

## 국산 상황버섯을 활용한 뼈기질 강화 소재개발

Development of osteo-active supplement from *Phellinus linteus*

연구기관  
한국식품연구원

농림수산식품자료실



0016180

농림수산식품부

## 제 출 문

농림수산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “국산 상황버섯을 활용한 뼈기질 강화 소재 개발” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2008년 4월 22일

주관연구기관명 : 한국식품연구원  
총괄연구책임자 : 김인호 책임연구원  
세부연구책임자 : 김은미 책임연구원, 이창호 선임연구원  
연 구 원 : 한대석 책임연구원, 김영언 선임연구원  
                  성기승 책임기술원, 이영철 책임연구원  
                  오세욱 선임연구원, 신지영 연구원  
협동연구기관명 : 경희대학교  
협동연구책임자 : 백남인 교수  
참 여 연 구 원 : 송명중 연구원, 류하나 연구원  
참 여 기 업 : 진주상황버섯 (버섯돌이삼형제)



# 요 약 문

## I. 제 목

국산 상황버섯을 활용한 뼈기질 강화 소재개발

## II. 연구개발의 목적 및 필요성

현대 사회는 웰빙(참살이)사회의 도래와 함께 사망성 질환의 억제와 더불어 골다공증 억제 등 성인의 활동력 유지에 대한 관심이 증대하고 있다. 골관계 질환은 남녀 모두에게 생리적으로 hormone의 변화와 함께 필연적으로 찾아오는 자연노화 현상으로서 골량의 손실은 30대부터 시작되나 최근에는 운동부족, 스트레스, 무리한 체중 감량 등으로 골다공증이 빈발하여 젊은 층에서도 발생하고 있는 실정이다. 이는 평균수명 및 노년 인구의 증가로 미래 국가의 생산성이 노년인구의 활동력에 좌우할 만큼 중요하지만 노년기 발생자의 10%가 골반파열로 사망할 만큼 심각하다. 골약화는 침묵의 병이라 일컬어지는 것처럼 만성적으로 진행되는 점과 생체 노화 현상의 하나로 받아들이기 때문에 예방이나 치료시기를 놓치는 경우가 많으나 완전한 치료수단이 개발되어 있지 않으며 대중적인 요법만이 있다. 상황버섯(*Phellinus linteus*)은 담자균문(Basidiomycotina), 민주름버섯목(Aphylliphorales), 소나무비늘과(Hymenochaetaceae)의 진흙버섯속(Phellinus)에 속하는 백색부후균으로 뿔나무 줄기에 자생하며 샷갓표면을 제외하고는 모두 황색이므로 상황(桑黃)이라고 불리며 한국명은 목질진흙버섯이다. 상황버섯은 본초강목, 동양의학대사전, 중국본초도감 등의 옛 문헌에 각종 지병 치료약으로 이용되어 온 것으로 기록되어 있으며 또한 높은 항암활성, 항종양활성, 항돌연변이원성, 면역활성 등의 생리적 활성을 갖고 있는 것으로 보고되어 있다. 약리작용으로는 소화기 계통의 암인 위암, 식도암, 십이지장암, 결장암, 직장암을 비롯한 간암수술 후 화학

요법을 병행할 때 면역기능을 향진시키며, 자궁출현 및 대하, 월경불순, 장출혈, 오장기능을 활성화시키고 해독작용을 하는 것으로 알려져 있다. 그러나 상황의 생리적 기능성은 주로 면역, 항암 관련 보고가 주를 이루며 기타 성인병 관련 억제활성은 미비하다. 최근 성인질환 가운데 남녀노소를 불문하고 발생하는 골다공증은 개인의 활동력 및 국가의 생산성을 저하시켜 예방 중요성이 증대되고 있으며, 현재 칼슘 중심의 단순 배합제제나 Fluoro 또는 sterol 화합물이 치료제로 사용되고 있긴 하지만 부작용이 나타나고 있다. 상황버섯은 면역기능을 향상시키는 활성이 보고되어 있고 건강기능에서 다기능 활성이 예상되므로 고령화 시대에 개인의 활력 및 국가 생산성을 위한 뼈기질 강화소재로서 건강활성과 소재화 가능성을 연구하였다. 현재 상황 재배농가는 새로운 건강기능성을 보완하여 국산상황의 우수성과 가치확인을 모색하며 활성성분의 실체, 활성성분의 추출 기술과 활용, 가공기술 등을 필요로 하고 있다. 따라서 국내 5,000억, 국외 300억불에 이르는 골 강화 예방 및 치료 시장에 참여하고 국산 상황의 우수성을 입증하여 부작용 없는 뼈 강화 제품의 기초를 확립하고자 하였다.

### Ⅲ. 연구개발 내용 및 범위

1. 국산 상황버섯의 세포계 뼈강화 활성 검증 및 이화학적 특성
  - 가. 시료의 확보 및 추출
  - 나. 세포계 골강화 활성 시스템 구축
  - 다. 뼈강화 성분의 이화학적 특성
  - 라. 뼈강화 추출물의 성분 특성 조사
2. 상황버섯의 동물계 뼈강화 활성 및 성분 특성
  - 가. 동물계 뼈강화 활성 시스템 구축
  - 나. 시료의 투여 및 기초대사
  - 다. 상황버섯의 뼈강화 활성 검색

- 라. 활성성분의 분리
- 3. 상황버섯 뼈강화 활성 물질의 소재화 기술 개발
  - 가. 상황버섯의 뼈강화 소재화 활용기술
  - 나. 상황버섯 골강화 액상 및 소형소재 개발
  - 다. 분리물로부터 골강화 활성성분의 정제

## IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

### 1. 연구결과 요약

상황버섯의 뼈기질 강화효과는 세포계와 동물실험계로 평가하였으며 시료는 국산상황버섯 [진주상황버섯, (영농법인)버섯돌이삼형제]으로서 참여기업에서 제공하였다. 세포계 뼈기질 강화효과는 인간유사세포계(human-like osteoblast cells)를 이용하여 비교하였으며 용량-반응(dose-response) 시험에서 세포 분화도 (cell proliferation)는 대조구의 95%~109%로 증식효과가 양호하여 세포독성 면에서 안전한 것으로 판단하였다. 상황의 뼈기질 강화 활성의 지표인 ALP 활성 (Alkaline phosphatase activity)은 대조구 대비 최고 70% 이상 높아 식품중 골강화 효과가 알려진 대두보다 높은값을 보였다. 뼈흡수(과골) 억제활성은 분화초기 (precursor cell 억제)와 골흡수 과정 (multinucleate cell 억제)에서 모두 억제활성을 나타내었다. 즉, RANKL과 OPG 상호작용에서 60% 억제, 과골세포 분화에서 80% 억제활성을 보였다. 국산상황버섯의 세포계 뼈기질 강화활성은 뼈세포 형성 및 흡수(과골) 억제효과가 동시에 매우 높았으며 품종 및 토질 등 재배환경의 차이가 있는 외산 상황버섯과 비교한 경우에도 상대적으로 높은값을 보여 국산시료의 우수성을 확인할 수 있었다. 뼈기질 강화활성 추출물의 이화학적 특성은 pH 변화에 따라 증식활성 105~119%, ALP 활성 100% 이상을 나타내었다. 온도변화조건에서 증식활성 137~156%, ALP 활성 115~120%를 나타내어 체내이용 및 가공과정에서 활성유지의 가능성을 시사하였다. 상황시료를 동물 (ovariectomized rat)

에 급여한 경우 간대사 등에서 독성이 미약하였으며 뼈기질 강화지표로서 혈청의 ALP, osteocalcin은 control 보다 30%이상 높았고 Sham 그룹(위대조군)과도 유사한 값을 보였다. 혈청의 Calcium, Phosphate 비율 역시 상황추출물이 대조구보다 높고 Sham과 유사한 값을 보였다. 동물시험계 뼈흡수(파골) 지표로서 뇨의 DPD (Deoxypyridinoline) 값은 대조구 보다 50%이상 낮았고 Sham보다도 낮아 뼈 파괴 억제 효과가 높음을 확인하였다. 난소적출 실험동물의 시료급여후 발골표본을 대상으로 뼈 특성을 측정할 경우, BMD (골밀도)와 탄성도 (Stiffness), 골강도 (Breaking strength)에 있어서 상황시료는 대퇴골 (Femur), 경골 (Tibia)에서 부분적으로 대조구보다 높은 값을 보였고 Sham군과도 유사하였다. 발골시료의 무기질 분석에서도 상황시료 투여군은 대조구 대비 20% 이상 높은값을 보여 bone matrix 형성에 도움을 주는 것으로 나타났다. 발골시료의 뼈지주 및 뼈파괴세포 빈도는 뼈지주에서 상황조성물의 빈도가 높았으며 뼈파괴세포에서는 상황 및 조성물 시료에서 빈도 감소로 억제 효과가 나타났다. 이로부터 상황시료 투여에 의하여 뼈기질 강화 및 뼈 흡수 억제 활성을 종합적으로 확인할수 있었다. 상황의 뼈기질 관련 성분으로 Total phenolic compounds 함량 11.2mg/g, Total flavonoid compounds 7.5mg/g을 나타내었으며 Estron, Estriol 등 Phyto-estrogen 성분함유가 분석 결과 확인되었다. 이들 성분과 관련하여 활성산소 소거능 등 항산화활성이 확인되었으며 면역기능 및 뼈강화 활성에 유기적으로 영향을 준 것으로 판단하였다. 인간유사 세포계시험을 활용하여 상황의 뼈기질 강화 성분을 분리한 결과 1*H*-cyclopentantracene(1), episterol(2), dehydroperoxyergosterol(3), ergosterol peroxide(4), 6-*O*-methycerevisterol(5), cerevisterol(6), 4-hydroxybenzalacetone(7), 2-(3',4'-dihydroxyphenyl)-1,3-benzodioxole-5-aldehyde(8), 3,4-dihydroxybenzalacetone (9), protocatechualdehyde(10)로 동정하였다. 이 가운데 6종의 스테롤화합물 (화합물 1~6)과 3종의 페놀 화합물 (화합물 7~9)은 본 연구에서 처음 분리되었으며 이들 성분은 독성을 나타내

지 않고 뼈 강화 활성이 높았다. 상황활성성분을 함유한 추출물을 소재화 하기 위하여 액상분산한 경우 카라기난, 자당에스테르 등을 이용하였을때 분산이 정상분포로 유지되었으며 빛에 의하여 Scanning 한 결과 부유층, 침전층의 안정화 그래프가 확인되었다. 활성 추출물은 액상용으로 nanoemulsion, nanoencapsulation으로, 고상 소재로서 복합분체 및 유동층 코팅시료로 시험 개발하여, 용해도를 향상시킨 액상이용 소재 및 용이한 섭취, 가공첨가용 고상 소재로서 활용도를 높이기 위한 소재를 개발하였다.

## 2. 활용에 대한 건의

국산상황버섯은 항암 중심의 활성만이 알려져 왔으므로 유효성분을 새롭게 발견하고 건강다기능 활성을 규명하여 가치를 높이는 연구가 필요하다. 본 연구에서는 그와 같은 시도의 일환으로 고령화사회를 대비한 건강활성으로서 뼈기질 강화 시험계를 구축하고 상황버섯의 뼈기능 강화활성을 확인 및 핵심 성분 동정을 수행하였다. 국산 상황버섯의 뼈기질 강화 활성이 과학적으로 검증되었으며 외산과 비교하여 우수성이 입증되었다. 동정된 유효성분은 본시험에서 안전성이 확인되고 뼈강화 활성이 높으나 식품소재로서 이용하기까지 관련법규와 절차에 의한 확인과정이 요구된다. 농가와 참여기업 (버섯돌이삼형제 영농조합)에서는 과학적으로 구명된 뼈건강 활성을 바탕으로 원료의 부가가치를 높일 것이며 유효성분은 제품화 과정에서 생산공정의 표준물질로 활용될 것이다. 상황 뼈강화 활성성분은 추후 별도의 조건과 과정을 통하여, 상황버섯 건강식품의 개별인정 과정과 식품, 제약 등으로의 단일 소재화 공정, 유도체개발, 기타 화합물과 활성 비교 등에 기초로 활용될 것이다. 국산 상황버섯의 품질 우수성을 바탕으로 현행 관련법규 및 농가규모에 따라 제품화가 협의될 것이며 본과제의 새로운 소재화 개발방식이 적용될수 있다. 향후 대사계 및 인체실험을 통하여 시장접근적인 연구가 지속될 예정이며 개별인정을 위한 준비가 진행될 경우 국산 상황버섯 골강화 제품의 시장 경쟁력은 보다 확고할



것으로 고려한다. 기술적 권리 확보 및 기술이전을 통하여 상황버섯으로부터 국내외 최초의 뼈강화 제품 생산에 기여 하고자 하며 국민 골건강 향상 및 해당농가의 소득에 기여하고자 한다.

# SUMMARY

## I. Title

Development of osteo-active supplement from *Phellinus linteus*

## II. Purpose and Significance of the Study

LOHAS (life of health and sustainability) has been gradually interested in the moderns. People, who pursue well-being, needs more health supplements which is helpful to prevention against natural aging like osteoporosis than inhibition of death disease. Osteoporosis has been taken in all our body with natural aging as hormon unbalance inevitably. Actually, 10~15% of elderly person is caught with osteoporosis and that cause weakness of individual and national activity. The bone weakness even appears from age of twenties with stress, lack of exercise, excessive loss of weight and nutritional trouble. *Phellinus linteus* is a kind of mushroom that genealogies are Basidiomycotina, Aphyllophorales, Hymenochaetaceae and species of Phellinus. The mushroom was only known to inhibition of cancer cells and increase of immune activity. But other prevention effect against disease or symptom was not tried to experiments, and the bone mineralization effect of the mushroom extracts including high immunity has been assayed on human like osteoblast cells and ovariectomized rats. Isolation and identification of active components of the samples is conducted on separation of the active extracts. Remedy against osteoporosis had been in fluoro or sterol chemicals with side effects. Study has been active for search effective compounds from natural food resources against chronic disease. *Phellinus linteus* is investigated to

effective food resources which is high up bone matrix as multifunctional stuff with anticancer and immune activity. The active extracts would be applied to material processing including microencapsulization, microemulsion for solubilization in liquid and fluid bed coating material, complex flour in solid phase for food supplement. Active components for bone mineralization would be utilized for markers for final production of food supplements. Effective products of *Phellinus linteus* should be expected to contribute on individuals and national activity in periods of old age, and on farmers corporation of the mushroom.

### III. Contents and Scope of the Study

1. Physicochemical characteristics and osteoblast cell activation
  - 1) Korean *Phellinus linteus* preparation and extraction
  - 2) Preparation of assay system on human like osteoblast cell
  - 3) Physicochemical characteristics of sample extract on cell proliferation
  - 4) Profile analysis of sample extract
  
2. Assay on ovariectomized rats and isolation of active components
  - 1) Preparation of assay system of ovariectomized rats
  - 2) Diet of sample extract and performance of breeding
  - 3) Evaluation of *Phellinus linteus* extracts on the analysis of blood, urine, and bone sample from anatomy of ovariectomized rats
  - 4) Separation and fraction of active components from sample extracts

### 3. Development of osteo-active materials for food supplements

- 1) Material processing condition of active extracts
- 2) Soluble or solid products of active extracts
- 3) Purification and identification from active fraction

### 4. Application of the results

- 1) Achievement and contribution to related field
- 2) Application plan of the results
- 3) International trend of food supplement

## IV. Results and Recommendation

Effect of bone mineralization and matrix of Korean *Phellinus linteus* extract was investigated in assay system of human like cell proliferation and ovariectomized rat.

The mushroom extract proliferate 95%~109% compared to control on human-like osteoblast cell suggesting safe from cell cytotoxicity. ALP (Alkaline phosphatase activity) as a marker of osteoblast cell proliferation was 70% higher than that of control. The extract inhibited differentiation of osteoclast cell precursor and multinucleate cell ranging 90% compared to control. It suggest that the extract suppress not only initiation step of precursor cell but also RANKL-OPG response on the osteoclast cell differentiation. Dose-response of ALP activity shows the activity increase as sample concentration increase till  $10^{-2}$ mg/ml. The extract is stable on temperature variation and keep the high activity compared to control till 10 minutes of sample heating. The activity shows 20% higher than

control at various pH. It suggest that activity of the base is able to stable on change of temperature and pH during processing or absorption in human body. ALP and osteocalcin value as marker of bone mineralization of Korean *Phellinus linteus* extract showed 30% higher than those of control on blood serum of ovariectonized rats. Calcium/Phosphate ratio of the mushroom diet group in serum was higher than that of control too. DPD (Deoxypyridinoline) value as marker of bone loss showed 50% lower than that of control. BMD (bone mineral density), Stiffness and Breaking strength of the extract was measured higher than those of control on femur or tibia of separate speciman of rats. Morphology in the femur by histopathological findings indicates that diets of the mushroom affect positive bone matrix from Epiphysis and growth of Metaphysis, and supress accumulation of bone fatty acids. The results from human like osteo-cell test and animal test suggest that Korean *Phellinus linteus* is able to affect positive effects on improvement of bone matrix and inhibition of bone loss with prevention of osteoporosis. Active compounds were isolated from the extract on the test of osteoblast cell. Ten compounds were identified as 1*H*-cyclopentanthracene(1), episterol(2), dehydroperoxyergosterol(3), ergosterol peroxide(4), 6-*O*-methycerevisterol (5), cerevisterol(6), 4-hydroxybenzalacetone(7), 2-(3',4'-dihydroxyphenyl)-1,3-benzodioxole-5-aldehyde(8), 3,4-dihydroxybenzalacetone(9), protocatechu aldehyde(10). The materials have high activity and low cytotoxicity on bone cell proliferation, and should be applied to industrial process. The active extract was tested to preparation of materials for liquid or solid phase, as it were, nanoemulsion, nanoencapsulation and fluid bed coating. Korean *Phellinus linteus* have scientific results in useful material for bone mass and it will be applied to commercial products and health claim.

# CONTENTS

Summary in Korean .....	3
Summary in English .....	9
Chapter 1. Outline of the interest .....	31
1. Object .....	32
2. Necessity .....	32
3. Research range .....	34
4. Prospect .....	35
5. Summary .....	35
Chapter 2. State of the art .....	36
Chapter 3. Methods and results .....	37
Chapter 3-1. Materials and method .....	37
I. Extraction and evaporation of the sample .....	37
1. Extraction and evaporation of sample .....	37
1.1. Sample preparation and extraction .....	37
1.2. Concentration yield and approximate composition .....	38
1.3. Approximate composition of sample .....	39
1.4. Mineral and vitamin assay of sample .....	39
1.5. Sample condensation for cell assay system .....	41
II. Preparation and assay on human-like Osteoblast or osteoclast cell ..	41
1. Preparation and assay on human-like Osteoblast or osteoclast cell ..	41
1.1. Cell proliferation of positive control .....	41

1.2. Alkaline phosphatase activity(ALP) of positive control .....	04
1.3. Cell proliferation of Korean, China and Cambodia sample .....	4
1.4. ALP of Korean, China and Cambodia sample .....	4
1.5. Cell proloferation and ALP of supplement with sample (KY) .....	4
2. Inhibition of osteoclast cell differentiation .....	41
2.1. Osteoclast cell culture .....	4
2.2. Inhibition of osteoclast cell .....	2
2.3. The effect of osteoclast cell differentiation .....	24
2.4. Tartrate-resistant acid phosphatase(TRAP) staining .....	24
3. Physicochemical properties of active extract .....	3
3.1. Effect of temperature variation for active extract .....	43
3.2. Effect of pH variation for active extract .....	43
III. Ovariectomized rat model .....	43
1. Animal breeding and feeding .....	43
2. Ovariectomy .....	44
3. Body weight, feed intake and feed efficiency ratio .....	6
4. Blood and organ sample preparation .....	6
5. Analysis of blood serum .....	6
5.1. GOT and GPT activities .....	6
5.2. Blood lipid parameters .....	6
5.3. Analysis of ALP and osteocalcin in serum .....	7
5.4. Analysis of Ca and P in serum .....	8
6. Urine preparation and assay of urine factor .....	8
6.1. Creatinine and Deoxypyridinoline .....	9
6.2. Analysis of Ca, P in urine .....	9
7. Physicochemical analysis of femur and tibia .....	9

7.1. Preparation of femur and tibia .....	9
7.2. Characteristics of separate bone specimen .....	9
1) Weight, length and diameter of bone .....	9
2) BMD, BMC of bone specimen .....	50
3) Breaking strength, Displacement and Stiffness .....	50
4) Traceculase on epiphysis and metaphysis in the femur .....	5
5) Mineral contents analysis on femur or tibia .....	5
IV. Profiling of active components .....	52
1. Reagent .....	52
2. Instrument .....	53
3. Method .....	53
3.1. Sovent partition of extract .....	3
3.2. Analysis of total phenolic compounds .....	3
3.3. Analysis of total flavonoids .....	3
3.4. Analysis of phytoestrogen by GC .....	4
3.5. Antioxidantive effect .....	5
① Preparation of sample .....	5
② $\alpha$ - $\alpha$ -Diphenyl- $\beta$ -picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging activity .....	55
③ Superoxide dismutase activity .....	56
④ ABTS radical scavenging activity .....	56
V. Isolation, Purification and identification from active extract .....	56
1. Instrument and reagent .....	56
2. Plant sample .....	57
3. Isolation of active material .....	57



VI. Material Process of active extract for commercial product .....	5
1. Suspension properties of active extract .....	5
1.1. Preparation of emulsifier .....	5
1.2. Measurement of dispersibility .....	6
2. Nanoemulsions of <i>Phellinus linteus</i> (PL) extract .....	6
2.1. Particle size of nanoemulsions .....	6
2.2. Storage stability .....	6
3. nanoparticles of sample (PL) .....	8
3.1. Redispersibility of nanoemulsions .....	8
4. Microcapsule of PL .....	8
5. Hybridization .....	8
5.1. Sample .....	8
5.2. Methods .....	8
6. Granulation and coating .....	64
6.1. Granulation .....	65
6.2. Coating .....	65
7. Application of pill and beverage product .....	6
7.1. Pill product .....	6
7.2. Beverage product .....	6
VII. Statistics .....	66
<b>Chapter 3–2. Results .....</b>	<b>67</b>
I. Extraction and evaporation of the sample .....	7
1. Extraction and evaporation of the sample .....	7
1.1 Extraction and evaporation of sample .....	7

1.2. Approximate composition of sample .....	6
1.3. Mineral and vitamin assay of sample .....	6
II. Preparation and assay on human-like Osteoblast or osteoclast cell .....	96
1. Preparation and assay on human-like Osteoblast or osteoclast cell .....	96
1.1. Cell proliferation of positive control .....	96
1.2. Alkaline phosphatase activity(ALP) of positive control .....	97
1.3. Cell proliferation of Korean, China and Cambodia sample .....	97
1.4. ALP of Korean, China and Cambodia sample .....	98
1.5. Cell proliferation and alkaline phosphatase of KY .....	97
2. Inhibition of osteoclast cell differentiation .....	76
2.1. Osteoclast cell culture .....	6
2.2. Inhibition of osteoclast cell .....	6
2.3. The effect of osteoclast cell differentiation .....	77
3. Physiochemical properties of active extract .....	9
3.1. Effect of temperature variation for active extract .....	81
3.2. Effect of pH variation for active extract .....	83
3.3. Metabolic characteristic of PL .....	8
III. Effect of bonr matrix in ovariectomized rat model .....	8
1. Body weight, feed intake and feed efficiency ratio .....	8
2. Change of organ weight on ovariectomized rat .....	8
3. Analysis of blood serum .....	8
3.1. GOT and GPT activities .....	8
3.2. Blood lipid parameters .....	9
3.3. Analysis of ALP and osteocalcin in serum .....	9
3.4. Analysis of Ca and P in serum .....	9
4. Urine preparation and assay of urine factor .....	9

4.1. Creatinine and Deoxypyridinoline .....	9
4.2. Analysis of Ca, P in urine .....	9
5. Physicochemical analysis of femur and tibia .....	9
5.1. Weight, length and diameter of bone .....	9
5.2. BMD, BMC of bone specimen .....	9
5.3 Breaking strength, Displacement and Stiffness .....	9
5.4. Traceculase in epiphysis and metaphysis in the femur .....	11
5.5. Mineral contents analysis on femur or tibia .....	13
IV. Analysis of active components .....	104
1. Isolation of active material .....	104
2. Profiling of sample .....	104
3. Analysis of total phenolic compounds .....	106
4. Analysis of total flavonoids .....	107
5. Analysis of phytoestrogen by GC .....	111
6. Antioxidantive effect .....	111
6.1. $\alpha$ - $\alpha$ -Diphenyl- $\beta$ -picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging activity .....	111
6.2. Superoxide dismutase activity .....	112
6.3. ABTS radical scavenging activity .....	113
V. Isolation, Purification and identification from active extract .....	114
1. Solvent partition of sample extract .....	114
2. Fraction of the sample extract .....	116
3. Purification and identification of active components (1~10) .....	9
4. Yield of active components .....	148
5. Characteristics of active compounds .....	149

6. Activity of isolated compounds on bone cell proliferation assay	151
VII. Material development of commercial product	156
1. Formulation for commercial product	156
2. Suspension properties of active extract	157
2.1. Suspension properties of PL	157
2.2. Suspension properties of KY	160
3. Nanoemulsions of sample (PL)	161
3.1. Particle size of nanoemulsions	161
3.2. Storage stability	165
4. Nanoparticles of PL	165
4.1. Redispersibility of nanoemulsions.	166
5. Microcapsule of PL	167
6. Hybridization of PL	168
6.1. Particle size of PL after milling	168
6.2. Hybridization of potato starch and PL	170
6.3. Hybridization of cellets and PL	173
6.4. Hybridization of PL and heat treatment cereal	177
7. Granulation and coating	184
7.1. Granulation	184
7.2. Coating	185
8. Application of pill and beverage product	186
8.1. Pill product	186
8.2. Beverage product	186
<b>Chapter 4. Achievement and controbution to related field</b>	<b>189</b>

Chapter 5. Application plan of the results .....	199
Chapter 6. International trend of food supplement .....	200
Chapter 7. Reference .....	207

# 목 차

요약문 .....	3
영문요약문 .....	9
<b>제 1 장 연구개발과제의 개요 .....</b>	<b>31</b>
1. 연구의 목적 .....	32
2. 연구개발의 필요성 .....	32
3. 연구범위 .....	34
4. 앞으로의 전망 .....	35
5. 기술도입의 타당성 .....	35
<b>제 2 장 국내외 기술개발 현황 .....</b>	<b>36</b>
<b>제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과 .....</b>	<b>37</b>
<b>제 3-1 장 연구개발수행내용 .....</b>	<b>37</b>
<b>제 1 절 시료의 용매 추출 및 농축 .....</b>	<b>37</b>
1. 시료의 용매 추출 및 농축 .....	37
1.1. 시료 확보 및 활성성분추출 .....	37
1.2. 시료의 농축 및 수율 측정 .....	38
1.3. 시료의 일반성분 .....	39
1.4. 시료의 무기질 및 비타민 분석 .....	39
1.5. 세포시험용 검액 제조 .....	39
<b>제 2 절 세포계 골강화 활성 시스템 및 검색 .....</b>	<b>40</b>
1. 골 활성 세포계 시험법의 구축 및 골강화 활성 검색 .....	40
1.1. Positive control의 세포 생존능 측정 .....	40

1.2. positive control의 Alkaline phosphatase(ALP) 활성 측정	41
1.3. 국산 및 외산 품종 추출물의 세포 생존능 측정	41
1.4. 국산 및 외산 품종 추출물의 Alkaline phosphatase(ALP) 활성 측정	41
1.5. 건강 기능성 조성물(KY)의 세포 생존능 및 ALP 활성 측정	41
2. 파골세포 억제활성	41
2.1. 파골세포의 분리 및 배양	41
2.2. 파골세포의 억제 활성	42
2.3. 파골세포 생성에 미치는 영향	42
2.4. 파골세포 표지효소 TRAP 활성도에 미치는 영향	42
3. 골강화 성분의 이화학적 특성	43
3.1. 온도에 따른 골세포 활성화 변화	43
3.2. pH에 따른 골세포 활성화 변화	43
제 3 절 시료 및 조성물의 동물계 혈액인자 및 뇨대사 활성	43
1. 실험동물 및 식이	43
2. 난소적출(ovariectomy)	44
3. 체중, 식이섭취량 및 식이효율	46
4. 혈액, 장기 시료	46
5. 혈액 분석	46
5.1. GOT와 GPT활성 측정	46
5.2. 혈액의 지질 성분 분석	46
5.3. 혈액의 ALP, Osteocalcin 분석	47
5.4. 혈액의 Ca, inorganic P 분석	48
6. 뇨시료 수집 및 뇨 지표인자 분석	48
6.1. Creatinine과 DPD 측정	49
6.2. 뇨의 Ca, P 분석	49
7. 대퇴골 및 경골의 변화 측정	49

7.1. 대퇴골 및 경골의 발골 .....	49
7.2. 물리적 변화도 측정 .....	49
1) 골의 무게, 길이 및 두께의 측정 .....	49
2) 골의 BMD, BMC 및 Area의 측정 .....	50
3) Breaking strength, Displacement 및 Stiffness .....	6
4) 조직병리학적 검사 .....	51
① 대퇴골 뼈지주 .....	51
② 뼈 파괴 세포의 출현 정도 .....	51
③ 골수 내 지방 축적 .....	51
5) 발골 시료의 무기질 분석 .....	51
제 4 절 유효성분의 분석 .....	52
1. 시약 .....	52
2. 기기 .....	53
3. 실험 방법 .....	53
3.1. 용매 분획 .....	53
3.2. 비색법을 이용한 Total Phenolic Compounds 함량 측정 .....	53
① 추출 및 용매 분획 .....	53
② 실험방법 .....	54
3.3. 비색법을 이용한 Total Flavonoids 정량 .....	54
① 실험방법 .....	54
3.4. GC를 이용한 phytoestrogen 정량 분석 .....	54
① 실험방법 .....	54
3.5. 항산화 효과 분석 .....	55
① 시료 제조 .....	55
② $\alpha$ - $\alpha$ -Diphenyl- $\beta$ -picrylhydrazyl (DPPH) radical 소거 활성 .....	55
③ Superoxide dismutase (SOD) 유사활성 .....	56



④ ABTS radical 소거활성 .....	56
제 5 절 활성성분의 분리 및 구조 동정 .....	56
1. 기기 및 시약 .....	56
2. 활성성분 탐색용 시료 .....	57
3. 활성물질의 분리 .....	57
3.1. 용매 분획 .....	57
3.2. ergosterol 화합물의 분리 .....	58
3.3. 페놀화합물의 분리 .....	58
제 6 절 활성성분의 소재화 활용 기술 .....	59
1. 골강화 활성성분의 수용액내 분산 .....	59
1.1. 유화제의 선정 .....	59
1.2. 분산도의 측정 .....	59
2. 상황시료 (PL) 나노에멀전 제조 .....	61
2.1. Particle size 측정 .....	61
2.2. 저장 안정성 .....	61
3. 상황시료 (PL) 나노체 제조 .....	62
3.1. 재분산성 .....	62
4. 상황시료 (PL) 마이크로캡슐 제조 .....	62
5. 복합분체의 제조 .....	62
5.1. 재료 .....	62
5.2. 방법 .....	63
1) 상황버섯의 미분쇄 .....	63
2) 상황버섯 복합분체화 공정 .....	63
3) SEM을 이용한 분체의 표면분석 .....	63
4) 입도분석 .....	63

5) 영상현미경을 이용한 표면분석 .....	64
6. 유동층 코팅 (fluid bed) 기기를 이용하여 과립화 및 코팅 공정 .....	64
6.1. Granulation .....	65
6.2. Coating .....	65
7. 환 및 음료제품의 적용 .....	66
제 7 절 통계처리 .....	66
<b>제 3-2 장 연구개발 수행 결과 .....</b>	<b>67</b>
제 1 절. 시료의 용매 추출 및 농축 .....	67
1. 골강화 활성분획의 탐색 .....	67
1.1 시료의 추출수율 및 성분분석 .....	67
1) 시료의 농축 수율 및 농도 .....	67
1.2. 시료의 일반성분 .....	67
1.3. 시료의 무기질 및 비타민 분석 .....	68
제 2 절 세포계 골강화 활성 시스템 및 검색 .....	69
1. 골 활성 세포계 시험법의 구축 및 골강화 활성 검색 .....	69
1.1. 양성대조구 (Positive control)의 세포 생존능 측정 .....	69
1.2. 양성대조구의 Alkaline phosphatase(ALP) 활성 측정 .....	70
1.3. 상황버섯 추출물의 세포 생존능 측정 .....	72
1.4. 상황버섯 추출물의 Alkaline phosphatase(ALP) 활성 측정 .....	73
1.5. 국산 및 외산 품종의 조골세포 증식활성 .....	74
2. 파골세포 억제활성 .....	76
2.1. 파골세포의 분화 .....	76
2.2. 파골세포의 억제활성 .....	76
2.3. 파골세포 생성에 미치는 영향 .....	77

3. 골강화 성분의 이화학적 특성 .....	79
3.1. 온도에 따른 골세포 활성화 변화 .....	79
1) 가열온도의 영향 .....	79
2) 가열시간의 영향 .....	81
3.2. pH에 따른 골세포 활성화 변화 .....	83
3.3. 상황버섯 추출물의 뼈세포내 작용 특성 .....	85
제 3 절 조성물의 동물계 뼈강화 활성 .....	86
1. 난소절제 실험동물의 식이 효율 및 체중 변화 .....	86
2. 난소절제 실험동물의 장기무게 변화 .....	88
3. 혈액내 지표 검색 .....	89
3.1 GOT와 GPT활성 .....	89
3.2 혈액의 지질 성분 분석 .....	90
3.3 혈액의 ALP, Osteocalcin 분석 .....	91
3.4 혈액의 Ca, P 분석 .....	93
4. 뇨대사 지표검색 .....	94
4.1 Creatinine과 DPD 측정 .....	94
4.2 뇨의 Ca 및 P 분석 .....	96
5. 대퇴골 및 경골의 물리적 변화도 측정 .....	97
5.1 골의 무게, 길이 및 두께 측정 .....	97
5.2 골의 BMD (bone mineral density) 측정 .....	99
5.3 골의 강도 및 탄성도 .....	99
5.4 대퇴골의 조직병리적 표본분석 .....	101
5.5 발골 시료의 무기질 분석 .....	103
제 4 절 유효 성분의 분석 .....	104
1. 용매 분획 .....	104

2. 상황버섯 추출물의 물질 profile 분석 .....	104
3. 비색법을 이용한 Total Phenolic Compounds 함량 측정 .....	106
4. 비색법을 이용한 Total Flavonoids 정량 .....	106
5. GC를 이용한 phytoestrogen 정량 분석 .....	107
6. 항산화효과 .....	111
6.1. DPPH radical 소거능 .....	111
6.2. SOD 유사활성 .....	112
6.3. ABTS radical 소거 활성 .....	113
제 5 절 활성성분의 분리 및 구조동정 .....	114
1. 용매분획의 증식능 및 골강화활성 .....	114
2. 활성성분의 분리 및 활성분획의 선발 .....	115
3. 상황 뼈강화 활성성분의 구조 동정 (1~10) .....	119
4. 활성성분의 수율 .....	148
5. 단일 활성성분의 특성 .....	149
6. 단일 활성성분의 골 강화 활성 .....	151
제 6 절 활성성분의 소재화 활용기술 .....	156
1. 상황 버섯 소재의 골강화 제품화를 위한 Formulation .....	156
2. 액상제품 개발을 위한 골강화 활성성분의 수용액내 분산 .....	157
2.1. 상황버섯추출물의 수용액내 분산 .....	157
2.2. 상황조성물의 수용액내 분산 .....	160
3. 상황시료(PL) 나노에멀전의 제조 .....	164
3.1. Particle size의 측정 .....	164
3.2. 저장 안정성 .....	165
4. PL 나노체 제조 .....	165
4.1. 재분산성 .....	166

5. 상황시료 (PL) 마이크로캡슐 제조 .....	166
6. 상황버섯을 이용한 복합분체의 제조 .....	167
6.1. Planetary mill을 이용한 상황버섯의 미분쇄 .....	168
6.2. 감자전분-상황버섯 복합분체의 제조 .....	170
6.3. Cellets-상황버섯 복합분체의 제조 .....	173
6.4. 열처리한 곡류-상황버섯 복합분체의 제조 .....	177
7. 과립화 및 코팅 .....	184
7.1. Granulation .....	184
7.2. coating .....	185
8. 환 및 음료 제품에의 적용 .....	186
8.1. 환 제품의 적용 .....	186
8.2. 음료 제품의 적용 .....	187
<b>제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도 .....</b>	<b>189</b>
1. 상황버섯 다기능 활성 구명 .....	189
2. 국산 상황버섯의 우수성 .....	189
3. 상황버섯 뼈강화 활성의 과학적 검증 .....	189
4. 상황 뼈강화 유효성분 및 이화학적 특성 .....	189
5. 상황 뼈강화 활성성분의 소재화 .....	190
6. LOHAS 사회용 제품의 개발 .....	190
7. 연구 성과물 .....	190
<b>제 5 장 연구개발결과의 활용계획 .....</b>	<b>199</b>
1. 기술적 측면 .....	199
2. 경제 · 산업적 측면 .....	199
3. 활용방안 .....	199

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보 ..... 200

제 7 장 참고 문헌 ..... 207



## 제 1 장 연구개발과제의 개요



상황버섯의 학명은 *Phellinus linteus*이며 담자균문 (Basidiomycotina), 민주름버섯목(Aphylliphorales), 소나무비늘과(Hymenochaetaceae)의 진흙버섯속 (*Phellinus*)에 속하는 백색부후균이다. 뽕나무(*Morus alba*, Moraceae) 줄기에 자생하며 샷갓표면을 제외하고는 모두 황색이므로 상황(桑黃)이라고 불리고, 한국명은 목질진흙버섯이다. 우리나라 분포지역은 강원도며 자실체는 버섯자루가 없고 전체가 목질화 되어 있는 편구형 또는 말굽 모양을 하고 있으며 갈색 암 회갈색 또는 흑색을 띤다. 어린 버섯에는 약간의 털이 있으나 성장하면서 없어지며 윗면은 거북이 등 모양을 하며 껍질은 없다. 어릴 때는 노란색으로 싹을 띄우며 힘차게 성장 할 때는 황금색으로 빛을 발하고 버섯의 나이테는 성장 환경 및 온도 변화에 따라 일 년에 많이 형성될 수도 있다. 균모는 반원형, 편평형 또는 둥근산형 내지는 말굽형으로 너비 6-12cm, 두께 2-10cm이다. 종류는 250여 가지가 있으며 뽕나무, 활엽수의 고사목 또는 부분 고사된 곳에 기생하고 있으나 각각 다른 종류이며 맛에도 많은 차이가 있다. 최근 국내에서 대량 인공 배양에 성공하여 재배하며 한국산 자생 상황은 맛이 없는 것이 특징이다. 상황버섯은 항암, 면역 활성이 알려져 있으나 다기능 건강기능은 조사, 연구된바 없다. 웰빙시대에 있어서 사망성 질병 억제와 더불어 골관계 등 개인의 활동성과 국가 생산성에 영향을 미치는 건강활성이 주목된다. 따라서 면역기능 등을 바탕으로 국산 상황버섯 (참여기업 : 영농조합 버섯돌이삼형제)의 뼈기질 강화활성을 시험하고 소재화하여 다기능 활성의 과학적 구명, 소재의 활용 및 생산농가의 경제적 향상에 기여하고자 하였다.



## 1. 연구의 목적

- 1) 국산 상황버섯의 골강화 활성 검증
- 2) 국산 상황버섯의 골강화 활성 물질 구성 성분 구명
- 3) 활성 성분의 추출 및 활용
- 4) 상황버섯을 이용한 골강화 제품의 기초 설정

## 2. 연구개발의 필요성

### 1) 기술적 측면

- 상황버섯(*Phellinus linteus*)은 중국의 「약성론」 상신(桑臣), 상이(桑耳)라는 이름으로 처음 수록된 이래 한국, 아시아, 호주, 필리핀, 북아메리카 등에 자생하는 것으로 알려져 왔음.

- 본초강목, 동양의학대사전, 중국본초도감 등의 옛 문헌에 의하면 전통한약으로 자궁출혈 및 대하, 월경불순, 해독작용, 장출혈, 이질 등의 각종 질병 치료약으로 이용되며, 위장기능을 활성화시키고 해독작용을 하는 것으로 기록되어 있음.

- 일본 국립 암연구소의 Ikegawa 등(1968)이 버섯 자실체 추출물을 sarcoma 180 암세포에 대한 항종양 활성을 측정한 결과, 상황버섯이 식용버섯 및 약용버섯 27종 중 최고라고 발표하였음. 국내의 경우 공 등, 송 등은 NK 세포기능에 작용하여 숙주의 비특이적 면역능 증강과 항암활성을 발표하였으며, 마우스에 투여한 결과 LD<sub>50</sub>은 1,500 mg/kg 이상으로 안전성이 있다고 보고하였음. 이 등은 간 microsome에 비효소적인 방법으로 유도시켜 지질과 산화 억제율을 측정한 결과 산화억제 활성을 보고하였음.

- 성분으로는 다당류를 비롯해 agaricic acid가 약4% 그리고 lactic acid, 포화지방산(주로C22, C24), 포화탄화수소(C23, C25), 아미노산(glycine, aspartic acid), triterpenoid, oxalic acid 및 ergosterol, 당분해 효소 등이 함유되어 있음. 항암 및 면역증강효과 등의 약리활성을 나타내는 물질은 고분자 다당류로서 특이적 구조를 갖는 β-glucan성 다당류로 알려져 있음.

- 상황의 생리적 기능성은 주로 면역, 항암 관련에 대한 보고가 집중되어 있으며 기타 성인병 관련 활성은 미미함. 최근 성인질환 가운데 남녀노소를 불문하고 발생하는 골다공증은 개인의 활동력 및 국가의 생산성을 저하시켜 예방 중요성이 증대

하고 있음. 현재 칼슘중심의 단순 배합제제나 Fluoro 또는 sterol 화합물이 치료제로 사용되고 있으나 부작용이 나타남.

- 본 연구자는 골다공증 억제 활성을 측정할 수 있는 인간유사 세포, 동물 시험 시스템을 갖추고 있으며 생리활성 성분을 분리, 정제한 경험이 있음.

- 골기질 강화 활성성분은 미네랄 외에도 terpenoid, flavonoid, sterol 등의 phytoestrogen이 역할을 하는 것으로 알려져 있으며 상황버섯은 자실체의 경우 저분자 물질을 다량 함유하고 있음.

- 예비실험에서 조골세포를 대조구 대비 10%이상 활성화하여 가능성을 발견하였으므로 활성을 세포, 동물계에서 다각도로 명확히하고 조골과 파골의 상호 연관성 및 물질의 실체를 확인하는 것이 필요함.

- 참여기업에서는 뼈기질 활성화에 이로운 효능 확인, 활성성분의 실체, 활성성분의 추출기술과 활용, 가공기술 등의 개발을 필요로 함.

## 2) 경제·산업적 측면

- 상황버섯은 균이 약하여 재배가 힘들었지만 1997년 지면재배에 성공한 이후 참여기업인 (주)머쉬가이에서 상황포트균 개발과 함께 땅에서 키우지 않고 공중에서 키우는 독특한 방식의 "공기완전노출재배방법"을 개발하였음. 이어서 가장 자연상황버섯에 가까운 순환행거식 재배법을 새롭게 개발하여 대량 생산의 길을 열었음.

- 상황버섯은 현재까지 항암, 면역, 항산화에 대한 연구만이 집중적으로 연구되어 왔으며 기타 활성연구는 미미 하였음. 본 참여기업에서는 상황을 자연에 가깝게 대량 생산에 성공한 이후 성인의 뼈 강화 등 성인병 억제 효과의 탐색을 필요로 함.

- 유럽과 미국의 경우 1.2 Billion(\$U.S.) ~ 2.4 Billion(\$U.S.)의 비용이 직접 치료에 사용되며 이로인한 사회적 손실 (간접비)은 직접비의 10%(미국의 경우 약 200억 달러)를 상회할 만큼 노령화 인력과 국가의 활동성에 미치는 영향은 심각함.

- 골다공증의 억제는 anabolic steroid, fluoro compound 등의 치료제나 대증요법에 의존하나 약물로는 치료가 불가능할뿐만 아니라 심장질환 및 암 발생 위험 등 부작용도 심각함. 따라서 안전한 천연물을 이용하여 예방하는 방법이 최선임.

- 약물 일색인 국내 3,500억, 국외 250억불에 이르는 골강화 예방 및 치료 시장에 참여하기 위하여 과학적인 활성확인과정 및 성분구명, 활용기술이 이루어져야함.

- 최근에 식품으로 허용된 상황버섯의 역할과 용도를 다양화하고 암 억제외에 다기능 작물로서 효능과 상품성을 제고하여 세계 시장에 진출하기 위한 교두보의 일환이 요구됨.

### 3) 사회·문화적 측면

- 웰빙(참살이) 사회의 도래와 함께 사망성 질환의 억제와 더불어 골다공증 억제 등 성인의 활동력 유지에 대한 관심이 증대함.

- 골량의 소실은 30대부터 시작되며 골관계 질환은 남녀 모두에게 생리적으로 hormone의 변화와 함께 필연적으로 찾아오는 자연노화 현상임. parathyroid hormone(PTH) 등 전신성 호르몬과 estrogen, testosterone 등 steroid계 호르몬의 변화에서 촉발되나 최근에는 운동부족, 스트레스, 무리한 감량 등으로 골다공증이 빈발하여 젊은층에서도 발생함.

- 평균수명 및 노년 인구의 증가로 미래 국가의 생산성이 노년인구의 활동력에 좌우할 만큼 중요함. 그러나 노년기 발생자의 10%가 골반파열로 사망할 만큼 심각하여 사망률이 4~8배 증가함. 골약화는 침묵의 병이라 일컬어지는 것처럼 만성적으로 진행되는 점과 생체노화 현상의 하나로 받아들이기 때문에 예방이나 치료시기를 놓치는 경우가 많음.

- 천연물의 생체내 뼈약화 예방을 발굴하여 안전하면서도 활성이 우수한 뼈강화 건강식품을 보급하여 활동력과 생산성에 기여하여야 함.

### 3. 연구범위

#### 1) 국산 상황버섯의 세포계 뼈강화 활성 검증 및 이화학적 특성

가. 시료의 확보 및 추출

나. 세포계 골강화 활성 시스템 구축

다. 뼈강화 성분의 이화학적 특성

라. 뼈강화 추출물의 성분 특성 조사

#### 2) 상황버섯의 동물계 뼈강화 활성 및 성분 특성

가. 동물계 뼈강화 활성 시스템 구축

나. 시료의 투여 및 기초대사

다. 상황버섯의 뼈강화 활성 검색

라. 활성성분의 분리

3) 상황버섯 뼈강화 활성 물질의 소재화 기술 개발

가. 상황버섯의 뼈강화 소재화 활용기술

나. 골강화 건강 기능성 시제품 제작

다. 분리물로부터 골강화 활성성분의 정제

4. 앞으로의 전망

- 상황버섯의 뼈강화 효능 및 성분 확인으로 허가 등의 시험지표 기초 제공
- 활성의 확인으로부터 홍보의 범위 확대 및 생산농가의 매출 증대
- 국산 상황버섯의 활성 및 소재화로부터 국제경쟁력 확보
- 국내 우수 식물자원의 보호 및 권리확보
- 국민의 뼈강화 소재 발굴

5. 기술도입의 타당성

- 상황버섯의 원료 생산기술은 참여기업이 최고의 경쟁력을 갖고 있으며 뼈강화 효과는 국내에서 처음으로 검증 및 응용되는 것으로서 기술도입의 필요성은 없다.

- 본 과제에서 기술이 개발될 경우 미국, 중국 등 일부국가의 소규모 유통을 넘어서서 충분한 경쟁력을 갖출수 있으며 연구결과 발표로 범조성이 이루어질 경우 참여기업의 매출과 국제 경쟁력이 제고할 것으로 판단하였다.

## 제 2 장 국내외 기술개발 현황

○ 식물을 활용한 골다공증 예방과 치료는 일본의 경우 잎차 등 식물의 flavonoid를 이용한 소재가 다소 개발되어 있으며 국내에서도 한약재가 골다공증에 효과적일 수 있다는 보고가 있으나 현재 식품의 경우 콩외에 뚜렷한 연구가 적으며 콩의 경우도 정확한 역할은 밝혀져 있지 않다.

○ 뼈강화는 단순 검색보다는 조골과 파골의 균형과 길항을 측정해야하나 경제적, 시간적으로 검색 조건과 활성확인이 난이하기 때문에 다양한 식물군의 검색이나 다각적 활성확인이 이루어지지 않았음. 본 연구자는 세포계(인간유사 조골 및 파골세포) 및 실험동물을 이용한 골다공증 억제 시험계가 준비되어 있으며 활성성분의 분리, 정제 연구를 수행하였다.

○ 세계적으로 골다공증이 고령화 사회의 중요한 의료문제로 대두됨에 따라 예방 및 치료제 개발에 많은 연구가 진행되어 수많은 약제들이 개발되었으나 부작용등으로 인하여 사용이 제한되어 있는 상태이다.

○ 임상에서 현재 사용되는 약물로는 골형성을 촉진과 골흡수 차단 약제로 나눌 수 있는데, 주로 calcitonin 등 thyroid hormone류와 steroid, fluoro compound 등의 화학제가 있으나 모두 심각한 한계점을 가지고 있다.

○ 골강화 관련 건강식품은 작용기작 등을 고려한 과학적인 제품보다는 인산칼슘을 사용한 단순 배합제제만이 판매되고 있는 실정임. 부작용을 낮추면서도 이미 진행된 골관절계 질환의 예방 및 치료를 위한 새로운 방법이 필요하며, 천연물을 이용한 골 강화작용이 해결방법이 될 수 있다고 판단한다.

○ 상황버섯은 전국적으로 500여 농가들이 전문적으로 재배하는 것으로 추정되고 있으며 연간 500여톤이 생산, 유통되어 킬로그램당 30만원에서 80만원으로 소비자 가격 차이가 나고 있어 품질등급 등 유통 문제점을 안고 있음. 상황버섯은 현재 한의원에서 일부 처방으로 미미하게 사용되고 있으며, 특정 암환자에게 민간거래 식으로 유통되고 있다.

○ 상황버섯은 최근 식품공전에 부원료로 등록되어 원료배합시 기준으로 50% 미만 사용 가능하도록 명시되어 있음. 상황버섯의 식품화 추세에 맞추어 다양한 기능성을 구명하고자 한다.

○ 본 연구자는 상황버섯의 성인병 억제 활성을 탐색하고 효과적인 활용기술을 개발하는데 경험적으로 준비되어 있다고 판단함. 상황버섯의 뼈강화 활성과 활성성분의 구성 및 효과적인 소재활용기술 등을 처음으로 구명하여 참여업체(영농조합)의 제품화에 기여하고자 한다.

## 제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

### 제 3-1 장 연구개발수행내용

#### 제 1 절 시료의 용매 추출 및 농축

##### 1. 시료의 용매 추출 및 농축

###### 1.1. 시료 확보 및 활성성분추출

참여기업(진주, 상황버섯영농조합법인)으로부터 순수국산시료를 확보하여 추출하였다. 국산 시료와 비교하기 위하여 중국산과 캄보디아산을 시중에서 구입하여 실험에 이용하였다. 제품화의 기초로서 조성물 시료를 준비하였다. 제조를 위한 이온화 칼슘과 casein phospho peptide(CPP Type-12P)은 (주)MSC(Korea)에서 제공받았고, 스테아린산 마그네슘과 vitamin D<sub>3</sub>는 (주)다송식품(Korea)에서 제공받았으며, 제3인산 칼슘은 (주)광일(Korea)에서 제공받아서 사용하였다. 상황버섯을 기초원료로 뼈강화 효과를 갖는 건강 기능성 조성물(KY군)을 Table 1과 같이 조성하였다.

Table 1. Composition of base material for osteo-active product

KY	
성분	함량(%)
상황버섯	24.0
Factor	42.0
Ca	20.0
P	10.0
Mg	1.8
Casein phospho peptide	2.0
Vitamin D <sub>3</sub>	0.2
Total	100.0

Factor는 전통적으로 뼈강화 효능으로 알려진 식물추출물이며, Ca, P, Mg, Casein phospho peptide, Vitamin D<sub>3</sub>를 각각 5.25% 함량으로 첨가하였다. 따라서 골강화 세포 실험을 위한 시료군은 국산 상황버섯 추출물, 일반식품으로서 골강화 효과가 있는 것으로 알려진 대두 (soybean) 추출물, 외산 상황버섯 (중국산, 캄보디아산), 골건

강 조성물(KY)군이며, 동물시험계 (ovariectomized rat) 실험을 위한 시료군으로는 sham군, control군, PL군 (상황버섯 추출물 식이군), KY군 (조성물 식이군)의 4개군으로 하였다.

#### 1.2. 시료의 농축 및 수율 측정

상황버섯의 추출은 저분자 및 고분자를 광범위하게 포함하기 위하여 에탄올:물 (8:2) 용액으로 추출하였다. 상황버섯을 80% 에탄올로 30℃에서 24시간 동안 추출하고 Whatman No. 42 여과지를 사용하여 여과한 후, 40 ℃이하에서 감압 농축하였다. 추출 및 농축물의 무게를 측정하고 수율을 구하였다.

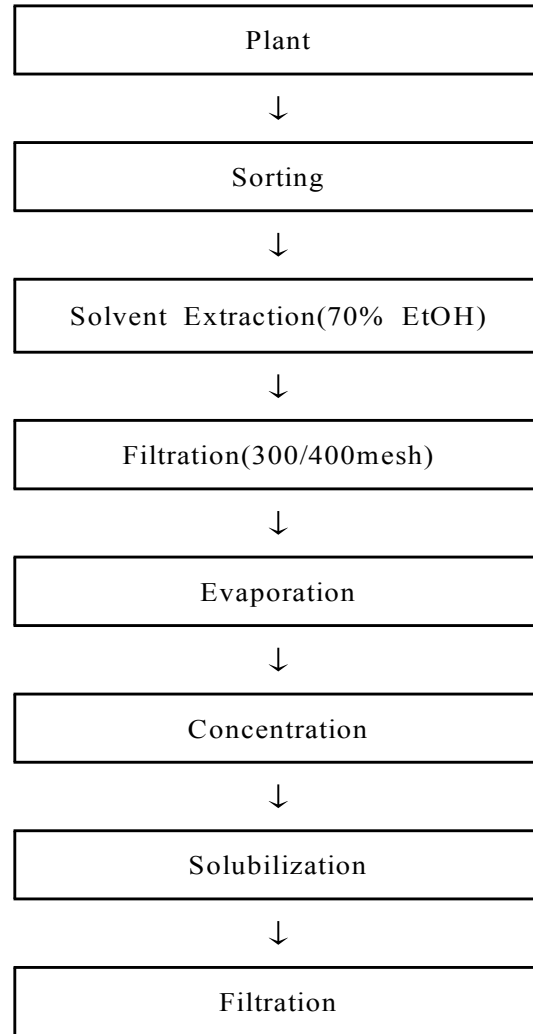


Fig 1. Scheme for sample extraction and concentration

### 1.3. 시료의 일반성분

본 실험에 사용된 상황버섯을 AOAC법에 따라 일반성분 분석하였다.

### 1.4. 시료의 무기질 및 비타민 분석

상황버섯의 무기질 및 비타민 함량을 각각 유도결합 플라즈마 원자방출 분광법



(Inductively Coupled Plasma-Atomic Emission Spectrophotometer, Jobin Yvon Activa, France, ICP-AES)과 고속액체크로마토그래피법으로 분석하였다.

#### 1.5. 세포시험용 검액 제조

상황버섯을 80% 에탄올로 30℃에서 24시간 동안 추출하고 Whatman No. 42 여과지를 사용하여 여과한 후, 40℃ 이하에서 감압 농축하고 이를 동결 건조하여 분말을 얻었다. 본 실험에 사용 시 DMSO에 용해한 후 희석하여 농도별로 사용하였고, DMSO의 최종농도는 0.1% 이하로 하였다.

## 제 2 절 세포계 골강화 활성 시스템 및 검색

### 1. 골 활성 세포계 시험법의 구축 및 골강화 활성 검색

#### 1.1. Positive control의 세포 생존능 측정

Mosmann(1978)의 방법에 따라  $2 \times 10^4$  cells/well이 되도록 조절하여 각 농도별 sample과 함께 96 well plate에 분주하고 2일간 배양하였다. 배양액으로만 세포배양한 시험군을 대조군으로 하고, sample 군은 농도별( $1 \times 10^{-1} \sim 10^{-8}$  mg/ml)로 적용하였으며 positive control로는 NaF(Sigma Co., U.S.A)와  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (Sigma Co., U.S.A), 그리고 식품 자체 control로 대두를 사용하였다. 분석당일 MTT(3-[4,5-dimethyl-thiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide, Sigma Co., U.S.A) solution(0.5 mg/ml. final conc.)을 well당 20  $\mu$ l씩 적용시킨 후 4시간동안 배양하고 배양액을 제거한 후 dimethylsulfoxide(DMSO)를 150  $\mu$ l씩 넣어 5분간 방치하면서 MTT formazan을 용해하였으며, 5분후 ELISA reader로 흡광도(540nm, 25℃)를 측정하여 control % 비로 비교하였다.

#### 1.2. positive control의 Alkaline phosphatase(ALP) 활성 측정

인간 유사 조골세포주인 Saos-2 cell에서 조골세포의 활성을 나타내는 지표로 사용되는 Alkaline phosphatase(ALP) 증가활성을 측정하였으며 조골세포에서 ALP의 활성을 증가시키는 것으로 보고된 NaF와 식품 대두를 positive control로 사용하였다.

Majeska(1982)등의 방법에 따라 무색의 p-nitrophenylphosphate를 노란색의 p-nitrophenol과 phosphate로 분해를 촉진시키는 ALP 활성을 측정하였다. 먼저 MTT 실험과 같이 Saos-2 cell을  $2 \times 10^4$  cells/well이 되도록 조절하여 각 농도별 sample과 함께 96 well plate에 분주하고 48 시간 배양하였다. 배양액만으로 한 세포군을 대조군으로 하고 sample 군은 농도별( $1 \times 10^{-1} \sim 10^{-8}$  mg/ml)로 적용하였으며, NaF,  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ , 대두를 positive control로 사용하였다. 배양액은 48시간 배양 후 Ice 상에서 10% Triton x-100/in PBS(final conc.) 5  $\mu\text{l}$ /well. 1% Triton x-100/in PBS(final conc.) 300  $\mu\text{l}$ /well를 넣어 용해시킨 후 sonication(15 sec)하고 원심분리(14,000 rpm, 20min, 4°C)하였다. 원심분리 후 상층액을 4  $\mu\text{l}$ 씩 96 well plate에 놓고 ALP test kit reagent(Thermo Trace kinetic method kit)를 200  $\mu\text{l}$ 씩 첨가한 후 microplate reader(405 nm)를 이용하여 1분간 반응시킨 후 2분간 측정하여 control % 비로 비교하였다.

### 1.3. 국산 및 외산 품종 추출물의 세포 생존능 측정

국내산 및 중국, 캄보디아산 상황버섯 추출물의 세포증식효과를 Saos-2 cell을 이용하여 비교하였다. 실험 방법은 positive control의 세포 생존능 측정법과 동일하였다.

### 1.4. 국산 및 외산 품종 추출물의 Alkaline phosphatase(ALP) 활성 측정

국내산 및 중국, 캄보디아산 상황버섯 추출물의 인간유사 세포계 골기질 강화 활성을 시험하고 ALP 활성으로 나타내었다. 실험 방법은 positive control의 ALP 활성 측정법과 동일하였다.

### 1.5. 건강 기능성 조성물(KY)의 세포 생존능 및 ALP 활성 측정

Table 1. 과 같이 제조한 건강 기능성 조성물의 세포 생존능 및 ALP 활성 측정을 positive control과 동일한 방법으로 실시하였다.

## 2. 파골세포 억제활성

### 2.1. 파골세포의 분리 및 배양

(M-CSF dependent bone marrow macrophage, MDBM)

마우스 골수세포를 분리하기 위해 웅성 마우스의 대퇴골과 경골을 적출하고 연조직을 제거하였다. 한쪽 끝의 골수강에 0.1% collagenase, 0.05% trypsin 및 0.5 mM EDTA가 포함된 효소용액을 주사하여 골수를 꺼낸 후 30분간 교반하여 골수세포를 모아 10% FBS가 포함된  $\alpha$ -minimum essential medium ( $\alpha$ -MEM)에 24시간 배양한 후 미부착세포를 모았다. 파골세포의 전구세포가 되는 미부착세포를 96 well 배양접시에 well당  $6 \times 10^4$ 개의 세포가 되도록 분주하여 배양하였다. 배양하는 동안 10 ng/ml의 macrophage-colony stimulation factor (M-CSF)와 50 ng/ml receptor activator of NF $\kappa$ B ligand (RANKL)이 포함된 배지에 시료를 첨가하여 배양하였다.

## 2.2. 파골세포의 억제 활성

파골세포의 형성후 상황버섯의 파골세포 분화억제 활성을 precursor의 억제활성과 multinucleate 분화억제로 나누어 조사하였다.

## 2.3. 파골세포 생성에 미치는 영향

파골세포 전구세포를  $6 \times 10^4$  cells/well 씩 96-well plate에 분주하고 3일동안 M-CSF가 첨가된  $\alpha$ -MEM에 배양하였다. 그 후 RANKL을 첨가하여 파골세포의 분화를 유도하고 이 때 시료를 함께 첨가하였다. RANKL과 시료를 첨가한 후 6일간 배양하고 TRAP stain kit를 이용하여 파골세포를 고정 및 염색하였다. 배양시 3일마다 배지를 교환하였다. 현미경 하에서 염색된 파골세포 중 핵의 수가 3이상인 세포들을 계수하였다.

## 2.4. 파골세포 표지효소 TRAP 활성도에 미치는 영향

파골세포 전구세포를  $6 \times 10^4$  cells/well 씩 96 well plate에 분주하고 3일동안 M-CSF가 첨가된  $\alpha$ -MEM에 배양하였다. 그 후 RANKL을 첨가하여 파골세포의 분화를 유도하고 이 때 시료를 함께 첨가하였다. RANKL과 시료를 첨가한 후 6일간 배양하였다. 배양이 끝난 후 세포를 0.1% Triton X-100/saline으로 처리하여 세포 처리액의 일정량을 TRAP 효소 활성측정에 사용하였으며, 기질인 100 mM의 p-nitrophenyl phosphate (PNPP)와 tartrate 용액 존재하에 0.1M sodium citrate buffer (pH 4.9)와 함께 37°C에서 10분간 반응시켜 기질인 PNPP로부터 유리되어 나

은 p-nitrophenol(PNP)의 양을 405 nm에서 비색 정량하였다. 세포 처리액의 일정량은 Lowry 변법을 이용하여 단백질을 정량하였고 TRAP 활성을 계산하였다. (activity : umol substrate cleaved/min/mg protein)

### 3. 골강화 성분의 이화학적 특성

#### 3.1. 온도에 따른 골세포 활성화 변화

상황버섯 골기질 강화 활성성분의 가공중 안정성을 조사하기 위하여 활성이 높았던 추출물 ( $1 \times 10^{-2}$  mg/ml)을 대상으로 가열온도와 가열시간에 따른 골세포 증식능과 효소활성도를 조사하였다.

