

발 간 등 록 번 호

11-1543000-001889-01

# 호흡기질환 예방용 천문동 제품개발 및 산업화 최종보고서

2017. 11. 6

주관연구기관 / (주)강림오가닉  
협동연구기관 / 부산대학교

농림축산식품부



# 제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “호흡기질환 예방용 천문동 제품개발 및 산업화”(개발기간 : 2014. 08. 01 ~ 2017. 07. 31)과제의 최종보고서로 제출합니다.

2017. 09. 30.

주관연구기관명 : (주)강림오가닉 (대표자) 임수복 (인)

협동연구기관명 : 부산대학교 산학협력단 (대표자) 윤석영 (인)

협동연구기관명 : 부산대학교 산학협력단 (대표자) 윤석영 (인)

주관연구책임자 : 이충렬

협동연구책임자 : 김동섭

협동연구책임자 : 황대연

국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제18조에 따라 보고서 열람에 동의합니다.





## 보고서 요약서

과제고유번호	114034-03	해당단계 연구기간	2014.8.1. ~ 2017.7.31.	단계구분	최종/3년
연구사업명	단위사업	농식품기술개발사업			
	사업명	고부가가치식품기술개발사업			
연구과제명	대과제명	(해당 없음)			
	세부과제명	호흡기질환 예방용 천문동 제품개발 및 산업화			
연구책임자	이충렬	해당단계 참여 연구원 수	총: 43명 내부: 43명 외부:   명	해당단계 연구개발비	정부:510,000천원 민간:170,100천원 계:680,100천원
		총연구기간 참여 연구원 수	총: 43명 내부: 43명 외부:   명	총연구개발비	정부:510,000천원 민간:170,100천원 계:680,100천원
연구기관명 및 소속부서명	(주)강림오가닉 부산대학교			참여기업명 : (주)강림오가닉	
위탁연구	연구기관명:			연구책임자:	
요약(연구개발성과를 중심으로 개조식으로 작성하되, 500자 이내로 작성합니다)				보고서 면수 269	
<p>천문동을 활용한 호흡기 예방용 제품의 개발을 위해서 1협동에서는 천문동의 가공기술 개발 조건과 관련하여 발효 및 증숙 조건을 확립하였으며, 2협동에서는 관련된 소재 및 시제품의 효능평가를 수행하여 이를 토대로 제1세부에서는 다양한 천문동 관련 시제품(천문동, 발효 천문동 및 증숙 천문동 제품)제작하였으며 소비자 반응을 통해서 제품을 생산하였음. 천문동 활용 제품 개발과 관련된 연구내용은 아래와 같음</p> <p>○ 호흡기 질환 예방 제품 생산 및 산업화</p> <p>- 천문동을 수확한 후, 각 건조방법과 가공방법에 따라 품질 향</p>					

상효과를 분석

- 천문동, 발효천문동 및 증숙천문동의 소비자 및 기호도를 조사한 후, 마케팅 및 홍보전략 수립함
- 대량 생산을 위한 공정 표준화 체계 구축하고, 천문동 가공제품의 배합 및 공정과정을 확립
- 이들을 바탕으로 호흡기 질환 예방 시제품 생산
- 호흡기 질환 관련 생리활성 성분분석 및 기능성 증진연구
- 천문동 괴근의 이화학적 성분과 유해 물질 분석
- 천문동의 발효 및 증숙 조건의 최적화를 수행함
- 호흡기 질환관련 생리활성물질의 탐색하고 분리 및 정제를 수행한 후, 분리된 분획의 효능 분석
- 천문동의 호흡기 질환 효능연구
- 천문동의 생리활성 검증을 위한 세포주를 확립하였고, 천문동의 항염증 효능과 작용기전, 독성을 분석함
- 효능분석을 위한 호흡기질환모델동물을 생산하고 이를 이용하여 천문동의 생리활성, 작용기전분석, 다른기능성물질과의 비교평가를 수행함
- 천문동의 단위독성평가를 수행하고, 발효천문동의 약리효능작용기전, 생리활성 등에 대한 검증을 완료함

## 국문 요약문

		코드번호	D-01		
연구의 목적 및 내용	<p>○ 연구의 목적</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 최근 미세먼지가 증가하고 있어서 심각한 사회문제가 되고 있으며, 예로부터 호흡기 질환으로 활용되고 있는 한약재인 천문동을 활용하여 호흡기 질환 예방과 관련된 구체적인 천문동의 기능성성분 연구와 호흡기 질환 예방 등의 효능연구를 수행하고 이를 통한 다양한 제품 개발하고자 함</li> </ul> <p>○ 연구 내용</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 호흡기 질환 예방 제품 생산 및 산업화</li> <li>- 호흡기 질환 관련 생리활성 성분분석 및 기능성 증진연구</li> <li>- 천문동의 호흡기 질환 효능연구</li> </ul>				
연구개발성과	<p>○ 호흡기 질환 예방 제품 생산 및 산업화</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 천문동을 수확한 후, 각 건조방법과 가공방법에 따라 품질 향상효과를 분석</li> <li>- 천문동, 발효천문동 및 증숙천문동의 소비자 및 기호도를 조사한 후, 마케팅 및 홍보전략 수립함</li> <li>- 대량 생산을 위한 공정 표준화 체계 구축하고, 천문동 가공제품의 배합 및 공정과정을 확립</li> <li>- 이들을 바탕으로 호흡기 질환 예방 시제품 생산</li> </ul> <p>○ 호흡기 질환 관련 생리활성 성분분석 및 기능성 증진연구</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 천문동 괴근의 이화학적 성분과 유해 물질 분석</li> <li>- 천문동의 발효 및 증숙 조건의 최적화를 수행함</li> <li>- 호흡기 질환관련 생리활성물질의 탐색하고 분리 및 정제를 수행한 후, 분리된 분획의 효능 분석</li> </ul> <p>○ 천문동의 호흡기 질환 효능연구</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 천문동의 생리활성 검증을 위한 세포주를 확립하였고, 천문동의 항염증 효능과 작용기전, 독성을 분석함</li> <li>- 효능분석을 위한 호흡기질환모델동물을 생산하고 이를 이용하여 천문동의 생리활성, 작용기전분석, 다른기능성물질과의 비교 평가를 수행함</li> <li>- 천문동의 단회독성평가를 수행하고, 발효천문동의 약리효능작용기전, 생리활성 등에 대한 검증을 완료함</li> </ul>				
연구개발성과의 활용계획 (기대효과)	<p>○ 천문동의 증숙, 발효 및 가공기술 개발을 통하여 생리활성 성분을 함유하는 새로운 천문동 제품을 생산하는 과정에서 획득된 기술 노하우는 특수 기능성 제품 개발에 응용 가능할 것으로 예측되며, 결과적으로 다양한 호흡기 질환 예방 식품 및 제품의 창출 및 국민 건강 증진에 활용할 수 있을 것임.</p> <p>○ 천문동의 전통 약효에 대하여 과학적인 연구를 통해 고가가치 향상</p> <p>○ 농민소득의 증대 : 야생에서 버려지던 천문동을 재배하여 새로운 소득원을 제공함으로서 농민소득을 증대할 수 있는 획기적인 기회를 제공 함</p> <p>○ 기업매출의 증대 : 천문동을 이용한 새로운 차, 파우치, 농축액, 캡슐 등의 제품을 상품화하고, 현재 기업이 보유하고 있는 대리점, 판매처, 홈쇼핑 등을 통한 마케팅전략으로 기업매출 증진에 기여하고자 함</p>				
중심어 (5개 이내)	호흡기 질환	고부가가치식품	발효	천문동	

< SUMMARY >

		코드번호	D-02
Purpose& Contents	<p>○ Purpose of Research Recently, particulate matter (PM) has been increasing and became a serious social problem. Purpose of our research was to develop and industrialize Respiratory disease prevention products through the research on the functional ingredients and efficacy studies of Asparagus cochinchinensis which are herb medicine used as respiratory diseases for a long time.</p> <p>○ Research content - Production and industrialization of respiratory disease prevention products using Asparagus cochinchinensis - Analysis of physiologically active components related to respiratory diseases and functional enhancement study - Study on the efficacy of respiratory diseases of Asparagus cochinchinensis</p>		
Results	<p>○ Production and industrialization of respiratory disease prevention products using Asparagus cochinchinensis - Analysis of the effect of quality improvement according to each drying method and processing method - Investigate consumers and preferences of Asparagus cochinchinensis related products, and established a marketing and PR strategy - Establishment of process standardization system for mass production, establishment of mixing and processing process of processed products - Production of respiratory disease prevention prototype</p> <p>○ Analysis of physiologically active ingredients related to respiratory diseases and functional enhancement study - Analysis of physicochemical components and hazardous substances of Asparagus cochinchinensis root - Optimization of fermentation and/or steaming and drying conditions of Asparagus cochinchinensis - Detection, separation and purification of physiologically active substances related to respiratory diseases, followed by analysis of the efficacy of isolated fractions</p> <p>○ Efficacy study of Asparagus cochinchinensis on respiratory disease - Establishment of a cell line for the verification of physiological activity of Asparagus cochinchinensis - Analysis of anti-inflammatory effects, mechanism and toxicity of Asparagus cochinchinensis - Animal models of respiratory diseases for efficacy analysis are produced and used to compare physiological activities, mechanism, and comparison with other functional substances of Asparagus cochinchinensis - Performed a one-time toxicity evaluation and completed the verification of pharmacokinetics, physiological activity, etc. of Asparagus cochinchinensis</p>		

	and its fermented products				
Expected Contribution	<p>○ The technical know-how gained during the production of <i>Asparagus cochinchinensis</i> related products for a prevention of respiratory disease could be applicable to the development of new functional products to promote public health.</p> <p>○ Improvement of high value through scientific research about traditional medicine effect of <i>Asparagus cochinchinensis</i></p> <p>○ Increase of farmer's income: Provide a new opportunity to raise farmer's income by cultivating <i>Asparagus cochinchinensis</i></p> <p>○ Increase in company sales: The products such as beverages, pouches, concentrates, and capsule-type products using <i>Asparagus cochinchinensis</i> could be industrialized and contributed to promoting corporate sales by marketing strategies through distributors, sales offices.</p>				
Keywords	Respiratory disease	functional food products	fermentation	<i>Asparagus cochinchinensis</i> Merr	

## CONTENTS

Chapter 1. Outline of the research project .....	10
Section 1. The purpose of research .....	10
Section 2. The necessity of research .....	11
Section 3. The range of research .....	22
Chapter 2. Trend of foreign and domestic on researches .....	24
Chapter 3. The contents and results .....	29
Section 1. Development of functional food products for respiratory disease prevention using <i>Asparagus cochinchinensis</i> .....	29
Section 2. Analysis of physiologically active components related to respiratory diseases and functionality enhancement study .....	98
Section 3. Efficacy study of <i>Asparagus cochinchinensis</i> on the respiratory diseases .....	152
Section 4. The strategy for the research .....	239
Section 5. The results of the research .....	246
Chapter 4. Goal achievement and contribution to related field .....	252
Section 1. Achievements of Goals .....	252
Section 2. Contributions to related field .....	255
Chapter 5. Application plan for study results .....	258
Chapter 6. International science and technology information collected in the process of the study .....	261
Chapter 7. Security level of research results .....	265
Chapter 8. Research facilities and equipment status .....	266
Chapter 9. Safety measurement for a laboratory .....	267
Chapter 10. Representative research achievement .....	270
Chapter 11. Others .....	271
Chapter 12. References .....	272

## 〈 목 차 〉

제 1장. 연구개발과제의개요 .....	10
제 1절. 연구개발 목적 .....	10
제 2절. 연구개발의 필요성 .....	11
제 3절. 연구개발 범위 .....	22
제 2장. 국내외 기술개발 현황 .....	24
제 1절. 국내외 관련기술 현황 .....	24
제 2절. 국내외 제품생산 및 시장현황 .....	26
제 3장. 연구수행 내용 및 결과 .....	29
제 1절. 호흡기 질환 예방 제품 생산 및 산업화(제1세부) .....	29
제 2절. 호흡기 질환 관련 생리활성 성분분석 및 기능성 증진 연구 (제1협동) .....	98
제 3절. 천문동의 호흡기 질환 효능연구(제2협동) .....	152
제 4절. 연구개발 추진 전략 .....	239
제 5절. 연구개발 성과 .....	246
제 4장. 목표달성도 및 관련분야에의 기여도 .....	252
제 1절. 목표달성도 .....	252
제 2절. 관련분야 기여도 .....	255
제 5장. 연구결과의 활용계획 등 .....	258
제 1절. 활용방안 .....	258
제 2절. 기대성과 .....	260
제 6장. 연구과정에서 수집한 해외과학기술정보 .....	261
제 1절. 천문동 유래 신규 물질 정보 .....	261
제 2절. 호흡기 질환 관련 효능평가 정보 .....	261
제 7장. 연구개발성과의 보안등급 .....	265
제 8장. 국가과학기술종합정보시스템에 등록된 연구시설·장비현황 ..	266
제 9장. 연구개발과제 수행에 따른 연구실 등의 안전조치 이행실적 .....	267
제 10장. 연구개발과제의 대표적 연구실적 .....	270
제 11장. 기타사항 .....	271
제 12장. 참고문헌 .....	272

# 제 1장. 연구개발과제의 개요

코드번호	D-03
------	------

## 제 1절. 연구개발 목적

천문동(*Asparagus cochinchinensis* Merr.)은 한국, 중국, 일본에서 분포하는 백합과(Liliaceae) 식물로 예로부터 다양한 질병 치료에 이용되어 왔으며, 주로 건근(덩이뿌리)을 식용 및 약용에 널리 사용하고 있다(Koo HN et al., 2000; Lee SY et al., 2008; Xiong D et al., 2011). 천문동의 건근에는 asparagine,  $\beta$ -sitosterol, 5-methoxy-methylfurfural, 점액질, steroidal saponin, furostanol saponin, phenol 화합물, 단당류, 올리고당류, 다당류 등이 함유되어 있는 것으로 알려져 있다(Lee DY et al., 2009; Zhu GL et al., 2014; Lee SY et al., 2008; Shen Y et al., 2011; Xiong D et al., 2011).

천문동 건근은 예로부터 전통한방의학에서 진정제 및 안정제와 같은 부가적인 효과와 함께, 감염, 피부염, 천식 그리고 뇌 질환과 관련하여 염증질환을 치료하기 위해 이용되어 왔다(Huang KC., 1993). 그리고 항염증, 이노작용, 진해제, 항균, 신경안정, 타액분비촉진, 해열 등 다양한 치료 효과를 가지고 있으며(Lee DY et al., 2009; Xiong D et al., 2011), 노화를 지연시키고 superoxide radical 제거 효과를 가지고 있다고 보고되고 있다(Shen Y et al., 2011; Xiong D et al., 2011). 또한 객혈, 당뇨, 변비, 부어오름, 인후통 그리고 폐암 등에 효능이 있어 그 치료제로 사용되고 있다(Shen Y et al., 2011).

천문동의 생리활성과 관련된 연구로는 천문동 열수 추출물을 이용한 free radical 소거능 및 LPS로 활성화된 RAW 264.7 cell을 이용한 NO 생성 저해(Samad NB et al., 2014),  $\beta$ -sitosterol 성분의 mouse S-180 leukemia와 폐암 저해(Huang KC, 1993), 신경아교세포(astrocyte)에서 TNF- $\alpha$  분비 억제(Kim H et al, 1998), Hep G2 세포에서 TNF- $\alpha$ 로 유도된 apoptosis의 저해(Koo HN et al., 2000)가 보고되고 있다. 또한 천문동 에탄올 추출물을 이용하여 뼈의 대사와 관련해서 조골세포 분화를 촉진하고 파골세포 생성을 억제하는 효과(Lee SY et al., 2008)와 쥐의 피부에 12-O-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate(TPA)로 유도된 염증을 억제하는 효과(Lee DY et al., 2009) 등이 연구되고 있다.

천문동 건근은 예로부터 그 효능에 대해 많이 알려져 전통한방의학에서 여러 질환의 치료제로써 사용되어 왔지만, 우수한 기능에도 불구하고 다양한 제품의 개발을 통한 산업화는 이루어지고 있지 않은 실정이다. 또한, 천문동은 2000년 이후 대부분을 중국에서 수입하여 사용하고 있는 상황이다. 따라서, 천문동은 항염증과 관련된 효능을 지니고 있어서 최근 사회적 문제로 대두되고 있는 미세먼지로 인한 호흡기 질환 예방과 관련된 효능평가를 통해 과학적으로 천문동의 호흡기 질환 예방 효능을 검증하여 이와 연관된 다양한 고부가가치 제품의 개발 및 판매 함으로서 국내토종 자원을 활용한 녹색성장 기반기술 확립 및 고부가가치 제품 생산에 기여하고자 한다. 이를 통해서 야생에서 버려지던 천문동의 재배를 유도하여 새로운 소득원을 제공함



으로서 농민소득을 증대할 수 있는 기회를 제공하여 농민 신 소득원 창출하고자 한다. 본 연구 개발을 통한 최종 목표 및 주요 내용은 다음과 같다.

○ 최종목표

- 천문동의 덩이뿌리(괴근)을 활용한 호흡기 질환 예방 관련 생리활성 성분의 탐색 및 분리 동정과 효능평가를 통한 호흡기 예방 전용 소재의 고부가가치화
- 천문동의 가공처리 조건의 최적화 및 표준화에 따른 기능성 증진
- 호흡기 질환 예방 전용 고부가 제품 개발 및 산업화

○ 주요내용

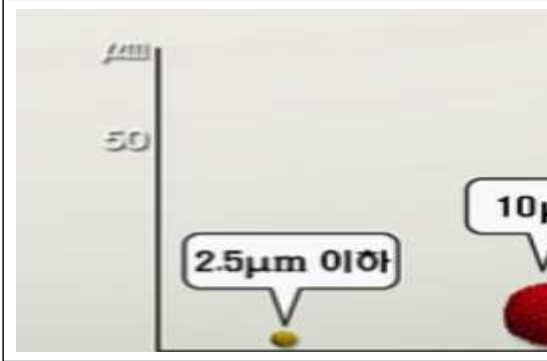
- 호흡기 질환 예방 관련 생리활성 물질의 분리 및 신소재 대량생산
- 호흡기 질환 예방 제품의 최적화 및 표준화
- 천문동과 일반 민간소재와의 생리활성(호흡기질환 등) 비교 효능연구
- 호흡기 질환 예방 전용 고부가가치제품 개발 및 산업화

## 제 2절. 연구개발의 필요성

### 1. 미세먼지의 증가로 인한 사회문제 대두

○ 유해물질을 다량함유하고 있는 중국발 미세먼지의 재양이 새롭게 대두됨

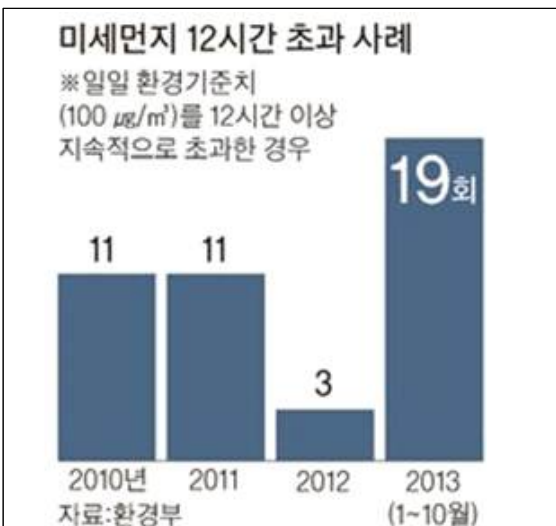
미세먼지는 우리 눈에 보이지 않을 정도로 가늘고 작은 먼지 입자로 지름 10 $\mu$ m 이하이며, 2.5 $\mu$ m 이하인 먼지는 초미세먼지로 불려진다. 대도시의 미세먼지는 70% 이상이 자동차 배기가스에서 나오는데, 화석연료의 연소작용에 의해 발생되며, 황산염, 질산염, 암모니아 등의 이온 성분과 금속화합물, 탄소화합물 등 유해물질로 이루어져 있다. 그러나 최근에 우리나라에 많이 발생하는 미세먼지는 내몽골 지역에 아주 넓은 고비사막에서 바람이 불면 모래먼지가 날리게 되어 형성되는 황사가 중국의 공업화지역을 통과하면서 미세먼지와 합쳐지게 된다. 이러한 미세먼지는 편서풍을 타고 중국을 거쳐 우리나라로 날아오며, 발생량은 해마다 증가하고 있다.



○ 우리나라의 전국 각 도시는 미세먼지농도가 매년 급속히 증가하고 있어 심각한 사회문제로 대두되고 있음

중국에서는 노후자동차 배출가스, 석탄사용(에너지의 70%) 증가, 기상 정체 등으로 최근 극심한 스모그가 빈발하고 있으며, 실제 베이징의 초미세먼지(PM2.5) 농도는 '13.1월, 10월 각각 최고 993 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ , 407 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ 에 달한다. 이는 WHO 권고기준 일일 25 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ 와 비교할 때 상당히 높은 농도이다.

국내에서는 장거리 이동 오염물질의 국내 기여도는 초미세먼지(PM2.5) 농도의 약 30~50% 수준으로 추정하고 있으며, 특히, 기상상황이 서풍 또는 북서풍 계열일 경우 국내 미세먼지(PM10) 농도는 평균 44.5% 증가하는 것으로 분석되고 있다('11년 백령도 측정소 분석결과). 특히, 우리나라에서는 일일환경기준치인 100  $\mu\text{g}/\text{m}^3$ 을 12시간이상 지속적으로 초과한 날수가 2013년에는 19회까지 증가하여 심각한 사회문제로 대두되고 있다. 더불어, 서울은 세계주요도시의 평균 초미세먼지농도보다 월등히 높은 27.8 $\mu\text{g}$ 으로 뉴욕보다 222.4% 높고, 파리보다 166.5%가 높아 국민들의 건강에 심각한 문제를 유발하고 있다.



○ 미세먼지로 인한 호흡기질환자는 최근 몇 년 사이에 30%이상 급증하고 있음

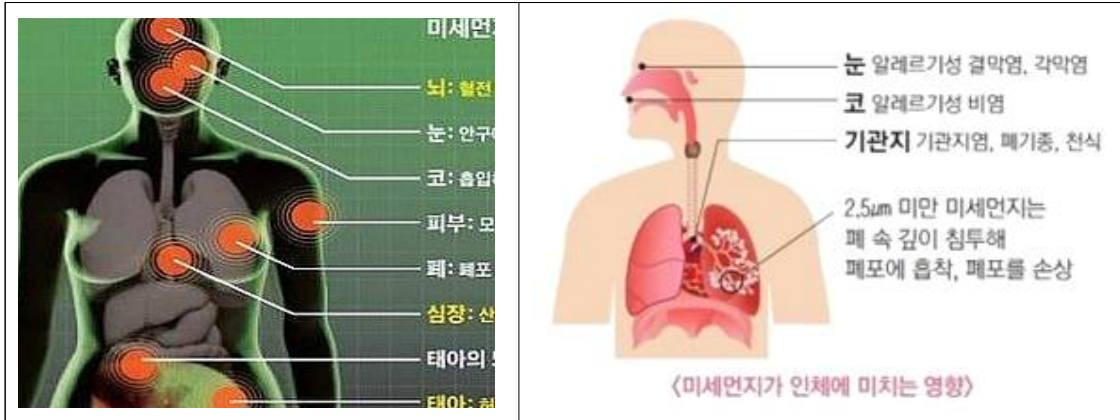
국내 대형병원에는 만성기관지염 같은 만성폐쇄성 폐 질환 환자들이 2012년 같은 기간에 비해 최고 30%가량 급증하는 것으로 보고하였고, 중국에서 난방 시작과 동시에 치명적인 유해물질이 섞인 미세먼지가 국내에 유입되기 시작한 지 석 달째, 국내 대형병원에는 만성기관지염 같은 만성폐쇄성 폐 질환 환자들이 2012년 같은 기간에 비해 최고 30%가량 급증했다. 또한 미세먼지로 인해 수도권서 하루 3~4명이 추가로 사망하는 것으로 알려져 있다.



○ 미세먼지는 사람의 인체에 미치는 심각한 악영향을 미치며, 특히 호흡기질환은 가장 직접적인 손상을 받는 부위로 알려져 있음

미세먼지는 사람의 인체의 다양한 장기에 심각한 질병이나 대사장애를 유발하는 것으로 알려져 있다.

- 뇌 : 혈전 만들고 세포 손상시켜 뇌졸중, 치매 유발
- 눈 : 안구에 붙어 염증, 가려움증 유발
- 코 : 흡입하면 폐포를 통과해 혈액 속으로 들어감
- 피부 : 모공 속으로 들어가 모공 확대, 피부염 일으킴
- 폐 : 폐포 손상시키고 염증 반응 일으킴, 기침, 천식 악화
- 심장 : 산화스트레스 증가로 칼슘 대사 이상 초래해 부정맥 발생
- 태아의 뇌 : 태어난 뒤 뇌 신경 발달 저하로 지능 저하
- 태아 : 허벅지, 머리 등 성장 저하
- 자궁 속 태반 : 혈액 순환 잘 안돼 태아에 영양공급 방해



이들 장기 중에서 특히 미세먼지는 호흡기질환에 가장 심각한 영향을 미친다. 미국 환경보호청의 자료에 따르면 미세먼지는 폐손상과 염증을 유발하고, 폐렴, 감기 등의 감염에 민감하게 만들고, 천식을 악화시키고 숨이 차는 증상을 유발한다고 보고하였다. 또한, 폐손상으로 인해 호흡능력 및 심장기능을 저하시키고, 심장박동의 불규칙을 유발하고 염증이 혈액 점성을 늘려 심장마비위험을 증가시키는 것으로 알려져 있다.

미세먼지로 인한 건강영향		자료: 미국환경보호청
<b>폐 직접영향</b>	- 폐손상, 염증 - 폐렴, 감기 등 감염 취약 - 천식악화, 습침	
<b>폐 손상으로 인한 부작용</b>	- 호흡능력 및 심장기능 저하 - 심장박동 불규칙 - 염증이 혈액 점성 늘려 심장마비 위험 증가	
<b>심장 직접 영향</b>	- 유해물질 혈관 유입 - 심장과 심혈관계 자동조절 능력 교란	

ScienceAll.com

한편, 미국 남캘리포니아 대학이 12개 지역의 아동 1천 700명을 조사한 결과에 따르면, 미세먼지 농도가 높은 지역에서 태어난 아이들은 폐활량이 떨어지는 '폐 기능 장애'를 겪을 가능성이 다른 지역 아동보다 4.9배 높은 것으로 나타났다. 이화여대 병원이 임신부 1천500명을 4년에 걸쳐 추적 조사한 결과, 미세먼지 농도가 m<sup>3</sup>당 10µg 상승할 경우 기형아를 출산할 확률이 최대 16%나 높아지는 것으로 나타났다. 또 저체중아 출산율과 조산·사산율도 각각 7%와 8% 증가했다.



○ 우리나라에서 민간에 전해오는 일부 호흡기 질환에 좋은 식품들이 알려져 있으나 신소재로서의 가치가 떨어지는 단점이 있음

- ① 배즙- 기침과 가래를 삭혀주는 작용을 함. 오래된 천식에 장기간 복용해도 부작용이 없으며, 약을 먹을 수 없는 유아라면 배즙만 먹여도 효과가 있다고 알려져 있다.
- ② 감- 감 또는 꽃감. 감은 몸을 식히고 폐를 보호하는데, 꽃감 표면의 흰 가루에는 진해작용을 하는 성분이 들어있는 것으로 알려져 있다.
- ③ 도라지- 염증치료 효과가 있어서, 목이 아플 때 달여서 차로 마시면 기관지염에 좋고 목감기로 가래가 끓을 때도 말린 도라지나 꿀을 쥔 도라지청을 차로 만들어 마시면 효과가 있는 것으로 알려져 있다.
- ④ 더덕- 생채로 무치거나 고추장 양념을 덧발라 구워 먹으면 먼지와 가래배출에 효과적일 뿐만 아니라 목감기를 예방하는데도 크게 도움이 된다.
- ⑤ 당근- 기관지 점막을 강하게 하고 저항력을 키우는 작용이 있다.
- ⑥ 감초- 다린 물이 역류성 식도염 증상 완화에 도움을 주는 것으로 알려져 있다.
- ⑦ 생강- 비염에 좋은 것으로 알려져 있다.
- ⑧ 은행- (동의보감) 폐를 맑게 하고 습찬 것과 기침을 멎게 하는 효과가 있는 것으로 알려져 있다. 그 외 모과, 오미자, 녹두, 부추, 무 등도 민간에 알려지고 있다.

이들 식품들은 민간에 효능이 알려지고 있으나 정확한 작용기전이나 성분 등에 대한 연구가 매우 미흡하고, 일반적으로 식품으로 사용되고 있어 특히 신소재 제품으로서 상품성과 가치가 떨어지는 단점이 있다.

따라서, 국내에서 부가가치가 높은 토종자원을 신소재로 개발하여 농민의 소득을 증가시키고, 소득의 다변화를 위한 노력이 절실히 필요하며, 이를 위해 새로운 자원으로부터 기능성소재를 추출하여 다양한 인체질환에 대한 효능을 평가하고 이들 소재를 기존기술과 접목하여 새로운 신제품을 개발 필요성이 대두된다. 이러한 연구를 통해 기능성소재를 활용한 다양한 가공제품의 종합생산지원체계 구축이 요구된다.

<토종 고부가가치 신소재 활용기술 개발의 필요성>



### 미세먼지로 인한 **호흡기질환 예방제품**의 개발 필요

국내 폐질환환자는 2012년에 비해 2013년 30%가량 증가  
[일일환경기준치인 100  $\mu\text{g}/\text{m}^3$ 을 12시간 이상 초과한 날이  
2013년 19회까지 증가]

호흡기질환 예방 및 치료제품 개발 필요

### 고부가가치 국내 **신소재 개발**로 농민 **소득 다변화** 필요

도라지, 더덕, 생강 등이 호흡기질환 식품으로 활용되고 있으나  
부가가치가 낮아 농민소득에 기여하지 못하고 있음

국내 토종자원을 이용한 고부가가치 **신소재**의 개발로 농민소득  
다변화를 위한 **노력이 절실히 요구**

고부가가치 국내 토종자원을 활용한 **“고부가가치 에코제품”**  
개발 필요 및 농업분야 **“녹색성장 기반기술”** 확립 필요

## 2. 천문동의 전통 약효

○ 한국 토종 약초 천문동은 예로부터 늙지 않고 피부, 이뇨효과 약재로 알려짐

조선 세종 때 펴낸 《향약집성방(鄉藥集成方)》에는 ‘신선방(神仙方)’이라고 하여 사람을 신선이 되게 하는 약으로 늙지 않고 병들지 않고 오래 살며 특별한 육체적, 정신적 능력을 지니게 한다하여 《향약집성방》에 ‘천문동을 먹고 살과 골수를 튼튼하게 하고 늙지 않게 하는 방법’이라고 하여 다음과 같이 적혀 있다. 천문동 12kg을 잘게 썰어 그늘에서 말린 다음 가루 내어 한 번에 12그램씩 하루 대여섯 번 술에 타서 먹는다. 200일 동안 먹으면 몸이 오그라지던 것이 펴지고 여윈 것이 튼튼해지며 300일 동안 먹으면 몸이 거뜩해지고, 2년 동안 먹으면 달리는 말을 따라잡을 수 있게 된다. 천문동 1,200g과 숙지황 600g을 가루 내어 졸인 후 꿀로 반죽하여 달걀 노른자 만하게 알약을 만든다. 이것을 한 번에 3개씩 하루 3번 더운 술에 풀어서 먹는다. 산길이나 먼 길을 갈 때 곡식을 안먹어도 배고프지 않고 10일 동안 먹으면 몸이 거뜩해지고 눈이 밝아지며, 20일 동안 먹으면 모든 병이 낫고 얼굴빛이 꽃처럼 된다. 30일 동안 먹으면 흰머리가 검어지고 빠졌던 이빨이 다시 나오며, 40일 동안 먹으면 달리는 말을 따라잡을 수 있고 100일 동안 먹으면 무병장수한다.”고 하였다.

○ 민간에서 알려져 내려오는 천식, 호흡기질환 효능이 있으나, 이에 대한 과학적인 연구 필요.

천문동은 (1) 중기, 불면증, 치질, 피부가려움증에 도움이 되고 (2)콜레스테롤 감소, 노화예방에 도움이 되며 (3) 혈기보충과 장의 연동운동을 촉진하여 대변을 원활하게 한다고 전해져 오고 있다. 또한 (4)힘줄과 뼈를 튼튼하게 하며 (5) 역울형 신경쇠약을 안정시키는 작용과 남성

조루증에 도움이 된다고 전해져 다양한 효능에 대하여 알려져 있으나, 지금까지 이에 대한 과학적이고 체계적으로 연구가 되어 있지 않으며, 부위에 따른 생리활성의 효능에 대한 평가가 미흡한 실정이다.

### 3. 천문동 개발 연구의 가치성

○ 천문동은 한국 원산지로서 세계 보급을 위한 연구가 필요

한국 토종 약초인 천문동은 우리나라의 경남, 경북이나, 제주도, 전남, 전북 따뜻한 지역등지에 자생하는 덩굴성 다년초로서 땅 속의 뿌리줄기는 짧고 덩이 모양으로 비대하며 뿌리가 사방으로 퍼진다. 줄기는 1~2m 정도로 덩굴져서 자라며 가지가 많이 갈라진다. 잔가지는 가는 잎 모양으로 1~3개씩 모여서 나며 윤채가 있으며 활처럼 휘다. 잎은 짧은 가지처럼 되어 흩어져서 난다. 꽃은 잎겨드랑이에서 1~3개씩 모여 담황색으로 핀다. 꽃잎은 6개이고 선상 타원형이며 3개의 수술과 3개로 갈라진 암술대가 있다. 구형의 장과는 흰색으로 익으며 안에 1개의 종자가 들어있다.



(천문동의 줄기와 꽃)



(천문동 열매)



(천문동 뿌리)

○ 천문동 국내재배의 현황

천문동은 사용 용도가 넓고 폐, 신경을 돕는 중요한 약초로 국내 수요를 자급했던 것이 2000년 이후 연간 소요량 전량(100t 내외)을 중국에서 수입하여 사용하고 있어, 천문동을 활용한 고부가가치 제품의 개발을 통하여 천문동의 국내 재배를 유도함으로써 농가소득의 향상을 기대할 수 있다.

### 4. 천문동의 고부가가치 제고

○ 타 토종약초에 비하여 전통 약리 효과가 우수함

천문동은 다양한 생리활성 물질을 포함하고 있으며, 만성질환의 치료효능을 갖고 있어 새로운 질병치료효능에 대한 연구가 가능하다. 따라서, 본 연구에서는 최근 급증하고 있는 호흡기 질환과 관한 효능에 대하여 주안점을 두고 평가하고자 한다.

〈표〉 천문동의 기능적 특성 및 생리활성 물질

기능적 특성	생리활성물질
항암, 중기치료, 콜레스테롤 감소, 노화예방, 변비, 신경쇠약 강화,	스테로이달 사포닌, 올리고당, 식물성 스테롤류, 세레토닌, 아스파라긴산

5. 본 연구진의 선행연구와 참여기업의 능력

- 본 연구진의 선행연구에 의한 결과, 천문동은 인삼에 비해 단기재배가 용이하며 saponin 등의 기능성 성분을 다량 함유하고 있어 이의 가공공정을 개발함으로써 인삼 및 홍삼 대체 기능성 식품의 개발을 할 수 있는 가능성이 높음.
- 천문동의 다양한 처리 방법을 통한 기능성 제품의 제조를 통하여 인삼 및 홍삼제품을 대체 할 수 있는 기능성 제품의 개발이 필요한 실정임.

가. 본 연구진의 선행연구

(1) 천문동 자생종과 재배종 비교

경남 밀양과 경북 청도, 전북, 전남 일대에서 천문동의 군락지를 확인하고 2010- 2012년 2년간에 걸쳐 자생하고 있는 천문동 수집

수집한 천문동을 일반 밭 포장에 이식하고 종자를 파종하여 재배가 가능하다는 것을 확인하였으며 수집한 지역별로 큰 차이가 나타남

(2) 천문동의 수량성 비교

수집한 천문동의 수량성을 비교해 본 바, 생육지별 다양한 크기와 수량성을 나타나 생육환경 조건을 파악하여 재배기술을 개발하면 높은 수량을 올릴수 있을 것으로 사료됨



(천문동의 생육차이)

(천문동 뿌리 품질 차이)

지역별 자생 천문동의 지하부 특성을 조사한 바, 괴근중의 분포가 다양하여 재배를 통하여 괴근의 비대 발육 가능성이 높은 것으로 사료됨



표. 지역별 자생종간 천문동의 생육 특성

구분	괴근수	근장 (cm)	근태 (mm)	근 중(g/개)	
				생체중	건조중
경북	12	3.48	12.94	3.02	1.75
경남	17	6.79	14.31	7.74	4.21
전남	14	5.31	13.06	5.15	2.85
전북	10	6.14	11.02	6.34	3.52

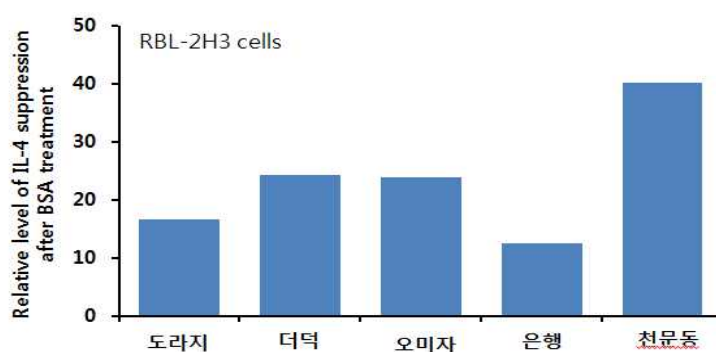
### (3) 천문동의 성분분석

○ 천문동은 다양한 saponin을 함유하고 있으며, 그 함량이 천문동 건근의 7.9%(인삼의 경우 6.4%)를 차지할 정도로 많은 양을 함유하고 있는 우수한 기능성 작물이나 현재 한약재로 이용되고 있으며, 천문동을 이용한 제품개발에 대한 시도가 있었으나 산업화에는 성공하지 못하였음. 또한 대부분 수입에 의존하고 있는 실정임.

○ Saponin을 함유하고 있는 인삼 및 홍삼제품에 대한 소비자의 요구도는 증가하고 있으나, 인삼의 재배기간이 최소 4년 이상 소요되고 가격이 비싸기 때문에 외국으로부터 수입량이 증가하고 있으나 국내산과의 구별할 수 있는 방법이 없어 문제가 되고 있음.

### (4) 천문동을 이용한 호흡기 질환 신소재 개발 가능성 검토

○ 본 연구진은 사전 연구를 통하여 천문동의 덩이뿌리(괴근)의 호흡기 질환과 관련된 생리활성 효과를 살펴보기 위하여 건조된 시료의 열수추출물을 BSA에 유발된 호흡기질환 상태의 mast cell 세포주(RBL-2H3)에 처리하여 사이토카인의 분비억제능에 대한 다음과 같은 결과를 도출하였음.



○ 본 예비실험의 결과 기준에 민간에서 호흡기 관련 질환예방을 위하여 사용한 도라지, 더덕, 오미자, 은행 등과 비교하여 천문동이 호흡기 질환예방의 효과에 있어서 우수한 결과를 나타내고 있음. 따라서, 천문동이 보유하고 있는 호흡기 질환 예방관련 생리활성을 활용한 신소재 개발 가능성이 상당히 높을 것으로 판단되며, 이를 활용한 고부가가치의 제품 생산이 가능할 것

으로 판단됨.

나. 본 연구의 참여기업의 역량

○ 참여기업인 (주) 강림오가닉은 영농법인으로 우리나라 대표적인 유기농업 기업으로 국내 최초 유기농 김치로 일본 JAS인증을 받아 수출하였으며 풀무원에 납품하였음. 이외, 유기농 국수, 전병과 건강식음료(파우치)등을 판매하고 있으며 대표이사 임수복 회장은 이전부터 유기농 기업의 전신으로 신지식인상을 수상. 또한, 부산에 건강식품 판매하는 전문매장을 보유하고 있음(농장 4만평, 저장고 7동, 공장동 보유)

6. 연구팀의 핵심기술과 연구역량

○ 본 연구팀은 과제의 수행에서 제품개발에 핵심기술인 “로스팅을 통한 음료제조기술을 보유하고 있으며, 또한, 발효 및 증숙기술에 적용할 수 있는 다양한 균주와 발효를 통한 제품개발 특허를 보유하고 있음



○ 본 과제의 주관연구책임자는 유기농제품 등의 개발, 판매에 대한 전문성을 확보하고 있으며, 부산대학교 개발연구팀은 기능성제품의 성분분석과 효능평가에 대한 많은 논문과 특허를 갖고 있어 본 연구를 수행하기 위한 충분한 역량을 보유하고 있음

세부과제명	과제책임자	과제책임자의 주요업적
호흡기 질환 예방 제품생산 및 산업화	이중렬 [㈜강림오가닉] 제품 산업화	- 국내최초 일본 JAS인증업체, 신지식인 - 총매출액 : 190백만원 - 상시종업원수 : 6명, 특허보유
호흡기 질환 관련 생리활성 성분분석 및 기능성 증진	김동섭 [부산대] 제품개발	- 논문 : SCI 32편, SCIE 5편, - 논문 : 학진등재 5편, 기타 1편 - 특허등록 : 9건
전문동의 호흡기 질환 효능 연구	황대연 [부산대] 효능평가	- 논문 : SCI 93편, 학진등재 85편 - 특허출원 : 16건 - 특허등록 : 8건

7. 환경 및 사회적 배경

○ 건강기능성 제품에 대한 수요 증대

국민소득이 증가함에 따라 우리 사회에는 웰빙 붐이 일어나고 있으며, 건강 기능성 제품에 대한 소비자의 관심이 높아지고 있음.

한편, 세계 건강기능제품 시장은 연평균 10%(2007년 약 5,321억 달러) 성장하고 있으며 이러한 시장 확대는 생활수준 향상, 고령화로 인한 건강지향욕구 증대, 대체의학과 자가치료에 대한 관심증대 그리고 건강과 식품에 관한 지식 축적 등에 기인함.

2010년도 국내 건강기능식품 생산실적은 총 생산액이 1만 671억 원으로 1조원 시장에 진입 하였으며, 전년대비 11% 증가를 보이고 있으며, 농산물을 원료로 하여 제조·가공한 건강기능식품은 국내 시장에서 점차 확대되는 추세로 '07년 기준 4,876억 원으로 전체 건강기능식품시장의 67%를 차지함.

<기능성식품의 국내 시장 현황>

(단위 : 억원)

구분	2006년	2007년	2008년	2009년	2010년	'10/'09(%)
총 생산액	7,008	7,235	8,031	9,598	10,671	△11.2

● **국내외 기능성 음료 및 미용제품 시장은 연간 2~6% 증가됨**

- 소비자는 새로운 기능성 제품 요구
- 기존 제품은 다른 기능성 제품으로 대체되기에 새로운 제품 개발 필요

<국내>

	증가 현황			
	2007년(전년비)	2008년	2009년	
음료	1% 성장	3~4% 성장	4~5% 성장예상	매년 기능성음료 50여종 출시
미용제품	5.7% 성장	5.9% 성장	6.2% 성장예상	매년 기능성제품 200여종 출시

식품의약품안전청, 한국보건산업진흥원 2007~2008

<일본>

	증가 현황			
	2007년(전년비)	2008년	2009년	
음료	1.2% 성장	1.8% 성장	2.3% 성장예상	매년 기능성음료 30~40여종 출시
미용제품	1.9% 성장	1.8% 성장	1.8% 성장예상	매년 기능성제품 300여종 출시

후지경제 2008

○ 천연소재 가공제품에 대한 수요증대

인공합성 식품 및 미용제품에 대한 부정적 여론이 증대되면서 천연생물소재를 활용한 자연제

품에 대한 소비자의 욕구가 날로 증대되고 있음.

특히, 일본의 원전사고 및 불량식품사고 등 (멜라닌 과동, 카드뮴 쌀, 가짜 식용유 등) 사회적인 문제가 된 유해식품 과동으로 인해 식품의 안전성에 대한 논란이 증폭됨에 따라 천연소재 가공제품에 대한 관심이 증가하고 있음.

이에 따라 슬로우푸드, 식물자원을 활용한 기능성 화장품 등이 소수 개발·판매되고 있으나 소비자들의 다양한 욕구를 충족시키기에는 미흡한 실정임.

#### ○ 소득 증대로 인한 고품질제품 선호

인터넷 발전과 함께 나타난 정보화 사회는 정보공유를 통한 천연가공제품에 대한 욕구를 가속화시킴.

소비자들이 안심하고 먹을 수 있는 상품, 특화 및 차별화된 상품에 대한 수요가 급속히 증가하고 있음.

웰빙 열풍에 따른 품질표시제로 고급화의 필요성이 크게 대두되고 있음.

### 제 3절. 연구개발 범위

천문동은 다양한 생리활성 물질을 포함하고 있으며, 만성질환의 치료와 관련된 다양한 효능이 보고되고 있는 기능성 재료중의 하나이지만 일반적으로 한약재로만 활용되고 있는 실정이다. 또한, 천문동은 폐, 신경을 돕는 중요한 약초로 국내 수요를 자급했던 것이 2000년 이후에는 연간 소요량의 대부분을 중국에서 수입하여 사용하고 있는 실정이다. 우수한 기능성에 비하여 현재까지 산업화로 성공한 예가 전무한 실정이므로, 본 과제에서는 다양한 제품에 적용을 위한 발효 및 증숙과 같은 가공처리 조건을 통해 원재료가 가지고 있는 특성을 향상시켜서 소비자의 기호도에 적합한 제품을 개발하고자 한다. 증숙에 따른 열처리·건조 조건 및 발효에 따른 조건에 따라 원료의 특성이 달라지게 되므로, 천문동의 증숙 및 발효 조건을 최적화하여 최적의 품질을 나타내는 가공처리방법을 표준화하며, 이로부터 얻어지는 재료를 활용하여 고부가가치 제품으로 개발하고 호흡기 질환과 관련된 효능을 평가하여 이를 바탕으로 제품화함으로써 천문동의 소비를 촉진하며, 농가에서 천문동의 재배를 유도하여 농가의 소득 향상 및 기업매출의 증진에 기여할 수 있을 것으로 사료된다.

구체적인 단계별 및 과제별 연구범위는 다음과 같다.

#### ○ 단계별 목표

☞ 제1단계 : 기술기반 구축

- 호흡기 질환관련 천문동의 기능성 성분 분리·동정 및 in vitro 기능성 분석
- 기존 민간요법 재료(도라지, 쑥 등)와의 비교 연구
- 천문동 활용 호흡기 질환예방과 관련된 다양한 제품 개발(차음료, 파우치, 농축액, 환 등의 다양한 제품 및 제형)
- 소비자 기호도 조사 및 시장분석을 통한 가공적성의 최적화 및 표준화
- 천문동의 고품질 원료의 최적 조건의 확립
- ☞ 제2단계 : 호흡기 질환예방 in vivo 효능분석 및 최적 제품개발
- 모델동물 평가시스템 구축
- 생리활성(호흡기질환 등) 효능연구
- 호흡기 질환 예방 전용 최적 제품 및 융복합 제품 개발
- ☞ 제3단계 : 호흡기 질환 예방용 제품의 산업화
- 호흡기 질환 예방 고효율 제품 생산 및 공정기술 개발
- 호흡기 질환 예방관련 지표물질의 추출공정 확립을 통한 신소재 생산
- 호흡기 질환 예방 관련 기능성성분의 효능 평가
- 식약청 허가자료 생산

○ 과제별(세부·협동) 연구개발의 목표 및 내용

- ☞ 제1세부(주관기관: 기업) : 호흡기 질환 예방 제품 생산 및 산업화
- 천문동을 활용한 호흡기 질환 예방 고품질 제품의 최적조건 확립
- 호흡기 질환 예방관련 지표물질의 최적 추출공정 확립
- 호흡기 질환 예방 식음료 제품의 배합 및 공정조건 확립(차음료, 파우치, 농축액, 환 등의 다양한 제품 및 제형)
- 호흡기 질환 예방 제품의 기호도 및 시장조사
- 호흡기 질환 예방 제품의 마케팅 및 홍보전략 수립
- ☞ 제1협동 : 호흡기 질환 관련 생리활성 성분분석 및 기능성 증진연구
- 천문동 덩이뿌리(괴근)의 이화학적 성분 분석
- 천문동의 호흡기 질환 예방관련 성분의 분석, 분리 동정 및 소재화
- 천문동 가공처리 조건의 최적화(발효, 증숙 및 로스팅)
- 천문동 가공처리에 따른 호흡기 질환 예방 관련 기능성 성분의 분석
- 호흡기 질환 예방 관련 기능성 성분의 대량 생산 방법 연구
- ☞ 제2협동 : 천문동의 호흡기 질환 효능연구
- 천문동의 in vitro 생리활성(호흡기질환) 효능분석
- 모델동물을 이용한 천문동의 호흡기질환 효능평가
- 천문동의 호흡기질환에 대한 효능비교 (도라지, 쑥 등과의 비교 연구)
- 신규분리된 소재의 효능 검증 및 융복합 효능 분석

## 제 2장. 국내외 기술개발 현황

코드번호

D-04

### 제 1절. 국내외 관련기술 현황

#### 1. 발효관련 기술

○ 최근 들어 젖산균, 효모, 곰팡이 등의 유익 미생물을 이용한 발효기술의 진보로 올리고당, 아미노산, 펩티드 등의 발효산물을 얻거나 또는 상호간의 시너지 작용에 의하여 생리활성 효과가 증가되는 것으로 알려져 있음

○ 이에 따라 가시오가피, 구지뽕, 뽕잎, 인삼, 콩, 현미 등 각종 농작물을 다양한 미생물을 이용하여 발효시킴으로써 항산화 활성, 항고혈압 활성 등을 증진시키고, 발효산물을 추출하여 요구르트 등의 식품에 첨가하는 연구가 실험실 수준에서 활발히 수행되고 있음. 또한 한약재를 유산균을 이용하여 발효시킴으로써 한약 성분의 체내 흡수율과 생체 이용률을 향상시키는 연구 또한 최근 보고되었음.

