

발 간 등 록 번 호

11-1541000-001511-01

혈압조절 및 뇌기능개선용 가바강화 천마발효식품개발에  
관한 연구

(Development of health food for improved blood pressure and  
brain function containing fermented *Gastrodia elata* Bl.  
products containing high levels of GABA)

(주) 비피도

농 립 수 산 식 품 부

## 제 출 문

농림수산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “혈압조절 및 뇌기능개선용 가바강화 천마발효식품개발에 관한 연구” 과제의 보고서로 제출합니다.

2012년 6월 일

주관연구기관명 : (주)비피도

주관연구책임자 : 지 근 역

세부연구책임자 : 지 근 역

연 구 원 : 박 명 수

연 구 원 : 김 자 영

연 구 원 : 신 지 영

연 구 원 : 이 상 준

연 구 원 : 박 유 진

협동연구기관명 : 서울벤처정보대학원대학교

협동연구책임자 : 강 순 아

# 요 약 문

## I. 제 목

혈압조절 및 뇌기능개선용 가바강화 천마발효식품개발에 관한 연구

## II. 연구개발의 목적 및 필요성

가바 (GABA) 생산능과 gastrodin 전환능이 우수한 선발 유산균을 이용하여 천마를 발효하여 천마의 gastrodin을 4-hydroxy benzyl alcohol로 전환시키고 가바 생산량을 최적화한 발효 천마 제품을 개발함. 개발 제품의 혈압조절 및 뇌기능 개선 효과 규명. 본 연구는 천마 재배 농가 소득 증진, 개발 업체의 발전, 국민 건강 증진에 기여할 것임.

## III. 연구개발 내용 및 범위

1. 생리활성 물질 GABA 생산 유산균 개발 - 95% 이상의 전환률을 보이는 균주 확보 (정량적 분석)
2. GABA 생산균주의 배지 및 배양 환경 개발로 생체량 및 전환률 증대 - 생체량 증대를 위한 배지조건 최적화와 GABA 전환률 증대를 위한 배양환경 최적화
3. 천마의 성분 분석을 통한 우수소재 선별 - HPLC 분석을 이용해 가스트로딘 전환 및 가바 등 생리활성 물질 함유량이 우수한 천마를 선별
4. 발효천마의 4-hydroxy benzyl alcohol 및 GABA 생산 최적화 - HPLC를 이용한 GABA 함유량 분석 및 발효천마의 생리활성 물질 gastrodin의 전환패턴 분석 및 발효 조건 최적화
5. GABA 함유 발효천마의 생리활성 평가 - 발효 천마의 혈압조절 및 뇌기능 활성화기능을 평가하고자 급성독성모델과 아급성 독성모델을 통하여 발효천마를 평가하고 항산화평가.
6. 고혈압모델 쥐(SHR) 에서의 혈압유도 확인 후 혈압 조절능력 평가 및 middle cerebral artery occlusion/reperfusion (MCAO/R) operation 모델을 통한 뇌기능 활성화효과 평가
7. 제품화를 위한 GABA 함유 발효천마의 소재 개발 및 가공 공정 확립 - GABA 함유 발효 천마의 소재 개발과 다양한 식품 개발, 품질 평가 및 GMP 가공 공정 개발

#### IV. 연구개발결과

1. GABA생산 우수균주 *L. brevis* GABA100 균주로 천마를 발효하여 GABA 생산성 95% 이상 및 gastrodin 전환 95% 이상 수율 달성.
2. 스케일업 생산 규모를 목표치인 200 L 발효기에서 공정 변수 최적화 하였으면 시제품 생산.
3. HPLC, TLC 등으로 GABA, gastrodin, 및 gastrodin 전환체 분석을 하였고 시제품 생산을 하여 발효 천마에 대한 GABA 함량의 규격화를 완료하였고 소재 조합 및 관능성 증진.
4. 천마 (GE) 및 발효천마(FGE) 시료는 경구투여 시 마우스에서 급성독성을 나타내지 않았고, SD계 흰쥐에 대한 14 일간 반복 경구 투여 시 무관찰 부작용량은 1,000 mg/kg 이상인 것으로 확인.
5. DPPH 라디칼 소거능, ABTS 양이온 라디칼 소거능 및 총 페놀함량 측정결과를 통해 발효천마가 천마보다 유의적으로 높은 전자공여능, 라디칼 소거능 및 페놀성 성분 함량을 나타내었음.
6. 고혈압모델 쥐(SHR) 에서의 혈압유도 확인 후 500, 1000, 2000 mg/kg 모든 투여량에서 고혈압에 대한 관련 인자들을 정체 또는 감소 경향에 의하여 발효천마의 혈압 조절능력이 나타났음.
7. 중대뇌동맥폐색/재관류 (Middle cerebral artery occlusion/reperfusion (MCAO/R)) operation 모델을 통한 뇌기능 활성화효과 평가에서 경색에 의한 부위를 감소시키며 사이토카인의 함량을 감소시키는 뇌기능 개선효과를 확인하였음.

#### V. 연구성과 및 성과활용 계획

- 가바 생산능과 gastrodin 전환능이 우수한 선발 유산균을 이용하여 천마를 발효하여 가바 생산량을 최적화한 발효 천마 제품을 개발함. 개발 제품의 혈압조절 및 뇌기능 개선 효과 규명.
- 본 연구는 천마 재배 농가 소득 증진, 개발 업체의 발전, 국민 건강 증진에 기여할 것임.
- 현대인의 생활습관에 따른 대사 관련 뇌기능과 혈압 조절 기능을 갖는 새로운 건강기능성 식품 소재의 개발로 국민 보건향상에 기여하며 천마의 새로운 부가가치를 창출함.
- 유산균 이용 발효천마를 이용한 생리활성 물질 생산
- 발효천마의 건강기능식품 소재 개발
- 국산 천마의 식품소재 활용 증대 및 수출로 농가 소득 증대
- 발효천마식품의 건강기능성을 위한 기술력 확보

## SUMMARY

### (영문요약문)

*Gastrodia elata* Bl.(GE) is a traditional herbal medicine used for the treatment cerebrovascular disease and also exerts beneficial functions in the regulation of blood pressure.  $\gamma$ -Aminobutyric acid (GABA) is known to be beneficial for the prevention of neurological disorder and hypertension. The objective of this study was the development of fermented *Gastrodia elata* Bl. products containing high levels of GABA and evaluation of the GABA containing fermented *Gastrodia elata* on the antioxidant, anti-inflammatory, anti-hypertensive effects and improvement of brain function. The optimized medium conditions for the fermentation were: initial pH 6.5, monosodium glutamate 3%, freeze dried powder of GE 10%, yeast extract 0.5%. The production of GABA was further enhanced by the co-culture of *L. brevis* GABA 100 with *Bifidobacterium bifidum* BGN4. During the fermentation high amounts of organic acids as well as GABA were produced. Fermented GE product containing GABA was successfully produced and scaled-up to 200 L scale by the optimization of the fermentation conditions. The *Gastrodia elata* Blume fermented by *Lactobacillus brevis* GABA 100 showed a remarkable scavenging activity on the DPPH radical and inhibition of NO production in the macrophage cells treated with lipopolysaccharide. Systolic and diastolic blood pressure level was increased in SHR rat compared to WKY group during 8 weeks experimental period. Cardiac beats per minute was decreased in SHR rat. During 8 weeks experimental period, systolic and diastolic blood pressure level was decreased by fermented *Gastrodia elata* Blume in SHR rat ( $p < 0.01$ ). There was no difference in systolic blood pressure and diastolic blood pressure of WKY rats until 8 weeks of age, but cardiac beats per minute (BPM) of WKY rats fed fermented *Gastrodia elata* Blume for 8 weeks was significantly lower than that of control. There was no difference in hematological parameters of WKY rats until 8 weeks of age, except LHDH, Creatinine, LDL-cholesterol. The results provide an alternative protective mechanism of fermented *Gastrodia elata* Blume and provide information on the potential use for anti-hypertensive use. In the brain function assay, rats were assigned to sham, MCAO/R-control, MCAO/R-FG 500, 1000, 2000 mg/kg. Post-lesional behavioral tests were performed for 4 weeks after confirmation of lesion by magnetic resonance imaging (MRI), followed by histological examination. Infarct volume was decreased in MCAO/R-FG 500, 1000, 2000 rat compared to MCAO/R-control group during 8 weeks experimental period by image analysis system. Cytokine (IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6) was decreased in MCAO/R-FG 500, 1000, 2000 rat compared to MCAO/R-control group. Brain weight showed no difference between control and experimental group. Behavioral function assessment by Rota-rod test showed significant difference between MCAO/R and MCAO/R-FG 500, 1000, 2000 group ( $p < 0.01$ ). Fermented *Gastrodia elata* Blume showed improvements in the recovery of motor dysfunction after over time and the brain function.

CONTENTS  
(영 문 목 차)

Chapter 1. Research outline ..... **1**

Chapter 2. Current research activities in domestic and global environments .... **2**

Chapter 3. Contents and results of the research and developments ..... **8**

Chapter 4. Achievements and contributions of the R&D results ..... **83**

Chapter 5. Potential applications of the R&D results ..... **84**

## 목 차

제 1 장 연구개발과제의 개요 .....	1
제 2 장 국내외 기술개발 현황 .....	2
제 3 장 연구개발 수행 내용 및 결과 .....	8
제 1 절 우수 GABA 생산 균주의 선발 .....	9
제 2 절 GABA 생산균주의 배양조건 최적화 .....	10
제 3 절 GABA 생산균주에 의한 천마의 발효 .....	18
제 4 절 발효 천마의 안전성 및 생리활성 연구 .....	38
제 4 장 목표 달성도 및 관련분야에의 기여도 .....	83
제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획 .....	84

# 제 1 장 연구 개발 과제의 개요

가바 (GABA) 생산능과 gastrodin 전환능이 우수한 선발 유산균을 이용하여 천마를 발효하여 천마의 gastrodin을 4-hydroxy benzyl alcohol로 전환시키고 가바 생산량을 최적화한 발효 천마 제품을 개발함. 개발 제품의 혈압조절 및 뇌기능 개선 효과 규명.

1. 생리활성 물질 GABA 생산 유산균 개발 - 95% 이상의 전환률을 보이는 균주 확보 (정량적 분석)
2. GABA 생산균주의 배지 및 배양 환경 개발로 생체량 및 전환률 증대 - 생체량 증대를 위한 배지조건 최적화와 GABA 전환률 증대를 위한 배양환경 최적화
3. 천마의 성분 분석을 통한 우수소재 선별 - HPLC 분석을 이용해 가스트로딘 전환 및 가바 등 생리활성 물질 함유량이 우수한 천마를 선별
4. 발효천마의 4-hydroxy benzyl alcohol 및 GABA 생산 최적화 - HPLC를 이용한 GABA 함유량 분석 및 발효천마의 생리활성 물질 gastrodin의 전환패턴 분석 및 발효 조건 최적화
5. GABA 함유 발효천마의 생리활성 평가 - 발효 천마의 혈압조절 및 뇌기능 활성화기능을 평가하고자 급성독성모델과 아급성 독성모델을 통하여 발효천마를 평가하고 항산화 평가.
6. 고혈압모델 쥐(SHR) 에서의 혈압유도 확인 후 혈압 조절능력 평가 및 middle cerebral artery occlusion/reperfusion (MCAO/R) operation 모델을 통한 뇌기능 활성화효과 평가
7. 제품화를 위한 GABA 함유 발효천마의 소재 개발 및 가공 공정 확립 - GABA 함유 발효 천마의 소재 개발과 다양한 식품 개발, 품질 평가 및 GMP 가공 공정 개발

## 제 2 장 국내외 기술개발 현황

농산물 가격의 인상 요인 등이 있었으나 현재는 다시 가격의 안정화가 진행되고 있음. 연구 및 개발 환경의 변화는 없음. 연구 개발의 필요성은 다음과 같음.

- ◆ 최근 정부가 발표한 국민건강영양조사에 따르면, 30세이상 고혈압환자 유병률은 지난해 26.8%로 조사가 시작된 1998년 30.0%보다 감소했으나 고혈압환자 인지율은 1998년 24.6%에서 지난해 65.8%로 크게 상승했으며, 치료율도 21.9%(1998년)에서 58.7%(2008년), 조절율도 5.1%(1998년)에서 41.8%(2008년)로 대폭 늘어 이에 대한 치료부담이 급증하고 있으며 예방책의 필요성이 절실함.
- ◆ 이달초 건강보험심사평가원이 발표한 올 3분기 다빈도 상병 순위에서도 본태성(월발성) 고혈압은 외래진료 질환중 6위를 차지함. 3분기 고혈압환자가 지불한 전체 요양급여비용은 3779억원에 급여비 2653억원, 1인당 진료비 8만8248원임. 특히 올 3분기 65세 이상 노인층의 다빈도 상병 순위에서 본태성 고혈압은 입원 9위, 외래진료 1위를 기록했음.
- ◆ 고혈압환자 증가와 치료율·인지율이 증가하면서 고혈압치료제 시장규모도 꾸준히 증가하는 것으로 확인됨. 의약조사 전문기관인 IMS헬스데이터와 관련 업계에 따르면 지난 2002년 5208억원이던 고혈압치료제 시장은 2004년 7000억원에서 지난해 기준 1조2631억원으로 대폭 상승했음.
- ◆ 2009년 농림수산식품부에서 발표된 <농업통계>에 따르면, 2008년 천마의 생산액은 552 억원으로 전체 약용작물시장의 약 9%를 차지함. 천마는 강원도 농가의 소득 작물이나 현재 단순 가공 등의 형태 위주로 판매되고 있어 생산량 과잉 상태임. 발효천마식품의 개발은 국산 천마의 사용을 증대시키고, 대부분 한약재의 재료로만 사용되어지고 있는 천마의 적용범위를 확대 시킬 수 있으며, 또한 발효천마의 뚜렷한 기능성 효과로 인해 혈압 조절 및 뇌기능 개선 기능성 식품 소재로의 활용범위를 확대하고 농민 소득 증대에 기여할 것임.

제품	매출실적(원)	점유율(%)
고혈압치료제(회사명)	1,263,133,503,432	100.00
노바스크(화이자)	64,029,555,400	5.07
디오반(노바티스)	53,341,957,398	4.22
달라트렌(종근당)	52,295,689,004	4.14
아모디핀(한미약품)	42,221,264,400	3.34
올메텍(대웅제약)	38,509,172,524	3.05
아달라트오로스(바이엘)	38,157,323,889	3.02
아프로벨(사노피아벤티스)	37,593,408,782	2.98
엑스포지(노바티스)	37,538,918,052	2.97
올메텍 플러스(대웅)	36,504,380,773	2.89
아타칸(아스트라제네카)	33,136,354,185	2.62
코디오반(노바티스)	32,684,455,595	2.59
코자(한국MSD)	31,881,956,865	2.52
코아프로벨(사노피아벤티스)	28,401,058,724	2.25
아타칸플러스(아스트라제네카)	27,517,045,140	2.18
코자플러스(한국MSD)	26,258,412,396	2.08
프리토플러스(GSK)	23,584,578,364	1.87
미카르디스플러스(베링거인겔하임)	23,326,818,071	1.85
자니딕(LG생명과학)	23,132,732,961	1.83
기타	569,362,654,923	45.08
2008년 10월 1일~2009년 9월 30일 기준(출처 IMS 헬스데이터)		

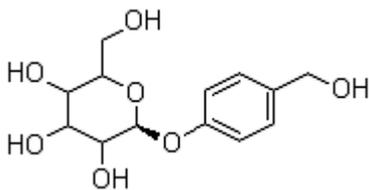
제품명	매출실적(원)	점유율(%)
ARB계열(회사명)	623,360,956,151	100.00
디오반(노바티스)	53,341,957,398	8.56
올메텍(대웅)	38,509,172,524	6.18
아프로벨(사노피)	37,593,408,782	6.03
엑스포지(노바티스)	37,538,918,052	6.02
올메텍플러스(대웅)	36,504,380,773	5.86
아타칸(아스트라)	33,136,354,185	5.32
코디오반(노바티스)	32,684,455,595	5.24
코자(MSD)	31,881,956,865	5.11
코아프로벨(사노피)	28,401,058,724	4.56
아타칸플러스(아스트라)	27,517,045,140	4.41
기타	90,316,800,422	14.51
CCB계열(회사명)	394,531,510,370	100.00
노바스크(화이자)	64,029,555,400	16.23
아모디핀(한미약품)	42,221,264,400	10.70
아달라트오로스(바이엘)	38,157,323,889	9.67
자니딕(LG)	23,132,732,961	5.86
오로디핀(동아제약)	21,505,761,315	5.45
박사르(GSK)	16,386,410,069	4.15
헤르벤(CJ)	14,788,161,814	3.75
시나롱(보령제약)	14,197,145,992	3.60
레보텐션(안국약품)	9,565,655,918	2.42
무노발(한독약품)	8,518,539,403	2.16
기타	83,054,543,988	21.08

출처 IMS 헬스데이터

품목	농림업 생산액 (단위: 10억원)					
	2003	2004	2005	2006	2007	2008
약용작물	423.1	405.1	523.7	563.5	821.9	616.1
강황	3.2	2.7	3.7	-	-	-
구기자	11.2	12.8	15.3	14.2	16.2	19.5
길경	127.9	15.8	34.2	45.1	42.7	48.6
당귀	14.5	24.6	20.1	30.1	26.4	19.4
두충	6.2	11.4	5.8	5.0	2.6	2.2
맥문동	5.0	2.5	4.2	-	-	-
방풍	2.3	1.7	2.9	-	-	-
사삼	93.0	79.8	52.3	53.7	61.1	86.8
산약	50.3	119.2	232.9	155.9	375.4	179.2
시호	1.1	1.4	2.0	-	-	-
의이인	3.2	6.7	3.6	12.1	12.6	17.6
오미자	22.4	47.0	66.5	102.8	109.5	103
작약	7.9	7.5	7.0	13.8	13.8	9.4
지황	4.1	4.8	7.8	8.0	3.6	13.6
전공	36.1	25.2	24.3	24.5	24.6	44.1
택사	1.1	3.8	3.6	-	-	-
하수오	3.6	5.8	5.8	6.4	4.7	4.5
향부자	1.9	3.0	3.0	-	-	-
황기	23.8	27.3	26.5	27.7	21.3	13
황금	4.4	2.0	2.2	-	-	-
천마	-	-	-	64.0	107.6	55.2
출처: 농림통계(2009), 농림수산식품부						

품목	가중치	농림업 생산지수 2005년(2004~2006평균)=100					
		2003	2004	2005	2006	2007	2008
약용작물	14.4	96.2	87.7	111.3	101.0	135.7	100.7
강황	-	-	-	-	-	-	-
구기자	0.4	96.4	86.6	111.3	101.9	100.4	111.7
길경	0.9	108.3	88.4	92.6	119.0	119.4	128.1
당귀	0.7	116.9	123.3	82.6	94.1	103.4	90.3
두충	0.2	117.6	76.7	118.5	104.8	60.5	51.3
맥문동	-	-	-	-	-	-	-
방풍	-	-	-	-	-	-	-
사삼	1.7	108.5	108.4	84.8	106.9	94.5	98.8
산약	4.8	90.5	79.0	141.9	79.1	168.8	87.9
시호	-	-	-	-	-	-	-
의이인	0.2	73.6	98.6	69.5	132.0	131.9	298.4
오미자	2.0	27.7	62.0	94.4	143.7	151.3	130.2
작약	0.3	89.8	93.0	84.0	122.9	143.5	99.1
지황	0.2	104.4	100.7	105.4	93.7	41	135.9
전공	0.7	109.9	114.5	99.4	86.1	59.2	72.3
택사	-	-	-	-	-	-	-
하수오	0.2	153.1	113.4	94.0	92.9	107.4	82.9
향부자	-	-	-	-	-	-	-
황기	0.8	128.7	109.6	92.7	97.6	101	58.3
황금	-	-	-	-	-	-	-
천마	1.4	0.0	79.4	120.9	99.7	172.8	101.3
출처: 농림통계(2009), 농림수산식품부							

- ◆ 천마의 주 성분인 가스트로딘(Gastrodin, p-hydroxymethyl phenyl-β-D-glucopyranoside)은 뇌의 가바 (GABA, γ-Amino-n-butyric acid)의 분해를 억제하여 뇌기능 개선 및 혈압 조절에 도움을 줌. 가스트로딘은 배당체로서 비배당체형인 4-hydroxybenzyl alcohol로 전환되면 활성이 증가됨. 본 연구 책임자는 선행연구에서 가스트로딘 배당체 분해 능력 및 가바 생산성이 모두 우수한 유산균 *L. brevis* GABA 100 균주를 개발하였음. 본 연구에서는 혈압조절 및 뇌기능 개선용 가바 강화 천마발효식품을 개발하여 농민 소득 증대 기여 및 기업 발전에 활용하고자 함.
- ◆ 천마(天麻, *Gastrodiae rhizoma*)는 뿌리나뭇과 편리 공생하는 난초과(Orchidaceae) 식물에 속하는 식물 천마(*Gastrodiae elara* BLUME)의 구근임. 천마는 흥분억제효과, 항경련 작용, 정신집중력과 기억력 강화, 혈압강화 등의 체내기능을 가진다고 알려져 있음. 천마의 주요 생리 활성 성분은 가스트로딘으로 알려져 있음. 외에 천마추출물이 전뇌허혈(global <3> ischemia), 흥분독성(excitotoxicity)에 대한 신경보호 활성(neuroprotective activity)을 나타낸다는 연구가 있으며, 이 밖에도 천마의 생리활성물질인 4-하이드록시벤질 알코올, 4-하이드록시벤질 알데하이드, 바닐린이 전뇌허혈에 따른 해마 CA1 세포 사멸(hippocampal CA1 cell death)을 억제하고 GABA성 신경조절(GABAergic neuromodulation)을 도와주는 것이 연구되었음. 강영희 등의 연구에서 천마의 심장 및 관상동맥의 국소적 순환기능에 대한 약리적 작용을 규명하기 위해 천마의 수용성, 에탄올 추출물을 SD, SHR rat에 투여한 결과 수용성 추출물이 혈관확장작용 또는 혈압 강하작용을 나타낸다는 결과를 나타냈음(김은지 외, 1994).
- ◆ 천마의 혈압조절기능은 혈관을 수축하는 안지오텐신전환효소를 억제해주고 브라다키닌 성분이 혈압을 조절할 수 있다고 알려져 있으나 동물모델을 이용한 실험의 연구가 보충되어야 함. 건조 천마의 일반 성분은 탄수화물이 72.9%(w/w), 수분 11.8%, 단백질 7.6%, 회분 3.2%, 지방 0.5%, 섬유 3.9% 임.
- ◆ 동물 실험에서 천마의 주된 성분인 가스트로딘이 해마의 GABA 대사 효소 면역반응을 감소시켜 GABA의 농도를 상승시킨다는 연구가 보고되었고(An SJ et al, 2003), 천마에서 추출한 배당체가 GABA transaminase를 억제함으로써 GABA의 수준을 높일 수 있다는 연구 결과가 보고되었음.(Choi JH et al, 2006)



gastrodin

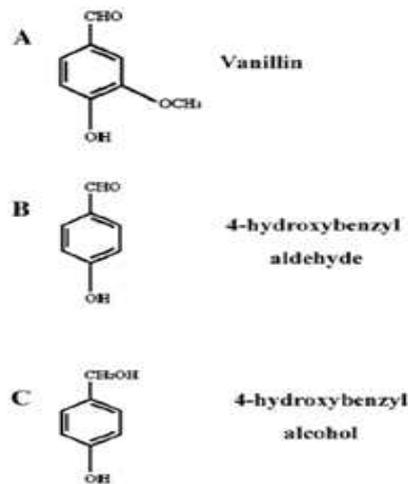
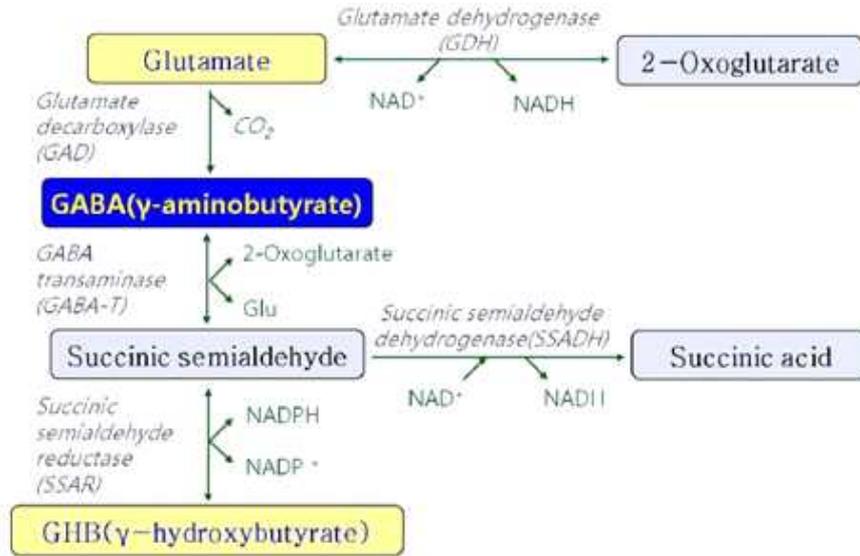


Fig. 1 - The chemical structure of vanillin (A), 4-hydroxybenzyl aldehyde (B), and 4-hydroxybenzyl alcohol (C).

천마 유용성분의 화학구조

- ◆ 본 연구진이 개발한 유산균은 가스트로딘을 4-hydroxybenzyl alcohol로 생물 전환이 가능하며 4-hydroxybenzyl alcohol은 가스트로딘에 비하여 뇌 신경 조절 효과가 더욱 높은 것으로 알려져 있음.
- ◆ 단백질을 구성할 수 있는  $\alpha$ -amino acid와 달리 GABA는  $\gamma$ -amino acid 형태를 띠는 비단백질 아미노산의 일종으로 흥분 억제성 신경전달 물질임. GABA는 인체 내에서 뇌, 척수, 및 망막에 존재하는 억제성 신경전달물질로 의약품의 재료로 사용되고 있으며, 최근, 뇌세포의 산소공급량을 증가시켜 뇌경색과 동맥경화에 효과가 있다는 연구결과가 발표되면서 성인병 예방효과를 보이는 기능성 식품소재로서 새롭게 관심을 갖게 되어 그 수요가 크게 기대되는 물질임. GABA는 이미 일본에서 식품에 다양하게 사용되고 있으며 2009 년에 국내에서도 식품의약품안전청으로부터 혈압조절용 건강기능성 원료로서 인정받았음. 식물의 경우 발아현미를 비롯한 발아곡류, 녹차, 배추 뿌리 등에서 검출되고 동물의 경우 뇌·신장·심장·폐 등에서 발견됨.(오석홍, 2006) 가장 효과적인 GABA 생산은 *Lactobacillus brevis*, *L. hilgardii*, *Lactococcus lactis* 등의 유산균을 이용하는 방법임.
- ◆ GABA의 효능 및 신경 전달 조절 기능: 일반적으로 정상인에서 체내의 glutamate는 뇌에서 억제성 신경전달물질인 GABA를 생성하는데 사용됨. 포유동물의 중추신경계(CNS, central nervous system)에서 GABA의 비정상적인 농도는 직접 또는 간접적으로 많은 신경 이상 증세에 관여하는데, 예를 들면 간질병, 헌팅톤병, 파킨슨씨병, 정신분열증, 노인성치매, 지연성운동장애, 허혈 등과 같은 행동장애의 질병발생과정에 관여함(Woo TU, 1998). 간질(epilepsy)은 뇌조직의 기질적 병변 또는 기능적 장애로 인해 발작적으로 신경기능 장애를 일으켜 여러 가지 신경증상, 즉 돌발적인 의식상실, 경련, 정신 또는 감각 장애를 일으키는 질환으로 알려져 있음. 이러한 이상증세를 보이는 원인으로 억제성 신경전달물질인 GABA의 생성이상과 glutamate의 대사이상이 나타나는 것으로 알려져 있음.(Meldrum BS, 2007) 한편 GABA는 미토콘드리아 효소인 GABA transaminase(GABA-T)에 의하여 succinic semialdehyde로 변함으로써 신경전달물질로의 역할이 불활성되며, succinic semialdehyde는 NAD<sup>+</sup>-dependent succinic semialdehyde dehydrogenase(SSADH)에 의해 succinate로 산화됨으로써 GABA의 탄소원자는 TCA cycle로 들어감.(강태진, 오석홍, GABA의 생성과 이용, 생물학연구정보센터 BioWave, Vol.9)
- ◆ 최근 GABA를 섭취한 성인 그룹의 임상실험에서 GABA의 섭취가 면역 성장 호르몬인 immunoreactive GH (irGH)와 immunofunctional GH (ifGH)의 분비를 촉진시켜 근육 단백질의 합성을 촉진시키는 사실이 보고되어(Powers ME, 2008) 음료 및 스포츠식품 소재로 GABA의 활용이 부각되고 있음. 또한 고혈압 환자를 대상으로 12주간 GABA를 섭취하였을 때 수축기혈압이 유의적으로 감소한다는 연구 결과도 보고되었고,(FUKUWATARI YASUSHI, 2001) GABA 100 mg을 함유한 정제분을 섭취한 고지혈증 환자들의 혈중 중성지방 수치가 정상수준으로 떨어졌다는 연구결과가 보고되었음.(강태진, Ibid)
- ◆ 국내의 경우 2000년 천마가 식품의 주원료로 사용할 수 있는 품목으로 등재 되어 천마가공 기능성 식품의 개발이 가능해졌지만, 국내 천마 생산량의 대부분은 단순가공 제품이나 생약재로 이용되어 소비량은 한계가 있으며, 2000년도를 기점으로 천마의 생산량이 급격하게 증가하여 보다 다양한 형태의 천마 가공제품 개발 및 천마제품의 품질 고급화를 위한 연구가 필요함. 또한 천마 연구의 대부분은 단순 추출물만을 이용해 효과를 보거나 또는 뇌 관



### GABA shunt

런 질환에 국한된 효과를 보았으나, 본 연구에서는 발효를 통한 구체적인 성분변화 효과와 발효후에 생성된 GABA와의 상승작용도 기대할 수 있으며 또한 이를 고혈압과 관련된 효과를 검증하므로 천마 이용분야의 확대에 기여 할 수 있음.

- ◆ 본 연구에서는 한국의 여러 지역에서 재배한 천마의 생리활성 물질들을 분석하고, 이중 주요 활성물질인 가스트로딘의 함량이 가장 높은 천마를 선별하고, 선별된 천마를 다양한 조건에서 락토바실러스 브레비스 G100(*Lactobacillus brevis* G100)을 이용하여 발효하여 제품 개발 할 것임. 발효가 진행되는 동안 천마의 생리활성물질 중 생리활성이 가장 우수한 4-하이드록시벤질 알코올과 GABA의 생산량을 극대화하여 혈압 조절 및 뇌기능 개선에 시너지 효과를 창출 할 것임.
- ◆ 지금까지 혈압 강하, 신경 안정 작용을 갖는 GABA의 생산을 증대시키는 유산균을 분리한 보고서는 있으나 천마를 원료로 하여 유산균을 이용해 발효한 보고서나 GABA를 강화시킨 천마를 개발한 보고는 아직까지 없음. 더불어 천마를 채취한 그대로 이용하기에는 천마의 보존에 따른 불편, 부패, 독성과 자극성 등의 부작용이 있어 가공처리를 필요로 함. 천마를 건강기능식품 가공소재로서 효율적으로 이용하기 위해서는 가공 중 일어날 수 있는 유효성분의 파괴를 최소화해야 하는데, 이는 유산균을 이용해 GABA 생산량을 최적화 시키고 천마의 유용성분 함량을 증가시켜 천마의 기능성을 높일 수 있을 것임.
- ◆ 본 연구를 성공적으로 수행하면 인체적용연구를 수행하여 발효천마 원료의 개별 인정에 관한 연구를 수행할 것임.

### [참고문헌]

강태진, 오석홍, GABA의 생성과 이용, 생물학연구정보센터 BioWave, Vol.9  
 김은지, 지근역, 천마 Extracts가 백서의 국소적 관상순환기능에 미치는 영향, 한국식품과학 학회지, Vol. 26, No. 3, pp.213-220(1994)  
 오석홍, 김치 유산균을 이용한 가바 대량 생산 및 기능성 식품 개발, 월간식품산업, 2006, 24, 74-80.

