

**고부가가치식품개발사업 R&D  
Report**

발간등록번호

11-1543000-002195-01

**하수오 버섯발효물 생산조건  
확립 및 발효물을 이용한 중장년층  
건강음료 개발  
최종보고서**

2017. 12. 31.

주관연구기관 / 동부생약영농조합법인(주)  
협동연구기관 / (재)장흥군버섯산업연구원

**농림축산식품부**

## 2. 제출문

# 제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “하수오 버섯발효물 생산조건 확립 및 발효물을 이용한 중장년층 건강음료 개발”(개발기간 : 2016. 07. ~ 2017. 12.)과제의 최종보고서로 제출합니다.

2018. 02. 14.

주관연구기관명 : 동부생약영농조합법인 (대표자) 홍재희 (인)



협동연구기관명 : (재)장흥군버섯산업연구원 (대표자) 김 성



주관연구책임자 : 홍재희

협동연구책임자 : 서경순

국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제18조에 따라 보고서 열람에 동의합니다.

### 3. 보고서 요약서

#### 보고서 요약서

과제고유번호	116031-2	해 당 단 계 연 구 기 간	2016.07.07.- 2017.12.31.	단 계 구 분	2/2
연구사업명	단 위 사 업	고부가가치식품개발사업			
	사 업 명	하수오 버섯발효물 생산조건 확립 및 발효물을 이용한 중장년층 건강음료 개발하수오			
연구과제명	대 과 제 명	(해당없음)			
	세부 과제명	하수오 버섯발효물 생산조건 확립 및 발효물을 이용한 중장년층 건강음료 개발하수오			
연구책임자	홍재희	해당단계 참 여 연구원 수	총: 12명 내부: 12명	해당단계 연 구 개 발 비	정부:170,000천원 민간: 42,500천원 계: 212,500천원
		총 연구기간 참 여 연구원 수	총: 12명 내부: 12명	총 연구개발비	정부:250,000천원 민간: 62,500천원 계: 312,500천원
연구기관명 및 소 속 부 서 명	(재)장흥군버섯산업연구원			참여기업명 동부생약영농조합법인	
위탁연구					
요약(연구개발성과를 중심으로 개조식으로 작성하되, 500자 이내로 작성합니다)				p. 250	
<ol style="list-style-type: none"> <li>1. 발효원액의 이화학적 분석 및 품질관리연구</li> <li>2. 적하수오 버섯발효 조건 수립</li> <li>3. 발효 적하수오의 갱년기 및 면역증진 효능규명</li> <li>4. 하수오버섯발효물과 생약초 활용 제품개발 및 공정확립</li> <li>5. 시제품 영양성분분석, 안전성 평가</li> </ol>					

#### 4. 국문 요약문

	코드번호	D-01
<p style="text-align: center;">연구의 목적 및 내용</p>	<p>□ 연구목적</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. 남부지역을 중심으로 재배면적이 증가하고 있는 하수오를 활용한 고부가가치식품개발</li> <li>2. 국산적하수오의 갱년기 증상 및 면역력 효과를 탐색하여 적하수오의 고부가가치성을 검증한다.</li> <li>3. 버섯균사체의 효능을 접목하여 일반식품 수준의 안전성과 새로운 유효효과를 창출한다.</li> <li>4. 3.의 결과를 바탕으로 버섯균사(표고, 상황 등)로 발효한 적하수오 제조공정을 확보한다.</li> <li>5. 버섯발효 적하수오와 한의약적 조화를 고려한 국내생약초를 배합한 농축액상 제품 개발로 편의성과 유용성이 확보된 제품을 개발한다.</li> <li>6. 제품의 효능(유효성) 및 안전성 평가를 통해 산업적 기술 기반의 건강지향성 갱년기 제품을 개발하고자 함.</li> </ol> <p>□ 연구내용</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. 개발 목표           <ul style="list-style-type: none"> <li>- 주관연구기관 (동부생약 영농조합법인) : 버섯발효 적하수오와 생약초 추출물을 가공한 제품개발</li> <li>- 참여기관 (장흥군버섯산업연구원) : 하수오 <i>P. multiflorum</i>버섯발효 조건 수립, 발효와 가공에 따른 성분변화, 생리활성 탐색, 제품의 면역증진 효능 및 제품제작지원</li> </ul> </li> <li>2. 개발 내용 및 범위           <ul style="list-style-type: none"> <li>- 주관연구기관 (동부생약 영농조합법인)               <ul style="list-style-type: none"> <li>○ 하수오 및 생약초 배합비율 선정</li> <li>○ 발효원액 제조조건 수립 및 제품개발 공정개발</li> <li>○ 관능적 평가</li> <li>○ 시제품 제작 포장디자인 개발</li> <li>○ 하수오버섯발효물과 생약초를 활용한 액상제품개발 및 공정확립</li> <li>○ 최적의 액상차의 대량생산공정 확립</li> <li>○ 시제품의 영양성분분석 및 안정성 평가</li> <li>○ 향산화 활성 확인</li> </ul> </li> <li>- 참여기관 (장흥군버섯산업연구원)               <ul style="list-style-type: none"> <li>○ 하수오 버섯발효 조건 수립</li> <li>○ 하수오와 발효산물의 유효성분 분석</li> <li>○ 발효원액의 이화학적 분석 및 품질관리연구</li> <li>○ 갱년기 개선 in-vivo, in-vitro 효과 검정</li> <li>○ 면역증진 효능 평가</li> <li>○ 하수오 버섯발효 조건 수립</li> </ul> </li> </ul> </li> </ol> <p>실험결과 요약</p> <p>마디풀과에 속하는 적하수오의 일반성분 분석결과 수분, 조단백질, 조회분 및 가용성무질소물 함량은 동결건조 적하수오, 음건 적하수오, 열풍건조 적하수오 순으</p>	

로 높게 나타난 반면, 조섬유는 열풍건조 적하수오 및 음건 적하수오에서 다소 높게 나타났다. 유리당 분석에서 총 유리당 함량은 동결건조 적하수오에서 높게 나타났으며, fructose, glucose 및 sucrose의 함량 역시 동결건조 적하수오, 음건 적하수오, 열풍건조 적하수오 순으로 높게 나타났다. 유기산은 총 5종이 검출되었으며 oxalic acid가 가장 높게 나타났다. 구성아미노산 분석에서 총 구성아미노산 함량 및 필수아미노산 함량은 동결건조 적하수오에서 높게 나타났고, 유리아미노산 함량도 동결건조 적하수오에서 높게 나타났다. 무기성분은 potassium이 가장 많았으며, sodium이 가장 낮게 나타났다. 적하수오의 지방산을 분석한 결과 총 3종의 지방산이 검출되었으며, 모든 시험구에서 linoleic acid 함량이 높게 나타났다. 건조방법에 따른 적하수오의 성분분석 결과, 동결건조 적하수오에서 유리당, 아미노산 및 지방산 함량이 가장 높은 것으로 나타났다. 열풍건조 적하수오는 동결건조 적하수오보다 유리당, 아미노산 및 지방산 함량이 다소 낮게 나타났지만, 산업화 측면에서 대량생산 과정을 고려할 경우 적하수오를 건조하는 방법 중 동결건조와 음건의 방법은 경제적, 시간적 제약이 존재하므로 열풍건조가 적합한 것으로 생각된다.

본 연구는 하수오 표고균사(*Lentinula edodes* JMI-10079) 배양 최적조건 탐색을 목적으로 수행하였으며, 표고균사로 배양된 하수오의 일반성분, 아미노산, 무기성분을 분석하였다. 하수오 표고균사 배양 최적온도는 생장속도는 25℃였으며, pH 5~6의 범위에서 균사생장이 양호하였다. 하수오 표고균사 배양 최적 탄소원은 glucose였으며, 질소원은 malt extract로 나타났다. 조단백질 함량은 적하수오 첨가량이 증가함에 따라 증가하는 경향을 보였다. 조지방 함량과 조회분 함량은 적하수오 발효물 첨가량에 비례하여 증가하는 경향을 보였다. 조섬유 함량은 대조구에서 36.39%로 가장 높게 나타났다. 16종의 아미노산이 검출되었으며, 총 구성아미노산 및 필수아미노산의 함량은 적하수오 발효물 첨가량에 비례하여 증가하는 경향을 확인하였다. 본 연구는 하수오 100%에서도 표고균사 배양이 원활하게 이루어져 향 후 대량생산을 시도할 때 공정조건이 간편할 것으로 보인다. 성분 분석 결과에서도 하수오 첨가량이 증가함에 따라, 조단백질, 조회분, 총 아미노산 및 potassium을 제외한 무기성분 함량이 증가함을 확인하여, 향 후 표고균사 배양 하수오를 이용한 식품개발이 기대되어 진다.

하수오의 수분함량은 7.35%로 나타났으며, 버섯균사발효하수오의 수분함량은 59%로 높게 나타났다. 조단백질 함량은 두 시료간의 큰 차이를 나타내지 않았으며, 조지방, 조회분 및 조섬유 함량도 발효전에 비하여 버섯균사발효하수오에서 낮아지는 경향을 확인하였다. 가용성무질소물 함량은 발효 전 79.78%에서 발효 후 31.05%로 큰 차이를 보였다.

발효전 하수오에서는 총 16종의 아미노산이 검출되었으며, arginine이 높게 나타났다. Arginine과 histidine은 성장에 관여하는 필수아미노산이다. 하수오의 구성아미노산 함량을 살펴보면 arginine이 586.67 mg%로 가장 많이 함유되어있었고, glutamic acid가 503.3 mg%, 283.78 mg% 및 260.84 mg%으로 높게 나타났다. 버섯균사발효하수오에서는 총 16종의 아미노산이 검출되었으며 arginine과 threonine이 각각 654.68 mg%와 591.18 mg%로 다른 아미노산에 비하여 높은 함량을 보였다.

총 구성아미노산의 함량은 하수오에서 3,469.03 mg%로 나타났으며, 버섯균사 발효하수오 총 구성아미노산 함량은 3,630 mg%로 나타났다.

	<p>본 연구는 약용자원인 하수오의 활용성 향상을 위하여 버섯균사발효하수오를 제조하였으며, 일반성분의 변화는 버섯균사 발효에 따른 가습으로 수분함량이 증가한데 기인하였으며, 버섯발효에 따라 아미노산의 조성과 함량 차이가 발생한 것으로 보인다.</p> <p>본 연구는 표고균사체 발효 적하수오 열수 최적 추출조건 탐색을 목적으로 수행하였으며, 표고균사로 배양된 하수오의 독립변수로는 독립변수(Xi)로서 추출온도(X1), 추출시간(X2) 및 시료에 대한 용매비(X3)에 대한 실험범위를 설정하여 각각을 5단계로 부호화하였고 중심합성계획에 따라 16구로 설정하여 추출하였다. 또한 이들 독립변수에 영향을 받을 종속변수(Yn)로는 고형분 함량(Y1) 및 당도(Y2), TPC (total polyphenol contents, Y3), TFC (total flavonoid contents, Y4), ABTS cation radical scavenging activity (Y5), DPPH radical scavenging activity (Y6)으로 하였다. 고형분 함량 최대값과 최소값은 각각 31.99%와 16.84%로 나타났다. 이를 회귀분석한 결과 고형분 함량에 대한 모델식의 R<sup>2</sup>은 0.867로 나타났다. 당도는 7번(8 hrs, 85°C, 67 mg/mL)과 15번(6 hrs, 70°C, 100 mg/mL)시험구에서 3.0 brix로 다른 시험구에 비하여 높은 함량을 보였다. 항산화물질인 총 폴리페놀과 플라보노이드 함량은 8번 시험구(8 hrs, 85°C, 40 mg/mL)에서 총 폴리페놀 함량이 30.40 mg GAE/g, 총 플라보노이드 함량이 146.50 mg QE/g으로 가장 높게 나타났으며, 16가지 시험구의 항산화 활성도 총 폴리페놀과 총 플라보노이드 함량의 결과와 같이 8번 시험구(8 hrs, 85°C, 40 mg/mL)에서 가장 높은 활성을 보였다. 이상의 결과를 참조하여 표고균사체 발효 적하수오에 대한 열수 추출조건을 최적화 할 목적으로 추출온도를 95°C로 고정하고 용매비와 추출시간에 대한 종속변수들의 contour map을 superimposing하여 추출물의 특성 중 생리활성물질 함량과 생리활성을 만족시켜주는 최적조건은 91.22°C에서 39.71 mg/mL 용매비와 7.72 추출시간으로 각각 분석되었다.</p> <p>본 연구는 적하수오에 표고균사체를 배양한 후 생리활성이 우수한 원료를 추출 생산하고자 최적 추출조건을 확립하기 위하여 반응표면분석법을 활용하였다. 향후 생리활성부분에 대한 추가적인 연구가 이루어진다면 더욱 완성도가 높은 표고균사체 발효 적하수오 식품개발에 가능 할 것으로 사료된다.</p>
<p>연구개발성과</p>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. 적하수오와 버섯균사체 발효 및 제조공정 확립</li> <li>2. 반응표면 분석법(RSM)을 활용한 적하수오의 최적 추출조건 확립</li> <li>3. 추가적인 천연물 소재의 스크리닝 테스트를 통한 추출조건 확립 부원료 탐색을 통한 갱년기 효과 천연물 2종 확인 (홍화자와 오미자)</li> <li>4. 버섯균사체발효 적하수오를 이용한 제품 개발 2종</li> <li>5. 갱년기 효능 검증 천연물소재활용 제품 1종 개발</li> <li>6. 면역증진 효능 평가</li> <li>7. 갱년기 개선 in-vivo, in-vitro 효능 평가</li> <li>8. 시제품에 대한 평가를 바탕으로 1종 사업화 추진</li> <li>9. 갱년기를 병으로 인식할 것이아닌 인체의 당연한 순리이며 이는 식품(천연물 소재)의 올바른 활용으로 개선이 가능함을 확인</li> <li>10. 적하수오의 유용성과 추가적인 천연물 소재 탐색을 통한 기능성 규명으로</li> </ol>

	<p>갱년기 완화 식품의 다양성 확보</p> <p>11. 버섯발효기술 접목으로 안전성 확보 및 버섯과 하수오의 유용성분 시너지 창출</p> <p>12. 2016년 특허출원 1건(2017.11. 등록), 2017년 특허출원 1건</p> <p>13. 2016년 고용창출 1건, 2017년 고용창출 1건</p> <p>14. 하수오 상품 매출액 5,000만원을 달성하였으며, 2017년 11월 국제인증규격인 ISO22000을 획득함. 향후 2018년 HACCP을 수행과 더불어 장비의 확충을 준비중에 있음. 따라서 매출의 증대가 가능 할 것으로 판단됨.</p>				
<p>연구개발성과의 활용계획 (기대효과)</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 적하수오를 발효함으로써, 안전성을 높이는데 이바지 할 수 있으며, 이는 발효 하수오의 분석을 통하여 기존의 스탠다드 물질이 검출되지 않는 것으로 현재 적하수오의 지표물질로 언급되는 THSG의 변화가 안전성을 향상하는데 도움을 줄 것으로 판단되며, 추가적인 연구를 통하여 발효하수오의 안전성을 추적할 필요성이 있음.(THSG의 독성논문 검색) 상기의 연구를 통하여 안전성을 입증할 경우 부가가치 창출 효과가 과급적일 것임.</li> <li>• 국내 적하수오의 갱년기 개선 효과가 우수함을 확인 하였으며, 이는 고부가가치농산물로 적하수오의 가능성을 확인 한 것으로 사료된다. 또한 부원료 탐색을 통하여 갱년기 개선 효과에 효과가 있는 천연물 소재 2종을 추가로 확보하여 연구결과를 해외저널에 발표함.</li> <li>• 상기 원료를 배합하여 생산하는 2차년도 생산 제품의 경우 추가적인 맛보정을 통하여 홈쇼핑 진입을 위한 MD미팅과 바이어 미팅을 진행하고 있음.</li> <li>• 국내 식품산업의 선진화 및 국가경쟁력 제고로 해외수출증대에도 기여가 가능 할 것으로 판단됨.</li> <li>• 고부가가치화에 따른 농민 및 생산자 단체의 소득 증진과 지역경제 활성화 유도가 가능하며, 안정적인 고부가가치창출 작물로 성장이 가능함.</li> <li>• 갱년기 여성의 치료에 대한 가계 부담을 줄일 수 있으며, 더 나아가 국가적인 손실을 줄임</li> </ul>				
<p>중심어 (5개 이내)</p>	<p>적하수오</p>	<p>버섯발효</p>	<p>갱년기</p>	<p>면역력증강</p>	<p>액상제품</p>

5. 영문 요약문

< SUMMARY >

		코드번호	D-02
Purpose& Contents	<p>1. Development of high-value-added food using the <i>Polygonum multiflorum</i> which is growing in the south area</p> <p>2. Investigate the effects of domestic climatic conditions on the menopausal symptoms and immunity, and verify the high added value of <i>P. multiflorum</i>.</p> <p>3. It combines the efficacy of mushroom mycelium to create safety and new effective effects at the level of general food.</p> <p>4. Based on the results of above, ensure the production process of mushroom mycelial fermentation <i>P. multiflorum</i> by fermentation with patent mushroom mycelials.</p> <p>5. To develop products with convenience and usefulness in product development on concentrated liquid formulated with domestic herbal medicine considering mushroom fermented <i>P. multiflorum</i> and herbal medicinal solutions harmony.</p> <p>6. We want to develop health-oriented menopausal products based on industrial technology through product efficacy and safety evaluation.</p>		
	<p><input type="checkbox"/> Research content</p> <p>1. Development Objectives</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Main research institute (Dongbu Herbal Co.) : Product development of processed fermented <i>P. multiflorum</i> by mushroom mycelials and herbal medicine extract</li> <li>- Participating agency (Jangheung Research Institute for Mushroom Industry) : Establishment of fermentation condition of <i>P. multiflorum</i> by mushroom mycelials, change of composition due to fermentation and processing, search for physiological activity, support for product's immunity enhancement effect and product production.</li> </ul> <p>2. Contents and scope of development</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Main research institute (Dongbu Herbal Co.)</li> <li>○ Determination of the mixing ratio of fermented <i>P. multiflorum</i> by mushroom mycelials and herbal medicine extracts.</li> <li>○ Establishment of production condition of fermented <i>P. multiflorum</i> by mushroom mycelials and development of product development process and sensory evaluation.</li> <li>○ Developing prototype product packaging design.</li> <li>○ Development and process establishment of liquid product using fermentation product of fermented <i>P. multiflorum</i> by mushroom mycelials and herbal medicine</li> </ul>		



	<p>extracts.</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>○ Establishment of mass production process of optimal liquid beverage.</li> <li>○ Nutritional analysis and stability evaluation of prototype</li> <li>○ Identification of antioxidant activity <ul style="list-style-type: none"> <li>- Participating agency (Jangheung Research Institute for Mushroom Industry)</li> </ul> </li> <li>○ Establishment of fermentation conditions of fermented <i>P. multiflorum</i> by mushroom mycelials.</li> <li>○ Analysis of active ingredients of Sucrose and fermented products.</li> <li>· Physicochemical analysis and quality control of fermented stock solution.</li> <li>○ In-vivo, in-vitro effect test for improving menopausal symptoms.</li> <li>○ Evaluation of immunity enhancement efficacy.</li> <li>○ Establishment of fermentation conditions of fermented <i>P. multiflorum</i> by mushroom mycelials.</li> </ul>
Results	<p>This study was performed to analysis of chemical constituent in <i>Polygonum multiflorum</i> root by different dry methods (hot air drying, shade dry, and freeze dry). The results are summarized as followings; major free sugar were detected fructose, glucose, and sucrose in dried <i>P. multiflorum</i> roots based on various dry methods. The highest content of free sugars was found in freeze dried <i>P. multiflorum</i> root. The four organic acids were detected in dried <i>P. multiflorum</i> root by HPLC analysis. The content of oxalic acid in shade dried <i>P. multiflorum</i> root was higher than the dried <i>P. multiflorum</i> roots by different dry methods. The content of total amino acid and essential amino acids were high in the orders of freeze drying &gt; shade drying &gt; hat-air drying. The potassium and magnesium levels of freeze dried <i>P. multiflorum</i> root was significantly higher than the other drying method of <i>P. multiflorum</i> root. Whereas the calcium and sodium levels were higher in hot-air dried <i>P. multiflorum</i> root. The major fatty acids were determined the linoleic acid in <i>Polygonum multiflorum</i> root by different dry methods.</p> <p>This study was carried out to determination of <i>Lentinula edodes</i> JMI-10079 mycelial optimal cultivation condition on the root of <i>Polygonum multiflorum</i>, and we were perform to analysis of proximate compositions, total amino acids, minerals from the root of <i>P. multiflorum</i> cultivated with <i>L. edodes</i> JMI-10079 mycelial. The optimal temperature and pH of <i>L. edodes</i> JMI-10079 mycelial cultivation on the root of <i>P. multiflorum</i> were 25°C and pH 5~6, respectively. The optimal carbon resources and nitrogen resources of <i>L. edodes</i> JMI-10079 mycelial cultivation on the root of <i>P. multiflorum</i> were glucose and maltos, respectively. The content of crude protein, crude fat and ash from the root of <i>P. multiflorum</i> cultivated with <i>L. edodes</i> JMI-10079 mycelial was increased by higher the root of <i>P. multiflorum</i> concentration. The content of crude fiber was the highest in</p>

control. As the result of total amino acid analysis, total amino acids and total essential amino acids were increased by higher root of *P. multiflorum* concentration.

This study was performed to find out optimal extraction conditions of fermented *Polygonum multiflorum* root by *Lentinula edodes*(JMI10079) Pegler mycelials using the response surface methodology(RSM). The independent factors were extraction temperature (X1: 40–100°C), extraction time (X2: 2–10 hrs.), and the ratio of water to sample (X3: 33–100 mg/mL). These were effects on dependent variables of the extract properties, such as soluble solid contents(Y1), °brix of sample extract(Y2), total polyphenol content(Y3), total flavonoid content(Y4), ABTS (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid)) radical cation scavenging activity(Y5) and DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) radical scavenging activity(Y6). The experimental data obtained were fitted to a second-order polynomial equation. The optimal extraction conditions for fermented *P. multiflorum* root were determined as follows: X1: 91.22°C, X2: 7.72 hrs and X3: 39.71 mg/mL.

The moisture content of *P. multiflorum* and fermented *P. multiflorum* by mushroom mycelial(FPM) were 7.35% and 59%, respectively. The crude protein content did not show a significant difference between the two samples, crude fat, ash and crude fiber content of FPM were lower than *P. multiflorum*. The content of soluble nitrogen free extract of *P. multiflorum* (79.78%) was significantly higher than FPM (31.05%). Sixteen kinds of amino acids were detected in *P. multiflorum*, and the major amino acid was determined the arginine. The content of arginine and glutamic acid were 586.67 mg%, and 283.78 mg%, respectively. Sixteen kinds of amino acids were detected in FPM, and the major amino acids were determined the arginine (654.68 mg%) and threonine (591.18 mg%). The total amino acid contents of *P. multiflorum* and FPM were 3,469.03 mg%, and 3,630 mg%, respectively.

Also, we fermented *P. multiflorum* by mushroom mycelial, and analyzed for chemical compositions and biological active of fermented *P. multiflorum* root. The crude protein content did not show a significant difference between control and fermented *P. multiflorum* root, crude fat, ash and crude fiber content of fermented *P. multiflorum* root were lower than control. The content of soluble nitrogen free extract of *P. multiflorum* root was significantly higher than fermented *P. multiflorum* root. The major amino acids of *P. multiflorum* root were determined the arginine. The content of arginine and glutamic acid were 586.67 mg%, and 283.78 mg%, respectively. Sixteen kinds of amino acids were detected in fermented *P. multiflorum* root, and the major amino acids were determined the arginine and threonine. The total amino acid contents of control and fermented *P. multiflorum* root were 3,469.03 mg%, and 3,630 mg%, respectively. As the results of antioxidant activity test, the antioxidant capacity of fermented *P. multiflorum* had a higher than the control. As the mushroom fermentation progresses, it is confirmed

	<p>that the amino acid content and antioxidant capacity were increased, and it is expected to develop the product using the fermented <i>P. multiflorum</i> using mushroom mycelials. The content of crude fat, ash, crude fiber, and soluble nitrogen free extract of FPM were lower than the <i>P. multiflorum</i>, and the major amino acids were different in two samples. Total amino acid content of FPM was higher than the <i>P. multiflorum</i>. As the mushroom fermentation progresses, it is confirmed that the amino acid content is increased, and it is expected to develop the product using the <i>P. multiflorum</i> fermented with mushroom mycelial.</p> <p>As a result of free sugars from <i>P. multiflorum</i> root analysis, three kind of free sugars were determined the glucose, sucrose and lactose by HPLC. Four kind of organic acids were found in lactic acid fermented <i>P. multiflorum</i> root. And oxalic acid, lactic acid and succinic acid were detected in organic acids. The content of lactose and lactic acid in lactic acid fermented <i>P. multiflorum</i> root was the highest among the free sugars and organic acids. The content of minerals were in high orders of sodium&gt; calcium&gt; magnesium in <i>P. multiflorum</i> by acetic acid fermentation. The content of inorganic components was highest in lactic acid fermented solution with 5% and proportional to the content of <i>P. multiflorum</i></p> <p><i>Lentinula edodes</i>, a member of the <i>Pleurotaceae</i>, is a blood pressure and cholesterol lowering effect. Recently, research the reduction of irritation and the enhancement of function have been cultivation of natural resources using mushroom mycelium. For the development of food fermented with <i>L. edodes</i> mycelium of natural medicinal herb remnants, determined to be 20%, and the product were used after lyophilization.</p> <p>In this study, we were analyzed the contents of <math>\beta</math>-glucan and amino acids of fermented herb remnants by <i>L. edoeds</i> mycelials. <math>\beta</math>-Glucan is a type of polysaccharide that has immune-enhancing and is known to inhibit cancer cells. The content of <math>\beta</math>-glucan and total amino acids of fermented herb remnants by <i>L. edoeds</i> mycelials were 35.13% and 8,697.36 mg%, respectively. The content of essential amino acid from fermented herb remnants by <i>L. edoeds</i> mycelials was 3,226.85 mg%. Collectively, our findings suggest that fermented herb remnants by <i>L. edoeds</i> mycelials extract could be used as an chemo-preventive material for consumers.</p>
<p>Expected Contribution</p>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Establishment of fermentation and manufacturing process of fermented <i>P. multiflorum</i> by mushroom mycelials.</li> <li>2. Establishment of optimum extraction condition of fermented <i>P. multiflorum</i> by mushroom mycelials using reaction surface method (RSM).</li> <li>3. Establish extraction conditions by screening additional natural materials</li> </ol> <p>Identification of two natural products (<i>Carthamus tinctorius</i> fruit and <i>Schizandra</i></p>

	<p><i>chinensis</i>).</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>4. Product development using fermented <i>P. multiflorum</i> by mushroom mycelials.</li> <li>5. Development of one kind of product using natural material.</li> <li>6. Evaluation of immunity enhancement efficacy.</li> <li>7. Evaluation of in-vivo and in-vitro efficacy in menopausal period</li> <li>8. Promotion of commercialization of one kind based on evaluation of prototype.</li> <li>9. It is not natural to recognize menopause as a disease, but it is the natural right of the human body, and it can be improved by correct utilization of food (natural material).</li> <li>10. Diversity of menopausal relief foods is secured by the usefulness of <i>P. multiflorum</i> and the search for additional natural materials.</li> <li>11. Ensure safety by combining mushroom fermentation technology and create synergistic effect of mushroom and fermented <i>P. multiflorum</i> by mushroom mycelials.</li> <li>12. One patent application in 2016 (registered in 2017.11), one patent application in 2017</li> <li>13. 1 job creation in 2016, 1 job creation in 2017</li> <li>14. Achieved product sales of KRW 50 million, and obtained ISO 22000 in November, 2017. In 2018, HACCP will be implemented and equipment will be expanded. Accordingly, we believe that sales growth will be possible.</li> </ol> <p>It is possible to contribute to safety by fermenting the <i>P. multiflorum</i> by mushroom mycelials. This is because the existing standard material is not detected through the analysis of fermented <i>P. multiflorum</i> by mushroom mycelials, and the change of THSG. And it is necessary to trace the safety of fermented <i>P. multiflorum</i> by mushroom mycelials through additional studies (THSG toxicological research). Through the above-mentioned studies, it will be more effective in creating added value when proving safety.</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• It was confirmed that the effect of domestic fermented <i>P. multiflorum</i> by mushroom mycelials on the improvement of menopausal period was excellent. In addition, through the search for sub-materials, we have secured two additional natural materials that are effective in improving the effect of menopause, and present the findings</li> <li>• In the case of products produced in the second year by mixing the raw materials, we are conducting MD meetings and buyer meetings to enter home shopping through additional taste corrections.</li> <li>• It is possible to contribute to the increase of overseas exports by advancing domestic food industry and improving national competitiveness.</li> </ul>
--	--

	<ul style="list-style-type: none"> <li>- It is possible to promote the income of farmers and producers' associations due to high value added and induce local economy, and it can grow as a stable high value-added crop.</li> <li>• Reduce the household burden of treatment for menopausal women.</li> </ul>				
Keywords	Polygonum multiflorum	Fermented with mushroom mycelia	Climacteric symptoms	Improve immunity	Liquid products

## 6. 영문목차

1. Outline of research and development project .....	15
2. Status of International and domestic technology development .....	26
3. Results and research contents .....	38
4. Achievement of purpose and contribution to related field .....	225
5. Plan to use research results .....	228
6. International science and technology information .....	228
7. Security level of R & D achievement .....	228
8. Research facilities registered in the NTIS .....	229
9. Implementation of safety programs in laboratories based on R & D tasks .....	229
10. Representative research results of R & D project .....	245
11. Others .....	245
12. References .....	245

<Appendix> Self-evaluation statement

## 7. 본문목차

### < 목 차 >

1. 연구개발과제의개요 .....	15
2. 국내외 기술개발 현황 .....	26
3. 연구수행 내용 및 결과 .....	38
4. 목표달성도 및 관련분야에의 기여도 .....	225
5. 연구결과의 활용계획 등 .....	228
6. 연구과정에서 수집한 해외과학기술정보 .....	228
7. 연구개발결과의 보안등급 .....	228
8. 국가과학기술종합정보시스템에 등록된 연구시설·장비현황 .....	229
9. 연구개발과제 수행에 따른 연구실 등의 안전조치 이행실적 .....	229
10. 연구개발과제의 대표적 연구실적 .....	245
11. 기타사항 .....	245
12. 참고문헌 .....	245

<별첨> 자체평가의견서

# 1. 연구개발과제의 개요

코드번호	D-03
------	------

## 1-1. 연구개발 목적

○ 남부지역을 중심으로 재배면적이 증가하고 있는 하수오의 판로 확대를 위하여, 국산하수오의 갱년기 증상 및 면역력 효과를 탐색. 또한 일반식품 수준의 안전성과 새로운 유횠효과 창출을 위하여 버섯균사(표고)로 발효한 하수오 제조공정을 확보. 버섯발효 하수오와 한의약적 조화를 고려한 국내생약초를 배합한 농축액상 제품 개발로 편의성과 유용성이 확보된 제품을 개발하고자 함.

## 1-2. 연구개발의 필요성

○ 개발의 필요성

### 가. 갱년기 인구의 증가

· 우리나라 여성의 평균수명 증가와 여성 구성비의 증가(2015년 5월 이후)로 인해 갱년기(폐경기) 여성에 대한 건강의 중요성이 새롭게 대두되고 있음.

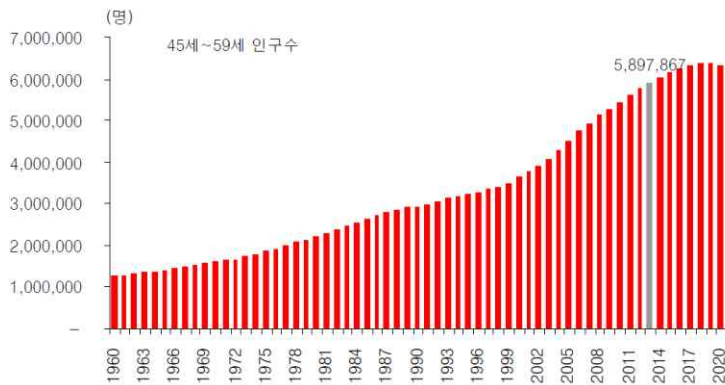
· 2015년 5월을 기점으로 여성 인구 구성비가 남성을 넘어섰으며, 기대수명 증가와 더불어 중년 및 노년인구의 비율이 증가되고 있음.



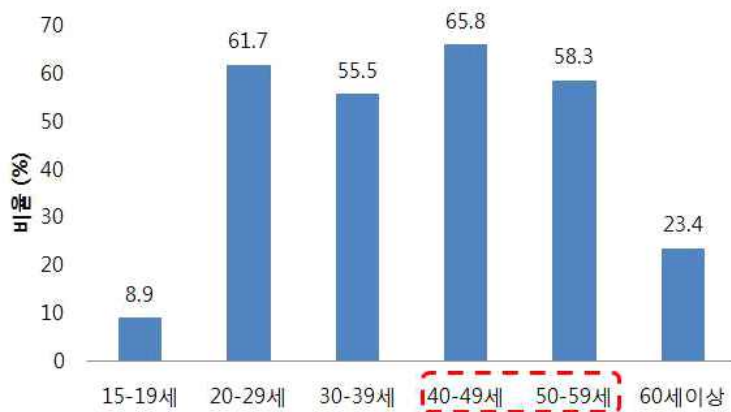


가정	1960년	1970년	1980년	1990년	2000년	2010년	2020년	2030년	2040년	2050년	2060년
중위 전체	25,012	32,241	38,124	42,869	47,008	49,410	51,435	52,160	51,091	48,121	43,959
남자	12,551	16,309	19,236	21,568	23,667	24,758	25,645	25,901	25,265	23,736	21,767
여자	12,462	15,932	18,888	21,301	23,341	24,653	25,790	26,259	25,827	24,385	22,193

가정별 총인구 및 인구 성장률, 1960-2060



갱년기 인구



**여성의 연령계층별 경제 활동 참가율**

자료: 통계청, 2011년 연간 고용동향

· 특히, 우리나라 전체 여성 중 50세 이후 여성의 비율은 점점 증가하는 추세로 2010년 1.4%에서 2050년에는 62%로 약 30.6%증가할 것으로 예상됨.

· 2011년 경제활동 참가율은 전체 여성 중 40~49세가 65.8%로 가장 높은 것으로 조사 되었고 40~59세 사이의 중년여성들의 경제참여율이 높아 중년 여성건강에 대한 간과는 국가적의 경제적 손실을 야기 할 수 있음.

- 또한, 이러한 중장년층 여성인구의 증가에 따라 국가의료비 비용 지출이 가계 재정 부담에 직결될 것으로 예상되며, 이는 국가적인 문제로 작용될 것임.
- ‘2010년 건강보험 통계분석자료집’에 따르면 연령이 증가함에 따라 300만원 이상의 고액 진료비를 지출하는 환자의 비율이 커지는 경향을 보였으며, 50~59세가 18.3%로 70~79세 (24.7%) 다음으로 높았음.

#### 나. HRT (Hormone Replacement Therapy)

· 전세계적으로 갱년기 증상 치료에 사용되는 여성호르몬 대체요법(HRT)은 폐경으로 인해 부족해지는 호르몬을 인위적으로 보충해주는 방법으로 미국 Wyeth사(이후 Pfizer에서 인수)에서 최초로 개발되어 2002년까지 많이 사용됨.

· 그러나 2002년에 미국 국립보건원에서 호르몬대체요법의 안전성 검사를 위해 ‘여성건강 이니시어티브(Women’s Health Initiative, or WHI)’ 임상 연구 도중 유방암, 심장마비, 뇌졸중, 심혈관 질환 등 심각한 부작용으로 인해 연구를 중단하고 결과를 발표한 이후 대표적인 HRT 약품인 ‘Premarin’과 ‘Prempro’ 사용이 감소 됨.

· WHI(미국 여성건강학회)의 에스트로겐 - 프로제스틴 혼합요법 에 대한 임상실험의 중간 결과 발표에 대한 보도를 통해 이런 호르몬 대체요법에 대한 우려가 높아짐.

· 연구 결과에 따르면, 혼합 호르몬 대체요법시 실험 대상 자에 있어서 5.2년간 환자 10,000명 당 심혈관계 질환 7명 증가, 심장마 비 8명 증가, 폐색전증 8명 증가, 유방암 8명 증가함.

· 미국의 통계이긴 하지만, 일반적으로 50세 여성의 경우 남은 일생중 관상동맥 심장 질환에 이환될 위험도가 46%, 이 심장질환으로 사망할 위험도가 31%로 높은데 비하여, 유방암에 대해서는 10%의 발생률과 3%의 사망률의 위험도가 있으며, 골다공증에 의한 대퇴부 골절의 발생은 15%, 그에 의한 사망률의 위험도는 1.5%로 알려져 있음.

#### 다. 하수오

· 흔히 큰 조롱이라고 하며 황해도나 경상도 지방에서는 새박덩굴이라 부르기도 함. 이들은 양지바른 풀밭이나 바닷가의 비탈진곳 등에 드물게 자람. 하수오는 백하수오와 적하수오의 두 종류가 있는데, 우리나라에 야생하는 것은 대개 백하수오이고 적하수오는 극히 드물게 발견 됨.

□ 적하수오, 백수오, 이엽우피소

명칭(학명)	과(科, family)	사용부위	기타
하수오 <i>Pleuropterus multiflorus</i> Thunb.	여뀌과 (Polygonaceae)	덩이뿌리	다년생 덩굴성 초본
백수오 <i>Machilus thunbergii</i> Siebold et Zuccarini var. <i>obovata</i> Nakai	박주가리과 (Asclepiadaceae)	덩이뿌리	일년생 덩굴성 초본
이엽우피소 <i>Cynanchum wilfordi</i> HEMSL	박주가리과 (Asclepiadaceae)	덩이뿌리	일년생 덩굴성 초본

□ 적하수오



· 백하수오는 박주 가리과(은조롱)의 뿌리를 말하고, 적하수오는 마디풀과(하수오)의 뿌리를 말하며, 이들 두 식물은 목과 과가 다르고 약효도 다름.

구분	하수오 (적하수오)	(백하수오)백수오 (큰조롱, 은조롱, 새박뿌리)
약용부위	뿌리	뿌리
약효성분	Anthraquinone화합물 : emodin, chrysophanol, rhein, physcion,	Preganane계열의 배당체 gagaminine

	2,3,5,4'-Tetrahydroxystilbene-2-O-β-D-glucoside	
효능	강장(強壯), 강정(強精), 보혈(補血), 사하(瀉下)	자양(滋養), 강장(強壯), 보혈(補血), 익정(益精), 소종(消腫)
이용	생약재, 차, 술, 강장음료, 건강 보조식품, 기능성 화장품 원료	생약재, 차, 술, 강장음료, 건강 보조식품, 기능성 화장품 원료

· 적화수오(Polygoni Multiflori)는 쌍떡잎 식물, 마디풀목 마디풀과의 덩굴성 여러해 살이풀로서, 성분은 뿌리에 oxymethylanthequinone 유도체 chrysophanol, emodin, aloe emodin 2,3,5', 4'-tetrahydroxystilbene-2-o-β-D-glucoside 등이 함유되어 있음.

구분	하수오	백수오(재래종)	이엽우피소(도입종)	박주가리
과(科)	여뀌과(마디풀과)	박주가리과	박주가리과	박주가리과
기원 식물	적하수오	큰조롱(은조롱, 새박뿌리)	이엽우피소	박주가리
줄기	밑부분 목질화	줄기와 잎을 자르면 흰색 유액이 분비됨		
꽃	흰색	연한 황록색	연한 황록색	연한 자주색
결실	모서리가 3개 있는 방추형 종자, 흑색으로 광택	농갈색 종자가 들어 있음	재래종에 비해 꼬투리가 작고 색이 진함	꼬투리 표면에 사마귀같은 돌기가 있음
뿌리	덩이뿌리	비대근	비대근	가늘고 길음

· 신장 기능을 튼튼하게 하여 정력을 높이고 머리카락을 검게 하며 병 없이 오래 살게 하는 약초로 이름이 높음.

· 간장의 기능을 좋게 하여 피곤함을 없애고, 살결을 곱게하며, 뼈와 근육을 튼튼하게 하고, 심장을 튼튼하게 하여 신경쇠약이나 불면증 완화 효과가 있음.

· 조혈 작용이 뛰어나 빈혈치료에도 좋고 여성의 생리불순, 자궁염, 만성변비 등에도 쓰임.

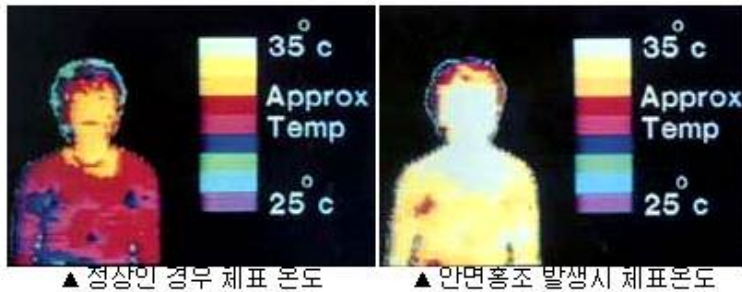
· 노인들의 기력을 돋우는데 매우 좋은 약으로, 신장 기능을 좋게 하여 머리카락이 희어지지

않게 하고 머리카락이 빠지지 않게 하며 오래 먹으면 노화를 예방한다고 알려져 있음.

#### 라. 갱년기 증상

- 대부분의 폐경 여성들은 호르몬 변화로 인한 증상을 경험하며, 증상이 나타나는 시기에 따라 급성, 아급성, 만성 증상으로 분류함.

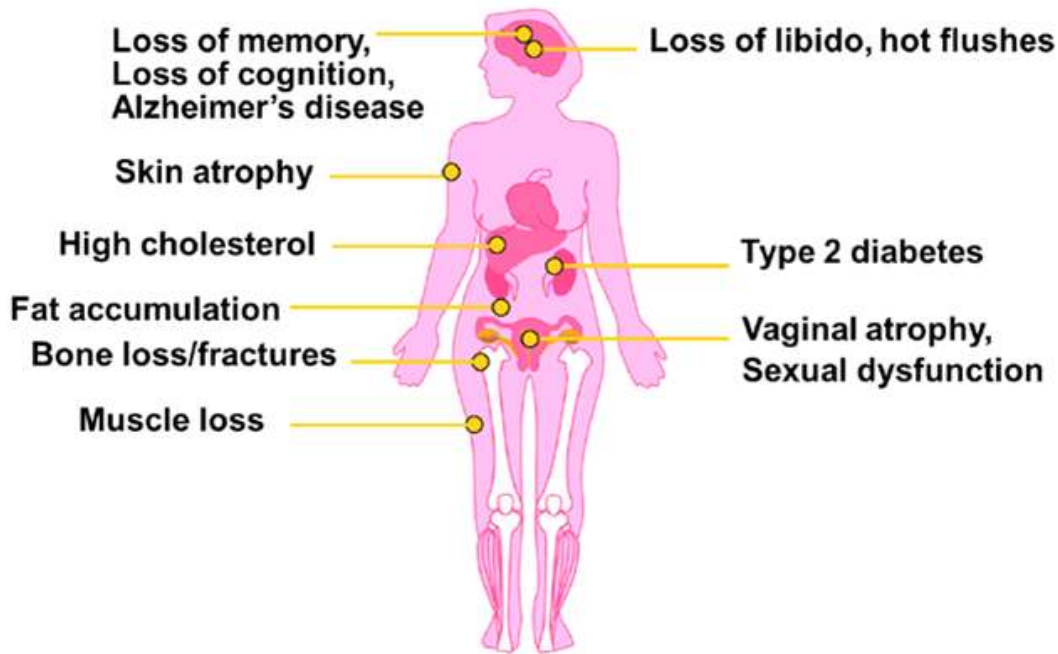
- 단기 증상으로 안면홍조(facial flushing), 심계항진 (palpitation), 안면홍조(facial flushing)란 폐경이 완전히 되기 수개월 전부터 발생하는 가장 특징적인 폐경 증상의 하나임. 25%의 폐경여성에서는 일상생활이 전혀 불가능할 정도로 심한 분도 있으며(죽고 싶다고 말할 정도로), 폐경 여성의 25% 정도는 약하게 혹은 전혀 나타나지 않고 지나가며 보통 50% 정도는 2~3년 정도 나타나다가 자연적으로 사라지며, 25% 정도는 5년 이상 나타나고 70대 여성에게서도 나타난다고 보고되어 있음.



- 안면홍조를 그냥 방치하는 경우, 장기적인 영향으로는 1) 골다공증의 진행이 빠르게 진행되며 2) 치매의 유전적 요인을 가진 경우 뇌의 hippocampus 부위에 영향을 미쳐 치매가 앞당겨지는 보고한 연구결과가 있음.

- 심리적 증상에는 무력감, 우울, 기분 저하, 불안, 초조, 불면증, 두통, 집중력 감소, 기억력 감퇴 등이 있으며, 기타 증상으로는 흔히 군살이 생기고, 유방이 축 늘어지게 됨. 피부는 탄력을 잃어 까실 까실해지고, 근육이 굳어져 근육통이 오며, 탈모현상, 목소리가 낮아지는 경우도 있음.

- 비뇨 생식기 증상으로, 질 조직과 요도, 방광 조직은 에스트로겐의 영향을 받는 것으로 알려져 있으며, 에스트로겐을 보충해 주지 않는 여성의 1/3 정도에 있어 폐경 후 4~5년 안에 이러한 조직의 위축 현상을 느낌으로 질 건조감, 성교통, 질염등이 유발됨.

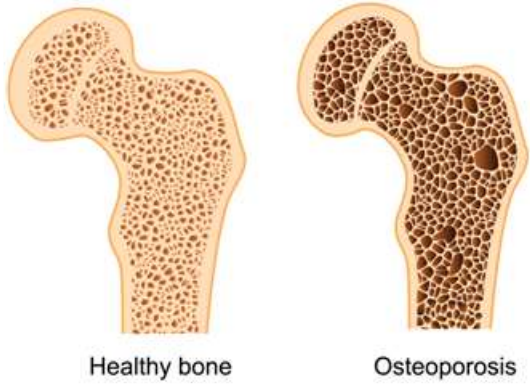


· 비뇨기계 증상으로는 소변이 잘 안 나오는 배뇨곤란, 오줌 소태, 재발성 비뇨기계 염증이 있으며, 재채기, 기침, 계단을 오르거나 무거운 것을 들어 올리는 등으로 배의 압력이 급격하게 상승하였을 때 소변이 나오는 긴장성 요실금 역시 에스트로겐 결핍과 관련이 있을 수도 있는 것으로 폐경 후 요도의 위축현상은 요실금을 야기함.

· 심혈관계 질환으로, 폐경 전에는 에스트로겐이 심혈관계 질환을 예방하는 역할을 하기 때문에 폐경 전에는 여성이 남성보다 심혈관계 질환에 대한 위험이 낮음. 그러나 폐경 후에는 에스트로겐의 감소로 인하여 이러한 보호 작용이 없어지게 되며 실제로 심혈관계 질환은 폐경 여성의 가장 큰 사망원인이 됨.

· 폐경 후 에스트로겐의 감소는 콜레스테롤의 수치를 변화시킴. 즉 에스트로겐의 결핍은 '좋은 콜레스테롤'이라 불리는 HDL 콜레스테롤을 감소시키고 '나쁜 콜레스테롤'이라 불리는 LDL 콜레스테롤을 증가시키며 이러한 변화는 관상동맥 경화, 심장마비, 뇌졸중 등을 유발.

· 폐경기의 가장 심각한 합병증 중 하나인 골다공증을 일으킴. 매년 1,000명 중 50~70세에서 심각한 골절이 발생함. 특히 고관절부 골절은 높은 이병률과 사망률을 나타냄. 원인으로는 에스트로겐 결핍으로 인한 골 재흡수(bone.. resorption)의 억제를 감소시키는 것 외에 영양결핍에 의한 칼슘과 인 대사 장애, 그리고 골성숙 결여 등이 있음.



#### 마. 면역 저하

- 노인성 면역기능이상은 특히 T 림프구의 장애가 특징적임.
- 고령화에 따른 T 세포기능 감소에 선행하여 흥선의 퇴화가 일어남. 예를 들면 나이가 40세에 이르면 흥선의 90%가 퇴화됨.
- 노년기에 memory 및 naive T 세포의 숫자가 모두 감소될 수 있지만, 상대적으로 naive T 세포의 소실이 더욱 크므로 과거에 노출된 적이 없었던 항원에 대한 방어반응이 감소됨.
- 결과적으로 노년기에 면역학적 감시의 효율 저하로 감염병 내지 암 또는 자가면역질환의 발생에 취약하게 되는 원인이 되는 것으로 추정됨.

#### ○ 개발의 중요성

- 건강보험심사평가원에서 조사한 자료에 따르면, 2011년 기준 ‘폐경기 및 기타 폐경기 전후 장애’로 치료를 받은 인구는 총 446,204명으로 50세~ 54세 인구가 전체 진료 인구의 46%를 구성하고 있음.
- 폐경을 적절히 관리 하지 못할 시 우울증이나 각종 만성질환의 위험을 높여 삶의 질을 저하시켜 중장년기 여성의 건강을 위협할 수 있는 심각한 위기를 초래할 것으로 추정.
- 현재 한국 중년 여성들의 경제활동 참가율 확대로 경제활동 기여에 큰 비중을 차지하고 있으므로 모든 중년여성이 겪는 폐경 증상을 완화 할 수 있는 치료요법이 필요함.
- ‘2010 통계청의 사망 원인 통계’에 따르면 여성의 사망 원인질환 중 암(1위), 뇌혈관질환(2위), 심장질환(3위), 당뇨병(5위), 고혈압성 질환(7위)등의 만성질환이 상위를 차지함.
- 우리나라 여성 사망순위 상위를 차지하는 이 만성질환들은 기존 역학연구에서 볼 수 있듯이 폐경과 관련한 호르몬 및 신체의 변화와 연관성이 있는 것으로 보고되었으며, 폐경 후 여성

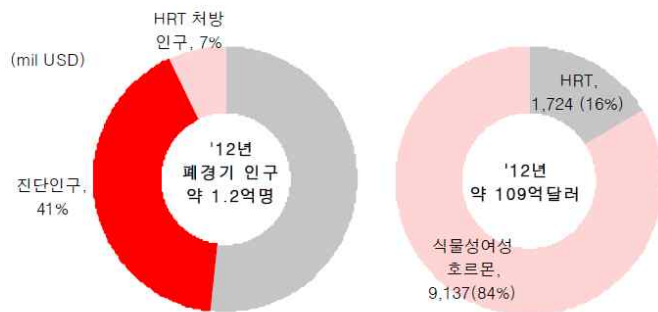
이 폐경 전 여성에 비해 유병률 및 발생률이 더 높은 것으로 나타남. 적절히 관리하지 못할 경우 각종 만성질환의 위험을 높이고 삶의 질을 저하시키는 것으로 보고됨.



Global HRT 시장: 부작용 발표 후 미국내 HRT 처방 대폭 감소

자료: 유진투자증권

· 갱년기 증상에 부족한 여성호르몬을 인위적으로 보충해주는 방법으로 사용되던 여성호르몬 대체요법(HRT: Hormone Replacement Therapy)의 부작용이 부각되어 사용이 급감함.



글로벌 식물성 여성호르몬 시장

자료: GBI Research, 유진투자증권

· 식물성 여성호르몬제인 이소플라본도 질출혈, 간손상, 암 유발 가능성등이 보고돼, 새로운 여성 갱년기 증상완화제가 필요한 실정임.

· 국내 소비자들은 면역능력과 관련하여 면역력증가(37.8%), 감기예방(24.3%), 질병예방(15.3%) 등 기대효과를 예상하고 있는 것으로 조사되었음. 기능식품 연구진행분야를 보면 면역기능증진은 33.3%로 항산화, 관절건강과 함께 가장 높은 비율을 차지하고 있었으며, 기업을 대상으로 우선 개발해야할 기능식품 연구진행 분야를 조사하여 본 결과, 면역기능증진은 28.0%로 높은 순위를 차지하는 것으로 조사됨.



### 1-3. 연구개발 범위

#### 가. 1차년도

##### ① 개발 목표

- 주관연구기관 (동부생약 영농조합법인)  
: 버섯발효 하수오와 생약초 추출물을 가공한 액상제품 개발
  
- 참여기관 (장흥군버섯산업연구원)  
: 하수오 버섯발효 조건 수립 및 발효와 가공에 따른 성분변화, 생리활성 탐색

##### ② 개발 내용 및 범위

- 주관연구기관 (동부생약 영농조합법인)
  - 하수오 및 생약초 배합비율 선정
    - 한의약 원리 및 문헌고찰을 통한 부원료 생약초 후보군 발굴
    - 갱년기 및 골다공증 예방 효과가 있는 부원료 생약초 선정
    - 최적 혼합비 설정
  - 발효원액 제조조건 수립 및 제품개발 공정개발
    - 버섯배양 하수오 최적 추출조건 탐색
    - 생약초 최적 추출조건 및 혼합비 설정
    - 버섯배양 하수오 및 생약초 추출물 혼합비율 설정
    - 원료 추출온도, 추출시간, 농축조건 확립
    - 추출물의 고형분 함량
    - 탁도 측정
  - 관능적 평가
    - 관능검사
  - 시제품 제작 포장디자인 개발
    - 음료시제품의 추출조건별 공정도 확립
    - 시제품 제조
    - 포장디자인 개발
  
- 참여기관 (장흥군버섯산업연구원)
  - 하수오 버섯발효 조건 수립
    - 분쇄 입도별 하수오 버섯발효 조건 확인
    - 버섯균사 생장율에 따른 최적 버섯 균사 선정
    - 최적 버섯발효조건 탐색
  - 하수오와 발효산물의 유효성분 분석
    - 유효성분 분석
  - 발효원액의 이화학적 분석 및 품질관리연구
    - 일반성분 분석 : 수분은 105℃ 직접건조법, 조회분은 550℃ 직접 회화법으로, 조단백은 micro-Kjeldahl법, 조지방은 soxhlet 추출법으로, 조섬유의 함량은 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-NaOH 분해법
    - 이모딘(Emodin), 크리소파놀(Chrysoophanol), 레인(Rhein), 피션(Phycion) 분석
    - 추출물의 고형분 함량

○ 갱년기 개선 in-vivo, in-vitro 효과 검증

- 여성 갱년기 개선효과 검증
- E-screen assay
- 유전자 발현 측정
- 폐경모델 제작

나. 2차년도

① 개발 목표

- 주관연구기관 (동부생약 영농조합법인)  
: 시장진출용 제품 제작 및 대량생산을 위한 양산화, 영양성분분석
- 참여기관 (장흥군버섯산업연구원)  
: 제품의 면역증진 효능 평가, 성분분석, 제품제작 지원

② 개발 내용 및 범위

- 주관연구기관 (동부생약 영농조합법인)
- 하수오버섯발효물과 생약초를 활용한 액상제품개발 및 공정확립
  - 버섯배양 하수오 대량 추출조건 탐색
  - 생약초 추출물 농축조건 확립
  - 원료 및 부원료 혼합 배양조건 탐색
  - 대량원료 추출온도, 추출시간, 농축조건 확립
  - 추출물 및 제품의 고형분 함량
  - 관능검사를 통한 선호도 확보
- 최적의 액상차의 대량생산공정 확립
  - 대량생산공정 시스템 확립
  - 제품 생산 공정별 성분분석
- 시제품의 영양성분분석 및 안정성 평가
  - 시제품 영양성분분석
  - 시제품의 안정성 평가
- 항산화 활성 확인
  - DPPH 소거능(DPPH Scavenging activity)
  - ABTS 라디칼 소거 활성
  - Superoxide anion scavenging activity
- 참여기관 (장흥군버섯산업연구원)
- 면역증진 효능 평가
  - 대식세포의 활성측정
  - 면역활성 측정
  - 감염동물에 대한 방어능 평가
- 하수오 버섯발효 조건 수립
  - 선정된 버섯균사 활용 최적 버섯발효 조건 확인

- 버섯균사배양물 관능검사, 성분분석 및 생리활성 확인
- 최적 버섯발효조건 확립
- 발효원액의 이화학적 분석 및 품질관리연구
  - 일반성분 분석 : 수분은 105℃ 직접건조법, 조회분은 550℃ 직접 회화법으로, 조단백은 micro-Kjeldahl법, 조지방은 soxhlet 추출법으로, 조섬유의 함량은 H2SO4-NaOH 분해법
  - 이모딘(Emodin), 크리소파놀(Chrysoophanol), 레인(Rhein), 피션(Phycion) 분석
  - 추출물의 고형분 함량

## 2. 국내외 기술개발 현황

	코드번호	D-04
가. 국내 기술 수준 및 시장 현황		
(1) 기술현황		
<ul style="list-style-type: none"> <li>· 하수오는 중국이 주산지라 국내 자연산 하수오와는 모양, 성분 및 효능이 전혀 다른 것으로 보고되어 있으나 하수오의 생리기능적 특성에 대한 연구는 거의 없는 실정이어서 하수오에 관한 생리적 특성 분석 자료를 통한 기술력 확보가 시급함.</li> <li>· 현재까지 하수오의 주성분으로 알려진 anthraquinone 화합물 중 항산화효과, 항암효과, 항염증 활성 등 생리기능효과가 보고된 emodin, rhein, aloin 등의 연구는 몇몇 있으나 하수오 또는 하수오의 활성성분을 활용한 고부가 가치 기능성 식품화에 대한 연구는 거의 없는 실정임.</li> <li>· 폐경 관련 국내 기술 현황</li> </ul>		
연 구 자	폐경증상 완화 방법	
Song, 1997; Kang, 2001	자기 효능 증진	
Choi 1998	운동을 중심으로 한 운동 훈련 프로그램	
Won 등 2001	이소플라본을 포함한식이섭취	
Park, 2003	식이요법	
Choi, 2006	약물요법	
Choi, 2001	폐경 증상 관리 프로그램	

Park, Cho, & Park, 2004	통합적 건강증진 프로그램
Kim, 2005; Kim, 2007	운동요법
Lee, 2007	이완요법
Park 등 2011	통합적 폐경관리 프로그램
Chung, Yun, & Kim, 2004	호르몬 대체 요법
Shin, 2006	향기요법
Song, 2006	수지요법
Kim, 2005	요가
Park, 2006	태반요법
Yang, Park, & Lee, 2008	마사지

· 하수오 관련 기술 현황

특 허 명	년도	발 명 자
갱년기 증상 개선용 건강 식품 및 그 제조방법	2014	주식회사 에스에스바이오팜
홍삼 복합물을 유효성분으로 함유하는 비만 예방, 개선 또는 치료를 위한 조성물	2013	재단법인진안홍삼연구소
적하수오 추출물을 유효성분으로 함유하는 암 예방 또는 치료용 약학조성물	2013	영남대학교산학협력단
홍삼 복합물을 유효성분으로 함유하는 이상지질혈증 예방, 개선 또는 치료를 위한 조성물	2013	재단법인진안홍삼연구소
적하수오 추출물을 함유하는 피부주름개선 기능성 화장품 조성물	2013	주식회사사임당화장품
적하수오에서 분리한 화합물을 포함하는 탈모	2013	제주대학교산학협력단

방지 또는 육모 촉진을 위한 조성물		충남대학교산학협력단
체지방 억제에 유용한 약용식물 추출물을 포함하는 항비만조성물	2012	주식회사 백옥생
유효성분으로 적하수오 에탄올 추출물을 포함하는 혈압 강하용 조성물	2010	한국식품연구원
유효성분으로 적하수오 에탄올 추출물을 포함하는 혈전 감소용 조성물	2010	한국식품연구원
혈관질환 예방 또는 개선용 조성물	2009	한국식품연구원
적하수오 추출물을 유효성분으로 함유하는 피부 미백 및피부 노화방지용 화장품 조성물	2006	한국식품연구원
생약소재에 의한 고지혈증 개선용 농축액 및 그 제조방법	2004	서울향료주식회사
하수오를 주재료로 하는 건강식품 및 그 제조방법	2004	김영옥
항비만 녹차 및 그의 제조방법	2002	전라남도

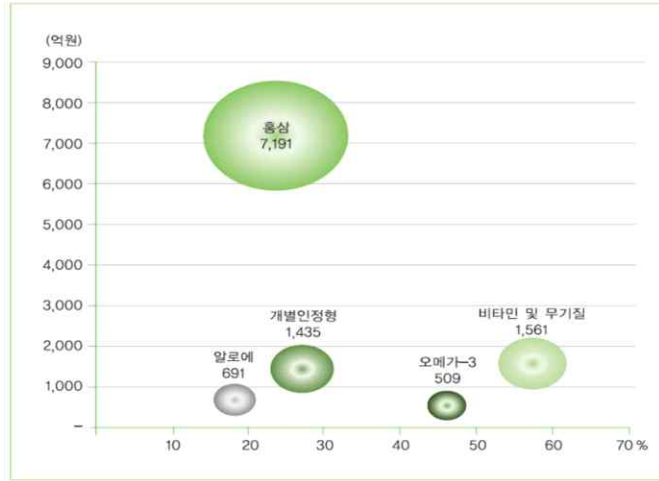
(2) 시장현황

(가) 갱년기 개선제품 시장

- 갱년기 진료를 받은 환자들의 연령은 주로 45세에서 59세까지로 갱년기 증상 여성 호르몬제의 주 타겟 시장이며, 대한민국에만 2013년 기준으로 동 연령대의 여성은 전체 인구의 24%인 590만명이 존재함.
- 여성 중 50%가 갱년기 증상을 호소한다고 가정할 경우 대한민국 여성 300만명이 타겟 시장으로 판단됨.

건강기능성 식품		의약품		
한미약품 제니스	유니온 제약 피토소야	동국제약 헤라민 Q	조아제약 에로스트 Q	종근당 시미도나
				

- 건강기능식품 중 지난해 높은 성장세를 보인 제품군으로 체지방 감소 제품으로 201.2%(78→235억원)이었으며, 다음으로 갱년기여성 건강 103.1%(64→130억원), 간건강 41.6%(531→752억원) 등의 순임.  
: 이들 제품의 급성장 요인은 젊음을 유지하고 싶은 욕구 증대와 몸매관리를 중시하는 사회적 환경 변화로 풀이됨.
- 최근 홍삼제품의 면역효과 이외에도 피부미용 및 주름개선 등의 미용기능이 각광받기 시작하면서, 전년대비 성장률이 23.6%를 기록하는 등 국내 건강기능식품시장의 성장을 주도하고 있음.



주요 품목별 생산액 및 성장률 현황

자료) '11년 건강기능식품 생산실적 분석결과 발표', 식품의약품안전청(2012.5)

(나) 목표시장의 경쟁상황 (음료시장)

- 닐슨 소매점 판매액 지수 기준, 국내 전체 음료시장은 전년 대비 6.2% 성장한 3조 7,527억원 규모로 산출됨.
- 품목별로는 탄산음료, 스포츠음료, 생수, 음용차, 초코드링크의 판매액 규모가 전년 대비 증가하였고, 과일음료, 야채음료, 두유, 음용식초는 감소하였음.

갱년기 관련 음료제품				
천호식품 황후백수오	로다 황후비책	웰파인 백하수오	q오신코리아 에스트로밸런스	대동고려삼(주) 홍삼과 석류
				

(다) 경쟁기관현황

(단위 : 억원)

경쟁사명	제품명	판매가격 (천원)	연 판매액 (천원)
① 천호식품	황후백수오	170,000	
② 웰파인	백하수오	49,000	
③ 로다	황후비책	133,000	

(라) 지식재산권현황

• 폐경기 치료

특허명	년도	발명자
지황 및 갈근의 복합 추출물을 함유하는 갱년기 증상의 예방 또는 치료용 조성물	2015	(주)뉴메드
향부자 추출물로부터 분리된 세스퀴테르페노이드계 화합물을 함유하는, 갱년기 질환의 예방 또는 치료용 조성물	2015	성균관대학교 산학협력단
민들레 추출물 또는 민들레 함유 복합 추출물을 유효성분으로 하는 갱년기 예방 및 개선용 조성물	2014	주식회사 파미니티
루이보스 추출물을 유효성분으로 하는 남성 노화 및 갱년기 예방 및 개선용 조성물	2014	주식회사네이처센스
폐경기 여성건강 예방 및 치료용 칩 추출물 조성물	2012	고려대학교 산학협력단
글리세올린을 유효성분으로 함유하는 갱년기 증상의 예방 및 개선용 조성물	2011	
산나물 추출물을 함유하는 여성 폐경기 증후군 예방 및 치료용 조성물	2010	한국과학기술연구원
돌단풍 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 함유하는 폐경기 증후군 예방 및 치료용 조성물	2010	한국과학기술연구원
발효청국장 추출물을 포함하는 갱년기 질환의 예방 및 치료용 조성물	2008	주식회사 바이오포트코리아
돼지 태반 추출물을 함유하는 갱년기/폐경기 장애 개선용 식품 조성물, 이를 포함하는 건강기능식품 및 그 제조방법	2006	



• 갱년기 완화

지식재산권명	지식재산권출원인	출원국/출원번호
갱년기 증상 개선용 건강 식품 및 그 제조방법	주식회사 에스에스바이오팜	대한민국 /10-1449904
구기자 추출물을 포함하는 남성갱년기 복합증후군 개선용 조성물 및 이를 이용한 건강기능식품	(주)바이오믹스	대한민국 /1015074270000
돼지 태반 추출물을 함유하는 갱년기/폐경기 장애 개선용 식품 조성물, 이를 포함하는 건강기능식품 및 그 제조방법	케이에이취팜 주식회사	대한민국 /1006420800000
루이보스 추출물을 유효성분으로 하는 남성 노화 및 갱년기 예방 및 개선용 조성물	주식회사 네이처센스 농업회사법인, 주식회사 바이오그랜드	대한민국 /1014601250000
글리세올린을 유효성분으로 함유하는 갱년기 증상의 예방 및 개선용 조성물	경북대학교 산학협력단	대한민국 /1010930090000
민들레 추출물 또는 민들레 함유 복합 추출물을 유효성분으로 하는 갱년기 예방 및 개선용 조성물	주식회사 파미니티, 주식회사 바이오그랜드	대한민국 /1014601260000
여성 갱년기 증상의 개선 기능을 갖는 생약조성물을함유하는 기능성 식품	주식회사 한국인삼공사, 주식회사 케이티앤지	대한민국 /1004191210000
여성 갱년기 증상개선에 효과를 갖는 효모 가수분해물 및 이를 포함하는 식품	(주)새롬바이오	대한민국 /1009891740000
고함량의 엘라그산을 포함하는 석류 추출물, 및 석류 추출물의 갱년기 증상 관련 효과를 향상시키는 방법	이해연, (주) 건강사랑	대한민국 /1012726020000

(마) 표준화현황

· 갱년기 남성 건강

번호	원료명	인정번호	인정등급	기능(지표)성분	일일섭취량	섭취 시 주의사항
1	MR-10 민들레등복합 추출물	제2013-31호	생리활성기능 2등급	① Luteolin (민들레) ② Isoorientin (루이보스)	MR-10 민들레등 복합 추출물로서 400 mg	

· 갱년기 여성 건강

번호	원료명	인정번호	인정등급	기능(지표)성분	일일섭취량	섭취 시 주의사항
1	백수오 등 복합추출물	제2010-20호	생리활성기능 2등급	① Cinnamic acid ② Shanzhiside methyl ester ③ Nodakenin	백수오, 속단, 당귀 열수추출물 로서 514 mg/일	① 임신부, 수유부 섭취 삼가 ② 항응고제 또는 항혈전제를 복용하시는 분은 의사와 상담
2	석류추출/ 농축물	제2010-23호	생리활성기능 2등급	Ellagic acid	석류추출물로서 6.0 g/일	① 임신부와 수유부 섭취 주의 ② 항혈전제 복용하는 분의사와 상담 ③ 에스트로겐 호르몬에 민감한 사람 섭취 주의
	석류추출/ 농축물	제2010-40호			석류농축액으로서 40 mL/일	① 어린이, 임신부 및 수유부는 섭취 삼가 ② 에스트로겐 호르몬에 민감한 사람 섭취 주의
3	회화나무 열매추출물	제2010-27호	생리활성기능 2등급	Sophoricoside	회화나무열매 추출물로서 350 mg/일	① 어린이, 임신부와 수유부는 섭취 삼가 ② 에스트로겐 호르몬에 민감한 사람 섭취 주의
		제2010-60호				에스트로겐 호르몬에 민감한 사람 섭취 주의
		제2011-25호				
		제2011-26호				

나. 국외 기술 수준 및 시장 현황

(1) 기술현황

- 독일의 LFGB에서는 갱년기 환자를 위한 민간요법으로 승마가 폐경기 신경 증상 완화에 효과가 있다고 보고함. 또한, 정조나무가 호르몬 조절 작용에 있어서 폐경기 환자 치료에 사용함.
- 중국에서는 당귀를 여성 생식기 질병과 갱년기 호르몬 조절을 위하여 사용함.
- 여러 천연물, 과일, 해양 자원들에 대해 갱년기 개선 효능 연구가 진행 중임.

연 구 자	폐경증상 완화 방법
Casini, 2006; Ho, 2007	이소플라본을 포함한 식이섭취
Bloomfield, Williams, Lamb, & Jackson, 1993 Nelson 등 1994, Ready 등 1996	운동 요법
Hunter & Liao,1995 Wijma, Melin, Nedstrand, & Hammer,1997	이완 요법
Hunter & Liao, 1995	인지 행동 치료
Freedman & Woodward, 1992	호흡 바이오피드백 적용
McBride 등 2002	폐경 증상 완화 방법 교육
Bastian 등 2002	호르몬 요법
Legare 등 2008; Menard 등 2010	Natural health products
Nagamani M, Kolver ME, Smith ER 등	Clonidine
Stearns V, Beebe K, Iyengar M 등	Selective serotonin and norepinephrine reuptake inhibitors
Loprinzi C, Sloan J, Perez E 등	Gabapentin
Barton D, Loprinzi C, Quella S, 등	Vitamin E

(2) 시장현황

- 미국 트렌트 조사 전문업체인 SPINS에 따르면, 갱년기 관련제품의 판매실적이 2012년에 전년시장 대비 19.3% 증가하여 32 백만 달러가 판매되었다고 보고함.

(3) 경쟁기관현황

- Welnox TM에 제품으로 72.95 달러 부과세 별도.



Product Rating	
Safety	★★★★★ 4.9/5
Ingredient Quality	★★★★★ 4.6/5
Customers Reviews	★★★★★ 4.9/5
Experts Reviews	★★★★★ 4.6/5
Overall rating	★★★★★ 4.8/5
Side Effects	None
Guarantee	60 Days Guarantee
Servings	120 servings (1 months supply)
Certifications	

- WelnoxTM에 제품으로 BiopauseTM 49.95 달러 부과세 별도. 최소 2~3주 복용하면 효과를 볼수 있으며, 1~3개월을 권장. 골다공증에 효과가 좋으며, 건망증에 효과적임.



Product Rating	
Safety	★★★★★ 4.9/5
Ingredient Quality	★★★★★ 4.6/5
Customers Reviews	★★★★★ 4.6/5
Experts Reviews	★★★★★ 4.6/5
Overall rating	★★★★★ 4.6/5
Side Effects	None
Guarantee	60 Days Guarantee
Servings	120 servings (1 months supply)
Certifications	

- LovanoxTM로 부과세별도로 39.95 달러. 기억력 감퇴를 줄여주고, 불면증을 줄여주어 갱년기 완화하는 역할을 함.



**Product Rating**

Safety	★★★★★	4.9/5
Ingredient Quality	★★★★★	4.5/5
Customers Reviews	★★★★★	4.6/5
Experts Reviews	★★★★★	4.5/5
Overall rating	★★★★★	4.5/5

**Side Effects** None  
**Guarantee** 60 Days Guarantee  
**Servings** 120 servings (1 months supply)

**Certifications**

(4) 지식재산권현황

지식재산권명	지식재산권출원인	출원국/출원번호
Anti-aging/menopause symptoms relief using ganoderma lucidum spores	Chee-Keung Chung, Siu Kan Tong	US /6908614 B2
Compositions and methods for treating symptoms associated with menopause, hormonal variations and arthritis	Duke Debra M, Duke Richard C	US /2010011767 A2
Compositions and treatment for alleviation of symptoms associated with menopause	Standard Homeopathic Company	US /6248307 B1
Antiestrogens and their use in treatment of menopause and osteoporosis	Bcm Technologies, Inc.	US /4894373 A

(5) 표준화현황

- 미국 FDA는 시중에 유통되는 제품과의 표시내용에 일치하는지만을 감사하며, NLEA에서 대중적이고 타당한 과학적 증거에 기반을 두어 건강강조 표시에 적합한 형태로 한정할 뿐 표준화는 미흡한 실정임.

(6) 기타현황 (지식재산권 확보 및 회피 방안)

- 특허기술을 보면 하수오와 갱년기의 키워드로 37건의 특허가 존재하며, 활용 예로는 갱년기 증상 개선용 건강 식품 및 그 제조방법, 백수오 추출물을 포함하는 여성 갱년기 질환의 예방 또는 치료용 조성물, 홍삼, 천마 및 하수오 혼합 추출물을 유효 성분으로 하는 발기부전 질환의 예방과 치료를 위한 조성물 등에 관한 특허기술이 있음.

- 하지만 하수오, 면역증강, 갱년기의 복합 특허는 없는 실정으로 특히, 버섯발효, 초산발효를 통한 발효특허는 전혀 없는 상태로 나타났으며, 본 연구과제를 통하여 원천기술을 확보할수 있을 것으로 사료됨.
- 또한, 생리활성 가능성이 우수한 발효하수오의 다양한 제품에 대한 특허도 없어서, 선행특허 회피에는 문제가 없으리라 사료됨.

### 3. 연구수행 내용 및 결과

코드번호

D-05

#### □연구방법 및 결과(1차년)

### I. 재료 및 방법

#### 1. 재료

##### 가. 실험재료

본 실험에 사용한 하수오(*Polygonum multiflorum* Thunberg)는 (주) 송산제약에서 구입하여 사용하였다.

##### 나. 시료 건조법

하수오를 60℃에서 열풍건조, 통풍이 잘되는 20℃에서 음건 및 동결건조기를 이용한 동결 건조방법으로 Fig. 1과 같이 각각 건조하여 사용하였다.

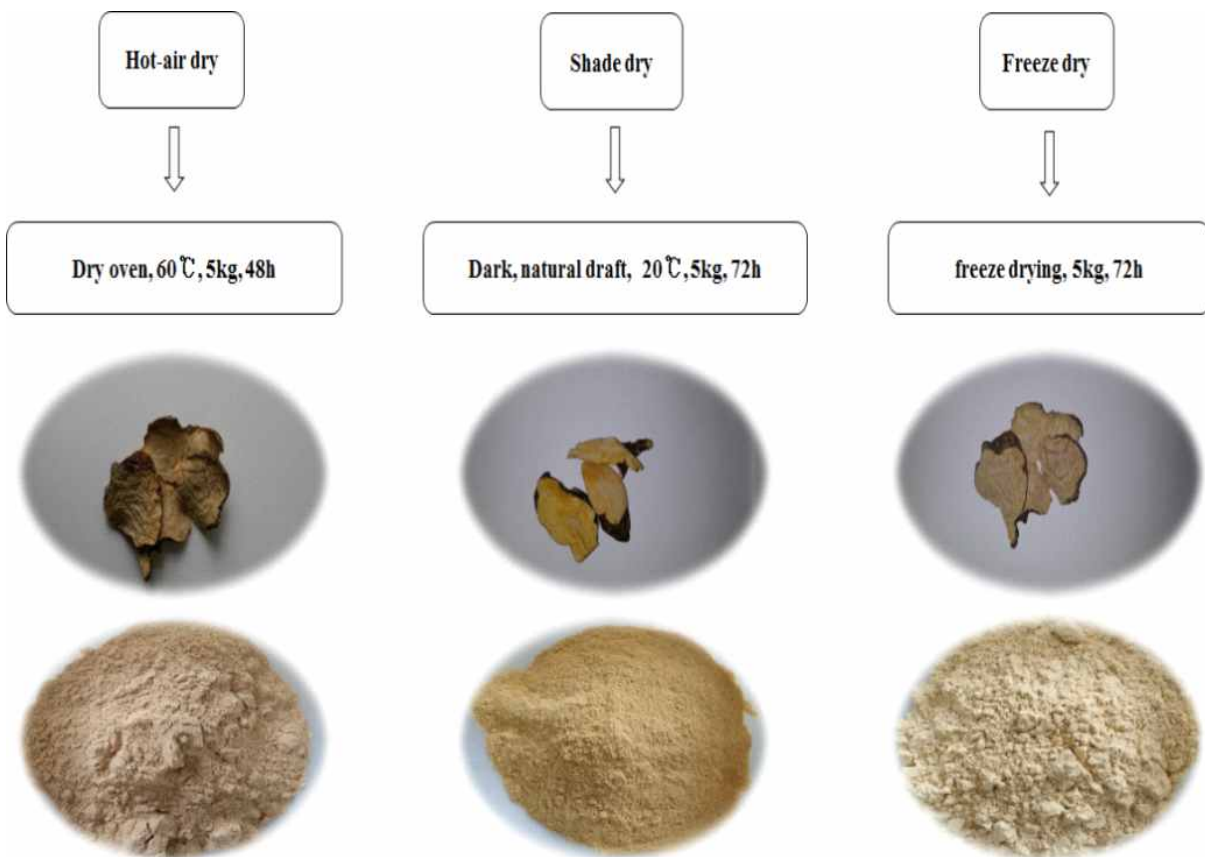


그림 1. 건조방법에 따른 하수오 건조.

## 2. 실험방법

### 가. 건조방법에 따른 하수오의 성분분석

#### 1) 일반성분 분석

일반성분은 AOAC방법에 따라 분석하였다. 수분은 시료 1 g을 각각 칭량병에 담고 105°C dry oven에서 항량이 될 때까지 건조시켜 무게를 측정하여 구하였다. 조회분은 시료 2 g을 250°C에서 예비 회화한 후 600°C에서 직접 회화법으로, 조단백질의 함량은 Kjeldahl법으로 측정된 질소량에 질소계수 6.25를 곱하여 산출하였으며, 조지방의 함량은 Soxhlet 추출법으로, 조섬유는 Henneberg Stohmann 개량법으로 구하였다. 가용성 무질소물의 함량은 총량에서 수분, 조회분, 조단백질, 조지방 및 조섬유의 함량을 뺀 값으로 산출하였다.

#### 2) 유리당 분석

유리당 성분은 Wilson 등의 방법에 따라 분석하였다. 즉 시료 5 g에 증류수를 가하여 교반시킨 후 100 mL로 정용하여 원심분리(50,000 rpm × 30 min)한 후 상정액을 취하여 0.45 μm membrane filter(Millipore Co., USA)로 여과한 여액으로 HPLC(1200 Series, Agilent Technologies, USA)를 이용하여 분석하였으며 함량은 integrator에 의한 외부표준법으로 계산하였다. 이 때 HPLC 분석 조건은 표 1과 같다.

표 1. 유리당 분석 조건

Item	Condition
Instrument	1200 Series Agilent Technologies (Agilent Co., USA)
Detector	Agilent Technologies 1200 Series ELSD
Column	Carbohydrate column (Alltech Co., USA, 250 mm L × 4.6 mm ID)
Solvent	75% Acetonitrile
Column temp.	30°C
Flow rate	1.0 mL/min
Injection volume	5 uL

#### 3) 유기산 분석

유기산 함량은 Paler와 List의 방법에 준하여 분석하였다. 즉, 시료 5 g에 증류수를 가하여 교반시킨 후 100 mL로 정용하여 원심분리(50,000 rpm, 30 min)하고 상정액을 취하여 여과(Whatman No.2)하였다. 여과한 여액을 Sep-pak C18으로 정제시킨 다음, 0.45 μm



membrane filter(Millipore Co., USA)로 여과 후 HPLC를 이용하여 분석하였으며, 함량은 integrator에 의한 외부표준법으로 계산하였다. 이 때 HPLC 분석 조건은 표 2와 같다.

표 2. 유기산 분석조건

Item	Condition
Instrument	1200 Series Agilent Technologies
Detector	UV (Agilent Co., USA)
Column	Grace Prevail Organic Acid (4.6 mm L × 250 mm ID, 5 μm)
Solvent	25 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (pH 2.5)
Column temp.	30°C
Wave length	210 nm
Flow rate	1.0 mL/min
Injection volume	5 uL

#### 4) 아미노산 분석

##### 가) 구성아미노산 분석

아미노산 분석은 Daniel과 Steven의 방법에 따라 분해 및 유도체화 과정을 거친 후 HPLC(1200 Series, Agilent Technologies, USA)로 분석하였다. 시료 0.5 g과 6 N-HCl 10 mL을 시험관에 넣고 시험관 끝을 불로 녹여 밀봉한 후, 멸균기로 110°C에서 24시간 가수분해 시켰다. 가수분해가 완료된 시료는 여과하면서 methanol 50 mL로 정용하여 감압농축한 후, 20 mM HCl 5 mL로 정용하였다. 0.45 μm membrane filter로 여과하여 얻은 여액을 일정량 취한 후 AccQ-Tag 시약을 사용하여 유도체화 시킨 후 HPLC로 분석하였고 함량은 integrator에 의한 외부표준법으로 계산하였고 분석조건은 표 3과 같다.

