



(19)대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(51) 。 Int. Cl.
A23L 1/28 (2006.01)

(11) 공개번호 10-2007-0082617
(43) 공개일자 2007년08월22일

(21) 출원번호 10-2006-0015418
(22) 출원일자 2006년02월17일
심사청구일자 2006년02월17일

(71) 출원인 경상대학교산학협력단
경상남도 진주시 가좌동 900
(주)에이치케이바이오텍
경상남도 진주시 수곡면 원계리 612-14

(72) 발명자 하영래
경남 진주시 주악동 407-1번지 금호석류아파트 105-1602
김정옥
경남 진주시 수곡면 원계리 612-14번지
김정인
부산 금정구 구서2동 185-1번지 12통 8반 선경2차아파트8동 1002호
정관주
경남 진주시 사봉면 사곡리 454번지

(74) 대리인 진천웅
조현동

전체 청구항 수 : 총 6 항

(54) 아가리쿠스버섯균사체 동결건조물, 에탄올침전물, 에틸아세테이트 분획물 및 이것의 제조방법

(57) 요약

본 발명은 아가리쿠스버섯균사체 동결건조물, 에탄올침전물, 에틸아세테이트 분획물 및 이것의 제조방법에 관한 것으로, 특히 아가리쿠스버섯균사를 배양시키는 단계; 상기 배양된 배양물을 열수추출하여 열수추출물시료를 제조하는 단계; 상기 열수추출물시료에서 찌꺼기가 제거된 배양여액을 분리하고, 상기 배양여액을 감압농축하여 농축액을 얻는 단계; 및 상기 농축액을 동결건조시키는 단계;를 포함하는 아가리쿠스버섯균사체 추출물 제조방법에 의하는 경우, 이로부터 제조된 동결건조물, 에탄올침전물, 에틸아세테이트 분획물은 알파글루코시다제의 저해활성에 우수한 효과가 있으며, 정상인과 제2형 당뇨병환자에 있어서 식후 혈당증가를 유의 적으로 감소시켜 인체에 있어서 당뇨병 예방 및/또는 치료에 우수한 효과가 있다.

대표도

도 1

특허청구의 범위

청구항 1.

아가리쿠스버섯균주를 배양시키는 단계;

상기 배양된 배양물을 열수추출하여 열수추출물시료를 제조하는 단계;

상기 열수추출물시료에서 찌거기가 제거된 배양여액을 분리하고, 상기 배양여액을 감압농축하여 농축액을 얻는 단계; 및

상기 농축액을 동결건조시키는 단계;를 포함하는 아가리쿠스버섯균사체 동결건조물 제조방법.

청구항 2.

제1항에 따른 제조방법으로 제조되어, 혈당강화 효과를 가지는 것을 특징으로 하는 아가리쿠스버섯균사체 동결건조물.

청구항 3.

아가리쿠스버섯균주를 배양시키는 단계;

상기 배양된 배양물을 열수추출하여 열수추출물시료를 제조하는 단계;

상기 열수추출물시료에서 찌거기가 제거된 배양여액을 분리하고, 상기 배양여액을 감압농축하여 농축액을 얻는 단계;

상기 농축액을 동결건조시켜서 동결건조물을 제조하는 단계; 및

상기 동결건조물을 물에 용해시키고 에탄올을 첨가한 후, 원심분리하여 침전물을 분리하는 단계;를 포함하는 아가리쿠스버섯균사체 에탄올 침전물 제조방법.

청구항 4.

제3항에 따른 제조방법으로 제조되어, 혈당강화 효과를 가지는 것을 특징으로 하는 아가리쿠스버섯균사체 에탄올 침전물.

청구항 5.

아가리쿠스버섯균주를 배양시키는 단계;

상기 배양된 배양물을 열수추출하여 열수추출물시료를 제조하는 단계;

상기 열수추출물시료에서 찌거기가 제거된 배양여액을 분리하고, 상기 배양여액을 감압농축하여 농축액을 얻는 단계;

상기 농축액을 동결건조시켜서 동결건조물을 제조하는 단계;

상기 동결건조물을 물에 용해시키고 에탄올을 첨가한 후, 원심분리하여 제1상등액을 분리하는 단계;

상기 제1상등액에 트리카르복실산(tricarboxylic acid: TCA)을 첨가하여 제2상등액을 분리하는 단계; 및

상기 제2상등액을 에틸아세테이트(ethylacetate) 용액으로 분획하여 분획물을 얻는 단계;를 포함하는 아가리쿠스버섯균사체 에틸아세테이트 분획물 제조방법.

청구항 6.

제5항에 따른 제조방법으로 제조되어, 혈당강하 효과를 가지는 것을 특징으로 하는 아가리쿠스버섯균사체 에틸아세테이트 분획물.

명세서

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

본 발명은 아가리쿠스버섯균사체에 관한 것으로, 특히 아가리쿠스버섯균사체 동결건조물, 에탄올침전물, 에틸아세테이트 분획물 및 이것의 제조방법에 관한 것이다. 더욱 상세하게는, 아가리쿠스버섯균주의 배양, 열수추출, 배양여액 분리, 감압농축, 동결건조 과정을 거쳐서 아가리쿠스버섯균사체 추출물을 제조방법하는 방법이다.

최근 현대인의 식생활 패턴 변화로 당뇨인구가 증가하고 있으며, 통계청 자료에 의하면 당뇨병은 현재 한국 성인의 사망요인 중 제 4위를 차지하고 있다. 당뇨병(糖尿病, diabetes mellitus)은 인체의 혈액 중의 포도당(혈당)이 정상인 보다 그 농도가 높아져서 소변에 포도당을 배출하는 만성질환을 말하는데, 발병원인으로는 췌장의 랑게르한스섬의 베타(β)세포에서 분비되는 인슐린의 부족, 뇌하수체전엽, 부신, 갑상선 등의 내분비선 기능항진, 중추신경 특히 시상하부의 병변 등을 들 수 있는데, 이들 인자가 합쳐져서 발병하는 것으로 생각되고 있다.

이를 위하여, 인슐린은 포도당으로부터 글리코겐의 생성, 포도당의 산화 및 지방으로의 전화 등을 촉진하는 작용이 있어서, 인슐린의 수용액을 주사하면 혈당이 저하되므로 당뇨병의 치료에 쓰인다. 당뇨병환자를 치료하는 방법으로는 보리, 두류와 같은 식이 섬유를 많이 함유하는 식품의 섭취하는 식이요법, 금사상황버섯추출물의 알파아밀라제 효소활성억제에 의한 당뇨병예방 및 치료효과(한국공개특허공보 2p2001-327), 뽕나무 잎 추출물, 누에 등 각종식이요법과 설폰요소제, meglitinide, buanide, 알파글루코시다제, thiazolodinedione와 같은 약물요법이 사용되고 있다.

민간 식이요법에 비해 약물요법은 치료효과가 빠른 반면, 장기사용시 유산혈증, 복부팽만, 구토, 복통, 간독성과 같은 심각한 부작용이 있다. 이러한 이유로 많은 당뇨병 환자들이 약물치료법보다는 식이요법을 통한 혈당조절을 하고 있지만, 이들 식이요법에 사용되는 식품소재에 관한 과학적인 근거가 미흡하고, 그 효과가 미약한 것이 현재의 사실이다. 이와 같은 이유로, 당뇨병 치료를 위해 혈당강하에 효과가 있으면서도 부작용이 없는 천연물 유래 식품소재의 발굴이 절실하다.

발명이 이루고자 하는 기술적 과제

본 발명은 상기와 같은 문제점을 해결하기 위하여 안출된 것으로, 아가리쿠스버섯균사체를 배양시키고 자가분해 효소 반응을 유도하며 그 반응물로부터 제조된 동결건조물, 에탄올 침전물, 에틸아세테이트(ethylacetate) 분획물과 이들을 얻기 위한 제조방법을 제공하기 위한 것이다.

그리고, 이러한 본 발명에 의해 제조된 아가리쿠스버섯균사체 추출물, 즉 아가리쿠스버섯균사체 동결건조물, 에탄올침전물, 에틸아세테이트 분획물을 통하여, 알파글루코시다제(말타제)의 저해활성에 우수한 효과를 가지며, 정상인과 제2형 당뇨병환자에 있어서 식후 혈당증가를 유의적으로 감소시켜 인체의 당뇨병 예방 및/또는 치료에 이바지하는 것을 본 발명의 목적으로 한다.

또한, 본 발명에 따른 아가리쿠스버섯균사체 동결건조물, 에탄올침전물, 에틸아세테이트 분획물을 섭취하게 함으로써, GLUT4의 gene expression을 증가시키고 말초조직에서 glucose transport를 증가시켜 혈당 개선효과를 나타낼 수 있는 당뇨병 예방 및 치료용 조성물을 제공함에 그 목적이 있다.

발명의 구성

상기한 목적을 달성하기 위한 본 발명은 아가리쿠스버섯균사체에 관한 것으로, 특히 아가리쿠스버섯균사체 동결건조물, 에탄올침전물, 에틸아세테이트 분획물 및 이것의 제조방법에 관한 것이다. 더욱 상세하게는, 아가리쿠스버섯균주의 배양, 열수추출, 배양여액 분리, 감압농축, 동결건조 과정을 거쳐서 아가리쿠스버섯균사체 추출물을 제조하는 방법이다.

이러한 본 발명은 혈당강하 효과를 가지는 추출물을 제조하기 위하여 아가리쿠스버섯(*Agaricus blazei*)균주를 이용하는 것이 특징이다. 금사상황버섯은 재배기간이 길고(6개월-3년) 따라서 원료자체가 고가인데 비해, 아가리쿠스버섯 균사체는 배양기간이 짧고(3-7일) 따라서 원가자체가 저렴하여, 당뇨병환자가 지속적으로 사용하는데 있어 부담을 경감시킬 수 있는 소재이다. 따라서, 본 발명자들은 아가리쿠스버섯 균사체를 배양한 다음, 자가분해효소반응계를 이용하여 목적하는 조성물을 제조한 다음, 이로부터 보다 혈당저하효과가 큰 분획물을 추출함으로써 본 발명을 완성하였다.

여기서, 아가리쿠스버섯균사체 추출물이라 함은 본 발명에 따른 아가리쿠스버섯균사체 동결건조물, 에탄올침전물, 에틸아세테이트 분획물을 모두 포함하여 지칭하며, 본 발명에 따른 상기 동결건조물은 아가리쿠스버섯균사체를 배양하고, 열수추출한 뒤, 배양여액을 분리하고, 감압농축 과정을 거쳐서, 동결건조됨으로써, 제조되는 것이고, 상기 에탄올침전물은 상기 동결건조물을 물에 용해시키고 에탄올을 첨가한 후, 원심분리하여 침전물을 분리하는 단계를 거쳐서 제조되는 것을 특징으로 한다.

또한, 상기 에틸아세테이트 분획물은 상기 동결건조물을 물에 용해시키고 에탄올을 첨가한 후, 원심분리하여 제1상등액을 분리하는 단계;와 상기 상등액에 트리카르복실산(tricarboxylic acid: TCA)을 첨가하여 제2상등액을 분리하는 단계; 및 상기 제2상등액을 에틸아세테이트(ethylacetate) 용액으로 분획하여 분획물을 얻는 단계;를 거쳐서 제조되는 것이 특징이다.

이러한 본 발명을 더욱 구체적으로 설명하면 아래와 같다.

먼저, 본 발명은 아가리쿠스버섯균주를 배양시키는 단계; 상기 배양된 배양물을 열수추출하여 열수추출물시료를 제조하는 단계; 상기 열수추출물시료에서 찌꺼기가 제거된 배양여액을 분리하고, 상기 배양여액을 감압농축하여 농축액을 얻는 단계; 및 상기 농축액을 동결건조시키는 단계;를 포함하는 아가리쿠스버섯균사체 동결건조물 제조방법이다.

본 발명에 따라 혈당강하효과를 지닌 아가리쿠스버섯균사체 추출물 제조방법은, 먼저 대두에 프로테아제 및 세투라아제 효소를 처리한 다음, 황백당, 황산마그네슘, 인산칼륨을 첨가하여 조제한 배지에 아가리쿠스버섯균사체를 접종하여 액체배양한다. 여기서, 아가리쿠스버섯 원균은 한국국립종자관리소로부터 분양 받아서 (주)HK바이오텍에서 배양한 것을 사용하였고, 배양조건은 15내지 35℃에서 폭기하여 3내지 7일간 배양시키는 것이 가능하다.

그리고, 상기 배양은 삼각플라스크에 액체배지와 아가리쿠스버섯균주를 혼합시켜 소량으로 배양하는 과정과 대량으로 배양하는 2단계 배양과정을 거칠 수 있고, 배양 후에는 아가리쿠스버섯균사체 배양물을 자가분해시키는 과정을 더 거치는 것도 가능하다.

또한, 이러한 본 발명에 있어서 배양된 배양물을 열수추출하여 열수추출물시료를 제조하는 단계는 배양물을 100℃ 내지 150℃에서 열수추출한 뒤, 실온으로 냉각시키고 필터로 거른 여액을 농축시켜서 열수추출물시료를 준비하는 것이 바람직하다. 본 발명에서는 이러한 열수추출물시료를 SLAB로 명명하였다. 이어서, 상기 열수추출물시료(SLAB)를 필터로 여과하여 찌꺼기와 배양여액을 분리하고, 상기 배양여액을 감압농축하여 농축액을 얻는다. 그리고, 상기 농축액을 동결건조시킴으로서, 본 발명에 따른 아가리쿠스버섯균사체 동결건조물을 제조하는 것이다.

여기서, 본 발명의 다른 목적을 달성하기 위한 다른 실시형태는 상기한 동결건조물 제조방법으로 제조되어, 혈당강하 효과를 가지는 것을 특징으로 하는 아가리쿠스버섯균사체 동결건조물이 바람직하다. 본 발명자는 이러한 동결건조물을 HEAB-FD(Freeze Drying)이라 명명하였고, 이하에서는 HEAB-FD를 이용하여, 아가리쿠스버섯균사체 에탄올 침전물과 에틸아세테이트 분획물을 제조하는 방법을 설명한다.

본 발명에 따른 아가리쿠스버섯균사체 추출물의 하나로, 아가리쿠스버섯균사체 에탄올 침전물 제조방법은 아가리쿠스버섯균주를 배양시키는 단계; 상기 배양된 배양물을 열수추출하여 열수추출물시료를 제조하는 단계; 상기 열수추출물시료에서 찌꺼기가 제거된 배양여액을 분리하고, 상기 배양여액을 감압농축하여 농축액을 얻는 단계; 상기 농축액을 동결건조시켜서 동결건조물을 제조하는 단계; 및 상기 동결건조물을 물에 용해시키고 에탄올을 첨가한 후, 원심분리하여 침전물을 분리하는 단계;를 포함한다.