#### 3.2. pH에 따른 골세포 활성화 변화

상황버섯 뼈기질 강화 성분의 체내활성을 간접 시험하고자 산성, 중성, 염기성 조건에서 추출물의 pH 변화에 따른 골세포 증식능과 효소활성도를 조사하였다

## 제 3 절 시료 및 조성물의 동물계 혈액인자 및 노대사 활성

### 1. 실험동물 및 식이

생후 7주령 된 Sprague-Dawley계 암컷 흰쥐(180~200 g)를 (주)중앙실험동물(Seoul, Korea)에서 분양 받아 사용하였다. 사육온도는  $22 \pm 2^\circ\text{C}$ , 습도는  $50 \pm 5\%$ , 명암주기는 12시간으로 조절하였고, 1주일간 실험환경에 적응시킨 후 실험 식이를 제공하였으며, 물과 실험 식이는 자유롭게 섭취하도록 하였다. 실험군은 총 4군으로 AIN-93M 기본식이를 공급하는 위군(sham)과 대조군(control), 골다공증 예방용 건강 기능성 조성물 투여군(PL군, KY군)으로 나누었으며 군 당 10마리의 실험동물을 사용하였다. 실험식이는 Table 2과 같이 AIN-93M 기본식이에 조성물을 건조중량 대비로 2%를 첨가하여 제조하였다.

Table 2. Composition of the experimental diets(g/kg diets)

Components	sham	control	KY
Corn Starch	450	450	450
Casein High Nitrogen	140	140	140
Sucrose	100	100	80
Soybean Oil	40	40	40
Fiber Cellulose FCC	50	50	50
Ca-Deficient 93M Salt Mix	40	40	40
AIN-93Vx Vitamin Mix	10	10	10
Dyetrose	150	150	150
L-Cystine	5.5	5.5	5.5
t-BHQ	0.5	0.5	0.5
Choline Bitartrate	14	14	14
Samples	0	0	20

## 2. 난소적출(ovariectomy)

12주령된 암흰쥐를 대상으로 난소적출(卵巢剔出)실험을 수행하였다. 난소적출은 에틸에테르(ethyl ether)로 흰쥐를 마취시킨 다음 요각으로부터 10~15 mm전방, 척추로부터 15~20 mm 하방부위의 피부를 10~15 mm정도 절개하였다. 그 다음 절개구를 통하여 가위의 둔연이나 핀셋으로 피부가 자유로이 움직일 수 있도록 복벽과 분리시킨 다음 복벽을 5~7 mm정도 근심유의 방향으로 절개하여 바로 밑의 난소를 싸고 있는 백색의 지방조직을 서서히 끌어내어 반전시키면 난소가 노출시켰다. 그 다음 난관-자궁접합부에서 혈관이나 지방조직을 함께 결찰하고 결찰부위의 난소를 절제한 후 자궁과 지방조직을 복강내로 밀어 넣어 복벽과 피부를 각각 1~2개소 봉합하였다. 절개부위는 염증방지를 위하여 페니실린을 도포하였다. sham군은 난소를 절제하지 않고 위장 대조군 수술을 시행하였다. (Fig. 2.)



Fig. 2. Ovariectomy and diet of rat

### 3. 체중, 식이섭취량 및 식이효율

체중은 일주일에 한 번씩 같은 시각에 측정하였고, 실험 식이는 자유롭게 섭취하도록 하면서 일주일간의 식이섭취량을 측정하였다. 식이효율(FER)은 체중증가량과 식이섭취량으로부터 아래의 식으로 계산하였다.

$$FER = \text{Weight gain(g)}/\text{Food intake(g)} \times 100$$

### 4. 혈액, 장기 시료

혈액은 실험동물을 12시간 동안 절식시킨 후 안구에서 채혈 후, 경추 탈골하였다. 채혈한 다음 응고되는 것을 방지하기 위하여 응고방지 tube에 담아 ice bath에 20분 방치 하였다. 채혈시료는 3000 rpm에서 10분간 원심 분리하여 혈청을 분리하고 실험에 사용하기 전까지 냉장보관 하였다. 간, 신장 및 자궁 등 장기는 적출하여 0.9 % 생리 식염수로 세척한 후 여과지(Whatman No. 2)로 수분을 제거하고 중량을 측정하였다.

### 5. 혈액 분석

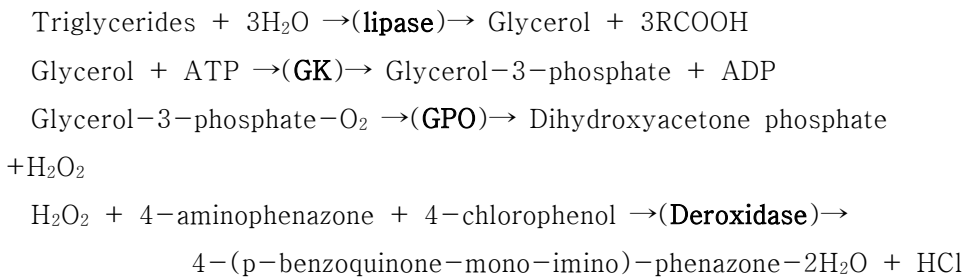
#### 5.1. GOT와 GPT활성 측정

혈액 중의 aspartic acid와  $\alpha$ -ketoglutaric acid는 oxalacetic acid와 L-glutamic acid로 변화한다. 생성된 oxalacetic acid는 조효소 NADH의 존재하에 MDH의 작용으로 malate가 생성되고 NADH가  $\text{NAD}^+$ 로 산화될 때 340 nm에서 흡광도의 감소를 측정하는 GOT 활성은 AST reagents (Bayer, USA)를 사용하고 IFCC법에 따라 autoanalyzer (ADVIA 1650, Bayer, Japan)로 분석하였다. L-alanine과  $\alpha$ -ketoglutaric acid는 pyruvic acid와 L-glutamic acid로 변화한다. 생성된 pyruvate는 조효소 NADH의 존재하에 LDH 작용으로 acetate가 생성되고  $\text{NAD}^-$ 가  $\text{NAD}^+$ 로 산화될 때 파장 340 nm에서 흡광도의 감소를 측정하는 GPT 활성은 ALT reagents (Bayer, USA)를 사용하여 위와 동일한 방법으로 분석하였다.

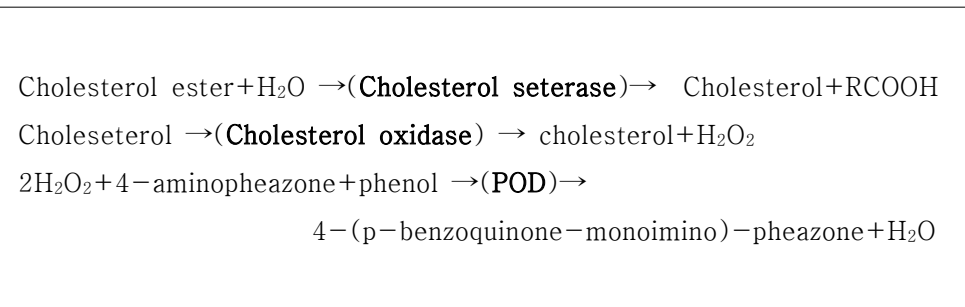
#### 5.2. 혈액의 지질 성분 분석

1) 혈청의 triglyceride는 아래와 같은 원리에 의해 glycerol 비소거법을

사용하였다. Bayer(USA)사의 kits를 이용하여 autoanalyzer (ADVIA 1650, Bayer, Japan)로 colorimetry를 505 nm에서 측정하였다.



2) 혈청의 total cholesterol 측정은 enzymatic colorimetric test법을 사용하였다. 아래와 같은 원리에 의해 Bayer(USA)사의 cholesterol reagents kits를 이용하여 autoanalyzer (ADVIA 1650, Bayer, Japan)로 505 nm에서 측정하였다.



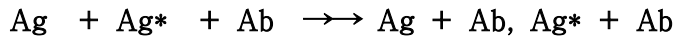
3) 혈청의 HDL-cholesterol은 Bayer(USA)사의 kits를 이용하여 autoanalyzer (ADVIA 1650, Bayer, Japan)로 colorimetry를 측정하였다.

### 5.3. 혈액의 ALP, Osteocalcin 분석

혈청에서의 Alkaline phosphatase 활성은 Buffer/Enzyme Reagents와 ALT co-enzyme으로 구성된 ALP reagents (Bayer, USA)를 사용하여 autoanalyzer(ADVIA 1650, Bayer, Japan)로 분석하였다.

Osteocalcin은 competitive method법으로 autoanalyzer(ADVIA 1650, Bayer, Japan)를 이용하여 분석하였다. 그 원리는 아래와 같다





- Ag : Serum
- Ag\* : <sup>125</sup>I-labelled Osteocalcin
- Ab : polyclonal sheep anti-h-Osteocalcin

Tube에 STD 및 control, sample을 labeling 한 후, 50 ul를 첨가하고, tracer를 250 ul 씩 첨가하여 mixing 후 4~8 °C에서 20~24 시간동안 incubation 하였다. Tube의 내용물을 완전 흡입 해 내고 washing buffer 2 ml로 tube를 washing 한 후 1분 이내에 Y-counter에서 activity를 측정하며, 그 결과는 각각의 binding percentage를 구하고 logit-log graph를 이용해 standard curve를 만들고 각각의 농도값을 산출하였다.

$$\%B = \frac{(\text{검체의 평균 CPM} - \text{NSB CPM})}{(\text{MB 평균 CPM} - \text{NSB NSB CPM})} \times 100$$

#### 5.4. 혈액의 Ca, inorganic P 분석

Calcium은 OCPC(O-Creosolphthalain Complex)과 알카리 용액에서 violet의 복합물을 형성한다. 이러한 원리를 이용하여 혈청의 calcium 함량은 calcium reagents(Bayer, USA)를 이용하여 chemistry autoanalyzer(ADVIA 1650, Bayer, Japan)로 454 nm에서 분석하여 자동분석계산법으로 결과를 산출하였다. Inorganic P는 황산 환경에서 phosphate이온과 molybdate가 반응하여 phosphomolybdate 복합물을 생성한다. 이러한 원리로 부터 sulfuric acid와 phosphate reagent로 이루어진 Inorganic Phosphorus Reagent kits (Bayer, USA)를 이용하여 chemistry autoanalyzer(ADVIA 1650, Bayer, Japan)로 340nm에서 분석하였다.

#### 6. 뇨시료 수집 및 뇨 지표인자 분석

뇨는 실험식이 공급 후 6주와 해부하기 전에 metabolic-cage에 실험동물을 한 마리 씩 수용하였다. 물과 실험식을 자유롭게 섭취하도록 하면서 24시간 뇨를 수집하였고, 3000 rpm에서 10분간 원심분리하여 이물질을 제거한 다음 냉동보관 하였다.

### 6.1. Creatinine과 DPD 측정

Creatinine은 알카리용액에서 2.4.3-니트로 페놀과 반응하여 적색의 크레아니틴피구레드로 변한다. 이러한 원리를 바탕으로 Jaffe 반응법을 이용한 Roche사의 kits를 사용하여 Hitachi 7180(Hitachi, Japan)으로 505 nm에서 분석하였다. Monoclonal anti-DPD antibody가 coating된 microplate에 희석된 환자의 urine을 가하면 urine내 DPD가 plate에 coating된 Ab에 부착되며 이 때 Ag-Ab complex에 enzyme labelling된 접합체와 발색제를 가하여 발색시킨 후 Ag의 농도를 구하는 것이 DPD측정의 원리이다. Test tube에 STD, control, sample과 검체 희석액을 1:10배 희석하였다. microplate를 준비하고 enzyme conjugate에 Assay buffer 7mL을 넣고 mix후 냉장보관하였다. 각 well에 희석된 STD, control, sample을 50ul씩 분주 후 enzyme conjugate를 100ul씩 첨가, sealing 후 냉암소에서 2시간 방치하였다. Washing 후 물기를 완전히 제거하고 발색제 150 ul를 첨가 한 후 암실에서 60분간 방치 후 stop solution 100ul를 첨가하고 Diagnostic ACS 180(Bayer, USA)를 사용하여 405 nm에서 흡광도를 측정하였다.

### 6.2. 뇨의 Ca, P 분석

뇨의 calcium과 Inorganic phosphorus의 함량은 혈청의 분석법과 동일하게 Roche사의 kits를 사용하여 Hitachi 7180(Hitachi, Japan)으로 분석하였다.

## 7. 대퇴골 및 경골의 변화 측정

### 7.1. 대퇴골 및 경골의 발골

Ovariectomized rat 사육 12주 후 해부하고 흰쥐의 좌·우측 경골 및 대퇴골을 분리한 후 냉동 및 formalin 처리하여 보관하였다.

### 7.2. 물리적 변화도 측정

#### 1) 골의 무게, 길이 및 두께의 측정

양쪽 경골과 대퇴골의 근육, 지방, 인대 등을 제거한 후 무게를 측정하였다. 골의 길이와 두께는 Digimatic caliper(Mitutoyo, Japan)로 측정하였다.

2) 골의 BMD, BMC 및 Area의 측정

오른쪽 경골과 대퇴골의 BMD(bone mineral density), BMC(bone mineral content) 및 Area를 pDEXA Forearm X-Ray Bone Densitometer (CooperSurgical Company, Northland)를 이용하여 측정하였다.

3) Breaking strength, Displacement 및 Stiffness

왼쪽 경골과 대퇴골의 특성은 Texture analyzer(TA-XT2)를 이용하여 측정하였다. 기기의 측정 조건은 HDP/BSG Blade set with guillotine, Pre-Test Speed 5.0 mm/s, Test-Speed 1.0 mm/s, Post-Test Speed 10.0 mm/s, Rupture Test Distance 1.0 mm, Distance 7.0 mm로 하였다. 일정한 방향으로 뼈를 platform 중앙에 놓고 압착했을 때 얻어지는 결과로부터  $\Delta E$ ( kg/s), stiffness, Breaking strength(kg), Time(s), Displacement(mm)를 구하였다. Breaking strength는 뼈의 중앙에 load로 힘이 가해졌을 때 그 중앙부위와 중앙으로부터 같은 거리에 위치한 두 지점에서 받는 최대 힘의 크기이며, displacement는 뼈의 최대 이동거리를 측정한 것이다. 뼈에 힘을 가하면 이에 반응하여 변형(deformation)이 일어나 load-displacement curve가 그려지는데, 이 때의 면적을  $\Delta E$ 로 나타내었고, 뼈에 가해지는 힘이 증가함에 따라 displacement가 비례하여 증가하는 직선 그래프의 기울기를 측정하여 stiffness로 나타내었다.

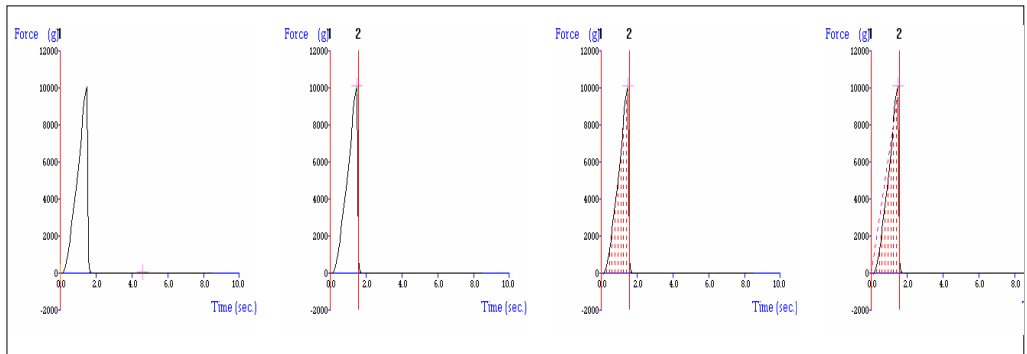


Fig. 3. Measurement of bone characteristics by texture analyzer

#### 4) 조직병리학적 검사

왼쪽 대퇴골의 traceculase in epiphysis and metaphysis in the femur (대퇴골 뼈지주), frequency of osteoclast (뼈파괴세포의 출현정도) 및 fatty accumulation (골수 내 지방축적)을 다음의 기준을 토대로 하여 상대적 평가를 수행하였다.

##### ① 대퇴골 뼈지주

난소절제를 하지 않은 대조군에서 치밀하게 형성된 뼈지주를 +4로 하고 난소 절제를 한 군에서 미약한 정도로 형성된 뼈지주 정도를 +1로 설정한 후, 이것을 기준으로 하여 처치군의 대퇴골 내 뼈지주 형성정도를 평가하였다. 본 값은 골다공증 정도를 평가할 수 있는 가장 중요한 평가 항목이다.

##### ② 뼈 파괴 세포의 출현 정도

골수 내에서 활동하고 있는 뼈 파괴 세포의 집락 (colony)수를 세어 1~7개 사이는 +1, 8~14개 사이는 +2, 15~21개 사이는 +3, 그 이상은 +4로 평가하였다. 본 값은 통하여 뼈 파괴 세포의 활성도를 개략적으로 평가할 수 있을 것으로 판단되었다.

##### ③ 골수 내 지방 축적

골수 내에서 지방의 축적은 골수의 위축정도를 평가할 수 있는 항목으로 본 실험에서는 골수세포를 지방세포가 치환한 정도를 난소를 절제한 그룹에 관찰되는 심한 정도를 +4로, 정상에서도 관찰될 수 있는 아주 미약한 정도 또는 미약한 정도를 각각 +1과 +2로 비교, 평가하였다.

#### 5) 발골 시료의 무기질 분석

무기질 및 중금속의 전처리는 시료를 약 2~5g 도가니에 넣고 전열기에서 예비회화시킨 후 550°C 전기회화로에서 2시간 태운 다음 방냉하였다. 여기에 탈이온수 10방울을 가해 재를 적시고 묽은 질산 (1:1 HNO<sub>3</sub>) 4 ml을 넣고 다시 전열기(120°C)에서 수분을 날려보낸 다음, 550°C 전기회화로에서 1시간 회화, 방냉 후 묽은 염산 (1:1 HCl) 10 ml로 녹여 이를 50 ml 정용 플라스크로 옮겨 탈이온수로 정용, 여과하여 유도결합 프라즈마 원자방출 분광법(Inductively Coupled Plasma -Atomic Emission Spectrophotometer, Jobin Yvon JY138 Ultrace, France, 이하 ICP-AES로 함)으로 분석하였다. 실험에 사용된 증류수는 17 MΩ 이상 되는 탈이온수 (NATO pure ultra system, Barnstead, USA)이었고, 이 때 사용한 초자기구는 10% HNO<sub>3</sub> 용액에 하룻밤

답근 다음 꺼내어 수돗물로 세척한 후 탈이온수로 3번 이상 행군 것을 건조하여 사용하였다. 각 원소의 표준용액의 농도는 0, 1, 10, 50 ppm으로 조제하여 4점을 이용한 검량곡선을 작성하여 측정하였다. 이때 ICP-AES의 작동조건은 Table 3과 같으며, 각 표준물질은 High-Purity Standard사 (USA) 제품을 사용하였다.

Table 3. ICP-AES의 작동 조건

	Power	1 Kw for aqueous
	Nebulizer pressure	3.5 bars for meunhard type C
	Aerosol flow rate	0.3 L / min
	Shealth gar flow	0.3 L / min
	Cooling gas	12 L / min
	Na	589.592
	Ca	393.366
	Fe	238.204
Wavelength	P	213.618
(nm)	Pb	220.353
	Cd	214.438
	Ge	209.426
	Se	196.090

## 제 4 절 유효성분의 분석

### 1. 시약

TLC (Thin Layer Chromatography)는 Merck사에서 생산한 HPTLC-Fertigplatten Kieselgel 60 F<sub>254</sub>를 사용하였다. 시료 분획에 사용한 유기용매는 대정화학주식회사에서 생산한 1급 시약을 사용하였다. 시료 발색에는 UV lamp와 10% aq. H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, Dragendorff'sreagent 및 Ferric chloride를 사용하였다.

## 2. 기기

UV lamp는 Spectrometer (Model ENF-240C/F. spetronics corporation, USA)를 사용하였다.

## 3. 실험 방법

### 3.1. 용매 분획

시료를 감압농축하여, 각각의 농축물들을 물(600 ml)과 *n*-hexane(600 ml)로 분배, 추출하고 물 층을 다시 EtOAc(600ml)로 분배, 추출하였으며, 다시 한 번 물 층을 *n*-BuOH(600ml)로 분배, 추출하여 얻어진 분획을 감압 농축하여 *n*-hexane Fr., EtOAc Fr., *n*-BuOH 및 H<sub>2</sub>O Fr.을 얻었다 (Fig. 4).

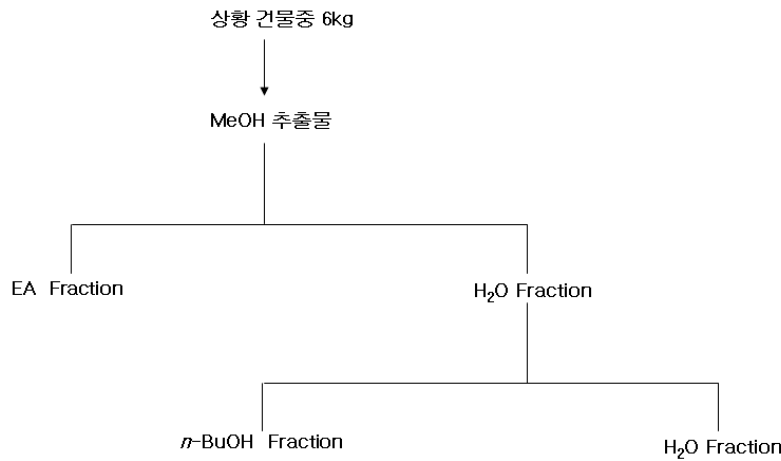


Fig. 4. Solvent partitioning of *Phellinus linteus* extract

### 3.2. 비색법을 이용한 Total Phenolic Compounds 함량 측정

#### ① 추출 및 용매 분획

상황버섯 건물 중 6kg을 분쇄기로 분쇄하여 상온에서 80% MeOH 수용액 20L로 3회 추출 하였으며 추출액을 감압 농축하여 MeOH 추출물을 얻었다. 감압 농축한 시료를, EA(1000ml)와 H<sub>2</sub>O(1000ml)로 2회 분배·추출하고, 물층을 다시 *n*-BuOH(1000ml)로 2회 분배·추출하여 얻은 분획을 감압 농축하여, EtOAc Fr., *n*-BuOH 및 H<sub>2</sub>O Fr.을 얻었다.

## ② 실험방법

상황 건조 시료 10g에 70% MeOH 100ml을 첨가하여 추출하기를 2회 반복한 후 여과지(Whatman, No. 2)로 여과한 다음 감압 농축하여 농축물을 제조하였다. 이 중 10mg을 취한 뒤, 70% MeOH 10ml에 녹여 검액으로 사용하였다. 검액 중 100 $\mu$ l을 취해 2% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 2ml와 잘 혼합하고 2분간 반응시킨 후 50% folin 시약(Folin & Ciocalteu's Phenol Reagent, Sigma) 100 $\mu$ l를 넣어 다시 30분간 반응시킨 다음 UV spectrophotometer(SHIMADZU, UV-1601)로 750nm에서 정량 하였다. (+)-catechin(Sigma)을 표준물질로 하여 환산하였다. 각각 3개의 검액으로 이 과정을 3회 반복 하였다.

### 3.3. 비색법을 이용한 Total Flavonoids 정량

#### ① 실험방법

상황 건조 시료 1g에 50% MeOH 60ml을 가하여 마쇄한 후 Sonicator를 이용하여 1시간동안 추출하여 50% MeOH로 100ml 정용하여 여과하여 시료 용액으로 하였다. 시료 용액 1ml와 diethylene glycol 10ml을 혼합한 후 1N NaOH 1ml를 가하여 잘 혼합하여 37 $^{\circ}$ C에서 1시간 방치한 후 420nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때 표준곡선은 농도가 0~0.5mg% 범위가 되도록 제조한 표준용액 naringin (Sigma)을 이용하여 검량선을 작성하여 Total flavonoids 정량에 이용하였다. 각각 2개의 검액으로 이 과정을 3반복 하였다.

### 3.4. GC를 이용한 phytoestrogen 정량 분석

#### ① 실험방법

건조한 상황을 마쇄한 후, 50g을 80% MeOH 100ml로 추출하기를 2회 반복한 뒤, 여과한 뒤, EtOAc와 *n*-BuOH로 용매 분획하여 각 각의 분획물을 농축하였다. 추출과 분획에 사용한 용매는 대정화금주식회사 (시흥, 한국)에서 구입한 1급 시약을 사용하였다. 표준시료 및 상황추출물을 GC 분석하기 위해 1mg씩을 떼어, N,O-Bis(trimethylsilyl) acetamide (Aldrich Chemical Company) 100 $\mu$ l 가한 후, 60 $^{\circ}$ C의 오븐에서 60분 동안 반응 시켰다. 여기에 CHCl<sub>3</sub> (HPLC grade) 900 $\mu$ l을 첨가하여 분석용 시료로 사용하였다. TMS화 시킨 각 시료 용액 5 $\mu$ l을 취하여 GC (GC-14B,

Shimadzu, Japan)로 분석하였다. 검출기는 flame ionization detector(FID)를 사용하였고, column은 DB-5(30m×0.32mm ID(0.25μm), J&W, Folsom, CA, USA)를 사용하였다. 오븐 온도는 200℃에서 5.0℃/min으로 상승시켜 250℃까지 올린 후, 3분간 유지시킨 후, 5℃/min으로 상승시켜 최종 온도 300℃에서 3분간 유지 하였다. Injector와 detector의 온도는 모두 300℃로 유지 하였다. GC/MS 역시, 동일한 조건으로 측정하였다.

### 3.5. 항산화 효과 분석

#### ① 시료 제조

본 실험에 사용한 상황버섯은 실온에서 80% 에탄올로 5시간 추출하여 45℃에서 감압농축(BUCHI Rotavapor R-205, Switzerland) 하였다. 이를 동결건조하여 시료로 하였으며, 항산화 효과를 분석하기 위하여 시료를 다양한 농도 (100 ppm, 300 ppm, 500 ppm, 1000 ppm)로 증류수와 에탄올에 녹였다. 오염 물질을 제거하기 위하여 filter paper(Whatman International Ltd., England)를 이용하여 filtering 하였다.

#### ② α-α-Diphenyl-β-picrylhydrazyl (DPPH) radical 소거 활성

DPPH는 자체가 매우 안정한 free radical로서 517 nm에서 특징적인 광흡수를 나타내는 보라색 화합물이다. DPPH는 알코올 등의 유기용매에서 매우 안정하며 항산화 기작 중 proton-radical scavenger에 의하여 탈색되기 때문에 항산화 활성을 육안으로도 쉽게 관찰할 수 있는 장점이 있다. DPPH를 에탄올에 400 ul의 농도로 녹인 다음 DPPH를 190 ul와 시료 10 ul를 첨가하여 실온에서 30분간 방치한 다음 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. DPPH radical 소거활성 비율 (% inhibition)은 다음과 같이 계산하였다.

$$\% \text{ inhibition} = \frac{(\text{ABS control} - \text{ABS sample})}{(\text{ABS control})} \times 100$$



### ③ Superoxide dismutase (SOD) 유사활성 측정

SOD radical 소거활성은 Marlund의 방법에 의하여 시행하였다. 시료 0.2 ml에 50 mM Tris+ 10 mM EDTA, pH 8.5의 Tris-HCl 2.6 ml을 가하고 7.2 mM pyrogallol 0.2 ml을 가하여 실온에서 10분간 방치하면서 흡광도의 감소를 측정하였다. 정확히 10분 후 1 N HCl 0.1 ml로 반응을 정지시켰으며, 420 nm에서 흡광도를 측정하였다.

### ④ ABTS radical 소거활성

ABTS radical을 이용한 항산화력 측정은 ABTS<sup>+</sup> cation decolorization assay 방법에 의하여 시행하였다. 7 mM 2,2-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid)와 2.45 mM potassium persulfate를 최종농도로 혼합하여 실온인 암소에서 24시간동안 방치하여 ABTS<sup>+</sup>을 형성시킨 후 732 nm에서 흡광도 값이  $0.70 \pm 0.02$ 이 되게 phosphate buffer saline(PBS, pH 7.4)로 희석하였다. 희석된 용액 990  $\mu$ l에 시료 10  $\mu$ l를 가하여 정확히 1분 동안 방치한 후 흡광도를 측정하였다.

## 제 5 절 활성성분의 분리 및 구조 동정

### 1. 기기 및 시약

NMR 스펙트럼은 Varian Inova AS 400(Varian, USA)으로, 비선광도( $[\alpha]_D$ )는 Polarimeter P-1010(JASCO, Japan)으로, IR 스펙트럼은 Spectrum One(Perkin-Elmer, USA)으로, EI/MS와 FAB/MS는 JMS-700 (JEOL, Japan)로 측정하였다. 녹는점은 Fisher-John's Melting Point Apparatus(Fisher Scientific, U.S.A.)를 사용하여 측정하였고, 미보정하였다. Column chromatography용 silica gel은 Kiesel gel 60(Merck, Germany)을 octadecyl silica(ODS) gel은 LiChroprep RP-18(Merck, Germany)을 사용하였다. TLC는 Kieselgel 60 F<sub>254</sub>와 RP-18 F<sub>254s</sub>를 사용하였고, TLC 상의 물질 검출에는 UV lamp와 10% aq. H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>를 사용하였다. 시료의 추출과 분획에 사용한 유기용매는 대정화학주식회사에서 생산한 1급 시약을 사용하였다.

## 2. 활성성분 탐색용 시료

본 실험에서 사용한 상황버섯은 경남 진주 상황버섯영농조합법인으로부터 2005년 5월에 구입한 순수국산시료이며, 표본시료(KHU-05012)는 경희대학교 생명공학원 천연물화학실험실에 보관되어 있다.

## 3. 활성물질의 분리

### 3.1. 용매 분획

상황버섯 건물 중 1kg을 분쇄기로 분쇄하여 상온에서 80% MeOH 수용액 30L 로 2회 추출 한 후 여과지(Advantec, No. 2)로 여과하였다. 얻어진 여액을 45 °C에서 감압농축하고, MeOH 추출물을 얻었다. 감압 농축한 시료를, EA(1 l)와 H<sub>2</sub>O(1 l)로 2회 분배·추출하고, 물층을 다시 *n*-BuOH(1000ml)로 2회 분배·추출하여 얻은 분획을 감압 농축하여, EtOAc분획(10g), *n*-BuOH(18g) 및 물분획(10g)을 얻었다.

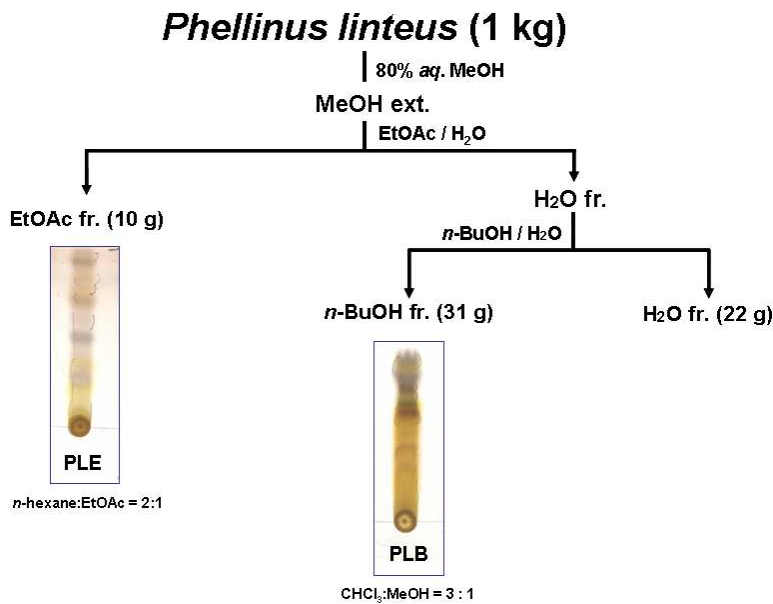


Fig. 5. Solvent partitioning of *Phellinus linteus* extract.

### 3.2. ergosterol 화합물의 분리

EtOAc 추출물(PLE)을 silica gel column( $\Phi$  6.5× 17 cm) chromatography(c.c.)(CHCl<sub>3</sub>-MeOH = 15:1→10:1→7:1→5:1→3:1→1:1)를 실시하여 22

개의 분획물(PLE1~PLE22)을 얻었다. 그 중 ALP 활성에 좋은 효과를 보이고 major 성분을 포함하고 있는 PLE2(328 mg) 분획을 silica gel c.c.(*n*-hexane-EtOAc = 4:1 →1:1,  $\Phi$  3.7×13 cm)를 이용하여 17개의 분획물(PLE2-1~PLE2-17)을 얻었다. 얻어진 분획들에 대하여 TLC를 확인한 결과 5번 분획(PLE2-5)과 6번 분획(PLE2-6)이 비슷한 발색양상을 보여, 두 분획을 합한 PLE2-5+6(45 mg)에 대하여 ODS c.c.(acetone-CH<sub>3</sub>CN = 1:3,  $\Phi$  2.4×7cm)로 정제하여 화합물 1[PLE2-5+6-7, 5.8mg( $5.8\times 10^{-4}\%$ ), ODS TLC(acetone-CH<sub>3</sub>CN = 3:1) rf: 0.45]과 화합물 2[PLE2-5+6-10, 6.5 mg( $6.5\times 10^{-4}\%$ ), ODS TLC(acetone-CH<sub>3</sub>CN = 1:3) rf: 0.26]를 분리하였다. 또한 PLE2의 17개의 분획물 중 TLC를 확인한 결과 비슷한 발색양상을 보이는 11번 분획(PLE2-11)부터 13번 분획(PLE2-13)을 합한 PLE2-11~13(80.7 mg)에 대하여 ODS c.c.(MeOH-H<sub>2</sub>O = 12:1,  $\Phi$  2.4×8 cm)로 정제하여 화합물 3[PLE2-11~13-5, 6.3 mg( $6.3\times 10^{-4}\%$ ), ODS TLC(MeOH-H<sub>2</sub>O = 12:1) rf: 0.21]과 화합물 4[PLE2-11~13-8, 16.6 mg( $1.66\times 10^{-3}\%$ ), ODS TLC(MeOH-H<sub>2</sub>O = 15:1) rf: 0.21]을 분리하였다. 다른 주성분을 포함하고 ALP 활성에 좋은 효과를 보이는 PLE4(312 mg) 분획을 silica gel c.c.(*n*-hexane-EtOAc = 2:1,  $\Phi$  3.7×13 cm)를 이용하여 22개의 분획물(PLE4-1~PLE4-22)을 얻었고, 이 분획들에 대하여 TLC를 확인한 결과 13번 분획(PLE4-13)부터 16번 분획(PLE4-16)까지 비슷한 발색양상을 보여, 이 분획들을 합한 PLE4-13~16(61.3 mg)에 대하여 ODS c.c.(MeOH-H<sub>2</sub>O = 10:1,  $\Phi$  2.4×7 cm)로 정제하여 화합물 5[PLE4-13~16-6, 10.7 mg( $1.07\times 10^{-3}\%$ ), ODS TLC(MeOH-H<sub>2</sub>O = 15:1) rf: 0.19]를 분리하였다. PLE8(179 mg) 분획을 silica gel c.c.(*n*-hexane-EtOAc = 1:4,  $\Phi$  3.7×13 cm)를 이용하여 8개의 분획물(PLE8-1~PLE8-8)을 얻었다. 얻어진 분획들 중 7번 분획, PLE8-7(20 mg)에 대하여 ODS c.c.(MeOH-H<sub>2</sub>O = 10:1,  $\Phi$  2.5×4 cm)로 정제하여 화합물 6[PLE8-7-3, 4.9 mg( $4.9\times 10^{-4}\%$ ), ODS TLC(MeOH-H<sub>2</sub>O = 10:1) rf: 0.22]를 분리하였다.

### 3.3. 페놀화합물의 분리

위에서 얻어진 PLE4(312 mg)의 22개의 분획 중 TLC를 확인하여 비슷한 발색양상을 보이는 6번 분획(PLE4-6)부터 8번 분획(PLE4-8)을 합한 PLE4-6~8(27 mg)에 대하여 ODS c.c.(MeOH-H<sub>2</sub>O = 1:1,  $\Phi$  2.5×6 cm)로 정제하여 화합물 7[PLE4-6~8-2,

5.5 mg( $5.5 \times 10^{-4}\%$ ), ODS TLC(MeOH-H<sub>2</sub>O = 3:1) rf: 0.65]를 분리하였다. ALP 활성은 높게 나타나지 않았지만 주성분을 포함하고 있는 PLE6(250 mg) 분획을 ODS c.c.(MeOH-H<sub>2</sub>O = 1:3→1:1, Φ 3× 8 cm)로 정제하여 화합물 8[PLE6-1, 22.4 mg( $2.24 \times 10^{-3}\%$ ), ODS TLC(MeOH-H<sub>2</sub>O = 2:1) rf: 0.75]과 화합물 9[PLE6-4, 17.5mg( $1.75 \times 10^{-3}\%$ ), ODS TLC(MeOH-H<sub>2</sub>O = 2:1) rf:0.66]을 분리하였다. EtOAc 추출물과 비슷하게 높은 ALP 활성을 나타내는 *n*-BuOH 추출물(PLB, 31 g)을 silica gel column(Φ 6.5× 23 cm) chromatography (c.c.)(CHCl<sub>3</sub>-MeOH-H<sub>2</sub>O = 6:4:1→5:4:1)를 실시하여 19개의 분획물(PLB1~PLB19)을 얻었다. 그 중 major 성분을 포함하고 있는 PLB2(831 mg) 분획을 silica gel c.c.(CHCl<sub>3</sub>-MeOH = 20:1→10:1, Φ 5× 15 cm)를 이용하여 10개의 분획물(PLB2-1~PLB2-10)을 얻었다. 얻어진 분획들 중 3번 분획(PLB-2-3, 103 mg)을 ODS c.c.(MeOH-H<sub>2</sub>O = 2:3, Φ 2.5 × 5 cm)로 정제하여 화합물 10[PLB2-3-2, 7.6 mg( $7.6 \times 10^{-4}\%$ ), ODS TLC(MeOH-H<sub>2</sub>O = 2:1) rf: 0.72]과 화합물 11[PLB-2-3-4, 6.5mg( $6.5 \times 10^{-4}\%$ ), ODS TLC(MeOH-H<sub>2</sub>O = 2:1) rf:0.65]을 분리하였다.

## 제 6 절 활성성분의 소재화 활용 기술

### 1. 골강화 활성성분의 수용액내 분산

상황버섯의 경우 수용액 상에서 침전율이 높은 관계로 액상 제품 개발이 없었다. 본 과제에서는 골강화 가공품 가운데 액상제품 개발을 시도하기 위하여 사전 단계로서 골강화 활성성분이 포함된 추출물의 수용액내 분산조건을 예비 실험하였다. 수용액내 분산을 위한 유화제로는 F-50, F-160 (일신웰스), 카라기난(한국카라기난), 아라비안검(일신유화)을 0.1%에서 1.5%까지 조합하며 사용하였다.

#### 1.1. 유화제의 선정

수용액내 분산을 위한 유화제로는 아라비안검, 카라기난, 자당지방산에스테르 F-50, F-160을 0.1%에서 1.5%까지 조합하며 사용하였다. 아라비안검은 식품의 점착성 및 점도를 증가시키고 유화안정성을 증진하며, 식품의 물성 및 촉감을 향상시키기 위한

식품첨가물로서 식품에 증점제, 안정제, 피막제 등으로 사용된다. "Irish moss"라고 하는 홍조류 진도박과 석초의 세포간물질로 이물질질을 추출하여 얻은 점성 고분자 전해질인 다당류 혼합물인 카라기난은 식품의 분산제, 안정제 등으로 광범위하게 사용되고 있다. 자당 지방산 에스테르류는 수산기가 8개인 자당과 지방산의 에스테르 에스테르화의 정도에 따라 물에 전혀 녹지 않는 것에서부터 물에 녹기 쉬운 것까지 HLB가 1~16까지의 종류가 있어 케익용기포제, 크림용 유화제, 활택제, 가공 유지의 개질제에 이용된다. F-50은 HLB 1의 산가 5이하의 유화제로서 담황갈색 분말로서 수분함량 4% 이하의 특성을 가지며, F-160은 HLB 16의 유화제이다.

## 1.2. 분산도의 측정

수용액내 입자 분산성은 Formulaction사의 Turbiscan을 사용하여 광학적으로 분석하였다. Turbiscan의 optical sensor인 reading head는 광원으로 파장이 880 nm인 근적외선(Near Infrared)을 사용하여 광원의 반대편(180℃)에 위치한 transmission detector 및 입사각과 45℃ 각도 뒤쪽에 위치한 Backscattering detector로 구성된다. 부유층(creaming)은 emulsion 또는 suspension의 경우 혼하게 일어나는 현상이며, 분산상의 밀도가 연속상의 밀도보다 낮은 경우에 일어난다. 분산상인 입자들이 시료의 위쪽으로 이동하는 현상으로 시료의 위쪽과 아래쪽의 농도 차이, 즉 시료의 위쪽은 농도가 증가(creaming)하고 시료의 아래쪽은 농도가 감소(clarification)하여 결과적으로 backscattering flux(%)가 시료의 상층부는 증가하고 하층부는 감소하는 현상을 보인다. Sedimentation은 creaming과 유사하며, 분산상의 밀도가 연속상의 밀도보다 높은 경우에 일어난다. 분산상인 입자들이 시료의 아래쪽으로 이동하는 현상으로 시료의 위쪽과 아래쪽의 농도 차이, 다시 말해 시료의 하층부는 농도가 증가(sedimentation)하고 시료의 상층부는 농도가 감소(clarification)하여 결과적으로 backscattering flux(%)가 시료의 아래쪽은 증가하고 위쪽은 감소하는 현상을 보인다. 이러한 수용액내 입자 분산성은 입자분산도(variation)와 부유(creaming), 침강(sedimentation)을 파장 back scattering의 역함수로 계산하였다. 역학적 지표의 함수는 다음과 같다.

$$BS \propto [1/l^*]^{1/2}$$

$$l^* = [2d/3\Phi(1-g)Q_s]$$

즉, 빛이 반사하는 이동경로( $l^*$ )가 짧을수록 BS(backscattering) 값은 증가하며 creaming 및 sedimentation의 정도를 감지할 수 있다. BS값이 작은 경우 이동경로가 크며 variation이 이루어져 있음을 감지할 수 있다. BS값으로부터 BS의 변화(BSt)와 creaming의 이동속도(migration velocity,  $V_t$ )를 판단하여 수용액내 분산 상태를 파악하였다.

## 2. 상황시료 (PL) 나노에멀전 제조

상황시료 (PL) 용액은 PL 50mg에 100% 메탄올 10mL 을 첨가하여 20분 동안 완전히 용해시킨 다음 0.45 $\mu$ m syringe filter로 여과하였다. PL 용액과 MCT(medium chain triglyceride)를 1:1의 비율로 혼합하여 3분 동안 일정한 속도로 교반하여 PL-MCT mixture를 제조하였다. 이 mixture에 잔존하는 메탄올을 제거하기 위해 5 $^{\circ}$ C에서 감압농축하였다. 메탄올이 제거된 PL-MCT mixture에 Tween 80을 일정한 비율(1:1, 1:1.5, 1:2, 1:3)로 혼합하였다. PL-MCT-Tween 80 mixture를 물에 용해시켰으며 1시간 동안 일정한 속도로 교반하여 나노에멀전을 제조한 다음, 0.45 $\mu$ m filter를 이용하여 여과한 다음 측정에 이용하였다.

### 2.1. Particle size 측정

상황시료 (PL) 나노에멀전의 입자 크기 측정은 나노 입자들의 brownian motion을 photon correlation spectroscopy(Nanotracer<sup>TM</sup>250, Microtrac Inc., USA)을 이용하여 25 $^{\circ}$ C에서 30초 동안 light scattering 방법에 의해 측정하였다.

### 2.2. 저장 안정성

상황시료 (PL) 나노에멀전을 25 $^{\circ}$ C에서 28일 동안 저장하면서 7일 간격으로 입자 크기를 측정하여 저장 안정성을 분석하였다.

### 3. 상황시료 (PL) 나노체 제조

Chitosan을 0.2%(w/v) 농도로 용해시켜 100℃에서 3분 동안 boiling한 후, 실온까지 냉각시켜 PL 나노체 제조에 사용하였다. 미리 준비해 놓은 PL 용액(5mg/mL MeOH)과 MCT(medium chain triglyceride)를 1:2의 비율로 혼합한 다음, 메탄올을 제거하기 위해 50℃에서 감압농축하였다. 메탄올이 제거된 PL-MCT mixture에 Tween 80을 1:2의 비율로 혼합하였다. PL-MCT-Tween 80 mixture를 0.2% chitosan 용액에 용해시켰으며 1시간 동안 일정한 속도로 교반하여 나노에멀전을 제조한 다음, -70℃에서 냉동하여 동결건조하였다.

#### 3.1. 재분산성

나노에멀전을 동결 건조하여 회수한 고형분 0.5 g을 증류수 10 mL에 재분산시켜 1시간 동안 일정한 속도로 교반한 다음, 입자 크기를 측정하였다.

### 4. 상황시료 (PL) 마이크로캡슐 제조

상황시료 (PL) 마이크로캡슐의 wall material은 1.5% alginate (Sodium salt, From *Macrocystis pyrifera*, low viscosity, Sigma)을 base material로 하였다. Core material은 미리 준비해 놓은 PL 용액(5mg/mL MeOH)과 MCT(medium chain triglyceride)를 1:1의 비율로 혼합한 mixture를 사용하였다. Monodispersion 마이크로캡슐을 제조하기 위하여 Encapsulator (IE-50R Inotech, Switzerland) 장치를 이용하였으며, core material의 nozzle size 150 $\mu$ m, wall material은 500 $\mu$ m를 이용하였다.

### 5. 복합분체의 제조

#### 5.1. 재료

상황버섯, 감자전분 (한울농산), 열처리한 곡류 (현미, 현미찹쌀, 백태, 흑태, 겉보리, 쌀보리)등은 국내에서 구입하였으며 상황버섯 미분말을 결합시켜 안정화시키기 위한 식품용 excipient로서 100 - 350 $\mu$ m 크기의 원형 셀룰로스인 Sellets (Pharma Trans Sanaq AG, Swiss)를 사용하였다.

## 5.2. 방법

### 1) 상황버섯의 미분쇄

건조된 상황버섯을 Cutting mill (M20, IKA, Germany)로 조분쇄한 후 Planetary mill을 이용하여 2차로 미분쇄 하였다. 분쇄는 직경 1mm, 5mm, 10mm의 지르코늄 비드 (zirconium bead)를 사용하였고, 분쇄조건은 250rpm에서 20분 간격으로 시료를 취하여 입도의 변화를 분석하였다.

### 2) 상황버섯 복합분쇄화 공정

Hybridization system (NHS-0, Nara Machinery, Japan)을 이용하여 분쇄복합화 공정을 수행하였으며, 사용한 Hybridization system의 형태는 그림 1에 나타내었다. Host 물질 (core particles)로 감자전분, Cellets와 열처리한 곡류 (현미, 현미잡쌀, 백태, 흑태, 겉보리, 쌀보리)등을 사용하였으며, 이와 결합시킬 Guest 물질 (surface particles)로는 미분쇄한 상황버섯을 사용하였다. 비교적 크고 일정한 입자의 감자전분을 선별하여 사용하기 위해 170mesh, 270mesh, 450mesh의 체를 이용하여 일정한 입도범위의 분말을 회수하였고, 열처리한 곡류에는 60mesh와 80mesh의 체를 이용하였다. 분쇄결합을 위한 비율의 경우, 상황버섯과 감자전분은 1:9 (10% 상황버섯), 1:19 (5% 상황버섯), 1:29(3.3% 상황버섯) 의 비율로 시료를 제조하였고, 회전수를 5,000-15,000rpm으로 3분간의 분쇄복합화 공정을 거쳐 상황버섯 복합분체 (composite)를 제조하였다.

### 3) SEM을 이용한 분체의 표면분석

주사전자현미경(S-2380N Scanning electron microscope, Hitachi, Japan)을 이용하여 분체 표면의 특성을 관찰하였다. 준비된 시료는 SEM ion sputter coater를 이용하여 gold-palladium 층으로 진공상태에서 60초간 코팅시킨 후 15 kV에서 관찰하였으며, 대표적인 표면의 형태를 비교하여 분체간 결합정도를 분석하였다.

### 4) 입도분석

입자크기 분석은 Particle size analyzer(Compagnie Industrielle Des Lasers, CILAS 1064, France)을 이용하여 시료의 평균 입도와 입도분포를 측정하였다.



5) 영상현미경을 이용한 표면분석

Color video microscope system (MW200B1, 삼성, Korea)을 이용하여 분체 표면의 특성을 관찰하였다. 대표적인 영상은 Easy vision (version 5, PSI 트레이딩, Korea) 프로그램을 사용하여 저장된 화면을 비교분석 하였다.



Fig. 5. Hybridization System

6. 유동층 코팅 (fluid bed) 기기를 이용하여 과립화 및 코팅 공정

본 실험에 사용한 (주) 청진테크의 유동층 코팅 기기는 그림과 같다. Fluid bed system에 시료를 적용시켜 과립화 및 코팅 공정을 실시하였다.



Fig. 6. Fluid Bed processor type FBC -1 Bottom spray system Batch capacity : 1 kg /batch Filter type : polyester , T165P Nozzle insert: 1.2 mm dia Bottom plate : type B.

## 6.1. Granulation

### ① 무수함수포도당에 의한 과립화 형성

과립차의 제조는 동결건조물 1%와 무수함수포도당 (대상)을 base로 하여 제조하였다. 동결건조물과 함수포도당을 고르게 혼합한 후 30 mesh 체를 통과시켰다. 10%의 물을 첨가하여 반죽한 후 과립을 제조하고 열풍건조기에서 약 2시간 건조시킨 후, 습기가 차단되도록 즉시 포장하였다.

### ② 유동층 과립기에 의한 형성

과립화를 위하여 부형제(또는 Carrier)로서 starch 500을 사용하여 유동화 시킨 후 0.1% PL 추출액 2 L를 starch에 분무하였다. 이 때 실험 조건은 아래와 같다.

B#	Air Vol	습기온도	품온	분사압	액이송	P,Hgt	Filter	Re
1	Fp 30 %	60°C	30°C	1 bar	11g/m	2 cm	5/5 sec	-

Air Volume: Starch를 유동화 시키기 위해 사용된 air volume, Fp(flap position % )

습기온도: 유동화 air를 가열 solution의 moisture를 증발시키는데 사용된 온도.

품온: Process Zone의 온도 ( 제품온도 )

분사압: Solution을 분사 시키는데 사용된 분사 압력 ( Atomizing Air Pressure )

액이송: 추출액 이송속도

P, Hgt: Bottom spray system의 partition height.

Filter 5/5 : Filter shaking interval , 5 sec

Filter shaking time , 5 sec

## 6.2. Coating

Coating을 위해 부형제로서 원형의 pellet을 유동화 시킨 후, 추출액을 분사하였다. 과립공정과는 달리 pellet 표면에 추출액에 포함 돼 있는 solid를 도포하는 공정을 수행하였다. 이 때 실험 조건은 아래와 같다.

B#	Air Vol	습기온도	품온	분사압	액이송	P,Hgt	Filter	Re
2	Fp 40 %	60°C	32°C	1.7 bar	20g/m	2 cm	5/8 sec	-

## 6. 환 및 음료 제품에의 적용

상황버섯 뼈강화 소재로서 유화, microemulsion, nanoparticle, microcapsule 등 액상 소재와 복합분체, 과립, 유동층 코팅 시료 등 고상소재를 제조하였다. 이들 소재들은 상황버섯 뼈강화 소재로서 역할과 함께 새로운 개념의 체내 용출 조절용 코팅환 등 가공물로서의 역할도 가능하다. 상황버섯 뼈강화 액상, 고상 소재 및 추출물을 적용하여 일반적인 환 및 액상 가공품을 시험 제조 할 수 있다.

## 제 7 절 통계처리

본 연구의 실험 결과는 실험군당 평균과 표준편차를 계산하였고, SAS V8 프로그램 (SAS Institute INC., Cary, USA)을 이용하여 one-way ANOVA를 실시한 후  $\alpha=0.05$  수준에서 Duncan's multiple range test에 의하여 각 실험군의 평균치간의 유의성을 검정하였다.

## 제 3-2 장 연구개발 수행 결과

### 제 1 절 시료의 용매 추출 및 농축

#### 1. 골강화 활성분획의 탐색

##### 1.1 시료의 추출수율 및 성분분석

##### 1) 시료의 농축 수율 및 농도

시료의 농축 수율 및 농도는 Table 4와 같다.

Table 4. Yield and concentration of *Phellinus linteus* extracts.

Sample	Yield(%)	Concentration(Brix)
<i>Phellinus linteus</i>	4.7	11.9

농축 후 시료의 농축 수율은 원료 중량대비 4.7 %, 수용성 고형분 농도는 11.9 °Brix로 나타났다.

##### 1.2. 시료의 일반성분

본 실험에 사용된 상황버섯의 일반성분 함량은 Table 5와 같다.

Table 5. Proximate compositions of *Phellinus linteus*.

Unit : %

Sample	Moisture	Lipid	Protein	Ash	NFE*
Raw	12.38	0.37	4.62	1.37	81.26
Ethanol extracts *	1.52	9.87	3.73	2.80	82.08

\* NFE : nitrogen free extract(starch, NDF)

\* Ethanol extracts : 추출 후 동결건조물

상황버섯의 수분함량은 12.38%, 조지방은 0.37%, 조단백질은 4.24%, 회분은 1.37%로 나타났고, 전분과 난소화성 섬유가 포함된 비질소 추출물은 81.26%로 높은 함량을 보였다. 상황버섯의 에탄올 추출물의 동결건조물 경우는 수분함량이 1.52%, 조지방 9.87%, 조단백질 3.73%, 회분 2.80%로 나타났고, 비질소 추출물 함량은 82.08%를 보였다. 원료 자체와 추출물의 일반성분 분석 결과 조지방 함량의 경우 추출물이 월등히 높은 값을 나타내었고, 조단백은 다소 낮았으며, 비질소 추출물 함량은 유사한 값을 나타내었다. 조단백 함량의 저하는 Filtering 과정에서 sludge 소실로 인한 것으로 판단하였다.

### 1.3. 시료의 무기질 및 비타민 분석

상황버섯의 무기질 및 비타민 함량을 각각 유도결합 플라즈마 원자방출 분광법 (Inductively Coupled Plasma-Atomic Emission Spectrophotometer, Jobin Yvon Activa, France, ICP-AES)과 고속액체크로마토그래피법으로 분석하였다(Table 6).

**Table 6. Mineral, Vitamin contents of *Phellinus linteus***

	Unit : mg/100g							IU/100g	mg/100g	µg/100g
	Na	K	Mn	Ca	P	Mg	Fe	VitA	VitC	VitE
<i>Phellinus linteus</i>	79.8	295.9	0.9	117.5	67.7	117	2.1	-	-	-

무기질 함량으로서 K가 295.9 mg/100g으로 가장 높았으며 Ca, Mg는 117 mg/100g으로 높은 값을 보였다. P, Na는 67.7 mg/100g ~ 79.8 mg/100g으로 측정되었으며 Mn, Fe은 0.9mg/100g ~ 2.1 mg/100g로 낮았다. Vitamin은 정량되지 않았으며 무기질 함량 가운데 골대사에 관계될것으로 고려되는 Ca, P, Mg는 사료배합 과정에서 함량조정의 기초로 활용할 것이다.

## 제 2 절 세포계 골강화 활성 시스템 및 검색

### 1. 골 활성 세포계 시험법의 구축 및 골강화 활성 검색

#### 1.1. 양성대조구 (Positive control)의 세포 생존능 측정

인체 유사 조골세포주인 Saos-2 cell에 대해 세포의 정상적인 형성을 확인하였다. 세포의 생육상태 확인은 골 생성 표준물질로 사용되는 NaF와 식품중 골생성 활성이 알려진 대두 추출물을 양성대조군 (positive control)으로 하였으며 세포 증식능은 MTT assay로 검색하였다(Fig 7). NaF 처리시 농도에 비례하여 증식능이 증가하였고  $10^{-2}$  mg/ml 농도에서 129%의 최고값을 보인후 감소하였다. 대두추출물도 농도에 비례하여 증식능이 증가하여 NaF와 유사한 경향이었으며  $10^{-2}$  mg/ml 농도에서 125%의 최고값을 보인후 감소하였다. NaF의 경우  $10^{-2}$  mg/ml 농도를 제외하고 모든 농도에서 대조구와 유사한 정도의 활성을 보였으며  $10^{-8}$ mg/ml 및  $10^{-1}$  mg/ml에서는 69% ~ 90%로 세포독성을 나타내었다. 대두추출물의 경우는 모든 농도에서 대조구의 100%를 상회하여  $10^{-8} \sim 10^{-2}$  mg/ml의 농도에서 대조구의 104~125%의 세포증식 효과를 나타내었다. Positive control의 세포증식능을 조사하여 상황시료와 비교를 위한 기초로 하였으며 식품의 세포 증식능이 화학제보다 우수함을 알 수 있었다.

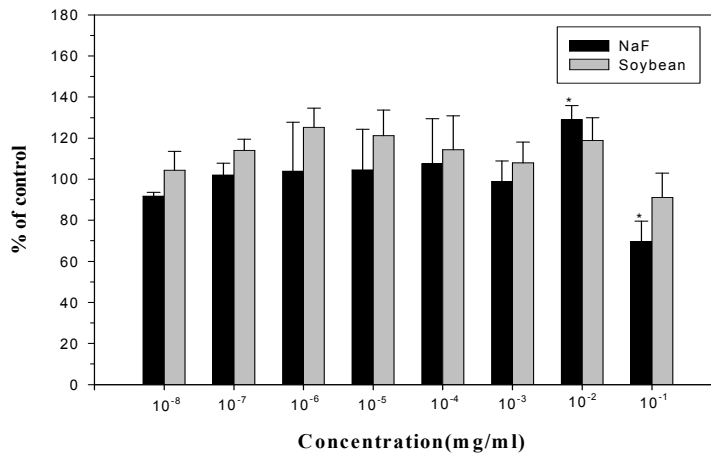


Fig. 7. Cell proliferation effects of soybean extract and NaF on Saos-2, human osteoblast-like cells.

Significantly different from the control values ( $p < 0.05$ )

골다공증시험에서 Vitamin 계열의 Positive control로서 사용되는  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 를 처리하여 분화능과 증식능을 재확인하였다 (Fig. 8).  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 의 경우  $10^{-8} \sim 10^{-4}$  mg/ml으로 농도가 증가함에 따라 증식능이 일정하여 대조구의 98~104%를 나타내었으며 같은 화학제인 NaF와 비교하여 모든 농도에서 독성을 보이지 않았다.

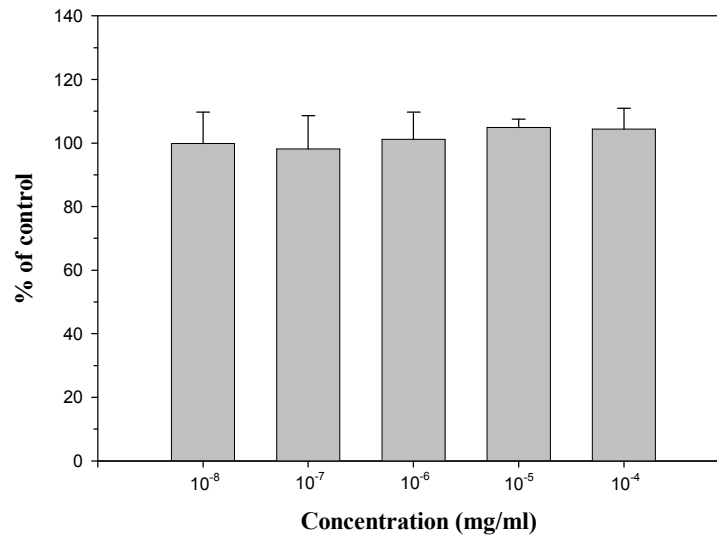
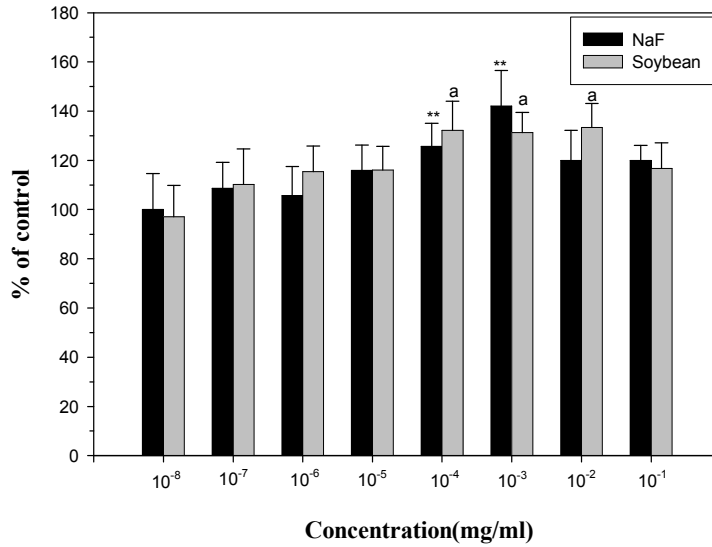


Fig. 8. Cell proliferation effects of  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  on Saos-2, human osteoblast-like cells.

### 1.2. 양성대조구의 Alkaline phosphatase(ALP) 활성 측정

인간 유사 조골세포주인 Saos-2 cell에서 조골세포의 활성을 나타내는 지표로 사용되는 Alkaline phosphatase(ALP) 증가활성을 측정하였다. 조골세포에서 ALP의 활성을 증가시키는 것으로 보고된 NaF와 식품 대두를 positive control로 사용한 결과를 Fig. 9에 나타내었다. NaF는 농도에 비례하여 증식능이 증가하였고  $10^{-3}$  mg/ml 농도에서 145%의 최고값을 보인후 감소하였다. 대두추출물도 농도에 비례하여 증식능이 증가하여 NaF와 유사한 경향이었으며  $10^{-4} \sim 10^{-2}$  mg/ml의 농도에서 130% 이상의 값을 유지한후 감소하였다. NaF의 경우 모든 농도에서 골강화 지표 효소활성이 대조구의 100%를 넘었으며  $10^{-4}$ 과  $10^{-3}$  mg/ml의 농도에서는 대조구의 125, 145%로 유의적인 활성증가를 보였다( $p < 0.05$ ). 대두추출물의 경우  $10^{-7} \sim 10^{-1}$  mg/ml의 농도에서

110~133%의 활성증가를 나타내었고, 특히  $10^{-4}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-2}$  mg/ml의 농도에서는 각각 132, 131, 135%의 유의적인 활성증가를 나타내었다( $p < 0.05$ ). ALP 활성에서는 NaF가 대두 추출물보다 다소 높은 값을 보였다.