##### 나) 유리아미노산 분석

유리 아미노산 분석은 유리당 정량과 같은 방법으로 얻은 여액을 Ohara와 Ariyosh의 방법으로 분석하였다. 즉 시료 5 g을 유리당 전처리 방법과 같이 처리한 여액 10 mL에 sulfasalicylic acid 25 mg을 첨가하여 4°C에서 4시간 동안 방치시킨 후 원심분리(50,000 rpm, 30 min)하여 단백질을 제거하고, 상정액을 0.45 μm membrane filter로 여과하여 얻은 여액을 일정량 취하여 AccQ-Tag 시약을 사용하여 유도체화 시킨 후 HPLC로 분석하였다. 함량은 integrator에 의한 외부표준법으로 계산하였고 분석조건은 구성아미노산과 같다(표 3).

표 3. 아미노산 분석조건

Item	Condition																																												
Instrument	1200 Series Agilent Technologies																																												
Detector	Agilent Technologies 1200 Series FLD																																												
Column	AccQ-Tag™ (Waters Co., 150 mm L × 3.9 mm ID)																																												
Column temp	37°C																																												
	A : AccQ-Tag Eluent A (Acetate-phosphate buffer)																																												
	B : AccQ-Tag Eluent B (100% Acetonitrile)																																												
	C : DW																																												
	<table border="1"> <thead> <tr> <th>time (min)</th> <th>A %(v/v/v)</th> <th>B</th> <th>C</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>0</td> <td>100</td> <td>0</td> <td>0</td> </tr> <tr> <td>0.5</td> <td>99</td> <td>1</td> <td>0</td> </tr> <tr> <td>18</td> <td>95</td> <td>5</td> <td>0</td> </tr> <tr> <td>19</td> <td>91</td> <td>9</td> <td>0</td> </tr> <tr> <td>26</td> <td>86.7</td> <td>13.3</td> <td>0</td> </tr> <tr> <td>30</td> <td>84</td> <td>16</td> <td>0</td> </tr> <tr> <td>32</td> <td>83</td> <td>17</td> <td>0</td> </tr> <tr> <td>36</td> <td>0</td> <td>60</td> <td>40</td> </tr> <tr> <td>39</td> <td>100</td> <td>0</td> <td>0</td> </tr> <tr> <td>48</td> <td>100</td> <td>0</td> <td>0</td> </tr> </tbody> </table>	time (min)	A %(v/v/v)	B	C	0	100	0	0	0.5	99	1	0	18	95	5	0	19	91	9	0	26	86.7	13.3	0	30	84	16	0	32	83	17	0	36	0	60	40	39	100	0	0	48	100	0	0
time (min)	A %(v/v/v)	B	C																																										
0	100	0	0																																										
0.5	99	1	0																																										
18	95	5	0																																										
19	91	9	0																																										
26	86.7	13.3	0																																										
30	84	16	0																																										
32	83	17	0																																										
36	0	60	40																																										
39	100	0	0																																										
48	100	0	0																																										
Buffer solution																																													
Flow rate	1.0 mL/min																																												
Injection volume	5 uL																																												

5) 무기성분 분석

무기성분은 건식분해법으로 전 처리하여 분석하였고, 분석조건은 표 4와 같다. 즉 시료 0.5 g을 600°C에서 회화시켜 백색회분을 얻은 후, 2배 희석한 진한 염산 10 mL를 가해 여과하여 수욕상에서 증발 건조 시킨 후 4배 희석한 염산 10 mL를 가한 후, 증류수를 이용하여 100 mL로 정용한 여액을 분석시료로 사용하였다. 각 무기성분의 정량은 원자흡광광도계 (AAAnalyst 400, Perkin Elmer, USA)로 각 원소의 표준 용액 농도를 0.1, 0.5 및 1.0 ppm으로 조제하여 표준 검량 곡선을 작성하여 분석하였다.

표 4. 무기성분 분석조건

Item	Condition
Instrument	Atomic Absorption Spectrophotometer (AAAnalyst 400, Perkin Elmer)
Fuel flow	C2H2, 2.0/min
Oxidant flow	Air, 10.0 L/min
Wavelength(nm)	K: 766.49, Mg: 285.51, Na: 589.00 Ca: 422.67

다. 하수오 시료추출 및 활성화

1) 하수오 열수추출

하수오 시료 1 kg에 증류수 10 L를 가하여 85℃에서 3시간 동안 환류추출하여 추출하였다. 동일한 과정을 3반복 한 후 회수한 추출액을 여과(Whatman No.2)하였고, 이 추출여액을 rotary vacuum evaporator(EYELA N-1000S, Japan)로 50℃ 수욕상에서 감압농축 후 동결 건조하여 4℃의 냉장실에 보관하면서 사용하였다.

2) 항산화활성 측정

가) Total flavonoid content(TFC)

Total flavonoid content 분석은 Herald 등이 사용한 실험방법에 준하여 측정하였다. 추출물 25 uL에 증류수 100 uL 와 5% NaNO<sub>2</sub> 10 uL를 가한 다음, 5분 후 10% AlCl<sub>3</sub> 15 uL를 가하여 6분간 방치하고 1 N NaOH 50 uL 와 증류수 50 uL를 가하였다. 1분 후, 반응액의 흡광도 값을 510 nm에서 측정하였다. 표준물질은 quercetin을 사용하여 표준 검량선을 작성 후 추출물의 총 플라보노이드 함량은 mg QE(quercetin equivalent)/g로 나타내었다. 표준물질은 quercetin을 0.5, 1.0, 5.0, 10, 50 및 100 mg/mL로 만들어 처리한 후 흡광도와 농도의 관계를 나타내는 표준곡선을 만들어 total flavonoid 함량을 나타냈다.

나) Total polyphenol content (TPC)

Total polyphenols 분석은 Folin-Denis법으로 실험하였다. 증류수에 희석한 시료 25 uL에 증류수 75 uL와 Folin-Ciocalteu phenol reagent 시약 25uL를 가하고, 6분간 반응 시킨 뒤 포화용액 Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 100 uL를 가하여 혼합한 후 90분간 실온에서 방치하고, 765 nm에서 흡광도를 측정한 후, 표준물질인 gallic acid를 사용하여 표준 검량선을 작성 후 추출물의 총 폴리페놀 함량을 mg GAE(gallic acid equivalent)/g로 나타내었다. 표준물질은 gallic acid를 각각 0.5, 1.0, 5.0, 10, 50 및 100 mg/mL로 만들어 처리한 후 흡광도와 농도와의 관계를 나

타내는 표준곡선을 만들어 total polyphenols 함량을 나타냈다.

3) 하수오추출물의 rhein, emodin, chrysophanol, physcion 및 2,3,5,4'-tetrahydroxystilbene-2-O-β-D-glucoside 함유 검증

Anthraquinone류의 standard 물질 4종(rhein, emodin, chrysophanol, physcion) 및 2,3,5,4'-tetrahydroxystilbene-2-O-β-D-glucoside(THSG)의 함유 여부를 LC-MS와 ELSD를 사용하여 분석하였다. 분석조건은 표 5와 같다.

표 5. LC-MS 분석조건

Item	Condition
Instrument	Agilent Technologies 1260 series HPLC / Agilent Technologies 6130 Quadrupole LC-MS / Agilent ELSD / Agilent Technologies 1260 Hip ALS(Agilent Technologies, USA)
Column	Poroshell 120(SB-C18 2.7 um 4.6×150 mm, Agilent Technologies, USA)
Solvent	5% acetonitrile : 95% Water → 100% acetonitrile
Column temp.	37°C
Wavelength	UV 210, 254, 280, 310, 365, 400, 525, 750 nm
Flow rate	0.8 mL/min
Sample concentration	1,000 ug/mL
Injection volume	Standard 10 uL / Sample 30 uL

라. 최적 버섯균사체 탐색

1) 하수오 접종 발효균사 종별 성장 측정

하수오 버섯발효 조건 수립을 위하여 우선 표고, 동충하초, 상황, 치마버섯 4종의 균사를 증자 후 열풍건조 된 하수오를 톱밥과 동일한 비율(1:1, w/w)로 혼합한 후 직경 24 mm, 높이 200 mm의 투명한 원통형 시험관에 각각 50 g씩 넣은 후, 121°C에서 15분간 멸균하여 식힌 후 표고균사체를 하수오의 표면부분에 접종하고 표고, 동충하초, 치마버섯 균사는 26°C로 설정한 배양기에서 배양하였다. 상황균사는 30°C로 설정한 배양기에서 배양하였다. 균사체의 성장은 접종면으로부터 아래로 성장해간 균사의 길이를 측정하여 나타내었다. 그 결과 표고에서 균사밀도가 정상적으로 나타났으며, 상황과 치마버섯은 낮은 수준의 균사밀도를 나타내

었다. 따라서 본 연구에서는 표고를 발효균주로 선정하였다. 표고 발효의 효율성 향상을 위하여 (재)장흥군버섯산업연구원에서 배양한 JMI10075, JMI10076, JMI10077, JMI10078 및 JMI10079 총 5종의 톱밥배지용 버섯균사를 하수오 발효에 접목한 결과, JMI10079 > JMI10078 > JMI10075 > JMI10076 > JMI10077 순으로 균사밀도가 높게 나타났다. 이상의 결과를 바탕으로 하수오 버섯발효에 사용한 최종 균사는 표고균사 JMI10079로 결정하였다.

표 5. 버섯균사 종류에 따른 하수오 발효조건

버섯균사	발효온도	발효기간(일)	균사밀도 (mg/20day)
표고 ( <i>Lentinula edodes</i> )	26℃	30	48.7±4.2
동충하초 ( <i>Codyceps militaris</i> )	26℃	30	-
상황 ( <i>Phellinus linteus</i> )	30℃	30	4.2±0.4
치마버섯 ( <i>Schizophyllum commune</i> )	26℃	30	6.7±0.2

표 7. 표고균사 종류에 따른 하수오 발효조건

버섯균사	발효온도	발효기간(일)	균사밀도 (mg/20day)
JMI10075	26℃	20	32.7±3.9
JMI10076	26℃	20	24.6±3.7
JMI10077	26℃	20	19.4±2.7
JMI10078	26℃	20	36.5±3.1
JMI10079	26℃	20	46.8±2.4

마. 최적 발효 조건 탐색

1) 재료 및 방법

가) 재료

하수오는 동부생약조합법인에서 제공받았으며, 발효에 사용한 표고균사는 (재)장흥군버섯산업연구원에서 분양받은 *L. edoeds* (JMI10079)를 배양하여 연구를 진행하였다.

나) 방법

(1) 하수오 입도크기에 따른 균사의 성장 측정

증자 후 열풍건조 된 하수오를 각각 25 mesh, 50 mesh, 100 mesh체를 통과한 분말과 25 mesh를 통과하지 않은 잔류물을 시료로 하여, 직경 24 mm, 높이 200 mm의 투명한 원통형 시험관에 각각 50 g씩 넣은 후, 121℃에서 15분간 멸균하여 식힌 후 표고균사체를 하수오의 표면부분에 접종하고 23, 25, 27 및 29℃로 설정한 배양기에서 배양하였다. 균사체의 성장은 접종면으로부터 아래로 성장해간 균사의 길이를 측정하여 나타내었다.

#### (2) pH에 따른 하수오에서 따른 균사의 생장 측정

증류수를 1N HCl과 1N NaOH를 사용하여 pH를 4.0~8.0으로 조절한 후, 25 mesh를 통과하지 않은 하수오 잔류물을 직경 24 mm, 높이 200 mm의 투명한 원통형 시험관에 각 하수오 50 g씩 넣은 후, 121℃에서 15분간 멸균하여 식힌 후 표고균사체를 하수오의 표면부분에 접종하고 30℃로 조절된 배양기에서 배양하였다. 균사체의 성장은 접종면으로부터 아래로 성장해간 균사의 길이를 측정하여 나타내었다.

#### (3) 탄소원에 따른 균사의 생장 측정

탄소원으로 glucose, lactose, maltose, starch, sucrose 5종을 선택하여 증류수에 2% 농도로 각각의 탄소원을 각 25 mesh를 통과하지 않은 하수오 50 g과 함께 직경 24 mm, 높이 200 mm의 투명한 원통형 시험관에 넣은 후, 121℃에서 15분간 멸균하여 식힌 후 표고균사체를 하수오의 표면부분에 접종하고 30℃로 조절된 배양기에서 배양하였다. 균사체의 성장은 접종면으로부터 아래로 성장해간 균사의 길이를 측정하여 나타내었다.

#### (4) 질소원에 따른 균사의 생장 측정

질소원으로 ammonium tartrate, glutamic acid, malt extract, potassium nitrate, urea 5종을 선택하여 증류수에 2% 농도로 각각의 질소원을 녹여, 각 25 mesh를 통과하지 않은 하수오와 함께 직경 24 mm, 높이 200 mm의 투명한 원통형 시험관에 50 g씩 넣은 후, 121℃에서 15분간 멸균하여 식힌 후 표고균사체를 하수오의 표면부분에 접종하고 30℃로 조절된 배양기에서 배양하였다. 균사체의 성장은 접종면으로부터 아래로 성장해간 균사의 길이를 측정하여 나타내었다.

#### (5) 곡류배지에서의 대량 배양

하수오를 2% 탄소원 용액에 4시간 수침하고 30분간 물 빼기를 행한 다음, 직경 24 mm, 높이 200 mm의 투명한 원통형 시험관에 25 mesh를 통과하지 않은 하수오를 넣은 후, 121℃에서 15분간 멸균하여 식힌 후 표고균사체를 하수오의 표면부분에 접종하고 25℃로 조절된 배양기에서 배양하였다(그림 2).

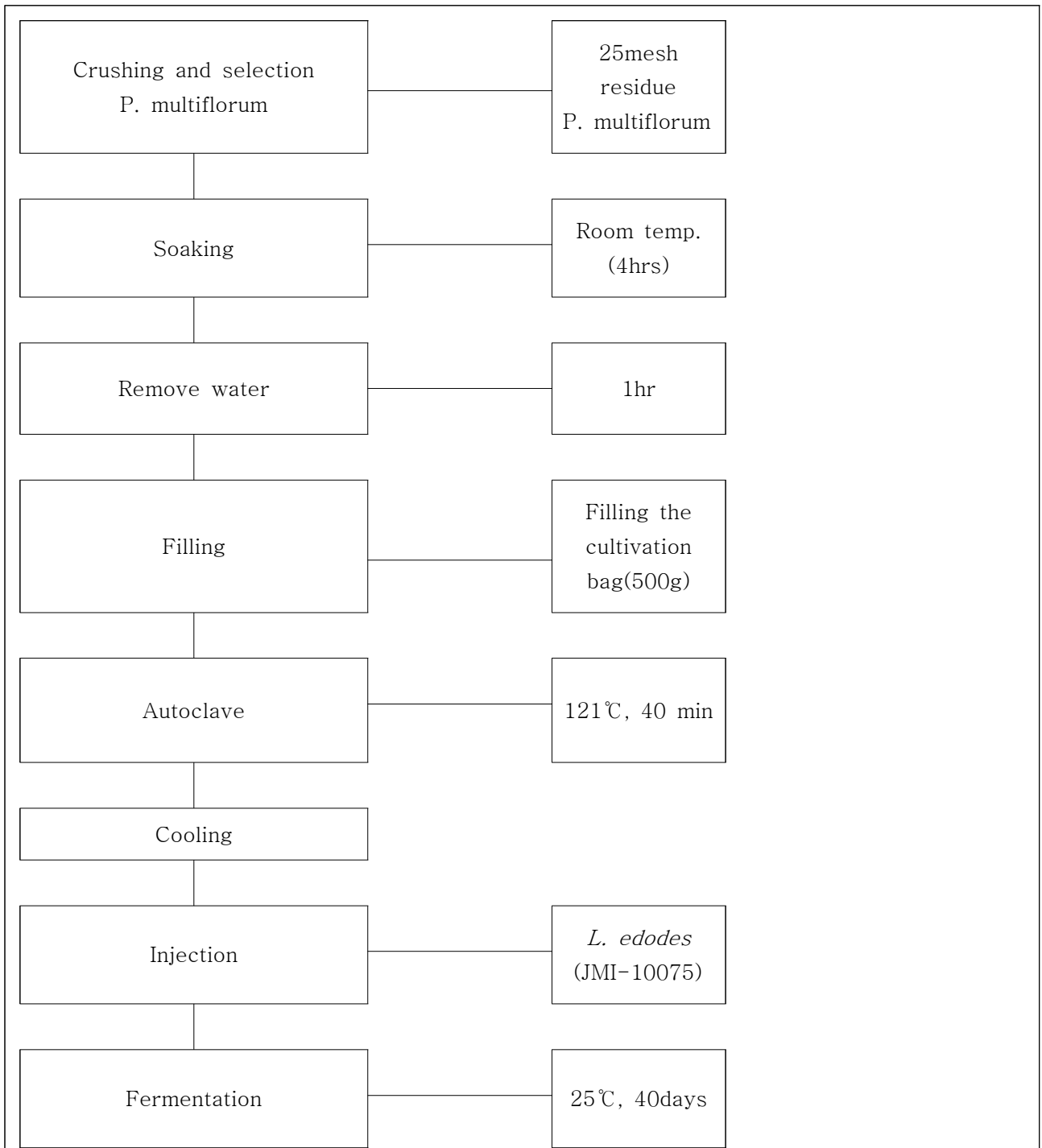


그림 2. 하수오 버섯균사 발효 공정

바. 발효 하수오의 유효성분 분석

1) 발효 하수오추출물의 rhein, emodin, chrysophanol, physcion 및 2,3,5,4'-tetrahydroxystilbene-2-O- $\beta$ -D-glucoside 함유 검증

Anthraquinone류의 standard 물질 4종(rhein, emodin, chrysophanol, physcion) 및 2,3,5,4'-tetrahydroxystilbene-2-O- $\beta$ -D-glucoside(THSG)의 함유 여부를 LC-MS와 ELSD를 사용하여 분석예정.

사. 발효 하수오의 이화학 성분 분석

1) 일반성분 분석

실험방법은 2-가-1)의 방법과 동일하다.

2) 유리당 분석

실험방법은 2-가-2)의 방법과 동일하다.

3) 유기산 분석

실험방법은 2-가-3)의 방법과 동일하다.

4) 아미노산 분석

가) 구성아미노산 분석

실험방법은 2-가-4)-가)의 방법과 동일하다.

나) 유리아미노산 분석

실험방법은 2-가-4)-나)의 방법과 동일하다.

5) 무기성분 분석

실험방법은 2-가-5)의 방법과 동일하다.

아. 발효 하수오 음료 부원료 추출조건

1) 열수추출

열수추출은 그림 3의 방법으로 원료를 절편하여 20배의 물을 첨가하여 추출온도(60, 80, 100℃), 추출시간(1, 3, 6, 9, 12, 15hrs)등을 각기 달리하여 실시하였다. 즉 발효하수오, 속단, 홍화자, 당귀를 조체 중량의 일정한 비율로 물을 첨가하여 시간별로 진탕시키면서 추출한 뒤



원심분리(4,000rpm, 15min)한 후 상층액을 각각의 추출액으로 하였다.

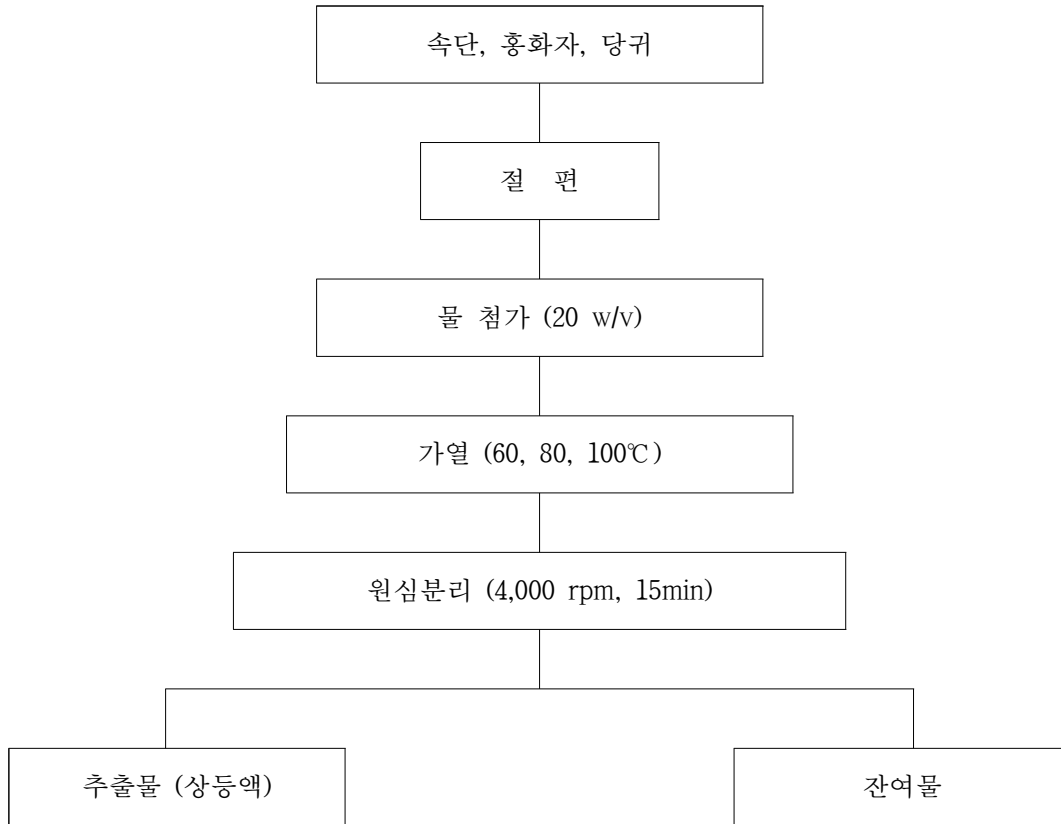


그림 3. 부원료 생약초의 열수추출물 제조 공정도

자. 발효 하수오 음료 부원료 이화학분석

1) 일반성분 분석

실험방법은 2-가-1)의 방법과 동일하다.

2) 유리당 분석

실험방법은 2-가-2)의 방법과 동일하다.

3) 아미노산 분석

가) 구성아미노산 분석

실험방법은 2-가-4)-가)의 방법과 동일하다.

4) 무기성분 분석

실험방법은 2-가-5)의 방법과 동일하다.

차. 시제품 제작

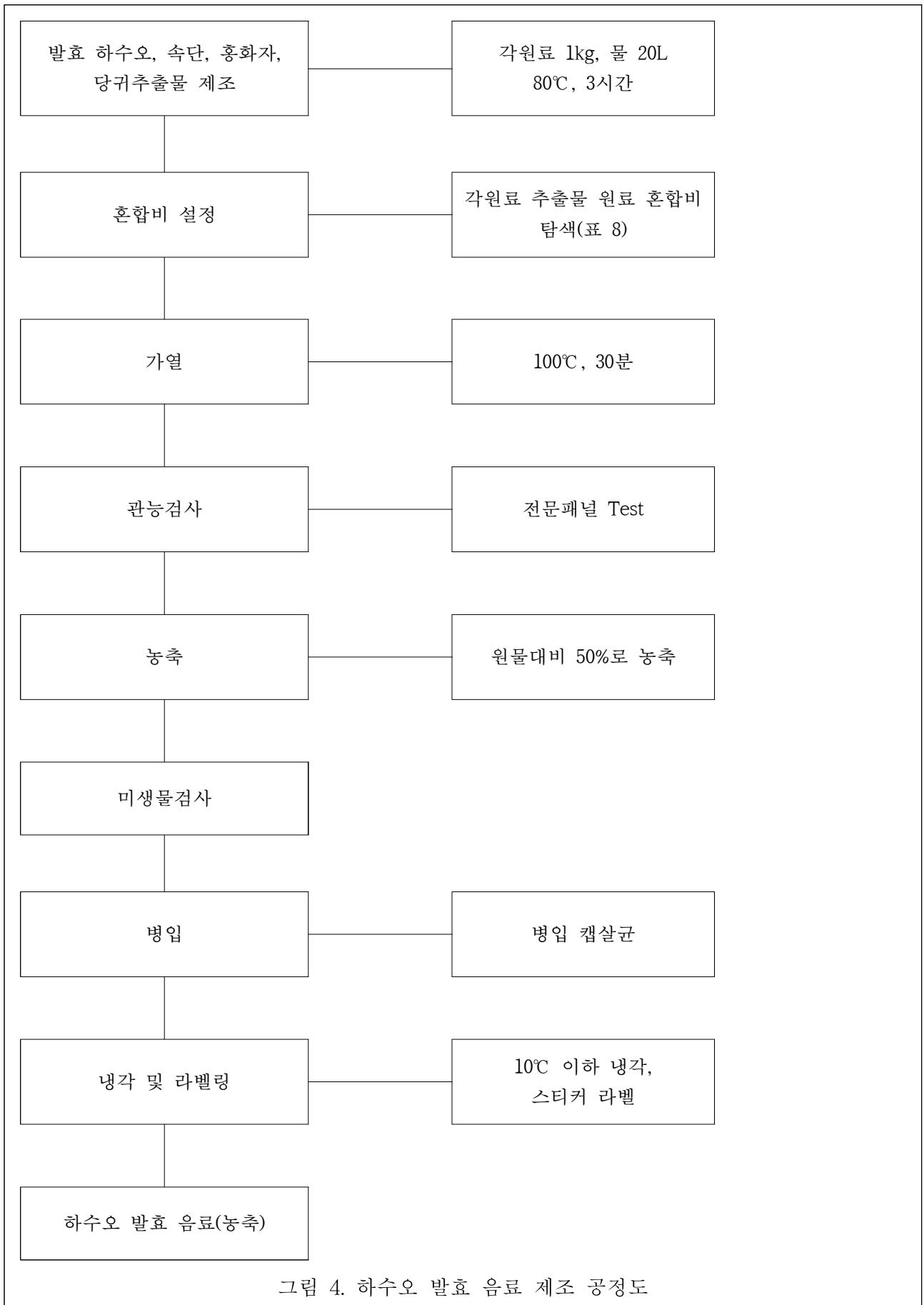
1) 후보소재의 혼합비

시제품 제조에 사용된 하수오, 속단, 홍화자, 당귀 추출물들의 배합비율은 아래 표 8과 같고 발효 하수오 음료 제조공정도는 그림 4와 같다.

표 8. 하수오 발효 음료 제조를 위한 원료 혼합 비율

(mL)

시료	발효 하수오	속단	홍화자	당귀
A	100	70	50	30
B	100	50	50	50
C	100	50	70	30
D	100	50	30	70
E	100	30	50	70
F	100	40	60	50
G	100	40	50	60



## 2) 시제품 관능검사

선호도 높은 시제품 제작을 위한 원료 혼합 비율을 결정하기 위하여 발효 하수오, 속단, 홍화자 및 당귀의 추출물 혼합비를 달리하여 제조한 시료들에 대하여 panel 11명을 대상으로 색, 향, 맛 및 전체 기호도를 5점 평점법으로 실시하였다. 이때 채점 기준은 아주 좋다; 5점, 좋다; 4점, 보통이다; 3점, 나쁘다; 2점, 아주 나쁘다; 1점으로 하였고, 2시간 간격으로 시료의 번호를 바꾸어 같은 panel로 3회 반복하였으며 각 반복 시 가장 높은 점수와 가장 낮은 점수를 제외하고 평균 득점을 구하였다. 처리구별 유의성 검정은 SPSS프로그램을 이용한 Duncan의 다중 비교법으로 분석하였다.

## 카. 갱년기 in vitro

### 1) E-screen assay

MCF-7 세포는 10% FBS가 함유된 Dullbecco's modified Eagle's medium(DMEM) 배지를 사용하여 5% CO<sub>2</sub>, 37°C 조건하에서 배양함. Hormone induction하기 전 세포는 PBS 로 세척하며, 시료 처리 전 모든 estrogenic source를 제거하기 위해서 2일 동안 10% charcoal-dextran stripped FBS (CD-FBS)가 함유된 phenol red free DMEM에서 배양하고 배양된 세포는 0.25% trypsin-EDTA를 처리하여 1000 rpm에서 5분간 원심분리하고, 세포수를 측정하여 5×10<sup>3</sup>cells/well이 되도록 96well 배양판에 분주하였다. 24시간 후 시료를 처리하고 7일(144시간)간 배양한 후 MTT assay로 세포의 증식 정도를 측정하였다.

### 2) MTT assay

시료를 농도별로 처리하여 배양하고, MTT 용액을 각 well에 첨가하여 4시간 동안 반응시켰다. MTT 용액을 제거하고 DMSO를 넣고 15분 후에 ELISA reader를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하고 그 결과를 control 값에 대한 비율로 계산하였다.

### 3) Estrogen receptor binding assay

estrogen receptor binding assay는 assay kit에서 제공하는 매뉴얼에 따라 진행하였다. 결합능력은 시료의 존재하에 polarization value에 의해 결정된다.

### 4) 유전자 발현 측정

시료 처리 후 배양된 세포는 lysis buffer (50 mM tris-Cl, 150 mM NaCl, 5mM EDTA, 1% Triton X-100, 1 mM sodium fluoride, 1 mM sodium vanadate, 1% deoxycholate, protease inhibitors)를 이용하여 용해하고 원심분리하여 순수한 단백질을 얻었다. 단백질은 BCA Protein assay kit를 사용하여 정량하고 동량의 단백질은 10% SDS-polyacrylamide gel에서 분리하였다. 분리된 단백질은 PVDF membrane으로 옮기고 PVDF membrane은 5% non-fat drymilk를 처리하여 비특이 단백질이 붙는 것을 방지하였다. 그리고 1차 항체 및 2차 항체를 처리하였다. TBS-T 완충용액으로 PVDF막을 세척하여 enhanced chemiluminescence를 이용해 단백질 발현을 관찰하였다.

타. 하수오 및 하수오/표고 발효소재의 항산화 활성 분석

1) 항산화 효능 분석

가) DPPH 라디칼 소거능

- 시료는 methanol을 이용하여 1 mg/mL 농도로 준비하였음.
- DPPH 시약은 빛을 차단한 상태에서 0.1 mM 농도가 되도록 methanol에 녹여 준비하였음.
- 시료 100  $\mu$ L과 DPPH 시약 0.5 mL을 넣고 20분 동안 빛을 차단한 조건에서 반응시킨 후 Microplate reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)를 이용하여 517 nm에서 흡광도를 측정하였음.
- 음성대조군으로 시료 대신 methanol을 사용하였고, 양성대조군으로는 시료 대신 ascorbic acid(1 mg/mL)를 가하여 동일한 조건으로 실험을 수행하였음.
- DPPH 라디칼 소거능은 다음과 같은 식을 이용하여 DPPH 억제율 (Inhibitory activity, %)을 산출하였음.
- DPPH inhibition (%) =  $[1 - (\text{시료 처리군의 흡광도} / \text{시료 무처리군의 흡광도})] \times 100$

나) Hydroxyl 라디칼 소거능

- 제조된 시료용액 0.15 mL에 buffer 0.35 mL, 3 mM deoxyribose, 0.1 mM ascorbic acid, 0.1 mM EDTA, 0.1 mM FeCl<sub>3</sub>, 1 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 용액 0.1 mL을 넣어 잘 교반한 후 37°C에서 1시간 동안 반응시킴.
- 반응이 끝난 후 2% TCA 용액과 1% TBA 용액을 잘 섞은 후 100°C에서 20분간 반응한 후 실온으로 냉각하여 원심분리한 뒤 상등액을 취하여 분광광도계를 이용하여 532 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 라디칼 소거능(%)을 다음의 식으로 계산함.
- Free radical scavenging effect (%) =  $(\text{Absblank} - \text{Abssample}) / \text{Absblank} \times 100$

다) Fe<sup>2+</sup> chelating 활성

- 2 mM FeCl<sub>2</sub> 60  $\mu$ L, 농도별 시료 40  $\mu$ L와 증류수 700  $\mu$ L를 혼합한 후 상온에서 약 10분간 반응 시켰음.
- 반응 후 5 mM ferrozine을 첨가하여 Fe<sup>2+</sup>-ferrozine complex를 유도하기 위해 상온에서 약 5분간 반응 시킨 후 UV/Visible spectrophotometer(Berkman, USA)을 이용하여 562 nm에서 흡광도를 측정하였음.
- 다음 식으로 킬레이팅 활성(%)을 구하였음.
- 킬레이팅 활성(%) =  $\{1 - (\text{추출물 첨가구의 흡광도} / \text{추출물 무 첨가구의 흡광도})\} \times 100$

라) Reducing power

- 추출물에 0.2 M sodium phosphate buffer(pH 6.6) 500  $\mu$ L, 1% potassium ferricyanide 500  $\mu$ L를 각각 혼합하여 50°C에서 20분 동안 반응시킨 후 10% trichloroacetic acid 2.5 mL을 가하였음.
- 위 반응액을 650 rpm에서 10분간 원심분리하여 상층액 500  $\mu$ L에 증류수 500  $\mu$ L, 1% ferric chloride 100  $\mu$ L를 가하여 혼합한 반응액의 흡광도 값을 700 nm에서 측정하였음.

마) 지질 과산화 분석(Malondialdehyde 함량)

- 조직 절편의 homogenate를 만든 후 추출물에 0.8% TBA 1 mL와 1 mM FeSO<sub>4</sub> (in 20% TCA 0.5 mL)와 D.W 1.3 mL를 첨가한 다음 잘 혼합하여 98°C 수욕조에서 30분 동안 반응시킨 후 바로 냉각
- 냉각한 tube에 n-butanol 5 mL을 가하여 잘 섞고 4,000 rpm에서 10분간 원심분리 시켜 상층액을 취하여 532 nm에서 흡광도를 측정
- 표준물질로 1,1,3,3-tetraethoxypropane을 사용
- 지질과산화물 수준은 조직의 nmole MDA/g 로 도출

파. 하수오/표고 발효소재의 여성갱년기개선 분석

1) 폐경모델 제작 및 여성 갱년기 개선 분석

가) 폐경모델 제작

Sprague-Dawley계 암컷 rat (200-210g)을 대조군과 실험군으로 나누며 실험군은 근육주사로 마취시킨 후 복부의 털을 제거한 다음 무균 상태로 수술을 시행. 먼저 복부 정중절개를 시행하여 개복한 다음 양측의 난소를 제거한 후 다시 복부를 봉합. 3일 후 시료 투여함. 시료 투여는 매일 50-100 mg/kg 농도로 경구투여하고 대조군은 같은 용량의 생리식염수를 투여함.

나) 혈액 내 생화학적 분석

혈청 분리를 위해 실험동물을 해부 전 24시간 절식시킨 후 ether 마취 하에서 개복한 후 정맥에서 채혈하고 실온에서 30분간 방치 한 후 3,000 rpm, 4°C에서 10분간 원심 분리하여 혈청을 분리하고, 실험 시까지 -70°C에 보관함.

혈청 내 생화학적 지표로 혈중 여성 호르몬 E1 (Estrone) 등, 성욕감쇠 Testosterone, 지질대사 Total cholesterol, HDL, LDL, VLDL, Triglyceride, 우울증 [IL-1 $\beta$ ], 골대사 ALP (Alkaline phosphatase) activity, Calcium level 측정함.

다) 조직 분석

장기 적출을 위해 실험동물을 해부 전 24시간 절식시킨 후 ether 마취 하에서 개복한 후 혈청 분리 후 0.9% 생리 식염수 용액으로 관류 시킨 후 물기를 제거하고, 조직은 분리하며 피부는 털을 잘라내고 표피 위의 지방을 제거하여 무게를 잰 후 분석할 때 까지 -70°C에 보관함.

조직염색을 위해 동물은 희생시켜 질 및 조직을 절제한 후 phosphate buffered paraformaldehyde 고정액으로 3시간동안 냉고정한 후 세척과 탈수과정을 거쳐 파라핀에 포매하여 5 $\mu$ m 두께로 절개한 후 Hematoxylin & Eosin과 Masson's trichrome염색을 실시함.

단백질 발현을 확인하기 위해 western blotting analysis를 수행하며, 폐경모델 갱년기장애 Estrogen receptor in vagina와 우울증 Serotonin (5-HT) in hippocampus에 관련된 단백질의 발현을 확인함.

## II. 결과

### 1. 하수오 원료 분석

#### 가. 일반성분 함량

건조방법에 따른 하수오의 일반성분 분석결과는 표 9와 같다. 열풍건조 하수오, 음건 하수오 및 동결건조 하수오의 수분함량은 각각 7.35%, 8.25% 및 3.18%로 동결건조 하수오의 수분함량이 가장 낮게 나타났다. 조단백질 함량은 동결건조 하수오가 7.13%로 열풍건조 하수오 4.29% 및 음건 하수오 5.64%에 비하여 높은 함량을 나타내었다. 열풍건조 하수오, 음건 하수오 및 동결건조 하수오의 조지방 함량은 각각 0.58%, 1.11% 및 0.98%로 나타났으며, 이는 같은 마디풀과 식물인 소리쟁이 뿌리의 조지방 함량 2.58%에 비하여 다소 낮은 함량을 보였다. 조회분 함량은 각각 4.62%, 4.91% 및 5.28%로 나타났다. 열풍건조 하수오, 음건 하수오 및 동결건조 하수오의 조섬유 함량은 각각 3.38%, 3.26% 및 2.92%로 나타났다. 가용성 무질소물 함량은 동결건조 하수오가 83.58%로 열풍건조 하수오(79.78%)와 음건 하수오(76.83%)에 비하여 높은 함량을 나타내었다.

표 9. 건조방법에 따른 하수오의 일반성분 함량

구성	함량(%)		
	열풍건조	음건	동결건조
수 분	7.35±0.22 <sup>1)</sup>	8.25±0.31	3.18±0.16
조단백질	4.29±0.49	5.64±0.32	7.13±0.68
조 지방	0.58±0.17	1.11±0.18	0.91±0.08
조 회 분	4.62±0.42	4.91±0.73	5.28±0.81
조 섬유	3.38±0.33	3.26±0.21	2.92±0.14
가용성무질소물	79.78±2.14	76.83±2.36	80.58±1.97

<sup>1)</sup> Values are presented mean ± SD(n=3).

#### 나. 유리당 함량

건조방법을 달리한 하수오의 유리당은 표 10과 같이 fructose, glucose 및 sucrose가 검출되었으며, 총 유리당 함량은 동결건조 하수오, 음건 하수오 및 열풍건조 하수오 순으로 열을

적게 가한 하수오의 총 유리당 함량이 높게 나타났다. 열풍건조 하수오에서 유리당 함량은 sucrose가 7.06%, glucose와 fructose가 각각 0.58%와 0.57%로 나타났으며, 음건 하수오의 유리당 함량은 sucrose가 9.83%, glucose와 fructose가 각각 0.68%와 0.99%로 나타났다. 동결건조 하수오의 유리당 함량은 sucrose가 12.06%, glucose와 fructose가 각각 0.99%와 1.47%로 나타났다. 건조방법을 달리한 모든 하수오에서 sucrose 함량이 가장 높게 나타났으며, 건조방법에 따라 sucrose를 비롯한 유리당들의 함량차이가 크게 나타났다. 이는 인삼을 건조할 때 70~80℃의 온도에서 sucrose 함량의 변화가 거의 없다는 Kim 등이 보고와 상반되어, 하수오의 유리당은 높은 온도에서 장시간 건조할 경우 감소됨을 확인하였다.

표 10. 건조방법에 따른 하수오의 유리당 함량

유리당	함량(%)		
	열풍건조	음건	동결건조
Fructose	0.57±0.11 <sup>1)</sup>	0.99±0.04	1.47±0.11
Glucose	0.58±0.10	0.68±0.01	0.99±0.09
Sucrose	7.06±0.08	9.83±0.00	12.06±0.29
Total free sugars	8.21	11.5	14.52

<sup>1)</sup> Values are presented mean ± SD(n=3).

#### 다. 유기산 함량

건조방법에 따른 하수오의 유기산 분석결과는 표 11과 같다. 하수오의 유기산 분석결과 총 4종의 유기산이 검출되었으며, oxalic acid가 가장 높게 나타났다. 이는 하수오와 같이 지하부를 이용하는 야콘 연구에서 Kim 등이 보고한바와 같이 야콘의 oxalic acid 함량이 2,519.29 mg%로 가장 높은 것과 유사한 결과이다. 열풍건조 하수오의 유기산 함량은 oxalic acid 524.45 mg%로 나타났으며, tartaric acid, malic acid 및 malonic acid는 각각 84.70 mg%, 95.75 mg% 및 12.38 mg%로 나타났다. 음건 하수오의 유기산 함량은 oxalic acid가 1,482.32 mg%로 나타났으며, tartaric acid, malic acid 및 malonic acid가 각각 143.66 mg%,



63.92 mg% 및 31.46 mg%로 나타났다. 가장 많이 검출된 유기산인 oxalic acid는 체내에서 축적되어 무기질의 생체 내 이용도를 낮추는 것으로 알려져 있다. 연구결과 유기산은 음건 하수오에서 가장 높은 함량을 보였으며, 그 중 oxalic acid 함량이 높게 나타났다. 동결건조 하수오에서는 oxalic acid 함량이 377.0 mg%로 적게 나타났고, tartaric acid를 비롯한 다른 유기산들의 함량은 다른 건조방법 하수오에 비하여 높은 함량을 보였다.

표 11. 건조방법에 따른 하수오의 유기산 함량

유기산	함량(%)		
	열풍건조	음건	동결건조
Oxalic acid	524.45 ± 1.63 <sup>1)</sup>	1,482.32 ± 2.92	377.00 ± 2.29
Tartaric acid	84.70 ± 7.72	143.66 ± 1.44	156.38 ± 1.29
Malic acid	95.75 ± 7.67	63.92 ± 3.13	242.24 ± 0.07
Malonic acid	12.38 ± 7.50	31.46 ± 1.63	59.57 ± 1.93
Total organic acids	717.28	1,721.36	835.19

<sup>1)</sup> Values are presented mean ± SD(n=3).

#### 라. 아미노산 함량

##### 1) 구성아미노산 함량

건조방법에 따른 하수오의 구성아미노산 분석결과는 표 12와 같다. 총 16종의 아미노산이 검출되었으며, 모든 시험구에서 arginine이 높게 나타났다. Arginine과 histidine은 성장에 관여하는 필수아미노산으로 동결건조 하수오와 음건 하수오에서 함량이 높게 나타났다. 열풍건조 하수오의 구성아미노산 함량을 살펴보면 arginine이 586.67 mg% 로 가장 많이 함유되어 있었고, glutamic acid, proline 및 aspartic acid가 503.3 mg%, 283.78 mg% 및 260.84 mg%으로 높게 나타났다. 음건 하수오의 구성아미노산 함량은 arginine이 1,091.06 mg%로 가장 많이 함유되어 있었고, glutamic acid, lysine 및 aspartic acid의 함량이 각각 727.02 mg%, 455.25 mg% 및 418.73 mg%으로 높게 나타났다. 동결건조 하수오의 구성아미노산 함량은 arginine이 1,258.01 mg%로 다른 시험구에 비하여 가장 많은 함량을 보였고, glutamic acid,

proline 및 serine의 함량이 각각 820.97 mg%, 577.41 mg% 및 462.87 mg% 순으로 높게 나타났다.

총 구성아미노산의 함량은 열풍건조 하수오, 음건 하수오 및 동결건조 하수오에서 각각 3,469.03 mg%, 5,630.84 mg% 및 6,256.54 mg%로 음건 하수오와 동결건조 하수오가 열풍건조 하수오에 비하여 높은 함량을 보였다.

표 12. 건조방법에 따른 하수오의 구성아미노산 함량

총 아미노산	함량(mg%)		
	열풍건조	음건	동결건조
Aspartic acid	260.84±18.97 <sup>4)</sup>	418.73±5.48	414.36±5.07
Serine	232.12±17.86	417.09±4.72	462.87±5.93
Glutamic acid	503.30±13.28	727.02±13.30	820.97±8.81
Glycine	155.42±7.95	236.90±2.66	260.67±6.25
Histidine	158.91±6.43	240.33±12.06	285.81±6.11
Arginine	586.67±17.19	1,091.06±10.75	1,258.01±12.30
Threonine	179.01±8.28	298.36±2.92	338.30±7.61
Alanine	179.35±8.74	296.74±4.23	306.58±1.13
Proline	283.78±7.77	358.77±5.99	577.41±2.17
Tyrosine	98.51±1.48	154.69±3.87	159.47±2.60
Valine	178.74±6.07	285.39±6.40	290.36±1.43
Methionine	29.15±4.67	63.93±1.27	61.91±1.56
Lysine	268.00±8.14	455.25±5.26	426.09±2.70
Isoleucine	145.15±4.32	245.25±1.62	253.70±1.97
Leucine	161.06±4.01	241.50±7.11	238.78±3.33
Phenylalanine	79.03±2.80	99.83±1.85	101.25±1.73
TAA <sup>1)</sup>	3,469.03	5,630.84	6,256.54
EAA <sup>2)</sup>	1,169.05	1,929.83	1,996.19
EAA/TAA(% <sup>3)</sup> )	33.70	34.27	31.91

<sup>1)</sup> TAA, total amino acid.

<sup>2)</sup> EAA, total essential amino acid (Thr.+Val.+Met.+Ile.+Leu.+Phe.+His.+Lys.).

<sup>3)</sup> EAA/TAA(%), total amino acid/total essential amino acid.

<sup>4)</sup> All values are mean ± SD(n=3).

## 2) 유리아미노산 함량

건조방법에 따른 하수오의 유리아미노산 분석결과는 표 13과 같다. 총 16종의 아미노산이 검출되었으며, 그중 arginine이 가장 높게 나타났다. 열풍건조 하수오의 유리아미노산 함량을 살펴보면 arginine이 210.48 mg% 로 가장 많이 함유되어있었고, proline, glutamic 및 histidine acid 순으로 함량이 각각 135.11 mg%, 34.17 mg% 및 28.23 mg%로 높게 나타났다. 음건 하수오의 유리아미노산 함량은 arginine이 170.44 mg%로 가장 많이 함유되어 있었고, proline, histidine 및 glutamic acid가 각각 56.48 mg%, 21.96 mg% 및 21.41 mg%로 높게 나타났다. 동결건조 하수오의 유리아미노산 함량은 aspartic acid가 258.51 mg%로 가장 많이 함유되어 있었고, proline, histidine 및 glutamic acid가 각각 119.18 mg%, 92.22 mg% 및 69.27 mg%로 높게 나타났다.

총 유리아미노산의 함량은 열풍건조 하수오, 음건 하수오 및 동결건조 하수오에서 각각 487.75 mg%, 12.64 mg% 및 694.68 mg%로 나타났다.

표 13. 건조방법에 따른 하수오의 유리아미노산 함량

총 아미노산	함량(mg%)		
	열풍건조	음건	동결건조
Aspartic acid	9.92±14.04 <sup>4)</sup>	11.06±0.85	30.05±7.35
Serine	8.80±12.45	-	16.29±2.22
Glutamic acid	34.17±32.03	21.41±1.04	69.27±41.83
Glycine	-	-	-
Histidine	28.23±24.53	21.96±3.83	92.22±17.95
Arginine	210.48±179.39	170.44±29.82	258.51±140.16
Threonine	14.65±12.64	6.98±0.99	28.26±6.02
Alanine	17.78±14.04	13.84±2.51	26.54±6.41
Proline	135.11±116.90	56.48±10.56	119.18±71.64
Tyrosine	9.87±8.07	4.13±0.53	20.26±2.63
Valine	6.87±6.00	2.09±0.01	7.04±1.62
Methionine	5.22±3.41	3.68±1.16	7.24±0.97
Lysine	-	-	10.05±3.10
Isoleucine	2.04±2.89	-	3.17±0.77
Leucine	2.09±2.95	-	2.95±0.82
Phenylalanine	2.51±2.06	0.57±0.80	3.66±0.46
TAA <sup>1)</sup>	487.75	312.64	694.68
EAA <sup>2)</sup>	61.61	35.29	154.59
EAA/TAA(% <sup>3)</sup>	12.63	11.29	22.25

<sup>1)</sup> TAA, total amino acid.

<sup>2)</sup> EAA, total essential amino acid (Thr.+Val.+Met.+Ile.+Leu.+Phe.+His.+Lys.).

<sup>3)</sup> EAA/TAA(%), total amino acid/total essential amino acid.

<sup>4)</sup> All values are mean ± SD(n=3).

마. 무기성분 함량

건조방법에 따른 하수오의 무기성분 분석결과는 표 14와 같다. 하수오의 무기성분 분석결과 potassium, calcium, magnesium, sodium이 검출되었다. 열풍건조 하수오의 무기성분 함량은 potassium이 1,077.18 mg%로 나타났으며, calcium, magnesium 및 sodium의 함량이 각각 125.89 mg%, 110.36 mg% 및 8.14 mg% 순으로 높게 나타났다. 음건 하수오의 무기성분 함량은 potassium이 1,392.02 mg%로 나타났으며, magnesium, calcium 및 sodium의 함량이 각각 137.09 mg%, 114.67 mg% 및 6.4 mg% 순으로 높게 나타났다. 동결건조 하수오의 무기성분 함량은 potassium이 1,515.01 mg%로 나타났으며, magnesium, calcium 및 sodium의 함량이 각각 139.66 mg%, 104.36 mg% 및 7.18 mg%로 나타났다.

표 14. 건조방법에 따른 하수오의 무기성분 함량

구성	함량(mg%)		
	열풍건조	음건	동결건조
K	1,077.18±0.26 <sup>1)</sup>	1,392.02±0.07	1,515.01±0.08
Ca	125.89±2.34	114.67±0.80	104.36±1.27
Mg	110.36±1.50	137.09±0.86	139.66±0.08
Na	8.14±0.30	6.40±0.47	7.18±0.11

<sup>1)</sup> Values are presented mean ± SD(n=3).

## 2. 하수오의 항산화활성 측정 및 유효물질 검증

### 가. Total flavonoid content(TFC)

총 플라보노이드는 생체 내에서 자유기의 생성과 전파를 억제하는데 참여하며 항산화 기능과 산화촉진인자의 금속이온과 착염을 형성하는 기능으로 인해 free radical이나 electrophiles의 소거효과, 노화방지, 심혈관순환계질환의 예방효과가 알려져 널리 이용되고 있어 추출물의 플라보노이드 함량을 조사하였다. 그 결과 표 15와 같이 나타났다. 건조방법에 따른 하수오의 총 플라보노이드 함량은 동결건조 하수오, 열풍건조 하수오 및 음건 하수오가 각각 443.00 mg QE/g, 409.39 mg QE/g 및 338.28 mg QE/g순으로 높게 나타났다.

표 15. 건조방법에 따른 하수오의 총 플라보노이드 함량

시료	총 폴리페놀 함량(QE) <sup>1)</sup>
열풍건조 하수오 <sup>2)</sup>	409.39±10.61 <sup>3)</sup>
음건 하수오	338.28±6.68
동결건조 하수오	443.00±17.28

<sup>1)</sup> Milligram Quercetin equivalents per gram.

<sup>2)</sup> PMHW : water extracts from Polygonum multiflorum root based on hot-air dry, PMSW : water extracts from Polygonum multiflorum root based on shade dry, PMFW : water extracts from Polygonum multiflorum root based on freeze dry.

<sup>3)</sup> Values are presented mean ± SD(n=3).

### 나. Total polyphenol content (TPC)

식품내의 지질이나 체내의 생체막에 존재하는 지질은 활성산소의 존재 하에 유리기와 연쇄반응을 일으켜 산화되어 식품의 품질변화 및 생체노화의 원인이 된다. 이때, 이차대사물질로 식물계에 널리 분포되어 있는 페놀화합물은 항산화 작용을 통하여 노화를 억제해주고 활성산화를 제거하여 활성산소로 인해 유발되는 노화, 심장질환, 암, 면역력감소, 백내장 등 각종 질환을 예방하고 증상을 완화시키므로 이러한 산화반응을 방지하기 위한 물질로 페놀성 화합물이 널리 이용되고 있다. 따라서 건조방법에 따른 하수오 추출물의 페놀성 화합물의 함량을 측정하였다. 그 결과 표 16과 같다. 총 폴리페놀 함량은 열풍건조 하수오, 동결건조 하수오 및 음건 하수오가 각각 172.57 mg GAE/g, 120.08 mg GAE/g 및 119.20 mg GAE/g

순으로 높은 함량을 보였다.

표 16. 건조방법에 따른 하수오의 총 폴리페놀 함량

시료	총 플라보노이드 함량(GAE) <sup>1)</sup>
열풍건조 하수오 <sup>2)</sup>	172.57±2.17 <sup>3)</sup>
음건 하수오	119.20±3.25
동결건조 하수오	120.08±1.39

<sup>1)</sup> Milligram Gallic acid equivalents per gram.

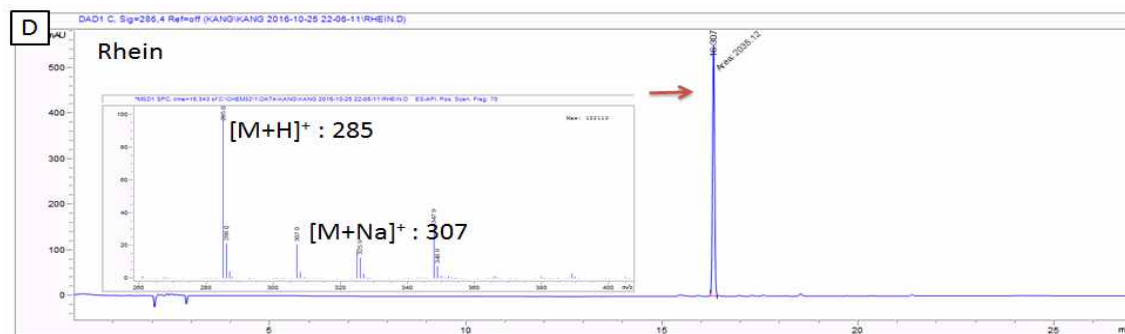
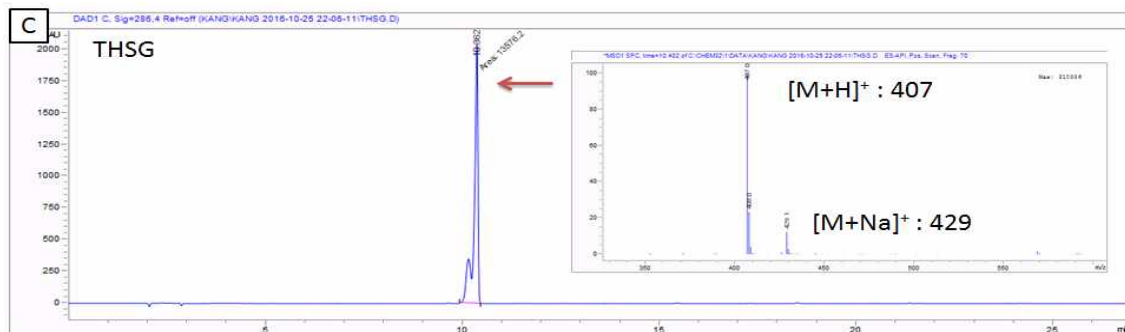
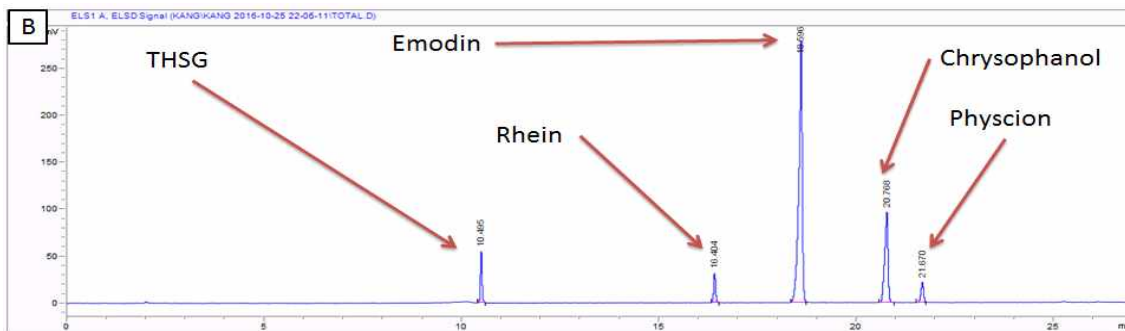
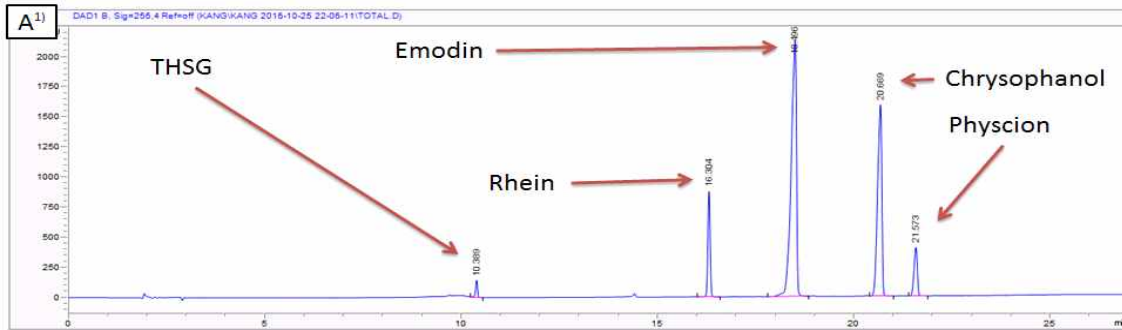
<sup>2)</sup> Symbols are referred Table 18.

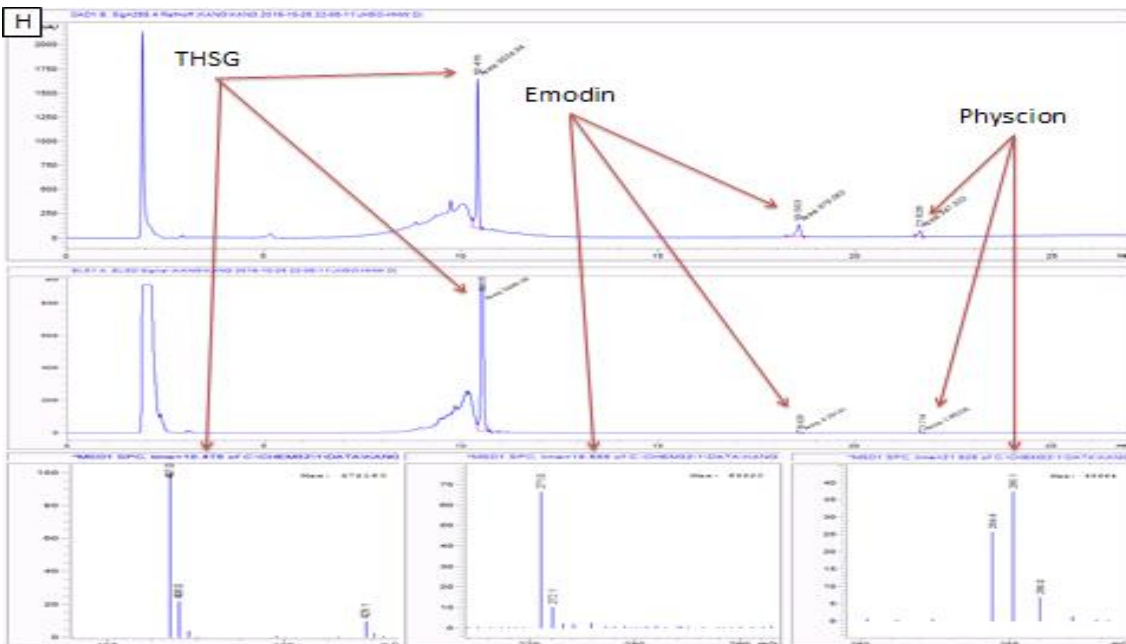
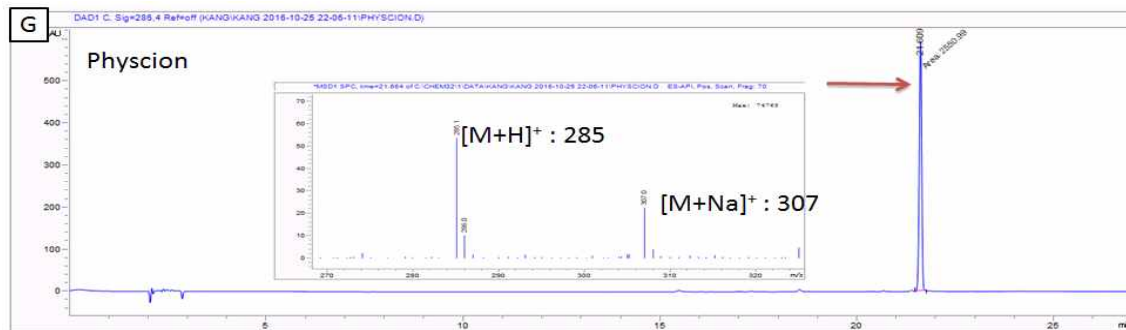
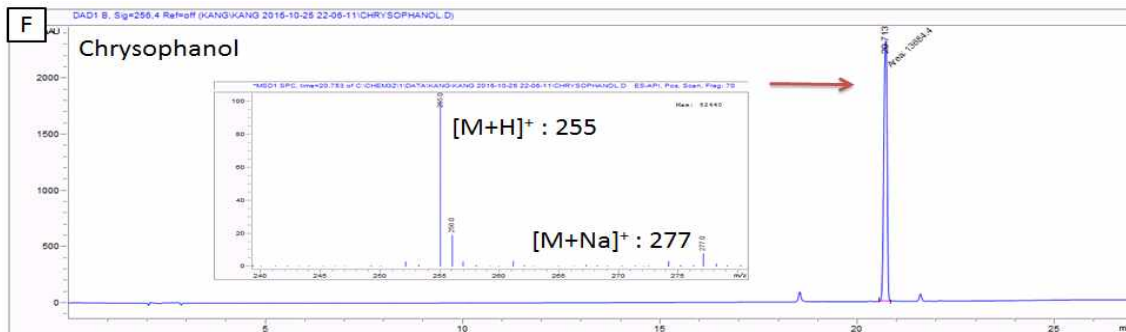
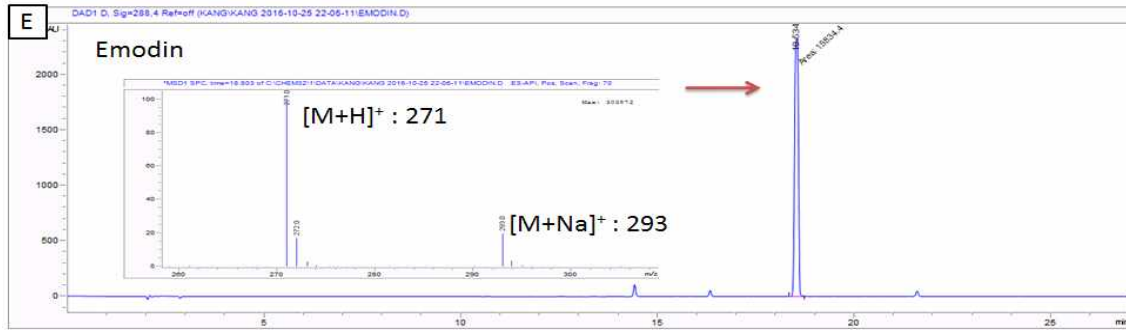
<sup>3)</sup> Values are presented mean ± SD(n=3).

다. 하수오추출물의 rhein, emodin, chrysophanol, physcion 및 2,3,5,4'-tetrahydroxystilbene-2-O-β-D-glucoside 함유 검증

하수오추출물의 anthraquinone류 및 지표물질 함유 검증을 위하여 anthraquinone류 4종 (rhein, emodin, chrysophanol, physcion) 및 지표물질인 2,3,5,4'-tetrahydroxystilbene-2-O-β-D-glucoside(THSG)의 함유 여부를 LC-MS와 ELSD를 사용하여 분석한 결과, THSG, emodin, physcion이 검출 되었다. 특히 THSG의 함량이 매우 높게 나타났다.







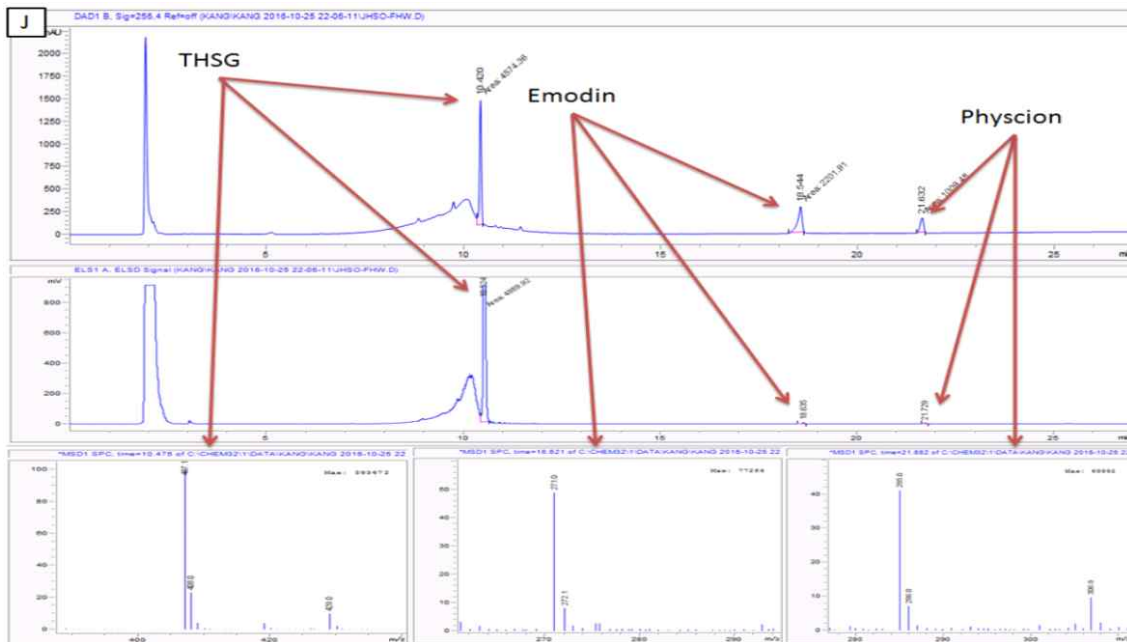
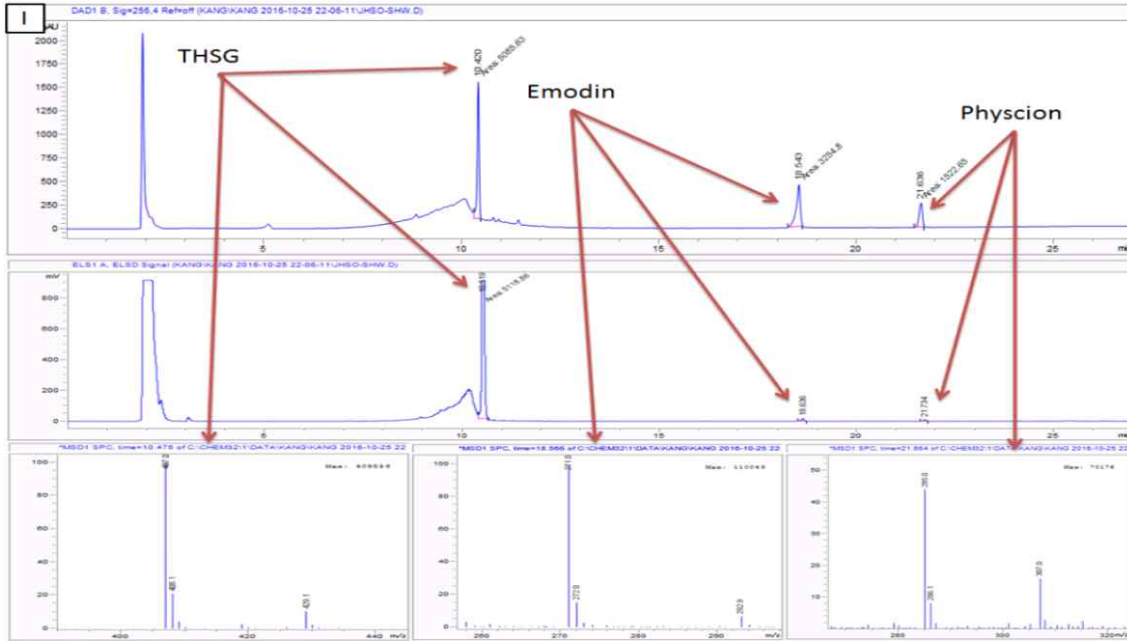


그림 6. 건조방법에 따른 하수오의 스탠다드 anthraquinolic 류와 THSG의 검증

1) A: 256 nm, B: ELSD, C: 2,3,5,4'-tetrahydroxystilbene - 2-O-β-D-glucoside(THSG), D: 레인, E: 이모딘, F: 크리스판올, G: 피사이온, H: 열풍건조 하수오, I: 음건 하수오, J: 동결건조 하수오.

### 3. 하수오 발효 조건

가. 하수오 발효 최적입도 및 최적온도

하수오 발효에 최적합한 입도크기를 조사하기 위하여 25 mesh, 50 mesh, 100 mesh체를 통과한 분말과 25 mesh를 통과하지 않은 잔류물을 배양온도를 달리하여 균사 생육을 조사한 결과는 그림 7 및 표 17과 같다. 하수오 입도크기에 따른 *L. edodes* JMI-10079 균주의 생장은 25 mesh 체를 통과하지 않은 잔류물들에서 가장 빠르게 나타났으며, 다음으로는 25 mesh 체를 통과한 하수오에서 높게 나타났다. 50 mesh 이상의 체를 통과한 하수오 분말에서는 생장이 거의 일어나지 않았다. 온도별로는 성장속도는 25℃에서 가장 빨랐으며, 23℃, 27℃ 순으로 성장속도가 빠르게 나타났다. 29℃에서는 균사의 생장이 오히려 억제되는 것을 확인하였다(그림 8). *L. edodes* JMI-10079 균주의 하수오 균사배양은 25 mesh체를 통과한 잔류물과 25℃가 적당함을 확인하였다.

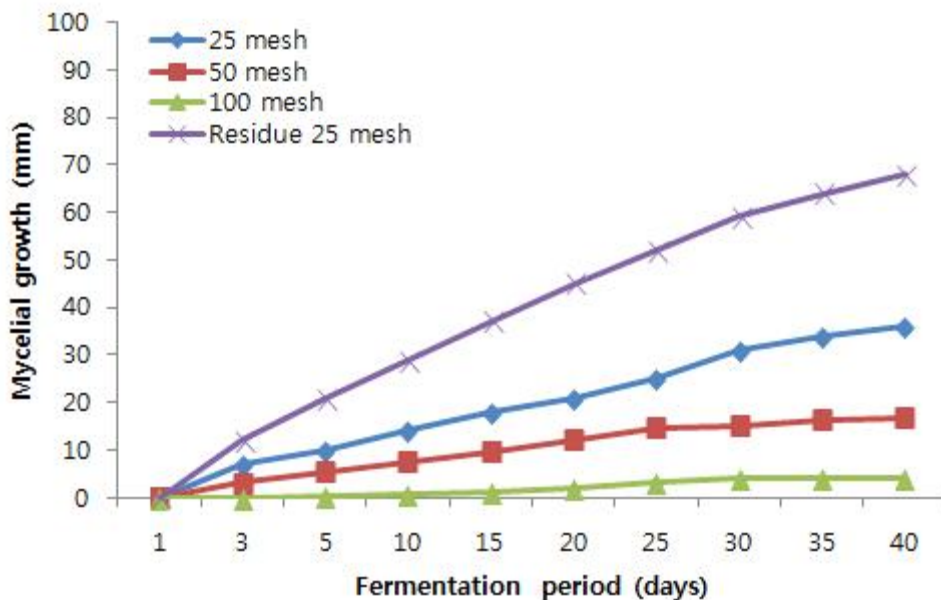


그림 7. 하수오 입자크기에 따른 하수오 발효를 위한 *L. edodes* JMI-10079 균사의 성장측정 결과.

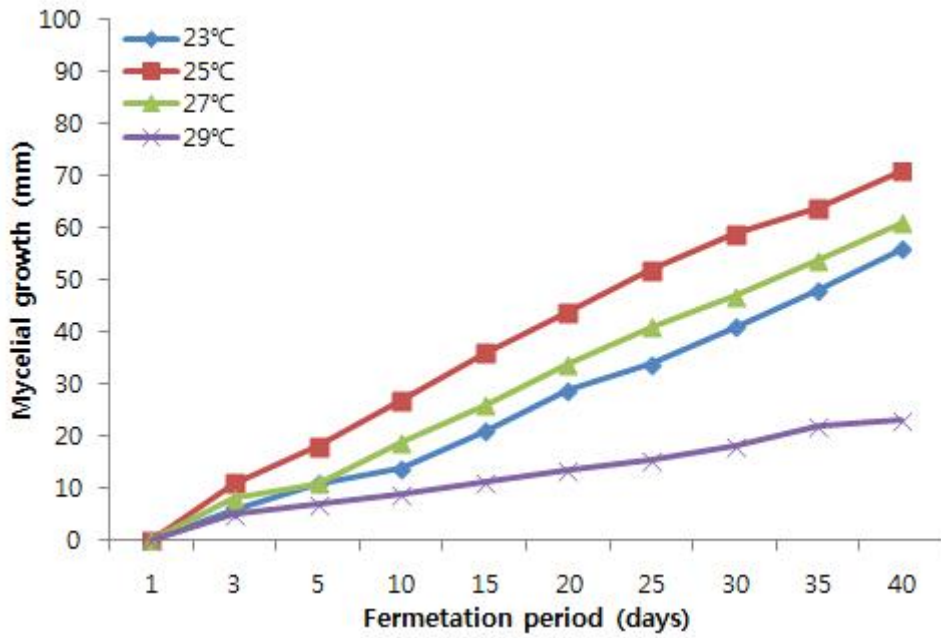


그림 8. 온도에 따른 하수오 발효를 위한 *L. edodes* JMI-10079 균사의 성장측정 결과.

표 17. 온도에 따른 하수오 발효를 위한 *L. edodes* JMI-10079 균사의 밀도 측정 결과

온도	균사 밀도
23°C	+++ <sup>1)</sup>
25°C	++++
27°C	++++
29°C	++

<sup>1)</sup>+: Poor ++:Thin +++:Sparse ++++:Compact +++++:Very compact.

나. 하수오 버섯 발효 pH

pH에 따른 하수오 발효를 위한 *L. edodes* JMI-10079 균사의 성장 결과는 그림 9 및 표 18에 나타나있다. pH 6~8의 범위에서 균사생장이 양호하였다. pH 4의 조건에서는 균사의 생장이 많이 저조한 것으로 나타났다. 이러한 결과로 *L. edodes* JMI-10079 균주 성장에 최적합한 산도는 pH 6,7,8임을 확인할 수 있었다.

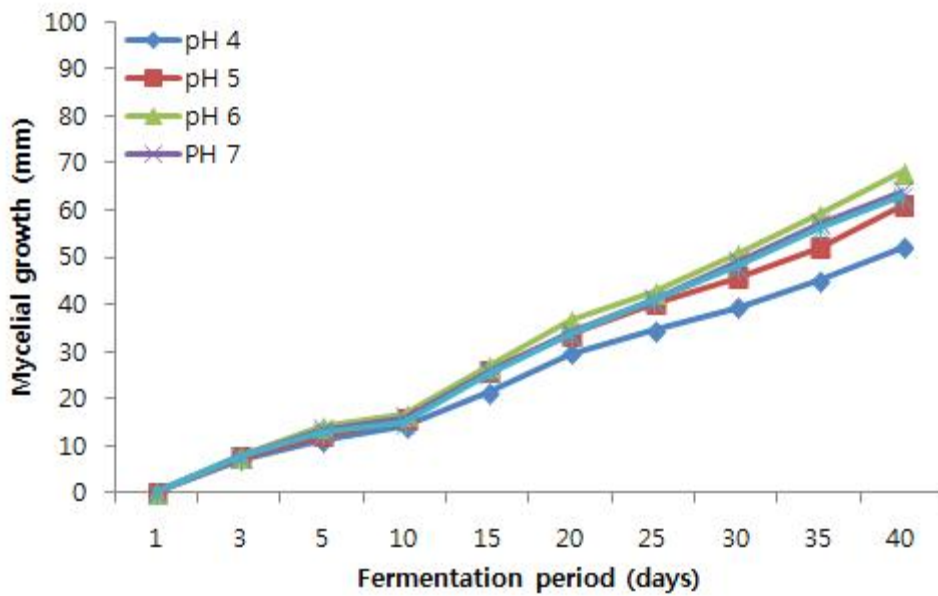


그림 9. pH에 따른 하수오 발효를 위한 *L. edodes* JMI-10079 균사의 성장측정 결과.

표 18. pH에 따른 하수오 발효를 위한 *L. edodes* JMI-10079 균사의 밀도 측정 결과.

pH	균사 밀도
4	+++ <sup>1)</sup>
5	++++
6	+++++
7	+++++
8	+++++

<sup>1)</sup>+: Poor ++:Thin +++:Sparse ++++:Compact +++++:Very compact.

다. 탄소원, 질소원에 따른 균사 생장

탄소원은 균류에 있어서 탄수화물, 단백질, 지질, 핵산 등의 합성과 에너지 공급원으로서 균주의 생장에 필수적인 영양원이다. 하수오 발효를 위한 *L. edodes* JMI-10079의 균사생육을 위한 최적 탄소원을 선별하기 위한 실험결과는 모든 처리구에서 생육이 양호하게 나타났으며, glucose 처리구에서 가장 양호하였다(표 19, 그림 10).

최적 질소원을 선별하기 위한 실험결과는 ammonium tartrate 와 glutamic acid 처리구에서 대조구보다 생장이 저조하였으며, malt extract와 potassium nitrate 처리구에서는 대조구에 비해 생육은 촉진되는 걸 확인하였고, malt extract 처리구에서 가장 양호하였다(표 20, 그림 11).

표 19. 탄소원에 따른 하수오 발효를 위한 *L. edodes* JMI-10079 균사의 생장 밀도 측정 결과

탄소원	균사 밀도 (mg/13day)
Glucose	48.7±4.2
Lactose	40.2±3.7
Maltose	45.6±4.4
Sucrose	43.1±5.1

Values are presented mean ± SD(n=3).

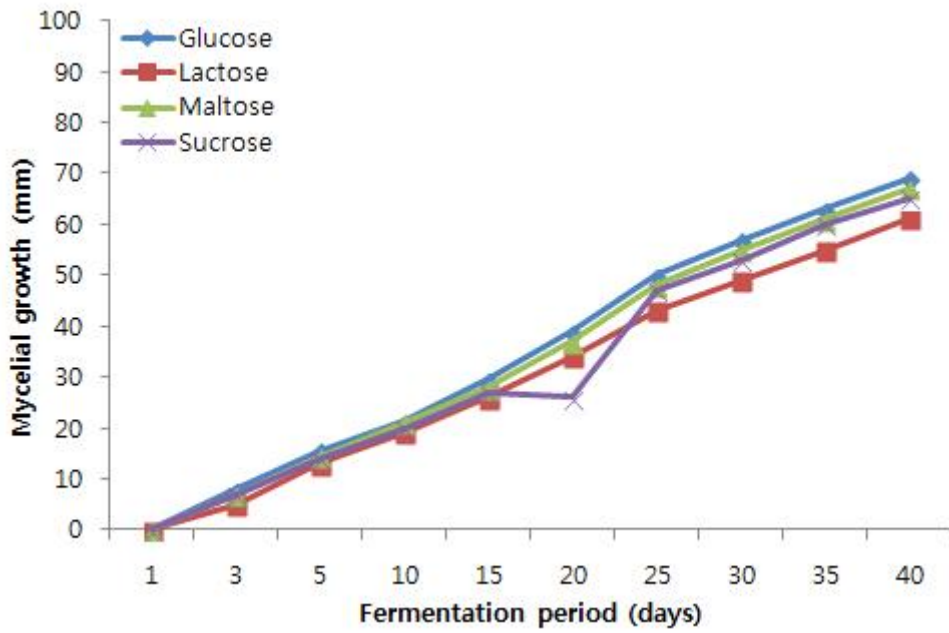


그림 10. 탄소원에 따른 하수오 발효를 위한 *L. edodes* JMI-10079 균사의 성장측정 결과.

표 20. 질소원에 따른 하수오 발효를 위한 *L. edodes* JMI-10079 균사의 성장 밀도 측정 결과

질소원	균사 밀도 (mg/13day)
Ammonium tartrate	17.6±2.1
Glutamic acid	23.9±3.4
Malt extract	42.7±3.7
Potassium nitrate	26.1±2.9

Values are presented mean ± SD(n=3).



