보유하고 있는 기기를 사용하였음.

Table. 3-10. 발효일수에 따른 균체증가량

발효일수	균체증가량(g/L)		
	<i>G. lucidum</i>	<i>H. erinaceum</i>	<i>P. linteus</i>
1	*	*	*
2	*	*	*
3	0.7	0.4	0.4
4	1.9	0.6	0.8
5	2.1	1.2	1.5
6	2.1	1.9	2.2
7		2.1	2.2
8		2.1	
9			
10			

- ② 균체량 증가량의 편차는 대부분 ± 0.15 정도임.
- ③ 발효일수에 따른 균체량 증가량을 측정한 결과, 같은 균체량 증가량을 기준으로 실험실내에서 최적배양조건 보다 배양일수가 1~2일정도 빨랐으며, 균체량 증가량도 많았음.
- ④ 영지버섯의 발효일수는 5일이며 이때 균체증가량은 2.1 ± 0.15 g/L 이며, 노루궁뎅이버섯 발효일수는 7일째로 균체증가량은 2.0 ± 0.15 g/L이며, 상황버섯 발효일수는 6일째로 균체증가량은 2.2 ± 0.15 g/L임.

2. 오가피-발효물의 지표성분 및 주요성분 분석

가. 오가피-발효물의 Eleutheroside B와 Eleutheroside E 함량(mg/g)

(1) Eleutheroside B와 Eleutheroside E 검량선 작성

(가) Eleutheroside B와 E를 정량하기 위하여 표준물질의 검량선을 작성한 결과는 Table 3-11과 같다. 검량선의 회귀방정식은 Eleutheroside B가 $y(\text{area}) = 7.20e+0.004 \times X - 6.63e+003$ ($R^2=0.999430$)이었고, Eleutheroside E가 $y(\text{area}) = 2.38e+0.004 \times X - 4.64e+003$ ($R^2=0.999823$)로 고도의 유의적인 정의 상관관계가 있었다.

(나) Retention time은 Fig. 3-8에서와 같이 Capcell pak C₁₈(5 μ m 4.6 \times 250 mm, Shiseido)컬럼을 사용하여 Table 3-11의 조건으로 분석하였을 때 Eleutheroside B는 5.842min, Eleutheroside E는 15.872min 이었다. UV 220nm에서 Eleutherosides의 검출감도는 Eleutheroside B가 Eleutheroside E 보다 높았다.

Table 3-11. Standard의 농도별 Area와 Calibration Curve

Eleutheroside B 농도(mg/L)	면적 (Area)	그래프 1
0.5	33277	
1.0	66505	
2.0	137895	
3.1	210183	
4.1	284036	
5.1	363835	
기울기(slope)	7.20e+0.004	
y-절편	-6.63e+003	
상관계수(R ²)	0.999430	
Eleutheroside E 농도(mg/L)	면적 (Area)	그래프 2
0.6	9096	
1.2	22216	
2.3	50460	
3.5	78058	
4.6	105954	
5.8	131668	
기울기(slope)	2.38e+0.004	
y-절편	-4.64e+003	
상관계수(R ²)	0.999823	

(2) Standard와 Sample의 Chromatogram 및 Spectrum

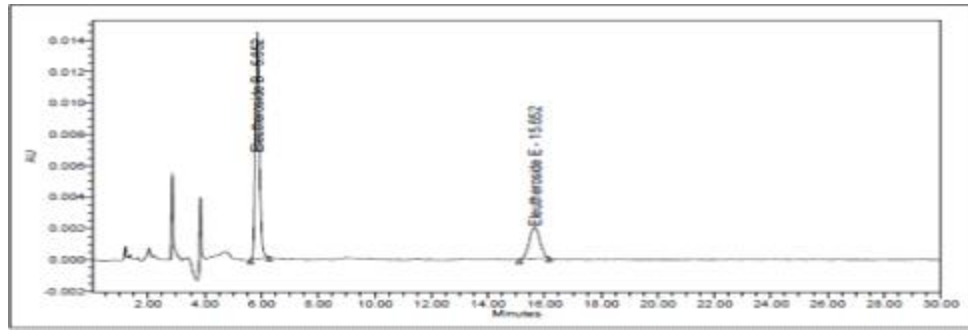


Fig. 3-8. HPLC-chromatogram of Eleutheroside B and Eleutheroside E (STD)

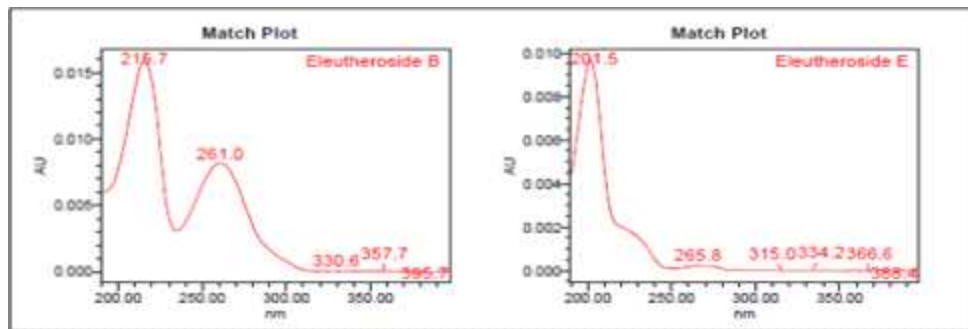


Fig. 3-9. HPLC-chromatogram Spectrum of Eleutheroside B and Eleutheroside E (STD)

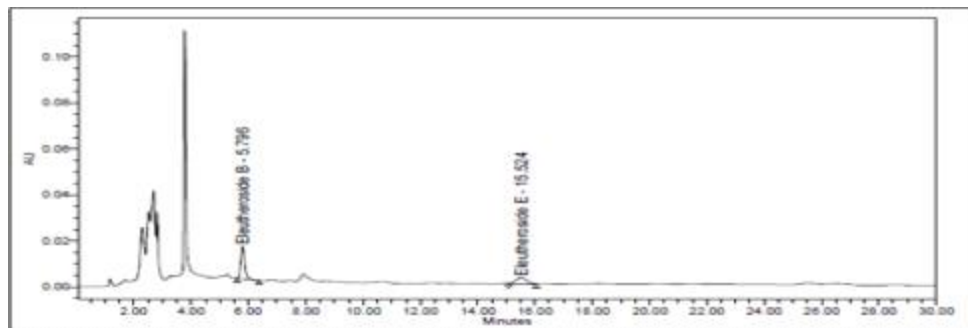


Fig. 3-10. HPLC-chromatogram of Eleutheroside B and Eleutheroside E (NR-5012)

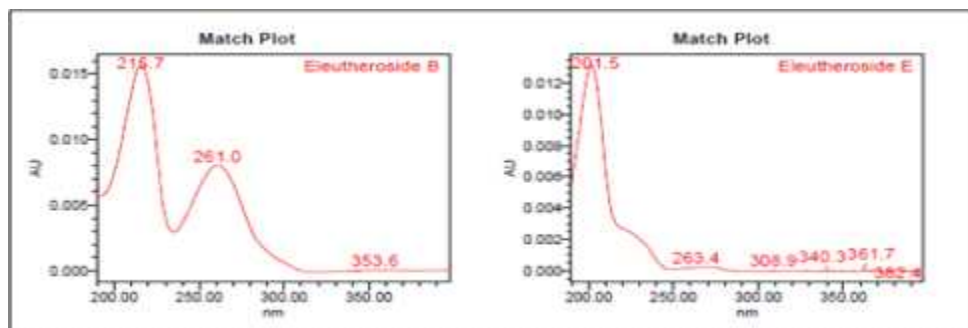


Fig. 3-11. HPLC-chromatogram Spectrum of Eleutheroside B and Eleutheroside E (NR-5012)

(3) Eleutheroside B와 Eleutheroside E의 평균함량(mg/g) 및 표준편차(mg/g)

- (가) 본 연구에서는 오가피-버섯발효물이 건강기능식품원료(또는 식품원료)로 산업화시, 식품원료에 대한 품질관리를 목적으로 오가피-버섯발효물에 대한 지표성분을 설정하는 표준화작업임.
- (나) 최적배지발효조건으로 오가피-영지버섯발효물(FM5110)과 오가피-노루궁뎅이버섯발효물(FM5120), 오가피-상황버섯발효물(FM5130)을 각각 같은 조건으로 5회 반복 배양하여, 원료(시료)화 공정을 거쳐서 얻어지는 각각의 오가피-버섯발효추출분말(산업화시 식품원료소재)에 대하여 지표성분으로 사용하고자 하는 Eleutheroside B와 Eleutheroside E의 평균함량(mg/g)과 표준편차를 구하여 표준화하고자 하였음.
- (다) 각각의 오가피-발효물은 추출(Water/70%EtOH), 농축, 동결건조를 통해 시료화한 후 각각 무게를 측정하여 물을 가한 후 Methanol로 최종 가하여 60℃에서 40분간 초음파추출 하여 Eleutheroside B와 Eleutheroside E의 함량을 측정하였다.
- (라) 측정된 오가피 원물의 Eleutheroside B와 E 분석 결과 줄기 와 잎의 배합이 8:2인 배합물에서 5:5배합물보다 높은 함량(NR-5011>NR-5021, NR-5012>NR-5022)을 나타내었고 오가피 70%EtOH 추출물이 Water 추출물보다 높은 함량을 보이는 것을 확인하였다(NR-5011<NR-5012, NR-5021<NR-5022). 즉 오가피원물에서는 줄기가 잎보다 Eleutheroside가 많이 함유되어 있고, 70%EtOH추출을 한 시료가 Eleutheroside의 함량이 높아지는 것을 확인할 수 있었다(Table 3-12).
- (마) 고체배양물에서 Eleutheroside B는 노루궁뎅이버섯균사체를 배양한 발효물인 FM-5121 (0.067 ± 0.004 mg/g)과 FM-5122 (0.090 ± 0.035 mg/g)이 Eleutheroside E는 상황버섯균사체를 배양한 발효물인 FM-5131 (0.074 ± 0.064 mg/g)과 FM-5132 (0.102 ± 0.025 mg/g)이 약간 높게 측정되었고 70%EtOH 추출물이 Water 추출물보다 Eleutheroside 함량이 높게 측정되는 것을 확인할 수 있었다(Table 3-13). 이와 같이 오갈피나무의 부위에 따른 Eleutheroside 함량의 변화를 분석한 논문을 보면 줄기>뿌리>잎 순으로 잎에서 가장 낮은 함량을 나타내는 것을 확인할 수 있으며 최적추출조건과 성분조성을 분석하였을 때 에탄올 농도가 높을수록 Eleutheroside 수율이 증가하는 것을 확인할 수 있었다.
- (바) 오가피 버섯발효물(고체배양)에서는 오가피 원물과 비교하였을 때 Eleutheroside B와 E의 함유량이 감소하는 경향을 나타내었는데 발효과정을 통해 Eleutheroside의 함량에 영향을 주는 것으로 생각되어지며 함량 값이 0.5mg/g 이하로 측정이 되는 것을 확인하였다(Table 3-14).

Table 3-12. 오가피 원물의 Eleutheroside B와 EleutherosideE 의 평균함량(mg/g)

(Unit : mg/g)		
sample number	Eleutheroside B	Eleutheroside E
NR-5011	3.325 ± 0.024	3.148 ± 0.384
NR-5021	1.638 ± 0.115	1.437 ± 0.087
NR-5012	3.148 ± 0.114	3.243 ± 0.182
NR-5022	1.658 ± 0.124	1.424 ± 0.094

* NR-5011, NR5012, NR-5021 and NR-5022 symbols are referred to note of Table 3-3

Table 3-13. 오가피-버섯발효물(고체배양)의 Eleutheroside B와 Eleutheroside E의 평균함량(mg/g)

(Unit : mg/g)		
sample number	Eleutheroside B	Eleutheroside E
FM-5111	0.050	0.064 ± 0.011
FM-5121	0.067 ± 0.004	0.047 ± 0.006
FM-5131	0.028 ± 0.006	0.074 ± 0.064
FM-5112	0.038 ± 0.002	0.091 ± 0.012
FM-5122	0.090 ± 0.035	0.028 ± 0.023
FM-5132	0.041 ± 0.012	0.102 ± 0.025

* FM5111, FM5112, FM5121, FM5122, FM5131 and FM 5133 symbols are referred to note of Table 3-3

나. 오가피-발효물의 베타글루칸(β -glucan) 함량

- (1) 본 연구에서는 오가피-버섯발효물이 건강기능식품원료(또는 식품원료)로 산업화시, 식품원료에 대한 품질관리를 목적으로 오가피-버섯발효물에 대한 지표성분을 설정하는 표준화작업임.
- (2) 최적배지발효조건으로 오가피-영지버섯발효물(FM5110)과 오가피-노루궁뎅이버섯발효물(FM5120), 오가피-상황버섯발효물(FM5130)을 각각 같은 조건으로 5회 반복 배양하여, 원료(시료)화 공정을 거쳐서 얻어지는 각각의 오가피-버섯발효추출분말(산업화시 식품 원료소재)에 대하여 지표성분으로 사용하고자 β -glucan의 함량 및 표준편차를 측정하여 표준화하고자 함.
- (3) β -glucan 함량 측정 시 함량이 표기된 Control과 같이 시험을 진행하여 실험의 오차범위를 확인하여 주었다. (Control의 β -glucan 함량(%): 56.5%)
- (4) 오가피 원물의 β -glucan 함량 측정 결과 줄기와 잎의 배합비율이 8:2인 NR-5011 ($7.63 \pm 0.23\%$)과 NR-5012($7.87 \pm 0.38\%$)가 5:5 배합물 보다 높게 측정되는 것을 확인하였으며 70%EtOH 추출물(NR-5012)이 Water 추출물(NR-5011)보다 약간 높게 함량이 측정되는 것을 통해 줄기의 함유량이 많고 70%EtOH 추출 할 경우 β -glucan함량이 높게 측정이 되는 것을 알 수 있었다(Table 3-14). 오가피-버섯발효물(고체배양)의 β -glucan의 함량 측정 결과 Water 추출물은 FM5111>FM-5131>FM-5121 함량 순이었고 70%EtOH 추출물은 FM-5112>FM-5132>FM-5122 함량순서로 확인이 되었다. 이를 통해 영지버섯균사체 배양물>상황버섯균사체 배양물>노루궁뎅이버섯균사체 배양물의 순으로 나타나는 것을 확인할 수 있었고 오가피 원물과 비교했을 때 β -gluca함량이 감소되는 것을 알 수 있었다(Table 3-15).

Table 3-14. 오가피 원물의 β -glucan 의 함량

(Unit : %)			
sample number	Total Glucan	Alpha-Glucan	Beta-Glucan
Control	57.22	0.50	56.71 \pm 0.36
NR-5011	8.08	0.45	7.63 \pm 0.23
NR-5021	7.01	0.52	6.49 \pm 0.42
NR-5012	8.35	0.48	7.87 \pm 0.38
NR-5022	7.25	0.61	6.64 \pm 0.56

* NR-5011, NR5012, NR-5021 and NR-5022 symbols are referred to note of Table 3-3

Table 3-15. 오가피-발효물(고체배양)의 β -glucan 의 함량

(Unit : %)			
sample number	Total Glucan	Alpha-Glucan	Beta-Glucan
Control	57.22	0.50	56.71 \pm 0.36
FM-5111	7.06	0.49	6.57 \pm 0.57
FM-5121	5.95	0.57	5.38 \pm 0.31
FM-5131	6.27	0.52	5.75 \pm 0.24
FM-5112	7.76	0.45	7.31 \pm 0.45
FM-5122	6.16	0.48	5.68 \pm 0.53
FM-5132	6.92	0.51	6.41 \pm 0.16

* FM5111, FM5112, FM5121, FM5122, FM5131 and FM 5132 symbols are referred to note of Table 3-3

다. 오가피-발효물의 지표물질 선정

(1) 오가피-발효물의 지표물질 선정

- (가) Eleutheroside B와 Eleutheroside E : 천연물인 오가피의 지표성분으로 잘 알려진 Eleutheroside B와 Eleutheroside E를 오가피 발효물의 지표성분으로 선정하여 분석방법을 확립하였으며, 또한 발효전후의 각각의 시료에 대하여 Eleutheroside B와 Eleutheroside E의 변화량을 측정하여 오가피 발효물이 산업화시 품질을 관리하는 주요 지표성분으로 하고자 하였음.
- (나) 또한 버섯균사체와 밀접한 관련이 있는 β -glucan 을 오가피-발효물의 지표성분으로 선정하여 분석방법을 확립하였으며, 발효전후의 함량 및 변화량을 측정하여 Eleutheroside B와 Eleutheroside E와 함께 오가피-발효물의 품질을 관리할 수 있는 지표성분으로 하고자 하였음.
- (다) 본 표준화작업을 수행하면서, 최적배지조건으로 5회를 생산하여 각각 측정하여 오가피-발효추출분말 소재에 대한 표준화를 추진하였음.
- (라) 오가피-발효추출분말 소재(3종)에 대한 지표물질 기준은 Table 3-16과 같음.

Table 3-16. 오가피-발효물의 1차 지표성분 범위 설정

sample number	Eleutheroside B (Unit : mg/g)	Eleutheroside E (Unit : mg/g)	Beta-Glucan (Unit : %)
FM-5111	< 0.15	< 0.20	5 < Beta-Glucan < 8
FM-5121	< 0.20	< 0.15	4 < Beta-Glucan < 7
FM-5131	< 0.15	< 0.20	4 < Beta-Glucan < 7
FM-5112	< 0.15	< 0.27	5 < Beta-Glucan < 9
FM-5122	< 0.27	< 0.15	4 < Beta-Glucan < 7
FM-5132	< 0.15	< 0.30	5 < Beta-Glucan < 8

* FM5111, FM5112, FM5121, FM5122, FM5131 and FM 5132 symbols are referred to note of Table 3-3

라. 대량생산한 오가피-발효물의 지표성분 분석 및 적합성 평가

(1) Eleutheroside B, Eleutheroside E의 함량분석을 통한 오가피-버섯발효물의 표준화 확인 :

(가) 대량생산한 오가피-발효물의 지표성분인 Eleutheroside B와 Eleutheroside E를 분석하여 Table 3-17에 나타내었음.

(나) 각각의 오가피 발효물의 Eleutheroside B는 FM-5111 0.051 ± 0.011 mg/g, FM-5121 0.065 ± 0.005 mg/g, FM-5131 0.027 ± 0.001 mg/g, FM-5112 0.039 ± 0.003 mg/g, FM-5122 0.060 ± 0.028 mg/g, FM-5132 0.037 ± 0.020 mg/g으로 분석되었으며, Eleutheroside E는 FM-5111 0.056 ± 0.013 mg/g, FM-5121 0.047 ± 0.003 mg/g, FM-5131 0.076 ± 0.025 mg/g, FM-5112 0.062 ± 0.012 mg/g, FM-5122 0.032 ± 0.031 mg/g, FM-5132 0.091 ± 0.011 mg/g으로 분석되었다. 이와 같이 오가피의 원물이 발효과정을 거치면서 Eleutheroside B와 E의 함량이 대부분 0.1mg/g 이하의 함량을 가지고 있음이 확인하였음.

(다) 이러한 결과는 오가피-발효물의 표준화에 적합한 지표성분인 범위 내에 포함된 것으로 건강기능식품소재로 활용하기 적합하다고 판단함.

Table 3-17. 대량배양 한 오가피-버섯발효물의 Eleutheroside B와 Eleutheroside E의 함량

sample number ¹⁾	Eleutheroside B (Unit : mg/g)	Eleutheroside E (Unit : mg/g)	평 가
FM-5111	0.051 ± 0.011	0.056 ± 0.013	적합
FM-5121	0.065 ± 0.005	0.047 ± 0.003	적합
FM-5131	0.027 ± 0.001	0.076 ± 0.025	적합
FM-5112	0.039 ± 0.003	0.062 ± 0.012	적합
FM-5122	0.060 ± 0.028	0.032 ± 0.031	적합
FM-5132	0.037 ± 0.020	0.091 ± 0.011	적합

¹⁾ See the legend of Table 3-3.

(2) β -glucan 함량분석을 통한 오가피-버섯발효물의 표준화 확인 :

- (가) 대량생산한 오가피-발효물의 지표성분인 β -glucan을 분석하여 Table 3-18에 나타내었다.
- (나) 대량배양 한 오가피-영지버섯 발효물과 오가피-노루궁뎅이버섯 발효물, 오가피-상황버섯 발효물을 각각 같은 조건으로 3회 반복 배양하여, 원료(시료)화 공정을 거쳐서 얻어지는 각각의 오가피-버섯발효추출분말(산업화시 식품 원료소재)에 대하여 β -glucan의 함량을 측정하였음.
- (다) β -glucan 함량 측정 시 함량이 표기된 Control과 같이 시험을 진행하여 실험의 오차범위를 확인하여 주었다. (Control의 β -glucan 함량(%): 56.5%)
- (라) 오가피 원물의 β -glucan 함량 측정 결과 줄기와 잎의 배합비율이 8:2인 NR-5011 ($6.83 \pm 0.11\%$)과 NR-5021($5.87 \pm 0.37\%$)가 5:5 배합물 보다 높게 측정되는 것을 확인하였으며 70%EtOH 추출물(NR-5012)이 Water 추출물(NR-5010)보다 약간 높게 함량이 측정되는 것을 통해 줄기의 함유량이 많고 70%EtOH 추출 할 경우 β -glucan함량이 높게 측정이 되는 것을 알 수 있었다(Table 3-5). 오가피-버섯발효물(고체배양)의 β -glucan 의 함량 측정 결과 Water 추출물은 FM5111>FM-5131>FM-5121 함량 순이었고 70%EtOH 추출물은 FM-5112>FM-5132>FM-5122 함량순서로 확인이 되었다. 이를 통해 영지버섯균사체 배양물>상황버섯균사체 배양물>노루궁뎅이버섯균사체 배양물의 순으로 나타나는 것을 확인할 수 있었음(Table 3-18).
- (마) 이러한 결과는 오가피-발효물의 표준화에 적합한 지표성분인 범위 내에 포함된 것으로 건강기능식품소재로 활용하기 적합하다고 판단함.

Table 3-18. 대량배양 한 오가피-버섯발효물의 베타글루칸(β -glucan)의 함량

sample number ¹⁾	Total Glucan(%)	Alpha-Glucan(%)	Beta-Glucan(%)	평 가
Control	54.62	0.13	54.51 \pm 0.21	적합
FM-5111	4.96	0.49	4.47 \pm 0.14	적합
FM-5121	3.99	0.58	3.41 \pm 0.15	적합
FM-5131	4.70	0.55	4.15 \pm 0.06	적합
FM-5112	5.68	0.50	5.18 \pm 0.36	적합
FM-5122	4.23	0.49	3.74 \pm 0.40	적합
FM-5132	4.85	0.48	4.37 \pm 0.32	적합

¹⁾ See the legend of Table 3-3.

마. 오가피-발효물의 지방산(Fatty acid) 함량분석

(1) 오가피-발효물의 지방산(Fatty acid) 함량분석

- (가) 오가피 추출물 및 오가피-발효물 추출물의 지방산은 GC 패턴 상에서 총 12종이 동정되었으며, 분석 결과 오가피-발효물 추출물이 오가피 추출물에 비해 대체로 지방산의 함량이 높게 나타나는 것을 확인하였음.
- (나) 불포화 지방산의 경우 오가피 추출물은 NR-5012(11.21%), NR-5022(4.53%)로 오가피-발효물 추출물은 FM-5112(29.11%), FM-5122(16.45%), FM-5132(5.23%)로 오가피-발효물 추출물에서 높은 함량을 보이는 것을 확인하였음.
- (다) 특히 불포화 지방산 중 Linoleic acid의 함량의 경우, 오가피 추출물은 NR-5012(3.83%), NR-5022(0.51%)로 오가피-발효물 추출물은 FM-5112(10.19%), FM-5122(5.61%), FM-5132(0.57%)로 오가피-발효물 추출물에서 높은 함량을 보이는 것을 확인하였음.

Table 3-19. Fatty acid contents in *Acanthopanax senticosus* and *Acanthopanax senticosus*-fermented mushroom

(Unit : %)					
Fatty acid	NR-5012 ¹⁾	NR-5022 ¹⁾	FM-5112 ¹⁾	FM-5122 ¹⁾	FM-5132 ¹⁾
Lauric acid	0.46	0.43	0.65	0.40	0.45
Myristic acid	2.62	2.89	4.62	2.25	2.62
Palmitic acid	2.27	3.72	5.58	3.87	29.43
Stearic acid	10.21	7.07	17.20	7.24	4.87
Nonadecylic acid	0.71	0.48	1.49	0.61	0.41
Arachidic acid	6.97	3.57	8.38	0.71	3.65
Decanoic acid	0.13	0.13	0.36	1.20	0.95
Pentadecanoic acid	2.70	1.14	8.05	1.25	1.13
Heptadecanoic	2.91	2.07	5.45	1.33	1.52
Oleic acid	1.49	0.67	4.74	1.57	1.05
Linoleic acid	3.83	0.51	10.19	5.61	0.57
Linolenic acid	0.16	ND	0.32	5.51	ND
²⁾ T.S.F.A	23.25	18.16	37.92	15.09	41.44
³⁾ T.U.S.F.A	11.21	4.53	29.11	16.45	5.23

¹⁾ See the legend of Table 3-3.

²⁾ Total saturated fatty acids

³⁾ Total unsaturated fatty acids

바. 오가피-발효물의 유리아미노산 함량분석

(1) 오가피-발효물의 유리아미노산 함량분석

(가) 오가피-영지버섯 발효물

- ① 오가피 원물 water추출물과 70% EtOH추출물, 오가피-영지버섯 발효물 water추출물과 EtOH추출물의 유리아미노산 분석결과는 table 3-20과 같음. 17종의 amino acid중 대부분의 함량이 원물보다 오가피-영지버섯 발효물에서 증가하는 경향을 보였음.
- ② 특히 간 대사를 촉진하는 것으로 알려진 alanine의 함량이 42.50 ~ 48.68에서 70.71 ~ 82.16 $\mu\text{g}/100\text{g}$ 으로 증가하였으며, 필수 amino acid인 valine은 천연물에서는 13.57 ~ 17.58 $\mu\text{g}/100\text{g}$ 을 보인 반면 오가피-영지버섯 발효물에서는 60.82 ~ 63.00 $\mu\text{g}/100\text{g}$ 을 보여 약 3배 이상의 함량증가를 나타냈음.
- ③ 그 외에도 leucine, isoleucine, lysine, tryptophan등에서도 높은 함량증가를 나타내어, 영지버섯 발효를 통하여 필수 amino acid 함량이 증가됨을 확인할 수 있었음.

Table 3-20. 오가피-영지버섯 발효물(8:2) 추출물

unit($\mu\text{g}/100\text{g}$)

Amino acid	Sample Name ¹⁾			
	NR-5011	NR-5012	FM-5111	FM-5121
Asp	35.29 \pm 4.56 b	24.03 \pm 6.18 b	97.01 \pm 12.53 a	86.31 \pm 2.17 a
Ser	24.85 \pm 4.71 c	16.59 \pm 4.07 c	103.92 \pm 3.22 b	86.77 \pm 6.00 a
Glu	27.95 \pm 4.46 c	20.53 \pm 5.62 c	66.01 \pm 4.22 b	80.23 \pm 5.41 a
Gly	14.79 \pm 3.27 c	7.42 \pm 1.95 d	55.45 \pm 1.00 a	37.14 \pm 1.04 b
His	9.31 \pm 2.87 bc	4.07 \pm 1.44 b	23.25 \pm 1.80 a	18.12 \pm 7.87 ab
Arg	262.40 \pm 46.53 a	157.71 \pm 33.99 b	84.39 \pm 1.31 bc	36.80 \pm 6.57 c
Thr	77.30 \pm 23.03 a	68.42 \pm 21.43 a	62.67 \pm 0.77 a	46.54 \pm 9.10 a
Ala	48.68 \pm 7.18 b	42.50 \pm 9.07 b	70.71 \pm 2.41 a	82.16 \pm 10.47 a
Pro	188.53 \pm 25.08 a	146.22 \pm 35.36 ab	77.40 \pm 2.79 c	88.35 \pm 17.42 bc
Cys	64.56 \pm 19.76 a	97.34 \pm 56.99 a	90.61 \pm 19.51 a	99.99 \pm 3.28 a
Tyr	13.48 \pm 2.65 c	6.60 \pm 3.06 c	81.99 \pm 7.30 a	60.09 \pm 10.50 b
Val	17.58 \pm 3.95 b	13.57 \pm 3.71 b	63.00 \pm 3.98 a	60.82 \pm 4.81 a
Met	2.51 \pm 1.26 a	2.38 \pm 0.48 a	13.06 \pm 8.42 a	6.89 \pm 4.03 a
Lys	17.11 \pm 6.45 c	7.90 \pm 5.16 c	82.54 \pm 3.51 a	52.25 \pm 4.70 b
iLe	8.67 \pm 3.25 b	5.27 \pm 1.48 b	40.76 \pm 4.63 a	30.50 \pm 5.68 b
Leu	12.03 \pm 3.45 b	6.57 \pm 1.62 b	47.86 \pm 6.02 a	25.79 \pm 18.80 ab
Phe	14.67 \pm 5.28 b	7.85 \pm 2.33 b	63.12 \pm 11.52 a	26.02 \pm 12.91 b

¹⁾ See the legend of Table 3-3.

Values in a row followed by the same letter are not significantly different (a-d) ($P < 0.05$).

(나) 오가피-노루궁뎅이버섯 발효물

- ① 오가피 노루궁뎅이버섯 발효물과 오가피 원물의 유리 아미노산 함량은 Table 3-21과 같음.
- ② 전반적으로 오가피-노루궁뎅이버섯 발효물에서 함량이 증가하였으며 특히 Tyrosine과 Isoleucine, Leucine, phenylalanine에서 그 함량이 증가가 두드러지게 나타났음. 그 중에서도 특히 Tyrosine은 3.50~3.60 $\mu\text{g}/100\text{g}$ 에서 발효 후 51.47 ~ 51.72 $\mu\text{g}/100\text{g}$ 으로 약 15배 이상의 함량증가를 보였음.