○ 천연물에 존재하는 파이토케미컬은 발효시 활성 및 생이용성이 강화되고, 항산화 효과 또한 한층 강화되는 것으로 증명됨

- 콩, 곡류, 야채, 허브, 과일 등에 들어 있는 파이토케미컬 성분의 활성 및 생이용성은 발효과정을 거치면서 괄목할 정도로 강화됨(방부제 효과도 추가)

- 플라보노이드, 페놀산, 리그닌 탄닌 등 페놀릭 계열의 파이토케미컬은 항산화 효과를 갖는데, 발효과정에서 이러한 항산화 효과가 한층 강화되는 것으로 증명됨

○ 식물세포에 함유되어 있는 단백질, 지질, 당류 등은 발효과정을 거치면서 인체에 유용한 성분으로 전환됨

- 단백질 발효는 식물 내 단백질 성분은 발효과정에서 미생물에 의해 활성 펩타이드로 전환되며, 활성 펩타이드는 항고혈압, 면역조절, 항암효과를 갖는 것으로 알려짐

- 지질발효는 발효과정에서 포화지방은 불포화지방 혹은 다른 활성지방으로 전환. 과도한 포화지방의 섭취는 인체의 콜레스테롤 지수를 높여 비만, 당뇨, 암 발병의 원인이 될 수 있지만, 불포화지방은 인체에 이롭다고 알려짐

- 당류 및 섬유질 발효는 발효과정에서 당류 및 식이성섬유로부터 부티르산염(Butyrate)이 생성됨. 부티르산염은 대장세포의 주요에너지 공급원으로서 대장 내 세포건강 유지에 중요한 역할을 담당하며, 그 결과로서 항비만, 항염, 심장질환예방 효과를 갖는 것으로 밝혀짐

○ 이에 반해 천문동의 경우, 미생물을 이용한 천문동 발효 연구는 거의 수행되어 있지 않고

있어서 천문동과 관련된 미생물 발효기술 수준은 초창기에 있다고 해도 과언이 아님

## 2. 열처리 관련 기술

○ 최근 소비자들은 건강지향형 식품을 구입하는 식품소비 트렌트로 인하여 식품 또는 천연물에 존재하는 생리활성물질을 이용하는 방법으로는 한계가 있음. 그로 인하여 초고압, 증숙, 열처리 공정 등의 새로운 가공기술을 적용하여 새로운 유용성분을 증가시키는 연구가 지속적으로 진행되고 있음.

○ 증숙이란 증기를 이용해 열처리를 하여 원재료의 구성성분들의 변화를 야기시키어 새로운 화합물을 만들어 내거나 재료의 조직을 파괴하여 유용성분 용출을 극대화하는 공정으로 인삼의 증숙이 많이 알려져 있음

○ 한방에서는 수치(修治)라 하여 한약재의 가열처리를 통한 독성을 낮추고 부작용을 최소화하여 치료효과를 높이며, 가공이나 절편에 편리하게 사용하고자 하는 방법의 하나로 사용해 왔음. 특히 수치법 중의 하나인 구증구포(九蒸九曝)의 방법은 9번 찌고 말리는 과정을 반복하여 제조하는 것으로 수삼에 적용하여, 홍삼 및 흑삼등의 제조에 많이 이용하는 가공 방법 이임

○ 일반적으로 직접적인 열처리에 의한 추출공정은 조직성분을 연소시키며 활성성분의 파괴가 야기될 수 있으며, 그에 따른 활성성분의 수율 및 생리활성도 감소하게 되기 때문에, 이러한 단점을 극복하기 위한 공정으로 직접적 열처리가 아닌 습기를 통한 간접적인 열처리로 활성성분의 파괴를 막으며, 유용성분의 용출을 증진시킬 수 있는 증숙을 사용하고 있음.

○ 증숙과정을 통하여 약용식물의 free polyphenolic compound 및 flavonoids 등의 성분 용출이 용이하고 활성산소 소거작용이 증가를 가져오는 것으로 보고되어 지고 있으며, 특히 홍삼의 경우에는 열처리에 의하여 ginsenoside의 C-20 위치에 결합한 당이 이탈 및 이성화에 의하여 Rh2, Rg3, Rg5, Rs4 등이 생성되며, 이들은 강한 항암작용을 하는 것으로 알려져 있다. 또한 증숙 과정 중의 Maillard 반응에 의해 생성된 Arg-Fru-Glc 중합체는 혈류개선 효과가 뛰어나며, maltol 은 강한 활성산소 소거작용을 가지는 것으로 보고되고 있음.

○ 증기를 이용한 열처리는 원재료의 물리적인 조직 변화뿐만 아니라 화학적인 변화를 일으키며, 폴리페놀 화합물, 갈변 물질 등에 의한 항산화 활성의 증가를 가져오는 것으로 여겨지고 있으며, 열처리 시 가열 온도, 시간 열처리 횟수에 따라 다양한 양상의 물리, 화학적 특성 변화를 가져오게 됨.

○ 증숙과 관련된 열처리 기술은 일반적으로 인삼에 가장 많이 적용이 되고 있으며, 이와 관련된 연구 또한 가장 많이 진행되어 왔으나 인삼을 제외한 재료에 있어서는 마늘, 차가버섯, 오미자 등에 일부가 진행되고 있으며, 천문동에 증숙 공정을 이용한 연구는 진행된 바가 없음. 증숙처리 조건은 원재료에 따라 온도 및 시간, 그리고 건조과정이 매우 다르기 때문에 천문동을 증숙하는 열처리 공정에 대한 연구는 전무한 상황임.

## 제 2절. 국내외 제품생산 및 시장현황

### 1. 국내 현황

○ 천문동의 기능성에 관한 연구가 미흡하고 이를 이용한 제품의 수준도 단순 추출물의 형태를 이용하고 있는 실정이다. 또한 천문동을 이용하는 경우에도 현재 시판되고 있는 제품은 극소수이며 단지 과거에 자생 천문동을 깨어서 이용해 온 수준임.

○ 천문동은 스테로이드, saponin 등을 함유하고 있으며 saponin의 경우, 천문동 건근의 7.9%(인삼의 경우 6.4%)를 차지할 정도로 많은 양을 함유하고 있는 우수한 기능성 작물로 인삼에 비견될 수 있음. 따라서 인삼과 홍삼의 제품생산 및 시장현황을 살펴봄으로서 천문동 및 천문동의 제품생산 및 시장현황을 전망해 볼 수 있을 것으로 사료됨

○ 전통적으로 인삼을 달여서 섭취하는 한의학적 방법은 조제에 시간과 불편이 따르므로 근래에 와서 가공기술의 발달로 소비자들이 섭취가 간편하고, 휴대가 편리한 2차 가공인삼제품들이 가공되고 있다. 이러한 가공제품들은 농축, 정분, 차류, 타블렛, 캡슐, 분말류, 음료, 환제, 절편삼, 봉밀삼, 과자류, 주류 등 소비자들 기호에 맞는 다양한 제조기법으로 제품이 개발되고 됨

○ 생활수준의 향상과 함께 건강에 관심이 높아지면서 웰빙추구로 인삼/홍삼에 관한 관심도 꾸준히 높아지고 있다. 2004년부터 시행된 건강기능식품법의 시행으로 많은 대기업에서 인삼제품 시장에 진출해 시장규모가 급격히 늘어나고 있는데, 인삼업계에서는 홍삼시장의 규모가 2004년 2,113억원, 2006년 6,000억원, 2010년도에는 1조원대의 거대시장을 형성할 것으로 전망하고 있음.

○ 인삼 및 홍삼 본삼을 가공한 식품과 건강기능식품을 포함한 인삼제품류의 2015년 출하액은 1조 2,570억 원으로, 2011년 1조 452억 원에서 20.3% 증가함. 인삼제품류에서 홍삼



제품의 비중이 2015년 출하액 기준 약 97%로, 시장의 대부분을 차지하고 있음. 특히, 면역력에 대한 관심 증가로 2015년 출하액 상승하고 있으며, 2014년의 출하 감소는 홍삼 가공업 후발업체들의 사업 규모 축소 및 철수가 주요 요인으로 보이는 반면 2015년의 출하 증가는 ‘메르스(중동 호흡기 증후군, MERS)’의 여파로 면역력 증가에 대한 관심 증가가 직접적인 요인으로 보임

○ 이러한 인삼시장의 급격한 성장은 인삼이 중장년층, 노년층이 섭취하는 보약개념에만 국한되었던 것이 어린이, 청소년층, 여성층 등 다양한 소비자층의 욕구에 부응하는 제품 출시와 질병예방, 건강유지 등 일반인들의 관심 증가로 소비자층이 확대되었기 때문인 것으로 사료됨. 한국의 인삼시장의 특징은 단일 시장 중에서는 매우 커다란 시장을 형성하고 있다는 것이다. 이는 오랫동안 인삼의 효능에 대한 인식과 활용경험에 의거한 한국인의 인삼선호도에 기인하리라 여겨진다. 1차 재배산물을 기준으로 총 인삼 생산량(2005년기준, 약 1만 5천톤) 약 14%만 수출하고 나머지는 국내에서 소비함은 것 큰 내수시장을 가지고 있음을 의미함.

○ 현재 국내에 유통되는 전체 인삼제품의 품목별 분포를 인삼과 홍삼으로 대별해 보면 인삼류 보다 홍삼류가 약 6배 정도 많은 출하량을 보이고 있고, 홍삼엑기스나 홍삼분말과 같은 그자체로서 보다 홍삼을 이용한 음료나 식품류가 더 많은 출하액을 보인다. 이는 점차 인삼에 대한 수요가 고유한 인삼보다 좀 더 부가가치가 높은 홍삼이나 홍삼을 응용한 새로운 형태의 제품이 개발되고 시장을 점유한다는 의미로 해석된다. 따라서 천문동을 증속하여 제조하는 천문동과 천문동의 기능성 제품이 천문동을 이용하는 제품에 비해 보다 높은 선호도를 보일 것으로 전망됨

## 2. 국외현황

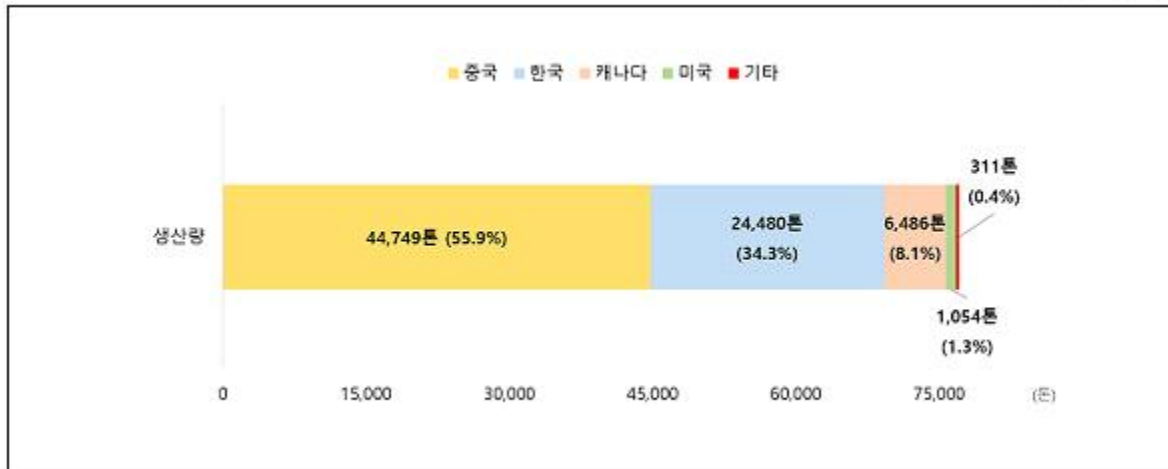
○ 인삼의 다양하고 우수한 효용성에 근거하여 인삼류의 개발과 제품생산이 활발하게 이루어져 현재 국내 건강보조식품 생산량 중에서 인삼류가 30%를 차지.

○ 세계 인삼생산 규모는 2013년 기준, 총 80,000톤이며, 주요 4개국의 인삼생산량이 전 세계 인삼 총 생산량의 95%를 차지하고 있음

### <주요국 인삼 생산 현황>

○ 한국에서의 인삼류 생산의 활성화에도 불구하고, 한국 인삼이 세계시장에서 차지하는 위상은 심각하게 축소되어가고 있는 실정임

(단위 : 톤, %)



○ 세계적으로 인삼을 주로 소비하는 지역은 한국, 일본, 중국 등 동남아시아권의 나라들이나 건강기능성 식품이 각광받으면서 전 세계적으로 인삼시장에 대한 관심도가 점차 높아지고 있음.

○ 주로 인삼이 소비되는 나라들의 그 추세를 살펴보면 일본은 한국과 달리 뿌리삼형태로의 유통은 거의 없고 제약회사나 건강기능식품의 완제품 형태로 판매되는 것이 특징이고, 미국의 천연물 제품 매출은 2004년 약 52억불에 달하여 전년대비 15%의 고성장을 보이고 있으며, 그 중 인삼제품은 가장 인기 있는 제품임. 미국 시장 내 소비패턴은 뿌리삼의 형태는 거의 없고 캡슐이나 타정 형태이거나 스낵이나 드링크와 같은 형태의 상품을 선호하고 있으며, 객관적인 인삼효능의 데이터 등을 요구하는 경향이 강하므로 이에 대한 고려가 필요함.

### 제 3장. 연구수행 내용 및 결과

#### 제 1절. 호흡기 질환 예방 제품 생산 및 산업화(제1세부)

##### 1. 천문동 고품질 원료의 최적 조건

##### 가. 천문동 수확 시기별 원료의 품질 비교

본 실험에 사용한 천문동은 전북 고창에서 재배한 천문동을 2014년 11월 수확과 2015년 1, 2, 3월의 수확시기에 따라 원료의 크기 및 무게의 변화를 조사하였다. Table 1에서 보는 바와 같이 수확시기에 따라 천문동의 크기와 무게는 가을의 수확에 비하여 다음 해인 봄에 수확하는 것이 약간 증가하는 경향이였다.

Table 1. 수확시기별 크기 및 무게의 변화

수확시기	크기(갯수)				무게(g)			
	4cm 이하	4-6cm	6cm 이상	합계	4cm 이하	4-6cm	6cm 이상	합계
2014. 11	19	12	7	38	57	76	90	223
2015. 1	19	14	6	39	61	81	94	226
2015. 2	16	14	8	38	51	87	117	255
2015. 3	14	16	10	40	45	112	131	288



Figure 1. 수확시기별 천문동 건근

나. 일반성분의 변화

수확시기에 따라 천문동의 일반성분을 비교, 분석하였다. 천문동의 일반성분은 A.O.A.C.방법에 준하여 측정하였으며 가용성 고형분 함량은 시료 20ml를 항량을 구한 칭량병에 각각 취하여 105℃의 건조기에서 항량이 될 때까지 건조시킨 후 중량을 측정하여 % (w/v)로 나타내었다.

탄수화물은 phenol-sulfuric acid법으로 시료용액 0.5ml에 5% phenol용액 동량을 넣고 교반한 후 황산용액을 2.5ml를 가하여 발열시키며 잘 혼합한다. 이 반응액을 실온에서 20분 방치한 후 spectrophotometer(BioSpec-mini, Shimadzu Corp., Japan)를 이용하여 490nm에서 흡광도를 측정하였다.

단백질 정량은 Lowry법을 이용하며, Reagent A, B, C 용액(A: 2% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> in 0.1N NaOH, B: 1% Sodium potassium tartrate in H<sub>2</sub>O, C: 0.5% CuSO<sub>4</sub> · 5H<sub>2</sub>O in H<sub>2</sub>O)용액을 첨가하여 교반한 후 Folin's reagent (2N-Folin phenol reagent:H<sub>2</sub>O=1:10)를 첨가한 후 spectrophotometer를 이용해 540nm에서 흡광도를 측정하며, 표준물질로는 BSA(bovine serum albumin)를 사용하여 정량하였다.

또한, 지방의 함량은 건조된 시료를 속실렛추출법을 실시하여 함량을 측정하였고 회분은 회화법으로 분석하며 조지방은 추출물을 항량을 구한 수기에 취하여 105℃에서 충분히 건조시킨 후 ethyl ether로 추출하여 중량을 측정하였다.

일반성분을 측정한 결과 table 2에 나타난 것과 같이 수확시기에 따라 수분과 단백질 함량은 감소하는 경향이었으나, 다른 성분은 이듬 해에서 약간 증가하는 경향을 보여 이는 천문동의 수확시기 등 다양한 변수에 의해 나타날 수 있으므로 실험을 진행하는데 영향을 미치지 않을 것으로 여겨졌다.

Table 2. 천문동의 수확시기별 일반성분의 변화 (단위:%)

수확시기	수분	조단백	조지방	조회분	조탄수화물
2014. 11	86.6	13.03	0.19	1.02	3.26
2015. 1	85.3	14.7	0.18	1.09	3.30
2015. 2	84.5	12.1	0.19	1.03	3.29
2015. 3	84.1	11.29	0.21	1.08	3.32

다. 천문동의 건조방법에 관한 연구

수확한 천문동에 대하여 원료의 최적 조건을 판단하기 위하여 건조방법에 따라 천문동의 변화를 조사하였다. 건조방법은 열풍건조와 동결건조 방법을 사용하였는데, 열풍건조는 천문

등을 얇게 슬라이스 형태로 자른 후 50℃에서 열풍건조기(DE/ULE400, MEMMERT CO., Germany)를 이용하여 3일동안 건조하였다. 또한, 동결건조는 천문동을 얇게 슬라이스 형태로 자른 후 하루동안 예비동결 시킨 다음 동결건조기로(FD5510S-FD5520S, Ilshinbiobase co., Dongducheon, korea)로 4일동안 건조한 다음 분쇄기(MF-3100S, Hanil Electric Co., Seoul,Korea)로 분말화 한것을 재료로 사용하였다.

그 결과, 열풍건조의 경우는 1일차에서부터 부패하는 경향을 보였으며 동결건조방법에서는 정상적으로 원료를 사용할 수 있어서 제품 원료 확보를 위해서는 동결건조 방법을 사용해야 하는 것으로 판단된다.

이와 같이, 천문동의 고품질을 원료확보는 수확 후, 일반 건조하는 것보다 동결건조하여 연중에 사용하는 것이 보다 합리적인 것으로 본 연구 결과를 통해 알 수 있었다.


			
			
0일차(건조 전) -천문동 구근의 형태이며 울퉁불퉁한 타원형이며 흰색의 등근 단면을 가짐.	1일차 -약간의 청국장 냄새가 나며 약간의 점질물 생성	2일차 -청국장냄새가 심하게 나며 바실러스 균이 자란 것이 보임. 부패가 진행 중	3일차 -부패가 상당히 진행되어 건조가 불가능한 상태

Figure 2. 열풍건조에 따른 천문동의 변화

## 2. 호흡기 질환 예방제품 생산체계 구축

### 가. 소비자 조사 및 기호도 조사

(1) 천문동 제품

천문동은 식품에 제한적으로 사용할 수 있는 원료이며, 식품의 기준 및 규격(식품공전)의 별표2에 덩이뿌리(괴근)만을 사용할 수 있도록 허가되어 있다. 또한, “식품에 제한적으로 사용할 수 있는 원료”로 명시되어 있는 동·식물 등은 가공 전 원재료의 중량을 기준으로 원료 배합시 50% 미만(배합수는 제외한다) 사용하여야 하며, “식품에 제한적으로 사용할 수 있는 원료”에 속하는 원료를 혼합할 경우, 혼합성분의 총량이 제품의 50% 미만(배합수는 제외한다)이어야 한다. 다만, 다류, 음료류, 주류 및 향신료 제조 시에는 제품의 구성원료 중 “식품에 제한적으로 사용할 수 있는 원료”에 속하는 식물성원료가 1 가지인 경우에는 “식품에 사용할 수 있는 원료”로 사용할 수 있다. 따라서, 식품공전에서 제시된 기준에 의거하여 제품을 개발하고자 하였으며, 천문동 괴근을 이용한 차음료관련 제품은 개발시 제약이 없으며, 기타 제품의 경우에는 배합비를 50%이하로 하여 제품을 개발하고자 하였다.

천문동 열수 추출물을 이용한 음료를 개발하기 위하여 추출물의 농도에 따른 관능평가를 실시하였다. 천문동 음료의 소비자 기호도를 알아보기 위하여 천문동 음료를 차음료의 선호도가 높으며 주 이용층이라고 할 수 있는 20대 여성을 대상으로 하여 관능평가를 수행하였다. 관능평가 시 음료는 천문동 열수추출액을 각각 20, 40, 60, 80% 함량으로 물과 함께 희석하여 제조하여 수행하였다. 그 결과는 Table 3과 같으며, 천문동 열수 추출액 농도에 따른 관능평가를 살펴보면 색, 종합적인 맛 평가 및 기호도, 향, 구매의향에서 열수추출액이 40% 들어간 음료가 가장 높은 선호도를 나타내는 것을 확인할 수 있었으며, 감칠맛에서도 다른 항목과 유의적인 차이는 없었지만 항목 중에서 높은 값을 나타내었다. 단맛, 쓴맛, 비린맛, 향은 추출액의 농도가 올라갈수록 높게 나타났으며, 이는 천문동 열수 추출액 함량이 높은 경우 단맛은 많지만 반대로 쓴맛, 비린맛도 같이 상승하여 기호도가 떨어지는 것으로 여겨진다. 따라서 천문동을 차음료로 개발함에 있어 천문동 열수 추출액이 40% 들어갔을 때 적합한 농도라고 판단된다. 하지만 이를 실제로 제품 개발로 실행하기에는 전반적인 기호도가 낮은 것으로 확인되어 이를 보완하기 위한 방안이 필요할 것으로 판단되었다.

Table 3. 천문동 열수추출물의 농도에 따른 관능평가

농도	20%	40%	60%	80%
1. 색	4.16±1.61 <sup>b</sup>	5.85±1.66 <sup>a</sup>	5.32±1.53 <sup>ab</sup>	4.26±2.05 <sup>b</sup>
<세부적인 맛 평가>				
1) 단맛	2.11±1.20 <sup>c</sup>	4.00±1.56 <sup>b</sup>	4.00±1.89 <sup>b</sup>	5.26±2.23 <sup>a</sup>
2) 쓴맛	2.89±2.16 <sup>b</sup>	3.30±1.92 <sup>b</sup>	4.79±2.04 <sup>a</sup>	5.84±2.09 <sup>a</sup>
3) 신맛	1.37±1.01 <sup>ns</sup>	1.95±1.82 <sup>ns</sup>	1.74±1.19 <sup>ns</sup>	2.00±1.33 <sup>ns</sup>
4) 떫은 맛	2.61±2.15 <sup>b</sup>	3.20±2.14 <sup>b</sup>	3.95±2.12 <sup>ab</sup>	5.26±2.49 <sup>a</sup>
5) 비린 맛	2.37±1.71 <sup>b</sup>	2.90±1.71 <sup>b</sup>	3.37±2.34 <sup>ab</sup>	4.21±2.46 <sup>a</sup>
6) 감칠 맛	2.37±1.38 <sup>ns</sup>	3.40±1.90 <sup>ns</sup>	3.00±1.80 <sup>ns</sup>	2.68±1.92 <sup>ns</sup>

2. 종합적인 맛 평가	3.53±1.90 <sup>a</sup>	4.65±1.98 <sup>a</sup>	3.63±1.61 <sup>a</sup>	2.16±1.21 <sup>b</sup>
3. 향	4.05±1.78 <sup>ns</sup>	4.90±1.45 <sup>ns</sup>	3.68±2.00 <sup>ns</sup>	3.84±1.98 <sup>ns</sup>
4. 종합적인 기호도	3.37±1.95 <sup>b</sup>	4.55±1.76 <sup>a</sup>	3.16±1.46 <sup>bc</sup>	2.37±1.21 <sup>c</sup>
5. 구매의향	2.74±2.31 <sup>ab</sup>	3.50±2.46 <sup>a</sup>	2.26±1.24 <sup>ab</sup>	1.68±1.06 <sup>b</sup>

Values are mean ± S.D

<sup>a-c</sup> Data are significantly different by one-way ANOVA followed Duncan's multiple range test at the 0.05 level of significance.

천문동 차음료 개발을 위하여 천문동 괴근을 온도 및 시간에 따라 로스팅하여 제조하였으며, 천문동 차음료 역시 주 이용대상인 20대 여성을 중심으로 관능평가를 실시하였으며, 그 결과는 Table 4와 같다. 천문동 차음료의 관능평가 결과를 살펴보면 색, 단맛, 쓴맛, 신맛, 비린 맛, 감칠 맛, 향, 구매의향 등에서 유의적인 차이가 없었지만, 종합적인 맛 평가 및 기호도에서 2-C 시료가 유의적으로 높음을 확인할 수 있었으며, 구매의향 및 향 항목에서도 유의적인 차이가 없었지만 결과 값이 다른 조건에 비해 높음을 확인할 수 있었다. 이러한 결과는 2-C 시료가 비록 유의적인 차이는 없었지만 단맛이 높으며, 쓴맛이 감소하여 전반적인 기호도가 증가한 것으로 추측되며, 로스팅 온도 및 시간이 길수록 전반적인 기호도가 떨어짐을 확인할 수 있었다.

Table 4. 천문동 로스팅 조건에 따른 차음료의 관능평가

음료	2-A	2-B	2-C	2-D	2-E	2-F
1. 색	5.40±1.57 <sup>ns</sup>	5.20±1.64 <sup>ns</sup>	5.50±1.54 <sup>ns</sup>	4.75±1.37 <sup>ns</sup>	5.45±1.47 <sup>ns</sup>	4.85±2.01 <sup>ns</sup>
<세부적인 맛 평가>						
1) 단맛	3.75±2.12 <sup>ns</sup>	3.65±2.08 <sup>ns</sup>	4.00±2.29 <sup>ns</sup>	3.80±2.17 <sup>ns</sup>	3.65±1.98 <sup>ns</sup>	3.70±2.13 <sup>ns</sup>
2) 쓴맛	2.75±1.59 <sup>ns</sup>	3.90±1.62 <sup>ns</sup>	2.60±1.54 <sup>ns</sup>	3.00±1.34 <sup>ns</sup>	3.60±1.96 <sup>ns</sup>	3.65±2.11 <sup>ns</sup>
3) 신맛	1.40±0.82 <sup>ns</sup>	1.35±0.67 <sup>ns</sup>	1.55±1.05 <sup>ns</sup>	1.30±0.57 <sup>ns</sup>	1.35±0.75 <sup>ns</sup>	1.40±0.68 <sup>ns</sup>
4) 떫은 맛	2.40±1.47 <sup>b</sup>	2.75±2.00 <sup>ab</sup>	2.85±1.79 <sup>ab</sup>	2.95±1.61 <sup>ab</sup>	3.55±2.04 <sup>a</sup>	3.15±1.98 <sup>ab</sup>
5) 비린 맛	3.35±2.35 <sup>ns</sup>	3.20±2.28 <sup>ns</sup>	4.00±1.81 <sup>ns</sup>	3.05±2.14 <sup>ns</sup>	3.25±2.05 <sup>ns</sup>	3.15±2.01 <sup>ns</sup>
6) 감칠 맛	2.15±1.46 <sup>ns</sup>	2.05±1.36 <sup>ns</sup>	2.30±1.53 <sup>ns</sup>	2.70±2.25 <sup>ns</sup>	2.15±1.35 <sup>ns</sup>	2.05±1.39 <sup>ns</sup>
2. 종합적인	4.40±1.82 <sup>ab</sup>	4.35±2.01 <sup>ab</sup>	5.25±1.59 <sup>a</sup>	4.20±1.88 <sup>ab</sup>	3.85±1.98 <sup>b</sup>	3.95±2.19 <sup>ab</sup>

맛 평가						
3. 향	4.40±2.26 <sup>ns</sup>	4.55±2.01 <sup>ns</sup>	5.55±1.61 <sup>ns</sup>	4.60±2.04 <sup>ns</sup>	4.70±2.18 <sup>ns</sup>	4.50±2.28 <sup>ns</sup>
4. 종합적인 기호도	4.30±1.84 <sup>ab</sup>	4.45±2.01 <sup>ab</sup>	5.25±1.45 <sup>a</sup>	4.60±1.82 <sup>ab</sup>	4.20±1.99 <sup>ab</sup>	3.90±1.92 <sup>b</sup>
5. 구매의향	3.75±2.40 <sup>ns</sup>	3.75±2.53 <sup>ns</sup>	4.70±2.05 <sup>ns</sup>	3.70±2.08 <sup>ns</sup>	3.45±2.28 <sup>ns</sup>	3.40±2.21 <sup>ns</sup>

Values are mean ± S.D

<sup>a-f</sup> Data are significantly different by one-way ANOVA followed Duncan's multiple range test at the 0.01 level of significance.

천문동 열수 추출액을 이용한 음료 관능평가에서 추출액이 40% 함유된 음료에서 기호도가 좋은 것으로 나타났지만 전반적인 기호도는 떨어짐을 확인할 수 있었다. 따라서 그에 대한 대안으로 탄산을 첨가하여 스파클링 제품을 제조함으로써 특쓰는 맛을 추가하여, 새로운 형태의 음료를 개발하고자 하였다. 탄산수는 말 그대로 물에 탄산이 첨가된 형태로 최근 탄산수의 소비가 증가하고 있으며, 여러 가지 음료에 탄산수가 첨가된 스파클링 제품이 인기를 끌고 있는데 천문동 스파클링은 이러한 추세에 맞는 제품이라 할 수 있을 것이다.

천문동 탄산수는 천문동 열수 추출액 음료 관능평가에서 전반적인 기호도가 높았던 추출액 40%를 기준으로 천문동 열수 추출액을 희석할 때 일반 물 대신 탄산수로 희석하여 제조하였다. 열수 추출액에 직접 탄산을 주입하는 것이 아니기 때문에 탄산의 정도가 떨어지는 것을 감안하여 탄산수에 다시 한 번 탄산을 더 첨가하여 일반 탄산수보다 탄산의 정도가 높은 탄산수를 제조하여 천문동 스파클링을 제조하였다. 만들어진 천문동 스파클링은 시중에 출시되어 있는 다른 회사 제품의 스파클링과 비교하여 관능평가를 실시하였으며 그 결과는 Table 5과 같다.

그 결과 종합적인 기호도 맛 평가 및 기호도, 향, 구매의향에서 천문동 스파클링 제품이 가장 낮은 결과를 나타내었다. 색에서는 제품간 유의적인 차이가 없었지만 전반적인 기호도가 높았던 C 제품의 기호도에서 단 맛과 탄산강도가 높은 것을 확인하였을 때 천문동 스파클링 제품의 보완점을 생각해볼 수 있었다. 먼저 열수 추출액에 직접 탄산을 주입하는 것이 아님으로 탄산의 강도가 타사 제품에 비해 낮은 것이 단점이었으므로 이를 보완하기 위해 천문동 열수 추출액 40%를 제조하여 직접 탄산을 주입하는 방식으로 전환해야 할 것으로 판단되며, 그 다음으로 추출액을 희석하여도 천문동 특유의 쓴맛과 비린맛이 기호도에 영향을 주는 것으로 추측되어 이를 보완하기 위해 일정량의 당을 첨가하여 그 맛을 보완해야 할 것으로 판단되었다.



Table 5. 천문동 스파클링 제품의 관능평가

음료	3-A	3-B	3-C
1. 색	5.26±2.17 <sup>ns</sup>	5.04±1.73 <sup>ns</sup>	4.96±1.53 <sup>ns</sup>
<세부적인 맛 평가>			
1) 단맛	2.04±1.70 <sup>b</sup>	3.11±1.83 <sup>b</sup>	6.41±2.28 <sup>a</sup>
2) 쓴맛	2.85±1.82 <sup>b</sup>	4.48±2.42 <sup>a</sup>	2.04±1.35 <sup>b</sup>
3) 신맛	2.70±2.12 <sup>b</sup>	2.52±1.99 <sup>b</sup>	4.04±2.35 <sup>a</sup>
4) 뚝은 맛	3.22±1.85 <sup>a</sup>	4.07±2.37 <sup>a</sup>	2.11±1.52 <sup>b</sup>
5) 감칠 맛	2.22±1.64 <sup>b</sup>	3.44±2.31 <sup>b</sup>	1.70±1.33 <sup>a</sup>
6) 비린 맛	2.70±1.96 <sup>b</sup>	2.41±1.89 <sup>a</sup>	4.00±2.14 <sup>b</sup>
7) 탄산강도	5.78±1.34 <sup>a</sup>	2.96±1.60 <sup>b</sup>	5.63±1.25 <sup>a</sup>
2. 종합적인 맛 평가	3.89±1.89 <sup>b</sup>	2.93±1.56 <sup>b</sup>	5.37±1.89 <sup>a</sup>
3. 향	4.22±2.18 <sup>b</sup>	3.59±1.68 <sup>b</sup>	5.56±2.10 <sup>a</sup>
4. 종합적인 기호도	3.93±2.05 <sup>b</sup>	3.00±1.52 <sup>b</sup>	5.56±2.04 <sup>a</sup>
5. 구매의향	2.81±2.07 <sup>b</sup>	2.26±1.55 <sup>b</sup>	4.81±2.37 <sup>a</sup>

천문동 스파클링 개발 시 탄산의 강도가 낮았던 점을 보완하기 위해 음료를 제작 후 탄산을 직접 주입하여 탄산 함유량을 증가시켰으며, 특유의 쓴맛과 비린맛을 보완하기 위해 천연 감미료인 스테비안을 첨가하여 단맛을 증가시켰다. A는 천문동 열수 추출액 40% 농도에 탄산을 직접 주입한 음료이며, B는 A 음료에 천연감미료인 스테비안을 0.02% 첨가하여 단맛을 증가시킨 스파클링 음료이며, C와 D는 타사 제품이었다. 그에 따른 결과는 다음과 같다. 종합적인 맛 평가, 기호도, 향, 구매의향에서 천연감미료가 포함된 스파클링 제품인 B의 기호도가 유의적으로 높은 것을 확인할 수 있었으며, 천문동 열수 추출액 40% 농도에 탄산을 직접 주입한 A 음료의 기호도도 전에 비해 상승한 것을 확인할 수 있었다. 이 결과를 토대로 천문동 열수 추출액 40% 농도에 스테비안 0.02% 첨가한 후 탄산을 직접 주입한 음료가 기존의 제품보다 기호도 및 구매의향이 높았으므로 B와 같은 제품을 시장에 출시하였을 때 기존의 제품과 비교하여 충분히 경쟁력이 있을 것이라 판단된다.

Table 6. 천문동 스파클링 제품의 관능평가(2차평가)

음료	A	B	C	D
1. 색	5.43±1.40 <sup>a</sup>	6.00±1.32 <sup>a</sup>	4.57±1.59 <sup>ab</sup>	3.14±1.25 <sup>b</sup>
<세부적인 맛 평가>				
1) 단맛	4.14±1.55 <sup>c</sup>	5.57±2.21 <sup>b</sup>	2.57±1.18 <sup>d</sup>	8.29±0.45 <sup>a</sup>
2) 쓴맛	3.00±1.85 <sup>ns</sup>	1.86±1.17 <sup>ns</sup>	3.29±1.98 <sup>ns</sup>	1.71±0.70 <sup>ns</sup>
3) 신맛	2.29±1.58 <sup>ns</sup>	1.86±1.30 <sup>ns</sup>	2.14±1.36 <sup>ns</sup>	3.57±2.72 <sup>ns</sup>
4) 뽀은 맛	2.86±1.55 <sup>ab</sup>	2.00±2.03 <sup>b</sup>	3.86±1.81 <sup>a</sup>	1.29±0.45 <sup>b</sup>
5) 감칠 맛	3.71±1.16 <sup>ab</sup>	4.71±2.03 <sup>a</sup>	2.29±1.48 <sup>b</sup>	3.14±1.46 <sup>ab</sup>
6) 비린 맛	3.57±1.99 <sup>ns</sup>	2.57±2.45 <sup>ns</sup>	3.71±1.91 <sup>ns</sup>	1.86±1.73 <sup>ns</sup>
7) 탄산강도	5.29±0.88 <sup>ns</sup>	6.14±1.27 <sup>ns</sup>	6.43±1.50 <sup>ns</sup>	5.71±1.75 <sup>ns</sup>
2. 종합적인 맛 평가	4.00±1.41 <sup>b</sup>	7.00±1.58 <sup>a</sup>	3.00±1.31 <sup>b</sup>	3.71±1.48 <sup>b</sup>
3. 향	4.29±1.03 <sup>ab</sup>	5.71±1.67 <sup>a</sup>	3.57±1.18 <sup>b</sup>	4.14±1.36 <sup>ab</sup>
4. 종합적인 기호도	4.14±0.99 <sup>b</sup>	6.14±1.84 <sup>a</sup>	3.43±1.18 <sup>b</sup>	4.29±1.58 <sup>b</sup>
5. 구매의향	3.71±1.03 <sup>ab</sup>	5.71±1.93 <sup>a</sup>	3.14±1.64 <sup>b</sup>	4.43±1.76 <sup>ab</sup>

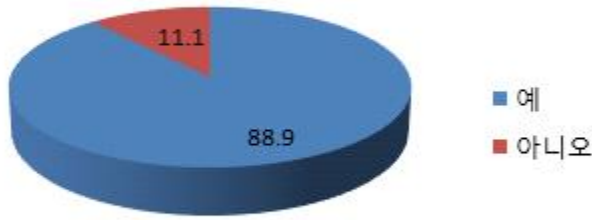
Values are mean ± S.D

<sup>a-c</sup> Data are significantly different by one-way ANOVA followed Duncan's multiple range test at the 0.01 level of significance.

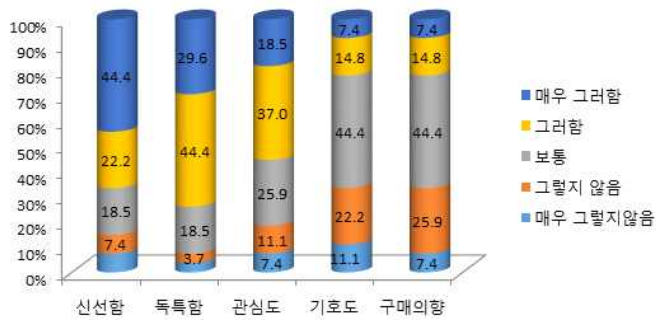
천문동 스파클링 제품에 대한 선호도 조사는 Figure 3과 같다. 스파클링 제품 선호도 조사에서 스파클링 제품의 구매 경험에 대한 질문에 조사대상자의 88.9%가 음료를 구매한 경험이 있다고 답하였고, 11.1%가 구매한 경험이 없다고 답하였다. 이는 탄산수 제품에 대한 소비자의 인지도가 높다는 것을 의미하며, 탄산수 제품에 대한 소비자의 니즈를 충분히 충족시킬 수 있는 새로운 제품을 만들기 위해 지속적인 연구 및 개발, 홍보가 필요할 것으로 여겨진다. Figure 1과 같이 '천문동 스파클링'에 대한 소비자 선호도 조사 결과는 제품에 대한 독특함과 신선함이 다른 항목에 비하여 높은 평가를 받았는데 이는 시판되는 스파클링 제품 중 천문동이라는 새로운 재료가 더해진 결과로 보여진다. 그 외에도 제품에 대한 관심도와 기호도, 구매의향의 모든 항목에 대한 평가가 50%가 넘는 것을 보이며 천문동 탄산수에 대한 소비자 평가가 높은 것으로 나타났다. 제품의 가격면에서는 소비자가 기존의 탄산수 제품의 가격은 1000원 이상~1300원 미만이 37.9%로 가장 높았으며, 시중에서 구입하는 탄산수 제품의 가격도 이와 비슷한 것으로 조사되었다. 이에 대한 제품의 적당 가격을 묻는 설문에서도 44.8%가 1000원 이상~1300원 미만, 37.9%가 1300원 이상~1600원 미만으로 기존의 탄산수 구입가격과 비슷한 수준을 선택하였다. 이러한 결과는 앞으로 제품을 출시할 때 고려

되어야 할 것으로 판단된다.

A



B



C

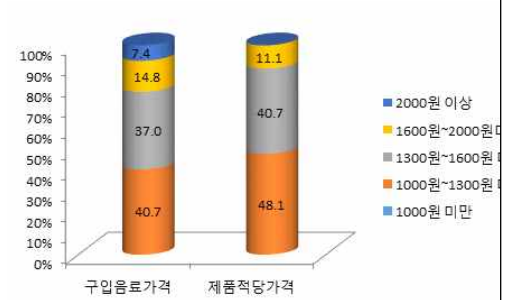


Figure 3. 천문동 스파클링의 선호도 조사

A, 제품구매 경험; B, 제품평가; C, 가격민감도

(2) 증숙 천문동 제품

증숙 천문동을 이용한 액상차 제품의 개발을 위하여 제1협동에서 연구된 조건을 바탕으로 기호도 조사를 실시하였다. 증숙 조건에 따라 기호도에 미치는 영향이 상이하기 때문에 Table 7과 같이 대조군을 포함한 7가지의 샘플을 준비하여 기호도 조사를 실시하였다.

Table 7. 증숙 온도 및 시간에 따른 증숙처리 조건

시료	증숙조건	
	증숙온도(°C)	증숙시간(분)
대조군	0	0
증숙 천문동 #1	80	60
증숙 천문동 #2	80	180
증숙 천문동 #3	100	60
증숙 천문동 #4	100	180
증숙 천문동 #5	120	60
증숙 천문동 #6	120	180

각 증숙단계별 천문동 음료의 기호도 조사 결과 전체적으로 증숙 온도 및 시간이 증가할 수록 모든 항목에서 증가하는 경향을 나타내었으며, 특히 색, 향, 맛, 전체적인 기호도의 모든 부분에서 120℃로 3시간 증숙한 6번 샘플에서 가장 큰 기호도를 나타내었다.

Table 8. 증숙 조건에 따른 천문동 음료의 기호도 조사

시료	기호도			
	색	향	맛	종합적 기호도
대조군	3.2±1.4	3.5±1.3	2.9±1.5	3.2±1.2
증숙 천문동 #1	3.8±1.7	3.8±1.5	3.7±1.6	4.0±1.3
증숙 천문동 #2	5.0±1.7	4.0±1.1	3.9±1.3	4.1±0.9
증숙 천문동 #3	5.3±1.5	4.8±1.2	4.4±1.0	4.8±1.0
증숙 천문동 #4	5.5±1.8	5.9±0.9	5.0±1.4	5.5±1.3
증숙 천문동 #5	5.9±1.2	6.1±1.2	5.9±1.0	6.1±1.4
증숙 천문동 #6	6.9±1.4	7.9±0.7	7.6±0.8	7.9±0.5

증숙 온도 및 시간에 따른 조건에서는 120℃에서 3시간 증숙한 경우에 전반적인 기호도가 높았으며, 이를 세부적으로 농도에 따라서 제조한 후(Figure 4) 기호도 조사를 수행하였다. 증숙 천문동의 농도가 증가함에 따라서 색, 향, 맛 및 종합적 기호도가 전반적으로 증가하였다가 높은 농도에서는 오히려 감소하는 경향을 나타내었다. 이를 토대로 종합하여 볼 때, 0.4 Brix에서 가장 높은 기호도를 보였다.



Figure 4. 농도별 증숙천문동(왼쪽부터 0.1, 0.4, 0.7, 1.0 Brix순)

Table 9. 농도별 증숙 천문동 음료의 기호도 조사

시료	기호도			
	색	향	맛	종합적 기호도
증숙 천문동 #6-1	4.2±1.2	4.3±1.3	4.5±1.6	4.0±1.3
증숙 천문동 #6-2	6.9±0.7	7.5±0.7	7.6±0.5	7.5±0.5
증숙 천문동 #6-3	4.3±1.0	4.9±1.0	4.9±0.8	4.9±0.9
증숙 천문동 #6-4	4.1±1.1	4.0±1.6	3.8±2.0	4.0±1.4

아래는 기호도 조사 및 선호도 조사에 사용되었던 조사표를 나타내었다.

### 관능검사 평가표

◆ 다음은 액상차 음료에 대한 기호도 검사입니다.(해당하는 점수를 적어 주세요.)

시료번호                      A        B        C        D        E

<b>1. 색</b>														
1	2	3	4	5	6	7	8	9						
매우 싫음				보통		매우 좋음								
<b>2. 맛</b>														
<b>&lt;세부적인 맛 평가&gt;</b>														
① 단맛														
1	2	3	4	5	6	7	8	9						
매우 약함				보통		매우 강함								
② 쓴맛														
1	2	3	4	5	6	7	8	9						
매우 약함				보통		매우 강함								
③ 신맛														
1	2	3	4	5	6	7	8	9						
매우 약함				보통		매우 강함								
④ 떫은 맛(수렴성 감각)														
1	2	3	4	5	6	7	8	9						
매우 약함				보통		매우 강함								
⑤ 비린 맛														
1	2	3	4	5	6	7	8	9						
매우 약함				보통		매우 강함								

⑥ 감칠 맛

①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨	_____	_____	_____	_____	_____
매우 약함				보통				매우 강함					

<종합적인 맛 평가>

①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨	_____	_____	_____	_____	_____
매우 싫음				보통				매우 좋음					

3. 향

①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨	_____	_____	_____	_____	_____
매우 싫음				보통				매우 좋음					

4. 종합적인 기호도

①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨	_____	_____	_____	_____	_____
매우 싫음				보통				매우 좋음					

5. 구매의향

①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨	_____	_____	_____	_____	_____
구매하지 않음								구매함					

♥ 참여해주셔서 감사합니다 ♥

관능검사 평가표

◆ 다음은 차 음료에 대한 기호도 검사입니다.(해당하는 점수를 적어 주세요.)

시료번호                    A            B            C            D            E

1. 색

①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨	_____	_____	_____	_____	_____
매우 싫음				보통				매우 좋음					

2. 맛

<세부적인 맛 평가>

① 단맛

①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨	_____	_____	_____	_____	_____
매우 약함				보통				매우 강함					

② 쓴맛

①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨	_____	_____	_____	_____	_____
매우 약함				보통				매우 강함					

③ 신맛



매우 약함		보통		매우 강함					
② 쓴맛									
1	2	3	4	5	6	7	8	9	___
매우 약함		보통		매우 강함					
③ 신맛									
1	2	3	4	5	6	7	8	9	___
매우 약함		보통		매우 강함					
④ 짙은 맛(수렴성 감각)									
1	2	3	4	5	6	7	8	9	___
매우 약함		보통		매우 강함					
⑤ 감칠 맛									
1	2	3	4	5	6	7	8	9	___
매우 약함		보통		매우 강함					
⑥ 비린 맛									
1	2	3	4	5	6	7	8	9	___
매우 약함		보통		매우 강함					
⑦ 탄산 강도									
1	2	3	4	5	6	7	8	9	___
매우 약함		보통		매우 강함					
<b>&lt;종합적인 맛 평가&gt;</b>									
1	2	3	4	5	6	7	8	9	___
매우 싫음		보통		매우 좋음					

<b>3. 향</b>									
1	2	3	4	5	6	7	8	9	___
매우 싫음		보통		매우 좋음					

<b>4. 종합적인 기호도</b>									
1	2	3	4	5	6	7	8	9	___
매우 싫음		보통		매우 좋음					

<b>5. 구매의향</b>									
1	2	3	4	5	6	7	8	9	___
구매하지 않음								구매함	

♥ 참여해주셔서 감사합니다 ♥

**관능검사 평가표**

◆ 다음은 증숙 천문동 음료에 대한 기호도 검사입니다.(해당하는 점수를 적어 주세요.)

시료번호    A        B        C        D

1. 색



1	2	3	4	5	6	7	8	9	___	___	___	___
매우 싫음				보통				매우 좋음				

**2. 맛**

1	2	3	4	5	6	7	8	9	___	___	___	___
매우 싫음				보통				매우 좋음				

**3. 향**

1	2	3	4	5	6	7	8	9	___	___	___	___
매우 싫음				보통				매우 좋음				

**4. 종합적인 기호도**

1	2	3	4	5	6	7	8	9	___	___	___	___
매우 싫음				보통				매우 좋음				

♥ 참여해주셔서 감사합니다 ♥

<< 천문동 스파클링 신제품 개발을 위한 선호도 조사 >>

안녕하세요. 본 설문지는 (주)강림오가닉에서 개발한 ‘천문동 스파클링’에 대한 선호도 조사를 위한 것입니다. 응답해 주신 설문 내용은 분석용 이외에는 절대 사용되지 않을 것을 약속드립니다. 바쁘시더라도 성심성의껏 답해주시면 감사하겠습니다. 좋은 하루 되십시오^^

◎ 다음은 설문 조사 분석에 필요한 간단한 인적 사항에 관한 질문입니다.