- 임상동, 김기성, GABA의 효능과 이용, 한국유가공기술과학회지, Vol.27 No.1, pp.45-51(2009)
- 정현서, 지근역, 천마의 일반 성분과 기능성 조사, 한국식품과학회지, Vol. 28, No.1, pp.53-57(1996)
- 항경련물질인 가스트로딘의 함량을 높이는 천마의 가공 방법, 유한회사 엠제이허브, 특허등록100882325 (2009.01.30)
- GABA 고함유 기능성식품 소재의 이용연구(1997)
- An SJ et al. Gastrodin decreases immunoreactivities of gamma-aminobutyric acid shunt enzymes in the hippocampus of seizure-sensitive gerbils, *Journal of Neuroscience Research* 2003; 71:534-543.
- Choi JH, Lee DU, A new cirtyl glycoside from *Gastrodia elata* and its inhibitory activity on GABA transaminase, *Chem Pharm Bull(Tokyo)* 2006;54:1720-1724.
- FUKUWATARI YASUSHI, A study on the antihypertensive action and safety of tablets containing Gamma-aminobutyric acid(GABA), *Eastern Medicine*, 2001;17(3):1-7.
- HeSuchang et al., Protective effects of *gastrodia elata* on aluminium-chloride-induced learning impairments and alterations of amino acid neurotransmitter release in adult rats, *Restor Neurol Neurosci*. 2008;26(6):467-473.
- Meldrum BS, Rogawski MA., Molecular targets for antiepileptic drug development, *Neurotherapeutics*. 2007 Jan;4(1):18-61.
- Powers ME, Yarrow JF, McCoy SC, Borst SE, Growth hormone isoform responses to GABA ingestion at rest and after exercise, *Med Sci Sports Exerc*, 2008, Jan;40(1):104-10.
- Woo TU, Whitehead RE, Melchitzky Ds, Lewis DA, A subclass of prefrontal gamma-aminobutyric acid axon terminals are selectively altered in schizophrenia. *Proc. Natl, Acad. Sci, USA*, 1998, 95: 5341-5346

### 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

연구 범위	연구수행방법 (이론적·실험적 접근방법)	구체적인 내용
우수균주 확보	유산균 700 여 균주에 대하여 GABA 생산능을 분석하고 gastrodin에 대한 전환능을 분석하여 우수 균주 개발	GABA생산 및 gastrodin 전환 우수 유산균주 확보 · GABA생산 유산균의 배지조건 최적화와 배양환경 개발 · 천마의 전처리 및 발효조건 개발 (gastrodin 전환)
천마 발효 조건 최적화	천마 발효를 통한 GABA 생산 및 가스트로딘 전환 최적화. 200리터 스케일 업 목표를 달성하였고 시제품 생산.	HPLC 분석을 통해 유효성분 고함유 천마 선별 · 발효천마의 GABA 함유량 및 생리활성물질 성분 분석 · 발효천마의 배당체 전환패턴 분석 및 일반천마와의 비교분석
발효 천마 독성 검사	가바(GABA) 강화시킨 발효천마의 독성검사 규명	•발효천마의 독성검사 급성독성모델과 아급성 독성모델 -Dose에 따른 단회투여 후 효능 -Dose에 따른 장기투여 후 효능
발효 천마의 항산화, 혈압 조절 평가	가바(GABA) 강화시킨 발효천마의 항산화, 혈압조절능검사	•발효천마의 항산화효과 -DPPH, OH radical 등 항산화 지표 효과 규명 •발효천마의 고혈압모델에서 혈압관련 효과 검증 -혈압유도 확인 검증 -발효천마 투여후 혈압조절효과
발효천마 뇌기능활성화 평가	가바(GABA) 강화시킨 천마발효의 중대뇌동맥 폐색 및 재관류모델을 이용한 효능평가	•middle cerebral artery occlusion/reperfusion (MCAO/R) operation 모델 완료 •Infarct volume 측정 : Image Analysis System •Cytokine 농도 측정 : IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-10 (ELISA) kits •뇌조직의 조직학적 검사 •행동학적 장애변화 검사: Behavioral function assessment •Rota-rod test

## 제 1 절 우수 GABA생산 균주의 선발

### 1. GABA생성 유산균 선발

직접 담근 여러 종류의 김치들을 0.85% saline으로  $10^6$ 으로 희석한 뒤 bromocresol purple이 함유된 MRS agar배지에 도말하여 48시간 배양한 후 콜로니 주변이 노란색인 유산균으로 예상되는 735개의 집락을 분리하였다. 이렇게 분리된 균주들을 다시 1% MSG를 포함한 GYP배지에 24시간 배양하여 CO<sub>2</sub>생성능이 있는 균주를 대상으로 배양액을 TLC분석하여 GABA 생성능이 있는 균주를 선별하였다. 이와 같이 검사하여 735 균주의 TLC 분석을 통하여 GABA 생산성이 높은 16 균주를 1 차 선발하고 다음과 같이 2 차 선발 과정을 거쳤다.

Table 1. Screening of GABA producing lactic acid bacteria from various Kimchi.

Type of kimchi	Total strains isolated	Number of GABA producing strains
Cabbage kimchi	82	NF
Pickled young radishes	76	NF
Leek kimchi	20	NF
Cabbage kimchi	26	NF
Sliced radish kimchi	65	NF
Pickled young radishes	12	NF
Sliced radish kimchi	4	NF
Cabbage kimchi	22	NF
Turnip kimchi	102	7 strains
Mustard leaf kimchi	4	NF
Cabbage kimchi	80	NF
Turnip kimchi	125	9 strains
Green onion kimchi	117	NF
<b>Total strains</b>	<b>735</b>	<b>16</b>

### 2. 분리균주의 GABA 생산량 분석 및 최종균주 선정

1 차 선발 실험을 통하여 분리한 16균주에 대하여 GABA 생산능을 TLC와 HPLC를 이용하여 분석하였다. 기존에 GABA 생산 우수균주로 문헌에 보고되어 있는 IFO12005균주를 대조구로 하여 생산능을 평가하였다.

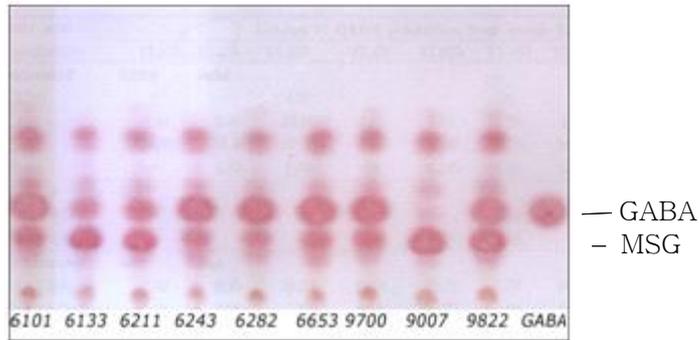


Fig. 1 TLC analysis of GABA production by kimchi derived lactic acid bacteria

이들 균주의 GABA생산량을 정량적으로 분석한 결과 5 균주에서 대조구인 IFO12005균주에 비하여 높은 GABA 생산량을 보였으며 그 중에서도 6282 균주가 가장 높은 1.2g/L의 GABA 생산량을 보여 이 균주를 최종 GABA 생산균주로 선정하였다. 이 균주는 FAME analysis와 16S rDNA sequence 분석을 통해 *Lactobacillus brevis* 로 동정하였고 *Lactobacillus brevis* G100이라 명명하였다.

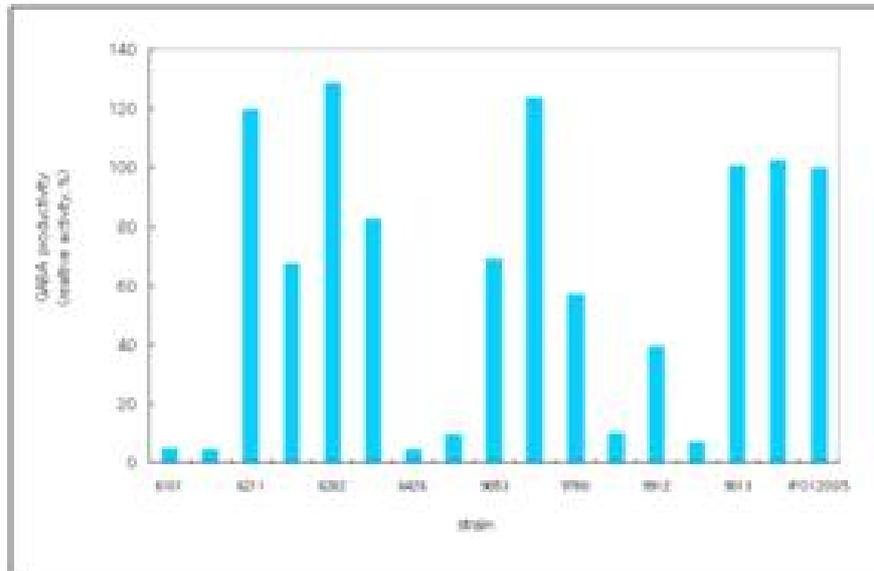


Fig. 2 HPLC analysis of GABA concentration produced by kimchi derived lactic acid bacteria

## 제 2 절 GABA 생산균주의 배양조건 최적화

### 1. MSG 첨가량에 따른 GABA생성능 평가

GABA 생산의 기본 배지인 GYP배지에 MSG를 농도별로 첨가하여 전환능을 평가해본 결과 MSG 1% 까지는 GABA로 모두 전환이 되었으나 그 이상의 농도에서는 전환되지 않고 남은 MSG가 존재하였다.

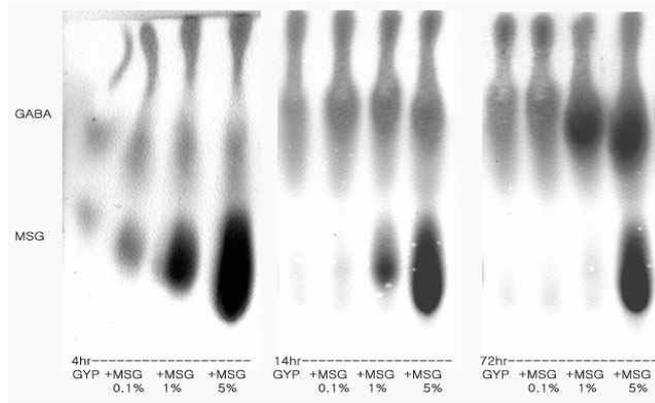


Fig. 3 TLC analysis of GABA production according to added MSG concentration. The sample was pooled at 4, 14 and 72 hr of incubation.

## 2. 탄소원과 질소원에 따른 GABA 생성능 평가

탄소원의 첨가에 따른 GABA 생산능을 평가하였다. GYP 배지에 탄소원으로는 arabinose, glucose, fructose, sucrose, maltose를 추가하여 균체의 성장과 GABA 생산량을 HPLC로 분석하였다. 그 결과 lactose 첨가군에서 가장 높은 성장과 전환률을 보였다. 또한 질소원의 영향을 평가하기 위하여 tryptone, yeast extract, yeast nitrogen base, ammonium sulfate, soytone 등을 첨가하여 GABA 생산량을 분석한 결과 yeast extract와 yeast nitrogen base에서 가장 높은 생산성을 보였다.

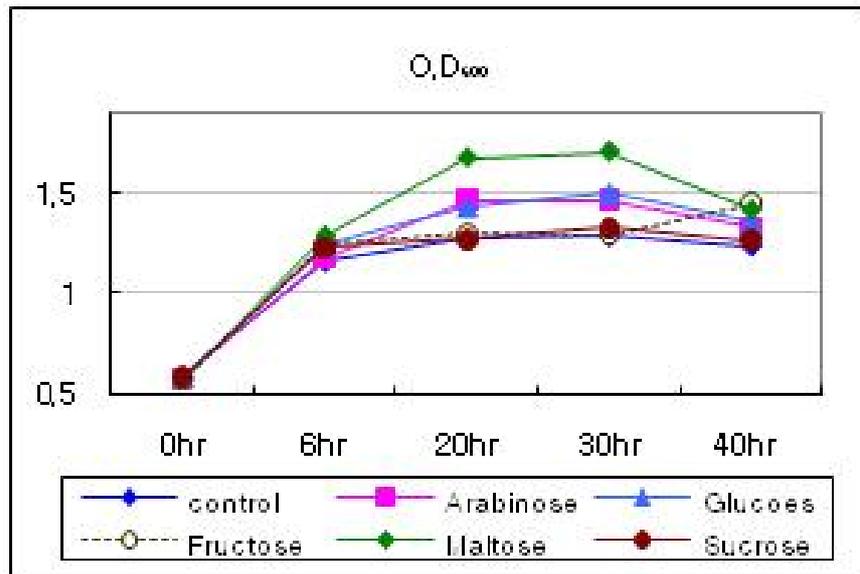


Fig. 4 The effect of various carbon sources on the growth of *L. brevis* G100.

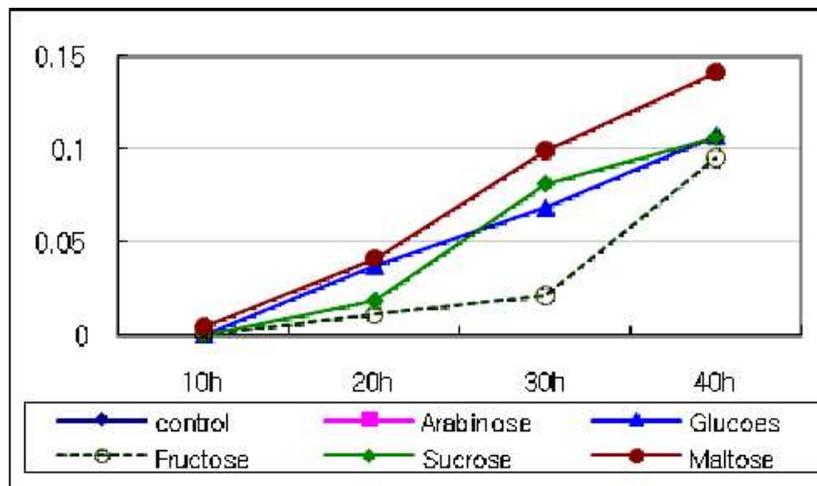


Fig. 5 The effect of various carbon sources on GABA production by *L. brevis* G100. Arabinose, glucose, fructose, sucrose and maltose were added to GYP medium as carbon sources.

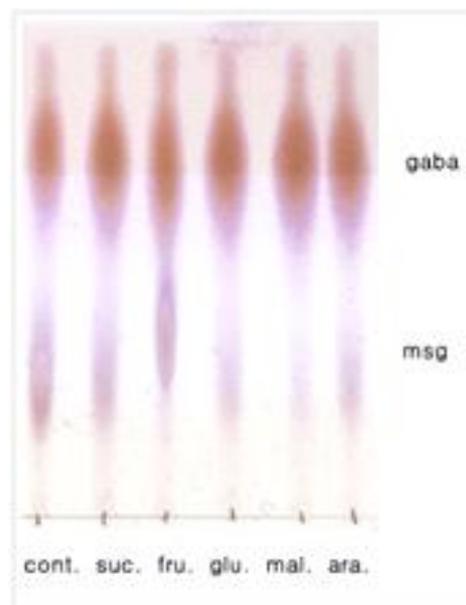


Fig. 6 TLC analysis of GABA production by *L. brevis* G100 according to carbon sources.

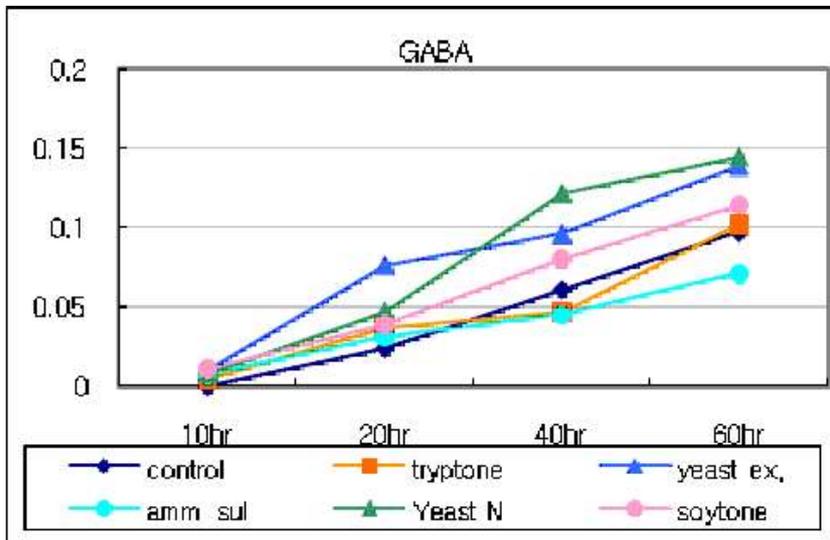


Fig. 7 The effect of various nitrogen sources on GABA production by *L. brevis* G100. Tryptone, yeast extract, yeast nitrogen base, ammonium sulfate, soytone were added to GYP medium as nitrogen sources.

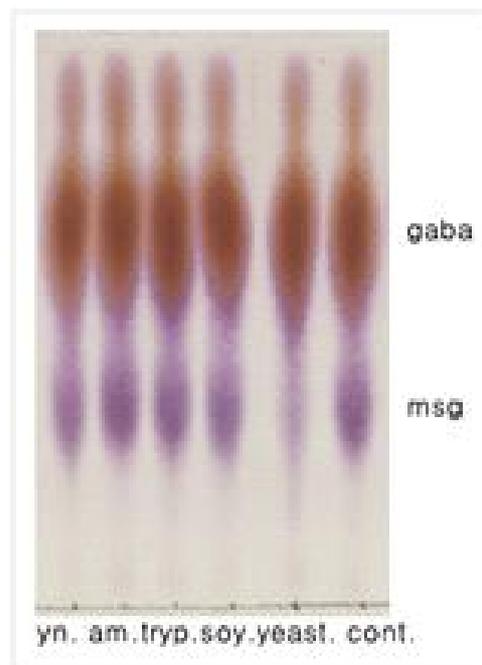


Fig. 8 TLC analysis of GABA production by *L. brevis* G100 according to nitrogen sources.

### 3. 최적화 배지에서의 GABA의 생산

이상의 결과를 종합하여 초기 GYP 배지와 최적화 생산배지의 GABA 생산능을 비교하여 보았다. 그 결과 GABA 생산이 약 10 배이상 (초기 1%에서 최적화 후 10% MGS를 GABA 로 전환) 증가되었음을 알 수 있었다(Fig 9, 10).

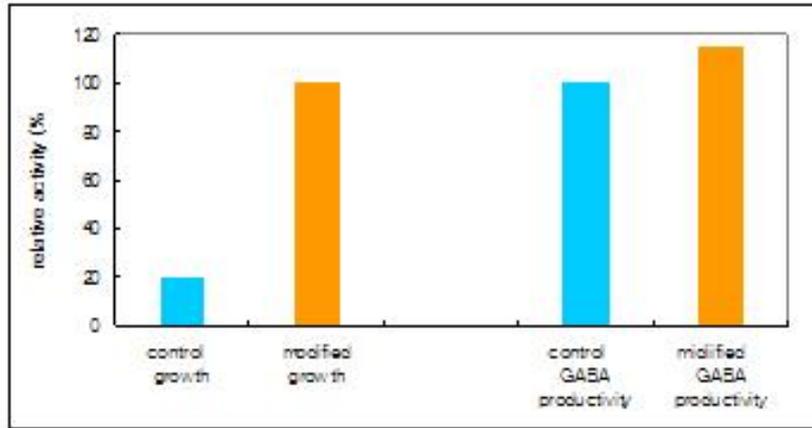


Fig. 9 Comparison of growth and GABA productivity between control and optimized medium

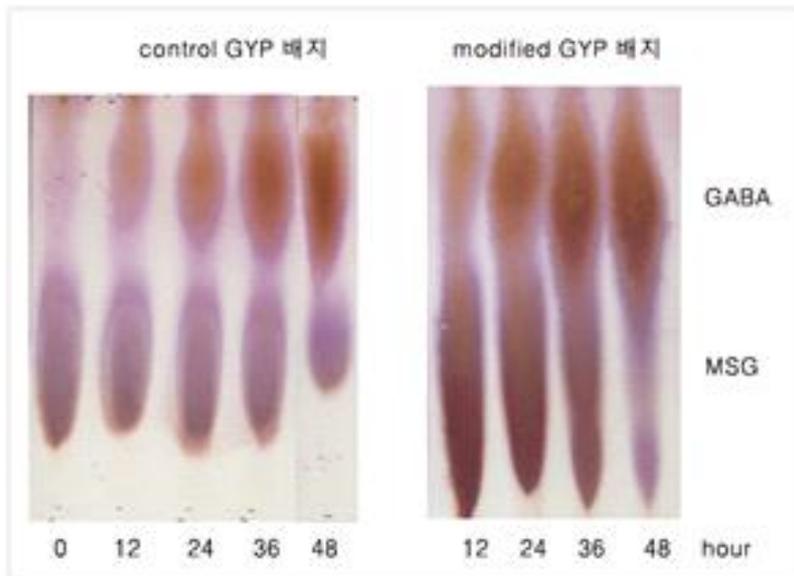


Fig. 10 Comparative TLC analysis of GABA production between control and optimized medium.

#### 4. 단계별 배양에 따른 GABA 생산 조건 연구

균체의 생산과 GABA 생산의 분리를 통하여 1차 배양을 통한 균체의 대량생산단계와 여기에 MSG 첨가에 따른 전환능의 최적화를 도모하였다.

GABA 전구체인 MSG를 첨가하지 않은 growth stage에서는 24시간 배양하였을 때 GABA의 농도가 증가하지 않았고, 반면 MSG를 첨가한 conversion stage에서는 배양 시간에 따라 GABA의 농도가 현저히 증가하였다. 2% MSG를 첨가한 배지에서 *L. brevis* G100는 48시간 배양되었을 때 MSG를 모두 GABA로 전환하였고, 10% MSG를 첨가한 배지에서는 120시간 배양되었을 때 대부분 GABA로 전환하였다. 첨가된 MSG의 양이 많을수록

GABA로 전환시키는 GAD(glutamic acid decarboxylase)가 반응할 수 있는 기질이 증가하여 반응 속도가 감소한다. 따라서 *L. brevis* G100을 이용해 발효를 실시할 때 MSG를 첨가하는 적정 농도는 2~3% 수준임을 확인하였다.

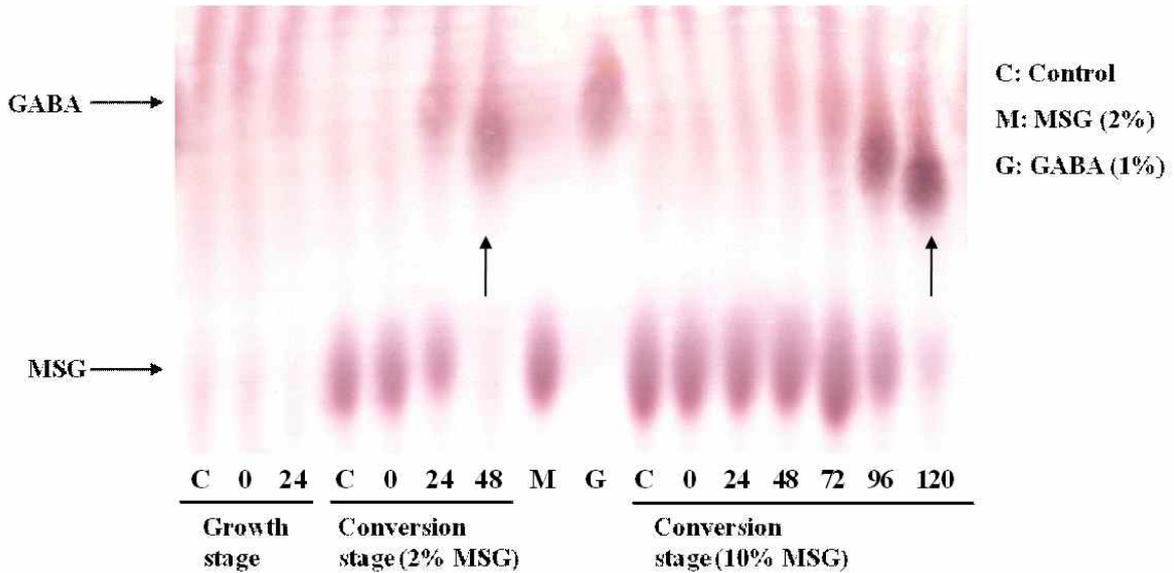


Fig. 11 Two-stage conversion of MSG by *L. brevis* G100. The first stage is for cell growth and the second stage is for conversion of added MSG to GABA. The effect of MSG concentrations and conversion time on the production of GABA with *L. brevis* G100.

배양 시간에 따른 pH는 전환 초기 pH 5.0에서 48시간이 지난 후, pH 6.8로 증가함을 확인하였다. GABA의 생성은 glutamate가 GAD효소에 의해 CO<sub>2</sub>를 내며 분해되어 생성되는데, 수용액 상태에서 약염기성이다. *L. brevis* G100가 MSG를 GABA로 전환하며 생성된 CO<sub>2</sub>는 진탕 배양 과정 중에 공기 중으로 방출되고, 생성된 GABA가 배양액의 pH를 상승시키는 요인이 되었다.

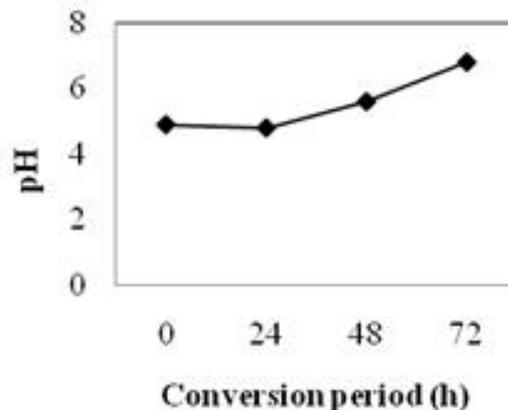


Fig. 12 Changes of pH during GABA production with *L. brevis* G100.

## 5. *A. niger*를 이용한 GABA의 생성능 확인

본 연구에서는 식용 미생물의 하나인 *A. niger*의 대사과정에서 TCA cycle과 GABA shunt를 조절하여 GABA를 생성할 수 있다는 문헌 자료를 참고하여 GABA 전환용 새로운 미생물을 탐색하고자 하였다(Figure. 13). 세포를 통해 유입된 glutamate가 TCA cycle을 통해 대사되는 경로를 차단함으로써 glutamate가 GABA 생성에 이용될 수 있도록 acidogenic growth(AG) medium을 제조하였고, 대조군으로써 normal growth(NG) medium을 이용하였다. 각 medium의 조성은 다음의 Table. 2에 나타내었다.

Table 2 Compositions of normal and acidogenic growth medium of *Asp. niger*.

Normal Growth			Acidogenic Growth		
Component		w/L	Component		w/L
Glucose		1% g	Glucose		140 g
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	Ammonium Nitrate	2.25 g	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	Ammonium Nitrate	2.25 g
FeCl <sub>3</sub> ·6H <sub>2</sub> O	Iron(3)chloride	20 mg	MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O		0.25 g
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	Zinc sulfate	10 mg	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>		1 g
MnSO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	Manganese(2)sulfate	3 mg	Fe(NH <sub>4</sub> )(SO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> ·12H <sub>2</sub> O		0.1 mg
NaMoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O		1.5 mg			
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O		1 mg			
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	buffer	96g/l			
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	buffer	3g/l			
pH 5.5-6.0			Add sufficient HCl to pH 2.3		

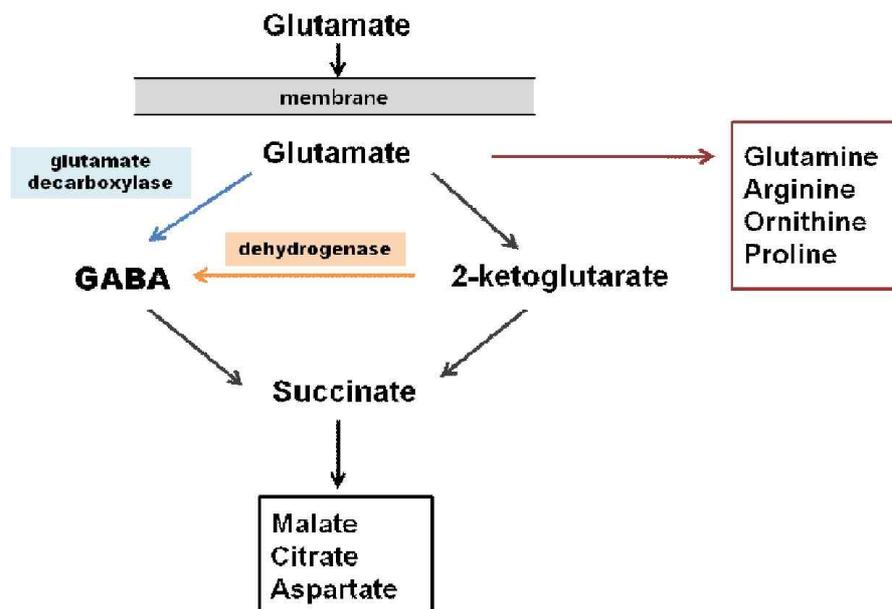


Fig. 13 Schematic representation of glutamate metabolism of *A. niger*.

PDA(Potato Dextrose Agar) 배지에 *A. niger* 포자를 접종해 배양한 후, 0.9% saline(with tween 80 solution)을 이용해 생성된 포자를 수거하였다. 수거된 포자는 계수하여 100 ml normal growth 배지에 10<sup>3</sup>, 10<sup>6</sup>spores/ml수준으로 접종하였고, 호기 상태에서 5일간 배양하였다. 포자의 발아와 증식 상태를 확인하고 GABA 생성을 유도하기 위해 100 ml acidogenic growth 배지에 각각 옮긴 후, MSG를 2% 수준으로 첨가하고 혐기 배양 하였다. 혐기 전환을 시작한 0 time, 2일, 4일의 시료 일정량을 취하여 -20℃ 냉동고에 보관하였고, TLC analysis 를 이용해 GABA의 생성 정도를 분석하였다. 생산된 GABA는 cellulose F aluminum TLC plate(Merck Co., Germany)를 이용하여 n-butanol: acetic acid: water(4:1:1)의 용매로 분리하였고 0.2% ninhydrin(in absolute ethanol) 용액으로 발색하여 정성적으로 분석하였다. (Fig. 14) Acidogenic growth 배지의 autoclave 전, 후의 성분 변화를 확인하기 위해 채취한 각 시료와 함께 분석하였고, 10<sup>3</sup>,10<sup>6</sup>spores/ml로 접종한 시료간의 성분 차이는 유의하게 나타나지 않았다. 또한 MSG와 GABA standard와 비교할 때 *A. niger*를 배양한 시료에서는 각각의 성분이 spot으로 나타나지 않고 끌림 현상이 나타났다 (Fig. 14). 이는 *A. niger* 자체에서 생성된 아미노산이 함께 검출되었다고 보이며, 106-1번 시료에서만 MSG가 없어지며 GABA가 다른 시료에 비해 소량 생성됨을 확인하였다. 그러나, *L.brevis* G100의 GABA 생성과 비교할 때, *A. niger*는 배양 조건이 까다롭고 GABA의 생성 비율도 낮아 효율이 떨어짐을 확인하였다.

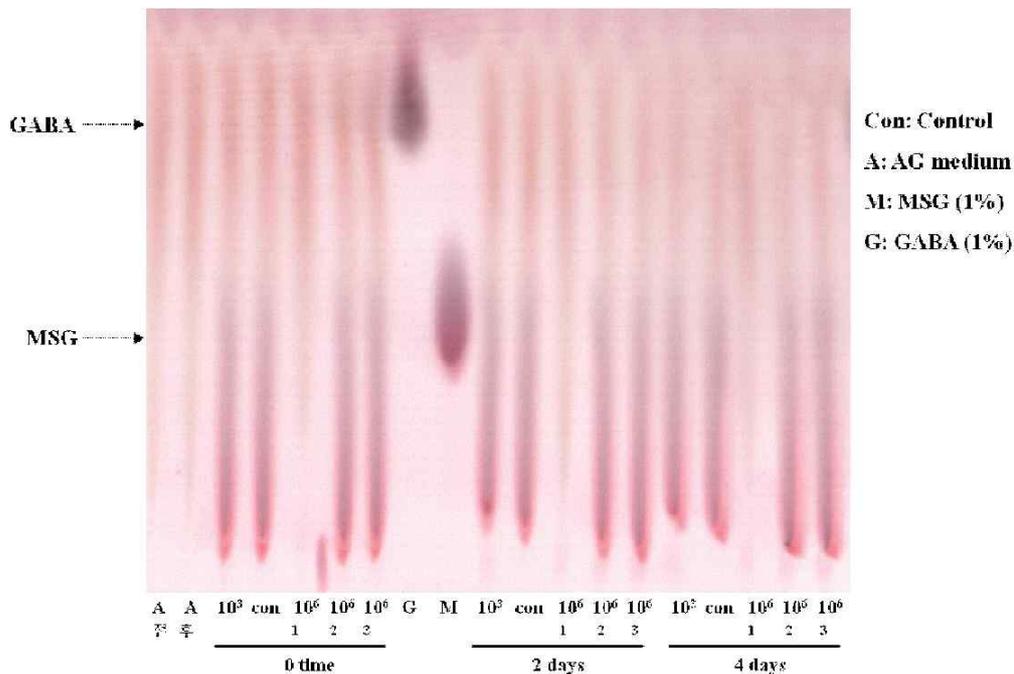


Fig. 14 The production of GABA with *A. niger*.