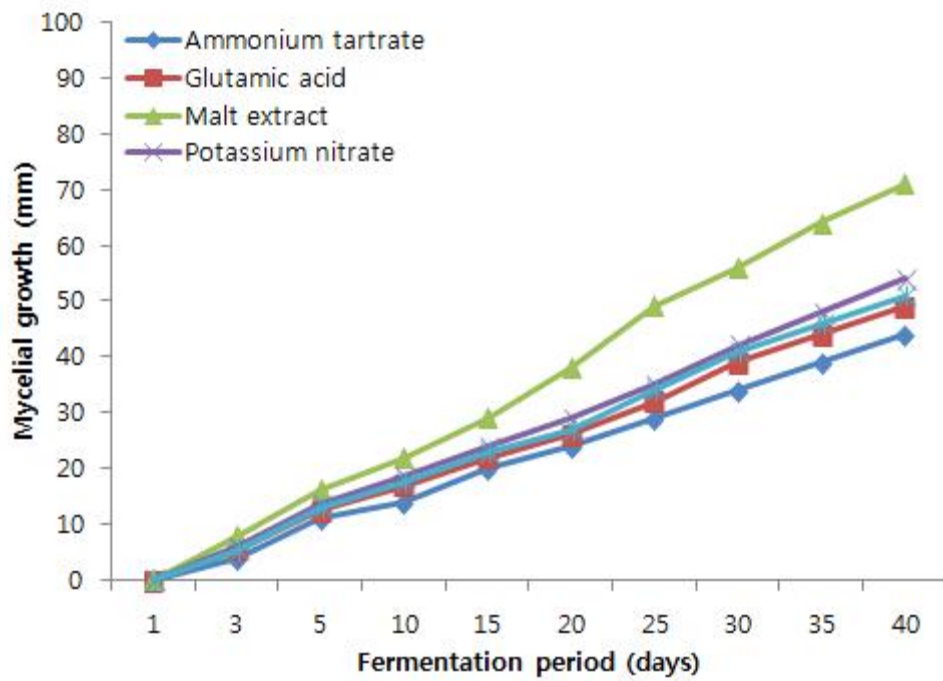


그림 11. 질소원에 따른 하수오 발효를 위한 *L. edodes* JMI-10079 균사의 성장측정 결과.

## 5. 발효 하수오의 이화학성분분석

### 가. 일반성분 함량

발효 하수오의 일반성분 분석결과는 표 21과 같다. 수분함량은 59.54 mg%로 함량이 높았다. 조단백, 조지방, 조회분, 조섬유 및 가용성무질소물의 함량은 각각 4.02 mg%, 0.1 mg%, 2.84 mg% 및 2.45 mg%로 나타났다. 표고버섯의 유효성분인 렌티난은 다당체로, 가용성무질소물 함량은 당 성분으로 변화되는 탄수화물의 함량과 관련이 있는 것으로 보고된 바 있다. 본 연구에서 시험구들의 가용성무질소물 함량은 31.05 mg%로 높게 나타났다.

표 21. 표고 균사체(*Lentinula edodes*)를 활용한 발효 하수오의 일반성분 함량

구성	함량(mg%)
	발효 하수오
수 분	59.54±1.04
조단백질	4.02±0.10
조 지방	0.1±0.05
조 회 분	2.84±0.02
조 섬유	2.45±0.05
가용성무질소물	31.05

Values are presented mean ± SD(n=3).

### 나. 유리당 함량

발효 하수오의 유리당은 표 22와 같다. 발효 하수오에서 유리당은 fructose(과당), glucose(포도당) 및 sucrose(설탕)로 총 3종이 검출 되었다. 그중 함량은 sucrose가 7.13 mg%으로 가장 높았으며, fructose와 glucose는 각각 0.86 mg%와 0.77 mg%로 낮은 함량을 보였다.

표 22. 표고 균사체(*Lentinula edodes*)를 활용한 발효 하수오의 유리당 함량

구성	합량(mg%)
	발효 하수오
Fructose	0.86±0.03
Glucose	0.77±0.02
Sucrose	7.13±0.16

Values are presented mean ± SD(n=3).

다. 유기산 함량

발효 하수오의 유기산은 oxalic acid와 succinic acid가 검출되었으며, oxalic acid와 succinic acid의 함량은 각각 545.75 mg%와 70.60 mg%로 나타났다(표 23).

표 23. 표고 균사체(*Lentinula edodes*)를 활용한 발효 하수오의 유기산 함량

구성	합량(mg%)
	발효 하수오
Oxalic acid	545.75±2.17
Succinic acid	70.60±0.87

Values are presented mean ± SD(n=3).

라. 아미노산 함량

1) 구성아미노산 함량

발효 하수오의 구성아미노산은 표 24와 같다. 아미노산은 총 16종이 검출 되었으며, 총 구성아미노산 함량은 3,630 mg%로 나타났다. 그 중 arginine과 threonine이 각각 654.68 mg%와 591.18 mg%로 다른 아미노산에 비하여 높은 함량을 보였다.

표 24. 표고 균사체(*Lentinula edodes*)를 활용한 발효 하수오의 구성아미노산 함량

구성	함량(mg%)
	발효 하수오
Aspartic acid	140.88±0.78 <sup>4)</sup>
Serine	283.33±2.81
Glutamic acid	200.34±1.18
Glycine	201.13±0.82
Histidine	200.57±0.93
Arginine	654.68±2.84
Threonine	591.18±3.48
Alanine	214.96±0.84
Proline	148.87±0.14
Tyrosine	100.31±0.43
Valine	127.76±0.18
Methionine	36.88±0.07
Lysine	145.47±0.28
Isoleucine	187.81±0.38
Leucine	200.65±0.78
Phenylalanine	195.58±0.46
TAA <sup>1)</sup>	3,630.40
EAA <sup>2)</sup>	1,685.90
EAA/TAA(% <sup>3)</sup>	46.44

<sup>1)</sup> TAA, total amino acid.

<sup>2)</sup> EAA, total essential amino acid (Thr.+Val.+Met.+Ile.+Leu.+Phe.+His.+Lys.).

<sup>3)</sup> EAA/TAA(%), total amino acid/total essential amino acid.

<sup>4)</sup> All values are mean ± SD(n=3).

2) 유리아미노산 함량

발효 하수오의 유리아미노산은 표 25와 같다. 아미노산은 총 16종이 검출 되었으며, 총 유리아미노산 함량은 631.57 mg%로 나타났다. 그 중 arginine과 proline이 각각 171.38 mg%와 154.56 mg%로 높은 함량을 보였다.

표 25. 표고 균사체(*Lentinula edodes*)를 활용한 발효 하수오의 유리아미노산 함량

구성	함량(mg%)
	발효 하수오
Aspartic acid	23.77 ± 0.08 <sup>4)</sup>
Serine	10.98 ± 0.05
Glutamic acid	32.73 ± 0.18
Glycine	13.43 ± 0.06
Histidine	30.54 ± 0.08
Arginine	171.38 ± 0.23
Threonine	31.99 ± 0.03
Alanine	105.21 ± 0.48
Proline	154.56 ± 0.58
Tyrosine	8.14 ± 0.05
Valine	4.12 ± 0.02
Methionine	6.46 ± 0.04
Lysine	17.32 ± 0.02
Isoleucine	3.32 ± 0.01
Leucine	9.45 ± 0.01
Phenylalanine	8.17 ± 0.01
TAA <sup>1)</sup>	631.57
EAA <sup>2)</sup>	111.37
EAA/TAA(% <sup>3)</sup>	17.63

<sup>1)</sup> TAA, total amino acid.

<sup>2)</sup> EAA, total essential amino acid (Thr.+Val.+Met.+Ile.+Leu.+Phe.+His.+Lys.).

<sup>3)</sup> EAA/TAA(%), total amino acid/total essential amino acid.

<sup>4)</sup> All values are mean ± SD(n=3).

마. 무기성분 함량

발효 하수오의 무기성분 함량은 표 26과 같다. 무기성분은 potassium, calcium, magnesium, sodium이 검출되었다. Potassium 함량은 1,109.53 mg%로 가장 높은 함량을 나타내었고, magnesium, calcium 및 sodium 함량이 각각 121.84 mg%, 105.91 mg% 및 7.26 mg%순으로 높은 함량을 보였다.

표 26. 표고 균사체(*Lentinula edodes*)를 활용한 발효 하수오의 무기성분 함량

구성	함량 (mg%)
	발효 하수오
K	1,109.53±0.48
Ca	105.91±0.25
Mg	121.84±0.18
Na	7.26±0.01

Values are presented mean ± SD(n=3).

## 6. 발효 하수오 음료의 부원료 탐색

### 가. 열수추출 최적조건 선정

원료의 추출액 제조 중 적당한 온도와 시간을 선정하기 위하여 건조된 원료에 대하여 중량 비로 20배량의 물을 가하여 60℃, 80℃, 100℃에서 1, 3, 6, 9 시간 동안 열수 추출하여 당도와 고형분 함량을 측정된 결과는 그림 12 ~ 17에 나타내었다. 온도가 높을수록 brix 값이 증가하였다. 시간에 따른 결과는 모든 원료가 6시간 까지는 증가하였으나 이후 9시간에는 감소하는 경향을 나타내었다. 100℃의 열수에서 6시간 추출한 결과 2.6 brix로 가장 크게 나타났으나 100℃ 추출물에서는 가열에 의한 이취가 발생하여 음료 제조 추출물로서 적당하지 않았다. 80℃에서 6시간 동안 추출한 추출물의 경우 2.3 brix로 나타났으나 앞의 경우와 마찬가지로 가열에 의한 이취가 발생하여 추출물로 사용하기에 적합하지 않았다. 가열에 의한 이취가 발생하지 않고 brix의 값이 가장 크게 나타난 것은 80℃/3시간 추출물이었다. 추출물들의 고형분 함량을 측정된 결과 시간이 지날수록 함량이 증가하였으나 3시간 이후로는 그 변화가 아주 적었다. 위의 결과로 보아 열수 추출의 최적 조건은 80℃, 시간은 3시간으로 선정하였다.

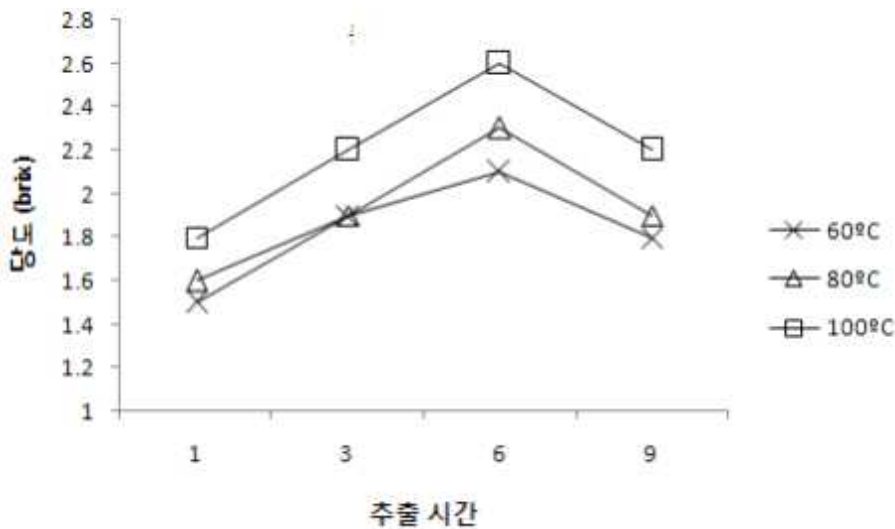


그림 12. 온도와 시간을 달리한 속단 추출물의 당도 측정

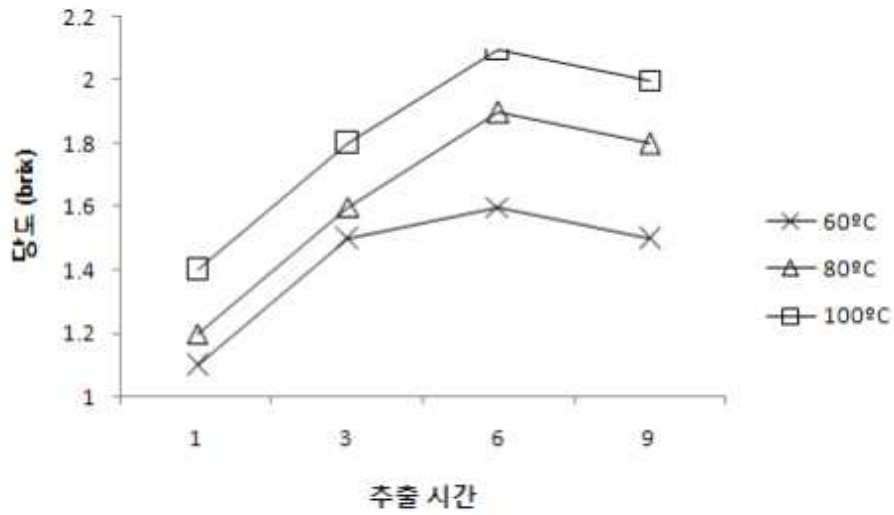


그림 13. 온도와 시간을 달리한 홍화자 추출물의 당도 측정

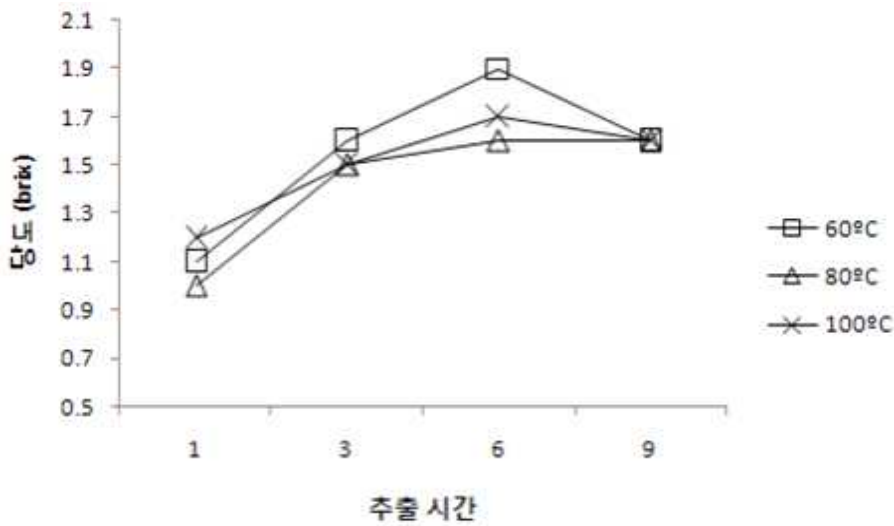


그림 14. 온도와 시간을 달리한 당귀 추출물의 당도 측정



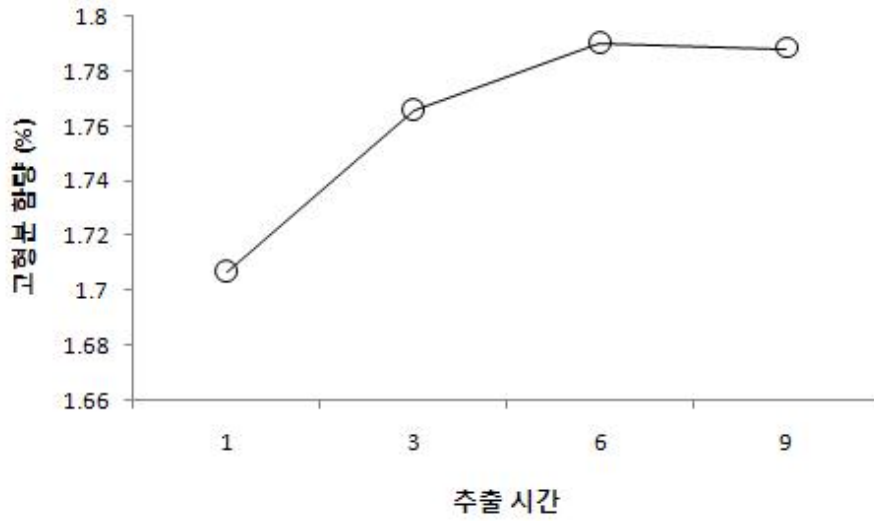


그림 15. 속단 열수(80°C) 추출물의 시간에 따른 고형분 함량 변화

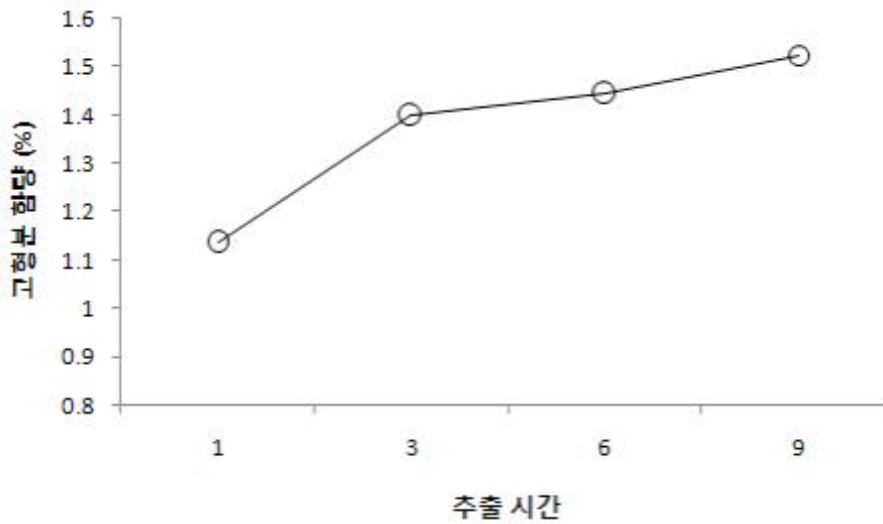


그림 16. 홍화자 열수(80°C) 추출물의 시간에 따른 고형분 함량 변화

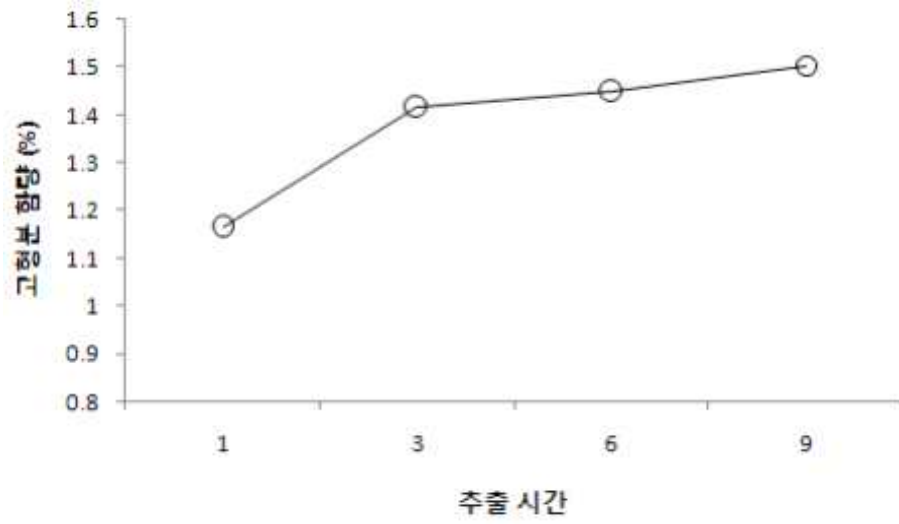


그림 17. 당귀 열수(80℃) 추출물의 시간에 따른 고형분 함량 비교

나. 이화학분석

1) 일반성분 함량

원료의 일반성분의 분석 결과는 표 27에서 보는 바와 같다. 수분함량은 당귀, 속단, 오미자 및 홍화자가 각각 10.50%, 9.02%, 7.62% 및 5.58% 순으로 높게 나타났다. 조단백질 함량은 홍화자가 35.16%로 가장 높았으며, 조지방 함량은 오미자가 20.45%로 가장 높았다. 조회분은 속단 12.35%, 오미자 7.22%, 홍화자 6.02%, 당귀 4.02%로 나타났으며, 조섬유는 당귀가 35.52%로 가장 높은 함량을 보였다.

표 27. 원료의 일반성분 분석 결과

(%)

	속단	홍화자	당귀	오미자
수 분	9.02	5.58	10.50	7.62
조단백질	8.96	35.16	16.91	14.51
조 지방	2.64	11.69	8.86	20.45
조 회 분	12.35	4.02	6.02	7.22
조 섬 유	14.75	3.50	35.52	8.73
가용성무질소물	52.28	40.05	22.19	41.47

2) 유리당 함량

원료의 유리당 분석 결과는 표 28에서 보는 바와 같이 총 당함량은 홍화자가 6.26%로 가장 높게 나타났다. 속단은 fructose(과당),glucose(포도당), sucrose(설탕)와 같이 3종의 유리당이 검출되었으며, 그 중 sucrose(설탕)가 2.26%로 높게 나타났다. 홍화자는 fructose(과당),glucose(포도당), sucrose(설탕) 및 maltose(엿당)가 검출되었으며, fructose(과당)가 3.29%로 가장 높은 함량을 보였다. 당귀는 sucrose(설탕)가 검출되지 않았으며, fructose(과당)가 0.66%로 높게 확인 되었다.

표 28. 원료의 유리당 분석 결과

	(%)			
	속단	홍화자	당귀	오미자
Fructose	0.11	3.29	0.66	0.62
Glucose	1.32	0.71	0.32	0.93
Sucrose	2.26	1.74	-	0.77
Maltose	-	0.52	0.04	0.16
총 당	3.69	6.26	1.02	2.48

### 3) 구성아미노산 함량

구성아미노산을 측정한 결과는 표 29와 같이 나타났다. 총 아미노산은 속단, 홍화자, 당귀가 각각 8,662.18 mg%, 4,221.80 mg% 및 2,818.26 mg%순으로 높게 나타났다. 속단에서 glutamic acid가 3,171.12 mg%로 가장 높게 확인이 되었으며, 다음으로는 aspartic acid와 alanine이 높은 함량을 보였다. 홍화자는 glycine과 alanine이 각각 803.97 mg%와 705.43 mg%로 높은 함량을 확인 하였다. 당귀는 arginine이 980.87 mg%로 가장 높은 함량을 보였다.

표 29. 원료의 구성 아미노산 분석 결과

총 아미노산	함량(mg%)			
	속단	홍화자	당귀	오미자
Aspartic acid	721.32	331.24	-	204.36
Serine	353.28	290.65	220.54	37.29
Glutamic acid	3,171.12	272.58	17.69	367.41
Glycine	312.78	803.97	30.70	42.62
Histidine	125.33	214.23	139.63	180.04
Arginine	342.12	371.93	980.87	116.30
Threonine	280.61	251.45	199.75	32.16
Alanine	543.03	705.43	133.35	180.40
Proline	301.09	212.99	213.52	77.81
Cystine	-	12.45	-	18.64
Tyrosine	422.10	16.55	15.19	93.42
Valine	471.13	206.86	63.12	101.88
Methionine	183.28	93.99	237.71	128.36
Lysine	232.39	71.50	300.46	75.33
Isoleucine	370.52	121.99	26.35	92.45
Leucine	501.06	130.67	106.88	142.26
Phenylalanine	331.02	113.32	132.50	132.70.
TAA <sup>1)</sup>	8,662.18	4,221.80	2,818.26	2,023.43
EAA <sup>2)</sup>	2,495.34	1,204.01	1,206.4	885.18
EAA/TAA(%) <sup>3)</sup>	28.81	28.52	42.81	43.75

<sup>1)</sup> TAA, total amino acid.

<sup>2)</sup> EAA, total essential amino acid (Thr.+Val.+Met.+Ile.+Leu.+Phe.+His.+Lys.).

<sup>3)</sup> EAA/TAA(%), total amino acid/total essential amino acid.

<sup>4)</sup> All values are mean ± SD(n=3).

#### 4) 무기성분 함량

원료의 무기성분 분석 결과는 표 30에서 보는 바와 같다. 무기성분은 potassium, calcium, magnesium, sodium으로 총 4종을 검출하였으며, 그 결과 potassium이 모든 시험구에서 가장 높은 함량을 보였다. 속단과 홍화자의 경우potassium다음으로 calcium이 각각 1,201.50

mg%와 1,005.31 mg%로 높게 나타났으나 당귀의 경우 potassium다음으로 magnesium이 139.20 mg%로 높게 나타났다. sodium은 홍화자에서 134.90 mg%로 가장 높게 나타났다.

표 30. 원료의 무기성분 분석 결과

	(mg%)			
	속단	홍화자	당귀	오미자
K	1,826.25	1,528.31	2,828.00	1,844.68
Ca	1,201.50	1,005.31	10.99	1,347.51
Mg	459.47	607.62	139.20	308.44
Na	83.02	134.90	21.43	194.34

### 7. 발효 하수오 음료 관능평가

관능검사 결과 향과 맛에서는 B 시험구가 가장 우수하였으며, 색은 F 시험구와 A 시험구에서 우수한 것으로 나타났다. 종합적 기호도에서는 B 시험구가 가장 우수하였으며, A 시험구, F시험구의 관능검사 결과도 양호한 것으로 나타났다(표 31). 따라서, 관능검사 결과가 가장 우수하게 나타난 B 시험구를 최종 배합비율로 선정하였다.

표 31. 관능검사 결과

	향	맛	색	기호도
A	3.3±1.1 <sup>ab</sup>	3.3±0.8 <sup>bc</sup>	4.0±0.9 <sup>b</sup>	3.6±0.7 <sup>ab</sup>
B	4.1±0.9 <sup>b</sup>	4.1±1.3 <sup>c</sup>	3.6±1.0 <sup>ab</sup>	3.8±1.4 <sup>b</sup>
C	3.6±0.8 <sup>ab</sup>	3.0±0.8 <sup>ab</sup>	3.8±1.1 <sup>ab</sup>	3.4±0.7 <sup>ab</sup>
D	2.9±0.8 <sup>a</sup>	2.7±1.2 <sup>ab</sup>	3.6±1.0 <sup>ab</sup>	3.2±0.6 <sup>ab</sup>
E	3.0±0.6 <sup>a</sup>	3.1±0.9 <sup>b</sup>	3.7±1.0 <sup>ab</sup>	0.5±0.7 <sup>ab</sup>
F	3.2±1.1 <sup>ab</sup>	3.4±1.0 <sup>b</sup>	4.1±1.0 <sup>b</sup>	3.6±0.5 <sup>ab</sup>
G	2.9±1.0 <sup>a</sup>	3.4±1.1 <sup>b</sup>	3.6±1.0 <sup>ab</sup>	0.6±0.9 <sup>ab</sup>

A~G : 재료 및 방법 원료 혼합비율 표 참조

8. 갱년기 in vitro

가. E-Screen (MCF-7 cell proliferation assay)을 이용한 표고버섯 발효 하수오와 하수오의 에스트로겐 활성 평가

Estrogen receptor를 가지고 있는 MCF-7 breast carcinoma cell에 시료를 처리한 후 7일 간의 배양기간을 거친후 세포증식 유도 측정을 MTT assay로 평가하였다. 대조군으로는 Estradiol을 사용하였다. E-screen 방법에 의한 에스트로겐 활성을 측정한 결과 (그림 18), estradiol (1nM)은 약1.9배 정도 증가된 세포증식률을 나타냈다. 표고버섯 발효 하수오와 하수오 모두 10~100 µg/mL에서 농도 의존적으로 MCF-7 세포의 성장을 증가시켰다. 100 µg/mL에서 표고버섯 발효 하수오는 1.7배 정도 증가시켰으며 하수오에서는 1.5배 정도로 성장을 증가시켰으며 두 시료 모두 100 µg/ml 이상의 농도에서 세포 독성을 갖는 것으로 나타났다. 따라서 두 시료들은 저농도에서는 에스트로겐 활성을 가지나, 고농도에서는 세포독성을 갖는 것으로 나타났다.

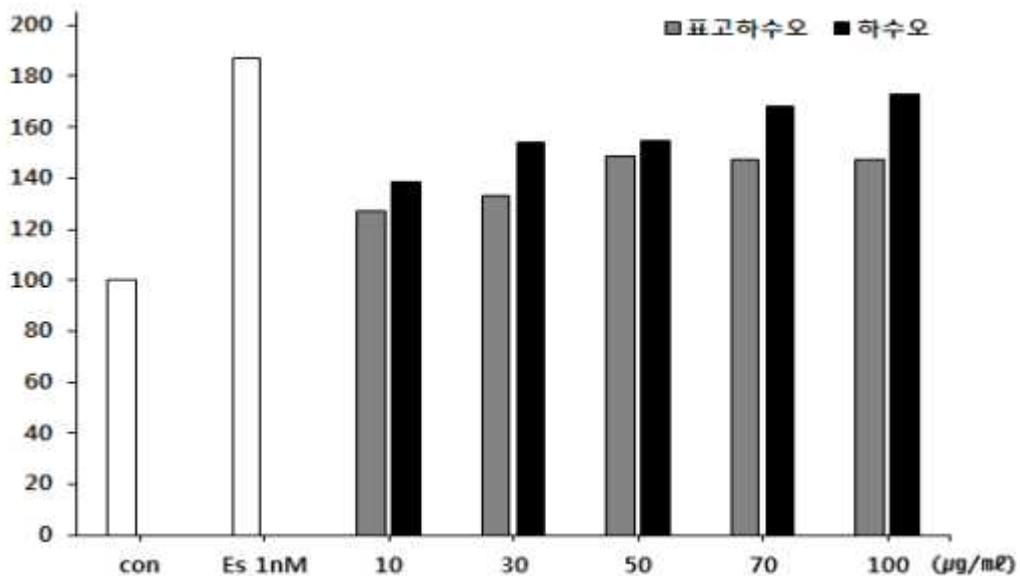


그림 18. Estrogenic Effect of Lentinula edodes-fermented Fallopia multiflora(LFF) and Fallopia multiflora(FM) in MCF-7 Cells using the E-SCREEN assay.

나. 표고버섯 발효 하수오와 하수오의 에스트로겐 수용체 활성화에 미치는 영향

표고버섯 발효 하수오와 하수오에 의한 MCF-7세포 증식이 에스트로겐 수용체를 통해 매개된 증식인지를 확인하기 위해 에스트로겐 길항제인 ICI 182,780 (100nM)을 처리하여 증식을 변화를 측정하였다 (그림 19). 대조군인 estradiol (1nM) 뿐만 아니라 표고버섯 발효 하수오와 하수오만 단독으로 처리한 세포에 비해 ICI를 동시에 처리하였을 때 세포 증식률이 현저하게 감소함을 확인하였다. 이를 통해서 표고버섯 발효 하수오와 하수오에 의한 세포 증식이 에스트로겐 수용체 의존적임을 확인하였다.



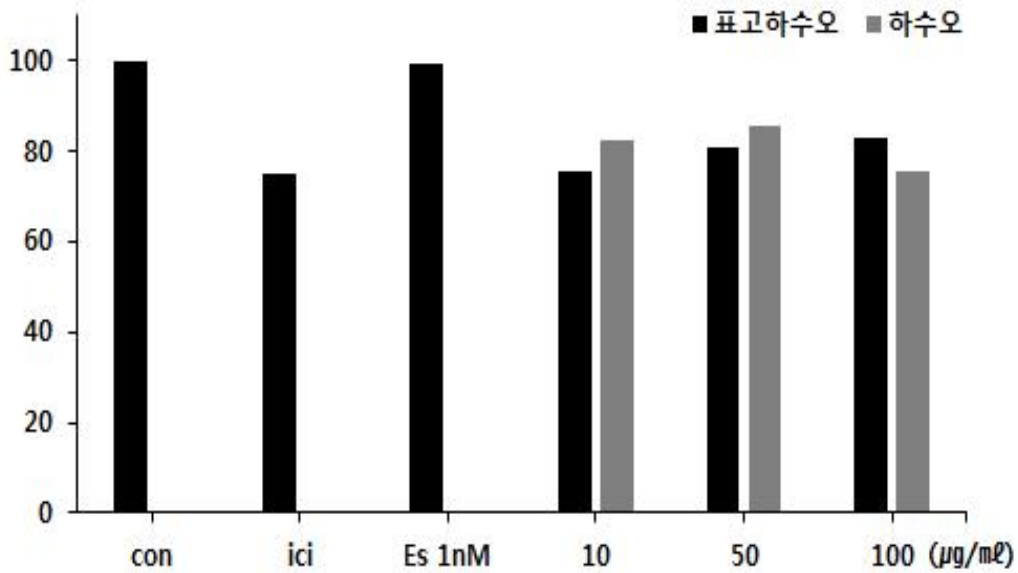


그림 19. Effect of ICI 182,780 on fermented Fallopia multiflora and Fallopia multiflorain induced proliferation in MCF-7 Cells

표고버섯 발효 하수오와 하수오에 의한 에스트로젠 수용체 활성화 정도를 측정하였다 (그림 20). control에 비해 Estradiol 은 약 2.7배로 증가하였다. 표고버섯 발효하수오의 경우 10, 50, 100 µg/mL에서 각각 1.6, 2.2, 2.5배로 증가하였으며, 하수오의 경우 10, 50, 100 µg/mL에서 각각 1.7, 2.4, 2.5배로 증가하였다.

ICI 182.780 처리에 의한 세포생존을 감소와 에스트로젠 수용체 활성화 결과를 통해서 표고버섯 발효 하수오와 하수오에 의한 세포 증식이 에스트로젠 수용체 의존적임을 확인하였

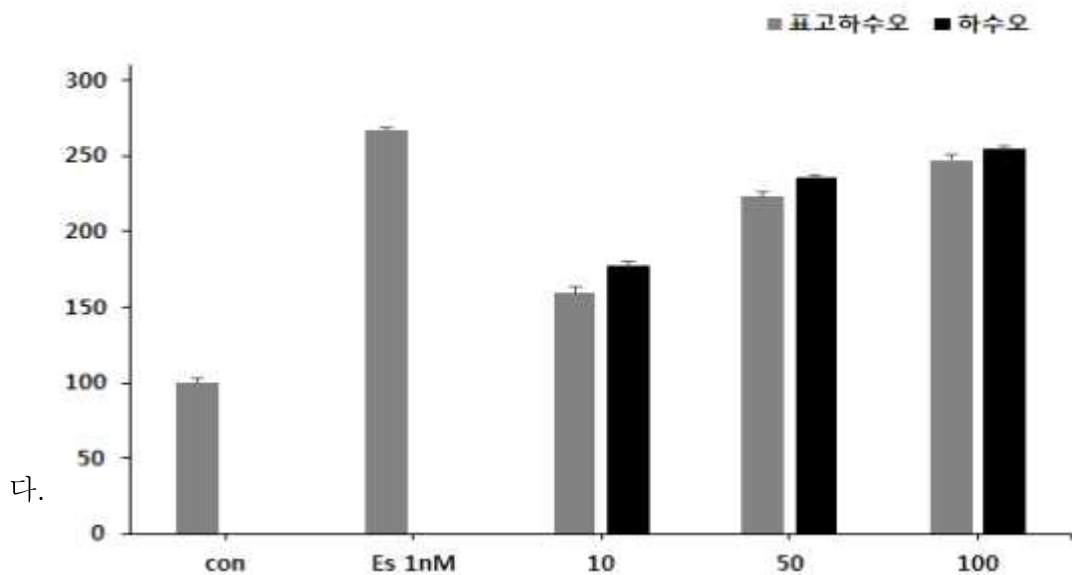


그림 20. Effect of fermented Fallopia multiflora and Fallopia multiflorain on estrogen receptor activation in MCF-7 Cells

다. 에스트로젠 관련 유전자 발현

MCF-7 cell proliferation assay와 동일한 방법으로 세포를 배양하여 시료를 처리한 후 단백질을 분리하여 western blot을 이용하여 측정하였다. 에스트로젠 수용체에 결합하여 에스트로젠에 의존적으로 반응하여 발현하는 pS2, PR의 발현정도를 확인하였다. control에 비해 estadiol을 처리하였을 때 PR는 1.8배, pS2는 14배 발현이 급격하게 증가하였다. 100 $\mu$ g/mL으로 표고버섯 발효 하수오를 처리하였을 때 PR, pS2는 각각 1.75, 6.32배로 증가하였으며 하수오를 처리하였을 때 PR, pS2는 각각 2.36, 9.35배로 증가하였다(그림 21).

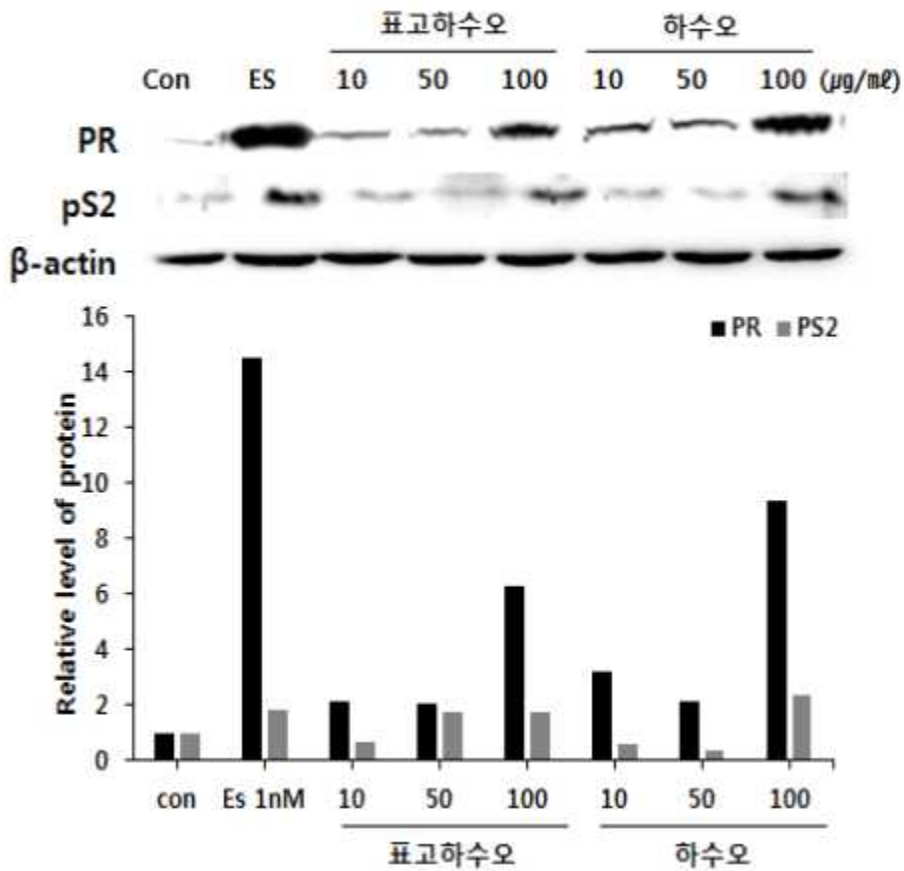


그림 21. Effect of fermented Fallopia multiflora and Fallopia multiflorain on the expression of estrogen-dependent genes.

## 9. 하수오 및 하수오/표고 발효소재의 항산화 활성 평가

### 가. DPPH radical-scavenging activity 분석

시험관 내 항산화능 분석은 517 nm에서 최대 흡광도를 보이는 자유라디칼인 DPPH와 하수오 열수추출물 및 하수오/표고 열수추출물을 반응시켜 노란색이 되면서 흡광도 값이 낮아지는 것을 이용하여 항산화 효과를 측정하였다. 비교분석을 위해 음성대조군은 vehicle (methanol)을 처리하였고 양성대조군은 ascorbic acid를 처리하여 DPPH 라디칼 소거능을 분석하였다.

양성대조군 ascorbic acid(Asc)은 1 mg/ml 농도에서 자유라디칼을  $85.13 \pm 4.82\%$  억제시켰다. 하수오 열수추출물은 DPPH 라디칼을 10  $\mu\text{g}$ 에서  $15.28 \pm 1.38\%$ , 20  $\mu\text{g}$ 에서  $21.87 \pm 1.97\%$ , 30  $\mu\text{g}$ 에서  $25.32 \pm 2.28\%$ , 50  $\mu\text{g}$ 에서  $43.55 \pm 3.92\%$  억제시켰다(그림 22). 하수오/표고 열수추출물은 DPPH 라디칼을 10  $\mu\text{g}$ 에서  $24.37 \pm 2.19\%$ , 20  $\mu\text{g}$ 에서  $37.85 \pm 3.41\%$ , 30  $\mu\text{g}$ 에서  $51.64 \pm 4.65\%$ , 50  $\mu\text{g}$ 에서  $63.27 \pm 5.69\%$  억제시켰다(그림 23). 하수오 열수추출물 및 하수오/표고 열수추출물의 DPPH 라디칼 억제능은 농도비례적으로 효능이 증가되었고 가장 높은 농도에서 하수오/표고 열수추출물의 효능이 비교적 높은 것으로 분석되었다. DPPH 라디칼 억제능은 다음과 같은 순서로 나열하였다.

Ascorbic acid (85.13%) > 50  $\mu\text{g}$  하수오/표고 (63.27%) > 30  $\mu\text{g}$  하수오/표고 (51.64%) > 50  $\mu\text{g}$  하수오 (43.55%) > 20  $\mu\text{g}$  하수오/표고 (37.85%) > 30  $\mu\text{g}$  하수오 (25.32%) > 10  $\mu\text{g}$  하수오/표고 (24.37%) > 20  $\mu\text{g}$  하수오 (21.87%) > 10  $\mu\text{g}$  하수오 (15.28%).

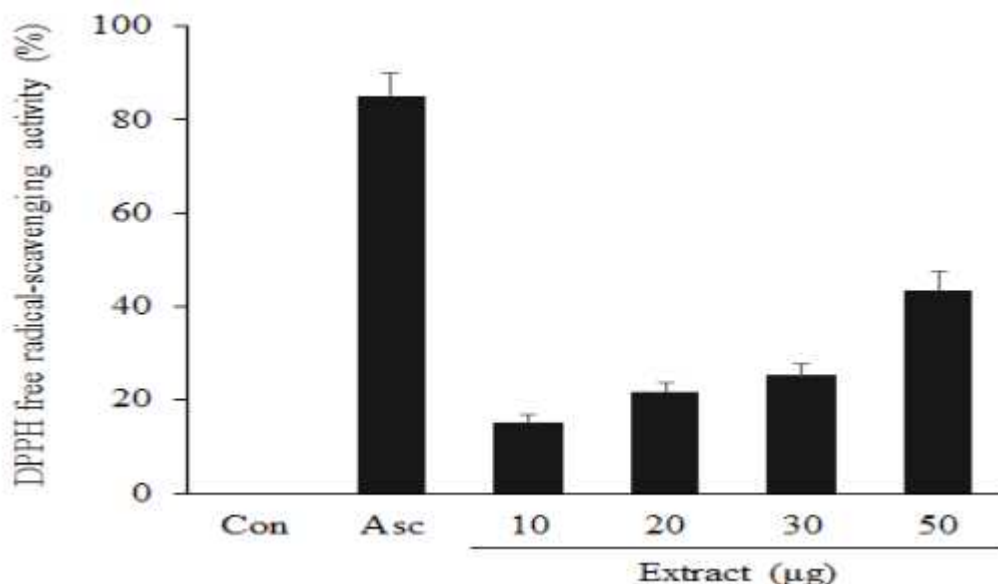


그림 22. DPPH free radical-scavenging activity of the extract of Polygonum multiflorum. The DPPH free radical scavenging activity was determined by using a reaction mixture containing the extracts dissolved in methanol, and 0.1 mM of DPPH dissolved in ethanol in 96-well microplate. The extracts were mixed with 0.6 mL of DPPH solution, then

incubated at RT for 20 min. After incubation, the absorbance of reaction mixture was measured at 517 nm in a microplate reader. Inhibition percentage of radical scavenging activity was determined by comparison with a methanol-treated control group, or ascorbic acid (100 µg)-treated control group. Percentage DPPH free radical scavenging activity was calculated as: (%) = (Abscontrol without sample-Abssample)/Abscontrol without sample X 100. Each value represents the mean ± SD for three determinations. Con, methanol (vehicle) treated group as negative control; Asc, ascorbic acid (1 mg/ml) treated group as positive control; 10-50, 10-50 µg the extract of *Polygonum multiflorum* as sample group.

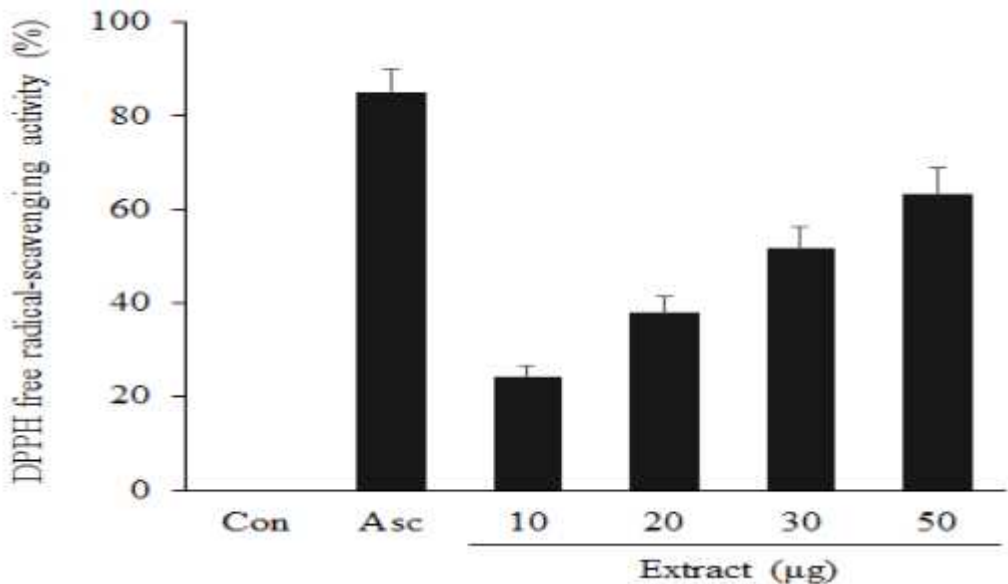


그림 23. DPPH free radical-scavenging activity of the mixture extract. The DPPH free radical scavenging activity was determined by using a reaction mixture containing the extracts dissolved in methanol, and 0.1 mM of DPPH dissolved in ethanol in 96-well microplate. The extracts were mixed with 0.6 mL of DPPH solution, then incubated at RT for 20 min. After incubation, the absorbance of reaction mixture was measured at 517 nm in a microplate reader. Inhibition percentage of radical scavenging activity was determined by comparison with a methanol-treated control group, or ascorbic acid (100 µg)-treated control group. Percentage DPPH free radical scavenging activity was calculated as: (%) = (Abscontrol without sample-Abssample)/Abscontrol without sample X 100. Each value represents the mean ± SD for three determinations. Con, methanol (vehicle) treated group as negative control; Asc, ascorbic acid (1 mg/ml) treated group as positive control; 10-50, 10-50 µg the mixture extract with *Polygonum multiflorum* and *Lentinula edodes* as sample group.

#### 나. Hydroxyl radical-scavenging activity 분석

Hydroxyl radical-scavenging activity 분석은 Fenton's reagent에 의해 발생하는 hydroxyl radical과 하수오 열수추출물 및 하수오/표고 열수추출물을 반응시켜 흡광도 값이 낮아지는 것을 이용하여 항산화 효과를 측정하였다. 비교분석을 위해 음성대조군은 vehicle (phosphate buffer)을 처리하였고 양성대조군은 ascorbic acid를 처리하여 hydroxyl radical 소거능을 분석하였다.

양성대조군 ascorbic acid(Asc)은 1 mg/ml 농도에서 hydroxyl radical을  $51.44 \pm 6.17\%$  억제시켰다. 하수오 열수추출물은 hydroxyl radical을 10  $\mu\text{g}$ 에서  $4.48 \pm 0.54\%$ , 20  $\mu\text{g}$ 에서  $13.51 \pm 1.62\%$ , 30  $\mu\text{g}$ 에서  $21.98 \pm 2.64\%$ , 50  $\mu\text{g}$ 에서  $32.29 \pm 3.87\%$  억제시켰다(그림 24). 하수오/표고 열수추출물은 hydroxyl radical을 10  $\mu\text{g}$ 에서  $9.64 \pm 1.16\%$ , 20  $\mu\text{g}$ 에서  $13.92 \pm 1.67\%$ , 30  $\mu\text{g}$ 에서  $24.85 \pm 3.0\%$ , 50  $\mu\text{g}$ 에서  $33.53 \pm 4.02\%$  억제시켰다(그림 25). 하수오 및 하수오/표고 열수추출물의 hydroxyl radical 억제능은 농도비례적으로 효능이 증가되었고 가장 높은 농도에서 하수오/표고 열수추출물의 효능이 비교적 높은 것으로 나타났다. Hydroxyl radical 억제능은 다음과 같은 순서로 나열하였다.

Ascorbic acid (51.44%) > 50  $\mu\text{g}$  하수오/표고 (33.53%) > 50  $\mu\text{g}$  하수오 (32.29%) > 30  $\mu\text{g}$  하수오/표고 (24.85%) > 30  $\mu\text{g}$  하수오 (21.98%) > 20  $\mu\text{g}$  하수오/표고 (13.92%) > 20  $\mu\text{g}$  하수오 (13.51%) > 10  $\mu\text{g}$  하수오/표고 (9.64%) > 10  $\mu\text{g}$  하수오 (4.48%).

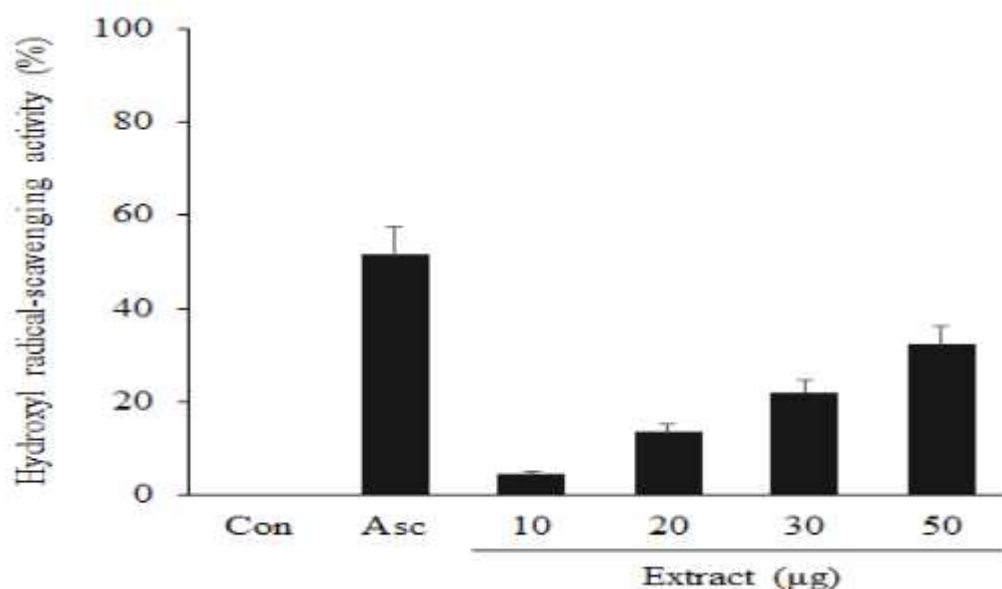


그림 24. Hydroxyl radical-scavenging activity of the extract of *Polygonum multiflorum*. The extracts were added to the reaction mixture containing 100  $\mu\text{M}$  EDTA, 1 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$ , and 2.8 mM deoxyribose. The volume was made up to 1 mL with 20 mM pH 7.4 phosphate buffer, and incubated at 37  $^\circ\text{C}$  for 1 h. The mixture was then heated to 95 $^\circ\text{C}$  in a water bath for 15 min, followed by the addition of 1 mL each of 2.8 % of TCA, and 0.5 % of TBA. After cooling, it was centrifuged at 4800 rpm for 15 min. The absorbance of the supernatant was

measured at 532 nm. The percentage hydroxyl radical scavenging activity was determined in comparison with the negative or positive control. Percentage hydroxyl radical scavenging activity was calculated as: (%) = (Abscontrol without sample - Abs sample) / Abscontrol without sample X 100. Each value represents the mean  $\pm$  SD for three determinations. Con, phosphate buffer (vehicle) treated group as negative control; Asc, ascorbic acid (1 mg/ml) treated group as positive control; 10-50, 10-50  $\mu$ g the extract of *Polygonum multiflorum* as sample group.

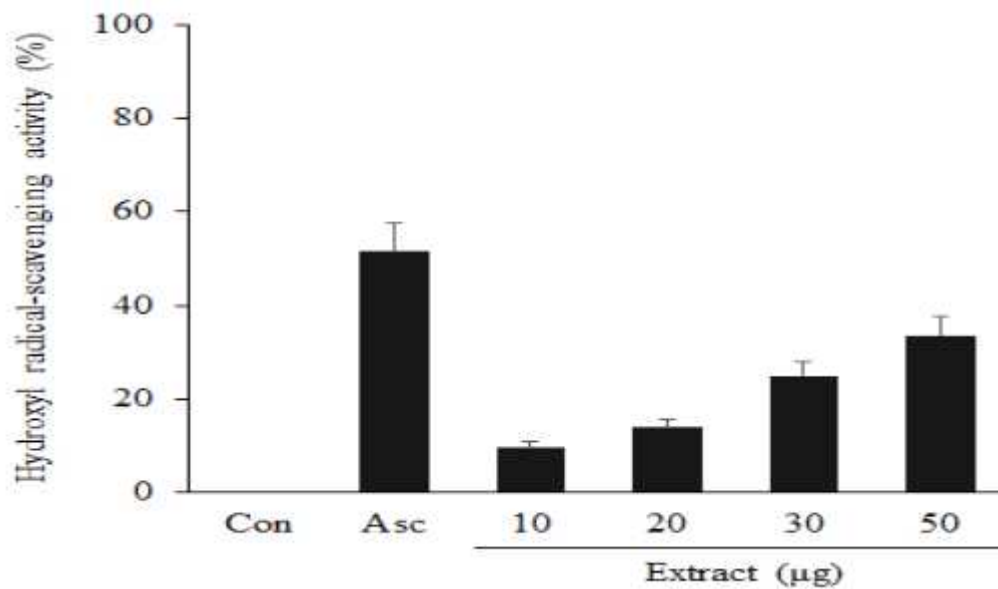


그림 25. Hydroxyl radical-scavenging activity of the mixture extract. The mixture extracts were added to the reaction mixture containing 100  $\mu$ M EDTA, 1 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, and 2.8 mM deoxyribose. The volume was made up to 1 mL with 20 mM pH 7.4 phosphate buffer, and incubated at 37 °C for 1 h. The mixture was then heated to 95°C in a water bath for 15 min, followed by the addition of 1 mL each of 2.8 % of TCA, and 0.5 % of TBA. After cooling, it was centrifuged at 4800 rpm for 15 min. The absorbance of the supernatant was measured at 532 nm. The percentage hydroxyl radical scavenging activity was determined in comparison with the negative or positive control. Percentage hydroxyl radical scavenging activity was calculated as: (%) = (Abscontrol without sample - Abs sample) / Abscontrol without sample X 100. Each value represents the mean  $\pm$  SD for three determinations. Con, phosphate buffer (vehicle) treated group as negative control; Asc, ascorbic acid (1 mg/ml) treated group as positive control; 10-50, 10-50  $\mu$ g the mixture extract with *Polygonum multiflorum* and *Lentinula edodes* as sample group.

다. Fe<sup>2+</sup> chelating activity 분석

Fe<sup>2+</sup> chelating activity 분석은 Fe<sup>2+</sup>-ferrozine complex에 의한 산화적 반응 유도과정에 하수오 열수추출물 및 하수오/표고 열수추출물을 반응시켜 흡광도 값이 낮아지는 것을 이용하여 항산화 효과를 측정하였다. 비교분석을 위해 음성대조군은 vehicle (Tris-HCl buffer)을 처리하였고 양성대조군은 ascorbic acid를 처리하여 Fe<sup>2+</sup> chelating activity를 분석하였다.

양성대조군 ascorbic acid(Asc)은 1 mg/ml 농도에서 Fe<sup>2+</sup>-ferrozine complex에 의한 산화적 반응을 40.66 ± 4.47% 억제시켰다. 하수오 열수추출물은 Fe<sup>2+</sup>-ferrozine complex에 의한 산화적 반응을 10 µg에서 3.18 ± 0.35%, 20 µg에서 12.52 ± 1.38%, 30 µg에서 16.33 ± 1.80%, 50 µg에서 21.47 ± 2.36% 억제시켰다(그림 26). 하수오/표고 열수추출물은 Fe<sup>2+</sup>-ferrozine complex에 의한 산화적 반응을 10 µg에서 10.29 ± 1.13%, 20 µg에서 14.83 ± 1.63%, 30 µg에서 20.51 ± 2.26%, 50 µg에서 28.23 ± 3.11% 억제시켰다(그림 27). 하수오 열수추출물 및 하수오/표고 열수추출물의 Fe<sup>2+</sup>-ferrozine complex에 의한 산화적 반응 억제능은 농도비례적으로 효능이 증가되었고 가장 높은 농도에서 하수오/표고 열수추출물의 효능이 다소 높게 분석되었다. Fe<sup>2+</sup>-ferrozine complex에 의한 산화적 반응 억제능은 다음과 같은 순서로 나열하였다.

Ascorbic acid (40.66%) > 50 µg 하수오/표고 (28.23%) > 50 µg 하수오 (21.47%) > 30 µg 하수오/표고 (20.51%) > 30 µg 하수오 (16.33%) > 20 µg 하수오/표고 (14.83%) > 20 µg 하수오 (12.52%) > 10 µg 하수오/표고 (10.29%) > 10 µg 하수오 (3.18%).

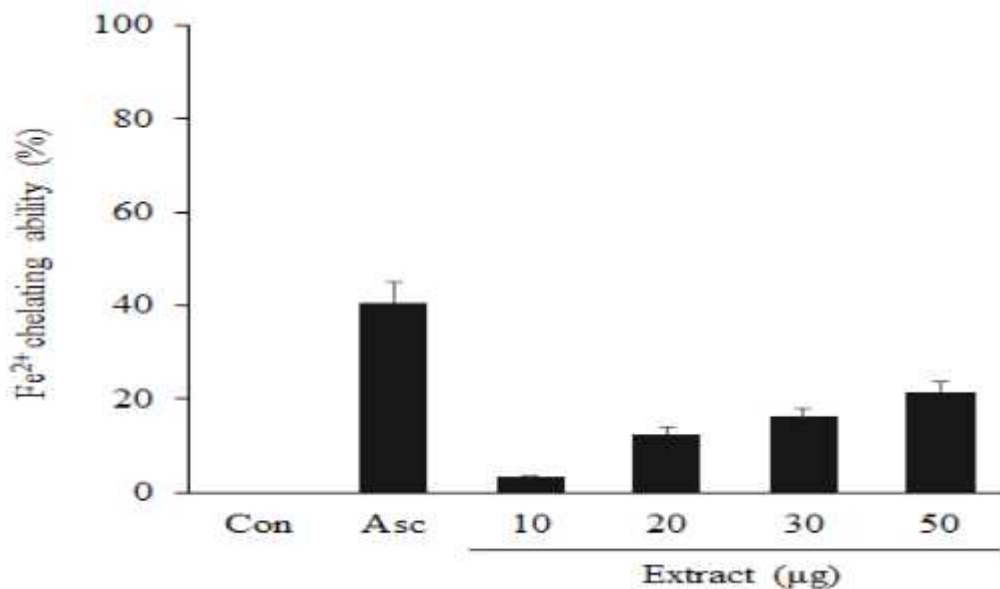


그림 26. Fe<sup>2+</sup> chelating assay of the extract of Polygonum multiflorum. Freshly prepared 150 µL of 500 µM FeSO<sub>4</sub> was added to a reaction mixture containing 170 µL of 0.1 M Tris-HCl (pH 7.4), 220 µL of Tris-HCl buffer and the extracts. The reaction mixture was incubated for 5 min before the addition of 10 µL of 0.25 % 1,10-phenanthroline (w/v). The absorbance was subsequently measured at 510 nm in a microplate reader. The Fe<sup>2+</sup> chelating ability was calculated with respect to the control. Fe<sup>2+</sup> chelating

ability (%) = (Abscontrol without sample - Abs sample) / Abscontrol without sample X 100. Each value represents the mean ± SD for three determinations. Con, Tris-HCl buffer (vehicle) treated group as negative control; Asc, ascorbic acid (1 mg/ml) treated group as positive control; 10-50, 10-50 µg the extract of *Polygonum multiflorum* fruit as sample group.

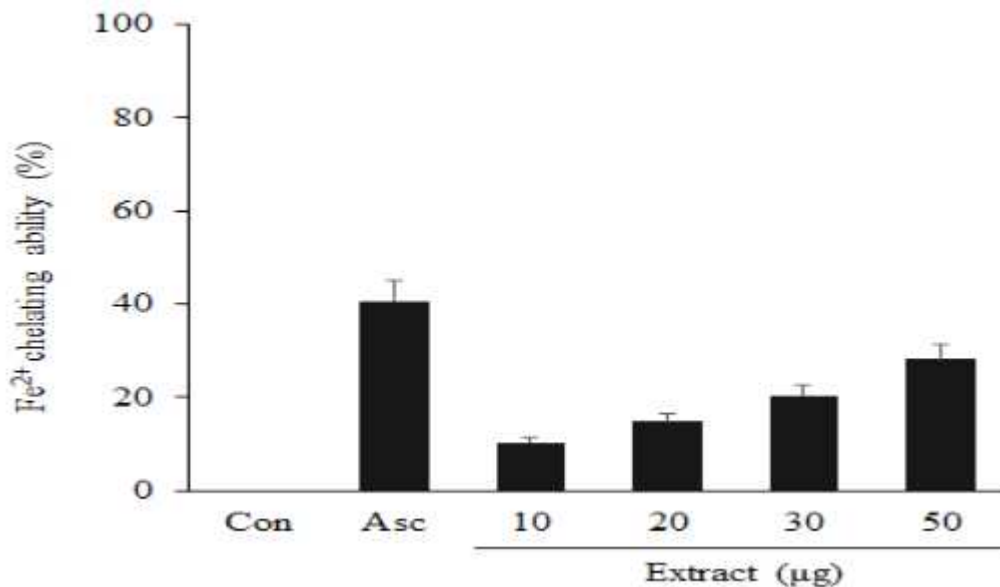


그림 27. Fe<sup>2+</sup> chelating assay of the mixture extract. Freshly prepared 150 µL of 500 µM FeSO<sub>4</sub> was added to a reaction mixture containing 170 µL of 0.1 M Tris-HCl (pH 7.4), 220 µL of Tris-HCl buffer and the extracts. The reaction mixture was incubated for 5 min before the addition of 10 µL of 0.25 % 1,10-phenanthroline (w/v). The absorbance was subsequently measured at 510 nm in a microplate reader. The Fe<sup>2+</sup> chelating ability was calculated with respect to the control. Fe<sup>2+</sup> chelating ability (%) = (Abscontrol without sample - Abs sample) / Abscontrol without sample X 100. Each value represents the mean ± SD for three determinations. Con, Tris-HCl buffer (vehicle) treated group as negative control; Asc, ascorbic acid (1 mg/ml) treated group as positive control; 10-50, 10-50 µg the extract of the mixture extract with *Polygonum multiflorum* and *Lentinula edodes* as sample group.

#### 라. Reducing power 효능 분석

Reducing power 효능 분석은 FeCl<sub>3</sub>에 의한 산화적 반응 유도과정에 하수오 열수추출물 및 하수오/표고 열수추출물을 반응시켜 흡광도 값이 낮아지는 것을 이용하고 ascorbic acid의 효능과 비교분석하여 항산화 효과를 분석하였다.

하수오 및 하수오/표고의 reducing power 효능이 존재함을 확인하였고, 3.92 ± 0.29 mg ascorbic acid equivalent/g, 4.67 ± 0.48 mg ascorbic acid equivalent/g의 값이 분석되었음 (표 32).



표 32. Reducing assay of the extract of *Polygonum multiflorum* extract and mixture extract.

	<i>Polygonum multiflorum</i> extract	Mixture extract with <i>Lentinula edodes</i>
Reducing power (mg ascorbic acid equivalent/g)	3.92 ± 0.29	4.67 ± 0.48

The reducing property of the extracts was determined by assessing the ability of the extract to reduce a FeCl<sub>3</sub> solution. The extracts was mixed with 0.5 mL of 200 mM sodium phosphate buffer (pH 6.6), and 0.5 mL of 1 % potassium ferricyanide. The mixture was incubated at 50°C for 20 min, and then 0.5 mL of 10 % TCA was added. This was centrifuged at 650 g for 10 min. 1 mL of the supernatant was mixed with an equal volume of distilled water, and 0.2 mL of 0.1% ferric chloride. The same treatment was performed to a standard of ascorbic acid solution, and the absorbance was measured at 700 nm. The reducing power was then calculated and expressed as ascorbic acid equivalent. Each value represents the mean ± SD for three determinations.

마. 지질과산화 억제능 분석

지질과산화의 분석은 조직 내 MDA 생성량을 통해 이루어진다. 조직 균질액에서 하수오 및 하수오/표고 열수추출물의 지질과산화 억제 효능을 분석하기 위해, 각 실험군 및 대조군의 조직 균질액에서 MDA 생성량을 측정하여 비교분석하였다. 비교분석을 위해 음성대조군은 시료 대신 vehicle (DW)을 처리하였고 양성대조군은 ascorbic acid를 처리하여 지질과산화 억제능을 분석하였다.

각 그룹의 MDA 농도는 일반대조군(Con)에서 3.25 ± 0.29 nM, 음성대조군(Veh)에서 10.37 ± 0.96 nM, 양성대조군(Asc)에서 6.62 ± 0.60 nM의 농도로 나타났다(Figure 7). 실험군의 하수오 열수추출물에서는 10 µg에서 10.33 ± 0.93 nM, 20 µg에서 9.73 ± 0.88 nM, 30 µg에서 8.82 ± 0.79 nM, 50 µg에서 8.45 ± 0.76 nM로 측정되었다(그림 28). 하수오/표고 열수추출물에서는 10 µg에서 10.14 ± 0.91 nM, 20 µg에서 8.96 ± 0.81 nM, 30 µg에서 8.41 ± 0.76 nM, 50 µg에서 7.96 ± 0.72 nM로 측정되었다(그림 29). 이는 일반대조군(Con)의 MDA농도를 100% 기준으로 했을 때 음성대조군(Veh)은 328.24 ± 29.54% 증가되었고 양성대조군(Asc)에서는 203.60 ± 18.32% 증가되었다. 실험군의 하수오 열수추출물에서는 10 µg에서 317.79 ± 28.60%, 20 µg에서 299.30 ± 26.94%, 30 µg에서 271.19 ± 24.41%, 50 µg에서 259.80 ± 23.38%로 분석되었다(그림 30). 하수오/표고 열수추출물에서는 10 µg에서 311.94 ± 28.07%, 20 µg에서 275.42 ± 24.79%, 30 µg에서 258.63 ± 23.28%, 50 µg에서 244.70 ± 22.02%로 분석되었다(그림 31).

음성대조군의 결과에서 Fe<sup>2+</sup>는 간 조직의 MDA 수치를 3.28 ± 0.30배 증가시켰다. 양성대

조금 ascorbic acid(Asc)은 1 mg/ml 농도에서 Fe<sup>2+</sup>에 의한 지질과산화 반응을 54.61% 억제시켰다. 하수오 열수추출물은 지질과산화 반응에 의한 산화적 반응을 10 µg에서 7.14%, 20 µg에서 23.14%, 30 µg에서 30.50%, 50 µg에서 36.60% 억제시켰다. 하수오/표고 열수추출물은 지질과산화 반응에 의한 산화적 반응을 10 µg에서 4.58%, 20 µg에서 12.68%, 30 µg에서 24.99%, 50 µg에서 29.98% 억제시켰다. 하수오 열수추출물 및 하수오/표고 열수추출물의 지질과산화 억제능은 농도비례적으로 효능이 증가되었고 가장 높은 농도에서 하수오 열수추출물의 효능이 높게 분석되었다. 지질과산화 억제능은 다음과 같은 순서로 나열하였다.

Ascorbic acid (54.61%) > 50 µg 하수오/표고 (36.60%) > 30 µg 하수오/표고 (30.50%) > 50 µg 하수오 (29.98%) > 30 µg 하수오 (24.99%) > 20 µg 하수오 (23.14%) > 20 µg 하수오/표고 (12.68%) > 10 µg 하수오 (7.14%) > 10 µg 하수오/표고 (4.58%).

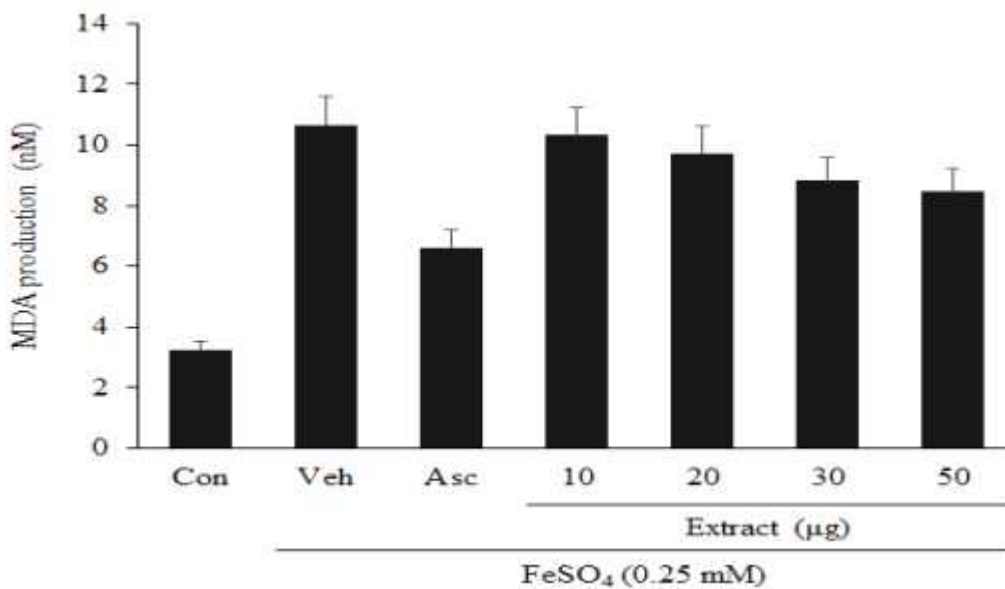


그림 28. The MDA production from Fe<sup>2+</sup>-induced lipid peroxidation in rat liver by Polygonum multiflorum extract. 100 µL of homogenate was mixed with a reaction mixture containing 30 µL of 0.1 M Tris-HCl buffer (pH 7.4), the extracts and 30 µL of the prooxidative solution (250 µM FeSO<sub>4</sub>). The volume was made up to 300 µL with water before incubation at 37°C for 1 h. The color reaction was developed by adding 300 µL of 8.1% sodium dodecyl sulphate (SDS) to the reaction mixture containing homogenate. This was followed by the addition of 500 µL of acetic acid/HCl (pH 3.4) and 500 µL of 0.8 % TBA. This mixture was incubated at 100°C for 1 h. Thiobarbituric acid reactive species (TBARS) produced were measured at 532 nm, and the absorbance was compared with that of standard curve using malondialdehyde (MDA). Each value represents the mean ± SD for three determinations. Con, vehicle-treated control ; Veh, FeSO<sub>4</sub>+vehicle; Asc, FeSO<sub>4</sub>+ascorbic acid; 10-50, FeSO<sub>4</sub>+Polygonum multiflorum extract 10-50 µg.

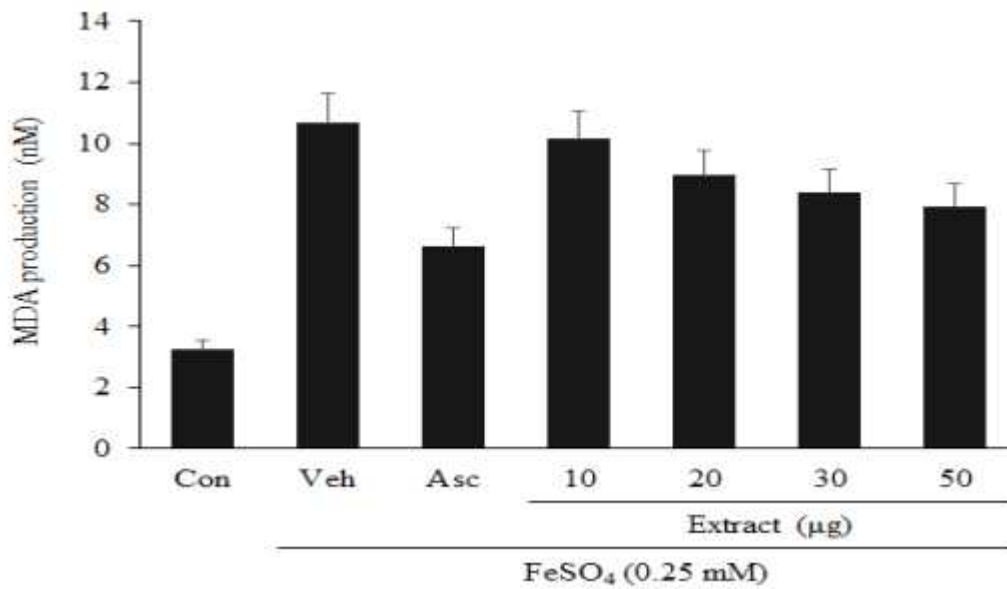


그림 29. The MDA production from Fe<sup>2+</sup>-induced lipid peroxidation in rat liver by the mixture extract. 100 μL of homogenate was mixed with a reaction mixture containing 30 μL of 0.1 M Tris-HCl buffer (pH 7.4), the extracts and 30 μL of the prooxidative solution (250 μM FeSO<sub>4</sub>). The volume was made up to 300 μL with water before incubation at 37°C for 1 h. The color reaction was developed by adding 300 μL of 8.1% sodium dodecyl sulphate (SDS) to the reaction mixture containing homogenate. This was followed by the addition of 500 μL of acetic acid/HCl (pH 3.4) and 500 μL of 0.8 % TBA. This mixture was incubated at 100°C for 1 h. Thiobarbituric acid reactive species (TBARS) produced were measured at 532 nm, and the absorbance was compared with that of standard curve using malondialdehyde (MDA). Each value represents the mean ± SD for three determinations. Con, vehicle-treated control ; Veh, FeSO<sub>4</sub>+vehicle; Asc, FeSO<sub>4</sub>+ascorbic acid; 10-50, FeSO<sub>4</sub>+the mixture extract 10-50 μg.

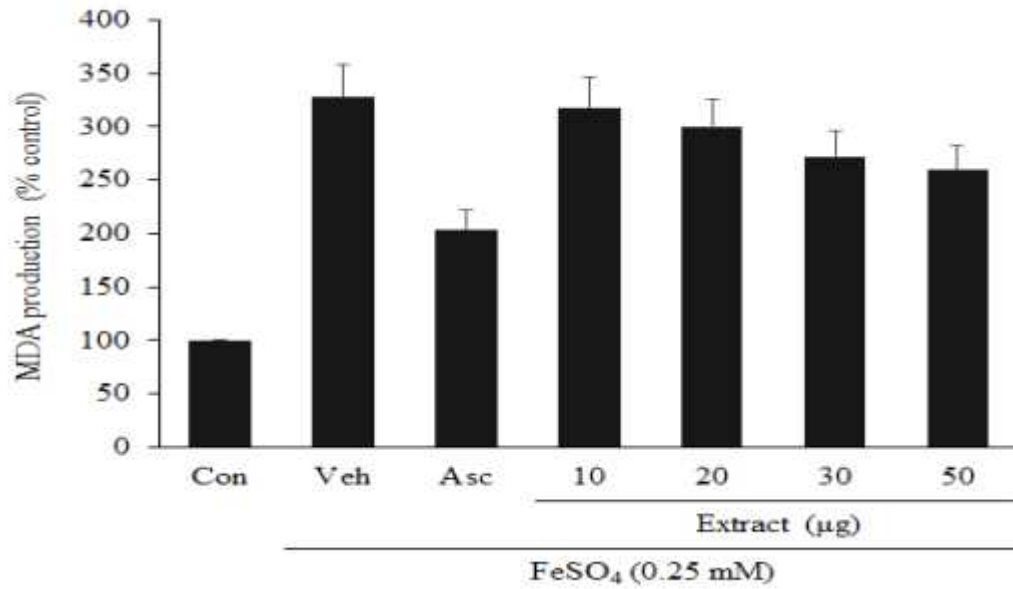


그림 30. Inhibition of the MDA production from Fe<sup>2+</sup>-induced lipid peroxidation in rat liver by Polygonum multiflorum extract. 100 µL of homogenate was mixed with a reaction mixture containing 30 µL of 0.1 M Tris-HCl buffer (pH 7.4), the extracts and 30 µL of the prooxidative solution (250 µM FeSO<sub>4</sub>). The volume was made up to 300 µL with water before incubation at 37°C for 1 h. The color reaction was developed by adding 300 µL of 8.1% sodium dodecyl sulphate (SDS) to the reaction mixture containing homogenate. This was followed by the addition of 500 µL of acetic acid/HCl (pH 3.4) and 500 µL of 0.8 % TBA. This mixture was incubated at 100°C for 1 h. Thiobarbituric acid reactive species (TBARS) produced were measured at 532 nm, and the absorbance was compared with that of standard curve using malondialdehyde (MDA). Each value represents the mean ± SD for three determinations. Con, vehicle-treated control ; Veh, FeSO<sub>4</sub>+vehicle; Asc, FeSO<sub>4</sub>+ascorbic acid; 10-50, FeSO<sub>4</sub>+Polygonum multiflorum extract 10-50 µg.

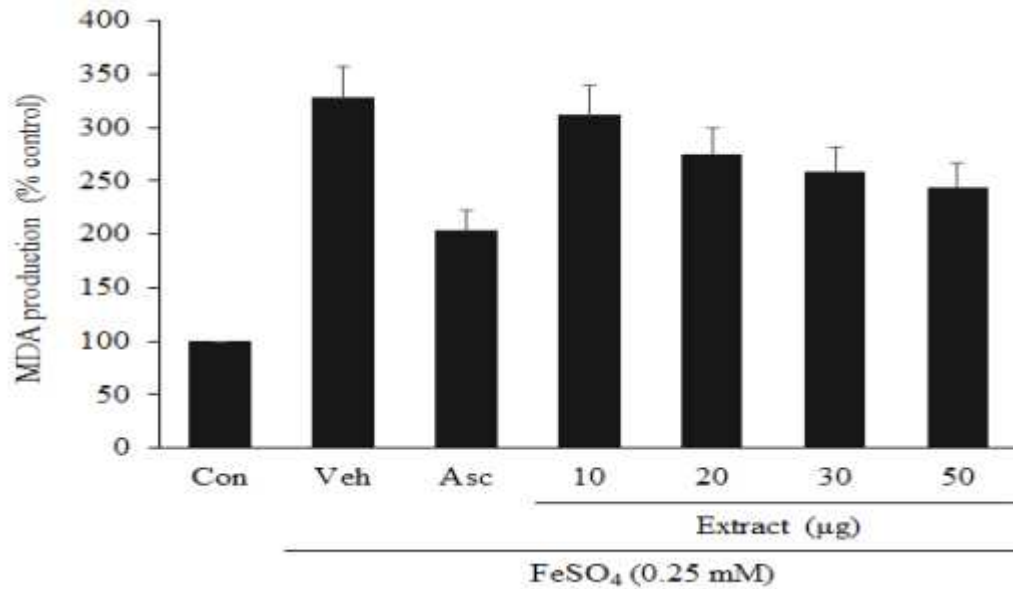


그림 31. Inhibition of the MDA production from Fe<sup>2+</sup>-induced lipid peroxidation in rat liver by the mixture extract. 100  $\mu$ L of homogenate was mixed with a reaction mixture containing 30  $\mu$ L of 0.1 M Tris-HCl buffer (pH 7.4), the extracts and 30  $\mu$ L of the prooxidative solution (250  $\mu$ M FeSO<sub>4</sub>). The volume was made up to 300  $\mu$ L with water before incubation at 37°C for 1 h. The color reaction was developed by adding 300  $\mu$ L of 8.1% sodium dodecyl sulphate (SDS) to the reaction mixture containing homogenate. This was followed by the addition of 500  $\mu$ L of acetic acid/HCl (pH 3.4) and 500  $\mu$ L of 0.8 % TBA. This mixture was incubated at 100°C for 1 h. Thiobarbituric acid reactive species (TBARS) produced were measured at 532 nm, and the absorbance was compared with that of standard curve using malondialdehyde (MDA). Each value represents the mean  $\pm$  SD for three determinations. Con, vehicle-treated control ; Veh, FeSO<sub>4</sub>+vehicle; Asc, FeSO<sub>4</sub>+ascorbic acid; 10-50, FeSO<sub>4</sub>+the mixture extract 10-50  $\mu$ g.

## 10. 하수오/표고 발효소제의 여성갱년기개선 활성 평가

### 가. 체중 변화

하수오/표고 발효소제의 여성갱년기 개선효과를 분석하기 위해 분말화된 형태의 시료를 매일 200 mg/kg/day 의 농도로 50일 동안 경구투여 하였다. 시험군 설계를 통해 4개 그룹으로 실험을 수행하였고 난소제거 여성갱년기 모델을 처치하지 않은 그룹은 일반대조군, 난소제거 여성갱년기 모델을 처치한 그룹 중 실험군은 하수오/표고 발효소제를 200 mg/kg/day 로 경구투여 하였다. 비교분석을 위해 난소제거 여성갱년기 모델을 처치한 그룹 중 양성대조군은 ascorbic acid (50 mg/kg/day) +  $\alpha$ -tocopherol (50 mg/kg/day)을 경구투여 하였고, 난소제거 여성갱년기 모델을 처치한 그룹 중 음성대조군은 시료 대신 일반사료 및 생리식염수를 급여하였다.

