

발간등록번호

11-1543000-002746-01

고부가치식품기술개발사업 R&D

# 꽃송이버섯을 활용한 골관절 염 개선 건강기능식품 개발 최종보고서

2019. 06. 15.

주관연구기관/(주)경신바이오  
협동연구기관/덕성여자대학교  
계명대학교

농림축산식품부

<제출문>

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “꽃송이버섯을 활용한 골관절염 개선 건강기능식품 개발”[개발기간 : 2016.07.07 ~ 2018.12.31 (30개월)]과제의 최종보고서로 제출합니다.

2019. 06. 14.

주관연구기관명 : 주식회사 경신바이오 장 기 자 (인)  
협동연구기관명 : 덕성여자대학교 산학협력단 (인)  
협동연구기관명 : 계명대학교 산학협력단 (인)



주관연구책임자 : 김 선 근  
협동연구책임자 : 심 상 희  
협동연구책임자 : 정 길 생

국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제18조에 따라 보고서 열람에 동의합니다.

<보고서 요약서>

보고서 요약서

과제고유번호	11600103	해 당 단 계 연 구 기 간	2016.07.07~20 18.12.31	단 계 구 분	1/1
연구사업명	단 위 사 업	고부가가치식품기술개발사업			
	사 업 명	꽃송이버섯을 활용한 골관절염 개선 건강기능성식품 개발			
연구과제명	대 과 제 명	(해당 없음)			
	세부 과제명				
연구책임자	김선근	해당단계 참여연구원 수	총: 1 명 내부: 1 명 외부: 명	해당단계 연구개발비	정부: 540,000 천원 민간: 235,000 천원 계: 775,000 천원
		총 연구기간 참여연구원 수	총: 명 내부: 명 외부: 명	총 연구개발 비	정부: 540,000 천원 민간: 235,000 천원 계: 775,000 천원
연구기관명 및 소속부서명	덕성여자대학교 산학협력단, 계명대학교 산학협력단			참여기업명	
국제공동연구	상대국명:			상대국 연구기관명:	
위탁연구	연구기관명:			연구책임자:	

※ 국내외의 기술개발 현황은 연구개발계획서에 기재한 내용으로 같음

연구개발성과의 보안등급 및 사유	일 반
-------------------------	-----

9대 성과 등록·기탁번호

구분	논문	특허	보고서 원문	연구시설 ·장비	기술요약 정보	소프트 웨어	화합물	생명자원		신품종	
								생명 정보	생물 자원	정보	실물
등록·기탁 번호											

국가과학기술종합정보시스템에 등록된 연구시설·장비 현황

구입기관	연구시설· 장비명	규격 (모델명)	수량	구입연월일	구입가격 (천원)	구입처 (전화)	비고 (설치장소)	NTIS 등록번호

요약(연구개발성과를 중심으로 개조식으로 작성하되, 500자 이내로 작성합니다)      보고서 179면수

<국문 요약문>

<p>연구의 목적 및 내용</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 꽃송이버섯을 원료로 골관절염 개선 기능성 건강식품 개발             <ul style="list-style-type: none"> <li>- 꽃송이버섯을 원료로 하여, 골관절염에 효과가 뛰어난 성분 규명 및 효능 검증을 하여 궁극적으로 개별인정형 원료등록 신청을 목표로 함.</li> </ul> </li> <li>○ (원료 표준화) 지표성분 설정 및 가공 표준화             <ul style="list-style-type: none"> <li>- 원료의 추출법 및 가공화 적정기술 개발</li> <li>- 지표성분 설정 및 시험법 밸리데이션을 통한 원료의 기준규격 설정</li> <li>- 가공을 위한 원료 표준화 방법 설정</li> </ul> </li> <li>○ (기능성 검증) 소재의 골관절염에 대한 효능 검증             <ul style="list-style-type: none"> <li>- 원료 및 성분의 골관절염 개선 효능 검증</li> <li>- 동물모델을 활용하여 후보소재에 대한 골관절염 기능성 확인</li> <li>- 골관절염 개선의 효능 탐색 및 작용기전 연구</li> </ul> </li> <li>○ (제품화 및 인체적용시험) 제품 개발 및 출시             <ul style="list-style-type: none"> <li>- 대량생산공정을 위한 원재료·제조공정의 표준화 및 안정성 연구</li> <li>- 인체시험을 통한 기능성평가 : 시제품(확정된 식품형태) 생산 및 인체적용시험</li> <li>- 기능성원료인정 신청 : 개별인정형 기능성원료 추진</li> <li>- CRO업체와 연계하여 인체시험을 통한 기능성평가 및 개별인정형 등록 신청</li> </ul> </li> </ul>				
<p>연구개발성과</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ (연구기반지표) SCI급 5편, KCI급 4편 발표 본 연구의 결과로, 식품 천연물 분야의 JCR상위 10%이내의 저널인 Journal of Agricultural and Food Chemistry, Journal of Natural Products, Phytomedicine에 논문을 게재하였음. SCI급 저널에 총 5편의 논문을 게재하였고, 한국생약학회지, Natural Products Science등 비 SCI저널에 총 4편의 논문을 게재하였음.</li> <li>○ (사업화 지표) 특허출원 2건, PCT출원 1건 연구의 결과로 특허출원 2건, PCT출원 1건을 완료하였음. 제품화를 실시하였고, 고용창출 (1인) 발생.</li> </ul>				
<p>연구개발성과의 활용계획 (기대효과)</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 기술개발 결과물             <ul style="list-style-type: none"> <li>- 꽃송이버섯의 지표성분을 규명함으로써 표준화된 시료 조제 및 제법</li> <li>- 꽃송이버섯의 효능 검증</li> <li>- 조성 및 제조공정에 대한 특허 출원</li> <li>- 국제저명학술지 논문 발표</li> </ul> </li> <li>○ 기술개발 결과의 활용방안             <ul style="list-style-type: none"> <li>- 연구 결과를 바탕으로 한 논문 및 특허를 통하여 당 기술결과의 연구 성과를 공인 추진함</li> <li>- 지표성분을 이용한 원료표준화 방안 마련 및 기능성 검증으로 통하여 추후 건강기능식품으로의 기능성 원료 개별인정의 토대 마련</li> <li>- 개별인정형 건강기능식품 개발로 인하여 꽃송이 버섯의 부가가치 증진, 이로 인한 농가소득 증대 및 일본 수출 품목으로 개발</li> </ul> </li> </ul>				
<p>국문핵심어 (5개 이내)</p>	<p>꽃송이버섯</p>	<p>골관절염</p>	<p>건강기능식품</p>	<p>원료표준화</p>	
<p>영문핵심어 (5개 이내)</p>	<p>Cauliflower mushroom</p>	<p>osteo-arthritis</p>	<p>functional food</p>	<p>standardization</p>	

**<국문 목차>**

**< 목 차 >**

1. 연구개발과제의 개요 .....	9
2. 연구수행 내용 및 결과 .....	37
3. 목표 달성도 및 관련 분야 기여도 .....	173
4. 연구결과의 활용 계획 등 .....	175
붙임. 참고 문헌 .....	179

**<별첨>** 주관연구기관의 자체평가의견서

## <뒷면지>

### 주 의

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

<영문 요약문>

< SUMMARY >

		코드번호	D-02		
Purpose& Contents	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ Development of a functional food to relieve osteoarthritis using cauliflower mushroom.</li> <li>-We aim to apply for registration of individual raw materials as ultimately by identifying the ingredients that are effective for osteoarthritis and verifying the efficacy, using the raw material of the mushroom.</li> <li>○ (Standardization of raw materials) Establishment of standard compound and standardization of processing                             <ul style="list-style-type: none"> <li>- Raw material extraction and processing technology development</li> <li>- Establishment of standard compound of raw materials and validation of test method</li> <li>- Setting raw material standardization method for processing</li> </ul> </li> <li>○ (Evaluation of activity) Effectiveness on Osteoarthritis                             <ul style="list-style-type: none"> <li>- Validation of improvement effects of raw materials and ingredients on osteoarthritis</li> <li>- Identification of functional osteoarthritis of candidate material using animal model</li> <li>- Study on the efficacy of osteoarthritis improvement and mechanism of action</li> </ul> </li> <li>○ Product development and release                             <ul style="list-style-type: none"> <li>- Standardization and stability study of raw material and manufacturing process for mass production process</li> <li>- Functional evaluation through human testing: production of prototype (confirmed food type) and Human body application test</li> <li>- Application for functional raw materials approval: promotion of functional raw materials for individual users</li> <li>- Functional evaluation through human body test in conjunction with CRO company and application for individual person registration</li> </ul> </li> </ul>				
Results	<p>(Research-based indicators) 5 SCI-indexed papers and 4 KCI papers</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>○ As a result of this study, many articles were published in renowned journals including Journal of Agricultural and Food Chemistry, Journal of Natural Products, and Phytomedicine, which are journals within the top 10% of JCR in food natural products. A total of five papers were published in SCI journals, and four papers were published in non-SCI journals such as the Journal of Korean Pharmacopoeia and Natural Products Science.</li> <li>○ (Commercialization index) 2 patent applications, 1 PCT application</li> </ul> <p>As a result of the study, two patent applications and one PCT application were completed. Commercialization, job creation (one person) occurred.</p>				
Expected Contribution	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ Result of technology development                             <ul style="list-style-type: none"> <li>- Standardized preparation and preparation of specimens by identifying the surface components of Mushroom</li> <li>- Verification of the efficacy of Mushroom</li> <li>- Patent application for composition and manufacturing process</li> <li>- Presentation of internationally renowned journals</li> </ul> </li> <li>○ Use of technology development results                             <ul style="list-style-type: none"> <li>- Research on the results of the research through the papers and patents based on the research results</li> <li>- Establishment of standardization method of raw materials and functional verification using surface elements</li> <li>- Establishment of basis for individual recognition of functional raw materials as health functional foods in the future</li> <li>- Due to the development of individual functional foods for health, the value-added of the mushroom is increased, resulting in the increase of the farm income and the export to Japan.</li> </ul> </li> </ul>				
Keywords	Cauliflower mushroom	osteo-arthritis	functional food	standardization	



## <Contents>

1. Summary of the research and development .....	9
2. Research contents and results .....	37
3. Goal achievement and contribution to the related field .....	173
4. Usage plan of the results .....	175
Appendix. References .....	179

# 1. 연구개발과제의 개요

## 1-1. 연구개발 목적

### (1) 연구개발의 최종목표

꽃송이버섯을 원료로 하여, 골관절염에 대한 우수한 효능 검증 및 인체시험을 통한 개별인정형 원료 등록 신청을 목표로 함.

### (2) 연구개발의 세부목표

#### ① 주관연구기관-(주)경신바이오

- 제제화를 통한 제품개발, 원재료 · 제조공정의 표준화 및 안정성
- Bench scale 및 Plant scale의 추출 공정 확립
- 공업적 순도수준의 정제방법 확립
- 원료의 안정성 및 물성, 가공적성 검토
- 시제품 가공/제작 및 제제화 품질 및 저장적성 검토
- 섭취량, 섭취 시 주의사항 및 그 설정에 관한 시험
- 보존기준 유통기간 및 그 설정에 관한 시험
- 유해물질에 대한 규격 및 그 설정에 관한 자료
- 개별인정형 추진을 위한 인체적용시험 (위탁 CRO기관 의뢰)  
이중맹검/대조물질 대조/무작위배정/인체적용시험
- 건강기능식품 기능성원료 인정 신청서 자료(위탁)
- MKT전략 수립
- 사업화 전략을 위한 MKT 일정 process 확립  
시장분석 및 기회/컨셉 및 아이디어/브랜드 개발/상품화/런칭

#### ② 협동연구기관-덕성여자대학교 약학대학

- 꽃송이버섯 원료 및 가공표준화
- 원료의 기준 및 시험방법 연구
- 지표성분의 규명 및 대량추출
- 함량시험법 설정
- 분석법 밸리데이션

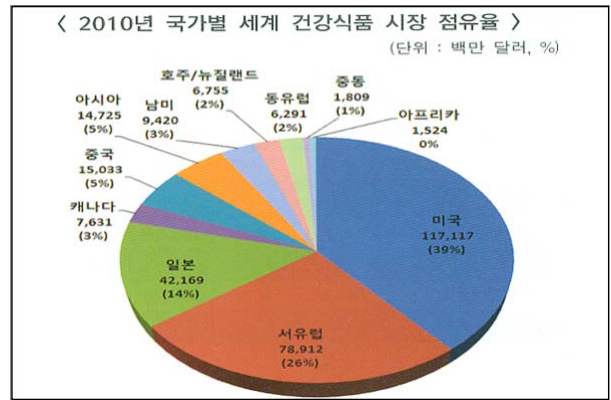
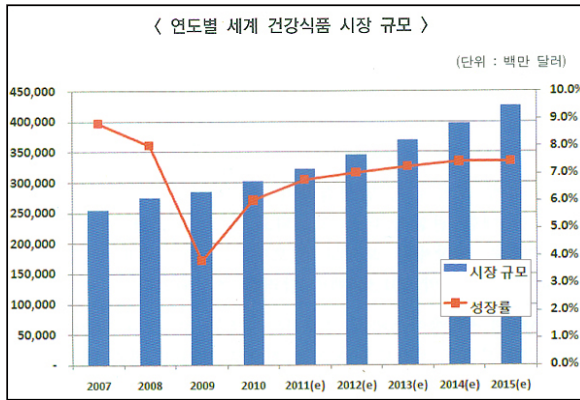
- 원료의 활성성분 분리 연구
- 유효 활성성분 추출, 정제 및 구조 규명

### ③ 협동연구기관-덕성여자대학교 약학대학

- 국내산 약용버섯 원료의 기능성 검증
- 원료 및 유효성분에 대한 골관절염에 활성이 있는 *in vitro* 효능 검증
- 원료 및 유효성분에 대한 동물모델을 이용한 *in vivo* 효능 검증
- 원료 및 유효성분의 골관절염 억제기능 작용기전 연구

## 1-2. 연구개발의 필요성 (건강기능식품 개발의 필요성)

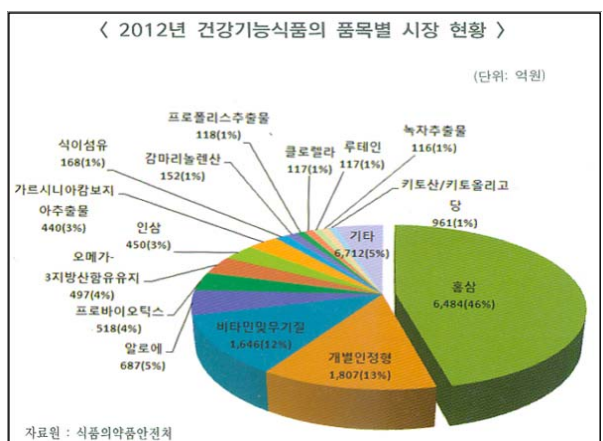
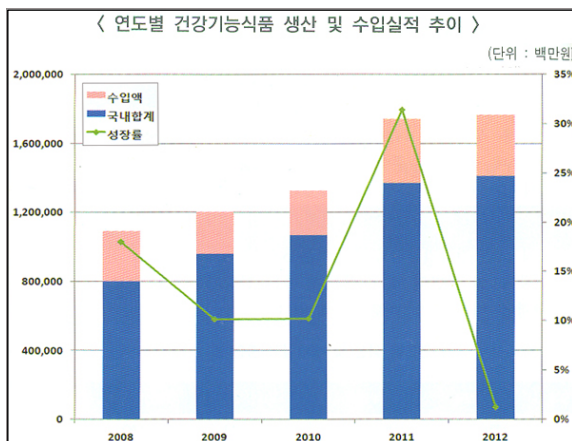
- (1) 고령화, 소비자 가치 추구 다양화, 건강위해 요인 증가, 질병구조의 변화, 바이오 경제 확대, R&D 확대, 바이오 기술의 실용화, 맞춤형 제품 및 서비스의 확대, 첨단기술과 문화의 융합, 과학적 근거를 기반으로 한 안전관리강화 등의 사회 트렌드변화는 건강기능식품의 발전에 긍정적인 영향으로 작용함 (건강기능식품산업 미래발전방향 수립을 위한 산업체전문가 조사기획보고서, 한국보건산업진흥원, 2011).
- (2) 통계청자료('11년)에 의하면, 65세 이상 인구의 비율은 2010년11%, 2030년 24.3%, 2060년 40.1%로. 2030년에는 초고령 사회로 진입할 예정이며, 인구고령화와 웰빙 트렌드의 확산은 음식을 통한 건강관리에 대한요구를 증가시켜 건강기능식품의 시장발전을 가속화시킬 것으로 예상됨.
- (3) 한국건강기능식품협회의 '2013 건강기능식품 시장 현황 및 소비자 실태 조사'에 따르면, 다음 그림과 같이 전세계 건강기능식품 시장은 꾸준히 성장하고 있으며, 미국 1,170억 달러로 1위, 독일을 비롯한 서유럽이 2위, 일본의 경우 420억 달러로 3위를 차지하고 있음.



[세계 건강기능식품 시장과 국가별 점유율]

(4) 미국은 특히 비타민, 미네랄, 허브, 식사대용식품, 스포츠·영양강화식품, 스페셜티 등의 Supplement 시장 규모가 280억 달러에 달할 정도로 큰 인기를 끌고 있음. 유럽시장에서 시장규모가 가장 큰 국가인 독일의 2010년 건강기능식품 시장은 190억 달러 규모로 비타민·미네랄과 허브·식물 등이 높은 점유율을 기록하고 있음. 아시아에서는 일본이 가장 활성화되어 있으며, 일본의 건강기능식품 시장은 2010년 421억 달러로 전 세계 건강기능식품 시장의 14%를 차지하고 있고 앞으로도 지속적인 성장이 전망됨.

(5) 국내의 건강기능식품은 주로 미국(17,652억 원), 일본(2,745억 원), 캐나다(1,586억 원), 중국(953억 원)으로부터 수입되고 있으며, 수입식품의 국내시장점유율이 지속적으로 증가하고 있으며, 무역수지가 지속적으로 악화되고 있음(10년 기준). 국내 건강기능식품 업체는 제조업, 수입업, 및 판매업을 포함하여 2004년부터 2012년 총 8만7343개소로 보고되었으며, 지속적으로 증가하고 있는 추세임. 제조 품목은 비타민·무기질이 가장 많고, 홍삼, 개별인정제품, 프로바이오틱스, 오메가-3 지방산 함유 유지, 가르시니아 캄보지아추출물 등이 많은 것으로 알려짐.



### 1-3. 국내 건강기능식품 시장 규모

- (1) 심의 받은 개별인정형 제품의 기능성 내용은, 2013년 갱년기 여성 건강 기능성 제품이 107건으로 가장 많았으며, 꾸준히 강세를 보였던 간 건강 기능성은 전년대비 감소한 것으로 개별인정형 건강기능식품은 꾸준히 증가하고 있으며, 이는 건강기능식품 개발에 대한 노하우가 축적되고 국내 연구개발 인프라가 지속 발전하고 있는 것으로 분석됨.
- (2) 국내 건강기능식품소재는 자체 연구개발보다는 수입의존도가 높고, 다른 나라에 비해 원천 기술력도 낮음. 또한 농산물, 자생약용식물, 생약성분 등 기초연구는 지속적으로 수행되었으나 산업계와의 연계 미흡으로 산업화가 저조한 상황임. 또한 연구초기단계에 제품화를 고려하지 않은 개발로 전임상단계에 머무르거나, 중복투자 등으로 제품화 실적이 저조함. 따라서, 과학적 기술력을 보유하고 있는 대학과 제품생산능을 갖춘 기업과의 산학연 공동연구를 통해 고부가가치 창출이 가능한 소재를 발굴하여 산업화 할 필요성이 있음.

### 1-4. 버섯과 건강기능식품

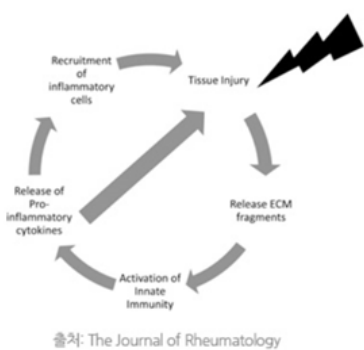
- (1) 우리나라에서는 버섯이 식용 또는 약용으로 예로부터 많이 사용되어져 왔음. 특히 일본과 우리나라는 버섯재배기술이 세계적인 것으로 알려져 있고, 우리나라 버섯이 중국산보다는 안전하다는 인식이 있어 국내의 버섯산업의 전망은 상당히 유망한 것으로 알려져 있다.
- (2) 그러나 우리나라 버섯에 관한 연구는 주로 대량생산을 위한 재배방법, 종균 개발, 등 1차 산업에 국한되어 왔고, 최근에 이르러서 버섯의 기능성을 목적으로 한 연구가 수행되어 왔음.
- (3) 일반적으로 버섯류는 항암, 면역, 항염증 등 여러 가지 기능성을 가지고 있는 것으로 알려이다. 그러나 기능성 내용을 표시/광고할 수 있는 “건강기능식품”은 “건강기능식품에 관한 법률”에 따른 과학적 근거자료를 토대로 그 기능성을 입증할 수 있어야 함. 건강기능식품은 건강기능식품 공전에 등재되어 있는 고시형과 새로이 인정받아야 하는 개별인정형으로 나뉠 수 있음.

- 현재 건강기능식품 공전에 등재된 버섯원료는 “목이버섯(배변활동 원활)”과 “영지버섯 자실체 추출물(혈행개선)”이며, 개별인정받은 원료로는 “금사상황버섯(면역기능개선)”, “표고버섯 균사체 AHCC(면역기능증진)” 및 “표고버섯균사체추출물 분말(간 건강)”의 3가지임.

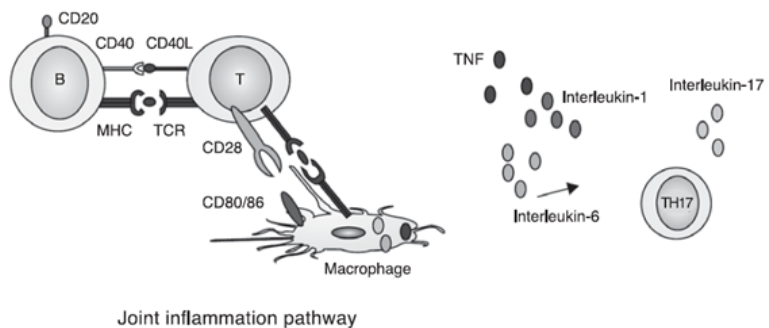
## 1-5. 골관절염 예방 제품 개발의 필요성

- (1) 관절염은 노화, 기계적 손상, 면역 이상 등 여러 원인에 의해서 관절내에 염증성 변화가 생긴 것을 지칭하며, 퇴행성 관절염 (osteoarthritis)과 류마티스 관절염 (rheumatoid arthritis) 이 대표적임.
- (2) 퇴행성 관절염은 골관절염 또는 마모 관절염이라고 불리며 나이가 들어가면서 모든 사람에게 올 수 있는 흔한 병으로 주요 원인은 노화, 과도한 관절의 사용, 비만, 유전 등이며, 통계청 자료에 따르면 우리나라 55세 이상 인구의 80%에서 골관절염이 나타남.
- (3) 골관절염과 달리 류마티스 관절염은 자가면역질환의 일종으로, 발병 원인은 아직 정확히 밝혀져 있지 않으나, 유전적인 요인과 감염, 호르몬 이상 등에 의한 것으로 추정됨.
- (4) 우리나라에서 류마티스 관절염을 앓는 인구는 약 67만 명으로 전체 인구의 1.4%를 차지하는데(대한류마티스학회 자료), 대개 20~40대에 발생하며 남성보다 여성에게서 3배 정도 많이 발생함.
- (5) 우리나라는 이미 2000년부터 65세 이상 노인 인구 비율이 전체 인구의7% 이상을 차지하는 사회, 즉 고령화 사회에 섰으며, 2012년 현재 총인구에서 65세 이상 고령자가 차지하는 비중은 12%로 1970년 3%에서 지속적으로 증가하여 2030년 24%, 2050년 37%에 이를 것으로 전망됨. 이에 따라 2016년에는 65세 이상 고령자 비중이 14%를 넘으며 고령사회에 진입할 것으로 예상되며, 2025년에는 20%를 상회하며 초고령사회가 될 것으로 전망됨. 선진국에서도 고령사회 진입과 질병예방, 높은 의료비 때문에 건강기능식품 시장이 지속적으로 성장하고 있으며, 한국도 빠르게 진행되고 있는 고령화추세와 자기건강관리 (Self-Health Care)에 대한 관심증가로 건강기능식품 산업의 성장추세는 이어질 것으로 예상됨.

- (6) 골관절염의 고령화 사회에서 급속히 증가하는 대표적인 질환으로, 고령화사회에 진입하는 우리나라의 경우, 골관절염에 효과가 있는 건강기능식품 개발이 시급하다 할 수 있음.
- (7) 관절의 염증 반응은 염증을 유발시키는 cytokine과 이를 생성하는 대식세포의 수가 증가하거나 면역세포에서 염증을 유발하는 leukotriene B4가 증가하여 일어남.
- (8) 관절염 동물 모델이나 류마티스 관절염 환자의 활막에서 많은 종류의 사이토카인 발현이 보고되고, 이들 사이토카인의 억제가 관절염의 증상, 이학적 소견뿐만 아니라 관절 파괴도 막는다는 연구 결과들이 있어 질환의 발병과 지속에 사이토카인이 중요한 역할을 하는 것으로 생각됨.
- (9) 류마티스 관절염 조직의 배양에서 IL-1 $\beta$ 의 발현은 TNF $\alpha$ 에 의해 조절됨이 밝혀졌고 TNF $\alpha$  중화항체를 이용하여 TNF $\alpha$ 의 작용을 억제한 경우 IL-1 $\beta$ 의 발현뿐만 아니라 GM-CSF, IL-6, IL-8등 여러 염증성 사이토카인의 발현도 억제됨을 보였음. 따라서, 관절염에서 염증성 사이토카인 조절은 매우 중요한 타겟이 되어지고 있음.



[관절염의 주요 원인]



[관절염의 주요 작용 기전]

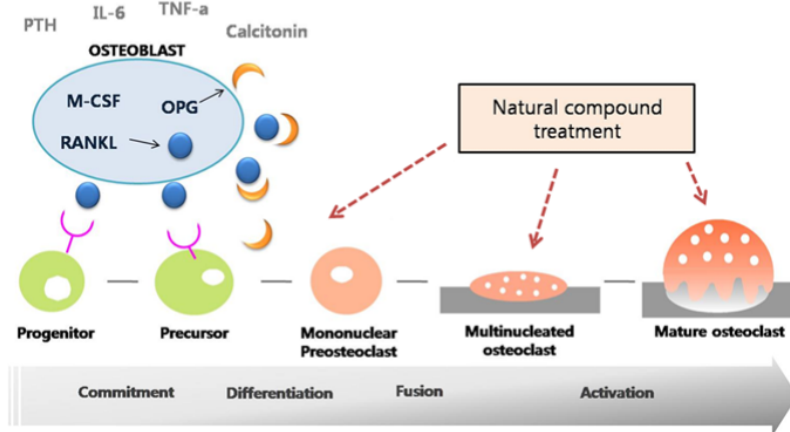
[관절염의 주요 원인과 그 작용 기전]

(10) 또한, 관절염(arthritis)은 관절 파괴를 유발하는 만성 염증성 면역질환으로 골 파괴를 특징으로 하며, 관절 내에서 골 파괴는 파골세포(osteoclast)가 활성화되면서 나타나는데 조혈모세포에서 분화된 골수 성 전구세포(myeloid precursor)가 염증성 환경에서 파골세포로 분화됨.

(11) 파골세포는 조혈간세포에서 조골세포(Osteoblast)의 지지를 받아 분화 유도된 후에 전파

골세포끼리 융합되어 형성되는 거대한 다핵세포임. 골 분해를 위한 파골세포의 활성화에도 조골세포가 관여하는 것으로 알려져 있음.

## Osteoclastogenesis



[관절염의 주요 원인 중 하나인 파골세포 분화 활성화 기전]

(12)관절염은 부분적인 골 미란과 관절 주위뿐만 아니라 전반적인 골 감소를 초래함.

이 중 골 미란은 다음의 3가지 기전에 의존하여 발생하게 됨.

- 첫째: RANKL 자극에 의한 파골세포의 활성화
- 둘째: 활성화된 T 세포의 파골세포에 대한 직접적인 작용
- 셋째: 섬유아세포양 활막세포(fibroblast-like synoviocyte)의 판누스(pannus)조직에서의 활성화

(13)이러한 세 가지 기전에 대한 치료전략이 골 감소와 미란에 대응할 수 있는 약제 개발

이 이루어지고 있으며, 탐색 기전과 모델도 위와 같은 결과를 얻고자 하는 방향으로 설정됨.

(14)따라서, 본 연구팀은 마우스 골수세포를 이용하여 관절염의 직접적인 염증 억제효과와

더불어 파골세포 형성 억제 효과를 함께 탐색하고자 하며, 이에 더욱 효과적인 관절염 치료제 접근이 가능하다고 판단함.

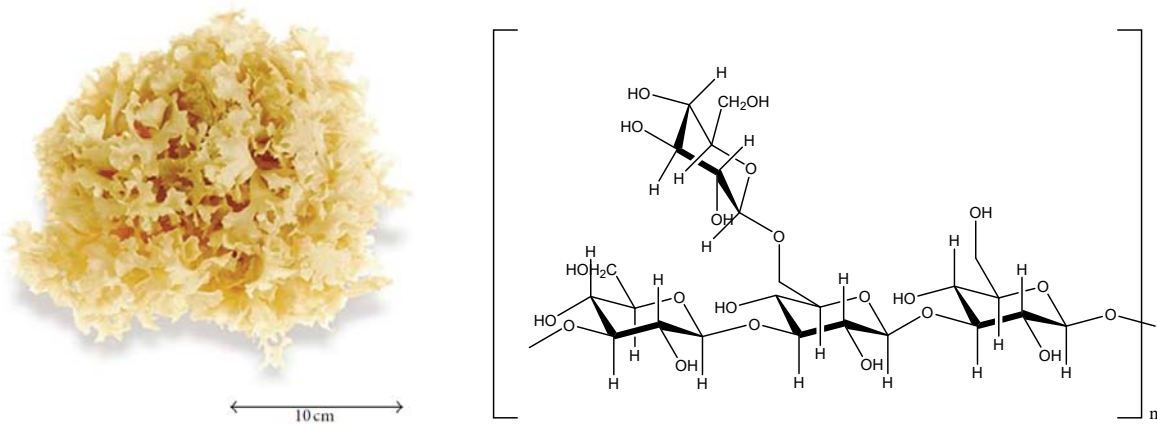
## 1-6. 꽃송이버섯 연구의 필요성

(1) 꽃송이버섯(*Sparassis crispa*)은 담자균아문(Basidiomycotina), 꽃송이버섯과 (Sparassidaceae)에 속하는 대표적인 약용버섯으로 건조 자실체 100 g 당 43.6 g에 달하는 조단

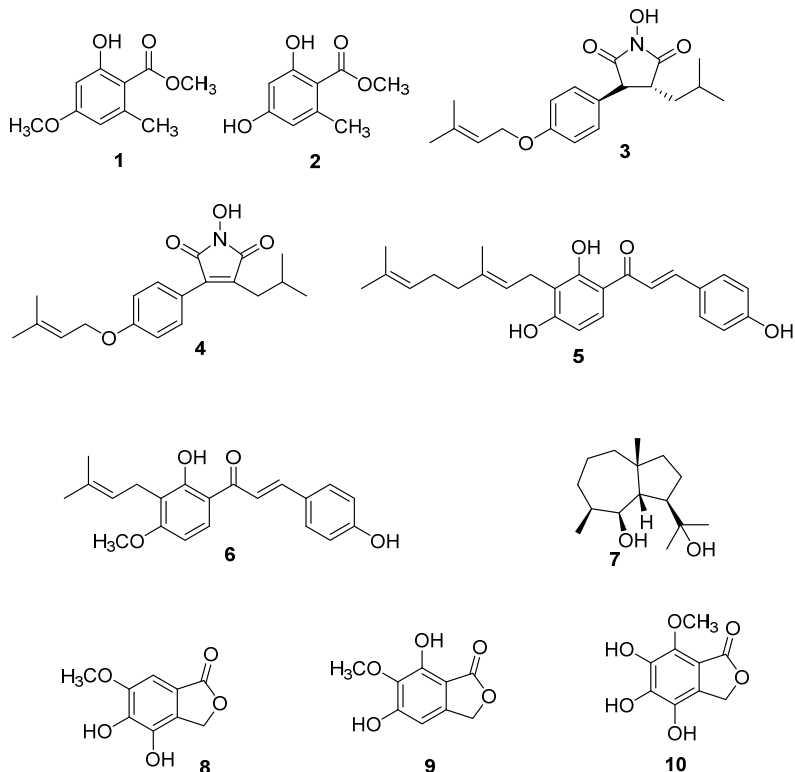


백다당체가 함유되어 있는 것으로 보고되었음. 이는 그동안 재배되어온 버섯 중 비교적 단백다당체 성분이 많이 들어있다고 알려진 아가리쿠스 버섯보다 약 3배 이상 높은 함량임.

(2) 꽃송이 버섯의 균사체는 잡균을 퇴치하는 항균 능력을 가지고 있으며 주요 성분인 단백다당체에 의한 항암작용 및 면역세포를 활성화하는 기능이 다른 버섯에 비해 높다는 보고가 있음. 특히 혈액 암을 제외한 위암, 간암, 대장암 등 고형암에서 높은 항암효과를 보였는데, 이는 버섯이 함유한 다당체 (베타글루칸) 때문인 것으로 알려짐.



[꽃송이 버섯의 균사체와 베타글루칸]



[꽃송이버섯으로부터 보고된 저분자물질들]

(3) 본 과제의 참여기업인 (주)경신바이오는 그림 5과 같이 꽃송이버섯을 효율적으로 재배하여 제품화하여 판매하고 있는 기업으로 꽃송이버섯의 약리효과를 입증하기 위하여 지금까지 회사 자체 내의 연구개발비를 투자하여 지속적으로 연구개발을 진행하여 해 왔음. 그러나 건강기능식품으로 개별인정을 받기 위하여 필요한 지표성분 선정, 원료 표준화 및 기능성 입증 등에 관한 기술력이 부족하여 건강기능식품 개발에 큰 걸림돌이 되고 있는 상황임.



[(주) 경신바이오에서 생산되는 꽃송이버섯 제품들]

(4) 꽃송이버섯을 이용한 제품은 일본에서 연구가 활발히 되었고 많은 제품들이 만들어져 일본 및 해외에서 판매되고 있음. 그러나, 몇 해전 일본의 원전사고의 영향으로 일본에서는 일본에서 생산된 버섯보다는 우리나라에서 생산된 버섯의 신뢰도가 높아짐. 본 소재가 식품의약품안전처로부터 개별인정형 건강기능식품으로 허가를 받는다면, 일본 수

출에 아주 큰 영향을 줄 수 있을 것으로 판단됨.

- (5) 국내에서 꽃송이버섯은 재배에 중점을 두고 연구되어 왔으며 초보적인 단계라 할 수 있는 건조된 상태의 버섯으로 시판되어 왔음. 그러나 주관연구기관은 꽃송이버섯을 발효시킨 제조방법을 개발하였음. 꽃송이버섯은 국내에서 아직 일반화되지 않아 건강식품 소재로 참신성이 있고, 꽃송이버섯 연구가 많이 되어 있는 일본도 아직 초보적인 단계의 제품만이 생산되고 있어 본 연구를 통해 개발 예정인 상품의 사업성은 높을 것으로 판단됨. 꽃송이버섯이 고가인 것은 아직 대중화가 되지 않음에 따른 시장의 협소성 때문인 것으로 파악되며, 이는 연구개발을 통해 대중적인 제품 개발 시 그 원료 단가를 낮출 수 있을 것으로 판단됨. 주관연구기관은 2015년 꽃송이버섯 제품을 통해 15억 정도의 매출을 올렸고, 소비자의 반응도 좋아 향후 건강기능식품 제품 개발 시 현재보다 더 높은 인지도 및 판매 유통구조로 충분히 사업화가 가능할 것으로 판단됨.

## 1-7. 연구개발 범위

### (1) 1차 2016년도 개발 목표

- 주관연구기관(경신바이오): 꽃송이버섯의 재배 방법 규격화 및 원료의 안정성 연구
- 협동연구기관(덕성여자대학교): 꽃송이버섯의 성분 규명
- 협동연구기관(계명대학교): 원료에 대한 관절염 in vitro 모델에서의 효능 검증

#### ① 주관연구기관(주식회사 경신바이오)

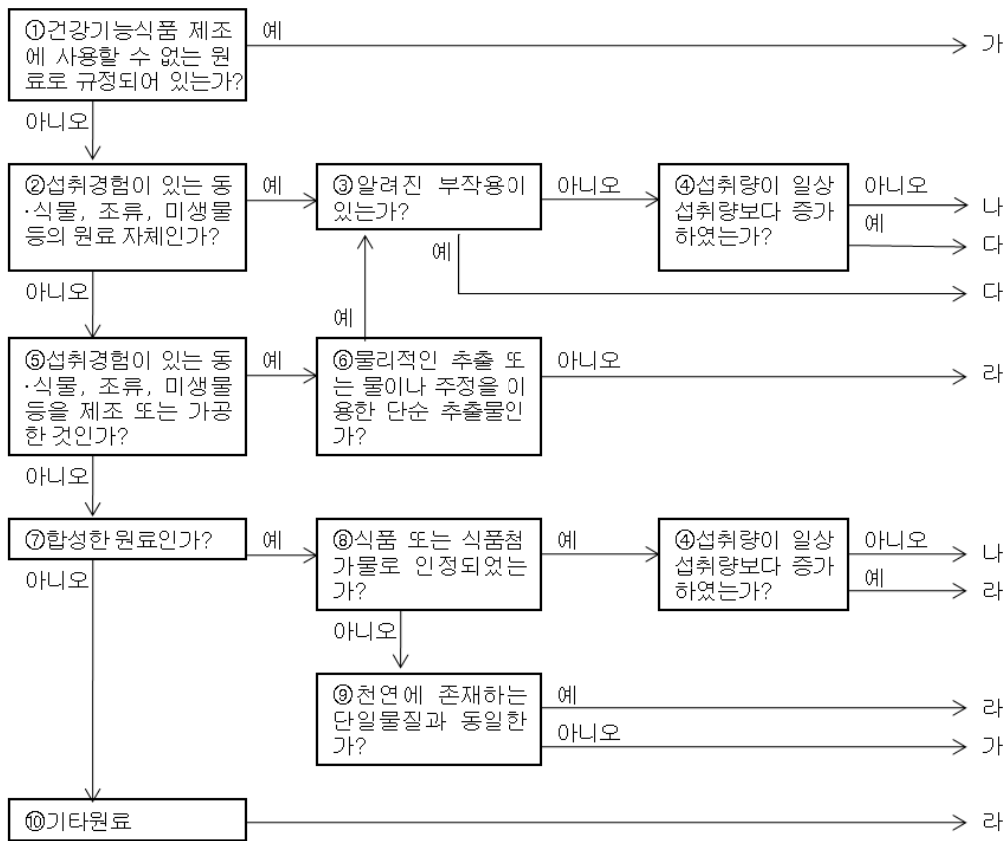
- 꽃송이버섯 재배 방법 규격화

-주관연구기관의 주원료인 꽃송이버섯은 12월에 송진이 없는 낙엽송을 벌목하여 높이 15센티미터, 지름 17센티미터 정도로 자른 후 낙엽송에 있는 독성을 스팀보일러를 통해 제거함. 이렇게 준비된 원목에 꽃송이버섯 종균을 투입하여 무균실에서 일정기간 재배한 후 생육장에서 4개월 재배하여 생산함. 균일화된 원료 공급을 위해 주관연구기관의 직영 농장에서 균일화된 재배방법으로 자가 생산하여 원료의 품질관리 및 규격을 일정하게 유지하고 있음.

-꽃송이버섯을 가공함에 있어 추출물로 제품을 생산하기에는 많은 시설이 요구되고, 투입된 원료대비 산출량이 적어 생산 단가가 상승함. 따라서 경제성을 위하여, 현재 (주)경신바이오에서 생산하는 제품과 같이 꽃송이버섯을 건조한 후 미세한 분말 형태로 생산할 계획임. 주관연구기관은 국내 꽃송이버섯 재배 방법 중, 원목에 종균(진정담자균)을 투입

하는 방법으로 재배하고 있으며, 종균은 기존의 꽃송이버섯 배양균을 이용함으로써 균일화된 균사를 투입하는 것이 가능함.

-꽃송이버섯은 이미 식품의약품안전처에 식품원료로 등재되어 있음. 또한 『건강기능식품 기능성 원료 및 기준·규격 인정에 관한 규정』의 건강기능식품 기능성 원료의 안전성 평가를 위한 의사결정도에 따르면, 꽃송이버섯은 섭취경험이 있는 원료이므로, 제출해야 할 안전성 자료 범위에 해당함.



<1. 제출되어야 하는 안전성 자료의 범위>

제출되어야 하는 안전성 자료	가	나	다	라
건강기능식품으로 신청할 수 없음	√			
섭취 근거 자료 <sup>1)</sup>		√	√	√
해당 기능성분 또는 관련물질에 대한 안전성 정보 자료 <sup>2)</sup>		√	√	√
섭취량평가자료 <sup>3)</sup>		√	√	√
영양평가자료, 생물학적 유용성자료, 인체적용시험자료 <sup>4)</sup>			√	√
독성시험자료 <sup>5)</sup>				√

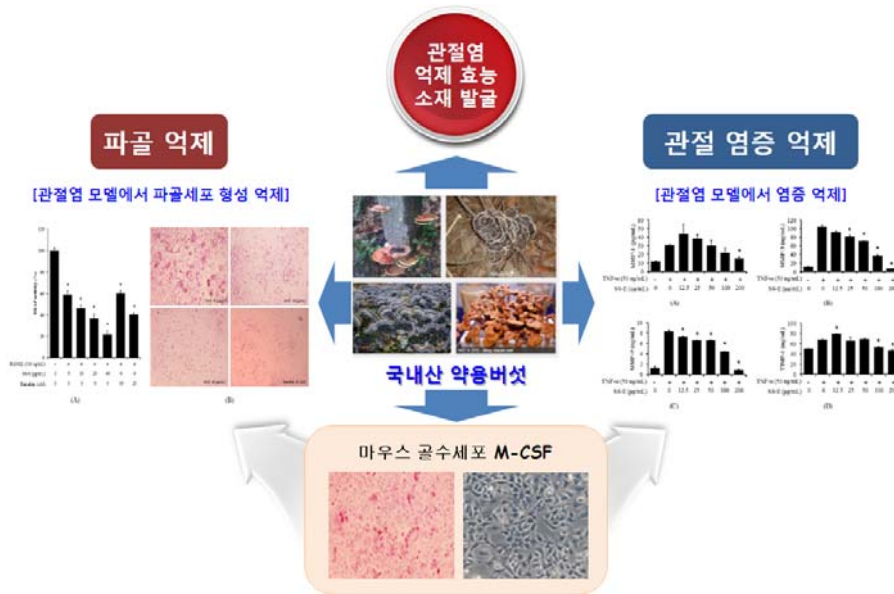
-따라서, 나에 해당하는 섭취 근거 자료, 해당 기능성분 또는 관련물질에 대한 안전성 정보 자료 및 섭취량 평가 자료를 준비함과 동시에, 다에 대한 해당여부를 심층적으로 조사하고 이에 따른 영양평가자료, 생물학적 유용성자료 및 인체적용시험자료를 준비할 계획임.

## ② 협동연구기관(덕성여자대학교):

- 꽃송이버섯 추출 및 협동기관과 연계하여 1차적으로 스크리닝
- 천연물 추출물로부터 활성분획물 제조 시스템 확립: 제품화 시의 용이성 및 경제성을 고려하여, 가장 효율적이며 재현성이 뛰어난 천연물 추출법 확립.
- 본 시료는 약용버섯으로 일반적으로 베타글루칸이라는 다당체가 많은 것으로 알려져 있으므로, 다당체를 최적으로 추출할 수 있는 방법 및 다당체와 저분자물질을 동시에 최대로 추출할 수 있는 방법을 확립함.

## ③ 협동연구기관(계명대학교):

- 본 연구에서 골관절염의 in vitro 모델 가운데 하나인 마우스의 골수세포에 M-CSF를 처리하여 파골세포의 전구체로 유도하고 이에 RANKL을 투여하여 파골세포로 분화를 유도함.
- 이 전구체가 완전한 파골세포로 분화되기 전에 원료 및 유효성분을 처리함으로 파골세포의 기능을 약화시킬 수 있는 소재를 탐색하고자 함.
- 또한, 동시에 본 연구에서는 마우스의 골수세포에 M-CSF와 RAW 264.7 세포에서 RANKL 또는  $TNF\alpha$ 를 이용하여 유도한 파골세포에서의 염증성 인자들의 조절 효과를 탐색하고자 함.
- 관절 건강 기능성을 확인하기 위한 기전은 항염증 작용의 바이오마커로 먼저 NO생성과 염증성 cytokine 생성 억제 효과를 탐색함.



[본 연구팀의 관절염 in vitro 모델에서의 효능 탐색 방법]

## (2) 2차 2017년도 개발 목표

- 주관연구기관(주식회사 경신바이오) : 인체적용 시험용 시제품 제형화 연구 및 생산
- 협동연구기관(덕성여자대학교) : 꽃송이버섯으로부터 유효성분 분리, 구조결정 및 성분 프로파일링
- 협동연구기관(계명대학교):유효성분에 대한 관절염 in vitro 모델에서의 작용 기전 검증

### ① 주관연구기관(주식회사 경신바이오)

#### (1) 제형화 연구 및 인체적용 시험용 시제품 생산

- 주관연구기관은 1차적으로는 꽃송이버섯을 발효 건조 과정을 거쳐서 미를 과립형태로 만들어 판매할 예정임. 향후 응고 가능한 첨가물이 있으면 일회용으로 복용이 가능한 환제로 만들 예정임.
- 개발된 소재를 가지고 제품시험을 거쳐 직접 소비자에게 품평을 받아 그 결과에 근거하여 제품화 시킬 예정이며 시장의 반응에 의거하여 가격, 마케팅, 유통구조를 정립할 예정임.

#### (2) 국내 버섯 관련 상품시장 분석

#### (3) 국외(수출 예정지 중심) 버섯 관련 상품시장 분석

#### (4) 국내외 소비자 수요 조사 (양적, 질적 연구 포함)

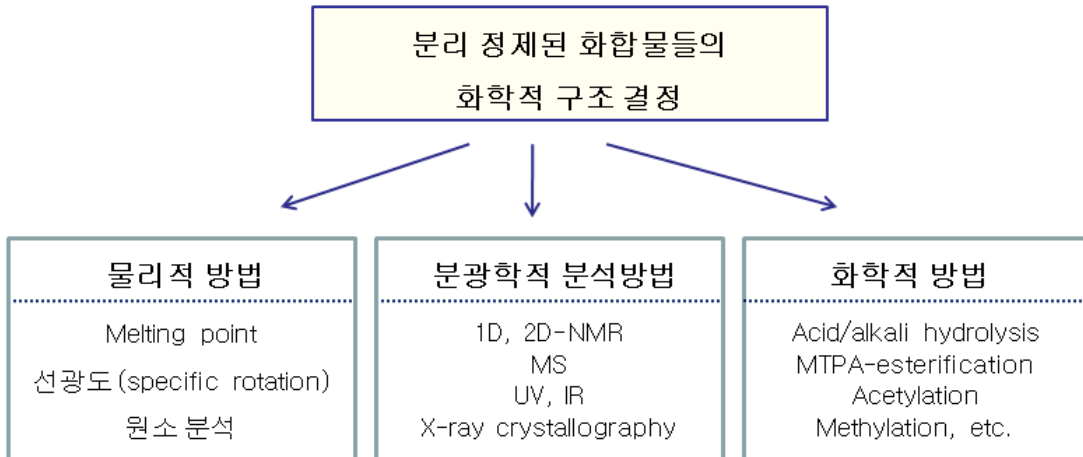
#### (5) 임상시험 대행기관 (CRO)선정

;단국대학교 병원에서 실시할 예정임. 위약군 30 case, 실험군 30 case 실시예정.

② 협동연구기관(덕성여자대학교):

(1) 선정된 소재의 성분분리 및 구조결정

용매분배법 및 MPLC, Open Column Chromatography, preparative TLC, HPLC 등 각종 컬럼, 크로마토그래피법을 이용하여 유효/지표 성분을 분리함, 분리된 성분은 다음과 같은 방법으로 구조를 확인함.

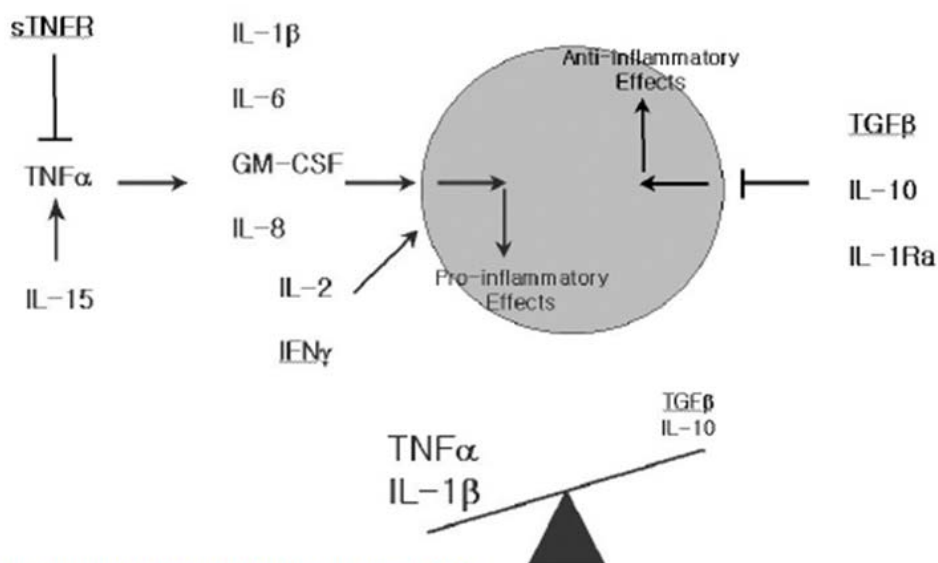


(2) HPLC-MS로 시료의 PROFILING 실시

③ 협동연구기관(계명대학교):

(1) 본 연구에서는 관절염 유발 상태에서 염증 억제 효능을 갖는 구체적 기전을 탐색함.

(2) 대식세포와 골세포를 동시에 이용하여 염증 유발을 위한 TNF-alpha, IFN-gamma로 싸이토카인을 처리하고, 관절염의 주요한 기전으로 알려져 있는 NF-kB 억제 활성화과 그 작용 기전을 명확하게 검증함.

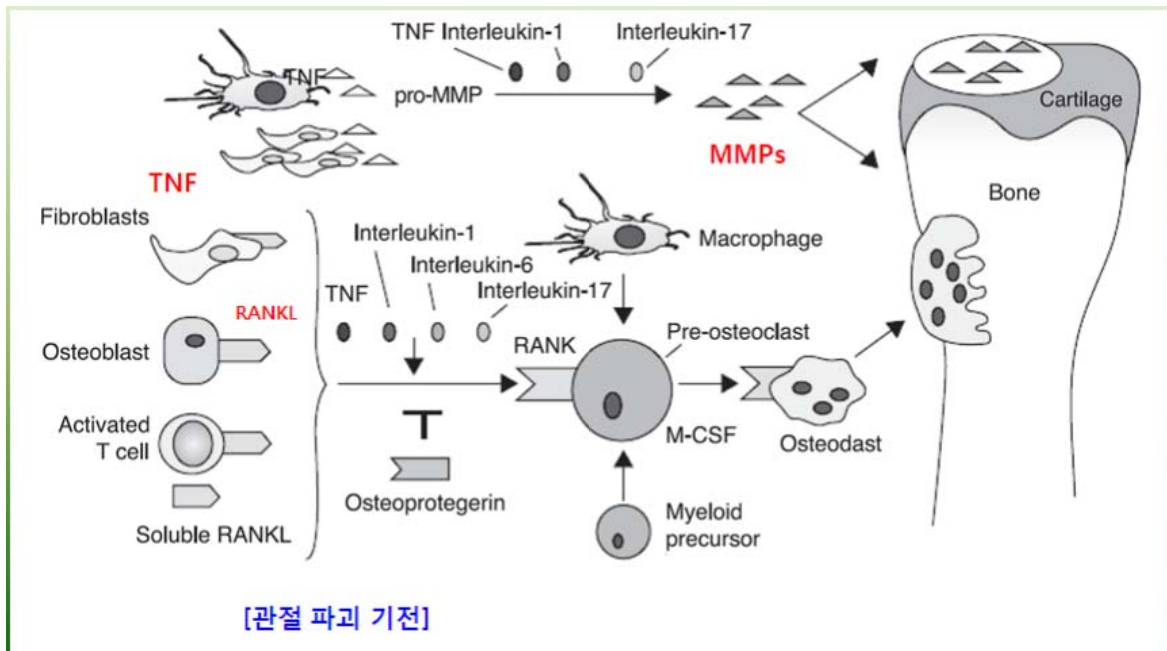


[참고: Hanyang Medical Reviews Vol. 25, No. 2, 2005]

[관절에서 염증을 심화시키는 주요 타겟 분자들과 그 작용 기전]

(3)TNF-alpha, IL-1beta, IL-17같은 염증촉진 사이토카인들이 상승작용을 해서 섬유아세포(fibroblast)와 대식세포로부터 기질분해효소(matrix metalloproteinases, MMPs)의 분비에 역할을 함. 이러한 기질분해효소는 연골의 세포외 기질 내에 있는 모든 중요 구조 단백질을 파괴시킬 수 있고 류마티스 관절염에서는 주로 MMP1, MMP3 가 중요한 역할을 하고 있음.

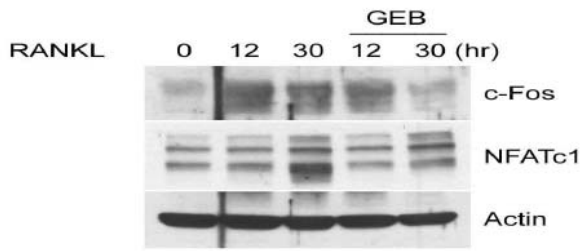
(4)또한, 연골조직 파괴에 관여하는 단백질을 MMP를 감소시키고 TIMP(Tissue inhibitor of matrix metalloproteinase)를 증가시켜 연골의 파괴를 억제하였으며, IL-1β 등의 사이토카인과 함께 PGE2, NO와 같은 염증성 매개인자를 감소시켜 강력한 항염증 작용을 나타냄으로서 뚜렷한 항관절염 효능이 갖는지를 구체적으로 확인함.



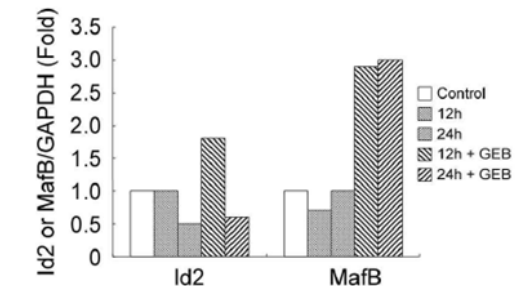
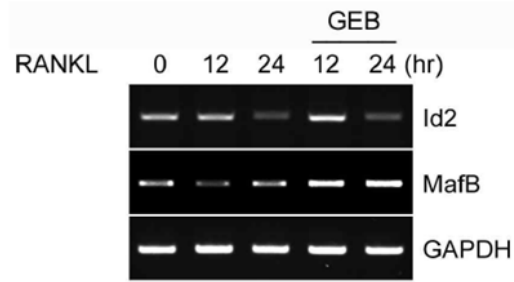
[관절염 상태 시 골 관절 파괴의 주요 작용 기전과 타겟 분자들의 역할]

(5)본 연구에서는 선행 연구 결과와 더불어 현재 추가적으로 잘 알려진 관절염의 주요한 조절 기전들에 대한 구체적인 작용 기전을 파악하고, 이를 바탕으로 *in vivo* 모델에서의 효능 탐색에 근거로 활용할 계획임.





[추출물 GEB의 마우스 골수세포 M-CSF에서 c-FOS, NFATc1 발현 조절 기전]



[추출물 GEB의 마우스 골수세포 M-CSF에서 Id2, MafB 발현 조절 기전]

[추출물 GEB의 마우스 골수세포 M-CSF에서 파골세포 조절 기전 탐색결과의 예시]

### (3) 3차 2018년도 개발 목표

- 주관연구기관(주식회사 경신바이오):
  - 인체적용시험 연구 및 전략구축
  - 인체적용시험 추진 및 완료
  - 연구종료 5개월 전, 식약처에 개별인정형 원료등록 신청서류 접수
  - 연구개발 성과의 활용계획 및 사업화
    - ;꽃송이버섯 추출물(액)가열 추출물 제조방법 및 상품화
- 협동연구기관(덕성여자대학교): 원료의 기준 설정 및 시험방법 연구, 각 성분에 대한 분리-분석조건 검토
- 협동연구기관(계명대학교): 원료 및 유효성분에 대한 동물모델을 이용한 *in vivo* 효능검증

#### ① 주관연구기관(주식회사 경신바이오)

##### (1) 인체적용시험 연구계획서 작성

- 연구방법 : 이중눈가림, 무작위배정, 위약대조 인체적용시험
- 피험자 수 산정 및 근거 설정
- 피험자의 선정/제외기준 및 스크리닝 항목 선정
- 시험식품 섭취 용량 및 기간설정 근거 확립 : 동물실험을 통해 확인된 기능성 및

안전성(단회독성, 반복독성 및 유전독성 등) 용량을 기반으로 한 인체적용 섭취 용량 및 기간 설정)

- 사전연구 및 메커니즘 규명 연구 자료를 바탕으로 기능성 biomarker 선정
- 안전성 평가 항목 선정 : 인구학적 조사, 신체검사, 임상실험적 검사 등
- 인체적용시험 시험계획서(protocol)
- 증례기록서(CRF)
- 피험자 설명문 및 동의서
- 피험자 보상규약
- 식품 복약지도
- 시험대상자 공고문 등 제출
- IRB 심의 및 승인 : 인체적용시험 protocol 및 관련 서류를 토대로 합리적이고 피험자의 인권이 보장된 시험계획 수립여부 대한 관련 전문위원의 심의 및 승인 후 인체적용시험 수행

#### (2) 인체적용시험 추진 및 관리

- 피험자 모집 공고
- 계획한 피험자 수의 원활한 모집을 위해 인체적용시험 목적 및 시험식품의 정보 등이 작성된 공고문을 병원 내 부착하고, 필요에 따라 신문 등의 언론 매체를 통해 모집공고를 할 수 있음.

#### (3) 피험자 모집 및 선정

- 자발적으로 본 시험에 참여하고자 하는 사람을 대상으로 피험자의 선정/제외기준 및 스크리닝을 통하여 피험자 선정기준에 적합한 피험자를 선정하여 인체적용시험에 참여시킴.
- 선정된 피험자에게는 본 실험을 추진하는데 있어 시험의 목적 및 방법, 예상되는 효과 및 이상반응, 피험자가 시험에 참가를 동의하지 않아도 불이익을 당하지 않는다는 점, 피험자가 시험참가에 동의해도 언제든지 철회할 수 있다는 점, 기타 대상자의 인권보호 및 시험식품의 이해에 필요한 정보 등 충분한 설명하고 서면동의서를 받음.

#### (4) 인체적용시험 추진

- 피험자 무작위 배정 및 이중눈가림법
- 피험자는 피험자 선정기준에 적합 시 피험자 배정번호를 순차적으로 부여 받게 되고, 시험자는 의뢰자가 제공한 무작위배정표에 따라 맞는 시험 기능성원료 또는 위약을 처방하고, 관리 약사는 시험자가 처방한 내용이 의뢰자가 제공한 무작위배정표에 맞는지 확인 후 해당 건강기능식품을 피험자에게 공급함으로써, 해당 피험자는 A 군 (시험군) 또는 B 군 (위약군)에 무작위 배정함.
- 연구자와 피험자 모두 어느 시험군에 배정되었는지 모르는 이중눈가림 사용함.

- 시험식품 복용
- 대조군과 시험군은 각각 제공된 시험식품을 정해진 기간 동안 섭취함.
- 섭취 전/후 선정된 기능성 및 안전성 지표 (biomarker)의 대조군과 시험군의 유의적 차이 비교하여 효능을 판단함.

(5)인구학적 조사 및 신체검사

인체적용시험 추진 중 피험자 배경 및 병력 등에 대하여 면담, 차트 확인 및 질문 등을 통하여 다음 사항 등을 점검하고 증례기록서에 기록함.

- 배경조사 : 피험자 이니셜, 생년월일, 성별, 가입 및 수유 여부 (여성인 경우)
- 생활습관 조사 : 흡연, 음주, 운동 상태, 식이섭취 조사 (24시간 회상법)
- 병력조사 : 현재 앓고 있는 질환 유무, 과거 앓았던 질환 유무, 약물이나 건강기능식품의 알레르기 및 과민성 기왕력 여부 등
- 선행약물 조사 : 과거 2개월 이내 (현재 복용 중인 약물 포함) 복용 약물 조사
- 활력징후 : 최소 3분 이상의 휴식을 취한 후 좌위 수축기 및 이완기혈압, 맥박수를 측정함. (주변 환경에 따라 변동이 가능하므로 3차까지 재측정 가능(재측정 간격은 3분 이상하며 최종측정값을 사용함.))
- 신체검사 : 신체검사에 포함되는 내용은 일반상태, 영양상태, 피부, 점막, 눈, 귀, 코, 목, 갑상선, 폐, 심장, 순환계, 복부, 신장, 비뇨생식기계, 신경계, 정신계, 척추, 사지, 종양, 기타 등이며, 각각의 정상유무를 확인함.

(6)임상실험실적 검사

- 혈액학 검사 : WBC, RBC, WBC differential count, hemoglobin, hematocrit, platelets 등
- 일반화학 검사 : AST, ALT, r-GT, T.bil, glucose, BUN, creatinine 등
- 뇨검사 : Protein, Glucose, WBS, RBC, S.G. 등
- 기능성 biomarker 평가
- 설문조사 : 기능성 biomarker의 평가 시 국제적으로 공인된 설문지를 활용한 평가지표의 개선 유무를 통하여 인체적용시험의 기능성 여부를 평가함.
- 생체분석 : 피험자의 생체시료 (혈액 및 뇨) 내 선정된 biomarker의 변화를 분석하여 인체적용 시험의 기능성 여부를 평가함.