즉, 상술한 아가리쿠스버섯균사체 동결건조물을 제조한 이후에, 도 1에 나타난 바와 같이 상기 동결건조물을 물에 용해시키고 에탄올을 첨가한 후, 원심분리하여 침전물을 분리하는 단계;를 거치는 것이다. 도 1은 본 발명의 바람직한 일 실시예에 따른 아가리쿠스버섯균사체 동결건조물(HEAB-FD)을 유기용매로 순차적으로 분획하는 단계를 나타내는 흐름도이다.

도 1에 도시된 바와 같이, 상기 동결건조물을 물이나 증류수에 첨가하여 시료를 용해하고, 여기에 에탄올(EtOH)을 첨가한 후, 하루쯤 방치한 뒤 원심분리하여 상등액(supernatant)과 침전물(Precipitation: PPT)을 분리하는 것이다. 아가리쿠스버섯균사체 에탄올 침전물은 바로 도 1의 좌측 흐름도를 따라 제조되는 침전물을 의미하는 것이다. 이러한 침전물을 상기 동결건조물을 에탄올을 이용하여 침전시킨 것이 특징이므로 에탄올 침전물이라 하였고, 이러한 에탄올 침전물은 도 1에 나타난 흐름도를 따라 반복적으로 에탄올에 의해 침전된 후, 원심분리하여 침전물로 분리할 수 있다.

여기서, 본 발명의 다른 목적을 달성하기 위한 다른 실시형태는 상기한 에탄올 침전물 제조방법으로 제조되어, 혈당강화 효과를 가지는 것을 특징으로 하는 아가리쿠스버섯균사체 에탄올 침전물이 바람직하다.

또한, 본 발명에 또 다른 아가리쿠스버섯균사체 추출물의 하나로 아가리쿠스버섯균사체 에틸아세테이트 분획물 제조방법은 아가리쿠스버섯균주를 배양시키는 단계; 상기 배양된 배양물을 열수추출하여 열수추출물시료를 제조하는 단계; 상기 열수추출물시료에서 찌꺼기가 제거된 배양여액을 분리하고, 상기 배양여액을 감압농축하여 농축액을 얻는 단계; 상기 농축액을 동결건조시켜서 동결건조물을 제조하는 단계; 상기 동결건조물을 물에 용해시키고 에탄올을 첨가한 후, 원심분리하여 제1상등액을 분리하는 단계; 상기 제1상등액에 트리카르복실산(tricarboxylic acid: TCA)을 첨가하여 제2상등액을 분리하는 단계; 및 상기 제2상등액을 에틸아세테이트(ethylacetate) 용액으로 분획하여 분획물을 얻는 단계;를 포함하여 이루어지는 것이 특징이다.

즉, 본 발명에 따른 아가리쿠스버섯균사체 에틸아세테이트 분획물 제조방법은 도 1의 오른쪽 흐름도에 나타난 바와 같다. 먼저, 상술한 동결건조물을 물에 용해시키고 에탄올을 첨가한 후, 원심분리하여 제1상등액을 분리하는 단계를 거치고, 상기 제1상등액으로부터 에탄올을 증발시킨 뒤, 10% 트리카르복실산(tricarboxylic acid: TCA)을 첨가하여 하루 뒤에 원심분리로 제2상등액을 분리하는 단계를 거치는 것이다. 이후에는 상기 제2상등액을 에틸아세테이트(ethylacetate) 용액으로 분획하여 분획물을 얻는 단계;를 거치는데, 그 전에 헥산(hexane) 용액과 클로로포름(chloroform) 용액으로 분획시키는 단계를 더 거칠 수도 있다.

여기서, 본 발명의 다른 목적을 달성하기 위한 다른 실시형태는 상기한 에탄올 침전물 제조방법으로 제조되어, 혈당강화 효과를 가지는 것을 특징으로 하는 아가리쿠스버섯균사체 에틸아세테이트 분획물이 바람직하다.

이하, 실시예를 통하여 본 발명의 혈당강화효과를 지닌 아가리쿠스버섯균사체 추출물(동결건조 조성물, 에탄올 침전물, ethylacetate 분획물)의 제조방법을 상세히 설명하고, 이로부터 제조된 상기 추출물의 기능성 특징과 혈당저하기능 및 관련 효과에 대한 실시예를 상세히 설명한다. 그러나, 이들 실시예는 본 발명의 예시일 뿐, 본 발명이 이에 한정되는 것은 아니다.

실시예: 1 아가리쿠스버섯균사체 추출물 제조

1) 삼각플라스크 배양 (500 ml)

대두분해물 0.4%, prolin 1%, xylose 1%, 황백당 2%, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.05%, KH_2PO_4 0.05%로 조제된 액체배지(300 ml)를 삼각플라스크 (500 ml)에 첨가하고 고압멸균(121℃, 30분)한 다음, 실온으로 냉각한 후 PDA배지에서 생육한 아가리쿠스버섯균주(*Agaricus blazei*)를 지름 7mm이하로 잘게 잘라 접종하고 shaking incubator(130 rpm, 25℃, 8일)에서 배양하였다

2) 배양기 대량배양

상기“1)”의 방법과 동일한 액체배지(350l)를 대량배양조(500l)에 첨가하고 고압멸균(121℃, 60분)한 다음, 냉각조를 이용하여 충분히 식힌 후 상기“1)”의 방법으로 배양한 아가리쿠스 배양물 30l를 접종한 후, 3일간 배양하여(75 rpm, 25℃) 배양물을 얻었다.

3) 아가리쿠스버섯균사체 배양물의 자가분해

아가리쿠스버섯균사체 배양액을 55±5℃에서 3시간동안 반응시킨다.

4) 열수추출물시료의 조제

상기와 같이 자가분해시킨 아가리쿠스버섯균사체 배양물을 121℃에서 60분간 열수추출하고, 실온으로 냉각시킨 다음 규조토가 함유된 filter press를 통과시킨다. 이렇게 필터를 통과한 여액을 농축시킨 뒤 농축된 것을 열수추출물시료(SLAB)로 사용하였다.

5) 동결건조물(HEAB-FD)의 조제

상기 SLAB 350ℓ를 ultra-membrane filter로 여과하여 찌거기와 배양여액을 분리하였다. 또, 분리된 배양 여액을 1,000ℓ 농축조 (75℃)에서 약 20배 정도로(Brix 50) 감압 농축하여 15ℓ의 농축액을 얻었다. 이상의 배양방법과 농축기술로 얻어진 배양농축액을 동결건조기를 이용해 동결건조하여 본 발명에 따른 동결건조물 HEAB-FD를 얻었으며, 이러한 HEAB-FD 건조중량 596 g/1ℓ의 시료를 얻어 분석 및 임상용 시료로 활용하였다.

6) 에탄올침전물과 에틸렌아세테이트 분획물의 조제

상기 HEAB-FD 시료 50g을 150 ml의 증류수에 첨가하여 시료를 용해하였다. 여기에 800 ml의 95% EtOH을 첨가하여 (75% EtOH 용액) 4℃ 냉장고에 하루 방치한 후 원심분리(10,000 rpm, 10 min)하여 상등액과 침전물을 분리한 다음 각각을 도 1에 도시된 흐름도를 따라 분획하였다.

즉, 동결건조물 50g로부터 에탄올(EtOH)침전물(β -D-Glucan, 약간의 다른 다당체 포함됨)을 10.4 g을 얻었고, 제1상등액에 10% TCA를 첨가하여 단백질 침전물(PPT) 0.3 g을 얻었다. 이후에는 유기용매의 순차적 분획법에 의하여 hexane, chloroform, ethylacetate, butanol, 수용성 분획을 각각 0.6, 4.8, 7.9, 12.1, 13.9 g을 얻었다. 그 결과는 하기의 표 1에 나타난 바와 같다. 분석용 시료는 건조물 50 g으로부터 얻은 분획을 사용하였다.

[표 1: 아가리쿠스버섯균사체 동결건조물 중의 용매분획물의 함량]

분획	함량 (g)	구성비 (%)
β -D-Glucan (75% EtOH ppt)	10.4	20.8
Protein (10% TCA ppt)	0.3	0.6
Hexane	0.6	1.2
Chloroform	4.8	9.6
Ethylacetate	7.9	15.8
Butanol	12.1	24.2
others (water sol. fraction)	13.9	27.8
합계	50	100

실험예 1: 아가리쿠스버섯균사체 추출물의 항당뇨 효과(α -glucosidase: maltase 활성억제 효과)

α -glucosidase(maltase, 50 μ l, Sigma, USA; 0.7 U/mL)와 Acarbose 5 mg/mL용액 및 본 발명에 따른 아가리쿠스버섯균사체 추출물 10 μ l를 96-well plate에 넣고 Microplate reader(Model 550, Biorad, USA)를 사용하여 OD₄₀₅를 측정하였다. 5분 후에 기질용액(5 mM p-nitrophenyl- α -D- glucopyranoside in 0.1 M phosphate buffer, pH 7.0) 50 μ l를 첨가하고 실온에서 5분간 반응시킨 뒤, OD₄₀₅를 측정하여 흡광도 변화로부터 효소저해활성을 계산하였다.

실험결과, 하기 표 2에 나타난 바와 같이, 종래 보고된 금사상황버섯(한국공개특허공보 제2001-327호)이나 영지버섯(한국공개특허공보 제2001-327호 인용), 아카보스와 비교해 볼 때, α -glucosidase의 저해율은 대조구를 0%로하고 아카보스처리구를 99±0.7%로 할 때 아가리쿠스버섯균사체 동결건조물 처리구는 80±1.3%, 에탄올침전물은 104±1.7%, 에틸

아세트레이트(ethylacetate) 분획물은 $160 \pm 1.5\%$ 로 나타났다. 즉, 동결건조물은 금사상황버섯, 영지버섯에 비해 높은 저해율을 나타내었지만, 아카보스처리구에 비해서는 낮은 저해율을 보였다. 에탄올침전물과 에틸아세트이트 분획물은 이들에 비해 높은 저해율을 보였다.

[표 2: 흰쥐의 장내 알파글루코시다제에 대한 아가리쿠스버섯균사체 조성물의 억제효과]

	대조구	아카보스	아가리쿠스버섯균사체추출물			금사상황 버섯	영지버섯
			동결건조 조성물 (HEAB-FD)	에탄올 침전물	Ethylacetate 분획물		
저해정도 (%)	0	99 ± 0.7	80 ± 1.3	104 ± 1.7	160 ± 1.5	73 ± 1.7	25 ± 1.4

저해정도: 평균±표준편차, 단위: % 농도: 2mg/ml

실험예 2: 아가리쿠스버섯균사체 동결건조물의 항당뇨 효과(제1형 당뇨병 모델에서 혈당강하효과: Streptozotocin (STZ)-induced diabetes rat 실험)

1) 단기실험

실험동물의 당뇨 유발을 위해 0.1 M citrate buffer(pH 4.5)에 용해시킨 streptozotocin(STZ, Sigma Co., USA, 65 mg/kg)을 체중 230g ~ 270g의 흰쥐(SD)의 복강에 주사하여 당뇨를 유발시켰다. STZ 투여 1주일 후 공복상태의 동물의 꼬리 정맥으로부터 채혈하여 간이 혈당계(Glucotrend, Germany)로 측정한 혈당이 200mg/dL 이상일 때 당뇨병이 유발된 것으로 간주하여 실험에 사용하였다. 실험동물식은 하기의 표 3과 같은 조성을 갖고 AIN-93M basal diet를 사용하였다.

[표 3: 대조군과 동결건조물(HEAB-FD) 첨가군의 식이]

성분	Basal diet (%) ¹⁾	동결건조시료첨가 식이(%) ²⁾
Corn starch	39.75	39.75
Casein	20.00	16.18
Dextrinized cornstarch	13.20	13.20
Sucrose	10.00	6.98
Alpha-cellulose	5.00	3.15
Mineral mixture	3.50	3.50
Vitamin mixture	1.00	1.00
L-cystine	0.30	0.30
Choline bitartrate	0.25	0.25
Tert-butyl hydroquinone	0.0014	0.0014
Soybean oil	7.00	6.93
10% HEAB-FD	—	10.0

¹⁾ AIN-93M basal diet, ²⁾ Hot water extract of submerged liquid culture of mushroom strains.

당뇨가 유발된 쥐를 난괴법으로 두 군으로 나눈 후, 밤 동안 12시간 절식시킨 후, 꼬리정맥에서 채혈하여 혈당을 간이혈당계로 측정하였다. 대조군(n=7)은 soluble starch(1 g/kg, Sigma Co., USA)를, 시료 투여군(n=7)은 soluble starch(1 g/kg) 및 동결건조시료(HEAB-FD, 500 mg/kg)를 생리식염수에 용해하여 gastric intubation 하였다. 투여 후 30, 60, 90, 120, 180, 240분에 꼬리 정맥에서 채혈하여 혈당을 측정하였다. 각 시점의 혈당 증가치를 계산하여 혈당증가곡선을 구하고, 혈당증가곡선의 면적(area under the curve, AUC)을 계산하였다.

실험 결과, 도 2와 표 4에서 보는 바와 같이, 공복 상태의 대조군에게 전분(1 g/kg)을 투여한 후의 혈당 증가는 30, 60분에 각각 128.6 ± 14.0 , 140.6 ± 15.7 mg/dL로 나타났다. 전분과 함께 HEAB-FD시료(500 mg/kg)을 투여한 경우 30, 60분에 혈당 증가가 각각 76.7 ± 5.1 , 101.0 ± 10.6 mg/dL로 나타나, 대조군에 비해 유의적으로 낮게 나타났다($P < 0.05$).

HEAB-FD시료의 식후혈당증가곡선의 area under the curve(AUC)는 $10,027 \pm 944$ mg·min/dL로 나타나, 대조군($13,381 \pm 1,306$ mg·min/dL)에 비해 유의적으로 작았다($P < 0.05$). 따라서, HEAB-FD 시료는 당뇨병에 있어서 식후 혈당증가를 저하하는 효과가 있음을 알 수 있다.

[표 4. STZ-유발 제 1형 당뇨병에 HEAB처리군에서 식후 혈당증가를 저하 효과]

그룹(Group)	AUC (mg·min/dL)
대조군(Control)	$13,381 \pm 1,306$
HEAB-FD ¹⁾	$10,027 \pm 944$ ²⁾

¹⁾ Submerged liquid culture of AB.

²⁾ significantly different at $p < 0.05$.

2) 장기 실험

체중 220 ~ 250g의 수컷 흰쥐에게 STZ(65 mg/kg)를 복강에 주사하여 당뇨를 유발시키고, STZ 투여 1주일 후 공복상태의 동물의 꼬리정맥으로부터 채혈하여 측정된 혈당이 200 mg/dL 이상일 때 당뇨병이 유발된 것으로 간주하여 실험에 사용하였다. 난괴법으로 동물을 두 군으로 나눈 후, 대조군에게는 AIN-93G basal diet를, 실험군에게는 HEAB-FD시료를 10% 함유한 diet를 자유급식으로 8주간 섭취시켰다. 대조군과 실험군의 식이별 탄수화물, 단백질, 지방, 식이섬유의 함량을 동일하게 하였고, 복합당과 단순당의 섭취 비율도 유사하도록 하였다(표 3).

