KOREAN J. FOOD SCI. TECHNOL. Vol. 46, No. 2, pp. 249~255 (2014)
http://dx.doi.org/10.9721/KJFST.2014.46.2.249

KOREAN JOURNAL OF
한국식품과학회지
FOOD SCIENCE AND TECHNOLOGY
©The Korean Society of Food Science and Technology

흰쥐에서 가시오가피 발효물의 단회 및 반복투여 독성평가

조주현* · 박인재 · 백순옥 · 최수영[1] · 최구희
휴럼 중앙연구소, [1]충북대학교 생물학과

Single- and Repeated-dose Toxicities of *Acanthopanax senticosus* Fermentation Products in Rats

Ju-Hyun Cho*, In-Jae Park, Soon-Ok Baik, Soo-Young Choi[1], and Goo-Hee Choi
Hurum Central Research Institute Co., Ltd.
[1]*College of Biology, Chungbuk National University*

Abstract In this study, the products of *Acanthopanax senticosus* fermentation were derived from the mycelia of 2 mushrooms, *Ganoderma lucidum* and *Phellinus linteus,* to determine their safety in Sprague-Dawley rats. Rats were orally administered the water extracts of *A. senticosus* fermentation products with *G. lucidum* (FM-5111) or *P. linteus* (FM-5131) at dose levels of 0.5, 1.0, or 2.0 g/kg for the single-dose toxicity test and 0.25, 0.5, or 1.0 g/kg for the repeated-dose toxicity test. There were no significant differences in body weight gain, feed intake, or water consumption between control and FM-5111- or FM-5131-treated rats. Hematological and blood biochemistry analysis revealed that none of the investigated parameters were affected by the *A. senticosus* fermentation products, and no remarkable lesions were observed upon histopathological analysis. We conclude that the *A. senticosus* fermentation products obtained from mushroom mycelia are safe for long-term administration and could be considered as multi-functional nutrients for the improvement of liver function and immunity.

Keywords: *Acanthopanax senticosus* fermentation, single-dose toxicity, repeated-dose toxicity, *Ganoderma lucidum*, *Phellinus linteus*

서 론

오가피는 인삼과 같은 두릅나무과(Araliaceae) *Acanthopanax* 속에 속하는 활엽관목으로 러시아 남동쪽, 중국 북동쪽, 아시아 남동쪽, 일본 홋카이도 섬에 많이 분포하고 있다. 우리나라는 지리산, 설악산, 오대산, 덕유산, 대관령 부근 고산지대 등에서 자생하고 있다(1). 성목은 1.6-3.0 m까지 자라며, 유년기에는 엽병(잎자루)과 주맥에 무수히 많은 세자가 있고, 꽃은 산형 화서로 구형의 우산 모양이며 장과는 타원형이고 검다. 오가피의 씨앗은 미배숙으로 1년간 휴면기를 지난 후에 발아를 하며 발아율이 낮은 이유로, 발아율 증대, 삽목번식, 체세포 번식 등의 연구가 이루어지고 있다(2). 오가피의 종류로는 두상오가피, 섬오가피, 당오가피 등의 여러 종류가 있으며, 그 중에서도 유효성분이 많아 약효가 가장 좋다고 밝혀진 것은 '가시오가피'이다. 가시오가피(*Acanthopanax senticosus*)는 서양에서 한국인삼에 버금가는 효능을 가지고 있다하여 고려인삼(Korean ginseng)과 비교해서 시베리아 인삼(Siberian ginseng)이라 불리어 진다(3).

가시오가피의 유효성분으로는 sesamin, savinin과 acanthoside A, B, C, D, chillsanoside, polyacetylene 등이 있으며, 가시오가피의 줄기와 잎에 함유되어 있는 acanthoside A, B, C, D와 chillsanoside는 기초대사의 생체 기능에 작용하는 것으로 알려져 있다(4,5). 또한, eleutheroside E, acankoreoside D 등으로 불리어지는 lignin 배당체인 acanthoside D는 T 세포의 증식을 증가시키고, 콜레스테롤 수치를 저하시키며, 전립선 활성 등에 도움을 주는 것으로 알려져 있다(4-8).

상황버섯은 진흙버섯속에 속하는 백색 부후균으로 뽕나무 줄기 등에 자생하며, 갓표면을 제외하고는 모두 황색을 나타내어 상황이라 부른다. 상황버섯은 전 세계적으로 220여종이 알려져 있으나, 국내에는 *Phellinus linteus, P. baumii, P. gilvus, P. igniarius* 등의 7종이 있으며 그 중에서도 국내에서는 *P. baumii*와 *P. linteus*가 일반적으로 재배, 유통되고 있다(9). 영지버섯은 열대, 아열대, 온대지방 등 전세계적으로 분포하고 있으며, 미국 9종, 일본 5종, 중국 64종, 한국 4종 등이 보고되어 있다. 이러한 상황버섯과 영지버섯 등의 균사체는 면역증진, 항암, 항알러지, 항염 등의 다양한 효능을 가지고 있다(10,11).

본 연구에서는 다양한 기능성을 갖는 가시오가피를 천연배지로 활용하여, 상황버섯과 영지버섯 균사체를 각각 고체배양하였고, 이를 이용하여 기능성 식품소재 개발을 목적으로 가시오가피 발효물에 대한 안전성 확보를 위하여 단회 및 반복투여 독성을 평가하였다.

재료 및 방법

가시오가피 발효물 생산 및 추출

가시오가피 영지버섯 발효물을 생산하기 위하여 마쇄한 가시

*Corresponding author: Ju-Hyun Cho, Hurum Central Research Institute Co., Ltd., Cheongwon, Chungbuk 363-883, Korea
Tel: 82-43-217-1077
Fax: 82-43-217-1088
E-mail: dusvnd608@hurum.co.kr
Received September 16, 2013; revised November 1, 2013; accepted December 11, 2013

오가피의 줄기와 잎의 비율이 80:20로 조절하여 천연배지 원료를 준비하였고, 가시오가피 상황버섯 발효물은 마쇄한 가시오가피의 줄기와 잎의 비율이 50:50로 조절하여 천연배지 원료를 준비하였다. 천연배지 원료에 수분이 63±3%가 되도록 정제수를 투입하고 autoclave에서 121°C, 20분간 초벌 멸균한 후, 산업용 배양포트(2,000 mL)에 가시오가피 배지 부피가 60%가 되도록 적당한 압력으로 눌러 주고 배양 용기 뚜껑으로 밀폐시킨 후 autoclave에서 121°C, 40분간 멸균을 실시하였고, 배지를 25°C까지 급랭시켜 천연배지를 준비하였다.