### 제 3 절 GABA 생산 균주에 의한 천마의 발효

천마(*Gastrodia elata* (GE) Blume Orchidaceae)는 한국, 중국 등에서 전통적으로 두통, 마비, 경련, 신경성 질환 등의 치료에 사용되어져 왔다. 천마에는 여러 다양한 compound (gastrodin, 4-hydroxybenzyl alcohol, 4-hydroxybenzyl aldehyde, vanillin, vanillyl alcohol 등)이 있으며, 이중 gastrodin은 대표적이 생리활성 물질로 혈행개선, 두통과 어지러움의 치료 그리고 항경련 효과 등의 특성을 나타낸다고 보고되어 있다. 또한 천마의 추출물도 global ischemia, excitotoxicity 에 대한 neuroprotective를 나타낸다는 연구가 있으며 이밖에도 천마의 생리활성물질인 4-hydroxybenzyl alcohol, 4-hydroxybenzyl aldehyde, vanillin 이 global ischemia에 따른 hippocampal CA1 cell death 를 억제해준다는 것, 4-hydroxybenzyl aldehyde이 rat brain에서 GABAergic neuromodulation과 antioxidation에 대한 활성이 있다는 연구가 보고되고 있다. 본 연구에서는 천마의 열수추출물을 *Lactobacillus brevis* G100을 이용하여 발효하여 천마의 생리활성물질 중 생리활성이 가장 우수한 4-hydroxybenzyl alcohol와 GABA를 동시에 생산하고자 하였다. 천마동결건조가루는 경상북도 상주시에 한 농장에서 2011년 12월에 구입하였다. 효모 추출물은 Gistex LS Powder AGGL, sodium L-Glutamate(MSG)는 crown guaranteed reagents, GABA시약은 sigma-aldrich사에서 구매하여 이용하였다. 여러가지 당 소스는 sigma-aldrich사 등으로부터 구입한 것을 사용하였다. 배지의 pH변화는 pH meter(model 730P, Istek, Inc, Seoul)를 이용하였다. 공동 배양법 개발을 위하여 사용한 공동 발효 균주로서는 유산균인 *L. brevis bifidum* BGN4 (KCTC 3202) 를 이용하였다. 균 접종 전 0.05%(w/v) L-cysteine-hydrochloride anhydrous(Sigma) 가 첨가된 MRS 액체 배지에서 18시간씩 두 번 활성화 시킨 것을 사용하였다. 생균수 측정에는 한천 고체 배지를 이용하여 생균수를 측정하였다. 공동 배양 중에 두 균주를 형태학적으로 구별하여 생균수를 측정하기 위해 도말 배지로써 BL blood agar배지(DifcoTM, 식품공전 15번 배지)를 이용하였다. BL agar에 5% 마혈액(메덱스(주))을 첨가하여 측정용 도말배지를 만들었다. 배지는 균 접종 후 혐기배양하여 3일 후에, 30~300개 사이의 균을 유효하게 측정하였다.

#### 1. *L. brevis* G100을 이용한 천마의 발효

천마의 열수추출물에 *L. brevis* G100을 접종하여 GABA의 생산을 유도하였다. *L. brevis* G100을 접종하기 전 추출물의 초기 pH는 6.5로 맞추었고 GABA로의 전환을 위한 MSG는 2% 첨가하였다. 효율을 높이기 위해 여러 가지 당류 및 N-source를 첨가한 실험에서는 maltose 1% 첨가균에서 생균수가 가장 높게 나왔고, GABA 생산의 경우 yeast extract 1%를 첨가한 실험균에서 GABA가 효율적으로 생산된 것을 확인할 수 있었다. 선별된 조건들을 조합하여 배양한 실험에서 천마의 열수추출물에 *L. brevis* G100을 접종하여 GABA를 생산한 경우 maltose와 yeast extract 1%를 혼합 첨가한 실험균에서 가장 높은 생산량을 보였다(Fig).

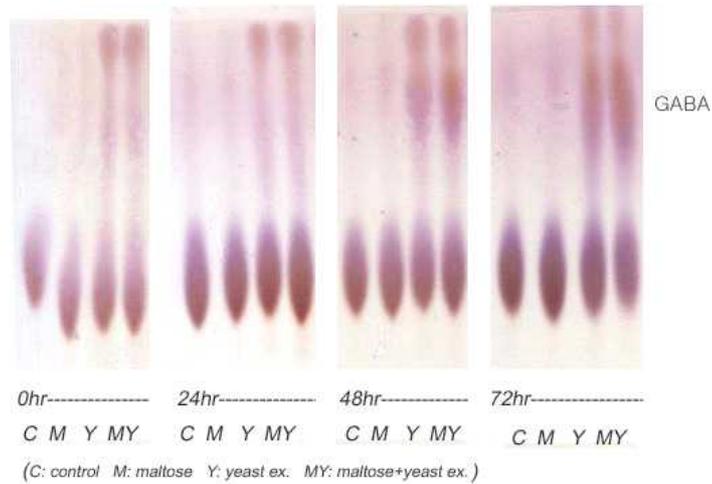


Fig. 15 Production of GABA by fermentation of the extract of *Gastrodia elata* using *L. brevis* G100

## 2. 발효 천마의 발효 특성 분석

천마 10%, 맥아당 1%, 효모 추출물 1%로 천마 배지를 만든 후 혐기조건, pH 6.5 하에서 *Lactobacillus brevis* GABA 100 균을 3% 접종하고, 1일 후 MSG를 첨가하였다. 균 접종 후 2~3일경에 MSG가 GABA로 모두 생전환 된 것을 TLC를 통해 확인하였다. 초기 접종균 수는 약  $10^7$ 이고, GABA 전환 시기의 *L. brevis* G 100의 생균수는  $10^9$ 으로 확인되었다. 천마배지에서 호기로 배양시에는 GABA전환은 이루어지지 않았고, 생균수는 3일 후부터 감소하는 경향을 나타냈다. 혐기조건에서는 생균수가 접종 후 6일까지  $10^9$  CFU/ml에 도달하는 것을 확인할 수 있었다. pH는 혐기상태에서만 변화를 보였는데, 3일 이후에 GABA 생성으로 인해서 pH 6이상을 나타내었다. *L. brevis* G 100의 GAD 활성이 pH 5.5~6.0이므로 5 M 구연산을 소량씩 첨가하면서 적정 범위에 머무를 수 있도록 pH를 조절하였다. 이에 반해 호기조건에서는 GABA가 생성이 미약하였고, 따라서 pH는 4.0대로 계속 유지되는 것을 볼 수 있었다. 결론적으로 같은 조건의 천마배지에서 호기/혐기 배양으로 실험을 했을 때 호기 조건에서는 전환이 미약한 것을 확인 하였고, 혐기조건에서 전환시의 생균수, pH의 변화가 잘 확인되었다. 또한 TLC를 통해 GABA 100균주가 천마배지에서 MSG를 원료로 하여 GABA를 효율적으로 생산하는 것을 확인 하였다.

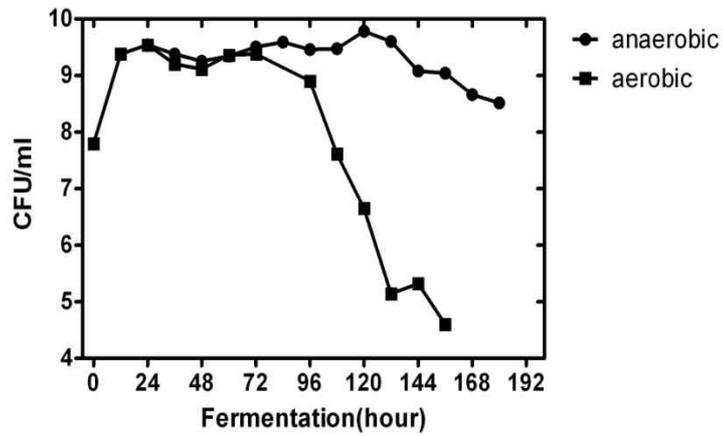


Fig. 16 Cell numbers (log CFU/ml) of lactic acid bacteria in fermented GE medium

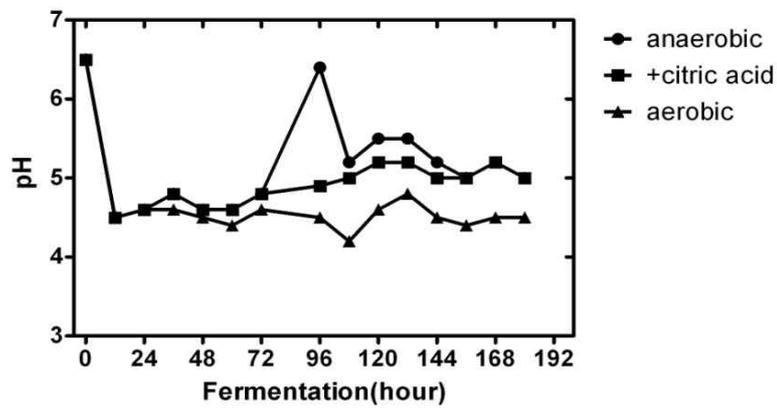


Fig. 17 Change of pH in fermented GE medium



Fig. 18 TLC of the GABA produced in fermented GE medium

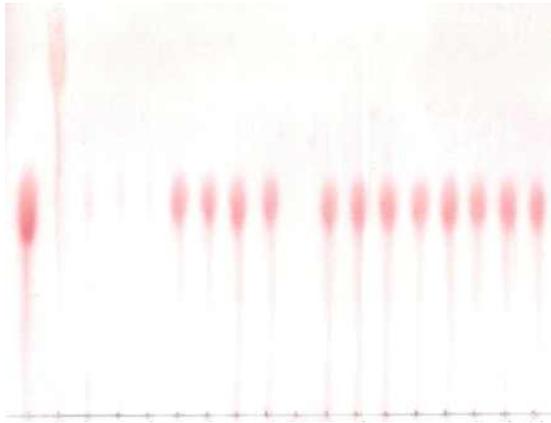


Fig. 19 TLC of the GABA produced in fermented GE medium under the anaerobic state

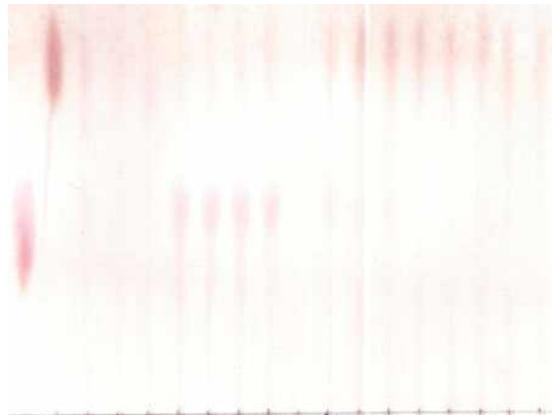


Fig. 20 TLC of the GABA produced in fermented GE medium under the aerobic state

### 3. *Lactobacillus brevis* G100와 *L. brevis bifidum* BGN4의 공동배양에 의한 GABA 생산성 증진

배양하고 있는 동안에, pH를 5.0~5.5로 유지시켜 GAD의 활성을 높이고, GABA생산의 효율을 높이기 위해 적절한 pH 조절이 요구되었다. 이를 위해 *L. brevis bifidum* BGN4 와 co-culture를 시행하였다. 먼저, MSG 3%, cysteine 0.05%를 넣은 MRS 액체배지에서 각 균을 키웠을 때와 함께 키웠을 때의 생균수를 측정하고, TLC를 찍어보았다. 분석결과 MRS-MSG 배지에서 공동배양을 하는 것이 GABA의 전환 효율을 높임을 확인 할 수 있었다.

Table 3. Cell numbers (log CFU/ml) of lactic acid bacteria in MRS medium with 3% MSG at 37°C

day	<i>L. brevis</i> GABA100	<i>Bif. bifidum</i> BGN4	<i>L. brevis</i> GABA100 co - cultured	<i>Bif. bifidum</i> BGN4 co - cultured
0	3.3E+07	7.0E+06	3.5E+07	5.0E+06
1	2.8E+09	3.5E+08	2.6E+09	2.1E+08
2	3.7E+08	2.0E+08	5.8E+08	3.8E+07
3	8.9E+07	1.0E+06	9.3E+07	1.0E+06
4	6.5E+07	1.0E+06	1.6E+07	7.0E+06
5	6.2E+06	1.0E+04	1.7E+07	7.0E+05

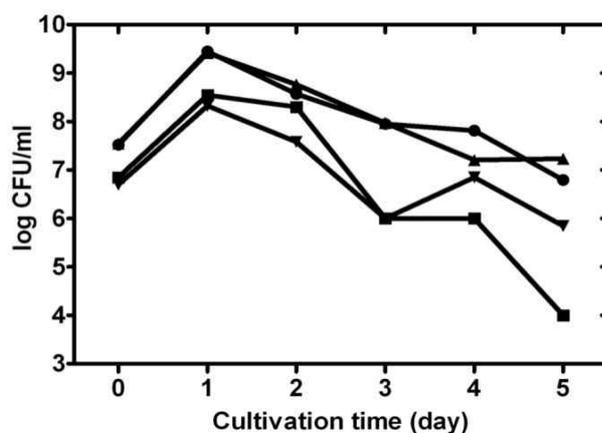


Fig. 21 Cell numbers (log CFU/ml) of lactic acid bacteria in MRS medium with 3% MSG at 37°C. Symbols: (●) *L. brevis* GABA 100; (▲) *L. brevis* GABA 100 co-cultured with *B. bifidum* BGN4; (▼) *B. bifidum* BGN4 co-cultured with *L. brevis* GABA 100; (■) *B. bifidum* BGN. Data expressed as average in duplicate.

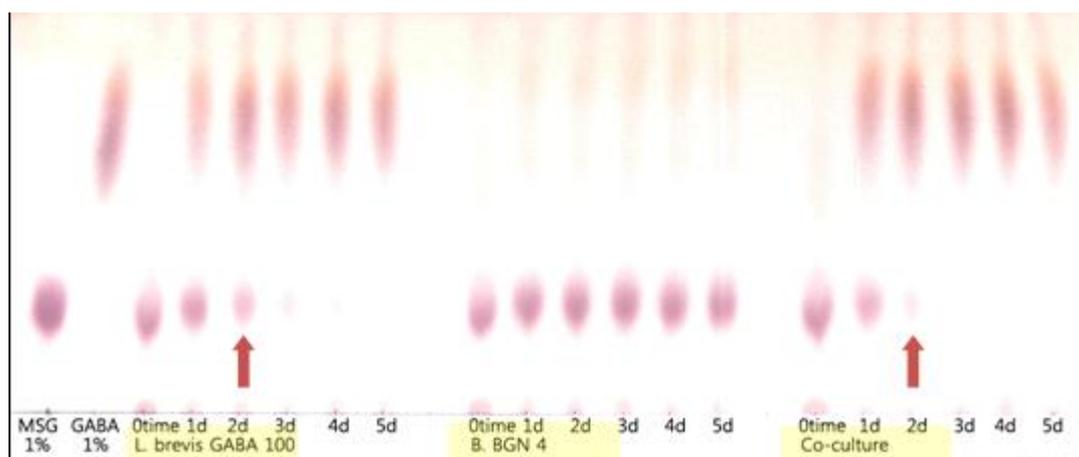


Fig. 22 TLC of the GABA produced in MRS medium with 3% MSG at 37°C. The co-culture of *L. brevis* GABA 100 with *B. bifidum* BGN4 presented higher conversion rate than that of *L. brevis* GABA 100. MRS medium inoculated by *B. bifidum* BGN4 did not show GABA production. The standard concentration of GABA and MSG was 1 %. Sampling volume of 10-fold dilutions of fermented GE was 2 $\mu$ L.

공동 배양에 의하여 GABA의 생산성이 증진됨을 확인하였기 때문에 이를 천마배지에 적용하였다. 천마배지(천마10%, yeast extract 1%)에서 공동배양을 한 후 배양 4일 째 TLC를 분석한 결과 공동배양을 했을 때 GABA의 전환효율이 높아진다는 것을 확인하였다.

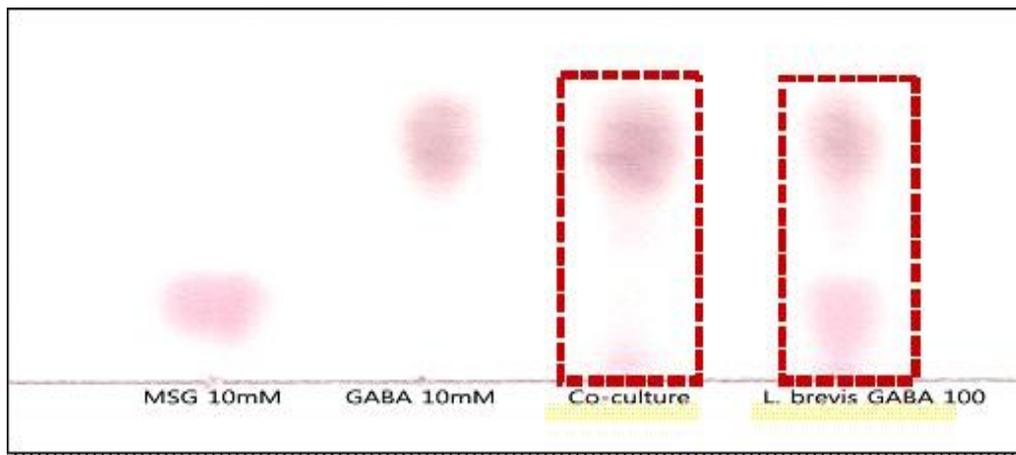


Fig. 23 TLC of the GABA produced in fermented GE medium for 4 days. The enhanced production of GABA by co-culture observed in GE medium. The standard concentration of GABA and MSG was 10mM. Sampling volume of 10-fold dilutions of fermented GE was 2 uL.

#### 4. 첨가당의 종류에 따른 발효 천마의 GABA 생산성 연구

천마배지에서 당 source 별로 GABA 전환율이 빨라지는지 알아보기 위해 실험을 진행하였다. 천마배지의 조성은 천마 10%, 효모 추출물 1%, MSG 3%이며 각 당은 1 %씩 첨가하였고, 각각의 균을 1 %씩 접종하여 공동배양하였다. 당의 종류는 총 11개이고, TLC 결과는 다음과 같다. 실험 결과 galactose, cellobiose, dextrin, lactose, sucrose, rhamnose를 첨가하였을 때는 GABA 생산이 잘 되는 것으로 보였으나 당을 넣지 않은 대조군 (Blank)과 비슷한 효율을 가지고 있음을 확인 하였다. 이로써 공동배양의 천마배지에서 당을 첨가하지 않아도 GABA 전환 효율에 영향을 미치지 않는 것을 확인 하였다. 또한 xylose, arabinose 당은 같은 조건하에서 GABA전환이 전혀 되지 않았고, MRS배지에서도 xylose와 arabinose는 *L. brevis* GABA 100의 가바 생산을 저해하였다.

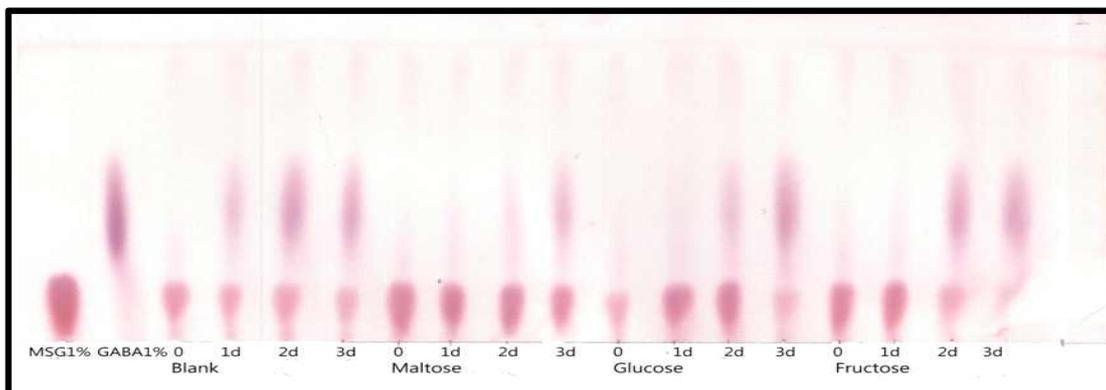


Fig. 24 TLC of the GABA produced in fermented GE medium by various carbon sources 1

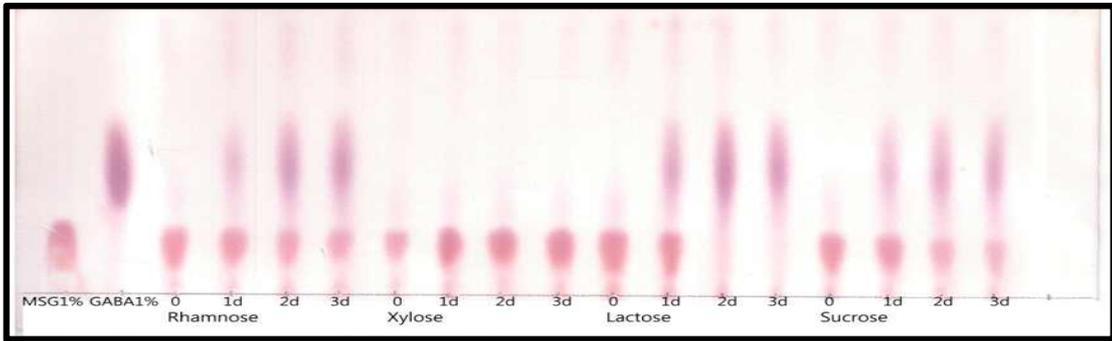


Fig. 25 TLC of the GABA produced in fermented GE medium by various carbon sources 2

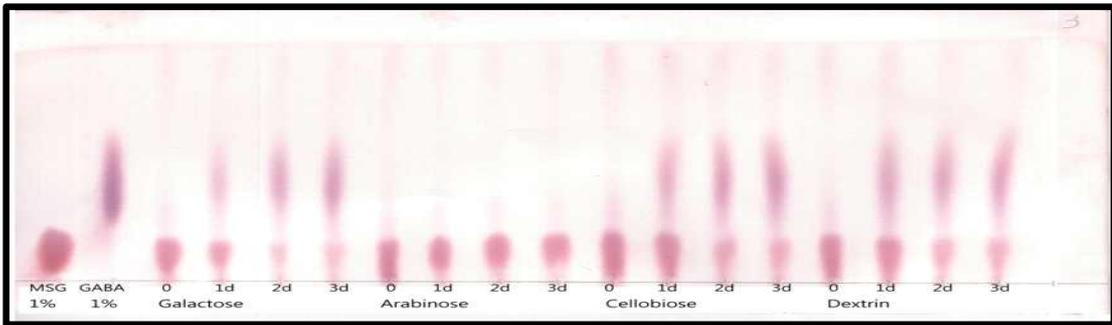


Fig. 26 TLC of the GABA produced in fermented GE medium by various carbon sources 3

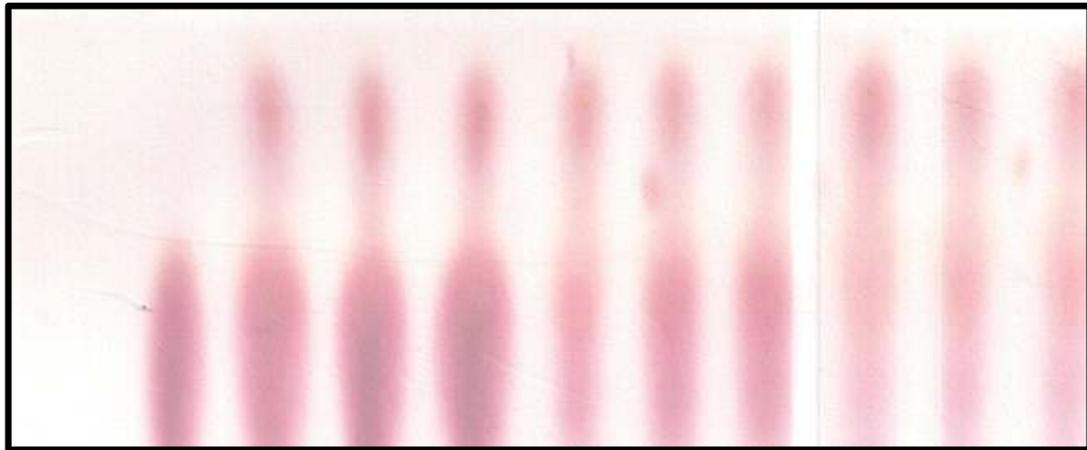


Fig. 27 TLC of the GABA produced in fermented MRS-MSG medium

### 5. 효모추출물 첨가에 따른 발효 천마의 GABA 생산성 연구

천마 배지(천마10%, sucrose 1%, MSG 3%)에서 효모 추출물에 따른 GABA 전환을 보기 위해서 실험을 진행하였다. 효모추출물을 첨가하지 않은 것과 0.5% 첨가한 것을 비교했을 때, 효모 추출물이 첨가되었을 때 GABA 전환이 빨라짐을 확인하였다.

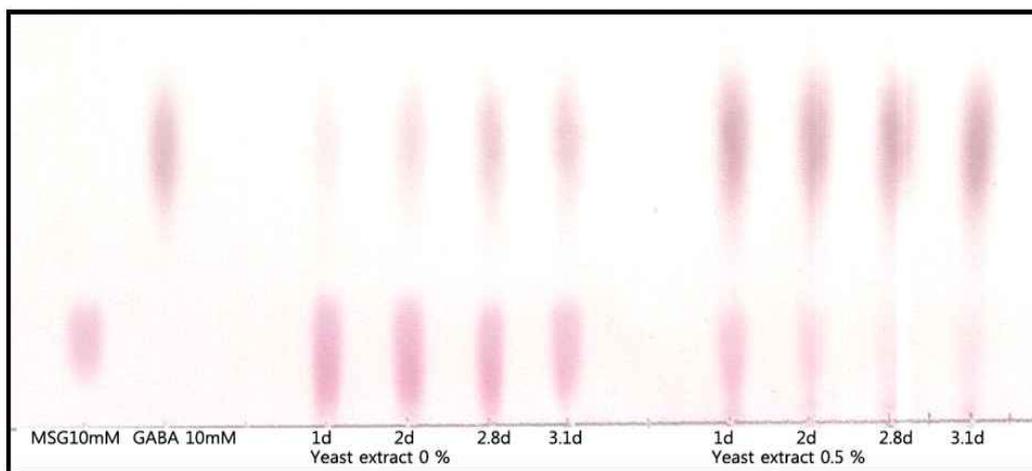


Fig. 28 TLC of the GABA produced in fermented GE medium with 3% MSG. When yeast extract was added into the medium, the production of GABA was considerably increased. The standard concentration of GABA and MSG was 10mM. Sampling volume of 10-fold dilutions of fermented GE was 2uL.

#### 6. 천마 발효를 위한 부원료 원재료에서의 GABA 생산성 연구

본 연구에서는 GABA를 생성하는 *L. brevis* G100을 스타터로 이용하여 부원료 혼합물 소재를 구성하였고 control군, MSG 첨가군, starter 첨가군, MSG와 starter를 모두 첨가한 군의 총 네 군으로 나누어 비교 실험을 하였다. MSG는 2%(w/w) 수준으로 첨가하였으며, starter 첨가군은 MRS 배지에서 배양한 *L. brevis* G100를 원심분리 하여 0.1M phosphate buffer(pH 6.8)로 2회 세척한 후 다시 PB에 녹여 0.025%(w/w) 수준으로 첨가하였다. 제조된 원료는 밀폐 용기에 담아 4℃ 저온에서 숙성시켰다. 숙성 기간에 따른 GABA 생성을 측정하기 위해 일정량을 채취하여 잘게 분쇄한 후, PBS(pH 7.4)로 희석하고 원심 분리하여 상층액을 TLC로 분석에 사용하였다. Cellulose F aluminum TLC plate(Merck Co., Germany)를 이용하여 n-butanol: acetic acid: water(4:1:1)의 용매로 분리하였고 0.2% ninhydrin(in absolute ethanol) 용액으로 발색하여 정성적으로 분석하였다.

4주 발효 결과, control군에 비해 MSG를 첨가한 군의 GABA 생성이 우수하였으며 MSG와 starter를 모두 첨가한 군에서 MSG의 함량이 줄어들며 GABA가 생성됨을 확인하였다. 또한 starter 첨가군보다 MSG와 starter를 모두 첨가한 군의 GABA 생성이 조금 증가함을 확인하였다 (Fig. 29).

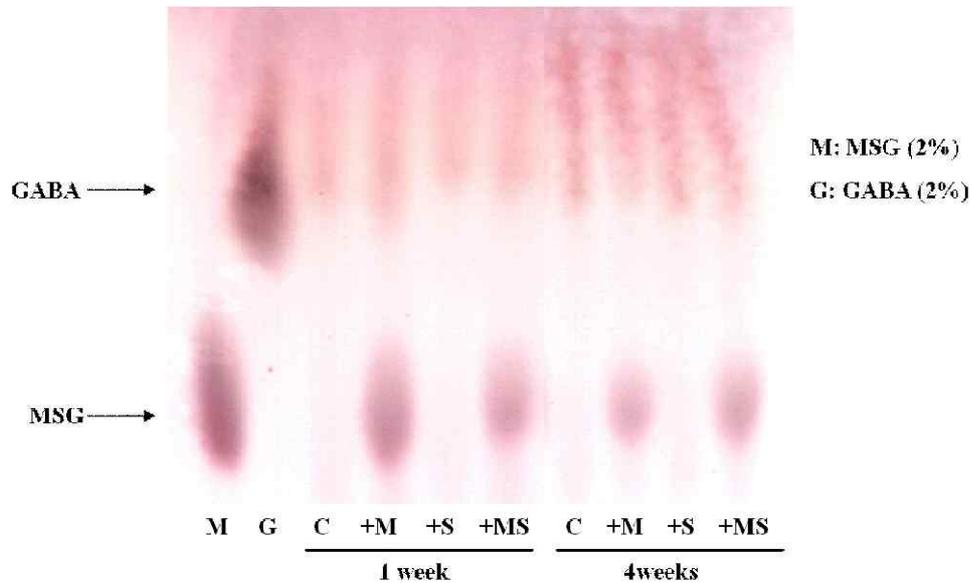


Fig. 29 TLC analysis of GABA from kimchi fermented by *L. brevis* G100 starter.

다음에는 발효 기간에 따른 pH의 변화와 총 생균수는 *L. brevis* G100를 starter로 하여 우점을 유도할 수 있도록 조절하였다. Starter 첨가균은 MRS 배지에서 배양한 *L. brevis* G100를 원심분리 하여 0.1M phosphate buffer(pH 6.8)로 2회 세척한 후 다시 PB에 녹여 0.0025%(w/w) 수준으로 첨가하였다. 제조된 원료는 밀폐용기에 담아 20°C incubator에서 24시간 발효시켜 starter가 우점할 수 있도록 유도하였고, MSG 첨가균은 24시간 발효시켜 starter가 증식한 것을 확인한 후에 MSG 첨가균에 2%(w/w) 수준으로 MSG 용액을 첨가하고, control균에는 동일량의 증류수를 첨가하여 4°C 저온에서 후속 발효를 실시하였다. Starter의 우점률은 0.002% BPB(Bromo phenol blue)가 첨가된 MRS agar 를 이용하여 유산균 colony의 색깔과 모양으로 확인하였다.

7일간 발효후 확인한 결과 control균과 MSG균의 유산균 집락은 *Lactobacillus*보다 *Leuconostoc*이 주로 분포하였고, starter균과 MSG와 starter를 모두 첨가한 균은 *L. brevis* G100이 우점하고 있음을 확인하였다 (Fig. 30).

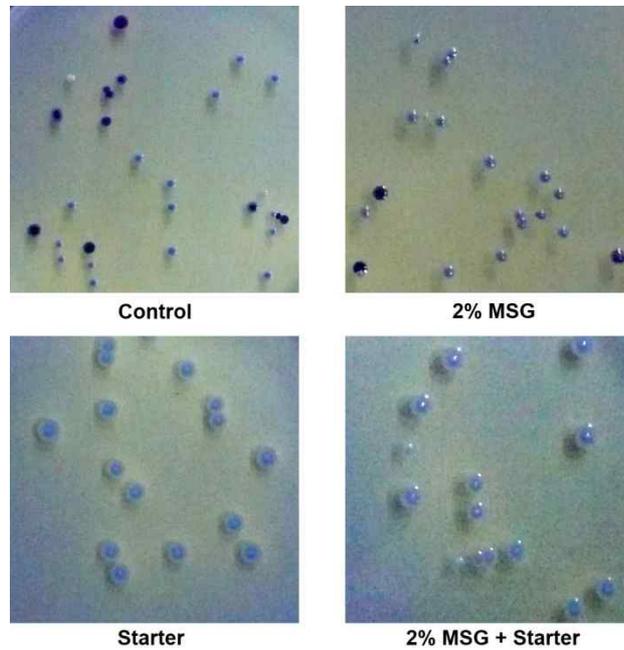


Fig. 30 Colonies of lactic acid-producing bacteria appeared on MRS agar with bromophenol blue (BPB).

Starter를 넣은 균은 초기 발효 시기에 pH가 현저히 감소하였으며 *L. brevis* G100의 증식으로 인해 유기산이 생성되어 pH가 감소했음을 확인하였다 (Fig. 31 A). 24시간 발효 후에 첨가한 MSG는 감소한 pH를 상승시키는데 영향을 미치지 않았고, 일정기간 발효 한 후에는 균의 pH가 전반적으로 비슷해지는 것을 확인하였다. 발효 기간에 따른 총 유산균 수를 측정하기 위해 일정량을 채취하여 잘게 분쇄한 후, PBS(pH 7.4)로 수 회 희석하여 MRS agar 배지에 도말하였고, 생성된 colony를 계수하여 비교 분석하였다. (Fig. 31 B) 발효 초기에는 starter를 첨가한 균의 유산균수가 현저히 많았으나 일정 기간 발효했을 때 총 유산균 수는 비슷한 수준으로 유지되는 것을 확인하였다.