실험 동물의 체중과 식이 섭취량은 매주 2회 측정하였다. 해당식이 섭취 8주째, 동물을 12시간 절식 시킨 후 heart puncture로 실험동물을 희생시켰다. 혈액으로부터 혈장을 분리하여 실험에 사용하였다. 혈액 당화해모글로빈은 크로마토그래피법으로 측정하였고, 혈장 포도당은 효소법으로 측정하였다.

실험결과, 주간 대조식이 및 HEAB-FD시료를 섭취시킨 결과 대조군 및 HEAB-FD시료군의 혈액 당화해모글로빈의 농도는 각각 $6.9 \pm 0.4\%$, $6.2 \pm 0.3\%$ 로 HEAB-FD시료군의 당화해모글로빈 농도가 낮은 경향을 나타내었다(도 3). 당화해모글로빈은 당뇨병 환자에게서 3-4개월 전의 평균 혈당을 알 수 있는 방법으로 중요한 혈당 조절 지표로 이용되고 있다. 따라서 HEAB-FD의 장기간 섭취는 당화 해모글로빈 농도를 감소시켜 장기간 혈당조절에 효과가 있었다.

혈장중의 포도당 농도는 도 4에 나타내었다. 10% HEAB의 FD시료군의 공복혈당은 295.7 ± 14.4 mg/dL로 대조군(341.6 ± 14.6 mg/dL)에 비해 유의적으로 낮았다($P < 0.05$). 따라서 *in vitro* 및 *in vivo*에서 α -glucosidase 저해활성을 나타낸 HEAB-FD시료는 STZ로 당뇨병을 유발한 제1형 당뇨병동물모델에 있어서도 혈당강하 효과를 나타내었다. 당뇨병 치료에 있어서 가장 중요한 목표는 혈당 조절이며 혈당 조절은 당뇨병환자의 주요 사망요인인 합병증의 예방 및 치료에 있어서도 가장 중요한 요인으로 알려져 있다. 따라서 아가리쿠스 활성성분의 장기간 섭취는 식후 혈당 뿐만 아니라 공복 혈당 또한 감소시켜 당뇨 치료에 효과가 있음을 나타내었다.

실험예 3: 제1형 당뇨병 모델(db/db mouse 실험)에서 당뇨병과 관련하여 유발되는 합병증 예방 및/또는 치료효과

1) 혈장 중성지방 및 콜레스테롤 농도

상기 실험예 2의 시험에서 사용된 제1형 당뇨병쥐로부터 채취한 혈장 중성지방 농도 및 콜레스테롤 농도를 효소법으로 측정하였다. 혈장 중성지방 농도와 콜레스테롤 농도는 HEAB-FD시료군에서 낮은 경향을 나타내었다(표 5). 당뇨병상태의 지질 농도 감소는 신장의 병변 및 관상 동맥질환 등의 당뇨병합병증 예방에 도움이 된다고 알려져 있다. 따라서 HEAB-FD의 섭취는 당뇨 합병증인 심혈관계질환 및 신장의 병변 예방에 중요한 역할을 할 것으로 사료된다.

[표 5: HEAB-FD식을 섭취한 제1형 당뇨병모델의 혈중 중성지질함량과 콜레스테롤함량]

구분(Treatment)	Triglyceride (mg/dL)	Cholesterol (mg/dL)
대조군(Control)	142.7 ± 40.7	143.7 ± 17.8
HEAB-FD	135.2 ± 45.4	129.1 ± 33.2

2) Alanine aminotransferase(GOT), Aspartate aminotransferase(GPT) 활성

상기 실험에 2의 시험에서 사용된 제1형 당뇨병모델로부터 채취한 혈장 중의 GOT와 GPT의 활성을 효소법으로 측정한 결과, GOT 활성은 HEAB의 FD시료군이 161.0 ± 7.6 U/L로 대조군(203.8 ± 18.4 U/L)에 비해 유의적으로 낮았다(표 6). 혈장 GPT 활성은 HEAB의 FD시료군이 대조군에 비해 낮은 경향을 나타내었다. GOT, GPT는 간세포에 다량으로 존재하는 효소로서 지방간이 유발되거나 간이 손상되었을 때 혈액속으로 유출되어 효소활성도가 높아진다. HEAB의 FD시료 섭취는 당뇨병으로 인한 간기능 손상을 억제할 수 있다는 가능성을 나타내었다.

[표 6: HEAB-FD식을 섭취한 제1형 당뇨병모델의 혈장 GOT(U/L)와 GPT(U/L)활성]

구분(Treatment)	GOT (U/L)	GPT (U/L)
대조군(Control)	203.8 ± 18.4 ^a	162.7 ± 36.7
HEAB-FD	161.0 ± 7.6 ^b	137.6 ± 20.2

^a Significantly different at p<0.05

3) 혈장 blood urea nitrogen (BUN)

상기 실험에 2의 시험에서 사용된 제1형 당뇨병모델로부터 채취한 혈장중의 BUN의 농도를 효소법으로 측정하였다. 대조군 및 HEAB의 FD시료군의 심장 손상지표인 혈장 BUN 농도는 유의적 차이가 없었다(도 5).

실험예 4: 아가리쿠스버섯균사체추출물 동결건조물의 항당뇨 효과(제2형 당뇨병 모델(db/db mouse 실험)을 이용한 혈당 강하효과조사)

생후 4주된 제2형 당뇨병모델 수컷 db/db mouse(n = 16)를 두 군으로 나누어, AIN-93G basal 식이 및 10% HE 동결건조 시료를 첨가한 식이를 6주간 섭취시켰다. 식이별 탄수화물, 단백질, 지방, 식이섬유의 함량을 동일하게 하였고, 복합당과 단순당의 섭취 비율도 유사하도록 하였다(표 3). 동물에게 식이는 *ad libitum*으로 공급하였고, 사육실의 온도 및 습도는 20~25℃, 50~60%로 유지하였고, 명암은 12시간 간격으로 점등 및 소등하였다.

실험동물의 체중 및 식이 섭취량은 일주일에 두 번 측정하였다. 해당 식이 섭취 6주째 14시간 절식시킨 동물을 심장 채혈 방법으로 희생시켜 혈액 및 장기를 수집하였고, 혈액으로부터 혈장을 분리하여 실험에 사용하였다. 혈액 당화헤모글로빈은 크로마토그래피법에 의해 측정하였고, 혈장 포도당은 효소법으로 측정하였다.

실험결과, 혈액 당화헤모글로빈, 혈장 포도당 및 혈장 인슐린 농도를 표 7에 나타내었다. Db/db mouse에 있어서 HEAB-FD시료의 장기간 섭취는 공복혈당과 혈장 인슐린 농도를 유의적으로 감소시켰다(P<0.05). 당화헤모글로빈 농도는 HEAB-FD시료군이 감소하는 경향을 나타내었다. 당뇨병치료에 있어서 가장 중요한 목표는 혈당조절로 HEAB-FD시료 활

성분은 공복 혈당을 낮추어 당뇨치료에 효과가 있음을 나타내었으며, HEAB-FD시료 활성성분의 섭취로 인한 혈당의 저하는 인슐린 요구도를 감소시켜 인슐린 농도를 감소시켰다. 혈액 당화헤모글로빈은 장기간의 혈당 변화를 나타내는 지표이므로, HEAB-FD시료 활성성분을 좀 더 장기간 섭취할 경우 유의적인 변화를 나타낼 것으로 기대된다.

[표 7: HEAB-FD식을 섭취한 제2형 당뇨쥐의 혈액 당화헤모글로빈, 혈장포도당, 및 혈장 인슐린농도]

구분(Treatment)	HbA _{1c} (%)	Glucose (mg/dL)	Insulin (ng/mL)
대조군(Control)	8.5 ± 0.3	328.7 ± 28.1	4.2 ± 1.1
HEAB-FD	8.2 ± 0.5	210.9 ± 17.5*	2.8 ± 0.8*

*Significantly different at p<0.05

실험예 5: 제2형 당뇨쥐 모델(db/db mouse 실험)에서 당뇨병과 관련하여 유발되는 합병증을 예방 및/또는 치료효과

1) 혈액 지질 profile 개선

상기 실험예 4의 시험에서 사용된 제2형 당뇨쥐로부터 채취한 혈장 중의 중성지방 농도 및 콜레스테롤 농도를 효소법으로 측정하였다. 총 콜레스테롤 농도는 178.0±9.3 mg/dL로 나타나, 대조군 (231.8±9.9 mg/dL)보다 유의적으로 낮게 나타났다(P<0.05). 대조군과 HEAB-FD시료군의 혈장 중성지방 농도는 유의적인 차이가 없었다(도 6). 장기간의 HEAB-FD 시료 활성성분의 섭취는 고콜레스테롤혈증을 개선하여, 동맥경화증을 포함한 심혈관계 합병증 예방에 기여하리라고 사료된다.

2) 혈장 GOT, GPT 활성

상기 실험예 4의 시험에서 사용된 제2형 당뇨쥐로부터 채취한 혈장 중의 GOT와 GPT의 활성을 효소법으로 측정한 결과, 혈장 GOT 활성은 아가리쿠스군이 324.6±12.8 U/L로 대조군 (399.4±32.8 U/L)에 비해 유의적으로 낮았다(P<0.05). 혈장 GPT 활성은 HEAB-FD 시료군(111.2±14.0 U/L)이 대조군(146.6±31.3 U/L)에 비해 낮은 경향을 나타내었다(도 8). GOT, GPT는 간세포에 다량으로 존재하는 효소로서 지방간이 유발되거나 간이 손상되었을 때 혈액 속으로 유출되어 효소 활성도가 높아진다. HEAB-FD시료의 섭취는 당뇨로 인한 간기능 손상을 억제할 수 있다는 가능성을 나타내었다.

3) 혈장 BUN 및 크레아티닌 농도

상기 실험예 4의 시험에서 사용된 제2형 당뇨쥐로부터 채취한 혈장 중의 BUN과 크레아티닌의 농도를 효소법으로 측정한 결과, 대조군 및 HEAB-FD시료군의 혈장 BUN 및 크레아티닌 농도는 유의적 차이가 없어 두 군의 신기능에는 큰 차이가 없었다(표 8).

[표 8: HEAB-FD식을 섭취한 제2형 당뇨쥐의 혈장 BUN(urea nitrogen)과 크레아티닌(creatinine)농도]

구분(Treatment)	BUN (mg/dL)	Creatinine (mg/dL)
대조군(Control)	25.8 ± 2.6	0.5 ± 0.2
HEAB-FD	24.3 ± 4.2	0.4 ± 0.1

4) 간 지질농도 측정

간 조직의 지질 추출은 Folch 등의 방법을 이용하였으며, 간지질 추출액의 총 콜레스테롤과 중성지방 농도는 효소법으로 측정하였다.

상기 실험예 4의 시험에서 사용된 제2형 당뇨병쥐로부터 채취한 간조직의 콜레스테롤 및 중성지방 농도는 각각 43.0 ± 1.9 mg/g protein, 73.1 ± 5.9 mg/g protein으로 대조군과 유의적 차이가 없었다(표 9).

[표 9: HEAB-FD식을 섭취한 제2형 당뇨병쥐의 간 cholesterol and triglyceride 함량]

구분(Treatment)	Cholesterol (mg/g liver)	Triglyceride (mg/g liver)
대조군(Control)	46.8 ± 3.7	77.4 ± 3.3
HEAB-FD	43.0 ± 1.9	73.1 ± 5.9

5) 간조직의 지질과산화물 및 catalase 활성 측정

간 조직의 지질과산화물의 측정은 Ohkawa 등의 방법을 이용하여, thiobarbituric acid(TBA)와 반응하는 malondialdehyde (MDA)의 함량을 측정하였고 표준용액으로는 1,1,3,3,-tetramethoxypropane(TMP)을 사용하였다. 간조직의 catalase 활성은 Abei법으로 측정하였으며, 효소 활성은 1분 동안 1μ mole의 기질을 분해시키는 효소의 양을 1unit로 하였다.

상기 실험예 4의 시험에서 사용된 제2형 당뇨병쥐로부터 채취한 간조직의 지질과산화물 및 catalase를 측정한 결과, HEAB-FD 치료군 간 조직의 TBARS 함량(2.58 ± 0.09 nmol MDA/mg protein)은 대조군(5.20 ± 0.18 nmol MDA/mg protein)에 비해 유의적으로 감소하여, 지질과산화물의 생성이 억제된 것으로 나타났다(도 7, $P < 0.05$). HEAB-FD 치료군의 catalase 활성은 2.84 ± 0.18 U/mg protein으로 대조군(2.33 ± 0.04 U/mg protein)에 비해 유의적으로 증가하였다(도 5, $P < 0.05$).

당뇨 동물에서는 유리자유기 생성계가 촉진됨으로써 지질과산화가 가속화되고, 따라서 조직의 과산화적 손상이 쉽게 초래된다. Catalase는 지질과산화물을 산소와 물로 전환시켜 조직을 과산화로부터 보호한다. 따라서, 당뇨병동물에 있어서 아가리쿠스 활성성분의 섭취는 catalase 활성을 증가시켜, 조직의 지질과산화를 억제하며 당뇨 합병증 개선효과를 나타낼 것으로 사료된다. 아가리쿠스 활성성분의 장기간 섭취는 당뇨병동물을 산화적 스트레스로부터 보호하여 당뇨병을 개선하는 효과가 있는 것으로 사료된다.

6) 간 조직의 glycogen 농도 및 PEPCK 측정

상기 실험예 4의 시험에서 사용된 제2형 당뇨병쥐로부터 채취한 간조직의 glycogen 농도는 Hassid와 Abraham의 방법으로 측정하였다. PEPCK 활성은 Chang과 Lane의 방법으로 측정하였으며, 효소 활성은 1분동안 1μ mole의 기질을 분해시키는 효소의 양을 1unit로 하였다.

대조군 및 HEAB-FD치료의 간 조직 glycogen 농도 및 PEPCK 활성은 유의적 차이가 없었다(표 10). 당뇨 동물의 경우 간에서 글리코겐의 분해가 촉진되고 당신생반응 또한 촉진되어 고혈당을 악화시키게 되는데, 아가리쿠스 활성성분의 섭취는 글리코겐 분해 및 당신생반응에는 유의적인 영향을 주지 않는 것으로 사료된다.

[표 10: HEAB-FD식을 섭취한 제2형 당뇨병쥐의 간 glycogen 함량과 PEPCK 활성]

구분(Treatment)	Glycogen (mg/g liver)	PEPCK (U/g protein)
대조구(Control)	35.3 ± 5.1	26.6 ± 1.3
HEAB-FD	34.6 ± 2.4	25.6 ± 1.5

실험예 6: 혈당조절 기전연구

당뇨동물모델계에 있어서 시료의 활성성분의 혈당조절 기전을 연구하기 위하여 생후 4주된 수컷 db/db mouse(n=16)를 두 군으로 나누어, AIN-93G basal 식이 및 10 % 첨가식을 6주간 섭취시킨 후, 14시간 절식시키고 희생시켰다. 소장 점막을 채취하여 탄수화물 소화효소 활성을 측정하였고, 간 및 서혜부 백색지방조직 (white adipose tissue, WAT)을 채취하여 insulin receptor 및 glucose transporter (GLUT4)의 gene expression에 미치는 영향을 조사하였다.