영지버섯과 상황버섯 종균 제조는 potato dextrose agar (Difco Laboratories, Detroit, MI, USA) 배지에 접종하고 28°C에서 7일간 배양한 후 cork borer (직경 8 mm)로 절취하여 균주디스크를 만들어 멸균된 potato dextrose broth (Difco) 배지가 100 mL씩 분주되어 있는 삼각플라스크에 5-6개의 균주디스크를 접종하여 6일간 진탕배양(SI-400R, JEIOTECH, Seoul, Korea)한 다음 분쇄기(Waring, Winsted, CT, USA)로 균질화하여 다시 PDB 배지가 100 mL씩 분주되어 있는 삼각플라스크에 9 mL를 접종하여 5일간 배양하여 종균으로 사용하였다.

준비된 영지버섯 발효물 제조용 천연배지에 영지버섯(*Ganoderma lucidum*; KCTC 6729) 종균을 9%씩 접종하고 28°C에서 14일간 배양하여 가시오가피 영지버섯 발효물을 수득하였고, 상황버섯 발효물 제조용 천연배지에 상황버섯(*Phellinus linteus*; KCTC 6719) 종균을 9%씩 접종하고 28°C에서 30일간 배양하여 가시오가피 상황버섯 발효물을 수득하였다.

가시오가피 영지버섯 발효물과 가시오가피 상황버섯 발효물을 60°C에서 건조하여 열수추출한 후, 동결건조하여 시료(가시오가피 영지버섯 발효물 시료; FM-5111, 가시오가피 상황버섯 발효물 시료; FM-5131)로 사용하였으며, 가시오가피 발효물의 지표성분으로 eleutheroside B, eleutheroside E 와 β-glucan의 함량을 분석하였다.

Eleutheroside 분석은 eleutheroside B (분자량 372.37, ChromaDex, Irvine, CA, USA)와 eleutheroside E (분자량 742.72, ChromaDex)를 각각 2.5 mg씩을 취하여 증류수 20 mL로 용해한 다음 methanol (JT baker, Avantor Performance Materials, Center Valley, PA, USA)을 첨가해 100 mL로 제조하여 각각의 표준원액으로 사용하였다. 표준원액에서 0.25, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5 mL씩 취하고 정확히 10.0 mL가 되도록 methanol을 첨가해 정용하여 eleutheroside B와 eleutheroside E가 혼합된 표준액을 제조하였다. 각각의 시료 100 mg을 각각 10 mL volumetric flask에 넣고 water 2 mL를 넣은 후 methanol로 용해하여 10 mL이 되게 한 후, ultrasonic cleaner (powersonic 420, Hwashin Instrument, Daegu, Korea)에서 40분간 추출한 후 최종 10 mL로 한 것을 0.45 μm membrane filter (ADVANTEC, Tokyo, Japan)로 여과하여 시험용액으로 사용하였다. 상기 조제된 표준용액과 시험용액을 고속액체크로마토그래피(WATERS 2695, Waters, Milford, MA, USA)-Photodiode Array Detector (PDA, WATERS 996, Milford)를 사용하여 Capcell pak C18 (5 μm 4.6×250 mm, Shiseido, Tokyo, Japan)컬럼 고정상에 이동상은 acetonitrile과 water가 15:85의 비율로 isocratic flow가 되게 1.0 mL/min 유속으로 하고 220 nm 파장에서 제조된 표준액과 시험용액을 주입하여 흡광분석 하였다. 이 결과에서 eleutheroside peak 면적을 y축으로 eleutheroside의 농도를 x축으로 하여 eleutheroside B와 eleutheroside E의 검량선을 작성하고 시험용액에 함유된 함량 값을 계산하였다(12,13).

β-glucan 분석은 Yeast beta-glucan kit (Megazyme, Wicklow, Ireland)를 사용하여 β-glucan 분석법에 따라 수행하였다. 시료 100 mg을 50 mL 용량의 glass test tube에 넣고 1.5 mL의 37% 염산을 넣어 30°C 항온수조에서 45분간, 15분마다 교반하면서 반응시킨 다음 10 mL의 증류수를 첨가하고 혼합한 후 끓는 물에서 마개를 느슨하게 열어놓은 상태에서 5분간 반응시킨 다음, 마개를 단단히 닫고 100°C 항온수조에서 2시간 동안 교반시킨 다음 냉각시키고 10 mL의 2 N KOH를 넣고 혼합한 다음 원심분리(1,500 rpm, 10 min)하여 상등액을 얻었다. 상등액 0.1 mL에 각각 0.1 mL씩의 exo-1,3-β-glucosidase를 첨가한 후 40°C에서 60분간 반응시켜 total glucan 분석에 사용하였다. 또한 100 mg의 시료를 50 mL 용량의 glass test tube에 담아 2 mL의 2 M KOH를 넣어 얼음에서 20분간 교반시킨 다음 8 mL의 1.2 M sodium acetate buffer (pH 3.8)와 0.2 mL의 amyloglucosi-dase plus invertase를 넣고 혼합한 후 40°C 항온수조에서 30분간 반응시킨 후 원심분리(1,500 rpm, 10 min)하여 상등액에 0.1 mL의 200 mM sodium acetate buffer (pH 5.0)를 첨가한 것을 α-glucan 분석에 사용하였다. Total glucan과 α-glucan 분석용 시료에 3 mL의 glucose oxidase/peroxidase/4-amino-anipyrine (GOPOD) 시약을 넣어 40°C 항온수조에서 20분간 반응시킨 후 UV-Vis Spectrophotometer (UV-1650PC, Shimadzu, Kyoto, Japan)를 이용하여 510 nm에서 흡광도를 측정하고 아래의 식에 따라 β-glucan 함량(%)으로 나타내었다(14-17).