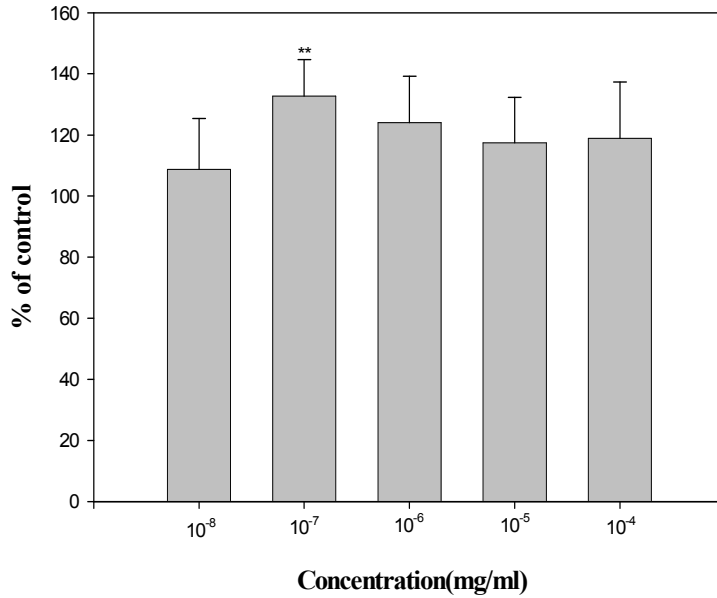


**Fig. 9. Alkaline phosphatase(ALP) activities of soybean extract and NaF on Saos-2, human osteoblast-like cells.**

Significantly different from the control values ( $p < 0.05$ )

Positive control로서  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 를 처리하여 ALP 활성을 나타낸 결과는 Fig. 10.에 나타내었다.  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 는  $10^{-8} \sim 10^{-4}$  mg/ml의 농도에서 대조구의 108~132%의 ALP 활성증가를 나타내었으며, 특히  $10^{-7}$  mg/ml의 농도에서는 대조구의 132%로 유의적인 증가를 보였다( $p < 0.05$ ). 화학제로서 NaF와의 비교시  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 에서 다소 낮은 값을 나타내었다.





**Fig. 10. Alkaline phosphatase(ALP) activities of 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> on Saos-2, human osteoblast-like cells.**

Significantly different from the control values ( $p < 0.05$ )

### 1.3. 상황버섯 추출물의 세포 생존능 측정

국내산 상황버섯 추출물의 세포증식효과를 Saos-2 cell을 이용하여 비교하였다 (Fig. 11). 상황버섯 추출물은  $1 \times 10^{-8}$  mg/ml ~  $1 \times 10^{-2}$  mg/ml에서 증식능이 농도에 비례하여 대조구의 103% ~ 111%를 나타내었다. NaF의 경우  $1 \times 10^{-1}$  mg/ml의 고농도에서 세포독성을 보였으나 본 시료에서는 독성을 나타내지 않았으며 농도 증가에서 지속적인 증식능 유지를 확인할 수 있었다. 식품 Positive control인 대두추출물 보다는 세포 증식 면에서 다소 떨어졌으나, 농도 전반에 걸쳐 상황버섯 추출물과 대두추출물간에 비슷한 경향을 확인할 수 있었다. 상황버섯 시료의 증식능이 대두에 비하여 다소 저하된 경우는 항암, 면역강화, 콜레스테롤 저하, 항염증, 항바이러스, 혈당강하, 항산화 특성 등의 보고와 같이 식품으로서는 강한 생리활성작용에 기인한 것으로 판단하였다.

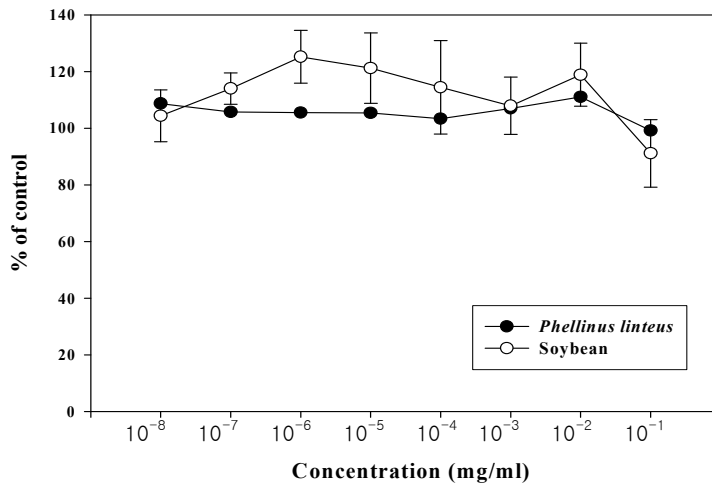


Fig. 11. Cell proliferation of *Phellinus linteus* and soybean extracts on the Saos-2, human osteoblast-like cells.

#### 1.4. 상황버섯 추출물의 Alkaline phosphatase(ALP) 활성 측정

시료인 상황버섯 추출물의 인간유사 세포계 골기질 강화 활성을 시험하고 ALP 활성으로 나타내었다 (Fig. 12). 상황버섯은 농도에 비례하여 ALP 활성이 증가하여  $1 \times 10^{-2}$  mg/ml의 농도에 서 175%로 최고값을 보였다. 시료는 실험된 모든 농도에서 대두추출물보다 현저하게 ALP 활성이 증가하였으며 특히  $1 \times 10^{-6} \sim 1 \times 10^{-2}$  mg/ml 농도에서는 대조구의 151%~175%로 유의적인 활성증가를 나타내었다( $p < 0.05$ ). 이는 Kim등이 새송이 버섯의 추출 물을 조골세포에 적용하여 ALP활성 증가를 확인한 결과에 부합하였다. 상황버섯의 인간유사 조골세포계 ALP 활성은 양성대조구로서 화학제인 NaF,  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 의 경우를 비롯 식품으로서 뼈 강화에 효과적일수 있다는 대두보다도 현저히 높아 골기질 강화 효과가 강한 것으로 판단하였다. 가장 높은 활성을 나타낸 농도는  $1 \times 10^{-2}$  mg/ml의 175%로 추후 이화학적 실험시 기준 농도로 활용하였다.

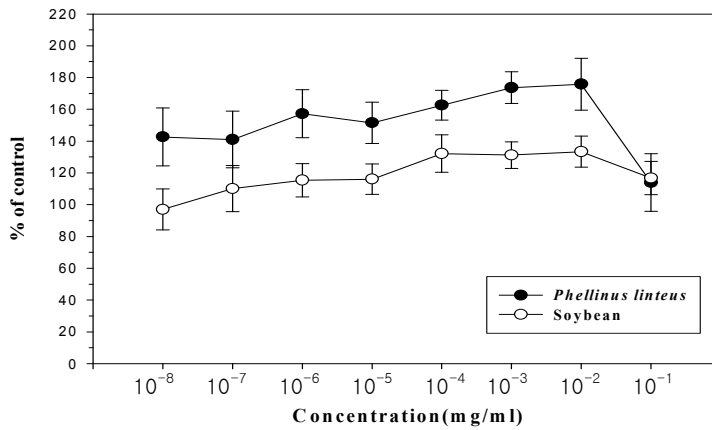


Fig. 12. Alkaline phosphatase(ALP) activities of *Phellinus linteus* and soybean extracts on Saos-2, human osteoblast-like cells.

1.5. 국산 및 외산 품종의 조골세포 증식활성

국산과 캄보디아산, 중국산 상황버섯의 세포증식효과를 Saos-2 cell을 이용하여 비교하였다(Fig. 13).

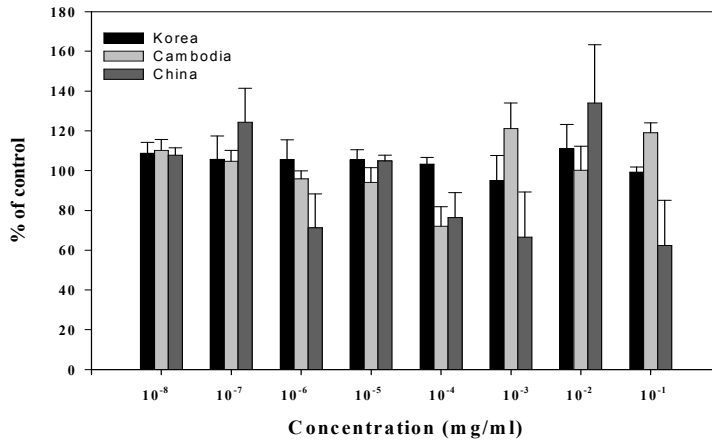


Fig. 13. Cell proliferation effects of *Phellinus linteus* extracts on the Saos-2, human osteoblast-like cells.

국내산 상황버섯은 실험된 농도에서 대조구의 95%~109%로 세포독성 면에서는 비

교적 안정적인 효과를 나타내었다. 캄보디아산 상황버섯의 경우  $10^{-8} \sim 10^{-4}$  mg/ml의 농도에서 대조구의 72~110%로 국내산 상황버섯에 비해 세포증식율이 낮았으며, 특히  $10^{-4}$  mg/ml의 농도에서는 대조구에 비해 약 28%의 세포독성을 나타내었다.  $10^{-3} \sim 10^{-1}$  mg/ml의 농도에서는 대조구의 100~121%로 증식율이 증가하였다. 중국산 상황버섯의 경우는  $10^{-7}$ ,  $10^{-2}$  mg/ml의 농도를 제외하고 국내산과 캄보디아산 상황버섯에 비해 전반적으로 증식율이 낮게 나타났다. 특히  $10^{-4} \sim 10^{-3}$  mg/ml의 농도에서는 대조구의 67~76%로 세포독성을 나타내었으며,  $10^{-1}$  mg/ml의 농도에서도 62%의 증식율을 나타내어 중국산 상황버섯이 높은 농도에서 독성 효과를 나타내고 있음을 알 수 있다.

국내산과 외산 상황버섯의 ALP 활성효과는 Fig. 14.에 나타내었다.

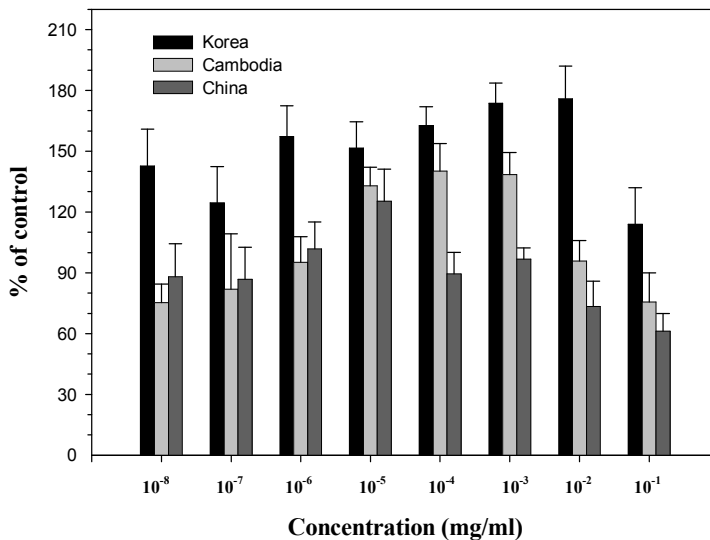


Fig. 14. Alkaline phosphatase(ALP) activities of *Phellinus linteus* extracts on the Saos-2 cell, human osteoblast-like cells.

국내산 상황버섯의 ALP 활성은  $10^{-8} \sim 10^{-3}$  mg/ml의 농도에서 대조구의 125~174%로 농도가 증가함에 따라 활성이 증가하였고,  $10^{-2}$  mg/ml의 농도에서는 대조구의 176%로 최고값을 보였으며 그 후 감소하였다. 캄보디아 상황버섯의 경우  $10^{-8} \sim 10^{-5}$  mg/ml의 농도까지는 75~133%로 농도가 증가함에 따라 활성이 증가하였고,  $10^{-4}$

mg/ml의 농도에서 140%로 최고활성을 보이다가 그 후 감소하여  $10^{-1}$  mg/ml의 농도에서는 76%로 감소하였다. 중국산 상황버섯의 ALP 활성은  $10^{-5}$  mg/ml의 농도에서 125%로 최고값을 보이다가  $10^{-2} \sim 10^{-1}$  mg/ml의 농도에서는 61~73%로 감소하였다. 실험된 모든 농도에서 국내산 상황버섯이 외산 상황버섯보다 ALP활성이 현저하게 높게 나타나 토종 토양에서 재배한 국내산의 우수성을 확인할 수 있었다( $p < 0.05$ ). 외산 상황버섯 중에서는 중국산 보다는 캄보디아산 상황이 ALP활성이 전반적으로 높게 나타났다. 김 등은 산지별 상황버섯의 cytokine을 통한 면역조절반응 실험에서 한국산 상황버섯이 캄보디아산, 중국산 상황버섯보다 GM-CSF, IL-12, p35, IFN- $\gamma$ 의 유전적 발현을 증가시켜 cytokine 조절을 통해 항암작용을 나타낸다고 보고하였다

## 2. 파골세포 억제활성

### 2.1. 파골세포의 분화

파골세포의 형성을 Fig. 15.에 나타내었다.

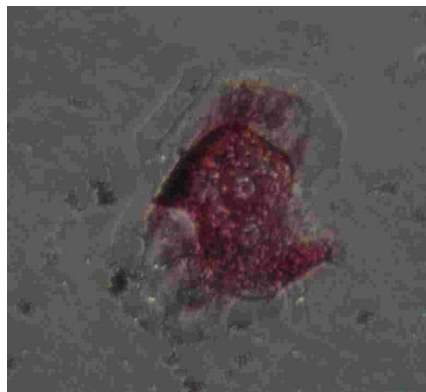


Fig. 15. Photo for Osteoclast formation from RANKL-OPG system

### 2.2. 파골세포의 억제활성

파골세포의 형성후 상황버섯의 파골세포 분화억제 활성을 precursor의 억제활성과 multinucleate 분화억제로 나누어 조사하였다(Table 7).

Table 7. Inhibition rate of *Phellinus linteus* extract on the osteoclast cell differentiation

Conc.(ug/ml)	Inhibition of precursor cell differentiation (inhibition%)	Inhibition of multinucleate cell differentiation (inhibition%)
100	100	100
50	100	100
25	95	95
1	90	90

상항버섯 추출물은 1ug/ml, 25ug/ml에서 90%, 95%의 precursor cell 억제활성을 나타내었으며 90%, 95%의 multinucleate cell 분화억제 활성을 나타내었다. 50ug/ml 이상의 농도에서는 precursor cell 및 multinucleate cell 분화에서 100%의 억제활성을 보였다. Osteoblast 및 stromal cell 세포막의 RANKL(the soluble receptor activator of NF- $\kappa$ B ligand)와 OPG(osteoclast progenitor의 RANK-osteoprotegerin)의 상호작용 및 multinucleate cell의 분화에 대한 억제활성이 높은 것으로 검색되었다. 그러나 초기 precursor 형성의 경우 양성대조구의 분화도가 높지 않아 세포 stress 등의 영향을 고려하였다.

### 2.3. 파골세포 생성에 미치는 영향

상항 추출물의 파골세포 억제활성을 TRAP stain을 통하여 조사하였다(Fig. 16.)

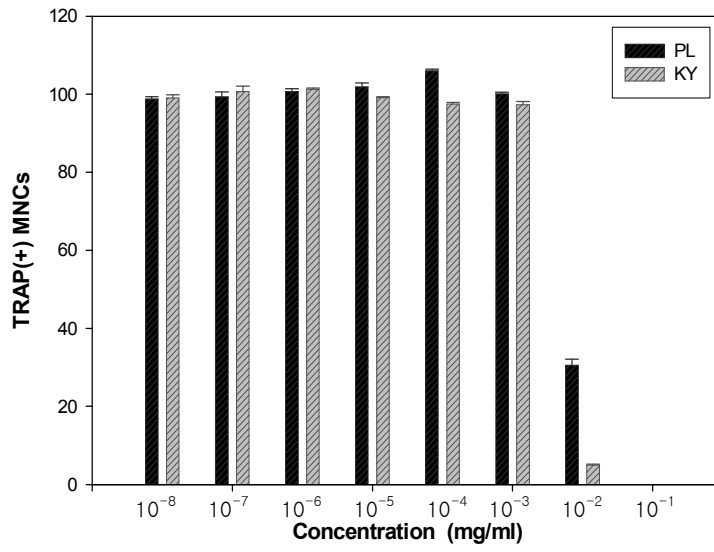
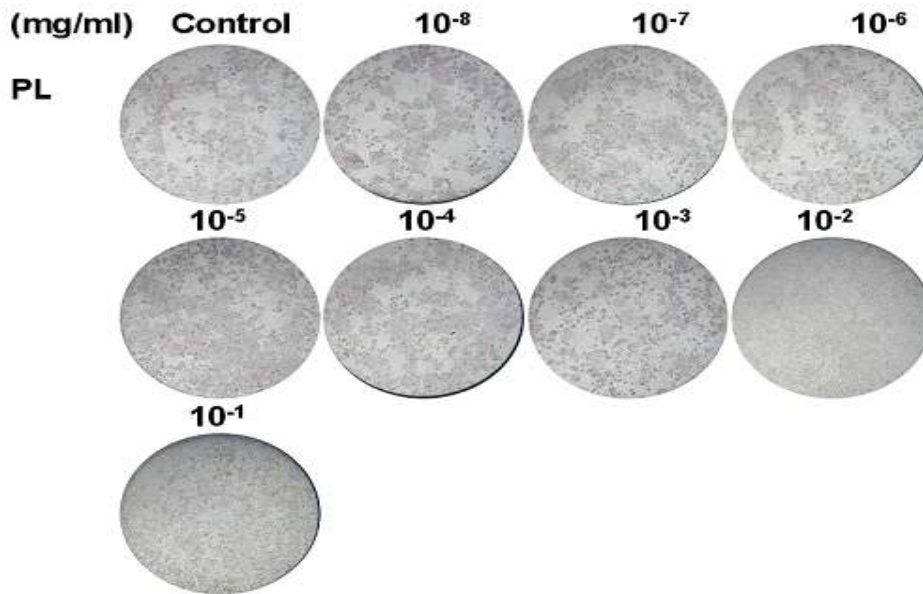


Fig. 16. TRAP(+) MNCs of osteoclast



파골 세포의 생성에 미치는 영향을 관찰하기 위하여 파골 세포의 표지 효소인 tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP)에 양성이며 다핵인 세포를 대조구와 비교하여 측정하였다. 상황 조성물  $10^{-2}$  mg/ml 농도에서 TRAP 억제활성은 70%를 나타냈으며  $10^{-1}$  mg/ml에서 파골세포 분화의 완전억제는 세포에 대한 시료농도의 영향으로 판단하였다. 상황추출물의 경우 시료농도  $10^{-2}$  mg/ml에서 60% TRAP 활성을 감소시켜 파골세포 분화효소를 억제하였다. 시료농도  $10^{-1}$  mg/ml에서 TRAP 활성이 감소되는 것은 세포 분화가 미진했기 때문인 것으로 생각되었다.

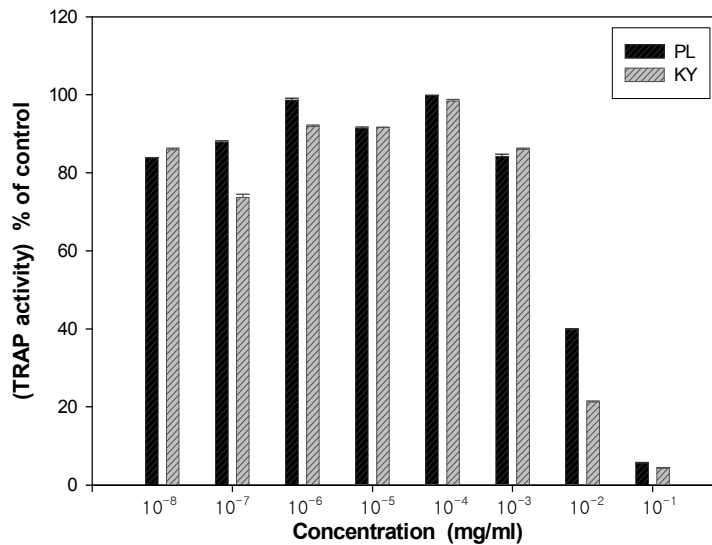


Fig. 17. TRAP activity of osteoclast

세포 내 실험을 통하여 시료가 파골 세포의 생성 및 TRAP 효소의 활성화에 미치는 영향을 관찰한 결과, PL과 KY 모두  $10^{-2}$  mg/ml의 농도에서 파골 세포의 생성 및 TRAP 효소 활성을 억제한 것으로 나타났다.

### 3. 골강화 성분의 이화학적 특성

#### 3.1. 온도에 따른 골세포 활성화 변화

##### 1) 가열온도의 영향



상황버섯추출물의 가열온도에 따른 골세포 증식능과 효소활성도를 Fig. 18. 및 Fig. 19.에 나타내었다.

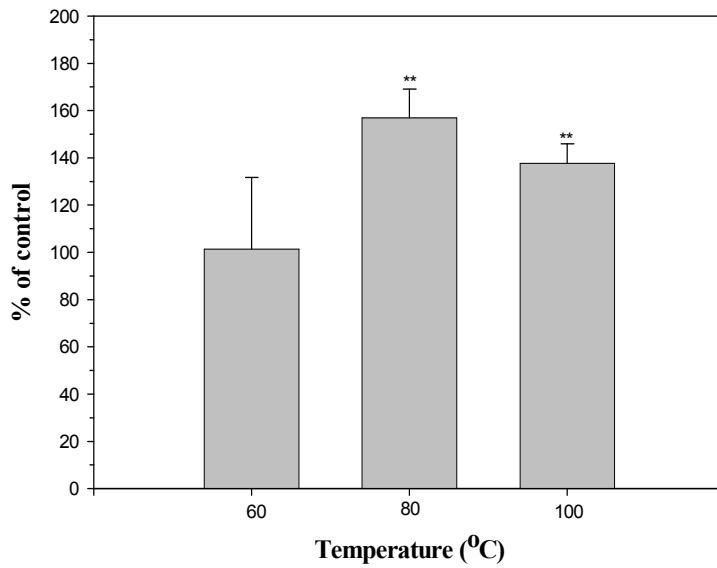


Fig. 18. Cell proliferation of *Phellinus linteus* extract on various temperatures.

Significantly different from the control values ( $p < 0.05$ )

온도에 따른 조골세포 증식능은 온도를 60°C~100°C로 증가시켰을 때 세포 증식이 유지됨을 관찰할 수 있었다. 80°C에서는 대조구 대비 156%, 100°C에서는 137%로 유의적인 세포증가를 보였다( $p < 0.05$ ).

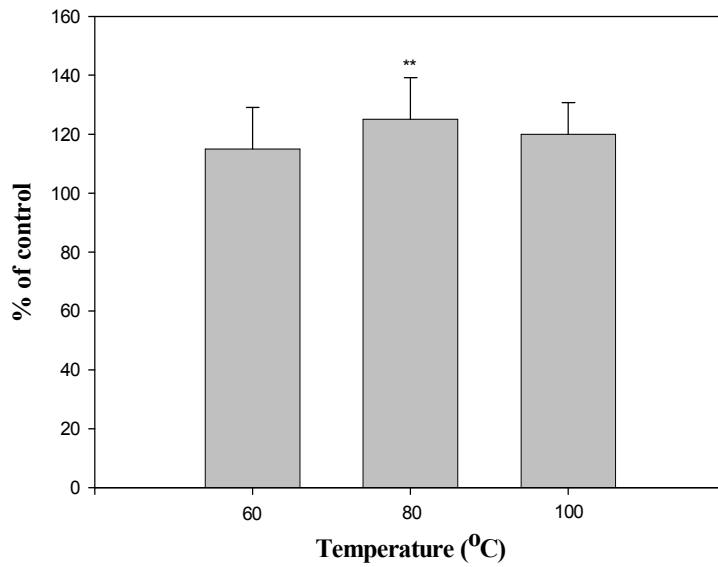


Fig. 19. Alkaline phosphatase(ALP) activities of *Phellinus linteus* extract on various temperatures.

온도처리에 따른 ALP 효소 활성은 60°C에서 약 115%, 80°C에서는 125%( $p < 0.05$ ), 100°C에서는 120%의 활성증가를 나타내었다. 이상의 결과로 볼 때, 가공 중 온도변화시 활성성분의 세포증식 효과는 유지됨을 알수 있었다. 80°C에서 세포 증식 및 ALP활성이 가장 우수하였으므로 상황버섯활용 뼈강화 제품의 가공조건 설정 시 기초 조건으로 활용할 수 있었다.

2) 가열시간의 영향

상황버섯 추출물의 가열시간에 따른 골세포 증식능과 효소활성도를 Fig. 20. 및 Fig. 21.에 나타내었다.

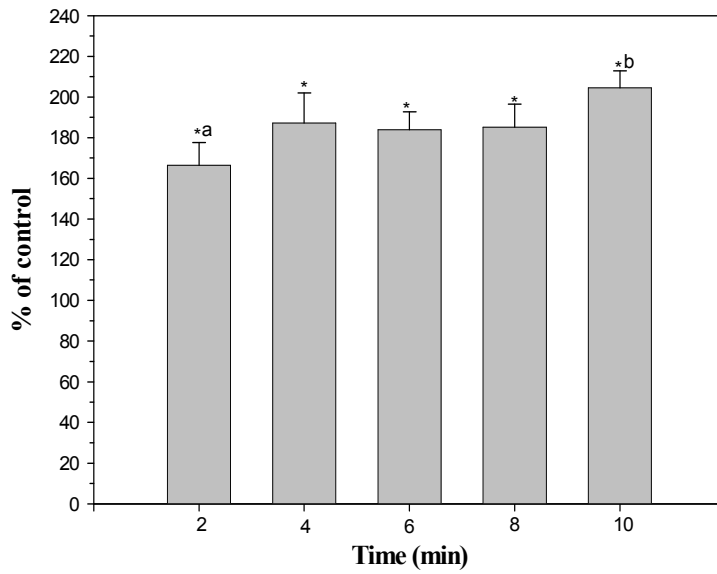
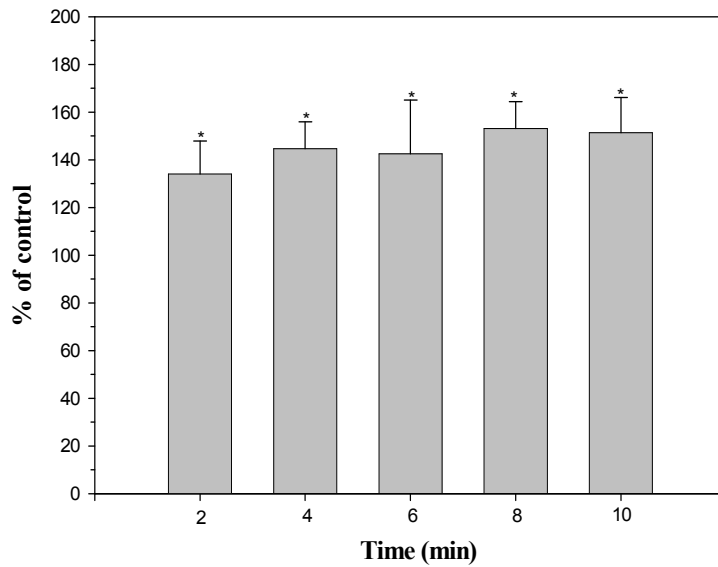


Fig. 20. Cell proliferation of *Phellinus linteus* extract on various heating times.

Significantly different from the control values ( $p < 0.05$ )

a,b: Values differ from each other ( $p < 0.05$ ).

가열시간에 따른 증식능은 가열시간이 증가함에 따라 증가하여 2분 가열 시에는 166%로 세포증식이 일어났고, 10분 가열 시에는 204%로 세포가 증식하였다 ( $p < 0.05$ ). 실험된 모든 조건에서 대조구 대비 유의적인 세포증식이 일어났음을 알 수 있었다( $p < 0.05$ ).



**Fig. 21.** Alkaline phosphatase(ALP) activities of *Phellinus linteus* extract on various heating times.

Significantly different from the control values ( $p < 0.05$ )

가열시간에 따른 효소활성도도 세포 증식능의 경향과 유사하여 가열시간이 증가함에 따라 효소 활성이 증가하였다. 가열초기에 134%의 효소활성을 나타내었고, 가열 8분 후에는 153%로 활성이 증가하였다. 실험된 모든 조건에서 대조구 대비 유의적인 ALP 효소활성이 측정되었다 ( $p < 0.05$ ). 온도에 따른 골세포의 영향은 증식능의 경우 온도변화에도 100% 이상의 높은 증식능과 ALP 활성을 유지하였다. 상황버섯을 이용한 뼈기질 강화 제품개발시 가공중 활성성분이 유지됨을 알수 있었다. 활성추출물의 80°C 이상 가열 및 10분 가열의 경우도 증식능과 활성유지에 영향을 미치지 않아 고온살균 등 일반가공에 의한 제품개발이 가능한 것으로 판단하였다.

### 3.2. pH에 따른 골세포 활성화 변화

상황버섯 뼈기질 강화 성분의 체내활성을 간접 판단하고자 산성, 중성, 염기성 조건에서 추출물의 pH 변화에 따른 골세포 증식능과 효소활성도를 조사하였다 (Fig. 22, Fig. 23).

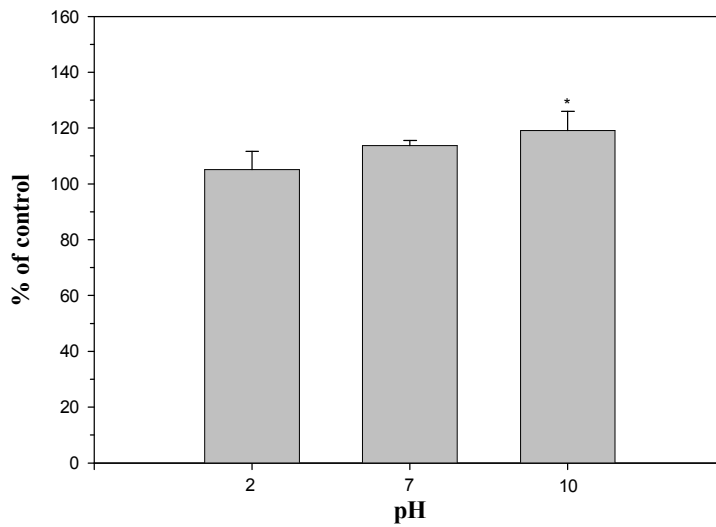


Fig. 22. Cell proliferation of *Phellinus linteus* extract on various pH.

Significantly different from the control values ( $p < 0.05$ )

pH 변화에 따른 조골세포 증식능은 pH 2에서 105%의 증식능을 보였고, pH 7에서 110%, pH 10에서는 119%의 세포증식 나타내었다( $p < 0.05$ ). 상황버섯 추출물은 pH 변화에 따라 증식능이 유지됨을 알 수 있었다.

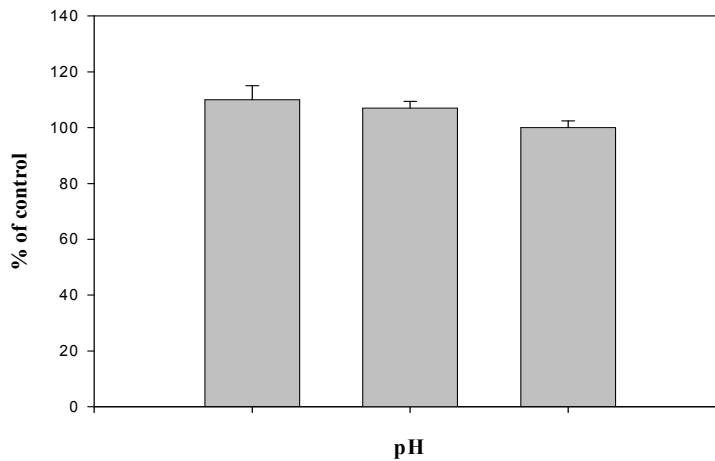


Fig. 23. Alkaline phosphatase(ALP) activities of *Phellinus linteus* extract on various pH.

pH에 따른 효소 활성도는 pH 2와 pH 7, pH 10 등 pH 변화에 따라 대조구 대비 100%이상의 활성도를 보였다. 상황버섯 추출물은 pH의 변화에서 효소활성도를 유지하여 체내활성의 가능성을 확인할 수 있었다.

### 3.3. 상황버섯 추출물의 뼈세포내 작용 특성

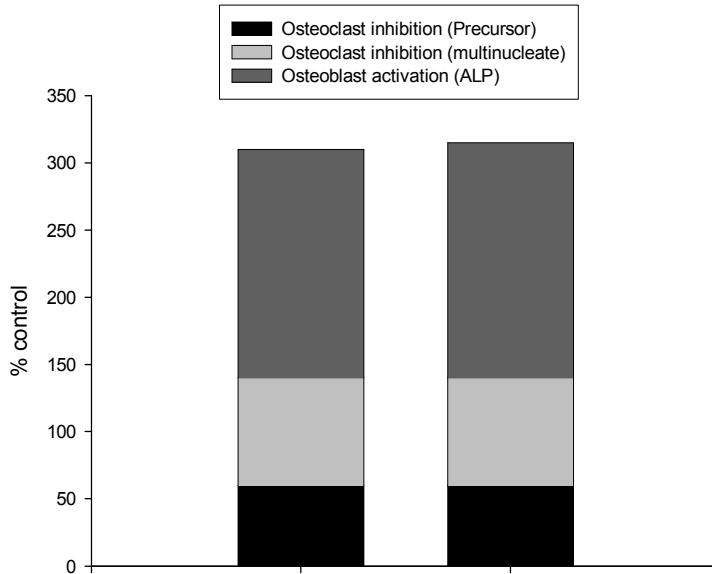


Fig. 24. Osteo-activity characteristics of on the osteoblast and osteoclast cell.

뼈 세포 강화 및 뼈 흡수(과골) 특성을 종합한 결과는 Fig. 24와 같다. 상황추출물은 뼈 형성과 뼈흡수(과골) 억제 효과를 모두 나타내었다. 뼈세포 강화는  $10^{-1}$ mg/ml 농도에서 175%,  $10^{-2}$ mg/ml 농도에서 170%로서 높았으며, 과골은 osteoblast 및 RANKL-OPG 반응으로부터 precursors cell 형성 및 multinucleate cell의 분화과정을 모두 억제하였다. precursors cell은 1ug/ml 농도에서 60%, 25ug/ml 농도에서 80%를 억제하였으며, multinucleate cell 역시 1ug/ml 농도에서 60%, 25ug/ml 농도에서 80%를 억제하였다.

### 제 3 절 상황 추출물의 동물계 뼈강화 활성

#### 1. 난소절제 실험동물의 식이 효율 및 체중 변화

실험동물을 군 당 10마리씩 네 군으로 나누고 난소절제술을 시행하여 골다공증을 유발하고, 일주일간의 회복기간을 거친 후 골다공증 예방 및 치료효능을 가진 조성물을 12주간 공급하였다. 12주간의 실험 기간 동안 총식이섭취량, 체중 및 식이효율을 Table 8와 Fig. 25.에 나타내었다.

Table 8. Body weight changes, food intakes and food efficiency ratio of rats fed osteo-active product for 12 weeks

	sham	control	PL	KY
<b>Body weight(g/rat)</b>				
Initial	213.18±16.96 <sup>ns</sup>	204.28±12.19	200.35±10.34	206.79±13.02
Final	281.61±27.52 <sup>b</sup>	357.54±32.55 <sup>a</sup>	359.48±29.48 <sup>a</sup>	359.96±26.04 <sup>a</sup>
Wt. gain	68.33±24.27 <sup>b</sup>	151.72±24.82 <sup>a</sup>	155.98±27.97 <sup>a</sup>	156.74±18.35 <sup>a</sup>
<b>Food intake</b>				
Total(g/rat)	2938.39±58.74 <sup>ns</sup>	3155.07±43.74	3499.19±48.07	3369.59±58.45
Weekly(g/wk/rat)	244.87±4.90 <sup>ns</sup>	262.92±3.65	291.60±4.01	280.80±4.87
<b>FER<sup>4)</sup></b>	2.54±0.49 <sup>b</sup>	4.81±0.79 <sup>a</sup>	4.46±0.80 <sup>a</sup>	4.65±0.54 <sup>a</sup>

1) Values are means±SD

2) Values with different superscript within the row are significantly different at  $\alpha=0.05$  by Duncan's multiple range test.

3) FER : Food efficiency ratio, Wt. gain(g)/Food intake(g) × 100

실험 동물의 초기 체중은 200.35~213.18g이었다. 12주 동안 실험식이의 공급으로 sham(위대조군), control, PL군, KY군의 체중이 각각 68.33g, 151.72g, 155.98g 및 156.74g씩 증가하여, 각각 최종 체중이 281.51g, 357.54g, 359.48g 및 359.96g으로 나타났다. 0주에서 1주간의 체중 증가량이 가장 컸으며, 10주 이후에는 유지되거나 다소

감소하는 경향을 보였다. 난소 제거 수술을 받은 control, PL군, KY군은 개복 수술만 받은 sham군에 비해 비교적 체중 증가량이 높게 나타났다. 이러한 난소 절제로 유발된 체중 증가 현상은 기존의 연구에서도 이미 보고된 바 있다. 골아세포와 지방세포는 같은 배아세포에서 분화되는데 에스트로겐은 같은 배아세포에서 골아 세포의 분화를 촉진하는 반면에 지방세포의 분화는 억제시킨다는 보고에 근거할 때 난소 제거 후 에스트로겐 결핍으로 인한 체중 증가는 지방조직 축적에서 기인된 것이라 고려하였다.

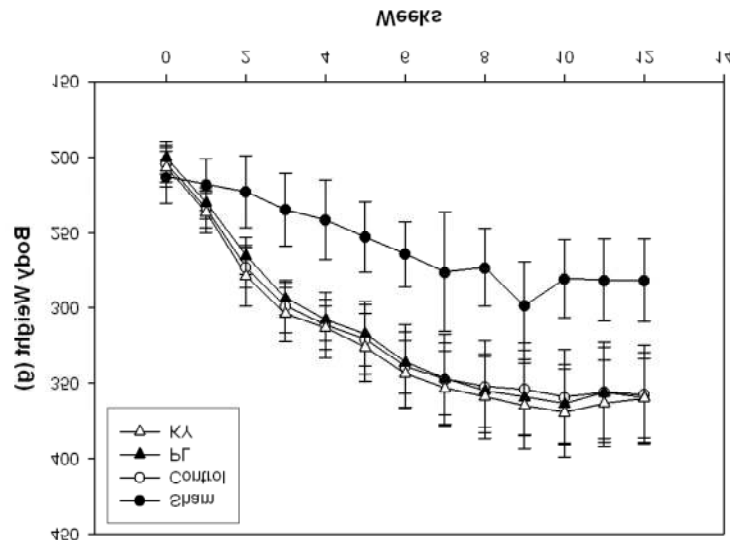


Fig. 25. Effect of PL and KY on the body weight gain of rats fed osteo-active product for 12 weeks.

총식이섭취량의 경우 sham군의  $2938.39 \pm 58.74\text{g}$ 에 비해 control, PL군 및 KY군은  $3155.07 \pm 43.74 \sim 3499.19 \pm 48.07\text{g}$ 으로 대조구와 실험구간의 사료 섭취량의 유의적인 차이는 없었다. 한주간의 식이 섭취량의 경우도 총식이섭취량과 마찬가지로 sham군에 비해 control, PL군 및 KY군이 다소 높게 나타났다.

총식이섭취량과 체중증가량을 고려하여 산출한 식이효율 (FER: Food efficiency ratio)의 경우도, sham군의  $2.54 \pm 0.49$ 에 비해 control, PL군 및 KY군은  $4.46 \pm 0.80 \sim 4.81 \pm 0.79$ 로 유의적으로 높게 나타났다. 식이효율은 체중증가량을 식이섭취량으로 나



는 것이므로 난소절제 시에 sham군보다 식이효율이 높은 것은 난소절제군의 체중 증가율이 높은 것과 관련이 있다. Jang의 연구에서 난소절제군의 식이효율이 sham군보다 더 높게 나타나 본 결과와 동일하였고, 난소절제 후 체중증가와 식이효율의 증가는 난소절제로 인한 에스트로겐 분비감소와 식이섭취량의 증가에 기인하는 것으로 나타난 보고와 동일하였다.

## 2. 난소절제 실험동물의 장기무게 변화

난소절제 실험동물의 간, 신장, 자궁을 절제한 후 무게변화를 조사하였다(Table 9).

Table 9. Organ weights of rats fed osteo-active product for 12 weeks

Organ weight(g)	sham	control	PL	KY
Liver	9.03±1.06 <sup>ns</sup>	9.88±1.52	9.40±1.43	9.58±1.18
Kidneys	1.90±0.15 <sup>a</sup>	1.76±0.17 <sup>bc</sup>	1.73±0.16 <sup>c</sup>	1.87±0.14 <sup>ab</sup>
Uterus	0.75±0.28 <sup>a</sup>	0.11±0.02 <sup>b</sup>	0.13±0.02 <sup>b</sup>	0.12±0.02 <sup>b</sup>

1) Values are means±SD

2) ns: not significant

3) Values with different superscript within the row are significantly different at  $\alpha=0.05$  by Duncan's multiple range test.

간 무게는 난소를 절제하지 않은 sham군이 난소를 절제한 control군보다 높게 나타났다. sham군은 9.03 g으로 가장 낮았으며 control은 9.88 g으로 가장 높았다. PL군과 KY군은 9.40~9.58 g으로 sham군보다는 다소 높았으나 유의차가 없어 시료의 간에 대한 영향은 없는 것으로 판단하였다. 시료처리군의 경우 control보다는 다소 낮은 값을 보여 장기의 지방축적이 control에 비하여 감소하였음을 확인할 수 있었다. 이는 지질이 골형성의 전구체와 관련있음을 고려할 때 PL군과 KY군이 골다공 진행을 다소 지연한 것과 관련 있는 것으로 판단하였다. 신장의 경우 sham군이 1.90 g으로 가장 높았으며, KY군(1.87 g), control(1.76 g) 및 PL군(1.73 g) 순으로 신장 무게가 낮았다. 자궁의 무게는 sham군이 0.75 g으로 가장 높았으며 난소절제한 군은 0.11 g~

0.13 g으로 약 7배 정도 유의적으로 낮게 나타났으며, 이는 골형성 호르몬 유사활성과 관련이 있는 것으로 판단하였다.

### 3. 혈액내 지표 검색

#### 3.1 GOT와 GPT활성

혈청의 GOT와 GPT활성을 Table 10에 나타내었다.

Table 10. GOT and GPT activities of rats fed osteo-active product for 12 weeks

Parameters (U/L)	sham	control	PL	KY
GOT	85.40±17.58 <sup>b</sup>	117.73±46.13 <sup>ab</sup>	128.40±45.88 <sup>a</sup>	120.00±55.389 <sup>ab</sup>
GPT	33.30±9.39 <sup>ns</sup>	31.55±10.79	33.70±7.41	34.50±10.70

1) Values are means±SD

2) Values with different superscript within the row are significantly different at  $\alpha=0.05$  by Duncan's multiple range test.

혈청 중의 GOT(Glutamic oxalacetic transaminase), GPT(Glutamic pyruvic transaminase)의 활성은 알콜, 사염화탄소, 유기용매와 기타 독성물질에 의한 간 실질 세포의 장해 발생시 혈 중으로의 방출이 항진되어 나타나는 간장해의 지표로 이 때 GOT의 활성이 GPT에 비하여 높게 나타나는 것으로 알려졌다.

이처럼 GPT, GOT 활성은 정상상태에서는 효소의 활성이 낮으나 심장, 간, 근육, 혈구 등의 조직이 병적 상태에 빠지거나 혹은 붕괴되어 질병이 발생하면 세포내에 존재하는 효소가 다량으로 혈중에 유출되어 활성이 증가하는 효소로 만성간염, 급성간염, 지방간, 알콜성 간염, 간암 등 주로 간세포의 변성이나 괴사를 반영한다. 본 실험에서 GOT는 sham군이 85.40 U/L로 가장 낮았으며, 난소 적출 군은 control 117.73 U/L, PL군 128.40 U/L 및 KY군 120.00 U/L로 유의적으로 높은 값을 보였다. GPT의 경우는 control이 31.55 U/L로 가장 낮았으며 sham군과 PL군은 각각 33.70 U/L, 33.70 U/L로 유사했으며, KY군은 34.50 U/L로 약간 높았으나 유의적인 차이는 나타

나지 않았다. 시료 투여군에서 GOT 값이 다소 높았으나, GOT의 경우 유의차가 없기는 하나 PL군 및 KY군이 sham군의 값보다 높아 난소절제술의 실시와 식이 공급의 영향이 실험동물의 간에 무리를 유발할수 있는지 추후 연구가 더 진행되어야 할 것으로 고려하였다.

### 3.2 혈액의 지질 성분 분석

혈액의 지질 성분을 분석한 결과는 Table 11에 나타내었다.

Table 11. The changes of Blood lipid parameters of rats fed osteo-active product for 12 weeks

Parameters (mg/dL)	sham	control	PL	KY
Triglyceride	94.20±62.99 <sup>ns</sup>	104.09±24.40	74.50±20.54	73.80±26.52
Total cholesterol	84.90±18.00 <sup>b</sup>	105.64±18.63 <sup>a</sup>	97.00±13.21 <sup>ab</sup>	100.00±11.90 <sup>a</sup>
HDL-cholesterol	26.30±4.16 <sup>b</sup>	31.73±3.93 <sup>a</sup>	29.40±4.45 <sup>ab</sup>	30.40±2.84 <sup>a</sup>

1) Values are means±SD

2) ns : not significant

3) Values with different superscript within the row are significantly different at  $\alpha=0.05$  by Duncan's multiple range test.

혈중 triglyceride의 경우 sham군의 94.20 mg/dl과 비교하여 PL군과 KY군은 73.80 ~ 74.50 mg/dl로 다소 낮았으나, control은 104.09 mg/dl로 비교적 높게 나타났으나 유의적인 차이는 보이지 않았으며, 총 콜레스테롤의 경우 sham군의 84.90 mg/dl에 비해 난소 절제군은 97.00~105.00 mg/dl로 유의적으로 높게 나타났다. 난소절제군 중에서는 시료처리군의 total cholesterol 양이 다소 낮게 나타나 성호르몬의 전구체로서의 역할과 함께 뼈 형성의 기전에 관여한 것으로 추론할수 있으나 유의성은 없었다. HDL 콜레스테롤은 sham군이 26.30 mg/dl으로 난소절제군의 29.40~31.73 mg/dl보다 유의적으로 낮았다.

### 3.3 혈액의 ALP, Osteocalcin 분석

혈청 ALP의 활성은 포괄적인 골생성 (bone formation)의 지표로서 가장 유의하게 사용되며 조골세포의 활성을 반영한다. Osteocalcin은 조골세포에 의해 합성되며 뼈의 extracellular matrix에 결합된다. 새로 결합된 osteocalcin의 일부는 순환계로 방출되는데 osteocalcin과 조직학적으로 증명된 골형성 정도와 좋은 상관성을 나타내므로 혈청 중 osteocalcin의 농도는 조골세포의 활성도를 직접적으로 반영한다고 볼 수 있다. 혈청 ALP(Alkaline phosphatase)와 Osteocalcin 함량을 측정하여 Fig. 26, 27에 각각 나타내었다.

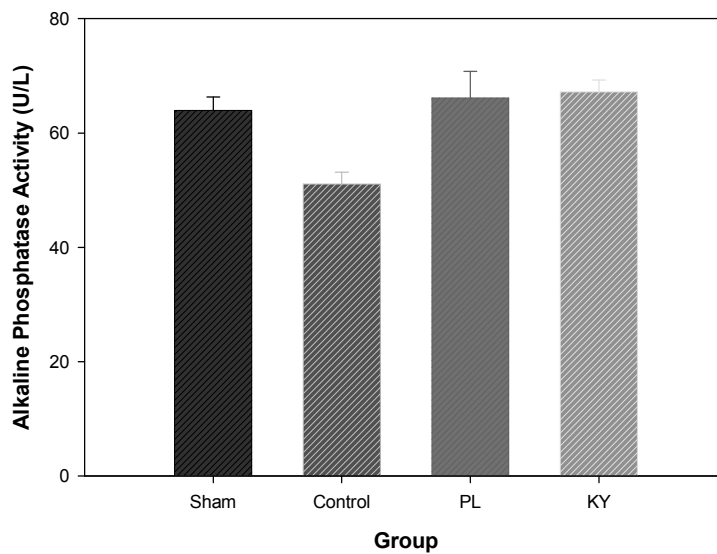
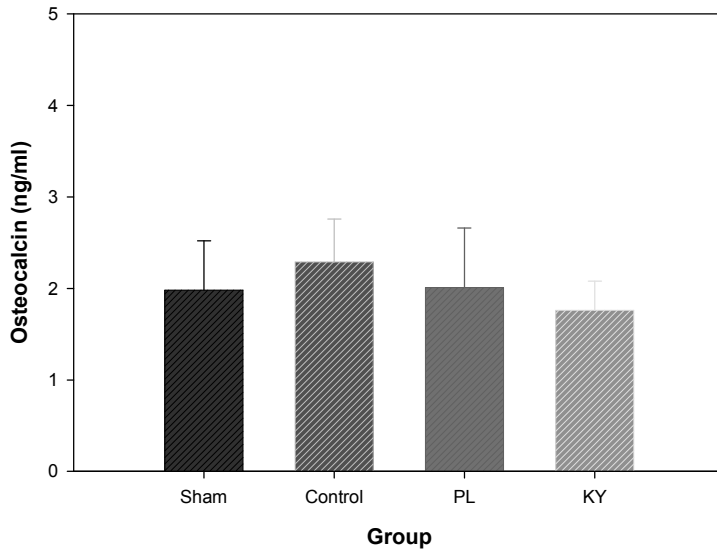


Fig. 26. The changes of alkaline phosphatase activity of rats fed osteo-active product for 12 weeks



**Fig. 27. The changes of osteocalcin contents of rats fed osteo-active product for 12 weeks**

혈청 ALP 농도는 sham군의 63.9700 L/U 에 비해 control은 51.0800 L/U로 낮았으나 시료 처리군은 66.1200~67.1700 L/U로 sham군에 비해 다소 높았다. 이는 Kim의 난소 절제 쥐는 sham군에 비해 혈청 ALP의 농도가 높았다고 한 것과, Kim의 난소 절제 쥐 실험에서 sham군보다 혈청 ALP의 농도가 증가하였다고 보고한 것과 일치하였다. 일반적으로 난소 절제 수술은 골형성의 생화학적 지표인 혈청 ALP의 증가를 유도하고 난소 절제시 ALP 활성의 증가는 에스트로겐 결핍으로 bone turnover가 증가되었기 때문이라고 보고되고 있다.

혈청 Osteocalcin은 sham군의 1.9800 ng/ml에 비해 난소 절제군은 다소 높은 경향을 보였다. 에스트로겐의 골보호 기전은 골 turnover rate를 감소시키면서 골손실을 방지하는 것으로 알려져 있다. Fandi 등은 난소 절제한 흰쥐에게 genistein을 주사했을 때 혈청 osteocalcin 수준을 증가시켰다고 보고하였으며, 본 연구에서는 상황버섯을 첨가한 PL군의 혈청 osteocalcin이 2.0100 ng/ml로 높은 값을 보였다. 이는 Sham군의 경향을 볼 때 골형성후 bone turn over에 의한 저하현상으로 판단할수 있으며 시료군 역시 Sham군의 경향과 일치하여 골형성 기여후 저하현상으로 고려하였다. 따라서 상

황버섯 추출물 및 조성물이 혈청내 osteocalcin 농도 증가후 bone turnover 한 것으로 판단하였다.

### 3.4 혈액의 Ca, P 분석

실험동물의 체내 칼슘과 인의 함량을 Table 12에 나타내었다.

Table 12. Calcium, Inorganic phosphorus and Ca/P ratio in Serum

Parameters	sham	control	PL	KY
Ca(mg/dL)	11.35±0.42 <sup>a</sup>	10.55±0.32 <sup>b</sup>	10.58±0.34 <sup>b</sup>	10.68±0.29 <sup>b</sup>
P(mg/dL)	6.19±0.31 <sup>ns</sup>	6.01±0.49	5.78±0.96	5.77±0.411
Ca/P	1.84±0.12 <sup>ns</sup>	1.77±0.16	1.87±0.29	1.86±0.12

1) Values are means±SD

2) ns: not significant

3) Values with different superscript within the row are significantly different at  $\alpha=0.05$  by Duncan's multiple range test.

혈중 칼슘 농도는 내적, 외적 변화에 대해 항상성을 유지하므로 실험 요인에 따른 변화에도 칼슘 농도는 보통 정상 범위 내에 있는 것으로 보고되어 있다. 본 연구에서도 혈청 칼슘의 농도에서 모든 군은 흰쥐의 혈청 칼슘 농도의 정상수준 (7.2~13.0 mg/dl) 내에 포함되었다. 식이가 시료 첨가군일 때 난소 절제군은 sham군에 비해 혈청 칼슘농도가 유의적으로 낮았다. 이 결과는 Kang의 연구에서 난소절제 쥐에서 9주 동안 사육했을 때 난소 절제군의 혈청 칼슘이 sham군에 비하여 유의적으로 낮게 나타났다고 한 것과, Kim의 연구에서 sham군에 비하여 난소 절제군이 시간이 지남에 따라 혈청 칼슘이 감소하는 경향을 나타내었다고 보고한 것과 일치하였다.

혈청 인의 농도는 실험군 간에 유의적인 차이가 나타나지 않았으며 모두 정상수준 (3.11~11.0 mg/dl) 내에 포함되었다. Kim의 연구에서 혈청 인은 난소절제에 의한 변화보다는 식이 칼슘의 차이에 따른다고 제시하였고, Kang의 연구에서도 혈청 인이 난소절제 시에 영향을 받지 않는다고 하여 본 연구 결과와 일치하였다. 칼슘과 인의

농도보다는 칼슘/인의 비율이 중요할 수 있으며 비율이 높은 경우 골흡수 감소, 골형성 반응과 관련이 있는 것으로 알려져 있다. 칼슘과 인의 비율에 있어서는 control군이 1.77로 비교적 낮았으며, sham, PL, KY 투여군의 Ca/P가 높아 1.84~1.87로 나타났다. 조성물 KY의 경우 혈중의 인의 함량이 낮고 Ca/P 비율이 높아 bone turnover 및 mineralization이 활성화 되는 것으로 간접 확인하였다.

#### 4. 뇨대사 지표검색

##### 4.1 Creatinine과 DPD 측정

실험동물에게 난소절제술을 실시하여 골다공증을 유발하고 실험식이를 공급한 후 6wk와 12wk에 24시간 뇨를 수집하여 creatinine과 deoxypyridinoline(DPD) 함량을 분석한 결과를 Table 13과 Fig. 28에 나타내었다.

Table 13. Creatinine contents of urine in experimental groups

	6wk	12wk
	Creatinine(mg/dL)	
sham	78.97±9.75 <sup>ns</sup>	69.03±26.62 <sup>ns</sup>
control	56.50±16.61	62.00±5.07
PL	78.10±23.60	72.87±40.84
KY	70.90±21.39	59.87±11.05

1) Values are means±SD

2) ns: not significant

난소절제 후 6주 시점에서 sham군은 78.97 mg/dL로 난소절제군의 56.50~78.10 mg/dL과 비교하여 유의적인 차이는 없었다. 12주 시점에서는 control이 62.00 mg/dL으로 증가한 것을 제외하고는 sham군 69.03 mg/dL, PL군 72.87 mg/dL, KY군 59.87 mg/dL로 감소하였으나, 유의적인 차이는 나타나지 않았다.

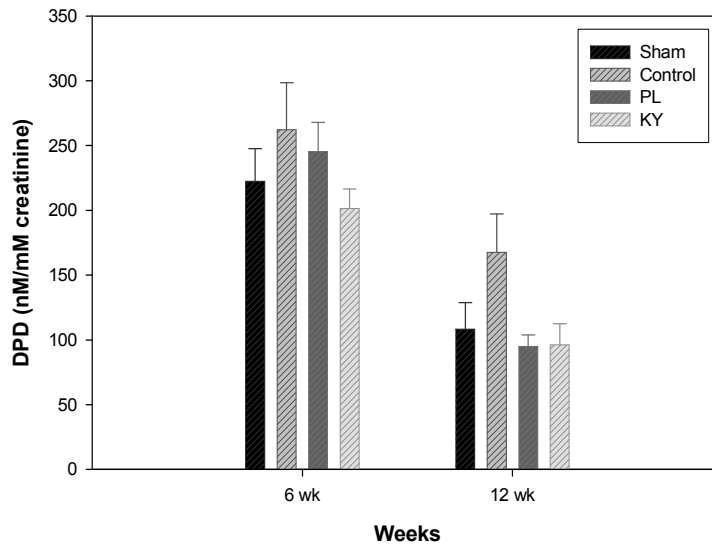


Fig. 28. Deoxypyridinoline of urine in experimental groups

골 흡수 지표로 알려진 collagen의 crosslink인 pyridiniline 및 deoxypyridinoline은 골격 내에 분포하며 다른 연골조직은 제외되고 골격의 뼈에서만 유리된다. 파골 세포의 흡수와 더불어 이들 collagen의 부산물의 생성은 혈중을 통해 노로 배설되게 된다. 따라서 소변 내의 이러한 crosslink를 측정하는 것은 골 흡수의 특이적인 지표로 보고되고 있다. 즉 골 교체율이 빠를 때 요중 pyridinoline, deoxypyridinoline, crosslink value가 높아지게 된다. 즉, DPD (Deoxypyridinoline)는 성숙한 collagen에 존재하며 피부나 조직보다는 주로 뼈에 분포되어 있고, 사람의 경우 pyridinoline 보다 3배 정도 높게 존재하므로 특히 골 흡수를 진단하는데 특이성이 높다고 알려져 있다. 폐경 후 노중 DPD 농도가 증가되며, 호르몬 요법 또는 골흡수제의 적용은 이를 억제시킨다고 보고된 바 있다. 골흡수 지표인 뇨의 pyridinoline과 DPD는 hydroxylysine 및 lysine의 post-translational processing에 의해 형성되어 mature collagen에 존재한다. Pyridinoline과 DPD는 파골세포에 의해 뼈에 있는 type I collagen이 분해될 때 많이 혈중과 소변으로 유리된다. 본 실험에서는 난소절제 후 6주 시점에서 DPD는 sham이 222.40 nM/mM, 난소절제군은 201.37~262.39 nM/mM로 KY군에서 가장 높은 값을 보였다. 사육 12주에서는 control이 167.63 nM/mM로 가장 높았으며, sham군의



108.37 nM/mM과 비교하여 PL군은 94.93 nM/mM로 가장 낮았고 KY군 역시 96.13 nM/mM로 6주와 비교하여 2배 이상 감소됨을 보였다. 이상의 결과로부터 골 흡수 억제 효과를 확인 할 수 있었다.

#### 4.2 뇨의 Ca 및 P 분석

수집한 뇨시료의 Ca 및 P 함량을 분석하여 Table 14에 나타내었다.

Table 14. Calcium, and inorganic phosphorus contents in urine

	6wk		12wk	
	Calcium (mg/dL)	Inorganic P (mg/dL)	Calcium (mg/dL)	Inorganic P (mg/dL)
sham	4.40±0.4 <sup>a</sup>	390.03±58.39 <sup>a</sup>	3.90±0.17 <sup>a</sup>	307.70±121.78 <sup>a</sup>
control	2.73±1.62 <sup>b</sup>	130.07±58.38 <sup>b</sup>	2.73±0.46 <sup>b</sup>	149.13±43.99 <sup>b</sup>
PL	4.27±0.06 <sup>a</sup>	278.77±17.43 <sup>a</sup>	1.93±0.40 <sup>c</sup>	161.13±80.58 <sup>b</sup>
KY	5.07±1.31 <sup>a</sup>	295.40±84.29 <sup>a</sup>	2.97±0.50 <sup>b</sup>	185.67±12.42 <sup>b</sup>

1) Values are means±SD

2) Values with different superscript within the row are significantly different at  $\alpha=0.05$  by Duncan's multiple range test.

뇨의 Ca 함량은 사육 6주에 sham에서 4.40 mg/dL, 시료처리 PL군 및 KY군에서 4.27~5.07로서 유의적으로 높았고 control군에서는 2.73 mg/dL로 낮았다. 사육 12주째 뇨의 Ca 함량은 다소 감소하는 경향이였으며 sham군은 3.90mg/dL로 높았으며 control, 조성물 KY 군은 2.73~3.90 mg/dL로서 PL 군의 1.93 mg/dL보다 높은 값을 나타내었다. Inorganic P의 함량은 사육 6주에 sham에서 390 mg/dL로 가장 높았으며 PL 및 KY 군에서 278~295 mg/dL를 보였고 control 군에서 130 mg/dL로 낮았다. 사육 12주에 뇨의 P 함량은 감소하는 경향이였으며 sham 군은 307 mg/dL으로 가장 높았고 control, KY, 조성물 PL 군은 161~185 mg/dL를 나타내었으며 Control군은 149 mg/dL로 낮았다. 뇨의 무기질 대사 경향은 Sham군과 시료처리군에서

mineralization 대사후 배출순환양이 Control군에 비하여 높은 값을 보인 것으로 해석하였다.

## 5. 대퇴골 및 경골의 물리적 변화도 측정

### 5.1 골의 무게, 길이 및 두께 측정

난소절제 수술 후 12주 사양 후 경골과 대퇴골의 형태적 조사를 Table 15에 나타내었다.

Table 15. Weight, length and diameter of left femur and tibia bone in experimental groups

	Femur			Tibia		
	weight (g)	length (mm)	diameter (mm)	weight (g)	length (mm)	diameter (mm)
sham	1.04±0.09 <sup>ns</sup>	34.35±1.42 <sup>ns</sup>	3.68±0.18 <sup>b</sup>	0.97±0.12 <sup>ns</sup>	40.17±1.04 <sup>ns</sup>	4.02±0.18 <sup>b</sup>
control	1.06±0.08	35.54±1.58	3.91±0.27 <sup>ab</sup>	0.93±0.14	40.27±1.35	4.11±0.25 <sup>ab</sup>
PL	1.04±0.12	35.81±1.67	3.72±0.34 <sup>b</sup>	0.89±0.09	37.66±9.53	4.12±0.19 <sup>ab</sup>
KY	1.15±0.16	36.27±1.23	4.11±0.33 <sup>a</sup>	0.96±0.07	41.25±1.42	4.28±0.13 <sup>a</sup>

1) Values are means±SD

2) ns: not significant

대퇴골의 경우 무게는 sham군과 난소절제군이 1.04~1.15 g을 나타내어 유의적인 차이는 없었다. 길이는 sham군이 34.35 mm, 난소절제군이 35.54~36.27 mm를 나타내었으며, 직경은 sham군이 3.68 mm, 난소절제군이 3.72~4.11 mm로 길이와 직경이 sham군에 비해 난소 절제군이 다소 길고, 두꺼웠으나 유의적인 차이는 없었다. 경골의 경우 무게는 sham군이 0.97 g으로 가장 무거웠고 난소절제군이 0.89~0.96 g을 나타내었다. 길이는 sham군이 40.17 mm를 나타내었고, 난소절제군은 37.66~41.25 mm를 나타내었다. 직경은 sham군이 4.02 mm, 난소절제군이 4.11~4.28 mm를 나타내어

유의적인 차이가 없었다. 전반적으로 대퇴골 및 경골에서 각 군간의 무게, 길이, 직경 간에 뚜렷한 유의차는 나타나지 않았다.