1) 소장효소 활성측정

소장에서 α -amylase 활성은 Bernfeld법을 이용하여 가용성 전분으로부터 효소에 의해서 유리된 전체 환원당의 함량으로 측정하였다. 효소 활성은 1분 동안 1 μ mole의 maltose를 유리시키는 효소의 양을 1unit로 하였다. 소장의 α -glucosidase (maltase) 및 sucrase 활성은 Dahqvist의 방법으로 측정하였으며, 효소 활성은 1분 동안 1 μ mole의 기질을 분해된 이당류의 양을 1unit로 하였다.

실험결과, 공복시 소장 점막의 α -amylase 활성은 HEAB-FD시료군이 0.69 ± 0.15 U/mg protein으로 대조군에 비해 유의적으로 낮았다(표 11, $P < 0.05$). HEAB-FD시료군의 소장내 α -glucosidase(maltase) 활성은 276.6 ± 11.7 U/g protein으로 대조군 (304.4 ± 5.3 U/g protein)에 비해 유의적으로 낮았으며($P < 0.05$), sucrase 활성은 HEAB-FD 시료군 (157.1 ± 14.8 U/g protein)이 대조군(190.5 ± 8.4 /g protein)에 비해 낮은 경향을 나타내었다(도 9).

식이중의 탄수화물은 아밀라제 및 이당류 분해효소의 작용에 의해 포도당으로 소화되어 흡수된다. 따라서 HEAB-FD의 장기간 섭취는 α -amylase 및 α -glucosidase 활성을 저해하여, 탄수화물 소화를 지연시킴으로써 식후 혈당 증가를 억제하고 이는 인슐린 요구도를 감소시키고 또한 인슐린 민감도를 개선하여 공복 혈당조절 효과를 나타내는 것으로 사료된다.

[표 11. HEAB-FD식이를 섭취한 제2형 당뇨병 쥐의 소장점막의 α -Amylase 활성]

구분(Treatment)	Amylase activity (U/mg protein)
대조구(Control)	1.07 ± 0.07
HEAB-FD	0.69 ± 0.15*

* Significantly different at $p < 0.05$

2) 간 및 지방조직의 glucose transport 및 insulin receptor 발현수준

시료의 장기적인 섭취가 insulin receptor, glucose transporter(GLUT4)의 gene expression에 미치는 영향을 조사하였다. 동물의 간, 지방조직 (WAT)의 total RNA를 TRI reagent (Sigma, St Louise, U.S.A.)를 사용하여 분리하였다. 분리된 total RNA를 1.2% formaldehyde-agarose gel에 fractionation한 후 Hybond N+ nylon membrane(Amersham pharmacia, USA)에 transfer 하였다. Target gene의 ^{32} P-labeled cDNA를 probe로 사용하여 northern blot hybridization을 실시하였다.

HEAB-FD 시료의 장기적인 섭취가 insulin receptor, glucose transporter(GLUT4)의 gene expression에 미치는 영향을 조사한 결과는 다음과 같다(도 10). HEAB-FD 시료군의 GLUT4 mRNA expression은 간 조직에서 2.6 ± 0.2 으로 대조군(1.0 ± 0.1)에 비해 유의적으로 증가되었으며(도 12, $P < 0.001$), 지방조직(1.3 ± 0.1)에서도 대조군(1.0 ± 0.1)에 비해 유의적으로 증가되었다(도 9, $P < 0.05$). 간조직 및 지방조직의 insulin receptor의 gene expression은 HEAB-FD 시료군과 대조군 사이에 유의적 차이가 없었다(도 11, 도 13). 따라서 HEAB-FD 활성성분의 섭취는 GLUT4의 gene expression을 증가시켜, 말초조직에서 glucose transporter를 증가시켜 혈당 개선효과를 나타내는 것으로 사료된다.

실험예 7: 간세포 모델에 있어서 혈당 조절효과

간세포(HepG-2 cell)를 사용하여 간세포의 당신생반응 효소(phosphoenolpyruvate carboxykinase, PEPCK) 및 glucose transporter 발현 정도를 western blot으로 측정하였다. HepG-2 cell은 한국세포주 은행에서 분양받아 DMEM 배지를 사용하였다. HepG-2세포를 6-well로 옮긴 후 시료를 10, 25, 50, 10 mg/ml의 농도로 1시간 또는 6시간 처리하였다.

간세포를 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na_2PO_4 , 2 mM KH_2PO_4 (pH7.4)가 함유된 PBS로 씻은 후 50-200 μL 의 triton lysis buffer (20 mM Tris, pH 7.4, 137 mM NaCl, 25 mM β -glycerophosphate, pH 7.14, 2 mM sodium pyrophosphate, 2 mM EDTA, 1 mM Na_3VO_4 , 1% Triton X-100, 10% glycerol, 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ leupeptin, 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ aprotinin, 3 μM benzamidin, 0.4 mM DTT, 1 mM PMSF)에 담겨 초음파 분해하였다.

그 후 각 sample에 대한 단백질을 정량하였으며, 그 중 10 μg 의 단백질의 발현은 anti-GLUT1, anti-GLUT4 antibody 및 anti-PEPCK1을 이용하여 확인하였다. Membrane protein을 12% SDS-PAGE 상에서 전기영동 시킨 후 PVDF membrane에 전기이동 시켰다. Antibody와의 비특이적 결합을 막기 위해 3% BSA, 0.1% Tween 20을 함유하고 있는 TBS buffer에서 membrane을 1시간 동안 상온 반응 시키고 4°C에서 16시간 동안 반응시켰다. 반응을 끝낸 membrane을 washing한 후 rat GLUT-4의 C-terminal에 특이적인 polyclonal antibody를 Blocking buffer에 1:1000의 비율로 희석하여 상온에서 30분 동안 반응시켰다. membrane을 씻어내고 anti-rabbit IgG가 결합되어 있는 horseradish peroxidase를 1대 1000의 비율로 희석하여 상온에서 30분 동안 처리 하고 다시 washing하였다. Membrane에 부착된 단백질을 Western blotting detection system을 이용하여 측정하였다.

HEAB-FD 시료 활성성분이 glucose transporter 1(GLUT1)의 발현에 미치는 영향을 조사한 결과는 다음과 같다(도 12). 간세포(HepG-2 cell)를 HEAB-FD시료에 1시간 및 6시간 동안 노출시킨 경우, HEAB-FD시료군의 GLUT1 protein expression은 10, 25, 50 mg/mL의 농도에서 대조군에 비해 증가하는 경향을 나타내었으나 유의적인 차이는 없었다.

HEAB-FD 시료 활성성분이 간세포(HepG-2 cell)의 glucose transporter 4(GLUT4)의 발현에 미치는 영향을 조사한 결과는 다음과 같다(도 13). HEAB-FD시료 활성성분에 1시간 노출시킨 경우 GLUT4 protein expression은 10, 25, 50 mg/mL의 농도에서 대조군(actin)에 비해 증가하는 경향을 나타내었으나 유의적인 차이는 없었다. HEAB-FD 시료 활성성분에 6시간 노출시킨 경우 GLUT4 protein expression은 25 및 50 mg/mL의 농도에서 대조군에 비해 유의적으로 증가하였다($p < 0.05$). 따라서 HEAB-FD시료 활성성분은 GLUT4 발현을 증가시켜, 혈당 조절효과를 나타내는 것으로 사료된다.

HEAB-FD 시료가 PEPCK의 발현에 미치는 영향을 조사한 결과는 다음과 같다 (도 14). 간세포(HepG-2 cell)를 HEAB-FD 시료 활성성분에 1시간 및 6시간 동안 노출시킨 경우, HEAB-FD시료군의 PEPCK protein expression은 10, 25, 50 mg/mL의 농도에서 대조군에 비해 감소하는 경향을 나타내었으나 유의적인 차이는 없었다.

실험예 8: 용매 분획물시료의 항당뇨 효과(α -glucosidase:maltase 활성억제)

동결건조물 50 g로부터 EtOH 침전물(β -D-Glucan, 약간의 다른 다당체 포함 됨)을 10.4 g, 상등액에 10% TCA를 첨가하여 단백질 0.3 g을 얻었다. 이후의 유기용매의 순차적 분획법에 의하여 hexane, chloroform, ethylacetate, butanol, 수용성 분획을 각각 0.6, 4.8, 7.9, 12.1, 13.9 g을 얻었다. 분석용 시료는 건조물 50 g 으로부터 얻은 분획을 사용하였다.

분획물의 α -glucosidase의 저해율을 도 16에 나타내었다. Hexane (HX), chloroform (CL), ethylacetate (EA), butanol (BT), 75% EtOH 침전물 (EtOH), 10% TCA 침전물을 각각 0.5 mg 처리한 결과를 Acarbose (AC) 0.5 mg의 저해율과 비교하였다. Acarbose가 34% 저해를 나타내었고, Hexane (HX), chloroform (CL), ethylacetate (EA), butanol (BT),

75% EtOH 침전물 (EtOH), 10% TCA 침전물은 각각 1.8 ± 0.2 , 2.9 ± 0.2 , 29.0 ± 3.4 , $11.1 \pm 1.7\%$, 18.7 ± 2.4 , $3.8 \pm 0.4\%$ 의 저해율을 나타내어 ethylacetate 분획물이 29.0%, 75% EtOH 침전물이 19%로 높은 저해 효과를 나타내었다. 이것은 순수한 시약 acarbose를 0.5 mg 처리 34%의 저해율과 비교할 때 높은 저해율이다.

HEAB-FD 시료(10 g)를 증류수 100 mL에 녹인 다음 도 1과 같이 극성에 따라 hexane, chloroform, ethylacetate, butanol, aqueous fraction으로 분획하였다. 표 9와 표 12에서는 분획물의 양과 α -glucosidase 활성저해 정도를 비교하였다. 각 분획물의 양은 큰 차이가 있었다. 가장 많은 분획은 aqueous 층으로 전체의 약 80%였다. 그 다음이 butanol, ethylacetate 층으로 각각 10%, 5%였다. Chloroform 및 hexane층의 함량은 아주 낮았다. Acarbose 25, 50 μ g의 억제능이 각각 23 및 30%였다. 그리고 이들 각 분획의 α -glucosidase 활성억제능은 ethylacetate, hexane, butanol, chloroform 분획이 각각 62, 59, 38, 17%로서 ethylacetate와 hexane 분획에서 높은 활성이 나타났다.

도 15는 각 분획의 α -glucosidase 활성 억제능을 Acarbose와 비교한 결과이다. Ethylacetate 분획과 hexane 분획의 100 μ g은 Acarbose 50 μ g 보다 각각 187%와 170%의 효과를 나타내었고 Acarbose 25 μ g 보다 271%, 260%의 효과를 나타내었다. 이 결과는 단위량으로 계산할 때 이들 분획의 활성은 Acarbose의 효과와 거의 동일하였다. 이들 분획물에는 실제 유효성분이 있는 반면 in vitro 효소 억제 assay에서 default result 즉 실제 효소작용을 억제하는 것이 아니라, 효소 활성을 방해하는 물질이 존재할 가능성이 있기 때문에 순수한 물질을 분리, 동정하여야 할 것이다. Ethylacetate 분획과 hexane 분획 이외의 분획물에서도 상당한 α -glucosidase 활성을 억제하였지만 이들 분획보다 훨씬 낮았다.

[표 12: HEAB-FD와 용매분획물의 쥐의 장내 α -glucosidase 활성 저해효과]

분획물(Fraction) ¹⁾	실험에 사용된 양(μ g) ²⁾	저해효과(%) ³⁾
Acarbose ⁴⁾	25	$22.7 \pm 0.9^{5)c}$
	50	39.5 ± 0.9^b
Crude extract	100	32.9 ± 1.0
Ethylacetate	100	61.6 ± 0.5^a
Hexane	100	59.0 ± 0.8^a
Butanol	100	37.9 ± 1.3^b
Chloroform	100	17.0 ± 0.3^c

¹⁾The fractionation of freeze dried materials from submerged liquid culture of AB.

²⁾Concentration of Acarbose 25 and 50 μ g was 2.5 and 5.0 mg/mL, respectively, and of crude extract or fraction was 10 mg/mL.

³⁾ α -glucosidase inhibitory activities.

⁴⁾Positive control

⁵⁾Mean $\pm$ SD of triplication. Means with same superscript small letters represent significantly different at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test.

실험예 9: Ethylacetate 분획으로부터 α -glucosidase 활성물질의 분리

Ethylacetate 분획에 함유된 α -glucosidase 활성억제 물질을 분리하기 위하여 ethylacetate 분획을 C₁₈ reversed phase column으로 분리하고 Dual UV detector (220과 280 nm)에서 검출한 결과 10개의 peak가 분리되었다(표 13). 이들을 반복하여 collection한 다음 농축하여 이들의 α -glucosidase 활성 저해능을 측정하였다. 그 결과 가장 활성이 높은 peak는 3번으로 α -glucosidase 활성을 약 70% 저해하였다. 그 외 peak는 다소 낮은 저해율을 나타내었다.

따라서 Peak 3번을 UV, TLC 및 IR 등으로 임시적으로 분리, 동정한 결과 isoflavone의 배당체(여러 개의 단당이 결합되어 있음)로 밝혀짐에 따라 이와 관련되는 isoflavone을 구입하여 α -glucosidase의 활성 억제능을 측정하였다(도 17). 그 결과 daidzein이 33.9% genestein이 85%, genistin이 15%의 제해 효과가 있어, 배당체가 아닌 genestein의 효과가 가장 탁월하였다.

[표 13: Reversed-phase HPLC를 사용하여 ethylacetate분획물로부터 분리된 피크의 α -glucosidase 활성저해효과¹⁾]

피크번호(Peak No).	Relative area (%)	α -glucosidase 활성저해 효과 (%) ²⁾
1	6.3	10.8 $\pm$ 0.7
2	5.5	15.5 $\pm$ 0.9
3	20.1	70.1 $\pm$ 1.4
4	9.9	18.6 $\pm$ 0.3
5	5.8	19.4 $\pm$ 0.8
6	12.3	25.5 $\pm$ 0.6
7	9.5	30.7 $\pm$ 0.4
8	13.2	14.5 $\pm$ 0.7
9	9.6	17.4 $\pm$ 0.4
10	7.8	20.1 $\pm$ 0.4
Total relative area	100	

¹⁾C₁₈ column (Young Lin Instrument CO., LTD; Mobile phase, MeOH:1 mM ammonium acetate=6:4).

실험예 10: 임상시험(제 2형 당뇨병환자 단기치리에 의한 혈당 개선효과)

당뇨환자에 있어서 시료의 α -glucosidase 저해활성을 규명하기 위하여, 경구 혈당 강하제인 설포닐유레아계 약물을 복용하고 있는 제 2형 당뇨병환자를 모집하였다. 평균 연령 35-75세, 공복혈당 127-270 mg/dL이며, 당화헤모글로빈 수치가 6.5% 이상인 당뇨병환자 9명(여)을 선별하였다.