β-glucan함량(%)=Total glucan 함량(%)–α-glucan 함량(%)

단회투여 독성 시험

단회투여 독성 시험은 6주령 Sprague-Dawley (SD) rats 암컷과 수컷을 (주)대한바이오링크(Eumseong, Korea)에서 공급받았고, 입수동물은 1주일간 동물실에서 순화시킨 후 시험에 사용하였다. 사육상자 당 3수의 rats를 사육하였고, 사육환경은 자동환경조절장치로 다음과 같이 조절하였다(온도: 22±3°C, 상대습도: 50%±10%, 조도: 200-300 Lux, 명암주기: 12시간 점등/12시간 소등, 조명시간: 오전 8시-오후 8시). 실험동물을 1개의 용매대조군(G1; 멸균 증류수)과 3개의 FM-5111 시험군(G2; 0.5 g/kg, G3; 1.0 g/kg, G4; 2.0 g/kg)과 3개의 FM-5131 시험군(G5; 0.5 g/kg, G6; 1.0 g/kg, G7; 2.0 g/kg)으로 설정하였고, 각 군당 암컷, 수컷 각 5수씩, 총 10수씩 구성하였다. FM-5111과 FM-5131 투여 시험군은 시료를 1회 투여하여 7일간 관찰하였다. 모든 실험동물은 사육기간 동안 매일 1회씩 일반상태의 변화, 중독 증상발현, 사망동물의 유무를 확인하였고, 하루에 한번씩 체중을 측정하였다. 7일간 사육 후, 실험동물을 부검하여 장기조직들의 이상 유무를 검사하였다.

반복투여 독성 시험

반복투여 독성 시험은 단회독성 시험에서 언급한 실험동물 사육방법들을 동일하게 적용하여 수행하였다. 실험동물을 1개의 용매대조군(G1; 멸균 증류수)과 3개의 FM-5111 시험군(G2; 0.25 g/kg, G3; 0.5 g/kg, G4; 1.0 g/kg)과 3개의 FM-5131 시험군(G5; 0.25 g/kg, G6; 0.5 g/kg, G7; 1.0 g/kg)으로 설정하였고, 각 군당 암컷, 수컷 각 5수씩, 총 10수씩 구성하였다. FM-5111과 FM-5131 투여 시험군은 시료를 매일 동일한 시간에 1회씩 28일간 투여하였으며, 투여기간동안 모든 실험동물은 매일 1회씩 일반상태의 변화, 중독 증상발현, 사망동물의 유무 및 시료 투여 후 시료에 의하여 나타날 가능성이 있는 증상에 대하여 주의하여 관찰하였고, 일반증상은 식욕부진, 타액분비, 설사, 구토, 다뇨 및 무뇨, 분변의 변화를 중심으로 관찰하였다. 또한, 주 1회 체중을 측정하였다. 28일간 사육 후, 혈액학적 검사와 혈액생화학적 검사를 수

행하였으며, 부검을 통한 장기조직들의 이상 유무를 검사하였고, 장기 중량을 측정하였다.

혈액학적 검사

반복투여 독성 시험에서, 28일간 시험물질(FM-5111, FM-5131)을 투여한 후, 부검 전 12시간 절식시킨 동물을 CO_2로 마취시킨 후 복대정맥으로부터 전 채혈하여 얻은 혈액의 일부를 EDTA로 항응고 처리하여, 혈구자동측정기(Hemavet, Drew Scientific Co, Oxford, CT, USA)로 총 백혈구수(Total leucocyte count, WBC), 중성호성 백혈구(neutrophil. NEUT), 림프구(lymphocyte, LYMP), 단핵구(monocyte, MONO), 산호성백혈구 (eosinophil, EOS), 염기호성백혈구 (basophil, BASO), 총 적혈구수(total erythrocyte count, RBC), 혈색소량(hemoglobin concentration, HGB), 헤마토크리트치(hematocrit, HCT), 평균적혈구용적(mean cell volume, MCV), 평균헤모글로빈양(mean cell hemoglobin, MCH), 평균적혈구헤모글로빈농도(mean cell hemoglobin concentration, MCHC), 혈소판수(platelet, PLT)를 측정하였다.

Table 1. Mortality of Sprague-Dawley rats fed of *Acanthopanax senticosus* fermentation products during oral administration for 7 day

		Group/Dose (g/kg)						
			FM-5111[2)]			FM-5131[3)]		
		G1[1)]/0	G2/0.5	G3/1.0	G4/2.0	G5/0.5	G6/1.0	G7/2.0
Mortality (%) (dead/total)	Male	0% (0/5)	0% (0/5)	0% (0/5)	0% (0/5)	0% (0/5)	0% (0/5)	0% (0/5)
	Female	0% (0/5)	0% (0/5)	0% (0/5)	0% (0/5)	0% (0/5)	0% (0/5)	0% (0/5)

[1)]Control: without extract was treated with aseptic water.
[2)]*Acanthopanax senticosus* fermentation product with *Ganoderma lucidum*
[3)]*Acanthopanax senticosus* fermentation product with *Phellinus linteus*

Table 2. Clinical sign of Sprague-Dawley rats fed of *Acanthopanax senticosus* fermentation products during oral administration for 7 day

		Group/Dose (g/kg)						
			FM-5111[2)]			FM-5131[3)]		
		G1[1)]/0	G2/0.5	G3/1.0	G4/2.0	G5/0.5	G6/1.0	G7/2.0
Clinical sign	Male	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD
	Female	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD	NAD

[1)]Control: without extract was treated with aseptic water.
[2)]*Acanthopanax senticosus* fermentation product with *Ganoderma lucidum*
[3)]*Acanthopanax senticosus* fermentation product with *Phellinus linteus*
NAD: No Abnormality Detected

Table 3. Changes of body weight of Sprague-Dawley rats fed of *Acanthopanax senticosus* fermentation products during oral administration for 7 day

