



**(19) 대한민국특허청(KR)**  
**(12) 등록특허공보(B1)**

(45) 공고일자 2014년07월16일  
 (11) 등록번호 10-1418790  
 (24) 등록일자 2014년07월07일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
 A23L 2/38 (2006.01) A23L 1/29 (2006.01)  
 A61K 36/72 (2006.01) A61P 1/16 (2006.01)  
 (21) 출원번호 10-2012-0133379  
 (22) 출원일자 2012년11월23일  
 심사청구일자 2012년11월23일  
 (65) 공개번호 10-2014-0066873  
 (43) 공개일자 2014년06월03일  
 (56) 선행기술조사문헌  
 KR1020110104278 A\*  
 KR1020100106880 A  
 KR1020110137908 A  
 KR1020060024095 A  
 \*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자  
 주식회사 새롬  
 전라남도 장흥군 장동면 북교반산로 137  
 재단법인 장흥군버섯산업연구원  
 전라남도 장흥군 안양면 우드랜드길 288  
 (72) 발명자  
 김경제  
 전라남도 장흥군 안양면 우드랜드길 288  
 서경순  
 전라남도 광양시 진월면 이정1길 72  
 (뒷면에 계속)  
 (74) 대리인  
 최규환

전체 청구항 수 : 총 4 항

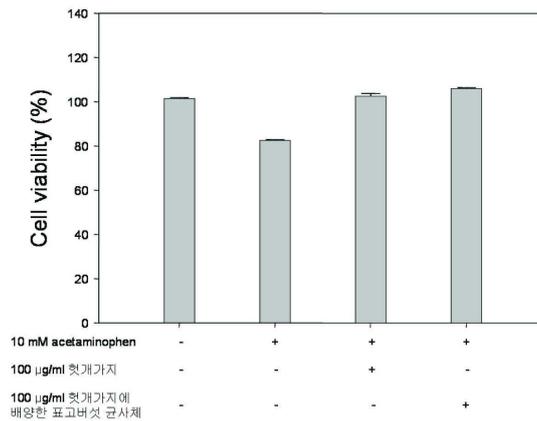
심사관 : 이윤아

(54) 발명의 명칭 **헛개나무를 첨가한 표고버섯 균사체 배양액을 유효성분으로 함유하는 간기능 개선용 식품**

**(57) 요약**

본 발명은 헛개나무에 표고버섯 균사체를 접종하여 배양한 배양액을 유효성분으로 함유하는 간기능 개선용 식품 및 약학조성물에 관한 것으로, 본 발명의 배양액은 간세포 보호 및 간기능 개선효과가 증진되어 간기능 개선을 위한 식품 및 약학 조성물 등에 유용하게 사용할 수 있다.

**대표도 - 도2**



(72) 발명자

**반승언**

전라남도 장흥군 안양면 우드랜드길 288

**진성우**

전라남도 장흥군 안양면 우드랜드길 288

**최봉석**

전라남도 장흥군 안양면 우드랜드길 288

**김유선**

전라남도 장흥군 대덕읍 신리 601

**박태영**

전라남도 장흥군 대덕읍 산정구평길 149-31

**박종국**

전라남도 장흥군 장동면 북교반산로 137

**김기만**

광주광역시 남구 계중로 11 휴먼시아1차아파트 10  
3동 406호

**유태경**

광주광역시 동구 남문로693번길 11 (학동, 학2마을  
아파트) 206동 501호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 70011158

부처명 지식경제부

연구사업명 지역산업기술개발사업

연구과제명 헛개와 버섯균사체를 이용한 간기능 개선 건강기능식품소재 개발 및 사업화

기 여 율 1/1

주관기관 (주)피엔케이/(재)장흥군버섯산업연구원

연구기간 2010.11.01 ~ 2012.10.31

**특허청구의 범위**

**청구항 1**

헛개나무 가지를 분쇄한 분쇄물에 정제수를 첨가하여 수분함량이 60~70%(v/w)가 되도록 조절한 후, 표고버섯 균사체를 접종하고 23~27℃에서 배양한 배양액을 유효성분으로 함유하는 간기능 개선용 식품.

**청구항 2**

삭제

**청구항 3**

삭제

**청구항 4**

제1항에 있어서, 상기 식품은 육류, 곡류, 음료, 초콜릿, 빵류, 스넥류, 과자류, 피자, 젤리, 면류, 껌류, 아이스크림류, 알코올성 음료, 술, 비타민 복합제 또는 건강보조식품류인 것을 특징으로 하는 간기능 개선용 식품.