시료의 단기 복용이 식후 혈당에 미치는 영향을 조사하기 위하여 쌀밥(쌀중량 58.3 g)과 함께 포도당 4.6 g을 섭취시키거나(대조군), 쌀밥과 함께 동결건조시료(15.2 g)를 동시 또는 1시간 전에 섭취시켰다. 각 부하시험시 가용성 탄수화물(흡수 가능한 탄수화물, available carbohydrates)의 섭취량은 50 g으로 하였다. 대조군의 경우 동결건조시료(고형물 7.6 g)를 동시 또는 1시간 전에 섭취시켰다. 쌀밥만 섭취할 경우 HEAB 200 mL에 함유되어 있는 당의 양과 동일하게 포도당 4.6 g을 쌀밥에 추가하여 섭취시켰다 식후 0, 60, 120분에 정맥 혈액을 채취하고, 원심분리하여 혈당을 분리하였다.

포도당 농도는 효소법으로 측정하였다. 각 시점의 혈당 증가치를 계산하여 혈당증가곡선을 구하고, 혈당증가곡선의 면적(AUC)을 계산하였다. 인슐린 농도는 radioimmunoassay 법으로 측정하였다. 실험은 적어도 2주 이상의 간격을 두고 실시하였고, 당뇨병환자들은 실험 실시 전 3일간 약물 복용을 중지하고 실험을 실시하였다.

실험대상자의 일반사항은 표 14에 나타내었다. 환자의 평균연령은 67.9 ± 3.0 세, 유병기간은 9.0 ± 2.4 년, 체질량지수는 $24.9 \pm 1.2 \text{ kg/m}^2$, 당뇨병환자의 공복 정맥 혈당은 $139.2 \pm 8.3 \text{ mg/dL}$, 당화헤모글로빈 수치는 $6.8 \pm 0.4\%$ 이었으며, 인슐린농도는 $13.4 \pm 2.1 \text{ } \mu\text{U/mL}$ 이었다.

[표 14: 본 시험에 참여한 제2형 당뇨병환자의 일반사항]

Age (yr)	BMI (kg/m ²)	Body fat (%)	Blood glucose (mg/dL)	HbA1c (%)	Insulin ($\mu\text{U/mL}$)
67.9 $\pm$ 3.0	24.9 $\pm$ 1.2	33.8 $\pm$ 1.9	139.2 $\pm$ 8.3	6.8 $\pm$ 0.4	13.4 $\pm$ 2.1

실험결과, 당뇨병환자에게 쌀밥만 섭취시킨 경우, 또는 쌀밥과 함께 HEAB-FD를 먼저 섭취시키고, 활성성분을 먼저 섭취시킨 후 1시간 후에 쌀밥을 섭취시킨 경우의 혈당증가치 변화곡선을 도 19에 나타내었다. 당뇨병환자가 쌀밥 섭취 1시간 전에 HEAB-FD를 섭취한 경우 식후 60분의 혈당 증가치가 쌀밥만 섭취한 경우 또는 쌀밥 섭취 1시간 전에 HEAB-FD를 섭취한 경우에 비해 유의적으로 작게 나타났다($P < 0.05$).

식후 혈당증가곡선의 면적(AUC)은 쌀밥을 섭취한 경우 $14,700 \pm 1,444$ mg·min/dL, HEAB-FD 활성성분을 동시에 섭취한 경우 $11,581 \pm 1,038$ mg·min/dL, HEAB-FD를 1시간 전에 섭취한 경우 $13,900 \pm 1,725$ mg·min/dL으로 나타나, 쌀밥과 HEAB-FD 활성성분을 동시에 섭취한 경우 AUC가 유의적으로 낮게 나타났다(표 15). 따라서 당뇨병환자에 있어서 HEAB-FD를 식사와 함께 섭취하는 것이 postprandial hyperglycemia 조절효과가 큰 것으로 사료된다.

[표 15. HEAB-FD섭취가 제2형 당뇨병환자에서 식후 혈당변화에 미치는 영향]

	AUC (mg·min/dL)
Rice	$14,700 \pm 1,444$
Rice+HEAB-FD (before 1hr)	$13,900 \pm 1,725$
Rice+HEAB-FD (at the same time)	$11,581 \pm 1,038^*$

*significantly different at $P < 0.05$.

당뇨환자에 있어서 식후 인슐린 증가치를 조사한 결과(도 18), 쌀밥과 함께 섭취한 경우 식후 60분에 인슐린 증가치가 쌀밥만 섭취한 경우 및 쌀밥 섭취 1시간 전에 HEAB-FD를 섭취한 경우에 비해 유의적으로 억제되었다($P < 0.05$). 따라서 당뇨병환자에 있어서 HEAB-FD활성성분을 식사와 함께 섭취할 경우 인슐린 저항성 개선효과가 있는 것으로 사료된다.

실험예 11: 임상시험(제 2형 당뇨병환자 장기치리에 의한 혈당 개선효과)

당뇨환자에 있어서 시료의 혈당조절 효과를 규명하기 위해 제2형 당뇨병환자 20명(남 12명, 여 8명)을 random하게 두 군으로 나누었다.

실험군은 시료를 12주간 섭취하도록 하였다. 환자들은 활성성분 건조중량 7.6g이 함유된 HEAB-FD 200 mL을 매일 3회 식사와 함께 복용하였다. 대조군은 placebo (7.6 g의 유당이 함유된 액상제품 200 mL)를 매일 3회 복용하였다. 실험시작 전, 후에 환자의 신장과 체중을 측정하여 체질량지수(body mass index, BMI, kg/m^2)를 계산하였고 혈압과 체지방 양(Bioimpedance analyzer, TANICA, Japan)을 측정하였다. 섭취기간 시작 전 및 종료 후 공복상태에서 정맥으로부터 채혈하였다.

혈액 당화해모글로빈 농도는 크로마토그래피법으로 측정하였고, 혈당 및 혈장 프락토사민, 콜레스테롤, 중성지방, HDL-콜레스테롤, LDL-콜레스테롤, BUN(blood urea nitrogen), creatinine 농도를 효소법으로 측정하였다. 혈장 GOT (glutamate oxaloacetate transaminase), GPT(glutamate pyruvate transaminase) 활성을 측정하였고 인슐린 농도는 radioimmunoassay법으로 측정하였다. 포도당 부하검사는 실험 기간 전과 후에 공복시에 75 g의 포도당을 섭취시킨 후, 포도당 부하 0, 60, 120, 240분에 정맥에서 채혈하여 혈당 및 인슐린을 측정하였다.

대상자는 실험 기간동안 일상적인 식생활 및 생활습관을 유지하도록 하였으며, 오심, 구토, 복부팽만감 등 부작용을 보고하도록 하였다.

실험대상자의 신체계측치는 표 16에서 보는 바와 같다. 대조군에 있어서 평균연령은 62.1 ± 1.7 세, 평균 유병기간은 6.3 ± 1.5 년이었다. HEAB-FD의 평균연령은 59.4 ± 2.3 세, 유병기간은 6.4 ± 1.5 년이었다. 당뇨병환자는 모두 설포닐유레아제 경구혈당강하제를 복용하고 있었다. 실험대상자의 평균 체질량지수(BMI)는 HEAB-FD활성성분 섭취 전 23.8 ± 0.7 kg/m^2 , 섭취 후 23.5 ± 0.8 kg/m^2 로 감소하는 경향을 나타내었다 (0.3 ± 0.2 kg/m^2).

실험대상자의 HEAB-FD 활성성분 섭취 전 체지방 양은 26.3 ± 1.8 %이었으며, 섭취 후 25.9 ± 1.7 %를 나타내어 감소하는 경향을 나타내었다(-0.4 ± 0.2 %). 체중 및 허리둘레는 섭취 전 각각 61.2 ± 3.3 kg, 85.5 ± 1.8 cm이었으며, 섭취 후 각각 60.4 ± 3.3 kg, 85.0 ± 6.6 cm로 감소하는 경향을 나타내었다. 대조군의 체중, 체질량지수, 체지방 및 허리둘레는 실험기간 전과 후에 유의적인 차이가 없었다.

[표 16: 본 시험에 참여한 제2형 당뇨병환자의 신체적인 특성]

패러미터 (Parameters)	대조그룹(Control group)			HEAB-FD group		
	Pre	Post	Difference	Pre	Post	Difference
연령(yr)	62.1 ± 1.7	62.1 ± 1.7	—	59.4 ± 2.3	59.4 ± 2.3	—
유병기간(yr)	6.3 ± 1.5	6.3 ± 1.5	—	6.4 ± 1.5	6.4 ± 1.5	—
체중(g)	62.8 ± 1.4	63.2 ± 1.5	0.4 ± 0.5	61.2 ± 3.3	60.4 ± 3.3	-0.8 ± 0.4
BMI (kg/m ²)	24.2 ± 0.6	24.4 ± 0.7	0.2 ± 0.2	23.8 ± 0.7	23.5 ± 0.8	-0.3 ± 0.2
체지방(%)	28.5 ± 1.5	28.7 ± 1.3	0.2 ± 1.2	26.3 ± 1.8	25.9 ± 1.7	-0.4 ± 0.2
허리둘레(cm)	90.0 ± 1.5	90.4 ± 1.6	0.4 ± 0.7	85.5 ± 1.8	85.0 ± 6.6	-0.5 ± 0.3

임상시험에서, 내당능 개선효과는 실험 시작 전, 후에 실시된 경구 당부하 검사 후 혈당 증가곡선 면적 및 인슐린 면적 결과는 표 17에 나타내었다. HEAB-FD 활성성분의 장기간 섭취는 포도당 부하시 혈당 증가곡선 면적 및 인슐린 증가곡선 면적을 감소시키는 경향을 나타내었다.

[표 17: 제2형 당뇨병환자에서 글루코스를 섭취한 후 혈중 글루코스함량과 인슐린농도의 변화]

AUC (Group)	대조그룹(Control group)			HEAB-FD group		
	Pre	Post	Difference	Pre	Post	Difference
AUC of glucose response curve (mg·min/dL)	21,525 ± 960	22,801 ± 1,814	1,276 ± 2,055	22,450 ± 1,286	20,697 ± 1,045	-1,753 ± 1,881
AUC of insulin response curve (μU·min/mL)	2,029 ± 340	2,166 ± 189	138 ± 337	2,117 ± 273	1,906 ± 142	-211 ± 287

시험결과 혈당 조절 효과는 다음과 같다. HEAB-FD 섭취 전, 후의 혈액 당화헤모글로빈 및 혈장 포도당, 프락토사민, 인슐린 농도를 표 18에 나타내었다. 혈액 당화헤모글로빈 농도는 HEAB-FD 섭취 전에 8.5 ± 0.5 %이었으나 섭취 후 7.9 ± 0.5 %로 유의적으로 감소하였다(-0.6 ± 0.1, P<0.01). 당뇨병환자의 공복 혈장 포도당은 HEAB-FD 섭취 전에 172.1 ± 14.0 mg/dL이었으나, 12주간 HEAB-FD를 섭취한 후에 유의적으로 감소(-22.8 ± 2.8 mg/dL)하여 149.3 ± 12.4 mg/dL로 나타났다(P < 0.001).

당뇨환자의 혈당 조절에 있어서 공복 혈당치의 조절도 중요하지만, 최근 2-3개월간의 평균 혈당을 나타내는 당화헤모글로빈의 농도 또한 중요성이 크다. 이는 당화헤모글로빈 수치가 합병증의 발병 및 진단과 상관관계가 크기 때문이다. 프락토사민은 아가리쿠스 활성성분 섭취 전, 후에 각각 399.2 ± 7.4 μmol/L 및 382.9 ± 6.9 μmol/L로 나타나 HEAB-FD의 섭취로 인해 유의적으로 감소하였다(-16.3 ± 3.0 μmol/L, P<0.05). 프락토사민은 최근 2~3주간의 혈당 조절 정도를 나타내는 수치이다. 혈장 인슐린 농도는 HEAB-FD 섭취 전에 17.8 ± 0.8 uU/mL이었으나, 12주간 HEAB-FD 을 섭취한 후에 유의적으로 감소(-2.1 ± 0.4 uU/mL)하여 15.7 ± 0.9 uU/mL로 나타났다(P<0.05). 아가리쿠스 활성성분의 섭취는 혈당농도를 감소시키고, 따라서 인슐린 요구도를 감소시켜 인슐린 분비량을 조절하여 인슐린 저항성 개선에 도움을 줄 것으로 사료된다. 따라서 HEAB-FD 활성성분의 섭취는 당뇨 환자에 있어서 혈당 조절 및 인슐린 저항성 개선에 크게 도움이 되는 것으로 나타났다. 대조군의 혈액 당화헤모글로빈 및 혈장 포도당, 프락토사민, 인슐린 농도는 유의적인 차이가 없었다.

[표 18: 제2형 당뇨병환자에서 HEAB-FD를 섭취한 후 혈청 글루코스 (mg/dL), 당화헤모글로빈 (%), 프락토사민 (μmol/L), 인슐린(μU/mL)농도의 변화]

패라미터 (Parameters)	대조그룹(Control group)			HEAB-FD group		
	Pre	Post	Difference	Pre	Post	Difference
Plasma glucose (mg/dL)	165.6 ± 8.2	163.5 ± 7.1	-2.1 ± 4.0	172.1 ± 14.0	149.3 ± 12.4	-22.8 ± 2.8***
HbA1c (%)	8.20 ± 0.57	8.17 ± 0.51	-0.03 ± 0.16	8.47 ± 0.51	7.85 ± 0.51	-0.62 ± 0.07**
Fructosamine (μmol/L)	386.3 ± 10.4	381.6 ± 10.0	-4.7 ± 3.2	399.2 ± 7.4	382.9 ± 6.9	-16.3 ± 3.0*
Insulin (uU/mL)	17.4 ± 2.0	17.2 ± 2.1	-0.2 ± 0.6	17.8 ± 0.8	15.7 ± 0.9	-2.1 ± 0.4*

*Significantly different at P < 0.05

**Significantly different at P < 0.01

***Significantly different at P < 0.001

실험예 12: 임상시험 (제 2형 당뇨병환자 장기치리에 의한 혈당 개선효과)에서 당뇨병과 관련하여 유발되는 합병증을 예방 및/또는 치료효과

1) 혈압강하효과

HEAB-FD 섭취 전 수축기 혈압은 148.5 ± 6.2 mmHg, 섭취 후 140.2 ± 4.9 mmHg로 유의적으로 감소하였으며(-8.3 ± 2.2 mmHg, $P < 0.05$), 이완기 혈압은 섭취 전, 후 각각 89.6 ± 6.3 mmHg, 85.6 ± 5.2 mmHg로 감소하는 경향을 나타내었다(-4.0 ± 2.0 mmHg, 표 19). 대조군의 수축기 혈압 및 이완기 혈압은 실험기간 전과 후에 유의적 차이가 없었다. 당뇨병환자에 있어서 혈압의 감소는 심혈관계 합병증을 감소시키는 것으로 보고되었다. 따라서, “HEAB-FD”의 섭취는 혈압을 조절하고 심혈관계 합병증을 예방하고 개선하는데 도움이 될 것으로 사료된다.