Sex	Day	Group/Dose (g/kg)						
			FM-5111[2)]			FM-5131[3)]		
		G1[1)]/0	G2/0.5	G3/1.0	G4/2.0	G5/0.5	G6/1.0	G7/2.0
Male	1	203.86±7.92	204.22±7.75	204.72±7.19	205.28±7.17	205.04±7.09	204.82±7.50	204.30±8.14
	2	204.00±8.65	205.78±8.50	205.08±7.59	205.92±9.29	204.20±7.79	206.36±6.49	202.98±9.01
	3	212.20±9.07	213.40±8.26	212.46±7.46	212.80±9.84	211.66±8.68	214.84±6.95	210.70±7.71
	4	223.44±9.47	225.34±8.69	223.96±7.61	224.10±9.59	223.22±10.22	226.96±8.25	222.22±8.51
	5	229.58±10.47	231.58±8.45	229.94±7.87	231.28±10.85	230.76±8.64	232.60±8.68	229.08±8.98
	6	234.92±10.64	237.80±7.71	236.42±8.67	237.66±10.67	236.08±9.06	239.26±9.63	235.34±8.71
	7	250.26±12.04	249.28±4.64	247.94±9.44	250.22±11.76	248.68±10.35	252.72±10.28	248.38±9.18
Female	1	161.12±7.05	160.80±6.50	160.96±5.79	161.06±5.71	161.58±5.46	161.72±5.81	162.08±6.22
	2	160.34±9.31	156.98±4.52	158.02±7.15	157.28±5.70	156.86±7.50	156.64±5.96	158.28±7.07
	3	163.78±11.10	161.84±4.33	161.62±8.45	160.62±4.75	161.66±8.86	160.20±6.04	162.48±6.89
	4	169.58±12.01	166.98±3.08	166.96±9.99	167.82±4.86	167.86±8.14	166.08±5.41	168.94±5.67
	5	172.70±12.44	171.08±5.51	171.54±9.20	170.68±5.55	171.36±9.36	169.36±5.54	171.08±4.24
	6	173.14±15.75	172.40±4.48	173.42±10.17	172.28±5.44	172.04±11.90	173.52±3.74	174.64±6.51
	7	181.22±16.46	176.74±3.71	180.78±11.59	180.02±6.09	179.64±13.37	178.08±5.90	182.68±5.78

[1)]Control: without extract was treated with aseptic water.
[2)]*Acanthopanax senticosus* fermentation product with *Ganoderma lucidum*
[3)]*Acanthopanax senticosus* fermentation product with *Phellinus linteus*

혈액생화학적 검사

채혈한 전혈 일부를 15분간 원심분리(3,000 rpm, Eppendorf, Hamburg, Germany) 한 후 혈청을 취하여 혈청자동분석기(Hitachi7060, Hitachi, Tokyo, Japan)를 이용하여, 총 단백질(total protein: TP), 알부민(albumin: ALB), 알칼라인포스파타제(alkaline phosphatase: ALP), 아스파테이트 아미노기전이효소(aspartate aminotransferase: AST), 알라닌 아미노기전이효소(alanine aminotransferase: ALT), 크레아티닌(creatnine: CRE), 혈액요소질소(blood urea nitrogen: BUN), 총 콜레스테롤(total cholesterol: TC), 혈당(glucose: GLU), 트리글리세라이드(triglycerides: TG)을 측정하였다.

통계 분석

체중, 혈액 및 혈액생화학적 검사 및 장기 중량 측정에서 얻어진 모든 자료들은 평균과 표준편차로 나타내었으며, SPSS program (SPSS INC, Chicago, IL, USA)을 사용하여 통계분석을 실시하였다. One-way analysis of variation (ANOVA)를 실시하여 유의성이 관찰되면 대조군과 유의차가 있는 시험군을 확인하기 위해 Dunnett's *t*-test의 다중검정을 실시하였다.

Table 4. Changes of body weight of Sprague-Dawley rats fed of *Acanthopanax senticosus* fermentation products during oral administration for 28 days

Sex	Week	Group/Dose (g/kg)						
		FM-5111[2)]				FM-5131[3)]		
		G1[1)]/0	G2/0.25	G3/0.5	G4/1.0	G5/0.25	G6/0.5	G7/1.0
Male	0	198.50±7.19	199.90±6.39	198.12±5.00	199.56±7.65	198.94±5.43	199.58±8.41	199.82±8.20
	1	240.20±12.50	243.26±7.51	238.82±5.65	239.92±10.77	242.12±6.10	240.80±9.24	238.96±9.36
	2	270.48±32.81	292.46±11.03	285.18±7.98	291.68±16.39	293.30±9.18	292.24±12.63	288.66±11.83
	3	329.48±20.02	330.38±13.17	322.78±11.05	331.90±18.78	334.70±9.92	328.06±13.49	327.58±12.72
	4	341.22±20.32	337.78±15.71	331.54±14.25	342.92±15.94	343.90±11.76	334.40±15.83	333.36±15.49
Female	0	160.98±8.48	159.28±6.76	160.20±7.49	160.04±7.28	159.56±8.61	161.06±7.21	159.26±8.53
	1	183.50±9.79	176.22±8.77	173.14±6.71	175.44±8.65	177.66±12.52	179.12±10.18	173.72±9.73
	2	202.24±12.93	200.34±11.77	192.78±7.57	190.18±7.45	197.22±10.87	193.64±9.96	189.60±12.34
	3	218.44±18.34	212.54±8.14	204.32±9.93	207.64±8.88	211.32±13.10	216.46±6.96	210.42±13.50
	4	217.66±16.12	212.34±4.41	200.62±9.41	205.22±11.38	207.62±10.05	211.92±7.71	208.76±16.04

[1)]Control: treated with aseptic water.
[2)]*Acanthopanax senticosus* fermentation product with *Ganoderma lucidum*
[3)]*Acanthopanax senticosus* fermentation product with *Phellinus linteus*

Table 5. Organ weight changes in Sprague-Dawley rats administered with *Acanthopanax senticosus* fermentation products by daily oral gavage for 28 days