1) 성별은?

- ① 여    ② 남

2) 나이는?

- ① 10대    ② 20대    ③ 30대    ④ 40대    ⑤ 50대 이상

3) 스파클링 제품을 구매한 경험이 있습니까? (예, 하늘보리 탄산수 등)

- ① 예    ② 아니오

3)번의 ①을 선택하신 분은 아래의 질문에 대답해 주시기 바랍니다.



1	2	3	4	5
매우 그렇지 않음	보통	매우 그러함		

◎ 다음은 '천문동 스파클링' 제품에 대한 가격 민감도에 관한 설문입니다.

- 1) 다음 중 보통 구입하시는 탄산수 제품의 가격을 선택해 주시기 바랍니다.
- ① 1000원 미만    ② 1000원 이상~1300원 미만    ③ 1300원 이상~1600원 미만  
 ④ 1600원 이상~2000원 미만    ⑤ 2000원 이상
- 2) '천문동 탄산수' 제품의 적당한 가격대는 어느 정도라고 생각하십니까?
- ① 1000원 미만    ② 1000원 이상~1300원 미만    ③ 1300원 이상~1600원 미만  
 ④ 1600원 이상~2000원 미만    ⑤ 2000원 이상

◆ 설문에 응해 주셔서 감사합니다 ◆

나. 대량 생산을 위한 공정 표준화 체계 구축

(1) 천문동의 원료 크기별 성분

천문동은 수확시기에 따라 원료의 크기와 무게가 매우 상이하나, 1차년도에는 수확시기에 따라 원료의 크기 등을 비교하였고 2차년도에는 크기에 따라 천문동의 성분을 비교 검토하였다. 실험방법은 수확시기에 따라 천문동의 일반성분을 비교, 분석하였다. 천문동의 일반성분은 A.O.A.C.방법에 준하여 측정하였으며 가용성 고형분 함량은 시료 20ml를 항량을 구한 칭량병에 각각 취하여 105℃의 건조기에서 항량이 될 때까지 건조시킨 후 중량을 측정하여 % (w/v)로 나타내었다.

탄수화물은 phenol-sulfuric acid법으로 시료용액 0.5ml에 5% phenol용액 동량을 넣고 교반한 후 황산용액을 2.5ml를 가하여 발열시키며 잘 혼합한다. 이 반응액을 실온에서 20분 방치한 후 spectrophotometer(BioSpec-mini, Shimadzu Corp., Japan)를 이용하여 490nm에서 흡광도를 측정하였다.

단백질 정량은 Lowry법을 이용하며, Reagent A, B, C 용액(A: 2% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> in 0.1N NaOH, B: 1% Sodium potassium tartrate in H<sub>2</sub>O, C: 0.5% CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O in H<sub>2</sub>O)용액을 첨가하여 교반한 후 Folin's reagent (2N-Folin phenol reagent:H<sub>2</sub>O=1:10)를 첨가한 후

spectrophotometer를 이용해 540nm에서 흡광도를 측정하며, 표준물질로는 BSA(bovine serum albumin)를 사용하여 정량하였다.

또한, 지방의 함량은 건조된 시료를 속실판추출법을 실시하여 함량을 측정하였고 회분은 회화법으로 분석하며 조지방은 추출물을 항량을 구한 수기에 취하여 105℃에서 충분히 건조시킨 후 ethyl ether로 추출하여 중량을 측정하였다. 그 결과 껍에서 보는바와 같이, 유의성이 인정되지 않았다.

Table 10. 천문동의 크기별 일반성분의 변화 (단위:%)

크기(g)	수분	조단백	조지방	조회분	조탄수화물
3 이하	83.6	12.5	0.22	1.07	3.14
4-7	87.3	13.2	0.19	1.04	3.25
8-11	83.7	13.5	0.20	1.06	3.24
12이상	86.4	12.9	0.19	1.03	3.29

### (2) 천문동 원료의 확보방안

천문동의 원활한 수급을 위하여 본 기관의 인근지역에서 천문동 재배를 희망하는 농가를 대상으로 천문동 재배법 및 고부가가치화와 관련된 교육을 실시하였으며, 교육내용은 야생천문동의 재배시 고려사항, 천문동과 맥문동의 재배비교, 천문동의 약효증진 재배법 및 천문동의 식물생리학적 특성에 대하여 2015년 9월 7일에 교육을 실시하였다. 또한, (주)강림오가닉과 천문동 재배농가간의 업무제휴 협약서를 2016년 6월 23일에 체결하였다. 관련된 협약 내용으로는 천문동 재배 및 기술 보급 지원, 천문동 연구개발과 기술이전 협력, 천문동 농산물의 구매협력 및 기타 양 기관의 발전을 위하여 필요하다고 인정되는 사업 등에 관한 사항이었다.

### (3) 천문동의 제품화 연구

천문동을 활용한 제품생산은 추출조건과 제조방법 및 발효, 로스팅을 통하여 차음료와 파우치 제품 생산이 가장 적합한 것으로 판단되므로 이를 수행하기 위해서는 제품의 유형, 제품명의 선정, 제품용기의 선택, 제품 디자인 및 제품의 영양성분 분석이 필요하다. 따라서, 다양한 가공제품에 대한 제조공정은 표에서 제시한 바와 같다.

주관기관 및 세부협동과제의 연구 결과를 바탕으로 천문동 및 발효 천문동을 활용한 호흡기 질환 예방용 기능성 음료를 개발하고자 하였으며, 개발 제품의 현황 및 시제품 제조공정 조건은 Table 11과 같다.

Table 11. 천문동 가공제품의 개발

구 분	조건
천문동 음료	재료 : 천문동 건근 열수추출(100℃, 3시간) → Brix에 의한 농도 조정
천문동 차음료	재료 : 천문동 건근 로스팅(120~140℃) → 열수추출(100℃, 3시간) → Brix에 의한 농도 조정
천문동 스파클링 음료	재료 : 천문동 건근 열수추출(100℃, 3시간) → Brix에 의한 농도 조정 → 탄산, 감미료 등의 첨가물 사용
천문동 발효 음료	재료 : 천문동 건근 열수추출(100℃, 3시간) → 고형분함량 1%, 멸균 → <i>Weissella kimchii</i> 로 4.5일간 발효 → 채균
천문동 발효 농축액	재료 : 천문동 건근 천문동 건근:물 = 37.5:50비율로 멸균 → 발효균주( <i>Lactobacillus sakei</i> 383, <i>Leuconostoc meseteroides</i> 4395, <i>Lactobacillus plantarum</i> KCCM 11322) 5% 접종, 48시간 발효 → 주정으로 추출 및 감압농축
천문동 증숙 음료	재료 : 천문동 건근 증숙(120℃, 3시간) → 열수추출(100℃, 3시간) → Brix에 의한 농도 조정
천문동 캡슐	재료 : 천문동 건근 증숙(120℃, 3시간) → 열수추출(100℃, 3시간) → 분무건조(20%말토덱스트린 첨가) → 분말:유화제:오일(30:3:67)

○ 천문동 음료

천문동 건근을 열수 추출하여 각각 20, 40, 60, 80% 함량으로 물과 함께 희석하여 제조하여 수행하였다(Figure 5). 천문동 음료 개발 시 품질관리를 위해 색도와 고형분 함량을 측정하였으며 결과는 Table 12와 같다. 색도는 색차계를 이용하여 L값 (Lightness), a값 (redness), b값 (yellowness)으로 측정하였으며, 고형분의 함량은 당도계를 사용하여 나타내었다. 관능검사에서 전반적인 기호도가 높았던 천문동 열수 추출액 40%일 때 색도는 L값은 94.86, a값은 -0.89, b값은 7.47로 연한 노란색을 나타내었으며, 고형분 함량은 1.7 brix였다.

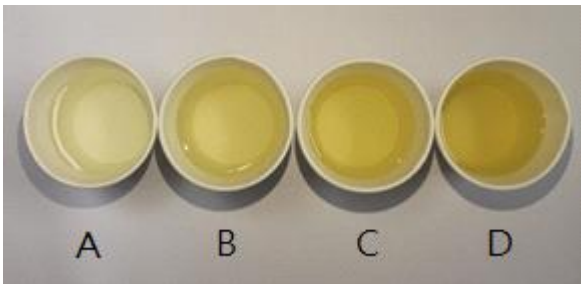


Figure 5. 천문동 음료 제품사진

- A : 천문동 액상차 20%
- B : 천문동 액상차 40%
- C : 천문동 액상차 60%
- D : 천문동 액상차 80%

Table 12. 천문동 열수추출물의 농도에 따른 색도 및 당도

시료	Color			Brix (%)
	L	a	b	
20%	97.16±0.01 <sup>a</sup>	-0.55±0.04 <sup>a</sup>	4.10±0.02 <sup>d</sup>	0.9±0.1 <sup>d</sup>
40%	94.86±0.02 <sup>b</sup>	-0.89±0.02 <sup>b</sup>	7.47±0.00 <sup>c</sup>	1.7±0.1 <sup>c</sup>
60%	92.51±0.02 <sup>c</sup>	-1.09±0.04 <sup>c</sup>	1074±0.01 <sup>b</sup>	2.5±0.0 <sup>b</sup>
80%	90.80±0.02 <sup>d</sup>	-1.35±0.02 <sup>d</sup>	13.63±0.0 <sup>a</sup>	3.3±0.0 <sup>a</sup>

Values are mean ± S.D

<sup>a-d</sup> Data are significantly different by one-way ANOVA followed Duncan's multiple range test at the 0.01 level of significance.

○ 천문동 차음료

천문동 차음료 개발을 위하여 천문동 껍질을 온도 및 시간에 따라 로스팅하여 제조하였다. 로스팅 온도 및 시간은 Table 13과 같으며 각각 제조된 로스팅 천문동을 열수 추출하여 천문동을 제거한 후 관능평가 및 색도, 당도를 측정하였다(Figure 6, Table 14). 전반적인 기호도가 좋았던 130℃, 3분 조건의 색도는 L값은 87.61, a값은 -0.63, b값은 43.73이었으며, 당도는 0.6 brix였다.

Table 13. 로스팅 천문동 제조조건

재료	건조된 천문동 껍질
로스팅 조건	A : 120℃, 3분 B : 120℃, 5분 C : 130℃, 3분 D : 130℃, 5분 E : 140℃, 3분 F : 140℃, 5분

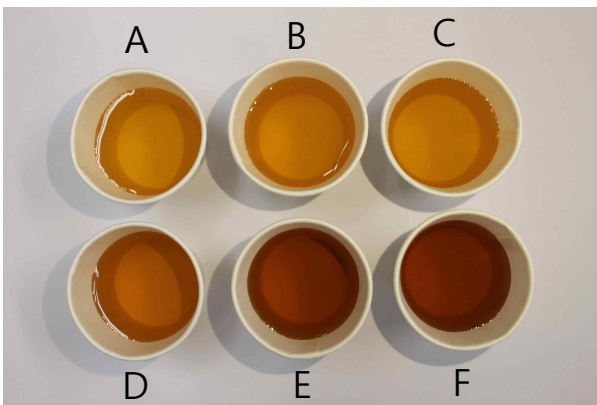


Figure 3. 천문동 차음료 제품사진

Table 14. 천문동 로스팅 조건에 따른 차음료의 색도 및 당도

Samples	Color			Brix (%)
	L	a	b	
A	88.24±0.02 <sup>a</sup>	-1.26±0.03 <sup>f</sup>	38.81±0.03 <sup>f</sup>	0.5±0.0 <sup>a</sup>
B	87.73±0.01 <sup>b</sup>	-0.83±0.02 <sup>e</sup>	42.70±0.02 <sup>e</sup>	0.5±0.0 <sup>a</sup>
C	87.61±0.04 <sup>c</sup>	-0.63±0.06 <sup>d</sup>	43.73±0.03 <sup>d</sup>	0.6±0.0 <sup>a</sup>
D	85.26±0.03 <sup>d</sup>	1.01±0.05 <sup>c</sup>	50.64±0.01 <sup>c</sup>	0.4±0.0 <sup>b</sup>
E	78.44±0.12 <sup>e</sup>	6.48±0.02 <sup>b</sup>	64.93±0.06 <sup>b</sup>	0.4±0.0 <sup>b</sup>
F	76.38±0.01 <sup>f</sup>	8.64±0.02 <sup>a</sup>	69.33±0.02 <sup>a</sup>	0.4±0.0 <sup>b</sup>

Values are mean ± S.D

<sup>a-f</sup> Data are significantly different by one-way ANOVA followed Duncan's multiple range test at the 0.01 level of significance.

○ 천문동 스파클링 음료

천문동 열수 추출액을 이용한 음료는 관능평가에서 전반적인 기호도가 감소함을 확인할 수 있었다. 따라서 그에 대한 대안으로 탄산을 첨가하여 스파클링 제품을 제조함으로써 특쓰는 맛을 추가하여, 새로운 형태의 음료를 개발하고자 하였다. 탄산수는 말 그대로 물에 탄산이 첨가된 형태로 최근 탄산수의 소비가 증가하고 있으며, 여러 가지 음료에 탄산수가 첨가된 스파클링 제품이 인기를 끌고 있는데 천문동 스파클링은 이러한 추세에 맞는 제품이라 할 수 있을 것이다. 1차의 관능검사 결과 탄산의 첨가만으로는 기호도가 높지 않아 특유의 쓴맛과 비린맛을 보완하기 위해 천연감미료인 스테비안을 0.02%첨가하였다.





Figure 7. 천문동 스파클링 음료 제품사진

○ 천문동 발효 농축액

제1협동과제에서 수행한 조건을 토대로 하여 천문동 건근과 물의 비율을 37.5:50로 하여 멸균한 후 *Lactobacillus sakei* 383, *Leuconostoc mesenteroides* 4395, *Lactobacillus plantarum* KCCM 11322를 5% 접종하여 48시간 동안 발효하였다. 이후 주정으로 추출한 후 감압농축하여 주정을 제거하여 천문동 발효 농축액을 제조하였다.



Figure 8. 천문동 발효농축액 제품사진

(4) 제품 디자인

천문동, 발효 천문동 및 증숙 천문동 제품의 생산을 위하여 천문동 관련제품(천문동 파우치 제품, 천문동 탄산음료, 천문동 발효음료제품, 증숙 천문동 음료 및 증숙 천문동 캡슐제품 등)과 포장용 박스 디자인을 도안하였으며, 최종 제품의 출시 전까지 보완할 계획이다.



Figure 9. 천문동 관련 제품 및 포장재 디자인

## 다. 제품의 마케팅 및 홍보전략 수립

### (1) 사업화 전략

본 연구 개발에서 개발된 다양한 시제품중에서 소비자들에게서 긍정적인 반응을 보인 증속 천문동과 발효천문동을 이용한 제품을 생산하여 사업화를 진행하고자 하며, 증속 천문동의 경우 증속조건 및 추출조건의 최적화 연구를 통해서 얻어진 결과를 토대로 하기의 “천문동을 활용한 호흡기질환 예방 제품 생산”에서 제시된 방법을 토대로 제품을 생산하고자 한다. 또한, 다양한 제형의 제품의 생산을 위해서 증속 천문동과 발효 천문동의 경우 제1세부에서 제시한 분말화 소재를 활용하여 캡슐을 생산하고자 한다. 캡슐 제품의 경우 현재의 트렌드에 부합하는 제품을 위해서는 추가적인 사업을 통한 연구개발을 활용하여 건강기능식품으로의 전환을 통해 제품화를 진행하고자 한다.

### (2) 마케팅 및 홍보전략

천문동 제품에 대한 마케팅 및 홍보를 위한 전략은 전문가의 도움 및 본 수행기관의 (주)강림오가닉의 유통망을 활용하여 마케팅 및 홍보를 수행하며, 협동기관인 부산대학교 장전캠퍼스 및 밀양캠퍼스와 연계하여 진행하고 있으며 다음과 같은 전략을 이용하여 진행한다.

기본적인 마케팅 및 홍보전략으로는 4P 전략을 바탕으로 수행하며 그 내용은 다음과 같다. 첫 번째로 Product 전략에 있어서는 현재 기획하고 있는 제품포장, 제품명칭, 제품용기 등을 상지에서 기술한 소비자 및 기호도 조사 분석의 결과를 피드백하여 제품에 다시 반영하고자 하며, Price 전략은 소비자 및 기호도 조사 분석에서의 소비자의 구매행태 분석을 통한 판매우위를 선점할 수 있는 가격결정 및 시장진입 추진과 대상 소비계층 구매 유도 가격으로 책정하고자 한다. 또한, Place 전략은 본 연구의 수행기관인 산동농협가공공장과 연계된 독립적 유통 경로인 농협 하나로마트(전국 1200개 판매처) 및 본 연구의 협동기관인 부산대학교의 생활협동조합과의 연계를 통해 소비자에게 제품이 포지셔닝 할 수 있도록 유도하고자 한다. 마지막으로 Promotion 전략으로는 다양한 매체의 홍보물 제작하여 잡지, 온라인 등을 통해 전파하며, 특히 제품 개발 초기에는 농협 하나로마트 및 부산대학교 등 공공기관에서 홍보용 제품 무료 제공하는 등 적극적인 활동을 전개하고자 한다.

또한, 기업의 매출 향상과 판매망 구축 및 홍보를 위한 전략은 아래와 같다.

#### ○ 마케팅 전략

- 개발제품 런칭 컨설팅
  - . 신제품에 대한 소비자 선호도 조사 및 컨설팅
  - . 적정 가격, 판로 등 판매 촉진을 위한 조사 및 컨설팅
- 제품포장 및 디자인 개발
  - . 제품 포장지 및 디자인 개발 지원

- 기업의 국내외 시장개척 노력 지원
  - . 국내외 전시회 및 박람회행사 참가지원
  - . 국내외 전시회 및 박람회행사 유치지원
  - . 각종 전시회 및 행사의 공동 실시 유도
  - . 시장개척과 관련된 다양한 행사 적극홍보

○ 전자상거래 사이트 구축과 온라인 판매, 홍보 활성화

- 통합 인터넷 쇼핑몰 구축 및 관리
  - . 브랜드 홍보 및 판매, 패키지 상품 개발 및 판매를 위한 인터넷 쇼핑몰 구축
  - . 지속적인 관리 및 update를 위해 인터넷 쇼핑몰 관리 전담 인원 배치
  - . 홍보 및 이용률 제고를 위해 홈페이지와 연계
- 개별 기업의 홈페이지 홍보 및 연계 추진
  - . 시너지효과 창출을 위해 기존 개별 참여기업의 홈페이지 보수관리 및 연계



(3) 마케팅 및 홍보

○ 일간지 보도

(주) 강림오가닉과 부산대학교 천문동 연구진의 연구개발 결과를 바탕으로 천문동의 우수성 및 본 연구팀의 수행실적 및 제품화와 관련된 내용이 경상남도의 일간지인 경남신문에 보도되었다(Figure 10).



부산대학교 천문동 연구팀(식품공학과 김동섭, 바이오소재과학과 황대연, 식품영양학과 이희섭)은 새로운 천연물의약품 소재로서 천문동(사진)이 천식질환, 치매질환 등의 치료에 우수한 효능이 있음을 규명하고 향후 발전 가능성을 제시했다고 27일 밝혔다.

천문동은 예로부터 사람을 신선이 되게 하는 약으로 늙지 않고, 병들지 않고, 오래 살게 하는 능력을 지녔다고 전해지고 있지만 그 효능에 대한 과학적 연구가 수행되지 않은 상태다.

이에 천문동 연구팀은 농림수산식품기술기획평가원으로부터 지난 2014년부터 3년간 연구 과제를 수주받아 천문동의 성분 규명, 발효 및 증숙천문동 제조, 만성질환 치료 효능 규명, 천문동제품 개발 등의 연구를 수행했다.

Figure 10. 경남신문 보도자료



○ 제품 홍보

- (주) 강림오가닉과 부산대학교 천문동 연구진에서는 천문동을 활용하여 개발한 증숙천문동과 발효천문동 및 천문동 캡슐 등을 경남 밀양역 광장에서 일반 소비자에게 시음, 시식회를 통하여 소비자의 선호도 및 천문동의 효능 등에 대하여 홍보전을 개최하였다(Figure 11).



Figure 11. 음료 시음회 및 제품 홍보전

- 제 16회 친환경 유기농 무역박람회 참석

· 일 시 : 2017년 08월17일 ~ 19일

· 장 소 : 서울 코엑스 C홀

· 내 용 : 대한민국 대표 유기농무역박람회, 어린이와 주부의 건강을 생각하는 친환경 웰빙식품을 한자리에서 볼 수 있는 2017년 제 16회 친환경 유기농 무역박람회에 (주)강림오가닉이 참가하여 증숙천문동 천문동캡슐 등 바이어 및 고객들에 선보여, 국내 시장 뿐만 아니라 동남아 지역에 유통망 개척을 할 수 있는 장이 되는 좋은 기회가 되었다(Figure 12).



Figure 12. 무역 박람회 참가 및 제품 홍보

### 3. 천문동을 활용한 호흡기질환 예방 제품 생산

#### 가. 천문동의 전처리, 추출공정, 배합 및 제조공정 확립

##### (1) 분획물 제조 및 수율

천문동의 전반적인 생리활성에 영향을 주는 기능성 물질을 분석하기 전에 천문동 부위별 추출물을 대상으로 Sep-pak plus C18 column을 이용하여 용매의 극성에 따라 분획하였다. 증류수, 30% 메탄올, 50% 메탄올, 100%메탄올 순으로 통과시켜 얻은 분획물을 순서대로 Fraction I, Fraction II, Fraction III, Fraction IV로 명칭하고 이를 농축시켜서 추후 실험에 이용하였다. 근피, 속의 분획물의 추출 수율은 Table 15과 같다. 근피, 속 Fraction I의 추출 수율이 70.18%, 79.30% 로 각 분획물 중에서 가장 높았으며 그 다음으로 근피, 속 모두 같은 경향으로 Fraction II, Fraction IV, Fraction III의 순서대로 추출수율이 높았음을 확인하였다. Fraction II, Fraction III에서는 근피의 수율이 속보다 더 높았음을 확인하였고 Fraction I, Fraction IV에서는 속의 수율이 근피보다 더 높았음을 확인하였다. Sep-pak C18 column을 이용하여 얻은 근피, 속 분획물을 대상으로 생리활성을 확인하고 이에 영향을 주는 기능성 성분을 확인하고자 하였다.

Table 15. Yield of *Asparagus cochinchinensis*(LOUREIRO) MERRILL. root bark and flesh Sep-pak plus C18 Fractions

Sample	Yield of AC Root bark(%)	Yield of AC Flesh(%)
Fraction I	70.18	79.30
Fraction II	4.70	3.93
Fraction III	1.25	0.23
Fraction IV	3.15	3.60

(2) 생리활성 분석

○ 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) 소거능

Sep-pak plus cartridge C18을 이용하여 분리된 근피, 속 분획물을 대상으로 항산화능을 확인하기 위해 DPPH 라디칼 소거능을 측정하였다(Table 16). 근피 분획물의 라디칼 소거능은 250 µg/mL 의 농도일 때 Fraction I 7.56%, Fraction II 82.70%, Fraction III 96.69%, Fraction IV 74.95% 임을 확인할 수 있었고 분리된 속 분획물의 라디칼 소거능은 250 µg/mL의 농도일 때 Fraction I 불검출, Fraction II 9.07%, Fraction III 70.84%, Fraction IV 0.42% 임을 확인할 수 있었고 이들 사이에 유의적인 차이가 있었다. 근피와 속 분획물의 항산화능을 비교하였을 때, 앞에서 측정한 부위별 메탄올 추출물의 항산화능 결과와 마찬가지로 근피 분획물이 속 분획물 보다 전반적으로 항산화능이 더 높음을 확인할 수 있었다. 특히 근피 Fraction II, Fraction III이 높은 항산화능을 나타내었는데 이는 근피의 항산화능에 기여하는 기능성 물질이 근피 Fraction II와 Fraction III에 존재한다는 것을 시사한다.



Table 16. DPPH radical scavenging activity of *Asparagus cochinchiensis*(LOUREIRO) MERRILL. root bark and flesh Sep-pak plus C18 Fractions

Sample <sup>1)</sup>	Root bark fractions DPPH radical scavenging activity (%)	Flesh fractions DPPH radical scavenging activity(%)
Fraction I	7.56±0.86 <sup>e</sup>	ND
Fraction II	82.70±1.30 <sup>b</sup>	9.07±0.34 <sup>e</sup>
Fraction III	96.69±0.00 <sup>a</sup>	70.84±1.36 <sup>d</sup>
Fraction IV	74.95±1.67 <sup>c</sup>	0.42±1.94 <sup>f</sup>

Values are mean ± S.D.

<sup>a-f</sup>Values with different superscripts were significantly different by Duncan's multiple test (p<0.05)

<sup>1)</sup>The tested concentration was 250 µg/mL

○ 항염증 활성(Hyaluronidase 저해활성)

고분자의 Hyaluronic acid는 염증반응에 있어서 중요한 반응 중 하나인 대식세포의 포식 능력을 저해시킨다. 이러한 고분자 Hyaluronic acid는 염증반응을 저해함으로써 치명적인 외상으로부터 상흔 회복에 중요한 역할을 한다. 그러나 Hyaluronic acid의 분해산물은 상처에 염증, 혈관신생, 섬유화, 그리고 콜라겐 축적 등을 야기하며, 류머티즘 관절염과 같은 염증질환을 앓고 있는 환자에게서 높은 수준의 저분자 Hyaluronic acid가 관찰된다. Hyaluronidase는 염증반응을 저해하는 고분자의 Hyaluronic acid의 분해를 개시하는 endohexosaminidase이다. 따라서 Hyaluronic acid를 분해하는 Hyaluronidase의 활성을 억제하여 Hyaluronic acid를 고분자 형태로 유지시킴으로써 항염증 효과를 기대할 수 있다. Sep-pak plus cartridge C18을 이용하여 분리된 근피, 속 분획물을 대상으로 항염증 활성을 측정하기 전에 먼저 천문동 부위별 메탄올 추출물을 대상으로 항염증 활성 측정 방법 중 하나인 Hyaluronidase 저해활성을 측정하였다(Table 17). 천문동 에탄올 추출물이 간세포에 항염증 효능이 있음을 확인했던 연구와는 달리 천문동 부위별 메탄올 추출물에서는 항염증 활성을 확인할 수 없었다.

근피, 속에서 분리된 분획물을 대상으로 Hyaluronidase 저해활성을 측정한 결과는 Table 18과 같다. 양성 대조군으로는 *Asparagus* 속에 존재하고 항염증 물질로 알려져 있는 steroidal saponin계통의 Protodioscin을 사용하였다. Hyaluronidase 저해활성은 179 µ

g/mL의 농도일 때, 속 FractionIV 85.95%로 가장 높은 저해활성을 나타냈으며, 양성대조군인 Protodioscin은 46.69%로 속 Fraction IV가 Protodioscin 보다 훨씬 더 높은 항염증 활성을 나타내었고 이들 사이에 유의적인 차이가 있었다. 근피 Fraction IV 29.75%로 근피 분획물 중에서는 가장 높은 항염증 활성을 나타내었음을 확인할 수 있고 앞의 DPPH 라디칼 소거능에서 근피, 속의 Fraction IV보다 훨씬 높은 항산화 활성을 나타냈던 근피 FractionII에서는 Hyaluronidase 저해활성을 확인할 수 없었다. 이는 항염증 효능을 나타내는 기능성 물질이 천문동 덩이뿌리 근피, 속 FractionIV에 존재한다는 것을 시사한다.

Table 17. Hyaluronidase inhibition activity of *Asparagus cochinchinensis*(LOUREIRO) MERRILL. root partial parts 80% methanol extract

Sample <sup>1)</sup>	Hyaluronidase inhibition activity(%)
Root bark	ND
Whole	ND
Flesh	ND

ND means not detected

<sup>1)</sup>The tested concentration was 1 mg/mL

Table 18. Hyaluronidase inhibition activity of AC root bark Sep-pak C18 Fractions

Sample <sup>1)</sup>	Root bark fractions (%)	Flesh fractions (%)
Fraction I	ND	ND
Fraction II	ND	ND
Fraction III	23.78±1.95 <sup>d</sup>	9.45±2.99 <sup>e</sup>
Fraction IV	29.75±1.89 <sup>c</sup>	85.95±1.43 <sup>a</sup>
Protodioscin	46.69±1.24 <sup>b</sup>	

Values are mean ± S.D.

<sup>a-e</sup>Values with different superscripts were significantly different by Duncan's multiple test (p<0.05)

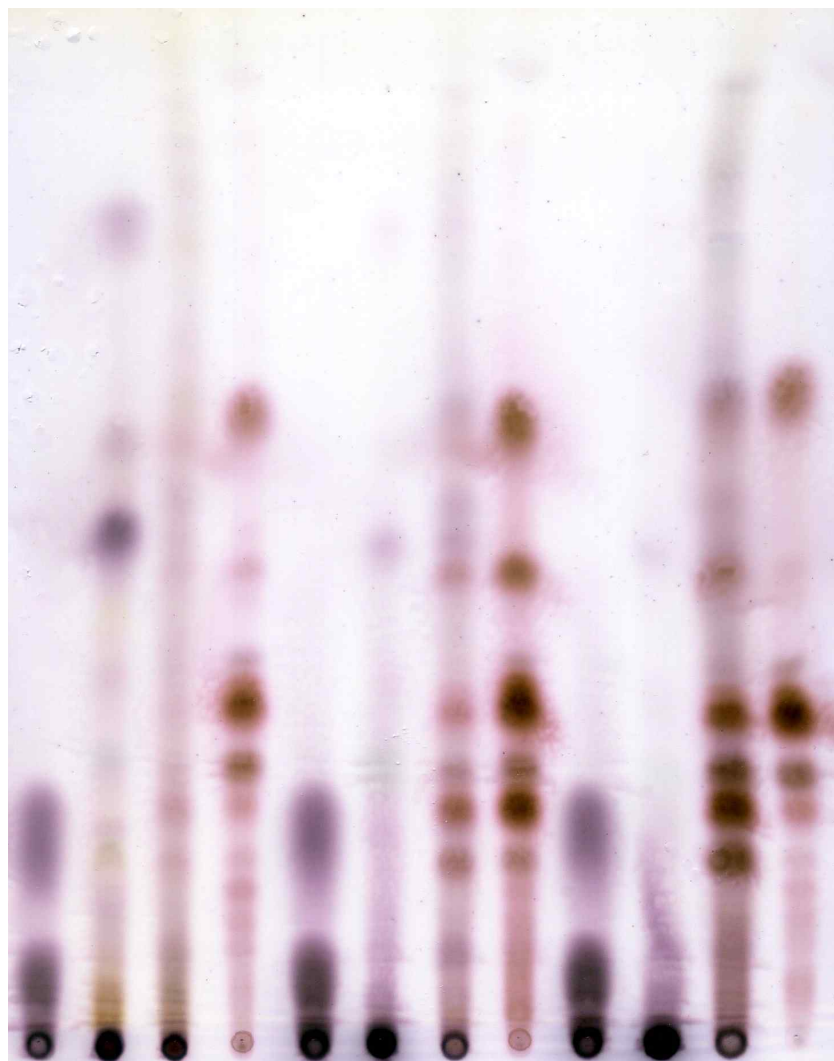
<sup>1)</sup>The tested concentration was 179 µg/mL

○ Thin layer chromatography(TLC) 분석

Sep-pak plus cartridge C18을 이용하여 분리한 천문동 부위별 추출물 분획물에 있어서 성분 차이를 Thin Layer Chromatography(TLC)를 통해 확인하였다(Figure 13, 14). 근피 Fraction II의 황산발색과 UV에서 검정색 박스로 표시한 부분이 특징적으로 다른 부위의 Fraction II와 차이를 나타내었다. 이는 앞에서 측정된 근피 분획의 DPPH 라디칼 소거능 중에서 Fraction III의 항산화능이 Fraction II의 항산화능에 비해 유의적으로 높지만 Fraction II에서 높은 항산화 활성을 나타내었고 추출수율 및 TLC 패턴을 고려할 경우 Fraction II를 이용하여 근피의 항산화 활성에 직접적인 영향을 나타내는 물질을 정제하는 것이 보다 유리한 것으로 판단되었다.

황산 발색 결과를 나타낸 Figure 13에서 속 Fraction IV의 TLC 패턴을 살펴보면 근피, 전체 Fraction IV의 TLC 패턴과 유사함을 확인할 수 있었고 Figure 14를 살펴보면 부위별 Fraction IV에는 UV에 흡광하는 물질이 거의 확인되지 않았다. 이는 천문동 근피, 속 Fraction IV의 성분 조성이 유사하다는 것을 시사한다. 또한 앞에서 천문동 부위별 추출물 분획물의 항염증 활성 측정결과에서 속 Fraction IV의 항염증 활성이 가장 높다는 것을 확인하였고 근피 분획물 중 근피 Fraction IV의 항염증 활성이 가장 높다는 것을 고려하면 근피, 속 Fraction IV에 항염증 효능을 나타내는 동일한 물질이 존재할 수 있다는 것을 시사한다.

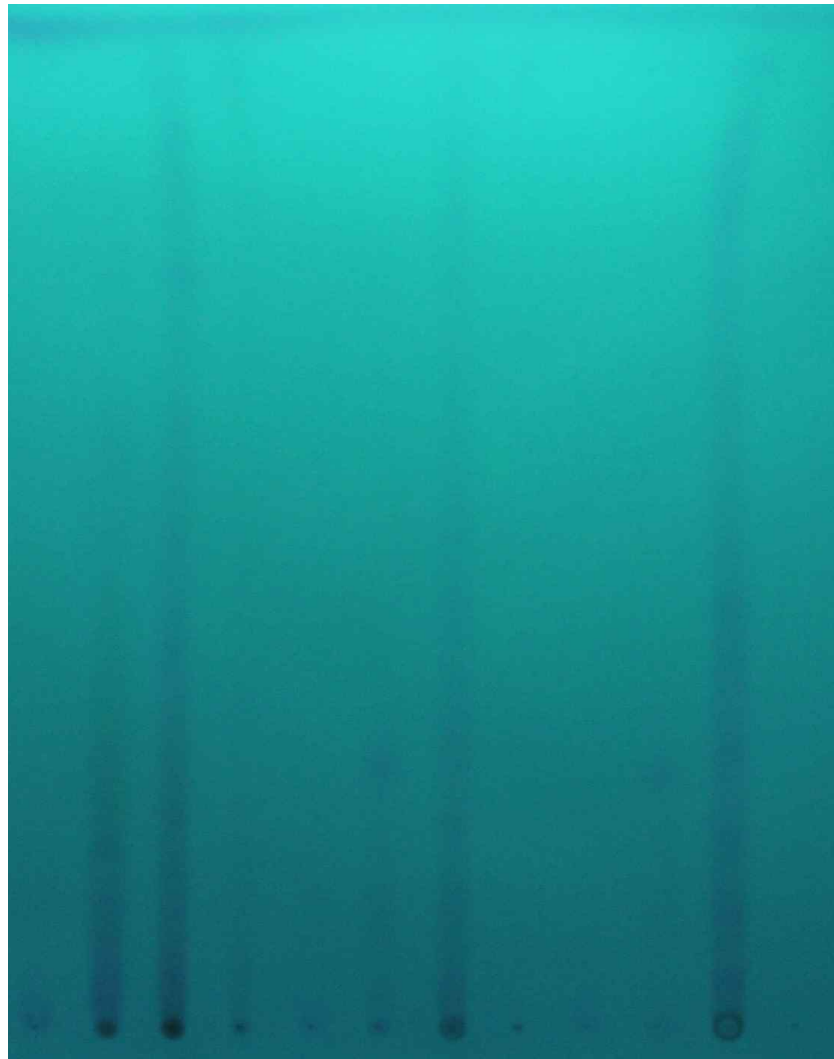
이러한 TLC 결과 및 앞에서 측정된 천문동 부위별 분획물의 생리활성 결과를 바탕으로 근피 Fraction II에서는 근피의 항산화에 기여하는 물질을 검색 및 동정하고자 하였으며 근피, 속 Fraction IV에서는 항염증 성분을 찾고 동정하고자 하였으며 이를 위해 이들을 대상으로 HPLC, LC-MS, LC-MS/MS 분석을 진행하였다.



Root bark                      Whole root                      Flesh

Figure 13. TLC analysis of isolated fractions.

Lane 1, Fraction I ; Lane 2, Fraction II ; Lane 3, Fraction III ; Lane 4, Fraction IV



**Root bark**
**Whole root**
**Flesh**

Figure 14. TLC analysis of isolated fractions.

Lane 1, Fraction I; Lane 2, Fraction II; Lane 3, Fraction III; Lane 4, Fraction IV

○ 항산화 활성 물질 분리

근피와 속 Fraction II를 검출기 PAD (photodiode array detector)와 CAD (charged aerosol detector)를 이용하여 HPLC 분석을 시행하였다(Figure 15, 16). HPLC 분석에 UV 검출기를 이용한 방법은 폴리페놀 화합물을 정량분석 하는데 가장 보편적이고 편리한 방법으로 보통 폴리페놀 화합물은 하나 혹은 두 개의 UV 흡광 띠를 가지고 있는데 화학구조에 따라 크게 305-390nm에서 흡광하거나 230-300nm에서 흡광한다. 페놀 화합물은 크게 hydroxycinnamic acid derivatives, flavonols와 flavones의 유도체로 나뉘며 이들은 305-390nm에서 강하게 흡광하는 화학구조를 지니고 있다. 이와는 반대로 hydroxybenzoic acid derivatives, catechins, isoflavones, and flavanones은 230-300nm에서 강하게 흡광

하는 화학구조를 지니고 있다. 따라서 앞에서 항산화능 및 총폴리페놀 함량 측정에서 근피의 항산화능에 영향을 주는 물질이 폴리페놀류일 것이라며 판단하였으며 PAD 검출기를 이용하여 근피 Fraction II를 대상으로 전 파장을 스캔 하였을 때, 근피의 성분이 가장 잘 흡광하는 파장대 영역이 220nm, 270nm, 320nm인 것을 확인하였다. 피크 base line 붕괴 및 용매 간섭으로 인해 220nm 파장대를 제외한 270nm, 320nm의 파장대를 선택하여 분석을 진행하였다. 분리를 위해 0.1% formic acid를 함유한 water와 acetonitrile을 사용하여 총 60분간 분석하였다. Figure 15에서와 같이 CAD에서 검출된 결과를 살펴보면 근피 Fraction II는 6개의 주 피크가 있음이 확인되었고 속 Fraction II는 3개의 주 피크가 있음이 확인되었다. 즉, CAD분석 결과 속 Fraction II보다 근피 Fraction II에 더 많은 물질이 존재함을 확인할 수 있었다. PAD 분석결과는 Figure 16와 같으며, 320nm 파장에서 분석하였을 때 근피 Fraction II에서 3개의 주 피크가 검출되었고 속 Fraction II에서는 피크가 검출되지 않았다. 270nm 파장에서 분석하였을 때 속 Fraction II에서 2개의 주 피크가 검출되었고 근피 Fraction II에서 6개의 주 피크가 검출되었고 주 피크 이외에도 속에서 검출되지 않은 피크를 근피 Fraction II에서 확인할 수 있었다. 앞에서 Sep-pak plus cartridge C18을 이용하여 분리된 Fraction을 대상으로 DPPH 라디칼 소거능을 측정하였을 때, 근피 Fraction II가 속 Fraction II보다 항산화능이 훨씬 더 높았음을 확인할 수 있었고 TLC 분석에서도 속 Fraction II보다 근피 Fraction II에서 더 많은 성분이 존재함을 확인할 수 있었다. 또한 TLC 상에서도 속에서 발견되지 않은 특이한 TLC 패턴을 근피 Fraction II에서 확인할 수 있었다. 이러한 결과들과 HPLC 분석 결과를 종합하여 근피의 항산화능에 직접적인 영향을 주는 물질을 찾고 동정하기 위해 Preparative HPLC를 이용하여 근피 Fraction II의 분리 및 분획을 진행하였다.

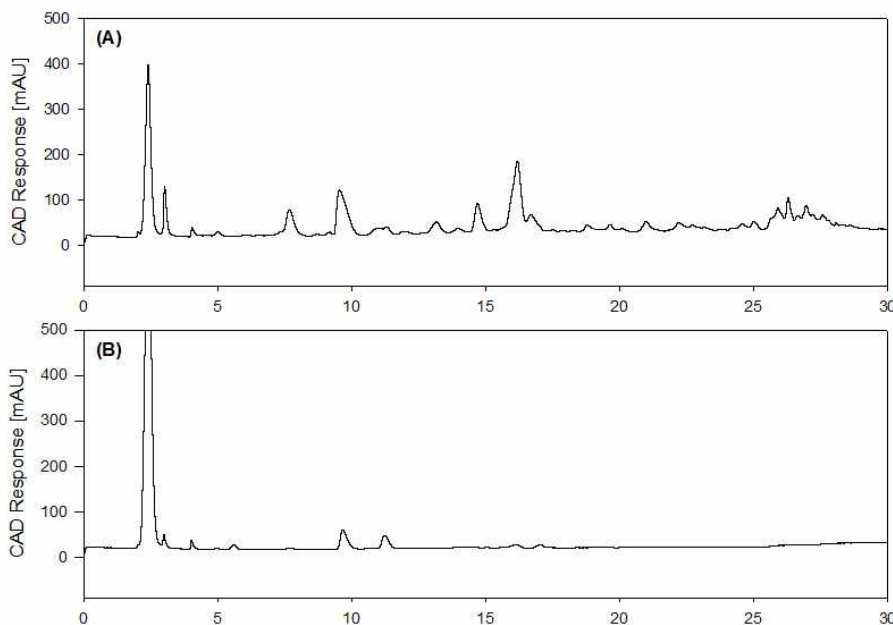


Figure 15. HPLC Chromatogram of AC Root bark and Flesh Fraction II with CAD((A)

Root bark and (B) flesh)

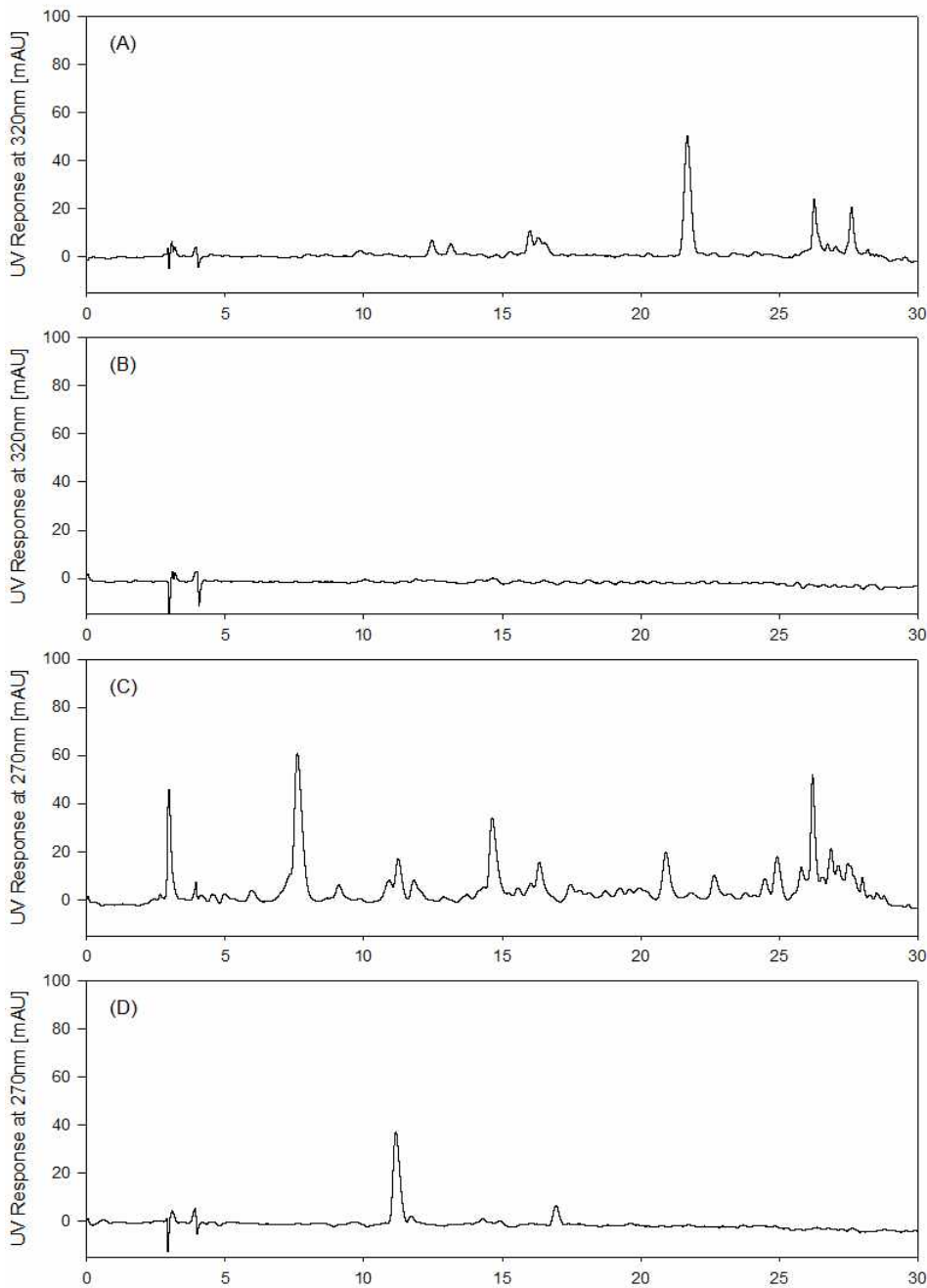


Figure 16. HPLC Chromatogram of AC Root bark and Flesh Fraction II with PAD at 320nm and 270nm((A) Root bark at 320nm, (B) Flesh at 320nm, (C) Root bark at 270nm and (D) Flesh at 270nm)

근피의 항산화능에 직접적으로 영향을 주는 물질을 찾고 동정하기 위해 근피 Fraction II 를 대상으로 Preparative HPLC를 이용하여 분리 및 분획하였다(Figure 17). 분리를 위해

0.1% formic acid를 함유한 water와 acetonitrile을 사용하여 앞에서 수행한 HPLC 분석과 같은 gradient 조건으로 총 60분간 분석하였다. 앞에서 HPLC 분석 시 수행한 전 파장 스캔 결과를 바탕으로 320nm, 270nm, 220nm에서 동시 분석하였다. 220nm 파장대의 Chromatogram을 살펴보면 피크가 크게 4부분으로 분리되는 것을 확인할 수 있었고 세 파장 중 피크의 크기가 가장 높았음을 확인할 수 있었다. 270nm 파장대의 Chromatogram에서는 피크의 세기가 약하지만 220nm에서와 마찬가지로 크게 4부분으로 분리되는 것을 확인할 수 있었다. 320nm 파장대의 Chromatogram에서는 크게 1부분으로 분리되는 것을 확인할 수 있었으며 이곳에서 단일 피크가 검출되었음을 확인할 수 있었다. 각 파장대에서 검출된 피크를 바탕으로 근피 FractionII에서 총 5개의 Sub-fraction으로 분리 및 분획하였다. 분리된 순서대로 Sub-fraction 1,2,3,4,5 로 칭하고 이를 농축하였다. Sub-fraction의 항산화능을 스크리닝 하기위해 1, 1 - Diphenyl - 2 - picrylhydrazyl (DPPH) 라디칼 소거능을 측정하였고 이를 바탕으로 근피의 항산화능에 직접적인 영향을 주는 물질을 찾고 동정하고자 하였다.