(7)인체적용시험 모니터링

IRB 승인 인체적용시험 protocol에 준하여 시험이 추진되고 있는지, 피험자 관리 및 관련 자료의 작성 등을 지속적으로 모니터링함. (참조1)

(도표-참조1)

<b>품목</b>	꽃송이버섯추출분말 / 골관절 건강 개선		
<b>기능성</b>	관절 건강		
<b>의뢰사</b>	(주)경신바이오		
<b>수행기관</b>	단국대학교병원 정형외과		
<b>CRO</b>	(주)에스에프씨기능성식의약품상지원센터		
<b>연구제목</b>	꽃송이버섯추출분말의 관절염 개선 기능성 및 안전성을 평가하기 위한 단일기관, 무작위 배정, 이중눈가림, 위약대조 인체적용시험		
<b>연구목적</b>	꽃송이버섯추출분말(1,000 mg/day)을 12주 동안 섭취 하였을 때 슬관절통을 호소하는 준건강인에서 통증 및 기능의 개선 여부를 확인하고자 함.		
<b>연구유형</b>	인체적용시험	<b>IRB 구성 및 승인</b>	DKUH 2018-04-013
<b>연구설계</b>	무작위배정	이중눈가림	위약대조
<b>대상자 선정기준</b>	1) 스크리닝 검사 당시 연령이 만 20세 이상인 성인남녀 2) 경증의 슬관절통을 호소하는 준건강인 : NRS 1 이상 4이하 3) 본 연구에 대한 자세한 설명을 듣고 완전히 이해한 후, 자의로 참여를 결정하고 주의 사항을 준수하기로 서면 동의한 자		
<b>평가 바이오마커</b>	1) 1차 유효성 : NRS 및 WOMAC 설문 2) 2차 유효성 : 혈중 ROS 변화 및 PGIC 설문 3) 안전성 : 혈액 및 소변 검사, 활력징후, 심전도 등		
<b>시험디자인</b>	<b>대조군</b>	말토덱스트린(맛과 향, 외형이 시험제품과 동일, 1일 2회, 식후 경구섭취, 1,000mg/day)	
	<b>시험군</b>	꽃송이버섯추출분말(1일 2회, 식후 경구섭취, 1,000mg/day)	
	<b>섭취기간</b>	12주	
	<b>식이조절</b>	평상시 식사량, 음식종류, 식습관 유지	
<b>시험방법</b>	자원자에 한하여 1차 방문으로부터 전 4주 이내에 스크리닝 검사를 시행하여 본 인체적용시험에 연구대상자로서 적합하다고 판단되는 자를 선정한다. 스크리닝 방문에 이어 1차 방문 시에 연구대상자 선정/제외기준 적합성 평가를 재실시하여 무작위배정을 실시하게 되고, 이에 해당하는 시험식품 또는 대조식품을 12주간 섭취하며 4주 간격으로 방문이 이루어진다. 매 방문 시 활력징후, 약물투여력 및 의학적 상태변화 확인, 이상반응의 확인 등을 시행한다. 시험제품 최종 섭취 후 혹은 조기종료 방문 후 필요에 따라 추적 관찰을 실시할 수도 있다.		
<b>피험자수</b>	총 60명(시험군 : 30명, 대조군 : 30명)		
<b>선정기준</b>	1) 스크리닝 검사 당시 연령이 만 20세 이상인 성인남녀 2) 경증의 슬관절통을 호소하는 준건강인 : NRS 1 이상 4이하 3) 본 연구에 대한 자세한 설명을 듣고 완전히 이해한 후, 자의로 참여를		

	결정하고 주의사항을 준수하기로 서면 동의한 자
제외기준	<ol style="list-style-type: none"> <li>1) 현재 관절염 관련 약물을 복용 중인 자</li> <li>2) 꽃송이버섯추출물 성분이 함유된 제품을 복용 중인 자</li> <li>3) 관절 주위의 골극 현상, 불규칙한 관절면, 관절의 연골하 골낭종 등이 동반되어 있으며 이학적검사 및 단순 방사선 사진상 중등도 이상의 관절염으로 판단되는 사람</li> <li>4) 임신가능성이 있는 가임 여성중 적절한 피임법의 시행을 수용하지 않은 경우 (단, 불임수술을 받은 여성은 제외)</li> <li>5) 임신 혹은 수유 중인 여성</li> <li>6) 슬관절통이 아닌 다른 중요한 통증이 있는 준건강인</li> <li>7) 위염, 위궤양 치료 중인 사람</li> <li>8) 심장, 신장 또는 간의 중요한 질환을 가지고 있거나 치료할 수 없는 기능 불구로 인체적용시험 참여 후 이상반응 평가에 영향을 주거나, 인체적용시험을 완료하는데 방해가 될 것으로 예상되는 준건강인</li> <li>9) 연구자의 판단에 의해 인체적용시험에 영향을 줄 수 있는 중요한 의학적 처치/수술을 받았던 과거력이 있는 준건강인</li> <li>10) 인체적용시험용제품의 흡수에 영향을 줄 수 있는 위장관계 질환(예: 크론병)이나 위장관계 수술 (단, 단순맹장수술이나 탈장수술은 제외)의 과거력이 있는 자</li> <li>11) 첫 섭취일 전 2주 이내에 면역증진에 영향을 미칠 수 있는 의약품, 한약, 건강기능식품을 섭취한 경험이 있는 자 (건강기능식품의 경우 첫 섭취일 전 1주간의 휴약기간을 거쳐 참가가능)</li> <li>12) 스크리닝 검사 전 2개월 이내에 항정신병 약물치료를 받은 경험이 있는 자</li> <li>13) 알코올 중독 또는 약물 남용으로 인한 치료력이 있는자</li> <li>14) 스크리닝 검사 전 2개월 이내에 타 인체적용시험에 참여한 자</li> <li>15) 검사실검사에서 다음에 해당하는 결과를 보이는 자 <ul style="list-style-type: none"> <li>☞ AST, ALT &gt; 참고범위 상한치의 2배</li> <li>☞ Serum Creatinine &gt; 2.0 mg/dl</li> <li>☞ Creatine Kinase (CK) &gt; 참고범위 상한치의 2배</li> </ul> </li> <li>16) 진단검사의학 검사결과를 비롯한 기타 사유로 인하여 시험책임자가 연구 참여에 부적합하다고 판단한 자</li> </ol>
유효성 평가	<p><b>-1차 유효성 평가</b></p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1) Numerical Pain Scale (NRS)를 이용한 통증평가 기저치(baseline, 방문2) 대비 섭취 12주 후 체중부하 시 평균통증 점수(NRS score)의 변화량의 양군간의 차이.</li> </ol> <p><b>-2차 유효성 평가</b></p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1) Western Ontario and McMaster Universities Osteoarthritis (WOMAC) Index</li> </ol>

	<p>기저치(baseline, 방문2) 대비 4주, 8주, 12주 각 시점의 WOMAC-Likert Assessment 점수의 변화.</p> <p>2) Patient's global impression of change (PGIC)</p> <p>투여 후 4주, 8주, 12주 각 시점에서의 PGIC 점수.</p>
안전성평가	<p>1) 자·타각 증상 등 이상반응 모니터링</p> <p>2) 진단검사의학 검사</p> <p>3) 활력징후, 신체검진, 심전도</p>
통계적 절차	<p><b>5. 통계적 절차</b></p> <p><b>- 유효성</b></p> <p>평가 항목의 검사결과를 전후 비교시 각 섭취군 내, 군간의 Independent t-test, Paired t-test 등을 적용하여 검정한다. 단, 동질하지 않은 항목은 covariate로 보정하여 ANCOVA를 실시한다. 섭취군의 반복측정에 대해서 각 섭취군 내, 군간의 RM-ANOVA/Linear mixed model 등을 적용한다. 단, 동질하지 않을 경우 RM-ANCOVA를 실시한다. 시점간 차이는 Contrast test 로 분석한다.</p> <p><b>- 안전성</b></p> <p>연구기간 중 인체적용시험용제품 관련 이상반응 연구대상자의 비율은 각 섭취군에 따라 요약제시하며, Fisher's exact test 를 적용하여 분석한다. 단, 정규성검정을 통하여 정규성 만족을 하지 못할 경우, 비모수적 분석방법을 이용한다(각 섭취군 내, 군간의 Wilcoxon signed-rank test, Mann-Whitney test 등). 진단검사의학 검사, 활력징후, 심전도검사 등은 기술통계학적으로 분석하고, 섭취 전후 변화 양상 등을 Independent t-test, Paired t-test, RM-ANOVA/Linear mixed model 등을 적용하여 비교한다.</p>

(8)인체적용시험 시험식품 정보

①제제명 : 시험식품(꽃송이버섯추출분말)/ 900mg/정(사용기간:24개월(실온보관))

구분	성분	함량(%)
주성분	꽃송이버섯추출분말	55.6
	결정셀룰로스	39.4
	이산화규소	2.0
	오파드라이화이트120k580000	3.0
합계		100%

②제제명 : 대조식품(말토덱스트린)/ 900mg/정(사용기간:24개월(실온보관))

구분	성분	함량(%)
주성분	결정셀룰로스	95.0
	이산화규소	2.0
	오파드라이화이트120k580000	3.0
합계		100%

\*섭취방법:12주간, 1일2회, 1회 2정 식후 경구섭취(꽃송이버섯추출분 1,000mg/day)

• 골관절염 기능성 biomaker를 설정함.

- 유효성 평가항목으로 관절의 통증평가, 전반적인 증상 평가, 자가 설문 조사 (WOMAC 또는 Lequesne 지수) 및 혈액학적 평가 실시.
- 관절의 통증평가 항목으로 리커트(Likert) 또는 10 cm VAS(visual analogue scale)를 이용하여 통증강도를 측정함.
- 관절의 통증, 기능, 강직 상태평가를 위한 자가설문 평가도구로서 Lequesne 지수와 WOMAC 점수를 측정함.
- 혈액학적 평가로서 혈액 염증성 사이토카인 발현을 측정함.

○ IRB (임상시험심의위원회) 신청 및 승인 통지서

DKUH201804013-HE001

2013.12.23 개정본



## 통지서

※ 본 과제의 문서보존기간은 3년 입니다.

수신	의뢰(지원)기관	(주)sfc기능성식의약품임상지원센터				
	연구책임자	정형외과 박희곤				
IRB File No.		DKUH 2018-04-013	심사내용	연구심의신청서	통지일자	2018.05.02
연구과제명	국문	꽃송이버섯추출물의 골관절염 개선 기능성 및 안전성을 평가하기 위한 단일기관, 무작위배정, 이중눈가림, 위약대조 인체적용시험				
	영문					
임상시험코드		Study Nick Name				

연구분류1	<input type="checkbox"/> 약물 <input type="checkbox"/> 생물학적 제재 <input type="checkbox"/> 세포치료제 <input checked="" type="checkbox"/> 건강기능식품					
	<input type="checkbox"/> 의료기술 <input type="checkbox"/> 의료기기 ( <input type="radio"/> 1등급 <input type="radio"/> 2등급 <input type="radio"/> 3등급 <input type="radio"/> 4등급 )					
	<input type="checkbox"/> 해당사항 없음					
연구분류2	<input checked="" type="checkbox"/> 인간대상연구 <input type="checkbox"/> 인체유래물(검체)연구 <input type="checkbox"/> 의무기록연구					
	<input type="checkbox"/> 유전자연구 <input type="checkbox"/> 유전자 치료					
	<input type="checkbox"/> 배아연구 <input type="checkbox"/> 체세포복제배아연구 <input type="checkbox"/> 줄기세포주연구					
	<input type="checkbox"/> 기타 ( )					
연구분류3	<input checked="" type="radio"/> 전향적 연구 <input type="radio"/> 후향적 연구 <input type="radio"/> 전향적 & 후향적 병행연구					
연구분류4	<input type="checkbox"/> 중재연구 <input type="checkbox"/> 설문조사 <input type="checkbox"/> 자료분석 및 분석연구					
	<input type="checkbox"/> 관찰연구 ( <input type="checkbox"/> 단면조사연구 <input type="checkbox"/> 환자대조군연구 <input type="checkbox"/> 코호트 연구 )					
	<input checked="" type="checkbox"/> 기타 ( 기능성식품 인체적용시험 )					
연구분류5	<input type="checkbox"/> 인간을 대상으로 하지 않는 연구 Non-clinical study (in vitro, in vivo preclinical study)					
일반명		상품명				
전체피험자증례수	전체	60 명	국내	60 명	본원	60 명
연구승인기간	2018.04.18 ~ 2018.12.31					
지원의뢰기관	기관명	(주)sfc기능성식의약품임상지원센터	대표(직위)		성명	임현우
제출서류목록	(첨부) 연구계획서 [1.0] [03 / APL / 18] (첨부) 임상시험에 대한 연구자서약서 [ ] [ ] (첨부) 피험자 모집 문건 [1.0] [03 / APL / 18] (첨부) 증례기록서 [1.0] [03 / APL / 18] (첨부) 피험자 설명문 및 동의서 [1.0] [03 / APL / 18]					



관련근거	대면회의	2018.04.18	
중간보고시기	2018.11.29.까지 종료보고	비고	
심사결과	<input checked="" type="radio"/> 승인 <input type="radio"/> 시정승인 <input type="radio"/> 보완 <input type="radio"/> 반려 *연구계획 승인합니다. *권고사항 검사 후 검체처리에 대한 언급이 없고, 교통비 보상이 매주 지급되는지 완료 후 지급되는지 명시가 없습니다. 내용을 추가하시기 바랍니다.		

\*본 위원회에서 승인된 모든 연구자들은 다음의 사항을 준수하여야 합니다.

1. 연구계획서 및 변경계획서의 승인 이전에 연구대상자의 해당임상연구 참여가 금지되며, 승인받은 계획서에 따라 연구를 수행하여야 합니다.
2. 강제 혹은 부당한 영향이 없는 상태에서 충분한 설명에 근거한 동의 과정을 수행할 것이며, 잠재적인 시험 대상자에게 연구 참여여부를 결정할 수 있도록 충분히 기회를 제공하여야 합니다.
3. 연구진행 시 시험대상자를 보호하기 위해 불가피한 경우를 제외하고 어떠한 변경이든 위원회의 사전 승인을 받고 수행하여야 합니다. 시험대상자들의 보호를 위해 취해진 응급 상황에서의 변경도 즉각 위원회에 보고하여야 합니다.
4. 시험대상자에게 발생한 즉각적 위험 요소의 제거가 필요하여 원 계획서와 다르게 연구를 실시하여야 하는 경우, 시험대상자에게 발생하는 위험요소를 증가 시키거나 연구의 실시에 중대한 영향을 미칠 수 있는 변경사항, 예상하지 못한 중대한 이상약물반응에 관한 사항, 시험대상자의 안전성이나 임상시험의 실시에 부정적인 영향을 미칠 수 있는 새로운 정보에 관한 사항은 위원회에 신속히 보고하여야 합니다.
5. 승인 받은 시험대상자 동의서 (DKUHIRB가 천공 날인된 동의서) 를 사용하여야 합니다. 모국어가 한국어가 아닌 시험대상자들에게는 승인된 동의서를 시험대상자의 모국어로 인증된 번역본을 사용할 것이며, 이러한 동의서 번역본은 반드시 위원회의 승인을 받아야 합니다.
6. 위원회의 승인을 받은 시험대상자 모집공고문을 사용해야 합니다.
7. 위원회의 승인은 1년을 초과할 수 없으며 1년 이상연구를 지속하고자 하는 경우에는 반드시 중간보고를 하여야 하며, 위원회에서 요구한 중간보고 주기에 따라 연구 진행과 관련된 중간보고서를 제출하여야 합니다.
8. 심의결과가 승인이 아닐 경우에는 답변서를 제출하여야 하며, 심의일로부터 6개월 이내에 이루어져야 합니다.
9. 위원회가 연구를 반려하는 경우 이의신청을 할 수 있으며, 같은 사항에 대하여 2번 연속으로 이의 신청은 할 수 없습니다.
10. 연구 종료 연구 종료시에는 종료 및 결과보고서를 제출해야 하며 모든 연구의 진행은 의약품의약품임상시험관리기준 / 의료기기임상시험실시기준 (KGCP) , 생명윤리 및 안전에 관한 법률 및 헬싱키 선언, ICH-GCP가이드라인 등 국내외 관련법규를 준수하여야 합니다.

단국대학교병원 Institutional Review Board



## (8)인체적용시험 통계 및 결과 분석

### ①인구학적 기초자료

- 본 임상시험에 포함된 모든 피험자의 자료를 각 군별로 평가하며 연속형 자료는 평균, 표준편차 등을 구하고 범주형 자료의 경우에는 절대 및 상대빈도를 구함.
- 시험군과 위약군 간의 인구통계학적 자료와 기저치 자료를 비교 평가함. 연속형 변수는 t-test (모수적 통계방법), Wilcoxon rank sum test (비모수적 통계방법)로, 범주형 변수는 카이제곱 검정을 이용하여 비교함.

### ②효능변수에 대한 분석

- 섭취 전/후 선정된 기능성 및 안전성 지표 (biomarker)의 대조군과 시험군의 유의적 차이 비교하여 효능을 판단함.
- 인구학적 인자나 기저치 값 중 주평가변수에 영향을 미치는 요인들이 있는 지에 대한 통계적 분석으로 다중회귀분석을 실시하며, 영향이 있다고 인정되는 변수값이 있는 경우에는 층화 분석 등 적절한 통계방법을 고려한 아분석을 추가로 실시함.

### ③안전성변수에 대한 분석

- 발현된 모든 이상반응은 각 군별로 자세한 설명과 함께 나열함. 각 치료군 별로 시험약 물과의 연관성이 있는 이상반응과 없는 이상반응의 빈도를 기록함.
- 이상반응의 발현건수와 1회 이상의 이상반응을 경험한 피험자의 비율에 대하여 각 치료 군내에서 95% 신뢰구간을 구하고 또한 치료군간 이상반응 빈도율이 군간 차이가 있는지를 카이제곱검정 등을 실시하여 비교함. 또한, 군간 이상반응 정도를 이상반응별로 비교, 제시하고, 필요한 경우 정도별 이상반응 발생 빈도가 군간 차이가 있는지 카이 제곱 검정 등을 실시하여 비교함.
- 인체적용시험 전/후 간기능 또는 신기능 지표를 측정하고, 군간 간기능 또는 신기능 지표의 변화가 차이가 있는지를 알아보기 위해 t-test를 실시하여 비교함.

### ④통계분석의 해설

- 모든 통계 분석의 결과는 평가 변수에 대한 통계적 유의성 ( $p < 0.05$ )으로 평가함.

### ⑤결과보고서 작성

- IRB 승인 인체적용시험 protocol 및 기능성/안전성 평가 지표 및 통계분석 데이터를 활용하여 결과보고서를 작성함. 관련 raw data 및 참고자료도 별첨으로 첨부하여 결과보고서의 신뢰성을 확보함.

#### ⑥IRB 결과보고서 승인

- 작성된 결과보고서를 IRB에 제출하여 인체적용시험 완료보고를 함.
- 시험군과 위약군에서 각 군에서 평가변수의 변화량은 paired t-test를 시행함. 두 군에서의 평가 변수의 차이는 t-test (모수적 통계방법)나 Wilcoxon rank sum test(비모수적 통계 방법)를 이용하여 비교함.
- 인구학적 인자나 기저치 값 중 주평가변수에 영향을 미치는 요인들이 있는 지에 대한 통계적 분석으로 다중회귀분석을 실시하며, 영향이 있다고 인정되는 변수값이 있는 경우에는 층화 분석 등 적절한 통계방법을 고려한 아분석을 추가로 실시함.
- 연구종료 5개월 전 식약처에 개별인정형 건강기능식품 원료등록 허가 신청서 식품의약품안전처 제출.

#### ⑦인체적용시험 목적 및 배경

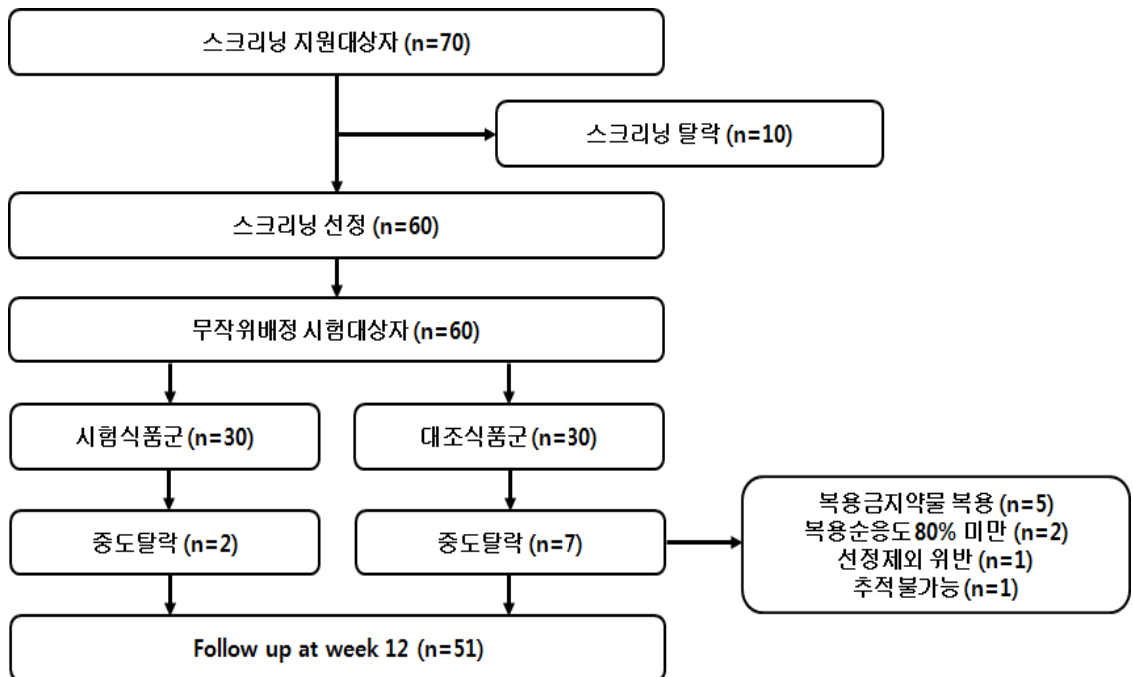
- 목적
  - 꽃송이버섯추출물을 1일 1,000mg, 12주간 섭취하였을 때 나타나는 다음 평가항목의 변화를 대조식품 섭취와 비교 하여 살펴보고자 한다.
  - 1차 목적:기저치(baseline, 방문2) 대비 섭취 12주 후 체중부하 시 평균통증점수(NRS score)의 변화량을 대조식품과 비교 평가하고자 한다.
  - 2차 목적:기저치(baseline, 방문2) 대비4주, 8주, 12주각시점의 WOMAC-Likert Assessment 점수의 변화와 투여 후 4주, 8주, 12주 각 시점에서의 PGIC 점수를 대조식품과 비교 평가하고자 한다.
- 배경 및 필요성
  - 관절염은 노화, 기계적 손상, 면역 이상 등 여러 원인에 의해서 관절내에 염증성 변화가 생긴 것을 지칭하며, 퇴행성 관절염 (osteoarthritis)과 류마티스 관절염(rheumatoid arthritis)이 대표적이다.
  - 퇴행성 관절염은 골관절염 또는 마모 관절염이라고 불리며 나이가 들어가면서 모든 사람에게 올 수 있는 흔한 병으로 주요 원인은 노화, 과도한 관절의 사용, 비만, 유전 등이며, 통계청 자료에 따르면 우리나라 55세 이상 인구의 80%에서 골관절염이 나타나고 있다.
  - 골관절염과 달리 류마티스 관절염은 자가면역질환의 일종으로, 발병 원인은 아직 정확히 밝혀져 있지 않으나, 유전적인 요인과 감염, 호르몬 이상 등에 의한 것으로 추정되고 있다.
  - 꽃송이버섯(*Sparassis crispa*)은 담자균아문(Basidiomycotina), 꽃송이버섯과(Sparassida-ceae)에 속하는 대표적인 약용버섯으로 건조 자실체 100g 당 43.6g에 달하는 조단백다당체가 함유되어 있는 것으로 보고되었다. 이는 그동안 재배되어온 버

첫 중 비교적 단백다당체 성분이 많이 들어 있다고 알려진 아가리쿠스 버섯보다 약 3배 이상 높은 함량이다. 꽃송이 버섯의 균사체는 잡균을 퇴치하는 항균 능력을 가지고 있으며 주요 성분인 단백다당체에 의한 항암작용 및 면역세포를 활성화하는 기능이 다른 버섯에 비해 높다는 보고가 있다. 특히 혈액 암을 제외한 위암, 간암, 대장암 등 고형암에서 높은 항암효과를 보였는데, 이는 버섯이 함유한 다당체(베타글루칸) 때문인 것으로 알려져 있다. 이러한 버섯의 항암 및 항암 면역활성에 대한 약리활성 외에도 최근에는 피부 노화 방지, 고지혈증 등에 대한 효능이 알려져 있으며 특히 골관절염 예방 효과에 초점을 맞추어 연구가 진행되고 있다.

-현재 골관절염을 적응증으로 하는 건강기능식품은 거의 없으며, 대부분이 위장장애를 동반하는 NSAIDs로 치료를 하고 있는 상황이기 때문에 보다 부작용이 적은 건강기능식품의 개발이 시급한 실정이다.

-따라서 본 연구는 선행연구 결과를 바탕으로 꽃송이 버섯 추출물의 골관절염 개선 효과를 과학적으로 평가하고자 하며, 이를 통해 꽃송이 버섯 추출물의 새로운 기능성 식품 소재로 활용 가능한 기초자료를 확립하여 국민 보건 향상에 기여하고자 한다.

⑧인체적용시험 흐름도 결과 분석



⑨인체적용시험 통계분석

- 유효성 평가 분석은 대상자 중 인체적용시험계획서에 따라 본 연구를 성공적으로 완료한 PP(Per Protocol)군 분석을 주 분석으로 실시하였다.
- 안전성 평가는 최소한 1회 이상 시험식품을 복용한 대상자로부터 얻어진 자료를 모두 분석하는 ITT(Intent-to-treat) 원칙에 따른 FAS(Full Analysis Set)분석을 시행하였음.
- 분석에 사용한 프로그램은 SPSS(Version 22.0)를 사용하였으며, 섭취 전/후 및 군간의 반복 측정자료에 대한 변화 양상 등을 Independent t-test, Paired t-test, RM-ANOVA 등을 적용하여 비교하였다.

## 2. 연구 수행 내용 및 결과

### 2-1. 인체적용시험 연구 수행 및 결과

#### (1) 인체 적용시험 확인서

- ① 인체적용시험 제목 : 꽃송이버섯추출분말의 골관절염 개선 기능성 및 안전성을 평가하기 위한 단일기관, 무작위배정, 이중눈가림, 위약대조 인체적용시험
- ② 프로토콜 번호 : CS-1
- ③ 시험 식품 : 꽃송이버섯추출분말 또는 대조식품
- ④ 인체적용시험 의뢰자 : 주식회사 경신바이오

본 인체적용시험은 “임상시험관리기준(KGCP)”을 준수하여 시행되었으며 그 결과 최종 인체시험보고서를 (주)경신바이오와 단국대학교병원 임상의학연구소에 제출하는 바입니다. 단국대학교병원에서 수행된 본 시험의 보고서 내용에 대하여 인체적용시험 책임자로서 확인합니다.

2018년 12월

• 연구책임자 : 박희곤 교수  
단국대학교병원 정형외과

일 시 : 2018년 12월 7일

서 명 : 박 희 곤 (인)



## 요 약 문

품목	꽃송이버섯추출분말		
기능성	관절건강 개선		
의뢰기관	(주)경신바이오		
수행기관	단국대학교병원		
CRO	(주 )에스에프씨기능성식의약품상지원센터		
연구제목	꽃송이버섯추출분말의 골관절염 개선 기능성 및 안전성을 평가하기 위한 단일기관, 무작위배정, 이중눈가림, 위약대조 인체적용시험		
연구목적	꽃송이버섯추출분말(1,000 mg/day)을 1일 2회 섭취 하였을 때 슬관절통을 호소하는 준건강인에서 통증 및 기능의 개선 여부를 확인하고자 함.		
연구유형	학술연구	기능성식품 인체적용시험	
연구설계	무작위배정	이중맹검	위약대조군 인체적용시험
대상자 선정기준	1) 스크리닝 검사 당시 연령이 만 20세 이상인 성인남녀 2) 경증의 슬관절통을 호소하는 준건강인 : NRS 1 이상 4이하 3) 본 연구에 대한 자세한 설명을 듣고 완전히 이해한 후, 자의로 참여를 결정하고 주의사항을 준수하기로 서면 동의한 자		
디자인	대조군	말토덱스트린(맛과 향, 외형이 시험제품과 동일, 1일 2회, 식후 경구섭취, 1,000mg/day)	
	시험군	꽃송이버섯추출분말(1일 2회, 식후 경구섭취 1,000mg/day)	
	섭취기간	12주	
	식이조절	평상시 식사량, 음식종류, 식습관 유지	
바이오마커	<b>-1차 유효성 평가</b> 1) Numerical Rating Scale (NRS)를 이용한 통증평가 기저치(baseline, 스크리닝) 대비 6주, 12주 각 시점의 체중부하 시 평균 통증점수(NRS score)의 변화량의 양군간의 차이 2) Western Ontario and McMaster Universities Osteoarthritis (WOMAC) Index 기저치(baseline, 스크리닝) 대비6주, 12주 각 시점의 WOMAC-Likert Assessment 총 점수 및 세부항목(통증, 경직도, 신체기능) 합계 점수 변화량의 양군간의 차이 <b>-2차 유효성 평가</b> 1) 혈중 ROS(Reactive oxygen species) 변화량의 양군간의 차이 2) Patient' s global impression of change (PGIC) 6 주, 12 주 각 시점의 PGIC 점수		

<p>시험결과</p>	<p>1) 1차 유효성 평가변수 중 체중부하 시 평균통증점수(NRS score) 및 Western Ontario and McMaster Universities Osteoarthritis(WOMAC) Index를 통한 통증, 경직도, 신체기능을 비교하였을 때 시험군 및 대조군 모두에서 유의한 호전을 보이지 못했다. 이에 대하여는 더 많은 시험자를 포함한 연구가 추가되어야 시험식품의 유효성을 증명할 수 있겠다.</p> <p>2) 2차 유효성 평가변수 중 혈액 내 ROS(Reactive oxygen species)는 ROS_TOS, ROS_TAS 모두 시험식품의 사용에 따라 유의한 변화를 보였다. 하지만 종합적으로 보았을 때 군 간의 유의적인 차이는 없었다.</p> <p>3) 2차 유효성 평가변수 중 Patient's global impression of change(PGIC)는 시험군 및 대조군 모두에서 유의한 차이는 없었다.</p> <p>4) 이상반응은 시험식품을 투여한 후 1회 이상 안전성에 대한 조사가 된 시험대상자를 대상으로 평가하였다. 총 28명의 시험군 중에서 이상반응이 있다고 응답한 시험대상자는 총 16건으로 소화불량 및 속쓰림 등의 위장장애 5건, 감기 등의 URI증상 2건, 근골격계질환 1건, 두통 등의 신경계질환 2건, 간기능효소 상승 1건, 방광염 등 비뇨기계질환 4건, 전신 무력감과 같은 기타 항목이 1건이 확인되었으나 시험제품과의 명백한 인과관계는 없었다.</p> <p>5) 안전성을 확인하기 위해 시행한 혈액학적 검사, 생화학적 검사, 소변검사서 유의미한 변화는 시험군과 대조군에서 보이지 않았으며, 군간의 차이도 발견되지 않아 시험군의 안전성에는 특별한 문제점은 없는 것으로 확인 할 수 있다.</p>
<p>결론</p>	<p>꽃송이버섯추출분말의 안전성은 확보되었으나, 통증, 경직도, 신체기능, 혈액내 ROS, PGIC 점수의 개선은 보이지 않았다.</p>
<p>성과</p>	<p>꽃송이버섯추출분말의 안전성에 대하여 입증함.</p>
<p>향후계획</p>	<p>본 연구를 통해 안전성은 확보되었으므로 향후 체중 당 용량을 증량하거나 시험대상자수를 늘여서 진행하는 추후 연구가 필요할 것으로 사료됨.</p>



## < 목 차 >

1. 인체적용시험의 명칭 .....	41
2. 연구 배경 .....	41
3. 임상 시험 방법 .....	65
4. 안전성 및 기능성 평가 및 해석 .....	76
5. 시험대상자의 기초정보 .....	80
6. 유효성 분석결과 .....	82
7. 안전성 분석 결과 .....	88
8. 유효성 분석의 결론 .....	92
9. 안전성 분석의 결론 .....	92
10. 토의 .....	93
11. 결론 .....	94
12. 참고문헌 .....	95

## 1. 인체적용시험의 명칭

꽃송이버섯추출분말의 골관절염 개선 기능성 및 안전성을 평가하기 위한 단일기관, 무작위배정, 이중눈가림, 위약대조 인체적용시험

## 2. 연구 배경

관절염은 노화, 기계적 손상, 면역 이상 등 여러 원인에 의해서 관절내에 염증성 변화가 생긴 것을 지칭하며, 퇴행성 관절염 (osteoarthritis)과 류마티스 관절염 (rheumatoid arthritis)이 대표적이다.

퇴행성 관절염은 골관절염 또는 마모 관절염이라고 불리며 나이가 들어가면서 모든 사람에게 올 수 있는 흔한 병으로 주요 원인은 노화, 과도한 관절의 사용, 비만, 유전 등이며, 통계청 자료에 따르면 우리나라 55세 이상 인구의 80%에서 골관절염이 나타나고 있다.

골관절염과 달리 류마티스 관절염은 자가면역질환의 일종으로, 발병 원인은 아직 정확히 밝혀져 있지 않으나, 유전적인 요인과 감염, 호르몬 이상 등에 의한 것으로 추정되고 있다.

꽃송이버섯(*Sparassis crispa*)은 담자균아문(Basidiomycotina), 꽃송이버섯과(Sparassidaceae)에 속하는 대표적인 약용버섯으로 건조 자실체 100g 당 43.6g에 달하는 조단백다당체가 함유되어 있는 것으로 보고되었다. 이는 그동안 재배되어온 버섯 중 비교적 단백질다당체 성분이 많이 들어있다고 알려진 아가리쿠스 버섯보다 약 3배 이상 높은 함량이다. 꽃송이버섯의 균사체는 잡균을 퇴치하는 항균 능력을 가지고 있으며 주요 성분인 단백질다당체에 의한 항암작용 및 면역세포를 활성화하는 기능이 다른 버섯에 비해 높다는 보고가 있다. 특히 혈액암을 제외한 위암, 간암, 대장암 등 고형암에서 높은 항암효과를 보였는데, 이는 버섯이 함유한 다당체(베타글루칸) 때문인 것으로 알려져 있다. 이러한 버섯의 항암 및 항암 면역 활성화에 대한 약리활성 외에도 최근에는 피부 노화 방지, 고지혈증 등에 대한 효능이 알려져 있으며 특히 골관절염 예방 효과에 초점을 맞추어 연구가 진행되고 있다.

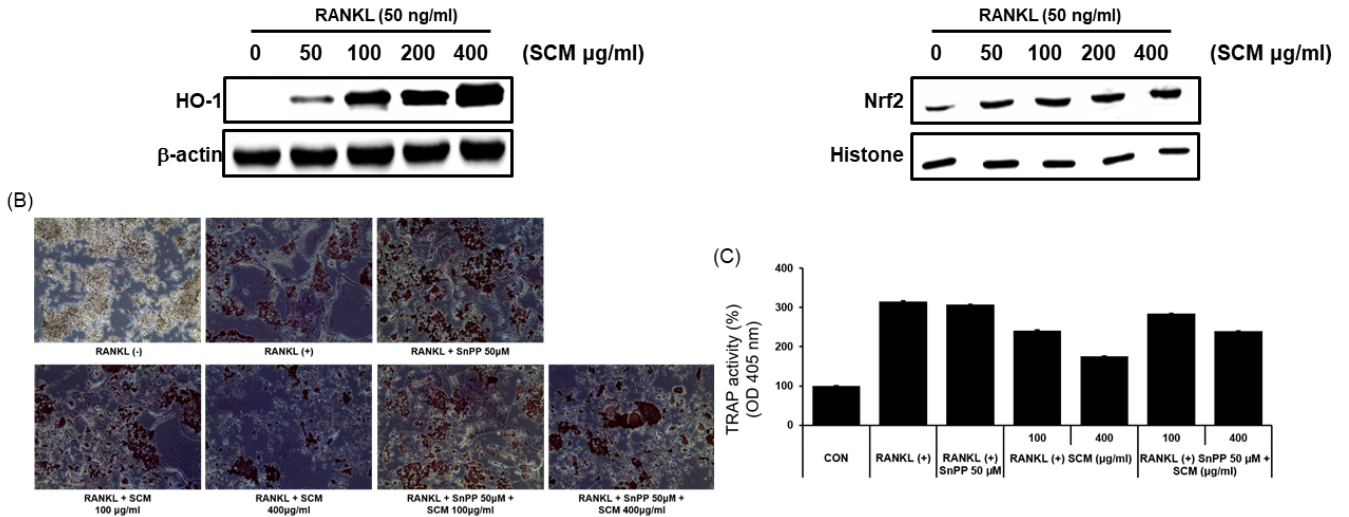
현재 골관절염을 적응증으로 하는 건강기능식품은 거의 없으며, 대부분이 위장장애를 동반하는 NSAIDs로 치료를 하고 있는 상황이기에 보다 부작용이 적은 건강기능식품의 개발이 시급한 실정이다.

따라서 본 연구는 선행연구 결과를 바탕으로 꽃송이버섯추출분말의 관절건강 개선 효과를 과학적으로 평가하고자 하며, 이를 통해 꽃송이버섯추출분말의 새로운 기능성 식품 소재로 활용 가능한 기초자료를 확립하여 국민 보건 향상에 기여하고자 한다.

[전임상 시험결과 요약]

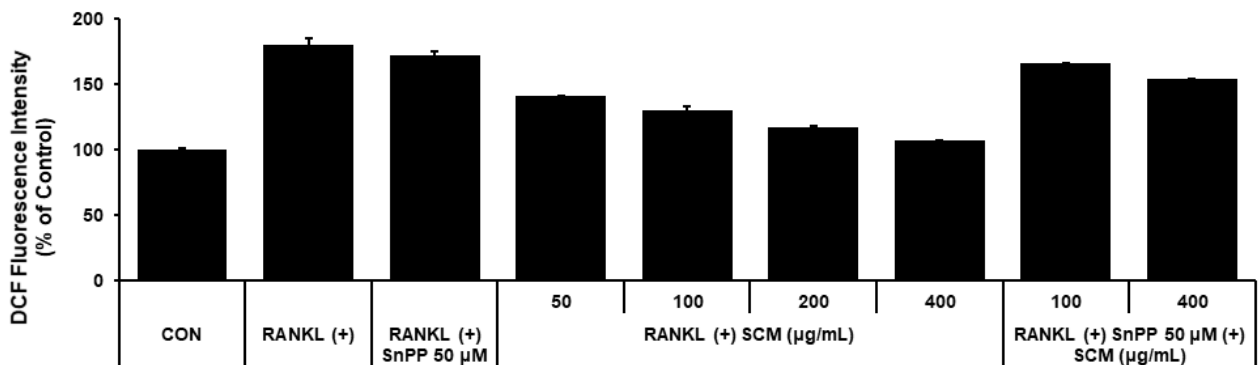
(1) 관절염 *in vitro* 모델에서의 작용 기전 검증

▶ 파골세포분화 억제효과와 꽃송이버섯의 Heme oxygenase-1발현 효과의 관계



[꽃송이버섯의 HO-1발현과 파골세포분화억제]

-파골세포분화를 억제할 수 있는 새로운 기전으로 HO-1 및 Nrf2 pathway를 가설로 세웠으며, 이를 입증하기 위해 위의 실험을 진행함. 그림 (A/좌)는 SCM이 HO-1의 발현을 농도의존적으로 증가시키는 것을 나타내어주고 있으며, (A/우)는 Nrf2의 핵 내 이동을 나타내고 있음. 그림(B)와 (C)는 HO-1의 enzyme inhibitor인 SnPP(Tin protoporphyrin)을 활용하여, 파골세포분화에 HO-1의 발현이 관여한다는 것을 보여주고 있음.



[꽃송이버섯의 ROS소거 활성과 파골세포분화억제]

-파골세포분화 및 연골의 파괴와 관련이 있는 것 중에 잘알려진 것으로 ROS를 확인하기 위해 위의 실험을 진행하였음. 또한, HO-1의 발현은 ROS를 줄인다는 연구보고가 있으며, SCM이

HO-1을 발현하고 발현된 HO-1이 ROS로부터 나타나는 과산화세포분화 연골 손상 등을 억제하는 것을 알 수 있음.

## (2) 골관절염 *in vivo* 모델에서의 꽃송이버섯의 효과 검증

▶ MIA로 유발된 골관절염 동물모델에 있어서 SCM의 효과

### ① 체중 및 식이섭취량

MIA 유발 전과 후 4주 동안 모든 군에서 체중이 증가하였으며 대조군과 비교하였을 때 투여군들 간의 유의성은 없었다. 식이섭취량은 정상군  $25.1 \pm 1.5g$ , 대조군  $23.9 \pm 2.7g$ , SCM50군  $24.4 \pm 2.4g$ , SCM100군  $24.4 \pm 2.1g$ , SCM200군  $23.3 \pm 2.4g$ 으로 나타났고 각 군 간의 유의성은 없었다(Table 1).

Table 1. Body weight and food intake

Group	Body weight (g)					Food intake (g/day)
	-2 week	-1 week	0 week	1 week	2 week	
N	$296.5 \pm 10.8^a$	$349.4 \pm 7.3^a$	$376.4 \pm 11.8^{ab}$	$394.6 \pm 19.7^a$	$419.9 \pm 11.2^a$	$25.1 \pm 1.5^a$
Con	$296.1 \pm 15.1^a$	$352.1 \pm 16.8^a$	$377.8 \pm 16.9^a$	$393.4 \pm 19^a$	$406.6 \pm 21.3^{ab}$	$23.9 \pm 2.7^a$
SCM50	$296.1 \pm 11.2^a$	$341.4 \pm 14.1^a$	$364.6 \pm 14.7^{ab}$	$382.4 \pm 19.1^a$	$395.6 \pm 21.2^b$	$24.4 \pm 2.4^a$
SCM100	$296 \pm 9.2^a$	$352.8 \pm 14.6^a$	$373.4 \pm 18.5^{ab}$	$393.3 \pm 19.4^a$	$407.9 \pm 21.8^{ab}$	$24.4 \pm 2.1^a$
SCM200	$297.5 \pm 8.2^a$	$340.3 \pm 20.1^a$	$358.6 \pm 24.8^b$	$377.8 \pm 25.6^a$	$392.3 \pm 28.5^b$	$23.3 \pm 2.4^a$

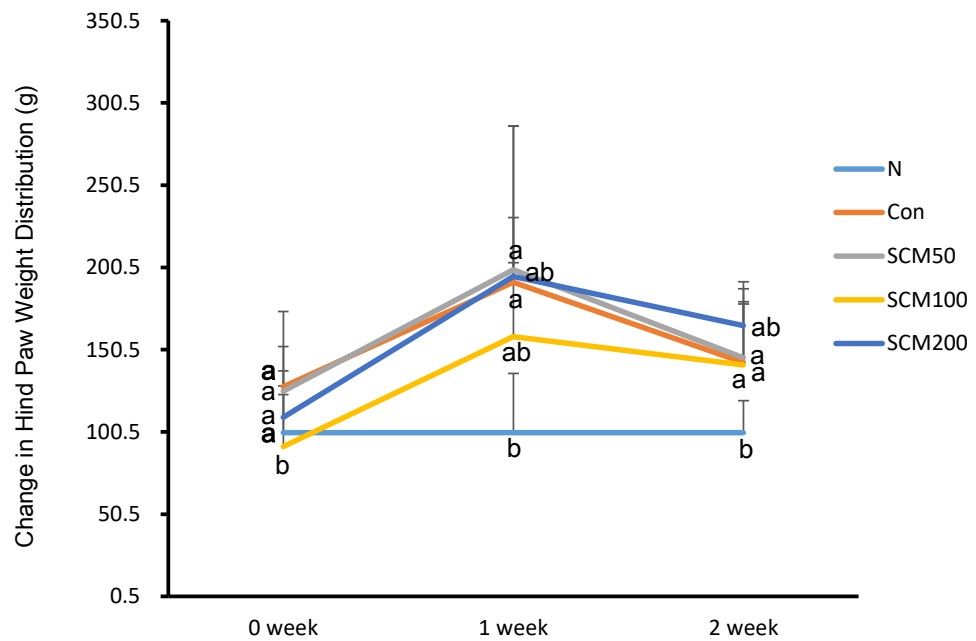
All values are mean  $\pm$  SD (n=8)

N: Normal rat, Con: MIA-induced osteoarthritis rat, SCM50: MIA-induced osteoarthritis rat treated with SCM 50 mg/kg body weight, SCM100: MIA-induced osteoarthritis rat treated with SCM 100 mg/kg body weight, SCM200: MIA-induced osteoarthritis rat treated with SCM 200 mg/kg body weight.

Different letters show a significantly difference at  $p < 0.05$  as determined by one-way ANOVA followed by least-significant differences (LSD) test.

② 뒷다리 체중 부하의 변화

실험기간 동안 MIA 주사하기 전(0 week), MIA 주사 1주일 후(1 week)와 MIA 주사 2주일 후(2 week)에 뒷다리 체중 부하를 측정하였다. 정상군의 뒷다리 체중부하 비율을 100으로 하였을때, 각 군의 상대적 뒷다리 체중 부하의 변화를 측정한 결과, MIA 투여 1주일 후에는 대조군  $191.44 \pm 95.15$ 로 나타나 정상군에 비해 유의성 있는 증가를 보였다. SCM50군  $199.11 \pm 87.28$ , SCM100군  $158.47 \pm 44.84$ , SCM200군은  $195.05 \pm 35.75$ 로 나타났으며 대조군과 비슷한 수치를 보였다. MIA 투여 2주일 후에는 대조군  $142.74 \pm 44.71$ , SCM50  $145.57 \pm 32.61$ , SCM100군  $141.12 \pm 38.49$ , SCM200군  $165.10 \pm 26.62$ 로 나타났다 (Fig. 1).



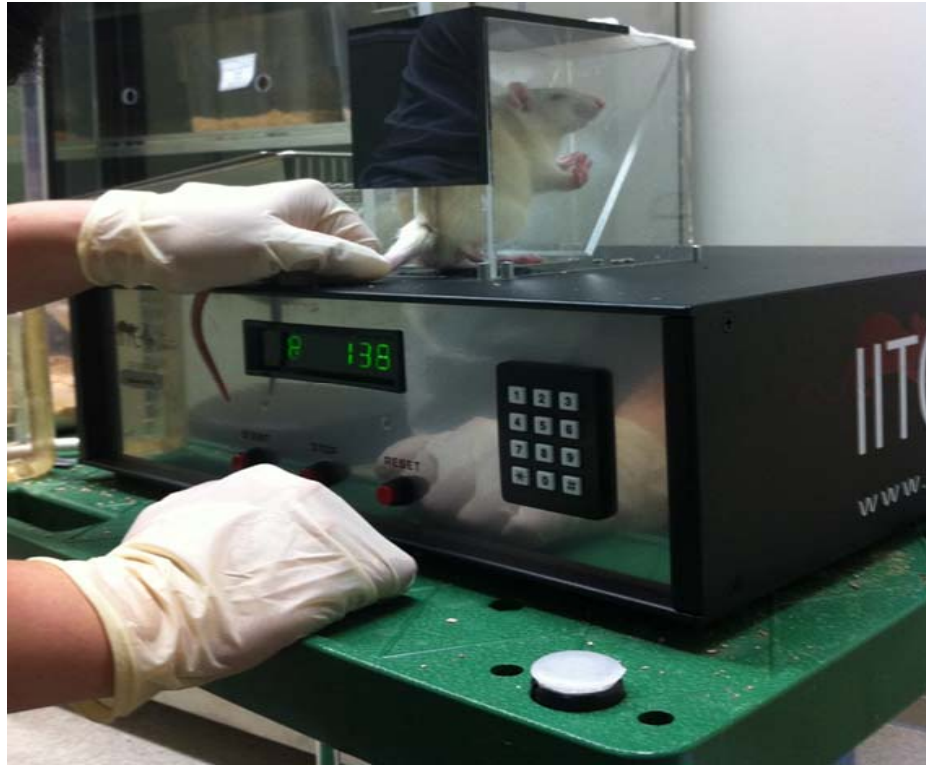


Fig. 1. The changes in relative hind paw weight distribution in MIA-induced osteoarthritis rats.

All values are mean  $\pm$  SD (n=8)

N: Normal rat, Con: MIA-induced osteoarthritis rat, SCM50: MIA-induced osteoarthritis rat treated with SCM 50 mg/kg body weight, SCM100: MIA-induced osteoarthritis rat treated with SCM 100 mg/kg body weight, SCM200: MIA-induced osteoarthritis rat treated with SCM 200 mg/kg body weight.

Different letters show a significantly difference at  $p < 0.05$  as determined by one-way ANOVA followed by least-significant differences (LSD) test.

### ③ 혈청 내 산화적 스트레스 바이오마커 변화

채취한 혈액에서 혈청을 분리 후 산화적 스트레스 바이오마커인 ROS를 측정하였다. 그 결과 대조군 ( $5741.1 \pm 758.7$  fluorescence/ml)은 정상군 ( $3875.6 \pm 283.8$  fluorescence/ml)에 비해 유의성 있게 증가하였고 SCM50군 ( $4622.2 \pm 424.2$  fluorescence/ml), SCM100군 ( $4906.7 \pm 266.2$  fluorescence/ml)과 SCM200군 ( $4470 \pm 358.1$  fluorescence/ml)은 대조군에 비해 유의하게 감소하였다 (Fig. 2).

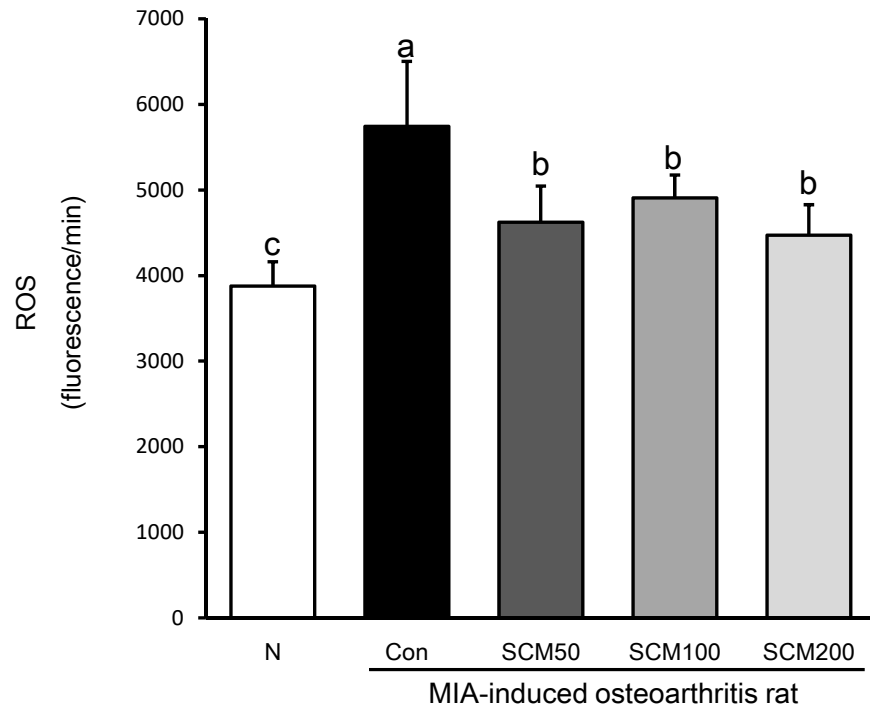


Fig. 2. Oxidative stress biomarker in serum.

All values are mean  $\pm$  SD (n=8)

N: Normal rat, Con: MIA-induced osteoarthritis rat, SCM50: MIA-induced osteoarthritis rat treated with SCM 50 mg/kg body weight, SCM100: MIA-induced osteoarthritis rat treated with SCM 100 mg/kg body weight, SCM200: MIA-induced osteoarthritis rat treated with SCM 200 mg/kg body weight.

Different letters show a significantly difference at  $p < 0.05$  as determined by one-way ANOVA followed by least-significant differences (LSD) test.

#### ④ 혈청 내 anti-type II collagen antibody 측정

혈청 내 anti-type II collagen antibody의 수치는 peroxynitrite (ONOO<sup>-</sup>)와 산화적 스트레스를 형성하는데 관련이 있는 것으로 알려져 있다<sup>2)</sup>.

대조군은 정상군에 비해 유의성 있는 증가를 보였으며 SCM100, 200군은 유의한 감소를 보였다.

Table 2. The serum level of anti-type II collagen antibody

Group	Collagen-II IgG antibody (Unit/mL)
N	1.78 $\pm$ 0.68 <sup>b</sup>
Con	2.95 $\pm$ 1.93 <sup>a</sup>
SCM50	3.19 $\pm$ 0.44 <sup>a</sup>
SCM100	0.21 $\pm$ 0.75 <sup>c</sup>
SCM200	0.22 $\pm$ 0.35 <sup>c</sup>

All values are mean  $\pm$  SD (n=8)

N: Normal rat, Con: MIA-induced osteoarthritis rat, SCM50: MIA-induced osteoarthritis rat treated with SCM 50 mg/kg body weight, SCM100: MIA-induced osteoarthritis rat treated with SCM 100 mg/kg body weight, SCM200: MIA-induced osteoarthritis rat treated with SCM 200 mg/kg body weight.

Different letters show a significantly difference at  $p < 0.05$  as determined by one-way ANOVA followed by least-significant differences (LSD) test.

### ⑤ 관절조직내 항산화 단백질 분석

#### • SOD

관절 조직에서 SOD 단백질을 분석한 결과 정상군  $1.00 \pm 0.05$ , 대조군  $0.75 \pm 0.02$ , SCM50군  $0.72 \pm 0.04$ , SCM100군  $0.75 \pm 0.01$ , SCM200군  $0.89 \pm 0.04$ 으로 나타나으며 SCM200군에서 대조군에 비해 유의한 증가를 보였다 (Fig. 3).

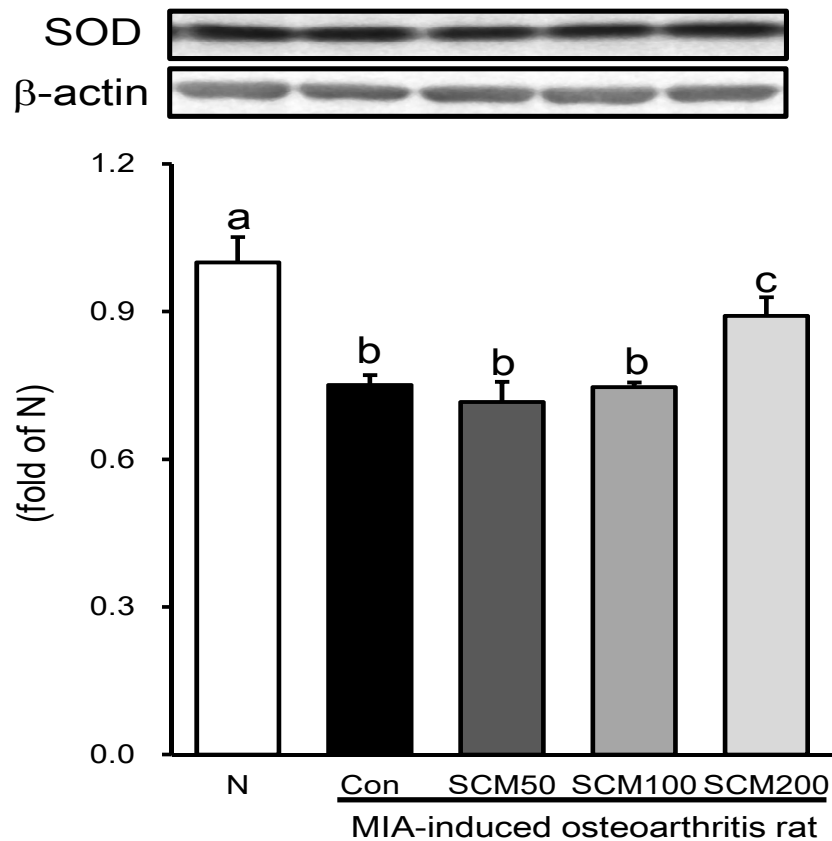


Fig. 3. Effects of SCM on the SOD protein expression in MIA-induced osteoarthritis rat.



- Catalase

관절 조직에서 catalase 단백질을 분석한 결과 정상군  $1.00 \pm 0.06$ , 대조군  $0.86 \pm 0.05$ , SCM50군  $0.78 \pm 0.04$ , SCM100군  $0.83 \pm 0.05$ , SCM200군  $0.97 \pm 0.04$ 로 나타났으며 SCM200군에서 대조군에 비해 증가하는 경향을 보였다 (Fig. 4).

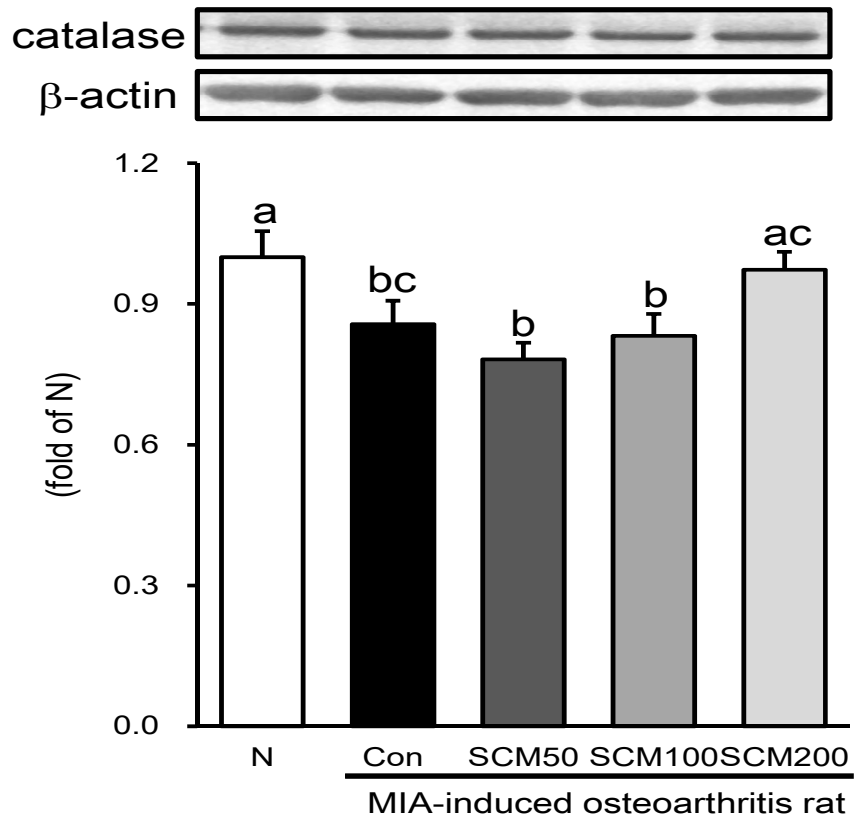


Fig. 4. Effects of SCM on the catalase protein expression in MIA-induced osteoarthritis rat.

- GPx

관절 조직에서 GPx단백질을 분석한 결과 정상군  $1.00 \pm 0.08$ , 대조군  $0.83 \pm 0.03$ , SCM50군  $0.64 \pm 0.03$ , SCM100군  $0.97 \pm 0.1$ , SCM200군  $0.99 \pm 0.08$ 으로 나타나으며 SCM100과 200군에서 대조군에 비해 증가하는 경향을 보였다 (Fig. 5).

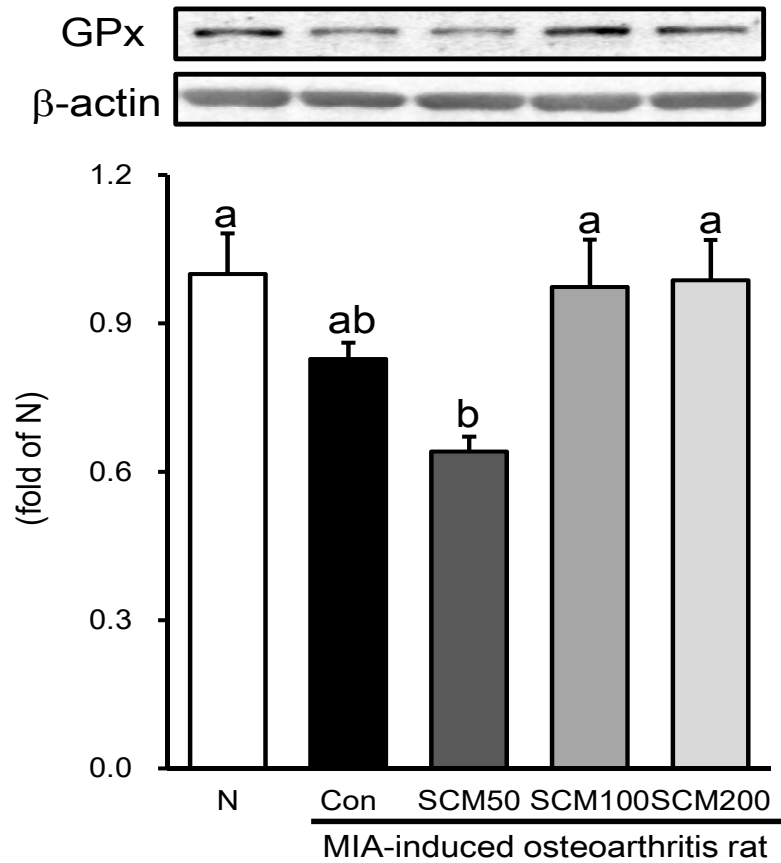


Fig. 5. Effects of SCM on the GPx protein expression in MIA-induced osteoarthritis rat.

⑥ 관절조직내 염증 cytokine 및 매개 인자 분석

• p-IκBa

관절 조직에서 p-IκBa를 분석한 결과 정상군  $1.00 \pm 0.13$ , 대조군  $1.43 \pm 0.1$ , SCM50군  $1.07 \pm 0.11$ , SCM100군  $1.18 \pm 0.14$ , SCM200군  $1.07 \pm 0.1$ 으로 나타났으며 SCM200군에서 대조군에 비해 유의한 감소를 보였다 (Fig. 6).

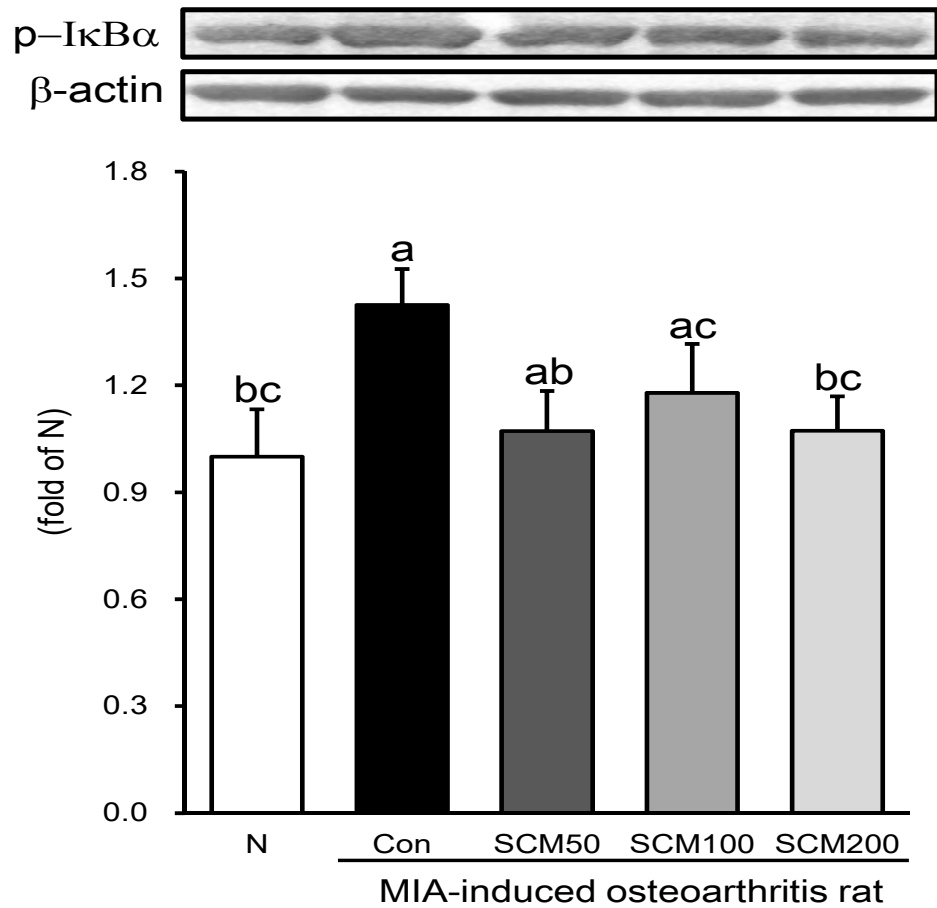


Fig. 6. Effects of SCM on the p-IκBa protein expression in MIA-induced osteoarthritis rat.

- NF-κBp65

관절 조직에서 NF-κBp65를 분석한 결과 정상군  $1.00 \pm 0.05$ , 대조군  $1.44 \pm 0.12$ , SCM50군  $1.21 \pm 0.08$ , SCM100군  $1.20 \pm 0.11$ , SCM200군  $1.10 \pm 0.05$ 으로 나타 나으며 SCM200군에서 대조군에 비해 유의한 감소를 보였다 (Fig. 7).

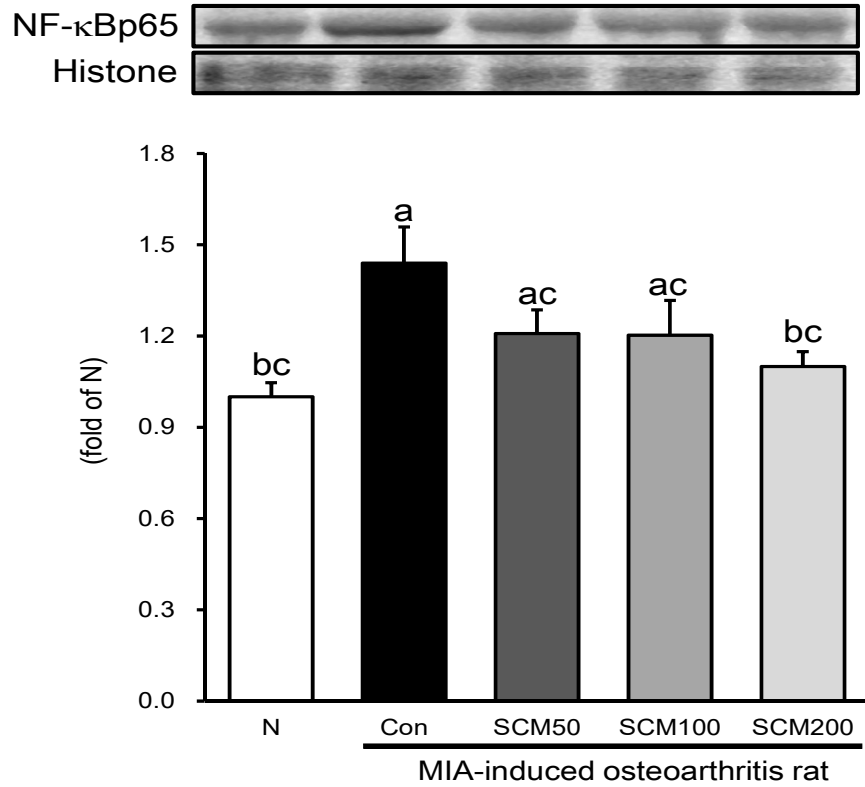


Fig. 7. Effects of SCM on the NF-κBp65 protein expression in MIA-induced osteoarthritis rat.

- COX-2

관절 조직에서 western blot을 실시하여 측정된 결과 정상군  $1.00 \pm 0.05$ , 대조군  $1.18 \pm 0.10$ , SCM50군  $1.04 \pm 0.05$ , SCM100군  $1.08 \pm 0.07$ , SCM200군  $1.03 \pm 0.06$ 으로 나타났다. 대조군은 정상군에 비해 증가하는 경향을 보였으며 SCM 투여군은 대조군에 비해 감소하는 경향을 보였다 (Fig. 8).