Table 3-21. 오가피-노루궁뎅이버섯 발효물(5:5) 추출물

Amino acid	Sample Name ¹⁾			
	NR-5021	NR-5022	FM-5121	FM-5122
Asp	40.06 ± 9.02 a	27.23 ± 8.59 b	38.68 ± 6.28 a	26.37 ± 1.82 a
Ser	19.52 ± 4.33 b	16.72 ± 5.13 b	64.90 ± 7.05 a	60.49 ± 6.42 a
Glu	40.97 ± 10.21 a	31.90 ± 10.45 a	25.30 ± 3.79 a	22.49 ± 1.19 a
Gly	11.70 ± 2.80 bc	8.43 ± 2.74 c	25.00 ± 3.07 a	19.04 ± 2.28 ab
His	6.15 ± 1.81 a	4.88 ± 1.83 ab	33.78 ± 7.73 a	23.92 ± 2.64 a
Arg	142.53 ± 32.47 a	116.12 ± 30.91 a	169.03 ± 21.81 a	127.68 ± 12.33 a
Thr	37.06 ± 11.26 a	38.66 ± 13.81 a	49.50 ± 10.90 a	44.75 ± 5.13 a
Ala	39.23 ± 7.41 a	35.29 ± 2.50 a	38.95 ± 1.15 a	40.57 ± 1.69 a
Pro	141.71 ± 20.20 a	133.74 ± 36.10 a	76.72 ± 23.23 ab	56.86 ± 5.19 b
Cys	141.03 ± 47.09 ab	179.89 ± 70.55 a	56.67 ± 18.34 ab	48.09 ± 14.07 b
Tyr	3.50 ± 2.09 b	3.60 ± 1.78 b	51.47 ± 11.51 a	51.72 ± 6.07 a
Val	14.69 ± 3.31 b	13.56 ± 4.10 b	41.51 ± 3.73 a	47.19 ± 6.79 a
Met	1.69 ± 0.23 a	1.99 ± 0.03 a	7.18 ± 4.46 a	5.90 ± 3.88 a
Lys	14.77 ± 2.71 c	11.53 ± 3.18 c	63.06 ± 8.21 a	43.05 ± 6.31 b
iLe	7.80 ± 1.92 b	6.19 ± 1.85 b	32.36 ± 5.13 a	33.80 ± 5.65 a
Leu	10.32 ± 2.27 b	7.81 ± 2.30 b	55.31 ± 6.55 a	55.41 ± 8.37 a
Phe	10.38 ± 2.52 b	7.84 ± 2.27 b	58.89 ± 11.81 a	51.29 ± 7.13 a

¹⁾ See the legend of Table 3-3.

Values in a row followed by the same letter are not significantly different (a-d) (P<0.05).

(다) 오가피-상황버섯 발효물

- ① 오가피-상황버섯 발효물의 amino acid 함량은 table 3-22과 같음.
- ② 오가피-상황버섯발효물의 경우에도 마찬가지로 발효전과 비교하였을 때, amino acid의 함량이 증가하는 경향이었으며, 몇 몇 개를 제외하고는 큰 폭으로 함량이 증가함을 나타냈음.
- ③ 특히 Tyrosine에서는 오가피-상황버섯 발효물 70% EtOH추출물이 약 30배 이상 증가함을 알 수 있었음. 특히 필수 아미노산종류와 간 대사활성에 도움을 주는 alanine 함량이 증가함을 보여 균사체 발효시 유효성분의 증대로 인한 효과를 기대할 수 있음.

Table 3-22. 오가피-상황버섯 발효물(5:5) 추출물

unit($\mu\text{g}/100\text{g}$)

Amino acid	Sample Name ¹⁾			
	NR-5021	NR-5022	FM-5131	FM-5132
Asp	40.06 \pm 9.02 b	27.23 \pm 8.59 b	124.22 \pm 21.06 a	47.77 \pm 4.40 b
Ser	19.52 \pm 4.33 b	16.72 \pm 5.13 b	86.42 \pm 3.22 a	94.21 \pm 9.65 a
Glu	40.97 \pm 10.21 ab	31.90 \pm 10.45 b	62.72 \pm 7.57 a	63.47 \pm 3.69 a
Gly	11.70 \pm 2.80 c	8.43 \pm 2.74 c	50.92 \pm 1.83 a	29.37 \pm 2.89 b
His	6.15 \pm 1.81 c	4.88 \pm 1.83 c	20.41 \pm 0.68 a	14.52 \pm 2.62 b
Arg	142.53 \pm 32.47 a	116.12 \pm 30.91 ab	59.90 \pm 4.58 b	105.32 \pm 13.24 ab
Thr	37.06 \pm 11.26 b	38.66 \pm 13.81 b	49.14 \pm 4.46 ab	69.15 \pm 8.56 a
Ala	39.23 \pm 7.41 b	35.29 \pm 2.50 b	74.20 \pm 9.58 a	85.35 \pm 17.41 a
Pro	141.71 \pm 20.20 a	133.74 \pm 36.10 b	73.09 \pm 4.69 bc	67.35 \pm 18.50 c
Cys	141.03 \pm 47.09 a	179.89 \pm 70.55 a	138.05 \pm 6.29 a	57.90 \pm 13.59 a
Tyr	3.50 \pm 2.09 c	3.60 \pm 1.78 c	37.55 \pm 0.24 b	103.13 \pm 14.54 a
Val	14.69 \pm 3.31 c	13.56 \pm 4.10 c	66.26 \pm 0.07 b	79.52 \pm 7.48 a
Met	1.69 \pm 0.23 a	1.99 \pm 0.03 a	10.36 \pm 9.09 a	6.49 \pm 4.19 a
Lys	14.77 \pm 2.71 b	11.53 \pm 3.18 b	21.60 \pm 11.32 ab	38.06 \pm 0.49 a
iLe	7.80 \pm 1.92 b	6.19 \pm 1.85 b	51.50 \pm 2.57 a	58.83 \pm 5.65 a
Leu	10.32 \pm 2.27 b	7.81 \pm 2.30 b	89.29 \pm 2.51 a	79.86 \pm 6.85 a
Phe	10.38 \pm 2.52 b	7.84 \pm 2.27 b	75.20 \pm 1.72 a	88.63 \pm 11.52 a

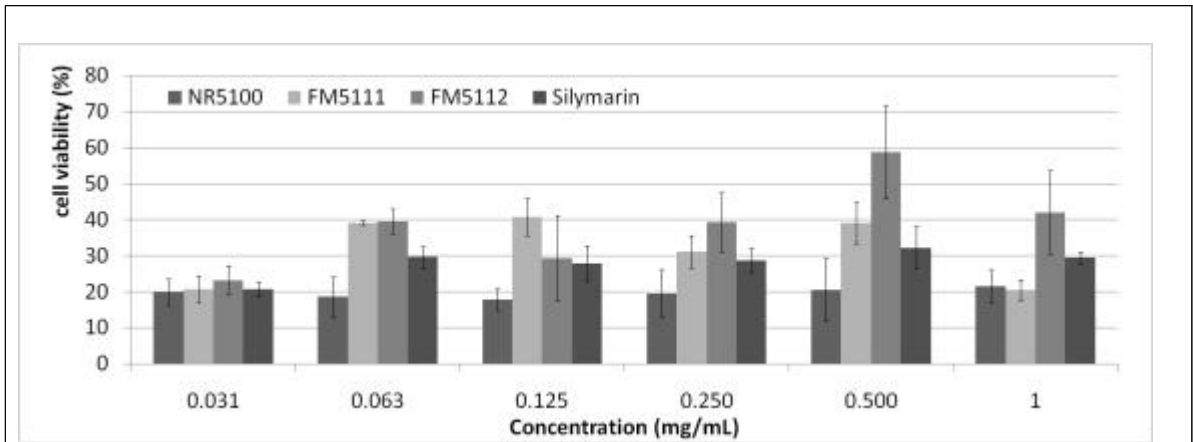
¹⁾ See the legend of Table 3-3.

Values in a row followed by the same letter are not significantly different (a-d) ($P < 0.05$).

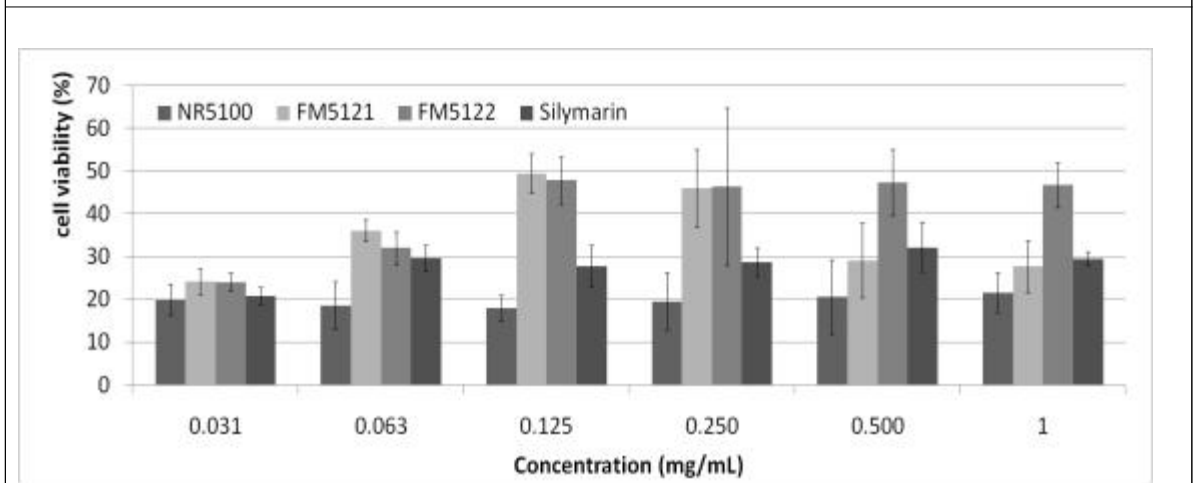
3. 오가피 발효물의 간 기능 개선 검토 (1) : *IN VITRO* TEST

가. Microculture tetrazolium (MTT) assay

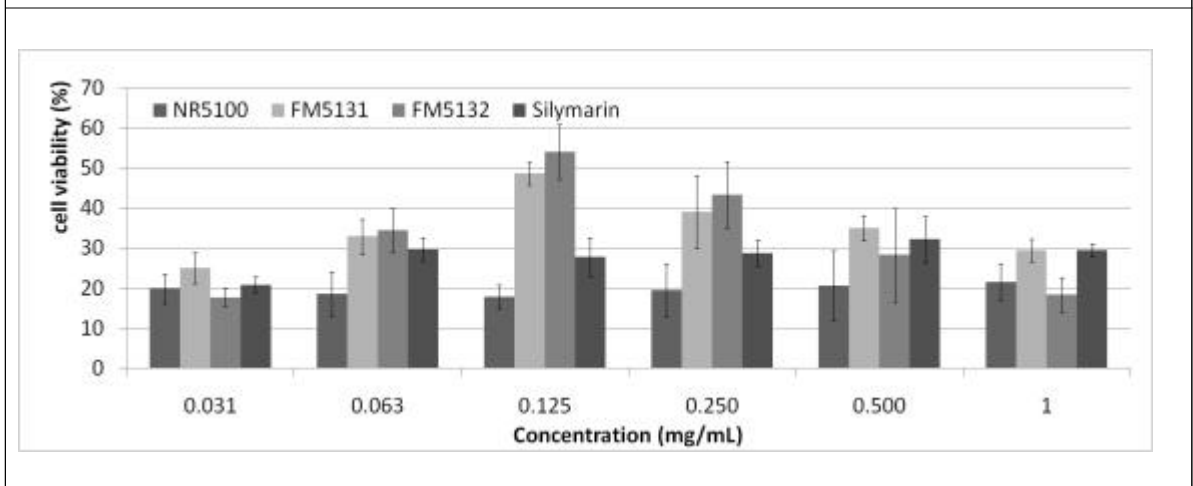
- (1) 인간 간암 세포(HepG2)에 CCl_4 에 의한 손상 및 세포 괴사에 대한 오가피버섯발효물의 세포 보호 효과를 관찰하기 위하여 MTT assay 방법으로 세포의 생존율을 측정하였음. 결과 비교는 CCl_4 를 처리하지 않은 세포들의 MTT 측정값을 100%로 하여 CCl_4 처리 후 오가피-버섯발효물을 넣어준 well의 세포들의 MTT 측정값을 비교하여 세포의 생존율(%)를 계산하였음.
- (2) NR5100(오가피 천연원료 시료)는 처리 농도와 상관없이 시료를 처리하지 않은 well의 세포(negative control)들로부터 보여지는 생존율(약 20%)과 거의 같은 18~21%의 생존율을 보였음. 이것은 발효과정을 거치지 않은 천연원료를 같은 방법으로 시료화하여도 CCl_4 로 인한 간세포 손상으로 부터 세포보호 효과를 기대할 수 없다는 것을 의미함. 양성대조군 silymarin는 전체적으로 처리 농도와 크게 관계없이 0.06 mg/mL농도 이상에서 29~32%의 일률적인 생존율을 보여 주었음. **Fig. 3-12(a)**에서 FM5111 시료는 0.06~0.13 mg/mL의 농도 범위에서 39~41%의 생존율로 silymarin보다 8~10%가량 더 높은 생존율을 보였음. FM5112 시료는 0.5 mg/mL의 농도에서 $58.8 \pm 12\%$ 의 최대 생존율을 보였음. **Fig. 3-12(b)**에서 FM5121은 0.13 mg/mL의 농도에서 $49.5 \pm 4.5\%$ 로 최대 생존율을 보였고 그 이상의 농도로 처리되었을 때에는 농도가 증가할 수록 생존율이 오히려 감소되는 결과를 확인할 수 있었음. FM5122는 0.13~1.0 mg/mL의 농도까지 46~48%로 일률적인 생존율을 보여주었음. **Fig. 3-12(c)**에서 FM5131, FM5132 시료는 처리하는 농도에 따라 비슷한 양상을 보여주었고 0.13 mg/mL의 농도에서 각각 $48.7 \pm 2\%$, $54.1 \pm 6\%$ 의 생존율을 보여 주었음. 모든 오가피-버섯발효물은 양성대조군인 silymarin과 같은 농도에서 더욱 높은 생존율을 보여주었으며, 오가피 천연원료에서 버섯균사체를 통한 발효과정을 거치면 CCl_4 에 의한 간세포 손상으로 부터 세포의 생존을 좀 더 보존할 수 있게 됨을 확인하였음.



(a) 오가피-영지버섯발효물(FM 5110)



(b) 오가피-노루궁뎅이버섯발효물(FM 5120)



(c) 오가피-상황버섯발효물(FM 5130)

Fig. 3-12. 오가피-버섯발효물의 MTT assay 결과

NR5100, FM5111, FM5112, FM5121, FM5122, FM5131 and FM 5132 symbols are referred to note of Table 3-3

나. AST, ALT 유리 억제능

- (1) 오가피-버섯발효물에 의한 CCl_4 에 의해 유도된 간세포독성의 보호효과를 측정하기 위하여 CCl_4 를 처리한 간세포 배지 내 AST 및 ALT 활성을 대조군의 활성과 비교하여 나타내었음(Fig. 3-13, Fig. 3-14). AST, ALT 두 효소는 간세포 내에 존재하고 간세포 손상시 간세포의 막 투과성 향진으로 배지내로 유출되므로 그 활성 정도로 간 손상을 확인할 수 있음.
- (2) 시료를 처리하지 않은 negative control의 배양으로부터 AST, ALT의 활성을 측정하여 이수치를 100%하여 시험군에서의 AST,ALT 활성을 측정한 후 기준값(100%)에서의 차이만큼을 AST 또는 ALT의 억제효율(inhibition rate, %)로 나타내었음.
- (3) 시료 FM5111은 0.25 mg/mL의 농도에서 $59.5 \pm 10.3\%$ 로 최대 AST 억제효율을 나타내었고 농도가 더 증가하였을 때에는 오히려 효율이 감소되는 경향을 보였다. FM5112는 0.125 mg/mL의 농도에서 $57.3 \pm 8.9\%$ 로 최대 효율을 보였다. 양성대조군 silymarin과 같은 농도에서 비교를 하였을 때 전체적으로 오가피-버섯발효물 시료가 높은 효율을 나타내었음(Fig. 3-13(a)).
- (4) FM5121과 FM5122 두 시료는 250 mg/mL의 농도에서 $82.3 \pm 6.5\%$ (FM5121)와 $84.3 \pm 6.3\%$ (FM5122)로 최대 억제효율을 나타내었다. 그리고 두 시료 모두 250 mg/mL 농도를 기점으로 낮거나 높은 농도로 갈수록 효율이 감소되는 경향을 보였다. 양성대조군 silymarin과 비교하면 0.63 mg/mL의 저농도에서는 silymarin 처리군이 AST 억제효율이 좋았고, 그 이상의 농도에서는 두 시료가 더 높은 효율을 나타내었음(Fig. 3-13(b)).
- (5) M5131 시료는 0.250 mg/mL의 농도에서 $78.9 \pm 8.4\%$ 로 가장 높은 효율을 보였고, 그 외의 농도에서는 효율이 급격히 떨어지는 경향을 보였다. FM5132 시료는 1.0 mg/mL의 농도에서 최대효율을 확인하였으나 농도가 증가할수록 효율도 함께 증가 될 것으로 예상됨(Fig. 3-13(c)).
- (6) AST 억제효율 시험에서 가시오가피-버섯발효물시료들 모두 0.125~0.50 사이에서 양성대조군 silymarin 보다 좋은 결과를 얻을 수 있었음.
- (7) Alanine aminotransferase(ALT)는 간세포에 특이적으로 존재하는 아미노산 합성 효소로 간 손상에 의해 세포막이 파괴되면 세포외로 유출되어 수치가 상승하게 됨. 간세포에 손상이 생기면 배지 중으로 유리되는 이들 효소의 양이 증가하게 되고, 간세포 보호작용이 있는 약물들은 유리된 이들 효소의 양을 감소시킴.
- (8) 오가피버섯발효물 시료들 중 FM5111은 1.0 mg/mL 농도에서 $44.8 \pm 6.2\%$ 로, FM5112는 0.125 mg/mL 농도에서 $57.3 \pm 4.2\%$ 로 ALT 최대 억제효율을 나타내었다. 두 가지 시료 모두 0.25 mg/mL의 농도에서 $69.69 \pm 6.8\%$ 의 최대 억제 효율을 같은 양성 대조군 silymarin에 비하여 효율이 떨어짐을 확인하였음(Fig. 3-14(a)).
- (9) FM5121 시료는 0.125~0.5 mg/mL의 농도에서 42~44% 범위의 효율이 유지됨을 확인하였고, FM5122 0.5 mg/mL 농도에서 $71.7 \pm 4.7\%$ 의 효율로 모든 시료(양성대조군 포함)중에서 가장 좋은 ALT 억제효율을 나타내었다. FM5131 시료는 0.250 mg/mL의 농도에서 $55.9 \pm 6.3\%$ 로 가장 효율이 좋았고, FM5132 시료는 1.0 mg/mL의 농도에서 가장 효율이 좋았으나 전체적으로 편차를 크게 보였다. 두 시료 모두 silymarin보다 ALT 억제효율면에서 떨어졌음(Fig. 3-14(c)).

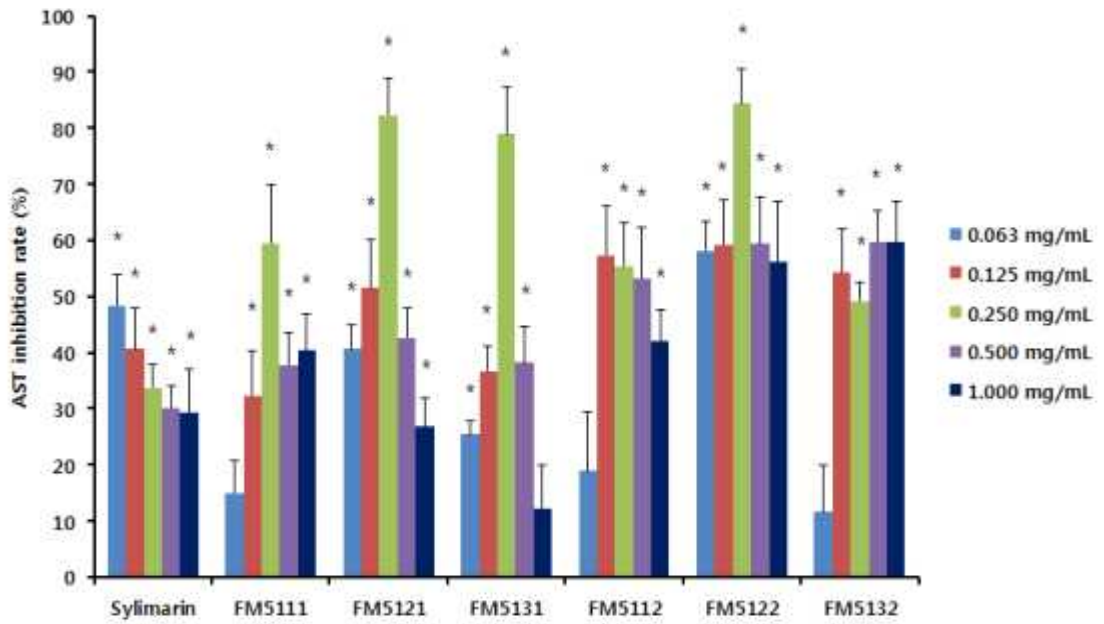


Fig. 3-13. 오가피-버섯발효물의 AST 활성측정 결과

FM5111, FM5112, FM5121, FM5122, FM5131 and FM 5132 symbols are referred to note of Table 3-3. * $P < 0.05$. Compared to C (Negative control).

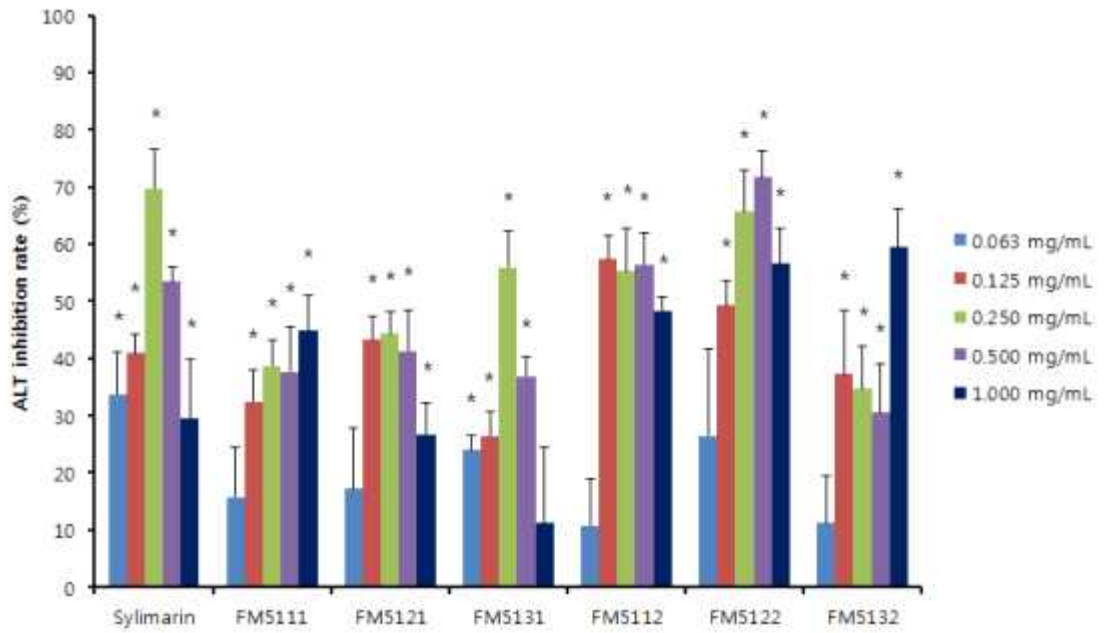


Fig. 3-14. 오가피버섯발효물의 ALT 활성측정 결과

FM5111, FM5112, FM5121, FM5122, FM5131 and FM 5132 symbols are referred to note of Table 3-3. $*P < 0.05$. Compared to C (Negative control).

다. LDH 활성의 측정 결과

- (1) Lactate dehydrogenase(LDH)는 lactate를 pyruvate로 전환하는 효소이다. LDH는 심질환, 간질환, 악성종양, 백혈병등에 의해 세포이상이 있을 경우 세포외로 배출되어 상승하는 것으로 알려져 있음. 따라서 본 연구에서는 LDH의 억제능을 확인하였음.
- (2) 오가피버섯발효물 시료들 중 FM5111은 0.125~0.25 mg/mL 농도에서 39 ~ 45.4% 정도의 LDH억제효율이 나타났다. 세포의 FM5112에서는 0.5 mg/mL 농도에서 58.6% 정도의 LDH 억제효율이 나타났다. 따라서 두 가지 시료 모두 최대 39 ~ 58%의 억제 효율을 보였고, 양성 대조군 silymarin에 비하여 효율이 높음을 확인하였음(Fig. 3-15(a)).
- (3) FM5121 시료는 0.25 mg/mL의 농도에서 $61.5 \pm 7.3\%$ 범위의 탁월한 효율이 확인하였고, FM5122도 0.25 mg/mL 농도에서 $76.7 \pm 1.2\%$ 로 가장 좋은 억제효율을 나타내었다. 양성 대조군 silymarin에 비하여 효율이 높음을 확인하였음(Fig. 3-15(b)).
- (4) FM5131시료는 0.125 mg/mL의 농도에서 $66.7 \pm 2.1\%$ 로 가장 효율이 좋았고, FM5132 시료는 0.125 mg/mL의 농도에서 $47.3 \pm 2.6\%$ 로 효율이 좋은 것으로 나타났으며, 두 시료 모두 silymarin보다 LDH 억제효율에서 증가하는 것을 보여줬음.(Fig. 3-15(c)).

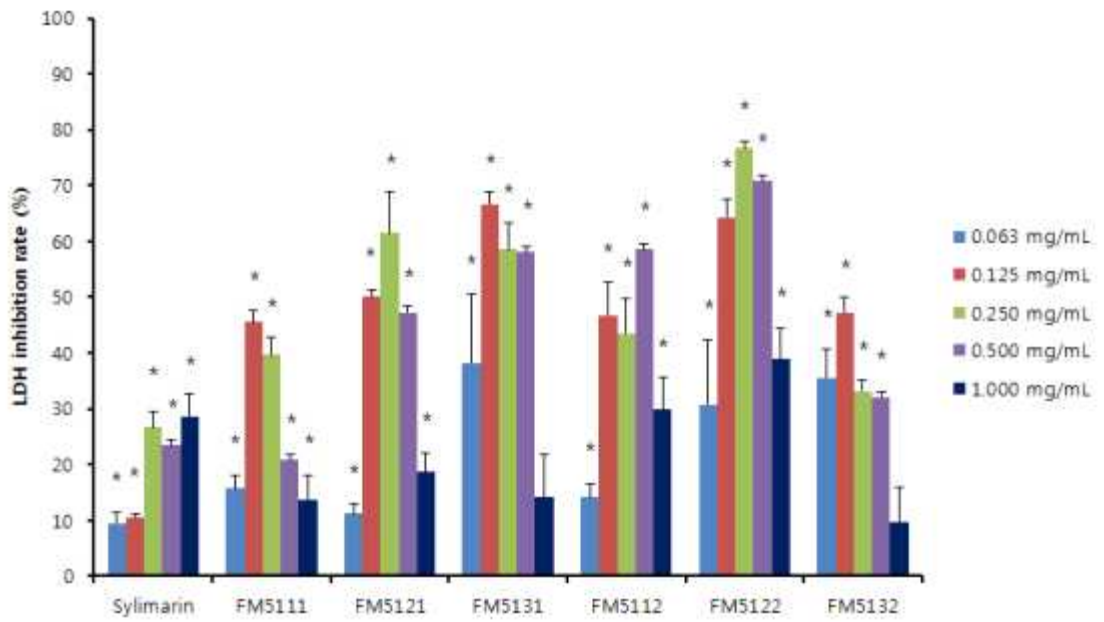


Fig. 3-15. 오가피버섯발효물의 LDH 활성측정 결과

FM5111, FM5112, FM5121, FM5122, FM5131 and FM 5132 symbols are referred to note of Table 3-3. * $P < 0.05$. Compared to C (Negative control).

4. 오가피 발효물의 간기능개선 검토 (2) : *IN VITRO* TEST

가. AST, ALT 유리 억제능

- (1) 오가피-버섯발효물에 의한 CCl_4 에 의해 유도된 간세포독성의 보호효과를 측정하기 위하여 CCl_4 를 처리한 간세포 배지 내 AST 및 ALT 활성을 대조군의 활성과 비교하여 나타내었음(Fig. 3-16, Fig. 3-17). AST, ALT 두 효소는 간세포 내에 존재하고 간세포 손상시 간세포의 막 투과성 향진으로 배지내로 유출되므로 그 활성 정도로 간 손상을 확인할 수 있음.
- (2) AST 측정결과, 오가피-버섯발효물은 발효하지 않은 오가피원물 보다 CCl_4 에 의해 급성독성 유도된 간세포에서 유리되는 AST의 양을 줄여주는 것으로 판단됨. 이것은 CCl_4 에 의한 독성으로부터 간세포를 보호하는 것을 의미함.
- (3) 오가피-버섯발효물은 타사(개별인정형)제품 뿐만 아니라 간 보호 효과가 알려져 있는 Silymarin 보다도 좋은 효과를 보여주고 있음.
- (4) ALT 측정결과, Silymarin과 비교하였을 때, 시판중인 간 기능 개선 제품의 일부제품과 오가피-버섯발효물이 효능이 있는 것으로 판단됨.
- (5) 특히, 오가피를 영지버섯, 노루궁뎅이버섯 및 상황버섯으로 각각 발효한 발효물 소재들의 AST, ALT 유리 억제능이 오가피 원물 소재에 비해 우수한 것으로 나타났으며, 오가피-버섯발효물 소재의 이러한 효능은 버섯균사체에 의해 발효된 결과로 판단되어짐.