Sex	Organ	Group/Dose (g/kg)						
		FM-5111[2)]				FM-5131[3)]		
		G1[1)]/0	G2/0.25	G3/0.5	G4/1.0	G5/0.25	G6/0.5	G7/1.0
Male	Liver	11.11±1.23	11.07±1.13	11.08±1.02	12.20±0.74	11.08±0.51	10.62±0.49	11.25±0.66
	Lung	1.27±0.13	1.28±0.08	1.29±0.12	1.26±0.11	1.36±0.15	1.31±0.07	1.29±0.08
	Spleen	0.78±0.07	0.75±0.13	0.75±0.07	0.81±0.14	0.85±0.14	0.70±0.07	0.76±0.08
	Kidney	1.27±0.10	1.25±0.08	1.24±0.09	1.33±0.09	1.27±0.10	1.23±0.09	1.23±0.05
	Heart	1.12±0.12	1.14±0.03	1.19±0.09	1.13±0.09	1.20±0.08	1.14±0.09	1.13±0.07
	Testis	1.55±0.08	1.57±0.16	1.54±0.11	1.76±0.04	1.62±0.20	1.57±0.11	1.53±0.09
	Adrenal gland	0.02±0.01	0.02±0.00	0.02±0.00	0.02±0.01	0.06±0.09	0.02±0.00	0.02±0.00
	Thymus	0.60±0.05	0.62±0.11	0.57±0.14	0.71±0.10	0.66±0.07	0.59±0.10	0.64±0.08
	Brain	2.02±0.09	1.97±0.05	1.98±0.10	2.00±0.11	1.97±0.15	2.05±0.06	1.95±0.08
Female	Liver	6.89±0.93	6.58±0.91	5.86±0.56	6.31±0.61	6.05±0.59	6.56±0.55	6.63±0.48
	Lung	1.10±0.09	1.08±0.09	1.04±0.11	1.05±0.06	1.17±0.13	1.08±0.09	1.11±0.13
	Spleen	0.64±0.11	0.59±0.09	0.53±0.04	0.53±0.06	0.59±0.07	0.55±0.06	0.52±0.08
	Kidney	0.78±0.09	0.79±0.05	0.76±0.10	0.83±0.04	0.80±0.04	0.80±0.04	0.80±0.06
	Heart	0.82±0.09	0.78±0.04	0.77±0.05	0.76±0.05	0.79±0.05	0.83±0.06	0.80±0.06
	Ovary	0.05±0.01	0.04±0.00	0.03±0.01	0.04±0.01	0.04±0.01	0.05±0.00	0.04±0.00
	Adrenal gland	0.03±0.00	0.03±0.00	0.03±0.01	0.03±0.00	0.03±0.00	0.03±0.00	0.03±0.00
	Thymus	0.45±0.06	0.39±0.09	0.42±0.05	0.41±0.03	0.43±0.04	0.42±0.06	0.42±0.03
	Brain	1.88±0.14	2.05±0.33	1.86±0.06	1.92±0.08	1.99±0.27	1.91±0.09	1.93±0.09

[1)]Control: treated with aseptic water.
[2)]*Acanthopanax senticosus* fermentation product with *Ganoderma lucidum*
[3)]*Acanthopanax senticosus* fermentation product with *Phellinus linteus*

결과 및 고찰

가시오가피 발효물의 지표성분 함량 분석

시료로 사용한 FM-5111, FM5131의 eleutheroside B는 각각, 0.050±0.003, 0.028±0.001 mg/g으로 분석 되었으며, eleutheroside E는 각각, 0.064±0.011, 0.074±0.064 mg/g으로 분석되었다. 또한, β-glucan의 함량은 FM-5111의 경우, 4.47±0.14%로 측정되었으며, FM-5131은 4.15±0.06%로 분석되었다.

Kim 등(18)은, 상황버섯균사체로 발효한 흑미 발효물에 대한 항산화능을 보고하였으며, 이는 상황버섯균사체의 발효에 의한 proanthocyanidin의 함량 증가에 기인하는 것으로 판단하였다. 따라서, 본 연구에서 사용한 가시오가피 발효물 시료인 FM-5111과 FM-5131의 경우, 버섯균사체의 발효에 의하여 어떠한 유효성분의 함량 증가를 기대할 수 있으며, 이는 가시오가피 원물이 갖는 항피로작용(19), 콜레스테롤 저하효과(20,21), 항산화작용(22), 항염증작용(23) 등 다양한 생리활성 기능이 가시오가피 발효물에서 더 높아질 수 있음을 기대할 수 있다.

단회 및 반복 투여 독성 시험

단회 및 반복 투여 독성 시험에서 시험기간 동안 관찰한 결과, FM-5111, FM5131을 투여한 모든 시험군에서 시험물질 투여와 관련된 사망 동물 또는 임상증상은 관찰되지 않았다. 또한, 7일간 1일 1회 체중을 측정한 결과에서도 의미 있는 차이를 보이지 않았다. 이러한 결과는 FM-5111, FM-5131이 시험에 사용된 농도 범위에서 어떠한 비정상적 임상증상이나 독성을 유발하지 않는다는 것을 의미한다(Table 1, 2, 3).

Table 4에서는 반복 투여 독성 시험에서의 체중변화를 보여준다. 대조군과 FM-5111, FM-5131 시험군의 체중변화를 1주 간격으로 4주간 측정한 결과 대조군과 시험군 사이에 통계적으로 유의적인 변화가 없음을 알 수 있었다. 또한, FM-5111, FM-5131을

Table 6. Changes of hematological parameters in Sprague-Dawley rats administered with *Acanthopanax senticosus* fermentation products by daily oral gavage for 28 days