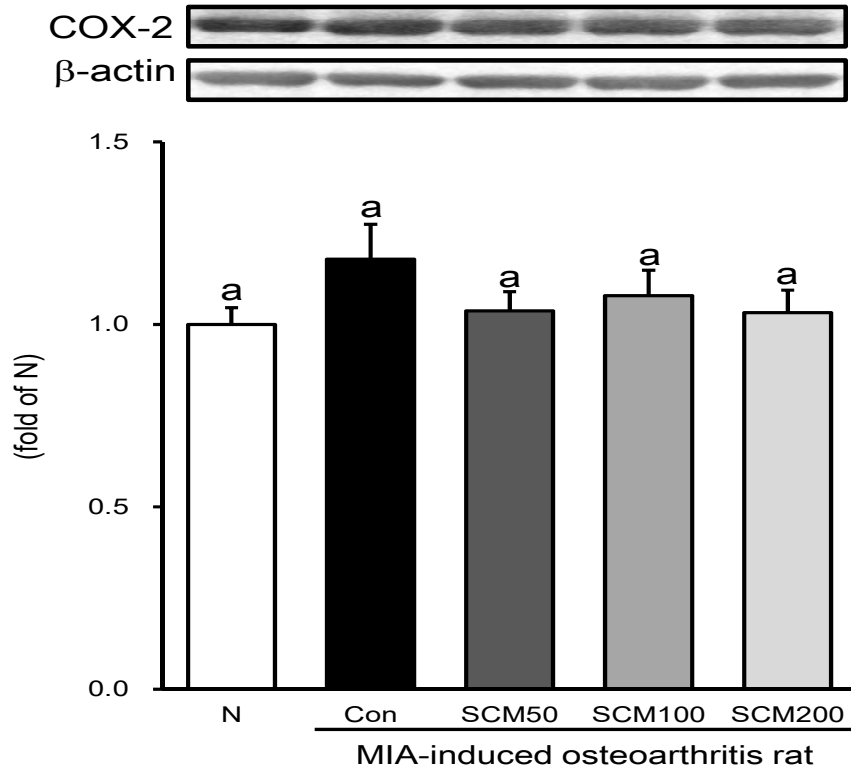


Fig. 8. Effects of SCM on the COX-2 protein expression in MIA-induced osteoarthritis rat.

- iNOS

관절 조직에서 western blot을 실시하여 측정한 결과 정상군  $1.00 \pm 0.04$ , 대조군  $1.26 \pm 0.05$ , SCM50군  $1.09 \pm 0.04$ , SCM100군  $1.08 \pm 0.05$ , SCM200군  $1.09 \pm 0.05$ 으로 나타났다. 대조군은 정상군에 비해 유의성 있는 증가를 보였으며 SCM 투여군 모두 대조군에 비해 유의한 감소를 나타냈다 (Fig. 9).

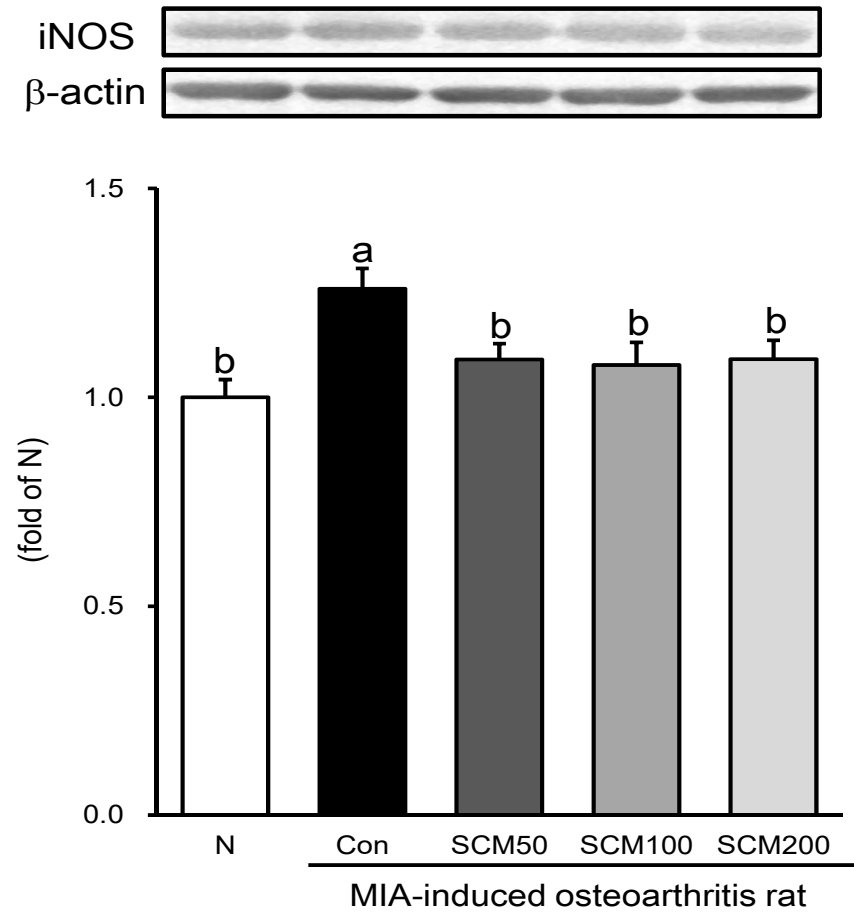


Fig. 9. Effects of SCM on the iNOS protein expression in MIA-induced osteoarthritis rat.

- TNF-a

관절 조직에서 western blot을 실시하여 측정된 결과 정상군  $1.00 \pm 0.05$ , 대조군  $1.18 \pm 0.03$ , SCM50군  $1.01 \pm 0.07$ , SCM100군  $1.09 \pm 0.11$ , SCM200군  $1.04 \pm 0.09$ 로 나타났다. 대조군은 정상군에 비해 증가하는 경향을 보였으며 SCM 투여군은 대조군에 비해 감소하는 경향을 보였다(Fig. 10).

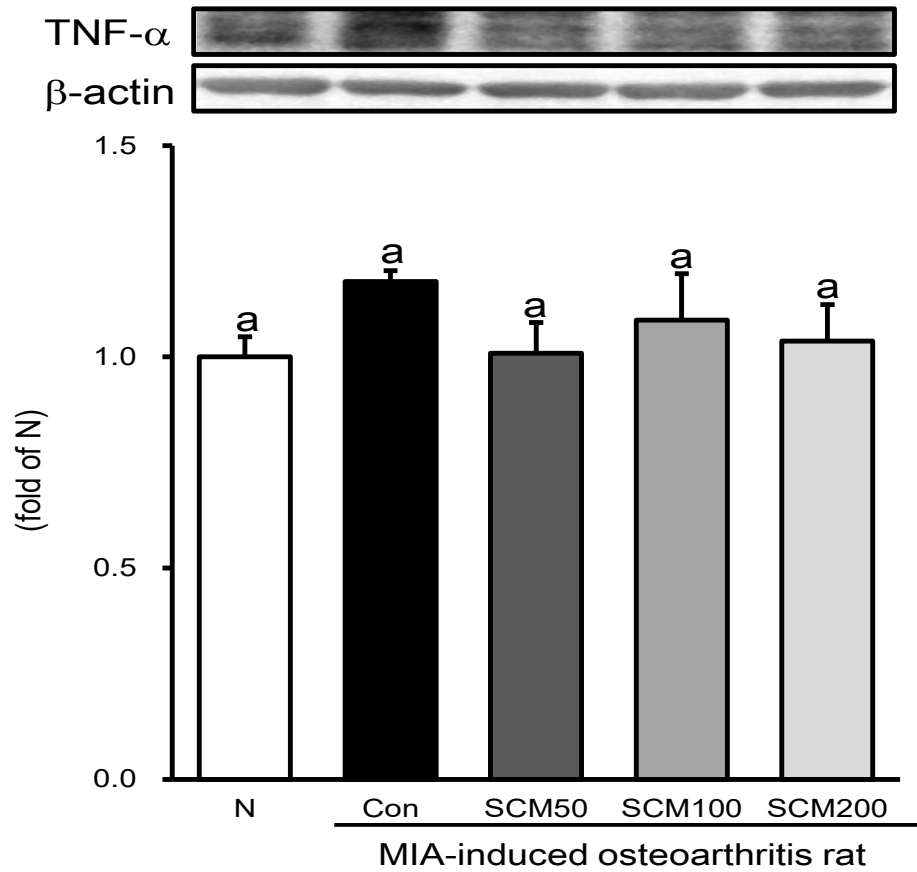


Fig. 10. Effects of SCM on the TNF-a protein expression in MIA-induced osteoarthritis rat.

- IL-6

관절 조직에서 western blot을 실시하여 측정한 결과 정상군  $1.00 \pm 0.10$ , 대조군  $1.31 \pm 0.07$ , SCM50군  $1.21 \pm 0.09$ , SCM100군  $1.22 \pm 0.04$ , SCM200군  $1.26 \pm 0.06$ 으로 나타났다. 대조군은 정상군에 비해 유의한 증가를 보였으며 SCM 투여군은 대조군에 비해 감소하는 경향을 보였다(Fig. 11).

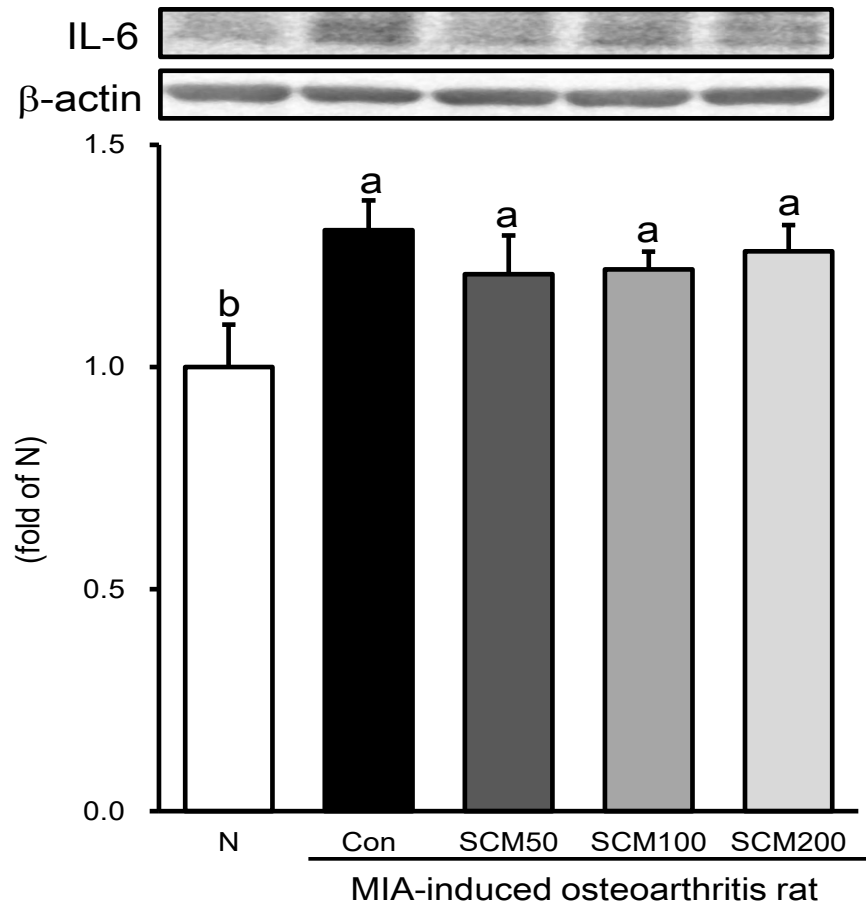


Fig. 11. Effects of SCM on the IL-6 protein expression in MIA-induced osteoarthritis rat.



⑦ 관절조직내 ROS 생성 관련 인자 분석

• Nox4

관절 조직에서 western blot을 실시하여 측정한 결과 정상군  $1.00 \pm 0.06$ , 대조군  $0.92 \pm 0.06$ , SCM50군  $1.04 \pm 0.10$ , SCM100군  $1.13 \pm 0.13$ , SCM200군  $0.63 \pm 0.07$ 으로 나타났다. 대조군은 정상군에 감소함을 보였으며 SCM50군과 100군에서 대조군에 비해 증가하는 경향을 보이며 SCM200군은 감소하는 경향을 보였다 (Fig. 12).

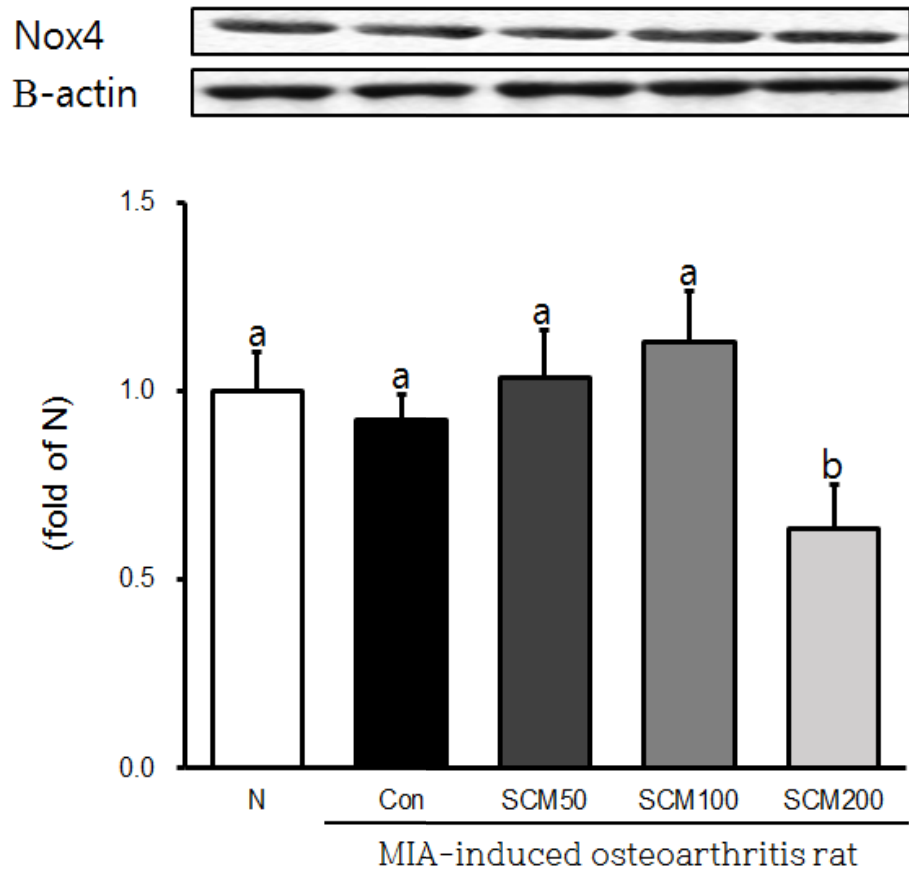


Fig. 12. Effects of SCM on the Nox-4 protein expression in MIA-induced osteoarthritis rat.

- p22phox

관절 조직에서 western blot을 실시하여 측정한 결과 정상군  $1.00 \pm 0.03$ , 대조군  $1.04 \pm 0.13$ , SCM50군  $1.69 \pm 0.26$ , SCM100군  $2.02 \pm 0.14$ , SCM200군  $1.57 \pm 0.15$ 으로 나타났다. 대조군은 정상군에 비해 증가를 보였으며 SCM 투여군은 대조군에 비해 유의한 증가하는 경향을 보였다 (Fig.13).

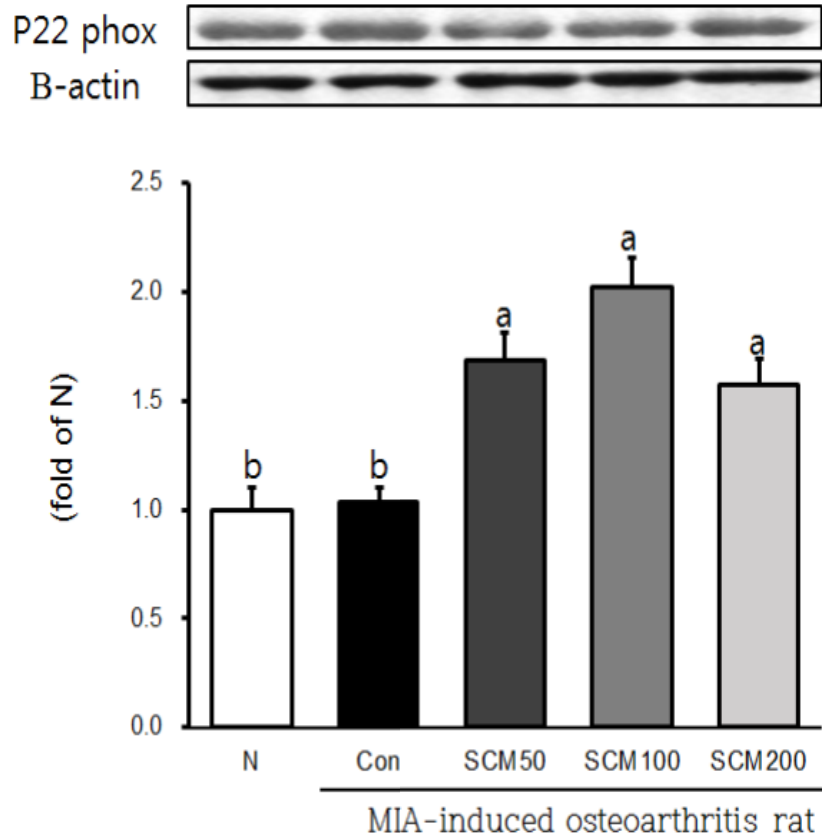


Fig. 13. Effects of SCM on the P22-phox protein expression in MIA-induced osteoarthritis rat.

- p47phox

관절 조직에서 western blot을 실시하여 측정한 결과 정상군  $1.00 \pm 0.33$ , 대조군  $0.79 \pm 0.06$ , SCM50군  $0.73 \pm 0.13$ , SCM100군  $0.84 \pm 0.08$ , SCM200군  $0.59 \pm 0.05$  으로 나타났다. 대조군은 정상군에 비해 감소를 보였으나 정상군과 유의성은 보이지 않았다. 또한 약물 투여군의 p47phox 단백질 발현량은 대조군에 비해 유의성은 보이지 않았으나, SCM200 고농도 투여군에서 가장 크게 감소되었다 (Fig. 14).

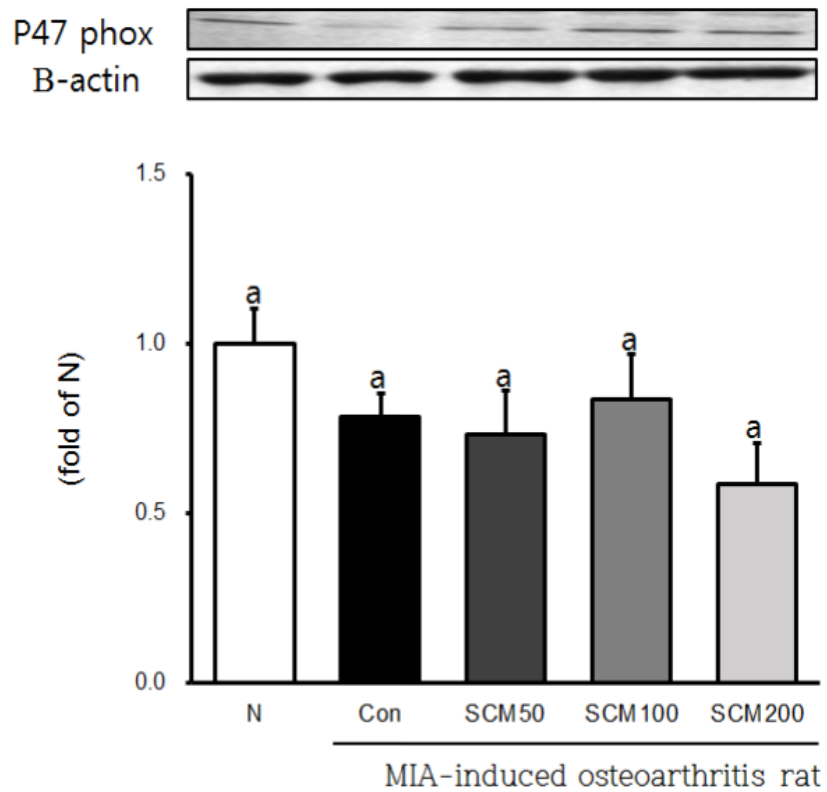


Fig. 14. Effects of SCM on the P47-phox protein expression in MIA-induced osteoarthritis rat.

⑧ 조직학적 분석

• Safranin O

정상군은 관절 조직과 proteoglycan이 정상적으로 보였으나 대조군은 골관절염 유발로 인해 정상 관절 조직과 proteoglycan의 파괴가 관찰되었다. 반면 SCM 투여군들은 관절 조직과 proteoglycan의 파괴가 억제되었다 (Fig. 15, 16).

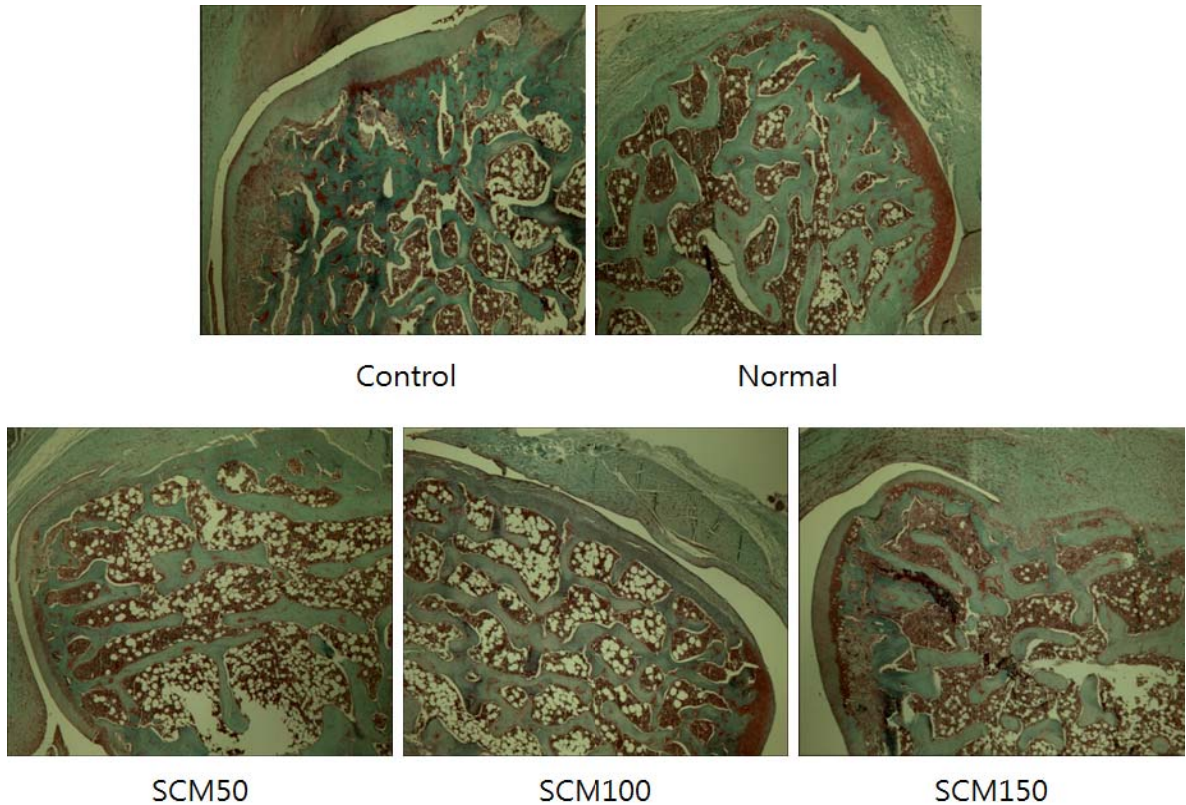


Fig. 15. The histological analysis of the knee joint tissues after treatment of JMT in MIA-induced osteoarthritis rat. (Safranin O staining,  $\times 40$ )

Safranin O

(A): Normal rat

(B): MIA-induced osteoarthritis rat

(C): MIA-induced osteoarthritis rat treated with SCM 50 mg/kg body weight

(D): MIA-induced osteoarthritis rat treated with SCM 100 mg/kg body weight

(E): MIA-induced osteoarthritis rat treated with SCM 200 mg/kg body weight

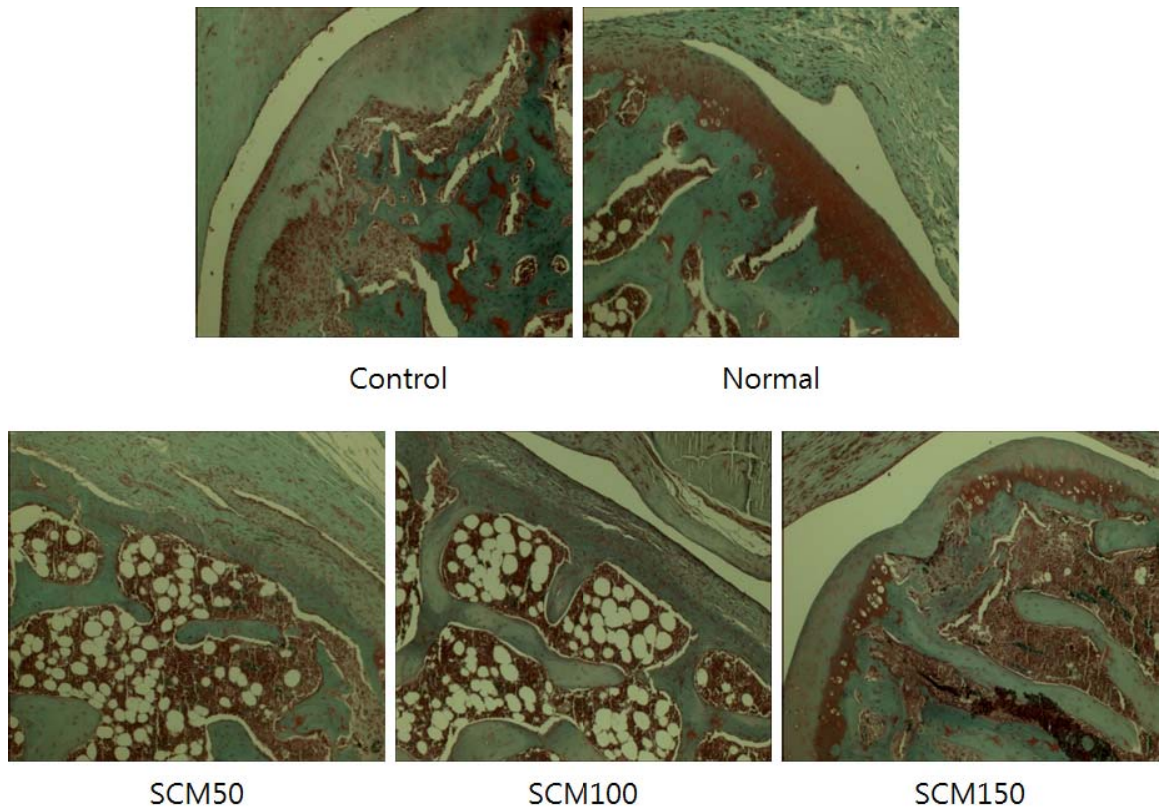


Fig. 16. The histological analysis of the knee joint tissues after treatment of JMT in MIA-induced osteoarthritis rat. (Safranin O staining,  $\times 100$ )

Safranin O

(A): Normal rat

(B): MIA-induced osteoarthritis rat

(C): MIA-induced osteoarthritis rat treated with SCM 50 mg/kg body weight

(D): MIA-induced osteoarthritis rat treated with SCM 100 mg/kg body weight

(E): MIA-induced osteoarthritis rat treated with SCM 200 mg/kg body weight

- Hematoxylin and Eosin

정상군은 활막 조직, 연골 조직이 정상적인 반면 대조군은 골관절염 유발로 인해 활막 조직과 연골조직의 심각한 손상이 나타났다. SCM 투여군들은 대조군과 비교하여 활막 조직과 연골 조직의 손상이 효과적으로 억제되었다 (Fig. 17, 18).

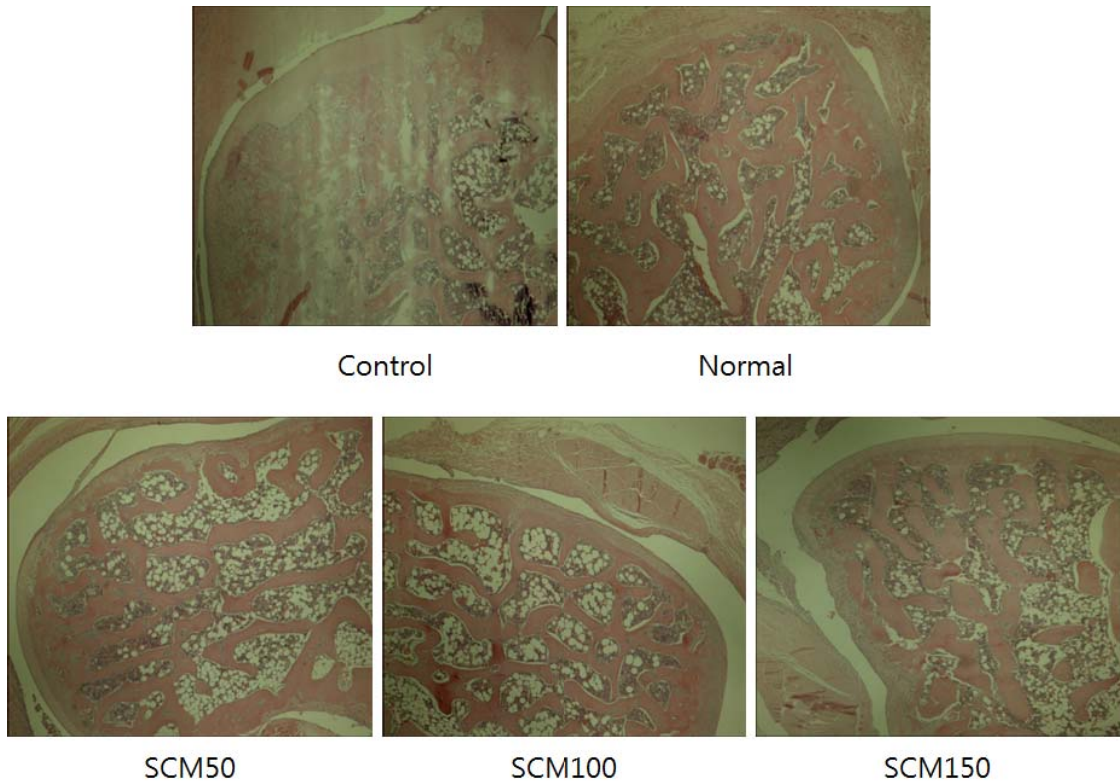


Fig. 17. The histological analysis of the knee joint tissues after treatment of JMT in MIA-induced osteoarthritis rat. (H&E staining,  $\times 40$ )

H&E: Hematoxylin and Eosin

(A): Normal rat

(B): MIA-induced osteoarthritis rat

(C): MIA-induced osteoarthritis rat treated with SCM 50mg/kg body weight

(D): MIA-induced osteoarthritis rat treated with SCM 100mg/kg body weight

(E): MIA-induced osteoarthritis rat treated with SCM 200mg/kg body weight

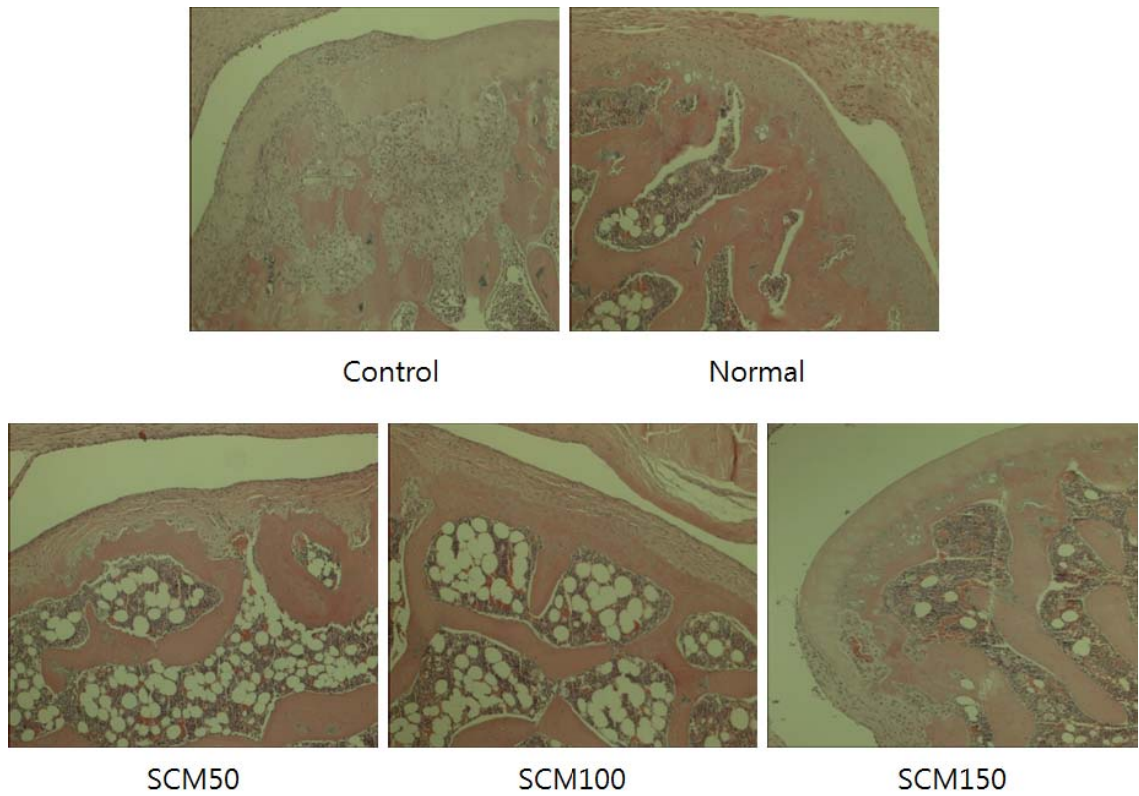


Fig. 18. The histological analysis of the knee joint tissues after treatment of JMT in MIA-induced osteoarthritis rat. (H&E staining,  $\times 100$ )

H&E: Hematoxylin and Eosin

(A): Normal rat

(B): MIA-induced osteoarthritis rat

(C): MIA-induced osteoarthritis rat treated with SCM 50mg/kg body weight

(D): MIA-induced osteoarthritis rat treated with SCM 100mg/kg body weight

(E): MIA-induced osteoarthritis rat treated with SCM 200mg/kg body weight

- Masson's Trichrome

정상군은 활막 조직, 연골 조직이 정상적인 반면 대조군은 골관절염 유발로 인해 면역세포의 침투, 활막 조직 과 연골 조직의 심각한 손상이 나타난다. 반면 SCM 투여군들은 면역세포의 침투나 활막 조직과 연골 조직의 손상이 효과적으로 억제되었다 (Fig. 19, 20).

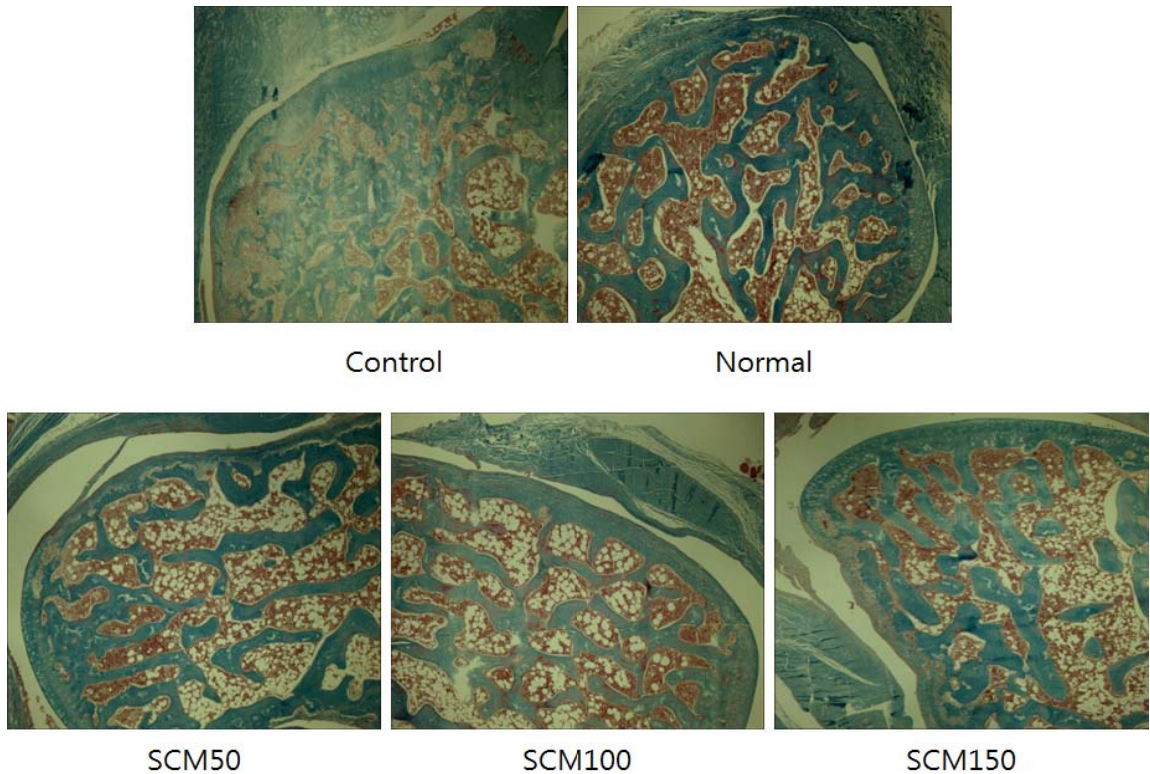


Fig. 19. The histological analysis of the knee joint tissues after treatment of JMT in MIA-induced osteoarthritis rat. (M-T staining,  $\times 40$ )

M-T: Masson's Trichrome

(A): Normal rat

(B): MIA-induced osteoarthritis rat

(C): MIA-induced osteoarthritis rat treated with SCM 50mg/kg body weight

(D): MIA-induced osteoarthritis rat treated with SCM 100mg/kg body weight

(E): MIA-induced osteoarthritis rat treated with SCM 200mg/kg body weight



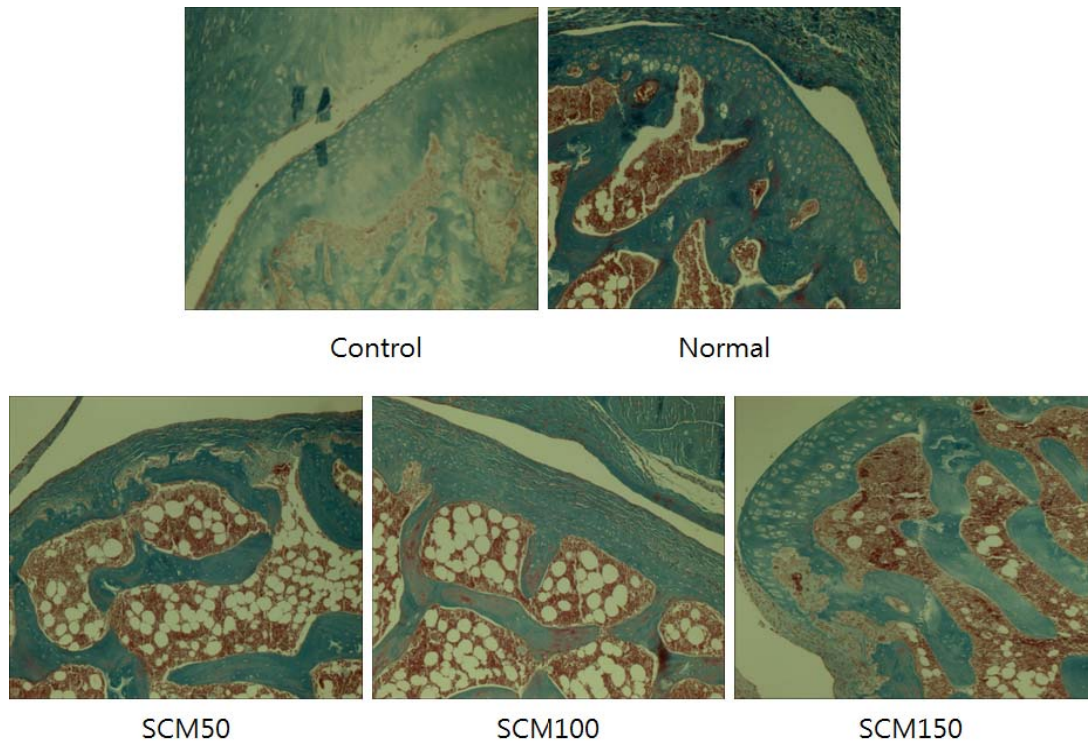


Fig. 20. The histological analysis of the knee joint tissues after treatment of JMT in MIA-induced osteoarthritis rat. (M-T staining,  $\times 100$ )

M-T: Masson's Trichrome

(A): Normal rat

(B): MIA-induced osteoarthritis rat

(C): MIA-induced osteoarthritis rat treated with SCM 50mg/kg body weight

(D): MIA-induced osteoarthritis rat treated with SCM 100mg/kg body weight

(E): MIA-induced osteoarthritis rat treated with SCM 200mg/kg body weight

### 3. 임상 시험 방법

#### (1) 인체적용시험의 윤리적 수행

본 인체시험은 가장 최근에 개정된 헬싱키 선언과 ICH guideline 및 식품의약품안전처의 의약품임상시험관리기준에 따라 수행되었다. 본 인체시험의 시험계획서, 시험대상자 동의서 및 기타 인체시험과 관련된 모든 사항은 2018년 4월 18일 단국대학교병원 기관생명윤리심의위원회(IRB)의 승인을 취득한 이후에 실시되었다(DKUH 2018-04-013).

시험대상자는 시험에 참여하기 전 준비된 시험대상자 설명문에 따라 임상시험 전반에 관한 설명을 들은 후 서면 동의서를 작성하였다. 설명문에는 임상시험의 목적 및 방법, 예측 효능 및 효과, 이상반응, 위험성, 피해 발생 시 보상 및 치료대책, 자료의 비밀보장 등의 내용이 포함되었다. 또한 본인의 자발적인 의지에 의해 시험에 참여하며, 참여에 동의한 후 언제라도 동의를 철회할 수 있다는 점과 이에 관련된 불이익을 받지 않는다는 점을 명시하였다. 서면 동의서를 작성한 시험대상자에 한하여 시험이 진행되었다.

#### (2) 시험제품

① 제제명 : 시험식품 (꽃송이버섯추출분말)

사용기간 : 24개월 (실온보관)

	성분	함량(%)
주성분	꽃송이버섯추출분말	55.6
부형제	결정셀룰로스	39.4
	이산화규소	2.0
	오파드라이화이트120k580000	3.0
합계	100%	

② 제제명 : 대조식품 (말토덱스트린)

사용기간 : 24개월 (실온보관)

	성분	함량(%)
부형제	결정셀룰로스	95.0
	이산화규소	2.0
	오파드라이화이트120k580000	3.0
합계	100%	

③ 섭취방법 : 12주간, 1일 2회, 식후 경구섭취 (1,000mg/day)

### (3) 시험 흐름도

Period	스크리닝 검사	투여기간 <sup>1</sup>			추가 방문 (필요 시)
		1차	2차	3차	
Visit	스크리닝 방문				
Week	-4 이내	0	6	12	
선정/제외기준 확인	●	●			
서면동의서 작성	●				
병력/수술력 조사 및 병용약물 모니터링	●	●	●	●	●
신체검사	●				●
활력징후 <sup>2</sup>	●	●	●	●	●
ECG	● <sup>3</sup>		●	●	●
실험실적검사	● <sup>3</sup>		●	●	●
임신진단검사 <sup>4</sup>	●		●	●	
무작위배정		●			
인체적용시험용식품 처방		●	●		
인체적용시험용식품 반납			●	●	
복용일지 작성 교육/확인		●	●	●	
이학적 검사	●	●	●	●	●
NRS (관절 통증에 대한 설문)	●	●	●	●	
WOMAC index (관절 기능에 대한 설문)		●	●	●	
PGIC (변화에 대한 전반적 느낌)			●	●	
이상반응 모니터링			●	●	●
제품순응도 검사			●	●	

\* 선정/제외기준을 만족시키지 못하는 연구대상자에 대해서는 이후 계획한 검사를 실시하지 않을 수 있다.

1 : 스크리닝 방문을 제외하고 각 방문은 전 5일, 후 5일을 허용한다.

2 : 혈압, 맥박, 체온을 측정한다.

3 : 스크리닝 검사는 스크리닝 방문 전 최근 1개월 이내 심전도 및 진단검사의학 검사 결과로 대체할 수

있다. 추가로 필요한 진단검사의학 검사항목은 해당 연구 스크리닝 방문일에 검사한다.

4 : 가임기 여성의 경우에만 실시한다.

#### (4) 시험대상자의 선정기준, 제외기준

##### ① 선정기준

시험대상자들은 다음의 모든 기준에 적합하여야 한다.

- 스크리닝 검사 당시 연령이 만 20세 이상인 성인남녀
- 경증의 슬관절통을 호소하는 준건강인 : NRS 1 이상 4이하
- 본 연구에 대한 자세한 설명을 듣고 완전히 이해한 후, 자의로 참여를 결정하고 주의사항을 준수하기로 서면 동의한 자

##### ② 제외기준

다음 조건의 어느 하나라도 해당되는 시험대상자는 본 연구에 참여할 수 없다.

- 현재 관절염 관련 약물을 복용 중인 자
- 꽃송이버섯추출분말 성분이 함유된 제품을 복용 중인 자
- 관절 주위의 골극 현상, 불규칙한 관절면, 관절의 연골하 골낭종 등이 동반되어 있으며 이학적 검사 및 단순 방사선 사진상 중등도 이상의 관절염으로 판단되는 사람
- 임신가능성이 있는 가임 여성중 적절한 피임법의 시행을 수용하지 않은 경우 (단, 불임수술을 받은 여성은 제외)
- 임신 혹은 수유 중인 여성
- 슬관절통이 아닌 다른 중요한 통증이 있는 준 건강인
- 위염, 위궤양 치료 중인 사람
- 심장, 신장 또는 간의 중요한 질환을 가지고 있거나 치료할 수 없는 기능 불구로 인체 적용시험 참여 후 이상반응 평가에 영향을 주거나, 인체적용시험을 완료하는데 방해가 될 것으로 예상되는 준 건강인
- 연구자의 판단에 의해 인체적용시험에 영향을 줄 수 있는 중요한 의학적 처치/수술을 받았던 과거 이력이 있는 준 건강인
- 인체적용시험용제품의 흡수에 영향을 줄 수 있는 위장관계 질환(예: 크론병)이나 위장관계 수술 (단, 단순맹장수술이나 탈장수술은 제외)의 과거력이 있는 자
- 첫 섭취일 전 2주 이내에 면역증진에 영향을 미칠 수 있는 의약품, 한약, 건강기능식품을 섭취한 경험이 있는 자 (건강기능식품의 경우 첫 섭취일 전 1주간의 휴약 기간을 거쳐 참가가능)
- 스크리닝 검사 전 2개월 이내에 항정신병 약물치료를 받은 경험이 있는 자
- 알코올 중독 또는 약물 남용으로 인한 치료력이 있는 자
- 스크리닝 검사 전 2개월 이내에 타 인체적용시험에 참여한 자
- 검사실검사에서 다음에 해당하는 결과를 보이는 자
  - ▶AST, ALT > 참고범위 상한치의 2배
  - ▶Serum Creatinine > 2.0 mg/dl

▶Creatine Kinase (CK) > 참고범위 상한치의 2배

- 진단의학검사 결과를 비롯한 기타 사유로 인하여 시험책임자가 연구 참여에 부적합하다고 판단 한 자

## (5) 목표한 시험대상자의 수 및 설정근거

- 시험대상자의 수

유효 표본수 최소 대상자 22명에 탈락률 20% 고려하여 각 군당 등록할 대상자 수는 30명이며, 총 대상자수는 60명이다.

- 목표 시험대상자의 수 설정근거

본 인체적용시험의 1차적인 목적은 꽃송이버섯추출분말을 12주간 섭취한 후의 슬관절통 개선 효과가 대조식품을 섭취한 군과 비교하여 우위에 있음을 증명하고자 함이다.

본 인체적용시험에서는 인체적용시험식품의 우위성을 검증하기 위한 연구대상자 수 산출을 위하여 꽃송이버섯추출분말을 12주간 섭취 후 슬관절통 개선 효과는 7.3%, 대조식품군은 1.6%, 꽃송이버섯추출분말과 대조식품군의 표준편차는 8%로 가정하였다. 위의 가정에 의해 본 인체적용시험의 연구대상자 수를 다음과 같이 산출하였다.

- 5% 유의수준에서 제 2종 오류는 0.2로 하여 80% 검정력을 유지한다  
( $\alpha=0.05$ ,  $\beta=0.2$ , 검정력=80%).
- 꽃송이버섯추출분말군과 대조식품군의 시험예수 비율은 1:1로 한다( $\lambda = 1$ ).
- 기초 평가로부터 시험 종료시점에 이르기까지 슬관절통의 개선효과는 꽃송이버섯추출분말군( $\mu t$ )에서 7.3%, 대조식품 군( $\mu c$ )은 1.6% 감소됨을 가정하였다.
- 꽃송이버섯추출분말군의 표준편차( $\sigma t$ )와 대조식품군의 표준편차( $\sigma c$ )는 8%로 가정하였다.

본 연구에서는 꽃송이버섯추출분말군과 대조식품군과의 개선 효과를 비교하여 꽃송이버섯추출분말군이 우위 함을 가정하고 그에 대한 시험예수를 산정한다.

이를 검정하기 위한 가설은 다음과 같다.

$$H_0: \mu t \leq \mu c$$

$$H_1: \mu t > \mu c$$

위의 (1)-(4)을 가정했을 때 인체적용시험에 필요한 연구대상자 수는 다음과 같다.

$$n = \frac{(\sigma_t^2 + \sigma_c^2) (Z_\alpha + Z_\beta)^2}{(\mu_t - \mu_c)^2} = 24$$

위의 계산으로부터 필요한 연구대상자 수를 산출하고 중도 탈락률 20%를 고려하여 다음 식에 의하여 인체적용시험에 필요한 최종 연구대상자 수를 산출하였다.

$$n = \frac{n_t}{1-r} = 30$$

두 시험군을 통틀어 요구되는 총 연구대상자 수는 60명이다.

## (6) 임상시험 기간

본 임상시험의 기관생명윤리심의위원회(IRB)의 승인 2018년 04월 18일로부터 2018년 11월 7일까지였다.

## (7) 인체적용시험 방법

### • 인체적용시험의 설계

본 인체적용시험은 준건강인을 대상으로 하는 단일기관, 이중눈가림, 무작위배정, 플라세보-대조 인체적용시험이다.

### • 스크리닝일 (Screening day, Visit 0, 등록 -2주~-1주)

연구자는 인체적용시험 참여에 적합하다고 판단되는 연구대상자에게 서면 동의서를 취득하고, 준건강인들이 본 인체적용시험의 연구대상자 선정기준, 제외기준을 만족하는지 평가하기 위해, 아래와 같은 검사를 시행했다.

-서면동의서 취득

-선정/제외 기준 확인

-연구대상자 기초정보 조사

-병력/수술력 확인

-신체검사

-활력징후(혈압, 맥박, 체온)

-ECG, 실험실적 검사 : 등록일로부터 4주 이내에 실시한 검사 결과의 사용이 가능하다.

-임신진단 검사 : 가임기 여성의 경우에만 시행했다.

-병용약물 모니터링

-체중 부하 시 NRS 설문 : NRS 점수 1이상 4이하

-혈중 ROS(Reactive oxygen species) 검사

- 등록일 (Baseline, Visit 1, 등록일)

등록일은 무작위 배정 및 인체적용시험용식품의 처방이 이뤄지는 날이다. 등록일에는 선정기준을 재확인한 후 이에 적합한 준건강인을 최종 연구대상자로 등록했다. 등록된 연구대상자는 무작위 배정된 군에 따라 인체적용시험용식품을 처방 받았다.

- 선정/제외 기준 재확인
- 활력징후(혈압, 맥박, 체온)
- 무작위배정
- WOMAC-Likert Assessment
- 체중 부하 시 Numerical Rating Scale
- 인체적용시험용식품 처방
- 병용약물 모니터링

- 섭취기 (Intervention, Visit 1 ~ Visit 3, 등록일로부터 섭취 12주)

연구대상자는 인체적용시험을 위해 섭취 시작일로부터 이후 6, 12주에 방문했다.

방문간격은 섭취기 동안  $\pm 5$ 일의 오차범위 내에서 일정하게 유지하되, 섭취기 종료일은 가능한 지켜 방문하도록 했다.

- 활력징후 측정 : 6주, 12주
- ECG : 6주, 12주
- 실험실적 검사 : 6주, 12주
- 임신진단 검사 : 6주, 12주
- 인체적용시험용식품 처방 : 0주, 6주
- 인체적용시험용식품 반납 : 6주, 12주
- WOMAC-Likert Assessment : 6주, 12주
- 체중 부하 시 Numerical Rating Scale : 6주, 12주
- PGIC : 6주, 12주
- 혈중 ROS(Reactive oxygen species) 검사: 6주, 12주
- 병용약물 모니터링 : 6주, 12주
- 이상반응 모니터링 : 6주, 12주
- 순응도 모니터링 : 6주, 12주

단, 중도 탈락 시에는 가능한 한 6, 12주 방문에 실시해야 하는 모든 항목을 실시하도록 했다.

- 추가방문(필요 시)

섭취 종료 혹은 조기종료 방문 시까지 지속되는 이상반응이 있었던 경우 혹은 섭취종

료 이후 추가적인 추적관찰이 필요하다고 시험책임자 또는 연구대상자에 의해 요청이 있을 경우 재방문하여 다음의 항목을 평가했다.

-활력징후를 측정한다.

-신체검진 검사를 실시한다.

-지난 방문 이후로 연구대상자의 병력이나 치료제품에 변화가 있는 경우 또는 병용제품이 있는 경우 증례기록표에 기록한다.

-이상반응 발생유무와 내용을 조사한다. 단, 시험자의 판단에 따라 비정상적인 결과에 대한진단의학검사, 심전도검사 등이 시행될 수 있다.

## (8) 복약순응도

반납제품 회수 및 인체적용시험용제품의 섭취 순응도는 6주, 12주에 연구대상자가 지참하고 온 인체적용시험식품의 잔량을 연구자 또는 연구담당자가 점검했다. 섭취하고 남은 잔량은 반드시 반납하여 수불장부를 기록하였다. 각 방문별 순응도는 100%를 초과할 수 없으며, 초과할 경우 100%로 간주했다. 각 방문별로 순응도를 계산하여 전체 순응도 평균치가 70% 이상이어야 하며, 이를 만족하지 못할 경우 분석에서 제외하였다. 순응도는 정수로 표기하였다.

$$\text{제품 순응도(\%)} = \frac{\text{실제 복용한 제품 수}}{\text{복용하여야 할 제품 수}} \times 100$$

- 복용해야 할 시험식품의 수 : 복용일수 1일 복용량
- 복용한 시험식품의 수 : 처방된 시험식품의 수 반납한 시험식품의 수

## (9) 복약지도

복약일지 작성 : 시험대상자가 시험식품/대조식품을 복약하고 제공된 복약일지에 복용캡슐량을 기록하였다. 6주, 12주에 복용하고 남은 시험식품/대조식품 전량과 포장용기를 반납하였다.

## (10) 미사용 시험식품/대조식품 회수

미사용 시험식품/대조식품은 인체적용식품의 관리에 따라 모두 회수하였다.

## (11) 무작위배정 및 이중 눈가림

자동생성(<http://randomization.com>) 프로그램을 이용하여 Randomization number 1번~93번까지 난수로 자동 생성하여 부여받았다. 시험대상자는 인체적용시험에 참여하는 순서대로 Randomization number를 부여받았다. 무작위 배정 이후에는 시험대상자 모두 무작



위 배정된 시험식품 정보를 알 수 없도록 이중 눈가림법으로 진행하였다.

## (12) 이중눈가림의 유지

무작위 배정표는 시험 종료 후 결과 분석을 위한 경우나 응급상황을 제외하고는 봉합된 상태로 유지되었다.

## (13) 이중눈가림의 해제

시험자 및 의뢰자가 시험대상자의 권익과 안전을 위하여 눈가림 해제가 반드시 필요하다고 판단한 경우(예: 시험대상자에게 중대한 이상반응 등 응급상황이 발생한 경우 등)에는 눈가림을 해제할 수 있었다. 시험책임자는 눈가림을 해제하기 전에 의뢰자 측 담당자와 연락하도록 하며, 시험자가 의뢰자와의 연락이 불가능한 경우에 의뢰자의 동의 없이 눈가림을 해제할 수 있으나, 시험자는 가능한 빨리 응급코드의 개봉사실과 개봉사유를 의뢰자에게 알리도록 하였다.

## (14) 시험절차

### ① 연구대상자 동의서(Informed Consent Form, ICF)

연구자는 인체적용시험 전반에 걸쳐 연구대상자가 가질 수 있는 질문에 대해 답변하고 연구대상자의 인체적용시험 참여 지속 의사에 중요할 수 있는 새로운 정보가 입수되는대로 적절한 시한 내에 이를 공유하는 것을 포함하여 연구대상자가 인체적용시험 참여로 인한 위험 및 이익을 이해하도록 확인하는 책임이 있다. ICF가 새로운 정보에 따라 갱신되는 경우 연구자는 갱신된 ICF를 사용하여 연구대상자의 인체적용시험 참여 지속 의사를 다시 한 번 확인하였다. ICF는 연구대상자가 인체적용시험에 참여하기 이전에 쉬운 용어를 사용하여 인체적용시험 참여에 따르는 위험 및 이익을 연구대상자에게 설명하기 위해 사용되었고, 연구대상자가 인체적용시험 참여에 따르는 위험 및 이익에 대해 만족할 만큼 이해하고 인체적용시험에 참여하고자 하는지 문서화하기 위해 사용되었다.

연구자는 각 연구대상자가 제출한 연구대상자 동의서를 확인할 책임이 있다. 여기에는 모든 인체적용시험 계획서 상의 절차수행 및 인체적용시험식품의 복용이전에 적절한 서명 및 날짜가 기재되어야 하는 점이 포함되었다.

### ② 스크리닝 번호 및 연구대상자 번호 부여

인체적용시험에 참여하고자 서면 동의한 자원자에게 스크리닝 번호를 부여하였다. 스크리닝 번호는 S로 시작하는 전체 네자리, 숫자 세자리로 구성되며(S001~), 동의서

를 받은 순서대로 부여하였다. 연구대상자 번호 부여방법은 스크리닝 검사를 시행하여 본 인체적용시험의 연구대상자로서 적합하다고 판단되는 자를 선정하고, 1차 방문시 최종통과 되면 통과된 순서대로 무작위배정하여 연구대상자 번호를 부여하였다. 연구대상자 번호는 SAN-R로 시작하는 전체 세자리, 숫자 두 자리로 일정한 규칙을 갖는다. 연구대상자 번호 숫자부분의 의미는 다음과 같다. 첫 번째와 두 번째 숫자는 참여한 연구대상자의 순서를 나타내며 01~99까지 나타낼 수 있다. 각 연구대상자에게 부여된 연구대상자 번호는 인체적용시험이 끝날 때까지 연구대상자를 인식하는 연구대상자식별코드(subject identification code)로 사용되었다.

### ③ 병력 및 약물 투여력 조사

연구대상자가 동의서에 서명한 시점에서, 3년 이내에 가지고 있는 과거 병력을 확인하고, 증례기록서의 해당 페이지에 기록하였다. 인체적용시험기간 동안 질환이 처음으로 발생하거나 병발질환이 시험기간 동안 악화된 경우에는 이상반응으로 간주하고 기록하였다. 또한 모든 병용약물의 제품명 및 성분명, 용량, 용법, 투여기간 등을 상세히 기록하였다.

### ④ 활력징후

본 임상시험에서 측정하는 활력징후 항목은 혈압(mmHg, sitting), 맥박(beats/min), 체온(℃)이었다. 맥박은 전완요골 또는 전완의 동맥을 촉진하는 방법으로 60 초 동안 측정하며 앉은 상태에서 측정하였다. 확장기/수축기혈압은 3분 이상 안정을 취한 후, 앉은 상태의 혈압을 측정하며 체온은 고막체온계 또는 액와전자체온계 등을 사용하였다. 활력징후는 스크리닝일(Visit 0), 0 주(Visit 1), 6 주(Visit 2), 12 주(Visit 3)에 측정하였다.

### ⑤ 신체계측

신체 계측은 신장, 체중 및 체질량 지수(BMI)를 확인하였다. 신장과 체중은 시험기간 중 동일한 기계를 사용하도록 하였다. 신장은 단위를 cm로 하며, 스크리닝 방문 시의 측정 값으로 인체적용시험 종료 시까지 기재하도록 하며, 소수점 첫째 자리에서 반올림하여 정수로 표기하였다. 체중은 단위를 kg으로 하며, 소수점 첫째 자리까지 표기하였다(단, 소수점 둘째 자리까지 나오는 기계일 경우, 둘째 자리에서 반올림하여 첫째 자리까지 표기하였다. 체질량지수(body mass index,  $\text{kg}/\text{m}^2$ )는 체중(단위 : kg)을 신장(단위 : m)의 제곱으로 나눈 값이며, 소수점 둘째자리에서 반올림하여 소수점 첫째 자리까지 표기하였다.

### ⑥ Numerical Rating Scale (NRS)

11-pointed NRS score(0-10)는 통증의 정도를 평가하는 도구이다. 연구대상자는 스크리

닝기부터 체중부하 시 슬관절 통증 정도를 연구대상자기록지에 기록하였다. 연구대상자는 연구대상 자기록지에 통증의 정도를 거르지 않고 기록하였다. 스크리닝일(Visit 0), 0 주(Visit1) 6 주(Visit 2), 12 주(Visit 3) 방문 시 평가를 실시하였다.

⑦ Western Ontario and McMaster Universities Osteoarthritis (WOMAC) Index  
퇴행성 슬관절염을 가진 대상자의 기능적 장애 정도를 측정할 수 있는 설문지(별첨 1)로 0 주(Visit 1), 6 주(Visit 2), 12 주(Visit 3) 방문 시 평가를 실시하였다.

⑧ Patient's global impression of change (PGIC)  
7-point scale 로 대상자 본인이 전반적인 상태의 변화를 평가하는 설문지(별첨 2)로 6 주(Visit 2), 12 주(Visit 3) 방문 시 평가를 실시하였다.

⑨ 심전도검사(12-Lead ECG)  
심전도검사는 스크리닝일(Visit 0), 6 주(Visit 2), 12 주(Visit 3) 방문 시 실시하였다.

⑩ 진단검사의학 검사  
진단의학검사는 스크리닝일(Visit 0), 6 주(Visit 2), 12 주(Visit 3)에 실시하였다. 치료기 중 시행한 진단의학검사에서 연구자의 판단에 따라 임상적으로 유의한 이상소견은 검사치의 이상으로 기록하였다. 임신검사는 가임기 여성에 한해서 실시하였다.

▶스크리닝 전 최근 1개월 이내의 심전도 및 진단의학검사 결과로 대체할 수 있다.  
추가로 필요한 진단의학검사 항목은 해당 인체적용시험 스크리닝 방문 일에 검사하였다.

분 류	검사항목
일반혈액검사	RBC, WBC, Hb, Hct, PLT
생화학검사	AST(SGOT), ALT(SGPT), Total bilirubin, Total Protein, Albumin, BUN, Creatinine, Cholesterol, Uric acid, CK, HDL, LDL, TG, Glucose, ROS(Reactive oxygen species)
요분석	Glucose, Ketone, Blood, pH, WBC, Blood, Nitrite, Protein, Urobilinogen, Bilirubin, SG, Color
임신 검사	Urine HCG test

## (15) 데이터 관리 및 통계

본 인체적용시험의 시험대상자로부터 얻어진 자료는 Microsoft사의 Excel(ver. 2013) 프로그램에 데이터 입력 후 통계프로그램인 SPSS(Version 24.0)로 양 군간의 차이를 통계적으로 검토하였다.

안전성 자료는 본 인체적용시험용 식품을 복용한 시험대상자와 위약군 복용자 간에 부작용 발생 건수 및 내용을 분석하였다.

## (16) 인체적용시험용 식품의 생산, 포장, 라벨 및 저장

- ① 인체적용시험용 식품은 의약품인체적용시험관리기준 (KGCP, 의약품 등의 안전에 관한 규칙 별표 4, 2014.08.21.) 제 8호 하목의 규정에 따라 인체적용시험의뢰자가 제조(또는 구입) 후, 인체적용시험기관의 관리약사에게 공급하였다.
- ② 인체적용시험용 식품은 동일한 라벨을 부착함으로써 시험대상자 및 연구자에 대하여 이중눈가림이 유지되도록 하였다.
- ③ 인체적용시험용 식품은 총 94 정 (6주 42일 84 캡슐 + 5일 여유분 10 캡슐)의 시험식품 및 대조식품을 PE 용기 포장한 후 Labeling하여 시험기관에 전달되었다.
- ④ 인체적용시험용 식품 라벨의 기재는 의약품 등의 안전에 관한 규칙 제 69조 6항에 준하며, 시험대상자 번호를 추가하여 아래와 같이 기입하였다.