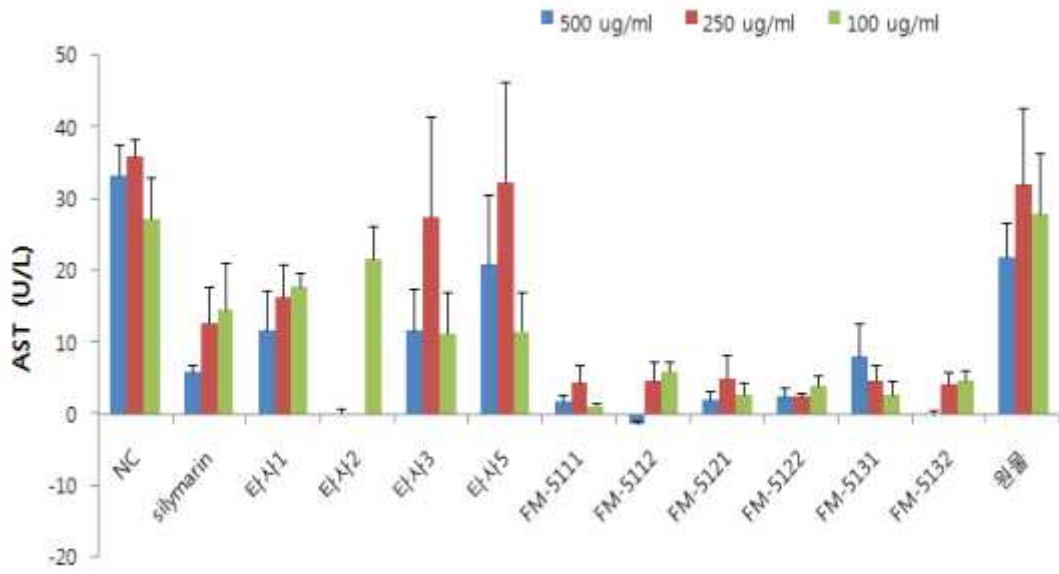


Fig. 3-16. 오가피-버섯발효물, 타사제품 및 오가피 원물의 AST 활성측정 결과 비교

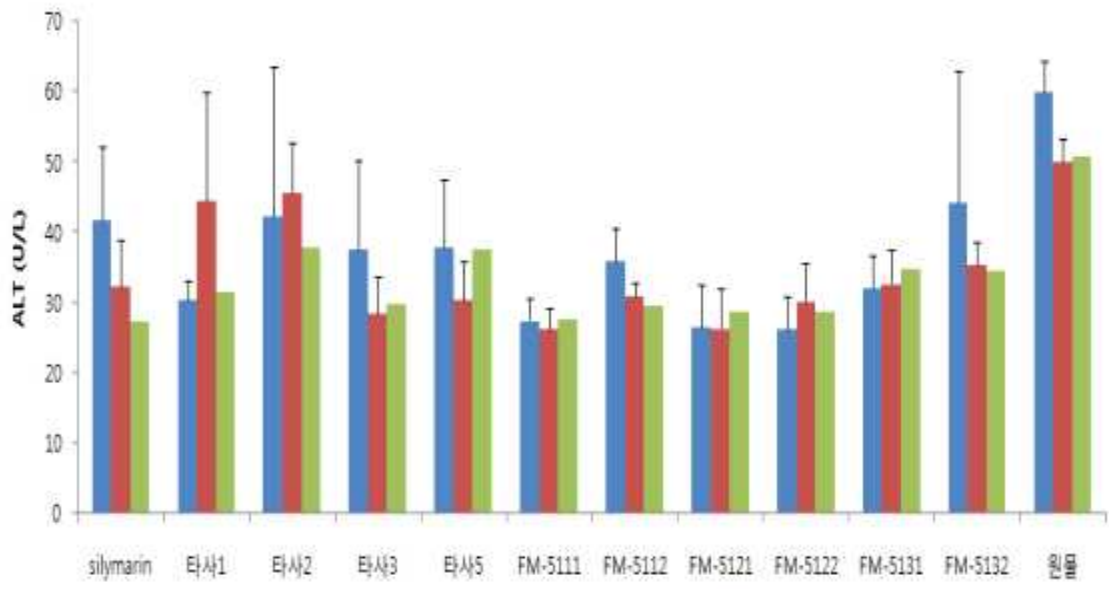


Fig. 3-17. 오가피-버섯발효물, 타사제품 및 오가피 원물의 ALT 활성측정 결과 비교

나. LDH 활성의 측정 결과

- (1) Lactate dehydrogenase(LDH)는 lactate를 pyruvate로 전환하는 효소이다. LDH는 심질환, 간질환, 악성종양, 백혈병 등에 의해 세포이상이 있을 경우 세포외로 배출되어 상승하는 것으로 알려져 있음. 따라서 본 연구에서는 LDH의 억제능을 확인하였음.
- (2) LDH 측정결과, Silymarin과 비교하였을 때, 시판중인 간 기능 개선 제품의 일부제품과 오가피-버섯발효물 소재에서 효능이 있는 것으로 판단됨.
- (3) 반면, 오가피 원물 소재는 Silymarin과 오가피-버섯발효물 소재에 비해 그 효능이 낮은 것을 확인할 수 있었음.
- (4) 따라서, *in vitro* test를 통해, 오가피-버섯발효물 소재가 오가피 원물 소재 보다 간 기능 개선 효능이 더 우수한 것을 확인하였고, 또한, 타사제품군들과 Silymarin과의 효능 비교에서도 더 우수하거나 유사한 효능을 갖는 것을 확인하였음(Fig. 3-18).
- (5) 이에 따라, 간 기능 개선에 대한 *in vivo* test는 간 기능 개선 효능이 낮은 오가피 원물 소재를 배제하고 진행하였음.

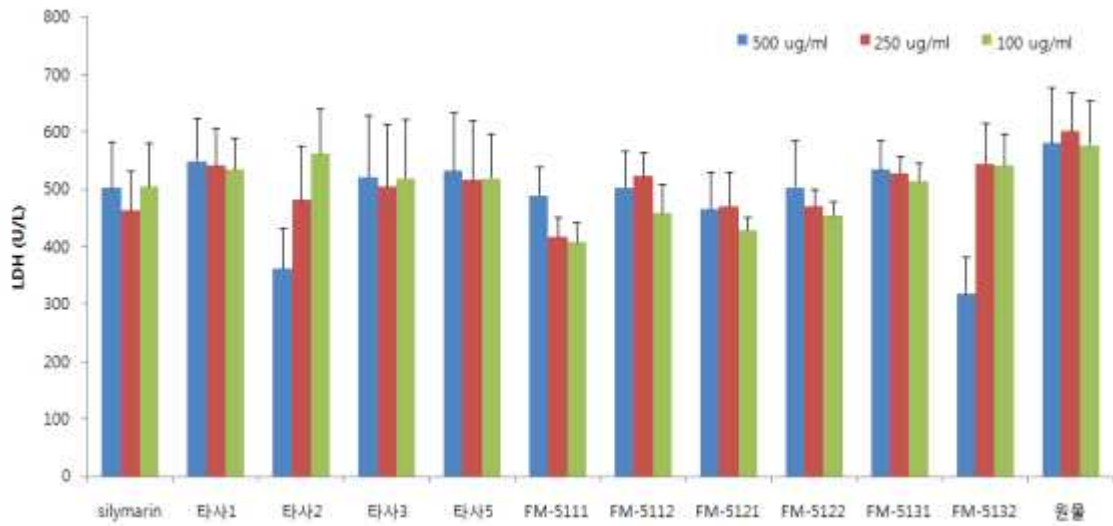


Fig. 3-18. 오가피-버섯발효물, 타사제품 및 오가피 원물의 LDH 활성측정 결과 비교

5. 오가피 발효물의 간 기능 개선 검토 (3) : *IN VIVO*

가. 사염화탄소로 유도된 급성 및 만성 간 장애 모델에서 간 기능 개선 효과

(1) CCl₄에 의한 급성 간 장애 모델에서의 체중 변화량

(가) CCl₄로 급성 간 장애를 유발한 군의 체중변화량은 Fig. 3-19와 같음.

(나) 사염화탄소 투여로 급성 간 장애를 일으킨 군의 체중 변화량은 정상시험군은 13.3 ± 1.06 g인 반면에 음성대조군에서는 -4.5 ± 0.78 g으로 유의적으로 체중이 감소하였음. 시험군(FM-5111-L, FM-5111-M, FM-5111-H, FM-5131-L, FM-5131-M, FM-5131-H)과 양성대조군은 3.3 ± 1.82 g, 1.6 ± 0.84 g, 1.5 ± 1.10 g, 4.2 ± 0.93 g, 4.4 ± 1.10 g, 0.5 ± 1.47 g과 2.9 ± 1.30 g으로 정상군 만큼의 체중증가를 보이지는 않았지만, 음성대조군에 비해 유의적으로 체중이 증가하였고, 시험군 내에서 오가피 발효물의 투여용량이 증가함에 따라 체중이 감소하였음.

(다) 결과적으로, FM-5111, FM-5131 투여군에서 음성대조군에 비하여 체중 변화량이 증가 하였으며, 이는 CCl₄에 의한 급성 간 장애에서 나타나는 체중 감소가 2 종류의 오가피 발효물 추출물에 의해 개선되는 것을 알 수 있음.

(2) CCl₄에 의한 급성 간 장애 모델에서의 간 지수

(가) CCl₄로 급성 간 장애를 유발한 군의 간 지수는 Fig. 3-20과 같음.

(나) 간 지수에서는 유의적인 차이가 보이지 않았음.

(3) CCl₄에 의한 급성 간 장애 모델에서의 혈액생화학적 분석

(가) CCl₄로 급성 간 장애를 유발한 군의 AST는 Fig 3-21과 같음.

(나) CCl₄로 급성 간 장애를 유발한 군에서 음성대조군은 $8,955 \pm 745.3$ g으로 정상군 243 ± 18.6 g보다 유의적으로 AST 수치가 높아졌으며, 시험군(FM-5111-L, FM-5111-M, FM-5111-H, FM-5131-L, FM-5131-M, FM-5131-H)과 양성대조군은 $6,570 \pm 578.8$ g, $6,035 \pm 624.4$ g, $6,018 \pm 607.7$ g, $8,005 \pm 814.9$ g, $6,815 \pm 742.9$ g, $5,965 \pm 532.9$ g과 $5,184 \pm 534.8$ g으로 음성대조군에 비하여 시험군 FM-5111-L, FM-5111-M, FM-5111-H, FM5131-M, FM5131-H와 양성대조군의 AST 수치가 유의적으로 감소하였음.

(다) 또한 ALT 수치(Fig 3-22)는 음성대조군의 경우 $2,065 \pm 138.9$ g로 정상군의 78 ± 4.8 g과 비교하여 유의적으로 수치가 증가하였고, 시험군(FM-5111-L, FM-5111-M, FM-5111-H, FM-5131-L, FM-5131-M, FM-5131-H)과 양성대조군은 $1,594 \pm 77.3$ g, $1,490 \pm 179.1$ g, $1,442 \pm 251.1$ g, $2,030 \pm 198.0$ g, $1,380 \pm 100.4$ g, $1,285 \pm 149.5$ g과 $1,350 \pm 214.1$ g으로 음성대조군에 비하여 FM-5111-L, FM-5111-M, FM-5111-H, FM-5131-M, FM5131-H군과 양성대조군에서 ALT 수치가 유의적으로 감소하였음.

(라) 손상된 간세포에서 유리되는 AST와 ALT의 수치가 FM-5111, FM-5131 투여군에서 유의적으로 감소하는 것은 FM-5111과 FM-5131이 CCl₄에 의한 간 손상을 억제한다는 것을 제시함.

(마) 또한, AST의 경우, FM-5111-M, FM-5111-H, FM-5131-H가 간 기능 개선 효능이 이미 알려진 silymarin과 비교하여 거의 유사한 정도의 효능을 나타냄을 알 수 있었고, ALT의 경우에는 FM-5111-L, FM-5111-M, FM-5111-H, FM-5131-M, FM-5131-H가 silymarin에 비해 유사하거나, 좀 더 우수한 효능을 나타내고 있음. 이는 FM-5111과 FM-5131이 급성 간 장애에 대한 간 기능 개선 기능성소재로서 활용이 가능함을 제시함.

(4) CCl₄에 의한 만성 간 장애 모델에서의 체중 변화

(가) CCl₄로 만성 간 장애를 유발한 군의 체중변화량, 음수섭취량 및 사료 섭취량은 Fig 3-23과 같음.

(나) 사염화탄소 투여로 만성 간 장애를 일으킨 군에서 체중변화량은 정상군은 7.1 ± 2.57 g로 음성대조군 3.9 ± 6.31 g에 비하여 유의적인 체중 증가를 보였음. 시험군(FM-5111-L, FM-5111-M, FM-5111-H, FM-5131-L, FM-5131-M, FM-5131-H)과 양성대조군은 4.8 ± 3.04 g, 4.7 ± 3.52 g, 4.4 ± 2.80 g, 4.7 ± 2.64 g, 5.0 ± 4.56 g, 5.3 ± 3.04 g과 4.6 ± 4.41 g으로 시험군에서는 투여용량이 증가함에 따라 체중변화량이 증가하였음.

(5) CCl₄에 의한 만성 간 장애 모델에서의 간 지수

(가) CCl₄로 만성 간 장애를 유발한 군의 간 지수는 Fig 3-24와 같음.

(나) 간 지수에서는 모든 군에서 유의적인 차이가 보이지 않았음.

(6) CCl₄에 의한 만성 간 장애 모델에서의 혈액생화학적 분석

(가) CCl₄로 만성 간 장애를 유발한 군의 AST는 Fig 3-25와 같음.

(나) CCl₄로 만성 간 장애를 유발한 군에서 음성대조군은 371 ± 76.4 g로 정상군 126 ± 3.7 g과 비교하여 AST 수치가 유의적으로 증가 하였다. 시험군(FM-5111-L, FM-5111-M, FM-5111-H, FM-5131-L, FM-5131-M, FM-5131-H)과 양성대조군은 183 ± 13.9 g, 223 ± 20.6 g, 185 ± 13.8 g, 133 ± 8.5 g, 102 ± 6.6 g, 110 ± 4.2 g과 150 ± 85.7 로 음성대조군과 비교하여 유의적으로 감소하였음.

(다) ALT 수치(Fig 3-26)는 음성대조군 139 ± 13.4 g으로 정상군 32 ± 1.3 g과 비교하여 유의적으로 수치가 증가 하였음. 양성대조군의 경우 45 ± 2.5 g로 음성대조군과 비교하여 ALT 수치가 유의적으로 감소하였고, 시험군(FM-5111-L, FM-5111-M, FM-5111-H, FM-5131-L, FM-5131-M, FM-5131-H)의 경우 57 ± 9.9 g, 68 ± 6.8 g, 59 ± 15.5 g, 75 ± 5.8 g, 42 ± 1.8 g, 40 ± 2.7 g으로 음성대

조군과 비교하여 ALT 수치가 유의적으로 감소하였음.

(라) 만성 간 장애 모델에서도 급성 간 장애 모델과 마찬가지로 AST와 ALT의 수치가 FM-5111, FM-5131 투여군에서 유의적으로 감소하는 것은 FM-5111과 FM-5131이 CCl₄에 의한 간 손상을 억제한다는 것을 제시하며, 이러한 효능은 간 기능 개선 효능이 이미 알려진 silymarin과 비교하여 거의 유사하거나, 좀 더 우수한 효능을 나타내고 있음. 이는 FM-5111과 FM-5131이 급성 간 장애 뿐만 아니라, 만성 간 장애에 대한 간 기능 개선 기능성소재로서 활용이 가능함을 제시함.

(7) 요약

(가) 결과를 종합하면, CCl₄에 의한 급성 및 만성 간 장애 모델에서 두 종류의 오가피 발효물 추출물(FM-5111, FM-5131)을 투여한 시험군에서 간 손상의 지표가 되는 ALT와 AST의 수치가 낮아짐을 알 수 있었고, 간 장애 유발에 따른 체중감소를 억제함을 알 수 있었음.

(나) 이러한 효능은 양성대조군인 silymarin (25 mg/kg) 투여군에 비해 비슷하거나 더 우수한 효능을 나타내고 있었음. 따라서 본 연구에서 시료로 사용한 오가피 영지버섯 발효물과 오가피 상황버섯 발효물이 간 기능 개선 기능성소재로서의 활용이 가능할 것으로 판단됨.

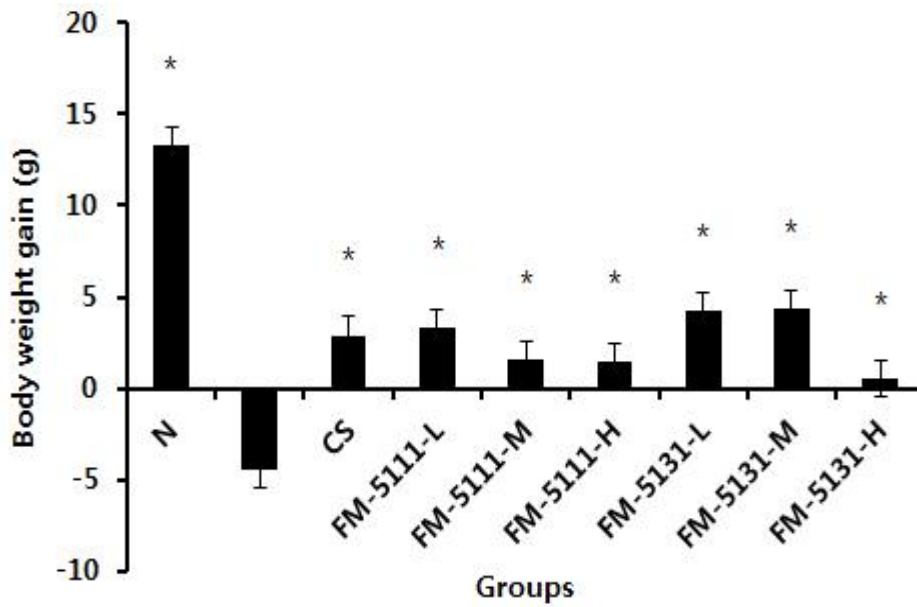


Fig 3-19. Body weight gain in CCl₄-induced acute hepatitis model.

N, Saline 10 ml/kg; C, CCl₄ 636.8 mg/kg; CS, CCl₄ 636.8 mg/kg + Silymarin 25 mg/kg; FM-5111-L, CCl₄ 636.8 mg/kg + FM-5111 50 mg/kg; FM-5111-M, CCl₄ 636.8 mg/kg + FM-5111 150 mg/kg; FM-5111-H, CCl₄ 636.8 mg/kg + FM-5111 300 mg/kg; FM-5131-L, CCl₄ 636.8 mg/kg + FM-5131 50 mg/kg; FM-5131-M, CCl₄ 636.8 mg/kg + FM-5131 150 mg/kg; FM-5131-H, CCl₄ 636.8 mg/kg + FM-5131 300 mg/kg; Data are presented as means ± SD. **P*<0.05. Compared to C (Negative control).

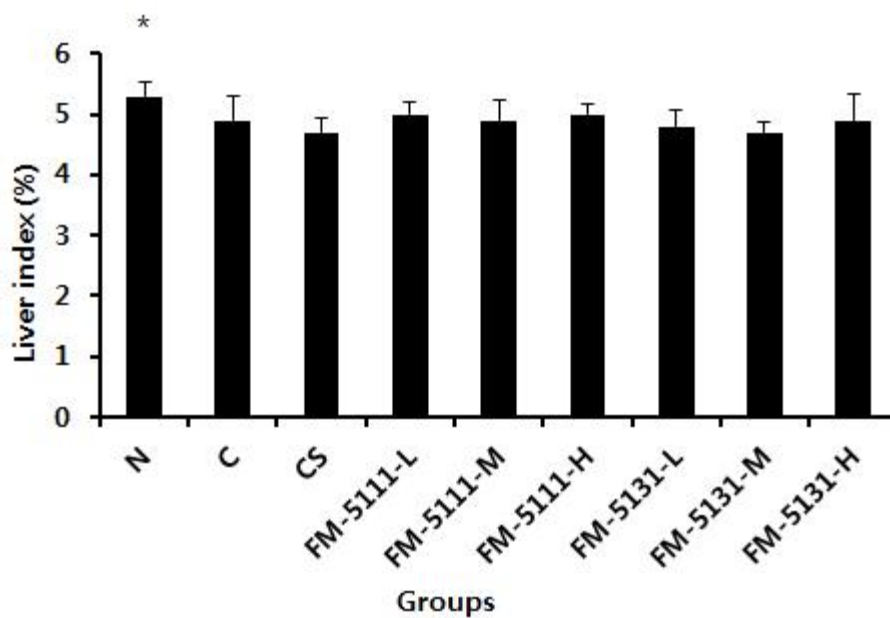


Fig 3-20. liver index in CCl₄-induced acute hepatitis model.

N, Saline 10 ml/kg; C, CCl₄ 636.8 mg/kg; CS, CCl₄ 636.8 mg/kg + Silymarin 25 mg/kg; FM-5111-L, CCl₄ 636.8 mg/kg + FM-5111 50 mg/kg; FM-5111-M, CCl₄ 636.8 mg/kg + FM-5111 150 mg/kg; FM-5111-H, CCl₄ 636.8 mg/kg + FM-5111 300 mg/kg; FM-5131-L, CCl₄ 636.8 mg/kg + FM-5131 50 mg/kg; FM-5131-M, CCl₄ 636.8 mg/kg + FM-5131 150 mg/kg; FM-5131-H, CCl₄ 636.8 mg/kg + FM-5131 300 mg/kg; Data are presented as means ± SD. **P*<0.05. Compared to C (Negative control).

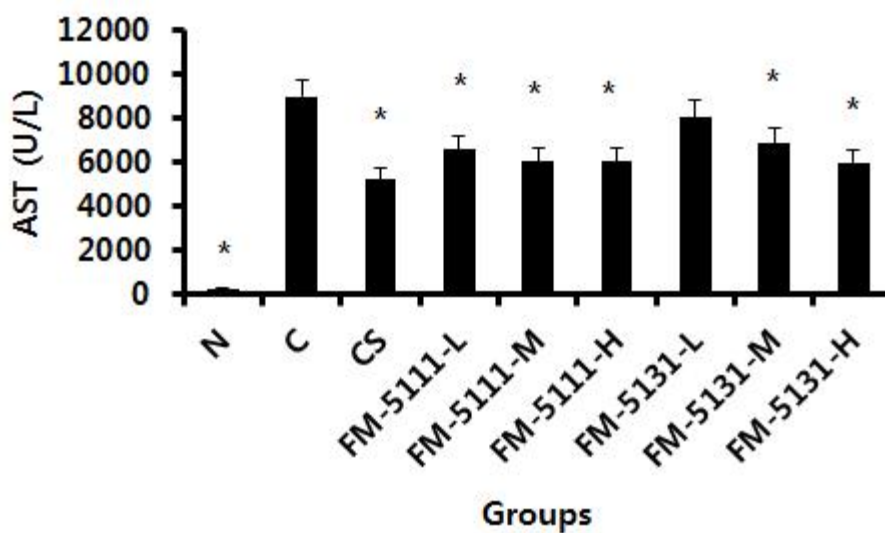


Fig 3-21. Level of AST in CCl₄-induced acute hepatitis model.

N, Saline 10 ml/kg; C, CCl₄ 636.8 mg/kg; CS, CCl₄ 636.8 mg/kg + Silymarin 25 mg/kg; FM-5111-L, CCl₄ 636.8 mg/kg + FM-5111 50 mg/kg; FM-5111-M, CCl₄ 636.8 mg/kg + FM-5111 150 mg/kg; FM-5111-H, CCl₄ 636.8 mg/kg + FM-5111 300 mg/kg; FM-5131-L, CCl₄ 636.8 mg/kg + FM-5131 50 mg/kg; FM-5131-M, CCl₄ 636.8 mg/kg + FM-5131 150 mg/kg; FM-5131-H, CCl₄ 636.8 mg/kg + FM-5131 300 mg/kg; Data are presented as means ± SD. **P*<0.05. Compared to C (Negative control).

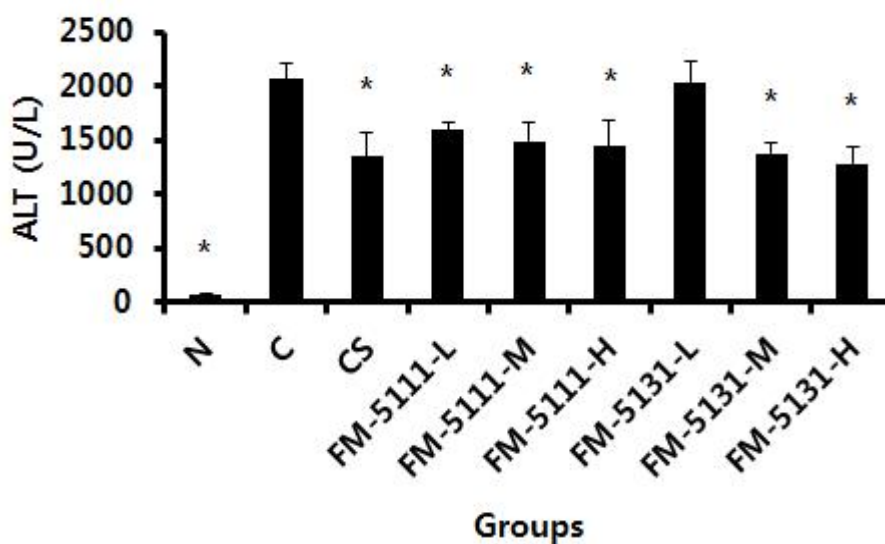


Fig 3-22. Level of ALT in CCl₄-induced acute hepatitis model.

N, Saline 10 ml/kg; C, CCl₄ 636.8 mg/kg; CS, CCl₄ 636.8 mg/kg + Silymarin 25 mg/kg; FM-5111-L, CCl₄ 636.8 mg/kg + FM-5111 50 mg/kg; FM-5111-M, CCl₄ 636.8 mg/kg + FM-5111 150 mg/kg; FM-5111-H, CCl₄ 636.8 mg/kg + FM-5111 300 mg/kg; FM-5131-L, CCl₄ 636.8 mg/kg + FM-5131 50 mg/kg; FM-5131-M, CCl₄ 636.8 mg/kg + FM-5131 150 mg/kg; FM-5131-H, CCl₄ 636.8 mg/kg + FM-5131 300 mg/kg; Data are presented as means ± SD. **P*<0.05. Compared to C (Negative control).

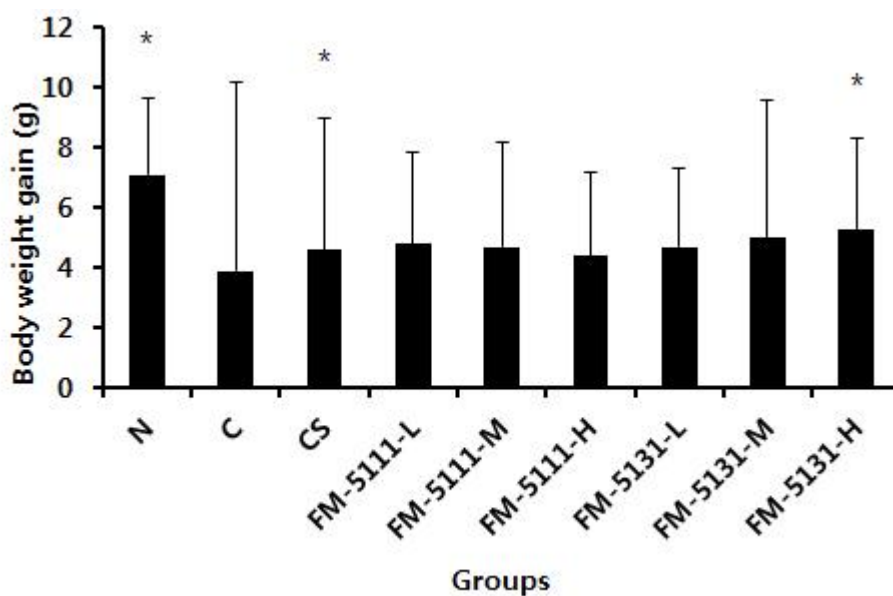


Fig 3-23. Body weight gain in CCl₄-induced chronic hepatitis model.

N, Saline 10 ml/kg; C, CCl₄ 318.4 mg/kg; CS, CCl₄ 318.4 mg/kg + Silymarin 25 mg/kg; FM-5111-L, CCl₄ 318.4 mg/kg + FM-5111 50 mg/kg; FM-5111-M, CCl₄ 318.4 mg/kg + FM-5111 150 mg/kg; FM-5111-H, CCl₄ 318.4 mg/kg + FM-5111 300 mg/kg; FM-5131-L, CCl₄ 318.4 mg/kg + FM-5131 50 mg/kg; FM-5131-M, CCl₄ 318.4 mg/kg + FM-5131 150 mg/kg; FM-5131-H, CCl₄ 318.4 mg/kg + FM-5131 300 mg/kg; Data are presented as means ± SD. **P*<0.05. Compared to C (Negative control).

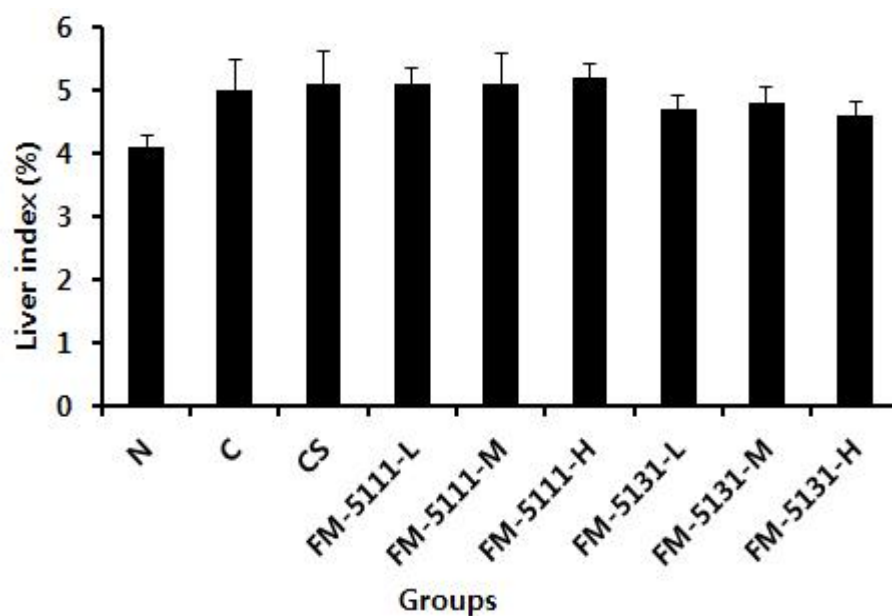


Fig 3-24. liver index in CCl₄-induced chronic hepatitis model.