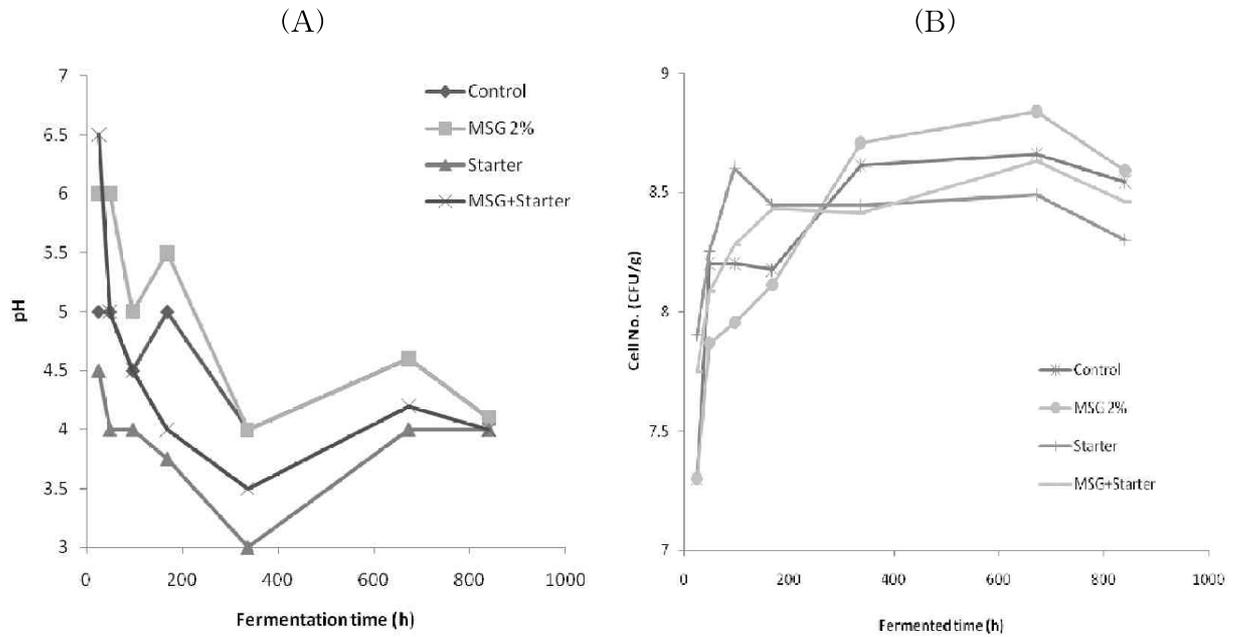


Fig. 31 Changes of pH (A) and microbial population dynamics (B) during fermentation.

24시간 동안 20°C에서 먼저 발효 시킨 후에 4°C에서 보관한 경우는 control군에 비해 MSG를 첨가한 군의 GABA 생성이 우수하였으며 MSG와 starter를 모두 첨가한 군에서 GABA의 생성량이 현저하게 증가하는 것을 확인하였다. Starter를 첨가한 군에서도 5주 발효시킨 결과 GABA의 생성이 증가하였지만, MSG를 첨가한 군보다 그 효율이 낮았다 (Fig).

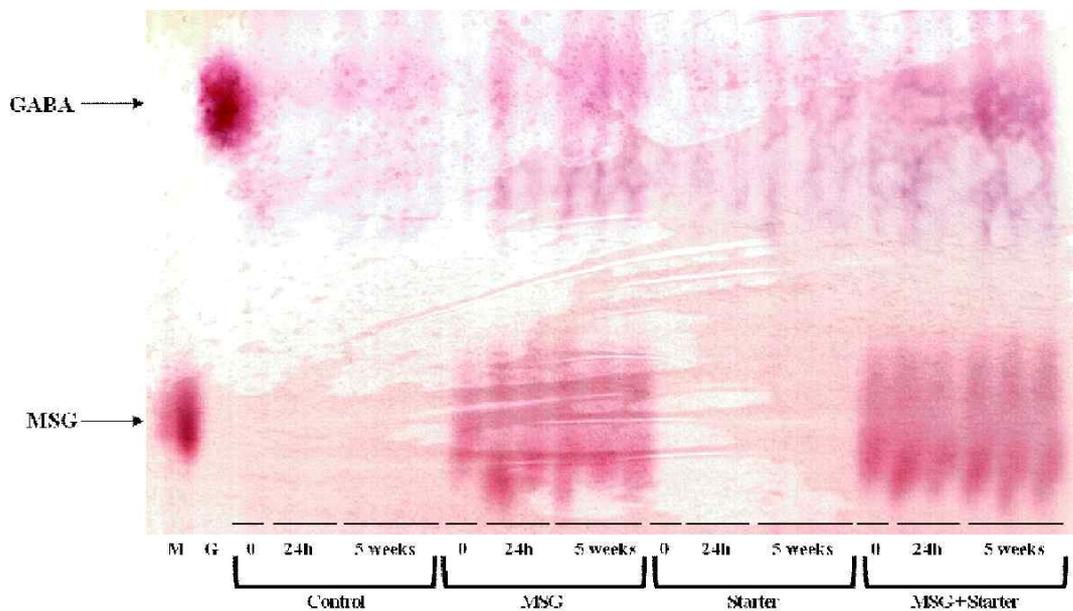


Fig. 32 TLC analysis for the production of GABA after fermentation for five weeks by *L. brevis* G100.

## 7. 천마의 발효 스케일업

### 가. 75 리터 스케일업 발효 천마 생산

소규모 실험에서 테스트 하였던 조건들을 조합하여 스케일업 연구를 실시하였다. 미세하게 분쇄한 천마에 최적화된 원료 구성비로 원료소재를 조합하고 GABA로의 전환을 위한 MSG는 2%를 첨가하였고 초기 pH는 6.5로 맞추었다. 대량 발효조에서 본격적인 발효를 하기전 80℃에서 6시간 동안 열수추출을 하였고, autoclave이후 *L. brevis* G100를 접종하여 3일간 발효하였다. 발효 후 첨가된 MSG는 거의 대부분 GABA로 전환된 것을 확인 하였다.

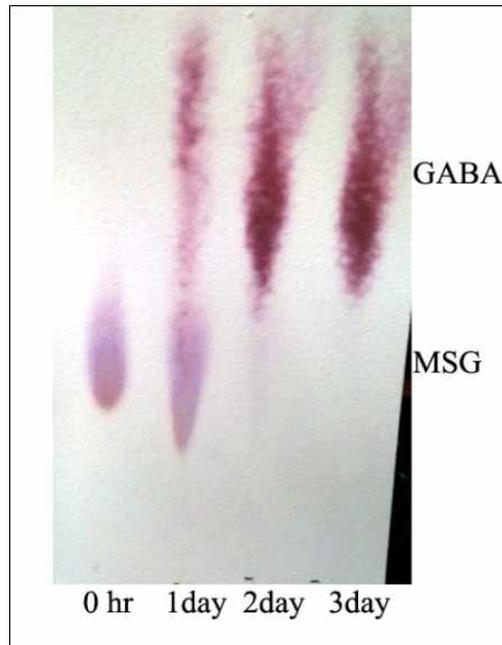


Fig. 33 Scale up of GABA production by 75L fermenter using *L. brevis* G100 and the extract of *Gastrodia elata*

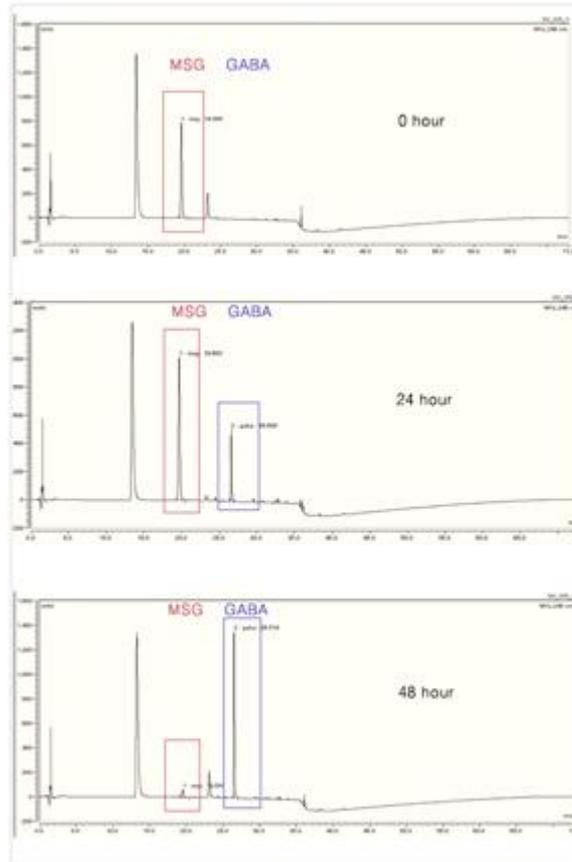


Fig. 34 GABA production profile during 48 hr of fermentation of the extract of *Gastrodia elata* by *L. brevis* G100.

#### 나. 200 리터 스케일업 발효 천마 생산

다양한 연구를 통하여 최적화 발효 천마의 제조 조건을 적용하였고 *Lactobacillus brevis* G100와 *Bifidobacterium bifidum* BGN4의 공동배양을 실시하였다. 발효 원료는 천마 동결건조가루 10%, 초기 pH 6.5, MSG(monosodium glutamate) 3%, 효모 추출물 0.5%을 사용하였고 200 리터 발효기로 scale up하여 발효 천마를 제조하였으며 제조한 발효 천마를 동결건조시켰다. 발효 천마에 대하여 GABA, 유리당, 유기산, 유리 아미노산, gastrodin의 4-hydroxybenzyl alcohol 전환성 등에 대하여 조사하였다.

#### 다. 발효 천마의 유리 당, 유기산, 유리 아미노산 함량

유리당 중 단당류는 모두 분해되어 발효 후에는 남아 있지 않았다. 유기산의 경우 citric acid, lactic acid, succinic acid, acetic acid 가 모두 증가하였다. 발효전과 비교하여 천마 발효물에는 GABA 생산뿐만 아니라 다양한 유기산이 존재함을 확인 할 수 있었다. 유리아미노산의 경우 미미한 변화가 있었으나 뚜렷한 증, 감소는 없었다.

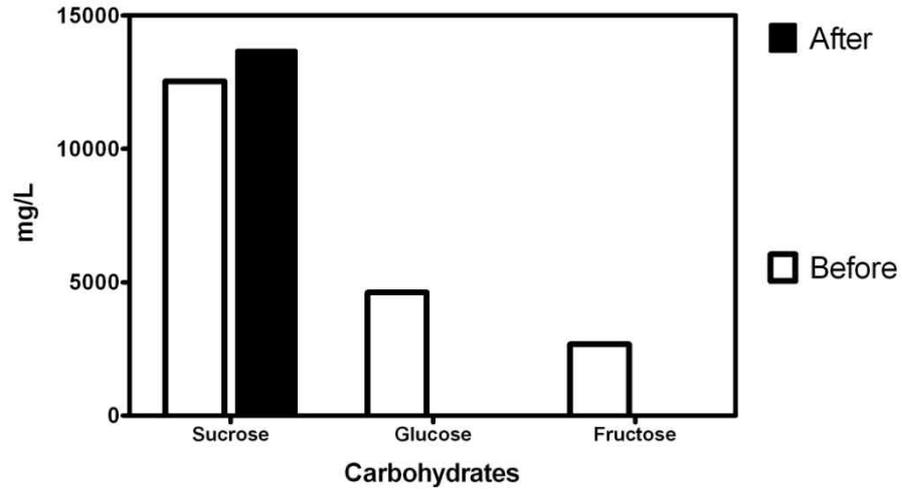


Fig. 35 Comparison of carbohydrates levels between GE medium and fermented GE medium after the co-culture of *L. brevis* GABA 100 with *B. bifidum* BGN4 for 6 days. The open bar (□) and the closed bar (■) indicate the organic acid levels of GE medium and fermented GE medium, respectively.

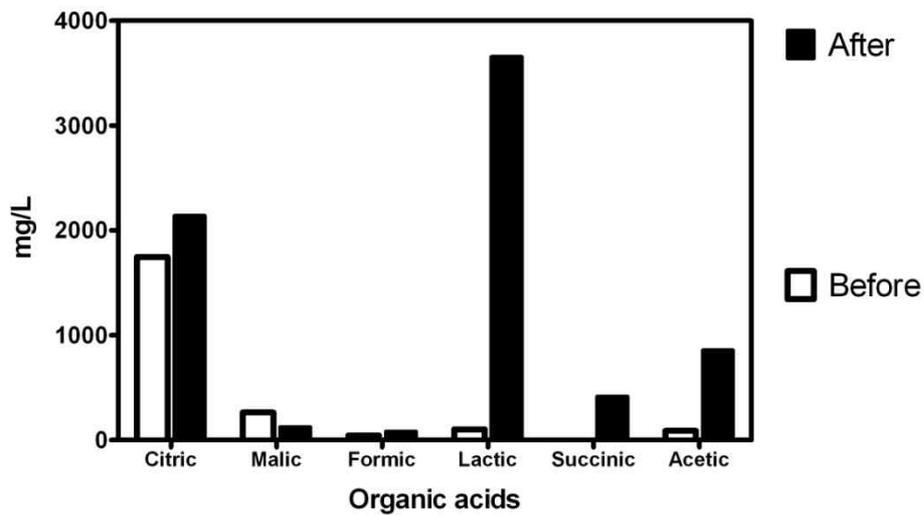


Fig. 36 Comparison of organic acids levels between GE medium and fermented GE medium after the co-culture of *L. brevis* GABA 100 with *B. bifidum* BGN4 for 6 days. The open bar (□) and the closed bar (■) indicate the organic acid levels of GE medium and fermented GE medium, respectively.

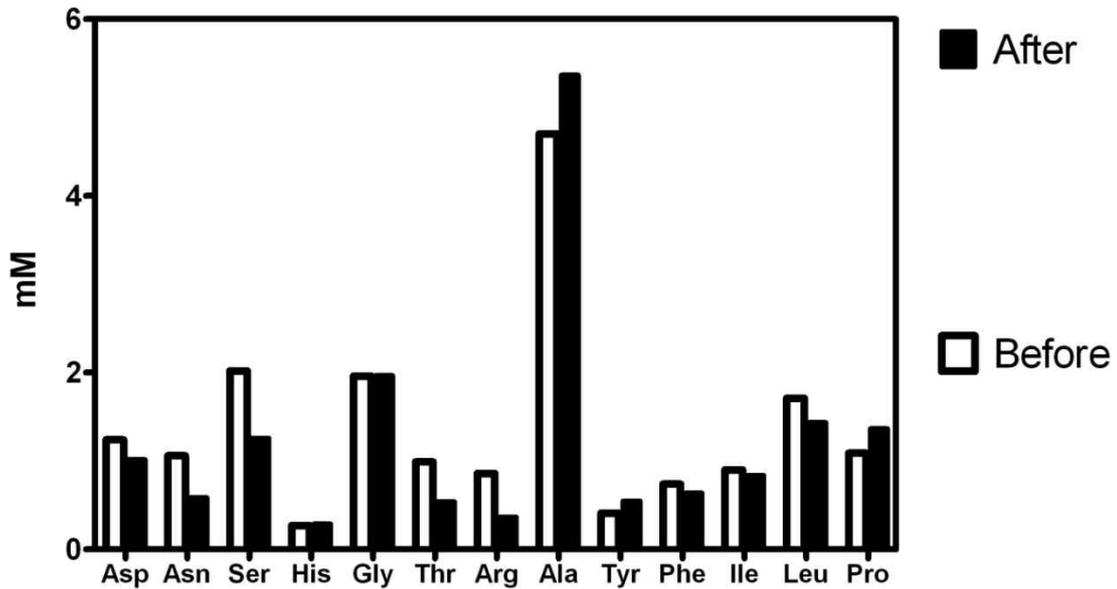


Fig. 37 Comparison of free amino acids levels between GE medium and fermented GE medium after the co-culture of *L. brevis* GABA 100 with *B. bifidum* BGN4 for 6 days. The open bar (□) and the closed bar (■) indicate the organic acid levels of GE medium and fermented GE medium, respectively.

#### 라. GABA 전환능

천마 발효 전, 후의 넣어준 MSG에서 GABA로의 전환율은 75% ( $122.15/162.29 * 100$ )이었다. 실험실 조건에서 95% 이상의 전환율을 나타낸 것보다는 낮았지만 GABA의 함량이 높았고 발효된 천마 고형물의 GABA의 양은 1g당 87 mg으로 측정되었다. 이는 2012년 2월 식품의약품 안전청에서 고시한 건강기능식품의 기능성원료 인정 현황에서 참고한 L-글루타민산 유래 GABA 함유 분말의 1일 섭취량인 20 mg와 비교해 보았을 때 매우 소량의 섭취로 섭취량을 충족시킬 수 있을 정도로 발효천마에 GABA이 높게 함유되어 있음을 확인 할 수 있었다.

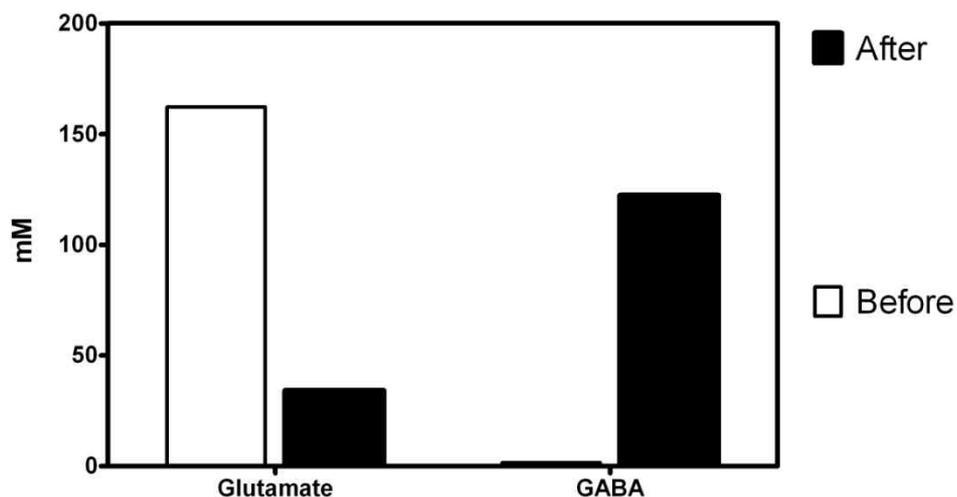


Fig. 38 Contents of GABA and glutamate in GE medium (□) and fermented GE medium after the co-culture of *L. brevis* GABA 100 with *B. bifidum* BGN4 for 6 days (■).

마. Gastrodin으로부터의 4-hydroxybenzyl alcohol 전환

HPLC를 이용하여 천마의 생리활성물질들 중 다음의 5가지 물질, gastrodin, 4-hydroxybenzyl alcohol, 4-hydroxybenzyl aldehyde, vanillin, vanillyl alcohol의 표준시약을 분석하였다 (Fig. 39).

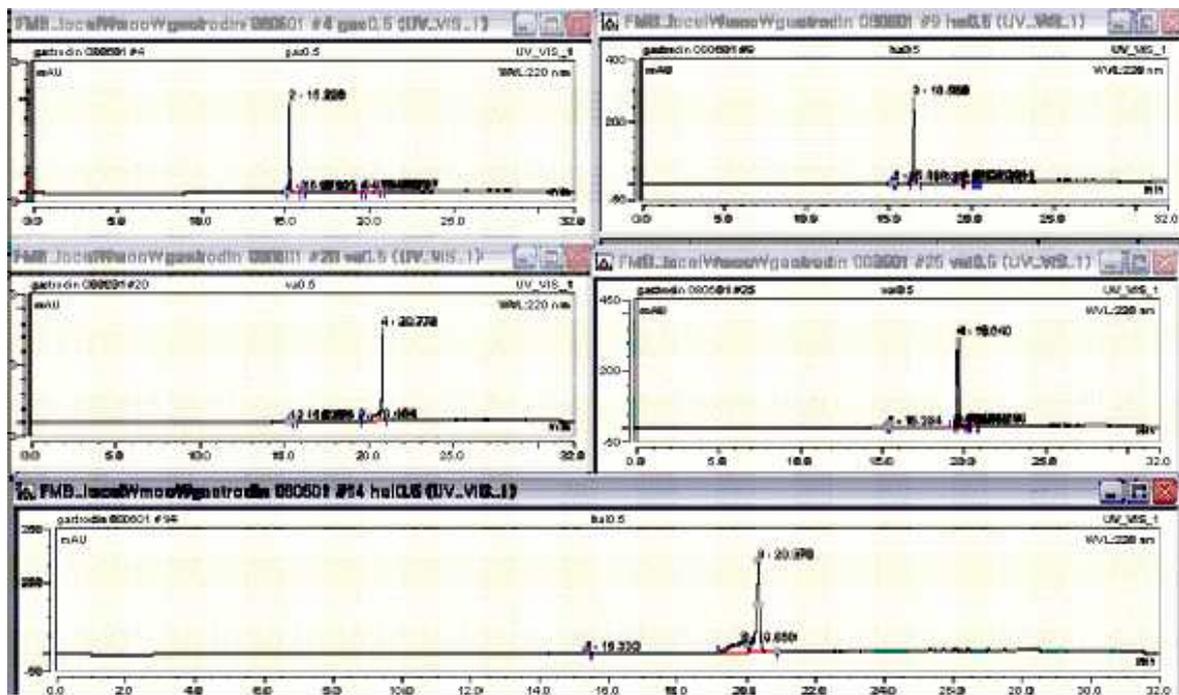


Fig. 39 HPLC analysis of gastrodin, 4-hydroxybenzyl alcohol, 4-hydroxybenzyl aldehyde, vanillin, vanillyl alcohol from the extract of *Gastrodia elata*

천마발효액의 발효시간에 따른 gastrodin의 함량변화를 측정한 결과 발효가 진행될수록 gastrodin의 양의 줄어들고 4-hydroxybenzyl alcohol의 양이 늘어나는 것으로 보다 원래 천마에 함유되어 있었던 gastrodin이 발효에 의해 보다 활성이 높은 형태의 4-hydroxybenzyl alcohol로 전환되는 것을 확인할 수 있었다. 배양이 48시간 정도 지난 후에는 거의 대부분의 gastrodin이 4-hydroxybenzyl alcohol로 전환되어 그 양이 현저히 줄어든 것을 확인할 수 있었다 (Fig. 40).

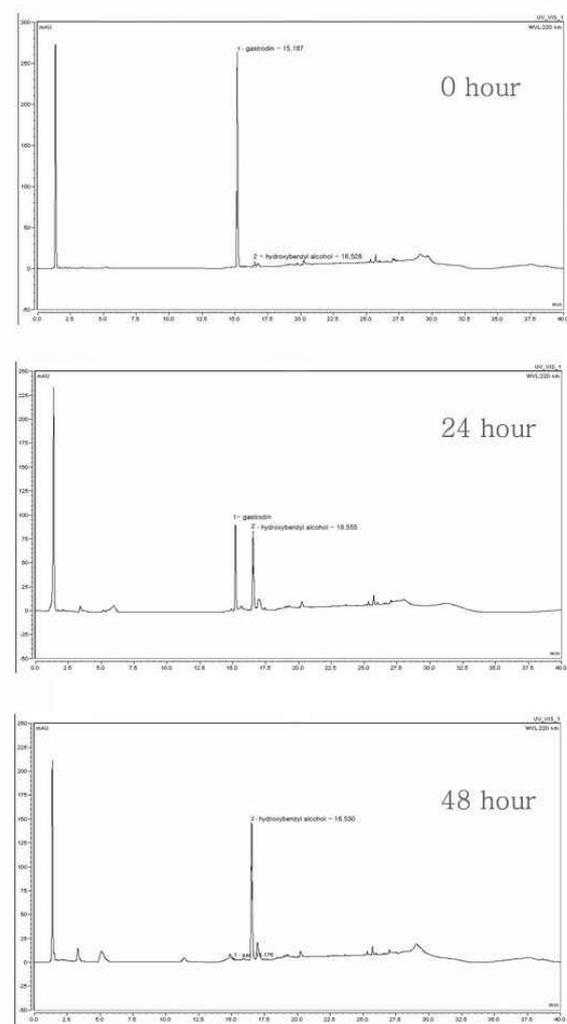


Fig. 40 Conversion of gastrodin to 4-hydroxybenzyl alcohol according to fermentation time.

#### 바. 발효 GABA 천마 시제품의 생산

발효한 GABA 천마의 경우 원료 분말에 비하여 더 진한 갈색을 나타내었으며 천마 특유의 냄새는 상당히 줄어들어 관능성이 향상되었음을 확인 하였다. 생산한 발효 천마는 혈압 조절 동물 실험에 사용하였다.



Fig. 41 Freeze-dried fermentation product of the extract of *Gastrodia elata* by *L. brevis* G100

### 8. 발효 천마의 관능성 제고 연구

동결건조된 발효천마가루를 이용하여 발효천마음료를 만들기 위한 사전 실험으로 기존에 나와 있는 천마음료를 분석하였고, 그에 기반하여 총 20가지의 과일 및 한방농축액을 준비하였다. 종류는 다음과 같다. 가시오가피 농축액, 배농축액(69Brix), 산수유농축액(65Brix), 생강농축액, 솔잎농축액, 칩농축액(65Brix), 계피농축액(65Brix), 오미자농축액, 매실농축액, 대추농축액, 헛개나무열매농축액(65Brix), 블루베리농축액, 석류농축액, 적포도농축액, 딸기농축액, 사과농축액(72Brix), 홍삼농축액, 구기자농축액(65Brix), 더덕농축액(55Brix), 도라지농축액이다. 이 농축액들을 질량대비 천마가루 무게의 50% 또는 100% 해당하는 만큼 각각 일대일로 조합하여 관능검사하여 특유의 불쾌한 향, 맛이 감소되고, 전반적인 관능이 향상되는 것으로 뽑아서 다시 조합하였다. 전체적으로 보았을 때 쓴맛이 나는 한약재의 경우 조합시에 천마의 쓴맛을 더 느끼게 하거나, 천마 특유의 맛을 더 강화하는 효과가 있어 제외하였다. 과일의 경우 신맛이 강하게 느껴지는 매실, 오미자, 석류 등은 천마 특유의 쓴맛을 덮어주는 효과가 있으나 이질감을 형성하여 조합시에 적절한 비율이 필요해 보였다. 향기가 강한 계피와 솔잎의 경우 소량첨가시 천마 특유의 좋지 않은 향을 덮어주는 효과가 있었다. 각 농축액과 일대일 조합으로 맛이 상승되는 것은 총 20가지 중에서 다음과 같았다. 대추농축액, 배농축액, 오미자농축액, 블루베리농축액, 석류농축액, 사과농축액, 계피농축액, 솔잎농축액으로 총 8가지가 선정되었다. 이 종류를 다시 조합하고, 주된 음료물질을 물 또는 우유로 하여 다음과 같은 조성으로 6가지 시료를 선택하였다.

Table 4. Formulation of fermented GE beverage with GABA

(w/w) %	FGE	Pear	Jujube	Schisandra	Pine needle	Cinnamon	Blueberry	Pomegranate	Apple	Water	Milk	Sum
FGE-1	2	2	2	2	1					91		100
FGE-2	2	2	2	2	1						91	100
FGE-3	2	2	2	2		1				91		100
FGE-4	2	2	2	2		1					91	100
FGE-5	2						2	2	2	92		100
FGE-6	2						2	2	2		92	100

관능 평가 결과를 보면 물보다는 우유에 대한 전반적인 기호도가 높은 것을 확인 할 수 있었다. 이는 우유가 천마 특유의 이미를 둔화시키는 작용을 하기 때문으로 보인다. 향미나 색에 있어서 FGE-5가 FGE-1또는 FGE-3보다 높은 점수를 받았다. FGE-5의 경우 신맛이 주를 이루었고, 색깔이 블루베리농축액의 첨가로 인해 와인빛을 띄었는데, 관능검사를 할 때 향미에서 발효천마의 특유의 이취가 가려졌고, 와인빛 색깔이 식욕을 더 자극하는 것으로 보인다. 이는 추후 음료개발시에 신맛의 가미와 와인빛 색의 발현이 관능평가를 올리는 데 긍정적인 작용을 할 것으로 판단된다. 추후 우유를 기준으로 블루베리농축액을 첨가한 조합을 다시 만들어보고, 관능평가를 진행하여 반응표면 분석법의 토대를 살리도록 할 수 있을 것이다.

Table 5. Sensory score of fermented GE beverage with GABA. Each value represents mean

Sample	Flavor	Color	Taste	Overall palatability
FGE-1	2.78	2.89	2.56	2.44
FGE-2	4.78	5.33	4.00	4.78
FGE-3	3.22	3.00	3.56	3.11
FGE-4	5.00	5.11	4.89	4.67
FGE-5	4.44	4.56	2.78	3.11
FGE-6	5.00	5.33	4.56	4.56

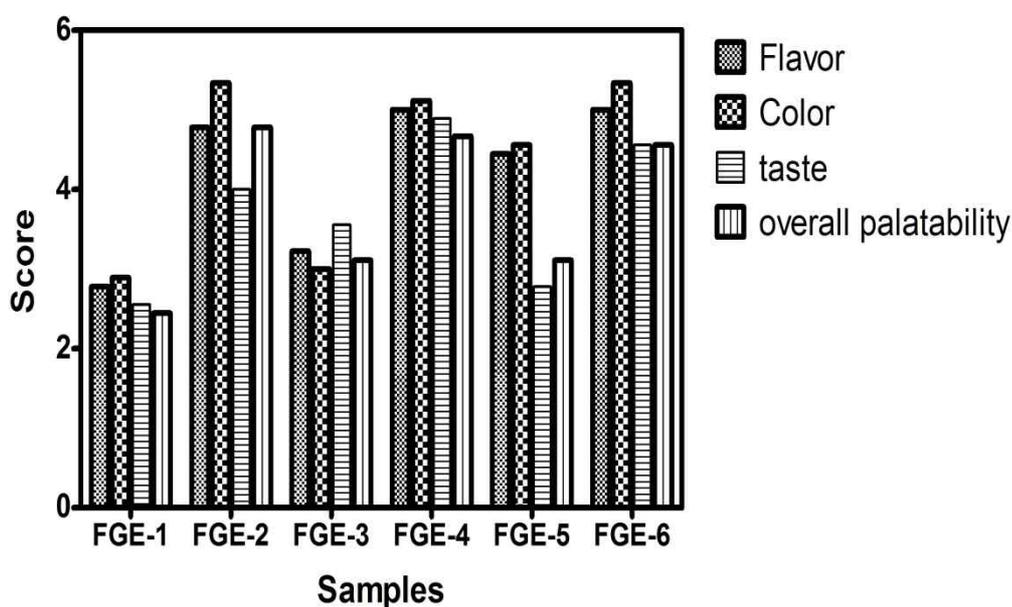


Fig. 42 Sensory score of fermented GE beverage with GABA. Each value represents

mean.

결론적으로, 적절한 배지 배합조건을 찾아 GABA를 함유한 발효천마를 생산하였고, 이를 사용하여 관능을 향상시킨 발효천마음료를 개발할 수 있었다. 천마는 다양한 생리기능성화합물을 지니고 있고, 동물실험, 세포실험을 통하여 뇌, 간병변에 효능이 입증된 천연소재이다. GABA는 신경전달물질로 고혈압 및 뇌혈관질환 예방에 효과가 있다. 글루탐산을 GABA로 생합성할 수 있는 효소를 분비하는 유산균을 이용하여 GABA가 생합성된 발효천마를 얻을 수 있었다. 이 물질은 기존에 천마 농축물을 제품화하고 있는 산업시장에서 GABA를 포함하고 있는 발효식품으로써 항고혈압기능을 위시한 시너지효과를 가진 천마 제품으로 진출 해 볼 수 있을 것이다. 더 나아가 발효천마에 과일농축액, 한방농축액을 우유와 조합시켰을 때 맛이 향상됨을 확인 할 수 있었다. GABA가 함유된 발효천마음료는 항고혈압효과가 있는 새로운 건강기능성식품으로 판매될 수 있을 것이다.

총량(ml)		80	100	160
	%			(w/w)
발효천마	2	1.6	2.0	3.2
블루베리(65Brix)	2	1.6	2.0	3.2
석류(65Brix)	2	1.6	2.0	3.2
사과(72Brix)	2	1.6	2.0	3.2
우유	92	73.6	92.0	147.2
sum	100	80.0	100.0	160.0
GABA함량	mg	139.2	174	278.4



## 제 4 절 발효 천마의 안전성 및 생리활성 연구

### 1. ICR계 마우스에 대한 발효 천마의 급성 경구 독성시험

가. 폐사율

마우스에 대한 경구투여 시 대조군 및 천마 (GE) 및 발효천마(FGE) 100, 250, 500 mg/kg 투여군에서 시험물질 투여 후 1일부터 14일까지 시험 전 기간을 통하여 사망한 예는 관찰되지 않았다 (Table 6)

Table 6. Mortality of ICR mice treated orally with GE and FGE

Group <sup>1)</sup>	Dose (mg/kg)	Days after treatment														Final Mortality <sup>2)</sup>
		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	
GE	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5
	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5
	250	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5
	500	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5
FGE	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5
	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5
	250	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5
	500	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5

1) GE : extract of *Gastrodia elata* (GE) Blume

FGE : extract of *Gastrodia elata* (GE) Blume fermented with lactic acid bacteria

2) Values are expressed as dead number/total number of animals.

나. 체중변화

모든 시험군에서 천마 (GE) 및 발효천마(FGE) 시료를 투여 후 꾸준히 체중이 증가하였으며, 6일째 100 mg/kg 와 500 mg/kg 투여군에서 약간의 체중감소를 보였으나 14일째에는 모두 정상적인 체중증가가 관찰되었다.

마우스에 대한 천마 (GE) 및 발효천마(FGE) 시료 3개 용량으로 경구투여한 군에서 대조군에 비하여 유의성있는 차이를 나타내지 않았다. 또한 투여 용량군 사이의 체중변화는 용량 의존성을 나타내지 않았다 (Table 7). 발효천마(FGE) 시료를 투여한 군에서 체중의 증가가 더디게 일어나는 것을 볼 수 있었다.