## 5.2 골의 BMD (bone mineral density) 측정

발골 시료의 femur와 tibia의 골밀도를 DEXA로 분석하여 Fig. 29.에 나타내었다.

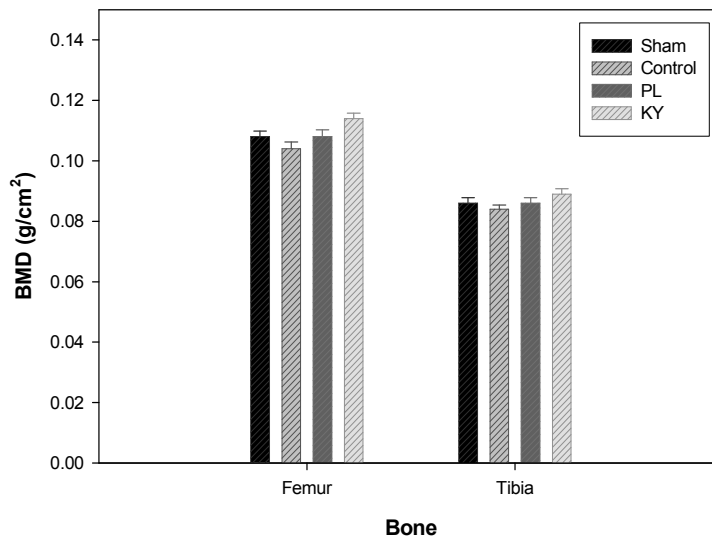


Fig. 29. Bone mineral density of right femur bone after 12 week administration since ovariectomy surgery

발골한 대퇴골과 경골의 골밀도 즉, BMD(bone mineral density)는 난소 절제 수술에 따라 경향은 나타내었으나 차이가 다소 작았는데 이는 난소 절제군의 체중증가 영향으로 고려하였다. 대퇴골의 sham군과 PL군이 0.108 g/cm<sup>2</sup>, control군이 0.104 g/cm<sup>2</sup>로 sham군과 PL군에 비해 다소 낮았고 KY 군이 0.114 g/cm<sup>2</sup>로 가장 높았다. 경골의 BMD 역시 sham 군과 PL군이 0.086 g/cm<sup>2</sup>였고 control 군이 0.083 g/cm<sup>2</sup>로 가장 낮았다. KY군은 0.089 g/cm<sup>2</sup>로 가장 높은 값을 보였다.

### 5.3 골의 강도 및 탄성도

오른쪽 대퇴골 및 경골의  $\Delta E$ , stiffness, breaking strength, time 및 displacement 를 측정하여 Table 16 (대퇴골), Table 17 (경골)에 나타내었다.

**Table 16.  $\Delta E$ , stiffness, breaking strength, time and displacement of right femur bone in experimental groups**

	$\Delta E$ (Kg/s)	Stiffness	Breaking strength	Time (s)	Displacement (mm)
<b>sham</b>	6.467±1.294 <sup>ns</sup>	6.625±0.982 <sup>b</sup>	10.129±1.101 <sup>ns</sup>	1.846±0.381 <sup>ns</sup>	1.845±0.381 <sup>ns</sup>
<b>control</b>	7.121±1.016	6.527±1.812 <sup>b</sup>	10.821±1.025	1.774±0.564	1.774±0.564
<b>PL</b>	6.450±1.845	7.145±1.442 <sup>a</sup>	10.269±0.893	1.501±0.447	1.501±0.448
<b>KY</b>	7.533±1.714	6.660±1.393 <sup>b</sup>	10.615±2.566	1.650±0.174	1.649±0.174

1) Values are means±SD

2) ns: not significant

3) Values with different superscript within the row are significantly different at  $\alpha=0.05$  by Duncan's multiple range test.

대퇴골의 경우  $\Delta E$ 는 sham이 6.467 kg/s, 난소 절제군이 6.450~7.533 kg/s로 유의적인 차이는 나지 않았다. Breaking strength는 sham군이 10.129 Kg로 가장 낮았으며, 난소 절제군은 10.269 Kg~10.821 Kg으로 유의적인 차이는 없었으나 control군이 다소 높은 편이었다. Time은 sham군이 1.846 s로 가장 늦은 반면 PL군은 1.501 s로 가장 빨랐다. 전반적으로 난소 절제군은 1.501 s~1.774 s로 sham군에 비해 빨랐으나 유의적인 차이는 나타나지 않았다. Displacement 역시 time과 동일한 경향이었으며, Stiffness는 sham군, 난소 절제군에서 6.527 ~ 6.625로 나타났으며 PL군이 7.145로 가장 높았고 KY군은 6.660을 나타내었다.

Table 17.  $\Delta E$ , stiffness, breaking strength, time and displacement of right tibia bone in experimental groups

	$\Delta E$ (Kg/s)	Stiffness	Breaking strength	Time (s)	Displacement (mm)
<b>sham</b>	4.530±0.793 <sup>a</sup>	3.850±1.121 <sup>ns</sup>	6.475±0.520 <sup>b</sup>	1.891±0.923 <sup>ns</sup>	1.890±0.925 <sup>ns</sup>
<b>control</b>	5.107±0.879 <sup>ab</sup>	5.025±1.248	6.950±0.653 <sup>ab</sup>	1.440±0.405	1.440±0.404
<b>PL</b>	5.085±1.602 <sup>ab</sup>	4.636±1.663	7.617±1.512 <sup>a</sup>	1.870±0.916	1.870±0.917
<b>KY</b>	5.623±0.612 <sup>b</sup>	4.949±0.661	7.270±0.476 <sup>ab</sup>	1.467±0.212	1.467±0.212

1) Values are means±SD

2) ns: not significant

3) Values with different superscript within the row are significantly different at  $\alpha=0.05$  by Duncan's multiple range test.

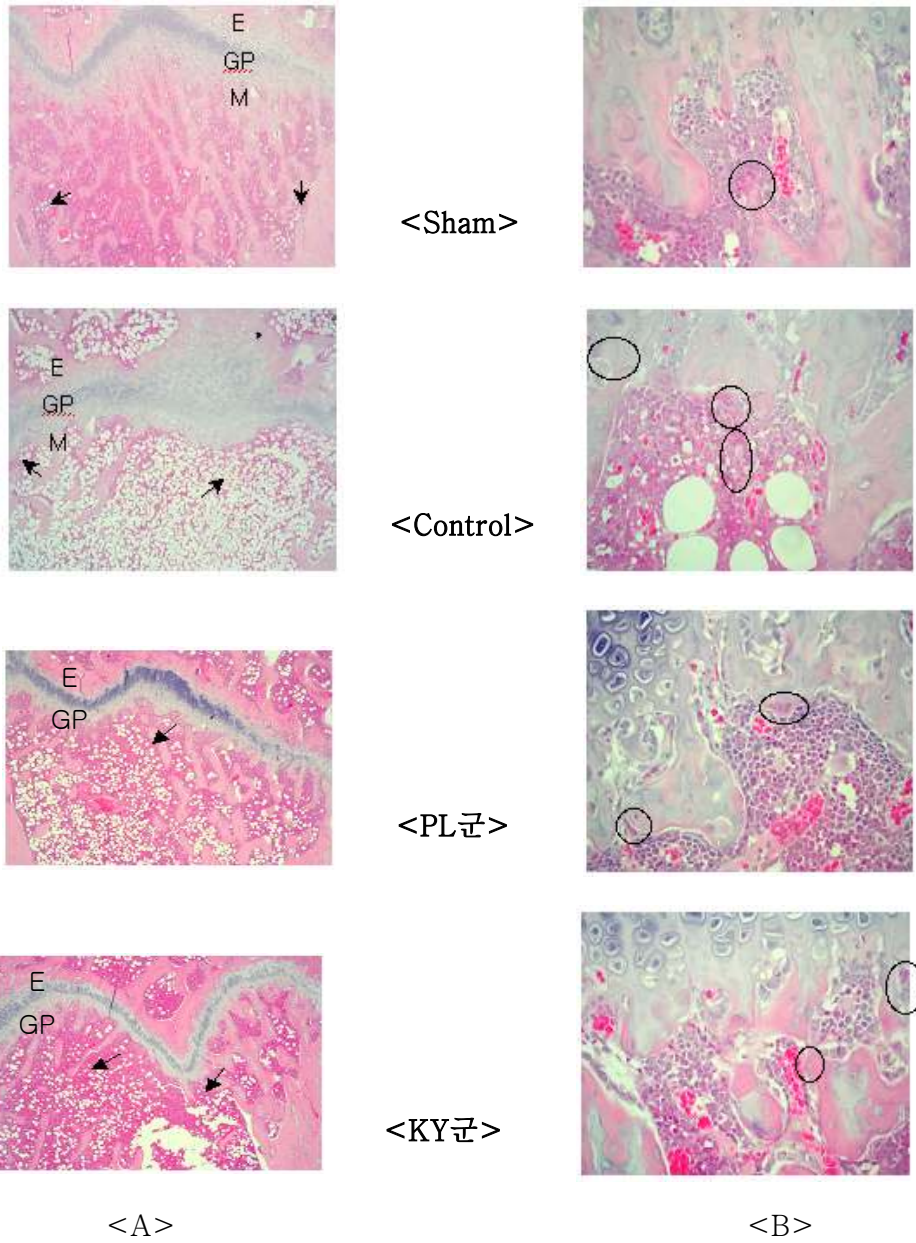
경골의 경우  $\Delta E$ 는 sham군이 4.530 kg/s로 가장 낮고 KY군이 5.623 kg/s로 가장 높았다. Breaking strength는 sham군이 6.475 kg으로 가장 낮았고 control이 6.950 kg 이었다. 치료 처리군 중에서는 PL군이 7.617 kgdm로 가장 높았고 KY군은 7.270 kg 이었으며, 난소 절제군이 sham군에 비하여 유의적으로 높은 breaking strength 값을 나타내었다. Time은 control과 KY군의 값이 1.440 s와 1.467 s로 다소 짧았고 sham 군과 PL군은 1.891 s와 1.870 s로 나타났다. Displacement 역시 time과 동일한 경향을 보였으며 stiffness는 3.850 mm로 sham군이 가장 낮았고, control은 5.025 mm로 가장 높았으며, 치료 처리군인 PL군과 KY군은 각각 4.636 mm와 4.949 mm를 나타내었으나 유의적인 차이는 크지 않았다. 전반적으로 골의 강도 및 탄성도는 대퇴골에 비하여 경골에서 난소 절제군과 비절제군 사이의 차이를 좀 더 유의적으로 볼 수 있었다.

#### 5.4 대퇴골의 조직병리적 표본분석

대퇴골의 뼈지주 형성, 뼈 파괴세포 출현 및 지질 침착도를 조직형태로 관찰하여 Table 18과 Fig. 30. 나타내었다.

Table 18. Histopathological findings in the femur

Group	No	Trabeculae in epiphysis and metaphysis		Frequency of osteoclast		Fatty accumulation	
Sham	s-1	+4	+4	+2	+1	+2	+2
	s-2	+4	+4	+1	+1	+2	+2
	s-3	+4	+4	+2	+1	+1	+1
	s-4	+4	+4	+1	+2	+2	+1
	s-5	+4	+4	+1	+2	+2	+1
	s-6	+4	+4	+2	+2	+2	+2
	s-7	+4	+4	+2	+1	+2	+2
	s-8	+4	+4	+1	+2	+3	+2
	s-9	+4	+4	+1	+1	+3	+2
	s-10	+4	+4	+1	+1	+1	+1
Control	c-1	+1	+2	+3	+2	+3	+3
	c-2	+2	+2	+2	+3	+4	+4
	c-3	+2	+2	+2	+2	+3	+3
	c-4	+1	+1	+2	+2	+4	+4
	c-5	+1	+3	+2	+2	+4	+4
	c-6	+2	+2	+3	+2	+3	+3
	c-7	+2	+3	+2	+2	+3	+4
	c-8	+1	+1	+3	+3	+4	+4
	c-9	+2	+3	+3	+2	+4	+3
	c-10	+2	+2	+2	+2	+4	+4
PL	PL-1	+2	+1	+2	+3	+4	+4
	PL-2	+1	+2	+2	+1	+4	+4
	PL-3	+2	+1	+2	+2	+3	+3
	PL-4	+3	+1	+1	+2	+4	+4
	PL-5	+3	+2	+2	+3	+4	+4
	PL-6	+2	+2	+2	+2	+4	+4
	PL-7	+2	+2	+2	+3	+3	+3
	PL-8	+2	+3	+1	+2	+3	+4
	PL-9	+3	+1	+1	+2	+4	+3
	PL-10	+3	+2	+1	+2	+3	+4
KY	KY-1	+2	+2	+1	+2	+2	+2
	KY-2	+3	+2	+1	+2	+4	+4
	KY-3	+2	+2	+2	+2	+2	+2
	KY-4	+2	+2	+2	+1	+2	+2
	KY-5	+2	+2	+2	+2	+3	+3
	KY-6	+3	+3	+1	+1	+2	+2
	KY-7	+2	+3	+2	+1	+3	+2
	KY-8	+2	+3	+2	+2	+4	+4
	KY-9	+3	+2	+2	+2	+3	+3
	KY-10	+3	+4	+2	+1	+3	+3



**Fig. 30. Morphology in the femur by histopathological findings**

<A> E: Epiphysis, GP: Growth plate, M: Metaphysis

Arrow: Osteoclast frequency

<B> Fatty acid accumulation

Sham군에서는 대퇴골에서 뼈지주가 정상적으로 많이(+4) 관찰되었으나 반면 대퇴골에서 뼈파괴세포의 출현빈도는 미약(+1~+2)하였다. 이에 반해 control군에서는 대퇴골에서 뼈지주가 감소(+2)되었고 대퇴골 뼈파괴세포의 출현빈도는 상대적으로 증가(+2~+3)하였다. KY군에서 대퇴골의 뼈지주 정도에 있어 난소절제한 control군에 비교할 때 구별이 가능한 정도의 유의한 개선효과(+2~+3)가 확인되었으며 PL군은 KY군에 비해 미약(+2)하였다. 뼈파괴세포의 출현빈도에 있어서도 시험물질투여군의 경우 KY군에서는 대퇴골의 뼈파괴세포의 출현빈도에 있어 난소절제한 control군에 비교할 때 구별이 가능한 정도의 감소(+1~+2)가 확인되었으며 PL군에서는 미약하나마 감소(+2)가 확인되었다.

대퇴골에서의 뼈지주와 뼈파괴세포 출현빈도 외에 본 실험에서 평가한 골수내 지방 축적에 있어서는 sham군에서는 골수내 지방축적이 정상적으로 적게(+2) 관찰되었다. 이에 반해 control군에서는 골수내 지방 축적이 현저히 증가(+3~+4)하였다. PL군에서는 control군에 비교할 때 미약하나마 차이점이 있었으나, KY군에서는 구별이 가능한 정도의 감소(+3)가 확인되었다.

### 5.5. 발골 시료의 무기질 분석

발골 시료의 무기질 분석의 결과는 Table 19와 같다.

Table 19. Bone mineral contents of ovariectomized rats fed the experimental diet for 12 weeks<sup>1)</sup>

Unit : mg/100g

	Sham	Control	PL	KY
<b>Ca</b>	16363.9	16747.2	18443.0	18151.3
<b>Mg</b>	292.3	290.3	307.1	296.0
<b>P</b>	10749.4	10388.9	10939.2	11040.6

1) All value are expressed as mean of 8 rats

발골한 시료의 Ca은 Sham군 16363.9 mg/100g, Control군 16747.2 mg/100g, PL군



18443.0 mg/100g, KY군 18151.3 mg/100g으로 측정되었으며, Mg은 Sham군 292.3 mg/100g, Control군 290.3 mg/100g, PL군 307.1 mg/100g, KY군 296.0 mg/100g으로 측정되었다. P은 Sham군 10749.4 mg/100g, Control군 10388.9 mg/100g, PL군 10939.2 mg/100g, KY군 11040.6 mg/100g으로 측정되었다. 발골한 시료의 무기질 침착은 난소를 절제하지 않은 위대조군 (Sham군)이 높았으며, 난소절제군에서 PL군과 KY군의 무기질침착은 난소를 절제하지 않은 위대조군보다 높은 값을 보여, PL과 KY의 골기질로서 무기질 형성효과를 명확히 확인할 수 있었다.

## 제 4 절 유효 성분의 분석

### 1. 용매 분획

상황 건물 6kg에서 80% MeOH 수용액으로 추출물하고 농축물로부터 EtoAc, *n*-BuOH, H<sub>2</sub>O을 각 38g, 40g, 35g의 분획물을 얻었다.

### 2. 상황버섯 추출물의 물질 profile 분석

용매분획에 대하여 농축하고 Thin layer chromatography (TLC) 전개한후 정성분석 시약 (Dragendorff's reagent, Ferric chloride, 10% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 등)을 사용하여 물질의 profile을 정성 분석하였다 (Fig. 31.)

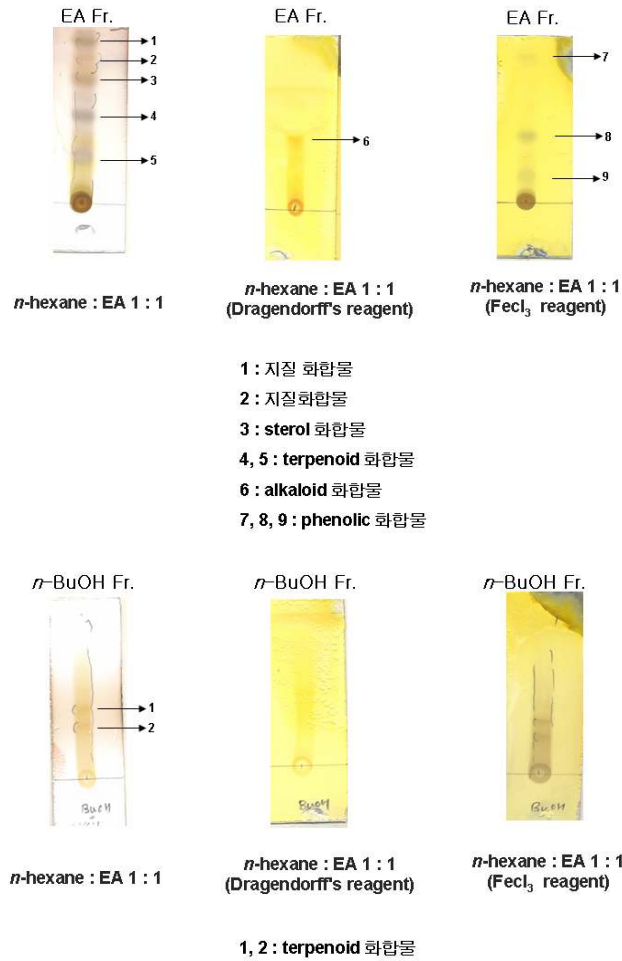


Fig. 31. Development of solvent fraction of *Phellinus linteus* extract on TLC

정성 분석한 결과 EtoAc 분획에는 2종의 지질 화합물, 1종의 sterol화합물, 2종의 terpenoid화합물, 1종의 alkaloid 화합물 및 3종의 phenolic 화합물 등이 존재함을 예상할 수 있었다. *n*-BuOH 분획에는 10% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 발색을 통해 2종의 terpenoid화합물과 flavonoid 등이 존재함을 예상할 수 있었다. 기타 발색 법으로는 뚜렷한 화합물의 존재를 발견할 수 없었다.

### 3. 비색법을 이용한 Total Phenolic Compounds 함량 측정

표준물질인 (+)-catechin(Sigma)의 농도에 따른 ABS값의 회귀그래프(Fig. 32) ( $y=0.0303x + 0.0779$ ,  $R^2=0.9990$ )를 이용하여 상황버섯 품종별 Total phenolic compounds를 정량하였다. 상황 A품에서는 Total phenolic compounds 함량이 0.6265%로 6.27mg/g로 정량되었다. 상황 B품에서는 총 함량이 1.119%로 11.2mg/g로 정량되었다. 상황버섯 품종에 따라 Total phenolic compounds 함량은 6.27~11.2mg/g의 분포를 나타내었다.

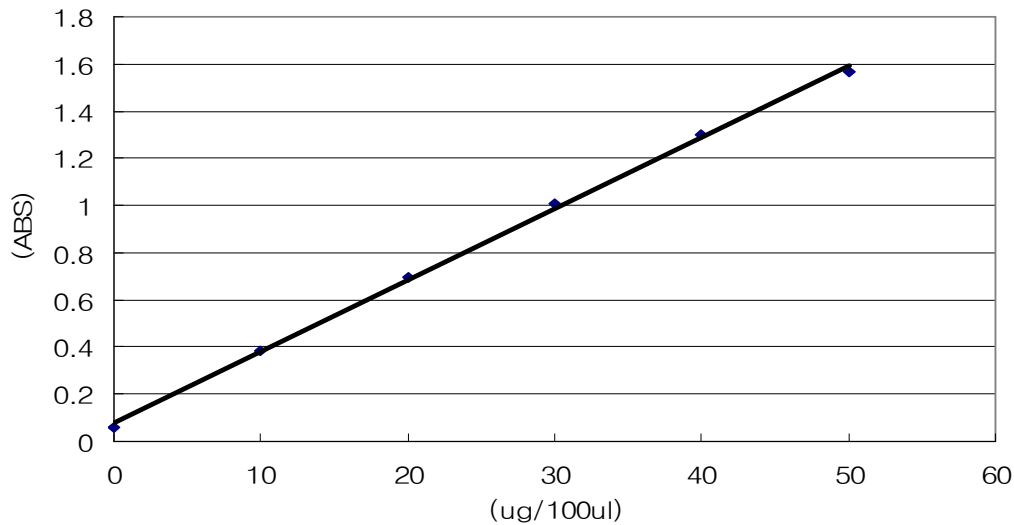


Fig. 32. The calibration curve of (+)-catechin

### 4. 비색법을 이용한 Total Flavonoids 정량

표준물질인 naringin(Sigma)의 농도에 따른 ABS값의 회귀그래프(Fig. 33) ( $y=0.0071x+0.0746$ ,  $R^2=0.9991$ )를 이용하여 상황버섯 품종별 Total flavonoids를 정량하였다. 상황 A품에서는 총 Flavonoid 함량이 0.26%로 2.6mg/g으로 정량되었다. 상황 B품에서는 총 함량이 0.75%로 7.5mg/g으로 정량되었다. 상황버섯 품종에 따라 Total flavonoid compounds 함량은 2.6~7.5mg/g의 분포를 나타내었다.

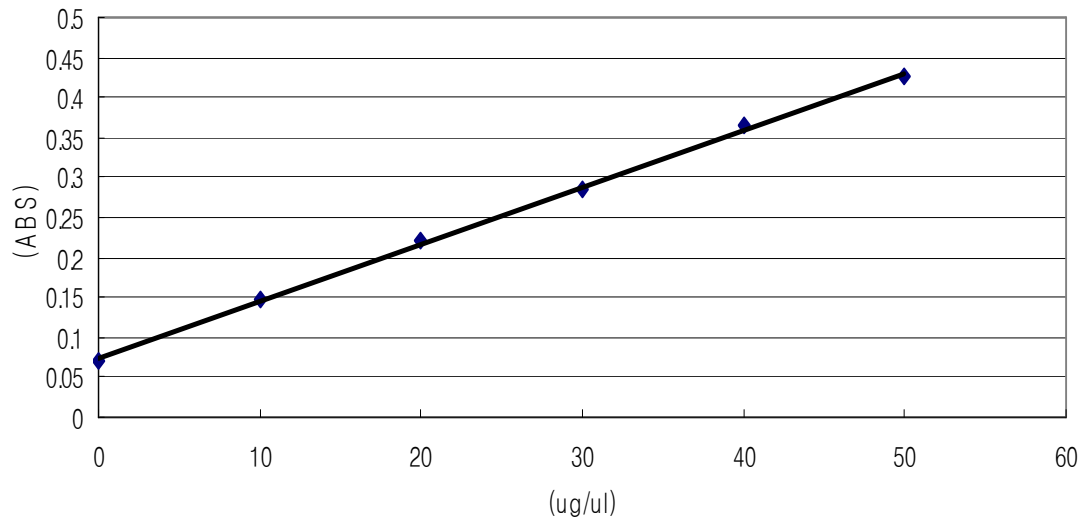


Fig. 33. The calibration curve of naringin

#### 5. GC를 이용한 phytoestrogen 정량 분석

상황 건조 시료 50g을 80% MeOH로 추출한 결과, 2.27g(4.53%)의 추출물을 얻을 수 있었고, 이를 용매 분획하여 EtOAc 분획 0.74g(1.28%), *n*-BuOH 분획 0.47g(0.93%)을 얻었다. 상기의 조건 하에서 측정한 표준품과 각 분획의 chromatograph는 아래의 그림과 같다.

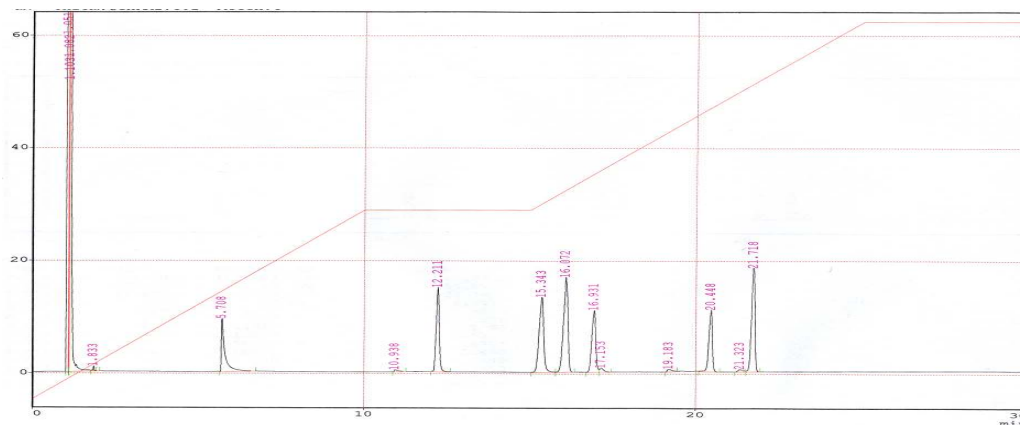


Fig. 34. GC chromatograph of all flavonoids

Table 20. The retention time of flavonoids

Flavonoids	Retention time	Flavonoids	Retention time
(+)-catechin	16.3 min	flavone	5.8 min
apigenin	20.7 min	genistein	17.3 min
biochanin-A	15.3 min	kaempferol	19.9 min
chrysin	12.5 min	naringin	-
daidzein	15.8 min	quercetin	22.1 min

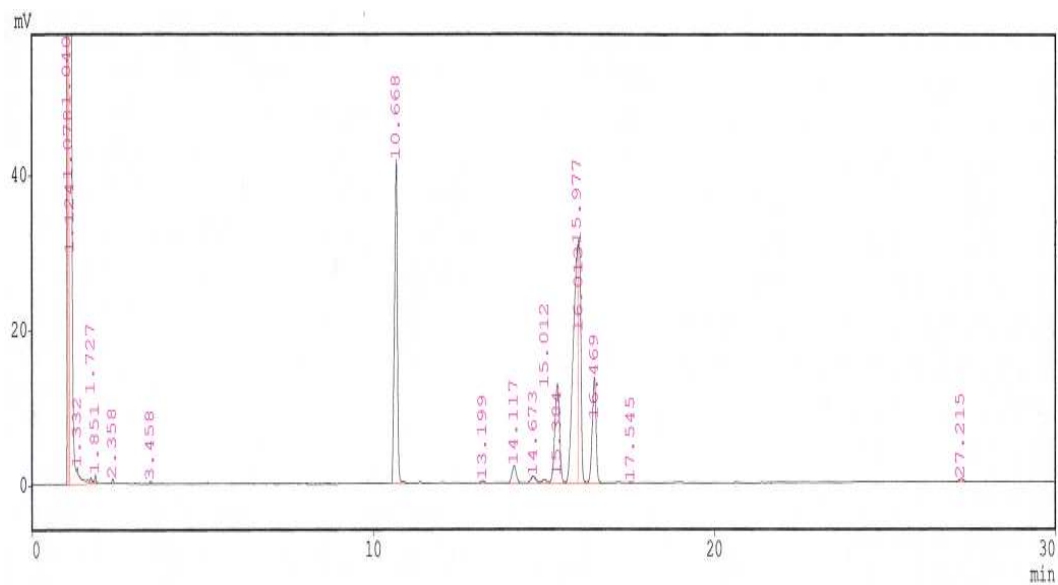


Fig. 35. GC chromatograph of all estrogens

Table 21. The retention time of estrogens

Estrogens	Retention time	Estrogens	Retention time
enterodiol	-	estrone	11.9 min
enterolactone	-	$\alpha$ -zearanol	18.4 min
equol	10.2 min	2-hydroxyestradiol	16.2 min
16-epiestriol	17.4 min	estriol	18.0 min
17-epiestriol	17.8 min		



확인된 flavonoids 중에서 quercetin에 대하여 농도에 따른 peak의 면적 사이의 회귀 곡선을 다음과 같이 그릴 수 있었다.

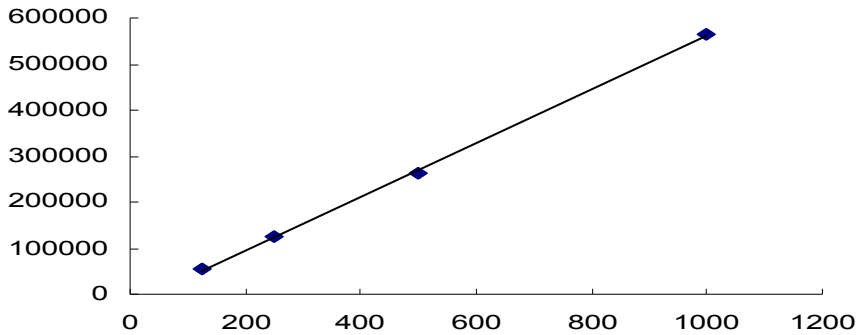


Fig. 38. The calibration curve of quercetin

이 회귀 그래프는  $y=581.5x-21106$ ,  $R^2=0.9996$ 였다. EtOAc 분획에 대하여서 quercetin의 함량을 계산한 결과, 함량이 0.026%로 0.26mg/g으로 정량되었다.

## 6. 항산화효과

### 6.1. DPPH radical 소거능

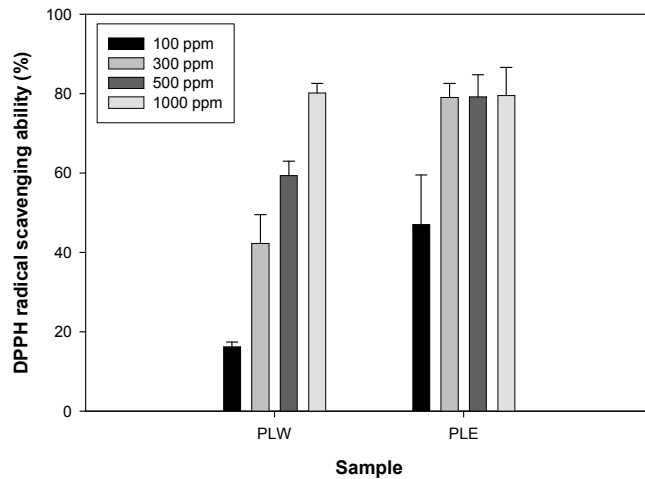


Fig. 39. DPPH radical scavenging ability of *Phellinus linteus*



DPPH는 짙은 자색을 띠는 비교적 안정한 free radical로서 cystein, glutathione과 같은 함 유황아미노산과 ascorbic acid, BHA 등에 의해 환원되어 탈색된다. 또한 인체 내에서 지질 또는 단백질 등과 결합하여 노화를 일으키기 쉬운데 페놀성 화합물의 경우 free radical을 환원시키거나 상쇄시키는 능력이 강해 인체 내에서 자유 라디칼에 의한 노화를 억제하는 척도로 이용할 수 있다. 상황버섯의 물 추출물과 에탄올 추출물에 있어 DPPH radical 소거능은 Fig. 39.와 같다. 물 추출물과 에탄올 추출물 모두 농도가 증가함에 따라 DPPH radical 소거능도 증가하였다. 물 추출물의 경우 100 ppm의 농도에서는 16.22%의 다소 낮은 소거능을 보였으나 농도가 300 ppm, 500 ppm, 1000 ppm으로 증가함에 따라 DPPH radical 소거능 역시 42.28%, 59.37%, 80.19%로 증가하였다. 에탄올 추출물의 경우 100 ppm 농도에서는 46.99%로 낮은 소거능을 보였으나 그 이상의 농도에서는 농도에 관계없이 79% 이상의 DPPH radical 소거활성을 나타내었다. 그러므로 에탄올 추출이 DPPH radical 소거능을 지닌 항산화 물질의 추출에 물 추출물보다 효과적임을 알 수 있었다.

## 6.2. SOD 유사활성

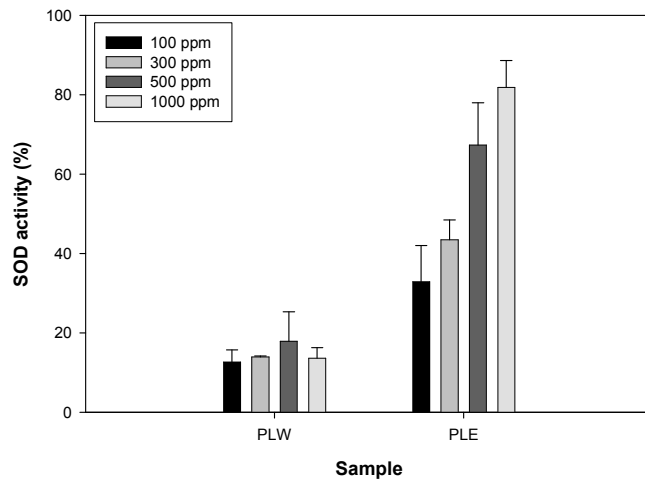


Fig. 40. SOD activity of *Phellinus linteus*

상황버섯의 물 추출물은 농도에 관계없이 모두 20% 이하의 낮은 SOD 소거 활성능을 보였다. 반면 에탄올 추출물에서는 100 ppm 농도일 때 32.92%, 300 ppm의 경우 43.51%, 500 ppm의 경우 67.38%, 1000 ppm의 경우 81.91%로 농도가 증가함에 따라 SOD 소거 활성능 역시 증가하는 것을 알 수 있었다. 이는 DPPH radical 소거능과 동일하게 에탄올 추출물이 DPPH radical 소거 뿐만 아니라 SOD 소거에서 효과적임을 알 수 있었다.

### 6.3. ABTS radical 소거 활성

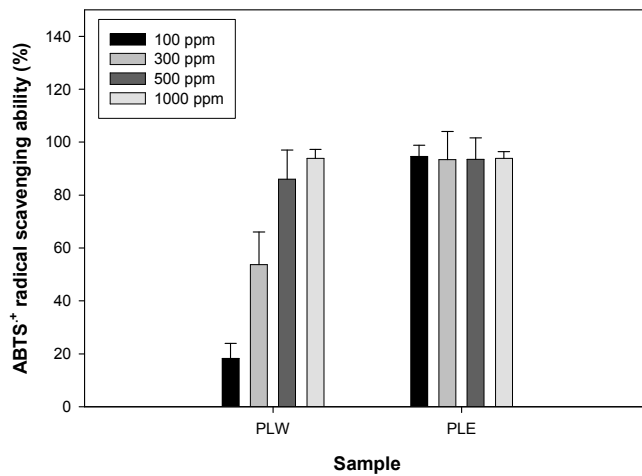


Fig. 41. ABTS<sup>+</sup> radical scavenging ability of *Phellinus linteus*

혈장에서 ABTS의 양이온 radical의 흡광도가 항산화제에 의해 억제되는 것에 기초하여 개발된 ABTS radical 소거활성법은 항산화능 측정의 방법으로 널리 이용되고 있다. ABTS와 potassium persulfate를 암소에 방치하여 ABTS<sup>+</sup>이 소거되어 radical 특유의 색인 청록색이 탈색되는데 이를 흡광도 값으로 나타내어 추출물의 ABTS<sup>+</sup>의 소거활성능을 측정할 수 있다.

상황버섯의 물 추출물과 에탄올 추출물에 대하여 ABTS<sup>+</sup> 소거활성을 측정 한 결과 물 추출물에서는 농도가 증가함에 따라 ABTS<sup>+</sup> 소거활성도 증가하였다. 즉, 100 ppm일 때 18.30%, 300 ppm일 때 53.73%, 500 ppm일 때 85.97%, 1000 ppm일 때

93.83%로 나타났다. 반면 에탄올 추출물에서는 농도와 관계없이 90% 이상의 높은 ABTS<sup>+</sup> 소거활성능을 나타내었다. 따라서 ABTS<sup>+</sup> 소거활성에서도 DPPH radical 소거능과 SOD 소거능과 마찬가지로 물 추출물보다 에탄올 추출물이 효과적임을 알 수 있었다. 현재 항산화효능과 관련되어 가장 관련성이 높게 평가되는 성분은 flavonoid/polyphenol으로 알려지고 있다. Kroyer 등은 DPPH radical 소거능이 우수한 에탄올 추출물에서 polyphenol 함량도 가장 높다고 보고하였다. 이에 본 연구에서도 상황버섯의 항산화 효능과 phenolic compound의 함량, flavonoid의 함량, phytoestrogen의 함량을 분석하였다. 그 결과 상황버섯에는 다수의 생리활성 물질이 존재하고 있으며, 항산화 효능을 알아보기 위해 실시한 DPPH radical 소거능, SOD 소거능, ABTS<sup>+</sup> 소거능에서 높은 활성을 나타내었다. 특히 항산화 효능에서는 물 추출물에 비해 에탄올 추출물에서 높은 활성을 나타내어 radical 소거능에서는 물 추출물보다 에탄올 추출이 효과적임을 알 수 있었다. 또한 이러한 항산화 효능은 면역력 향상과도 상관성이 있으며 골 형성 및 골 손실의 억제에도 긍정적 영향이 있을 것이다.

## 제 5 절 활성성분의 분리 및 구조동정

### 1. 용매분획의 증식능 및 골강화활성

상황버섯의 골기질 강화 활성성분을 탐색하기 위한 기초로서 용매 분획물, EtOAc, BuOH, H<sub>2</sub>O 분획의 세포 증식능 및 ALP 활성을 조사하였다 (Fig. 42, Fig. 43)

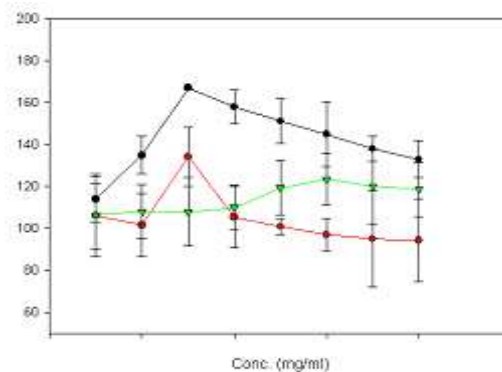
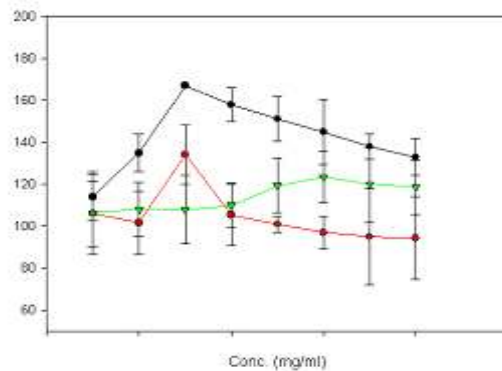


Fig. 42. Cell proliferation of solvent partition of Methanol extract on on the Saos-2, human osteoblast-like cells.

상황 추출물에 대한 MTT assay를 시행하였으며 분획 모두 대조구보다 높은 값을 나타내었다. EtOAc 층은  $10^{-8}$  mg/ml 농도에서 114%를 나타내었으며  $10^{-6}$  mg/ml 농도에서 167%를 보인후 감소하여  $10^{-1}$  mg/ml 농도에서 133%를 나타내었다. BuOH 층은  $10^{-8}$  mg/ml 농도에서 106%를 나타내었으며  $10^{-3}$  mg/ml 농도에서 123%를 보인후 감소하여  $10^{-1}$  mg/ml 농도에서 117%를 나타내었다. 수용액 층은  $10^{-8}$  mg/ml 농도에서 106%를 나타내었으며  $10^{-6}$  mg/ml 농도에서 134%를 보인후 감소하여  $10^{-1}$  mg/ml 농도에서 94%를 나타내었다. EtOAc 층의 분화능이 가장 높았으며 BuOH 층, 수용액 층이 차례로 분화능이 높았으며 세분획 모두 용매분획의 경우 세포에 대하여 독성이 없는 것으로 나타났다. 상황버섯의 EtOAc, BuOH, H<sub>2</sub>O 분획에 대한 ALP assay 결과는 다음과 같다.



**Fig. 43.** ALP activity of solvent partition of Methanol extract on on the Saos-2, human osteoblast-like cells.

EtOAc 층은  $10^{-8}$  mg/ml 농도에서 131%를 나타내었으며  $10^{-7}$  mg/ml 농도에서 163%를 보인후 감소하여  $10^{-2}$  mg/ml 농도까지 133%를 나타내었고  $10^{-1}$  mg/ml 농도에서 109%를 보였다. BuOH 층은  $10^{-8}$  mg/ml 농도에서 131%를 나타내었으며  $10^{-5}$  mg/ml 농도에서 174%를 보인후 감소하여  $10^{-2}$  mg/ml 농도까지 156%를 나타내었고  $10^{-1}$  mg/ml 농도에서 91%를 나타내었다. 수용액 층은  $10^{-8}$  mg/ml 농도에서 142%를 나타내었으며  $10^{-5}$  mg/ml 농도에서 157%를 보인후 감소하여  $10^{-1}$  mg/ml 농도에서 126%를 나타내었다. BuOH 층 의 골강화 효소활성이 가장 높았으며, EtOAc 층, 수용액 층의 활성이 유사하였다.

## 2. 활성성분의 분리 및 활성분획의 선별

용매분획결과 활성이 높았던 EtoAc 분획물에 대하여 1차 column chromatography 하여 23개의 분획물로 세분화하였다. 각 분획물에 대하여 세포증식능과 조골세포활성능을 측정하였다. (Fig. 44, Fig. 45)

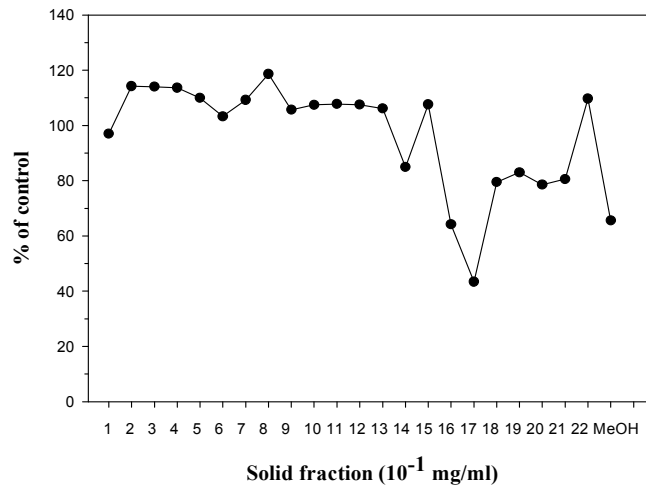


Fig. 44. Cell proliferation of 1st fractions from column chromatography of EtOAc partition of *Phellinus linteus* extract on Saos-2, human-like osteoblast cells.

상황버섯 EtoAc ext. 분획물을  $10^{-1}$  mg/ml로 인체유사 조골 세포주인 Saos-2 cell에 대해 세포증식능을 측정한 결과 1번~13번까지의 분획물은 대조구의 96~119%의 비교적 안정적인 증식능을 나타내었다. 그 후 16번~21번 사이의 분획물은 대조구의 43~83%의 증식을 보여 세포독성을 나타내었다. 가장 증식능이 우수했던 분획물은 8번 분획물로 118%의 세포 증식을 나타내었고, 17번 분획물은 대조구의 43%로 가장 효과가 떨어졌다. 이와 같은 사실로 보아 상황버섯의 EtoAc ext. 분획물은 분획 초중반 사이에 나오는 물질이 Saos-2 조골세포 증식능에 안정적인 것을 알 수 있다.

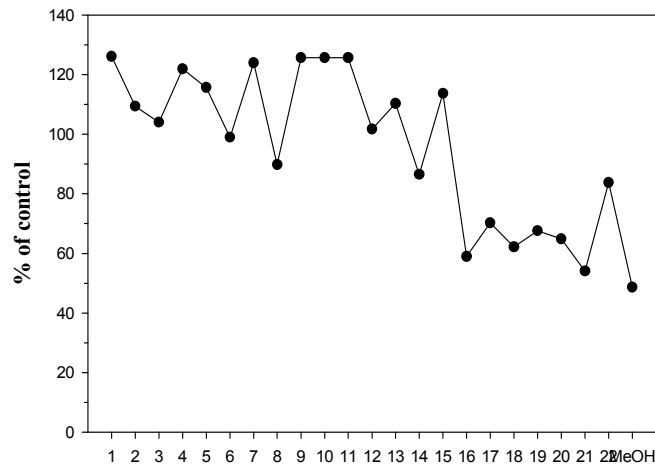


Fig. 45. Alkaline phosphatase (ALP) activities of 1st fractions from column chromatography of EtOAc partition of *Phellinus linteus* extract on Saos-2, human-like osteoblast cells.

상항버섯 EtoAc ext, solid 분획물을  $10^{-1}$  mg/ml 농도로 Saos2 cell에 적용하여 Alkaline phosphatase(ALP) 활성을 측정한 결과 1~13번 사이의 분획물은 대조구의 90~126%의 활성을 나타내었다. 그 후 16번~22번의 사이의 분획물은 대조구의 59%~84%로 ALP 활성이 낮게 나타났다. 이는 위의 세포 증식능 결과와 유사하여 세포증식능이 떨어진 분획 후반의 물질은 ALP 활성 또한 좋지 않음을 알 수 있다. 가장 ALP 활성이 우수한 분획물은 1번으로 126%의 활성을 나타내었고, MeOH의 단일 물질로 분리된 분획물은 49%로 가장 낮은 활성을 나타내었다. 위의 EtoAc 분획물에 대한 결과를 토대로 활성이 높았던 2차 column chromatography 분획물에 대하여 같은 방법으로 세포증식능과 조골 활성을 측정하였다. (Fig. 46, Fig. 47)

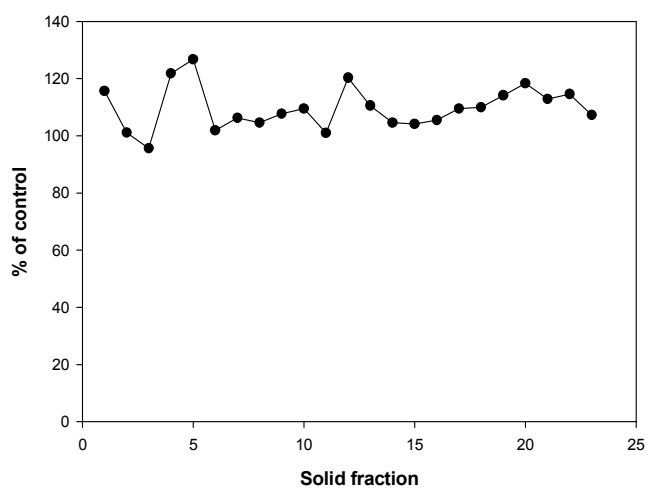


Fig. 46. Cell proliferation(MTT Assay) of 2nd fractions from column chromatography of EtOAc partition of *Phellinus linteus* extract on Saos-2, human-like osteoblast cells.

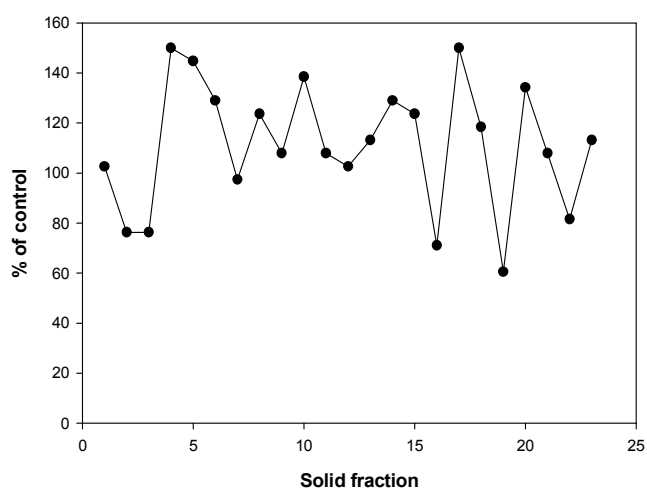


Fig. 47. Alkaline phosphatase (ALP) activities of 2nd fractions from column chromatography of EtOAc partition of *Phellinus linteus* extract on Saos-2, human-like osteoblast cells.

### 3. 상황 뼈강화 활성성분의 구조 동정

상황버섯의 MeOH 추출물로부터 ALP activity-guided fractionation에 따라 Steroid 5종과 phenyl butanoid 1종의 화합물을 분리, 동정하였다.

#### 1.1. 화합물 1의 구조

화합물 1의 스펙트럼 특성:  $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta_{\text{H}}$ ) 6.72(1H, br. s, H-7), 5.19(1H, dd,  $J=15.2, 7.2$  Hz, H-22), 5.22(1H, dd,  $J=15.2, 7.2$  Hz, H-23), 4.15(1H, m, H-3), 2.08(3H, s, H-19), 1.07(3H, d,  $J=6.4$  Hz, H-21), 0.92(3H, d,  $J=6.8$  Hz, H-28), 0.83(3H, d,  $J=6.4$  Hz, H-27), 0.82(3H, d,  $J=6.4$  Hz, H-26), 0.57(3H, s, H-18);  $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta_{\text{C}}$ ) 138.0(C-8), 135.7(C-22), 134.3(C-10), 132.7(C-6), 132.3(C-9), 132.2(C-23), 128.2(C-5), 124.0(C-7), 68.5(C-3), 55.3(C-17), 52.1(C-14), 43.1(C-24), 42.0(C-13), 40.8(C-20), 37.4(C-12), 36.9(C-4), 33.4(C-25), 31.7(C-2), 29.5(C-15), 27.9(C-1), 26.1(C-16), 24.5(C-11), 21.3(C-21), 20.3(C-27), 20.0(C-26), 17.9(C-28), 14.9(C-19), 11.6(C-18).

화합물 1(white powder)은  $^1\text{H-NMR}$  spectrum에서  $\delta_{\text{H}}$  6.72(1H, s), 5.23 (1H, d,  $J=15.2$  Hz), 5.19 (1H, d,  $J=15.2$  Hz)의 signal로부터 olefinic methine proton 3개와  $\delta_{\text{H}}$  4.15(1H, m)의 signal에서 oxygenated methine proton 1개가 관측되었다.  $\delta_{\text{H}}$  2.3 미만의 고자장 영역에서 다수의 methylene과 methine signal을 비롯하여, singlet methyl signal 2개 ( $\delta_{\text{H}}$  2.08, 0.57), doublet methyl signal 4개 [ $\delta_{\text{H}}$  1.07 (3H, d,  $J=6.4$  Hz) 0.92 (3H, d,  $J=6.8$  Hz), 0.83 (3H, d,  $J=6.4$  Hz), 0.82 (3H, d,  $J=6.4$  Hz)]가 관측되었다. 따라서 이 화합물은 trans 배향의 이중결합을 포함한 다수의 이중결합과 1개의 oxygenated methine을 가진 sterol로 추측되었다.  $^{13}\text{C-NMR}$  spectrum에서 총 28개의 carbon이 관측되어 이 화합물이 ergostane 골격을 갖는 것으로 추정되었다. 또한  $\delta_{\text{C}}$  138.0, 134.3, 132.7, 132.3, 128.2의 signal로부터 olefinic quaternary carbon 5개와  $\delta_{\text{C}}$  135.7, 132.2, 124.0의 signal로부터 olefinic methine carbon 3개를 확인하여 ring 내의 quaternary carbon과 연결된 이중결합이 3쌍 있음을 알 수 있었다.  $\delta_{\text{C}}$  68.5에서는 oxygenated methine carbon을 관측할 수 있었다. 그리고  $\delta_{\text{C}}$  21.3 미만의 고자장 영역에서 6개의 methyl carbon signal( $\delta_{\text{C}}$  21.3, 20.3, 20.0, 17.9, 14.9, 11.6)이 관측되었다. 이와 같은 chemical shift값을 보아 이 화합물은 ring안의 한 쌍 이상의 이중결합과



chain 내에 trans 배향의 이중결합 한 쌍을 포함하여 1개의 수산기를 가진 ergosterol 화합물임을 추정할 수 있었다. 좀 더 정확한 구조와 coumaroyl group 및 당의 위치를 확인하기 위하여 2D-NMR을 측정하였다.  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY 스펙트럼으로부터 정확한 부분구조를 추정할 수 있었으며, HSQC 스펙트럼을 토대로 각각의 탄소와 수소의 정확한 assign을 할 수 있었다. HMBC 스펙트럼에서 methyl proton인 H-19( $\delta$  2.08) signal이 C-10( $\delta$  134.3) signal과  $J^2$  correlation을 보이고, C-9( $\delta$  132.3)과 C-5( $\delta$  128.2) signal과  $J^2$  correlation을 보이고, olefinic methine proton인 H-7( $\delta$  6.72)이 C-9( $\delta$  132.3)과 C-5( $\delta$  128.2) signal과  $J^2$  correlation을 보이는 것이 확인되어 sterol 골격의 B ring에 3쌍의 이중결합이 존재함을 알 수 있었다. 이 결과를 종합하고 문헌과 비교 조사해본 결과 이 화합물을 1,6-cyclo-1,10-secoergosta-5,7,9,22E-tetraen-3 $\beta$ -ol (1*H*-cyclopentanthracene)로 동정하였다.

## 1.2. 화합물 2의 구조

화합물 2의 스펙트럼 특성:  $^1\text{H}$ -NMR(400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ,  $\delta$ ) 5.14(1H, m, H-7), 4.69(2H, s, H-28a), 4.64(2H, d,  $J=1.6$  Hz, H-28b), 3.57(1H, m, H-3), 1.01(3H, d,  $J=6.8$ Hz, H-26), 1.00(3H, d,  $J=7.2$  Hz, H-27), 0.93(3H, d,  $J=6.4$  Hz, H-21), 0.77(3H, s, H-19), 0.52(3H, s, H-18);  $^{13}\text{C}$ -NMR(100 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ,  $\delta_{\text{C}}$ ) 156.74(C-24), 139.45(C-8), 117.40(C-7), 105.87(C-28), 71.06(C-3), 56.00(C-17), 55.05(C-14), 49.45(C-9), 43.46(C-13), 40.28(C-5), 39.60(C-12), 38.03(C-4), 37.18(C-1), 36.24(C-20), 34.67(C-22), 34.25(C-10), 33.86(C-25), 31.53(C-2), 31.12(C-23), 29.70(C-6), 28.00(C-16), 23.02(C-15), 22.08(C-26), 21.94(C-27), 21.62(C-11), 18.92(C-21), 13.14(C-19), 11.94(C-18).

화합물 2(white powder)은  $^1\text{H}$ -NMR spectrum에서  $\delta_{\text{H}}$  5.14(1H, m)의 signal로부터 olefinic methine proton 1개와  $\delta_{\text{H}}$  4.69(2H, br. s),  $\delta_{\text{H}}$  4.64(2H, d)의 signal로부터 exomethylene proton 그리고  $\delta_{\text{H}}$  3.57(1H, m, H-3)의 signal에서 oxygenated methine proton 1개가 관측되었다.  $\delta_{\text{H}}$  2.3 미만의 고자장 영역에서 다수의 methylene과 methine signal을 비롯하여, singlet methyl signal 2개 ( $\delta_{\text{H}}$  0.77, 0.52), doublet methyl signal 3개 ( $\delta_{\text{H}}$  1.01, 1.00, 0.93)가 관측되었다. 따라서 이 화합물은 1개의 exomethylene을 포함한 2개의 이중결합과 1개의 oxygenated methine을 가진 sterol로 추측되었다.

$^{13}\text{C}$ -NMR spectrum에서 총 28개의 carbon이 관측되어 이 화합물이 ergostane 골격을 갖는 것으로 추정되었다. 또한  $\delta_{\text{C}}$  156.7와  $\delta_{\text{C}}$  139.5의 signal로부터 olefinic quaternary carbon 2개와  $\delta_{\text{C}}$  117.4의 signal로부터 olefinic methine carbon 1개를 확인하였으며,  $\delta_{\text{C}}$  105.9에서는 exomethylene carbon을 확인하여 이중결합이 2개 있음을 알 수 있었다.  $\delta_{\text{C}}$  71.1에서는 oxygenated methine carbon을 관측할 수 있었다. 그리고  $\delta_{\text{C}}$  11.9~22.1에서 5개의 methyl carbon signal( $\delta_{\text{C}}$  22.1, 21.9, 18.9, 13.1, 11.9)이 관측되었다. 이와 같은 chemical shift값을 보아 이 화합물은 ring안의 이중결합 한 쌍과 chain 내에 exomethylene 이중결합 한 쌍을 포함하여 1개의 수산기를 가진 ergosterol 화합물임을 추정할 수 있었다. 좀 더 정확한 구조와 coumaroyl group 및 당의 위치를 확인하기 위하여 2D-NMR을 측정하였다.  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY 스펙트럼으로부터 정확한 부분 구조를 추정할 수 있었으며, HSQC 스펙트럼을 토대로 각각의 탄소와 수소의 정확한 assign을 할 수 있었다. HMBC 스펙트럼에서 exo-methylene proton인 H-28( $\delta$  4.69,  $\delta$  4.64) signal이 C-24( $\delta$  156.74) signal과  $J^{\text{H-C}}$  correlation을 보이고, C-23( $\delta$  31.12)과 C-25( $\delta$  33.86) signal과  $J^{\text{H-C}}$  correlation이 확인되어 C-28에 exo-methyl group이 존재하는 것을 알 수 있었다. 이 결과를 종합하고 문헌과 비교 조사해본 결과 이 화합물을 ergosta-7,24-dien-3 $\beta$ -ol(episterol)로 동정하였다.

### 1.3. 화합물 3의 구조

화합물 3의 스펙트럼 특성:  $^1\text{H}$ -NMR(400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ ) 6.56(1H, d,  $J=8.8$  Hz, H-7), 6.25(1H, d,  $J=8.4$  Hz, H-6), 5.39(1H, dd,  $J=4.0, 1.6$ , H-11), 5.21(1H, dd,  $J=14.8, 6.4$ , H-22), 5.12(1H, dd,  $J=15.2, 7.6$ , H-23), 3.98(1H, m, H-3), 1.06(3H, s, H-19), 0.97(3H, d,  $J=6.8$  Hz, H-21), 0.88(3H, d,  $J=7.2$  Hz, H-28), 0.80(3H, d,  $J=6.8$  Hz, H-26), 0.79(3H, d,  $J=6.8$  Hz, H-27), 0.70(3H, s, H-18);  $^{13}\text{C}$ -NMR(100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta_{\text{C}}$ ) 142.42(C-9), 135.35(C-6), 135.01(C-22), 132.32(C-23), 130.65(C-7), 119.66(C-11), 82.67(C-5), 78.33(C-8), 66.32(C-3), 55.86(C-17), 48.18(C-14), 43.64(C-13), 42.79(C-24), 41.21(C-12), 39.94(C-20), 37.99(C-10), 36.10(C-4), 33.10(C-25), 32.61(C-1), 30.64(C-2), 28.68(C-16), 25.61(C-19), 20.95(C-15), 20.78(C-21), 20.01(C-27), 19.71(C-26), 17.62(C-28), 13.04(C-18).

화합물 3(colorless crystals)는  $^1\text{H}$ -NMR spectrum에서  $\delta_{\text{H}}$  6.56(1H, d,  $J=8.4$  Hz),

$\delta_{\text{H}}$  6.25(1H, d,  $J=8.4$  Hz),  $\delta_{\text{H}}$  5.39(1H, dd,  $J=4.0, 1.6$ ),  $\delta_{\text{H}}$  5.21(1H, dd,  $J=15.2, 6.4$ ),  $\delta_{\text{H}}$  5.12(1H, dd,  $J=15.2, 7.6$ )의 signal로부터 총 5개의 olefinic methine proton이 관측되었고,  $\delta_{\text{H}}$  3.98(1H, m)의 signal에서 oxygenated methine proton 1개를 관측할 수 있었다.  $\delta_{\text{H}}$  2.3 미만의 고자장 영역에서 다수의 methylene과 methine signal을 비롯하여, singlet methyl signal 2개( $\delta_{\text{H}}$  1.06, 0.70)와 doublet methyl signal 4개( $\delta_{\text{H}}$  0.97, 0.88, 0.80, 0.79)가 관측되었다. 따라서 이 화합물은 3쌍의 이중결합을 갖는 sterol로 추측되었다.  $^{13}\text{C}$ -NMR spectrum에서 총 28개의 carbon이 관측되어 이 화합물이 ergostane 골격을 갖는 것으로 추정되었다.  $\delta_{\text{C}}$  142.4의 signal의 olefine quaternary carbon을 비롯하여, 5개의 olefine mehtine carbon signal( $\delta_{\text{C}}$  135.4, 135.0, 132.3, 130.7, 119.7)을 확인할 수 있었으며,  $\delta_{\text{C}}$  82.7과  $\delta$  78.3의 signal에서 oxygenated quaternary carbon 2개와  $\delta_{\text{C}}$  66.3의 signal에서 oxygenated methine carbon이 관측되었다. 그리고  $\delta_{\text{C}}$  13.0~25.6의 고자장 영역에서 6개의 methyl carbon signal( $\delta_{\text{C}}$  25.6, 20.8, 20.0, 19.7, 17.6, 13.0)이 관측되었다. 이와 같은 chemical shift값과  $^1\text{H}$ - 및  $^{13}\text{C}$ - NMR을 종합하여 분석하여 본 결과, chain 구조상에서 *trans* 배향 ( $J=15.2$  Hz)을 갖는 이중결합과, ring 구조 안에 2개의 이중결합 ( $J=8.8$  Hz)을 비롯하여 산소가 결합한 3개의 탄소를 가지며, methyl기 6개를 가진 탄소수 28개의 ergosterol 화합물임을 추정할 수 있었다. 좀 더 정확한 구조와 이중결합의 위치를 확인하기 위하여 2D-NMR을 측정하였다.  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY 스펙트럼으로부터 정확한 부분구조를 추정할 수 있었으며, HSQC 스펙트럼을 토대로 각각의 탄소와 수소의 정확한 assign을 할 수 있었다. HMBC 스펙트럼에서 2개의 olefinic methine proton H-7( $\delta$  6.56)과 H-6( $\delta$  6.25) signal이 oxygenated quaternary carbon C-5( $\delta$  82.67)와 C-8( $\delta$  78.33)과 각각  $J^{\beta}$  및  $J^{\alpha}$  correlation을 보여주었다. 또한, singlet methyl proton H-19( $\delta$  1.06)는 C-1( $\delta$  32.61), C-5( $\delta$  82.67) 및 C-9( $\delta$  142.42)와의 사이에  $J^{\beta}$  correlation을 보여주었고, H-11( $\delta$  5.39) 이 C-8( $\delta$  78.33), C-10( $\delta$  37.99), C-13( $\delta$  43.64)와  $J^{\beta}$  correlation을 보여줌으로써, C-6과 C-7사이, C-9와 C-11사이, C-22와 C-23사이에 이중결합이 있음을 확인할 수 있었다. 이를 종합하고 문헌과 비교 조사해본 결과, 화합물 **3**은 ergosterol의 C-5와 C-8사이에 peroxide와 C3에  $\beta$ 배향의 수산기를 가지고, C-6(C-7), C-9(C-11) 및 C-22(C-23)에 3쌍의 이중결합을 가진 5 $\alpha,8\alpha$ -epidioxyergosta-6,9(11),22-trien-3 $\beta$ -ol (dehydroergosterol 5,8-epidioxide) 로 동정하였다.