**청구항 5**

헛개나무 가지를 분쇄한 분쇄물에 정제수를 첨가하여 수분함량이 60~70%(v/w)가 되도록 조절한 후, 표고버섯 균사체를 접종하고 23~27℃에서 배양한 배양액을 유효성분으로 함유하는 간기능 개선용 약학조성물.

**청구항 6**

헛개나무 가지를 분쇄한 분쇄물에 정제수를 첨가하여 수분함량이 60~70%(v/w)가 되도록 조절한 후, 표고버섯 균사체를 접종하고 23~27℃에서 배양하여 제조하는 것을 특징으로 하는 간기능 개선효과와 아미노산 함량이 증진된 배양액의 제조방법.

**명세서**

**기술분야**

[0001] 본 발명은 헛개나무에 표고버섯 균사체를 접종하여 배양한 배양액을 유효성분으로 함유하는 간기능 개선용 식품 및 약학조성물에 관한 것이다.

**배경기술**

[0002] 간은 인체에서 혈액 저장 및 순환, 혈액량 조절과 방어해독작용을 하며 정신적 활동과 밀접하게 관련되어 있다고 알려져 있다. 산업화에 따른 공해물질, 유독물질에 우리의 몸은 항상 노출되어 있어 우리의 간은 끊임없이 해독작용에 시달리고 있다.

[0003] 간은 완충능력이 큰 기관으로 질환의 초기단계에서는 잘 나타나지 않고 상당히 악화되어서야 발견된다. 간경화, 간암 등은 각종 간질환이 만성적으로 진행될 경우 공통적으로 이르는 마지막 단계이다. 그 원인으로는 알코올, 약물, 화학약품, 바이러스성 간염, 담도질환, 혈색소증(hemochromatosis)과 같은 대사성 질환, 자가 면역성 질환 등이 있으나 원인을 알 수 없는 경우도 많아 간은 초기의 건강관리가 매우 중요한 기관이다.

[0004] 최근 한국인의 건강수준에서 간암에 의한 사망률은 10만 명당 23.4명으로 세계 1위이고 만성 간질환의 경우도 28.8명으로 3번째로 조사되었다. 또한 최근 통계청에서 우리나라 40대의 경우 인구 10만 명당 56.1명이 간질환으로 가장 높은 사망원인으로 발표하였다.

[0005] 더욱 심각한 것은 정신적인 스트레스로 인한 간 손상이다. 정신적 휴식을 가질 경우 손상된 간세포는 복구되지 만 급박한 현대사회에서 정신적 휴식의 여유를 찾을 수 없어 정신적 스트레스, 과음, 흡연으로 간 손상을 가중 시켜 인체가 방어 해독 작용을 하지 못해 면역 체계에 이상을 가져와 다른 질병의 원인이 되기도 한다.

[0006] 헛개나무는 우리나라 특산수종으로 주독 해소, 이뇨 갈증해소 등 각종 해독작용을 하는 것으로 본초학이나 식물

도설 등에 기록되어 있다. 헛개나무 열매자루(果柄)가 간경화 방지와 알코올성 간 손상에 보호효능이 뛰어나다는 연구결과에 따라 간기능 개선 관련 상품으로 많은 주목을 받고 있다.

[0007] 버섯은 식물성 단백질과 아미노산, 효소, 지방, 철분, 섬유소, 비타민, 미네랄 등과 같이 인체에 중요한 각종 영양성분을 함유하고 있으며 특유의 향과 맛 때문에 예로부터 사람들이 즐겨 먹었고, 지방질이 적고 식이섬유와 단백질이 풍부한 저칼로리 식품으로 알려져 있다. 또한, 여러 가지 건강기능성 물질이 많이 함유되어 있는 식재료로써 노화예방을 위한 항산화활성, 항암, 항당뇨, 체중감량, 면역력증강, 고혈압예방 등의 성인병 예방에 관한 생리활성 효과를 가지고 있어 건강기능식품 및 의약품 원료로 많이 이용되고 있으며 자실체뿐만 아니라 균사체를 이용한 면역력 개선 제품이 시판되고 있다.

[0008] 표고균사체는 식물성 단백질과 아미노산, 효소, 지방, 철분, 섬유소, 비타민, 미네랄 등과 같이 인체에 중요한 각종 영양성분을 함유하고 있으며 특유의 향과 맛 때문에 예로부터 사람들이 즐겨 먹었고, 지방질이 적고 식이섬유와 단백질이 풍부한 저칼로리 식품으로 알려져 있다.

