

보안 과제(), 일반 과제(O) / 공개(O), 비공개()발간등록번호(O)

맞춤형혁신식품 및 천연안심소재기술개발사업 2022년도 최종보고서

발간등록번호

11-1543000-004192-01

버섯을 활용한 천연비타민 D 소재개발

2022. 10. 29.

주관연구기관 / (주)네이처텍

협동연구기관 / 대구대학교 산학협력단

경성대학교 산학협력단

위탁연구기관 / (재)포항테크노파크

농림축산식품부

(전문기관) 농림식품기술기획평가원

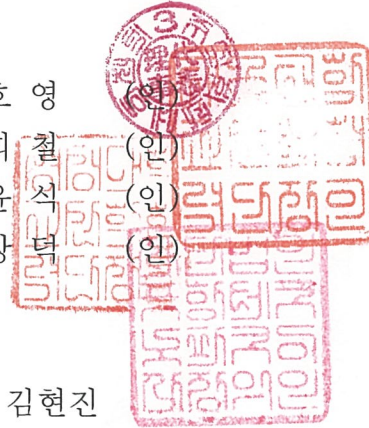
제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “버섯을 활용한 천연 비타민 D 소재개발”(개발기간 : 2019. 05. 20.
~ 2022. 06. 30.)과제의 최종보고서로 제출합니다.

2022 년 08월 31일

(주)네이처텍 : 심 호 영
대구대학교 산학협력단 : 원 희 철 (인)
경성대학교 산학협력단 : 최 윤 석 (인)
(재)포항테크노파크 : 이 강 덕 (인)



주관연구책임자 : 김현진
협동연구책임자 : 강선철
협동연구책임자 : 김강민
위탁연구기관책임자 : 박재규

국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제18조에 따라 보고서 열람에 동의 합니다.

최종보고서										보안등급 일반[√], 보안[]	
중앙행정기관명		농림축산식품부			사업명		사업명		맞춤형혁신식품 및 천연안심소재기술개발사업		
전문기관명 (해당 시 작성)					내역사업명 (해당 시 작성)						
공고번호		2019300188			총괄연구개발 식별번호 (해당 시 작성)				연구개발과제번호 319047-3		
기술분류	국가과학기술 표준분류	LB0206 원예특용작물생명학	30%	LB1801 기능성식품	30%	LB1706 식품공정공학	15%				
	농림식품과학기술분류	CA0105기능성소재	30%	AA0302 특용작물 생명공학	30%	PA0201 기능성식품 및 소재	10%				
총괄연구개발명 (해당 시 작성)		국문									
		영문									
연구개발과제명		국문		버섯을 활용한 천연 비타민D 소재개발							
		영문		Development of vitamin D natural sources based on mushroom							
주관연구개발기관		기관명		네이처텍		사업자등록번호		301-86-14677			
		주소		(우)충북 진천군 초평면 용정길 29-8		법인등록번호		154311-0029361			
연구책임자		성명		김현진		직위		팀장			
		연락처		직장전화 전자우편		휴대전화					
연구개발기간		전체		2019.05.20. - 2022.06.30. (3년 1.387개월)							
		단계 (해당 시 작성)		1단계		2019.05.20. - 2019.12.31. (7.387개월)					
				2단계		2020.01.01. - 2021.06.30. (1년 6개월)					
				3단계		2021.07.01. - 2022.06.30. (1년)					
연구개발비 (단위: 천원)		정부지원 연구개발비		기관부담 연구개발비		그 외 기관 등의 지원금 지방자치단체 기타()		합계		연구개발비외 지원금	
		현금		현금 현물		현금 현물		현금 현물		합계	
총계		786,000		27,500 247,500		- -		813,500 247,500		1,061,000	
1단계 1년차		200,000		7,500 67,500		- -		207,500 67,500		275,000	
2단계 1년차		286,000		10,000 90,000		- -		296,000 90,000		386,000	
2단계 2년차		300,000		10,000 90,000		- -		310,000 90,000		400,000	
공동연구개발기관 등 (해당 시 작성)		기관명		책임자		직위		휴대전화		전자우편	
		비고		역할		기관유형					
공동연구개발기관		대구대학교산학협력단		강선철		교수				-	
		경성대학교 산학협력단		김강민		교수				-	
위탁연구개발기관		포항테크노파크		박재규		책임연구원				-	
연구개발담당자 실무담당자		성명		김현진		직위		팀장			
		연락처		직장전화 전자우편		휴대전화		국가연구자번호			

이 최종보고서에 기재된 내용이 사실임을 확인하며, 만약 사실이 아닌 경우 관련 법령 및 규정에 따라 제재처분 등의 불이익도 감수하겠습니다.

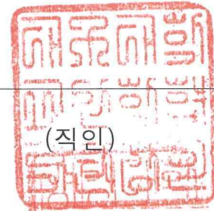
2022 년 08 월 31 일

연구책임자: 김 현 진

주관연구개발기관의 장: 심 호 영



공동연구기관
대구대학교 산학협력단장: 원 희 철



(직인)

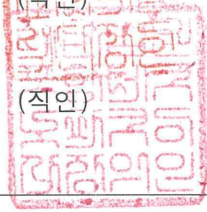
공동연구기관
경성대학교 산학협력단장: 최 윤 식

(직인)

위탁연구기관
포항테크노파크 이사장: 이 강 덕

(직인)

농림축산식품부장관·농림식품기술기획평가원장 귀하



< 요약 문 >

※ 요약문은 5쪽 이내로 작성합니다.

사업명	맞춤형 혁신식품 및 천연안심소재 기술개발사업	총괄연구개발 식별번호 (해당 시 작성)	-				
내역사업명 (해당 시 작성)	-	연구개발과제번호	319047-3				
기술분류	국가과학기술 표준분류	LB0206 원예특용작물생명학	30 %	LB1801 기능성식품	30 %	LB1706 식품공정공학	15%
	농림식품 과학기술분류	CA0105기능성소재	30 %	AA0302 특용작물 생명공학	30 %	PA0201 기능성식품 및 소재	10%
총괄연구개발명 (해당 시 작성)	-						
연구개발과제명	버섯을 활용한 천연 비타민 D 소재 개발						
전체 연구개발기간	2019.05.20.~2021.12.31						
총 연구개발비	총 1,061,000천원 (정부지원연구개발비: 786,000천원, 기관부담연구개발비: 275,000천원)						
연구개발단계	기초[] 응용[<input checked="" type="checkbox"/>] 개발[]		기술성숙도 (해당 시 기재)		-		
연구개발과제 유형 (해당 시 작성)	-						
연구개발과제 특성 (해당 시 작성)	-						

연구개발 목표 및 내용	최종 목표		<ul style="list-style-type: none"> ○ 고품량 천연비타민D 버섯 소재 생산을 위한 최적 전처리/전환 공정 표준화 기술의 개발과 보급 확산 및 현장적용 통한 대량생산 ○ 전환/수율 최적화 기술을 활용한 고품량 천연비타민D 원료 소재 2종 이상 상용화 ○ 고품량 천연비타민D 버섯 소재를 활용한 3종 이상 제품 생산 및 상용화
	전체 내용		<ul style="list-style-type: none"> ○ UVB를 이용하여 5종의 후보 버섯소재(새송이, 느타리, 팽이, 양송이, 표고)에 각각 함유된 ‘비타민D 전구체(ergosterol)’를 ‘비타민D2(ergocalciferol)’로 전환시켜 최적 수율을 도출할 수 있는 최적 전처리 조건 및 공정 확립 ○ 2종 이상의 원료 소재와 3종 이상의 제품에 대한 대량생산과 현장적용을 위한 공정 개발 확립 및 제품 표준화 ○ (비타민D 전환기술과) 제조 공정 기술의 이전/보급 확산으로 표준화 된 원료소재의 생산과 상용화 ○ ‘활성형 비타민D’ 제품 개발을 통한 기존 제품과의 차별화 도출 ○ 미래원천기술 확보를 위한 소재의 기능성 탐색 연구
	1차년도	목표	○ MOU 3건 이상, 경제비교성평가보고서 1건, 전환조건 및 전처리 공정 평가(비타민D 전환율 20% 이상, LED 처리시간 30분 이내, 분말 입도 800mesh 이상, 공인시험성적서 1건)
		내용	<ul style="list-style-type: none"> - 5종의 후보 버섯 원료 지역별 확보 - 지역별 영농조합/농업기술센터와 협력 네트워크 구축을 통한 원료 수급 안정화 - 비타민D 전구체 함량 및 전환수율 기초자료 확보 - 제품 경제성 비교 평가를 통한 우선 개발 순위 원료 선정 - 비타민D 최적 전환/추출 공정 개발 및 최적화 - 원료 소재의 이화학적 특성 및 안전성 분석 - 비타민D 전구체 및 비타민D 함량 분석 기술 개발 및 표준화
	2차년도	목표	○ 원료 생산 2건, 품목 신고 2건, 소재 생산 1톤 이상, 제품제조 지시서 1건, 논문 2건
		내용	<ul style="list-style-type: none"> - 소재 대량생산 및 품목(원료) 신고 - 소재 내 비타민D 표준화 - 소재 이화학적 특성 및 안전성 분석 - proto-type 시제품 연구 및 제작

			- proto-type 시제품 유효성 탐색 - 제품화를 위한 적용성, 기호도 평가 및 마케팅 전략 수립
	3차년도	목표	○ 제품 생산 2건, 품목신고서 2건, 제조지시기록서 2건
		내용	- proto-type 시제품 기반 가공적성 최적화 실시 - 개발 제품 등록 - 제품 유효성 및 안전성 평가 - 제품 대량생산 및 출시

○ 국내산 천연 식물성 비타민D 소재 개발 및 응용 제품 개발
○ 과제 기간 내에 성과는 특허 출원 5건, 특허 등록 1건, 비SCI(E) 연구 논문 5건, 학술 발표 8건, 기술이전 실시 2건, 원료 소재화 2건, 제품화 5 건, 고용 창출 6건

	연구목표	연구성과	
연구개발성과	1차년도	○ 지역별/품종별 원료확보 및 협력 네트워크 구축	○ 후보소재 5종 버섯 원료 확보 및 전환 수율 측정완료, 버섯선정 완료 ○ MOU 3건 체결
		○ 비타민D 전구체 함량 및 전환 수율 기초자료 확보	○ UVB 처리 최적 조건 테스트
		○ 제품경제성 비교 평가를 통한 우선개발 순위원료 선정	○ 버섯 5종 비타민 D 전구체 (ergosterol)함량 및 단가 비교
		○ 비타민D 최적전환/추출 공정 개발 및 최적화	○ 버섯 5종의 UVB 0,5,10,15,20,30 분 조사 후 최적조건 확립
		○ 원료소재의 이화학적 특성 및 안전성 분석	○ 동물세포주와 Zebrafish model 을 이용한 안전성 평가
		○ 비타민 D 전구체 및 미타민 D 함량부식기술 개발 및 표준화	○ 식품공전 및 유기용매 사용 간이 추출 법비교 평가
	2차년도	○ 소재 대량생산 및 품목(원료) 신고	○ 소재 원물 1ton 기준 건조물 200 kg 대량생산 완료 ○ 품목신고 2건 완료
		○ 소재 내 비타민D 표준화	○ 비타민D 최적 처리 조건 구명 완료
		○ 소재 이화학적 특성 및 안전성 분석	○ 소재 in vivo 안전성 평가 완료 ○ 소재 이화학적 특성 분석 완료
		○ proto-type 시제품 연구 및 제작	○ 시제품 연구 개발 및 제작 3건 완료
		○ proto-type 시제품 유효성 탐색	○ 시제품 유효성 탐색 완료
		○ 제품화를 위한 적용성, 기호도 평가 및 마케팅 전략 수립	○ 시제품 제형 연구 개발 완료 ○ 기호도 평가 완료 ○ 마케팅 전략 수립 완료
	3차년도	○ proto-type 시제품 기반 가공적성 최적화 실시	○ 정제와 분말 제품의 가공적성 최적화 확인 ○ 정제제품의 안정성결과 확보
		○ 개발제품 등록	○ 고시형건강기능식품 1건, 일반식품 1 건 제품 등록 완료
		○ 제품 유효성 및 안전성 평가	○ 제품의 간보호효과, 항염, 항알레르기 효과 시험 실시 ○ 대사체 분석 실시, GAG test, 랫드에서 단회독성 시험 실시
		○ 제품 대량생산 및 출시	○ 대량생산을 위한 (주)네이처텍 생산 시스템 등록 및 공급처 공급계약 완료 ○ 출시준비 중 - 건강기능식품 품목제조 신고 완료, 제품 출시를 위한 MOU 체결

연구개발성과 활용계획 및 기대 효과

- 기능식품 제조기술/추출기술 등의 우위선점 효과
: 버섯 유래 비타민D 전환/전처리 관련 기술에 대한 지식재산권 확보 후 관련 생산 산업체에 통상실시권 부여 등을 통한 기술 보급 확산 및 건강기능성 소재 제조기술의 기술우위 선점 및 한국의 식·의약 산업과 연계된 산업(건강기능식품산업)의 기술적인 진보가 기대됨

	<ul style="list-style-type: none"> - 원료 공급 농가의 경제성장 : 버섯 유래 천연 비타민D 소재 상용화/소재 기반 제품화를 통한 원료 생산 농가와 가공/제조 관련 산업체(6차산업)의 안정적 수익 구조 도출 및 소득 증대 기대 - 국내토착 생물자원의 확보 효과 : 나고야의정서 발효에 따른 국내 식·의약품, 화장품산업에 미칠 파급효과를 최소화하기 위해 원천소재의 대량생산 기술 확보 - 식품관련 기술 진보 효과 : 식품과 관련된 전반적인 기반기술의 선점을 통해 기능성 식품, 식품 분석학, 식품공정·포장학 및 기능성식품학 등의 생물 산업 분야에서의 핵심 기반 기술을 주도할 것으로 기대됨 - 건강기능식품의 고부가가치 효과 : 고함량 천연 비타민D 소재 생산을 통한 기존 천연물(버섯)에 고부가가치를 부여함과 동시에 소비자 보호 및 제품 신뢰성 확보 및 다양한 제형의 제품 개발을 통한 제품 다양성 확보와 함께 향후 기능성 제품 개발을 통한 제품 차별화/고부가가치화 실현 - 새로운 신수요 창출 효과 : 버섯 유래 천연 비타민D 대량생산 기술은 다른 식품 개발의 기초자료로서 활용할 수 있음. 한편 본 연구의 성공적 수행으로 건강식품의 개발로 건강식품산업의 글로벌화에 이바지할 것으로 기대되며 그에 따른 인력 채용의 기회가 확대됨 - 신시장 개척 효과 : 건강식품 전문업체인 기업의 생산라인과 수출 인프라를 이용한 제품 생산으로 국내 수요창출 뿐만 아니라 수출 상품 개발에 활용 가능함 : 최근 각광 받고 있는 비건 건강기능식품 진출을 도모하여 새로운 시장진출이 가능함
--	---

연구개발성과의 비공개여부 및 사유	해당없음
--------------------	------

연구개발성과의 등록·기탁 건수	논문	특허	보고서 원문	연구 시설·장비	기술 요약 정보	소프트 웨어	표준	생명자원		화합물	신품종	
								생명 정보	생물 자원		정보	실물
5	4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
연구시설·장비 종합정보시스템 등록 현황	구입 기관	연구시설·장비명	규격 (모델명)	수량	구입 연월일	구입가격 (천원)	구입처 (전화)	비고 (설치장소)	ZEUS 등록번호			
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
국문핵심어 (5개 이내)	에르고스테롤		식물성 비타민 D		비타민D2 전환		버섯류		식품소재			
영문핵심어 (5개 이내)	Ergosterol		Phyto vitamin D		Vitamin D2 conversion		Mushrooms		Food material			

< 목 차 >

1. 연구개발과제의 개요

- 1) 기술 개발 비전 및 목표
- 2) 연구개발 대상 및 기술 목표

2. 연구개발과제의 수행 과정 및 수행내용

- 1) 연구개발의 최종목표
- 2) 연도별 개발목표 및 내용
- 3) 개발 내용 및 범위
- 4) 평가의 착안점 및 기준

3. 연구개발과제의 수행 결과 및 목표 달성 정도

- 1) 연구수행 결과
- 2) 목표 달성 정도

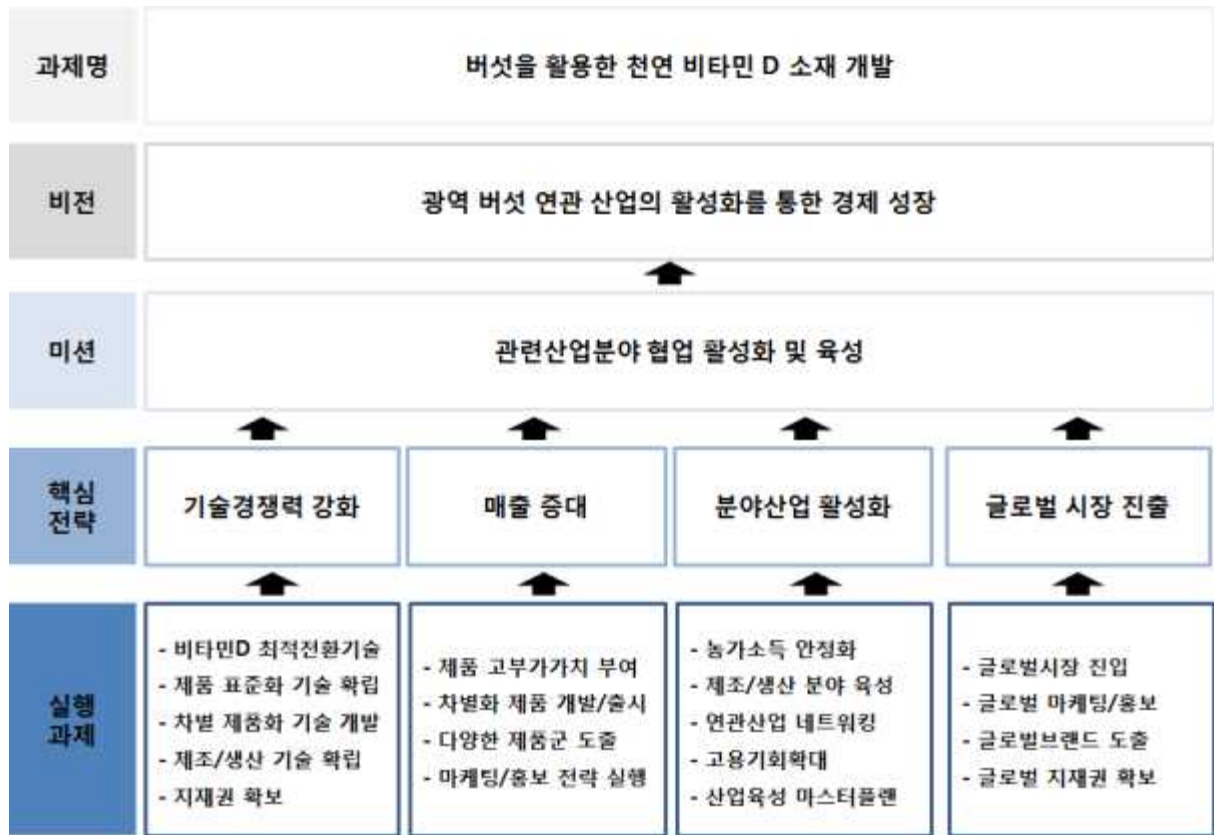
4. 목표 미달 시 원인분석(해당 시 작성)

5. 연구개발성과 및 관련 분야에 대한 기여 정도

6. 연구개발성과의 관리 및 활용 계획

1. 연구개발과제의 개요

1) 기술 개발 비전 및 목표



본 과제를 통해 국내 버섯 연관 산업의 활성화를 통한 농업 경제 성장을 비전으로 하여 버섯 관련 1, 2, 3차(6차) 산업간 긴밀한 연계협력을 활성화 시키고 제반 산업을 육성하는 것을 미션으로 함

미션 달성을 위한 핵심 전략은 크게 네 가지로 나누어지며 이를 위한 본 과제에서의 실행사항은 다음과 같 음

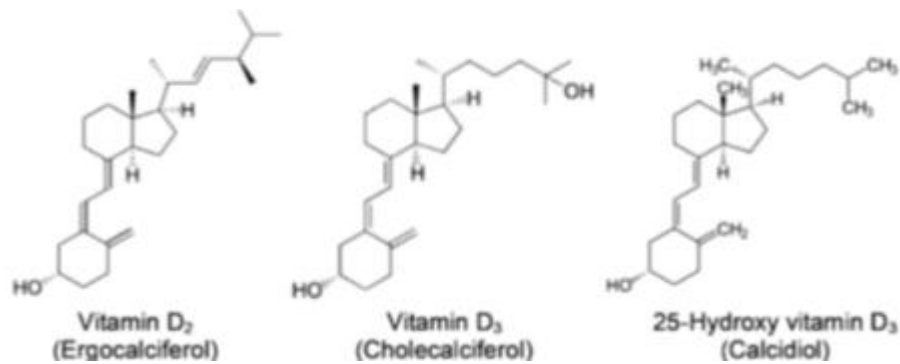
- 버섯 이용 천연비타민D 제품 개발에 대한 국내외 기술 경쟁력 강화
 - 버섯 내 전구체로부터 천연 비타민D로의 최적 전환/전처리 기술의 확립
 - 소재 및 제품에 대한 표준화 기술의 확립
 - 차별화된 제품화 기술의 지속적인 개발과 확립
 - 대량생산을 목표로 하는 제조/생산 기술의 확립 및 현장 적용
 - 특허, 논문 등 개발기술의 지식재산권 확보
- 개발 제품과 소재에 대한 매출 증대
 - 차별화된 제품 개발과 다양한 제품군 도출로 매출 향상에 기여
 - 고부가가치를 부여할 수 있는 제품군 개발을 통한 실질적인 소득 증대
 - 차별화된 마케팅/홍보 전략을 통한 제품판매 증대
- 관련분야산업의 활성화
 - 지속적인 원료 수급을 통한 농가소득의 안정화로 1차 산업 분야 육성
 - 제조/생산 분야의 다양성 확장성 추구를 통한 2차 산업 분야 활성화
 - 1, 2, 3차 산업의 유기적인 연계 협력을 통한 산업육성 선순환 실현 및 고용 기회 확대
 - 분야산업 육성을 위한 마스터플랜 수립 추진 및 실행

- 기술/제품의 글로벌 시장 진출 달성
 - 글로벌 시장에서 경쟁이 가능한 수준의 제품과 기술력 확보
 - 글로벌 시장 진입을 목적으로 하는 지식재산권 확보 및 제품 개발
 - 글로벌 시장 진출을 위한 통합 브랜드 도출
 - 글로벌 시장 선점을 목표로 하는 마케팅/홍보 전략 수립 및 추진

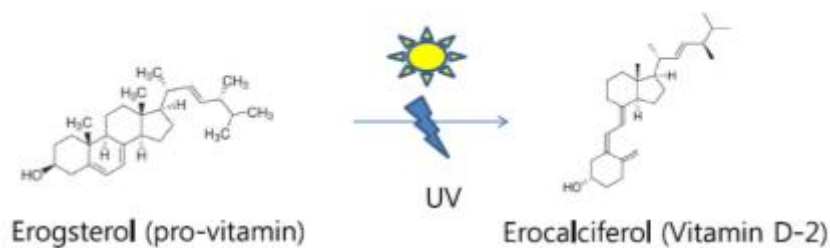
2) 연구개발 대상 및 기술 목표

○ 버섯 내 비타민D 전구체로부터의 비타민D 전환

- 비타민D는 체내 칼슘농도의 항상성과 뼈건강 유지에 관여하는 지용성비타민의 한 종류이며 세포의 증식/분화 조절과 면역기능 등에도 관여하는 것으로 잘 알려져 있음
- 인체에서 사용되는 비타민D는 동물성 (비타민D3, cholecalciferol)과 식물성(비타민D2, ergocalciferol) 두 종류이며 각각의 전구체(프로비타민)인 7-dehydrocholesterol과 ergosterol이 자외선(UVB, 290~315nm)조사에 의해 이성질화되어 비타민D로 전환된 후 간에서 25-hydroxylase의 작용으로 생리적 활성을 나타내는 calcitriol로 전환되어 사용됨

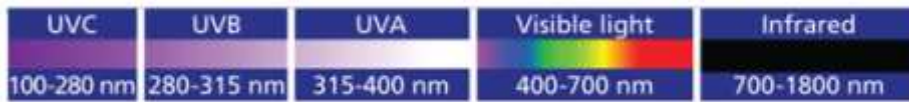


Vit-D2 conversion of Mushroom

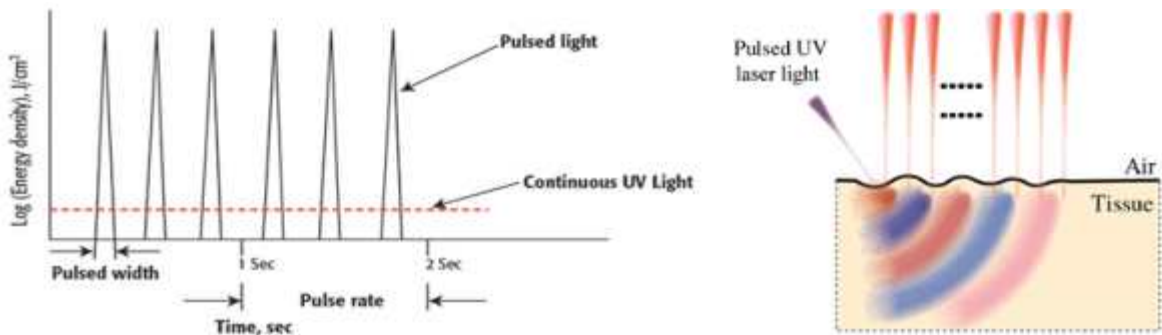


- 특히, 버섯에는 비타민D2의 전구체인 ergocalciferol이 많이 함유되어있는 것으로 알려져 있으며 버섯의 건조 과정에서 UVB 조사에 의해 비타민D2로의 전환이 잘 되는 것으로 알려져 있음
- 목이버섯과 표고버섯에 전구체 및 비타민D2가 많이 함유되어있는 것으로 알려져 있으나 버섯유래 비타민D의 산업화에 있어서 이들 버섯 자체의 높은 가격으로 인하여 경제성이 낮아 새송이, 양송이, 느타리, 팽이 등 상대적으로 경제성이 높은 비타민D 급원 버섯류를 활용하는 것이 효율적임
- 본 과제에서는 새송이, 양송이, 느타리, 팽이, 표고 등 5종 버섯을 사용하여 천연 비타민D 소재/제품 개발에 적합한 산지별/품종별 경제성 비교 및 선정을 우선적으로 실시하고 제품화를 추진하는 것을 목표로 함

○ UVB를 이용한 비타민D 전환 및 전처리 기술

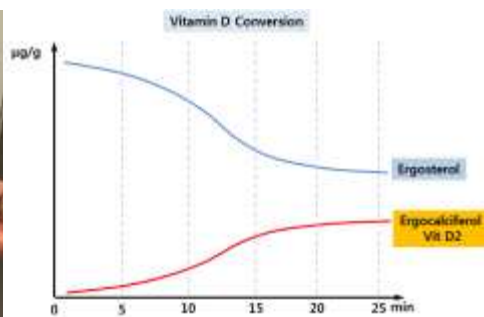
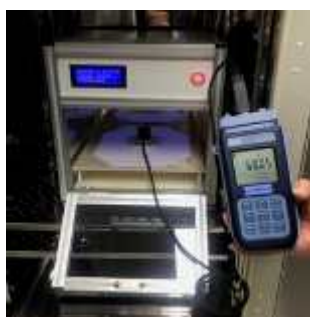


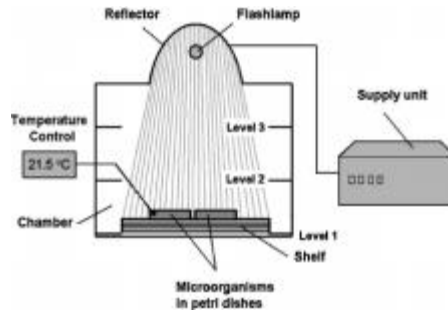
- 비타민D 전구체로부터 비타민D로의 전환을 위해서 UV파장 ($\lambda = 100 \sim 400\text{nm}$) 중에서 280 ~ 315nm의 mid wave length에 해당하는 UVB의 조사가 필요 하며 특히, 2017년도에 발표된 연구에 따르면 비타민D 전환에 있어서 293nm의 파장이 태양광의 조사보다 더 효율적이라는 보고가 있었음
- 하지만, UVB는 일반적으로 유리를 통과할 수 없을 정도로 투과력이 매우 약한 특성을 가지고 있어 버섯에 조사할 경우 버섯 표면으로부터 1mm 이상 투과할 수 없는 문제가 있음
- 이러한 문제 극복을 위해 버섯을 1mm 이하의 두께로 세절 또는 분말화 하여 UVB의 영향을 받을 수 있는 표면적을 넓히거나 UVB의 강도를 높이기 위해 간헐적 (pulsed) 조사 방식이 활용 됨



- 간헐적 조사방식은 짧은 시간 간격으로 UVB를 조사시킴으로써 연속적인 UVB 조사방식에 비해 조사 시 전달되는 에너지 강도를 높여주는 작용을 하는 것으로 알려져 있으나 산업현장에서의 적용을 위해서는 설비 및 유지 비용이 높은 단점이 있음
- 다양한 연구에서 제시한 바 UVB에 의한 비타민D 전환은 비타민D 전구체의 함량과 밀접한 관계가 있으며 버섯의 생/건 상태와는 상관없고 UVB 파장과의 접촉 표면적이 중요한 것으로 알려져 있음.
- 때문에, 버섯 소재의 비타민D 전환에 필요한 보다 효율적인 전처리 공정은 버섯을 건조한 후 미세분말화 하여 UVB 조사 표면적을 높이는 것으로 사료됨
- 따라서, 본 연구에서는 건조 버섯을 미세분말화 시키는 전처리공정과 함께 유지비용이 상대적으로 낮은 단일파장방식의 UVB (LED-UVB) 조사를 활용하여 '고함량 천연 비타민D (식품) 소재' 를 개발하고자 함

○ 품종에 따른 전처리 조건 설정의 필요성





- 본 연구팀에서 수행하였던 새송이버섯과 느타리버섯에 함유된 비타민D 전구체를 비타민D로 전환시키는 기술 개발을 위한 사전 연구 결과에 따르면 비타민D 전환은 버섯 내 비타민D 전구체의 함량이 가장 중요한 요소이며 LED를 이용한 단일 UVB 파장의 조사도 일반 UVB light 에서와 유사한 수준으로 비타민D 전환이 일어나는 것을 확인함

• Pleurotus eryngii

- raw : Vitamin D ₂ : 0 µg	→ exposed to UV : 94.5 µg (per gram)
Ergosterol : 1.67 µg	→ exposed to UV : 1.98 µg (per gram)

- 하지만, 건조하지 않은 버섯에 UVB를 조사할 경우 전구체의 함량이 지속적으로 증가되는 경향이 있어 이 후 제품 내 비타민D의 표준화에 영향을 미칠 수 있는 것으로 확인됨
- 특히, 버섯의 품종과 건조 유무에 따라 비타민D 전환에 있어서 전환 수준과 소요시간에 차이를 보였는데 새송이버섯의 경우 건조 상태에서의 UVB 조사가 효율적이었으나 느타리의 경우 비 건조 상태에서의 UVB조사가 비타민D 전환에 효율성이 높은 것으로 확인됨
- 따라서, 본 사업 수행 기간 동안 버섯 품종에 따른 전처리 공정의 다양성 부분도 고려하여 제품생산에 효율적인 공정 개발을 할 필요성이 있음

2. 연구개발과제의 수행 과정 및 수행 내용

1) 연구개발의 최종목표

- 최종목표

- 고품량 천연비타민D 버섯 소재를 활용한 3종 이상 원료 소재 생산 및 상용화
- 전환/수율 최적화 기술을 활용한 고품량 천연비타민D 제품 2종 이상 상용화
- 고품량 천연비타민D 버섯 소재 생산을 위한 최적 전처리/전환 공정 표준화 기술의 개발과 보급 확산 및 현장적용 통한 대량생산

- 세부목표

- UVB를 이용하여 5종의 후보 버섯소재 (새송이, 느타리, 팽이, 양송이, 표고)에 각각 함유된 ‘비타민D 전구체(ergosterol)’ 를 ‘비타민D2(ergocalciferol)’ 로 전환시켜 최적 수율을 도출 할 수 있는 최적 전처리 조건 및 공정 확립
- 2종 이상의 원료 소재와 3종 이상의 제품에 대한 대량생산과 현장적용을 위한 공정 개발 확립 및 제품 표준화
- 비타민D 전환기술과 제조 공정 기술의 이전/보급 확산으로 표준화된 원료 소재의 생산과 상용화
- 활성형 비타민D’ 제품 개발을 통한 기존 제품과의 차별화 도출
- 미래 원천기술 확보를 위한 소재의 기능성 탐색 연구

2) 연도별 개발목표 및 내용

<1차년도 연구개발목표 >

- MOU 3건 이상, 경제비교성 평가보고서 1건, 전환조건 및 전처리 공정 평가(비타민D 전환율 20% 이상, LED 처리시간 30분 이내, 분말 입도 800mesh 이상, 공인시험성적서 1건)
- 주관연구기관 (㈜네이처텍):
 - 지역별/품종별 원료 확보 및 협력 네트워크 구축
 - 경제성비교평가
 - 초미세화 공정개발
 - 식품 소재화 전처리/공정 최적화
- 참여기관 1 (대구대학교산학협력단):
 - 비타민D 최적 전환 조건 및 전처리 공정 기술 개발
 - 전환수율 기초자료 확보
 - 비타민D 최적 추출 공정 확립
 - 이화학적 특성 및 안전성 분석
- 참여기관 2 (경성대학교산학협력단):
 - 비타민D 전구체 함량분석/원료선정

- 비타민D 최적 전환 조건 및 전처리 공정 기술 개발
- 전환수율 기초자료 확보

<2차년도 연구개발 목표>

- 원료 생산 2건, 품목 신고 2건, 소재 생산 1톤 이상, 제품제조지시서 1건, 논문2건
- 주관연구기관 (㈜네이처텍):
 - 1차 년도에 최적화시킨 소재 생산 공정을 현장 적용한 대량 생산 및 품목(원료) 신고
 - 참여기관과의 협력을 통한 소재 내 비타민D 표준화 확립
 - 참여기관의 연구 결과를 바탕으로 한 proto-type 시제품 제작
 - 제품화를 위한 적용성 및 기호도 평가실시
 - 제품판매를 위한 마케팅 전략 수립
- 참여기관 1 (대구대학교산학협력단):
 - 주관기관과의 협력을 통한 개발 소재의 이화학적 특성 및 안전성 분석
 - 참여기관과의 협력을 통한 proto-type 시제품 개발 연구 실시
 - 주관기관에서 제작한 proto-type 시제품에 대한 유효성 탐색
- 참여기관 2 (경성대학교산학협력단):
 - 주관기관과의 협력을 통한 소재 내 비타민D 표준화 추진
 - 참여기관과의 협력을 통한 proto-type 시제품 개발 연구 실시
 - 주관기관에서 제작한 proto-type 시제품에 대한 유효성 탐색
- 위탁연구기관 (포항테크노파크):
 - 고순도 비타민D 추출조건 확립
 - 용매에 따른 추출조건 확립
 - 온도에 따른 추출조건 확립

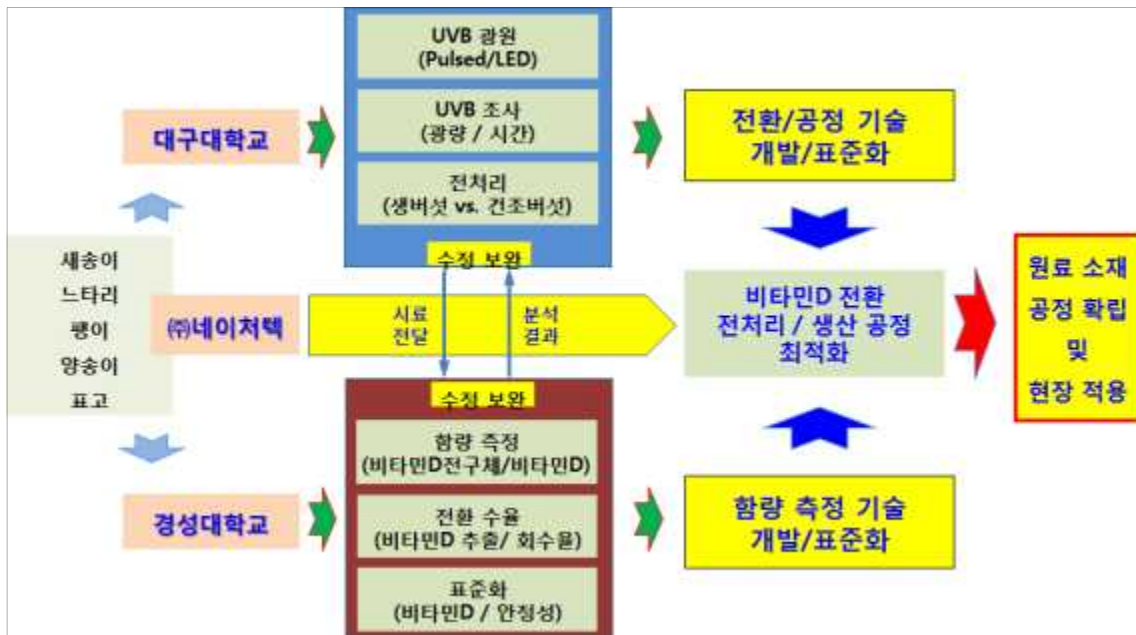
<3차년도 연구개발 목표>

- 제품생산 2건, 품목신고서 2건, 제조지시기록서 2건
- 주관연구기관 (㈜네이처텍):
 - 비타민D 표준화를 위한 대량생산공정 validation
 - 2차 년도에 평가된 proto-type 시제품 등을 바탕으로 가공적성 최적화 실시
 - 개발 제품의 등록 추진
 - 제품의 대량생산 및 출시
 - 후속 개발제품에 대한 마스터플랜 수립
 - 제품 출시 전 경제성 검토 및 경쟁 제품과 유효성 비교분석

- 참여기관 1 (대구대학교산학협력단):
 - 주관기관에서 생산한 제품에 대한 유효성 연구 및 평가
 - ✓ 표고버섯유래 비타민D₂ 제품의 칼슘흡수에 대한 유효성 평가
 - ✓ 표고버섯유래 비타민D₂ 제품의 간에 대한 항염증 유효성 평가
 - 주관기관에서 생산한 제품에 대한 안전성 평가 실시
- 참여기관 2 (경성대학교산학협력단):
 - 주관기관에서 생산한 제품에 대한 유효성 연구 및 평가
 - 주관기관에서 생산한 제품에 대한 안정성 평가

3) 개발 내용 및 범위

<1차년도> 소재제품 개발을 위한 원료 전처리/가공 공정의 확립 및 표준화



- 주관연구기관 (㈜네이처텍):
 - 원료소재 개발과 제품화를 위한 5종 후보버섯원료(새송이, 느타리, 팽이, 양송이, 표고)의 최적 품종 선정과 안정적 수급을 위해 주요 산지인 충남, 전남, 전북, 경남, 경북을 중심으로 하여 영농조합 (또는 해당지역 농업기술센터) 등으로부터 원료 공급 및 기술협력 관련 네트워크를 구축
 - 참여기관과의 협력을 통하여 고품량 천연 비타민D 원료소재 개발 및 대량생산을 위한 현장적용 최적화 공정 기술을 확립
- 참여기관 1 (대구대학교산학협력단):
 - 사업 초기에 확보한 후보버섯원료에 함유되어있는 비타민D전구체(ergosterol)가 비타민D₂(ergocalciferol)로 전환될 수 있는 최적의 전처리 조건을 경성대학교 연구팀과 협력하여 개발
 - 본 사업에서 개발하고자하는 LED 기반의 UVB 효율성 검토, UVB 조사 시 최적의 광량과 조사

시간에 대한 검토, 생버섯과 건조버섯에 대한 전환율 비교를 통해 원료전처리 조건에 대한 검토를 실시

- 주관기관과의 협력을 통해 최적 비타민D 소재를 생산할 수 있는 전환/전처리 공정 기술을 개발하고 표준화 하여 대량생산을 위한 scale-up 공정 확립 및 현장 적용이 가능하도록 지원

- 참여기관 2 (경성대학교산학협력단):

- 사업 초기에 확보한 후보버섯원료에 함유되어있는 비타민D전구체(ergosterol)와 UVB조사에 따라 전환되는 비타민D2(ergocalciferol)의 함량을 측정하는 기술을 표준화시킴으로써 이 후 개발되는 비타민D 전환 기술의 기초/기반 기술이 되도록 함
- 대구대학교에서 전환/전처리하여 공급한 시료 내 전구체/비타민D 함량, 전구체로부터 전환된 비타민D의 전환수율, 비타민D 추출을 통한 가용 비타민D 회수율 등을 지속적으로 공유/보완하여 최적화 전환/공정 기술을 확립할 수 있도록 함

<2차년도> 2종 이상 소재 제품의 대량생산 및 3종 이상 제품 개발 연구



- 주관연구기관 (㈜네이처텍):

- 1차 년도에 확립한 비타민D 원료소재의 최적화 생산 공정을 사업초기에 업무협약을 맺은 원료가 공 생산기업 및 초미세 소재 가공기업과 함께 현장적용(scale-up) 하여 소재 제품으로서 1ton 이상 수준의 대량생산을 2종(품종별 또는 제형별) 이상 추진
- 대량생산 과정에서 도출된 소재에 대하여 참여기관들과의 협업을 통해 소재 표준화 (비타민D 함량 표준화)와 이화학적 특성분석 및 미생물/유해물질 등에 대한 안전성 시험을 실시하고 이들 결과를 바탕으로 하여 생산 소재에 대한 품목 신고를 실시
- 참여기관에서 연구된 결과를 바탕으로 proto-type 시제품들을 제작하고 적용성 및 기호도 평가를 실시하여 3종 이상의 상용화 제품 개발에 대한 최적 제품화 모델 도출 및 시장조사 등을 통한 마케팅 전략을 수립

- 참여기관 1 (대구대학교산학협력단):

- 주관기관에서 제공한 2종 이상의 대량생산 소재에 대한 이화학적 특성과 미생물/유해물질 등의

안전성 시험/평가를 실시하여 품목(원료) 신고를 위한 근거자료 제공

- 대량생산된 소재제품을 사용하여 경성대학교 연구팀과 함께 proto-type 시제품 개발을 추진하는데 필요한 비타민D 활성화 및 흡수율 등의 분야를 기반으로 연구
 - 주관기관에서 제작한 proto-type 시제품에 대한 시험/평가를 실시함과 동시에 경성대학교 연구팀과 협력하여 비임상 수준에서의 효능 탐색 연구를 실시
- 참여기관 2 (경성대학교산학협력단):
- 주관기관에서 제공한 2종 이상의 대량생산 소재 내 함유된 비타민D에 대한 시험/평가를 통해 소재 표준화를 확립하여 품목(원료) 신고를 위한 근거자료를 제공
 - 대량생산된 소재제품을 사용하여 대구대학교 연구팀과 함께 proto-type 시제품 개발을 추진하는데 필요한 제형, 제제, 용출 등의 기술 분야를 기반으로 연구
 - 주관기관에서 제작한 proto-type 시제품에 대한 시험/평가를 실시함과 동시에 대구대학교 연구팀과 협력하여 비임상 수준에서의 유전체 기반 유효기능성 탐색 연구를 실시
- 위탁연구기관 (포항테크노파크):
- 주관기관에서 원료인 버섯을 제공하면 조건별 처리 시료를 생산하여 함량분석 담당 기관에 전달 후 비타민D 함량 및 전환율을 측정하여 고순도 액상 비타민D 최적 추출 공정 확립

<3차년도>3 종 이상 제품의 대량 생산 및 출시



- 주관연구기관 (㈜네이처텍):
- 2차 년도에 검토/평가를 통해 결정된 proto-type 시제품을 근거로 하여 현장에서의 가공적성을 최적화 시켜 3종 이상의 제품 대량생산을 실시함
 - 3종 이상의 제품(예, 고순도 천연비타민D제품, 드링크제품, 활성형 천연비타민D제품 등)에 대한 제품등록을 실시하고 제품대량 생산 후 수립된 마케팅 전략을 바탕으로하여 제품의 출시/판매 추진

- 참여기관들과 협력하여 대량생산 제품에 대한 안전성과 안정성을 확보함과 동시에 이후 추가적인 (예, 개별인정형, 신규기능성 등) 제품 개발을 위한 마스터 플랜 수립
- 참여기관 1 (대구대학교산학협력단):
 - 주관기관에서 생산 제공한 3종 이상의 제품의 미생물/유해물질 등에 대한 안전성 평가를 실시
 - 경성대학교 연구팀과 협력하여 2차 년도에 검토된 소재의 미 검증된 유효 기능성에 대한 비임상 수준에서의 검증 및 평가 실시
- 참여기관 2 (경성대학교산학협력단):
 - 주관기관에서 생산 제공한 3종 이상의 제품에 대하여 3~6개월간의 안정성 평가를 실시
 - 대구대학교 연구팀과 협력하여 2차 년도에 검토된 소재의 미 검증된 유효 기능성에 대한 비임상 수준에서의 검증 및 평가 실시

4) 평가의 착안점 및 기준

- 비타민D 전환률 20%이상, LED처리시간 30분 이내, 분말 입도 800mesh이상
- 비타민D소재(2건 이상):품목신고 완료, 비타민D 제품 (2건 이상):품목신고 완료, 비타민D 건강기능 식품 고시형 적합 : 공인시험성적서
- 본 사업은 기존의 UVB조사를 통한 버섯의 비타민D 전환 기술과 차별성을 가지는 전환/전처리 공정에 대한 기술의 개발과 표준화
- 대량생산에 대한 현장적용을 통한 소재 상용화와 제품화로 매출 성과 도출 등의 목표 달성
- 개발 기술의 지적재산권 확보와 해당 기술의 이전 등이 주요 착안점이 됨

3. 연구개발과제의 수행 결과 및 목표 달성 정도

1) 연구수행 결과

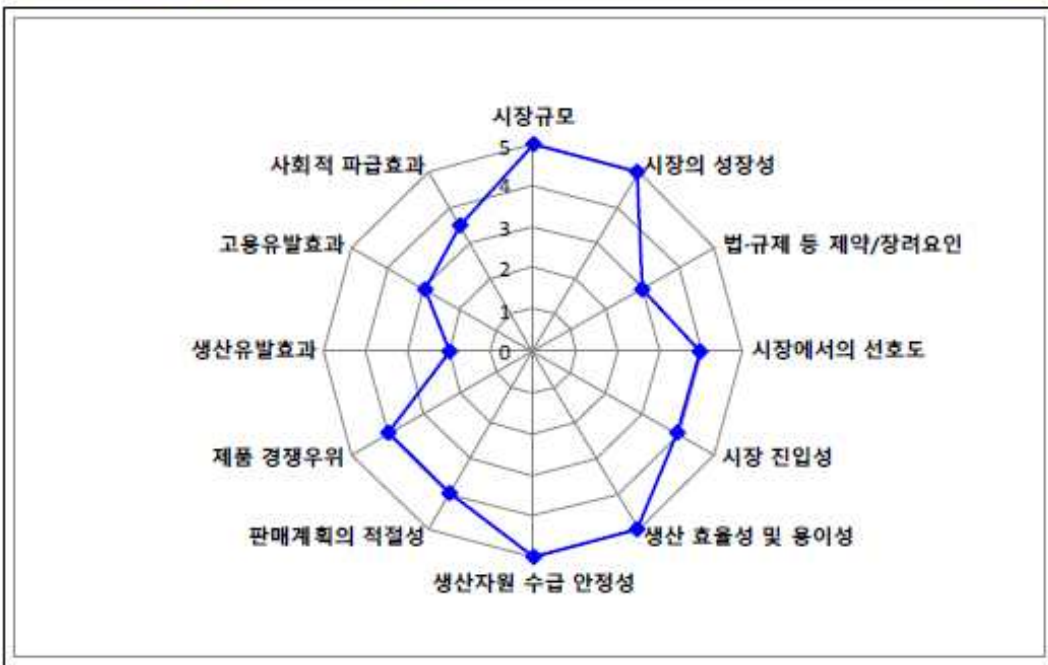
(1) 정성적 연구개발성과

<1차년도 연구수행결과>

○ 사전경제성평가 완료 : 주관연구기관 (㈜네이처텍)

분석점수	82.0점 / 100점
------	--------------

구분	평가지표	배점	가중	평가결과										평가점수	
				A	B		C		D		E				
				5	4.5	4	3.5	3	2.5	2	1.5	1			
시장성	시장규모	5	1	○											5.0
	시장의 성장성	5	2	○											10.0
	법·규제 등 제약/장려요인	5	1				○								3.0
	시장에서의 선호도	5	1			○									4.0
	시장 진입성	5	2			○									8.0
	소 계		35												30.0
사업성	생산 효율성 및 용이성	5	2	○											10.0
	생산자원 수급 안정성	5	1	○											5.0
	판매계획의 적절성	5	3			○									12.0
	제품 경쟁우위	5	3			○									12.0
	소 계		45												39.0
공공성	생산유발효과	5	1				○								3.0
	고용유발효과	5	1				○								3.0
	사회적 파급효과	5	2			○									7.0
	소 계		20												13.0
총 계(점)			100												82.0



- 시장규모 조사 결과

- 고시형 건강기능식품(비타민) 시장규모 평가 결과, 국내 및 해외 시장규모는 꾸준히 성장하고 있음

- '17년 품목별 매출액 중 비타민 및 무기질은 2,259억 원으로 건강기능식품 중에서도 탄탄한 기반을 가지고 있음
- 따라서, 본 과제의 시장규모는 ' 17년 기준 약 2,259억 원으로 판단되며, 평가결과 A 등급에 해당함

표 1. 비타민 및 무기질 건강기능식품 시장규모 (단위: 억 원)

구분	2014	2015	2016	2017	CAGR(3Y, %)
매출액 현황	1,646	2,079	1,843	2,259	16.9

자료: BNK 투자증권, 건강기능식품이슈리포트, 2018/12/18, 식품의약품안전처, 건강기능식품 생산실적, 2018

- 시장의 성장성 조사 결과

- 우리나라의 건강기능식품 산업 총생산액은 2017년 기준 전년대비 5.2% 증가한 2조 2,374억 원이며, 이는 제조업 총생산(GDP) 대비 0.47%의 비중을 보임
- 건강기능식품은 지난 5년간 연평균성장률 9.7%의 고성장을 지속함

표 2. 주요 산업 군별 시장규모와 연평균성장률 비교

(조원, %)	2012	2013	2014	2015	2016	CAGR ('12~'16)
식품	139.0	146.3	145.5	146.7	148.7	+1.7
YoY	-	5.3	-0.5	0.8	1.3	
건강기능식품	1.3	1.4	1.5	1.5	2.0	+9.7
YoY	2.3	0.3	10.5	3.1	26.6	
의약품	19.2	19.3	19.4	19.2	21.7	+3.1
YoY	-	0.5	0.3	-0.7	12.9	
화장품	7.0	7.6	8.2	9.0	9.5	+7.7
YoY	-	8.7	7.2	10.5	4.6	
의료기기	4.6	4.6	5.0	5.3	5.9	+6.3
YoY	-	0.9	7.3	6.0	11.4	

자료: BNK 투자증권, 건강기능식품이슈리포트, 2018/12/18 식품의약품안전처, 2017 식품의약품통계연보

- 품목별 건강기능식품 매출액 중 홍삼이 전체 시장의 46%를 차지하고 있으며, 그 뒤로 개별인정제품, 비타민 및 무기질, 프로바이오틱스, 밀크씨슬 추출물 순으로 나타남
- 2014~2017 3년 연평균성장률 비교 결과, 비타민 및 무기질은 17%의 높은 성장률을 나타냄

표 3. 주요 산업 군별 시장규모와 연평균성장률 비교

순위	품목	총 매출액 (억원)					YoY (%)	CAGR (3Y, %)	
		2012	2013	2014	2015	2016			2017
1	총합	6,484	5,869	6,330	6,943	9,900	10,358	4.6	17.8
2	개별인정제품	1,807	2,324	3,177	3,195	2,357	2,450	3.9	-8.3
	당귀혼합추출물	245	314	396	714	533	582	9.1	13.7
	헛개나무과병추출분말	502	541	379	255	249	226	-9.1	-15.8
	소목입혼합추출오일복합물	28	36	70	103	145	194	33.4	40.3
	보이차추출물	-	-	-	-	-	185	-	-
	플리코사놀-사탕수수-익스알로올	19	23	32	50	93	115	23.1	53.0
	꽃사과추출물/리페놀	-	-	-	1	86	114	32.9	-
	과채유래유산균	-	-	57	112	126	77	-38.9	10.5
	대역 등 복합추출물(안티젠)	-	-	63	183	93	70	-24.3	3.8
	황기추출물등복합물(HFD42)	-	-	-	266	98	67	-31.9	-
	겨분차콜라겐펩타이드	-	-	-	0	5	60	1002	-
	백수오등복합추출물	100	704	1,193	380	47	40	-14.8	-67.8
	대두배아열수추출물 등 복합물	61	27	36	44	30	39	29.7	2.9
	장겨루추출분말	-	-	81	56	22	38	76.4	-22.2
	후태인리아진틴복합추출물	-	-	-	-	30	34	12.3	-
	폴리입추경추출분말	-	63	51	40	47	32	-31.6	-14.8
	기타 개별인정제품	852	616	906	991	754	579	-23.2	-10.9
3	비타민 및 무기질	1,646	1,747	1,415	2,079	1,843	2,259	22.6	16.9
4	프로바이오틱스	519	804	1,388	1,579	1,903	2,174	14.2	16.1
5	일크씨슬추출물	135	308	676	705	1,091	1,042	4.5	15.5
6	EPA 및 DHA 함유 유지(오메가 3)	498	490	396	485	700	625	-10.8	16.5
7	알로에	688	628	575	560	475	376	-20.8	-13.2
8	후태인	118	95	111	204	309	357	15.6	47.4
9	가르시니아캄보지아 추출물	440	541	221	277	278	294	5.9	10.0
10	인삼	450	466	426	307	311	204	-34.6	-21.8
11	녹차추출물	116	109	107	121	158	201	27.2	23.4
12	식이섬유	168	167	171	260	281	179	-36.3	1.4
13	쏘팔메토열매추출물	48	58	65	86	116	134	15.2	26.9
14	프로폴리스추출물	118	95	97	99	103	119	14.9	6.8
15	멜레스염 MSM	-	58	75	61	77	110	43.3	13.8
	기타	855	1,061	1,078	1,270	1,359	1,493	9.9	11.5
	총 매출액	14,091	14,820	16,310	18,230	21,260	22,374	5.2	11.1

자료: BNK 투자증권, 건강기능식품이슈리포트, 2018/12/18 식품의약품안전처, 2017 식품의약품통계연보

- 따라서, 본 과제의 목표시장인 비타민 및 무기질 시장은 향후 3년간 15% 이상의 높은 성장률을 유지할 것으로 판단되며, 평가결과 A등급에 해당함

- 법·규제 등 제약/장려요인

- 건강기능식품 시장은 식품의약품안전평가원에 기준·규격 평가, 기능성 평가, 안전성 평가의 3가지 엄격한 심사를 거쳐야 기능성 원료로 인정받을 수 있으므로 일반 식품 제품에 비해 사업화를 위해 상대적으로 법 제도적 제약요인이 존재하나, 정부에서 건강기능식품산업 발전전략 등을 수립하여 제도적으로 지원하는 분야이므로, 이러한 상황을 종합적으로 고려하면 법적 제도적 요인은 보통인 것으로 판단되며, 평가결과 C등급에 해당함

- 시장에서의 선호도

- ‘안심하고 먹을 수 있는 재료’에 대한 수요가 식품업계와 마찬가지로 건강기능식품 시장에서도 나타나고 있음
- 또한 과거 효능에만 집중했던 소비자들이 원료의 원산지에 관심을 가지며 이를 앞세워 광고하는 제품이 증가하고 있음

- 현재 비타민D 원료는 국내생산보다 해외에서 생산된 원료를 수입해서 사용하는 경우가 대부분이며, 수출금액 4,889천 불 대비 수입금액 37,842천 불로 수출입 금액에서 큰 차이가 나는 품목임

표 4. 비타민D 관련 품목의 수출입 현황

HS코드	품목명	수출			수입		
		수출액	평균 증감률	중량	수입액	평균 증감률	중량
2936292000	비타민D와 그 유도체	876	2.2	97,445	24,553	4.2	500,479
3004504000	비타민D 제제	4,889	-5	110,946	37,842	8	103,469

주) 품목: HSK 10단위, 년월: 2015년 1월~2018년 12월, 단위: 천 불, Kg, %

자료: 수출입무역통계, <http://stat.kita.net>

- 따라서, 버섯 전구체로부터 천연 비타민D로의 최적 전환/전처리 기술을 확립하여 생산된 동 천연 비타민 제품은 ‘안심하고 먹을 수 있는 재료’에 대한 시장의 수요를 만족시켜 안전한 원료로써 선호도가 높을 것으로 판단됨. 따라서 평가결과 B등급에 해당함

- 시장 진입성

- 건강기능식품 시장은 규모의 경제가 큰 산업에 속해 신규업체의 진입장벽이 있는 것으로 판단됨
- 또한, 제조품목 현황 조사 결과 전체 건강기능식품 제조품목 중 비타민 및 무기질 제품이 27.5%를 차지하고 있고, 다양한 형태(과립형·정제형·액상형 등)의 제품이 출시되어 있어 제품차별화에 따른 진입장벽이 있는 것으로 판단됨
- 하지만 한국보건산업진흥원의 조사 결과(2007)에 따르면, 건강기능식품 사업 추진의 장애요인 중 초기 투자비용의 과도 소요는 12%에 불과해 소요자본 규모에 따른 진입장벽은 없는 것으로 판단됨
- 정부에서 대형마트나 백화점 등의 자유판매와 각종 신고의무를 완화한다는 방침을 내놓아 유통망의 진입장벽은 없을 것으로 판단됨
- 따라서 본 과제의 목표시장은 규모의 경제 및 제품 차별화의 2가지 장애요인과 관련되어 있으며, 평가결과 B등급에 해당함

- 생산 효율성 및 용이성

- 사업화업체인 (주)네이처텍은 KFDA GMP인증('05), US FDA Inspection('09), 호주 식약청 TGA 인증('10), HACCP('12) 인증을 획득하였고, 건강기능식품 생산을 위한 건강기능식품제조업 허가를 획득함
- (주)네이처텍은 2017년 328억 원의 건강기능식품 매출액을 기록하여 업계 14위 규모이나, 관계사인 유니베라의 매출액을 합산하면 업계 10위권 내인 것으로 추정됨
- 동사는 리스크 관리 및 생산 효율성 측면에서 노하우를 보유하고 있으며, 한국야쿠르트, LG생명건강 등의 협력사로 다양한 ODM 제품을 제작하여 판매하고 있으며, 다양한 형태의 비타민 제품생산에 노하우를 확보하고 있음
- 또한, 관계사인 유니베라와 유니젠의 OEM 생산시설 등 외부 시설 활용 채널을 확보함

표 5. 사업화업체의 생산 효율성 및 용이성

구분	해당	비고
생산 및 품질관련 인증 여부	○	GMP, HACCP 인증 등, 건강기능식품 제조업 허가
생산 시스템 및 인력의 자체 보유	○	다양한 제형의 건강식품 생산라인 가동 중
장비관리를 위한 시스템 구축 여부	○	상기 인증획득으로 관리시스템 구축 확인
외부생산시설 활용 채널 확보 유무	○	유니베라, 유니젠 등 생산시설 활용채널 확보

- 따라서, 사업화업체인 (주)네이처텍은 생산 효율성 및 용이성 관련 평가지표 중 4개에 해당하는 것으로 판단되며, 평가결과 A등급에 해당함

- 생산자원 수급 안정성

- 한국농촌경제연구원의 KREI-KASMO 모형 추정 결과, 느타리, 양송이, 새송이, 팽이, 기타 버섯 등을 포함하는 농산버섯의 2018년 재배면적은 가격하락으로 2017년보다 3% 감소한 462ha였으며, 장기적으로 2027년 443ha까지 감소할 것으로 전망됨

표 6. 농산버섯 중장기 수급 전망

구분	단위	2017	전망			
			2018	2022	2027	
재배면적	ha	75	462	462	443	
총 공급량(A=B+C)	천 톤	182	177	186	191	
	생산량(B)	천 톤	169	163	171	174
	수입량(C)	천 톤	13	14	15	17
총 수요량(F=D+E)	천 톤	180	175	184	188	
	소비량(D)	천 톤	164	160	167	170
	수출량(E)	천 톤	16.6	15.0	16.9	17.8
자급률	%	103.3	101.8	102.4	102.0	

주: 전망치는 한국농촌경제연구원(KASMO) 추정치임
한국농촌경제연구원, 2018 농업전망, 엽근채소 수급 동향과 전망

- 한편, 버섯 농가의 규모화와 재배 기술 향상으로 단수가 증가하여 장기적으로는 생산량이 소폭 증가할 것으로 전망됨
- 2017년 자급률은 103%이며, 생산량과 소비량이 모두 증가하여 2027년 자급률 역시 현재와 비슷한 수준에서 유지될 것으로 전망됨
- (주)네이처텍은 원료의 안정적 수급을 위해 버섯 주요 생산자와 협력 네트워크를 구축하고 원료 버섯을 해당 산지와 구매(공급)계약을 체결하였음
- 따라서, 본 과제 기술제품의 생산을 위한 버섯자원의 안정적인 수급 가능성은 매우 양호한 것으로 판단되며, 평가결과 A등급에 해당함

- 판매계획의 적절성

- (주)네이처텍은 자체설비를 활용하여 기술제품을 생산할 계획이며, 다양한 건강기능식품을 생산할 수 있는 설비와 노하우를 갖추고 있음
- 비타민D 원료를 기존에 판매하는 제품에 적용하여 리모델링 형태의 신제품 개발과 판매가 가능하므로 상기 계획한 비타민D 제품의 매출 달성은 가능할 것으로 판단됨
- 동사에서 제시한 제품의 출고가 및 판매가는 적절한 수준으로 판단되며, 시중에 판매되는 가격은 경쟁 제품과 다소 낮은 수준으로 가격 경쟁력이 있는 것으로 판단됨

표 7. 기술제품 판매규모 산출근거

<input type="checkbox"/> 버섯의 UV처리 공정을 거쳐 비타민D 원료 생산
<input type="checkbox"/> 비타민D의 일일 섭취량은 3~10 μg (120~400 IU)으로 원료 및 제품의 생산은 충분히 가능함
<input type="checkbox"/> 제품 가격(1 BOX): 출고가(15,000원), 판매가(30,000원)

표 8. 기술제품의 매출액

구분	1차년도	2차년도	3차년도	합계
내수	5	20	50	75
수출	1	3	5	5
매출액(억 원)	6	23	55	84

- 동사는 OEM 및 ODM 생산 방식을 구축하여 다양한 협력사와 제휴하고 있어 다양한 유통채널을 확보하고 있으며 마케팅 또한 기존 협력사를 통해 진행할 수 있어 광고·홍보 전략이 큰 효과를 볼 수 있을 것으로 판단됨
- 따라서, 기술제품의 생산계획, 유통전략, 예상 판매규모 등 전반적인 마케팅 계획이 구체적이고 실현 가능성이 있으므로 평가 결과는 B에 해당함

- 제품 경쟁우위

- 국내에서 생산된 원료를 사용함으로써 건강기능식품시장에서 차별적인 이미지를 확보할 수 있을 것으로 판단됨
- 기술제품은 비교적 가격이 저렴한 농산버섯을 UVB 조사 공정을 통하여 비타민D 원료를 다량으로 추출이 가능하며, 친환경적이라는 경쟁력이 있음
- 자체 유통라인과 대형유통매장, 온라인, 홈쇼핑 등 기존 유통망을 활용할 수 있어 원가절감이 가능할 것으로 판단됨
- 따라서 본 과제 기술제품은 제품 차별화, 성능 및 품질 경쟁력, 가격 경쟁력 3가지 경쟁우위가 있는 것으로 판단되며, 평가결과 B등급에 해당함

- 생산유발효과 및 고용유발효과

- 2015년 산업연관분석 실측표를 활용하여 공급체인모형의 유발계수를 추정한 결과, 상기 산업의 생산유발계수는 1.52이며, 고용유발계수는 5,00임
- 따라서, 본 과제의 기술개발로 해당산업의 부가가치가 증가했을 때 파급되는 생산유발효과와 고용유발효과는 보통인 것으로 판단되며 C등급에 해당함

- 사회적 파급효과

- 기술제품은 골다공증을 예방할 수 있는 제품으로, 국민의 건강증진과 사회적 비용절감에 파급효과가 있을 것으로 예상됨
- 또한, 농산버섯의 고부가가치에 기여하는 효과가 있을 것으로 기대됨
- 따라서 대상과제는 국민 건강증진 기여, 농산물의 고부가가치화 2가지 사회적 파급효과가 있는 것으로 판단되며, 평가결과 C등급에 해당함

○ 품종별 원료 확보 및 협력 네트워크 구축: 주관연구기관 (㈜네이처텍)

- 국산 버섯 5종(새송이, 느타리, 팽이, 양송이, 표고) 원료 확보 완료

- 버섯 농가에 방문하여 안정적인 버섯 공급이 가능하고, 버섯 생육 시 배지를 이용하여 균일한 조건의 버섯 납품이 가능한 농가를 섭외함



그림 1. 버섯농장 현장 방문

- 국산 버섯 중 건조 새송이버섯, 건조 느타리버섯, 건조 팽이버섯, 건조 양송이버섯, 건조 표고버섯을 확보함



건조 느타리버섯 건조 새송이버섯 건조 양송이버섯 건조 팽이버섯 건조 표고버섯

그림 2. 국산 버섯 5종의 건조 결과물

- 미세분말작업을 위하여 추가 건조 및 수분 함량 측정을 진행하였음

표 9. 건조버섯 5종의 수분함량 측정 결과

	무게(g)	수분함량(%)
느타리버섯	1.074	7.28
새송이버섯	1.14	6.58
양송이버섯	1.044	7.28
팽이버섯	1.425	4
표고버섯	1.033	3.97

- 건조 후 미세 분말화하여 각 기관에 전달함



느타리버섯 분말



새송이버섯 분말



양송이버섯 분말



팽이버섯 분말



표고버섯 분말

그림 3. 국산 버섯 5종 분말작업 결과물

○ 버섯분말 5종을 이용한 최적 UV-B LED 및 UV-B 처리 조건 테스트 :참여기관 1 (대구대학교산학협력단)

가) 실험 내용 및 방법

1. 실험 재료

본 연구에 사용된 버섯 시료는 주관기관인 (주)네이처텍에서 제공된 느타리버섯, 표고버섯, 양송이버섯, 팽이버섯, 새송이버섯의 분말로서 이들 버섯 10g을 각각 0, 5, 10, 15, 20분간 UV-B LED 처리한 시료와 UV-B로 5분 처리한 시료를 분석에 사용함



그림 4. UV-B LED and UV-B detector.