Sex	parameter	Group/Dose (g/kg)						
		FM-5111[2)]				FM-5131[3)]		
		G1[1)]/0	G2/0.25	G3/0.5	G4/1.0	G5/0.25	G6/0.5	G7/1.0
Male	RBC (1×10^6 cells/μL)	7.94±0.44	8.13±0.31	8.21±0.48	8.29±0.36	8.51±0.15	8.42±0.31	8.43±0.46
	HGB (g/dL)	15.38±0.78	15.78±0.50	15.88±0.57	15.86±0.84	16.40±0.41	16.02±0.70	16.12±0.91
	HCT (%)	49.36±2.43	51.26±1.53	51.50±2.02	50.10±1.91	52.24±0.71	51.06±1.72	52.46±1.36
	MCV (fL)	62.24±0.86	63.12±0.63	62.75±1.19	60.48±2.02	61.48±0.89	60.64±0.90	62.26±1.93
	MCH (pg)	19.36±0.50	19.44±0.24	19.35±0.47	19.10±0.56	19.28±0.48	19.00±0.44	19.10±0.60
	MCHC (g/dL)	31.14±0.50	30.76±0.18	30.85±0.37	31.60±0.55	31.36±0.52	31.34±0.48	30.68±1.04
	PLT (1×10^3 cells/μL)	899.40±109.56	941.20±84.07	975.50±174.69	1077.20±258.17	1108.40±39.57	1041.60±178.88	1097.60±81.95
	WBC (1×10^3 cells/μL)	6.86±0.72	5.52±0.70	8.53±0.57	10.66±2.73	9.71±1.48	9.60±2.21	11.26±1.32
	Neut (%)	10.24±2.27	10.46±1.07	9.83±3.97	7.28±1.37	5.88±1.27	6.26±0.89	7.12±1.19
	Lymph (%)	85.58±3.81	86.74±1.09	86.55±5.12	89.96±1.57	91.72±1.20	91.28±1.21	89.82±1.24
	Mono (%)	1.42±0.19	1.32±0.40	1.00±0.41	1.32±0.69	0.88±0.16	0.98±0.25	1.18±0.11
	Eos (%)	1.85±0.37	1.16±0.25	1.70±1.49	1.16±0.42	1.28±0.63	1.22±0.28	1.60±0.70
	Baso (%)	0.28±0.11	0.32±0.13	0.27±0.06	0.28±0.13	0.24±0.05	0.26±0.05	0.28±0.08
Female	RBC (1×10^6 cells/μL)	7.58±0.27	7.82±0.10	8.15±0.32	8.00±0.21	8.02±0.31	7.82±0.27	7.85±0.37
	HGB (g/dL)	14.88±0.45	14.94±0.34	15.52±0.53	15.16±0.49	15.28±0.54	14.98±0.41	15.14±0.65
	HCT (%)	47.34±1.66	47.54±0.57	49.70±1.69	48.18±1.64	48.24±1.19	47.14±1.57	47.40±2.24
	MCV (fL)	62.48±1.12	60.78±0.82	61.02±0.81	60.16±0.47	60.12±1.46	60.30±1.02	60.42±1.23
	MCH (pg)	19.60±0.48	19.08±0.58	19.02±0.36	18.90±0.25	19.06±0.48	19.14±0.36	19.28±0.42
	MCHC (g/dL)	31.36±0.33	31.40±0.60	31.14±0.31	31.44±0.32	31.66±0.75	31.70±0.22	31.88±0.42
	PLT (1×10^3 cells/μL)	1117.40±142.41	1117.20±135.74	1187.60±67.74	1040.60±139.76	1109.20±183.11	1064.00±104.77	978.20±141.75
	WBC (1×10^3 cells/μL)	4.40±0.98	3.63±0.34	3.00±0.71	3.95±0.67	3.77±0.88	2.83±0.53	3.33±1.13
	Neut (%)	8.38±3.21	10.84±3.94	10.56±4.36	11.14±2.81	8.94±2.60	11.10±3.92	11.00±3.56
	Lymph (%)	87.64±3.76	85.16±4.47	86.08±4.56	84.72±3.67	86.80±4.32	84.74±3.79	83.54±3.36
	Mono (%)	1.00±0.58	0.92±0.19	0.88±0.27	1.24±0.39	1.32±0.29	1.10±0.10	1.00±0.37
	Eos (%)	2.68±0.83	2.70±1.35	2.04±0.59	2.68±0.78	2.72±1.86	2.94±1.38	3.60±0.55
	Baso (%)	0.30±0.10	0.38±0.08	0.30±0.24	0.22±0.13	0.22±0.04	0.15±0.06	0.20±0.10

[1)]Control: treated with aseptic water.
[2)]*Acanthopanax senticosus* fermentation product with *Ganoderma lucidum*
[3)]*Acanthopanax senticosus* fermentation product with *Phellinus linteus*

Table 7. Blood biochemistry changes in Sprague-Dawley rats administered with *Acanthopanax senticosus* fermentation products by daily oral gavage for 28 days

Sex	Parameter	Group/Dose (g/kg)						
		FM-5111[2)]				FM-5131[3)]		
		G1[1)]/0	G2/0.25	G3/0.5	G4/1.0	G5/0.25	G6/0.5	G7/1.0
Male	ALB (g/dL)	4.60±0.10	4.56±0.05	4.52±0.08	4.68±0.11	4.64±0.15	4.62±0.04	4.66±0.09
	ALP (U/L)	487.80±91.91	412.25±56.79	408.40±92.25	415.80±44.43	405.40±24.80	456.60±65.57	381.60±88.40
	CRE (mg/dL)	0.60±0.12	0.60±0.07	0.50±0.10	0.54±0.05	0.60±0.10	0.58±0.04	0.56±0.15
	GLU (mg/dL)	108.40±11.39	126.60±8.44	112.00±14.72	116.40±5.18	105.60±16.05	118.20±16.05	122.00±9.19
	AST (U/L)	85.63±12.75	89.63±28.65	114.47±21.86	93.57±2.32	111.17±6.09	93.40±11.01	108.13±21.77
	ALT (U/L)	42.00±8.69	40.00±6.04	37.60±13.39	42.20±8.23	41.20±8.50	39.00±7.28	40.60±4.34
	T-CHO (mg/dL)	56.65±1.50	52.63±5.64	57.95±24.31	50.72±16.96	104.38±14.03	103.47±18.94	83.34±13.64
	T-PRO (g/dL)	6.20±0.14	6.14±0.09	6.22±0.16	6.48±0.04	6.28±0.26	6.28±0.11	6.40±0.19
	TG (mg/dL)	80.50±27.43	54.80±14.69	65.00±13.80	103.50±8.85	68.20±9.23	78.60±15.29	109.80±15.07
	BUN (mg/dL)	15.00±2.59	14.60±1.98	17.46±3.20	19.38±2.01	18.70±1.99	18.66±1.34	21.38±1.65
Female	ALB (g/dL)	1.48±0.22	1.14±0.25	1.18±0.36	1.26±0.64	2.50±0.16	2.32±0.22	2.43±0.25
	ALP (U/L)	232.40±36.53	272.00±73.02	223.20±47.89	275.25±31.55	255.00±34.73	245.40±30.99	208.00±21.91
	CRE (mg/dL)	0.58±0.04	0.56±0.05	0.52±0.04	0.52±0.08	0.56±0.11	0.64±0.11	0.54±0.09
	GLU (mg/dL)	95.20±15.71	91.80±8.41	92.80±15.32	98.40±11.93	100.40±22.41	95.80±9.47	103.60±13.07
	AST (U/L)	190.80±38.82	188.40±32.69	202.80±38.83	201.60±27.49	169.00±41.73	175.80±22.58	156.40±19.74
	ALT (U/L)	29.20±5.72	35.00±5.15	34.40±2.88	31.80±4.97	36.40±2.30	33.80±4.60	29.60±6.43
	T-CHO (mg/dL)	102.20±14.04	104.40±28.27	95.60±12.05	97.60±15.73	111.00±22.57	96.60±18.23	108.00±8.28
	T-PRO (g/dL)	5.86±0.15	6.10±0.23	6.14±0.21	6.14±0.11	6.02±0.26	5.96±0.18	6.04±0.27
	TG (mg/dL)	26.25±6.80	21.40±8.65	19.00±3.24	24.00±6.04	23.25±7.80	23.20±5.63	25.25±5.74
	BUN (mg/dL)	16.46±0.81	15.28±1.55	15.70±3.05	15.84±2.30	15.26±2.30	15.44±2.56	16.96±6.67