[0009] 헛개를 이용한 건강기능식품 인정내용은 간 기능개선에 주기능으로 되어있으나 식품학적 가치에서 볼 때 영양성분 공급에 대한 부분은 취약하므로, 헛개를 주원료로 표고버섯 균사체를 배양한 배양액을 활용한다면 기능적 측면뿐만 아니라 영양학적 측면에서도 우수한 제품을 기대할 수 있을 것으로 생각되어, 헛개와 버섯균사체에 대한 간 기능 개선에 관한 연구를 실시하고 이에 대한 과학적 근거를 확보하고 이를 건강식품 소재로 개발하여 산업화함으로써 국민의 건강 증진을 도모하여 삶의 질을 높이는 연구가 필요하다.

[0010] 한국등록특허 제0937781호에는 에나활성미네랄 A 활성수를 유효성분으로 함유하는 간손상 방지 또는 간기능 개선용 약학조성물이 개시되어 있고, 한국공개특허 제2012-0122264호에는 간 기능 개선용 오가피 발효물과 이의 추출물을 유효성분으로 하는 간기능 개선용 제제가 개시되어 있으나, 본 발명의 헛개나무를 첨가한 표고버섯 균사체 배양액을 유효성분으로 함유하는 간기능 개선용 식품과는 상이하다.

**발명의 내용**

**해결하려는 과제**

[0011] 본 발명은 상기와 같은 요구에 의해 도출된 것으로서, 본 발명의 목적은 헛개나무 어린가지, 잎, 과병 등 부위별 성분분석 및 효능평가를 통한 이용성 확대 및 버섯균사체를 이용하여 간 기능 개선에 대한 효능 연구를 실시하여 과학적 근거를 제시하고 간기능 개선 기능성을 가지는 건강식품 소재의 생산 기술 확립과 안정적인 생산체계를 마련하기 위해, 헛개나무에 표고버섯 균사체를 접종한 후 최적의 배양조건을 확립하여 배양한 배양액을 유효성분으로 함유함으로써, 간세포 및 간기능 개선 효과를 증진시킬 수 있는 조성물을 제공하는 데 있다.

**과제의 해결 수단**

[0012] 상기 과제를 해결하기 위해, 본 발명은 헛개나무에 표고버섯 균사체를 접종하여 배양한 배양액을 유효성분으로 함유하는 간기능 개선용 식품을 제공한다.

[0013] 또한, 본 발명은 헛개나무에 표고버섯 균사체를 접종하여 배양한 배양액을 유효성분으로 함유하는 간기능 개선용 약학조성물을 제공한다.

[0014] 또한, 본 발명은 헛개나무 가지를 분쇄한 분쇄물에 정제수를 첨가하여 수분함량이 60~70%(v/w)가 되도록 조절한 후, 표고버섯 균사체를 접종하고 23~27℃에서 배양하여 제조하는 것을 특징으로 하는 간기능 개선효과와 아미노산 함량이 증진된 배양액의 제조방법을 제공한다.

**발명의 효과**

[0015] 기존 헛개 추출물만을 사용한 건강기능식품의 경우 헛개나무의 소비가 증가함에 따라 국산 헛개나무 수급에 어려움이 따르고 있다. 헛개 과병의 경우 식재 후 7-8년의 긴 기간이 소요되고 이에 따른 중국산 수입이 불가피하므로 이러한 문제점을 해결하고자 헛개나무 어린가지를 원료로 하여 단위시설에서 일정한 생산량과 추출이 가능한 표고균사체를 배양한 표고균사체 배양 헛개나무 어린가지 배양액을 활용하여 건강기능식품 소재로 활용할 수 있다.

[0016] 또한, 본 발명의 배양액은 간기능 개선뿐만 아니라, 구성아미노산 함량이 증진되어 건강 기능적 측면에서 시너지 효과를 기대할 수 있어, 상기 배양액을 이용하여 제조된 약학 또는 식품 조성물은 간기능 개선 및 인체의 유

용성분인 아미노산 섭취를 위해 효과적으로 이용할 수 있다.