[표 19. HEAB-FD섭취 후 제2형 당뇨병환자의 혈압변화]

패라미터 (Parameters)	대조그룹(Control group)			HEAB-FD group		
	Pre	Post	Difference	Pre	Post	Difference
Systolic blood pressure (mmHg)	133.5 ± 7.7	135.2 ± 6.4	1.7 ± 2.8	148.5 ± 6.2	140.2 ± 4.9	-8.3 ± 2.2*
Diastolic blood pressure (mmHg)	82.9 ± 2.8	83.6 ± 2.4	0.7 ± 3.2	89.6 ± 6.3	85.6 ± 5.2	-4.0 ± 2.0

*Significantly different at P < 0.05

2) 지질대사 개선 효과

HEAB-FD 섭취 전, 후의 지질 profile은 표 20에 나타내었다. 혈장 중성지방 농도는 HEAB-FD 섭취 전에 169.2 ± 25.2 mg/dL이었으나 섭취 후 154.4 ± 24.4 mg/dL로 유의적으로 감소하였다(-14.8 ± 3.7 , $P < 0.05$). 당뇨병환자의 혈장 콜레스테롤 농도는 HEAB-FD 섭취 전에 213.8 ± 12.0 mg/dL이었으나, 12주간 HEAB-FD 섭취한 후에 유의적으로 감소(-22.1 ± 7.4 mg/dL)하여 191.7 ± 9.9 mg/dL로 나타났다 ($P < 0.05$).

LDL-콜레스테롤 농도는 HEAB-FD 섭취 전, 후에 각각 146.8 ± 8.9 mg/dL 및 138.4 ± 8.9 mg/dL로 나타나 HEAB-FD의 섭취로 인해 유의적으로 감소하였다(-8.4 ± 2.1 mg/dL, $P < 0.05$). HDL-콜레스테롤 농도는 섭취 전, 후 각각 44.4

± 1.8 mg/dL 및 45.8 ± 1.5 mg/dL로 증가하는 경향을 나타내었다. 대조군의 지질 profile은 실험기간 전, 후에 유의적 차이가 없었다. 제 2형 당뇨병환자는 중성지방 및 LDL-콜레스테롤의 증가 및 HDL-콜레스테롤이 감소하는 지질이상 (dyslipidemia)이 일어나며, 이러한 변화는 당뇨 합병증인 관상동맥 질환의 원인이 된다고 알려져있다. 따라서 HEAB-FD의 섭취는 지질 profile을 개선시켜 당뇨 합병증을 예방하는데 도움을 줄 것으로 기대된다.

[표 20: HEAB-FD섭취 후 제2형 당뇨병환자의 혈장 triglyceride (mg/dL), cholesterol (mg/dL), HDL-cholesterol (mg/dL), LDL-cholesterol(mg/dL)변화]

패라미터 (Parameters)	대조그룹(Control group)			HEAB-FD group		
	Pre	Post	Difference	Pre	Post	Difference
Triglyceride (mg/dL)	178.8 $\pm$ 24.5	175.0 $\pm$ 22.3	-3.8 $\pm$ 3.2	169.2 $\pm$ 25.2	154.4 $\pm$ 24.4	-14.8 $\pm$ 3.7*
Cholesterol (mg/dL)	216.3 $\pm$ 12.1	215.0 $\pm$ 10.9	-1.3 $\pm$ 2.6	213.8 $\pm$ 12.0	191.7 $\pm$ 9.9	-22.1 $\pm$ 7.4*
HDL-cholesterol (mg/dL)	43.1 $\pm$ 3.1	43.4 $\pm$ 2.2	-0.3 $\pm$ 1.3	44.4 $\pm$ 1.8	45.8 $\pm$ 1.5	1.4 $\pm$ 1.1
LDL-cholesterol (mg/dL)	149.2 $\pm$ 8.0	149.0 $\pm$ 7.3	-0.2 $\pm$ 3.3	146.8 $\pm$ 8.9	138.4 $\pm$ 8.9	-8.4 $\pm$ 2.1*

*Significantly different at P < 0.05

3) 간기능 및 신장기능 개선효과

당뇨환자의 간기능 정도를 나타낼 수 있는 지표인 GOT, GPT 농도는 HEAB-FD 섭취 전, 후 유의적인 차이를 나타내지 않았다(표 21). 신장기능을 나타낼 수 있는 지표인 BUN, creatinine 농도를 조사한 결과, HEAB-FD 섭취 전, 후 유의적인 차이를 나타내지 않았다.

[표 21: HEAB-FD섭취 후제2형 당뇨병환자의 GOT, GPT, BUN 및 creatinine의 변화]

패라미터 (Parameters)	대조그룹(Control group)			HEAB-FD group		
	Pre	Post	Difference	Pre	Post	Difference
GOT (U/L)	25.70 $\pm$ 1.87	25.50 $\pm$ 1.60	-0.20 $\pm$ 1.60	26.70 $\pm$ 2.33	23.50 $\pm$ 2.41	-3.20 $\pm$ 1.30
GPT (U/L)	22.90 $\pm$ 1.78	23.70 $\pm$ 1.34	0.80 $\pm$ 1.14	24.80 $\pm$ 1.62	22.80 $\pm$ 1.96	-2.00 $\pm$ 2.00
BUN (mg/dL)	22.26 $\pm$ 2.72	23.89 $\pm$ 1.78	1.63 $\pm$ 1.15	18.88 $\pm$ 1.12	19.58 $\pm$ 0.74	-0.70 $\pm$ 0.88
Creatinine (mg/dL)	1.17 $\pm$ 0.07	1.14 $\pm$ 0.07	-0.03 $\pm$ 0.08	0.99 $\pm$ 0.06	0.92 $\pm$ 0.06	-0.07 $\pm$ 0.04

따라서 제2형 당뇨병환자에 있어서 HEAB-FD 장기간 섭취는 수축기 혈압을 유의적으로 감소시키고, 공복 혈당 및 당화혈색소, 프락토자민 및 인슐린 농도를 감소시켜 강력한 혈당 조절효과를 나타내었다. 또한 HEAB-FD의 섭취는 혈중 중성지방 및 콜레스테롤, LDL-콜레스테롤 농도를 유의적으로 감소시켜, dyslipidemia 개선효과를 나타내었다. 따라서 HEAB-FD의 섭취는 당뇨병환자의 혈당을 조절하고 당뇨합병증을 개선하는데 기여하는 것으로 사료된다.

상기한 바와 같은 본 발명에 따른 아가리쿠스버섯균사체 추출물(아가리쿠스버섯균사체 동결건조물, 에탄올침전물, 에틸아세테이트 분획물)이 가지는 특성을 정리하면 다음과 같다. 1) 혈당을 저하하여 insulin의 요구도를 감소시킨다. 2) Cholesterol 치를 감소시켜 동맥경화 예방효과가 있다. 3) GOT를 감소시켜 간기능을 향상시킨다. 4) TBARS를 감소시키

고, catalase를 증가시킴으로써 당뇨합병증 예방에 도움이 된다. 5) Glycogen분해나 당신생합성반응에는 관여하지 않는다. 6) 소장의 amylase와 maltase의 활성을 감소시켜 탄수화물 흡수 지연 효과가 있다. 7) 간과 지방조직의 GLUT4의 발현을 촉진시켜 당의 흡수를 촉진한다.

이상, 상기 내용은 본 발명의 바람직한 일 실시 예를 단지 예시한 것으로 본 발명의 당업자는 본 발명의 요지를 변경시킴이 없이 본 발명에 대한 수정 및 변경을 가할 수 있음을 인지해야 한다.

발명의 효과

상술한 바와 같이, 본 발명은 새로운 아가리쿠스버섯균사체 동결건조물, 에탄올침전물, 에틸아세테이트 분획물 및 이것의 제조방법을 제공할 수 있다. 특히, 아가리쿠스버섯균주를 배양시키는 단계; 상기 배양된 배양물을 열수추출하여 열수추출물시료를 제조하는 단계; 상기 열수추출물시료에서 찌꺼기가 제거된 배양여액을 분리하고, 상기 배양여액을 감압농축하여 농축액을 얻는 단계; 및 상기 농축액을 동결건조시키는 단계;를 포함하는 아가리쿠스버섯균사체 추출물 제조방법을 제공할 수 있다.

이와 같은 본 발명에 의하는 경우, 이로부터 제조된 동결건조물, 에탄올침전물, 에틸아세테이트 분획물은 알파글루코시다제(말타제)의 저해활성에 우수한 효과가 있으며, 정상인과 제2형 당뇨병환자에 있어서 식후 혈당증가를 유의적으로 감소시켜 인체에 있어서 당뇨병 예방 및/또는 치료에 우수한 효과가 있다.

또한, 본 발명에 따른 아가리쿠스버섯균사체 동결건조물, 에탄올침전물, 에틸아세테이트 분획물은 당뇨병환자의 혈장콜레스테롤과 GOT/GPT 활성을 저하시키고, 제2형 당뇨병환자에 있어서 간조직의 지질과산화를 억제시킴으로써 당뇨병과 관련하여 유발되는 합병증을 예방 및/또는 치료하는데 우수한 효과가 있다. 따라서, 본 발명은 당뇨병예방 및 치료에 우수한 효과가 있을 뿐만 아니라, 당뇨병 환자에 있어서 합병증을 예방 및/또는 치료하는데 우수한 효과가 기대되는 식품으로써 개발이 가능하므로 식품의약품산업에 있어서 매우 유용한 발명인 것이다.

도면의 간단한 설명

도 1은 본 발명의 바람직한 일 실시예에 따른 아가리쿠스버섯균사체 동결건조물(HEAB-FD)을 유기용매로 순차적으로 분획하는 단계를 나타내는 흐름도이고,

도 2는 본 발명의 일 실시예에 따라 STZ-유발 제1형 당뇨병쥐에서 HEAB-FD 투여가 혈중 glucose 함량에 미치는 영향을 나타내는 그래프이고,

도 3은 본 발명의 일 실시예에 따라 대조군과 HEAB-FD 처리군에서 단식후 혈중 glycated hemoglobin 함량을 나타내는 그래프이고,

도 4는 본 발명의 일 실시예에 따라 대조군과 HEAB-FD 처리군에서 단식후 혈장중 glucose 함량을 나타내는 그래프이고,

도 5는 본 발명의 일 실시예에 따라 대조군과 HEAB-FD 처리군에서 단식후 혈장중 blood urea nitrogen 함량을 나타내는 그래프이고,

도 6은 본 발명의 일 실시예에 따라 대조군과 HEAB-FD 처리군에서 단식후 혈장중 cholesterol 과 triglyceride 함량을 나타내는 그래프이고,

도 7은 본 발명의 일 실시예에 따라 대조군과 HEAB-FD 처리군에서 간 TBARS 함량과 catalase 활성을 나타내는 그래프이고(유의수준; $P < 0.05$),

도 8은 본 발명의 일 실시예에 따라 대조군과 HEAB-FD 처리군에서 혈장중 GOT 와 GPT의 활성을 나타내는 그래프이고,

도 9는 본 발명의 일 실시예에 따라 대조군과 HEAB-FD 처리군에서 disaccharidase 활성을 나타내는 그래프이고,

도 10은 본 발명의 일 실시예에 따라 대조군과 HEAB-FD를 처리한 쥐의 간 과 백색 지방세포에서 GLUT4 mRNA 의 발현을 나타내는 그래프이고,

도 11은 본 발명의 일 실시예에 따라 대조군과 HEAB-FD를 처리한 쥐의 간 과 백색 지방세포에서 insulin receptor mRNA 의 발현을 나타내는 그래프이고,

도 12는 본 발명의 일 실시예에 따라 HepG-2 cell에서 GLUT-1 단백질의 함량 (%)에 대한 HEAB-FD의 영향을 나타내는 그래프이고,

도 13은 본 발명의 일 실시예에 따라 HepG-2 cell에서 GLUT-4 단백질의 함량 (%)에 대한 HEAB-FD의 영향을 나타내는 그래프이고,

도 14는 본 발명의 일 실시예에 따라 HepG-2 cell에서 PEPCK1 단백질의 함량 (%)에 대한 HEAB-FD의 영향을 나타내는 그래프이고,

도 15는 본 발명의 일 실시예에 따라 HEAB-FD와 각 용매 분획물이 아카보스와 대비하여 쥐의 장내 α -glucosidase 활성 저해효과(Acabose; 25 와 50 ug, HEAB-FD(CE); 100 μ g, EA; ethylacetate fraction, HX; hexane fraction, BT; butanol fraction, CL; chloroform fraction)를 나타내는 그래프이고,

도 16은 본 발명의 일 실시예에 따라 HEAB-FD의 용매분획물별 쥐의 장내 α -glucosidase 활성저해효과를 나타내는 그래프이고,

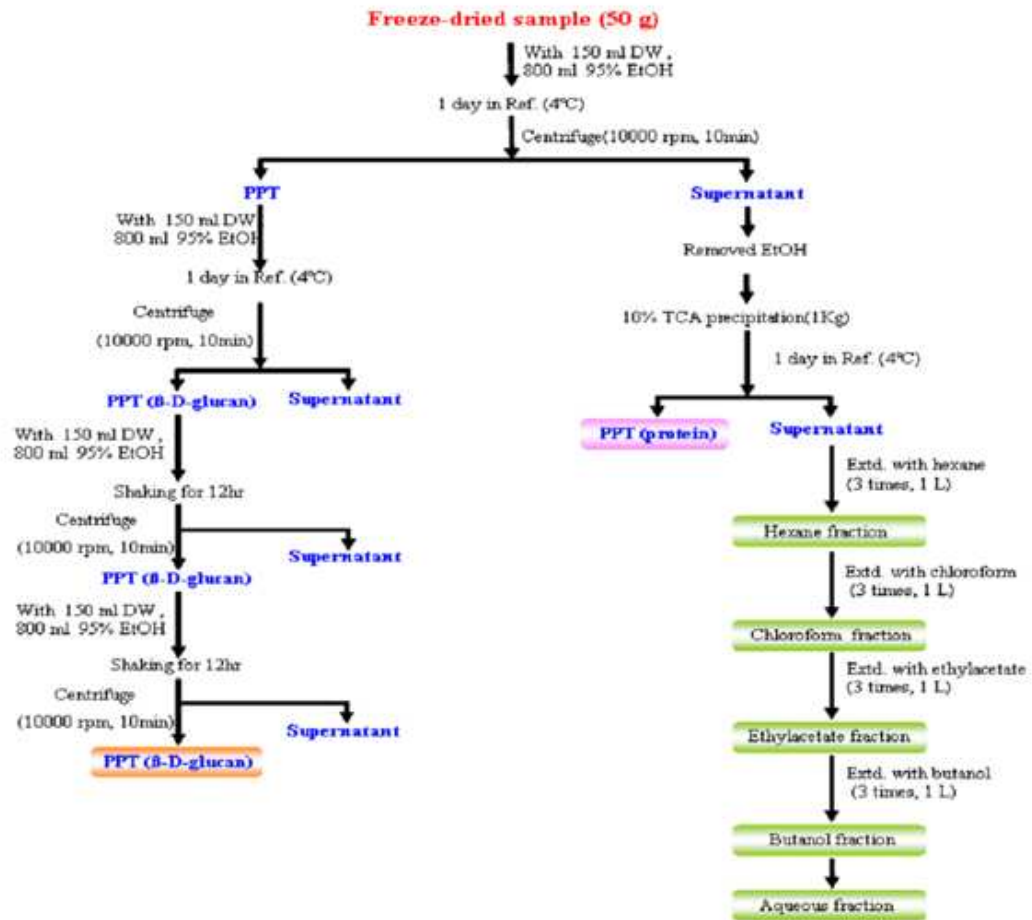
도 17은 본 발명의 일 실시예에 따라 Isoflavones(Daidzein, Genistein, and Genistin)이 쥐의 장내 α -glucosidase 활성 저해효과를 나타내는 그래프이고,