Table 7. Body weights of ICR mice treated orally with GE and FGE

Group <sup>1)</sup>	Dose (mg/kg)	No. of animals	Days after treatment(g)					
			0	3	6	9	12	14
GE	0	5	26.9±1.1	27.7±1.0	30.2±1.3	30.5±2.0	31.3±2.0	31.5±1.8
	100	5	28.2±1.3	29.1±1.4	29.6±1.9	30.9±1.9	31.6±1.9	32.4±2.1
	250	5	27.9±1.2	30.1±1.7	29.7±1.8	31.4±1.4	32.7±1.5	33.2±2.3
	500	5	28.1±1.1	30.2±1.4	30.2±1.8	31.2±2.5	31.4±2.2	33.7±1.7
FGE	0	5	26.9±1.1	27.7±1.0	30.2±1.3	30.5±2.0	31.3±2.0	31.5±1.8
	100	5	28.9±1.1	29.7±1.3	30.1±1.9	32.4±2.0	31.8±1.8	32.7±2.0
	250	5	28.4±0.9	30.3±1.9	31.4±1.5	32.5±1.5	32.8±2.1	33.4±1.9
	500	5	27.9±1.2	29.3±1.8	30.2±2.2	32.3±1.8	34.3±2.8	34.4±2.0

1) GE : extract of *Gastrodia elata* (GE) Blume

FGE : extract of *Gastrodia elata* (GE) Blume fermented with lactic acid bacteria

다. 일반 증상

마우스에 대한 천마 (GE) 및 발효천마(FGE) 시료 투여 후 대조군에 비해 특이적으로 관찰된 일반증상의 변화는 없었다 (Table 8).

Table 8. Clinical signs in ICR mice treated orally with GE and FGE

Group <sup>1)</sup>	Dose (mg/kg)	Signs observation					
		Appears normal	Prone position	Decrease of locomotive activity	Decreased respiration rate	Lacrimation	Death
GE	0	5/5 <sup>2)</sup>	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
	100	5/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
	250	5/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
	500	5/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
FGE	0	5/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
	100	5/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
	250	5/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
	500	5/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5

1) GE : extract of *Gastrodia elata* (GE) Blume

FGE : extract of *Gastrodia elata* (GE) Blume fermented with lactic acid bacteria

2) Number of animals with the sign/total number of animals examined.

라. 육안적 해부소견

마우스에 대한 천마 (GE) 및 발효천마(FGE) 시료의 투여에 의하여 해부시 육안적으로 시료 투여에 기인한다고 사료되는 어떠한 유의할 만한 병변을 관찰하지 못하였다 (Table 9). 발효천마(FGE)를 500mg/kg 으로 투여 한 군에서 유의적 무게의 증가가 있었으나 병변은 없었다. 발효천마(FGE) 시료의 500mg/kg 투여와 천마 (GE)를 250mg/kg 와 500mg/kg 으로 투여군에서 신장의 무게가 증가하였으나 육안으로의 병변은 없었다.

Table 9. Organ weights in ICR mice treated orally with GE and FGE

Group <sup>1)</sup>	Dose (mg/kg)	Organ(g)		
		Liver	Kidney	Testis
GE	0	1.50±0.09	0.26±0.03	0.10±0.02
	100	1.54±0.15	0.23±0.01	0.12±0.02
	250	1.51±0.21	0.28±0.03*	0.11±0.01
	500	1.63±0.11*	0.30±0.03*	0.13±0.01*
FGE	0	1.50±0.09	0.26±0.03	0.10±0.02
	100	1.58±0.17	0.25±0.03	0.12±0.01
	250	1.58±0.19	0.26±0.01	0.14±0.01*
	500	1.62±0.21	0.28±0.01*	0.12±0.02

1) GE : extract of *Gastrodia elata* (GE) Blume

FGE : extract of *Gastrodia elata* (GE) Blume fermented with lactic acid bacteria

All values are expressed as mean ± S.D.

\* Significantly different from the control value (\*: p < 0.05)

마. 결 론

이상의 결과로 시험물질인 천마 (GE) 및 발효천마(FGE) 시료는 경구투여 시 마우스에서 아무런 급성독성을 나타내지 않았고, LD50값은 마우스에서 경구투여 최고용량 400 mg/kg 이상일 것으로 사료된다.

## 2. SD계 흰쥐에 대한 발효천마의 아급성경구독성시험 연구 결과

### 가. 일반증상 및 사망동물

시험 전 기간 동안 대조군을 포함한 천마 (GE) 및 발효천마(FGE) 시료 투여군 모두에서 사망한 동물은 없었다 (Table 10). 또한 모든 동물에서 시험물질 투여후 자발적인 운동 및 호흡율의 증가 등과 같은 특이할 만한 임상증상은 관찰되지 않았으며 최종투여일에 실시한 안구검사에서도 특이한 안구부위의 이상소견은 관찰되지 않았다 (Table 11).

Table 10. Mortality in rats orally treated with GE and FGE for 14 days

Group <sup>1)</sup>	Dose (mg/kg)	Days after treatment														Final Mortality <sup>2)</sup>
		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	
GE	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5
	1,000	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5
FGE	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5
	1,000	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5

1) GE : extract of *Gastrodia elata* (GE) Blume

FGE : extract of *Gastrodia elata* (GE) Blume fermented with lactic acid bacteria

2) Values are expressed as dead number/total number of animals.

Table 11. Clinical signs in rats orally treated with GE and FGE for 14 days

Group <sup>1)</sup>	Dose (mg/kg)	Signs observation					
		Appears normal	Prone position	Decrease of locomotive activity	Decreased respiration rate	Lacrimation	Death
GE	0	5/5 <sup>2)</sup>	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
	1,000	5/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
FGE	0	5/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
	1,000	5/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5

1) GE : extract of *Gastrodia elata* (GE) Blume

FGE : extract of *Gastrodia elata* (GE) Blume fermented with lactic acid bacteria

2) Number of animals with the sign/total number of animals examined.

### 나. 체중변화

시험물질을 투여한 후 14 일 동안 체중 변화를 관찰하였을 때, 대조군 및 시험물질 투여군에서 시간이 경과함에 따라 모두 정상적인 체중증가가 관찰되었다 (Table 12). 시험물질 투여군은 대조군에 비하여 체중이 증가하였으나, 이는 천마 (GE) 및 발효천마(FGE) 시료의 치료 효과로 인정되며 시험물질의 부작용으로 인정되지 않았다. 시험물질 투여에 따른 외견상의 임상소견은 발견되지 않았으며 사료섭취량과 음수량도 대조군과 유의성 있는 차이를 나타내지 않았다.

Table 12. Body weight of rats orally treated with GE and FGE for 14 days

Group <sup>1)</sup>	Dose (mg/kg)	No. of animals	Days after treatment(g)					
			0	3	6	9	12	14
GE	0	5	150.5±4.2	182.1±3.5	190.2± 9.3	194.7±12.4	198.4±20.1	200.9±18.2
	1,000	5	150.1±3.8	184.4±4.6	197.1±11.1	200.3±19.8	203.7±19.4	203.9±13.6
FGE	0	5	150.5±4.2	182.1±3.5	190.2± 9.3	194.7±12.4	198.4±20.1	200.9±18.2
	1,000	5	150.3±5.2	188.5±4.9	193.8±9.7	200.7±14.3	202.9±17.2	204.6±19.5

1) GE : extract of *Gastrodia elata* (GE) Blume

FGE : extract of *Gastrodia elata* (GE) Blume fermented with lactic acid bacteria

All values are expressed as mean ± S.D.

다. 혈액학적 검사

혈액학적 검사 소견은 Table 13에 요약하였다. 적혈구 용적을 제외한 모든 혈액학적 검사 항목에서 투여군과 대조군 사이에 통계학적으로 유의한 차이를 나타내지 않았다 (Table 13).

Table 13. Levels of hematological analysis in rats orally treated with GE and FGE for 14 days

Group <sup>1)</sup>	Dose (mg/kg)	WBC	RBC	HB	HCT	MCV	MCH	MCHC	PLT
GE	0	12.1 ±4.2	7.2 ±0.4	14.9 ±0.9	42.8 ±0.9	59.5 ±2.2	19.9 ±0.5	34.0 ±1.2	805.7 ±99.0
	1,000	12.5 ±4.1	7.0 ±0.6	15.2 ±1.1	43.1 ±2.8*	59.2 ±1.9	20.1 ±0.8	33.6 ±0.9	821.7 ±137.3
FGE	0	12.1 ±4.2	7.2 ±0.4	14.9 ±0.9	42.8 ±0.9	59.5 ±2.2	19.9 ±0.5	34.0 ±1.2	805.7 ±99.0
	1,000	13.0 ±3.9	7.7 ±0.6	15.9 ±0.8	42.3 ±2.8*	61.4 ±1.9	20.7 ±0.5	33.1 ±0.6	808.9 ±241.3

1) GE : extract of *Gastrodia elata* (GE) Blume

FGE : extract of *Gastrodia elata* (GE) Blume fermented with lactic acid bacteria  
 All values are expressed as mean  $\pm$  S.D.

WBC, white blood cell count (10<sup>3</sup>/mm<sup>3</sup>); RBC, red blood cell count (10<sup>6</sup>/mm<sup>3</sup>); HB, hemoglobin (g/dl); HCT, hematocrit (%); MCV, mean corpuscular volume (fl); MCH, mean corpuscular hemoglobin (pg); MCHC, mean corpuscular hemoglobin concentration (%); PLT, platelet (10<sup>6</sup>/mm<sup>3</sup>)

라. 혈액생화학적 검사

시험물질에 의한 혈액생화학적검사 결과를 Table 14에 요약하였다. 모든 혈액생화학적 검사 항목에서 투여군과 대조군 사이에 통계학적으로 유의한 차이를 나타내지 않았다 (Table 14).

Table 14. Levels of serum biochemical analysis in rats orally treated with GE and FGE for 14 days

Group <sup>1)</sup>	Dose (mg/kg)	Protein (g/dL)	ALB (g/dL)	BUN (mg/dL)	Creatinine (mg/dL)	Globulin (g/dL)	A/G Ratio	AST (IU/L)	ALT (IU/L)	ALP (U/L)
GE	0	5.2 $\pm 0.9$	2.9 $\pm 0.4$	15.5 $\pm 2.6$	0.5 $\pm 0.1$	2.1 $\pm 0.6$	1.3 $\pm 0.1$	81.3 $\pm 29.4$	34.9 $\pm 12.4$	222.3 $\pm 68.6$
	1,000	5.3 $\pm 0.3$	3.0 $\pm 0.3$	15.9 $\pm 3.0$	0.5 $\pm 0.1$	2.3 $\pm 0.4$	1.4 $\pm 0.3$	83.6 $\pm 12.5$	30.9 $\pm 8.1$	215.7 $\pm 33.7$
FGE	0	5.0 $\pm 0.9$	2.9 $\pm 0.4$	15.5 $\pm 2.6$	0.5 $\pm 0.1$	2.1 $\pm 0.6$	1.3 $\pm 0.1$	81.3 $\pm 29.4$	34.9 $\pm 12.4$	222.3 $\pm 68.6$
	1,000	5.4 $\pm 0.9$	2.9 $\pm 0.4$	15.7 $\pm 3.1$	0.5 $\pm 0.2$	2.4 $\pm 0.4$	1.4 $\pm 0.2$	83.0 $\pm 14.8$	32.1 $\pm 10.2$	220.3 $\pm 46.1$

1) GE : extract of *Gastrodia elata* (GE) Blume

FGE : extract of *Gastrodia elata* (GE) Blume fermented with lactic acid bacteria  
 All values are expressed as mean  $\pm$  S.D.

마. 육안소견 및 장기중량의 변화

시험물질 투여에 의한 육안 소견상 이상이 있는 개체는 관찰되지 않았다. 모든 투여 군에서 시험물질 투여에 의한 변화는 인정되지 않았다 (Table 15).

Table 15. Organ weights in rats orally treated with GE and FGE for 14 days

Group <sup>1)</sup>	Dose (mg/kg)	Organ(g)		
		Liver	Kidney	Testis
GE	0	7.45±0.72	0.75±0.06	1.47±0.05
	1,000	7.34±0.52	0.75±0.04	1.48±0.05
FGE	0	7.45±0.72	0.75±0.06	1.47±0.05
	1,000	7.40±0.73	0.79±0.05	1.43±0.07

1) GE : extract of *Gastrodia elata* (GE) Blume

FGE : extract of *Gastrodia elata* (GE) Blume fermented with lactic acid bacteria

All values are expressed as mean ± S.D.

#### 바. 결 론

이상과 같이 천마 (GE) 및 발효천마(FGE) 시료에 대한 아급성독성시험에서 체중, 일반증상, 사료섭취량, 음수량, 혈액학적 검사, 혈액생화학적 검사, 육안적 소견, 장기 중량, 병리조직학적 검사 등에서 특이한 독성병변은 관찰되지 않았으며, 본 시험조건에서 천마 (GE) 및 발효천마(FGE) 시료의 SD계 흰쥐에 대한 14 일간 반복 경구 투여 시 무관찰 부작용량은 1,000 mg/kg 이상인 것으로 인정되었다.

### 3. 발효천마의 항산화 활성 연구 결과

천마 및 발효천마의 유리라디칼 소거능 등의 항산화성을 탐색하기 위해 아래와 같은 방법을 사용하였다.

#### 1) 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl(DPPH) 라디칼 소거능

0.1mM DPPH(methanol solution) 3.8mL과 천마 및 발효천마 에탄올 추출물을 희석하여 각각을 0.2mL 첨가 후 암실에서 30분간 반응시키고, UV-spectrophotometer를 이용하여 517nm에서 흡광도를 측정하였다. 라디칼 소거능 결과는 vitamin C 표준곡선을 작성한 뒤 비교하여 비타민 C equivalent로 나타내었다.

#### 2) 2,2'-Azinobis-3-ethyl-benzothiazoline-6-sulfonic acid(ABTS) 양이온 소거능

ABTS 양이온 생성을 위해 7mM ABTS 수용액과 2.45mM potassium persulfate를 혼합하여 암실에서 16시간 반응 시킨 뒤, UV-spectrophotometer를 이용하여 734nm에서의 흡광도가  $0.700 \pm 0.050$ 이 되도록 ethanol에 희석하여 실험에 사용하였다. 시료 0.05mL을 ABTS 양이온이 형성된 시약 1.9mL에 각각 첨가하여 상온정치 후, 6분 동안 반응시켜 UV-spectrophotometer를 이용하여 734nm에서 흡광도를 측정하였다. 결과는 DPPH법과 동일하게 비타민 C equivalent로 나타내었다.

#### 3) 총 페놀함량 분석(Total Phenolic Content)

시료 0.25mL와 증류수 4mL, 증류수와 1:1(v/v)로 희석한 Folin-Denis 시약 0.25mL을 첨가하여 30초간 혼합하고 5분간 반응시킨 뒤, 포화된 sodium carbonate 0.5mL을 첨가하여 30분간 정치시킨다. UV-spectrophotometer를 이용하여 725nm에서 흡광도를 측정 후 tannic acid 표준곡선을 작성하여 비교하였다.

#### 4) 통계분석

본 연구의 결과는 세 번 반복하여  $\text{mean} \pm \text{SD}$ 로 표시하였으며, 그룹간의 통계적 유의성은 SPSS program을 이용하여, t-test 분석을 실시하여 유의성이 0.05 이하인 것을 유의한 값으로 판정하였다.

가. DPPH 라디칼 소거능

천마와 발효천마의 DPPH 라디칼 소거능은 Fig. 43에 나타내었다. 발효천마의 경우 본 실험에 사용하였던 에탄올에 용고되어 천마만의 라디칼 소거능을 측정 한 결과, 천마의 농도 2500, 5000, 7500, 10000ppm의 농도에 따라 각각 4.3, 9.6, 17.4ppm의 비타민C 효과를 나타내었다.

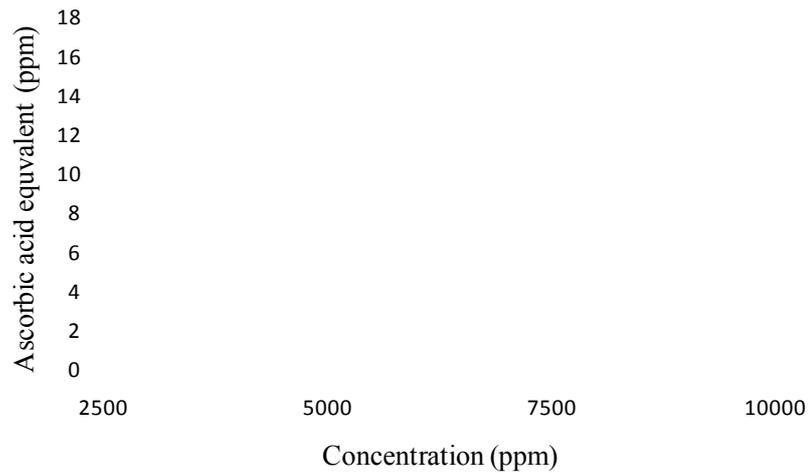


Fig. 43 DPPH Radical scavenging activity of Gastrodia elata Blume

나. ABTS 양이온 소거능

천마와 발효천마의 ABTS 양이온 소거능 실험 결과는 <그림 44>에 나타내었다. 발효천마가 천마보다 ABTS 라디칼 소거능이 유의적으로 높았다( $p < 0.05$ ).

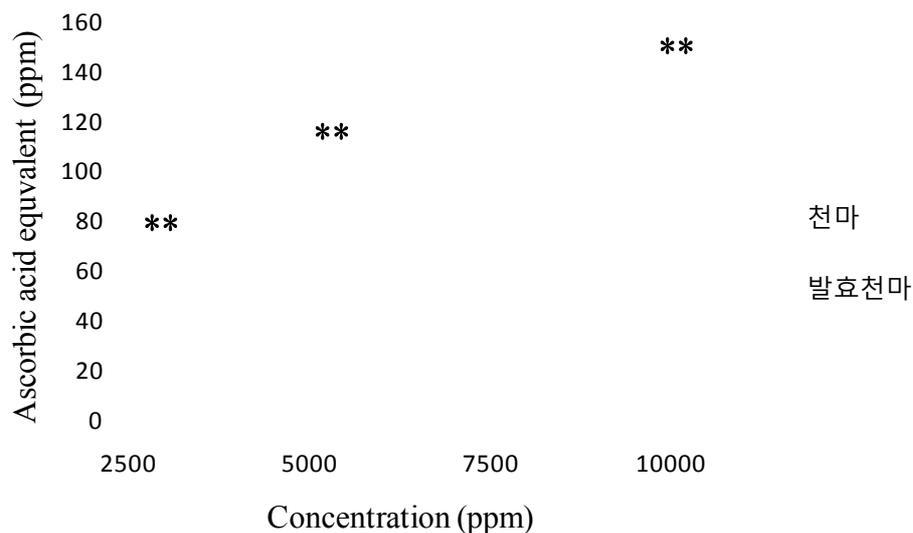


Fig. 44 Hydroxy Radical scavenging activity of Gastrodia elata Blume

ABTS 양이온과 비타민C를 이용하여 작성된 표준곡선은 그림 3에 나타내었다. 결과적으로

2500, 5000, 7500, 10000ppm에 따라 나타내는 천마의 양이온 소거능은 121.2, 88.0, 55.4ppm 비타민C 효과를 보였고, 발효천마의 경우는 145.0, 119.3, 75.0ppm 비타민C 효과를 보여 발효천마가 각각의 농도에서 천마보다 더 강력한 양이온 소거능을 보이는 것으로 관찰할수 있었다.

다. 총 페놀함량 분석 (Total Phenolic Content)

천마와 발효천마의 총 페놀함량은 <그림 45>에 나타내었다. 발효천마가 천마보다 페놀성 성분 함량이 유의적으로 높은 것으로 나타났다(p<0.05).

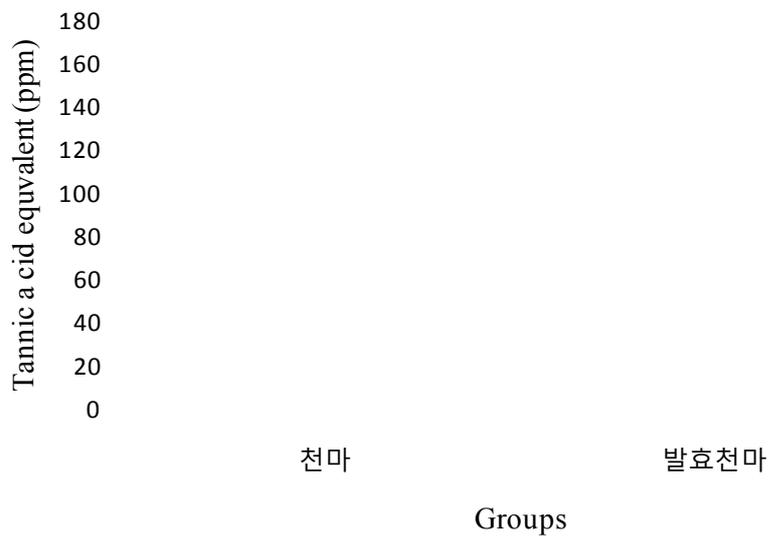


Fig. 45 Total phenolic content of Gastrodia elata Blume

○ 천마와 발효천마 각각 같은 농도인 10000ppm으로 하였으며, 이는 각각 121.4, 134.4ppm의 tannic acid에 해당하는 페놀 성분을 함유하고 있었다.

○ 본연구결과, DPPH 라디칼 소거능, ABTS 양이온 라디칼 소거능 및 총 페놀함량 측정 결과를 통해 발효천마가 천마보다 유의적으로 높은 전자공여능, 라디칼 소거능 및 페놀성 성분 함량을 나타내었다.

4. 발효천마의 혈압조절효과

○ 본 시험은 10주령 나이의 고혈압이 유발된 랫드를 이용하여, 시험물질의 혈압조절 및 뇌 기능에 미치는 영향을 관찰함으로써 고혈압에 대한 치료 효능을 알아보기 위해 수행하였다.

○ 정상군(WKY군)과 음성대조군(SHR군)을 두었으며, 시험물질 500, 1000 및 2000 mg/kg 투여군을 설정하였고, 최초 혈압 체크 10주령 나이에 WKO와 SHR군의 통계적 유의성의 혈압차이를 본 후 8주 동안 경구 반복투여하여 그 치료효능을 검토하였다.

○ 혈압조절능을 보기위하여 10주령의 고혈압이 유발된 랫드 SHR을 이용하여, 시험물질을 8 주 반복 투여하여, 체중증가, 식이효율, 혈액내 지질, 고혈압 (수축기압, 이완기압, 심박수)을 측정하였다.

○ 본 시험동물 SHR의 경우 심혈관 대사성 심장비대증 및 심장비대가 오랫동안 지속되면 심장의 벽이 얇아지는 확장성 심근증 (dilated cardiomyopathy) 과 같은 형태적, 기능적 장애 (decompensation) 로 발전하게 되고, 결국에는 심부전 (heart failure) 으로 전개 되는데 이에 심장비대 및 심부전능을 확인 할 것이며 숫컷의 경우 전립선 비대증 모델로도 널리 알려져 있기에 더불어 효능 평가를 실시한다.

○ 시험물질의 조제는 예비조제를 통해 멸균용수에 현탁되므로 이 상태로 사용하였고, 특별한 부형제를 사용하지 않았다. 조제물의 분석은 조제한 시험물질의 안정성 및 균질성은 조제시와 투여시에 육안으로 확인한 결과 발열, 발색 등의 변화는 관찰되지 않았고, 고농도 일수록 점도(점성)가 높은 것으로 확인되었다. 농도 분석은 별도로 실시하지 않았다.

○ 일반식이(18% Protein, 2018S)를 공급하였고, 공급원 명칭은 Harlan Laboratories Inc, USA 8520 Allison이며 급이방법 및 급이량은 급이기에 사료를 넣고, 자유섭취 시켰다. 투여경로 및 투여횟수는 최초 혈압장비를 이용하여 그룹핑을 한후, 시험물질을 매일 1 회, 총 8 주간 경구 투여하였다. 경구투여용 존대가 부착된 일회용 주사기를 이용하여 위내에 경구 투여하였다.

## 가. 시험재료 및 방법

### 1. 시험물질

물질명 FG 10 (천마 발효추출물/ 학명 *Gastrodia elata* Blume)- Fermented *Gastrodia elata*

### 2. 시험물질의 조제

(1) 부형제의 명칭 및 선택이유 : 시험물질은 멸균용수에 현탁되어 이 상태로 사용하였고, 특별한 부형제를 사용하지 않았다.

(2) 조제물의 분석 : 조제한 시험물질의 안정성 및 균질성은 조제시와 투여시에 육안으로 확인한 결과 발열, 발색 등의 변화는 관찰되지 않았고, 고농도 일수록 점도(점성)가 높은 것으로 확인되었다.

### 3. 시험계

(1) 종 및 계통 랫드, WKY/ SHR

(2) 구입처 : 명 칭 (주)두얼바이오텍 (주 소 서울특별시 서초구 양재동 153)

(3) 공급원 : 명 칭 Harlan Laboratories Inc, USA 8520 Allison (주 소 Pointe Blvd,suite 400, Indianapolis,IN 46250)

(4) 시험계 선정이유 : SHR 랫드는 본태성 고혈압모델로 항고혈압 효능시험에 널리 사용되고 있으며 WKY 랫드는 SHR 랫드의 정상군(Wild type)으로 사용된다. 이에 항고혈압 치료능을 비교하기에 적합하기에 선정하였다.

(5) 성별 및 동물수 수컷, 60 마리(입수시) / 56 마리(투여시)

(6) 주령 및 체중범위 입수시: 8, 9 주령, WKY 130 ~ 175 g, SHR 180 ~ 215 g  
투여시: 9, 10 주령, WKY 170 ~ 205 g, SHR 215 ~ 240 g

(7) 반입동물의 개체번호표기법 :입수시 체중 측정순으로 유성매직을 이용하여 개체식별법에 따라서 꼬리에 표기하였다.

(8) 검역.순화방법 및 기간 : 일주간의 검역..순화기간 중에 매일 1회 일반증상 관찰을 실시하였다. 반입시 및 검역..순화기간 종료시 체중을 측정하여 시험 실시에 적합한 건강한 동물을 선발하였다.

(9) 군분리법 : 검역..순화기간 종료시, 체중 증가량에 이상이 없는 개체를 선별하였으며, 정상 군은 별도로 하고, 혈압분석기를 이용 수축기압, 이완기압을 기준으로 군분리 하였고, 군평균 및 표준편차를 계산하여 군간 균등하게 동물을 배치하였다.

(10) 개체식별방법 :군분리 종료 후 사육상자에는 개체식별카드를 부착하고, 개체식별은 유성매직을 이용하여 개체식별법에 따라 꼬리에 표시하였다.

(11) 잔여동물의 처리 : 잔여동물은 안락사 시켰다.

### 4. 사료

(1) 종류 : 일반식이(18% Protein, 2018S)

(2) 구입처 : 명 칭 (주)두얼바이오텍 (주 소 서울특별시 서초구 양재동 153)

(3) 공급원 : 명 칭 Harlan Laboratories Inc, USA 8520 Allison (주 소 Pointe Blvd,suite 400, Indianapolis,IN 46250)

(4) 급이방법 및 급이량 : 급이기에 사료를 넣고, 자유섭취 시켰다.

### 5. 음수

(1) 종류 : 필터와 유수살균기를 이용하여 여과·살균된 정제수

(2) 급수방법 : 폴리카보네이트제 음수병(500 mL)에 정제수를 넣어 자유섭취 시켰다.

### 6. 투여

(1) 투여경로 및 투여횟수 : 최초 혈압장비를 이용하여 군을 분리 한 후, 시험물질을 매일 1 회, 총 8 주간 경구 투여하였다.



Fig.46 Experimental Design

(2) 투여방법 : 경구투여용 존데가 부착된 일회용 주사기를 이용하여 위내에 강제 경구 투여 하였다.

### 7. 군구성

Table 16. Experimental Groups

군 (Group)	투여용량 (mg/kg)	투여액량 (ml/kg)	마리수 (N수)
G1(정상군)+ 대조군	0	10	7
G2(정상군)+ 시험물질투여군(저용량)	500	10	7
G3(정상군)+ 시험물질투여군(중용량)	1000	10	7
G4(정상군)+ 시험물질투여군(고용량)	2000	10	7

그룹명/ WKY		Dose	n Number
G1	WKY Control	Sterile water	7 (7)
G2	WKY FG L	FG 500mg/kg	7 (7)

G3	WKY FG M	FG 1000mg/kg	7 (7)
G4	WKY FG H	FG 2000mg/kg	7 (7)
그룹명 / SHR		Dose	n Number
G1	SHR Control	Sterile water	7 (7)
G2	SHR FG L	FG 500mg/kg	7 (7)
G3	SHR FG M	FG 1000mg/kg	7 (7)
G4	SHR FG H	FG 2000mg/kg	7 (7)

WKY rat - Wild type, SHR rat - Disease type

#### 나. 관찰 및 평가항목

##### (1) 체중 측정 및 전체 체중증가량

시험동물의 체중은 군분리시(시험물질 투여직전) 및 투여 개시일부터 부검당일 까지 주 5~6 회 측정하였고, 전체 체중증가량은 부검 전일에 측정한 체중에서 실험 개시시의 체중을 빼어 산출하였다.

##### (2) 식이섭취량 측정 및 식이효율 산출

식이섭취량은 개체별로 시험물질 투여 개시일부터 부검당일까지 주 2 회 사료공급량 및 잔량을 측정하였으며, 평균 식이섭취량은 4 주간의 1 일 평균식이섭취량으로 하였고, 식이효율은 평균 체중증가량을 1 일 평균 식이섭취량으로 나누어 산출하였다.

##### (3) 혈액학, 생화학적 검사

관찰기간 종료 시 생존동물은 이소푸르란/질소/산소를 이용 흡입 마취 하에서 대동맥(abdominal aorta)으로부터 채혈하였고, 채혈한 혈액 중 혈액학적 검사를 위하여 약 1 mL을 CBC 분석기 (BECKMAN COULTER AC.Tdiff™,USA)로 검사하였다. 이후 나머지를 혈액을 원심분리하여 얻은 혈청 또는 혈장에 대하여 자동분석기(7020, HITACHI, JAPAN)를 이용하여 다음 항목들의 검사를 실시, 적정 투여량에서의 독성평가도 확인하였다.

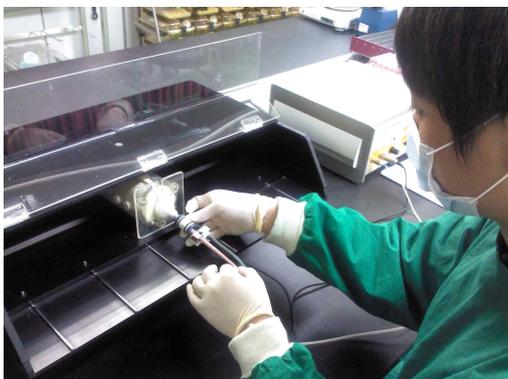


Fig. 47 Measurement of blood pressure

(4) 고혈압 유효성 평가

시험동물의 혈압은 0, 1, 2, 4, 8주차에 검사하였고, 분석항목은 수축기압, 이완기압, 심박수 등을 분석 실시하였다.

(5) 조직병리검사

시험 종료후 동물의 부검, 검체제작, 슬라이드 판독 과정을 거쳐 심혈관 및 특정 장기를 적출/고정 후 유효성 및 독성평가를 확인 실시하였다.

다. 자료의 통계처리

모든 시험결과는 평균치와 표준편차를 사용하여 나타내었으며, 각 군간의 비교는 ANOVA (software StatView: version 4.51, Abacus Concepts, Berkeley, CA).를 사용하고 음성대조군과 시험물질투여군을 비교하여 1%, 5%의 유의수준에서 유의성을 검증하였다

라. 시험결과

(1) 체중 및 고혈압관련 인자

WKY(Wild)군과 SHR(Disease)군 10주령 동물을 선별하여 체중의 변화를 관찰하고 (Fig. 48) 0일차에 고혈압의 인자인 Systolic, Diastolic blood pressure, Cardiac Beats Per Minute (BPM) 수치를 유의성 있게 차이가 있는 상태에서 8주간의 시험 진행한 결과 음성대조군에 비해 유의성 있는 결과를 보여주었다. (Table 17-21, Fig 48-53). 고혈압 관련 수치를 검토해 보면 SHR(Disease)군에서 FG10 군의 모든 투여군에서 2주차부터 음성대조군에 비해 유의성있게 정체하거나 감소하는 결과를 8주 시험종료까지 보여 주었다. 하지만 WKY(Wild)군에 못 미치는 결과이지만 Crude한 상태의 물질로 보았을 때 큰 성과로 사료된다. 고혈압 관련 합병인 비만관련 체중엔 크게 효력을 보이진 않았다.