▶ 시험식품에 대한 라벨은 다음과 같은 내용을 포함하여야 하였다. 단,

- 인체적용시험용 이라는 표시
- 시험식품의 코드명 또는 주성분의 일반명
- 제조번호 및 사용(유효)기한 또는 재검사 일자
- 저장방법: 실온 보관
- 인체적용시험계획 승인을 받은자의 상호와 주소
- 제조업자 또는 수입자의 상호
- “인체적용시험의 목적으로는 사용할 수 없음” 이라는 표시

## (17) 인체적용시험 식품의 관리

- ① 본 인체적용시험용 식품은 실온 보관하였다.
- ② 인체적용시험에 사용되는 식품의 관리에 대한 책임은 시험책임자가 담당하였다.
- ③ 인체적용시험에 사용되는 식품을 관리하는 시험책임자 또는 시험담당자는 인체적용시험에 사용되는 식품에 대해 인수, 재고 관리, 시험대상자별 투약, 반납 등의 의무를 수행하고 관련 기록을 유지하였고 해당 사항을 주기적으로 시험책임자에게 알렸다.
- ④ 규정에 의한 기록에는 각 시험대상자별로 인체적용시험에 사용되는 식품의 투여일자, 수량, 제조번호 또는 일련번호, 사용(유효)기간(필요한 경우에 한함), 시험식품의 코드

명 또는 주성분의 일반명 및 시험대상자식별코드가 포함되었다.

- ⑤ 인체적용시험 담당자는 각 시험대상자가 계획서에 명시된 적정 용량을 투여 받았는지 확인할 수 있는 투약기록을 유지하고, 인체적용시험에 사용되는 식품의 재고가 사용기록과 일치하는지의 여부를 확인하였다.
- ⑥ 인체적용시험에 사용되는 식품은 의뢰자가 지정한 조건과 관련규정이 정하는 바에 따라 보관되었다.
- ⑦ 시험책임자는 인체적용시험에 사용되는 식품이 계획서에 따라 투여되고 관리되는지의 여부를 확인하였다.
- ⑧ 시험책임자, 시험담당자는 각각의 시험대상자에게 인체적용시험에 사용되는 식품의 정확한 투여방법을 설명하였고, 시험대상자가 해당 지시 사항을 적절히 이행하고 있는지를 일정한 간격으로 확인하였다.

## 4. 안전성 및 기능성 평가 및 해석

### (1) 유효성 평가

본 인체적용시험의 연구대상자로부터 얻어진 자료는 크게 Safety군, ITT (Intent-to-treat) 군과 PP(per protocol)군으로 분석되었다.

- ① Safety군은 인체적용시험에 참여하여 최소한 1회 이상 인체적용시험식품을 섭취한 연구대상자를 대상으로 분석하였다.
- ② ITT군은 인체적용시험용제품 섭취 후, 최소한 1회 이상 주 평가변수에 대한 측정이 이루어진 연구대상자를 대상으로 하였다.
- ③ PP군은 ITT군에 포함되는 연구대상자 중 인체적용시험계획서에 따라 인체적용시험을 완료한 연구대상자를 대상으로 분석하였다.

유효성 평가에 대한 자료는 PP군을 주 분석대상으로 하되, ITT군을 추가적으로 분석하여 유효성을 평가할 수 있었다. 안전성 평가에 대한 자료는 Safety군에 대해 분석하여 본 인체적용시험식품에 대한 안전성을 평가하였다.

#### ▶ 유효성 분석

##### • 1차 유효성 평가 변수

-기저치(baseline, 스크리닝) 대비 섭취 6주 및 12주 후 체중부하 시 평균통증점수(NRS score)변화량의 양군간의 차

-기저치(baseline, 스크리닝) 대비 섭취 6주 및 12주 후 Western Ontario and McMaster Universities Osteoarthritis (WOMAC) Index 총합점수 및 각 기능별 세부항목(통증, 경직도, 신체기능) 점수 합에 대한 변화량의 양군간의 차

- 2차 유효성 평가 변수
  - 기저치(baseline, 스크리닝) 대비 섭취 6 주 및 12 주 후 혈액 내 ROS(Reactive oxygen species)의 변화
  - 투여 후 6 주, 12 각 시점에서의 Patient's global impression of change(PGIC) 점수
- 유효성 평가 변수의 분석 방법
 

평가 항목의 검사결과를 전 후 비교 시 각 섭취군 내, 군간의 Independent t-test, Paired t-test 등을 적용하여 검정하였다. 단, 동질하지 않은 항목은 covariate 로 보정하여 ANCOVA 를 실시하였다. 섭취군의 반복측정에 대해서 각 섭취군 내, 군간의 RM-ANOVA/Linear mixed model 등을 적용하였다. 단, 동질하지 않을 경우 RM-ANCOVA 를 실시하였다. 시점간 차이는 Contrast test 로 분석하였다.

## (2) 안전성 평가

본 인체적용시험에서는 인체적용시험용식품에 대한 안전성을 평가하기 위해 다음과 같은 사항을 검사하였다.

- ① 활력징후 : 활력징후로는 혈압, 맥박, 체온을 측정하여 확인하였다.
- ② 임상적 이상반응(전신적인자•타각증상)의 모니터링
 

전신적 인자•타각 증상을 포함한 이상반응은 연구대상자의 자발적인 보고 이외에도 인체적용시험에 사용되는 식품섭취 시 연구자의 문진 등을 통하여 확인하였다. 인체적용시험 기간 동안 연구대상자는 매일 이상반응 발현 여부를 확인하여 연구대상자 일지에 발현된 이상반응을 기록하고, 연구대상자 방문일에 연구자는 연구대상자 일지 확인과 문진을 통해 발현된 이상반응을 상세히 확인하였다. 이상반응이 나타나는 경우에는 증상, 출현시기, 지속시간, 이상반응의 정도 및 인과관계에 대하여 CRF 에 상세히 기록하였다.
- ③ 실험실적검사
 

인체적용시험 기간 동안 안전성 평가를 위해 진단의학검사 항목의 검사를 시행하였다.
- ④ 심전도검사
 

인체적용시험 기간 동안 안전성 평가를 위해 검사를 시행하였다.
- ⑤ 안전성 평가 변수의 분석 방법
 

연구기간 중 인체적용시험제품 관련 이상반응 연구대상자의 비율은 각 섭취군에 따라 요약 제시하며, Fisher's exact test 를 적용하여 분석하였다. 단, 정규성검정을 통하여 정규성 만족을 하지 못할 경우, 비모수적 분석방법을 이용하였다(각 섭취군 내, 군간의 Wilcoxon signed-rank test, Mann-Whitney test 등). 진단검사의학 검사, 활력징후,

심전도검사 등은 기술통계학적으로 분석하고, 섭취 전후 변화 양상 등을 Independent t-test, Paired t-test, RM-ANOVA/Linear mixed model 등을 적용하여 비교하였다.

### (3) 분석 대상

본 인체적용시험의 대상자로부터 얻어진 자료는 기능성 평가 분석과 안전성평가 분석이다.

#### ① 기능성 평가 분석

유효성 평가 분석은 대상자 중 인체적용시험계획서에 따라 본 연구를 성공적으로 완료한 대상자를 대상으로 하였다.

#### ② 안전성 분석

본 인체적용시험에 참여하여 최소한 1회 이상 인체적용시험용 식품을 복용한 대상자로부터 얻어진 자료를 모두 분석하였다.

### (4) 결과 해석의 원칙

기능성 평가에 대한 자료는 본 연구를 성공적으로 완료한 대상자(PP군)를 대상으로 하였다. 안전성 평가에 대한 자료는 Safety군에 대해 실시하여 본 인체적용시험용 식품의 안전성을 평가하였다.

### (5) 통계적 분석

본 자료의 통계적 분석은 호서대학교 빅데이터경영공학부의 통계상담실에 의뢰하여 진행하였다. 대상자의 일반적인 특성 및 연구변수에 대한 서술적 통계는 빈도와 백분율, 평균과 표준편차를 구하였다. 인구통계학적 변수와 건강 상태 변수에 있어서 시험군과 대조군 간 통계학적 차이가 있는지 검정하기 위해 양적 자료의 경우 군간 비교를 위해 ANOVA를 이용하여 고농도시험군, 저농도시험군, 대조군간의 비교를 실시하였고, 범주형 자료의 경우 군간 비교를 위해 군간 빈도를 구하고 Chi-square test or Fisher's Exact test 등을 이용하여 분석하였다.

모든 검정 변수들에 대하여 정규성 검정을 시행하였다. 정규성 검정 값인 Shapiro-Wilk 검정 값이 0.05 이하로 나와서 정규분포를 만족하지 않았으므로 비모수 통계검정을 실시하였다. 기능성 변수에서 대조군과 시험군의 평균차이를 검정하기 위해 Mann-Whitney U test와 ANCOVA분석을 실시하였고, 안전성 변수 관련 시험군과 대조군 간의 평균차이를 검정하기 위해 Kruskal-Wallis H test와 ANCOVA분석을 실시하였다. 또한 대조군과 시험군의 각 군 내에서 baseline과 종료시험에서의 변화 유무를 검정하기 위해 Wilcoxon signed rank test를 실시하였다.

본 인체적용시험의 대상자로부터 얻어진 자료로 기능성 평가와 안전성 평가를 실시하였다. 안전성 평가에 대한 자료는 Safety군에 대해 실시하여 본 인체적용시험용 식품의 안전성을 평가하였다.

① 안전성 분석군

본 인체적용시험에 참여하여 최소한 1회 이상 인체적용시험용 식품을 복용한 대상자로부터 얻어진 자료를 모두 분석하였다.

② 유효성 평가 분석군

유효성 평가 분석에 포함되는 대상자는 인체적용시험계획서에 따라 본 연구를 성공적으로 완료한 대상자를 대상으로 하였다(Per Protocol Analysis).

## (6) 결과 분석의 참고사항

① 통계처리의 기준

기술 분석 시 연속형 자료인 경우 평균, 표준편차, 95% 신뢰구간을 산출하고, 범주형 자료인 경우 빈도, 퍼센트를 산출하였다. 결측치가 있는 경우, 결측치를 나타내는 자료는 분석에서 제외하였다. 본 자료 분석 시 이용되는 모든 검정 통계량은 양측검정의 결과이고, 통계적 유의수준은 0.05를 기준으로 하였다

② 자료관리 (Data Management)

인체적용시험에서 얻어진 자료의 질적 수준을 확보하기 위한 자료관리는 KGCP 규정 및 ICH 지침에 근거하여 실시하며, 인체적용시험 자료의 질적 보증(data quality assurance)을 위한 자료관리 과정은 인체적용시험 관련자(시험책임자, 시험담당자 등)에 대한 교육, 인체적용시험 의뢰자에 의한 모니터링 및 점검(monitoring and audit), 데이터 관리(data management) 등의 형태로 실시하였다.

증례기록서에 기록된 인체적용시험 자료의 입력 및 관리를 위해 데이터 관리계획(Data Management Plan, 이하 DMP)를 정의하여 데이터의 완전성, 정확성 및 일치성을 점검하였다. 임상시험 자료 입력의 정확성을 보장하고, 이상반응 및 병용약물은 코딩사전(Coding Dictionary)을 이용하여 코드화하였다. 임상자료의 입력이 완료되면, 데이터 점검과정(Data validation) 및 Data Quality Control(QC) 과정을 실시하여 데이터의 완결성, 정확성 및 신뢰성을 보장할 수 있도록 하고, 이 후 데이터베이스 잠금(Database Lock)을 실시하였다. 맹검 해제(Code Open)를 실시하기 전에 Blind Meeting을 실시하여 객관성을 유지하였다. 임상시험 데이터 관리를 위해 사용된 데이터베이스(database) 및 데이터 관리 과정에서 발생하는 모든 문서들은 시스템 오류 또는 재난(system error or environmental disasters) 등으로 인한 데이터 손실을 방지하기 위해 정기적인 백업을 실시하여 복구가 가능하도록 관리하였다.



## (7) 시험대상자 동의서 및 설명문

본 시험의 실시에 있어서 시험대상자 또는 보호자에게 본 시험의 내용 및 시험식품의 효과, 이상반응에 대해 사전에 충분히 설명한 후 시험대상자의 동의를 얻어 동의서를 작성하고 증례기록서에 동의를 취득한 년도와 월일을 기재하였다.

## 5. 시험대상자의 기초정보

### (1) 시험대상자의 기초정보

70명을 스크리닝하여 최종적으로 선정/제외 기준을 충족하는 시험대상자 60명을 선별한 후 각 군당 30명씩 무작위로 배정하여 연구를 수행하였다. 섭취 기간 중 타 약제(진통제, 우울증약) 복용(5건)과 시험식품 복용순응도 80%미만(2건)과, 슬관절 주사치료 시행(1건), 추적 불가능(1건)해당되는 9명이 중도 탈락하였다.

시험 대상자는 남자 5명, 여자 46명으로 총 51명이었다. 시험군의 여성 성비가 92.86%, 대조군의 여성 성비는 86.96% 였으며, 군간 남성 성비 또한 통계적으로 차이가 없었다. ( $p=0.481$  by Fisher's exact test).

시험대상자의 연령의 평균은 시험군  $59.04 \pm 5.34$ 세, 대조군  $46.13 \pm 13.99$  세를 보여 시험군에서 연령이 통계적으로 유의하게 높았다( $p < 0.01$  by Independent t-test), 체중도 시험군에서  $60.26 \pm 7.98$  kg, 대조군에서  $63.70 \pm 11.25$  kg 으로 군간의 차이는 없었다. ( $p=0.562$  by Independent t-test).

그 이외에도 시험군과 대조군간에 인구학적 기초 검사 항목인 신장, BMI, 체온, 수축기압, 이완기압, 맥박, 심전도, 선행/병용 약물여부, 병력여부 등에 있어서 차이가 없었다. (표 1)

<표 1> 대상자 인구학적 기초 검사 항목

Variable	시험식품군	대조식품군	p-value
	(n=28)	(n=23)	
n(%) or Mean±S.D.			
연령(세)	59.04±5.34	46.13±13.99	<.001 <sup>a</sup>
성별 (n,%)			
남자	2(7.14%)	3(13.04%)	0.481 <sup>b</sup>
여자	26(92.86%)	20(86.96%)	
신장(cm)	155.09±7.00	160.74±6.49	0.562 <sup>a</sup>
체중(kg)	60.26±7.98	63.70±11.25	0.374 <sup>a</sup>
BMI(kg/m <sup>2</sup> )	25.10±2.84	24.63±3.61	0.330 <sup>a</sup>
맥박(beats/min)	80.46±8.82	77.61±7.88	0.077 <sup>a</sup>
체온	36.58±0.05	36.58±0.07	0.980 <sup>a</sup>
수축기압(mmHg)	117.21±12.91	114.09±11.00	0.213 <sup>a</sup>
확장기압(mmHg)	78.11±5.93	78.00±5.29	0.681 <sup>a</sup>
심전도 (n,%)			
정상	28(100.00%)	23(100.00%)	-
비정상	-	-	
선행/병용 약물조사 (n,%)			
No	28(100.00%)	21(91.30%)	0.111 <sup>b</sup>
Yes	0(0.00%)	2(8.70%)	
병력여부 (n,%)			
Yes	0(0.00%)	2(8.70%)	0.111 <sup>b</sup>
No	28(100.00%)	21(91.30%)	

\* S.D.: Standard Deviation

\* a: Compared between groups: p-value by Independent t-test

\* b: Compared between groups: p-value by Chi-square test or Fisher's exact test

## 6. 유효성 분석결과

### (1) 시험 전후 유효성 평가 변수의 변화

#### ① 1차 유효성 평가 - 체중부하 시 평균통증점수(NRS score) 분석결과

체중부하 시 평균통증점수(NRS score)에 대하여 Baseline, 6주 후, 12주 후 측정하여 비교하였다.

Baseline에서는 시험식품군이  $3.04 \pm 0.88$ , 대조식품군이  $2.17 \pm 0.89$ 로, 6주 후에는 시험식품군이  $2.39 \pm 0.96$ , 대조식품군이  $1.78 \pm 0.80$ 로 통계적으로 의미 있게 시험식품군에서 더 높았으나( $p=0.002, 0.025$ ) 12주 후에는 시험식품군이  $1.82 \pm 1.02$ , 대조식품군이  $1.39 \pm 0.94$ 로 두 군 간에 통계학적으로 의미 있는 차이는 보이지 않았다( $p=0.203$ ) 양 군간 시간의 흐름에 따라 비교한 결과에서도 통계학적으로 의미있는 차이를 보이지 않았다( $p=0.185$ )(표 2)

<표 2> 1차 유효성 평가변수 - 체중부하 시 평균통증점수(NRS score)의 주효과

	시험식품군	대조식품군	$p^a$	$p^b$
	(n=28)	(n=23)		
	Mean±S.D	Mean±S.D		
Baseline	$3.04 \pm 0.88$	$2.17 \pm 0.89$	0.002**	
After 6 weeks	$2.39 \pm 0.96$	$1.78 \pm 0.80$	0.025*	
After 12 weeks	$1.82 \pm 1.02$	$1.39 \pm 0.94$	0.203	
				0.185

\* $p < .05$ , \*\* $p < .01$  \*\*\* $p < .001$

<sup>a</sup> : 각 시점에서 시험군/대조군 간 T-test의 p-value

<sup>b</sup> : 시간에 따른 군간 차이 Repeated Measures ANOVA p-value

#### ② 1차 유효성 평가 - Western Ontario and McMaster Universities

Osteoarthritis (WOMAC) Index 분석결과

Western Ontario and McMaster Universities Osteoarthritis (WOMAC) Index에 대하여 Baseline, 6주 후, 12주 후 측정하여 각 기능별 세부항목(통증, 경직도, 신체기능) 점수 합에 대하여 비교하였다.

• 통증

Baseline에서는 시험식품군이  $13.25 \pm 3.71$ , 대조식품군이  $11.00 \pm 4.72$ 로, 6주 후에는 시험식품군이  $11.36 \pm 3.50$ , 대조식품군이  $9.04 \pm 3.67$ 로 통계적으로 의미 있게 시험식품군에서 더 높았으나( $p=0.047, 0.015$ ) 12주 후에는 시험식품군이  $9.64 \pm 3.46$ , 대조식품군이  $8.61 \pm 3.85$ 로 두 군 간에 통계학적으로 의미 있는 차이는 보이지 않았다( $p=0.136$ ) 양 군간 시간의 흐름에 따라 비교한 결과에서도 통계학적으로 의미있는 차이를 보이지 않았다( $p=0.158$ )(표 3)

<표 3> 1차 유효성 평가변수 - Western Ontario and McMaster Universities Osteoarthritis (WOMAC) Index(통증)의 주효과

	시험식품군	대조식품군	p <sup>a</sup>	p <sup>b</sup>
	(n=28)	(n=23)		
	Mean±S.D	Mean±S.D		
Baseline	13.25±3.71	11.00±4.72	0.047*	
After 6 weeks	11.36±3.50	9.04±3.67	0.015*	
After 12 weeks	9.64±3.46	8.61±3.85	0.136	
				0.158

\* $p < .05$ , \*\* $p < .01$  \*\*\* $p < .001$

<sup>a</sup> : 각 시점에서의 시험군/대조군 간 T-test의 p-value

<sup>b</sup> : 시간에 따른 군간 차이 Repeated Measures ANOVA p-value

• 경직도

Baseline에서는 시험식품군이  $5.96 \pm 1.71$ , 대조식품군이  $5.39 \pm 1.88$ 로, 6주 후에는 시험식품군이  $4.75 \pm 1.71$ , 대조식품군이  $4.48 \pm 1.59$ 로, 12주 후에는 시험식품군이  $4.18 \pm 1.49$ , 대조식품군이  $3.91 \pm 2.00$ 으로 두 군 간에 통계학적으로 의미 있는 차이는 보이지 않았다( $p=0.274, 0.531, 0.380$ ) 양 군간 시간의 흐름에 따라 비교한 결과에서도 통계학적으로 의미있는 차이를 보이지 않았다( $p=0.780$ )(표 4)

<표 4> 1차 유효성 평가변수 - Western Ontario and McMaster Universities Osteoarthritis (WOMAC) Index(경직도)의 주효과

	시험식품군	대조식품군	p <sup>a</sup>	p <sup>b</sup>
	(n=28)	(n=23)		
	Mean±S.D	Mean±S.D		
Baseline	5.96±1.71	5.39±1.88	0.274	
After 6 weeks	4.75±1.71	4.48±1.59	0.531	
After 12 weeks	4.18±1.49	3.91±2.00	0.380	
				0.780

\*p<.05, \*\*p<.01 \*\*\*p<.001

<sup>a</sup> : 각 시점에서 시험군/대조군 간 T-test의 p-value

<sup>b</sup> : 시간에 따른 군간 차이 Repeated Measures ANOVA p-value

• 신체기능

Baseline에서는 시험식품군이 46.54±13.49, 대조식품군이 38.17±14.79로, 6주 후에는 시험식품군이 39.11±13.64, 대조식품군이 32.04±12.14로, 12주 후에는 시험식품군이 34.43±12.90, 대조식품군이 29.48±12.54으로 두 군 간에 통계학적으로 의미 있는 차이는 보이지 않았다.(p=0.072, 0.066, 0.092) 양 군간 시간의 흐름에 따라 비교한 결과에서도 통계학적으로 의미있는 차이를 보이지 않았다.(p=0.552)(표 5)

<표 5> 1차 유효성 평가변수 - Western Ontario and McMaster Universities Osteoarthritis (WOMAC) Index(신체기능)의 주효과

	시험식품군	대조식품군	p <sup>a</sup>	p <sup>b</sup>
	(n=28)	(n=23)		
	Mean±S.D	Mean±S.D		
Baseline	46.54±13.49	38.17±14.79	0.072	
After 6 weeks	39.11±13.64	32.04±12.14	0.066	
After 12 weeks	34.43±12.90	29.48±12.54	0.092	
				0.552

\*p<.05, \*\*p<.01 \*\*\*p<.001

<sup>a</sup> : 각 시점에서 시험군/대조군 간 T-test의 p-value

<sup>b</sup> : 시간에 따른 군간 차이 Repeated Measures ANOVA p-value

• 통합

Baseline에서는 시험식품군이  $65.75 \pm 18.06$ , 대조식품군이  $54.57 \pm 20.93$ 로, 6주 후에는 시험식품군이  $55.21 \pm 18.38$ , 대조식품군이  $45.57 \pm 16.68$ 로, 12주 후에는 시험식품군이  $48.25 \pm 17.25$ , 대조식품군이  $42.00 \pm 17.83$ 으로 두 군 간에 통계학적으로 의미 있는 차이는 보이지 않았다.( $p=0.051, 0.065, 0.116$ ) 양 군간 시간의 흐름에 따라 비교한 결과에서도 통계학적으로 의미있는 차이를 보이지 않았다.( $p=0.468$ )(표 6)

<표 6> 1차 유효성 평가변수 - Western Ontario and McMaster Universities Osteoarthritis (WOMAC) Index(통합)의 주효과

	시험식품군	대조식품군	p <sup>a</sup>	p <sup>b</sup>
	(n=28)	(n=23)		
	Mean±S.D	Mean±S.D		
Baseline	65.75±18.06	54.57±20.93	0.051	
After 6 weeks	55.21±18.38	45.57±16.68	0.065	
After 12 weeks	48.25±17.25	42.00±17.83	0.116	
				0.468

\* $p < .05$ , \*\* $p < .01$  \*\*\* $p < .001$

<sup>a</sup> : 각 시점에서의 시험군/대조군 간 T-test의 p-value

<sup>b</sup> : 시간에 따른 군간 차이 Repeated Measures ANOVA p-value

③ 2차 유효성 평가 - 혈액내 ROS(Reactive oxygen species) 분석결과

혈액내 ROS(Reactive oxygen species)에 대하여 Baseline, 6주 후, 12주 후 측정하여 ROS\_TOS, ROS\_TAS에 대하여 비교하였다.

• ROS-TOS

Baseline에서는 시험식품군이  $0.43 \pm 0.79$ , 대조식품군이  $2.93 \pm 5.02$ 로 통계학적으로 의미 있게 대조식품군에서 높았으며( $p=0.004$ ), 6주 후에는 시험식품군이  $5.30 \pm 3.32$ , 대조식품군이  $5.05 \pm 3.44$ 로, 12주 후에는 시험식품군이  $3.80 \pm 1.15$ , 대조식품군이  $3.95 \pm 3.49$ 으로 두 군 간에 통계학적으로 의미 있는 차이는 보이지 않았다.( $p=0.427, 0.050$ ) 양 군간 시간의 흐름에 따라 비교한 결과에서는 통계학적으로 의미있는 차이를 보였다.( $p=0.043$ )(표 7)

<표 7> 2차 유효성 평가 - 혈액내 ROS(Reactive oxygen species)\_TOS의 주효과

	시험식품군	대조식품군	p <sup>a</sup>	p <sup>b</sup>
	(n=28)	(n=23)		
	Mean±S.D	Mean±S.D		
Baseline	0.43±0.79	2.93±5.02	0.004**	
After 6 weeks	5.30±3.32	5.05±3.44	0.427	
After 12 weeks	3.80±1.15	3.95±3.49	0.050	
				0.043*

\*p<.05, \*\*p<.01 \*\*\*p<.001

<sup>a</sup> : 각 시점에서의 시험군/대조군 간 T-test의 p-value

<sup>b</sup> : 시간에 따른 군간 차이 Repeated Measures ANOVA p-value

• ROS-TAS

Baseline에서는 시험식품군이 1.67±0.18, 대조식품군이 1.67±0.17로, 6주 후에는 시험식품군이 1.06±0.10, 대조식품군이 1.31±0.44로, 12주 후에는 시험식품군이 1.80±0.16, 대조식품군이 1.75±0.17으로 두 군 간에 통계학적으로 의미 있는 차이는 보이지 않았다.(p=0.719, 0.142, 0.276) 양 군간 시간의 흐름에 따라 비교한 결과에서는 통계학적으로 의미있는 차이를 보였다.(p<0.001)(표 8)

<표 8> 2차 유효성 평가 - 혈액내 ROS(Reactive oxygen species)\_TAS의 주효과

	시험식품군	대조식품군	p <sup>a</sup>	p <sup>b</sup>
	(n=28)	(n=23)		
	Mean±S.D	Mean±S.D		
Baseline	1.67±0.18	1.67±0.17	0.719	
After 6 weeks	1.06±0.10	1.31±0.44	0.142	
After 12 weeks	1.80±0.16	1.75±0.17	0.276	
				<.001***

\*p<.05, \*\*p<.01 \*\*\*p<.001

<sup>a</sup> : 각 시점에서의 시험군/대조군 간 T-test의 p-value

<sup>b</sup> : 시간에 따른 군간 차이 Repeated Measures ANOVA p-value

④ 2차 유효성 평가 - Patient' s global impression of change (PGIC) 점수 분석결과

Patient' s global impression of change (PGIC)점수에 대하여 6주 후, 12주 후 측정하여 환자의 증상 변화도에 대하여 비교하였다.

6주 후에는 시험식품군이  $3.29 \pm 0.66$ , 대조식품군이  $3.48 \pm 0.67$ 로, 12주 후에는 시험식품군이  $2.79 \pm 1.07$ , 대조식품군이  $3.09 \pm 0.95$ 으로 두 군 간에 통계학적으로 의미 있는 차이는 보이지 않았다.( $p=0.329, 0.262$ ) 양 군간 시간의 흐름에 따라 비교한 결과에서도 통계학적으로 의미 있는 차이를 보이지 않았다.( $p=0.656$ )(표 9)

<표 9> 2차 유효성 평가 - Patient' s global impression of change (PGIC)점수의 주효과

	시험식품군	대조식품군	p <sup>a</sup>	p <sup>b</sup>
	(n=28)	(n=23)		
	Mean±S.D	Mean±S.D		
After 6 weeks	3.29±0.66	3.48±0.67	0.329	
After 12 weeks	2.79±1.07	3.09±0.95	0.262	
				0.656

\* $p < .05$ , \*\* $p < .01$  \*\*\* $p < .001$

<sup>a</sup> : 각 시점에서의 시험군/대조군 간 T-test의 p-value

<sup>b</sup> : 시간에 따른 군간 차이 Repeated Measures ANOVA p-value



## 7. 안전성 분석 결과

안전성 분석에서 이상반응은 시험에 참여한 모든 시험대상자를 대상으로 평가하였고, 실험실 검사 및 그 외의 항목에 대하여는 조사된 자료를 모두 이용하였다.

### (1) 이상반응 발생 현황

시험군과 대조군의 이상반응 발생 현황은 시험군의 경우 소화불량 및 속쓰림 등의 위장장애 5건, 감기 등의 URI증상 2건, 근골격계질환 1건, 두통 등의 신경계질환 2건, 간기능효소 상승 1건, 방광염 등 비뇨기계질환 4건, 전신 무력감과 같은 기타 항목 1건이 발생하였으나 투여한 시험식품과의 인과관계가 있다고 판단할 만한 사례는 없었다.

대조군의 경우 감기 등의 URI증상 3건, 근골격계질환 3건, 대상포진 등 신경계질환 2건, 간기능효소 상승 1건, 전신 무력감과 같은 기타 항목 3건이 발생하였다.<표 10>

<표 10> 시험군과 대조군의 이상반응 발생건수

이상반응 분류	건수 / 총수		비율(%)	
	시험군	대조군	시험군	대조군
위장장애	5/28	0/23	17.8%	0
URI (감기 등)	2/28	3/23	7.1%	13%
근골격계질환	1/28	3/23	3.5%	13%
신경계질환	2/28	2/23	7.1%	8.6%
간기능효소 상승	1/28	1/23	3.5%	4.3%
비뇨기계질환	4/28	0/23	14.2%	0
기타	1/28	3/23	3.5%	13%

## (2) 실험실 검사 결과

실험실 검사 결과의 변화는 시험식품을 투여하기 직전과 투여한 후 12주 후의 변화량을 비교하였다. 그 결과 AST가 12주 후에 측정했을 때 시험식품군에서  $26.67 \pm 10.95$ , 대조식품군에서  $21.50 \pm 7.04$ 로 통계학적으로 의미 있게 시험식품군에서 높으면서( $p=0.035$ ) 양군간 시간의 흐름에 따라 비교한 결과에서는 통계학적으로 의미있는 차이를 보였다( $p=0.016$ ) 또한 HDL Cholesterol은 Baseline에 측정했을 때 시험식품군에서  $66.00 \pm 14.77$ , 대조식품군에서  $58.00 \pm 9.97$ 로, 6주 후 시험식품군에서  $61.13 \pm 14.92$ , 대조식품군에서  $54.53 \pm 9.83$ 로 통계학적으로 의미 있게 시험식품군에서 높았다( $p=0.017, 0.049$ ) 그러나 검사 결과가 모두 정상 범위 내에서 존재하는 변화로 임상적으로 유의한 결과는 아닌 것으로 사료된다. 그 외 소변 검사를 포함한 모든 실험실 검사 결과의 변화가 각 군에서 의미 있는 차이를 나타내지 않았다.(표 11 ~ 13)

<표 11> 섭취 전/후 실험실 혈액학적 검사 변화 - 대조군 vs 시험군

평가변수		시험식품군	대조식품군	p-value <sup>a</sup>	p-value <sup>b</sup>
		(n=28)	(n=23)		
Mean±S.D.					
RBC	Baseline	4.37±0.29	4.47±0.45	0.314	0.572
	After 6 weeks	4.28±0.31	4.44±0.43	0.112	
	After 12 weeks	4.42±0.28	4.53±0.47	0.285	
WBC	Baseline	5.95±1.54	6.12±1.18	0.633	0.592
	After 6 weeks	5.59±1.51	5.91±1.34	0.395	
	After 12 weeks	5.80±1.48	5.84±1.42	0.904	
HCT	Baseline	39.63±2.66	40.55±3.52	0.258	0.653
	After 6 weeks	38.70±2.85	39.84±3.60	0.179	
	After 12 weeks	39.80±2.26	40.43±3.62	0.422	
Hemoglobin	Baseline	13.20±1.05	13.60±1.26	0.184	0.829
	After 6 weeks	12.93±1.16	13.41±1.25	0.128	
	After 12 weeks	13.27±0.95	13.65±1.33	0.207	
Platelet	Baseline	256.70±66.13	261.20±63.58	0.786	0.147
	After 6 weeks	270.80±74.28	257.60±71.74	0.487	
	After 12 weeks	243.20±82.77	247.00±74.10	0.855	

\* $p < .05$ , \*\* $p < .01$  \*\*\* $p < .001$

<sup>a</sup> : 각 시점에서의 시험군/대조군 간 T-test의 p-value

<sup>b</sup> : 시간에 따른 군간 차이 Repeated Measures ANOVA p-value

<표 12> 섭취 전/후 실험실 생화학 검사 변화 - 대조군 vs 시험군

평가변수		시험식품군	대조식품군	p-value <sup>a</sup>	p-value <sup>b</sup>
		(n=28)	(n=23)		
Mean±S.D.					
Proteinl	Baseline	7.40±0.32	7.53±0.38	0.155	0.506
	After 6 weeks	7.36±0.33	7.49±0.33	0.141	
	After 12 weeks	7.47±0.37	7.53±0.34	0.542	
Albuminl	Baseline	4.77±0.25	4.84±0.27	0.279 <sup>*</sup>	0.705
	After 6 weeks	4.71±0.26	4.82±0.25	0.101 <sup>*</sup>	
	After 12 weeks	4.76±0.25	4.83±0.27	0.297	
Bilirubin	Baseline	0.69±0.29	0.66±0.37	0.757	0.573
	After 6 weeks	0.58±0.29	0.56±0.24	0.807	
	After 12 weeks	0.56±0.23	0.58±0.27	0.758	
AST	Baseline	22.60±6.00	21.63±5.74	0.526	0.016
	After 6 weeks	24.77±7.73	27.03±12.45	0.401 <sub>x</sub>	
	After 12 weeks	26.67±10.95	21.50±7.04	0.035	
ALT	Baseline	19.00±6.05	18.97±12.11	0.989	0.357
	After 6 weeks	21.47±8.02	21.50±17.45	0.993	
	After 12 weeks	25.47±19.18	21.53±21.19	0.454	
CK	Baseline	96.40±38.99	100.70±50.14	0.712	0.573
	After 6 weeks	99.10±34.61	93.73±42.67	0.595	
	After 12 weeks	106.50±49.90	100.50±56.80	0.664	
Creatinine	Baseline	0.66±0.14	0.70±0.13	0.211	0.370
	After 6 weeks	0.64±0.08	0.67±0.12	0.265	
	After 12 weeks	0.66±0.11	0.67±0.12	0.736	
BUN	Baseline	15.53±3.40	14.00±3.48	0.090	0.890
	After 6 weeks	15.70±4.74	13.77±3.77	0.086	
	After 12 weeks	14.57±4.40	13.07±3.82	0.164	
Uric acid	Baseline	4.60±1.18	4.60±1.37	0.984	0.558
	After 6 weeks	4.51±1.03	4.66±1.73	0.692	
	After 12 weeks	4.47±1.31	4.44±1.45	0.933	
Cholesterol	Baseline	203.80±41.19	187.40±39.29	0.120	0.263
	After 6 weeks	195.00±40.42	188.60±38.75	0.530	
	After 12 weeks	197.20±40.60	191.70±32.67	0.568	

HDL Cholesterol	Baseline	66.00±14.77	58.00±9.97	0.017 <sup>*</sup>	0.224
	After 6 weeks	61.13±14.92	54.53±9.83	0.049	
	After 12 weeks	61.13±16.19	56.73±10.89	0.223	
LDL Cholesterol	Baseline	137.10±37.24	126.80±37.69	0.291	0.259
	After 6 weeks	127.80±35.37	126.10±35.10	0.850	
	After 12 weeks	129.60±33.93	129.40±29.20	0.974	
Triglyceride	Baseline	106.90±42.56	106.10±45.05	0.942	0.875
	After 6 weeks	116.90±47.05	120.80±49.00	0.752	
	After 12 weeks	127.90±58.60	126.60±68.95	0.938	
Glucose	Baseline	96.93±24.15	93.73±10.86	0.512	0.277
	After 6 weeks	104.20±25.36	95.63±12.59	0.105	
	After 12 weeks	106.20±37.60	98.80±22.41	0.359	

\*p<.05, \*\*p<.01 \*\*\*p<.001

<sup>a</sup> : 각 시점에서서의 시험군/대조군 간 T-test의 p-value

<sup>b</sup> : 시간에 따른 군간 차이 Repeated Measures ANOVA p-value

<표 13> 섭취 전/후 실험실 소변 검사 변화 - 대조군 vs 시험군

평가변수		시험식품군	대조식품군	p-value <sup>a</sup>	p-value <sup>b</sup>
		(n=28)	(n=23)		
		Mean±S.D.			
PH, urine	Baseline	5.93±0.55	5.88±0.83	0.784	0.522
	After 6 weeks	6.10±0.88	5.98±0.83	0.599	
	After 12 weeks	6.38±0.88	6.08±0.64	0.137	
SG, urine	Baseline	1.02±0.01	1.02±0.01	0.673	0.959
	After 6 weeks	1.02±0.01	1.02±0.01	0.894	
	After 12 weeks	1.02±0.01	1.02±0.01	0.920	

\*p<.05, \*\*p<.01 \*\*\*p<.001

<sup>a</sup> : 각 시점에서서의 시험군/대조군 간 T-test의 p-value

<sup>b</sup> : 시간에 따른 군간 차이 Repeated Measures ANOVA p-value

## 8. 유효성 분석의 결론

본 시험은 단일기관, 위약대조, 무작위배정, 이중맹검, 평행 인체적용시험으로 시험의 목적은 슬관절의 골관절염 환자에서 꽃송이버섯추출분말 섭취 전/후에 대한 통증, 경직도, 신체기능과 혈액내 ROS, PGIS의 비교를 통해 기능성을 예비적으로 확인하고 안전성 여부도 확인하고자 하였다.

유효성에 대한 자료는 처음에 배정받은 대상자중 중도 탈락자를 제외한 PP(Per Protocol)분석을 시행하였다.

- ① 1차 유효성 평가변수 중 체중부하 시 평균통증점수(NRS score) 및 Western Ontario and McMaster Universities Osteoarthritis(WOMAC) Index를 통한 통증, 경직도, 신체기능을 비교하였을 때 시험군 및 대조군 모두에서 유의한 호전은 보이지 못했다. 이에 대하여는 더 많은 시험자를 포함한 연구가 추가되어야 시험약제의 유효성을 증명할 수 있겠다.
- ② 2차 유효성 평가변수 중 혈액내 ROS(Reactive oxygen species)는 ROS\_TOS, ROS\_TAS 모두 시험약물의 사용에 따라 유의한 변화를 보였다. 하지만 종합적으로 보았을 때 군 간의 유의적인 차이는 없었다.
- ③ 2차 유효성 평가변수 중 Patient's global impression of change(PGIC)는 시험군 및 대조군 모두에서 유의한 효과를 입증하지 못했다.

## 9. 안전성 분석의 결론

이상반응은 시험식품을 투여한 후 1회 이상 안전성에 대한 조사가 된 시험대상자 60명을 대상으로 ITT(Intent-to-treat) 원칙에 따른 FAS(Full Analysis Set)분석으로 평가하였다. 총 30명의 시험군 중에서 이상반응이 있다고 응답한 시험대상자는 총 16건으로 소화불량 및 속쓰림 등의 위장장애 5건, 감기 등의 URI증상 2건, 근골격계질환 1건, 두통 등의 신경계질환 2건, 간기능효소 상승 1건, 방광염 등 비뇨기계질환 4건, 전신 무력감과 같은 기타 항목이 1건이 확인되었으나 시험제품과의 명백한 인과관계는 없었다.

안전성을 확인하기 위해 시행한 혈액학적 검사, 생화학적 검사, 소변검사에서 유의미한 변화는 시험군과 대조군에서 보이지 않았으며, 군간의 차이도 발견되지 않아 시험군의 안전성에는 특별한 문제점은 없는 것으로 확인 할 수 있다.

## 10. 토의

본 시험은 단일기관, 위약대조, 무작위배정, 이중맹검, 평행 인체적용시험으로 시험의 목적은 슬관절의 골관절염 환자에서 꽃송이버섯추출분말 섭취 전/후에 대한 통증, 경직도, 신체기능과 혈액내 ROS, PGIC의 비교를 통해 기능성을 예비적으로 확인하고 안전성 여부도 확인하고자 하였다.

본 연구에서 통증을 확인하기 위한 연구지표로 NRS score, 통증을 포함한 경직도, 신체기능을 확인하기 위한 연구지표로 WOMAC index를 이용하였다.

NRS score, WOMAC index는 환자의 주관적인 설문 조사로 매 방문 시 환자 본인에게 직접 작성하도록 하였다. 통증 정도는 객관적으로 측정하기 어려운 만큼 설문지에 의존할 수 밖에 없는 단점이 있다.

본 연구 결과에서 NRS score 및 WOMAC index는 시험약품을 복용함과 관계 없이 유의한 차이를 보이지 않았으며 추후 연구대상자수를 증가할 경우 의미 있는 차이가 나올 가능성도 있어 추가적인 연구가 필요하다.

혈액내 ROS는 파골세포분화 및 연골의 파괴와 관련이 있는 것 중에 잘 알려진 것으로 꽃송이버섯이 HO-1 발현을 농도의축적으로 증가시키고 그 결과 ROS를 줄인다는 연구보고도 있었다. 본 연구에서는 이를 확인하여 ROS 변화를 확인하여 연골의 파괴로 인한 통증의 변화양상을 보고자 하였다. 그 결과 시험약물의 사용에 따라 혈액내 ROS는 유의한 변화를 보였으나 대조군에서도 변화를 보여 종합적으로 보았을 때 군 간에는 유의적인 차이는 없었다.

그 외에도 환자에게 주관적으로 약물 복용 후 증상의 변화도를 확인하기 위한 PGIC 점수를 확인하였으나 이 또한 두 군 모두에서 유의한 차이를 보이지 못했다.

본 연구는 안전성 측면에서는 매우 우수함을 증명하였다. 시험식품 섭취 중 이상반응은 총 16건으로 소화불량 및 속쓰림 등의 위장장애 5건, 감기 등의 URI증상 2건, 근골격계 질환 1건, 두통 등의 신경계질환 2건, 간기능효소 상승 1건, 방광염 등 비뇨기계질환 4건, 전신 무력감과 같은 기타 항목이 1건이 확인되었으나 시험제품과의 명백한 인과관계는 없었다. 안전성 평가를 위한 실험실 검사에도 시험식품 섭취에 따른 검사 이상은 관찰되지 않았다.

결론적으로 시험군이 복용한 꽃송이버섯추출물은 대조식품에 통증, 경직도, 신체기능, 혈액내 ROS, PGIC 점수 등에 대하여 의미 있는 변화를 보여주지 못했다.

## 11. 결론

본 시험은 단일기관, 위약대조, 무작위배정, 이중맹검, 평행 인체적용시험으로 시험의 목적은 슬관절의 골관절염 환자에서 꽃송이버섯추출분말 섭취 전/후에 대한 통증, 경직도, 신체기능과 혈액내 ROS, PGIC의 비교를 통해 기능성을 예비적으로 확인하고 안전성 여부도 확인하고자 하였다. 결과적으로 꽃송이버섯추출분말은 통증, 경직도, 신체기능, 혈액 내 ROS, PGIC 점수의 개선은 보이지 않았다. 꽃송이버섯추출분말의 효과를 확인하기 위해서는 추가 연구가 필요하다고 사료된다.

또한, 본 인체적용시험을 통하여 꽃송이버섯추출분말은 상대적으로 매우 안전한 식품으로 볼 수 있다.

### [결과의 고찰]

- ① 본 인체적용시험은 경증의 슬관절 통증을 호소하는 대상자에서 꽃송이버섯추출분말 섭취 후 관절건강 개선에 있어 대조군과 비교하여 유의한 차이를 보이는지 검증하기 위하여 실시하였음.
- ② 꽃송이버섯 추출분말 섭취 후 6주, 12주의 통증, 관절 경직도, 신체기능에 대한 설문 점수를 평가 한 결과 기저치(0주) 대비 개선을 보였지만 통계적 유의성은 없었으며, 대조 식품군 대비 섭취군 간의 통계적인 유의적 차이도 보이지 않았음. 향후 시험대상자수 및 섭취량 증가를 통한 추가 연구를 통해 효능의 입증 가능성이 가능하리라 사료됨.
- ③ 혈액 내 ROS는 파골세포분화 및 연골의 파괴와 관련이 있는 주요 기전으로 본 연구에서는 ROS 변화를 확인하여 연골의 파괴로 인한 통증의 변화양상을 보고자 하였음. 그 결과 시험식품의 섭취에 따라 혈액 내 TOS 및 TAS가 유의한 변화를 보였으나 상호 연관성 및 종합적으로 보았을 때 의미 있는 결과는 아니었음.
- ④ 시험 중대한 이상반응은 관찰되지 않았으며, 혈액 및 소변을 이용한 진단의학검사 등으로 살펴 본 시험식품의 안전성 또한 대조군과 비교하여 통계적으로 안전한 것으로 확인됨.

## 12. 참고문헌

- 1) 건강기능식품 인체적용시험 설계 안내서. 식품의약품안전평가원 식품위해평가부. (2012)
- 2) 건강기능식품 기능성 평가 가이드, ‘관절 건강에 도움’ 편. 식품의약품안전청 (2012)
- 3) 2009 국민건강통계 : 국민건강영양조사 제4기 3차년도, 보건복지가족부 2009
- 4) Guidance for Industry - Estimating the Maximum Safe Starting Dose in Initial Clinical Trials for Therapeutics in Adult Healthy Volunteers. U.S. FDA.)
- 5) Shim SH and Secondary metabolites produced by endophytic fungus, *Arthrinium phaeospermum*, Korean Journal of Pharmacognosy, 47(3): 217-221, September, 2016
- 6) Bang SG, Chae HS, Lee CG, Choi, HG, Ryu JY, Li W, Lee HN, Jeong GS, Chin YW, and Shim SH, New Aromatic Compounds from the Fruiting Body of *Sparassis crispa* (Wulf.) and Their Inhibitory Activities on Proprotein Convertase Subtilisin/Kexin Type 9 mRNA Expression, J. Agric. Food Chem., 65(30), pp 6152-6157, 2017
- 7) Lee CI, Kim S, Li W, Bang S, Lee H, Lee HJ, Noh EY, Park JE, Bang WY and Shim SH, Bioactive secondary metabolites produced by an endophytic fungus *Gaeumannomyces* sp. JS0464 from a maritime halophyte *Phragmites communis*. The Journal of Antibiotics, 70(6), March 2017
- 8) Kim YG and Jeong GS, Inhibitory effects of the roots of *Cudrania tricuspidata* Bureau on osteoclast differentiation, Korean Journal of Pharmacognosy, 48(2): 155-159, June, 2017
- 9) Bang S, Lee C, Ryu J, Li W, Koh YS, Jeon JH, Lee J and Shim SH, Simultaneous determination of the bioactive compounds from *Sparassis crispa* (Wulf.) by HPLC-DAD and their inhibitory effects on LPS-stimulated cytokine production in bone marrow derived dendritic cell, Arch Pharm Res., 41(8): 823-829, August, 2018
- 10) Song JH, Lee C, Lee D, Kim S, Bang S, Shin MS, Lee J, Kang KS, Shim SH, Neuroprotective Compound from an Endophytic Fungus, *Colletotrichum* sp. JS-0367, J Nat Prod., 22:81(6):1411-1416, June, 2018
- 11) Choi EH, Kim EN and Jeong GS, Inhibitory effect of Cudraticusxanthone A on osteoclast differentiation and function, 43(1), 86-91, April, 2018
- 12) Kim EN, Roh SS and Jeong GS, Inhibitory Effect of *Sparassis crispa* (Wulf.) Extract on Monosodium Iodoacetate Induced Osteoarthritis, Korean Journal of Pharmacognosy, 49(3): 262-269, 2018
- 13) *Sparassis crispa* (Wulf.) Extract Inhibits IL-1 $\beta$  Stimulated Inflammatory Mediators Production on SW1353 Human Chondrocytes
- 14) Park SE, Seo SH, Moon YS, Lee YM, Na CS and Son HS, Antioxidant and Immunological Activities of *Sparassis crispa* Fermented with *Meyerozyma guilliermondii* FM, Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition, 45(10): 1398-1405, 2016
- 15) Jeong GS and Lee WC, Antitumor immunoactivities of the combinations containing the hot water extract of *Sparassis crispa*, Journal of pharmaceutical sciences, 20: 58-63, 2005
- 16) Kim IK, Yun YC, Shin YC and Yoo JY, Effect of *Sparassis crispa* Extracts on Immune Cell Activation and Tumor Growth Inhibition, Journal of Life Science, 23(8): 984-988, 2013



- 17) Lee JJ, Son HY, Choi YM, Cho JH, Min JM and Oh HK, Physicochemical components and antioxidant activity of *Sparassis crispa* mixture fermented by lactic acid bacteria, The Korean Society of Food Preservation, 23(3): 361-368, 2016

### 3. 제품 표준서

#### 3-1. 제품 표준서 & 꽃송이버섯 추출물 제조공정

(주)경신바이오는 2018년 10월 11일 꽃송이버섯 추출물에 대한 표준서와 제조 공정도 체계적으로 만들고 그에 따른 제품을 사업화했다.

- ① 제품의 개요
- ② 배합비
- ③ 원료/부원료 기준규격
- ④ 제조공정도/제조방법
- ⑤ 제조단위 미공정별 생산량
- ⑥ 품질향상 및 위해요소 제거를 위한 중점관리 기준 및 관리 방법
- ⑦ 제조 및 품질관리에 필요한 시설 및 기구
- ⑧ 반제품/완제품 기준 및 규격기준
- ⑨ 완제품(사진)

##### (1) 제품의 개요

No.	구분	내용
1	제품명	꽃송이버섯추출물
2	품목제조보고연월일	
3	품목제조신고증번호	
4	작성자 및 년월일	
5	제품의 유형	[개별인정형] 꽃송이버섯추출물
6	섭취대상	관절 및 연골 건강에 도움을 줄 수 있는 제품(20대이상)
7	섭취량 및 섭취방법	1. 섭취량 : 1일 섭취량 :1000mg(베타글루칸 17.6%) 2. 섭취방법 : 개별인정형 원료 로서 일일섭취량 함량에 맞게 섭취
8	섭취시 주의사항	① 임산부 및 수유부는 섭취 시 주의
9	유통기한	제조일로부터 24개월
10	보존 및 유통기준	실온
11	포장단위	1~200kg

(2) 배합비(꽃송이버섯 추출물)

원재료명	함량(%)	식품 또는 식품첨가물 유형
꽃송이버섯	10	식품
주정(70%)	90	식품
이하여백		
합계	100	

(3) 주/부원료 규격기준(꽃송이버섯)

검 사 항 목	공통기준 (자체규격)	검 사 방 법	비 고
1.성상	이미, 이취가 없고 고유의 향미가 있는 분말	식품공전 제8.검체의 채취 및 취급방법	식품공전
2.카드뮴(mg/kg)	1 이하		식품공전
3.원 료	발육이 양호한 것		수산물 관리기준
4.색 택	고유의 색택이 양호한 것		수산물 관리기준
5.협잡물	협잡물이 3%이하인 것		수산물 관리기준
6.향 미	고유의 향미를 가지고 있으며 이취가 없는 것		수산물 관리기준
7.수분	12%이하 (추출수율 확립에 따른다.)		자체기준규격
8.비소(mg/kg)	75이하 (자체기준에 따른다)		자체기준규격
9.나트륨	실험중 (자체기준에 따른다)		자체기준규격

(4) 주/부원료 규격기준(주정)

검 사 항 목	공통기준 (자체규격)	검 사 방 법	비 고
성상	무색투명하고 부유물 및 이취,이 미가 없을 것	제5.식품별 기준 및 규격 27-12주 정	
에틸알콜(V/V%)	95.0	제5.식품별 기준 및 규격 27-12주 정	
증발잔분(mg/100ml)	2.5 이하	제5.식품별 기준 및 규격 27-12주 정	
유리산 (식초산으로 W/V%)	0.002 이하	제5.식품별 기준 및 규격 27-12주 정	
알데히드 (아세트알데히드mg/100 ml)	1 이하 / 단, 공업용 합성 주정은 5 이하	제5.식품별 기준 및 규격 27-12주 정	
메틸알콜(mg/ml)	0.5 이하	제5.식품별 기준 및 규격 27-12주 정	
휴젤유(V/V%)	0.01 이하	제5.식품별 기준 및 규격 27-12주 정	
디아세칠 (mg/100ml)	0.2 이하	제5.식품별 기준 및 규격 27-12주 정	
황산정색물	불검출	제5.식품별 기준 및 규격 27-12주 정	
염화물	불검출	제5.식품별 기준 및 규격 27-12주 정	
수산화나트륨정색물	불검출	제5.식품별 기준 및 규격 27-12주 정	
중금속	불검출	제5.식품별 기준 및 규격 27-12주 정	
유기불순물	5분이내에 표준액 보다퇴색되지 않을 것	제5.식품별 기준 및 규격 27-12주 정	

(5) 주/부원료 규격기준(정재수)

수 질 검 사 성 적									
검 사 항 목		수질기준	결 과	검 사 항 목		수질기준	결 과		
미생물	1	일반세균	100CFU/mL	0	30	사염화탄소	0.002mg/L	불검출	
	2	총대장균군	불검출/100mL	불검출	31	1,2-디브로모-3-클로로프로판	0.003mg/L	불검출	
	3	대장균/분원성대장균	불검출/100mL	불검출	32	유리잔류염소	4.0mg/L	0.83	
유해영향무기물질	4	납(Pb)	0.01mg/L	불검출	33	총트리할로메탄(THMs)	0.1mg/L	0.022	
	5	불소(F)	1.5mg/L	불검출	34	클로로포름	0.08mg/L	0.01400	
	6	비소(As)	0.01mg/L	불검출	35	클로랄하이드레이트(CH)	0.03mg/L	불검출	
	7	셀레늄(Se)	0.01mg/L	불검출	36	디브로모아세토니트릴	0.1mg/L	불검출	
	8	수은(Hg)	0.001mg/L	불검출	37	디클로로아세토니트릴	0.09mg/L	불검출	
	9	시안(CN)	0.01mg/L	불검출	38	트리클로로아세토니트릴	0.004mg/L	불검출	
	10	크롬	0.05mg/L	불검출	39	할로아세틱에시드(HAAs)	0.1mg/L	0.0040	
	11	암모니아성질소(NH <sub>3</sub> -N)	0.5mg/L	불검출	40	디브로모클로로메탄	0.1mg/L	0.0020	
	12	질산성질소(NO <sub>3</sub> -N)	10mg/L	1.4	41	브로모디클로로메탄	0.03mg/L	0.00600	
	13	카드뮴(Cd)	0.005mg/L	불검출	42	포름알데히드	0.5mg/L	불검출	
	14	보론(B)	1.0mg/L	0.01	43	경도	300mg/L	69	
	유해영향유기물질	15	페놀	0.005mg/L	불검출	44	과망간산칼륨소비량	10mg/L	2.2
		16	다이아지논	0.02mg/L	불검출	45	냄새	무취	없음
		17	파라티온	0.06mg/L	불검출	46	맛	무미	없음
18		페니트로티온	0.04mg/L	불검출	47	구리	1mg/L	불검출	
19		카바릴	0.07mg/L	불검출	48	색도	5도	불검출	
20		1,1,1-트리클로로에탄	0.1mg/L	불검출	49	세제(음이온계면활성제:ABS)	0.5mg/L	불검출	
21		테트라클로로에틸렌(PCE)	0.01mg/L	불검출	50	수소이온농도(pH)	5.8-8.5	7.4	
22		트리클로로에틸렌(TCE)	0.03mg/L	불검출	51	아연(Zn)	3mg/L	불검출	
23		디클로로메탄	0.02mg/L	불검출	52	염소이온(Cl <sup>-</sup> )	250mg/L	21.0	
24		벤젠	0.01mg/L	불검출	53	증발잔류물	500mg/L	119	
25		톨루엔	0.7mg/L	불검출	54	철(Fe)	0.3mg/L	불검출	
26		에틸벤젠	0.3mg/L	불검출	55	망간(Mn)	0.05mg/L	불검출	
27		크실렌	0.5mg/L	불검출	56	탁도	0.5NTU	0.07	
28		1,1-디클로로에틸렌	0.03mg/L	불검출	57	황산이온(SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> )	200mg/L	17	
29	1-4다이옥산	0.05mg/L	불검출	58	알루미늄(Al)	0.2mg/L	0.040		

(6) 주/부원료 규격기준(내포장지)

검 사 항 목	공통기준 (자체규격)	검 사 방 법	비 고
1. 함유량	기본 중합체 중 스티렌 또는 α-메틸스티렌의 함유율이 50%이상	기구 및 용기 포장의 기준 및 규격	공인성적서
2. 용출규격(mg/L)	납 1.0 이하 과망간산칼륨소비량 10 이하 증발잔류물 30 이하 1-헥센: 3 이하 1-옥텐: 15 이하	기구 및 용기 포장의 기준 및 규격	공인성적서

\*합성수지제/폴리에틸렌(PE)

(7) 제조공정도

제조공정	식품, 식품첨가물	조건	(3)기능/지표성분 함량변화%)
원료	꽃송이버섯		$\beta$ -glucan 4 % $\beta$ -glucan : 40 mg/g
↓			
입고 및 보관	꽃송이버섯		
↓			
칭량	꽃송이버섯		
↓			
원료투입	꽃송이버섯	꽃송이버섯 : 100%	
↓			
세척 및 침지	정제수	비율 : (원료1 정제수9) 침지 : 1시간	
↓			
배출		세척/침지 정제수 배출 투입원물 수분 12% -> 침지후 수분 약30%증가	
↓			
용매투입	70%주정	원료1:용매9	
↓			
추출		온도 : 70℃ 시간 : 9시간 압력 : 1.5kg/cm <sup>3</sup> 이하	
↓			
여과		2 $\mu$ m 필터	
↓			
진공농축		온도 : 40℃ 진공도 : :-500~600mmHg 농축 : 10~50brix	$\beta$ -glucan 17.6% $\beta$ -glucan : 176mg/g
↓			
보정		농축액 10 $\pm$ 1brix로 보정한다	
↓			
동결건조		선반온도 : -47℃이하 콜드트랩온도 : -55℃ 시간 : 48시간이상	
↓			
분쇄 및 정립		고객사요청에 따라 분쇄 및 정립	
↓			
계량 및 포장		분말을 이중 비닐에 담고 외포장한다	
↓			
시험의뢰 및 확인		품질 관리팀에 시험을 의뢰하고 결과 확인후 입고한다.	$\beta$ -glucan 17.6% $\beta$ -glucan : 176mg/g
↓			
입고		제품창고에 입고하여 보관한다.	$\beta$ -glucan 17.6% $\beta$ -glucan : 176mg/g

(8) 제조방법(추출 동결건조)

공정명	제조방법	검사 항목	기타 사항
1. 원료준비	<p>1. 원료 입고</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 발주와 납품된 원료, 부원료 및 내외포장재가 일치하는지 확인한다.</li> <li>- 시험 대기장소로 해당 물품을 이동시킨다.</li> </ul> <p>2. 검사</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 원료, 부원료 및 내외포장재를 시험의뢰한다.</li> <li>- 검체채취 및 '시험증라벨'을 부착한다.</li> <li>- 시험 결과 적합 시 '적합라벨'을 부착한다.</li> </ul>	<p>수량, 품목명, 포장 파손여부등</p> <p>원자재별 시험항목</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-발주량, 실납품량의 일치 여부</li> <li>-오염에 주의</li> <li>-검체채취된 원료의 재포장 철저</li> <li>-부적합품 격리 보관</li> </ul>
2.원료입고 및보관	<p>1. 보관</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 검사가완료된 원료를 입고 처리한다.</li> <li>- 원재료별 적합구역에 보관한다.</li> <li>- 부적합시 부적합 구역에 보관한다.</li> </ul>		
3.원료칭량	<p>1. 원료 인수</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 적합필증이 부착된 원료를 인수하고 원료명 및 유통기한, 한글표시사항등을 확인한다.</li> </ul> <p>2. 원료 칭량</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 제조지시서에 따라 원료를 칭량한다.</li> <li>- 원료는 용기에 계량하여 식별이 가능하도록 표시하고 잔여 원료는 위생적으로 처리하여 보관한다.</li> <li>- 칭량 완료된 원료는 원료투입전 이상 유무를 다시 한 번 확인한다.</li> </ul>	<p>원료명 및 유통기한</p> <p>지시량 및 계측량</p>	칭량의 이중점검
4.원료투입	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 칭량한 원료를 추출탱크에 투입한다.</li> </ul>	<p>정제수 투입량(9배)</p> <p>수분함량</p>	
5.세척 및 침지	<p>정제수를 원료 중량의 약 9배를 가한후 원료와 함께 침지한다.</p>	<p>비율 : (원료1 정제수9)</p> <p>침지 : 총2회,</p> <p>1회:1시간</p> <p>나트륨 : xxxxx 이하</p>	
6.배출	<p>세척/침지 수를 배출한다.</p>	<p>세척/침지 정제수 배출 투입원물 수분 12% -&gt; 침지후 수분30%증가</p>	



공정명	제조방법	검사 항목	기타 사항
7.용매투입	70%주정을 원료 중량의 약9배를 투입한다	비율 : 원료1 용매 9 용매 : 70*주정 주정투입량: 900kg	
8.추출	용매 투입 후 (70°C±5°C)까지 온도상승 온도 상승 후 약9시간±2시간 추출 한다.	온도 : 70°C 시간 : 9시간 압력:1.5kg/cm3 이하	
9.여과	추출물을 여과(1마이크로 필터)후 저장조로 이송한다.	성형불량	
10.진공농축	여과된 추출물은 40°C±5°C 에서 감압농축하여 10~50brix로 농축한다(주정회수율확인)	필터 : 1µm 추출(brix): 2.5brix 이송량 : 880L	
보정	농축액 brix 측정후 정제수를 이용하여 10±1brix로 보정한다	농축액량 : 163.9KG 농축액(brix) : 12.2 정제수투입량 : 40.13KG 보정후(brix) : 9.8 원액량 합계 :204.03KG 필터 : 1µm	
동결건조	보정된 원액을 선반에 투입후 -47도까지 온도 하강 온도하강후 48시간 이상 동결건조 한다	투입용량 : 204.03KG 선반온도 : -47°C이하 콜드트랩온도 : -55°C 시간 : 48시간이상	
분쇄 및 정립	고객사 요청에 따라 분쇄 및 정립한다	분쇄 입도 : 18MESH~	
계량 및 포장	건조분말을 비닐에 충전후 외 포장한다. ※주의 이중비닐포장을 하며 내용물이 비산되거나 분말이 포장 겉면에 묻지 않도록 집진기를 가동하여 실시한다.	분쇄 입도 : 18MESH~	
시험의뢰 및 확인	제품의 기준규격에 따른 시험의뢰를한다 시험결과 적합시 입고한다.		
입고	제품창고에 입고 한다.		