도 18은 본 발명의 일 실시예에 따라 제2형 당뇨병환자에 있어서 HEAB-FD 섭취가 혈중 인슐린농도에 미치는 영향을 나타내는 그래프이고(유의수준; $P < 0.05$),

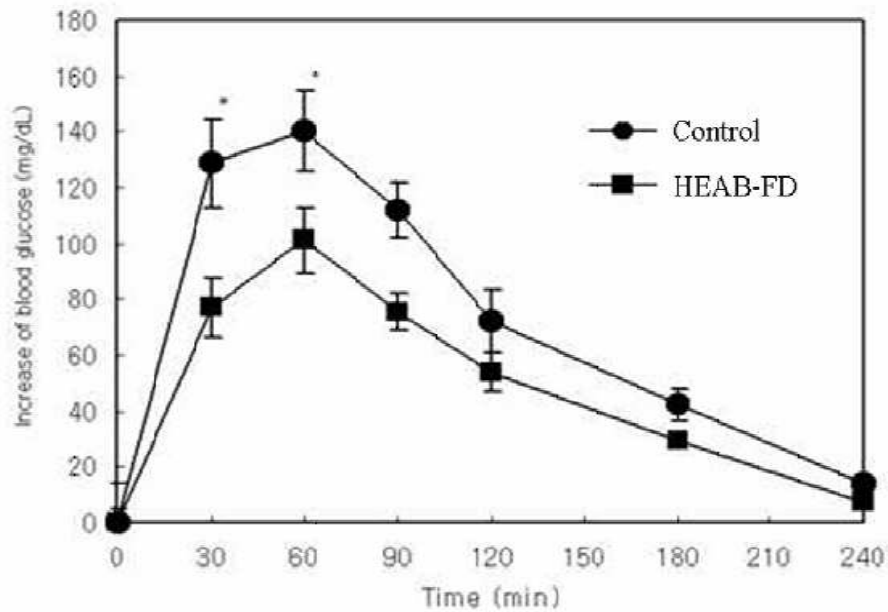
도 19는 본 발명의 일 실시예에 따라 제2형 당뇨병환자에 있어서 HEAB-FD 섭취가 혈중 글루코스농도에 미치는 영향을 나타내는 그래프이다(유의수준; $P < 0.05$).