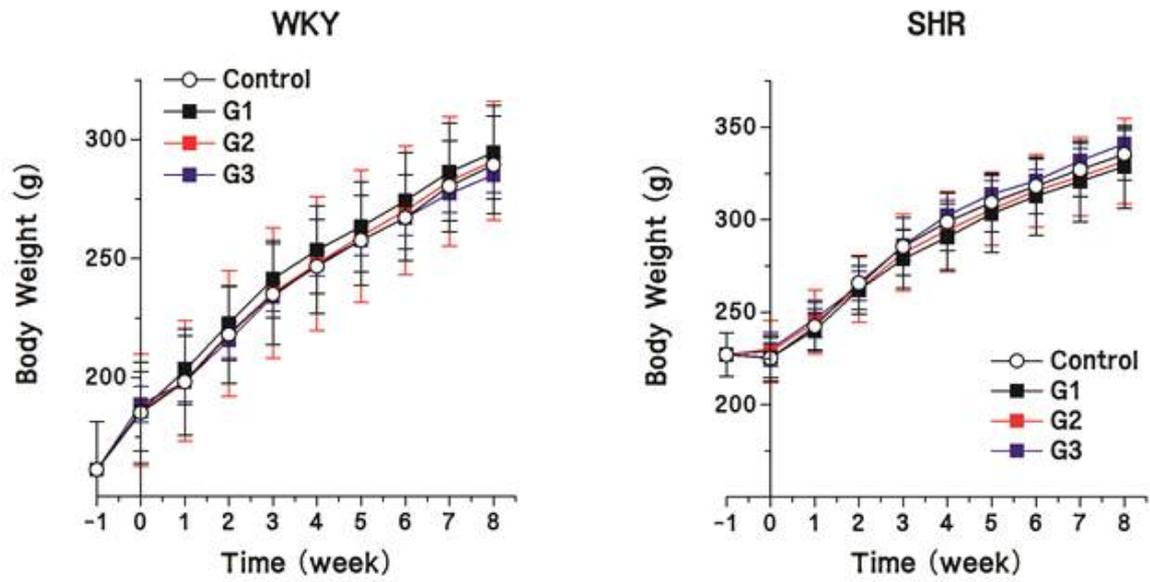


Fig. 48 Weight Change

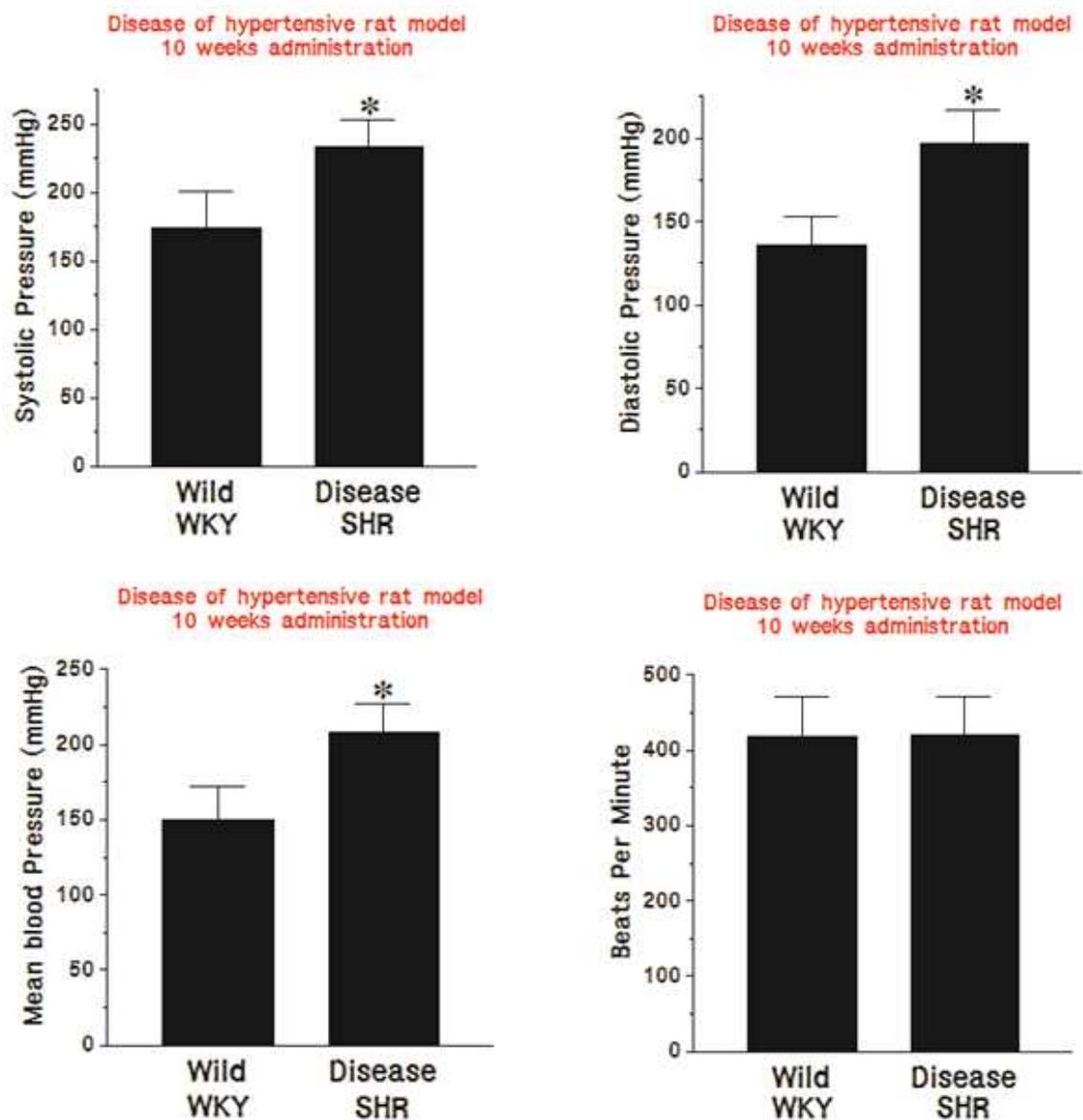


Fig. 49 Change of Parameters in Hypertensive rat model  
(\* vs. Wild(WKY) )

Table 17. Disease of hypertensive rat models (Group summary)

Group	Systolic Pressure (mmHg)			Pressure Gain (mmHg)
	WKY	SHR		
Mean	173.7	234.3##		60.6##
Whole S.D	17.1	27.0		9.9
N	42	42		88

WKY : Wista kyoto (SHR wild type)

SHR : Spontaneously hypertension rats

N : Number of animals

Significantly different from WKY vs SHR (# ; P<0.05, ## ; P<0.01)

Table 18. Change of Systolic blood pressure (Group summary)

Condition	Group	Mean ± STDEV				
		0 weeks	1 weeks	2 weeks	4 weeks	8 weeks
WKY rat -Wild type	G 1	173.7 ± 27.6	173.7 ± 17.9	171.4 ± 6.4	163.1 ± 13.3	171.1 ± 12.4
	G 2	173.1 ± 12.3	170.1 ± 8.8	167.5 ± 10.4	158.0 ± 18.1*	171.7 ± 10.5
	G 3	173.6 ± 10.1	172.1 ± 3.4	171.9 ± 6.7	164.1 ± 11.0	169.8 ± 10.5
	G 4	174.3 ± 23.0	172.3 ± 12.1	170.1 ± 8.6	166.1 ± 12.4	170.8 ± 7.6
SHR rat -Disease type	G 1	233.7±19.0###	239.7±17.1##	235.3±16.9##	245.0±23.4###	255.6±14.7##
	G 2	234.6 ± 28.0	235.1 ± 8.9	225.9 ± 11.5*	244.9 ± 18.0	250.4 ± 17.9
	G 3	233.6 ± 29.7	237.7 ± 26.0	222.8 ± 10.8*	233.7± 15.2	245.3 ± 8.6*
	G 4	234.4 ± 30.2	235.4 ± 21.5	225.4 ± 10.5*	226.7 ± 16.4*	237.4 ± 6.4*

WKY : Wista kyoto (SHR wild type)

SHR : Spontaneously hypertension rats

N : Number of animals

Significantly different from WKY vs SHR (\* ; P<0.05, \*\*; P<0.01)

Significantly different from G1 vs G2~G4 (# ; P<0.05, ## ; P<0.01)

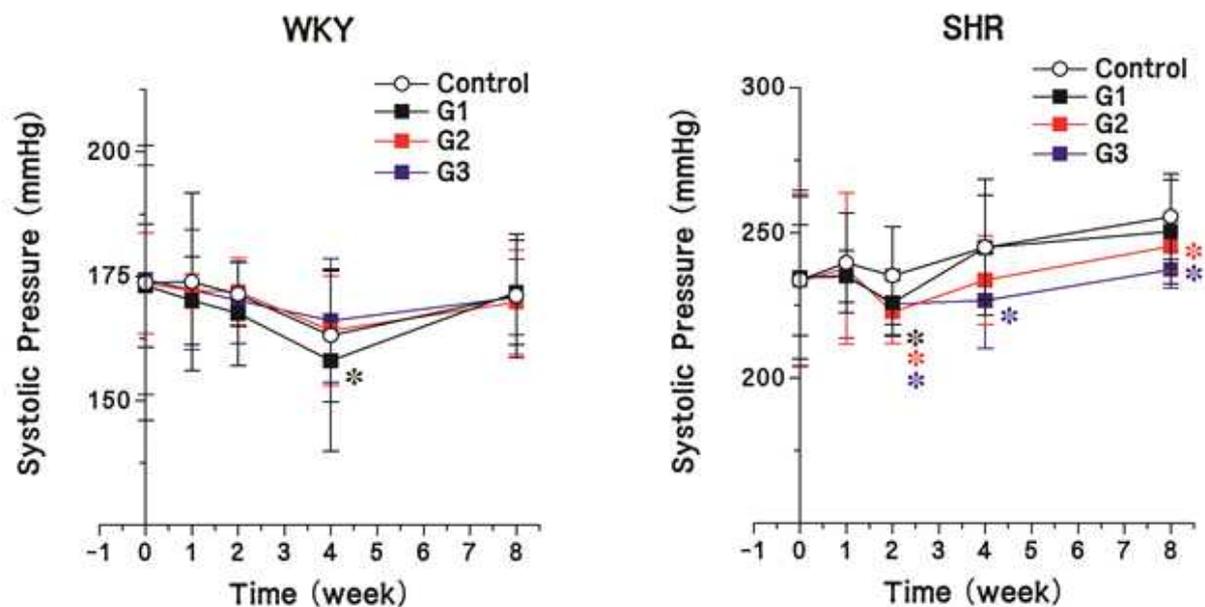


Fig. 50 Systolic blood pressure

Table 19. Change of Diastolic blood pressure (Group summary)

Condition	Group	Mean ± STDEV				
		0 weeks	1 weeks	2 weeks	4 weeks	8 weeks
WKY rat -Wild type	G 1	135.4 ± 17.7	123.9 ± 17.3	118.9 ± 10.1	116.6 ± 11.0	110.6 ± 18.2
	G 2	133.1 ± 16.2	115.6 ± 23.4	115.3 ± 7.2*	111.6 ± 8.0	113.0 ± 10.7
	G 3	131.1 ± 14.5	134.7 ± 11.4	119.9 ± 10.6	112.6 ± 8.3	112.0 ± 14.0
	G 4	139.9 ± 28.8	109.4 ± 18.1	105.5 ± 8.4	119.5 ± 9.9	122.5 ± 11.7
SHR rat -Disease type	G 1	196.9 ± 19.6###	193.9 ± 15.1###	184.7 ± 13.4###	182.2 ± 33.1###	192.6 ± 17.6###
	G 2	188.1 ± 30.8	192.1 ± 19.7	181.4 ± 15.1	176.8 ± 38.6	182.4 ± 25.8
	G 3	192.3 ± 44.1	202.4 ± 19.5	179.4 ± 10.0	171.2 ± 28.6	184.9 ± 14.6
	G 4	195.6 ± 24.0	201.7 ± 25.0	178.1 ± 12.9	140.1 ± 16.5**	188.9 ± 13.6

WKY : Wista kyoto (SHR wild type)

SHR : Spontaneously hypertension rats

N : Number of animals

Significantly different from WKY vs SHR (\* ; P<0.05, \*\*; P<0.01)

Significantly different from G1 vs G2~G4 (# ; P<0.05, ## ; P<0.01)

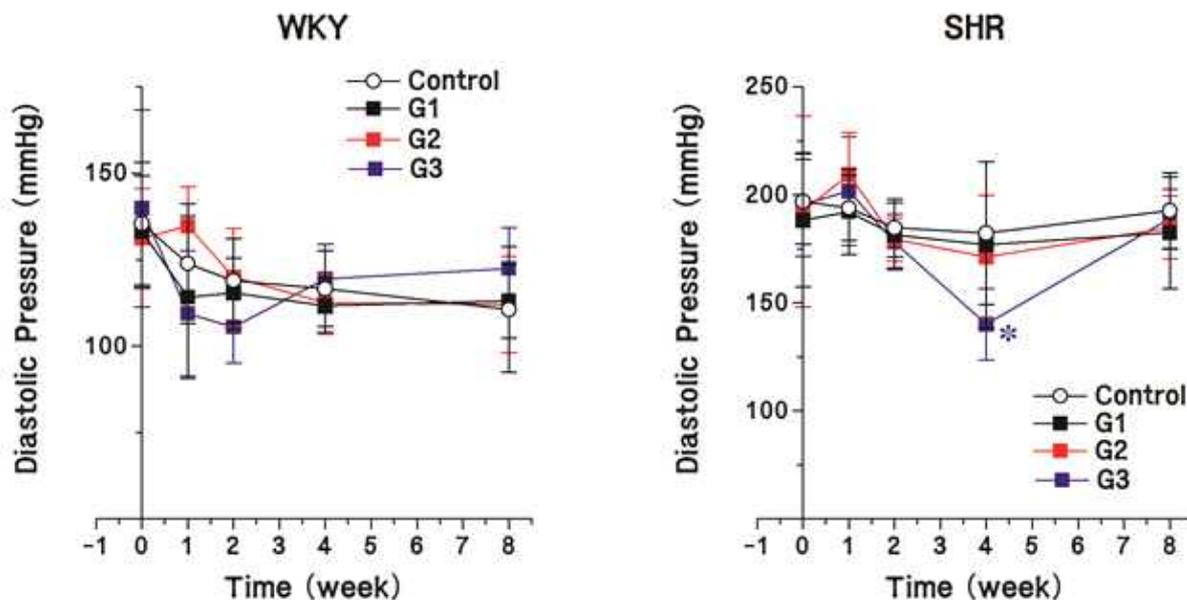


Fig. 51 Diastolic blood pressure

Table 20. Change of Mean blood pressure (Group summary)

Condition	Group	Mean ± STDEV				
		0 weeks	1 weeks	2 weeks	4 weeks	8 weeks
WKY rat -Wild type	G 1	149.3 ± 22.7	140.1 ± 16.0	136.6 ± 10.1	137.4 ± 9.0	134.3 ± 10.0
	G 2	142.9 ± 12.7	133.0 ± 17.9	132.1 ± 7.2	129.8 ± 9.2	132.5 ± 9.6
	G 3	143.1 ± 11.7	137.9 ± 6.3	136.4±10.6	129.9 ± 9.7	130.4 ± 12.5
	G 4	151.0 ± 27.1	129.1 ± 15.1	126.3 ± 8.4	133.5 ± 9.2	133.9 ± 12.3
SHR rat -Disease type	G 1	208.0±19.5##	208.7±14.4##	201.1±12.1##	203.3±26.5##	212.8±16.4##
	G 2	203.9 ± 29.9	206.1 ± 14.3	195.6 ± 11.5	199.1 ± 30.4	195.9 ± 23.3*
	G 3	207.4 ± 39.6	211.3 ± 21.7	193.6 ± 9.7	191.8 ± 23.2	200.0 ± 12.6*
	G 4	208.1 ± 25.2	214.0 ± 24.3	193.1 ± 11.3	168.6±15.3**	201.4 ± 10.1

WKY : Wista kyoto (SHR wild type)

SHR : Spontaneously hypertension rats

N : Number of animals

Significantly different from WKY vs SHR (\* ; P<0.05, \*\*; P<0.01)

Significantly different from G1 vs G2~G4 (# ; P<0.05, ## ; P<0.01)

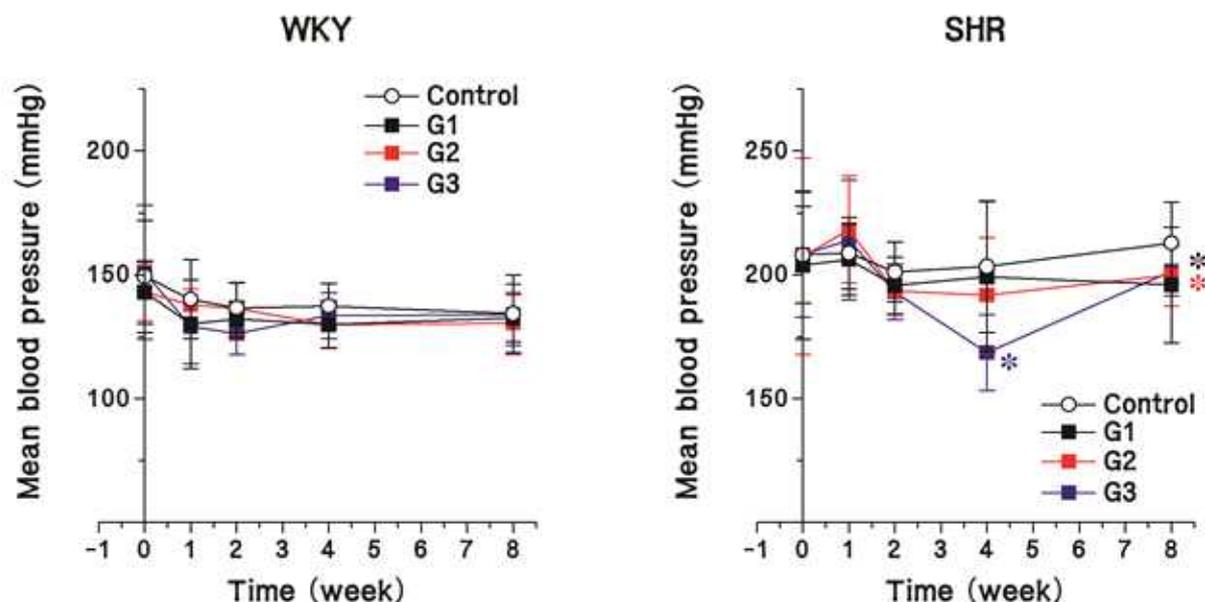


Fig. 52 Mean blood pressure

Table 21. Change of Cardiac Beats Per Minute (Group summary)

Condition	Group	Mean ± STDEV				
		0 weeks	1 weeks	2 weeks	4 weeks	8 weeks
WKY rat -Wild type	G 1	417.9 ± 53.2	440.0 ± 57.9	414.2 ± 75.9	417.7 ± 76.1	460.4 ± 44.7
	G 2	448.6 ± 38.5	368.4 ± 87.4	397.9 ± 72.8	389.1 ± 81.6	416.1 ± 77.6*
	G 3	411.4 ± 97.6	367.9 ± 35.5	404.4 ± 77.4	406.5 ± 43.2	413.4 ± 56.9*
	G 4	429.3 ± 62.9	411.0 ± 71.2	422.3 ± 58.7	402.6 ± 46.7	418.9 ± 61.1*
SHR rat -Disease type	G 1	419.6 ± 52.4	405.9±89.6###	406.2 ± 40.6#	401.7 ± 10.2#	411.0±42.3##
	G 2	408.6 ± 48.6	400.0 ± 107.0	406.6 ± 77.4	413.9 ± 33.7	390.4 ± 43.0
	G 3	414.4 ± 89.9	383.0 ± 95.3	393.9 ± 59.0	380.6 ± 59.6	396.0 ± 52.9
	G 4	417.9 ± 53.9	403.0 ± 70.6	394.0 ± 52.2	392.4 ± 49.2	398.3 ± 45.0

WKY : Wista kyoto (SHR wild type)

SHR : Spontaneously hypertension rats

N : Number of animals

Significantly different from WKY vs SHR (\* ; P<0.05, \*\*; P<0.01)

Significantly different from G1 vs G2~G4 (# ; P<0.05, ## ; P<0.01)

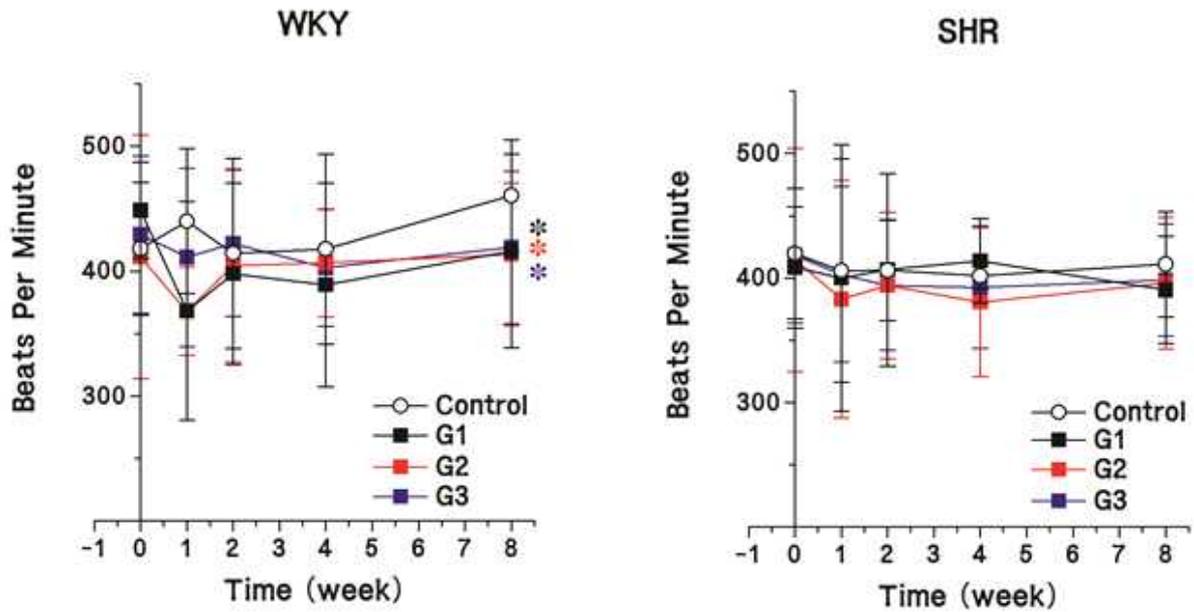


Fig. 53 Cardiac Beats per Minute

(2) 혈액 및 혈장내 생화학적 검사

혈액학 분석에서는 만성모델임에도 불구하고 WKY(Wild)군과 SHR(Disease)군간의 차이가 없는 상태에서 모든 물질간의 차이를 보이진 않았다. 하지만 혈액내 혈장을 분리하여 혈장내의 생화학검사를 한 결과 유전적인 원인 고혈압으로 인한 비만증진으로 간질환효소(GOT, GPT, T.Bil) 콜레스테롤류(Total chol, HDLchol, LDL chol)나 중성지방(TG)등을 통계적 유의성있는 결과는 아니지만 감소시키는 경향을 보여주었다. 신장관련 BUN, Creatinine, ALB등은 모두 정상이었다 (Fig. 54-59).

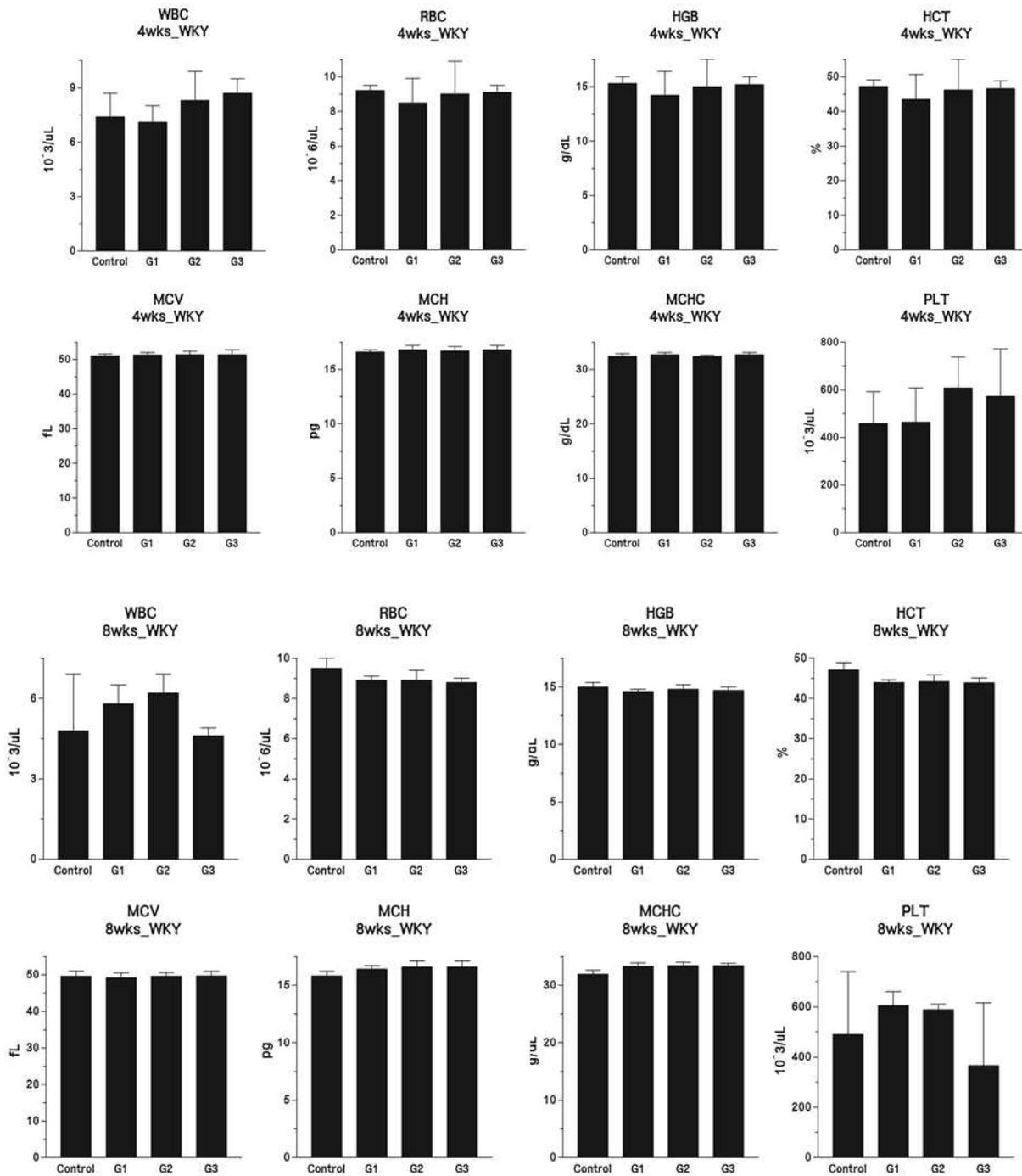


Fig. 54 Hematological parameters at 4 and 8weeks WKY rats (\* vs. G1 (VEH))

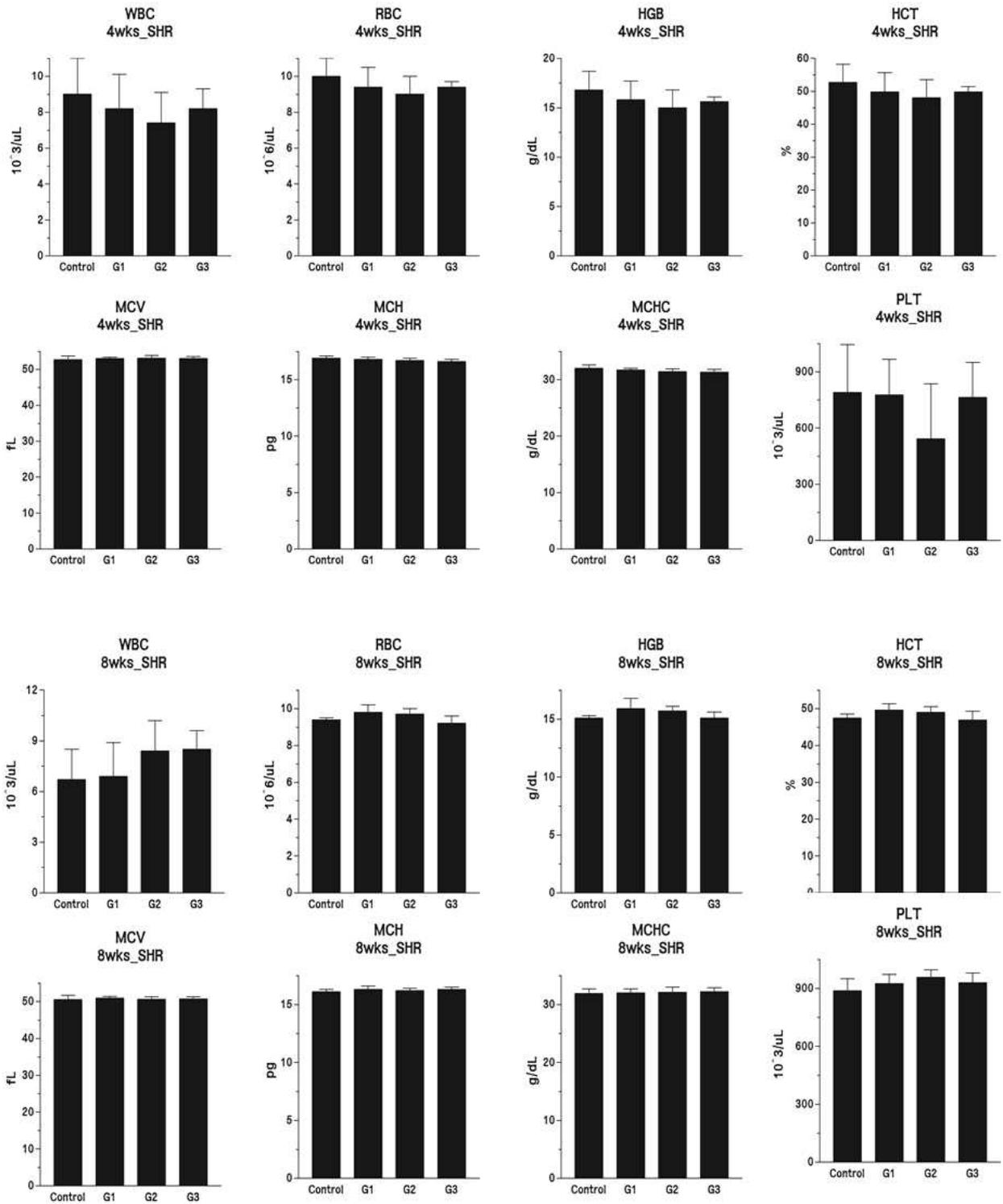


Fig. 55 Hematological parameters at 4 and 8weeks SHR rats (\* vs. G1 (VEH))

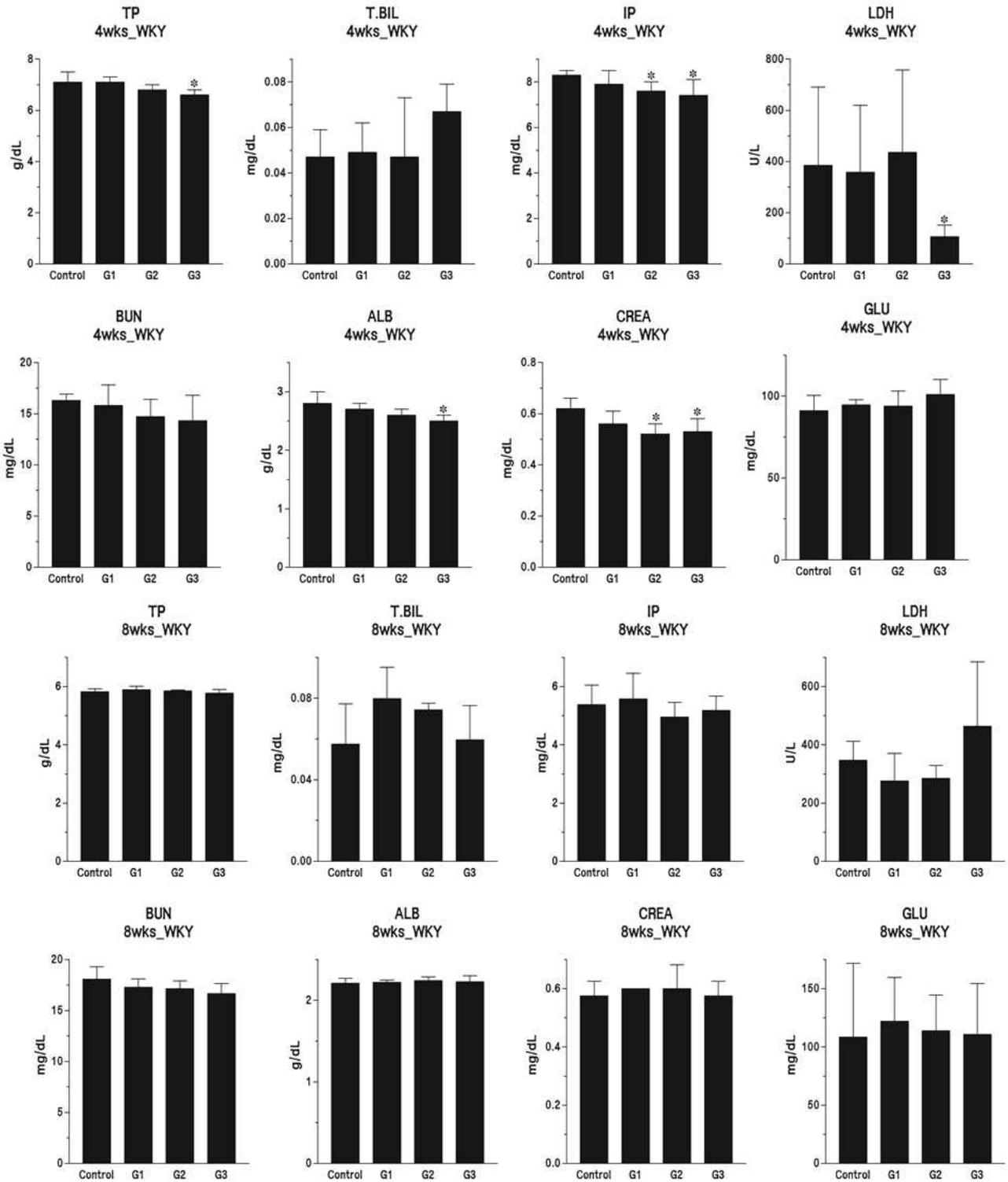


Fig. 56 Biochemical blood parameters at 4 and 8 weeks WKY rats (\* vs. G1 (VEH))