그림 5. UV-B LED 처리한 버섯 분말 샘플

2) 실험 방법

① 식품공전(환류추출법)

- 식품공전 일반시험법에 준하여 추출함

- 버섯분말 약 0.2g에 물을 2mL 첨가하여 녹인 후 피로갈롤-에탄올(1→10)용액 20mL로 혼합한 후 수산화칼륨 (1→10) 5mL을 가한 후 환류냉각기를 부착하여 끓는 물에서 중탕으로 30분간 가열하여 비누화함 30mL 헥산으로 5회 추출하여 합한 후 0.5N 수산화칼륨용액 50mL을 가하여 진탕한 후 물층을 버리고, 다시 헥산층을 중화가 될 때까지 수회 세척한 후 무수황산나트륨으로 탈수한 후 감압농축함. 잔류물은 메탄올 2mL를 가하여 녹임

② 주정(ethanol 추출법)

- 버섯 약 2.5g 해당량에 ethanol (주정) 50mL을 넣고 초음파로 1시간 이상 추출

③ Chloroform 추출법

- 버섯 약 2.5g 해당량에 chloroform 50mL을 넣고 초음파로 1시간 이상 추출

나. 실험 결과

식품공전법, 주정, chloroform 등 다양한 용매 추출후의 버섯시료는 그림 6과 같음



그림 6. UV-B LED 처리한 버섯 분말을 이용한 최적 ergosterol 및 비타민 추출법 시험

○ 대구대에서 UV-B 처리한 버섯분말의 비타민D 및 ergosterol 함량 분석 및 최적 추출방법 조사: 참여기관 2 (경성대학교산학협력단)

가. 실험 내용 및 방법

1) 식품공전(환류추출법)

- 식품공전 일반시험법에 준하여 추출함

- 버섯분말 약 0.2g에 물을 2 mL 첨가하여 녹인 후 피로갈롤-에탄올(1→10)용액 20mL로 혼합한 후 수산화칼륨 (1→10) 5 mL을 가한 후 환류냉각기를 부착하여 끓는 물에서 증탕으로 30분간 가열하여 비누화함 30mL 헥산으로 5회 추출하여 합한 후 0.5N 수산화칼륨용액 50mL을 가하여 진탕한 후 물층을 버리고, 다시 헥산층을 중화가 될 때까지 수회 세척한 후 무수황산나트륨으로 탈수한 후 감압농축함. 잔류물은 메탄올 2mL를 가하여 녹임

2) 주정(에탄올 추출법)

- 버섯 약 2.5g 해당량에 에탄올(주정) 50mL을 넣고 초음파로 1시간 이상 추출

나. 실험 결과

1) 식품공전(환류추출법) UV-B 시간대별 조사 실험

- 버섯 5종의 UV-B LED 5분, 10분, 15분, 20분 시간대별 조사 후 3반복 실험을 통해 비교 분석함

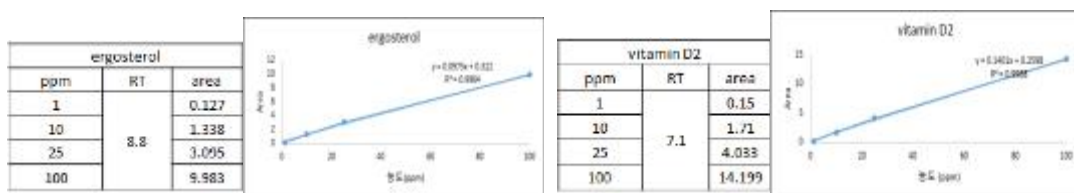


그림 7. Ergosterol 및 비타민 D2 검량선 작성

표 10. 느타리버섯의 ergosterol 함량 분석 결과

sample	성분	Area	부피(ml)	농도(µg/ml)	함량(mg/g)	평균 함량(mg/g)	표준편차
1-느타리-5min_1	ergosterol	24.889	2	252.0645203	2.520645203	2.349	0.227
1-느타리-5min_2		24.076	2	243.7229041	2.437229041		
1-느타리-5min_3		20.704	2	209.1252043	2.091252043		
1-느타리-10min_1		19.229	2	193.9912757	1.939912757	2.234	0.254
1-느타리-10min_2		23.463	2	237.4333459	2.374333459		
1-느타리-10min_3		23.601	2	238.849266	2.38849266		
1-느타리-15min_1		23.6	2	238.8390058	2.388390058	2.447	0.133
1-느타리-15min_2		23.261	2	235.3607673	2.353607673		
1-느타리-15min_3		25.667	2	260.0470263	2.600470263		
1-느타리-20min_1		22.889	2	231.5439392	2.315439392	2.422	0.284
1-느타리-20min_2		27.077	2	274.514036	2.74514036		
1-느타리-20min_3		21.838	2	220.7603738	2.207603738		

표 11. 표고버섯의 ergosterol 함량 분석 결과

sample	성분	Area	부피(ml)	농도(µg/ml)	함량(mg/g)	평균 함량(mg/g)	표준편차
2-표고-5min_1	ergosterol	35.453	2	360.4542297	3.604542297	3.354	0.298
2-표고-5min_2		33.812	2	343.6170929	3.436170929		
2-표고-5min_3		29.794	2	302.3912455	3.023912455		
2-표고-10min_1		32.846	2	333.7056522	3.337056522	3.374	0.051
2-표고-10min_2		33.006	2	335.3472987	3.353472987		
2-표고-10min_3		33.79	2	343.3913665	3.433913665		
2-표고-15min_1		36.27	2	368.8368871	3.688368871	3.602	0.227
2-표고-15min_2		37.114	2	377.4965723	3.774965723		
2-표고-15min_3		32.917	2	334.4341329	3.344341329		
2-표고-20min_1		34.23	2	347.9058944	3.479058944	3.521	0.056
2-표고-20min_2		35.261	2	358.4842539	3.584842539		
2-표고-20min_3		34.428	2	349.9374319	3.499374319		

표 12. 양송이버섯의 ergosterol 함량 분석 결과

sample	성분	Area	부피(ml)	농도(µg/ml)	함량(mg/g)	평균 함량(mg/g)	표준편차
3-양송이-5min_1	ergosterol	37.419	2	380.625961	3.80625961	3.700	0.120
3-양송이-5min_2		36.639	2	372.6229343	3.726229343		
3-양송이-5min_3		35.112	2	358.956706	3.58956706		
3-양송이-10min_1		35.823	2	364.250372	3.64250372	3.651	0.047
3-양송이-10min_2		35.493	2	360.864413	3.60864413		
3-양송이-10min_3		36.415	2	370.3246292	3.703246292		
3-양송이-15min_1		26.727	2	270.9229343	2.709229343	2.727	0.019
3-양송이-15min_2		27.109	2	274.8423653	2.748423653		
3-양송이-15min_3		26.887	2	272.5645008	2.725645008		
3-양송이-20min_1		27.924	2	283.2045021	2.832045021	2.860	0.025
3-양송이-20min_2		28.27	2	288.7545627	2.887545627		
3-양송이-20min_3		28.411	2	288.2012636	2.882012636		

표 13. 팽이버섯의 ergosterol 함량 분석 결과

sample	성분	Area	부피(ml)	농도(µg/ml)	함량(mg/g)	평균 함량(mg/g)	표준편차
4-팽이-5min_1	ergostanol	19.831	2	198.1159125	1.981159125	2.015	0.034
4-팽이-5min_2		19.97	2	201.694151	2.01694151		
4-팽이-5min_3		20.296	2	204.9390358	2.049390358		
4-팽이-10min_1		20.782	2	210.0281099	2.100281099	2.018	0.073
4-팽이-10min_2		19.4	2	195.7457854	1.957457854		
4-팽이-10min_3		15.785	2	159.6969973	1.596969973		
4-팽이-15min_1		19.839	2	200.250053	2.00250053	1.990	0.010
4-팽이-15min_2		19.678	2	196.5981462	1.965981462		
4-팽이-15min_3		19.658	2	196.3929404	1.963929404		
4-팽이-20min_1		19.942	2	201.3068629	2.013068629	1.928	0.090
4-팽이-20min_2		18.181	2	183.2384912	1.832384912		
4-팽이-20min_3		19.224	2	193.9389743	1.939389743		

표 14. 새송이버섯의 ergosterol 함량 분석 결과

sample	성분	Area	부피(ml)	농도(µg/ml)	함량(mg/g)	평균 함량(mg/g)	표준편차
5-새송이버섯-5min_1	ergosterol	25.654	2	259.8136426	2.599136426	2.637	0.079
5-새송이버섯-5min_2		25.515	2	258.4874622	2.584874622		
5-새송이버섯-5min_3		26.92	2	272.9051704	2.729051704		
5-새송이버섯-10min_1		22.952	2	232.1903375	2.321903375	2.365	0.058
5-새송이버섯-10min_2		24.023	2	249.1793087	2.491793087		
5-새송이버섯-10min_3		23.154	2	234.2629167	2.342629167		
5-새송이버섯-15min_1		25.13	2	254.5372503	2.545372503	2.511	0.076
5-새송이버섯-15min_2		25.326	2	256.5482673	2.565482673		
5-새송이버섯-15min_3		23.941	2	242.3377648	2.423377648		
5-새송이버섯-20min_1		22.453	2	227.0704525	2.270704525	2.266	0.041
5-새송이버섯-20min_2		21.998	2	222.4020203	2.224020203		
5-새송이버섯-20min_3		22.796	2	230.5887321	2.305887321		

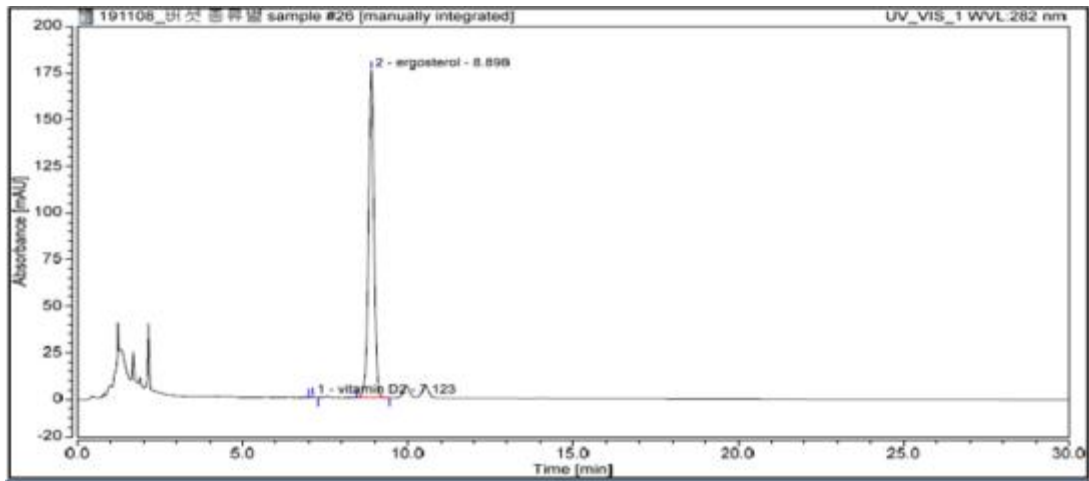


그림 8. 버섯 5종 UV-B 조사 후 sample의 vitamin D2 함량 분석 결과

→ 비타민 D2의 peak는 검출되지 않음.

- 분석 결과, 대구대학교에서 보낸 버섯 5종류의 시간대별 ergosterol 함량이 경성대 및 네이처텍에서 UV-B 조사 한 것보다 높게 나왔으나, 비타민 D2는 검출되지 않음

2) 식품공전(환류추출법) 단순 UV-B 조사 실험

- 버섯 5종의 단순 UV-B 조사 후 환류추출법으로 ergosterol 및 비타민 D2 함량 확인
- 검량선은 위 나-1)과 동일

표 15. 단순 UV-B 후 ergosterol 함량 분석 결과

sample	성분	Area	부피(ml)	농도(µg/ml)	함량(mg/g)
UVB-느타리	ergosterol	24.675	2	174.278	1.743
UVB-표고		36.816	2	260.942	2.609
UVB-양송이		35.066	2	248.451	2.485
UVB-팽이		19.25	2	135.554	1.356
UVB-새송이		22.039	2	155.462	1.555

표 16. 단순 UV-B 후 vitamin D2 함량 분석 결과

sample	성분	Area	부피(mL)	농도(µg/mL)	함량(mg/g)
UVB-느타리	vitamin D2	0.373	2	0.523	0.005
UVB-표고		0.834	2	5.253	0.053
UVB-양송이		0.596	2	2.811	0.028
UVB-팽이		0.466	2	1.477	0.015
UVB-새송이		0.371	2	0.503	0.005

- 분석 결과, UV-B LED가 아닌 단순 UV-B에서 비타민 D2가 검출 되었으며 표고버섯의 ergosterol과 비타민 D2의 함량이 가장 높게 나옴

3) 주정(에탄올 추출법) UV-B 시간대별 조사 실험

- 버섯 5종의 UV-B LED 5분, 10분, 15분, 20분 시간대별 조사 후 3반복 실험을 통해 비교 분석함.

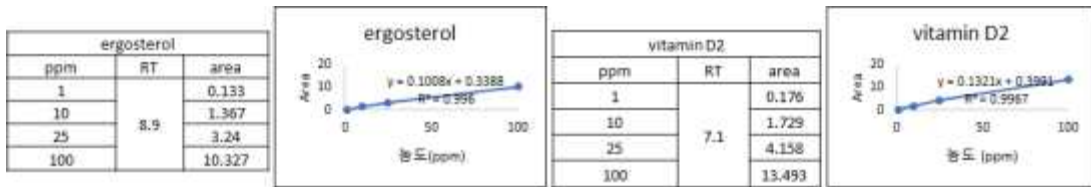


그림 9. Ergosterol 및 비타민 D2 검량선 작성

표 17. 느타리버섯 ergosterol 함량 분석 결과

sample	성분	Area	부피(mL)	농도(µg/mL)	함량(mg/g)	평균 함량(mg/g)	표준편차
1-느타리-5min_1	ergosterol	15.148	2	146.8829087	1.468829087	1.231	0.333
1-느타리-5min_2		14.219	2	137.688787	1.37688787		
1-느타리-5min_3		8.908	2	84.99257589	0.8499257589		
1-느타리-10min_1		15.907	2	154.4109155	1.544109155	1.467	0.068
1-느타리-10min_2		14.878	2	144.2049816	1.442049816		
1-느타리-10min_3		14.804	2	141.4875412	1.414875412		
1-느타리-15min_1		15.224	2	147.8387012	1.478387012	1.503	0.038
1-느타리-15min_2		15.336	2	148.7475533	1.487475533		
1-느타리-15min_3		15.938	2	154.7183835	1.547183835		
1-느타리-20min_1		14.310	2	138.6308643	1.386308643	1.541	0.213
1-느타리-20min_2		18.329	2	178.430928	1.78430928		
1-느타리-20min_3		14.987	2	145.2860588	1.452860588		

표 18. 표고버섯 ergosterol 함량 분석 결과

sample	성분	Area	부피(mL)	농도(µg/mL)	함량(mg/g)	평균 함량(mg/g)	표준편차
2-표고-5min_1	ergosterol	20.804	2	202.9809411	2.029809411	2.037	0.010
2-표고-5min_2		20.999	2	204.915014	2.04915014		
2-표고-5min_3		20.837	2	203.3082458	2.033082458		
2-표고-10min_1		20.247	2	197.4564355	1.974564355	2.039	0.059
2-표고-10min_2		21.405	2	208.941853	2.08941853		
2-표고-10min_3		21.068	2	205.5993783	2.055993783		
2-표고-15min_1		20.558	2	200.5410538	2.005410538	2.002	0.005
2-표고-15min_2		20.465	2	199.6186298	1.996186298		
2-표고-15min_3		20.552	2	200.4815238	2.004815238		
2-표고-20min_1		19.831	2	193.3304133	1.933304133	2.018	0.087
2-표고-20min_2		21.588	2	210.756906	2.10756906		
2-표고-20min_3		20.649	2	201.4436011	2.014436011		

표 19. 양송이버섯 ergosterol 함량 분석 결과

sample	성분	Area	부피(mL)	농도(µg/mL)	함량(mg/g)	평균 함량(mg/g)	표준편차
3-양송이-5min_1	ergosterol	33.47	2	328.6064147	3.286064147	3.213	0.064
3-양송이-5min_2		32.481	2	318.7971937	3.187971937		
3-양송이-5min_3		32.25	2	316.5080612	3.165080612		
3-양송이-10min_1		32.679	2	320.7610216	3.207610216	3.172	0.032
3-양송이-10min_2		32.019	2	314.2149287	3.142149287		
3-양송이-10min_3		32.281	2	316.8135292	3.168135292		
3-양송이-15min_1		32.982	2	317.8152798	3.178152798	3.148	0.028
3-양송이-15min_2		31.82	2	312.2411825	3.122411825		
3-양송이-15min_3		32.04	2	314.4232135	3.144232135		
3-양송이-20min_1		31.554	2	309.6029087	3.096029087	3.156	0.053
3-양송이-20min_2		32.34	2	317.3987102	3.173987102		
3-양송이-20min_3		32.588	2	319.8584542	3.198584542		

표 20. 팽이버섯 ergosterol 함량 분석 결과

sample	성분	Area	부피(mL)	농도(µg/mL)	함량(mg/g)	평균 함량(mg/g)	표준편차
4-팽이-5min_1	ergosterol	12.628	2	121.8887358	1.218887358	1.178	0.038
4-팽이-5min_2		12.167	2	117.5163891	1.173163891		
4-팽이-5min_3		11.857	2	114.2417081	1.142417081		
4-팽이-10min_1		12.083	2	116.48325	1.1648325	1.105	0.051
4-팽이-10min_2		11.255	2	108.1708789	1.082708789		
4-팽이-10min_3		11.112	2	106.8525588	1.068525588		
4-팽이-15min_1		11.466	2	110.363645	1.10363645	1.103	0.006
4-팽이-15min_2		11.527	2	110.9686627	1.109686627		
4-팽이-15min_3		11.39	2	109.6098525	1.096098525		
4-팽이-20min_1		11.154	2	107.2691284	1.072691284	1.093	0.017
4-팽이-20min_2		11.448	2	110.1851152	1.101851152		
4-팽이-20min_3		11.477	2	110.4727466	1.104727466		

표 21. 새송이버섯 ergosterol 함량 분석 결과

sample	성분	Area	부피(mL)	농도(µg/mL)	함량(mg/g)	평균 함량(mg/g)	표준편차
5-새송이-5min_1	ergosterol	12.852	2	124.1104401	1.241104401	1.281	0.088
5-새송이-5min_2		12.652	2	122.1267756	1.221267756		
5-새송이-5min_3		14.282	2	138.2936414	1.382936414		
5-새송이-10min_1		13.715	2	132.6699525	1.326699525	1.350	0.041
5-새송이-10min_2		13.712	2	132.8401975	1.328401975		
5-새송이-10min_3		14.446	2	139.5202463	1.395202463		
5-새송이-15min_1		13.608	2	131.6086919	1.316086919	1.506	0.368
5-새송이-15min_2		13.189	2	127.2545483	1.272545483		
5-새송이-15min_3		19.807	2	193.0923735	1.930923735		
5-새송이-20min_1		12.894	2	122.5433451	1.225433451	1.259	0.034
5-새송이-20min_2		13.397	2	129.5159259	1.295159259		
5-새송이-20min_3		13.011	2	125.6874534	1.256874534		

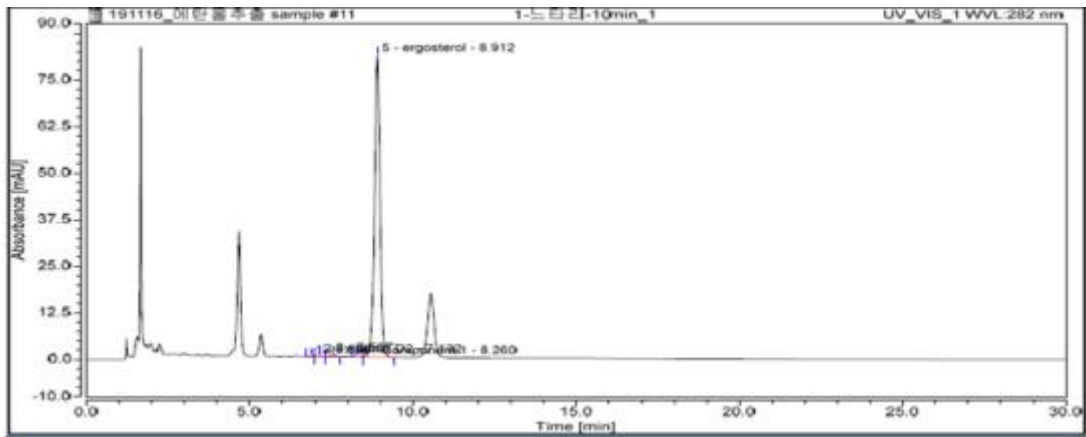


그림 10. 버섯 5종의 UV-B 조사 후 sample의 vitamin D2 함량 분석 결과

- 비타민 D2 의 peak는 검출되지 않음
- 분석 결과, 대구대학교에서 보낸 에탄올추출 sample의 ergosterol 함량은 환류추출법 보다 전체적으로 낮게 나왔으며, 비타민 D2는 검출되지 않음

4) 주정(에탄올 추출법) 단순 UV-B 조사 실험

- 버섯 5종의 단순 UV-B 조사 후 에탄올 추출법으로 ergosterol 및 비타민 D2 함량 확인
- 검량선은 그림 9와 동일

표 22. 단순 UV-B 후 ergosterol 함량 분석 결과

sample	성분	Area	부피(ml)	농도(µg/ml)	함량(mg/g)
UVB-노타리	ergosterol	14.973	2	110.361	1.104
UVB-표고		19.93	2	147.898	1.479
UVB-양송이		31.747	2	237.382	2.374
UVB-팽이		12.014	2	87.954	0.880
UVB-새송이		12.923	2	94.837	0.948

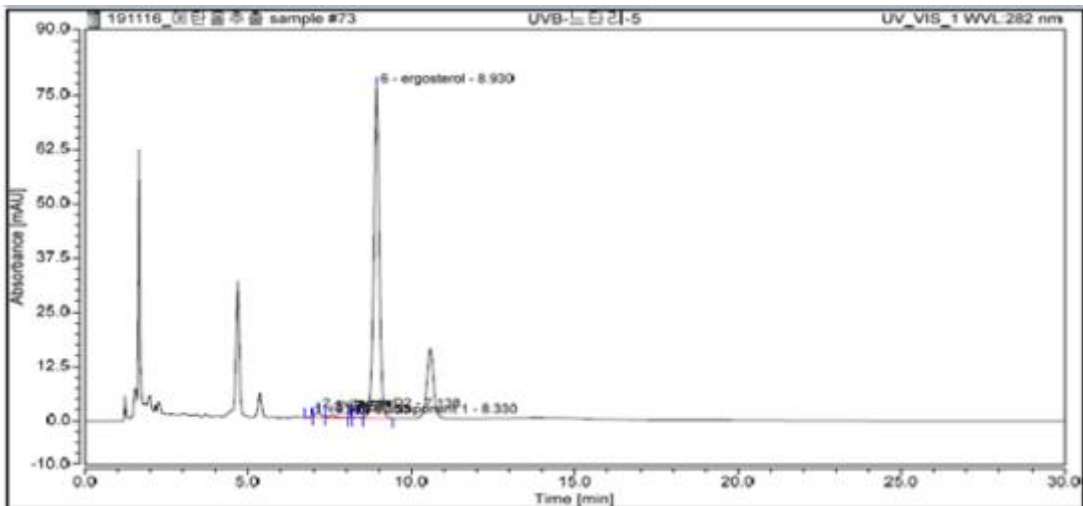


그림 11. 단순 UV-B 후 비타민 D2 함량 분석 결과

→ 비타민 D2의 peak는 검출되지 않음

- 분석 결과, 에탄올 추출법에서는 UV-B조사 sample의 ergosterol 함량이 전체적으로 낮게 나왔으며, 비타민 D2는 검출되지 않음

5) 다양한 용매추출법에 의한 ergosterol 분석결과와 비교분석

- 식품공전법, 주정 (Ethanol) 추출법, chloroform 추출법의 추출효율을 비교하기 위하여 UV-B 처리 전 버섯 시료 5종의 ergosterol 함량 분석결과를 아래의 표23에 나타냄 이 결과에 의하면 chloroform 추출과 주정추출이 식품공전법에 의한 분석값과 큰 차이가 없었으며, 오히려 조금 더 나은 결과를 보여줌
- 이 결과는 버섯 종류에 관계없이 유사한 양상을 보여줌. 따라서 버섯분석용 시료는 시간이 많이 소비되는 식품공전법의 환류추출을 생략하고 chloroform 추출이나 주정 추출로 분석하여도 결과 값을 얻기에 충분한 것으로 판단됨
- 식품공전법에 의한 환류추출로 ergosterol과 비타민 D2 분석을 위한 추출은 8시간이 소요되지만, chloroform과 주정추출법을 적용할 경우 4시간으로 시간을 1/2로 단축할 것으로 판단됨

표 23. 각종 용매추출법에 의한 버섯 내 ergosterol 함량비교

시험용액의 조제	Sample	함량_Ergosterol(mg/g)
Ethanol	느타리 Ethanol추출	2.02
	표고 Ethanol추출	2.81
	양송이 Ethanol추출	4.38
	팽이 Ethanol추출	1.57
	새송이 Ethanol추출	1.76
Chloroform	느타리 Chloroform추출	2.03
	표고 Chloroform추출	2.96
	양송이 Chloroform추출	4.71
	팽이 Chloroform추출	1.60
	새송이 Chloroform추출	1.86
식품공전 추출	느타리 식품공전 추출	1.71
	표고 식품공전 추출	2.76
	양송이식품공전 추출	3.75
	팽이 식품공전 추출	1.40
	새송이 식품공전 추출	1.63

6) 발색법에 의한 ergosterol과 비타민 D2 간이분석법 개발

① Ergosterol 분석

- 버섯시료 0.1g 에 3ml 25% KOH 용액을 첨가하여 85℃에서 1시간 처리한 후 상온에서 식힘. 1ml의 증류수와 3ml의 n-heptane를 첨가하여 3분 동안 vortexing 함
- 상등액은 버리고 1ml을 취한 후 282nm에서 흡광도를 측정함. 이와 같은 분석법으로 ergosterol을 분석한 결과는 그림 12와 그림 13으로 나타냄
- 이와 같은 발색법에 의한 ergosterol 간이분석법은 총 1시간 30분이면 분석이 가능함
- 이에 비해 식품공전법에 의한 분석은 전체 분석시간이 10시간이 소요되기 때문에 상대적으로 매우 간편한 분석법이 될 수 있음
- 이상의 발색법에 의한 간이분석법 결과를 종합하면 HPLC를 통한 분석법에 비해 정량결과가 정확히 일치하지는 않지만, 버섯간의 ergosterol 함량에 대한 정량적 경향은 유사하므로 초기의 다양한 버섯 내 ergosterol 함량을 판단하는 데는 충분히 사용할 수 있는 방법이라고 판단됨

Ergosterol standard curve

Sol Conc (mg)	Sol OD	Blank	OD Adjusted
0	0.0710	0.0710	0.0000
5	0.1110	0.0710	0.0400
25	0.2340	0.0710	0.1630
50	0.3400	0.0710	0.2690

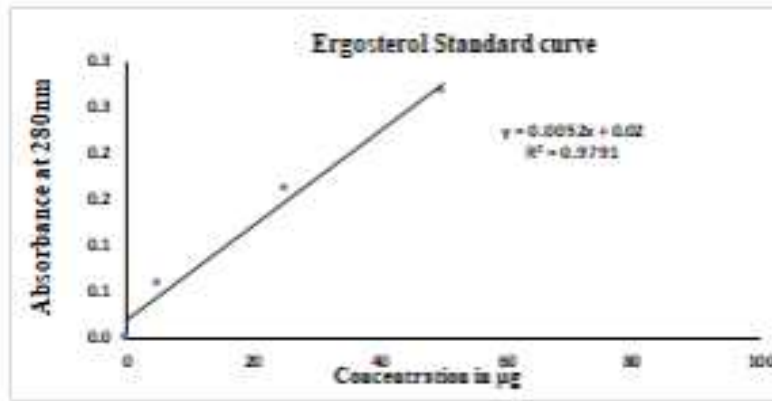
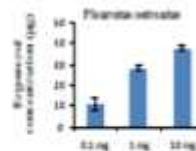


그림 12. 비색분색법을 이용한 ergosterol의 standard curve

Calorimetric analysis of ergosterol

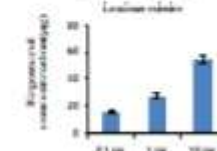
느타리버섯 (*Pleurotus ostreatus*)

Sample	Final conc (µg)	Final conc (µg)	Final conc (µg)	Final conc (µg)	Final conc (µg)	Final conc (µg)	Final conc (µg)	Average	Stdev
0.1 mg	6.335	6.335	12.778	10.877	10.877	12.778	14.678	10.866	1.211
1 mg	29.503	29.503	27.222	29.503	27.222	27.222	27.222	28.200	1.219
10 mg	39.006	39.006	39.006	36.535	36.535	36.535	39.006	37.947	1.321



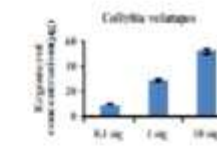
표고버섯 (*Leucium edode*)

Sample	Final conc (µg)	Final conc (µg)	Final conc (µg)	Final conc (µg)	Final conc (µg)	Final conc (µg)	Final conc (µg)	Average	Stdev
0.1 mg	14.678	14.678	14.678	14.678	16.579	14.678	16.579	15.221	0.927
1 mg	29.503	29.503	27.222	29.503	24.941	24.941	24.941	27.222	2.261
10 mg	56.111	56.111	53.070	56.111	56.111	50.020	56.111	54.807	2.393



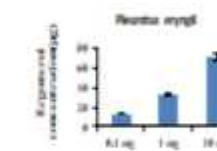
팽이버섯 (*Collybia velutipes*)

Sample	Final conc (µg)	Final conc (µg)	Final conc (µg)	Final conc (µg)	Final conc (µg)	Final conc (µg)	Final conc (µg)	Average	Stdev
0.1 mg	9.167	9.167	9.167	10.877	9.167	10.877	9.167	9.656	0.833
1 mg	29.503	29.503	27.222	27.222	29.503	29.503	27.222	28.525	1.219
10 mg	53.070	53.070	50.020	53.070	47.178	53.070	53.070	51.794	2.330



새송이버섯 (*Pleurotus eryngii*)

Sample	Final conc (µg)	Final conc (µg)	Final conc (µg)	Final conc (µg)	Final conc (µg)	Final conc (µg)	Final conc (µg)	Average	Stdev
0.1 mg	12.778	12.778	14.678	12.778	14.678	14.678	12.778	13.592	1.016
1 mg	34.064	34.064	34.064	31.783	31.783	34.064	31.783	33.087	1.219
10 mg	73.976	73.976	73.976	69.985	73.976	66.374	66.374	71.294	3.626



양송이버섯 (*Agaricus bisporus* :sing.)

Sample	Final conc (µg)	Final conc (µg)	Final conc (µg)	Final conc (µg)	Final conc (µg)	Final conc (µg)	Final conc (µg)	Average	Stdev
0.1 mg	-0.145	-2.626	-2.626	0.424	2.895	0.424	2.895	0.42	2.3
1 mg	26.842	24.371	5.743	1.085	24.371	16.88	11.48		
10 mg	46.037	48.508	62.762	60.291	62.762	56.83	61.14		

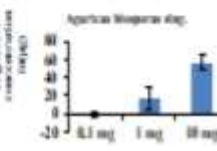


그림 13. 비색분색법을 이용한 버섯 5종의 ergosterol 분석 결과

② 비타민 D2 (Ergocalciferol) 분석법

- 버섯시료 0.1g에 2ml의 0.1% hydroquinone 용액을 첨가하여 혼합한 후 용액을 35-40°C에서 evaporation 시킴

- 0.5ml의 chloroform을 첨가하여 혼합한 후, 2ml의 trifluoroacetic acid를 첨가하여 50초 동안 혼합함
 - 이 용액 1ml을 취한 후 490nm에서 흡광도를 측정과 동시에 이 용액에 2방울의 H₂O₂를 첨가한 후 반응을 중지시켜 2분 후에 시료 1ml을 취하여 490nm에서 흡광도를 측정함
- 최종적인 비타민 D2의 양은 (처음측정값) - (H₂O₂ 처리 후의 측정값)으로 결정함
- 이와 같은 분석법으로 분석한 결과는 그림 14와 그림 15에 나타내었으며, 발색법에 의한 비타민 D2 (ergocalciferol) 간이분석법은 총 2시간 30분이면 분석이 가능함
- 이에 비해 식품공전법에 의한 분석은 전체 분석시간이 10시간이 소요되기 때문에 상대적으로 매우 간편한 분석법이 될 수 있음
- 발색법에 의한 간이분석법 결과를 종합하면 HPLC를 통한 분석법에 비해 정량결과가 정확히 일치하지는 않지만, 버섯간의 비타민 D2 함량에 대한 정량적 경향은 유사하므로 초기의 UV-LED 처리에 따른 다양한 버섯 내 비타민 D2 전환률의 경향을 판단하는 데는 충분히 사용할 수 있는 방법이라고 판단됨

Ergocalciferol (Vitamin D2) standard curve

Std Conc (µg)	OD	Blank	OD Adjusted
0	0.2230	0.2230	0.0000
5	0.4450	0.2230	0.2240
25	1.4677	0.2230	1.2447
50	2.1151	0.2230	1.8921

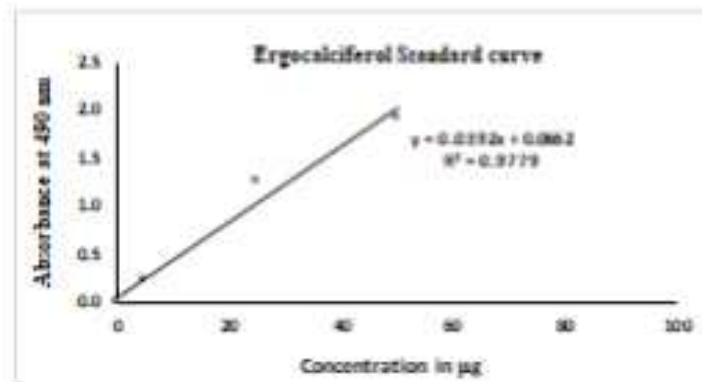
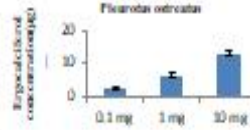


그림 14. 비색분석법을 이용한 ergosterol의 standard curve

Calorimetric analysis of ergocalciferol (vitamin D2)

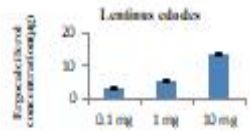
느타리버섯 (*Pleurotus ostreatus*)

Sample	Final conc	Final conc	Final conc	Final conc	Final conc	Final conc	Final conc	Average	Stdev
	(μg)	(μg)	(μg)	(μg)	(μg)	(μg)	(μg)		
0.1 mg	1.808	2.681	2.356	2.157	2.356	2.157	2.356	2.267	0.268
1 mg	7.118	6.719	5.598	7.118	6.719	5.598	5.598	6.353	0.725
10 mg	12.578	12.653	12.902	13.177	13.476	13.625	13.750	13.166	0.470



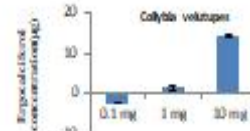
표고버섯 (*Leucium edodes*)

Sample	Final conc	Final conc	Final conc	Final conc	Final conc	Final conc	Final conc	Average	Stdev
	(μg)	(μg)	(μg)	(μg)	(μg)	(μg)	(μg)		
0.1 mg	3.129	3.254	3.229	3.503	4.127	3.578	3.802	3.518	0.356
1 mg	5.323	6.296	5.298	5.348	5.398	5.373	5.373	5.487	0.358
10 mg	13.251	13.102	13.700	13.925	13.974	14.174	14.199	13.761	0.434



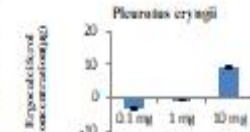
평이버섯 (*Collybia velutipes*)

Sample	Final conc	Final conc	Final conc	Final conc	Final conc	Final conc	Final conc	Average	Stdev
	(μg)	(μg)	(μg)	(μg)	(μg)	(μg)	(μg)		
0.1 mg	-2.256	-2.131	-2.231	-2.131	-2.181	-2.181	-2.156	-2.181	0.048
1 mg	0.811	1.210	1.135	1.534	1.609	2.232	2.381	1.559	0.576
10 mg	14.523	14.249	14.348	14.324	14.373	14.448	14.897	14.452	0.215



새송이버섯 (*Pleurotus eryngii*)

Sample	Final conc	Final conc	Final conc	Final conc	Final conc	Final conc	Final conc	Average	Stdev
	(μg)	(μg)	(μg)	(μg)	(μg)	(μg)	(μg)		
0.1 mg	-3.502	-3.228	-3.153	-2.954	-2.854	-2.779	-2.605	-3.011	0.304
1 mg	-0.785	-0.585	-0.261	-0.112	0.337	0.362	0.362	-0.098	0.474
10 mg	9.462	9.038	9.287	9.213	9.487	9.262	9.262	9.287	0.152



양송이버섯 (*Agaricus bisporus: sing.*)

Sample	Final conc	Final conc	Final conc	Average	stdev
	(μg)	(μg)	(μg)		
0.1 mg	1.411	1.192	0.369	0.990	0.550
1 mg	0.346	0.392	1.466	0.730	0.630
10 mg	2.380	6.060	6.060	4.830	2.120

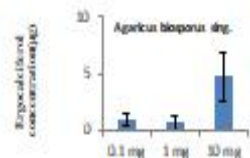


그림 15. 비색분색법을 이용한 버섯 5종의 vitamin D2(ergocalciferol) 분석 결과

○ 버섯 5종의 비타민D 전구체 및 비타민D 전환을 조사

:참여기관 1 (대구대학교산학협력단), 참여기관 2 (경성대학교산학협력단)

가. 실험 내용 및 방법

1) 추출법

- 추출법은 식품의약품안전처의 식품공전의 비타민 D 추출법과 동일하게 진행함
- 균질화 된 시료 1g을 비누화 플라스크에 정밀히 취한 후, 피로갈롤-에탄올 용액 40mL를 가하여 약하게 진탕 혼합
- 수산화칼륨 10mL을 가하고, 환류냉각기를 부착하여 비등수욕 중에서 60분 간 가열하여 비누화 함



그림 16. 버섯 시료를 이용한 비타민 D2 전구체 추출

- 즉시 실온으로 냉각하고 갈색 분액깔때기로 옮긴 후, 0.01% BHT를 함유하는 헥산 50mL을 가하여 헥산층을 250~300mL 새로운 분액깔때기로 옮김(층 분리가 원활하지 않을 때는 0° C, 6,000rpm에서 10분간 원심분

리)

- 남은 하층에 추출용매 50mL를 가하여 2회 더 반복하여 이전의 추출용매와 합하고 1N 수산화칼륨용액 100mL를 가하여 15초간 강하게 진탕함
- 이를 방치하여 분리하고 혼탁한 물층을 버리고 핵산층에 0.5N 수산화칼륨용액 40mL를 가하여 진탕한 후 물층을 다시 버림
- 핵산층을 수세하여 세척액이 페놀프탈레인 시액으로 알칼리의 반응을 나타내지 않을 때까지 수회 수세함
- 수세 시 매회 15초간 격렬하게 진탕 한 뒤 수세한 핵산층을 무수황산나트륨으로 탈수하여 갈색 플라스크로 옮기고 무수황산나트륨을 핵산 10mL로 2회 세척한 후 탈수한 핵산용매와 합하고 이를 40° C 이하에서 감압농축함
- 잔류물에 메탄올 2mL를 가해 녹이고, 이를 멤브레인 필터(PTFE, 0.45 μ m)로 여과하여 기기분석을 위한 시험용액으로 사용함



그림 17. Vitamin D2 전구체 추출을 위한 버섯 추출 용매 및 농축

2) 버섯 분말 UV-B LED 조사 과정

- 버섯 5종의 분말을 고르게 펼쳐 tray에 담고 UV-B LED 장치가 되어있는 상자에 넣고 30분 동안 UV-B LED를 쬐م



그림 18. 버섯 분말의 UV-B LED 처리 과정

3) HPLC 분석 조건 확립

- 참고 문헌을 토대로 ergosterol 및 비타민D2의 동시분석법을 확립함.
- HPLC 분석 조건은 아래와 같음.

표 24. ergosterol 및 vitamin D2 HPLC 분석 조건

Apparatus	DIONEX UltiMate 3000		
Column	SUPERSIL COLUMN ODS-I, 4.6 X 250 mm, 5µm		
Mobile Phase		Solvent A (Acetonitrile)	Solvent B (Methanol)
	0 – 5min	20	80
	5 – 20min	80	20
	20 – 30min	90	10
Oven Temp	30 °C		
Flow Rate	1.8 ml/min		
Injection volume	10 µL		
Run time	30 minutes		
Wave length	282 nm		

Ref. Distribution of ergosterol in different tissues of mushrooms and its effect on the conversion of ergosterol to vitamin D2 by UV irradiation, *Food Chemistry*, (2005) 92, 541-546

나. 실험 결과

1) 버섯 선정을 위한 5가지 버섯의 조사 전 ergosterol 함량 확인 시험

- 표고버섯, 양송이버섯, 느타리버섯, 새송이버섯, 팽이버섯 5가지의 ergosterol 함량 확인 (식품공전법으로 진행한 추출 및 분석 확인시험)

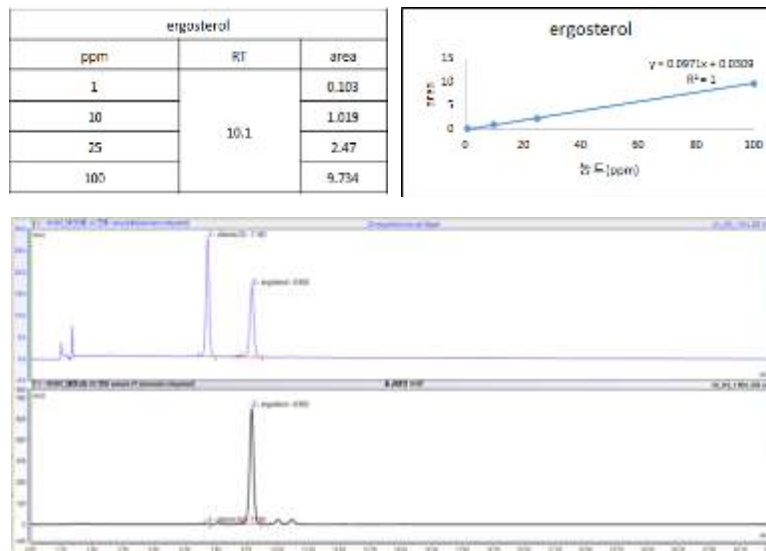


그림 19. Ergosterol의 검량선 작성 및 분석 peak 결과

표 25. Ergosterol 함량 분석 결과

sample	성분	Area	부피(mL)	농도(µg/mL)	함량(mg/g)
표고버섯	ergosterol	123.773	2	1274.690	2.549
양송이버섯	ergosterol	117.238	2	1207.372	2.415
느타리버섯	ergosterol	93.212	2	959.876	1.920
새송이버섯	ergosterol	90.266	2	929.528	1.859
팽이버섯	ergosterol	73.447	2	756.273	1.513

- 분석 결과, 표고버섯과 양송이버섯의 ergosterol 함량이 높음을 확인

○ 경성대 내 간이 제작한 UV-B LED 조사 후 버섯 분말의 ergosterol 및 비타민 D2 함량 확인 시험
: 참여기관 2 (경성대학교산학협력단)

- 주관기관에서 인계받은 버섯 5종 중 UV-B LED 조사 후 비타민 D2가 가장 많이 전환되는 버섯 선정
- UV-B LED 조사 방법은 위의 가-2) 방법에 따름

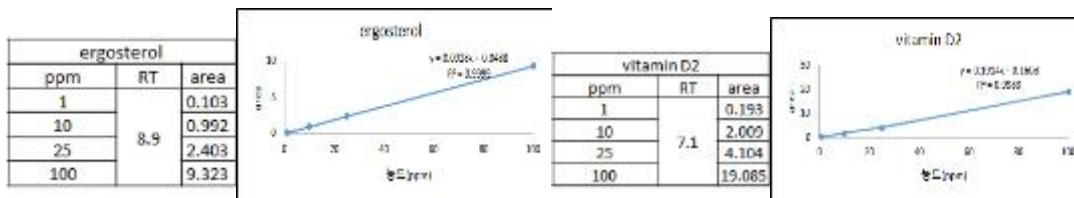


그림 20. Ergosterol 및 비타민 D2의 검량선 작성

표 25. UV-B LED 조사 전 ergosterol 함량 분석 결과

sample	성분	Area	부피(mL)	농도(µg/mL)	함량(mg/g)
양송이버섯 UV-B LED 전	ergosterol	95.799	2	1031.393	2.063
새송이버섯 UV-B LED 전	ergosterol	86.068	2	926.573	1.853
느타리버섯 UV-B LED 전	ergosterol	83.964	2	903.910	1.808
표고버섯 UV-B LED 전	ergosterol	83.851	2	902.692	1.805
팽이버섯 UV-B LED 전	ergosterol	57.449	2	618.298	1.237

표 26. UV-B LED 조사 후 vitamin D2 및 ergosterol 함량 분석 결과

sample	성분	Area	부피(mL)	농도(µg/mL)	함량(mg/g)
표고버섯 UV-B LED 후	ergosterol	80.333	2	864.798	1.730
	vitamin D2	5.182	2	27.910	0.056
양송이버섯 UV-B LED 후	ergosterol	84.161	2	906.032	1.812
	vitamin D2	5.147	2	27.727	0.055
새송이버섯 UV-B LED 후	ergosterol	60.395	2	650.031	1.300
	vitamin D2	4.051	2	22.002	0.044
느타리버섯 UV-B LED 후	ergosterol	54.516	2	586.704	1.173
	vitamin D2	3.709	2	20.215	0.040
팽이버섯 UV-B LED 후	ergosterol	40.252	2	433.057	0.866
	vitamin D2	0.869	2	5.379	0.011

- 전환율은 양송이 (2.67%), 새송이 (2.37%), 느타리 (2.21%), 팽이 (0.89%), 표고 (3.10%)로 나타남
- 분석 결과, 표고버섯과 양송이버섯의 함량이 높음을 확인
- 버섯의 종류는 가장 많이 전환되는 표고버섯으로 최종 품종 선택함

○ 경제성비교평가 :주관연구기관 (㈜네이처텍)

- 국산 버섯 5종(새송이, 느타리, 팽이, 양송이, 표고)의 경제성 비교평가

- 새송이 버섯, 느타리버섯, 팽이버섯, 양송이버섯, 표고버섯의 단가 및 비타민D 전구체 (ergosterol) 함량을 이용한 경제성 비교평가 결과, 표고버섯의 비타민D 함량이 가장 높았으며, 단가는 가장 저렴했음 따라서, 비타민D 대량생산 원료로 표고버섯을 선정함

표 27. 버섯을 이용한 비타민 D 제품 개발 경제성비교평가 결과

	종료 1차	종료 2차	종료 3차
내수	5억	20억	50억
수출	1억	3억	5억

- 비타민 및 무기질 시장 산업규모 : 2,259억(2017년)
- 비타민D 및 종합비타민 예상 시장 : 2,033억 이상 (전체 비타민 무기질 시장의 90% 이상)
- 천연비타민 시장 예측 : 203억(1%) (22') → 609억(3%) (23') → 1,015억(5%) (24')
- 예상 매출 : 천연비타민 시장 2%(22') → 3%(23') → 5%(24')
- 비타민D 제품 평균 가격 : 3만원
- 프리미엄(천연)예상 가격 : 4만원
- 예상 출고가 : 15,000 원
- 35만 박스 (5억)

표 28. 버섯 5종의 예상 비타민D 전환률 및 단가 비교

Sample	성분	Area	부피(mL)	농도(μg/mL)	함량(mg/g)
표고버섯	ergosterol	123.773	2	1274.690	2.549
양송이버섯	ergosterol	117.238	2	1207.372	2.415
느타리버섯	ergosterol	93.212	2	959.876	1.920
새송이버섯	ergosterol	90.266	2	929.528	1.859
팽이버섯	ergosterol	73.447	2	756.273	1.513

	전환 후 농도(20%)	구입가격	수량(Kg)	Kg 당 단가
표고버섯	254.938	300,000	5	60,000
양송이버섯	241.4744	480,000	5	240,000
느타리버섯	191.9752	450,000	5	90,000
새송이버섯	185.9056	385,000	5	77,000
팽이버섯	151.2546	330,000	5	66,000

○ 산지별 버섯 원료 확보 및 협력 네트워크 구축 :주관연구기관 (㈜네이처텍)

- 산지별 표고버섯 원료 확보 완료

- 위 결과를 바탕으로 ergosterol 함량이 높고 단가가 저렴한 표고버섯을 산지별로 (강원, 경상, 경기, 충청, 전라) 확보함



그림 21. 산지별 표고버섯 농가명



전라도

경상도

충청도

경기도

강원도

그림 22. 산지별 표고버섯 건조물



강원도



충청도



전라도



경상도



경기도

그림 23. 5개 지역 표고버섯 원산지증명서

- 원료 소재의 안정적 수급을 위한 원료 공급 및 기술협력 관련 네트워크 구축
 - 원료 소재의 대량생산 시 안정적인 원료 공급 및 기술협력을 위해 3건의 MOU를 체결함



팜스마켓㈜

(주)더푸른농산



성화농원

그림 24. 표고버섯 농가 MOU 3건 체결

○ 표고버섯의 재현성 실험 : 참여기관 2 (경성대학교산학협력단)

- Ergosterol 및 비타민 D2 함량이 가장 많이 나온 표고버섯의 재현성을 위해 3번 반복 실험 진행

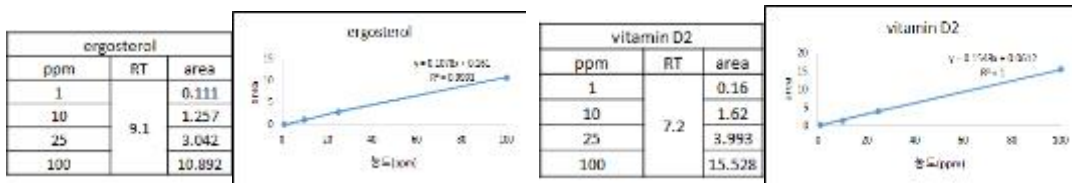


그림 25. Ergosterol 및 비타민 D2 의 검량선 작성

표 29. UV-B LED 조사 전 ergosterol 함량 분석 결과

sample	성분	Area	부피 (mL)	농도(μg/mL)	함량(mg/g)	평균 함량 (mg/g)	표준편차
표고버섯 UV-B LED 전_1	ergosterol	111.055	2	1028.908	2.058	2.029	0.101
표고버섯 UV-B LED 전_2		103.45	2	958.347	1.917		
표고버섯 UV-B LED 전_3		113.987	2	1056.112	2.112		

표 30. UV-B LED 조사 후 비타민 D2 및 ergosterol 함량 분석 결과

sample	성분	Area	부피 (mL)	농도(µg/mL)	함량(mg/g)	평균함량 (mg/g)	표준편차
표고버섯 UV-B LED 후_1	ergosterol	103.163	2	955.684	1.911	1.917	0.005
표고버섯 UV-B LED 후_2		103.545	2	959.228	1.918		
표고버섯 UV-B LED 후_3		103.653	2	960.230	1.920		
표고버섯 UV-B LED 후_1	vitamin D2	5.066	2	32.326	0.065	0.066	0.001
표고버섯 UV-B LED 후_2		5.174	2	33.023	0.066		
표고버섯 UV-B LED 후_3		5.216	2	33.294	0.067		

- 분석 결과, 표고버섯의 UV-B LED 조사 전 ergosterol의 평균 함량은 2.029 ± 0.101 이며 UV-B LED 조사 후 ergosterol 평균 함량은 1.917 ± 0.005 , 비타민 D2의 평균 함량은 0.066 ± 0.001 로 실험 오차가 적음을 확인

○ **초미세화 공정 개발 :주관연구기관 (쥬네이처텍)**

▪ **비타민D 소재 제조 및 사업화를 위한 MOU 체결**

- 버섯을 소재로한 식품 원료의 안정적인 공급 및 제조를 위해 살균, 식품원료 전문기업 (쥬더원네이처)와 MOU 1건 체결



그림 26. (쥬더원네이처 MOU 체결

- 버섯 미세분말 제조공정 확립
- : 수세→건조→미세분말→UV-LED 조사
- 버섯 분말 입자 분쇄 사이즈 확립
- : 800~1,000 mesh

○ **전환 수율 기초자료 확보: :참여기관 1 (대구대학교산학협력단), 참여기관 2 (경성대학교산학협력단)**

▪ **UV-B 최적 처리 조건 테스트 진행**

- UV-B 처리 시간(0분, 5분, 10분, 15분, 20분, 30분)에 따른 비타민D 전환율 측정
- 산지별 표고버섯분말 UVB 처리 후 ergosterol 함량 및 비타민D 전환율 측정



그림 27. UV-B 처리 시간별 버섯 샘플

가. 실험 내용 및 방법

- 1) 표고버섯의 산지별 5가지 시간대 UV-B 조사 후 비타민 D2와 ergosterol 함량 확인
- 2) 강원도, 경기도, 경상도, 전라도, 충청도 6가지의 0분, 5분, 10분, 15분, 20분, 30분 시간대별 함량 비교
- 3) 추출법과 분석법은 위 추출·분석 방법과 동일

나. 실험 결과

- 1) 지역별 표고버섯의 UV-B 미처리 시 ergosterol 및 비타민 D2 함량 확인 실험
 - 4개 지역(충청도, 경상도, 경기도, 전라도) 표고버섯의 UV-B 처리 전 ergosterol 및 비타민 D2 함량 확인
 - 분석 결과, 전 지역의 표고버섯에서 ergosterol이 비타민 D2로 전환되지 않았음을 확인함

표 31. 4개 지역 UV-B 처리 전 ergosterol 및 비타민 D2 함량 분석 결과

Sample	함량_Ergosterol(mg/g)	함량_Ergocalciferol(mg/g)
충청도 Chloroform추출	1.10	불검출
경상도 Chloroform추출	0.68	불검출
경기도 Chloroform추출	0.46	불검출
전라도 Chloroform추출	1.61	불검출

2) 강원도 표고버섯의 시간대별 ergosterol 및 비타민 D2 함량 확인 실험

- 5가지 산지 중 강원도 표고버섯의 시간대별 함량 확인
- 강원도 표고버섯의 세척 전 후 ergosterol의 손실 발생 여부 확인

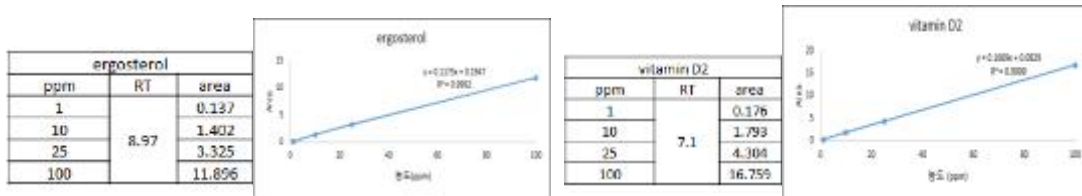


그림 28. Ergosterol 및 비타민 D2 검량선 작성

표 32. 시간대별 ergosterol 함량 분석 결과

Sample (UV B-LED 조사 후)	성분	Area	부피(mL)	농도(µg/mL)	함량(mg/g)
강원도 세척 전	ergosterol	123.182	2	1046.617	2.093
강원도 세척 후		37.167	2	314.633	0.629
강원도 5분		33.507	2	283.487	0.567
강원도 10분		51.816	2	439.295	0.879
강원도 15분		34.83	2	294.745	0.589
강원도 20분		30.139	2	254.825	0.510
강원도 30분		39.145	2	331.466	0.663

표 33. 시간대별 비타민 D2 함량 분석 결과

Sample (UV B-LED 조사 후)	성분	Area	부피(mL)	농도(µg/mL)	함량(mg/g)
강원도 세척 전	vitamin D2	0	2	0.000	0.000
강원도 세척 후		2.290	2	13.223	0.026
강원도 5분		2.255	2	13.013	0.026
강원도 10분		2.815	2	16.368	0.033
강원도 15분		3.029	2	17.650	0.035
강원도 20분		2.006	2	11.522	0.023
강원도 30분		2.479	2	14.355	0.029

- 분석 결과, UV-B 조사 15분 sample의 비타민 D2 함량이 가장 높음
- 강원도 표고버섯의 세척 전 후 비교분석 결과 세척 전의 ergosterol 함량이 더 높게 나옴 → 세척 과정에서 손실 발생 확인
- 미세분말제조공장의 UV-B 처리 sample이 경성대에서 간이 처리한 sample보다 vitamin D2 전환 함량이 적게 나옴
- UV-B 시간대는 15분 (전환율 5.56%)으로 최종 선택

3) 산지별 표고버섯의 UV-B 조사 15분 sample 함량 확인 실험

- 강원도, 경기도, 경상도, 전라도, 충청도 산지의 표고버섯 UV-B 조사 15분 sample 비교 분석.