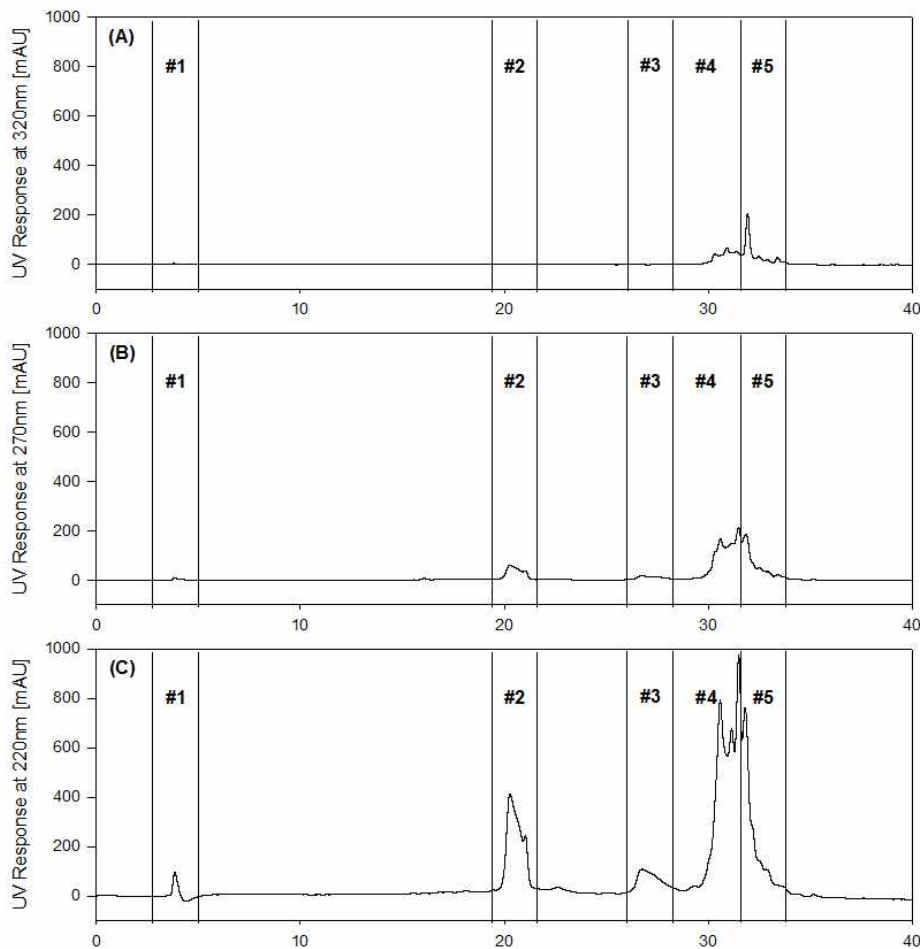


Figure 17. HPLC chromatogram of Sub-fractions 1,2,3,4 and 5 isolated from AC Root bark FractionII by preparative HPLC with PAD at 320nm, 270nm and



220nm((A) PAD at 320nm, (B) PAD at 270nm and (C) PAD at 220nm)

근피 Fraction II에서 분리된 Sub-fraction을 대상으로 항산화 성분을 분석 및 동정하기 전에 이들 사이의 항산화능을 스크리닝 하고자 DPPH 라디칼 소거능을 측정하였다(Table 19). 250 µg/ml의 농도일 때, Sub-fraction 5가 93.08%로 가장 높은 항산화능이 있음이 확인되었고, 이는 앞에서 같은 농도일 때, 항산화 활성이 82.70%인 근피 Fraction II 보다 더 높았음을 확인할 수 있었다. Sub-fraction 1과 Sub-fraction 3는 각각 65.38%, 64.62%로 이들 사이에서는 유의적인 차이가 없었으나 다른 Sub-fraction의 항산화 활성과는 유의적인 차이가 있음을 확인할 수 있었다. Sub-fraction 4와 Sub-fraction 2는 각각 46.92%, 26.15%의 소거능이 있음을 확인할 수 있었다. 이들 중 가장 높은 항산화 활성을 나타내는 Sub-fraction 5에서 근피의 항산화 활성에 직접적인 영향을 주는 물질이 있을 것이라고 추정된다.

Table 19. DPPH radical scavenging activity of Fractions isolated from *Asparagus cochinchinensis*(LOUREIRO) MERRILL. root bark fraction II

Sample	DPPH radical scavenging activity (%)
Fraction 1	65.38±1.09 <sup>b</sup>
Fraction 2	26.15±3.26 <sup>d</sup>
Fraction 3	64.62±2.18 <sup>b</sup>
Fraction 4	46.92±1.09 <sup>c</sup>
Fraction 5	93.08±1.09 <sup>a</sup>

Values are mean ± S.D.

<sup>a-d</sup>Values with different superscripts were significantly different by Duncan's multiple test (p<0.05)

<sup>1)</sup>The tested concentration was 250 µg/mL

#### 나. 기능성 지표물질의 최적 추출 공정의 확립

천문동 건근에 존재하는 기능성 지표 물질의 탐색을 위하여 항산화 및 항염증 활성의 효능을 지니는 물질을 천문동 건근의 껍질 및 속부분으로 나누어서 분석하였다.

##### ○ 항산화물질의 분석 및 동정

천문동 건근의 항산화 성분을 분석하기 위하여 천문동 건근의 껍질 및 속부분 추출물을 대상으로 Sep-pak plus C18 column을 이용하여 용매의 극성에 따라 분획하였다. 증류수, 30% 메탄올, 50% 메탄올, 100%메탄올 순으로 통과시켜 얻은 분획물을 순서대로 Fraction I, FractionII, FractionIII, FractionIV로 명칭하고 이를 농축시켜서 실험에 이용하였다.

FractionII의 부분을 HPLC로 분획하여 항산화 활성이 가장 높았던 fraction을 대상으로 CAD와 PAD를 이용하여 동시 분석하였고 파장대는 320nm와 270nm를 선택하였다(Figure 18). 320nm에서는 단일 피크가 검출되었고 270nm와 CAD에서는 320nm에서 검출되지 않은 다른 피크가 있음을 확인하였다. 320nm, 270nm 그리고 CAD에서 단일 피크로 검출되는 것을 대상으로 LC-MS 분석을 시행하였다(Figure 19). ESI (Electrospray ionization) 이온화 방법으로 negative ion mode에서 분석을 시행하였고 그 결과 Sub-fraction 5의 분자량 대 전하비(m/z)는 179.09임을 확인하였다(Figure 19의 (A)). 이는 모분자  $[M-H]^-$ 에 해당하는 피크로 180의 분자량을 갖는 caffeic acid로 추정되었다. 표준물질 caffeic acid를 이용하여 동일한 조건에서 LC-MS 분석을 시행하였다(Figure 19의 (B)). 그 결과 동일한 질량스펙트럼 패턴을 나타내었고 이는 근피의 항산화 활성을 나타내는 생리활성 물질이 caffeic acid으로 판단되었다(Figure 20). Caffeic acid는 hydroxycinnamic acid 계열로 리그닌의 생합성에서 중요한 전구물질이며, 과일, 야채, 커피 및 차 등의 다양한 식물유래의 식품에 풍부한 물질로서 항염증, 항암, 항바이러스, 항혈전 및 신경세포 보호효과 등의 생리활성이 있는 것으로 보고되고 있다.

따라서, 천문동 건근의 대표적인 항산화 물질로는 caffeic acid로 판단되며, 항산화 활성과 관련된 지표 물질의 동정 및 함량은 caffeic acid를 기준으로 설정하는 것이 타당한 것으로 판단된다.

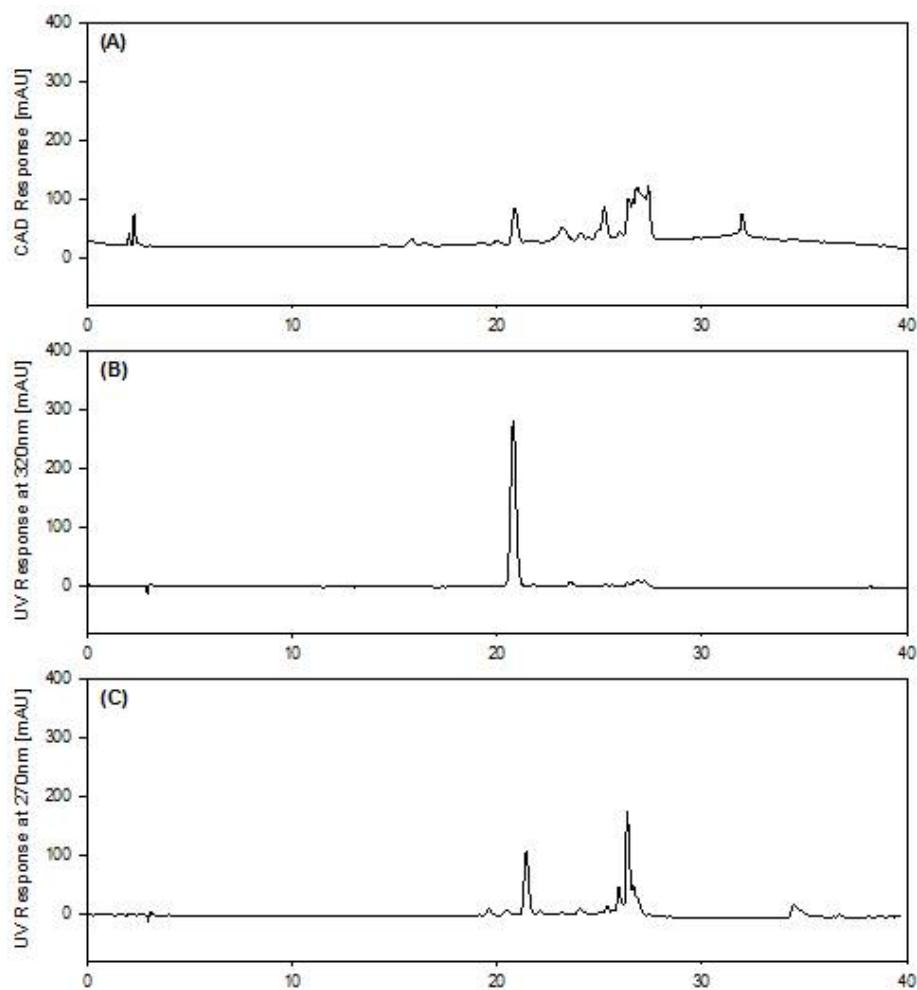


Figure 18. HPLC Chromatogram of fraction isolated from AC Root bark Fraction II with PAD at 320nm and 270nm ((A) CAD, (B) PAD at 320nm and (C) PAD at 270nm)

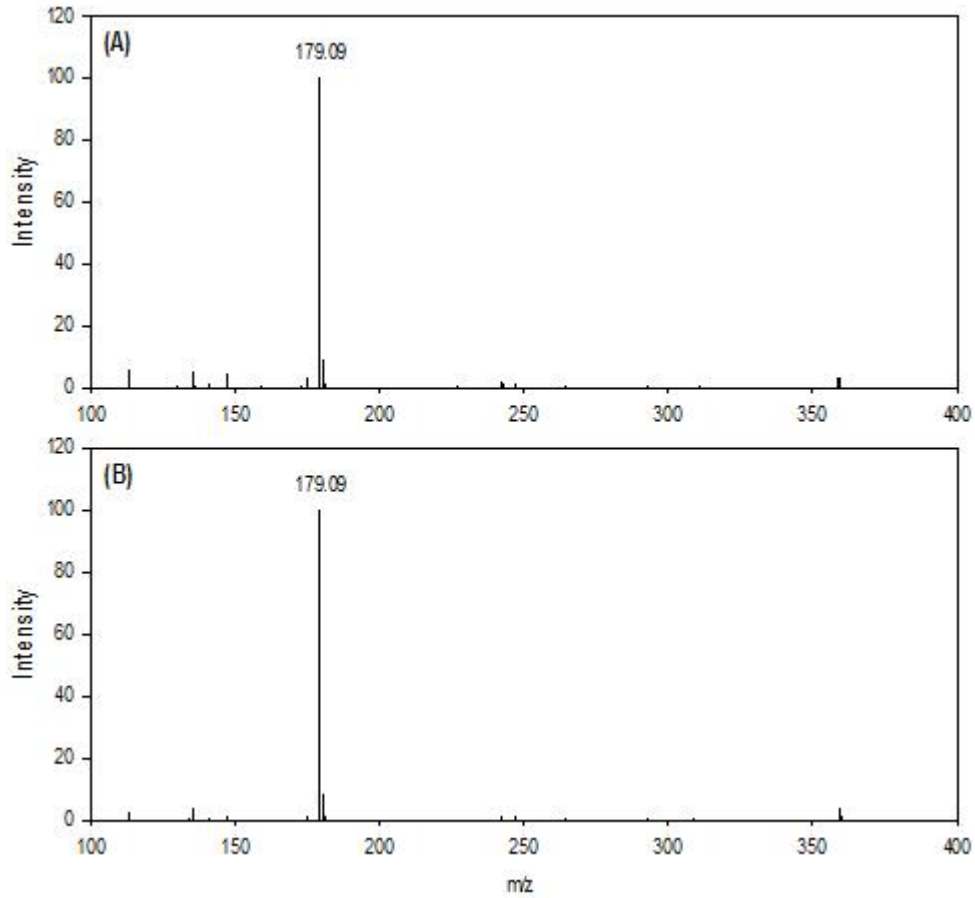


Figure 19. The MS spectra in the negative ion mode using Q-TOF MS ((A) *Asparagus cochinchinensis* Root bark fraction and (B) Caffeic acid)

Figure 20. Chemical structure of Caffeic acid

○ 항염증 활성 물질 분석 및 동정

천문동의 근피와 속의 Fraction IV를 검출기 CAD (charged aerosol detector)를 이용하여 HPLC 분석을 하였을 경우, Fraction IV에서는 UV에 흡광하는 파장대 영역이 없었으므로

로 PAD를 이용하지 않고 CAD 만을 이용하여 분석을 진행하였다. 분리를 위해 0.1% formic acid를 함유한 water와 acetonitrile을 사용하여 총 60분간 분석하였다. 근피, 속 Fraction IV의 CAD 패턴이 피크의 높이나 면적에 차이가 있지만 Chromatogram 패턴이 유사했음을 확인하였다. 이는 근피, 속 Fraction IV의 성분 구성이 동일하다는 것을 시사한다. 또한 Asparagus 속에 존재한다고 알려져 있는 steroidal saponin 계통의 항염증 성분인 Protodioscin을 Fraction IV의 분석조건과 동일하게 HPLC 분석을 시행하였다. 그 결과 근피, 속 Fraction IV에서 Protodioscin의 Retention time과 일치하는 피크가 있음을 확인하였고 Fraction IV에서 Protodioscin을 확인하기 위해 근피 Fraction IV를 대상으로 Internal standard를 만들어 동일한 조건으로 HPLC 분석을 시행하였다 (Figure 21).

1 mg/mL 농도의 근피 Fraction IV과 100 µg/mL 농도의 Protodioscin의 Chromatogram의 결과는 Figure 22의 (A), (B)와 같으며, 이와 같은 Final 농도로 Internal Standard를 만들어 HPLC 분석한 결과는 (C)와 같았다. Internal standard의 전반적인 피크 패턴은 근피 Fraction IV의 피크 패턴과 일치했으며 예상되는 Protodioscin의 피크위치에서 높이가 급격하게 증가하는 것을 확인하였다. 이로써 근피, 속 Fraction IV에 Protodioscin이 존재함을 분석용 HPLC를 통해 확인하였고 이에 대해 추가적으로 LC-MS/MS 분석을 시행하였다.

앞에서 HPLC 분석을 통해 천문동의 생리활성 성분 중 근피, 속 Fraction IV에 Protodioscin이 있음을 확인하였다. ESI 이온화 방법으로 positive ion mode에서 표준물질 protodioscin과 속 Fraction IV를 대상으로 LC-MS/MS 분석을 시행하여 질량 스펙트럼 결과를 비교하였다(Figure 23). 속 Fraction IV의 질량스펙트럼 결과는 (A)와 같으며 이는 표준물질 Protodioscin의 질량스펙트럼의 결과 (B)와 일치했음을 확인할 수 있었다. 이동상으로 0.1% Formic acid-Acetonitrile을 사용하였을 때, positive ion mode에서 모분자의 분자량 대 전하비(m/z)가 1031.54로 이것은  $[M+H]^+$  또는  $[M+Na]^+$  가 아닌  $[M+H-18]^+$  으로 확인되었으며, 이는 Protodioscin에서 H<sub>2</sub>O 분자 1개가 빠져나간 것이다. 이 모분자 피크를 MS/MS 분석한 결과, 분자량 대 전하비(m/z)가 869.49, 725.37, 723.42, 577.37, 415.32의 패턴이 나오는 것을 확인할 수 있었다. 이러한 피크들은 rhamnose (Rham)와 glucose (Glu)의 손실로 나타난 것이다. m/z 869.49는 모분자 1031.54에서 glucoside가 빠져나간 것으로  $[1031.54-Glu]^+$ 이며, 723.42는 869.49에서 Rhamnose가 빠져나간 것으로  $[869.49-Rham]^+$ 이며, 577.37은 723.42에서 Rhamnose가 빠져나간 것으로  $[725.37-Rham]^+$ 이며, 415.32는 577.37에서 Rhamnose와 H<sub>2</sub>O가 빠져나간 것으로  $[577.37-Rham-H_2O]^+$  으로 확인된다(Jaiswal et al., 2014; Wang M et al., 2003). 따라서 LC-MS/MS 분석결과 속 Fraction IV와 표준물질 Protodioscin의 질량스펙트럼이 일치하는 것을 확인하였고 이에 따라 근피, 속 Fraction IV의 항염증 활성과 관련되는 성분으로 Protodioscin이 있음을 확인하였다.

Protodioscin을 methanol에 용해시켰을 때, 암세포에 대한 세포독성 및 항종양 효과가 있다고 알려져 있는 methyl protodioscin으로 전환된다고 알려져 있다(Figure 24). 실제로 표준

물질 Protodioscin을 메탄올에 용해하였고 근피, 속 Fraction IV 역시 100% 메탄올 용매에서 얻었음을 고려하면 Methyl protodioscin이 존재할 가능성이 있다. 앞서 분석한 질량 스펙트럼 결과를 살펴보면 Protodioscin에서 확인할 수 없는 분자량 대 전하비(m/z) 725.37이 있음을 확인하였다. Methyl protodioscin의 질량 스펙트럼에서 모분자는 MeOH 1분자가 빠져나가서 1031.54[M+H-MeOH]<sup>+</sup>으로 Protodioscin의 모분자와 같으며 이를 MS/MS 분석하면 분자량 대 전하비(m/z)가 869.49, 725.37의 패턴을 확인할 수 있으며 이는 [1031.54-Glu]<sup>+</sup>, [869.49-144]<sup>+</sup>을 각각 나타내는 것으로 이에 따라 Methyl protodioscin의 질량 스펙트럼 패턴을 확인할 수 있었다. 즉 천문동 근피, 속 Fraction IV에 Protodioscin과 Methyl protodioscin이 동시에 존재함을 확인하였다.

따라서, 천문동 건근의 대표적인 항염증 관련 물질은 protodioscin으로 판단되며, 천문동의 항염증 활성 관련 지표물질로는 protodioscin를 기준으로 설정하는 것이 타당하고 제품의 표준화를 위해서는 protodioscin을 토대로 설정하는 것이 바람직한 것으로 판단된다. 천문동 건근의 열수추출물의 프로토디오신의 함량을 측정하기 위해서 butanol분획을 수행한 후 측정된 프로토디오신의 함량은 25.5µg/mg butanol fraction이었다. 그러므로 천문동 건근의 열수추출물의 지표물질인 protodioscin이 천문동 건근 열수추출물의 부탄올 분획 1g당 20mg에서 30mg의 범위(표준범위의 약 80~120%내외)로 표준물질의 함량을 설정되도록 제품을 제작하는 것이 바람직한 것으로 판단된다.

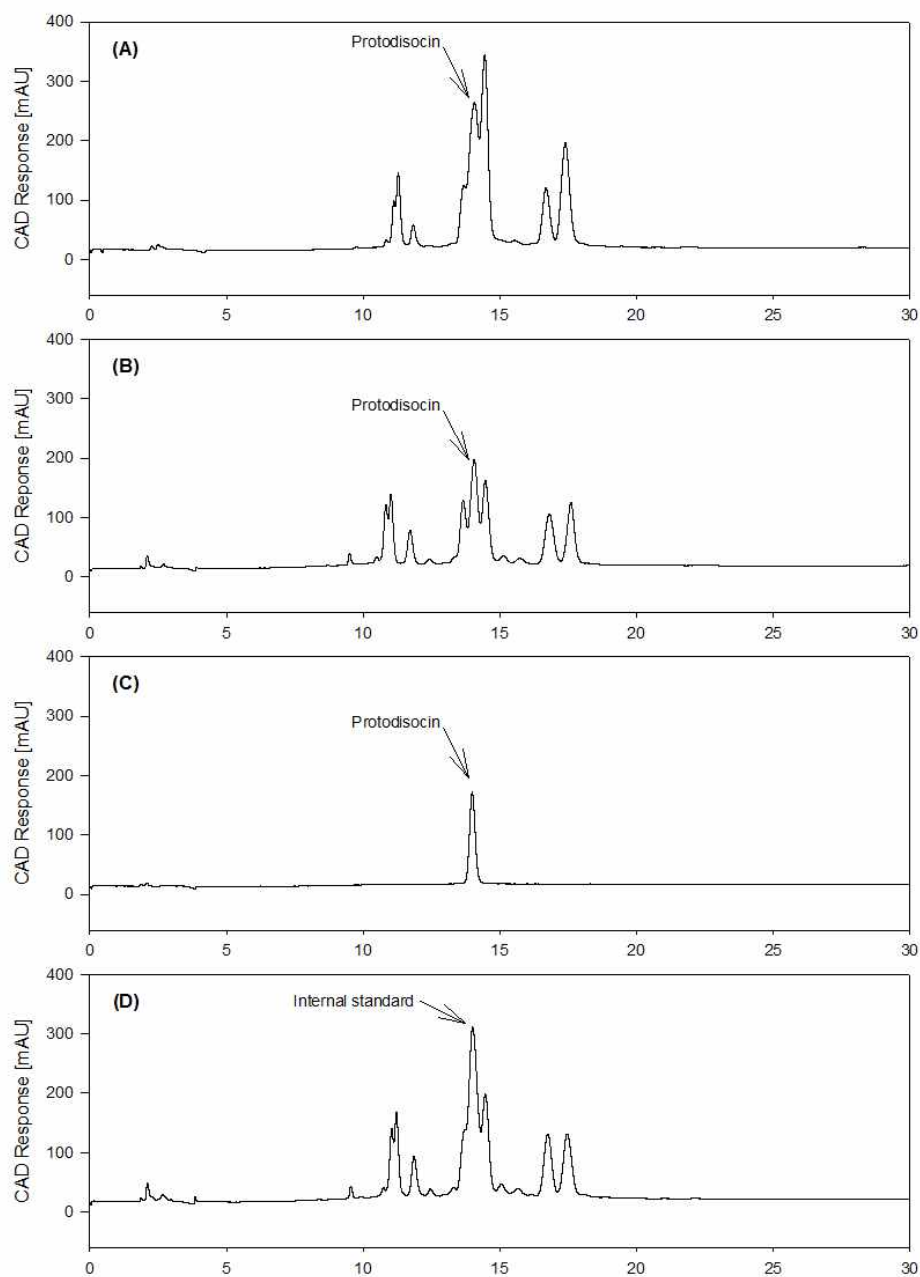


Figure 21. HPLC Chromatogram of AC Root bark and Flesh FractionIV with CAD ((A) Flesh, (B) Root bark and (C) Protodioscin)

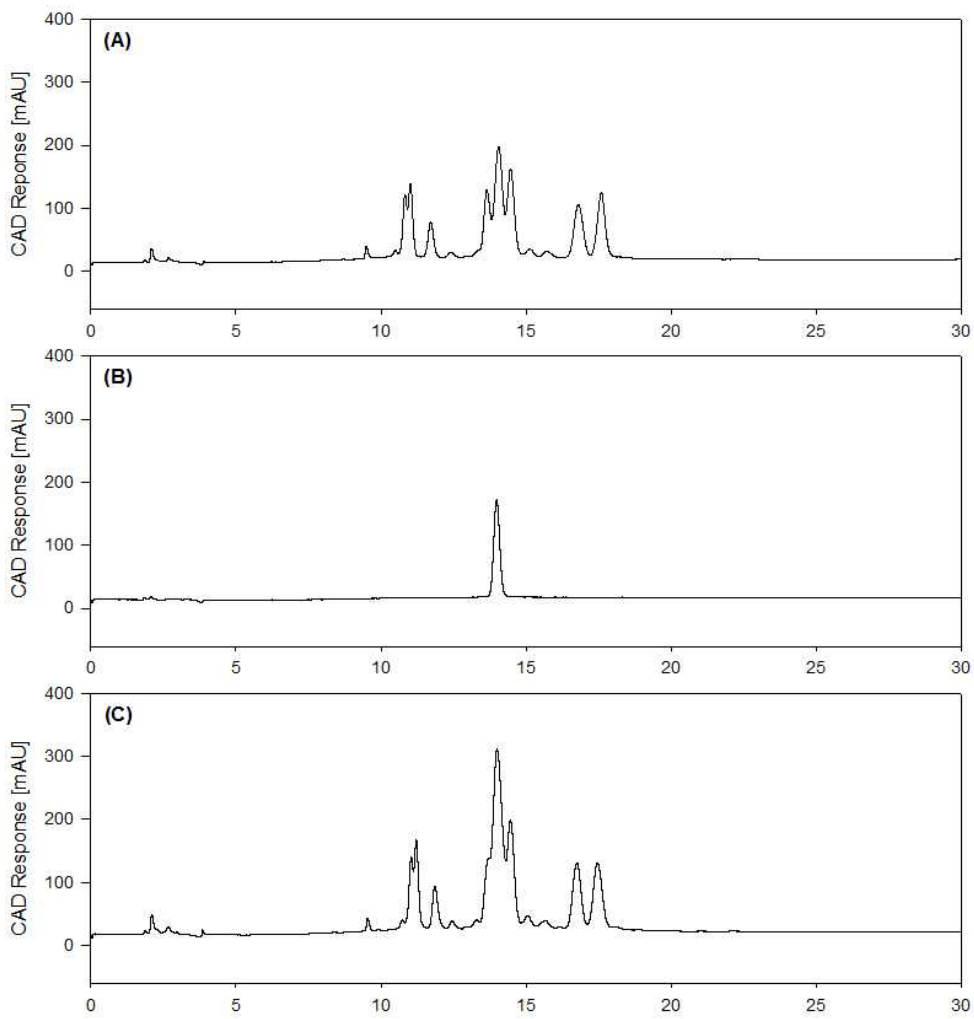


Figure 22. HPLC Chromatogram of Internal Standard From AC Root bark Fraction IV with CAD ((A) Root bark Fraction IV, (B) Protodisocin and (C) Internal Standard)



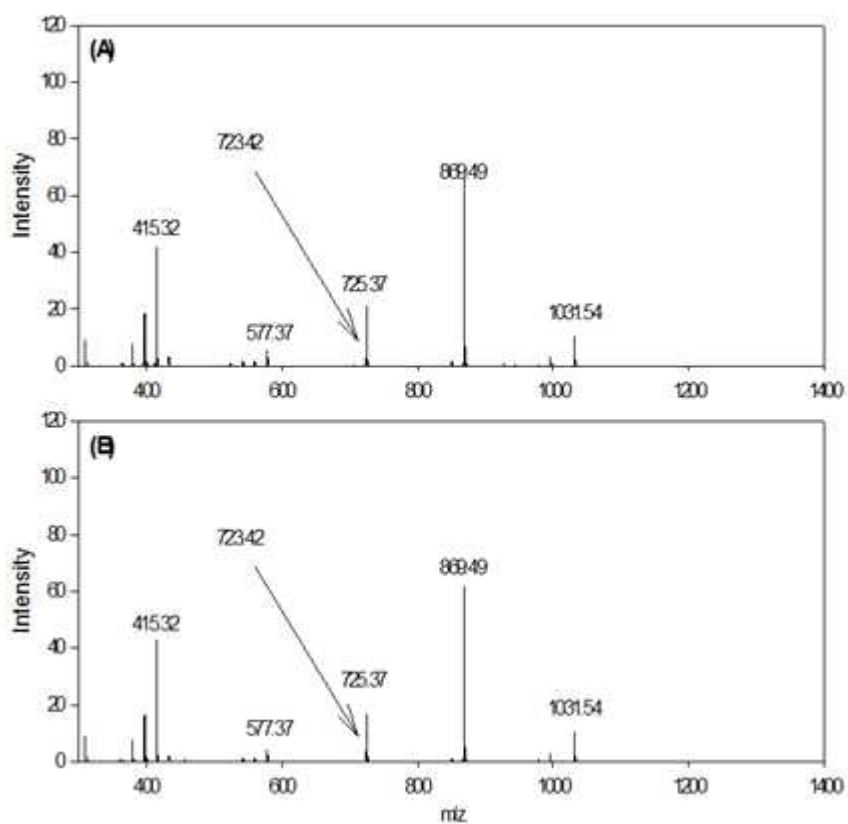


Figure 23. The MS/MS spectra in positive ion mode using Q-TOF MS/MS((A) Flesh Fraction IV and (B) Protodioscin)

R - OH

Protodioscin

R - OCH<sub>3</sub>

Methyl Protodioscin

Figure 24. Chemical structure of Protodioscin and Methyl protodioscin

○ 발효 천문동의 지표성분 분석

하기(천문동 활용 제품의 배합 및 공정조건 확립 연구내용 참고)에 연구된 발효 천문동의 제품 표준화 연구로부터 도출된 발효 천문동으로부터 지표성분을 분석하기 위하여 charged aerosol detector(CAD)를 장착한 HPLC를 이용하여 천문동 발효 전과 후의 물질은 분석하여 Figure 25에 나타내었다. HPLC분석을 위하여 발효 전후의 시료를 BuOH로 추출한 후 감압 건조하여 시료로 사용하였다. 천문동 건근에서와 같이 항염증과 관련된 물질로 protodioscin이 검출되었으며, protodioscin의 함량은 발효전의 천문동 시료에서 부탄올 추출물 1mg당 25.5 $\mu$ g인 반면, 발효후에는 약 35%의 함량이 증가하여 부탄올 추출물 1mg당 34.5 $\mu$ g으로 함량이 증가하였으며, 이는 발효에 따른 항염증의 활성화와 일치되는 경향을 나타내었다. 따라서, 발효 천문동에 있어서도 천문동 건근에서와 동일하게 protodioscin이 지표물질로 사용한 것을 판단할수 있었으며, 또한 발효 천문동 제품의 표준화에 protodioscin의 함량을 기준으로 설정하는 것이 타당한 것으로 판단된다.

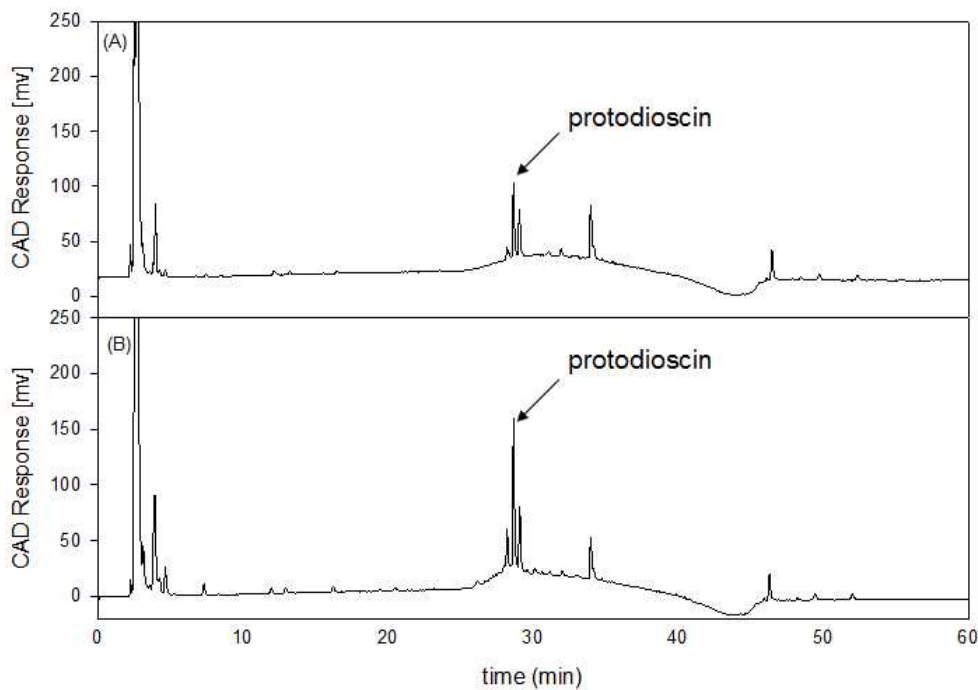


Figure 25. HPLC chromatogram of BuOH extract of fermented *Asparagus cochinchinensis* by *W.kimchii* with charged aerosol detector (CAD), (A) Before fermentation, (B) Fermented at optimized condition.

○ 증숙 천문동의 지표성분 분석

제1협동의 결과로부터 증숙 천문동의 경우 증숙과정에서 일어나는 메일라드 반응으로 인하여 갈변현상이 일어나며 또한 증숙과정을 통해서 HMF가 형성이 되는 것으로 연구되었다.

이를 바탕으로 Lerici (1990), Ajandous (2001) 등의 연구에 따라 UV-vis spectrometer를 이용하여 각 유기용매 분획물의 browning absorbance를 측정하여 메일라드 반응산물의 정도를 비교하였다. 비효소적 갈변반응인 메일라드 반응은 294nm와 420nm의 파장에서 반응의 중간 (intermediate) 및 최종 (final) 산물의 정도를 나타내게 된다. 유기용매 분획별 흡광도의 측정결과는 Figure 25와 같다. 그림에서 보는 것과 같이, 294nm, 420nm 두 파장에서 모두 증숙에 따라 모든 유기용매 분획물의 흡광도 값이 증가한 모습을 확인하였다. 증가 비율은 메탄올 추출물을 제외한 나머지 층에서는 물>n-부탄올>n-헥산>에틸아세테이트 순으로 증가하였으나 에틸아세테이트 층에서 가장 큰 흡광도 값을 나타내었다. 따라서, 294nm, 420nm 두 파장에서의 흡광도를 이용하여 제품 표준화에 활용하는 것이 바람직한 것으로 판단되었다.

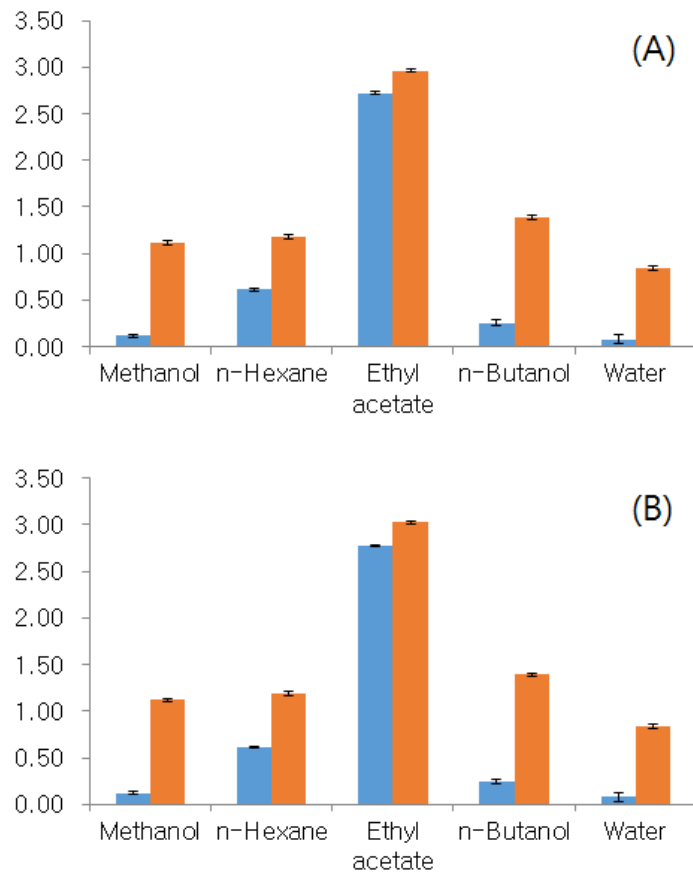


Figure 25. Absorbance at 294nm(A) and 420nm(B) of steamed *Asparagus cochinchinensis* according to organic solvent fractionations.

일반적인 증숙 천문동을 활용한 제품은 열수추출물을 활용하므로 1Brix에 해당하는 열수 추출물의 경우에 294nm에서 35.9의 흡광도를 420nm에서는 3.4에 해당하는 흡광도를 보이므로 294nm에서 28.5~43, 420nm에서 2.7~4범위(표준범위의 약 80~120%내외)로 설정하

여 제품을 제작하는 것이 바람직한 것으로 판단된다. 또한, 증숙시 생성되는 HMF의 물질이 증숙천문동에서도 검출이 되었으며 열수추출물의 에틸아세테이트 분획을 이용하여 함량을 측정된 결과 분획물 1mg당 10.9 $\mu$ g의 함량을 나타내었으며, HMF의 경우 증숙 천문동의 대표적인 지표물질로의 설정이 가능하다. 그러므로 증숙 천문동의 열수추출물의 지표물질인 HMF이 천문동 건근 열수추출물의 부탄올 분획 1g당 8.7mg에서 13mg의 범위(표준범위의 약 80~120%내외)로 표준물질의 함량을 설정되도록 제품을 제작하는 것이 바람직한 것으로 판단된다.

다. 천문동 활용 제품의 배합 및 공정조건 확립

#### (1) 천문동 제품

천문동을 활용한 제품의 경우 다양한 시제품군중에서 음료나 차음료가 제품으로는 가장 적합한 것으로 판단되며, 시제품의 제작시에 사용했던 조건인 배합 조건을 토대로 천문동 건근을 100 $^{\circ}$ C에서 3시간 이상 열수로 추출하여 최종 제품에는 1.7 Brix로 조정을 수행하여 파우치의 형태로 제조가 가능하여 상대적으로 발효 또는 증숙 천문동 제품에 비하여 배합 및 공정조건에서는 상대적으로 brix조정을 통해서 충분히 제품의 생산이 가능한 것으로 판단된다.

#### (2) 발효 천문동 제품

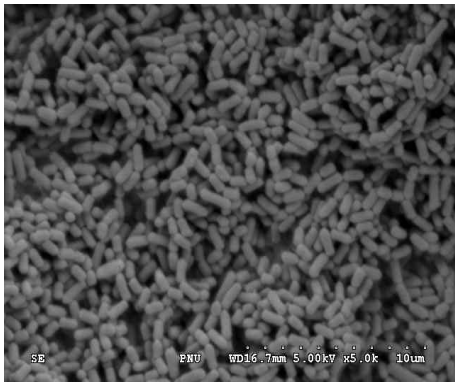
천문동 열수 추출액 발효의 최적 조건을 찾기 위하여 최적화에 유용한 방법인 반응표면분석법(RSM, response surface methodology)을 이용하였으며, 발효 공정변수에 따른 최적의 항염증효과를 얻을 수 있는 발효 조건 및 공정 조건을 확립을 통하여 발효 천문동 제품에 표준화를 설정하고자 하였다.

#### ○ 발효균주의 선정

본 실험에서 사용된 발효 균주는 맥문동으로부터 분리된 균으로서 *Weissella kimchii* 와 *Lactobacillus plantarum*이 사용되었다. 미생물의 배양에 사용된 배지는 모두 Difco(U.S.A)사의 Lactobacilli MRS broth 제품과 Junsei(Japan)사의 Agar powder를 사용하였다. *Weissella kimchii* 의 경우 그람 양성, 카탈라아제 음성, 비 포자 형성, 통성혐기성의 짧은 모양 간균으로 알려져 있으며, *Lactobacillus plantarum*의 경우 정상발효를 하는 그람 양성, 내기성 균으로 일반적으로 15 $^{\circ}$ C에서는 생육하나 45 $^{\circ}$ C나 48 $^{\circ}$ C에서는 생육하지 않는다고 알려져 있다. MRS broth(Difco)에서 12시간 이상 배양 시킨 균을 전처리하여

silver paste로 고정하고 ion-coater(gold)로 coating 한 후에 주사전자현미경(S3500N, Hitachi Ltd., Tokyo, Japan)을 이용하여 세포의 형태학적 특성을 살펴보았다.

Figure 26에서 볼 수 있듯이 두 균주 모두 간균의 형태를 보였으며, 그 중 *Weissella kimchii*균의 경우 길이가 짧은 것을 볼 수 있었다.



*Weissella kimchii*



*Lactobacillus plantarum*

Figure 26. Electron scanning microscope of strain *Weissella kimchii* and *Lactobacillus plantarum*. (×5K)

○ 발효 균주의 특성

실험에 사용되는 두 균의 시간에 따른 증식률을 알아보기 위해 MRS broth에 균을 접종한 후 균체량이 균체현탁액의 탁도나 흡광도와 일정한 관계에 있다는 것을 근거로 2시간 간격으로 ELISA reader를 사용하여 600nm의 파장에서 32시간 동안 흡광도를 측정하였다. Shaking incubator를 이용하여 진탕 배양의 하였으며 배양기의 온도는 37℃로 맞추어 균을 배양하였다. 두 균 모두 유도기를 거쳐 접종 후 6시간 후 대수 증식기에 도달하여 생육률이 최대가 되고, 16시간 전 후로 정지기에 도달하는 것을 확인할 수 있었다.

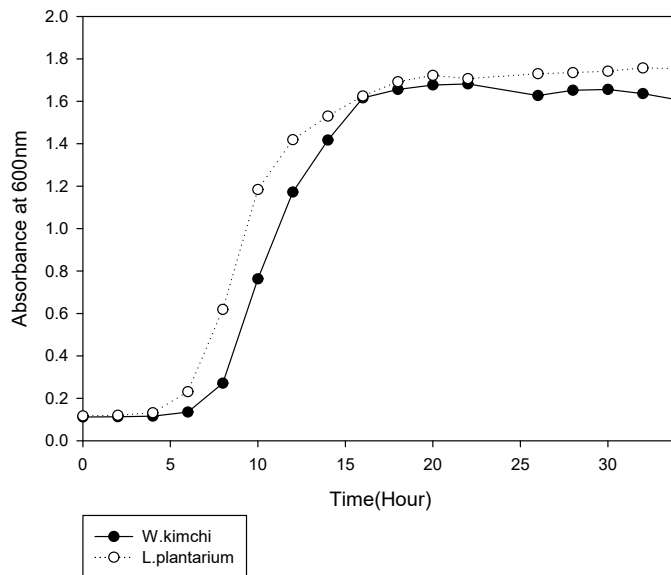


Figure 27. Growth rate of *Weissella kimchi* and *Lactobacillus plantarum*.

미생물의 증식은 화학적·물리적·생물학적 요인들에 의해서 영향을 받으므로, 실험에 사용된 균주들의 온도와 pH에 의한 증식률을 알아보았다(Figure 28).

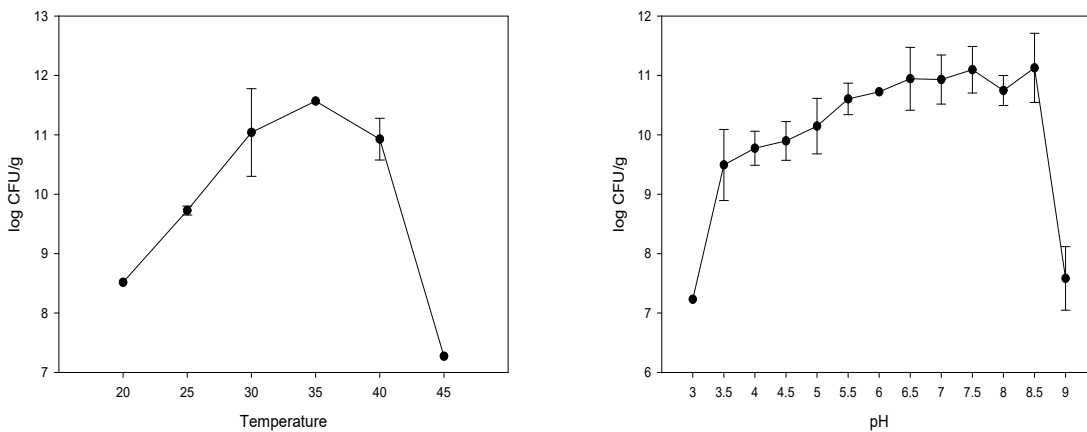


Figure 28. Effect of Temperature and pH on *Weissella kimchii* growth.

*Weissella kimchii*균의 온도에 따른 성장률을 알아보기 위해서 20°C, 25°C, 30°C, 35°C, 40°C, 45°C에서의 생균수를 측정하였다. 이때, 온도를 제외한 다른 외부적 조건들에 의한 영향을 최소화 하기 위하여 MRS broth의 pH는 6.8, 배양시간은 12시간, 접종한 균체량은 6가지 모두 동일 하였다. 그 결과 Figure 28에서 보는 바와 같이 35°C에서 생균수가 가장 많은 것을 볼 수 있었다.

pH가 *Weissella kimchii*균의 증식에 미치는 영향을 조사하기 위해서 MRS broth의 배지를 NaOH와 HCl를 이용하여 pH를 3부터 9까지 맞추었으며, 35℃에서 12시간동안 배양한 결과는 Figure 29에서 보는 바와 같다. pH 8.5에서 *Weissella kimchii*균의 생균수가 최대가 되는 것을 확인할 수 있었으며, pH3과 pH9에서는 확연히 낮은 생존율을 나타내었다.

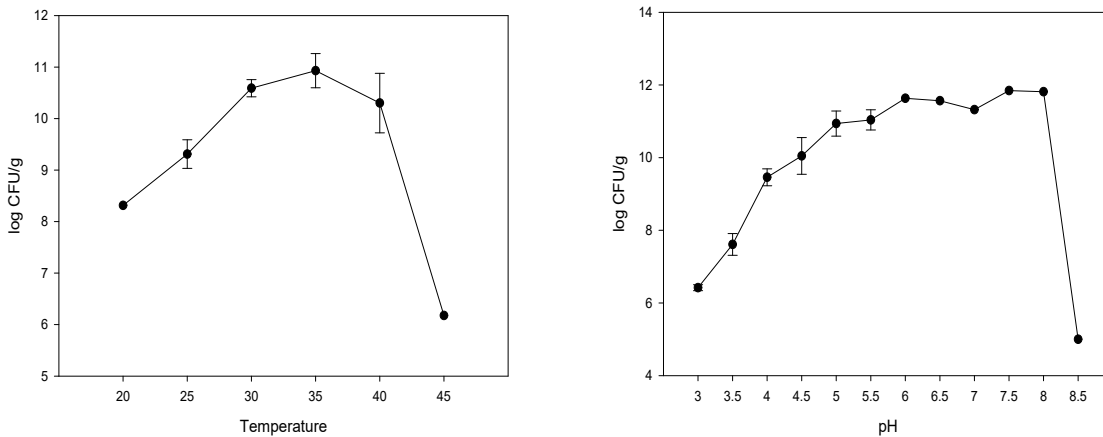


Figure 29. Effect of Temperature and pH on *Lactobacillus plantarum* growth.

*Lactobacillus plantarum*균의 온도에 따른 성장률을 알아보기 위해서 20℃, 25℃, 30℃, 35℃, 40℃, 45℃에서의 생균수를 측정하였으며. 이때, 온도 외의 다른 외부적 조건들에 의한 영향을 최소화 하기 위하여 MRS broth의 pH는 6.8, 배양시간은 12시간, 접종 균체량 모두 통일 하였다. 그 결과 Figure 29에서 보는 바와 같이 35℃에서 생균수가 가장 많은 것을 볼 수 있었고, 40℃ 이후에서는 생존율이 급격히 감소하는 것을 확인할 수 있었다.

또한 pH가 *Lactobacillus plantarum*균의 증식에 미치는 영향을 조사하기 위해서 MRS broth의 배지를 pH 3부터 9까지 NaOH와 HCl를 사용하여 조정 하였으며, 35℃에서 12시간동안 배양한 결과는 Figure 29에서 보는 바와 같다. *Lactobacillus plantarum*균은 pH 8에서 생균수가 최대가 되는 것을 확인할 수 있었으며, pH3과 pH8.5에서는 확연히 낮은 생존율을 보였다.

#### ○ 발효균주의 선정

실험에 사용한 천문동은 전라북도 고창군 고창읍에 있는 고창천문농원에서 재배된 17년산 천문동(*Asparagus cochinchinensis*)의 괴근을 동결건조한 후 저온실(4℃)에 보관하여 실험 재료로 사용하였다. 추출 방법은 동결 건조된 천문동 괴근 20g을 1.2 L 증류수에 넣고 추출기를 이용하여 150분간 추출한 후 여과지(Whatman No. 2)로 여과하였고, 얻어진 여액은 감압농축기(EYESA, N-1100 series, Tokyo)에서 농축하였다. 그 후, 동결 건조기를 이용하여 용매를 제거 후 시료로 사용하였다. 이때, 추출 수율은 60.71%가 되었다.

천문동 열수 추출물을 온도 35℃, pH 6.5의 조건에서 동일한 기간 동안 발효를 진행한

후, Morgan-Elson method (Elson et al., 1933; Lee et al., 1999; Kaegawa et al., 1985)의 방법에 따라 항염증 효과를 측정하였을 때, 천문동 열수 추출물이 *Lactobacillus plantarum*에 의해 발효한 것 보다, *Weissella kimchii*에 의해 발효를 하였을 때 항염증 활성이 더 큰 것을 확인하였다. 이 결과를 바탕으로 *Weissella kimchii*균을 발효 균주로 선정하였다.

○ 천문동 열수추출물 발효 공정 최적화

본 실험에서는 발효를 통한 항염증 효과의 최적화를 알기 위해서 반응표면 분석법(response surface methodology, RSM)을 사용하였고, 발효조건에 대한 실험 계획은 중심합성계획법(central composition design, CCD)에 따라 발효 공정에 중요한 독립변수( $X_i$ )로 고려되는 인자 즉, 천문동 열수추출물 농도( $X_1$ ), 발효균주의 접종량( $X_2$ ), 천문동 열수 추출물의 pH( $X_3$ ), 발효 시간( $X_4$ )에 대한 실험범위를 설정하여 각각을 +2, +1, 0, 1, 2와 같이 5단계 부호화 하였으며(Table 19), CCD에 따라 27개의 조건을 설정하여 발효를 진행하였다. 그리고 이 실험에서 나온 값들을 바탕으로 Design Expert 8 program (State-Easy Co., Minneapolis, MN, USA)을 이용하여 천문동 열수추출물 발효와 그 발효액의 항염증 효과에 있어서 선택된 변수들이 어떠한 영향을 미치고 어떤 조건이 최적 발효 조건인지 분석하였다.