실험동물의 체중측정은 동물 사육실에서 적응기간(7일)을 제외하고 시료투여 하루 전날과 50일 동안 시료투여 기간 동안 51번 수행되었다 (그림 32). 난소제거 여성갱년기 모델을 처치하지 않은 일반대조군은 처음 평균체중  $227.0 \pm 17.44$  g에서 50일 후 평균체중  $321.67 \pm 2.08$  g으로 평균적으로  $94.67 \pm 4.73$  g의 체중변화를 보였다. 난소제거 여성갱년기 모델을 처치한 그룹 중 일반사료 및 생리식염수만 급여한 음성대조군은 처음 평균체중  $213.75 \pm 6.02$  g에서 50일 후 평균체중  $301.75 \pm 6.34$  g으로 평균적으로  $88.0 \pm 4.4$  g의 체중변화를 보였다. 난소제거 여성갱년기 모델을 처치한 그룹 중 하수오/표고 발효소제 시료를 50일 동안 섭취한 실험군은 처음 평균체중  $222.33 \pm 9.29$  g에서 50일 후 평균체중  $310.33 \pm 27.68$  g으로 평균적으로  $88.0 \pm 4.3$  g의 체중변화를 보였다. 또한, 난소제거 여성갱년기 모델을 처치한 그룹 중 ascorbic acid와  $\alpha$ -tocopherol을 50일 동안 섭취한 양성대조군은 처음 평균체중  $228.33 \pm 8.74$  g에서 50일 후 평균체중  $360.33 \pm 58.60$  g으로 평균적으로  $132.0 \pm 6.6$  g의 체중변화를 보였다 (그림 33).

각 그룹의 체중변화 결과를 통해, 난소제거 여성갱년기 모델을 처치한 음성대조군의 평균체중이 모델을 처치하지 않은 일반대조군의 평균체중에 비해 19.92 g 만큼 더 낮았고 시험종료 후 체중증가량(body weight gain)도 7.04 % 만큼 낮아진 것으로 확인되었다. 이는 난소제거 여성갱년기 모델처치에 의해 체중이 감소되고 체중증가량도 낮아진 것으로 분석되었다. 반면, ascorbic acid와  $\alpha$ -tocopherol을 50일 동안 섭취한 양성대조군에서는 평균체중이 모델을 처치하지 않은 일반대조군의 평균체중에 비해 58.58 g 만큼 더 높았고 체중증가량 또한 39.44 % 만큼 더 높은 것으로 확인되었다. 하수오/표고 발효소제 시료를 섭취한 실험군에서는 평균체중이 8.58 g 만큼 높았지만 체중증가량은 음성대조군의 수치와 거의 유사하게 나타났다.

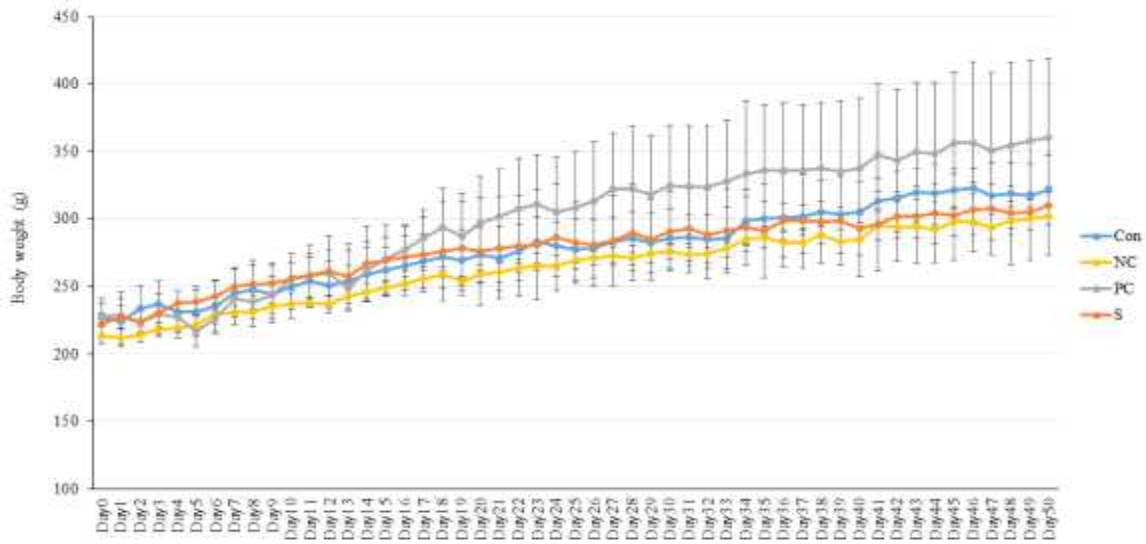


그림 32. Effect of the sample on body weight in ovariectomized (OVX) rat. Body weight was measured at 1-day intervals in 50 day. The data are expressed as mean  $\pm$  SD and are representative of 5 different experiments. Con, control group (non-OVX + normal diet); NC, negative control group (OVX + normal diet); PC, positive control group (OVX + ascorbic acid (50 mg/kg/day)/ $\alpha$ -tocopherol (50 mg/kg/day)); S, sample group (OVX + the sample (200 mg/kg/day)).

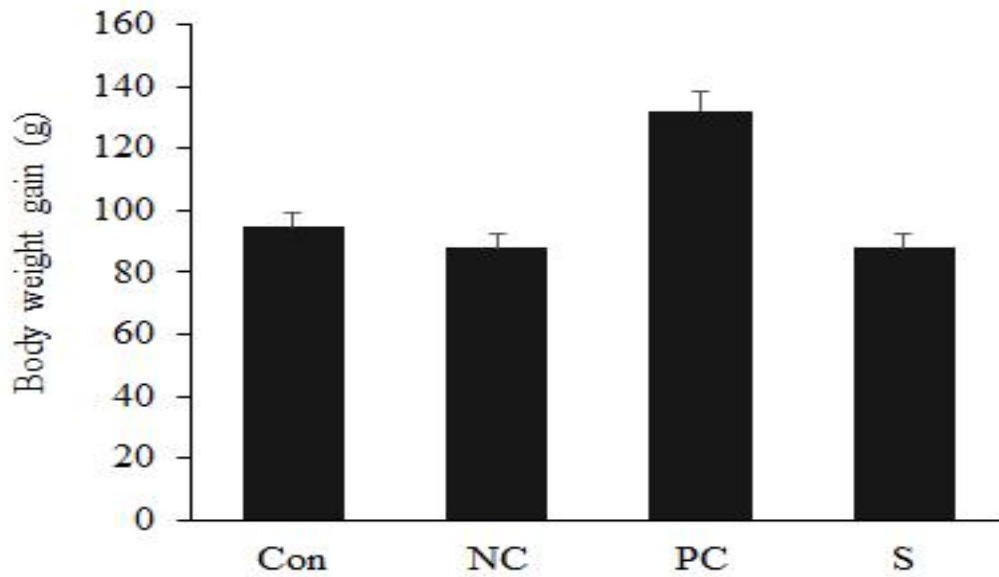


그림 33. Average body weight gain on the OVX rat fed normal diet, ascorbic acid/ $\alpha$ -tocopherol, and the sample for 50 days. The data are expressed as mean  $\pm$  SD and are representative of 5 different experiments. Con, control group (non-OVX + normal diet); NC, negative control group (OVX + normal diet); PC, positive control group (OVX + ascorbic acid (50 mg/kg/day)/ $\alpha$ -tocopherol (50 mg/kg/day)); S, sample group (OVX + the extracts (200 mg/kg/day)). Average body weight gain (g) was calculated as [After 50 day average body weight - 0 day average body weight].



### 나. 식이 섭취량

실험군은 하수오/표고 발효소재를 경구투여 하였고 비교분석을 위해 양성대조군은 시료 대신 ascorbic acid와  $\alpha$ -tocopherol을 경구투여 하였고 일반대조군 및 음성대조군은 시료 대신 일반사료 및 생리식염수를 급여하였다. 실험동물의 사료 섭취량을 측정하여 일당 평균 섭취량과 총 식이 섭취량을 분석하였다.

50일 동안 실험동물의 일반사료 섭취량을 통해 일당 평균 섭취량 결과는 아래와 같은 그래프로 제시하였다 (그림 34). 이러한 결과를 통해, 일반대조군과 음성대조군, 실험군, 양성대조군의 모든 그룹에서 일당 평균 섭취량 패턴이 유사하였고 50일 동안 1마리당 총 섭취량은 일반대조군에서 1128.0 g, 음성대조군에서 1109.3 g, 양성대조군에서 1148.7 g, 실험군에서 1113.0 g으로 나타났다 (그림 35).

각 그룹의 식이 섭취량 변화 결과를 통해, 난소제거 여성갱년기 모델을 처치한 음성대조군의 총 식이 섭취량이 모델을 처치하지 않은 일반대조군의 총 식이 섭취량에 비해 18.7 g(약 1%) 만큼 적게 나온 반면, 양성대조군의 총 식이 섭취량은 일반대조군보다 더 많이 섭취하였고 (20.7 g), 실험군의 총 식이 섭취량은 음성대조군보다 3.7 g을 더 섭취한 것으로 확인되었다.

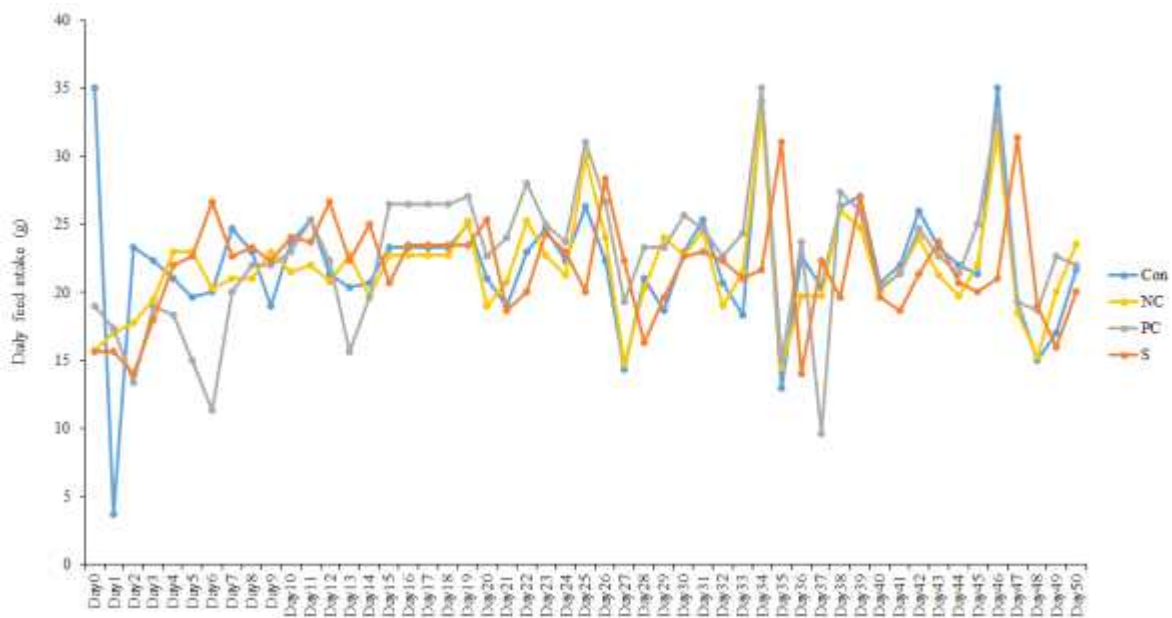


그림 34. Daily feed intake on the OVX rat fed normal diet, ascorbic acid/ $\alpha$ -tocopherol, and the sample for 50 days. Feed was measured at 1-day intervals in 50 day. Date are expressed as mean  $\pm$  SD and are representative of 5 different experiments. Con, control group (non-OVX + normal diet); NC, negative control group (OVX + normal diet); PC, positive control group (OVX + ascorbic acid (50 mg/kg/day)/ $\alpha$ -tocopherol (50 mg/kg/day)); S, sample group (OVX + the extracts (200 mg/kg/day)).

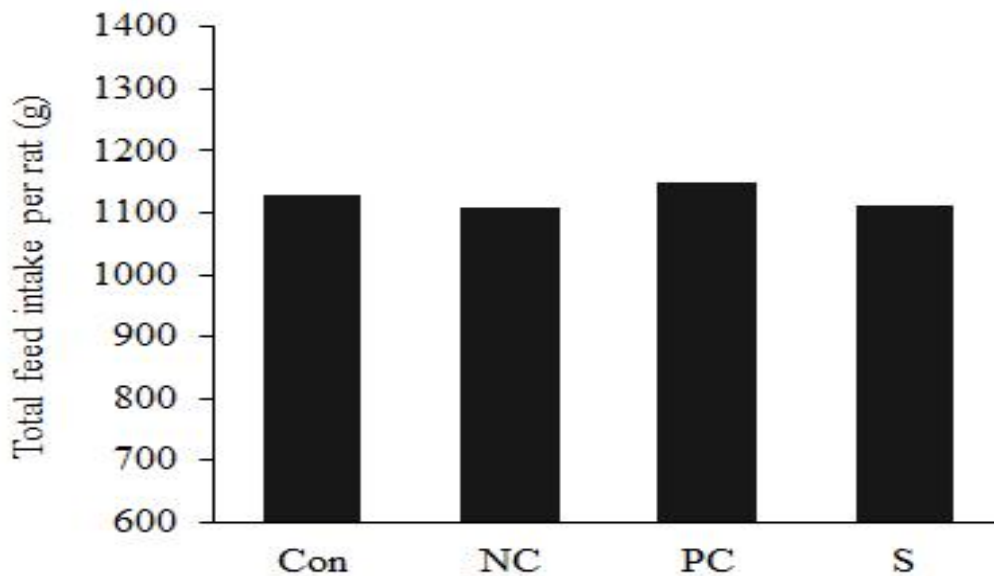


그림 35. Total feed intake (per rat) on the OVX rat fed normal diet, ascorbic acid/ $\alpha$ -tocopherol, and the sample for 50 days. Feed was measured at 1-day intervals in 50 day. Data are expressed as mean  $\pm$  SD and are representative of 5 different experiments. Con, control group (non-OVX + normal diet); NC, negative control group (OVX + normal diet); PC, positive control group (OVX + ascorbic acid (50 mg/kg/day)/ $\alpha$ -tocopherol (50 mg/kg/day)); S, sample group (OVX + the extracts (200 mg/kg/day)).

#### 다. 조직 관찰

실험군은 하수오/표고 발효소재를 경구투여 하였고 비교분석을 위해 양성대조군은 시료 대신 ascorbic acid와  $\alpha$ -tocopherol을 경구투여 하였고 일반대조군 및 음성대조군은 시료 대신 일반사료 및 생리식염수를 급여하였다. 조직염색을 위해 동물은 희생시켜 혈청 분리 후 조직은 간, 비장, 자궁, 난소, 질, 뇌 순서로 분리하였다. 조직 관찰은 자궁, 난소, 질 조직을 절제한 후 phosphate buffered paraformaldehyde 고정액으로 3시간동안 냉고정한 후 세척과 탈수과정을 거쳐 파라핀에 포매하여 5 $\mu$ m 두께로 절개한 후 Hematoxylin & Eosin과 Masson's trichrome염색을 수행하였다.

조직 관찰 결과, 자궁 (Uterus) 및 난소 (Ovary)의 경우 자궁은 일반대조군(Con)과 음성대조군(NC)를 비교해 볼 때 음성대조군의 자궁 크기와 두께가 상당히 감소되었고 난소 조직 또한 자궁과 난소 사이에 ligation 부분부터 조직괴사가 일어나 변색 및 부피감소 등을 관찰하였다 (그림 36-38). 반면, ascorbic acid와  $\alpha$ -tocopherol을 경구투여한 양성대조군(PC)의 경우 자궁이 일반대조군(Con)과 유사한 크기와 두께를 유지하였고 (그림 36, 37) 일부 난소 조직이 괴사로부터 억제 및 회복되었음을 관찰하였으며 (그림 38), 하수오/표고 발효소재를 경구투여한 실험군(S)에서는 자궁의 크기가 일반대조군과 유사하게 유지되었고 (그림 36, 37)

난소의 피사가 일부 억제되었음을 확인하였다 (그림 38). 질 (Vagina) 조직의 경우, 음성대조군(NC)에서 일부 표피조직이 얇아졌지만 양성대조군(PC)과 실험군(S)에서는 일반대조군(Con)과 유사한 형태를 보였다 (그림 39).

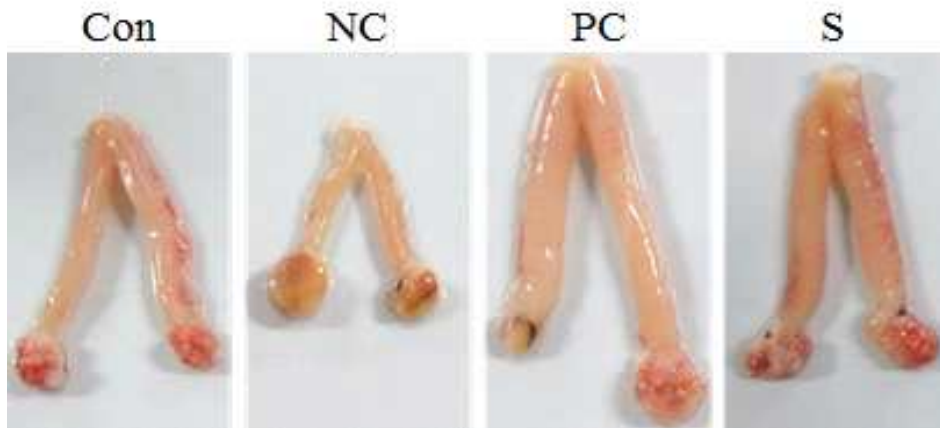


그림 36. Effect of ovariectomy and the ascorbic acid/ $\alpha$ -tocopherol or the sample treatments on uterus tissues. Representative microscopic uterus tissue pictures from the OVX rat fed normal diet, ascorbic acid/ $\alpha$ -tocopherol, and the sample for 50 days. Con, control group (non-OVX + normal diet); NC, negative control group (OVX + normal diet); PC, positive control group (OVX + ascorbic acid (50 mg/kg/day)/ $\alpha$ -tocopherol (50 mg/kg/day)); S, sample group (OVX + the extracts (200 mg/kg/day)).

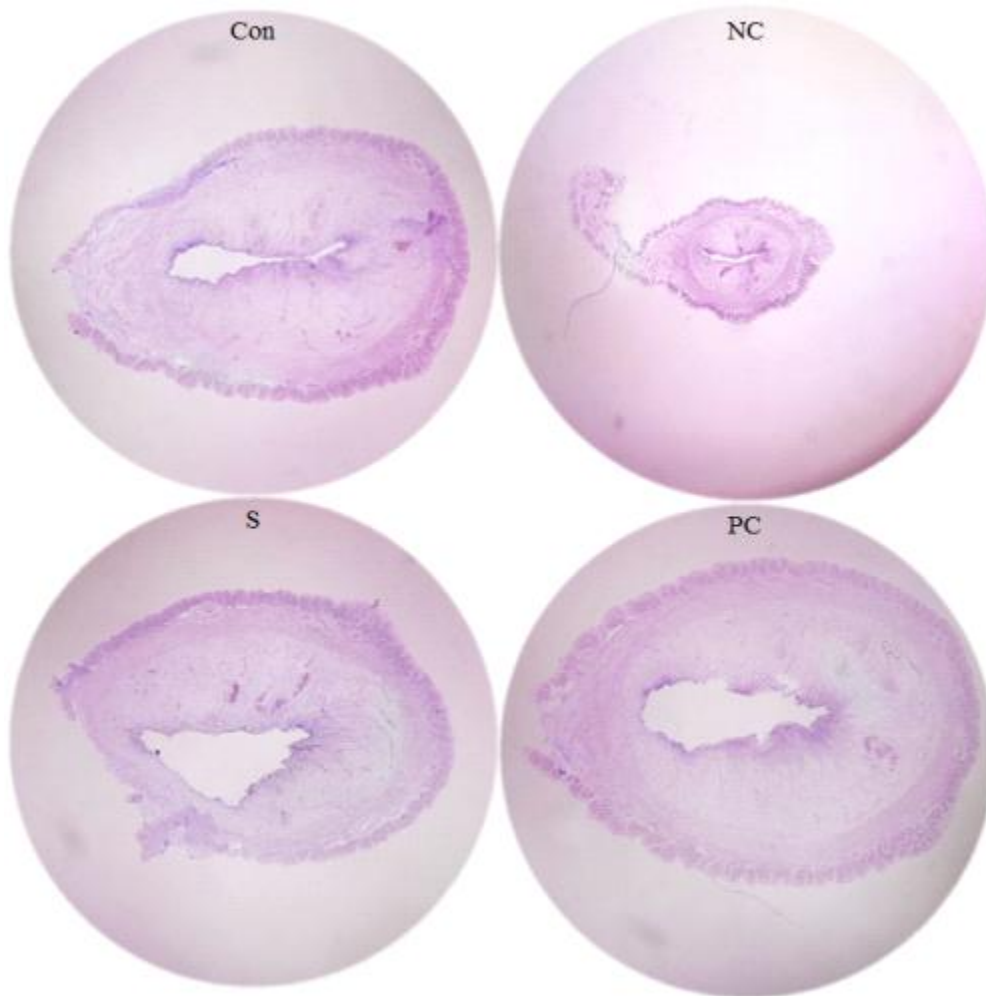


그림 37. Effect of ovariectomy and the ascorbic acid/ $\alpha$ -tocopherol or the sample treatments on uterus tissues. Representative microscopic Hematoxylin-Eosin stained uterus tissue pictures from the OVX rat fed normal diet, ascorbic acid/ $\alpha$ -tocopherol, and the sample for 50 days. Con, control group (non-OVX + normal diet); NC, negative control group (OVX + normal diet); PC, positive control group (OVX + ascorbic acid (50 mg/kg/day)/ $\alpha$ -tocopherol (50 mg/kg/day)); S, sample group (OVX + the extracts (200 mg/kg/day)).

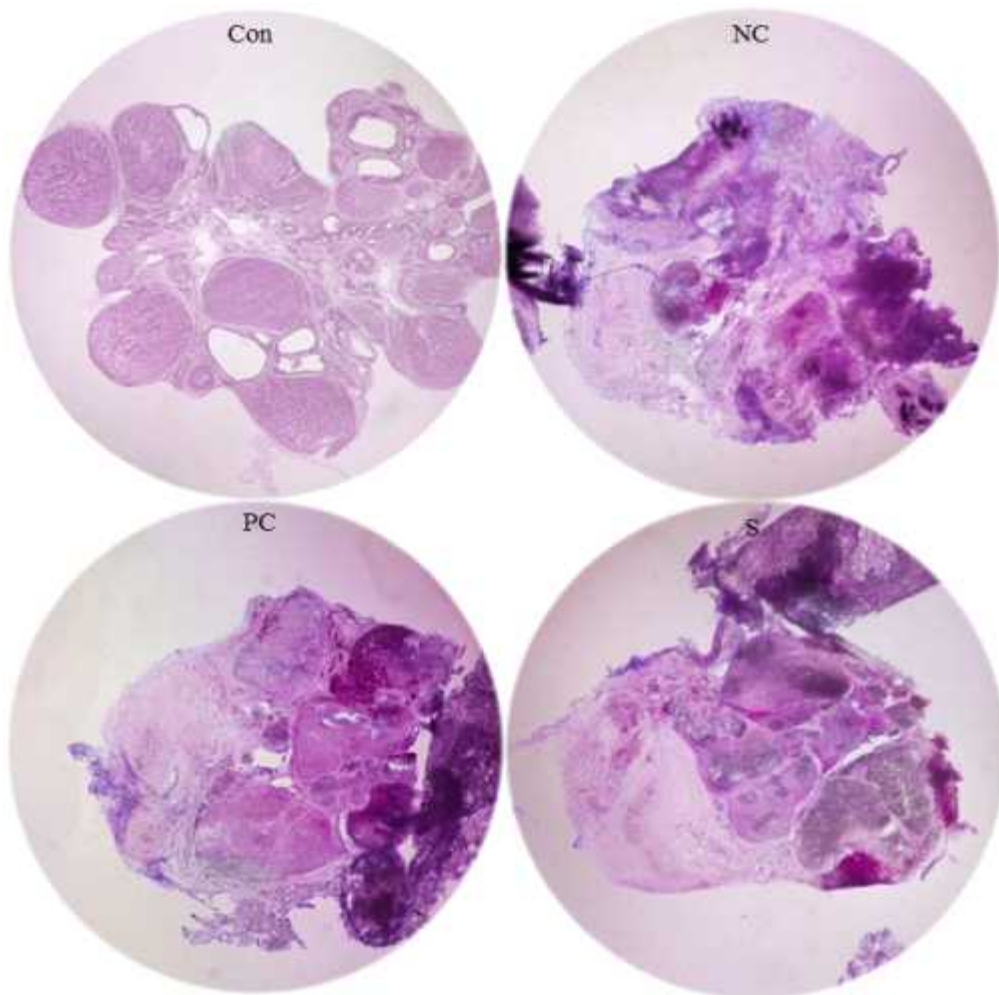


그림 38. Effect of ovariectomy and the ascorbic acid/ $\alpha$ -tocopherol or the sample treatments on ovary tissues. Representative microscopic Hematoxylin-Eosin stained ovary tissue pictures from the OVX rat fed normal diet, ascorbic acid/ $\alpha$ -tocopherol, and the sample for 50 days. Con, control group (non-OVX + normal diet); NC, negative control group (OVX + normal diet); PC, positive control group (OVX + ascorbic acid (50 mg/kg/day)/ $\alpha$ -tocopherol (50 mg/kg/day)); S, sample group (OVX + the extracts (200 mg/kg/day)).

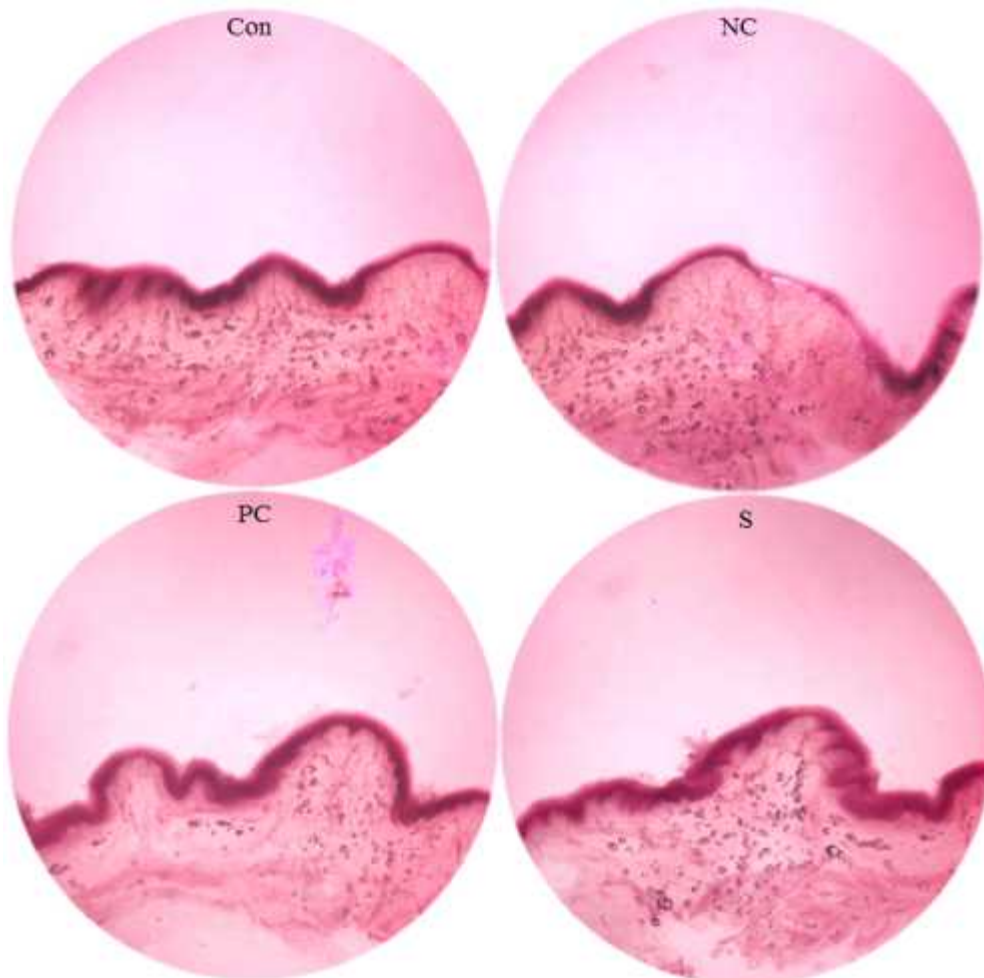


그림 39. Effect of ovariectomy and the ascorbic acid/ $\alpha$ -tocopherol or the sample treatments on vagina tissues. Representative microscopic Hematoxylin-Eosin stained vagina tissue pictures from the OVX rat fed normal diet, ascorbic acid/ $\alpha$ -tocopherol, and the sample for 50 days. Con, control group (non-OVX + normal diet); NC, negative control group (OVX + normal diet); PC, positive control group (OVX + ascorbic acid (50 mg/kg/day)/ $\alpha$ -tocopherol (50 mg/kg/day)); S, sample group (OVX + the extracts (200 mg/kg/day)).

#### 라. 조직 무게 변화

실험군은 하수오/표고 발효소재를 경구투여 하였고 비교분석을 위해 양성대조군은 시료 대신 ascorbic acid와  $\alpha$ -tocopherol을 경구투여 하였고 일반대조군 및 음성대조군은 시료 대신 일반사료 및 생리식염수를 급여하였다. 장기 적출을 위해 실험동물을 해부 전 24시간 절식시킨 후 ether 마취 하에서 개복한 후 혈청 분리 후 0.9% 생리 식염수 용액으로 관류 시킨 후 물기를 제거하고, 조직은 분리하며 피부는 털을 잘라내고 표피 위의 지방을 제거하여 무게를 잰 후 분석할 때 까지  $-70^{\circ}\text{C}$ 에 보관하였다.

조직의 무게 변화는 식이 종료 후 간(Liver), 비장(Spleen), 자궁(Uterus)의 3개 조직에 대해 수행한 결과, 간에서는 일반대조군(Con)이  $9.71 \pm 0.67$  g, 음성대조군(NC)이  $8.72 \pm 0.48$  g, 양성대조군(PC)이  $9.58 \pm 1.70$  g, 실험군(S)이  $9.26 \pm 1.43$  g 으로 나타났다 (그림 40). 비장에서는 일반대조군(Con)이  $0.61 \pm 0.07$  g, 음성대조군(NC)이  $0.64 \pm 0.05$  g, 양성대조군(PC)이  $0.74 \pm 0.16$  g, 실험군(S)이  $0.61 \pm 0.06$  g 으로 나타났다 (그림 41). 자궁에서는 일반대조군(Con)이  $0.93 \pm 0.07$  g, 음성대조군(NC)이  $0.41 \pm 0.16$  g, 양성대조군(PC)이  $0.84 \pm 0.19$  g, 실험군(S)이  $1.01 \pm 0.13$  g 으로 나타났다 (그림 42).

이러한 조직 무게 변화의 결과를 통해, 간과 자궁 조직에서 난소제거모델의 처치에 의해 유도되는 무게 감소가 다소 또는 상당히 개선되었으며, 비장 조직에서는 난소제거모델 처치에 따른 유의미한 변화를 보이지 않았다. 간 조직에서 ascorbic acid와  $\alpha$ -tocopherol을 경구투여한 양성대조군(PC)은 모델처치에 의한 무게 감소를 86.21 % 감소시켰으며, 하수오/표고 발효소재를 경구투여한 실험군(S)은 모델처치에 의한 무게 감소를 54.58 % 감소시켰다 (그림 40). 자궁 조직에서 ascorbic acid와  $\alpha$ -tocopherol을 경구투여한 양성대조군(PC)은 모델처치에 의한 무게 감소를 81.96 % 감소시켰으며, 하수오/표고 발효소재를 경구투여한 실험군(S)은 모델처치에 의한 무게 감소를 114.81 % 감소시켰다 (그림 42). 비장 조직에서 ascorbic acid와  $\alpha$ -tocopherol을 경구투여한 양성대조군(PC)은 일반대조군(Con)에 비해 조직 무게가 21.2 % 증가되었음을 확인하였다 (그림 41).

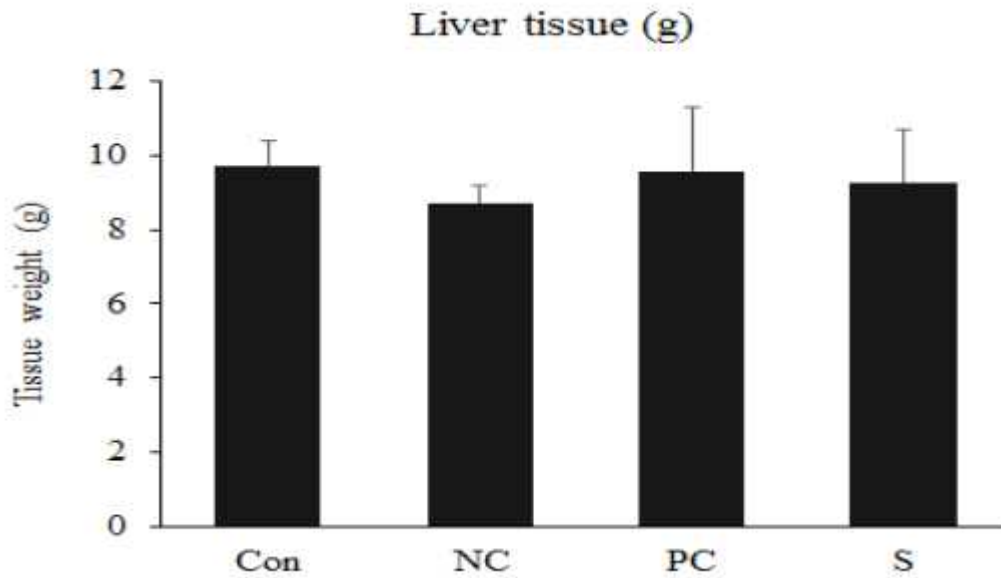


그림 40. Average liver tissue weight from the OVX rat fed normal diet, ascorbic acid/ $\alpha$ -tocopherol, and the sample for 50 days. The data are expressed as mean  $\pm$  SD and are representative of 5 different experiments. Con, control group (non-OVX + normal diet); NC, negative control group (OVX + normal diet); PC, positive control group (OVX + ascorbic acid (50 mg/kg/day)/ $\alpha$ -tocopherol (50 mg/kg/day)); S, sample group (OVX + the extracts (200 mg/kg/day)).

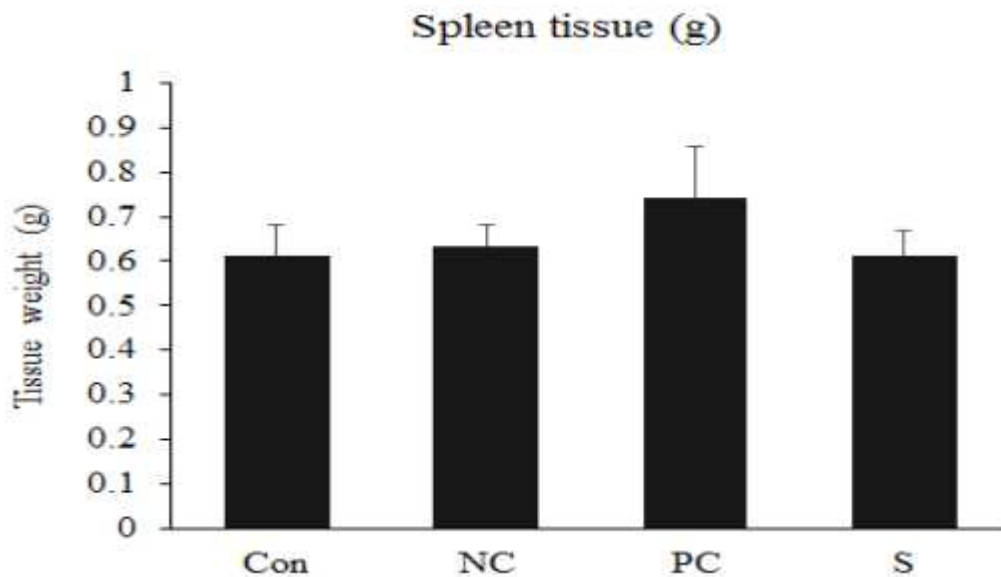


그림 41. Average spleen tissue weight from the OVX rat fed normal diet, ascorbic acid/ $\alpha$ -tocopherol, and the sample for 50 days. The data are expressed as mean  $\pm$  SD and are representative of 5 different experiments. Con, control group (non-OVX + normal diet); NC, negative control group (OVX + normal diet); PC, positive control group (OVX + ascorbic acid (50 mg/kg/day)/ $\alpha$ -tocopherol (50 mg/kg/day)); S, sample group (OVX + the extracts (200 mg/kg/day)).



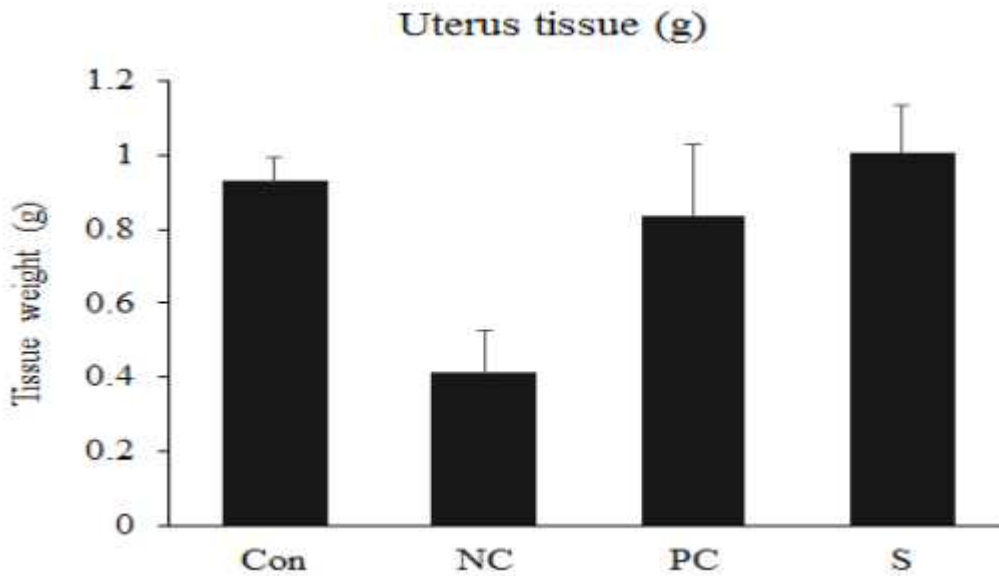


그림 42. Average uterus tissue weight from the OVX rat fed normal diet, ascorbic acid/ $\alpha$ -tocopherol, and the sample for 50 days. The data are expressed as mean  $\pm$  SD and are representative of 5 different experiments. Con, control group (non-OVX + normal diet); NC, negative control group (OVX + normal diet); PC, positive control group (OVX + ascorbic acid (50 mg/kg/day)/ $\alpha$ -tocopherol (50 mg/kg/day)); S, sample group (OVX + the extracts (200 mg/kg/day)).

#### 마. 조직 단백질 함량

실험군은 하수오/표고 발효소재를 경구투여 하였고 비교분석을 위해 양성대조군은 시료 대신 ascorbic acid와  $\alpha$ -tocopherol을 경구투여 하였고 일반대조군 및 음성대조군은 시료 대신 일반사료 및 생리식염수를 급여하였다.

조직의 단백질 농도 변화는 식이 종료 후 뇌(Brain), 자궁(Uterus), 난소(Ovary), 질(Vagina), 간(Liver), 비장(Spleen)의 6개 조직에 대해 수행한 결과, 뇌에서는 일반대조군(Con)이  $19.96 \pm 1.40$  mg/g, 음성대조군(NC)이  $23.05 \pm 1.52$  mg/g, 양성대조군(PC)이  $23.67 \pm 1.94$  mg/g, 실험군(S)이  $22.73 \pm 2.11$  mg/g 으로 나타났다. 자궁에서는 일반대조군(Con)이  $16.86 \pm 3.62$  mg/g, 음성대조군(NC)이  $22.23 \pm 1.38$  mg/g, 양성대조군(PC)이  $17.22 \pm 0.62$  mg/g, 실험군(S)이  $16.04 \pm 1.54$  mg/g 으로 나타났다. 난소에서는 일반대조군(Con)이  $31.91 \pm 1.75$  mg/g, 음성대조군(NC)이  $31.42 \pm 3.96$  mg/g, 양성대조군(PC)이  $20.92 \pm 8.22$  mg/g, 실험군(S)이  $25.23 \pm 2.82$  mg/g 으로 나타났다. 질에서는 일반대조군(Con)이  $1.17 \pm 0.17$  mg/g, 음성대조군(NC)이  $11.13 \pm 3.78$  mg/g, 양성대조군(PC)이  $8.28 \pm 2.41$  mg/g, 실험군(S)이  $12.90 \pm 1.43$  mg/g 으로 나타났다. 간에서는 일반대조군(Con)이  $65.28 \pm 1.70$  mg/g,

음성대조군(NC)이  $64.95 \pm 6.56$  mg/g, 양성대조군(PC)이  $73.67 \pm 6.67$  mg/g, 실험군(S)이  $66.56 \pm 5.06$  mg/g 으로 나타났다. 비장에서는 일반대조군(Con)이  $56.96 \pm 7.01$  mg/g, 음성대조군(NC)이  $60.31 \pm 6.08$  mg/g, 양성대조군(PC)이  $57.38 \pm 4.78$  mg/g, 실험군(S)이  $58.30 \pm 3.16$  mg/g 으로 나타났다 (그림 43). 이러한 조직 단백질 농도 변화의 결과를 통해, 간 조직의 단백질 농도가 ascorbic acid와  $\alpha$ -tocopherol을 경구투여한 양성대조군(PC)에서 평균적으로 증가되었으나, 다른 조직들에서는 난소제거모델 처치 또는 시료 처리에 따른 유의미한 변화를 보이지 않았다.

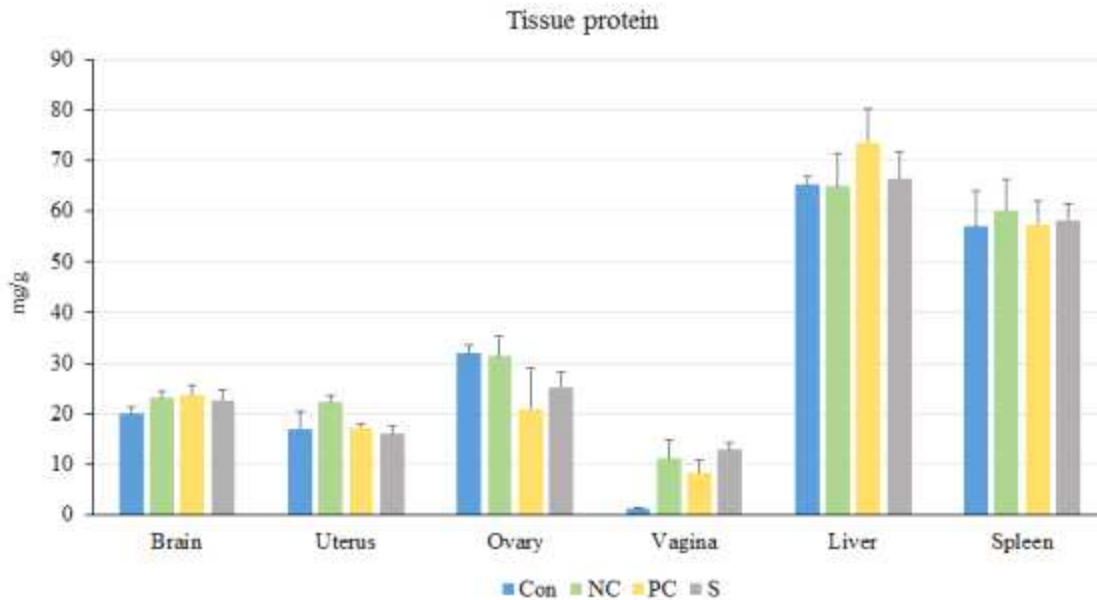


그림 43. Average protein concentrations on the brain, uterus, ovary, vagina, liver, spleen tissues from the OVX rat fed normal diet, ascorbic acid/ $\alpha$ -tocopherol, and the sample for 50 days. The data are expressed as mean  $\pm$  SD and are representative of 5 different experiments. Con, control group (non-OVX + normal diet); NC, negative control group (OVX + normal diet); PC, positive control group (OVX + ascorbic acid (50 mg/kg/day)/ $\alpha$ -tocopherol (50 mg/kg/day)); S, sample group (OVX + the extracts (200 mg/kg/day)).

□연구방법 및 결과(2차년)

I. 재료 및 방법

1. 재료

가. 실험재료



2. 실험방법

가. 발효 하수오 성분분석

1) 일반성분 함량

일반성분은 AOAC 방법에 따라 분석함. 수분은 105℃ 직접건조법, 조회분은 550℃ 직접회화법으로, 조단백은 micro-Kjeldahl법, 조지방은 soxhlet 추출법으로, 조섬유의 함량은 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-NaOH 분해법으로 구함. 가용성 무질소물의 함량은 총량에서 조회분, 조단백질, 조지방, 조섬유의 함량을 뺀 값으로 계산함.

2) 유리당 함량

유리당 분석은 Wilson 등의 방법에 따라 분석함. 시료를 원심분리 (3,000 rpm, 30 min)하여 상정액을 취한 후 여과 (Whatman No.2)하고, Sepak C18으로 정제시킨 다음 0.45 μm membrane filter (Millipore Co., U.S.A)로 여과한 여액을 HPLC (High Performance Liquid Chromatography)를 이용하여 분석함. 원심분리하여 분리된 침전물은 증류수를 가하여 추출한 후 상정액과 같은 방법으로 전처리하여 분석한다. 분석조건은 아래 표 1과 같으며, 함량은 외부표준법을 이용하여 계산함.

표 1. 유리당 분석 위한 HPLC 조건

항 목	분석조건
Instrument	Agilent Technologies 1200 Series
Detector	ELSD detector
Column	ZORBAX Carbohydrate ( 4.6 mm × 150 mm )
Solvent	75% Acetonitrile
Column temp.	30°C
Flow rate	1.4 mL/min
Injection volume	5 μL

3) 유기산 함량

시료 10 g에 증류수를 가하여 100 mL 정용 하여 추출시켜 200 mL로 정용한 다음 원심분리(3,000 rpm, 30 min)하여 상정액을 취하여 여과(Whatman No.2)하고, Sepak C18으로 정제시킨 다음 0.45 μm membrane filter(Millipore Co., U.S.A)로 여과한 여액을 HPLC(High Performance Liquid Chromatography)를 이용하여 분석함. 분석조건은 아래 표 2와 같으며, 함량은 외부표준법으로 계산함.

표 2. 유기산 분석 위한 HPLC 석 조건

항 목	분석조건
Instrument	Agilent Technologies 1200 Series
Column	Agilent Zorbax SB-Aq ( 4.6 × 150 mm, 5um )
Solvent	20mM NaHPO4 : ACN( 99:1 )
Column temp.	30°C
Flow rate	1.0 mL/min
Injection volume	20 μL

4) 유용성분(Emodin, Chrysophanol, Rhein, Physcion) 분석

시료 4.0 g을 정확히 칭량하여 70% methanol 50 ml를 가해 2시간 가열하여 식힌 다음 여과하고, 잔류물에 메탄올 50ml을 넣어 같은 방법으로 조작하였다. 여액을 모두 합한 다음 농축하여 용매를 날려 보내고 잔류물을 물 50ml로 녹인 후 동량의 에테르로 2회 분획한 다음 에테르층을 탈수하여 농축한 후 메탄올을 넣어 100ml로 정량하였다.

\* HPLC 분석조건

표준액의 HPLC 분석조건으로 column은 Luna C18 (4.6x250mm, 5 $\mu$ m, Phenomenex)를 사용하였고 이동상으로는 0.1% phosphoric acid : acetonitrile의 비율 70:30으로 60분간 0:100 (v/v)의 비율이 되도록 하고, 유속은 1.0ml/min의 분석조건으로 한다. Emodin, chrysophanol, physicion, rhein의 peak는 각각 30.3, 38.8, 41.9, 22.3min에 각각 분리되어 나타난다.

5) Ergosterol 분석

에르고스테롤은 시료 5 g에 에탄올 100 mL을 넣어 80°C에서 1시간 환류추출 시킨 후, 상등액을 취하고 잔사에 에탄올 100 mL을 넣고 80°C에서 1시간 환류추출 하였다. 추출물을 필터하여 20 mL 에탄올과 수산화칼륨 10 g을 넣고, 80°C에서 1시간 환류 추출시킨 후 검화된 용액에 증류수 50 mL을 첨가하였다. 그 후, 헥산으로 50 mL씩 3번 분획하여 헥산 층을 취해서 완전 농축시킨 후 메탄올 10 mL로 녹여서 HPLC로 측정하였다. 함량은 외부표준법으로 계산하고, HPLC조건은 표 3과 같다.

표 3. Ergosterol 분석 위한 HPLC 분석 조건

항 목	분석조건
Instrument	Agilent Technologies 1200 Series
Column	Agilent XDB-C18 (Method Development Kit) ( 4.6 × 150 mm, 5 $\mu$ m )
Solvent	98% Methanol
Column temp.	28.8°C
Wavelength	UV 280 nm
Flow rate	1.0 mL/min
Injection volume	20 $\mu$ L

6)  $\beta$ -glucan 함량

Total glucan을 구한 후  $\alpha$ -glucan 량을 빼서  $\beta$ -glucan 정량하였다. 먼저 total glucan은 100 mesh 체로 걸른 분쇄 시료 100 mg 을 tube에 넣어 37% HCl 1.5 mL을 넣고 45분간 30°C water bath에 넣어 분해하였다. 그 후 증류수 10 mL을 넣어 vortex하고, 100°C에서 2시간 incubation 시켰다. 그 후 실온에서 식히면서 2 N KOH를 10 mL씩 넣고 200 mM sodium acetate buffer로 100 mL 정용 후 충분히 mixing 하였다. 그 후 상등액 0.1 mL 에 200 mM sodium acetate buffer에 녹인 exo-1,3- $\beta$ -glucanase plus  $\beta$ -glucosidase 0.1 mL을 넣고. reagent blank는 acetate buffer 0.2 mL을 넣고, D-glucose standard는 D-glucose

standard 0.1 mL과 acetate buffer 0.1 mL을 넣고 mixing 후 40°C에서 60분 동안 incubation 한다. Glucose oxidase/oxidase mixture(GOPOD) 3 mL을 넣고 40°C에서 20분 동안 incubation 한 후, 510 nm에서 흡광도를 측정하였다. α-Glucan은 100 mesh 체로 걸른 분쇄 시료 100 mg 을 tube에 넣고 2 M KOH 2 mL씩 넣고 20분간 mixing 하였다. 1.2 M sodium acetate buffer 8 mL를 넣고 섞은 후 amyloglucosidase plus invertase 0.2 mL을 넣고, 잘 섞어서 40°C water bath에서 30 분간 incubation 하였다. 상등액 0.1 mL에 200 mM sodium acetate buffer 0.1 mL, GOPOD 3 mL을 넣고 40°C에서 20분간 incubation 한 후, 510nm 흡광도에서 측정하였다.

#### 나. 반응표면분석법

##### 1) 재료

본 실험에 사용한 적하수오(Polygonum multiflorum root)는 동부생약영농조합법인 부설 재배단지(위도 35°01'95", 경도127°30'25")에서 2016년 12월에 생산한 것을 사용하였다. 발효에 사용한 표고균사는 (재)장흥군버섯산업연구원에서 분양받은 Lentinula edodes(JMI10079)를 배양하여 발효에 사용하였다. 절단 적하수오에 표고균사체로 발효시킨 후 열풍건조한 후, 분쇄하여 보관하였다. 추출물은 분말상태로 밀봉 후 실리카겔을 2차 동봉하여 실온에서 보관하면서 실험에 사용하였다.

##### 2) 시약

본 실험에서 사용된 분석 및 추출, chromatography용 용매와 시약은 일급 또는 특급시약을 구입하여 사용하였다.

##### 3) 반응표면 분석 시험 설계

본 연구에서는 추출특성의 모니터링과 추출조건의 최적화를 위하여 반응표면 분석법(repose surface methodology, RSM)을 이용하였고, 추출조건에 대한 실험계획은 표 4와 같이 중심합성계획(central composite design)을 실시하였다. 추출공정에서 중요한 독립변수(Xi)로서 추출온도(X1), 추출시간(X2) 및 시료에 대한 용매비(X3)에 대한 실험범위를 설정하여 각각을 5단계로 부호화하였으며, 중심합성계획에 따라 16구로 설정하여 추출하였다(표 5).

또한 이들 독립변수에 영향을 받을 종속변수(Yn)로는 고형분 함량(Y1), 당도(Y2), TPC(total polyphenol contents)(Y3), TFC(total flavonoid contents)(Y4), ABTS cation radical scavenging activity(Y5) 및 DPPH radical scavenging activity(Y6)으로 하였으며, 모든 실험은 3반복 측정하여 평균값을 회귀분석에 사용하였다. 회귀분석에 의한 최적 조건의 예측은 Minitab 14.0 Ver. program(mini Tab Inc, Pa, USA)을 이용하였다.

⌘ 4. Levels of extraction conditions in experimental design for RSM(Response Surface Methodology) analysis

Xi	Extraction conditions	Levels				
		-2	-1	0	1	2
X1	Extraction temperature (°C)	40	55	70	85	100
X2	Extraction time (hrs)	2	4	6	8	10
X3	Added sample raio (mg/mL)	100	67	50	40	33

⌘ 5. The fractional factorial design by RSM for optimal hot water extraction conditions of fermented Polygonum multiflorum root by Lentinula edodes mycelials

Treatment number	Extraction condition		
	Extraction temperature(°C)	Extraction time(hrs)	Ratio of solvent and sample(mg/mL)
1	55 (-1)	4 (-1)	67 (-1)
2	55 (-1)	4 (-1)	40 (+1)
3	55 (-1)	8 (+1)	67 (-1)
4	55 (-1)	8 (+1)	40 (+1)
5	85 (+1)	4 (-1)	67 (-1)
6	85 (+1)	4 (-1)	40 (+1)
7	85 (+1)	8 (+1)	67 (-1)
8	85 (+1)	8 (+1)	40 (+1)
9	70 (0)	6 (0)	50 (0)
10	70 (0)	6 (0)	50 (0)
11	40 (-2)	6 (0)	50 (0)
12	100 (+2)	6 (0)	50 (0)
13	70 (0)	2 (-2)	50 (0)
14	70 (0)	10 (+2)	50 (0)
15	70 (0)	6 (0)	100 (-2)
16	70 (0)	6 (0)	33 (+2)

#### 4) 고형분 함량

표고균사체로 발효한 적하수오 열수추출물의 고형분 함량은 항량을 구한 수기에 추출액 20 mL을 취하여 105°C에서 증발 건조시킨 후 그 무게를 측정하였으며, 추출액 조제에 사용된 원료량(건물량)에 대한 백분율로써 고형분 함량(soluble solid contents, %)을 나타내었다.

#### 5) 당도 측정

표고균사체로 발효한 적하수오 열수추출물의 당도측정은 추출물을 취하여 디지털 당도계 (Atago Co., Japan)로 3회 반복 측정하여 평균값으로 나타내었다.

#### 6) Total polyphenol 함량 측정

표고균사체로 발효한 적하수오 열수추출물의 총 폴리페놀 함량은 Folin-Denis법을 실험하였다(Joslyn, 1970). 추출물을 동결건조 하여 얻은 시료를 증류수를 이용하여 농도별로 희석한 후, 각 시료 25 uL에 증류수 75 uL와 Folin-Ciocalteu phenol reagent 시약 25 uL 가하였다. 6분간 실온에서 반응 시킨 뒤 포화용액 Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 100 uL를 가하여 혼합하고, 90분간 실온에서 방치한 후 765 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준물질로 gallic acid를 각각 0.5, 1.0, 5.0, 10, 50 및 100 mg/mL로 조제한 후 흡광도와 농도와의 관계를 나타내는 표준 곡선을 나타내었으며, 추출물의 총 폴리페놀 함량을 mg GAE(gallic acid equivalent)/g로 나타내었다.

#### 7) Total flavonoid 함량 측정

표고균사체로 발효한 적하수오 열수추출물의 총 플라보노이드 함량은 Herald 등(2012)이 사용한 실험방법에 준하여 측정하였다. 추출물을 동결건조 하여 얻은 시료를 증류수를 이용하여 농도별로 희석한 후, 각 시료 25 uL에 증류수 100 uL와 5% NaNO<sub>2</sub> 10 uL를 가하여 5분간 반응시켰다. 반응이 끝난 후, 10% AlCl<sub>3</sub> 15 uL를 가하여 6분간 방치하고, 1N NaOH 50 uL와 증류수 50 uL를 가하였다. 1분 후, 반응액의 흡광도 값을 510 nm에서 측정하였다. 표준물질로 quercetin을 각각 0.5, 1.0, 5.0, 10, 50 및 100 mg/mL로 조제한 후 흡광도와 농도와의 관계를 나타내는 표준 곡선을 나타내었으며, 추출물의 총 플라보노이드 함량을 mg QE(quercetin equivalent)/g로 나타내었다.

#### 8) ABTS cation radical scavenging activity

ABTS radical을 이용한 항산화력 측정은 ABTS<sup>+</sup>· cation decolorization assay 방법에 의하여 측정하였다(Roberta et al., 1999). 7 mM 2,2-azinobis(3-ethyl-benthiazolin3-6-sulfonic acid)와 2,4 mM potassium persulfate를 혼합하여 실온에서 24시간 동안 방치하여 ABTS<sup>+</sup>·를 형성시킨 후 ethanol로 희석하여 ABTS<sup>+</sup>· 100 uL에 시료 100 uL를 가하여 1분동안 방치한 후 732 nm에서 흡광도를 측정하였다.



$$\text{Scavenging activity(\%)} = \left( 1 - \frac{\text{Absorbance of sample}}{\text{Absorbance of control}} \right) \times 100$$

#### 9) DPPH radical scavenging activity

DPPH radical 소거능 측정은 Abe 등(2000), Yamachuchie 등(1998) 및 Blois(1958)의 방법을 준용하여, 각 추출물의 DPPH(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl)에 대한 수소공여 효과로 측정하였다. 즉, 일정 농도의 시료 2 mL에  $2 \times 10^{-4}$  M DPPH용액(dissolved in 99% methanol)을 1 mL를 가하고, vortex mixing하여 37°C에서 30분간 반응시켰다. 이 반응액을 흡수분광광도계를 사용하여 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. DPPH radical 소거능(DPPH radical scavenging activity, %)으로 측정하였으며, 3회 반복 실험하여 얻은 결과를 평균과 표준편차로 나타내었다.

$$\text{DPPH(\%)} = \left( 1 - \frac{\text{Absorbance of sample}}{\text{Absorbance of control}} \right) \times 100$$

#### 10) 통계분석

표고근사체 발효 적하수으로부터 최적의 열수추출물을 얻고자 추출조건에 대한 실험계획으로써 fractional factorial design 사용하였으며, 반응표면 회귀분석을 위해서 Minitab 14.0 Ver. program을 사용하였다(Ha et al., 2014).

다. 갱년기 음료 생약소재 탐색

##### 1) 항균활성

##### 2) 표준추출조건

가) 추출시간에 따른 표준추출조건 확립

##### (1) 고형분함량

##### (2) 총 폴리페놀 함량

Total polyphenols 분석은 Folin-Denis법으로 실험하였다. 증류수에 희석한 시료 25 uL에 증류수 75 uL와 Folin-Ciocalteu phenol reagent 시약 25uL를 가하고, 6분간 반응 시킨 뒤 포화용액  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  100 uL를 가하여 혼합한 후 90분간 실온에서 방치하고, 765 nm에서 흡광도를 측정한 후, 표준물질인 gallic acid를 사용하여 표준 검량선을 작성 후 추출물의 총 폴리페놀 함량을 mg GAE(gallic acid equivalent)/g로 나타내었다. 표준물질은 gallic acid를 각각 0.5, 1.0, 5.0, 10, 50 및 100 mg/mL로 만들어 처리한 후 흡광도와 농도와의 관계를 나

타내는 표준곡선을 만들어 total polyphenols 함량을 나타냈다.

### (3) 총 플라보노이드 함량

Total flavonoid content 분석은 Herald 등이 사용한 실험방법에 준하여 측정하였다. 추출물 25 uL에 증류수 100 uL 와 5% NaNO<sub>2</sub> 10 uL를 가한 다음, 5분 후 10% AlCl<sub>3</sub> 15 uL를 가하여 6분간 방치하고 1 N NaOH 50 uL 와 증류수 50 uL를 가하였다. 1분 후, 반응액의 흡광도 값을 510 nm에서 측정하였다. 표준물질은 quercetin을 사용하여 표준 검량선을 작성 후 추출물의 총 플라보노이드 함량은 mg QE(quercetin equivalent)/g로 나타내었다. 표준물질은 quercetin을 0.5, 1.0, 5.0, 10, 50 및 100 mg/mL로 만들어 처리한 후 흡광도와 농도의 관계를 나타내는 표준곡선을 만들어 total flavonoid 함량을 나타냈다.

## 나) 추출온도에 따른 표준추출조건 확립

### (1) 고형분함량

### (2) 총 폴리페놀 함량

Total polyphenols 분석은 Folin-Denis법으로 실험하였다. 증류수에 희석한 시료 25 uL에 증류수 75 uL와 Folin-Ciocalteu phenol reagent 시약 25uL를 가하고, 6분간 반응 시킨 뒤 포화용액 Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 100 uL를 가하여 혼합한 후 90분간 실온에서 방치하고, 765 nm에서 흡광도를 측정한 후, 표준물질인 gallic acid를 사용하여 표준 검량선을 작성 후 추출물의 총 폴리페놀 함량을 mg GAE(gallic acid equivalent)/g로 나타내었다. 표준물질은 gallic acid를 각각 0.5, 1.0, 5.0, 10, 50 및 100 mg/mL로 만들어 처리한 후 흡광도와 농도와의 관계를 나타내는 표준곡선을 만들어 total polyphenols 함량을 나타냈다.

### (3) 총 플라보노이드 함량

Total flavonoid content 분석은 Herald 등이 사용한 실험방법에 준하여 측정하였다. 추출물 25 uL에 증류수 100 uL 와 5% NaNO<sub>2</sub> 10 uL를 가한 다음, 5분 후 10% AlCl<sub>3</sub> 15 uL를 가하여 6분간 방치하고 1 N NaOH 50 uL 와 증류수 50 uL를 가하였다. 1분 후, 반응액의 흡광도 값을 510 nm에서 측정하였다. 표준물질은 quercetin을 사용하여 표준 검량선을 작성 후 추출물의 총 플라보노이드 함량은 mg QE(quercetin equivalent)/g로 나타내었다. 표준물질은 quercetin을 0.5, 1.0, 5.0, 10, 50 및 100 mg/mL로 만들어 처리한 후 흡광도와 농도의 관계를 나타내는 표준곡선을 만들어 total flavonoid 함량을 나타냈다.

## 3) 총 플라보노이드 및 안트라퀴논 LC-MS분석

### 가)폴리페놀류와 안트라퀴논류 함량 분석

- 실험방법
- LC-MS와 ELSD를 이용한 정량 및 정성 분석
- : 추출물들을 gradient 용리방법을 이용해서 분석하였으며, single mass의 조건은 positive scan fragment 70으로 분석하였다. 분석조건은 Table 에 나타내었다.

표 6. 안쓰라퀴논류의 분석 방법

Item	Condition
Instrument	Agilent Technologies 1260 series HPLC / Agilent Technologies 6130 Quadrupole LC-MS / Agilent ELSD / Agilent Technologies 1260 Hip ALS(Agilent Technologies, USA)
Column	Phenomenex kinetic C18 EVO 2.6 $\mu$ m 2.1mm*100mm
Solvent	0-2min                    5% acetonitrile + 95% Water / 0.25% F.A
	2-23min                100% acetonitrile / 0.25% F.A
	23-27min              100% acetonitrile / 0.25% F.A
Column temp.	37 $^{\circ}$ C
Wavelength	UV 280 nm
Flow rate	0.35 mL/min
Sample concentration	1000 ug/mL
Injection volume	Sample 20 uL / standard 1, 2, 3, 4, 5 uL

표 7. 폴리페놀류의 분석 방법

Item	Condition
Instrument	Agilent Technologies 1260 series HPLC / Agilent Technologies 6130 Quadrupole LC-MS / Agilent ELSD / Agilent Technologies 1260 Hip ALS(Agilent Technologies, USA)
Column	Poroshell 120 SB-C18 column (150 × 4.6 mm i.d., 2.7 μm particle size, Agilent Technologies, U.S.A)
Solvent	0-2min 0% acetonitrile + 100% Water / 0.25% F.A
	2-22min 45% acetonitrile + 55% Water / 0.25% F.A
	22-25min 100% acetonitrile / 0.25% F.A
	25-28min 100% acetonitrile / 0.25% F.A
Column temp.	37°C
Wavelength	UV 254 nm
Flow rate	0.8 mL/min
Sample concentration	1000 ug/mL
Injection volume	Sample 20 uL / standard 1, 2, 3, 4, 5 uL

라. 초산발효

본 발명에 사용한 하수오, 오미자, 홍화자, 속단, 당귀는 동부생약영농조합법인에서 제공받아 사용하였다. 하수오 발효에 사용한 표고균사는 (재)장흥군버섯산업연구원에서 보관중인 특허균주 *Lentinula edodes*-KCTC18583P를 사용하였으며, 초산균발효에 사용된 초산균은 한국종균협회에서 분양받은 *Acetobacter aceti* KCCM 40229, *Acetobacter pasteurianus* KCCM 40011, 2종을 시험에 사용하였다.

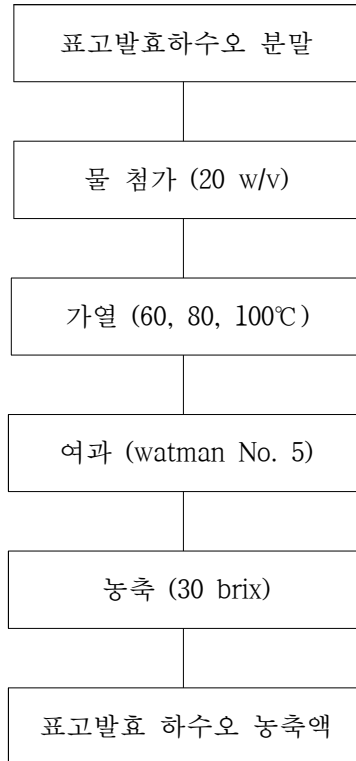
하수오 버섯균사 발효물을 제조하기 위한 조건은 아래 도와 같다.

하수오 분쇄
하수오 분쇄물(10mesh 통과, 25mesh 잔류물)
농도별 하수오분쇄물 (500 g) + glucose 1% + sucrose 1%
멸균 (121°C/15분)
방랭 후, 표고균사(Lentinula edodes-KCTC18583P) 10 mL 접종
25°C/30 일간 배양
탈병 및 건조 (dry oven 80°C/12시간)
분쇄
표고균사발효 하수오 분말

<표고발효하수오 분말 제조 공정도>

1) 열수추출

열수추출은 아래 도의 방법으로 원료를 절편하여 20배의 물을 첨가하여 추출온도(60, 80, 100°C), 추출시간(1, 3, 6, 9, 12, 15hrs)등을 각기 달리하여 실시하였다. 즉 발효하수오, 속단, 홍화자, 당귀를 조체 중량의 일정한 비율로 물을 첨가하여 시간별로 진탕시키면서 추출한 뒤 원심분리(4,000rpm, 15min)한 후 상층액을 각각의 추출액으로 하였다.



〈표고발효 하수오 농축액 제조 공정〉

2) 하수오 초산발효 공정 확립

가) 사용균주 및 배지

실험에 사용한 균주로 초산균은 한국종균협회에서 분양받은 *Acetobacter aceti* KCCM 40229, *Acetobacter pasteurianus* KCCM 40011, 2종을 시험에 사용한다, 효모는 한국종균협회에서 분양받은 *Saccharomyces cereviase* KCCM 11290 균주를 사용한다. 초산균 분리, 초산생성능 비교와 종초제조를 위한 배지는 Difco(USA)사 제품을 구입하여 사용하였다.

나) 분리균주의 초산 생성능 비교

초산생성능이 우수한 균주를 선정 하기위해 표 8의 기본 배지에 10-20% 버섯발효 하수오 추출물을 첨가한 액체배지를 제조하여 분리용 평판배지에서 초산 생성 균주로 판정된 균주들을 접종하고 shaking incubator(150 rpm)를 사용하여 30°C에서 8일간 진탕배양한 후 초산 생성량을 측정하여 초산 생성능이 가장 우수한 균주를 최종적으로 선발하였다.

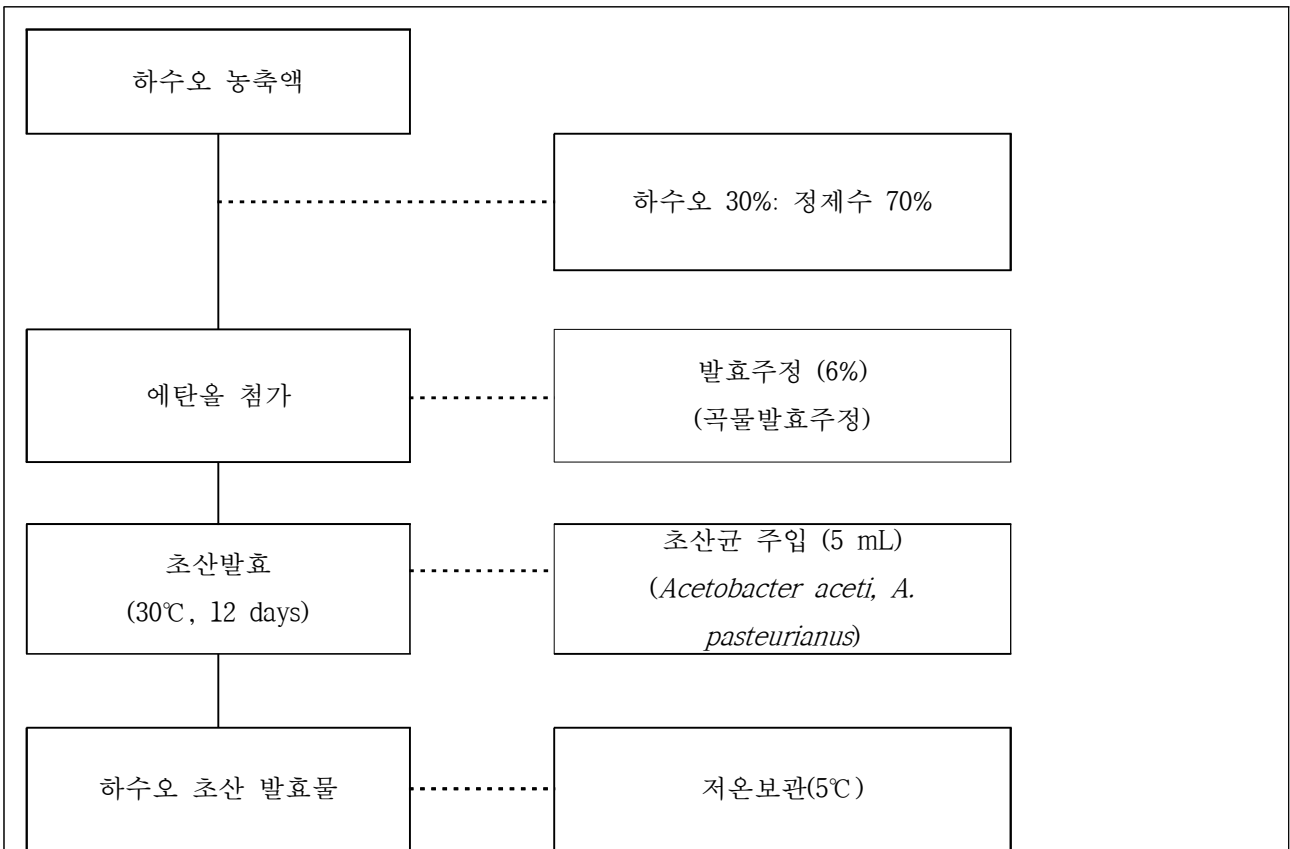
표 8. 초산 생성균 액체 배지의 조성

구 분	함량(%)
Glucose	5
Yeast extract	1
Ethanol	7
Acetic acid	2

다) 버섯발효 하수오 초산발효

버섯발효하수오 추출물과 배지 혼합물의 당 함량을 검사한 후 설탕으로 12%가 되게 보정하여 알코올 발효 덩을 만들었다. 알코올 발효 덩에 효모를 첨가하여 초산 발효 덩을 만들고 25℃에서 3~5일간 알코올 발효를 하였다. 알코올 발효가 끝난 후 초기 산도를 2%로 조절한 다음 종초를 첨가하여 25℃에서 14~16일간 교반 하면서 초산 발효를 하여 버섯발효하수오 초산발효 복합물을 제조하였다.

하수오 분쇄
하수오 분쇄물(10mesh 통과, 25mesh 잔류물)
농도별 하수오분쇄물 (500 g) + glucose 1% + sucrose 1%
멸균 (121℃/15분)
방랭 후, 표고균사(Lentinula edodes-KCTC18583P) 10 mL 접종
25℃/30 일간 배양
탈병 및 건조 (dry oven 80℃/12시간)
분쇄
표고균사발효 하수오 분말

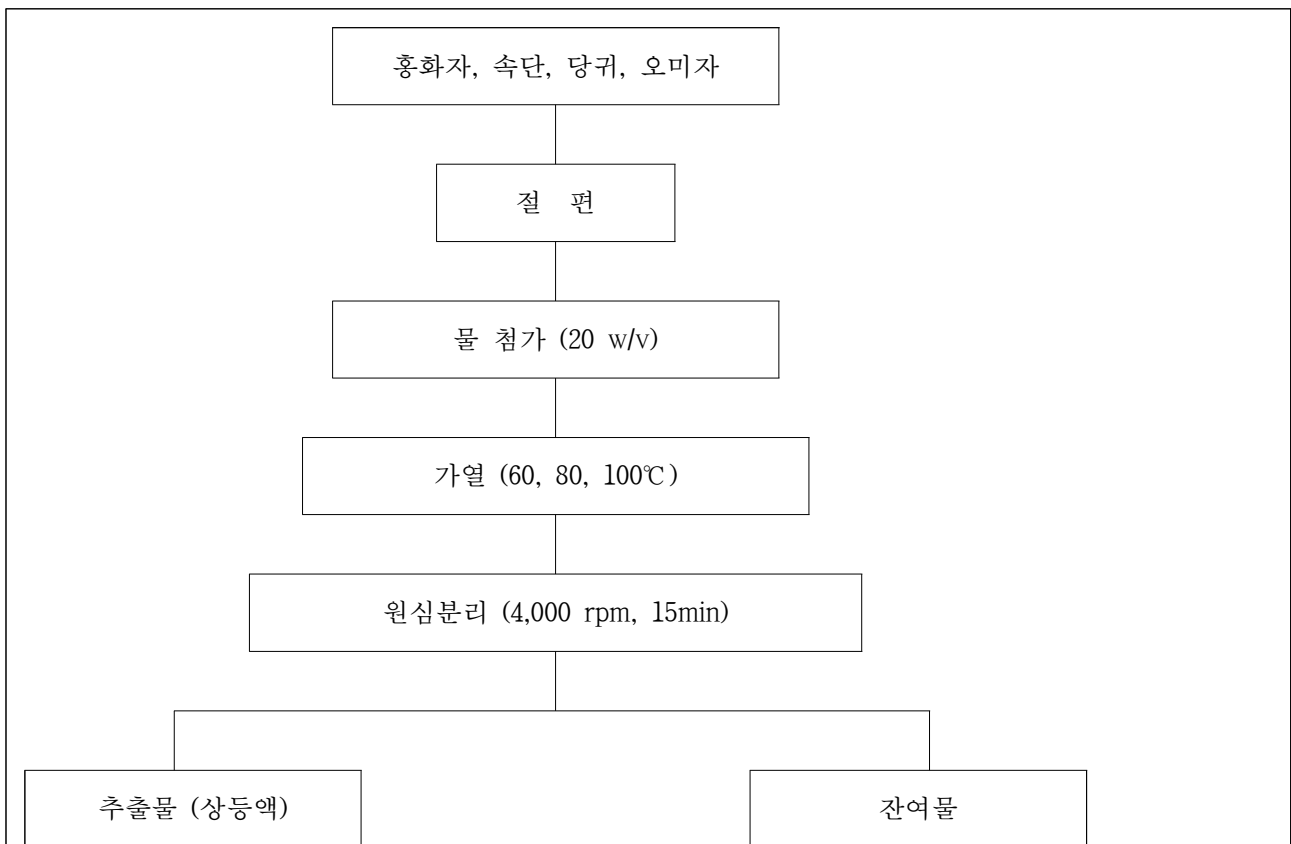


<버섯발효 하수오 초산발효물 제조공정도>

라) 열수추출

열수추출은 도 3의 방법으로 원료를 절편하여 20배의 물을 첨가하여 추출온도(60, 80, 100°C), 추출시간(1, 3, 6, 9, 12, 15hrs)등을 각기 달리하여 실시하였다. 즉 발효하수오, 속단, 홍화자, 당귀를 조제 중량의 일정한 비율로 물을 첨가하여 시간별로 진탕시키면서 추출한 뒤 원심분리(4,000rpm, 15min)한 후 상층액을 각각의 추출액으로 하였다.





〈부원료 생약초의 열수추출물 제조 공정도〉

마. 갱년기 in vivo

1) 선행연구: 항산화 시험 및 골대사 지표 ALP를 이용한 효능 확인

가) DPPH 라디칼 소거능

각 시료는 methanol을 이용하여 5, 10, 20  $\mu\text{g}$  농도로 준비. DPPH 시약은 빛을 차단한 상태에서 0.1 mM 농도가 되도록 methanol에 녹여 준비. 시료 100  $\mu\text{L}$ 과 DPPH 시약 0.5 mL을 넣고 20분 동안 빛을 차단한 조건에서 반응시킨 후 Microplate reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)를 이용하여 517 nm에서 흡광도를 측정. 음성대조군으로 시료 대신 methanol을 가하여 동일한 조건으로 실험을 수행. DPPH 라디칼 소거능은 다음과 같은 식을 이용하여 DPPH 억제율 (Inhibitory activity, %)을 산출.

$$- \text{DPPH inhibition (\%)} = [1 - (\text{시료 처리군의 흡광도} / \text{시료 무처리군의 흡광도})] \times 100$$

나) Alkaline phosphatase 활성 분석

P-nitrophenyl phosphate liquid substrate system을 이용하여 spectrophotometric assay 수행. Substrate solution에 다양한 농도의 시료를 상온에서 15분 반응시킨 후 405 nm에서

p-nitrophenol (PNP)를 측정하여 분석. alkaline phosphatase 표준 효소를 이용하여 농도별 표준값으로 시료의 alkaline phosphatase 유사활성 분석. Microplate reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)를 이용하여 측정.

2) 인간세포를 이용한 여성 갱년기 개선 분석

가) E-screen assay

MCF-7 세포는 10% FBS가 함유된 Dullbecco's modified Eagle's medium(DMEM) 배지를 사용하여 5% CO<sub>2</sub>, 37°C 조건하에서 배양. Hormone induction하기 전 세포는 PBS 로 세척하며, 시료 처리 전 모든 estrogenic source를 제거하기 위해서 2일 동안 10% charcoal-dextran stripped FBS (CD-FBS)가 함유된 phenol red free DMEM에서 배양함. 배양된 세포는 0.25% trypsin-EDTA를 처리하여 1000 rpm에서 5분간 원심분리하고, 세포수를 측정하여 5×10<sup>3</sup>cells/well이 되도록 96well 배양판에 분주. 24시간 후 샘플을 처리하고 6일(144시간)간 배양한 후 MTT assay로 세포의 증식 정도를 측정.

나) MTT assay

시료를 농도별로 처리하여 배양함. MTT 용액을 각 well에 첨가하여 4시간 동안 반응. MTT 용액을 제거하고 DMSO를 넣고 15분 후에 ELISA reader를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하고 그 결과를 control 값에 대한 비율로 계산.

다) Estrogen receptor binding assay

estrogen receptor binding assay는 assay kit에서 제공하는 매뉴얼에 따라 진행. 결합능력은 시료의 존재하에 polarization value에 의해 결정.

3) 폐경모델 제작 및 여성 갱년기 개선 분석

가) 폐경모델 제작

Sprague-Dawley계 암컷 rat (200-210g)을 모델을 처치하지 않은 일반대조군과 모델을 처치한 실험군으로 나누며, 실험군은 근육주사로 마취시킨 후 복부의 털을 제거한 다음 무균 상태로 수술을 시행. 먼저 등쪽 하부 양쪽을 최소한으로 절개하여 노출시킨 후 양측의 난소를 제거하고 다시 복부를 봉합. 3일 후 시료 투여.

나) 그룹 설정 및 시료 투여방법

홍화자 복합추출물 시료 투여는 200 mg/kg/day 농도로 경구투여하고 음성대조군은 같은 용량의 생리식염수를 투여. 양성대조군은 estradiol E2를 0.5 mg/kg/day 농도로 경구투여. 실

험군의 모든 시료 투여기간은 폐경모델 처치 3일 후부터 50일간 투여.