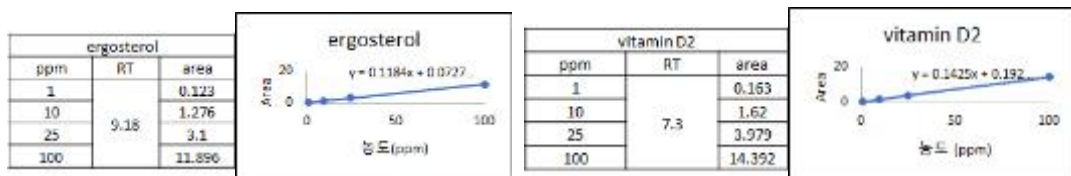


그림 29. Ergosterol 및 비타민 D2 검량선 작성

표 34. 산지별 ergosterol 함량 분석 결과

sample	성분	Area	부피(mL)	농도(µg/mL)	함량(mg/g)
강원도 15분 sample	ergosterol	34.83	2	293.527	0.587
충청도 15분 sample		51.155	2	431.393	0.863
경기도 15분 sample		33.267	2	280.327	0.561
전라도 15분 samle		75.692	2	638.609	1.277
경상도 15분 sample		55.506	2	293.527	0.587

표 35. 산지별 비타민 D2 함량 분석 결과

sample	성분	Area	부피(mL)	농도(μg/mL)	함량(mg/g)
강원도 15분 sample	vitamin D2	3.029	2	19.903	0.040
충청도 15분 sample		3.046	2	20.022	0.040
경기도 15분 sample		4.817	2	32.446	0.065
전라도 15분 samle		2.831	2	18.514	0.037
경상도 15분 sample		7.214	2	49.262	0.099

- 분석 결과, 경상도 15분 sample의 비타민 D2 함량이 **0.099 mg/g**로 가장 높음

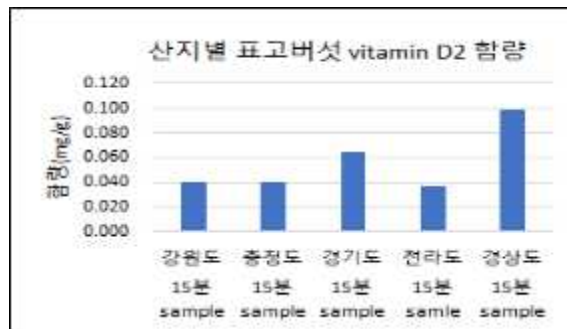


그림 30. 산지별 표고버섯 vitamin D2 함량 분석 결과

○ 식품 소재화 전처리/공정 최적화 : 주관연구기관 (㈜네이처텍)

- 버섯 소재 식품 원료 대량생산 현장적용을 위한 전처리 및 공정 최적화

- 버섯 분말 UV-B 조사 면적 확립
: 분말 높이 5-7mm, 세로 30-40cm
- 버섯분말 UV-B 조사 시간 확립
: 15분



그림 31. 식품 소재화 전처리 및 공정 최적화 과정

○ 버섯시료 추출물의 안전성 평가 : 참여기관 1 (대구대학교산학협력단)

- UV-LED 처리한 버섯시료 추출물에 대한 안전성 평가는 동물 세포주를 이용한 MTT assay와 Zebrafish model을 이용한 in vivo 실험을 동시에 진행 중에 있음
- 동물 세포주를 이용한 안전성 평가

- 정상세포주인 HACAT cell 혹은 Raw 264.7 세포주를 배양한 후 MTT assay로 버섯추출물의 독성여부를 판단한다.
- Zebrafish model을 이용한 in vivo 안전성 평가
- 버섯추출물의 처리에 따른 zebrafish의 수정란을 이용하여 in vivo 안전성을 평가
- 즉 수정란에서 부화되는 숫자, 어린치어의 외형적 변이 유무, 행동양상, 심장박동수를 전체적으로 평가하여 안전성을 평가

<2차년도 연구수행결과>

[주관연구기관 (㈜네이처텍)]

○ UV-B LED 처리를 통한 산지별 버섯 5종의 비타민D 전환 비교

- 실험방법

- 산지별 버섯 5종(전라도, 강원도, 경상도, 충청도, 경기도)의 분말을 고르게 펼쳐 tray에 담고 UV-B LED 장치가 되어있는 상자에 넣고 30분 동안 UV-B LED 조사
- 추출법은 식품의약품안전처의 식품공전의 비타민D 추출법과 동일하게 진행

- 실험결과

- 경성대학교 제작 간이챔버를 이용해 버섯 5종의 비타민D 전환 비교 결과, 강원도산 표고버섯에서 가장 높은 비타민D 함량을 나타내었음

표 35. UV-B LED 처리시간별 비타민 D2 함량 비교

처리군	Ergosterol (ug/g)	Ergocalciferol (ug/g)
충청도	1.100	-
경상도	0.680	-
경기도	0.460	-
전라도	0.610	-
강원도	0.589	0.035

○ 소재 내 비타민D 표준화

■ 버섯 비타민D 최적 전환 거리 확인

- 실험방법

- 분쇄된 버섯 분말을 두께 7mm로 각각의 트레이에 올려두고 5분 간격으로 혼합하여 20분간 UV-LED를 조사함
- 램프의 종말 단과 버섯분말 표면사이의 거리를 1cm에서 8cm 까지 단계적으로 적용하여 시료를 제조함
- 각 조건별로 제조된 버섯분말의 Ergosterol과 비타민 D2 의 함량을 분석 비교하였음

- 실험결과

- 버섯 비타민 D 최적 전환 조건을 확인하기 위해 대구대학교 실험실에서 UV-B LED 처리 거리별 전환율을 비교하였음
- 그 결과, 처리 거리가 짧을수록(5 cm 이하) 전환율이 높아짐을 확인하였음

처리구	성분	평균함량 (ug/g)
No treatment	Ergosterol	3,125
1cm		2,054
2cm		2,065
4cm		2,267
5cm		2,505
6cm		2,212
8cm		2,453
No treatment		Vit D ₂
1cm	199	
2cm	250	
4cm	228	
5cm	211	
6cm	175	
8cm	105	

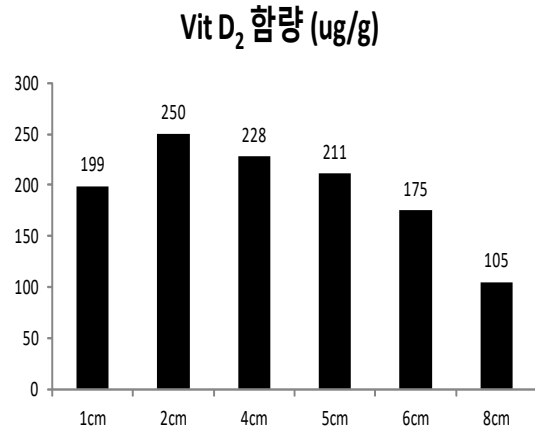


그림 32. UV-B LED 처리 거리별 비타민 D2 함량 비교

■ 버섯 비타민D 분말 입자 크기 비교

- 실험목적

- 버섯 비타민 D 전환 시 분말 입자가 미세할수록 입자 사이에 생기는 공간이 좁아져 투과율이 낮은 UV-B wave가 바닥면까지 전달이 어려워 비타민 D 전환이 잘 이루어지지 않을 가능성이 있음. 이에 초미세분말과 미세분말을 제조하여 각 분말 입자 크기를 측정하고 그에 따른 UV-B LED 처리 후 각 시험조건에 따른 Ergosterol과 비타민 D2의 함량을 분석하였음

- 실험방법

- 입도분석기(Particle size analyzer Mastersizer 3000, Malvern)의 sample dispersion unit에 버섯 분말을 약 1 g 투입하여 입도를 분석함

- 실험결과

- 경성대학교에서 버섯 분말을 초미세(800~1,000 mesh 기준), 미세 분말(160~180 mesh 기준)로 제작하여 두 샘플의 입자 크기 차이를 비교하였음
- 버섯 초미세분말의 입도 분석 결과 평균적으로 D(10) 4.5 μ m, D(50) 15 μ m, D(90) 40 μ m였음 이는 버섯 초미세분말의 전체 입도 분포에서 10%일 때 입자 크기는 4.5 μ m, 50%일 때 15 μ m, 90%일 때 40 μ m임을 의미함
- 버섯 미세분말의 입도 분석 결과 평균적으로 D(10) 7.5 μ m, D(50) 39 μ m, D(90) 145 μ m였음 이는 버섯 초미세분말의 전체 입도 분포에서 10%일 때 입자 크기는 7.5 μ m, 50%일 때 39, 90%일 때 145 μ m임을 의미함

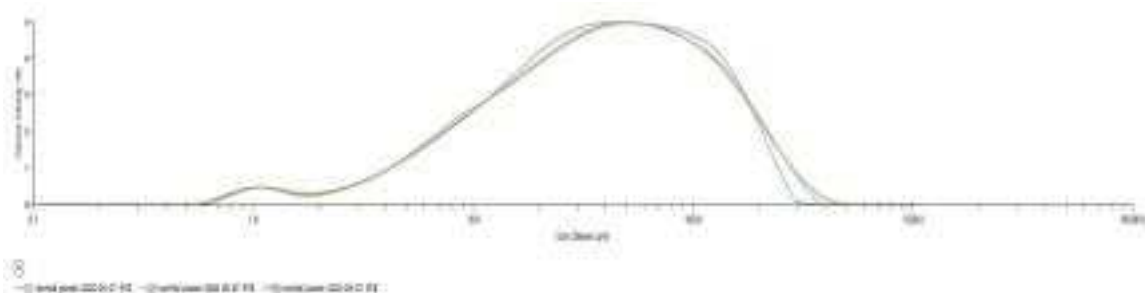


그림 33. 초미세분말 입자 크기. d10: 4.50, d50: 15.00, d90: 40

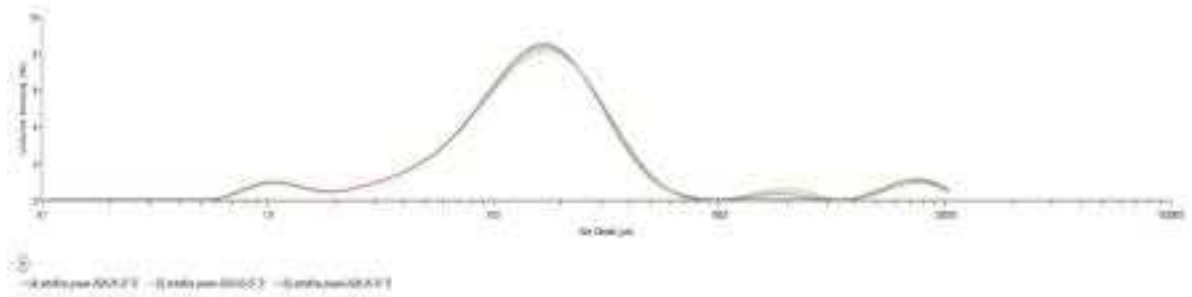


그림 34. 미세분말 입자 크기. d10: 7.00, d50: 39.00, d90: 145

- 입자 크기가 다른 두 샘플 간 UV-B LED 처리 시 비타민D 전환율을 비교하였음 그 결과 초미세분말 보다 미세분말에서 전환율이 더 높음을 확인하였음
- UV-B 및 UV-B LED를 2분간 조사했으며, 실험실 전환조건은 조사거리가 2cm 이고 대량생산시설의 최소 조사거리인 20cm의 조건으로 각각의 조사거리에 의한 비타민 D 전환 차이 여부에 대한 실험을 수행한 한 결과 두 처리군 사이에는 유의미한 차이가 없음을 확인함

표 36. 분말 입자 크기별 비타민 D2 함량 비교. UV-B 및 UV-B LED 조사 거리; 2 cm

처리구		ug/g	Ergosterol	Vit D ₂
무처리	초미세분말		140.3	0
	미세분말		381.3	0
UV-B LED	초미세분말		228	26
	미세분말		368.1	52
UV-B	초미세분말		199.2	73
	미세분말		231.3	154

표 37. 분말 입자 크기별 비타민 D2 함량 비교. UV-B 및 UV-B LED 조사 거리; 20 cm

처리구		ug/g	Ergosterol	Vit D ₂
무처리	초미세분말		140.3	0
	미세분말		381.3	0
UV-B LED	초미세분말		239.6	13
	미세분말		388.4	16
UV-B	초미세분말		209.1	69
	미세분말		327.4	177

■ 원료 대량생산 공정 확립을 위한 UV-B 및 UV-B LED 비교

- 실험목적

- 연구 계획 및 초기 단계에서 UV-B LED를 이용해 버섯 비타민D 제작을 진행하였으나 UV-B LED 소자의 원활한 공급 및 대량생산 적용 시 경제성이 낮아 식품 원료 개발 현장에 적용하기 위한 대체 방안을 탐색함

- 실험방법

- UV-B LED 소자의 현장 적용 어려움을 극복하기 위하여 대체 방안으로 대중적으로 널리 사용되고 있는 살균용 UV-B 램프를 구입하여 대량생산시설과 유사환경으로 간이챔버를 제작하여 (램프-버섯분말 표면 거리 약 15cm) 각각 15분, 20분간 조사하였음. 조사된 버섯 분말의 비타민D 전구체 및 비타민D 함량을 분석하여 전환 여부 및 실제 생산 적용 가능성에 대한 연구를 수행하였음. 또한 실험실 조건에서 UV-B 램프 및 UV-B LED 램프 사용 시 버섯분말의 비타민D 전환 연구를 수행하

였음

- 실험결과

- UV-B 램프에 의한 버섯 분말에서의 비타민D 전환 여부를 확인하였고, 이를 활용한 대량생산 공정 개발을 진행하였음 (표 5)

표 38. UV-B 처리 후 샘플의 비타민 D2 함량

	ug/g	Ergosterol	비타민 D2
UV-B (Sankyo) 15cm. 15min		4,180	27
UV-B (Sankyo) 15cm. 20min		5,080	45

- UV-B 램프 및 UV-B LED 램프 적용 시 각 램프에 의한 비타민 D 전환율을 비교하였음
- 두 번의 반복 실험 결과, UV-B LED 처리군 보다 일반 UV-B 처리군이 동일 조건에서 비타민 D2 함량이 비슷하거나 더 높음을 확인하였음 따라서 대량생산을 위해 일반 UV-B 램프를 사용하여 공정 확립이 가능한 것을 확인하였음

표 39. UV-B LED와 일반 UV-B 처리 후 샘플의 비타민 D2 함량 비교 1

	ug/g	Ergosterol	비타민 D2
NO treatment		120.6	0
UV-B LED	5 min	258.8	3
	15 min	238.5	44
	30 min	84.8	87
No treatment		159.1	0
UV-B	5 min	1956	38
	15 min	227.2	48
	30 min	108.7	87

표 40 UV-B LED와 일반 UV-B 처리 후 샘플의 비타민 D2 함량 비교 2

	ug/g	Ergosterol	비타민 D2
NO treatment		350	0
UV-B LED	5 min	853	12
	15 min	979.5	19
	30 min	637.5	11.5
No treatment		569.5	1
UV-B	5 min	622	20.5
	15 min	290	31.5
	30 min	451.5	21

■ 원료 대량생산 공정 확립을 위한 UV-B 시간별 조사 비교 (실험실 조건 확립)

- 실험방법

- 대량생산 적용 시설에 UV-B 램프를 약 20cm 높이로 설치한 후 적절한 조사시간을 확인하기 위하여 10~ 20 분 사이의 조사시간별 비타민D 전환 버섯분말을 제조하고 각 시료의 Ergosterol과 비타민 D2 함량을 분석 비교하였음 또한 식품원료신고에 필요한 대장균군에 대한 검사도 실시함

- 실험결과

- UV-B 10분, 15분, 20분 조사를 진행 후 분석 결과를 비교한 결과 UV-B 20분 조사 시 비타민D 함량이 더 높아짐을 확인하였음
- 비타민 D2 고시형 원료 신고 시 필요한 대장균군 검사결과는 모두 음성임을 확인하였음

표 41. UV-B 처리 시간별 샘플의 비타민 D2 함량 비교

ug/g	Ergosterol	비타민 D2	대장균군
UV-B 10분	3,058	7	음성
UV-B 15분	3,115	7	음성
UV-B 20분	3,066	11	음성

■ 원료 대량생산 공정 확립을 위한 UV-B 램프 개수별 비타민 D 전환 비교 (실험실 조건 확립)

- 실험방법

- 대량생산 적용 시설에 설치할 UV-B 램프 수를 결정하기 위하여 설치된 램프 수 및 조사거리 (10 또는 20cm)를 달리하여 버섯분말의 비타민D 전환율을 비교분석 하였음

- 실험결과

- UV-B 조사 시간, 조사 거리 및 램프의 수에 따른 버섯 분말의 비타민D 분석결과 램프의 개수 및 조사거리는 비타민D 전환율에 영향을 미치지 않음을 확인함

표 42. UV-B 처리 시간별 샘플의 비타민 D2 함량 비교 (조사 거리: 10 cm)

	ug/g	Ergosterol	비타민 D2
램프 1개	UV-B 5 min	3,109	7
	UV-B 10 min	3,466	16
	UV-B 20 min	2,188	10
램프 2개	UV-B 5min	2,341	10
	UV-B 10min	2,055	11
	UV-B 20 min	2,050	0

표 43. UV-B 처리 시간별 샘플의 Vit D₂ 함량 비교 (조사 거리: 20 cm)

	ug/g	Ergosterol	비타민 D2
램프 1개	UV-B 5 min	4,058	14
	UV-B 10 min	2,188	10
	UV-B 20 min	1,122	10
램프 2개	UV-B 5min	2,071	0
	UV-B 10min	2,393	11
	UV-B 20 min	1,049	0

■ 원료 대량생산 공정 확립을 위한 UV-B 거리별 조사 비교 (대량생산시설 시험)

- 실험방법

- 대량생산 적용 시설에 UV-B 램프 설치 후 조사거리 차이 (10 또는 20cm) 에 의한 버섯분말의 비타민 D 전환을 분석 비교하였음

- 실험결과

- 버섯 비타민D 원료 대량생산 현장에서는 그림 1.에서와 같이 처리 거리 5 cm 미만으로 진행하기 어렵기 때문에 UV-B 처리 거리를 10 cm 와 20 cm 로 조절하여 두 샘플의 비타민 D2 함량을 비교하였음. 그 결과 두 샘플간의 유의적인 차이는 없었음

표 44. UV-B 처리 거리별 샘플의 Vit D₂ 함량 비교

ug/g	Ergosterol	비타민 D2
UV-B 10 cm	3,910	16
UV-B 20 cm	5,300	18

- 원료 대량생산 공정 확립을 위한 공정개선 연구 (UV-B 조사 시 분말 두께 및 컨베이어 자동시스템 사용 환경 조성)

- 실험방법

- 대량생산 적용 시설에 UV-B 램프 설치 후 실시한 버섯분말의 비타민D 전환 (조사시간 15분, 조사 거리 20cm) 결과 비타민D 함량이 예상보다 적게 나오는 경향이 발생함
- 생산공정을 검토하고 수정함. 기존 방법은 호퍼에서 컨베이어 벨트에 쏟아지는 버섯 분말의 두께가 5cm 이상으로 두꺼웠으며 UV-B 조사 시 컨베이어 벨트의 이동이 없이 각각 15분 조사하는 방식으로 생산되어 생산효율이 낮고 비타민D 전환도 잘 이루어지지 않았음
- 이에 도포되는 분말 두께 및 조사 시간을 분석 비교하였음. 컨베이어 벨트에 분말이 도포될 때 특수 제작한 comb를 이용하여 분말 두께를 5mm 이하로 조절하고 컨베이어 벨트 1회 이동 시 8분이 걸린다는 점을 감안하여 동일한 분말을 4회 이동시키는 방법으로 이전 방식보다 생산효율을 높였으며 1회 이동 시 직접 분말을 섞어 UV-B가 골고루 조사될 수 있게 조절함

- 실험결과

- 버섯 비타민D 원료 대량생산 시 컨베이어 벨트 위에 도포되는 분말 두께를 5 mm 이하로 조절하여 UV-B wave가 바닥면까지 잘 도달할 수 있도록 진행하였음



그림 35. 생산현장에 적용된 분말두께 조절용 장치 및 컨베이어 벨트

- 분말의 UV-B 조사 컨베이어벨트 이동 횟수, 즉 UV-B 조사 시간 (8분/1회)에 따른 비타민 D2 함량을 분석하였음. 그 결과 UV-B 4회 처리(32분) 시 비타민D2 함량이 가장 높았음

표 45. UV-B 처리 시간별 샘플의 비타민 D2 함량 비교

ug/g	Ergosterol	비타민 D2
대조구	8,160	6
8min	3,062	20
16min	7,497	42
24min	9,513	59
32min	8,759	68

- 수정된 생산공정으로 UV-B 처리 시간 표준화를 위한 반복실험을 진행하였음

표 46. UV-B 32분 처리 후 비타민 D2 함량

ug/g	Ergosterol	비타민 D2
sample 1	5,100	140
sample 2	6,100	130
sample 3	5,210	140

■ 원료 내 비타민D 표준화를 위한 공인시험성적서 발급

- 실험방법

- 버섯 비타민D 함량 측정을 위해 공인시험기관에 UV-B 32분 처리 샘플을 전달하여 분석 후 공인시험성적서 발급

- 실험결과

- 공인시험성적서 확인 결과 샘플 1에서는 130.71 ug/g, 샘플 2에서는 105.75 ug/g, 샘플 3에서는 131.87 ug/g이 포함된 것으로 확인됨



그림 36. 한국기능식품연구원 비타민D 검사 결과.

○ 1차년도 개발 소재 대량생산 및 품목(원료) 신고

■ 개발 소재 1ton 이상 대량생산

- 원물 1ton 기준 건조물 200 kg을 구매하여 분쇄 및 전처리 공정 진행 (버섯 건조물의 수분 함량 15% 기준)

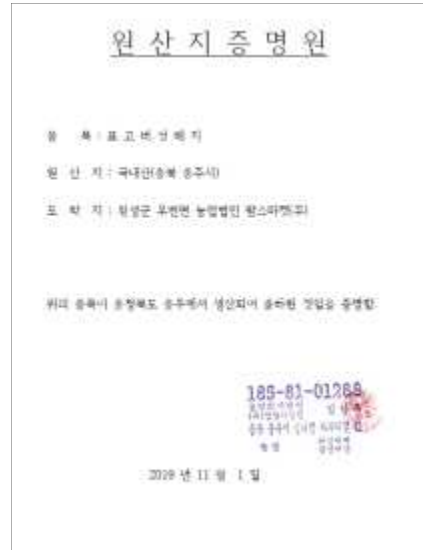


그림 37. 건표고버섯 200kg 및 원산지증명서

- 개발 소재 품목(원료) 신고

- 버섯 분말 및 액상추출물 제조 공정도 2건 작성 완료

□ 재조방법설명서

업 제 명	더블네이버		
재 품 명	표고버섯분말	유 형	분말
< 재 조 방 법 >			
공정명	제조방법 설명		
입고검사	원료 입고시 외무오염/병신자를 확인하고, 원료 원료대기실로 이동한다.		
세척	원한 물에서 원통의 이물질을 세척한다.		
간조	65도에서 3시간 건조한다.		
질수	수분도 10% 이하를 확인한다.		
1차분쇄	1차 분쇄기를 이용하여 1차조분쇄를 한다.		
1차 이물제거	1차 조분쇄된 원료를 유관선별하여 이물제거 한다.		
2차 이물제거	2차 조분쇄된 원료를 1000Gauss 금속이물기를 이용하여 금속성 이물을 제거한다.		
ACM분쇄	ACM분쇄기를 이용하여 500~1000 mesh로 분쇄한다.		
UV살균	UV 램프를 이용하여 20분 동안 살균한다.		
포장	AL 파우치에 원료를 포장 후 실링한다.		

그림 38. 표고버섯분말 제조공정도

- 제품명: 표고버섯추출물 (액상차)

발급번호 : MANS-ADMN-OMWR-VEGT-FUJIR

식품·식품첨가물 품목제조보고서

보고인	성명	성년출생
	직명	1971년 03월 25일
	주소	경북안동
제출인	성명	홍정호
	직명	홍정호
	주소	경북안동
제출처	소재지	경북안동
	소재지	경북안동
제품정보	식품의 유형	액상차
	원재료	표고버섯추출물
	제조방법	표고버섯추출물 24.2g/병
	제조일자	
	유통기한	제조일로부터 12개월
	제조방법 또는 성분명 및 첨가물	표고버섯 추출물
	제조 방법	표고버섯 추출물
	제조방법 및 포장방법	표고버섯 추출물
	포장방법 및 포장단위	표고버섯 추출물
	제조방법	표고버섯 추출물

2021년 03월 24일
보고인 홍정호

진천군수 귀하

발급번호 : 198043015471

제출처 : 경북안동

그림 41. 표고버섯추출물 품목제조보고서

○ Proto-type 시제품 제작

- 표고버섯 비타민D 과립 제작

- 제품 처방

No.	Code	원료명	처방(X)
1	신규	버섯분말 (비타민D 60µg/g)	16.00
2	0190349	덱스트린(AAA Maltodextrin 1P)	74.00
3	0193311	식이섬유(셀룰로오스)	1.00
4	신규	표고버섯추출물	1.00
			100.00
비타민 D 과립 비율			
		히노시노스(비타민D 함유) 로스AM-6	7.0
		치기코판엑소	2.3
		글리세린 9-45K, 지방산에스테르	0.7
		주정	30.0
		정제수	60.0
Total			100.0

그림 42. 표고버섯 비타민 D 과립 제품 처방

- 시제품 사진
 - 맛: 구운 양파맛
 - 섭취량: 1일 1포

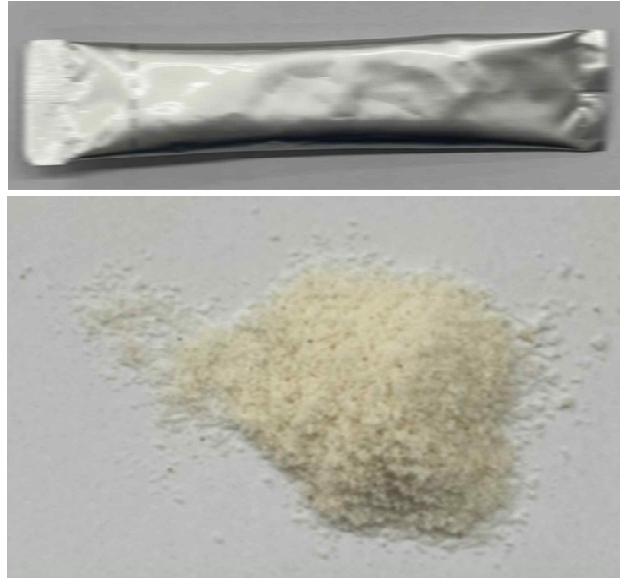


그림 43. 표고버섯 비타민 D 과립 시제품

■ 표고버섯 비타민D 정제 제작

- 제품 처방

No.	Code	원료명	단위(%)
1	신규	백성추출분말(비타민 D3/kg)	0.53
2		유당	20
3		크로스	17.42
4		아그	1
5		이산화규소	1.5
6		황산화제	0.5
7		글리세린	0.05
		Total	100.00

그림 44 표고버섯 비타민 D 정제 처방

- 시제품 사진
 - 섭취량: 1일 1포



그림 45 표고버섯 비타민 D 정제 시제품 사진

- 표고버섯 비타민D 젤리 제작
- 제품 처방

No.	Code	원료명	처방(%)
1	신규	버섯분말 (비타민D 50.00/%)	1.55
2	0190101	착상고과당(과당 55)	2.00
3	0190815	불대과당(과당)	5.00
4	0190349	맥스트랄(MA Maxstral 10)	5.00
5	0193041	우드길사	2.00
6	0190277	(착상) 버섯분말 (2017034-비타민D무수)	1.50
7	0197771	결상합성	0.50
8	0190120	구연산(Glycolic Acid Anhydrous)	0.40
9	0190110	솔로사리스제비어(프리미엄 레베넨 골드)	0.10
10	0190110	구연산삼나트륨	0.10
11	19032	경계수	58.74
Total			100.00

그림 46 표고버섯 비타민 D 젤리 처방

- 시제품 사진
 - 맛: 망고향
 - 섭취량: 1일 1포



그림 46 표고버섯 비타민 D 젤리 시제품 사진

○ 적용성 및 기호도 평가

■ 적용성 평가

- 참여기관인 경성대학교에서 분말을 이용한 제형 개발을 진행 완료함 (경성대학교 보고서 p.58 첨부)

■ 기호도 평가

- 방법 : (주)네이처텍에서 제작한 시제품 3종 이용하여 30명 랜덤 관능평가 진행

표 47 적용성, 기호도 평가 점수 표

점수	기준
1점	매우 나쁨
2점	나쁨
3점	보통
4점	좋음
5점	매우 좋음

- 결과

- 과립

과립	평균
외관(색)	3.9
맛	4.8
식감	4.3
향기	4.2
전체적인 기호도	4.6

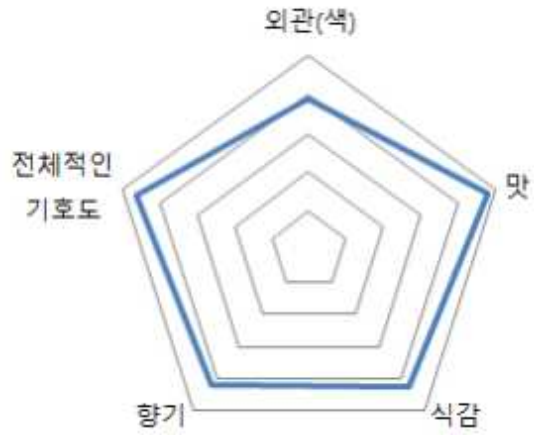


그림 47 표고버섯 비타민 D 과립 기호도, 적용성 평가 결과

- 정제

과립	평균
외관(색)	4.8
맛	3.7
식감	4
향기	4.2
전체적인 기호도	4.2

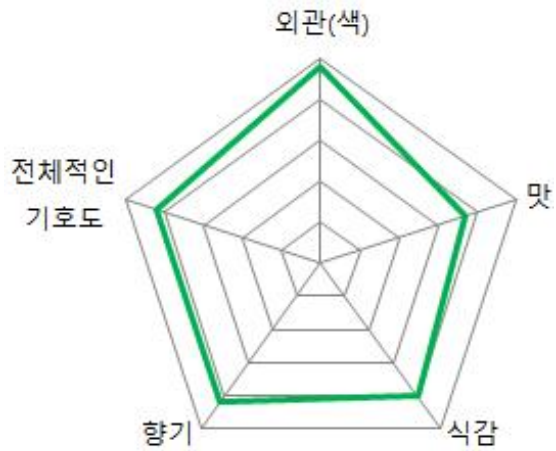


그림 48 표고버섯 비타민 D 정제 기호도, 적용성 평가 결과

- 젤리

과립	평균
외관(색)	4.3
맛	4.9
식감	4.6
향기	4.6
전체적인 기호도	4.7

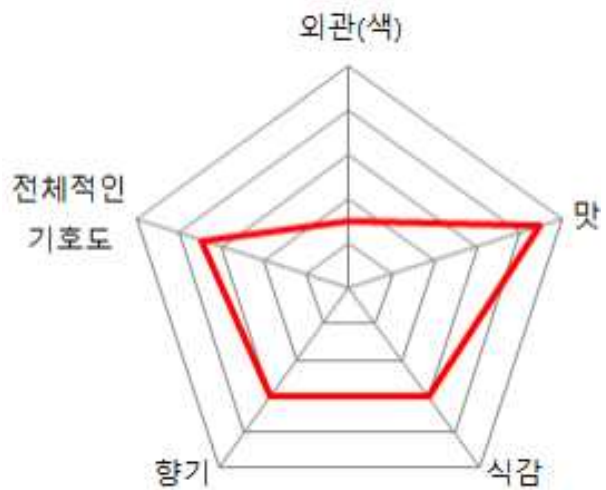


그림 49 표고버섯 비타민 D 젤리 기호도, 적용성 평가 결과

○ 시제품 홍보 1건 진행 완료

■ 바이오코리아2021 참가

- 버섯 분말을 이용해 제작한 시제품 홍보를 위해 바이오코리아2021 참가
- 일시: 2021년 6월 9일 ~ 11일
- 장소: 서울 coex



그림 50. 바이오코리아 표고버섯 분말 제품 전시

○ 제품 판매 전략 마케팅 수립

■ 상용화 능력 및 자원보유



그림 51. (주)네이처텍 상용화 능력 및 보유 자원

- 천연물을 소재로 제품화하는 (주)네이처텍의 독창적인 제제화 기술
- 고객사의 니즈에 따라 생산·납품하는 OEM 방식과 보유한 기술력과 노하우를 바탕으로 상품의 기획에서부터 출하까지 전 과정에 대한 서비스를 제공하는 ODM 방식 구축
- KFDA로부터 인증 받은 설비로 제조·생산하며 엄격한 품질 관리 실시, SOP에 따라 합리적이고 GMP적인 방법으로 최고의 제품을 생산

■ 수요처

- 자사 브랜드 Daily Wells를 이용한 T-commerce 및 신규 유통채널 확대
- 유니베라(한국/미국) 등
 - 자매 회사인 Univera의 광범위한 글로벌 네트워크 활용
 - 국내 420여개 대리점 및 미국, 캐나다 현지 판매 법인 통한 판매 네트워크 형성



그림 52. 에코넷 네트워크

■ 국내 기존 고객사를 활용한 OEM 제품 및 원료 판매 추진



그림 53. (주)네이처텍 국내 고객사

■ 국외 기존 고객사를 활용한 OEM 제품 및 원료 판매 추진



그림 54. (주)네이처텍 국외 고객사

■ 마케팅 전략

- 천연 버섯 비타민D를 이용한 건강기능식품 브랜드화
- 자사 판매 또는 OEM을 통한 소비자 맞춤형 제품 생산 및 판매
- 언론(일간지, 경제지 등) 홍보, 제품설명회 및 수요기업 대상 설명회 등 Off-Line 홍보
- SNS (인스타, 트위터, UCC 등) On-Line 홍보
- 버섯농가와와의 MOU 체결을 통한 지역특화산업 브랜드화 추진
- 지속적인 국내외 박람회 참가를 통한 원료의 우수성 및 차별성 홍보
- 신규 고객사와의 미팅을 통한 제품 홍보
- 국내·외 판매 전략 도식화
-



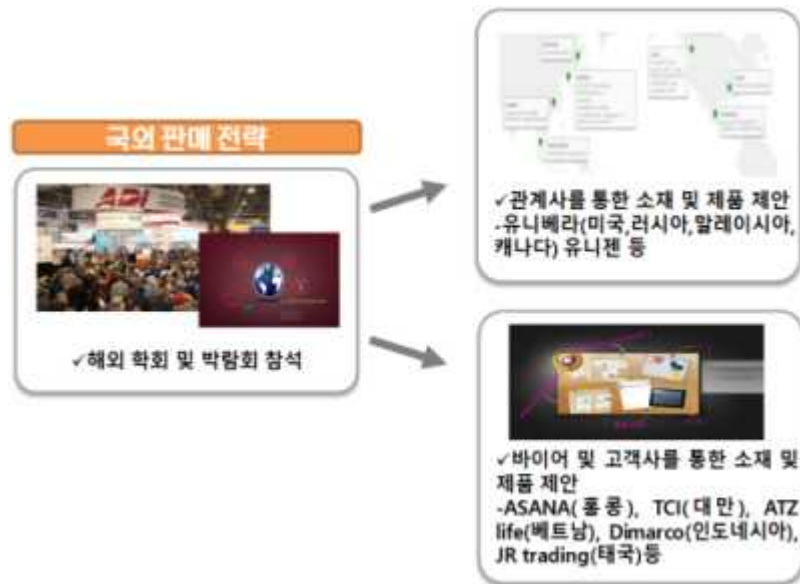


그림 55. 국내외 판매 전략

[참여기관 1 (대구대학교산학협력단)]

○ **비타민 D2 최적 전환조건 확립**

■ **비타민 D2의 균일한 조사를 위한 바닥 소재 비교**

- 실험방법

- UV-B LED 처리 시 반사에 따른 비타민D 전환율을 비교하기 위해 바닥 소재를 유리, 알루미늄, 종이, 플라스틱으로 달리하여 전환율을 비교함

- 실험결과

- 실험결과, 처리구간 바닥 소재에 따른 유의미한 차이는 없었음

표 48. 바닥 소재에 따른 ergosterol 및 비타민 D2 함량 비교

ug/g	Ergosterol	비타민 D2
Glass plate	3,082	186
Aluminium foil	1,870	199
Paper board	2,031	239
Hard plastic sheet	2,369	245

■ **LED 램프 제조사에 따른 비타민D 전환율 비교**

- 실험방법

- 제조사에 따라 UV-B 파장 및 가격에 차이가 있어 두 제조사(에릭송, 루미)의 UV-B LED를 이용하여 비타민D 전환율을 비교하였음

- 실험결과

- 루미에서 제작한 UV-B LED 램프를 이용했을 때 비타민D 전구체 및 비타민D 함량이 더 높게 나왔음. 하지만, 대량생산 연구 공정 단계에서 UV-B LED 램프는 경제성이 낮은 것으로 판단되어 이후 일반 UV-B 램프로 연구를 진행하게 되었음

비타민 D2 함량이 각각 84.43%와 87.25% 잔존함 으로서 열적 안정성이 크게 증가 되었음

표 50. 비타민 D2를 50°C에 보관했을 때 열적안정성 분석결과

Vitamin and Quercetin	0°C, 0 min (% of vit. D ₂ retention)	50°C, 30 min (% of vit. D ₂ retention)	50°C, 1 hour (% of vit. D ₂ retention)	50°C, 2 hours (% of vit. D ₂ retention)	50°C, 3 hours (% of vit. D ₂ retention)	50°C, 6 hours (% of vit. D ₂ retention)
Vit D ₂ (5 µg)	100±5	94.67±4.15	92.97±3.78	85.89±4.72	78.82±3	62.58±2.37
Vit D ₂ (5 µg) + Quercetin(5 µg)	100 ^{ns} ±7	96.13 ^{ns} ±1.52	95.49 ^{ns} ±3.05	90.27 ^{ns} ±5.12	87.38 ^{***} ±1.73	84.43 ^{***} ±6.18
Vit D ₂ (5 µg) + Quercetin (10µg)	100 ^{ns} ±5	97.33 ^{ns} ±1	95.62 ^{ns} ±2.78	91.43 [*] ±6	88.45 ^{***} ±4.58	87.25 ^{***} ±7.67

표 51. 비타민 D2를 75°C에 보관했을 때 열적안정성 분석결과

Vitamin and Quercetin	75°C, 30 min (% of vit. D ₂ retention)	75°C, 1 hour (% of vit. D ₂ retention)	75°C, 2 hours (% of vit. D ₂ retention)	75°C, 3 hours (% of vit. D ₂ retention)	75°C, 6 hours (% of vit. D ₂ retention)
Vit D ₂ (5 µg)	77.31±1.96	62.33±3.93	49.56±2.18	38.82±2.49	33.82±1.44
Vit D ₂ (5 µg) + Quercetin(5 µg)	82.05 ^{ns} ±2.32	85.46 ^{***} ±4.72	82.46 ^{***} ±1.12	83.67 ^{***} ±1.49	79.67 ^{***} ±2.52
Vit D ₂ (5 µg) + Quercetin (10µg)	88.02 [*] ±0.93	86.60 ^{***} ±7.46	85.40 ^{***} ±5.28	86.51 ^{***} ±1.84	82.514 ^{***} ±4.36

- 비타민 D2를 75°C, 2시간동안 pH를 달리하면서 보관했을 때 Quercetin이 없을 때는 2시간 후에 시험한 모든 pH 범위에서 상대적으로 불안정하였음
- 특히 pH 1.0에서 28.59% 대부분이 분해되었지만, Quercetin을 각각 5 ug/ml, 10ug/ml 농도로 첨가하여 동일한 시간동안, pH 1.0에서 보관했을 때 비타민 D2 함량이 각각 96.04%와 97.96% 잔존함으써 열적 및 pH안정성이 거의 완벽할 정도로 크게 증가되었음

표 52. 비타민 D2를 75°C 2시간, pH 달리 보관했을 때 열적안정성 분석결과

Vitamin and Quercetin	pH 1, 75°C, 2 hours (% of vit. D ₂ retention)	pH 4, 75°C, 2 hours (% of vit. D ₂ retention)	pH 5, 75°C, 2 hours (% of vit. D ₂ retention)	pH 7, 75°C, 2 hours (% of vit. D ₂ retention)	pH 10, 75°C, 2 hours (% of vit. D ₂ retention)
Vit D ₂ (5 µg)	28.59±0.48	65.77±2.96	62.44±2.88	46.46±6	45.42±5
Vit D ₂ (5 µg) + Quercetin(5 µg)	96.04 ^{***} ±5.19	93.96 ^{***} ±4.16	91.96 ^{***} ±1.73	85.73 ^{***} ±5	92.45 ^{***} ±1.52
Vit D ₂ (5 µg) + Quercetin (10µg)	97.96 ^{***} ±3.46	95.90 ^{***} ±4	96.56 ^{***} ±3.05	91.2 ^{***} ±5	97.94 ^{***} ±2.88

- Vit D2를 75°C, 2시간동안 Ethanol 첨가량을 달리하면서 보관했을 때 Quercetin이 없을 때는 2시

간 후에 45.78% 잔존하였음. 이때 Quercetin을 5 ug/ml 농도로 첨가하여 동일한 시간동안 보관했을 때 Vit D2 함량이 86.17% 잔존함으로써 열적안정성이 크게 증가되었음. 그러나 Quercetin 첨가후에 Ethanol을 추가적으로 첨가하면 미미한 수준이지만 열적안정성이 다소 떨어졌음

표 53 Vit D₂를 75°C, 2시간 보관했을 때 Quercetin 과 Ethanol에 의한 안정성 평가

Vitamin and Quercetin	75°C, 2 hour (% of vit. D ₂ retention)
Vit D ₂ (5 µg)	45.78±3.17
Vit D ₂ (5 µg) + Quercetin(5 µg)	86.17***±3.24
Vit D ₂ (5 µg) + Quercetin(5 µg) EtOH 1%	84.12***±4.72
Vit D ₂ (5 µg) + Quercetin(5 µg) EtOH 5%	83.72***±3.10
Vit D ₂ (5 µg) + Quercetin(5 µg) EtOH 10%	83.36***±2.58
Vit D ₂ (5 µg) + Quercetin(5 µg) EtOH 50%	82.03***±3.50

○ 버섯추출 Vit D₂ *in vitro* 안전성 평가

- UV-B LED 조사처리한 표고버섯(Lentinus edodes)에서 추출한 에르고칼시페롤(Vit D₂)과 순도 100%의 상업용 Vit D₂가 인체유래 조골세포, 간세포, 대장세포에 미치는 영향 평가

- 실험방법

- 안전성 평가에 사용된 인간 조골세포 MG-63, 간세포 HepG2, 대장세포주는 CCD 841 CoN는 각각 한국세포주 은행 (KCLB: 21427), ATCC (HB-8065), ATCC (CRL-1790)에서 구입하여 사용하였음. 각각의 세포주는 상온에서 녹인후 2,000 rpm에서 3분간 원심분리하여 수집하였고, 각 세포주는 구입한 회사에서 추천된 배지에서 10% FBS와 1% penicillin- streptomycin을 첨가하여 37 °C, 5% CO₂ 농도에서 배양하고, 70% 정도 배양하면 계대배양을 진행하였음
- 각 세포주에 대한 버섯추출 Vit D₂ 농도에 대한 *ex vivo* 안전성 평가는 MTT assay로 시험함
- 모든 시험은 최소한 2반복으로 진행하고 최종적으로는 540 nm에서 흡광도를 측정하여 세포생존율을 정량적으로 결정함

- 실험결과

- MG-63 조골세포에서는 5 ug/ml 농도까지는 버섯추출물과 상업적 Vit D₂간에 유의적 차이가 없었으나, 10 ug/ml 이상의 농도에서는 표고버섯 추출물 Vit D₂가 상업적 Vit D₂에 비해 유의적으로 안전성이 증가함을 확인함
- HepG2 간세포와 CCD 841 CoN 대장세포에 대한 세포 생존성 평가에서도 조골세포와 비슷한 양상을 보였으며, 10 ug/ml 이상의 농도에서 현격한 안전성 차이를 나타냄
- 따라서 표고버섯에서 UV-LED로 전환하여 추출한 Vit D₂는 상업적 Vit D₂에 비해 인체에 훨씬 안

전하며, 특히 고농도의 비타민 D₂ 급여시 안전성 차이가 큰 것으로 평가됨

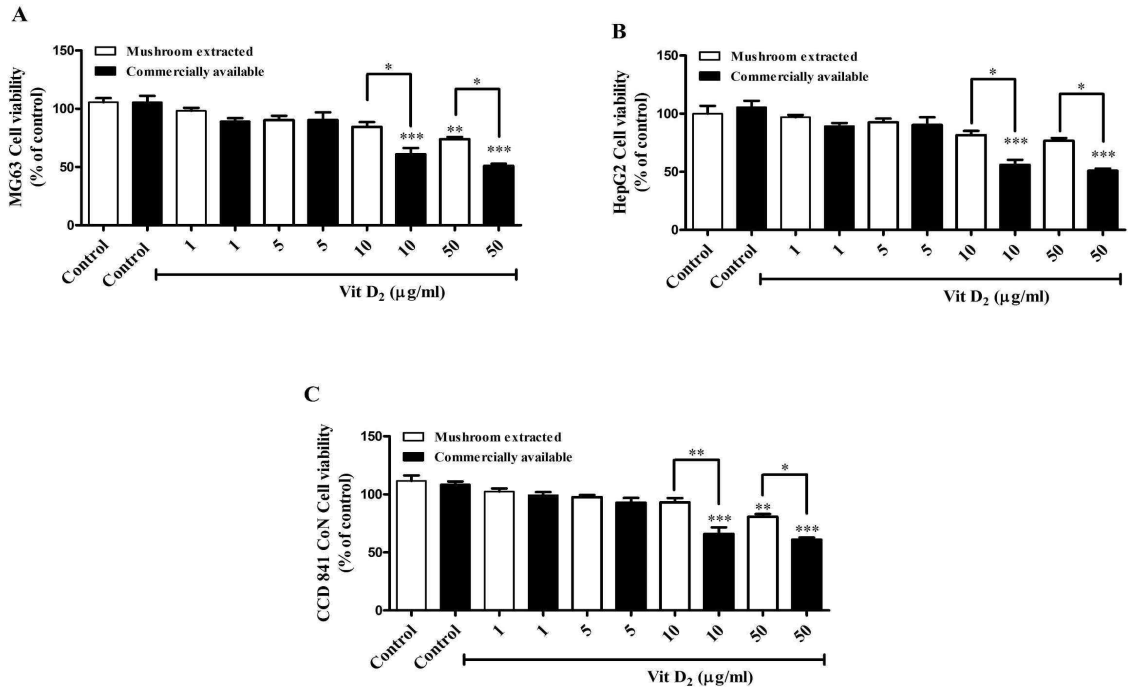


그림 57. UV-B LED 처리한 표고버섯(*L. edodes*)에서 추출된 에르고칼시페롤(Vit D₂)과 순도 100%의 상업용 Vit D₂가 인체 세포에 미치는 영향.

(A) MG-63 조골세포에 대한 세포 생존성 평가 (B) HepG2 간세포에 대한 세포 생존성 평가 (C) CCD 841 CoN 대장세포에 대한 세포 생존성 평가. 데이터는 3회의 독립 실험의 평균 \pm S.D로 나타내었으며, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. 통계적 유의성은 prism ANOVA에 의해 분석되었음

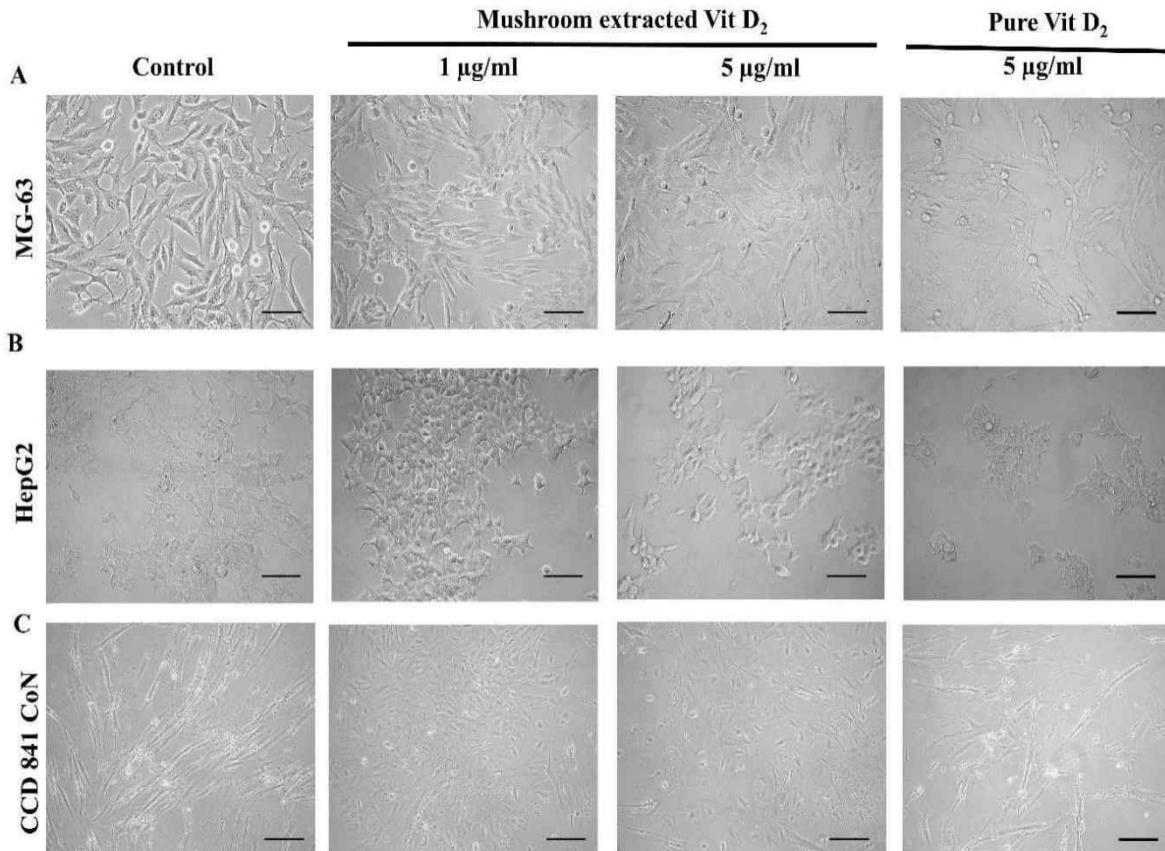


그림 58. UV-B LED 처리한 표고버섯(*L. edodes*)에서 추출된 Vit D₂와 상업용 Vit D₂의 세포독성을 비교한 현미경사진 (Scale bar 100 μm). (A) MG-63 조골세포, (B) HepG2 간세포 및 (C)는 CCD 841 CoN 대장세포

- UV-B LED 조사처리한 표고버섯에서 추출한 Vit D₂ 투여된 그룹과 상업적 Vit D₂ 투여된 그룹간의 제브라피쉬 배아 및 유충의 발육정도 통한 in vivo 안전성 평가

- 실험방법

- 안전성 Zebrafish 산란유도 및 배아수집

(a) 제브리피쉬 암수를 분리후 합방하여 12시간의 자연 짝짓기 후 얻은 제브리피쉬 배아를 신선한 비염소수에서 수집함.

(b) 얻은 배아는 깨끗하게 세척 후 E3 배지(0.2mM Ca (NO₃)₂, 0.13mM MgSO₄, 19.3mM NaCl, 0.23mM KCl, 1.67mM HEPES)에서 유지함

- 안전성평가: 안전성 평가는 zebrafish의 수정란에 대하여 배아와 유충의 발육정도를 수정 후 1일 간격으로 현미경하에서 관찰함
- 또한 배아의 부화율 및 유충의 심낭부위 크기, 난황낭 부위 크기, 20초간 심장박동수, 유충의 사망률을 측정하였음
- 이를 위해서 E3 배지 1.0ml에 상업적 비타민 D₂, 버섯추출 비타민 D₂를 최종농도가 각각 0, 5, 10 ug/ml 가 되도록 조절된 용액을 zebrafish 수정란에 처리 후 1일 간격으로 각 평가항목을 측정하여 안전성을 평가하였음.

- 실험결과

- 표고버섯 추출한 비타민 D₂ 처리시에는 2 dpf에서 안정적으로 배아 발육과 유충형성이 되었지만 상업적 비타민 D₂를 투여한 그룹에서는 아직 배아상태에 머물러서 성장이 지연되고 있음
- 또한 3-5 dpf 에서 상업적 비타민 D₂ 처리 그룹에서는 심낭의 형태 이상도 관찰됨
- 따라서, 표고버섯 비타민 D₂는 상업적 비타민 D₂에 비해 생체안전성이 월등히 증가하는 것으로 평가됨

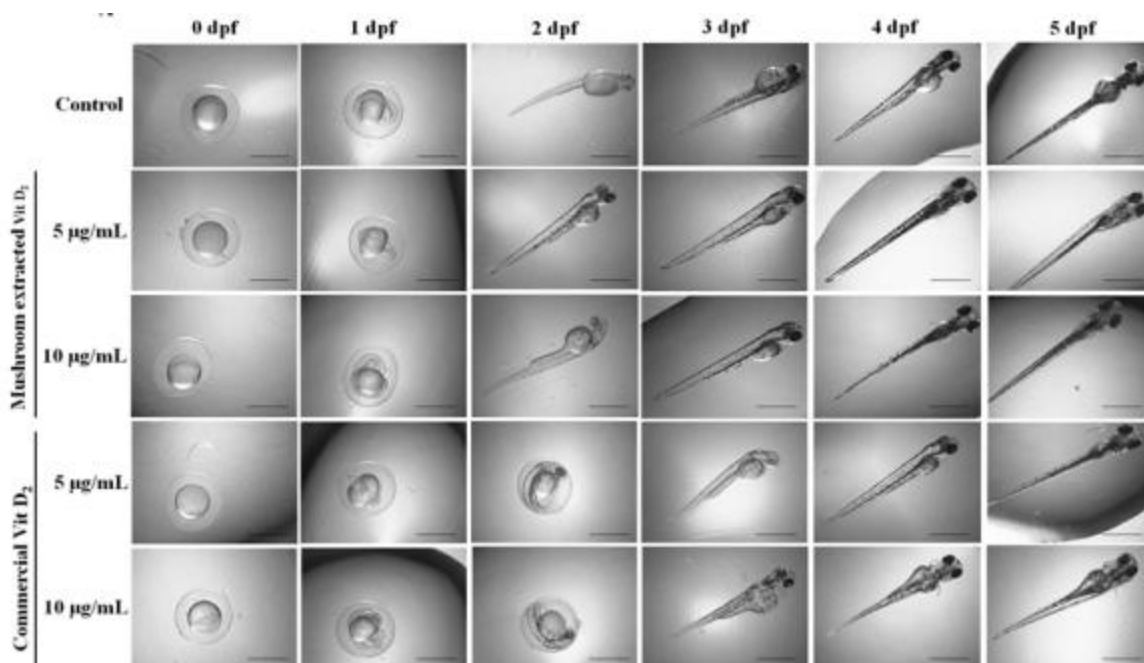


그림 59. UV-B LED 처리한 표고버섯(*L. edodes*)에서 추출된 Vit D₂와 상업용 Vit D₂ 투여된 제브라피쉬 배아 및 유충의 발육정도를 보여주는 현미경 관찰 결과. (스케일 바: 200 μm at 4× magnification)

- UV-B LED 조사처리한 표고버섯에서 추출한 Vit D₂ 투여된 그룹과 상업적 Vit D₂ 투여된 그룹간의 제브라피쉬 배아 및 유충의 발육단계에서의 부화율, 심낭부위 크기, 난황낭 부위 크기, 20초간 심장박동수, 유충의 사망률 비교를 통한 *in vivo* 안전성 평가

- 실험방법

- 안전성 Zebrafish 산란유도 및 배아수집

(a) 제브리피쉬 암수를 분리후 합방하여 12시간의 자연 짝짓기 후 얻은 제브리피쉬 배아를 신선한 비염소수에서 수집함.

(b) 얻은 배아는 깨끗하게 세척 후 E3 배지(0.2mM Ca (NO₃)₂, 0.13mM MgSO₄, 19.3mM NaCl, 0.23mM KCl, 1.67mM HEPES)에서 유지함.

- 안전성평가: 안전성 평가는 zebrafish의 수정란에 대하여 배아와 유충의 발육정도를 수정후 1일 간격으로 현미경하에서 관찰함. 또한 배아의 부화율 및 유충의 심낭부위 크기, 난황낭 부위 크기, 20초간 심장박동수, 유충의 사망률을 측정하였음. 이를 위해서 E3 배지 1.0ml에 상업적 비타민 D₂, 버섯추출 비타민 D₂를 최종농도가 각각 0, 5, 10 ug/ml 가 되도록 조절한 용액을 zebrafish 수정란에 처리 후 1일 간격으로 각 평가항목을 측정하여 안전성을 평가하였음

- 실험결과

- 모든 평가항목에서 표고버섯 추출 Vit D₂ 투여된 그룹은 무처리와 비슷한 정도의 안전성을 나타내었으나, 상업적 Vit D₂ 투여된 그룹에서는 모든 항목에서 독성이 확인됨. 특히 유충의 사망률은 버섯추출 Vit D₂ 투여된 그룹은 무처리 대조구와 비슷한 수준을 나타낸 반면, 상업적 Vit D₂ 투여된 그룹에서는 5 ug/ml 농도에서는 10%, 10 ug/ml 농도에서는 40%의 상당히 높은 수준의 독성이 있음을 확인

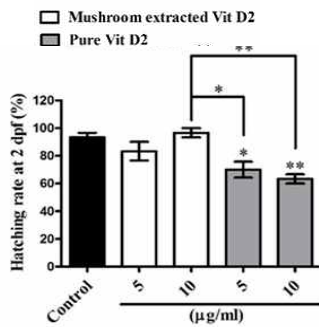


그림 60 제브라피쉬 배아 부화율

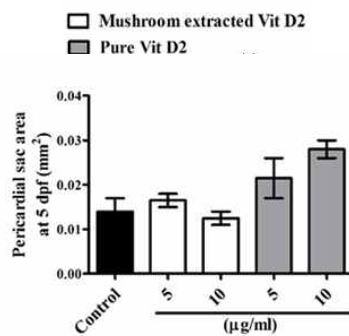


그림 61. 제브라피쉬 심낭부위 크기

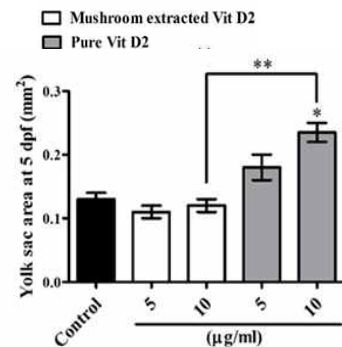


그림 62. 제브라피쉬 난황낭 부위 크기

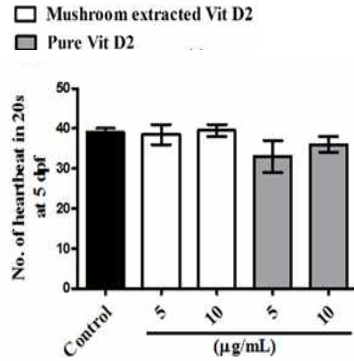


그림 63. 제브라피쉬 20초당 심장박동수

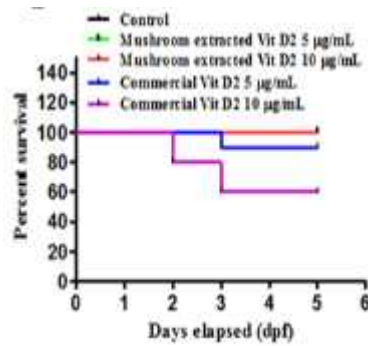


그림 64. 제브라피쉬 유충 사망률

■ LPS(lypopolysaccharide) 염증유발 물질처리 시 버섯추출 Vit D₂에 의한 제브라피쉬 발달장애 및 기형 개선 효과 확인

- 실험방법

- 안전성 Zebrafish 산란유도 및 배아수집

(a) 제브라피쉬 암수를 분리후 합방하여 12시간의 자연 짝짓기 후 얻은 제브라피쉬 배아를 신선한 비염소수에서 수집함

(b) 얻은 배아는 깨끗하게 세척 후 E3 배지(0.2mM Ca (NO₃)₂, 0.13mM MgSO₄, 19.3mM NaCl, 0.23mM KCl, 1.67mM HEPES)에서 유지함

- 항염증 효과평가: 버섯추출 비타민 D₂의 제브라피쉬에 대한 in vivo 항염증 효과를 평가하기 위하여 5개의 실험구로 구분함
- 즉, (그룹 1) 무처리구, (그룹 2) 버섯 추출 비타민 D₂ (10ug/ml) 처리구, (그룹 3) LPS 처리구, (그룹 4) LPS + 버섯 추출 비타민 D₂ (5ug/ml) 처리구, (그룹 5) LPS + 버섯 추출 비타민 D₂ (10ug/ml) 처리구로 구분함
- 시험을 위해서 버섯 추출물 처리구는 24시간 동안 버섯추출물을 전처리하였으며, 그 이후에 LPS (100 ug/ml) 농도에 5일 동안 노출시킴
- 각 그룹별 수정란의 개수는 20개로 하였으며, 평가항목은 zebrafish의 수정란에 대하여 배아와 유충의 발육정도를 수정후 1일간격으로 현미경하에서 관찰함
- 또한 수정란의 부화율 및 유충의 총길이, 심낭부위 크기, 난황낭 부위 크기, 20초간 심장박동수, 유충의 사망률을 측정함

- 실험결과

- 버섯추출 Vit D₂ 처리에 의해 농도의존적으로 제브라피쉬의 형태학적 변형 감소, 부화율 증가, 심낭 부위 크기 감소, 난황낭 부위 크기 감소, 유충의 총 길이 증가, 심박수 증가, 유충 사망률 감소 등 평가한 모든 항목에서 독성이 경감되는 것을 확인하였음

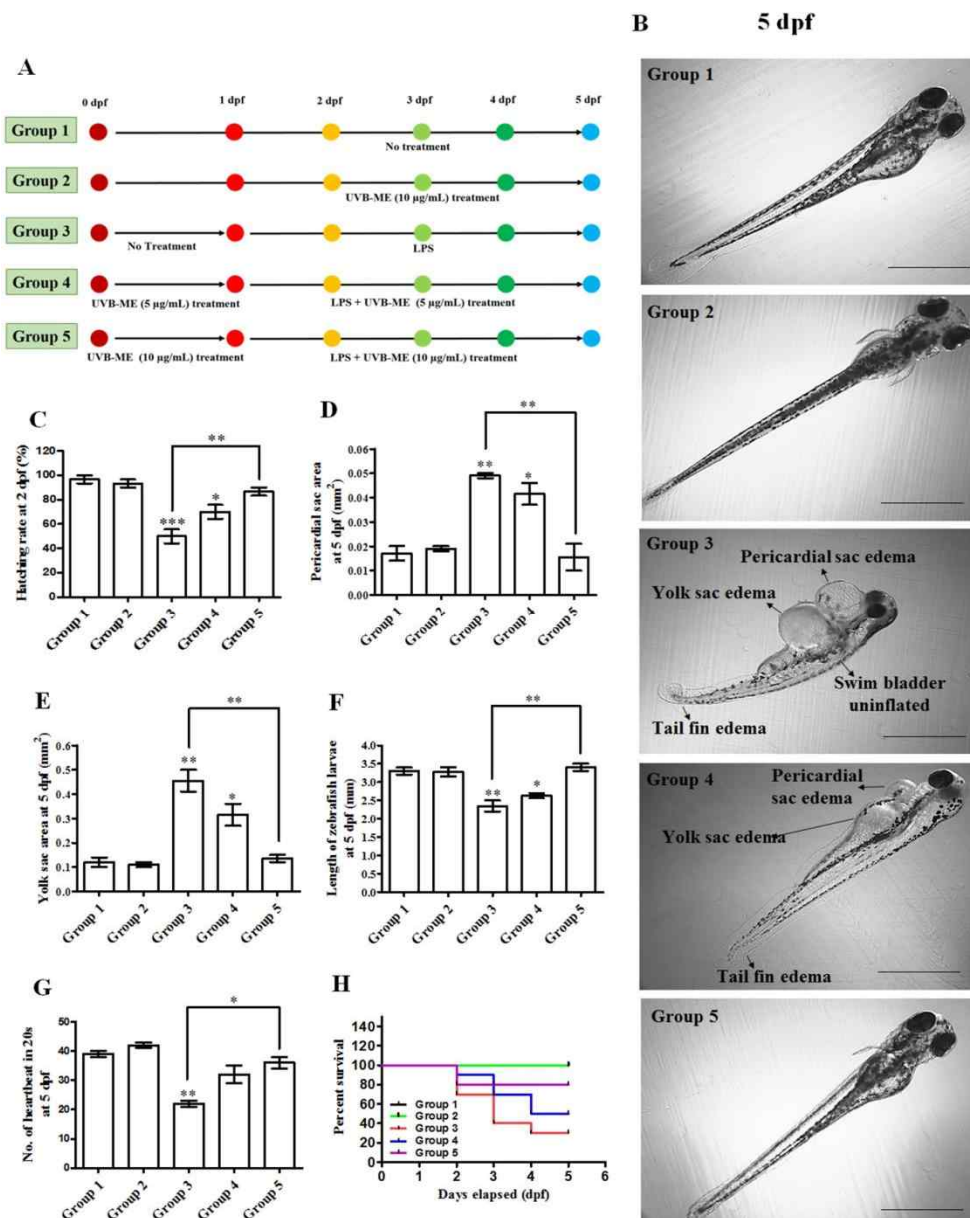


그림 65. 버섯추출 Vit D₂ 처리에 따른 LPS 염증유발 물질에 의한 제브라피쉬 배아 발달장애 및 기형 개선 효과. A; 제브라피쉬 배아 그룹에 따른 실험설계 Pectoral diagram, B; 각 그룹 5 dpf 제브라피쉬의 형태학적 변형. 스케일 바: 200 µm at 4× magnification, C; 각 그룹의 제브라피쉬 배아 부화율, D; 심낭 부위 크기, E; 난황낭 부위 크기, F; 제브라피쉬 유충의 총 길이, G; 5dpf 제브라피쉬의 심박수, H; 제브라피쉬 유충의 사망률. 데이터는 평균 ± S.D로 나타내었음; *p < 0.05, **p < 0.01, *** p < 0.001.