**도면의 간단한 설명**

- [0017] 도 1은 헛개가지 추출물(A)과 본 발명의 배양액 추출물(B)의 다양한 농도(0, 10, 50, 100, 500  $\mu\text{g/mL}$ )별로 간세포 생존율을 비교한 그래프이다.
- 도 2는 100  $\mu\text{g/mL}$ 의 헛개가지 추출물과 본 발명의 배양액 추출물(헛개가지에 배양한 표고버섯 균사체)을 아세트아미노펜(acetaminophen) 처리하여 간독성을 일으킨 간세포에 처리하여 간세포 보호활성을 비교한 그래프이다.
- 도 3은 100  $\mu\text{g/mL}$ 의 헛개가지 추출물과 본 발명의 배양액 추출물(헛개가지에 배양한 표고버섯 균사체)을 아세트아미노펜(acetaminophen) 처리하여 간독성을 일으킨 간세포에 처리하여 간기능 보호활성을 비교한 그래프이다.

**발명을 실시하기 위한 구체적인 내용**

- [0018] 본 발명의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 헛개나무에 표고버섯 균사체를 접종하여 배양한 배양액을 유효성분으로 함유하는 간기능 개선용 식품을 제공한다.
- [0019] 본 발명의 간기능 개선용 식품에서, 상기 헛개나무의 부위는 어린가지, 뿌리, 줄기, 열매 또는 잎일 수 있으며, 바람직하게는 어린가지일 수 있는데, 상기 어린가지는 12개월 미만된 가지일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0020] 또한, 본 발명의 간기능 개선용 식품에서, 상기 배양액은 헛개나무 가지를 분쇄한 분쇄물에 정제수를 첨가하여 수분함량이 60~70%(v/w)가 되도록 조절한 후, 표고버섯 균사체를 접종하고 23~27 $^{\circ}\text{C}$ 에서 배양하여 제조될 수 있으며, 더욱 바람직하게는 헛개나무 가지를 분쇄한 분쇄물에 정제수를 첨가하여 수분함량이 60%(v/w)가 되도록 조절한 후, 표고버섯 균사체를 접종하고 25 $^{\circ}\text{C}$ 에서 배양하여 제조될 수 있다. 상기 방법으로 배양액을 제조하는 것이 헛개나무 추출물에 비해 간세포 및 간기능 보호활성이 증진될 뿐만 아니라 인체의 유용성분인 아미노산 함량을 최대로 증진시킬 수 있었다.
- [0021] 상기 식품은 간기능을 개선시키기 위해 섭취할 수 있는 것이면 특별히 제한되지 않는다.
- [0022] 본 발명의 배양액을 식품첨가물로 사용하는 경우, 상기 배양액을 그대로 첨가하거나 다른 식품 또는 식품 성분과 함께 사용될 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다. 유효 성분의 혼합량은 그의 사용 목적(예방, 건강 또는 치료적 처치)에 따라 적합하게 결정될 수 있다. 일반적으로, 식품 또는 음료의 제조시에 본 발명의 배양액은 원료에 대하여 15 중량부 이하, 바람직하게는 10 중량부 이하의 양으로 첨가된다. 그러나, 건강 및 위생을 목적으로 하거나 또는 건강 조절을 목적으로 하는 장기간의 섭취의 경우에는 상기 양은 상기 범위 이하일 수 있으며, 안전성 면에서 아무런 문제가 없기 때문에 유효성분은 상기 범위 이상의 양으로도 사용될 수 있다.
- [0023] 상기 식품의 종류에는 특별한 제한은 없다. 상기 배양액을 첨가할 수 있는 식품의 예로는 육류, 소세지, 빵, 초코렛, 캔디류, 스낵류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 각종 스프, 음료수, 차, 드링크제, 알콜 음료 및 비타민 복합제 등이 있으며, 통상적인 의미에서의 건강식품을 모두 포함한다.
- [0024] 본 발명의 건강음료 조성물은 통상의 음료와 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다. 상술한 천연 탄수화물은 포도당, 과당과 같은 모노사카라이드, 말토스, 슈크로스과 같은 디사카라이드, 및 텍스트린, 사이클로덱스트린과 같은 폴리사카라이드, 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알콜이다. 감미제로서는 타우마틴, 스테비아 추출물과 같은 천연 감미제나, 사카린, 아스파르탐과 같은 합성 감미제 등을 사용할 수 있다.
- [0025] 상기 외에 본 발명의 건강음료 조성물은 여러 가지 영양제, 비타민, 전해질, 풍미제, 착색제, 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알콜, 탄산음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 그 밖에 본 발명의 건강음료 조성물은 천연 과일주스, 과일주스 음료 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 혼합하여 사용할 수 있다. 이러한 첨가제의 비율은 크게 중요하진 않지만 본 발명의 조성물 100 중량부당 0.01~0.1 중량부의 범위에서 선택되는 것이 일반적이다.
- [0026] 본 발명은 또한, 헛개나무에 표고버섯 균사체를 접종하여 배양한 배양액을 유효성분으로 함유하는 간기능 개선용 약학조성물을 제공한다.