N, Saline 10 ml/kg; C, CCl₄ 318.4 mg/kg; CS, CCl₄ 318.4 mg/kg + Silymarin 25 mg/kg; FM-5111-L, CCl₄ 318.4 mg/kg + FM-5111 50 mg/kg; FM-5111-M, CCl₄ 318.4 mg/kg + FM-5111 150 mg/kg; FM-5111-H, CCl₄ 318.4 mg/kg + FM-5111 300 mg/kg; FM-5131-L, CCl₄ 318.4 mg/kg + FM-5131 50 mg/kg; FM-5131-M, CCl₄ 318.4 mg/kg + FM-5131 150 mg/kg; FM-5131-H, CCl₄ 318.4 mg/kg + FM-5131 300 mg/kg; Data are presented as means ± SD. **P*<0.05. Compared to C (Negative control).

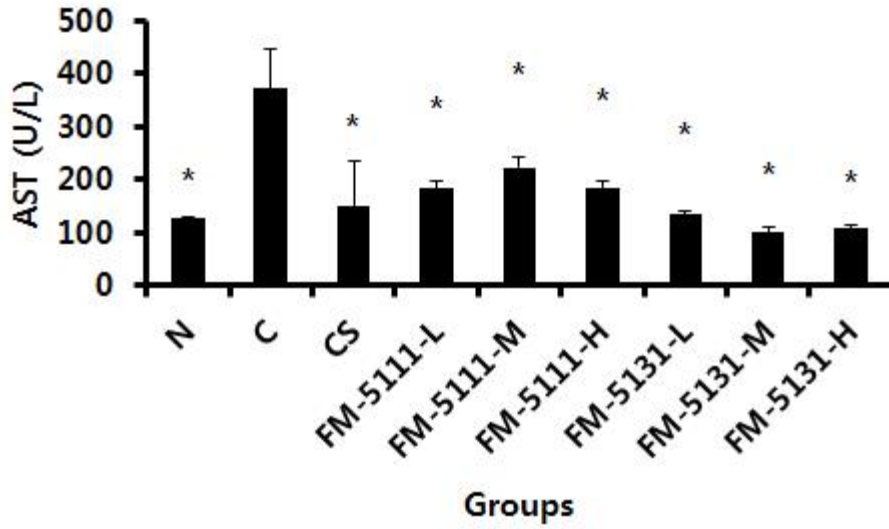


Fig 3-25. Level of AST in CCl₄-induced chronic hepatitis model.

N, Saline 10 ml/kg; C, CCl₄ 318.4 mg/kg; CS, CCl₄ 318.4 mg/kg + Silymarin 25 mg/kg; FM-5111-L, CCl₄ 318.4 mg/kg + FM-5111 50 mg/kg; FM-5111-M, CCl₄ 318.4 mg/kg + FM-5111 150 mg/kg; FM-5111-H, CCl₄ 318.4 mg/kg + FM-5111 300 mg/kg; FM-5131-L, CCl₄ 318.4 mg/kg + FM-5131 50 mg/kg; FM-5131-M, CCl₄ 318.4 mg/kg + FM-5131 150 mg/kg; FM-5131-H, CCl₄ 318.4 mg/kg + FM-5131 300 mg/kg; Data are presented as means ± SD. **P*<0.05. Compared to C (Negative control).

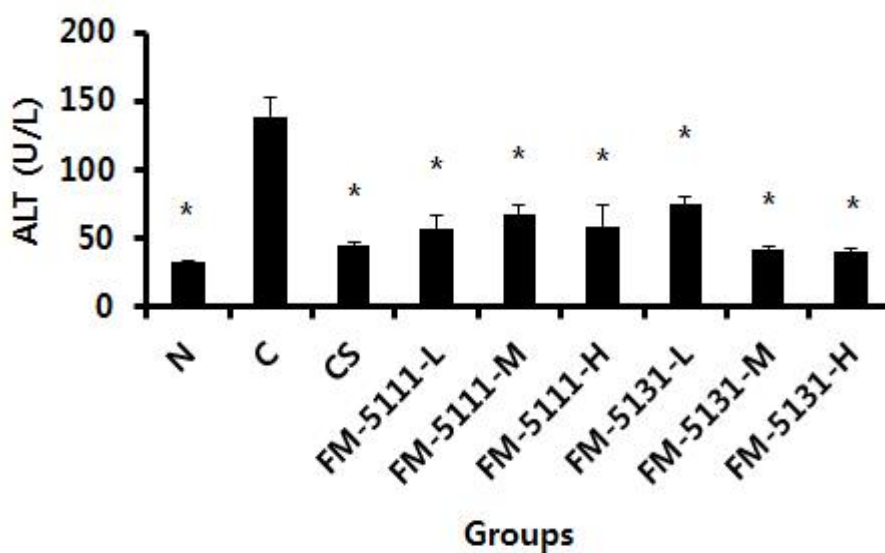


Fig 3-26. Level of ALT in CCl₄-induced chronic hepatitis model.

N, Saline 10 ml/kg; C, CCl₄ 318.4 mg/kg; CS, CCl₄ 318.4 mg/kg + Silymarin 25 mg/kg; FM-5111-L, CCl₄ 318.4 mg/kg + FM-5111 50 mg/kg; FM-5111-M, CCl₄ 318.4 mg/kg + FM-5111 150 mg/kg; FM-5111-H, CCl₄ 318.4 mg/kg + FM-5111 300 mg/kg; FM-5131-L, CCl₄ 318.4 mg/kg + FM-5131 50 mg/kg; FM-5131-M, CCl₄ 318.4 mg/kg + FM-5131 150 mg/kg; FM-5131-H, CCl₄ 318.4 mg/kg + FM-5131 300 mg/kg; Data are presented as means ± SD. **P*<0.05. Compared to C (Negative control).

나. D-galactosamine로 유도된 급성 간 장애 모델에서 간 기능 개선 효과

(1) D-galactosamine에 의한 급성 간장애 모델에서의 체중 변화량

(가) D-galactosamine으로 급성 간염을 유발한 군의 체중변화량은 Fig. 3-27과 같음.

(나) D-galactosamine 투여로 급성 간염을 일으킨 군의 체중변화량을 보면 정상군은 6.99 ± 2.46 g로 음성대조군 5.82 ± 2.66 g과 비교하여 유의적인 차이가 있었음 ($p < 0.05$). 그러나 실험군과 양성대조군은 체중변화량의 차이가 없었으며 음성대조군과도 유의적인 차이가 없었음.

(2) D-galactosamine에 의한 급성 간장애 모델에서의 간장지수

(가) D-galactosamine으로 급성 간염을 유발한 군의 간장지수는 Fig 3-28과 같음.

(나) D-galactosamine으로 급성 간염을 일으킨 군의 간장지수는 음성대조군이 4.1 ± 0.20 g로 정상군 4.6 ± 0.26 g에 비하여 수치가 낮아졌음. 양성대조군은 3.9 ± 0.28 g과 비교하여 실험군에서 FM-5111-M 3.7 ± 0.13 g, FM-5111-L 3.7 ± 0.13 g, FM-5131-M 3.7 ± 0.20 g으로 두 군 간의 유의적인 감소하였음($p < 0.05$). 음성대조군과 비교하여 FM-5111-L 3.8 ± 0.24 g, FM-5111-M 3.7 ± 0.13 g, FM-5131-L 3.7 ± 0.13 g, FM-5131-M 3.7 ± 0.20 g으로 유의적으로 감소하였음 ($p < 0.05$).

(3) D-galactosamine에 의한 급성 간장애 모델에서의 혈액생화학적 분석

(가) D-galactosamine으로 급성 간염을 유발한 군의 AST와 ALT는 Fig 3-29, 30과 같다.

(나) D-galactosamine으로 급성 간염을 유발한 군의 GOT와 GPT 수치는 음성대조군이 $4,429 \pm 1,096.9$ g, $2,004 \pm 377.4$ g로 정상군 195 ± 4.3 g, 59 ± 6.9 g로 유의적으로 증가하였음. 양성대조군은 $1,420 \pm 95.3$ g, 720 ± 56.4 g로 음성대조군에 비해 수치가 유의적으로 감소하였음($p < 0.05$). 실험군의 경우 음성대조군과 비교하여 봤을 때 수치가 줄어들기는 했으나 유의적인 차이는 없었음.

(4) 요약

(가) 결과를 종합하면, D-galactosamine에 의한 급성 간 장애 모델에서 두 종류의 오가피 발효물 추출물(FM-5111, FM-5131)을 투여한 시험군에서 간장지수가 낮아짐을 알 수 있었고, AST와 ALT 수치는 줄어들기는 했으나 유의적인 차이는 없었음.

(나) 이러한 효능은 양성대조군인 silymarin (25 mg/kg) 투여군에 비해 비슷한 효능을 나타내고 있었음. 따라서, 본 연구에서 시료로 사용한 오가피 영지버섯 발효물과 오가피 상황버섯 발효물이 간 기능 개선 기능성소재로서의 활용이 가능할 것으로 판단됨.

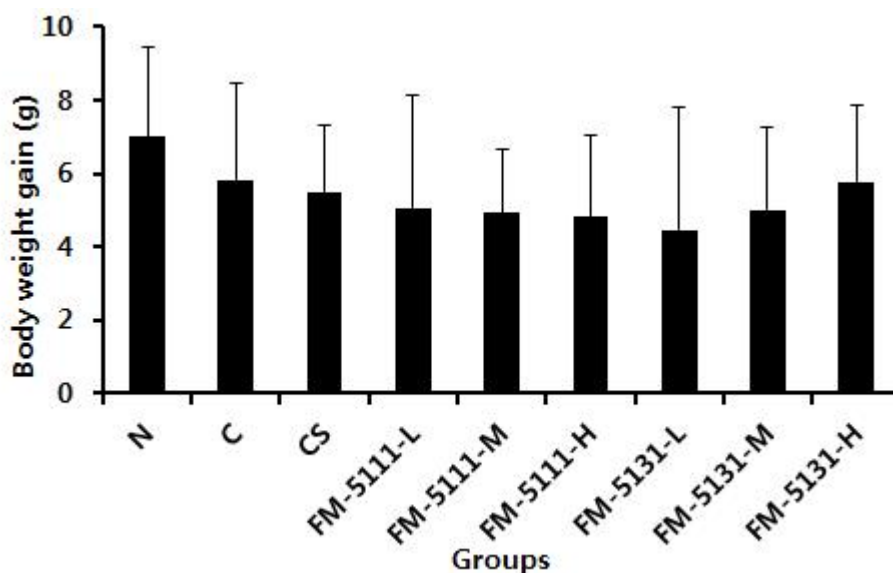


Fig 3-27. Body weight gain in D-galactosamine treated SD rats.

N, Saline 10 ml/kg; D, D-galactosamine(DGA) 650 mg/kg; DS, DGA 650 mg/kg + Silymarin 25 mg/kg; FM-5111-L, DGA 650 mg/kg + FM-5111 50 mg/kg; FM-5111-M, DGA 650 mg/kg + FM-5111 150 mg/kg; FM-5111-H, DGA 650 mg/kg + FM-5111 300 mg/kg; FM-5131-L, DGA 650 mg/kg + FM-5131 50 mg/kg; FM-5131-M, DGA 650 mg/kg + FM-5131 150 mg/kg; FM-5131-H, DGA 650 mg/kg + FM-5131 300 mg/kg; Data are presented as means \pm SD. Values with different superscripts are significantly different by one-way ANOVA and Tukey's multiple comparison test. $*P < 0.05$. Compared to D(Negative control).

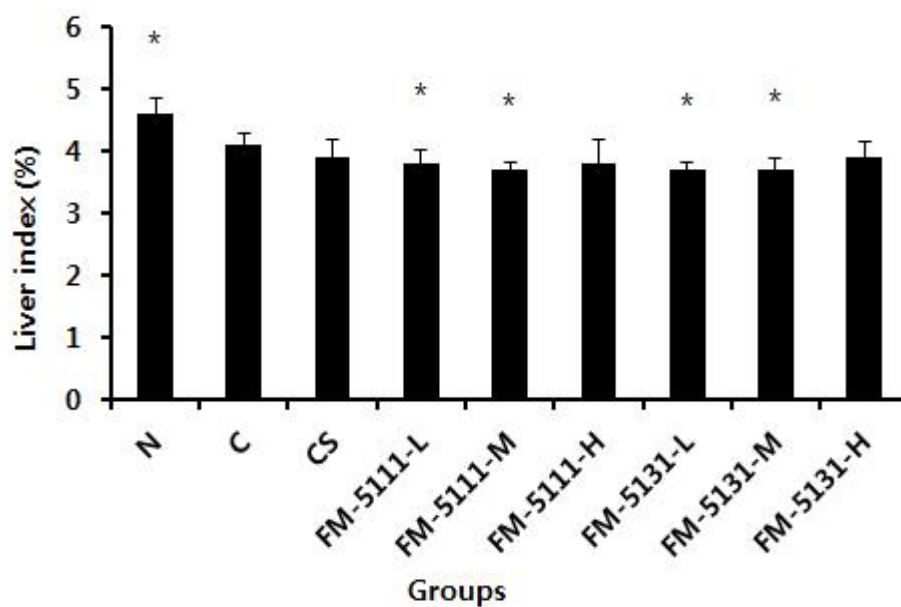


Fig 3-28. liver index in D-galactosamine-treated SD rats.

N, Saline 10 ml/kg; D, D-galactosamine(DGA) 650 mg/kg; DS, DGA 650 mg/kg + Silymarin 25 mg/kg; FM-5111-L, DGA 650 mg/kg + FM-5111 50 mg/kg; FM-5111-M, DGA 650 mg/kg + FM-5111 150 mg/kg; FM-5111-H, DGA 650 mg/kg + FM-5111 300 mg/kg; FM-5131-L, DGA 650 mg/kg + FM-5131 50 mg/kg; FM-5131-M, DGA 650 mg/kg + FM-5131 150 mg/kg; FM-5131-H, DGA 650 mg/kg + FM-5131 300 mg/kg; Data are presented as means \pm SD. Values with different superscripts are significantly different by one-way ANOVA and Tukey's multiple comparison test. $*P < 0.05$. Compared to D(Negative control).

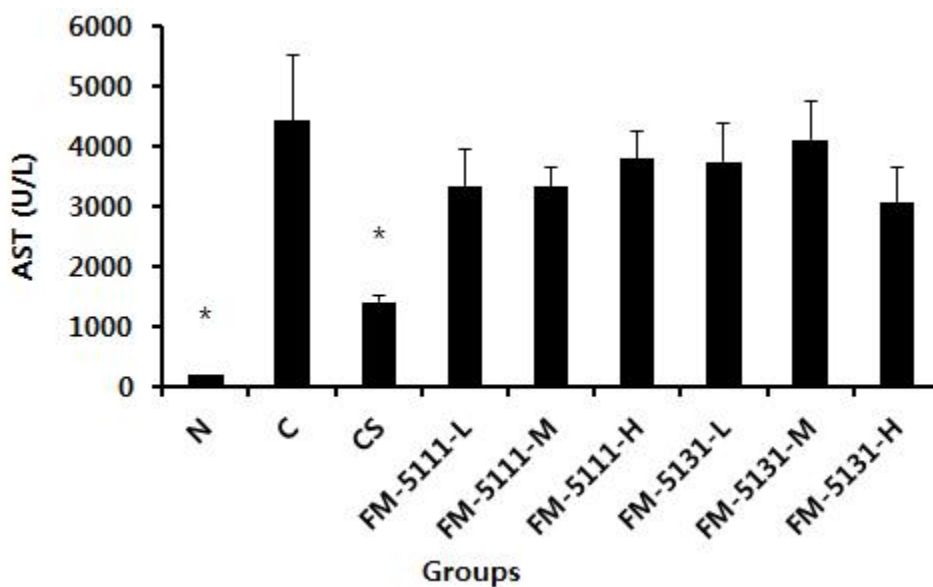


Fig 3-29. Level of AST in D-galactosamine-treated SD rats.

N, Saline 10 ml/kg; D, D-galactosamine(DGA) 650 mg/kg; DS, DGA 650 mg/kg + Silymarin 25 mg/kg; FM-5111-L, DGA 650 mg/kg + FM-5111 50 mg/kg; FM-5111-M, DGA 650 mg/kg + FM-5111 150 mg/kg; FM-5111-H, DGA 650 mg/kg + FM-5111 300 mg/kg; FM-5131-L, DGA 650 mg/kg + FM-5131 50 mg/kg; FM-5131-M, DGA 650 mg/kg + FM-5131 150 mg/kg; FM-5131-H, DGA 650 mg/kg + FM-5131 300 mg/kg; Data are presented as means \pm SD. Values with different superscripts are significantly different by one-way ANOVA and Tukey's multiple comparison test. $*P < 0.05$. Compared to D(Negative control).

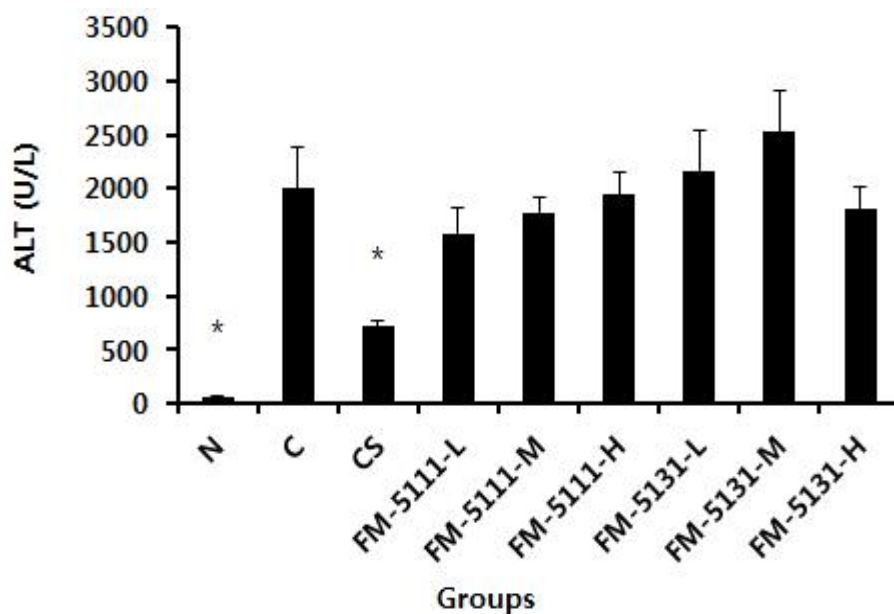


Fig 3-30. Level of ALT in D-galactosamine-treated SD rats.

N, Saline 10 ml/kg; D, D-galactosamine(DGA) 650 mg/kg; DS, DGA 650 mg/kg + Silymarin 25 mg/kg; FM-5111-L, DGA 650 mg/kg + FM-5111 50 mg/kg; FM-5111-M, DGA 650 mg/kg + FM-5111 150 mg/kg; FM-5111-H, DGA 650 mg/kg + FM-5111 300 mg/kg; FM-5131-L, DGA 650 mg/kg + FM-5131 50 mg/kg; FM-5131-M, DGA 650 mg/kg + FM-5131 150 mg/kg; FM-5131-H, DGA 650 mg/kg + FM-5131 300 mg/kg; Data are presented as means \pm SD. Values with different superscripts are significantly different by one-way ANOVA and Tukey's multiple comparison test. *P<0.05. Compared to D(Negative control).

다. 지방간 모델에서 오가피 발효물의 간 기능 개선 효과

(1) 지방간 모델의 체중 및 혈액생화학적 분석

(가) 체중 측정결과 전체 시험기간에 걸쳐 ethionine 및 ethanol로 유발한 지방간 모델에서 음성대조군(control)과 비교하여 양성대조군 및 시험물질 투여군에서 통계적으로 유의성 있는 변화는 관찰되지 않았음(Fig. 3-31). 이러한 결과는 지방간 모델에서 시험물질 투여가 시험동물의 생육에 부정적인 영향을 주고 있지 않는 것으로 판단됨.

(나) Ethionine으로 유발한 지방간 모델에서의 혈액으로부터 AST와 ALT 수치를 분석한 결과, AST와 ALT 모두 간에 존재하는 효소로 간 손상시 혈액으로 유리되어 간 손상의 지표로서 사용됨. Ethionine으로 지방간이 유도된 control군은 normal군에 비하여 모두 수치가 증가하였음. 특히 AST는 FM-5111-H, FM-5131-M, FM-5131-H 군에서 control과 비교하여 유의적으로 감소하였음(Fig. 3-32, A). ALT는 모든 시험군에서 감소하였으나 대조군과 비교하여 시험물질 투여군에서 유의적으로 감소하지 않았음(Fig. 3-32, B).

(다) Ethanol로 유발한 지방간 모델에서의 혈액으로부터 AST와 ALT 수치를 분석한 결과, ethanol로 지방간이 유도된 control군은 normal군에 비하여 모두 수치가 증가하였으며, 시험물질 투여군 중 FM-5111-M, FM-5111-H, FM-5131-H 군에서 control과 비교하여 AST의 수치가 유의적으로 감소하였음(Fig. 33, A). ALT는 대조군과 비교하여 시험물질 투여군, 양성대조군 모두에서 유의적으로 감소하지 않았음(Fig. 33, B).

(라) 이러한 결과로 볼 때, FM-5111, FM-5131은 ethionine과 ethanol에 의해 유발된 지방간 모델에서 간 손상에 대한 예방 및 개선 효능을 갖는 것으로 사료됨.

(2) 지방간 모델의 간 내 총 지질 분석

(가) Ethionine 지방간 모델에서, control군의 간 내 총 지질량은 간 g당 65.56 ± 9.95 mg으로 normal군 31.01 ± 5.50 mg에 비해 2배 이상 총 지질량이 증가되었으며, 시험물질 투여군에서의 간 내 총 지질량은 전체적으로 감소하는 경향을 보였음. 특히 FM-5111-L, FM-5111-M, FM-5131-M, FM-5131-H 군에서 총 지질량이 유의적으로 감소하였음(Fig. 34, A). 이 결과에서 보면, 시험물질 투여군에서의 간 내 총 지질량이 양성대조군인 UDCA 투여군보다 더 낮아진 것을 알 수 있었음.

(나) Ethanol 지방간 모델에서, control군은 normal군에 비해 간 내 총 지질량이 증가하였다. UDCA를 투여한 양성대조군의 간 내 총 지질량은 감소하였으며, 모든 시험물질 투여군에서 총 지질량은 유의적으로 현저히 감소하였고(Fig. 34, B), 시험물질 투여군의 총 지질량은 양성대조군보다 더 감소하였음. 또한, 시험물질 투여군에서 총 지질량이 감소한 것은 시험물질 투여군의 간 내 인지질이나 지방산의

양이 감소한 것으로 사료됨.

(다) 이러한 결과로 볼 때, ethionine 또는 ethanol 지방간 모델에서 FM-5111과 FM-5131은 간 내 지질의 축적을 예방하는 효능을 갖는 것으로 판단됨. 또한, 이러한 효능은 ethionine 지방간 모델보다 ethanol 지방간 모델에서 더욱 두드러지게 나타나고 있음.

(3) 지방간 모델의 간 내 중성지방 분석

(가) Ethionine 지방간 모델에서, control군의 간 조직 내 중성지방 함유량은 간 g당 52.28 ± 9.95 mg으로 normal군 17.89 ± 14.75 mg에 비하여 약 3배가량 증가하였으며, FM-5111-M, FM-5111-H, FM-5131-M, FM-5131-H 군에서 중성지방 함유량이 유의적으로 감소하였음(Fig. 35, A). 시험물질 투여군의 중성지방 함유량 감소정도는 양성대조군인 UCDA 투여군과 비슷한 정도를 보이고 있었음.

(나) Ethanol 지방간 모델에서, control군은 normal군에 비해 간 내 중성지방 함유량이 증가하였음. UDCA를 투여한 양성대조군의 간 내 중성지방 함유량은 감소하였으며, FM-5111-L, FM-5111-M, FM-5111-H, FM-5131-M, FM-5131-H 군에서 중성지방 함유량은 유의적으로 감소하였고(Fig. 35, B), 시험물질 투여군의 중성지방 감소정도는 normal군의 감소수준으로 감소하였음.

(다) 이러한 결과들은 FM-5111과 FM-5131이 ethionine과 ethanol 지방간 모델에서 간 내 중성지방의 축적을 예방하는데 효능을 갖는 것을 보여주고 있으며, 그 효능은 양성대조군인 UCDA와 유사함을 알 수 있었음. 또한, FM-5111과 FM-5131의 이러한 효능은 ethionine 지방간 모델과 ethanol 지방간 모델에서 유사한 경향을 보이고 있었음.

(라) 따라서, FM-5111과 FM-5131은 비알콜성 지방간과 알콜성 지방간 형성을 억제하는 효능을 갖는 것으로 사료됨.

(4) 요약

(가) 두 종류의 오가피 발효물 추출물(FM-5111, FM-5131)에 대한 지방간 예방 및 개선 효능을 검토하였음. 그 결과, FM-5111, FM-5131 모두 ethionine과 ethanol 지방간 모델에서 간 손상의 지표인 AST의 수치를 감소시키며, 간 내 총 지질량과 중성지방 함유량을 감소시키는 효능을 보이고 있었음.

(나) 특히, 간 내 총 지질량과 중성지방 함유량의 감소정도로 보았을 때, ethanol 지방간 모델에서 더욱 두드러진 효능을 보이고 있었음. 따라서, FM-5111과 FM-5131은 비알콜성 지방간 형성을 예방하고 알콜에 의해 형성된 지방간을 개선하는 효능을 가지고 있으며, 비알콜성 지방간과 알콜성 지방간 모델에서 간 손상 등을 억제하는 것으로 판단되어짐.

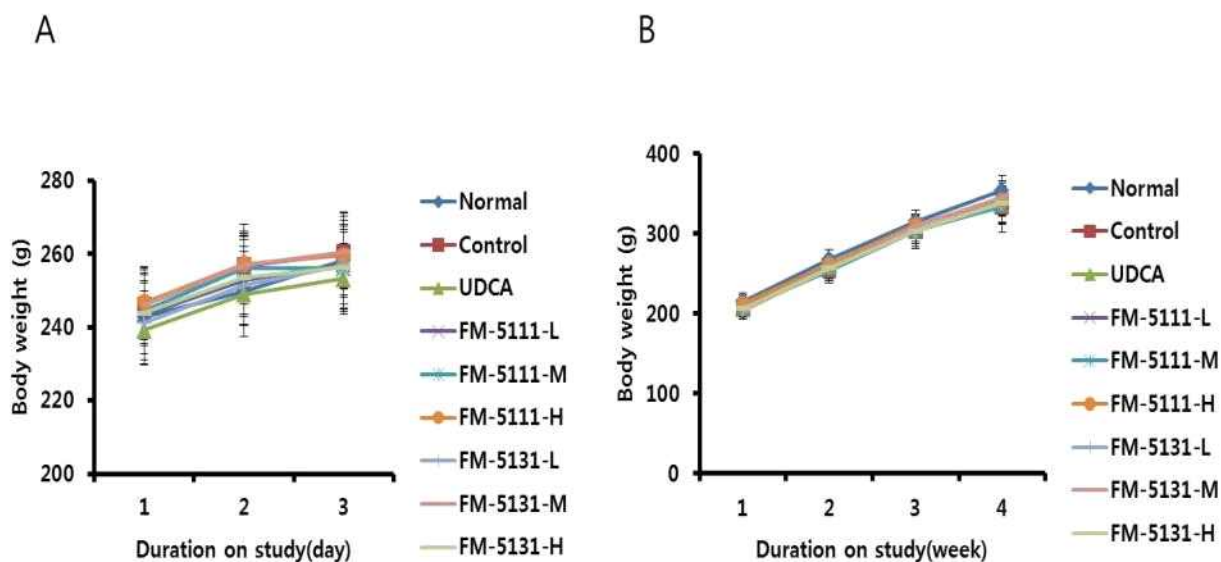


Fig. 3-31. Body weight in ethionine-induced(A) and ethanol-induced(B) fatty liver model.

Normal, Saline 10 mL/kg; Control, fatty liver model; UDCA, fatty liver model + ursodeoxycholic acid 30 mg/kg; FM-5111-L, fatty liver model + FM-5111 50 mg/kg; FM-5111-M, fatty liver model + FM-5111 150 mg/kg; FM-5111-H, fatty liver model + FM-5111 300 mg/kg; FM-5131-L, fatty liver model + FM-5131 50 mg/kg; FM-5131-M, fatty liver model + FM-5131 150 mg/kg; FM-5131-H, fatty liver model + FM-5131 300 mg/kg; Data are presented as means \pm SD.

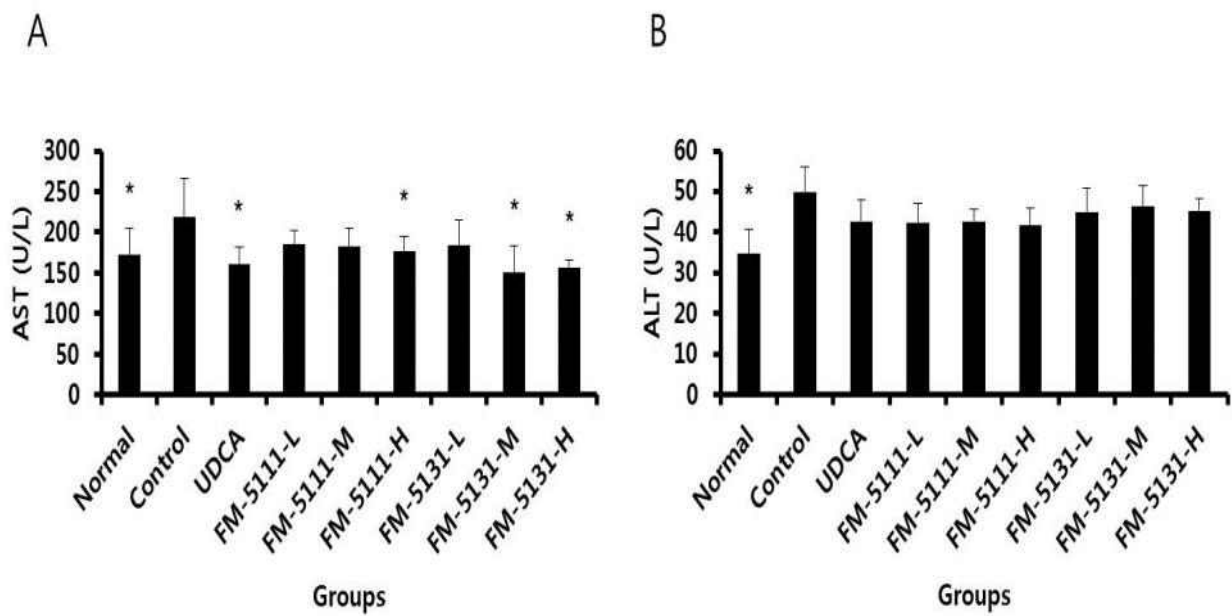


Fig 3-32. Level of AST(A) and ALT(B) in ethionine-induced fatty liver model.