■ 버섯추출 Vit D₂에 따른 LPS 유래 염증 반응 및 부작용 저감효과에 대한 바이오마커 분석

- 실험방법

- iNOS, Cox-2, IL-1β 및 TNF-α 등 염증에 대한 바이오마커에 대한 정량적 분석을 위하여 각각에 대한 ELISA Kit를 iNOS (#13120, Cell Signaling Technology), COX-2 (#4842, Cell Signaling Technology), IL-1β (#12242, Cell Signaling Technology) and TNF-α (#6945, Cell Signaling Technology)에서 구입하여 사용하였음. 분석방법은 효소반응후 450 nm에서 microtiter plate reader 기기 (Bio-Tek Instrument Co., WA, USA)를 이용하여 측정하였으며, 실험은 3회를 반복하여 평균값을 구함으로써 통계적으로 계산하였음.

- 실험결과

- iNOS, Cox-2, IL-1β 및 TNF-α 등 염증에 대한 바이오마커 정량적 분석 결과, 버섯추출 Vit D₂

처리는 LPS 유래 염증 반응을 현저히 감소시키는 것을 확인함

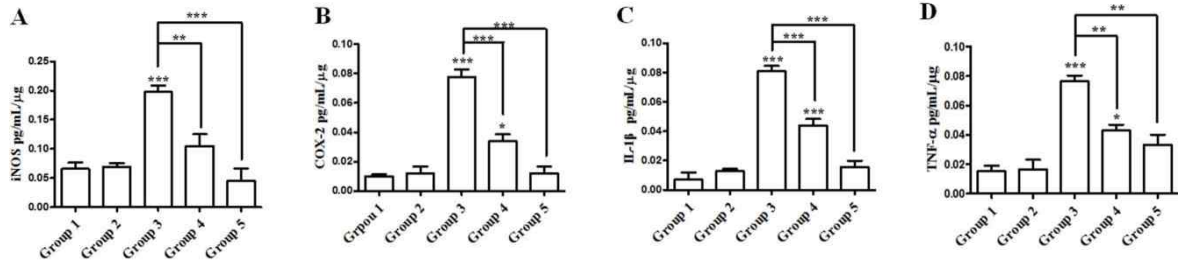


그림 66. 버섯추출 Vit D₂ 처리에 따른 LPS 염증유발 물질에 의한 제브라피쉬 염증 반응 및 부작용 저감효과. A; iNOS. B; Cox-2. C; IL-1β, D; TNF-α

- 개발 소재 이화학적 특성 및 안전성 분석
- 개발 소재의 중금속 함량 분석

- 실험방법

- 공인기관 (재)경북바이오 산업연구원을 통해 표고버섯 분말에 포함된 납, 카드뮴, 수은, 비소 등 중금속 함량 분석 진행

- 실험결과

- 분석 결과 납, 수은, 비소는 분석값이 식약처 기준치 이하였으며, 카드뮴은 버섯 농산물 기준 0.3 mg/kg 이내의 기준치이지만 분석결과는 0.45 mg/kg를 나타내어 기준치보다 높은 함량을 나타냄
- 그러나 이 기준치는 버섯 농산물 원물에 대한 기준임으로 본 연구에서 제공한 원물은 수분함량 1% 이내의 표고버섯 건조물을 제공했으므로 실제 표고버섯 원물기준으로는 0.045 mg/kg으로 환산되어 기준치보다 훨씬 낮은 함량을 갖고 있어서 사용상에 문제가 없는 것으로 판단됨

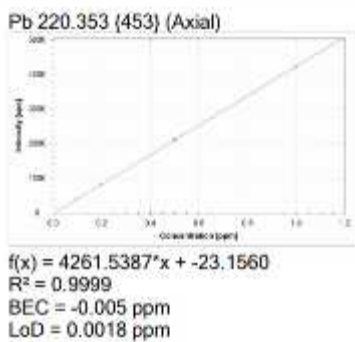


그림 67. 버섯분말 내 납(Pb) 함량

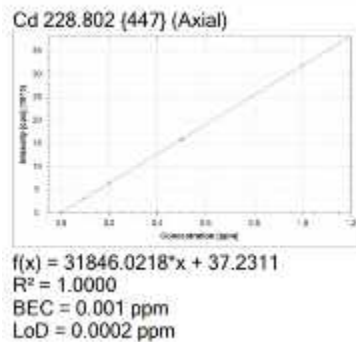


그림 68. 버섯분말 내 카드뮴(Cd) 함량

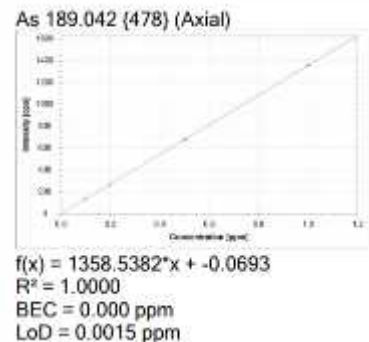


그림 69. 버섯분말 내 비소(As) 함량

발급번호 : 품질2021-000438-1

시험 성적서

검체명	MUSHROOM	접수번호	품질2021-000438
제품유형		검사목적	내부참고용
제조일자		유통기한	
업체명	강선철	대표자명	강선철
소재지	경상북도 경산시 진량읍 대구대로 201 대구대학교 공과대학 생명공학과		
접수일자	2021년04월22일	검사완료일	2021년05월03일
참고사항	1. 본 성적서는 시험항목에 한하여, 검사목적 이외의 법적소송, 상생선전 및 상업적 용도 등 기타 목적으로 사용할 수 없습니다. 2. 검사한 결과는 제시된 시료에 대한 것이며, 생산되는 모든 제품의 품질을 대표하는 것은 아닙니다.		

시험, 검사 항목 및 결과

시험, 검사 항목	시험, 검사 기준	시험, 검사 결과	비 고
1) 납	-	0.19 mg/kg	
2) 카드뮴	-	0.45 mg/kg	
3) 수은	-	0.007 mg/kg	
4) 비소	-	0.04 mg/kg	

2021년 05월 03일

재단법인 경북바이오산업연구원장

www.gib.re.kr

우) 36918 경상북도 안동시 풍산읍 산업단지2길 5

Tel. 054-850-6914 Fax. 054-850-6999





그림 70. UV-B 처리 표고버섯의 중금속 함량분석에 대한 시험성적서

■ 개발 소재의 식중독 미생물 오염여부 확인

- 실험방법

- 공인기관 (재)경북바이오 산업연구원을 통해 표고버섯 분말의 대장균 (Escherichia coli), 장출혈성 대장균(enterohemorrhagic Escherichia coli), 살모넬라 (Salmonella sp.), 황색포도상구균 (Staphylococcus aureus), 바실루스 세레우스 (Bacillus cereus), 클로스트리디움 퍼프린젠스 (Clostridium perfringens), 리스테리아 모노사이토제네스 (Listeria monocytogenesis) 등 식

품오염시 사용이 불가능한 미생물 존재 유무를 분석하였음

- 실험결과

- 분석 결과, 모든 미생물에 대하여 음성으로 판정되어 식품으로 사용하는데 문제가 없음을 확인함

시 험 성 적 서			
발급번호 : 품질2021-000439-1			
검 체 명	MUSHROOM	접수번호	품질2021-000439
제품유형		검사목적	내부참고용
제조일자		유통기한	
업 체 명	강선철	대표자명	강선철
소 재 지	경상북도 경산시 진항읍 대구대로 201 대구대학교 공과대학 생명공학과		
접수일자	2021년04월22일	검사완료일	2021년04월30일
참고사항	1. 본 성적서는 시험항목에 한하여, 검사목적 이외의 법적소송, 상품선전 및 상업적 용도 등 기타 목적으로 사용할 수 없습니다. 2. 검사한 결과는 제시된 시료에 대한 것이며, 생산되는 모든 제품의 품질을 대표하는 것은 아닙니다.		
시험, 검사 항목 및 결과			
시험, 검사 항목	시험, 검사 기준	시험, 검사 결과	비 고
1) 대장균(정량)	-	0 CFU/g	
2) 장출혈성대장균	-	음성	
3) 살모넬라	-	음성	
4) 황색모도상구균(정성)	-	음성	
5) 배실루스 세레우스(정성)	-	음성	
6) 클로스트리디움 퍼프란젠스(정성 검사)	-	음성	
7) 리스테리아모노사이토제네스	-	음성	
2021년 04월 30일 재단법인 경북바이오산업연구원장			
www.gib.re.kr 우) 36618 경상북도 안동시 풍산읍 산업단지2길 5 Tel. 054-850-6914 Fax. 054-850-6999			

그림 71. UV-B 처리 표고버섯의 미생물 시험에 대한 시험성적서

○ 개발 소재 유효성 탐색

■ 버섯추출 Vit D2 의 ex vivo 효능 평가

- 실험방법

- 버섯추출 Vit D2의 세포내 칼슘 활성화 및 흡수율 연구를 위하여 인간 조골세포 MG-63 세포주를 DMEM 배지 (Dulbeco' s Modified Egale Media)에서 유지함
- 본 연구에서는 세포주를 12 well plates에 2 x 10⁴ cells/mL 농도로 seeding 하고, 세포주를 부착시킨 후, Ca⁺⁺ 결핍 DMEM 배지 (#21068028, Gibco)에서 24시간 추가적으로 배양함
- 여기에 A23 1 μM Ca⁺⁺ ionophore (A23187, Sigma-Aldrich)를 첨가하여 48시간 배양한 후 1, 5 ug/ml 농도의 버섯 추출 비타민 D2를 7일간 처리함
- 이와 같이 처리된 세포주에서 Ca⁺⁺ 흡수를 측정하기 위하여 세포주를 HBSS buffer 속에 Fura-2 AM (5μM)을 녹인후 처리하여 60 분간, 37 °C에서 반응시킴
- 반응이 끝난 세포주는 HBSS buffer로 37 °C에서 3회 세척하여 형광염색약을 제거함. 형광염색 정도는 형광현미경 (OLYMPUS, Japan)을 이용하여 분석하고, 각 시료의 이미지는 4배 배율로 측정하여 ImageJ software(version 1.50i)로 정량 분석함

- 실험결과

- 비타민 D2를 5 μg/ml 농도로 처리 시 순도 100%의 상업용 Vit D2가 버섯 추출 비타민 D2 보다 5배 이상 조골세포가 더 많이 사멸하였기 때문에 버섯추출 비타민 D2가 100% 순도의 상업적 비타민 D2 보다 뼈형성에 더 유리한 것으로 판단됨

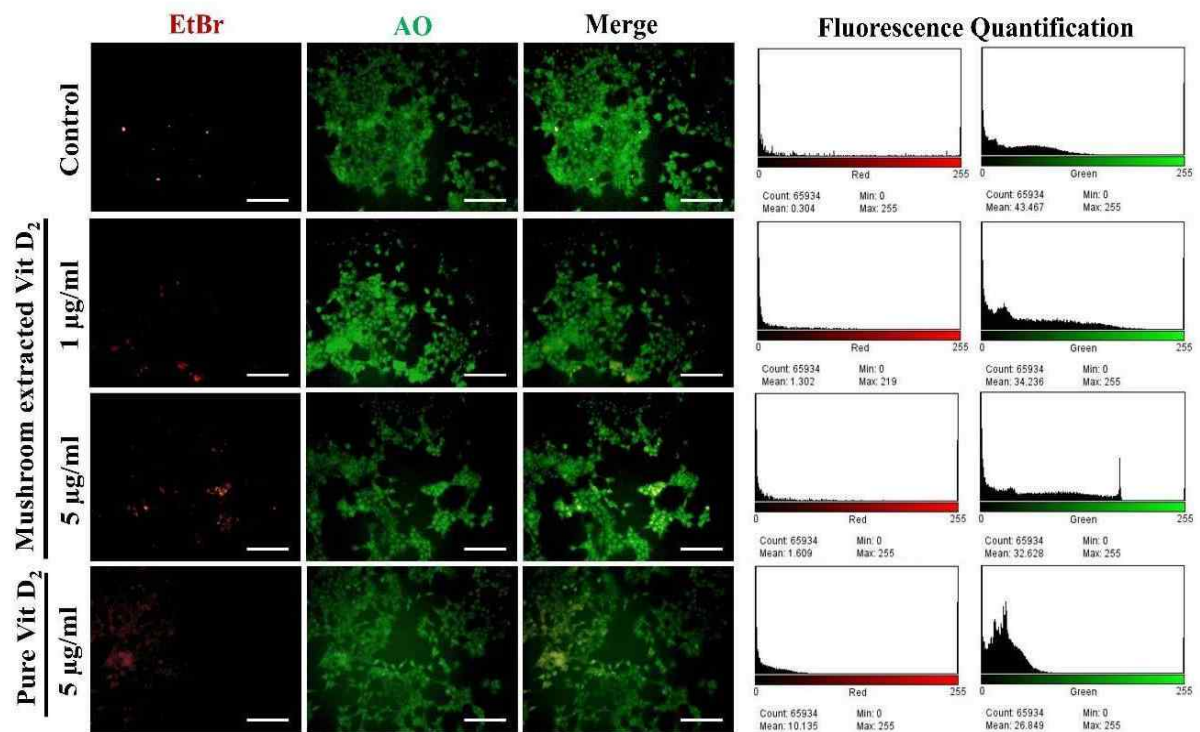


그림 72. 버섯추출 Vit D₂와 상업용 Vit D₂ 처리된 MG-63 조골세포를 AO/EtBr 염색하여 현미경 관찰 결과. (Scale bar; 100 μm)

- 버섯추출 Vit D2 처리 후 조골세포 MG-63의 Fura-2AM 염색이미지 분석을 통하여 칼슘흡수와 뼈형성

회화를 정량적으로 평가한 결과, 5 ug/ml 농도의 동량처리로 비교했을 때 버섯추출 Vit D2가 상업용 Vit D2 처리된 경우보다 칼슘흡수가 더 높았음

- 또한, 골생성 단백질 마커에 대한 Western blot 분석에서도 BMP-4와 ALP의 함량이 버섯추출물에서 더 높게 나타남

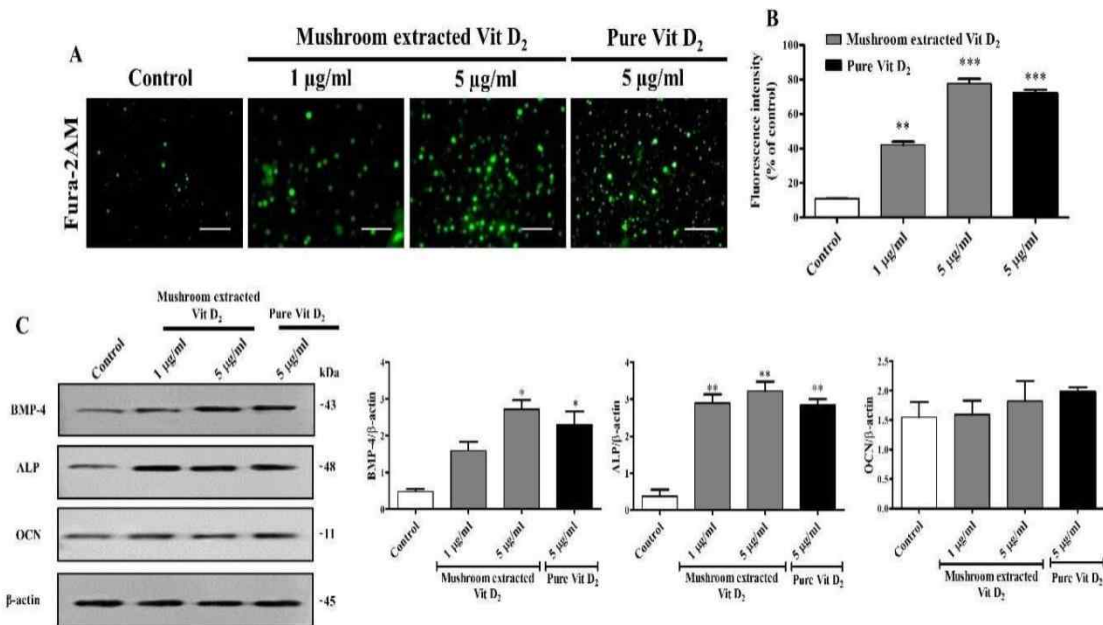


그림 73. 버섯추출물과 상업적 Vit D₂ 처리시 조골세포 MG-63의 칼슘흡수와 뼈석회화 정량 분석 결과. (A) 버섯추출 Vit D₂와 상업용 Vit D₂처리된 MG-63조골세포의 Fura-2AM 염색이미지 (B) 조골세포 MG-63의 칼슘흡수를 보여주는 형광강도 (C) 골생성 단백질 마커에 대한 웨스턴 블롯분석. 데이터는 3회의 독립 실험의 평균 ± S.D로 나타내었으며, *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001. 통계적 유의성은 prism ANOVA에 의해 분석되었음

■ 버섯추출 Vit D₂ 의 in vivo 효능 평가

- 실험방법

- 표고버섯 추출 비타민 D₂의 동물 효능 평가를 위하여 시험구는 (그룹 1) 대조구 (일반사료), (그룹 2) 비타민 D 결핍사료, (그룹 3) 비타민 D 결핍사료 + 상업적 Vit D₃, (그룹 4) 비타민 D 결핍사료 + 상업적 Vit D₂, (그룹 5) 비타민 D 결핍사료 + 표고버섯 추출 Vit D₂, 5개의 그룹으로 구분하여 4주령 남성 Wistar Rat를 대상으로 동물실험을 진행하였으며, 각 그룹당 개체수는 5마리로 하였음. 본 연구에 사용한 실험동물용 배지조성은 표 54에 나타내었음
- 시험동물은 1주일간의 안정화기간을 거친후 각각 14일, 28일 동안 2회 진행하였으며, 매일 각각의 쥐에 대하여 25 µg/1 kg food/100 g of body weight의 양으로 비타민 D를 경구투여 하였음
- 14일과 28일에 각 그룹당 5마리의 동물을 희생하여 간조직과 혈액을 채취하여 주요 항목을 평가함
- 주요 시험 평가 항목: 체중변화, 혈액 serum내 ALT, AST, ALP, 칼슘, 칼륨, 나트륨 및 인의 함량, 1,25(OH)₂ 활성형 Vit D 함량, PTH 함량, 간 및 간 조직사진, 간조직내 NO 함량, 간조직내 GST 활성, 소장길이, 소장의 조직사진, 소장내 염증지수 정량분석 (IL-6, TNF-α) 함
- 혈장내 활성형 비타민 D인, 1,25(OH)₂ Vitamin D를 정량하기 위하여 Enzyme Immunoassay Kit (KRR1971, Biocompare)를 이용하여 정량함

- 혈장내 염증성 cytokines 인 IL-6와 TNF- α 를 정량하기 위하여 IL-6 (#R6000B, R&D systems)와 TNF- α (#RTA00, R&D systems)의 ELISA Kit를 구입하여 사용함
- 간과 소장 조직에 대한 조직분석을 위하여 H & E staining을 실시하였다. 동물에서 간과 소장조직을 적출한 후 4% paraformaldehyde 용액에 2일 동안 담귀 고정함
- 2일 후에 조직을 꺼내어 다른 농도의 에탄올와 자이렌 용액에서 세척한 후 파라핀에 고정한 뒤 고정된 조직을 HistoCore rotary microtome으로 6 μ m 두께로 절단함
- 절단된 시료는 타이렌에 담구어 파라핀을 제거하였음. 이 시료를 다른 농도의 에탄올에 세척하여 조직을 탈수시킴. 이 시료를 hematoxylin에 15분간 담귀 염색하였음
- 과도한 염색약을 제거하기 위하여 1% HCl-EtOH 용액에 30분간 담구어 둔다음 곧바로 암모니아 수에 30초 처리함. 최종적으로 eosin 용액에 염색하여 자일렌과 에탄올로 고정함. 염색하여 고정된 시료를 200 \times 배율로 현미경하에서 관찰함

표 54. 본 연구에 사용된 쥐사료의 조성

Composition	Normal Diet	Vit D Deficient Diet
Carbohydrate	150.00 g	397.49 g
Fat	50.00 g	-
Fiber	50.00 g	50.00 g
Protein	3.00 g	3.00 g
Vitamin		
Vitamin E Acetate	10.00 g	15.00 g
Niacin	3.00 g	3.00 g
Choline Bitartrate	2.00 g	2.50 g
Vitamin B ₁₂	1.00 g	2.50 g
Biotin	2.00 g	2.00 g
Pantothenic Acid	1.60 g	1.60 g
Vitamin A Acetate	0.80 g	0.80 g
Pyridoxine HCl	0.70 g	0.70 g
Thiamine HCl	0.60 g	0.60 g
Vitamin D ₃	1.00 g	-
Mineral		
Calcium Carbonate	-	357.00 g
Potassium Phosphate, Monobasic	-	196.00 g
Sodium Chloride	74.00 g	74.00 g
Potassium Citrate, Monohydrate	220.00 g	70.78 g
Potassium Sulfate	52.00 g	46.60 g
Magnesium Oxide	24.00 g	24.00 g
Ferric Citrate	6.00 g	6.06 g
Zinc Carbonate	1.60 g	1.65 g
Sodium Metasilicate	-	1.45 g

Manganese Carbonate Hydrate	3.50 g	0.63 g
-----------------------------	--------	--------

- 실험결과

- 혈장 내 활성형 Vit D 함량은 Vit D 결핍사료를 급이한 그룹에 비해서 상업적 및 버섯추출 Vit D를 급이한 모든 그룹에서 상대적으로 높게 나타났음
- 동물사육 30일에는 비타민 D 급이 그룹간에는 유의적인 차이가 거의 없었음 따라서 버섯추출 비타민 D2 급이가 다른 상업적 비타민 D3 및 D2에 비교했을 때 칼슘흡수에 대한 동물 효능에서 별다른 차이가 없음을 알 수 있음

표 55 그룹별 처리 급이 사료

그룹 1	대조구(일반사료)
그룹 2	비타민 D 결핍사료
그룹 3	비타민 D 결핍사료+ 상업적 Vit D ₃ ,
그룹 4	비타민 D 결핍사료+ 상업적 Vit D ₂
그룹 5	비타민 D 결핍사료+표고버섯 추출 Vit D ₂

표 56. 14일간 Vit D 투여후 Rat 혈장내 1,25(OH)₂ 활성형 Vitamin D 함량 분석 결과

No. \ Group	Group 1	Group 2	Group 3	Group 4	Group 5
1	101.0	50.2	83.5	88.2	67.1
2	98.8	53.6	113.6	72.6	69.2
3	40.4	53.9	87.2	92.2	40.3
4	63.9	80.8	94.3	94.0	82.7
5	104.9	58.9	60.8	59.7	80.5

표 57. 28일간 Vit D 투여후 Rat 혈장내 1,25(OH)₂ 활성형 Vitamin D 함량 분석 결과

No. \ Group	Group 1	Group 2	Group 3	Group 4	Group 5
1	99.8	66.8	100.1	99.8	107.2
2	108.3	63.6	114.4	116.8	88.3
3	112.9	75.9	97.2	105.5	89.9
4	101.6	69.2	119.6	88.6	99.6
5	128.8	68.5	138.8	137.3	156.1

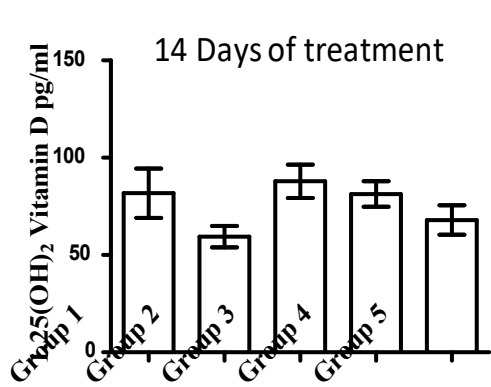


그림 74. 14일간 Vit D 투여후 Rat 혈액 serum 내 1,25(OH)₂ 활성형 Vitamin D 함량 분석 결과

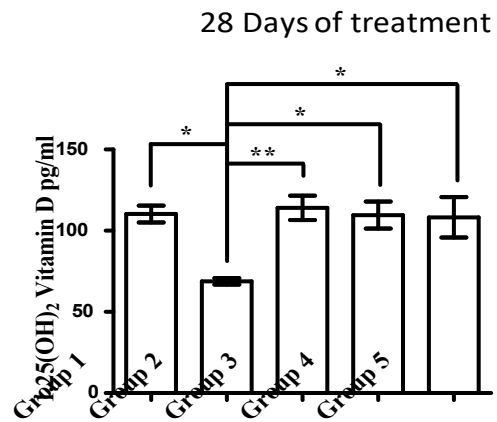


그림 75. 28일간 Vit D 투여후 Rat 혈액 serum 내 1,25(OH)₂ 활성형 Vitamin D 함량 분석 결과

- 그룹 간 체중 비교 결과 일반사료를 급이한 그룹의 체중이 가장 낮게 나타났으며, 비타민 D 결핍 배지 및 비타민 D 결핍배지에 비타민 D를 급이한 그룹에는 큰 차이가 없었음
- 그러나 미세하지만 버섯 추출 비타민 D2 > 상업적 비타민 D2 > 상업적 비타민 D3 > 비타민 D 결핍 그룹의 순으로 체중변화가 나타남
- 따라서 버섯추출 비타민 D2 급이가 다른 상업적 비타민 D3 및 D2에 비해 동물 성장촉진에 효과가 있음을 확인함

표 58. 14일간 Vit D 투여 그룹의 Rat 체중 변화

Group Day	Body Weight of Group 1 (g)					Body Weight of Group 2 (g)					Body Weight of Group 3 (g)					Body Weight of Group 4 (g)					Body Weight of Group 5 (g)						
	1	98	90	92	110	102	88	114	106	114	102	96	104	104	98	108	98	106	104	112	106	104	112	114	114	110	98
2	98	96	104	98	102	98	98	110	118	106	102	108	108	100	110	104	108	110	114	108	112	114	114	116	106	106	
3	102	102	106	106	106	104	112	122	126	108	112	112	120	108	120	114	114	114	114	118	108	112	122	126	110	110	
4	94	104	104	106	108	106	118	124	125	118	120	118	126	114	120	122	120	118	120	126	124	122	128	120	120	120	
5	104	110	112	118	112	120	124	138	142	130	130	130	124	136	132	130	128	126	134	126	134	128	136	130	130	130	
6	108	112	112	124	118	124	134	138	144	142	136	138	142	140	138	134	134	130	132	142	138	140	132	138	128	128	
7	112	114	124	124	120	142	146	150	142	140	140	138	144	136	144	144	140	138	144	146	144	146	144	146	142	142	
8	114	116	126	118	122	138	146	150	150	146	144	148	142	144	152	142	142	144	146	150	134	144	158	152	140	140	
9	122	120	134	136	126	140	162	156	150	162	156	152	148	152	152	152	144	138	144	152	136	146	161	160	145	145	
10	134	122	134	132	132	142	146	154	152	164	158	152	148	144	154	152	146	140	142	152	134	150	160	154	144	144	
11	132	126	136	140	132	148	152	156	154	166	164	154	150	156	156	148	148	152	144	158	138	156	164	162	152	152	
12	144	130	144	144	146	148	158	164	156	174	172	162	154	164	162	152	158	144	160	166	160	164	150	166	160	160	
13	148	132	148	146	140	148	160	164	160	180	156	164	158	152	162	156	162	160	168	166	142	164	176	166	162	162	
14	156	140	148	154	158	146	170	168	164	178	158	164	162	174	170	164	164	166	172	166	166	170	174	168	160	160	

표 59. 28일간 Vit D 투여 그룹의 Rat 체중 변화

Group Day	Body Weight of Group 1 (g)					Body Weight of Group 2 (g)					Body Weight of Group 3 (g)					Body Weight of Group 4 (g)					Body Weight of Group 5 (g)				
	1	96	94	96	96	98	86	110	110	98	91	102	100	98	102	96	102	94	96	98	99	96	102	96	100
2	102	94	102	112	100	100	116	116	114	100	100	101	110	98	106	102	104	108	106	98	104	112	112	102	102
3	96	100	100	112	112	112	120	122	120	110	116	112	114	118	114	106	110	110	112	112	116	116	114	116	108
4	104	96	102	112	104	114	124	126	120	120	122	120	124	122	120	114	118	114	116	118	112	120	120	124	112
5	108	104	110	112	112	124	142	140	136	134	132	128	132	130	130	125	132	124	130	132	132	128	138	140	134
6	114	114	118	112	120	136	140	146	137	136	142	128	136	137	137	136	136	130	136	138	128	134	147	142	138
7	122	122	122	128	124	134	146	146	144	152	148	146	148	146	148	144	144	140	140	148	134	144	138	150	140
8	124	128	122	122	126	142	152	148	144	160	152	140	148	148	148	148	136	140	150	146	150	140	150	148	148
9	132	138	130	134	128	146	144	154	152	146	146	142	150	144	154	146	152	150	152	154	136	146	142	145	150
10	124	138	130	138	130	144	160	156	150	146	144	140	150	152	152	144	150	148	150	154	152	152	142	152	146
11	142	144	138	142	136	148	162	156	152	150	150	140	154	144	154	154	142	166	156	156	152	144	156	150	150
12	132	144	136	148	142	154	166	160	160	156	152	146	164	152	160	160	160	158	150	162	144	160	170	168	156
13	136	154	142	142	148	158	166	166	164	160	176	150	162	172	166	160	164	150	152	170	160	166	154	176	164
14	142	160	162	154	158	156	162	162	162	160	180	146	162	154	164	162	166	148	154	172	130	168	158	166	162
15	150	150	160	158	158	164	174	174	172	172	170	158	172	166	176	176	174	162	168	178	154	178	170	182	172
16	149	138	154	150	152	160	172	176	168	166	160	170	164	174	170	168	154	162	176	156	172	168	182	182	172
17	154	154	160	154	156	170	178	182	180	180	176	168	180	168	186	178	178	172	174	186	160	184	180	192	182
18	162	160	166	162	164	180	194	198	194	196	194	186	202	188	200	196	194	186	190	204	180	200	198	208	198
19	166	166	172	166	168	188	202	208	200	204	208	192	212	190	210	208	202	196	200	208	184	210	206	218	212
20	186	186	190	194	188	196	210	218	212	214	220	208	222	206	218	214	218	210	210	220	196	220	218	230	224
21	186	186	194	196	186	216	228	234	230	232	236	218	236	222	234	230	226	228	226	236	210	238	230	244	238
22	206	200	210	200	200	224	236	248	240	204	248	230	250	236	246	246	240	236	238	250	222	248	246	258	252
23	206	202	212	194	198	228	244	256	250	250	260	236	260	242	252	250	248	244	248	254	228	254	250	258	264
24	222	212	226	206	210	242	256	270	264	262	274	250	272	254	262	264	258	260	260	268	244	270	262	274	276
25	230	224	234	212	218	256	268	282	274	272	284	262	282	260	274	274	270	272	268	280	250	278	276	286	288
26	234	228	238	216	222	262	276	290	282	278	294	270	296	270	282	282	278	280	280	286	262	290	286	290	304
27	244	236	250	226	232	272	288	306	292	290	304	284	304	280	294	294	288	292	294	300	264	298	298	300	310
28	248	242	258	228	236	280	304	314	306	300	322	296	318	286	308	318	304	306	302	314	278	306	308	316	318

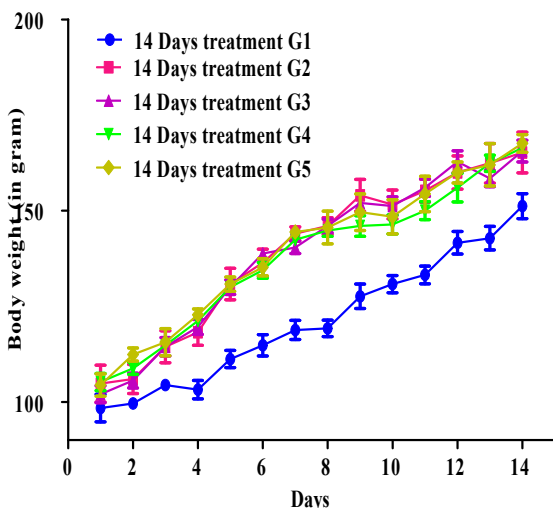


그림 76. 14일간 Vit D 투여 그룹의 Rat 체중 변화

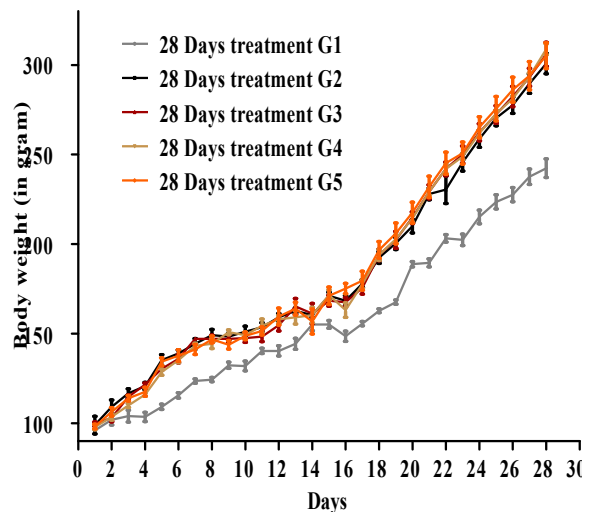


그림 77. 28일간 Vit D 투여 그룹의 Rat 체중 변화

- 간과 간조직의 H & E 조직분석 했을 때 14일째부터 버섯추출 Vit D2를 처리한 그룹에서 간의 색상과 조직의 모양에서 가장 좋은 상태를 보여주었음. 즉, 버섯추출물 Vit D2 처리 시 간의 색깔이 선홍색을 띄고, 건강한 형태를 보이는 반면, Vit D3 결핍처리구와 상업용 Vit D3, Vit D2 처리구는 회백색의 간색깔을 보임으로 전형적인 손상된 간임을 확인할 수 있음. 이후 Zebrafish 시험에서도 독성 경감효과를 보였음. 따라서 버섯추출 비타민 D2 급이가 다른 상업적 비타민 D3 및 D2에 비해 간에 대한 동물 효능에서 차이가 있음을 알 수 있음

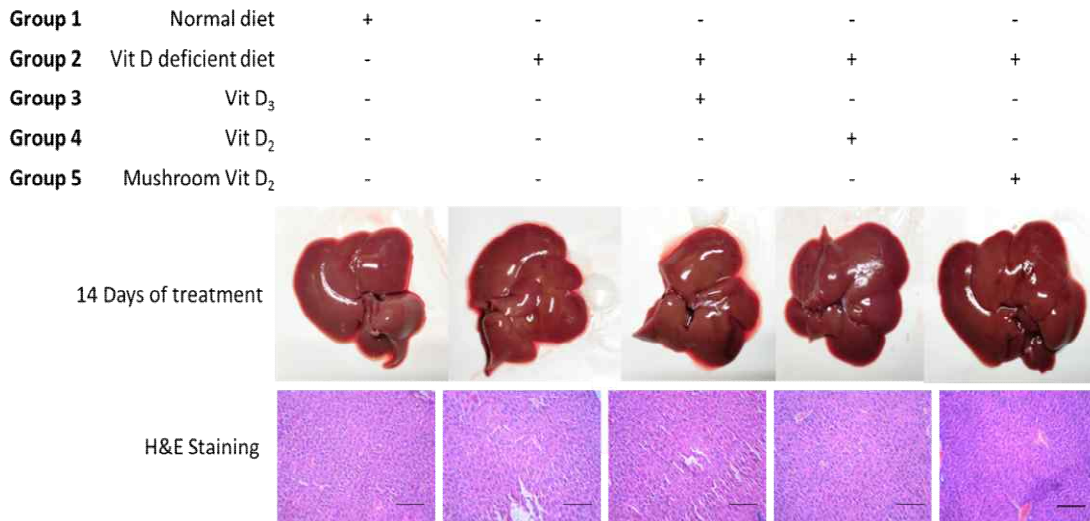


그림 78. 14일간 Vit D 투여그룹의 간 및 간조직에 대한 H&E 분석 결과 (Scale bar; 100 μm)

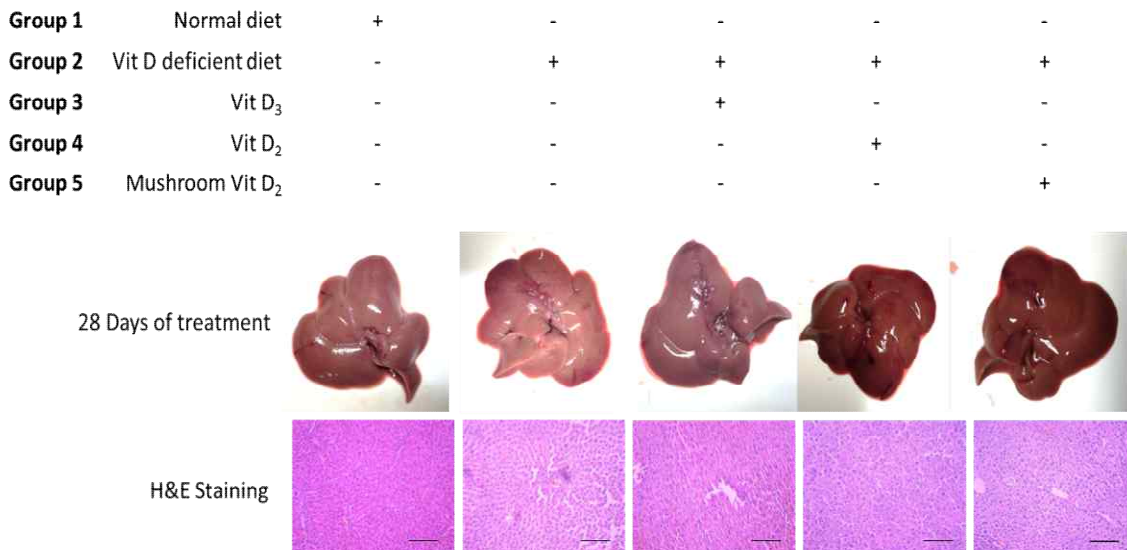


그림 79. 28일간 Vit D 투여그룹의 간 및 간조직에 대한 H&E 분석 결과 (Scale bar; 100 μm)

- 다양한 Vit D를 급이한 Rat의 간조직에서 산화적 스트레스를 유무를 확인하기 위하여 NO 함량을 측정 한 결과, 간조직의 산화적 스트레스는 비타민 D 결핍사료를 급이한 경우가 가장 높았으며, 비타민 D3에 비해서는 비타민 Vit D2를 처리한 그룹에서 상대적으로 낮게 나타났음. 따라서 비타민 Vit D2를 처리한 그룹이 간의 손상이 가장 낮음을 알 수 있음

표 60. 14일간 Vit D 투여그룹간의 간조직내 NO 측정 결과

Group No.	Group 1	Group 2	Group 3	Group 4	Group 5
1	75.4	61.3	59.4	50.4	47.9
2	83.7	71.6	86.6	46.5	50.4
3	69.2	76.3	62.9	61.2	37.1
4	43.2	100.4	78.0	74.4	81.0
5	51.4	92.8	46.0	39.3	68.6

표 61. 28일간 Vit D 투여그룹간의 간조직내 NO 측정 결과

Group No.	Group 1	Group 2	Group 3	Group 4	Group 5
1	79.2	99.4	86.7	81.7	50.4
2	71.4	122.9	65.7	40.7	91.7
3	55.5	117.6	92.8	50.9	80.2
4	59.2	106.3	71.7	84.3	67.9
5	31.7	106.0	51.3	30.4	47.9

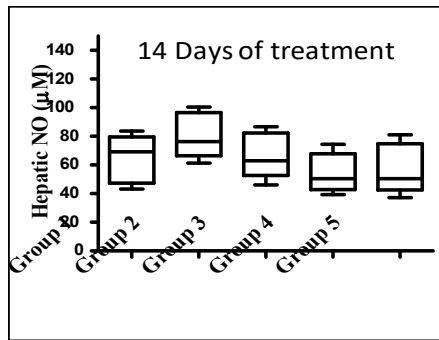


그림 80. 14일간 Vit D 투여 그룹간의 NO측정 결과

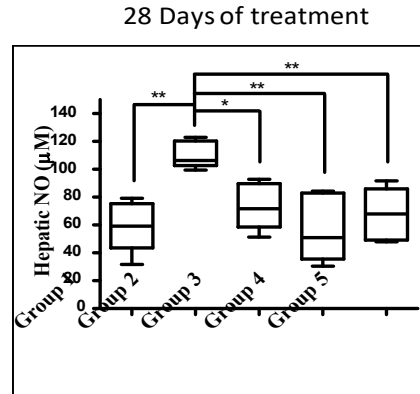


그림 81. 28일간 Vit D 투여 그룹간의 NO측정 결과

- 또한, 간조직의 항산화능을 평가하기 위하여 GST (Glutathione S-transferase) 효소 활성을 측정 한 결과 버섯추출 비타민 D2를 급이한 그룹이 다른 모든 그룹에 비해 28일에 가장 높게 나타났으며, 비타민 D 결핍사료를 급이한 그룹에서 가장 항산화능이 낮았음. 따라서 간조직의 상대적 활 력이 버섯추출 비타민 D2 급이 시 가장 높음을 확인하였음

표 62. 14일간 Vit D 투여그룹간의 GST 활성 측정 결과

Group No.	Group 1 (Unit/mg protein)	Group 2 (Unit/mg protein)	Group 3 (Unit/mg protein)	Group 4 (Unit/mg protein)	Group 5 (Unit/mg protein)
1	69.1	102.9	84.2	54.7	67.7
2	63.3	97.8	55.4	65.3	61.4
3	76.2	89.4	71.3	49.9	93.2
4	99.2	66.8	51.8	38.0	42.2
5	81.9	72.3	92.8	87.8	55.7

표 63. 28일간 Vit D 투여그룹간의 GST 활성 측정 결과

Group No.	Group 1 (Unit/mg protein)	Group 2 (Unit/mg protein)	Group 3 (Unit/mg protein)	Group 4 (Unit/mg protein)	Group 5 (Unit/mg protein)
1	69.2	63.1	94.9	60.3	112.2
2	81.3	58.0	85.4	119.7	89.4
3	113.4	35.3	81.3	98.4	118.0
4	99.1	42.9	102.7	59.8	106.7
5	116.8	51.5	111.7	107.8	132.7

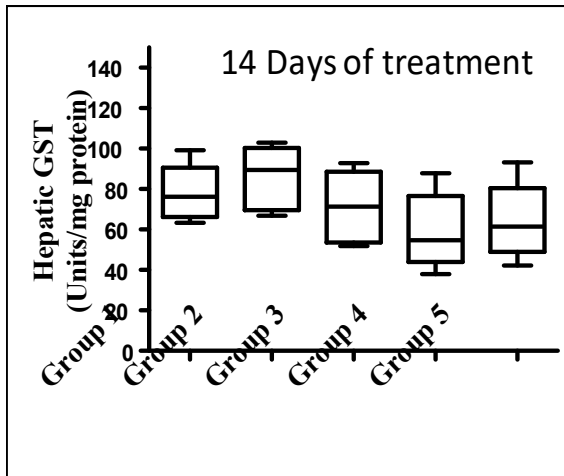


그림 82. 14일간 Vit D 투여 그룹간의 GST 활성 측정

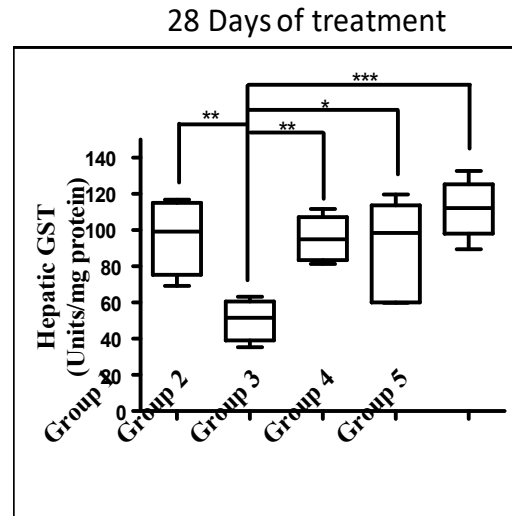


그림 83. 28일간 Vit D 투여 그룹간의 GST 활성 측정

- 간기능 평가를 위하여 14일, 28일 동안 다양한 Vit D를 급이한 Rat의 혈장내 ALT (alanine aminotransferase), AST (aspartate aminotransferase), ALP (alkaline phosphatase) 함량을 측정하였음
- 그 결과 혈장내 간기능은 대부분의 항목에서 표고버섯 추출물 Vit D2에서 가장 낮은 값을 가졌기 때문에 버섯 추출 비타민 Vit D2를 처리한 그룹이 간손상이 가장 낮음을 확인함

표 64. 14일간 Vit D 투여 후 Rat 혈액 serum 내 ALT 함량 분석 결과

Group No.	Group 1	Group 2	Group 3	Group 4	Group 5
1	17	12	8	8	8
2	13	12	15	9	6
3	16	12	12	10	8
4	10	17	14	12	13
5	12	16	10	7	10

표 65. 28일간 Vit D 투여 후 Rat 혈액 serum 내 ALT 함량 분석 결과

Group No.	Group 1	Group 2	Group 3	Group 4	Group 5
1	26	5	14	25	8
2	25	25	8	5	20
3	12	15	15	15	14
4	22	8	11	40	11
5	11	10	4	4	5

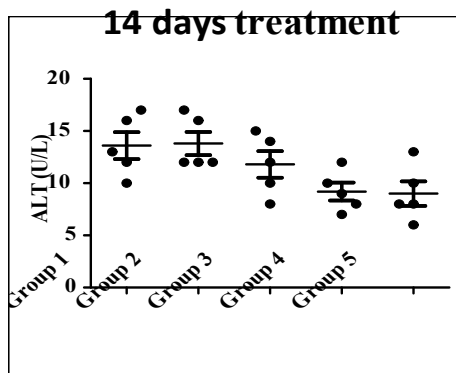


그림 84. 14일간 Vit D 투여 후 Rat 혈액 serum 내 ALT 함량 분석 결과

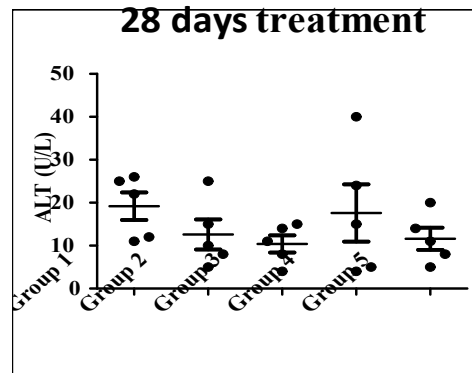


그림 85. 28일간 Vit D 투여 후 Rat 혈액 serum 내 ALT 함량 분석 결과

표 66. 14일간 Vit D 투여 후 Rat 혈액 serum 내 AST 함량 분석 결과

Group No.	Group 1	Group 2	Group 3	Group 4	Group 5
1	61	41	27	30	26
2	54	35	51	34	16
3	60	44	35	40	30
4	38	49	51	44	52
5	50	51	31	19	41

표 67. 28일간 Vit D 투여 후 Rat 혈액 serum 내 AST 함량 분석 결과

Group No.	Group 1	Group 2	Group 3	Group 4	Group 5
1	69	18	70	63	35
2	65	62	40	23	77
3	45	60	82	62	60
4	62	31	48	84	35
5	42	38	25	20	25

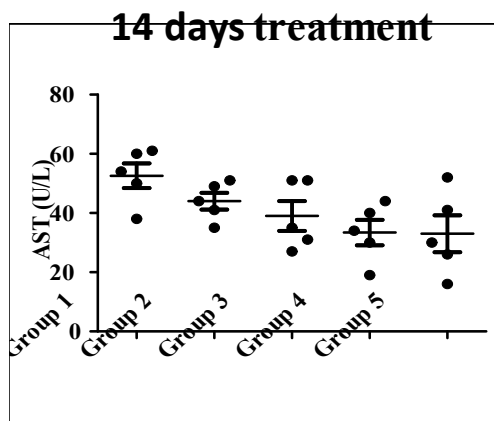


그림 86. 14일간 Vit D 투여 후 Rat 혈액 serum 내 AST 함량 분석 결과

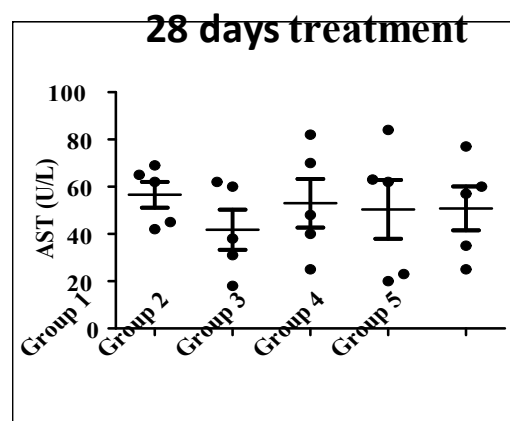


그림 87. 28일간 Vit D 투여 후 Rat 혈액 serum 내 AST 함량 분석 결과

표 68. 14일간 Vit D 투여 후 Rat 혈액 serum 내 ALP 함량 분석 결과

No. \ Group	Group 1	Group 2	Group 3	Group 4	Group 5
1	63	17	19	25	16
2	34	17	51	26	14
3	52	20	24	30	17
4	29	34	26	30	29
5	31	45	22	18	28

표 69. 28일간 Vit D 투여 후 Rat 혈액 serum 내 ALP 함량 분석 결과

No. \ Group	Group 1	Group 2	Group 3	Group 4	Group 5
1	25	32	36	22	33
2	32	78	34	22	44
3	43	58	39	28	38
4	36	45	30	30	32
5	35	49	26	19	23

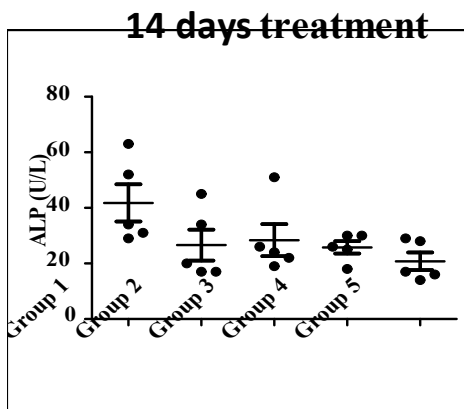


그림 88. 14일간 Vit D 투여 후 Rat 혈액 serum 내 ALP 함량 분석 결과

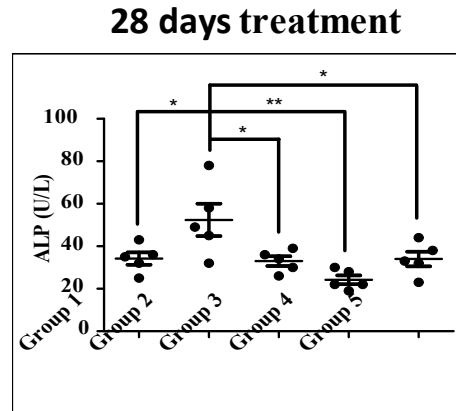


그림 89. Vit D 투여 후 Rat 혈액 serum 내 ALP 함량 분석 결과

- 다양한 Vit D 급이에 따른 소장 내의 면역기능을 평가하기 위하여 소장의 길이, H&E 염색을 통한 소장 조직분석을 진행함
- 분석 결과 소장의 길이에서 Vit D 결핍사료를 급이한 경우에만 현저히 길이가 짧았으나, 다양한 비타민 D를 급이한 경우에는 그룹간에 유의적인 차이가 거의 없음을 확인함

표 70. 14일, 28일간 Vit D 투여 후 Rat의 소장길이 측정 결과

Period \ Group	Vit D Administration for 14 days					Vit D Administration for 28 days				
	1	110	109	97	114	104	142	150	132	135
2	89	103	98	104	96	100	115	106	118	120
3	109	91	102	134	109	150	122	135	145	146
4	115	122	101	113	104	139	145	146	134	135
5	108	112	93	104	118	145	136	133	152	142

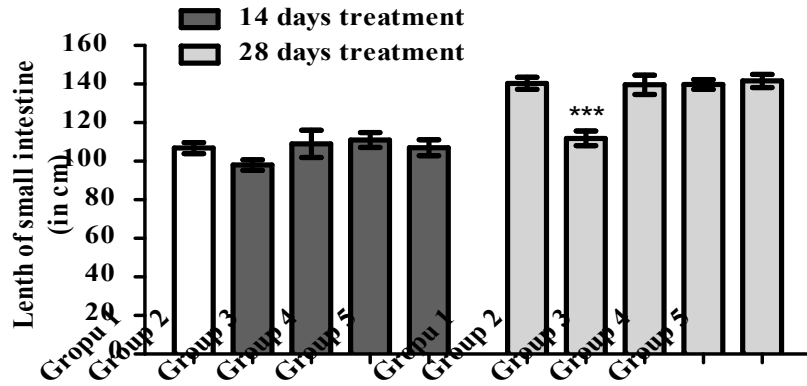


그림 90. 14일, 28일간 Vit D 투여 후 Rat의 소장길이 측정 결과

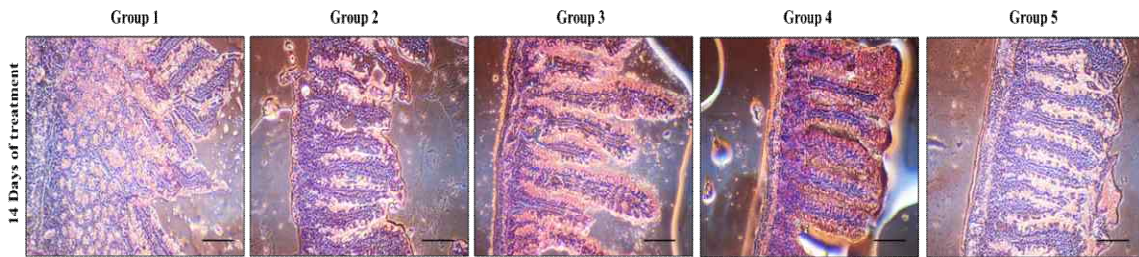


그림 91. 14일간 Vit D 투여한 Rat의 H&E 염색 후 소장 조직 사진 (Scale bar; 100 μm)

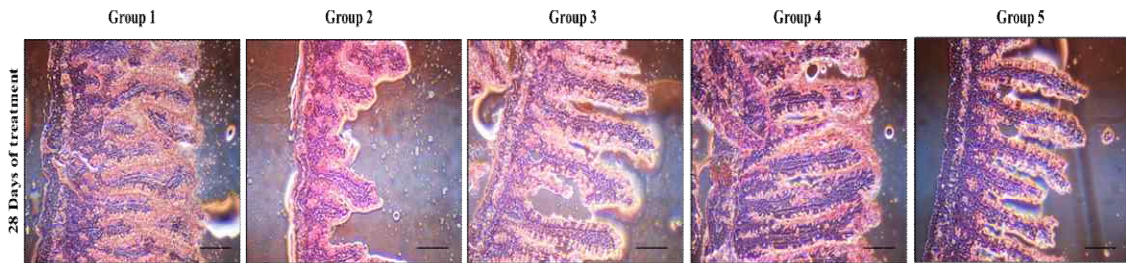


그림 92. 28일간 Vit D 투여한 Rat의 H&E 염색 후 소장 조직 사진 (Scale bar; 100 μm)

- 소장 내의 면역기능을 정량적으로 평가하기 위하여 소장내 염증 마커인 IL-6 및 TNF- α 함량을 측정하였음
- 그 결과 IL-6 및 TNF- α 의 함량에서 Vit D 결핍사료를 급이한 경우에만 현저이 증가하였으나, 다양한 비타민 D를 급이한 경우에는 그룹간에 유의적인 차이가 거의 없었음. 따라서 다양한 Vit D 그룹간에 유사한 정도의 항염증 효과가 입증됨

표 71. 28일간 Vit D 투여 후 Rat 소장 내 IL-6 함량 측정 결과

No. \ Group	Group 1	Group 2	Group 3	Group 4	Group 5
1	16.2	22.1	20.0	12.8	17.8
2	28.0	57.4	23.6	22.0	22.6
3	7.0	33.6	14.8	11.6	16.8
4	17.8	22.8	12.8	15.7	21.0
5	9.2	31.8	16.7	10.8	9.7

표 72. 28일간 Vit D 투여 후 Rat 소장 내 TNF-α 함량 측정 결과

No. \ Group	Group 1	Group 2	Group 3	Group 4	Group 5
1	54.8	90.1	38.5	23.8	42.8
2	29.2	71.8	52.6	62.6	20.6
3	40.0	67.4	34.0	24.0	60.0
4	45.2	83.6	48.8	48.8	32.8
5	49.0	77.8	56.7	16.7	45.7

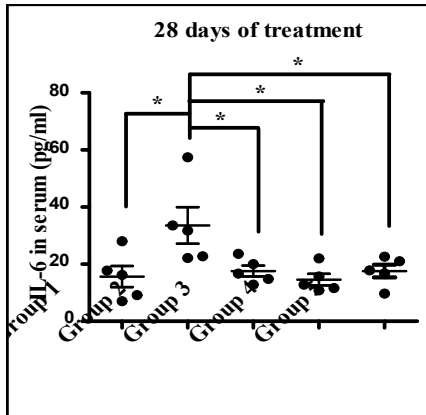


그림 93. 28일간 Vit D 투여 후 Rat 소장 내 IL-6 함량 측정 결과

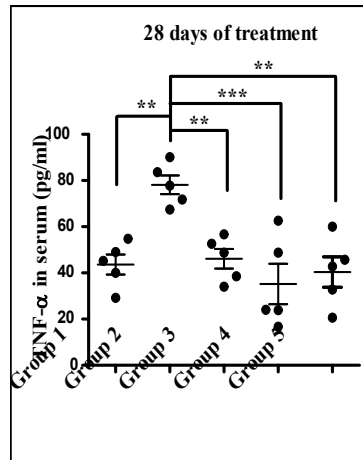


그림 94. 28일간 Vit D 투여 후 Rat 소장 내 TNF-α 함량 측정 결과

- 생체내 비타민 D와 연관된 칼슘흡수 호르몬 변화를 측정하기 위해 PTH 함량을 평가함
- 그 결과 14일에는 PTH가 모든 그룹에서 거의 비슷했으나 28일에는 그룹 2는 사료에 칼슘이 충분하고 Vit D3 부족한 사료 조건임으로 PTH가 감소하고, 나머지 그룹들에서는 칼슘이 충분하고 Vit D가 충분한 조건임으로 비슷한 수준으로 그룹 2에 비해 높은 PTH의 함량을 보임

표 73. 14일간 Vit D 투여 후 Rat 혈장 내 PTH 함량 측정 결과

No. \ Group	Group 1	Group 2	Group 3	Group 4	Group 5
1	62.1	54.1	48.8	59.1	36.9
2	29.5	25.0	36.7	42.9	54.1
3	27.4	44.9	25.2	27.4	40.7
4	16.9	36.1	48.9	28.7	34.7
5	40.0	32.3	34.1	31.5	47.4

표 74. 28일간 Vit D 투여 후 Rat 혈장 내 PTH 함량 측정 결과

No. \ Group	Group 1	Group 2	Group 3	Group 4	Group 5
1	71.7	36.3	92.8	81.7	91.7
2	95.4	87.9	125.7	190.4	177.9
3	31.7	76.0	86.7	64.4	67.9
4	74.2	39.4	71.7	90.7	130.2
5	59.2	52.9	91.7	40.7	40.4

- 다양한 Vit D 급이에 따른 혈장내 Sodium, Potassium, Calcium, Phosphate 등 무기물 함량 평가 하였음
- 결과에 의하면 모든 그룹에서 14일째에는 유의적인 차이가 없었으나, 28일에는 공통적으로 비타민D 결핍사료를 급이한 그룹에서만 미네랄 농도가 올라가고, 나머지 비타민D 급이 그룹은 거의 비슷한 정도의 미네랄 함량을 보였음. 따라서 다양한 비타민D를 급이한 경우에는 그룹간에 유의적인 차이가 거의 없었음

표 75. 14일간 Vit D 투여 후 Rat 혈장 내 sodium 함량 측정 결과

No. \ Group	Group 1	Group 2	Group 3	Group 4	Group 5
1	123.3	154.3	143.3	145.2	142.2
2	147.7	150.2	152.4	143.9	151.6
3	143.1	151.8	152.4	147.9	153.6
4	142.1	143.8	151.3	136.5	145.6
5	149.8	150.8	130.1	146.2	147.3

표 76. 28일간 Vit D 투여 후 Rat 혈장 내 sodium 함량 측정 결과

No. \ Group	Group 1	Group 2	Group 3	Group 4	Group 5
1	142.4	187.1	187.4	155.0	138.3
2	150.4	223.8	162.7	164.3	142.7
3	140.0	226.2	148.3	152.3	189.1
4	151.4	211.5	153.3	183.8	211.0
5	145.9	180.1	147.5	142.6	154.5