도면

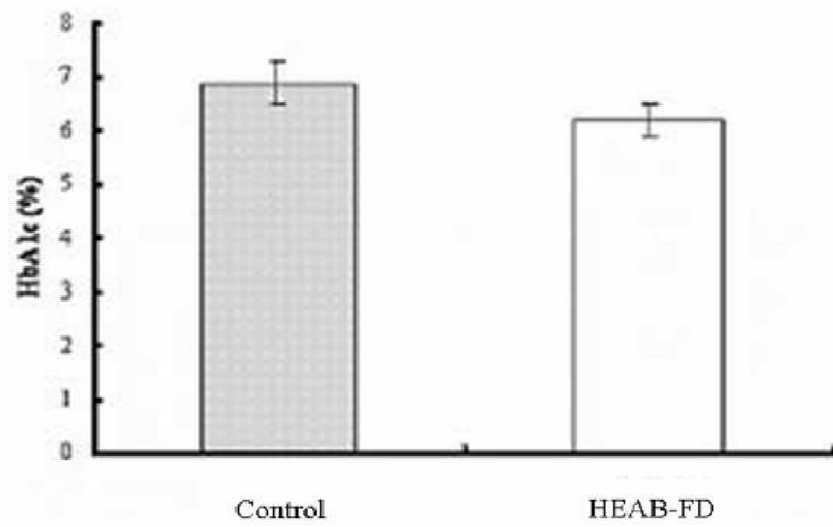
도면1



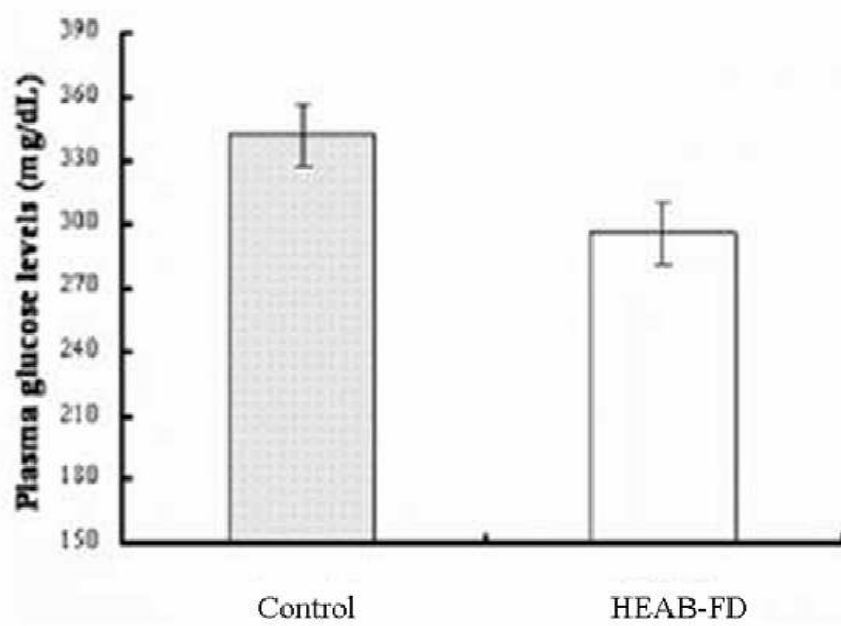
도면2



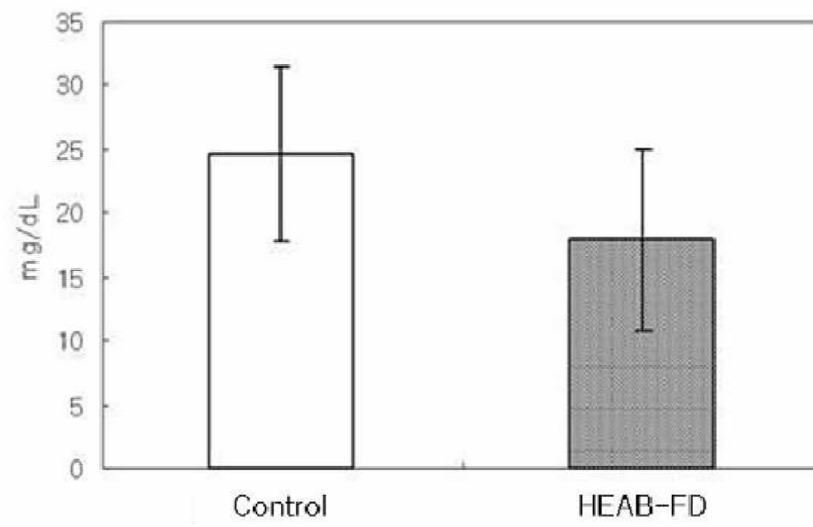
도면3



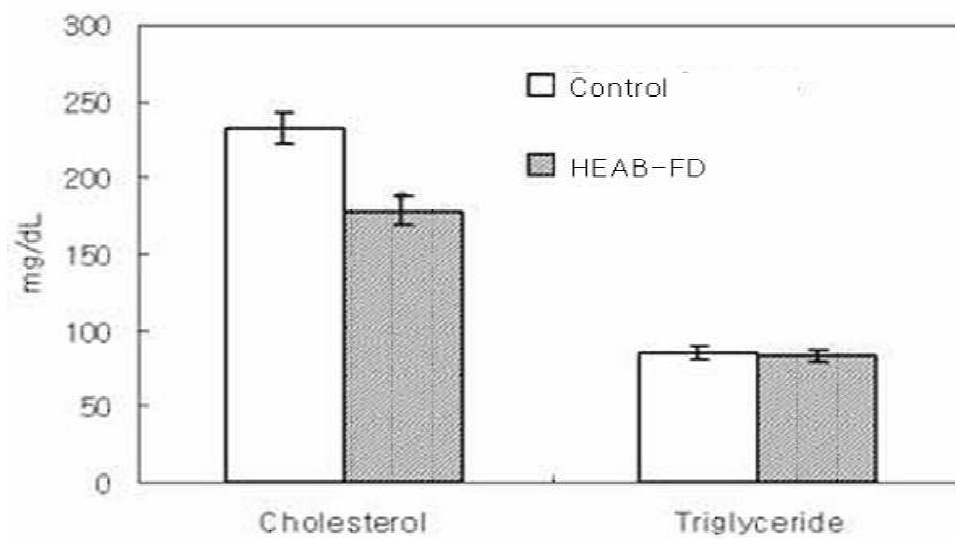
도면4



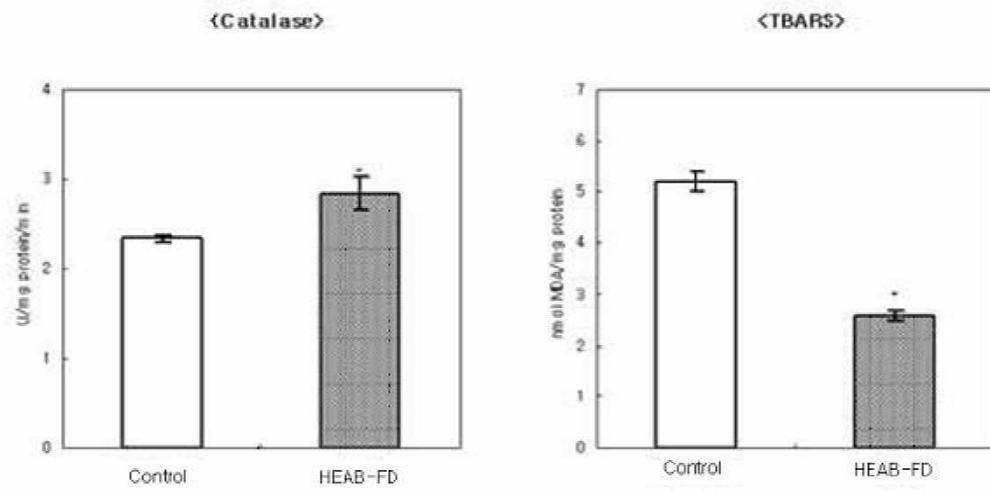
도면5



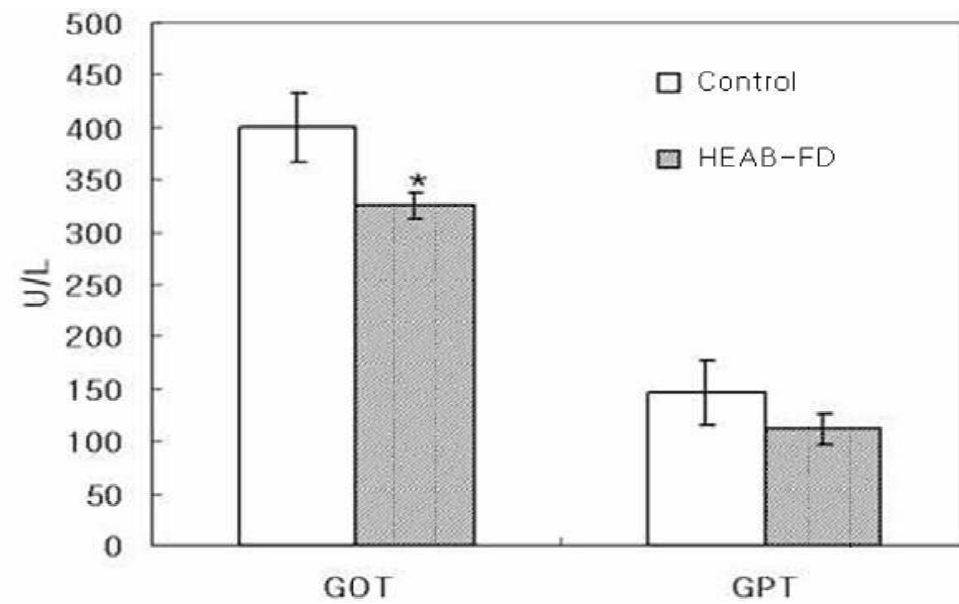
도면6



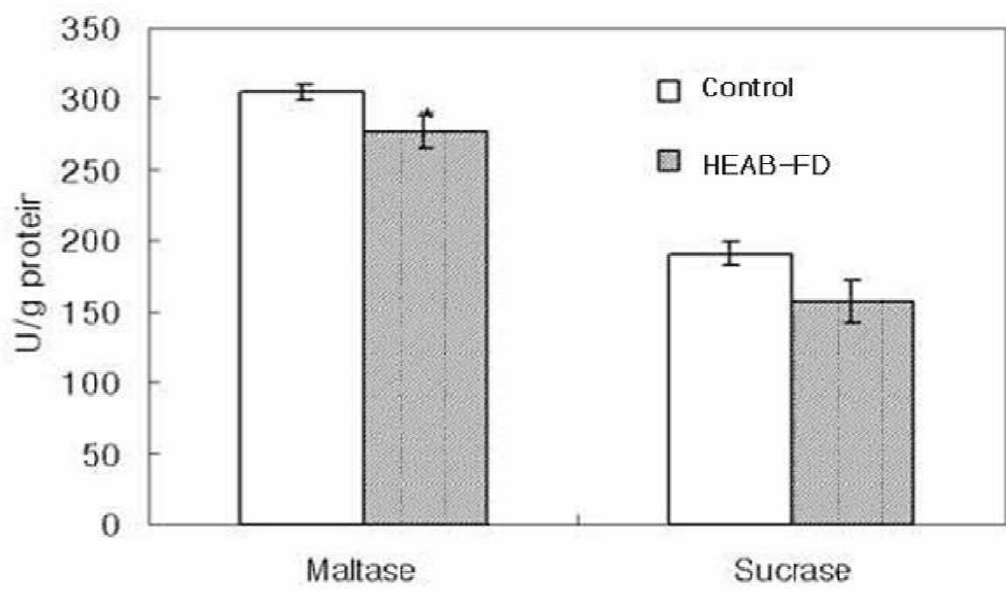
도면7



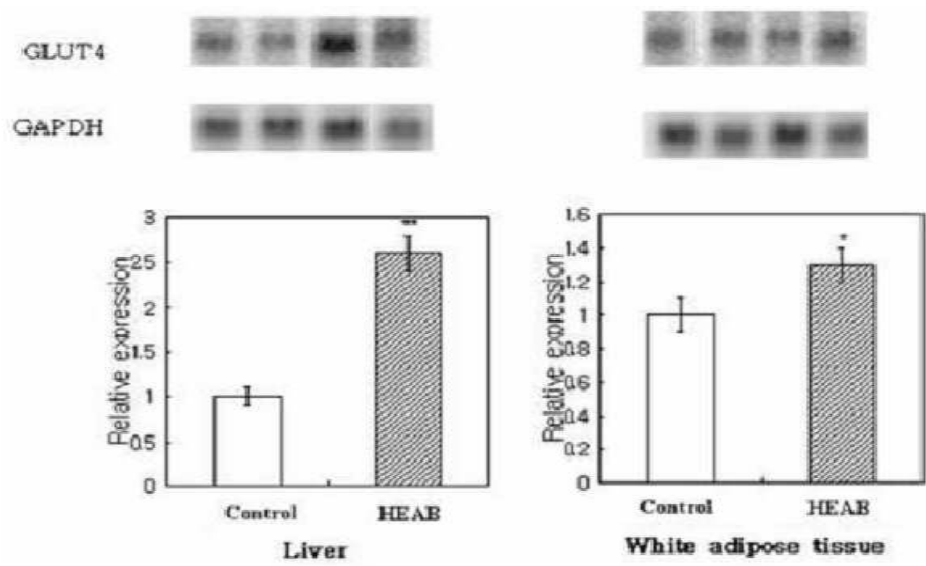
도면8



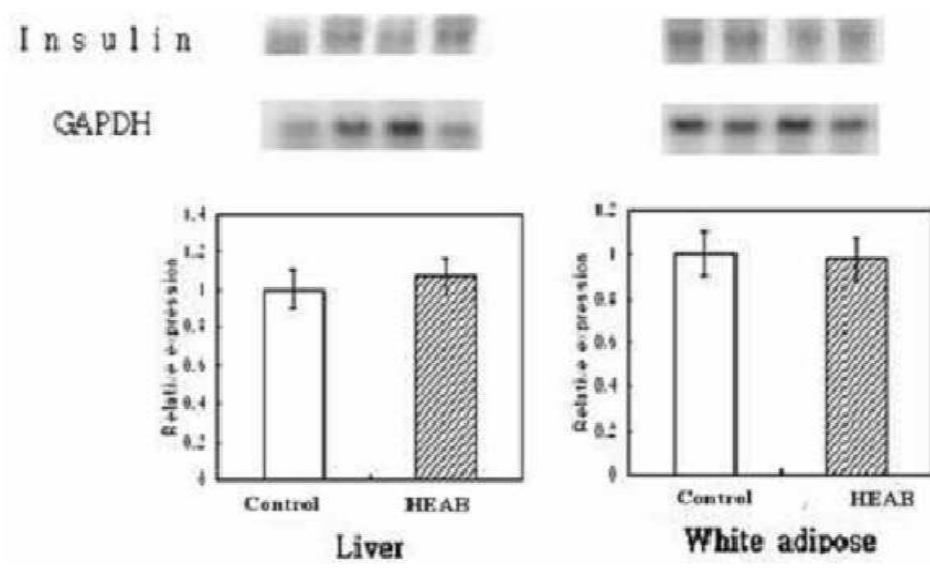
도면9



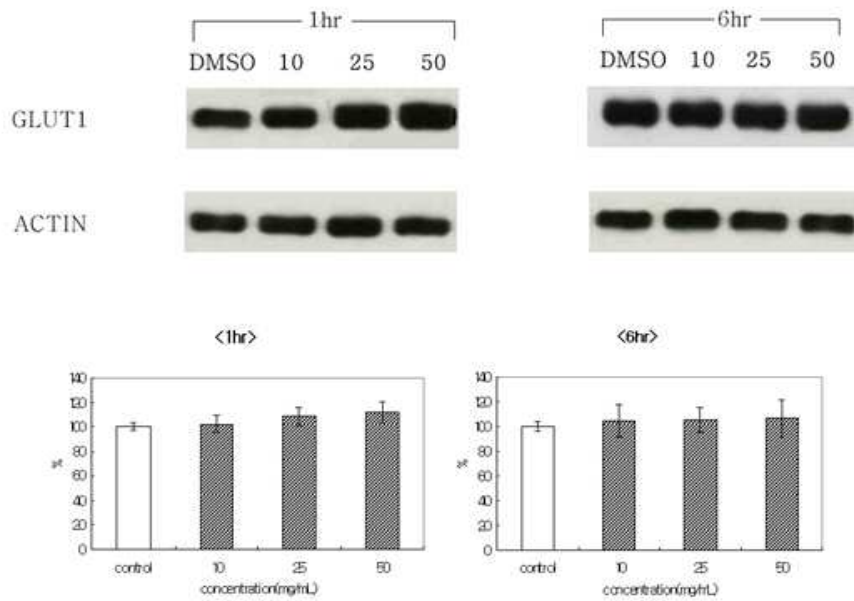
도면10



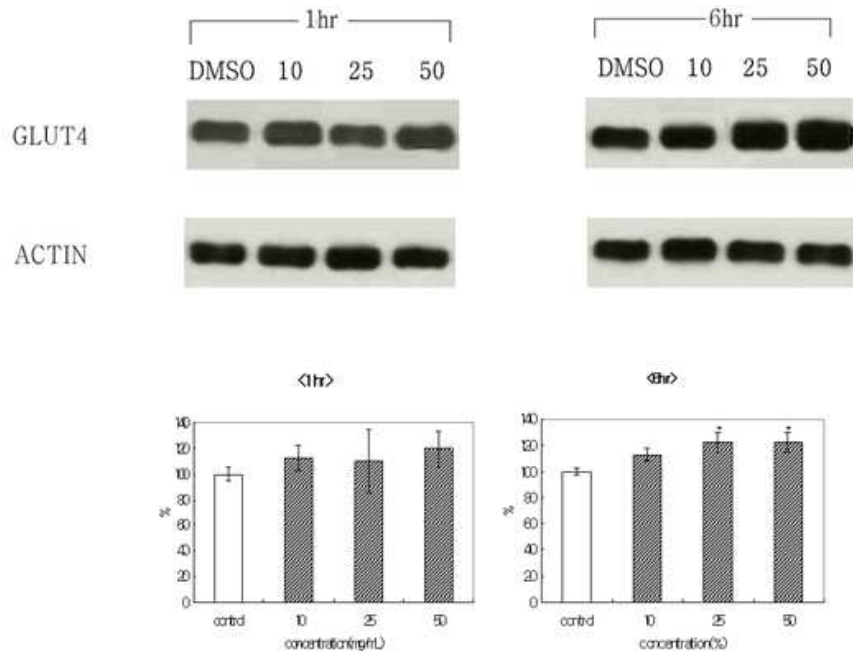
도면11



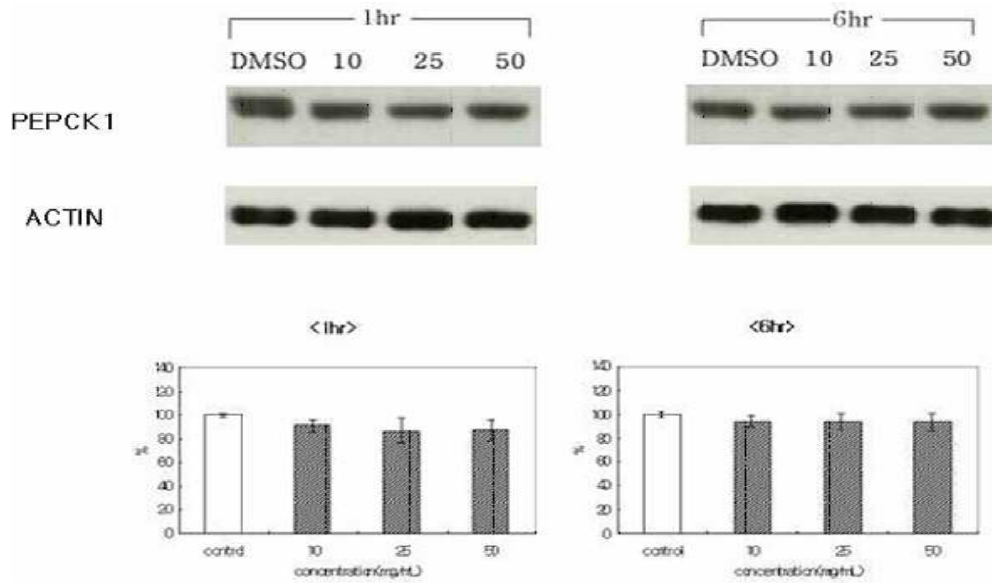
도면12



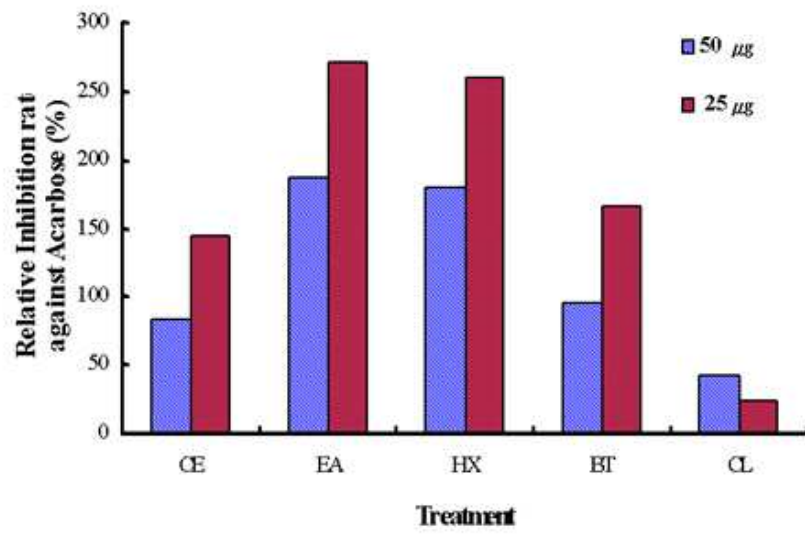
도면13



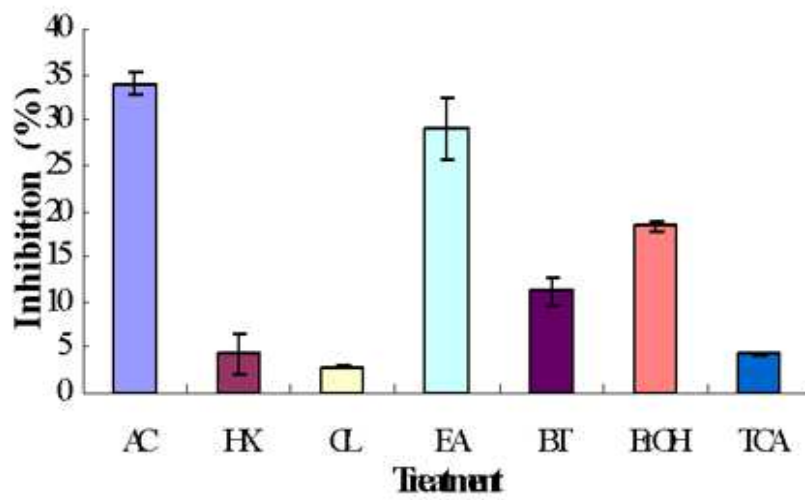
도면14



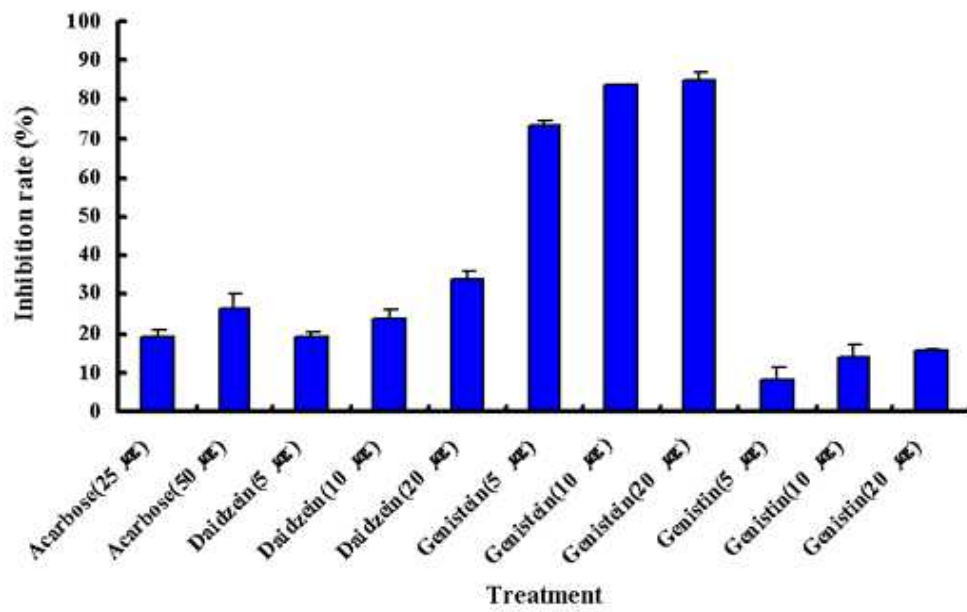
도면15



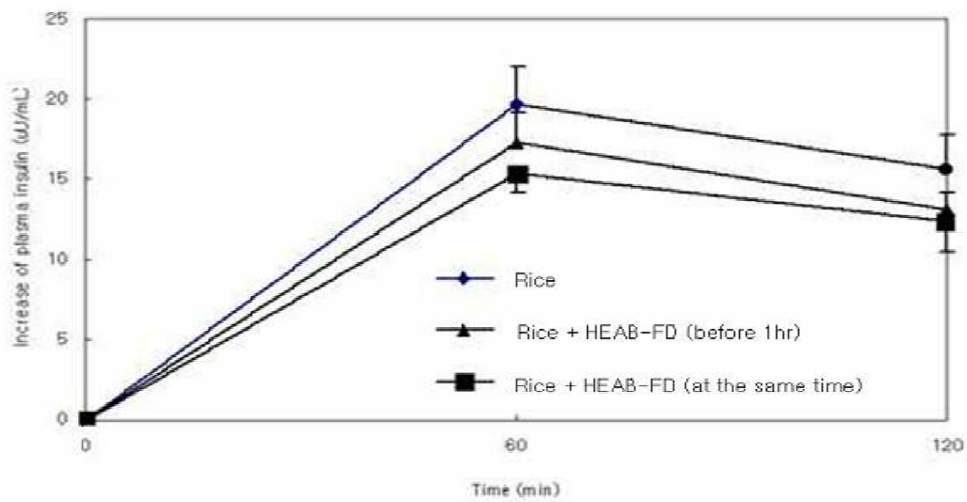
도면16



도면17



도면18



도면19