Normal, Saline 10 mL/kg; Control, fatty liver model; UDCA, fatty liver model + ursodeoxycholic acid 30 mg/kg; FM-5111-L, fatty liver model + FM-5111 50 mg/kg; FM-5111-M, fatty liver model + FM-5111 150 mg/kg; FM-5111-H, fatty liver model + FM-5111 300 mg/kg; FM-5131-L, fatty liver model + FM-5131 50 mg/kg; FM-5131-M, fatty liver model + FM-5131 150 mg/kg; FM-5131-H, fatty liver model + FM-5131 300 mg/kg; Data are presented as means \pm SD. * $P < 0.05$. Compared to Control.

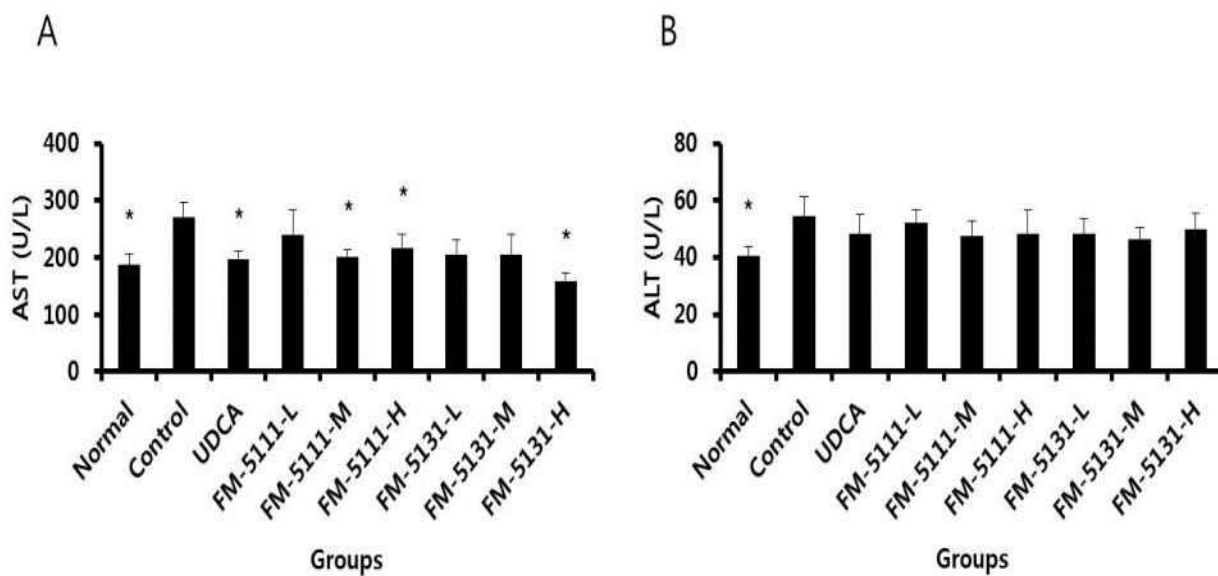


Fig 3-33. Level of AST(A) and ALT(B) in ethanol-induced fatty liver model.

Normal, Saline 10 mL/kg; Control, fatty liver model; UDCA, fatty liver model + ursodeoxycholic acid 30 mg/kg; FM-5111-L, fatty liver model + FM-5111 50 mg/kg; FM-5111-M, fatty liver model + FM-5111 150 mg/kg; FM-5111-H, fatty liver model + FM-5111 300 mg/kg; FM-5131-L, fatty liver model + FM-5131 50 mg/kg; FM-5131-M, fatty liver model + FM-5131 150 mg/kg; FM-5131-H, fatty liver model + FM-5131 300 mg/kg; Data are presented as means \pm SD. * $P < 0.05$. Compared to Control.

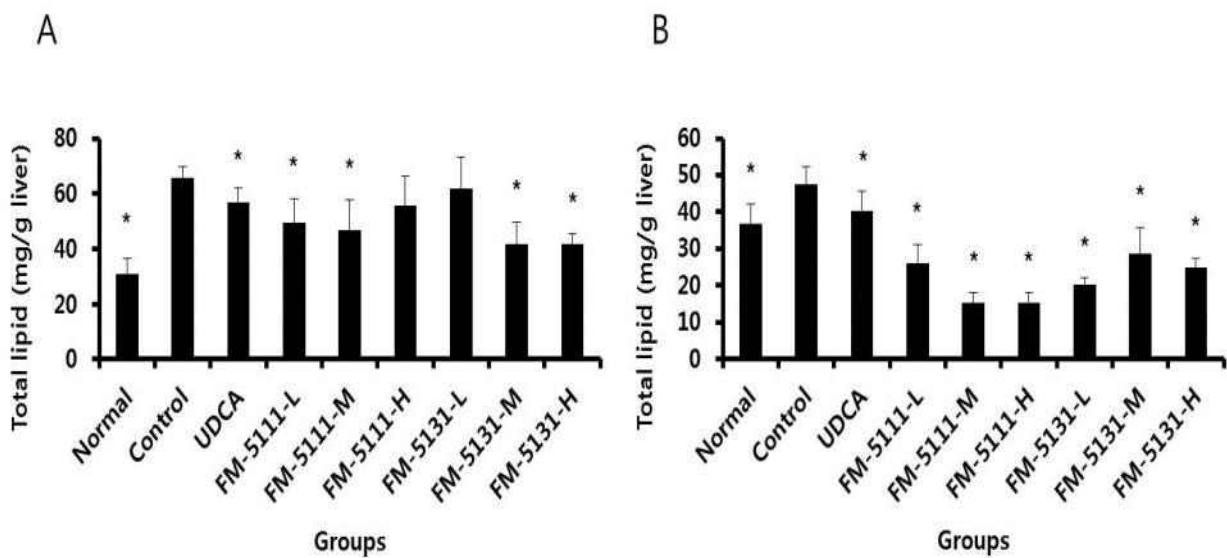


Fig 3-34. Contents of total lipid in liver in ethionine-induced(A) and ethanol-induced fatty liver model.

Normal, Saline 10 mL/kg; Control, fatty liver model; UDCA, fatty liver model + ursodeoxycholic acid 30 mg/kg; FM-5111-L, fatty liver model + FM-5111 50 mg/kg; FM-5111-M, fatty liver model + FM-5111 150 mg/kg; FM-5111-H, fatty liver model + FM-5111 300 mg/kg; FM-5131-L, fatty liver model + FM-5131 50 mg/kg; FM-5131-M, fatty liver model + FM-5131 150 mg/kg; FM-5131-H, fatty liver model + FM-5131 300 mg/kg; Data are presented as means \pm SD. * $P < 0.05$. Compared to Control.

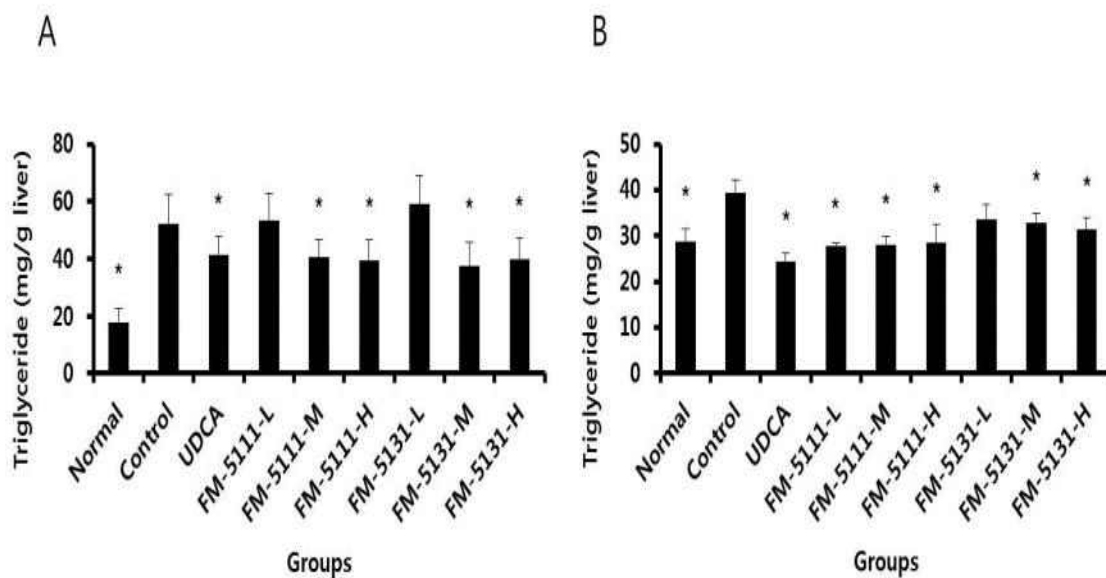


Fig 3-35. Contents of triglyceride in liver in ethionine-induced(A) and ethanol-induced fatty liver model.

Normal, Saline 10 mL/kg; Control, fatty liver model; UDCA, fatty liver model + ursodeoxycholic acid 30 mg/kg; FM-5111-L, fatty liver model + FM-5111 50 mg/kg; FM-5111-M, fatty liver model + FM-5111 150 mg/kg; FM-5111-H, fatty liver model + FM-5111 300 mg/kg; FM-5131-L, fatty liver model + FM-5131 50 mg/kg; FM-5131-M, fatty liver model + FM-5131 150 mg/kg; FM-5131-H, fatty liver model + FM-5131 300 mg/kg; Data are presented as means \pm SD. * $P < 0.05$. Compared to Control.

6. 오가피 발효물의 안전성 확보(독성시험) : *IN VIVO*

가. 단회 및 반복 투여 독성 시험

- (1) 단회 및 반복 투여 독성 시험에서 시험기간 동안 관찰한 결과, FM-5111, FM5131을 투여한 모든 시험군에서 시험물질 투여와 관련된 사망 동물 또는 임상증상은 관찰되지 않았음. 또한, 7일간 1일 1회 체중을 측정된 결과에서도 의미 있는 차이를 보이지 않았음. 이러한 결과는 FM-5111, FM-5131이 시험에 사용된 농도 범위에서 어떠한 비정상적 임상증상이나 독성을 유발하지 않는다는 것을 의미함(Table 3-23, 24, 25).
- (2) Table 3-26에서는 반복 투여 독성 시험에서의 체중변화를 보여줌. 대조군과 FM-5111, FM-5131 시험군의 체중변화를 1주 간격으로 4주간 측정된 결과 대조군과 시험군 사이에 통계적으로 유의적인 변화가 없음을 알 수 있었음.
- (3) 또한, FM-5111, FM-5131을 투여한 4주 후에, 실험동물의 장기 무게를 측정하였음. 시험군의 간, 폐, 비장, 신장, 심장, 부신, 흉선, 뇌, 생식기(난소 또는 고환)의 무게와 대조군의 장기 무게 사이에 통계적으로 유의적인 변화가 없었음.
- (4) 이 결과는 수컷 SD-rats와 암컷 SD-rats(Table 3-27)에서 유사하게 나타났음. 이러한 결과는 FM-5111, FM-5131 등이 본 연구에서 사용된 농도범위에서 장기에 손상을 유발하지 않음을 알 수 있었음.

나. 혈액학적 검사

- (1) 반복 투여 독성 시험에서, 28일간 시험물질(FM-5111, FM-5131)을 투여한 후, 실험동물을 ether로 마취하고 복부대동맥으로부터 채혈하여 총백혈구수(total leucocyte count, WBC), 중성호성 백혈구(neutrophil, NEUT), 림프구(lymphocyte, LYMP), 단핵구(monocyte, MONO), 산호성백혈구 (eosinophil, EOS), 염기호성백혈구 (basophil, BASO), 총적혈구수(total erythrocyte count, RBC), 혈색소량(hemoglobin concentration, HGB), 헤마토크리트치(hematocrit, HCT), 평균적혈구용적(mean cell volume, MCV), 평균헤모글로빈양(mean cell hemoglobin, MCH), 평균적혈구헤모글로빈농도(mean cell hemoglobin concentration, MCHC), 혈소판수 (platelet, PLT) 등 혈액학적 지표를 혈구자동측정기(Hemavet, Japen)로 측정하였음.
- (2) 혈액학적 지표들은 FM-5111, FM-5131을 투여한 시험군에서 대조군과의 통계적으로 유의한 차이를 보이지 않았음. 이 결과는 수컷 SD-rats와 암컷 SD-rats (Table 3-28)에서 유사하게 나타났음. 이러한 결과는 FM-5111, FM-5131 등이 혈액세포들의 조혈 작용에 유해한 작용을 하지 않는 것을 제시함.

다. 혈액생화학적 검사

- (1) 혈액생화학적 지표들은 대조군과 시험군 사이에서 유의적인 변화가 나타나지 않았음.
- (2) 이 결과는 수컷 SD-rats와 암컷 SD-rats (Table 3-29)에서 유사하게 나타났으며, 이는

FM-5111, FM-5131 등이 독성이 없음을 시사하고 있으며, 특히 간, 신장 등의 손상에 의해 유리되는 지표들인 아스파테이트 아미노기전이효소(Aspartate aminotransferase: AST), 알라닌 아미노기전이효소(Alanine aminotransferase: ALT), 크레아티닌(Creatinine: CRE), 혈액요소질소(Blood Urea nitrogen: BUN) 등에 변화가 없는 것은 간, 신장 등에 손상을 유발하지 않음을 알 수 있었음.

라. 요약

- (1) 오가피-발효물 3종 중 오가피-영지버섯 발효물과 오가피-상황버섯 발효물데 대하여 단회 및 반복투여를 통한 독성시험을 실시한 것으로, 오가피-영지버섯 발효물과 오가피-상황버섯 발효물에 대한 열수추출물을 최고 2 g/kg의 농도로 단회 투여한 SD-rats에 체중 변화, 임상증상 등에서 어떠한 독성도 관찰할 수 없었으며, 1 g/kg 이하의 농도로 4주간 반복 투여한 SD-rats에서도 체중변화, 임상증상, 장기 무게, 혈액학적 성상, 혈액생화학적 성상 등에서 어떠한 독성과 비정상적인 소견을 관찰할 수 없었음.
- (2) 따라서, 이러한 결과로 볼 때 오가피 영지버섯-발효물 열수추출물(FM-5111)과 오가피-상황버섯 발효물 열수추출물(FM-5131)은 본 연구에서 사용한 농도 내에서의 안전성을 확인할 수 있었음.

Table 3-23. Mortality of Sprague-Dawley rats fed of *Acanthopanax senticosus* fermentation products during oral administration for 7 day.

		Group/Dose(g/kg)						
		FM-5111 ²⁾				FM-5131 ³⁾		
		G1 ¹⁾ /0	G2/0.5	G3/1.0	G4/2.0	G5/0.5	G6/1.0	G7/2.0
mortality(%) (dead/total)	male	0%(0/5)	0%(0/5)	0%(0/5)	0%(0/5)	0%(0/5)	0%(0/5)	0%(0/5)
	female	0%(0/5)	0%(0/5)	0%(0/5)	0%(0/5)	0%(0/5)	0%(0/5)	0%(0/5)

¹⁾ Negative control: without extract was treated with aseptic water.

²⁾ *Acanthopanax senticosus* fermentation product with *Ganoderma lucidum*

³⁾ *Acanthopanax senticosus* fermentation product with *Phellinus linteus*

Table 3-24. Clinical sign of Sprague-Dawley rats fed of *Acanthopanax senticosus* fermentation products during oral administration for 7 day.

		Group/Dose(g/kg)						
		FM-5111 ²⁾				FM-5131 ³⁾		
		G1 ¹⁾ /0	G2/0.5	G3/1.0	G4/2.0	G5/0.5	G6/1.0	G7/2.0
Clinical sign	male	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD
	female	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD

¹⁾ Negative control: without extract was treated with aseptic water.

²⁾ *Acanthopanax senticosus* fermentation product with *Ganoderma lucidum*

³⁾ *Acanthopanax senticosus* fermentation product with *Phellinus linteus*

NAD: No Abnormality Detected

Table 3-25. Changes of body weight of Sprague-Dawley rats fed of *Acanthopanax senticosus* fermentation products during oral administration for 7 day.

Sex	Day	Group/Dose(g/kg)						
		G1 ¹⁾ /0	FM-5111 ²⁾			FM-5131 ³⁾		
			G2/0.5	G3/1.0	G4/2.0	G5/0.5	G6/1.0	G7/2.0
male	1	203.86 ± 7.92	204.22 ± 7.75	204.72 ± 7.19	205.28 ± 7.17	205.04 ± 7.09	204.82 ± 7.50	204.30 ± 8.14
	2	204.00 ± 8.65	205.78 ± 8.50	205.08 ± 7.59	205.92 ± 9.29	204.20 ± 7.79	206.36 ± 6.49	202.98 ± 9.01
	3	212.20 ± 9.07	213.40 ± 8.26	212.46 ± 7.46	212.80 ± 9.84	211.66 ± 8.68	214.84 ± 6.95	210.70 ± 7.71
	4	223.44 ± 9.47	225.34 ± 8.69	223.96 ± 7.61	224.10 ± 9.59	223.22 ± 10.22	226.96 ± 8.25	222.22 ± 8.51
	5	229.58 ± 10.47	231.58 ± 8.45	229.94 ± 7.87	231.28 ± 10.85	230.76 ± 8.64	232.60 ± 8.68	229.08 ± 8.98
	6	234.92 ± 10.64	237.80 ± 7.71	236.42 ± 8.67	237.66 ± 10.67	236.08 ± 9.06	239.26 ± 9.63	235.34 ± 8.71
	7	250.26 ± 12.04	249.28 ± 4.64	247.94 ± 9.44	250.22 ± 11.76	248.68 ± 10.35	252.72 ± 10.28	248.38 ± 9.18
female	1	161.12 ± 7.05	160.80 ± 6.50	160.96 ± 5.79	161.06 ± 5.71	161.58 ± 5.46	161.72 ± 5.81	162.08 ± 6.22
	2	160.34 ± 9.31	156.98 ± 4.52	158.02 ± 7.15	157.28 ± 5.70	156.86 ± 7.50	156.64 ± 5.96	158.28 ± 7.07
	3	163.78 ± 11.10	161.84 ± 4.33	161.62 ± 8.45	160.62 ± 4.75	161.66 ± 8.86	160.20 ± 6.04	162.48 ± 6.89
	4	169.58 ± 12.01	166.98 ± 3.08	166.96 ± 9.99	167.82 ± 4.86	167.86 ± 8.14	166.08 ± 5.41	168.94 ± 5.67
	5	172.70 ± 12.44	171.08 ± 5.51	171.54 ± 9.20	170.68 ± 5.55	171.36 ± 9.36	169.36 ± 5.54	171.08 ± 4.24
	6	173.14 ± 15.75	172.40 ± 4.48	173.42 ± 10.17	172.28 ± 5.44	172.04 ± 11.90	173.52 ± 3.74	174.64 ± 6.51
	7	181.22 ± 16.46	176.74 ± 3.71	180.78 ± 11.59	180.02 ± 6.09	179.64 ± 13.37	178.08 ± 5.90	182.68 ± 5.78

¹⁾ Negative control: without extract was treated with aseptic water.

²⁾ *Acanthopanax senticosus* fermentation product with *Ganoderma lucidum*

³⁾ *Acanthopanax senticosus* fermentation product with *Phellinus linteus*

Table 3-26. Changes of body weight of Sprague-Dawley rats fed of *Acanthopanax senticosus* fermentation products during oral administration for 28 day.

Sex	Week	Group/Dose(g/kg)						
		G1 ¹⁾ /0	FM-5111 ²⁾			FM-5131 ³⁾		
			G2/0.25	G3/0.5	G4/1.0	G5/0.25	G6/0.5	G7/1.0
male	0	198.50 ± 7.19	199.90 ± 6.39	198.12 ± 5.00	199.56 ± 7.65	198.94 ± 5.43	199.58 ± 8.41	199.82 ± 8.20
	1	240.20 ± 12.50	243.26 ± 7.51	238.82 ± 5.65	239.92 ± 10.77	242.12 ± 6.10	240.80 ± 9.24	238.96 ± 9.36
	2	270.48 ± 32.81	292.46 ± 11.03	285.18 ± 7.98	291.68 ± 16.39	293.30 ± 9.18	292.24 ± 12.63	288.66 ± 11.83
	3	329.48 ± 20.02	330.38 ± 13.17	322.78 ± 11.05	331.90 ± 18.78	334.70 ± 9.92	328.06 ± 13.49	327.58 ± 12.72
	4	341.22 ± 20.32	337.78 ± 15.71	331.54 ± 14.25	342.92 ± 15.94	343.90 ± 11.76	334.40 ± 15.83	333.36 ± 15.49
female	0	160.98 ± 8.48	159.28 ± 6.76	160.20 ± 7.49	160.04 ± 7.28	159.56 ± 8.61	161.06 ± 7.21	159.26 ± 8.53
	1	183.50 ± 9.79	176.22 ± 8.77	173.14 ± 6.71	175.44 ± 8.65	177.66 ± 12.52	179.12 ± 10.18	173.72 ± 9.73
	2	202.24 ± 12.93	200.34 ± 11.77	192.78 ± 7.57	190.18 ± 7.45	197.22 ± 10.87	193.64 ± 9.96	189.60 ± 12.34
	3	218.44 ± 18.34	212.54 ± 8.14	204.32 ± 9.93	207.64 ± 8.88	211.32 ± 13.10	216.46 ± 6.96	210.42 ± 13.50
	4	217.66 ± 16.12	212.34 ± 4.41	200.62 ± 9.41	205.22 ± 11.38	207.62 ± 10.05	211.92 ± 7.71	208.76 ± 16.04

¹⁾ Negative control: without extract was treated with aseptic water.

²⁾ *Acanthopanax senticosus* fermentation product with *Ganoderma lucidum*

³⁾ *Acanthopanax senticosus* fermentation product with *Phellinus linteus*

Table 3-27. Organ weight changes in Sprague-Dawley rats administered with *Acanthopanax senticosus* fermentation products by daily oral gavage for 28 day.

Sex	Organ	Group/Dose(g/kg)						
		G1 ¹⁾ /0	FM-5111 ²⁾			FM-5131 ³⁾		
			G2/0.25	G3/0.5	G4/1.0	G5/0.25	G6/0.5	G7/1.0
male	Liver	11.11 ± 1.23	11.07 ± 1.13	11.08 ± 1.02	12.20 ± 0.74	11.08 ± 0.51	10.62 ± 0.49	11.25 ± 0.66
	Lung	1.27 ± 0.13	1.28 ± 0.08	1.29 ± 0.12	1.26 ± 0.11	1.36 ± 0.15	1.31 ± 0.07	1.29 ± 0.08
	Spleen	0.78 ± 0.07	0.75 ± 0.13	0.75 ± 0.07	0.81 ± 0.14	0.85 ± 0.14	0.70 ± 0.07	0.76 ± 0.08
	Kidney	1.27 ± 0.10	1.25 ± 0.08	1.24 ± 0.09	1.33 ± 0.09	1.27 ± 0.10	1.23 ± 0.09	1.23 ± 0.05
	Heart	1.12 ± 0.12	1.14 ± 0.03	1.19 ± 0.09	1.13 ± 0.09	1.20 ± 0.08	1.14 ± 0.09	1.13 ± 0.07
	Testis	1.55 ± 0.08	1.57 ± 0.16	1.54 ± 0.11	1.76 ± 0.04	1.62 ± 0.20	1.57 ± 0.11	1.53 ± 0.09
	Adrenal gland	0.02 ± 0.01	0.02 ± 0.00	0.02 ± 0.00	0.02 ± 0.01	0.06 ± 0.09	0.02 ± 0.00	0.02 ± 0.00
	Thymus	0.60 ± 0.05	0.62 ± 0.11	0.57 ± 0.14	0.71 ± 0.10	0.66 ± 0.07	0.59 ± 0.10	0.64 ± 0.08
	Brain	2.02 ± 0.09	1.97 ± 0.05	1.98 ± 0.10	2.00 ± 0.11	1.97 ± 0.15	2.05 ± 0.06	1.95 ± 0.08
female	Liver	6.89 ± 0.93	6.58 ± 0.91	5.86 ± 0.56	6.31 ± 0.61	6.05 ± 0.59	6.56 ± 0.55	6.63 ± 0.48
	Lung	1.10 ± 0.09	1.08 ± 0.09	1.04 ± 0.11	1.05 ± 0.06	1.17 ± 0.13	1.08 ± 0.09	1.11 ± 0.13
	Spleen	0.64 ± 0.11	0.59 ± 0.09	0.53 ± 0.04	0.53 ± 0.06	0.59 ± 0.07	0.55 ± 0.06	0.52 ± 0.08
	Kidney	0.78 ± 0.09	0.79 ± 0.05	0.76 ± 0.10	0.83 ± 0.04	0.80 ± 0.04	0.80 ± 0.04	0.80 ± 0.06
	Heart	0.82 ± 0.09	0.78 ± 0.04	0.77 ± 0.05	0.76 ± 0.05	0.79 ± 0.05	0.83 ± 0.06	0.80 ± 0.06
	Ovary	0.05 ± 0.01	0.04 ± 0.00	0.03 ± 0.01	0.04 ± 0.01	0.04 ± 0.01	0.05 ± 0.00	0.04 ± 0.00
	Adrenal gland	0.03 ± 0.00	0.03 ± 0.00	0.03 ± 0.01	0.03 ± 0.00	0.03 ± 0.00	0.03 ± 0.00	0.03 ± 0.00
	Thymus	0.45 ± 0.06	0.39 ± 0.09	0.42 ± 0.05	0.41 ± 0.03	0.43 ± 0.04	0.42 ± 0.06	0.42 ± 0.03
	Brain	1.88 ± 0.14	2.05 ± 0.33	1.86 ± 0.06	1.92 ± 0.08	1.99 ± 0.27	1.91 ± 0.09	1.93 ± 0.09

¹⁾ Negative control: without extract was treated with aseptic water.

²⁾ *Acanthopanax senticosus* fermentation product with *Ganoderma lucidum*

³⁾ *Acanthopanax senticosus* fermentation product with *Phellinus linteus*

Table 3-28. Changes of hematological parameters in Sprague-Dawley rats administered with *Acanthopanax senticosus* fermentation products by daily oral gavage for 28 day.

Sex	parameter	Group/Dose(g/kg)						
		G1 ¹⁾ /0	FM-5111 ²⁾			FM-5131 ³⁾		
			G2/0.25	G3/0.5	G4/1.0	G5/0.25	G6/0.5	G7/1.0
male	RBC(1×10^6 cells/ μ l)	7.94 \pm 0.44	8.13 \pm 0.31	8.21 \pm 0.48	8.29 \pm 0.36	8.51 \pm 0.15	8.42 \pm 0.31	8.43 \pm 0.46
	HGB(g/dL)	15.38 \pm 0.78	15.78 \pm 0.50	15.88 \pm 0.57	15.86 \pm 0.84	16.40 \pm 0.41	16.02 \pm 0.70	16.12 \pm 0.91
	HCT(%)	49.36 \pm 2.43	51.26 \pm 1.53	51.50 \pm 2.02	50.10 \pm 1.91	52.24 \pm 0.71	51.06 \pm 1.72	52.46 \pm 1.36
	MCV(fL)	62.24 \pm 0.86	63.12 \pm 0.63	62.75 \pm 1.19	60.48 \pm 2.02	61.48 \pm 0.89	60.64 \pm 0.90	62.26 \pm 1.93
	MCH(pg)	19.36 \pm 0.50	19.44 \pm 0.24	19.35 \pm 0.47	19.10 \pm 0.56	19.28 \pm 0.48	19.00 \pm 0.44	19.10 \pm 0.60
	MCHC(g/dL)	31.14 \pm 0.50	30.76 \pm 0.18	30.85 \pm 0.37	31.60 \pm 0.55	31.36 \pm 0.52	31.34 \pm 0.48	30.68 \pm 1.04
	PLT(1×10^3 cells/ μ l)	899.40 \pm 109.56	941.20 \pm 84.07	975.50 \pm 174.69	1077.20 \pm 258.17	1108.40 \pm 39.57	1041.60 \pm 178.88	1097.60 \pm 81.95
	WBC(1×10^3 cells/ μ l)	6.86 \pm 0.72	5.52 \pm 0.70	8.53 \pm 0.57	10.66 \pm 2.73	9.71 \pm 1.48	9.60 \pm 2.21	11.26 \pm 1.32
	Neut(%)	10.24 \pm 2.27	10.46 \pm 1.07	9.83 \pm 3.97	7.28 \pm 1.37	5.88 \pm 1.27	6.26 \pm 0.89	7.12 \pm 1.19
	Lymph(%)	85.58 \pm 3.81	86.74 \pm 1.09	86.55 \pm 5.12	89.96 \pm 1.57	91.72 \pm 1.20	91.28 \pm 1.21	89.82 \pm 1.24
	Mono(%)	1.42 \pm 0.19	1.32 \pm 0.40	1.00 \pm 0.41	1.32 \pm 0.69	0.88 \pm 0.16	0.98 \pm 0.25	1.18 \pm 0.11
	Eos(%)	1.85 \pm 0.37	1.16 \pm 0.25	1.70 \pm 1.49	1.16 \pm 0.42	1.28 \pm 0.63	1.22 \pm 0.28	1.60 \pm 0.70
	Baso(%)	0.28 \pm 0.11	0.32 \pm 0.13	0.27 \pm 0.06	0.28 \pm 0.13	0.24 \pm 0.05	0.26 \pm 0.05	0.28 \pm 0.08
	female	RBC(1×10^6 cells/ μ l)	7.58 \pm 0.27	7.82 \pm 0.10	8.15 \pm 0.32	8.00 \pm 0.21	8.02 \pm 0.31	7.82 \pm 0.27
HGB(g/dL)		14.88 \pm 0.45	14.94 \pm 0.34	15.52 \pm 0.53	15.16 \pm 0.49	15.28 \pm 0.54	14.98 \pm 0.41	15.14 \pm 0.65
HCT(%)		47.34 \pm 1.66	47.54 \pm 0.57	49.70 \pm 1.69	48.18 \pm 1.64	48.24 \pm 1.19	47.14 \pm 1.57	47.40 \pm 2.24
MCV(fL)		62.48 \pm 1.12	60.78 \pm 0.82	61.02 \pm 0.81	60.16 \pm 0.47	60.12 \pm 1.46	60.30 \pm 1.02	60.42 \pm 1.23
MCH(pg)		19.60 \pm 0.48	19.08 \pm 0.58	19.02 \pm 0.36	18.90 \pm 0.25	19.06 \pm 0.48	19.14 \pm 0.36	19.28 \pm 0.42
MCHC(g/dL)		31.36 \pm 0.33	31.40 \pm 0.60	31.14 \pm 0.31	31.44 \pm 0.32	31.66 \pm 0.75	31.70 \pm 0.22	31.88 \pm 0.42
PLT(1×10^3 cells/ μ l)		1117.40 \pm 142.41	1117.20 \pm 135.74	1187.60 \pm 67.74	1040.60 \pm 139.76	1109.20 \pm 183.11	1064.00 \pm 104.77	978.20 \pm 141.75
WBC(1×10^3 cells/ μ l)		4.40 \pm 0.98	3.63 \pm 0.34	3.00 \pm 0.71	3.95 \pm 0.67	3.77 \pm 0.88	2.83 \pm 0.53	3.33 \pm 1.13
Neut(%)		8.38 \pm 3.21	10.84 \pm 3.94	10.56 \pm 4.36	11.14 \pm 2.81	8.94 \pm 2.60	11.10 \pm 3.92	11.00 \pm 3.56
Lymph(%)		87.64 \pm 3.76	85.16 \pm 4.47	86.08 \pm 4.56	84.72 \pm 3.67	86.80 \pm 4.32	84.74 \pm 3.79	83.54 \pm 3.36
Mono(%)		1.00 \pm 0.58	0.92 \pm 0.19	0.88 \pm 0.27	1.24 \pm 0.39	1.32 \pm 0.29	1.10 \pm 0.10	1.00 \pm 0.37
Eos(%)		2.68 \pm 0.83	2.70 \pm 1.35	2.04 \pm 0.59	2.68 \pm 0.78	2.72 \pm 1.86	2.94 \pm 1.38	3.60 \pm 0.55
Baso(%)		0.30 \pm 0.10	0.38 \pm 0.08	0.30 \pm 0.24	0.22 \pm 0.13	0.22 \pm 0.04	0.15 \pm 0.06	0.20 \pm 0.10

¹⁾ Negative control: without extract was treated with aseptic water.