다) 체중 및 식이량 측정

폐경모델 처치 3일 후부터 50일간 일주일에 한번 각 그룹의 체중과 식이량을 측정하여 체중증가율 및 식이량 변화를 분석.

라) 혈액 내 생화학적 분석

50일간 시료 투여 종료 후 혈청 분리를 위해 실험동물을 해부 전 24시간 절식시킨 후 ether 마취 하에서 개복한 후 정맥에서 채혈하고 실온에서 30분간 방치 한 후 3,000 rpm, 25°C에서 15분간 원심 분리하여 혈청을 분리하고, 실험 시까지 -70°C에 보관.

혈청 내 생화학적 지표로 혈청 총단백질, albumin, 골대사 지표 calcium, alkaline phosphatase, 혈중 여성 호르몬 지표 estrogen, estradiol, 성욕감쇠 지표 호르몬 testosterone, 혈당 지표 glucose, 간기능 지표 AST, ALT, 지질대사 지표 total cholesterol, HDL, LDL, VLDL, triacylglycerol, 동맥경화지수 AI, 동맥경화상관계수 AC, 심장위험지수 CRR, 관상동맥지수 CAI 변화를 각 지표 측정용 kit 및 자동혈액분석기기(Vitros 250 chemistry system (Ortho Clinical Diagnostics))를 사용하여 분석. LDL-콜레스테롤, VLDL콜레스테롤 함량은 Friedewald 식에 의하여 계산.

$LDL\text{콜레스테롤} = \text{총콜레스테롤} - (\text{HDL콜레스테롤} + \text{중성지방}/5)$

$VLDL\text{콜레스테롤} = \text{중성지방}/5$

콜레스테롤, 중성지방, HDL, LDL, VLDL 수치를 이용하여 동맥경화지수 (AI, Atherogenic index), 동맥경화상관계수 (AC, Atherogenic coefficient), 심장위험지수 (CRR, Cardiac risk ratio), 관상동맥지수 (CAI, Coronary artery index)를 다음과 같은 식으로 분석.

$Atherogenic\ index = [TG/HDL]$

$Atherogenic\ coefficient = [(TC-HDL)/HDL]$

$Cardiac\ risk\ ratio = [TC/HDL]$

$Coronary\ artery\ index = [LDL/HDL]$

4) 조직 분석

장기 적출을 위해 실험동물을 해부 전 24시간 절식시킨 후 ether 마취 하에서 개복한 후 혈청 분리 후 0.9% 생리 식염수 용액으로 관류 시킨 후 물기를 제거하고, 각 조직(간, 신장, 비장, 자궁-난소)은 분리하며, 조직에 있는 지방을 제거하고 무게를 잰 후 분석할 때 까지 -70°C에 보관.

조직염색을 위해 동물은 희생시켜 자궁-난소 조직을 세척 후 디지털 카메라(Canon Power Shot SX40 HS)로 이미지 결과 도출하고 자궁관 조직 상부 약 0.5 cm를 절제하여 cryosection법과 cryostat (model KD-2950, Kede, China)을 이용하여 10 μm 두께로 절개한

후 Hematoxylin 염색을 실시하고 현미경(Leica microscope (DM500, Leica, Germany))으로 관찰.

바. 시제품제작

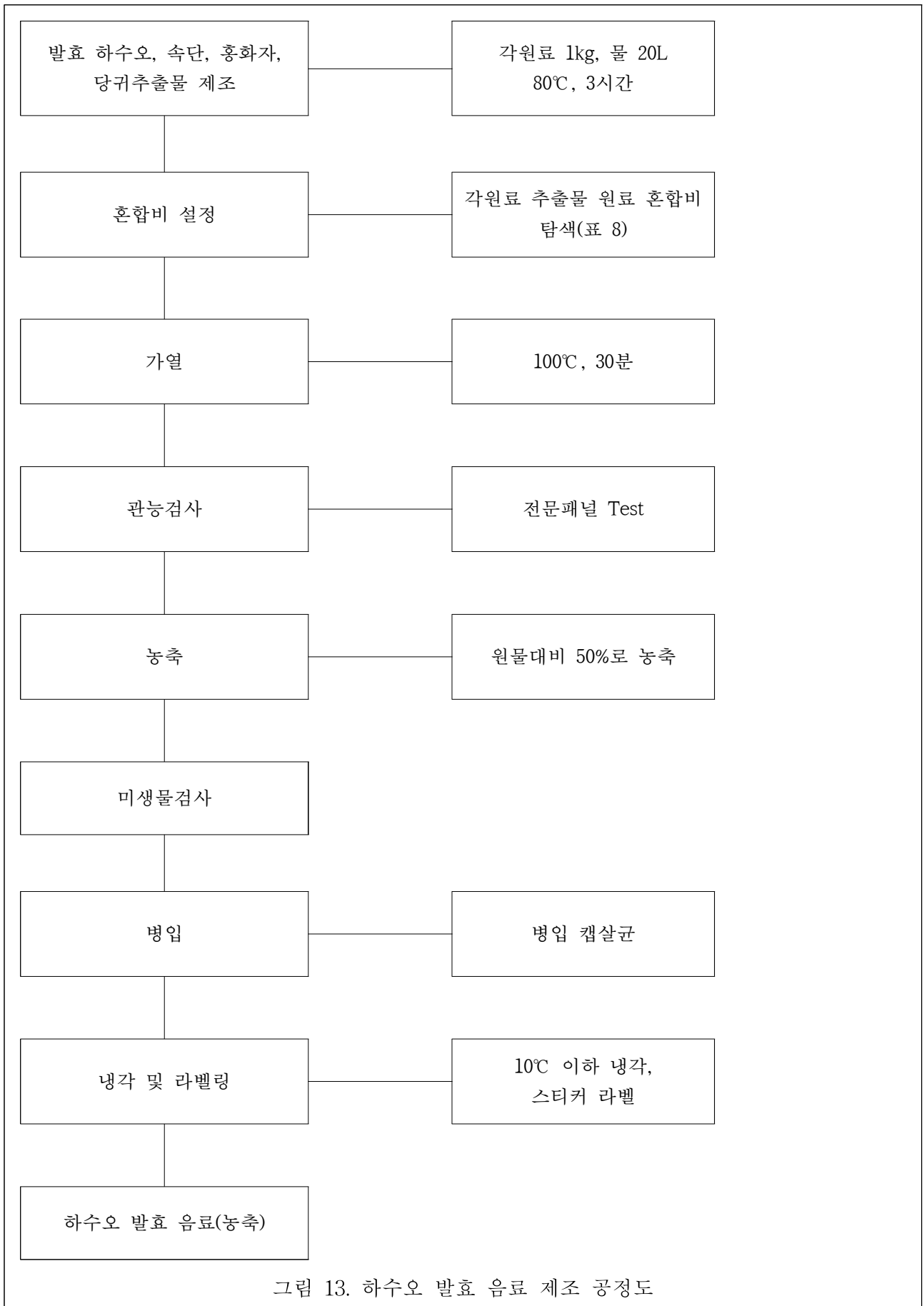
1) 후보소재의 혼합비

시제품 제조에 사용된 하수오, 홍화자, 속단, 당귀, 오미자 추출물들의 배합비율은 아래 표 8과 같고 발효 하수오 음료 제조공정도는 표 9와 같다.

표 9. 하수오 발효 음료 제조를 위한 원료 혼합 비율

(%, v/v)

시료	발효 하수오	홍화자	속단	당귀	오미자
A	50	15	20	5	5
B	50	20	15	10	5
C	50	25	10	10	5
D	50	30	5	10	5
<b>E</b>	<b>50</b>	<b>35</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>
F	50	40	5	0	5
G	50	45	0	0	5



## 2) 시제품 항산화활성 평가

### 가) Total polyphenols 함량 측정

Total polyphenols 분석은 Folin-Denis법으로 실험하였다. 발효복합물을 1000배 희석한 후 Folin 시약 2 mL을 첨가하여 3분 후에 10% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 5 mL을 가해 혼합하여 발색시켰다. 1시간 후 발색된 시약을 765 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 표준물질은 gallic acid를 1, 5, 10, 50, 100 및 500 µg/mL로 만들어 처리한 후 흡광도와 농도와의 관계를 나타내는 표준곡선을 만들어 total polyphenols 함량을 나타내었다.

### 나) Electron donating ability

전자공여능 측정은 발효복합물의 DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl)에 대한 수소공여 효과로 측정하였다. 즉, 일정 농도의 시료 70 µl에 0.2mM DPPH용액(dissolved in 99% methanol)을 140 µl가하고, vortex mixing하여 37°C에서 30분간 반응시켰다. 이 반응액을 흡수분광광도계를 사용하여 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 전자공여능(electron donating ability, EDA%)으로 측정하였으며, 3회 반복 실험하여 얻은 결과를 평균과 표준편차로 나타내었다.

$$\text{EDA}(\%) = \frac{\text{Absorbance of control} - \text{Absorbance of sample}}{\text{Absorbance of control}} \times 100$$

### 다) ABTS scavenging activity

ABTS radical을 이용한 항산화력 측정은 ABTS<sup>•+</sup> cation decolorization assay 방법에 의하여 측정하였다. 7mM 2,2 - azino - bis (3 - ethyl - benthiazoline - 6 - sulfonic acid)와 2.4 mM potassium persulfate를 혼합하여 실온에서 24시간 동안 방치하여 ABTS<sup>•+</sup>를 형성시킨 후 ethanol로 희석하여 ABTS<sup>•+</sup> 100 µL에 발효복합물 시료 100 µL를 가하여 1분동안 방치한 후 732 nm에서 흡광도를 측정하였다.

$$\text{Scavenging activity}(\%) = \left( 1 - \frac{\text{Absorbance of sample}}{\text{Absorbance of control}} \right) \times 100$$

## 3) 시제품 관능검사

선호도 높은 시제품 제작을 위한 원료 혼합 비율을 결정하기 위하여 발효 하수오, 속단, 홍화자 및 당귀의 추출물 혼합비를 달리하여 제조한 시료들에 대하여 panel 11명을 대상으로 색, 향, 맛 및 전체 기호도를 7점 평점법으로 실시하였다. 이때 채점 기준은 아주 좋다; 7점, 좋다; 6점, 좋다; 5점, 보통이다; 4점, 약간 나쁘다; 3점, 나쁘다; 2점, 아주 나쁘다; 1점으

로 하였고, 2시간 간격으로 시료의 번호를 바꾸어 같은 panel로 3회 반복하였으며 각 반복 시 가장 높은 점수와 가장 낮은 점수를 제외하고 평균 득점을 구하였다. 처리구별 유의성 검정은 SPSS프로그램을 이용한 Duncan의 다중 비교법으로 분석하였다.

### 3. 결 과

#### 가. 발효 하수오 성분분석

##### 1) 일반성분 함량

갱년기 개선 제품 개발을 위하여 소재화 한 하수오의 일반성분 분석결과는 표 10과 같다. 건조하수오, 법제하수오 및 발효하수오의 수분함량은 각각 7.35%, 5.68% 및 5.14%로 발효하수오의 수분함량이 가장 낮게 나타났다. 조단백질 함량은 발효하수오가 9.31%로 건조하수오 4.29%, 법제하수오 4.32%에 비하여 높은 함량을 나타내었다. 건조하수오, 법제하수오 및 발효하수오의 조지방 함량은 각각 0.58%, 0.43% 및 0.20%로 나타났다. 조회분 함량은 각각 3.38%, 4.02% 및 5.03%로 나타났다. 조섬유 함량은 각각 3.38%, 4.02% 및 5.03%로 나타났다. 가용성무질소물 함량은 각각 79.78%, 81.29% 및 74.55%로 나타났다.

표 10. 일반성분 함량

(%)

구성	건조하수오	법제하수오	발효 하수오
수 분	7.35±0.22	5.68±0.06	5.14±0.41
조단백질	4.29±0.49	4.32±0.11	9.31±0.29
조 지방	0.58±0.17	0.43±0.09	0.20±0.02
조 회 분	4.62±0.42	4.26±0.36	5.77±0.13
조 섬유	3.38±0.33	4.02±0.41	5.03±0.62
가용성무질소물	79.78±2.14	81.29±1.40	74.55±1.36

##### 2) 유리당 함량

갱년기 개선 제품 개발을 위하여 소재화 한 하수오의 유리당은 표 11과 같다. 검출된 유리당은 fructose(과당), glucose(포도당) 및 sucrose(자당)로 총 3종이 검출 되었다. 그중 발효하

수오의 유리당이 11.40%, 건조하수오 9.60%, 법제하수오 8.69% 순으로 나타났다. 모든 시료에서 sucrose의 함량이 가장 높게 나타났으며, glucose, fructose 순으로 나타나며.

표 11. 유리당 함량

(%)

구성	건조하수오	법제하수오	발효 하수오
Fructose	0.62±0.12	0.86±0.03	1.32±0.26
Glucose	0.88±0.09	1.20±0.24	1.44±0.18
Sucrose	8.10±0.25	6.63±0.45	8.64±0.40
Total free sugars	9.60±0.40	8.69±0.32	11.40±0.72

3) 유기산 함량

갱년기 개선 제품 개발을 위하여 소재화 한 하수오의 유기산 함량을 분석한 결과는 표 12와 같다. Oxalic acid와 succinic acid가 검출되었다. Oxalic acid의 함량은 각각 28.71 mg%, 19.34 mg%, 936.26 mg%h 나타났으며 succinic acid의 함량은 각각 4.88 mg%, 4.52 mg%, 210.25 mg%로 나타났다.

표 12. 유기산 함량

(mg%)

구성	건조하수오	법제하수오	발효 하수오
Oxalic acid	28.71±0.43	19.34±0.12	936.26±19.02
Succinic acid	4.88±0.22	4.52±0.38	210.25±10.24



4) 유용성분(Emodin, Chrysophanol, Rhein, Physcion) 함량  
 하수오와 발효하수오의 유용성분으로 이모딘(Emodin), 크리소파놀(Chrysophanol), 레인(Rhein), 피션(Physcion)을 분석한 결과는 표 13과 같다. 4종의 유용성분 중 이모딘만 검출된 것을 확인 하였으며, 그 함량은 건조하수오 14.93 mg%, 법제하수오 13.58 mg%, 발효하수오 12.40 mg%로 나타났다. 하수오를 증자하여 제조한 법제하수오는 건조하수오의 약 91%, 표고 균사체배양을 통해 발효하여 제조한 발효하수오는 건조하수오의 약 83% 수준으로 이모딘의 함량이 약간 낮아 졌다. 적하수오의 품질 평가 시 지표성분으로 이용되며, 약효 성분으로 알려진 이모딘은 항산화활성, 항염증작용, tyrosinekinase 억제활성, 콜레스테롤 저하 효과, 면역력 증가 등의 효과를 나타내는 것으로 알려져 있다. 건조 하수오를 증자와 표고 균사체 배양을 통한 발효 과정을 거치며 이모딘의 함량은 약간 감소하였으나 큰 차이는 보이지 않는 것으로 보아 적하수오를 이용한 갱년기 개선 관련 음료 개발의 소재로 활용하기에 적합 할 것으로 판단된다.

표 13. 하수오와 발효하수오의 유용성분 분석 결과

(mg%)			
구분	건조하수오	법제하수오	발효하수오
Emodin	14.93±0.42	13.58±0.83	12.40±0.66
Chrysophanol	-	-	-
Rhein	-	-	-
Physcion	-	-	-

5) 에르고스테롤 함량  
 하수오와 발효하수오의 에르고스테롤을 분석한 결과는 표 14와 같다. 베타글루칸은 표고 균사를 배양한 발효하수오에서 14.65 mg%의 함량이 나타났으며, 건조하수오와 법제하수오에서는 나타나지 않았다. 에르고스테롤은 버섯류에 풍부하게 존재한다고 알려져 있으며, 자외선 조사에 의하여 비타민 D로 전환되어 현대인에게 부족한 비타민 D의 공급원이 될 수 있다. 비타민 D는 뼈 건강과 심혈관질환, 항암효과 등에 효과가 있어 갱년기 개선에도 크게 부합되어 본 연구 개발의 소재로 활용 가치가 높을 것으로 판단된다.

표 14. 하수오와 발효하수오의 에르고스테롤 분석 결과

(mg%)

구분	건조하수오	법제하수오	발효하수오
에르고스테롤	-	-	14.65±0.48

6) 베타글루칸 함량

하수오와 발효하수오의 베타글루칸을 분석한 결과는 표 15와 같다. 베타글루칸은 표고 균사를 배양한 발효하수오에서 740.25 mg%의 함량이 나타났으며, 건조하수오와 법제하수오에서는 나타나지 않았다. 베타글루칸은 다당류의 일종으로 면역증강작용을 가지며 버섯류에 많이 존재하고 있다. 인체 정상 세포의 면역기능을 활성화시켜 암세포의 증식과 재발을 억제하고 혈당과 혈중 콜레스테롤을 감소시키며 지질대사를 개선하여 체지방 형성과 축적을 억제하는 기능을 하는 것으로 알려져 있다. 표고 균사를 배양한 발효하수오는 일반 건조한 하수오와 법제 하수오에는 함유되어 있지 않은 베타글루칸 성분이 포함 되어 있어 본 연구에서 목표로 하는 갱년기 개선 음료 제품 개발에 있어 시너지 효과를 보일 수 있는 소재로 판단된다.

표 15. 하수오와 발효하수오의 베타글루칸 분석 결과

(mg%)

구분	건조하수오	법제하수오	발효하수오
$\beta$ -glucan	-	-	740.25±27.56

나. 반응표면 분석법 결과

1) 추출물의 특성

표고발효 적하수오의 최적 열수추출조건을 탐색하고자 반응표면분석법 실험계획에 따라 추출한 열수추출물의 결과는 표 16과 같다. 이와 같은 결과를 바탕으로 독립변수(Xi)인 추출 온도(X1), 추출시간(X2) 및 시료에 대한 용매비(X3)의 추출조건과 종속변수(Yn) 고형분 함량(Y1), 당도(Y2), TPC(total polyphenol contents)(Y3), TFC(total flavonoid contents)(Y4), ABTS cation radical scavenging activity(Y5) 및 DPPH radical scavenging activity(Y6)에 대한 각각의 반응표면 회귀식은 표 17과 같다.

Table 16. The brix, total polyphenol content, total flavonoid content, ABTS and DPPH of hot water extracts from fermented *Polygonum multiflorum* root by *Lentinula edodes* mycelials

Treatment number	Brix of sample extract	Total polyphenol content (mg GAE/g)	Total flavonoid content (mg QE/g)	ABTS cation radical scavenging activity (%)	DPPH radical scavenging activity (%)
1	2.23	10.41	44.63	13.39	3.75
2	1.63	11.31	45.46	14.54	3.95
3	2.30	11.12	52.54	39.77	7.99
4	1.77	12.07	51.29	21.00	7.02
5	2.67	24.97	115.04	44.80	21.77
6	1.90	24.78	109.63	49.95	25.22
7	3.00	25.54	127.96	51.29	25.30
8	1.93	30.40	146.50	70.60	40.20
9	1.90	15.89	68.79	32.65	14.48
10	2.03	15.78	70.46	30.69	15.58
11	1.80	9.19	35.88	15.26	4.24
12	1.63	28.69	142.75	63.76	31.82
13	2.00	13.75	66.71	27.34	9.74
14	2.00	17.39	75.04	44.34	13.67
15	3.00	15.09	67.96	39.14	12.94
16	1.10	12.38	59.63	41.10	14.48

표 17. Polynomial equations calculated by RSM program on quality test for processing of extracts of extracts from petals of fermented Polygonum multiflorum root by *Lentinula edodes* mycelials

Response	Polynomial model equation1)	R2	p
Soluble solid contents(%)	$-3.2151+0.3232X_1+2.4187X_2-0.0819X_3-0.1141X_{12}-0.066X_{22}-0.0013X_{32}+0.0094X_1X_2+0.0237X_1X_3+0.0078X_2X_3$	0.867	0.044
Sugar content(°Brix)	$0.6335+0.0053X_1-0.0185X_2-0.0639X_3-0.0022X_{12}+0.009X_{22}-0.0003X_{32}-0.0029X_1X_2+0.0006X_1X_3-0.0012X_2X_3$	0.851	0.059
Total polyphenol content (mg GAE/g)	$15.4575-1.9860X_1+0.1423X_2-0.2792X_3-0.0166X_{12}-0.0210X_{22}+0.0034X_{32}+0.0637X_1X_2+0.0197X_1X_3+0.0047X_2X_3$	0.902	0.020
Total flavonoid content (mg QE/g)	$125.034-14.414X_1-0.093X_2-2.254X_3+0.078X_{12}-0.058X_{22}+0.022X_{32}+0.273X_1X_2+0.150X_1X_3+0.023X_2X_3$	0.924	0.010
ABTS cation radical scavenging activity(%)	$111.881+2.912X_1-7.723X_2-1.542X_3+0.261X_{12}+0.084X_{22}+0.009X_{32}-0.072X_1X_2-0.024X_1X_3+0.070X_2X_3$	0.940	0.005
DPPH radical scavenging activity(%)	$45.6219-2.2904X_1-2.2154X_2-0.7801X_3-0.2078X_{12}-0.132X_{22}+0.0033X_{32}+0.1285X_1X_2+0.0467X_1X_3+0.0319X_2X_3$	0.911	0.015

<sup>1)</sup>X<sub>1</sub> : Extraction temperature(°C), X<sub>2</sub> : Extraction time(hrs), X<sub>3</sub> : Ratio of solvent to sample content

## 2) 고형분 함량

추출조건별 표고균사체 발효 적하수 추출물의 고형분 함량은 그림 1과 같았으며 반응표면분석 결과는 그림 2와 같다. 고형분 함량 최대값과 최소값은 각각 31.99%와 16.84%로 나타났다. 이를 회귀분석한 결과 고형분함량에 대한 모델식의 R2은 0.867로 나타났다. 고형분 함량은 추출온도와 추출시간이 높을수록 증가하는 것으로 나타났으며, 용매비가 높을수록 감소하는 경향을 보였다. 그러나 추출온도와 용매비가 함께 높아지거나 추출시간과 용매비가 함께 높아질수록 고형분 함량은 증가하는 것으로 확인되었다. 용매비가 높을수록 증가하는 이 등(Lee et al., 2016)의 연구결과와 다소 차이를 보였으며 이는 실험시료의 특성에 따라 가용성 고형분의 용해력 차이, 추출성분의 확산 및 표면적 등에 따른 차이가 원인으로 생각된다.

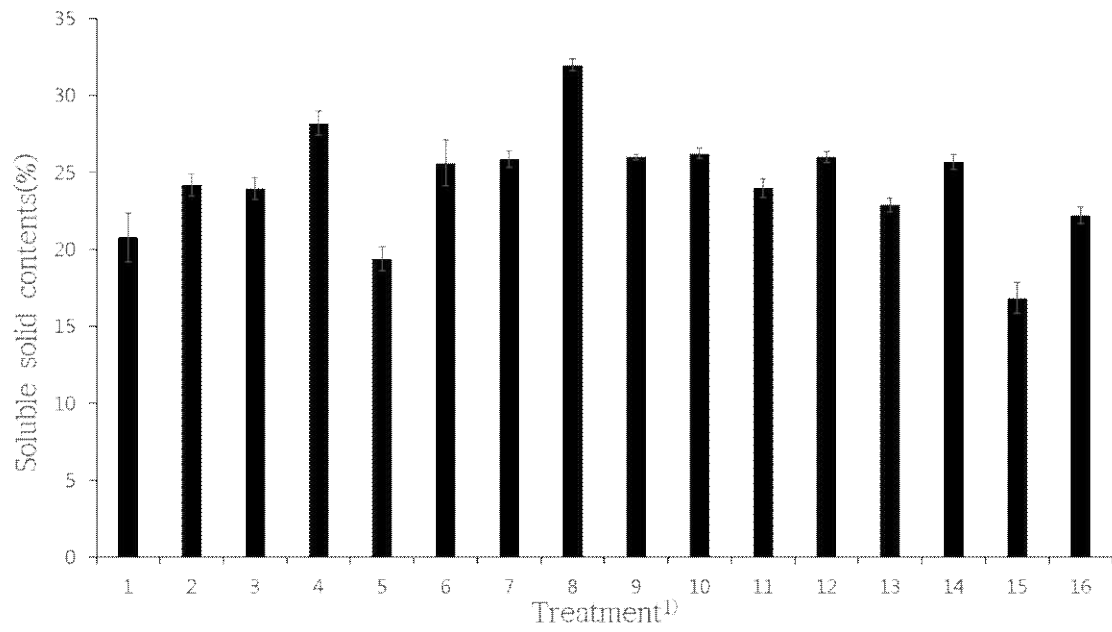


그림 1. The soluble solid contents of hot water extracts from fermented *Polygonum multiflorum* root by *Lentinula edodes* mycelials.

<sup>1)</sup> Treatment numbers are referred to 표 14.

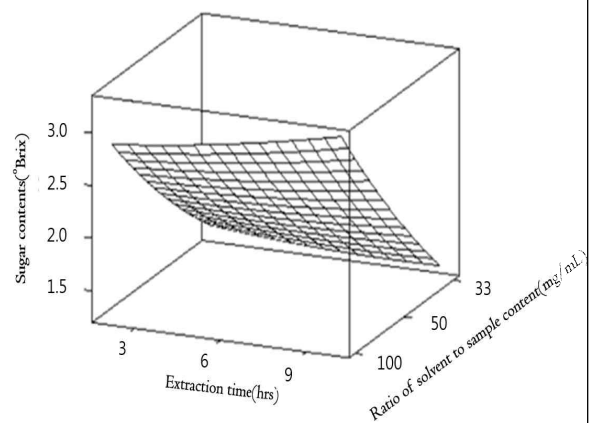
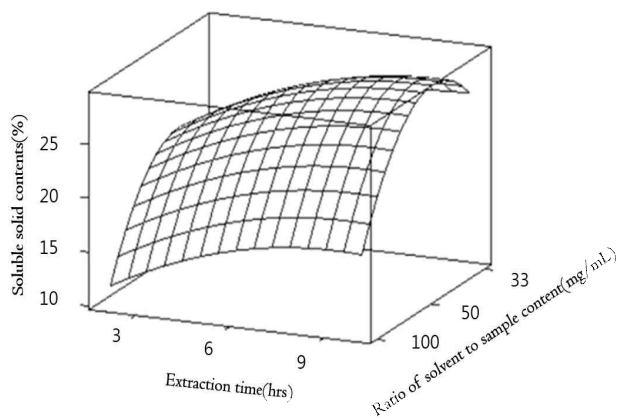
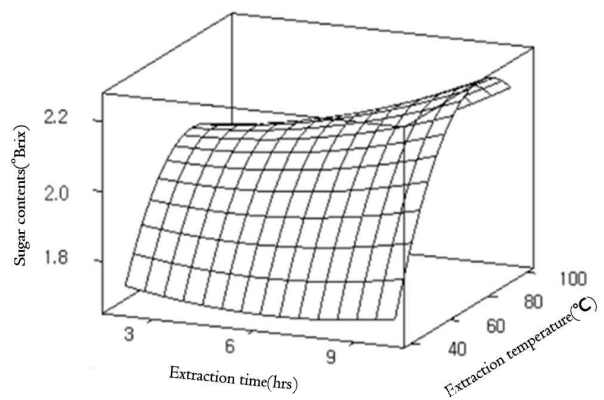
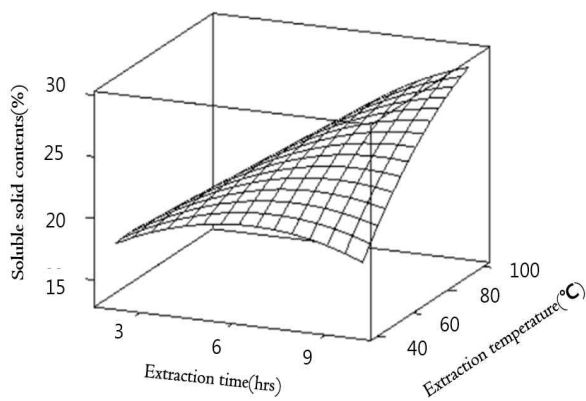
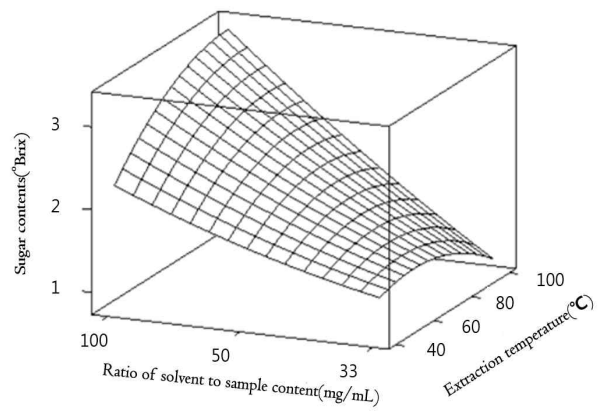
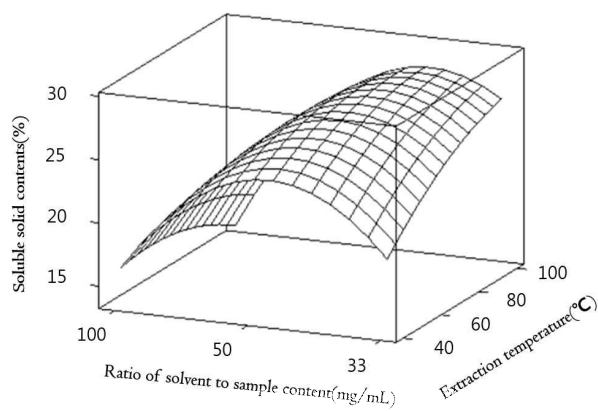


그림 2. Response surface plot for soluble solid and sugar contents of hot water extraction from fermented *Polygonum multiflorum* root by *Lentinula edodes* mycelials cultivation.

### 3) 당도 측정

표고군차체 발효 적하수오 추출물의 당도에 대한 반응표면분석결과 당도는 7번(8 hrs, 85°C, 67 mg/mL)과 15번(6 hrs, 70°C, 100 mg/mL)시험구에서 3 brix로 다른 시험구에 비하여 높은 함량을 보였다(표 14). 이를 회귀분석한 결과 당도에 대한 모델식의 R<sup>2</sup>은 0.851로 나타났다. 반응표면분석결과 추출시간 10 hrs, 추출온도 59.27°C 및 용매비 100 mg/mL일 때 가장 높은 고형분 함량은 3 brix로 나타났다. 동일시간 동일 온도에서는 용매비가 낮을수록 높은 당도를 나타내었다. 윤과 조(Yoon and Cho, 2007)는 동일한 시료량에서 일정온도와 일정시간이 지나면 당의 추출 수율은 더 이상 올라가지 않는다고 보고한 바 있다. 본 연구결과도 최대 추출조건 이상에서는 추출 수율의 향상이 이루어지지 않아, 당도 변인의 목표값을 최대값으로 하여 최적조건을 판단 할 때 최적 추출시간은 10시간으로 판단하였다.

### 4) Total polyphenol 함량 및 Total flavonoid 함량

표고군차체 발효 적하수오 추출물의 총 폴리페놀과 플라보노이드 함량은 표 14와 같다. 8번 시험구(8 hrs, 85°C, 40 mg/mL)에서 총 폴리페놀 함량이 30.40 mg GAE/g, 총 플라보노이드 함량이 146.50 mg QE/g으로 가장 높게 나타났다. 추출조건에 따른 총 폴리페놀 함량의 결과를 반응표면분석한 것은 Fig. 3에서 보는 것과 같이 10 hrs, 86.81°C 및 43 mg/mL 추출조건에서 31 mg GAE/g으로 가장 높게 분석되었으며, 총 플라보노이드 함량을 반응표면 분석한 것은 4.96 hrs, 100°C 그리고 80 mg/mL 일 때 148 mg QE/g으로 분석되었다. 각각의 회귀식의 결정계수 R<sup>2</sup>은 0.902 및 0.924로 반응모형이 적합하였다.

총 폴리페놀 함량은 추출온도가 증가함에 따라 크게 감소하는 반면, 추출시간의 증가와 연관성이 상대적으로 낮게 나타났다. 용매량의 증가에 따라 총 폴리페놀 함량이 증가하였으나, 용매비 최적점을 지나치면서 폴리페놀은 다소 감소하는 경향을 보였다. 기존 연구에서 민들레 잎과 천마의 항산화 물질을 추출할 때, 일정량 이상의 용매를 적용한 경우 폴리페놀 함량이 증가하지 않는다고 보고(Koh et al., 2008; Kim et al., 2006) 한 바 있어, 본 연구와 유사한 결과를 나타내었다. 총 플라보노이드 함량은 총 폴리페놀 함량 보다 추출온도의 증가와 밀접하게 증가하는 경향을 나타내었으나, 용매양과 추출시간에는 연관성이 낮게 나타났다. 청미래덩굴 잎 열수 추출조건 탐색(Kim et al., 2013)에서 총 폴리페놀과 총 플라보노이드는 최적 추출온도가 각각 82.2°C와 92.59°C로 분석하여, 본 연구와 유사한 상관관계를 보인다. 이상과 같은 결과로 표고발효 적하수오는 열에 비교적 안정한 폴리페놀류와 플라보노이드류를 다량 함유한 것으로 판단된다.

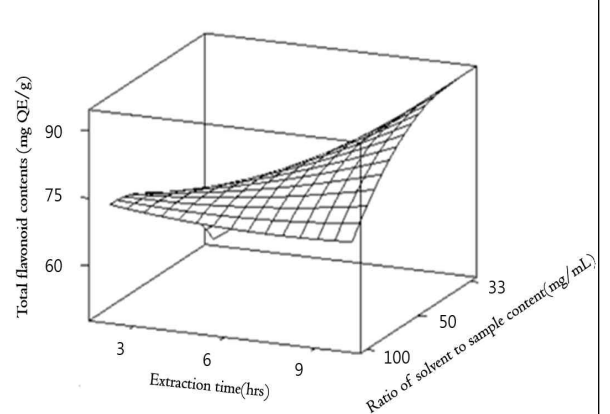
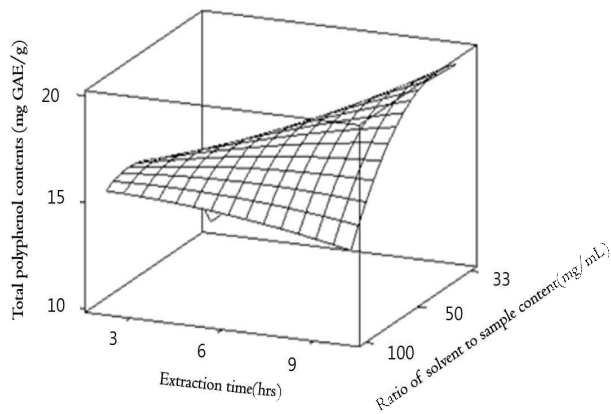
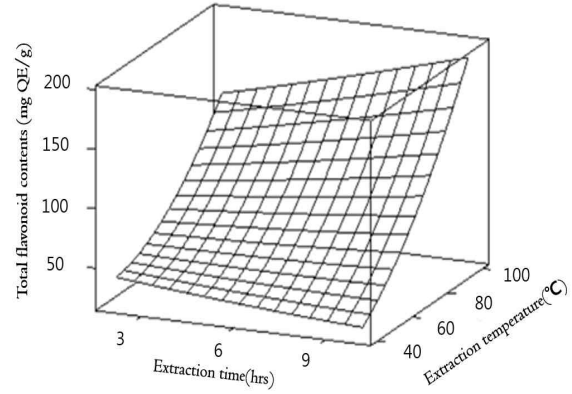
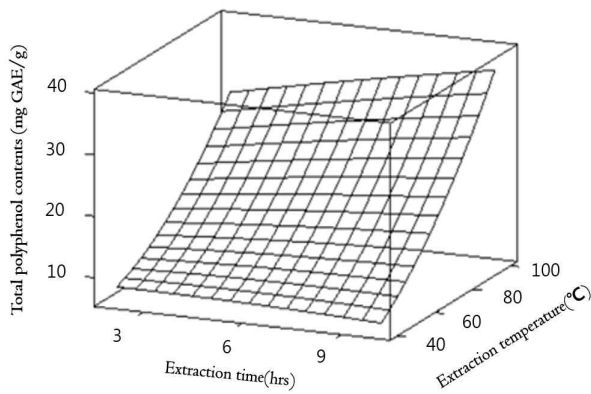
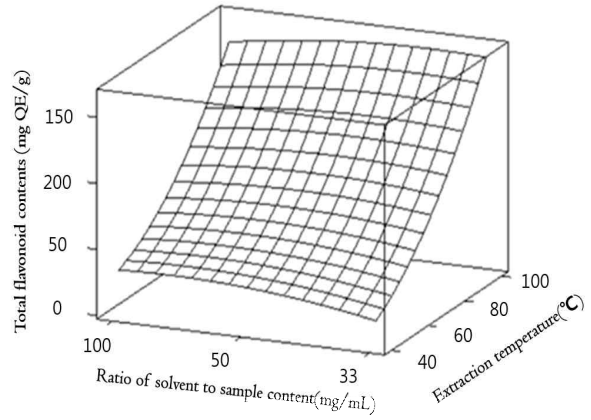
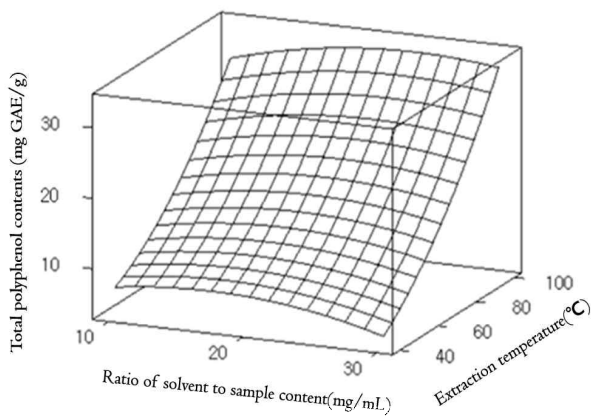


그림 3. Response surface plot for total polyphenol and flavonoid contents of hot water extraction from fermented *Polygonum multiflorum* root by *Lentinula edodes* mycelials cultivation.

### 5) 항산화 활성

ABTS radical은 DPPH와 같은 radical의 일종이지만 free radical인 전자공여능(DPPH)에 비해 ABTS는 peroxidase, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>와 반응시킨 활성 양이온 radical 이라는 점에서 차이가 있



다(Miller et al., 1993). 따라서 표고균사체 발효 적하수오 열수 추출물의 항산화 활성 탐색에서 두 가지 항산화 활성을 측정하였다. ABTS radical 소거능과 전자공여능(DPPH)을 측정한 결과는 표 14와 같다. 16가지 시험구의 항산화 활성도는 총 폴리페놀 및 총 플라보노이드 함량분석 결과와 같이 8번 시험구(8 hrs, 85°C, 40 mg/mL)에서 가장 높은 활성을 보였다. ABTS radical 소거능 70.60%와 전자공여능(DPPH) 40.20%으로 측정되었으며, 각각의 회귀식의 결정계수 R2은 0.940과 0.991로 나타났다. 인진쑥 열수추출물의 항산화 특성에 관한 연구(Kim, 2014)에서 인진쑥 추출물의 전자공여능 변화는 추출온도가 높고 시료에 대한 용매비가 증가 할수록 항산화활성이 증가하였으며, 이는 본 연구결과와 유사하게 나타났다.

ABTS radical 소거능은 그림 4와 같이 그래프가 아래로 움푹 꺼지는 형태로 나타나 최대값이 나타나지 않았다. 그러나 동일한 용매비에서는 추출시간이 증가할수록 추출온도다 높을수록 낮은 활성을 보였으나 고온에서는 다시 높아지는 경향을 나타내었다. 이는 건조방법에 따른 아로니아의 열수 추출물 ABTS cation radical 소거능이 추출온도와 높은 상관관계를 보였다는 결과와 유사하였다(Lee, 2015).

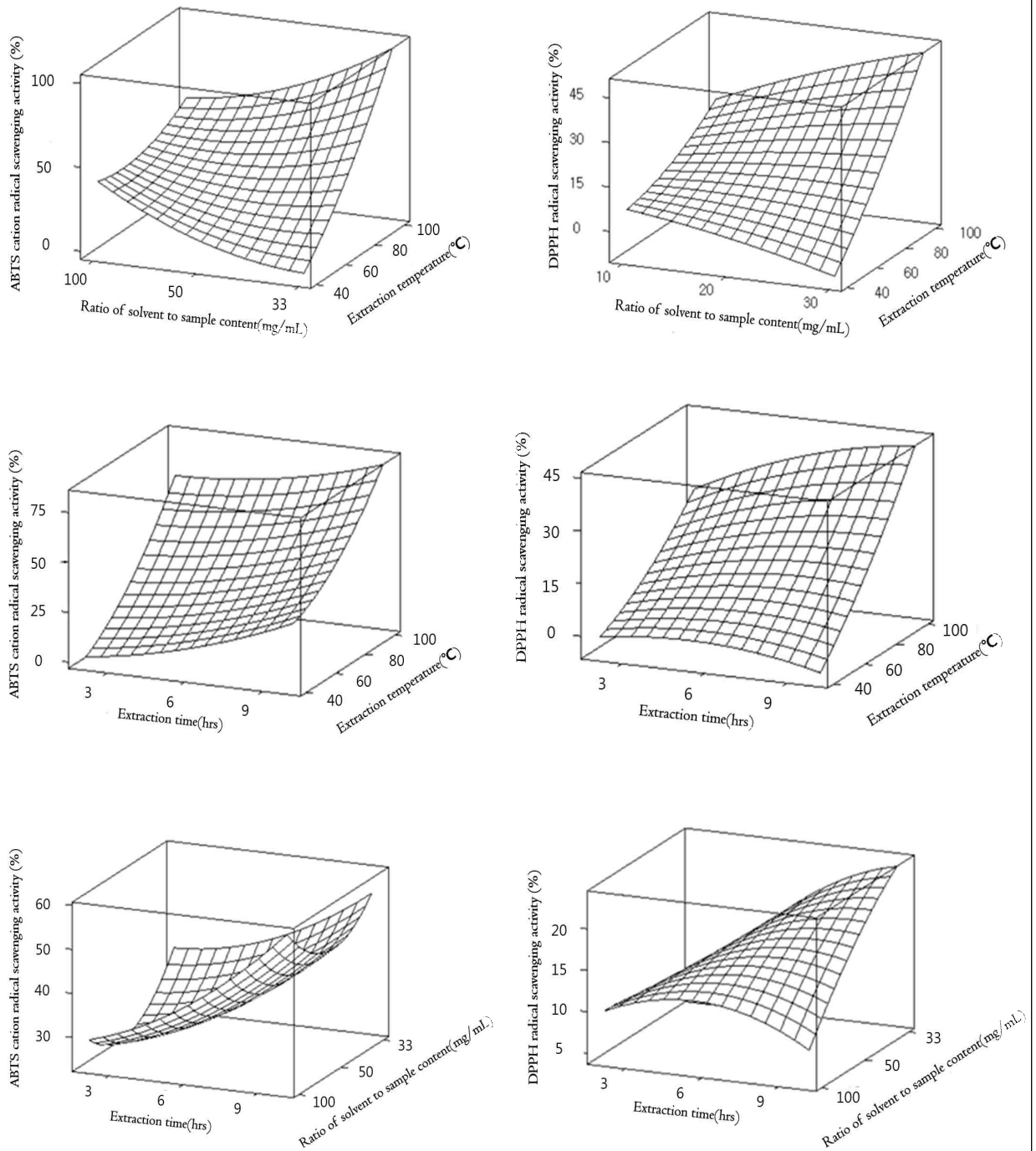


그림 4. Response surface plot for antioxidant activities of hot water extraction from fermented *Polygonum multiflorum* root by *Lentinula edodes* mycelials.

#### 6) 열수 추출조건의 최적화

표고균사체 발효 적하수오에 대한 열수 추출조건을 최적화 할 목적으로 추출온도를 95°C로 고정하고 용매비와 추출시간에 대한 각 종속변수들의 contour map을 superimposing하여 추출물의 특성 중 생리활성물질 함량과 생리활성을 만족시켜주는 최적조건은 91.22°C에서

39.71 mg/mL 용매비와 7.72 hrs 추출시간으로 각각 예측되었다(그림 5). 이와 같은 최적 추출조건들은 상업화 환경에 따라 다소 변수가 발생할 수 있다고 판단된다. 표고발효 적하수의 생리활성에 대한 연구가 추가적으로 진행되어 기능적 특성에 대한 기초 연구가 진행된다면 새로운 기능성 제품에 이용되는 원료로 사용될 가능성이 있다고 보여진다.

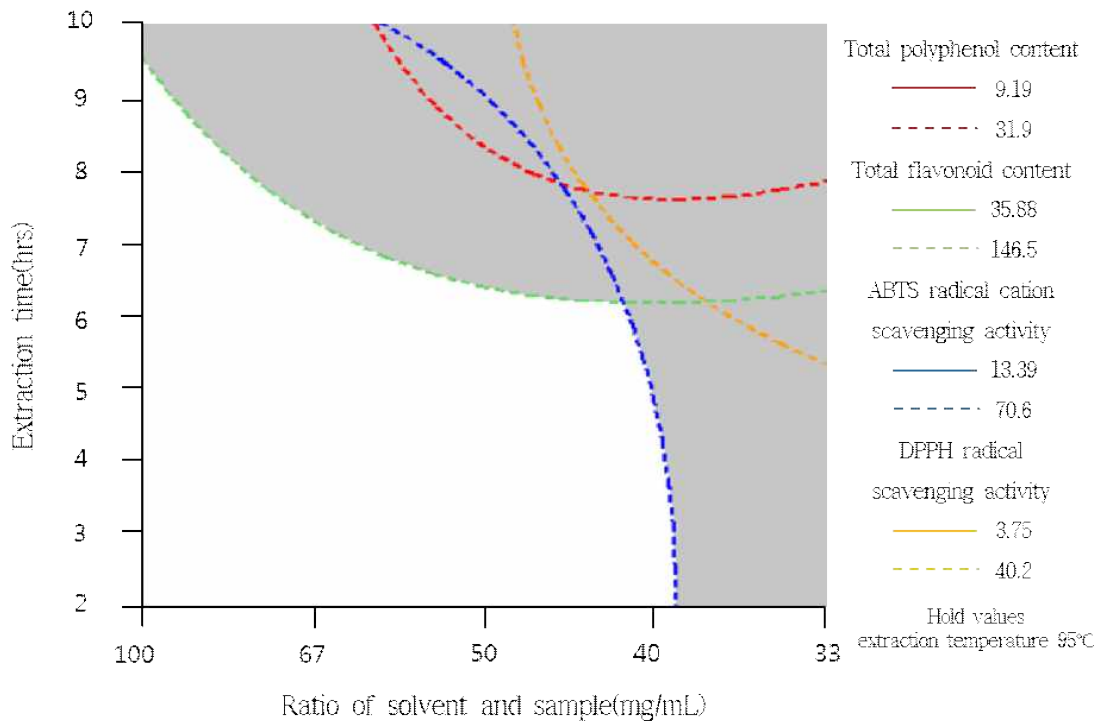


그림 5. Superimposed contour map for optimization of response variables in fermented *Polygonum multiflorum* root by *Lentinula edodes* mycelials.

### 7) 요약

본 연구는 표고균사체 발효 적하수 열수 최적 추출조건 탐색을 목적으로 수행하였으며, 표고균사로 배양된 하수오의 독립변수로는 독립변수( $X_i$ )로서 추출온도( $X_1$ ), 추출시간( $X_2$ ) 및 시료에 대한 용매비( $X_3$ )에 대한 실험범위를 설정하여 각각을 5단계로 부호화하였으며, 중심합성계획에 따라 16구로 설정하여 추출하였다. 또한 이들 독립변수에 영향을 받을 종속변수( $Y_n$ )로는 고형분 함량( $Y_1$ ), 당도( $Y_2$ ), TPC(total polyphenol contents,  $Y_3$ ), TFC(total flavonoid contents,  $Y_4$ ), ABTS cation radical scavenging activity( $Y_5$ ) 및 DPPH radical scavenging activity( $Y_6$ )으로 하였다. 고형분 함량 최대값과 최소값은 각각 31.99%와 16.84%로 나타났다. 이를 회귀분석한 결과 고형분함량에 대한 모델식의  $R^2$ 은 0.867로 나타났다. 당도는 7번(8 hrs, 85°C, 67 mg/mL)과 15번(6 hrs, 70°C, 100 mg/mL)시험구에서 3 brix로 다

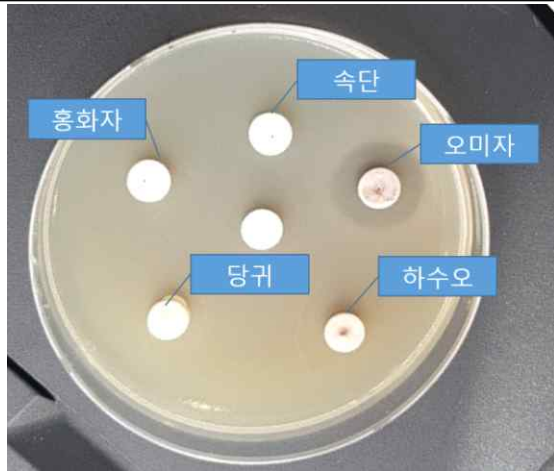
른 시험구에 비하여 높은 함량을 보였다. 항산화물질인 총 폴리페놀과 플라보노이드 함량은 8번 시험구(8 hrs, 85°C, 40 mg/mL)에서 총 폴리페놀 함량이 30.40 mg GAE/g, 총 플라보노이드 함량이 146.50 mg QE/g으로 가장 높게 나타났으며, 16가지 시험구의 항산화 활성도 총 폴리페놀과 총 플라보노이드 함량의 결과와 같이 8번 시험구(8 hrs, 85°C, 40 mg/mL)에서 가장 높은 활성을 보였다. 이를 바탕으로 표고균사체 발효 적하수오에 대한 열수 추출 조건을 최적화 할 목적으로 추출온도를 95°C로 고정하고 용매비와 추출시간에 대한 중속변수들의 contour map을 superimposing하여 추출물의 특성 중 생리활성물질 함량과 생리활성을 만족시켜주는 최적조건은 91.22°C에서 39.71 mg/mL 용매비와 7.72 추출시간으로 각각 분석되었다.

본 연구는 적하수오 100%에서 배양한 표고균사체를 활용하여 향 후 대량생산을 통한 최적 추출조건을 탐색하기 위하여 반응표면분석법을 활용하여 그 조건을 확립하고자 실시하였다. 향 후 생리활성부분에 대한 추가적인 연구가 이루어진다면 더욱 완성도가 높은 표고균사체 발효 적하수오 식품개발에 가능 할 것으로 사료된다.

다. 갱년기 음료 생약소재 탐색

#### 1) 항균활성 측정

시료별 항균활성을 확인하기 위해 *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*에 대한 항균활성을 검증한 결과는 그림 6과 같다. 오미자는 3종의 균에 대하여 모두 활성을 나타내었으며, 특히 *Pseudomonas aeruginosa*에서 가장 높은 활성을 보였다. 그러나, 당귀, 숙단, 하수오 및 홍화자는 활성을 보이지 않았다.



*Escherichia coli*



*Staphylococcus aureus*



*Pseudomonas aeruginosa*

그림6. 항균활성측정 결과.

## 2) 표준추출조건

### 가) 추출시간에 따른 표준추출조건 확립

시료별 표준추출조건을 확립하기 위하여 추출시간에 따른 고형분함량, 총 폴리페놀 함량 및 총 폴리페놀 함량을 검증 하였다.

#### (1) 고형분함량

최종 선별 시료 5가지의 추출시간에 따른 고형분함량은 그림 7과 같다. 당귀의 경우 6시간 추출시험구가 고형분 함량이 가장 높은 것으로 확인 되었다. 속단은 2시간과 8시간 시험구에서 높은 고형분을 보였으나 산업화 적용측면에서 고형분만을 볼 경우 2시간이 가장 적합한 것으로 사료된다. 오미자의 경우 4시간 시험구가 가장 높은 고형분 함량을 보였고, 적하수오는 시간에 비례하여 증가하는 경향을 보였으며 8시간 시험구가 가장 높은 고형분함량을 나타내었다. 홍화자는 2시간 시험구가 높은 고형분 함량을 나타내었다.

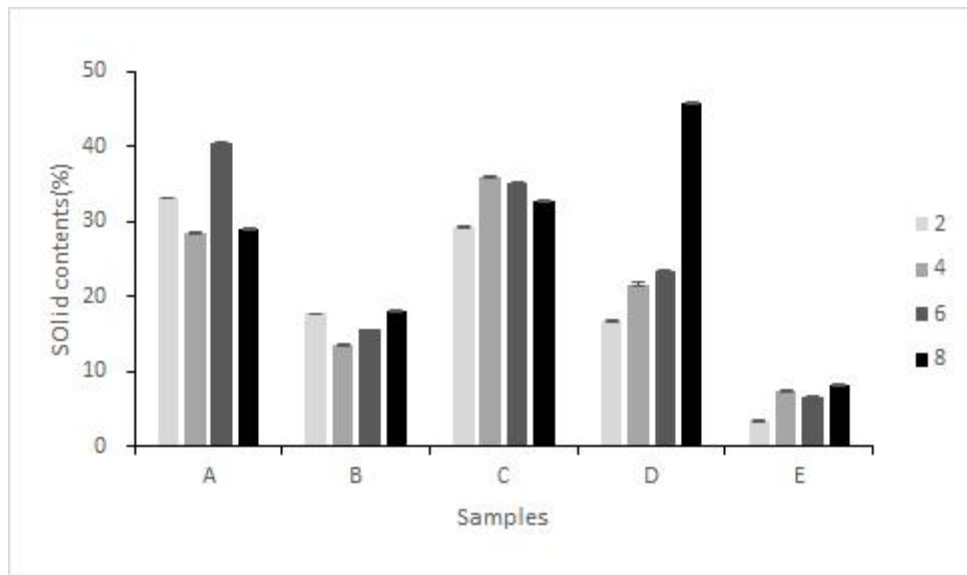


그림 7. 추출시간에 따른 고형분함량.

(2) 총 폴리페놀 함량

최종 선별 시료 5가지의 추출시간에 따른 총 폴리페놀 함량은 그림 8과 같다. 속단과 하수 오는 2시간 시험구에서 가장 높은 총 폴리페놀 함량을 보였고, 홍화자는 4시간 시험구에서 높은 활성을 나타내었다. 당귀와 오미자의 경우 시간에 따른 차이가 높지는 않았으며 6시간 시험구가 적합한 것으로 판단하였다.

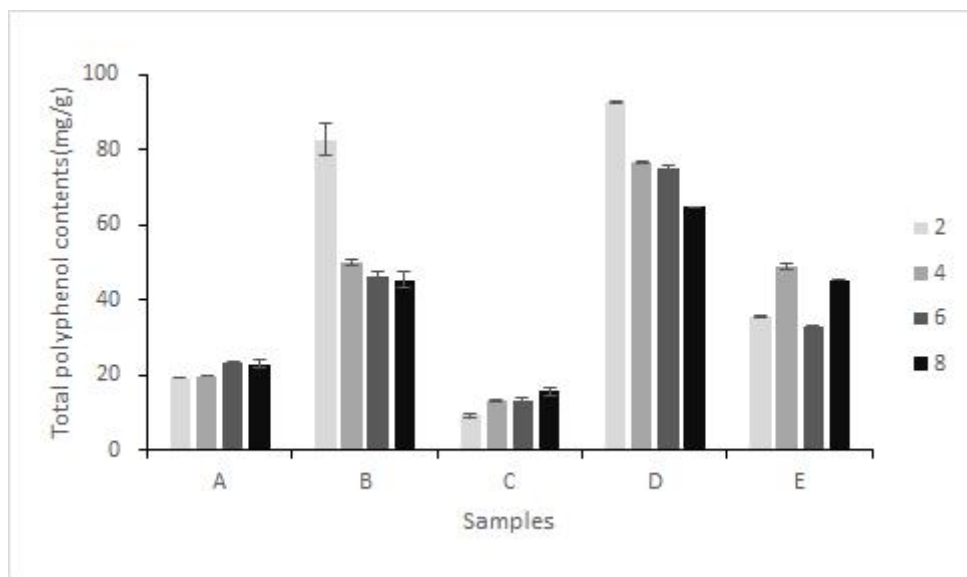


그림 8. 추출시간에 따른 총 폴리페놀 함량.

(3) 총 플라보노이드 함량

최종 선별 시료 5가지의 추출시간에 따른 총 플라보노이드 함량은 그림 9와 같다. 당귀와

오미자는 플라보노이드 함량이 시험구별 큰 차이를 나타내지 않았으며, 속단과 하수오는 2시간 시험구에서 가장 높은 총플라보노이드 함량을 나타내었다. 홍화자의 경우 2시간과 8시간 시험구에서 높은 함량을 나타내었으나 경제성을 고려할 때 2시간이 적합한 것으로 판단된다.

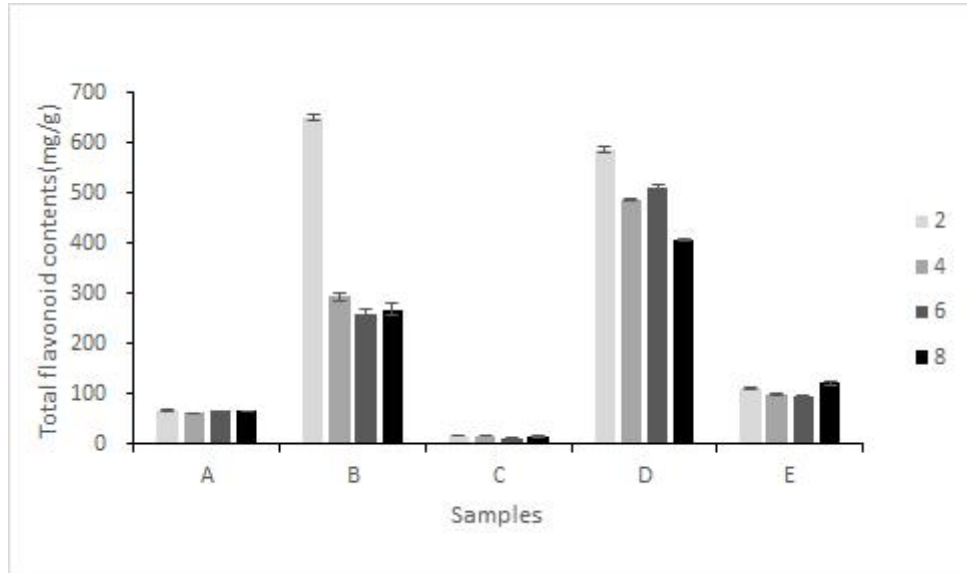


그림 9. 추출시간에 따른 총 플라보노이드함량.

(4) 추출시간에 따른 표준추출조건 탐색 결과

최종 선별 시료 5가지의 추출시간에 따른 고형분함량, 총 폴리페놀 함량, 총폴리페놀함량 및 경제적 측면을 고려하였을 때 시료별 추출시간은 당귀 6시간, 속단 2시간, 오미자 4시간, 하수오 8시간, 홍화자 4시간으로 결정하였다.

나) 추출온도에 따른 표준추출조건 확립

시료별 표준추출조건을 확립하기 위해 시료별 최적 추출시간을 확인하였으며 추출온도에 따른 고형분함량, 총 폴리페놀 함량 및 총 폴리페놀 함량을 검증 하였다.

(1) 고형분함량

최종 선별 시료 5가지 각각의 추출시간을 검증 후 추출 온도에 따른 고형분함량은 그림 10과 같다. 모든 시료에서 고형분함량은 120℃에서 가장 높게 나타났으며, 당귀와 하수오는 120℃에서 다소 높은 증가를 나타내었으나 속단, 오미자, 홍화자는 온도에 비례하여 증가는 하였으나 다른 시험구에 비하여 낮게 증가하였다.

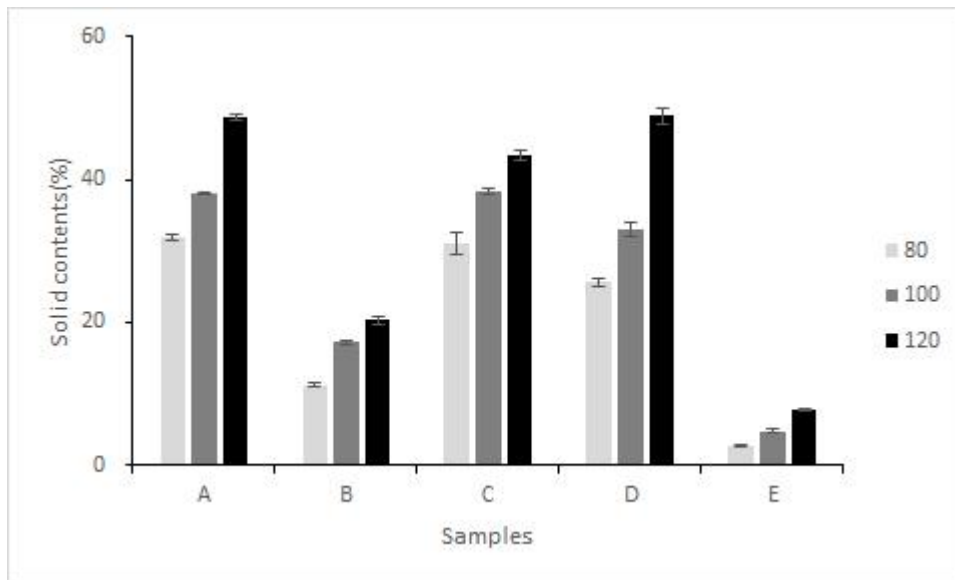


그림 10. 추출온도에 따른 고형분함량.

(2) 총 폴리페놀 함량

최종 선별 시료 5가지의 추출온도에 따른 총 폴리페놀 함량은 그림 11과 같다. 하수오가 다른 시험구에 비하여 높은 총 폴리페놀 함량을 나타내었고, 100°C에서 가장 높았다. 당귀, 속단, 오미자는 120°C 시험구가 가장 높은 함량을 보였다.

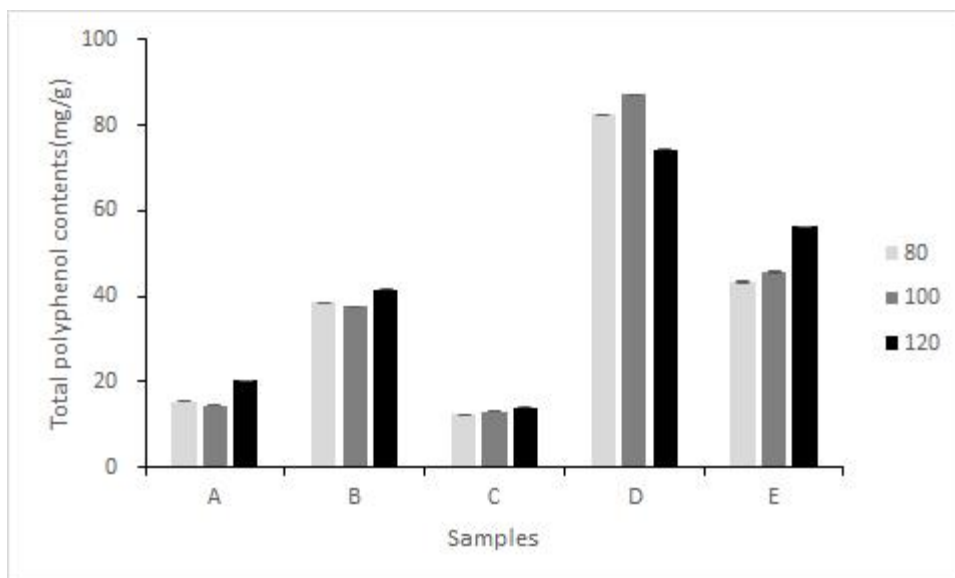


그림 11. 추출온도에 따른 총 폴리페놀 함량.



### (3) 총 플라보노이드 함량

최종 선별 시료 5가지의 추출온도에 따른 총 폴리페놀함량은 그림 12와 같다. 속단과 홍화자는 120℃ 시험구에서 가장 높은 함량을 나타내었고, 오미자와 하수오는 100℃ 시험구가 높은 함량을 나타내었다. 당귀의 총 폴리페놀 함량은 온도에 비례하여 감소하는 경향을 나타내었다.

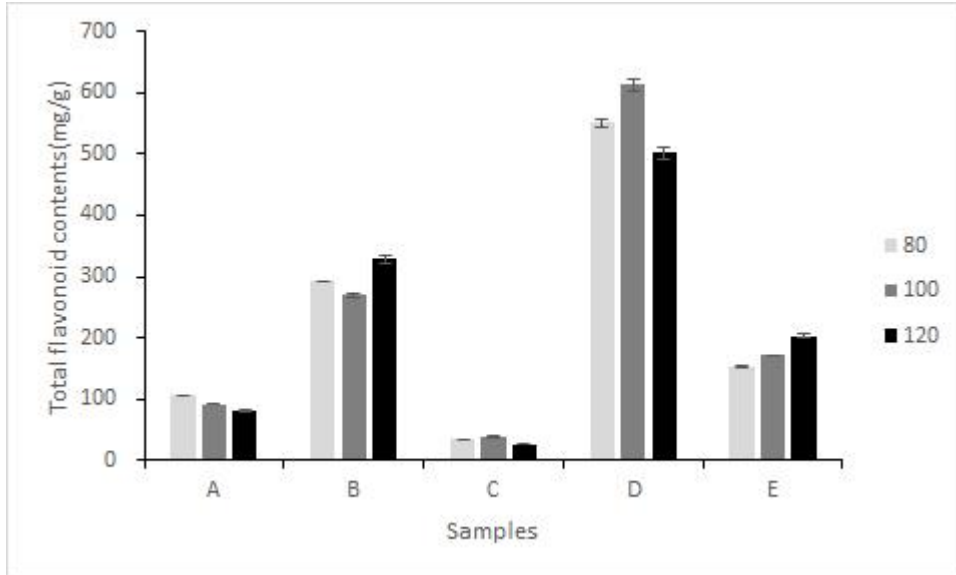


그림 12. 추출온도에 따른 총 폴리페놀 함량

### (4) 추출온도에 따른 표준추출조건 탐색 결과

시료별 최적 추출시간에 따른 추출온도별 표준추출조건을 탐색한 결과 당귀와 오미자는 고형분 함량과 총 폴리페놀 함량을 고려하여 120℃가 적합한 것으로 확인 되었으며, 하수오는 시험구간 고형분함량에서 높은 차이가 있어 120℃가 적합한 것으로 나타났다. 속단과 홍화자는 고형분 함량, 총 폴리페놀 함량, 총 플라보노이드 함량이 모두 120℃에서 높게 나타났다. 고형분 함량과 총폴리페놀 함량을 고려하여 모든 시험구의 최적 추출온도는 120℃로 설정하였다.

3) 총 플라보노이드 및 안트라퀴논 LC-MS분석

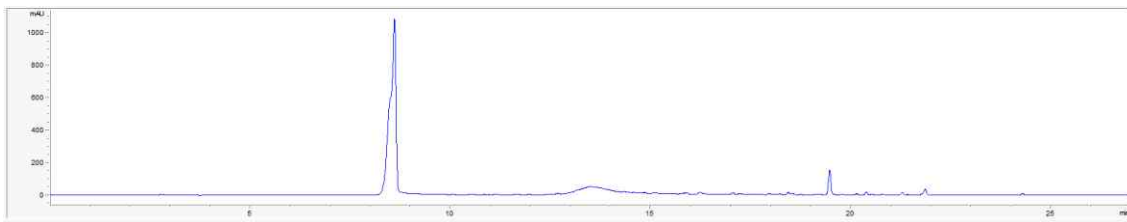
가) 폴리페놀류와 안트라퀴논류 함량 분석

· 안트라퀴논 4종 및 2,3,5,4'-tetrahydroxystilbene-2-O-β-D-glucoside 분석결과 안트라퀴논류 중 Rhein, Emodin, Physcion이 검출 되었으며, 적하수오가 첨가된 것에서 주로 확인되었다. 특히 적하수오가 첨가된 경우에는 지표물질로 알려진 2,3,5,4'-tetrahydroxystilbene-2-O-β-D-glucoside가 검출됨을 확인 할 수 있었다.

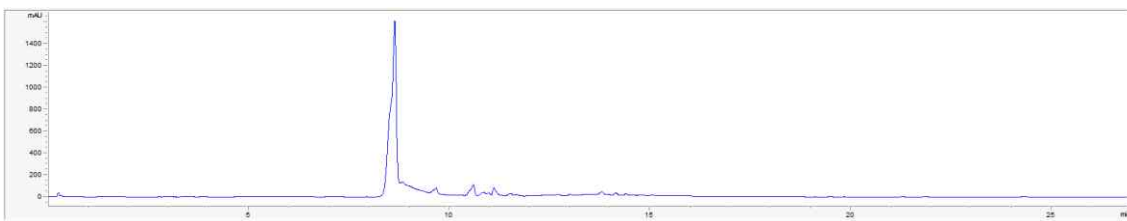
표 18. HPLC-ESI/MS data and identities of compounds associated with peaks detected in the HPLC chromatograms of samples.

Peaka	Retention time (min)	Identification	[M+H] <sup>+</sup> (m/z)	[M-H] <sup>+</sup> (m/z)	[M+Na] <sup>+</sup> (m/z)
1	19.334	Rhein	-	283	307
2	21.560	Emodin	271	-	293
3	23.667	Chrysophanol	255	-	277
4	24.819	Physcion	285	-	307
5	12.659	2,3,5,4'-tetrahydroxystilbene-2-O-β-D-glucoside	407	-	429

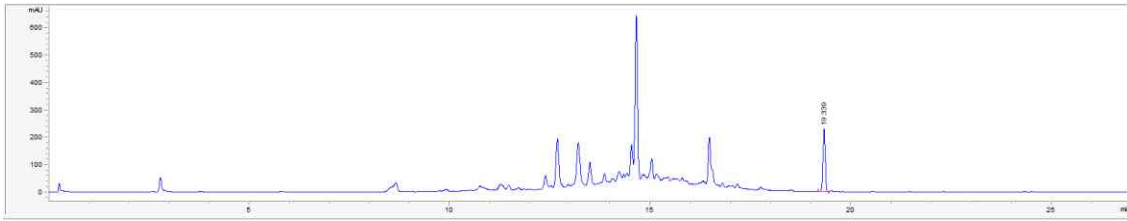
오미자 (chloroform)



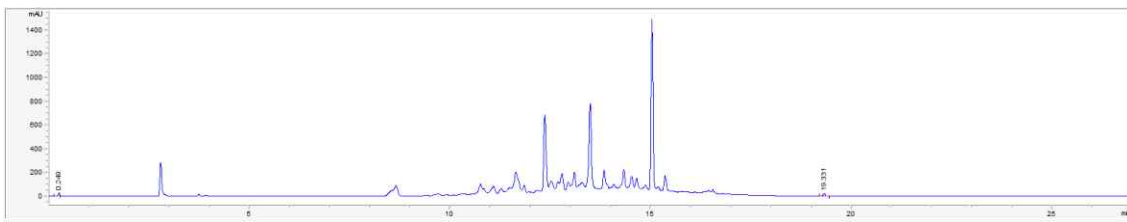
오미자 (ethyl acetate)



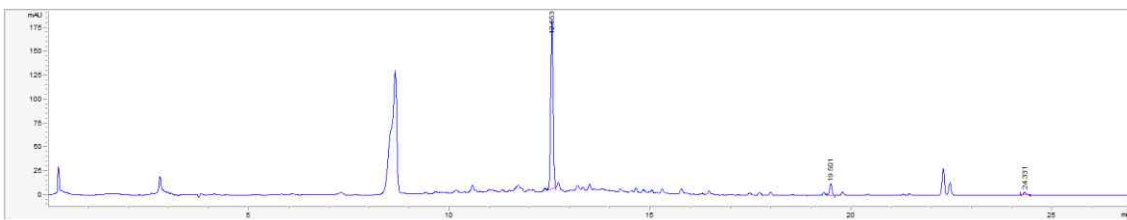
홍화자 (chloroform)



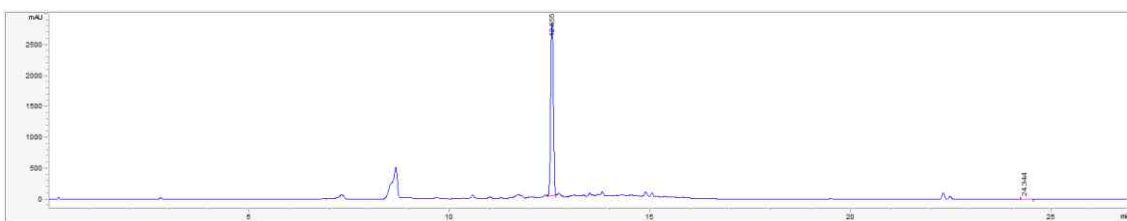
홍화자 (ethyl acetate)



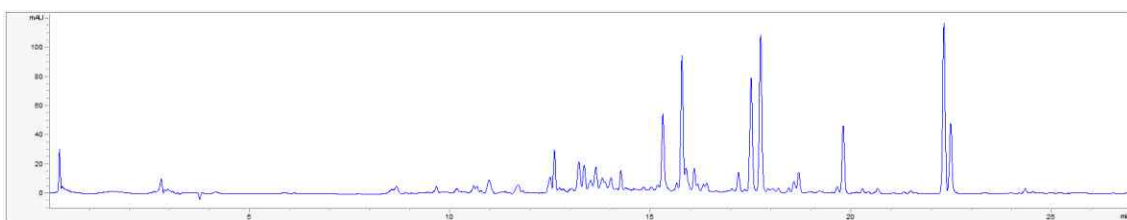
적하수오 혼합물



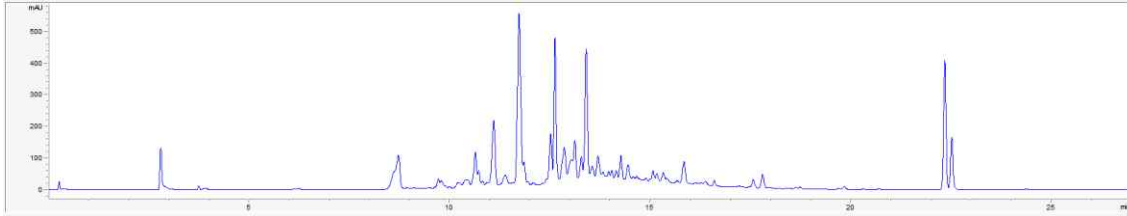
발효적하수오 혼합물



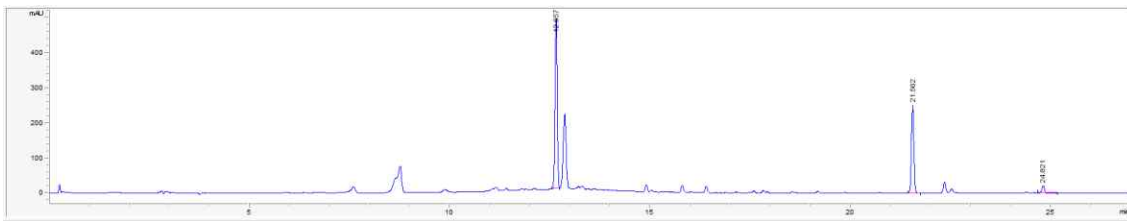
당귀 (chloroform)



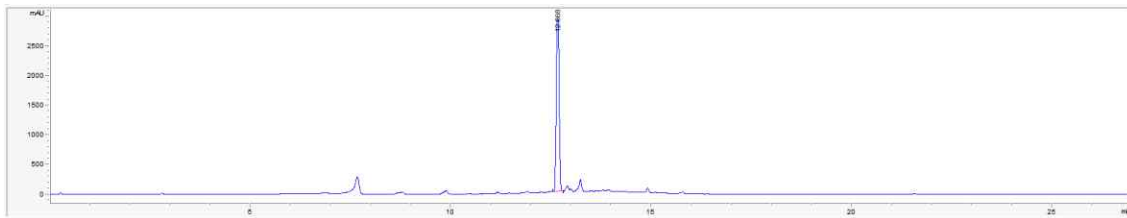
당귀 (ethyl acetate)



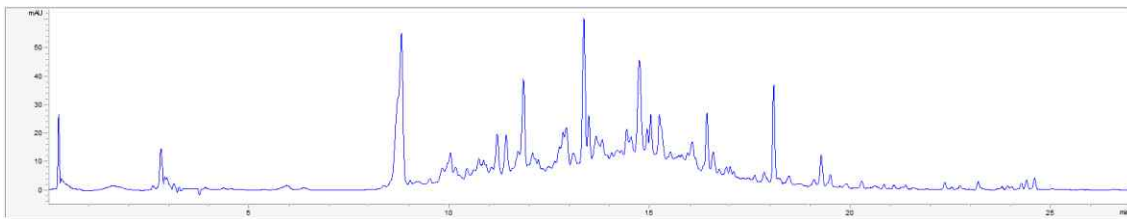
하수오 (chloroform)



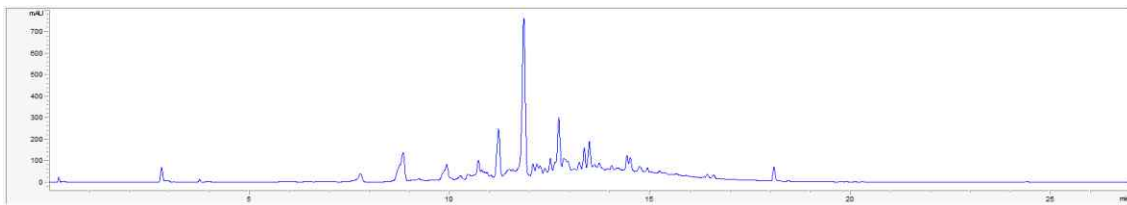
하수오 (ethyl acetate)



속단 (chloroform)



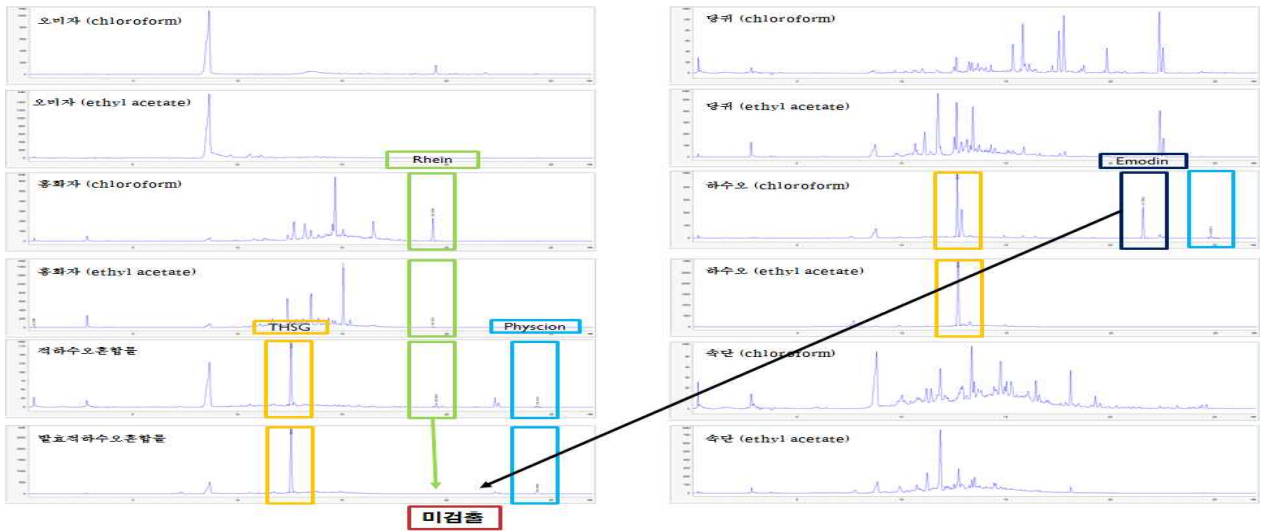
속단 (ethyl acetate)



· 독성감소

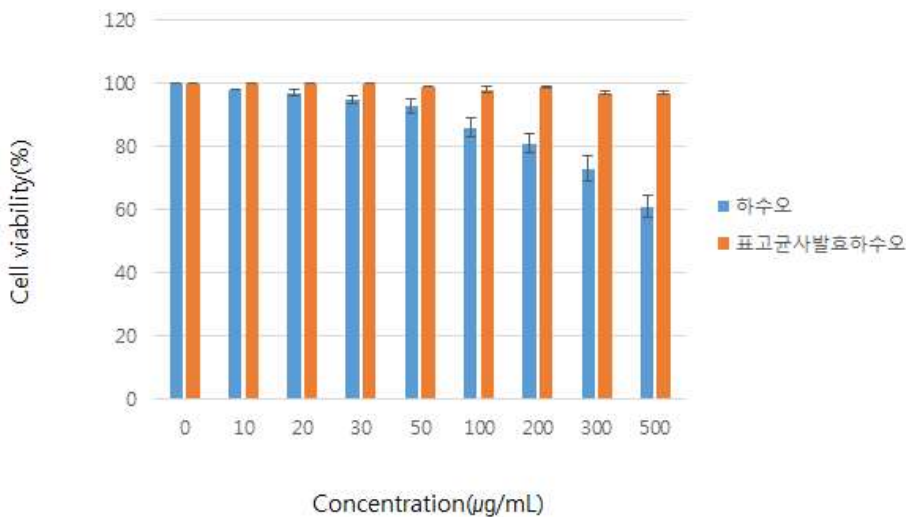
① 자극성 물질 감소효과

안트라퀴논류는 emodin을 비롯하여 사하작용의 독성을 나타내는 것으로 알려져 있다. 본 연구에서 적하수오혼합물과 발효적하수오혼합물을 비교한 결과 emodin은 모두 검출되지 않았으며, 적하수오 혼합물에서 검출된 rhein이 발효적하수오혼합물에서는 검출되지 않았다. 이는 버섯균사체 발효를 통해 독성이 경감한 것으로 판단된다. 반면 하수오의 지표물질로 알려진 THSG는 발효전·후 혼합물에서 검출되어 발효 후에도 THSG를 지표물질로 설정이 가능한 것으로 확인 되었다.