- [0027] 본 발명의 배양액은 약학적 조성물의 제조에 통상적으로 사용하는 적절한 담체, 부형제 및 희석제를 포함할 수 있다.
- [0028] 본 발명의 배양액의 약학적 투여 형태는 이들의 약학적 허용 가능한 염의 형태로도 사용될 수 있고, 또한 단독으로 또는 타 약학적 활성 화합물과 결합뿐만 아니라 적당한 집합으로 사용될 수 있다.
- [0029] 본 발명에 따른 배양액은, 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 및 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있다. 배양액에 포함될 수 있는 담체, 부형제 및 희석제로는 락토즈, 텍스트로즈, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유 등을 포함한 다양한 화합물 혹은 혼합물을 들 수 있다. 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다. 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 상기 성분 에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트(calcium carbonate), 수크로스(sucrose) 또는 락토오스(lactose), 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 또한 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트, 탈크 같은 윤활제들도 사용된다. 경구를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순 희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제, 좌제가 포함된다. 비수성용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜(propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일 과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위템솔(witepsol), 마크로골, 트윈 (tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다.
- [0030] 본 발명의 배양액의 바람직한 투여량은 환자의 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물형태, 투여경로 및 기간에 따라 다르지만, 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다. 그러나, 바람직한 효과를 위해서, 본 발명의 배양액은 1일 0.0001 내지 100 mg/kg으로, 바람직하게는 0.001 내지 100 mg/kg으로 투여하는 것이 좋다. 투여는 하루에 한번 투여할 수도 있고, 수회 나누어 투여할 수도 있다. 상기 투여량은 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.
- [0031] 본 발명의 배양액은 쥐, 생쥐, 가축, 인간 등의 포유동물에 다양한 경로로 투여될 수 있다. 투여의 모든 방식은 예상될 수 있는데, 예를 들면, 경구, 직장 또는 정맥, 근육, 피하, 자궁 내 경막 또는 뇌혈관내 (intracerebroventricular) 주사에 의해 투여될 수 있다.
- [0032] 본 발명은 또한, 헛개나무 가지를 분쇄한 분쇄물에 정제수를 첨가하여 수분함량이 60~70%(v/w)가 되도록 조절한 후, 표고버섯 균사체를 접종하고 23~27℃에서 배양하여 제조하는 것을 특징으로 하는 간기능 개선효과와 아미노산 함량이 증진된 배양액의 제조방법을 제공한다.
- [0033] 본 발명의 배양액의 제조방법은 바람직하게는 헛개나무 가지를 분쇄한 분쇄물에 정제수를 첨가하여 수분함량이 60%(v/w)가 되도록 조절한 후, 표고버섯 균사체를 접종하고 25℃에서 배양하여 제조할 수 있다.
- [0034] 이하, 본 발명의 실시예에 의해 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.
- [0035] **재료 및 방법**
- [0036] 1) 원료
- [0037] 헛개나무 어린가지는 (주)PNK에서 구입하여 사용하였다.
- [0038] 2) 표고균주
- [0039] *Lentinus edodes*

[0040] 3) 배양방법

[0041] 헛개나무 어린가지는 분쇄기를 이용하여 톱밥 형태로 분쇄 후 사용하였다. 분쇄된 헛개나무 어린가지 톱밥에 정제수를 첨가하여 수분함량이 60%(v/w)가 되도록 조절한 후, 배양봉지에 500 g씩 입봉하여 이것을 121℃에서 40분간 멸균하여 식혀 배지를 제조하고, 제조된 배지 중량 대비 표고버섯 균사체를 10% 내외로 배지에 접종하고 배양기로 25℃에서 40일간 배양하였다.

[0042] 4) 시료제조 방법

[0043] 분쇄한 각 시료 6 g에 정제수 100 mL을 넣고 60℃에서 4시간 동안 추출하고, Whatman filter paper No. 2로 여과한 후 동결건조하여 실험에 사용하였다.