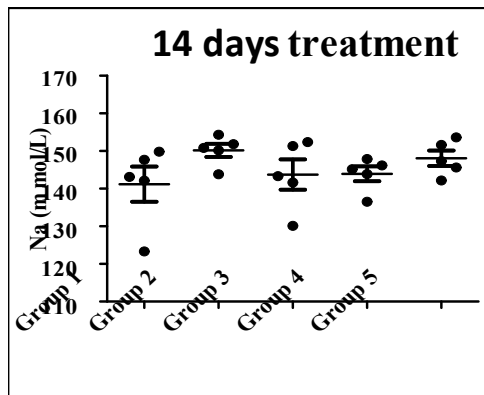


그림 95. 14일간 Vit D 투여 후 Rat 혈장 내 sodium 함량 측정 결과

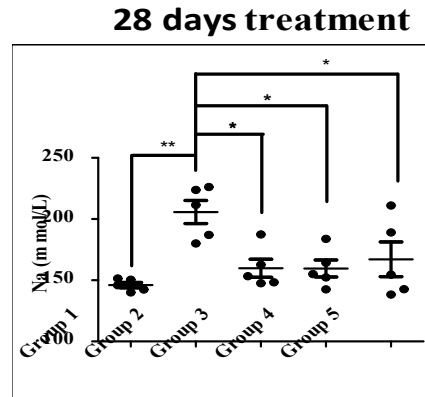


그림 96. 28일간 Vit D 투여 후 Rat 혈장 내 sodium 함량 측정 결과

표 77. 14일간 Vit D 투여 후 Rat 혈장 내 potassium 함량 측정 결과

Group No.	Group 1	Group 2	Group 3	Group 4	Group 5
1	11.1	14.2	13.3	16.8	14.0
2	12.0	12.5	11.2	14.0	12.7
3	14.1	11.5	10.7	13.6	14.3
4	12.8	11.2	12.5	10.7	11.8
5	15.6	13.1	10.6	10.8	10.4

표 78. 28일간 Vit D 투여 후 Rat 혈장 내 potassium 함량 측정 결과

Group No.	Group 1	Group 2	Group 3	Group 4	Group 5
1	8.8	9.9	6.8	5.9	5.4
2	6.2	11.8	7.2	6.1	8.5
3	10.6	7.2	6.2	5.0	6.3
4	5.2	6.1	6.3	9.5	5.0
5	5.0	8.5	5.3	5.1	8.8

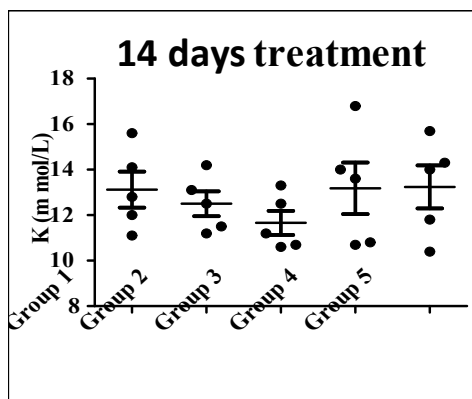


그림 97. 14일간 Vit D 투여 후 Rat 혈장 내 potassium 함량 측정 결과

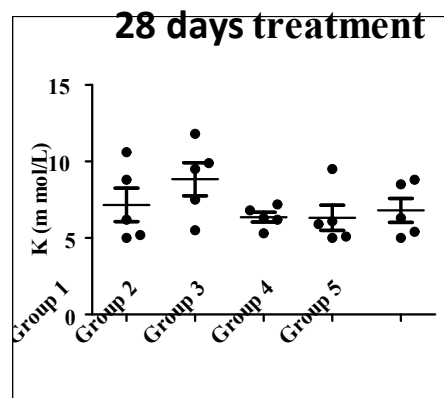


그림 98. 28일간 Vit D 투여 후 Rat 혈장 내 potassium 함량 측정 결과

표 79. 14일간 Vit D 투여 후 Rat 혈장 내 calcium 함량 측정 결과

Group No.	Group 1	Group 2	Group 3	Group 4	Group 5
1	9.5	11.9	10.4	11.5	10.6
2	12.2	11.0	11.4	11.0	12.0
3	11.7	11.2	10.7	11.0	11.4
4	9.9	10.7	11.8	10.6	10.8
5	10.9	11.4	8.9	10.8	11.6

표 80. 28일간 Vit D 투여 후 Rat 혈장 내 calcium 함량 측정 결과

Group No.	Group 1	Group 2	Group 3	Group 4	Group 5
1	10.6	14.9	13.8	12.4	12.3
2	11.2	18.1	15.7	13.8	14.2
3	10.3	17.6	13.7	11.8	11.0
4	11.4	15.1	11.8	13.7	12.7
5	10.8	16.6	12.4	10.7	10.5

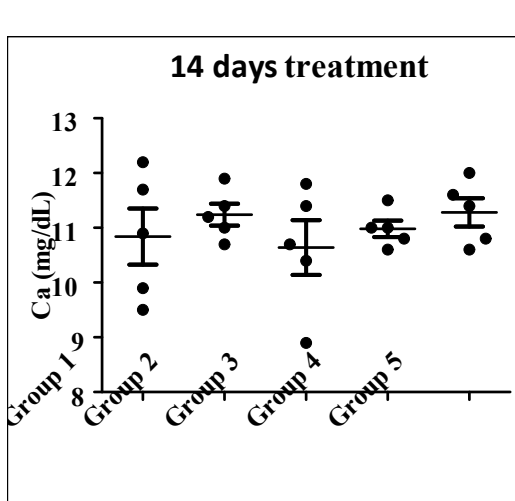


그림 99. 14일간 Vit D 투여 후 Rat 혈장 내 calcium 함량 측정 결과

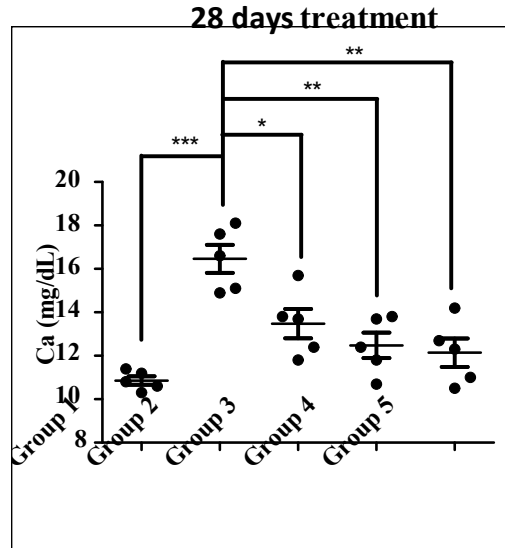


그림 100. 28일간 Vit D 투여 후 Rat 혈장 내 calcium 함량 측정 결과

표 81. 14일간 Vit D 투여 후 Rat 혈장 내 phosphate 함량 측정 결과

Group No.	Group 1	Group 2	Group 3	Group 4	Group 5
1	13.2	15.6	14.4	20.1	16.2
2	16.9	13.1	15.0	14.3	16.7
3	15.9	13.2	13.9	14.2	15.3
4	10.8	13.1	13.4	12.7	12.3
5	15.7	16.7	11.1	12.2	11.5

표 82. 28일간 Vit D 투여 후 Rat 혈장 내 phosphate 함량 측정 결과

No. \ Group	Group 1	Group 2	Group 3	Group 4	Group 5
1	13.9	15.4	15.8	12.3	9.3
2	12.7	19.8	13.7	12.1	18.9
3	13.7	20.0	12.1	11.2	10.6
4	10.9	16.7	11.3	17.4	12.5
5	10.4	13.2	11.4	9.8	12.1

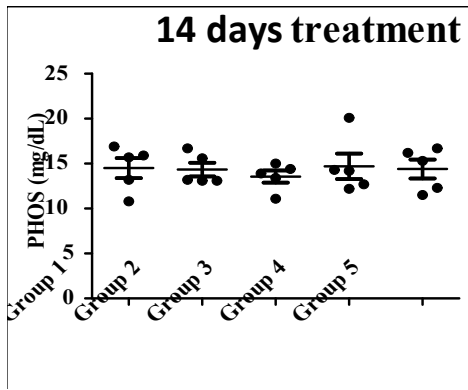


그림 101. 14일간 Vit D 투여 후 Rat 혈장 내 phosphate 함량 측정 결과

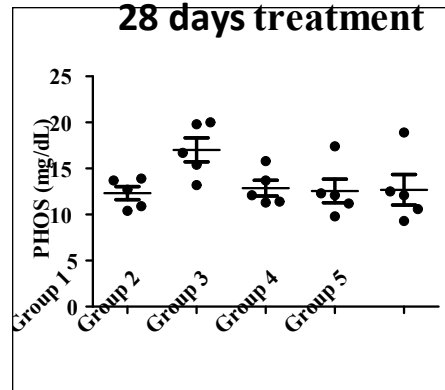


그림 102. 28일간 Vit D 투여 후 Rat 혈장 내 phosphate 함량 측정 결과

[참여기관 2 (경성대학교산학협력단)]

○ 버섯 비타민D2 함유 표고버섯분말 제형개발

■ 표고버섯 미세분말 이용 정제, 캡슐, 과립 제조 및 비타민D2 함량 분석 결과 보고서 작성

- 요약

- 비타민 D2가 함유된 표고버섯 미세건조분말을 원료로 하여 과립, 정제 및 캡슐을 제조하였을 때 비타민 D2의 함량에 변화가 없는지 확인하기 위해 과립, 정제, 캡슐을 제조하였음
- 정제, 캡슐 과립물 시험 결과 Loss on Drying 1.22 %, Carr' s Index 21 %, 안식각 39.2° 으로 평가됨
- 정제는 경도 4 kp, 마손도는 0.003 %로 기준에 부합하였음
- 식품공전의 비타민 D2 추출법에 따라 과립, 정제, 캡슐 제조 전·후의 비타민 D2 함량을 확인한 결과 제조 전의 함량이 0.154 mg/g, 제조 후의 함량이 0.177 mg/g으로 큰 차이가 없었음
- 비타민 D2가 첨가된 표고버섯 미세건조분말을 원료로 하여 과립, 정제 및 캡슐을 제조하였을 때 비타민 D2의 함량에 변화가 없음을 확인하였음

- 적용

- 표고버섯 미세건조분말의 건강기능식품 개발에 적용함

- 실험계획

- 목적

비타민 D₂가 함유된 표고버섯 미세건조분말을 원료로 하여 과립, 정제, 캡슐을 제조하였을 때

비타민 D₂의 함량 변화가 없는지 확인하기 위해 과립, 정제 및 캡슐을 제조함

- 시료 제조 방법

: 표고버섯 미세건조분말

표 83. 표고버섯 미세건조분말 과립 formulation

No.	Ingredient	Weight (mg)	Content (%)	Test (g)
1	표고버섯 미세분말	10	5.00	2
2	Starch 1500	415	42.50	83
3	Mannitol	464.5	46.45	92.9
4	Croscamellose sodium	50	5.00	10
5	Hydroxy Propyl Methyl Cellulose 6cps	50	5.00	10
6	Magnesium stearate	10	1.00	2
7	Sucralose	0.5	0.05	0.1
Total		1000	100.00	200

- Mannitol을 600 μ m 체로 체과하여 고른 입자로 만든 후 비닐 백에 표고버섯 미세분말, Starch 1500, 체과한 Mannitol, Croscamellose sodium, Hydroxy propyl methyl cellulose (이하 HPMC로 표기), Magnesium stearate, Sucralose를 정량 대로 넣고 잘 섞었음
- 3차 증류수 100 ml를 10 - 20 ml씩 나눠 넣으며 고르게 섞어준 뒤 로터리과립기를 사용하여 과립을 만들었음. 이를 충분히 건조시킨 후 1.18 mm 체를 통과시켜 일정한 크기의 과립제를 제조하였음

: 캡슐 및 정제

표 84. 표고버섯 미세건조분말 캡슐 및 정제 formulation

No.	Ingredient	Weight (mg)	Content (%)	Test (g)
1	표고버섯 미세분말	10	5.00	10
2	Lactose monohydrate	115	57.50	115
3	Microcrystalline cellulose	57	28.50	57
4	Hydroxy Propyl Methyl Cellulose 6cps	2	1.00	2
5	Silicon dioxide	2	1.00	2
6	Croscarmellose sodium	12	6.00	12
7	Magnesium stearate	2	1.00	2
Total		200	100.00	200

- Lactose monohydrate와 Silicon dioxide를 600 μ m 체로 체과하여 고른 입자로 만든 후 비닐 백에 표고버섯 미세분말, 체과한 Lactose monohydrate, Microcrystalline cellulose, HPMC, 체과한 Silicon dioxide를 정량 대로 넣고 잘 섞음
- 물 35 ml를 3 - 5 ml씩 나눠 넣으며 고르게 섞어준 뒤 드라이오븐을 사용해 70 °C에서 2시간 동안 건조하였음
- 이를 600 μ m 체로 정립하고 Croscarmellose sodium, Magnesium stearate를 정량 대로 넣고 잘

섞어주었음

- 캡슐은 캡슐기를 사용하여 1호 캡슐에 중량 200 mg이 되도록 충전하였고 정제는 이층정타정기를 사용하여 타정압 970 kgf로 중량 200 mg이 되도록 타정하였음
- 캡슐 및 정제의 시험항목 기준

표 85. 캡슐 및 정제의 시험항목 및 기준

공정	시료	시험항목	평가기준	시험방법
건조	10분 간격으로 채취한 건조물	Loss of Density	2 % 이하	1 g, 105°C, 10분
정립	정립물	Carr' s Index	흐름성 확인	USP <616>, <1174>
정립	정립물	안식각	흐름성 확인	USP <1174>
	정제	마손도	1 % 이하	25 rpm, 100회 회전
	정제	경도	4 kp 이상	경도 측정기 사용하여 측정

- 시료 분석 방법

제조한 과립, 캡슐 및 정제의 비타민 D2 함량을 확인하기 위해 식품공전 일반시험법 2.2.2.7 비타민D 분석법에 따라 시험을 진행하였음. HPLC 분석 조건은 표86에 정리하였음.

- 표 86. 비타민 D의 HPLC 분석 조건

Apparatus	DIONEX UltiMate 3000		
Column	SUPERSIL COLUMN ODS-I, C18 5 μ m, 4.6 \times 250mm		
Mobile Phase		Solvent A (Acetonitrile)	Solvent B (Methanol)
	0-5min	20	80
	5-20min	80	20
	20-30min	90	10
Over Temp	30°C		
Flow Rate	1.8 ml/min		
Injection volumn	10 μ l		
Run time	30 minutes		
Wave length	282 nm		

- 실험결과

- 표 43 항목에 따른 결과
 - 1) LoD 건조 측정 값: 1.22 %
 - 2) Carr' s Index: Bulk, tapped density를 통해 구한 Carr' s Index는 21 %로 이에 따른 flowability는 표 51를 참조하였을 때 Passible으로 평가되었음.
 - 3) 안식각: 안식각은 39.2° 로 이에 따른 flowability는 표 87를 참조하였을 때 Fair으로 평가되었음.
 - 4) 마손도: 0.003 %
 - 5) 경도: 4 kp

표 87. Carr's Index와 안식각에 따른 Flowability

Carr' s Index (%)	안식각 (°)	Flowability
<11	25-30	Excellent
11-15	31-35	Good
16-20	36-40	Fair
21-25	41-45	Passible
26-31	46-55	Poor
32-37	56-65	Very poor
>37	>65	Very very poor

- 시료 분석 결과

표고버섯 미세분말의 과립, 정제, 캡슐 제조 전과 후 함량 분석 결과는 표88에 정리하였음

표 88. 표고버섯 미세분말의 과립, 정제, 캡슐 제조 전 후 비타민 D 함량 분석 결과

제조 전 함량 (mg/g)	제조 후 함량 (mg/g)
0.159	0.174
0.153	0.182
0.150	0.175
	평균
0.154	0.177

- 결론

- 비타민 D2가 함유된 표고버섯 미세건조분말을 원료로 하여 과립, 정제 및 캡슐을 제조하였을 때 비타민 D2의 함량에 변화가 없는지 확인하기 위해 과립, 정제, 캡슐을 제조하였음
- 표 88의 시험항목에 따른 결과, Loss on Drying 1.22 %, Carr' s Index 21 %, 안식각 39.2° 으로 평가되었음. Flowability는 Carr' s Index가 Passible, 안식각이 Fair으로 일반적으로 Passible 까지 생산 가능하므로 해당 과립의 flowability는 기준 내에 드는 것으로 평가되었음
- 정제는 경도 4 kp, 마손도는 0.003 %로 기준에 부합하였음 식품공전의 비타민 D2 추출법에 따라 과립, 정제, 캡슐 제조 전·후의 비타민 D2 함량을 확인한 결과 제조 전의 평균 함량이 0.154 mg/g, 제조 후의 평균 함량이 0.177 mg/g으로 큰 차이가 없었음 이를 통해 과립, 정제 및 캡슐을 제조하였을 때 표고버섯 미세분말에 첨가된 비타민 D2의 함량에 변화가 없음을 확인하였음

○ 버섯추출 Vit D2의 유전체 기반 유효기능성 탐색

- 대구대학교에서 수행한 동물실험 결과 유의미한 효과를 보이는 샘플들을 선정하여 유전체 분석 진행

- 샘플준비

표 89. 동물실험 group

group	조직
group 1	정상군
group 2	vit D deficient 식이 투여군
group 3	vit D deficient 식이 + VitD3 투여군
group 4	vit D deficient 식이 + VitD2 투여군
group 5	vit D deficient 식이 + 버섯추출 VitD2 투여군

- 수컷 Rat에 28일동안 위의 5개군으로 식이 투여를 한 후 각 그룹에서 간조직을 확보하였음
- 각 군당 3마리씩 total RNA를 추출한 후 Affymetrix GeneChip Rat Gene 2.0 ST Array를 통하여 gene expression 분석을 진행하였음

- Analysis Process

- 분석 프로세스는 그림과 같이 진행하였음

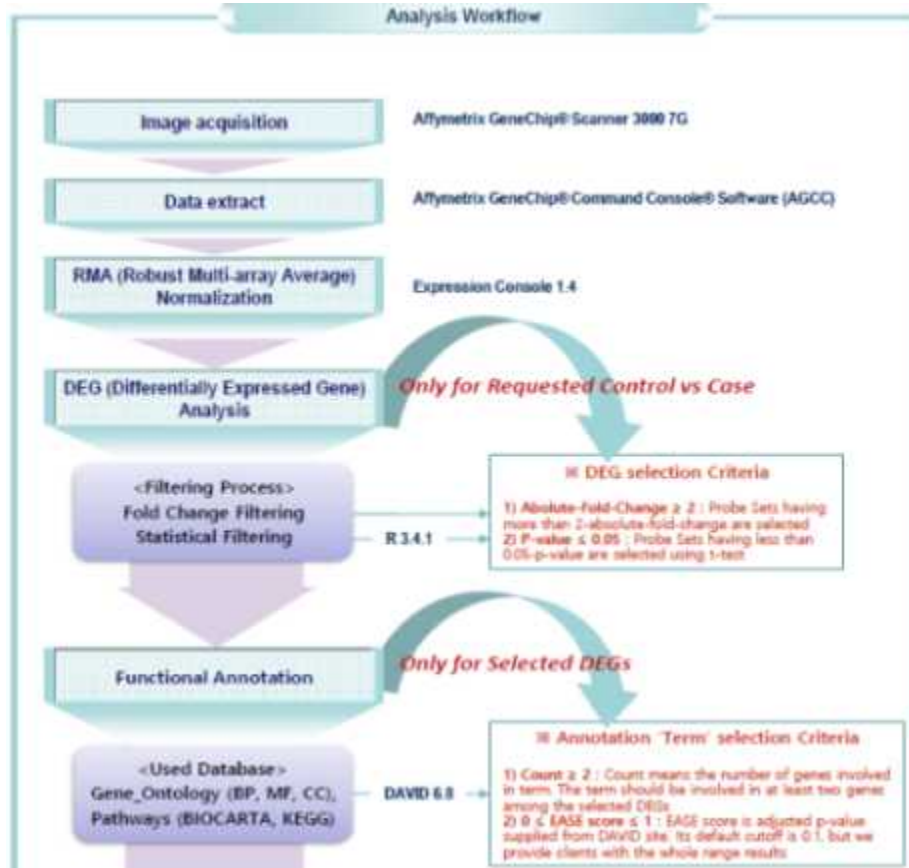


그림 103. 분석 프로세스

- 분석방법

Raw data normalization

- Affymetrix GeneChip Rat Gene 2.0 ST Array를 이용한 마이크로어레이 chip processing 후 scanning 결과 얻어진 각 cell파일을 Robust Multi-array Average (RMA) 알고리즘을 이용하여 모두 합쳐 normalization 한 후 log2 transformation 한 자료를 최종 통계 분석에 사용

두 그룹 간 평균 발현의 차이에 대한 통계분석

- 그룹 간 변화한 유전자 분석은 t-test 방법을 사용하였으며 유의한 유전자는 p value<0.05, fold change≥1.5배 변화를 기준으로 선정

Gene-set enrichment 및 functional annotation 분석

- Affymetrix GeneChip Scanner를 통해 분석한 데이터 값을 Expression Console 1.4 프로그램을 이용하여 normalization 한 후 DEG (Differentially Expressed Gene) Analysis를 수행함. 이후 나온 결과값을 대조군 대비 1.5 fold 이상, p-value 0.05이하인 유전자들을 선택하여 DAVID 데이터 베이스를 기반으로 한 기능분석을 수행함

- 분석결과

각 식이군별 간조직에서 변화한 유전자의 탐색

- 28주 동안 식이를 한 후 Rat의 간조직에서 발현되는 유전자의 양을 토대로 대조군 대비 각 군에서 발현이 변화된 유전자를 탐색하였음. Bayesian t-test결과 p value<0.05이면서 fold change가 1.5배 이상이 되는 유전자와 2.0배 이상 발현이 변화된 유전자로 구분하였음

표 90. 간 조직 유전자 발현량

Expression change	Organ	Change	VitD deficient	VitD deficient+Vit D3	VitD deficient+Vit D2	VitD deficient+mushroom extracted VitD2
Fold change ≥ 1.5배	liver	up	10	19	22	62
		down	42	20	11	18
Fold change ≥ 2배	liver	up	4	6	6	8
		down	16	3	2	5

- 위의 표와 같이 각 군에서 t-test결과 p value<0.05이면서 fold change가 2.0배 이상이 되는 유전자 pool이 대부분 10개 미만으로 현저히 적게 나온 것을 확인하였음. 유전자 변화를 토대로한 생물학적 기능분석을 위해서는 유전자 pool의 범위를 확대할 필요가 있을 것으로 생각되어 fold change를 1.5배 수준으로 정하고 이를 생물학적 기능분석을 위한 데이터로 활용하였음

각 식이군별 간조직에서 발현이 변화한 유전자에 대한 functional annotation 분석 결과

- 정상식이군 대비 Vit D deficient 식이를 한 Rat의 간조직에서 변화한 52개 유전자들을 DAVID 데이터베이스를 기반으로 한 생물학적 기능분석을 수행한 결과 아래표와 같은 결과를 확인하였음

표 91 정상군 간 조직 유전자 생물학적 기능 분석

Term (Biological Process)	P Value	Genes
GO:0006695~cholesterol biosynthetic process	4.98E-09	IDI1, HMGCS1, APOA4, DHCR24, DHCR7, FDFT1
GO:0008299~isoprenoid biosynthetic process	0.0012	CYP2J4, MSMO1, DHCR24, FMO5, ACADSB, TM7SF2, SQLE, LDHA, CYP1A2, CYP2A1, CYP2B1, BLVRB, PHGDH, DHCR7, IDO2, ND3, FDFT1
GO:0019373~epoxygenase P450 pathway	0.0018	CYP2J4, CYP2A1, CYP2B1
GO:0017144~drug metabolic process	0.026	CYP1A2, CYP2B1, FMO5
GO:0030300~regulation of intestinal cholesterol absorption	1.28E-04	ABCG8, ABCG5, APOA4
GO:0033344~cholesterol efflux	0.002	ABCG8, ABCG5, APOA4

- 또한 각 식이군 특히 버섯에서 추출한 VitD2를 섭취한 Rat의 간조직에서 변화한 80개 유전자들을 DAVID 데이터베이스를 기반으로 한 생물학적 기능분석을 수행한 결과 아래표와 같은 결과를 확인하였음

표 92 비타민 D2 섭취 군 간 조직 유전자 생물학적 기능 분석

Term (Biological Process)	P Value	Genes
GO:0017144~drug metabolic process	0.0064	CYP2B1, FMO3, FMO4
GO:0055114~oxidation-reduction process	5.00E-05	CYP3A9, POR, CYP2J4, VCAM1, ALDH1A1, CYP2B1, KDSR, FMO3, PTGR1, FMO4, SNCA, CYP17A1
GO:0014070~response to organic cyclic compound	7.53E-04	IL1RN, CYP2J4, HMGCS1, ALDH1A1, CYP2B1, CYSS, CYP17A1
GO:0032496~response to lipopolysaccharide	0.026	PTGFR, IL1RN, VCAM1, IL6R, SNCA

VitD deficient 식이를 한 군에서 나타난 유전자 발현이 증가되거나 감소한 62개를 분석

- 분석 결과, cholesterol biosynthetic process, isoprenoid biosynthetic process, regulation of intestinal cholesterol absorption 등에 관여하는 유전자가 많았음
- 그에 반하여 ViD deficient 사료에 버섯 추출 Vit D2를 투여한 군에서 나타난 발현이 증가되거나 감소한 유전자들은 drug metabolic process, oxidation-reduction process, response to lipopolysaccharide 등의 기능에 관여하는 유전자들이 많이 보이는 것으로 나타났음

[위탁연구기관 (포항테크노파크)]

버섯시료 함수율에 따른 비타민 D 전환을 평가

- 버섯 시료의 수분 함량이 비타민 D 전환율에 미치는 영향 테스트

- 주관기관에서 제작한 표고버섯 칩 함수율 측정 (29.62%)
- UV-B 처리한 후 전환율 측정 의뢰 (대구대)

- 실험내용 및 방법

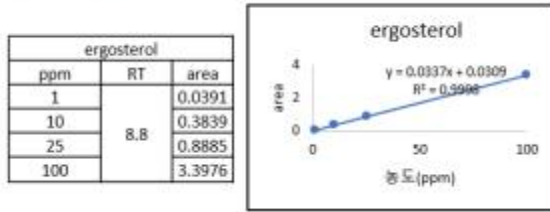


그림 104. 함수율에 따른 비타민 D 전환을 평가 전처리 및 시료 제작 과정

- 실험결과

- 버섯 시료의 수분함량 차이에 따른 전환율 측정 실험
- 수분함량 차이에 따른 추출물의 ergosterol 및 vitamin D2 함량 확인

* Ergosterol calibration curve



* Vitamin D2 calibration curve

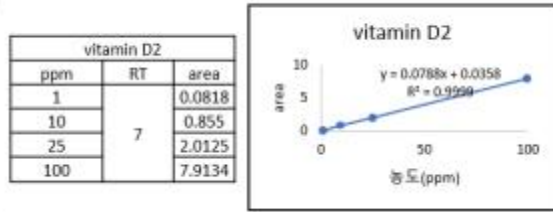


그림 105. 표고버섯 칩의 수분함량에 따른 Ergosterol 및 vitamin D2 검량선 작성

표 93. 수분함량 차이에 따른 ergosterol 함량 분석 결과

Sample	성분	Area	부피(mL)	시료 양(g)	농도(µg/mL)	함량(mg/g)
버섯 원물 UV 처리	Ergosterol	216.5071	2	1	6420.385	12.841
		195.6256	2	1	5801.069	11.602
		219.0084	2	1	6494.57	12.989
		148.2506	2	1	4395.992	8.792
		158.2492	2	1	4692.536	9.385
		139.8877	2	1	4147.96	8.296
60°C 8h 건조 후 UV 처리	Ergosterol	195.9375	2	1	5810.319	11.621
		238.7233	2	1	7079.287	14.159
		177.6168	2	1	5266.953	10.534
		163.9906	2	1	4862.818	9.726
		227.321	2	1	6741.111	13.482
		166.0918	2	1	4925.137	9.85

표 94. 수분함량 차이에 따른 vitamin D2 함량 분석 결과

Sample	성분	Area	부피(mL)	시료 양(g)	농도(µg/mL)	함량(mg/g)
버섯 원물 UV 처리	Vitamin D2	2.3613	2	1	29.504	0.059
		2.3018	2	1	28.749	0.057
		2.5968	2	1	32.492	0.065
		3.7601	2	1	47.251	0.095
		3.9508	2	1	49.67	0.099
		4.3546	2	1	54.794	0.11
60°C 8h 건조 후 UV 처리	Vitamin D2	3.3251	2	1	41.732	0.083
		3.1096	2	1	38.998	0.078
		3.8066	2	1	47.841	0.096
		2.3317	2	1	29.128	0.058
		3.6975	2	1	46.457	0.093
		3.7074	2	1	46.582	0.093

- 분석 결과, 버섯 원물 UV 처리 sample의 vitamin D2 평균 함량이 60°C에서 8h 건조 후 UV처리 sample에 비해 상대적으로 높은 수치를 나타냈으며, 반면 ergosterol 평균 함량에서는 60°C에서 8h 건조 후 UV처리 sample이 상대적으로 높은 수치를 나타냄. → 표고버섯 칩이 함유하고 있는 수분은 UV-B조사로 인한 ergosterol가 vitamin D2로 전환에 영향을 미치는 것으로 판단됨
- 비교적 높은 전환율을 나타내는 버섯 원물 UV 처리 sample을 추출 조건으로 채택

○ EtOH 농도 최적 조건 확립 비교 평가

■ EtOH 농도 최적 조건 테스트에 사용되는 추출물 제작

- EtOH 농도가 다른 용매(0%, 10%, 20%, 30%)에 따른 추출물 제작
- 10mg/ml로 희석한 후 ergosterol 함량 및 비타민D 전환을 측정 의뢰 (경성대)
- 액상 비타민D 안정성 평가

- 실험내용 및 방법

- 주관기관으로부터 전달받은 균질화 된 시료 1g을 유리 바이알 12개에 정밀히 칭량
- 추출하는 용매의 EtOH 농도를 0%/ 10%/ 20%/ 30% 로 제작한 후, 각 농도별 바이알 3개씩 설정함. 이후 각 용매를 20mL씩 가하여 60℃에서 8시간 추출함
- Evaporater를 이용하여 농축한 뒤, 50ml tube에 옮겨 air blower 및 에어 펌프를 이용하여 농축함
- Absolute EtOH에 10mg/ml의 농도로 희석하여 경성대로 전달하여 ergosterol 함량 및 비타민D 전환을 측정을 의뢰함
- 이후 액상 비타민D 안정성 평가를 위하여 2-3개월 시료를 보관한 뒤 재측정

- 실험결과

- 지역별 표고버섯의 UVB 미처리 시 ergosterol 및 vitamin D2 함량 확인 실험
- 각각 다른 EtOH 농도 (0%, 10%, 20%, 30%) 용매를 이용한 추출물의 ergosterol 및 vitamin D2 함량 확인

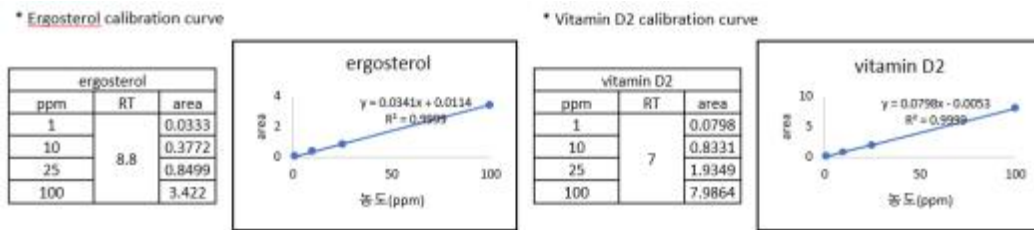


그림 106. Ergosterol 및 vitamin D2 검량선 작성

표 95. EtOH 농도별 ergosterol 함량 분석 결과

Sample	성분	Area	부피(mL)	시료 양(mg)	농도(µg/mL)	함량(mg/g)
EtOH 0% 1	Ergosterol	0.7157	1	10	20.658	2.066
EtOH 0% 2		0.6832	1	10	19.705	1.970
EtOH 0% 3		0.6873	1	10	19.825	1.983
EtOH 10% 1		0.9803	1	10	28.419	2.842
EtOH 10% 2		0.8558	1	10	24.767	2.477
EtOH 10% 3		1.2709	1	10	36.942	3.694
EtOH 20% 1		1.1192	1	10	32.492	3.249
EtOH 20% 2		0.7475	1	10	21.591	2.159
EtOH 20% 3		0.8832	1	10	25.571	2.557
EtOH 30% 1		0.9969	1	10	28.905	2.891
EtOH 30% 2		0.4429	1	10	12.657	1.266
EtOH 30% 3		0.7461	1	10	21.550	2.155

표 96. EtOH 농도별 vitamin D2 함량 분석 결과

Sample	성분	Area	부피(mL)	시료 양(mg)	농도(µg/mL)	함량(mg/g)
EtOH 0% 1	Vitamin D2	0.0209	1	10	0.329	0.033
EtOH 0% 2		0.015	1	10	0.255	0.025
EtOH 0% 3		0.0205	1	10	0.324	0.032
EtOH 10% 1		0.0358	1	10	0.515	0.052
EtOH 10% 2		0.0271	1	10	0.406	0.041
EtOH 10% 3		0.0426	1	10	0.600	0.060
EtOH 20% 1		0.0432	1	10	0.608	0.061
EtOH 20% 2		0.0391	1	10	0.557	0.056
EtOH 20% 3		0.0398	1	10	0.565	0.057
EtOH 30% 1		0.0526	1	10	0.726	0.073
EtOH 30% 2		0.0411	1	10	0.582	0.058
EtOH 30% 3		0.0599	1	10	0.817	0.082

- 분석 결과, EtOH 30% sample의 vitamin D2 평균 함량이 가장 높으며, 10% EtOH sample의 ergosterol 평균 함량이 가장 높게 나옴. → UV-B조사로 인해 ergosterol이 vitamin D2로 전환된 것으로 판단됨
- 가장 높은 전환율을 가지는 30% EtOH 용매를 추출 용매 조건으로 채택
- 측정 완료 시료 2-3개월 보관한 뒤 재측정 예정

○ 최적 추출 온도 확립 비교 평가

■ 추출 온도 최적 조건 테스트에 사용되는 추출물 제작

- 추출 시 용매의 온도를 40°C / 50°C / 60°C로 설정하여 추출물 제작
- 10 mg/ml로 희석한 후 ergosterol 함량 및 비타민D 전환율 측정 의뢰 (경성대)

- 실험 내용 및 방법

- 주관기관으로부터 전달받은 균질화 된 시료 1g을 유리 바이알 12개에 정밀히 칭량
- 이전 실험에서 가장 높은 전환율을 나타낸 30% EtOH 용매 20 ml을 가한 뒤 온도별 (40°C, 50°C, 60°C) 로 바이알 3개씩 설정하고 각 8시간 추출함
- Evaporater를 이용하여 농축한 뒤, 50ml tube에 옮겨 air blower 및 에어 펌프를 이용하여 농축함
- Absolute EtOH에 10mg/ml의 농도로 희석하여 경성대로 전달하여 ergosterol 함량 및 비타민D 전환율 측정을 의뢰함

<3차년도 연구수행결과>

[주관연구기관 (주)네이처텍]

○ 대량생산공정 validation

- 대량생산 시설에서 Vit D2전환 표고버섯 분말의 반복 생산 실시

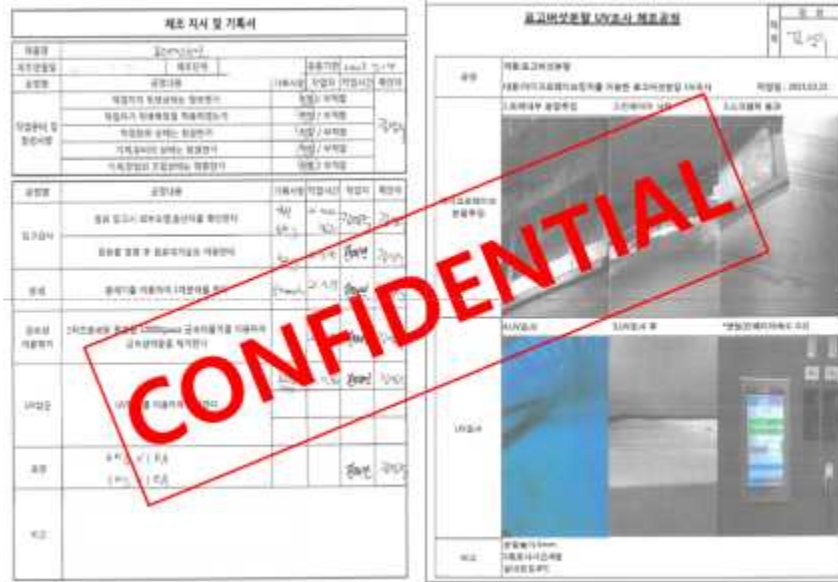


그림106. 대량생산시설에서의 표고버섯분말의 Vit D2전환공정 및 제조지시기록서

- 반복생산 된 Vit D2전환 표고버섯 분말의 Vit D2 함량분석결과-공인기관분석결과 확보
 - 공인기관별로 식품공전법을 이용하여 분석을 하나 결과값이 다르게 나와 3개 기관에서 분석을 실시하였고 이에 기관 1,2의 결과가 유사하게 나와 본 시험의 결과값으로 채택하였음
 - 자사 분석결과 또한 기관 1과 유사하게 나와서 향후 품질관리에는 기관 1의 검사결과를 사용할 예정임

표 97. 대량생산 Validation 용 제조 Vit D2전환 표고버섯 분말의 Vit D₂ 함량

Vit D ₂ (ug/g)	기관 1	기관2	기관 3
sample 1	73.1	78.28	27.86
sample 2	76.78	75.79	28.96

- 자사의 생산시설을 이용한 제품 생산을 위하여 공급계약을 체결하고 생산 시스템에 원료 등록
 - 자사의 생산시스템에 등록된 표고버섯 원물과 분말의 정보는 아래와 같음

표 98. 표고버섯분말의 (주)네이처텍 생산시스템 등록현황

품목	품명	로트	유통기한	수량	단가	금액
193676	표고버섯분말(원물)_국가과제전용	F21091501 7	2023-03-14	83		
A400235	표고버섯분말(혼합)_국가과제전용	NPN21001	21/10/06 조제	13		

- 제품 생산을 위하여 원료성 제품에 대한 제품 표준서, COA, 품목제조보고사항 변경 (1차년도 표고버섯 분말의 품목제조사항을 변경함)

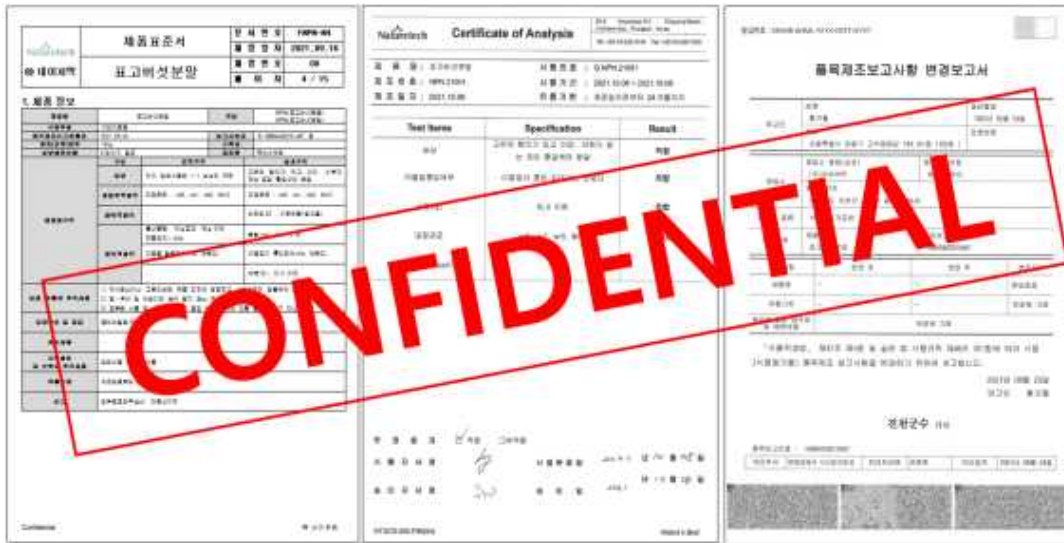


그림107. 표고버섯분말의 생산원료 등록 증빙

○ 개발 제품의 등록 및 대량생산 준비

- 1건의 일반식품 과 1건의 건강기능식품(유형: 비타민 D) 에 대한 시제품생산을 완료하고 각각의 제품에 대한 품목제조보고 및 신고를 완료하였음
- 일반식품은 최근 천연 조미료시장을 타겟으로 하여 버섯시즈닝 제품을 개발하였음. 향후 이 제품은 ‘일반식품기능성표시’ 제품으로 확대 개발을 진행하여 제품화 할 경우 시장성이 큰 것으로 기대됨



그림108. ‘자연담은 버섯 시즈닝’ 제품 사진 및 품목제조 보고서

- 건강기능식품(유형: 비타민 D) 은 Vit D2 전환 표고버섯 분말을 주원료로 하여 비타민 D 제품을 개발하였음. 안정성 시험이 완료되지 않은 상황에서 안정성을 확보하기 위하여 Vit D3와 혼합한 제품을 개발함. 향후 이 제품은 Vit D2 에 대한 안정성 결과를 확보한 후에는 식물성 비타민 제품군으로 개발 예정임
- 최근 각광받고 있는 비건 건강기능식품으로 개발하고자 함



시원 · 검사성적서

건장기능식품 품질제조보고서

CONFIDENTIAL

대한지왕리종리약품연구원

2022년 03월 14일

그림109. '엔티 비타민 D' 제품 사진 및 품목제조 보고서

○ 경제성 검토 및 경쟁 제품과 유효성 비교분석

- 시판되고 있는 천연 비타민 D 2 제품과 비타민 드링크제 등의 비타민 함량을 개발 제품과 비교분석하여 자료 확보함

표99. 시판 제품 과 자사 시제품의 비타민 함량 정보

No.	Sample	Vitamin D 구분	비타민 D/섭취량당	섭취량	공인기관 분석결과			성상	제품사진
					비타민D, ug/100g	비타민D ug/섭취량당	표시량 대비 함량%		
1	표고버섯유래 에이치케이 비타민디 4000	비타민D2	4000IU *	1600mg/2tablets	8777.87	140.4	-	정제	
2	뉴오리진 비타민D	비타민D2	10ug	300mg/tablet	4368	13.1	131	정제	
3	Mushroom vegan vitamin D	비타민D2	25ug	capsule* *	3694.21	25.9	103.6	정제	
4	뉴트리라이트 비타민 디 건강기능식품	비타민D2, 비타민D3	25ug	330.9mg/tablet	533.80, 8458.64	29.8	119.2	정제	
5	기분좋은활력 비타민D 1,000IU	비타민D3	25ug	100ml/병 ***	111.17	111.2	444.8	액상	
6	엔티 비타민 디 - 버섯(D2)	비타민D2	15ug	1.2g	1198.78	14.4	96	정제	
7	엔티 비타민 디 - 버섯(D3)	비타민D3	15ug	1.2g	1125.57	13.5	90	정제	
8	엔티 비타민 디 -버섯(D2+D3)	비타민D2, 비타민D3	30ug	1.2g	1626.13, 1307.95	35.2	117.3	정제	

- 경제성 검토

- 자사 엔티 비타민 디 제품의 1개월 섭취 단가는 약 13,000 ~ 15,000원으로 산정되었음
- 이에 국내브랜드 제품군 사이에서는 가격경쟁력이 우수한 것으로 평가되어 이 부분은 향후 마케팅 적용에 이점으로 작용될 것으로 예상됨
- 비건제품개발증시 제품단가의 상승이 예상되는 바 기존에 확보된 가격경쟁력을 바탕으로 추후 제품의 개발진행에 무리가 없을 것으로 기대됨

표 100. 국내 브랜드 제품의 섭취단가 산정

No.	Sample	Vitamin D 구분	가격(원)	포장단위	1회섭취량	섭취기간	1개월 섭취단가 (원)
1	표고버섯유래 에이치케이비타민D 4000	비타민D2	50,000	120정	2정	2개월	25,000
2	뉴오리진비타민D	비타민D2	38,000	60정	1정	2개월	19,000
3	Mushroom vegan vitamin D	비타민D2	9,99 유로 = 13344.98 원	60정	1정	2개월	>10,000
4	뉴트리라이트비타민 디 건강기능식품	비타민D2, 비타민D3	33,000	90정	1정	2	16,500

○ 후속 개발 제품에 대한 마스터플랜 수립

■ Vit D2 전환 표고버섯 분말의 대사체 분석

- 시험방법

- Sample: [Total sample, n = 3]

: 미처리표고버섯분말

: UVB-LED 처리표고버섯분말

: UVB Lamp처리표고버섯분말

- Metabolite extraction

: E-tube aliquot한 표고버섯분말 200 mg에 1mL [80% MeOH + IS (2-chloro-L-phenylalanine)] 을 넣어줌

: 80% MeOH이 담긴 표고버섯sample을 1분간 vortexing 및 10분간 sonication 진행함

: 이후 Mixer mill을 10분 동안 수행함

: 한 시간 동안 4°C에서 냉동보관

: Centrifuge를 10분/13,000rpm 후 filter 후 speed vac. 농축진행

: 건조된 샘플은 80%MeOH로 50,000ppm으로 농도를 맞춰 재용해 진행

(internal standard (IS)는 2-chloro-phenylalanine 을사용함)

- 분석 기기 정보

● **GC-TOF-MS** (Gas chromatography-Time of Flight-Mass spectrometry)



- GC system: Agilent 7890A
- Auto-sampler: L-PAL3
- Mass spectrometer: Pegasus III
- Column: Rtx-5MS (30 m length x 0.25 mm x 0.25 μm)
- Injection volume: 1μL [분석 농도: 50,000 ppm]
- Split ratio: Splitless
- Mass range: 50-800 m/z

● **GC-TOF-MS 분석 방법 및 분석 조건**

1. 앞서 재용해한 샘플 100 μL을 1.5 mL e-tube에 넣어 speed vac. 으로 건조 진행
2. 건조된 샘플은 oximation을 위해서 methoxyamine hydrochloride (20 mg/mL in pyridine) 를 50 μL를 넣어 30 °C에서 90 분간 반응 시킴.
3. Oximation이 완료 되면 Silylation를 위해 MSTFA 50 μL를 넣어 37 °C에서 30 분간 반응 시킴.
[MSTFA: N-Trimethylsilyl-N-methyl trifluoroacetamide]
4. 반응이 끝나면 Filter 후 auto sampler vial에 옮겨 담은 후, GC-TOF-MS 분석 수행

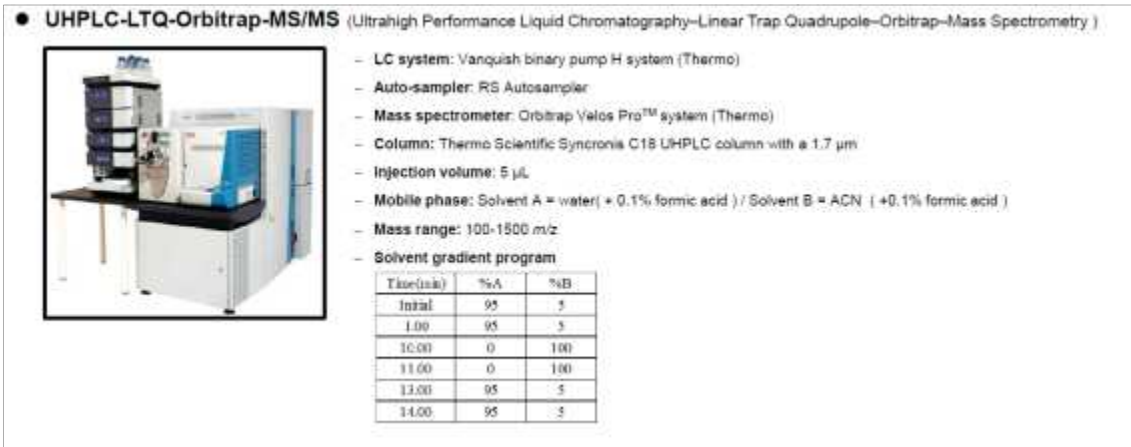


그림 110. 대사체 분석기기

• 대사체데이터처리

: .GC-TOF-MS & UHPLC-LTQ-Orbitrap-MS/MS Raw data는 ChromaTOF & Xcalibur 소프트웨어를 이용하여 cdf format 으로 변환함

: Metalign을 프로그램 이용하여 GC-TOF-MS & UHPLC-LTQ-Orbitrap-MS/MS data를 수치화 및 peak selection, alignment, baseline correction 등data processing을 수행함

• 다변량통계분석

: 앞서 Metalign을 통해 Data processing을 통해 얻은 수치화된 Data를SIMCA-P+ (Ver.12.0) 소프트웨어를 이용하여 다변량 통계 분석을 수행함

: PCA: Principal component analysis

: PLS-DA: Partial least squares discriminant analysis (그룹정보포함, Biased)

: VIP- The Variable Importance in the Projection

■ 시험결과

- 다변량 통계분석 결과[UHPLC-LTQ-Orbitrap-MS/MS /QC 포함]

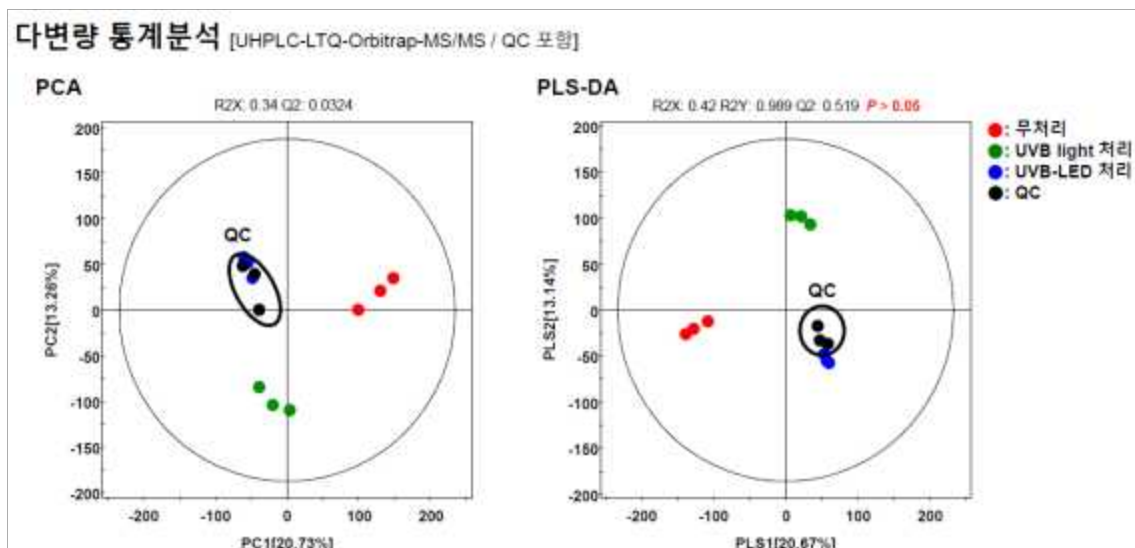


그림 111. 다변량 통계분석 결과[UHPLC-LTQ-Orbitrap-MS/MS /QC 포함]

- PCA 결과, 무처리, UV-Blight처리, UVB-LED 처리 그룹이 나뉘는 현상을 보임
- QC Sample은 잘 cluster된 것으로 보아 기기분석에는 문제가 없는 것으로 사료됨
- QC sample : 무처리, UVB light처리, UVB-LED처리 샘플 모두 pooling 한 샘플
- QC sample 분석이유 : 샘플이 분석되는 중간 중간에 QC 샘플 분석을 하여 Chromatogram의 변화 확인 및 분석이 원활하게 이루어졌는지 확인을 위해 분석 수행함
- PLS-DA 결과, 그룹별로 Clear하게 나뉘는 현상을 확인함 이후 QC를 제거하고 다시 통계분석을 수행함

- 다변량 통계분석 결과[UHPLC-LTQ-Orbitrap-MS/MS /QC 제외]

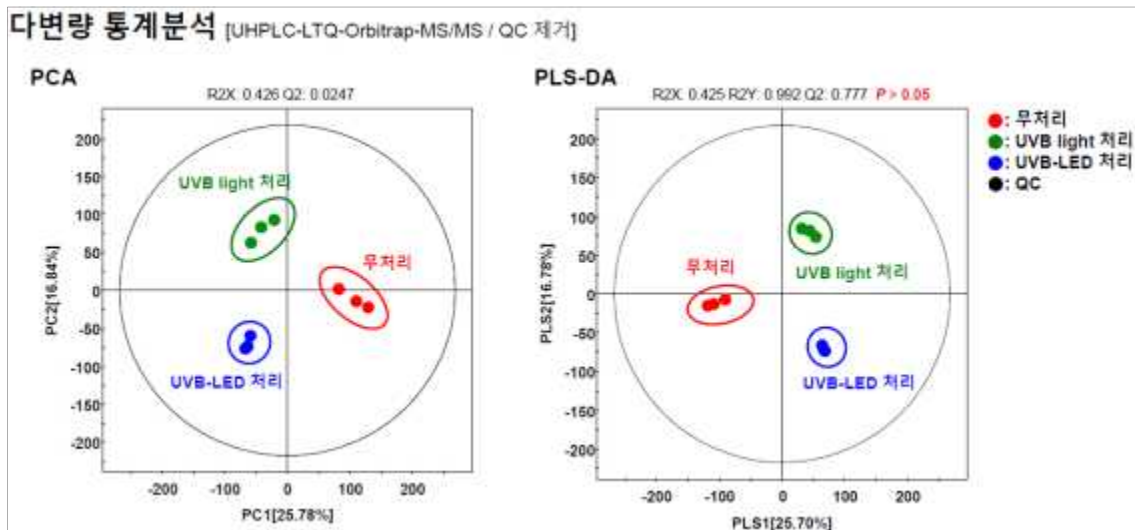


그림 112. 다변량 통계분석 결과[UHPLC-LTQ-Orbitrap-MS/MS /QC 포함]

- PCA 결과, 무처리, UVB light 처리, UVB-LED 처리 그룹이 각각 잘 나뉘는 현상을 보임
- PLS-DA 결과, PLS1 [25.70%]에 의해 무처리 그룹과 나머지 2 그룹이 나뉘며, UVB-light 처리 그룹이 UVB-LED 처리 그룹과 PLS2 [16.67%]에 의해서 나뉨
- PLS-DA 모델은 유의적인 차이를 보이지는 않지만, PLS-DA 모델을 기반으로 하여 차이나는 대사체 분석을 수행함

- UHPLC-LTQ-Orbitrap-MS/MS ID table [vip>1.0, pM0.05]

- PLS-DA 모델 기반으로 하여 그룹별로 차이 나는 대사체 분석 수행[VIP > 1.0, P < 0.05 기준]
- 차이나는 대사체 확인결과 총 51개 대사체가 검출됨
 - : Organic acids: 4개
 - : Amino acids & Peptides: 7개
 - : Flavonoids: 2개
 - : Fatty acids & Lipids: 17개

No.	Retention ^a	[M-H] ⁺	[M+H] ⁺	M.W. ^b	VIP1	VIP2	Tentative Identifications ^c	Molecular Formula	Mass fragment pattern (m/z) ^d	P ^e
Organic acids										
1	1.34	191.0768	-	192	1.62	1.35	Citric acid	C ₆ H ₈ O ₇	(-) 111, 173> 87	0.037
2	1.39	131.0353	-	132	0.27	1.54	Glucic acid	C ₆ H ₁₂ O ₆	(-) 87, 113	0.009
3	1.90	145.0510	-	146	1.85	1.32	Methylglutaric acid	C ₆ H ₁₀ O ₄	(-) 101, 127> 85	0.002
4	4.34	173.0924	-	174	0.29	1.58	Sebacic acid	C ₁₀ H ₁₈ O ₄	(-) 111, 120> 83	0.004
Amino acids & Peptides										
5	0.98	461.0080	463.0218	162	0.41	1.82	Lentiginic acid	C ₁₂ H ₂₂ N ₂ O ₁₀ S ₄	(-) 403, 301, 171, 215, 226, 278, 341, 291	0.002
6	4.52	202.1090	204.1228	203	0.80	1.47	<i>N</i> -Lactylleucine	C ₈ H ₁₇ N ₂ O ₄	(-) 158, 130> 114, 140> 84	0.012
7	4.90	306.1598	308.1736	307	1.80	1.38	Phe-Thr-Met	C ₁₈ H ₂₇ N ₃ O ₅ S	(+) 254> 266> 277	0.001
8	0.71	336.2591	338.2678	337	0.49	1.57	<i>N</i> -Lisoleoylglycine	C ₂₃ H ₄₃ N ₂ O ₃	(-) 292, 318> 295, 273	0.004
9	0.78	364.2857	366.2968	365	0.38	1.80	<i>N</i> -LisoleoylGABA	C ₂₂ H ₃₉ N ₂ O ₃	(-) 348> 381, 318> 243	0.003
10	0.93	350.2705	352.2830	351	0.64	1.54	<i>N</i> -Lisoleoylsarcosine	C ₂₁ H ₃₇ N ₂ O ₃	(-) 308, 332> 235	0.006
11	10.39	378.3010	380.3152	379	1.15	1.53	<i>N</i> -Lisoleoylvaline	C ₂₃ H ₄₁ N ₂ O ₃	(-) 118, 334> 88, 88	0.001
Flavonoids										
12	0.55	445.0788	447.0915	446	1.91	1.30	Baicalin	C ₁₅ H ₁₀ O ₁₁	(-) 259> 251, 241> 223	0.000
13	0.01	459.0940	461.1071	460	1.87	1.32	Wogonoside	C ₂₂ H ₂₀ O ₁₁	(-) 293> 299> 243, 212, 164, 223	0.002
Fatty acids & Lipids										
14	0.59	329.2330	331.2464	330	1.72	1.21	3 β -HDMG	C ₁₈ H ₃₄ O ₅	(-) 229, 311, 293> 211> 183	0.018
15	7.30	311.2233	-	312	1.62	1.15	Dihydroxy- ϵ -cadecadienoic acid	C ₁₈ H ₃₂ O ₄	(-) 293> 248, 275> 113, 99	0.036
16	7.50	309.2375	311.2502	310	0.57	1.44	HyOTC	C ₁₈ H ₃₀ O ₄	(-) 291, 209> 207, 125> 97	0.023
17	0.01	605.2805	607.3000	506	1.60	1.30	LyscP(18:2)	C ₂₇ H ₄₈ O ₁₂ P	(-) 315, 276, 241> 223, 152> 79	0.015
18	8.10	313.2394	315.2528	314	0.23	1.83	12,13-DHDMG	C ₁₈ H ₃₄ O ₄	(-) 291, 295, 277, 171, 183> 185> 137	0.002
19	0.17	482.2522	484.2661	483	1.81	1.32	LyscPS(15:0)	C ₂₁ H ₄₂ N ₂ O ₉ P	(-) 395> 153, 171> 79, 67	0.002
20	0.20	638.3304	640.3442	639	1.93	1.36	Hexoyl LPE(18:2)	C ₂₉ H ₅₄ N ₂ O ₁₂ P	(-) 470> 279> 261	0.000
21	0.21	667.2948	669.3070	668	1.11	1.46	PG(20:1)	C ₂₆ H ₄₈ O ₁₁ P	(-) 437, 433, 212> 153> 67, 79	0.004
22	0.27	520.2877	522.2808	521	1.89	1.34	LyscPS(18:2)	C ₂₄ H ₄₄ N ₂ O ₉ P	(-) 433> 153> 79, 67	0.004
23	0.48	476.2775	478.2914	477	1.02	1.41	LyscPE(18:2)	C ₂₃ H ₄₄ N ₂ O ₇ P	(-) 279, 415, 196> 201> 243	0.015
24	0.58	486.2978	488.2915	487	1.77	1.27	LyscPS(16:0)	C ₂₂ H ₄₄ N ₂ O ₉ P	(-) 438> 153> 79, 69	0.007
25	0.80	205.2276	-	206	0.19	1.45	HOCE	C ₁₈ H ₃₂ O ₃	(-) 277, 171, 195> 233> 161	0.026
26	0.89	478.2948	480.3073	479	1.82	1.30	LyscPE(18:1)	C ₂₃ H ₄₄ N ₂ O ₇ P	(-) 291, 198> 203> 159	0.001
27	0.20	540.3058	542.3094	495	1.27	1.30	LyscPC(16:0)	C ₂₄ H ₄₈ N ₂ O ₇ P	(-) 480> 235> 237	0.027
28	0.28	265.2123	267.2260	264	1.48	1.26	HOCE	C ₁₈ H ₃₀ O ₃	(-) 248, 165> 113> 57	0.017
29	0.34	666.3620	668.3753	667	1.88	1.30	PA-PS	C ₃₁ H ₅₈ N ₂ O ₁₂ P	(+) 348> 263, 330> 245	0.000
30	0.50	295.2332	297.2312	296	1.71	1.33	Palmitic acid	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	(-) 237, 211> 206	0.004

Others										
31	0.32	298.1080	300.1227	299	1.57	1.37	Caffeoyltyramine	C ₁₇ H ₁₇ N ₂ O ₄	(-) 135, 178	0.004
Unknowns										
32	4.58	351.1009	375.1629	352	1.03	1.28	N.I.1	-	(-) 187, 217, 307> 129> 97	0.012
33	4.83	519.1608	573.1661	550	1.07	1.26	N.I.2	-	(-) 255, 428> 135> 91	0.000
34	4.90	453.1401	499.1487	468	1.88	1.40	N.I.3	-	(-) 407> 227> 211	0.000
35	5.22	323.1173	325.1311	324	1.87	1.36	N.I.4	-	(-) 137, 235> 75	0.001
36	5.40	549.1611	551.1752	530	1.90	1.40	N.I.5	-	(-) 255, 428> 135> 91	0.000
37	6.08	483.3018	517.2672	484	1.43	1.27	N.I.6	-	(-) 320, 475> 511, 171> 203	0.024
38	6.15	463.2618	487.2876	464	1.05	1.51	N.I.7	-	(-) 320, 445> 311> 203	0.003
39	6.29	449.2755	477.2662	464	1.35	1.51	N.I.8	-	(-) 403, 329, 431> 311> 293, 171, 229	0.001
40	6.49	738.4193	740.4327	739	1.08	1.50	N.I.9	-	(-) 676> 329> 223, 311	0.003
41	0.54	375.1851	399.1607	376	0.95	1.71	N.I.10	-	(-) 255, 357, 191> 277> 233	0.000
42	0.90	821.3062	823.4100	822	1.87	1.42	N.I.11	-	(-) 351, 646, 759> 103, 290> 131, 175	0.000
43	7.80	429.2855	453.2815	430	1.39	1.41	N.I.12	-	(-) 265, 313> 277, 251> 233	0.005
44	0.01	682.3210	684.3345	683	1.74	1.30	N.I.13	-	(-) 433, 520> 153> 79, 97	0.006
45	0.24	658.3240	660.3341	659	1.70	1.21	N.I.14	-	(-) 400, 460> 153> 79, 07	0.016
46	0.27	1041.5379	1043.5559	1042	1.88	1.40	N.I.15	-	(-) 520> 433> 153	0.001
47	0.38	743.2389	745.2512	744	1.54	1.28	N.I.16	-	(-) 433, 477> 380, 348> 128	0.016
48	0.48	953.5636	955.5778	954	1.24	1.49	N.I.17	-	(-) 476> 279> 291	0.002
49	0.77	1003.6640	1005.6725	1003	0.97	1.61	N.I.18	-	(-) 504, 564, 1023> 279> 261	0.000
50	0.02	407.2612	409.3058	408	1.80	1.34	N.I.19	-	(-) 380, 345> 126	0.001
51	0.71	518.3708	474.3777	473	0.90	1.54	N.I.20	-	(-) 431, 450> 255> 237	0.002