#### 1.4. 화합물 4의 구조

화합물 4의 스펙트럼 특성:  $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ ) 6.48(1H, d,  $J=8.8$  Hz, H-7), 6.22(1H, d,  $J=8.8$  Hz, H-6), 5.20(1H, dd,  $J=15.6$ , 8.0, H-22), 5.11(1H, dd,  $J=15.2$ , 7.6, H-23), 3.95(1H, m, H-3), 0.98(3H, d,  $J=6.8$  Hz, H-21), 0.88(3H, d,  $J=6.8$  Hz, H-28), 0.87(3H, s, H-19), 0.81(3H, d,  $J=6.8$  Hz, H-26), 0.79(3H, d,  $J=6.4$  Hz, H-27), 0.79(3H, s, H-18);  $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta_{\text{C}}$ ) 135.31(C-6), 135.08(C-23), 132.19(C-22), 130.63(C-7), 82.13(C-8), 79.40(C-5), 66.44(C-3), 56.19(C-17), 51.69(C-14), 51.09(C-9), 44.58(C-13), 42.80(C-24), 39.77(C-20), 39.37(C-12), 36.99(C-1), 36.96(C-10), 34.73(C-4), 33.10(C-25), 30.16(C-2), 28.70(C-15), 23.45(C-16), 20.94(C-21), 20.69(C-11), 20.02(C-26), 19.71(C-27), 18.24(C-19), 17.63(C-28), 12.94(C-18).

화합물 4(colorless crystals)은  $^1\text{H-NMR}$  spectrum에서  $\delta_{\text{H}}$  6.48(1H, d,  $J=8.8$  Hz),  $\delta_{\text{H}}$  6.22(1H, d,  $J=8.8$  Hz),  $\delta_{\text{H}}$  5.20(1H, dd,  $J=15.6$ , 8.0 Hz),  $\delta_{\text{H}}$  5.11(1H, dd,  $J=15.6$ , 7.6 Hz)의 signal로부터 총 4개의 olefinic methine proton이 관측되었고,  $\delta_{\text{H}}$  3.95(1H, m)의 signal에서 oxygenated methine proton 1개를 관측하였다.  $\delta_{\text{H}}$  2.2 미만의 고자장 영역에서 다수의 methylene과 methine signal을 비롯하여, singlet methyl signal 2개 ( $\delta_{\text{H}}$  0.87, 0.79)와 doublet methyl signal 4개( $\delta_{\text{H}}$  0.98, 0.88, 0.81, 0.79)가 관측되었다. 따라서 이 화합물은 2개의 이중결합과 1개의 oxygenated methine을 가진 sterol로 추측되었다. 특히 저자장 영역에서 두 개의 olefinic methine proton이 8.8 Hz로 coupling하고, 또 다른 두 개의 olefinic methine proton은 각각 15.6 Hz로 coupling 하는 것으로 보아 ring 안에 이중결합 한 쌍과 chain 상에 *trans* 구조를 갖는 이중결합 한 쌍이 있는 것으로 예상할 수 있었다.  $^{13}\text{C-NMR}$  spectrum에서 총 28개의 carbon이 관측되었고,  $\delta_{\text{C}}$  135.3,  $\delta_{\text{C}}$  135.1,  $\delta_{\text{C}}$  132.2,  $\delta_{\text{C}}$  130.6의 signal로부터 olefinic methine carbon 4개를 확인하였다. 또한  $\delta_{\text{C}}$  82.1과  $\delta_{\text{C}}$  79.4의 signal에서 oxygenated quaternary carbon 2개와  $\delta_{\text{C}}$  66.4의 signal에서 oxygenated methine carbon이 관측되었다.  $\delta_{\text{C}}$  12.9~21.0 사이의 고자장 영역에서 6개의 methyl carbon signal( $\delta_{\text{C}}$  21.0, 20.0, 19.7, 18.2, 17.6, 12.9)이 관측되었다. 이러한  $^1\text{H-}$  및  $^{13}\text{C-NMR}$ 을 종합하여 분석하여 본 결과, *trans* 배향( $J=15.2$ , 8.0 Hz)을 갖는 chain 상의 이중결합과 ring 안의 이중결합( $J=8.8$  Hz)을 비롯하여 산소가 결합한 3개의 탄소 및 methyl기 6개를 갖는 탄소수

28개의 ergosterol 화합물임을 추정할 수 있었다. 좀 더 정확한 구조와 이중결합의 위치를 확인하기 위하여 2D-NMR을 측정하였다.  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY 스펙트럼으로부터 정확한 부분구조를 추정할 수 있었으며, HSQC 스펙트럼을 토대로 각각의 탄소와 수소의 정확한 assign을 할 수 있었다. HMBC 스펙트럼에서 2개의 olefinic methine proton H-7( $\delta$  6.48)과 H-6( $\delta$  6.22) signal이 oxygenated quaternary carbon C-5( $\delta$  79.40)와 C-8( $\delta$  82.13)과 각각  $J^{\beta}$  및  $J^{\alpha}$  correlation을 보여주었고, olefinic methine proton H-22( $\delta$  5.20), H-23( $\delta$  5.11) signal이 C-20( $\delta$  39.77)과 C-24( $\delta$  42.80)와 각각  $J^{\beta}$  및  $J^{\alpha}$  correlation을 보여주었다. 이로써, C-7과 C-8사이와 C-22와 C-23사이에 이중결합이 있음을 확인할 수 있었다. 이를 종합하고 문헌과 비교 조사해본 결과, 화합물 **4**는 ergosterol의 C-5와 C-8사이에 peroxide와 C3에  $\beta$ 배향의 수산기를 가지고, C-6(C-7) 및 C-22(C-23)에 2쌍의 이중결합을 가진 5 $\alpha$ ,8 $\alpha$ -epidioxyergosta-6,22-dien-3 $\beta$ -ol(ergosterol peroxide)로 동정하였다.

#### 1.5. 화합물 **5**의 구조

화합물 **5**의 스펙트럼 특성:  $^1\text{H}$ -NMR(400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ,  $\delta$ ) 5.39(1H, d,  $J=5.2$ , 2.4 Hz, H-7), 5.22(1H, d,  $J=15.2$ , 6.0 Hz, H-23), 5.21(1H, dd,  $J=15.2$ , 6.0, H-22), 3.95(1H, m, H-3), 3.36(3H, s, H-6O-Me), 3.14(1H, d,  $J=4.8$ , H-6), 1.04(3H, d,  $J=6.8$  Hz, H-21), 0.97(3H, s, H-19), 0.93(3H, d,  $J=6.4$  Hz, H-28), 0.86(3H, d,  $J=7.6$  Hz, H-27), 0.84(3H, d,  $J=6.8$  Hz, H-26), 0.61(3H, s, H-18);  $^{13}\text{C}$ -NMR(100 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ,  $\delta_{\text{C}}$ ) 144.34(C-8), 136.89(C-23), 133.11(C-22), 115.94(C-7), 83.82(C-6), 76.92(C-5), 68.29(C-3), 58.21(C-6O-Me), 57.36(C-17), 56.06(C-14), 44.74(C-9), 44.74(C-13), 44.37(C-24), 41.85(C-20), 40.74(C-12), 40.69(C-4), 38.29(C-10), 34.40(C-25), 33.69(C-1), 31.73(C-2), 29.24(C-16), 24.04(C-15), 23.09(C-11), 21.72(C-27), 20.53(C-26), 20.15(C-21), 18.87(C-19), 18.29(C-28), 12.80(C-18).

화합물 **5**(white powder)는  $^1\text{H}$ -NMR spectrum에서  $\delta_{\text{H}}$  5.39(1H, br. d,  $J=5.2$  Hz, H-7),  $\delta_{\text{H}}$  5.22(1H, d,  $J=15.2$ , 6.0 Hz),  $\delta_{\text{H}}$  5.21(1H, dd,  $J=15.2$ , 6.0 Hz)의 signal로부터 총 3개의 olefinic methine proton이 관측되었고,  $\delta_{\text{H}}$  3.95(1H, m),  $\delta_{\text{H}}$  3.14(1H, d,  $J=4.8$  Hz)의 signal에서 2개의 oxygenated methine proton이 관측되었다. 또한  $\delta_{\text{H}}$  3.36(3H, s, H-6-OMe)에서 oxygenated singlet methyl proton이 관측되어 hydroxy

group에 methyl group이 결합되어 있는 것으로 추정되었다.  $\delta_H$  2.4 미만의 고자장 영역에서 다수의 methylene과 methine signal을 비롯하여, singlet methyl signal 2개( $\delta_H$  0.97, 0.61)와 doublet methyl signal 4개( $\delta_H$  1.04, 0.93, 0.86, 0.84)가 관측되었다. 따라서 이 화합물은 2개의 이중결합, 2개의 hydroxy, 1개의 methoxy를 가지고 있는 sterol로 추측되었다.  $^{13}C$ -NMR spectrum에서는 총 29개의 carbon이 관측되었고,  $\delta$  144.34 signal의 olefine quaternary carbon을 비롯하여, 3개의 olefine methine carbon signal( $\delta_C$  136.9, 133.1, 115.9)을 확인하였다. 또한  $\delta_C$  83.8와  $\delta_C$  68.3의 signal에서 oxygenated methine carbon 2개가 관측되었고,  $\delta_C$  76.9의 signal에서는 oxygenated quaternary carbon이,  $\delta_C$  58.2의 signal에서 oxygenated methyl carbon이 관측되었다.  $\delta_C$  12.8~21.7의 고자장 영역에서 6개의 methyl carbon signal( $\delta_C$  21.7, 20.5, 20.2, 18.9, 18.3, 12.8)이 관측되었다. 이와 같은 chemical shift값과  $^1H$ - 및  $^{13}C$ -NMR을 종합하여 분석하여 본 결과, chain 구조상에서 *trans* 배향( $J=15.2, 6.0$  Hz)을 갖는 이중결합 한 쌍과 ring 안의 quaternary carbon과 연결된 이중결합 한 쌍이 있음을 알 수 있었고, 3개의 hydroxy기 중 하나에 methyl group이 결합되어 있으며, methyl group이 6개인 화합물로, methoxy 기의 탄소를 제외하면 28개의 탄소로 이루어진 ergosterol 화합물임을 추정할 수 있었다. 좀 더 정확한 구조와 이중결합의 위치를 확인하기 위하여 2D-NMR을 측정하였다.  $^1H$ - $^1H$  COSY 스펙트럼으로부터 정확한 부분구조를 추정할 수 있었으며, HSQC 스펙트럼을 토대로 각각의 탄소와 수소의 정확한 assign을 할 수 있었다. 이중결합과 methoxy group의 정확한 위치를 알고자 HMBC 스펙트럼을 분석한 결과 olefinic methine proton인 H-7( $\delta$  5.39)의 signal이 oxygenated methine carbon인 C-6( $\delta$  83.82)과  $J^2$  correlation을 하며, C-5 ( $\delta$  76.92)와 C-9( $\delta$  44.74) 및 C-14( $\delta$  56.06)와  $J^3$  correlation하는 것 보여주었고, olefinic methine proton H-22( $\delta$  5.21), H-23( $\delta$  5.22) signal이 C-20( $\delta$  41.85)과 C-24( $\delta$  44.37)과 각각  $J^2$  및  $J^3$  correlation을 보여주었다. 또한 methoxy group의 methyl proton인  $\delta$  3.36의 signal이 C-6( $\delta$  83.82)과  $J^3$  correlation을 보여주었다. 이로써, C-7과 C-8사이와 C-22와 C-23 사이에 이중결합이 있음과 C-6에 methoxy group이 결합되어 있음을 확인할 수 있었다. 이를 종합하고 문헌과 비교 조사해본 결과, 화합물 **5**는 ergosterol의 C-3과 C-6에  $\beta$ 배향의 수산기와 C-5  $\alpha$ 배향의 수산기를 가지고, C-6에 methoxy group이 결합되어 있으며, C-7(C-8) 및 C-22(C-23)에 2쌍의 이중결합을 가진 3 $\beta$ ,5 $\alpha$ -dihydroxy-6 $\beta$

-methoxyergosta-7,22-diene(6-*O*-methycerevisterol)로 동정하였다.

#### 1.6. 화합물 6의 구조

화합물 6의 스펙트럼 특성:  $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz,  $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ ,  $\delta_{\text{H}}$ ) 5.74(1H, m, H-7), 5.23(1H, dd,  $J=15.6, 7.6$  Hz, H-22), 5.16(1H, dd,  $J=15.6, 7.6$  Hz, H-23), 4.83(1H, m, H-3), 4.33(1H, m, H-6), 1.53(3H, s, H-19), 1.05(3H, d,  $J=6.4$  Hz, H-21), 0.94(3H, d,  $J=6.8$  Hz, H-28), 0.85(3H, d,  $J=6.8$  Hz, H-26), 0.84(3H, d,  $J=6.8$  Hz, H-27), 0.65(3H, s, H-18);  $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz,  $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ ,  $\delta_{\text{C}}$ ) 140.84(C-8), 135.50(C-23), 131.38(C-22), 119.86(C-7), 75.51(C-5), 73.67(C-6), 67.00(C-3), 55.49(C-17), 54.69(C-14), 43.19(C-9), 43.19(C-13), 42.51(C-24), 41.47(C-4), 40.38(C-20), 39.34(C-12), 37.52(C-10), 33.31(C-1), 32.79(C-25), 32.14(C-2), 27.99(C-16), 22.97(C-15), 21.88(C-11), 20.89(C-21), 19.64(C-26), 19.33(C-27), 18.33(C-19), 17.32(C-28), 12.01(C-18).

화합물 6(colorless needles)는  $^1\text{H-NMR}$  spectrum에서  $\delta_{\text{H}}$  5.74(1H, m, H-7),  $\delta_{\text{H}}$  5.23(1H, dd,  $J=15.6, 7.6$  Hz, H-22),  $\delta_{\text{H}}$  5.16(1H, dd,  $J=15.6, 7.6$  Hz, H-23)의 signal로부터 총 3개의 olefinic methine proton이 관측되었고,  $\delta_{\text{H}}$  4.83(1H, m, H-3),  $\delta_{\text{H}}$  4.33(1H, m, H-6)의 signal에서 2개의 oxygenated methine proton이 관측되었다.  $\delta_{\text{H}}$  2.0 미만의 고자장 영역에서 다수의 methylene과 methine signal을 비롯하여, singlet methyl signal 2개( $\delta_{\text{H}}$  1.53, 0.65)와 doublet methyl signal 4개( $\delta_{\text{H}}$  1.05, 0.94, 0.85, 0.84)가 관측되었다. 따라서 이 화합물은 2개의 이중결합과 다수의 hydroxy group을 가지고 있는 sterol로 추측되었다.  $^{13}\text{C-NMR}$  spectrum에서는 총 28개의 carbon이 관측되었고,  $\delta$  140.8 signal의 olefine quaternary carbon을 비롯하여, 3개의 olefine methine carbon signal( $\delta_{\text{C}}$  135.5, 131.4, 119.9)을 확인하였다. 또한  $\delta_{\text{C}}$  75.5의 signal에서는 oxygenated quaternary carbon이,  $\delta_{\text{C}}$  73.7와  $\delta_{\text{C}}$  67.0의 signal에서 oxygenated methine carbon 2개가 관측되었다.  $\delta_{\text{C}}$  12.0~20.9의 고자장 영역에서 6개의 methyl carbon signal( $\delta_{\text{C}}$  20.9, 19.6, 19.3, 18.3, 17.3, 12.0)이 관측되었다. 이와 같은 chemical shift값과  $^1\text{H-}$  및  $^{13}\text{C-NMR}$ 을 종합하여 분석하여 본 결과, chain 구조상에서 *trans* 배향( $J=15.6, 7.6$  Hz)을 갖는 이중결합 한 쌍과 ring 안의 quaternary carbon과 연결된 이중결합( $J=8.8$  Hz) 한 쌍을 비롯하여, hydroxy group이 결합된 3개 탄소 및 methyl

group이 6개인 탄소수 28개의 ergosterol 화합물임을 추정할 수 있었다. 좀 더 정확한 구조와 이중결합의 위치를 확인하기 위하여 2D-NMR을 측정하였다.  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY 스펙트럼으로부터 정확한 부분구조를 추정할 수 있었으며, HSQC 스펙트럼을 토대로 각각의 탄소와 수소의 정확한 assign을 할 수 있었다. 이중결합과 hydroxy group의 정확한 위치를 알고자 HMBC 스펙트럼을 분석한 결과 olefinic methine proton인 H-6( $\delta$  4.33)의 signal이 oxygenated methine carbon인 C-5( $\delta$  75.51)와 methin carbon인 C-7( $\delta$  119.86)과  $J$  correlation을 하며, quartarnary carbon인 C-8( $\delta$  140.84)과 C-10( $\delta$  37.52)과  $J$  correlation하는 것 보여주었고, olefinic methine proton인 H-7( $\delta$  5.74)의 signal이 oxygenated methine carbon인 C-6( $\delta$  73.67)과  $J$  correlation을 하며, oxygenated methine carbon인 C-5( $\delta$  75.51)와 methin carbon인 C-9( $\delta$  43.19) 및 methylene carbon C-14( $\delta$  54.69)와  $J$  correlation하는 것 보여주었다. 또한 olefinic methine proton H-22( $\delta$  5.23), H-23( $\delta$  5.16) signal이 C-20( $\delta$  40.38)과 C-24( $\delta$  42.51)과 각각  $J$  및  $J$  correlation을 보여주었다. 이로써, C-7과 C-8사이와 C-22와 C-23사이에 이중결합이 있음과 C-3, C-5, C-6에 hydroxy group이 결합되어 있음을 확인할 수 있었다. 이를 종합하고 문헌과 비교 조사해본 결과, 화합물 **6**은 ergosterol의 C-3과 C-6에  $\beta$ 배향의 수산기와 C-5  $\alpha$ 배향의 수산기를 가지고, C-7(C-8) 및 C-22(C-23)에 2쌍의 이중결합을 가진 ergosta-7,22*E*-diene-3 $\beta$ ,5 $\alpha$ ,6 $\beta$ -triol (cerevisterol)로 동정하였다.

### 1.7. 화합물 **7**의 구조

화합물 **7**의 스펙트럼 특성:  $^1\text{H}$ -NMR(400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ,  $\delta$ ) 7.52 (1H, d,  $J=8.4$ , H-2), 7.52 (1H, d,  $J=8.4$ , H-6), 7.43 (1H, d,  $J=16.0$ , H-7), 6.84 (1H, d,  $J=8.4$ , H-3), 6.84 (1H, d,  $J=8.4$ , H-5), 6.58 (1H, d,  $J=16.0$ , H-8), 2.34 (3H, s, H-10);  $^{13}\text{C}$ -NMR(100 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ,  $\delta_c$ ) 199.0(C-9), 158.1(C-4), 143.6(C-7), 130.4(C-2), 130.4(C-6), 127.2(C-1), 125.1(C-8), 116.2(C-3), 116.2(C-5), 27.7(C-10).

화합물 **7**(yellow amorphous oil)는  $^1\text{H}$ -NMR spectrum에서  $\delta$  7.52(1H, d,  $J=16.0$  Hz),  $\delta$  6.58(1H, d,  $J=16.0$  Hz)의 signal과  $\delta$  7.43(1H, d,  $J=8.4$  Hz),  $\delta$  6.84(1H, dd,  $J=8.4$  Hz) 각각 두 쌍의 signal로부터 총 6개의 olefinic methine proton이 관측되었고,  $\delta$  2.34의 signal에서 1개의 singlet methyl proton을 관측할 수 있었다. 특히  $\delta$  7.52와



$\delta$  6.58의 signal이 16.0 Hz로 coupling을 이루는 것을 보아 trans로 이중결합을 하고 있는 것을 확인 할 수 있었고,  $\delta$  7.43(1H, d,  $J=8.4$  Hz),  $\delta$  6.84(1H, dd,  $J=8.4$  Hz) 각각 두 쌍의 coupling으로 1,4번 탄소가 치환된 벤젠 고리가 존재함을 추정할 수 있었다.  $^{13}\text{C}$ -NMR spectrum에서 총 10개의 탄소가 관측되었고,  $\delta$  199.0에서 1개의 ketone이 존재함을 확인할 수 있었고,  $\delta$  158.1에서 산소가 결합한 olefinic quaternary carbon 1개 그리고,  $\delta$  127.2에서 olefinic quaternary carbon signal이 관측되었으며,  $\delta$  130.4, 130.4, 143.6 125.1, 116.2, 116.2의 signal에서 총 6개의 olefinic methine carbon signal을,  $\delta$  27.7에서 methyl carbon signal을 확인하였다. 이와 같은 chemical shift값을 보아 벤젠고리 1개가 존재하며, 벤젠고리 이외에 trans로 한 쌍의 이중결합이 더 존재함을 알 수 있었다. 좀 더 정확한 구조와 이중결합의 위치를 확인하기 위하여 2D-NMR을 측정하였다.  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY 스펙트럼으로부터 정확한 부분구조를 추정할 수 있었으며, HSQC 스펙트럼을 토대로 각각의 탄소와 수소의 정확한 assign을 할 수 있었다. 또한 HMBC 스펙트럼에서 proton과 carbon의  $J$  및  $J^2$  correlation을 확인하고 작용기의 위치를 결정하였다. 이를 종합하고 문헌과 비교 조사해본 결과, 화합물 7은 C-4 위치에 hydroxy group이 있는 phenyl기에 trans 이중결합이 결합되어 있고, C-9 위치에 ketone이 있는 4-(4-hydroxyphenyl)-3-buten-2-one(4-hydroxybenzylacetone)으로 동정하였다.

#### 1.8. 화합물 8의 구조

화합물 8의 스펙트럼 특성:  $^1\text{H}$ -NMR(400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ,  $\delta$ ) 9.67 (3H, s, H-7), 7.30 (1H, dd,  $J=7.2, 2.0$ , H-6), 7.29 (1H, d,  $J=2.0$ , H-2), 6.90 (1H, d,  $J=7.2$ , H-5), 6.84 (1H, d,  $J=1.6$ , H-2'), 6.74 (1H, d,  $J=6.8$ , H-5'), 6.74 (1H, d,  $J=6.8, 1.6$ , H-6'), 5.20 (3H, s, H-7');  $^{13}\text{C}$ -NMR(100 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ,  $\delta_c$ ) 192.9 (C-7), 153.5 (C-3), 147.0 (C-4), 146.5 (C-4'), 145.9 (C-3'), 130.9 (C-1'), 130.7 (C-1), 126.3 (C-6), 119.3 (C-6'), 116.1 (C-5), 115.7 (C-5'), 115.2 (C-2), 114.7 (C-2'), 104.7 (C-7'). In the  $^1\text{H}$ -NMR spectrum, proton signals indicated the presence of two 1,3,4-trisubstituted benzene ring [ $\{\delta_{\text{H}} 7.30$  (1H, dd,  $J=7.2, 2.0$  Hz),  $7.29$  (1H, d,  $J=2.0$  Hz),  $6.90$  (1H, d,  $J=7.2$  Hz)},  $\{\delta_{\text{H}} 6.84$  (1H, d,  $J=1.6$  Hz),  $6.74$  (1H, d,  $J=6.8$  Hz),  $6.74$  (1H, dd,  $J=6.8, 1.6$  Hz)}]. Also, a aldehyde signal at  $\delta_{\text{H}} 9.67$  (1H, s) and

a dioxymehatine signal at  $\delta_{\text{H}}$  5.20 (1H, s) were observed. In the  $^{13}\text{C}$ -NMR spectrum, fourteen signals, consisting of one aldehyde at  $\delta_{\text{C}}$  192.9 (1H, s), four oxygenated olefinic quaternary at  $\delta_{\text{C}}$  153.5, 147.0, 146.5, 145.9, two olefinic quaternary at  $\delta_{\text{C}}$  130.9, 130.7, six olefinic methine at  $\delta_{\text{C}}$  126.3, 119.3, 116.1, 115.7, 115.2, 114.7 and one dioxymethine at  $\delta_{\text{C}}$  104.7 signals were observed, leading to the conclusion that compound **8** was a phenolic, with two 1,3,4-trisubstituted benzene ring, one aldehyde, and one dioxymehatine.

화합물 **8**(pale purple amorphous powder)은  $^1\text{H}$ -NMR spectrum에서  $\delta$  7.30 (1H, dd,  $J=7.2, 2.0$ ), 7.29 (1H, d,  $J=2.0$ ), 6.90 (1H, d,  $J=7.2$ ), 6.84 (1H, d,  $J=1.6$ ), 6.74 (1H, d,  $J=6.8$ ), 6.74 (1H, d,  $J=6.8, 1.6$ )의 signal로부터 총 6개의 olefinic methine proton이 관측되었고,  $\delta$  9.67(3H, s)의 signal로부터 aldehyde 1개와  $\delta$  5.20(1H, s)의 signal에서 1개의 dioxymehatine proton을 관측할 수 있었다. 특히  $\delta$  7.30 (1H, dd,  $J=7.2, 2.0$ , H-6), 7.29 (1H, d,  $J=2.0$ , H-2), 6.90 (1H, d,  $J=7.2$ , H-5)의 coupling과 6.84 (1H, d,  $J=1.6$ , H-2'), 6.74 (1H, d,  $J=6.8$ , H-5'), 6.74 (1H, d,  $J=6.8, 1.6$ , H-6')의 coupling으로 1,3,4번 탄소가 치환된 벤젠 고리가 2개 존재함을 추정할 수 있었다.  $^{13}\text{C}$ -NMR spectrum에서 총 14개의 탄소가 관측되었고,  $\delta$  192.9에서 1개의 aldehyde가 존재함을 확인할 수 있었고,  $\delta$  153.5, 147.0, 146.5, 145.9에서 산소가 결합한 olefinic quaternary carbon 4개,  $\delta$  130.9, 130.7에서 olefinic quaternary carbon signal이 관측되었으며,  $\delta$  126.3, 119.3, 116.1, 115.7, 115.2, 114.7의 signal에서 총 6개의 olefinic methine carbon signal을,  $\delta$  104.7에서 dioxymethine carbon signal을 확인하였다. 이와 같은 chemical shift값을 보아 1,3,4 탄소가 치환된 벤젠고리 2개가 존재하며, dioxymethine carbon(C-7')로 두 개의 벤젠고리가 연결되어 있음을 예측할 수 있었다. 좀 더 정확한 구조와 이중결합의 위치를 확인하기 위하여 2D-NMR을 측정하였다.  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY 스펙트럼으로부터 정확한 부분구조를 추정할 수 있었으며, HSQC 스펙트럼을 토대로 각각의 탄소와 수소의 정확한 assign을 할 수 있었다. 또한 HMBC 스펙트럼에서 proton과 carbon의  $J^2$  및  $J^3$  correlation을 확인하고 작용기의 위치를 결정하였다. 이를 종합하고 문헌과 비교 조사해본 결과, 화합물 **8**은 2개의 1,3,4번 탄소가 치환된 벤젠고리와 1개의 aldehyde group(C-7), 1개의 dioxymethine(C-7')이 존재하는 2-(3',4'-dihydroxyphenyl)-1,3-benzodioxole-5-aldehyde로 동정하였다.

### 1.9. 화합물 9의 구조

화합물 9의 스펙트럼 특성:  $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ,  $\delta$ ) 7.51(1H, d,  $J=16.4$  Hz, H-7), 7.07(1H, d,  $J=2.4$  Hz, H-2), 6.98(1H, dd,  $J=8.4, 2.4$ , H-6), 6.78(1H, d,  $J=8.4$  Hz, H-5), 6.54(1H, d,  $J=16.4$ , H-8), 2.32(3H, s, H-10);  $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ,  $\delta_c$ ) 201.39(C-9), 149.83(C-4), 146.74(C-3), 146.74(C-7), 127.56(C-1), 124.55(C-8), 123.44(C-6), 116.42(C-5), 115.14(C-2), 27.02(C-10).

화합물 9는  $^1\text{H-NMR}$  spectrum에서  $\delta$  7.51(1H, d,  $J=16.4$  Hz),  $\delta$  7.07(1H, d,  $J=2.4$  Hz),  $\delta$  6.98(1H, dd,  $J=8.4, 2.4$ ),  $\delta$  6.78(1H, d,  $J=8.4$  Hz),  $\delta$  6.54(1H, d,  $J=16.4$ )의 signal로부터 총 5개의 olefinic methine proton이 관측되었고,  $\delta$  2.32의 signal에서 1개의 singlet methyl proton을 관측할 수 있었다. 특히  $\delta$  7.51(1H, d)의 signal과 이와 16.4 Hz로 coupling을 이루는  $\delta$  6.54(1H, d)의 signal로부터 trans로 이중결합을 하고 있는 것 확인 할 수 있었으며,  $\delta$  7.07(1H, d,  $J=2.4$  Hz),  $\delta$  6.98(1H, dd,  $J=8.4, 2.4$ ),  $\delta$  6.78(1H, d,  $J=8.4$  Hz)이 각각 8.0Hz, 2.4 Hz로 각각 coupling하는 것을 보아 벤젠 고리가 존재함을 추정할 수 있었다.  $^{13}\text{C-NMR}$  spectrum에서 총 10개의 탄소가 관측되었고,  $\delta$  201.39에서 1개의 ketone이 존재함을 확인할 수 있었고,  $\delta$  149.83과  $\delta$  146.74에서 산소가 결합한 olefinic quaternary carbon 2개 그리고,  $\delta$  127.56에서 olefinic quaternary carbon signal이 관측되었으며,  $\delta$  146.74,  $\delta$  124.55,  $\delta$  123.44,  $\delta$  116.42,  $\delta$  115.14의 signal에서 총 5개의 olefinic methine carbon signal을,  $\delta$  27.02에서 methyl carbon signal을 확인하였다. 이와 같은 chemical shift값을 보아 벤젠고리 1개가 존재하며, 벤젠고리 이외에 trans로 한 쌍의 이중결합이 더 존재함을 알 수 있었다. 좀 더 정확한 구조와 이중결합의 위치를 확인하기 위하여 2D-NMR을 측정하였다.  $^1\text{H-}^1\text{H}$  COSY 스펙트럼으로부터 정확한 부분구조를 추정할 수 있었으며, HSQC 스펙트럼을 토대로 각각의 탄소와 수소의 정확한 assign을 할 수 있었다. 또한 HMBC 스펙트럼에서 proton과 carbon의  $J$  및  $J'$  correlation을 확인하고 작용기의 위치를 결정하였다. 이를 종합하고 문헌과 비교 조사해본 결과, 화합물 6은 C-3과 C-4 위치에 hydroxy group이 있는 phenyl기에 trans 이중결합이 결합되어 있고, C-9위치에 ketone이 있는 3,4-dihydroxy benzalacetone으로 동정하였다.

### 1.10. 화합물 10의 구조

화합물 10의 스펙트럼 특성:  $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ,  $\delta$ ) 9.67 (3H, s, H-7), 7.30 (1H, d,  $J=8.0, 1.6$ , H-6), 7.29 (1H, d,  $J=1.6$ , H-2), 6.90 (1H, d,  $J=8.0$ , H-5);  $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ,  $\delta_c$ ) 191.9 (C-7), 152.8 (C-4), 146.1 (C-3), 129.5 (C-1), 125.3 (C-6), 115.1 (C-5), 114.1 (C-2).

화합물 10(yellow amorphous powder)는  $^1\text{H-NMR}$  spectrum에서  $\delta$  7.30 (1H, dd,  $J=8.0, 1.6$  Hz), 7.29 (1H, d,  $J=1.6$  Hz), 6.90 (1H, d,  $J=8.0$  Hz)의 signal로부터 총 3개의 olefinic methine proton이 관측되었고, 이 3개의 olefinic methine proton이 각각 8.0Hz, 1.6 Hz로 각각 coupling하는 것을 보아 벤젠 고리가 존재함을 추정할 수 있었다. 또한  $\delta$  9.67(1H, s)의 signal로부터 aldehyde가 1개 존재하는 것 확인 할 수 있었다.  $^{13}\text{C-NMR}$  spectrum에서 총 7개의 탄소가 관측되었고,  $\delta$  191.9에서 1개의 aldehyde가 존재함을 확인할 수 있었고,  $\delta$  152.8, 146.1에서 산소가 결합한 olefinic quaternary carbon 2개 그리고,  $\delta$ 129.5에서 olefinic quaternary carbon signal이 관측되었으며,  $\delta$  125.3, 115.1, 114.1의 signal에서 총 3개의 olefinic methine carbon signal을 확인하였다. 이와 같은 chemical shift값을 보아 벤젠고리 1개가 존재하며, aldehyde group이 1개 존재함을 알 수 있었다. 좀 더 정확한 구조와 이중결합의 위치를 확인하기 위하여 2D-NMR을 측정하였다.  $^1\text{H}-^1\text{H}$  COSY 스펙트럼으로부터 정확한 부분구조를 추정할 수 있었으며, HSQC 스펙트럼을 토대로 각각의 탄소와 수소의 정확한 assign을 할 수 있었다. 또한 HMBC 스펙트럼에서 proton과 carbon의  $J$  및  $J'$  correlation을 확인하고 작용기의 위치를 결정하였다. 이를 종합하고 문헌과 비교 조사 해본 결과, 화합물 10은 3,4-dihydroxybenzaldehyde (protocatechualdehyde)으로 동정하였다. 이와 같이 ALP 활성 검정을 토대로 용매분획과 컬럼 크로마토그래피 (column chromatography)로 분리 및 정제를 반복하여 ergostane 골격의 스테롤 화합물 6종과 페놀화합물 4종을 분리하였다. 각 화합물의 화학구조는 NMR, MS 및 IR 등의 스펙트럼 데이터를 해석하여, 1*H*-cyclopentantracene(**1**), episterol(**2**), dehydroperoxyergosterol(**3**), ergosterol peroxide(**4**), 6-*O*-methycerevisterol(**5**), cerevisterol(**6**), 4-hydroxybenzalacetone(**7**), 2-(3',4'-dihydroxyphenyl)-1,3-benzodioxole-5-aldehyde(**8**), 3,4-dihydroxybenzalacetone(**9**), protocatechualdehyde(**10**)로 동정하였다. 이 중 6종의 스테롤화합물 (화합물 1~6)과 3종의 페놀 화합물 (화합물

7~9)은 이번에 상항버섯에서 처음 분리된 것이다.

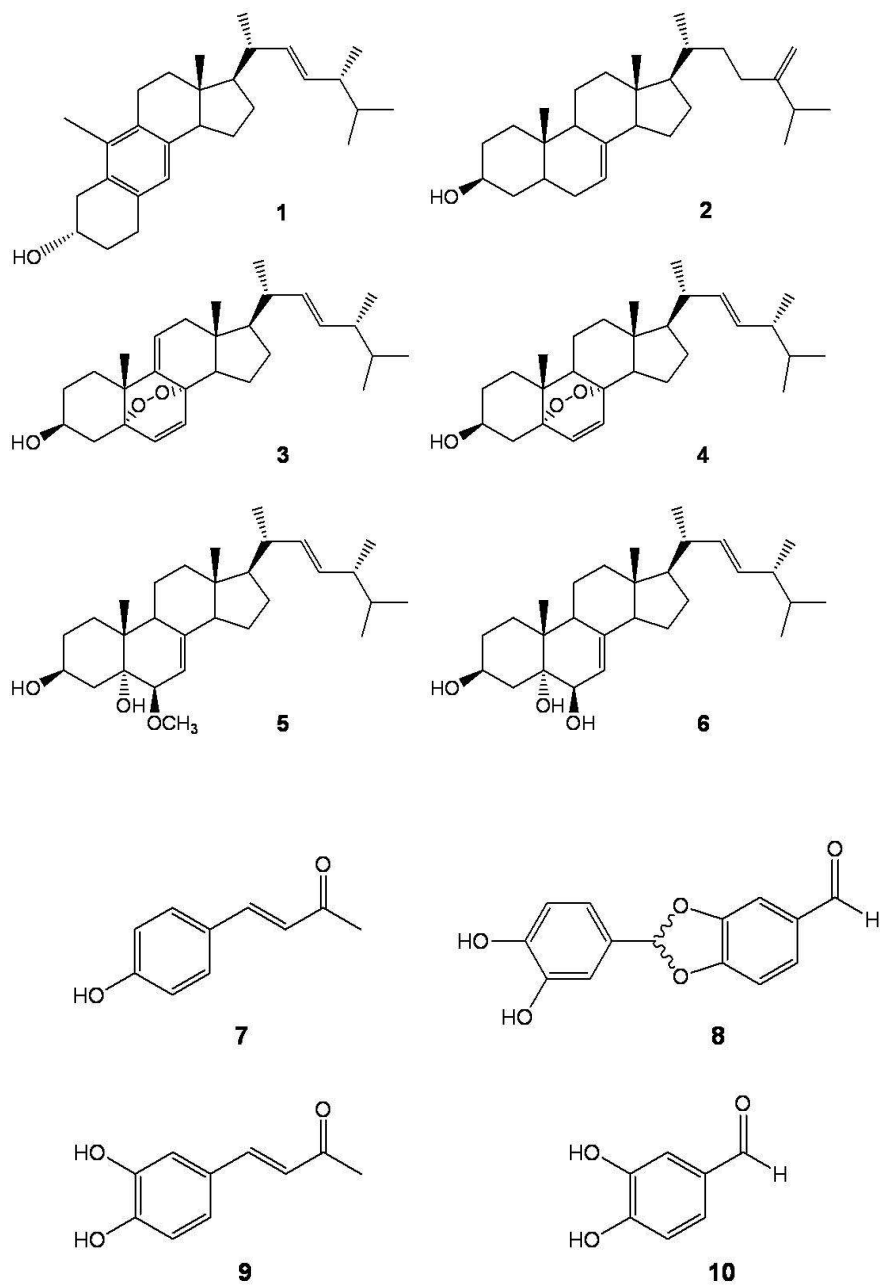


Fig. 48. Chemical structure of compounds isolated from the *Pellinus linteus*.

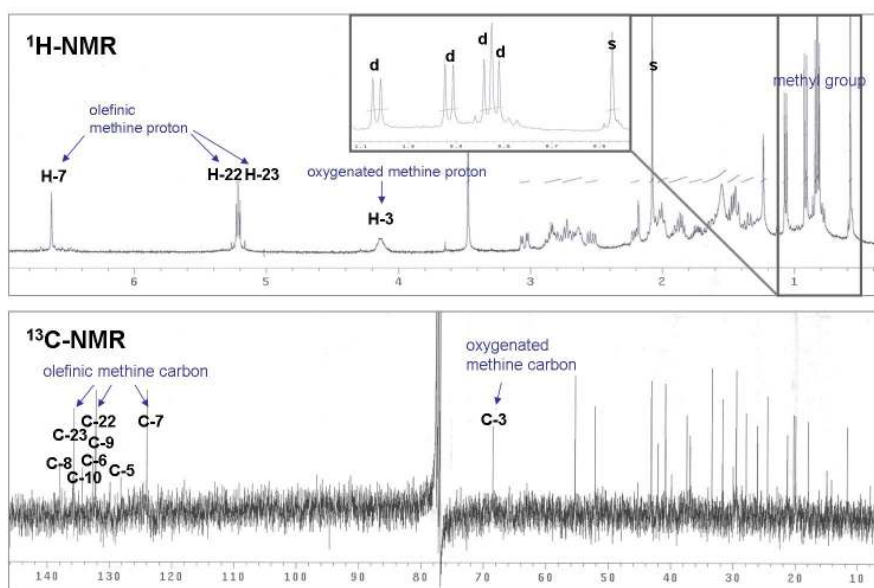


Fig. 49.  $^1\text{H-NMR}$ (400MHz),  $^{13}\text{C-NMR}$ (100MHz) spectra of compound 1 from the fruit body of *Pellinus linteus*.

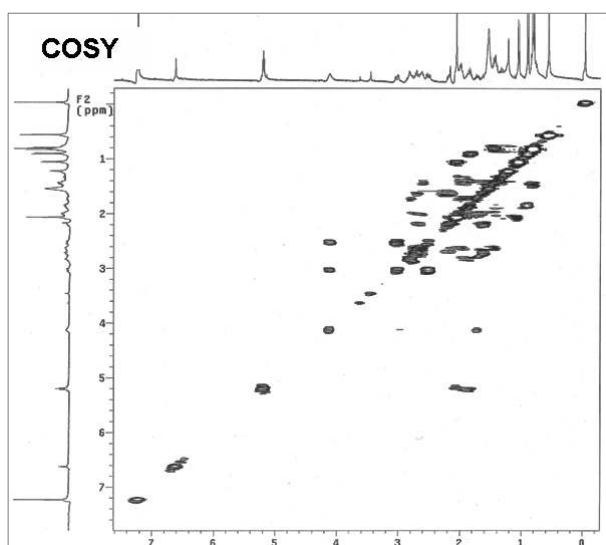


Fig. 50. COSY spectrum of compound 1 from the fruit body of *Pellinus linteus*.

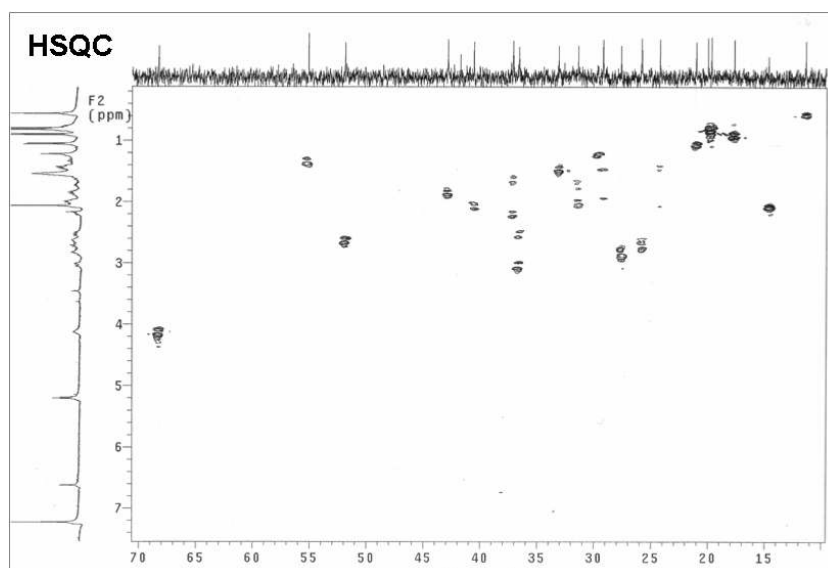
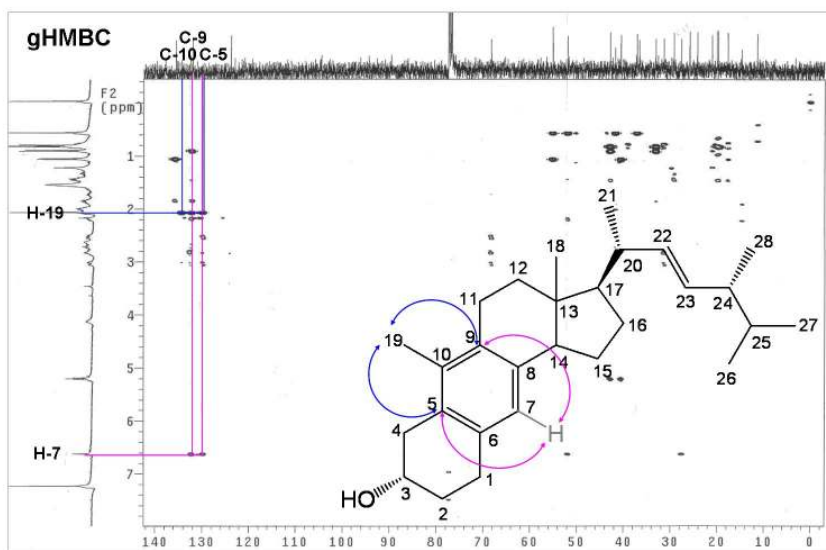


Fig. 51. HMBC & HSQC spectra of compound 1 from the fruit body of *Pellinus linteus*.

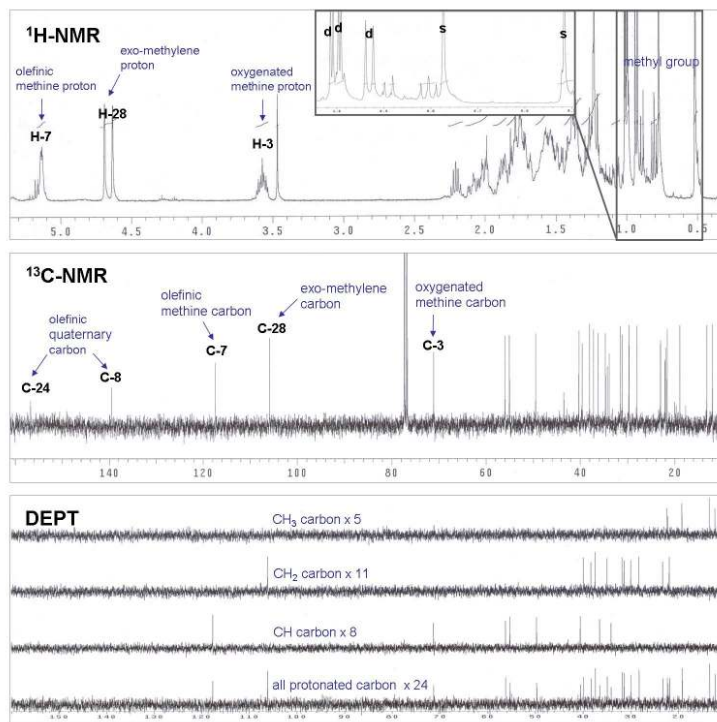


Fig. 52.  $^1\text{H-NMR}$ (400MHz),  $^{13}\text{C-NMR}$  & DEPT(100MHz) spectra of compound 2 from the fruit body of *Pellinus linteus*.

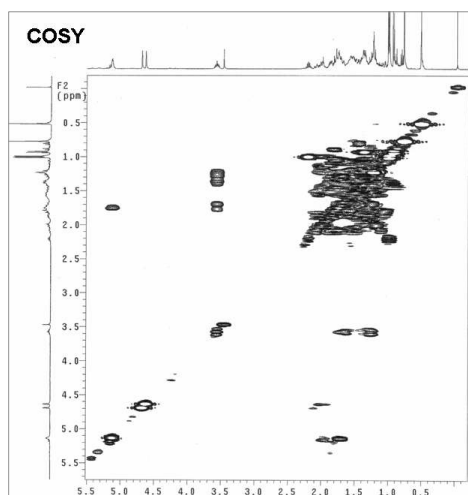


Fig. 53. COSY spectrum of compound 2 from the fruit body of *Pellinus linteus*.



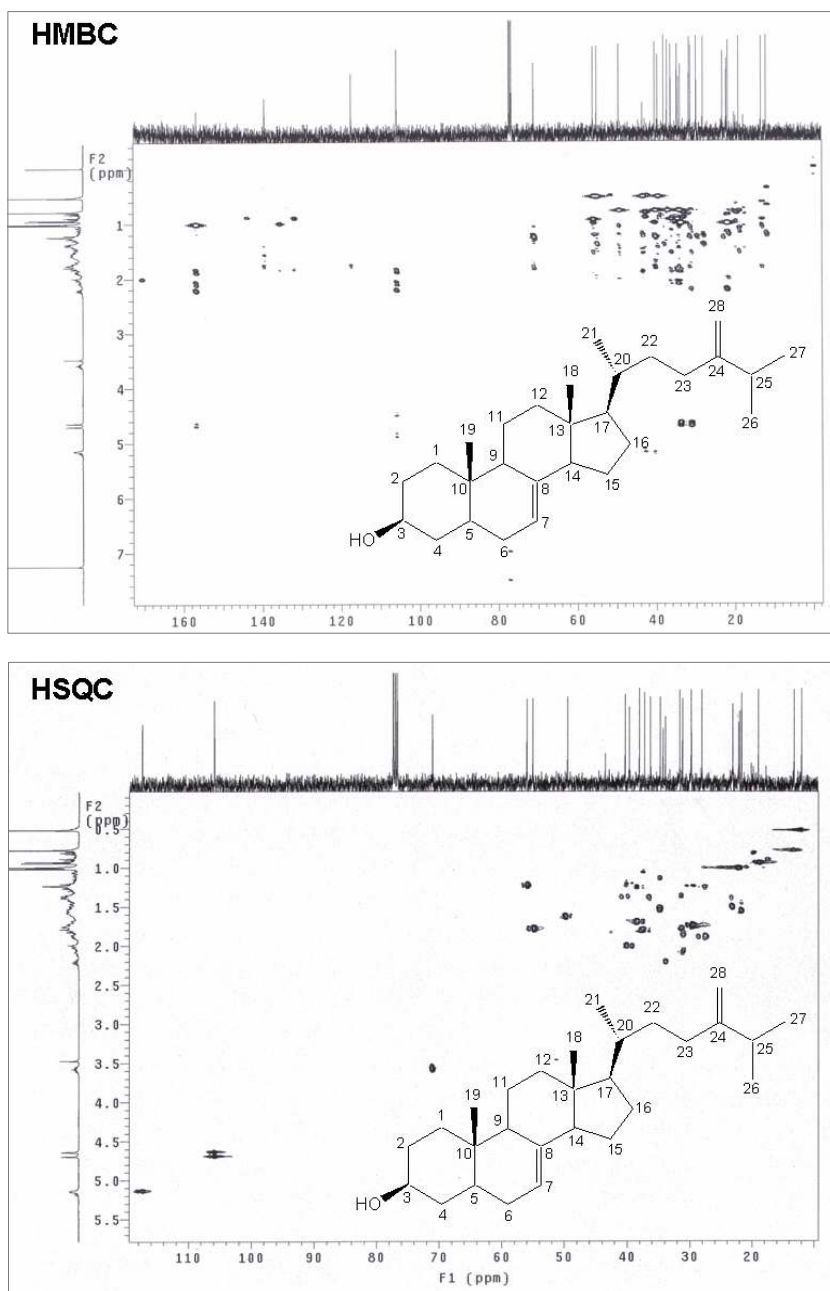


Fig. 54. HMBC & HSQC spectra of compound 2 from the fruit body of *Pellinus linteus*.

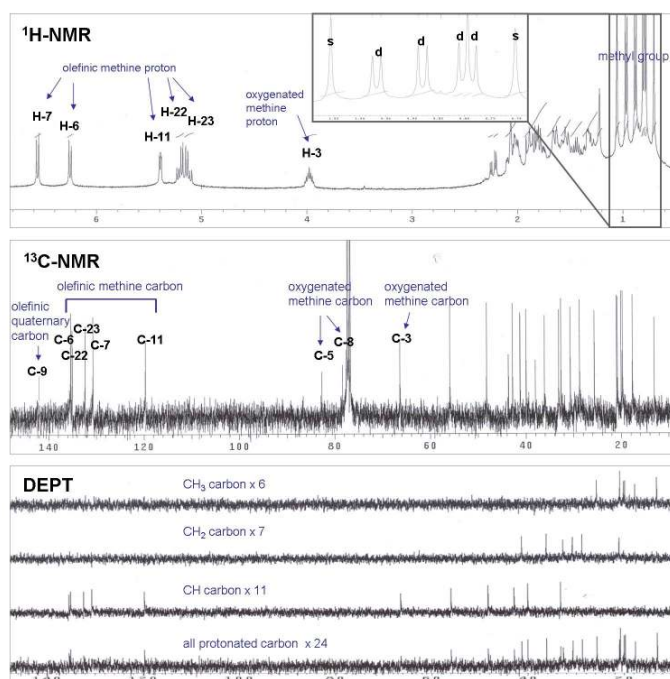


Fig. 55.  $^1\text{H-NMR}$ (400MHz),  $^{13}\text{C-NMR}$  & DEPT(100MHz) spectra of compound 3 from the fruit body of *Pellinus linteus*.

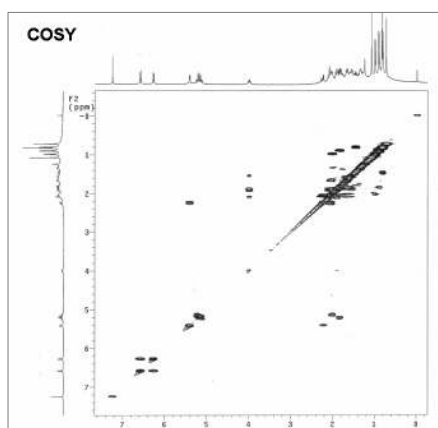


Fig. 56. COSY spectrum of compound 3 from the fruit body of *Pellinus linteus*.

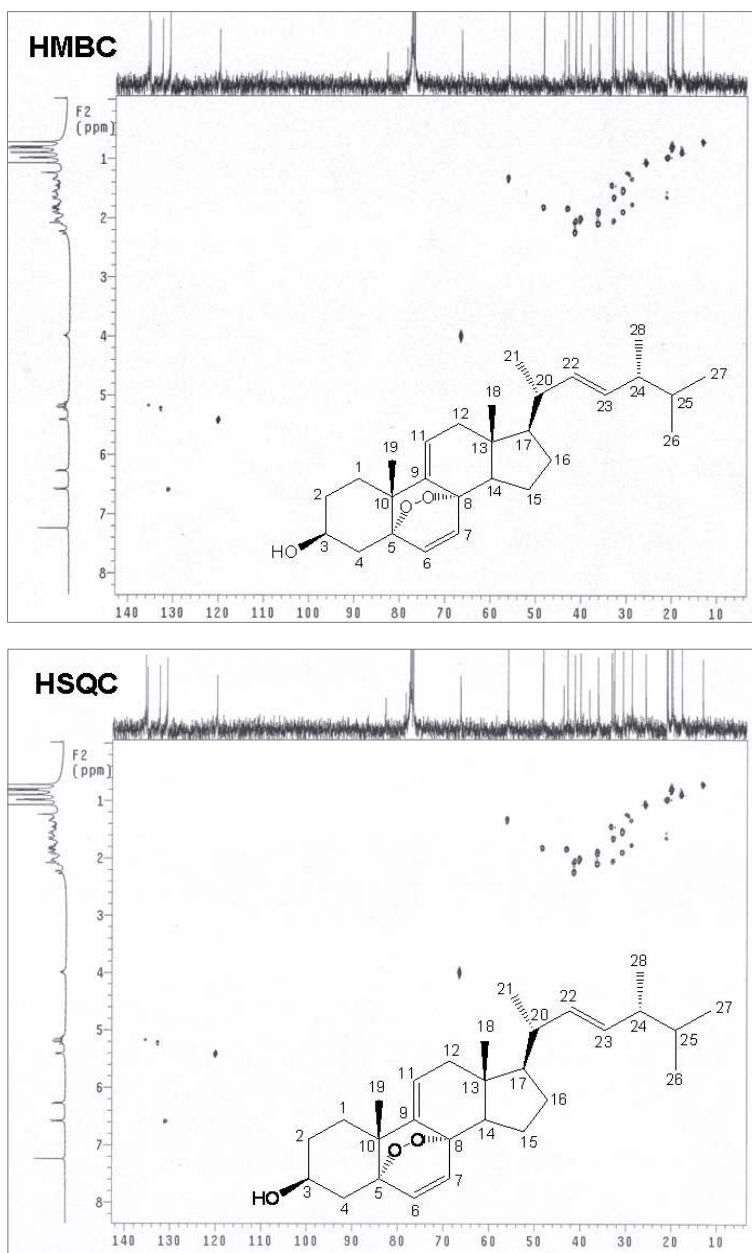


Fig. 57. HMBC & HSQC spectra of compound 3 from the fruit body of *Pellinus linteus*.

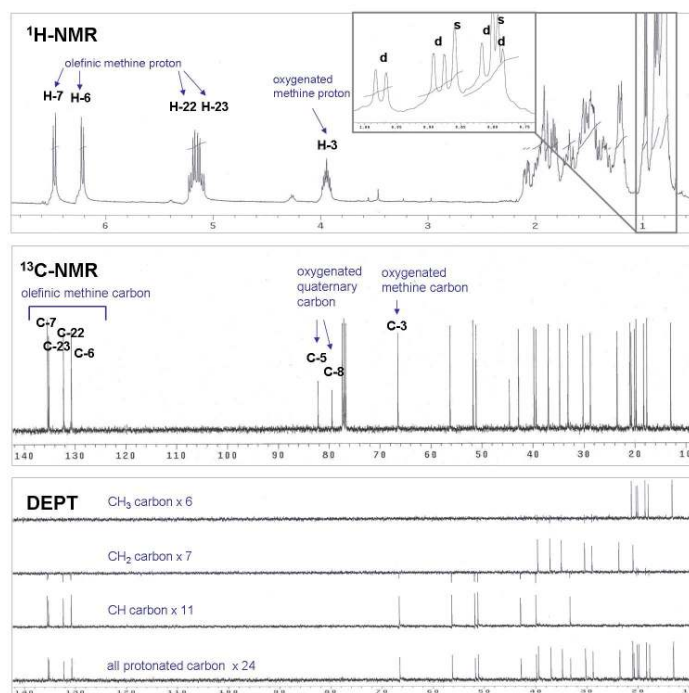


Fig. 58.  $^1\text{H}$ -NMR(400MHz),  $^{13}\text{C}$ -NMR & DEPT(100MHz) spectra of compound 4 from the fruit body of *Pellinus linteus*.

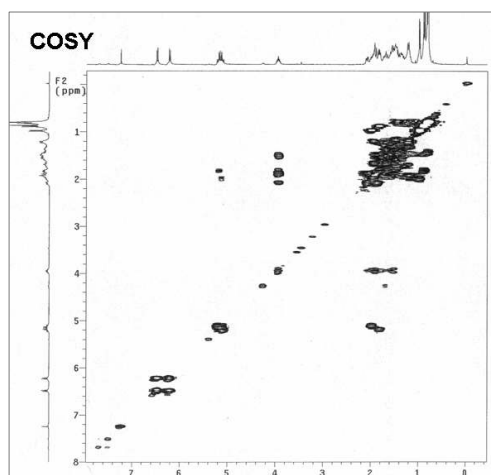


Fig. 59. COSY spectrum of compound 4 from the fruit body of *Pellinus linteus*.

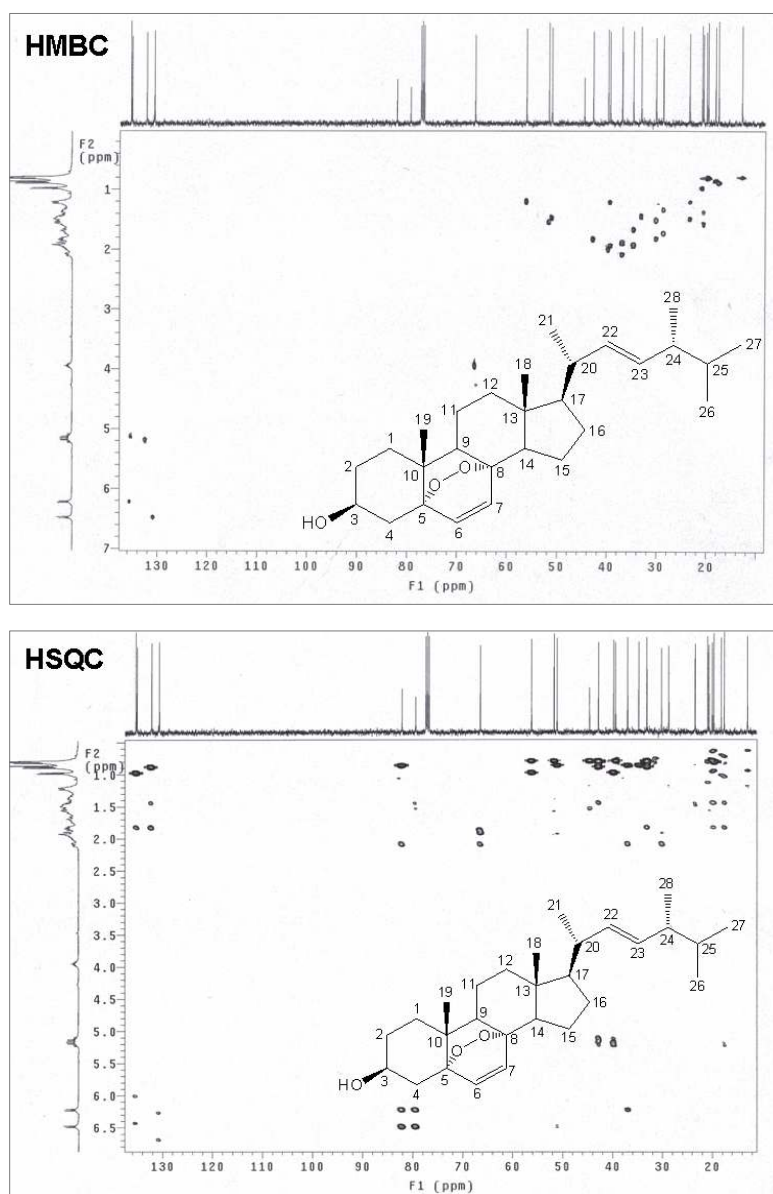


Fig. 60. HMBC & HSQC spectra of compound 4 from the fruit body of *Pellinus linteus*.