²⁾ *Acanthopanax senticosus* fermentation product with *Ganoderma lucidum*

³⁾ *Acanthopanax senticosus* fermentation product with *Phellinus linteus*

Table 3-29. Blood biochemistry changes in Sprague-Dawley rats administered with *Acanthopanax senticosus* fermentation products by daily oral gavage for 28 day.

Sex	parameter	Group/Dose(g/kg)						
		G1 ¹⁾ /0	FM-5111 ²⁾			FM-5131 ³⁾		
			G2/0.25	G3/0.5	G4/1.0	G5/0.25	G6/0.5	G7/1.0
male	ALB(g/dL)	4.60 ± 0.10	4.56 ± 0.05	4.52 ± 0.08	4.68 ± 0.11	4.64 ± 0.15	4.62 ± 0.04	4.66 ± 0.09
	ALP(U/L)	487.80 ± 91.91	412.25 ± 56.79	408.40 ± 92.25	415.80 ± 44.43	405.40 ± 24.80	456.60 ± 65.57	381.60 ± 88.40
	CRE(mg/dL)	0.60 ± 0.12	0.60 ± 0.07	0.50 ± 0.10	0.54 ± 0.05	0.60 ± 0.10	0.58 ± 0.04	0.56 ± 0.15
	GLU(mg/dL)	108.40 ± 11.39	126.60 ± 8.44	112.00 ± 14.72	116.40 ± 5.18	105.60 ± 16.05	118.20 ± 16.05	122.00 ± 9.19
	AST(U/L)	85.63 ± 12.75	89.63 ± 28.65	114.47 ± 21.86	93.57 ± 2.32	111.17 ± 6.09	93.40 ± 11.01	108.13 ± 21.77
	ALT(U/L)	42.00 ± 8.69	40.00 ± 6.04	37.60 ± 13.39	42.20 ± 8.23	41.20 ± 8.50	39.00 ± 7.28	40.60 ± 4.34
	T-CHO(mg/dL)	56.65 ± 1.50	52.63 ± 5.64	57.95 ± 24.31	50.72 ± 16.96	104.38 ± 14.03	103.47 ± 18.94	83.34 ± 13.64
	T-PRO(g/dL)	6.20 ± 0.14	6.14 ± 0.09	6.22 ± 0.16	6.48 ± 0.04	6.28 ± 0.26	6.28 ± 0.11	6.40 ± 0.19
	TG(mg/dL)	80.50 ± 27.43	54.80 ± 14.69	65.00 ± 13.80	103.50 ± 8.85	68.20 ± 9.23	78.60 ± 15.29	109.80 ± 15.07
	BUN(mg/dL)	15.00 ± 2.59	14.60 ± 1.98	17.46 ± 3.20	19.38 ± 2.01	18.70 ± 1.99	18.66 ± 1.34	21.38 ± 1.65
female	ALB(g/dL)	1.48 ± 0.22	1.14 ± 0.25	1.18 ± 0.36	1.26 ± 0.64	2.50 ± 0.16	2.32 ± 0.22	2.43 ± 0.25
	ALP(U/L)	232.40 ± 36.53	272.00 ± 73.02	223.20 ± 47.89	275.25 ± 31.55	255.00 ± 34.73	245.40 ± 30.99	208.00 ± 21.91
	CRE(mg/dL)	0.58 ± 0.04	0.56 ± 0.05	0.52 ± 0.04	0.52 ± 0.08	0.56 ± 0.11	0.64 ± 0.11	0.54 ± 0.09
	GLU(mg/dL)	95.20 ± 15.71	91.80 ± 8.41	92.80 ± 15.32	98.40 ± 11.93	100.40 ± 22.41	95.80 ± 9.47	103.60 ± 13.07
	AST(U/L)	190.80 ± 38.82	188.40 ± 32.69	202.80 ± 38.83	201.60 ± 27.49	169.00 ± 41.73	175.80 ± 22.58	156.40 ± 19.74
	ALT(U/L)	29.20 ± 5.72	35.00 ± 5.15	34.40 ± 2.88	31.80 ± 4.97	36.40 ± 2.30	33.80 ± 4.60	29.60 ± 6.43
	T-CHO(mg/dL)	102.20 ± 14.04	104.40 ± 28.27	95.60 ± 12.05	97.60 ± 15.73	111.00 ± 22.57	96.60 ± 18.23	108.00 ± 8.28
	T-PRO(g/dL)	5.86 ± 0.15	6.10 ± 0.23	6.14 ± 0.21	6.14 ± 0.11	6.02 ± 0.26	5.96 ± 0.18	6.04 ± 0.27
	TG(mg/dL)	26.25 ± 6.80	21.40 ± 8.65	19.00 ± 3.24	24.00 ± 6.04	23.25 ± 7.80	23.20 ± 5.63	25.25 ± 5.74
	BUN(mg/dL)	16.46 ± 0.81	15.28 ± 1.55	15.70 ± 3.05	15.84 ± 2.30	15.26 ± 2.30	15.44 ± 2.56	16.96 ± 6.67

¹⁾ Negative control: without extract was treated with aseptic water.

²⁾ *Acanthopanax senticosus* fermentation product with *Ganoderma lucidum*

³⁾ *Acanthopanax senticosus* fermentation product with *Phellinus linteus*

7. 시작품제작 및 품질관리 : 1차

가. 1차 시작품 레시피 개발

- (1) 캡슐제품 : 궁극적으로 인체적용시험을 위한 제품으로 오가피-발효물(오가피 발효물 추출 분말)이 가지는 효능을 정확하게 측정하기 위하여 최소한의 부형제를 사용하여 1차 시작품 제작을 추진하고자 하였음.

원료명	합량(mg)	처방비율(%)	사용목적
오가피 발효추출분말	240.00	66.667	기능성확인목적
결정셀룰로우스 M101	111.25	30.903	부형제
해조칼슘	7.00	1.944	부형제
이산화규소	1.75	0.486	부형제
합 계	360	100	

- (2) 병 음료 제품 : 100ml 병제품용으로 오가피-발효물소재를 이용한 제품화시 제품으로서의 가능성 및 소재의 안정성 등을 확보하기 위하여 1차시작품 제작을 추진하였음.

성분명	배합비(%)	비고
오가피-발효물 추출물(고형분 2.5%)	96.00	
부원료 1 : 대추추출농축액	3.67	
부원료 2 : 과채복합추출물	0.28	
부원료 3 : A	0.02	
부원료 4 : B	0.02	
부원료 5 : C	0.01	
계	100	

나. 1차 시작품 안정성 검사



Fig. 3-36. 안정성시험을 위한 제작 시작품 및 항온항습기에서 가속시험 평가

(1) 오가피 발효물 분말제품 : ELEU-F(분말)

(가) 가속시험 : 2011. 10 ~ 2012. 04(6개월간)

- ▶ 제조 년·월·일 : 2011. 10. 13.
- ▶ 보존조건 : 38℃, 75% RH 이상
- ▶ 가속시험 1차 시험일 : 2011. 10. 14.

시험항목	제조번호	20111013		
		sample 1	sample 2	sample 3
성상		적합	적합	적합
Eleutheroside B와 E 함량		적합	적합	적합
베타글루칸 함량		적합	적합	적합
대장균군		적합	적합	적합
붕해도		적합	적합	적합

▶ 가속시험 2차 시험일 : 2011. 11. 14

시험항목	제조번호	20111013		
		sample 1	sample 2	sample 3
성상		적합	적합	적합
Eleutheroside B와 E 함량		적합	적합	적합
베타글루칸 함량		적합	적합	적합
대장균군		적합	적합	적합
붕해도		적합	적합	적합

- ▶ 가속시험 3차 시험일 : 2011. 12. 14. → 적합
- ▶ 가속시험 4차 시험일 : 2012. 01. 16. → 적합
- ▶ 가속시험 5차 시험일 : 2012. 02. 14. → 적합
- ▶ 가속시험 6차 시험일 : 2012. 03. 14. → 적합
- ▶ 가속시험 7차 시험일 : 2012. 04. 18. → 적합

시험항목	제조번호	20111013		
		sample 1	sample 2	sample 3
성상		적합	적합	적합
Eleutheroside B와 E 함량		적합	적합	적합
베타글루칸 함량		적합	적합	적합
대장균군		적합	적합	적합
붕해도		적합	적합	적합

(나) 장기안정성시험 : 2011. 10 ~ 2013. 04(18개월간)

- ▶ 제조 년·월·일 : 2011. 10. 13.
- ▶ 보존조건 : 실온
- ▶ 장기 안정성시험 1차 시험일 : 2011. 10. 14.

시험항목	제조번호	20111013		
		sample 1	sample 2	sample 3
성상		적합	적합	적합
Eleutheroside B와 E 함량		적합	적합	적합
베타글루칸 함량		적합	적합	적합
대장균군		적합	적합	적합
붕해도		적합	적합	적합

- ▶ 장기안정성시험 2차 시험일 : 2012. 01. 16

시험항목	제조번호	20111013		
		sample 1	sample 2	sample 3
성상		적합	적합	적합
Eleutheroside B와 E 함량		적합	적합	적합
베타글루칸 함량		적합	적합	적합
대장균군		적합	적합	적합
붕해도		적합	적합	적합

- ▶ 장기안정성시험 3차 시험일 및 시험결과 : 2012. 04. 14 → 적합
- ▶ 장기안정성시험 4차 시험일 및 시험결과 : 2012. 07. 16 → 적합
- ▶ 장기안정성시험 5차 시험일 및 시험결과 : 2012. 10. 15 → 적합
- ▶ 장기안정성시험 6차 시험일 및 시험결과 : 2013. 01. 14 → 적합
- ▶ 장기안정성시험 7차 시험일 및 시험결과 : 2013. 04. 15 → 적합

시험항목	제조번호	20111013		
		sample 1	sample 2	sample 3
성상		적합	적합	적합
Eleutheroside B와 E 함량		적합	적합	적합
베타글루칸 함량		적합	적합	적합
대장균군		적합	적합	적합
붕해도		적합	적합	적합

(2) 오가피 발효물 액상제품 : ELEU-F(병100ml-액상)

(가) 가속시험 : 2012. 02 ~ 2012. 08(6개월간)

- ▶ 제조 년·월·일 : 2012. 02. 09.
- ▶ 보존조건 : 38℃, 75% RH 이상
- ▶ 가속시험 1차 시험일 : 2012. 02. 09.

시험항목	제조번호		
	20120209		
	sample 1	sample 2	sample 3
성상	적합	적합	적합
대장균군	0 / 적합	0 / 적합	0 / 적합
세 균	0 / 적합	0 / 적합	0 / 적합

- ▶ 가속시험 2차 시험일 : 2012. 03. 12.

시험항목	제조번호		
	20120209		
	sample 1	sample 2	sample 3
성상	적합	적합	적합
대장균군	0 / 적합	0 / 적합	0 / 적합
세 균	0 / 적합	0 / 적합	0 / 적합

- ▶ 가속시험 3차 시험일 : 2012. 04. 09. → 적합
- ▶ 가속시험 4차 시험일 : 2012. 05. 08. → 적합
- ▶ 가속시험 5차 시험일 : 2012. 06. 11. → 적합
- ▶ 가속시험 6차 시험일 : 2012. 07. 09. → 적합
- ▶ 가속시험 7차 시험일 : 2012. 08. 08. → 적합

시험항목	제조번호		
	20120209		
	sample 1	sample 2	sample 3
성상	적합	적합	적합
대장균군	0 / 적합	0 / 적합	0 / 적합
세 균	0 / 적합	0 / 적합	0 / 적합

(나) 장기안정성시험 : 2012. 02 ~ 2013. 08(18개월간)

- ▶ 제조 년·월·일 : 2012. 02. 09.
- ▶ 보존조건 : 실온
- ▶ 장기 안정성시험 1차 시험일 : 2012. 02. 09.

시험항목	제조번호		
	20120209		
	sample 1	sample 2	sample 3
성상	적합	적합	적합
대장균군	0 / 적합	0 / 적합	0 / 적합
세 균	0 / 적합	0 / 적합	0 / 적합

- ▶ 장기 안정성시험 2차 시험일 : 2012. 05. 09.

시험항목	제조번호		
	20120209		
	sample 1	sample 2	sample 3
성상	적합	적합	적합
대장균군	0 / 적합	0 / 적합	0 / 적합
세 균	0 / 적합	0 / 적합	0 / 적합

- ▶ 장기 안정성시험 3차 시험일 : 2012. 08. 08. → 적합
- ▶ 장기 안정성시험 4차 시험일 : 2012. 11. 08. → 적합
- ▶ 장기 안정성시험 5차 시험일 : 2013. 02. 06. → 적합
- ▶ 장기 안정성시험 6차 시험일 : 2013. 05. 08. → 적합
- ▶ 장기 안정성시험 7차 시험일 : 2013. 08. 07. → 적합

시험항목	제조번호		
	20120209		
	sample 1	sample 2	sample 3
성상	적합	적합	적합
대장균군	0 / 적합	0 / 적합	0 / 적합
세 균	0 / 적합	0 / 적합	0 / 적합

8. 인체적용시험

가. 인체적용시험 제품제작 및 품질관리

(1) 인체적용시험용 제품 레시피

(가) 시험군 레시피

상품명	오가피발효물 시험약		
성상 및 제형	갈색액상 / 치어백 파우치		
원료의약품의 분량	30포/1박스		
복용방법	1일 1회 / 1회 1포		
저장방법	실온보관		
사용기간	2013. 03. ~ 2013. 12.		

원 료 명	함량(g)	처방비율(%)	사용목적
오가피발효물[1.5brix]	66.6	66.6	기능성확인
프락토올리고당	14.00	14.00	맛
부원료 1	1.00	1.00	맛
부원료 2	0.30	0.30	맛
부원료 3	0.02	0.02	맛
정제수	18.08	18.08	-
합 계	100g	100	
특 징	<ul style="list-style-type: none"> ○ 제형 : 파우치(100g) ○ BRIX : 12.0±0.3 ○ 점도 : 1.4 		

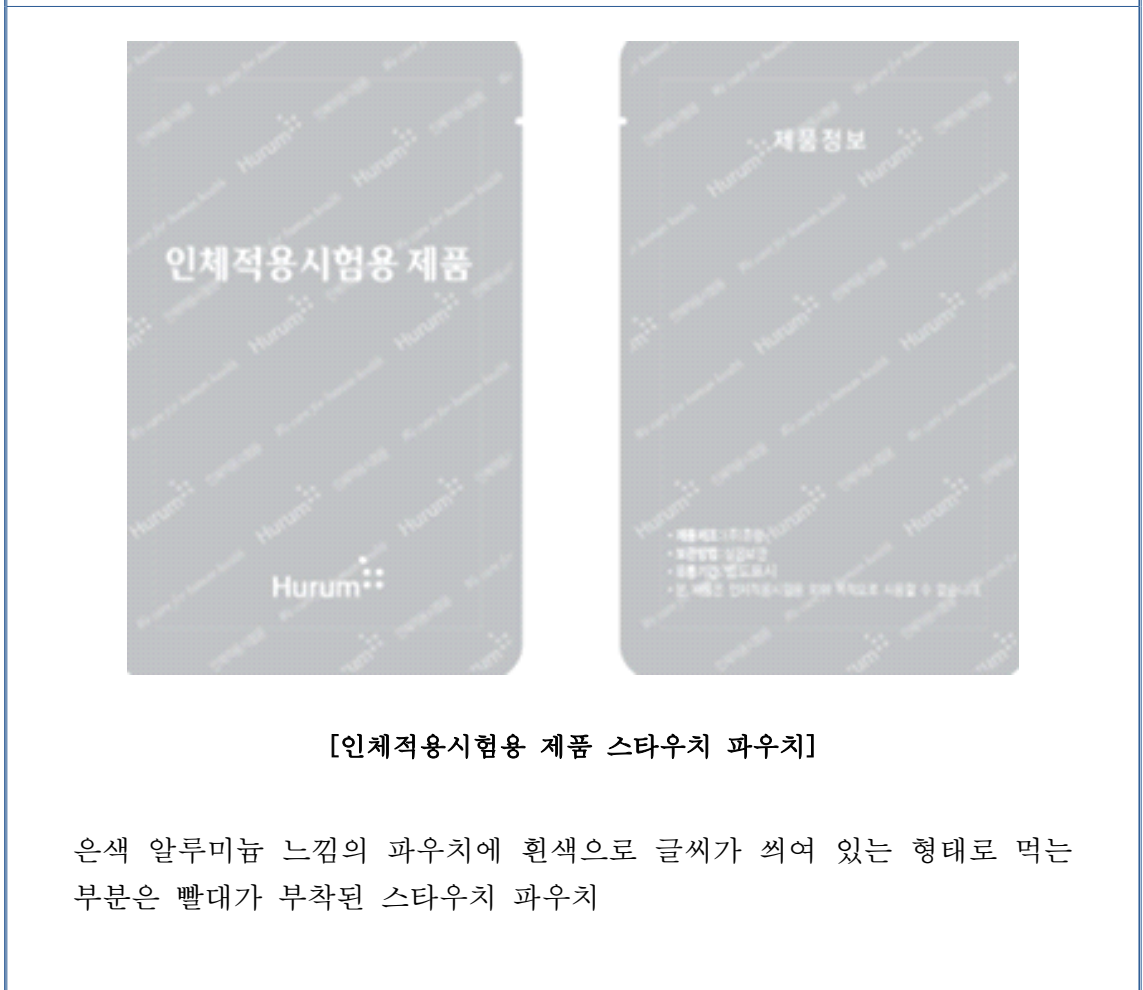
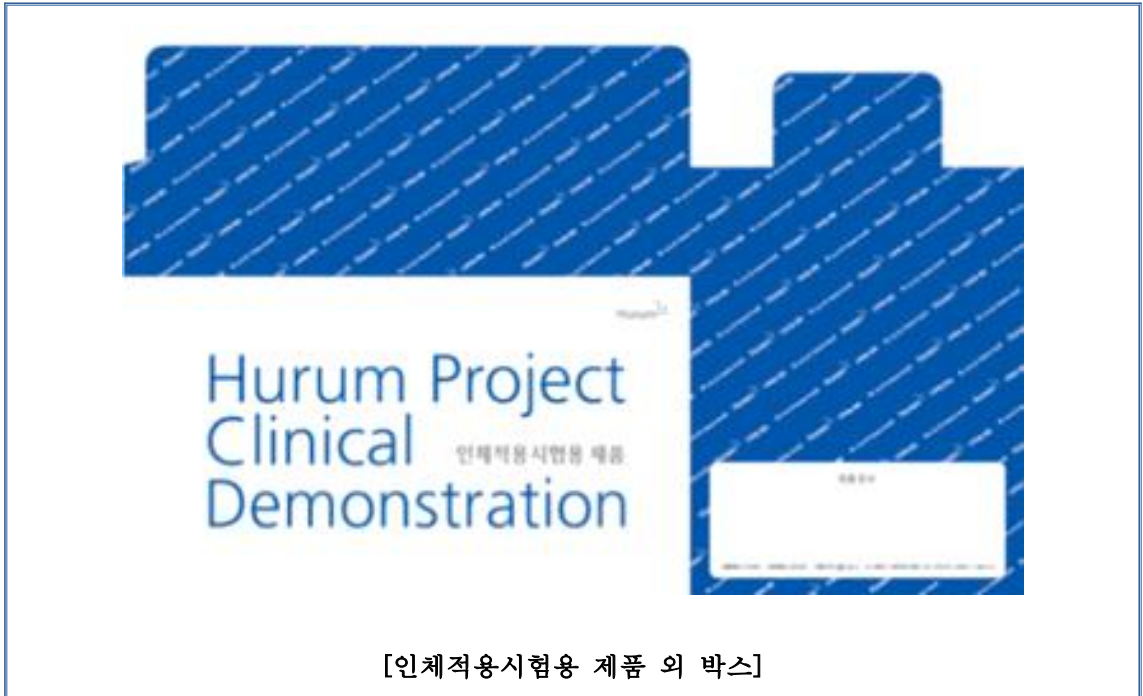
(나) 대조군(위약, 플라시보) 레시피

상품명	오가피발효물 대조군
성상 및 제형	시험군과 동일한 성상
원료의약품의 분량	30포/1박스
복용방법	1일 1회 / 1회 1포
저장방법	실온보관
사용기간	2013. 03. ~ 2013. 12.

원 료 명	함량(g)	처방비율(%)	사용목적
카라멜색소	0.7	0.7	대조군
프락토올리고당	14.00	14.00	맛
부원료 1	1.00	1.00	맛
부원료 2	0.30	0.30	맛
부원료 3	0.02	0.02	맛
정제수	83.97	83.97	-
오가피향	0.01	0.01	-
합 계	100g	100.00	
특 징	<ul style="list-style-type: none"> ○ 제형 : 파우치(100g) ○ BRIX : 11.9±0.3 ○ 점도 : 1.36 		

(2) 인체적용시험용 제품 제작

(가) 제품 디자인 : 의박스 및 용기



(나) 인체적용시험용 제품제작



[인체적용시험용 제품 외 박스 : 전면]



[인체적용시험용 제품 외 박스 : 윗면]



[인체적용시험용 제품 외 박스 : 옆면]



[인체적용시험용 제품 스타우치 파우치]



[인체적용시험용 제품 : 박스내 + 파우치]



[인체적용시험용 제품 외 박스와 파우치]

(3) 인체적용시험용 제품 품질관리

(가) 시험군 및 대조군의 가속시험

- ① 제조 년·월·일 : 2013. 01. 02.
- ② 보존조건 : 38℃, 75% RH 이상
- ③ 가속시험 1차 시험일 및 시험결과 : 2013. 01.02.~01.04

제조번호	T-110128			F-110128		
	sample 1	sample 2	sample 3	sample 1	sample 2	sample 3
시험항목						
성 상	적합	적합	적합	적합	적합	적합
세 균	적합	적합	적합	적합	적합	적합
Eleutheroside - B	적합	적합	적합	-	-	-
Eleutheroside - E	적합	적합	적합	-	-	-
베타글루칸 함량	적합	적합	적합	-	-	-
대장균군	적합	적합	적합	적합	적합	적합

- ④ 가속시험 2차 시험일 및 시험결과 : 2013. 02.04.~02.06.

제조번호	T-110128			F-110128		
	sample 1	sample 2	sample 3	sample 1	sample 2	sample 3
시험항목						
성 상	적합	적합	적합	적합	적합	적합
세 균	적합	적합	적합	적합	적합	적합
대장균군	적합	적합	적합	적합	적합	적합

- ⑤ 가속시험 3차 시험일 및 시험결과 : 2013. 03.04.~03.06.

제조번호	T-110128			F-110128		
	sample 1	sample 2	sample 3	sample 1	sample 2	sample 3
시험항목						
성 상	적합	적합	적합	적합	적합	적합
세 균	적합	적합	적합	적합	적합	적합
대장균군	적합	적합	적합	적합	적합	적합

(나) 시험군 및 대조군의 장기안전성시험

① 제조년·월·일 : 2013. 01. 02.

② 보존조건 : 실온

③ 장기안전성시험 1차 시험일 및 시험결과 : 2013. 01.02.~01.04

시험항목	T-110128			F-110128		
	sample 1	sample 2	sample 3	sample 1	sample 2	sample 3
성상	적합	적합	적합	적합	적합	적합
세균	적합	적합	적합	적합	적합	적합
Eleutheroside - B	적합	적합	적합	-	-	-
Eleutheroside - E	적합	적합	적합	-	-	-
베타글루칸 함량	적합	적합	적합	-	-	-
대장균군	적합	적합	적합	적합	적합	적합

④ 장기안정성시험 2차 시험일 및 시험결과 : 2013. 03.04.~03.06.

시험항목	T-110128			F-110128		
	sample 1	sample 2	sample 3	sample 1	sample 2	sample 3
성상	적합	적합	적합	적합	적합	적합
세균	적합	적합	적합	적합	적합	적합
대장균군	적합	적합	적합	적합	적합	적합

⑤ 장기안정성시험 3차 시험일 및 시험결과 : 2013. 05.06.~05.08.

시험항목	T-110128			F-110128		
	sample 1	sample 2	sample 3	sample 1	sample 2	sample 3
성상	적합	적합	적합	적합	적합	적합
세균	적합	적합	적합	적합	적합	적합
대장균군	적합	적합	적합	적합	적합	적합

나. 인체적용시험결과 작성

(1) 충북소재 S 병원과 M 社(CRO)에서 작성한 인체적용시험결과보고서 내에서 실험내용 등 중요사항을 기술한 부분을 중심으로 요약정리.

(2) *Clinical Study Report*

(가) 계획서 번호 : HURUM-OGAPI-01

(나) 인체적용시험 : 충북소재 S 병원

(다) 인체시험제목 : A single-center, randomized, placebo-controlled, double-blind clinical trial to evaluate the efficacy and safety after 8-week of fermented *Acanthopanax Senticosus* in patients with abnormal ALT levels.

(라) 시험제품명

시험제품 : 오가피 발효물	○ 주성분명 : 오가피-발효물 ○ 복용량 : 1일 1회, 1회 파우치
대조제품 : Placebo	○ 주성분명 : 오가피향, 색소 ○ 복용량 : 1일 1회, 1회 파우치

(마) 인체시험 디자인 : 이중맹검, 위약대조, 무작위배정

(바) 준수사항 : 본 인체시험은 인체시험 기본문서 관리를 포함하여 인체시험 전 과정에 걸쳐 인체시험 관리기준을 준수하여 수행되었음.

(사) 보고서작성일 : 2013년 08월 26일

다. 인체적용시험의 결과 및 고찰

(1) 유효성평가 결과

(가) 1차 유효성 평가 항목인 ALT의 평균 변화량: 기저 시점 대비 4주와 8주 시점에서 두 구간 통계적으로 유의한 차이는 나타나지 않았으나, 기저 시점 대비 4주와 8주 시점에서 모두 시험군이 대조군에 비해 ALT의 평균 변화량이 더 많이 감소하였으며, 4주 시점에서 시험군 내에서 투여 전과 후가 통계적으로 유의한 차이를 보였음(p-value=0.0151).

(나) 또한 시험군에서 일부 기저 시점의 ALT 수치가 170(U/L) 이상으로 높았던 대상자의 경우, 기저 시점의 ALT가 174(U/L)이었던 대상자의 수치가 4주 시점에서 114(U/L), 8주 시점에서 92(U/L)로 ALT 수치가 정상 범위까지 감소하였으며, 기저 시점의 ALT가 276(U/L)이었던 대상자의 경우 4주 시점에서 50(U/L), 8주 시점에서 45(U/L)로 정상 범위까지 감소함을 보였음.

(다) AST, Gamma GPT, Alkaline phosphatase의 평균 변화량: 군내 변화량(투여 전·후) 및 두 구간 통계적으로 유의한 차이는 나타나지 않았음.

(라) 혈당(FBS)의 평균 변화량: 군내 변화량(투여 전·후) 및 두 군간 통계적으로 유의한 차이는 나타나지 않았음.

(마) 혈중 지질(Total cholesterol, Triglyceride, HDL-cholesterol, LDL-cholesterol)의 변화량: 기저 시점 대비 8주 시점에서 Total cholesterol과 LDL-cholesterol의 항목의 경우 두 군간 통계적으로 유의한 차이가 나타났음.

(2) 안전성평가 결과

(가) 이상반응으로 인한 중도탈락한 대상자는 시험군에서 1명 존재하였으나, 본 인체 적용시험의 시험제품과 관련성은 없었으며, 이학적 검사, 혈액학적 검사 및 혈액 화학적 검사에서도 임상적으로 유의한 비정상 대상자도 존재하지 않았음. 소변 검사의 Glucose 항목에서 ‘비정상’인 대상자가 시험군에서 1명 존재하였으나, 해당 대상자의 경우 현재 당뇨 질환이 있으며, 시험제품과 관련성이 없는 이상 반응으로 인해 중도 탈락한 대상자로 확인되었음.