^a Retention time; ^b Molecular weight; ^c Tentative metabolites based on VIP analysis with a cut off value of 1.0 and p-value < 0.05; ^d Mass fragment patterns detected in the negative ion mode; ^e P, One-way ANOVA

그림 113. 버섯 대사체 함량 분석 결과

- 차이나는 대사체 중 Baicalin 의 함량의 증대되는 것을 확인함



그림 114. 대사체 함량 비교 결과

: 바이칼린은 항 알러지 및 항염 효과가 있는 것으로 알려진 플라보노이드임

: 본 연구결과는 향후 Vit D2 전환 표고버섯 분말의 차별화 및 고부가가치를 가져올 수 있는 점으로 시사 되어 이를 바탕으로 특허를 출원함

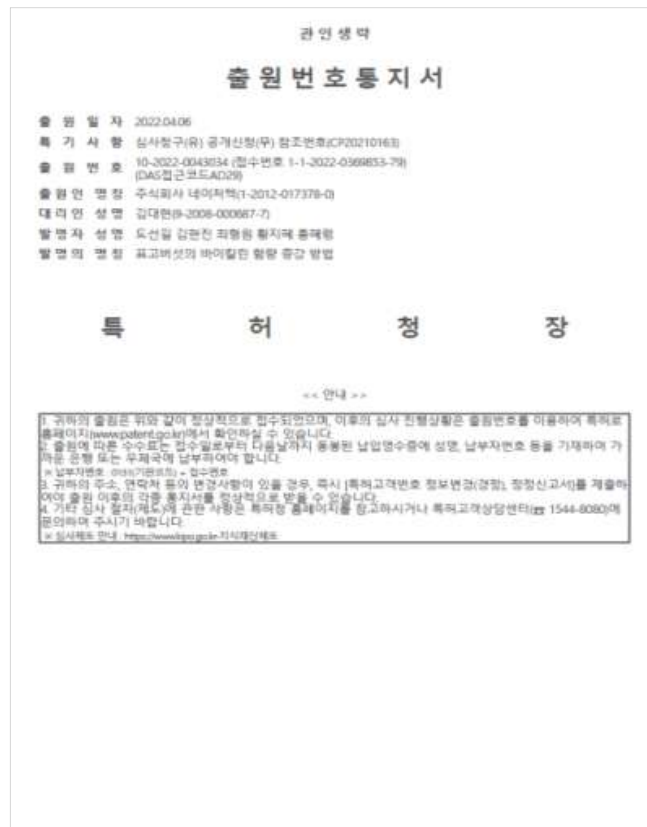


그림 115. 특허출원증 : 표고버섯의 바이칼린 함량 증강 방법

■ Vit D2 전환 표고버섯 분말의 효능 평가 : GAG 실험

- 시험방법

- Sample: 12주령의 뉴질랜드 흰 토끼의 양쪽 뒷다리 관절로부터 연골조직을 분리한 후 연골조직을 FBS가 첨가된 DMEM 배지에서 배양. 48시간 후 연골조직을 48-well plate에 30 mg/well로 넣은 후 1% FBS가 첨가된 DMEM 배양액에 후보 시료와 양성대조군인 diclofenac을 처리
- 시료 처리 1시간 뒤 IL-1 α 5 ng/ml을 처리한 후 37° C, 5% CO2 incubator에서 72시간 동안 배양 함
- 그 후 배양액을 blyscan dye와 반응시켜 656 nm에서 흡광도를 측정함으로써 GAG 양을 확인함

- 시험결과

- GAG은 연골조직을 구성하는 성분으로 proteoglycan이 분해되어 생성되는 물질임
- 본 실험에서는 버섯 vitamin D2가 proteoglycan 분해에 미치는 영향을 알아보하고자 함
- 예비 실험으로 토끼의 연골조직을 배양해 UV 4회 조사한 버섯추출물을 처리한 후 세포 배양액 안 의 GAG 양을 측정함
- 그 결과, IL-1 α 로 인해 연골분해가 촉진되면서 GAG 양이 증가하였지만 버섯추출물에 의해 감소 하는 효과는 나타나지 않음 (그림 116). 동일 조건으로 버섯 vitamin D2를 처리 하여 시험하였을 시 시료에 의한 효과가 나타나지 않음 (그림 117).
- 표고버섯추출물 및 Vit D2 는 연골조직보호에 직접적인 효과를 나타내지 않는 것으로 사료됨

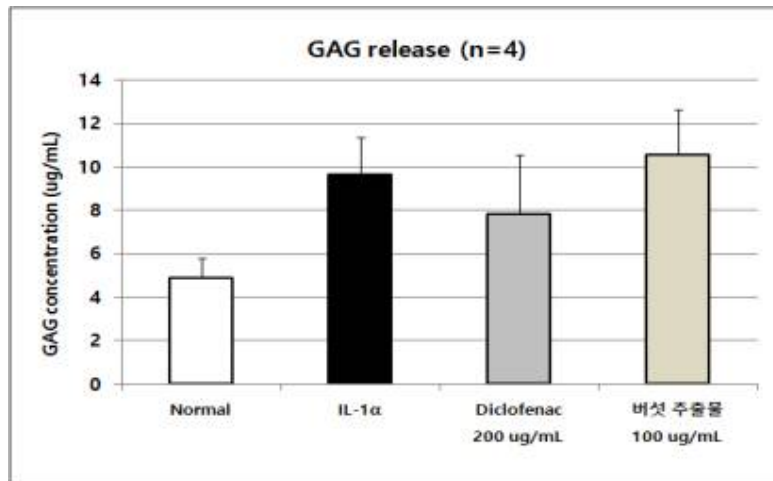


그림 116. 버섯추출물 연골 분해 억제 효능 평가

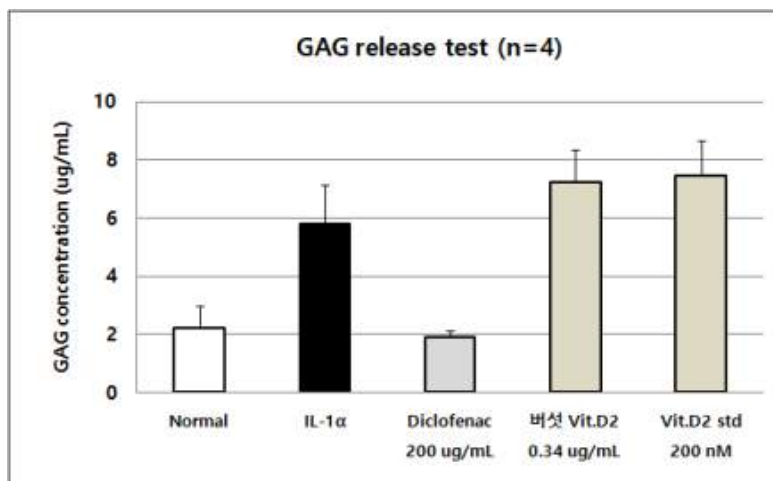


그림 117. 버섯 vitamin D2 연골 분해 억제 효능 평가

■ Vit D2 전환 표고버섯 분말의 마케팅 자료 확보 : 단회독성 시험

- 암수 Wistar rat을 이용하여 후보소재의 단회 경구투여 시 나타나는 독성 반응을 관찰하고 그 안전성을 평가하고, 14일 동안의 독성변화 여부를 확인하고자 함

- 실험방법

- 실험물질 용량 및 실험군 설정

: 모든 실험동물의 임상증상 및 건강상태를 관찰하였고 체중 및 임상증상을 바탕으로 무작위배정을 거쳐 군분리를 실시하였음

: 시험물질 투여 용량은 ‘비임상시험관리기준’ 식품 의약품안전처고시 제2018-93호에 의거하여 2,000 mg/kg 단회 용량과 대조군(증류수)으로 정하였고, 군당 5마리를 설정

- 안전성 지표 측정

: 관찰기간 동안 모든 동물에 대하여 1일 1회 이상 일반증상을 관찰

: 투여 후 0.5, 1, 2, 4시간, 1, 3, 7, 14일에 빈사와 사망동물의 유무를 확인

: 투여 개시일, 투여 개시 후부터 투여 1, 3, 7, 14일 까지 주1회 체중을 측정

- 실험 종료

: 모든 실험동물은 시험종료 1일 전 약 16시간 이상 절식 시킨 후, 부검일에 isoflurane으로 마취하여 전신의 장기 및 조직에 대해 상세한 육안검사를 실시

- 실험 결과

- 사망률 및 임상징후

: 연구 기간 동안 모든 투여 그룹의 동물에서 사망 및 임상증상은 관찰되지 않았음

표101. Mortality of a single oral toxicity study in Wistar rats.

Sex: Male

Group / Dose (mg/kg)	No. of ani mal s	Observation time (days)										Mortality (dead/total)	
		0	0.5 hr	1 hr	2 hr	4 hr	1	3	7	14			
대조군 G1 0	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5
버섯 분말 G2 2,00 0	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5

Sex: Female

Group / Dose (mg/kg)	No. of ani mal s	Observation time (days)										Mortality (dead/total)	
		0	0.5 hr	1 hr	2 hr	4 hr	1	3	7	14			
대조군 G3 0	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5
버섯 분말 G4	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5

- 체중

: 시험 물질에 의한 유의적인 체중 변화 나타나지 않음

표 102. Body weight of single oral toxicity study in Wistar rat.

Sex : Male

Group / Dose (mg/kg)		Observation time (days)					
		0	1	3	7	14	
대조군	G1 0	Mean	298.63	301.74	316.06	333.48	375.93
	(N=5)	S.D.	5.524	6.562	7.147	12.819	13.922
버섯분말	G2 2,000	Mean	298.21	301.25	316.63	346.90	390.75
		S.D.	5.548	5.438	9.517	11.632	23.609
	(N=5)	<i>p</i> value	0.454	0.453	0.459	0.061	0.131

Sex : Female

Group / Dose (mg/kg)		Observation time (days)					
		0	1	3	7	14	
대조군	G3 0	Mean	218.13	219.98	222.98	226.55	255.41
	(N=5)	S.D.	5.197	3.745	7.737	15.032	15.414
버섯분말	G4 2,000	Mean	218.36	223.65	222.59	238.66	257.06
		S.D.	5.187	4.519	5.794	4.300	1.119
	(N=5)	<i>p</i> value	0.473	0.100	0.465	0.061	0.408

- 부검 및 육안 관찰 소견

: 모든 시험 물질 투여군에서 시험물질 투여에 기인한 영향으로 판단되는 육안적 이상 소견은 관찰되지 않았음

표 103. Histopathological findings of single oral toxicity study in Wistar rat (Group summary)

Organ/ Findings	Gender	Male	Female
	Group / Dose (mg/kg)	-	-
No. of animals	-	-	

※ There were unremarkable changes in all the other

- 결론

: 표고버섯 분말 단회 경구투여 독성을 시험한 결과 14일 동안의 사망례, 임상증상, 체중 및 육안부검소견 등에서 독성 소견이 나타나지 않았다. 따라서 버섯 분말의 무독성량은 각 2,000 mg/kg 상회하는 것으로 판단됨

[참여기관 1 (대구대학교산학협력단)]

○ UV-B LED 처리로 Vit D₂ 전환된 표고버섯 시제품의 마우스 실험동물에서 칼슘흡수 및 간에 대한 항염증 효능 평가

■ 시험디자인

- UV-B LED 처리된 표고버섯 추출 비타민 D₂의 mouse에 대한 칼슘흡수 및 간의 항염증 효능 평가를 위하여 6개의 그룹으로 구분하여 5주령 수컷 BalB/c mouse를 대상으로 동물실험을 진행하였으며, 각 그룹 당 개체 수는 5마리로 합 본 연구에 사용된 사료의 조성은 표104에 나타냄
- 간에 대한 염증 유발은 CCl₄를 Olive oil로 10배 희석하여 300 ul씩 3일 간격으로 총 4회 mouse 복강 내 (i.p injection)에 투여함 본 연구에서는 (그룹 1)은 비타민 D 결핍사료를 급여한 그룹, (그룹 2)는 CCl₄ + 비타민 D 결핍사료를 급여한 그룹, (그룹 3)은 CCl₄ + 비타민 D 결핍사료에 경구로 100% 순도의 상업적 Vit D₂를 급여한 그룹, (그룹 4)는 CCl₄ + 비타민 D 결핍사료에 경구로 100% 순도의 상업적 Vit D₃를 급여한 그룹, (그룹 5)는 CCl₄ + 비타민 D 결핍사료에 경구로 Vit D₂ 전환된 표고버섯 분말을 급여한 그룹, (그룹 6)는 CCl₄ + 비타민 D 결핍사료에 경구로 Vit D₂ 전환된 표고버섯 추출물을 급여한 그룹으로 나누어 시험함 시험동물은 1주일간의 안정화기간을 거친후 14일 동안 진행하였으며, 매일 각각의 mouse에 대하여 0.25 µg/100 g of body weight의 양으로 비타민 D를 경구투여함 14일에 5마리의 동물을 희생하여 간조직과 혈액을 채취하여 주요 항목을 평가함 주요 시험 평가 항목은 체중변화, 혈액 serum내 1,25(OH)₂ 활성형 Vit D 함량, PTH 함량, 간 및 간 조직사진, 간조직 내 염증 바이오마커인 catalase, TNF-α, α-SMA 등을 Western blotting하여 정량 및 정성적으로 평가함

표 104. 본 연구에 사용된 mouse 사료 조성표

Composition	Vitamin-D Deficient Diet
Carbohydrate	397.49 g
Fiber	50.00 g
Protein	3.00 g
Vitamin	
Vitamin E Acetate	15.00 g
Niacin	3.00 g
Choline Bitartrate	2.50 g
Vitamin B ₁₂	2.50 g
Biotin	2.00 g
Pantothenic Acid	1.60 g
Vitamin A Acetate	0.80 g
Pyridoxine HCl	0.70 g
Thiamine HCl	0.60 g
Vitamin D ₂	-
Vitamin D ₃	-
Mineral	
Calcium Carbonate	357.00 g
Potassium Phosphate, Monobasic	196.00 g
Sodium Chloride	74.00 g
Potassium Citrate, Monohydrate	70.78 g
Potassium Sulfate	46.60 g
Magnesium Oxide	24.00 g
Ferric Citrate	6.06 g
Zinc Carbonate	1.65 g
Sodium Metasilicate	1.45 g
Manganese Carbonate Hydrate	0.63 g

■ 시험 방법 및 결과

- 체중 변화

- 실험동물을 대상으로 다양한 종류의 Vit D를 급이하면서 14일간 사육하면서 체중변화를 측정하였다. 그 결과는 표 105 및 <그림 1>에 나타내었다. 이 결과에 의하면 Vit D 결핍사료 및 다양한 Vit D 처리구간에 큰 차이가 없었으며, 대부분 40 ~ 45 g 내외의 범위에 있었다. 전체적으로 상업적 D₂ 사료를 급이한 그룹에서 가장 낮게 나타났으며, Vit D₂ 전환된 표고버섯 분말 (M.Powder)을 급이한 그룹이 가장 높게 나타났다.

표105. 14일간 Vit D 투여그룹의 Mouse 체중변화. Group 1; 대조구(Control)로서 비타민 D 결핍사료를 급이한 그룹, Group 2; CCl₄ + 비타민 D 결핍사료를 급이한 그룹 (CCl₄), Group 3; CCl₄ + 비타민 D 결핍사료에 경구로 100% 순도의 상업적 Vit D₂ (C.Vit D₂)를 급이한 그룹, Group 4; CCl₄ + 비타민 D 결핍사료에 경구로 100% 순도의 상업적 Vit D₃ (C.Vit D₃)를 급이한 그룹, Group 5; CCl₄ + 비타민 D 결핍사료에 경구로 Vit D₂ 전환된 표고버섯 분말 (M.Powder)을 급이한 그룹, Group 6; CCl₄ + 비타민 D 결핍사료에 경구로 Vit D₂ 전환된 표고버섯 추출물 (M.Extract)을 급이한 그룹.

Group Day	Body Weight of Group 1 (g)					Body Weight of Group 2 (g)					Body Weight of Group 3 (g)					Body Weight of Group 4 (g)					Body Weight of Group 5 (g)				
	1	46	40	42	38	38	48	40	42	38	34	42	40	40	40	36	42	46	40	38	36	44	46	44	44
2	44	38	42	36	40	46	40	42	38	32	40	40	38	42	36	40	44	38	38	36	42	44	42	42	34
3	42	40	42	36	40	44	40	42	40	34	42	42	38	42	38	42	46	42	40	38	46	46	44	44	40
4	40	40	42	36	42	46	42	40	40	34	42	42	38	42	36	44	44	40	38	41	44	46	42	44	45
5	40	40	42	38	42	46	44	38	36	42	42	40	38	42	34	42	42	40	36	42	44	46	44	44	40
6	34	40	42	36	44	46	42	38	36	44	42	40	38	33	32	42	42	42	36	43	44	46	44	42	40
7	42	40	42	38	45	47	44	38	38	39	43	41	39	34	35	44	42	44	36	40	44	46	42	44	42
8	42	40	44	38	44	44	41	40	38	40	44	42	38	34	35	42	40	44	36	38	42	44	42	44	40
9	38	40	44	38	44	46	42	40	38	34	42	42	38	32	33	42	40	40	38	38	44	44	42	44	40
10	44	40	44	38	44	44	43	40	36	36	40	42	40	40	32	42	38	40	36	36	42	43	41	44	42
11	46	42	44	43	45	47	44	38	38	39	43	41	39	34	35	44	42	44	36	37	44	46	42	44	42
12	42	44	45	46	43	44	42	40	38	40	44	42	38	34	34	42	40	44	36	36	42	44	42	44	40
13	45	44	46	42	45	46	42	40	38	34	42	42	38	32	35	42	40	40	38	39	44	44	42	44	40
14	43	44	44	42	44	44	44	40	36	36	40	42	40	41	32	42	38	40	36	40	42	43	41	44	44

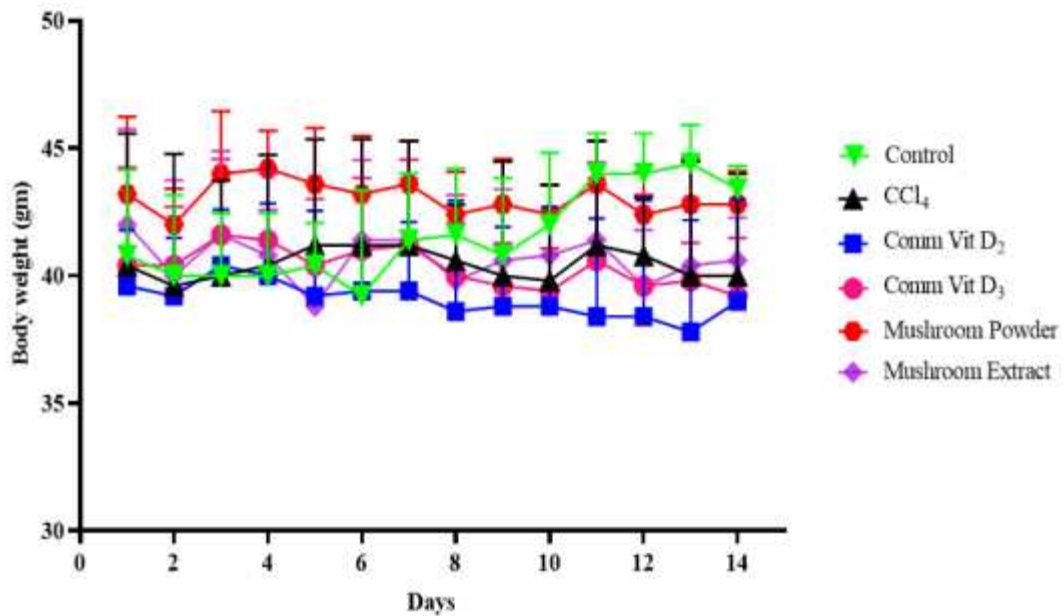


그림 118. CCl₄ 처리하여 독성이 유발된 mouse에서 14일간 다양한 Vit D 급이그룹의 체중변화. Group 1; 대조구로서 비타민 D 결핍사료를 급이한 그룹, Group 2; CCl₄ + 비타민 D 결핍사료를 급이한 그룹, Group 3; CCl₄ + 비타민 D 결핍사료에 경구로 100% 순도의 상업적 Vit D₂를 급이한 그룹, Group 4; CCl₄ + 비타민 D 결핍사료에 경구로 100% 순도의 상업적 Vit D₃를 급이한 그룹, Group 5; CCl₄ + 비타민 D 결핍사료에 경구로 Vit D₂ 전환된 표고버섯 분말을 급이한 그룹, Group 6; CCl₄ + 비타민 D 결핍사료에 경구로 Vit D₂ 전환된 표고버섯 추출물을 급이한 그룹. 매일 각각의 mouse에 대하여 0.25 µg/100 g of body weight의 양으로 비타민 D를 경구투여함

- 혈액분석결과

• 혈중 Vit D

: BalB/c mouse 실험동물로부터 14일째에 동물을 희생하여 혈액을 채취한 후 serum을 분리함 이로부터 1,25(OH)₂ 활성형 Vitamin D 함량을 분석하였다. 분석방법은 mouse serum 시료에 대하여 ELISA kit (KRR1971, Biocompare)를 사용하여 Enzyme Immunoassay 방법으로 정량하였으며, 분석 결과는 그림119에 나타냄 마우스 혈청에 존재하는 Vit D [1,25(OH)₂ Vit D] 는 Vit D₂ (Ergocalciferol) 및 Vit D₃ (Cholecalciferol) 전구체가 소장에서 흡수된 후 활성형으로 바뀐 것으로서 실제의 Vit D로서 역할을 수행함. Vit D는 칼슘흡수에 중요한 역할을 수행하며, Group 1에서 활성형 Vit D의 농도가 낮은 것은 사료가 Vit D 결핍사료이기 때문임 이에 비해 Group 2는 가장 낮은 활성형 Vit D의 농도를 나타냈으며, 그 이유는 mouse에 CCl₄를 처리함으로써 Vit D의 소모가 많아져서 Vit D 결핍사료 처리군보다 더욱 낮은 활성형 Vit D 값이 나온 것으로 판단됨 나머지 Vit D 급이 그룹은 CCl₄가 처리되었음에도 불구하고 상업적 혹은 표고버섯 유래의 Vit D₂ 또는 Vit D₃가 공급되어 활성형 Vit D의 농도가 2배 이상 높게 측정됨 특히 Vit D₂ 전환된 표고버섯 추출물을 급이한 그룹에서 가장 높은 활성형 Vit D가 측정되어 가장 좋은 결과를 얻음 이상의 결과에 의하면 혈장내 활성형 Vit D 함량은 Vit D 결핍 사료를 급이한 그룹에 비해서 상업적 및 버섯추출 Vit D를 급이한 모든 그룹에서 상대적으로 높게 나타남

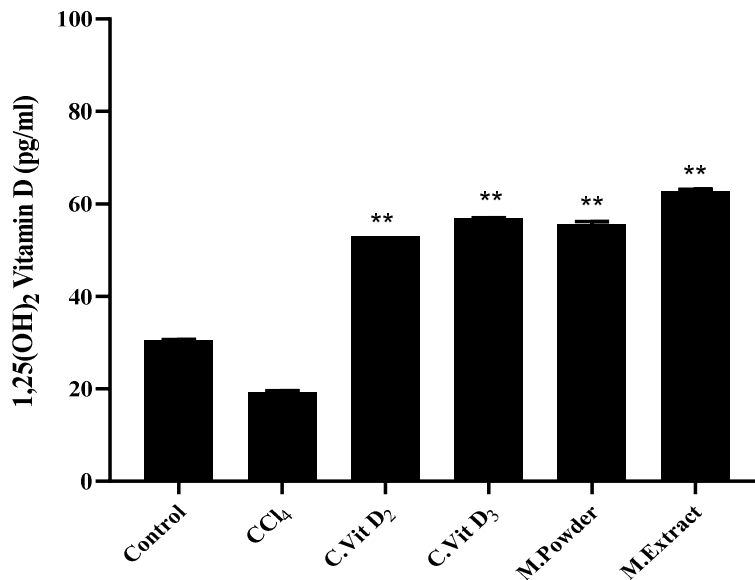


그림 119. 14일간 Vit D 투여후 mouse 혈액 serum내 1,25(OH)₂ 활성형 Vitamin D 함량 분석 결과. Group 1; 대조군(Control)로서 비타민 D 결핍사료를 급이한 그룹, Group 2; CCl₄ + 비타민 D 결핍사료를 급이한 그룹 (CCl₄), Group 3; CCl₄ + 비타민 D 결핍사료에 경구로 100% 순도의 상업적 Vit D₂ (C.Vit D₂)를 급이한 그룹, Group 4; CCl₄ + 비타민 D 결핍사료에 경구로 100% 순도의 상업적 Vit D₃ (C.Vit D₃)를 급이한 그룹, Group 5; CCl₄ + 비타민 D 결핍사료에 경구로 Vit D₂ 전환된 표고버섯 분말 (M.Powder)을 급이한 그룹, Group 6; CCl₄ + 비타민 D 결핍사료에 경구로 Vit D₂ 전환된 표고버섯 추출물 (M.Extract)을 급이한 그룹. 매일 각각의 mouse에 대하여 0.25 µg/100 g of body weight의 양으로 비타민 D를 경구투여함. 데이터는 3회의 독립 실험의 평균 ± S.D로 나타내었으며, *p < 0.05, **p < 0.01. 통계적 유의성은 prism ANOVA에 의해 분석됨

• 혈중 PTH (parathyroid hormone)

: BalB/c mouse 실험동물로부터 14일째에 동물을 희생하여 혈액을 채취한 후 serum을 분리하였다. 이로부터 PTH (parathyroid hormone) 함량을 정량함 분석방법은 mouse serum 시료에 대하여 ELISA kit (RIS003R, BioVendor)를 사용하여 Enzyme Immunoassay 방법으로 정량하였으며, 분석 결과는 <그림 3>에 나타냄 Vit D는 autocrine 및 paracrine 방식으로 호르몬의 기능을 수행하며, 가장 중요한 기능은 혈액내 칼슘농도의 유지에 관한 기능임 Vit D는 proximal 및 distal

intestines에서 Vit D receptor (VDR)와 결합하여 활성형 비타민 D인 $1,25(OH)_2$ Vit D로 변환되어 소장으로부터 칼슘흡수를 증가시킴 Vit D와 calcium은 Vit D receptor를 통하여 PTH 호르몬 생산을 조절한다는 것이 보고됨 또한 serum 내 활성성 비타민 D인 $1,25(OH)_2$ Vit D 함량은 serum 내에서 PTH 함량과 반비례 관계가 있음이 보고됨 그림120의 결과에서 보여주는 바와 같이 활성형 비타민 D 함량과 비교했을 때 정확히 반비례 관계에 있음을 알 수 있음 즉, CCl_4 급이구가 상대적으로 Vit D 처리구들에 비해서 PTH 함량이 높음을 알 수 있음 사람을 포함하여 늙은 동물에서 증가된 PTH 호르몬 함량은 뼈전환율과 뼈손실을 증가시켜 골다공증과 골절을 유발시키게 됨

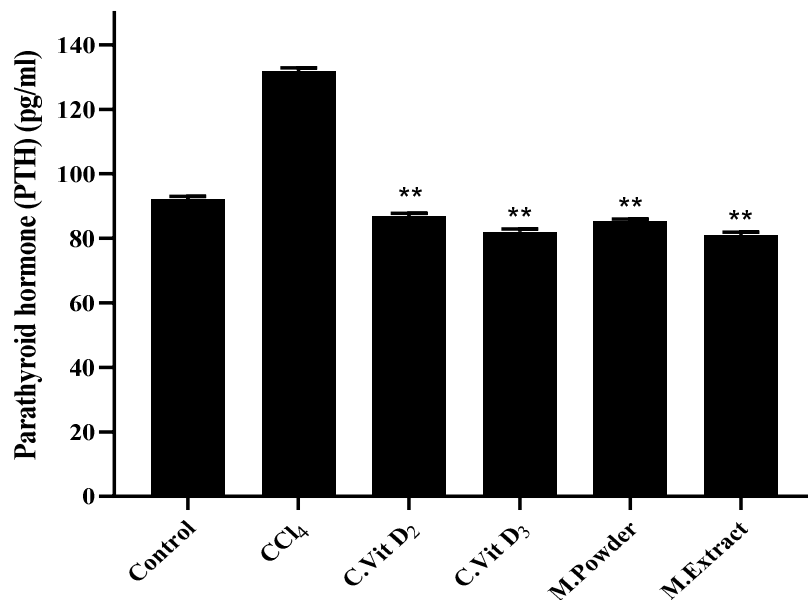


그림 120. 14일간 Vit D 투여후 mouse 혈액 serum내 PTH (parathyroid hormone) 함량 분석 결과 (n=5 in each group). Group 1; 대조구(Control)로서 비타민 D 결핍사료를 급이한 그룹, Group 2; CCl_4 + 비타민 D 결핍사료를 급이한 그룹 (CCl_4), Group 3; CCl_4 + 비타민 D 결핍사료에 경구로 100% 순도의 상업적 Vit D₂ (C.Vit D₂)를 급이한 그룹, Group 4; CCl_4 + 비타민 D 결핍사료에 경구로 100% 순도의 상업적 Vit D₃ (C.Vit D₃)를 급이한 그룹, Group 5; CCl_4 + 비타민 D 결핍사료에 경구로 Vit D₂ 전환된 표고버섯 분말 (M.Powder)을 급이한 그룹, Group 6; CCl_4 + 비타민 D 결핍사료에 경구로 Vit D₂ 전환된 표고버섯 추출물 (M.Extract)을 급이한 그룹. 매일 각각의 mouse에 대하여 0.25 μ g/100 g of body weight의 양으로 비타민 D를 경구투여함. 데이터는 3회의 독립 실험의 평균 \pm S.D로 나타내었으며, *p < 0.05, **p < 0.01. 통계적 유의성은 prism ANOVA에 의해 분석되었다.

• 간기능 지표

: 간기능 평가를 위하여 14일 동안 다양한 Vit D를 급이한 mouse의 혈장내 ALT (alanine aminotransferase), AST (aspartate aminotransferase) 함량을 측정하였음 이 결과에 의하면 CCl_4 처리한 그룹이 간손상이 가장 컸으며 혈장내 간기능은 대부분의 항목에서 Vit D 처리구에서 상대적으로 거의 손상이 없음 특히 표고버섯 추출물 Vit D₂의 분말과 추출물은 무처리구보다 낮은 가장 낮은 값을 가졌기 때문에 버섯 추출 비타민 Vit D₂를 처리한 그룹이 간손상을 복구하여 손상이 없음을 알 수 있음

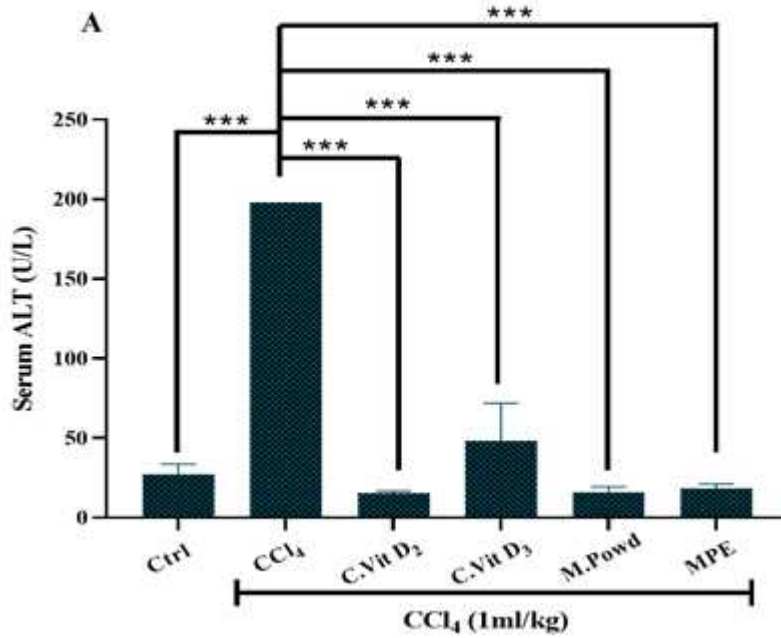
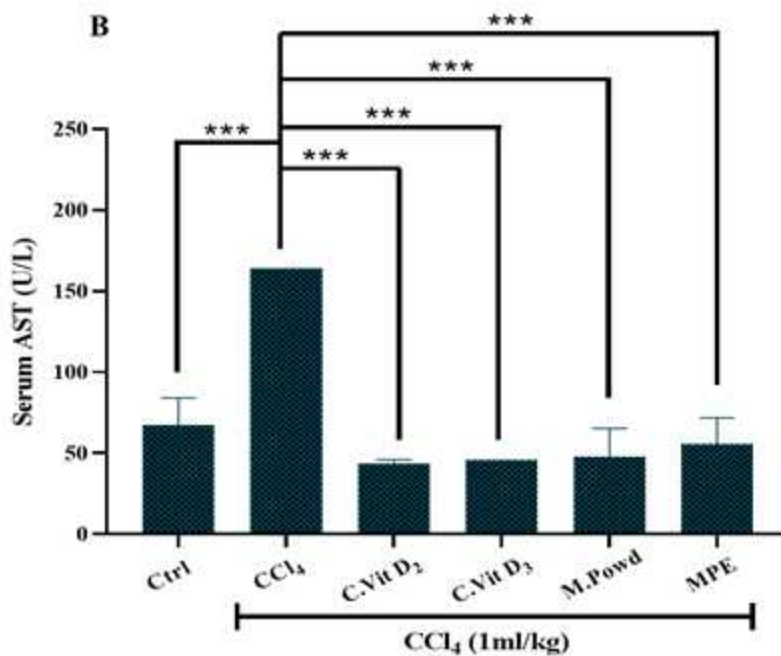


그림 121. 간기능 평가를 위한 14일간 Vit D 투여후 mouse 혈액 serum내 ALT (alanine aminotransferase) 함량 분석 결과 (n=5 in each group). Group 1; 대조구(Control)로서 비타민 D 결핍사료를 급이한 그룹, Group 2; CCl₄ + 비타민 D 결핍사료를 급이한 그룹 (CCl₄), Group 3; CCl₄ + 비타민 D 결핍사료에 경구로 100% 순도의 상업적 Vit D₂ (C.Vit D₂)를 급이한 그룹, Group 4; CCl₄ + 비타민 D 결핍사료에 경구로 100% 순도의 상업적 Vit D₃ (C.Vit D₃)를 급이한 그룹, Group 5; CCl₄ + 비타민 D 결핍사료에 경구로 Vit D₂ 전환된 표고버섯 분말 (M.Powder)을 급이한 그룹, Group 6; CCl₄ + 비타민 D 결핍사료에 경구로 Vit D₂ 전환된 표고버섯 추출물 (M.Extract)을 급이한 그룹. 매일 각각의 mouse에 대하여 0.25 µg/100 g of body weight의 양으로 비타민 D를 경구투여함 데이터는 3회의 독립 실험의 평균 ± S.D로 나타내었으며, *p < 0.05, **p < 0.01. 통계적 유의성은 prism ANOVA에 의해 분석됨



<그림 122> 간기능 평가를 위한 14일간 Vit D 투여후 mouse 혈액 serum내 AST (aspartate aminotransferase) 함량 분석 결과 (n=5 in each group). Group 1; 대조구(Control)로서 비타민 D 결핍사료를 급이한 그룹, Group 2; CCl₄ + 비타민 D 결핍사료를 급이한 그룹 (CCl₄), Group 3; CCl₄ + 비타민 D 결핍사료에 경구로 100% 순도의 상업적 Vit D₂ (C.Vit D₂)를 급이한 그룹, Group 4; CCl₄ + 비타민 D 결핍사료에 경구로 100% 순도의 상업적 Vit D₃ (C.Vit D₃)를 급이한 그룹, Group 5; CCl₄ + 비타민 D 결핍사료에 경구로 Vit D₂ 전환된 표고버섯 분말 (M.Powder)을 급이한 그룹, Group 6; CCl₄ + 비타민 D 결핍사료에 경구로 Vit D₂ 전환된 표고버섯 추출물 (M.Extract)을 급이한 그룹. 매일 각각의 mouse에 대하여 0.25 µg/100 g of body weight의 양으로 비타민 D를 경구투여함 데이터는 3회의 독립 실험의 평균 ± S.D로 나타내었으며, *p < 0.05, **p < 0.01. 통계적 유의성은 prism ANOVA에 의해 분석됨

결핍사료에 경구로 Vit D₂ 전환된 표고버섯 분말 (M.Powder)을 급이한 그룹, Group 6; CCl₄ + 비타민 D 결핍사료에 경구로 Vit D₂ 전환된 표고버섯 추출물 (M.Extract)을 급이한 그룹. 매일 각각의 mouse에 대하여 0.25 µg/100 g of body weight의 양으로 비타민 D를 경구투여함 데이터는 3회의 독립 실험의 평균 ± S.D로 나타내었으며, *p < 0.05, **p < 0.01. 통계적 유의성은 prism ANOVA에 의해 분석됨

- 간조직 분석결과

• 실험 방법

: BalB/c mouse 실험동물로부터 CCl₄ 유도된 간손상에서 Vit D₂ 전환된 표고버섯 분말과 추출물을 포함하는 다양한 Vit D를 급이한 시험동물 그룹에서 14일째에 동물을 희생하여 항염증 효과를 평가하기 위하여 간조직을 분리함 이로부터 간과 간조직을 Hematoxylin and Eosin (H&E) 염색, Picrosirius red 염색, H2DCHFDA 염색, TUNEL 분석 등 다양한 방법으로 염색하여 간조직의 손상과 항염증 및 간섬유화 저해 효과를 평가함

• H&E 염색 결과

: H&E 염색은 간조직의 조직학적 변화를 관찰하기 위하여 수행됨 시험방법은 간조직을 4% paraformaldehyde 용액에 1일동안 담구어 고정함 고정된 간조직은 에탄올과 자일렌 용액에 옮겨 담아 세척한 후 파라핀에 고정함 파라핀에 고정된 간조직은 HistoCore rotary microtome으로 6µm 두께로 절단함 이 절단된 시료를 슬라이드로 옮긴후 자일렌으로 세척하여 파라핀을 제거 후에 70, 80, 90, 100% 에탄올로 세척하여 시료를 탈수시킴 여기에 hematoxylin 용액에 15분간 담귀 염색함 염색약은 암모니아수에 30초 담구어 세척하고, 1% HCl-EtOH solution에서 재세척함 최종적으로 증류수로 세척후 eosin 용액으로 2분간 추가염색 함 염색된 시료는 자일렌과 에탄올로 고정하면서 탈수시켜 염색을 완료 H&E 염색된 시료는 200배의 배율로 광학현미경 하에서 관찰하였으며, 간과 간조직의 H&E 염색 결과는 <그림 123>에 나타냄

: 이 결과에 의하면 간과 간조직의 H&E 조직분석했을 때 CCl₄ 처리구는 간의 외형과 간조직이 매우 심하게 손상되었음을 알 수 있음 즉, 간의 손상은 간조직 형태의 파괴, 간세포조직 내부로 물질의 이동, 염증반응, 매듭 (nodule) 재생, 간섬유화 등의 다양한 형태로 나타냄 본 연구에서는 CCl₄를 3일 간격으로 4회 처리하였으며, CCl₄ 를 장기간 처리할 경우 간손상에 따른 apoptosis 및 necrosis (Guo et al., 2016)에 따른 세포사멸과 간섬유화, 간암 등이 유발될 수 있음(Zhao et al., 2015)고 보고되었다. CCl₄ 유도된 간손상에서 Vit D 급이에 따른 간손상 치유효과를 평가한 결과 Vit D 처리구는 모두 Vit D 결핍 사료 처리구에 비해 CCl₄를 처리했음에도 불구하고 간조직이 상대적으로 건강한 상태를 유지함 특히 상업적 Vit D₂ 및 D₃ 처리구보다 표고버섯 분말이나 표고버섯 추출물 Vit D₂를 처리한 그룹에서 간의 색상과 조직 모양에서 가장 좋은 상태를 보여줌 즉, 버섯추출물 Vit D₂ 처리시 간의 색깔이 선홍색을 띄고, 건강한 형태를 보이는 반면, CCl₄ 처리구 및 Vit D₃ 결핍처리구와 상업용 Vit D₃, Vit D₂ 처리구는 회백색 혹은 옅은 회백색의 간색깔을 보임으로써 전형적으로 손상된 간임을 확인할 수 있음 이 결과는 표고버섯 분말과 버섯추출물이 mouse에 대한 CCl₄ 처리에 의해서 유도되는 간독성을 해독하는 효과가 매우 크다는 것을 나타내는 결과로서 2차년도 Zebrafish 시험에서 독성 경감효과를 보였다는 결과와 매우 잘 일치하는 결과임 따라서 표고버섯 분말 및 추출물 비타민 D₂ 급이가 CCl₄ 유도된 간손상에서 다른 상업적 비타민 D₃ 및 D₂에 비해 mouse 간에 대한 간독성 경감 및 항염증 효능 증진이 일어남을 알 수 있음(<그림 123>).

- Group 1 Vit D deficient diet
- Group 2 CCl₄ + Vit D deficient diet
- Group 3 CCl₄ + Vit D deficient diet + Commercial Vit D₂
- Group 4 CCl₄ + Vit D deficient diet + Commercial Vit D₃
- Group 5 CCl₄ + Vit D deficient diet + Mushroom powder
- Group 6 CCl₄ + Vit D deficient diet + Mushroom liquid extract

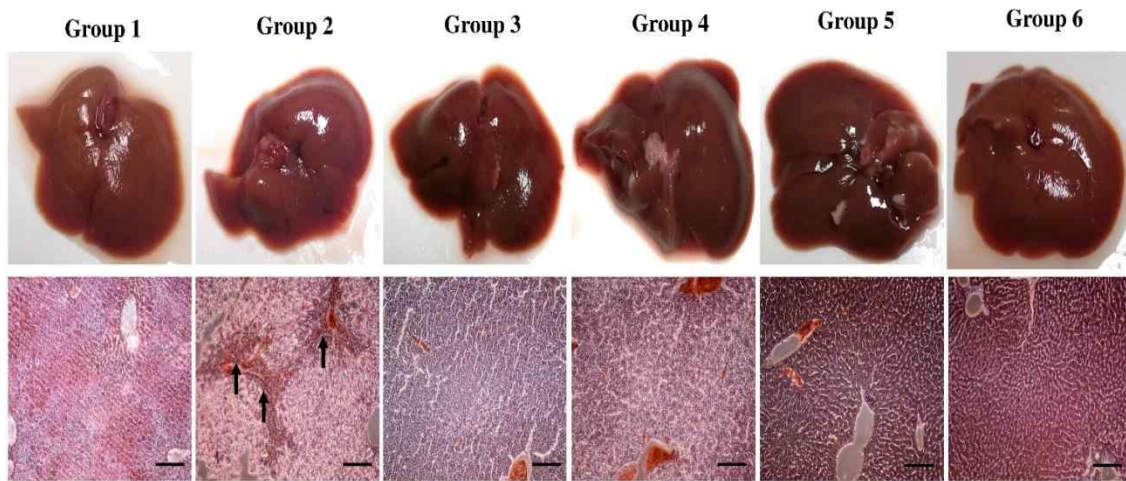


그림 123. CCl₄ 처리하여 손상된 mouse 간조직을 14일간 다양한 Vit D 급이로 회복된 간 및 간조직에 대한 H&E 분석 결과 (Scale bars: 100 μ m). Group 1; 대조구로서 비타민 D 결핍사료를 급이한 그룹, Group 2; CCl₄ + 비타민 D 결핍사료를 급이한 그룹, Group 3; CCl₄ + 비타민 D 결핍사료에 경구로 100% 순도의 상업적 Vit D₂를 급이한 그룹, Group 4; CCl₄ + 비타민 D 결핍사료에 경구로 100% 순도의 상업적 Vit D₃를 급이한 그룹, Group 5; CCl₄ + 비타민 D 결핍사료에 경구로 Vit D₂ 전환된 표고버섯 분말을 급이한 그룹, Group 6; CCl₄ + 비타민 D 결핍사료에 경구로 Vit D₂ 전환된 표고버섯 추출물을 급이한 그룹. 매일 각각의 mouse에 대하여 0.25 μ g/100 g of body weight의 양으로 비타민 D를 경구투여함 매일 각각의 mouse에 대하여 0.25 μ g/100 g of body weight의 양으로 비타민 D를 경구투여함

• Picrosirius red 염색 결과

: 마우스에서 CCl₄ 처리에 따른 간조직 손상의 결과 간섬유화에 따른 콜라겐 섬유 축적과 Vit D의 급이에 따른 치유효과를 Picrosirius red 염색으로 평가함 Picrosirius red 염색법에 대한 시험방법은 파라핀 코팅한 간조직 슬라이드를 제조한 후 자일렌 용액으로 파라핀을 제거하고 에탄올로 탈수시킨 후에 10분 동안 흐르는 물에서 세척한 후 10분 동안 hematoxylin으로 염색함 추가적으로 Sirius red 용액으로 1시간 염색한 후 산성수로 2번 세척 후에 잔류액을 100% 에탄올에 5분간 침지시켜 탈수시킴 탈수시킨 시료는 자일렌으로 세척 및 건조한후 광학현미경으로 관찰함

: 그 결과 <그림 124>의 결과에서 보여주는 바와 같이 CCl₄ 처리구는 화살표로 표시된 바와 같이 붉은색 혈관과 작은 소엽 (lobule)들이 무수히 겹쳐있음을 볼 수 있음 이와 같은 소엽들이 콜라겐층으로 섬유화가 많이 진행되었음을 나타냄 다양한 Vit D 급이구는 대체적으로 혈관과 소엽이 CCl₄ 급이구에 비해 현저히 감소하였으며, 이 중에서도 표고버섯 분말과 추출물을 급이한 그룹에서 현저히 감소함을 알 수 있음

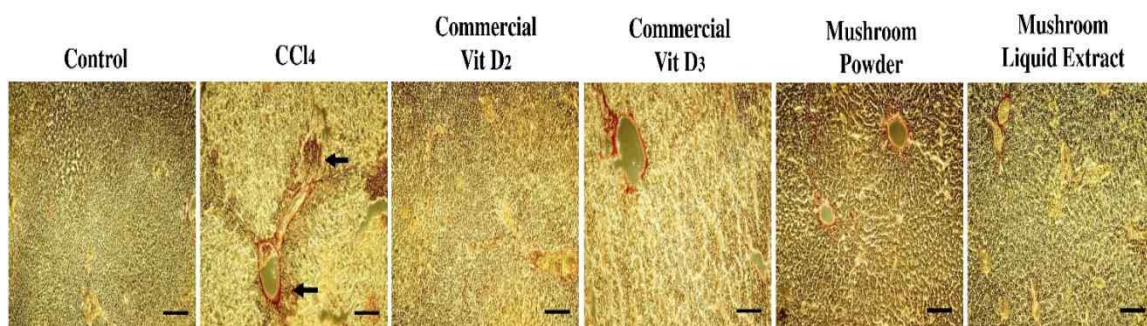


그림 124. CCl₄ 처리하여 간손상된 mouse에 14일간 다양한 Vit D 급이후 Picosirius red 염색을 통하여 콜라겐 응집여부로 간섬유화 정도를 분석한 결과 (Scale bars: 100 μm). Group 1; 대조구로서 비타민 D 결핍사료를 급이한 그룹, Group 2; CCl₄ + 비타민 D 결핍사료를 급이한 그룹, Group 3; CCl₄ + 비타민 D 결핍사료에 경구로 100% 순도의 상업적 Vit D₂를 급이한 그룹, Group 4; CCl₄ + 비타민 D 결핍사료에 경구로 100% 순도의 상업적 Vit D₃를 급이한 그룹, Group 5; CCl₄ + 비타민 D 결핍사료에 경구로 Vit D₂ 전환된 표고버섯 분말을 급이한 그룹, Group 6; CCl₄ + 비타민 D 결핍사료에 경구로 Vit D₂ 전환된 표고버섯 추출물을 급이한 그룹. 매일 각각의 mouse에 대하여 0.25 μg/100 g of body weight의 양으로 비타민 D를 경구투여함

• H2DCHFDA 염색 결과

: 마우스에서 CCl₄ 처리에 따른 간조직 손상의 결과 산화적 스트레스로 ROS (reactive oxygen species) 생성에 따른 독성 효과와 다양한 Vit D의 급이에 따른 치유효과를 H2DCHFDA 염색으로 평가함 (Koyama et al., 2014). H2DCHFDA 염색법에 대한 시험방법은 파라핀 코팅한 간조직 슬라이드를 제조한 후 얼음물에서 냉각한 100% 메탄올 용액으로 5분간 침지하여 고정함 이 슬라이드를 PBST (phosphate buffer saline with tween)로 세척하고 아세톤에 7분간 추가적으로 침지함 다음 단계로 3% BSA 용액에서 40C, overnight 동안 blocking 시킨다음 증류수로 2 ~ 5분간 세척 한 후 이것을 PBST buffer로 3분씩 4번 추가적으로 세척하고, 10 μM H2DCFDA 용액으로 30분간 37도에서 염색함 각 시료의 ROS 생성유무는 epi-fluorescence 현미경 (Nikon Eclipse TS200, Nikon Corp., Tokyo, Japan)으로 200배 배율로 관찰 한 결과 CCl₄ 처리구는 CCl₄에 의한 산화적 스트레스가 유도되면 H2DCFDA 용액이 세포속으로 흘러 들어가서 세포내 esterase에 의하여 탈아세틸화가 일어나 DCF로 변환되어 밝은 연녹빛 형광색을 형성하여 많은 양의 ROS가 생성됨을 확인할 수 있음 이에 비해 CCl₄ 처리와 함께 Vit D 급이구들은 대체적으로 CCl₄ 단독 급이구에 비해 밝은 연녹빛 형광색이 현저히 감소하였으므로 ROS 생성이 급감함을 확인할 수 있음 특히 이 중에서도 표고버섯 추출물을 급이한 그룹에서 형광색이 가장 많이 감소함을 관찰할 수 있었기 때문에 Vit D₂ 함유 표고버섯 추출물이 CCl₄에 의한 산화적 스트레스로 유도되는 간독성을 가장 많이 경감시킴을 알 수 있음

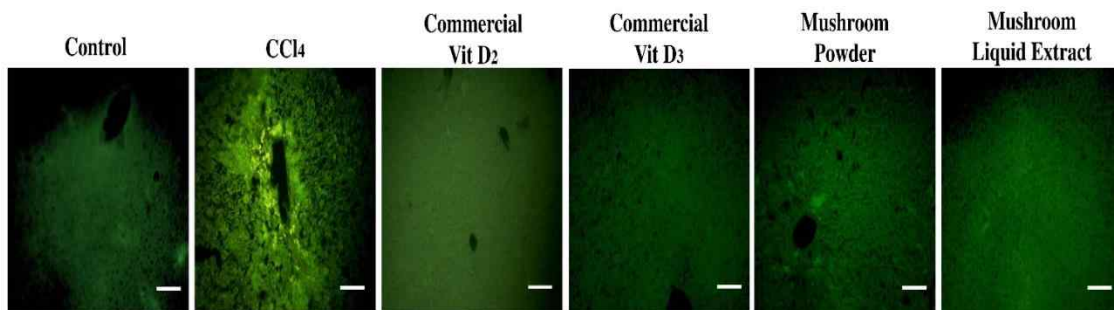


그림 125. CCl₄ 처리하여 손상된 mouse 간조직에 14일간 다양한 Vit D 급이하여 산화적 스트레스에 의해 유도된 간독성에서 회복된 정도를 H2DCFDA 형광염색으로 분석한 결과 (Scale bars: 100 μm). Group 1; 대조구로서 비타민 D 결핍사료를 급이한 그룹, Group 2; CCl₄ + 비타민 D 결핍사료를 급이한 그룹, Group 3; CCl₄ + 비타민 D 결핍사료에 경구로 100% 순도의 상업적 Vit D₂를 급이한 그룹, Group 4; CCl₄ + 비타민 D 결핍사료에 경구로 100% 순도의 상업적 Vit D₃를 급이한 그룹, Group 5; CCl₄ + 비타민 D 결핍사료에 경구로 Vit D₂ 전환된 표고버섯 분말을 급이한 그룹, Group 6; CCl₄ + 비타민 D 결핍사료에 경구로 Vit D₂ 전환된 표고버섯 추출물을 급이한 그룹 매일 각각의 mouse에 대하여 0.25 μg/100 g of body weight의 양으로 비타민 D를 경구투여함

• TUNEL 염색 결과

: 마우스에서 CCl₄ 처리에 따른 간조직 손상으로 apoptosis를 유발하여 세포사멸되는 조건에서 다양한 Vit D의 급이에 따른 치유효과를 TUNEL (Terminal Deoxynucleotidyl Transferase-Mediated dUTP Biotin Nick End Labeling) assay로 평가함 TUNEL assay에 대한 시험방법은 파라핀 코팅한 간조직 슬라이드에 TUNEL peroxidase detection kit (Dead End™ Colorimetric TUNEL System, Promega)를 사용하여 분석함 구체적으로 설명하면 간조직 슬라이드를 100, 95, 85, 70, 50% 에탄올 용액으로 순차적으로 낮은 농도로 각각 3분간 세척한 후 5분동안 자일렌 용액으로 2번 더 세척함 이것을 PBS buffer로 세척한 후 추가적으로 0.85% NaCl 용액에 5분동안 침지함 이 간조직 슬라이드를 다시 PBS

buffer로 세척하고 4% paraformaldehyde 용액에 5분씩 3번 총 15분동안 침지하여 고정시킴 여기에 20 g/mL 농도의 100 μ l proteinase K 용액을 처리하고, 30분 동안 상온에서 반응시킴 반응이 끝난 슬라이드를 4% paraformaldehyde 용액으로 재고정하고 PBS buffer로 5분간 2번 세척한 후 100 μ l equilibration buffer를 10분간 처리함 이렇게 준비한 간조직에 plastic coverslips을 덮은 다음 100 μ l의 TdT reaction mix를 처리하고 1시간 동안 37°C에서 반응시킴 반응이 끝난 간조직 슬라이드를 plastic coverslips을 제거한 후, 2배의 SSC buffer에 15분간 침지시킴 이 슬라이드를 PBS buffer로 5분간 2번 세척한 다음 0.3% H₂O₂ 용액과 반응시킴 그 후 5분간 PBS buffer로 다시 세척하고, 100 μ l의 streptavidin HRP (1:500 in PBS)로 상온에서 30분간 반응시킴 반응물은 PBS buffer로 5분 세척하고 DAB 용액을 처리한 다음 밝은 갈색이 나올 때까지 반응시킴 반응이 끝난 간조직 슬라이드는 형광현미경 하에서 관찰함 그 결과 CCl₄ 처리구는 화살표로 표시한 바와 같이 CCl₄에 의한 세포손상으로 apoptosis가 유도된 세포사멸이 슬라이드의 대부분에서 밝은 갈색을 띄면서 관찰됨 이에 비해 CCl₄ 처리와 함께 다양한 Vit D 급이구는 대체적으로 CCl₄ 단독 급이구에 비해 밝은 갈색 부위가 현저히 감소하였으므로 apoptosis에 의한 세포사멸이 거의 발생하지 않을 정도로 조직이 회복되었음을 확인할 수 있음 특히 그 중에서도 표고버섯 분말과 추출물을 급이한 그룹에서 밝은 갈색이 가장 많이 감소함을 관찰할 수 있었기 때문에 Vit D₂ 함유 표고버섯 분말과 추출물이 CCl₄에 의한 간세포 사멸을 가장 많이 경감시킴을 알 수 있음

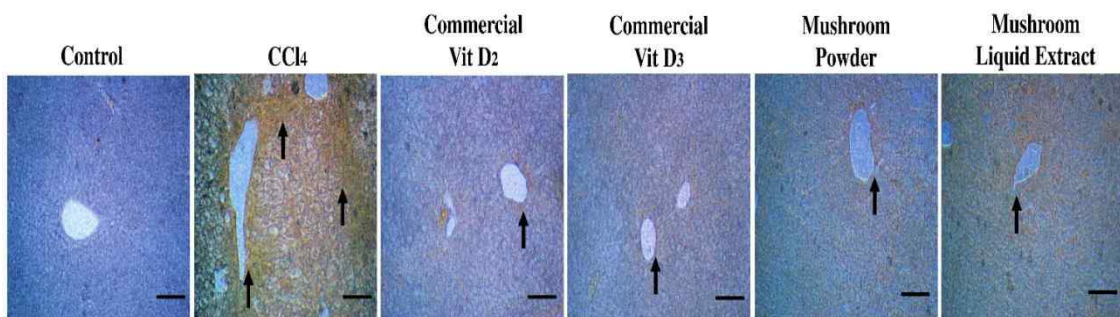


그림 126. CCl₄ 처리하여 손상된 mouse 간조직에 14일간 다양한 Vit D 급이하여 apoptosis에 의한 세포사멸에서 회복된 정도를 TUNEL assay로 분석한 결과 (Scale bars: 100 μ m). Group 1; 대조구로서 비타민 D 결핍사료를 급이한 그룹, Group 2; CCl₄ + 비타민 D 결핍사료를 급이한 그룹, Group 3; CCl₄ + 비타민 D 결핍사료에 경구로 100% 순도의 상업적 Vit D₂를 급이한 그룹, Group 4; CCl₄ + 비타민 D 결핍사료에 경구로 100% 순도의 상업적 Vit D₃를 급이한 그룹, Group 5; CCl₄ + 비타민 D 결핍사료에 경구로 Vit D₂ 전환된 표고버섯 분말을 급이한 그룹, Group 6; CCl₄ + 비타민 D 결핍사료에 경구로 Vit D₂ 전환된 표고버섯 추출물을 급이한 그룹. 매일 각각의 mouse에 대하여 0.25 μ g/100 g of body weight의 양으로 비타민 D를 경구투여함

- 간조직의 항염증 및 간섬유화 관련 단백질 발현 관찰

: 마우스에서 CCl₄ 처리에 따른 간조직 손상에 대한 다양한 Vit D 급이에 따른 항염증 및 간섬유화 치유효과를 catalase, TNF- α , α -SMA 단백질 항체를 이용한 바이오마커로 Western blotting 방법으로 정성적 및 정량적으로 평가함 Western blotting에 대한 시험방법은 보관중인 각 시험 그룹에 대한 간조직을 일정량 절단한 후 RIPA buffer에서 homogenizing하여 분쇄한 후, 14,000 rpm에서 15분간 원심분리하여 total protein을 얻음 Bradford 시약으로 단백질을 정량한 후 동일한 양의 단백질을 SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis)로 전기영동하여 분리함 분리된 단백질 gel을 nitrocellulose membrane으로 옮긴 후, 5% skim milk 용액으로 상온에서 1시간 blocking 시킴 이 단백질을 1차 항체로 4°C에서 overnight 동안 반응시킨 후 2차 항체를 처리하여 1차 항체와 반응하는 각각의 단백질 band를 확인함 각각의 항체 반응된 단백질의 Western blotting 이미지와 상대적인 단백질의 정량은 Amersham Imager 680 Blot 및 Gel Imager (GE Healthcare)를 이용하여 분석함

: 마우스에서 CCl₄ 처리에 따른 간조직 손상의 결과 항산화효소인 catalase가 감소함 Catalase는

H2O2 제거와 관련된 효소로서 CCl4 유도된 간손상을 회복하는 데 관련된 단백질로 독성이 강한 H2O2를 분해하여 무독한 H2O와 O2를 생성시키는 효소임(Bohinski, Melius, & Friedman, 1976; El-Sayed, Lotfy, El-Khawaga, Nasif, & El-Shahat, 2006). 다양한 Vit D 급이그룹에서, CCl4를 동시에 처리하였음에도 불구하고 catalase 단백질 발현이 현저히 증가함으로써 간손상에 대한 방어효과가 크다는 것을 알 수 있음 ($p < 0.001$) 특히 상업적 Vit D2 처리구와 Vit D2 함유 표고버섯 추출물 처리구에서 CCl4 처리구에 비해 2.5배 이상의 높은 catalase 단백질 발현량을 보여줌 이상의 결과로부터 Vit D 급이구들은 Vit D에 의해 catalase 생성이 촉진되어 mouse 간손상을 회복시키는 능력이 증진됨을 확인시켜줌