[0044] 실험방법

[0045] 1) 구성아미노산 분석

[0046] 추출 후 동결건조한 각 시료를 분쇄하여 0.3 g을 시험관에 넣고 6N-HCl 용액 10 mL를 가한 후 110℃에서 24시간 가수분해해서 얻은 여액을 원심분리하고, 상등액을 50℃에서 농축하여 염산과 물을 완전히 증발시킨 후, 20 mM HCl(pH 2.2)을 사용하여 5 mL로 정용한 다음 0.45 막 필터(membrane filter)로 여과하여 여액을 취하고 AccQ-Tag 시약을 사용하여 유도체화 시킨 후 HPLC용 분석 시료로 사용하였다. 분석조건은 표 1과 같고, 아미노산 함량은 적분기(integrator)에 의한 외부표준법으로 계산하였다.

표 1

아미노산 분석 조건

[0047]

항 목	분석조건			
Instrument	Agilent Technologies 1200 Series			
Detector	Agilent Technologies 1200 Series FLD			
Column	AccQ-Tag <sup>TM</sup> (Waters Co., 150 mm L × 3.9 mm ID)			
Column temp	37℃			
Buffer solution	A : AccQ-Tag Eluent A(acetate-phosphate buffer) B : AccQ-Tag Eluent B(60% acetonitrile) C : DW			
	time	A	B	C
	0	100	0	0
	0.5	99	1	0
	18	95	5	0
	19	91	9	0
	26	86.7	13.3	0
	30	84	16	0
	32	83	17	0
	36	0	60	40
	39	100	0	0
48	100	0	0	
Flow rate	1.0 mL/min			
Injection volume	5 µL			

[0048] 2) 간보호 및 간기능 개선 실험

[0049] 가) 콜라게나제 주입(Collagenase perfusion)

[0050] Sprague-Dawley(SD) 랫트의 간세포는 Berry와 Friend의 방법을 수정한 2단계 콜라게나제 주입(collagenase perfusion) 방법으로 분리하였다. 랫트 간 세포(primary rat hepatocyte)를 얻기 위해 SD 랫트는 에테르로 흡입 마취시키고 70% 에탄올(ethanol)로 복부를 소독한 후, 개복하고 우심방을 절개하여 혈액이 제거될 수 있도록

하고 좌심실에 21 게이지(gauge) 주사기로 HBSS 100 mL을 주입(perfusion)하였다. 혈액을 제거한 후, 100 U/mL 콜라게나제(collagenase)가 포함된 HBSS를 100 mL 재순환시켜 세포(hepatocyte)가 유리화 되도록 하였다. 간 조직을 떼어내어 100 mm 배양 접시(culture dish)에서 HBSS 60 mL를 첨가하고 No. 11 블레이드(blade)로 세절(chopping)하여 단일 세포(single cell)들을 얻을 수 있었다. 이 세포(hepatocyte) 현탁액에 콜라게나제(collagenase)를 제거하기 위해 3회 Waymouth's MB 752/1 medium(5% 소태아혈청, 2.0 mg/mL 소 혈청 알부민,  $10^{-6}$  M 텍사메타손,  $10^7$  M 인슐린,  $5.32 \times 10^{-2}$  M L-세린,  $4.09 \times 10^{-2}$  M L-알라닌,  $2.67 \times 10^{-2}$  M  $\text{NaHCO}_3$ , 100 IU/mL 페니실린, 100 IU/mL 스트렙토마이신, 50  $\mu\text{g/mL}$  겐타마이신 설페이트)로 행귀주었다. 이 랫트 간 세포(primary rat hepatocyte)는  $1 \times 10^5$  cell/mL로 희석하여 사전에 콜라겐(collagen)으로 코팅되어 있는 96-웰 플레이트에 4시간 동안 부착시킨 후, 각 시료를 처리하였다.

[0051] 나) 세포독성분석

[0052] 랫트 간 세포(rat primary hepatocyte)는 96-웰 플레이트에  $1 \times 10^5$  cell/mL의 농도로 배양하여 시료를 처리하였다. 24시간 처리 후, 0.5  $\mu\text{g/mL}$  tetrazolium-based colorimetric(MTT)가 첨가된 Waymouth's MB 752/1 배지로 4시간 동안 포르마잔(formazan)을 형성시켰다. 반응이 끝나면 배지를 제거하고, 150  $\mu\text{L}$  DMSO로 포르마잔(formazan)을 용해시켜 540 nm로 multiplate reader(BioTek, USA)를 이용하여 측정하였다. 각 시료의 세포 생존율은, 무처리군을 100%로 하여 상대적으로 계상하였다.