Table 19. Independent Variables Their Levels Used CCD

Variables	Parameter	Level				
		-2	-1	0	1	2
Concentration of hot extract (%)	$X_1$	1	2	3	4	5
Amount of starter culture (%)	$X_2$	1	2	3	4	5
pH	$X_3$	4	5	6	7	8
Fermentation time (day)	$X_4$	0	2.5	5	7.5	10

발효에 있어서의 네 가지 변수와 그의 다섯 가지 레벨과 함께 세 번의 중앙점을 포함하는 27-run 방법은 총 27번의 실험을 필요로 한다. 이 방법은 최적화된 천문동 열수 추출물 발효 후 가지는 항염증 활성 조건을 얻기 위해서 이차 반응 표면을 이용한다. 세 번의 중앙점은 실험의 다양성과 공정상의 안정성을 유지하며 발효액의 항염증 활성을 측정하기 위하여 설정되었다. 코드 단위로 설계된 27개의 서로 다른 조건들에 대한 항염증 활성의 실제 값과 예측 값은 Table 20에 나타내었다. 각 조건에 따른 실험은 3회 이상 수행하였고, 표에서 보듯이 실험값과 예측 값이 비교적 잘 일치 하는 것을 확인할 수 있었다.



Table 20. Central composition design with independent variables

Run	Coded variable levels				Anti-inflammatory activity(%)	
	$X_1$	$X_2$	$X_3$	$X_4$	Actual values	Predicted values
1	-1	-1	-1	-1	20.9135	19.335
2	1	-1	-1	-1	22.1154	20.585
3	-1	1	-1	-1	22.1154	22.255
4	1	1	-1	-1	22.8365	21.625
5	-1	-1	1	-1	15.1442	16.265
6	1	-1	1	-1	21.1538	19.635
7	-1	1	1	-1	19.9519	19.485
8	1	1	1	-1	23.3173	20.975
9	-1	-1	-1	1	11.2981	11.715
10	1	-1	-1	1	15.8654	13.025
11	-1	1	-1	1	16.1058	14.335
12	1	1	-1	1	16.8269	13.765
13	-1	-1	1	1	11.7788	9.685
14	1	-1	1	1	15.1442	13.115
15	-1	1	1	1	12.9808	12.605
16	1	1	1	1	15.8654	14.155
17	-2	0	0	0	25.4808	25.16
18	2	0	0	0	22.4242	27.96
19	0	-2	0	0	20.2424	22.7
20	0	2	0	0	23.8788	26.66
21	0	0	-2	0	20.9697	24.1
22	0	0	2	0	19.2727	21.42
23	0	0	0	-2	-2.28365	-1.14
24	0	0	0	2	-19.7115	-15.58
25	0	0	0	0	23.5577	23.56
26	0	0	0	0	22.8365	23.56
27	0	0	0	0	24.2788	23.56

이 결과들을 바탕으로 천문동 열수추출물 발효액의 항염증 활성과 독립변수들 사이의 상관관계를 2차 다항식으로 나타낸 것이 다음의 식(1)이다. 이는 변수들을 코드화 하여 통일된 변수로 산출한 반응 모델이다.

$$Y = 23.56 + 0.7X_1 + 0.99X_2 - 0.67X_3 - 3.61X_4 - 0.47X_1X_2 + 0.53X_1X_3 + 0.015X_1X_4 + 0.075X_2X_3 - 0.075X_2X_4 + 0.26X_3X_4 + 0.75X_1^2 + 0.28X_2^2 - 0.2X_3^2 - 7.98X_4^2 \quad (1)$$

각 계수의 의미는 Table 21의 값을 통해 확인할 수 있다.

Table 21. Analysis of Variance of the Experimental Results of CCD

Source	Sum of Squares	DF	Mean Square	F Value	p-value Prob > F
Model	2156.24	14	154.02	14.64	< 0.0001
X <sub>1</sub> -Sample	11.65	1	11.65	1.11	0.3133
X <sub>2</sub> -Micro	23.72	1	23.72	2.25	0.1591
X <sub>3</sub> -pH	10.85	1	10.85	1.03	0.33
X <sub>4</sub> -Time	312.04	1	312.04	29.66	0.0001
X <sub>1</sub> X <sub>2</sub>	3.47	1	3.47	0.33	0.5763
X <sub>1</sub> X <sub>3</sub>	4.42	1	4.42	0.42	0.5289
X <sub>1</sub> X <sub>4</sub>	3.61E-03	1	3.61E-03	3.43E-04	0.9855
X <sub>2</sub> X <sub>3</sub>	0.09	1	0.09	8.58E-03	0.9277
X <sub>2</sub> X <sub>4</sub>	0.09	1	0.09	8.58E-03	0.9277
X <sub>3</sub> X <sub>4</sub>	1.04	1	1.04	0.099	0.7582
X <sub>1</sub> <sup>2</sup>	12.11	1	12.11	1.15	0.3044
X <sub>2</sub> <sup>2</sup>	1.68	1	1.68	0.16	0.6965
X <sub>3</sub> <sup>2</sup>	0.89	1	0.89	0.085	0.7761
X <sub>4</sub> <sup>2</sup>	1359.86	1	1359.86	129.25	< 0.0001
Residual	126.25	12	10.52		
Lack of Fit	125.21	10	12.52	24.08	0.0405
Pure Error	1.04	2	0.52		
Cor Total	2282.49	26			

우선 p-value는 각 계수의 중요도와 각각의 독립 변수와의 상호 관계 정도를 나타내고 이 값이 0.05보다 작으면 이 모델이 유의미하며, 0.10보다 크면 무의미하다는 것을 뜻한다. 본 실험의 p-value값은 0.0001로서 매우 낮은 값을 가지고 모델의 F-value에 noise가 생길 확률이 1%도 안되므로 높은 유의성을 가진다고 할 수 있다. 각 모델의 p-value와 그에 상응하는 계수들( $X_1, X_2, X_3, X_4, \dots$ )은 중요한데, 특히 발효 시간( $X_4$ )이 다른 계수들에 비해 발효 시 얻어지는 항염증 활성에 가장 중요한 요소임이 사료된다. 결정계수( $R^2=0.9447$ ), 결정계수 조정( $R^2_{adj}=0.8802$ )와 유사계수( $C.V=18.8600\%$ )는 Table 22에서 확인할 수 있다. 이들 값은 다항식 모델의 일반적인 유효성 및 정확성을 암시하고 모델의 적합성을 판단하는데 기여한다.

Adeq.Precision값으로 signal에서 noise까지의 비율을 측정할 수 있는데, 일반적으로 4 이상의 값을 가지면 바람직하다고 한다. 본 모델의 값은 18.0154로 디자인 공간을 탐색하는데 있어 유용하게 사용될 가능성이 있다고 여겨진다.

Table 22. Analysis of Variance for the Fitted Quadratic Polynomial Model of fermentation

Item	Std. Dev.	Mean	C.V. %	PRESS	R-Squared	Adj R-Squared	Pred R-Squared	Adeq Precision
Value	3.2436	17.1985	18.8600	723.5762	0.9447	0.8802	0.6830	18.0154

이 반응표면 곡선은 결과의 최적 값을 얻기 위해 영향을 주는 각 변수들의 최적 값을 결정하고 그 변수들의 상호작용을 조사하여 그린다. 변수의 최적화된 값들은 회귀 방정식에 의해서 구하여 지는데, 본 실험에서는 Design-Expert software를 이용하여 회귀 방정식을 풀었다. 3차원(3D) 반응 표면 곡선과 2차원(2D) 등고선 평면도는 회귀 방정식의 결과를 그래프로 나타낸 것이다(Figure 30-35) 각각의 그래프 들은 총 네 가지의 독립 변수들 중에서 두 가지의 독립변수를 Level 0값에 고정시킨 후 나머지 두 독립변수들의 조합을 나타낸다. Figure 30(a)와(b)는 pH와 발효 시간을 level 0 값인 6과 5일로 각각 고정 시켰을 때, sample의 농도와 균 접종량의 상관관계가 반응 값에 어떤 영향을 미치는 지 나타낸 그래프이다. Figure 30에서 보듯이 pH와 발효 시간이 일정할 때, 발효 균 접종량과 천문동 열수 추출물의 농도가 -2 레벨에서 2 레벨로 갈수록 항염증 효과가 증가하는 것을 볼 수 있다. 그러나 그 증가폭이 다른 요인들이 미치는 영향에 비해 큰 값은 아니었다. Figure 31(a)와 (b)는 발효 균 접종량이 3, 발효시간이 5로 고정된 상황에서 pH와 열수 추출물의 농도가 항염증 활성에 미치는 영향을 나타낸 그래프로, 항염증 활성은 pH가 증가할수록 그 값이 소폭 하락하는 것을 확인할 수 있었고, 그에 비해 추출물의 농도가 커질수록 항염증 활성은 증가하는 것을 볼 수 있었다. Figure 32(a)와 (b)는 균 접종량이 3%, pH가 6으로 고정 된 조건에서 발효 시간과 시료의 농도가 최종 발효 산물의 항염증 활성에 미치는 영향을 나타낸 것이다. 발효시간의 경우에는 -2 레벨에서 0 레벨 정도 까지는 항염증 활성이 큰 폭으로 증가하는 것을 확인할 수 있었으나, 그 이후에는 다시 발효액의 항염증 활성이 큰 폭으로 떨어진다 것을 보여준다. 하지만 이때 천문동 열수추출물의 농도는 실험 결과 값에 영향을 미치지 않았다. Figure 33(a)와 (b)는 pH와 발효균의 접종량에 따른 항염증 활성 정도를 시료 농도 3%, 발효시간 5일로 고정된 조건에서 나타낸 것이다. 이 그래프 에서는 추출물의 농도와 발효 시간이 일정할 때, pH와 발효균의 접종량은 결과 값에 큰 영향을 주지 않고 일정하게 유지된다. Figure 34(a)와 (b)는 열수 추출물의 농도가 3, pH가 6으로 고정 되었을 때 발효시간과 접종 균의 양에 대한 항염증 결과 값에 대한 영향을 나타내는 그래프이다. 이 경우 발효 시간이 0일에서 5일이 될 때 까지는 항염증 활성이 증가하나, 그 이후에는 다시 감소하는 경향을 보였다. 반면, 균 접종량에 대해서는 영향을 미치지 않았다. 마지막으로 Figure 35(a)와 (b)는 열수 추출물 농도와 균 접종량이 level 0 값인 3으로 고정되었을 경우 발효 시간과 pH가 미치는 영향을 보여주는 그래프이다. 다른 그래프들과 마찬가지로 발

효시간이 level -2에서 0이 될 때까지는 결과값이 증가하는 것을 보이나, 그 후에는 결과값이 다시 감소하는 것을 나타내고 있다. pH의 경우에는 pH가 감소할수록 미세하게 항염증 활성이 감소하고 있다는 것을 보여준다. 이 그래프 들을 종합해 보면 발효 시간이 천문동 열수 추출물이 가지는 항염증 활성을 높이는 데 가장 중요한 요소라는 것을 알 수 있다. 따라서 발효 시 가장 주의해야 할 점은 발효 시간을 지키는 것으로 추측된다.

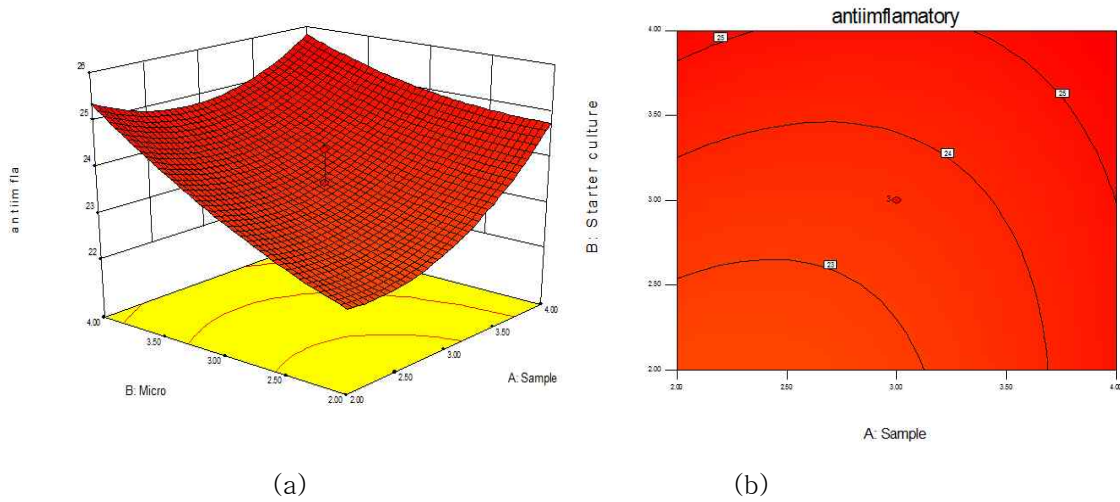


Figure 30. Effect of amount and reciprocal interaction of strain and extract with pH and fermentation time at level 0 ((a) 3D response surface; (b) 2D contour plots).

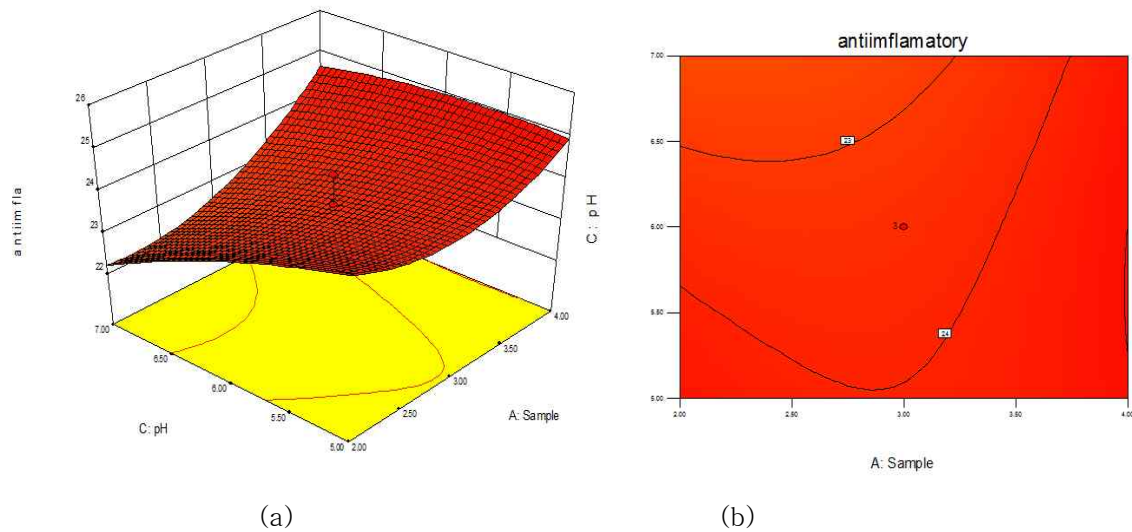
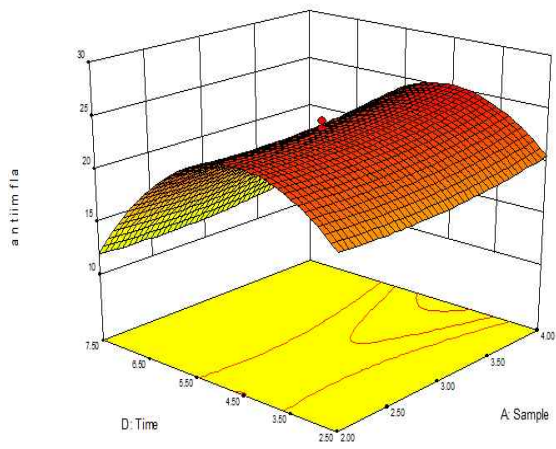
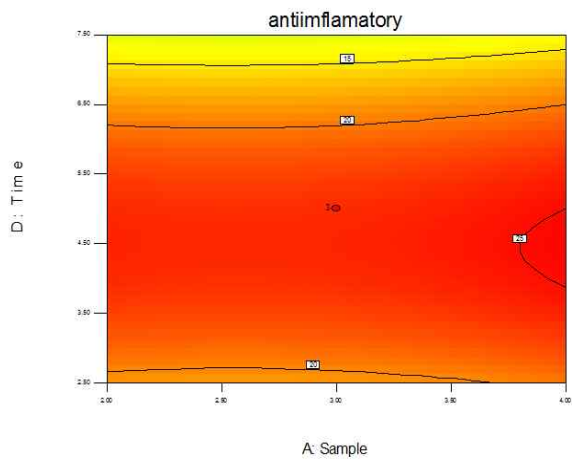


Figure 31. Effect of amount and reciprocal interaction of pH and extract with strain and fermentation time at level 0 ((a) 3D response surface; (b) 2D contour plots).

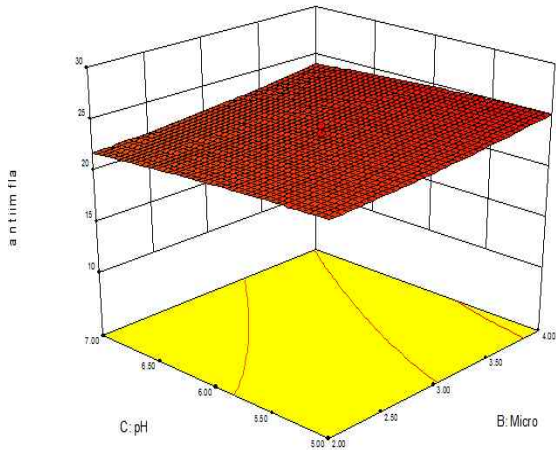


(a)

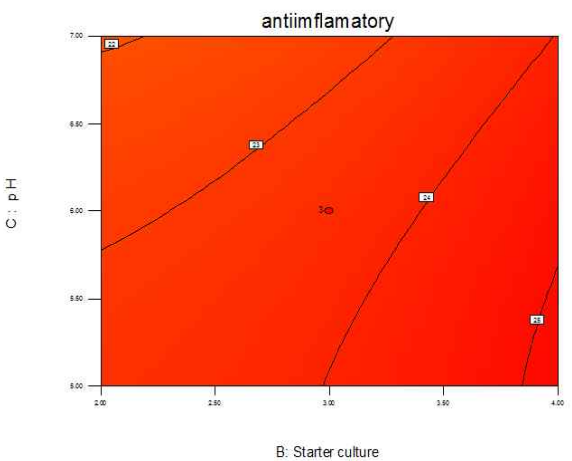


(b)

Figure 32. Effect of amount and reciprocal interaction of fermentation time and extract with pH and extract at level 0 ((a) 3D response surface; (b) 2D contour plots).



(a)



(b)

Figure 33. Effect of amount and reciprocal interaction of pH and strain with extract and fermentation time at level 0 ((a) 3D response surface; (b) 2D contour plots).

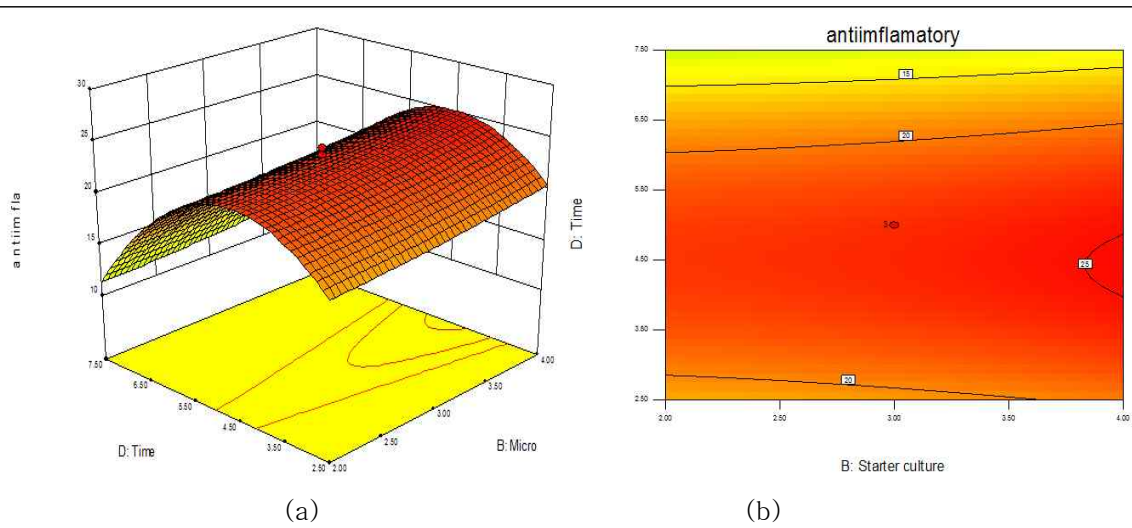


Figure 34. Effect of amount and reciprocal interaction of fermentation time and strain with pH and extract at level 0 ((a) 3D response surface; (b) 2D contour plots).

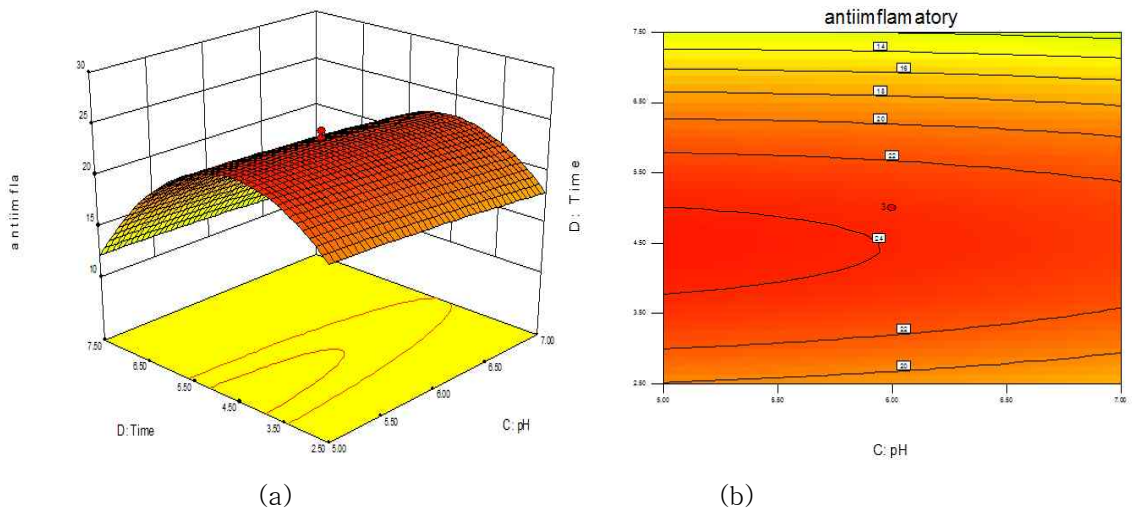


Figure 35. Effect of amount and reciprocal interaction of fermentation time and pH with extract and strain at level 0 ((a) 3D response surface; (b) 2D contour plots).

잔차 분석은 실험에서 얻은 결과들이 정규분포, 평균과 분산, 상호 독립성 및 독립변수와 종속변수 사이에 선형조건을 만족한다는 가정아래 이루어진다. 이 모델의 적합성을 알아보기 위해 반응 값 예측을 위한 회귀 방정식에서 예측치와 종속변수의 실제 값의 차이인 잔차 분석을 실시하였다(Figure 36, 37).

표준화 잔차의 정규 확률 그림을 보면 직선에 가까운 형태를 하고 있어, 잔차의 정규성을 가정할 수 있었다. Figure 36에서 볼 수 있는 표준화 잔차와 예측 값의 산점도를 보면

±3.0 이내의 수평밴드 내에서 랜덤하게 분포되어 있으므로 오차의 등분산성을 만족하는 것으로 사료된다.

이를 바탕으로 천문동 열수 추출물의 발효에 의해 얻을 수 있는 항염증 효과의 최적화된 조건을 얻을 수 있다. 회귀 방정식을 이용하여 계산된 최적화된 조건은 열수 추출물의 농도 1%, 접종 균량 5%, pH 4 그리고 발효시간 4.32이고 이 조건에서 얻을 수 있는 이론적인 항염증 효과는 33.0591%로 예측된다.

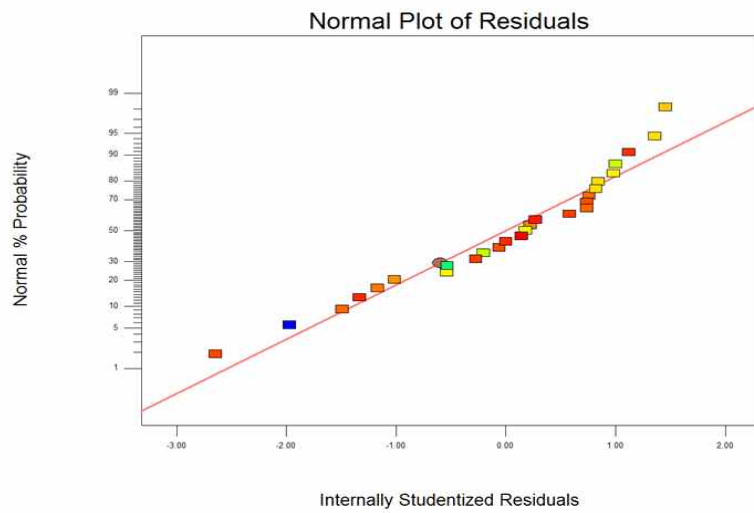


Figure 36. Residual plot of model for error values: normal% probabilities versus internally studentized residuals for anti-inflammatory activity of fermented *Asparagus cochinchinensis* extracts

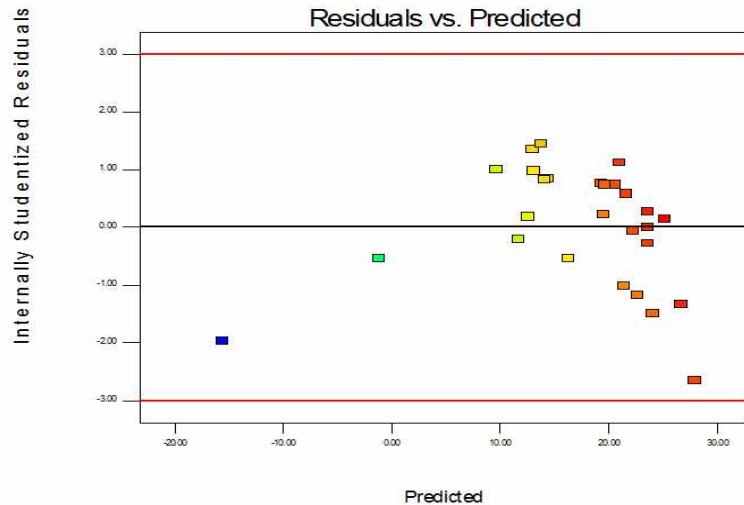


Figure 37. Residual plot of model for error values: scatter diagram of residuals and predicted for anti-inflammatory activity of fermented *Asparagus cochinchinensis* extracts

○ 모델 검증 및 천문동 발효 표준화 설정

반응표면분석법을 통해서 얻어진 모델이 적합한 것인지를 판단하기 위하여 실제 발효 천문동의 제조에 적합한 조건을 설정하여 모델에서 예측되는 결과와 비교 분석하였다. 회귀 방정식을 이용하여 계산된 최적화된 조건은 열수 추출물의 농도 1%, 접종 균량 5%, pH 4 그리고 발효시간 4.32이고 이 조건에서 얻을 수 있는 이론적인 항염증 효과는 33.0591%로 예측되었으나, 열수 추출물을 1%로 제조하여 멸균할 경우 pH가 약 5.33이 되며 이를 pH 4로 조절하기 위해서는 산첨가와 같은 추가 공정이 필요하게 된다. 따라서, 실제 발효 천문동 생산을 위해 적합한 조건의 경우 열수 추출물의 농도 1%, 접종 균량 5%, pH 5.33 그리고 발효시간 4.3일로 발효를 진행할 경우 모델로부터 예측되는 항염증활성의 값은 29.101이었다. 열수 추출물의 농도 1%, 접종 균량 5%, pH 5.33 그리고 발효시간 4.3일로 대량 발효를 진행한 후 항염증활성을 측정된 결과 항염증 효과는  $28.61 \pm 2.97$ 로 측정되었으며 예측값과 약 1.67%의 오차를 나타내어 상기에서 유도된 모델이 적합함을 확인할 수 있었다. 따라서, 발효 천문동 제품의 생산을 위한 표준화 조건으로는 천문동을 열수에서 추출하여 1%로 조정하고(pH 5.3내외), 여기에 5%에 해당하는 유산균을 접종하여 4.3일간 발효를 진행하는 것이 적합한 것으로 판단된다. 또한 발효 천문동의 butanol분획을 수행한 후 측정된 프로토디오신의 함량은  $34.5 \mu\text{g}/\text{mg}$  butanol fraction이었다. 따라서 발효 천문동의 지표물질인 protodioscin이 발효 천문동 부탄올 추출물 1g당 28mg에서 42mg의 범위(표준범위의 약 80~120%내외)로 표준물질의 함량을 설정되도록 제품을 제작하는 것이 바람직한 것으로 판단된다.



(3) 증숙 천문동 제품

증숙 천문동 제품(액상차 및 캡슐제품)을 제조하기 위한 제조방법 설명서는 아래와 같은 제조 방법을 이용하여 제조하였다(Figure 38, 39).

업 체 명	(주) 강림오가닉		
제 품 명	증숙 천문동차	유 형	액상차
<b>&lt; 제 조 방 법 &gt;</b>			
<b>공정명</b>	<b>제 조 방법 설명</b>		
입고 · 보관	원부재료 운송차량(일반차량)이 들어오면 운송차량의 온도 및 원부재료의 외관상태 등을 확인하고 정상제품만 해당 저온 창고에 입고 · 보관한다.		
▼			
개포	포대에 넣어 있는 천문동을 개포한다		
▼			
세척	원물을 세척기에 투입하여 5분 이상 1-2회 세척한다.		
▼			
증숙	세척된 원물을 90-100℃로 12시간 증숙시킨다		
▼			
농축,추출	증숙된 천문동을 90도에서 약 3시간 농축, 추출한다		
▼			
흡광도 측정	브릭스와 흡광도를 측정하여 1Brix당 294nm에서 28.5~43, 420nm에서 2.7~4범위(표준범위의 약 80~120%내외)에 해당 여부를 확인후 미달시에는 추출시간을 조정한다.		
▼			
농도조정	brix를 조정후, 온수를 첨가하여 약 1시간 가열한다.		
▼			
충진	추출물을 충전기를 이용하여 폴리에틸렌 비닐에 충전한다		
▼			
검사	표준물질인 HMF의 함량을 측정한다.		
▼			
보관 · 출하	외포장된 완제품은 창고에 보관 적재한다.		

Figure 38. Manufacture procedure of steamed Asparagus cochinchinensis for a beverage

업 체 명	(주) 강림오가닉		
제 품 명	파워 천문동	유 형	식용유지가공품
<b>&lt; 제 조 방 법 &gt;</b>			
공정명	제조방법 설명		
입고·보관	원부재료 운송차량(일반차량)이 들어오면 운송차량의 온도 및 원부재료의 외관상태 등을 확인하고 정상제품만 해당저온 창고에 입고·보관한다.		
▼			
개포	포장되어 있는 증숙천문동 농축액과 코코넛오일을 개포한다		
▼			
혼합	증숙천문동 분말 30%, 레시틴 3%, 코코넛오일 67%로 고속으로 교반하여 혼합하여 이멀전을 만든다		
▼			
기포제거	감압을 적용하여 공기를 제거한다		
▼			
이송	혼합물을 성형실로 이동한다		
▼			
캡슐원료 혼합	카라기난과 변성전분 및 글리세린을 리본믹스로 혼합한다		
▼			
용해	카라기난과 변성전분 및 글리세린을 혼합한 혼합물을 용해로에서 정제로를 투입하면서 60-90℃에서 용해시킴		
▼			
성형	연질캡슐성형기에 혼합물을 용해된 연질캡슐원료와 함께 성형기에 넣어 캡슐로 제작		
▼			
건조	온도 20도, 습도 30%이하에서 4-6일간 건조		
▼			
충진	건조된 연질캡슐을 용기(HDPE)에 넣은 후, 실리카겔과 비닐을 넣는다.		
▼			
캡핑 및 실링	충진된 용기를 캡핑기로 캡핑하고 고주파실링기로 실링한다		
▼			
라벨부착	충진하여 포장된 제품을 컨베이어벨트에 올려 라벨을 부착한다		

포장·출하

라벨부착된 용기를 외포장해서 창고에 보관,적재한다.

Figure 39. Manufacture procedure of steamed *Asparagus cochinchinensis* for a capsule product

상기와 같은 제조 방법을 통해서 증숙 천문동 음료와 캡슐형 제품을 생산하였다. 캡슐형 제품과 관련된 제조과정은 Figure 40에 나타내었다.



Figure 40. Capsule-type product using steamed *Asparagus cochinchinensis*

증숙 천문동 제품의 생산을 위하여 품목제조보고서를 작성하여 보고하였으며, 승인된 품목 제조보고서는 아래의 Figure 41 및 Figure 42과 같다. 또한 생산된 제품의 시험 성적서는 Figure 43 및 Figure 44에 나타내었다.



### 식품(식품첨가물) 품목제조보고서

보고인	성명(법인명) 임수혁	생년월일(법인번호) 1947년 03월 20일		
	주소 경상남도 밀양시 하남읍 초하로 510	전화번호 055 391 6201	휴대전화 010 83240985	
	영입소 영입등록번호 20010611009			
영입소	명칭(상호) 농업회사법인(주)강원오가닉	영입등록번호 20010611009		
	소재지 경상남도 밀양시 하남읍 초하로 510			
제품정보	식품의 유형	역상차	요청하는 품목제조 보고번호	2001061100934
	재용량	즉석 천분동		
	유통기한	제조일로부터 1년		
	유통유지기한	제조일로부터 1년		
	면역성 또는 영양성, 비타민류	맛장애 기재		
	중도 불합	맛장애 기재		
	모관방법 및 포장재질	맛장애 기재		
	포장방법 및 포장단위	포장기로 비닐포장, 포장단위 : 80ml		
	성상	액체		
	품목의 특성 <input checked="" type="checkbox"/> 고열량·저열량 식품 해당 여부 <input type="checkbox"/> 예 <input type="checkbox"/> 아니오 <input type="checkbox"/> 해당 없음 <input checked="" type="checkbox"/> 활동인용 식품 해당 여부 <input type="checkbox"/> 예 <input type="checkbox"/> 아니오			

기타

「식품위생법」 제37조제5항 및 같은 법 시행규칙 제45조제1항에 따라 식품(식품첨가물) 품목제조 사항을 보고합니다. 2017년 07월 27일  
 보고인 임수혁  
 경상남도 밀양시장 귀하

품목보고번호	20010611009-34
처리부서	보건소 보건위생과
처리자성명	안태환
처리일자	2017년 07월 28일



본 증명서는 인터넷으로 발급되었으며 식품안전정보포털(<http://www.foodsafetykorea.go.kr/>) 홈페이지에서 확인할 수 있습니다.

Figure 42. Products manufacture report of beverage product using steamed Asparagus cochinchinensis



### 식품(식품첨가물) 품목제조보고서

보고인	성명(법인명)	생년월일(법인번호)		
	임수복	1947년 03월 20일		
	주소	전화번호	055-391-6201	
	경상남도 밀양시 해남읍 초창로 510	팩스번호	010-83240988	
영업소	명칭(상호)	영업등록번호		
	동원회사법인(주)강원오거리	20010511009		
	소재지	경상남도 밀양시 해남읍 초창로 510		
제품정보	식품의 유형	어묵류	요청하는 품목제조 보고번호	2001051100935
	제품명	천문동오코너		
	유통기한	2년		
	품질유지기한			
	면도성 또는 성분명, 색합비율	면도에 기해		
	용도 용법	면도에 기해		
	보관방법 및 포장단위	면도에 기해		
	포장방법 및 포장단위	120캡슐(500ml)을 넣은 후, 고주파 살균기중 살균		
	성상	합송형(외부 : 고형, 내부 : 액체)		
	품목의 특성	<input checked="" type="checkbox"/> 고열성 : 저열성 식품 해당 여부 <input type="checkbox"/> 예 <input checked="" type="checkbox"/> 아니오 <input type="checkbox"/> 해당 없음 <input checked="" type="checkbox"/> 할랄인증 식품 해당 여부 <input type="checkbox"/> 예 <input checked="" type="checkbox"/> 아니오		

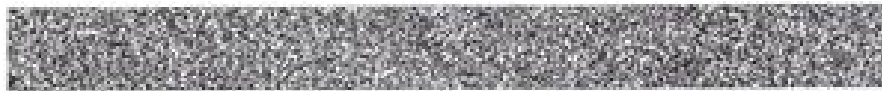
기타

「식품위생법」 제37조제5항 및 같은 법 시행규칙 제45조제1항에 따라 식품(식품첨가물) 품목제조 사항을 보고합니다. 2017년 08월 09일

보고인 임수복

### 경상남도 밀양시장 귀하

품목보고번호	20010511009-35		처리자성명	안무환	처리일자	2017년 08월 09일
처리부서	보건소 보건위생과					



본 증명서는 전자문자로 발급되었으며 식품안전정보포털(http://www.foodsafetykorea.go.kr/) 홈페이지에서 확인할 수 있습니다.

Figure 43. Products manufacture report of capsule-type product using steamed Asparagus cochinchinensis

**시험 · 검사성적서** **MEBIXON**  
Innovative Life Science Solutions

발급번호	000000008364	접수번호	R-11707-0623
제품명	음속천연음	제조일자 (LOT번호)	2017-07-07
의뢰명	업소명 농업회사법인(주)강원오가네	유형기법	-
	소재지 경상남도 밀양시 효동면 초저로 510	성명	임수백
접수일자	2017-07-27		
유형	Sample		
검사목적	참고용(영양성분)	검사완료일	2017-08-16

**시험항목 및 결과**

시험항목	기준규격	결과	단위
열량	-	1.18	kcal/100mL
탄수화물	-	0.15	g/100mL
당류	-	0.11	g/100mL
조단백질	-	0.10	g/100mL
조지방	-	0.02	g/100mL
포화지방	-	0.01	g/100mL
트랜스지방	-	0.00	g/100mL
콜레스테롤	-	0.00	mg/100mL
나트륨	-	2.03	mg/100mL

합 계 -

**비 고**

2017년 08월 16일  
**㈜메빅스 인**

\* 본 시험·검사성적서는 「식품·의약품분야 시험·검사 등에 관한 법률」에 따른 업무상 관인이 없으며, 이로 인한 법적 분쟁사 시종각의책임전치와 관련하여 효력을 발휘하지 않습니다.  
\* 비고: 1. 상기 내용은 의뢰인이 제출한 경우에 대한 결과이며, 정확성 및 정밀성 의뢰인이 책임하는 것임.  
2. 이 시험성적서는 승인 없이 복사 사용을 금지하며, 무단으로 사용을 금함.

시험검사원	고석영, 박성섭, 박진애, 최수진	시험검사책임자	문소영, 박성섭
-------	--------------------	---------	----------

(주)메빅스  
서울시 금천구 가산디지털2로 53 (가산동, 한미시그마빌딩) 본사 : 0211-0212호 / 생명공학연구소 : 011-612호  
Tel. 02-2088-7108 Fax. 070-4332-3191

Page 1 of 1

MEB-KIDP-06-F00
(주)메빅스
46
A4210'25

Figure 44. Analysis report of beverage product using steamed Asparagus cochinchinensis



MEBIXONMEBIXONMEBIXONMEBIXONMEBIXONMEBIXONMEBIXON

## 시험 · 검사성적서

**MEBIXON**  
Innovative Life Science Solutions

발급번호	00000008366	접수번호	R-11707-0624	
제품명	청문콩크로넷	제조일자 (LOT번호)	2017-07-07	
의뢰인	업소명	농업회사법인(주)광림오기농	유통기한	-
	소재지	경상남도 밀양시 초동면 초동로 510	성명	임수혁
접수일자	2017-07-27			
유형	Sample			
검사목적	참고용(영양성분)	검사완료일	2017-08-16	

**시험항목 및 결과**

시험항목	기준규격	결과	단위
열량	-	867.60	kcal/100g
탄수화물	-	6.44	g/100g
단백	-	0.00	g/100g
총당백분	-	0.04	g/100g
총지방	-	93.52	g/100g
포화지방	-	52.20	g/100g
트랜스지방	-	0.00	g/100g
콜레스테롤	-	0.00	mg/100g
나트륨	-	0.30	mg/100g

비 고

2017년 08월 16일  
주메빅손 인

\* 본 시험·검사성적서는 「식품·의약품분야 시험·검사 등에 관한 법률」 제 43조 규정에 의거하여, 이로 인한 법적 분쟁시 시험하여용인업체의 권한이 있음을 밝힙니다.  
\* 참고: 1. 상기 내용은 의뢰인이 제출한 정보에 대한 결과이며, 결과의 정확성은 의뢰인이 제시한 것임.  
2. 이 시험성적서는 승인 없이 복사·사용을 금지하며, 무단 이의의 사용을 금함.

시험검사원	고혜분, 박성성, 박진아, 최수진	시험검사책임자	문소영, 박성성
-------	--------------------	---------	----------

(주)메빅손  
서울시 금천구 가산디지털2로 53 (가산동, 한라시그라밸리) 본사 : 1211-1212호 / 생명공학연구소 : 611-612호  
Tel. 02-3088-7108 Fax. 070-4232-3191

MEBIXON  
Innovative Life Science Solutions

Page 1 of 1

Figure 45. Analysis report of capsule-type product using steamed *Asparagus cochinchinensis*

## 제 2절. 호흡기 질환 관련 생리활성 성분분석 및 기능성 증진 연구 (제1협동)

### 1. 천문동 성분분석

#### 가. 천문동 덩이뿌리(괴근)의 이화학적 성분 분석

##### (1) 천문동 추출물의 제조

실험에 사용한 천문동은 전라북도 고창군 고창읍에 있는 고창천문농원에서 재배된 17년산 천문동(*Asparagus cochinchinensis*)의 뿌리를 동결건조(FD5510S-FD5520S, Ilshinbiobase co., Dongducheon, Korea)하여 분쇄기(MF-3100S, Hanil Electric Co., Seoul, Korea)로 분말화한 것을 재료로 사용하였다.



Figure 1. *Asparagus cochinchinensis* root

추출방법은 용기에 분말화된 천문동 75g을 500ml 증류수에 넣고 추출기를 이용하여 120℃에서 45분간 추출한 후 여과지(Whatman No. 2)로 여과 후, 얻은 열수 추출물을 동결건조기를 이용하여 건조 후 시료로 사용하였다.





Figure 2. Hot water extraction



Figure 3. Hot water extract of *Asparagus cochinchinensis*



Figure 4. Lyophilized *Asparagus cochinchinensis* sample

## (2) 천문동의 특수성분 분석

### (가) 총폴리페놀 함량

- 천문동 분말시료 20g에 1.2L의 용매를 가하여 용매별 분획 추출물을 제조하여 여과하고, 45°C에 감압농축하여 1000µg/ml로 희석하여 분석용 시료로 사용한다. 시료 50µl와 증류수 500µl에 Folin 시약 100µl를 혼합하여 실온에서 3분간 정치한 후 10% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 용액을 100µl 가하여 혼합한 다음, 차광하여 실온에서 1시간 정치한 후 UV-spectrophotometer를 사용하여 725nm에서 흡광도를 조사한다. 정량에 사용한 표준품은 caffeic acid 로써, 시료와 동일한 방법으로 분석하여 얻은 표준 검량선으로 부터 총 페놀 함량을 측정하였다.

### (나) 총플라보노이드 함량

○ 시료용액 100µl 에 90% diehtylene glycol 1ml, 1N NaOH 100µl 를 가하여 37°C에서 1시

간 동안 정치한 후 420nm에서 흡광도를 측정한다. 표준물질로 사용한 naringin의 표준 검량선으로부터 총 플라보노이드 함량을 나타내었다.

열수추출물과 에틸아세테이트 추출물의 폴리페놀 및 플라보노이드 함량은 Table 1에 나타내었다, 페놀함량은 두 추출물간의 차이는 거의 없었으며, flavonoid 함량은 열수추출물이 2배가량 많았다.

Table 1. Contents of total polyphenol and flavonoid of various extract from *Asparagus cochinchinensis*

Content(mg/g)	Water	Ethyl acetate
Polyphenol	13.8±0.9 <sup>1)</sup>	14±0.7
Flavonoid	1.32±0.2	0.50±0.13

<sup>1)</sup> All value presents the mean ± SD of triplicate determinations

(다) Total saponins

○ 천문동의 조사포닌 함량은 건조분말시료 5g에 80% 메탄올 100mL을 넣은 후 70℃에서 수욕상에서 30분간 2회 반복 실시하여 추출액을 합하고 여과지(Whatman No. 2)로 여과 한 후 감압농축을 실시하였다.

감압농축 후 증류수 30ml로 다시 녹인 후 지용성물질을 제거하기 위해 ethyl ether 50ml을 첨가하여 2회 추출하였다. 추출된 물층을 회수하여 수포화 n-butanol 30ml로 3회 추출하여 얻은 n-butanol층을 감압농축하여 crude saponin을 추출 정량하였다. 결과는 Table 2에서 보는 바와 같다.

$$\frac{A - B}{S}$$

A: n-butanol 층 건조무게(mg)

B: 항량 플라스크 무게(mg)

S: 검체의 채취량(g)

Table 2. Crudel saponin content of *Asparagus cochinchinensis*

component	Contents(mg/g)
Total saponin	57.2±1.47

나. 유기용매 분획별 호흡기 질환관련 생리활성물질의 탐색

(1) 열수추출 및 용매분획의 제조

(가) 열수추출물의 제조

천문동의 열수추출방법은 분말화된 천문동 75g에 500ml 증류수를 첨가하고 추출기를 이용하여 120℃에서 45분간 추출한 후 여과지(Whatman No. 2)로 여과하였다. 여과하여 얻어진 추출물을 동결건조기를 이용하여 건조 후 열수추출 시료로 사용하였다.

(나) 열수추출물의 용매분획

천문동의 열수추출물을 열수:헥산(1:1 v/v)로 1시간동안 3회 추출 후 동결건조기로 건조 후 시료로 사용하였다. 이 외에도 위와 동일한 과정으로 Dichloromethane, Ethyl acetate, Butanol로 분획하여 나온 추출물을 동결건조하여 시료로 사용하였다. 실험에 사용하기 위해서 건조된 시료를 각각의 용매로 녹여 희석하여 농도별로 실험을 실시하였다.

(다) 용매별 추출

용매로는 MeOH, EtOH, MeOH, Hexane, Ethyl acetate, Ether를 사용하였다. MeOH와 EtOH추출은 각각 70℃, 60℃ 환류냉각하면서 24시간 3회 추출하였으며 Hexane, Ethyl acetate 추출은 시료 50g에 각각의 용매 500ml을 진탕항온수조(SHWB-30/45, Woori science Instrument co., Pocheon, Korea)에 50℃, 110rpm에서 24시간 3회 반복 추출하였다. Ether 추출은 시료 50g에 에테르 500ml을 상온에서 190rpm 진탕(VS-202D, Vision scientific, Daejeon, Korea)하여 24시간 3회 추출하였다. 모든 추출물은 동결건조하여 시료로 사용하였다.

(2) 용매별 추출물의 호흡기질환 관련 균주에 대한 항균활성

(가) 사용균주 및 배지

추출물의 항균력 실험에 사용된 균주는 한국미생물보존센터(KCCM)에서 분양 받았으며 표 3에 나타내었다. 미생물의 배양에 사용된 배지는 모두 Difico(U.S.A) 제품을 사용하였다. 세균의 배양 및 항균력 측정에 Trypticase Soy Broth(agar)와 Muller Hinton broth(agar)를 각각 사용하였다.

Table 3. Test bacteria

	Strain
Gram positive bacteria	<i>Staphylococcus aureus</i> (KCCM 40881)
	<i>Staphylococcus epidermidis</i> (KCCM 35494)
Gram negative bacteria	<i>Escherichia coli</i> (KCCM 11234)
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (KCCM 11328)

(나) 추출 용매별 항균활성

천문동 추출물의 항균활성 검사를 위하여 well diffusion method를 변형하여 실험하였다. 각 균주들은 TSB 배지에 2회 계대배양 하였으며 UV-spectrophotometer (Optizen POP, Mecasys co., Daejeon, Ltd, Korea)를 이용하여 O.D.<sub>650</sub>=0.4 농도로 일정하게 조정 한 후 항균 실험에 사용하였다. 일정한 농도로 조정 한 균을 MHA 배지에 (0.8% agar) 1% 접종 후 균 일하게 섞은 후 petri dish에 20ml 분주하였다. 실온에서 응고시킨 후 pasteur pipette을 이용하여 직경 6mm well을 만들어 각각의 추출물 70µl를 주입하였고 negative control로는 각각의 추출용매를 주입하였다. 37℃ 배양기에서 일정 시간 배양 후 well 주위의 성장저해환 직경(mm)을 측정하였다. 상기 실험 방법으로 항균활성 검사를 실시해 본 결과 열수 추출물과 에테르 분획물에서는 6.5mm정도의 희미한 활성을 나타냈으며, 부탄올 분획물에서는 활성을 찾아 볼수가 없었다. 가장 활성이 강한 추출물로는 에틸아세테이트 추출물이었는데, 에틸아세테이트 용매 자체의 약한 항균작용이 있어 에틸아세테이트 추출물은 DMSO(dimethyl sulfoxide)를 이용해 추출물을 녹여, 단계 희석하여 각 농도를 제조하여 실험에 사용하였다. 실험 결과 *Staphylococcus aureus*와 *Escherichia coli*, *Staphylococcus epidermidis* 는 100mg/ml 농도에서 약8mm의 성장저해환을 나타내었고 *Pseudomonas aeruginosa*는 25mg/ml에서 9mm 성장저해환을 나타냄으로서 4개의 의 실험균주 중 *Pseudomonas aeruginosa* 에 대해 가장 항균활성이 뛰어났다(Table 4, Figure. 5).