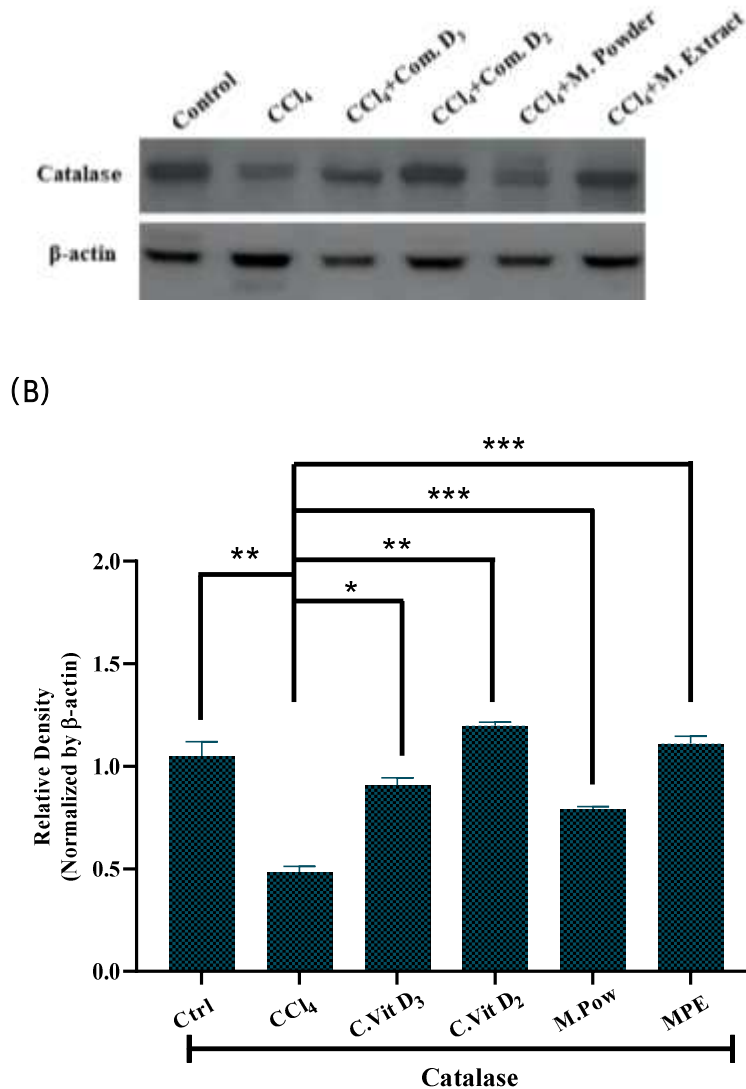
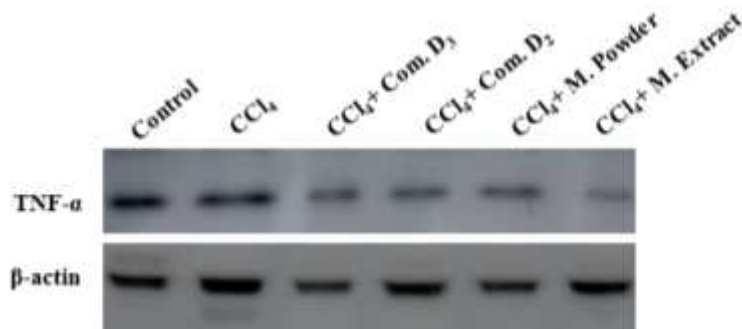


그림 127. CCl4 처리하여 손상된 mouse 간조직에 14일간 다양한 Vit D 급이한 후 발현된 catalase 단백질의 (A) Western blotting 및 (B) 상대적 단백질 정량 결과 Group 1; 대조구로서 비타민 D 결핍사료를 급이한 그룹, Group 2; CCl4 + 비타민 D 결핍사료를 급이한 그룹, Group 3; CCl4 + 비타민 D 결핍사료에 경구로 100% 순도의 상업적 Vit D2를 급이한 그룹, Group 4; CCl4 + 비타민 D 결핍사료에 경구로 100% 순도의 상업적 Vit D3를 급이한 그룹, Group 5; CCl4 + 비타민 D 결핍사료에 경구로 Vit D2 전환된 표고버섯 분말을 급이한 그룹, Group 6; CCl4 + 비타민 D 결핍사료에 경구로 Vit D2 전환된 표고버섯 추출물을 급이한 그룹. 매일 각각의 mouse에 대하여 0.25 μ g/100 g of body weight의 양으로 비타민 D를 경구투여함 데이터는 3회의 독립 실험의 평균 \pm S.D로 나타내었으며, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. 통계적 유의성은 prism ANOVA에 의해 분석됨

: 마우스에서 CCl4 처리에 따른 간조직 손상을 분석한 결과 항염증 지표인 TNF- α 단백질 발현이 증가하였다. TNF- α (tumor necrosis factor-alpha) 단백질 발현의 증가는 TLRs (Toll-like

receptors)와 MAPK (mitogen-activated protein kinases)를 활성화시킴 이와 같이 활성화된 염증반응은 다시 연쇄적으로 NF- κ B (nuclear factor kappa-light-chain- enhancer of activated B cells) 경로를 활성화시키게 됨 본 연구에서는 다양한 Vit D를 급이한 그룹에서 CCl₄를 동시에 처리하였음에도 불구하고 TNF- α 단백질 발현이 현저히 억제됨으로써 간손상에 의한 염증반응에서 방어효과가 매우 크다는 것을 알 수 있음 ($p < 0.001$). 특히 Vit D2 함유 표고버섯 추출물 처리구에서 CCl₄ 처리구에 비해 3배 이상의 낮은 TNF- α 단백질 발현량을 보여줌 이상의 결과로부터 Vit D 급이구들은 다양한 Vit D에 의해 항염증인자인 TNF- α 생성이 억제되어 mouse 간손상을 회복시키는 능력이 증진됨을 확인시켜 줌



(B)

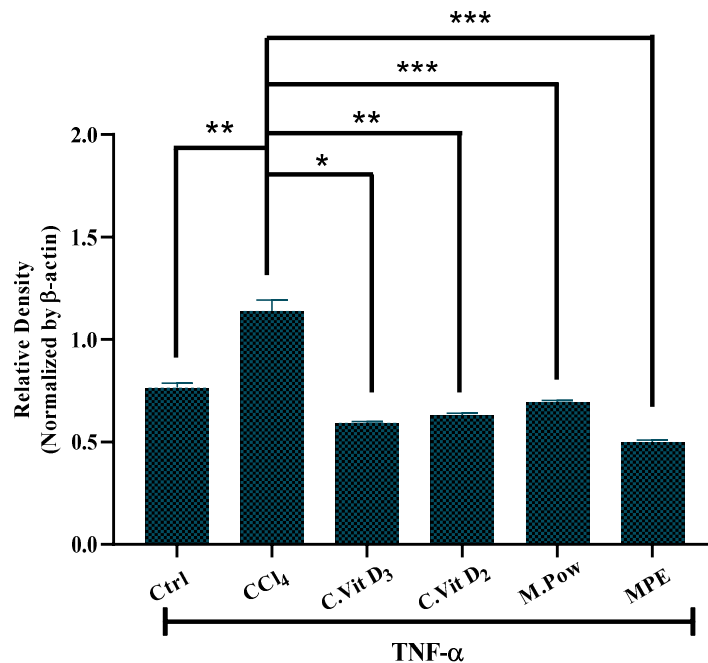


그림 128. CCl₄ 처리하여 손상된 mouse 간조직에 14일간 다양한 Vit D 급이한 후 발현된 TNF- α 단백질의 (A) Western blotting 및 (B) 상대적 단백질 정량 결과. Group 1; 대조구로서 비타민 D 결핍사료를 급이한 그룹, Group 2; CCl₄ + 비타민 D 결핍사료를 급이한 그룹, Group 3; CCl₄ + 비타민 D 결핍사료에 경구로 100% 순도의 상업적 Vit D2를 급이한 그룹, Group 4; CCl₄ + 비타민 D 결핍사료에 경구로 100% 순도의 상업적 Vit D3를 급이한 그룹, Group 5; CCl₄ + 비타민 D 결핍사료에 경구로 Vit D2 전환된 표고버섯 분말을 급이한 그룹, Group 6; CCl₄ + 비타민 D 결핍사료에 경구로 Vit D2 전환된 표고버섯 추출물을 급이한 그룹. 매일 각각의 mouse에 대하여 0.25 μ g/100 g of body weight의 양으로 비타민 D를 경구투여함 데이터는 3회의 독립 실험의 평균 \pm S.D로 나타내었으며, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. 통계적 유의성은 prism ANOVA에 의해 분석됨

: 다른 항염증 바이오마커인 IL-6를 사용하여 CCl4로 손상된 mouse 간조직의 Vit D에 의한 항염증 효과를 평가함 다양한 Vit D를 급이한 그룹에서 CCl4를 동시에 처리하였음에도 불구하고 IL-6 사이토카인 단백질 발현이 현저히 억제됨으로써 간손상에 의한 염증반응에서 방어효과가 매우 크다는 것을 알 수 있음 ($p < 0.001$) 특히 Vit D2 함유 표고버섯 추출물 처리구에서 CCl4 처리구에 비해 2배 이상의 낮은 IL-6 단백질 발현량을 보여줌 이 중에서도 특히 표고버섯 추출물 Vit D2에서 가장 항염증 효과가 높음 이상의 결과로부터 Vit D 급이구들은 다양한 Vit D에 의해 항염증인자인 IL-6 생성이 억제되어 mouse 간손상을 회복시키는 능력이 증진됨을 확인시켜 줌

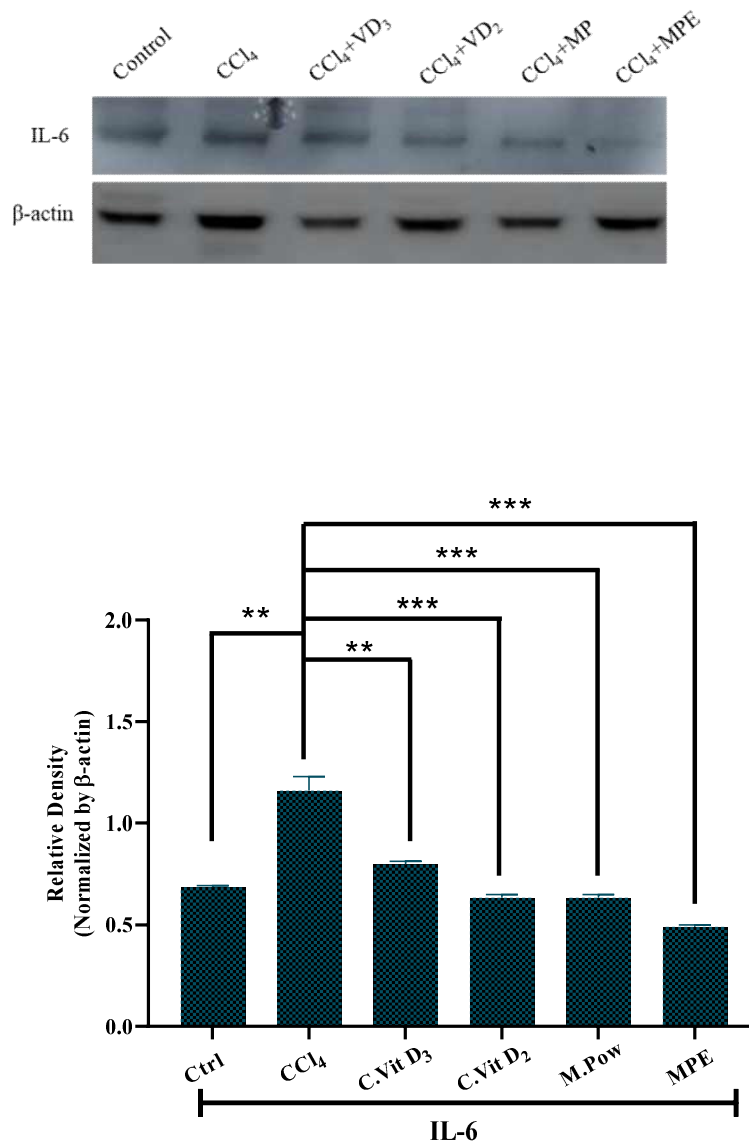


그림 129. CCl4 처리하여 손상된 mouse 간조직에 14일간 다양한 Vit D 급이한 후 발현된 IL-6 단백질의 (A) Western blotting 및 (B) 상대적 단백질 정량 결과 Group 1; 대조구로서 비타민 D 결핍사료를 급이한 그룹, Group 2; CCl4 + 비타민 D 결핍사료를 급이한 그룹, Group 3; CCl4 + 비타민 D 결핍사료에 경구로 100% 순도의 상업적 Vit D2를 급이한 그룹, Group 4; CCl4 + 비타민 D 결핍사료에 경구로 100% 순도의 상업적 Vit D3를 급이한 그룹, Group 5; CCl4 + 비타민 D 결핍사료에 경구로 Vit D2 전환된 표고버섯 분말을 급이한 그룹, Group 6; CCl4 + 비타민 D 결핍사료에 경구로 Vit D2 전환된 표고버섯 추출물을 급이한 그룹. 매일 각각의 mouse에 대하여 0.25 μ g/100 g of body weight의 양으로 비타민 D를 경구투여함 데이터는 3회의 독립 실험의 평균 \pm S.D로 나타내었으며, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. 통계적 유의성은 prism ANOVA에 의해 분석됨

: 마우스에서 CCl₄ 처리에 따른 간조직 손상을 분석한 결과 만성 간염증 및 간섬유화 지표인 α -SMA (alpha-smooth muscle actin) 단백질 발현이 증가함 α -SMA 단백질 발현 증가는 간세포에서 방사선 형태의 세포증식을 활성화시키고 더 많은 콜라겐을 생성시킴(Dooley et al., 2001; Guido et al., 1996; Kweon et al., 2001; Mann & Smart, 2002; Nakatani et al., 2002; Sternberg, 1992) 다양한 Vit D 급이그룹에서는 CCl₄를 처리하였음에도 불구하고 α -SMA 단백질 발현이 현저히 억제됨으로써 간손상에 의한 만성염증 및 간섬유화에 대한 방어효과가 매우 크다는 것을 알 수 있음 ($p < 0.001$) 특히 Vit D₂ 함유 표고버섯 추출물 처리구에서 CCl₄ 처리구에 비해 4배 이상 낮은 α -SMA 단백질 발현량을 보여줌 이상의 결과로부터 Vit D 급이구들은 Vit D에 의해 만성염증인자 및 간섬유화인자인 α -SMA 생성이 억제되어 mouse 간손상을 회복시키는 능력이 증진됨을 확인시켜 줌

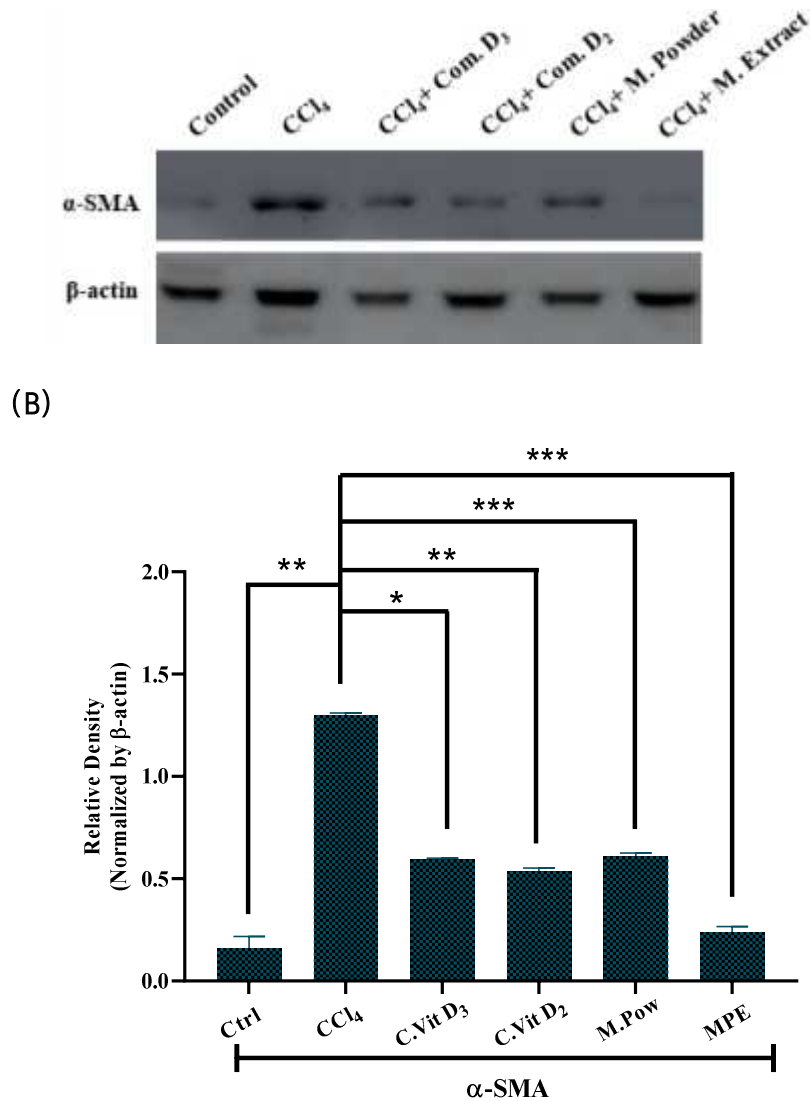


그림 130. CCl₄ 처리하여 손상된 mouse 간조직에 14일간 다양한 Vit D 급이한 후 발현된 α -SMA 단백질의 (A) Western blotting 및 (B) 상대적 단백질 정량 결과 Group 1; 대조구로서 비타민 D 결핍사료를 급이한 그룹, Group 2; CCl₄ + 비타민 D 결핍사료를 급이한 그룹, Group 3; CCl₄ + 비타민 D 결핍사료에 경구로 100% 순도의 상업적 Vit D₂를 급이한 그룹, Group 4; CCl₄ + 비타민 D 결핍사료에 경구로 100% 순도의 상업적 Vit D₃를 급이한 그룹, Group 5; CCl₄ + 비타민 D 결핍사료에 경구로 Vit D₂ 전환된 표고버섯 분말을 급이한 그룹, Group 6; CCl₄ + 비타민 D 결핍사료에 경구로 Vit D₂ 전환된 표고버섯 추출물을 급이한 그룹 매일 각각의 mouse에 대하여 0.25 μ g/100 g of body weight의 양으로 비타민 D를 경구투여함 데이터는 3회의 독립 실험의 평균 \pm S.D로 나타내었으며, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. 통계적 유의성은 prism ANOVA에 의해 분석됨

○ Vit D₂ 전환된 표고버섯분말 시제품의 식품안전성 평가

UV-B LED 처리되어 Vit D₂ 전환된 표고버섯의 중금속에 대한 식품안전성 분석을 실시하여 품목(원료) 신고를 위한 근거자료를 제공하고자 함 본 연구에서는 시제품인 표고버섯 Tablet 1종과 표고버섯 분말 1종, 총 2종의 시료에 대하여 납, 카드뮴, 수은, 비소 등 중금속 함량을 분석함 분석은 공인기관인 계명대학교 전통미생물자원개발 및 산업화연구센터에 의뢰하여 실시하였으며, 결과는 식약처 식품공전에서 제시된 버섯류의 중금속에 대한 식품안전성 규격은 납 0.3 mg/kg 이하, 카드뮴 0.3 mg/kg 이하, 비소와 수은은 기준없음으로 고시됨

시험결과 Tablet 시제품에 대한 납, 카드뮴, 비소, 수은 분석결과는 각각 0.022 mg/kg, 0.016 mg/kg, 0.062 mg/kg, 0.002 mg/kg의 분석 결과를 얻었음으로 기준치 이하로 판정됨 또한 표고버섯 분말 시제품에 대해서는 납, 카드뮴, 비소, 수은 분석결과가 각각 0.073 mg/kg, 0.091 mg/kg, 6.29 mg/kg, 0.008 mg/kg의 분석 결과를 얻었음으로 Tablet에서와 같이 기준치 이하로 판정됨 이상의 결과를 종합하면 납, 카드뮴, 수은, 비소는 분석값이 식약처의 기준치 이하였음으로 중금속에 대한 안전성이 충분히 입증됨 버섯분말에서 비소가 6.29 mg/kg으로 다소 높게 나왔으나 식품공전에는 비소에 대한 기준값이 없을 뿐만아니라 중금속에 대한 기준값은 버섯 농산물 원물에 대한 기준임으로 본 연구에서 제공한 시제품은 수분함량 1% 이내의 표고버섯 건조물을 제공했음으로 실제 표고버섯 원물기준으로는 0.069 mg/kg으로 환산되어 훨씬 낮은 함량을 갖고 있어서 식품안전 상에 전혀 문제가 없는 것으로 판단됨



그림 131. 안전성 평가를 위해 UV-B LED 처리후 전환한 Vit D₂ 함유 표고버섯으로 제조한 시제품 사진. Tablet (좌), 분말-시즈닝 제품 (우)

참고용 시험 성적서

본 성적서는 식품의약품안전처 「식품·의약품분야 시험·검사 등에 관한 법률」에 따른 것이 아닙니다.

검 체 명	버섯태블릿		
제 품 유 형	기준규격외(식중독균)	제조일자	
업 체 명	대구대학교 산학협력단	대 표 자	장종혁
소 재 지	경상북도 경산시 진량읍 대구대로 201(대구대학교 내)		
접 수 년 월 일	2022년 06월 22일	검사완료일	2022년 06월 30일
시 험 의 의 목 적	참고용	유통기한	

귀하가 시험 의뢰한 결과 및 판정은 의뢰된 시험항목에 한하여 다음과 같습니다.

결과 :

시 험 항 목	규 격 기 준	결 과	항 목 판 정
대장균	-	0/g	-
살모넬라균	-	음성	-
황색포도상구균	-	음성	-
비실루스세레우스	-	음성	-
일반세균	-	10/g	-
납	-	0.022 mg/kg	-
비소	-	0.062 mg/kg	-
카드뮴	-	0.016 mg/kg	-
수은	-	0.002 mg/kg	-

2022년 07월 04일

계명대학교 전통미생물자원개발 및 산업화연구센터장

대구지방식품의약품안전청 식품등 시험검사기관 제112호

대구지방식품의약품안전청 축산물 시험검사기관 제13호



※ 동 시험성적서는 법적효력이 없으며, 시험목적 이외에는 사용할 수 없습니다.

그림 132 전환한 Vit D₂ 함유 표고버섯으로 제조한 Tablet 시제품의 미생물 및 중금속 (납, 비소, 카드뮴, 수은) 함량 분석에 대한 시험성적서

참고용 시험 성적서

본 성적서는 식품의약품안전처 「식품·의약품분야 시험·검사 등에 관한 법률」에 따른 것이 아닙니다.

검 체 명	버섯분말		
제 품 유 형	기준규격외(식중독균)	제조일자	
업 체 명	대구대학교 산학협력단	대 표 자	장종혁
소 재 지	경상북도 경산시 진량읍 대구대로 201(대구대학교 내)		
접 수 년 월 일	2022년 06월 22일	검사완료일	2022년 06월 30일
시 험 의 의 목 적	참고용	유통기한	

귀하가 시험 의뢰한 결과 및 판정은 의뢰된 시험항목에 한하며 다음과 같습니다.

결과 :

시 험 항 목	규 격 기 준	결 과	항 목 판 정
대장균	-	0/g	-
살모넬라균	-	음성	-
항색포도상구균	-	음성	-
바실루스세레우스	-	음성	-
일반세균	-	14000/g	-
납	-	0.073 mg/kg	-
비소	-	6.290 mg/kg	-
카드뮴	-	0.091 mg/kg	-
수은	-	0.008 mg/kg	-

2022년 07월 04일

계명대학교 전통미생물자원개발 및 산업화연구센터장

대구지방식품의약품안전청 식품등 시험검사기관 제112호

대구지방식품의약품안전청 축산물 시험검사기관 제13호



※ 본 시험성적서는 법적효력이 없으며, 시험목적 이외에는 사용할 수 없습니다.

그림 133 전환한 Vit D₂ 함유 표고버섯으로 제조한 버섯분말 시제품의 미생물 및 중금속 (납, 비소, 카드뮴, 수은) 함량 분석에 대한 시험성적서

○ 비타민 D₂의 열적/제형적 안정성을 높이기 위한 curcumin 및 EGCG 첨가 효과

- 비타민 D₂는 열, 빛, pH 등에 의하여 불안정하여 쉽게 파괴된다. 따라서 비타민 D₂의 제형화를 성공적으로 추진하기 위해서는 비타민 D₂의 열적/제형적 안정성을 증가시킬 수 있는 방안이 필요함 안전하고 천연물 유래의 강력한 항산화 효능이 있는 물질을 탐색한 결과 Curcumin 및 EGCG (Epigallocatechin-3-gallate)가 각각 비타민 D₂의 안정성을 증가시킴을 본 연구를 통하여 확인함 전체적인 안정화 scheme은 그림 134에 요약함

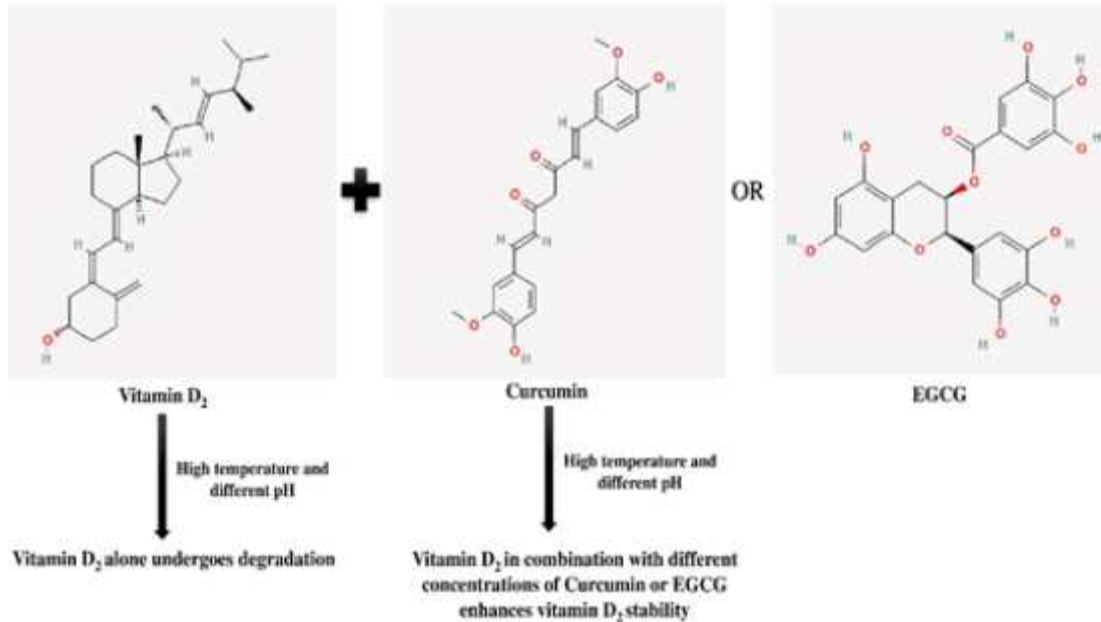


그림 134. Curcumin 및 EGCG 첨가에 의한 비타민 D₂의 열적/제형적 안정성 증가.

- Vit D₂를 다양한 농도의 curcumin과 혼합하여 50°C에서 시간을 달리하여 보관했을 때 curcumin이 없을 때는 6시간 후에 Vit D₂가 62.58% 잔존하였지만, curcumin을 각각 5 ug/ml, 10 ug/ml 농도로 첨가하여 동일한 시간동안 보관했을 때 표 105에서 보여주는 바와 같이 Vit D₂ 함량이 각각 85.75%와 90.42% 잔존함으로써 열적안정성이 크게 증가됨

표 106. Vit. D₂를 curcumin과 혼합하여 50°C에 보관했을 때 dml 열적안정성 분석결과

Vitamin D ₂ and curcumin	50°C, 1 hour (% of vit. D ₂ retention)	50°C, 2 hours (% of vit. D ₂ retention)	50°C, 3 hours (% of vit. D ₂ retention)	50°C, 6 hours (% of vit. D ₂ retention)
Vit D ₂ (5 µg)	95.95	85.89	78.82	62.58
Vit D ₂ (5 µg) + Curcumin (1 µg)	95.92	89.92	86.25	65.37
Vit D ₂ (5 µg) + Curcumin (2 µg)	94.78	87.45	88.15	78.45
Vit D ₂ (5 µg) + Curcumin (5 µg)	96.85	90.85	90.26	85.75
Vit D ₂ (5 µg) + Curcumin (10µg)	97.25	95.75	95.75	90.42

- Vit D₂를 다양한 농도의 EGCG와 혼합하여 50°C에서 시간을 달리하여 보관했을 때 EGCG가 없을 때는 6시간 후에 Vit D₂가 62.58% 잔존하였지만, EGCG를 각각 5 ug/ml, 10 ug/ml 농도로 첨가하여 동일한 시간동안 보관했을 때 Vit D₂ 함량이 각각 76.55%와 71.27% 잔존함으로써 열적안정성이 크게 증가되었다. 이상의 결과로 볼 때 50°C에서는 상대적으로 curcumin의 열적안정성이 EGCG에 비해 더 높은 것으로 나타남

표 107. Vit. D₂를 EGCG와 혼합하여 50°C에 보관했을 때의 열적안정성 분석결과

Vitamin D2 and EGCG	50°C, 1 hour (% of vit. D ₂ retention)	50°C, 2 hours (% of vit. D ₂ retention)	50°C, 3 hours (% of vit. D ₂ retention)	50°C, 6 hours (% of vit. D ₂ retention)
Vit D ₂ (5 µg)	95.95	85.89	78.82	62.58
Vit D ₂ (5 µg) + EGCG (1 µg)	93.33	83.1	76.15	60.15
Vit D ₂ (5 µg) + EGCG (2 µg)	92.16	84.15	80.23	66.56
Vit D ₂ (5 µg) + EGCG (5 µg)	95.65	88.16	85.16	76.55
Vit D ₂ (5 µg) + EGCG (10µg)	97.18	88.91	83.21	71.27

- Vit D₂를 다양한 농도의 curcumin과 혼합하여 75°C에서 시간을 달리하여 보관했을 때 curcumin이 없을 때는 6시간 후에 25.75% 존재하였지만, curcumin을 각각 5 ug/ml, 10 ug/ml 농도로 첨가하여 동일한 시간동안 보관했을 때 Vit D₂ 함량이 각각 82.64%와 90.46% 잔존함으로써 열적안정성이 50°C에 비해 상대적으로 더 크게 증가됨

표 108. Vit. D₂를 curcumin과 혼합하여 75°C에 보관했을 때의 열적안정성 분석결과

Vitamin D2 and curcumin	75°C, 1 hour (% of vit. D ₂ retention)	75°C, 2 hours (% of vit. D ₂ retention)	75°C, 3 hours (% of vit. D ₂ retention)	75°C, 6 hours (% of vit. D ₂ retention)
Vit D ₂ (5 µg)	69.53	44.14	30.56	25.75
Vit D ₂ (5 µg) + Curcumin (5 µg)	88.36	86.47	85.55	82.64
Vit D ₂ (5 µg) + Curcumin (10µg)	90.41	90.35	90.13	90.46

- Vit D₂를 다양한 농도의 EGCG와 혼합하여 75°C에서 시간을 달리하여 보관했을 때 EGCG가 없을 때는 6시간 후에 25.75% 존재하였지만, EGCG를 각각 5 ug/ml, 10 ug/ml 농도로 첨가하여 동일한 시간동안 보관했을 때 표 109에서 보여주는 바와 같이 Vit D₂ 함량이 각각 53.76%와 60.76% 잔존함으로써 열적안정성이 크게 증가됨 이상의 결과로 볼 때 75°C에서도 상대적으로 curcumin의 열적안정성이 EGCG에 비해 더 높은 것으로 나타남

표 109 Vit. D₂를 EGCG와 혼합하여 75°C에 보관했을 때의 열적안정성 분석결과

Vitamin D2 and EGCG	75°C, 1 hour (% of vit. D ₂ retention)	75°C, 2 hours (% of vit. D ₂ retention)	75°C, 3 hours (% of vit. D ₂ retention)	75°C, 6 hours (% of vit. D ₂ retention)
Vit D ₂ (5 µg)	69.53	44.14	30.56	25.75
Vit D ₂ (5 µg) + EGCG (5 µg)	68.54	58.75	55.46	53.76
Vit D ₂ (5 µg) + EGCG (10µg)	70.46	66.23	65.54	60.76

- Vit D₂를 다양한 농도의 curcumin과 혼합하여 75°C, 2시간동안 pH를 달리하면서 보관했을 때 curcumin이 없을 때는 2시간 후에 시험한 모든 pH 범위에서 상대적으로 불안정함 특히 pH 1.0에서 20.46%, pH 10.0에서 25.75%의 Vit D₂가 잔존하여 대부분이 분해되었지만, curcumin을 각각 5 ug/ml, 10 ug/ml 농도로 첨가하여 동일한 시간동안, pH 1.0에서 보관했을 때 표 110에서 보여주는 바와 같이 Vit D₂ 함량이 각각 90.35%와 95.46% 잔존함으로써 열적안정성 및 pH 안정성이 약 75% 증가하여 매우 크게 증가됨 또한 동일한 조건에서 curcumin을 각각 5 ug/ml, 10 ug/ml 농도로 첨가하여 pH 10.0에서 보관했을 때 Vit D₂ 함량이 각각 94.32%와 98.05% 잔존함으로써 열적안정성 및 pH 안정성이 약 73% 증가하여 매우 높은 수준으로 안정성이 증가됨

표 110. Vit. D₂를 curcumin과 혼합하여 75°C에서 2시간, pH를 달리하면서 보관했을 때의 pH 안정성 분석결과

Vitamin D2 and curcumin	pH 1.0, 75°C (% of vit. D ₂ retention)	pH 4.0, 75°C (% of vit. D ₂ retention)	pH 5.0, 75°C (% of vit. D ₂ retention)	pH 7.0, 75°C (% of vit. D ₂ retention)	pH 10.0, 75°C (% of vit. D ₂ retention)
Vit D ₂ (5 µg)	20.46	55.15	54.38	67.34	25.75
Vit D ₂ (5 µg) + Curcumin (5 µg)	90.35	87.24	92.46	95.13	94.32
Vit D ₂ (5 µg) + Curcumin (10µg)	95.46	95.71	95.68	97.71	98.05

- Vit D₂를 다양한 농도의 EGCG와 혼합하여 75°C, 2시간동안 pH를 달리하면서 보관했을 때 EGCG가 없을 때는 2시간 후에 시험한 모든 pH 범위에서 상대적으로 불안정함 특히 pH 1.0에서 20.46%, pH 10.0에서 25.75%의 Vit D₂가 잔존하여 대부분이 분해되었지만, EGCG를 각각 5 ug/ml, 10 ug/ml 농도로 첨가하여 동일한 시간동안, pH 1.0에서 보관했을 때 Vit D₂ 함량이 각각 35.45%와 38.64% 잔존함으로써 열적안정성 및 pH 안정성이 약 18% 증가됨 또한 동일한 조건에서 EGCG를 각각 5 ug/ml, 10 ug/ml 농도로 첨가하여 pH 10.0에서 보관했을 때 Vit D₂ 함량이 각각 37.61%와 45.85% 잔존함으로써 열적안정성 및 pH 안정성이 약 20% 증가됨 이상의 결과로 볼 때 75°C, 다양한 pH에서도 상대적으로 curcumin의 열적안정성이 EGCG에 비해 더 높은 것으로 나타남

표 111. Vit. D₂ 를 EGCG 와 혼합하여 75°C에서 2 시간, pH 를 달리하면서 보관했을 때의 pH 안정성 분석결과

Vitamin D ₂ and EGCG	pH 1.0, 75°C (% of vit. D ₂ retention)	pH 4.0, 75°C (% of vit. D ₂ retention)	pH 5.0, 75°C (% of vit. D ₂ retention)	pH 7.0, 75°C (% of vit. D ₂ retention)	pH 10.0, 75°C (% of vit. D ₂ retention)
Vit D ₂ (5 µg)	20.46	44.14	54.38	67.34	25.75
Vit D ₂ (5 µg) + EGCG (5 µg)	35.45	86.47	78.95	77.84	37.61
Vit D ₂ (5 µg) + EGCG (10µg)	38.64	90.35	88.46	86.85	45.85

[참여기관 2 (경성대학교산학협력단)]

○ 주관기관에서 생산한 제품에 대한 안정성 평가 실시

- (주)네이처텍에서 생산한 버섯 추출물을 이용한 3개의 정제 (Tablet: 버섯 내 D₂ 함유 정제, Vitamin D₃ 함유 정제, 버섯 내 D₂ +Vitamin D₃ 복합 함유 정제)에 대하여 6 개월간 가속 시험조건 (40±2 °C /75±5 % RH) 및 장기보존 시험조건 (25±2 °C/60±5 % RH)에서의 안정성 시험을 진행함

가. 실험 내용 및 방법

1) 정제 내의 함유된 vitamin 추출방법

- 1 및 2차년도와 동일하게 vitamin 추출법은 식품의약품안전처의 식품공전의 비타민 D 추출법과 동일하게 진행함
- 균질화 된 시료 1g을 비누화 플라스크에 정밀히 취한 후, 피로갈롤-에탄올 용액 40mL를 가하여 약하게 진탕 혼합함 수산화칼륨 10mL를 가하고, 환류냉각기를 부착하여 비등수욕 중에서 60분 간 가열하여 비누화 함



그림 135. 버섯 시료를 이용한 vitamin D₂ 전구체 추출

즉시 실온으로 냉각하고 갈색 분액깔때기로 옮긴 후, 0.01% BHT를 함유하는 헥산 50mL를 가하여 헥산층을 250~300mL 새로운 분액깔때기로 옮김(층 분리가 원활하지 않을 때는 0° C, 6,000rpm에서 10분간 원심분리) 남은 하층에 추출용매 50mL를 가하여 2회 더 반복하여 이전의 추출용매와 하바고 1N 수산화칼륨용액 100mL를 가하여 15초간 강하게 진탕함 이를 방지하여 분리하고 혼탁한 물층을 버림 헥산층에 0.5N 수산화칼륨용액 40mL를 가하여 진탕한 후 물층을 다시 버린다. 헥산층을 수세하여 세척액이 페놀프탈레인 시액으로 알칼리의 반응을 나타내지 않을 때까지 수회 수세함 수세 시 매회 15초간 격렬하게 진탕함 수세한 헥산층을 무수황산나트륨으로 탈수하여 갈색 플라스크로 옮기고 무수황산나트륨을 헥산 10mL로 2회 세척

한 후 탈수한 헥산용매와 함하고 이를 40° C 이하에서 감압농축함 잔류물에 메탄올 2mL를 가해 녹이고, 이를 멤브레인 필터(PTFE, 0.45 μ m)로 여과하여 기기분석을 위한 시험용액으로 사용함



그림 136. Vitamin D2 전구체 추출을 위한 버섯 추출 용매 및 농축

2) HPLC 분석 조건

- 버섯 추출물을 이용한 정제 (버섯 내 D2, Vitamin D3, 버섯 내 D2 +Vitamin D3)의 HPLC 분석 조건은 표1에 요약함

표 112. 버섯 추출물을 이용한 정제 (버섯 내 D2, Vitamin D3, 버섯 내 D2 +Vitamin D3)의 HPLC 분석 조건

Apparatus	DIONEX UltiMate 3000		
Column	SUPERSIL COLUMN ODS-I, 4.6 X 250 mm, 5 μ m		
Mobile Phase		Solvent A (Acetonitrile)	Solvent B (Methanol)
	0 – 5min	20	80
	5 – 20min	80	20
	20 – 30min	90	10
Oven Temp	30 °C		
Flow Rate	1.8 ml/min		
Injection volume	10 μ L		
Run time	30 minutes		
Wave length	282 nm		

Ref. Distribution of ergosterol in different tissues of mushrooms and its effect on the conversion of ergosterol to vitamin D2 by UV irradiation, *Food Chemistry*, (2005) 92, 541-546

나. 보관 조건

- 1) 검체의 보관 조건은 표 113에 요약하였고 포장 용기로는 HDPE를 사용한 버섯 추출물을 이용한 정제 (버섯 내 D2, Vitamin D3, 버섯 내 D2 +Vitamin D3)의 샘플링 일정은 0, 1, 3, 6 개월로 설정함

표 113. 버섯 추출물을 이용한 정제 (버섯 내 D2, Vitamin D3, 버섯 내 D2 +Vitamin D3)의 안정성 시험 요약

Test item	Condition
Test condition	Acceleration (40±2 °C/75±5 % RH) / Long-term (25±2 °C/60±5 % RH)
Open/close	closed
Closure system	HDPE
Test period	6 months (0, 1, 3, 6 months)

다. 실험 결과

- 1) (주)네이처텍에서 생산한 버섯 추출물을 이용한 정제 (버섯 내 D2, Vitamin D3, 버섯 내 D2 + vitamin D3)의 가속 시험조건 (40±2 °C/75±5 % RH) 및 장기보존 시험조건 (25±2 °C/60±5 % RH)에서 6개월간 안정성 시험 결과는 아래에 정리함

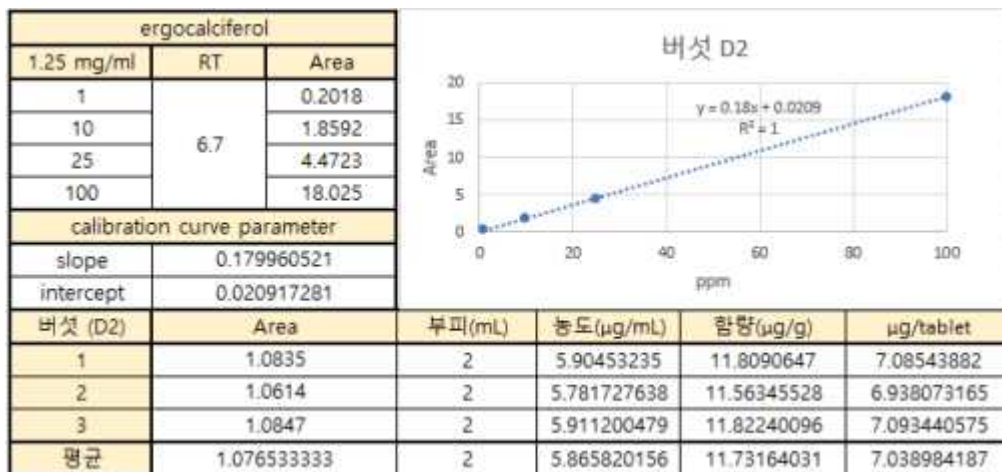


그림 137. 버섯 내 D2 안정성 시험 0개월 결과

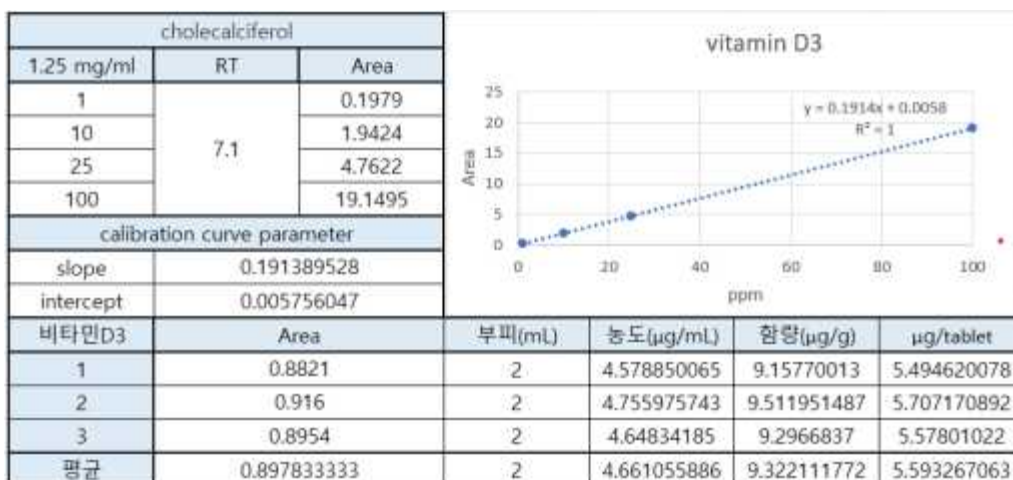


그림 138. vitamin D3 안정성 시험 0개월 결과

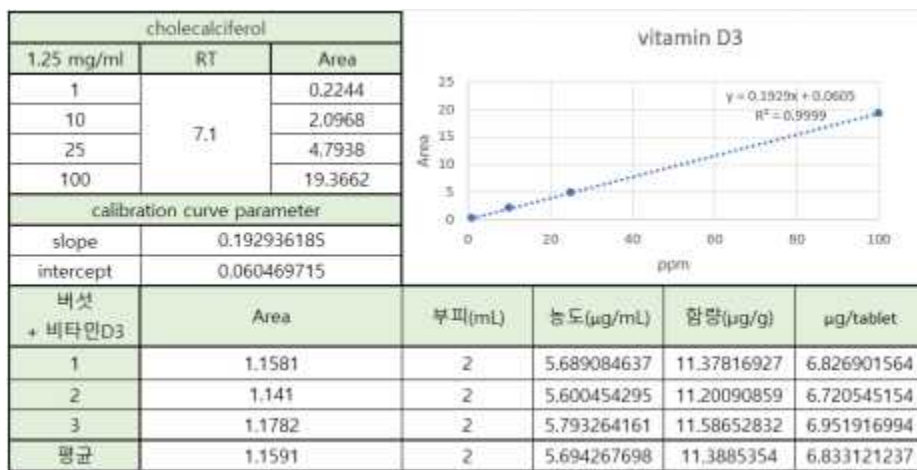
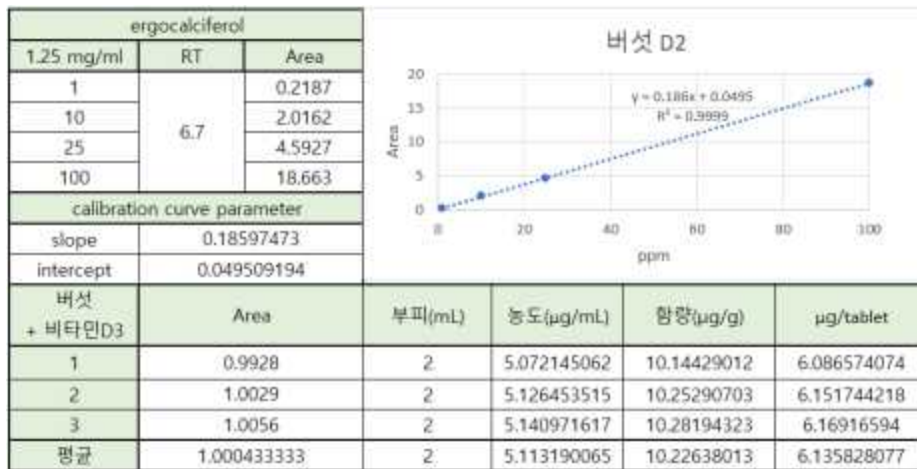


그림 139. 버섯 내 D2 +vitamin D3 안정성 시험 0개월 결과

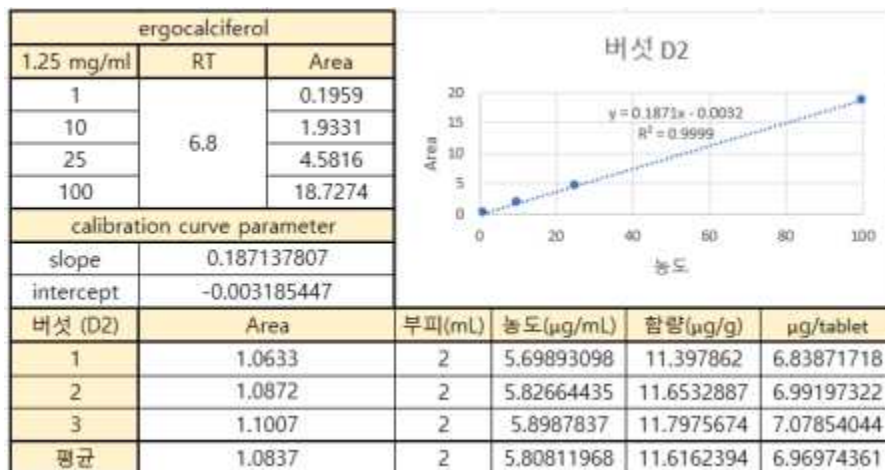


그림 140. 버섯 내 D2 안정성 시험 장기보존 시험 1개월 결과

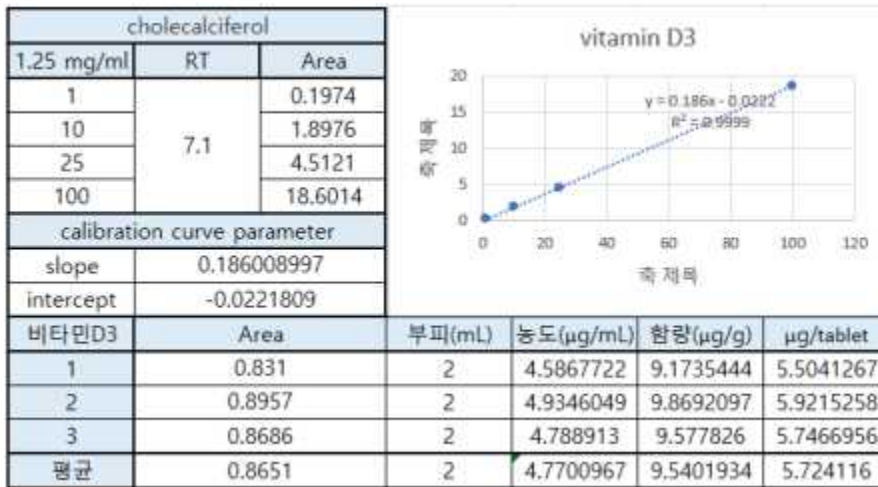


그림 141. vitamin D3 안정성 시험 장기보존 시험 1개월 결과

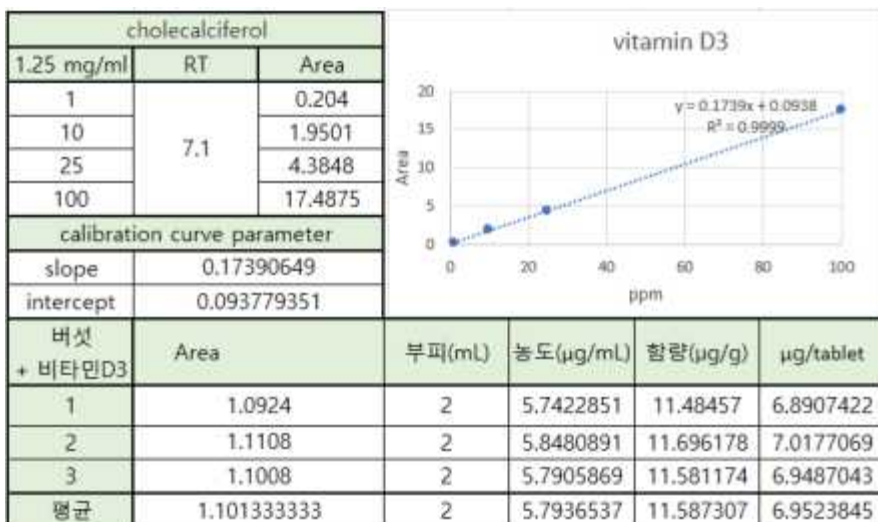
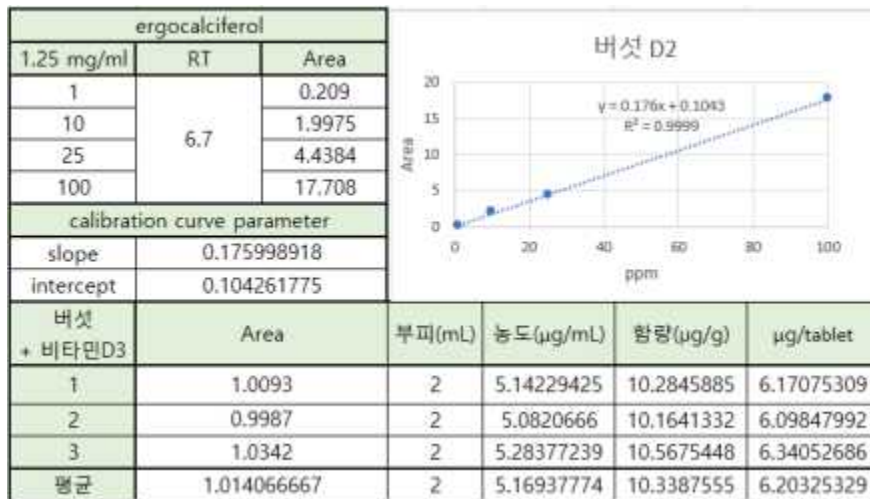


그림142. 버섯 내 D2 +vitamin D3 안정성 시험 장기보존 시험 1개월 결과

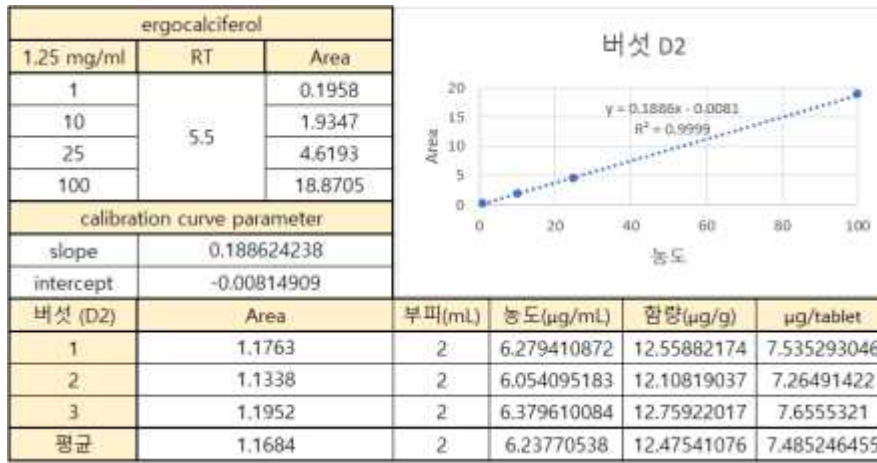


그림 143. 버섯 내 D2 안정성 시험 가속 시험 1개월 결과

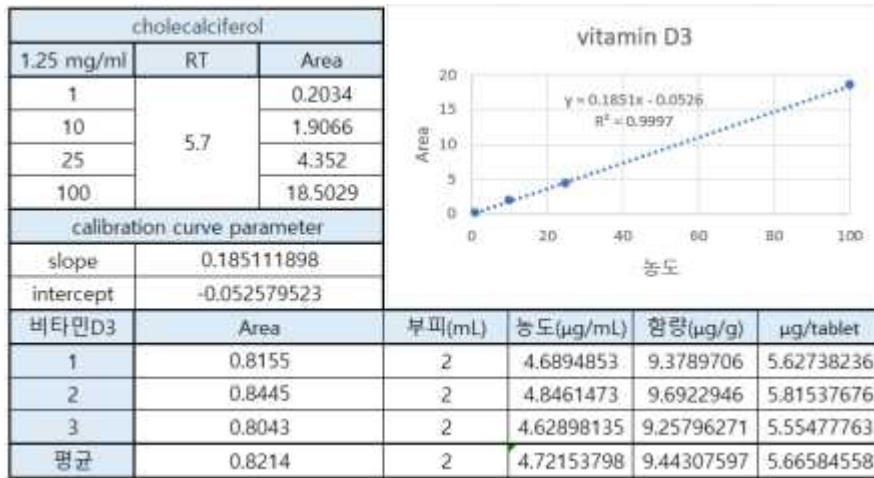
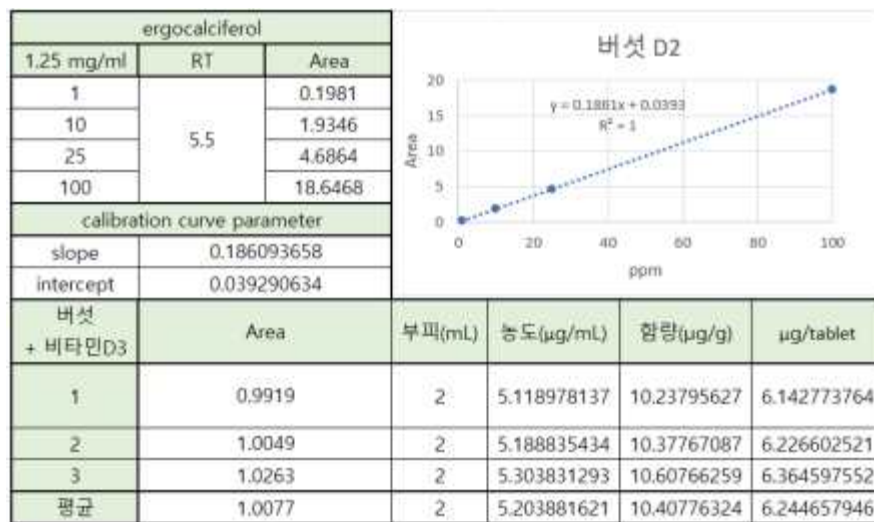


그림 144. vitamin D3 안정성 시험 가속 시험 1개월 결과



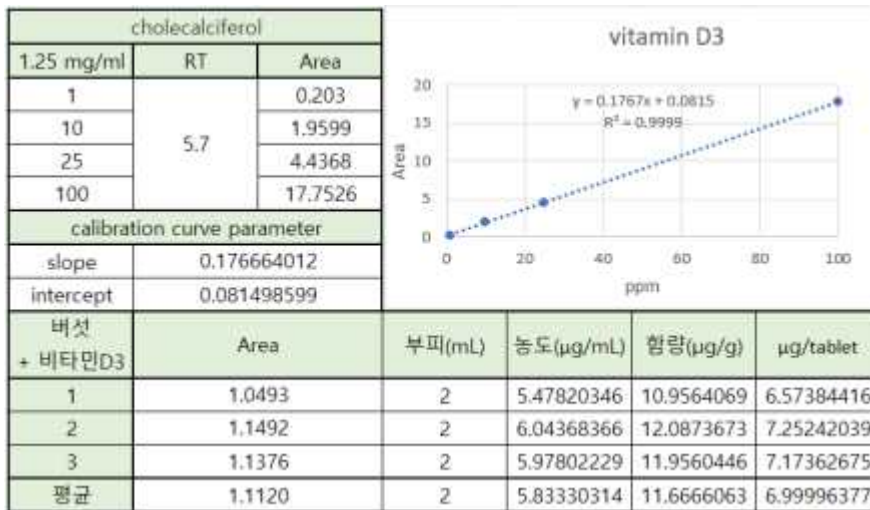


그림 145. 버섯 내 D2 +vitamin D3 안정성 시험 가속 시험 1개월 결과

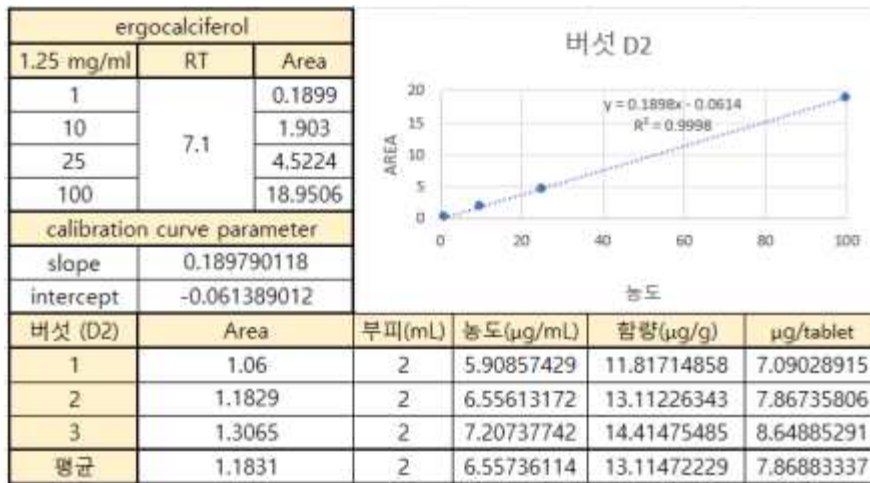


그림 146. 버섯 내 D2 안정성 시험 장기보존 시험 3개월 결과

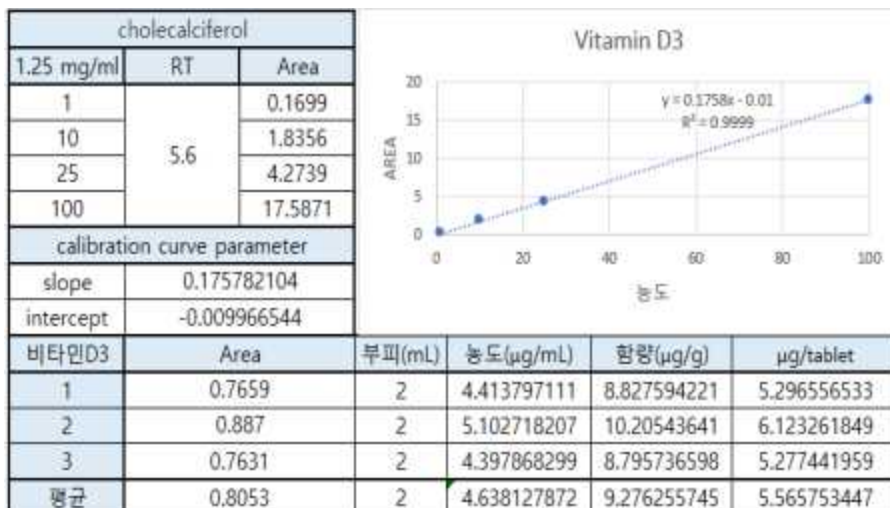


그림 147. vitamin D3 안정성 시험 장기보존 시험 3개월 결과

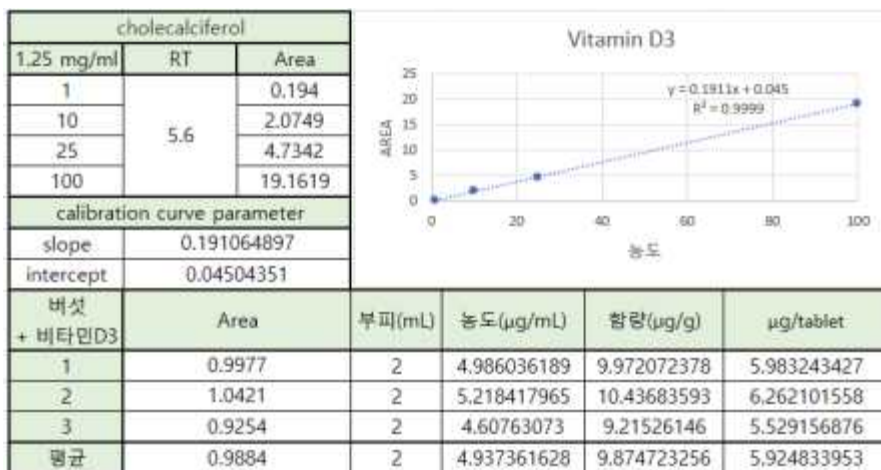
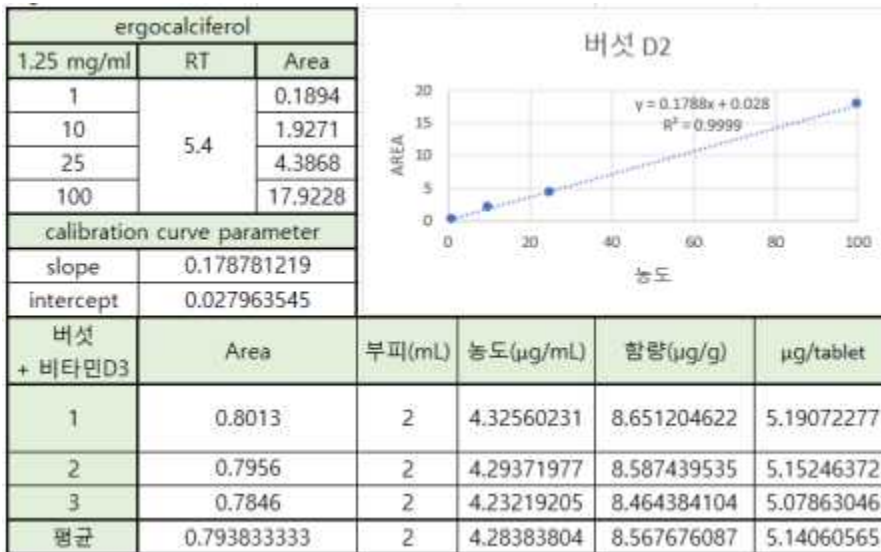