(9) 제조단위 및 공정별 이론 생산량

제조단위	100kg		*1회 혼합 100Kg 분량	
공정명	이론생산율	이론생산율	생산수율 (관리수율)	실생산량
칭량	100%	100kg	100%	100kg
추출	100%	100kg	20	19kg
농축	100%	100kg	18	17.6kg
동결건조	100%	100kg	18	17.6kg
포장	100%	100kg	18	17.6kg
비고				

(10) 품질향상 및 위해요소를 제거를 위한 중점관리대상 및 관리방법

No.	공정	품질향상목표	중점관리대상 및 관리 방법	관련문서
1	입고	품질 균질성 확보	인수량 및 타물질 혼입물질	원료인수 검사서
2	검사	품질 위해요소 제거	원료 품질 검사	원료인수 검사서
3	보관	품질 균질성 확보	보관 온도 및 구분보관	온습도일지 기준서
4	원료칭량	품질 균일성 확보 품질 위해요소 제거	원료명, 중량 확인, 적합 필증 확인, 이물 확인	제조기록서
5	세척 및 침지	품질 균일성 확보	침지시간 수분함량	제조기록서
6	배출	품질 균일성 확보	배출 후 원물 수분함량	제조기록서
7	용매투입	품질 균일성 확보	용매함량	제조기록서
10	추출	품질 균일성 확보	추출시간 온도 용매	제조기록서
11	여과	품질 균일성 확보	필터사용	제조기록서
12	진공농축	품질 균일성 확보	선별기 설비 점검	제조기록서
13	보정	품질의 균일성 확보	용기포장기 설비 점검 중량저울 확인	제조기록서
14	동결건조	품질 위해요소제거	동결건조 온도 시간	제조기록서
15	분쇄	품질위해요소제거	입도 분쇄물 금속탐지	제조기록서
16	계량 및 포장		포장중량	포장지시기기록서
17	시험의뢰 및 확인		꽃송이버섯추출물 기준규격에 의한 자가품질검사 실시	자가품질검사성적서
18	입고	-	선입선출	출하 승인서

### (11) 중점관리방법

No.	공정	위해요소	중점관리대상 및 관리방법	관련문서	
1	입고	생물학적	병원성 미생물, 진균	적합한 원료 입고, 확인	시험성적서, 입고검사서
		화학적	중금속, 잔류농약등	적합한 원료 입고, 확인	시험성적서, 입고검사서
		물리적	흙, 돌, 금속, 유리, 머리카락등	적합한 원료 입고, 확인	시험성적서, 입고검사서
2	검사	생물학적	병원성 미생물, 진균	청결한 채취 환경, 방법	GMP 기준서
		화학적	중금속, 잔류농약등	-	-
		물리적	흙, 돌, 금속, 유리, 머리카락등	청결한 채취 환경, 방법	GMP 기준서
3	보관	생물학적	병원성 미생물, 진균	적절한 보관 환경	작업장 온습도 일지
		화학적	중금속, 잔류농약등	-	-
		물리적	흙, 돌, 금속, 유리, 머리카락등	-	-
4	원료칭량	생물학적	병원성 미생물, 진균	청결한 칭량 환경, 작업자 복장	제조기준서
		화학적	중금속, 잔류농약등	-	-
		물리적	흙, 돌, 금속, 유리, 머리카락등	청결한 칭량 환경, 작업자 복장	제조기준서
5	세척 및 침지	생물학적	병원성 미생물, 진균	작업장, 작업도구, 작업자 위생관리	제조기준서
		화학적	중금속, 잔류농약등	-	-
		물리적	금속, 머리카락등	작업장, 작업도구, 작업자 위생관리	제조기준서
6	배출	생물학적	병원성 미생물, 진균	작업장, 작업도구, 작업자 위생관리	제조기준서
		화학적	중금속, 잔류농약등	-	-
		물리적	금속, 머리카락등	작업장, 작업도구, 작업자 위생관리	제조기준서
7	용매투입	생물학적	병원성 미생물, 진균	작업장, 작업도구, 작업자 위생관리	제조기준서
		화학적	중금속, 잔류농약등	-	-
		물리적	금속, 머리카락등	작업장, 작업도구, 작업자 위생관리	제조기준서
8	추출	생물학적	병원성 미생물, 진균	작업장, 작업도구, 작업자 위생관리	제조기준서
		화학적	중금속, 잔류농약등	-	-
		물리적	금속, 머리카락등	작업장, 작업도구, 작업자 위생관리	제조기준서
9	여과	생물학적	병원성 미생물, 진균	작업장, 작업도구, 작업자 위생관리	제조기준서
		화학적	중금속, 잔류농약등	-	-
		물리적	금속, 머리카락등	작업장, 작업도구, 작업자 위생관리	제조기준서
10	진공농축	생물학적	병원성 미생물, 진균	작업장, 작업도구, 작업자 위생관리	제조기준서
		화학적	중금속, 잔류농약등	-	-
		물리적	금속, 머리카락등	작업장, 작업도구, 작업자 위생관리	제조기준서, 금속검출기 점검표
11	보정	생물학적	병원성 미생물, 진균	작업장, 작업도구, 작업자 위생관리	제조기준서
		화학적	중금속, 잔류농약등	-	-
		물리적	금속, 머리카락등	작업장, 작업도구, 작업자 위생관리	제조기준서, 금속검출기 점검표
12	동결건조	화학적	중금속, 잔류농약등	-	-
		물리적	금속, 머리카락등	작업장, 작업도구, 작업자 위생관리	제조기준서, 금속검출기 점검표
13	분쇄	화학적	중금속, 잔류농약등	-	-
		물리적	금속, 머리카락등	작업장, 작업도구, 작업자 위생관리	제조기준서, 금속검출기 점검표
14	계량 및 포장	화학적	중금속, 잔류농약등	-	-
		물리적	금속, 머리카락등	작업장, 작업도구, 작업자 위생관리	제조기준서, 금속검출기 점검표
15	시험 의뢰서				
16	입고				

(12) 제조 및 품질관리에 필요한 시설 및 기구

항목	시설 및 기구	항목	시설 및 기구
제조시설	전자저울	품질관리기구	입도측정기
	추출기		인큐베이터
	농축기		고압멸균기
	동결건조기		clean bench
	분쇄기		알콜램프
	금속검출기		피펫
			비이커
			할로젠수분측정기
	액체크로마토그래피		

(13) 반제품 기준 및 규격

번호	검사항목	자 체 규 격	시험방법
1	성 상	갈색의 추출물	관능시험법(색깔,풍미,조직감,외관)
2	이 물	불검출	식품공전
3	brix	10±1	식품공전
4	대장균군(cfu/g)	음성	건강기능식품공전
5	일반세균(cfu/g)	100cfu/g	건강기능식품공전

(14) 완제품 기준 및 규격

번호	검사항목	자 체 규 격	시험방법
1	성 상	고유의 색택과 향미를 가지며 이미, 이취가 없는 갈색 분말	관능시험법(색깔,풍미,조직감,외관)
2	이 물	불검출	식품공전
3	베타글루칸 함량	표시량(176mg/g)의 80~120%	공인시험법(식품의약품안전처 공고 제2017-306호)
4	대장균군(cfu/g)	음성	건강기능식품공전
5	수분(%)	2.0±1	식품공전
6	납	1mg/kg 이하	건강기능식품공전
7	카드뮴	1mg/kg 이하	건강기능식품공전
8	총비소	75mg/kg 이하	건강기능식품공전
9	총수은	1mg/kg 이하	건강기능식품공전

(15) 꽃송이버섯추출물 완제품 샘플사진



꽃송이버섯추출물

### 3. 꽃송이버섯 추출물(액) 제조 기술 개발(가열)

꽃송이버섯 추출물(액) 추출 조건은 가열기를 이용하여 건조된 꽃송이버섯 160g를 10리터 끓인 물에 동안 100℃에서 가열하여 꽃송이 버섯 추출물(액) 뽑아낸다. 추출된 추출액을 가열기 60℃~80℃에서 120분 동안 다린후 추출액은 냉각후 여과를 통과후 추출액을 냉장 보관하여 제품 “발효 꽃송이버섯 특, 천, 아이엠티 플러스, 가루효” 효소제품에 부 원료로 사용한다.

①꽃송이버섯 자실체(추출액) 식품(식품첨가물)품목제조보고서 등록

;2017년 12월부터 꽃송이버섯 추출물을 당사의 제품에 원재료명 또는 성분명 및 배합비율로 등록하여 생산.

#### (1) 제품의 개요

No.	구분	내용
1	제품명	꽃송이버섯추출액
2	품목제조보고연월일	2018년 11월 14일
3	품목제조신고증번호	20140344281-117
4	작성자 및 년월일	장기자 / 2018.11.14
5	제품의 유형	침출차
6	섭취대상	제품의 주 원료로 사용
7	생산 사용량 기준	4.5/Kg/4 = 16/Kg / 꽃송이버섯추출액 1,500/ml
8	생산시 주의사항	
9	유통기한	제조일로부터 12개월
10	보존 및 유통기준	냉장보관
11	포장단위	/리터

## (2) 제조공정도

제조공정	식품, 식품첨가물	조건	(3)기능/지표성분 함량변화%
원료	꽃송이버섯		꽃송이버섯 160/g
↓			
입고 및 보관	꽃송이버섯		
↓			
개포, 칭량	꽃송이버섯	100%	
↓			
원료 세척	꽃송이버섯	수도수(흐르는물)이물제거	
↓			
침량	수도수	그물망 넣어 전기온수기	
↓			
가열(증자)		온도 : 100~102℃ 시간 : 60분	
↓			
증자(고온유지,추출액)		온도 : 60℃~70℃ 시간 : 2시간~3시간	
↓			
냉각		원료분리/상온 냉각후	
↓			
추출액 용기 저장		온도 : 0℃~9℃ 수율량 : 생산량에 비례	$\beta$ -glucan : mg/g 고형분 : 1.39 %
↓			
냉장보관			

## (3) 제조공정 설명서

- ① 입고.보관:절차에 원부재료를 따라 외관, 품질, 유통기한 등의 확인하고 냉장 창고에 보관한다.
- ② 원재료 개포 및 계량
- ③ 원료 세척공정으로 꽃송이버섯 수도수(흐르는물)이용하여 이물을 제거한다.
- ④ 꽃송이버섯 원료 그물망에 넣어 전기온수기에 침량한다.
- ⑤ 가열(증자) 위해요소 제어와 전기온수기를 이용하여 고온(98℃~102℃)에서 “가열(증자)” 을 1시간 동안 끓인다.
- ⑥ 증자(고온유지)에서 꽃송이버섯을 다린 기 위해 고온(70℃~90℃)에서 2시간 동안 꽃송이버섯 추출액을 우려냈다.
- ⑦ 냉각;전기온수기 전원 차단과 꽃송이버섯을 꺼낸후 상온에서 2~3시간동안 식힌다.
- ⑧ 저장/보관:소독된 용기에 저장하고 냉장 보관한다.

발급번호 : 1VKG-TJN9-FW6F-XXØQ-U51D



## 식품(식품첨가물) 품목제조보고서

보고인	성명(법인명)	장기자		생년월일(법인번호)	1955년 06월 15일
	주소	경기도 의왕시 오봉로 268(이동, 2,3층)		전화번호	031 461 8090
				휴대전화	
영업소	명칭(상호)	(주)경신바이오		영업등록번호	20140344281
	소재지	경기도 의왕시 오봉로 268(이동, 2,3층)			
제품정보	식품의 유형	침출차	요청하는 품목제조 보고번호	20140344281117	
	제품명	꽃송이버섯 추출액			
	유통기한	1년			
	품질유지기한				
	원재료 또는 성분명, 배합비율	뿔장에 기재			
	용도 용법	뿔장에 기재			
	보관방법 및 포장재질	뿔장에 기재			
	포장방법 및 포장단위	용기(PE) / 통			
	성상	액상			
	품목의 특성 <input checked="" type="checkbox"/> 고열량 · 저영양 식품 해당 여부      [ ]에 [ ]아니오 [O] 해당 없음 <input checked="" type="checkbox"/> 할랄인증 식품 해당 여부      [ ]에 [O]아니오				
기타					

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

2018년 11월 14일

보고인 장기자

경기도 의왕시장 귀하

품목보고번호	20140344281-117				
처리부서	도시개발국 청소위생과	처리자성명	이애경	처리일자	2018년 11월 16일



본 증명서는 인터넷으로 발급되었으며 식품안전정보포털(<http://www.foodsafetykorea.go.kr/>) 홈페이지에서 확인할 수 있습니다.



발급번호 : 1VKG-TJN9-FW6F-XXØQ-U51D



원재료명 또는 성분명 및 배합비율		
No.	원재료명 또는 성분명	배합비율(%)
1	꽃송이버섯자실체	100%
용도용법	자가 원부재료 혼합	
보관방법 및 포장재질	냉장보관(1~10℃이하) 폴리에틸렌(P/E) 수지	



본 증명서는 인터넷으로 발급되었으며 식품안전정보포털(<http://www.foodsafetykorea.go.kr/>) 홈페이지에서 확인할 수 있습니다.

제 D2016050677 호

## 검 사 성 적 서

검체명	가루효"북"	제조일자 (유통기한)	2016-05-11
의뢰인	업체명	주식회사경신바이오	
	주 소	경기도 의왕시 오봉로 268 (이동)	
	성 명	장기자	
제조번호		접수년월일	2016-05-12
검사의뢰목적	참고용	검체접수번호	D2016050677

귀하가 우리 연구원에 검사의뢰한 결과는 다음과 같습니다.

검사관련 총 책임자: 김 천 회

시험항목	결과	검사담당자
베타글루칸(mg/g)	289.96mg/g	김혜윤

[베타글루칸]분석법-건강기능식품공전 영지버섯자실체추출물 베타글루칸

2016 년 6 월 13 일

한국기능식품연구원



(사)한국건강기능식품협회 부설 한국기능식품연구원 <http://www.khsi.re.kr> 전화번호 (031) 628-2000 FAX(031)628-0400-1

# 시험일지

검사원 : 김혜윤 (서명)

검사책임자 : 이현영 (서명)

시료접수번호 : D2016050677	시료접수월일 : 2016-05-12
시험검사항목 : 베타글루칸	시험검사일자 : 2016-05-19 ~ 2016-05-20
시료명 : 가루호"특"	식품유형 : 기타

시험법근거 건강기능식품공전 제4. 건강기능식품 시험법 3. 개별성분별 시험법 3-25 베타글루칸

## 1. 표준물질 및 표준용액 제조

### 1) 표준물질정보

표준물질명	Lot. No	순도	제조사	관리번호
D-(+)-Glucose	SLBM4106V	99.9%	Sigma	STD-2015-0517

### 2) 표준용액제조 (Stock Solution 및 Working Solution)

Stock solution(mg/kg)			
표준물질명	표준물질채취량(mg)	최종용량(ml)	최종농도(mg/kg)
D-(+)-Glucose	51.5	100	514.4850

STD Working Solution( $\mu\text{g/ml}$ )					
표준물질명	1	2	3	4	5
D-(+)-Glucose	10.72	16.08	32.16	64.31	128.62

3) Working Solution 제조 : Stock Solution 최종용량에서 일정량을 취해 희석하여 제조한다. (검량선작성)

## 2. 시험·검사방법(시험·검사용액의 제조과정)

### 1) 표준용액의 조제

- ① D-글루코오즈 표준물질 일정량을 100ml 부피플라스크에 넣는다.
- ② 증류수를 가하여 완전히 녹인 후 100ml로 한 후 희석하여 표준원액으로 한다.
- ③ 위의 용액을 증류수로 적절히 희석하여 표준용액으로 한다.

### 2) 시험용액의 조제 (전처리 과정)

- ① 시험은 두개의 시료 및 공시험을 동시에 실시한다.
- ② 시료 일정량을 정밀히 달아 삼각플라스크에 취한다. (지방이 10%이상인 경우 탈지하고, 당을 많이 함유한 경우 85% 에탄올 용액으로 시료 1g당 10ml씩으로 세척한다).
- ③ 증류수 100ml를 가한다.
- ④ 여기에 아밀라아제(20unit) 약 40 ~ 200mg을 취한다.
- ⑤ 0.1 N 수산화나트륨용액을 이용하여 pH 6.9로 한 후 20℃에서 2시간동안 진탕하여 효소분해 시킨다.
- ⑥ 0.1 N 염산용액으로 pH 5.0으로 맞추고 셀룰라아제(50unit)를 넣고 37℃에서 2시간동안 진탕하여 효소분해 시킨다.
- ⑦ 프로테아제(10unit) 약 15 ~ 80mg을 넣고 0.1N 수산화나트륨용액으로 pH 7.5로 한 후 37℃에서 2시간동안 진탕하여 효소분해 시킨다.

## 4. 협동연구기관 연구 수행 결과

### 4-1. 덕성여자대학교 연구결과

원료의 기준 설정 및 시험방법 연구, 각 성분에 대한 분리-분석조건 검토

#### ▶MKT전략 수립 및 MKT 일정 process 수립

과목	Phase I .		Phase II .		Phase III .		Phase IV .
	Diagnosis	Research	Hit Idea & Concept Creation	Concept Evolution	STP Strategy	Launching Strategy	Coaching & Advisory
목표	"Market Chance Extraction" 사업 시장 기회 도출		"Hit Concept Development" 혁신적인 아이디어 및 concept 도출		"STP, 4P Mix & Launching" 차별적 Positioning과 성공적 4P Mix 표출적이고 효과적인 런칭전략		내부 실행력 강화 공감대 형성
메모리/아이템	<ul style="list-style-type: none"> <li>Triangle Work Shop™</li> <li>Pest Analysis</li> <li>SMC.C Model™</li> <li>Chance Recheck™</li> </ul>		<ul style="list-style-type: none"> <li>Seri-Coig™</li> <li>E2 balance™</li> <li>Value Transfer™</li> <li>USP Logic Trip™</li> <li>Concept Evaluation Process™</li> </ul>		<ul style="list-style-type: none"> <li>2 way Segmentation</li> <li>Target Pincette™</li> <li>Positioning Cascading™</li> <li>UPP 13way™</li> <li>MISF™, S-Big Picture</li> <li>IMC™, TTL Communication</li> </ul>		<ul style="list-style-type: none"> <li>Coaching &amp; Advisory</li> <li>Education</li> </ul>
조사	<ul style="list-style-type: none"> <li>U&amp;A조사 (On-line)</li> <li>전문가 Depth Interview (Delphi)</li> </ul>		<ul style="list-style-type: none"> <li>1차 Test : 정성조사 FGD</li> <li>2차 Test : Concept &amp; Product Test (HUT)</li> </ul>		<ul style="list-style-type: none"> <li>Survey Data Analysis</li> </ul>		-
주요 수행 내용	<ul style="list-style-type: none"> <li>Internal Interview - Project Needs 청취</li> <li>Data Research - 2차 자료 조사 - 수면관련 시장사업 구조 분석</li> <li>사업 전략 리뷰 - 내부 전략의 우안점 - 기존 전략에 대한 평가</li> <li>Quick &amp; Core FGD</li> <li>Triangle Work Shop</li> </ul>		<ul style="list-style-type: none"> <li>Hit Idea 개발 - Seri Profiling - Key Hit Point 도출 및 적용 - COIG 아이디어 개발 - Idea Screening</li> <li>Hit Concept 개발 - Mega Hit concept 개발 - Main Benefit Creation 개발 - USP 도출 - Ingredient Branding 개발</li> <li>Concept 검증 및 정교화 - 조사설계 및 조사 진행 - 조사분석</li> </ul>		<ul style="list-style-type: none"> <li>STP 전략 수립 - 신규 브랜드 concept 고객반응조사 결과를 통해 최적의 STP 도출 - 기존 숙면/수면 기능성 제품들과의 차별화가 가능한 positioning 수립 - 런칭 시장 수요예측</li> <li>4P MIX Guideline - 성공적인 시장 진입을 위한 최적의 4P Mix 조합 도출 - 제품 이미지 전략, 가격 전략, 유통 전략, 커뮤니케이션 전략 수립 - 소비자조사 결과를 바탕으로 가격 설정</li> <li>런칭 전략 및 실행 프로그램 설계 - BTL Communication 전략 설계</li> </ul>		<ul style="list-style-type: none"> <li>전략실행 관련 자문</li> <li>DNP Partner Networking</li> </ul>

① 지표 물질 선정: 추출물의 활성 지표물질을 선정하기 위해 추출 및 정제를 시행한 후, 분리된 활성물질의 순도를 높이기 위해 HPLC를 통해 분석함. 성분 peak들 중에서 분석법 설정과 정제분리의 용이성을 고려하여 지표물질로 선정함.

② 함량시험법 설정 및 분석법 밸리데이션

- 표준물질의 함량시험 분석법 설정: 건강기능식품에서 지표성분인 표준물질의 함량을 정확히 측정하기 위해서는 적절한 분석법 설정이 필요함. 이를 위해 검액 제조, 용매, 컬럼, 분석과장, 온도에 대한 조건별 시험을 통해 최적의 HPLC 분석법을 설정함.

- 분석법 밸리데이션

- 특이성(Specificity): 시험용액의 건강기능식품과 표준물질을 1:1(v:v)로 섞은 후 3회 분석하여 실측함량비율 및 변동계수를 확인함.

- 직선성(Linearity): 표준물질 시료를 농도별(최소 5개)로 희석하여 3회 분석한 후 상관계수(R<sup>2</sup>)를 통해 직선성 여부를 확인하고 회귀방정식으로부터 역산출한 농도 값에 대한 이론상 농도 값의 상대오차값을 확인함.

- 정확성(Accuracy): 농도별 표준물질 시료와 조제한 건강기능식품을 1:1(v:v) 비율로 혼합 후, 각 3회 분석하여 검량선을 이용하여 역산된 평균농도와 이론치의 상대오차, 변동계수를 확인하여 정확성의 허용기준 (상대오차: 90~110%, 변동계

수:2% 미만)에 적합한지 확인함.

- 정밀성(Precision)

- 반복성: 표준물질을 일정농도에 대하여 10회 분석하여 유지시간 측정값의 변동계수와 분석 면적 측정값의 변동계수를 허용기준 (유지시간 변동계수: 1% 미만, 분석면적 변동계수: 2% 미만)에 적합한지 확인함.

- 일내정밀성: 농도별 표준물질 용액을 짧은 시간차로 반복 분석하여 얻은 측정값들 사이의 상대오차 및 변동계수 확인함(허용기준 - 상대오차: 90~110%, 변동계수:2% 미만).

- 일간정밀성: 농도별 표준물질 용액을 다른 실험일, 다른 시험자, 다른 분석장비 등을 이용하여 분석 실험한 측정값들 사이의 상대오차 및 변동계수 확인함(허용기준 - 상대오차: 90~110%, 변동계수: 2% 미만).

- 범위(Range): 적절한 정밀성, 정확성 및 직선성이 입증되는 표준물질의 농도의 상한 및 하한값 사이의 영역을 설정함.

- 완건성 (Robustness): 농도별 표준물질 용액을 설정한 분석법에서 이동상의 pH 및 조성 등

- 함량기준안 설정

- 약용버섯 추출물에 함유된 지표성분의 함량기준안을 설정함.

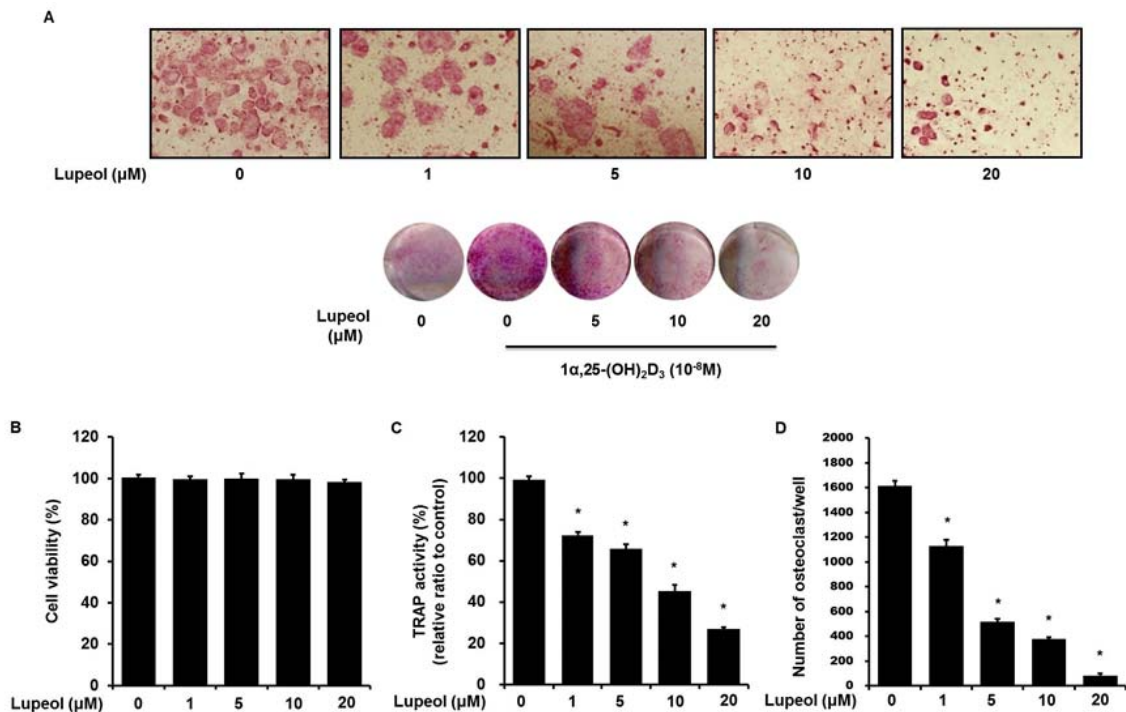
- 인체적용시험을 위한 임상시험용 제제에 함유된 지표성분의 함량기준안을 설정함.

## 4-2. 계명대학교 연구 수행 및 결과

원료 및 유효성분에 대한 동물모델을 이용한 *in vivo* 효능검증

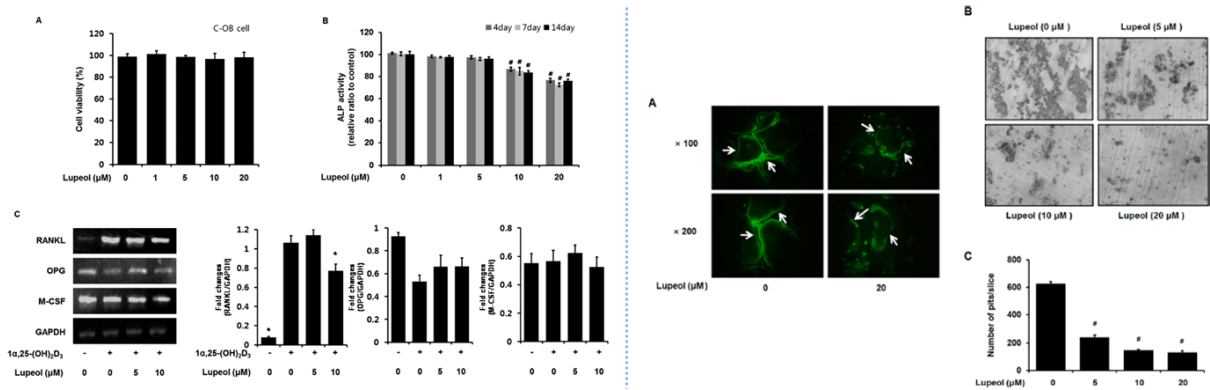
### (1) 선행 연구 수행

- ① 본 연구팀은 기존 선행연구를 통해 *in vivo*, *ex vivo* 방법으로 천연물 및 유효성분의 항염증 및 파골세포 억제효과에 관한 연구를 수행하였으며, 그 결과를 다수의 선행 결과를 얻을 수 있었음.
- ② 꿀 재흡수 활성국내 자생식물 유래의 추출물 중 정공등 Hexane분획물에서 우수한 효능을 확인하였으며, 이에서 활성을 나타내는 물질이 lupeol임을 확인하고, 정공등을 추출 및 분획하여 파골세포 분화 억제 효능을 *in vitro*, *in vivo*에서 아래와 같이 확인함.
- ③ Mouse primary osteoblasts를 이용하여  $1\alpha,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$ 으로 유발한 osteoclastogenesis에서의 lupeol의 효과를 탐색하였고, 그 결과 농도 의존적인 억제 효과가 나타났음.



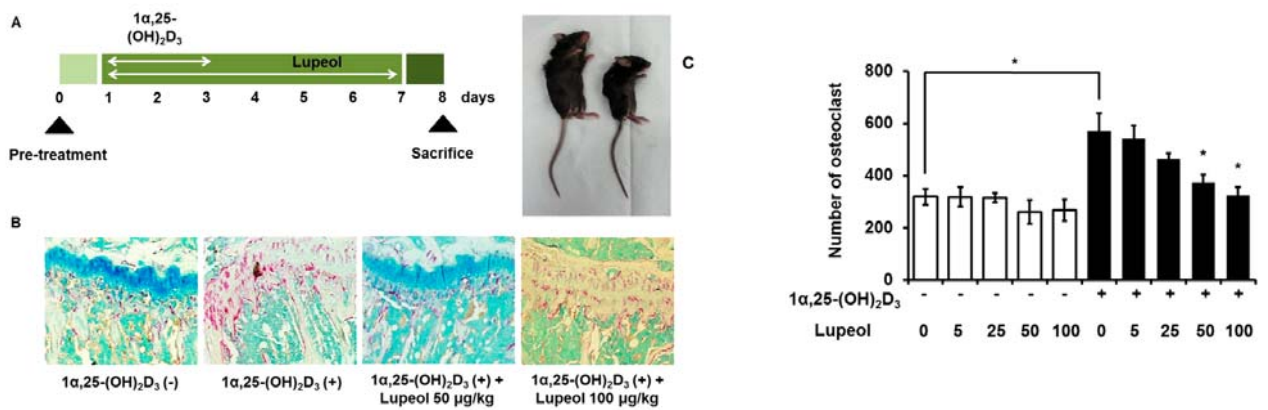
[lupeol의 Mouse primary osteoblasts에서 파골세포 분화 억제에 미치는 영향]

④ Mouse primary Calvaria Osteoblastic Cells을 분리하여 파골세포 분화에 lupeol의 효과를 탐색하였고, 그 결과 파골세포 분화에 미치는 다양한 인자의 생성을 감소하는 효과가 우수하였음.



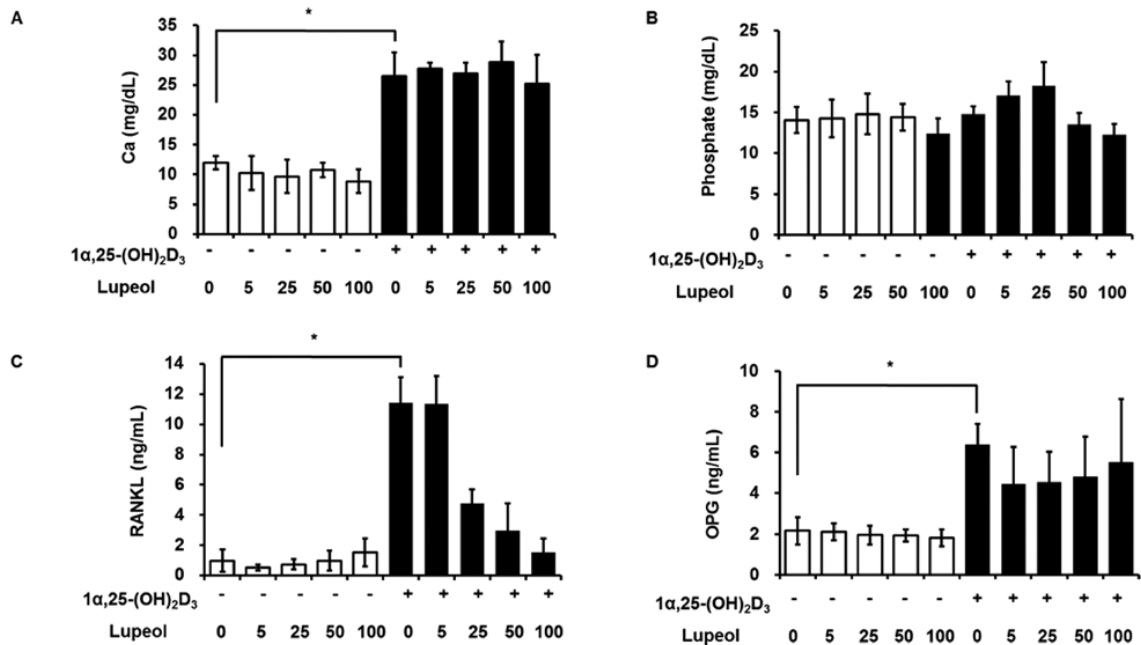
[lupeol의 Mouse primary Calvaria Osteoblastic Cells에서 파골세포 분화 억제에 미치는 영향]

⑤ C57BL/6 mice에 PBS or lupeol at 25 or 100 μg/kg/day를 3일간 투여하고, 1 α,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> 으로 유발한 in vivo 모델에서 파골세포 형성 억제 효과를 살펴본 결과 lupeol의 농도가 증가 할수록 파골세포 형성 억제가 뚜렷하게 나타났음.



[1 α,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>로 유도한 골소실 in vivo 모델에서 lupeol의 효과]

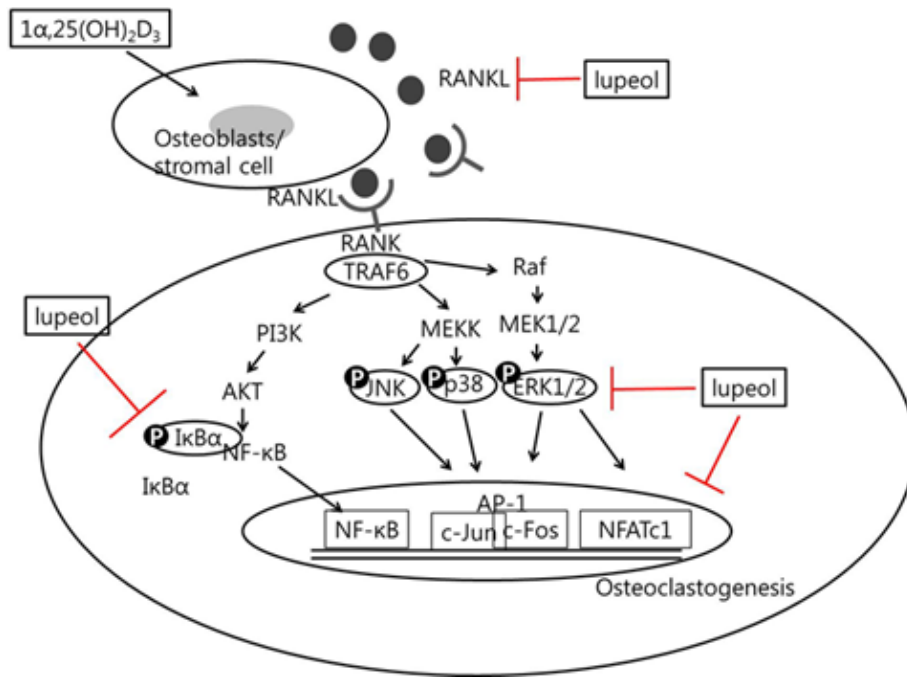
⑥ C57BL/6 mice에 PBS or lupeol at 25 or 100  $\mu\text{g/kg/day}$ 를 3일간 투여하고,  $1\alpha,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$ 으로 유발한 *in vivo*모델에서 serum을 채취하여 골 소실과 관련된 Ca (A), phosphate (B), ALP (C) 및 RANKL (D) 생성 정도를 살펴 본 결과 대부분 경우 lupeol 처리 군에서 억제 효과가 있었음.



[ $1\alpha,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$ 로 유도한 골소실 *in vivo* 모델의 serum에서 골 소실 인자의 변화 측정 결과]

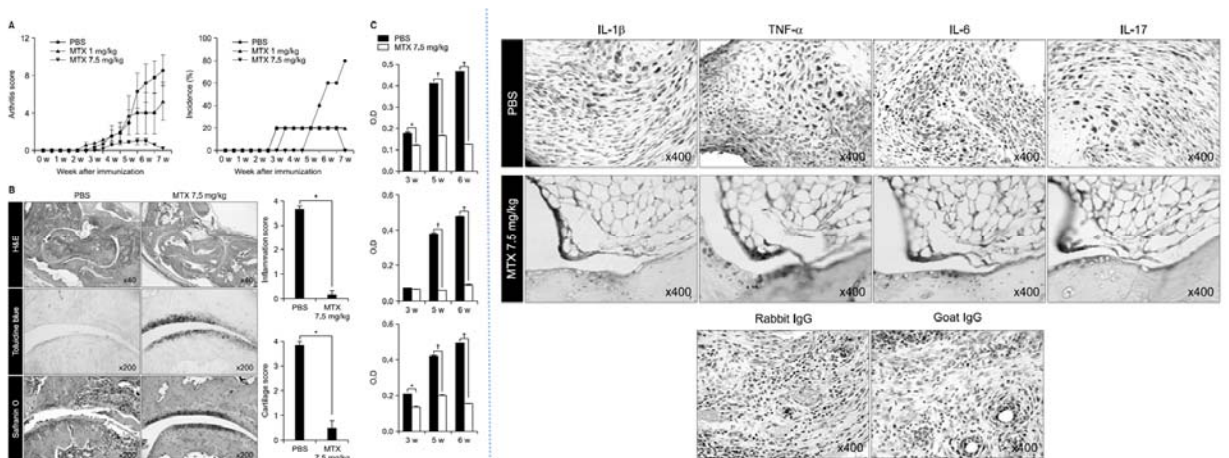
- ⑦ 본 연구팀은 위와 같은 관절염 관련 *in vivo*, *ex vivo*방법으로 천연물 및 유효성분의 항염증 및 파골세포 억제효과에 관한 연구를 수행하였으며, 그 결과를 학술 진흥 재단 등재 학술지와 국제 학술지에 발표하였음.
- ⑧ 본 연구에서는 *in vitro*에서의 효과탐색과 기전연구를 바탕으로 *in vivo*에서의 관절염 효과를 탐색하고자 함.
- ⑨ 본 연구에서는 2차년도에서 확인한 *in vitro*에서의 효과탐색과 기전연구를 바탕으로 최종 후보소재를 이용하여 *in vivo*에서의 관절염 억제 가능성을 최종적으로 검증함.





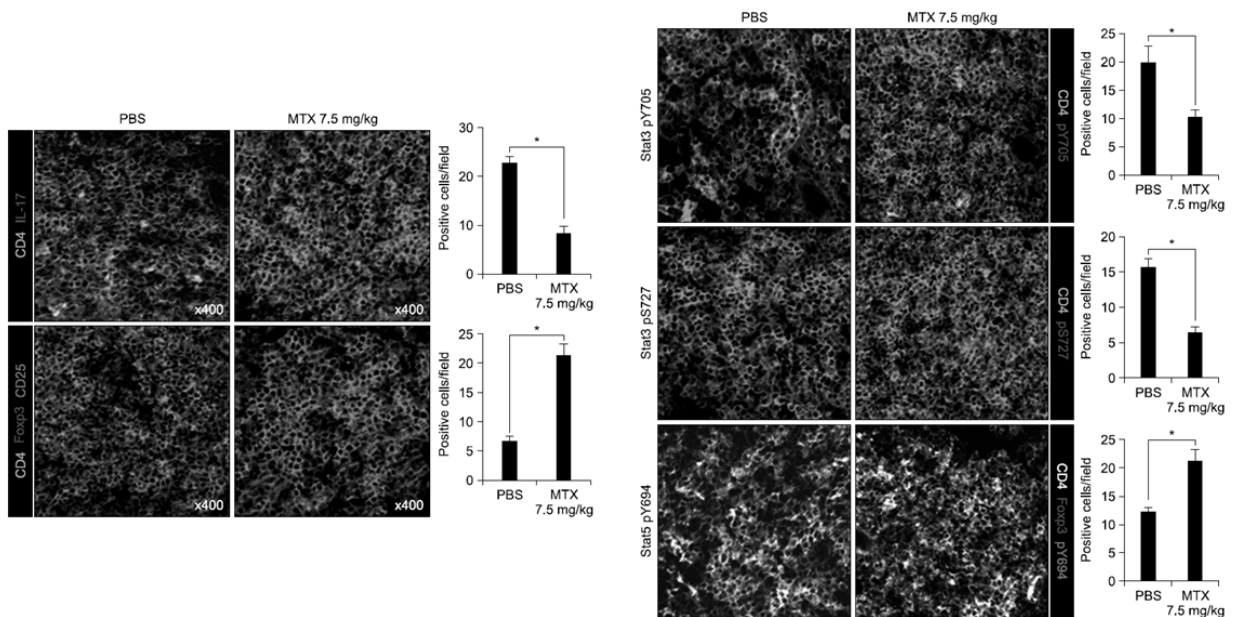
[In vitro & in vivo 상에서 관절염 억제제의 주요 기전 탐색의 모식도 예시]

- ⑩ 또한, 3차년도 수행한 in vivo 모델과 더불어 제2형 콜라겐을 이용하여 콜라겐 유발 관절염 마우스를 활용한 실험도 계획함.
- ⑪ 구체적으로 DBA/1J 마우스에 Complete Freund's Adjuvant 와 1 : 1 (v/v)비율로 섞은 Bovine Type II collagen 100  $\mu$ g을 꼬리 부분에 피하로 주사하여 일주일 동안 관절염을 유발하고, 이때 최종 원료를 투여하여 그 효과를 살펴봄.
- ⑫ 염증성 사이토카인인 IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6와 IL-17는 자가면역관절염의 병인과 관련된 중요 인자임. 따라서, 대조군과 치료군의 콜라겐 유발 관절염 마우스의 관절 조직에서 대표적인 염증성 사이토카인인 IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6와 IL-17에 특이적인 항체를 이용하여 면역조직화학염색을 시행할 예정임.



[콜라겐 유발 관절염 동물모델에서 메토트렉세이트의 치료효과와 메토트렉세이트 주입에 의한 콜라겐 유발 관절염 동물모델의 염증억제 효과의 예시]

- ⑬ 최근 염증성 자가면역질환의 치료 패러다임은 병인세포를 억제하는 동시에 조절세포의 분포 및 활성을 증가시켜 면역체계의 이상을 정상화하는 것에 초점이 맞춰지고 있음. 메토트렉세이트에 의한 치료효과 규명을 위해 처리군의 비장 내 존재하는 TH17 세포와 조절 T 세포의 분포를 조사하기 위해 면역형광염색을 시행하고 공초점 현미경으로 관찰하고 분석할 예정임.



[메토트렉세이트 주입에 의한 콜라겐 유발 관절염 모델V내  
염증 TH17 세포 및 면역조절 T 세포의 조절효과의 예시]

- ⑭ 최종 소재의 관절염 효과 검정을 목표로 위와 같이 최소 2가지 in vivo 관절염 모델 시스템에서의 활성을 체크할 예정임.

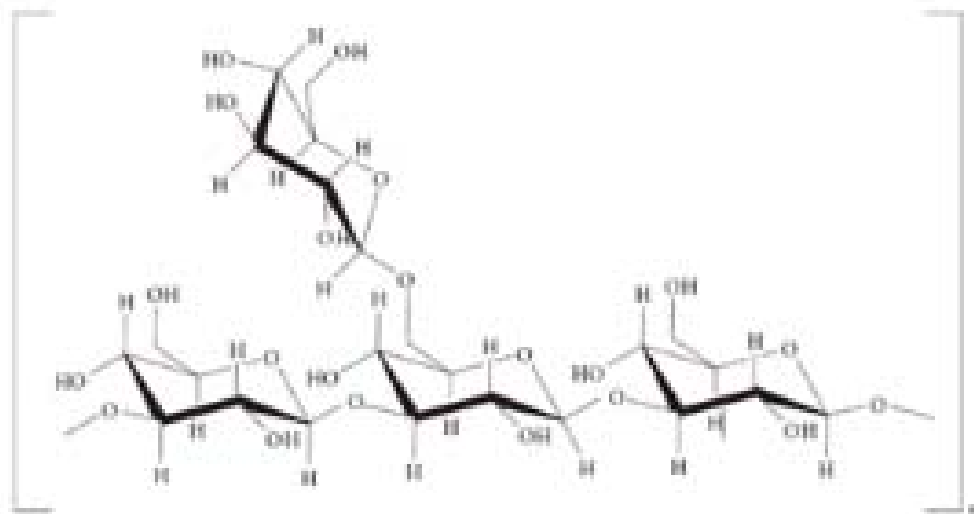
## (2) 연구수행 내용 및 결과

### ① 꽃송이버섯의 안전성 자료 검토

- 꽃송이버섯(*Sparassis crispa*)은 구멍장이버섯목 꽃송이버섯과에 속하는 버섯으로서, 노루궁뎅이버섯, 능이버섯, 곰보버섯, 차가버섯 등과 함께 식품의약품안전청 고시 “제 2010-78, 식품의 기준 및 규격 일부개정 고시 (2010.10.29)” 카. 항의 원료 품목에 꽃송이버섯 (*Sparassis crispa*)의 자실체가 식품에 사용할 수 있는 원료로 지정이 되어 있음.
- 꽃송이버섯의 자실체의 미네랄, 아미노산, 비타민의 함량을 분석해 보았을 때, 미네랄함량은 건조중량 100 g을 기준으로 K, P, Na, Mg가 주성분이며, 그 중 K가

1,299.44/mg으로 가장 많은 양을 차지하고, 유리아미노산은 총 3,223.45 mg이며 이중 glutamic acid의 함량이 724.46 mg이다. 비타민은 비타민E가 408.5 mg, Vitamin C 21.58 mg이다. 비타민 D는 곰보버섯과 비교할 때 3배 이상 높은 함량을 보였음.

- 일본의 unitika의 RnD그룹의 Hasegawa등의 논문에 따르면, 꽃송이버섯 가루를 8주간 건강한 남성에게 300 mg씩 경구 투여 하였을 시, NK세포의 수와는 상관없이 NK세포의 세포독성이 현저히 증가하는 것을 보여주었다. 또한, Kimura등에 의한 논문에 의하면, 320 mg 경구투여 시, 피부수분손실이 플라시보 그룹과 비교 하였을 때 현저하게 저해된 것을 보여주었음.



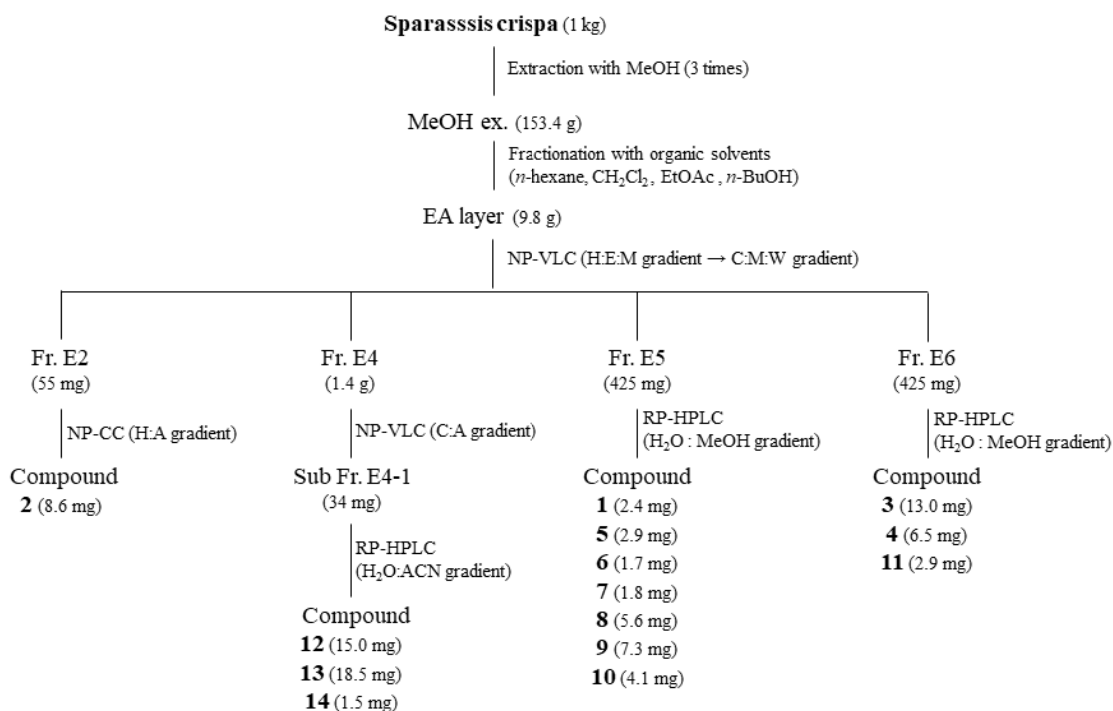
<β-glucan의 구조>

- 꽃송이버섯의 40%의 함량을 차지하는 성분은 베타글루칸 (β-glucan)으로 알려져 있다. 베타글루칸은 자연계에 널리 존재하고 있는, 소화가 되지 않는 다당류이다. 이 베타글루칸은 1960년대에 미국 투란 대학 의학부의연구진이 빵, 효모 등의 세포 벽에서 추출하여 처음으로 명명한 물질이다. 이러한 베타글루칸은 보리나 귀리, 버섯등에 풍부한 물질로 알려져 있으며, 미국식품의약품안전청 (FDA)의 규정에 따르면, 1일섭취량은 체중 40 kg당 1.0 g으로 규정이 되어 있음.
- 베타글루칸은 버섯에서 알려진 항암활성의 주요한 인자로 알려져 있으며, 미국 식품의약품안전청 (FDA)의 GRAS (General Recognized as Safe)로 승인을 얻어 현재 식품 첨가물로 사용되고 있으며, 한국을 비롯한 미국, 일본, 중국 등 전 세계적으로 기능성 식품, 화장품으로 사용되고 있음.
- 꽃송이버섯의 지표성분대한 연구는 현재 이루어지지 않았으나, 주성분으로 sparassol (Methyl 2-hydroxy-4-methoxy-6-methylbenzoate)이 보고 되었으며, 항균, 항생 활성이 있다고 알려져 있음.

② 소재의 성분분리 및 구조결정

• 추출물 분리

-꽃송이버섯 추출물로부터 성분을 분리한 과정은 다음과 같으며, 추출물로부터 헥산 (*n*-hexane), 메틸렌 클로라이드 (methylene chloride), 에틸 아세테이트 (ethyl acetate), 부탄올 (*n*-butanol)로 용매 분획한 다음, 그 중에서 ethyl acetate (EA) 분획을 이용하여 성분 분리 실험을 진행하였음.



[꽃송이버섯의 Ethyl acetate (EA) 분획으로부터 성분의 분리 과정]

-EA분획 9.8 g을 실리카겔로 충전한 칼럼에 *n*-hexane/EtOAc/MeOH (10:1:0, 2.5:1:0, 1.5:1:0, 1:1:0.2), CHCl<sub>3</sub>/MeOH/H<sub>2</sub>O (10:1:0, 5:1:0.1)과 100% MeOH 조건으로 vacuum liquid chromatography 실시하여, 총 7개의 분획으로 나누었음 (Fr. E1 ~ E7). 얻어진 분획들 중에 Fr. E2에 대하여 실리카겔로 충전한 칼럼에 *n*-hexane과 acetone 혼합 용매로 비극성 용매부터 시작하여 극성을 높여가며 기울기 용리시켜 open column chromatography를 실시하여 화합물 2 (8.6 mg)을 분리하였음. 그리고 Fr. E4에 대하여 실리카겔로 충전한 칼럼에 CHCl<sub>3</sub>과 acetone의 용매구배로 open column chromatography를 실시하여 총 6개의 소분획을 얻었음 (Fr. E4-1 ~ E4-6). 그 중 Fr. E4-1에 대하여 역상 칼럼 (ZORBAX SB-C18, 250 mm x 21.2 mm i.d., 5 μm, Agilent Technologies)을 이용한 HPLC (High performance liquid chromatography; 600 controller, waters)로 화합물 12 (15.0 mg), 13 (18.5 mg), 14 (1.5 mg)을 분리하였음. 이 때 분리 조건은 유속 5.0 mL/min로, 40% acetonitrile에서 시작하여 30 분 동안 55% acetonitrile로 기울기 용리시켰음. Fr. E5에 대하여

역상 칼럼 (ZORBAX SB-C18, 250 mm x 21.2 mm i.d., 5  $\mu$ m, Agilent Technologies)을 이용한 HPLC (600 controller, waters)로 화합물 1 (2.4 mg), 5 (2.9 mg), 6 (1.7mg), 7 (1.8 mg), 8 (5.6 mg), 9 (7.3 mg), 10 (4.1 mg)을 분리하였음. 이 때 분리 조건은 유속 5.0 mL/min로, 20% MeOH에서 시작하여 60 분 동안 100% MeOH로 기울기 용리시켰음. Fr. E6에 대하여 역상 칼럼 (ZORBAX SB-C18, 250 mm x 21.2 mm i.d., 5  $\mu$ m, Agilent Technologies)을 이용한 HPLC (600 controller, waters)로 화합물 3 (13.0 mg), 4 (6.5 mg), 11 (2.9 mg)을 분리하였음. 이 때 분리 조건은 유속 5.0 mL/min로, 5% MeOH에서 시작하여 70 분 동안 50% MeOH로 기울기 용리시켰음.

• 분리된 화합물들의 구조결정

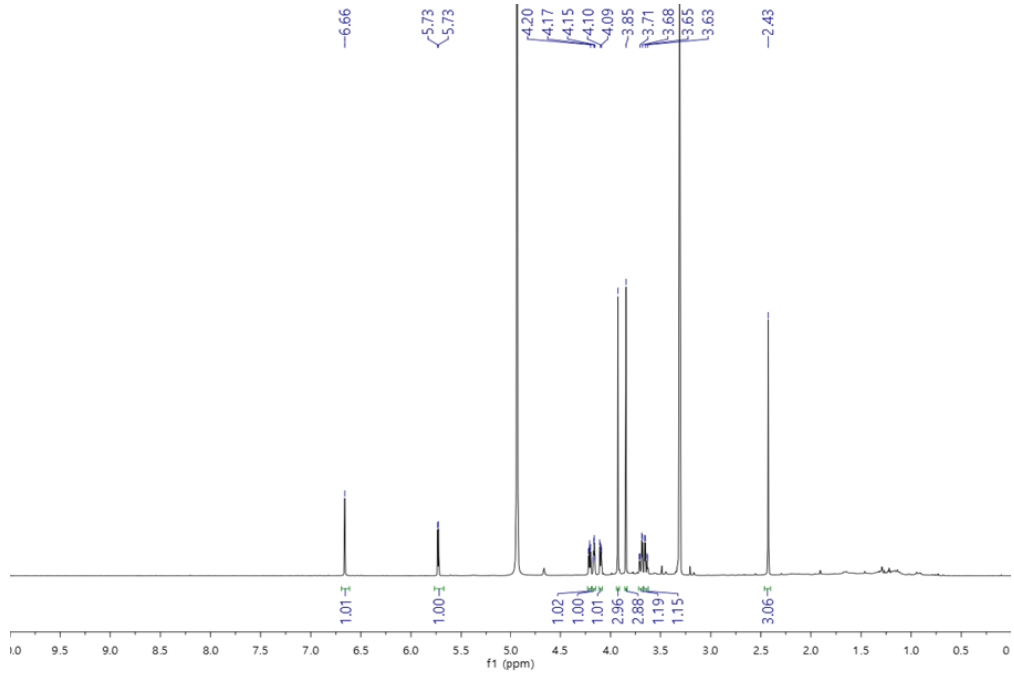
-꽃송이버섯으로부터 분리된 화합물들은 다음과 같은 NMR (Nuclear magnetic resonance), HRESIMS (High resolution electro-spray ionization mass spectrometry) 등의 분광학적 방법을 통하여 총 14 종의 화합물의 구조를 규명하였음.

-[화합물 1] (*Sparoside A, 2-hydroxy-3-methoxy-6-methyl benzoic acid methyl ester 4-O- $\alpha$ -D-riboside*).

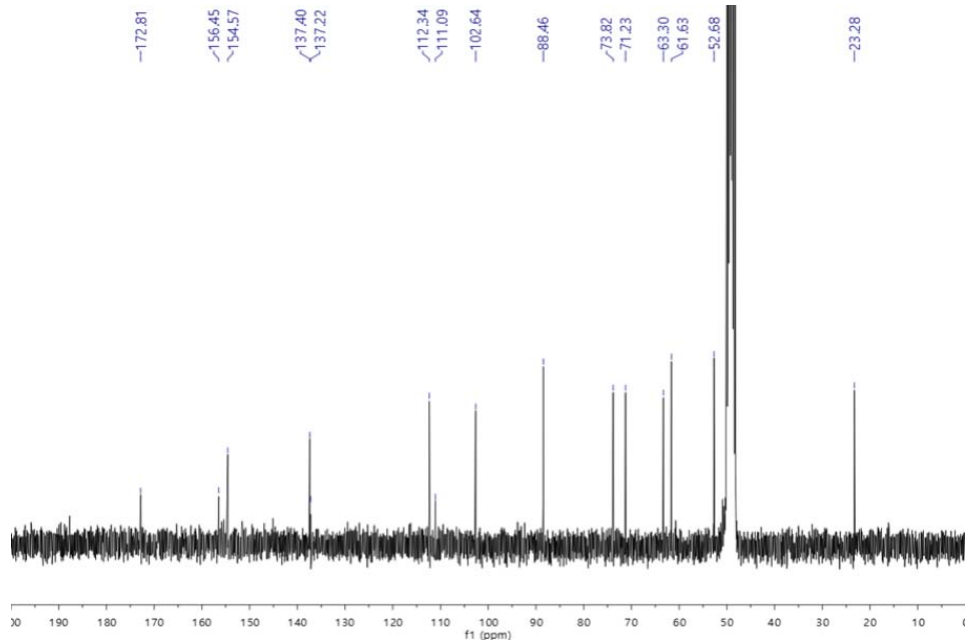
Yellowish amorphous solid; HRESIMS (positive mode) m/z, 측정치 367.1003 [M + Na]<sup>+</sup> (계산치 C<sub>15</sub>H<sub>20</sub>NaO<sub>9</sub>, 367.1000); <sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD):  $\delta$  6.66 (1H, s, H-5), 5.73 (1H, d, *J* = 4.44 Hz, H-1'), 4.32 (1H, dd, *J* = 4.5, 6.4 Hz, H-2'), 4.16 (1H, m, H-4'), 4.10 (1H, dd, *J* = 2.8, 6.5 Hz, H-3'), 3.93 (3H, s, COOCH<sub>3</sub>), 3.85 (3H, s, OCH<sub>3</sub>), 3.70 (1H, dd, *J* = 3.4, 12.0, H-5'a), 3.65 (1H, dd, *J* = 3.9, 12.0 Hz, H-5'b), 2.43 (3H, s, CH<sub>3</sub>); <sup>13</sup>C-NMR (125 MHz, CD<sub>3</sub>OD):  $\delta$  172.81 (COOCH<sub>3</sub>), 156.45 (C-2), 154.57 (C-4), 137.40 (C-6), 137.22 (C-3), 112.34 (C-5), 111.09 (C-1), 102.64 (C-1'), 88.46 (C-4'), 73.82 (C-2'), 71.23 (C-3'), 63.30 (C-5'), 61.63 (OCH<sub>3</sub>), 52.68 (COOCH<sub>3</sub>), 23.28 (CH<sub>3</sub>); HMBCs (Heteronuclear multiple-bond correlation, CD<sub>3</sub>OD, H-#  $\rightarrow$  C-#) H-5  $\rightarrow$  C-1, C-3, C-4, CH<sub>3</sub>; H-1'  $\rightarrow$  C-4, C-2', C-3', C-4'; H-2'  $\rightarrow$  C-1'; H-3'  $\rightarrow$  C-1', C-2', C-4', C-5'; H<sub>2</sub>-5'  $\rightarrow$  C-3', C-4'; CH<sub>3</sub>  $\rightarrow$  C-5, -6; OCH<sub>3</sub>  $\rightarrow$  C-3; COOCH<sub>3</sub>  $\rightarrow$  COOCH<sub>3</sub>.

화합물1의 <sup>1</sup>H-NMR spectrum에서  $\delta$  6.66에서 나타나는 한 개의 aromatic proton을 확인하였고,  $\delta$  5.73-3.65에서 나타나는 signal들로 한 개의 당 unit의 존재를 확인하였음. 또한  $\delta$  3.93과 3.85에서 singlet으로 나타나는 두 개의 methoxyl proton 들을 확인하였고,  $\delta$  2.43에서 singlet으로 나타나는 한 개의 methyl기를 확인하였음. 이 화합물의 <sup>13</sup>C-NMR spectrum에서는  $\delta$  172.81에서 하나의 carbonyl carbon 을,  $\delta$  156.45, 154.57, 137.40, 137.22, 112.34, 111.09에서 aromatic carbon들을,  $\delta$  102.64, 88.46, 73.82, 71.23, 63.30에서 한 개의 당 unit을 확인하였음. 그리고 두 개의 methoxyl 기와 한 개의 methyl 기를 각각  $\delta$  61.63, 52.68과  $\delta$  23.28에서 확인하였음. 결합하고 있는 관능기들의 위치는 HMBC를 측

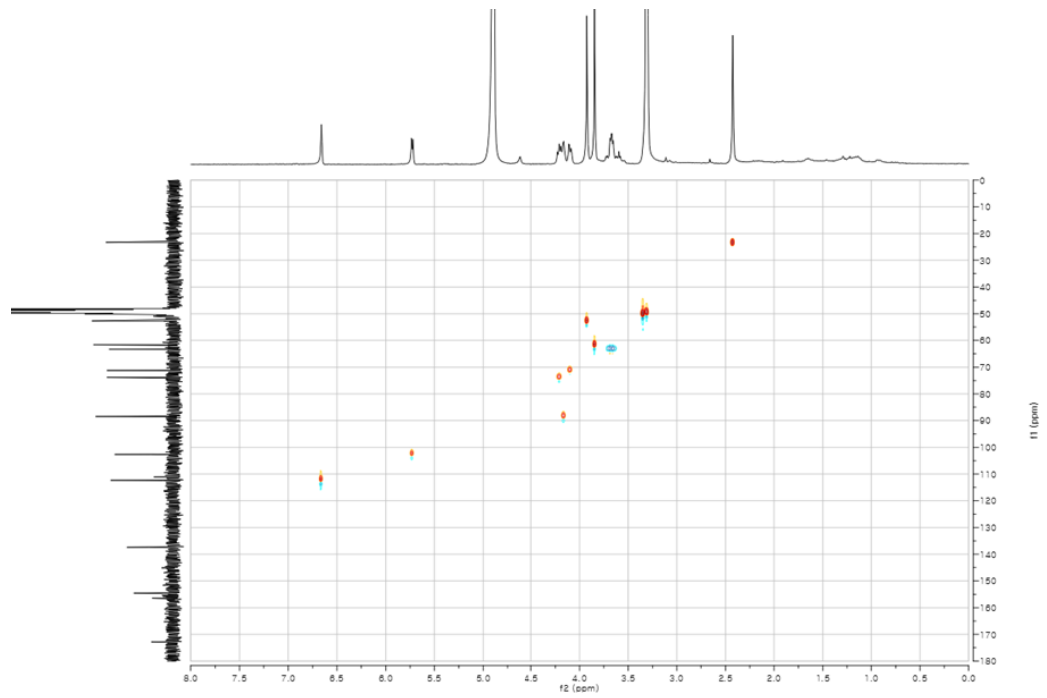
정함으로서 결정할 수 있었음. 이상의 data를 종합하여, 이 화합물을 2-hydroxy-3-methoxy-6-methyl benzoic acid methyl ester 4-O- $\alpha$ -D-ribose로 동정하였으며, 신규 화합물로서 sparside A로 명명하였음.



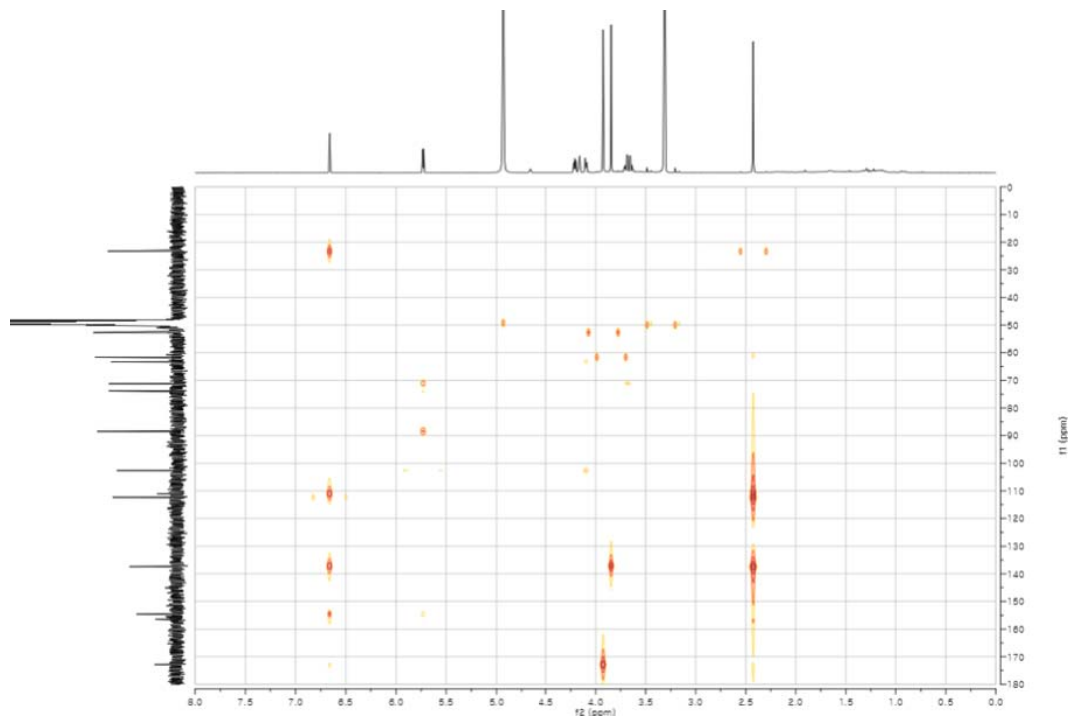
[화합물 1의  $^1\text{H-NMR}$  spectrum]



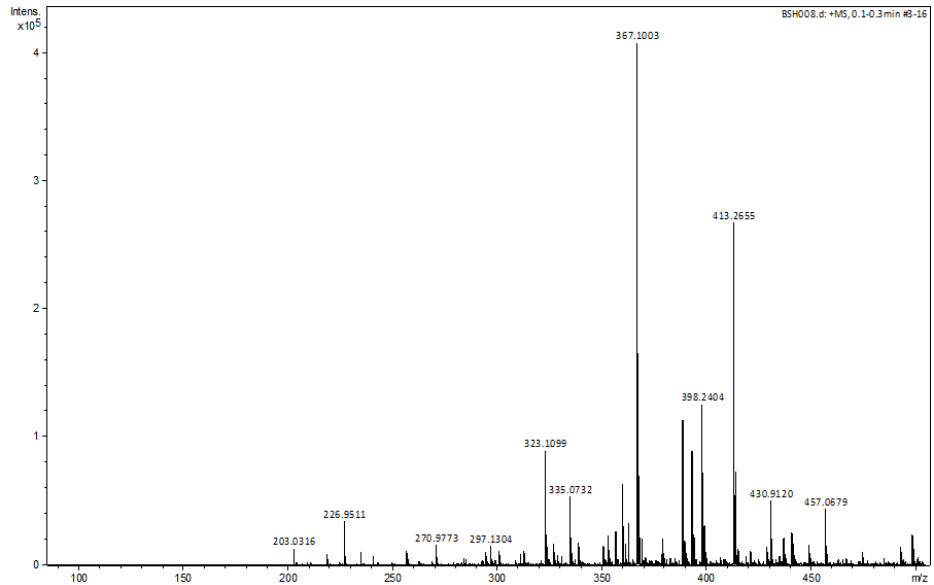
[화합물 1의  $^{13}\text{C-NMR}$  spectrum]



[ 화합물 1의 HMQC spectrum ]



[ 화합물 1의 HMBC spectrum ]



[ 화합물 1의 HRESIMS spectrum ]

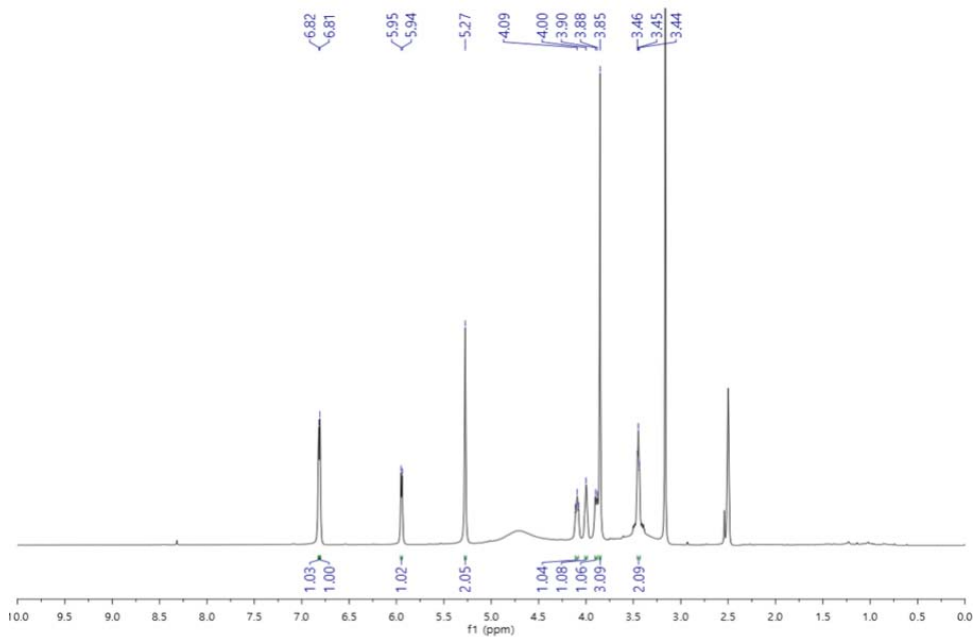
-[화합물 3] (*Sparalide A, 5-methoxy-phthalide 7-O- $\alpha$ -D-ribose*).