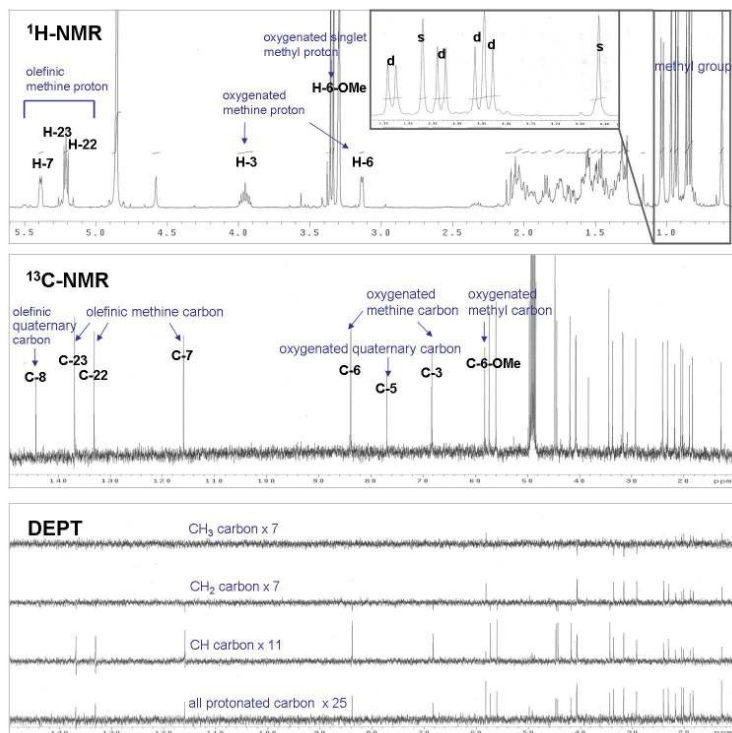


Fig. 61.  $^1\text{H}$ -NMR(400MHz),  $^{13}\text{C}$ -NMR & DEPT(100MHz) spectra of compound 5 from the fruit body of *Pellinus linteus*.

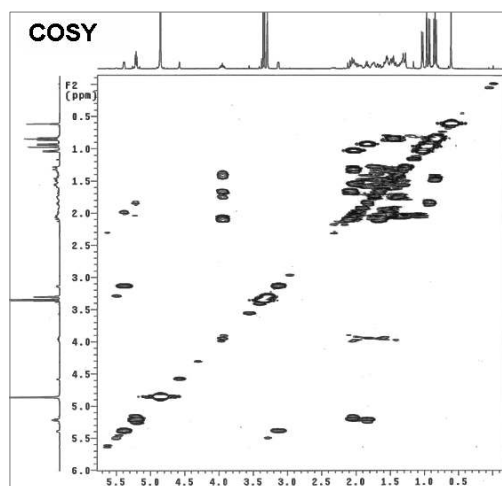


Fig. 62. COSY spectrum of compound 5 from the fruit body of *Pellinus linteus*.

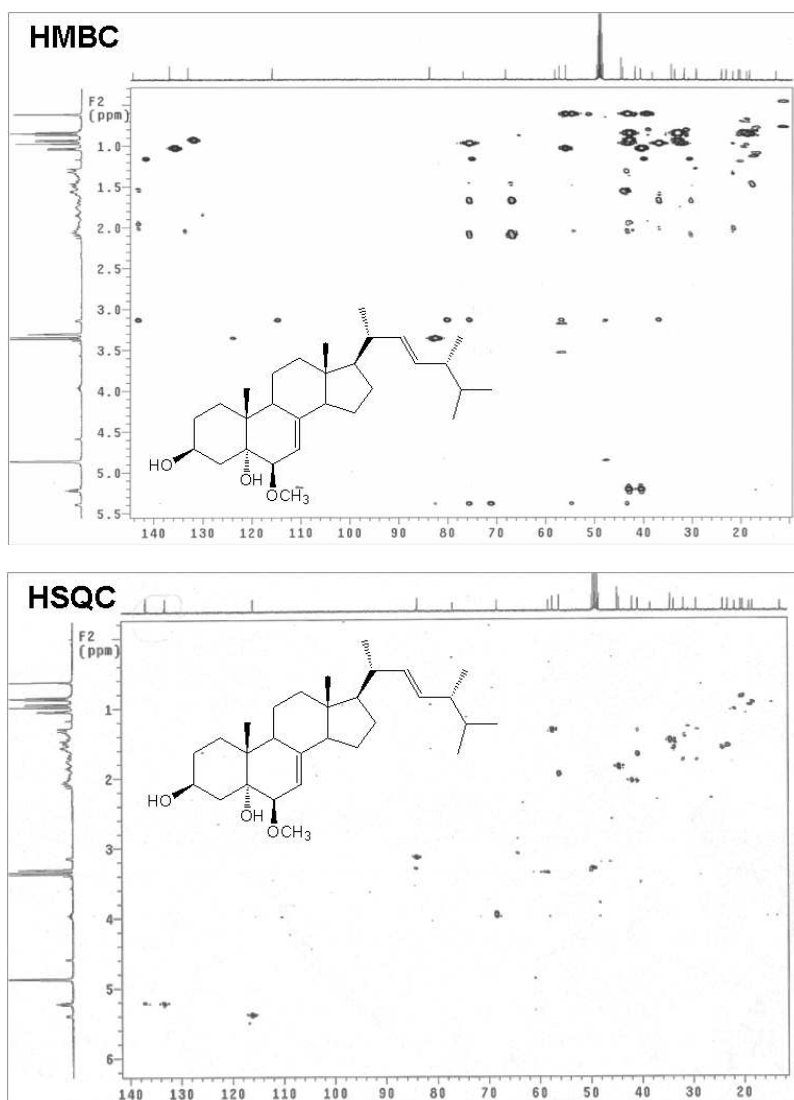


Fig. 63. HMBC & HSQC spectra of compound 5 from the fruit body of *Pellinus linteus*.

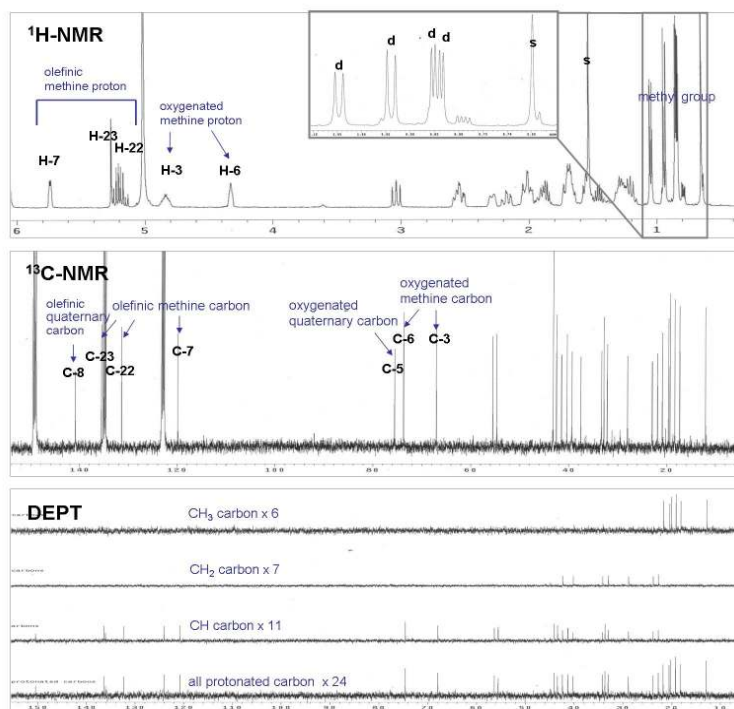


Fig. 64.  $^1\text{H}$ -NMR(400MHz),  $^{13}\text{C}$ -NMR & DEPT(100MHz) spectra of compound 6 from the fruit body of *Pellinus linteus*.

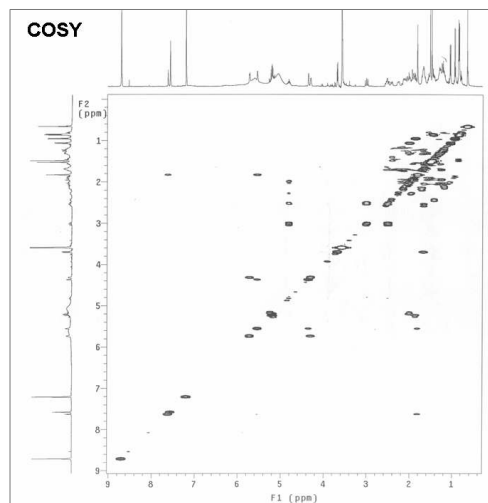


Fig. 65. COSY spectrum of compound 6 from the fruit body of *Pellinus linteus*.



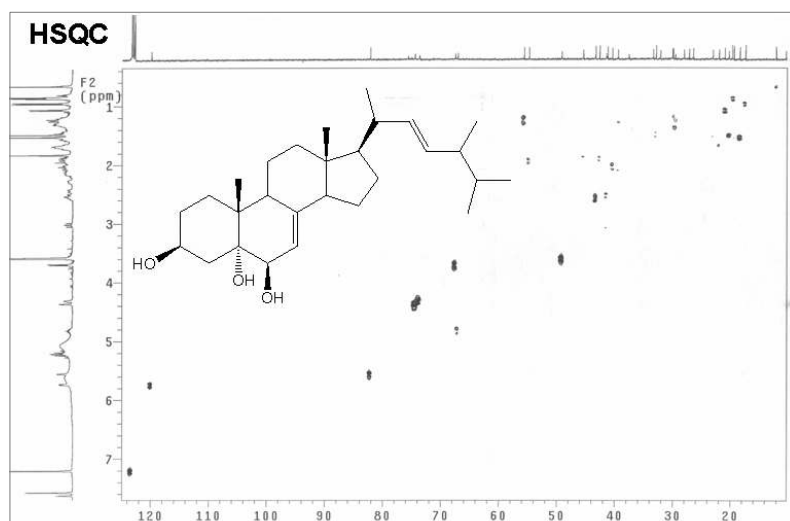
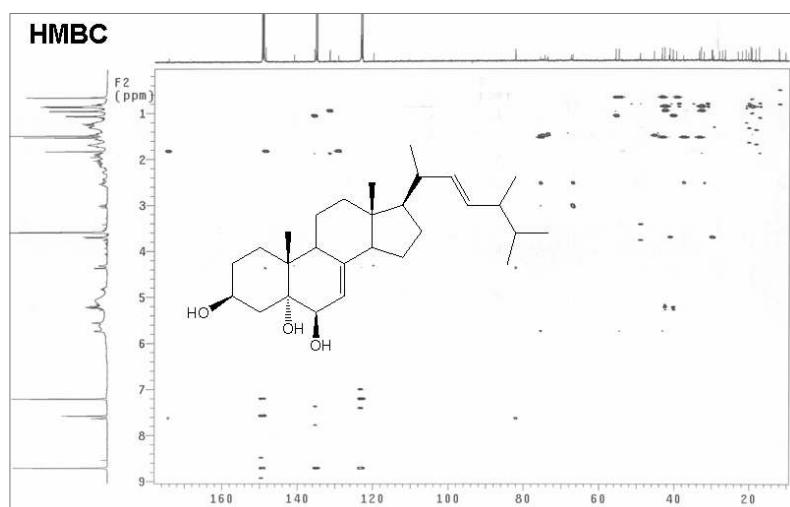


Fig. 66. HMBC & HSQC spectra of compound 6 from the fruit body of *Pellinus linteus*.

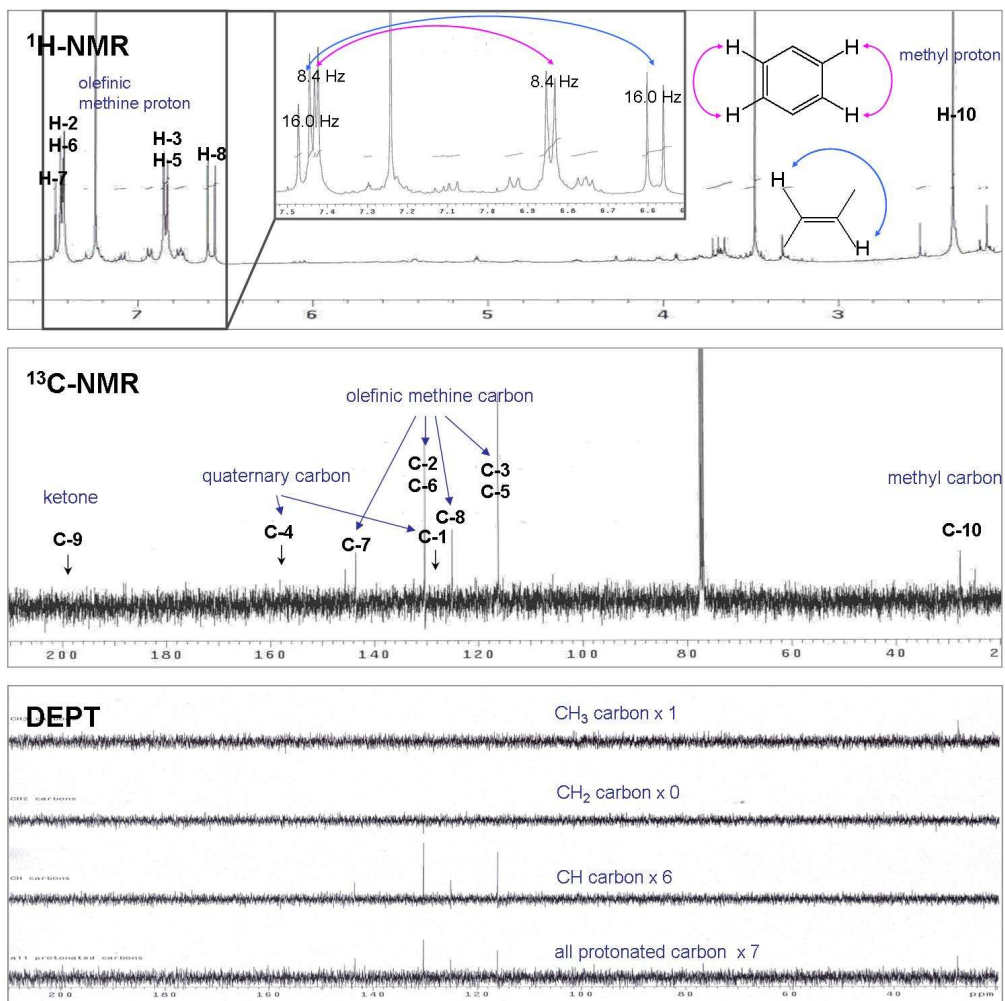


Fig. 67.  $^1\text{H-NMR}$ (400MHz),  $^{13}\text{C-NMR}$  & DEPT(100MHz) spectra of compound 7 from the fruit body of *Pellinus linteus*.

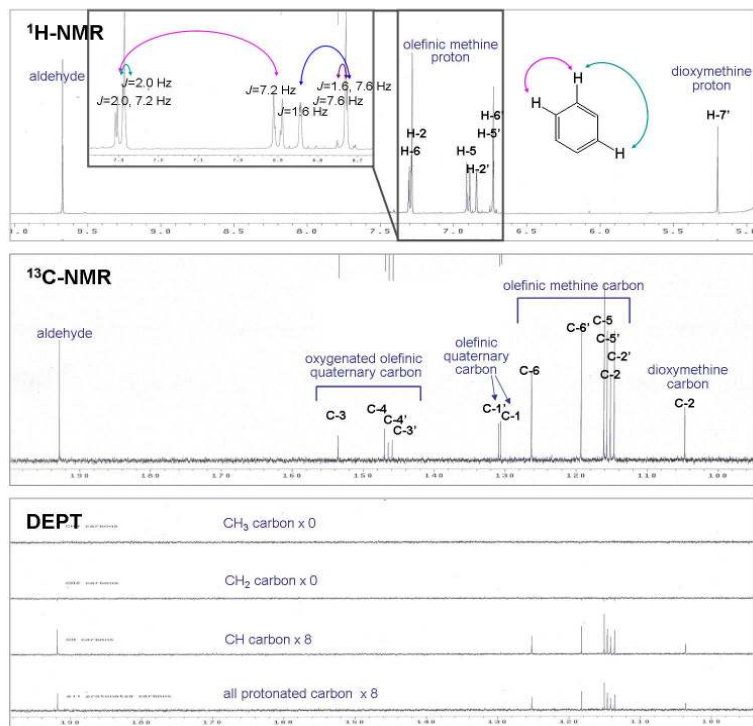


Fig. 68.  $^1\text{H}$ -NMR(400MHz),  $^{13}\text{C}$ -NMR & DEPT(100MHz) spectra of compound 8 from the fruit body of *Pellinus linteus*.

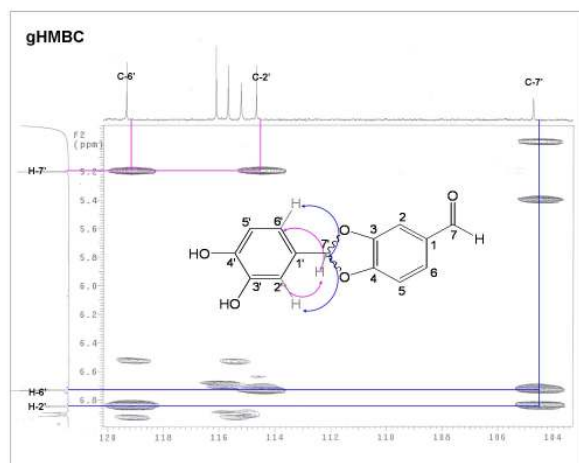


Fig. 69. HMBC spectrum of compound 8 from the fruit body of *Pellinus linteus*.

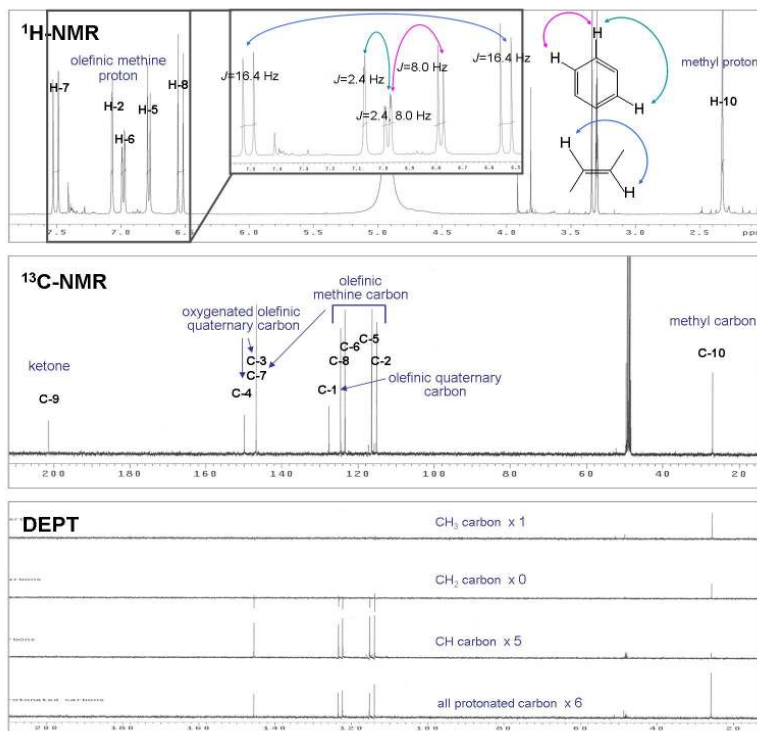


Fig. 70.  $^1\text{H}$ -NMR(400MHz),  $^{13}\text{C}$ -NMR & DEPT(100MHz) spectra of compound 9 from the fruit body of *Pellinus linteus*.

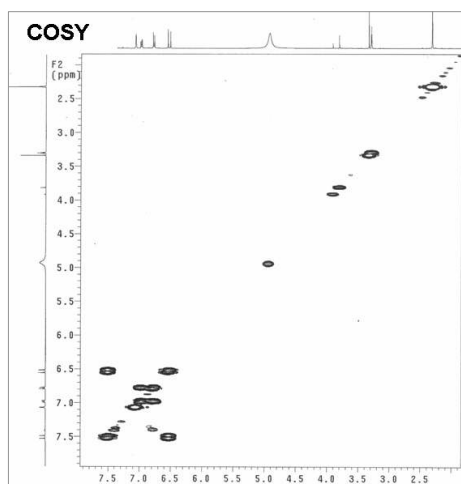


Fig. 71. COSY spectrum of compound 9 from the fruit body of *Pellinus linteus*.



상황버섯 1 Kg으로 methanol 추출하여 추출물을 얻었고 용매분획 후 활성분획인 ethylacetate 분획의 경우 10g을 얻었다. Ethylacetate 분획으로부터 open column chromatography와 정제과정을 거쳐 동정한 경우 활성성분 10가지 화합물 1*H*-cyclopentantracene(**1**) 5.8 mg, episterol(**2**) 6.5 mg, dehydroperoxyergosterol(**3**) 6.3 mg, ergosterol peroxide (**4**) 16.6 mg, 6-*O*-methycerevisterol(**5**) 10.7 mg, cerevisterol(**6**) 4.9mg, 4-hydroxybenzalacetone(**7**) 5.5mg, 2-(3',4'-dihydroxy phenyl)-1,3-benzodioxole-5-aldehyde(**8**) 22.4 mg, 3,4-dihydroxybenzalacetone(**9**) 17.5 mg, protocatechualdehyde (**10**) 7.6 mg을 얻었으며, 수율은 각각  $5.8 \times 10^{-4}\%$ ,  $6.5 \times 10^{-4}\%$ ,  $6.3 \times 10^{-4}\%$ ,  $1.66 \times 10^{-3}\%$ ,  $1.07 \times 10^{-3}\%$ ,  $4.9 \times 10^{-4}\%$ ,  $5.5 \times 10^{-4}\%$ ,  $2.24 \times 10^{-3}\%$ ,  $1.75 \times 10^{-3}\%$ ,  $7.6 \times 10^{-4}\%$ 였다. 이는 정제과정에서 물질동정과 순수정제를 위하여 인접 fraction의 양이 제거되었으므로 상황버섯 내 총량을 의미하지는 않는다. 본 과제에서 이 화합물들의 동정은 상황버섯 골 강화의 핵심성분 구명과 제품의 생산 공정상의 표준물질로 활용하기 위한데 의의가 있다. 활성성분이 제약으로 개발되는 것은 목적성분만을 위한 다량수득 공정, 유도체개발, 기타 화합물과 활성의 비교 등의 별도 조건과 과정이 필요할 것이다. 본 과제는 이를 위한 기초로서 활용할 수 있을 것이다.

##### 5. 단일 활성성분의 특성

Column chromatography를 통해 분리하여 NMR, MS, IR 등의 스펙트럼 데이터를 분석하여 화합물 **1~10**의 화학구조를 동정하였다. 이중 6종의 ergosterol(화합물 **1~6**)과 3종의 페놀화합물(화합물 **7~9**)은 이번에 상황버섯에서 처음 분리된 것이며, 화합물 **1, 2**와 **5~9**는 매우 드물게 발견되는 화합물이다. 특히 화합물 **1**은 천연 식용자원에서는 처음 분리되었다. 화합물 **1~6**과 같은 ergosterol 화합물은 그동안 주로 균류에서 발견되고 있다. Ergosterol peroxide(화합물 **4**)는 주로 fungi<sup>12,14)</sup>에서 발견되는 물질이나 *Naematoloma fasciculare*<sup>15)</sup>, *Sphaerophysa salsula* DC.<sup>16)</sup> 등의 plant와 *Bacidia stipata*<sup>17)</sup>와 같은 lichen에서도 분리, 보고되었다. Cerevisterol(화합물 **6**)도 역시 *Agaricus blazei*<sup>13)</sup>, *Hypsizigus marmoreus*<sup>24)</sup>와 같은 mushroom에서 주로 발견되는 물질이지만 *Homaxinella* sp.<sup>25)</sup>와 같은 marine sponge와 *Sphaerophysa salsula* DC.<sup>16)</sup>와 같은 고등식물에서도 분리된 것으로 보고되었다. dehydroperoxyergosterol(화

합물 3)와 6-*O*-methylcerevisterol(화합물 5)은 극히 드물게 존재하는 물질로 해면체<sup>11)</sup>와 해양식물<sup>18)</sup>에서 분리, 보고되어 있고, 6-*O*-methylcerevisterol(화합물 5)은 mushroom<sup>13)</sup>에서 분리된 것으로 보고되어 있다. 특히 이번처럼 한 가지 시료로부터 다양한 ergosteol 화합물이 분리된 것은 매우 드문 예라고 할 수 있다. 4-hydroxybenzalacetone(화합물 7)은 *Scutellaria barbata*<sup>26)</sup>에서 분리, 보고 되었고, 2-(3',4'-dihydroxyphenyl)-1,3-benzodioxole-5-aldehyde(화합물8)는 *Melissa officinalis*<sup>27)</sup>에서 분리된 것으로 보고되었고, 3,4-dihydroxy benzalacetone(화합물 9)은 *Phellinus linteus*와 같은 속인 *Phellinus igniarius*<sup>28)</sup>에서 분리된 것으로 보고 되어 있으며, plant인 *Hypochoeris radicata*<sup>29)</sup>에서도 분리, 보고되었다. protocatechualdehyde(화합물 10)은 다양한 천연자원에서 널리 분포되어 있으며, 다수의 문헌에서 분리, 보고되어 있다. 문헌에 의하면 화합물 3(dehydroperoxyergosterol)은 ovarian cancer에 대한 저해 활성과<sup>11)</sup>, stomach cancer cell에 대한 세포독성작용<sup>19)</sup>이 있으며, leukemia cell과 colon adenocarcinoma cell에 대한 성장을 저해하는 작용<sup>20)</sup>을 하는 것으로 보고 되어 있다. 화합물 4(ergosterol peroxide)는 ovarian과 colon cancer에 대한 저해 활성<sup>11)</sup>, tumor cell에 대한 세포독성작용<sup>12)</sup>, immunosuppressive<sup>21)</sup>, antiviral<sup>22)</sup> 및 anti-inflammatory<sup>23)</sup> 등의 다양한 생리활성이 보고되어 있다. 화합물 5(6-*O*-methylcerevisterol)는 antitubercular activity와 Epstein-Barr virus activation에 대한 저해 효과<sup>24)</sup>, HeLa cell에 대한 세포독성효과<sup>13)</sup>가 보고되었다. 또한 화합물 6(cerevisterol)는 antitubercular activity와 Epstein-Barr virus activation에 대한 저해 효과<sup>24)</sup>, human solid tumor cell에 대한 세포독성효과<sup>25)</sup>가 있는 것으로 보고되었다. 한편 페놀화합물인 화합물 7(4-hydroxybenzalacetone)은 antibacterial activity<sup>31)</sup>와 human leukemia cell에 대한 세포독성작용<sup>26)</sup>이 보고되었고, 화합물 8(2-(3',4'-dihydroxyphenyl)-1,3-benzodioxole-5-aldehyde)은 항산화활성(DPPH radical scavenging activity)<sup>27)</sup>이 보고되었다. 화합물 9(3,4-dihydroxy benzalacetone)은 antioxidant effect<sup>30)</sup>가 보고되었으며 화합물 10(protocatechualdehyde)은 biomembrane에 대한 peroxidative damage에 대한 보호작용<sup>32)</sup>, antirhematic<sup>33)</sup>, radical scavenging<sup>34)</sup>, antiproliferative activity<sup>35)</sup>가 보고되었다.

## 6. 단일 활성성분의 골 강화 활성

상황버섯 자실체로부터 분리한 10종의 화합물 중에 대하여, 인체유사 조골세포주인 Saos-2 세포에 대한 증식억제(세포독성, Table 22, 24)와 alkaline Phosphatase(ALP)의 활성에 미치는 영향을 조사하였다. 먼저 6개의 ergosterol 화합물(화합물 1~6)은 모두  $10^{-2}$  mg/ml 의 농도이하에서는 세포에 대한 독성을 보이지 않았다. 조골기능에 미치는 영향(ALP 활성)을 보면 화합물 1은  $10^{-1}$  mg/ml 농도에서는  $107.90 \pm 29.77\%$  의 활성을 나타내었으나 농도가 낮아질수록 활성이 낮아졌다. 화합물 2는  $10^{-4}$  mg/ml 의 농도에서  $138.47 \pm 44.66\%$ 의 활성을 나타냈고, 화합물 3은  $10^{-1}$  mg/ml의 농도에서  $102.63 \pm 22.33\%$  의 활성을, 화합물 4는  $10^{-4}$  mg/ml의 농도에서  $113.15 \pm 7.44\%$ 의 활성을, 화합물 5는  $10^{-1}$  mg/ml의 농도에서  $123.68 \pm 7.44\%$ 의 활성을 나타내었으나, 전체 농도에서 유의할만한 활성을 보이지 않았다. 화합물 6은  $10^{-4}$  mg/ml 의 농도에서  $200.00 \pm 24.74\%$ ,  $10^{-3}$  mg/ml 의 농도에서  $114.29 \pm 65.47\%$ 의 활성을 나타내었으나 대조군에 비하여 세포 독성이 높게 나타났다. 한편 4개의 페놀화합물은 인체유사 조골세포인 Saos-2 cell에 대한 골 강화 활성을 탐색해본 결과 대부분의 농도에서 세포독성은 거의 나타나지 않았으며(Fig. 74) 높은 ALP 활성을 나타내었다(Fig. 75). 화합물 7은  $10^{-2}$  mg/ml의 농도에서  $114.29 \pm 65.47\%$ ,  $10^{-3}$  mg/ml의 농도에서  $185.71 \pm 24.74\%$ ,  $10^{-4}$  mg/ml의 농도에서  $214.29 \pm 74.23\%$ ,  $10^{-5}$  mg/ml의 농도에서  $142.86 \pm 49.49\%$ ,  $10^{-6}$  mg/ml의 농도에서  $128.57 \pm 42.86\%$ 의 ALP 활성을 나타내었다. 화합물 8은  $10^{-2}$  mg/ml의 농도에서  $142.86 \pm 24.74\%$ ,  $10^{-3}$  mg/ml의 농도에서  $171.43 \pm 85.71\%$ ,  $10^{-4}$  mg/ml의 농도에서  $214.29 \pm 74.23\%$ ,  $10^{-5}$  mg/ml의 농도에서  $185.71 \pm 65.47\%$ ,  $10^{-6}$  mg/ml의 농도에서  $142.86 \pm 24.74\%$ ,  $10^{-7}$  mg/ml의 농도에서  $114.29 \pm 24.74\%$ 의 ALP 활성을 나타내었다. 화합물 9는  $10^{-3}$  mg/ml의 농도에서  $171.43 \pm 42.86\%$ ,  $10^{-4}$  mg/ml의 농도에서  $185.71 \pm 49.49\%$ ,  $10^{-5}$  mg/ml의 농도에서  $200.00 \pm 24.74\%$ ,  $10^{-6}$  mg/ml의 농도에서  $157.14 \pm 89.21\%$ ,  $10^{-7}$  mg/ml의 농도에서  $142.86 \pm 65.47\%$ ,  $10^{-8}$  mg/ml의 농도에서  $157.14 \pm 24.74\%$ 의 ALP 활성을 나타내었다. 그리고 화합물 10은  $10^{-2}$  mg/ml의 농도에서  $128.57 \pm 42.86\%$ ,  $10^{-3}$  mg/ml의 농도에서  $157.14 \pm 24.74\%$ ,  $10^{-4}$  mg/ml의 농도에서  $228.57 \pm 24.74\%$ ,  $10^{-5}$  mg/ml의 농도에서  $242.86 \pm 24.74\%$ ,  $10^{-6}$  mg/ml의 농도에서  $257.14 \pm 42.86\%$ ,  $10^{-7}$  mg/ml의 농도에서  $185.71 \pm 107.86\%$ ,  $10^{-8}$  mg/ml의 농도에서  $157.14 \pm 65.47\%$ 의 ALP 활성을 나타내었다. 이 결과를 토대로 분리된 4개의 페놀화합물에서 골다공증의 원인이되는 생리적 질환을 개선할 수 있는 물질로서의 가능성을 확인하였으며, 앞으로 골다공증 등의 성인 뼈질환에서 골 형성의 메커니즘에 관여하는



mineralization을 개선하는 의약품 및 건강기능성 식품의 소재로서의 충분한 가치가 있다고 여겨지며 앞으로 이에 관련된 연구가 활발히 추진될 것으로 기대된다.

**Table 22. The cell proliferation of compounds 1~6 from the fruit body of *P. luteus* on Saos-2 cell**

Compounds	Cell proliferation values <sup>a)</sup>			
	concentration (mg/mL) on Saos-2 Cell			
	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-1</sup>
Compound 1	107.71±1.13 <sup>b)</sup>	105.01±4.71	98.57±5.35	58.47±9.27
Compound 2	109.51±2.21	104.11±1.13	103.66±4.71	78.80±5.35
Compound 3	106.96±1.79	115.35±5.31	120.29±5.48	89.89±1.19
Compound 4	110.55±12.72	99.17±2.47	102.17±10.35	87.48±2.92
Compound 5	104.11±4.76	103.21±2.92	96.17±2.06	86.29±1.35
Compound 6	29.03±5.44	56.02±2.71	10.96±3.54	65.56±2.30

a) Positive control group shows 100 % cell proliferation.

b) Values are means±standard deviation of triplicate determinations.

**Table 23. The ALP activity of compounds 1~6 from the fruit body of *P. luteus* on Saos-2 cell**

Compounds	ALP activity values <sup>a)</sup>			
	concentration (mg/mL) on Saos-2 Cell			
	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-1</sup>
Compound 1	92.11±7.44 <sup>b)</sup>	97.37±14.89	92.11±7.44	107.90±29.77
Compound 2	138.47±44.66	50.00±7.47	65.79±14.56	60.53±7.44
Compound 3	92.11±7.44	81.58±7.44	71.05±7.44	102.63±22.33
Compound 4	113.15±7.44	23.68±14.89	60.53±22.33	55.26±14.89
Compound 5	76.35±14.89	92.11±7.44	92.11±22.33	123.68±7.44
Compound 6	200.00±24.74	114.29±65.47	71.43±65.47	57.14±24.74

a) Positive control group shows 100 % ALP activity.

b) Values are means±standard deviation of triplicate determinations.

**Table 24. The cell proliferation of compounds 7~10 from the fruit body of *P. liteus* on Saos-2 cell**

Compounds	Cell proliferation values <sup>a)</sup>							
	concentration (mg/mL) on Saso-2 Cell							
	10 <sup>-8</sup>	10 <sup>-7</sup>	10 <sup>-6</sup>	10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-1</sup>
<b>7</b>	59.44±3.54 <sup>b)</sup>	108.71±2.75	89.88±3.74	114.93±3.37	85.26±3.25	107.59±2.92	95.23±4.20	54.21±3.08
<b>8</b>	51.46±3.29	94.00±3.37	77.60±2.79	124.00±2.96	123.09±2.71	122.21±3.16	113.82±3.20	81.19±3.54
<b>9</b>	56.19±3.00	103.94±3.41	123.68±2.79	123.02±3.08	125.28±3.20	117.33±3.16	112.30±3.41	109.47±3.29
<b>10</b>	80.75±3.12	102.89±2.30	127.33±3.20	125.21±3.00	127.13±2.75	122.01±3.70	111.92±3.00	107.98±3.04

a) Positive control group shows 100 % cell proliferation.

b) Values are means±standard deviation of triplicate determinations.

**Table 25. The ALP activity of compounds 7~10 from the fruit body of *P. liteus* on Saos-2 cell**

Com pounds	ALP activity values <sup>a)</sup>							
	concentration (mg/mL) on Saso-2 Cell							
	10 <sup>-8</sup>	10 <sup>-7</sup>	10 <sup>-6</sup>	10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-1</sup>
<b>7</b>	59.44±3.54 <sup>b)</sup>	100.00±49.49	128.57±42.86	142.86±49.49	214.29±74.23	185.71±24.74	114.29±65.47	85.71±42.86
<b>8</b>	71.42±24.74	100.00±49.49	114.29±24.74	142.86±24.74	185.71±65.47	214.29±74.23	171.43±85.71	142.86±24.74
<b>9</b>	157.14±24.74	142.86±65.47	157.14±89.21	200.00±24.74	185.71±49.49	171.43±42.86	85.71±74.23	57.14±24.74
<b>10</b>	157.14±65.47	185.71±107.86	257.14±42.86	242.86±24.74	228.57±24.74	157.14±24.74	128.57±42.86	85.71±42.86

a) Positive control group shows 100 % cell proliferation.

b) Values are means±standard deviation of triplicate determinations.

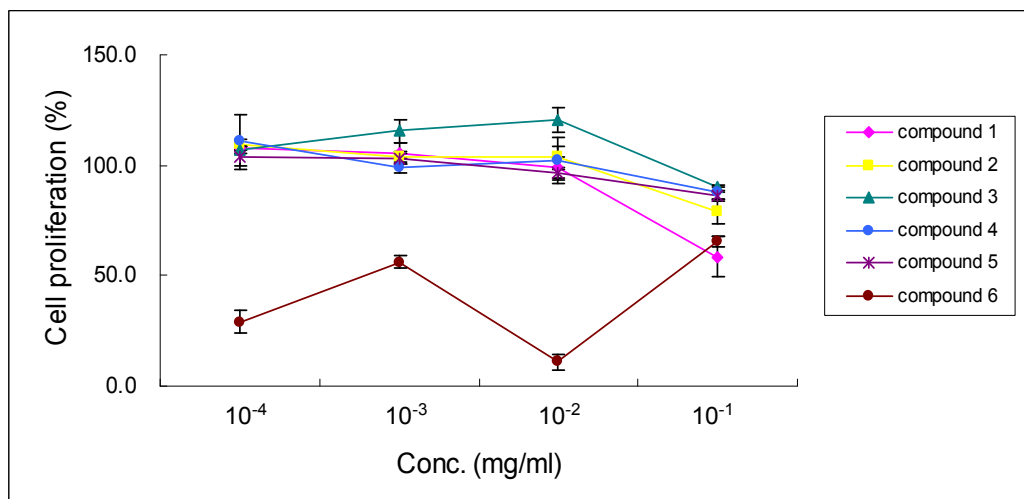


Fig. 74. Cell proliferation of ergosterols from the fruit body of *P. linteus* on Saos-2 cell.

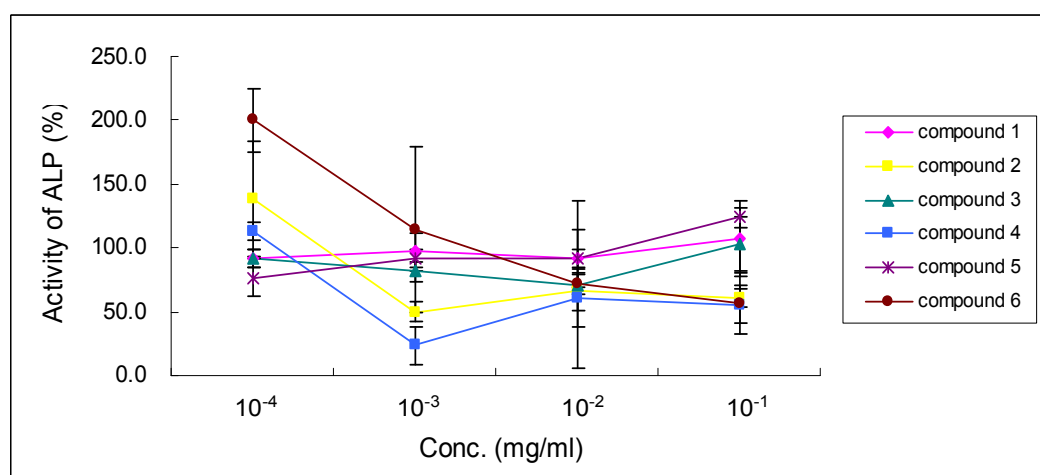


Fig. 75. ALP activity of ergosterols from the fruit body of *P. linteus* on Saos-2 cell.

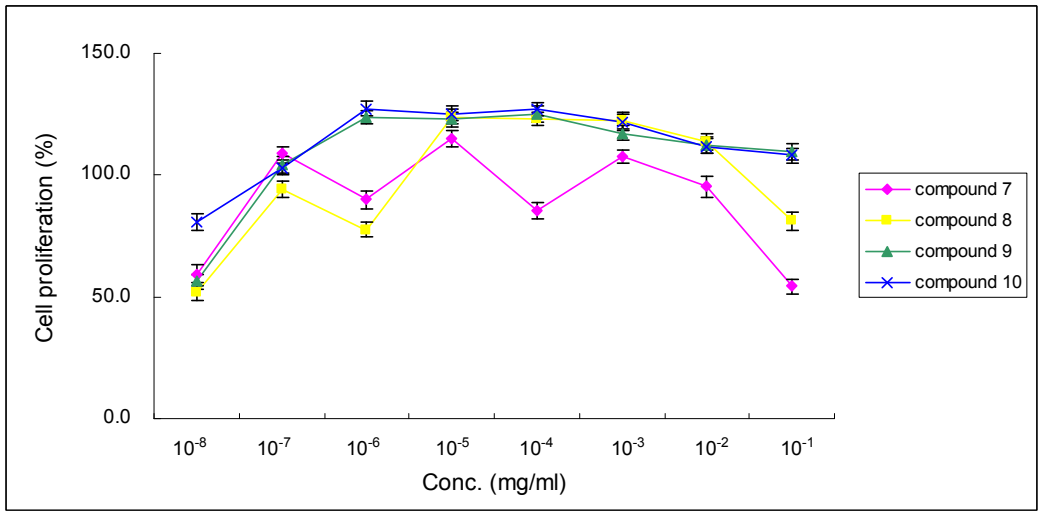


Fig. 76. Cell proliferation of phenolic compounds from the fruit body of *P. linteus* on Saos-2 cell.

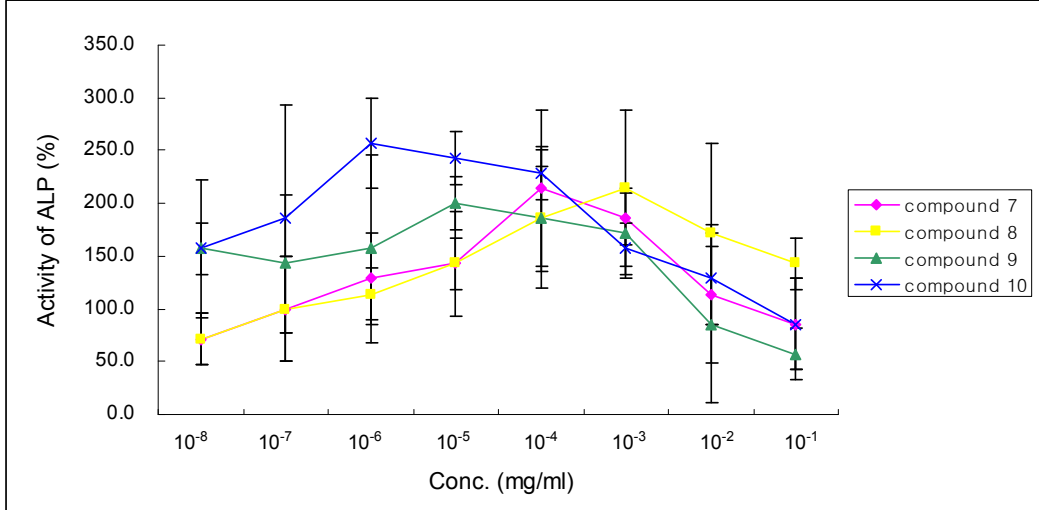


Fig. 77. ALP activity of phenolic compounds from the fruit body of *P. linteus* on Saos-2 cell.

## 제 6 절 활성성분의 소재화 활용기술

상황버섯 활성 추출물을 소재화하기 위하여 상황버섯 조성물과 액상소재, 고상소재를 시험제조 하였다. 액상소재로서 수용액내 분산액, nanoemulsion, nanoencapsulation을 시험제조 하였으며 고상소재로서 과립, 유동층코팅 분말, 나노체소재 등을 시험제조하고 특성을 검사하였다. 이들 소재들은 상황 추출물의 뼈강화 성분을 함유하면서 액상소재의 경우 난용성으로부터 용해성을 향상시켜 액상제품에 활용될수 있으며 고상소재의 경우 직접 섭취소재로 사용하거나 가공의 소재로 이용될수 있을것으로 고려하였다. 조성물, 액상소재, 고상소재의 내용 및 특성은 다음과 같다.

### 1. 상황 버섯 소재의 골강화 제품화를 위한 Formulation

상황 버섯을 활용한 골다공증 예방 및 치료 효능을 가진 건강 기능성 조성물을 Table 26.과 같이 조제하였다.

**Table 26. Composition of base material for osteo-active product.**

KY	
성분	함량(%)
상황버섯	24.0
plant extrat	42.0
Ca	20.0
P	10.0
Mg	1.8
Casein phospho peptide	2.0
Vitamin D <sub>3</sub>	0.2
Total	100.0

상황 버섯 및 골강화 보조용 식물부재료를 기초로 하였다. 칼슘, 인산과 마그네슘 비율이 골기질에 영향이 있다는 보고에 따라 이온화 칼슘과 인산염 및 스테아린산 마그네슘을 첨가하였다. 그 외 무기질 생성 촉진효과로서 CPP, 기타 관련 비타민으로서 vitamin D<sub>3</sub>를 조성의 기초로 하였다.

## 2. 액상제품 개발을 위한 골강화 활성성분의 수용액내 분산

수용액내 입자 분산성은 Formulaction사의 Turbiscan을 사용하여 광학적으로 분석하였다. 상황버섯 추출물(PL)과 골강화 보조용 식물부재료(KY)를 1% 수용액으로 제조하여, 아라비안검, 카라기난, 자당지방에스테르인 F-50과 F-160을 0.1%에서 1.5%까지 조합하여 처리함으로써 분산도를 조사하였다.

### 2.1. 상황버섯 추출물의 수용액내 분산성

상황버섯 추출물 (PL) 수용액 1% (A)과 F-160, 카라기난을 농도별로 조합하여 처리한 후 실온에 방치하면서 성상을 촬영하였다(Fig. 78). PL 1% 수용액은 20분 이내 모두 침전되어 하층부의 sedimentation 결과를 보였으며, 그 외 유화제 처리시 sedimentation의 시간은 다소 지연되었지만, 모두 가라앉아 골강화 활성소재가 분산되지 않았음을 나타냈다. 그러나 1%의 F-160과 1%의 카라기난을 혼합하여 처리했을 경우(E) 분산도가 향상되어 가장 안정적인 모습을 보였다.



Fig. 78. Photo for suspension properties of *Phellinus linteus* extract(PL) by emulsifier combination.

A	1% PL solution
B	0.1% F-160 + 0.1% carrageenan in A
C	0.5% F-160 + 0.5% carrageenan in A
D	0.7% F-160 + 0.7% carrageenan in A
<b>E</b>	<b>1.0% F-160 + 1.0% carrageenan in A</b>
F	1.0% F-160 in A
G	1.0% carrageenan in A

분산도는 분산 profile, 시간당 creaming층의 이동 속도, variation층의 Backscattering의 변화, Peak thickness kinetics로 나타내었다.

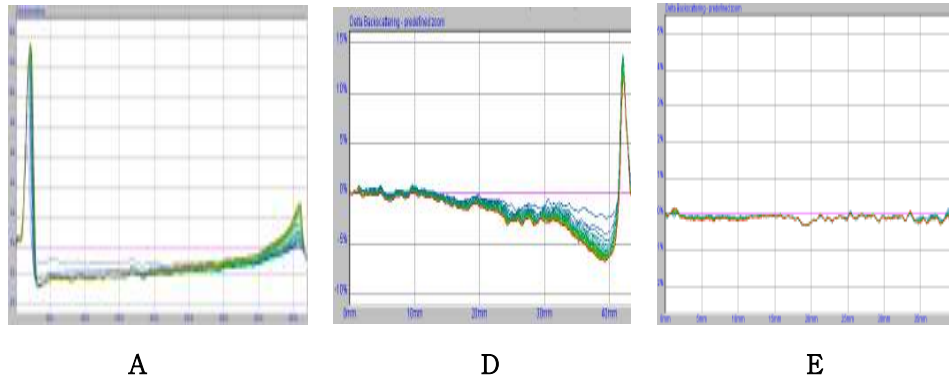


Fig. 79. Emulsion properties of *Phellinus linteus* extract in the aqueous portion. (Delta Backscattering Flux (%))

처리구의 하층부부터 상층부까지 scanning한 profile을 reference mode로 변형하여 비교한 결과 대조구 A의 경우 Backscattering이 하층부와 상층부에서 높았다. 이는 BS와 반비례하는 빛의 이동경로가 짧게 반사되었음을 의미하며, 하층부는 sedimentation, 상층부는 creaming된 결과를 보여준다. 중간부분은 빛이 충분히 반사된 후 돌아와 이동경로가 긴 variation으로서 입자가 거의 없음을 보여준다. 즉, 대조구 shaking 즉시 침강과 부유로 나뉘며 골강화 활성소재가 분산되지 않았음을 의미하는 것이다. 0.7%의 유화제를 처리한 처리구 D는 하층부의 경우 variation을 나타내어 분산성을 나타내었으나 상층부의 경우 BS가 증가하여 부유 상태가 잔존하였다. 1%의 유화제를 처리한 E는 전체 용액에서 variation이 일어났으며 BS가 일정하게 고르게 분산되었음을 나타내었다.

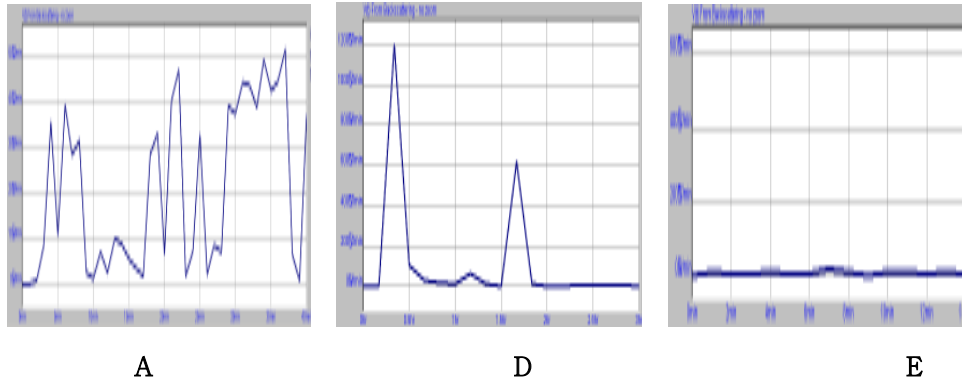


Fig. 80. Migration velocity of *Phellinus linteus* extract in the aqueous portion. (V(t) from Backscattering)

부유 상태층을 분석하여 시간당 상층부로의 creaming 이동속도 (migration velocity)를 분석하였다. A는 시간 경과에도 지속적으로 이동 peak가 나타났으며, D는 A보다는 미약하지만 불안정한 상태를 나타내었다. E는 shaking 초기부터 creaming의 이동없이 고른 분산으로 안정화된 상태를 보여주었다.

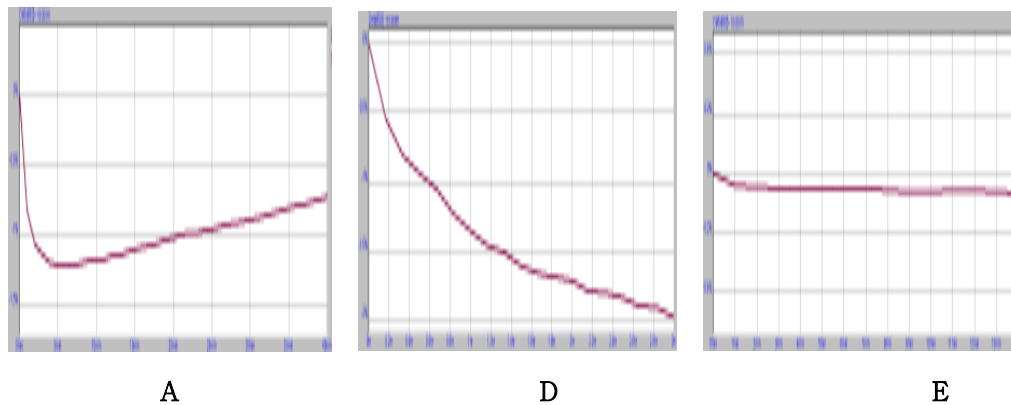


Fig. 81. Variation properties of *Phellinus linteus* extract in the aqueous portion. (Delta Backscattering)

Variation층을 분석하여 시간당 BS의 변화를 분석하였다. A는 시간이 경과함에 따라 BS가 지속적으로 증가하였고 중간 variation에서 이동경로가 감소함을 알 수 있었



다. 이동경로가 짧아진 것은 입자들이 뭉친 결과로 보여지며, 처리구 D는 시간이 지날수록 BS가 감소함을 보여주었다. 가장 안정화되었던 처리구 E는 BS 증가속도의 기울기가 일정하여 입자의 뭉침이 없고 시간이 경과해도 안정화가 지속됨을 보여주었다. 또한 전체 Scanning profile의 reference mode에서 peak thickness kinetics를 관찰하여 Fig. 57.에 나타내었다. A와 D는 시간이 지남에 따라 Delta H(t)값이 증가하다가 조금씩 안정되는 결과를 보였으나, E는 BS 이동경로에 관계없이 항상 일정한 결과를 나타냈다.

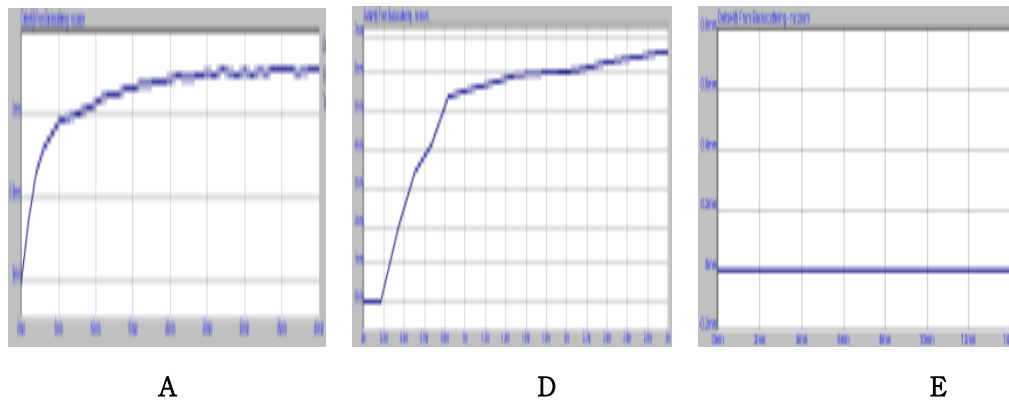


Fig. 82. Peak thickness kinetics of *Phellinus linteus* extract in the aqueous portion. (Delta H(t) from Backscattering)

## 2.2. 상황조성물의 수용액내 분산성

부재료를 첨가한 조성물 소재(KY) 추출물의 1% 수용액을 제조한 후, 동일한 유화제를 첨가하여 안정화된 분산 상태 조건을 찾고자 하였다(Fig. ). 대조군인 A는 1시간 이내에 모두 침전하여 sedimentation 상태를 보였으며, 0.5% 카라기난 첨가시 A보다는 침전 시간이 길었지만 3시간 이내에 sedimentation 현상을 보였다. 1.5%의 카라기난 첨가시 1%의 KY 수용액이 안정하게 모두 분산되었으며 방치 시간과 관계 없이 안정된 상태를 유지하였다. 유화제 F-160 역시 KY 수용액을 분산시킬 수 없었으며, 카라기난과 혼합하여 처리시에도 안정된 상태를 유지시킬 수 없었다. 결과적으로 1.5% 카라기난의 첨가가 1% KY 수용액의 안정화된 분산 상태를 만들 수 있었으며, 기존의 색상도 잘 유지됨을 알 수 있었다.



Fig. 83. Photo for suspension properties of osteo-active product extract(KY) by emulsifier combination.

A	1% KY solution
B	0.5% carrageenan in A
C	1.0% carrageenan in A
D	1.5% carrageenan in A
E	1.0% F-160 + 1.0% carrageenan in A
F	1.0% F-160 in A

KY 수용액의 분산도는 분산 profile, 시간당 creaming층의 이동 속도, variation층의 Backscattering의 변화, Peak thickness kinetics로 나타내었다.

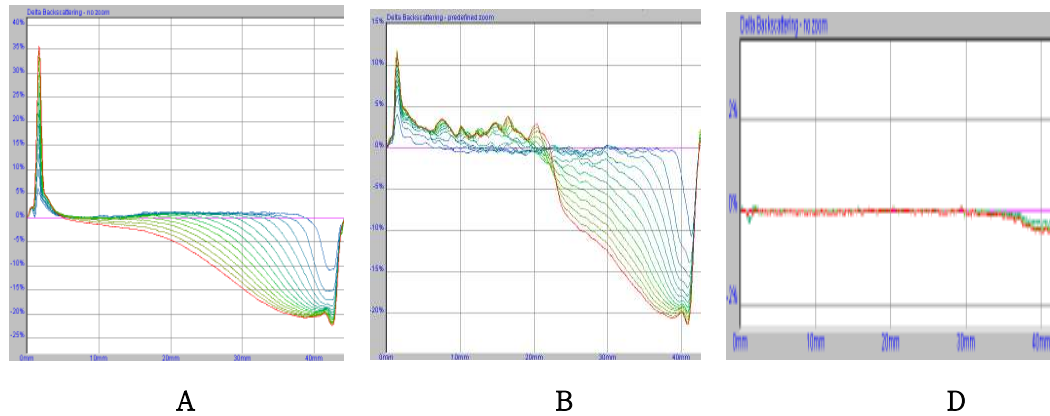


Fig. 84. Emulsion properties of osteo-active product extract(KY) in the aqueous portion. (Delta Backscattering Flux (%))

처리구의 하층부부터 상층부까지 scanning한 profile을 reference mode로 변형하여 비교한 결과 대조구인 1% KY군의 profile A의 경우 Backscattering이 하층부와 상층부에서 높았다. 특히 시간이 지날수록 하층부의 침전이 많아져 A에서 보듯이 전형적인 sedimentation 패턴을 보였으며, 이는 BS와 반비례하는 빛의 이동경로가 짧게 반사되었음을 의미한다. 즉, 대조구 shaking 한 후 침강과 부유로 나뉘어 골강화 활성소재가 분산되지 않았음을 의미하는 것이다. 1%의 카라기난을 처리한 처리구 B는 A와 비슷한 profile을 보였다. 상층부의 경우 BS가 증가하여 부유 상태가 잔존하였으나, 1.5%의 유화제를 처리한 D는 전체 용액에서 variation이 일어났으며 BS가 일정하게 고르게 분산되었으며 시간이 지남에도 안정화된 상태가 유지됨을 보였다.

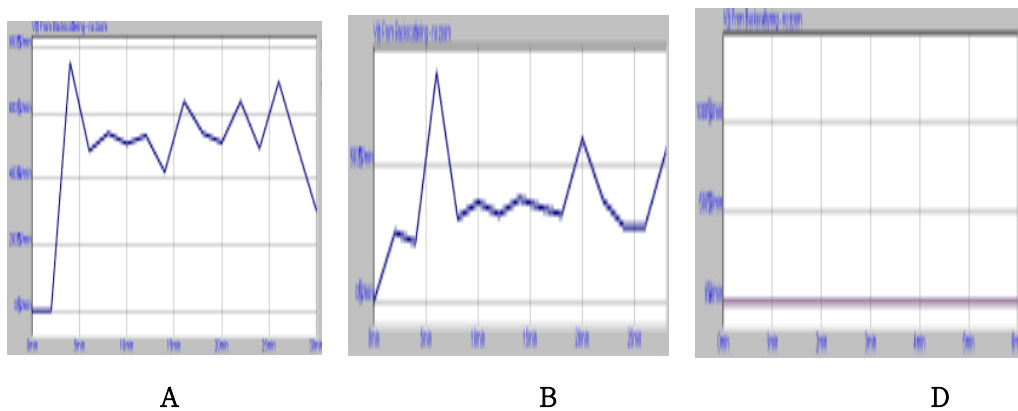


Fig. 85. Migration velocity of osteo-active product extract(KY) in the aqueous portion. (V(t) from Backscattering)

부유 상태층을 분석하여 시간당 상층부로의 creaming 이동속도 (migration velocity)를 분석하였다. A와 B는 시간 경과에도 지속적으로 이동 peak가 나타나 완전히 분산되지 못하고 불안정한 상태를 나타내었다. D는 shaking 초기부터 creaming의 이동없이 고른 분산으로 안정화된 상태를 보여주었다.

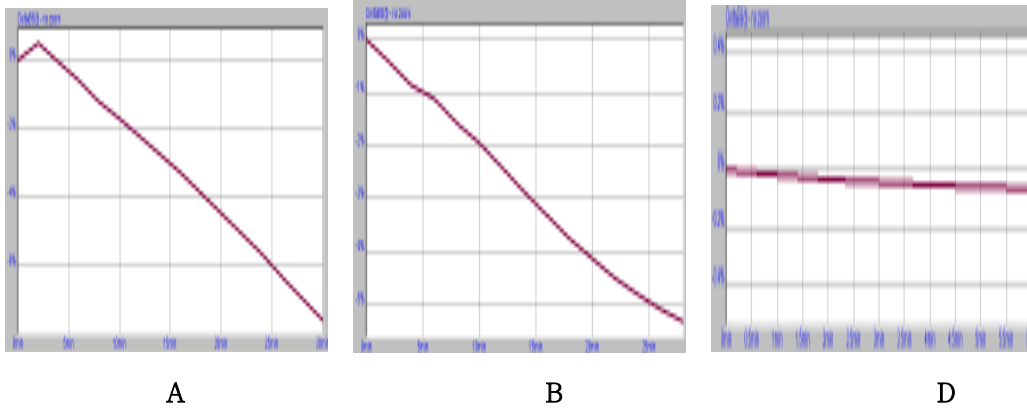


Fig. 86. Variation properties of osteo-active product extract(KY) in the aqueous portion. (Delta Backscattering)

Variation층을 분석하여 시간당 BS의 변화를 분석하였다. A는 시간이 경과함에 따라 BS가 초반 잠시 증가하다가 지속적으로 감소하였고 B 역시 꾸준히 감소하였다. 가장 안정화되었던 처리구 D는 BS 증가속도의 기울기가 일정하여 입자의 뭉침이 없고 시간이 경과해도 안정화가 지속됨을 보여주었다. 또한 전체 Scanning profile의 reference mode에서 peak thickness kinetics를 관찰하였다. A와 B는 시간이 지남에 따라 Delta H(t)값이 지속적으로 증가하는 경향을 보였으나, D는 BS 이동경로에 관계없이 항상 일정한 결과를 나타냈다.

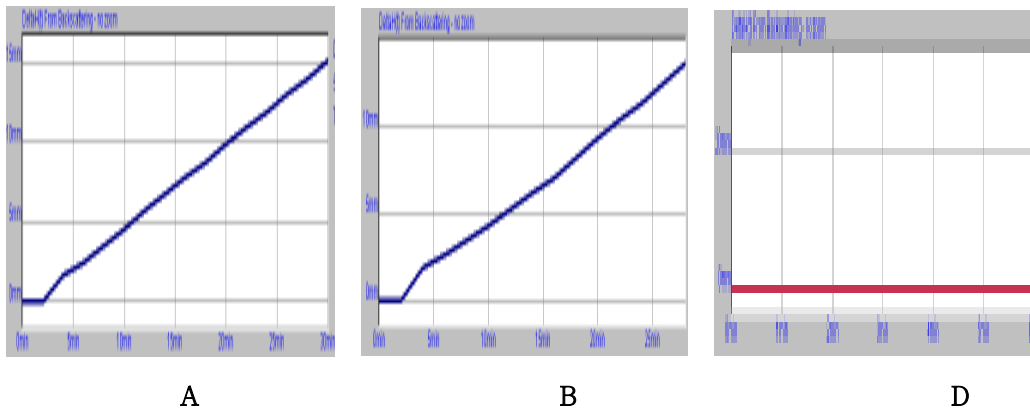


Fig. 87. Peak thickness kinetics of osteo-active product extract(KY) in the aqueous portion. (Delta H(t) from Backscattering)

### 3. 상황시료 (PL) 나노에멀전의 제조

본 실험에 사용한 PL 나노에멀전은 Fig. 88과 같이 4가지 종류이다.