Table 4. Antimicrobial activity of Ethylacetate fraction

Microorganism	Inhibition zone of plate(mm)			
	Concentration(mg/mL)			
	25	50	75	100
<i>P. aeruginosa</i>	9	9.1	9.1	
<i>S. aureus</i>	-	-	7.8	8.1
<i>E. coli</i>	-	7.2	7.3	8
<i>S. epidermidis</i>	-	-	7	8

-: Not Decteded



*S. epidermidis*

*S. aureus*



*E. coli*

*P. aeruginosa*

Figure 5. Anti-microbial activity of ethyl acetate extract.

### (3) 수확 시기별 천문동의 항균활성 비교

상기의 실험방법으로 용매별 항균활성을 비교했을 때 사용된 천문동은 2014년 11월 26일자로 구매한 것으로 에틸아세테이트 분획에서 약간의 항균활성을 보이기는 하지만, 일반적인 식물재료에서 보고되고 있는 항균활성에 비하면 활성이 매우 낮은 것으로 확인되었다. 이와 같은 결과는 3회 이상의 반복 실험에서도 같은 결과를 나타내었다.

따라서 여러 가지 조건들을 검토하고 분석한 결과 일부 식물성 재료들은 수확 시기별로 기능성 성분의 함량이 달라질 수 있다는 보고를 참고하여 겨울을 나는 식물인 천문동의 항균활성이 달라질 수 있을 것이라는 변수를 검토하기 위하여 수확 시기가 다른 천문동을 구매하여 항균활성을 비교 하였다. 수확 시기가 2014년 11월 26일, 2015년 1월 28일, 2015년 2월 25일 그리고 2015년 3월 11일로 각각 가을, 겨울 그리고 초봄에 수확한 천문동의 항균활성을 비교하였다.

상기의 실험결과 가장 항균활성이 좋았던 에틸아세테이트 분획의 천문동의 수확시기별 항

균활성을 비교한 결과 그림 6과 같이 가을과 겨울에 수확한 천문동에서는 항균활성이 거의 나타나지 않았으나 겨울이 지나고 수확한 두 종류의 천문동에서는 상대적으로 높은 항균활성을 확인할 수 있었다.



2014년 11월 26일

2015년 1월 28일

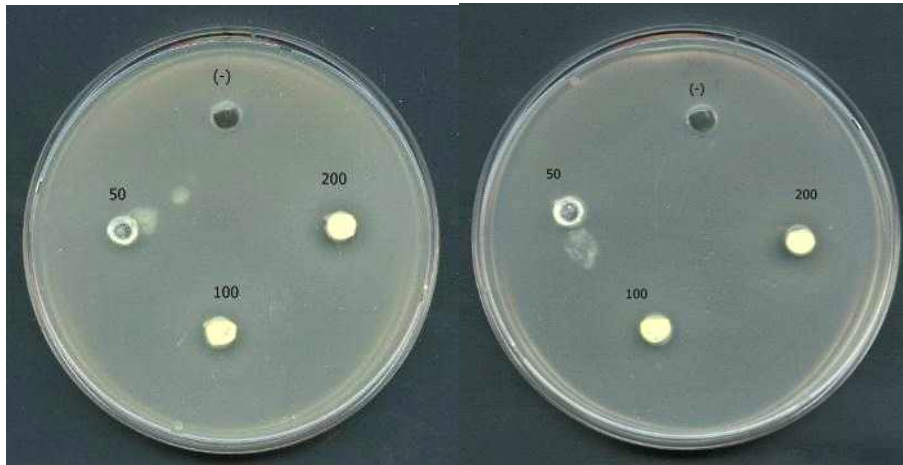


2015년 2월 25일

2015년 3월 11일

Figure 6. Anti-microbial activity of ethyl acetate extract according harvest time.

그리고 상기의 추출방법으로 초봄에 수확한 두 종류의 천문동의 에틸아세테이트 분획에서는 4개의 대상 실험균주에 대해 항균활성이 나타남을 확인할 수 있었다(Figure. 7, 8).



*Staphylococcus aureus*

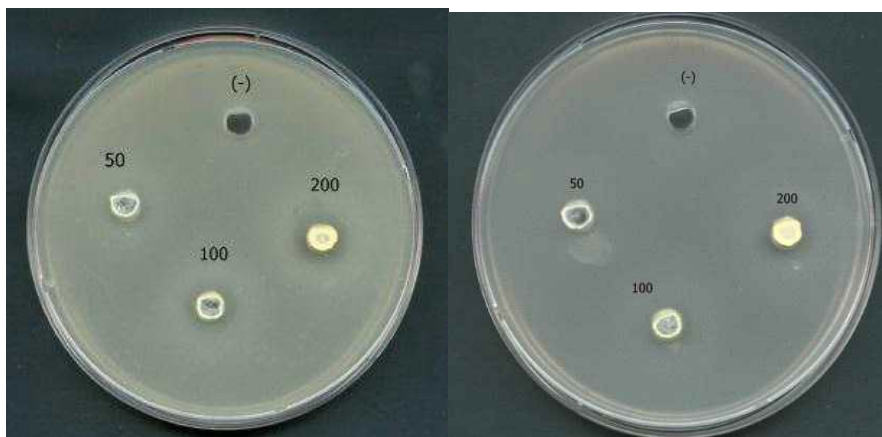
*Staphylococcus epidermidis*



*Escherichia coli*

*Pseudomonas aeruginosa*

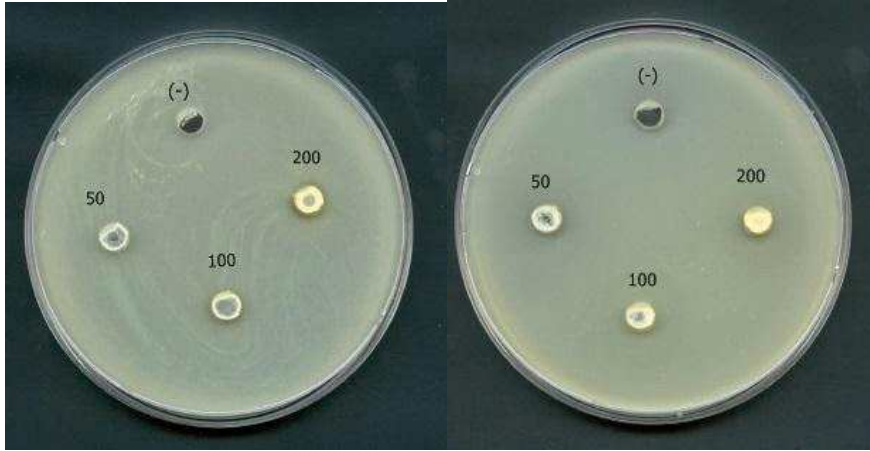
Figure 7. Anti-microbial activity of ethyl acetate extract according harvest time (2015. 2. 25).



*Staphylococcus aureus*

*Staphylococcus epidermidis*





*Escherichia coli*

*Pseudomonas aeruginosa*

Figure 8. Anti-microbial activity of ethyl acetate extract according harvest time (2015. 3. 11).

그러므로 추후의 천문동의 기능성을 활용한 연구나 제품생산을 위해서는 수확시기별 활성을 검토한 후에 활성이 높은 시기에 수확한 천문동을 다량 구입하여 보관하며 실험에 사용해야 할 것으로 여겨진다.

이러한 수확시기에 따른 천문동의 기능성분 효과의 차이로 인하여 당초 본 과제에서 계획했던 1년차의 결과물들을 확보하기 위한 일정이 조금 늦어지고 있는 상황이다. 하지만 실험 결과를 확인한 후 즉시 천문동을 다량 구매하여 건조시킨 후 상기의 방법과 과정을 거쳐 추출하여 실험을 진행하고 있기 때문에 문제없이 목표를 달성할 수 있을 것으로 예상된다.

다. 유해물질의 분석(잔류농약, 중금속 등)

#### (1) benzo(a)pyrene

천문동, 발효천문동 및 증숙 천문동의 시료를 분쇄한 후, 약 5.0 g을 정밀하게 달아 물 100 mL를 넣어 90 분간 초음파 추출한다. 여기에 헥산 약 100 mL 및 내부표준액 1 mL을 넣어 호모게나이저로 5 분간 균질하게 섞은 다음 30 분간 초음파 추출한다. 헥산으로 진탕추출을 반복한 후 감압농축한다. 활성화된 플로리실카트리지에 추출용액을 넣어 헥산·디클로로메탄혼합액(3 : 1) 20 mL를 초당 2 ~ 3방울의 속도로 용출시킨 후 35 °C이하의 수욕상에서 질소가스 하에 날려 보낸 후 잔류물을 아세토니트릴 1 mL에 녹인 다음 공경 0.45 μm이하의 멤브레인필터로 여과하여 검액으로 한다. 표준원액과 내부표준원액 적당량을 정확하게 취하여 아세토니트릴로 mL 당 3, 5, 10, 20 및 40 ng의 벤조피렌과 각각 50 ng의 내부표준물질이 함유되도록 희석하여 표준액으로 한다. 이때 검액의 검출농도가 검량선의 범위를 벗어나면 표준액의 농도가 검량선의 범위에 들어오도록 농도를 조정한다. 검액 및 표준액 10 μL씩을 가지고 Supelcosil LC-PAH (4.6 × 250 mm, 5 μm) 컬럼



에 아세트니트릴·물 혼합액(8 : 2)을 이용하여 분리하며 형광검출기(여기파장 : 294 nm, 형광파장 : 404 nm)를 이용하여 검출한다. 각 표준액에서 얻은 내부표준물질 피크면적에 대한 벤조피렌의 피크면적비[ $A_S/A_{IS}$ ]를 Y축으로 하고 벤조피렌의 농도를 X축으로 하여 만든 검량곡선을 작성하고, 검액의 내부표준물질 피크면적에 대한 벤조피렌의 피크면적비[ $A_{SAM}/A_{SAMS}$ ]를 Y축에 대입하여 벤조피렌의 농도를 구한다.

### (2) 잔류농약 분석

천문동의 시료를 분쇄한 후, 약 5 g을 달아 물 40 mL를 넣고 4시간 방치하고 여기에 아세톤 90 mL를 넣고 균질기(homogenizer)로 5분간 균질화한 후 진공펌프와 가지 달린 삼각플라스틱 및 부크너갈때기로 감압여과 한다. 이 여액을 500 mL 분액갈때기에 옮기고 포화 식염수 50 mL와 증류수 100 mL를 가한다. 이에 디클로로메탄 70 mL를 넣고 심하게 흔들어 섞은 다음 정치하여 층을 분리시킨다. 디클로로메탄층은 무수황산나트륨을 통과시켜 탈수하고 감압농축기에 넣어 농축한 다음 헥산 4 mL에 녹인다. 활성화된 플로리실 카트리지(6 mL, 1 g)를 이용하여 헥산·디클로로메탄·아세톤 (50:48.5:1.5) 5 mL로 유출하고 수욕상(40 °C 이하)에서 감압농축시켜 용매를 날려 보낸 다음 20 % 아세톤 함유 헥산 2 mL에 녹여 시험용액으로 사용하며 GC를 이용하여 각각의 잔류농약의 정성분석 및 정량분석을 수행한다.

실험에 사용한 천문동의 잔류농약 245성분을 분석한 결과 Table 5과 같이 잔류농약이 검출되지 않았다. 따라서 실험에 사용한 천문동의 잔류농약 안정성을 확인하였다.

### (3) 중금속 분석

천문동의 시료를 준비하여 원자흡광광도법을 이용하여 시험용액중의 금속원소를 적당한 방법으로 해리시켜 원자증기화하여 생성한 기저상태의 원자가 그 원자증기를 통과하는 빛으로부터 측정과장의 빛을 흡수하는 현상을 이용하여 광전측정등에 따라 목적원소의 특정과장에 있어서 흡광도를 측정하고 시험용액중의 목적원소의 농도를 구하고자 한다. 시험용액 및 공시험용액을 그대로, 혹은 희석 또는 농축한 다음 원자흡광광도계에 주입하여 흡광도를 구하고 따로 표준용액 및 이의 공시험용액에 대해서도 각각 시험용액의 경우와 같은 조작을 해서 검량선을 작성하여 시험용액의 농도를 구한다.

실험에 사용한 천문동의 중금속 오염 등을 알아보기 위해 납 등 4성분의 농도를 분석한 결과 Table 6과 같이 중금속 성분 검출되지 않았다. 따라서 실험에 사용한 천문동의 중금속에 대한 안정성을 확인할 수 있었다.



Table 6. Result of heavy metal test.

<b>시험결과</b>					
시험서 번호 Test No.	T150095			(2) 페이지 중 (2) 페이지 Page of Page	
시료	원소	분석기기	단위	검출한계	시험방법
CH	Pb	불검출	mg/kg	0.1	ICP-MS
	Cd	불검출	mg/kg	0.1	ICP-MS
	As	불검출	mg/kg	0.1	ICP-MS
	Hg	불검출	mg/kg	0.02	Hg Analyzer
이하이백					
비고					

2. 호흡기 질환관련 생리활성 물질의 분리 및 정제

가. 천문동의 기능성 성분 분석 및 정제

(1) 천문동의 Methanol 추출

본 실험에 사용된 천문동은 국내산 17년산으로 전라도 고창군 소재의 천문농원에서 재배된 것을 구입하여 동결 건조 시킨 후, 저온실(4℃)에 보관하여 실험재료로 사용하였다. 건조한 천문동을 각각 덩이뿌리 전체(whole root), 근피(root bark), 속(flesh)으로 분리한 후 분쇄하여 그 분말을 80% 메탄올로 25℃, 12시간씩 3회 추출한 후 filter paper(Whatman No. 2)로 여과하였고, 얻어진 여액은 감압농축기(EYESA, N-1100 series, Tokyo)에서 농축하여 메탄올 추출물을 얻었다. 각각의 추출물은 동결 건조하여 용매를 제거한 뒤 실험에 사용하였

다. 추출효율은 Table 7에서 보는 바와 같다.

Table 7. Yield of 80% methanol extract from *Asparagus cochinchinensis* (LOUREIRO) MERRILL. root

Extract	yield (%)
Root bark	12.0±0.3 <sup>a</sup>
Whole	62.8±0.7 <sup>b</sup>
Flesh	79.1±0.6 <sup>c</sup>

Values are mean ± SD.

<sup>a-c</sup>Values with different superscripts were significantly different by Duncan's multiple test (p<0.05)

## (2) 항산화 및 기능성 활성 탐색

부위별에 따른 천문동 덩이뿌리 Methanol 추출물의 생리활성을 측정하기 위하여 덩이뿌리를 전체(whole root), 근피(root bark), 속(flesh)으로 나누어 항산화능 측정중의 한 방법인 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl(DPPH) 소거능력을 측정하였다. 50% 에탄올에 부위별로 용해시킨 추출물 100µL와 60µM 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl(DPPH) 100µL를 96well plate에 넣은 후 혼합하여 차광한 후 상온에서 30분간 방치시킨 후 ELISA reader를 사용하여 540nm에서 흡광도를 측정하였다. 시료를 첨가하지 않은 대조군과 비교하여 DPPH 소거효과를 백분율(%)로 나타내었다.

천문동 덩이뿌리의 부위별에 따른 DPPH 라디칼 소거능은 Table 8에 나타내었으며, 대조군으로는 ascorbic acid (5 µg/mL)와 BHA (25 µg/mL)를 사용하였다. 라디칼 소거능은 근피 82.11%, 전체 18.38%, 속 부분 8.58%, ascorbic acid 84.31%, BHA 84.80%로, 부위별에 따른 라디칼 소거능은 껍질이 가장 높았으며 속 부분이 가장 낮았다. 부위별 중 라디칼 소거능이 가장 높았던 껍질 부분은 대조군인 ascorbic acid, BHA 각각의 농도에서 소거능을 비교했을 때 유의적인 차이가 있었지만, 그와 유사한 소거 활성을 나타냄을 확인할 수 있었다.

생리활성물질의 항산화능은 위에서 측정한 DPPH이외에도 hydroxyl radical 소거능, nitrite 소거능, 총항산화능(Trolox equivalent antioxidant capacity, TEAC)과 같은 다양한 측정방법이 존재한다. 이러한 다양한 항산화능을 측정하는 이유는 생리활성물질에 따라서 산화를 막는 메커니즘에 있어서 차이를 보이고 이러한 차이로부터 다양한 생리활성을 나타내게 된다. 따라서 천문동 부위별 메탄올 추출물을 이용하여 DPPH이외에 nitrite 소거능, hydroxyl radical 소거능, 총항산화능(Trolox equivalent antioxidant capacity, TEAC)을 측정하였다.

아질산염(nitrite) 소거능은 발암성 물질인 nitrosoamine 생성의 전구체로 작용하는 아질산염의 소거하는 능력을 측정하는 방법으로 아질산 나트륨 (1 mM NaNO<sub>2</sub>) 용액 1 mL에 시료

2 mL을 섞고 0.1 N HCl을 사용하여 반응 용액의 pH를 1.2로 조정하였다. 반응용액의 부피를 10 mL로 조정(D.W 첨가)한 다음 37°C에서 1시간 동안 반응시키고 test tube에 1 mL씩 취한 다음 2% 초산용액(acetic acid) 5mL 을 첨가하고 사용 직전에 조제한 Griess(30% acetic acid로 조제한 1% sulfanilic acid 와 1% naphthylamine을 1:1비율로 혼합한 것) 시약 0.4 mL을 가하여 잘 혼합한 후 15분간 방치하고 540 nm에서 흡광도를 측정하여 잔존하는 아질산량을 구하였다. 대조구는 Griess 시약 대신에 증류수 0.4 mL을 가하여 동일한 방법으로 실시하였다. 천문동 덩이뿌리의 부위별에 따른 nitrite 소거능은 Table 10에 나타내었으며, 대조군으로는 ascorbic acid (50 µg/mL)와 BHA (150 µg/mL)를 사용하였다. 천문동 부위별 nitrite 소거능은 근피 65.51%, 전체 42.74%, 속 35.76%, ascorbic acid 73.85%, BHA 70.32%로, 부위별에 따른 라디칼 소거능은 앞의 DPPH 라디칼 소거능의 결과와 같이 근피가 가장 높았고 속 부분이 가장 낮았다. 천문동 부위별 중 라디칼 소거능이 가장 높았던 근피 부분은 대조군인 ascorbic acid, BHA 각각의 농도에서 소거능을 비교했을 때 유의적인 차이가 있었지만, 그와 유사한 소거 활성을 나타냄을 확인할 수 있었다.

Table 8. Antioxidant activity of *Asparagus cochinchinensis*  
(LOUREIRO) MERRILL. root 80% methanol extract

Sample	DPPH radical scavenging activity (%)	Nitrite scavenging activity (%)
Root bark <sup>1)</sup>	82.11±0.85 <sup>b</sup>	65.51±0.59 <sup>c</sup>
Whole <sup>1)</sup>	18.38±0.74 <sup>c</sup>	42.74±0.20 <sup>d</sup>
Flesh <sup>1)</sup>	8.58±0.42 <sup>d</sup>	35.76±0.34 <sup>e</sup>
BHA	84.80±0.42 <sup>2)a</sup>	70.32±1.10 <sup>4)b</sup>
Ascorbic acid	84.31±0.52 <sup>3)a</sup>	73.85±0.20 <sup>5)a</sup>

Values are mean ± S.D.

<sup>a-e</sup>Means with different letters in the same column are significantly different by Duncan's multiple test (P<0.05).

<sup>1)</sup>The tested concentration was 1 mg/ml

<sup>2)</sup>The tested concentration was 25 µg/ml

<sup>3)</sup>The tested concentration was 5 µg/ml

<sup>4)</sup>The tested concentration was 150 µg/ml

<sup>5)</sup>The tested concentration was 50 µg/ml

Hydroxyl radical 소거능 측정은 PBS에 용해시킨 추출물 175 $\mu$ L와 10mM FeSO<sub>4</sub>-EDTA 25 $\mu$ L, 10mM deoxyribose 그리고 10mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 순서대로 혼합시킨 후 37 $^{\circ}$ C에서 4시간 반응하였다. 2.8% trichloroacetic acid 250 $\mu$ L, 1% tribarbituric acid 250 $\mu$ L를 가하여 100 $^{\circ}$ C에 끓여 반응 정지시켰다. 이 혼합액을 96 well plate에 넣은 후 540nm에서 흡광도를 측정하였다. 시료를 첨가하지 않은 대조군과 비교하여 Hydroxyl radical 소거효과를 백분율(%)로 나타내었다. 천문동 덩이뿌리의 부위별에 따른 hydroxyl radical 소거능의 결과는 Table 9에 나타내었으며, 대조군으로는 Trolox (500  $\mu$ g/mL)를 사용하였다.  $\cdot$ OH 소거능은 근피 46.92%, 전체 38.53%, 속 34.73%, Trolox 55.32%로 부위별에 따른  $\cdot$ OH 소거능은 DPPH 라디칼 소거능, nitrite 소거능의 결과와 같이 근피가 가장 높았고 속 부분이 가장 낮았다. 천문동 부위별 중  $\cdot$ OH 소거능이 가장 높았던 근피 부분은 대조군인 trolox의 농도에서의 소거능을 비교했을 때 유의적인 차이가 있었지만, 천문동 부위별 소거능 중에서 가장 유사한 소거 활성을 나타냄을 확인할 수 있었다.

총항산화능(Trolox equivalent antioxidant capacity, TEAC)의 측정은 7mM ABTS(2,2'-azono-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonate))와 2.45mM potassium persulfate를 혼합하여 ABTS radical cation (ABTS  $\cdot^+$ )를 만들어 12시간 이상 방치한 후 734nm에서 흡광도가 0.70  $\pm$  0.02가 되도록 5mM PBS (pH 7.4)로 조정된 후 실험에 사용하였다. 20 $\mu$ L의 시료와 Trolox(표준물질)에 ABTS  $\cdot^+$  용액 1mL를 첨가하여 734 nm에서 6분간 흡광도를 측정하고 시료의 총 항산화능은 Trolox 표준용액을 이용하여 작성한 표준곡선으로부터 구하였다. 천문동 덩이뿌리의 부위별에 따른 ABTS 양이온 소거능을 Trolox 표준곡선과 비교한 결과와 각 추출물의 농도가 1 mg/mL일 때 ABTS 양이온 소거능을 Table 10에 나타냈으며, 대조군으로는 ascorbic acid와 BHA를 사용하였다. ABTS 양이온 소거능은 근피 99.89%, 전체 부위 76.70%, 속 68.17%, ascorbic acid 99.73%, BHA 99.01%로 부위별에 따른 ABTS 양이온 소거능은 앞의 DPPH 라디칼 소거능, nitrite 소거능, hydroxyl radical 소거능의 결과와 같이 근피가 가장 높았으며 속 부분이 가장 낮았다. 천문동 부위별 중 총항산화능이 가장 높았던 근피 부분은 대조군인 Ascorbic acid와 비교하였을 때 총항산화능에서 유의적인 차이가 없었으며, BHA보다는 총항산화능이 더 높았고 유의적인 차이를 보였다.

Table 9. Hydroxyl radical scavenging activity of *Asparagus cochinchinensis* (LOUREIRO) MERRILL. root 80% methanol extract

Sample	Hydroxyl radical scavenging activity (%)
Root bark <sup>1)</sup>	46.92±0.81 <sup>b</sup>
Whole <sup>1)</sup>	38.53±0.45 <sup>c</sup>
Flesh <sup>1)</sup>	34.73±1.06 <sup>d</sup>
Trolox <sup>2)</sup>	55.32±0.45 <sup>a</sup>

Values are mean ± S.D.

<sup>a-d</sup>Means with different letters in the same column are significantly different by Duncan's multiple test (P<0.05).

<sup>1)</sup>The tested concentration was 1 mg/ml

<sup>2)</sup>The tested concentration was 500 µg/ml

Table 10. Trolox equivalent antioxidant capacity, TEAC of *Asparagus cochinchinensis* (LOUREIRO) MERRILL. root 80% methanol extract

Sample <sup>1)</sup>	TEAC mM
	Trolox equivalent (%)
Root bark	8.53±0.00 (99.89±0.06) <sup>a</sup>
Whole	7.53±0.01 (76.70±0.37) <sup>c</sup>
Flesh	7.17±0.01 (68.17±0.13) <sup>d</sup>
BHA	8.49±0.00 (99.01±0.04) <sup>b</sup>
Ascorbic acid	8.52±0.01 (99.73±0.33) <sup>a</sup>

Values are mean ± S.D.

<sup>a-d</sup>Means with different letters in the same column are significantly different by Duncan's multiple test (P<0.05).

<sup>1)</sup>The tested concentration was 1 mg/ml.

천문동 부위별 메탄올 추출물의 총플라보노이드 함량은 천문동 부위별 추출물 100 µL에 90% diethylene glycol 1 mL 및 1 N NaOH 1 mL을 가하고 잘 혼합한 후 37°C에서 1시간 반응시킨 후 420 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때 총플라보노이드 함량은 Naringin을 이용한 검량선에 의해 계산하였다. 천문동 덩이뿌리의 부위별에 따른 총플라보노이드 함량은 Table 13에 나타내었다. 총플라보노이드 함량은 근피 2.03 mg/g, 전체 0.56 mg/g, 속 0.29 mg/g로, 부위별 총플라보노이드 함량은 근피가 가장 높았으며 속 부분이 가장 낮았다. 이는 앞의 DPPH, 아질산염 소거능, ·OH 소거능 및 총항산화능 결과와 일치하는 것을 확인할 수

있었다.

천문동 부위별 메탄올 추출물의 총폴리페놀 함량은 시료 50 $\mu$ L와 증류수 500 $\mu$ L에 Folin 시약 100 $\mu$ L를 혼합하여 실온에서 3분간 정치한 후 10% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 용액을 100 $\mu$ L 혼합한 다음, 차광하여 실온에서 1시간 정치한 후 UV-spectrophotometer를 사용하여 흡광도를 조사하였다. 정량에 사용한 표준품은 Caffeic acid로써, 시료와 동일한 방법으로 분석하여 얻은 표준 검량선으로부터 총폴리페놀 함량을 측정하였다. 천문동 덩이뿌리의 부위별에 따른 총플라보노이드 함량은 Table 11에 나타내었다. 총플라보노이드 함량은 근피 2.03 mg/g, 전체 0.56 mg/g, 속 0.29 mg/g로, 부위별 총플라보노이드 함량은 근피가 가장 높았으며 속 부분이 가장 낮았다. 이는 앞의 DPPH, 아질산염 소거능, ·OH 소거능 및 총항산화능 결과와 일치하는 것을 확인할 수 있었다.

Table 11. Total polyphenol and flavonoid contents of *Asparagus cochinchinensis* (LOUREIRO) MERRILL. root 80% methanol extract

Sample	contents(mg/g)	
	Total flavonoid	Total polyphenol
Root bark	2.03±0.07 <sup>a</sup>	13.38±0.16 <sup>a</sup>
Whole	0.56±0.02 <sup>b</sup>	3.51±0.03 <sup>b</sup>
Flesh	0.29±0.04 <sup>c</sup>	2.92±0.12 <sup>c</sup>

Values are mean  $\pm$  S.D.

<sup>a-c</sup>Means with different letters in the same column are significantly different by Duncan's multiple test (P<0.05).

천문동 부위별 항산화 활성의 분석과 총플라보노이드 및 총폴리페놀 함량의 분석을 통하여 근피의 항산화 활성이 가장 높음을 확인할 수 있었다. 이러한 결과를 토대로 기능성 성분의 분석 및 정제과정에 있어서는 근피를 중심으로 연구가 진행되는 것이 타당할 것으로 판단된다.

#### (다) 천문동의 기능성 성분 분석 및 정제

천문동을 부위별로 나누어 항산화 활성을 측정하였을 때 속, 전체 부분보다 근피 부분이 유의적으로 활성이 높게 나온 것을 확인할 수 있었으며, 따라서 본 연구의 목적인 천문동 기능성 성분 분석을 위해 천문동 덩이뿌리 중 근피 부분을 이용하여 생리활성 성분의 함량과 유효 성분을 추출, 분리, 정제하고자 하였다.

- 천문동 근피 메탄올 추출물의 High Performance Liquid Chromatography (HPLC) 분석



천문동 근피의 기능성 성분 분석을 위하여 HPLC 분석을 시행하였다. 천문동 근피 메탄올 추출물을 Table 12와 같은 조건으로 HPLC 분석을 수행하였으며 HPLC장치는 Interface iLC 3000을 사용하였다. 검출기의 경우에는 Photodiode array detector (PAD)와 charged aerosol detector (CAD)를 동시에 사용하여 분석하였다. PAD를 이용하여 UV 및 가시광선 영역에서 스캐닝한 결과 280nm의 파장에서 peak가 크게 검출되는 것을 확인하였다. 따라서, 이후에 사용되는 크로마토그램은 280nm에 해당하는 파장을 이용하여 나타내었다. 이러한 결과로부터 천문동 근피는 280nm의 파장에서 흡광하는 물질을 포함하는 것을 알 수 있었다. UV-Vis detector계통의 단점중의 하나는 UV나 가시광선 영역에서 흡광하지 않는 물질의 검출이 불가능하다는 점이며 많은 물질들이 UV나 가시광선 영역에서 흡광하지 않으므로, 이러한 단점을 보완하기 위하여 CAD를 이용하여 PAD의 단점을 보완하고자 하였다.

Table 12. HPLC condition for sep-pak cartridge C18 fraction from root bark of *Asparagus cochinchinensis*

Column	YMC triart C18
Detector	Photodiode array detector (PAD) at 280nm Charged aerosol detector (CAD)
Inject volume	20 $\mu$ L
Flow rate	1.0 ml/min A : 0.1% formic acid B : Acetonitrile (ACN)
Mobile phase	0~10 min (B: 20→50%) 10~30 min(B: 50→80%) 30~60min (B: 80→100%)

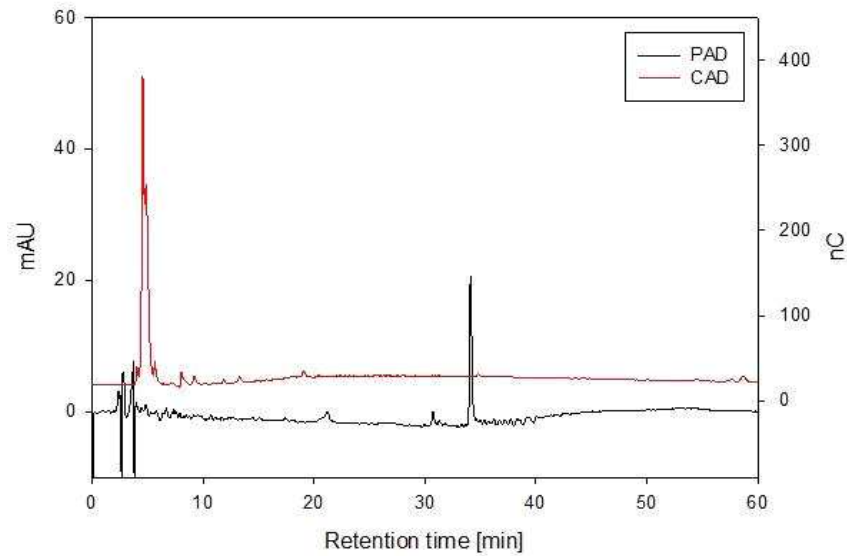


Figure 10. HPLC Chromatogram of root bark methanol extract by HPLC with photodiode array detection (PAD) at 280nm and charged aerosol detector (CAD).

근피 80% MeOH 추출물을 HPLC로 분석한 결과는 Figure. 10과 같다. 근피 메탄올 추출물을 acetonitrile로 gradient를 높여가면서 분석한 결과, 크로마토그램상에서는 retention time이 34분에 해당하는 peak의 경우에는 CAD에서는 검출이 되지 않고 PAD의 280nm에서 흡광을 하는 물질로 80%이상의 acetonitrile이 주입되었을 경우에 분리가 되는 것으로 판단된다. 따라서 이 peak에 해당하는 물질의 경우에는 상당히 소수성이 강한 물질로 유추될 수 있다. 또한, HPLC분석의 초기에 나타나는 peak들의 경우에는 앞서서와는 반대로 CAD에서만 검출되며 UV나 가시광선 영역의 파장은 흡광하지 않으며, 여기에 해당하는 물질들은 상대적으로 소수성이 낮은 물질로 판단된다.

이러한 결과를 통해서 소수성의 차이에 따른 물질 분리를 수행할 경우, 효율적으로 다양한 물질을 분리하는 것이 가능할 것으로 판단된다. 따라서, C18계통의 column이나 cartridge를 이용하여 분리한 후 분석을 진행하는 것이 바람직할 것으로 판단된다.

#### ○ Sep-pak Plus C18 cartridge를 이용한 정제

HPLC를 이용한 근피 메탄올 추출물의 크로마토그램의 결과를 토대로 소수성에 따른 물질의 분리를 수행하고자 하였다. 극성의 차이에 따라 물질을 분리하는데 사용되는 Sep-Pak Plus C18 cartridge (Waters Co.)을 이용하여 정제를 수행하였다. 천문동 근피의 메탄올 추출물에 대한 물질 분리과정은 다음과 같다. 먼저 메탄올을 이용해 Sep-pak Plus C18 cartridge를 활성화시킨 후, 미리 degassing된 3차 증류수로 수세하였다. 준비된 시료를 컬럼에 천천히 주입한 후 3차 증류수, 30% MeOH, 50% MeOH, 100% MeOH를 각각 10mL 씩 천천히 흘려주어 Sep-pak Plus C18 cartridge로부터 분리되어 나오는 물질을 각각 수거하였

다.

○ 생리활성 분석

- 항산화능 분석

Fraction에 따른 기능성을 확인하기 위하여 각 fraction을 대상으로 항산화능 측정중의 한 방법인 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) 소거능력을 측정하였다. DPPH 라디칼 소거능 측정 결과는 표 13와 같이 30% MeOH Fraction이 가장 높았고 100% MeOH, 50% MeOH, DW Fraction 순으로 높음을 확인할 수 있었다.

Table 13. DPPH radical scavenging activity of fractionated root bark of *Asparagus cochinchinensis* (LOUREIRO) MERRILL. methanol extract using Sep-pak Plus C18 cartridge

fraction	DW	30% MeOH	50% MeOH	100% MeOH
저해율	62.30	92.83	75.88	80.32

- in vitro 항염증 활성

Fraction 중 DPPH 라디칼 소거능이 높은 30% MeOH fraction을 대상으로 in vitro 항염증 실험을 실시하였다. 항염증 활성은 hyaluronic acid가 HAase에 의해 분해되어 생성된 N-acetylglucosamine의 정량을 DMAB solution 으로 발색시킨 후, ELISA reader를 이용하여 540 nm에서 비색 정량하였다. 정량법은 0.1 M acetate buffer (pH 3.5)에 녹인 HAase를 30% MeOH fraction과 혼합시킨 후 37°C 항온수조에서 20분간 반응 시켰다. HAase를 활성화시키기 위해 혼합액에 12.5 mM CaCl<sub>2</sub>를 가한 후 37°C 항온수조에서 20분간 반응시켰다. 반응이 끝난 후 0.1 M acetate buffer (pH 3.5)에 녹인 기질용액 hyaluronate를 반응액에 첨가하여 37°C 항온수조에서 40분간 반응시켰다. 기질-효소 반응 정지를 위해 0.4N NaOH와 0.4 M potassium tetraborate를 반응액에 가하여 100°C에서 3분간 반응정지 시킨 후, 상온에서 완전히 냉각시켰다. 기질-효소 혼합액에 발색제인 DMAB solution를 가한 후 ELISA reader를 이용하여 540 nm에서 OD값을 측정하였다. 그 결과 30% MeOH fraction의 항염증 활성은 1mg/mL 일 때 23.81%의 항염증 활성을 나타내었다.

○ Thin Layer Chromatography (TLC) 분석

천문동 근피 부분의 Sep-pak Plus Cartridge C18을 이용한 Fraction에서 DPPH 라디칼 소거능이 가장 높았던 30% MeOH fraction에 대한 HPLC 분석을 진행하기에 앞서 천문동 덩이뿌리의 부위별 간 성분 차이를 TLC를 이용하여 확인하였다. 이를 위해 천문동 덩이뿌리

의 전체, 속, 근피 부분을 Sep-pak Plus Cartridge C18 이용하여 fraction을 분리한 후 TLC 분석을 실시하였다. 분석을 위하여 사용된 TLC plate는 silica gel 60 F 254(Merck, Germany)이며, 이동상으로 chloroform : methanol : distilled water (14:6:1, v/v)을 사용하였으며, 분석에 대한 결과는 Figure. 11과 같다.



Figure 11. TLC analysis of isolated fraction.

(1) AC Root bark DW fraction; (2) AC Root bark 30% MeOH fraction; (3) AC Root bark 50% MeOH fraction; (4) AC Root bark 100% MeOH fraction; (5) AC Whole root DW fraction; (6) AC Whole root 30% MeOH fraction; (7) AC Whole root 50% MeOH fraction; (8) AC Whole root 100% MeOH fraction; (9) AC Flesh DW fraction; (10) AC Flesh 30% MeOH fraction; (11) AC Flesh 50% MeOH fraction; (12) AC Flesh 100% MeOH fraction;

TLC 분석 결과 천문동 부위별 fraction 중 근피 30% MeOH fraction이 다른 fraction들과 비교하였을 때 TLC 패턴이 확연하게 차이가 나는 것을 확인할 수 있으며, 이는 근피의 30% MeOH fraction에서 특정한 물질이 더 존재함을 확인할 수 있다. 이러한 결과는 앞선 근피 부분의 각 fraction DPPH 라디칼 소거능 결과와 연관하여 30% MeOH fraction에 존재하는

특정한 물질이 생리활성 물질일 것이라는 가능성을 더 높여주는 결과라고 생각할 수 있다. 이러한 결과를 바탕으로 추후 fraction들 간의 기능성 성분 차이 및 분리를 위한 HPLC 분석에 이용하고자 하였다.

○ Fraction별 High Performance Liquid Chromatography (HPLC) 분석

천문동 근피의 기능성 성분 분석을 위하여 HPLC 분석을 시행하였다. 실험에 사용된 시료는 근피 80% MeOH 추출물을 Sep-Pak Plus C18 cartridge를 이용하여 분리한 fraction이며, 분리를 위해 사용된 용매는 DW, 30% MeOH, 50% MeOH, 100% MeOH이다. 실험에 사용된 용매, 기기 및 실험조건은 전술한 조건과 동일하게 진행하였다.

근피의 fraction에 따른 HPLC 분석 결과는 Figure. 12, 13과 같다. mobile phase B(ACN)가 0~10min에서 그 농도가 20%에서 50%로 증가할 때, 30% MeOH fraction 부분이 280nm에서 흡광하는 물질이 가장 많았다. 50% MeOH fraction 부분은 280nm에서 흡광하는 물질이 상대적으로 소량 검출 되었으며, 100% MeOH fraction 부분은 거의 검출되지 않았다. CAD 검출기에서도 마찬가지로 30% MeOH fraction 부분이 0~10min 사이에서 검출되는 물질이 가장 많았으며 50% MeOH fraction에서는 검출된 물질이 30% MeOH fraction에 비해서 소량 검출되었다. 100% MeOH fraction은 다른 fraction들과는 다르게 retention time 10분 전후에서 다량으로 검출되는 물질이 있었으며 40~50min에서 물질이 약간 검출되었음을 확인할 수 있었으며 이는 30% MeOH fraction에서 검출되는 물질과는 차이가 있었다.

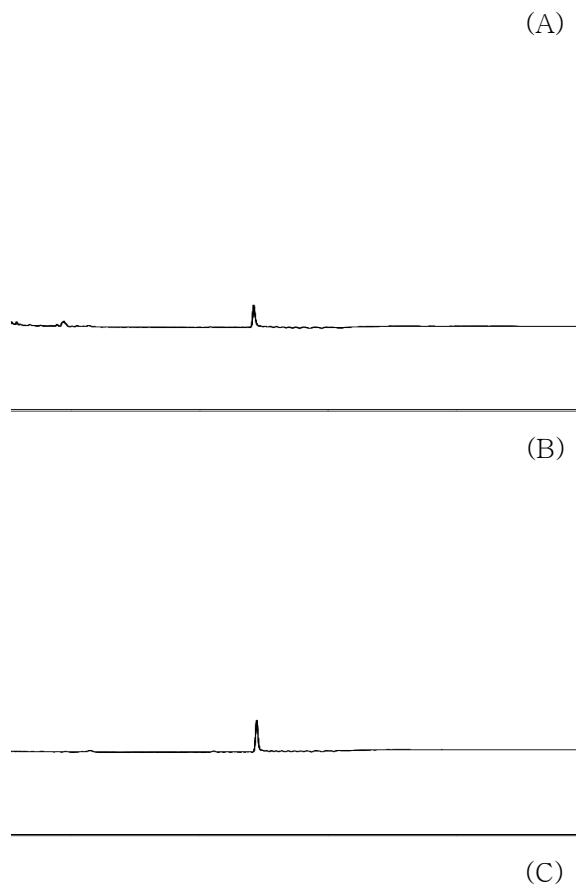


Figure 12. HPLC Chromatogram of Root bark MeOH fractions analyzed with photodiode array detector (PAD) at 280nm.

(A) AC Root bark 100% MeOH fraction; (B) AC Root bark 50% MeOH fraction; (C) AC Root bark 30% MeOH fraction.

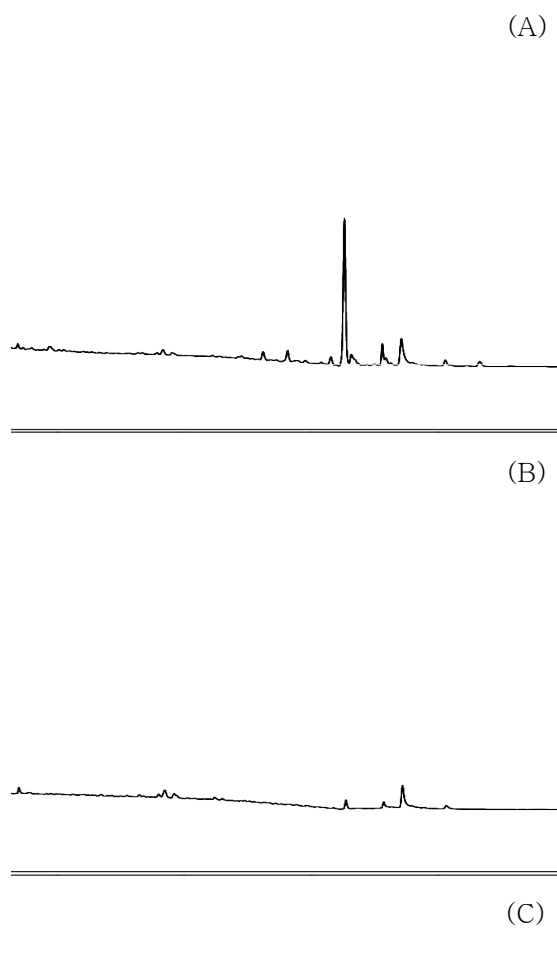


Figure 13. HPLC Chromatogram of Root bark MeOH fractions analyzed with charged aerosol detector (CAD).

(A) AC Root bark 100% MeOH fraction; (B) AC Root bark 50% MeOH fraction; (C) AC Root bark 30% MeOH fraction.

○ Prep-HPLC를 이용한 물질 분리

근피의 fraction에 따른 HPLC 분석 결과와 항산화 및 항염증활성을 토대로 판단할 경우, 근피의 30% MeOH fraction 부분이 가장 신규 생리활성 물질의 분리 및 정제가 가능할 것으로 판단되는 부분이다. 특히, 30% MeOH fraction의 경우 낮은 농도의 acetonitrile농도 구배 조건에서 대부분의 물질들이 검출되고 분리 또한 용이할 것을 판단된다 (그림 14).

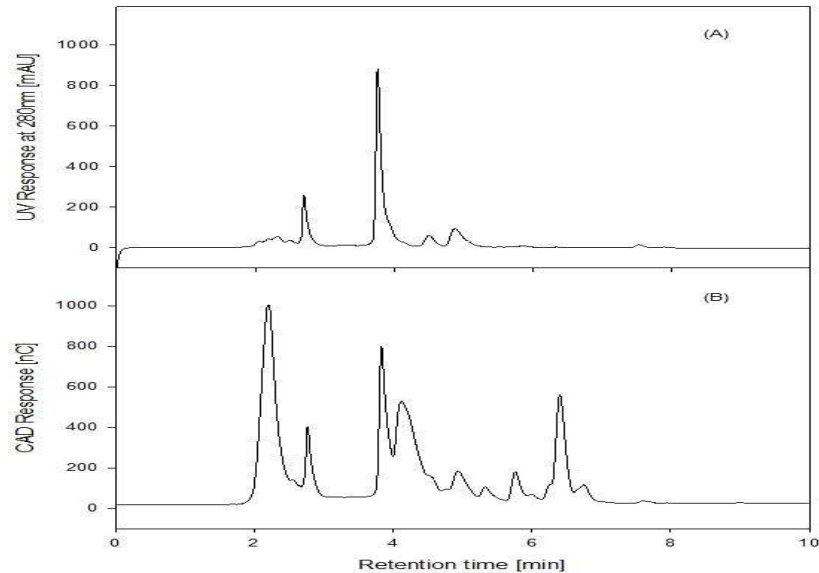


Figure 14. HPLC Chromatogram of Root bark 30% MeOH fraction analyzed with photodiode array detector (PAD) at 280nm (A) and charged aerosol detector (CAD; B).

3. 천문동 발효 조건의 확립 및 생리활성 성분의 분석

천문동 발효조건을 확립하기 위해 발효형태별 최적조건을 확립하고 발효에 따른 이화학적 성분의 변화 등을 분석하였다. 또한, 발효천문동의 호흡기질환 생리활성 성분을 분석하기 위해 유기용매별 기능성 성분을 분석하였고 분석된 성분의 기초효능을 분석한 후 제2협동과제에 제공하여 세포나 동물에서 효능을 평가하도록 추진하였다.

가. 사용균주 및 배지

발효 추출물의 항균 활성 실험에 사용된 병원성 미생물은 그람 양성균 2종, 그람 음성균 2종으로 한국미생물보전센터(KCCM)에서 분양받아 사용하였다. 그람 양성균은 만성 폐쇄성 질환을 유발하는 *S. aureus* KCCM 40881, 만성 부비동염을 *S. epidermidis* KCCM 35494를 사용하였으며 그람 음성균은 병원 내 감염되는 폐렴 균주인 *E. coli* KCCM 11234, 만성 폐쇄성질환 감염 미생물인 *P. aeruginosa* KCCM 11328을 사용하였다. 배양에 사용된



배지는 Difco(San Jose, CA, USA) 제품을 사용하였으며 세균의 배양 및 항균력 측정에는 각각 Trypticase Soy Broth(Difco, TSB) 와 Muller Hinton Broth(Difco)에 Bacto Agar(Difco)를 0.8% 첨가한 Muller Hinton Agar(MHA)를 각각 사용하였다.

천문동 발효에 사용된 미생물은 *Lactobacillus sakei* 383, *Leuconostoc mesenteroides* 4395, *Lactobacillus plantarum* KCCM 11322으로 *Lactobacillus sakei* 383, *Leuconostoc mesenteroides* 4395은 본 실험실에서 분리·동정된 것을 사용하였다. 발효에 필요한 미생물 배양에는 MRS Broth(Difco, CA, USA)를 사용하였다.

실험에 사용된 미생물은 모두 2회 계대배양한 뒤 호흡기 질환 병원성 미생물은  $O.D._{650nm} = 0.4$ 에서 발효 미생물은  $O.D._{600nm} = 1.0$ 의 농도로 실험에 사용되었다.

#### 나. 천문동의 발효

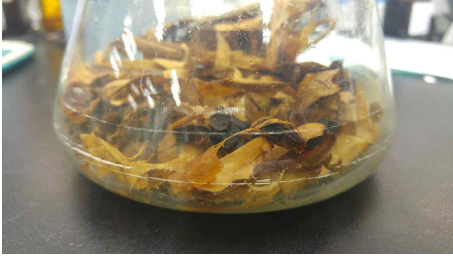
##### (1) 액상 발효

수세한 천문동 뿌리는 동결건조(FD5510S-FD5520S, Ilshinbiobase Co., Dongduchon, Korea)하고 분쇄기(MF-3100S, Hanil Electric Co., Seoul, Korea) 50 mesh 이하로 균질화한 뒤 사용하였다. 균질화한 천문동 37.5 g 과 증류수 250 ml를 121°C에서 15 분간 멸균하여 발효에 사용하였다. 멸균된 천문동은 발효균주(*Lactobacillus sakei* 383, *Leuconostoc mesenteroides* 4395, *Lactobacillus plantarum* KCCM 11322)를 5%(v/v)씩 접종한 뒤 48 시간 동안 발효하였다.