White amorphous powder; HRESIMS (positive mode)  $m/z$ , 측정치 335.0738 [ $M + Na$ ]<sup>+</sup> (계산치  $C_{14}H_{16}NaO_8$ , 335.0737); <sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  6.82 (1H, s, H-4), 6.81 (1H, s, H-6), 5.95 (1H, d,  $J = 3.8$  Hz, H-1'), 5.28 (1H, s, H-3), 4.10 (1H, dd,  $J = 4.0, 5.8$  Hz, H-2'), 4.00 (1H, dd,  $J = 3.6, 5.8$  Hz, H-4'), 3.89 (1H, d,  $J = 5.6$  Hz, H-3'), 3.85 (3H, s, OCH<sub>3</sub>), 3.45 (2H, m); <sup>13</sup>C-NMR (125 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  168.89 (C-1), 166.11 (C-5), 156.23 (C-7), 151.68 (C-3a), 107.05 (C-7a), 102.59 (C-6), 101.17 (C-1'), 100.49 (C-4), 87.99 (C-4'), 71.74 (C-2'), 69.77 (C-3'), 68.98 (C-3), 61.48 (C-5'), 56.19 (OCH<sub>3</sub>); HMBCs (DMSO-*d*<sub>6</sub>, H-#  $\rightarrow$  C-#) H-3  $\rightarrow$  C-1, C-3a, C-4, C-5, C-7a; H-4  $\rightarrow$  C-3, C-5, C-6, C-7, C-7a; H-6  $\rightarrow$  C-1, C-4, C-5, C-7, C-7a; H-1'  $\rightarrow$  C-3', C-4', C-7'; H-3'  $\rightarrow$  C-1'; H-4'  $\rightarrow$  C-3'; H<sub>2</sub>-5'  $\rightarrow$  C-3', C-4'; OCH<sub>3</sub>  $\rightarrow$  C-5.

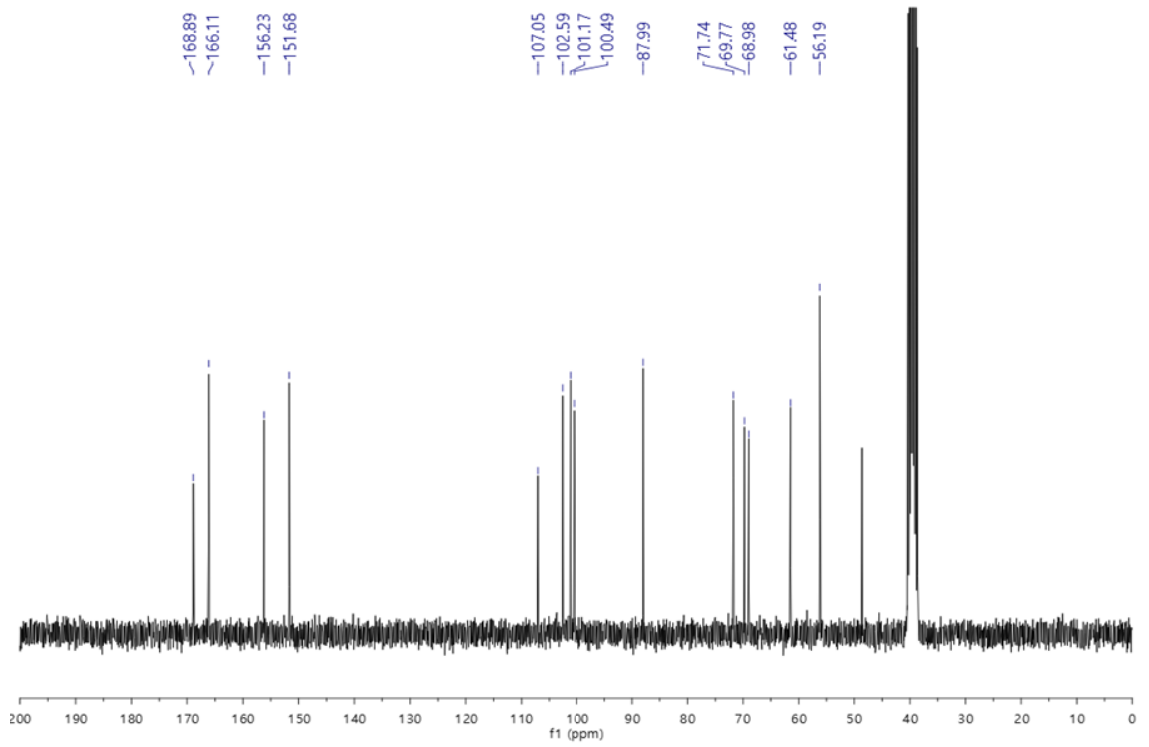
화합물3의 <sup>1</sup>H-NMR spectrum에서  $\delta$  6.82와 6.81에서 singlet으로 나타나는 signal으로 두 개의 aromatic proton들을 확인하였고,  $\delta$  5.28에서 적분값 2로 singlet으로 나타나는 한 개의 oxymethylene에 해당하는 signal 확인하였음. 또한  $\delta$  5.95-3.45에서 나타나는 signal들로 한 개의 당 unit의 존재를,  $\delta$  3.85의 signal로 methoxyl proton을 확인하였음. 이 화합물의 <sup>13</sup>C-NMR spectrum에서는  $\delta$  168.89에서 하나의 carbonyl carbon을,  $\delta$  166.11, 156.23, 151.68, 107.05, 102.59, 100.49에서 aromatic carbon들을,  $\delta$  101.47, 87.99, 71.74, 69.77, 61.48에서 한 개의 당 unit을 확인하였음. 그리고 하나의 oxymethylene과 한 개의 methoxyl 기를 각각  $\delta$  69.98과 56.19에서 확인하였음. 이와 같은 data를 바탕으로 문헌과 비교하여 phthalide계열임을 추정할 수 있었음. 또한, chemical shift와 TLC분석으로 표준품과 비교하여 당이 ribose로 확인하였으며, 당의 1번 proton인 anomeric proton의



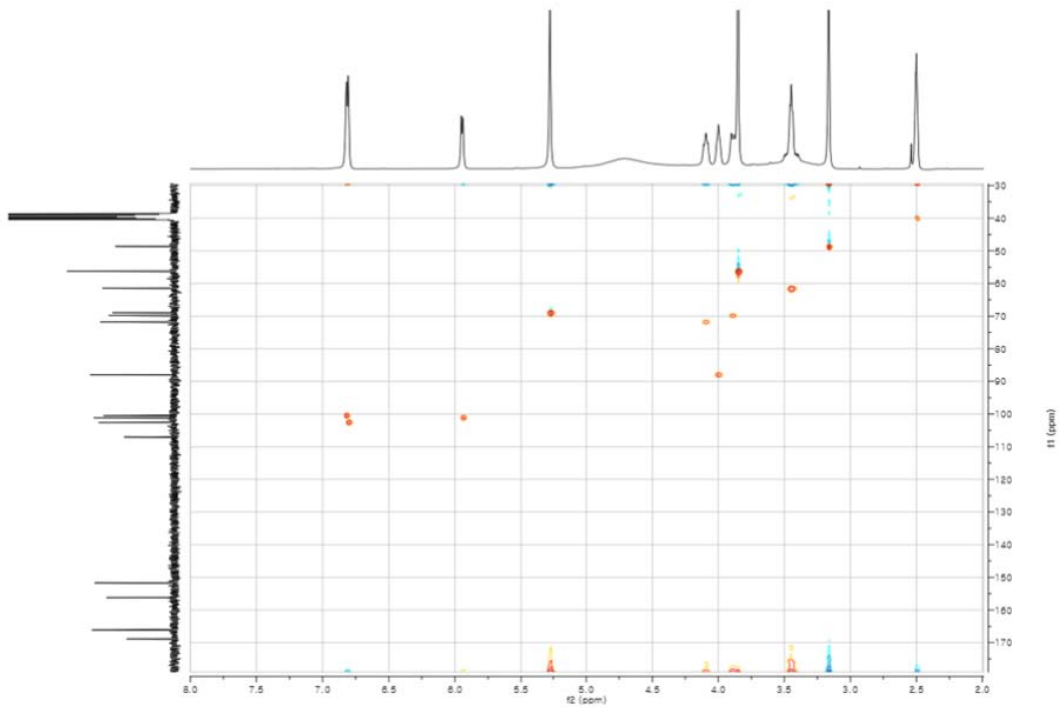
coupling constant가 3.9 Hz로 나타남에 따라 aglycone과  $\alpha$ -configuration되어져 있음을 확인하였음. 결합하고 있는 관능기들의 위치는 HMBC를 측정함으로써 결정할 수 있었음.  $\delta_H$  5.28에서 나타나는 oxymethylene이  $\delta_C$  168.89의 carboxyl carbon과  $\delta_C$  151.68, 107.05의 aromatic carbon과 correlation하여  $\gamma$ -lactonylated aromatic compound를 가지고 있음을 확인하였고, 이를 통해 phthalide skeleton임을 증명할 수 있었음. 그리고  $\delta_H$  5.95에서 나타나는 anomeric proton이  $\delta_C$  156.23과 correlation하여 당의 1번 proton인 anomeric proton이 7번 위치에 결합하고 있음을 확인하였음. 또한  $\delta_H$  3.85에서 나타나는 methoxyl proton이  $\delta_C$  166.11과 correlation하여 methoxyl기가 5번 위치에 결합하고 있음을 확인하였음. 이상의 data를 종합하여, 이 화합물을 5-methoxy-phthalide 7-O- $\alpha$ -D-ribose로 동정하였고, 신규 화합물로서 sparylde A로 명명하였음.



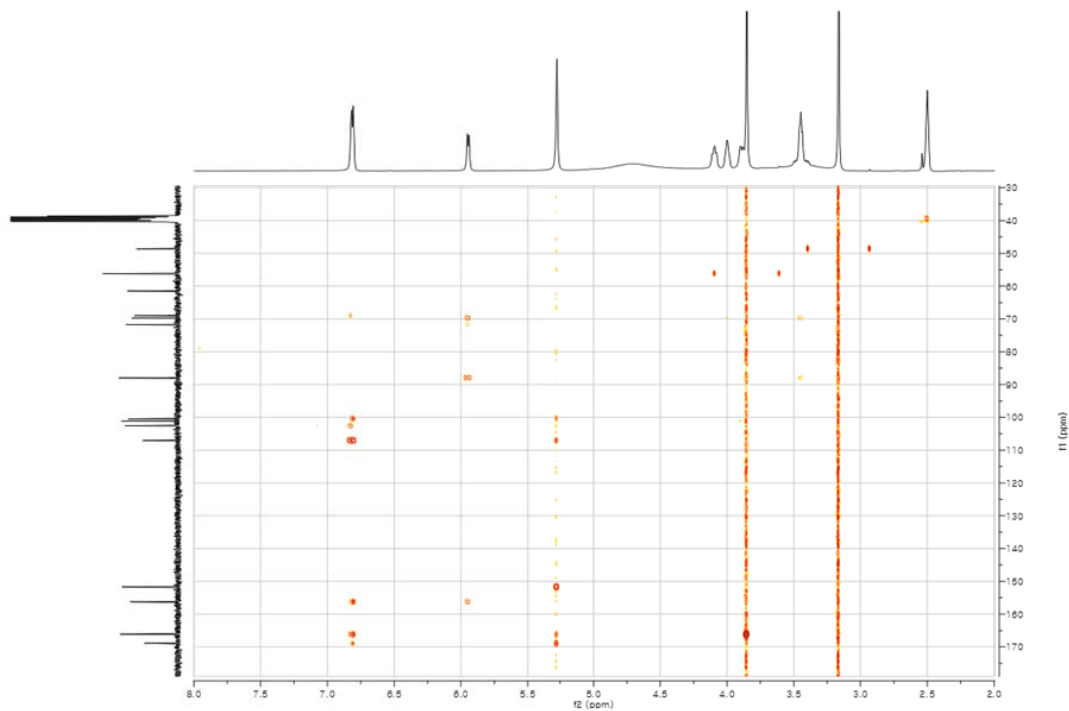
[ 화합물 3의  $^1\text{H-NMR}$  spectrum ]



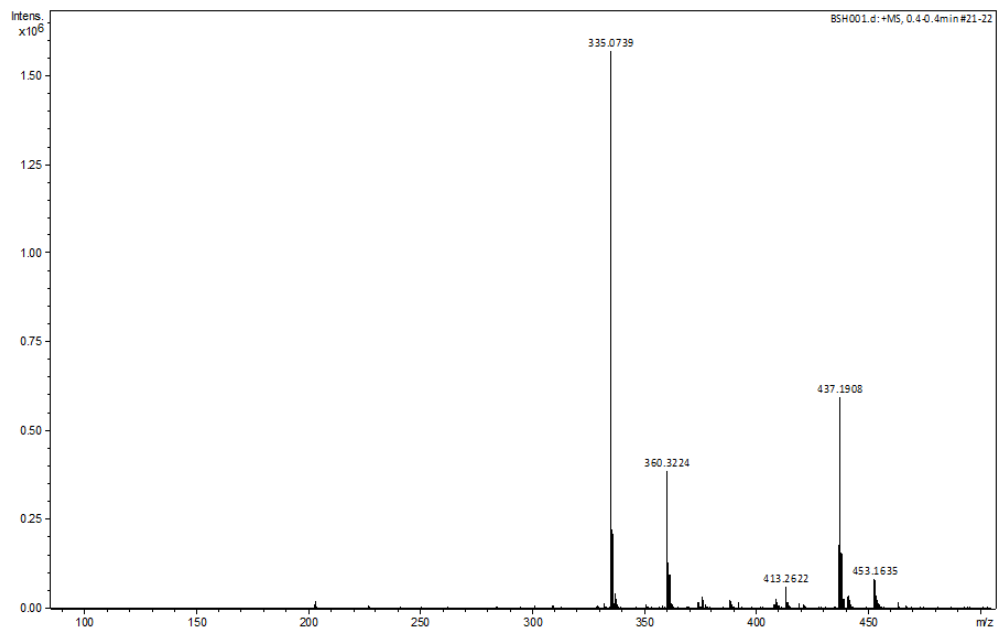
[ 화합물 3의  $^{13}\text{C}$ -NMR spectrum ]



[ 화합물 3의 HMQC spectrum ]



[화합물 3의 HMBC spectrum]

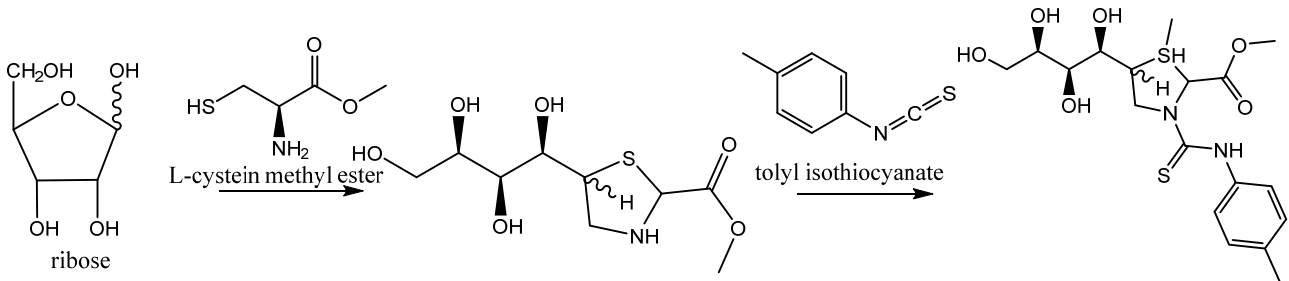


[화합물 3의 HRESIMS spectrum]

-이 화합물에 결합되어 있는 당의 종류는 표준품과의 직접 비교로 결정할 수 있었음. 이 화합물을 10% 염산으로 가수분해하여 가수분해물을 표준품과 함께 TLC (Thin Layer Chromatography)를 실시하여 결정할 수 있었음. Carbon NMR data로 이 화합물에 결합하고 있는 당은 ribose 또는 arabinose로 예상하였는데, TLC에서 RIBOSE의 표준품과 정확히 일치하였기에 결정할 수 있었음.

-결합된 당의 절대 배치 결정

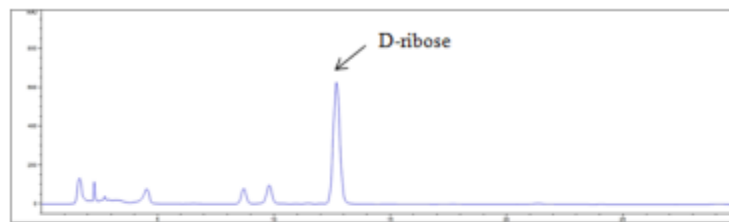
결합된 ribose가 D-form인지, L-form인지 결정하기 위하여, 이 화합물의 당 부분에 stereospecific한 물질을 다음 반응과 같이 결합시켰음.



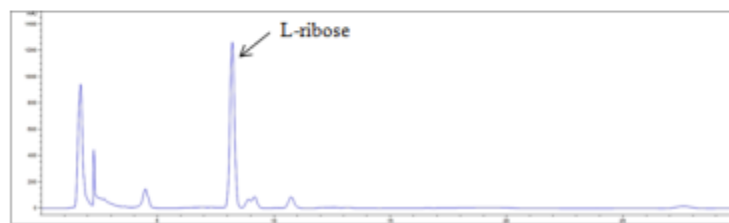
가수분해 산물을 유도체함과 동시에 시판하고 있는 표준품 D-ribose 및 L-ribose도 유도체화시켜서, HPLC에 injection하여 그 retention time을 비교하였음.

아래의 그림에서 알 수 있는 바와 같이 D-ribose 유도체가 L-ribose 유도체에 비해 3분 가량 늦게 elution 되었음. 본 화합물의 가수분해물을 표준품과 똑같은 방법으로 유도체화하여 같은 조건으로 HPLC를 실시했을 때, D-ribose 유도체와 같은 retention time에서 elution됨을 확인할 수 있었음.

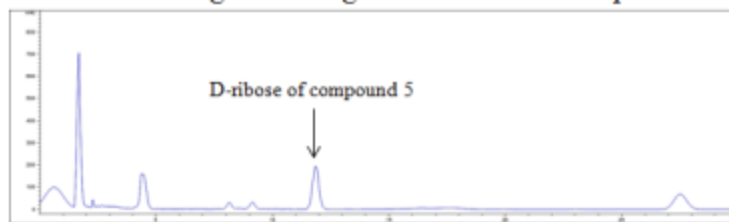
(A) HPLC chromatogram of D-ribose derivative



(B) HPLC chromatogram of L-ribose derivative



(C) HPLC chromatogram of sugar derivative of compound 5

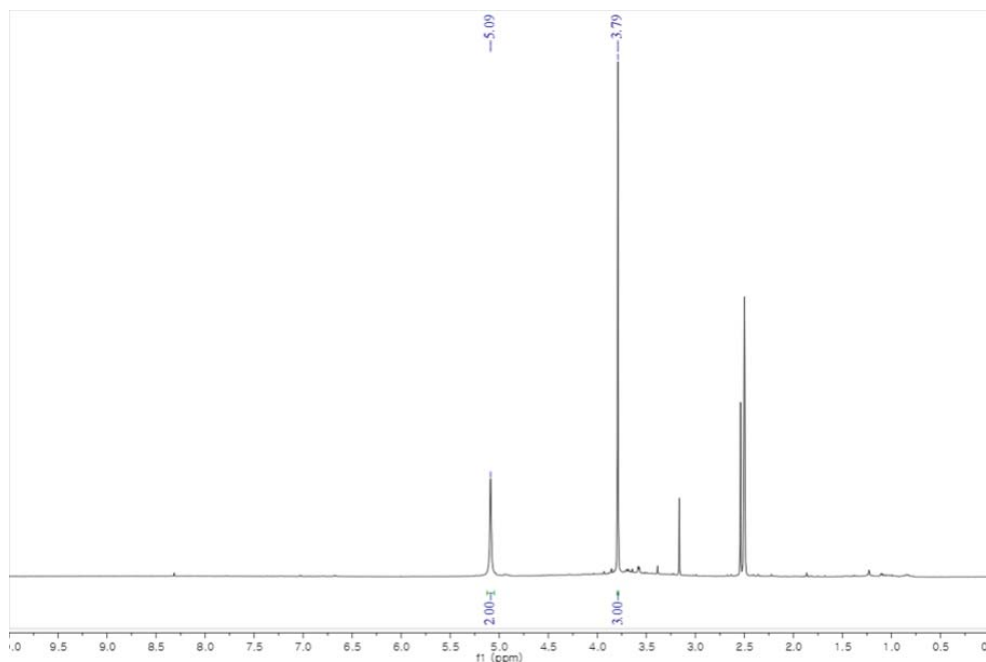


[D-ribose (A), L-ribose 표준품 (B) 및 화합물 5 가수분해물 (C)유도체의 HPLC chromatogram]

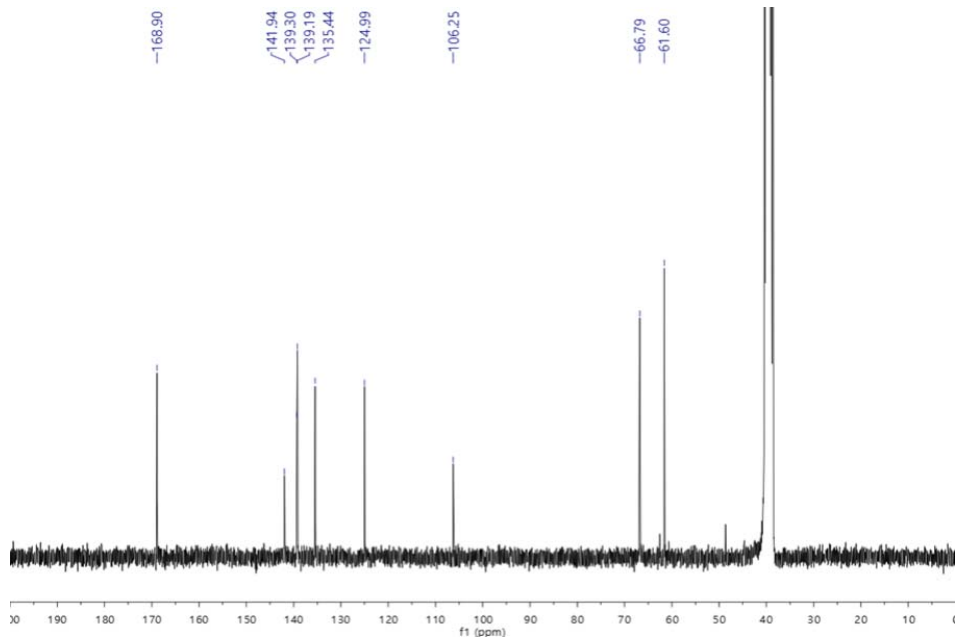
-[화합물 4] (*Sparalide B*, 6-methoxy-4,5,7-trihydroxy phthalide).

Yellow amorphous solid; HRESIMS (positive mode)  $m/z$ , 측정치 235.0212 [ $M + Na$ ]<sup>+</sup> (계산치  $C_9H_8NaO_6$ , 235.0213);  $^1H$ -NMR (500 MHz,  $DMSO-d_6$ ):  $\delta$  5.09 (1H, s, H-3), 3.79 (3H, s,  $OCH_3$ );  $^{13}C$ -NMR (125 MHz,  $DMSO-d_6$ ):  $\delta$  168.90 (C-1), 141.94 (C-7), 139.30 (C-6), 139.19 (C-5), 135.44 (C-4), 124.99 (C-3a), 106.25 (C-7a), 66.79 (C-3), 61.60 ( $OCH_3$ ); HMBCs ( $DMSO-d_6$ , H-#  $\rightarrow$  C-#)  $H_2-3 \rightarrow$  C-1, C-3a, C-4, C-5, C-7, C-7a;  $OCH_3 \rightarrow$  C-6.

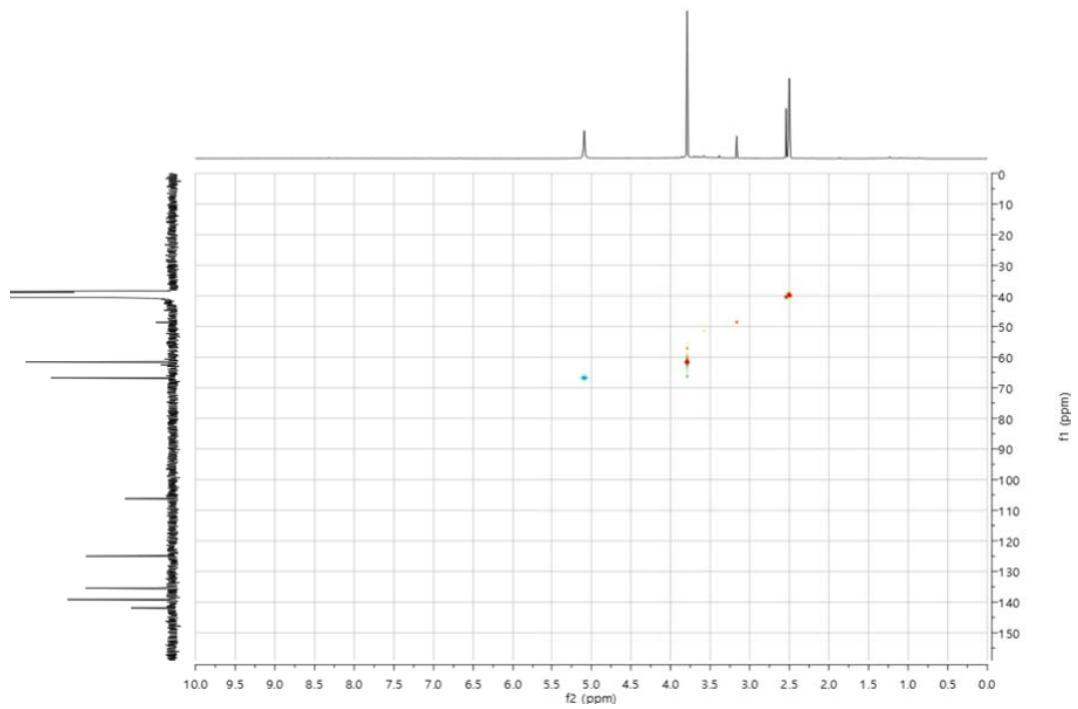
화합물4의  $^1H$ -NMR spectrum에서  $\delta$  5.09에서 oxymethylene signal과  $\delta$  3.79에서 methoxyl기를 확인하였음. 이 화합물의  $^{13}C$ -NMR spectrum에서는  $\delta$  168.90에서 carbonyl carbon과  $\delta$  141.94, 139.30, 139.19, 135.44, 124.99, 106.25에서 aromatic carbon들을 확인하였음. 이와 같은 data를 바탕으로 화합물 3과 유사한 phthalide 계열임을 추정할 수 있었음. 결합하고 있는 관능기들의 위치는 HMBC를 측정함으로써 결정할 수 있었음.  $\delta_H$  3.79의 methoxyl기와  $\delta_C$  139.31의 aromatic carbon과 correlation하여 methoxyl기가 6번 위치에 결합하고 있음을 확인하였음. 이를 종합하여 이 화합물을 6-methoxy-4,5,7-trihydroxy phthalide로 동정하였으며, 신규 화합물로 *sparalide B*로 명명하였음.



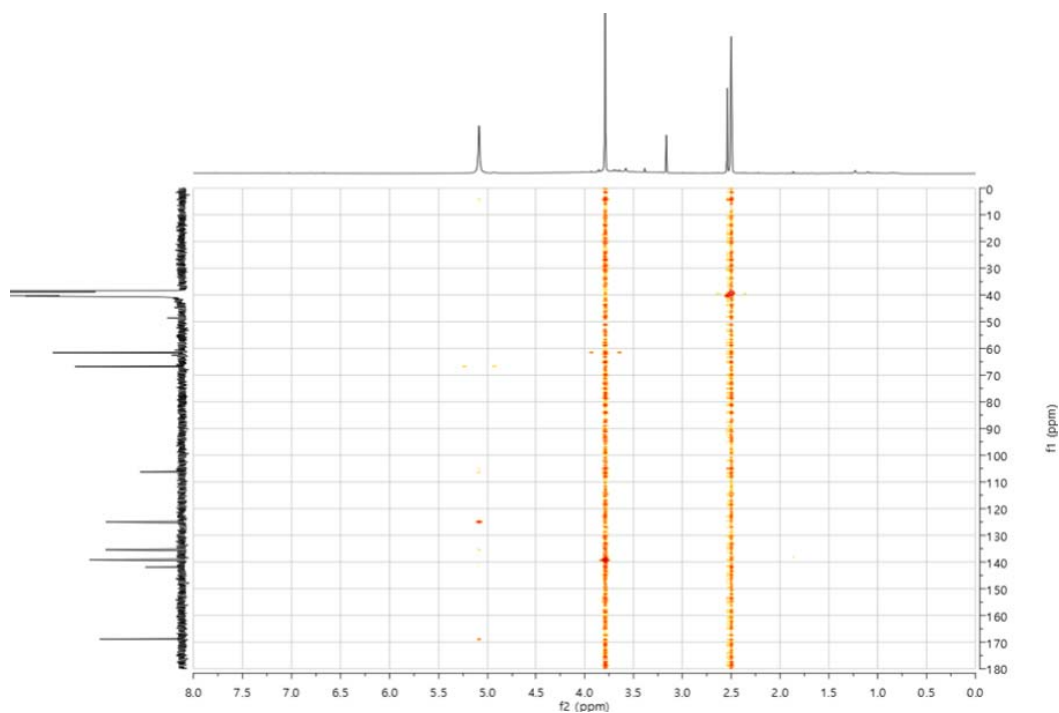
[ 화합물 4의  $^1H$ -NMR spectrum ]



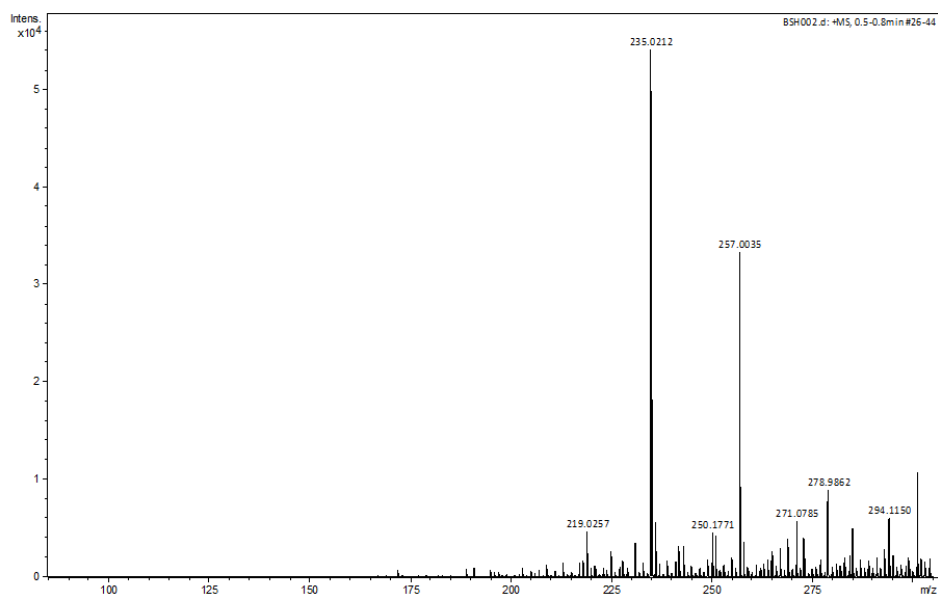
[ 화합물 4의  $^{13}\text{C}$ -NMR spectrum]



[ 화합물 4의 HMQC spectrum ]



[화합물 4의 HMBC spectrum]



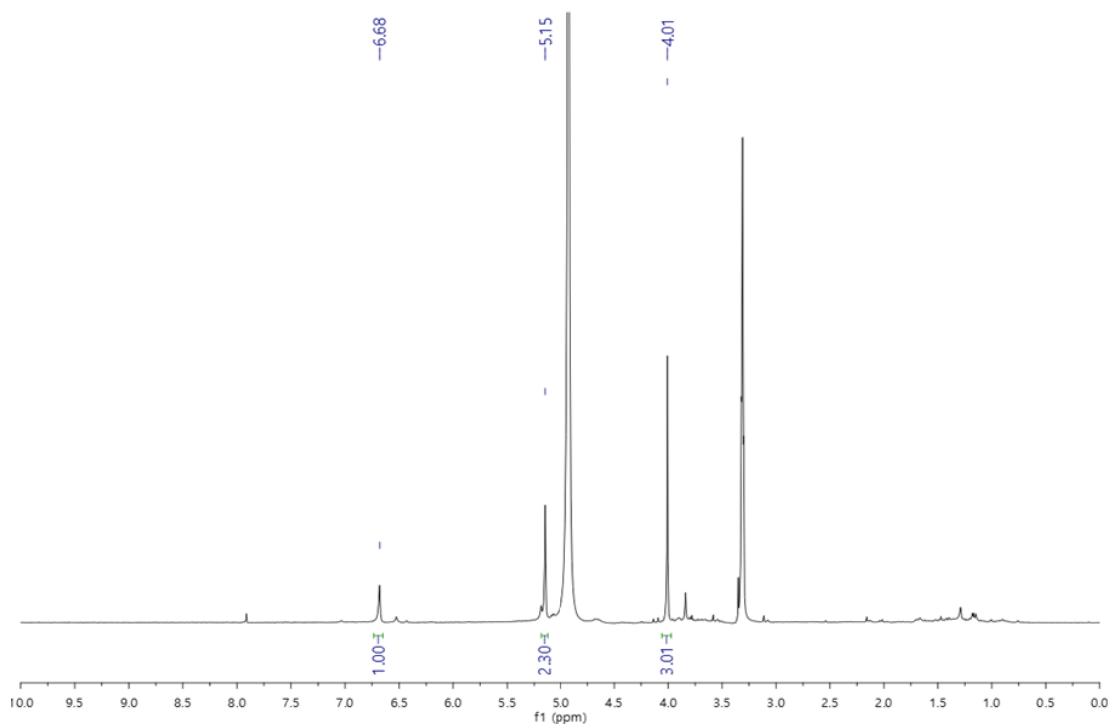
[화합물 4의 HRESIMS spectrum]

-[화합물 5] (*Sparalide C*, 5,6-dihydroxy-7-methoxy phthalide).

Colorless amorphous solid; HRESIMS (positive mode)  $m/z$ , 측정치 219.0268 [ $M + Na$ ]<sup>+</sup> (계산치  $C_9H_8NaO_5$ , 219.0264);  $^1H$ -NMR (500 MHz,  $CD_3OD$ ):  $\delta$  6.68 (1H, s, H-4), 5.15 (1H, s, H-3), 4.01 (3H, s,  $OCH_3$ );  $^{13}C$ -NMR (125 MHz,  $CD_3OD$ ):  $\delta$  172.14 (C-1), 155.49 (C-5), 147.44 (C-7), 142.32 (C-3a), 139.62 (C-6), 109.50

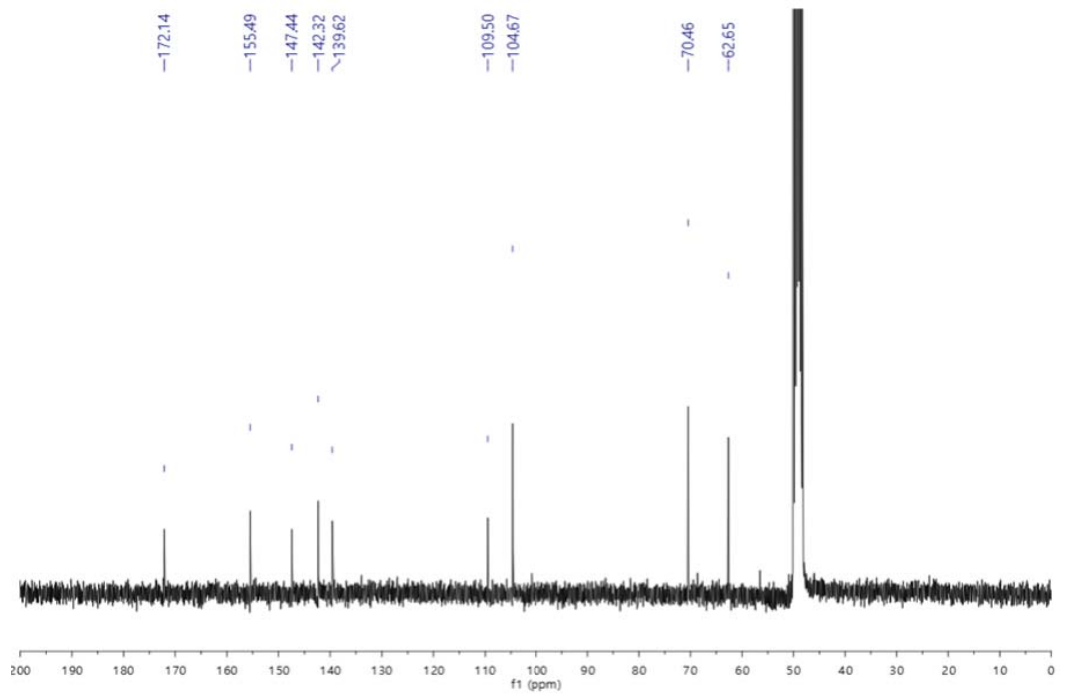
(C-7a), 104.67 (C-4), 70.46 (C-3), 62.65 (OCH<sub>3</sub>); HMBCs (CD<sub>3</sub>OD, H-# → C-#)  
H<sub>2</sub>-3 → C-1, C-3a, C-4, C-5, C-7a; H-4 → C-3, C-5, C-6, C-7a; OCH<sub>3</sub> → C-7.

화합물5의 <sup>1</sup>H-NMR spectrum에서 δ 6.68에서 aromatic proton을, δ 5.15에서 oxymethylene signal을, δ 4.01에서 methoxyl 기의 존재를 확인하였음. 이 화합물의 <sup>13</sup>C-NMR spectrum에서 carbonyl carbon을 δ 172.14에서, aromatic carbon들을 δ 155.49, 147.44, 142.32, 139.62, 109.50, 104.67에서 확인하였음. 또한 δ 70.46과 62.65에서는 oxymethylene과 methoxyl carbon의 존재를 확인하였음. 이와 같은 data를 바탕으로 phthalide계열임을 추정할 수 있었으며, 결합하고 있는 관능기들의 위치는 HMBC를 측정함으로써 결정할 수 있었음. 이를 종합하여 이 화합물을 5,6-dihydroxy-7-methoxy phthalide로 동정하였으며, 신규 화합물로서 sparalide C로 명명하였음.

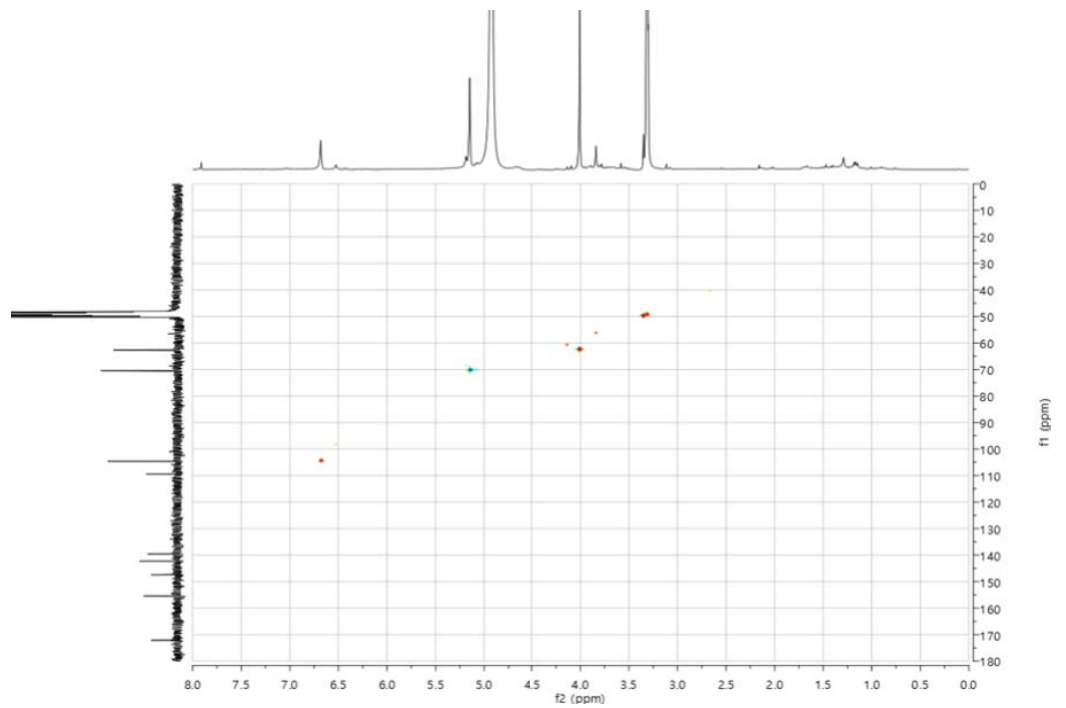


[ 화합물 5의 <sup>1</sup>H-NMR spectrum ]

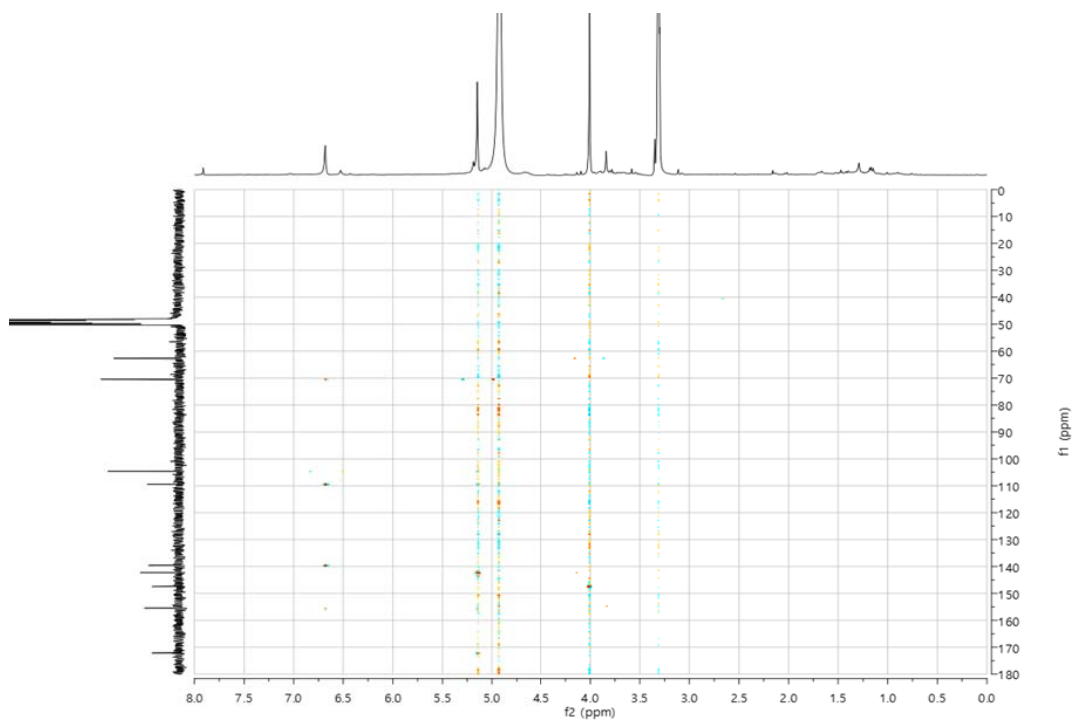




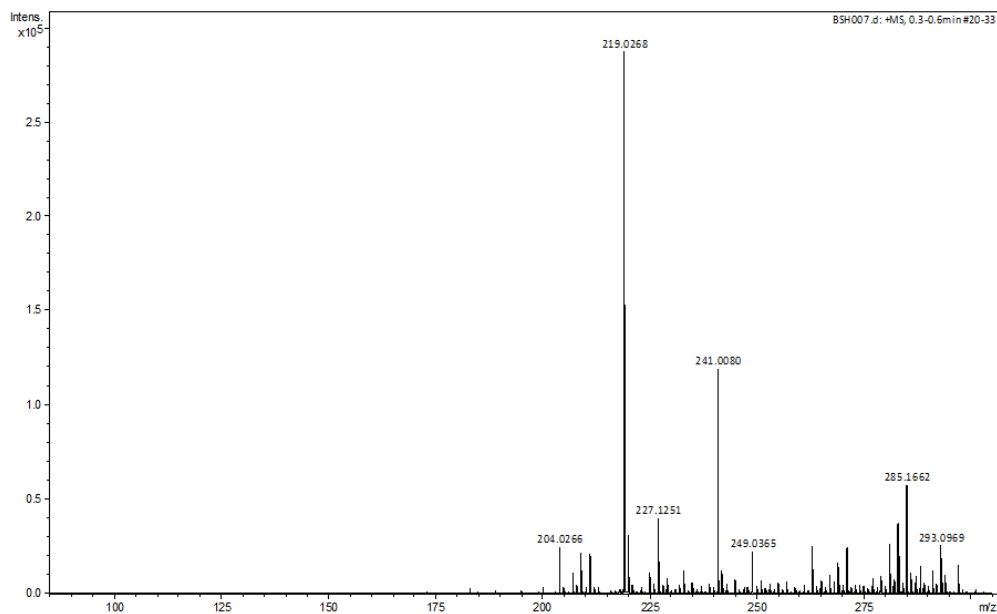
[ 화합물 5의  $^{13}\text{C}$ -NMR spectrum ]



[ 화합물 5의 HMQC spectrum ]



[ 화합물 5의 HMBC spectrum ]



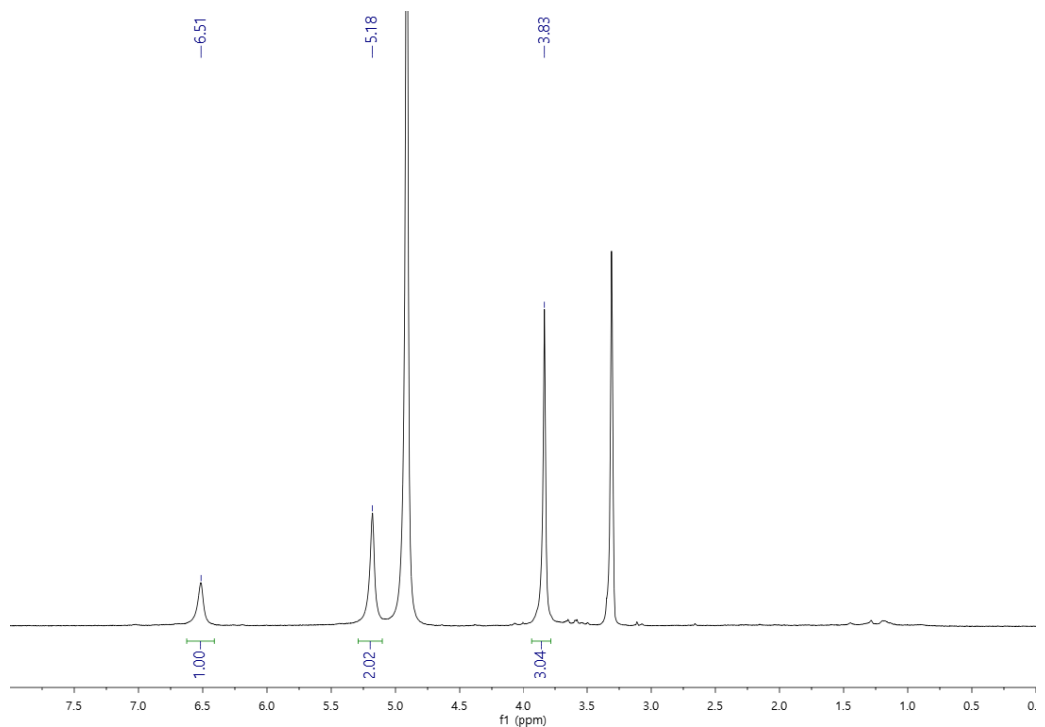
[ 화합물 5의 HRESIMS spectrum ]

-화합물 8 (*Habiratakelide A*)

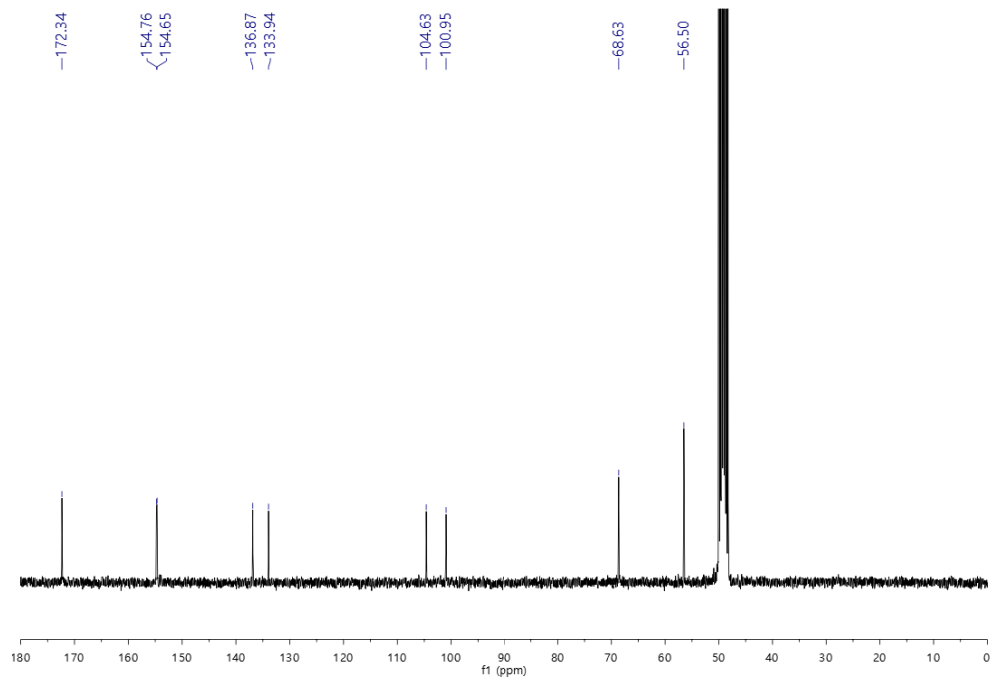
Colorless amorphous solid;  $^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta$  6.51 (1H, s, H-7), 5.18 (2H, s, H-3), 3.83 (3H, s,  $\text{OCH}_3$ );  $^{13}\text{C-NMR}$  (75 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta$  172.34 (C-1), 154.76 (C-5), 154.65 (C-6), 136.87 (C-4), 133.94 (C-3a), 104.63 (C-7a), 100.95 (C-7), 68.63 (C-2), 56.50 ( $\text{OCH}_3$ ); HMBs ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , H-#  $\rightarrow$  C-#) H<sub>2</sub>-3  $\rightarrow$  C-1,

C-3a, C-4, C-5, C-7a; H-7 → C-1, C-3a, C-5, C-7a; OCH<sub>3</sub> → C-5, C-6.

화합물8의 <sup>1</sup>H-NMR spectrum에서 δ 6.51에서 singlet으로 나타나는 aromatic proton signal을, δ 5.18에서 적분값 2로 나타나는 oxymethylene signal을, δ 3.83에서 적분값 3으로 singlet으로 나타나는 methoxyl 기의 존재를 확인하였음. 이 화합물의 <sup>13</sup>C-NMR spectrum에서 carbonyl carbon signal을 δ 172.34에서, aromatic carbon signal들을 δ 154.76, 154.65, 136.87, 133.94, 104.63, 100.95에서 확인하였음. 또한 δ 68.63과 56.50에서는 oxymethylene과 methoxyl carbon의 존재를 확인하였음. 결합하고 있는 관능기들의 위치는 HMBC를 측정함으로써 결정할 수 있었음. 이와 같은 data를 바탕으로 문헌과 비교하여 이 화합물을 꽃송이버섯에서 분리 보고된 바 있는 habiratakelide A로 동정하였음.



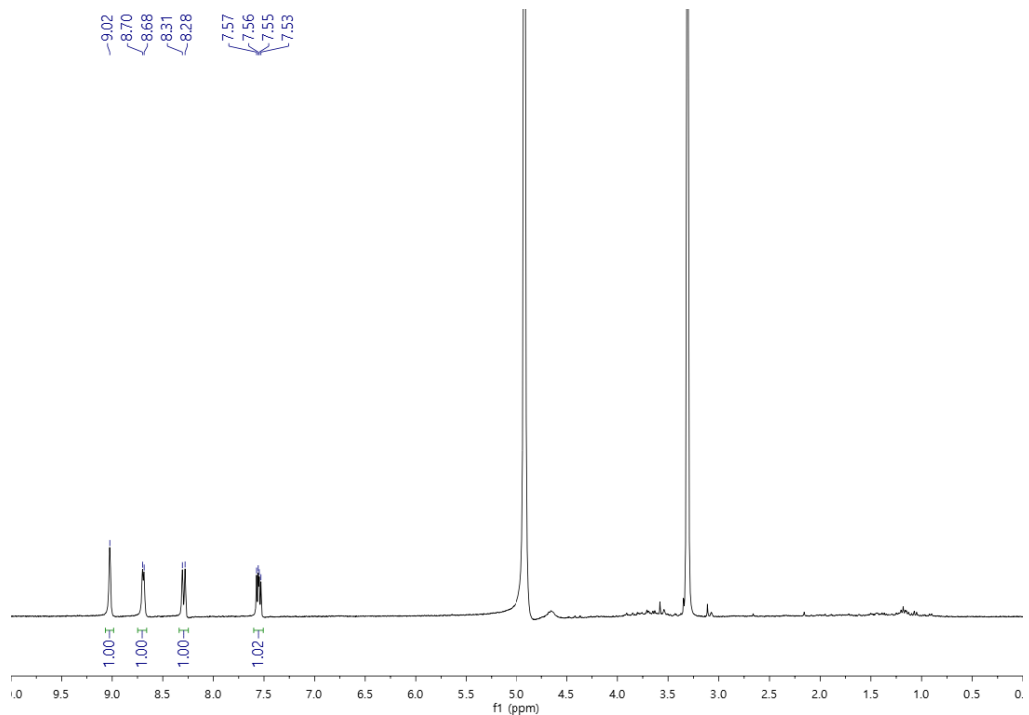
[ 화합물 8의 <sup>1</sup>H-NMR spectrum ]



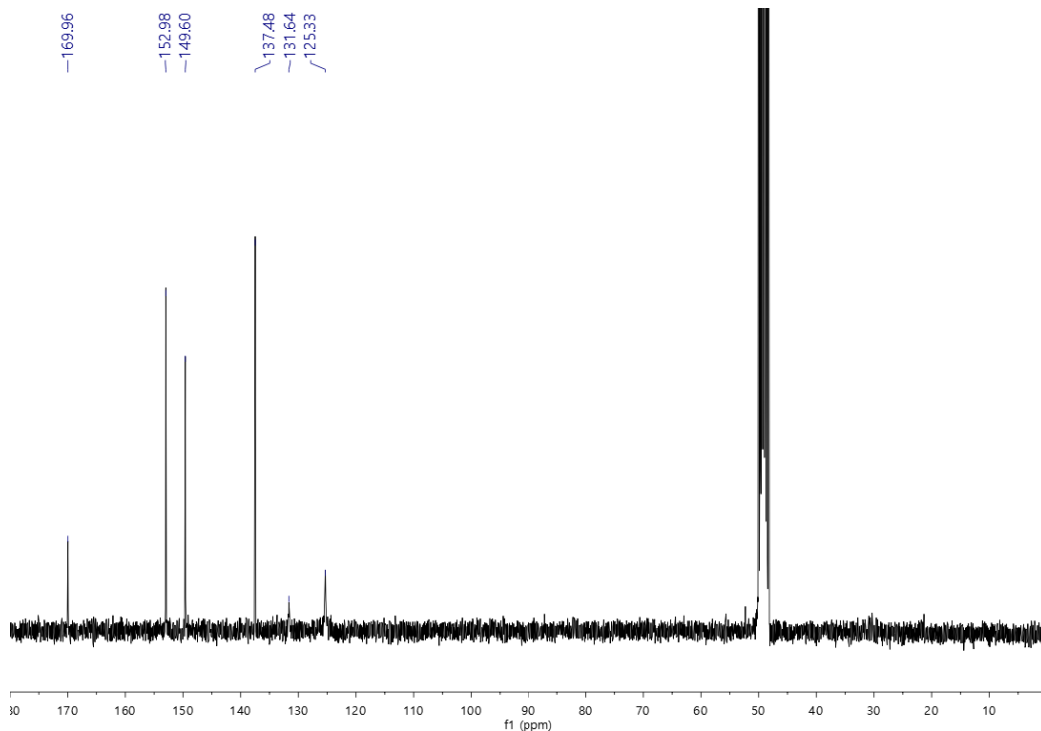
[ 화합물 8의  $^{13}\text{C}$ -NMR spectrum ]

-화합물 9 (*Nicotinamide*)

White powder;  $^1\text{H}$ -NMR (300 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta$  9.02 (1H, s, H-2), 8.69 (1H, d,  $J = 4.7$  Hz, H-6), 8.29 (1H, d,  $J = 8.0$  Hz, H-4), 7.56 (1H, dd,  $J = 4.9, 8.0$  Hz, H-6);  $^{13}\text{C}$ -NMR (75 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta$  169.96 (C-7), 152.98 (C-6), 149.60 (C-2), 137.48 (C-4), 131.64 (C-3), 125.33 (C-5).