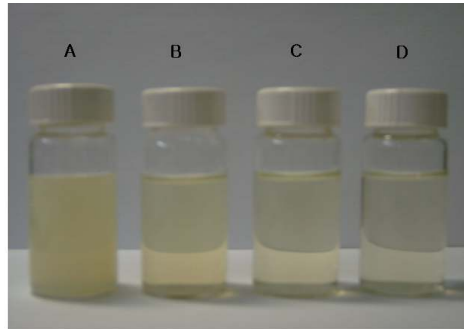


Fig. 88. Difference in appearance of nanoemulsions.

(A), PL-MCT : Tween 80 = 1:1; (B), PL-MCT : Tween 80 = 1:1.5; (C), PL-MCT : Tween 80 = 1:2; (D), PL-MCT : Tween 80 = 1:3.

#### 3.1. Particle size의 측정

PL-MCT mixture와 Tween 80이 1:1의 배합비율에서는  $111.7 \pm 19.64$  nm의 마이크로에멀전이 형성되었으나, 1:2 이상의 배합비율에서는 100 nm 이하의 나노에멀전이 형성되었다. 계면활성제인 Tween 80의 배합비율이 증가할수록 입자 크기는  $39.1 \pm 5.69$ ,  $22.6 \pm 0.49$ ,  $14.1 \pm 0.55$  nm로 감소하였다.

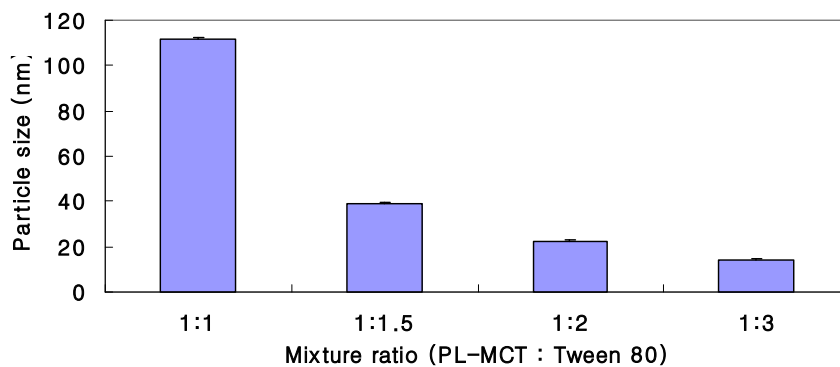


Fig. 88. Particle size of nanoemulsions depending on the mixture ratio of PL-MCT and Tween 80

### 3.2. 저장 안정성

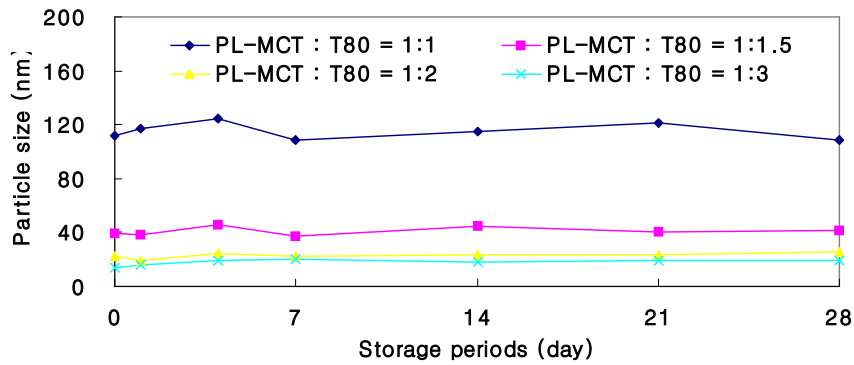


Fig. 90. Particle size of nanoemulsions depending on the mixture ratio of PL-MCT and Tween 80 during storage for 28 days.

PL-MCT mixture와 Tween 80이 1:1의 배합비율로 제조된 나노에멀전은 25°C, 저장 28일 동안 100-125 nm의 입자크기를 나타내며 비교적 안정적인 마이크로에멀전을 유지하였다. 또한 Tween 80의 함량을 증가시킨 1:1.5, 1:2, 1:3 배합비율의 나노에멀전은 저장 28일 동안 50 nm 이하의 입자 크기를 나타내며 매우 안정적이었다.

### 4. 상황시료 (PL) 나노체 제조



Fig. 91. Appearance of PL nanoparticles.

#### 4.1. 재분산성

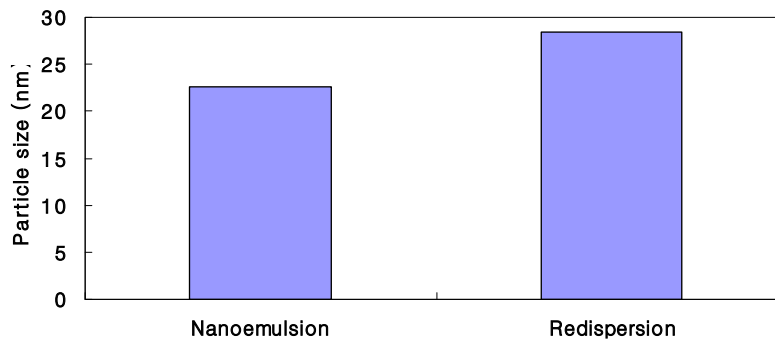


Fig. 92. Redispersibility of nanoemulsions.

PL 나노체를 물에 재분산시켜 입자 크기를 측정한 결과,  $28.5 \pm 1.30$  nm를 나타내어 나노에멀전 제조 직후의  $22.6 \pm 0.49$  nm와 큰 차이가 없었으며, 매우 높은 재분산 안정성을 나타내었다.

#### 5. 상황시료 (PL) 마이크로캡슐 제조

PL microcapsule의 제조 가능성과 pump speed, frequency, electro charge 등의 최적 조건을 확인하기 위하여 다양한 조건에서 예비 실험하였다. Wall material은 4.54g/min, core material은 0.84g/min의 속도의 pumping 조건에서 microcapsules의 형성이 가능하였다. Encapsulator에서 bead형태로 100mM CaCl<sub>2</sub> 용액 (500ml)에 낙하되었으며, 이 microcapsules의 경화를 위하여 100mM CaCl<sub>2</sub> 용액에 15분 방치하였다. Nylon filter(100 $\mu$ m)를 이용하여 CaCl<sub>2</sub> 용액을 filtering하고 표면에 묻은 CaCl<sub>2</sub> 용액을 제거하기 위하여 증류수로 3번 정도 washing한 후 microcapsule의 표면수 제거를 위하여 용기 위에 얇게 깔아 1시간 더 방치하여 제조하였다.

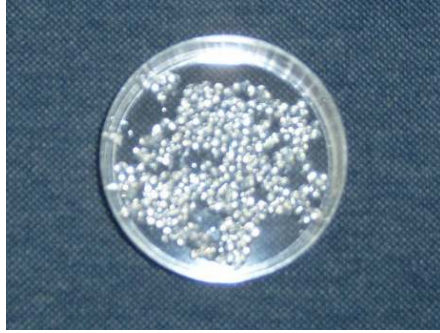


Fig. 93. Appearance of PL microcapsules

## 6. 상황버섯을 이용한 복합분체의 제조

입자표면의 기능성 등을 변화시키기 위한 방법의 하나로서 입자 코팅 (particle coating)은 많은 산업분야에서 매우 가치 있고 중요한 공정이다. 일반적으로 이러한 표면 조작 (surface modification)을 통한 코팅 공정은 pan coating이나 fluidized bed coating 등의 방법을 습식 공정으로서, coacervation, interfacial polymerization, emulsion 공정 등이 많이 사용되어져 왔다 . 그러나 이러한 습식 공정을 채용할 경우 습식 조건으로 인해 코팅 물질의 활성 감소 등의 문제점을 야기할 뿐 아니라 휘발성 용매를 사용하기 때문에 안전성의 문제가 항상 제기되어져 왔다.

이러한 문제점을 해결할 수 있는 방법이 건식코팅공정 (dry particle coating)이며, 용매나, binder, 혹은 물을 사용하지 않고 guest particle을 host particle에 물리적 방법에 의해 부착시키게 된다. 이러한 방법을 이용하여 식품에서의 지방흡착저감 식품재료의 개발, 유산균의 장용성 건식피복으로 많이 이용되어져 왔으며, 화장품에서의 자외선 차단, 다른 색깔의 토너입자 (toner particle)의 생산, metal/ceramic composite, 열적 분무 물질 (thermal spray materials), 세라믹 여과기 (ceramic filter) 고체 윤활제 (solid lubricant), 전기 접촉 물질 (electric contact materials) 뿐만 아니라 용출저해 마이크로캡슐 (controlled release microcapsule) 등에 많이 사용되어져 왔다. 본 실험은 Hybridization system을 이용하여 상황버섯을 다양한 Host 물질에 결합하여 복합분체를 제조하고, 물리적 변화 및 형태학적 변화를 살펴봄으로써 다양한 형태의 식품소재로 활용하는데 따른 가능성을 평가하였다.



### 6.1. Planetary mill을 이용한 상황버섯의 미분쇄

상황버섯을 복합분체화하기 위한 전처리공정으로서 미세분말화 공정을 거쳤다. 건조된 상황버섯을 Cutting mill로 조분쇄한 후 원심력을 이용한 볼밀(Ball mill)인 Planetary mill을 이용하여 미분쇄 하였다. 지르코늄 (zirconium) 소재의 직경 1, 5, 10 mm의 비드를 사용하였고, 분쇄조건은 250rpm에서 20분 간격으로 시료를 취하여 입도 분석 하였다 (Table 27). 직경 1mm의 비드를 사용하였을 경우 분쇄 20분이 경과한 후, 평균입도가 19.02 $\mu$ m로 입도가 작아졌으나 그 이후로 분쇄시간이 길어질수록 오히려 입자의 크기가 증가하는 것을 확인하였다. 이는 볼밀 등의 분쇄과정에서 흔히 발생하는 현상으로서, 분쇄된 상황버섯 분말이 분쇄과정에서 다시 응집되는 현상에 따른 결과로 판단된다. 5mm의 비드를 사용하였을 경우, 20분이 경과 후 평균입도가 10.81 $\mu$ m로 가장 작았으며 20분에서 분쇄가 적절하게 이루어지는 것을 확인하였다. 10mm의 비드를 사용한 경우, 분쇄시간이 10분이 지나면 분쇄가 완료된 것으로 보였지만 평균입도가 15.11 $\mu$ m로 5mm의 비드를 사용한 경우보다 분쇄 능력이 떨어지는 것을 알 수 있다. Fig. 94.는 분쇄시간 20분이 경과한 후 각 비드의 직경에 따른 입도분포를 나타낸 것이다. 그림에 나타난 바와 같이 1mm의 비드를 사용한 경우 미분쇄된 입자의 수는 가장 많지만 충격력의 부족으로 100 $\mu$ m수준의 큰 입자들의 분쇄는 이루어지지 못했다. 직경 5mm의 비드를 사용한 경우 입도분포가 가장 안정적이고 범위가 가장 좁게 나타났다. 따라서 예비실험의 결과에서 가장 평균입도가 작게 나타나고 Fig. 94.에서 가장 안정적인 입도분포를 가진 직경 5mm의 비드를 사용하여 20분간 분쇄한 상황버섯 시료를 복합분체의 재료로 사용하였다.

Table 27. Changes in particle size of *Phellinus Linteus* after cutting milling and planetary milling.

분쇄방법	비드 크기 (mm)	분쇄 시간 (min)	Particle size ( $\mu\text{m}$ )			Mean
			D <sub>10</sub>	D <sub>50</sub>	D <sub>90</sub>	
Cutting mill	-	1	2.70	16.86	312.85	88.95
		10	0.29	5.88	301.00	71.66
		20	0.36	5.62	71.19	19.02
		40	0.26	5.44	315.24	68.29
		60	0.27	5.43	324.81	80.72
		120	0.84	6.62	365.89	108.56
		180	1.16	8.41	375.84	122.29
		240	1.32	12.34	370.60	127.42
Planetary mill	1	10	1.41	7.24	51.87	16.61
		20	1.58	9.03	23.21	10.81
		40	1.61	9.04	23.87	10.78
		60	1.65	9.05	22.78	10.72
		120	1.83	9.58	23.41	11.16
		180	1.75	9.18	23.40	10.94
		240	1.69	9.10	24.49	11.24
		10	1.65	12.49	32.71	15.11
	5	20	1.88	13.04	34.45	15.88
		40	2.14	14.84	37.97	17.79
		60	2.15	15.11	37.76	17.91
		10	2.15	15.11	37.76	17.91

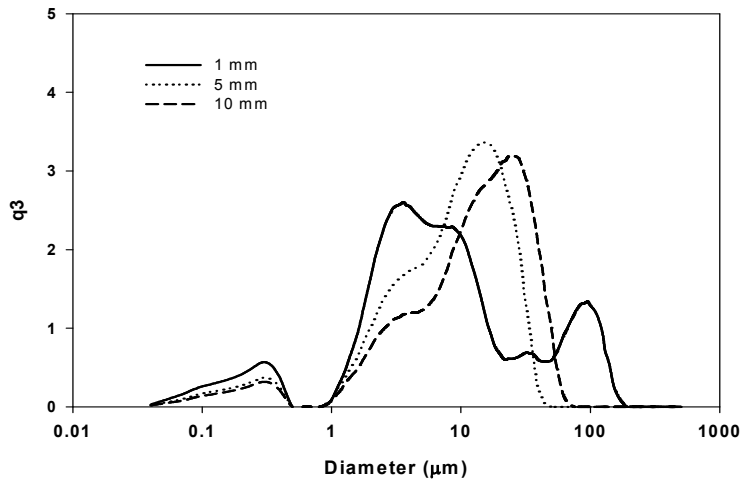


Fig. 94. Particle size distribution curve of microparticulated *Phellinus Linteus* after planetary milling for 20 min.

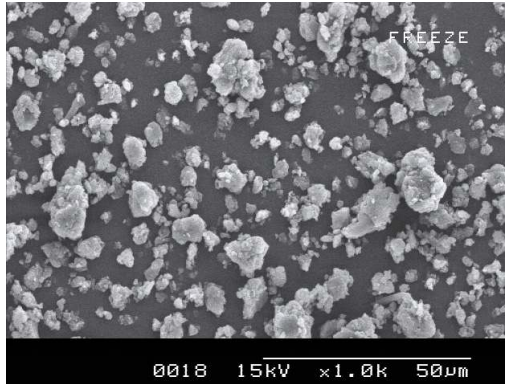
#### 6.2. 감자전분-상황버섯 복합분체의 제조

일반적으로 Hybridization system chamber 내에서 시료들은 빠른 rotor speed로 인해 많은 충격 (collision)을 받아 agglomerate의 break-up 뿐만 아니라 powder coating이 용이하게 유도된다. 효율적인 분체복합화에 영향을 미치는 인자는 여러 가지가 있으나 그 중에서 가장 중요한 것은 host 물질 및 guest 물질들 간의 입도 차이로 알려져 있으며, 15배 정도의 입도차이가 가장 바람직한 것으로 알려져 있다. Host 물질로 쓰인 감자전분은 체분리를 통해 270-170mesh의 입자를 가지는 시료를 선별하여 사용하였다. 체분리를 통한 감자전분의 크기와 분포를 Table 28.에 나타내었다. 체분리한 감자전분과 미분쇄한 상황버섯은 Hybridization system을 이용하여 15,000rpm에서 3분간의 분체결합 유도에 의하여 복합분체를 제조하였고, SEM촬영을 이용하여 분체간의 결합이 이루어진 표면을 비교분석 하였다 (Fig. 95). 미분쇄한 상황버섯의 평균입도는 10 $\mu$ m정도로 불규칙한 입자 형태를 나타내고, 거의 완벽한 구형에서 일부가 파쇄되어 떨어져나간 흔적들이 보였다. 감자전분의 경우, 체분리를 통하여 50 $\mu$ m이상의 비교적 큰 입자의 형태를 나타내고 있으며 매끄러운 표면을 갖고 있었다. 감자전분과 상황버섯을 이용한 분체간 결합비율을 9:1, 19:1, 29:1 (각각 총 중량의 10%,

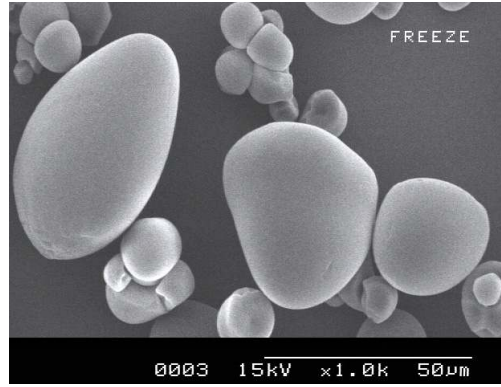
5%, 3.3%에 해당)의 비율로 달리하여 복합분체를 제조하여 표면을 관찰한 결과, 상대적으로 상황버섯의 함량이 높은 시료에서 표면에 부착한 상황버섯의 입자가 증가하였으며 상대적으로 감자전분의 표면에 고루 분포하는 것을 확인할 수 있었다. 또한 입자의 크기가 비교적 큰 감자전분의 표면에 상황버섯의 입자가 잘 부착되어있으며, 입자의 크기가 작은 편인 감자전분에서는 상황버섯과 혼재되어 결합된 형태를 나타내었다.

**Table 28. Particle size and distribution of potato starch after sieving.**

Sieve (mesh)	체눈크기 ( $\mu\text{m}$ )	시료량 (g)	분포 (%)
170	90	1	0.5
270	53	159	70.0
450	32	67	29.5
Pan	—	0	0.0
합계		227	100



A



B



C



D

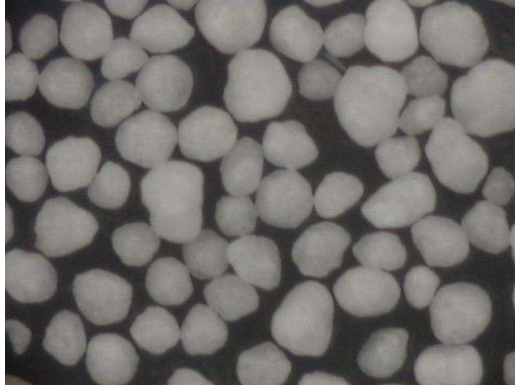


E

Fig. 95. SEM micrographs of microparticulated (A) *Phellinus Linteus*, (B) potato starch after sieving, (C) composite, potato starch : *Phellinus Linteus* = 9:1, (D) composite, potato starch : *Phellinus Linteus* = 19:1, (E) composite, potato : *Phellinus Linteus* = 29:1.

### 6.3. Cellets-상황버섯 복합분체의 제조

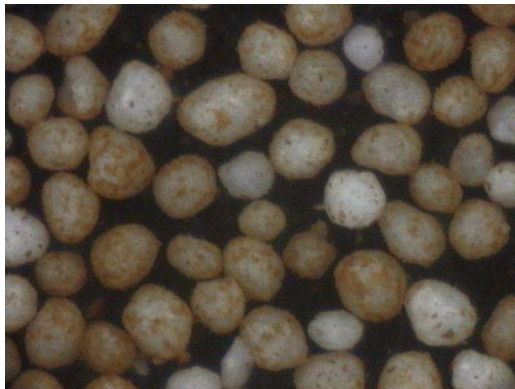
Cellets는 셀룰로오스를 개량하여 만든 제품으로, 셀룰로오스를 구형의 형태로 만들어 크기별로 제조한 제품이다. 이 Cellets는 주로 제약 등에서 부형제로 널리 이용되고 있는 제품이며, 식용으로 섭취하는데 대한 제약이 없다. 이러한 Cellets는 복합분체 제조에 유용하게 이용될 수 있을 것이라 판단하였고, 100, 200, 350 $\mu\text{m}$  평균입도를 가지는 제품을 사용하여 Cellets-상황버섯 복합분체를 제조하고 Color video microscope system (컬러 영상현미경)을 이용하여 분체의 표면을 관찰하였다 (Fig. 96-98). Cellets 100 (평균입도 100 $\mu\text{m}$ )을 이용하여 Hybridization system의 조건을 5,000rpm으로 복합분체를 제조하였을 경우, 입자의 형태를 유지하면서 미분쇄한 상황버섯이 골고루 표면에 입혀져 있는 모습을 관찰할 수 있었다. 그러나 8,000rpm의 조건으로 제조하였을 경우에는 Cellets의 파쇄가 일어나며 상황버섯의 표면부착의 정도가 5,000rpm에 비해 떨어지는 것이 확인되었다 (Fig. 96). 이러한 Cellets의 형태가 파괴됨은 Cellets 200 (평균입도 200 $\mu\text{m}$ )과 350 (평균입도 300 $\mu\text{m}$ )에서는 더 크게 나타나며, 5,000rpm 에서도 부분적으로 작은 입자로 부서진 모습을 보인다. Cellets 350을 이용한 경우 15,000rpm으로 복합분체를 제조하여 하였을 때, Cellets의 형태가 완전히 부서진 모습을 보였다. 결과를 토대로 Cellets-상황버섯 복합분체를 제조할 경우에는 Cellets 100을 이용하여 Hybridization system의 조건을 5,000rpm으로 조절하는 것이 가장 바람직하다.



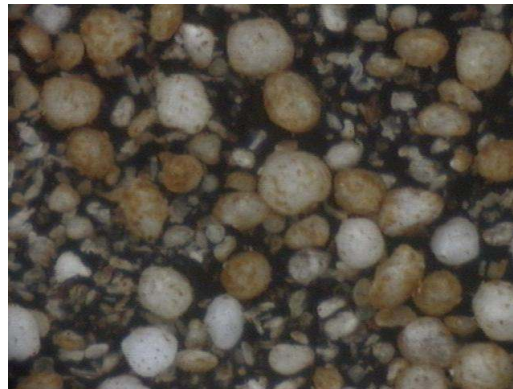
A



B



C

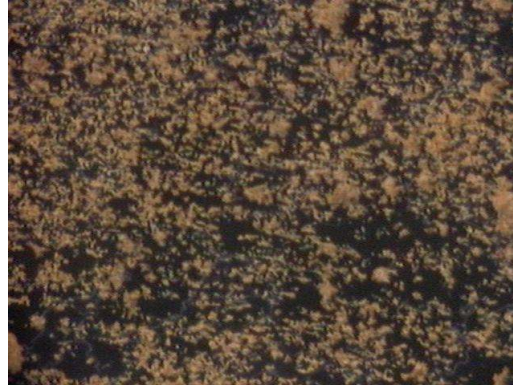


D

Fig. 96. Color video microscope system micrographs of (A) Cellets 100, (B) microparticulated *Phellinus Linteus*, (C) Composite processed at 5,000rpm, (D) Composite processed at 8,000rpm.



A



B



C



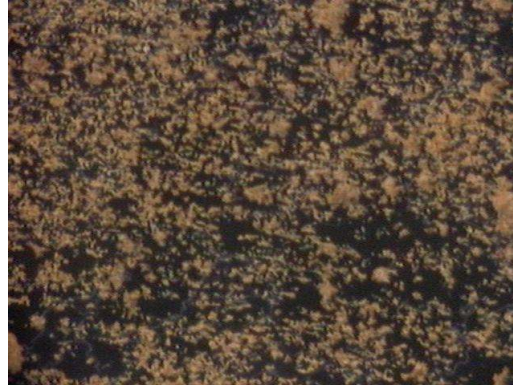
D

Fig. 97. Color video microscope system micrographs of (A) Cellets 200, (B) microparticulated *Phellinus Linteus*, (C) Composite processed at 5,000rpm, (D) Composite processed at 8,000rpm.





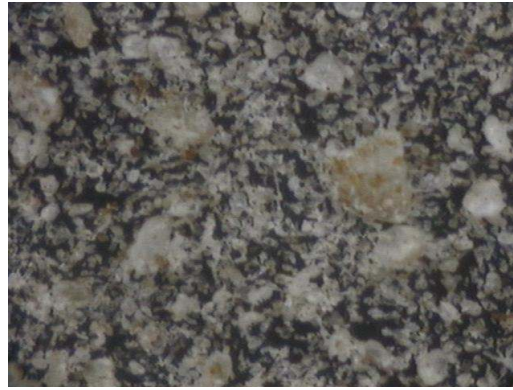
A



B



C



D



E

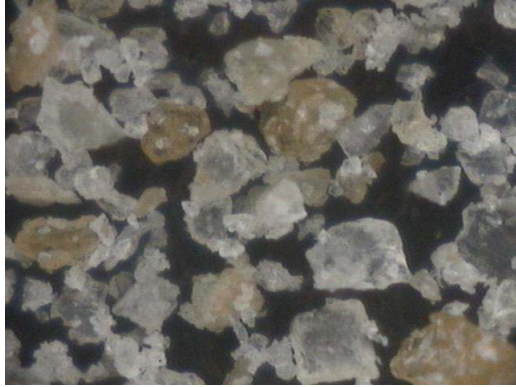
Fig. 98. Color video microscope system micrographs of (A) Cellets 350, (B) microparticulated *Phellinus Linteus*, (C) Composite processed at 5,000rpm, (D) Composite processed at 8,000rpm, (E) Composite processed at 15,000rpm.

#### 6.4. 열처리한 곡류-상황버섯 복합분체의 제조

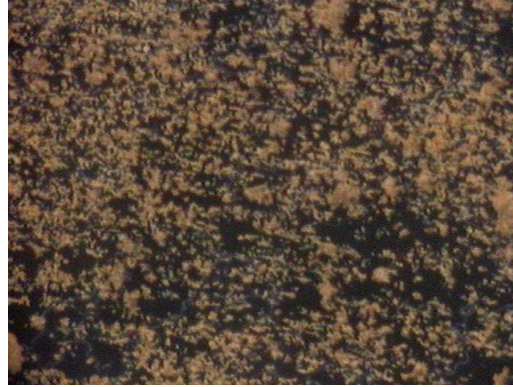
선식 등에 이용되는 열처리한 곡류는 노약자를 포함한 모든 연령층이 섭취하기에 부담이 없고 소화가 잘되는 소재이므로 초고가인 상황버섯을 효과적으로 섭취하는데 있어서 유용한 부형제가 될 수 있을 것으로 판단되었다. 따라서 이들 곡류분말을 전처리한 다음, Hybridization system의 조건을 5,000과 8,000rpm의 두 조건에서 곡류-상황버섯 복합분체를 제조하였고, 그 결과는 Color video microscope system (컬러 영상현미경)을 이용하여 분체의 표면을 관찰하였다 (Fig. 99-104). 열처리한 곡류의 종류로는 현미, 현미찰쌀, 백태, 흑태, 쌀보리, 그리고 겉보리의 6종류가 사용되었으며, 각 열처리한 곡류는 Cutting mill을 이용하여 60초간 조분쇄를 하고, 이를 체분리를 통하여 60-80mesh 사이의 입자를 선별하여 본 실험에 사용하였다 (Table 29.). 현미, 현미찰쌀, 백태 그리고 흑태를 이용한 복합분체의 경우, 미분쇄한 상황버섯이 입자에 고루 코팅되어 상황버섯의 색이 입자표면에 나타나는 것이 보인다. 그 중에서도 백태와 흑태의 경우, 상황버섯의 결합이 가장 잘 이루어졌다. 그러나 상대적으로 쌀보리와 겉보리의 경우, 상황버섯의 입자의벽에 코팅된 모습을 확인하기 어려웠으며 다른 입자들과 함께 단순히 섞여진 모습을 보였다. 그리고, 5,000rpm과 8,000rpm으로 조건을 다르게 복합분체를 제조하였을 경우, 8,000rpm에서는 비교적 큰 입자들이 거의 부서진 모습을 보이고, 5,000rpm에 비해 결합이 잘 이루어지지 않은 모습을 나타내었다.

**Table 29. Particle size and distribution of heat treatment cereal after sieving at 60-80mesh sieve.**

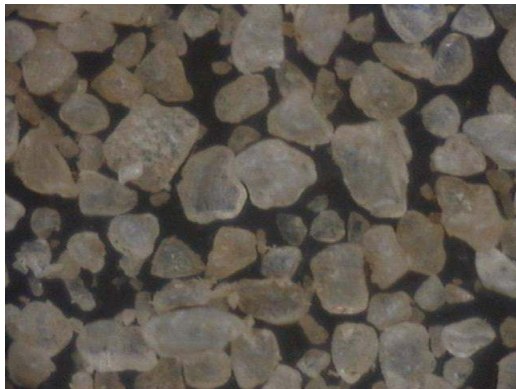
시료	총 투입량 (g)	60-80mesh 시료 (g)	회수량 (%)
현미	109	46	42.2
현미찰쌀	50	35	70.0
백태	87	40	46.0
흑태	90	57	63.3
쌀보리	101	46	45.5
겉보리	41	27	65.8



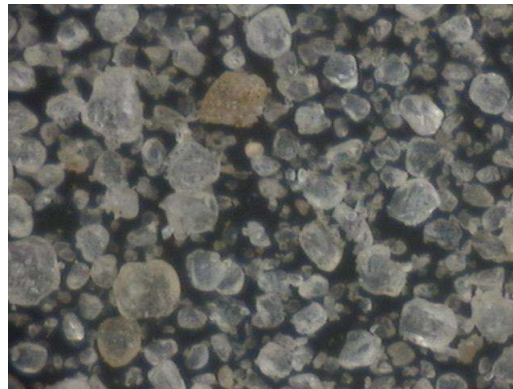
A



B



C

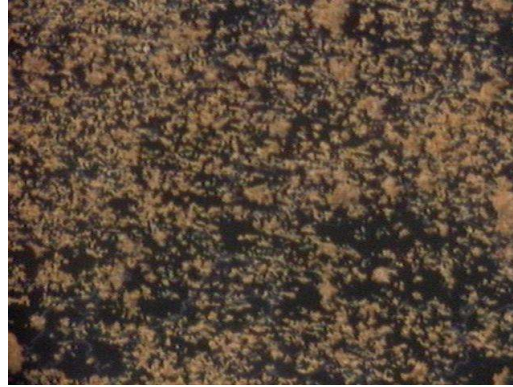


D

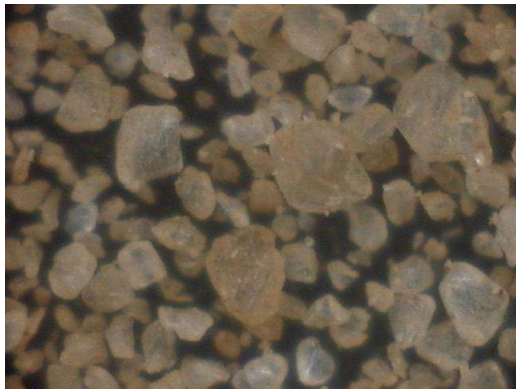
Fig. 99. Color video microscope system micrographs of (A) unpolished rice after sieving, (B) microparticulated *Phellinus Linteus*, (C) Composite processed at 5,000rpm, (D) Composite processed at 8,000rpm.



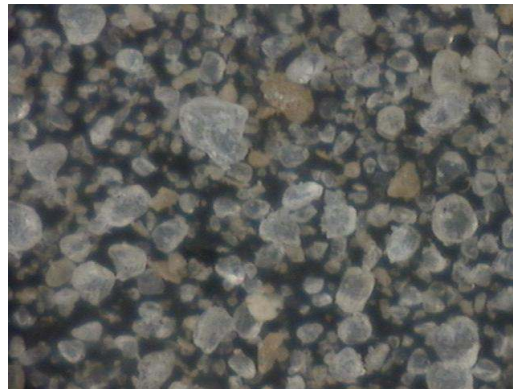
A



B



C

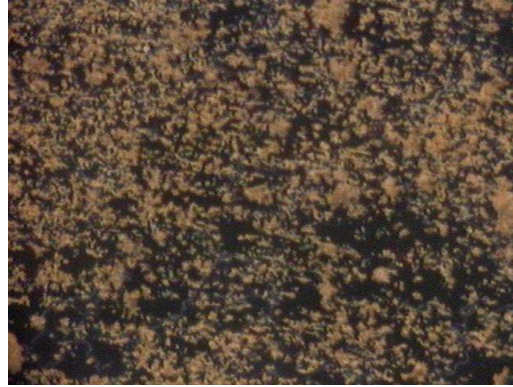


D

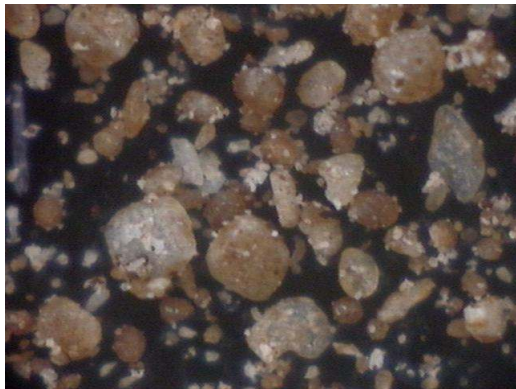
Fig. 100. Color video microscope system micrographs of (A) unpolished glutinous rice after sieving, (B) microparticulated *Phellinus Linteus*, (C) Composite processed at 5,000rpm, (D) Composite processed at 8,000rpm.



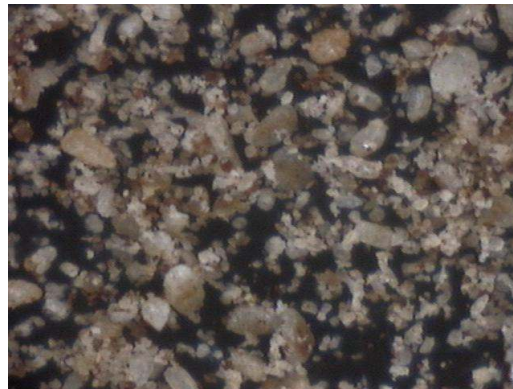
A



B



C

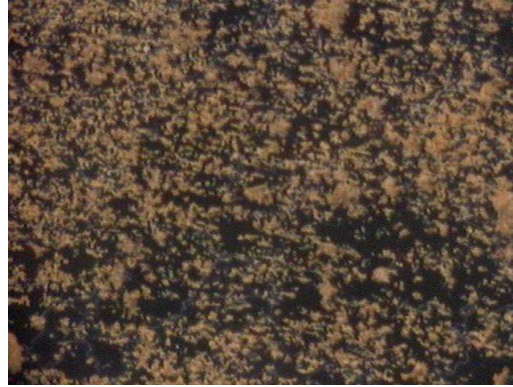


D

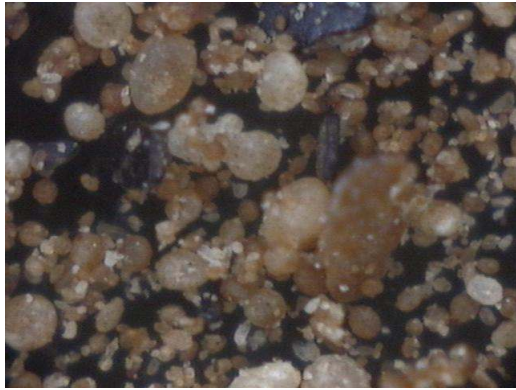
Fig. 101. Color video microscope system micrographs of (A) soybean after sieving, (B) microparticulated *Phellinus Linteus*, (C) Composite processed at 5,000rpm, (D) Composite processed at 8,000rpm.



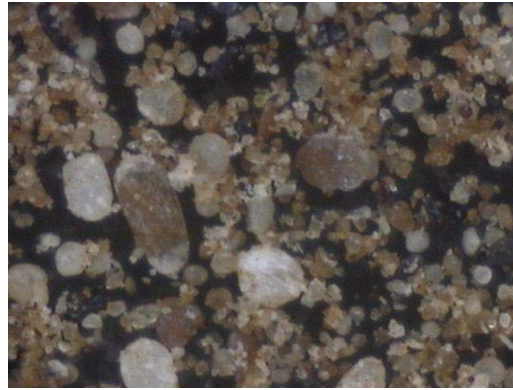
A



B

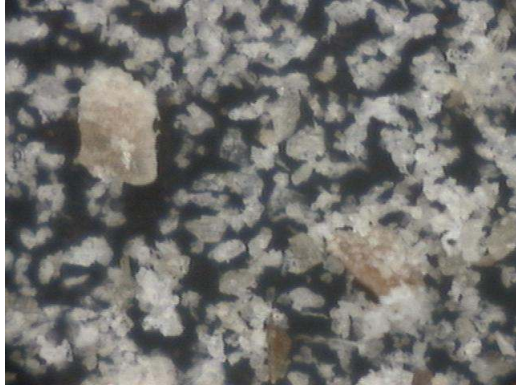


C



D

Fig. 102. Color video microscope system micrographs of (A) black soybean after sieving, (B) microparticulated *Phellinus Linteus*, (C) Composite processed at 5,000rpm, (D) Composite processed at 8,000rpm.



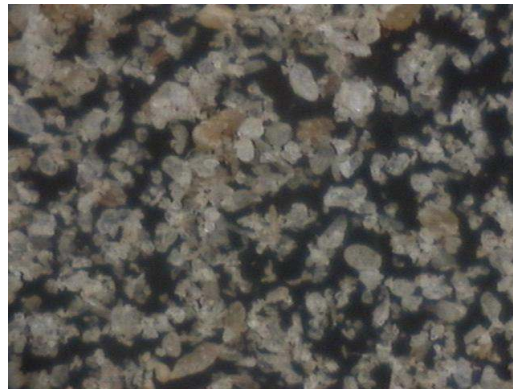
A



B



C

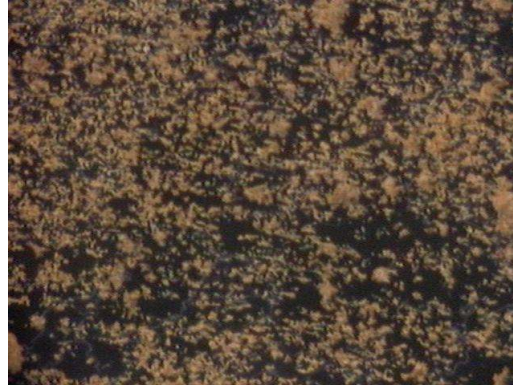


D

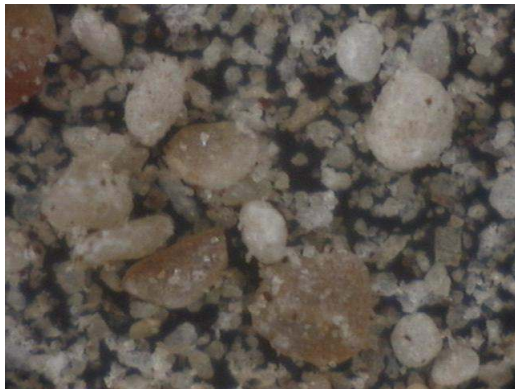
Fig. 103. Color video microscope system micrographs of (A) unhulled barley after sieving, (B) microparticulated *Phellinus Linteus*, (C) Composite processed at 5,000rpm, (D) Composite processed at 8,000rpm.



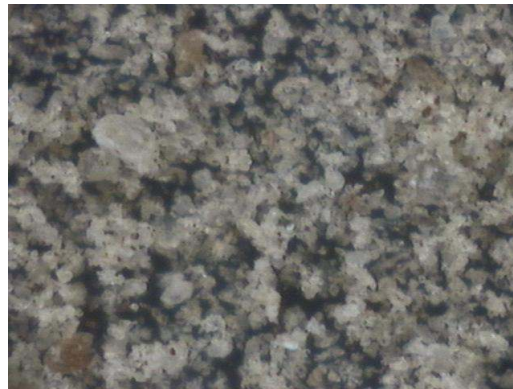
A



B



C



D

Fig. 104. Color video microscope system micrographs of (A) barley after sieving, (B) microparticulated *Phellinus Linteus*, (C) Composite processed at 5,000rpm, (D) Composite processed at 8,000rpm.



본 실험에서 사용한 복합분체 제조기술은 습식에 비해 안전하고 비용이 절감되며, 식품소재의 목적에 부합하는데다 친환경적인 장점을 가지고 있다. 이러한 기술로 제조한 복합분체는 미량성분이 부형제의 표면에 고르게 분포시키고 장 내에서의 유용성분의 용출을 제어할 수 있으며, 미량성분의 중량조절이 쉬운 이점이 있다. 유용성분을 다량 함유하고 있는 상황버섯의 이용도를 제고하기 위한 방안의 하나로서 복합분체공정을 적용하였으며, 이러한 복합분체화를 통하여 미량섭취 식품소재들의 이용편의성을 제고할 수 있는 가능성을 확인하였다. Host 물질의 입자선별 방법과 건식코팅 방법의 최적화된 공정을 위한 추가적인 실용화 단계 실험이 필요한 것으로 판단되며, 이러한 연구가 이루어지면 상황버섯을 포함한 다양한 식품소재의 부가가치 제고에 큰 도움이 될 수 있을 것으로 판단된다.

## 7. 과립화 및 코팅

### 7.1. Granulation

#### ① 무수결정포도당에 의한 과립형성

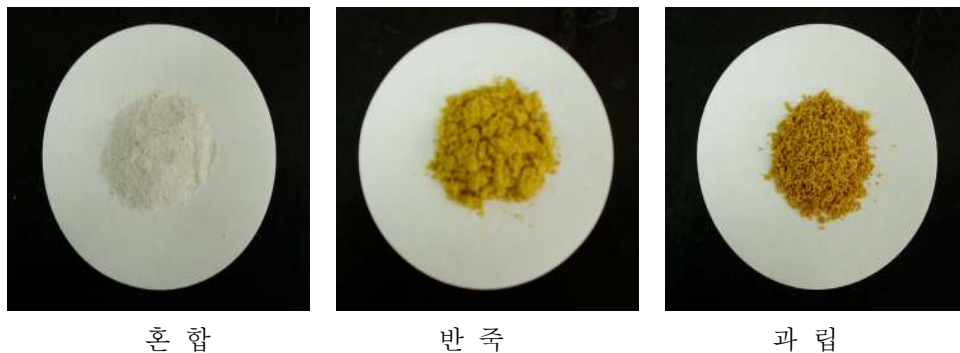


Fig. 105. Granulation process of 1% *Phellinus linteus*

과립차 제품은 PL 동결건조물에 단맛을 내기 위해 함수포도당을 첨가하여 제조하였다. 무수함수포도당에 1%의 동결건조물을 혼합하여 10%의 정제수를 첨가한 후 반죽하였다. 과립차를 제조후 열풍건조기에서 2시간 정도 건조하였다. 과립차 제조로서 용해성이 뛰어난 제품의 섭취가 가능할 것으로 보인다.

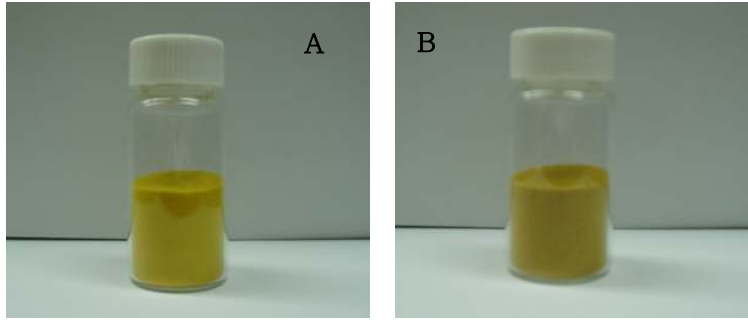


Fig. 106. Granulation (A) and coating cellet (B) of *Phellinus linteus*

starch 500에 0.1% PL 용액 2L를 분사하여 과립화 한 결과 비교적 세립에 속하며 흐름성, 분해 확산력 등이 fine powder보다 개선되었다. 세립이라 비교적 입자 크기도 균일해 용해성 또한 뛰어났다. 일반적으로 많이 알려진 추출액의 고형화 과정은 텍스트린이 섞인 lactose 분말을 유동화하여 추출액을 분사, 과립화 하는 것이다. 그런 면에서 granulation은 적합한 공정이라 할 수 있으며, 장치비, 운영비, 재료비에 있어서 coating process보다 훨씬 유리하였다.

## 7.2. coating

cellulose로 이루어진 cellet에 0.1% PL 용액을 도포하여 다양한 크기의 coated pellet을 얻고자 실시한 실험에서 500g의 oellet에 4L의 용액을 도포한 결과물은 B와 같다. 과립화에 비해 수용액상에서 용해도는 미진하였으나, 장내 코팅등의 방법을 동반할 경우 체내 흡수율 및 그 이용도가 향상될 것으로 전망된다. 또한 0.1% PL 용액을 농축하여 solvent를 제거한 후 starch를 첨가하여 suspension를 제조하고, 700 um의 cellet을 이용하여 coating 할 경우 Fig. 107.에서 보는 바와 같이 size의 크기를 자유롭게 할 수 있었다.

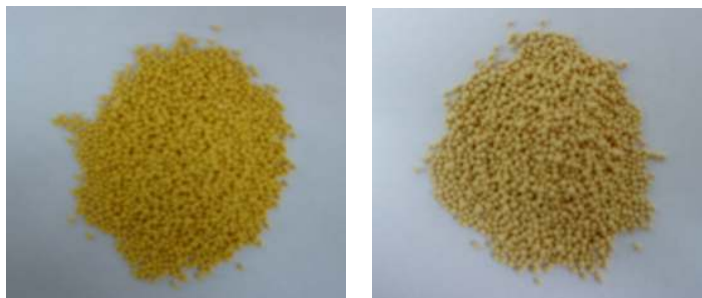


Fig. 107. Coated pellet of *Phellinus linteus* suspension with starch

## 8. 상황버섯의 환제품 및 음료제품의 적용

### 8.1 상황버섯 소재의 환제품 적용

환의 형성은 소재 제조시 유동층 코팅 (Fluid bed coating)에 의한 구형체를 활용한 경우도 가능하며 일반적인 제법에 의한 환 가공은 Fig. 108.과 같다.

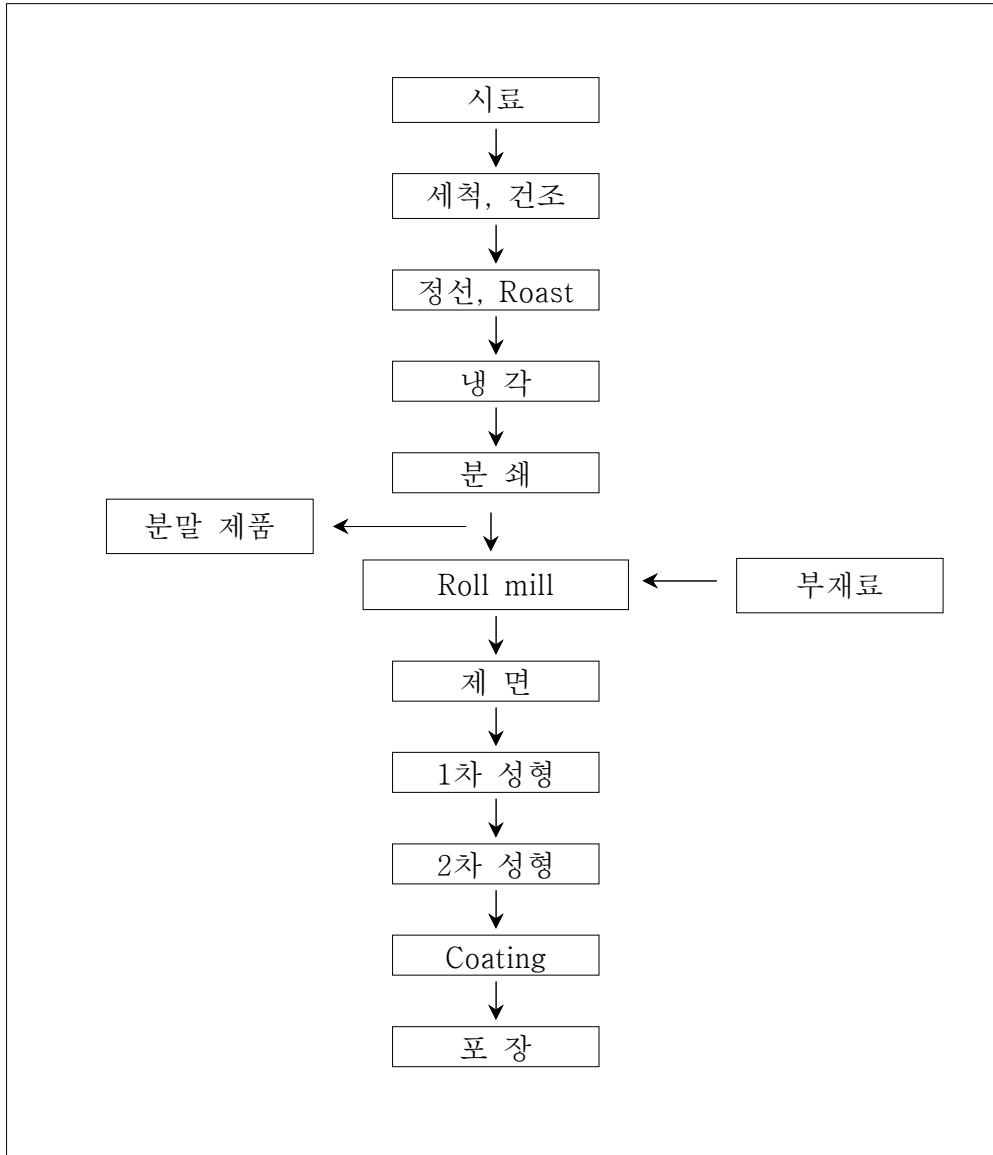


Fig. 108. Process for flour and pill from *Phellinus linteus* extract.

상황버섯 시료를 세척 후 80℃에서 12시간 건조(overnight) 한다. 세척시료는 건조 후 180℃에서 5분 roasting하여 표면의 수분과 wax 성분을 안정화 시킨다. 상온까지 송풍냉각 후 roll mill로 70회 이상 반복 분쇄하고 hammer mill로 재분쇄 한 다음 180 mesh 처리하여 분말 시료를 제조한다. 환은 준비된 상황분말외에 과립, 복합분체, 코팅물 등이 부형제로 목적에 따라 함께 이용될수 있으며, 배합반죽, 성형, 표면 coating 및 포장의 단계로 제조한다. 배합 반죽은 roll mill로 2회 반죽한 다음 압출과정을 거쳐 약 30cm 장방형으로 압출한다. 성형은 자환기를 이용해 면의 형태로 성형하고 제환기로 1차 성형을 하고 정환기를 통해 2차 성형을 거쳐 환의 형태로 한다. Coating 및 포장은 성형 후 건조한 다음 꿀 또는 셀락을 이용하여 표면을 코팅하여 포장한다.

## 8.2. 상황버섯 소재의 음료 가공품 적용

상황버섯 뼈강화 활성 추출물의 수용액내 분산도를 강화한 유화, microemulsion, nanoparticle, microcapsule 등 액상소재를 이용하여 액상가공물을 제조할수 있다. 액상소재를 활용한 액상가공물의 제조과정은 Fig. 109와 같다.

상황버섯 추출물로부터 제조한 유화, microemulsion, nanoparticle, microcapsule 등 액상소재를 준비한다. 액상소재의 수용액내 분산을 유도하고 분산시 발생하는 침전물을 제거하기 위하여 거즈를 이용, 여과하고 여과액은 냉각시킨 후, filter pad를 사용하여 감압 여과하거나 Whatman No. 42번 (2.5 um)으로 반복 여과한다. Depth filter pad는 고도로 정제된 순수 셀룰로오스 섬유를 paper filter와 결합시킨 것으로 액체가 pad를 통과할 때 정전기적 인력에 의해 미세한 입자가 흡착, 분리될 수 있도록 하는 방법이다. 산업적으로는 여과포를 통과시킨 후 2차로 0.5 um Cartridge filter 등으로 반복 여과하여 침전물을 제거할수 있다. 맛의 중화 및 부드러움을 위하여 식품용 중탄산염을 사용할수 있으며 보존성을 위하여 구연산으로 pH를 4이하로 낮추고 산화방지제로 vitamin C를 0.02% 첨가한다. 부재료로는 과즙, 한방재료, 비타민류, 건강소재 등을 첨가할수 있으며 조성물은 밀봉후 80℃ 이상으로 15-20분 가온 살균하고 90℃ 이상에서 후살균을 시행한다. 장기보존 등 필요에 따라 레토르트 살균(121℃, 7분 이상)을 추가로 병행 할수 있다. 단맛 등의 분해를 중지하기 위하여 냉수에 3분 이상 정치 후 완성한다. 완성된 액상 가공물은 통계적 기법(95% 신뢰수준)으로 관능검사 실시 후 수정보완 한다.

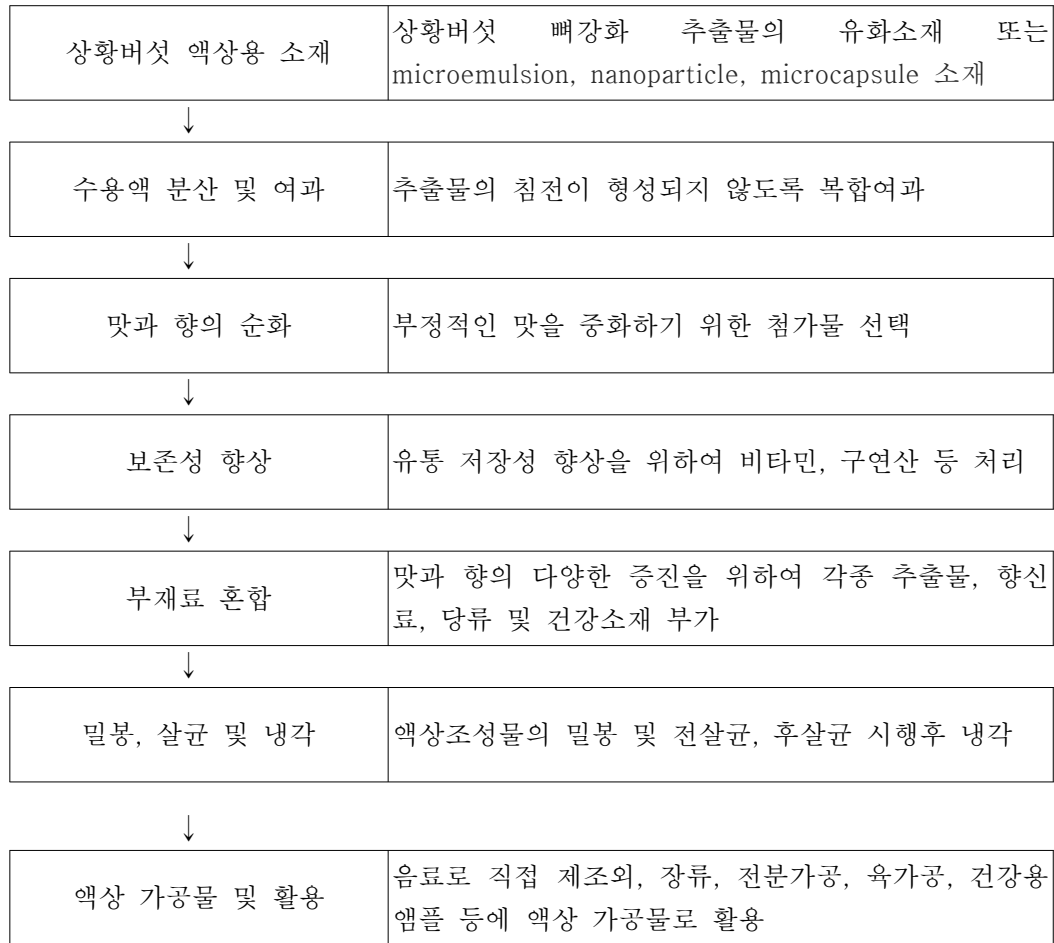


Fig. 109. Process for beverage from *Phellinus linteus* extract.

## 제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

### 1. 상황버섯 다기능 활성 구명

상황버섯은 면역, 항암 중심의 생리기능 활성이 알려져 왔으며 대사적 관련성이 있는 건강기능 활성은 연구되지 않았다. 본 과제에서는 국산 상황버섯의 면역, 항산화 활성을 바탕으로 상황의 뼈기질 강화활성을 다각적으로 교차 검증 함으로써 원료의 가치향상에 기여하였다.

### 2. 국산 상황버섯의 우수성

시료는 참여기업인 버섯들이3형제 (진주상황버섯 영농조합법인)의 국산상황버섯 원료를 사용하였다. 국산 상황버섯은 외산(중국산, 캄보디아산)과 비교하여 세포 증식능과 뼈강화 활성에서 우위를 보였다. 이는 품종과 재배환경의 차이에서 기인한 것으로 판단하였으며 국산 상황버섯의 우수성을 입증한 결과였다. 국산상황 버섯의 우수성 검증은 해당 농가의 제품 경쟁력 향상에 기여할 전망이다.

### 3. 상황버섯 뼈강화 활성의 과학적 검증

상황버섯의 뼈기능 강화 활성과 안정성 검증을 위한 시험계를 인간유사 세포계 및 난소적출 동물계 시험법으로 확립하였다. 인간유사 세포계를 활용하여 상황의 안전성 및 뼈기질 형성과 뼈흡수(과골) 억제효과를 검증하고 뼈강화 특성을 구명하였다. 세포계에 이어 난소적출 동물계 시험법을 확립하고 시험용 쥐의 난소적출을 통하여 골약화를 유도 하였다. 동물시험계에 상황시료를 투여하고 혈액 인자, 골밀도 등을 다각적으로 검색하였으며 세포계와 비교하여 상황버섯의 뼈기질 강화 활성을 명확히 하였다. 특히 12주 사양기간, 뇨대사 인자, 발골시료 탄성 측정, 온도 pH에 대한 시료의 뼈강화 활성유지 등 기존의 연구에서 진일보한 시도로 결과 검증의 내실 및 시료 활용도를 높였다.

### 4. 상황 뼈강화 유효성분 및 이화학적 특성

상황 뼈강화 활성성분의 추출은 물질을 광범위하게 추출하는 조건으로서 80% 에탄올로 추출하였다. 에탄올 추출물을 대상으로 높은 뼈강화 활성이 확인되어 식품으로 활용이 가능할 것으로 기대된다. 상황의 뼈강화 핵심성분은 분리, 정제를 통하여 구조가 동정되어 새로운 성분을 밝힘과 동시에 소재의 이용도 및 가치 확대를 기대하게

하였다. 단일성분은 현행법규상 식품소재 및 원료로서 사용이 어려우나 추출물 등 식품원료로 생산공정시 지표 (marker)로서 의의가 있다. 또한 상황의 뼈기능 단일 활성 성분은 새로운 성분이 동정되었으며 활성이 높고 안전성이 검증되었으므로 향후 단일 성분이용, 유도체 활용 등 식품, 제약에서 이용성 확대의 기초로 활용 가능하다. 상황의 활성성분은 pH, 온도에서 안정하고 조골, 파골 활성이 유지되므로 체내 및 가공 이용시 안정성과 함께 제품 응용성이 높음을 확인하였다.

#### 5. 상황 뼈강화 활성성분의 소재화

상황 뼈강화 성분을 포함하는 추출물의 식품 소재화를 위하여 액상 및 고상 소재화를 시도 하였다. 활성 추출물은 수용액에 용해도가 낮아 액상 제품의 소재로서 적합도가 떨어진다. 액상 제품을 위한 소재로서 유화성을 높인 소재의 조건 설정 및 nanoemulsion, nanoencapsulation 등의 소재를 개발하였다. 편이성을 증진시킨 직접 취식용 및 가공소재로서 고상소재를 개발하였으며 유동층 코팅, 나노분체 소재를 개발하였다. 이들 소재들은 가격이 고가인 시료의 섭취를 활성범위까지 편리하고 저렴하게 소비자에게 접근이 가능할것으로 판단하였다.

#### 6. LOHAS 사회용 제품의 개발

고령화 사회에서 개인의 웰빙을 위한 건강활성과 식품이 필요하며 이는 국가 활력 과도 직결된다. 뼈기능 약화는 치료가 불가능한 자연노화 현상으로서 고령화 사회에 따라 골 약화 인구는 늘어나며 국가 생산성도 그만큼 떨어진다. 선진국의 경우 골손실에 의한 국가적 손실이 수십억불 규모로 추산하고 있으며 국가 차원의 대비 및 지원 사항의 하나로 국민 뼈기능 강화사업을 시행한다. 본 과제의 결과는 웰빙의 기초인 활동성을 높이는 뼈강화 원료의 과학적 활성검증, 소재, 제품화를 시도 하였고 이는 LOHAS 사회로 가는 요소중의 한부분으로서 개발 의의가 있다고 판단한다. LOHAS 사회용 국산 상황버섯 소재는 개인의 건강, 복지에 일조할것으로 고려하며 가치향상 으로부터 해당 농가의 경쟁력 및 소득증대에 기여할것으로 판단하였다.

#### 7. 연구 성과물

연구결과를 정리하여 학술대회, 국내외 논문 투고를 하였으며 특허 출원을 준비하였다. 시제품을 바탕으로 농가형 상황버섯 제품 개발을 지원하고 제품화를 협의하고자 한다.

## 식용 식물자원으로부터 활성물질의 탐색-XVIII. 상황버섯 (*Phellinus linteus*) 자실체로부터 Ergosterol 유도체의 분리

류하나 · 유종수 · 송영중 · 이대영 · 김동현 · 노영덕<sup>1</sup> · 김인호<sup>2</sup> · 백남인\*

경희대학교 생명공학원 및 식품대사연구센터, <sup>1</sup>경희대학교 생명자원과학연구원, <sup>2</sup>한국식품연구원

### Development of Biologically Active Compounds from Edible Plant Sources XVIII. Isolation of Derivatives of Ergosterol from the Fruit Body of *Phellinus linteus*

Ha-Na Lyu, Jong-Su Yoo, Myoung-Chong Song, Dae-Young Lee, Dong-Hyun Kim, Young-Duk Rho<sup>1</sup>, In-Ho Kim<sup>2</sup> and Nam-In Baek\*

The Graduate School of Biotechnology & Plant Metabolism Research Center, Kyung Hee University, Suwon 446-701, Korea

<sup>1</sup>College of Life Science, Institute of Life Science & Resources, Kyung Hee University, Suwon 446-701, Korea

<sup>2</sup>Korea Food Research Institute, Sungnam 463-746, Korea

Received December 5, 2006; Accepted February 12, 2007

The fruiting body of *Phellinus linteus* was extracted with 80% aqueous MeOH, and the concentrated extract was partitioned with EtOAc, *n*-BuOH and H<sub>2</sub>O. The repeated silica gel and ODS column chromatographies of the EtOAc fraction led to isolation of four sterols. From the result of spectral data including NMR, MS and IR, the chemical structures of the sterols were determined as ergosta-7,24(28)-dien-3 $\beta$ -ol (episterol, 1), 5 $\alpha,8\alpha$ -epidioxyergosta-6,9(11),22-trien-3 $\beta$ -ol (dehydroperoxyergosterol, 2), 5 $\alpha,8\alpha$ -epidioxyergosta-6,22-dien-3 $\beta$ -ol (ergosterol peroxide, 3), and 3 $\beta$ /5 $\alpha$ -dihydroxy-6 $\beta$ -methoxyergosta-7,22-diene (6-*O*-methylcervisterol, 4). The ergosterols have been first isolated from this mushroom in this study.