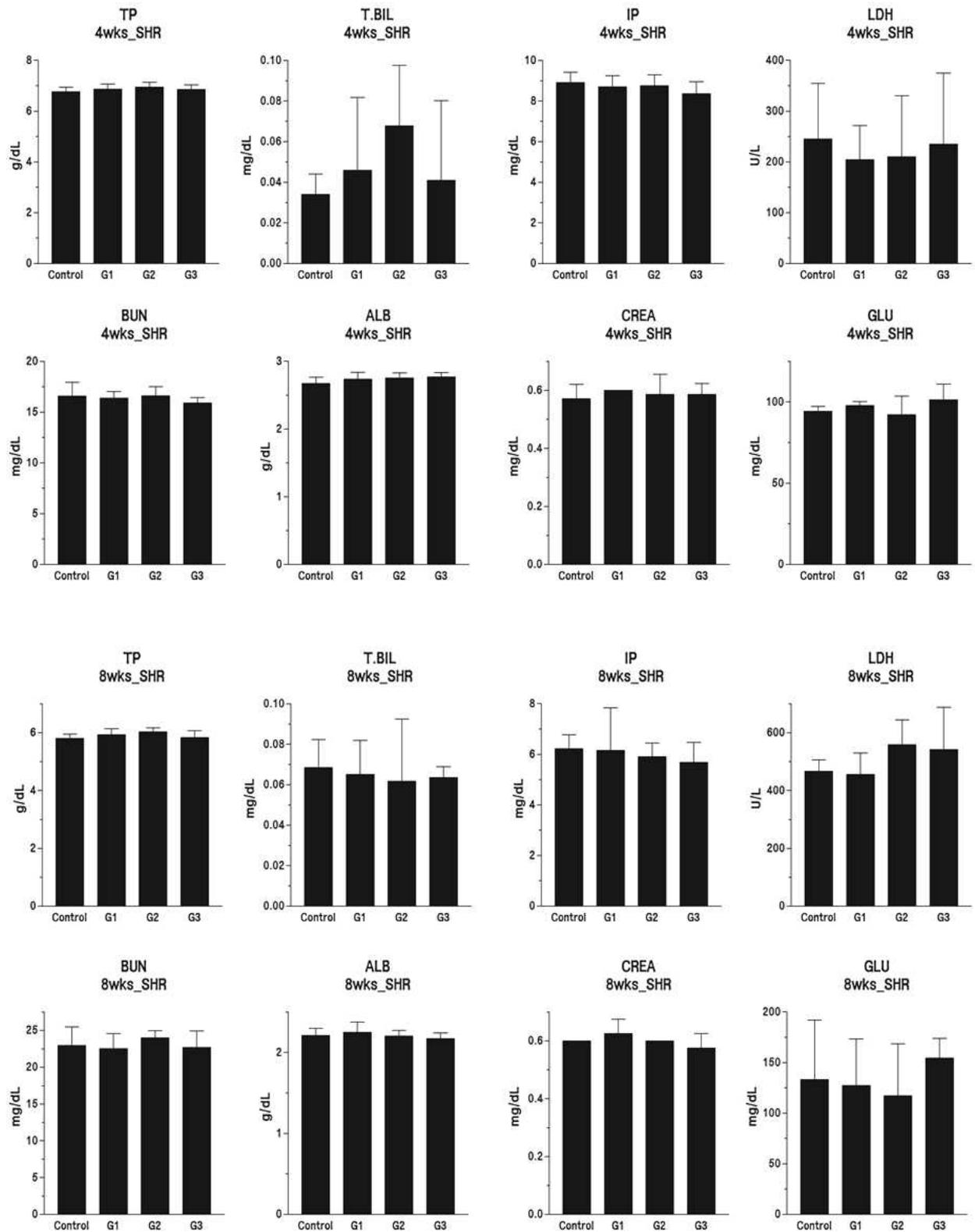


Fig. 57 Biochemical blood parameters at 4 and 8 weeks SHR rats (\* vs. G1 (VEH))

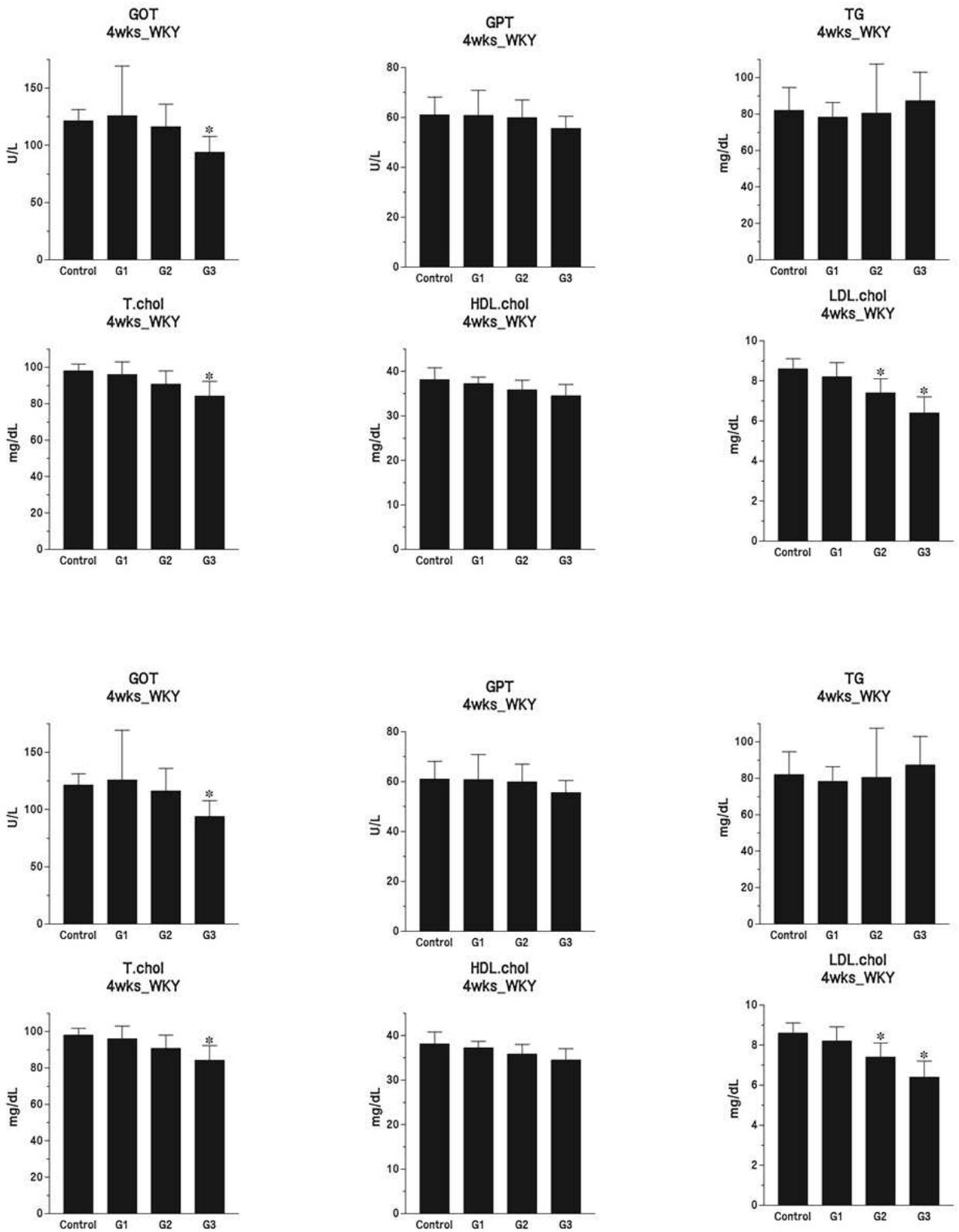


Fig. 58 Biochemical blood parameters at 4 and 8 weeks WKY rats (\* vs. G1 (VEH))

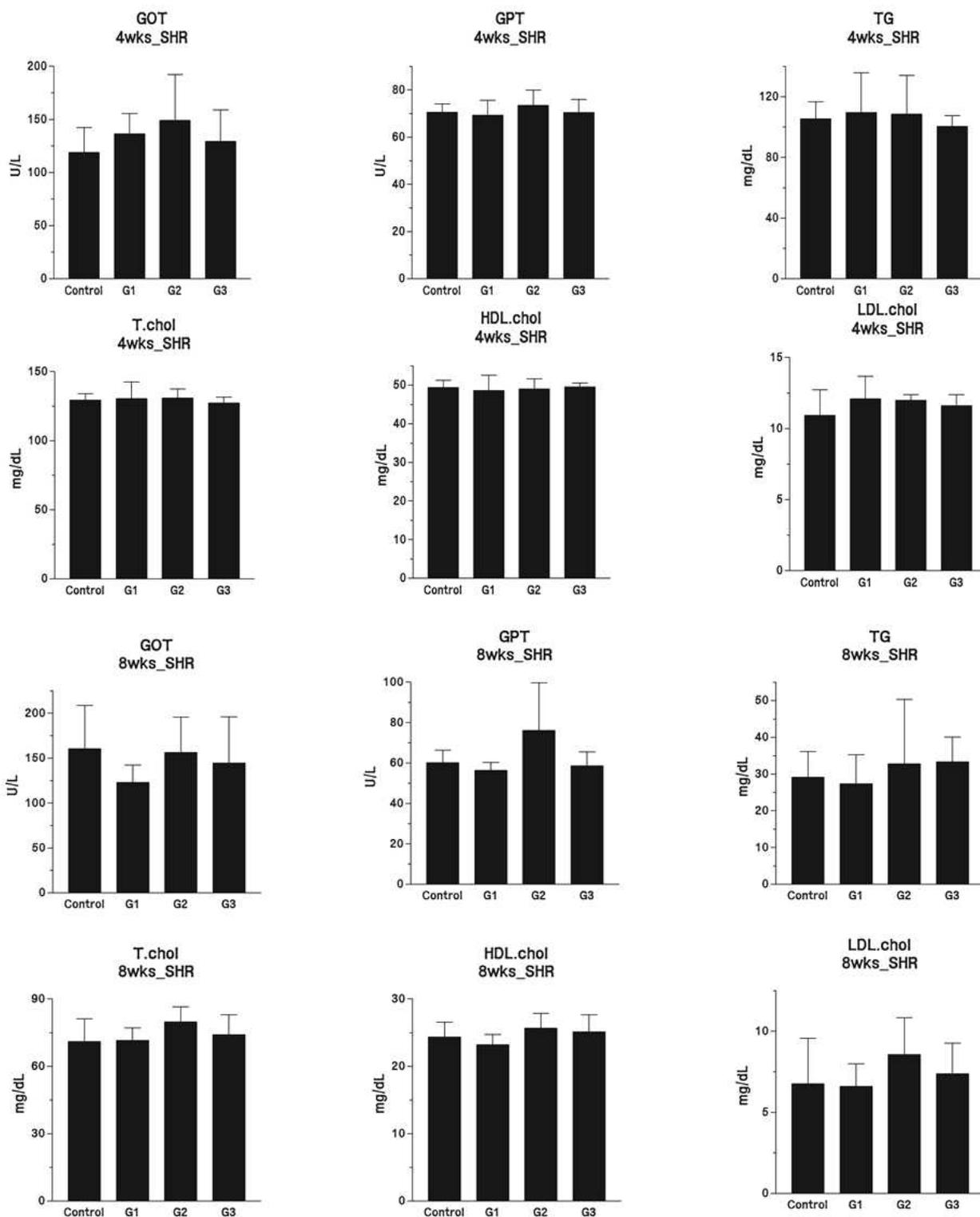


Fig. 59 Biochemical blood parameters at 4 and 8 weeks SHR rats (\* vs. G1 (VEH))

### (3) 장기 무게 및 비대증

모든 군에서 샘플에 의한 각각의 장기무게에 큰 영향을 보이진 않았지만, 특정부위 지방부위 중 Epididymal, Mesentric, Peritoneal fat 부위에서 감소하는 경향을 보였으며, SHR rat 만성모델에서 장기비대증 관련 cardiac hypertrophy(심장비대증), renal hypertrophy(신장비대증), Benign prostatic(전립선비대증)이 유발되는 것으로 보고가 되어 있다. 비대증 분석은 Tibia Length(TL, mm)에 대한 심장, 신장, 전립선의 무게(mg)의 비율(ratio)을 측정하여, WKY, SHR 대조군 대비 장기비대의 정도를 확인하여 Hypertrophy 를 평가하였다 (Fig. 60-63). 측정된 결과 심장, 신장, 전립선에서 비대가 감소하는 경향을 보여주었다, 특히 전립선비대에 대해선 통계적 유의성 있는 결과를 얻었다. 성장상태를 보여주는 부위로 Bone(Tibia, 정강이뼈) length, Brain weigh을 낸 결과 동물의 Growth상태엔 영향을 미치지 않는 것으로 사료된다.

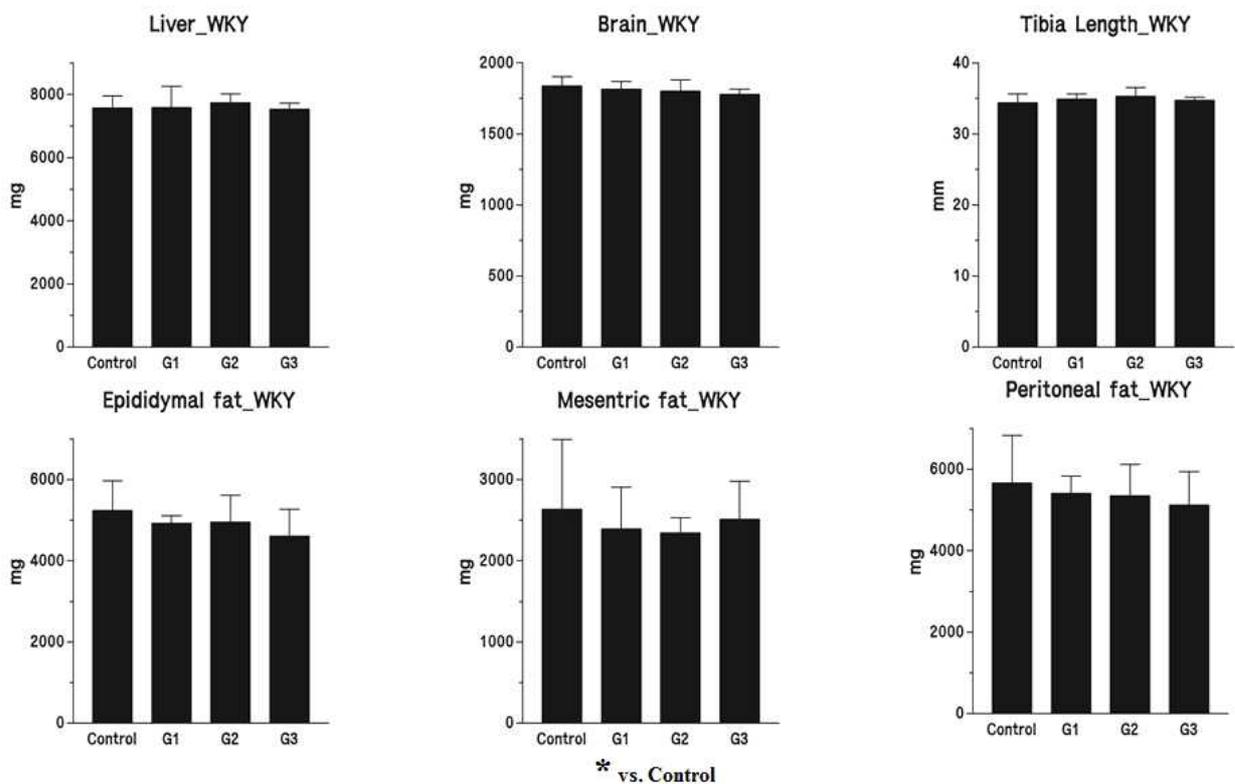


Fig. 60 Tissue weigh and growth of WKY rats (\* vs. control)

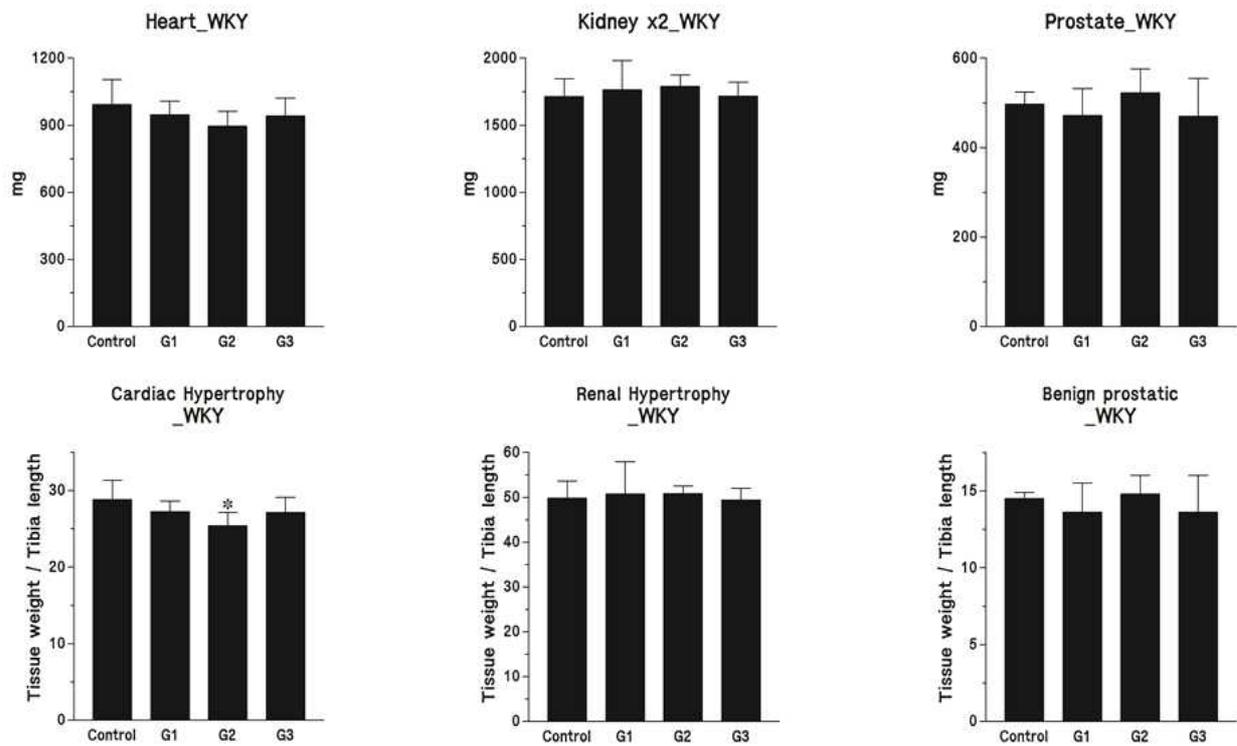


Fig. 61 Tissue hypertrophy of WKY rats (\* vs. control)

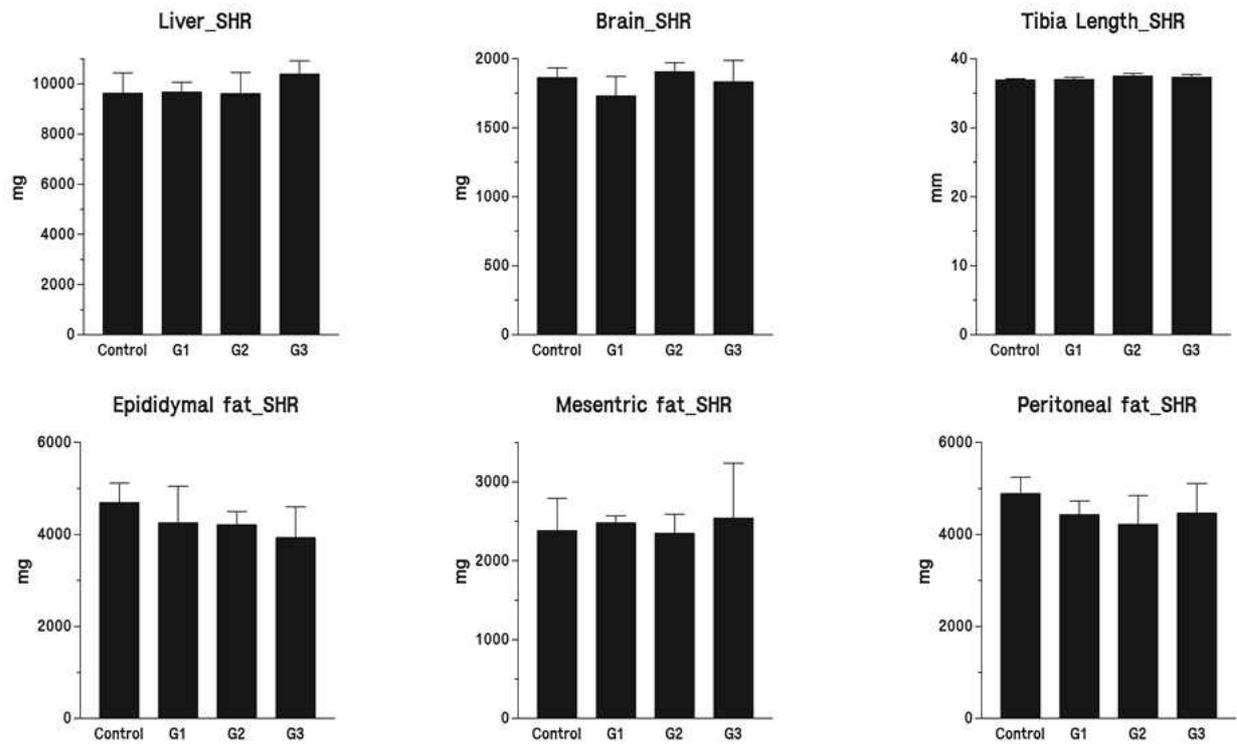


Fig. 62 Tissue weigh and growth of SHR rats (\* vs. control)

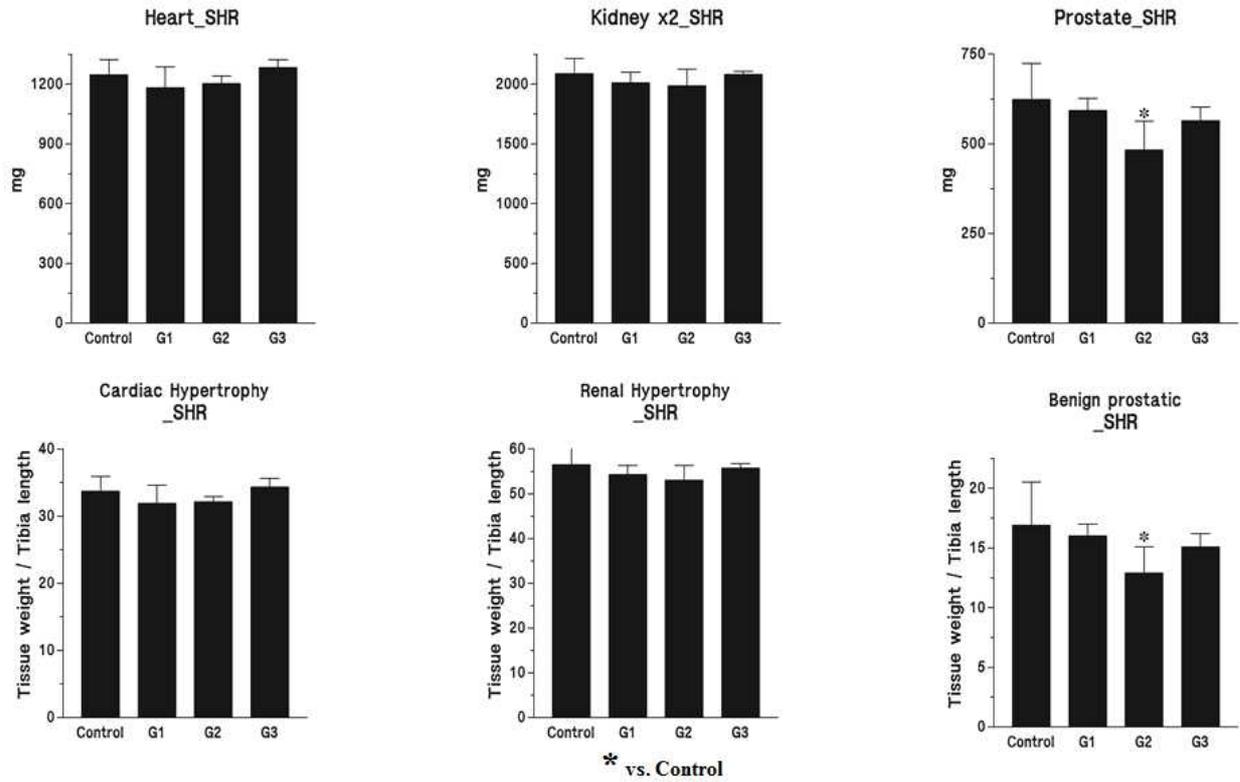


Fig. 63 Tissue hypertrophy of SHR rats (\* vs. control)

이상의 결과로, 시험물질 FG 10은 본 실험조건하에서 500, 1000, 2000mg/kg 모든 투여량에서 고혈압에 대한 관련 인자들을 정체 또는 감소 시켜주는 것으로 확인되었다. 이모든 결과물들은 에너지 대사 활성화 작용의 다중효과에 의한 것으로 사료된다.

## 5. 가바(GABA)강화 천마발효식품의 중대뇌동맥 폐색 및 재관류모델 효능평가

### 가. 연구목적

본 시험은 6주 SD rat을 이용하여 8주간 가바 강화시킨 천마발효물질을 존대를 이용하여 강제로 먹인 후 중대뇌동맥 폐색 및 재관류(MCAO/R)를 진행하여 신경학적 장애 및 뇌경색부위를 측정하여 가바 강화시킨 천마발효식품의 뇌기능 개선에 예방 효능 평가를 목적으로 하였다. 정상군(sham)과 MCAO/R Control군을 두었으며, MCAO/R 치료예방군으로 시험물질 각각 500, 1000, 2000 mg/kg투여군을 설정하였고, 56일 동안 경구 반복 투여한 후 MCAO/R를 유도하여 예방효능을 검토하였다.

### 나. 재료 및 방법

#### 1. 시험물질

- (1) 물질명 : FG(천마 발효 추출물/ 학명 *Gastrodia elata* Blume)- Fermentation *Gastrodia elata*
- (2) 외관 및 색상 : 밝은갈색의 분말
- (3) 순도 : 99.9%
- (4) 보존조건 : 저온(2~4°C보관)

#### 2. 시험물질의 조제

##### (1) 부형제의 명칭 및 선택이유

시험물질은 예비조제를 통해 멸균용수에 용해, 현탁되므로 이 상태로 사용하였고, 특별한 부형제를 사용하지 않았다.

##### (2) 조제물의 분석

조제한 시험물질의 안정성 및 균질성은 조제시와 투여시에 육안으로 확인 한 결과 발열, 발색 등의 변화는 관찰되지 않았고, 고농도 일수록 현탁액의 컬러가 짙은 것으로 확인되었다. 농도분석은 별도로 실시하지 않았다.

#### 3. 시험계

- (1) 종 및 계통 : 랫드, SD rat
- (2) 시험계 선정이유 : SD rat은 뇌기능 효능 시험을 위한 MCAO/R 유도 동물로 비교하기에 적합하기에 선정하였다.
- (3) 성별 및 동물수 : 수컷, SD rat 37마리(입수시) / 35 마리(투여시)
- (4) 주령 및 체중범위 : SD rat 5주령, 150 ± 20g
- (5) 반입동물의 개체번호표기법 : 입수 시 체중 측정 순으로 유성매직을 이용하여 개체식별법에 따라서 꼬리에 표기하였다.
- (6) 검역.순화방법 및 기간 : 일주간의 검역 • 순화기간 중에 매일 1회 일반증상 관찰을 실시하였다. 반입시 및 검역. 순화기간 종료 시 체중을 측정하여 시험 실시에 적합한 건강한 동물을 선발하였다.

- (7) 군 분리법 ;검역•순화기간 종료 시, 체중 증가량에 이상이 없는 개체를 선별하였으며, 정상군은 별도로 하고, 질환모델 동물을 대상으로 체중을 높은 순으로 배열하였으며, 공복 혈당을 췌 후 군 분리 하였고, 군 평균 및 표준편차를 계산하여 군간 균등하게 동물을 배치하였다.
- (8) 개체식별방법 : 군 분리 종료 후 사육상자에는 개체식별카드를 부착하고, 개체식별은 유성매직을 이용하여 개체식별 법에 따라 꼬리에 표시하였다.

## 6. 환경조건

- (1) 동물실번호 : Rat 실험실(B-5)
- (2) 사육상자 종류 및 크기 : 폴리설펜 사육상자(260W×350L×210H (mm), Tecniplast)
- (3) 사육상자당 동물수 : 2~3마리
- (4) 설정온도 : 22~24 °C
- (5) 습도(상대습도) : 50~30%
- (6) 환기방식 및 회수 : 10~15 회/시간
- (7) 조명시간 및 명암주기 : 오전 8시~오후 8시 조명(12hr 점등/12hr 소등)
- (8) 조도 : 150~300 Lux

## 7. 사료

- (1) 종류 : 일반식이(18% Protein, 2918), 15kg
- (2) 구입처 : 우정BSC (경기 수원시 영통구 의의동 906-5 차세대융합기술연구원 B동 B-2층)
- (3) 생산자 : Harlan Laboratories Inc, USA 8520 Allison (Pointe Blvd,suite 400, Indianapolis,IN 46250)
- (4) 급여 방법 및 급여량 : 급이기에 사료를 넣고, 자유 섭취시켰다.

## 8. 음수

- (1) 종류 : 필터와 유수살균기를 이용하여 여과·살균된 정제수.
- (2) 급수방법 : 폴리설펜제 음수병(500 mL)에 정제수를 넣어 자유섭취 시켰다.

Group	Dose	Dose	n Number
G 1	Sham / Normal	D.W 10ml/kg	7
G 2	MCAO/R ; Control	D.W 10ml/kg	7
G 3	MCAO/R ; FG_10 L	500 mg/kg	7
G 4	MCAO/R ; FG_10 M	1000 mg/kg	7
G 5	MCAO/R ; FG_10 H	2000 mg/kg	7

## 9. 투여

- (1) 투여경로 및 투여횟수 : 시험 동물을 확인후 시험물질을 오후 3:00 ~ 4:00에 일일1회 56일간 투여하였다.
- (2) 투여방법 : 시험물질 FG compound를 경구투여용 존데가 부착된 일회용 주사기를 이용하여 위 내에 강제 경구 투여 하였다.



Fig. 64 Experimental Design

10. 중대뇌동맥 폐색/재관류 (MCAO/R)

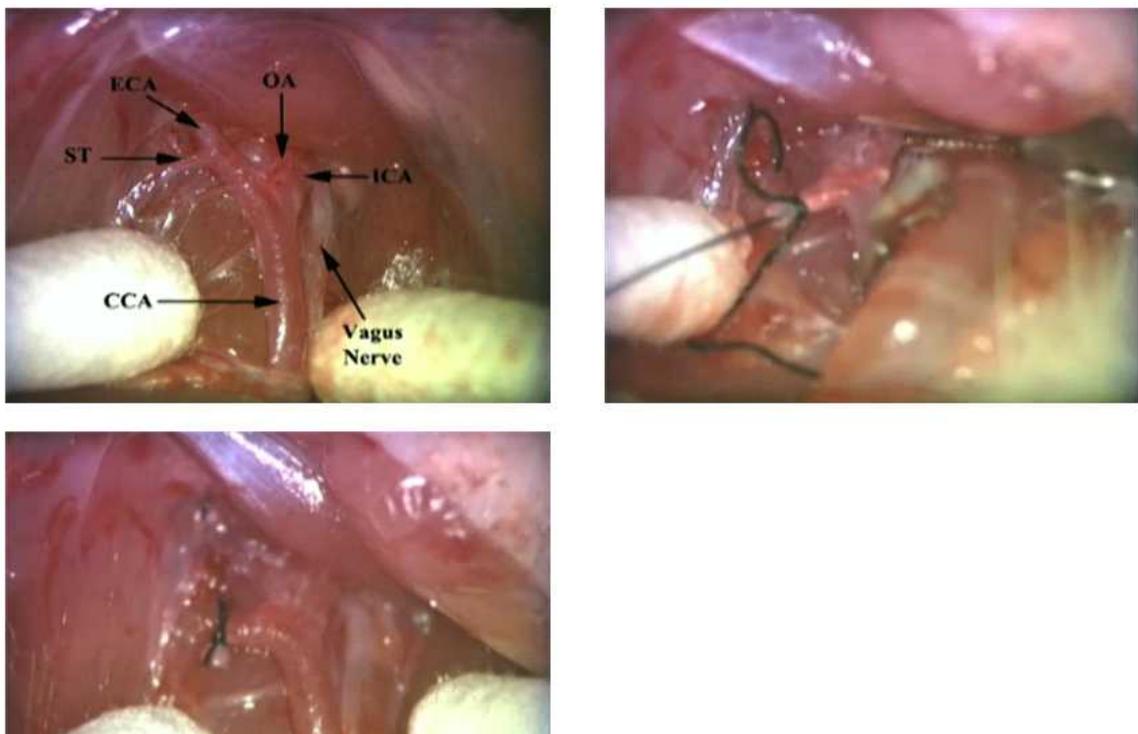


Fig. 65 Middle Cerebral Artery Occlusion/ Reperfusion

중대뇌동맥 폐색/재관류 실험법은 rat 실험동물을 isoflurane 으로 흡입마취를 시킨 상태에서 총경동맥을 결찰한 다음, 내경동맥을 일시적으로 혈관 clip으로 결찰한 후 내경동맥 기시부에 작은 창을 내고, 이창을 통해 미리 화염을 이용하여 끝을 둥글게 한 뒤 poly-L-lysine 을로 처리한 4-0 나일론 사(Ethicon, Eddinburg, UK) 를 총경동맥 분지부터 23mm까지 밀어 넣어 중대뇌동맥을 폐색함. 재관류는 isoflurane 흡입마취 상태에서 피부 밖으로 남겨져 있던 나일론사를 저항이 느껴 질때까지 잡아 뺀후 나머지 끝부분을 가위로 절단함으로써 시행함. Sham군은 실험군과 마찬가지로 마취후 중대뇌동맥만 폐색하지 않고 모든과정을 동일하게 시행하여 재관류 후 8시간이후에 모든 시험등이 시행된 후 희생된다

## 11. 군 구성

Group	Dose	Dose	n Number
G 1	Sham / Normal	D.W 10ml/kg	7
G 2	MCAO/R ; Control	D.W 10ml/kg	7
G 3	MCAO/R ; FG_10 L	500 mg/kg	7
G 4	MCAO/R ; FG_10 M	1000 mg/kg	7
G 5	MCAO/R ; FG_10 H	2000 mg/kg	7

## 12. 관찰 및 평가항목

### (1) 체중 측정

시험동물의 체중은 군 분리(시험물질 투여직전) 일 1 회 측정하였으며 이후엔 일주일간격으로 체중 측정하였다.