[0053] 다) 간기능 검사

[0054] 간기능 검사를 하기 위해, 랫트 간 세포(Rat primary hepatocyte)는 96-웰 플레이트에  $1 \times 10^5$  cell/mL의 농도로 배양하여 시료를 처리하였다. 24시간 처리 후, 배지 50  $\mu\text{L}$ 를 이용하여 BlueGene Co.(Shanghai, China)에서 구매한 Rat lactate dehydrogenase(LDH), Rat aspartate transaminase(AST), Rat alanine transaminase(ALT) ELISA kit를 사용하여 효소를 정량적으로 측정하였다. 흡광도는 450 nm로 multiplate reader(BioTek, USA)를 이용하여 측정하였다. 각 시료의 LDH, AST, ALT의 함량은 0, 10, 25, 50, 100, 250 ng/mL의 농도로 표준곡선을 만들어 정량하였다.

[0055] 실시예 1: 구성아미노산 함량

[0056] 구성아미노산 분석결과 표고 균사체를 배양한 헛개가지 배양액의 총 구성아미노산 함량은 4140.36 mg%로 헛개가지 추출물의 총 구성 아미노산 함량보다 높게 검출되었다. 헛개가지에서는 프롤린(proline), 아르기닌(arginine), 페닐알라닌(phenylalanine) 순으로 높게 검출되었고, 헛개가지에 표고 균사체 배양한 배양액에서는 프롤린(proline), 글루탐산(glutamic acid), 아스파르트산(aspartic acid) 순으로 검출되었으며 총 아미노산과 필수아미노산의 비율에 있어서는 헛개나무 가지를 표고균사체를 접종하여 배양한 배양액이 헛개나무 가지에 비해 더 높게 나타났다.

표 2

구성아미노산 함량(mg%)

[0057]

구 분	헛개가지	헛개나무 가지를 표고균사체를 접종하여 배양한 배양액
Aspartic acid	80.65	333.40
Serine	143.49	301.11
Glutamic acid	135.98	403.61
Glycine	126.75	256.05
Histidine	48.54	101.12
Arginine	438.35	116.23
Threonine	190.19	287.32
Alanine	178.25	231.73
Proline	1768.24	973.77

Tyrosine	50.99	66.73
Valine	212.92	290.55
Methionine	0.00	0.00
Lysine	0.00	184.30
Isoleucine	0.00	191.52
Leucine	105.54	266.53
Phenylalanine	441.45	136.36
TAA <sup>1)</sup>	3921.35	4140.36
EAA <sup>2)</sup>	998.65	1457.72
EAA/TAA(%)	25.46	35.20

[0058] <sup>1)</sup>TAA: 총 아미노산

[0059] <sup>2)</sup>EAA: 필수아미노산

[0060] **실시예 2: 시료에 대한 간세포 독성확인**

[0061] 헛개나무 어린가지 추출물(A)과 헛개나무 어린가지에 배양한 표고버섯 균사체 추출물(B)을 다양한 농도(0, 10, 50, 100, 500 μg/mL)별로 독성을 확인한 결과, 모든 농도에서 간세포 독성은 보이지 않았다(도 1). 따라서, 상기 추출물들은 독성이 없어 다량섭취해도 간에 지장을 주지 않을 것으로 사료된다.

[0062] **실시예 3: 아세트아미노펜(acetaminophen)에 대한 간세포 보호활성**

[0063] 고농도의 아세트아미노펜(acetaminophen)을 처리하여 간독성을 일으키고, 100 μg/mL의 시료들로 간세포 보호효과를 확인하였다. 이때, 10 mM 아세트아미노펜(acetaminophen)으로 간독성을 일으킨 그룹의 세포생존율은 84.2 ± 3.2%이었으나 각각의 헛개가지 추출물 및 헛개가지에 배양한 표고버섯 균사체 배양액 추출물이 처리된 세포 생존율은 각각 101.8 ± 1.9%, 102.9 ± 3.5%으로 나왔다. 따라서, 상기 추출물들은 아세트아미노펜(acetaminophen)에 의한 간독성을 보호하는 것으로 확인되었다(도 2). 또한, 아세트아미노펜(acetaminophen)에 의한 간독성에는 헛개나무 어린가지 추출물보다 헛개나무 가지에 배양한 표고버섯 균사체 배양액 추출물이 보다 높은 방어 역할을 하는 것을 확인할 수 있었다(도 2).