**Key words:** *Phellinus linteus*, ergosterol, episterol, dehydroperoxyergosterol, ergosterol peroxide, 6-*O*-methylcervisterol

## 서 론

상황버섯(*Phellinus linteus*)은 담자균문(Basidiomycotina), 민주콩버섯목(Aphylliphorales), 소나무버섯과(Hymenochaetaceae)의 진흙버섯속(*Phellinus*)에 속하는 백색부후균으로, 뽕나무(*Morus alba*, Moraceae) 줄기에 자생하며 샷갓표면을 제외하고는 모두 황색이므로 상황(桑黃)이라고 불리며, 한국명은 목질진흙버섯이다.<sup>1)</sup>

상황버섯은 중국의 '약성론'에 상산(桑扈), 상이(桑耳)라는 이름으로 처음 수록된 이래 한국, 아시아, 호주, 필리핀, 북아메리카 등에 자생하는 것으로 알려져 있으며, 우리나라에서는 주로 강원도 지역에 자생하고 있다.<sup>2)</sup> 자실체는 버섯자루가 없고 전체가 목질화 되어 있는 편구형 또는 팔굽 모양을 하고 있으며, 갈색, 암회갈색 또는 흑색을 띤다. 초기에는 노란색으로 진흙

덩이가 뭉친 것 같은 형태를 유지하다가 성장할 때는 황금색으로 빛을 받다가 다 자란 후 모습은 나무 그루터기에 헛바다를 내민 모습이어서 수설(樹舌)이라고도 한다.<sup>3)</sup>

옛 문헌에 의하면 상황버섯은 본초강목<sup>4)</sup>에서 목이(木耳)의 항으로 분류하여 상이(桑耳), 상황(桑黃) 등으로 기록하고 있고, 동의보감<sup>5)</sup>에서는 당액편에 상목이(桑木耳)라는 이름으로 기록되어 있으며 어혈, 혈병, 종양 등의 각종 질병 치료약으로 이용되어 온 것으로 기록되어 있다. 또한 상황버섯은 높은 항암활성<sup>6)</sup>, 항종양활성<sup>7)</sup>, 항돌연변이원성<sup>8)</sup>, 면역 활성<sup>9)</sup>, 지질 과산화 억제 효과 및 유리기 제거능<sup>10)</sup> 등의 다양한 생리학적 활성을 갖고 있는 것으로 보고되고 있다. 약리작용으로는 소화기 계통의 알인 위암, 식도암, 십이지장암, 결장암, 직장암을 비롯한 간암수술 후 화학요법을 병행할 때 면역기능을 향상시키며<sup>11)</sup>, 자궁출혈 및 대하, 월경불순, 장출혈, 오장기능을 활성화시키고 해독작용을 하는 것으로 알려져 있다.<sup>12)</sup>

그러나 상황버섯의 생리활성은 주로 면역, 항암 관련에 대한 보고가 집중되어 있고, 지금까지 상황버섯으로부터는 다당류, 아미노산 등 고분자 물질에 관한 성분들만이 분리, 보고되어 있

\*Corresponding author

Phone: +82-31-201-2661; Fax: +82-31-201-2157

E-mail: nibaek@khu.ac.kr



**Phenolic Compounds from the Fruit Body of *Phellinus linteus* Increase Alkaline Phosphatase (ALP) Activity of Human Osteoblast-like Cells**

**Ha-Na Lyu, Dae-Young Lee, Dong-Hyun Kim<sup>1</sup>, Jong-Su Yoo<sup>2</sup>, Min-Kyung Lee, In-Ho Kim<sup>3\*</sup>, and Nam-In Baek<sup>\*</sup>**

Graduate School of Biotechnology & Plant Metabolism Research Center, Kyung Hee University, Yongin, Gyeonggi 446-701, Korea,

<sup>1</sup>School of Chemistry, Manchester Interdisciplinary Biocentre, The University of Manchester, 131 Princess Street, Manchester M1 7DN, UK

<sup>2</sup>Acupuncture and Meridianology Scientific Research Center, Kyung Hee University, Yongin, Gyeonggi 446-701, Korea,

<sup>3</sup>KoreaFood Research Institute, Sunghnam, Gyeonggi 463-746, Korea

**Abstract**

Secondary metabolites from the fruit body of *Phellinus linteus* were evaluated for their proliferative effect on human osteoblast-like cells. 3-[4,5-Dimethylthiazole-2-yl]-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide (MTT) assay and alkaline phosphatase (ALP) activity assay were used to assess the effect those isolates on the human osteoblast-like cell line (Saos-2). Activity-guided fractionation led to the isolation of ALP-activating phenolic compounds through the extraction of *P. linteus*, solvent partitioning and repeated silica gel and octadecyl silica gel (ODS) column chromatographic separations. From the result of spectroscopic data including NMR, MS and IR, the chemical structures of the compounds were determined as 4-(4-hydroxyphenyl)-3-buten-2-one (**1**), 2-(3',4'-dihydroxyphenyl)-1,3-benzodioxole-5-aldehyde (**2**), 4-(3,4-dihydroxyphenyl)-3-buten-2-one (**3**), 3,4-dihydroxybenzaldehyde (**4**) and protocatechuic acid methyl ester (**5**), respectively. This study reports the first isolation of compounds **1-3** and **5** from *P. linteus*. In addition, these compounds increased ALP activity in Saos-2 compared to the control. Compound **1** showed ALP activity of 100.0±49.5 to 214.3±74.2% at concentration of 10<sup>-7</sup> to 10<sup>-2</sup> mg/mL, compound **2** showed ALP activity of 100.0±49.5 to 214.3±74.2% at concentration of 10<sup>-7</sup> to 10<sup>-1</sup> mg/mL, compound **3** showed ALP activity of 142.9±65.5 to 200.0±24.7% at concentration of 10<sup>-8</sup> to 10<sup>-3</sup> mg/mL, compound **4** showed ALP activity of 128.6±42.9 to 257.1±42.9% at concentration of 10<sup>-8</sup> to 10<sup>-2</sup> mg/mL, and compound **5** showed ALP activity of 114.3±24.7 to 271.4±24.7% at concentration of 10<sup>-8</sup> to 10<sup>-2</sup> mg/mL.

**Key Words:** *Phellinus linteus*, phenolic compound, alkaline phosphatase (ALP), Saos-2

\*Corresponding author:

Tel: +82-31-201-2661 Fax: 82-31-201-2157 E-mail: nibaek@khu.ac.kr

Tel: +82-31-780-9221; Fax: 82-31-780-9226; E-mail: skihs@kfri.re.kr

**The antioxidant and free radical scavenging activities  
of *Phellinus linteus* extracts**

**Ji-Young Shin<sup>+</sup>, In-Ho Kim and Seok Joong Kim<sup>1</sup>**

Korea Food Research Institute, Dongduk Women's university<sup>1</sup>

**Abstract**

The antioxidative properties from water (PLW) and ethanol extract (PLE) of *Phellinus linteus* were observed. Generally PLE were showed effective activity than PLW on SOD activity, DPPH radical scavenging and ABTS anion scavenging. Flavonoid contents of PLE (341.02±62.63 ug/ml) were higher than PLW (7.89±11.25 ug/ml) at a concentration of 1000 ppm. And polyphenol contents of PLE (132.69±4.28 ug/ml) were also more 2-fold higher than PLW (49.59±12.64 ug/ml) at a concentration of 1000 ppm. SOD activity range was lowed from 12.65±3.05% to 17.86±7.43% in PLW. But, PLE were high from 32.92±9.13% to 81.91±6.73%, in a concentration dependent manner. PLW were shown to scavenge directly the stable DPPH radical over a concentration range of 100 ppm (16.22±1.22%) to 1000 ppm (80.18±2.43%). PLE were shown scavenging of DPPH radical from 46.99±12.52% to 79.57±7.01% at a concentration form 100 ppm to 1000 ppm. And PLE showed a linear increase on ABTS<sup>•+</sup> radical scavenging activity with increasing concentration, reaching 93.83 ± 3.49% scavenging activity at a concentration of 1000 ppm. On the other hand, PLE showed over all high from 93.47±2.42% to 94.66 ± 4.21% irrespective of concentration.

**Key words** : *Phellinus linteus*, polyphenol, flavonoid, SOD, DPPH, ABTS

**Corresponding author** : In-Ho Kim(skihs@kfri.re.kr), Korea Food Research Institute, San 46-1, Baekhyun-dong, Bundang-Ku, Songnam-si, Kyonggi-do Republic of Korea (zip) 463-746

Tel. : 031-780-9221

Fax. : 031-780-9226

**Effect of ethanol extract of *Phellinus linteus* on osteoblast-like cell proliferation and osteoclast inhibition**

**In-Ho Kim<sup>+1</sup>, Ji-Young Shin<sup>1</sup>, Daeseok Han<sup>1</sup> and Youg-Ju Choi<sup>2</sup>**

*Korea Food Research Institute<sup>1</sup>, Mush Guy<sup>2</sup>*

**Abstract**

Physiological function of ethanol extract of Korean *Phellinus linteus* was investigated on osteoblast proliferation and osteoclast inhibition of human like Saos-2 cell. Korea PL was great in MTT test, it has no cell cytotoxicity than Cambodia and China PL. But Cambodia and China PL was showed toxic effect at  $10^{-4}$  mg/ml concentration. Alkaline phosphatase activity as a marker of osteoblast cell proliferation was till 75% higher than that of control. Dose-response of ALP activity shows the activity increase as sample concentration increase till  $10^{-2}$  mg/ml. The extract inhibited differentiation of osteoclast cell precursor and multinucleate cell above 90% compared to control.

Keywords : *Phellinus linteus*, osteoclast, MTT, ALP, TRAP activity

**Corresponding author : In-Ho Kim(skihs@kfri.re.kr), Korea Food Research Institute, 516, Baekhyun-dong, Bundang-Ku, Songnam-si, Kyonggi-do Republic of Korea (zip) 463-746**

## Effect of Korean *Phellinus linteus* Extract on Osteoblast Cell Proliferation and Osteoclast Cell Inhibition

In Ho Kim\*, Nak Hee Chung, Dae Seok Han, Chang Ho Lee and Young Eon Kim  
Korea Food Research Institute



### Abstract

Physiological function of ethanol extract of Korean *Phellinus linteus* was investigated on osteoblast proliferation and osteoclast inhibition of human like Saos2 cell. The extract has no cell cytotoxicity in MTT test. Alkaline phosphatase activity as a marker of osteoblast cell proliferation was till 75% higher than that of control. Dose-response of ALP activity shows the activity increase as sample concentration increase till 10-2mg/ml. The extract inhibited differentiation of osteoclast cell precursor and multinucleate cell above 90% compared to control. The sample is stable on temperature variation and keep the high activity compared to control till 10 minutes of sample heating. The activity shows 20% higher than control at various pH. It suggest that activity of the mushroom supplement is able to stable on change of temperature and pH during processing or absorption in human body.

### Materials and Methods

- ◆ Samples : ethanol extract of Korean *Phellinus linteus*
- ◆ MTT assay on Saos-2 cell as a marker of osteoblast cell proliferation
- ◆ ALP activity on Saos-2 cell as a marker of osteoblast cell differentiation
- ◆ Inhibition rate osteoclast cell before or after precursor cell differentiation

### Results

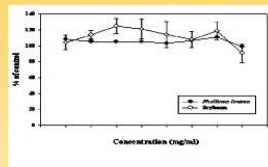


Fig 1. Dose-response of *Phellinus linteus* extracts on the cell proliferation of Saos-2, human-like osteoblast cells.

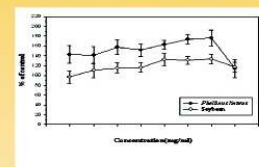


Fig 2. Dose-response of *Phellinus linteus* extracts on the Alkaline phosphatase activities of Saos-2, human-like osteoblast cells.

### 2. Alkaline phosphatase activity on the osteoblast-like cell at various heating or pH conditions.

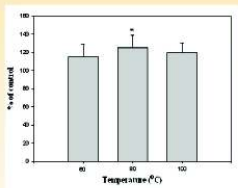


Fig 3. Alkaline phosphatase activities of *Phellinus linteus* extracts on various temperatures.

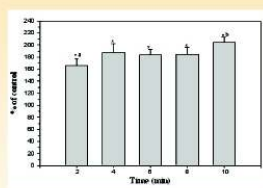


Fig 4. Alkaline phosphatase activities of *Phellinus linteus* extracts on various heating time.

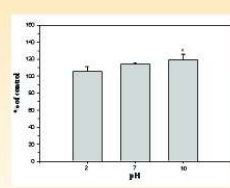


Fig 5. Alkaline phosphatase activities of *Phellinus linteus* extracts on various pH.

### 3. Characteristics of osteo-cell active metabolism.

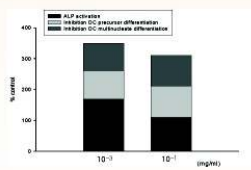


Fig 6. Osteo-activity characteristics of *Phellinus linteus* on the osteoblast and osteoclast cell.

### Conclusions

The Korean *Phellinus linteus* extract have no cytotoxicity on osteoblast cell and stimulate osteoblast cell proliferation. The extract also inhibit osteoclast precursor differentiation as well as multinucleate differentiation. The extract show osteoblast cell differentiation with high alkaline phosphatase activity on various heating or pH conditions. It suggested that the *Phellinus linteus* extracts keep potential activity during processing or digestion on the bone metabolism against osteoporosis.

### References

1. Roodman GD. Cell biology of the osteoclast. *Exp Hematol.* 1999;27(8):1229-41.
2. Janckila AJ, Li CY, Lam KW, Yam LT. The cytochemistry of tartrate-resistant acid phosphatase. Technical considerations. *Am J Clin Pathol.* 1978;70(1):45-55.
3. Hyeokjung Ha, Jinnyung Ho, Sunmi Shin, Hyejin Kim, Sungja Koo, Inho Kim, and Chungsook Kim. *Arch Pharm Res.* 2003;26(11):929-36.
4. Kwiok Oh, et al. Effect of *Rehmannia glutinosa* Libosch extracts on bone metabolism. *Clinica Chimica Acta.* 2003;334:185-95.

## Physicochemical properties of Korean *Phellinus linteus* Extract on Osteoblast Cell Proliferation

In Ho Kim<sup>1</sup>, Ji Young Shin<sup>1</sup>, Nam In Beak<sup>2</sup>, Dae Seok Han<sup>1</sup>, Chang Ho Lee<sup>1</sup>, Young Eon Kim<sup>1</sup> and Yong Ju Choi<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Korea Food Research Institute, <sup>2</sup>Kyung Hee University, <sup>3</sup>Mushguy



### Abstract

Physicochemical properties of ethanol extract of Korean *Phellinus linteus* was investigated on osteoblast proliferation. Proximate composition analysis was conducted on moisture, lipid, protein, ash and carbohydrate. Calcium, Phosphate, Magnesium and  $\beta$ -glucan was investigated as components related with bone mass formation. Phytoestrogen materials was isolated on flavonoid and phenolic contents. The physiologically function for bone cell proliferation was searched on human osteoblast-like cell (Saos-2). Alkaline phosphatase activity as a marker of osteoblast cell proliferation is till 75% higher than that of control. The extract was stable on various pH or temperature applying to osteoblast cell proliferation. The sample keep the high activity compared to control till 20% on heating or pH variation. It suggest that activity of the mushroom supplement is able to stable on change of temperature and pH during processing or absorption in human body.

### Materials and Methods

- ❖ Samples : ethanol extract of Korean *Phellinus linteus*
- ❖ Proximate composition analysis : proximate, minor components
- ❖ Phytoestrogen quantitative analysis : GC chromatograph of n-BuOH, EtOAc fraction
- ❖ Physicochemical stability on Saos-2 cell as a marker of osteoblast cell differentiation

### Results

#### ❖ Proximate composition analysis

##### - Proximate components

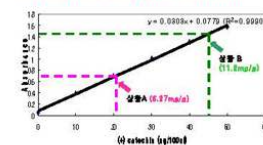
Energy (kcal)	198
Moisture (%)	9.6
Protein (g)	5.5
Fat (g)	0.2
Carbohydrate (g)	52.4
$\beta$ -glucan (%)	0.31

##### - Minor components

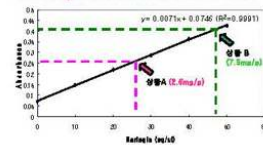
Ash (g)	1.0	Zinc (mg)	0.77
Calcium (mg)	35	Magnesium (mg)	135.9
Phosphorus (mg)	94	Thiamine (mg)	0.27
Iron (mg)	4.6	Riboflavin (mg)	2.68
Sodium (mg)	13	Niacin (mg)	5.2
Potassium (mg)	463	vitamin	-

#### ❖ Physiologically functional components

##### - Dose response of total phenolic contents

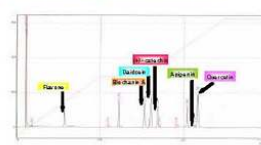


##### - Dose response of total flavonoid contents

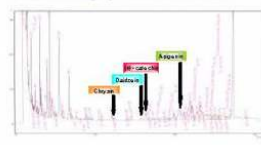


#### ❖ Phytoestrogen quantitative analysis

##### - GC chromatograph of all flavonoids

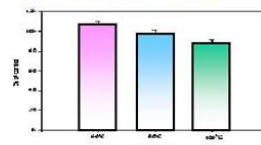


##### - GC chromatograph of EtOAc fraction

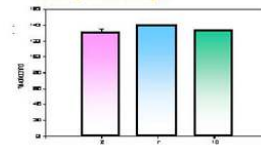


#### ❖ Physicochemical stability on osteoblast cell

##### - Stability on various temperature



##### - Stability on various pH



### Conclusions

Physicochemical properties of ethanol extract of Korean *Phellinus linteus* was investigated on osteoblast proliferation. Proximate composition was moisture 9.6%, lipid 0.2g, protein 5.5g, ash 1g and carbohydrate 52.4g. Calcium 35mg, phosphorus 94mg, magnesium 135.9mg and  $\beta$ -glucan 0.31% was investigated as components related with bone mass formation. Phytoestrogen materials was isolated on flavonoid and phenolic contents. GC chromatograph of EtOAc fraction was shown chrysin, daidzein, (+)-catechin and apigenin. The physiologically function for bone cell proliferation was searched on human osteoblast-like cell (Saos-2). Alkaline phosphatase activity as a marker of osteoblast cell proliferation is till 75% higher than that of control. The extract was stable on various pH or temperature applying to osteoblast cell proliferation. The sample keep the high activity compared to control till 20% on pH variation. It suggest that activity of the mushroom supplement is able to stable on change of temperature and pH during processing or absorption in human body. And *Phellinus linteus* extracts keep potential activity during processing or digestion on the bone metabolism against osteoporosis.

### References

1. Janckila AJ, Li CY, Lam KW, Yam LT. The cytochemistry of tartrate-resistant acid phosphatase. Technical considerations. Am J Clin Pathol. 1978;70(1):45-55
2. Christel Picherit et al. Soybean isoflavones dose-dependently reduce bone turnover but do not reverse established osteoporosis in adult ovariectomized rats. J. Nutr. 131; 723-728 (2001)
3. Christenson RH. Biochemical markers of bone metabolism : An overview, Clinical Biochemistry. 30(8); 573-593 (1997)

## Effect of Korean *Phellinus linteus* extract to ovariectomized rat on serum factor

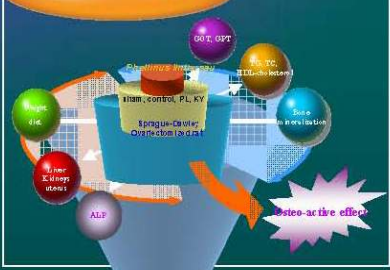
In Ho Kim<sup>1</sup>, Ji Young Shin<sup>1</sup>, Daeseok Han<sup>1</sup> and Yong Ju Choi<sup>2</sup>  
Korea Food Research Institute<sup>1</sup>, Mush

City<sup>2</sup>

### Abstract

Effect of Korean *Phellinus linteus* extract to ovariectomized rat was investigated on the serum factor. Weight gain of ovariectomized rats was higher than sham group from hormone variation to accumulation of lipid. In organ weigh, liver weigh was highest on control group with high lipid content but weigh of ovary and kidney was higher than ovariectomized group. Value of sample extract was not significant to that of control at ALT (alanine amino transferase, GPT), AST (aspartic amino transferase, GOT) of liver factor, indicating nontoxic material of samples. Total cholesterol contents was lower in sham group with metabolic activation of sex hormone. Alkaline phosphate was activated about 30% by treatment of extract. Sample group of calcium/phosphate ratio in blood serum was higher than control group suggesting bone matrix forming effect of the sample. Then, bone mineralization effect of Korean *Phellinus linteus* extract will be conducted to tibia and femur from sacrifice of experimental animal and analyzed osteo-active effect against osteoporosis of the sample extract.

### Materials and Methods



### Results

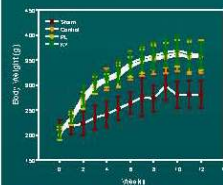


Fig 1. Effect of PL on the body weight gain of rats fed osteo-active product for 12 weeks

Table 1. Body weight change, food intake and food efficiency ratio of rats fed osteo-active product for 12 weeks

	sham	control	PL	KY
<b>Body weight (g)</b>				
Initial	213.18±3.96	204.25±1.19	206.35±10.24	206.79±3.02
Final	281.61±7.57*	357.54±32.55*	359.48±39.48*	359.96±26.04*
Wt gain	68.33±24.27*	151.72±24.87*	155.91±27.97*	156.74±18.25*
<b>Food intake</b>				
Total (g rat)	2228.39±59.74	3155.07±43.74	3489.19±48.0	3269.59±58.4
Weekly (g/kg rat)	244.67±4.0	282.92±3.65	291.66±4.01	286.60±4.27
FER	2.54±0.49*	4.81±0.79*	4.46±0.88*	4.65±0.54*

\* P < 0.05 vs Sham. Data are mean ± SEM. n = 10.

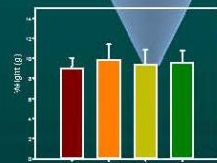


Fig 2. Liver weights of rats fed osteo-active product for 12 weeks

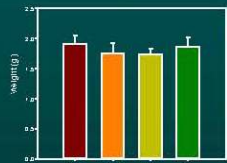


Fig 3. Kidney weights of rats fed osteo-active product for 12 weeks

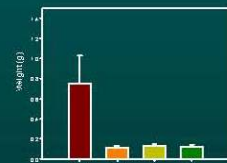


Fig 4. Uterus weights of rats fed osteo-active product for 12 weeks

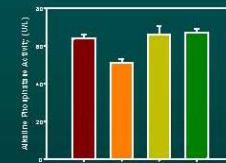


Fig 5. The changes of alkaline phosphatase activity of rats fed osteo-active product for 12 weeks

Table 2. GOT and GPT activities of rats fed osteo-active product for 12 weeks

	sham	control	PL	KY
GOT	85.40±17.58*	117.73±46.13*	120.40±45.88*	120.00±55.389*
GPT	33.30±9.39	31.55±10.79	33.70±7.41	34.50±10.70

Table 3. The changes of blood lipid parameters of rats fed osteo-active product for 12 weeks

	sham	control	PL	KY
Triglyceride	94.20±12.99	104.03±24.40	74.50±26.54	73.80±26.62
Total cholesterol	84.90±18.00*	165.64±18.02*	97.00±13.21*	100.00±11.90*
HDL-cholesterol	26.30±4.16*	31.73±3.93*	29.40±4.45*	30.40±2.64*

### Conclusions

Weight gain of ovariectomized rats was higher than sham group from hormone variation to accumulation of lipid. In organ weigh, liver weigh was highest on control group (9.88±1.52) with high lipid content but weigh of ovary and kidney was higher than ovariectomized group. Value of sample extract was not significant to that of control at alanine amino transferase, aspartic amino transferase of liver factor, indicating nontoxic material of samples. Total cholesterol contents was lower in sham group with metabolic activation of sex hormone. Alkaline phosphate was activated about 30% by treatment of extract. Sample group (1.84±0.12-1.87±0.29) of calcium/phosphate ratio in blood serum was higher than control group (1.77±0.16) suggesting bone matrix forming effect of the sample. Then, bone mineralization effect of Korean *Phellinus linteus* extract will be conducted to tibia and femur from sacrifice of experimental animal and analyzed osteo-active effect against osteoporosis of the sample extract.

### References

- Shin MK, Han SH. Effects of Lotus (*Nelumbo nucifera gaertner*) leaf powder on lipid concentration in rats fed high fat diet rats. *Korean J. Food Culture*. 21(2): 202-208 (2006)
- Lee, J. W., Baek, S. J., Bang, K. W., Kang, S. W., Kang, S. M., Kim, B.V. and Ha, I. S. Biological activity of polysaccharide extracted from the fruit body and cultured mycelia of *Phellinus linteus* LY001. *Kor. J. Food Sci. Technol.* 32(3), 726-735 (2000)
- M. Mulherjee, A.S. Das, S. Mitra, and C. Mitra. Prevention of bone loss by oil extract of *Gallium sativum* Linn.) in an ovariectomized rat model of osteoporosis. *Phytotherapy research*, 18:389-394 (2004)
- She Fang YE, I. Suga K Ichimura, T. Nagai, M. Shioda, S. Matsuzaki. Coumestrol as well as isoflavones in soybean extract prevent bone resorption in ovariectomized rats. *Endocrine Regulation*. 37:148-152 (2003)
- M. Arshad, S. Sengupta, S. Sharma, R. Ghosh, V. Sawhani, and M.M. Singh. In vitro anti-resorptive activity and prevent of ovariectomy-induced osteoporosis in female Sprague-Dawley rats by ormeloxifene, a selective estrogen receptor modulator. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 91:67-78 (2004)

P08-25

# Effect of Korean *Phellinus linteus* Extract to Ovariectomized Rat on Serum Factor and Bone Strength

In Ho Kim<sup>1</sup>, Ji Young Shin<sup>1</sup>, Daeseok Han<sup>1</sup>, Youngeon Kim<sup>1</sup> and Yong Ju Choi<sup>2</sup>  
 Korea Food Research Institute<sup>1</sup>, Mush Guy<sup>2</sup>

## Abstract

Effect of Korean *Phellinus linteus* extract to ovariectomized rat was investigated on the serum, urine and tissue factor. Alkaline phosphate(ALP) of serum factor was activated about 30% by treatment of extract and osteocalcin was higher in the treated samples. Value of sample extract was not significant to that of control at creatinine, deoxyuridine(DPD) of urine factor but DPD was reduced in 12 week than 6 week, indicating inhibition of bone absorption. Bone mineral density(BMD) of right femur bone after 12 week administration since ovariectomy surgery was lowest in control. Trabeculae in epiphysis and metaphysis of control group was reduced but frequency of osteoclast was increased than sham and sample group. And fatty acid accumulation of sham was normal, sample treatments reduced, but control was considerably increased. Isolation and identification of mineralization effect materials of Korean *Phellinus linteus* extract will be conducted from the sample extract.

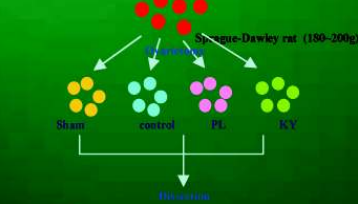
## Objectives

The objective of this study evaluated effect of Korean *Phellinus linteus* extract to ovariectomized rat on serum factor and bone strength.

## Materials & Methods

- ◆ Materials
  - Korean *Phellinus linteus* (Mushguy, JinJu, Korea)
  - rat : female rat (Sprague-Dawley)
  - group : sham, control, PL, KY

### ◆ Methods



- ◆ Serum analysis
  - ALP (alkaline phosphate)
  - Osteocalcin : competitive method
- ◆ Urine analysis
  - Creatinine : Jaffe method
  - DPD (Deoxyuridine)
- ◆ Femur and Tibia bone
  - Bone mineral density
  - Bone mineral density : DXA
  - Histopathology : (Hematoxylin & Eosin)

## Results and discussion

### 1. Serum analysis

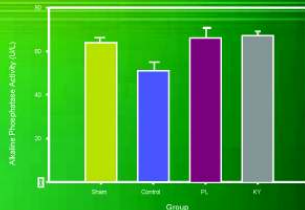


Fig. 1. The changes of alkaline phosphatase activity of rats fed osteo-active product for 12 weeks

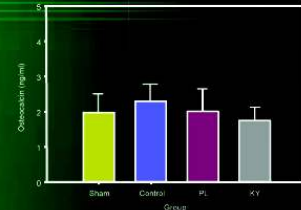


Fig. 2. The changes of osteocalcin contents of rats fed osteo-active product for 12 weeks

### 2. Urine analysis

Fig. 3. Creatinine contents of urine in experimental groups

	Creatinine(mg/dL)	
	6wk	12wk
sham	78.97±9.75 <sup>ab</sup>	69.03±26.62 <sup>ab</sup>
control	56.50±16.61	62.00±5.07
PL	78.10±23.60	72.87±40.84
KY	70.90±21.39	59.87±11.05

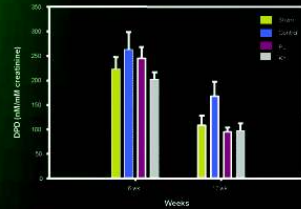


Fig. 3. Deoxyuridine of urine in experimental groups

### 3. Bone analysis

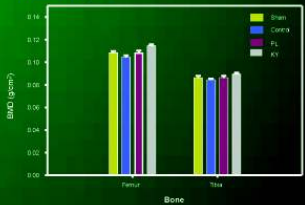


Fig. 4. Bone mineral density of right femur bone after 12 week administration since ovariectomy surgery

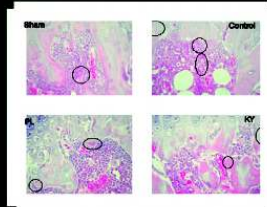


Fig. 5. Morphology in the femur by histopathological findings (Fatty acid accumulation)

## Conclusion

We have evaluated the effect of Korean *Phellinus linteus* extract to ovariectomized rat on serum factor and bone strength. The value of sample extract was not significant to that of control at creatinine, DPD of urine factor but DPD was reduced in 12 week than 6 week, indicating inhibition of bone absorption. Bone mineral density(BMD) of right femur bone after 12 week administration since ovariectomy surgery was lowest in control. Trabeculae in epiphysis and metaphysis of control group was reduced but frequency of osteoclast was increased than sham and sample group. And fatty acid accumulation of sham was normal, sample treatments reduced, but control was considerably increased. Isolation and identification of mineralization effect materials of Korean *Phellinus linteus* extract will be conducted from the sample extract.

## Reference

## 제 5 장 연구개발결과의 활용계획

### 1. 기술적 측면

- 골관계 질환에 효과적인 한국형 특용작물의 발굴 및 이용
- 상황버섯의 뼈강화 활성 표준 검색법 및 세포계 안전성 평가법 확립
- 상황버섯 뼈기질 강화활성의 과학적 구명 및 안전성 평가 시스템 구축
- 상황버섯 뼈강화 활성성분의 효율적 분리기술 개발
- 상황버섯 뼈강화 단일성분의 동정 및 특성구명
- 상황버섯 뼈강화 성분의 추출 및 소재화 기술 개발
- 상황 활성성분의 수용액내 나노 분산기술 개발
- 상황 활성성분의 유동층 코팅 및 나노체 제조기술 개발

### 2. 경제 · 산업적 측면

- 국산 상황버섯의 우수성 조사
- 상황버섯 다기능 활성 검증으로 원료의 가치 향상
- 상황 재배 농가에 과학적 검증결과 제공으로 수익성 향상 기대
- 상황버섯의 유효성분 추출기술로부터 뼈건강 소재 개발 및 활용
- 상황 뼈강화 성분의 용해도 향상으로부터 액상제품 가공기술 개발
- 섭취용 및 가공소재용 상황버섯 고상 소재개발로 부터 제품 다양화
- 성인의 골관계 보건 향상으로 개인 복지 및 국민 생산성 증진
- 국내 5,000억, 국외 300억불에 이르는 골강화 예방 및 치료 시장에 참여

### 3. 활용방안

- 국산 상황버섯의 건강 다기능 활성 및 우수성 홍보
- 뼈기질을 강화하는 새로운 특용작물의 제시 및 보호
- 용해도 향상 액상 소재화 및 섭취, 가공용 고상소재의 응용기술 개발
- 새로운 개념의 과학화된 상황 뼈기질 강화 제품 다양화
- 학술적 가치 보완 및 국내외 학술발표
- 상황버섯의 뼈강화 활성 및 응용기술의 권리 확보 및 영농단체, 산업계 기술지원 및 이전
- 상황 뼈강화 제품의 시장참여 및 수입대체 지원
- 노인 복지를 위한 골관계 질환 예방 및 기질 강화 사업지원



## 제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

호주 국제식품전시회 참관하여 골관련 제품현황을 조사하고 소재개발의 방향에 참고하였다. 전시회의 규모와 개요는 다음과 같았다.

### (가) 전시회 개요

개최기간 : 2005. 9. 12 - 2005. 9. 16

개최장소 : Sydney Convention & Exhibition Centre

주 관 : Australin Exhibit Service

후 원 : Endorsed by the Australasian Association of Convenience,  
Overseas program supported by Australian Trade Commission,  
Supported by the Australian Foodservice Manufacturers  
Association, Recognised by the Union des Foires Internationales

참가국수 : 15개국 (호주, 미국, 네덜란드, 영국, 독일, 프랑스, 중국, 홍콩, 타이완,  
타일랜드 등)

참가업체수 : 약 780 업체 (개최국 500업체 포함)

참관인원 : 총 6만5천명 (30,052 Buyer)

전시장 구성 : 23,500m<sup>2</sup> 전시장에 분과구역 구성

전시분과 : ■Bakery products,  
■Beverages and Restaurant,  
■Hotel & Catering  
■Biscuits, Snacks and confectionery,  
■Dairy product  
■Canned, Frozen & Convenience Food,  
■Sauces & Seasonings,  
■Coffee and facilities  
■Taiwan, Thailand, Section  
■Korea Section

(나) 전시품목 및 특징

● 금번 호주식품전시회는 “Fine Food Australia”, “Hotel Australia”의 두가지 주제로 개최되었음. 호주에서 식품 및 호텔 전시회는 가장 큰 “Event” 중의 하나일 만큼 해당산업은 주력 산업임. 유가공, 제과, 제빵, 음료, 스낵, 커피, 통조림, 육·수산 가공식품, 소스 및 향신료 등 식품 전분야에 걸쳐 광범위하게 전시되었음. 협회차원의 참여가 있었으며 호주, 뉴질랜드, 스페인의 협회가 품목소개를 하였음. 특히 대만은 제과, 음료, 차, 수산물 등 8개 협의회 또는 조합이 참여하였으며 한국은 수산무역협회가 참여하였음. 호텔 관련 설비, catering, 집기외에 Bar code, 홍보대행사 및 컨설팅 업체도 참여 하여 식품종합 전시회의 면모를 선보였음. 풍부한 원료와 자국주최를 바탕으로 호주 회사의 가공품이 주류를 이루었으나 참가국의 구획전시도 함께 이루어 졌음.

● 호주의 생산품은 목축, 해양을 주로한 원료중심의 품목과 가공품으로서 유가공, 육류 및 가공, 수산자원 및 가공품이 주를 이루었음. 기타 국가의 가공품은 각 국가의 특성에 부합하는 가공품을 선보였으며 국산가공품은 스낵, 토산가공품의 전시가 적었으나 제품다양화, 용기, 포장, 디자인 등에서 연구 발전이 지속될 경우 제품 경쟁력은 유지할 것으로 판단함.

● 전시회의 개념이 제품의 홍보, 기술성 제시와 함께 계약상담도 활발한 것을 볼수 있었음. 소비자와 함께하는 대중화된 전시의 의미도 있었으며 시음, 시식 행사가 여타 전시보다 풍부하였음. 편의용식품, 호주고유 파이 경연, 요리경연, 수산물 위생 세미나 등 부대행사도 개최되었음.

● 아시아 식품의 참여가 적극적이었으며 전시품목 및 참가기업은 다음과 같음. 아시아 국가의 회사 뿐만 아니라 호주회사도 다수 참여하였으며 아시아 식품의 건강적 효용성과 아시아 인구의 유입 증가를 나타내는 것으로 판단하였음. 아시아 국가 중에는 태국 및 중국관의 규모와 적극성이 주목할만 했으며 국가별 전시현황은 아래와 같음.

<태 국>

A-1 Produce Co Ltd (태국, 알로베라, 타마르 등 허브류)

Alpine Foods Co Ltd (태국, 산소흡수 포장재 등)

C & A Products Co Ltd (태국, 파인애플 등 과일통조림)

Chatchawal Orchid Co Ltd (태국, 오클라, 아스파라거스, 옥수수, 망고스틴 등 과일, 야채, 화훼류 및 GMP & HACCP standard 등 food safety 제품)

Excellent United International Co Ltd (태국, Rich flower 등 자생 야채, 과일)

Homhual Foods Industry Co.,Ltd. (태국, Dipping sauce, Chilli sauce, Seasoning Sauces)

Kijbanlue Multi-Food Co Ltd (태국, Green Curry, Rice & Curry, TomYum, dessert, 향신료)

Phiboonchai Maephanom Thai Chili Paste Co Ltd (태국, 칠리, 커리 소스)

Thai Fishsauce Factory (Squid Brand) Co.,Ltd. (태국, HACCP의거 생산 오징어 가공품, 소스, 향신료)

Thai Ha Public Company Limited (태국, GMP, HACCP 생산품, Thai Jasmine Rice, Bean vermicelli 등)

V.Thai Food Product Co Ltd (태국, seasoning, condiment, canned soup, 즉석 Thai food and dessert, GMP, HACCP 제품)

Vara Food & Drink Co Ltd (태국, coconut juice, coconut milk and cream, tropical drink, fruit and vegetables, HACCP 제품)

<대 만>

Taiwan Aquaculture Development Association (대만, 수산양식 등 기술, 정책기관)

Fortune Life Enterprise Co Ltd (대만, 수산가공품, ISO, HACCP 제품)

I-Mei Foods Co Ltd (호주-대만, 비스킷, 제과, 캔디, 스낵, 쌀과자, 음료, 냉동식품 등)

Importea Corporation Pty Ltd (호주-대만, 차류)

Royal Family Food Co Ltd (대만, 쌀과자(Millet Mochi), 초코파이, plum jelly, cake, egg rolls, monaka and marshmallow 등)

San Shu Gong Food Co Ltd (대만, 쌀과자, 비스킷, 젤리, CHOCOLATE PIE,

PINEAPPLE CAKE, MARSHMALLOW 등)

Shin Ho Sing Ocean Enterprise Co Ltd (대만, squid tube, squid steak, squid ring, shrimp ball, fish ball, imitation abalone, seasoned flying fish roe and seasoned capelin roe 등 오징어와 수산가공품)

Triko Foods Co Ltd (대만, fruit jelly, cup jelly, yogurt jelly, biscuits, cookies, wafer, nuts and seeds)

<인도네시아>

Leo Agung Raya PT (인도네시아, 토착식물 음료, Black Tea and Green Tea, Juice, Tomato Ketchup, Chili Sauce, Soya Sauce, Sweet&Salty Syrup)

PT. PARAMARTHA DHARMAGUNA (인도네시아, 프로단, 프로크런치 등 인도네시아 과일, 허브 이용 냉동건조향)

<호주, 중국, 싱가포르>

Fabi Foods Pty Limited (호주-일본, 일본소켄 제품 유통, 녹차 등 허브류, 홍화오일, 저칼로리 채식용 제품, 식이섬유, 연한 향신료 등)

Joseph Lee & Co Pty Ltd (호주-일본, 스시 제조 기계)

Kikkoman Australia Pty Ltd (호주-일본, 기꼬망 간장 등 가공품)

Food on the Move (호주, 유가공, 중동차 등 원료가공품)

Genesis Fine Foods Pty Ltd (호주, 일본식 감미 견과, 제과 등 가공품)

Hakka Pty Ltd (호주, Fish ball, Dim sim & Dumplings)

Lamyong Australia Pty Ltd (호주, 아시아 소스, 향신료, 채식용 제품 등)

Pacific Food Industries Pty Ltd (호주, 소스, 향신료)

Pacific West Foods (호주, 어묵, 생선포장품)

QLD State Development, Innovation and Trade (호주, 육, 수산가공품, 소스류)

The Spirit House Restaurant & Cooking School (호주, Asian inspired frozen meals, pastes, condiments, HACCP 제품)

Unilever Foods (호주, 파스타용 아시안 소스)

Waji Pty Ltd (호주, 인공 flavourings, colourings, preservatives)

Asian Foods Australia (호주, 아시안 칠리, 허브, 호주산 마카다미아스)  
 Colonial Farm (호주, 미트볼, 야채 spring roll)  
 Crazy Dragon Gourmet Dumplings (호주, chicken dim sim, dumpling, 향신료, 천연  
 첨가물)  
 Ettason Pty Ltd (호주, 장류, 소스류, 제과 등 수입, 유통대행)  
 Sabi Foods International (호주, Chutney's, MILLER Pure Ghee & FRUIZY Mango  
 & Guava juice, Spices, Curry Powders and Flours 등 인도식품)  
 Sichuan Baijia Food Co Ltd (중국, Sweet Potato Noodles and Seasonings 등  
 HACCP 관리제품)  
 Jiangsu Daysun Foods Co Ltd (중국, 견과류, 쌀과자 등)  
 Win-Ray Trading (싱가포르, Soluble Coffee, Non Dairy Creamer, fruit beverages,  
 즉석식품)

● 한국관의 식품회사 및 전시제품은 김치, 고추장, 김, 굴비, 덮밥류가 있었으며  
 대기업 및 품목다양화는 시도되지 않았음. 중소기업의 품목다양화와 경쟁가공품의 계  
 약협약이 이루어지길 기대함. 대한민국의 품목 및 참가업체는 다음과 같음.

AFMC (농수산물유통공사, 김치, 고추장 등지역농산물)  
 Green Catering Co Ltd (김치)  
 Oh Sung Foods Company (김 등 해조류)  
 Our Food Story (불고기, 치즈, 짜장, 카레, 오징어 등 덮밥류)  
 Sunil Products Co Ltd (김 및 해조류)  
 Wooseong Co., Ltd (해조류, 해조스낵 등 가공품)  
 Yu Myung Fisheries (고추장 굴비 등 굴비 가공품)

(다) 건강기능성 식품

● 정제, 캡슐 등 건강식품 제형보다는 일반식품의 전시와 무역의 성격이 강하였  
 음. 그러나 각 일반식품의 제조시 건강의 개념 및 기능부여에 주력하였음. 태국, 호주  
 기업에서는 제품중 유용성분, 식이섬유, 지방제거, 콜레스테롤 저하 등을 홍보하며 건  
 강기능성을 강조하였음. 또한 농·수산물, 육·유가공 중심으로 HMP, HACCP 등 관

리제품을 강조하여 원료중 건강성분과 위생을 중심으로 건강의 개념을 도입하였음.

● 버섯 제품은 전시회에서 Huon Valley Mushrooms(호주, 호주남부 지역 생산, 시다케, 시네지 종 버섯)이 유일하였음. 버섯은 전시회 뿐만아니라 시장에서도 송이 단순가공품 정도외에는 인식과 상용화가 활발하지 않아 추후 국내기업의 시장개척 가능성이 있음.

● 골관련 제품은 유제품, 소스중 홍화유 함유 정도이나 골관계를 홍보하거나 연관 짓는 제품은 없었음.

## 7. 건강기능관련 시장조사

(가) 건강기능성 제품은 식품보다는 의약으로 분류하는 경향이 있었으며 Pharmacy, 건강식품점, Chemist 등의 형태에서 취급하였음. Pharmacy는 잡화를 겸하여 전문 약제 취급점과는 차이가 있었으며, 우리가 범용적으로 접하는 기능성식품은 기념품점에서 취급하기도 하였음. 약제, 기능성식품을 전문으로 하는 매장은 Chemist에서 취급하는 경향이었음. 환경(햇빛 차단) 방어용 제제가 보편적이었으며 식품으로의 개발 가능성도 유효할 것으로 판단함. 목축, 해양국가이므로 이와 관련한 제품으로서 양의 성분 (Nanoline), Shark product (Cartilage, Squalene), 패류 유용성분 등을 소재로 활용한 경우가 있었음.

(나) 호주 역시 건강관련 최우선 과제는 비만문제로 고려함. 이와 관련하여 파생되는 골관계 질환 역시 관심분야로 대두될 것으로 판단함. 골관련 제품은 칼슘 배합제 (Harron사), 관절제제로 Osteoeze (Glucosamine, Chondroitin, Harron사), 지역특산의 관절연질 Lyprinol (Green mussel oil, Blackmore), 대중적인 소재들이며 차별성은 없음. 연구를 바탕으로한 식물군의 골강화 제품은 없으며 특히 버섯류 건강식품은 거의 없음. 단순 가공품으로 버터-송이 (Edgel사, Homebrand사) 가공품이 있을뿐 건강 연계의 특용 버섯류는 연구되지 않고 있으므로 건강 및 골관계 소재로서 새로운 시도와 제안은 의의가 있다고 판단함.

(다) Sunrise, Evergren, Careline 등의 회사외에 호주 건강식품전문회사로는 Blackmore사가 있으며 Pharmacy, Chemist 등에 전문매장을 구축함. 건강기능 제품대상의 질병군으로는 Allergy control, Antioxidant, Bone&Joint, Circulation&Heart, Cold&Fu, Energy&Nutrition, Digestion, Eyes&Ears, Hair&Nails, Infection,

Memory&Concentration, Mouth&Throat, Muscles, Tendons&Nerves, Pain, Pregnancy, Sexual health, Skin, Urinary, Weight management 등에 이르기 까지 광범위 함.

(라) 기타 대중적인 건강 제품군으로서 제품 및 효능부위, 제조회사는 다음과 같음.

Sheep placenta (Skin, anti-aging, Sunrise, New-biotech)

Grape seed (Antioxidant, Careline)

Biomarine collagen (Bone joint, Careline)

Bio-Kangaroo (Muscle, Hormone, Evergreen)

Ginkomax (Blood, Youngnaturalcare)

Salmon W-3 (Cholesterol, Careline)

Squalene (Anti-cancer, Queen's noice)

Cod liver oil (cholesterol, Careline)

DHA (Brain, Evergreen)

Shark cartilage (Bone Joint, Energreen)

Royal gelly (Anti-cancer, antibiotics, skin, Gold haven)

(마) 건강기능식품과 건강관심도는 상당히 선호도 높아보임. 그러나 법규, 활성표시 등이 마련되어 있지 않으며 PL 형식의 소비자 문제제기시 생산자 책임방식에 의존함. 현재 인구로인한 시장규모가 적은 점은 있으나 소비위한 소득 수준과 여력은 잠재성 있음. 따라서 국산 개별인정형 등 과학적 근거와 위생시설 생산제품의 시장 참여시 경쟁력이 있으며 버섯 등 골관련 소재의 과학적검증과 제품 개발시 해외 활용도를 제고할수 있다고 판단함.

## 8. 수집자료

(가) 식품박람회 전시편람

(나) 제품 catalogue 및 제조업체 연락처

## 제 7 장 참고 문헌

1. Bowles SA, Kurdy N, Davis AM, France MW, and Marsh DR. Serum osteocalcin, total and bone-specific alkaline phosphatase following isolated tibial shaft fracture. *Ann Clin Biochem.* 33;196-200 (1996).
2. Christenson RH. Biochemical markers of bone metabolism : An overview, *Clinical Biochemistry.* 30(8);573-593 (1997)
3. Christel Picherit et al. Soybean isoflavones dose-dependently reduce bone turnover but do not reverse established osteopenia in adult ovariectomized rats. *J. Nutr.* 131;723-728 (2001).
4. Duda RJ, OBren JF, and Katzmann JA. Concurrent assays of circulating bone-gla protein and alkaline phosphatase: Effect of sex, age, and metabolic bone disease. *J Clin Endocrinol metab.* 66;951-957 (1988).
5. Han YK, Park WK, Choi EH, Shin HH, and Kim SW. A study on hormonal changes and bone densities in Korean menopausal women. *J Korean Soc Endocrinol.* 4;21-26 (1989).
6. Jeong HK, Kim JY, Lee HS, The effect of dietary calcium and phosphate levels in calcium and bone metabolism in rats. *The Korean Nutrition Society.* 30(7);813-824 (1997).
7. Kim KH, Choi MJ, and Lee IK. The effect of dietary calcium level on bone mineral density and bone mineral content in ovariectomized female rats. *Korean J Nutrition.* 29(6);590-596 (1996).
8. Kin WW, Lee KS, and Lee SH. An immunohistochemical study on alkaline phosphatase activity in osteoblasts cultured with isoflavone. *The Korean Society of Menopause.* 8(1);3-10 (2002).
9. Kyoko Teramura, Shinji Fukushima, Kazutoshi Nozaki, Satoshi Kokubo, Koichiro Takahi. Comparison of incadronate and alfacalcidol on increased bone turnover caused by ovariectomy in rats. *European Journal of Pharmacology* 449;191-196



- (2002).
10. M. Arshad, S. Sengupta, S. Sharma, R. Ghosh, V. Sawlani, and M.M. Singh. In vitro anti-resorptive activity and prevent of ovariectomy-induced osteoporosis in female Sprague-Dawley rats by ormeloxifene, a selective estrogen receptor modulator. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. 91;67-78 (2004).
  11. M. Mukherjee, A.S. Das, S. Mitra, and C. Mitra. Prevention of bone loss by oil extract of Galic(*Allium sativum* Linn.) in an ovariectomized rat model of osteoporosis. *Phytotherapy research*. 18;389-394 (2004).
  12. She Fang YE, I. Saga, K Ichmura, T Nagai, M Shnoda, S Matsuzaki. Coumestrol as well as isoflavones in soybean extract prevent bone resorption in ovariectomized rats. *Endocrine Regulation*. 37;145-152 (2003).
  13. Watson RC, Grossman H, Meyers MA. Radiologic findings in nutritional disturbances, In : Shil ME, Olson JA, Shike M, Modern nutrition on health and disease. 8th ed. Philadelphia : Lea and Feber. 861-908 (1994)
  14. Xinxiang Wang, Jian Wu, Hiroshige Chiba, Keizo Umegaki, Kazuhiko Yamada, and Yoshiko Ishim. Puerariae radix prevents bone loss in ovariectomized mice. *J Bone Miner Meteb*. 21;268-675 (2003).
  15. Shin MK, Han SH. Effects of Lotus(*Nelumbo nucifera gaertner*) leaf powder on lipid concentration in rats fed high fat dist rats. *Korean J. Food Culture*. 21(2): 202-208, 2006
  16. Lee JW, Kim HJ, Jhee OH, Won HD, Yu YJ, Lee MH, Kim TW, Om AS, Kang JS. Effects of alternative medicine extract on bone mineral density, bone strength and biochemical markers of bone metabolism in ovariectomized rats. *Korean J. Food & Nutr*. 18(1): 72-80 (2005)
  17. Kim KY, Kim SB, Lim JW. Effects of Safflower seed yoghurt on the osteoporosis in ovariectomized rat. *Korean J. Anim. Sci. & Technol*. 46(1): 69-76 (2004)
  18. Choi MJ, Yu TS. Effects of red-yeast supplementation on bone mineral

- densoty and bone mineral content in overiectomized rats. Korean J. Nutr. 37(6): 423–430 (2004)
19. Choi MJ, Yu TS. Effects of soybean protein on bone mineral density and bone mineral content in ovariectomized rat. Korean J. Nutr. 38(4): 279–288 (2005)
  20. Li, S. In *Pents'ao kangmu*. Euiseongdang press, China, pp. 1714–1715 (1993)
  21. Choi, J. H., Ha, T. M., Kim, Y. H. and Rho, Y. D. Studies on the main factors affecting the mycelial growth of *Phellinus linteus*. *Kor. J. Mycil.* 24, 214–222 (1996)
  22. Han, S. B., Lee, C. W., Jeon, Y. J., Hong, N. D., Yoo, I. D., Yang, K. H. and Kim, H. M. The inhibitory effect of polysaccharides isolated from *Phellinus linteus* on tumor growth and metastasis. *Immuopharmacol.* 41, 157–164 (1999)
  23. Ikekawa, T., Nakanishi, M., Uehara, N., Chihara, G. and Fukuoka, F. (1968) Antitumor action of some basidiomycetes, especially *Phellinus linteus*. *Gann* 69, 155–157.
  24. Ji, J. H., Kim, M. N., Chung, C. K., and Ham, S. S. (2000) Antimutagenic and cytotoxicity effects of *Phellinus linteus* extracts. *J. Kor. Soc. Food. Sci. Nutr.* 29, 322–328.
  25. Song, K. S., Cho, S. M. and Lee, J. H. B-lymphocytestimulating polysaccharide from mushroom *Phellinus linteus*. *Chem. Pham. Bull.* 43, 2105–2108 (1995)
  26. Lee, J. W., Baek, S. J., Bang, K. W., Kang, S. W., Kang, S. M., Kim, B.Y. and Ha, I. S. Biological activity of polysaccharide extracted from the fruit body and cultured mycelia of *Phellinus linteus* IY001. *Kor. J. Food SCI. Technol.* 32(3), 726–735 (2000)
  27. Yamamae, S. Medical treatment and new drug. 25, 2357 (1988)
  28. Kaneyoshi, A. In *Hwahanyaku*, Isikoyaku press, Tokyo. Japan, p694.
  29. Shirane, N., Takenaka, I., Ueda, K., Hashimoto, Y., Katoh, K. and Ishii, H. (1996) Sterol analysis of DMI-resistant and -sensitive strains of *Venturia inaequalis*. *Phytochem.* 41(5), 1301–1308 (1974)
  30. Im, K. S., Nam, K. I., Sim, C. J. and Jung, J. H. Sterol peroxide derivatives

- from the marine sponge *Spirastrella abata*. *Kor. J. Pharmacogn.* 31(4), 401–406 (2000)
31. Bok, J. W., Lermer, L., Chilton, J., Klingeman, H. G. and Neil Towers, G. H. Antitumor sterols from the mycelia of *Cordyceps sinensis*. *Phytochem.* 51, 891–898 (1999)
  32. Kawagishi, H., Katsumi, R., Mizuno, T., Hagiwara, T. and Nakamura, T. Cytotoxic steroids from the mushroom *Agaricus blazei*. *Phytochem.* 27(9), 2777–2779 (1998)
  33. Sgarbi, D. B., da Silva, A. J., Carlos, I. Z., Silva, C. L., Angluster, J. and Alviano, C. S. Isolation of ergosterol peroxide and its reversion to ergosterol in the pathogenic fungus *Sporothrix schenckii*. *Mycopathologia*, 139(1), 9–14 (1997)
  34. Kim, D. S., Baek, N I., Oh, S. R., Jung, K. Y., Lee, I. S., Kim, J. H. and Lee, H. K. Anticomplementary activity of ergosterol peroxide from *Naematoloma fasciculare* and reassignment of NMR data. *Arch. Pharm. Res.* 20(3), 201–5 (1997)
  35. Li, G. Y., Wang, J. H. and Li, X. Sterols from the pericarp of *Sphaerophysa salsula* DC. *J. Nat. Prod.* 7(2), 165–169 (2005)
  36. Piovano, M., Guzman, G., Garbarino, J. A. and Chamy, M.C. The chemistry of *Bacidia stipata* (Lichens, Ascomycotina). *Biochem. System. Ecol.*, 27(6), 663–664 (1997)
  37. Greca, M. D., Mangoni, L., Molinaro, A., Monaco, P. and Previtera, L. (20S)-4  $\alpha$ -methyl-24-methylenecholest-7-en-3 $\beta$ -ol, an allelopathic strol from *Typha latifolia*. *Phytochem.* 29(6), 1797–1798 (1990)
  38. Yoshikawa, K., Ikuta, M., Arihara, S., Matsumura, E. and Katayama, S. Two new steroidal derivatives from the fruit body of *Chlorophyllum molybdites*. *Chem. Pharm. Bull.* 49(8), 1030–1032 (2001)
  39. Kobori, M., Yoshida, M., Ohnishi-Kameyama, M., Takei, T. and Shinmoto, H. 5 $\alpha$ ,8 $\alpha$ -Epidioxy-22 $E$ -ergosta-6,9(11),22-trien-3 $\beta$ -ol from an Edible Mushroom

- Suppresses Growth of HL60 Leukemia and HT29 Colon Adenocarcinoma Cells, *Biol. Pharm. Bull.* 29(4), 755–759 (2006)
40. Fujimoto, H., Nakayama, M., Nakayama, Y. and Yamazaki, M. Isolation and characterization of immunosuppressive components of three mushrooms, *Pisolithus tinctorius*, *Microporus flabelliformis* and *Lenzites betulina*. *Chem. Pharm. Bull.* 42(3), 694–697 (1994)
  41. Lindequist, U., Lesnau, A., Teuscher, E. and Pilgrim, H. The antiviral action of ergosterol peroxide. *Pharmazie* 44(8), 579–580 (1989)
  42. Yasukawa, K., Akihisa, T., Kanno, H., Kaminaga, T., Izumida, M., Sakoh, T., Tamura, T. and Takido, M. Inhibitory effects of sterols isolated from *Chlorella vulgaris* on 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate-induced inflammation and tumor promotion in mouse skin. *Biol. Pharm. Bull.* 19(4), 573–576 (1996)
  43. Akihisa, T., Franzblau, S. G., Tokuda, H., Tagata, M., Ukiya, M., Matsuzawa, T., Metori, K., Kimura, Y., Suzuki, T. and Yasukawa, K. Antitubercular activity and inhibitory effect on Epstein–Barr virus activation of sterols and polyisoprenepolyols from an edible mushroom, *Hypsizigus marmoreus*, *Biol. Pharm. Bull.* 28(6), 1117–1119 (2005)
  44. Mansoor, T. A., Lee, Y. M., Hong, J., Lee, C. O., Im, K. S. and Jung J. H. 5,6:8,9–Diepoxy and other cytotoxic sterols from the marine sponge *Homaxinella* sp. *J. Nat. Prod.* 69, 131–134 (2006)
  45. Mo, S. Y., Wang, S. J., Zhou, G. X., Yang, Y. C., Li, Y., Chen, X. G. and Shi, J. G. Phelligrindins C–F: Cytotoxic pyrano[4,3-c][2]benzopyran–1,6–dione and furo[3,2-c]pyran–4–one derivatives from the fungus *Phellinus igniarius*. *J. Nat. Prod.* 67, 823–828 (2004)
  46. Ohmura, K., Miyase, T. and Ueno, A. Sesquiterpene glucosides and a phenylbutanoid glycoside from *Hypochoeris radicata*. *Phytochem.* 28(7), 1919–1924 (1989)
  47. Motohashi, N., Takahashi, A., Yamagami, C. and Saito, Y. Antioxidant effects

- of hydroxybenzalacetones on peroxyxynitrite-induced lipid peroxidation in red blood cell membrane ghost and SOS response in *Salmonella typhimurium* TA4107/pSK1002. *Chem. Pharm. Bull.* 53(3) 1003–1005 (2005)
48. Reddy, P. S., Jamil, K., Madhusudhan, P., Anjani, G., and Das, B. (2001) Antibacterial activity of isolates from *Piper longum* and *Taxus baccata*. *Pharmaceutical Biol.*, 39(3), 236–238
  49. Liu, G. T., Ahang, T. M., Wang, B. E., and Wang, Y. W. Protective action of seven natural phenolic compounds against peroxidative damage to biomembranes. *Biochem. Pharmacol.*, 43, 147–152 (1992)
  50. Watanabe, K., Hayashi, H., and Mori, Y. Effect of a benzylidene derivative, a novel antirheumatic agent, on IL-1 production. *Pharm. Res.*, 28, 57–72 (1993)
  51. Kikuzaki, H., Kawai, Y., and Nakatani, N. 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl radical-scavenging active compounds from greater cardamom (*Amomum subulatum* Roxb.). *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, 47, 167–171 (2001)
  52. Wang, Y., Hasuma, T., Yano, Y., Morishima, Y., Matsui-Yuasa, I., and Otani, S. Induction of apoptosis in CTLL-2 cells by protocatechualdehyde. *Anticancer Res.*, 21, 1095–1101 (2001)
  53. Lemarchand, C., Couvreur, P., vauthier, C., Costantini, D., Gref, R., Study of emulsion stabilization by graft copolymers using the optical analyzer Turbiscan. *Int. J. Pharm.*, 254 77–82 (2003)
  54. Mengual, O., Meunier, G., Cayre, I., Puech, K., Snabre, P., Turbiscan MA 2000: multiple light scattering measurement for concentrated emulsion and suspension instability analysis. *Talanta*, 50 445–456 (1999)
  55. Mengual, O., Meunier, G., Cayre, I., Puech, K., Snabre, P., Characterisation of instability of concentrated dispersions by a new optical analyser: the Turbiscan MA 1000. *Colloids and surfaces*, 152 111–123 (1999)
  56. 박동준, 안은영, 김재승, 임지영, 김세현, 오세종. (2002). Hybridization system을 이용한 유산균의 장용성 건식피복. *한국식품과학회지*, 34(5), 856–861.
  57. 이정민, 조용진, 박동준, 고성호, 이승철. 초음파와 압력을 이용한 나노리포솜의 제

- 조. 한국식품과학회지, (2008, 인쇄중).
58. Ann, E. Y., Kim, J. S., Imm, J. Y., Han, K. S., Kim, S. H., Oh, S. J., & Park, D. J. (2002). Microencapsulation of *Lactobacillus acidophilus* ATCC 43121 with prebiotic substrate using a hybridization system. *International Journal of Food Science & Technology*. 34(5), 856–861.
59. Jun Y, Ales S, Amit B, Rajesh N. D, & Robert P, (2005). Dry particle coating for improving the flowability of cohesive powders, *Powder Technology*, In press.
60. Kim, B. K., Lee, J. S., Lee, C. H., & Park, D. J. (2008). Preparation of low-fat uptake frying batter composite by dry particle coating of microparticulated soybean hull. *Lebensmittel-Wissenschaft-und- Technologie*, 41, 34–41.
61. Lee, J. S., Kim, B. K., Kim, K. H., & Park, D. J. (2007). Preparation of low-fat uptake doughnut by dry particle coating technique. *Journal of Food Science*, In press.
62. Michelle R, Chang Y. W, Satoru W, Rajesh N. D, & Robert P. (2000). Dry particle coating using magnetically assisted impaction coating: modification of surface properties and optimization of system and operating parameters, *Powder Technology*, 112, 137–148.
63. Park, D. J., Imm, J. Y., & Ku, K. H. (2001). Improved dispersibility of green tea powder by microparticulation and formulation, 66(6), 793–798.
64. Pfeffer R., Dave, R. N., Wei, D., & Ramlakhan, M. (2001). Synthesis of engineered particulates with tailored properties using dry particle coating. *Powder Technology*, 117, 40–67.
65. Satoru W, Yasushi I, Kei M, Chang-Yu W, Rejesh N. D, Robert P, & Taizo Y, (2000). *Journal of Chemical Engineering of Japan*, 33 (6), 848–854.