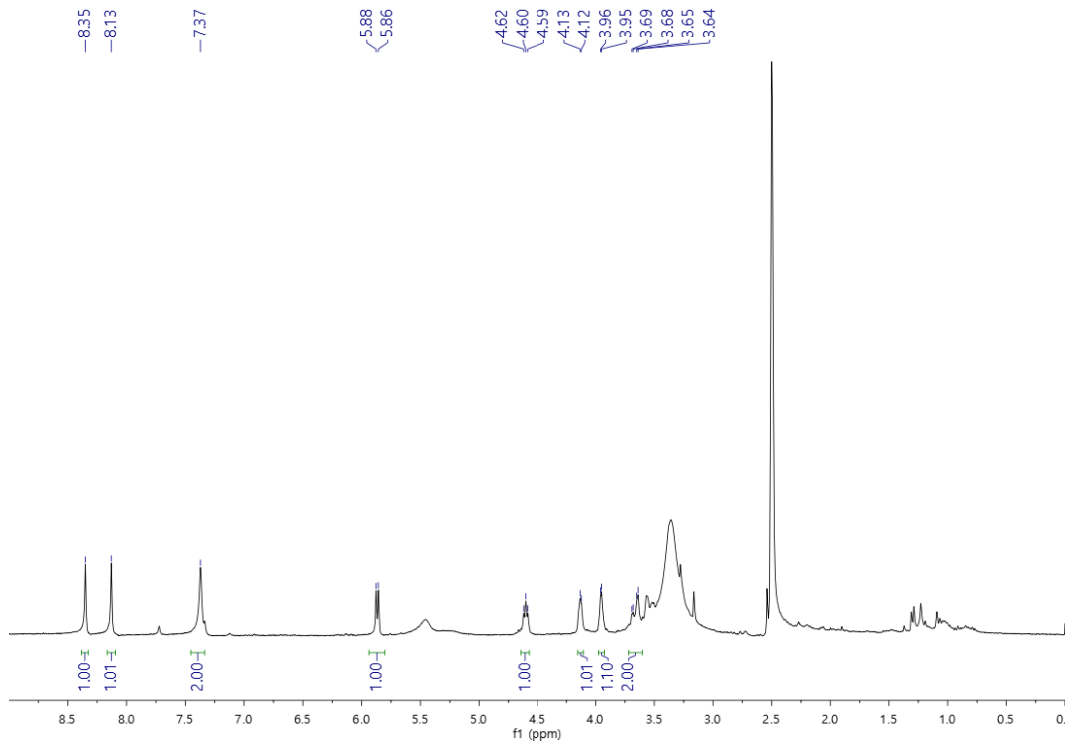
[ 화합물 9의  $^1\text{H}$ -NMR spectrum ]



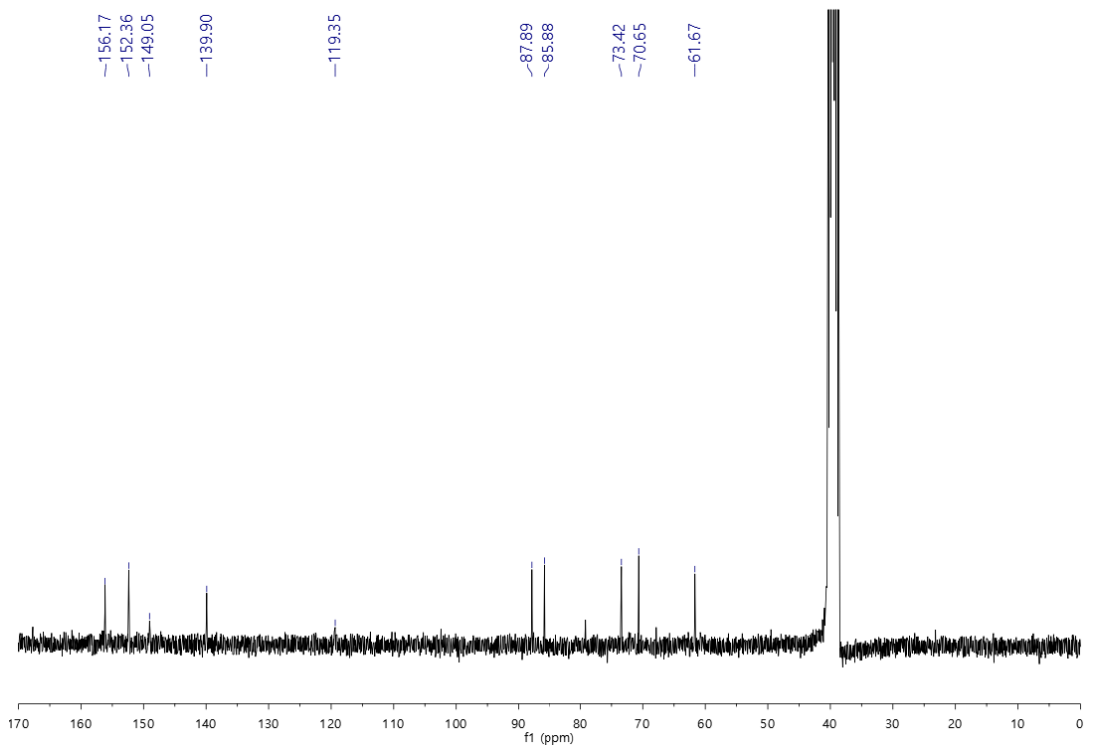
[ 화합물 9의  $^{13}\text{C}$ -NMR spectrum ]

-화합물 11 (*Adenosine*)

Colorless crystal;  $^1\text{H}$ -NMR (300 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ ):  $\delta$  8.5 (1H, s, H-5), 8.13 (1H, s, H-2), 7.37 (2H, s,  $\text{NH}_2$ ), 5.87 (1H, d,  $J = 6.5$  Hz, H-1'), 4.60 (1H, t,  $J = 6.0$  Hz, H-2'), 4.13 (1H, m, H-3'), 3.95 (1H, m, H-4'), 3.66 (2H, dd,  $J = 3.2, 12.2$  Hz, H-5');  $^{13}\text{C}$ -NMR (75 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ ):  $\delta$  156.17 (C-1), 152.36 (C-2), 149.05 (C-3), 139.90 (C-5), 119.35 (C-4), 87.89 (C-1'), 73.42 (C-2'), 70.65 (C-3'), 85.88 (C-4'), 61.67 (C-5')



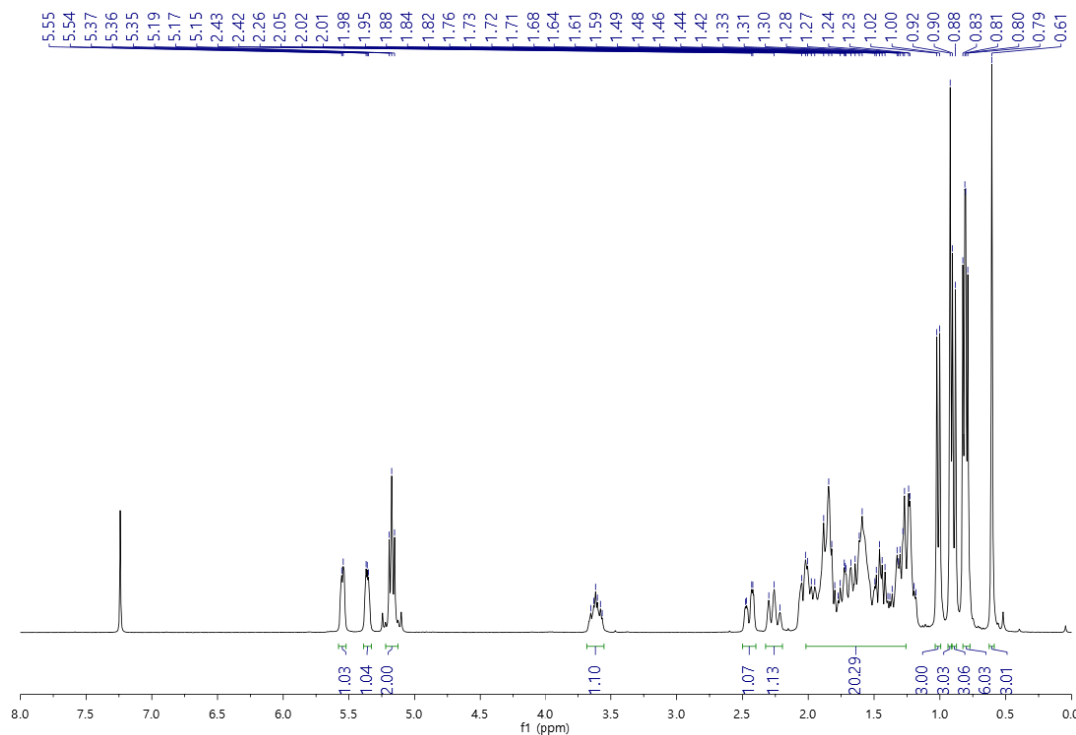
[ 화합물 11의  $^1\text{H-NMR}$  spectrum ]



[ 화합물 11의  $^{13}\text{C-NMR}$  spectrum ]

-화합물 12 (*Ergosterol*)

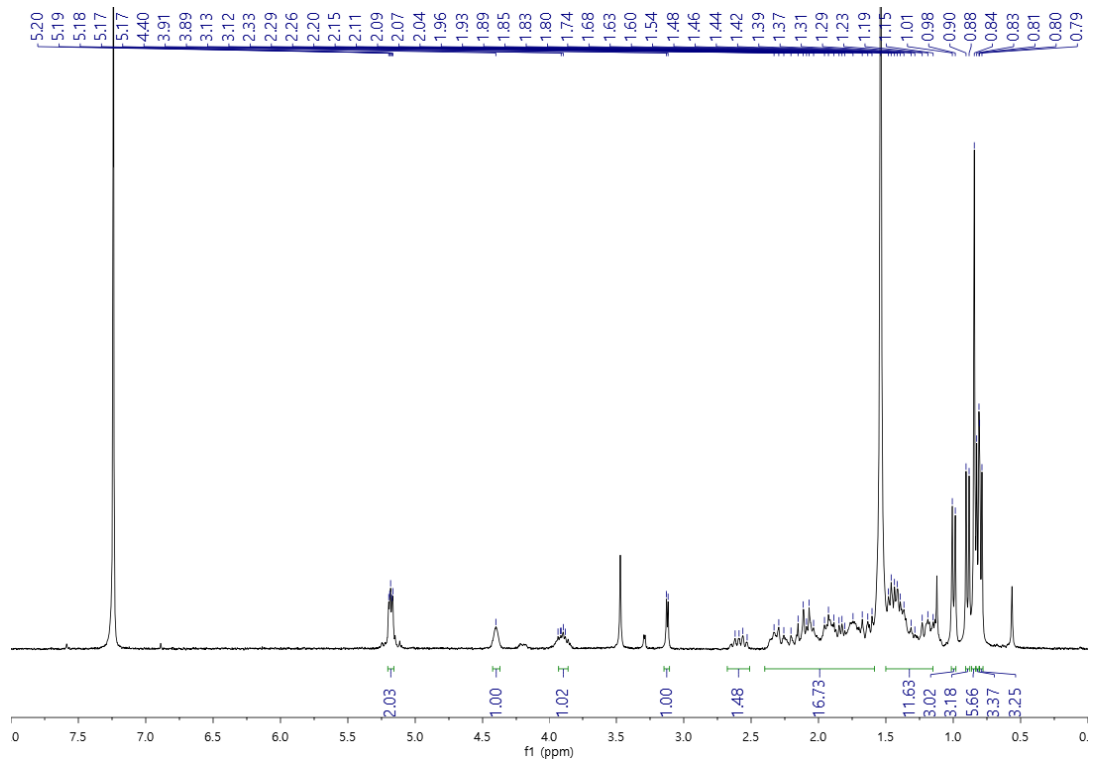
White powder;  $^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  5.54 (1H, m, H-6), 5.36 (1H, m, H-7), 5.17 (1H, t,  $J = 6.0$  Hz, H-22, 23), 3.62 (1H, m, H-3), 1.01 (3H, d,  $J = 6.0$  Hz, H-21), 0.92 (3H, s, H-19), 0.89 (1H, d,  $J = 6.0$  Hz, H-28), 0.82 (1H, d,  $J = 6.0$  Hz, H-26), 0.80 (1H, d,  $J = 6.0$  Hz, H-27), 0.61 (3H, s, H-18)



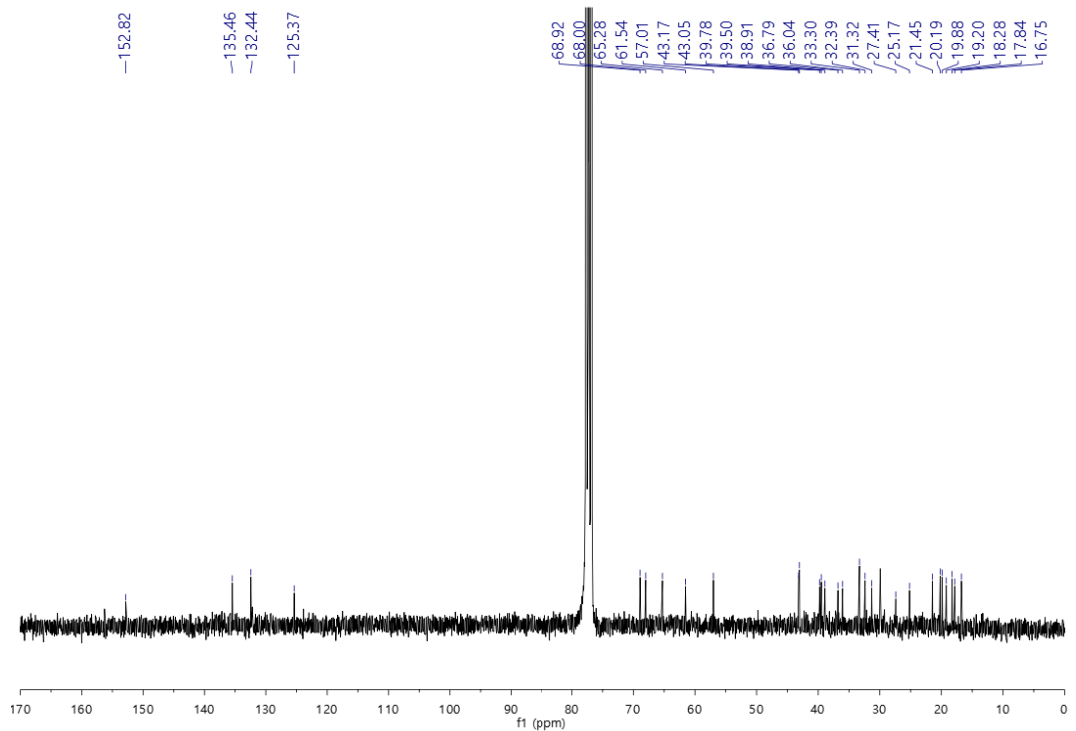
[ 화합물 12의  $^1\text{H-NMR}$  spectrum ]

-화합물 14 (*5 $\alpha$ ,6 $\alpha$ -Epoxy-(22E,24R)-ergosta-8(14),22-diene-3 $\beta$ ,7 $\beta$ -diol*)

Amorphous powder;  $^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  5.18 (1H, m, H-22, 23), 4.40 (1H, br s, H-7), 3.89 (1H, m, H-3), 3.13 (1H, d,  $J = 3.0$  Hz, H-6), 1.00 (3H, d,  $J = 6.6$  Hz, H-21), 0.84 (3H, s, H-18, 19), 0.89 (3H, d,  $J = 6.9$  Hz, H-28), 0.82 (3H, d,  $J = 5.1$  Hz, H-27), 0.78 (3H, d,  $J = 5.1$  Hz, H-26);  $^{13}\text{C-NMR}$  (75 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ):  $\delta$  152.82 (C-14), 135.46 (C-22), 132.44 (C-23), 125.37 (C-8), 68.92 (C-3), 68.0 (C-5), 61.54 (C-6), 65.28 (C-7), 57.01 (C-17), 43.17 (C-13), 43.05 (C-24), 39.78 (C-20), 39.50 (C-4), 38.91 (C-9), 36.79 (C-12), 36.04 (C-10), 33.30 (C-25), 32.39 (C-1), 31.32 (C-2), 27.41 (C-16), 25.17 (C-15), 21.45 (C-21), 20.19 (C-27), 19.88 (C-26), 19.20 (C-11), 18.28 (C-28), 17.84 (C-18), 16.75 (C-19)



[ 화합물 14의  $^1\text{H-NMR}$  spectrum ]



[ 화합물 14의  $^{13}\text{C-NMR}$  spectrum ]

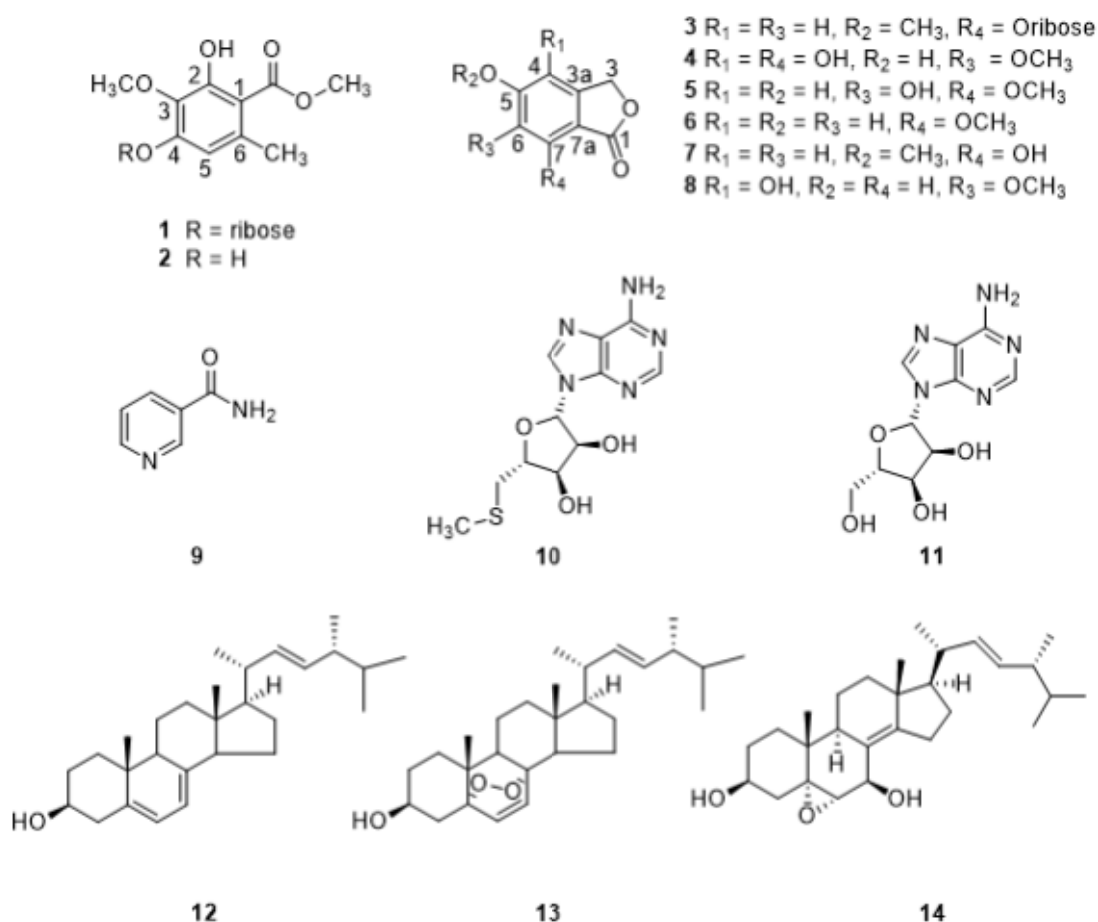


• 분리된 화합물들의 구조결정

-꽃송이버섯으로부터 분리된 화합물들은 다음과 같은 NMR (Nuclear magnetic resonance), HRESIMS (High resolution electro-spray ionization mass spectrometry) 등의 분광학적 방법을 통하여 총 14 종의 화합물의 구조를 규명하였음.

• 분리된 화합물들의 최종 구조

-꽃송이버섯으로부터 분리된 총 14 종의 화합물들의 구조는 다음과 같으며, 2-hydroxy-3-methoxy-6-methyl benzoic acid methyl ester 4-O- $\alpha$ -D-ribose, sparoside A (1), methyl 2,4-dihydroxy-3-methoxy-6-methylbenzoate (2), 5-methoxy-phthalide 7-O- $\alpha$ -D-ribose, sparalide A (3), 6-methoxy-4,5,7-trihydroxy phthalide, sparalide B (4), 5,6-dihydroxy-7-methoxy phthalide, sparalide C (5), 5-hydroxy-7-methoxyphthalide (6), 5-methoxy-7-hydroxyphthalide (7), hanabiratakeliide A, (8), nicotinamide (9), 5'-deoxy-5'-methylthioadenosine (10), adenosine (11), ergosterol (12), ergosterol peroxide (13), 5 $\alpha$ ,6 $\alpha$ -epoxy-(22E,24R)-ergosta-8(14),22-diene-3 $\beta$ ,7 $\beta$ -diol (14)로 규명하였음. 화합물 8번을 제외한 총 13 종의 화합물들이 꽃송이버섯에서 처음으로 분리되었음. 특히, 화합물 1, 3, 4, 5번은 신규 화합물로 규명하였으며, 화합물 2, 6번은 자연에서 처음으로 분리되었음.



③ 함량시험법 설정 및 분석법 밸리데이션

• 함량 시험법 분석

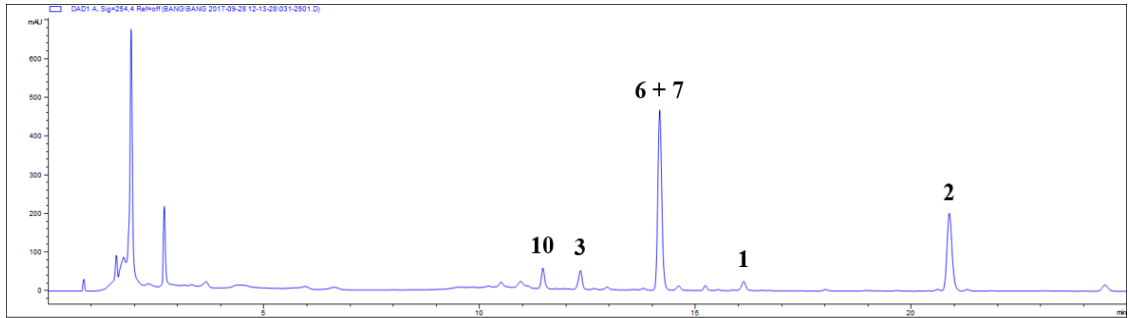
-꽃송이버섯으로부터 성분 분리 및 규명 과정을 바탕으로 이동상의 유기 용매의 종류와 조성, 기울기 용리 유무, 기울기 용리 조건 및 UV 검출 파장 등을 변화시켜 유효 성분들을 분석할 수 있는 최적화된 HPLC 분석 방법을 다음과 같이 설정함. HPLC 기종은 Agilent Technologies사의 quaternary pump (G1311C), auto sampler (G1329B), column oven (G1316A), photodiode array (PDA) detector (G1315D)로 구성되어진 1260 infinity HPLC system을 사용함. Column은 Agilent Technologies사의 직경 4.6 mm, 길이 150 mm인 Eclipse XDB-C18을 사용하였으며, 온도는 30 °C로 설정함. 분석 조건은 유속 0.8 mL/min로, 처음 5 분간 5% acetonitrile로, 그 후 2 분간 5% acetonitrile에서 15% acetonitrile로, 그 후 8 분간 15% acetonitrile에서 35% acetonitrile로, 그 후 10 분간 35% acetonitrile에서 50% acetonitrile로 기울기 용리시킴. UV 검출 파장은 254 nm로 설정함.

Table 1. HPLC를 이용한 함량 분석을 위한 조건

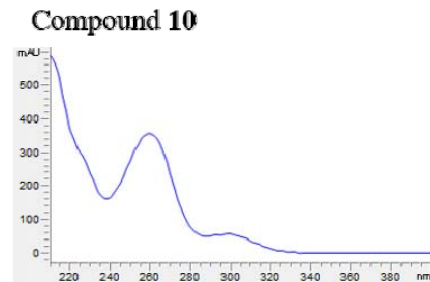
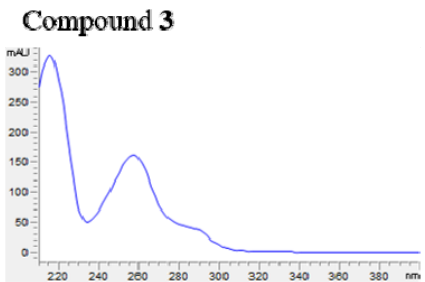
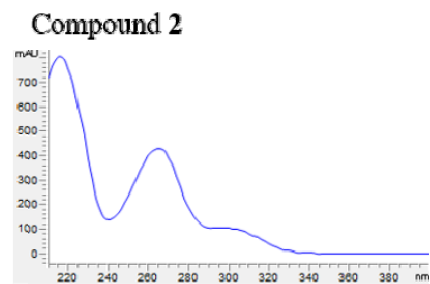
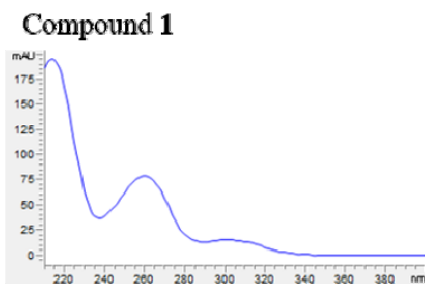
HPLC 기종	1260 infinity HPLC system (quaternary pump, auto sampler, column oven, photodiode array (PDA) detector)
Column	Eclipse XDB-C18 (4.6 x 150 mm) 온도 (30 °C)
Method	5% acetonitrile (0-5 분) 5% acetonitrile - 15% acetonitrile (5-7 분) 15% acetonitrile - 35% acetonitrile (7-15 분) 35% acetonitrile - 50% acetonitrile (15-25 분)
Flow rate (mL/min)	0.8
UV (nm)	254

-본 시료를 알코올로 추출한 후 추출물을 최적화된 HPLC 분석방법을 통하여 분석함. 지표 성분을 설정하기 위하여 chromatogram상의 각각의 peak들을 spiking 기술과 UV 분석을 통하여 성분 프로파일링함. 그 결과, 11.5 분에 나타나는 peak는 화합물 10 (5' -deoxy-5' -methylthioadenosine), 12.3 분에 나타나는 peak는 화합물 3 (5-methoxy-phthalide 7-O- $\alpha$ -D-ribose, sparalide A), 16.1 분에 나타나는 peak는 화합물 1 (2-hydroxy-3-methoxy-6-methyl benzoic acid methyl ester 4-O- $\alpha$ -D-ribose, sparoside A), 20.9 분에 나타나는 peak는 화합물 2 (methyl 2,4-dihydroxy-3-methoxy-6-methylbenzoate)로 확인됨. 주성분으로 관찰되는 14.1 분에 나타나는 peak는 화합물 6과 7 (5-hydroxy-7-methoxyphthalide, 5-methoxy-7-hydroxyphthalide)이 혼재되어 있는 것으로 확인되었으나, 다양한 분석 조건을

적용하였음에도 불구하고 분리되지 않아 지표 성분에서 제외함. 따라서 꽃송이버섯에서 분리되어진 4가지 성분 2-hydroxy-3-methoxy-6-methyl benzoic acid methyl ester 4-O- $\alpha$ -D-ribose, sparsoside A (1), methyl 2,4-dihydroxy-3-methoxy-6-methylbenzoate (2), 5-methoxy-phthalide 7-O- $\alpha$ -D-ribose, sparsalide A (3), 5'-deoxy-5'-methylthioadenosine (10) 을 지표 성분으로 설정함.



[ 발효 전 꽃송이버섯 추출물의 chromatogram ]



[ 지표 성분으로 설정된 화합물들의 UV spectrum ]

• 분석법 밸리데이션

-최적화된 HPLC분석 방법을 검증 (validation)하기 위하여 선택성 (selectivity), 직선성 (linearity), 검출한계 및 정량한계 (LOD; limit of detection, LOQ; limit of quantification), 피크면적의 반복성 (repeatability) 등의 항목에 대하여 실시함.

▶선택성 (Selectivity) : 꽃송이버섯의 4가지 지표 성분이 다른 피크의 어떠한 간섭을 받지 않고 분리되는지를 확인함.

▶직선성 (Linearity) : 꽃송이버섯의 4가지 지표 성분에 대하여 31.25 ~ 1000

$\mu\text{g/mL}$  내의 농도 범위에서 각 성분마다 검량선 (calibration curve)을 작성함. 모든 성분에 대하여 검량선의 상관계수 ( $r^2$ )가 0.99 이상의 직선성을 나타내는지 확인함.

- ▶ 검출한계 및 정량한계 (LOD; limit of detection, LOQ; limit of quantification) : 꽃송이버섯의 4가지 지표성분이 크로마토그램상에서 신호대 잡음비 (S/N ratio)가 3 이상인 것을 LOD로, 신호대 잡음비 (S/N ratio)가 10 이상인 것을 LOQ로 설정함.
- ▶ 피크면적의 반복성 (Repeatability) : 분석기기의 시간에 따른 변화 정도를 보기 위하여 꽃송이버섯의 4가지 지표 성분을 연속 분석하여 머무름 시간 (retention time)과 피크면적의 변화 정도를 평가함.

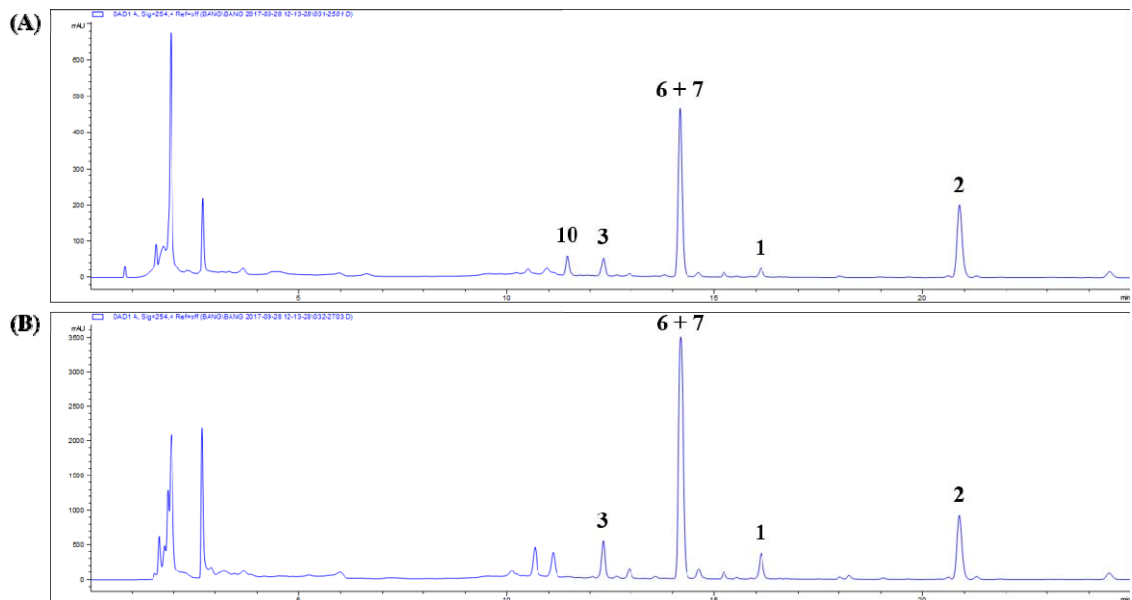
-Chromatogram상에서 확인할 수 있듯이 꽃송이버섯의 4가지 지표 성분이 다른 피크와 어떠한 간섭 없이 분리되고 피크의 시간과 면적이 일정하게 분석되어짐에 따라 선택성과 반복성을 확인하였음. 화합물 10 (5'-deoxy-5'-methylthioadenosine)의 머무름 시간은 11.5 분, 화합물 3 (5-methoxy-phthalide 7-O- $\alpha$ -D-ribose, sparalide A)의 머무름 시간은 12. 분, 화합물 1 (2-hydroxy-3-methoxy-6-methyl benzoic acid methyl ester 4-O- $\alpha$ -D-ribose, sparoside A)의 머무름 시간은 16.1분, 화합물 2 (methyl 2,4-dihydroxy-3-methoxy-6-methylbenzoate)의 머무름 시간은 20.9 분으로 분리되었음. 또한, 꽃송이버섯의 4가지 지표 성분에 대하여  $31.25 \sim 1000 \mu\text{g/mL}$  내의 농도 범위에서 검량선을 작성하였으며, 검량선의 상관계수가 0.99 이상으로 직선성을 확인하였음. 그리고 꽃송이버섯의 4가지 지표 성분에 대한 검출한계는  $0.19 \sim 2.11 \mu\text{g/mL}$ 내, 정량한계는  $0.65 \sim 7.04 \mu\text{g/mL}$ 내로 각각 설정함.

Table 2. HPLC 분석 방법에 대한 검증 (validation)

Analytes	Regression equation	$r^2$	LOD ( $\mu\text{g/mL}$ )	LOQ ( $\mu\text{g/mL}$ )
sparoside A (1)	$y=7.0742x+223.6750$	0.998 2	1.1361	3.7871
methyl 2,4-dihydroxy-3-methoxy-6-methylbenzoate (2)	$y=19.2083x+842.9000$	0.997 2	0.4022	1.3405
sparalide A (3)	$y=22.6554x+332.4736$	0.998 9	0.1949	0.6498
5'-deoxy-5'-methylthioadenosine (10)	$y=5.7248x+68.5083$	0.999 2	2.1115	7.0383

④ 발효에 따른 이차대사산물들의 함량 분석

- 본 시료를 *Lactobacillus acidophilus*로 발효시킨 후 알코올로 추출한 추출물을 획득함. 본 시료의 발효 전과 발효 후의 추출물을 비교 분석하기 위해 validation 되어진 HPLC 분석방법으로 동일하게 분석함. 그 결과, 12.3 분에 나타나는 peak는 화합물 3 (5-methoxy-phthalide 7-O- $\alpha$ -D-ribose, sparalide A), 16.1 분에 나타나는 peak는 화합물 1 (2-hydroxy-3-methoxy-6-methyl benzoic acid methyl ester 4-O- $\alpha$ -D-ribose, sparoside A), 20.9 분에 나타나는 peak는 화합물 2 (methyl 2,4-dihydroxy-3-methoxy-6-methylbenzoate), 14.1 분에 나타나는 peak는 화합물 6 과 7 (5-hydroxy-7-methoxyphthalide, 5-methoxy-7-hydroxyphthalide)이 혼재되어 있는 것까지 발효 전과 동일하게 확인함. 반면에, 11.5 분에 나타나는 peak는 화합물 10 (5' -deoxy-5' -methylthioadenosine)은 검출되지 않음.



[발효 전 (A)과 발효 후(B)의 꽃송이버섯 추출물 비교]

- 발효 전과 발효 후의 성분 프로파일링 분석 결과를 바탕으로, 발효전과 발효 후의 성분 함량 분석을 실시함. 확립된 HPLC 분석법에 적용하여 꽃송이버섯의 4가지 지표 성분의 피크 면적을 구한 후, 미리 작성한 검량선에 피크 면적비를 대입하여 함량을 구함. 분석 시료는 3회 반복하여 분석함. 시료의 함량 분석 결과, 발효 전 꽃송이버섯의 4가지 지표 성분인 2-hydroxy-3-methoxy-6-methyl benzoic acid methyl ester 4-O- $\alpha$ -D-ribose, sparoside A (1)은  $0.1928 \pm 0.0118$  mg/g, methyl 2,4-dihydroxy-3-methoxy-6-methylbenzoate (2)은  $4.4137 \pm 0.0240$  mg/g, 5-methoxy-phthalide 7-O- $\alpha$ -D-ribose, sparalide A (3)은  $0.5237 \pm 0.0005$  mg/g, 5' -deoxy-5' -methylthioadenosine (10)은  $2.7303 \pm 0.0206$  mg/g으로 나타남. 발효 후 꽃송이버섯의 4가지 지표 성분인 2-hydroxy-3-methoxy-6-methyl benzoic acid

methyl ester 4-O- $\alpha$ -D-ribose, sparoside A (1)은  $1.5416 \pm 0.0097$  mg/g, methyl 2,4-dihydroxy-3-methoxy-6-methylbenzoate (2)은  $9.1334 \pm 0.0949$  mg/g, 5-methoxy-phthalide 7-O- $\alpha$ -D-ribose, sparalide A (3)은  $1.3563 \pm 0.0134$  mg/g 나타남. 반면 지표 성분으로 설정된 화합물 10 (5'-deoxy-5'-methylthioadenosine)은 발효 후 추출물에서는 검출되지 않음. 화합물 10을 제외하고 화합물 1, 2, 3은 발효 전과 함량 비교하였을 때, 발효 후에 2-5 배 증가함을 확인함.

Table 3. 발효 전 (A)과 발효 후(B)의 꽃송이버섯의 지표 성분에 대한 함량 비교

Compounds	Contents (mg/g)	
	Before fermentation	After fermentation
sparoside A (1)	$0.1928 \pm 0.0118$	$1.5416 \pm 0.0097$
methyl 2,4-dihydroxy-3-methoxy-6-methylbenzoate (2)	$4.4137 \pm 0.0240$	$9.1334 \pm 0.0949$
sparalide A (3)	$0.5237 \pm 0.0005$	$1.3563 \pm 0.0134$
5'-deoxy-5'-methylthioadenosine (10)	$2.7303 \pm 0.0206$	Not detected

#### ⑤ 베타 글루칸의 함량 분석

- 베타글루칸 함량 분석

$\beta$ -glucan 분석은 Mushroom and Yeast beta-glucan kit(Megazyme, K-YBGL)를 사용하여  $\beta$ -glucan 분석법에 따라 실험하였음.

- 시료의 조제

-4M 수산화나트륨용액 (sodium hydroxide solution) 수산화나트륨 80 g을 증류수로 용해하여 500 mL로 정용함.

-200mM 초산완충액 (Acetate buffer, pH 5.0) 초산 11.6 mL를 900 mL 증류수에 용해한 후 4M 수산화나트륨용액으로 pH를 5.0으로 맞추어 1 L로 정용함.

-1.2M 초산완충액 (Acetate buffer, pH 3.8) 초산 69.6 mL를 800 mL 증류수에 용해한 후 4M 수산화나트륨용액으로 pH를 3.8로 맞추어 1 L로 정용함.

-2M 수산화칼륨용액 (potassium hydroxide solution) 수산화칼륨 112 g을 증류수로 용해하여 1 L로 정용함.

-10M 수산화칼륨용액 (potassium hydroxide solution) 수산화칼륨 561 g을 증류수로 용해하여 1 L로 정용함.

-12M 황산 (Sulphuric acid, 70% w/w) 황산 640 mL를 증류수 300 mL에 조심스럽게 넣어주고, 증류수 1 L로 희석함.

-표준물질은 D-glucose ( $C_6H_{12}O_6$ , 분자량: 180.16, CAS No. :50-99-7)이고, Megazyme에서 제공하는 D-glucose standard solution(5mL, 1.00 mg/mL)을 표준물질로 사용함.

-추출물 제조은 꽃송이버섯의 추출은 70%주정을 이용하여 70도씨에서 3시간 추출 후 냉각 여과시킨 후, 감압농축하여 사용하였음.

• 실험 과정

-시료 90 mg에 12M sulphuric acid 2 mL를 넣고 덩어리가 생기지 않도록 강하게 교반한 후 ice/water bath에서 2시간 반응시킴. 이후 증류수 10 mL를 첨가하고 강하게 교반 한 후 시험관 뚜껑을 완전히 닫지 않은 상태로 100°C water bath에서 5분간 방치한 후 뚜껑을 완전히 닫아 2시간 반응시킴. 이 반응액을 상온에서 식힌 후 200 mM sodium acetate buffer (pH 5.0)를 사용하여 100 mL로 정용하고, 원심분리 (1,500\*g, 10분)하여 상등액을 취함.

-상등액 0.1 mL을 새로운 5 mL 시험관에 옮긴 후  $\beta$ -Glucan 효소혼합액 (exo-1,3- $\beta$ -Glucanase (100 U/mL) +  $\beta$ -Glucosidase (20 U/mL), Megazyme)을 각 시험관에 0.1 mL를 가하고 40°C water bath에서 60분간 반응시킴. 이 반응액에 GOPOD (glucose oxidase/peroxidase, Megazyme) 시약 3 mL를 넣고 40°C에서 20분간 반응시킨 후 파장 510 nm에서 흡광도를 측정하여 total glucan 함량의 계산에 사용하였음.

-또한 시료 100 mg에 2M KOH 2 mL를 넣고 ice/water bath에서 stirrer를 이용하여 20분 동안 강하게 교반한다. 이 반응액에 1.2M sodium acetate buffer (pH 3.8) 8 mL를 가하여 강하게 교반한 후 알파글루칸 효소혼합액 (Amylo glucosidase (1,630 U/mL) + invertase (500 U/mL), Megazyme) 0.2 mL를 가하여 40°C water bath에서 30분간 반응시킨 후 원심분리(1,500\*g, 10분)하여 상등액을 얻음. 상등액 0.1 mL을 새로운 5 mL 시험관에 옮긴 후 0.2M sodium acetate buffer (pH 5) 0.1M과 GOPOD(glucose oxidase/peroxidase, Megazyme) 시약 3 mL를 넣고 40°C에서 20분간 반응시킨 후 파장 510 nm에서 흡광도를 측정하여  $\alpha$ -glucan 함량의 계산에 사용하였음.

-증류수 0.1 mL과 200 mM sodium acetate buffer (pH 5) 0.1 mL을 혼합하여 대조액으로 만들고, GOPOD (glucose oxidase/peroxidase, Megazyme) 시약 3 mL를 넣고 40°C에서 20분간 반응시킨 후 파장 510 nm에서 흡광도를 측정하여 계산에 사용하였음. D-glucose standard solution 0.1 mL와 200 mM sodium acetate buffer (pH 5) 0.1 mL을 혼합하여 D-glucose standard로 만들고, GOPOD(glucose oxidase/peroxidase, Megazyme) 시약 3 mL를 넣고 40°C에서 20분간 반응시킨 후 파장 510 nm에서 흡광도를 측정하여 계산에 사용하였음.

$\beta$ -Glucan 함량은 total glucan 함량에서  $\alpha$ -glucan 함량을 빼준 값으로 계산하였음.

$\beta$ -glucan, %(w/w)

$$= (\Delta E \times F \times 50/0.05 \times 1/1000 \times 100/W \times 162/180)_{\text{total-glucan}} - (\Delta E \times F \times 103 \times 1/1000 \times 100/W \times 162/180)_{\alpha\text{-glucan}}$$

$\Delta E$ : 시료의 흡광도 - 공시료(blank)의 흡광도

F: 흡광도를 D-glucose의 ug으로 환산하기 위한 계수

W: 시료의 무게(mg)

162/180: 유리상태 glucose분자량으로부터  $\beta$ -glucan분자와 같이 무수상태의 glucose 분자 량으로 전환하기 위한 계수

- $\beta$ -Glucan 함량 분석 결과  
-원물의 베타글루칸 함량

Table 6. 꽃송이버섯 원물의  $\beta$ -glucan함량 (unit : %)

Sample No.	Total glucan	alpha-glucan	beta-glucan
SEP-01	4.51	0.95	3.56 ± 0.85
SEP-02	5.51	0.86	4.65 ± 0.92
SEP-03	5.06	0.74	4.32 ± 1.01
Average	5.03	0.85	4.18 ± 0.93

\*sample number는 추출물 제조를 위해 생산한 batch별로 정리하였음.

- 추출물의 베타글루칸 함량

Table 6. 꽃송이버섯 원물의  $\beta$ -glucan함량 (unit : %)

Sample No.	실험일	Total glucan	alpha-glucan	beta-glucan
SEP-E-09	2018.06.28	25.16	5.71	19.45
SEP-E-09	2018.07.02	23.88	7.05	19.83
SEP-E-09	2018.07.03	23.50	4.80	18.70
SEP-E-10	2018.06.28	23.66	5.96	17.98
SEP-E-10	2018.07.02	27.99	6.88	21.11
SEP-E-10	2018.07.03	22.91	5.38	17.53
SEP-E-11	2018.06.28	23.80	5.85	17.95
SEP-E-11	2018.07.02	26.82	6.61	20.21
SEP-E-11	2018.07.03	21.03	4.85	16.18



SEP-E-12	2018.06.28	23.36	5.76	17.60
SEP-E-12	2018.07.02	26.44	6.82	19.62
SEP-E-12	2018.07.03	23.87	4.90	18.97
SEP-E-13	2018.07.05	24.23	5.05	19.18
SEP-E-13	2018.07.06./1회	23.19	5.43	17.76
SEP-E-13	2018.07.06./2회	22.88	5.06	17.82
SEP-E-13	2018.07.06../3회	23.66	4.78	18.88
SEP-E-14	2018.07.04	19.64	4.57	15.07
SEP-E-14	2018.07.05	21.97	4.81	17.16
SEP-E-14	2018.07.06./1회	23.93	5.39	18.54
SEP-E-14	2018.07.06./2회	21.00	5.06	15.94
SEP-E-14	2018.07.06./3회	19.10	4.07	14.40
SEP-E-15	2018.07.05	21.15	4.99	16.16
SEP-E-15	2018.07.06./1회	21.46	5.18	16.28
SEP-E-15	2018.07.06./2회	22.46	5.15	17.31
SEP-E-15	2018.07.06./3회	20.93	5.01	15.92
SEP-E-16	2018.07.04	18.97	4.88	14.09
SEP-E-16	2018.07.05	20.81	4.69	16.12
SEP-E-16	2018.07.06./1회	23.52	5.33	18.19
SEP-E-16	2018.07.06./2회	19.96	5.01	14.95
SEP-E-16	2018.07.06./3회	20.15	4.75	15.40
Average		23.11	5.40	17.64±1.41

\*sample number는 (주)경신바이오로부터 시료를 제공받은 batch별로 정리한 것임.

#### ⑥ 원료표준화의 제시

- 꽃송이버섯의 저분자물질은 위 표에서 제시된 바와 같이 추출물 g 당 4.4 mg으로 그 함유량이 매우 적을 뿐만 아니라, 시그마 등에서 판매되는 물질도 아니며, 제품이 생산될 때마다 품질 관리용으로 계속 사용하기에는 부적절하다고 판단하였음.
- 이에, 버섯균사체와 밀접한 관련이 있는  $\beta$ -glucan을 꽃송이버섯추출물의 지표성분으로 선정하여 분석방법을 확립하였음.
- 꽃송이버섯추출물의 지표성분으로 설정된  $\beta$ -glucan의 함량 변화를 측정하여 제조

공정상 필요한 품질관리 기준을 설정 할 수 있었음.

- 꽃송이버섯추출물의 지표성분인  $\beta$ -glucan의 기준은 17.64%의 80~120%로 설정할 수 있었고, 꽃송이버섯추출물에 대한 표준화를 추진하였음.

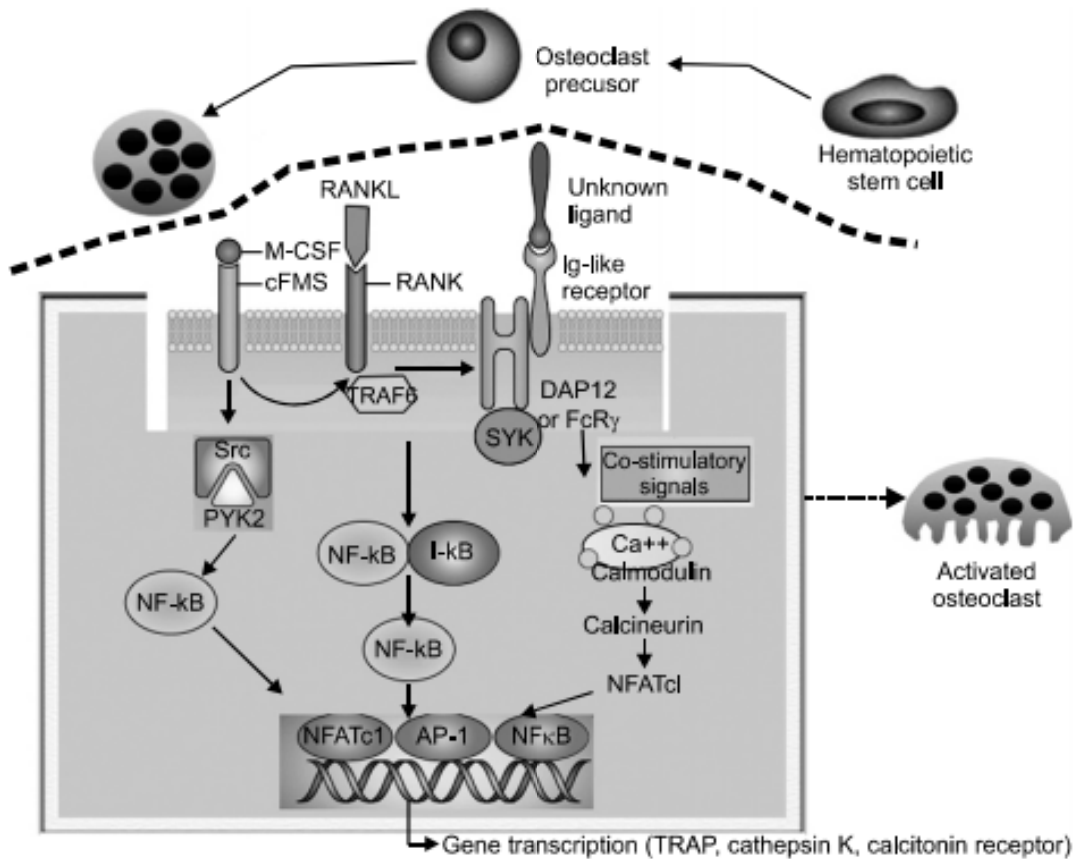
⑦ 꽃송이버섯의 유효분획 및 추출물 탐색

- 파골세포 분화억제효과 검색

-골관절염의 원인중의 하나인 파골세포에 의한 관절의 침식을 제어하기위한 방법으로 파골세포의 분화억제와 그 기능을 조절하는 것은 관절염의 예방 및 치료에 도움이 되는 것으로 알려져 있음.

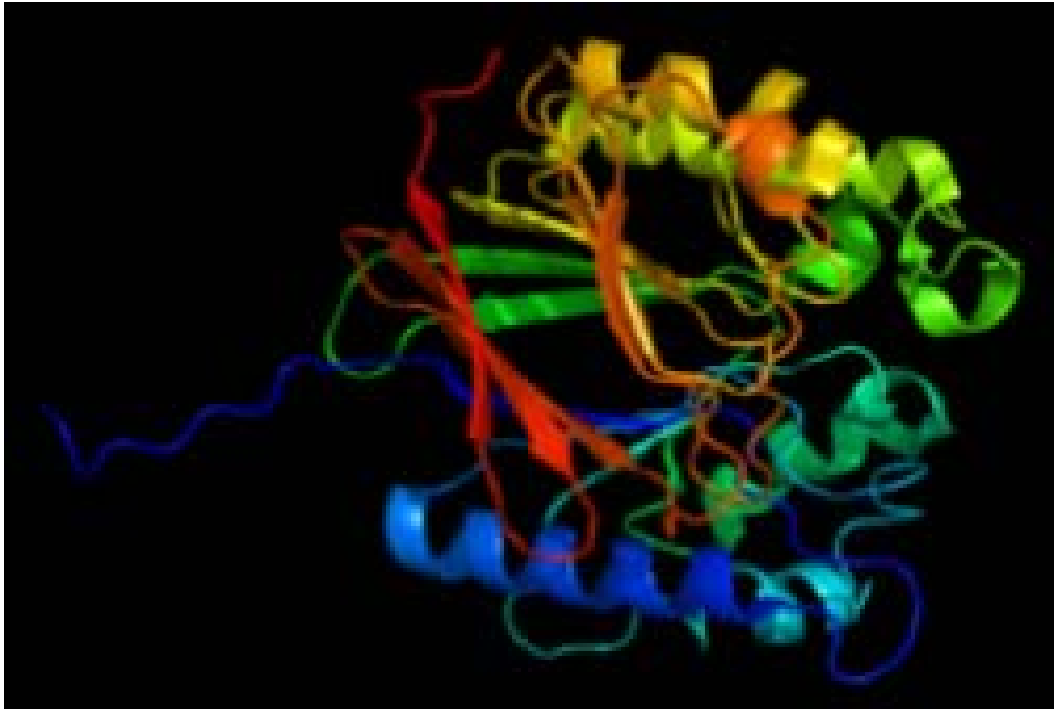
-관절 내에서 골파괴는 파골세포가 활성화되면서 나타나는데 조혈모세포에서 분화한 골수성 전구세포가 염증성 환경에서 파골세포로 분화됨.

-관절염의 치료 목표는 골파괴를 억제하여 관절 손상을 최소화하는 것이 중요하다고 인식되면서 염증성 관절 내에서 파골세포 분화 및 활성화를 억제하는 기전이 중요함.



[파골세포 분화 신호 전달 경로]

-Tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP 또는 acid phosphatase)는 가수분해효소로 파골세포 내에 5개의 isoenzyme 형태로 존재하며, TRAP는 osteoclast에 의한 재흡수(bone resorption)가 증가 할때 함께 증가하는 양상을 보여 재흡수의 지표로 활용됨.



[Tartrate-resistant acid phosphatase]

-파골세포는 뼈에 부착함과 동시에 세포의 공간과 뼈를 흡수하는 공간을 구분하기 위해, 파골세포의 actin이 하나의 큰 ring으로 조직화 됨. 따라서, 파골세포의 actin ring 형성은 세포가 뼈를 흡수할 수 있는 능력에 대한 중요한 표지가 됨.

-*in vitro* 파골세포분화 억제효과를 검색하기위해 다음의 방법을 사용함.

\* 세포 : RAW264.7 (마우스 대식세포)

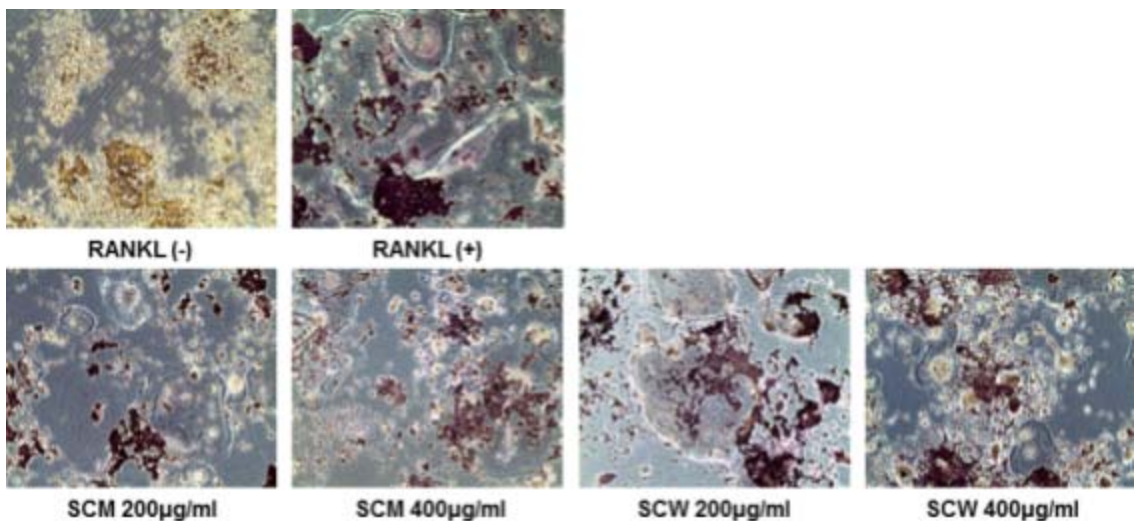
\* 분화유도인자 : RANKL (Receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand)

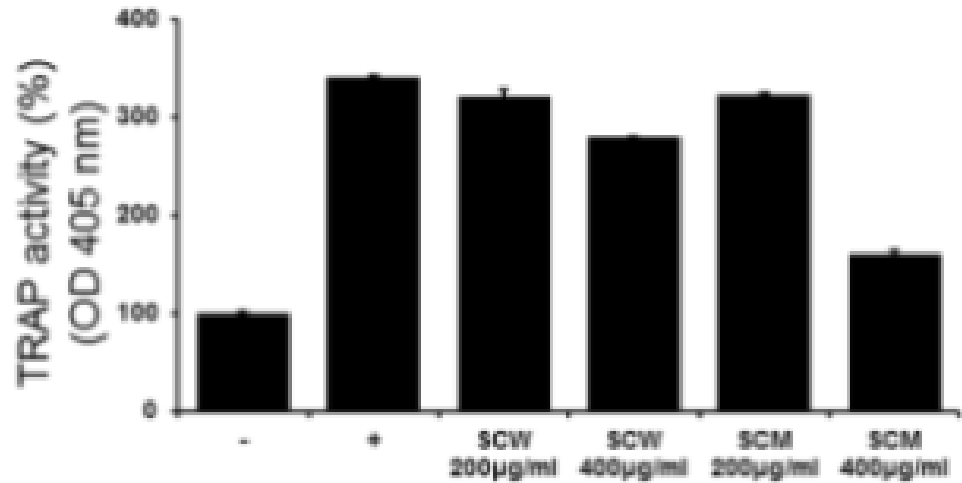
\* 대상시료 : 꽃송이버섯다당체분획 (SCW)

꽃송이버섯메탄올추출물 (SCM)

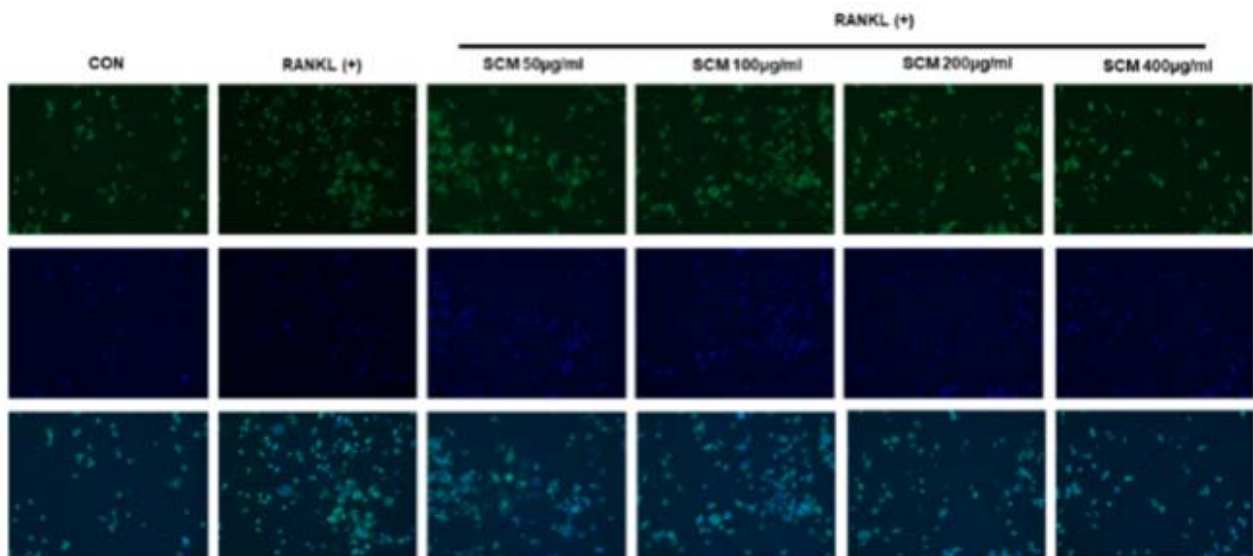
\* 측정 : TRAP(tartrate resistant acid phosphatase) activity

Actin ring & DAPI





[Trap activity 측정 결과]

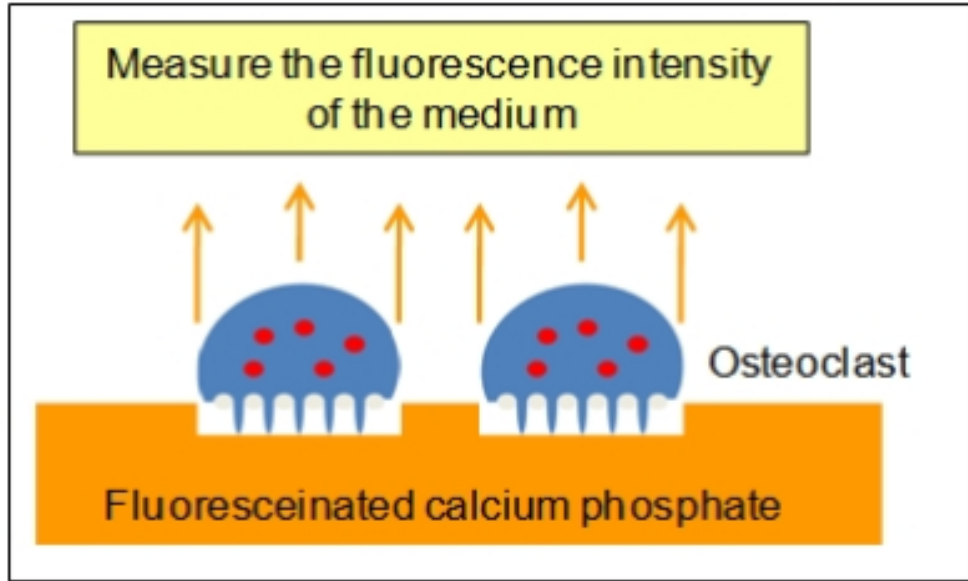


[Actiring formation 측정 결과]

-SCM이 파골세포 분화의 표지자인 TRAP의 효소활성을 강하게 저해하고 파골세포형성의 표지자인 Actiring formation을 억제하는 것으로 확인함.

#### ⑧ 파골세포 기능억제 효과검색

-Fluorescein-calcium phosphate (cf. fluoresceinamine-chondroitin sulfate (FACS)와 calcium phosphate의 binding 이용) 로 코팅된 plate (patent pending)에 배양된 세포의 osteoclastic resorption activity에 의해 배양액으로 유출된 물질의 형광 정도를 측정하여 Calcium의 재흡수 정도를 확인할 수 있음.



[Bone resorption 원리]

-골관절염에서 파골세포의 주된기능은 연골을 침식하는 기능으로 이것을 *in vitro* 실험으로 진행하였음.

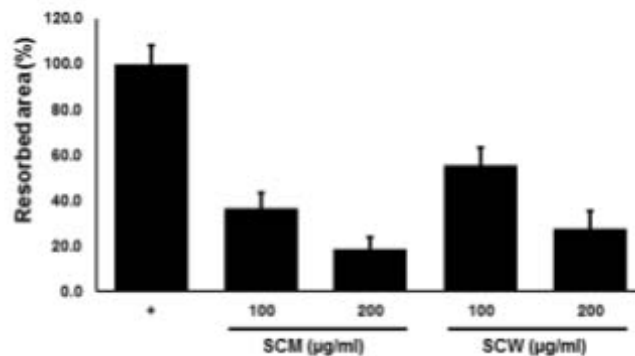
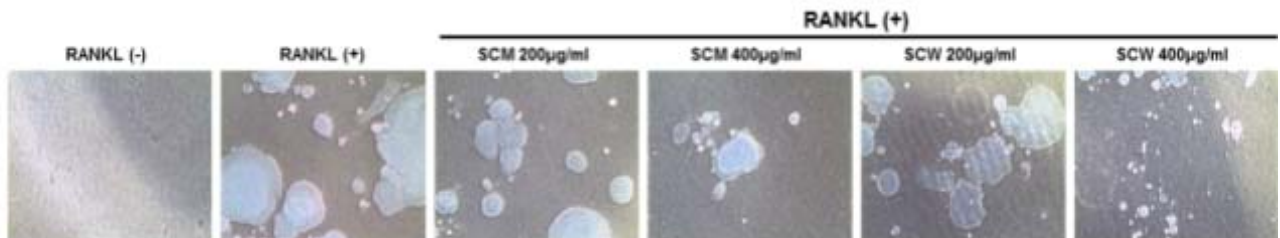
\* 세포 : RAW264.7 (마우스 대식세포)

\* 분화유도인자 : RANKL (Receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand)

\* 대상시료 : 꽃송이버섯다당체분획 (SCW)

꽃송이버섯메탄올추출물 (SCM)

\* 측정 : Bone resorption



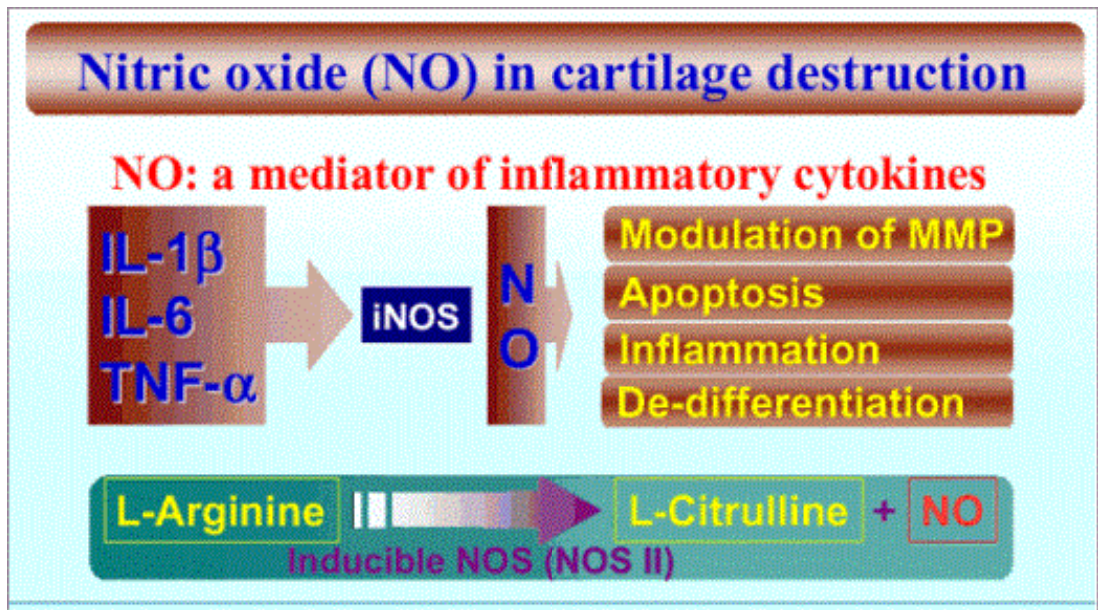
[Bone resorption 측정 결과]

-SCM이 파골세포 기능의 표지자인 Bone resorption을 강하게 억제하는 것으로 확인함.

⑨ 꽃송이버섯 유래 추출물 분획물의 염증성 인자 조절 효과 탐색

• 염증성 인자의 조절 효과 검색

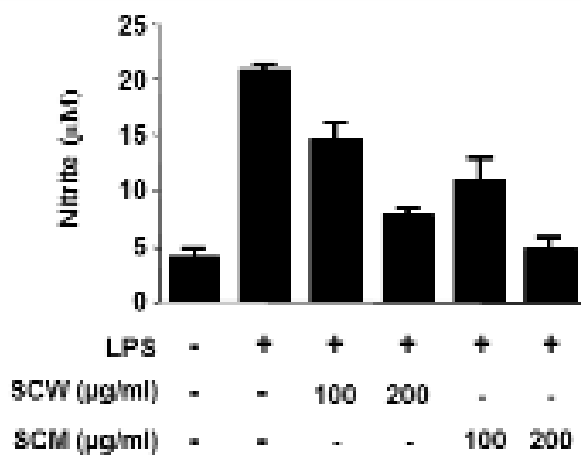
-관절 내에서 염증성 인자(Nitric oxide, IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ )로 인한 연골의 파괴는 중요한 기전임. 따라서, 염증성 인자의 발현을 억제하는 것은 관절염의 중요한 치료 방법임.



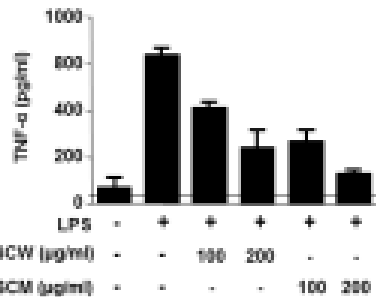
[연골 파괴와 염증성인자]

-*in vitro* 염증성인자(Pro-inflammatory mediators) 효과를 검색하기 위해 다음의 방법을 사용함.

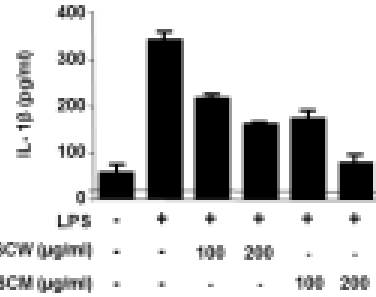
- \* 세포 : RAW264.7 (마우스 대식세포)
- \* 염증유도인자 : LPS (lipopolysaccharide)
- \* 대상시료 : SCW, SCM
- \* 측정 : NO 및 ELISA assay



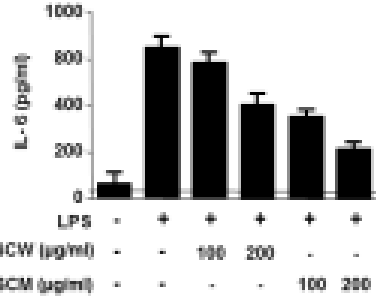
(A) TNF- $\alpha$  억제 효과



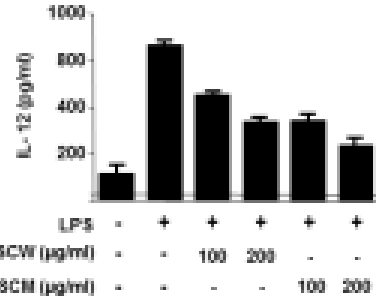
(B) IL-1 $\beta$  억제 효과



(C) IL-6 억제 효과



(D) IL-12 억제 효과



[NO production 및 사이토카인 측정]

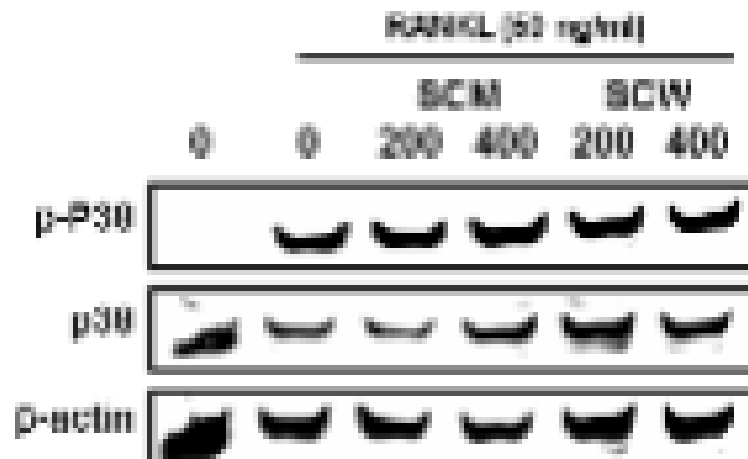
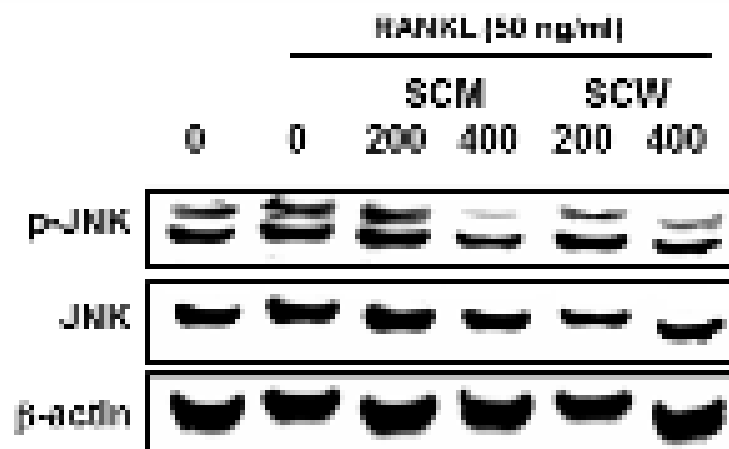
-메탄올추출물이 항염증 작용의 바이오마커로서 현저한 NO생성과 염증성 cytokine 생성 억제 효과를 나타내는 것을 확인하였음.