[0064] **실시예 4: 아세트아미노펜(acetaminophen)에 대한 간기능 보호활성**

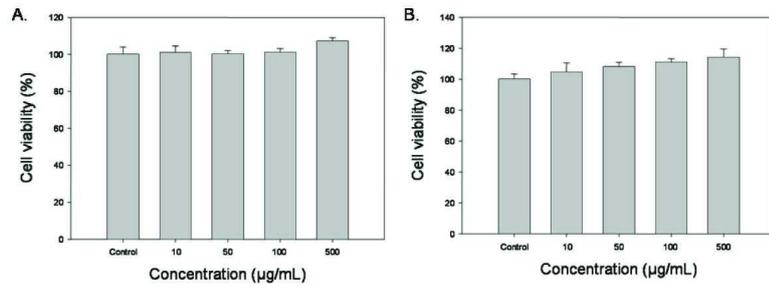
[0065] 고농도의 아세트아미노펜(acetaminophen)으로 간세포에 독성을 일으켰을 때, 배지로 분비되는 LDH의 함량을 측정 한 결과(도 3의 A), 대조구(무처리구, control)보다 31.6 ng/mL가 증가되었다. 이 결과는 간세포에 염증을 유발하여 LDH의 함량이 증가되는 것으로 판단된다. 염증을 유발하는 아세트아미노펜(acetaminophen)을 처리하고 100 μg/mL 헛개가지 추출물과 100 μg/mL 헛개가지에 배양한 표고버섯 균사체 배양액 추출물을 동시에 각각 처리하였을 때, 아세트아미노펜(acetaminophen) 만을 처리한 것보다 LDH의 함량이 줄어드는 것으로 확인되었다. 이 결과는, 상기 추출물들이 간세포에 염증을 감소시켜 간 기능을 개선하는 것으로 판단된다.

[0066] 또한, 배지 내의 AST의 경우에는(도 3의 B) 아세트아미노펜(acetaminophen)으로 간세포에 독성을 일으켰을 때 대조구(무처리구, control)보다 6.9 ng/mL이 증가되었으나, 100 μg/mL 헛개가지에 배양한 표고버섯 균사체 배양액 추출물을 처리하였을 때는 현저하게 감소되어 간세포의 염증반응 및 간 기능을 보호하는 것을 확인할 수 있었다.

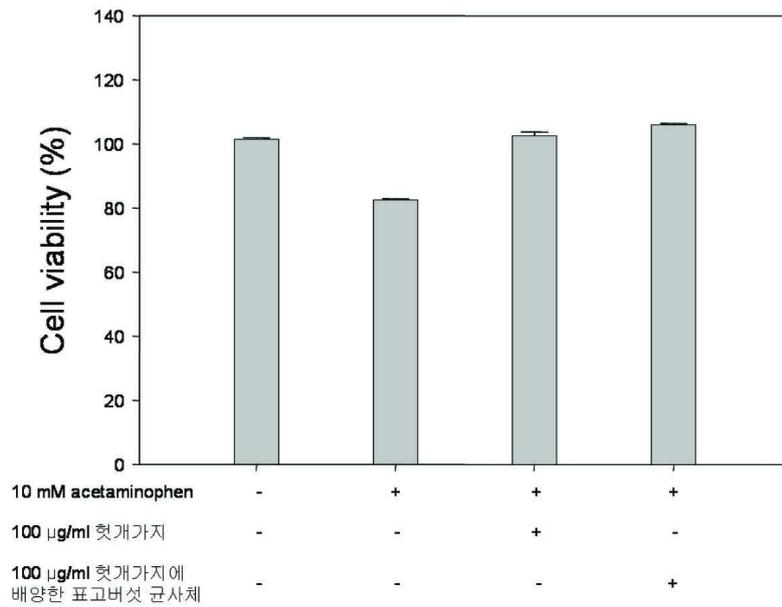
[0067] ALT의 경우에는(도 3의 C), 아세트아미노펜(acetaminophen)으로 간세포에 독성을 일으킨 처리군보다 헛개가지 추출물 처리군에서 6.5 ng/mL을 감소시켜 아세트아미노펜(acetaminophen)을 처리하지 않은 대조군 수준까지 감소시켰으며, 헛개가지에 배양한 표고버섯 균사체 추출물은 7.9 ng/mL을 감소시켜 헛개가지 추출물보다 간 손상을 줄이고 간 기능을 돕는 것으로 사료된다.

도면

도면1



도면2



도면3