(나) 1차 유효성 평가 항목인 ALT의 평균 변화량: 기저 시점 대비 4주와 8주 시점에서 모두 시험군이 대조군에 비해 ALT의 평균 변화량이 더 많이 감소하였으나, 시험군 내에서만 투여 전과 후가 통계적으로 유의한 차이를 보였으며 (p-value=0.0151), 두 군간 통계적으로 유의한 차이는 나타나지 않았음.

9. 시작품제작 및 품질검사

가. 시작품제작

(1) 디자인개발

(가) 디자인개발방향 :

- ① 제형 연구 및 설정 : 오가피 발효물소재를 이용하여 음료, 캡슐 등 다양한 제형 연구를 수행하였음.
- ② 1차 산업화 방향설정 : 병을 이용한 음료로제품화를 추진하고, 농축액의 정형태로 제품화를 추진하고자 함.
- ③ 2차 산업화 방향 추진예정 ; 파우치형태의 제품화 및 캡슐형태의 제품화 추진

(나) 개발 디자인

① 발효가시오가피 마일드

	
디자인 시안 A	디자인 시안 B
	
디자인 시안 C	디자인 시안 D
	
최종 라벨 디자인	최종 박스 디자인

② 발효가시오가피 정

<p>라벨 디자인 1차 시안 A</p>	<p>박스 디자인 1차 시안 A</p>
<p>라벨 디자인 1차 시안 B</p>	<p>박스 디자인 1차 시안 B</p>
<p>라벨 디자인 2차 시안</p>	<p>박스 디자인 2차 시안</p>
<p>최종 라벨 디자인</p>	<p>최종 박스 디자인</p>

(2) 시작용제작(1) : 레시피개발 및 품목보고서

(가) 레시피개발 방향 및 레시피

① 발효가시오가피 마일드

원료명	함량(%)
가시오가피발효추출물(45birx)	2.66
액상과당	x.xx
프락토올리고당	x.xx
식물복합추출물	x.xx
r-싸이클로덱스트린	x.xx
스테비오사이드	x.xx
정제수	x.xx

② 발효가시오가피 정

원료명	함량(%)
발효가시오가피혼합추출물(고형분65%)	100

* 발효가시오가피혼합추출물 : 발효가시오가피 50%, 대추, 황기, 오미자

(나) 품목보고서

① 발효가시오가피 마일드

식품(식품첨가물) 품목제조보고서

보고인	성명 : 박순옥	성년월일 : 1958.10.13
	주소 : 충북 청원군 오창읍 연구단지로 40	전화번호 : 216-1075
		유대선화
영업소	명칭(상호) : 주식회사 흥원	
	소재지 : 충북 청원군 오창읍 연구단지로 40	

식품의 유형	명칭	영업신고 번호	첨가물 제 267호
제품명	발효가시오가피 파일드		
유통기한	제조일부리	24개월 (월, 년)	
품질유지기한	제조일부리	일(월, 년)	
제품정보	원재료명 또는 성분명 및 배합비율	별첨	
	용도 용법	별첨	
보관방법 및 포장재질	별첨		
포장방법 및 포장단위	별첨		
성상	별첨		
고열량·저열량 식품 해당 여부	<input type="checkbox"/> 예 <input type="checkbox"/> 아니오 <input checked="" type="checkbox"/> 해당 없음		

기타

※식품위생법, 제37조제5항 및 같은 법 시행규칙 제45조제1항에 따라 식품(식품첨가물) 품목제조 사항을 보고합니다.

원본대조필

2013년 09월 01일

확인자 서순옥(인)

청원군

2013년 09월 01일

박순옥

청원군수 귀하

첨부서류	1. 제조방법설명서 1부 2. 식품위생법시행규칙의 알균한 식품등의 표시의 기준 및 규제 전도서 1부 3. 식품의약품안전청장이 정하여 고시한 방법에 따라 설정한 유통기한의 설정사유서 1부
------	---

유의사항

1. 품목제조보고서는 제품원신의 개시 전이나 개시 후 7일 이내에 제출하여야 합니다.
 2. 배합비를 표시는 식품공전 및 식품첨가물공전에 사용기준이 설정되어 있는 원재료 또는 성분의 경우만 해당합니다.

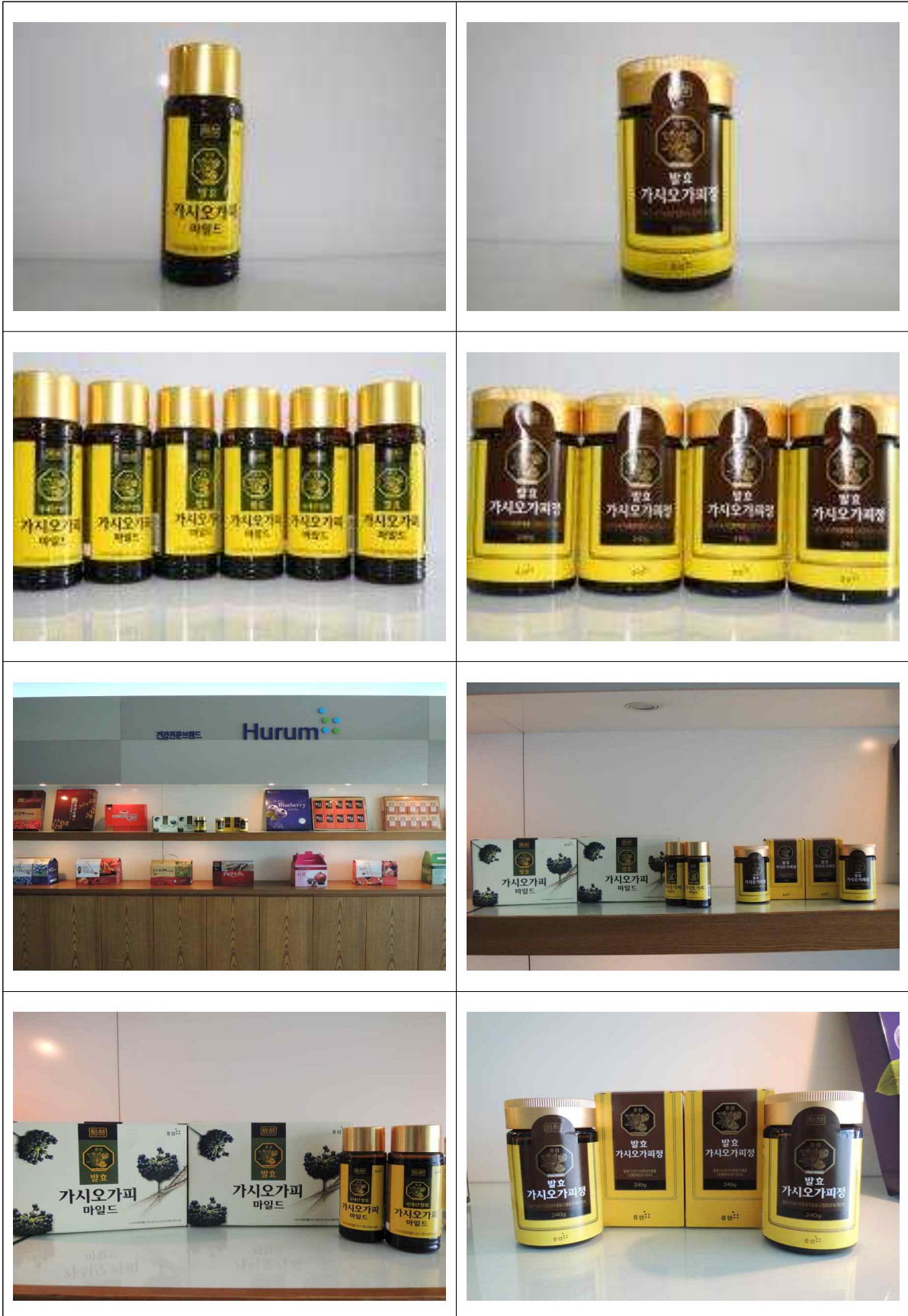
② 발효가시오가피 정

..

식품(식품첨가물) 품목제조보고서


보고인	성명 : 백순옥	생년월일 : 1958.10.13		
	주소 : 충북 청원군 오창읍 연구단지로 40	전화번호 : 216-1075		
	휴대전화			
영업소	명칭(상호) : 주식회사 흥원			
	소재지 : 충북 청원군 오창읍 연구단지로 40			
제품정보	식품의 유형	약상차	영업신고 번호	청원 제 267호
	제품명	발효가시오가피정		
	유통기한	제조일부터	24개월 (월, 년)	
	품질유지기한	제조일부터	일(월, 년)	
	원재료명 또는 성분명 및 배합비율	별첨		
	공도 용법	별첨		
	보관방법 및 포장재질	별첨		
	포장방법 및 포장단위	별첨		
	성상	별첨		
	고열량·저열량 식품 해당 여부	<input type="checkbox"/> 예 <input type="checkbox"/> 아니오 <input checked="" type="checkbox"/> 해당 없음		
기타				
<p>「식품위생법」 제37조제5항 및 같은 법 시행규칙 제45조제1항에 따라 식품(식품첨가물) 품목제조 사항을 보고합니다.</p> <div style="display: flex; justify-content: space-between; align-items: center;"> <div style="border: 2px solid purple; padding: 5px; text-align: center;"> <p style="font-size: 1.2em; color: purple;">원본대조필</p> <p style="color: purple;">2017년 9월 7일</p> <p style="color: purple;">확인자 서민경 (인)</p> <p style="color: purple;">청원군</p> </div> <div style="text-align: right;"> <p>2017년 09월 07일</p> <p>백순옥 (서민경인)</p> </div> </div> <p>청원군수 귀하</p>				
첨부서류	1. 제조방법설명서 1부 2. 식품위생검사가관에 달당한 식품등의 표시적 기준 및 규격 지도서 1부 3. 식품의약품안전청장이 정하여 고시한 방법에 따라 달당한 유통기한에 실험사유서 1부			
유의사항				
1. 품목제조보고서는 제품생산의 개시 전이나 개시 후 7일 이내에 제출하여야 합니다. 2. 배합비율 표시는 식품위생 및 식품첨가물공전에 사용기준이 담겨져 있는 용재로 또는 성분명 경우만 해당합니다.				

(3) 시작품제작(2)



나. 품질관리

(1) 공인인증기관 영양성분 분석



생명과학연구센터

시 험 성 적 서

발급번호 : 생참1306- 97		2013년 6월 10일	
접수번호	12-1305-448	접수일자	2013년 5월 27일
시 료 명	발효가시오가피마일드	검사구분	참 고 용
의 퇴 자 (제조업소 등 기관명)	(주)휴림		
소 재 지 (연 락 처)	서울시 강남구 역삼동 607-12 한진빌딩 4층 070-8896-4664		
시 험 결 과			
검 사 항 목	결 과	%영양소기준치	
열 량	39.57 kcal/100g		
탄수화물	9.48 g/100g	2.9%	
단 백 질	0.39 g/100g	0.7%	
지 방	0.01 g/100g	0.0%	
나 트 른	11.87 mg/100g	0.6%	
포화지방	0.00 g/100g	0.0%	
트랜스지방	0.00 g/100g	-	
당	6.49 g/100g	-	
콜레스테롤	0.00 mg/100g	0.0%	
2013년 6월 10일 중부대학교 산학협력단장 (인)			
<input type="checkbox"/> 이 성적은 제시된 검체에 한하며, 시험의뢰 목적 외의 광고, 선전 등에 이용 할 수 없음			

(2) 자체품질관리 : 가속시험 및 장기안정성시험

(가) 시험군 및 대조군의 가속시험



■ 기기명 : 항온항습기(JSRH-500CP)
 ■ 가속시험 안정성 시험조건 : 38℃, 75% RH 이상
 ■ 시험기간 : 2013. 05. 24. ~

- ① 제조 년·월·일 : 2013. 05. 24.
- ② 보존조건 : 38℃, 75% RH 이상
- ③ 가속시험 1차 시험일 및 시험결과 : 2013. 05.24.~05.27

시험항목	제품명			발효가시오가피 정		
	sample 1	sample 2	sample 3	sample 1	sample 2	sample 3
성 상	적합	적합	적합	적합	적합	적합
세 균	적합	적합	적합	적합	적합	적합
Eleutheroside - B	적합	적합	적합	-	-	-
Eleutheroside - E	적합	적합	적합	-	-	-
대장균군	적합	적합	적합	적합	적합	적합

④ 가속시험 2차 시험일 및 시험결과 : 2013. 06.24.~06.27.

시험항목	제품명	발효가시오가피 마일드			발효가시오가피 정		
		sample 1	sample 2	sample 3	sample 1	sample 2	sample 3
성 상		적합	적합	적합	적합	적합	적합
세 균		적합	적합	적합	적합	적합	적합
대장균군		적합	적합	적합	적합	적합	적합

⑤ 가속시험 3차 시험일 및 시험결과 : 2013. 07.24.~07.26.

시험항목	제품명	발효가시오가피 마일드			발효가시오가피 정		
		sample 1	sample 2	sample 3	sample 1	sample 2	sample 3
성 상		적합	적합	적합	적합	적합	적합
세 균		적합	적합	적합	적합	적합	적합
대장균군		적합	적합	적합	적합	적합	적합

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

제 1 절 연구개발목표의 달성도

1. 연도별연구목표에 따른 달성도

구분	연구개발의 목표	수행내용 및 달성도
1차년도	오가피-발효물소재 확보	<input type="checkbox"/> 수행내용 : 약용버섯을 이용한 오가피 발효물 소재 개발 ▶ 특허 및 논문 <input type="checkbox"/> 달성도 : 100%
	오가피-발효물소재의 표준화확립	<input type="checkbox"/> 수행내용 : 최적배지확립과 지표성분설정 및 분석 ▶ 논문 <input type="checkbox"/> 달성도 : 100%
	오가피-발효물소재의 간기능개선효과 확인 1 (in vitro test)	<input type="checkbox"/> 수행내용 : 개발소재의 양성대조군과 비교평가하여 간 기능 개선효과 확인 ▶ 논문 <input type="checkbox"/> 달성도 : 100%
	오가피-발효물소재의 간기능개선효과 확인 2 (in vivo test I)	<input type="checkbox"/> 수행내용 : 개발소재의 양성대조군과 비교평가하여 간 기능 개선효과 확인(급성 및 만성 모델) ▶ 논문 <input type="checkbox"/> 달성도 : 100%
2차년도	오가피-발효물소재의 대량생산조건확립	<input type="checkbox"/> 수행내용 : 개발소재의 산업화적용 대량생산 및 품질확인 ▶ 산업화적용 <input type="checkbox"/> 달성도 : 100%
	오가피-발효물소재의 안정성확립	<input type="checkbox"/> 수행내용 : 1차시작품제작을 통한 소재의 안정성확보 ▶ 산업화적용 <input type="checkbox"/> 달성도 : 100%
	오가피-발효물소재의 간 기능 개선효과 확인3 (in vivo test II)	<input type="checkbox"/> 수행내용 : 개발소재의 양성대조군과 비교평가하여 간 기능 개선 효과(지방간모델) 확인 ▶ 논문 <input type="checkbox"/> 달성도 : 100%
	오가피-발효물소재의 안전성확립	<input type="checkbox"/> 수행내용 : 개발소재의 단회 및 반복투여 독성시험을 통한 안전성확보 ▶ 논문, 산업화 <input type="checkbox"/> 달성도 : 100%
3차년도	간 기능 개선관련 인체실험	<input type="checkbox"/> 수행내용 : 개발소재의 인체적용시험실시를 통한 효능확인 ▶ 논문(작성중), 산업화 <input type="checkbox"/> 달성도 : 100%
	개별인정 신청 자료준비 및 개별인정신청	<input type="checkbox"/> 수행내용 : 자료준비 및 신청 ▶ 개별인정신청 <input type="checkbox"/> 달성도 : 100%
	오가피-발효물을 이용한 제품개발 및 산업화	<input type="checkbox"/> 수행내용 : 2종 제품 시작품제작 ▶ 산업화 <input type="checkbox"/> 달성도 : 100%

2. 정성적 및 정량적 목표에 따른 달성도

가. 특허

구분	발명의 명칭	등록/출원일
특허출원	오가피-버섯 발효물의 추출물을 유효성분으로 함유하는 간기능 개선을 위한 조성물	2011.04.28
특허출원	간기능을 위한 오가피추출물을 천연배지로 하여 획득한 오가피-버섯 발효물과, 이의 제조방법	2011.04.28
특허출원	오가피-버섯 발효물을 이용한 간기능 개선용 조성물	2013.08.30
특허등록	오가피-버섯 발효물의 추출물을 유효성분으로 함유하는 간기능 개선을 위한 조성물	2013.10.31

나. 논문

가. 출판 및 게재 예정(수정 후게재)

- Single- and repeated-dose toxicities of *Acanthopanax senticosus* fermentation products in rats(Korean Journal of Food Science and Technology)
- The Hepatoprotective Effect of *Acanthopanax Senticosus* Fermentation Products in Fatty Liver Model(한국식품영양과학회지)
- Development of Functional Food Materials of *Acanthopanax senticosus*-Fermented Mushroom Mycelium (한국식품영양과학회지)
- Anti-diabetic effects of fermented *Acanthopanax senticosus* extracts on rats with streptozotocin-induced type 1 diabetic mellitus (Journal of Medicinal Plants Research)
- Antioxidant and Nitrite Scavenging Activities of *Acanthopanax senticosus* Extract Fermented with Different Mushroom Mycelia(Korean Journal of Food Science and Technology)

나. 기타(학술발표, 심사중인 논문 외)

- The hepatoprotective effect of *Acanthopanax senticosus* fermentation products in carbon tetrachloride induced acute and chronic hepatitis model: 투고 심사중
- The Effect of *Acanthopanax Senticosus* fermentation products on Liver Function in Carbon Tetrachloride and D-galactosamine Induced Hepatitis Model(한국실험동물학회)
- Single- and repeated-dose toxicities of *Acanthopanax Senticosus* fermentation products in rats(한국실험동물학회)
- The Effect of Fermented *Acanthopanax Senticosus* on Liver Function in Carbon Tetrachloride and D-galactosamine Induced Hepatitis Model(Chungbuk National Univ.)
- The Development of functional materials from *Acanthopanax Senticosus-fermentation products and study on Hepatic Functional improvement in Vitro*(Chungnam National Univ.)

다. 상품화 : 2건 ▶ 제품 2건 제작(세부내용 본문)

제 2 절 관련분야 기술발전 기여도

1. 생명공학기술분야 중의 하나인 미생물 발효기술을 통한 기능성 신소재 개발 및 농산물가공을 통한 고부가가치화 소재 개발하는 기술 분야에 기여

가. 버섯균류를 이용한 오가피-발효기술은 천연물(농림산물)인 오가피를 원료로 하여 고부가가치를 갖는 소재를 개발하는 기술로 1차(농림산업) 및 2차(기능성식품, 제조업) 산업의 활성화에 기여하는 기술로, 미생물을 이용한 기능성소재개발 분야 및 농산물 가공을 통한 고부가가치소재를 개발하는 기술 분야에 기여하였음.

나. 신규개발소재인 오가피-발효물에 대하여 체계적인 연구개발을 수행한 점은 관련 기술개발 분야에 기여하였음(소재화 완료후 다양한 분야에 대한 연구개발 수행).

2. 참여연구원의 건강기능식품소재 개발방법 및 평가방법 습득을 통한 다양한 파급효과 기대

가. 본 연구 과제를 통하여 신소재 및 신제품을 개발하는 과정에 대한 체계적이면서 과학적 접근방법의 기술축적은 향후 새로운 소재 및 제품을 개발하는데 활용이 가능한 기술을 습득한 점은 관련분야의 인력양성에 기여하였다고 판단됨.

나. 또한 개발소재에 대한 간 기능개선 관련 기능성평가 및 안전성평가관련 기술축적은 추후에 다른 제품을 개발하고 평가하는데 도움이 될 수 있는 기술로 관련분야의 기술인력을 양성하는데 기여하였음.

제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

제 1 절 실용화계획

1. ㈜ 휴림의 유통 및 마케팅



가. 현재 휴림의 유통 및 판매

- (1) 할인마트 유통 및 판매 : 이마트 120여 점 등 할인마트를 통한 유통
- (2) 휴림건강전문대리점을 통한 유통 및 판매 : 60여점의 휴림 전문대리점을 통한 유통
- (3) 기타 : 벤더, 취급점, 온라인 등

나. 신규유통발굴

- (1) 세븐일레븐 등 편의점의 신규유통 및 판매망 확충
- (2) 국내외 박람회 참가 등을 통한 국외 바이어 확보를 통한 해외 수출

2. 오가피 발효물소재를 이용한 제품의 산업화

가. 연구개발을 통한 오가피-발효물소재의 주력 상품군으로 개발

- (1) 전략적인 계획을 수립하여 오가피-발효물소재의 다양한 연구를 단계적으로 추진하고 있어, 관련 특허 및 다수의 논문을 투고하는 등 소기의 성과를 얻고 있음.
- (2) 현재 간기능 개선 분야를 포함하여 위 기능 개선 등 소화기질환 분야에 대한 다양한 인체적용시험을 추진하고 있음(간 기능개선분야 1차적으로 완료),
- (3) 궁극적으로는 오가피-발효물 소재는 차별성을 가지고 있어, 휴림의 주력 상품군으로 개발하고자 함.

나. 유통 및 산업화 추진

- (1) 단계적인 제품화 : 오가피-발효물소재가 건강기능식품소재로 개별인정을 받기 전에는 건강식품으로 판매할 예정이며, 개별인정 후 건강기능식품 소재로 판매하고자 함.

(2) 1차 상품화 :

(가) 휴림이 보유하고 있는 휴림건강전문대리점과 이마트 등 할인마트를 이용하여 2014년도 상반기에 상품화를 추진할 예정으로 단기간인 첫제품 출시 후 3년 동안에는 3~5억 내외의 매출을 올릴 것으로 예상하고 있음.

(나) 우선 제작한 시작품을 휴림 건강전문대리점에서 전시하면서 홍보를 진행 중에 있음.



(3) 2차 상품화 : 오가피-발효물의 개별인정 및 다양한 연구가 완료되어 건강기능식품소재로 상품화를 추진하고자 함.

(4) 건강기능식품 시장에서의 간 건강관련제품 조사 및 주요소재 특징 분석

(가) 간 건강 관련 건강기능식품소재 조사 : 현재 간 건강기능식품에 사용된 기능성소재는 헛개나무 과병 추출분말, 표고버섯 균사체 추출물, 밀크씨슬 추출물 등이 있음.

(나) 주요소재의 주요특징

소재명	헛개나무 과병 추출분말	표고버섯 균사체 추출물	밀크씨슬 추출물 (밀크씨슬=영정귀)
기능성	<ul style="list-style-type: none"> 알콜성손상으로부터 간을 보호하는데 도움을 줄 수 있음 기타기능 II 	<ul style="list-style-type: none"> 간 건강에 도움을 줄 수 있습니다. 기타기능 II 	<ul style="list-style-type: none"> 간 건강에 도움을 줄 수 있음 기타기능 II
주성분	○ 퀘르세틴 17.2 ug	○ 베타 글루칸: 3.5~10%	○ 실리마린(Silymarin)
권장하루 섭취량	○ 2,460mg	○ 1.8g	○ 130mg
부작용	○ 없음	○ 거의 없음	<ul style="list-style-type: none"> 알레르기 반응, 위장 질환 (설사, 위통, 복부팽만등)

(5) 간 건강식품 관련 소재 및 제품분석을 통한 오가피-발효물소재의 산업화 가능성 제시

(가) 기능성 및 표기정도

기존 시장의 소재 및 제품	○ 기타기능 II, 간 건강에 도움을 줄 수 있습니다. ○ 기타기능 II 등급, 알콜성 손상으로부터 간을 보호하는데 도움을 줄 수 있음
오가피-발효물 소재 및 제품	○ 기타기능 II~III 으로 신청 할 예정임.

(나) 소재의 효능적인 특성 및 제품화방향 분석을 통한 차별성 제시

① 기존 시장의 소재 및 제품

- ㉔ 기존 시장의 대부분 제품은 간 건강 외에도 기타 기능성 소재를 첨가하여 다양한 기능성을 갖는 제품으로 산업화(비타민, 나이아신 등) 하는 특징을 가지고 있음.
- ㉕ 이는 밀크씨슬 등은 간 건강 외에 다른 효능을 가지고 있지 않거나 마케팅적으로 특징적인 홍보자료를 확보하고 있지 않음으로서 서로 다른제품과 차별성을 부각시키기 위하여 다른 기능성 성분을 첨가하는 방식임.

② 오가피-발효물소재 및 제품

- ㉔ 오가피-발효물 추출물 소재 : 오가피 발효물의 경우, 간 기능개선 외에도, 위 기능 개선효능에 대한 효능, 숙취해소 효능 에 대한 다양한 기능성을 가지고 있어, 기존의 간 기능 개선 효능을 갖는 원료보다 경쟁력을 가지고 있음.
- ㉕ 휴림의 오가피 발효물 소재에 대한 연구
 - 본 사업 : 간 기능 개선효능에 대한 연구
 - 본 사업 외 : 위 기능 개선에 대한 효능(IN VITRO, IN VIVO)을 확인하여 특허 등록을 하였음. 현재 장 기능 개선에 대한 효능을 검토진행 중.
 - 이와 같이 오가피-발효물소재의 경우, 기존의 간 기능 개선 소재보다 우수한 효능을 가지고 있다고 판단되며, 기존 기능성소재와 차별성을 가지고 있어 산업적인 경쟁력을 가질 것으로 판단됨

(나) 시장진입가능성 분석

① 기존 시장의 소재 및 제품

- ㉔ 가격분석 : 현재 간 건강과 건강기능식품시장의 대부분은 밀크씨슬 추출물이 점유하고 있으며, 제품의 가격은 3만원대 ~ 8만원대에 형성되어 있음
- ㉕ 중소기업의 시장진입가능성 분석 : 현재 소재(밀크씨슬 등)를 이용한 제품으로 중소기업이 시장에 진입하기에는 어렵다고 판단됨. 그 이유는 현재의 소재는 밀크씨슬과 헛개나무 과병추출물분말이라는 이라는 공통적인 소재로 대부분의 시장을 종근당, 유한양행, 보령제약, 중외제약, 일양약품, GNC, 한미양행 등 제약회사가 점

유하고 있는 시장에서 중소기업이 시장에 진입하기는 어렵다고 분석되며, 또한 시장에 진입하였다더라도 정착이 어려울 것으로 판단됨.

② 오가피-발효물소재 및 제품

㉠ 오가피-발효물 추출물 소재 :

- 오가피 발효물소재의 경우 천연물인 오가피의 가격보다 분명 상승요인이 있으나, 주 원료를 오가피 줄기(목질부)부분으로 하고 있어 다른 소재의 열매라든가 초본류를 사용한 것보다는 훨씬 큰 가격 경쟁력을 가지고 있을 것으로 판단됨.
- 대부분의 소비자의 제품선택 시 가격측면도 가장 중요한 요인이지만, 그 외에도 원료원산지, 제조회사, 기능성확장 등도 중요한 요인으로 작용하고 있음.
- 2010년부터 쿠파스제품으로 인한 헛개나무과병추출분말의 경우 국내생산량이 부족하여 많은 양을 외국(특히 중국)으로부터 수입해오고 있으며, 국내에서 생산되는 원료소재의 량이 제한적이며, 밀크씨슬추출물의 경우 대부분 외국산과 가격경쟁력의 차이로 대부분 수입에 의존하고 있음.
- 그러나 본 기술개발사업에 사용한 천연물원료인 오가피의 경우 전국적으로 과잉재배 되어졌으나, 현재 식품소재로서 활용성이 낮은 실정으로 국산원료소재의 공급적인 측면에서 우수하다고 판단됨.

㉡ 시장진입 가능성

- 휴림의 경우, 10여명의 마케팅인원을 보유하고 있음 : 마케팅, 마트, 대리점 등의 홍보, 관리 등
- (주)휴림은 이마트 등의 할인마트와 휴림건강전문대리점, 취급점 등의 유통망을 자체보유하고 있어 시장진입이 용이함.
- 특히 이마트 120여점 중 30여명의 판매사원과 10여개의 Shop-in-Shop을 보유하고 있는 점과 건강전문대리점은 소비자와 직접 상대하여 판매하는 방법으로 개발제품에 대한 홍보 및 판매할 수 있는 장점을 가지고 있음.
- 무엇보다도 마케팅 끼리를 가지고 있는 점이다, 오가피-발효물에 대한 특허를 보유하고 있는 점, 그리고 본 사업 종료 후에 얻게 될 개별인정까지 다양한 끼리를 가지고 있는 점, 이것이 현재시장의 제품 및 소재와 차별화가 가능한 점 등
- 무엇보다도 간 건강관련 시장의 소비자 관심으로 인한 성장가능성

제 2 절 특허 및 논문

1. 특허

구분	발명의 명칭	출원/등록번호	출원일/등록일	발명자	출원인
특허 출원	오가피-버섯 발효물의 추출물을 유효 성분으로 함유하는 간기능 개선을 위한 조성물(Acanthopanax-Mushroom fermented extract as an active ingredient formulation for improvements)	10-2011-0040317	2011.04.28	조주현 외	(주)휴림
특허 출원	간기능을 위한 오가피추출물을 천연배지로 하여 획득한 오가피-버섯 발효물과, 이의 제조방법(Manufacturing Method of Fermented Materials for liver function improvement using Acanthopanax sp.)	10-2011-0040316	2011.04.28	조주현 외	(주)휴림
특허 출원	오가피-버섯 발효물을 이용한 간기능 개선용 조성물{Composition for improving liver function}	10-2013-0104071	2013.08.30	조주현 외	(주)휴림
특허 등록	오가피-버섯 발효물의 추출물을 유효 성분으로 함유하는 간기능 개선을 위한 조성물(Acanthopanax-Mushroom fermented extract as an active ingredient formulation for improvements)	등록결정	2013.10.31	조주현 외	(주)휴림

2. 논문

가. 출판 및 게재 예정

- Single- and repeated-dose toxicities of *Acanthopanax senticosus* fermentation products in rats(Korean Journal of Food Science and Technology)
- The Hepatoprotective Effect of *Acanthopanax Senticosus* Fermentation Products in Fatty Liver Model(한국식품영양과학회지)
- Development of Functional Food Materials of *Acanthopanax senticosus*-Fermented Mushroom Mycelium (한국식품영양과학회지)
- Anti-diabetic effects of fermented *Acanthopanax senticosus* extracts on rats with streptozotocin-induced type 1 diabetic mellitus (Journal of Medicinal Plants Research)
- Antioxidant and Nitrite Scavenging Activities of *Acanthopanax senticosus* Extract Fermented with Different Mushroom Mycelia(Korean Journal of Food Science and Technology)

나. 기타(학술발표, 심사중인 논문 외)

- The hepatoprotective effect of *Acanthopanax senticosus* fermentation products in carbon tetrachloride induced acute and chronic hepatitis model: 투고 심사중
- The Effect of *Acanthopanax Senticosus* fermentation products on Liver Function in Carbon Tetrachloride and D-galactosamine Induced Hepatitis Model(한국실험동물학회)
- Single- and repeated-dose toxicities of *Acanthopanax Senticosus* fermentation products in rats(한국실험동물학회)
- The Effect of Fermented *Acanthopanax Senticosus* on Liver Function in Carbon Tetrachloride and D-galactosamine Induced Hepatitis Model(Chungbuk National Univ.)
- The Development of functional materials from *Acanthopanax Senticosus-fermentation products and study on Hepatic Functional improvement in Vitro*(Chungnam National Univ.)