그림 148. 버섯 내 D2 + vitamin D3 안정성 시험 장기보존 시험 3개월 결과

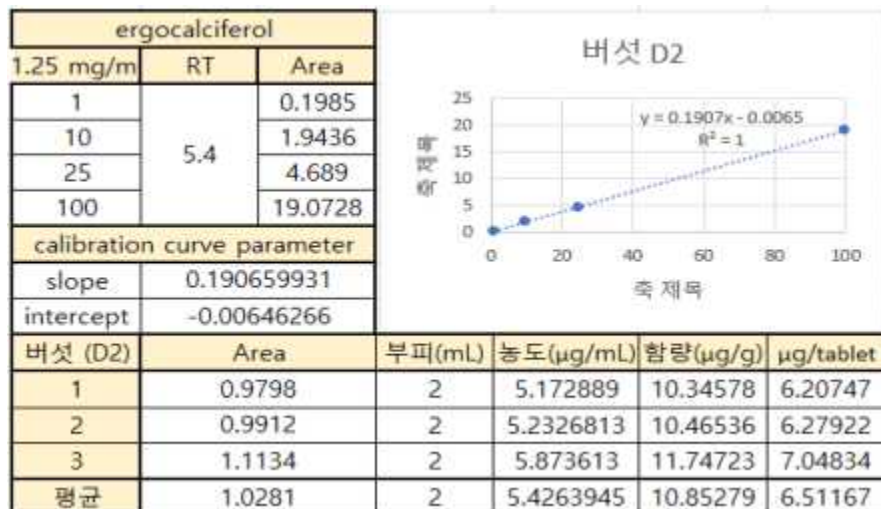


그림 149. 버섯 D2 안정성 시험 가속 시험 3개월 결과

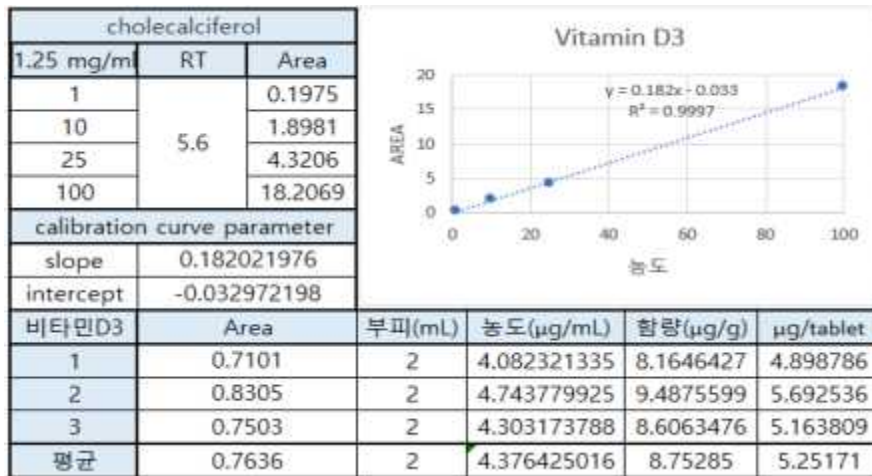


그림 150. vitamin D3 안정성 시험 가속 시험 3개월 결과

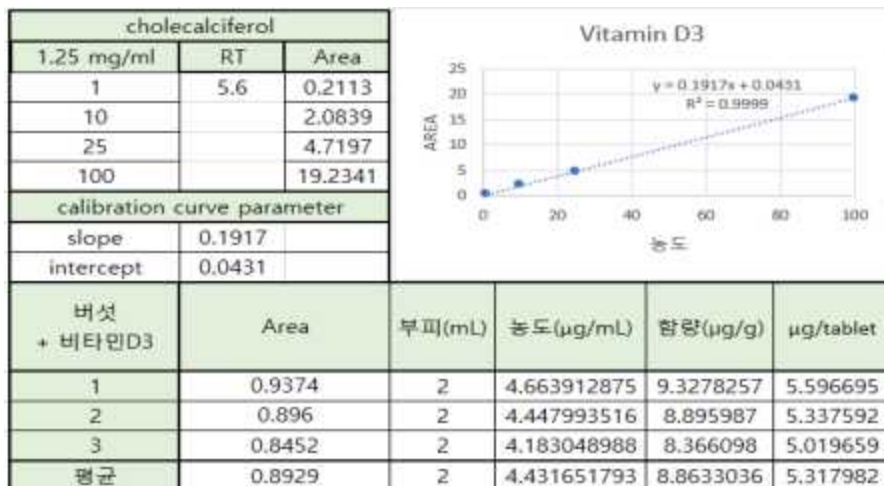
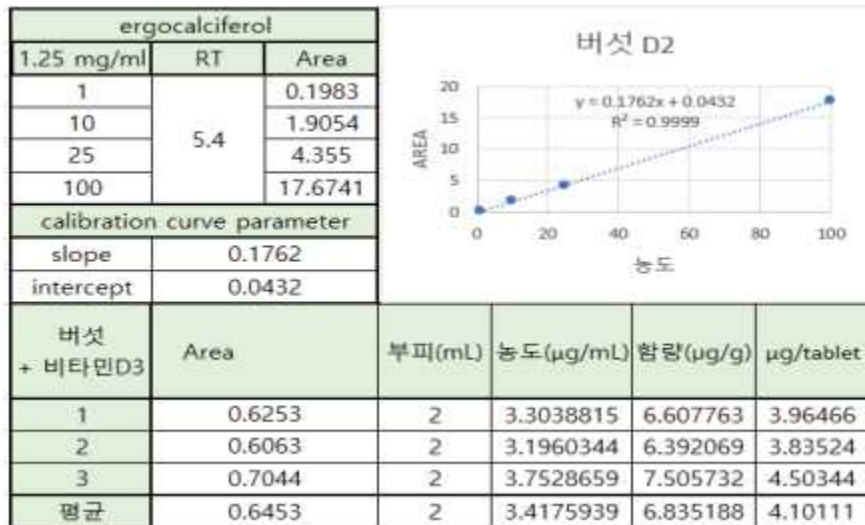


그림 151. 버섯 D2 +vitamin D3 안정성 시험 가속 시험 3개월 결과

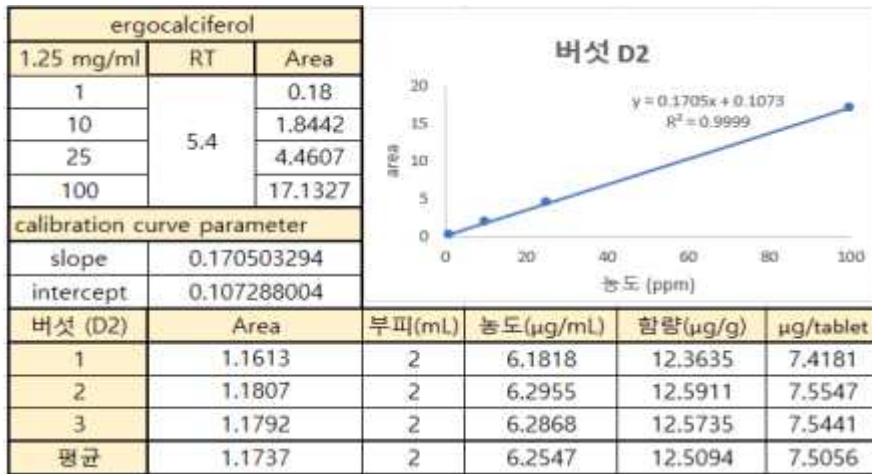


그림 152. 버섯 내 D2 안정성 시험 장기보존 시험 6개월 결과

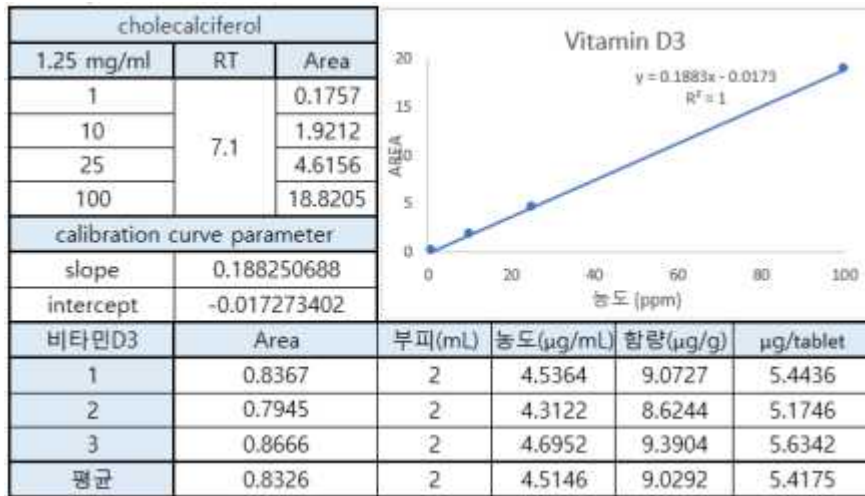
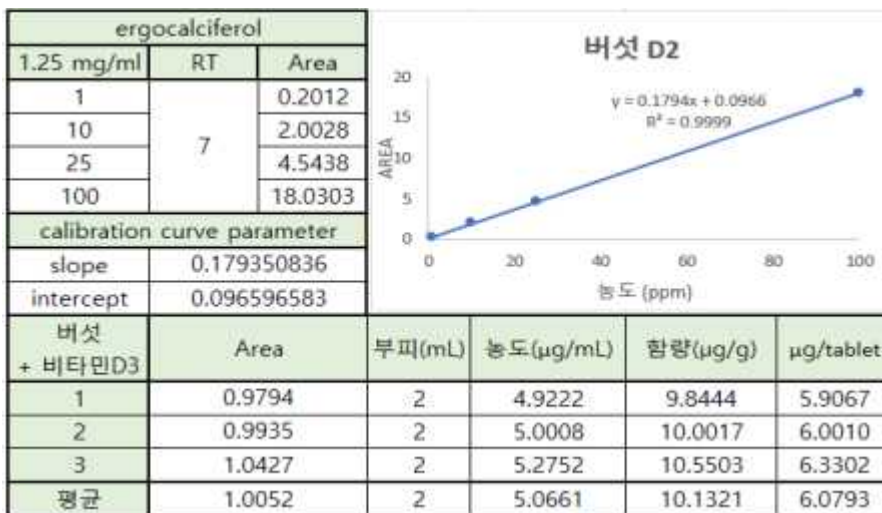


그림 153. vitamin D3 안정성 시험 장기보존 시험 6개월 결과



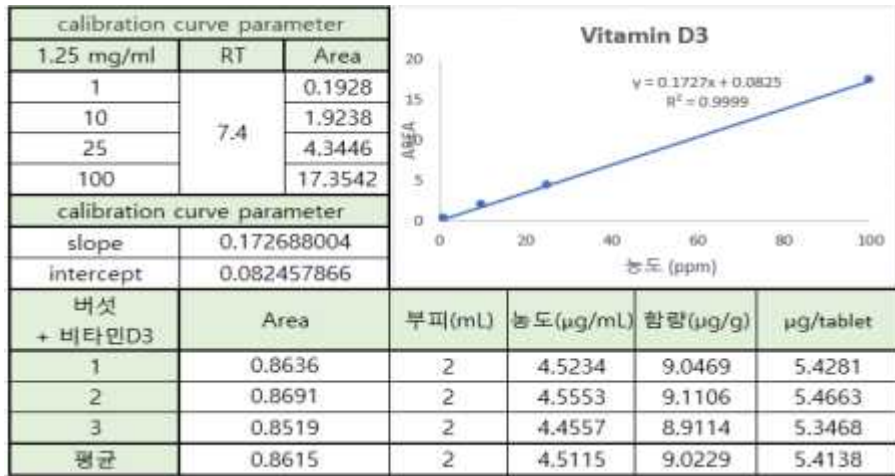


그림 154. 버섯 내 D2 +vitamin D3 안정성 시험 장기보존 시험 6개월 결과

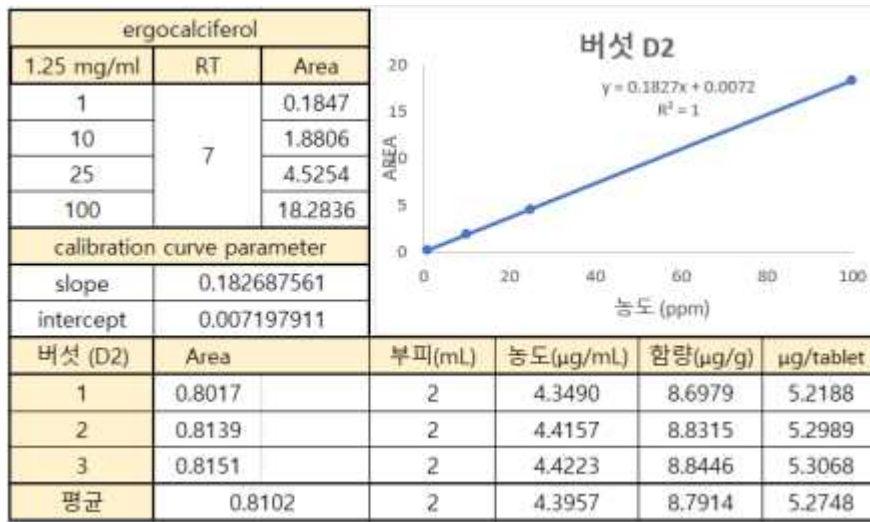


그림 155 버섯 내 D2 안정성 시험 가속 시험 6개월 결과

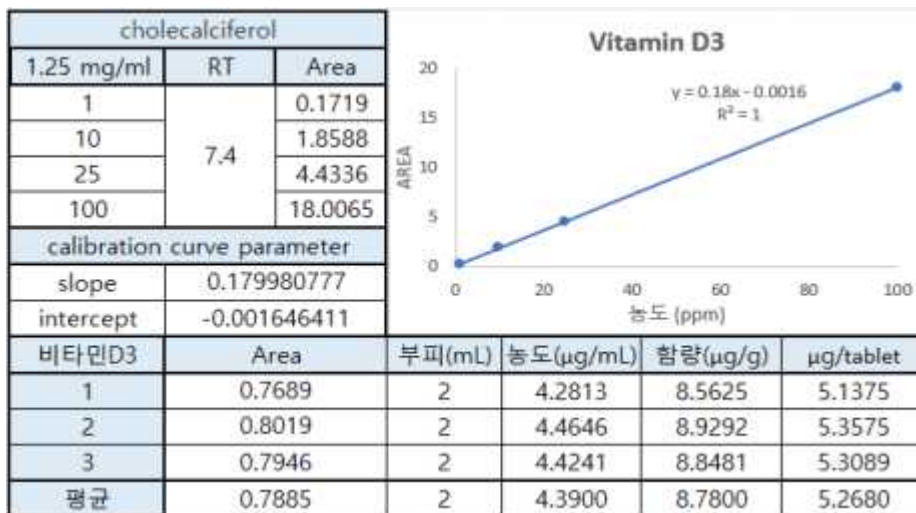


그림 156. vitamin D3 안정성 시험 가속 시험 3개월 결과

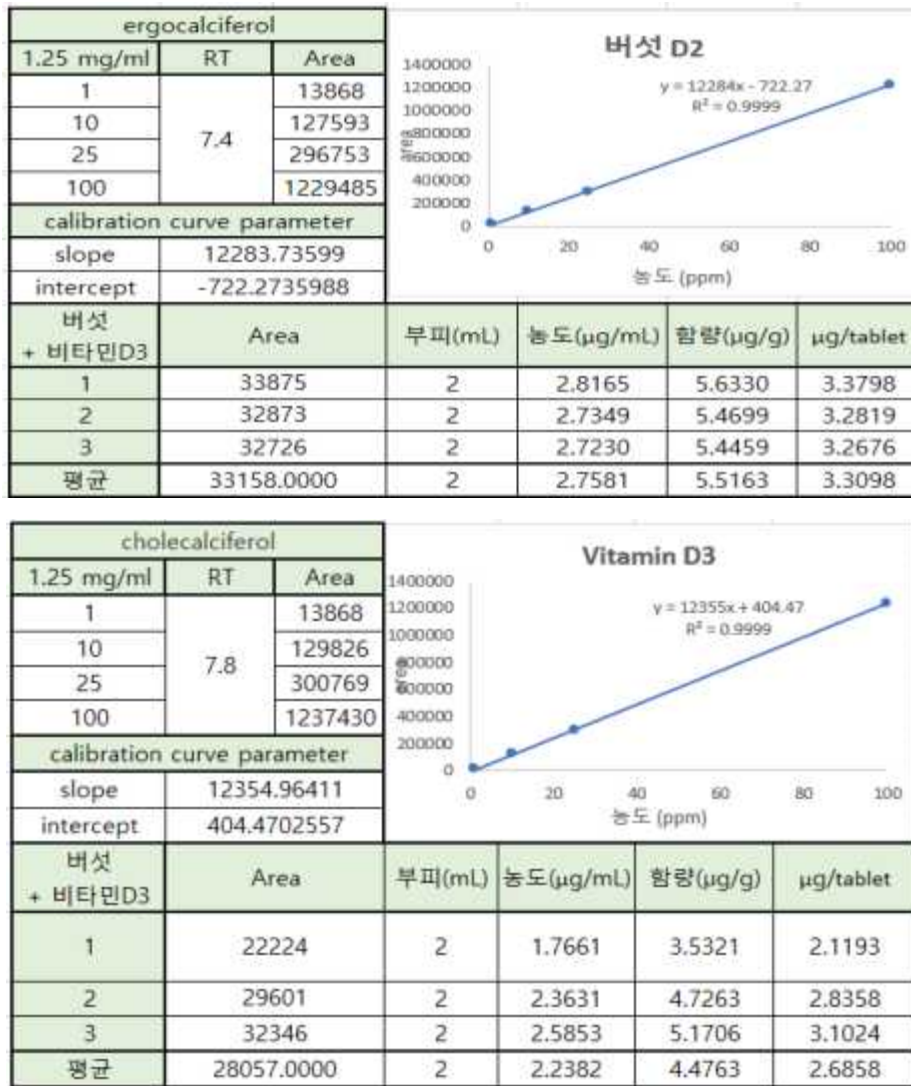


그림 157. 버섯 내 D2 + vitamin D3 안정성 시험 가속 시험 3개월 결과

표 114. 버섯 내 D2 안정성 시험 결과 요약

Test condition		Sample (month)	ug/tablet	Average
Long-term	40±2 °C /75±5 % RH	0	7.09	7.04
			6.94	
			7.09	
		1	6.84	6.97
			6.99	
			7.08	
		3	7.09	7.30
			7.17	
			7.65	
		6	7.42	7.51
			7.55	
			7.54	
Acceleration	40±2 °C /75±5 % RH	0	7.09	7.04
			6.94	
			7.09	
		1	7.04	7.02
			7.06	
			6.96	
		3	6.21	6.36
			6.28	
			6.58	
		6	5.22	5.27
			5.30	
			5.31	

표 115. vitamin D3 안정성 시험 결과 요약

Test condition		Sample (month)	ug/tablet	Average
Long-term	40±2 °C /75±5 % RH	0	5.49	5.59
			5.71	
			5.58	
		1	5.50	5.72
			5.92	
			5.75	
		3	5.30	5.57
			6.12	
			5.28	
		6	5.44	5.42
			5.17	
			5.63	
Acceleration	40±2 °C /75±5 % RH	0	5.49	5.59
			5.71	
			5.58	
		1	5.63	5.67
			5.82	
			5.55	
		3	5.30	5.57
			6.12	
			5.28	
		6	5.44	5.42
			5.17	
			5.63	

표 117. 버섯 내 D2 + vitamin D3 안정성 시험 결과 요약

Test condition		Sample (month)	ug/tablet		Average	
			버섯 D2	Vitamin D3	버섯 D2	Vitamin D3
Long-term	40±2 °C /75±5 % RH	0	6.09	6.83	6.14	6.83
			6.15	6.72		
			6.17	6.95		
		1	6.17	6.89	6.20	6.95
			6.310	7.02		
			6.34	6.95		
		3	5.19	5.98	5.14	5.92
			5.15	6.26		
			5.08	5.53		
		6	5.91	5.43	6.08	5.41
			6.00	5.47		
			6.33	5.35		
Acceleration	40±2 °C /75±5 % RH	0	6.09	6.83	6.14	6.83
			6.15	6.72		
			6.17	6.95		
		1	6.14	6.57	6.24	7.00
			6.23	7.25		
			6.36	7.17		
		3	3.96	5.60	4.10	5.32
			3.84	5.34		
			4.50	5.02		
		6	3.38	2.12	3.31	2.69
			3.28	2.84		
			3.27	3.10		

- 버섯 추출물을 이용한 정제 (버섯 내 D2 함유)의 경우 장기보존 시험조건에서는 6 개월간 안정하였음을 확인하였으나 가속 시험조건에서 1 개월부터 3 개월까지 약 0.66 ug/tablet 감소하였으며 3 개월부터 6 개월까지 약 1.19 ug/tablet 감소함을 확인함
- 버섯 추출물을 이용한 정제 (vitamin D3)의 경우 장기보존 시험조건 및 가속 시험조건에서 6 개월간 안정하였음을 확인함
- 버섯 추출물을 이용한 정제 (버섯 D2 + vitamin D3)의 경우 장기보존 시험조건에서는 6 개월간 안정하였음을 확인하였으나 가속 시험조건에서 버섯 D2와 vitamin D3는 각각 1 개월부터 3 개월까지 약 2.14 ug/tablet, 약 1.68 ug/tablet 감소하였으며 3 개월부터 6 개월까지 약 0.79 ug/tablet, 약 2.63 ug/tablet 감소함을 확인함

○ 주관기관에서 생산한 제품에 대한 유효성 연구 및 평가

- (주)네이처텍에서 생산한 버섯 추출물을 이용하여 세포 수준에서의 유효성 평가를 확인함

가. 실험 내용 및 방법

1) 버섯추출물 제조

- 자외선 조사된 버섯에서의 vitamin 추출법은 식품의약품안전처의 식품공전의 비타민 D 추출법과 동일하게 진행함
- 균질화 된 버섯 분말 1g을 비누화 플라스크에 정밀히 취한 후, 피로갈롤-에탄올 용액 40mL를 가하여 약하게 진탕 혼합하고 0.5N 수산화칼륨 10mL을 가한 후 환류냉각기를 부착하여 중탕으로 60분 간 가열하여 비누화함
- 실온으로 냉각시킨 후 0.01% dibutyl hydroxy toluene이 함유된 hexane 50 mL를 가하여 추출한 후 hexane층

을 수거하고 1 N KOH 100 mL를 가하여 15초간 진탕시킴

- Hexane층을 다시 중화가 될 때까지 세척하고 sodium sulfate, anhydrous로 탈수시키고 감압농축함

2) 세포 배양

-버섯 추출물의 항염증 효과와 항알레르기 효과를 확인하기 위해 마우스 대식세포 RAW 264.7와 rat basophil leukemia 세포주 RBL-2H3을 American Type Culture Collection (ATCC)에서 구매하였고 Penicillin/streptomycin 100 unit/ml과 10% FBS가 함유된 DMEM 배지를 사용하여 37°C, 5% CO2 incubator에서 배양함

3) 버섯 추출물의 세포 생존율 측정

- RAW 264.7 세포를 96 well plate에 1×10^5 cell/mL의 세포수가 되도록 분주하고 24 hr 동안 배양한 후, 표고버섯 추출물의 농도가 0.5, 1, 2, 4 ug/mL가 되도록 처리함 24 hr 동안 배양한 후, 5 mg/mL 농도의 MTT용액 넣고 1 hr 배양한 후 microplate reader를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정함 각 시료의 세포 생존율은 대조군을 100%로 하여 상대적으로 계산함

- MTT를 통한 세포 독성을 확인한 결과 대조군 대비 세포 생존율에 문제가 없음을 확인함

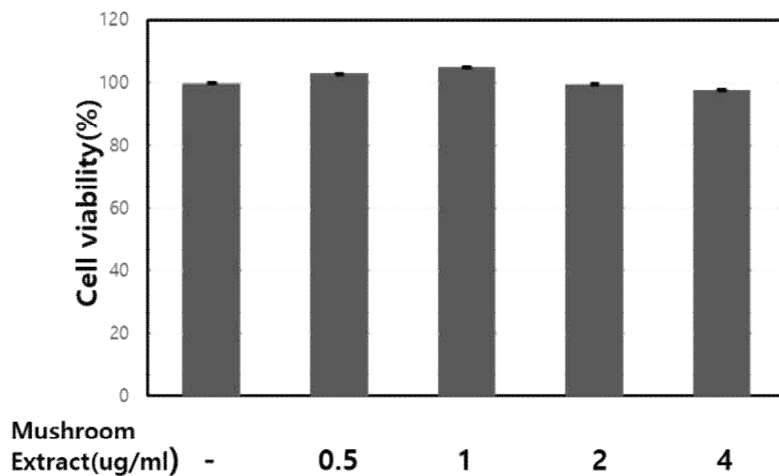


그림 158. The cell viability of *Lentinula edodes* extracts by UV irradiation. RAW 264.7 cells were treated with various concentration of extracts for 24h The cell viability was determined using MTT assay and represented by relative absorbance compared to control

4) 버섯 추출물의 항염증 효과

- RAW 264.7 세포를 24 well plate에 1×10^5 cell/ml이 되도록 분주하고 24 hr 배양 후, 시료와 LPS를 처리함 LPS는 각각 1 ug/ml의 농도로 처리하였으며, 각 시료는 0.5, 1, 2 ug/ml 농도로 희석하여 세포에 처리함 24 hr 후 염증성 cytokine 측정을 위해 세포 배양액을 회수하여 Quantikine ELISA kit (R&D SYSTEMS, USA)을 사용하여 정량함

- 표고버섯 추출물의 세포 내 항염증 효능을 확인하기 위하여 pro-inflammatory cytokine 인 TNF- α , IL-1 β 및 IL-6의 생성 억제 조절 효과를 확인함

- LPS를 처리한 대조군과 비교했을 때 표고버섯 추출물을 처리한 군에서 TNF- α 와 IL-6의 분비억제 효과를 확인하였고 IL-1 β 의 분비에는 큰 영향이 없는 것으로 확인됨

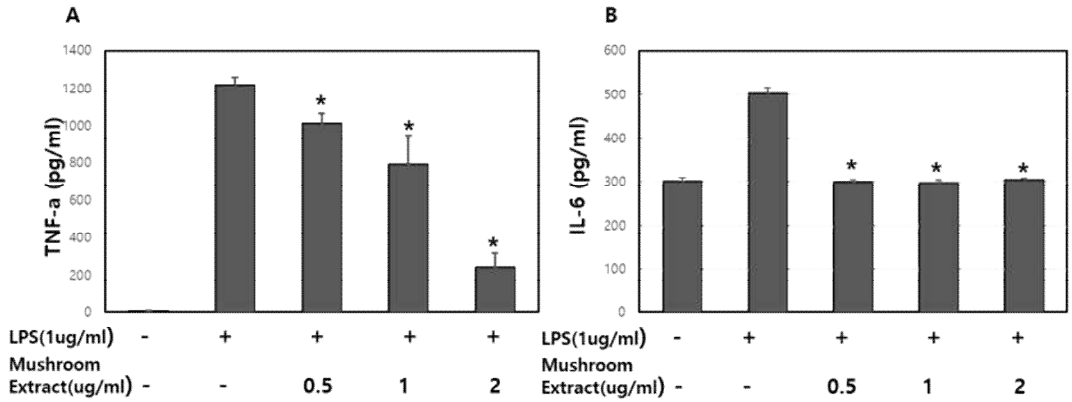


그림 159. Effect of mushroom(*Lentinula edodes*) extracts by UV irradiation on TNF- α and IL-6 cytokine stimulation. LPS stimulated RAW 264.7 cells were treated with mushroom extract at the indicated concentrations. TNF- α (A) and IL-6 production(B) were measured in the medium of RAW 264.7 cells by immunoassay as described in materials and methods. Data represent the mean \pm S.D. with three different experiments. Level of significance was identified statistically using Student's t test. * $p < 0.05$, compared with the LPS.

5) 염증성 cytokine의 mRNA 발현 측정

- RAW 264.7 세포를 6 well plate에 1×10^5 cell/ml 로 분주하고 24 hr 배양 후, LPS (1 ug/ml)와 표고버섯 추출물을 농도별로 처리하고 배양함 24 hr 뒤 Trizol reagent (Ambion, USA)를 사용하여 RNA를 추출함 추출된 RNA는 DEPC treated-water로 용해하여 사용함 total RNA 1 ug으로 cDNA를 합성하고 cDNA 합성 후 염증성 cytokine인 TNF- α , IL-1 β , IL-6에 대한 유전자 발현은 Sybr green PCR master mix (ThermoFisher, USA), primer, 멸균수, cDNA를 혼합하여 QuantStudio 1 Real-Time PCR (ThermoFisher, USA)로 측정함 Internal control로 18S ribosomal RNA (18S rRNA)를 사용함
- TNF- α , IL-1 β 및 IL-6의 발현이 LPS처리 군에서 각각 5.8배, 16.6배, 4배 증가하는 것을 확인하였고 표고버섯 추출물을 처리하였을 때 유전자 발현정도가 TNF- α 는 대조군 대비 1.8배, 1.4배를 보였고, IL-1 β 는 1.18배, 1.27배를 나타냈으며, IL-6는 1.69배, 2.84배를 보여 LPS에 의해 유도된 cytokine 발현이 자외선 조사한 표고버섯 추출물에 의해 감소함을 확인함

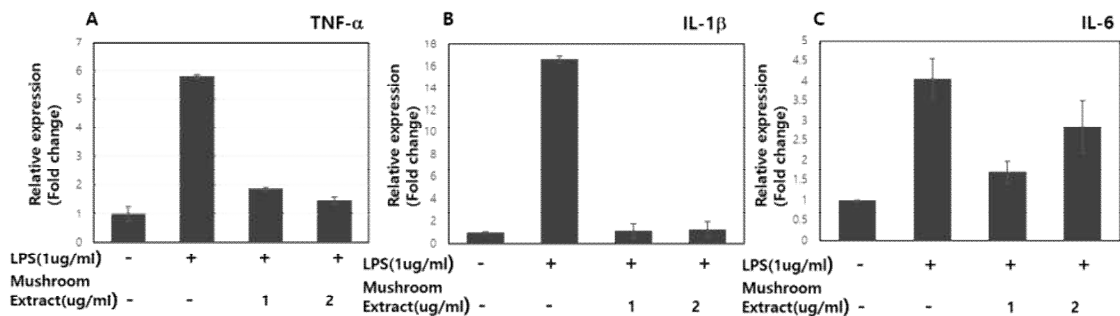


그림 160. Effect of mushroom(*Lentinula edodes*) extracts by UV irradiation on gene expression of inflammatory cytokines in LPS stimulated RAW 264.7 cells. RAW 264.7 cells were treated with mushroom extract at the indicated concentrations. After incubation, the mRNA expression levels of TNF- α (A), IL-1 β (B) and IL-6 (C) were evaluated by real-time PCR. Data represent the mean \pm S.D. with three different experiments.

6) 버섯 추출물의 항알레르기 효과

- 버섯 추출물의 항알레르기 효능은 히스타민 분비량 측정으로 확인함 Histamine 분비량은 rat basophil

세포주를 통해 확인함 RBL-2H3 세포를 24 well plate에 1×10^5 cell/ml이 되도록 분주하고 24 hr 배양하고 농도별 시료 처리 후 PMA (50 nM) 과 A23187 (1 μ M)를 8 hr 처리하여 histamine을 유리시킴 배양이 끝난 상층액을 96 well plate에 옮기고 histamine ELISA kit (abcam, UK)를 이용하여 측정함

- 표고버섯 추출물 처리에 의해 histamine 분비가 59%감소하는 효과를 확인함
- 또한 비만세포가 분비하는 염증유발 cytokine 인 IL-4를 측정하였고 버섯 추출물을 처리하였을 경우 감소하는 효과를 확인함

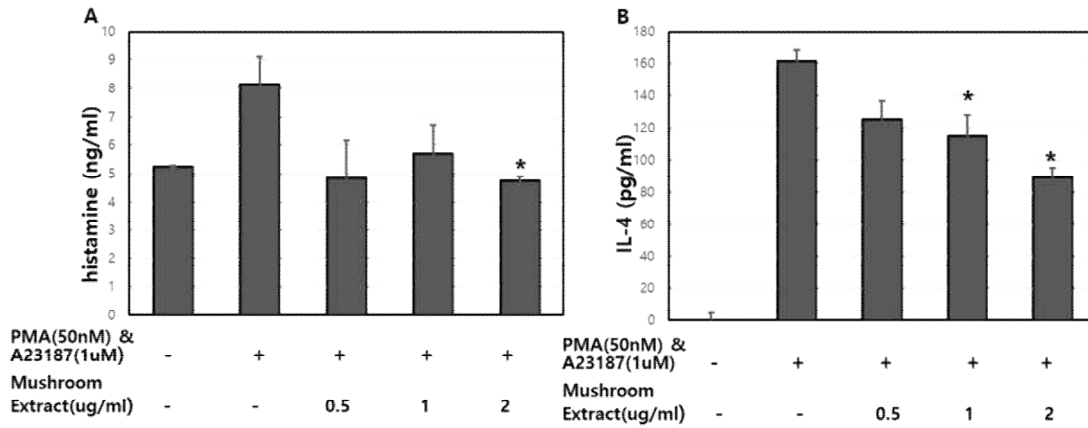


그림 162. Effect of mushroom(*Lentinula edodes*) extracts by UV irradiation on histamine release and cytokine stimulation. RBL-2H3 cells were pretreated with mushroom extract for 30 min prior to the PMA(50 nM) and A23187(1 μ M) stimulation. Histamine release(A) and IL-4 production(B) were measured in the medium of RBL-2H3 cells by immunoassay as described in materials and methods. Data represent the mean \pm S.D. with three different experiments. Level of significance was identified statistically using Student' s t test. *p<0.05, compared with the PMA & A23187

(2) 정량적 연구개발성과

(해당 시 작성하며, 연구개발과제의 특성에 따라 수정이 가능합니다)

성과 목표	사업화지표										연구기반지표									
	지식 재산권			기술 실시 (이전)		사업화					기술 인증	학술성과				교육 지도	인력 양성	정책 활용·홍 보		기 타 (타 연 구 활 용 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		
												SCI	비 SCI						논 문 평 균 IF	
단위	건	건	건	건	백 만 원	건	백 만 원	백 만 원	명	백 만 원	건	건	건	건	명	건	건			
가중치	10	5		5	5	35	10		15				5					10		
최종목표	3	3		12	70	10	17,550	1,900	11			5	3					7		
1차연도									2											
2차연도									2											
3차연도									2											
4차연도									2											
5차연도									2											
소계	2	2		2	20	5	50		6			4	2					2		
실적	5	1		2	22	5	0		6			4	1	8	4			2		
종료 1차연도	1			2	10	1	500	100	1			1	1					1		
종료 2차연도		1		2	10	1	2,000	300	1									1		
종료 3차연도				2	10	1	5,000	500	1									1		
종료 4차연도				2	10	1	5,000	500	1									1		
종료 5차연도				2	10	1	5,000	500	1									1		
소계	1	1		10	50	5	17,500	1,900	5			1	1					5		
합계	3	3		12	70	10	17,550	1,900	11			5	3					7		

(3) 세부 정량적 연구개발성과(해당되는 항목만 선택하여 작성하되, 증빙자료를 별도 첨부해야 합니다)

[과학적 성과]

□ 논문(국내외 전문 학술지) 게재

번호	논문명	학술지명	주저자명	호	국명	발행기관	SCIE 여부 (SCIE/비SCIE)	게재일	등록번호 (ISSN)	기여율
1	Ultraviolet B-irradiated mushroom supplementation increased the Ca ⁺⁺ uptake and ameliorated the LPS-induced inflammatory responses in zebrafish larvae	Journal of Food Biochemistry	Debasish Kumar Dey	-	미국	WILEY	SCIE	2021.04.07	1745-4514	100
2	버섯 종류별 비타민 D 함량 증가 조사	한국식품영양과학회지	표재성	49(3)	대한민국	-	비SCIE	2020.01.23.	1226-3311	100
3	Quercetin enhances vitamin D2 stability and mitigate the degradation influenced by elevated temperature and pH value	Turkish Journal of Chemistry	Sukkum Ngullie CHANG 1	45	Turky	TUBITAK	SCIE	2021.08.27.	1300-0527	100
4	Anti-inflammatory and anti-allergic effects of Lentinula edodes extract by UV irradiation	생명과학회지	황미선	32	대한민국	한국생명과학회	비SCIE	2022.5	1225-9918	100
5	Quercetin Mitigates Oxidative Stress, Developmental Toxicity and Teratogenic Effects Induced by High-dose Vitamin D2 in Zebrafish Embryos	TURKISH JOURNAL OF FISHERIES AND AQUATIC SCIENCES	Sukkum Ngullie CHANG 1	22	Turky	Central Fisheries Research Institute of Turkey and Japan International Cooperation Agency (IICA)	SCIE	2022.03	1303-2712	100

□ 국내 및 국제 학술회의 발표

번호	회의 명칭	발표자	발표 일시	장소	국명
1	한국식품영양과학회	이지한	2019.10.24.	제주 ICC	대한민국
2	한국응용생명화학회 E-conference	Debasish Kumar Dey	2020.08.20.	-	대한민국
3	한국식품영양과학회	김민지	2020.10.21	제주 ICC센터	대한민국
4	환경농학회	Sukkum Chang	2021.07.01	여수 소노캄	대한민국
5	한국응용생명화학회	Debasish Kumar Dey, Sukkum Chang	2021.08.23	라마다 플라자 제주	대한민국
6	한국식품영양과학회	송유림	2021.10.27	부산 BEXCO	대한민국
7	대한약학회 약품분석학분과학회	조은수	2022.02.22	온라인	대한민국
8	한국응용생명화학회	Sukkum Chang	2022.06.27.	바르미 호텔인터볼고, 대구	대한민국

□ 기술 요약 정보

연도	기술명	요약 내용	기술 완성도	등록 번호	활용 여부	미활용사유	연구개발기관 외 활용여부	허용방식

보고서 원문

연도	보고서 구분	발간일	등록 번호

생명자원(생물자원, 생명정보)/화합물

번호	생명자원(생물자원, 생명정보)/화합물 명	등록/기탁 번호	등록/기탁 기관	발생 연도

[기술적 성과]

지식재산권(특허, 실용신안, 의장, 디자인, 상표, 규격, 신제품, 프로그램)

번호	지식재산권 등 명칭 (건별 각각 기재)	국명	출원				등록			기여율	활용 여부
			출원인	출원일	출원 번호	등록 번호	등록인	등록일	등록 번호		
1	LED UV-B를 이용한 버섯의 vit-D 강화 방법	대한민국	(주)랩피플	19.07.23	10-2019-0088862	-	-	-	-	100	
2	버섯의 비타민D 함량 증대 장치 및 이를 이용한 버섯의 제조방법	대한민국	주식회사 네이처텍 외 1명	2021.04.27.	10-2021-0054317	-	주식회사 네이처텍 외 1명	2021.11.18	10-2330075	100	√
3	UV-LED 자외선조사를 통해 비타민D2 함량이 증대된 버섯추출물을 유효성분으로 포함하는 골형성 촉진용 약학 조성물 및 이의 용도	대한민국	대구대학교 산학협력단 외 1명	2021.05.03.	10-2021-0057329	-	-	-	-	100	
4	표고버섯의 바이칼린 함량 증강 방법	대한민국	주식회사 네이처텍	2022.04.06	10-2022-0043034	-	-	-	-	100	√
5	UV-LED 자외선조사를 통해 비타민 D2 함량이 증대된 버섯추출물을 유효성분으로 포함하는 골형성 촉진용 및 항염증용 약학 조성물의 제조방법	대한민국	대구대학교 산학협력단 외 1명	2022.06.13.	10-2022-0071702	-	-	-	-	100	

○ 지식재산권 활용 유형

※ 활용의 경우 현재 활용 유형에 √ 표시, 미활용의 경우 향후 활용 예정 유형에 √ 표시합니다(최대 3개 중복선택 가능).

번호	제품화	방어	전용실시	통상실시	무상실시	매매/양도	상호실시	담보대출	투자	기타
2			√							
4			√							

저작권(소프트웨어, 서적 등)

번호	저작권명	창작일	저작자명	등록일	등록 번호	저작권자명	기여율

신기술 지정

번호	명칭	출원일	고시일	보호 기간	지정 번호

기술 및 제품 인증

번호	인증 분야	인증 기관	인증 내용		인증 획득일	국가명
			인증명	인증 번호		

□ 표준화

○ 국내표준

번호	인증구분 ¹⁾	인증여부 ²⁾	표준명	표준인증기구명	제안주체	표준종류 ³⁾	제안/인증일자

- * 1) 한국산업규격(KS) 표준, 단체규격 등에서 해당하는 사항을 기재합니다.
- * 2) 제안 또는 인증 중 해당하는 사항을 기재합니다.
- * 3) 신규 또는 개정 중 해당하는 사항을 기재합니다.

○ 국제표준

번호	표준화단계구분 ¹⁾	표준명	표준기구명 ²⁾	표준분과명	의장단 활동여부	표준특허 추진여부	표준개발 방식 ³⁾	제안자	표준화 번호	제안일자

- * 1) 국제표준 단계 중 신규 작업항목 제안(NP), 국제표준초안(WD), 위원회안(CD), 국제표준안(DIS), 최종국제표준안(FDIS), 국제표준(IS) 중 해당하는 사항을 기재합니다.
- * 2) 국제표준화기구(ISO), 국제전기기술위원회(IEC), 공동기술위원회1(JTC1) 중 해당하는 사항을 기재합니다.
- * 3) 국제표준(IS), 기술시방서(TS), 기술보고서(TR), 공개활용규격(PAS), 기타 중 해당하는 사항을 기재합니다.

[경제적 성과]

□ 시제품 제작

번호	시제품명	출시/제작일	제작 업체명	설치 장소	이용 분야	사업화 소요 기간	인증기관 (해당 시)	인증일 (해당 시)
1	표고버섯 정제	2021.05.20	(주)네이처텍	-	식품	3년	-	-
2	표고버섯 과립	2021.05.20	(주)네이처텍	-	식품	3년	-	-
3	표고버섯 젤리	2021.05.20	(주)네이처텍	-	식품	3년	-	-
4	엔티 비타민 D	2022.03.14.	(주)네이처텍	-	건강기능식품	3년	-	-
5	자연담은 버섯시즈닝	2022.05.05.	(주)네이처텍		식품	3년	-	-

□ 기술 실시(이전)

번호	기술 이전 유형	기술 실시 계약명	기술 실시 대상 기관	기술 실시 발생일	기술료 (해당 연도 발생액)	누적 징수 현황
1	자가실시	버섯의 비타민D 함량 증대 장치 및 이를 이용한 버섯의 제조방법	(주)네이처텍	2021.06.01.	11,004,000원	-
2	자가실시	표고버섯의 바이칼린 함량 증강 방법	(주)네이처텍	2022.05.09	11,004,000원	-

- * 내부 자금, 신용 대출, 담보 대출, 투자 유치, 기타 등

□ 사업화 투자실적

번호	추가 연구개발 투자	설비 투자	기타 투자	합계	투자 자금 성격*

□ 사업화 현황

번호	사업화 방식 ¹⁾	사업화 형태 ²⁾	지역 ³⁾	사업화명	내용	업체명	매출액		매출 발생 연도	기술 수명
							국내 (천원)	국외 (달러)		

- * 1) 기술이전 또는 자기실시
- * 2) 신제품 개발, 기존 제품 개선, 신공정 개발, 기존 공정 개선 등
- * 3) 국내 또는 국외

□ 매출 실적(누적)

사업화명	발생 연도	매출액		합계	산정 방법
		국내(천원)	국외(달러)		
합계					

210mm×297mm[(백상지(80g/m²) 또는 중질지(80g/m²)
(22쪽 중 9쪽)]

□ 사업화 계획 및 무역 수지 개선 효과

성과					
사업화 계획	사업화 소요기간(년)				
	소요예산(천원)				
	예상 매출규모(천원)	현재까지	3년 후	5년 후	
	시장 점유율	단위(%)	현재까지	3년 후	5년 후
		국내 국외			
향후 관련기술, 제품을 응용한 타 모델, 제품 개발계획					
무역 수지 개선 효과(천원)	수입대체(내수)	현재	3년 후	5년 후	
	수출				

□ 고용 창출

순번	사업화명	사업화 업체	고용창출 인원(명)			합계
			2019년	2020년	2021년	
1	신규인력 고용	(주)네이처텍	2	2	2	6
합계						

□ 고용 효과

구분		고용 효과(명)	
고용 효과	개발 전	연구인력	27
		생산인력	157
	개발 후	연구인력	24
		생산인력	157

□ 비용 절감(누적)

순번	사업화명	발생연도	산정 방법	비용 절감액(천원)
합계				

□ 경제적 파급 효과

(단위: 천원/년)

구분	사업화명	수입 대체	수출 증대	매출 증대	생산성 향상	고용 창출 (인력 양성 수)	기타
해당 연도							
기대 목표							

□ 산업 지원(기술지도)

순번	내용	기간	참석 대상	장소	인원

210mm×297mm[(백상지(80g/m²) 또는 종질지(80g/m²)

(22쪽 중 10쪽)

□ 기술 무역

(단위: 천원)

번호	계약 연월	계약 기술명	계약 업체명	계약업체 국가	기 징수액	총 계약액	해당 연도 징수액	향후 예정액	수출/ 수입

[사회적 성과]

□ 법령 반영

번호	구분 (법률/시행령)	활용 구분 (제정/개정)	명 칭	해당 조항	시행일	관리 부처	제정/개정 내용

□ 정책활용 내용

번호	구분 (제안/채택)	정책명	관련 기관 (담당 부서)	활용 연도	채택 내용

□ 설계 기준/설명서(시방서)/지침/안내서에 반영

번호	구분 (설계 기준/설명서/지침/안내서)	활용 구분 (신규/개선)	설계 기준/설명서/ 지침/안내서 명칭	반영일	반영 내용

□ 전문 연구 인력 양성

번호	분류	기준 연도	현황											
			학위별				성별		지역별					
			박사	석사	학사	기타	남	여	수도권	충청권	영남권	호남권	기타	
1	경성대학교	2019		2					2			2		
2	경성대학교	2021		4	2		1	5				6		
3	경성대학교	2022		1			1					1		
4	대구대학교	2021	2				1	1				2		
5	대구대학교	2022	1				1					1		

□ 산업 기술 인력 양성

번호	프로그램명	프로그램 내용	교육 기관	교육 개최 횟수	총 교육 시간	총 교육 인원

다른 국가연구개발사업에의 활용

번호	중앙행정기관명	사업명	연구개발과제명	연구책임자	연구개발비

국제화 협력성과

번호	구분 (유치/파견)	기간	국가	학위	전공	내용

홍보 실적

번호	홍보 유형	매체명	제목	홍보일
1	전시회참가	박람회	바이오코리아2021	2021.06.09.-11
2	전시회참가	박람회	바이오코리아2022	2022.05.11.-13

포상 및 수상 실적

번호	종류	포상명	포상 내용	포상 대상	포상일	포상 기관

210mm×297mm[(백상지(80g/m²) 또는 중질지(80g/m²)
(22쪽 중 11쪽)]

[인프라 성과]

연구시설·장비

구축기관	연구시설/ 연구장비명	규격 (모델명)	개발여부 (○/×)	연구시설·장비 종합정보시스템* 등록여부	연구시설·장비 종합정보시스템* 등록번호	구축일자 (YY.MM.DD)	구축비용 (천원)	비고 (설치 장소)

* 「과학기술기초법 시행령」 제42조제4항제2호에 따른 연구시설·장비 종합정보시스템을 의미합니다.

[그 밖의 성과](해당 시 작성합니다)

(4) 계획하지 않은 성과 및 관련 분야 기여사항(해당 시 작성합니다)

Vit D 전환 표고버섯 분말의 대사체 분석을 통하여 바이칼린의 증대를 확인하고 이를 특허출원 하였음.

특허 출원된 기술의 자사 기술이전으로 본 연구개발 기술의 차별점을 부여함

2) 목표 달성 수준

[연차별 목표 및 달성 내용, 수준]

	추진 목표	달성 내용	달성도(%)
1차년도	○ 지역별/품종별 원료확보 및 협력 네트워크 구축	○ 후보소재 5종 버섯 원료 확보 및 전환수율 측정완료, 버섯선정 완료	100
		○ MOU 3건 체결	100
	○ 비타민D 전구체 함량 및 전환수율 기초자료 확보	○ UVB 처리 최적 조건 테스트	100
	○ 제품경제성 비교 평가를 통한 우선개발 순위원료 선정	○ 버섯 5종 비타민 D 전구체 (ergosterol) 함량 및 단가 비교	100
	○ 비타민D 최적전환/추출 공정 개발 및 최적화	○ 버섯 5종의 UVB 0,5,10,15,20,30 분 조사 후 최적조건 확립	100
	○ 원료소재의 이화학적 특성 및 안전성 분석	○ 동물세포주와 Zebrafish model 을 이용한 안전성 평가	100
	○ 비타민 D 전구체 및 미타민 D 함량부식기술 개발 및 표준화	○ 식품공전 및 유기용매 사용 간이 추출법 비교 평가	100
2차년도	○ 소재 대량생산 및 품목(원료) 신고	○ 소재 원물 1ton 기준 건조물 200 kg 대량 생산 완료	100
		○ 품목신고 2건 완료	100
	○ 소재 내 비타민D 표준화	○ 비타민D 최적 처리 조건 구명 완료	100
	○ 소재 이화학적 특성 및 안전성 분석	○ 소재 in vivo 안전성 평가 완료	100
		○ 소재 이화학적 특성 분석 완료	100
	○ proto-type 시제품 연구 및 제작	○ 시제품 연구 개발 및 제작 3건 완료	100
	○ proto-type 시제품 유효성 탐색	○ 시제품 유효성 탐색 완료	100
	○ 제품화를 위한 적용성, 기호도 평가 및 마케팅 전략 수립	○ 시제품 제형 연구 개발 완료	100
○ 기호도 평가 완료		100	
○ 마케팅 전략 수립 완료		100	
3차년도	○ proto-type 시제품 기반 가공적성 최적화 실시	○ 정제와 분말 제품의 가공적성 최적화 확인	100
		○ 정제제품의 안정성결과 확보	100
	○ 개발제품 등록	○ 고시형건강기능식품 1건, 일반식품 1건 제품 등록 완료	100
	○ 제품 유효성 및 안전성 평가	○ 제품의 항염, 항알레르기효과 시험 실시	100
		○ GAG test, 랫드에서 단회독성 시험 실시	100
	○ 제품 대량생산 및 출시	○ 대량생산을 위한 (주)네이처텍 생산 시스템 등록 및 공급처 공급계약 완료	100
○ 출시준비 중 - 건강기능식품 품목제조 신고 완료, 제품 출시를 위한 MOU 체결		50	

[과제 목표별 성과]

목표	성과
<ul style="list-style-type: none"> 고함량 천연비타민D 버섯 소재 생산을 위한 최적 전처리/전환 공정 표준화 기술의 개발과 보급 확산 및 현장적용 통한 대량생산 	UV 조사 등 최적 조건 확립/공정표준화 - 제조공정도 확보 - 기술의 보급 및 확산 : (주)네이처텍에 기술이전 2건 완료 - 대량생산 : 표고버섯 원물 기반 원료 1 ton 생산 완료
<ul style="list-style-type: none"> 전환/수율 최적화 기술을 활용한 고함량 천연비타민D 원료 소재 2종 이상 상용화 	고함량 비타민D 원료 소재 2종 - 분말원료 제품 -> 제품 등록 완료 - 액상원료 제품 -> 제품 등록 완료
<ul style="list-style-type: none"> 고함량 천연비타민D 버섯 소재를 활용한 3종 이상 제품 생산 및 상용화 	- 시제품 3건 생산 완료 : 분말, 정제, 젤리 - 품목 등록 : 자연담은 버섯 시즈닝 (일반식품) - 혼합 제품 : 엔티 비타민 D (규격적부심사완료, 품목제조신고 원료) - 비건 건강기능식품 개발을 위한 MOU 체결 : 마케팅 자료 및 상용화 진행 중
<ul style="list-style-type: none"> UVB를 이용하여 5종의 후보 버섯소재 (새송이, 느타리, 팽이, 양송이, 표고)에 각각 함유된 '비타민D 전구체(ergosterol)' 를 '비타민D2(ergocalciferol)' 로 전환시켜 최적 수율을 도출 할 수 있는 최적 전처리 조건 및 공정 확립 	관련 기술에 대한 특허 출원 및 등록 완료 기술이전 1건 완료
<ul style="list-style-type: none"> 2종 이상의 원료 소재와 3종 이상의 제품에 대한 대량생산과 현장적용을 위한 공정 개발 확립 및 제품 표준화 	고함량 비타민D 원료 소재 2종 - 분말원료 제품 -> 제품 등록 완료 - 액상원료 제품 -> 제품 등록 완료 - 시제품 3건 생산 완료 : 분말, 정제, 젤리 - 품목 등록 : 표고버섯 시즈닝 (일반식품) - 혼합 제품 : 엔티 비타민 D (규격적부심사완료, 품목제조신고 원료)
<ul style="list-style-type: none"> 비타민D 전환기술과 제조 공정 기술의 이전/보급 확산으로 표준화 된 원료소재의 생산과 상용화 	(주)네이처텍에 기술이전 2건 완료
<ul style="list-style-type: none"> '활성형 비타민D' 제품 개발을 통한 기존 제품과의 차별화 도출 	공정 및 안정성 시험결과 연구기간내 제품화 어려움
<ul style="list-style-type: none"> 미래원천기술 확보를 위한 소재의 기능성 탐색 연구 	대사체 분석을 통한 바이칼린 증대 확인 - 특허 출원 1편 염증 반응에 대한 효과 확인 - 논문 1편 항알러지 효과에 대한 연구 - 논문 1편

4. 목표 미달 시 원인분석(해당 시 작성합니다)

1) 목표 미달 원인(사유) 자체분석 내용

1) 특허 등록

- 본과제의 목표는 특허 등록 2건으로 연구과제 수행기간 중 특허 심사시간을 고려하여 출원을 진행하였으나 출원 과정 중 시험 결과 확보와 코로나 19로 인한 연구시설 폐쇄 등으로 일정이 지연되어 과제 종료시점에는 특허 등록 1건을 달성함

2) 제품 출시 및 매출

- 제품 출시를 위한 대량 생산 시스템 등록 완료 및 건강기능식품 품목신고를 완료하였음. 연구수행 중 제품에서 비타민 D2 의 불안정성이 발견되어 비타민 D3 와 합제를 개발하여 빠른 제품 출시를 계획하였으나 안정성 문제로 제품 출시가 지연되었음

3) 액상비타민 D 제품 개발

- 액상에서 불안정한 비타민 D를 안정화 시키기 위하여 여러 물질을 테스트 하였으나 최종 제품적용에는 제품 단가와 생산 안전성 등에 적용하기 어려운점이 있어 액상제품 개발은 중도에 중단되고 정제와 분말 제품개발에 집중하였음

2) 자체 보완활동

1) 특허 확보를 위한 추가 연구 수행

- 본 연구과제의 주요 성과물인 비타민 D 전환 표고버섯 분말의 제품성 및 타 버섯 유래 제품과 차별점을 확보하기 위하여 대사체 분석을 실시하였음. 대사체 분석결과 UVB 에 의하여 버섯분말에 항염, 항알러지 등 여러 약리작용을 가진 바이칼린이 증대 되는것을 발견하여 이를 기반으로 특허를 추가 출원하였음. 기존의 유가 특허들과를 차별점을 가지는 것으로 특허 등록 가능성이 높은것 으로 기대하고 있음. 과제 종료 후에도 지속적인 성과관리는 위하여 특허를 출원하였음. 특허 추가 출원
- 기존 특허의 거절에 전략적 대응. 출원한 특허가 거절될 가능성이 높다는 의견을 수용하여 기존 특허의 장점을 살리고 특허 등록성공율을 높이기 위하여 분할출원을 진행하였음.
- 추가로 출원된 특허들은 신속심사를 신청하여 빠른 시일 안에 성과를 도출하기 위한 보완활동을 수행하고 있음

2) 제품 출시를 위한 노력

- 제품의 차별점을 가지기 위한 대사체분석연구를 추가적으로 수행하였음.
- 기존의 식물성 비타민 D의 한계점에 바이칼린이라는 유효성분의 특징점을 추가하여 추후 마케팅 전략에 적극 활용할 예정임
- 최근 일고 있는 비건 열풍에 대응하기 위하여 버섯 유래 비타민 D 를 강조하고 기타 부원료등 제품 처방능력을 확보하고 있는 당사의 연구소에서 비건제품의 개발진행을 검토 중에 있음
- 추출물이 아닌 홀푸드개념으로 표고버섯 분말의 제품화를 진행하였고 이를 11월에 개최되는 미국 최대의 건강기능식품 원료 박람회인 SSW 에 출시 및 마케팅 활동을 위한 자료 준비 중
- 비건제품의 출시를 위하여 고객사와 MOU 체결

3) 마케팅 계획

- 1차적으로 관계사 제품개발에 원료를 소개하여 기존제품 활용방안 논의 및 제품 출시지원 예정
- 표고버섯 분말의 비건인증 원료화 진행 및 Vit D3 와 합제연구를 통한 마케팅자료 확보
- ODM 고객사 네트워크(LG생활건강, 롯데헬스원, NS홈쇼핑, 에스더, 동국제약, 등) 중심 ODM용 독점 소재 영업/마케팅.
- 해외관계사의 경우 버섯을 건조시켜 분말화 시킨 공정을 강조하여 홀푸드 측면의 스토리 텔링으로 마케팅자료 작성 11월 해외 박람회 참석시 고객사에 마케팅 활동예정
- 과제 종료에 따른 사업화 계획

	제품화(건)	매출액(백만원)	수출액(백만원)	고용창출(명)
--	--------	----------	----------	---------

과제 종료 1차년도	1	200	100	1
과제 종료 2차년도	1	400	200	1
과제 종료 3차년도	3	1000	500	2
과제 종료 4차년도	5	1500	1000	1
과제 종료 5차년도	5	1500	1000	1
계	15	4,600	2,800	6

3) 연구개발 과정의 성실성

- 표고버섯 분말의 제품화를 위한 차별화를 위한 추가 연구를 수행하였음.
- 2차년도에 대량생산 원료 확보를 마무리하여 3차 년도 분말화를 위한 연구비 절감효과 발생
- 비타민 D2 의 안정성을 보강하기 위한 D3 합제 개발
- 각 연구기관에서 기존 원료 및 최종 제품으로 다양한 평가를 통하여 비타민 D 전환 표고버섯분말의 약리적 효능을 평가하여 추후 이를 더 다양한 제품으로 개발가능성을 높였음
- 최근 식품 뿐 아니라 건강기능식품에서도 주목하고 있는 홀푸드 및 비건제품에 대한 제품개발을 검토 함으로써 제품출시를 위한 노력을 지속하고 있음 (제품출시를 위한 고객사와 MOU 체결)

5. 연구개발성과의 관련 분야에 대한 기여 정도

○ 기술적 성과

- 과제 진행 중 총 5 건의 특허 출원 및 1건의 등록을 통해 국내에서 원료에서부터 비타민D 전환/추출까지 자체적으로 활용할 수 있는 기술을 개발하여 국내외 천연 비타민D 시장에서 우월한 위치를 선점할 수 있도록 함
- 또한 대사체 분석을 통하여 기존 단순한 비타민 D 제품에서 차별점과 장점을 확보함
 - UV-LED 자외선조사를 통해 비타민D2 함량이 증대된 버섯추출물을 유효성분으로 포함하는 골형성 촉진용 약학 조성물 및 이의 용도
- 본 연구개발 과제성과인 두건의 특허 기술을 기술이전하여 제품화 및 상업화를 진행할수 있음.
 - 버섯의 비타민D 함량 증대 장치 및 이를 이용한 버섯의 제조방법
 - 표고버섯의 바이칼린 함량 증강 방법

○ 경제적 성과

- 버섯 생산에 생계를 의존하고 있는 농가의 경우 계약 재배 등을 통해 지속적이고도 안정적인 수입을 기대할 수 있으며 본 연구개발과제에서 선정된 표고버섯의 경우 건조 건조 등 가공이후 모양이 부서진것의 상품가치가 떨어지는것을 활용하기 때문에 농가소득향상에 도움이 됨
- 또한 당사의 생산과 관련하여 안정적인 버섯 원물 공급 계약을 체결함으로써 향후 제품화 증대시 계약 농가의 증가 및 관련 분야의 고용증대 효과를 기대 할 수 있음

○ 사회적 성과(일자리 창출 등)

- 과제 진행 중 총 6건의 고용창출 성과를 달성하였으며 과제 종료 이후에도 본 제품 개발을 위한 연구인력 및 생산, 영업인력 등의 고용창출을 기대함 사
- 사업에 참여한 (대학 청년 등) 인력의 기술 전문화는 관련 산업 분야에서 기술 실무에 대한 교육 관리 전문 인력으로서의 자격을 갖추게 되어 창업은 물론이고 관련 산업체에 고용될 수 있는 기회를 가질 것으로 전망됨
- 건의 특허 출원 및 1건의 등록을 통해 국내에서 원료에서부터 비타민D 전환/추출까지 자체적으로 활용할 수 있는 기술을 개발하여 국내외 천연 비타민D 시장에서 우월한 위치를 선점할 수 있도록

함

- 버섯을 활용한 고품질 천연비타민D 소재/제품의 개발을 통한 안전한 먹거리 도출로 국민건강 보호 및 소비자 신뢰도 증가
- 1, 2, 3차산업 활성화 및 경제 성장에 따른 관련 종사자의 사회적 만족도 상승
- 관련 산업 활성화 및 육성에 따른 전문 기술인력 등의 수요 증가로 고용 기회 확대

6. 연구개발성과의 관리 및 활용 계획

- 연구 개발 기간 중 논문 발표 비SCIE 4건, 연구개발 종료 후 1건
- 연구 개발 기간 중 특허출원 2건, 연구개발 종료 후 1건
- 연구 개발 기간 중 특허 등록 2건, 연구 종료 후 특허 등록 1건
- 연구 개발 기간 중 기술이전 2건, 연구 종료 후 기술이전 10건
- 연구 개발 기간 및 종료 후 발생한 내용을 바탕으로 기술이전 10건 진행 예정

<연구성과활용계획표>

구분(정량 및 정성적 성과 항목)		연구개발 종료 전	연구개발 종료 후 5년 이내
논문	SCIE	-	-
	비SCIE	4	1
	계	4	1
특허출원	국내	2	1
	국외	-	-
	계	2	1
특허등록	국내	2	1
	국외	-	-
	계	2	1
사업화	상품출시	5	5
	기술이전	2	10
	고용창출	6	5
성과홍보		2	-