②세포독성 감소효과

하수오와 표고균사발효하수오의 세포생존율을 확인한 결과 하수오는 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 61%의 세포생존율을 나타냈고 처리 농도에 비례하여 세포생존율이 감소하였다. 표고균사발효하수오의 경우 가장 고농도인 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 97%의 세포생존율을 나타내 표고균사발효하수오가 하수오에 비하여 세포생존율이 현저히 높은 것으로 확인되었다.



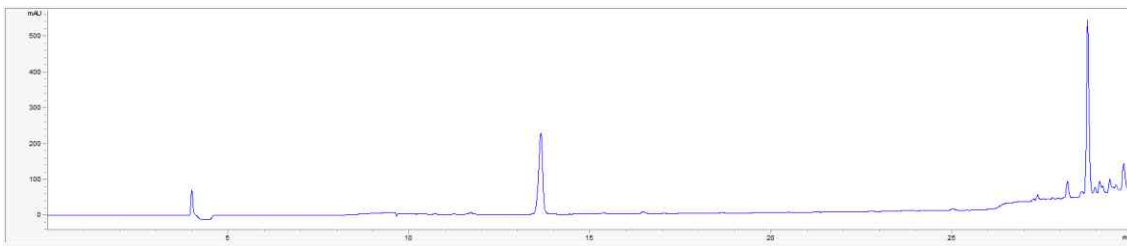
· 폴리페놀류 검증 결과

폴리페놀류 중 astragalin이 검출 되었으며, 홍화자(클로로포름), 적하수오혼합물, 발효적하수오 혼합물에서만 확인되었다.

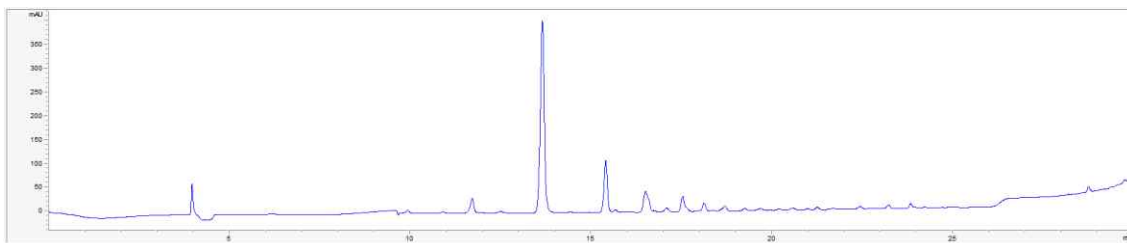
표 19. HPLC-ESI/MS data and identities of compounds associated with peaks detected in the HPLC chromatograms of samples.

Peak <sup>a</sup>	Retention time (min)	Identification	[M+H] <sup>+</sup> (m/z)	[M-H] <sup>+</sup> (m/z)	[M+Na] <sup>+</sup> (m/z)
1	2.183	Ascorbic acid	177.0	-	199.0
2	8.166	Gallic acid	171.0	-	194.0
3	13.098	Catechin	291.0	-	313.0
4	16.529	Rutin hydrate	611.2	-	633.2
5	17.088	Quercetin-3-glucoside	465.1	-	497.1
6	20.014	astragalin	449.1	-	471.1
7	22.842	Quercetin	303.0	-	325.0
8	26.62	Trolox	251.1	-	273.1

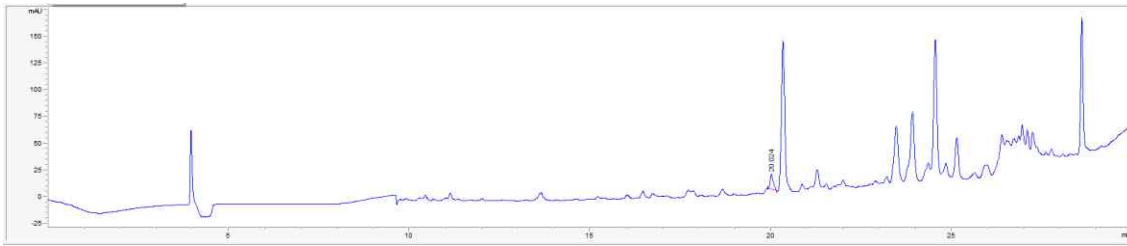
오미자 (chloroform)



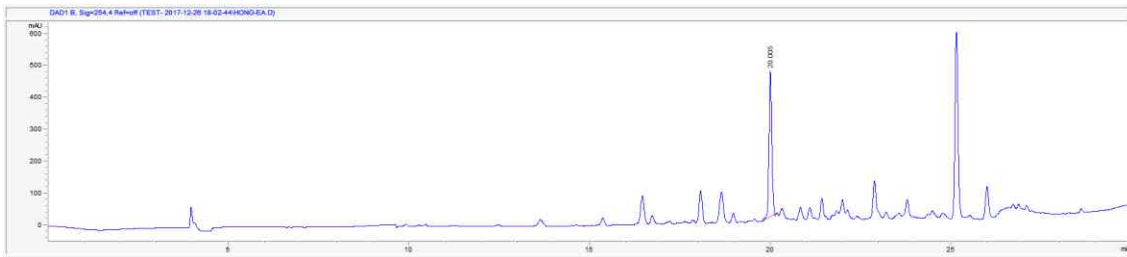
오미자 (ethyl acetate)



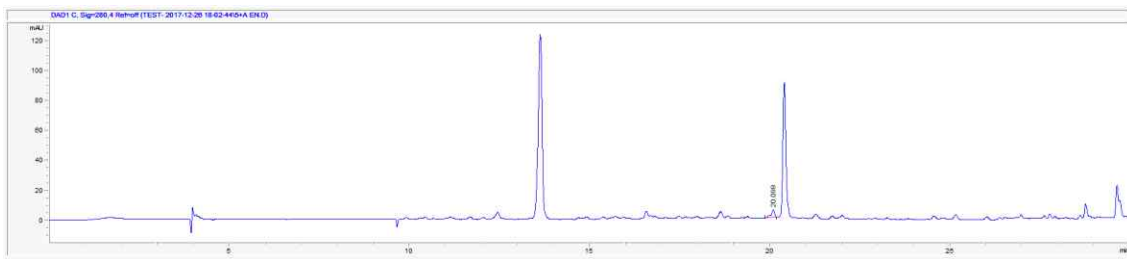
용화자 (chloroform)



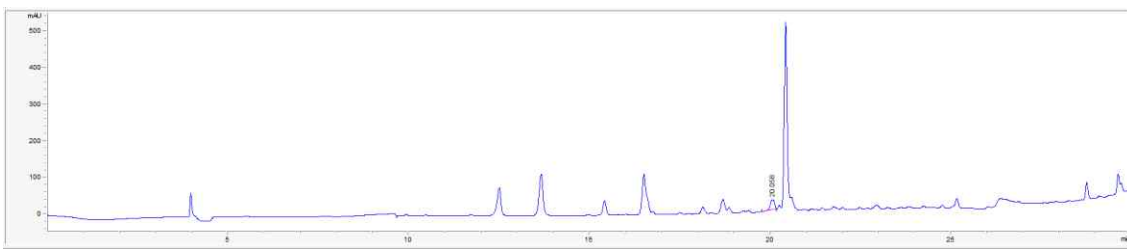
용화자 (ethyl acetate)



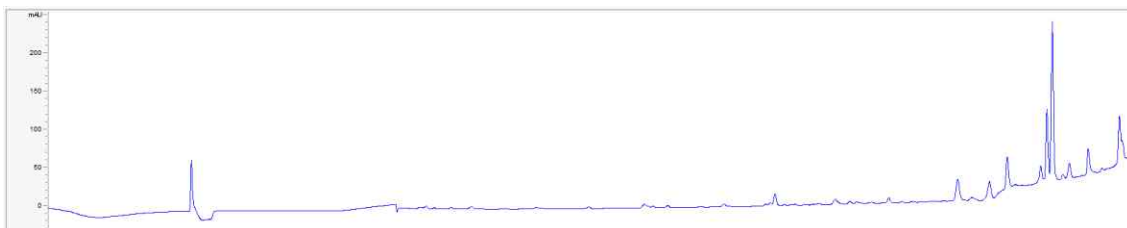
적하수오혼합물



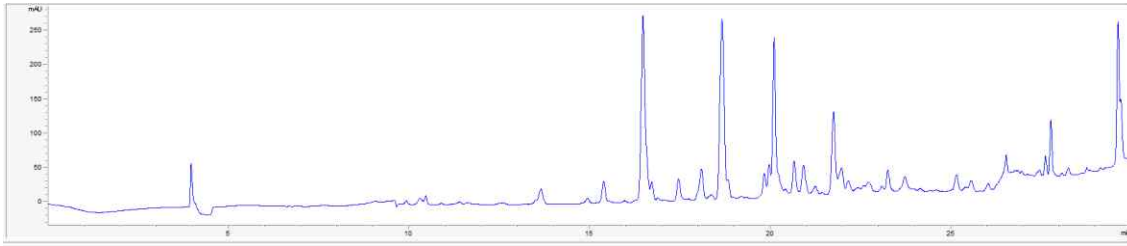
발효적하수오혼합물



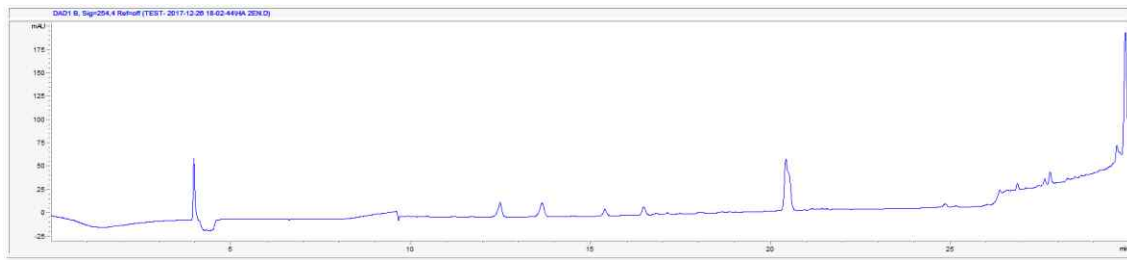
당귀 (chloroform)



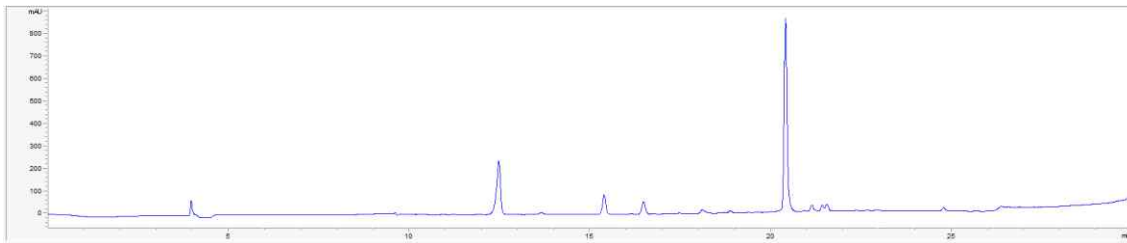
당귀 (ethyl acetate)



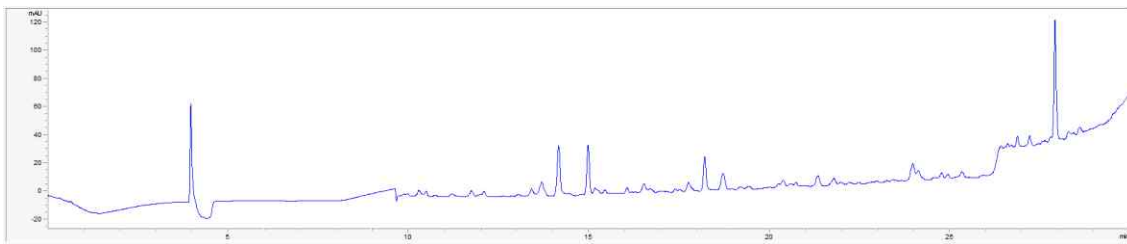
하수오 (chloroform)



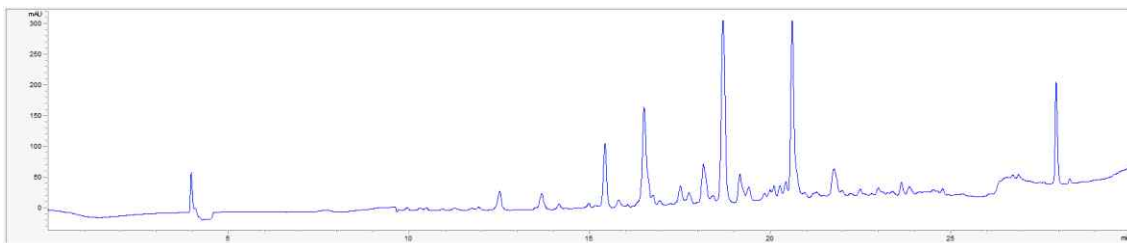
하수오 (ethyl acetate)



속단 (chloroform)



속단 (ethyl acetate)





라. 초산발효

1) pH

발효하수오 농축액 첨가 초산발효에 따른 pH 변화는 그림 13, 14와 같다. 초산균별 pH 변화는 *A. pasteurianus* 초산발효물이 *A. aceti* 초산발효물보다 낮은 pH를 보였다. 모든 시료구에서 발효가 진행됨에 따라 조금씩 낮아 졌으며, 시료구간의 pH는 일반적으로 초산균 발효초기부터 발효 종료시까지 조금씩 pH가 낮아진다고 보고된 바 있다. 본 실험 결과도 발효 기간에 따른 pH 변화는 있었으나 시료구간의 pH 차이는 크게 나타나지 않았다.

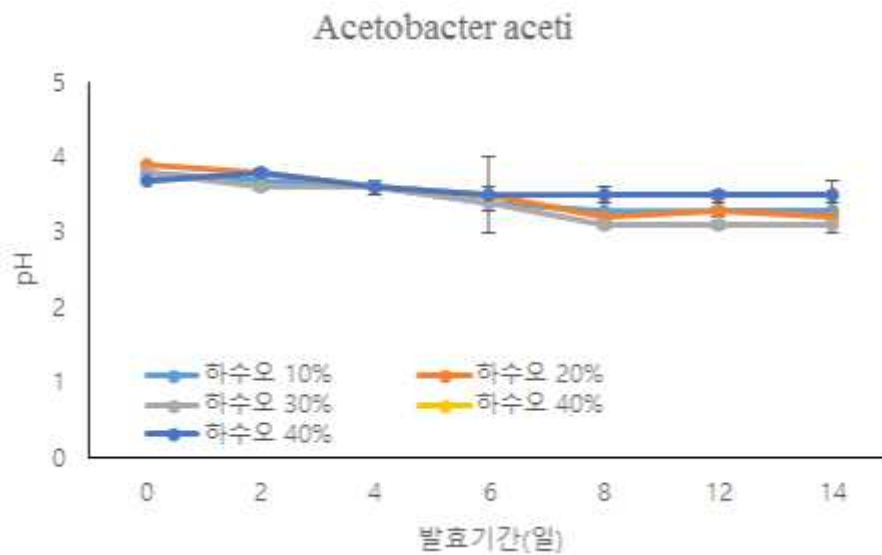


그림 13. 발효하수오 농축액 첨가에 따른 *Acetobacter aceti* 초산발효물의 pH 변화.

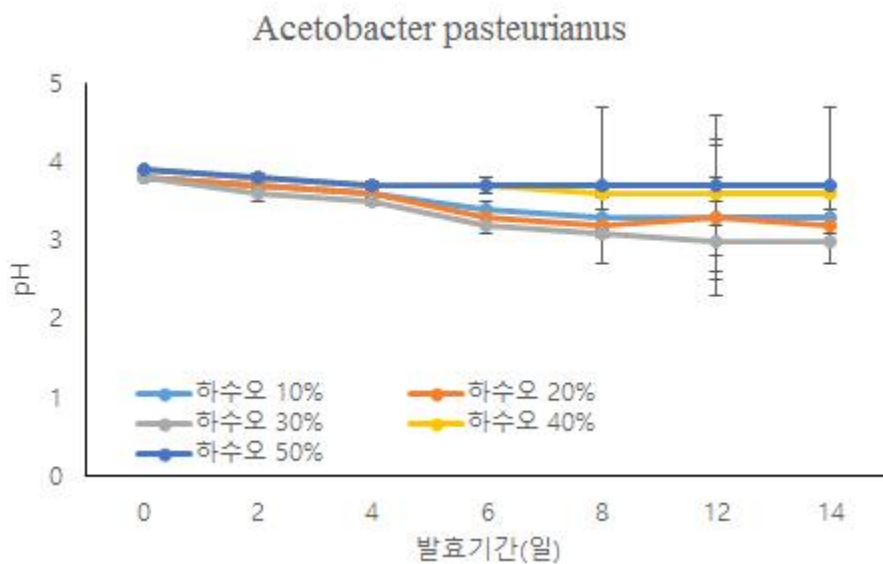


그림 14. 발효하수오 농축액 첨가에 따른 *Acetobacter pasteurianus* 초산발효물의 pH 변화.

2) 산도

초산균을 달리하여 발효한 발효하수오의 산도 변화는 그림 15, 16과 같다. 초산균을 달리하여 발효한 발효하수오의 발효기간에 따른 산도 변화는 발효 2일째부터 초산 생성량이 급격하게 증가하였고, 발효 10일까지 산도가 상승하였으며, 발효 8일 이후 일정하게 산도가 유지되었다. 본 실험에서는 발효 8일 이후 산도가 안정화되어 발효기간에 따른 산도변화가 이전 연구들보다 단기간에 안정화됨을 확인하였다.

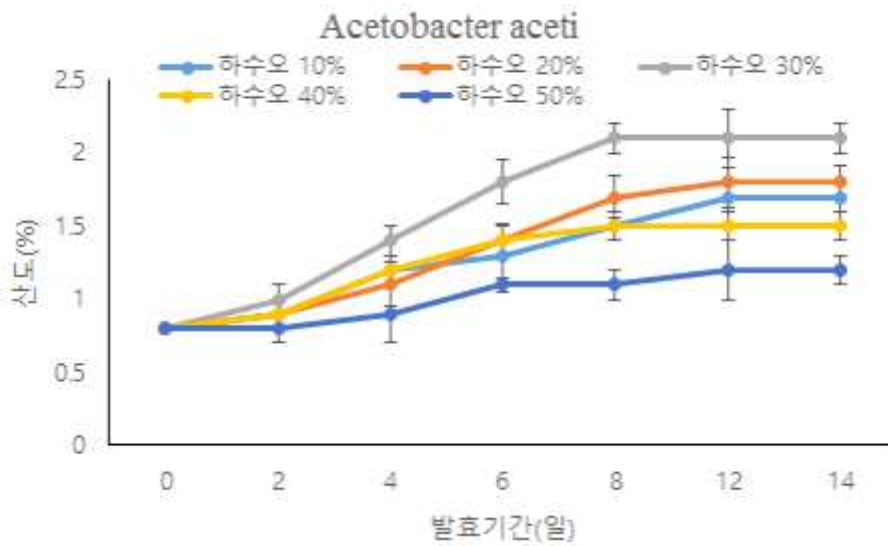


그림 15. 발효하수오 농축액 첨가에 따른 Acetobacter aceti 초산발효물의 산도 변화.

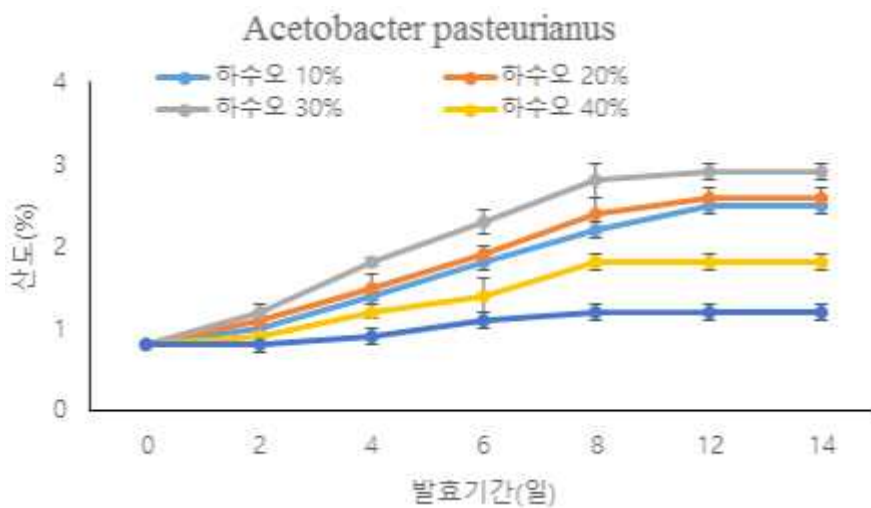


그림 16. 발효하수오 농축액 첨가에 따른 Acetobacter pasteurianus 초산발효물의 산도 변화.

마. 쟁년기 in vivo

1) 항산화 시험 및 골대사 지표 ALP를 이용한 효능 확인

가) DPPH 라디칼 소거능 분석

항산화 시험은 산화적 스트레스를 유발하는 DPPH 라디칼에 대한 속단, 오미자, 당귀, 홍화자의 소거능을 확인하였다. 속단은 DPPH 라디칼을 5 µg에서 24.1 %, 10 µg에서 23.5 %, 20 µg에서 37.6 % 억제시켰으며, 오미자는 DPPH 라디칼을 5 µg에서 7.5 %, 10 µg에서 0.4 %, 20 µg에서 3.1 % 억제시켰다. 당귀는 DPPH 라디칼을 5 µg에서 6.5 %, 10 µg에서 0.4 %, 20 µg에서 6.4 % 억제시켰으며, 홍화자는 DPPH 라디칼을 5 µg에서 5.1 %, 10 µg에서 11.6 %, 20 µg에서 16.8 % 억제시켰다 (그림 17). 각 시료 고농도의 DPPH 라디칼 소거능은 속단 (37.6 %) > 홍화자(16.8 %) > 당귀(6.4 %) > 오미자(3.1 %) 순서로 나타났다.

나) Alkaline phosphatase (ALP) 유사활성 분석

골대사 지표인 ALP는 골아세포에서 분비되는 효소로 조골세포의 활성을 반영하고 그 중 일부는 뼈에 존재하여 골형성 정도를 반영하므로 속단, 오미자, 당귀, 홍화자가 갖는 ALP 유사활성을 확인하였다. 속단은 5 µg에서 0.26 U, 10 µg에서 0.26 U, 20 µg에서 0.60 U으로 확인되었고, 오미자는 5 µg에서 0.15 U, 10 µg에서 0.07 U, 20 µg에서 0.12 U으로 확인되었다. 당귀는 5 µg에서 0.07 U, 10 µg에서 0.14 U, 20 µg에서 0.25 U으로 확인되었으며, 홍화자는 5 µg에서 0.08 U, 10 µg에서 0.16 U, 20 µg에서 0.25 U으로 확인되었다 (그림 18). 각 시료 고농도의 ALP유사활성은 속단(0.60 U) > 당귀(0.25 U) = 홍화자(0.25 U) > 오미자(0.12 U) 순서로 나타났다.

### DPPH SCARVENGING ACTIVITY

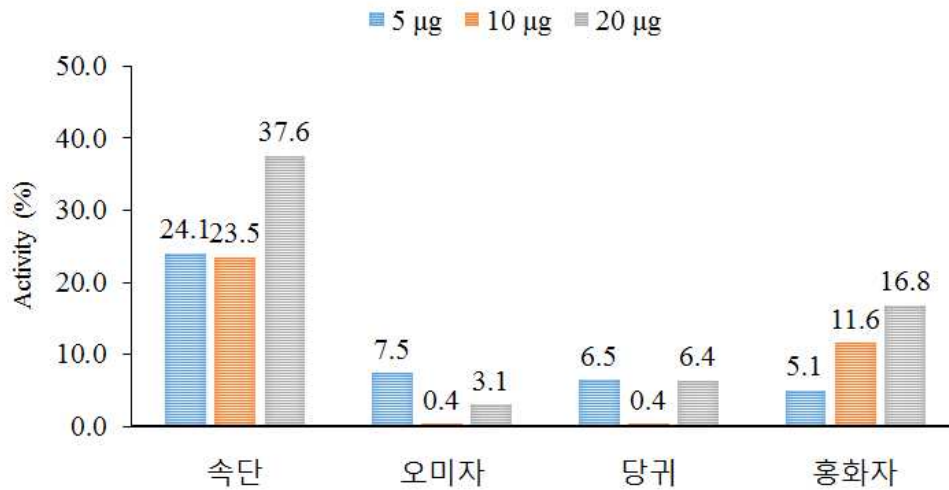


그림 17. DPPH free radical-scavenging activity of the extract of *Phlomis umbrosa*, *Schisandra chinensis* (Turcz.) Baill, *Angelica gigas*, and *Carthamus tinctorius* seed. Inhibition percentage of radical scavenging activity was determined by comparison with a methanol-treated control group. Percentage DPPH free radical scavenging activity was calculated as:  $(\%) = (\text{Abs}_{\text{control without sample}} - \text{Abs}_{\text{sample}}) / \text{Abs}_{\text{control without sample}} \times 100$ . Each value represents the mean  $\pm$  SD for three determinations.

### ALP ACTIVITY

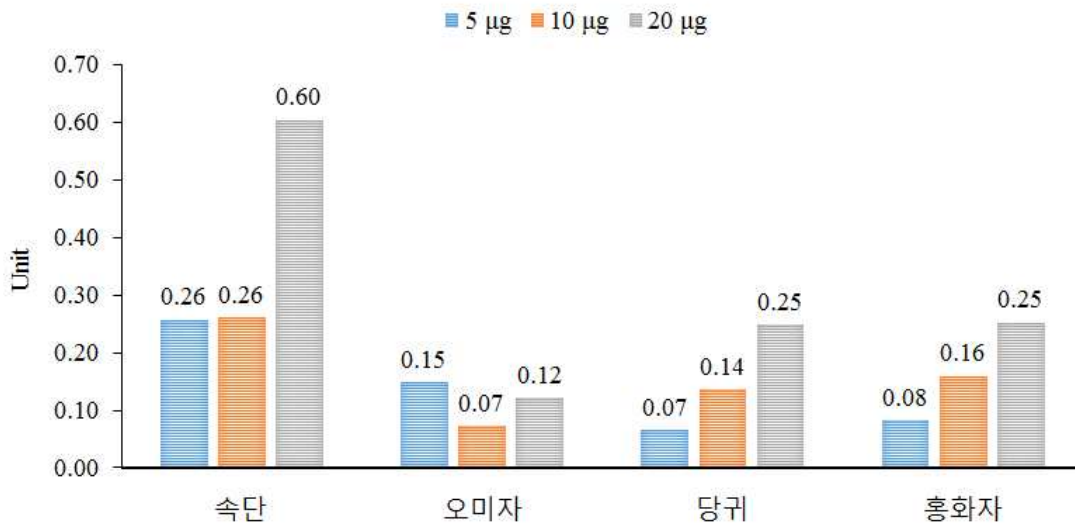


그림 18. The alkaline phosphatase-like activity assay of the extract of *Phlomis umbrosa*, *Schisandra chinensis* (Turcz.) Baill, *Angelica gigas*, and *Carthamus tinctorius* seed. The unit of ALP was calculated using a standard of ALP. Each value represents the mean  $\pm$  SD for three determinations.

## 2) 인간세포를 이용한 여성갱년기 개선 효능 분석

### 가) 추출물에 의한 세포 생존율 평가

각각의 추출물에 의한 세포 생존율 변화를 측정하기 위해 MTT assay를 이용하였다. MCF-7 세포를 분주하여 배양한 후 추출물을 농도별 (0, 1, 5, 10, 50, 100, 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) 로 처리하여 24시간동안 배양한 후 세포 생존율 변화를 확인하였다. 오미자의 경우 98, 97, 99, 99, 100, 90%를 나타냈으며, 당귀 추출물의 경우 97, 99, 101, 102, 104, 101%를 나타냈다. 홍화 추출물의 경우 99, 98, 100, 102, 103, 91%를 나타냈으며, 속단의 경우 96, 98, 98, 99, 93, 91%를 나타냈다. 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 오미자, 당귀, 홍화 추출물의 경우 세포 생존율이 감소하지 않았지만 속단은 93%로 감소하였다. 그리고 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서는 당귀를 제외하고 오미자, 홍화, 속단에서 모두 세포 생존율이 약 90%로 감소하였다.

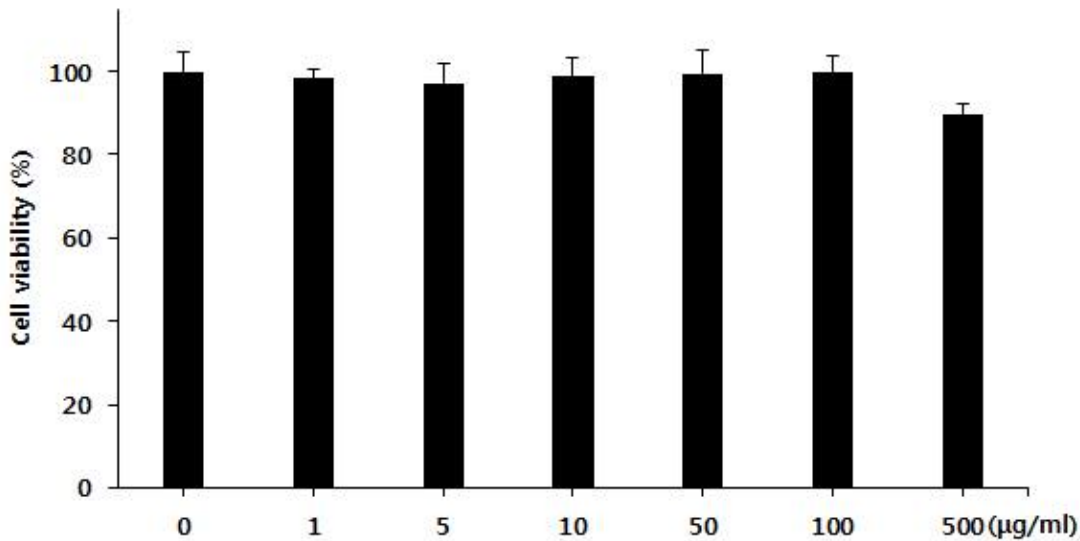


그림 19. Effects of *Schisandra chinensis* extract on cell viability in 3T3-L1 cell line. The cell was incubated with extract (final concentration: 0, 1, 5, 10, 50, 100, 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) for 24 hrs in 5% CO<sub>2</sub> incubator at 37°C. The amount of living cells was measured using MTT assay.

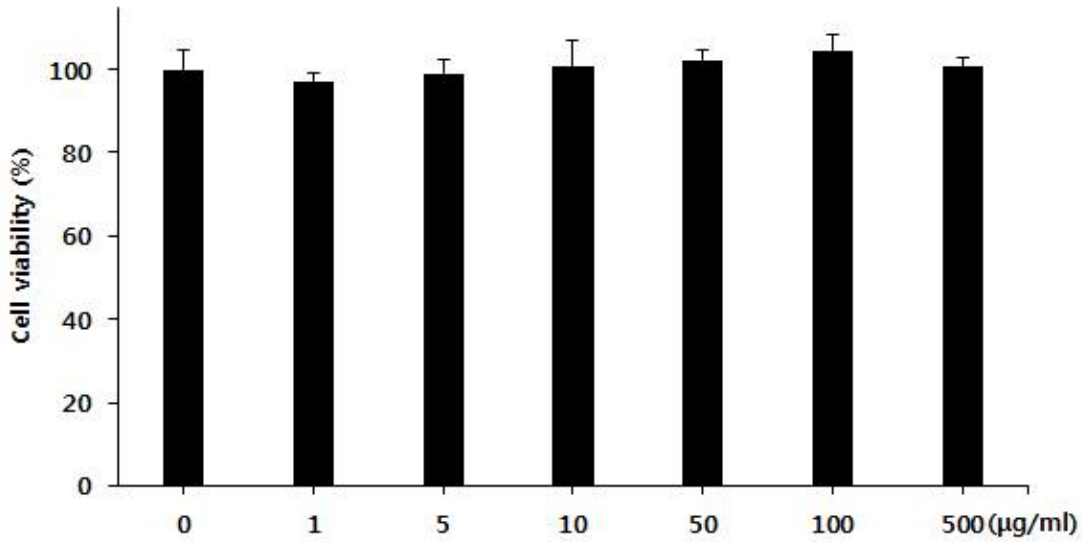


그림 20. Effects of *Angelica gigas Nakai* extract on cell viability in 3T3-L1 cell line. The cell was incubated with extract (final concentration: 0, 1, 5, 10, 50, 100, 500µg/ml) for 24 hrs in 5% CO<sub>2</sub> incubator at 37°C. The amount of living cells was measured using MTT assay.

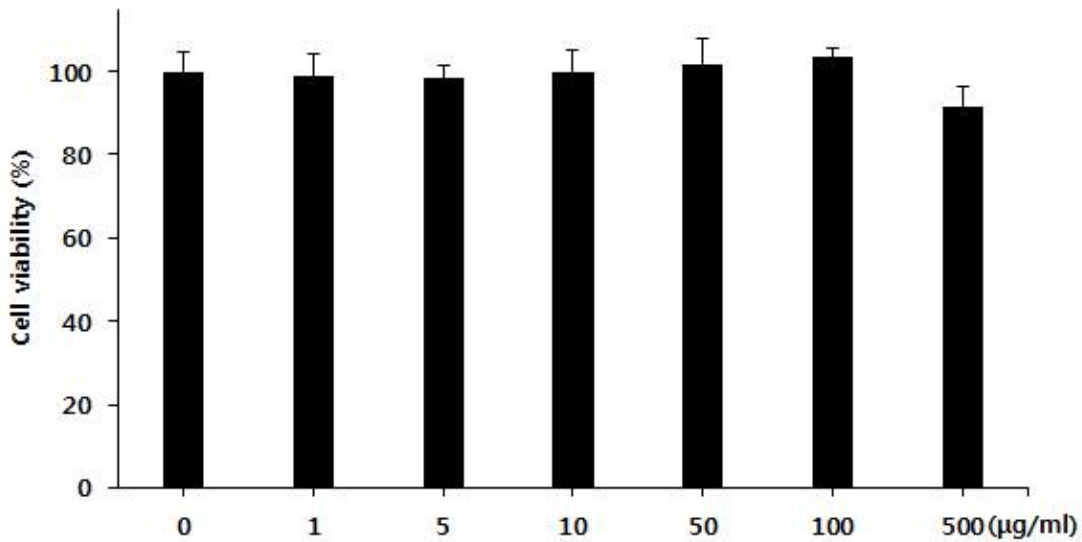


그림 21. Effects of *Carthamus tinctorius* seed extract on cell viability in 3T3-L1 cell line. The cell was incubated with extract (final concentration: 0, 1, 5, 10, 50, 100, 500µg/ml) for 24 hrs in 5% CO<sub>2</sub> incubator at 37°C. The amount of living cells was measured using MTT assay.

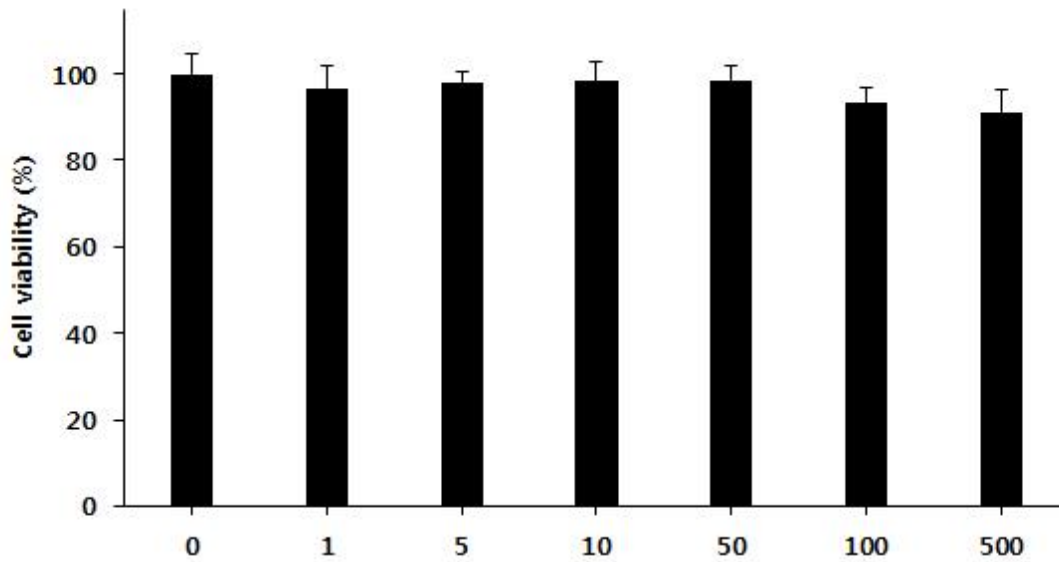


그림 22. Effects of *Dipsacus asperoides* extract on cell viability in 3T3-L1 cell line. The cell was incubated with extract (final concentration: 0, 1, 5, 10, 50, 100, 500µg/ml) for 24 hrs in 5% CO<sub>2</sub> incubator at 37°C. The amount of living cells was measured using MTT assay.

나) E-Screen (MCF-7 cell proliferation assay)을 이용한 활성평가

Estrogen receptor를 가지고 있는 MCF-7 breast carcinoma cell에 시료를 처리한 후 7일간 배양하여 세포증식 유도 측정을 MTT assay로 평가하였다. 대조군으로는Estradiol을 사용하였다. E-screen 방법에 의한 에스트로젠 활성을 측정한 결과, estradiol (1nM)은 약2.1배 정도 증가된 세포증식률을 나타냈다. 추출물을 10, 30, 50, 70µg/mL으로 처리한 후 세포 증식률을 측정하였다. 오미자의 경우 102, 101, 117, 155, 138%로 증가하였으며, 당귀의 경우 101, 105, 120, 148, 114%로 증가하였다. 홍화의 경우 99, 115, 170, 146, 151%로 증가하였으며, 속단의 경우 146, 174, 161, 135, 130%로 증가하였다. 오미자와 당귀의 경우 70µg/mL에서 가장 높은 증식률을 보였으며 홍화는 50µg/mL, 속단은 30µg/mL에서 가장 높은 증식률을 보였다.

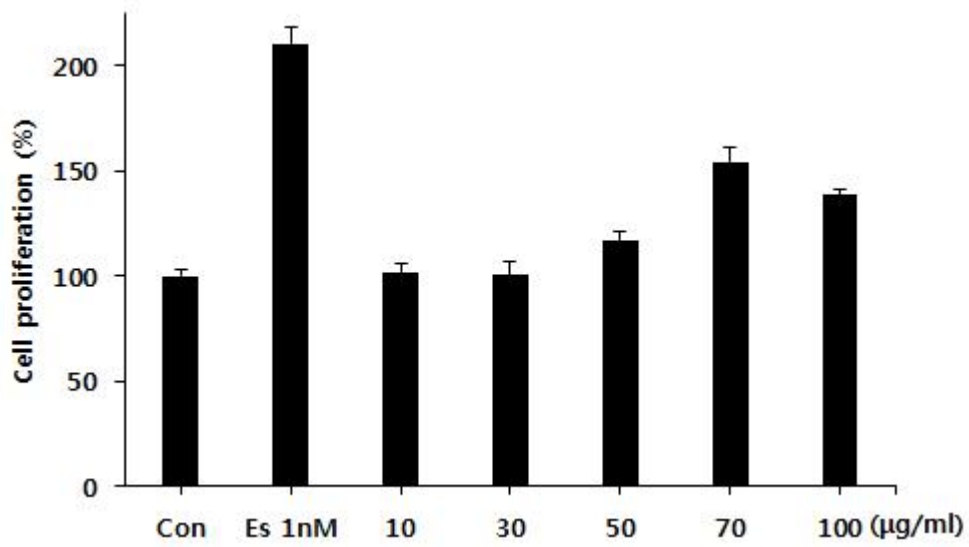


그림 23. Estrogenic Effect of *Schisandra chinensis* extract in MCF-7 Cells using the E-SCREEN assay.

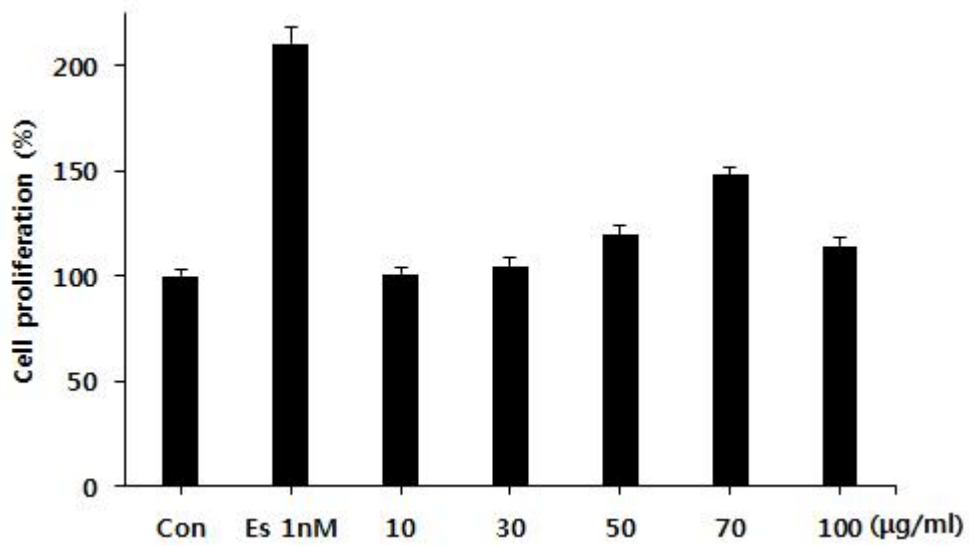


그림 24. Estrogenic Effect of *Angelica gigas Nakai* extract in MCF-7 Cells using the E-SCREEN assay.



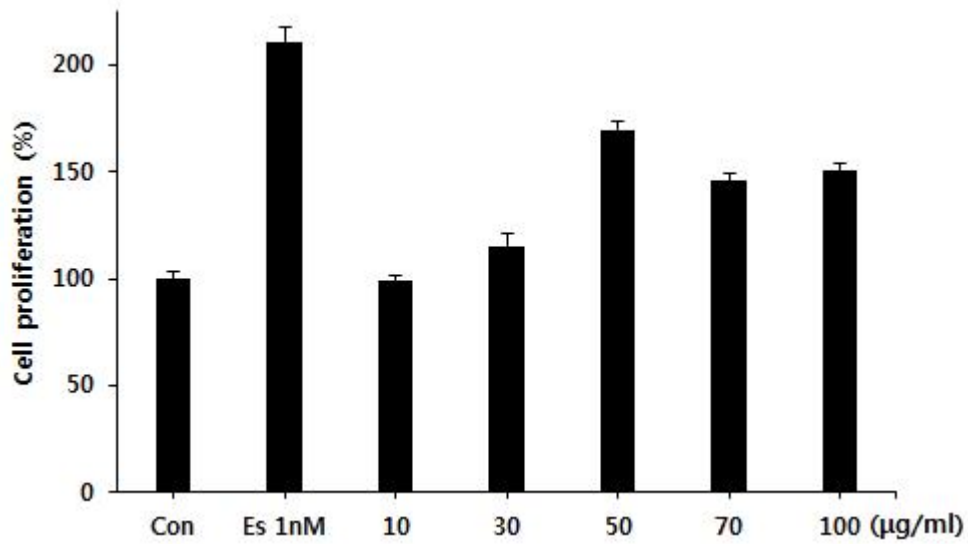


그림 25. Estrogenic Effect of *Carthamus tinctorius* seed extract in MCF-7 Cells using the E-SCREEN assay.

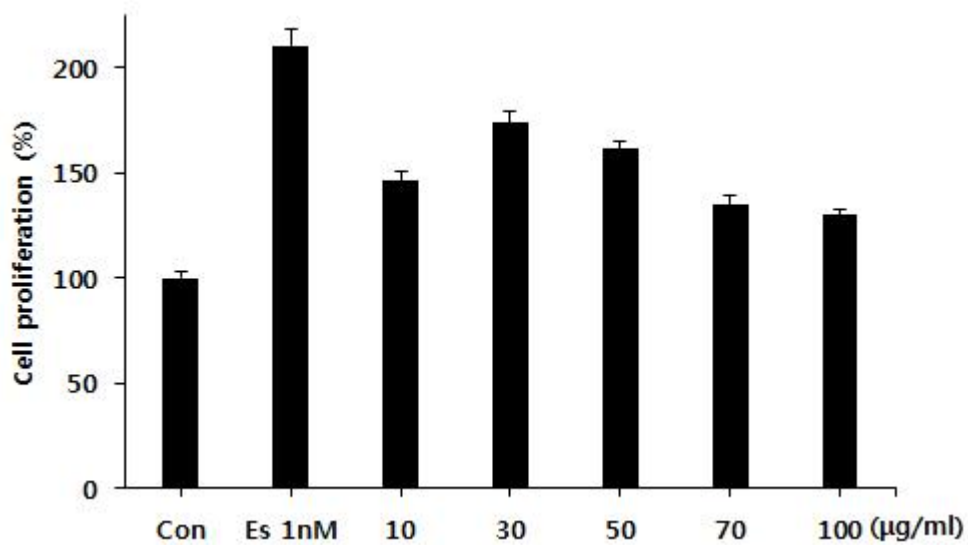


그림 26. Estrogenic Effect of *Dipsacus asperoides* extract in MCF-7 Cells using the E-SCREEN assay.

다) 표고버섯 발효 하수오와 하수오의 에스트로젠 수용체 활성화에 미치는 영향  
추출물에 의한 MCF-7세포 증식이 에스트로젠 수용체를 통해 매개된 증식인지를 확인하기 위해 에스트로젠 길항제인 ICI 182,780 (100nM)을 처리하여 증식률 변화를 측정하였다. ICI를 동시에 처리하였을 때 대조군인 estradiol (1nM) 뿐만 아니라 추출물을 처리한 세포에 세

포 증식률이 현저하게 감소함을 확인하였다. 이를 통해서 오미자, 당귀, 홍화, 속단에 의한 세포 증식이 에스트로겐 수용체 의존적임을 확인하였다.

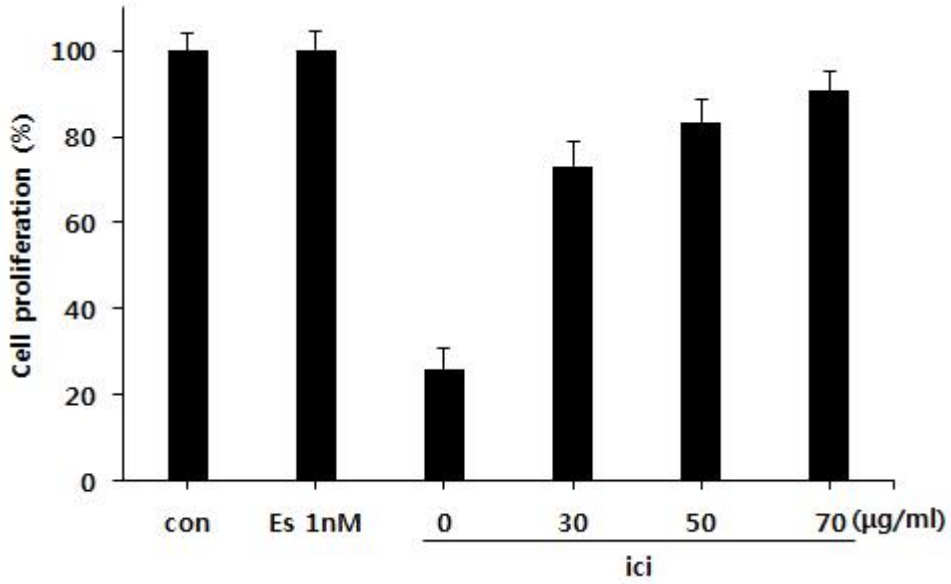


그림 27. Effect of ICI 182,780 on *Schisandra chinensis* extract induced proliferation in MCF-7 Cells.

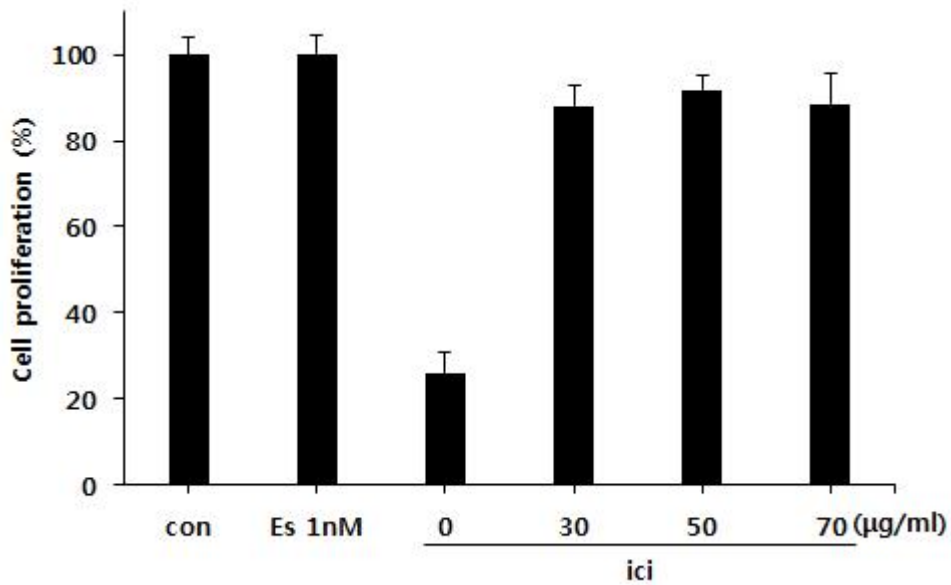


그림 28. Effect of ICI 182,780 on *Angelica gigas Nakai* extract induced proliferation in MCF-7 Cells.

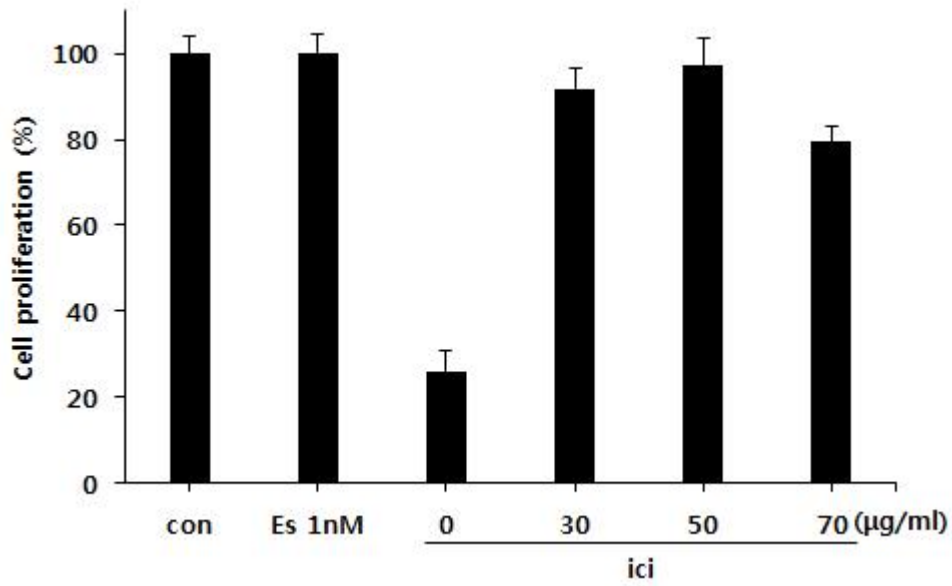


그림 29. Effect of ICI 182,780 on *Carthamus tinctorius* seed extract induced proliferation in MCF-7 Cells.

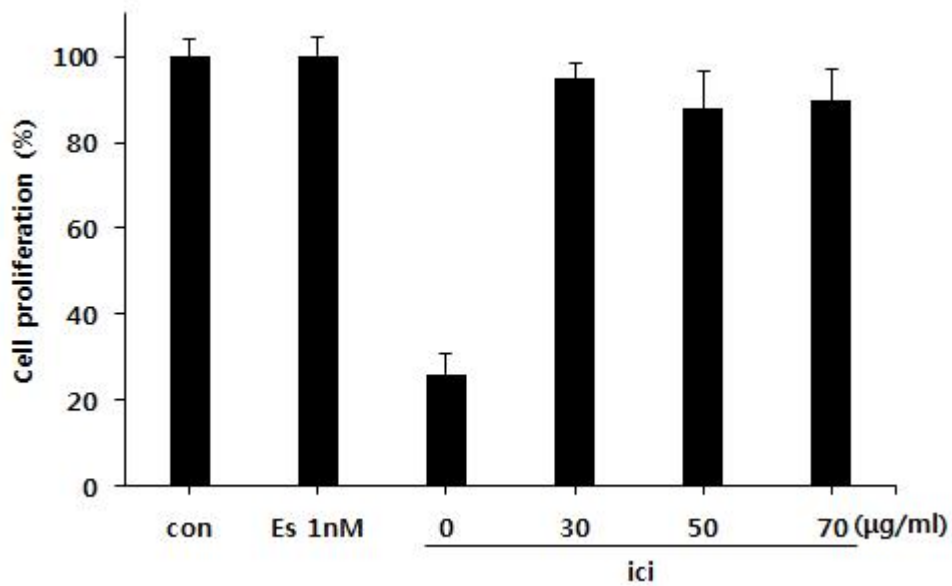


그림 30. Effect of ICI 182,780 on *Angelica gigas Nakai* extract induced proliferation in MCF-7 Cells.

오미자, 당귀, 홍화, 속단에 의한 에스트로겐 수용체 활성화 정도를 측정하였다. control에 비해 Estradiol 은 약 180%로 증가하였다. 추출물을 30, 50, 70 $\mu$ g/mL으로 처 한 후 오미자의 경우 101, 125, 144%로 증가하였으며, 당귀의 경우 102, 113, 135%로 증가하였다. 홍화의 경우 105, 151, 124%로 증가하였으며, 속단의 경우 161, 149, 134%로 증가하였다.

ICI 182.780 처리에 의한 세포생존을 감소와 에스트로겐 수용체 활성화 결과를 통해서 표고 버섯 발효 하수오와 하수오에 의한 세포 증식이 에스트로겐 수용체 의존적임을 확인하였다.

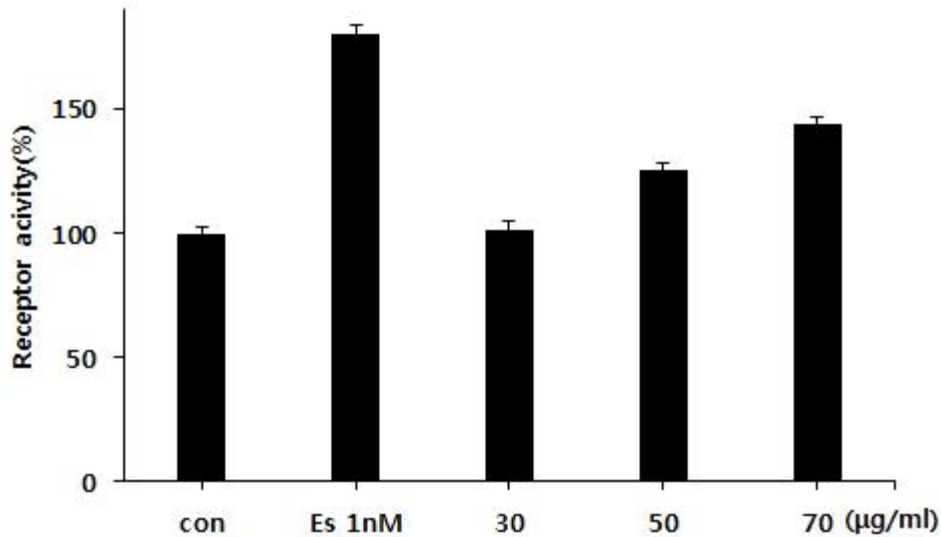


그림 31. Effect of *Schisandra chinensis* extract on estrogen receptor activation in MCF-7 Cells.

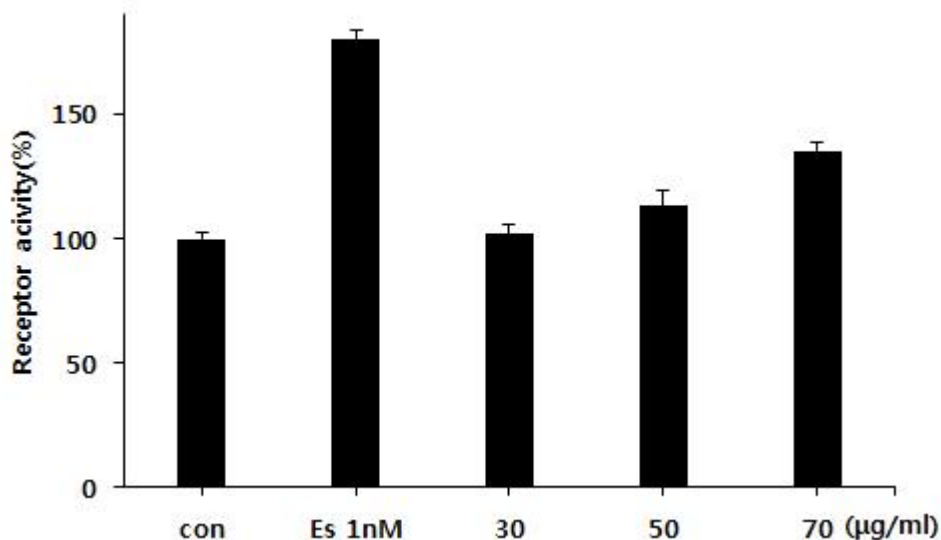


그림 29. Effect of *Angelica gigas Nakai* on estrogen receptor activation in MCF-7 Cells.

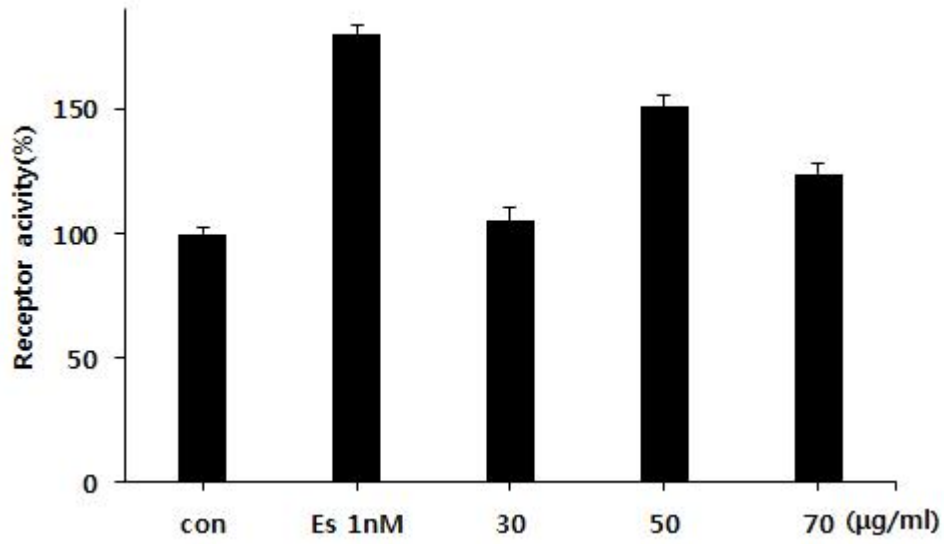


그림 32. Effect of *Carthamus tinctorius* seed extract on estrogen receptor activation in MCF-7 Cells.

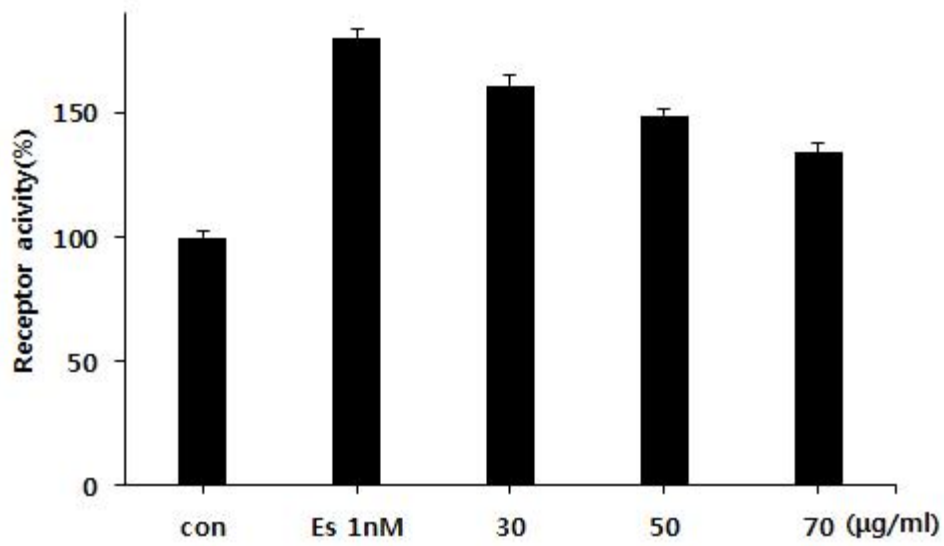


그림 33. Effect of *Dipsacus asperoides* extract on estrogen receptor activation in MCF-7 Cells.

### 3) 여성갱년기 백서모델을 이용한 여성갱년기 개선 효능 분석

#### 가) 주당 체중 변화 분석

실험동물의 체중측정은 동물 사육실에서 적응기간(7일)과 난소제거 여성갱년기 모델 처치 후 회복기간(3일)을 제외하고 50일 시료투여 기간 동안 8번 수행되었다. 난소제거 여성갱년기 모델을 처치하지 않은 일반대조군은 처음 평균체중  $257.5 \pm 16.3$  g에서 50일 후 평균체중  $322.0 \pm 17.0$  g으로 평균적으로 64.5 g의 체중변화를 보였다. 난소제거 여성갱년기 모델을 처치한 그룹 중 일반사료 및 생리식염수만 급여한 음성대조군은 처음 평균체중  $233.0 \pm 1.4$  g에서 50일 후 평균체중  $405.0 \pm 10.6$  g으로 평균적으로 172.0 g의 체중변화를 보였다. 난소제거 여성갱년기 모델을 처치한 그룹 중 estradiol E2를 50일 동안 섭취한 양성대조군은 처음 평균체중  $237.0 \pm 2.8$  g에서 50일 후 평균체중  $331.5 \pm 9.2$  g으로 평균적으로 94.5 g의 체중변화를 보였다. 난소제거 여성갱년기 모델을 처치한 그룹 중 발효하수오복합물을 50일 동안 섭취한 실험군은 처음 평균체중  $248.5 \pm 0.7$  g에서 50일 후 평균체중  $353.0 \pm 9.9$  g으로 평균적으로 104.5 g의 체중변화를 보였다 (그림 35).

이러한 각 그룹의 체중값으로 증가율을 분석한 결과, 시료투여 전 체중을 100 %로 할 때 일반대조군은  $125.5 \pm 14.5$  g, estradiol E2를 섭취한 양성대조군은  $139.9 \pm 5.5$  g, 일반사료 및 생리식염수만 섭취한 음성대조군은  $170.6 \pm 5.6$  g, 발효하수오복합물을 섭취한 실험군은  $142.0 \pm 3.6$  g으로 분석되었다 (그림 36). 모델처치 후 일반사료 및 생리식염수만 섭취한 그룹에서 체중이 약 71%로 크게 증가되었지만 양성대조군(약 40%)과 실험군(약 42%)에서 유사한 수준으로 체중 증가폭이 감소되었다.

#### 나) 주당 식이량 변화 분석

일반대조군은 1주부터 7주까지 주당 101 g, 77 g, 69 g, 91 g, 60 g, 81 g, 56 g을 섭취하였고 양성대조군은 1주부터 7주까지 주당 62.5 g, 77.5 g, 63.5 g, 101.5 g, 69 g, 105 g, 60 g을 섭취하였다. 음성대조군은 1주부터 7주까지 주당 56 g, 51 g, 43 g, 59 g, 45 g, 58 g, 44 g을 섭취하였고 발효하수오복합물을 섭취한 실험군은 1주부터 7주까지 주당 61.5 g, 73.5 g, 76.5 g, 104 g, 79 g, 115 g, 84.5 g을 섭취하였다 (그림 37). 총 섭취량은 일반대조군이 1070 g, 양성대조군이 1078 g, 음성대조군이 712 g, 실험군이 1188 g을 섭취하여, 실험군(1188 g) > 양성대조군(1078 g) > 일반대조군(1070 g) > 음성대조군(712 g) 순서로 확인되었다 (그림 38).

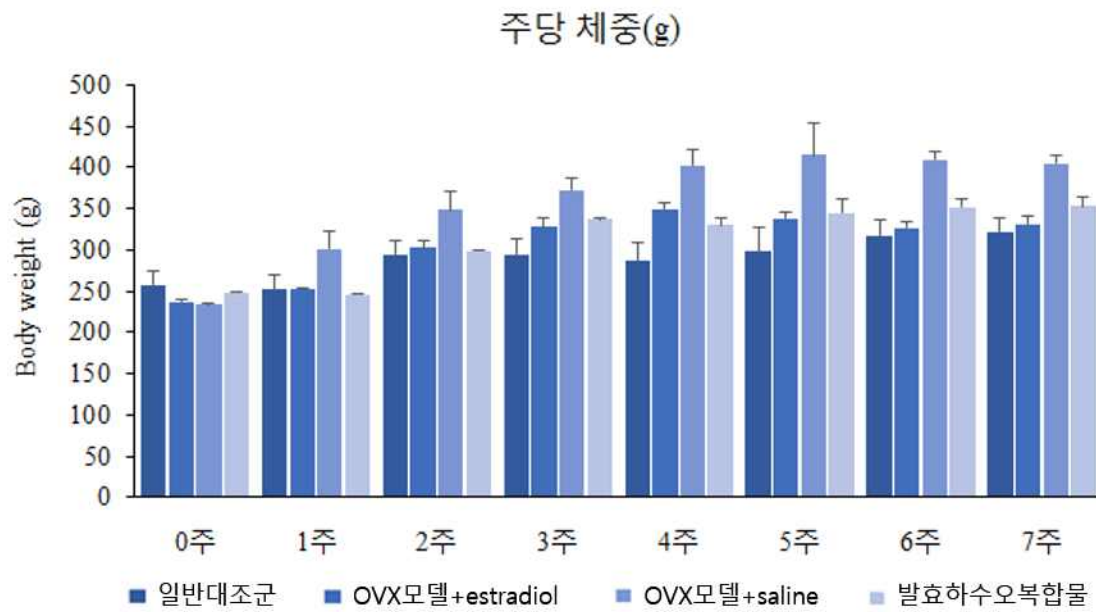


그림 35. Effect of the sample, estradiol E2, and saline on body weight in ovariectomized (OVX) rat. Body weight was measured at 1-week intervals in 50 day. The data are expressed as mean  $\pm$  SD. Control group (Non-OVX + normal diet); Positive control group (OVX + estradiol E2 (0.5 mg/kg/day)); Negative control group (OVX + saline); Experimental sample group (OVX + the sample (200 mg/kg/day)).

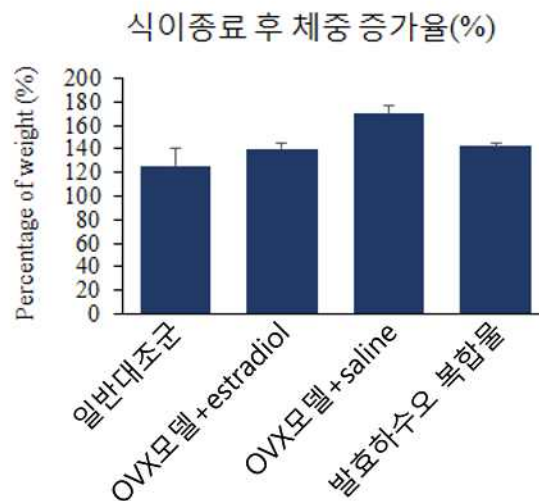


그림 36. Effect of the sample, estradiol E2, and saline on the percentage of body weight in ovariectomized (OVX) rat. Body weight was measured at 1-week intervals in 50 day. The percentage of body weight was analyzed from the results of first-weight and last-weight. The data are expressed as mean  $\pm$  SD. Control group (Non-OVX + normal diet); Positive control group (OVX + estradiol E2 (0.5 mg/kg/day)); Negative control group (OVX + saline); Experimental sample group (OVX + the sample (200 mg/kg/day)).

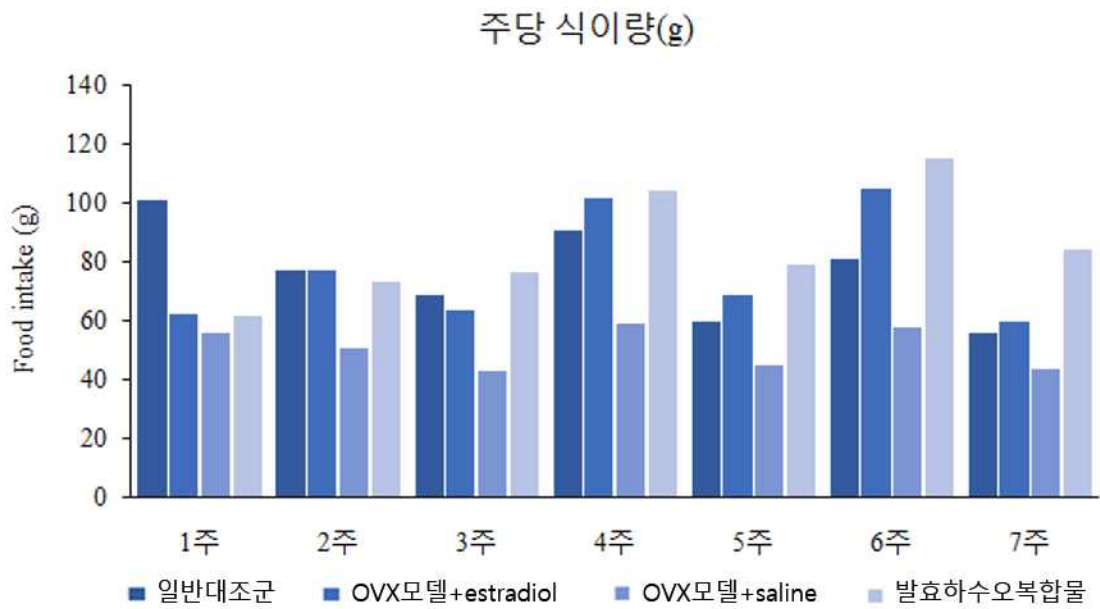


그림 37. Effect of the sample, estradiol E2, and saline on food intake in ovariectomized (OVX) rat. Food intake (g) was measured at 1-week intervals in 50 day. The data are expressed using the average results of each group. Control group (Non-OVX + normal diet); Positive control group (OVX + estradiol E2 (0.5 mg/kg/day)); Negative control group (OVX + saline); Experimental sample group (OVX + the sample (200 mg/kg/day)).

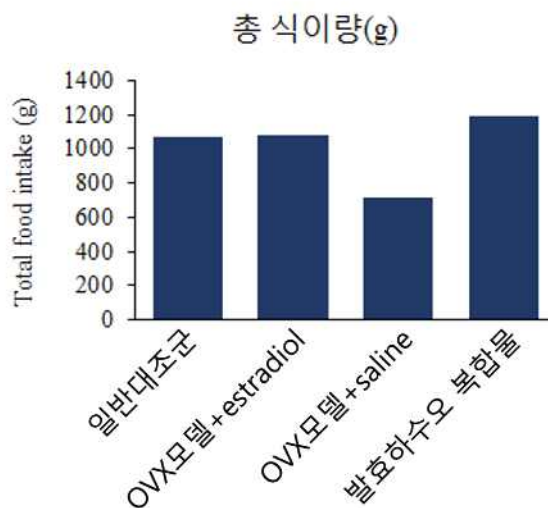


그림 38. Effect of the sample, estradiol E2, and saline on total food intake in ovariectomized (OVX) rat. Food intake (g) was measured at 1-week intervals in 50 day. Control group (Non-OVX + normal diet); Positive control group (OVX + estradiol E2 (0.5 mg/kg/day)); Negative control group (OVX + saline); Experimental sample group (OVX



+ the sample (200 mg/kg/day)).

#### 다) 식이효율 변화 분석

주당 식이량과 체중 변화 결과를 활용하여 식이효율 변화와 50일 동안의 최종 식이효율을 분석하였다. 일반대조군의 식이효율은 1-7주까지 차례로 -0.06, 0.48, 0.53, 0.34, 0.68, 0.74, 1.15로 분석되었고 양성대조군의 식이효율은 1-7주까지 차례로 0.26, 0.85, 1.43, 1.11, 1.47, 0.86, 1.58로 분석되었다. 음성대조군의 식이효율은 1-7주까지 차례로 1.21, 2.25, 3.23, 2.86, 4.04, 3.03, 3.91로 분석되었고 실험군의 식이효율은 1-7주까지 차례로 -0.03, 0.69, 1.16, 0.79, 1.22, 0.90, 1.24로 분석되었다 (그림 39). 모델처치 그룹 중 saline만 섭취한 음성대조군에서 식이량 대비 체중 증가량이 높아 비교적 높은 식이효율 수치를 보였고 양성대조군 > 실험군 > 일반대조군 순서로 식이효율이 높게 나타났다. 50일 동안의 최종 식이효율은 일반대조군에서 0.060, 양성대조군에서 0.088, 음성대조군에서 0.242, 실험군에서 0.088로 확인되어 음성대조군 > 실험군 ≥ 양성대조군 > 일반대조군 순서로 나타났다. 따라서, 모델처치 후 생리식염수만 섭취한 그룹의 급격한 체중증가로 식이효율이 높게 나타났고, 모델처치 후 estradiol E2와 발효하수오복합물을 섭취한 두 그룹에서 체중증가가 감소되어 일반대조군과 비교적 유사한 수준으로 식이효율이 나타났다.

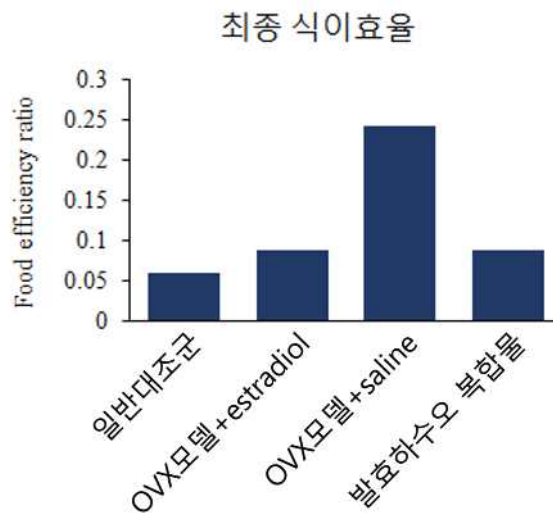


그림 39. Effect of the sample, estradiol E2, and saline on food efficiency ratio in ovariectomized (OVX) rat. Food intake (g) and body weight (g) were measured at 1-week intervals in 50 day. Food efficiency ratio was calculated as [Body weight gain/Food intake]. Control group (Non-OVX + normal diet); Positive control group (OVX + estradiol E2 (0.5 mg/kg/day)); Negative control group (OVX + saline); Experimental sample group (OVX + the sample (200 mg/kg/day)).

라) 조직 중량 변화 분석

50일 동안 식이 종료 후 간, 비장, 신장, 자궁-난소 조직을 절개하여 적출하고 조직 중량을 측정하였다. 간의 조직 중량은 일반대조군에서  $6.69 \pm 0.63$  g, 양성대조군에서  $6.55 \pm 0.45$  g, 음성대조군에서  $8.52 \pm 0.55$  g, 실험군에서  $6.65 \pm 0.11$  g으로 측정되었다. 음성대조군에서 비교적 가장 높았고 다른 3개 그룹에서 유사한 수준으로 나타났다 (그림 40).

비장의 조직 중량은 일반대조군에서  $0.47 \pm 0.05$  g, 양성대조군에서  $0.64 \pm 0.06$  g, 음성대조군에서  $0.65 \pm 0.03$  g, 실험군에서  $0.54 \pm 0.06$  g으로 측정되었다 (그림 41). 양성대조군과 음성대조군이 유사한 수준으로 비교적 가장 높게 나왔고 실험군의 비장 중량은 일반대조군보다 다소 높은 것으로 나타났다.

신장의 조직 중량은 일반대조군에서  $0.99 \pm 0.10$  g, 양성대조군에서  $1.01 \pm 0.001$  g, 음성대조군에서  $1.19 \pm 0.05$  g, 실험군에서  $1.08 \pm 0.01$  g으로 측정되었다 (그림 42). 음성대조군에서 비교적 가장 높았고 실험군의 신장 중량이 일반대조군과 양성대조군보다 비교적 높은 것으로 나타났다.

자궁-난소의 조직 중량은 일반대조군에서  $0.82 \pm 0.22$  g, 양성대조군에서  $0.22 \pm 0.002$  g, 음성대조군에서  $0.18 \pm 0.005$  g, 실험군에서  $0.21 \pm 0.14$  g으로 측정되었다 (그림 43). 모델처치한 3개 그룹에서 일반대조군에 비해 급격한 자궁-난소 조직 중량의 감소를 보였으며, 양성대조군과 실험군에서 자궁-난소 조직 중량이 음성대조군에 비해 다소 증가된 것을 확인하였다.

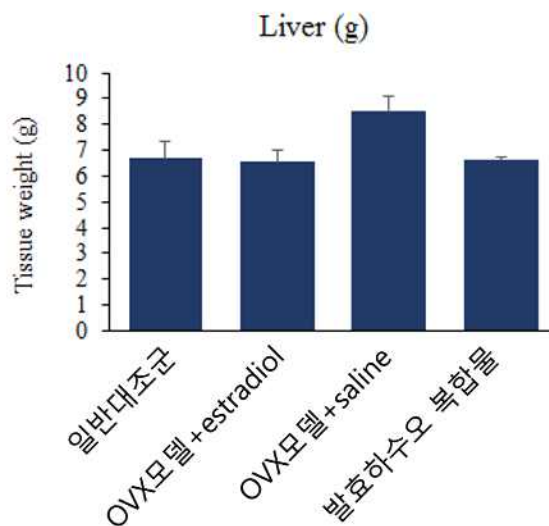


그림 40. Average liver tissue weight from the OVX rat fed saline, estradiol E2, and the sample for 50 days. The data are expressed as mean  $\pm$  SD. Control group (Non-OVX + normal diet); Positive control group (OVX + estradiol E2 (0.5 mg/kg/day)); Negative control group (OVX + saline); Experimental sample group (OVX + the sample (200 mg/kg/day)).

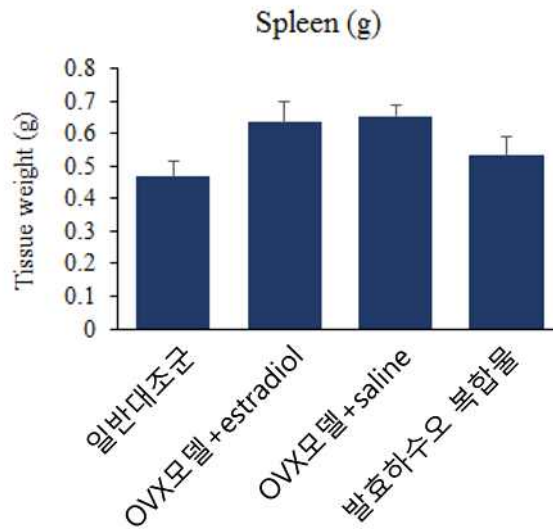


그림 41. Average spleen tissue weight from the OVX rat fed saline, estradiol E2, and the sample for 50 days. The data are expressed as mean  $\pm$  SD. Control group (Non-OVX + normal diet); Positive control group (OVX + estradiol E2 (0.5 mg/kg/day)); Negative control group (OVX + saline); Experimental sample group (OVX + the sample (200 mg/kg/day)).

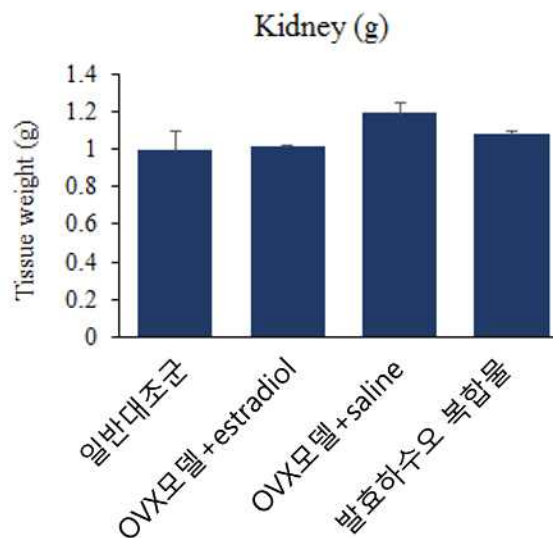


그림 42. Average kidney tissue weight from the OVX rat fed saline, estradiol E2, and the sample for 50 days. The data are expressed as mean  $\pm$  SD. Control group (Non-OVX + normal diet); Positive control group (OVX + estradiol E2 (0.5 mg/kg/day)); Negative control group (OVX + saline); Experimental sample group (OVX + the sample (200 mg/kg/day)).