제 3 절 개별인정형 신청

1. 간기능 개선에 관한 개발 소재의 개별인정형 신청

GUIDE

- 민원신청에 대한 접수사항에 대한 결과조회를 하실 수 있습니다.
- 접수진행중인 사항에 대해서는 담당자의 접수확인을 해야만 민원처리가 진행됩니다.
- 신청서기 보이지 않음일 경우 해당 프로그램을 직접 다운로드 설치하시기 바랍니다.
- 설치프로그램은 **이곳을 클릭**해서 다운로드 받으실 수 있습니다.
- 확인증을 출력하고자 하는 경우 처리구분의 "처리" 클릭하여 출력하시기 바랍니다.
- 처리완료 된 민원에 대해서 민원만족도 설문조사를 참여하여 주시면 감사드리겠습니다.

민원신청번호: 신청일자: 2013-09-13 ~ 2013-09-28
 민원접수번호: 접수일자:
 민원사무명:

신청방법: 전체 | 진행구분: 전체 | 처리구분: 전체

• 총 1건이 조회되었습니다.

신청일	신청번호	신청명		진행구분	처리구분	신청위치
접수일	접수번호	신청기간	제품명	상세내역		
수수료미납	20130315804	건강기능식품 기능성원료 인정 신청(새로운원료)		신청		
		석풍의약품안전처		신청서	수정	

오가피 발효물소재의 건강기능식품 기능성원료 인정 신청

제 4 절 추가연구 및 타 연구에 활용계획

1. 추가연구계획

가. 인체적용시험 추가진행 내용 및 방향

- (1) 비 알코올성 지방간 모델에 대한 인체적용시험 추가 진행 추진
- (2) 알코올성 지방간 모델에 대한 인체적용시험 진행 추진

나. 인체적용시험 추가진행 일정 및 방법

- (1) 일정 : 2014년도 초 ~
- (2) 방법 : 자체예산과 정부(또는 기관) 지원사업을 통한 인체적용시험비용 조달을 통한 추가연구진행

2. 타 연구에 활용계획



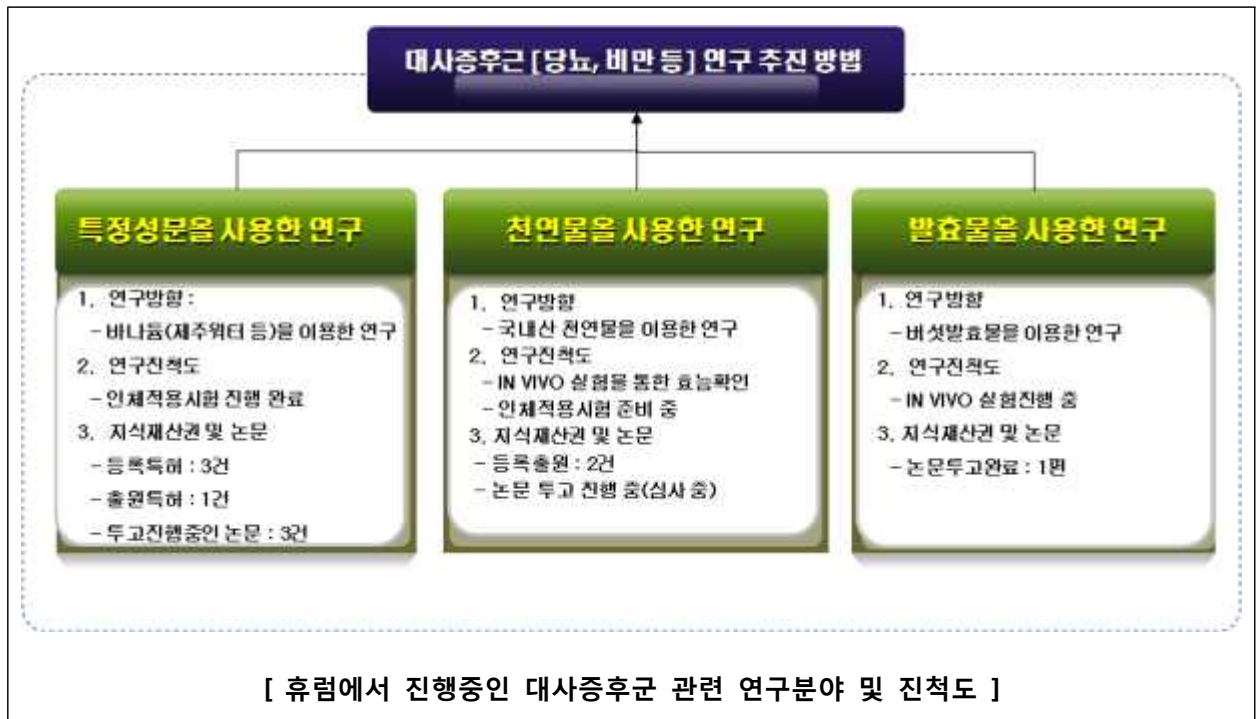
가. 소화기질환분야에 대한 연구 추진

- (1) 현재 휴림은 오가피 발효물 소재에 대하여 간기능개선회에도 위장질환 개선 등 소화기질환에 대하여 다양한 특허를 가지고 있음.
- (2) 또한 간 기능 개선에 대한 연구 외에도 위장질환개선분야에 대해서도 IN VIVO 실험을 통한 효능을 확인하는 등 오가피 발효물 소재가 소화기질환 개선에 대한 다양한 연구를 수행 중에 있음(관련 연구결과를 현재 논문을 투고준비 중에 있음).
- (3) 오가피발효물의 위장질환개선 연구분야 : 위질환 개선에 대한 연구에 있어서, 위질환의 원인이 되는 헬리코박터파이로니균에 의한 원인, 물리적원인(스트레스원인 등), 화

학적원인(알코올, 인도메타신, 초산 등의 모델을 통한 원인) 등 다양한 분야에 대하여 연구를 진행하고 있으며, 의미 있는 성과를 얻었음. 또한 장질환 개선효능 확인에 있어서 다양한 원인에 따른 장기능개선효과를 IN VITRO 및 IN VIVO 실험을 통하여 확인하였음.

(4) 위장질환 개선분야에 대한 인체적용시험을 준비중에 있음.

나. 당뇨개선분야에 대한 연구 추진



- (1) 오가피 발효물을 이용한 당뇨개선효과에 대한 연구를 추진 중에 있으며, 일부 연구결과를 상기 논문실적에 제시하였음.
- (2) 추가적으로 당뇨개선효과에 대한 연구를 추진 중에 있음.
- (3) 특히 당뇨개선은 현재 휴림이 추진하고 있는 대사증후군 개선효능을 갖는 소재를 개발하고 있는 한 테마에 포함되어 있는 연구분야로 체계적인 연구수행을 추진하고 있음.

제 5 절 기타(박람회 참가 등 홍보)

1. 국내박람회 참가 및 홍보

참가박람회명	“ 2012 생명산업 과학기술대전 “
참가일시	2012.09.20~2012. 09.22 (3일간) / aT센터
참가목적	연구개발사업으로 얻어진 개발신제품 홍보 및 회사의 주력제품 홍보
참가증빙자료	

2. 해외박람회 참가 및 홍보

참가박람회명	2012 동경식품박람회
참가일시	2012.03.06.~2012.03.09
참가목적	연구개발사업으로 얻어진 개발신제품 홍보 및 회사의 주력제품 홍보
참가증빙자료	

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

제 1 절 해외 건강기능식품기술 동향

1. 미국의 경우, 영양소 강화 식품이 트렌드를 이루고 있으며 미국 소비자의 81%가 건강 유지나 증진에 도움을 주는 식품을, 75%는 영양소가 강화된 식품을 구입하고 있음. 이에 따라, 기능성 식용식물 및 phytochemicals의 소재화 연구가 이루어지고 있으며, 허브들의 생리·약리 활성에 관한 연구개발이 국가연구 사업으로 자리잡고 있음. 또한 미국인의 약 50%가 기능성식품이 의약품을 대체할 수 있다고 믿고 있으며 이들은 천연 재료를 사용함으로써 부작용 및 위험을 완화시킬 수 있고 친숙한 식품 형태를 취하고 있는 점에서 건강기능식품을 선호함.
2. 유럽의 경우는 기존에 있는 특정 성분을 더욱 보강, 새로운 성분을 첨가한 식품을 개발하는 것이 최근 추세이며 비타민, 미네랄, 미량 성분 등을 첨가한 에너지드링크, 스포츠식품 등이 개발되고 있음. 유럽 각국의 식품연구기관에서 수행하고 있는 기능성 식품 관련 연구에는 주로 심혈관 질환 예방, 면역 조절, 장건강, 체중조절 등에 연구가 집중되고 있음. 주요 소재로는 phytochemicals 류의 연구 빈도가 가장 높았으며 또한 장 건강과 면역 증진과 관련하여 probiotics 연구도 활발하게 진행되고 있음. 네덜란드의 TNO의 식품영양 연구그룹은 영양 유전체학뿐만 아니라 post-genomics 기술 및 생물정보학기술을 통합적으로 접목시켜 학계의 기초연구와 산업계의 응용연구 간의 갭을 연결하는 역할을 수행함으로써 맞춤형식품의 실용화를 위해 나아가고 있음.
3. 일본의 경우는 정부의 건강장수 계층 탐색연구를 중심으로 유전체기술의 기반확대 및 SNP 발굴, 유전체 활용기술개발사업이 대대적으로 수행되고 있고 nutrigenomics 데이터베이스 등의 연구가 진행되고 있음. 일본은 주로 미생물 및 해양식물 유래의 활성 천연물에 집중하고 있음.

제 7 장 연구시설·장비 현황

제 1 절 도입한 연구시설 및 장비

기자재명	구매금액(원)	구매일자	기자재 활용용도	보관장소
Fraction collector	8,000,000	2010.10.26	분석시험에 활용	(주)휴림 중앙연구소
분쇄기	2,500,000	2010.11.18	시작품제작을 위한 원물 분쇄	(주)휴림 중앙연구소
항온항습기	14,500,000	2011.08.25	시작품 등 안정성평가	(주)휴림 중앙연구소



Fraction collector



분쇄기



항온항습기

제 8 장 참 고 문 헌

1. Yook CS, Lee DH, Seo YK. 1976. A New Forma of *Acanthopanax* Species(I). *korean J Pharmacogn* 7 : 179-190.
2. Lee WT. 1979. Distribution of *Acanthopanax* Pant in Korea. *Korean J Pharmacog* 10 : 103-107.
3. Ovodov YS, Ovodova RG, Solov'eva TF, Elyakov GB, Kochetkov NK. 1965. The Glycosides of *Eleutherococcus Senticosus* Max., I. Isolation and some Properties of Eleutheroside B and E. *Khim Prir Soedin* 1(1) : 3-7.
4. Ovodov YS, Frolova GM, Nefedova MY, Elyakov GB. 1967. The Glycosides of *Eleutherococcus Senticosus* Max., II. The Structure of Eleutheroside A1, B1, C and D. *Khim Prir Soedin* 3(1) : 53-54.
5. Elyakova LA, Dzizenko AK, Elyakov GB. 1965. Structure of Lignan Glycosides from *Acanthopanax* Roots. *Daklady Akademii Nauk SSR* 165(3) 562.
6. Elyakova LA, Dzizenko AK, Sova VV, Elyakov, GB. 1966. sesamin and (-) Sainine obtained from *Acanthopanax sessiliflorus* and their NMR spectra. *Akad Rlauk Uz SSR* 2(3) : 149-152.
7. Brekhman II, Dardymov IV. 1969. New Substances of Plant Origin which Increase Nonspecific Resistance, *Ann. Rev. Pharmacal.* 9 : 419-430.
8. Brekhman II, Dardymov IV. 1969. Pharmacological Investigation of Glycosides from Ginseng and *Eleutherococcus*. *J Nat Products(Lloydia)* 32(1) : 46.
9. Halstead BW, Hood LL. 1984. *Eleutherococcus Senticosus* Siberian Ginseng. America, Oriental Healing Arts Institute. p 1-94.
10. Lee GD, Chang HG, Kim HK. 1997. Antioxidative and Nitrite-scavenging Activities of Edible Mushrooms. *Korean J Food Sci Technol* 29(3) : 432-436.
11. Lee BW, Lee MS, Park KM, Kim CH, Ahn PU, Choi CH. 1998. Anticancer Activities of the Extract from the Mycelia of *Coriolus Versicolor*. *Korean J Appl Microbiol Biotechnol* 30(3) : 702-708.
12. Lee SY, Kang TS, Moon SO, Lew ID, Lee MY. 1996. Fractionation and Antitumor Activity of the Water Soluble Exo-polysaccharide by Submerged Cultivation of *Ganoderma lucidum* Mycelium. *Korean J Appl Microbiol Biotechnol* 24(4) : 459-464.
13. Kim SW, Kim ES, Kim YS. 1995. Studies on the Polysaccharide Extracted from *Ganoderma Lucidum*. *Korean J Soc Food Nutr* 24(1) : 147-153.
14. Kim YI, Kim BK, Jeong H, Lee KH. 1991. Production of Antihypertensive Constituents from *Ganoderma Lucidum* IY005 by Fermentation Using Industrial Wastes. *Korean J Mycol* 19(1) : 79-84.

15. Hwang KH, Kim HK, Han YN. 1997. Screening of Inhibitory Activity of Edible Mushrooms on Dopamine β -Hydroxylase. *Korean J Food Sci Technol* 29(2): 194-197.
16. Kim SH, Lee JN, Kim SH, Oh SJ, An SW, Lee JH, Park YS, Chung, EK, Lee, HY. 1998. Studies on Screening and Comparison of Biological Activities from the Fruiting Body and Mycelium of *Elfvigia Applanata*. *Korean J Appl Microbiol Biotechnol* 26(4) : 331-337.
17. Cho SM, Park JS, Kim KP, Cha DY, Kim HM, Yoo ID. 1999. Chemical Features and Purification of Immunostimulating Polysaccharides from the Fruit Bodies of *Agaricus Blazei*. *Korean J Mycology* 27 : 170-174.
18. Jeong JH, Wee JJ, Shin JY, Cho JH, Jung DH. 2005. Antioxidative Effect of Crude Saponin Fraction Prepared from Culture Product of *Basidiomycota* Cultured with Fresh Ginseng as Substrate. *Korean J Food Sci Technol*. 37(1) : 67-72.
19. Oh SI, Lee MS. 2005. Antioxidative and Antimutagenic Effects of *Ganoderma Lucidum* Krast Extracts. *Korean J. Food Nutr* 18(1) : 54-62.
20. Seo KW, Cho IS, Oh MH, Lee KM, Kim HJ. 1996. Subacute Toxicity of G009, a Polysaccharide Isolated from *Ganoderma Lucidum* IY009. *J Fd Hyg Safety* 11(4) : 261-271.
21. Bae HS, Kang SK, Shin IS, Woo SK, Kim YJ, Kim MA, Ra JC. 2009. The Effects of Extracts Mixture Drink from *Inonotus Obliquus*, *Phellinus Linteus* and *Ganoderma Lucidum* on Hematopoietic Stem Cells and Lymphocyte Subset of Blood in Human, *J Fd Hyg Safety* 24(1) : 78-85.
22. Choi MA, Park NY, Woo SM, Jeong YJ, Shin SR. 2003. Characteristics of *Hericium Erinaceus* and its Extracts. *Korea Journal of Food Preservation* 10(4) 560-564.
23. Jung JH, Lee KE, Lee SY. 2006. Optimization of Submerged Cultivation of *Hericium Erinaceum*. *KSBB Journal* 21(2) : 96-102.
24. Lim JH, Lee SH, Jun BS, Yang YT, Koh JS. 2005. Changes in Major Constituents by Soaking of *Acanthopanax Koreanum* with Spirit Solution. *J Korean Soc Appl Bio. Chem* 48(2) : 166-172.
25. Sung CK, Kim YM. 1995. Studies on the Production of Eleutherosides by Plant Tissue Culture of *Acanthopanax* Spp. *Korean J Pharmacogn*. 26(1) : 101-102.
26. McCleary BV, Shameer I. 1987. Assay of malt α -glucanase using azo barley glucan: an improved precipitant. *Journal of the Institute of Brewing*. 93 : 87-90.
27. McCleary BV, Glennie-Holmes M. 1985. Enzymic quantification of (1-3), (1-4) -D-glucan in barley and malt. *Journal of the Institute of Brewing*. 91 : 285-295.
28. Jwa CS, Yang YT, Koh JS. 2000. Changes in Eleutherosides Contents of *Acanthopanax Koreanum* by Harvest Time. *Korean Journal Postharvest Sci Technol* 7(4) : 362-365.
29. Jwa CS, Yang YT, Koh JS. 2001. Preparation of Extract from *Acanthopanax Koreanum* by Extraction Conditions and Its Chemical Compositions. *J Korean Soc Appl Biol Chem* 44(1) :

24-29.

30. Ahn HY, Cha JY, Cho YS. 2012. Biological Activity and Chemical Characteristics of Fermented *Acanthopanax senticosus* by Mold. *Journal of Life Science* 22(12) : 1704-1711.
31. Park SJ, Song SW, Seong DH, Park DS, Kim SS, Gou J, Ahn JH, Yoon WB, Lee HY. 2009. Biological activities in the extract of fermented *Codonopsis lanceolata*. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 38(8) : 983-988.
32. Hanh DR, Kim CJ, Kim JH. A Study on the Chemical Constituents of *Acanthopanax Koreanum* and its Pharmacobiological Activities. *Yakhak Hoeji*. 29: 357-361 (1985)
33. Kang HS, Kim YH, Lee CS, Lee JJ, Choi IP, Pyun KH. Suppression of interleukin-1 and tumor necrosis factor- α production by acanthoic acid, (-)-pimar-9(11), 15-diene-19-oic acid, and its antifibrotic effects in vivo. *Cell Immunol*. 170: 212-221 (1996)
34. Kang HS, Song HK, Lee JJ, Pyun KH, Choi IP. Effect of acanthoic acid on TNF- α gene expression and haptoglobin synthesis. *Mediators Inflamm*. 7: 257-259 (1998)
35. Shim SC, Koh HY. Polyacetylene Compounds from *Panax Ginseng* C. A. Meyer. *Bull Korean Chem Soc* 4: 183-188 (1983)
36. Yook CS, Rho YS, Seo SH, Leem JY, Han DR. Chemical components of *Acanthopanax divaricatus* and anticancer effect in leaves, *Yakhak Hoeji* 40(3), 251-261 (1996)
37. Yook CS, Chang SY. Pharmacognostical studies on *Eleutherococcus senticosus* Max. Var. *Subinermis* S. *Bull K H Pharma Sci* 20: 1-15 (1990)
38. Ovodov YS, Ovodova RG, Solov'eva TF, Elyakov GB, Kochetkov NK. The glycosides of *Eleutherococcus senticosus* Max. I. Isolation and some properties of eleutheroside B and E. *Khim Prirodn Soedin* 1: 1-4 (1965)
39. Ovodov YS, Frolova GM, Nefedova MY, Elyakov GB. The glycosides of *Eleutherococcus senticosus* Max. II. The structure of eleutheroside A1, B1, C and D. *Khim Prirodn Soedin* 3: 63-64 (1967)
40. Elyakova LA, Dzizenko AK, Sova VV, Elyakov GB. (-)-Sesamin and (-)-savinin from *Acanthopanax sessiliflorum* and their NMR spectra. *Khim Prirodn Soedin* 2: 149-152 (1966)
41. Hirata F, Fujita K, Ishikura Y, Hosoda K, Ishikawa H. Hypocholesterolemic effect of sesame lignan in humans. *Atherosclerosis* 122: 135-136 (1996)
42. Heinemann T, Aktmann G, Von Brtgmann K. Comparison of intestinal absorption of cholesterol with different plant sterols in man. *Eur J Clin Invest* 23: 827-831 (1993)
43. Danielak R, Popowska E, Borkowski B. The preparation of vegetable products containing isofraxidin, silibin, and glaucium alkaloids and evaluation of their choleric action. *Pol J Pharmacol Pharm.* . 25(3), 271-283 (1973)
44. Lee YS, Lee EB, Kim YH. Some pharmacological activities of acanthoic acid isolated from

Acanthopanax koreanum root bark. J Appl Pharmacol 9: 176-182 (2001)

45. Lee GD, Chang HG, Kim HK. Antioxidative and nitrite-scavenging activities of edible mushrooms. Korean J Food Sci Technol 29: 432-436 (1997)
46. Lee BW, Lee MS, Park KM, Kim CH, Ahn PU, Choi CH. Anticancer activities of the extract from the mycelia of *Coriolus versicolor*. Korean J Appl Microbiol Biotechnol 30: 702-708 (1998)
47. Lee SY, Kang TS, Moon SO, Lew ID, Lee MY. Fractionation and antitumor activity of the water soluble exo-polysaccharide by submerged cultivation of *Ganoderma lucidum* mycelium. Korean J Appl Microbiol Biotechnol 24: 459-464 (1996)
48. Kim SW, Kim ES, Kim YS. Studies on the polysaccharide extracted from *Ganoderma Lucidum*. Korean J Soc Food Nutr 24: 147-153 (1995)
49. Kim YI, Kim BK, Jeong H, Lee KH. Production of antihypertensive constituents from *Ganoderma Lucidum* IY005 by fermentation using industrial wastes. Korean. J Mycol 19: 79-84 (1991)
50. Hwang KH, Kim HK, Han YN, Screening of inhibitory activity of edible mushrooms on dopamine β -hydroxylase. Korean J Food Sci Technol 29: 194-197 (1997)
51. Kim SH, Lee JN, Kim SH, Oh SJ, An SW, Lee JH, Park YS, Chung EK, Lee HY. Studies on screening and comparison of biological activities from the fruiting body and mycelium of *Elfvigia Applanata*. Korean J Appl Microbiol Biotechnol 26: 331-337 (1998)
52. Júnior WS, Santos JS, Sankarankutty AK, Silva OC. 2006. Nonalcoholic fatty liver disease and obesity. *Acta Cir Bras* 21:72-78.
53. Younossi ZM. 1999. Non-alcoholic fatty liver disease. *Curr Gastroenterol Rep* 1:57-62.
54. Stewart S, Jones D, Day CP. 2001. Alcoholic liver disease : new insights into mechanisms and preventative strategies. *Trends Mol Med* , 7:408-413.
55. Purohit V, Russo D, Coates PM. 2004. Role of fatty liver, dietary fatty acid supplements, and obesity in the progression of alcoholic liver disease: introduction and summary of the symposium. *Alcohol* 34:3-8.
56. Stephen HC, Danielle MH, James TP, Elizabeth EH. 2002. Is NASH underdiagnosed among African Americans?. *Am J Gastroenterol* 97:1496-1500.
57. Lieber CS. 2004. Alcoholic fatty liver: its pathogenesis and mechanism of progression to inflammation and fibrosis. *Alcohol* 34:9-19.
58. Lakshman MR. 2004. Some novel insights into the pathogenesis of alcoholic steatosis. *Alcohol* 34:45-48.
59. Mallov S, Bloch JL. 1955. Role of hypophysis and adrenals in fatty infiltration of liver resulting from acute ethanol intoxication. *Am J Physiol* 184:29-34.

60. Papatheodoridis GV, Chrysanthos N, Cholongitas E, Pavlou E, Apergis G, Tiniakos DG, Andrioti E, Theodossiades G, Archimandritis AJ. 2009. Thrombotic risk factors and liver histologic lesions in non-alcoholic fatty liver disease. *J Hepatol* 51:931-938.
61. Ko JS, Yoon JM, Yang HR, Myung JK, Kim H, Kang GH, Cheon JE, Seo JK. 2009. Clinical and histological features of nonalcoholic fatty liver disease in children. *Dig Dis Sci* 54:2225-2230.
62. Bijl N, Sokolović M, Vrans C, Langeveld M, Moerland PD, Ottenhoff R, van Roomen CP, Claessen N, Boot RG, Aten J, Groen AK, Aerts JM, van Eijk M. 2009. Modulation of glycosphingolipid metabolism significantly improves hepatic insulin sensitivity and reverses hepatic steatosis in mice. *Hepatology* 50:1431-1441.
63. Mehta K, Van Thiel DH, Shah N, Mobarhan S. 2002. Nonalcoholic fatty liver disease: pathogenesis and the role of antioxidants. *Nutr Rev* 60: 289-293.
64. Duvnjak M, Lerotić I, Barsić N, Tomasić V, Virović Jukić L, Velagić V. 2009. Pathogenesis and management issues for non-alcoholic fatty liver disease. *World J Gastroenterol* 13:4539-4550.
65. Brekhman II. 1960. A new medicinal plant of the family Araliceae the spiny *Eleutherococcus*. *Izv Sibir Otdel Akad Nauk USSR* 9:113-120.
66. Ovodov YS, Ovodova RG, Solov'eva TF, Elyakov GB, Kochetkov NK. 1965. The glycosides of *Eleutherococcus senticosus* Max. I. Isolation and some properties of eleutheroside B and E. *Khim Prirodn Soedin* 1:1-4.
67. Kim YI, Kim BK, Jeong H, Lee KH. 1991. Production of antihypertensive constituents from *Ganoderma lucidum* IY005 by fermentation using industrial wastes. *Korean J Mycol* 19:79-84.
68. Oh SI, Lee MS. 2005. Antioxidative and antimutagenic effects of *Ganoderma lucidum* krast extracts. *Korean J Food Nutr* 18:54-62.
69. Bae HS, Kang SK, Shin IS, Woo SK, Kim YJ, Kim MA, Ra JC. 2009. The effects of extracts mixture drink from *Inonotus obliquus*, *Phellinus linteus* and *Ganoderma lucidum* on hematopoietic stem cells and lymphocyte subset of blood in human. *J Fd Hyg Safety* 24:78-85.
70. Lee SY, Rhee HM. 1990. Cardiovascular effects of mycelium extract of *Ganoderma lucidum*; Inhibition of sympathetic outflow as a mechanism of its hypotensive action. *Chem Pharm Bull* 38:1359-1364.
71. Adachi T, Ohno N, Ohsawa M, Oikawa S, Yadomae T. 1990. Macrophage activation in vitro by chemically cross linked(1→3)- β -D-glucan. *Chem Pharm Bull* 38:988-992.
72. Usui T, Iwasaki Y, Hayashi K, Mizuno T, Tanaka M, Shinkai K, Arakawa M. 1981. Antitumor activity of water-soluble β -D-glucan elaborated by *Ganoderma applanatum*.

Agric Biol Chem 45:323-326.

73. Sone Y, Okuda R, Wada N, Kishida E, Misaki A. 1985. Structures and antitumor activities of the polysaccharides isolated from fruiting body and the growing culture of mycelium of *Ganoderma lucidum*. *Agric Biol Chem* 49:2641-2653.
74. Hahn DR, Kim CJ, Kim JH. A study on the chemical constituents of *Acanthopanax koreanum* Nakai and its pharmaco-biological activities. *Yakhak hoeji*. 29: 357-361 (1985)
75. Park HK, Park MS, Kim TS, Choi IL, Jang YS, Kim GS. Cutting propagation of *Eleutherococcus senticosus*. *Korean J Medicinal Crop Sci.* 2: 133-139(1994)
76. Soya H, Deocaris CC, Yamaguchi K, Ohiwa N, Saito T, Nishijima T, Kato M, Tateoka M, Matsui T, Okamoto M, Fujikawa T. Extract from *Acanthopanax senticosus* harms (Siberian ginseng) activates NTS and SON/PVN in the rat brain. *Biosci Biotechnol Biochem.* 72: 2476-2480 (2008)
77. Yook CS, Rho YS, Seo SH, Lim JY, Han DY. Chemical components of *Acanthopanax divaricatus* and anticancer effect in leaves. *Yakhak hoeji*. 40: 251-261 (1996)
78. Kim LH, Han SS, Choi YS. Antioxidant effects of the extracts of *Acanthopanax senticosus*. *Korean J Phamarcogn.* 33: 359-363 (2002)
79. Choi SM, Park JB, Kim JM, In KM, Park HY. *Acanthopanax senticosus* extract acts as an important regulator for vascular functions. *J Life Sci.* 18: 701-707 (2008)
80. Hong SP, Row KH. Separation of acanthoside-D in *Acanthopanax senticosus* by preparative recycle chromatography. *Hwahak Konghak.* 40: 488-491 (2002)
81. Song MS, Lee YW, Kim JD, Row KH. Extraction of acanthoside-D in *Acanthopanax senticosus* by supercritical fluid. *Hwahak Konghak.* 41: 207-212 (2003)
82. Bae JS, Jang GH, Lee MH, Jeong GS, Jo US, Choe SG, Kim YH, Park SC. Comparison on the morphology, general composition, elemental composition and mineral contents of *Phellinus linteus*, *Phellinus baumii* and *Phellinus gilvus*. *Kor J Vet Res* 43: 423-428 (2003)
83. Kim HM, Han SB, Oh GT, Kim YH, Hong DH, Hong ND, Yoo ID. Stimulation of humoral and cell mediated immunity by polysaccharide from mushroom *Phellinus linteus*. *Int J Immunopharmacol* 18: 295-303(1996)
84. Hikino H, Konno C, Mirin Y, Hayashi T. Isolation and hypoglycemic activity of ganoderans A and B, glycans of *Ganoderma lucidum* fruit bodies. *Planta Med* 51: 339-40 (1985)

주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 고부가가치 식품개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림축산식품부에서 시행한 고부가가치 식품개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니 됩니다.