##### (2) 고형 발효

수세한 천문동 뿌리는 동결건조(FD5510S-FD5520S, Ilshinbiobase Co., Dongduchon, Korea)하여 천문동 37.5 g 과 증류수 50 ml를 121°C에서 15분간 멸균하여 발효에 사용하였다. 액상 발효와 마찬가지로 멸균된 천문동은 발효균주를 5%(v/v)씩 접종한 뒤 48시간 동안 발효하였다.



### (3) 발효 제형별 항균활성

제형별 천문동 발효 추출물의 항균활성 비교 실험 결과 액상의 유산균 발효 천문동에서 뛰어난 항균활성을 나타내었는데 이는 고형 발효의 경우 1~2 주 이상의 발효가 필요하기 때문으로 사료된다. 따라서 본 실험에서는 액상의 형태로 발효한 천문동을 이용하여 항균활성 등의 기능성과 일반성분등을 분석하였다.

#### 다. 유산균 발효 천문동의 항균활성 추출물 제조

유산균 발효 천문동 추출물 제조 시 용매는 물, 메탄올(MeOH), 에탄올(EtOH), 노르말 헥산(n-hexane), 에틸 아세테이트(EtOAc), 에테르(Ether)를 사용하였다. 메탄올과 에탄올 추출은 용매 250mL를 가한 뒤 진탕항온수조(SHWB-30/45, Woori science Instrument Co., Pocheon, Korea)에서 각각 60℃, 70℃, 110 rpm 으로 24시간 3회 추출하였다. 에틸아세테이트와 노르말 헥산 추출은 용매 250 ml를 가한 뒤 진탕항온수조에서 50℃, 110rpm 으로 24시간 3회 추출하였다. 에테르 추출은 용매 250ml를 가한 뒤 실온에서 190 rpm 으로 24 시간 3 회 추출하였다. 추출된 시료들은 여과지(Whatman No.2)를 사용하여 감압여과 후 진공농축시켜 일정 농도로 희석 후 실험에 사용하였다. 물 추출물은 Autoclave를 이용하여 121℃에서 45 분간 추출하였다. 각 조건별로 제조된 추출물은 25, 50, 100 mg/ml의 농도로 호흡기 관련 질환 미생물의 항균활성 측정 실험에 사용하였다.

#### 라. 유산균 발효 천문동의 항균활성 측정

천문동 발효 추출물의 항균활성은 well diffusion methods 법을 변형하여 실시하였다. 각 균주들은 37℃에서 TSB에서 배양하여 UV-spectrophotometer(Optizen POP, Mecasys CO., Ltd., Daejeon, Korea)를 이용하여 O.D.<sub>650nm</sub>=0.4 농도로 일정하게 조정된 후 실험에 사용하였다. 농도가 조절된 호흡기 질환 관련 병원성 미생물(*S. aureus* KCCM 40881, *S. epidermidis* KCCM 35494, *E. coli* KCCM 11234, *P. aeruginosa* KCCM 11328)은 MHA에 1% 접종 후 균일하게 섞어 petri dish에 20ml 분주하였다. 제조된 plate는 실온에서 응고시킨 후 pasteur pipette 을 이용하여 직경 6mm well을 만들어 각각의 용매별로 추출한 추출물 70μL를 주입하였다. Negative control 은 각각의 추출 용매를 주입하였다. 3

5°C 에서 일정 시간 배양 후 well 주위의 생장 저해환의 직경(mm)을 측정하였다. 실험결과 는 아래의 Table 14~19으로 나타내었다.

Table 14. 열수 추출물

Microorganism for fermentation Respiratory microbial	<i>Lactobacillus sakei</i> 383		<i>Leuconostoc meseteroides</i> 4395	<i>Lactobacillus plantarum</i> KCCM 11322
	<i>E.coli</i>	Concentration	100 mg/ml	100 mg/ml
Inhibition zone		8 mm	7 mm	-
<i>S.aureus</i>	Concentration	150 mg/ml	-	-
	Inhibition zone	6 mm	-	-
<i>P.aeruginosa</i>	Concentration	-	-	-
	Inhibition zone	-	-	-
<i>S.epidomidis</i>	Concentration	-	-	-
	Inhibition zone	-	-	-

Table 15. 에틸아세테이트 추출물

Microorganism for fermentation Respiratory microbial	<i>Lactobacillus sakei</i> 383		<i>Leuconostoc meseteroides</i> 4395	<i>Lactobacillus plantarum</i> KCCM 11322
	<i>E.coli</i>	Concentration	100 mg/ml	25 mg/ml
Inhibition zone		11 mm	11 mm	-
<i>S.aureus</i>	Concentration	50 mg/ml	50 mg/ml	25 mg/ml
	Inhibition zone	10 mm	9 mm	9 mm
<i>P.aeruginosa</i>	Concentration	100 mg/ml	-	-
	Inhibition zone	13 mm	-	-
<i>S.epidomidis</i>	Concentration	25 mg/ml	50 mg/ml	25 mg/ml
	Inhibition zone	23 mm	10 mm	10 mm

Table 16. 에탄올 추출물

Microorganism for fermentation Respiratory microbial	<i>Lactobacillus sakei</i> 383	<i>Leuconostoc meseteroides</i> 4395	<i>Lactobacillus plantarum</i> KCCM 11322
<i>E.coli</i>	Concentration	-	-
	Inhibition zone	-	-
<i>S.aureus</i>	Concentration	-	-
	Inhibition zone	-	-
<i>P.aeruginosa</i>	Concentration	-	-
	Inhibition zone	-	-
<i>S.epidomidis</i>	Concentration	-	-
	Inhibition zone	-	-

Table 17. 메탄올 추출물

Microorganism for fermentation Respiratory microbial	<i>Lactobacillus sakei</i> 383	<i>Leuconostoc meseteroides</i> 4395	<i>Lactobacillus plantarum</i> KCCM 11322
<i>E.coli</i>	Concentration	-	-
	Inhibition zone	-	-
<i>S.aureus</i>	Concentration	-	-
	Inhibition zone	-	-
<i>P.aeruginosa</i>	Concentration	-	-
	Inhibition zone	-	-
<i>S.epidomidis</i>	Concentration	-	-
	Inhibition zone	-	-

Table 18. 헥산 추출물

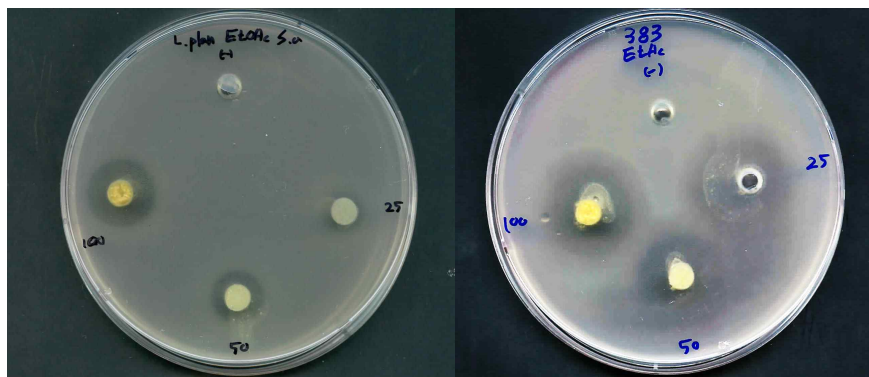
Microorganism for fermentation Respiratory microbial	<i>Lactobacillus sakei</i> 383	<i>Leuconostoc meseteroides</i> 4395	<i>Lactobacillus plantarum</i> KCCM 11322
<i>E.coli</i>	Concentration	-	100 mg/ml
	Inhibition zone	-	7 mm
<i>S.aureus</i>	Concentration	-	-
	Inhibition zone	-	-

<i>P.aeruginosa</i>	Concentration	-	-	-
	Inhibition zone	-	-	-
<i>S.epidomidis</i>	Concentration	-	-	-
	Inhibition zone	-	-	-

Table 19. 에테르 추출물

Microorganism for fermentation Respiratory microbial		<i>Lactobacillus sakei</i> 383	<i>Leuconostoc meseteroides</i> 4395	<i>Lactobacillus plantarum</i> KCCM 11322
<i>E.coli</i>	Concentration	-	-	-
	Inhibition zone	-	-	-
<i>S.aureus</i>	Concentration	-	-	-
	Inhibition zone	-	-	-
<i>P.aeruginosa</i>	Concentration	-	50 mg/ml	-
	Inhibition zone	-	7 mm	-
<i>S.epidomidis</i>	Concentration	-	-	-
	Inhibition zone	-	-	-

항균활성 측정 결과 유산균 발효 천문동의 에틸아세테이트 추출물에서 뛰어난 항균활성을 나타냈다. *E.coli*에서는 *Leuconostoc meseteroides* 4395, *S.aureus*에서는 *Lactobacillus plantarum* KCCM 11322, *S.epidomidis*에서는 *Lactobacillus sakei* 383으로 발효한 천문동의 에틸아세테이트 추출물이 크고 선명한 inhibition zone을 형성하여 이어지는 실험에 사용하였다. 특히 *Lactobacillus sakei* 383으로 발효한 천문동의 에틸아세테이트 추출물에서 *S.epidomidis*의 항균활성이 25 mg/ml의 농도에서 23mm의 clear zone을 형성하는 것으로 보여 높은 항균활성을 가지는 것으로 여겨진다.



마. 유산균 발효 천문동의 생균수 변화

동결건조한 천문동 분말 15g과 D.W 100 ml를 넣고 멸균하여 발효균주(*Lactobacillus sakei* 383, *Leuconostoc meseteroides* 4395, *Lobacillus plantarum* KCCM 11322)를 접종하고 시료로 사용하였다. 생균수의 측정은 30°C의 온도에서 0, 12, 24, 36, 48, 60, 72, 96, 120 hr마다 이루어졌으며 시료를 멸균 증류수로 적절히 희석하고 MRS plate에 도말한 뒤 배양하여 colony의 수를 측정하고 log CFU/ml로 표시하였다.

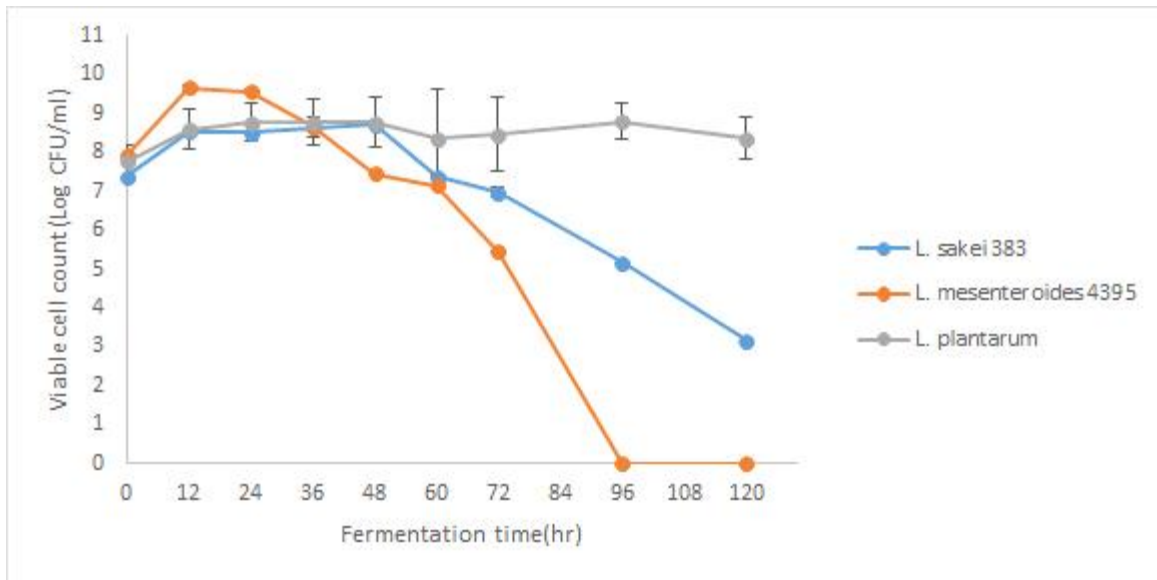


Figure 15. 생균수 측정

*Lactobacillus sakei* 383으로 발효한 천문동의 경우 48 hr 발효 시 가장 높은 생균수를 나타낸 반면 *Leuconostoc meseteroides* 4395으로 발효한 천문동은 12 hr 발효 시 가장 급속한 생균의 증가를 보이고 24 hr 이후에는 생균수가 떨어져 빠르게 사멸하는 것을 관찰할 수 있었다. 다른 발효 균주들과는 다르게 *Lobacillus plantarum* KCCM 11322의 경우 120 hr 발효 시에도 생균의 감소가 크지 않고 거의 일정하게 유지되는 경향을 관찰할 수 있었다.

바. 유산균 발효 천문동의 pH 및 산도 변화

동결건조한 천문동 분말 15 g과 D.W 100 mL를 넣고 멸균하여 발효균주(*Lactobacillus sakei* 383, *Leuconostoc meseteroides* 4395, *Lactobacillus plantarum* KCCM 11322)를

접종하고 30℃의 온도에서 0, 12, 24, 36, 48, 60, 72, 96, 120 hr 발효 시간별로 천문동의 pH 및 산도 변화를 측정하였다. pH는 pH-meter(pH-200L, Istek, Korea)를 이용하여 측정하여 관찰하였다.

산도는 발효 천문동 10ml에 distilled water를 10 ml첨가하여 교반 후 0.1 N NaOH를 이용하여 측정 pH가 8.3이 될 때까지 적정하였다. 사용된 0.1 N NaOH 양을 다음의 계산식으로 젖산으로 환산하였다.

$$\text{Acidity (\%)} = \frac{\text{ml of 0.1 N NaOH} \times \text{factor} \times \text{dilution rate} \times 0.009}{\text{Weight of sample (ml)}} \times 100$$

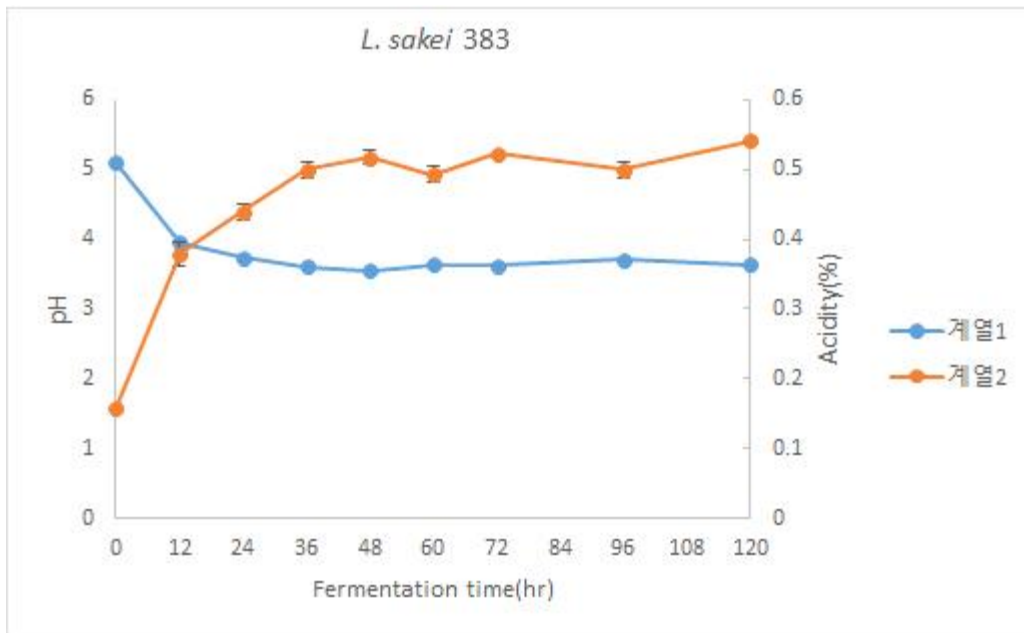


Figure 16. *L. sakei* 383 발효에 의한 천문동의 pH 및 산도

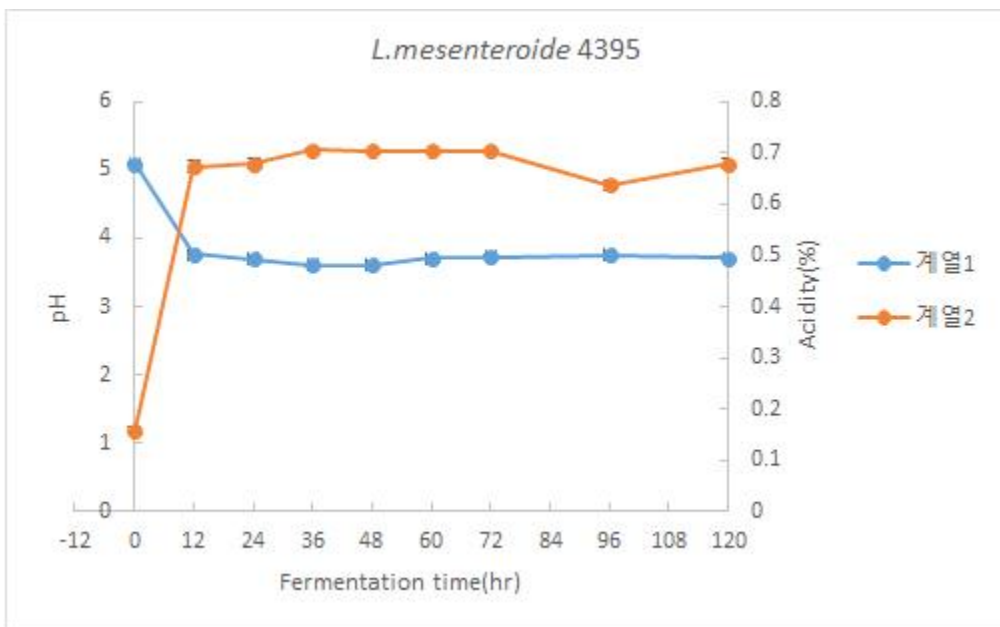


Figure 17. *Leuconostoc meseteroides* 4395 발효에 의한 천문동의 pH 및 산도

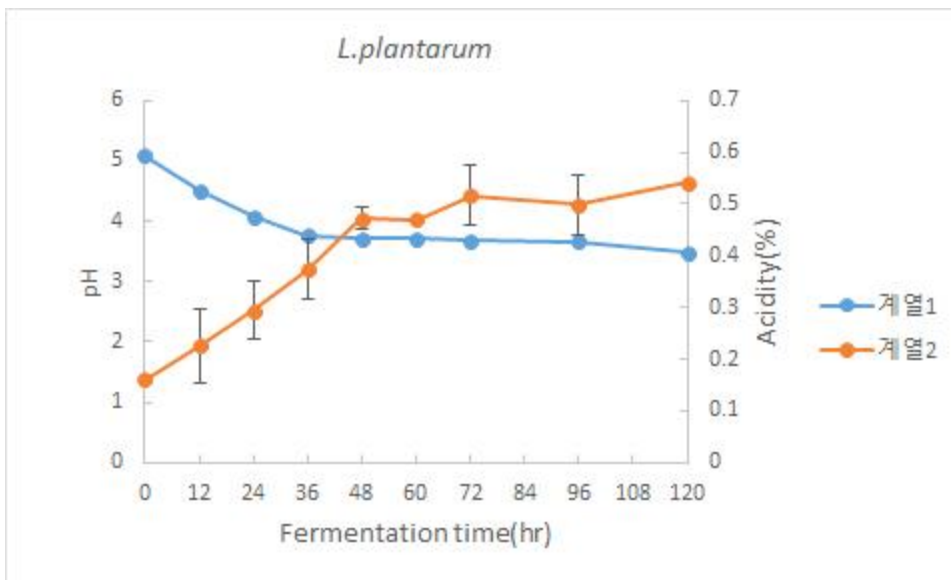


Figure 18. *Lactobacillus plantarum* KCCM 11322 발효에 의한 천문동의 pH 및 산도

발효 균주로 발효한 천문동의 pH와 산도는 Figure 16~18에서 보여지는 것처럼 *L. sakei* 383 발효에 의한 천문동의 pH의 경우 48 hr까지 그 값이 떨어지고 산도의 경우 일정하게 증가하는 경향을 보였다. 또한 *Leuconostoc meseteroides* 4395 발효에 의한 천문동의 pH는 0~12 hr 사이에 급격하게 떨어지고 산도는 급격히 증가하는 그래프를 보여주는 등 생균수의 경향과 유사하게 관찰되는 것을 확인할 수 있었다.



사. 유산균 발효 천문동의 수분, 환원당 및 총당 분석

발효 천문동의 수분은 105℃ 상압가열건조법 이용하여 측정하였다. 결과는 Table 20에서 보여지는 것과 같이 발효 천문동의 수분함량은 89.90~91.03%로 발효균주의 차이에 따른 차이는 크지 않은 것으로 보인다.

Table 20. 수분 함량

	Moisture
<i>Lactobacillus sakei</i> 383	89.90±0.01
<i>Leuconostoc meseteroides</i> 4395	90.77±0.00
<i>Lactobacillus plantarum</i> KCCM 11322	91.03±0.01

환원당은 DNS법, 총당은 phenol-sulfuric acid법을 이용하여 측정하였다. 환원당은 시료 4 ml에 증류수 100 ml로 정용한 뒤 30℃에서 120 rpm 으로 2 시간 교반한 후 10% TCA (v/v in water)를 소량 첨가하여 단백질을 침전시킨 후 15 분간 방치하여 여과하였다. 각각의 여액 0.5 mL에 3,5-dinitrosalicylic acid (DNS) 시약 1.5 ml를 넣고 90℃에서 10분간 발색시킨 후 535 nm에서 흡광도를 측정하였다.

총당은 시료 0.2 ml에 25% HCl (v/v in water) 1 ml와 증류수 9 ml를 첨가하여 95℃에서 2 시간 동안 산 분해시킨 후 여과지(Whatman fliter paper No.2)로 여과하였다. 각각의 여액 0.5 ml에 5% phenol 0.5 ml 와 진한황산 2.5 ml를 가하여 혼합한 후 15 분간 반응하여 분광광도계로 550 nm에서 흡광도를 측정하였다.

실험결과 Table 21에서 보는 것처럼 총당의 경우는 *Lactobacillus sakei* 383, *Lactobacillus plantarum* KCCM 11322으로 발효된 천문동은 약 22.58, 20.12%로 나타난 반면 *Leuconostoc meseteroides* 4395으로 발효된 천문동은 약 11.26%로 적은 함량을 나타내었다. 환원당도 총당과 마찬가지로 *Lactobacillus sakei* 383, *Lactobacillus plantarum* KCCM 11322으로 발효된 천문동은 약 0.33, 0.24%인 반면 *Leuconostoc meseteroides* 4395으로 발효된 천문동은 약 0.17%로 적은 것을 확인할 수 있었다.

Table 21. 총당 및 환원당

	unit(%)	
	Total sugar	Reducing sugar
L.sakei 383	22.58±0.20	0.33±0.01
L.mesenteroides 4395	11.26±0.89	0.17±0.00
L.plantarum	20.12±0.27	0.24±0.00

#### 4. 천문동의 증숙 조건 확립 및 최적화

##### 가. 증숙 천문동의 제조 특성 규명

식품의 가공방법중의 하나인 증숙 처리는 증기를 이용해 열처리 하여 원재료의 구성성분들의 변화를 야기시키어 새로운 화합물을 만들어 내거나 재료의 조직을 파괴하여 유용성분 용출을 극대화하는 공정으로 인삼의 가공 제품인 홍삼의 제조가 대표적으로 알려져 있다. 본 연구에서는 열처리 온도 및 시간에 따른 증숙 및 건조의 최적화 공정을 이용하여 증숙 천문동을 제조하고자 하였다. 본 실험에 사용된 천문동은 전라북도 고창군 고창읍에 있는 고창천문농원에서 재배된 17년산 천문동(*Asparagus cochinchinensis*)의 건근을 선별, 세척 후 건조시킨 것을 사용하였다. 증숙 방법으로는 증숙온도와 시간의 차이를 두어 실시하였다. 각 실험군의 증숙 조건은 Table 23과 같으며, 자세한 조건은 다음과 같다. 천문동 건근 100g을 1L의 증류수에 5분간 침지시킨 후 고압증기멸균기(JSAT-65, JS Research Inc., Chungnam, Korea)를 이용하여 각 가공조건에 따라 증숙 처리를 실시하였다. 증숙 후 70℃ 열풍건조기로 24시간 건조 후 천문동의 이화학적 분석과 기능성 성분 분석에 사용하였다.

Table 23. 증숙 온도 및 시간에 따른 증숙처리 조건

시료	증숙조건	
	증숙온도(℃)	증숙시간(분)
대조군	0	0
No. 1	80	60
No. 2	80	180
No. 3	100	60
No. 4	100	180
No. 5	120	60
No. 6	120	180

각 처리 조건에 따라 증숙 처리된 천문동은 Figure 40에서와 같이 증숙 온도 및 시간이 증가함에 따라서 색이 짙어져서 갈색 또는 검은색으로 변했으며, 처리조건이 강할수록 전체적으로 수축된 형태를 나타내었다. 또한, 처리후의 수율은 온도 및 처리시간이 증가함에 따라서 감소하는 경향을 나타내었다(Table 24).

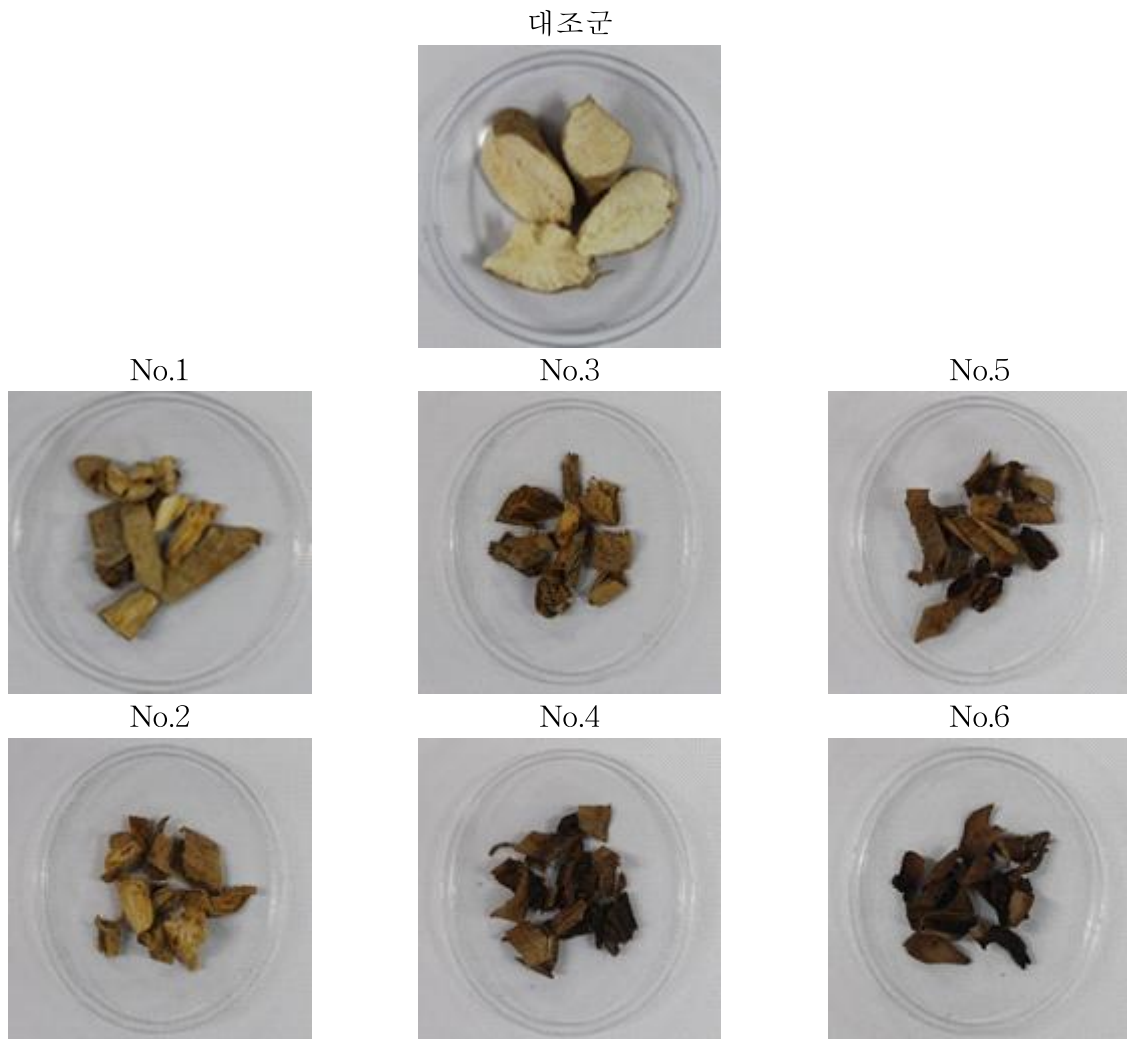


Figure 40. 증숙 처리 조건에 따른 천문동의 외형 및 색 변화

Table 24. 증숙 처리 조건에 따른 천문동의 수율

시료	수율 (%)
대조군	100
1	81.6
2	81.5
3	74.1
4	62.8
5	63.1
6	40.3

#### 나. 증숙 천문동 제조 조건의 최적화 및 표준화

증숙 조건에 따른 천문동 제조방법의 최적화 및 표준화를 위하여 천문동의 80% 메탄올 추출물을 이용하여 항산화능 측정중의 한 방법인 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) 소거측정을 실시하였다. 50% 에탄올에 농도별로 용해시킨 추출물 100 $\mu$ L와 60 $\mu$ M 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) 100 $\mu$ L를 96 well plate에 넣은 후 혼합하여 차광한 후 상온에서 30분간 방치시킨 뒤 ELISA reader를 사용하여 540nm에서 흡광도를 측정하였다. 시료를 첨가하지 않은 대조군과 비교하여 DPPH 소거효과를 백분율(%)로 나타내었다 (Figure 41).

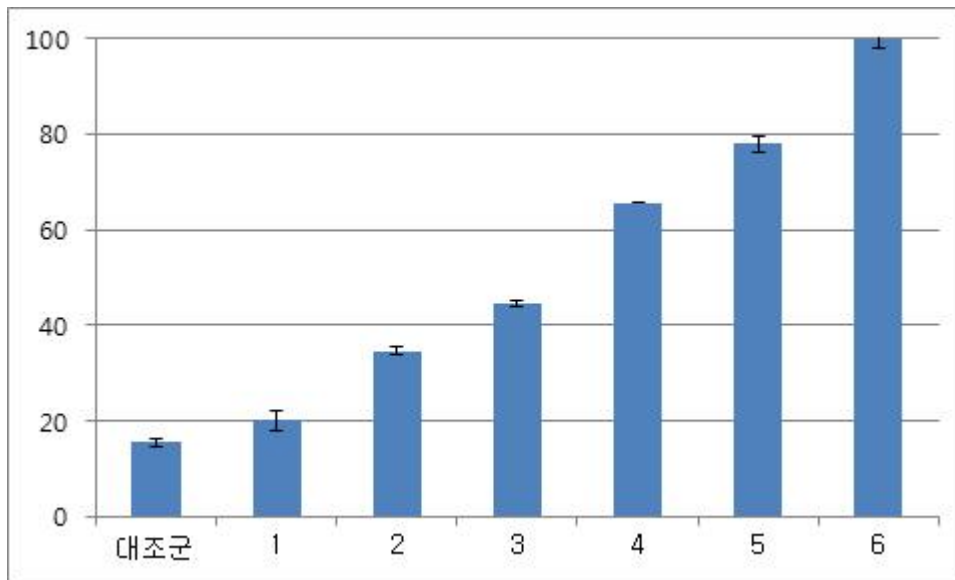


Figure 41. 증숙 조건에 따른 80%메탄올 추출물의 DPPH radical 소거능 비교 (1 mg/mL)

증숙온도 및 시간이 증가함에 따라 DPPH radical 소거능이 유의적으로 증가함을 알 수 있었다. 또한, 증숙단계에 따른 항염증 활성을 분석한 결과(Figure 44) 대조군에 비하여 약간 감소하는 경향을 나타내었지만 증숙에 따른 차이는 크게 나타나지 않았다. 이에 따라 가장 최적화된 천문동 제조의 방법은 이후에 기술할 증숙천문동의 기능성 성분 분석의 데이터를 종합하여 볼 때 고압멸균기에서 120 $^{\circ}$ C로 3시간동안 증숙한 천문동이 가장 효율적인 것으로 판단된다.

#### 5. 증숙 천문동의 호흡기 질환관련 생리활성 성분 분석 및 정제

##### 가. 증숙단계에 따른 이화학적 및 생리활성 성분 분석

(1) 증숙 단계에 따른 pH 변화

증숙의 온도와 시간의 차이에 따른 pH 변화를 관찰하기 위하여, 각 단계별 증숙 천문동 2g을 100mL의 증류수에 첨가하여 pH meter로 측정하였다. 증숙 단계에 따른 pH의 변화는 Figure 42에 나타내었으며, 증숙의 온도와 시간이 증가함에 따라 pH가 감소하는 경향을 나타냈다.

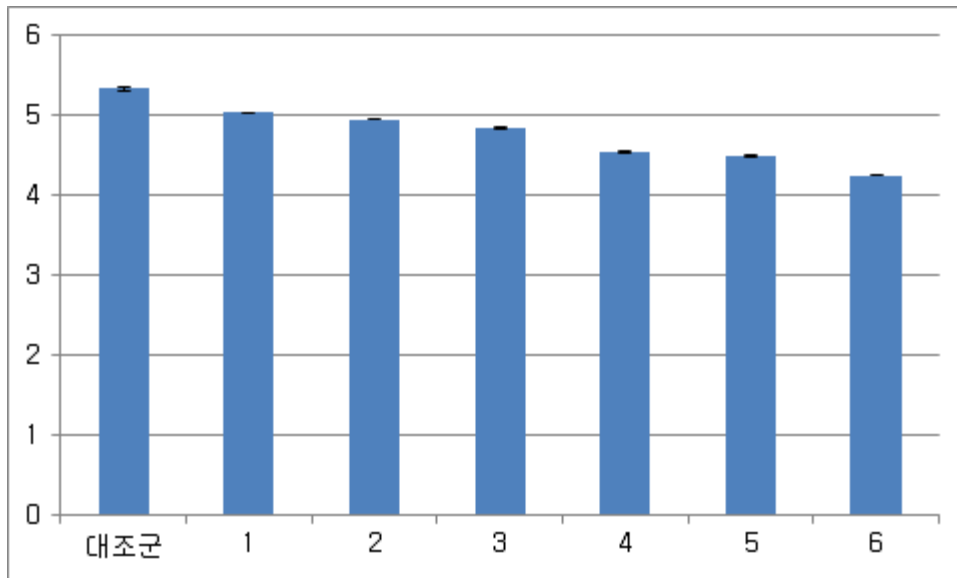
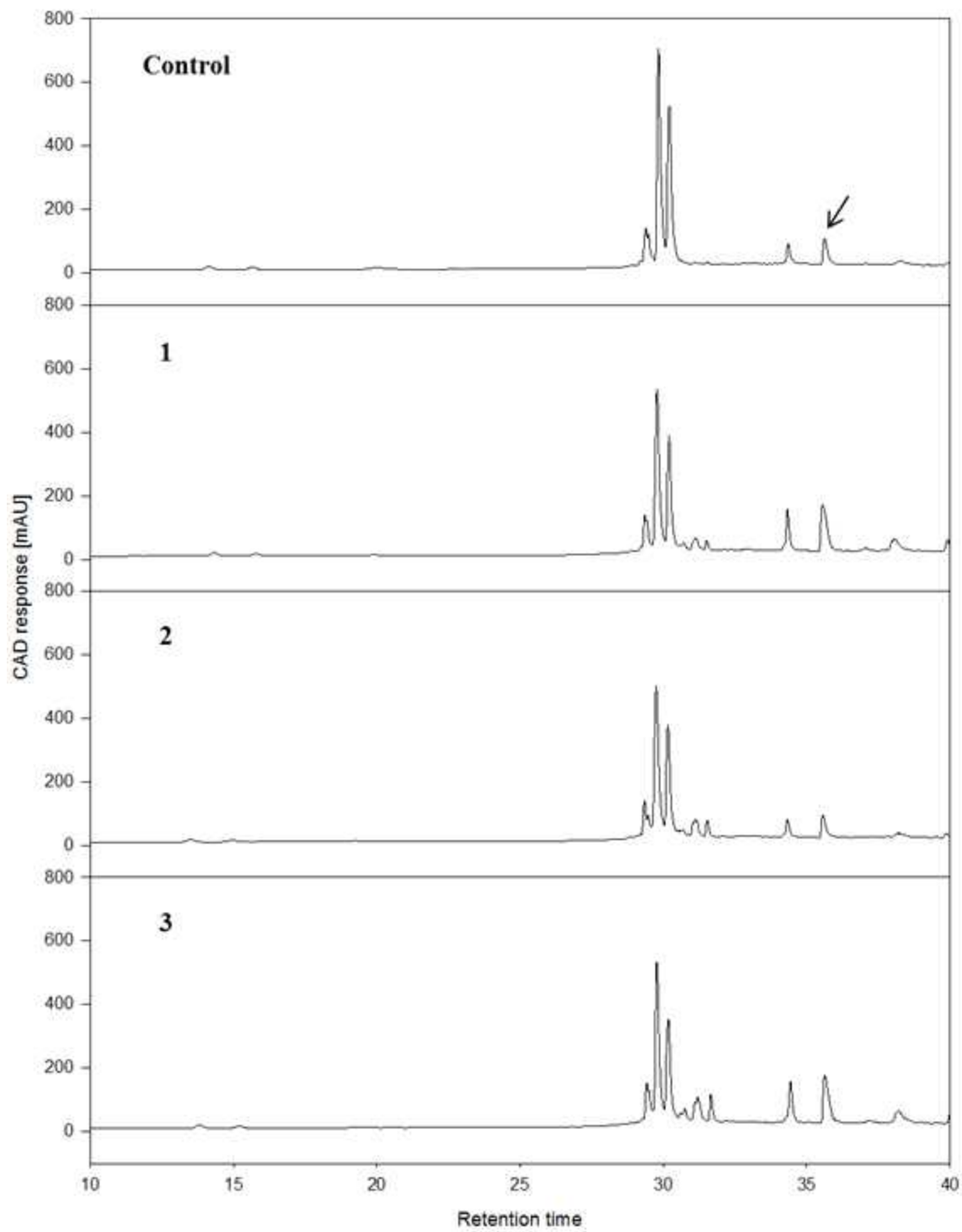


Figure 42. 증숙 조건에 따른 pH 변화

(2) 증숙단계에 따른 기능성 성분의 분석

증숙 천문동의 단계별 기능성 성분을 분석하기 위하여 각 단계별 80%메탄올 추출물 5g에 200mL의 n-부탄올을 이용하여 추출하였다. 추출 후 여과 및 건조시켜 최종적으로 n-부탄올 추출물을 얻었으며, 각 과정을 3번씩 반복하였다.

각 추출물의 CAD를 이용한 HPLC분석 결과는 Figure 43과 같다. 증숙의 온도와 시간의 증가함에 따라 RT 30분일 때의 가장 큰 피크가 점점 감소하는 경향을 나타내었다. 이 가장 큰 피크는 일반적으로 알려진 천문동 건근의 항염증 물질인 protodioscin 표준물질과 비교하여 분석한 결과 천문동에 존재하는 protodioscin으로 판단되었다. 전반적으로 증숙 처리 온도 및 시간이 증가함에 따라서 protodioscin은 감소하는 것으로 판단되었다. 그러나, 증숙 처리 온도 및 시간이 증가함에 따라서 Figure 43에서 화살표로 표시된 protodioscin 뒤에 존재하는 2개의 작은 피크가 증가하는 것으로 보아 증숙에 따른 신규 물질이 생성되는 것으로 판단된다.



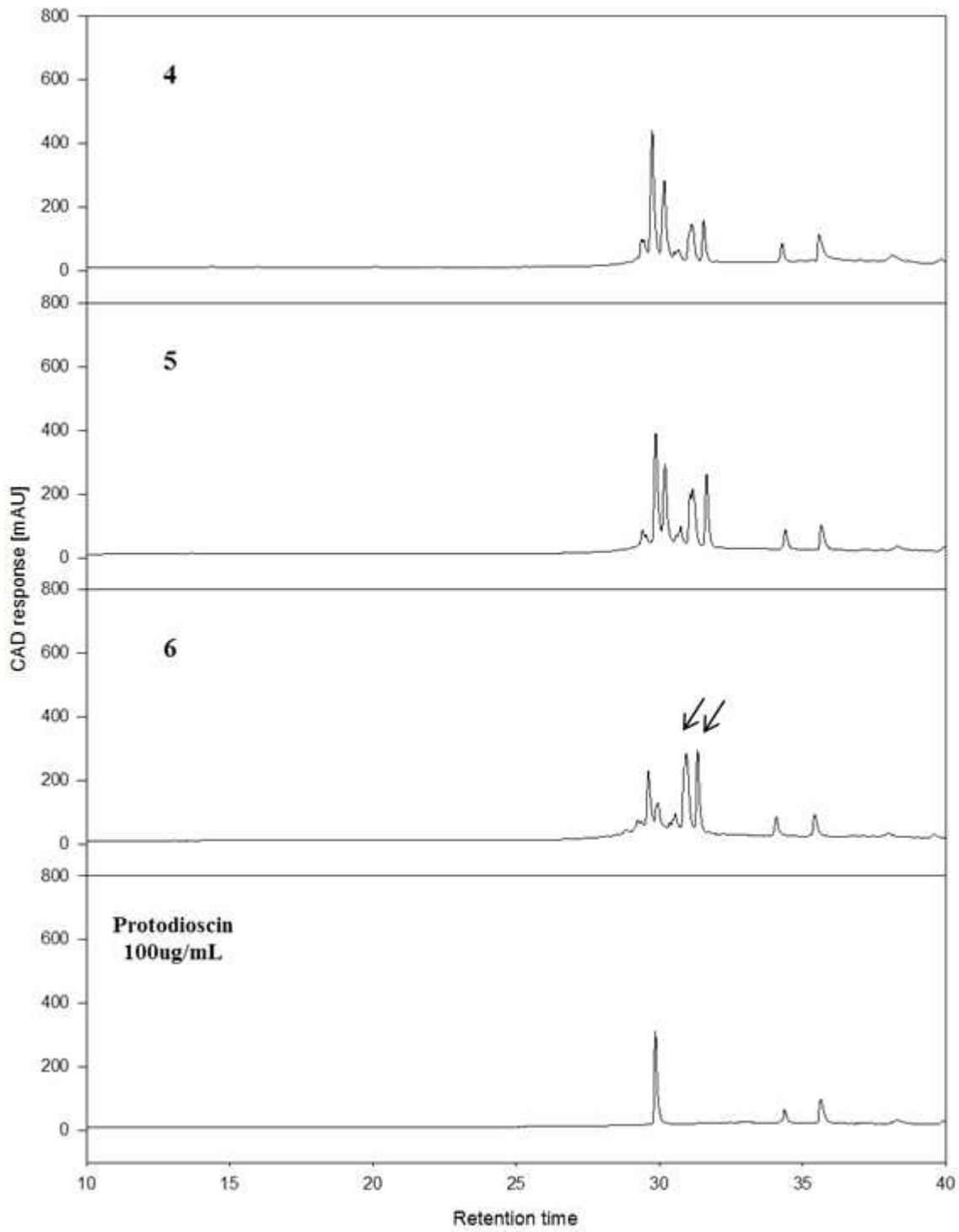


Figure 43. 증숙 조건에 따른 기능성 성분의 변화

각 증숙 단계별 천문동 n-부탄을 추출물의 항염증을 분석한 결과는 Figure 44와 같다. 먼저 같은 한시간을 처리한 1, 3, 5번의 결과를 비교하여보면, 시간이 증가함에 따라 점점 항염증 효과가 감소하는 경향을 나타내었다. 3시간 증숙처리한 2, 4, 6번의 경우 온도가 증가함에 따라 다소 상승하는 모습을 보였으나, 큰 차이는 나타나지 않았다. 또한, 증숙의 온도와 시간이 증가함에 따라 protodioscin이 감소하여 n-부탄을 추출물의 항염증효과가 감소하였지만, 이에 반해 RT 31~32에서 새로운 물질 2가지가 CAD에 의해 확인되었다. 또한 이는 증숙의 온도와 시간이 증가함에 따라 비례적으로 상승하는 것을 확인하였다. 이후 유기용매 분획별 기능성 성분의 분리에서 나타난 항염증 효과와 이를 같이 비교해 본다면 이 두 가지 물질이 새로운 항염증 효과를 가지는 것으로 예상된다.

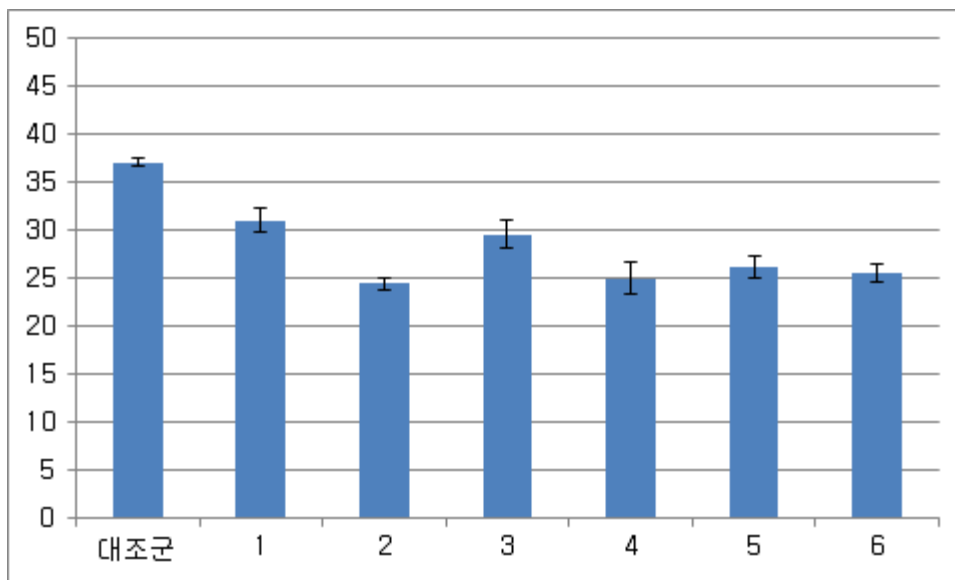


Figure 44. 증숙 조건에 따른 항염증 활성

### (3) 유기용매 분획별 기능성 성분의 분석 및 분리

앞서 최적조건으로 설정된 6번 시료(120℃, 3시간처리군)를 이용하여 유기용매 분획을 실시하여 증숙처리를 통하여 유기 용매 분획별 기능성 성분을 분석하였다. 유기용매 분획의 과정은 먼저 증숙천문동을 80%메탄올로 추출하여 감압농축 및 건조한 후 분말화하여 얻어진 80%메탄올 추출물을 이용해 총 4가지 용매, n-헥산>에틸아세테이트>n-부탄올>물(비극성에서 극성으로의 순)층의 분획을 실시하였으며 Figure 45에 도식화 하였다. 각 유기용매에 따라 얻어진 분획추출물은 감압농축 및 건조과정을 통하여 DMSO(dimethyl sulfoxide)에 일정한 농도로 용해시켜 실험에 사용하였다. 뿐만 아니라 증숙에 따른 천문동의 생리활성을 비교하고자 유기용매 분획은 대조군 또한 함께 실시하였다.