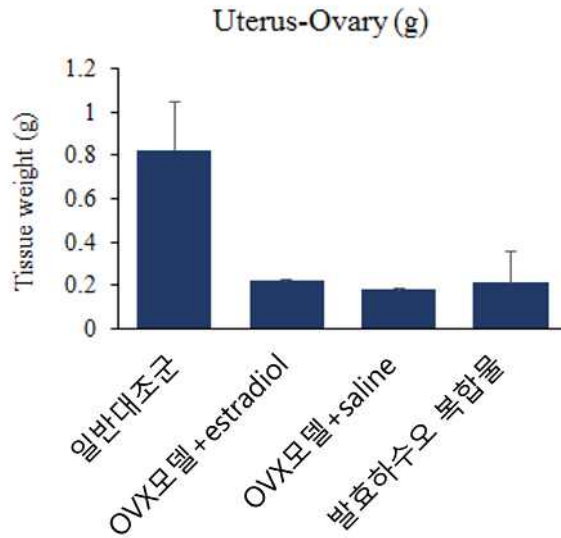


그림 43. Average uterus-ovary tissue weight from the OVX rat fed saline, estradiol E2, and the sample for 50 days. The data are expressed as mean  $\pm$  SD. Control group (Non-OVX + normal diet); Positive control group (OVX + estradiol E2 (0.5 mg/kg/day)); Negative control group (OVX + saline); Experimental sample group (OVX + the sample (200 mg/kg/day)).

마) 자궁-난소 조직 관찰

50일 동안 식이 종료 후 절개한 자궁-난소 조직의 중량을 측정 후 이미지 결과를 만들어 관찰하였다. 또한, 자궁관 상부를 단면 두께 10  $\mu$ m로 동결절편을 만들어 관찰하였다. 먼저 자궁-난소 조직의 이미지를 관찰해보면, 난소제거 모델을 처치하지 않은 일반대조군의 자궁-난소 조직에 비해 난소가 제거된 3개 그룹의 자궁 조직 크기가 상당히 감소된 것을 확인하였으며, estradiol E2와 발효하수오복합물을 섭취한 2개 그룹에서 조직 크기의 감소 정도가 줄었고 음성대조군에 비해 비교적 회복된 조직 형태를 보였다 (그림 44). 또한, 자궁관 상부 단면을 현미경으로 관찰한 결과, 자궁-난소 조직 크기와 유사한 패턴의 자궁관 크기가 확인되었고 일반대조군의 자궁관에 비해 난소가 제거된 자궁관 내 구성세포의 밀도가 상당히 감소되었고 구성세포가 약화되어 부분적으로 손실된 부분이 관찰되었지만, estradiol E2와 발효하수오복합물을 섭취한 2개 그룹에서 구성세포의 부분적 손실이 감소된 것을 확인하였다 (그림 45).

바) 혈청 내 총 단백질 및 albumin 변화 분석

50일 동안 식이 종료 후 혈액으로부터 얻은 혈청을 이용하여 총 단백질과 혈액단백질인 albumin을 측정하였다. 혈청 내 총 단백질 농도는 일반대조군에서  $5.80 \pm 0.99$  g/dL, 양성대조군에서  $5.25 \pm 0.35$  g/dL, 음성대조군에서  $5.50 \pm 0.28$  g/dL, 실험군에서  $5.25 \pm 0.35$  g/dL

으로 확인되었다 (그림 46). 혈청 내 albumin 농도는 일반대조군에서  $3.05 \pm 0.92$  g/dL, 양성 대조군에서  $2.55 \pm 0.07$  g/dL, 음성대조군에서  $2.70 \pm 0.14$  g/dL, 실험군에서  $2.55 \pm 0.21$  g/dL으로 확인되었다 (그림 47). 난소제거 모델을 처치하지 않은 일반대조군의 총 단백질 및 albumin 농도에 비해 난소가 제거된 3개 그룹에서 다소 감소된 것을 확인하였고 estradiol E2와 발효하수오복합물을 섭취한 2개 그룹에서 음성대조군보다 다소 낮은 농도를 보였다.



Control    OVX+estradiol    OVX+saline    OVX+sample

그림 44. Effect of saline, estradiol E2, and the sample treatments on uterus tissues. Representative microscopic uterus tissue pictures from the OVX rat fed saline, estradiol E2, and the sample for 50 days. Control group (Non-OVX + normal diet); Positive control group (OVX + estradiol E2 (0.5 mg/kg/day)); Negative control group (OVX + saline); Experimental sample group (OVX + the sample (200 mg/kg/day)).

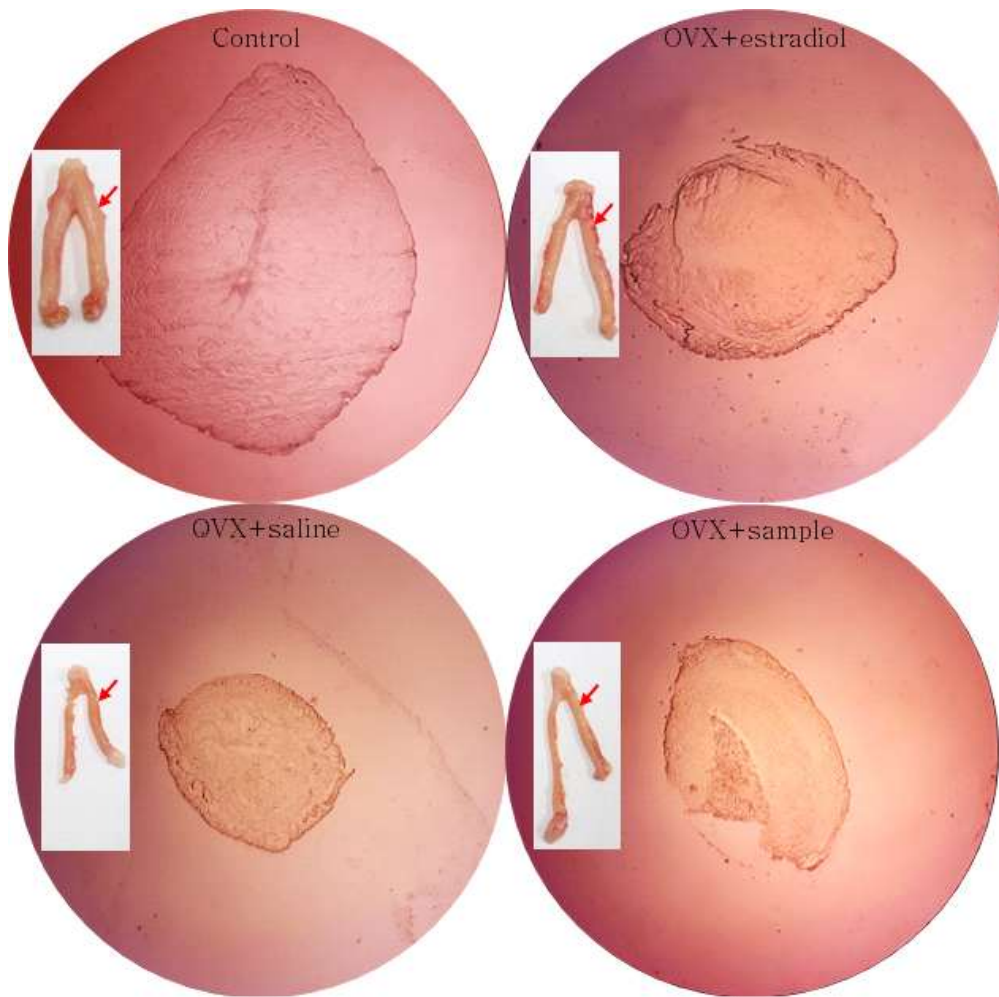


그림 45. Effect of saline, estradiol E2, and the sample treatments on uterus tissues. Representative microscopic Hematoxylin stained uterus tissue pictures from the OVX rat fed saline, estradiol E2, and the sample for 50 days. Control group (Non-OVX + normal diet); Positive control group (OVX + estradiol E2 (0.5 mg/kg/day)); Negative control group (OVX + saline); Experimental sample group (OVX + the sample (200 mg/kg/day)).

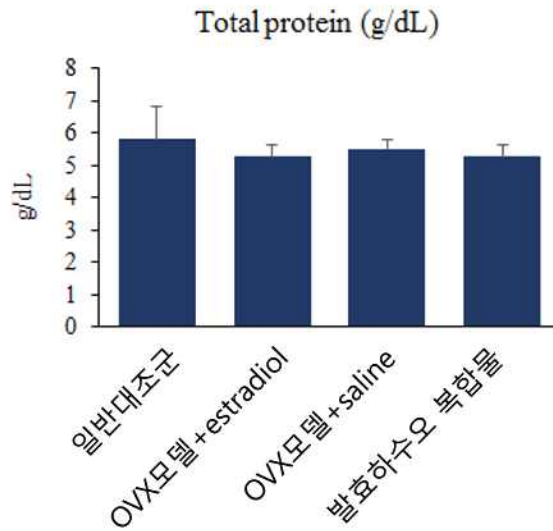


그림 46. Average total protein levels of serum from the OVX rat fed saline, estradiol E2, and the sample for 50 days. The total protein levels were determined using a Vitros 250 chemistry system (Ortho Clinical Diagnostics). The data are expressed as mean  $\pm$  SD. Control group (Non-OVX + normal diet); Positive control group (OVX + estradiol E2 (0.5 mg/kg/day)); Negative control group (OVX + saline); Experimental sample group (OVX + the sample (200 mg/kg/day)).

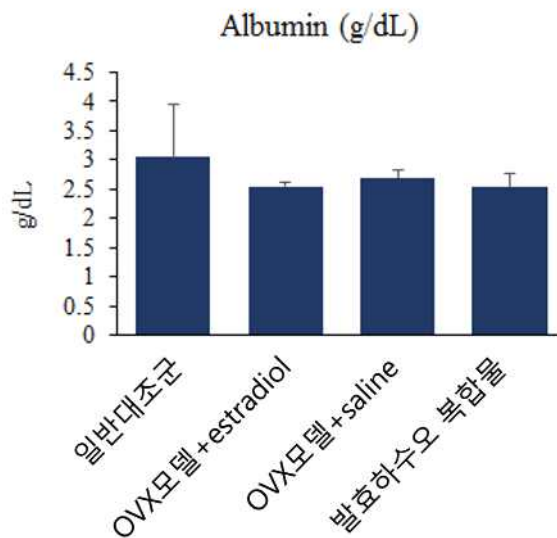


그림 47. Average albumin levels of serum from the OVX rat fed saline, estradiol E2, and the sample for 50 days. The albumin levels were determined using a Vitros 250 chemistry system (Ortho Clinical Diagnostics). The data are expressed as mean  $\pm$  SD. Control group (Non-OVX + normal diet); Positive control group (OVX + estradiol E2 (0.5 mg/kg/day)); Negative control group (OVX + saline); Experimental sample group (OVX

+ the sample (200 mg/kg/day)).

사) 혈청 내 골대사 지표 calcium, alkaline phosphatase 농도 변화 분석

혈청 내 calcium 농도는 일반대조군에서  $18.22 \pm 0.63$  mg/dL, 양성대조군에서  $16.11 \pm 0.01$  mg/dL, 음성대조군에서  $17.29 \pm 0.33$  mg/dL, 실험군에서  $17.96 \pm 0.24$  mg/dL으로 측정되었다 (그림 48). 음성대조군에서 calcium 농도가 감소되었지만 발효하수오복합물을 섭취한 실험군에서 일반대조군과 유사한 수준으로 증가되었고 estradiol E2를 섭취한 양성대조군에서는 calcium 농도를 증가시키지 못했다.

혈청 내 ALP 농도는 일반대조군에서  $0.58 \pm 0.10$  mU, 양성대조군에서  $0.66 \pm 0.02$  mU, 음성대조군에서  $0.51 \pm 0.09$  mU, 실험군에서  $0.56 \pm 0.05$  mU로 측정되었다 (그림 49). 음성대조군에서 ALP 농도가 감소되었지만 양성대조군에서 그 농도가 상당히 증가되었고 발효하수오복합물을 섭취한 실험군에서는 일반대조군과 유사한 수준으로 증가되었다.

아) 혈청 내 estrogen 농도 변화 분석

혈청 내 여성호르몬인 estrogen 농도를 측정하기 위해 estrogen standard를 0, 12.5, 62.5, 187.5 pg/mL 농도로 준비하고 450 nm에서 표준곡선을 도출하여 각 혈청의 흡광도 값을 산출하였다 (그림 50). Estrogen 농도는 일반대조군에서  $77.95 \pm 1.59$  pg/mL, 양성대조군에서  $32.55 \pm 21.38$  pg/mL, 음성대조군에서  $10.48 \pm 2.43$  pg/mL, 실험군에서  $27.63 \pm 17.55$  pg/mL으로 측정되었다 (그림 51). 난소제거 처치 후 음성대조군에서 estrogen 농도가 급격히 감소되었지만, estradiol E2와 발효하수오복합물을 섭취한 2개 그룹에서 estrogen 농도가 증가된 것을 확인하였다.

자) 혈청 내 estradiol 농도 변화 분석

혈청 내 여성호르몬인 estradiol E2 농도를 측정하기 위해 estradiol E2 standard를 0, 3, 10, 30, 100, 300 pg/mL 농도로 준비하고 450 nm에서 표준곡선을 도출하여 각 혈청의 흡광도 값을 산출하였다 (그림 52). Estradiol E2 농도는 일반대조군에서  $50.01 \pm 15.12$  pg/mL, 양성대조군에서  $53.09 \pm 26.63$  pg/mL, 음성대조군에서  $39.42 \pm 8.78$  pg/mL, 실험군에서  $75.35 \pm 6.18$  pg/mL으로 측정되었다 (그림 53). Estrogen 농도와 유사하게 음성대조군에서 농도가 감소되었지만, estradiol E2를 섭취한 양성대조군에서 다소 증가되었고 발효하수오복합물을 섭취한 실험군에서 상당히 증가된 것을 확인하였다.



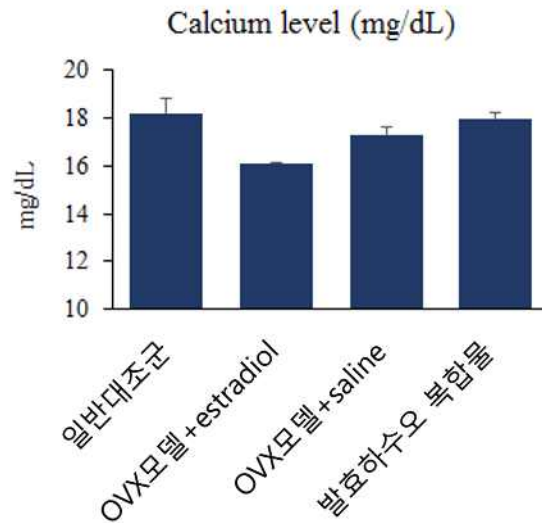


그림 48. Average calcium levels of serum from the OVX rat fed saline, estradiol E2, and the sample for 50 days. The calcium levels were determined at 570 nm using a Microplate reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) and the calcium measurement kit (Calcium Assay kit LS, Metallogenics). The data are expressed as mean  $\pm$  SD. Control group (Non-OVX + normal diet); Positive control group (OVX + estradiol E2 (0.5 mg/kg/day)); Negative control group (OVX + saline); Experimental sample group (OVX + the sample (200 mg/kg/day)).

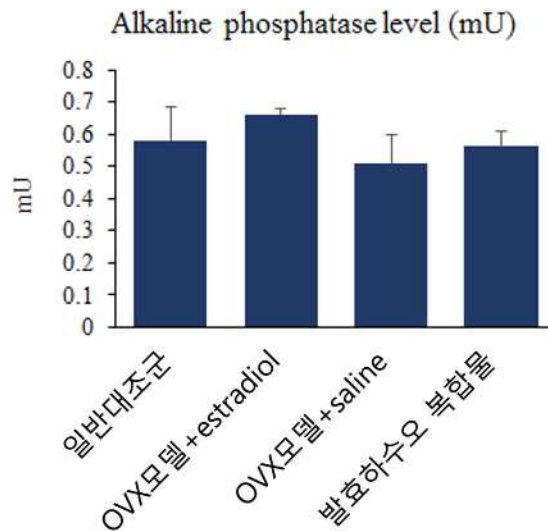


그림 49. Average alkaline phosphatase activities of serum from the OVX rat fed saline, estradiol E2, and the sample for 50 days. The activities were determined at 405 nm using a Microplate reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) and the substrate.

The data are expressed as mean  $\pm$  SD. Control group (Non-OVX + normal diet); Positive control group (OVX + estradiol E2 (0.5 mg/kg/day)); Negative control group (OVX + saline); Experimental sample group (OVX + the sample (200 mg/kg/day)).

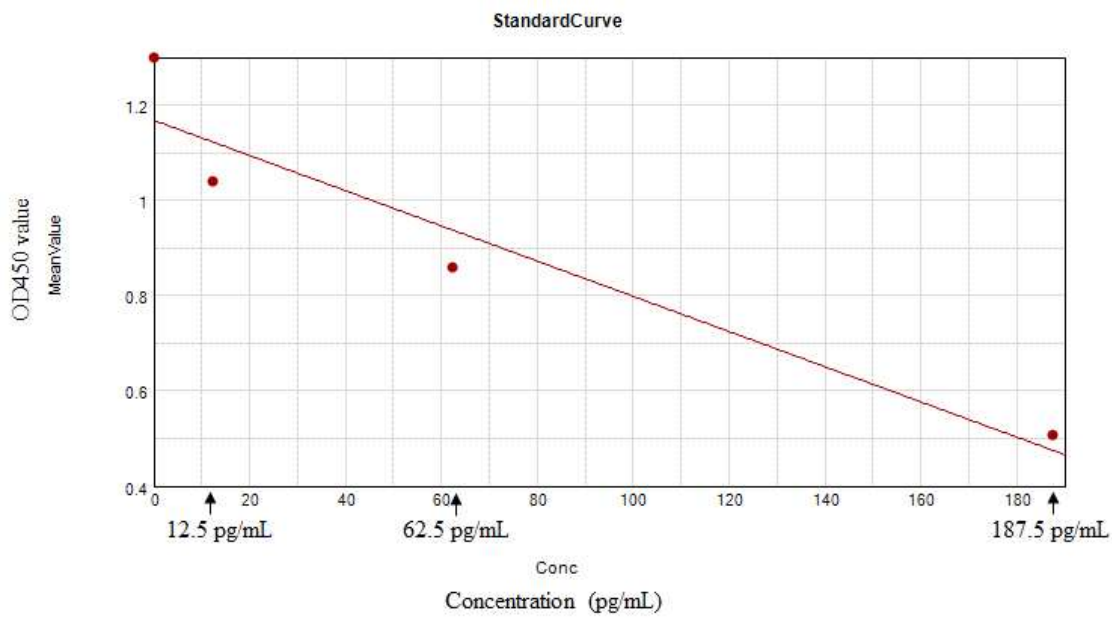


그림 50. The standard curve of estrogen with 0, 12.5, 62.5, and 187.5 pg/mL. Estrogen level was measured at 450 nm using a Rat Estrogen ELISA kit (MyBioSource, San Diego, CA) according to manufacturer's instructions.

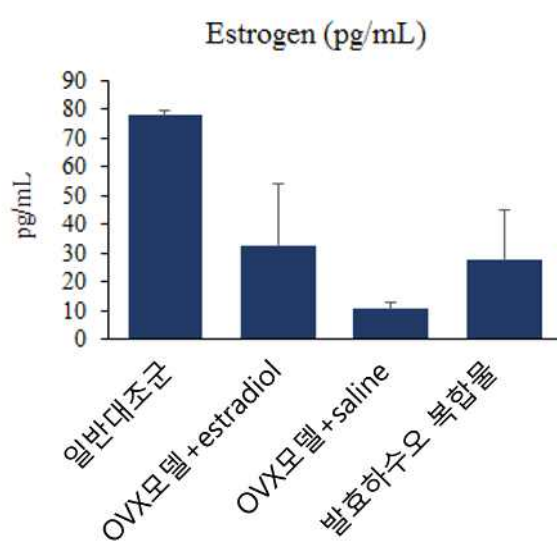


그림 51. Average estrogen levels of serum from the OVX rat fed saline, estradiol E2,

and the sample for 50 days. The estrogen levels were determined at 450 nm using a Microplate reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) and a Rat Estrogen ELISA kit (MyBioSource, San Diego, CA). The data are expressed as mean  $\pm$  SD. Control group (Non-OVX + normal diet); Positive control group (OVX + estradiol E2 (0.5 mg/kg/day)); Negative control group (OVX + saline); Experimental sample group (OVX + the sample (200 mg/kg/day)).

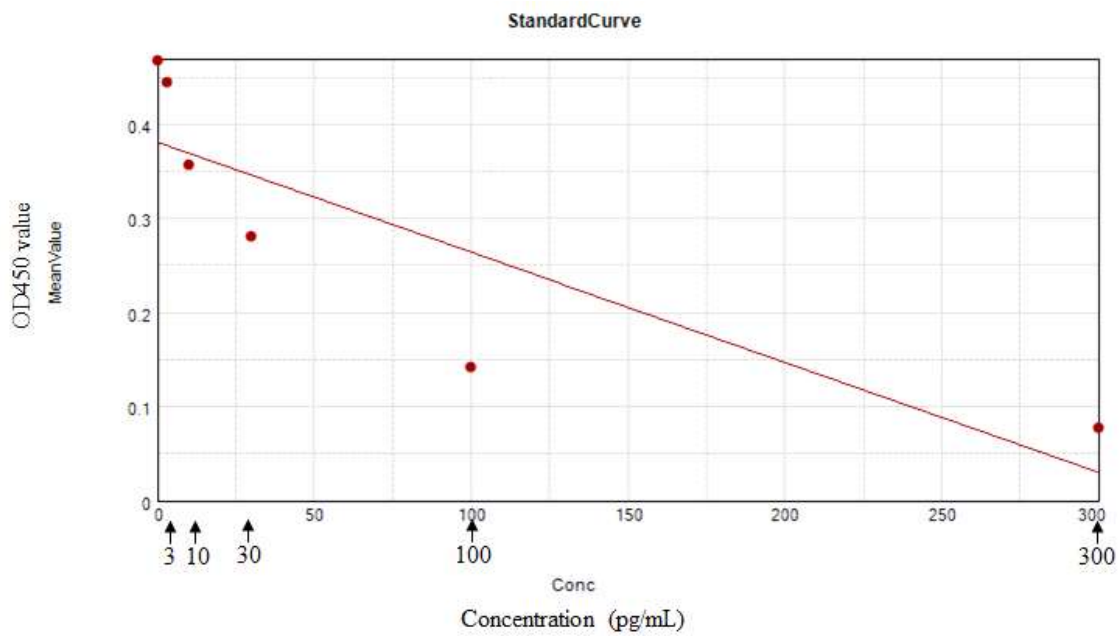


그림 52. The standard curve of estradiol E2 with 0, 3, 10, 30, 100, and 300 pg/mL. Estradiol E2 level was measured at 450 nm using a Rat Estradiol ELISA (CALBIOTECH, DRG Instrument GmbH, Marburg, Germany) according to manufacturer's instructions.

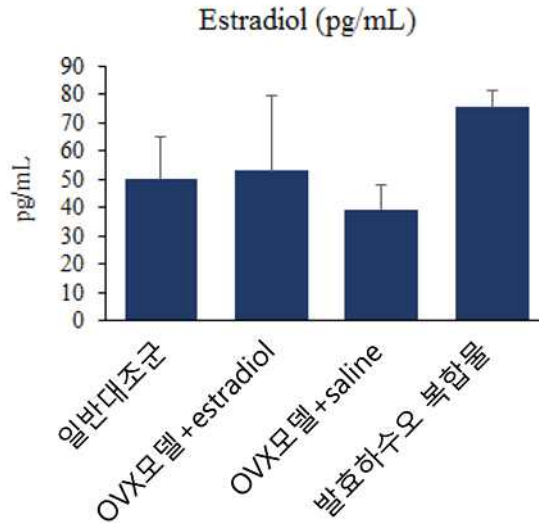


그림 53. Average estradiol E2 levels of serum from the OVX rat fed saline, estradiol E2, and the sample for 50 days. The estradiol E2 levels were determined at 450 nm using a Microplate reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) and a Rat Estradiol ELISA (CALBIOTECH, DRG Instrument GmbH, Marburg, Germany). The data are expressed as mean  $\pm$  SD. Control group (Non-OVX + normal diet); Positive control group (OVX + estradiol E2 (0.5 mg/kg/day)); Negative control group (OVX + saline); Experimental sample group (OVX + the sample (200 mg/kg/day)).

#### 차) 혈청 내 testosterone 농도 변화 분석

혈청 내 여성 testosterone 호르몬은 성욕에 관련되어 성욕감퇴 진단에 이용하는 지표이며, testosterone standard를 450 nm에서 표준곡선을 도출하여 각 혈청의 흡광도 값을 산출하였다 (그림 54). testosterone 농도는 일반대조군에서  $4.51 \pm 2.01$  ng/mL, 양성대조군에서  $1.81 \pm 1.62$  ng/mL, 음성대조군에서  $1.65 \pm 0.30$  ng/mL, 실험군에서  $4.35 \pm 0.56$  ng/mL으로 측정되었다 (그림 55). 음성대조군에서 testosterone 농도가 급격하게 감소되었지만 발효하수오복합물을 섭취한 실험군에서 일반대조군과 유사한 수준으로 증가되었다. Estradiol E2를 섭취한 양성대조군에서는 testosterone 농도가 증가되지 않았다.

#### 카) 혈청 내 glucose 농도 변화 분석

혈청 내 혈당 농도는 일반대조군에서  $170.5 \pm 24.7$  mg/dL, 양성대조군에서  $156.5 \pm 34.6$  mg/dL, 음성대조군에서  $152.0 \pm 9.9$  mg/dL, 실험군에서  $157.5 \pm 2.1$  mg/dL으로 측정되었다 (그림 56). 난소제거 처치 후 3개 그룹에서 모두 일반대조군의 혈당 농도보다 낮았으며, 양성대조군, 음성대조군, 실험군에서 유사한 농도를 보였다.

타) 혈청 내 간기능 지표 AST, ALT 활성 변화 분석

혈청 내 간기능 지표 중 AST 활성은 일반대조군에서  $170.5 \pm 24.7$  U/L, 양성대조군에서  $156.5 \pm 34.6$  U/L, 음성대조군에서  $152.0 \pm 9.9$  U/L, 실험군에서  $157.5 \pm 2.1$  U/L으로 측정되었다 (그림 57). 양성대조군과 실험군에서 비교적 높은 AST 활성을 보였다.

혈청 내 간기능 지표 중 ALT 활성은 일반대조군에서  $170.5 \pm 24.7$  U/L, 양성대조군에서  $156.5 \pm 34.6$  U/L, 음성대조군에서  $152.0 \pm 9.9$  U/L, 실험군에서  $157.5 \pm 2.1$  U/L으로 측정되었다 (그림 58). 난소제거 처치한 양성대조군, 음성대조군, 실험군에서 비교적 높은 ALT 활성을 보였다.

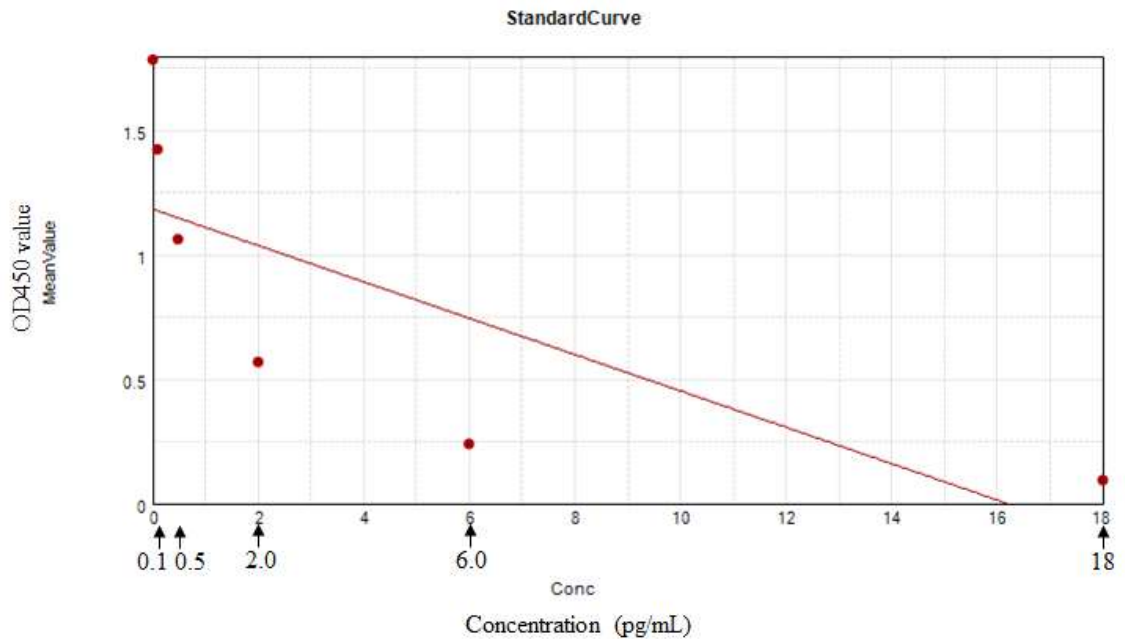


그림 54. The standard curve of testosterone with 0, 0.1, 0.5, 2.0, 6.0, and 18.0 pg/mL. Testosterone level was measured at 450 nm using a Testosterone (Rat) ELISA Kit (BioVision, Malpitas, CA, USA) according to manufacturer's instructions.

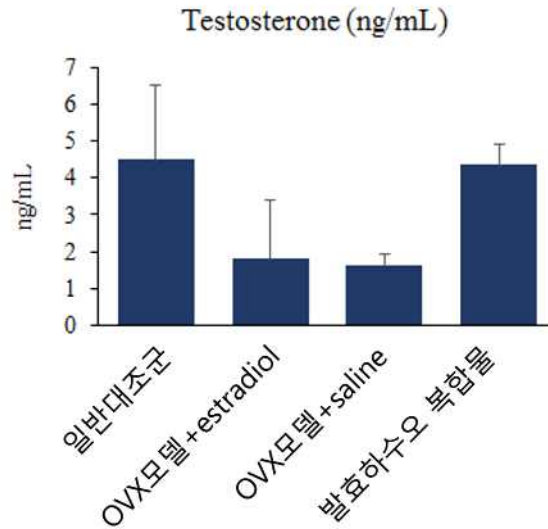


그림 55. Average testosterone levels of serum from the OVX rat fed saline, estradiol E2, and the sample for 50 days. The testosterone levels were determined at 450 nm using a Microplate reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) and a Testosterone (Rat) ELISA Kit (BioVision, Malpitas, CA, USA). The data are expressed as mean  $\pm$  SD. Control group (Non-OVX + normal diet); Positive control group (OVX + estradiol E2 (0.5 mg/kg/day)); Negative control group (OVX + saline); Experimental sample group (OVX + the sample (200 mg/kg/day)).

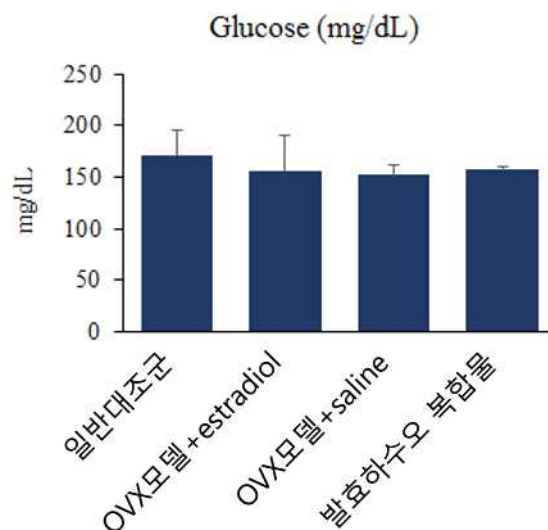


그림 56. Average glucose levels of serum from the OVX rat fed saline, estradiol E2, and the sample for 50 days. The glucose levels were determined using a Vitros 250

chemistry system (Ortho Clinical Diagnostics). The data are expressed as mean  $\pm$  SD. Control group (Non-OVX + normal diet); Positive control group (OVX + estradiol E2 (0.5 mg/kg/day)); Negative control group (OVX + saline); Experimental sample group (OVX + the sample (200 mg/kg/day)).

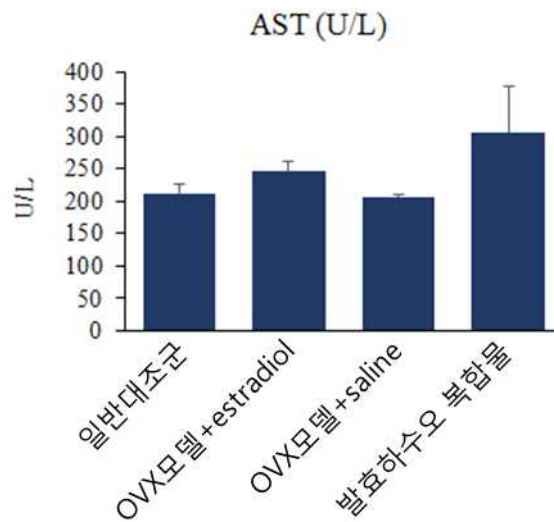


그림 57. Average AST activities of serum from the OVX rat fed saline, estradiol E2, and the sample for 50 days. The AST activities were determined using a Vitros 250 chemistry system (Ortho Clinical Diagnostics). The data are expressed as mean  $\pm$  SD. Control group (Non-OVX + normal diet); Positive control group (OVX + estradiol E2 (0.5 mg/kg/day)); Negative control group (OVX + saline); Experimental sample group (OVX + the sample (200 mg/kg/day)).

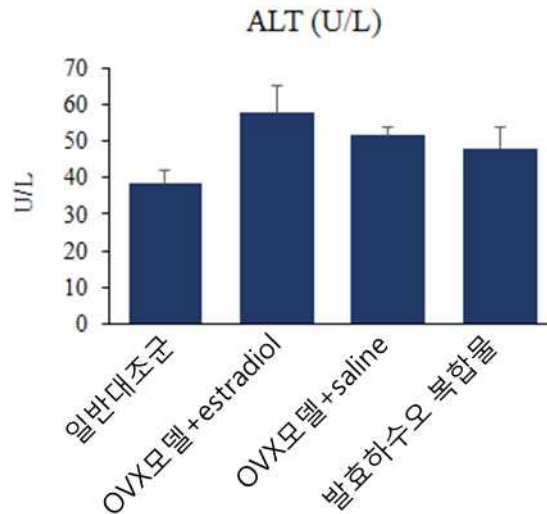


그림 58. Average ALT activities of serum from the OVX rat fed saline, estradiol E2, and the sample for 50 days. The ALT activities were determined using a Vitros 250 chemistry system (Ortho Clinical Diagnostics). The data are expressed as mean  $\pm$  SD. Control group (Non-OVX + normal diet); Positive control group (OVX + estradiol E2 (0.5 mg/kg/day)); Negative control group (OVX + saline); Experimental sample group (OVX + the sample (200 mg/kg/day)).

과) 혈청 내 지질대사 지표 변화 분석

혈청 내 지질대사 지표는 총 콜레스테롤(Total cholesterol), 중성지방(Triacylglycerol), 고밀도지단백 콜레스테롤(HDL-cholesterol), 저밀도지단백 콜레스테롤(LDL-cholesterol), 초저밀도지단백 콜레스테롤(VLDL-cholesterol)을 분석하였다. 혈청 내 총 콜레스테롤 농도는 일반대조군에서  $74.5 \pm 13.4$  mg/dL, 양성대조군에서  $66.0 \pm 14.1$  mg/dL, 음성대조군에서  $83.0 \pm 2.8$  mg/dL, 실험군에서  $75.5 \pm 0.7$  mg/dL으로 측정되었다 (그림 59). 양성대조군의 총 콜레스테롤 농도가 일반대조군에 비해 다소 증가되었지만, estradiol E2와 발효하수오복합물을 섭취한 2개 그룹에서 총 콜레스테롤 농도가 감소되었다.

혈청 내 중성지방 농도는 일반대조군에서  $54.0 \pm 9.9$  mg/dL, 양성대조군에서  $43.0 \pm 0.0$  mg/dL, 음성대조군에서  $49.5 \pm 3.5$  mg/dL, 실험군에서  $54.0 \pm 4.2$  mg/dL으로 측정되었다 (그림 60). 일반대조군과 실험군은 유사한 농도를 보였고 양성대조군과 음성대조군의 중성지방 농도는 일반대조군에 비해 낮은 것으로 나타났다.

혈청 내 고밀도지단백 콜레스테롤 농도는 일반대조군에서  $32.4 \pm 1.3$  mg/dL, 양성대조군에서  $42.0 \pm 4.2$  mg/dL, 음성대조군에서  $42.5 \pm 3.5$  mg/dL, 실험군에서  $45.0 \pm 0.0$  mg/dL으로 측정되었다 (그림 61). 고밀도지단백 콜레스테롤 농도가 난소제거 처치한 3개 그룹에서 비교



적 증가되었고 발효하수오복합물을 섭취한 실험군에서 가장 높은 농도를 보였다.

혈청 내 저밀도지단백 콜레스테롤 농도는 일반대조군에서  $52.9 \pm 16.7$  mg/dL, 양성대조군에서  $32.6 \pm 18.4$  mg/dL, 음성대조군에서  $50.4 \pm 1.4$  mg/dL, 실험군에서  $41.3 \pm 0.1$  mg/dL으로 측정되었다 (그림 62). 저밀도지단백 콜레스테롤 농도는 음성대조군에서 큰 변화를 보이지 않았지만 estradiol E2와 발효하수오복합물을 섭취한 2개 그룹에서 감소된 결과를 보였다.

혈청 내 초저밀도지단백 콜레스테롤 농도는 일반대조군에서  $10.8 \pm 2.0$  mg/dL, 양성대조군에서  $8.6 \pm 0.0$  mg/dL, 음성대조군에서  $9.9 \pm 0.7$  mg/dL, 실험군에서  $10.8 \pm 0.8$  mg/dL으로 측정되었다 (그림 63). 실험군에서는 큰 변화가 없었지만 음성대조군과 양성대조군에서 감소된 결과를 보였다.

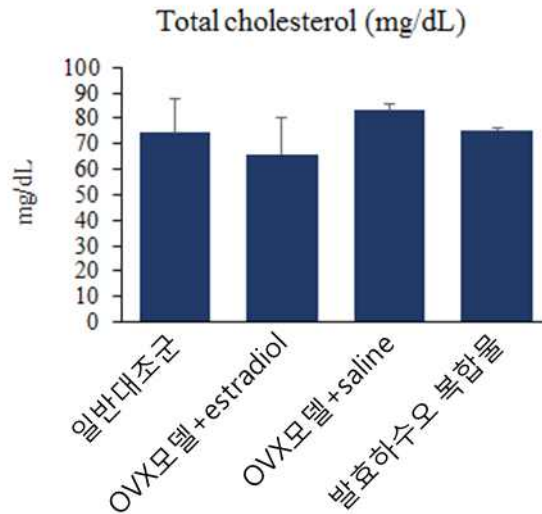


그림 59. Average total cholesterol levels of serum from the OVX rat fed saline, estradiol E2, and the sample for 50 days. The total cholesterol levels were determined using a Vitros 250 chemistry system (Ortho Clinical Diagnostics). The data are expressed as mean  $\pm$  SD. Control group (Non-OVX + normal diet); Positive control group (OVX + estradiol E2 (0.5 mg/kg/day)); Negative control group (OVX + saline); Experimental sample group (OVX + the sample (200 mg/kg/day)).

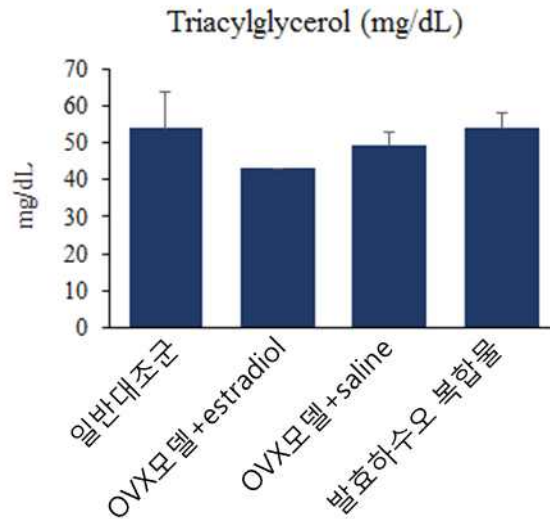


그림 60. Average triacylglycerol levels of serum from the OVX rat fed saline, estradiol E2, and the sample for 50 days. The triacylglycerol levels were determined using a Vitros 250 chemistry system (Ortho Clinical Diagnostics). The data are expressed as mean  $\pm$  SD. Control group (Non-OVX + normal diet); Positive control group (OVX + estradiol E2 (0.5 mg/kg/day)); Negative control group (OVX + saline); Experimental sample group (OVX + the sample (200 mg/kg/day)).

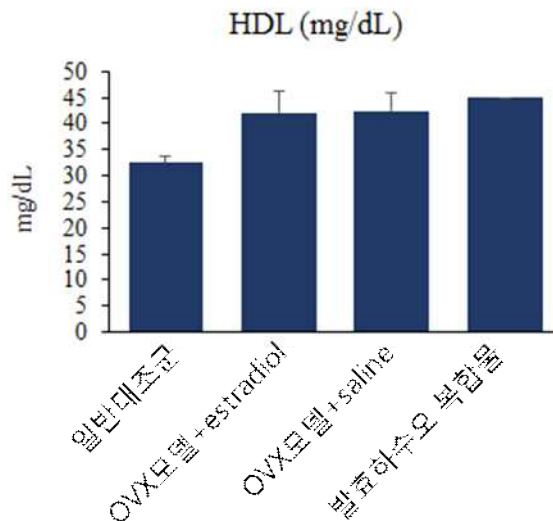


그림 61. Average HDL-cholesterol levels of serum from the OVX rat fed saline, estradiol E2, and the sample for 50 days. The HDL-cholesterol levels were determined using a Vitros 250 chemistry system (Ortho Clinical Diagnostics). The data are expressed as

mean  $\pm$  SD. Control group (Non-OVX + normal diet); Positive control group (OVX + estradiol E2 (0.5 mg/kg/day)); Negative control group (OVX + saline); Experimental sample group (OVX + the sample (200 mg/kg/day)).

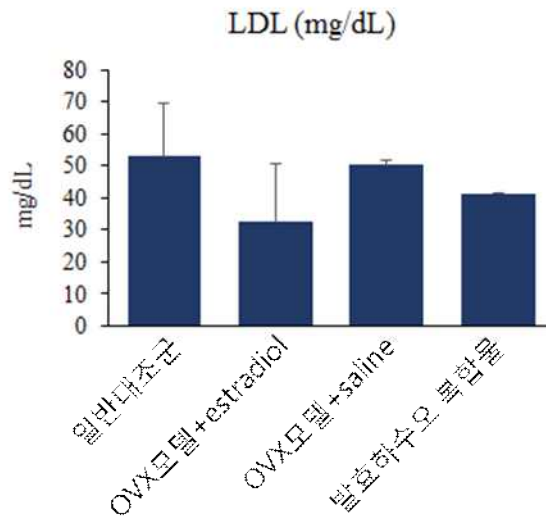


그림 62. Average LDL-cholesterol levels of serum from the OVX rat fed saline, estradiol E2, and the sample for 50 days. The LDL value was calculated as [LDL-cholesterol = Total cholesterol - (HDL-cholesterol - Triacylglycerol/5)]. The data are expressed as mean  $\pm$  SD. Control group (Non-OVX + normal diet); Positive control group (OVX + estradiol E2 (0.5 mg/kg/day)); Negative control group (OVX + saline); Experimental sample group (OVX + the sample (200 mg/kg/day)).

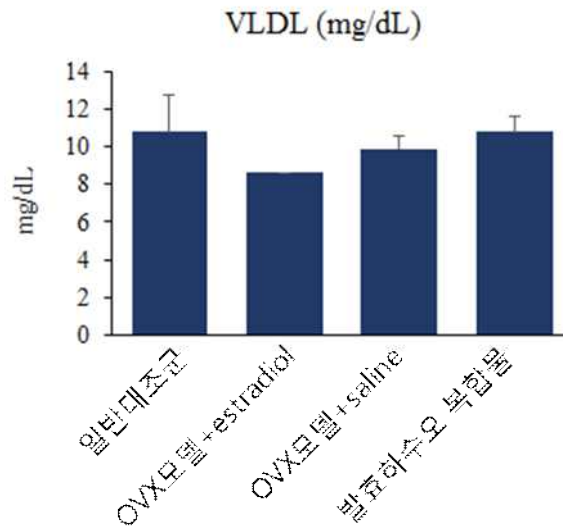


그림 63. Average VLDL-cholesterol levels of serum from the OVX rat fed saline, estradiol E2, and the sample for 50 days. The VLDL value was calculated as [VLDL-cholesterol = Triacylglycerol/5]. The data are expressed as mean  $\pm$  SD. Control group (Non-OVX + normal diet); Positive control group (OVX + estradiol E2 (0.5 mg/kg/day)); Negative control group (OVX + saline); Experimental sample group (OVX + the sample (200 mg/kg/day)).

#### 하) 동맥경화 및 심장위험지수 분석

혈청 내 총 콜레스테롤, 중성지방, 고밀도지단백 콜레스테롤 농도 결과를 활용하여 동맥경화지수(AI), 동맥경화상관계수(AC), 심장위험지수(CRR), 관상동맥지수(CAI)를 산출하여 분석하였다. 동맥경화지수는 일반대조군에서  $1.67 \pm 0.37$ , 양성대조군에서  $1.03 \pm 0.10$  mg/dL, 음성대조군에서  $1.17 \pm 0.18$  mg/dL, 실험군에서  $1.20 \pm 0.09$  mg/dL으로 분석되었다 (그림 64). 동맥경화지수는 estradiol E2와 발효하수오복합물을 섭취한 그룹에서 음성대조군과 유사한 수준으로 나타났다.

동맥경화상관계수는 일반대조군에서  $1.31 \pm 0.51$ , 양성대조군에서  $0.60 \pm 0.50$ , 음성대조군에서  $0.96 \pm 0.10$ , 실험군에서  $0.68 \pm 0.02$ 으로 분석되었다 (그림 65). Estradiol E2와 발효하수오복합물을 섭취한 2개 그룹에서 음성대조군의 수치에 비해 감소된 것으로 나타났다.

심장위험지수는 일반대조군에서  $2.31 \pm 0.51$ , 양성대조군에서  $1.60 \pm 0.50$ , 음성대조군에서  $1.96 \pm 0.10$ , 실험군에서  $1.68 \pm 0.02$ 으로 분석되었다 (그림 66). 동맥경화상관계수와 유사하게 Estradiol E2와 발효하수오복합물을 섭취한 2개 그룹에서 음성대조군의 수치에 비해 감소

된 것으로 나타났다.

관상동맥지수는 일반대조군에서  $1.64 \pm 0.58$ , 양성대조군에서  $0.80 \pm 0.52$ , 음성대조군에서  $1.19 \pm 0.13$ , 실험군에서  $0.92 \pm 0.003$ 으로 분석되었다 (그림 67). 동맥경화상관계수, 심장위험 지수와 유사한 패턴으로 Estradiol E2와 발효하수오복합물을 섭취한 2개 그룹에서 음성대조군의 수치에 비해 감소된 것으로 나타났다.

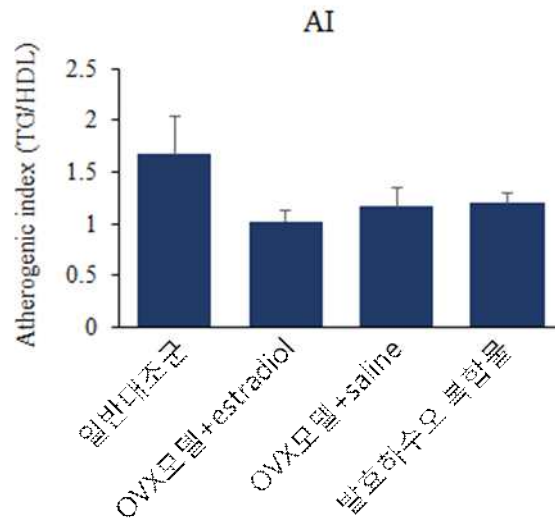


그림 64. Average atherogenic indexes of serum from the OVX rat fed saline, estradiol E2, and the sample for 50 days. The atherogenic index value was calculated as [Atherogenic index = TG/HDL]. The data are expressed as mean  $\pm$  SD. Control group (Non-OVX + normal diet); Positive control group (OVX + estradiol E2 (0.5 mg/kg/day)); Negative control group (OVX + saline); Experimental sample group (OVX + the sample (200 mg/kg/day)).

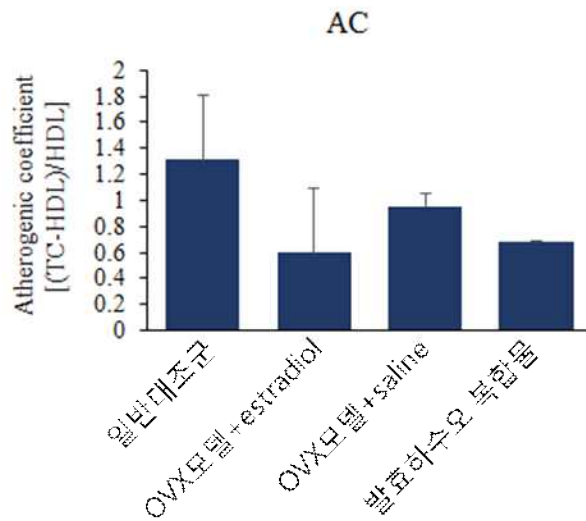


그림 65. Average atherogenic coefficients of serum from the OVX rat fed saline, estradiol E2, and the sample for 50 days. The atherogenic coefficient value was calculated as [Atherogenic coefficient = (TC-HDL)/HDL]. The data are expressed as mean  $\pm$  SD. Control group (Non-OVX + normal diet); Positive control group (OVX + estradiol E2 (0.5 mg/kg/day)); Negative control group (OVX + saline); Experimental sample group (OVX + the sample (200 mg/kg/day)).

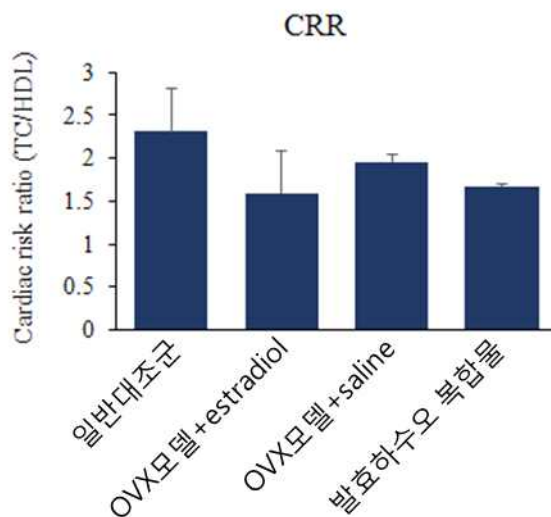


그림 66. Average cardiac risk ratio of serum from the OVX rat fed saline, estradiol E2, and the sample for 50 days. The cardiac risk ratio was calculated as [Cardiac risk ratio

= TC/HDL]. The data are expressed as mean  $\pm$  SD. Control group (Non-OVX + normal diet); Positive control group (OVX + estradiol E2 (0.5 mg/kg/day)); Negative control group (OVX + saline); Experimental sample group (OVX + the sample (200 mg/kg/day)).

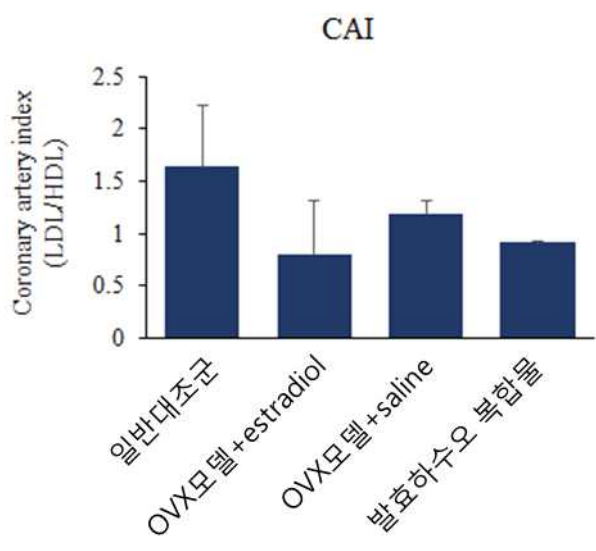


그림 67. Average coronary artery indexes of serum from the OVX rat fed saline, estradiol E2, and the sample for 50 days. The coronary artery index was calculated as [Coronary artery index = LDL/HDL]. The data are expressed as mean  $\pm$  SD. Control group (Non-OVX + normal diet); Positive control group (OVX + estradiol E2 (0.5 mg/kg/day)); Negative control group (OVX + saline); Experimental sample group (OVX + the sample (200 mg/kg/day)).

• 결론

선행연구를 통해 홍화자, 당귀, 속단, 오미자의 DPPH radical 소거능을 통한 항산화 효능과 alkaline phosphatase 유사활성을 통한 골대사 개선 효능이 확인되었다. 복합추출물은 아직 관련 논문이 없고 연구개발이 초기단계인 홍화자를 주요 소재로 선정하고 홍화자, 속단, 당귀, 오미자 소재를 7:1:1:1 비율로 발효하수오복합물을 제조하였다.

인간세포를 이용하여 각 추출물의 여성갱년기 개선 효능을 분석한 결과, 모든 추출물의 농도 100 $\mu$ g/ml 이하에서 MCF-7 세포생존율이 감소하지 않았으며, MCF-7 breast carcinoma cell에서 각 추출물의 estrogen 활성은 각각 다른 농도에서 estradiol(110%) > 속단(74%) > 홍화자(70%) > 오미자(55%) > 당귀(48%) 순서로 나타났다. 또한, 동일세포 내 에스트로겐 수용체 활성화는 estradiol(80%) > 속단(61%) > 홍화자(51%) > 오미자(44%) > 당귀(35%) 순서로 확인되었다.

난소제거 여성갱년기 백서모델을 이용하여 발효하수오복합물의 여성갱년기 개선 효능을 분석한 결과, 발효하수오복합물의 섭취는 여성갱년기 모델처치에 의한 체중증가를 68.08% 억제하였고 식이효율 증가를 84.73% 억제하였다. 발효하수오복합물의 섭취로 간, 비장, 신장 조직에서는 유의미한 변화를 보이지 않았지만 자궁-난소 조직의 중량을 19.56% 증가시켰으며, 자궁관을 구성하는 구성세포를 부분적으로 보호하였다. 발효하수오복합물의 섭취는 혈청 내 단백질을 변화시키지 못했으나 골대사 지표인 혈청 내 calcium 농도를 3.88% 증가시켰으며 ALP 활성을 10.28% 증가시켰다. 발효하수오복합물의 섭취로 여성호르몬인 estrogen을 163.66% 증가시켰으며, estradiol E2 호르몬을 91.14% 증가시켰고 성욕 관련 호르몬인 testosterone의 농도를 163.53% 증가시켰다. 발효하수오복합물의 섭취는 혈당을 변화시키지 못했고 간기능 지표인 AST 활성을 다소 증가시켰다. 발효하수오복합물의 섭취는 여성갱년기 모델처치에 의한 총 콜레스테롤의 증가를 88.24% 억제시켰으며 저밀도지단백 콜레스테롤을 18.06% 감소시켰고 고밀도지단백 콜레스테롤을 5.88% 증가시켰지만, 중성지방과 초저밀도지단백 콜레스테롤을 일반대조군의 농도와 유사한 수준으로 증가시켰다. 동맥경화지수, 동맥경화상관계수, 심장위험지수, 관상동맥지수의 4가지 지표는 난소제거 여성갱년기 백서모델에서 감소하는 경향을 보였으며, 발효하수오복합물의 섭취로 동맥경화상관계수, 심장위험지수, 관상동맥지수의 3가지 지표가 감소되었다.

따라서, 발효하수오복합물은 난소제거 여성갱년기 백서모델에서 체중증가 억제, 여성호르몬 증가, 자궁-난소 부분적 보호, 골대사 개선, 총 콜레스테롤 증가 억제, 혈액순환 개선을 통해 여성갱년기 증상 개선에 대한 효능을 기대할 수 있고 더 나아가 우수한 효능을 갖는 복합소재 및 기능성 제품 개발에 기반이 되는 data로 활용할 수 있을 것으로 판단된다.



바. 시제품 항산화활성 평가

1) Electron donating ability

하수오 발효복합물의 전자공여능을 측정한 결과는 그림 68과 같이 나타났다. 10 $\mu$ g/mL의 농도에서 2.8%의 전자공여능을 나타냈으며 50 $\mu$ g/mL의 농도에서는 27.5%의 전자공여능을 나타냈고, 100 $\mu$ g/mL의 농도에서는 각각 35.9%의 전자공여능을 나타내었다. 500 $\mu$ g/mL 농도에서는 전자공여능이 70.4%로 대조구인 vitamin C의 약 78%의 전자공여능을 나타내었고, 농도 의존적으로 전자공여능이 증가함을 확인하였다.

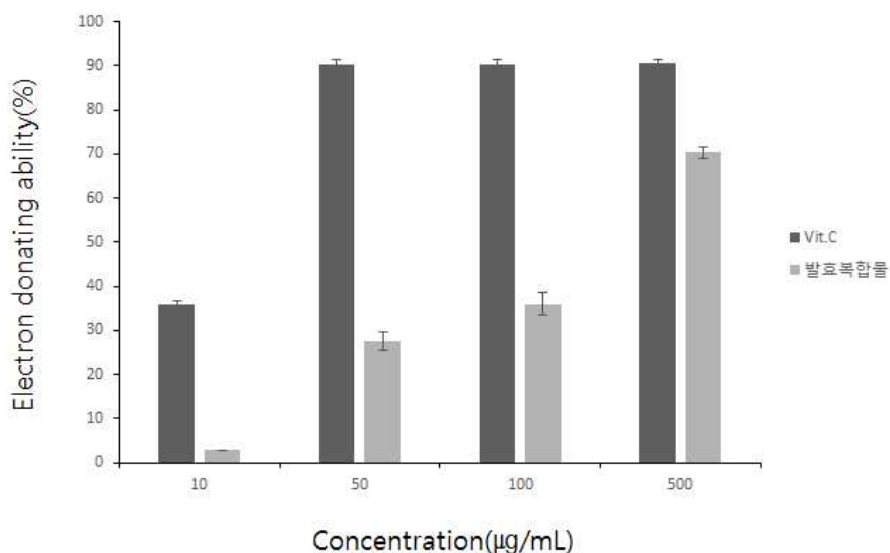


그림 68. Electron donating ability of the fermented compound from *Polygonum multiflorum*.

2) ABTS scavenging activity

ABTS 라디칼 소거능을 측정한 결과 그림 69와 같이 나타났다. 하수오 발효복합물은 10 $\mu$ g/mL의 농도에서 4.2%의 라디칼 소거능을 나타냈으며 50 $\mu$ g/mL의 농도에서는 21.6%의 라디칼 소거능을 나타내었다. 100 $\mu$ g/mL의 농도에서는 33.4%의 라디칼 소거능을 나타냈으며 500 $\mu$ g/mL의 농도에서는 67.4%로 대조구인 vitamin C 라디칼 소거능의 69%에 해당하는 라디칼 소거능을 나타내었다. 이에 하수오 발효복합물에서는 농도 의존적으로 ABTS 라디칼 소거능이 증가함을 확인하였다.

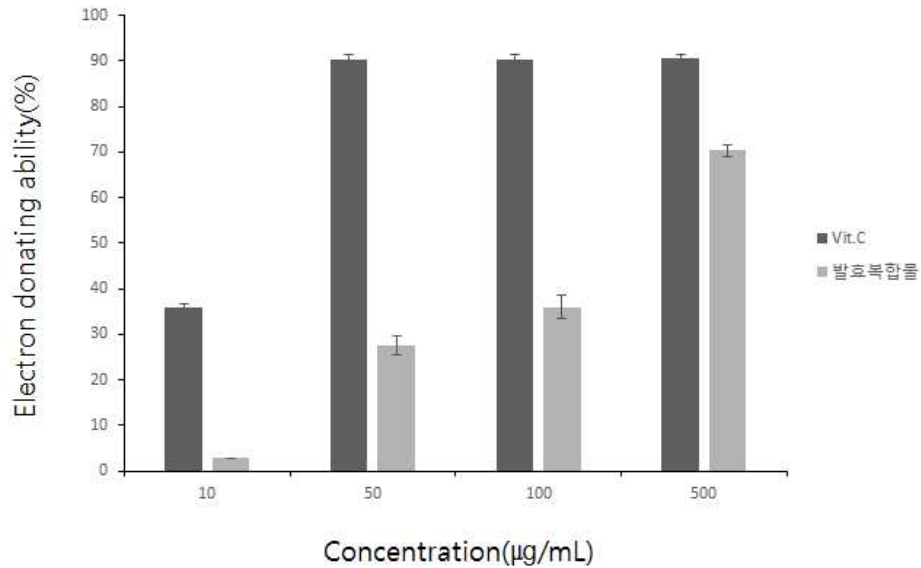


그림 69. The ABTS radical cation scavenging activity of the fermented compound from *Polygonum multiflorum*.

### 3) Total polyphenols 함량

하수오 발효복합물의 total polyphenols를 분석한 결과 표 20과 같다. 폴리페놀성 화합물은 식물계에 널리 분포되어 있는 2차 대사산물 중 하나로 다양한 구조와 분자량을 가지며, phenolic hydroxy기를 가지고 있으므로 단백질 및 기타 거대 분자들과 결합하는 성질을 나타낸다. 항산화 활성, 항암 및 항균 작용을 하는 생리활성 물질로 알려져 있으며, 대부분의 식물체들에서 항산화 활성을 나타내는 화합물이다.

표 20. The content of total polyphenols in the fermented compound from *Polygonum multiflorum*.

(mg%)	
Composition	fermented compound from <i>Polygonum multiflorum</i>
Total polyphenols	23.06 ± 0.17

사. 관능평가

관능검사 결과 향과 맛에서는 E 시험구가 가장 우수하였으며, 색은 E, F 시험구와 A 시험구에서 우수한 것으로 나타났다. 종합적 기호도에서는 E 시험구가 가장 우수하였으며, A 시험구, F 시험구의 관능검사 결과도 양호한 것으로 나타났다. 관능검사 결과 발효하수오복합음료의 기호도는 향미를 보정 및 유용성분 복합을 위하여 첨가한 홍화자, 속단, 당귀 및 오미자의 첨가비율의 영향이 큰 것으로 보인다. 따라서 시료구 중 관능검사 결과가 가장 우수하게 나타난 E 시험구를 최종 배합비율로 선정하였다.

표 21. 관능검사 결과

	향	맛	색	기호도
A	5.3±1.1 <sup>ab</sup>	5.3±0.8 <sup>bc</sup>	6.0±0.9 <sup>b</sup>	5.6±0.7 <sup>ab</sup>
B	5.0±0.9 <sup>a</sup>	4.6±1.0 <sup>ab</sup>	5.7±1.0 <sup>ab</sup>	4.9±0.7 <sup>a</sup>
C	5.6±0.8 <sup>ab</sup>	5.0±0.8 <sup>ab</sup>	5.8±1.1 <sup>ab</sup>	5.4±0.7 <sup>ab</sup>
D	4.9±0.8 <sup>a</sup>	4.7±1.2 <sup>ab</sup>	5.6±1.0 <sup>ab</sup>	5.2±0.6 <sup>ab</sup>
E	6.1±0.9 <sup>b</sup>	6.1±1.3 <sup>c</sup>	6.6±1.0 <sup>ab</sup>	6.1±0.4 <sup>b</sup>
F	5.2±1.1 <sup>ab</sup>	5.4±1.0 <sup>b</sup>	6.1±1.0 <sup>b</sup>	5.6±0.5 <sup>ab</sup>
G	4.9±1.0 <sup>a</sup>	5.4±1.1 <sup>b</sup>	5.6±1.0 <sup>ab</sup>	5.4±0.9 <sup>ab</sup>

A~G : 재료 및 방법 원료 혼합비율 표 참조

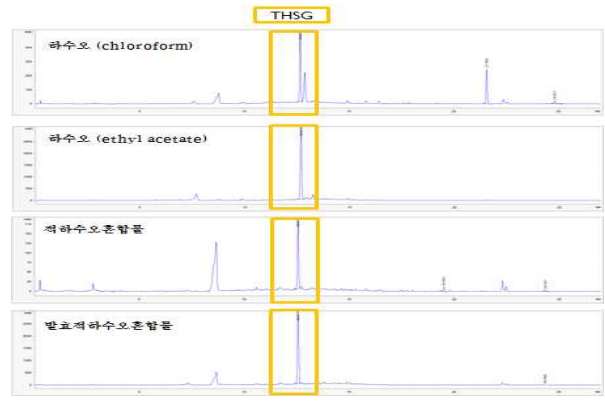
아. 안정성

1) 저장기간 안정성

실험 결과보고서 요약			
제목	"살기가는 하수오"의 유통기한 설정실험		
실험구분	차제실험( ) 피피실험( ○ )		
실험기간	2017년 02월 14일 ~ 2017년 08월 18일		
실험인원	임소영	동부생약 양동조함명인	대표자 홍 세 희
	주소	경라남도 순천시 해룡면 여술로 1679	연락처 061-752-9004
실험수행기관	기관명	(주)한국식품정보원	대표자 이 상 호
	주소	대전광역시 유성구 반석동 638-5 웰지코아 10층	연락처 042-822-6850
실험 참여자	책임자 나 세 진	연구원 일 세 영	
실험결과	요 약		
	◆유통기한 설정결과		
	식품유형	품질지표	0차 유통기한 일(월)
	백상차	일반산	-
		대장균군	-
pH		-	
관능검사		808.16일(18.84월)	
		1차 유통기한 일(월)	
		117.18일(30.29월)	
실험에 의한 유통기한: 503.16일 (16.54개월)			
실은 유통시 최종 유통기한 : 16.54 × 0.8 = 13.23 ≈ 13개월 (503.16 × 0.8 = 402.53 ≈ 403일)			

2) 지표성분 안정성 요약

하수오 지표물질로 알려진 2,3,5,4'-tetrahydroxystilbene-2-O-β-D-glucoside 분석결과 버섯균사체발효하수오를 포함하여 하수오가 첨가된 시험구에서 검출량이 두드러지게 확인되었다. 따라서 하수오 지표물질의 안정성이 확인되었다.



자. 수행성과

1) 특허출원 및 등록

### 특허 출원서

(표고버섯 균사체를 이용하여 발효시킨 적하수오 발효물을 유효성분으로 함유하는 여성 갱년기 증상의 예방, 개선 또는 치료용 조성물)

출원번호통지서

페이지 1 / 4

## 관인생략 출원번호통지서

**출원 일자** 2016.12.29

**특기사항** 심사청구(무) 공개신청(무)

**출원 번호** 10-2016-0182689 (접수번호 1-1-2016-1292312-34)

**출원인 명칭** 재단법인 장흥군버섯산업연구원(1-2008-016273-0) 외 1명

**대리인 성명** 최규환(9-2005-001504-0)

**발명자 성명** 서경순 김경재 진성우 반승언 고영우 임승빈 정상득 홍재희  
홍성은 홍성민 홍기성 박태영 오준석

**발명의 명칭** 표고버섯 균사체를 이용하여 발효시킨 적하수오 발효물을 유효성분으로 함유하는 여성 갱년기 증상의 예방, 개선 또는 치료용 조성물

## 특 허 청 장

<< 안내 >>

1. 귀하의 출원은 위와 같이 정상적으로 접수되었으며, 이후의 심사 진행상황은 출원번호를 통해 확인하실 수 있습니다.
2. 출원에 따른 수수료는 접수일로부터 다음날까지 통보된 납입명수증에 성명, 납부자번호 등을 기재하여 가까운 우체국 또는 은행에 납부하여야 합니다.  
※ 납부자번호 : 0131(기관코드) + 접수번호
3. 귀하의 주소, 연락처 등의 변경사항이 있을 경우, 즉시 [특허고객번호 정보변경(경정), 정정신고서]를 제출하여야 출원 이후의 각종 통지서를 정상적으로 받을 수 있습니다.  
※ 특허로(patent.go.kr) 접속 > 민원서비스다운로드 > 특허법 시행규칙 별지 제5호 서식
4. 특허(실용신안등록)출원은 명세서 또는 도면의 보정이 필요한 경우, 등록결정 이전 또는 의견서 제출기간 이내에 출원서에 최초로 첨부된 명세서 또는 도면에 기재된 사항의 범위 안에서 보정할 수 있습니다.
5. 외국으로 출원하고자 하는 경우 PCT 제도(특허·실용신안)나 마드리드 제도(상표)를 이용할 수 있습니다. 국내출원일을 외국에서 인정받고자 하는 경우에는 국내출원일로부터 일정한 기간 내에 외국에 출원하여야 우선권을 인정받을 수 있습니다.  
※ 제도 안내 : <http://www.kipo.go.kr>-특허마당-PCT/마드리드  
※ 우선권 인정기간 : 특허·실용신안은 12개월, 상표·디자인은 6개월 이내  
※ 미국특허상표청의 선출원을 기초로 우리나라에 우선권주장출원 시, 선출원이 미공개상태이면, 우선일로부터 16개월 이내에 미국특허상표청에 [전자적교환허가서(PTO/SB/39)]를 제출하거나 우리나라에 우선권 증명서류를 제출하여야 합니다.
6. 본 출원사실을 외부에 표시하고자 하는 경우에는 아래와 같이 하여야 하며, 이를 위반할 경우 관련법령에 따라 처벌을 받을 수 있습니다.  
※ 특허출원 10-2010-0000000, 상표등록출원 40-2010-0000000

**특허 등록**

(표고버섯 균사체를 이용하여 발효시킨 적하수오 발효물을 유효성분으로 함유하는 여성 갱년기 증상의 예방, 개선 또는 치료용 조성물)

**특허증**  
CERTIFICATE OF PATENT



**특허** 제 10-1806808 호  
Patent Number

**출원번호** 제 10-2017-0087642 호  
Application Number

**출원일** 2017년 07월 11일  
Filing Date

**등록일** 2017년 12월 04일  
Registration Date

발명의 명칭 Title of the Invention

표고버섯 균사체를 이용하여 발효시킨 적하수오 발효물을 유효성분으로 함유하는 여성 갱년기 증상의 예방, 개선 또는 치료용 조성물

특허권자 Patentee

등록사항란에 기재

발명자 Inventor

등록사항란에 기재

위의 발명은 「특허법」에 따라 특허등록원부에 등록되었음을 증명합니다.

This is to certify that, in accordance with the Patent Act, a patent for the invention has been registered at the Korean Intellectual Property Office.



**특허청**  
Korean Intellectual  
Property Office

2017년 12월 04일

**특허청장**  
COMMISSIONER,  
KOREAN INTELLECTUAL PROPERTY OFFICE

성 문 보

## 특허 출원서

(복합 발효 하수오 추출물과 한약재 추출물을 이용한 갱년기 증상 개선용 음료의 제조방법)

### 관인생략 출원번호통지서

출원일자 2018.02.13  
특기사항 심사청구(무) 공개신청(무)  
출원번호 10-2018-0017433 (접수번호 1-1-2018-0155037-04)  
출원인명칭 동부생약 영농조합법인(1-2011-014581-9) 외 1명  
대리인성명 최규환(9-2005-001504-0)  
발명자성명 서경순 김경재 진성우 반승연 고영우 임승빈 하늘이 홍재희 홍성은 홍성민  
홍기성 박태영 오준석  
발명의명칭 복합 발효 하수오 추출물과 한약재 추출물을 이용한 갱년기 증상 개선용  
음료의 제조방법

## 특 허 청 장

<< 안내 >>

1. 귀하의 출원은 위와 같이 정상적으로 접수되었으며, 이후의 심사 진행상황은 출원번호를 통해 확인하실 수 있습니다.
2. 출원에 따른 수수료는 접수일로부터 다음날까지 동봉된 납입영수증에 성명, 납부자번호 등을 기재하여 가까운 우체국 또는 은행에 납부하여야 합니다.  
※ 납부자번호 : 0131(기관코드)+ 접수번호
3. 귀하의 주소, 연락처 등의 변경사항이 있을 경우, 즉시 [특허고객번호 정보변경(경정), 정정 신고서]를 제출하여야 출원 이후의 각종 통지서를 정상적으로 받을 수 있습니다.  
※ 특허로(patent.go.kr) 접속 > 민원서식다운로드 > 특허법 시행규칙 별지 제5호 서식
4. 특허(실용신안등록)출원은 명세서 또는 도면의 보정이 필요한 경우, 등록결정 이전 또는 의견서 제출기간 이내에 출원서에 최초로 첨부된 명세서 또는 도면에 기재된 사항의 범위 안에서 보정할 수 있습니다.
5. 외국으로 출원하고자 하는 경우 PCT 제도(특허·실용신안)나 마드리드 제도(상표)를 이용할 수 있습니다. 국내출원일을 외국에서 인정받고자 하는 경우에는 국내출원일로부터 일정한 기간 내에 외국에 출원하여야 우선권을 인정받을 수 있습니다.  
※ 제도 안내 : <http://www.kipo.go.kr-특허마당-PCT/마드리드>  
※ 우선권 인정기간 : 특허·실용신안은 12개월, 상표·디자인은 6개월 이내  
※ 미국특허상표청의 선출원을 기초로 우리나라에 우선권주장출원 시, 선출원이 미공개상태이면, 우선일로부터 16개월 이내에 미국특허상표청에 [전자적교환허가서(PTO/SB/39)]를 제출하거나 우리나라에 우선권 증명서류를 제출하여야 합니다.
6. 본 출원사실을 외부에 표시하고자 하는 경우에는 아래와 같이 하여야 하며, 이를 위반할 경우 관련법령에 따라 처벌을 받을 수 있습니다.  
※ 특허출원 10-2010-0000000, 상표등록출원 40-2010-0000000
7. 종업원이 직무수행과정에서 개발한 발명을 사용자(기업)가 명확하게 승계하지 않은 경우, 특허법 제62조에 따라 심사단계에서 특허거절결정되거나 특허법 제133조에 따라 등록이후에 특허무효사유가 될 수 있습니다.
8. 기타 심사 절차에 관한 사항은 동봉된 안내서를 참조하시기 바랍니다.











## 논문(국내 비SCI) 2건 (심사중)

### 심사진행현황상세



#### ● 논문정보

논문번호	J1_201700056
학술지명	한국버섯학회지
제목	반응표면 분석법에 의한 표고균사체발효 적하수오 열수 추출조건의 최적화

#### ● 심사기록

차수	제출일	접수일	편집위원선정일	심사위원선정일	심사일	심사결과	총평일	총평결과
1	20171208	20171211	20171212	20171212	20180110	심사의견서	20180110	수정후 게재
				20171212	20171226	심사의견서		
				20171212	20171219	심사의견서		
2	20180120	20180131	20180131					

닫기

접수번호	논문제목	투고자/ 교신저자	납부현황		심사결과	논문현황
			심사료	게재료		
2018-01-17-00001 (2018-01-17)	[1차심] 건조방법에 따른 적하수오 (Polygonum multiflorum Thunberg)의 이화학적 성분	[투고] 서경순 [교신] 서경순	미납 납부하기	미납		심사위원추천
<div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">↓</div>						
<div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;">종합현황</div>						

4) 홍보 및 마케팅

하수오 홍보  
(명절 선물 세트 홍보)



- 뉴스
- 중도TV
- 전국
- 오피니언
- 비주일
- 맛글리
- E소포츠
- PDF

현재위치 : 홈 > 전국 > 광주/호남

전남산 청정 임산물로 설 준비하세요

입력 2017.01.25 22:33

기사 보기 | N:99 Link | Facebook | Tweet | Google+ | BAND | Print

전라남도가 설을 맞아 지역 생산 임산물 보호 및 소비 촉진을 위한 임산물 수급 안정대책을 추진한다고 23일 밝혔다.



설 제수품인 밤, 굴, 잣 등의 가격 등락을 상시 파악하고, 산림조합, 지역 생산자단체 등과 협력체계를 통해 품목별 수요량에 맞춰 가격 폭동에 대응할 계획이다.

특히 수입 임산물을 국산으로 표기하는 부정 유통행위를 근절하기 위해 26일까지 4일간 시군, 농산물품질관리청, 읍·면사무소와 합동단속을 집중 추진, 적발 시 고발 또는 행정처분을 엄정하게 하기로 했다.

설을 맞아 전남 우수 임업인들이 산지에서 생산한 임산물과 선물세트는 쇼핑몰과 지역로컬푸드 등을 통해 판매된다.

남나루 주산지의 광양에서 유기농 명인으로 지정된 방성호(62) 씨는 8.6ha 규모의 산지에서 생산한 밤을 친환경 유기농 인증을 받아 두레생협연합(www.ecoop.or.kr/shop) 쇼핑몰을 통해 1kg당 6천 원에 판매한다.

전국 최고 밭음료 주산지인 영암의 김성윤(67) 씨는 지난해 농림부가 주관한 '대한민국 대표과일 선밭대회'에서 우수상을 수상한 감으로 곶감을 생산해 자체쇼핑몰(www.kimsfarm.net)을 통해 5만 원(20개)에 판매한다.

표고버섯의 품고장인 장흥의 김순규(53) 하늘표고 대표는 경북 나루와 소나무가 어우러진 8ha 규모의 자연환경에서 생산한 '원목 표고버섯'을 2만~5만 원 선의 김명란비 상품을 개발해 정남진장흥농협쇼핑몰, G마켓, 옥션과 홈플러스, 롯데백화점 광주점 등을 통해 판매한다.

광의적인 아이디어와 임업의 6차산업화로 농림수산식품부 신지식농업인으로 선정된 홍재희(62) 순천 동부생약영농조합법인 대표는 자체쇼핑몰(www.dbherbal.kr)을 통해 볏대백화점 광주점이 5만 원(250g) 등 건강기능식품을 판매한다.

전남도 전라남도 산림산업과장은 "밤, 굴, 잣 등 제수품을 비롯해 표고, 향균 등 청정 임산물 수급에 최선을 다할 계획"이라며 전남 우수 임산물에 대한 관심과 구매를 당부했다.

이 기사를 보려면

- 톱뉴스
- 정치
- 사회
- 경제
- 서군별뉴스
- 문화
- 의식
- 교육
- 연예
- 오피니언
- 박상수 칼럼
- 서석대
- 전일칼럼
- 데스크 칼럼
- 취재수첩
- 사설
- 전일시론
- 기고
- 세상을 바꾸는 첫걸음

전남 임산물 설상품 판매

입력시간 : 2017. 01.24. 00:00

전남도는 설을 맞아 지역 생산 임산물을 보호 및 소비 촉진을 위한 임산물 수급 안정대책을 추진한다고 23일 밝혔다.

우수 임업인들이 생산한 임산물과 선물세트는 쇼핑몰과 지역로컬푸드 등을 통해 판매된다.

광양 유기농 명인 방성호(62)씨는 유기농 인증 밤을 두레생협연합(www.ecoop.or.kr/shop) 쇼핑몰을 통해 판매(1kg · 6000원)한다. 영암 주산지인 영암 김성윤(67)씨는 지난해 농식품부가 주관한 '대한민국 대표과일 선밭대회'에서 우수상을 수상한 감으로 곶감을 생산해 자체쇼핑몰(www.kimsfarm.net)을 통해 판매(20개 · 5만원)한다.

장흥 김순규(53) 하늘표고 대표는 '원목 표고버섯'(2만~5만원)을 김명란비 상품으로 개발해 정남진장흥농협 쇼핑몰 · G마켓 · 옥션과 홈플러스, 롯데백화점 광주점 등을 통해 판다. 임업 6차산업화로 농식품부 신지식농업인으로 선정된 홍재희(62)순천 동부생약영농조합법인 대표는 자체쇼핑몰(www.dbherbal.kr)을 통해 적하수오(250g · 5만원) 등 건강기능식품을 판매한다. 노병 기자

全南日報

- 이슈&쟁점
- 피플
- 주말&
- 스포츠
- 커뮤니티
- 지면보기

?  
여안경, 불편한눈보기 완전해방! nunsarang.net

로그인 | 회원가입



광주·전남 대표 정론지

무등일보

뉴스센터

무등TV

테마뉴스

주말&산책

문화수도

오피니언

지면보기

무등일보 PDF 지면보기 · 지면 신문보기와 스크



## 편의점 앞 머뭇거리는 아이

WorldVisionKorea

편의점 앞에서 머뭇거리는 아이들을 보신 적(

### 뉴스센터

- 탐뉴스
- 정치
- 지방자치
- 경제
- 지방경제
- 사회
- 국제
- 문화
- 전남뉴스
- 구청뉴스
- 오피니언
- 사람과생활

## 전남 선도임업인을 찾아서 1.순천 동부생약영농조합법인 홍재희 대표

입력시간 : 2016 12 21, 00:00



홍재희 대표가 자체 연구소에서 각종 생약초를 원료로 개발한 기능성식품을 소개하고 있다.