• MAPK activation

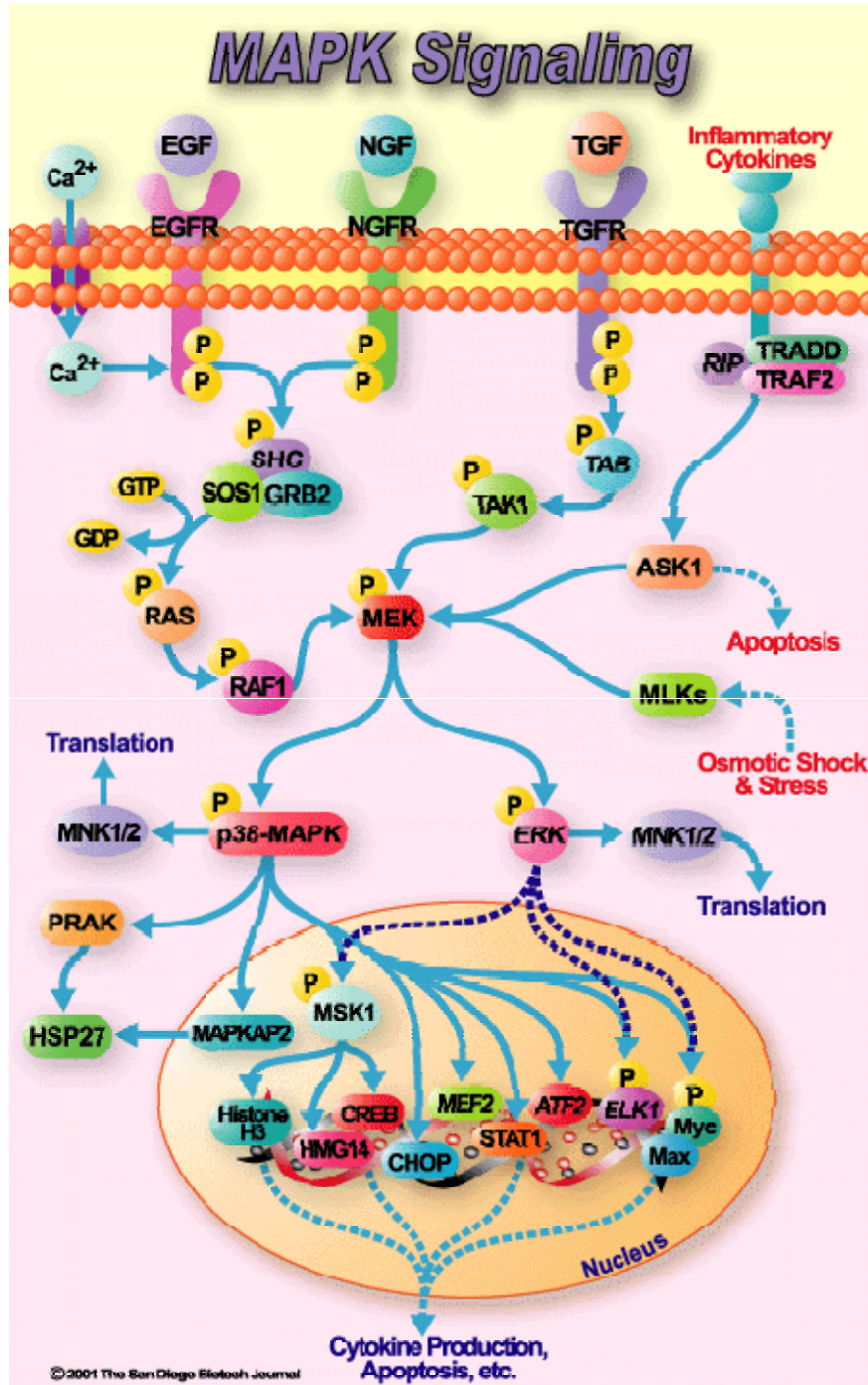
-MAPK는 세포 성장과 분화의 조절, 사이토카인과 stress에 대한 세포 반응의 조절에 중요한 역할을 하며, MAPK 신호전달경로는 진화적으로 보존되어왔고 세포외 환경으로부터 세포질을 통해 핵으로 정보를 전달하는데 중요한 역할을 하고 있으며, 최소 3가지의 신호전달경로가 존재함.

-ERK가 자극인에 의해 광범위하게 활성화되는 반면, p38과 JNK는 stress 반응 경로의 부분을 구성하며 염증성 사이토카인 같은 인자에 의해 유도된 세포스트레스에 의해 활성화되며, JNK 신호전달경로는 LPS와 TNF- $\alpha$ 와 같은 면역 염증 자극에 반응하는 세포에서 활성화되고, 세포의 형태적 증대와사이토카인 전사에 포함됨.

-꽃송이버섯추출물과 분획물을 이용하여, 염증성 기전에 관여하는 MAPK의 인산화 효과 관련 기전연구를 수행함.







[MAPK 인산화 효과 검색 결과]

-2차년도 연구이나 약간 진행하였음. 추가적으로 2차년도에 집중적으로 연구할 계획임.

⑩ 꽃송이버섯 에탄올추출물의 염증성 인자 조절 효과 탐색

- 염증성 인자 및 연골분해 효소 조절 효과 검색
  - 관절 내에서 염증성 인자 (Prostaglandin E<sub>2</sub>, Nitric oxide, Cyclooxygenase-2,

Inducible nitric oxide synthase)와 활성 산소종 (Reactive oxygen species) 및 연골 분해 효소(Matrix metalloproteinase-9, 13)등으로 인한 연골의 파괴는 중요한 기전임. 따라서 염증성 인자의 생성과 산화스트레스 및 연골 분해 효소를 억제하는 것은 관절염의 중요한 치료 방법임.

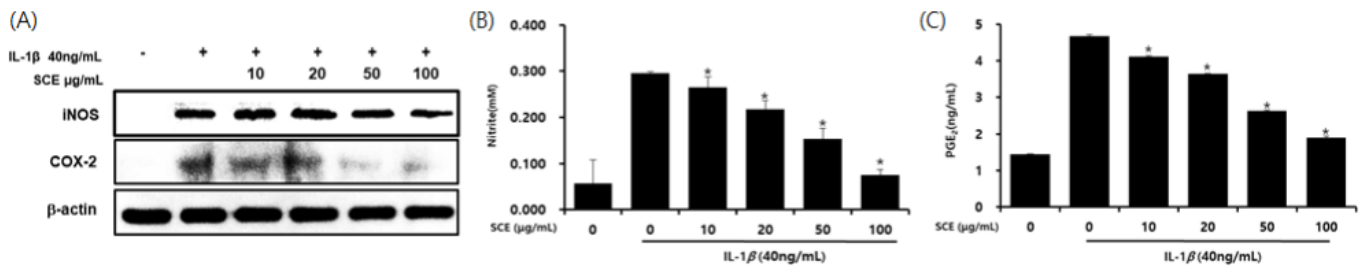
[염증성인자 측정]

-*in vitro* 염증성인자(Pro-inflammatory mediators) 효과를 검색하기 위해 다음의 방법을 사용함.

\* 세포 : SW1353 (인간 유래 연골세포)

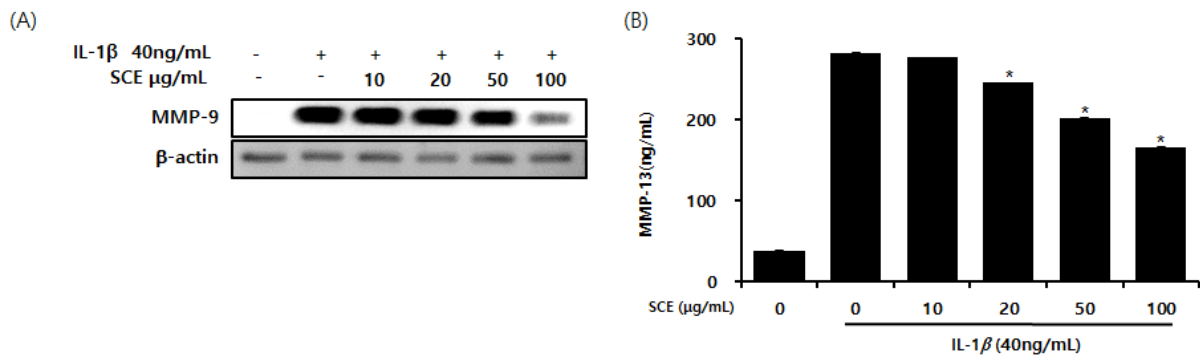
\* 염증유도인자 : IL-1 $\beta$  (Interleukin-1 beta)

\* 대상시료 : SCE



[염증성인자 측정 결과]

-꽃송이버섯 에탄올추출물이 IL-1 $\beta$ 로 유도된 인간 유래 연골세포 SW1353에서 염증성 인자 (Prostaglandin E<sub>2</sub>, Nitric oxide, Cyclooxygenase-2, Inducible nitric oxide synthase)의 생성 억제 효과를 나타내는 것을 확인함.



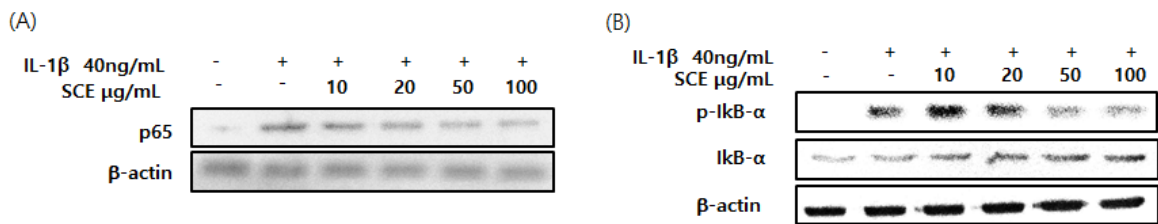
[연골분해 효소 측정 결과]

-꽃송이버섯 에탄올추출물이 IL-1 $\beta$ 로 유도된 인간 유래 연골세포 SW1353에서 연골 분해에 중요한 역할을 하는 연골 분해 효소 MMPs (Matrix metalloproteinases)의 발현에 현저한 억제 효과를 나타내는 것을 확인함.

- NF- $\kappa$ B(nuclear factor-kappa B) activation

-NF-kB는 염증반응 조절, 면역체계 조절(immune modulation), 세포고사(apoptosis), 세포증식, 상피세포의 분화(epithelial differentiation) 등에 관여하는 단백질군 (protein family)으로 염증성 사이토카인, 케모카인, 스트레스 관련 인자들에 의해 자극되며, 자극을 받은 NF-kB는 관절의 파괴를 유도하는 일련의 유전자들의 발현을 촉발하여 골 관절염의 개시와 진행으로 이어지게 됨.

-꽃송이버섯 에탄올추출물과 분획물을 이용하여, 염증성 기전에 관여하는 NF- $\kappa$ B의 인산화 효과 관련 기전연구를 수행함.



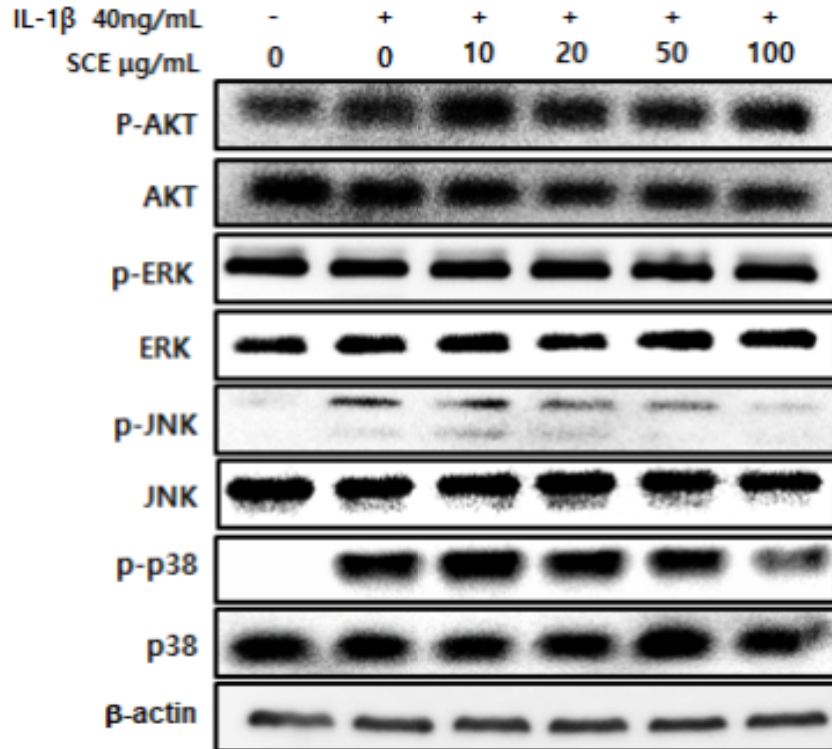
[NF- $\kappa$ B 인산화 효과 검색 결과]

-꽃송이버섯 에탄올추출물이 IL-1 $\beta$ 로 유도된 인간 유래 연골세포 SW1353에서 NF- $\kappa$ B p65를 억제하며, I $\kappa$ B- $\alpha$ 의 인산화를 효과적으로 억제하였음.

- MAPKs activation

-염증반응에서 ERK(extracellular signal regulated kinase), p38 MAP kinases, JNK(c-Jun N-terminal kinase)을 포함한 MAPK(mitogenactivated protein kinase)의 활성화는 연골파괴와 사이토카인 조절에 중요한 역할을 하며, IL-1 $\beta$ 에 의해 유도된 MMPs, iNOS 및 COX-2 생성은 MAPK와 활성화에 기인함. 따라서 MAPK의 활성을 억제하는 것이 염증성 질환의 치료에서 매우 중요한 역할을 함.

-꽃송이버섯 에탄올추출물을 이용하여, 염증성 기전에 관여하는 MAPK의 인산화 효과 관련 기전연구를 수행함



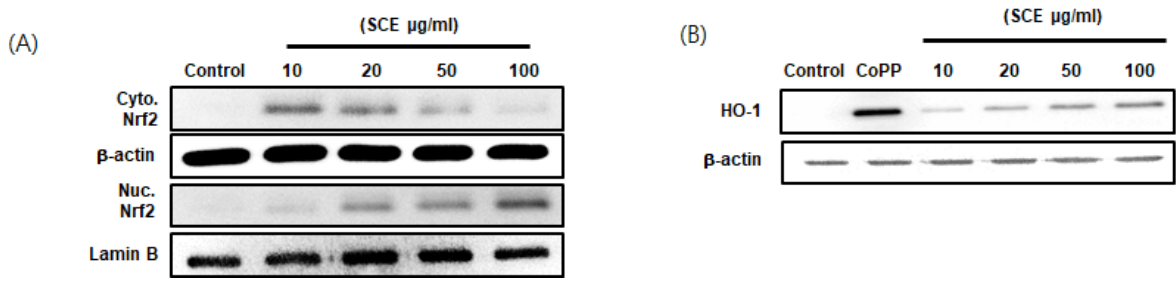
[MAPKs 인산화 효과 검색 결과]

-꽃송이버섯 에탄올추출물은 IL-1 $\beta$ 로 유도된 인간 유래 연골세포 SW1353에서 JNK 및 p38의 인산화를 효과적으로 억제함.

- HO-1(Heme oxygenase-1)과 Nrf2(Nuclear factor erythroid-derived 2-related factor 2) 발현 및 활성 산소종 (Reactive oxygen species)의 생성 조절

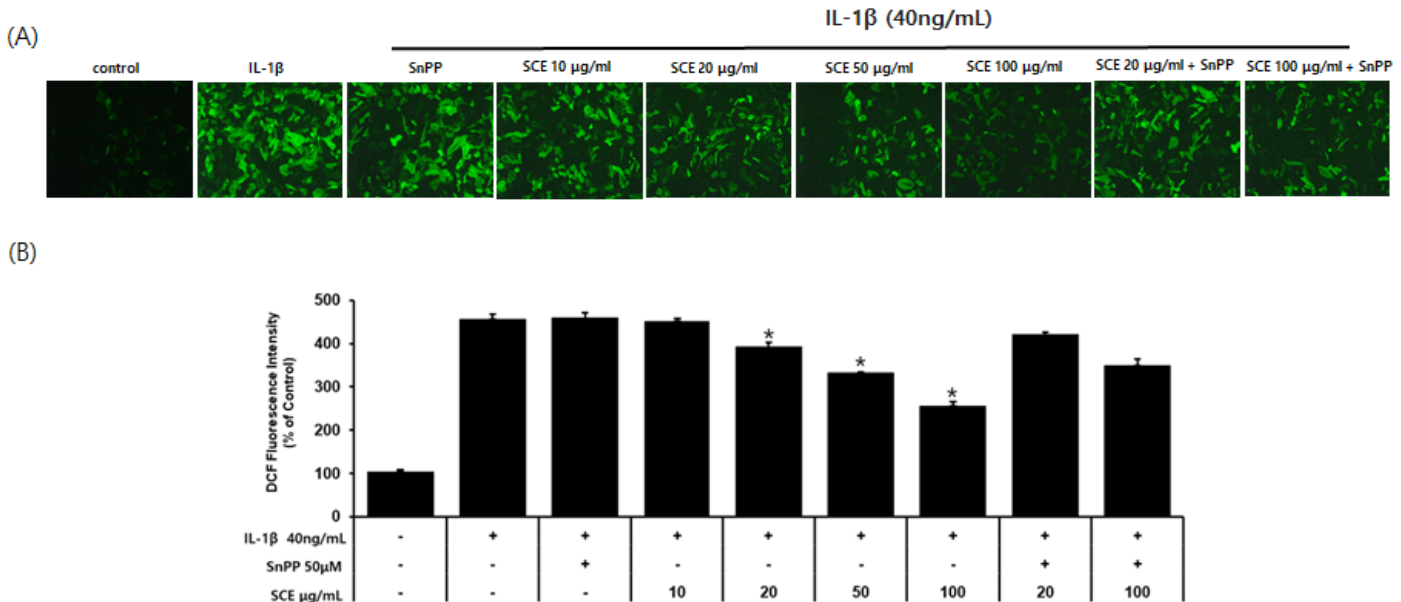
-염증반응에서 HO-1(Heme oxygenase-1)은 일산화탄소, 철 및 biliverdin과 bilirubin의 형성을 유도하며, Nrf2(Nuclear factor erythroid-derived 2-related factor 2)에 의해 조절되는 heme catabolism의 속도 제한 효소로 산화 스트레스에 의한 염증성 질환에서 매우 중요한 역할을 하고 활성 산소종과 친염증성 사이토카인의 생성과 발현을 억제함.

-꽃송이버섯 에탄올추출물을 이용하여 HO-1과 Nrf2 발현을 측정하고, 활성 산소종의 생성에 미치는 영향을 연구함.



[HO-1과 Nrf2 발현 조절]

-꽃송이버섯 에탄올추출물은 인간 유래 연골세포 SW1353에서 Nrf2의 핵 전이를 농도 의존적으로 증가시키고, HO-1의 발현 또한 증가시킴.



[활성 산소종 생성 조절]

-꽃송이버섯 에탄올추출물은 IL-1 $\beta$ 로 유도된 인간 유래 연골세포 SW1353에서 활성 산소종의 생성을 농도 의존적으로 억제시키고, HO-1 억제제인 SnPP (tin protoporphyrin IX)에 의해 생성이 다시 증가됨을 확인함. 따라서 꽃송이버섯 에탄올추출물은 활성 산소종 생성 조절에 관여한다고 판단됨.

① 꽃송이버섯 에탄올추출물의 *in vivo*에서 골관절염 억제효과 탐색

- 활성 산소종 및 항산화 효소 단백질 조절 효과 검색

-활성 산소종(Reactive oxygen species)과 같은 산화스트레스의 생성은 관절에서 염증반응의 매개체로서 유의한 관련이 있으며, 이러한 활성 산소종은 항산화 효소단백질로 알려진 SOD(superoxide dismutase), CAT(catalase)등에 의해 소거되고 NOX4(NADPH oxidase 4) 및 P47<sup>phox</sup> 와 같은 단백질에 의해 생성됨.

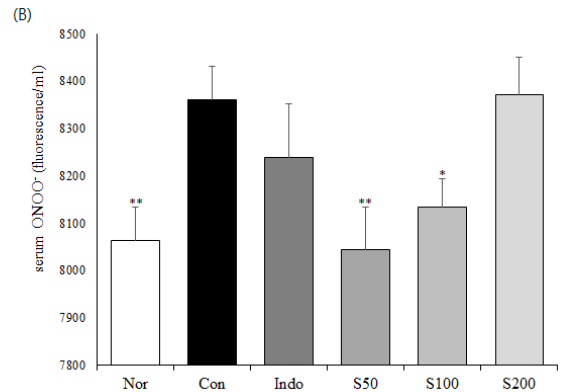
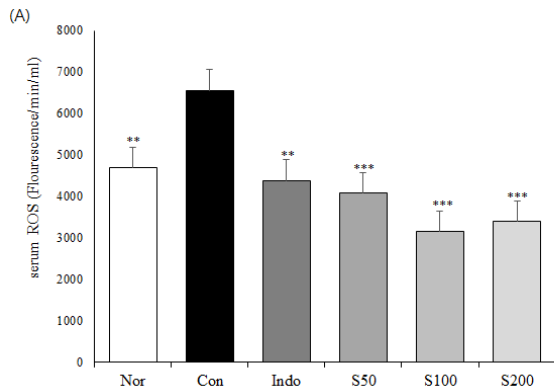
[활성 산소종 및 항산화 효소 단백질 조절 효과 검색 방법]

-*in vivo*에서 꽃송이버섯 에탄올추출물의 염증성 매개체(Pro-inflammatory mediators) 조절 효과를 검색하기 위해 다음의 방법을 사용함.

\* 실험동물 : Sprague-Dawley 랫드

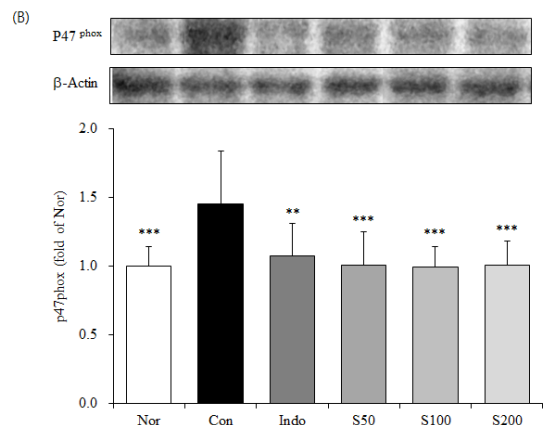
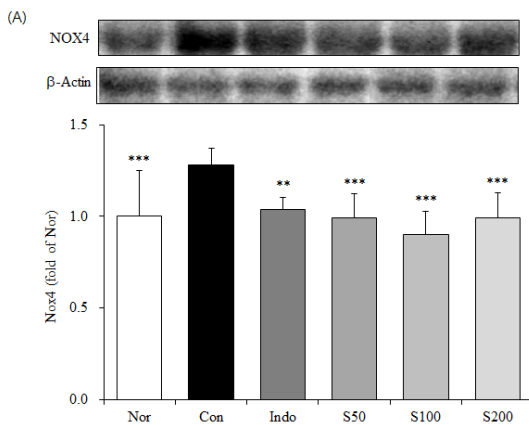
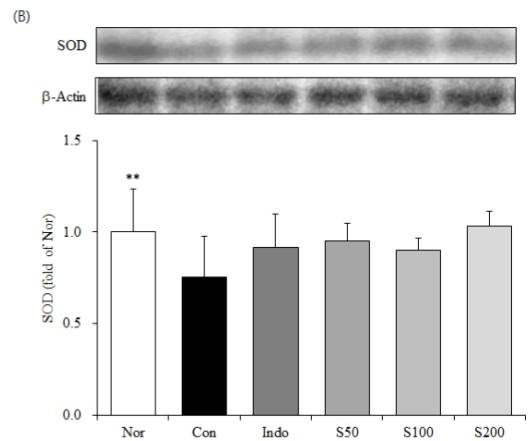
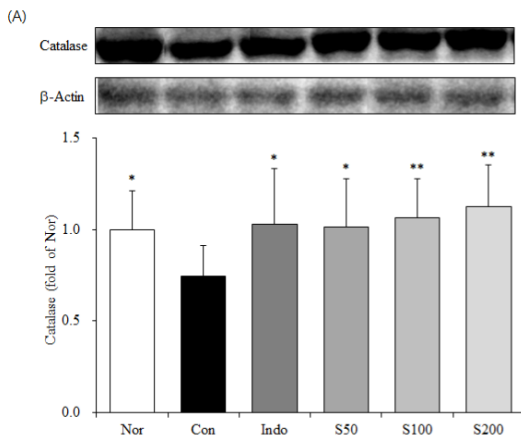
\* 골 관절염 유도인자 : MIA (Monosodium Iodoacetate)

\* 대상시료 : SCE



[활성산소종(Reactive oxygen species) 및 Peroxynitrite 측정]

-꽃송이버섯 에탄올추출물은 MIA (Monosodium Iodoacetate)로 골관절염이 유도된 랫드의 혈청에서 활성산소종의 생성을 억제하였으며, peroxynitrite의 생성을 농도 의존적으로 증가시킴.

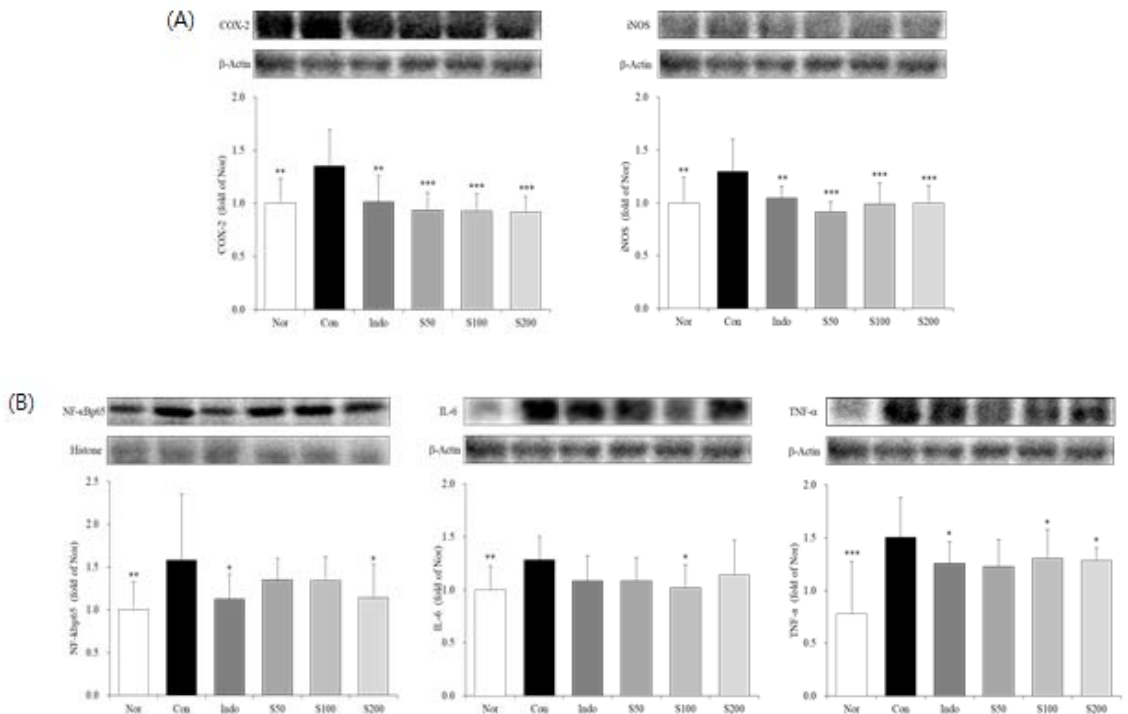


[항산화 및 산화스트레스 활성 효소단백질 측정]

-꽃송이버섯 에탄올추출물은 MIA (Monosodium Iodoacetate)로 골관절염이 유도된 랫드의 관절조직 세포질에서 항산화 효소단백질 SOD(superoxide dismutase), CAT(catalase)의 생성을 증가시켰으며, 산화스트레스 활성 효소단백질 NOX4(NADPH oxidase 4) 및 P47<sup>phox</sup>의 생성을 억제함.

• 염증성 매개인자 및 사이토카인 측정

-관절 내에서 염증성 인자(Cyclooxygenase-2, Inducible nitric oxide synthase, IL-6, TNF- $\alpha$ )로 인한 연골의 파괴는 중요한 기전임. 따라서, 염증성 인자의 발현을 억제하는 것은 관절염의 중요한 치료 방법임.



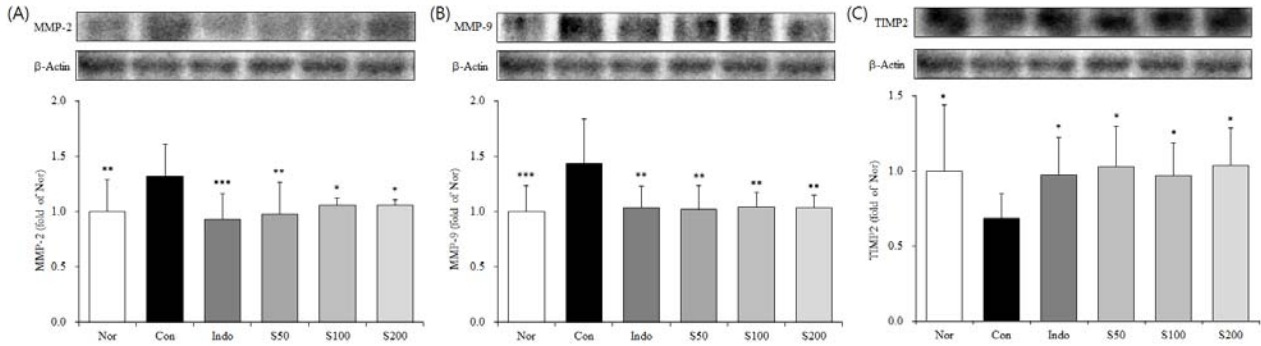
[염증성 매개인자 및 사이토카인 측정 결과]

-꽃송이버섯 에탄올추출물은 MIA (Monosodium Iodoacetate)로 골관절염이 유도된 랫드의 관절조직 세포질에서 염증성 매개인자 cyclooxygenase-2, inducible nitric oxide synthase와 사이토카인의 생성을 억제함.

• 단백질 분해 효소 및 단백질 분해 인자 활성 측정

-단백질 분해 효소 MMPs(Matrix metalloproteinases)의 과잉 발현은 연골 기질의 파괴를 유도하며, 그 중 MMP-2와 MMP-9은 골관절염에서 proteoglycan을 소실시

키고 재합성을 억제함. 이러한 단백질 분해 인자의 활성을 조절하는 TIMPs(Tissue inhibitors of metalloproteinases)는 MMPs에 길항작용을 하여 분비를 제어함.

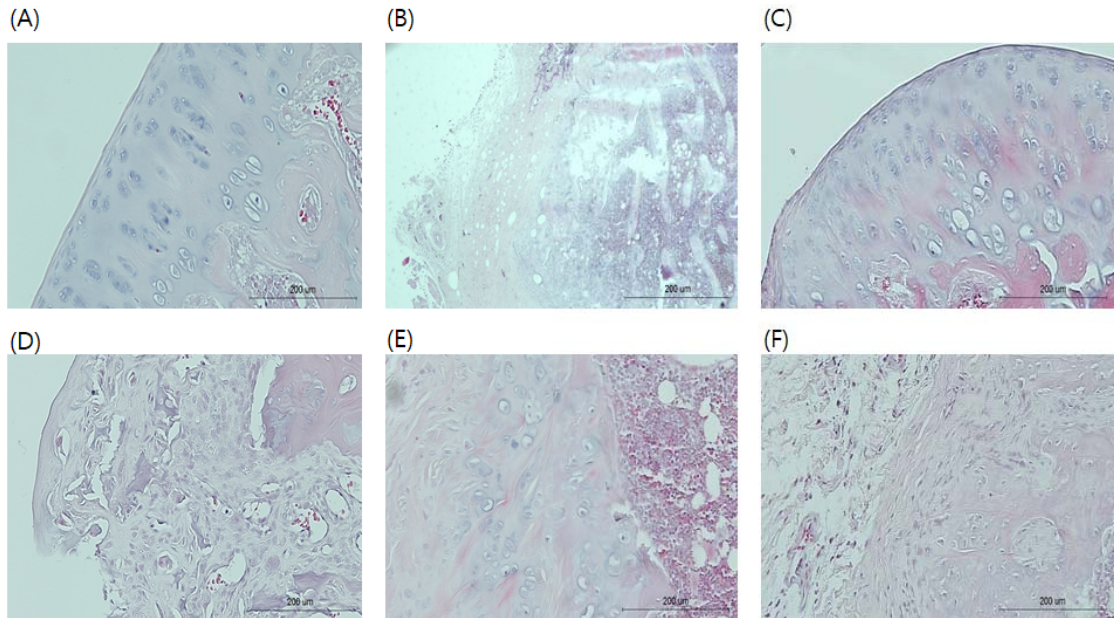


[MMPs 및 TIMPs 측정 결과]

-꽃송이버섯 에탄올추출물은 MIA (Monosodium Iodoacetate)로 골관절염이 유도된 랫드의 관절조직 세포질에서 단백질 분해 효소의 발현을 억제하였으며, 단백질 분해 인자의 활성을 조절하는 TIMPs의 발현을 증가시킴.

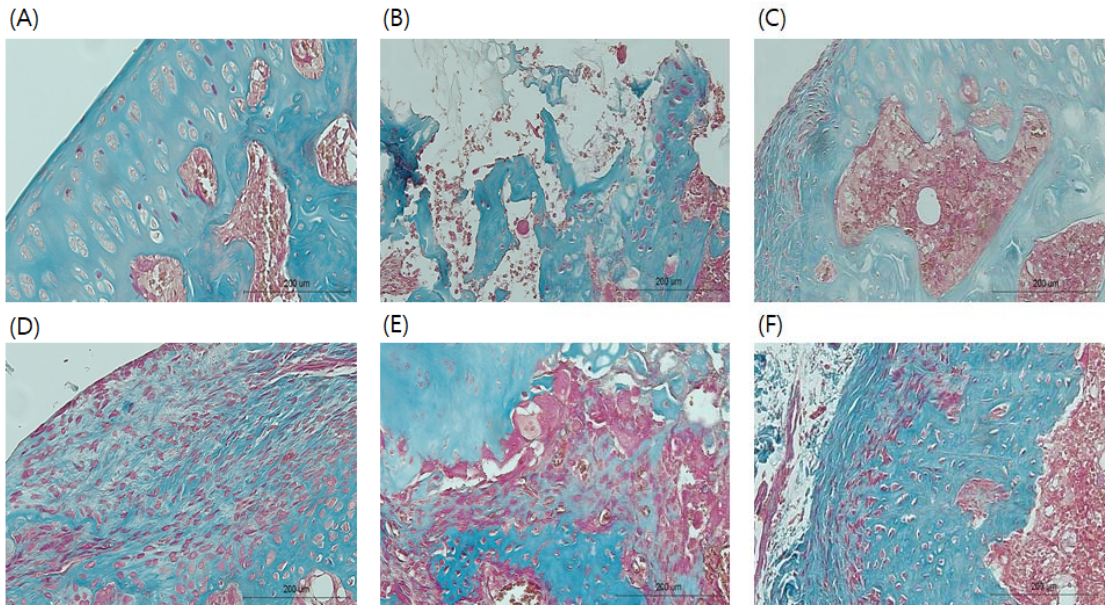
- 무릎관절 내 활막조직과 proteoglycan의 소실 정도 측정

H&E





Masson's trichrome



[무릎관절 내 활막조직과 proteoglycan의 소실 정도 측정 결과]

-꽃송이버섯 에탄올추출물은 MIA (Monosodium Iodoacetate)로 골관절염이 유도된 랫드의 활막조직과 연골조직의 손상을 효과적으로 억제하였으며, proteoglycan의 소실 또한 억제함.

### (3) 연구개발 성과

#### ① 논문발표

No	항목		주저 자명	호	국명	SCI여부 (SCI/비SCI)	게재 일	등록 번호
1	논문명	Secondary metabolites produced by endophytic fungus, <i>Arthrinium phaeospermum</i>	심상희	47	대한 민국	비SCI	2016. 10.30	
	학술지명	생약학회지						
	발행기관	한국생약학회						
2	논문명	New Aromatic Compounds from the Fruiting Body of <i>Sparassis crispa</i> (Wulf.) and Their Inhibitory Activities on Proprotein Convertase Subtilisin/Kexin Type 9 mRNA Expression	심상희	65	미국	SCI	2017. 08.02	
	학술지명	Journal of Agricultural and Food Chemistry						
	발행기관	American Chemical Society						
3	논문명	Bioactive secondary metabolites produced by an endophytic fungus <i>Gaeumannomyces</i> sp. JS0464 from a maritime halophyte <i>Phragmites communis</i> .	심상희	70	일본	SCI	2017. 06.	
	학술지명	Journal of Antibiotics						
	발행기관	Nature						
4	논문명	Inhibitory effects of the roots of <i>Cudrania tricuspidata</i> Bureau on osteoclast differentiation	정길생	48	대한 민국	비SCI	2017. 06.	
	학술지명	Korean Journal of Pharmacognosy						
	발행기관	The Korean society of pharmacognosy						

No	항목		주저 자명	호	국명	SCI여부 (SCI/비SCI)	게재 일	등록 번호
5	논문명	Simultaneous determination of the bioactive compounds from <i>Sparassis crispa</i> (Wulf.) by HPLC-DAD and their inhibitory effects on LPS-stimulated cytokine production in bone marrow-derived dendritic cell	심상희	41	대한민국	SCI	2018.08.	
	학술지명	Archives of Pharmacal Research						
	발행기관	The Korean society of pharmaceutics						
6	논문명	Neuroprotective Compound from an Endophytic Fungus, <i>Colletotrichum</i> sp. JS-0367	심상희	81	미국	SCI	2018.03.	
	학술지명	Journal of Natural Products						
	발행기관	American Chemical Society						
7	논문명	Inhibitory effect of Cudraticusxanthone A on osteoclast differentiation and function.	정길생	43	독일	SCI	2018.04.	
	학술지명	Phytomedicine.						
	발행기관	Stuttgart						
8	논문명	Inhibitory Effect of <i>Sparassis crispa</i> (Wulf.) Extract on Monosodium Iodoacetate Induced Osteoarthritis	정길생	49	대한민국	비SCI	2018.09.	
	학술지명	생약학회지						
	발행기관	한국생약학회						
9	논문명	<i>Sparassis crispa</i> (Wulf.) Extract Inhibits IL-1 $\beta$ Stimulated Inflammatory Mediators Production on SW1353 Human Chondrocytes	정길생	49	대한민국	비SCI	2018.12.	
	학술지명	생약학회지						
	발행기관	한국생약학회						

② 특허 출원

No	항목		출원		등록			기여율(%)
			날짜	번호	인	날짜	번호	
1	지식재산권 등 명칭	꽃송이버섯 추출물을 포함하는 이상지혈증 관련 질환 예방 또는 치료용 조성물	2017. 04.28	10-2017-0055011				100
	출원인	덕성여자대학교 산학협력단						
	국명	대한민국						
2	지식재산권 등 명칭	꽃송이버섯 추출물을 유효성분으로 함유하는 골관절염 예방 또는 치료용 약학조성물	2017. 07.21	10-2017-0092710				100
	출원인	계명대학교 산학협력단						
	국명	대한민국						
2	지식재산권 등 명칭	꽃송이버섯 추출물을 유효성분으로 함유하는 골관절염 예방 또는 치료용 약학조성물	2017. 06.21	PCT/KR2018/007037				100
	출원인	계명대학교 산학협력단						
	국명	대한민국						

### ③ 학술발표

No	회의명칭	발표자	발표일	장소	국명
1	제47회 한국생약학회	심상희 방성희	2016년 11월 24일	더 케이 호텔	대한민국
2	18th International Symposium on the Biology of the Actinomycetes	심상희 방성희	2017년 05월 24일	제주 ICC	대한민국
3	2017 Fall International Convention of The Pharmaceutical Society of Korea	정길생 김은남	2017년 10월 20일	더 케이 호텔	대한민국
4	한국생약학회 제48회 정기총회 및 학술대회	심상희 방성희	2017년 11월 23일	차바이오 컴플렉스	대한민국
5	제10회 한중일 생약학회 및 제49회 한국생약학회 정기총회 및 학술대회	심상희 방성희	2018년 11월 22일	이화여자 대학교 CC	대한민국
6	2018 대한 약학회 추계국제학술대회	정길생 김은남	2018년 10월 17일	제주국제 컨벤션센터	대한민국
5	제10회 한중일 생약학회 및 제49회 한국생약학회 정기총회 및 학술대회	정길생 김은남	2018년 11월 22일	이화여자 대학교 CC	대한민국

### 3. 목표 달성도 및 관련 분야 기여도

#### 5-1. 목표 달성 여부(연구성과 목표 대비 실적)

성과 목표	사업화지표										연구기반지표								
	지식 재산권			기술 실시 (이전)		사업화					기술 인 증	학술성과		교 육 지 도	인 력 양 성	정책 활용· 홍보		기 타	
	특 허 출 원	특 허 등 록	품 종 등 록	건 수	기 술 료	제 품 화	매 출 액	수 출 액	고 용 창 출	투 자 유 치		논 문				학 술 발 표	정 책 활 용		홍 보 전 시
												SCI	비 SCI						
최종 목표	2	1		2	30	1	11,000		2			4	3	4	0	9			
실적	3	0		0	0	3	337		1			5	4	7	1	2		3	
달성 율 (%)	150	0		0	0	200	3.1		50					175		22.2			

#### 5-2. 목표 미달성시 원인(사유) 및 차후대책(후속연구의 필요성 등)

##### ① 지적재산권 등록 계획

-현재 2건의 국내 특허 출원과 PCT 출원이 1건 있으며, 국내 특허 출원의 경우 특허 심사 중에 있으며, 향후 1~2년 내에 특허가 등록 될 것으로 생각됩니다. 잘 아시겠지만 특허 등록에는 심사 중에 시간이 다소 필요한 경우가 있어, 본 2건의 경우 기간 내에 이루지는 못하였지만, 지속적인 노력으로 심사를 통과하여 등록 될 수 있도록 최선을 다하겠습니다.

##### ② 기술실시 계획

-3년 동안 본 과제를 통해 얻어진 결과물 덕성여자대학교의 “꽃송이버섯 추출물을 포함하는 이상지질혈증 관련 질환 예방 또는 치료용 조성물” 계명대학교의 “꽃송이버섯 추출물을 유효성분으로 함유하는 골관절염 예방 또는 치료용 약학조성물”의 특허를 기반으로 하는 기술을 2019년 하반기에 기술 이전을 통해 사업화 추진을 실행할 계획임.

##### ③ 인체적용시험 및 기능성원료 재평가 실시

-지난 3년 동안 인체적용시험의 성과가 다소 부족하여, 본 시험에 대해서는 주관연구기관이 제품개발의 의지를 갖고 CRO 및 인체적용시험 수행기관을 개선정하여 임상대상자 모집, 추출물의 시험군, 대조군를 생산하여 임상을 실시할 계획입니다. 또한, 기능성원료 인정 추진, 개별인정 등록 신청을 다음과 같은 계획으로 진행하고자 함.

-재평가 실시 계획

구분	내용	실시예정일	완료예정일
기술이전계획	기술(특허, 논문 외)	2019년 하반기	2020.03
수행기관 선정	기능성 및 안전성 연구 용역	2019년 하반기	2020.06
CRO	임상시험 기준 마련	2020.06	
인체적용시험	시험군.대조군 실험	2020.06	2020.12

## 4. 연구 결과의 활용 계획 등

### (1) 기술개발 결과물

- 꽃송이버섯의 지표성분을 규명함으로써 표준화된 시료 조제 및 제법
- 꽃송이버섯의 효능 검증
- 조성 및 제조공정에 대한 특허 출원
- 국제저명학술지 논문 발표

### (2) 기술개발 결과의 활용방안

- 연구 결과를 바탕으로 한 논문 및 특허를 통하여 당 기술결과의 연구 성과를 공인 추진함
- 지표성분을 이용한 원료표준화 방안 마련 및 기능성 검증으로 통하여 추후 건강기능식품으로의 기능성 원료 개별인정의 토대 마련
- 개별인정형 건강기능식품 개발로 인하여 꽃송이 버섯의 고부가가치산업으로 인한 농가소득 증대 및 일본 수출 품목으로 개발

### (3) 매출액 달성을 위한 마케팅 전략과 고용 창출 계획

- 2019년 부가가치개발사업을 통해 얻은 결과로 꽃송이버섯 추출물을 원료와 기능성원료를 함유한 신제품 개발이 완료되어 기획팀과 마케팅팀, 디자인팀을 구성 신제품을 출시와 고용창출과 매출액 상승에 역점을 두고 매진할 것임.

### (4). 사업화(신제품)

#### ① 제품의 소개와 효능

꽃송이버섯을 유산균 발효한 회사로 꽃송이버섯 성분 베타글루칸, 현미호분층, 쌀눈 등에 들어있는 여러 가지 영양성분의 흡수율을 더욱 높이기 위하여 유산균(프로바이오틱스) 첨가하여 발효공정을 거쳐 생산되는 안전하고 믿을 수 있는 건강식품입니다.

우리 몸에 꼭 필요한 소화 알파아밀라아제, 프로테아제 효소가 함유되어 있으며, 꽃송이버섯에 들어있는 베타글루칸 1,3/1,6 성분이 우리 몸에 흡수 잘 되어 항암, 면역력을 높여준다. 또한 쌀의 영양 가바(gaba), 옥타코사놀, 감마오리자



놀, 리놀렌산, 알파토코페롤, 베타시스테놀, 미네랄, 칼슘, 라이신, 각종비타민, 왁스, 섬유질, 식물성지방 등의 흡수력을 높여주며 식이섬유와 유산균(프로바이오틱스)이 장내 유익균이 잘 살 수 있는 깨끗한 환경을 만들어주고 유산균 활성화를 위하여 유산균 먹이인 프락토올리고당을 첨가 장내 유익균 활성화를 더욱 높여주는 것은 물론 우리 몸에 꼭 필요한 여러 종류의 비타민까지 첨가한 안전한 제품이다.(참조:사진)

▶제품명 : 발효 꽃송이버섯 특



▶제품명 : 발효 꽃송이버섯 천



② 연구개발 사업화 추진

구분	구체적인 설명
기술개발 추진계획	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 인체적용시험 / 컨설팅 실시</li> <li>• 임상 기간 : 24개월</li> <li>• 개별인정원료 “꽃송이버섯” 식품의약품안전처 신청.</li> <li>• 개발 투입인력 및 기간 : 인력 4명, 개발기간 36개월예상</li> </ul>
상용화 및 자원보유	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 자체 공장을 통한 제품생산 및 품질관리</li> <li>• 분말의 수용성, 유동성, 균질도 등을 최적화 시키는 과립제조와 미세분말 및 펠렛(Seed)의 분말표면코팅 기술력 확보</li> <li>• 중량, 체적 등 기준규격을 세밀하게 생산</li> <li>• 롤러컷팅식 자동 제환기를 이용하여 경질소환, 대환 등이 생산가능</li> <li>• 이중캡충진기, 스틱포장기, PTP포장기, 사면포장기, 삼면포장기, 이열포장기, 로타리파우치포장기 확보</li> </ul>
상용화 계획	<ul style="list-style-type: none"> <li>-기능성 인정원료 MSM 원료와 꽃송이버섯을 첨가하여 골관절염 개선식품 “관절케어” 신제품개발 출시</li> <li>-시제품제작 : 2019년 3/4분기</li> <li>-제품 판매 개시 : 2019년 4/4분기</li> </ul>

③ 향후 매출액 및 고용창출 계획

(단위 : 백만원/명)

제품	2019년	2020	2021년	2022	2023	비고
발효꽃송이버섯 효소균	2,000	3,000	5,000	5,000	7,000	
기능성원료신제품	500	1,000	1,500	2,500	4,000	
골관절염 신제품		300	500		800	
개별인정형 (기능성원료)신제품			500	1,000	1,500	
고용창출	2	2	2		3	총 9명
총 매출액	2,500	4,300	7,500	8,500	13,300	

④ 연구 개발 향후 일정 계획(안)

구분	내용	실시예정일	완료예정일
기술이전계획	기술(특허, 논문 외)	2019년 하반기	2020.03
수행기관 선정	기능성 및 안전성 연구 용역	2019년 하반기	2020.06
CRO	임상시험 기준 마련	2020.06	
인체적용시험	시험군.대조군 실험	2020.06	2020.12

## [붙임. 참고문헌]

1. Bang S, Cha H-S, Lee C, Choi HG, Ryu J, Li W, Lee HN, Jeong G-S, Chin Y-W, Shim SH (2017) New aromatic compounds from the fruiting body of *Sparassis crispa* (Wulf.) and their inhibitory activities on proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 mRNA expression. *J Agric Food Chem* 65:6152-6157
2. Harada T, Miura N; Adachi Y, Nakajima M, Yadomae T, Ohno N (2002) Effect of SCG, 1, 3- $\beta$ -D-glucan from *Sparassis crispa* on the hematopoietic response in cyclophosphamide induced leukopenia mice. *Biol Pharm Bull* 25:931-939
3. Harada T, Masuda S, Arii M, Adachi Y, Nakajima M, Yadomae T, Ohno N (2005) Soy isoflavone aglycone modulates a hematopoietic response in combination with soluble  $\beta$ -glucan: SCG. *Biol Pharm Bull* 28:2342-2345
4. Harada T, Kawaminami H, Miura NN, Adachi Y, Nakajima M, Yadomae T, Ohno N (2006) Mechanism of enhanced hematopoietic response by soluble  $\beta$ -glucan SCG in cyclophosphamide-treated mice. *Microbiol Immunol* 50:687-700
5. Ishihara K, Hirano T (2002) IL-6 in autoimmune disease and chronic inflammatory proliferative disease. *Cytokine Growth Factor Rev* 13:357-368
6. Kimura T, Dombo M (2005) *Sparassis crispa*. In H. Kawagishi (Eds.), CMCPress, Tokyo, pp.167-178
7. Kwon AH, Qiu Z, Hashimoto M, Yamamoto K, Kimura T (2009) Effects of medicinal mushroom (*Sparassis crispa*) on wound healing in streptozotocin-induced diabetic rats. *Am J Surg* 197:503-509
8. Kobayashi M, Fitz L, Ryan M, Hewick RM, Clark SC, Chan S, Loudon R, Sherman F, Perussia B, Trinchieri G (1989) Identification and purification of natural killer cell stimulatory factor (NKSF), a cytokine with multiple biologic effects on human lymphocytes. *J Exp Med* 170:827-845
9. Ohno N, Miura NN, Nakajima M, Yadomae T (2000) Antitumor 1, 3- $\beta$ -glucan from cultured fruit body of *Sparassis crispa*. *Biol Pharm Bull* 23:866-872
10. Politi M, Silipo A, Siciliano T, Tebano M, Flamini G, Braca A, Jimenez-barbero J (2007) Current analytical methods to study plant water extracts: the example of the two mushrooms species, *Inonotus hispidus* and *Sparassis crispa*. *Phytochem Anal* 18:33-41
11. Roberfroid MB (1999) Concepts in functional foods: the case of inulin and oligofructose. *J Nutr* 129:1398S-1401S
12. Shin HJ, Oh DS, Lee HD, Kang HB, Lee CW, Cha WS (2007) Analysis of mineral, amino acid and vitamin contents of fruiting body of *Sparassis crispa*. *J Life Sci* 17:1290-1293
13. Stern AS, Podlaski FJ, Hulmes Jeffrey D., Pan YCE, Quinn PM, Wolitzky AG, Familletti PC, Stremlo DL, Truitt T, Chizzonite R, Gately MK (1990) Purification to homogeneity and partial characterization of cytotoxic lymphocyte maturation factor from human B-lymphoblastoid cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 87:6808-6812
14. Tada R, Harada T, Nagi-Miura N, Adachi Y, Nakajima M, Yadomae T, Ohno N (2007)

- NMR characterization of the structure of a  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3)-D-glucan isolate from cultured fruit bodies of *Sparassis crispa*. Carbohydr Res 342:2611-2618
15. Tracey KJ, Cerami A (1994) Tumor necrosis factor: a pleiotropic cytokine and therapeutic target. Annu Rev Med 45:491-503
  16. Trinchieri G, Proinflammatory and immunoregulatory functions of interleukin-12. Int Rev Immunol 16:365-396
  17. Wang Q, Li J, Wang Y, Zhang X, Li K (2011) Comparison of aromatic components from extracted by Static Headspace and Headspace-SPME. 32:174-176
  18. Yamamoto K, Kimura T, Sugitachi A, Matsuura N (2009) Anti-angiogenic and anti-metastatic effects of  $\beta$ -1,3-D-glucan purified from hanabiratake, *Sparassis crispa*. Biol Pharm Bull 32: 259-263
  19. Yoshikawa K, Kokudo N, Hashimoto T, Yamamoto K, Inose T, Kimura T (2010) Novel phthalide compounds from *Sparassis crispa* (Hanabiratake), hanabiratakelide A-C, exhibiting anti-cancer related Activity. Biol Pharm Bull 33:1355-1359

<별첨작성 양식>

[별첨 1]

연구개발보고서 초록

과 제 명	(국문) 꽃송이버섯을 활용한 골관절염 개선 건강기능성식품 개발				
	(영문) Development of a functional food with relieving osteoarthritis using Cauliflower mushroom				
주관연구기관	(주)경신바이오		주 관 연 구	(소속) (주)경신바이오	
참 여 기 업			책 임 자	(성명) 김선근	
총연구개발비 ( 775,000 천원)	계	775,000 천원	총 연구 기간	2016. 7. 7 ~ 2018. 12. 31 ( 2년 6월)	
	정부출연 연구개발비	540,000천원	총 참 여 연구 원 수	총 인 원	
	기업부담금	235,000천원		내부인원	
	연구기관부담금			외부인원	
<p>○ 연구개발 목표 및 성과</p> <p>*꽃송이버섯을 원료로 하여, 골관절염에 효과가 뛰어난 성분 규명 및 효능 검증을 하여 궁극적으로 개별인정형 원료등록 신청을 목표로 함.</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 지표성분 설정 및 가공 표준화/소재의 골관절염에 대한 효능 검증/제품 개발 및 출시</li> <li>- 연구기반성과 : SCI급 5편, KCI급 4편 발표</li> <li>- 사업화성과: 국내특허출원2건, PCT출원 1건</li> </ul> <p>제품화:가루효 특, 천 / 신규 상용화제품 :발효꽃송이버섯 특, 천 개발 2018년 12월말 매출 1,200,358천원으로 달성했다. 고용창출은 경기불황으로 많은 연구인력을 채용이 어려워 1명에 충원함.</p> <p>○ 연구내용 및 결과</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 원료의 추출법 및 가공화 적정기술 개발</li> <li>- 지표성분 설정 및 시험법 밸리데이션을 통한 원료의 기준규격 설정</li> <li>- 가공을 위한 원료 표준화 방법 설정</li> <li>- 원료 및 성분의 골관절염 개선 효능 검증</li> <li>- 동물모델을 활용하여 후보소재에 대한 골관절염 기능성 확인</li> <li>- 골관절염 개선의 효능 탐색 및 작용기전 연구</li> <li>- 대량생산공정을 위한 원재료·제조공정의 표준화 및 안정성 연구</li> <li>- 인체시험을 통한 기능성평가 : 시제품(확정된 식품형태) 생산 및 인체적용시험</li> </ul> <p>○ 연구성과 활용실적 및 계획</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 기술이전 - 당사의 2018년 기업부담금 외 추가 임상시험비용(CRO, IRB승인)으로 기술이전은 개발 완료후 2019년 상반기에 이전할 예정임.</li> <li>- 지표성분을 이용한 원료표준화 방안 마련 및 기능성 검증으로 통하여 추후 건강기능식품으로의 기능성 원료 개별인정의 토대 마련</li> <li>- 개별인정형 건강기능식품 개발로 인하여 꽃송이 버섯의 부가가치 증진, 이로 인한 농가소득 증대 및 일본 수출 품목으로 개발</li> </ul>					

## 자체평가의견서

### 1. 과제현황

		과제번호		<b>116001-3</b>	
사업구분	고부가가치식품개발사업				
연구분야				과제구분	단위
사업명	고부가가치식품개발사업				주관
총괄과제	기재하지 않음			총괄책임자	기재하지 않음
과제명	꽃송이버섯을 활용한 골관절염 개선 건강기능성식품 개발			과제유형	(기초,응용,개발)
연구기관	(주)경신바이오			연구책임자	김선근
연구기간 연구비 (천원)	연차	기간	정부	민간	계
	1차연도	2016.07.07~2016.12.31	120,000	30,000	150,000
	2차연도	2017.01.01~2017.12.31	220,000	55,000	275,000
	3차연도	2018.01.01~2018.12.31	200,000	150,000	350,000
	4차연도				
	5차연도				
	계		540,000	235,000	775,000
참여기업					
상대국	상대국연구기관				

※ 총 연구기간이 5차연도 이상인 경우 셀을 추가하여 작성 요망

2. 평가일 : 2019년 02년 12일

3. 평가자(연구책임자) : 김선근

소속	직위	성명
주식회사 경신바이오	부장	김선근

4. 평가자(연구책임자) 확인 : 김선근

본인은 평가대상 과제에 대한 연구결과에 대하여 객관적으로 기술하였으며, 공정하게 평가하였음을 확약하며, 본 자료가 전문가 및 전문기관 평가 시에 기초자료로 활용되기를 바랍니다.

<b>확약</b>	
-----------	--

## I. 연구개발실적

※ 다음 각 평가항목에 따라 자체평가한 등급 및 실적을 간략하게 기술(200자 이내)

### 1. 연구개발결과의 우수성/창의성

■ 등급 : (아주우수, 우수, 보통, 미흡, 불량)

꽃송이 버섯에 대한 원료 규격 표준화, 관절 및 연골 건강에 대한 기능성 체계화, 특히, 국내 처음으로 정석의 인체적용시험을 실시하여 꽃송이 버섯 추출물의 대중화에 기여하였다고 판단.

### 2. 연구개발결과의 파급효과

■ 등급 : (아주우수, 우수, 보통, 미흡, 불량)

꽃송이 버섯에 대한 지표성분으로 베타글루칸을 선정 하였으며 관절 및 연골의 건강 개선에 대한 기전 설명을 체계화 하여 이를 각 제형 제품화에 적용 할 것임

### 3. 연구개발결과에 대한 활용가능성

■ 등급 : (아주우수, 우수, 보통, 미흡, 불량)

현 과제의 원료표준화, 규격화, 기능성 자료를 토대로 새로운 과제의 도출 활용 가능하며 체계화 된 자료로서 시장 진입에 용이한 도구로 활용할 예정임.

### 4. 연구개발 수행노력의 성실도

■ 등급 : (아주우수, 우수, 보통, 미흡, 불량)

연구 목표 달성율(100%이상)을 보더라도 모든 세부 연구 목표 항목에 충실하여 과제를 수행 하였음

### 5. 공개발표된 연구개발성과(논문, 지적소유권, 발표회 개최 등)

■ 등급 : (아주우수, 우수, 보통, 미흡, 불량)

논문(9건), 특허(3건), 발표(7건)으로 목표 이상 달성함.



## II. 연구목표 달성도

세부연구목표 (연구계획서상의 목표)	비중 (%)	달성도 (%)	자체평가
원료표준화 및 지표성분 확보	20	20	베타글루칸 확보
인체적용시험 완료	20	20	51명 인체적용시험 완료
활성 물질 규명, 함량 시험법 및 전임상 완료	10	10	활성 물질 규명 및 전임상 완료
시제품 제작 및 개별인정 신청서 작성	10	10	코팅정 제형 제작 및 신청서 완성
합계	100점		

## III. 종합의견

### 1. 연구개발결과에 대한 종합의견

원료표준화, 지표성분 설정, 인체적용시험 완료, 활성 물질 규명, 함량시험법 및 전임상 완료 후 시제품 제작 및 개별인정 신청서 작성 등 당초 목표를 모두 달성하였음. 그러나, 인체적용시험 결과에서 설치류의 인지능 개선 효과가 일관성을 보이지는 않았음. 따라서, 기반 자료를 토대로 더 많은 연구를 수립 후 실행 한다면 기능성에 대한 보완이 될 수 있을 것으로 사료됨.

### 2. 평가시 고려할 사항 또는 요구사항

원료 표준화 및 규격, 안전성 자료 확보, 전임상 기능성이 이미 확보 되었기에 인체적용시험에 대한 추가 보완을 위한 지원이 이루어진다면 보다 완성도 있는 자료가 될 것임

### 3. 연구결과의 활용방안 및 향후조치에 대한 의견

최종 보고서 완성 후 전 임상 결과들은 사업화 및 제품화의 레시피 자료로 적극 활용할 계획이며, 차 후 협동기관과의 협의를 통해 인체적용시험에 대한 자료 추가 등으로 보다 완성된 개별인정 신청서를 작성할 예정임.

#### IV. 보안성 검토

o 연구책임자의 보안성 검토의견, 연구기관 자체의 보안성 검토결과를 기재함

※ 보안성이 필요하다고 판단되는 경우 작성함.

##### 1. 연구책임자의 의견

--

##### 2. 연구기관 자체의 검토결과

--

[별첨 3]

## 연구성과 활용계획서

### 1. 연구과제 개요

사업추진형태	<input checked="" type="checkbox"/> 자유응모과제 <input type="checkbox"/> 지정공모과제	분 야		
연구과제명	꽃송이버섯을 활용한 골관절염 개선 건강기능식품 개발			
주관연구기관	주식회사 경신바이오	주관연구책임자	김선근	
연구개발비	정부출연 연구개발비	기업부담금	연구기관부담금	총연구개발비
	540,000천원	235,000천원	-	775,000천원
연구개발기간	2016년 07월 07일 ~ 2018년 12월 31일(30개월)			
주요활용유형	<input type="checkbox"/> 산업체이전 <input type="checkbox"/> 교육 및 지도 <input type="checkbox"/> 정책자료 <input type="checkbox"/> 기타(                      ) <input type="checkbox"/> 미활용 (사유:                      )			

### 2. 연구목표 대비 결과

당초목표	당초연구목표 대비 연구결과
꽃송이버섯을 원료로 골관절염 개선 기능성 건강식품 개발	-(원료표준화)지표성분을 이용한 원료표준화 방안 마련. -기능성 검증으로 통하여 추후 건강기능 식품으로의 기능성 원료 개별인정의 토대 마련. -(기능성 검증) 소재의 골관절염에 대한 효능 검증(동물모델) -(제품화 및 인체적용시험) 제품 개발 및 출시 -기능성원료인정 신청 : 개별인정형 기능성원료 추진 예정 -(사업화 지표) 특허출원 2건, 특허등록 1건, SCI급 4편, KCI급 3편 게재, 제품화 1건 이상 개발 상용화 및 고용창출, 매출발생.

\* 결과에 대한 의견 첨부 가능

### 3. 연구목표 대비 성과

성과 목표	사업화지표										연구기반지표									
	지식 재산권			기술 실시 (이전)		사업화					기술 인증	학술성과				교육 지도	인력 양성	정책 활용·홍보		기 타 (타 연구 활용 등)
	특 허 출 원	특 허 등 록	품 종 등 록	건 수	기 술 료	제 품 화	매 출 액	수 출 액	고 용 창 출	투 자 유 치		논문		학 술 발 표	정 책 활 용			홍 보 전 시		
												SC I	비 SC I							
단위	건	건	건	건	백 만 원	백 만 원	백 만 원	백 만 원	명	백 만 원	건	4건	3건	4건	5명	건	0건			
가중치																				
최종목표	2	1		2	30	1	11, 00 0		2			5	3		5					
연구기간내 달성실적	1					3	33 7					3	2	3			1			
달성율(%)	10 0																			

### 4. 핵심기술

구분	핵심기술명
①	“발효물의 제조방법 및 그로부터 제조되는 비타민 발효물”은 효소는 인위적으로 효모균을 사용하지 않고 현미호분과 꽃송이버섯, 유산균(프로바이오틱스), 프락토올리고당 발효하는 특허와 핵심기술을 가지고 있다.
②	
③	
⋮	
⋮	

### 5. 연구결과별 기술적 수준

구분	핵심기술 수준					기술의 활용유형(복수표기 가능)				
	세계 최초	국내 최초	외국기술 복 제	외국기술 소화·흡수	외국기술 개선·개량	특허 출원	산업체이전 (상품화)	현장에로 해 결	정책 자료	기타
발효 기술	√	√				√	√			
②의 기술										
③의 기술										
⋮										

\* 각 해당란에 v 표시

6. 각 연구결과별 구체적 활용계획

핵심기술명	핵심기술별 연구결과활용계획 및 기대효과
기술개발결과물	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 꽃송이버섯의 지표성분을 규명함으로써 표준화된 시료 조제 및 제법</li> <li>- 꽃송이버섯의 효능 검증</li> <li>- 조성 및 제조공정에 대한 특허 출원</li> <li>- 국제저명학술지 논문 발표</li> </ul>
기술개발결과의 활용방안	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 연구 결과를 바탕으로 한 논문 및 특허를 통하여 당 기술결과의 연구 성과를 공인 추진함</li> <li>- 지표성분을 이용한 원료표준화 방안이 마련된 사항과 미진했던 인체적용 시험에 대한 부분을 좀 더 철저히 준비하여 기능성원료 재검증으로 통하여 추후 건강기능식품으로의 기능성 원료 개별인정의 토대 마련하겠다.</li> <li>- 개별인정형 건강기능식품 개발로 인하여 꽃송이 버섯의 부가가치 증진으로 인한 농가소득 증대 및 일본 수출 품목으로 개발</li> </ul>

7. 연구종료 후 성과창출 계획

성과목표	사업화지표										연구기반지표								
	지식 재산권			기술실시 (이전)		사업화					기술인증	학술성과			교육지도	인력양성	정책 활용·홍보		기타 (타 연구 활용 등)
	특허출원	특허등록	품종등록	건수	기술료	제품화	매출액	수출액	고용창출	투자유치		논문		학술발표			정책 활용	홍보진시	
												SCI	비SCI						
단위	건	1건	건	2건	백만원	건	백만원	백만원	2명	백만원	건	건	건	건	명				
가중치			1																
최종목표		1		2	30														
연구기간내 달성실적																			
연구종료 후 성과창출 계획		1	1	2	30	1	1500		2									1	