[1)]Control: treated with aseptic water.
[2)]*Acanthopanax senticosus* fermentation product with *Ganoderma lucidum*
[3)]*Acanthopanax senticosus* fermentation product with *Phellinus linteus*

투여한 4주 후에, 실험동물의 장기 무게를 측정하였다. 시험군의 간, 폐, 비장, 신장, 심장, 부신, 흉선, 뇌, 생식기(난소 또는 고환)의 무게와 대조군의 장기 무게 사이에 통계적으로 유의적인 변화가 없었다. 이 결과는 수컷 SD-rats와 암컷 SD-rats (Table 5)에서 유사하게 나타났다. 일반적으로 독성이 있는 물질을 섭취하게 되면 가장 먼저 간에서의 해독작용으로 인하여 장기 중 간이 가장 큰 영향을 받을 수 있는 데(24), 간의 무게를 살펴보면 각 군 간의 유의적인 차이가 나타나지 않았다. 이러한 결과는 FM-5111, FM-5131 등이 본 연구에서 사용된 농도범위에서 장기에 손상을 유발하지 않음을 알 수 있다.

혈액학적 검사

반복 투여 독성 시험에서, 28일간 시험물질(FM-5111, FM-5131)을 투여한 후, 실험동물을 ether로 마취하고 복부대동맥으로부터 채혈하여 총 백혈구수(WBC), 중성호성 백혈구(NEUT), 림프구(LYMP), 단핵구(MONO), 산호성백혈구(EOS), 염기호성백혈구(BASO), 총 적혈구수(RBC), 혈색소량(HGB), 헤마토크리트치(HCT), 평균적혈구용적(MCV), 평균헤모글로빈양(MCH), 평균적혈구헤모글로빈농도(MCHC), 혈소판수(PLT) 등 혈액학적 지표를 혈구자동측정기로 측정하였다. 혈액학적 지표들은 FM-5111, FM-5131을 투여한 시험군에서 대조군과의 통계적으로 유의한 차이를 보이지 않았다. 이 결과는 수컷 SD-rats와 암컷 SD-rats (Table 6)에서 유사하게 나타났다. An 등(25)은 백두옹에 대한 4주간 반복독성 시험을 수행한 결과, 고용량 투여군의 경우 호중구, 림프구 및 단핵구의 유의적으로 증가하여 면역 활성의 증진을 보고하였는데, 본 연구에서는 FM-5111을 투여한 수컷 SD-rats (0.5, 1.0 g/kg)에서와 FM-5131을 투여한 수컷 SD-rats (0.25, 0.5, 1.0 g/kg)에서 백혈구 등의 수치가 대조군에 비해 증가하였으나 유의적인 차이가 없었다. 이러한 결과는 FM-5111, FM-5131 등이 혈액세포들의 조혈작용에 유해한 작용을 하지 않는 것을 제시한다.

혈액생화학적 검사

혈액생화학적 지표들은 대조군과 시험군 사이에서 유의적인 변화가 나타나지 않았다. 이 결과는 수컷 SD-rats와 암컷 SD-rats (Table 7)에서 유사하게 나타났으며, 이는 FM-5111, FM-5131 등이 독성이 없음을 시사하고 있으며, 특히, 간 기능지표 효소로 알려진 아스파테이트 아미노기전이효소(AST), 알라닌 아미노기전이효소(ALT) 활성은 간세포의 독성 시에 간세포에 장애가 발생하여 간세포가 파괴되어 혈액으로 이들 효소의 방출이 항진되어 활성이 증가한다(26). 또한, 신장 손상에 의해 크레아티닌(CRE), 혈액요소질소(BUN) 등은 혈액으로 유리된다. 이러한 지표들의 수치에 변화가 없는 것은 FM-5111, FM-5131 등이 간, 신장 등에 손상을 유발하지 않음을 알 수 있다.

요 약

본 연구에서는 사용된 가시오가피 영지버섯 발효물과 가시오가피 상황버섯 발효물에 대한 열수추출물을 최고 2 g/kg의 농도로 단회 투여한 SD-rats에 체중 변화, 임상증상 등에서 어떠한 독성도 관찰할 수 없었으며, 1 g/kg 이하의 농도로 4주간 반복 투여한 SD-rats에서도 체중변화, 임상증상, 장기 무게, 혈액학적 성상, 혈액생화학적 성상 등에서 어떠한 독성과 비정상적인 소견을

관찰할 수 없었다. 따라서, 본 연구의 결과로 볼 때 가시오가피 영지버섯 발효물 열수추출물(FM-5111)과 가시오가피 상황버섯 발효물 열수추출물(FM-5131)은 본 연구에서 사용한 농도 내에서의 안전성을 확인할 수 있었다.

황 함유 아미노산의 결핍은 여러 가지 간질환 등의 증상을 야기한다(27). 또한, Choi와 Ahn(28)은 오가피 부위별 50% (v/v) 메탄올 추출액의 전자공여능은 줄기 추출물에서 90.21%, 뿌리 추출물에서 85.71%로 높은 활성을 보고하여 오가피의 항산화능을 규명하였다. 따라서, 본 연구에 사용된 시료 또한 항산화능과 같은 기능성을 가질것으로 사료되며, 추가 연구로 아미노산 분석을 통해 황 함유 아미노산의 함량 변화를 분석하고 간 기능 개선 효능을 평가하여 안전성이 확보된 기능성 식품소재 개발 연구를 진행할 계획이다.

감사의 글

본 논문은 농림수산식품기술기획평가원 고부가가치식품 기술개발사업(과제번호: 110128)의 지원에 의해 이루어진 것임.