### (2) 식이량 측정

시험동물의 섭취량은 군 분리(시험물질 투여직전) 일 1 회 측정하였으며 이후엔 일주일간격으로 남은 사료량을 측정하였다.

### (3) 행동학적 장애변화

중대뇌동맥폐색/재관류 유도 후 희생시키기 전 2번에 걸쳐 실험동물들의 Longa 점수체계를 변환한 5점 기준으로 평가하고, rota-rod test를 병행하였다.

### (4) 뇌조직의 Cytokine 변화 (TNF\_alpha, IL-1β, IL-6, IL-10)

중대뇌동맥폐색/재관류 유도 후 희생시킨 후 뇌조직을 LN2에 동결보관 후 Intrrogen 상에서 제공한 Tissue Homogenization Procedures for use with ELISA 지침서를 확인 후 뇌조직 추출물을 이용하여 다음항목들의 검사를 실시하였다.

### (5) 주요장기 뇌조직의 무게변화

시험동물의 주요장기 뇌조직 무게검사는 시험 마지막 부검 후 뇌조직 분리 후 초정밀저울로 weigh을 실시하였다.

### (6) 조직학적 검사

관찰기간 종료 후 부검진행 시 뇌조직을 브레인메트릭스에서 정중앙부위를 색션을 진행한 후 1%TTC용액에 차광하여 37°C유지 하여 15~20분간 보관후 그 이미지를 이용하여 경색부위를 측정 실시하였다. 나머지 부위는 10% 포르말린에 보관하였다.

2,3,5-triphenyltetrazolium chloride (TTC, sigma T-8877)염색을 시행하였다. TTC 염색이 된 뇌절편을 10%neutral-buffered formalin용액에 담가 고정시킨 후 각 절편의 이미지를 digital camera를 이용하여 촬영한 후 뇌경색이 일어난 부위의 면적 (infarct area, mm<sup>2</sup>)은

computerized image analysis system을 이용하여 측정. 뇌허혈 손상 면적은(A) 부종에 의하여 손상면적이 늘어난 것을 보정하기 위하여, 먼저 정상 측 대뇌반구 면적(B)을 측정하고 손상측 대뇌반구 정상조직 면적(C)을 측정한 다음 정상 측 대뇌반구면적에서 손상 측 대뇌반구의 정상조직 면적을 감하는 방법 ( $A=B-C$ )으로 계산하였다. 총뇌허혈 손상 체적은 아래 식과 같이 계산할 예정이다.

Total infarct volume (mm<sup>3</sup>)

=  $\Sigma$  infarct area (mm<sup>2</sup>) per side x 2 mm (slice thickness)

#### (7) 뇌조직의 이미지화

관찰기간 종료 후 부검진행 전 실험동물의 경색부위등을 검토 측정하기 위하여 Micro CT / SIEMENS Inveon 장비를 이용하여 이미지화하였다.

### 13. 자료의 통계처리

모든 시험결과는 평균치와 표준편차를 사용하여 나타내었으며, 각 군간의 비교는 ANOVA (software StatView: version 4.51, Abacus Concepts, Berkeley, CA).를 사용하고 Sham군과 음성대조군, compound간의 차이를 비교하여 5%의 유의수준에서 유의성을 검증하였다. N수가 7수 이므로 통계학적 유무 판정을 하여 스타마크(\*, \*\*)로 표기하였다.

## 다. 연구결과

### (1) 체중변화

8주간의 샘플을 투여한 후 주 간격으로 체중을 체크하였을 때 FG 농도별 고농도군에서 변화를 보였으며, 용량의존적으로 체중증가량이 정체 되거나 감소하는 것으로 사료된다.

그룹의 체중을 gain weight(g) 으로 표시하여 그룹간의 차이를 비교하였다. 전체군대비 FG 고농도군에서 유의적인 차이를 보였으며, 체중변화를 확인후 MCAO/R 를 진행하였다. (Fig. 66, 67, Table 22)

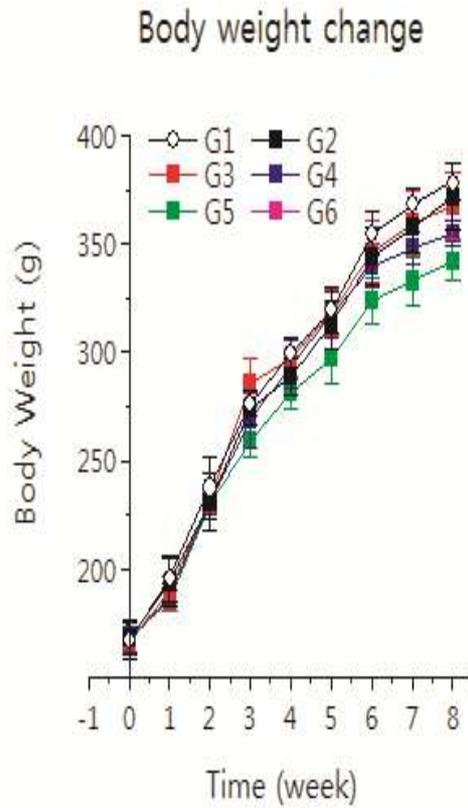


Fig. 66 Change of Body Weight  
\*, vs. G1, G2 (control)

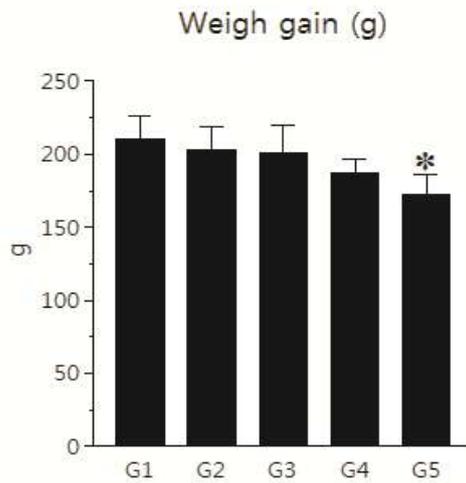


Fig. 67 Weight gain.  
\*, vs. G1, G2 (control)

Table 22. Change of body weight (Group summary)

Group/ Dose (mg/kg)		Weeks after administration									Weight gain(g)
		Be- fore	1	2	3	4	5	6	7	8	
G1	Mean	167.6	195.9	237.7	276.6	299.9	319.4	355	268.1	378.4	210.9
DW	SD	8.5	10.53	14	6.166	6.62	10.36	10.46	7.1	8.40	15.29
0	N	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7
G2	Mean	168.6	194.1	230.7	274.4	289.11	312.7	344.3	358.1	371.9	203.3
DW	SD	8.18	11.35	13.21	7.57	8.23	11.53	13.39	11.70	115.24	15.67
0	N	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7
G3	Mean	166.9	188.9	231.4	285.9	297.4	318.4	346.1	359.6	367.6	200.7
FG	SD	5.90	7.65	5.29	11.25	9.09	10.61	14.21	14.72	15.04	19.09
500	N	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7
G4	Mean	167.6	186.9	231.1	269.1	294.6	317.4	340.1	348.0	355.0	187.4
FG	SD	6.13	6.15	5.90	12.69	11.49	10.94	9.82	7.79	5.42	9.38
1000	N	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7
G5	Mean	169.6	185.6	230.0	259.1	281.3	297.6	323.9	333.0	342.3	172.7*
FG	SD	7.55	4.69	6.86	7.03	7.06	11.40	10.82	11.14	8.79	13.50
2000	N	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7

N : Number of animals

Significantly different from vs (\* ; P<0.05)

(2) 식이섭취량의 변화

전체군간의 식이섭취량에는 차이를 보이지는 않았다. (Fig. 68, Table 23)

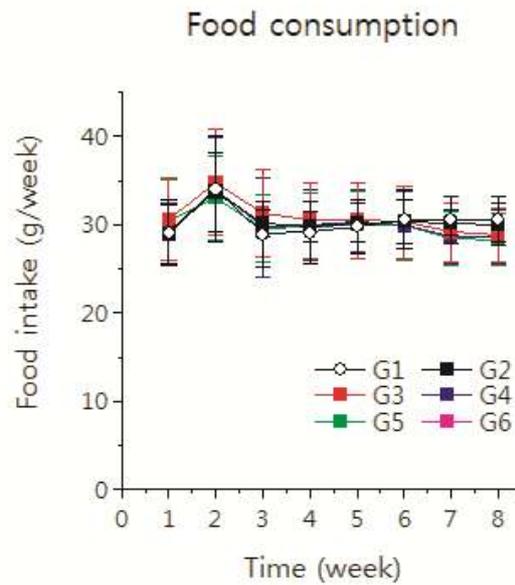


Fig. 68 Food Consumption

Table 23. Food Intake and Food Efficiency Ratio (Group summary)

Group/ Dose(mg/kg)		Food intake (g/day)
G1	Mean	30.3
	SD	3.59
	N	7
G2	Mean	30.4
	SD	2.43
	N	7
G3	Mean	30.7
	SD	4.32
	N	7
G4	Mean	30.0
	SD	4.02
	N	7
G5	Mean	29.9
	SD	3.85
	N	7

### (3) 행동학적 변화

신경학적 장애를 평가하기 위해 Rota-rod 테스트를 진행하였다.

MCAO/R 진행 후 희생직전에 테스트를 진행하였다. 신경, 행동학적 장애가 있는 경우 현저한 근력저하 증상을 보이므로 테스트중 떨어지는 시간을 2~3회 진행하여 체크하였다. 신경학적 장애가 없을 거로 사료되는 sham 군의 경우가 제일 오래 로타로드에서 버티었으며, 나머지 MCAO/R 유도군에서는 현저한 근력저하로 인해 단시간내에 떨어지는 증상을 보였다. 군간의 차이 관련 유의성을 보이진 않았다. (Fig. 69, Table 23)

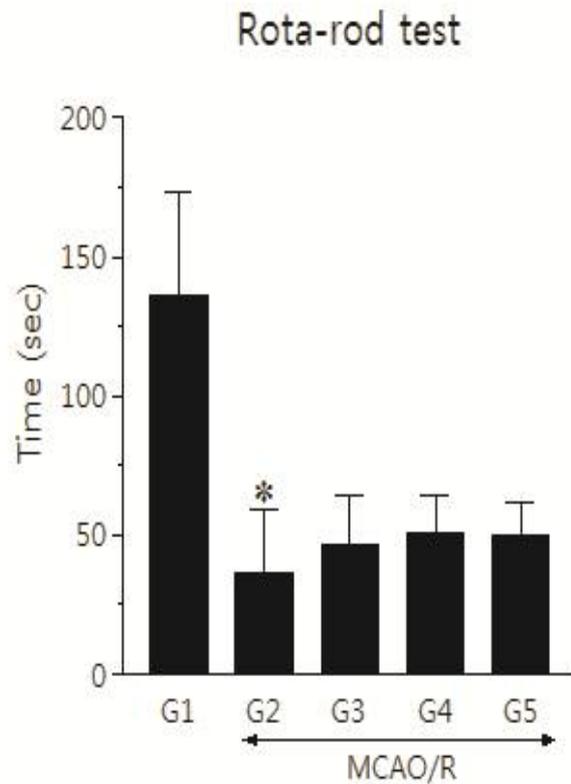


Fig. 69 Rota-rod test

\*, vs. G1 (Sham)

#### (4) 장기무게의 변화

중대뇌동맥폐색/재관류 유도 후 brain 조직에 미치는 영향을 체크하고자 sham군과의 비교한 후 MCAO/R 유도군간의 비교를 진행하였지만 FG 샘플로 인한 유의성 있는 차이를 보이지 않았다. (Fig. 70)

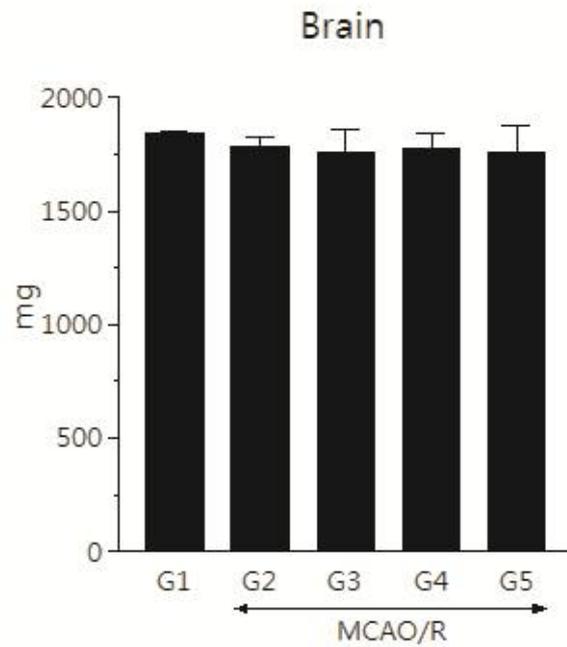


Fig. 70 Change of Brain weight

(5) Cytokine 분석

MCAO/R 유도모델의 뇌기능 관련인자로 알려진 Cytokine 계열중 TNF\_alpha, IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10 항목에 대해 ELISA kit을 이용하여 측정하였고, IL-1beta 및 IL-6 의 경우 MCAO/R 유도로 인해 유의성 있는 상승효과를 보였으며, IL-1beta의 경우 MCAO/R 대조군대비 FG 저농도군과 고농도군의 경우 유의성있는 감소 효과를 확인하였다. (Fig. 71)

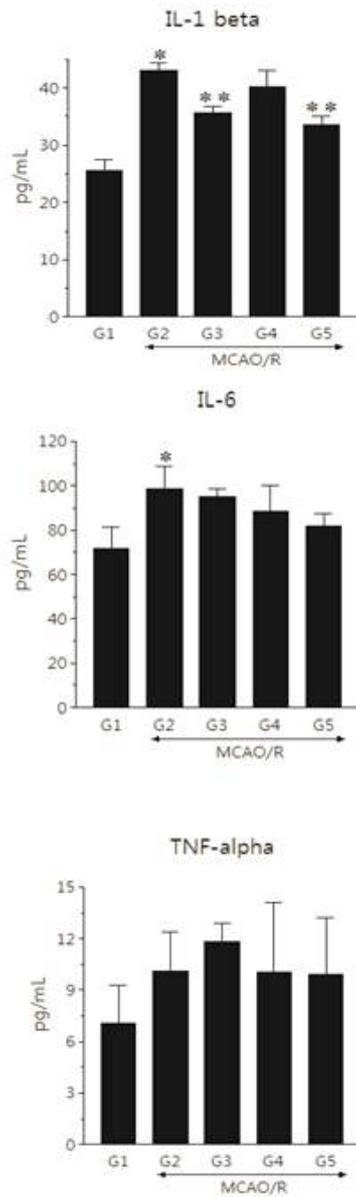
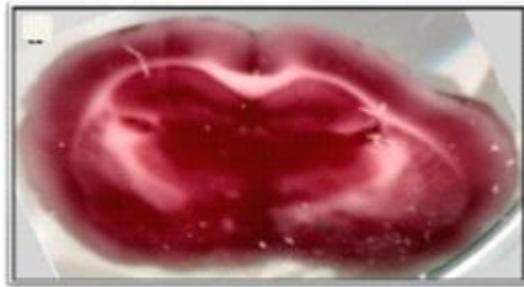


Fig. 71 IL-1beta, IL-6 and TNF-alpha

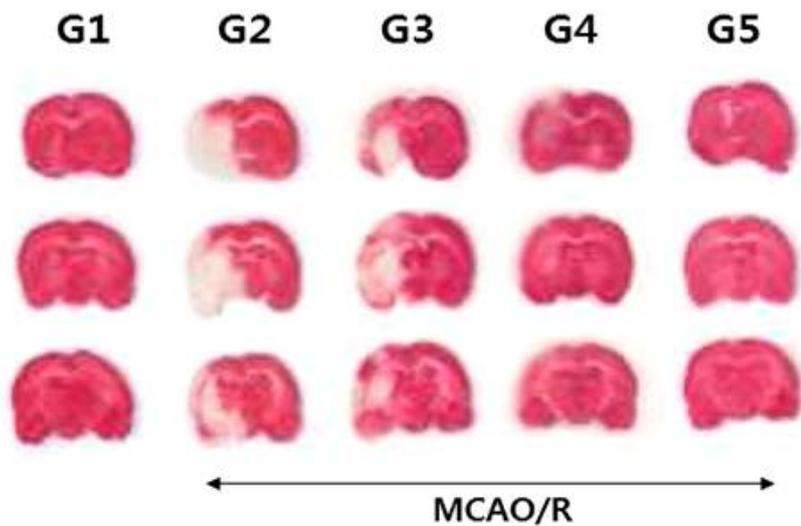
(6) 조직학적 검사

중대뇌동맥폐색/재관류 8시간 유도 후 FG 샘플의 효과가 있는지를 확인한 결과 염색되지 않은 부분이 허혈손상에 의해 생긴 뇌경색부분으로 FG 샘플의 고농도군에서 뇌경색 크기가 의미있게 감소되는 것을 관찰하였으며, 이 결과는 혈관반응 및 신경보호효과가 있음을 알려주는 바이다. (Fig. 72)



- white : infarcted
- red : uninfarcted

Fig. 72 Infarcted area of Ischemia



(7) Image 분석

Micro CT / SIEMENS Inveon 장비를 이용하였으며 Binitio biomedical사 eXIA160 주사용 마우스 조영제를 사용하여 이미지화 하였으나 이미지는 나타나지 않았다. (Fig. 73)

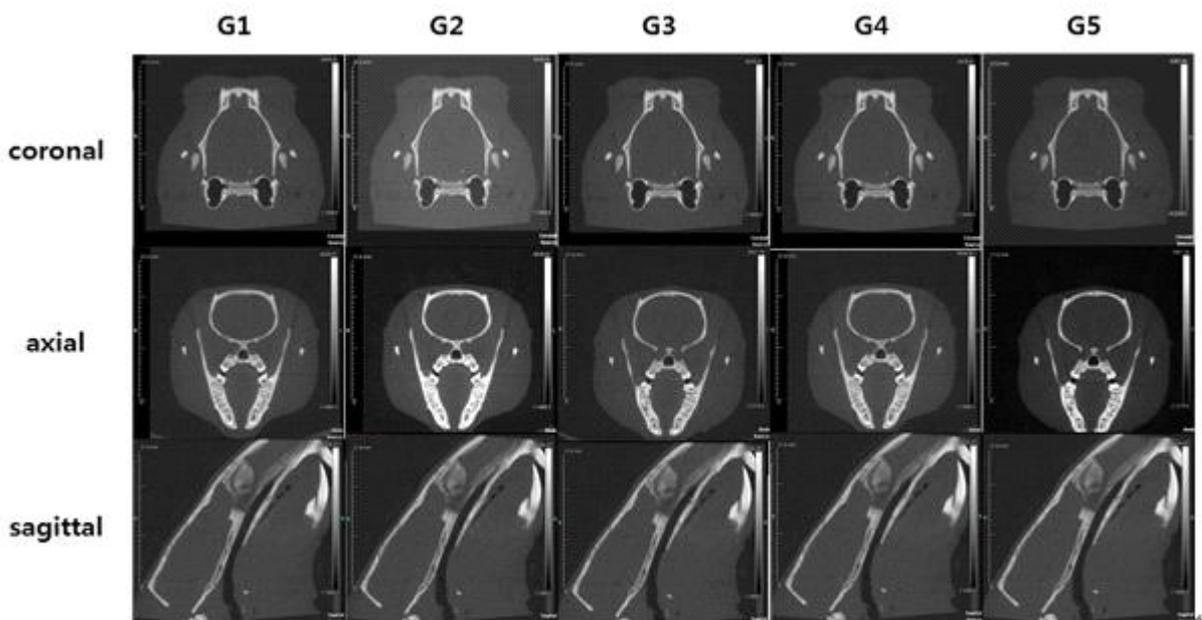


Fig. 73 Image Analysis

**[참고 문헌]**

1. Yang XD, Zhu J, Yang R, Liu JP, Li L, Zhang HB. Phenolic constituents from the rhizomes of *Gastrodia elata*. *Nat Prod Res.* 2007;21(2):180-6.
2. Li N, Wang KJ, Chen JJ, Zhou J. Phenolic compounds from the rhizomes of *Gastrodia elata*. *J Asian Nat Prod Res.* 2007;9(4):373-7.
3. Kim IS, Choi DK, Jung HJ. Neuroprotective Effects of Vanillyl Alcohol in *Gastrodia elata* Blume Through Suppression of Oxidative Stress and Anti-Apoptotic Activity in Toxin-Induced Dopaminergic MN9D Cells. *Molecules.* 2011;16(7):5349-61.
4. Tsai CF, Huang CL, Lin YL, Lee YC, Yang YC, Huang NK. The neuroprotective effects of an extract of *Gastrodia elata*. *Journal of Ethnopharmacology.* 2011;138(1):119-25.
5. Yu SS, Zhao J, Zhen WP, Zhao Y. Neuroprotective effect of 4-hydroxybenzyl alcohol against transient focal cerebral ischemia via anti-apoptosis in rats. *Brain Res.* 2010;1308:167-75.
6. Zeng XH, Zhang Y, Zhang SM, Zheng XX. A microdialysis study of effects of gastrodin on neurochemical changes in the ischemic/reperfused rat cerebral hippocampus. *Biological & pharmaceutical bulletin.* 2007;30(4):801-4.

7. Ojemann LM, Nelson WL, Shin DS, Rowe AO, Buchanan RA. Tian ma, an ancient Chinese herb, offers new options for the treatment of epilepsy and other conditions. *Epilepsy Behav.* 2006;8(2):376-83.
8. Ting Wong CG, Bottiglieri T, Snead OC. GABA,  $\gamma$ -hydroxybutyric acid, and neurological disease. *Annals of Neurology.* 2003;54(S6):S3-S12.
9. Shu CM, Chen CG, Zhang DP, Guo HP, Zhou H, Zong J, et al. Gastrodin protects against cardiac hypertrophy and fibrosis. *Molecular and Cellular Biochemistry.* 2012;359(1-2):9-16.
10. Ahn EK, Jeon HJ, Lim EJ, Jung HJ, Park EH. Anti-inflammatory and anti-angiogenic activities of *Gastrodia elata* Blume. *Journal of Ethnopharmacology.* 2007;110(3):476-82.
11. Choi JH, Lee DU. A new citryl glycoside from *Gastrodia elata* and its inhibitory activity on GABA transaminase. *Chem Pharm Bull.* 2006;54(12):1720-1.
12. Lim EJ, Kang HJ, Jung HJ, Park EH. Anti-angiogenic, anti-inflammatory and anti-nociceptive activity of 4-hydroxybenzyl alcohol. *J Pharm Pharmacol.* 2007;59(9):1235-40.
13. Yoshimura M, Toyoshi T, Sano A, Izumi T, Fujii T, Konishi C, et al. Antihypertensive Effect of a gamma-Aminobutyric Acid Rich Tomato Cultivar 'DG03-9' in Spontaneously Hypertensive Rats. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 2010;58(1):615-9.
14. Yang NC, Zhou KY, Tseng CY. Antihypertensive effect of mulberry leaf aqueous extract containing gamma-aminobutyric acid in spontaneously hypertensive rats. *Food Chemistry.* 2012;132(4):1796-801.
15. Liu CF, Tung YT, Wu CL, Lee BH, Hsu WH, Pan TM. Antihypertensive Effects of *Lactobacillus*-Fermented Milk Orally Administered to Spontaneously Hypertensive Rats. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 2011;59(9):4537-43.
16. Wang L, Xu DX, Lv YG, Zhang H. Purification and biochemical characterisation of a novel glutamate decarboxylase from rice bran. *J Sci Food Agric.* 2010;90(6):1027-33.
17. Johnson BS, Singh NK, Cherry JH, Locy RD. Purification and characterization of glutamate decarboxylase from cowpea. *Phytochemistry.* 1997;46(1):39-44.
18. Zhang H, Yao H-y, Chen F, Wang X. Purification and characterization of glutamate decarboxylase from rice germ. *Food Chemistry.* 2007;101(4):1670-6.
19. Xu JG, Hu QP, Duan JL, Tian CR. Dynamic Changes in gamma-Aminobutyric Acid and Glutamate Decarboxylase Activity in Oats (*Avena nuda* L.) during Steeping and Germination. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 2010;58(17):9759-63.
20. Huang J, Mei L-h, Wu H, Lin D-q. Biosynthesis of  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA) using immobilized whole cells of *Lactobacillus brevis*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology.* 2007;23(6):865-71.
21. Kim JY, Lee MY, Ji GE, Lee YS, Hwang KT. Production of  $\gamma$ -aminobutyric acid in black raspberry juice during fermentation by *Lactobacillus brevis* GABA100. *International Journal of Food Microbiology.* 2009;130(1):12-6.

## 제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	달성도 (%)	연구개발 수행내용
1차 연도 (2010 )	GABA 생산과 gastrodin의 생물전환 최적 조건 및 공정개발과 제품개발	<ul style="list-style-type: none"> <li>▶ GABA 함유 천마발효공정 :               <ul style="list-style-type: none"> <li>· GABA생산 및 gastrodin 전환 우수 유산균주 확보</li> <li>· GABA생산 유산균의 배지조건 최적화와 배양환경 개발</li> <li>· 천마의 전처리 및 발효조건 개발 (gastrodin 전환)</li> </ul> </li> <li>▶ 성분 분석 및 효능 확인 :               <ul style="list-style-type: none"> <li>· HPLC 분석을 통해 유효성분 고함유 천마 선별</li> <li>· 발효천마의 GABA 함유량 및 생리활성물질 성분 분석</li> <li>· 발효천마의 배당체 전환패턴 분석 및 일반천마와의 비교분석</li> </ul> </li> </ul>	100	GABA생산 우수균주 <i>L. brevis</i> GABA100 균주로 천마를 발효하여 GABA 생산성 95% 이상 및 gastrodin 전환 95% 이상 수율 달성. 75 리터 파이로트 생산 스케일업 성공
		발효천마의 독성검사 규명	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 발효천마의 독성검사 급성독성모델과 아급성 독성모델</li> <li>-Dose에 따른 단회투여 후 효능</li> <li>-Dose에 따른 장기투여 후 효능</li> </ul>
	발효천마의 혈압조절 및 뇌기능 활성화 평가(동물실험)	발효천마의 항산화, 혈압조절능검사	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 발효천마의 항산화효과</li> <li>-DPPH, OH radical 등 항산화 지표 효과 규명</li> <li>• 발효천마의 고혈압모델에서 혈압관련 효과 검증</li> <li>-혈압유도 확인 검증</li> <li>-발효천마 투여후 혈압조절효과</li> </ul>
	2차 연도 (2011 )	GABA 생산과 gastrodin의 생물전환 최적 조건 및 공정개발과 제품개발	대량생산에 적합하도록 공정 변수 최적화 및 스케일업(200L 발효기)	100
기능성 식품의 원료로 이용이 가능하도록 GMP 규정에 맞도록 공정개발			100	GMP 공정 표준서 도출.
시제품 개발 <ul style="list-style-type: none"> <li>· 제품표준화 지표 설정</li> <li>· 발효제품의 관능성 및 효능을 극대화 할 수 있는 제형개발</li> <li>· 기타 소재와의 조합연구</li> <li>· 개발 제품에 대한 관능평가</li> </ul>			100	시제품 생산을 하여 발효 천마에 대한 GABA 함량의 규격화를 완료하였고 소재 조합 및 관능성 증진
발효천마의 혈압조절 및 뇌기능 활성화 평가(동물실험)	middle cerebral artery occlusion/reperfusion (MCAO/R) operation 모델	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>• middle cerebral artery occlusion/reperfusion (MCAO/R) operation 모델 완료</li> </ul>	
	-Regional cerebral blood flow 측정 -Infarct volume 측정 : Image Analysis System -Cytokine 농도 측정 : IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-10 (ELISA) kits	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Infarct volume 측정 : Image Analysis System</li> <li>• Cytokine 농도 측정 : IL-1<math>\beta</math>, TNF-<math>\alpha</math>, IL-6, IL-10 (ELISA) kits</li> <li>• 뇌조직의 조직학적 검사</li> </ul>	
	-Behavioral function assessment -Modified neurologic severity scores	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 행동학적 장애변화 검사: Behavioral function assessment</li> <li>• Rota-rod test</li> </ul>	

## 제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

### (1) 연구성과 목표

(단위 : 건수)

구분	특허		신품종				유전자원 등록	논문		기타
	출원	등록	품종명칭 등록	품종수입 생산 신고	품종보호			SCI	비SCI	
					출원	등록				
1차년도	목표	1								
	달성	1								학술발표 : 1건
2차년도	목표	1					1			
	달성						1			학술발표 : 4건
계	목표	1					1			
	달성	1					1			학술발표 : 5건

\* 연차별 연구성과 목표는 향후 연차평가 등의 정량적 평가지표로 활용됨

#### ■ 학술대회발표

Moo Young Lee, Myeong Soo Park, Soon Ah Kang, Geun Eog Ji

Simultaneous production of 4-hydroxybenzyl alcohol and g-amino butyric acid from the extract of *Gastrodia elata* Blume by *Lactobacillus brevis* GABA100. 2010 한국식품과학회 국제학술대회.

Soon Ah Kang, Ji Hoon Paek, Sun jin Lee, jun Bum Shin, Geun Eog Ji. Radical Scavenging Effect and Anti-inflammatory Activity of *Gastrodia elata* Blume in LPS-treated RAW 264.7 Macro-phage. 2011 한국식품과학회 국제학술대회. P11-007. p274

SA Kang, JH Paek, SJ Lee, JB Shin, GE Ji. Anti-oxidant Effect and Anti-inflammatory Activity of *Gastrodiae rhizoma* in LPS-treated RAW 264.7 macrophage. UKC2011 (US-Korea Summit on Science and Engineering). August 10-14, 2011. Utah, USA. p179

SA Kang, JH Paek, SJ Lee, MS Kim, OK Kim, JB Shin, C Cheong, MJ Kim, GE Ji. Antihypertensive and anti-inflammatory Activity of *Gastrodiae rhizoma* Blume by *Lactobacillus brevis* GABA 100. in LPS-treated RAW 264.7 macrophage. 2012 Annual Meeting Korean Society of Food Science and Technology. 2012. 6.13-15. 대전 컨벤션센터. P11-129, p285

Kim JA, Park MS, Ji GE. Production of  $\gamma$ -aminobutyric acid during fermentation of *Gastrodia elata* Bl. by *Lactobacillus brevis* GABA 100. 한국식품과학회 학술발표회(2012)

(2) 연구성과 활용 목표

(단위 : 건수)

구분		기술실시(이전)	상품화	정책자료	교육지도	언론홍보	기타
활용건수	목표		1			2	2
	달성		시제품 2 건				수상실적 :2 건

나. 논문게재 성과

게재연도	논문명	저자			학술지명	Vol.(No.)	국내외 구분	SCI구분
		주저자	교신저자	공동저자				
2012	Enhancement of anti-tyrosinase activity of Mori Cortex Radicis extract by biotransformation using <i>Leuconostoc paramesenteroides</i> PR.	Kim JS,	Ji GE.	You HJ, Kang HY	Biosci. Biotechnol. Biochem.	in press	국외	SCI

다. 특허 성과

출원된 특허의 경우				
출원연도	특허명	출원인	출원국	출원번호
2011	유산균에 의해 발효된 천마 추출물을 포함하는 산화 예방용 또는 혈압 조절용 식품 조성물	(주)비피도	대한민국	제10-2011-0043026

라. 기술료 징수 현황

기 징수액	당해연도 징수액	향후 징수액	합계

마. 사업화 현황

사업화명	사업화내용	사업화 업체 개요				기매출액	당해연도 매출액	매출액 합계
		업체명	대표자	종업원수	사업화형태			

바. 인력활용/양성 성과

(1) 인력지원 성과

지원 총인원	지원 대상 (학위별, 취득자)				성별		지역별		
	박사	석사	학사	기타	남	여	수도권	대전	기타지역
7	2	3			1	6	7		

취업 : 신준범 (아워홈) 김미자(성균관대 식품연구소)

석사학위 취득 : 정경이, 홍세영

박사과정 중 : 김명숙, 이선진

석사과정 중 : 이영애

## 주 의

1. 이 보고서는 농림수산식품부에서 시행한 연구개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림수산식품부에서 시행한 연구개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니 됩니다.