신규 임업인, 귀농귀촌인을 대상으로 수년간 축적된 재배 기술과 경영 노하우 전수를 통해 임업·산촌의 새로운 도약을 꿈꾸고 있는 이들이 있다. 바로 전남지역 산림분야 우수 경영인들로 구성된 선도임업인협의회다. 지난해 11월 결성된 선도임업인회는 약용·약초류, 버섯류, 수산물, 산채류, 관상산림식물류, 산림자원 등 6개 분야의 신지식인 27명으로 구성됐다. 연간 소득액 1억원 이상의 고소득자와 신규 유망품목 재배자들이다. 이들은 자신들의 임산물 재배기술과 경영노하우, 임산물 생산·가공 유통분야 성공사례를 통해 전남지역 임업인의 수익창출과 권익실현을 위해 앞장서고 있다. 이에 본보는 귀농귀촌인 정착과 국내산림

산업발전에 기여하고 있는 각 분야별 선도임업인들의 성공사례를 소개하는 연중기획시리즈를 마련했다. 편집자주

하수오 홍보  
(귀촌 농어민대상 하수오 교육)

서영대학교 SEOYOUNG UNIVERSITY | 사랑방 NEWSIS | 광주·전남 대표 정문지 | **무등일보**

뉴스센터 | 무등TV | 테마뉴스 | 주말&산책 | 문화수도 | 오피니언 | 지면보기

담뉴스 · 정치 · 지방자치 · 경제 · 지방경제 · 사회 · 국제 · 문화 · 전남뉴스 · 구청뉴스 · 오피니언 · 사랑과생활

경희사이버대학교 KYUNG HEE CYBER UNIVERSITY | 2018학년도 1학기 **신·편입생 모집** | 학 부 2018.1.29(월) | KHCU 배

- 뉴스센터
- 담뉴스
  - 정치
  - 지방자치
  - 경제
  - 지방경제
  - 사회
  - 국제
  - 문화
  - 전남뉴스
  - 구청뉴스
  - 오피니언
  - 사랑과생활

예비 귀산촌인 정착 돕는다

입력시간 : 2017. 08. 28. 00:00

무, 정기집에 아카데미 운영

전남보가 미래 산출을 이끌 예비 귀산촌 입촌자의 성공 정착에 도움을 주기 위해 한국입업진흥원과 협업해 처음으로 '귀산촌 아카데미' 과정을 전라남도농업기술원에 개설했다.

전남보는 그동안 귀촌 중심의 방송 프로그램에서 벗어나 귀산촌 정착을 위한 전문프로그램의 필요성이 제기됨에 따라 각 시군 농업기술센터에서 예비 귀산촌인 80명을 대상으로 28일부터 2일간 아카데미를 실시한다고 27일 밝혔다.

이번 아카데미에서는 귀촌에 필요한 심정적 도움을 주기 위해 귀촌인 창업전략, 현충실 프로그램, 맞춤형 민간인입산률 재해 무상 등 귀촌에 필요한 다양한 정보를 제공한다.

귀촌에 성공한 이상규 전남보신문편집인협회 사무국장이 김철광을 주제로 산출정착 사례를 발표하고, 입산률의 8차산업화에 관해서도 있는 출제후 불부생각업(전라남도) 대표가 산출정착 민간인입산률 무용구들의 생생한 정보를 발표했다.

전남보는 아카데미 수료 후 예비 귀촌인의 성공적 정착을 돕기 위해 전남보신문편집인과 귀촌인 간 멘토-멘티를 맺도록 유도할 예정이다.

무 귀촌 시경은 주민과의 갈등에 원활히 대처하도록 사민합인 협력산출정보 멘토링을 맞아 안철호 귀산촌 정착을 이어가도록 지속 지원한다는 방침이다.

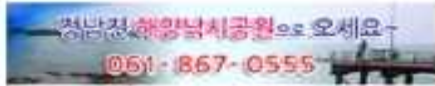
특정론 전남보 산출정착과장은 "이번 산출을 통해 전문가 멘토링이 안철호 산출 정착에 도움이 될 것"이라며 "귀산촌 프로그램을 확대하고 산출수요 생산 기반을 지원해 예비 귀산촌인이 정기에 정착하도록 해 전남의 인구 불리기 정착에 보탬이 되도록 하겠다"고 말했다. 김철광기자

1 X

**반**  
**장**

**도**  
**장**

홍보  
(기술이전 홍보)



홈 > 뉴스 > 경제

## 장흥군버섯산업연구, 표고버섯 발효특허 기술이전

동부생약영농조합에 보유 특허 기술이전

김순홍 기자 | momo6619@naver.com

승인 2018.01.31 11:10:51



장흥군버섯산업연구원(원장 재해신)은 전남도내 한약재 가공·유통회사인 동부생약영농조합(대표 홍재희)과 보유 특허에 대한 기술이전계약을 체결했다.

이날 체결식에는 장흥군버섯산업연구원 재해신 원장, 동부생약영농조합 홍재희 대표와 기술이전을 중계한 전남테크노파크 이경관 기업지원단장 등 관계자 20여명이 참석했다.

이번에 이전한 기술은 '표고버섯 균사체를 이용하여 발효시킨 적하수오 발효물을 유효성분으로 함유하는 여성 갱년기 증상의 예방과 개선 또는 치료용 조성물'에 관한 특허기술로 장흥군버섯산업연구원에서 지난 2년간 농림축산식품부의 '고부가가치 식품개발사업'으로 연구한 결과물이다.

이 기술은 갱년기 증상에 효능이 있다고 알려진 하수오와 면역력 향상 물질이 다량 함유되어 있는 표고버섯을 발효시켜 두 소재의 기능성은 향상 시키고, 인체 내 자극성은 감소시켜 다양한 식의약품 소재로 활용할 수 있다. 특히 장흥군의 특산물인 표고버섯을 원료로 사용함에 따라 재배농가의 소득향상과 부가가치 창출이 기대된다.

재해신 장흥군버섯산업연구원장은 "최근 들어 연구원에서 개발한 특허기술이 ㈜현연소라 등 지역 산업체에 활발하게 이전되고 있다"며, "이번 기술이전을 통해 우리군에서 생산된 표고버섯의 새로운 활용가능성이 모색되어 생산·가공·유통으로 이어지는 6차산업으로 활성화될 것이다"는 기대감을 나타냈다.

<저작권자 © 장강뉴스 무단전재 및 재배포금지>

5) 박람회 참가

김해 6차산업 박람회



산림청 산림바이오 비즈포럼



서울 국제박람회



광주국제식품전



미국 수출지원 파견단 참석



미국 현지 바이어 미팅







베이징

베이징 현지 바이어 미팅



두바이



두바이 현지 바이어 미팅



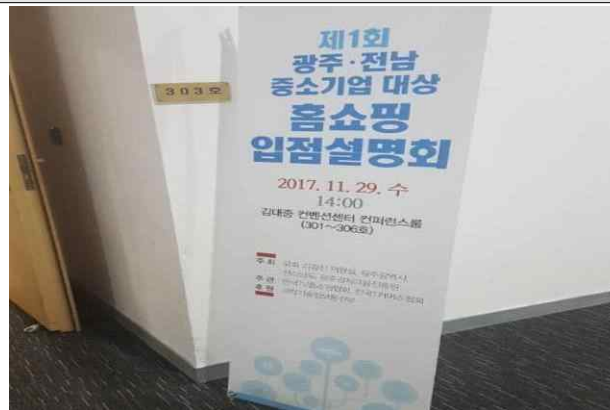
인도네시아



인도네시아 MOU 협약



광주·전남 중소기업 대상 홈쇼핑 입점설명회



전라남도공고 2018- 102호

## 전남 중소기업 제품 홈쇼핑 판매지원사업 신청 공고

전라남도는 도내 중소기업 제품의 홈쇼핑 방송판매 입점 지원을 위해 아래와 같이 「2018 전남 중소기업제품 홈쇼핑 판매지원 사업」을 추진하니 희망하시는 업체는 기한 내 신청하여 주시기 바랍니다.

### ■ 사업개요

- 사업명 : 「2018 전남 중소기업제품 홈쇼핑 판매지원 사업」
- 사업기간 : 2018. 2. ~ 10. 31
- 사업주체 : 전라남도 경제과학국 중소기업과
- 위탁수행 : 중소기업중앙회 광주전남 지역본부
- 사업내용 : TV홈쇼핑(홈&쇼핑) 1회 방송 입점 지원
- 사업대상 : 전라남도에 본사 또는 공장이 있는 중소기업이 생산한 제품

#### ● 제외대상

- 성인용품, 주류 등은 홈쇼핑을 통해 판매 불가
- 방송중 시연이 불가능한 상품 배제  
(고객의 관심 및 구매욕구를 자극할 수 없으므로 방송을 통한 판매 불가)
- 상품 포장에 표기된 문구나 성분이 일치하지 않거나, 입증할 수 없는 상품 배제
- 부피가 지나치게 커지거나, 상품 보관상의 문제가 발생하는 상품은 배제

- 방송(선정)기업수 : 9개 기업 \* 기업수는 방송사와 협의에 따라 변경될 수 있음
- 대상 TV홈쇼핑 : 홈&쇼핑(중소기업 전용 홈쇼핑)
- 방송시기(예정) : 2018년 4월 ~ 10월
- 지원사항 : 업체당 입점수수료 2,200만원(전라남도 50%, 중소기업중앙회 50%)  
※ 업체 부담 : 판매액의 8%(판매 직접비)
- 방송조건 : 1회(30분) 방송 \* 방송사와 협의에 따라 변경될 수 있음
- 지원대상업체 선정 : ①서류심사(1차 선정), ②선정위원회(2차 선정)  
※ 선정업체 발표는 업체별 개별 공지

[붙임 2]

홈&쇼핑 입점 희망 제안서

신청일자	2018. 01. 25.	협동조합(단체) 명	동부생약영농조합법인	
기업명	동부생약영농조합	대표자	성명	
			HP	
			E-mail	
주소	전라남도 순천시 해룡면 여순로 1679			
업종	❶ 식품, ❷ 이미용(화장품), ❸ 주방용품, ❹ 주방가전, ❺ 아동, ❻ 잡화, ❼ 족욕, ❽ 생활용품, ❾ 패션, ❿ 레포츠, ⓫ 침구, ⓬ 가구, ⓭ 주얼리, ⓮ 기타(     )			
전화번호		팩스		
설립연도	2007.02.01.	임직원수	9	
전년도 매출액	1,400,000,000	수출여부	무	
업체담당자	직위	성명	HP	E-mail

at센터 바이어 미팅(KOTRA)

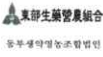


킨텍스(농촌실용화재단\_유통전문가 미팅)




실적내용	총수행기간 실적	내용
국내 박람회	7	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 친환경유기농박람회</li> <li>- 광주 국제 식품전</li> <li>- 부산 유기농 귀농귀촌박람회</li> <li>- 부산 국제식품대전</li> <li>- 서울 국제박람회</li> <li>- 오송 비즈포럼 박람회</li> <li>- 김해 6차산업 박람회</li> </ul>
국외 박람회	7	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 베트남 하노이 박람회 참석</li> <li>- 베트남 한국상품전 참석</li> <li>- 미주 수출지원단 파견</li> <li>- 중국베이징박람회 참석</li> <li>- 두바이 박람회 참석</li> <li>- 태국국제박람회 참석</li> <li>- 동남아 2차 파견기업 3개국 참석</li> </ul>
수출지원사업 참석	9	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 광주전남 중소기업 홈쇼핑 참석</li> <li>- 지역우수상품 품평·상담회 참석</li> <li>- 무역협회 수출기업상담회 참석</li> <li>- 호남소재 유망 제조업체 수출상담회</li> <li>- 전남생물산업진흥원 사업화 지원사업 설명회 참석</li> <li>- 수출지원기반활용사업 설명회 참석</li> <li>- 미얀마 수출상담회 참석</li> <li>- 홈쇼핑MD 광주광역시 경제고용진흥원 참석</li> <li>- 판로지원MD 상담회 참석</li> </ul>
온라인 판매망 구축	2	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 동부생약 홈페이지 제작</li> <li>- 동부생약 온라인 판매 구축(1,000만원 자사 지출)</li> </ul>
지역네트워크 구축	1	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 구례약산농업회사법인</li> </ul>
성과	4	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 6차산업 제품 경쟁력강화사업 선정</li> <li>- 6차산업 선정</li> <li>- 신지식인장선정</li> <li>- KOTRA 수출 첫걸음 선정</li> </ul>
지적재산권	2	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 출원 1건</li> <li>- 등록 1건</li> </ul>

6) MOU



**업무 협약서**

동부성남농조조합법인



구래약산농업회사법인

**[제1조] 목적**

"동부성남농조조합법인"과 "구래약산농업회사법인" (이하 "양 기관")은 상호 간 업무협력과 정보공유를 통한 지역특화산업의 경쟁력 제고 및 협력체계를 구축함으로써 양 기관의 발전에 기여한다는 점에 인식을 같이 하고 다음과 같은 사항에 대하여 협약한다.

**[제2조] 협약내용**

양 기관은 각자 적용 가능한 범위 내에서 공동의 목적을 달성하기 위하여 다음과 같은 분야에 대하여 상호 협조한다.

가. 관련 기술 분야 공동연구 및 개발  
 나. 지역특화산업 발전을 위한 공동 협력 사업 발굴  
 다. 연구장비 공동활용사업  
 라. 공동 마케팅  
 마. 사업 수행을 위한 연계활동  
 바. 기타 양 기관의 발전을 위하여 필요하다고 인정되는 사업

**[제3조] 협약의 운영**

이 협약서의 시행에 필요한 사항이나 조건은 양 기관이 협의하여 운영한다.

**[제4조] 비밀유지**

양 기관은 상호교류를 통하여 취득한 상대방의 비밀사항을 제3자에게 제공하거나 공개하지 아니한다.

**[제5조] 협약의 효력**

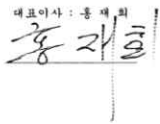
이 협약서의 효력은 서명일로부터 발생하며, 양 기관의 협의에 따라 협약 내용을 수정하거나 폐기할 수 있다.

이상의 협약을 증명하기 위하여 협약서는 2부를 작성하여 양 기관이 각각 1부씩 보관한다.

**2017년 1월 21일**

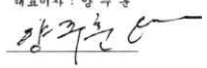
동부성남농조조합법인

대표이사 : 홍재희



구래약산농업회사법인

대표이사 : 양주홍



타. 사업화성과 및 매출실적  
- 사업화 성과

항목	세부항목			성 과
사업화 성과	매출액	개발제품	개발후 현재까지	0억원
			향후 3년간 매출	10억원
		관련제품	개발후 현재까지	3억원
			향후 3년간 매출	10억원
	시장 점유율	개발제품	개발후 현재까지	국내 : % 국외 : %
			향후 3년간 매출	국내 : 30 % 국외 : 20 %
		관련제품	개발후 현재까지	국내 : 30 % 국외 : %
			향후 3년간 매출	국내 : 30 % 국외 : 20 %
	세계시장 경쟁력 순위	현재 제품 세계시장 경쟁력 순위		4위
		3년 후 제품 세계 시장경쟁력 순위		2위



- 사업화 계획 및 매출실적

항 목	세부 항목	성 과			
사업화 계획	사업화 소요기간(년)	대량생산 시스템 구축예정(2년 이내)			
	소요예산(백만원)	150			
	예상 매출규모 (억원)	현재까지	3년후	5년후	
			10	15	
	시장 점유율	단위(%)	현재까지	3년후	5년후
		국내	10	30	50
국외			20	30	
	향후 관련기술, 제품을 응용한 타 모델, 제품 개발계획	시장 확인 후 건강기능식품 변경(OEM생산) 유무 판단 예정			
무역 수지 개선 효과	(단위: 억원)	현재	3년후	5년후	
	수입대체(내수)				
	수 출				

- 본 제품의 우수성

‘생기가든하수오스틱’은 표고버섯 균사체를 이용하여 발효시킨 적하수오 발효물을 유효성분으로 함유하는 여성갱년기 증상의 예방, 개선 또는 치료용 조성물에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 표고버섯 균사체를 이용하여 발효시킨 적하수오 발효물은 에스트로겐 수용체를 포함하고 있는 유방암 세포(MCF-7)에 처리하였을 때, 세포증식률을 크게 증가시키며, 적하수오에 대비하여 세포독성이 현저하게 낮으므로 여성갱년기 질환의 예방, 개선 또는 치료를 위한 안전한 기능성 식품 및 의약품으로 유용하게 이용될 수 있는 부분을 인정받아 특허 등록됨. 또한 여러 가지 표고버섯 균사체를 활용하여 적합한 종을 사용하였으며, 표고버섯균사체 증식에 알맞은 입도, 탄소원 및 질소원을 검증하여 최적의 환경을 확립하여 타 제품에 비하여 높은 경쟁력을 갖추고 있음.

- 제품의 안정성과 산업화 전략

제품의 안정성(유통기한설정)은 품질지표로 일반세균, 대장균군, 대장균, pH 및 관능검사를 설정하여 진행하며, 미생물과 이화학 실험은 식품공전에 준하여 실시하고, 관능은 식품의 유통기한 설정 실험가이드라인에 준하여 실시함. 실험 조건은 저장온도 15℃, 25℃, 35℃로 설정하고 보관기간과 주기는 90일동안 15일 주기 총 6회 3반복하여 실시함. 이를 바탕으로 품질지표별 반응속도상수(K)의 산출과 활성화에너지와 반응식 차트를 바탕으로 유통기한을 산출함. 정확한 안정성의 확보는 제품의 국내유통과 향후 수출을 대비하기 위해 꼭 필요한 항목임.

현재 HACCP 컨설팅을 1차 진행하였으며 2018년 상반기 이내에 공사와 설비의 증축을 완료할 예정임. 2016년 FDA인증, 2017년 ISO22000 인증, 2018년 HACCP 인증을 상반기에 완료하여 제품의 안정성에 대한 소비자 및 바이어의 신뢰를 확보할 계획임.

또한, HACCP 인증이 완료되면 ‘생기가든하수오스틱’의 홈쇼핑 진행이 선정되어있음. 따라서 식품안전성관련 인증과 홈쇼핑을 통한 제품과 브랜드 이미지를 확보하여 올해는 국내 홍보(모바일, 인터넷 라디오 등)에 안정적인 진입을 예상하고 있음.

#### 4. 목표달성도 및 관련분야 기여도

														코드번호		D-06			
4-1. 목표달성도																			
성과목표	사업화지표										연구기반지표								
	지식재산권			기술실시(이전)		사업화					기술인증	학술성과		교육지도	인력양성	정책활용·홍보		기타(타연구활용등)	
	특허출원	특허등록	품종등록	건수	기술료	제품화	매출액	수출액	고용창출	투자유치		논문				학술발표	정책활용		홍보전시
												SCI	비SCI						
최종목표	2	2		1		2	850		3			3	7			8			
1차년도	목표	1							1			1	3			1			
	실적	1							1			1	3			3			
2차년도	목표	1	1		1	1	50		1			2	4			2			
	실적	1	1		1	1	30		2			2	7			3			
소계	목표	2	1		1	2	50		2			3	7			3			
	실적	2	1		1	2	30		3			3	10			6			
종료 1차년도						1	100		1							1			
종료 2차년도		1					150									2			
종료 3차년도							150									2			
종료 4차년도							200												
종료 5차년도							200												
소계		1				1	800		1							5			
합계	2	2		1		2	850		3			3	7			8			

연도	세부과제명	세부연구목표	연구개발 수행내용	달성도	기여도
2016	하수오 버섯발효물 생산조건 확립 및 발효물을 이용한 중장년층 건강음료 개발	버섯발효 하수오와 생 약초 추출물을 가공한 액상제품 개발	<b>- 주원료와 부원료에 대한 기초 성분분석</b> <input type="checkbox"/> 일반성분은 AOAC방법 <input type="checkbox"/> 유리당 성분은 Wilson 등의 방법 <input type="checkbox"/> 유기산 함량은 Paler와 List의 방법 <input type="checkbox"/> 아미노산 분석은 Daniel과 Steven의 방법 <input type="checkbox"/> 유리 아미노산 분석은 Ohara와 Ariyosh의 방법 <input type="checkbox"/> 무기성분은 건식분해법	100	50
		하수오 버섯발효 조건 수립 및 발효와 가공에 따른 성분변화, 생리활 성 탐색	<b>- 시제품 제작(1건)</b> <input type="checkbox"/> 후보소재의 혼합비 설정 <input type="checkbox"/> 시제품제작 관능평가 <input type="checkbox"/> 시제품 시안완성	100	50
			<b>- 발효조건 탐색</b> <input type="checkbox"/> 하수오 접종 발효균사 종별 생장 측 정 <input type="checkbox"/> 효율성 향상을 위하여 선별 균사의 종류별 생장 측정 <input type="checkbox"/> 하수오 입도크기에 따른 균사의 생장 측정 <input type="checkbox"/> 온도에 따른 하수오에서 따른 균사의 생장 측정 <input type="checkbox"/> pH에 따른 하수오에서 따른 균사의 생장 측정 <input type="checkbox"/> 탄소원에 따른 균사의 생장 측정 <input type="checkbox"/> 질소원에 따른 균사의 생장 측정		
			<b>- 항산화활성 검증</b> <input type="checkbox"/> Total flavonoid content 분석은 Herald 등이 사용한 실험방법 <input type="checkbox"/> Total polyphenols 분석은 Folin-Denis법		
			<b>- 안트라퀴논 및 폴리페놀 검증</b> <input type="checkbox"/> Anthraquinone류의 standard 물질 4 종(rhein, emodin, chrysophanol, physcion) 및 2,3,5,4'-tetrahydroxystilbene-2-O-β -D-glucoside(THSG)의 함유 여부를 LC-MS와 ELSD를 사용하여 분석		
			<b>- in vitro 검증</b> <input type="checkbox"/> E-screen assay <input type="checkbox"/> MTT assay <input type="checkbox"/> Estrogen receptor binding assay <input type="checkbox"/> 유전자 발현 측정		

연도	세부과제명	세부연구목표	연구개발 수행내용	달성도	기여도
2017	하수오 버섯발효물 생산조건 확립 및 발효물을 이용한 중장년층 건강음료 개발	버섯발효 하수오와 생약초 추출물을 가공한 액상제품 개발 시장진출용 제품 제작 및 대량생산을 위한 양산화, 영양성분분석	<b>- 하수오 버섯발효 공정 확립</b> <input type="checkbox"/> 하수오 버섯발효 공정확립 <b>- 시제품 제작 및 생산공정 확립</b> <input type="checkbox"/> 시제품 제작과 관능적 평가 <input type="checkbox"/> 최적의 액상차 제품의 대량생산공정 확립 <input type="checkbox"/> 시제품 제작 포장디자인 개발 <b>- 시제품 분석</b> <input type="checkbox"/> 시제품의 영양성분분석 및 안정성 평가 <input type="checkbox"/> 항산화 활성 확인	100	50
		하수오 버섯발효 조건 수립 및 발효와 가공에 따른 성분변화, 생리활성 탐색 제품의 면역증진 효능 평가, 성분분석, 제품제작 지원	<b>- 혼합물 분석 및 유효성분 검증</b> <input type="checkbox"/> 하수오와 발효산물의 유효성분 분석 <input type="checkbox"/> 발효물 및 생약초 추출물의 이화학적 분석 및 품질관리연구 <b>- 갱년기 및 면역증진 효능 검증</b> <input type="checkbox"/> 갱년기 개선 in-vivo 효과 검정 <input type="checkbox"/> 여성 갱년기 개선효과 검정 <input type="checkbox"/> 면역증진 효능 평가 <input type="checkbox"/> 대식세포의 활성측정 <input type="checkbox"/> 면역활성 측정	100	50

4-2. 관련분야 기여도

- - 적하수오를 주원료로 활용하여 여성 갱년기 개선에 도움을 줄 수 있는 식품 및 건강기능식품 소재로 활용이 가능함을 확인 하여 소재 개발의 초석을 마련하였음.
  - 강근골 부류로 활용이 되어오는 홍화씨의 에스트로겐 함량이 높아 여성 갱년기 개선에 도움을 줄 수 있음을 in vivo 실험을 통하여 확인하였음. 이는 향후 홍화씨를 활용하는 새로운 분야에 대한 기초 자료가 될 것으로 판단됨.
  - 오미자에서도 다소 높은 활성을 확인하여 추가 적인 연구를 통해 시판중인 백수오복합추출물(백수오, 당귀, 속단)보다 높은 효능의 제품 개발이 가능 할 것으로 판단됨.
  - 향 후 적하수오, 오미자, 홍화씨의 건강기능식품 소재화가 진행되어 기능성이 확인 된다면 건강기능식품 상품화를 소재의 확보가 필요하여 계약재배를 통한 농가의 소득이 증대 할 것으로 판단됨.

## 5. 연구결과의 활용계획

	코드번호	D-07
<p>○ 기술적 측면</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 하수오의 버섯발효기술 확보로 하수오 및 기타 생약초의 발효기술 다변화</li> <li>- 하수오 발효 제품 제조 기술을 통한 하수오 가공 제품의 이미지 향상 및 기능성 구명</li> </ul> <p>○ 경제·산업적 측면</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 특허 획득을 통한 유사 제품에 대비한 시장 경쟁력 확보 및 수익 창출</li> <li>- 신개념의 고품질 하수오 가공 제품 개발을 통한 매출 증대</li> <li>- 신기술 제품 개발 기술로 인한 업체 이미지 향상 및 위상 제고</li> <li>- 신규 가공 공정을 이용한 제품으로 지식재산권 확보를 통한 국내외 시장에서 우위 선점</li> <li>- 고품질 하수오 가공 제품의 개발을 통한 참여기업의 매출증대 및 성인병의 예방을 통한 국가 의료비 손실 감소와 국민건강의 활성화</li> <li>- 새로운 품목의 산업적 활성화 효과 기대</li> </ul> <p>○ 활용방안</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 건강기능성, 고품질 발효하수오 및 식용한방 제품의 양산</li> <li>- 발효하수오 가공 제품으로의 마케팅 추진</li> <li>- 소비자의 마인드를 읽어낼 수 있는 차별화된 제품과 concept으로 기능성 상품으로 개발</li> <li>- 신개념 하수오 가공 제품을 개발하여 참여기업의 지식재산권 확보와 논문 게재를 통한 제품의 우위성 부여 및 홍보에 활용</li> <li>- 기능성 제품의 산업적 활용 기술을 참여기업에 이전·상품화하여 하수오 가공 제품 이외에 생산제품의 다양화로 기업의 수익 창출 및 발전에 활용</li> </ul>		

## 6. 연구과정에서 수집한 해외과학기술정보

	코드번호	D-08
○		

## 7. 연구개발결과의 보안등급

	코드번호	D-09
○ 해당없음		

## 8. 국가과학기술종합정보시스템에 등록된 연구시설·장비 현황

구입 기관	연구시설/ 연구장비명	규격 (모델명)	수량	구입 연월일	코드번호		D-10	
					구입 가격 (천원)	구입처 (전화번호)	비고 (설치 장소)	NTIS장비 등록번호
해당없음								

## 9. 연구개발과제 수행에 따른 연구실 등의 안전조치 이행실적

	코드번호	D-11
<p>○ 기술적 위험요소 분석</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>· 기술적 위험 요소는 없음</li> </ul> <p>○ 안전관리대책</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>· 동부생약영농조합에서는 안전하고 건강한 먹거리를 공급하기 위해 식품공정법상 유해요소를 최소화한 공정을 진행하였으며, 식약처 통제를 받아 투명하고 국민 건강을 도모할 수 있는 기업으로써, 본 과제를 완료함.</li> <li>· (재)장흥군버섯산업연구원은 분기별(4회/년)로 산업안전교육을 수행하여 연구실 안전화에 힘쓰고 있습니다. 또한, 매년 1회씩 참여연구원의 건강검진을 실시하여 건강상태를 확인하고 있습니다. 본 과제 수행시 연구실 안전을 위하여 꾸준한 연구실 안전점검을 실시할 것이며 지속적인 건강검진을 통해 참여연구원들에 건강을 확보하겠습니다.</li> </ul> <p>○ 기술유출 방지대책</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>· 본 연구를 담당할 주관기관과 참여기관은 이미 오랜 기간 동안 하수오 범제기술, 발효기술을 보유하고 있고, 향산화, 갱년기개선, 면역증강 실험에 관해 상당한 경험을 가지고 있어 특별히 개발기술을 입찰할 계획은 가지고 있지 않음</li> <li>· 본 연구에서 확보되는 개발기술에 대해서는 특허 출원을 할 계획임. 단순한 소재 첨가 또는 감소만으로는 특허 등록이 쉽지 않기 때문에 전략적인 접근이 필요하고, 이를 위해 변리사와 미리 논의하여 기술 보호가 되도록 할 것임</li> <li>· 과제 진행중 R&amp;D 데이터 관리 <ul style="list-style-type: none"> <li>- 주관기관은 실험결과 및 관련자료를 보안장소에 있는 PC에 보관하여 외부인이 접근할 수 없도록 할 계획이며 참여기관은 실험노트를 작성하여 가급적 과제책임자가 직접관리하여 보안을 유지함.</li> </ul> </li> <li>· 과제 결과보고서 및 결과물 <ul style="list-style-type: none"> <li>- 과제의 결과보고서 및 모든 결과물은 보안되어 있는 PC에 보관하여 외부인이 접근할 수 없도록 할 것이며 결과물을 이용하여 지적재산권등을 확보하여 도용을 방지할 계획임.</li> </ul> </li> </ul>		

## 10. 연구개발과제의 대표적 연구실적

번호	구분 (논문/ 특허/ 기타)	논문명/특허명/기타	소속 기관명	역할	논문게재지/ 특허등록국 가	코드번호		D-12	
						Impact Factor	논문게재일 /특허등록일	사사여부 (단독사사 또는 중복사사)	특기사항 (SCI여부/인 용횟수 등)
1	특허	표고버섯 균사체를 이용하여 발효시킨 적하수오 발효물을 유효성분으로 함유하는 여성 갱년기 증상의 예방, 개선 또는 치료용 조성물	동부생약 영농조합. 장흥군버 섯산업연 구원		대한민국		2017.12.04.	단독	
2	특허	복합 발효 하수오 추출물과 한약재 추출물을 이용한 갱년기 증상 개선용 음료의 제조방법	동부생약 영농조합. 장흥군버 섯산업연 구원		대한민국		2018.02.13.	단독	
3	논문	표고균사체 발효하수오 배양적 특성 및 이화학적 성분	동부생약 영농조합. 장흥군버 섯산업연 구원	제1저자 교신저자	한국버섯학 회		2016.12.19.	단독	KCI 등재후보
4	논문	반응표면 분석법에 의한 표고균사체발효 적하수오 열수 추출조건의 최적화	동부생약 영농조합. 장흥군버 섯산업연 구원	제1저자 교신저자	한국버섯학 회		심사중 (수정후 게재)	단독	KCI 등재후보
5	논문	건조방법에 따른 적하수오의 이화학적 성분	동부생약 영농조합. 장흥군버 섯산업연 구원	제1저자 교신저자	한국자원식 물학회		심사중	단독	KCI
6	기타	MOU	구례약산 농업회사 법인				2017.01.21		
7	기타	상표출원	동부생약 영농조합 장흥군버 섯산업연 구원		대한민국		2018.02.	단독	

## 성분분석 4종



분석확인번호 : DTC9-AQMW-XLOS-FRX0

### 시험 · 검사성적서

발행번호	R20180205-0017	접수번호	180100113-001	
검사완료일	2018-02-05	접수연월일	2018-01-23	
제품명	전하수오 A			
(품목)제조번호	품목제조신고번호			
유형 · 제형 · 품목명	기타기준규격외			
제조(수입)일	유통(물집유지)기한			
성명	홍재희	업체명	동부생약 영농협동조합법인	
의뢰자	08019인라남도 순천시 배롱면 여순로 1679 전화번호: 061-752-9004 팩스번호: 061-753-2003 전자우편:			
소제지				
제조원	업체명	소재지	제조국	
소제지				
시험 · 검사목적	식품   기타(영양성분)			
<b>시험 · 검사 항목 및 결과</b>				
시험 · 검사 항목	시험 · 검사 기준	시험 · 검사 결과	판정	비고
수분(g/100ml)	기준없음	99.4	상기사항확인함	
회분(g/100ml)	기준없음	0.1	상기사항확인함	
열량(kcal/100ml)	기준없음	0.8	상기사항확인함	
탄수화물(g/100ml)	기준없음	0.4	상기사항확인함	
식이섬유(g/100ml)	기준없음	0.6	상기사항확인함	
당류(g/100ml)	기준없음	0.2	상기사항확인함	
단백질(g/100ml)	기준없음	0.1	상기사항확인함	
지방산(g/100ml)	기준없음	0.0	상기사항확인함	
포화지방(g/100ml)	기준없음	0.0	상기사항확인함	
트랜스지방(g/100ml)	기준없음	0	상기사항확인함	
콜레스테롤(mg/100ml)	기준없음	0	상기사항확인함	
나트륨(mg/100ml)	기준없음	0.6	상기사항확인함	

분석확인번호 : DTC9-AQMW-XLOS-FRX0

시험 · 검사 항목	시험 · 검사 기준	시험 · 검사 결과	판정	비고
비타민C(mg/100ml)	기준없음	불검출	상기사항확인함	
철(mg/100ml)	기준없음	0.0	상기사항확인함	
칼슘(mg/100ml)	기준없음	1.3	상기사항확인함	
칼륨(mg/100ml)	기준없음	60.2	상기사항확인함	
리놀렌산(g/100ml)	기준없음	0	상기사항확인함	
갈마리놀렌산(g/100ml)	기준없음	0	상기사항확인함	

종합판정 : 상기사항확인함  
 시험검사원 : 강희진, 김도준, 김소라, 이현희 시험검사책임자 : 김도준, 조순영

비고 :  
 ※ 위 판정은 의뢰된 시험 · 검사 항목만을 대상으로 한 것입니다.  
 ※ 지면이 부족할 경우 시험 · 검사 항목 및 결과만을 별도로 작성 가능합니다.  
 ※ 검사결과를 알고자하거나 용기 · 포장 등에 표시할 때에는 시험 · 검사성적서 전체 내용을 모두 표시하여야 합니다.  
 「식품 · 의약품분야 시험 · 검사 등에 관한 법률」 제11조제2항 및 같은 법 시행규칙 제12조제4항제1호에 따라 위와 같이 시험 · 검사성적서를 발급합니다. 2018년02월05일

### 동해안해양생물자원연구원

210702 210702 김해해양대학교 공동실험실승인 410호 T:033-640-2730 F:033-643-3832

## 적하수오 추출물



분석확인번호 : AWJQ-ZSZL-L05T-ADD4

### 시험 · 검사성적서

발행번호	R20180205-0018	접수번호	180100113-002	
검사완료일	2018-02-05	접수연월일	2018-01-23	
제품명	관사제 보조적하수오 B			
(품목)제조번호	품목제조신고번호			
유형 · 제형 · 품목명	기타기준규격외			
제조(수입)일	유통(물집유지)기한			
성명	홍재희	업체명	동부생약 영농협동조합법인	
의뢰자	08019인라남도 순천시 배롱면 여순로 1679 전화번호: 061-752-9004 팩스번호: 061-753-2003 전자우편:			
소제지				
제조원	업체명	소재지	제조국	
소제지				
시험 · 검사목적	식품   기타(영양성분)			
<b>시험 · 검사 항목 및 결과</b>				
시험 · 검사 항목	시험 · 검사 기준	시험 · 검사 결과	판정	비고
수분(g/100ml)	기준없음	99.6	상기사항확인함	
회분(g/100ml)	기준없음	0.0	상기사항확인함	
열량(kcal/100ml)	기준없음	0.2	상기사항확인함	
탄수화물(g/100ml)	기준없음	0.4	상기사항확인함	
식이섬유(g/100ml)	기준없음	0.7	상기사항확인함	
당류(g/100ml)	기준없음	0.0	상기사항확인함	
단백질(g/100ml)	기준없음	0.0	상기사항확인함	
지방산(g/100ml)	기준없음	0.0	상기사항확인함	
포화지방(g/100ml)	기준없음	0.0	상기사항확인함	
트랜스지방(g/100ml)	기준없음	0	상기사항확인함	
콜레스테롤(mg/100ml)	기준없음	0	상기사항확인함	
나트륨(mg/100ml)	기준없음	0.3	상기사항확인함	

분석확인번호 : AWJQ-ZSZL-L05T-ADD4

시험 · 검사 항목	시험 · 검사 기준	시험 · 검사 결과	판정	비고
비타민C(mg/100ml)	기준없음	불검출	상기사항확인함	
철(mg/100ml)	기준없음	0.1	상기사항확인함	
칼슘(mg/100ml)	기준없음	1.3	상기사항확인함	
칼륨(mg/100ml)	기준없음	18.6	상기사항확인함	
리놀렌산(g/100ml)	기준없음	0	상기사항확인함	
갈마리놀렌산(g/100ml)	기준없음	0	상기사항확인함	

종합판정 : 상기사항확인함  
 시험검사원 : 강희진, 김도준, 김소라, 이현희 시험검사책임자 : 김도준, 조순영

비고 :  
 ※ 위 판정은 의뢰된 시험 · 검사 항목만을 대상으로 한 것입니다.  
 ※ 지면이 부족할 경우 시험 · 검사 항목 및 결과만을 별도로 작성 가능합니다.  
 ※ 검사결과를 알고자하거나 용기 · 포장 등에 표시할 때에는 시험 · 검사성적서 전체 내용을 모두 표시하여야 합니다.  
 「식품 · 의약품분야 시험 · 검사 등에 관한 법률」 제11조제2항 및 같은 법 시행규칙 제12조제4항제1호에 따라 위와 같이 시험 · 검사성적서를 발급합니다. 2018년02월05일

### 동해안해양생물자원연구원

210702 210702 김해해양대학교 공동실험실승인 410호 T:033-640-2730 F:033-643-3832



버섯발효적하수오 추출물



문서확인번호 : D980-ACD2-WX1C-AHEU

시험·검사성적서

발행번호	R20180209-0001	접수번호	180100113-003	
검사연월일	2018-02-09	접수연월일	2018-01-23	
제품명	생기가든 하수오 스틱			
(품목)제조번호		품목제조신고번호		
유통·저장·유통명	기타기준규격외			
제조(수입)일		유통(출입)유지(기한)		
의뢰자	성명 홍재희	업체명 동부생각 양농합동조합법인		
	소재지 (58039)전라남도 순천시 백룡면 아순로 1679			
	전화번호 061-752-9004	팩스번호 061-753-2003	전자우편	
제조업	업체명	제조국		
	소재지			
시험·검사목적	식품(기타(영양성분))			
시험·검사 항목 및 결과				
시험·검사 항목	시험·검사 기준	시험·검사 결과	판정	비고
수분(g/100ml)	기준없음	74.2	상기사항확인함	
회분(g/100ml)	기준없음	0.9	상기사항확인함	
알칼리도(acid/100ml)	기준없음	97.0	상기사항확인함	
탄수화물(g/100ml)	기준없음	24.2	상기사항확인함	
식이섬유(g/100ml)	기준없음	1.3	상기사항확인함	
당류(g/100ml)	기준없음	14.3	상기사항확인함	
단백질(g/100ml)	기준없음	0.7	상기사항확인함	
지방산(g/100ml)	기준없음	0.0	상기사항확인함	
포화지방(g/100ml)	기준없음	0.0	상기사항확인함	
트랜스지방(g/100ml)	기준없음	0	상기사항확인함	
콜레스테롤(mg/100ml)	기준없음	0	상기사항확인함	
나트륨(mg/100ml)	기준없음	31.5	상기사항확인함	

본 증명서는 인터넷으로 발급되었으며, 발급번호를 통하여 위변조 여부를 확인할 수 있습니다.  
또한, 품목명이나 품목코드 등 항목명(스틱)을 영문(영어)으로 표기할 수 있습니다. Page 1 of 2

문서확인번호 : D980-ACD2-WX1C-AHEU

시험·검사 항목	시험·검사 기준	시험·검사 결과	판정	비고
비타민C(mg/100ml)	기준없음	380.6	상기사항확인함	
칼(mg/100ml)	기준없음	1.9	상기사항확인함	
칼슘(mg/100ml)	기준없음	22.4	상기사항확인함	
칼륨(mg/100ml)	기준없음	618.4	상기사항확인함	
리놀렌산(g/100ml)	기준없음	0	상기사항확인함	
감마리놀렌산(g/100ml)	기준없음	0	상기사항확인함	

총합판정 : 상기사항확인함  
 시험검사자 : 양희진, 김도윤, 김소라, 이찬희  
 시험검사책임자 : 김도윤, 조은영

비고 :

※ 위 판정은 의뢰한 시험·검사 항목만을 대상으로 한 것입니다.  
 ※ 지면이 부족한 경우 시험·검사 항목 및 결과만을 별도로 작성 가능합니다.  
 ※ 검사결과를 알고자하시거나 용기 포장 등에 문제가 되시는 시험·검사성적서 기재 내용을 모두 표시하여야 합니다.  
 ※ 식품·의약품분야 시험·검사 등에 관한 법률 제11조제2항 및 같은 법 시행규칙 제12조제4항제1호에 따라 위와 같이 시험·검사성적서를 발급합니다.  
 2018년02월09일

동해안해양생물자원연구소



210702 210702 김홍원주대학교 공동실험실승인 410호 1033-640-2730 F:033-643-3632

본 증명서는 인터넷으로 발급되었으며, 발급번호를 통하여 위변조 여부를 확인할 수 있습니다.  
 또한, 품목명이나 품목코드 등 항목명(스틱)을 영문(영어)으로 표기할 수 있습니다. http://ims.mhds.go.kr Page 2 of 2

생기가든하수오스티 추출물

# 생기가든하수오스틱 관능

식품연구개발

원서서 실험실에 대해 소개합니다. (We will be your laboratory)

## 시험검사보고서

Test Report

1. 시험뢰해 번호(Document No.)	FERC-2018-700
2. 의뢰자 의뢰일자(Request date)	2017년 12월 27일
3. 시험기간(Test period)	2018년 01월 23일 ~ 2018년 02월 09일
4. 시험결과 출력일자(Report Date)	2018년 02월 09일
5. 시험목적(Purpose)	관능평가
6. 시료명(Sample)	생기가든하수오 스틱
7. 시험방법(Test Method)	3명 3회법
8. 패널수(Number of panel)	30명
9. 패널의 연령대(Panels age)	30~50대, 여성

본 검사는 주시회사 동부생각연구소로부터 개발한 생기가든하수오 스틱제품을 타사제품과 비교하여 제품의 소비자 기호도 및 개선방향, 구매의사를 알아보기 위함입니다.

### 9. 시료 및 검사(Sample & Questionnaire)

#### 1) 실험재료

본 검사에 사용된 시료는 동부생각연구소로부터 개발한 생기가든하수오 스틱 1종과 타사제품(이민한하, 이차의 쌀) 2종을 사용하였습니다.

#### 2) 실험방법

본 검사에 참여한 30~50대 여성 30명은 주시회사 식품개발연구소에서 모집하였다. 관능검사 이전에 평가 방법에 대해 교육한 후 10명씩 관능검사실에서 평가를 실시하였다.

관능검사에 사용한 제품은 아래에 [그림 1]과 같으며, [그림 2]에 같이 소분하여 제공하였다. 검사 제품은 [그림 3]과 같이 제공하였으며, 모든 제품은 세 가지 난수표를 이용하여 표기하였다.

참사지는 [그림 4], [그림 5], [그림 6]과 같으며, 3명 3회법을 사용하여 진행 하였다.



이민한하 (523번)

이차의 쌀 (788번)



[그림 1] 관능검사 시료



[그림 2] 관능검사 시료 제공

기호도 평가 항목은 '색상', '향각향', '신맛', '단맛', '쓴맛', '촉감', '전체적인 기호도'에 대하여 실시하였으며, 향도 평가항목은 '색상', '향각향', '신맛', '단맛', '쓴맛', '촉감'에 대하여 실시하였다.

기호도는 1점 '대단히 싫다', 2점 '약간 싫다', 3점 '보통으로 싫다', 4점 '약간 좋다', 5점 '좋지도 싫지도 않다', 6점 '약간 좋다', 7점 '보통으로 좋다', 8점 '약간 좋다', 9점 '대단히 좋다'로 평가하였다.

향도는 1점 '대단히 약해부드럽다', 2점 '약간 약해부드럽다', 3점 '보통으로 약해부드럽다', 4점 '약간 약해부드럽다', 5점 '약해부드럽지도 강해부드럽지도 않다', 6점 '약간 강해부드럽다', 7점 '보통으로 강해부드럽다', 8점 '약간 강해부드럽다', 9점 '대단히 강해부드럽다'로 평가하였다.

검사 후 패널들의 소중한 답변에 따라 적극적인 평가를 할 수 있도록 하였으며, 충분한 시간동안 시료를 평가할 수 있게 하였다.

- 1 -

- 2 -

- 3 -

### 관능검사 검사지

본 검사는 '생기가든하수오 스틱'에 대한 관능검사를 실시합니다. 검사 방법을 숙지 하고 후 검사에 임하여 주십시오. 총 3가지 제품이며, 각 측상을 영의 도구에 검사하여 주시기 바랍니다.

**Q1. 응답자 분류 질문**

이름 : \_\_\_\_\_ 성별 : \_\_\_\_\_ 연령 : \_\_\_\_\_  
 ( ) 남 ( ) 여 ( ) 30대 ( ) 40대 ( ) 50대 ( )

**Q2. 평가기 중세를 경험한 적이 있으신가요?**  
 □ 예 □ 아니오

**Q3. 구매(상하)해 본 평가기 제품이 있으신가요?**  
 □ 예 □ 아니오

**Q4. 설명(상하)이 있으시다면 효과가 있다고 생각되는 제품 순으로 작성해 주십시오.**

**Q5. 향후 평가기 제품을 구입할 의사가 있으신가요?**  
 □ 전혀 구입할 의사가 없다 □ 구입할 의사가 있다  
 □ 구입할 수도 하지 않을 수도 있다 □ 구입할 의사가 있다  
 □ 매우 구입할 의사가 있다

**Q6. Q5와 같이 답변 이유는 무엇입니까?**

[그림 4] 평가기제품의 관능검사 검사지 - 1

- 4 -

### Q7. 관능검사

한 가지 항목을 검사하신 후 반드시 평가기 종료 및 안전을 확인 후 다음 항목을 진행 하며 주십시오. 관찰 시 입안의 물감이 사라지면 관상을 관해 주십시오.

향수 (기호도)								
1점	2점	3점	4점	5점	6점	7점	8점	9점
대단히 싫다	약간 싫다	보통으로 싫다	약간 좋아도 싫다	보통으로 좋다	약간 좋아도 좋다	보통으로 좋다	약간 좋아도 좋다	대단히 좋다
생물번호			523 788			251		
색상	제품에서 느껴지는 색상은 어떤가요?							
향각향	제품에서 느껴지는 향각향은 어떤가요?							
신맛	제품에서 느껴지는 신맛은 어떤가요?							
단맛	제품에서 느껴지는 단맛은 어떤가요?							
쓴맛	제품에서 느껴지는 쓴맛은 어떤가요?							
촉감	제품에서 느껴지는 촉감은 어떤가요?							
전체적인 기호도	제품에서 느껴지는 전체적인 기호도는 어떤가요?							
향도 (영양)								
1점	2점	3점	4점	5점	6점	7점	8점	9점
대단히 약해부드럽다	약간 약해부드럽다	보통으로 약해부드럽다	약간 약해부드럽지도 강해부드럽지도 않다	보통으로 강해부드럽다	약간 강해부드럽다	보통으로 강해부드럽다	약간 강해부드럽다	대단히 강해부드럽다
생물번호			523 788			251		
색상	제품에서 느껴지는 색상은 어느 정도입니까?							
향각향	제품에서 느껴지는 향각향은 어느 정도입니까?							
신맛	제품에서 느껴지는 신맛은 어느 정도입니까?							
단맛	제품에서 느껴지는 단맛은 어느 정도입니까?							
쓴맛	제품에서 느껴지는 쓴맛은 어느 정도입니까?							
촉감	제품에서 느껴지는 촉감은 어느 정도입니까?							

[그림 5] 평가기제품의 관능검사 검사지 - 2

- 5 -

### Q8. 251번 제품을 섭취한 후 나타난 주관적 느낌 중 가까운 것을 선택해 주십시오. (복수선택 가능)

□ 다른 제품보다 한층 맛이 강해 보이는 것 같다  
 □ 색고양이와 한층 맛달 것 같은 느낌이 든다  
 □ 맛고양이 같다

**Q9. 251번 제품의 개선점을 작성해 주십시오.**

생물번호	개선점
251	

**Q10. 251번 제품을 시중에 판매한다면 구입할 의사가 있으신가요? (구입하면 구입하는 이유를, 구입하지 않으면 구입하지 않는 이유를 작성해 주십시오.)**

이유 : \_\_\_\_\_ 구입한다 ( )      구입하지 않는다 ( )  
 이유 : \_\_\_\_\_

[그림 6] 평가기제품의 관능검사 검사지 - 3

- 6 -

### 10. 결과 및 해석(Results and Interpretation)

#### 1) 평가기제품 구입 및 향후 구입의사

30~50대 여성대상 30명을 대상으로 평가기제품 구입 및 향후 구입의사를 조사하였다. 각 질문에 대한 결과는 아래와 같다.

#### Q2. 평가기 중세를 경험한 적이 있으신가요?

관찰 유무	신뢰(명)	응답률(%)
평가기 경험 있음	1	3.3
평가기 경험 없음	29	96.7
합계	30	100.0

#### Q3. 구매(상하)해 본 평가기 제품이 있으신가요?

관찰 유무	신뢰(명)	응답률(%)
구매 및 섭취 경험이 있음	3	10.0
구매 및 섭취 경험이 없음	27	90.0
합계	30	100.0

관능검사 설명에 포함된 30~50대 여성 30명 중 1명만 평가기 중세를 경험했다고 답하였으며, 평가기제품을 구매(상하)한 경험이 있다고 답한 인원은 3명으로 나타났다. 구매(상하)한 제품으로는 '이차의 쌀', '이차의 쌀', '강화유' 등이 있었다.

- 7 -

#### Q5. 향후 평가기제품을 구입할 의사가 있으신가요?

[표 5] 평가기제품의 향후 구입의사		
관찰 유무	신뢰(명)	응답률(%)
전혀 구입할 의사가 없다	0	0.0
구입할 의사가 있다	0	0.0
구입할 수도 하지 않을 수도 있다	11	36.7
구입할 의사가 있다	18	53.3
매우 구입할 의사가 있다	3	10.0
합계	30	100.0

#### Q6. Q5와 같이 답변 이유는 무엇입니까?

구분	이유
구입할 수도 하지 않을 수도 있다	평가가를 겪으신 분들의 이야기로 들으면 입안만 편이 없어서
	평가가 중세의 향도 저이며 따라 구매유무를 할 것 같음
	나의 상태에 따라 필요하면 구입할 수도 있을 것 같음
	평가가 중상 상태에 따라 구입할 의사가 있음
	평가가 중상에 따라 보조식품 구입할 의사가 있음
구입할 의사가 있다	주변인 추천으로 중상이 보이면 섭취할 것 같음
	중상이 오기 전에 먹으면 될 것 같음
	입자 평가가 어떤 중상으로 오는지 느껴보니 좋아서
	신체적, 정신적, 생활이 느껴지고 싶어서 많이 먹어서 가능
	평가가 중상적 기호도 심할 경우는 식물 또는 약에 의존함으로써 심리적 중상 또는 보편적 중상이 많이 완화될 수 있지 않을까 하는 생각이 들

- 8 -

구분	이유
구입할 의사가 있다	약보다는 식물이 효과도 있고 건강에도 도움이 될 것 같아서
	평가가를 활용이 있게 보이기 위해서
	먹고 싶은 음식이 없어서
	평가가를 무서워 할 필요가 없어서
	식용으로 섭취하는 것이 도움이 된다고 생각해서
	평가가 중상에 대한 이야기를 주위사람들로부터 많이 이야기 들어서 병행할 수 있는 식품은 구매할 의사가 있음
	평가가 중상상태에 도움이 있을 것 같아서
	평가가가 물 것 같아서 구입할 의사가 있음
	불거진 생활을 위해서
	평가가 중상에 도움을 받고 싶어서
40대에는 원통 몸으로 느끼는 중상이 있어서 건강을 위해 섭취하고 싶	
나에게 필요한 것을 사용하려면도 보충하고 평가가를 조금이라도 즐겁게 할	
물론 저내고 싶어서	
나이가 들면 평가가 보조식품이 필요하지 않다고 생각함	
평가가가 오기 전 미리 건강을 생각해서 미리 먹어보고 싶었다	
건강하기 위해서	
호전이 된다면 섭취하고 싶음	
주변 생활의 편의	
매우 구입할 의사가 있다	나이를 보아 많이 먹어서 건강이 좋을 것 같아서
	평가가를 잘 보아주고 싶은 마음

- 9 -



# 생기가든하수오 안정성

## 동부생약 영농조합법인의 '생기가든 하수오' 유통기한 설정실험 결과보고서

2017년 12월


(주) 한국식물정보원

### 실험 결과보고서 요약

제목	'생기가든 하수오'의 유통기한 설정실험																			
실험구분	과제실험 ( ) 과제실험( ○ )																			
실험기간	2017년 02월 14일 ~ 2017년 09월 18일																			
실험인	임소영 동부생약 영농조합법인 주소 경기도 고양시 덕양구 대림동 1117-1 1079	대표자 홍 제 회 연락처 061-752-9084																		
실험수행 기관	기전영 (사)한국식물정보원 주소 대관령역시 유성구 반석동 638-5 별지50아 10층	대표자 이 상 호 연락처 041-822-6450																		
실험 목적	책임자 나 배 민	연구원 임 세 영	요 약																	
<p>◆유통기한 설정결과</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>시험유형</th> <th>품질지표</th> <th>0차 유통기한 일(일)</th> <th>1차 유통기한 일(일)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td rowspan="4">배양액</td> <td>일반세균</td> <td>-</td> <td>-</td> </tr> <tr> <td>대장균군</td> <td>-</td> <td>-</td> </tr> <tr> <td>pH</td> <td>-</td> <td>-</td> </tr> <tr> <td>안정성</td> <td>803.16일(14.64년)</td> <td>617.38일(10.29년)</td> </tr> </tbody> </table> <p>실험에 의한 유통기한: 803.16일 (14.64년)  <b>실은 유통시 최종 유통기한</b>          : 16.54 × 0.8 = 13.23 ~ <b>13개월</b>          (503.16 × 0.8 = 402.53 ~ <b>403일</b>)</p>				시험유형	품질지표	0차 유통기한 일(일)	1차 유통기한 일(일)	배양액	일반세균	-	-	대장균군	-	-	pH	-	-	안정성	803.16일(14.64년)	617.38일(10.29년)
시험유형	품질지표	0차 유통기한 일(일)	1차 유통기한 일(일)																	
배양액	일반세균	-	-																	
	대장균군	-	-																	
	pH	-	-																	
	안정성	803.16일(14.64년)	617.38일(10.29년)																	

### 제1장 제품의 특성

구분	신규제품
제품유형	초합성료
성상	흰색 고체와 액상 제품
사용원료	
제조과정	원료 혼합 → 일수 추출(95℃, 8시간 이상) → 포장
포장재질	유리병
포장방법	밀봉포장
포장단위	100 mL
보존 및 유통조건	상온
포장소재	-
사용여부	-
유통유치유	-
알려진 또는 알려지지 않은 성분	-



- 1 -

### 제2장 실험방법

#### 1. 검체의 채취 및 취급방법

본 실험에 사용된 제품은 동부생약 영농조합법인에서 생산하여 유통됨으로써 표준화된 '생기가든 하수오'이며, 제품을 15℃, 25℃, 35℃ 인큐베이터에 30일간 적중시키면서 실험구간을 배양기간 중 6회 이상에 나누어 15일 간격으로 요철을 수행한다.

#### 2. 품질지표 및 실험방법

품질지표	실험방법
미생물	일반세균 식물공진 배양액 내 50 일반세균을 5.0 배양액 2.5 배양액
	대장균군 식물공진 배양액 내 50 일반세균을 5.0 배양액 3.7 배양액
이화력	pH 식물공진 배양액 내 5.0 식물공진 배양액 20~12 mL용액
안정성	품질의 유통기한 설정 실험 가이드라인 IV, 유통기한 설정을 위한 컨닝검사 가이드라인 표 6. 기준치에 입사됨

#### 3. 실험조건

구분	실험방법
적중온도	15℃, 25℃, 35℃
적중기간	180일
실험구기	30일, 6회
실험반복수	3회

- 2 -

### 4. 품질관리

품질지표	품질관리	연구
일반세균	10 <sup>6</sup> CFU/g 이하	식물공진 배양액 내 5.0 식물공진 배양액 16.54배 (5) 균액 (5) 배양액 : 1 mL용액 100 이하 (적중제품에 한한다).
대장균군	불검출	식물공진 배양액 내 5.0 식물공진 배양액 16.54배 (5) 균액 (5) 배양액 : 음성이거나 1 이하 (적중제품에 한한다).
pH	-	일반균의 없음
안정성 (키로노이드법)	3일 이상 (15일 안정)	식물공진 배양액 내 5.0 일반세균 9.1 성장(안정성) 확인한 경우가 평균 3일 이상이고 1회 정확히 밝혀야 한다.

- 3 -

### 제3장 실험결과

#### 1. 각 품질지표의 배양 결과 분석

Table 1.1 일반세균 품질관리

적중기간(일)	15℃	25℃	35℃
0	불검출	불검출	불검출
30	불검출	불검출	불검출
60	불검출	불검출	불검출
90	불검출	불검출	불검출
120	식물배양	식물배양	식물배양
150	식물배양	식물배양	식물배양
180	식물배양	식물배양	식물배양

Table 1.2 대장균군 품질관리

적중기간(일)	15℃	25℃	35℃
0	불검출	불검출	불검출
30	불검출	불검출	불검출
60	불검출	불검출	불검출
90	불검출	불검출	불검출
120	불검출	불검출	불검출
150	불검출	불검출	불검출
180	불검출	불검출	불검출

Table 1.3 pH 품질관리

적중기간(일)	15℃	25℃	35℃
0	4.50		
30	4.27	4.25	4.24
60	4.27	4.24	4.24
90	4.26	4.25	4.25
120	4.18	4.22	4.20
150	4.12	4.13	4.18
180	4.12	4.12	4.12

- 4 -

Table 1.4 반응열사 품질관리

계량기값(질)	18℃	25℃	30℃
0		9.00	
20	9.00	9.00	8.90
60	9.00	8.90	8.80
90	8.95	8.80	8.77
120	8.83	8.83	8.27
150	8.47	8.30	8.06
180	8.30	7.83	7.63

4. 품질지표별 유통기한 산출

품질지표별 품질관리 관리값을 기준으로 한계값에 이르기까지의 시간 간격을 산출하여, 여러 가지 품질지표 중에서 가장 먼저 한계점에 도달한 품질지표를 그 제품의 유통기한 기준으로 설정하였다.

Table 4.1 일련제균 유통기한 산출

과수	최소합량-품질관리	연간변화속도상수	유통기한(일)	유통기한(개월)
0	4.0000	2.90	603.16	16.64
1	0.5478	0.35	617.18	20.21

2. 품질지표별 반응속도상수(K)의 산출

식품의 품질변화에 대한 과학적연구는 시간과 온도 상관계수로 표현하는 다음 식을 기준으로 한다. 유통기한설정에서 얻은 결과는 저장기간에 따른 변화로서 이 결과로 품질손상의 반응속도(K)를 얻게 된다.

Table 2.1 반응열사 반응속도 상수

반응과수	온도(℃)	Slope(K)	Intercept(A0)	R <sup>2</sup>
0	15	-0.0042	9.1314	0.8949
	25	-0.0054	5.1988	0.8560
	35	-0.0077	5.1279	0.9611
1	15	-0.0005	2.2125	0.8026
	35	-0.0008	2.2211	0.8481

계4장 결론

동부 영남 양봉조합에서 생산한 '영기'는 '화수오'의 품질을 과학적으로 평가하기 위해 품질지표로 연변율, 내산량, pH, 반응열사를 선정하고 저장온도(15℃, 25℃, 35℃) 및 기간(180일, 6회)에 따라 관리하였다. 그 결과, 일반적으로, 내산량과 같은 영양분은 분해율이 낮아질수록 보존 기간이 길어질수록 나타나는 것을 알 수 있었다. 반응열사 결과 보관기간과 온도에 따른 품질의 변화는 없었다. 이 결과, 영양분 지표가 낮게 나타났다. 그러나 모든 샘플이 저장기간 동안 5.0mm 이상을 유지하였다.

품질지표 중에서 영양과수가 가장 낮은 반응열사 0회 반응열사 30일로 설정하여 유통되는 '영기'는 '화수오'의 유통기한은 16.64개월로 산출되었다. 이 결과 유통과정 중의 안전을 고려하여 연간변화 0.8을 고려하여 제품의 최종 유통기한은 13.8개월로 산출되었다.

계5장 참고자료

- 식품위생안전관리: 식품, 식용첨가물 및 건강기능식품의 유통기한 설정기준(제2015-34호, 2015. 06)
- 식품위생안전관리: 식품 및 축산물과 유통기한 설정 지침 가이드라인(2012. 12)

3. 품질지표별 품질회귀분석과 반응의 자료

품질회귀분석은 품질이 반응을 일으키는 데 필요한 최소한의 에너지로 이루어진 스캔들로부터의 구할 수 있는 적외선(FTIR)을 사용하여 17을 3축으로 하여 선형회귀분석 후, 얻은 3개의 기울기로부터 선형한 품질지표의 E<sub>0</sub>(품질회귀분석) 구한다(데이터는 최소 3개의 가속온도로부터 구할 값이 요구된다).

Table 3.1 반응열사 품질회귀분석과 반응의 자료

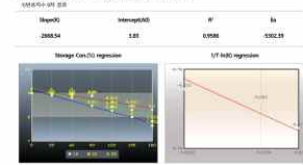
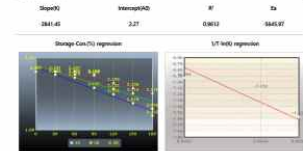


Table 3.2 regression statistics and plots for reaction heat.











제품표준서		MF70
제품명	생기(冠)원주오	
내 용	표준화, 원주(가)원 및 원주(가)원	

1. 주원재료

- 원주(가)원주오
- 내용량 : 70ml(병) × 10개(박스)

2. 품질표시사항

- 원주(가)원주오
- 식재료 유래 : 전통공법
- 내용량 : 70ml(병) × 10개(박스)
- 원주(가)원주오 : 원주(가)원주오, 원주(가)원주오, 원주(가)원주오, 원주(가)원주오, 원주(가)원주오, 원주(가)원주오, 원주(가)원주오, 원주(가)원주오, 원주(가)원주오, 원주(가)원주오
- 조제방법 및 조제조건 : 1) 1일 1회 1회
- 원주(가)원주오 : 1) 원주(가)원주오, 원주(가)원주오, 원주(가)원주오, 원주(가)원주오, 원주(가)원주오, 원주(가)원주오, 원주(가)원주오, 원주(가)원주오, 원주(가)원주오, 원주(가)원주오
- 유통기한 : 1년(제조일 기준)
- 원주(가)원주오 : 원주(가)원주오, 원주(가)원주오, 원주(가)원주오, 원주(가)원주오, 원주(가)원주오, 원주(가)원주오, 원주(가)원주오, 원주(가)원주오, 원주(가)원주오, 원주(가)원주오
- 원주(가)원주오 : 원주(가)원주오, 원주(가)원주오, 원주(가)원주오, 원주(가)원주오, 원주(가)원주오, 원주(가)원주오, 원주(가)원주오, 원주(가)원주오, 원주(가)원주오, 원주(가)원주오
- 원주(가)원주오 : 원주(가)원주오, 원주(가)원주오, 원주(가)원주오, 원주(가)원주오, 원주(가)원주오, 원주(가)원주오, 원주(가)원주오, 원주(가)원주오, 원주(가)원주오, 원주(가)원주오
- 원주(가)원주오 : 원주(가)원주오, 원주(가)원주오, 원주(가)원주오, 원주(가)원주오, 원주(가)원주오, 원주(가)원주오, 원주(가)원주오, 원주(가)원주오, 원주(가)원주오, 원주(가)원주오

3. 보관방법 및 유통기한

- 1) 냉장보관
  - 2) 직사광선을 피하고 서늘한 곳에 보관 및 유통하십시오.
  - 3) 유통기한
- 제조일로부터 1년(제조일 기준)

제품표준서		MF70
제품명	생기(冠)원주오	
내 용	가(가)원주오	

1. 원재료









09. 신제품 브랜드네임 스케치안 - 상표출원조사결과

- 01. 풍미단 - 등록가능 확인
- 02. 동의인 - 등록가능 확인
- 03. 약이인 - 등록가능 확인
- 04. 풍근 - 등록가능 확인
- 05. 풍근 - 등록가능 확인
- 06. 생지가든 - 등록가능 확인
- 07. 향유오 - 풍미단 등록특성표 '향유오'가 존재하여 등록이 어려울 것이라 판단됩니다.

09. 신제품 브랜드네임 스케치안 - 상표출원조사결과

- 08. 보초 - 등록가능 확인
- 09. 근본 - 식별력이 부족하여 상표등록이 어렵다고 사료됩니다.
- 10. 풍물 - 유사한 상품특성표 '풍물'이 존재하여 등록이 어려울 것이라 판단됩니다.
- 11. 풍미단 - 동일한 상품특성표 '풍미단'이 존재하여 등록이 어려울 것이라 판단됩니다.
- 12. 풍미단 - 동일한 상품특성표 '풍미단'이 존재하여 등록이 어려울 것이라 판단됩니다.
- 13. 풍미단 - 등록가능 확인
- 14. 약이인 - 등록가능 확인
- 15. 풍미단 - 등록가능 확인

10. 등록가능한 브랜드 네임

- 01. 풍미단 / 풍미단으로 이루어진 뿌리
- 02. 동의인 / 동의인에서 이루어진 사탕물
- 03. 약이인 / 풍고 인강한 약이인
- 04. 풍근 / 풍근이든 뿌리
- 05. 풍근 / 풍근이든 풍물 비책
- 06. 생지가든 / 뿌고 생지가든뿌리
- 08. 보초 / 보초같은
- 13. 풍미단 / 풍미단에서 내린 약이인
- 14. 약이인 - 약이인 / 약이인들 같은 향유오
- 15. 풍미단 - 향유오 / 생지가든 풍미단향유오

11. 신제품 브랜드 네임 제안 안

01 생지가든 풍미단향유오를 위한 생지가든향	02 동의인 풍미단향유오를 위한 동의인향	03 귀하늘 풍미단향유오를 위한 귀하늘향유오
--------------------------------	------------------------------	--------------------------------

패키지 디자인 개발



01. 향유오음료 - 1안



01. 향유오음료 - 1안



01. 향유오음료 - 1안



02. 향유오음료 - 2안



02. 향유오음료 - 2안



02. 향유오음료 - 2안



02. 향유오음료 - 2안



03. 향유오음료 - 3안



03. 향유오음료 - 3안



03. 향유오음료 - 3안



03. 향유오음료 - 3안



패키지 디자인 개발 확정안 및 인쇄원고 제작

04. 패키지 디자인 결정안



동부생약영농조합법인의 방침에 따라 새끼마수오 스틱으로 제품 변경  
패키지 디자인 수정하여 변경함

05. 패키지 디자인 최종 확정안



- 새끼마수오 스틱  
- 15g x 30 스틱

Preposal // 2017. 12. 7

동부생약 영농조합법인  
하수도 건강음료 신제품 패키지 디자인 개발 완료보고

감사합니다.

## 11. 기타사항

	코드번호	D-13
○ 해당없음		

## 12. 참고문헌

	코드번호	D-14
○ 참고문헌		
Abe N, Nemoto A, Tsuchiya Y, Hojo H, Hirota A. 2000. Study of the 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical scavenging mechanism for a 2-pyrone compound. <i>Biosci Biotech Biochem</i> , 64:306-333.		
AOAC. 1996. Official Methods of Analysis. 15th ed. Association of Official Analytical Chemists. Washington DC (USA). pp. 210-219.		
Ban, H.J. and K.S. Ko. 2012. Antioxidant activity of methanol extracts from the <i>Polygoni multiflori</i> radix. <i>J. Korean Soc. Beauty Cultural Arts</i> . 1:47-55 (in Korean).		
Blois MS. 1958. Antioxidant determination by the use of a table free radical. <i>Nature</i> , 26:1199-1744.		
Cao, G., E. Sofic and R.L. Prior. 1996. Antioxidant capacity of tea and common vegetables. <i>J. Agric. Food Chem</i> . 44:3426-3431.		
Chan, Y.C., M.F. Wang and H.C. Chang. 2003. <i>Polygonum multiflorum</i> extracts improve cognitive performance in senescence accelerated mice. <i>Am. J. Chin. Med</i> . 31:171-179.		
Chiu PY, Mak DH, Poon MK 2002. In vivo antioxidant action of a lignan-enriched extract of Schisandra fruit and an anthraquinone-containing extract of Polygonum root in comparison with schisandrin B and emodin. <i>Planta Med</i> . 68:951-956.		
Choi, J.H., H.S. Lee, Y.G. Kim, B.M. Kim, I.H. Kim and C.H. Lee. 2012. Effect of <i>Polygonum multiflorum</i> Thunberg extract on lipid metabolism in rats fed high-cholesterol diet. <i>J. Korean Soc. Food Sci. Nutr</i> . 41:957-962 (in Korean).		
Choi, S.K. 2009. Particulars Oriental Medicine Product. Shinkwang Publishing Co., Seoul, Korea. pp. 300-301 (in Korean).		
Do, Y.J., S.K. Ku, H.T. Kim, T.H. Oh, Y.M. Cho, S.W. Kim, I.S. Ryu and K.W. Lee. 2011.		

- Antiosteoporotic effects of *Polygoni multiflori radix* (PMR) in ovariectomized (OVX)-induced osteoporosis ddY Mice. *J. Vet. Clin.* 28:375-386 (in Korean).
- Dragsted LO, Strube M, Larsen JC. 1993. Cancer protective factors in fruits and vegetables. Biochemical and biological background. *Pharmacol Toxicol.*, 72:116-135.
- Goldberg I. 1994. Functional foods. Chapman & Hall Press. New York, USA pp.3-550.
- Ha KA, Park BS, Chang HJ. 2014. Development of squash sikhye added with retrograded rice flour containing resistant starch using response surface methodology and quality comparison with commercial beverages. *Korean J Food Cook Sci.* 30:129-138.
- Han HD, Jo JC, Lee HJ, Joung WY. 2003. In vitro evaluation of the cytotoxicity of gallic acid vitamin A. *Korean J Oral Anatomy.* 27:83-92.
- Han, K.S., S.S. Ham, E.H. Jeong and H.K. Lee. 1992. Antimutagenic effects of the edible mountain herb juices against Trp-P-1 and 2AF. *Korean J. Food Hygiene.* 7:161-168 (in Korean).
- Herald TJ, Gadgil P, Tilley M. 2012. High-throughput micro plate assays for screening flavonoid content and DPPH-scavenging activity in sorghum bran and flour. *J Sci Food Agric.* 92: 2326-2331.
- Hong JS, Kim YH. 1989. Contents of free amino acids and total amino acids in *Agaricus bisporus*, *Pleurotus ostreatus* and *Lentinus edodes*. *Korean J Food Sci Technol.* 21:58-62.
- Hwang, J.B., M.O. Yang and H.K. Shin. 1997. Survey for approximate composition and mineral content of medicinal herbs. *Korean J. Food Sci. Technol.* 29:671-679 (in Korean).
- Jansen, S. 2002. Anticancer and health protective properties of citrus fruit components. *J. Asia Pacific Clinical Nutrition.* 11:79-84.
- Jeong, K.S. 2011. A study on physicochemical properties of *Achyranthes japonica* and *Smilax china* extracts. *J. Korea Academia Industrial cooperation Soc.* 12:3317-3326 (in Korean).
- Jeong, K.S. 2011. Extraction characteristics of soluble solid from *Rumex crispus* (Curled Dock) roots. *J. Environmental Sci.* 20:1265-1272 (in Korean).
- Joo GJ, Park HD 1996. Optimizing conditions for *Streptomyces chibaensis* J-59 production using response surface methodology. *Agric. Res. Bull. Kyungpook Natl Univ.* 14, 101-110.
- Joslyn MA. 1970. Methods in food analysis, Acad. Press. New York. p. 710-711.
- Kang, S.J. 1987. Nutrition science. Hyongsul Publishing Co., Seoul, Korea. p. 69 (in Korean).
- KFDA : Food Code (a separate volume). 1999. Munyoungsa, Seoul, Korea. pp. 262-268 (in Korean).
- Kim JW, Lee SI, Lee YK, Yang SH, Kim SD, Suh JW. 2013. Establishment of hot water extraction conditions for optimization of fermented *Smilax china* L. using response surface methodology. *Korean J Food Preserv.* 20:668-683.
- Kim SH, Kim IH, Kang BH, Lee SH, Kim JH, LEE JM. 2006. Hot-water extraction condition

- of *Gastrodia elata* Blume by response surface methodology. *Korean J Food Preserv.* 13:131-137.
- Kim SH. 2014. Antioxidant characteristics of *Artemisis capillaris* hot-water extract using response surface methodology. *J life Sci.* 24:419-427.
- Kim, A.R., J.J. Lee, H.O. Jung and M.Y. Lee. 2010. Physicochemical composition and antioxidative effects of yacon (*Polymnia Sonchifolia*). *J. life Sci.* 20:40-48 (in Korean).
- Kim, H.J. and H.K. Joo. 1989. Change in sugar composition of ginseng extract during heat treatment. *Korean J. Ginseng Sci.* 23:56-59 (in Korean).
- Kim, H.N., S.Y. Yu, W.B. Yoon, S.M. Jang, Y.J. Jang and O.H. Lee. 2014. Analysis of nutritional components and physicochemical properties of hot-air dried Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus* L.) powder. *Korean J. Food Sci. Technol.* 46:73-78 (in Korean).
- Kim, H.R., J.H. Lee, Y.S. Kim and K.M. Kim. 2007. Chemical characteristics and enzyme activities of Icheon *Ge-Geol* radish, Gangwha turnip, and Korean radish. *Korean J. Food Sci. technol.* 39:255-259 (in Korean).
- Kim, M.H., H.L. Jang and K.Y. Yoon. 2012. Changes in physicochemical properties of *haetsun* vegetables by blanching. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 41: 647-654 (in Korean).
- Kim, O.K. 2008. Antidiabetic effect of Ha-Su-O(polygoni radix). *J. Korean Oil Chem. Soc.* 25:347-354 (in Korean).
- Kim, Y.S., Y.H. Lim, S.G. Wang, S.J. and C.R. Park. 1999. The physicochemical properties and antioxidation effect of *Samul Chol-Pyon*. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 28:990-996 (in Korean).
- Koh YJ, Cha DS, Choi HD, Park YK, Choi IW. 2008. Hot water extraction optimization of dandelion leaves to increase antioxidant activity. *Korean J Food Sci Technol.* 40:283-289.
- Kwon JH, Byun MW, Cho HO, Kim YJ, Kim JG. 1987. Effect of chemical fumigant and  $\gamma$ -rays on the physicochemical properties of dried oak mushrooms(in Korean). *Korean J Food Sc. Technol.* 19:273-278.
- Kwon, O.Y., H.J. Kim, S.H. Oh, J.H. Lee, H.C. Kim, W.K. Yoon, H.M. Kim, C.S. Park and M.R. Kim. 2006. Nutrient composition of domestic potato cultivars. *J. East Asian Soc. Dietary Life.* 16:740-746 (in Korean).
- Lee S. 2015. Quality characteristics of Aronia(*Aronia melanocarpa*(Michx.) Ell) by different drying method, and optimization of extraction conditions of bioactive substance. MS Thesis, Kyungpook University, Korea. 53-55.
- Lee WY, Choi SY, Lee BS, Park JS, Kim MJ, Oh SL. 2016. Optimization of extraction conditions from omija(*Schizandra chinensis* Baillon) by response surface methodology. *Korean J Food Preserv.* 13:252-258.
- Lee YN 2006. New Korean Flora. Kyohak Publishing Co., Seoul Korea, p 1-284.
- Lee, J.S., Y.S. Ahn, H.S. Kim, M.N. Chung and H.O. Boo. 2007. Proximate composition and minerals, phenolics, anthocyanins pigment characteristics on the parts of sweet potato. *Korean J. Intl. Agri.* 19:196-204 (in Korean).



- Lee, K.B., J.B. Yang and M.S. Ko. 2008. Food Analysis. Yoohan Publishing Co., Seoul, Korea. pp. 160-171 (in Korean).
- Lee, S., H.K. Moon, S.W. Lee, J.N. Moon and J.K. Kim. 2016. Biological activities in *Aronia melanocarpa* depending on drying methods. *J. Korean Food Preserv.* 23:1018-1025.
- Lee, Y.S., H.S. Kim, Y.W. Son, K.S. Yoo and J.H. Lee. 2002. Effect of radix *Polygoni multiflori* on cultured vascular endothelial cells damaged by xanthine oxidase and hypoxanthine. *Korean J. Oriental physiology Pathology.* 16:720-723.
- Miller NJ, Rice-Evans C, Davies MJ, Gopinathan V. 1993. A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. *Clinical Sci* 84:407.
- Morrison, W.R. and L.M. Smith. 1964. Preparation of fatty acid methylesters and dimethylacetals from lipid with boron fluoride methanol. *J. Lipid Res.* 5:600-608.
- Nanasombat S, Teckchuen N. 2009. Antimicrobial, antioxidant and anticancer activities of Thai local vegetables. *J Med Aromat Plant.* 3:443-449.
- Ohara, I. and S. Ariyoshi. 1979. Comparison of protein precipitants for the determination of free amino acid in plasma. *Agric. Biol. Chem.* 43:1473-1478.
- Palmer, J.K. and D.M. List. 1973. Determination of organic acids in foods by liquid chromatography. *J. Agric. Food Chem.* 21:903-909.
- Rho, M.W. and T.K. Lee. 2006. Monitoring of free sugar and amino acid of red bean paste by corn syrup concentration and heating treatment conditions. *Korean J. Food Preserv.* 13:581-588 (in Korean).
- Roberta R, Nicoletta P, Anna P, Ananth P, Min Y, Catherine RE. 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic Bio Med* 26:1231-1237.
- Seo, B.I., J.H. Lee, H.Y. Choi, D.Y. Kwon and Y.M. Bu. 2006. Oriental Herbal Medicine. Younglimsa Publishing Co., Seoul, Korea. pp. 865-868 (in Korean).
- Sin, H.S. 1987. Food Analysis. Shinkwang Publishing Co., Seoul, Korea. pp. 70-83 (in Korean).
- Son, S.M., H.O. Kwon and J.H. Lee. 2011. Physicochemical composition of *Capsosiphon fulvescens* according to drying methods. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 40:1582-1588 (in Korean).
- Strydom, D.J. and S.A. Cohen. 1993. Sensitive analysis of cystine/cysteine using 6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidy carbamate (AQC) derivatives. *Tech Prot. Chem.* 4:299-306.
- Wang W, Cao CY, Wang DQ, Zhao DZ. 2006. Effect of prepared *Polygonum multiflorum* on striatum extracellular acetylcholine and choline in rat of intracerebral perfusion with sodium azide. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi.* 31:751-753.
- Wilson, A.M., T.M. Work, A.A. Bushway and R.J. Bushway 1981. HPLC determination of fructose, glucose and sucrose in potatoes. *J. Food Sci.* 46:300-301.
- Xiao PG, Xing ST, Wang LW. 1993. Immunological aspects of Chinese medicinal plant as antiaging drugs. *J Ethnopharmacol.* 38:167-175.

- Yamachuchi T, Takamura H, Matoba T, Terao J. 1998. HPLC method for evaluation of the free radical-scavenging activity of foods by 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl. *Biosci Biotech Biochem.* 62:1201-1204.
- Yim TK, Wu WK, Mak DH, Ko MW. 1998. Myocardial protective effect of an n-tharaquinone-containing extract of *Polygonum multiflorum* ex vivo. *Planta Med.* 64:607-611.
- Yoon CH, Bok HS, Choi DK, Row KH. 2012. Optimization condition of astaxanthin extract from shrimp waste using response surface methodology. *Korean Chem Engineering Res.* 50:545-550.
- Yoon OK, Cho JS. 2007. Optimization of extraction conditions for hot water extracts from *Chrysanthemum indicum* L. by response surface methodology. *Korean J Cook Sci.* 23: 1-8.
- Yoon, J.A., S.W. Hahm and Y.S. Son 2009. Nutrients contents in different parts of pickly pear (*Opuntia humifusa*) and possible anti-breast cancer effect. *Korean J. Food Nutr.* 22:485-491 (in Korean).

### 주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 고부가가치식품개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표하는 때에는 반드시 농림축산식품부에서 시행한 고부가가치식품개발사업의 연구 결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.