References

1. Hahn DR, Kim CJ, Kim JH. A study on the chemical constituents of *Acanthopanax koreanum* Nakai and its pharmaco-biological activities. Yakhak hoeji 29: 357-361 (1985)
2. Park HK, Park MS, Kim TS, Choi IL, Jang YS, Kim GS. Cutting propagation of *Eleutherococcus senticosus* MAXIM. Korean J. Medicinal Crop Sci. 2: 133-139 (1994)
3. Soya H, Deocaris CC, Yamaguchi K, Ohiwa N, Saito T, Nishijima T, Kato M, Tateoka M, Matsui T, Okamoto M, Fujikawa T. Extract from *Acanthopanax senticosus* harms (Siberian ginseng) activates NTS and SON/PVN in the rat brain. Biosci. Biotech. Bioch. 72: 2476-2480 (2008)
4. Yook CS, Rho YS, Seo SH, Leem JY, Han DR. Chemical components of *Acanthopanax divaricatus* and anticancer effect in leaves. Yakhak hoeji 40: 251-261 (1996)
5. Jin LH, Han SS, Choi YS. Antioxidant effects of the extracts of *Acanthopanax senticosus*. Korean J. Phamarcogn. 33: 359-363 (2002)
6. Choi SM, Park JB, Kim JM, In KM, Park HY. *Acanthopanax senticosus* extract acts as an important regulator for vascular functions. J. Life Sci. 18: 701-707 (2008)
7. Hong SP, Row KH. Separation of acanthoside-D in *Acanthopanax senticosus* by preparative recycle chromatograpy. Hwahak Konghak 40: 488-491 (2002)
8. Song MS, Lee YW, Kim JD, Row KH. Extraction of acanthoside-D in *Acanthopanax senticosus* by supercitical fluid. Hwahak Konghak 41: 207-212 (2003)
9. Bae JS, Jang GH, Lee MH, Jeong GS, Jo US, Choe SG, Kim YH, Park SC. Comparison on the morphology, general composition, elemental composition and mineral contents of *Phellinus linteus*, *Phellinus baumii* and *Phellinus gilvus*. Korean J. Vet. Res. 43: 423-428 (2003)
10. Kim HM, Han SB, Oh GT, Kim YH, Hong DH, Hong ND, Yoo ID. Stimulation of humoral and cell mediated immunity by polysaccharide from mushroom *Phellinus linteus*. Int. J. Immunopharmaco. 18: 295-303 (1996)
11. Hikino H, Konno C, Mirin Y, Hayashi T. Isolation and hypoglycemic activity of ganoderans A and B, glycans of *Ganoderma lucidum* fruit bodies. Planta Med. 51: 339-340 (1985)
12. Lim JH, Lee SH, Jun BS, Yang YT, Koh JS. Changes in major constituents by soaking of *Acanthopanax koreanum* with spirit solution. J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem. 48: 166-172 (2005)
13. Sung CK, Kim YM. Studies on the production of eleutherosides by plant tissue culture of *Acanthopanax* Spp. Korean J. Pharmacogn. 26: 101-102 (1995)
14. Oh SI, Lee MS. Antioxidative and antimutagenic effects of *Ganoderma lucidum* krast extracts. Korean J. Food Nutr. 18: 54-62 (2005)
15. Seo KW, Cho IS, Oh MH, Lee KM, Kim HJ. Subacute toxicity of G009, a polysaccharide isolated from *Ganoderma lucidum* IY009. J. Fd. Hyg. Safety 11: 261-271 (1996)
16. Bae HS, Kang SK, Shin IS, Woo SK, Kim YJ, Kim MA, Ra JC. The effects of extracts mixture drink from *Inonotus obliquus*, *Phellinus linteus* and *Ganoderma lucidum* on hematopoietic stem cells and lymphocyte subset of blood in human. J. Fd. Hyg. Safety 24: 78-85 (2009)
17. Choi MA, Park NY, Woo SM, Jeong YJ, Shin SR. Characteristics of *Hericium erinaceus* and its extracts. Korean J. Food Preserv. 10: 560-564 (2003)
18. Kim YH, Lee YJ, Park SO, Lee SJ, Lee OH. Antioxidant compounds and antioxidant activities of fermented black rice and its fractions. Korean J. Food Sci. Technol. 45: 262-266 (2013)
19. Jung KW. Studies on the pharmacological activity of root bark of *Acanthopanax chiisanensis* Nakai. Bull. K. H. Pharma. Sci. 9: 21-29 (1981)
20. Heinemann T, Axtmann G, von Bergmann K. Comparison of intestinal absorption of cholesterol with different plant sterols in man. Eur. J. Clin. Invest. 23: 827-831 (1993)
21. Hirata F, Fujita K, Ishikura Y, Hosoda K, Ishikawa T, Nakamura H. Hypocholesterolemic effect of sesame lignan in humans. Atherosclerosis 122: 135-136 (1996)
22. Szolomecki S, Samochowiec L, Wojcicki J, Drozdzik M. The influence of active components of *Eleutherococcus senticosus* on cellular defence and physical fitness in man. Phytother. Res. 14: 30-35 (2000)
23. Han YS. A Study on the effects of antiinflammatory plant extracts on melanogenesis. PhD thesis, Ajou University, Suwon, Korea (2002)
24. Lee SG, Han KS, Jeong SG, Oh MH, Jang AR, Kim DH, Bae IH, Ham JS. A study on the sensory characteristic of yogurt and antimicrobial activity of *Lactobacillus plantarum* LHC52 isolated form kimchi. Korean J. Food Sci. Ani. Resour. 30: 328-335 (2010)
25. An IJ, Kwon JK, Lee JS, Lee SH, Park YS, Park BK, Kim SK, Kim BS, Cho SD, Choi CS, Lee BH, Kang BK, Jung JY. Evaluate a repeated oral dose toxicity and immunomodulating activity of *Pulsatilla koreana* and *Artemisiae annuae* in sprague-dawely rats. J. Fd. Hyg. Safety 27: 96-102 (2012)
26. Plaa GL, Charbonneau M. Detection and evaluation of chemically induced liver injury. pp. 839-870. In: Principles and Methods of Toxicology. Hayes AW (ed). Raven Press, New York, NY, USA (1994)
27. Ko KS. Hepatoprotective functions of sulfur containing amino acids: Possibilities of hepatocellular carcinoma prevention. Korean J. Food Sci. Technol. 44: 653-657 (2012)
28. Choi JM, Ahn JB. Functional properties of 50% methanol extracts from different parts of *Acanthopanax sessiliflorus*. Korean J. Food Sci. Technol. 44: 373-377 (2012)