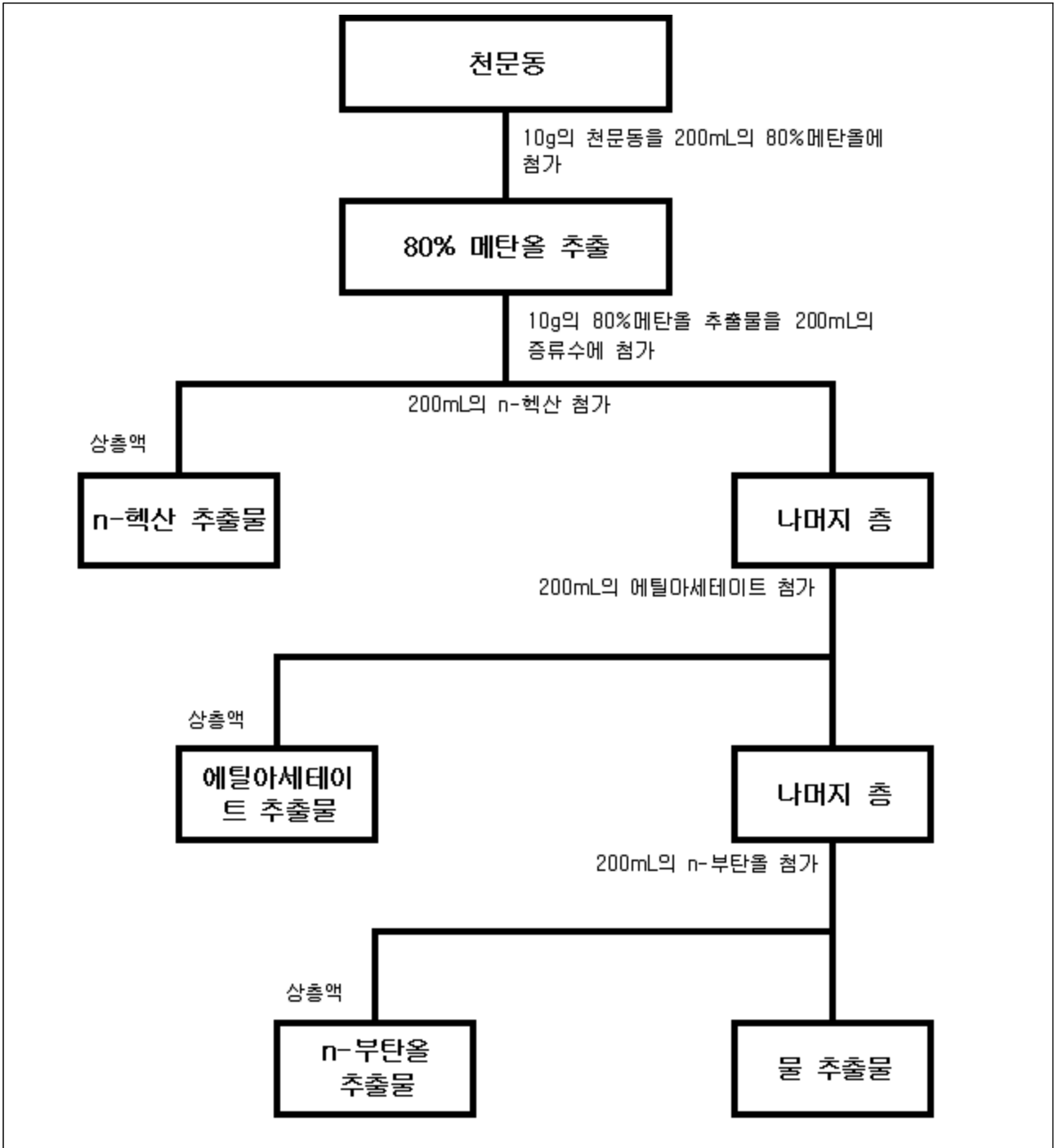


Figure 45. 유기용매 분획 도식화

○ 항산화능

천문동의 증숙에 따른 항산화능의 변화는 DPPH radical 소거능을 통하여 분석하였다. Figure 46에서 보는 것과 같이 천문동은 증숙과정 통하여 항산화능력이 전반적으로 증가한 것을 확인할 수 있었고 각 유기용매 분획별로 그 정도를 비교해보면 천문동 및 증숙천문동 두 가지 모두 에틸아세테이트층에서 가장 큰 항산화능력을 보였다. DPPH radical 소거능 뿐

만 아니라 생리활성 물질에 따라 nitrite 소거능 및 총 항산화능(Trolox equivalent antioxidant capacity, TEAC)에 대한 효과의 정도에는 다소 차이가 있으나 이러한 결과는 산화를 막는 메커니즘의 차이에서 유래된 것이며 전반적인 경향은 DPPH radical 소거능과 동일한 경향을 나타내었다(Table 25, 26).

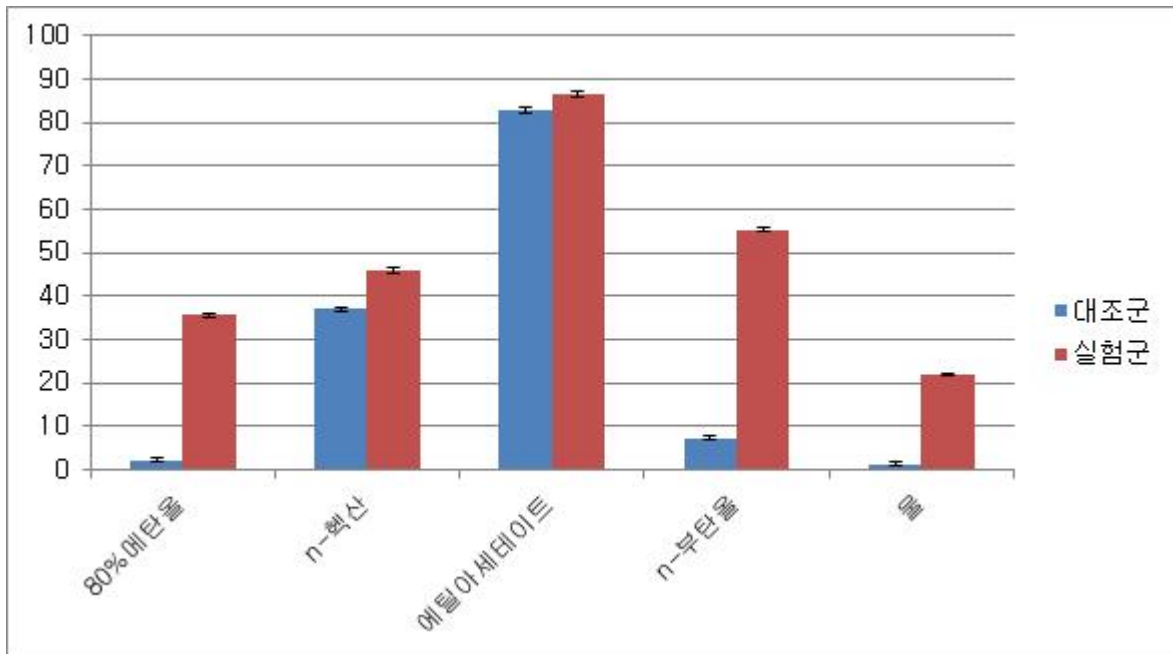


Figure 45. 유기용매 분획에 따른 DPPH radical 소거능

Table 25. 천문동 및 증숙천문동의 각 유기용매 분획별 nitrite 소거능

	80%메탄올	n-헥산	에틸아세테이트	n-부탄올	물
대조군 <sup>1)</sup>	12.71±0.62	23.38±0.54	81.70±0.31	36.85±0.36	3.05±0.18
실험군 <sup>1)</sup>	71.28±0.36	48.67±0.65	100.00±0.18	100.00±0.48	36.34±0.62
실험군 <sup>2)</sup>	38.11±0.19	22.70±0.51	96.62±0.51	78.11±0.33	17.70±0.57

<sup>1)</sup> 최종농도: 100 µg/mL

<sup>2)</sup> 최종농도: 50 µg/mL

Table 26. 천문동 및 증숙천문동의 각 유기용매 분획별 총항산화능

	80%메탄올	n-헥산	에틸아세테이트	n-부탄올	물
대조군	0.16±0.01	0.22±0.01	0.68±0.02	0.18±0.01	0.15±0.00
실험군	0.32±0.00	0.27±0.01	1.25±0.00	0.31±0.00	0.24±0.01

○ 총 폴리페놀 및 플라보노이드 함량

천문동 및 증숙천문동의 총 폴리페놀 함량은 다음과 같이 측정하였다. 시료 50μL와 증류수 500μL에 Folin 시약 100μL를 혼합하여 실온에서 3분간 정치한 후 10% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 용액 100μL를 가하여 혼합한 다음, 차광하여 실온에서 1시간 정치한 뒤 UV-spectrophotometer를 사용하여 725nm에서 흡광도를 측정하여 그 정도를 조사하였다. 정량에 사용한 표준물질로는 caffeic acid로써, 시료와 동일한 방법으로 분석하여 얻은 표준 검량선으로부터 총 폴리페놀 함량을 측정하였다. Figure 46에서와 같이 대조군과 실험군 모두 에틸아세테이트층에서의 총 폴리페놀 함량이 가장 컸으며, 증숙처리에 의해 그 함량이 유의적으로 증가한 모습을 나타내었다.

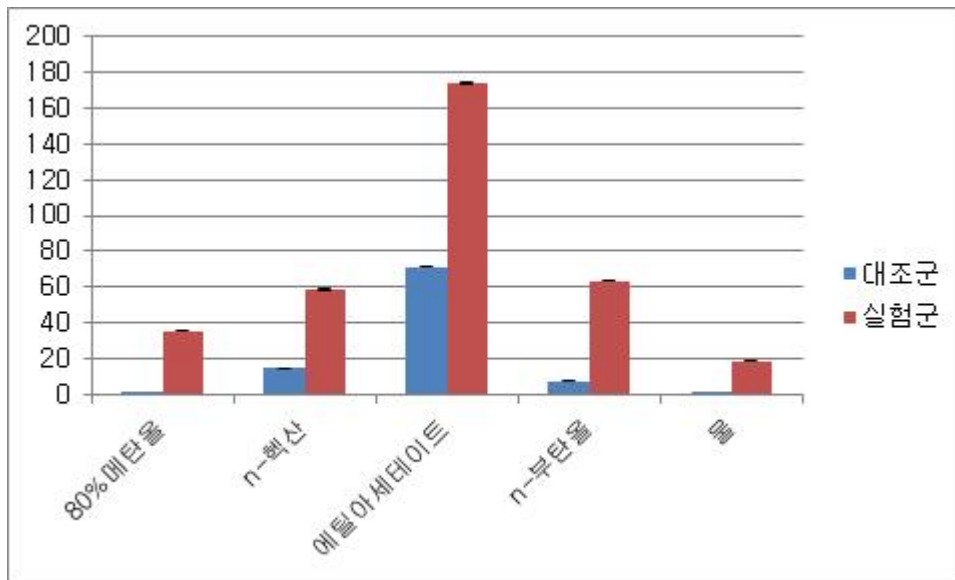


Figure 46. 유기용매 분획별 천문동 및 증숙 천문동의 총폴리페놀함량(mg/g)

총 플라보노이드 함량의 측정은 유기용매 추출물 100μL에 90% diethylene glycol 1000μL와 1N NaOH 100μL을 가하여 37°C에서 1시간동안 정치한 후 420nm에서 흡광도를 측정하여 그 함량을 조사하였다. 정량에 사용한 표준물질로는 naringin로써, 시료와 동일한 방법으로

분석하여 얻은 표준 검량선으로부터 총 플라보노이드 함량을 측정하였다. Figure 47에서와 같이 대조군과 실험군 모두 에틸아세테이트층에서의 총 플라보노이드 함량이 가장 컸으며, 증숙처리에 의해 그 함량이 유의적으로 증가한 모습을 나타내었다.

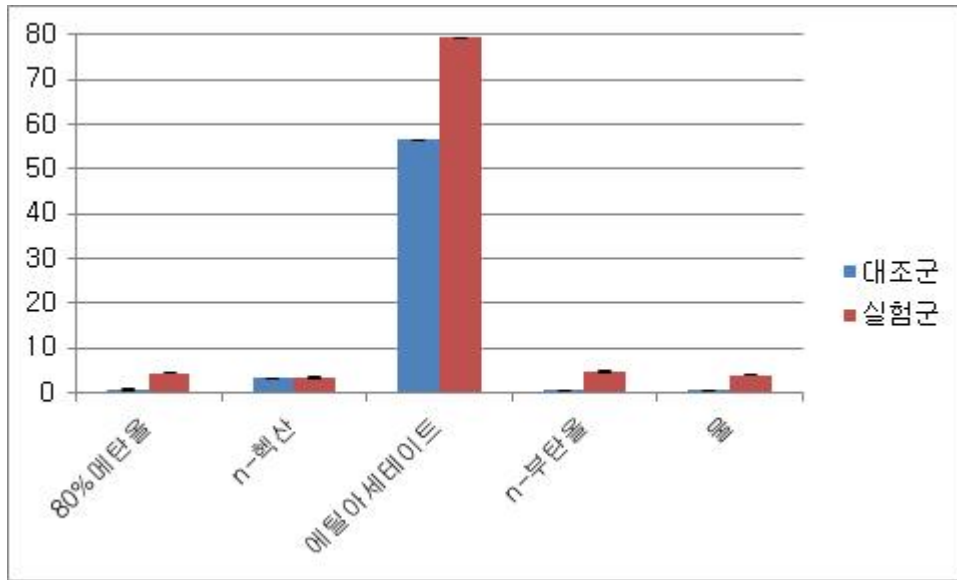


Figure 47. 유기용매 분획별 천문동 및 증숙 천문동의 총플라보노이드 함량(mg/g)

○ 항염증 활성

천문동 및 증숙천문동의 항염증능의 측정은 각 유기용매 추출물 12 $\mu$ L에 동량의 hyaluronidase를 첨가한 뒤 효소활성화를 위해 12.5mM CaCl<sub>2</sub> 12 $\mu$ L를 첨가하였다. 이 후 기질로서 hyaluronate를 24 $\mu$ L를 가한 뒤 40분간 정치하였다. 그리고 효소반응 정지를 위해 0.4N NaOH와 0.4M potassium tetraborate를 각각 12 $\mu$ L 첨가하였다. 해당 시료의 항염증효과는 spectrophotometer를 사용하여 540nm에서 흡광도를 측정하여 그 정도를 조사하였다.

$$\text{저해율(\%)} = (1 - \text{Absorbance}_{\text{sample}} / \text{Absorbance}_{\text{blank}}) * 100$$

Figure 48에서와 같이 대조군의 경우 비극성계열인 n-헥산과 에틸아세테이트 층에 비하여 n-부탄올층의 항염증효과가 다소 크게 나타났으나 최적조건으로 처리된 증숙천문동의 경우 n-헥산과 에틸아세테이트 층에서 항염증효과가 유의적으로 증가한 모습을 나타내었다. (n-헥산: 약 22배, 에틸아세테이트: 약 5배 증가) 항산화능, 총 폴리페놀 및 총 플라보노이드 함량, 그리고 항염증의 결과를 종합적으로 미루어볼 때 천문동은 증숙을 통해 그 기능성이 증가된다는 사실을 확인하였다.

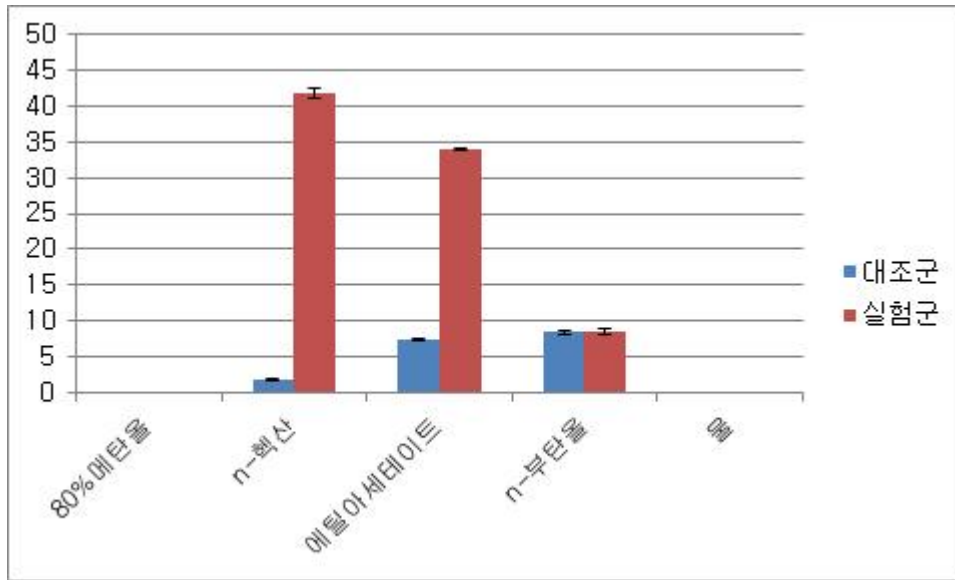


Figure 48. 각 유기용매 분획별 천문동 및 증숙천문동의 Hyaluronidase 억제율 (%)

○ 증숙천문동 에틸아세테이트 분획물의 기능성 성분 분석 및 정제

항산화능, 총폴리페놀 및 총플라보노이드 함량, 그리고 항염증의 결과를 바탕으로 증숙천문동 에틸아세테이트 분획물의 기능성 성분을 분석하고자 하였다.

- 천문동 및 증숙천문동의 thin layer chromatography (TLC) 분석

증숙에 따른 천문동의 유기용매 분획별 차이를 thin layer chromatography (TLC) 분석을 실시하였다. 천문동 및 증숙천문동의 유기용매별 TLC 분석은 그림과 같다. 각 시료는 10mg/mL의 농도로 희석시켜 각각 10 $\mu$ L를 분주하여 분석을 실시하였고 전개용매로서는 클로로포름:메탄올:증류수를 14:1:1(v/v)의 비율로 혼합하여 사용하였다. 전개이후 0.3% N-(1-naphyltyl)-ethylenediamine과 5% sulfuric acid를 포함한 메탄올 용매로 TLC plate를 발색시켜 증숙에 따른 천문동의 유기용매별 분획물의 변화를 관찰하였다.

TLC 분석 결과 모든 분획물에서 증숙에 의한 성분의 변화가 일어난 것이 확인되었다 (Figure 49). 그 중 항산화, 총 폴리페놀 및 총 플라보이드 함량에서 가장 큰 수치를 나타내었던 에틸아세테이트 분획물을 비교하여 보면 증숙천문동의 에틸아세테이트 분획물 상단에서 새로운 spot (회색)이 생겨난 것을 확인하였고 이는 증숙에 의해 생성된 기능성 성분으로 사료되어 추가적인 분석으로 위해 HPLC 분석을 실시하였다.

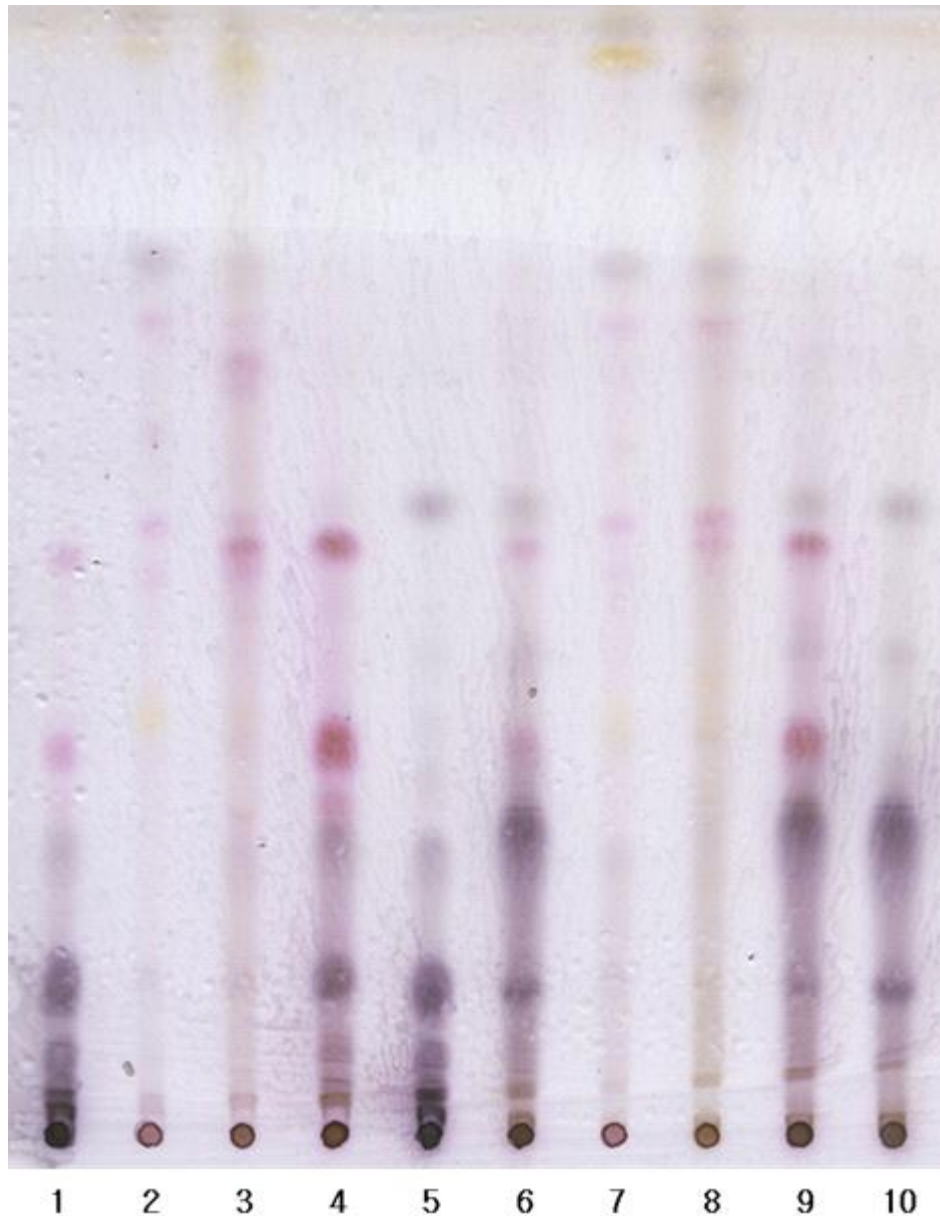


Figure 49. 천문동 및 증숙천문동의 유기용매 분획별 TLC 분석

1: 천문동 80%메탄올 분획물, 2: 천문동 n-헥산 분획물, 3: 천문동 에틸아세테이트 분획물,  
 4: 천문동 n-부탄올 분획물, 5: 천문동 물 분획물, 6: 증숙천문동 80%메탄올 분획물, 7:  
 증숙천문동 n-헥산 분획물, 8: 증숙천문동 에틸아세테이트 분획물, 9: 증숙천문동 n-부탄올  
 분획물, 10: 증숙천문동 물 분획물

- 증숙천문동 에틸아세테이트 분획물의 HPLC 분석

먼저 증숙천문동 에틸아세테이트 분획물을 HPLC용 메탄올로 희석하여 syringe filter(0.45  $\mu$ m)로 필터링하여 1mg/mL의 시료를 표와 같은 조건으로 HPLC 분석을 수행하였다. 분석에 사용된 HPLC장치는 Interface iLC 3000을 이용하였다. 증속하지 않은 천문동에 비교하여 증

속 후 천문동은 크게 3가지 주 peak가 검출되었으며 각각 295nm, 285nm, 그리고 265nm의 파장에서 흡광하는 물질을 포함하는 것으로 나타났다. UV에 흡광하지 않는 물질은 charged aerosol detector (CAD)를 이용하여 검출하였다. 각 UV peak는 고유한 파장을 나타내어 물질 확인을 위한 정보를 제공하여 각각의 표준물질이 나타내는 고유한 파장과 비교하여 추후 연구에서 성분을 확인하기 위한 기초 자료로 사용하고자 하였다.

Table 27. HPLC 분석 조건

Column	YMC-Triart C18 column (4.6mm * 250mm, i.d 5µm)
Detector	Photodiode array detector (PAD) at 270 nm Charged aerosol detector (CAD)
Injection volume	20 µL
Flow rate	1 mL/min
Solvents	A: 0.1% formic acid in water B: Acetonitrile
Mobile phase	0-20 min B: 10→20% 20-40 min B: 20→100% 40-60 min B: 100%→100% for washing the column

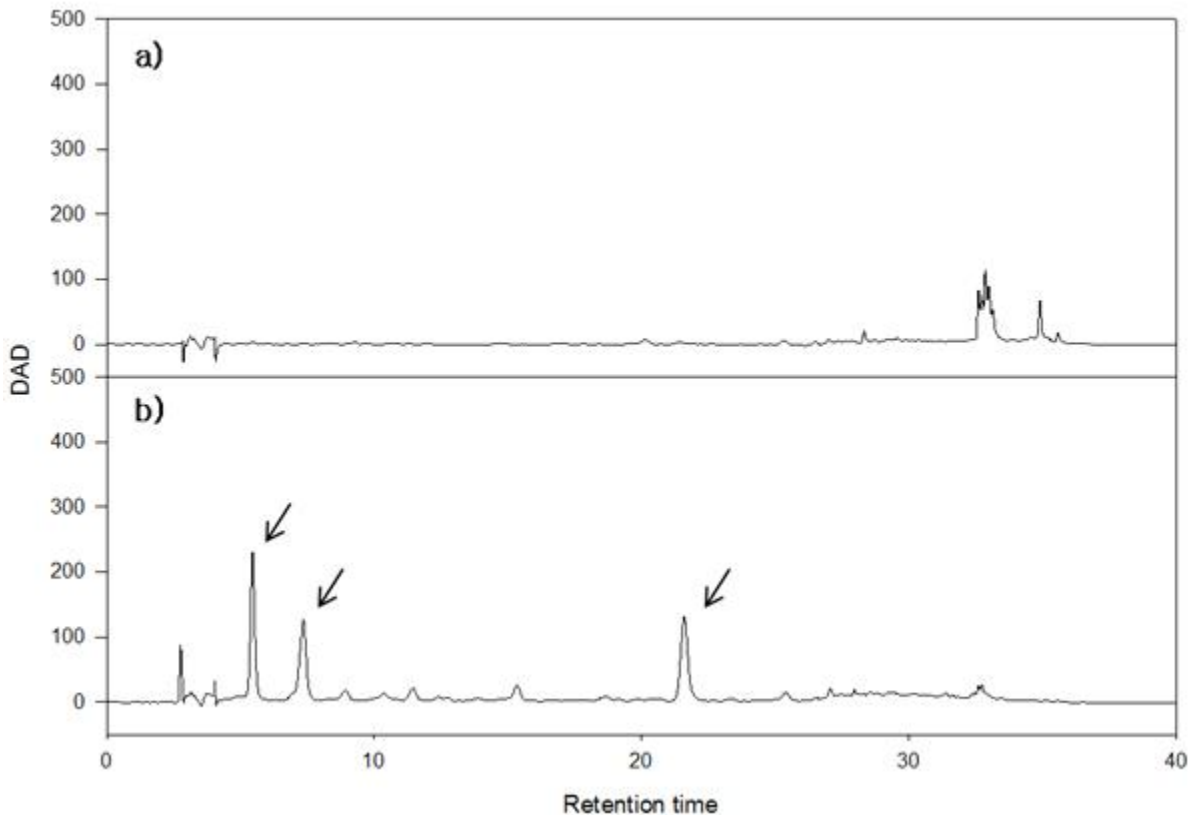


Figure 49. 천문동 및 증숙천문동의 에틸아세테이트 분획물 분석(DAD detector)

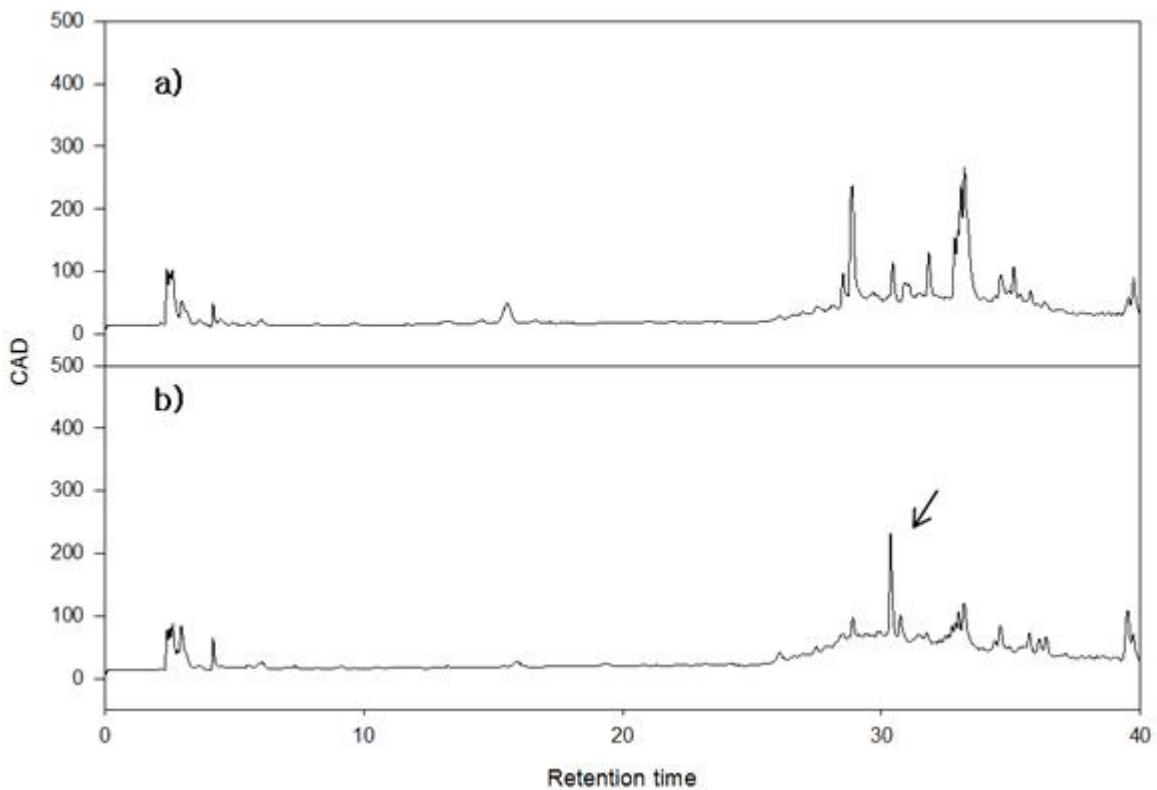


Figure 50. 천문동 및 증숙천문동의 에틸아세테이트 분획물 분석(CAD detector)

- Preparative HPLC를 이용한 성분 분리

증숙천문동 에틸아세테이트 분획물을 preparative HPLC (Agilent 1100, USA)를 사용하여 기능성 성분을 분리하였다(Table 28). Preparative HPLC 또한 HPLC 분석과 마찬가지로 3개의 주 peak가 검출되었고 각 peak의 최대파장에 해당하는 295nm, 285nm, 그리고 265nm를 검출파장으로 설정하여 각 성분을 분리하였다(Figure 51). 분석조건은 표와 같으며 분리된 시료는 농축하여 0.45 $\mu$ m syringe filter를 사용하여 필터링 후 정제 및 구조 분석에 사용하였다. 그림과 같이 증숙천문동 에틸아세테이트 분획물에서 preparative HPLC를 통하여 분리된 각 compound 1, 2, 그리고 3을 각각 HPLC로 분석한 결과 각각의 compound는 HPLC 분석에서 검출된 peak와 상응하며 단일 물질로 분리되었다(Figure 52).



Table 28. Preparative HPLC 분리 조건

Column	YMC-Triart C18-S column (10mm * 250mm, i.d 10μm)
Detector	Photodiode array detector (PAD) at 295, 285, and 265nm
Injection volume	Approximately 150 μL
Flow rate	4.7 mL/min
Solvents	A: Acetonitrile B: 0.1% formic acid in water
Mobile phase	0-30 min B: 10→20% 30-40 min B: 20→100% 40-60 min B: 100%→100% for washing the column

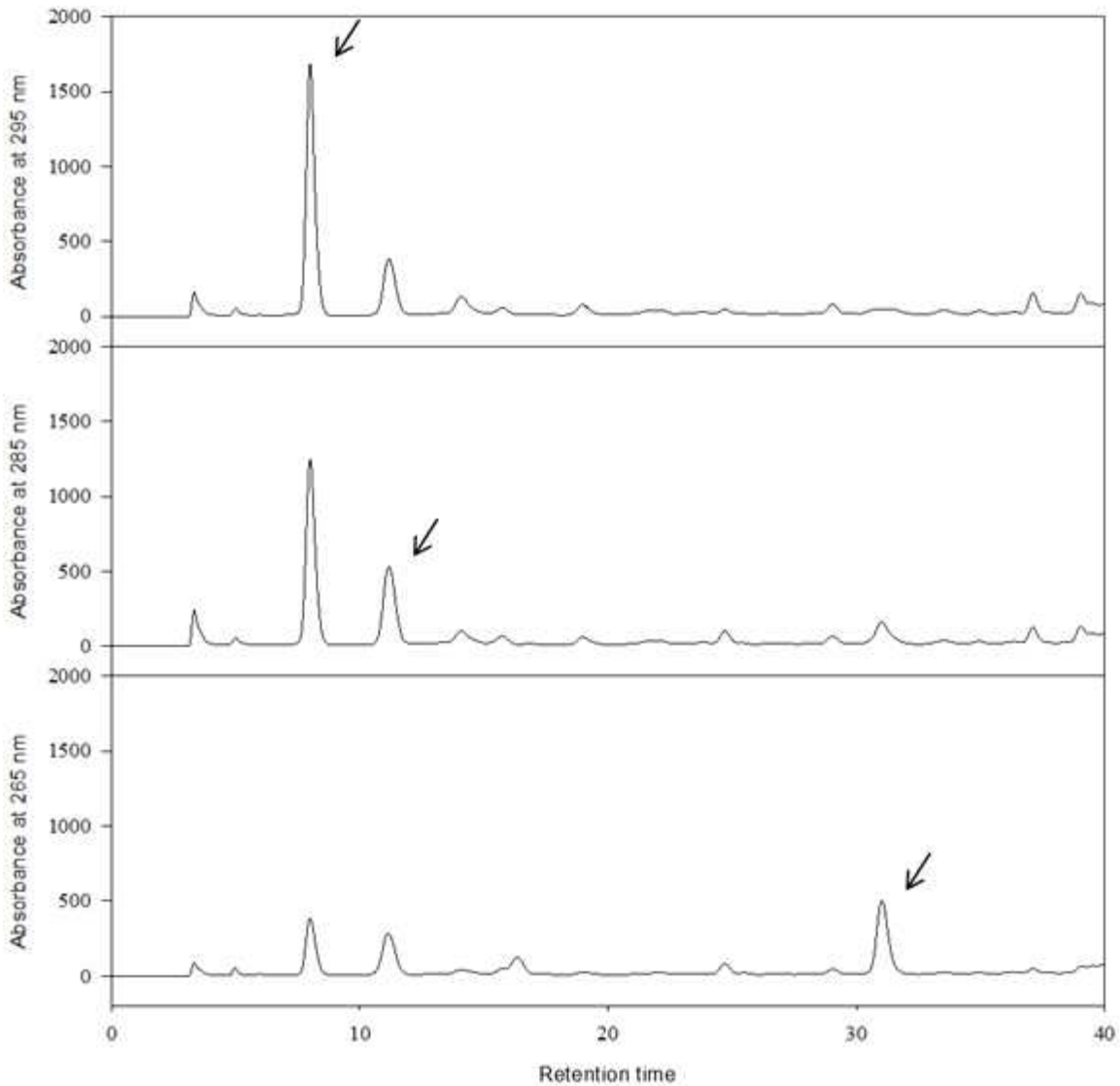


Figure 51. Preparative HPLC 크로마토그램

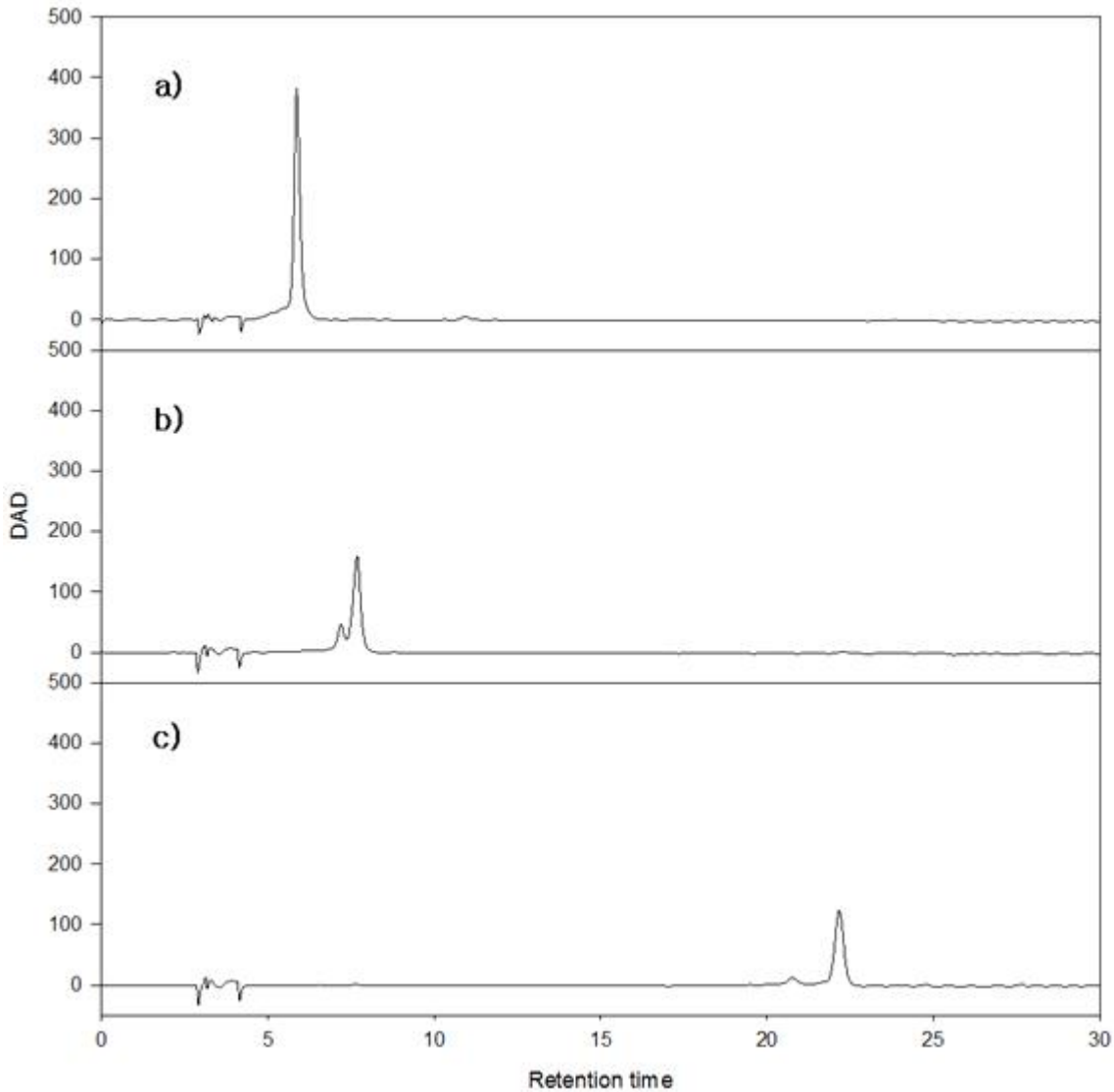


Figure 52. Preparative HPLC로 분리된 증숙천문동 에틸아세테이트 분획물의 기능성 성분  
 \*a): compound 1, b): compound 2, c): compound 3

- 분리된 기능성 성분의 규명

DAD 분석에서 검출된 3가지의 peak 중 2번째 peak는 해당 peak의 retention time과 최대 파장(285nm)에 의해 5-hydroxymethyl furfural로 판단된다. 이를 추가적으로 확인하기 위하여 기존의 증숙천문동 에틸아세테이트 분획물에 일정한 농도로 용해시킨 5-HMF를 첨가하여 HPLC 분석을 실시하였고 그 결과 그림에서 보는 것과 같이 5-HMF를 표준물질로 첨가하였을 때 2번째 peak만이 유일하게 상승한 모습을 나타낸 것을 확인할 수 있었다.

(4) 분리된 분획의 효능 분석

○ 항산화능

Preparative HPLC를 통하여 분리된 각 compound들은 DPPH radical 소거능을 통하여 그 항산화능을 조사하였다. 분리된 각 compound의 DPPH radical 소거능은 Figure 53과 같다.

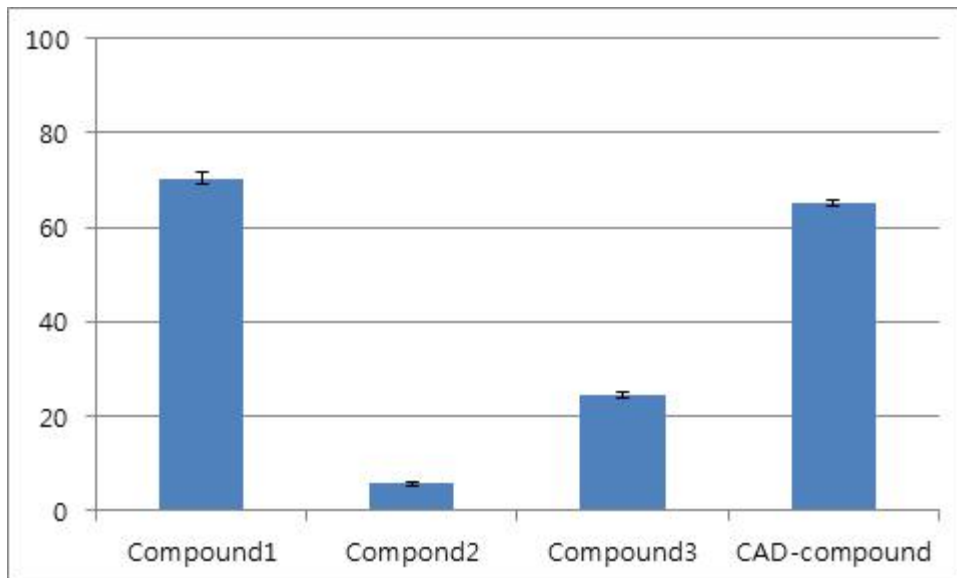


Figure 53. 분리된 물질의 항산화능

○ 항염증 활성

분리된 순수 물질의 항염증 활성을 분석한 결과 CAD detector에서 검출되는 피크에 해당하는 물질이 가장 높은 활성을 나타내었으며, DAD에서 검출되는 물질인 compound 1, 3에서도 항염증 활성이 나타났다.

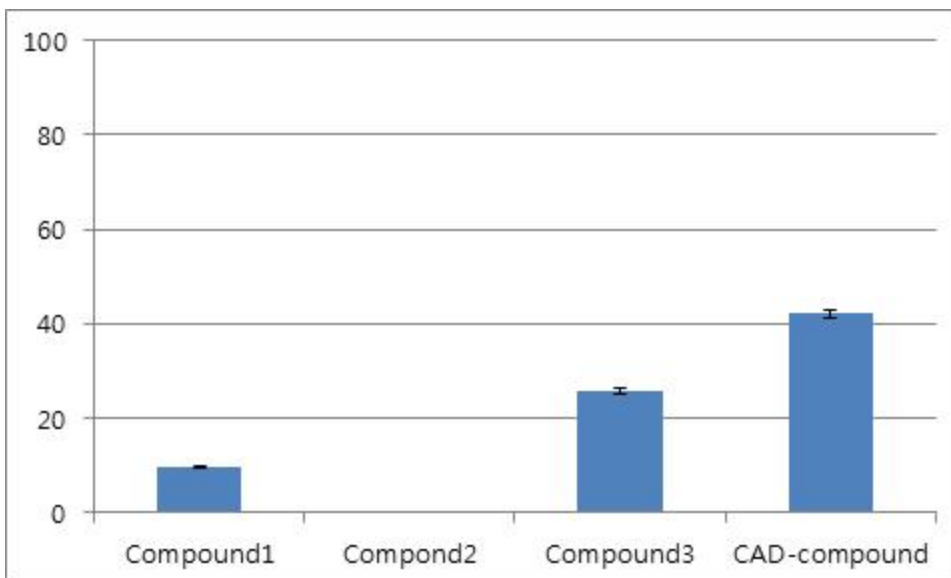


Figure 54. 분리된 물질의 항염증 활성

6. 호흡기 질환관련 생리활성물질의 소재화 및 대량생산

발효 천문동 및 증숙 천문동을 효율적으로 활용하기 위해서는 분말화 과정이 필수적이다. 일반적인 건조나 동결건조는 농축되는 과정에서 경화가 일어나거나 서로 엉겨붙기 때문에 이를 방지하기 위한 방법이 필요하다. 이를 위해서 증숙 및 발효 천문동 추출물의 분말화를 위하여 분무 건조를 수행하였다. 건조시킨 증숙천문동 20g을 1.2L의 열수로 추출한 다음, 전체 용량의 20% 비율로 말토덱스트린을 첨가하여 제조하였다. 추출물의 분말화를 위하여 분무건조기(SD-1000, EYELA, Tokyo)를 이용하였다. 분무건조기의 운용조건은 다음과 같다. outlet 온도 및 inlet 온도는 각각 52-60℃와 90-95℃ 범위 내에서 조절하여 과도한 가열로 인한 손상을 방지하였고, Blower 수치는 0.2-0.75m<sup>3</sup>/min 범위 내에서 조절 가능하지만, 0.40m<sup>3</sup>/min 이하의 조건에서는 분말이 뭉쳐져 충분히 건조되지 않았기 때문에 최종적으로 0.60m<sup>3</sup>/min에서 분무건조를 실시하였다. Atomizer 23(×10 kPa) 및 pump 속도 1.0의 조건으로 설정하였고 interval timer는 설정하지 않았다. 발효천문동의 분무건조 조건은 증숙천문동 열수추출물의 조건과 동일하게 진행하였다.

Figure 55에서 보는 바와 같이 증숙 천문동 및 발효 천문동의 경우 분말형태의 제형으로 만들어졌으며, 또한 기존의 천문동 추출물을 건조시에 나타나는 경화나 엉김현상은 나타나지 않았다. 증숙 및 발효 천문동 분말을 캡슐제품에 용이하게 적용하기 위하여 오일(들기름)과 유화제(레시틴)을 30:3:67 (분말:레시틴:오일)의 비율로 혼합하여 제조한 것은 Figure 55(c)와 같으며, 분말형태의 증숙 천문동이므로 오일에 유화되며 층분리가 일어나지 않아서 안정한 캡슐제품의 제조가 가능한 것으로 판단된다.

Table 29. 분무건조 조건

outlet temp. (℃)	52-60
inlet temp. (℃)	90-95
blower (m <sup>3</sup> /min)	0.60
atomizing (×10 kPa)	23
pump	1.0



Figure 55. 분무건조된 증숙(a) 및 발효 천문동(b) 추출 분말과 오일에 유화된 증숙 천문동 분말(c)

### 제 3절. 천문동의 호흡기 질환 효능연구(제2협동)

#### 1. 천문동의 in vitro 생리활성 및 기능성 분석

##### 가. 생리활성 검증을 위한 세포주 분석

###### (1) 호흡기질환 연관세포 등 확보 및 배양조건 확립

###### (가) 대식 세포주(macrophage)

천문동 추출물이 대식세포에 미치는 영향을 평가하기 위하여 Raw264.7 세포주를 한국세포주은행 (Korean Cellline Bank, KCLB)에서 구입하여 사용하였다(Figure 1). 마우스의 대식세포로부터 유래한 Raw264.7 세포주는 염증 자극을 유도하여 세포로부터 분비되는 다양한 사이토카인의 분석에 쓰인다. Raw264.7 세포주는 10% fetal bovine serum (FBS, Gibco, Carlsbad, CA, USA), 1% penicillin 및 streptomycin (Gibco)을 함유한 Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, Gibco)에 37°C, 5% CO<sub>2</sub>조건의 incubator에서 배양하였다. 배지는 매일 교체했으며, 세포가 배지 내에 70~80% 정도 성장하면 계대시켰다.

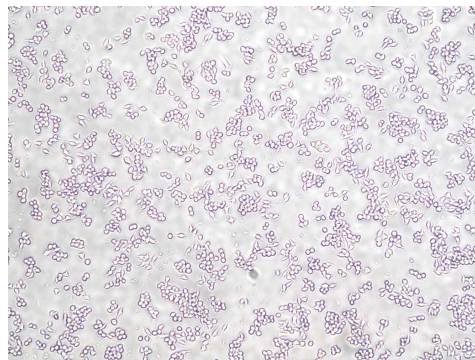


Figure 1. Culture morphology of Raw264.7 cells.

###### (나) 소신경교세포주(microglial cells)

천문동 추출물이 뇌신경 세포 사멸에 미치는 영향을 평가하기 위하여 BV-2 세포주를 한국생명공학연구원으로부터 분양받아 사용하였다(Figure 2). 소신경교세포는 뇌 조직 내에서 변성된 뉴런 및 이물질을 대식하는 식세포로서, BV-2 세포주는 10% fetal bovine serum (FBS, Gibco, Carlsbad, CA, USA), 1% penicillin 및 streptomycin (Gibco)을 함유한 Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, Gibco)에 37°C, 5% CO<sub>2</sub>조건의 incubator에서 배양하였다. 배지는 매일 교체했으며, 세포가 배지 내에 70~80% 정도 성장하면 계대시켰다.

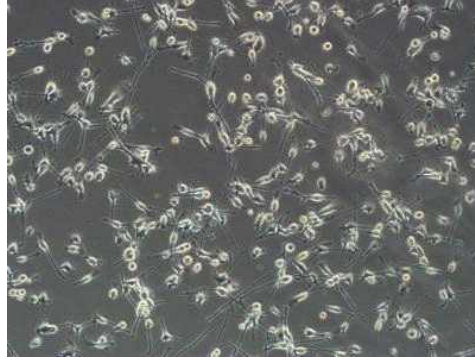


Figure 2. Culture morphology of BV-2 cells.

나. In vitro 효능평가

(1) 천문동의 생리활성(호흡기질환) 효능평가

(가) 천문동추출물

Table 1. 효능평가에 사용된 천문동추출물 특성

	천문동 추출물	추출 방법
열수	KW	<p>외피는 제거하지 않은 채로 둥근 단면 모양으로 얇게 썬 다음 지퍼 팩에 가지런히 넣었다. 그리고 동결건조를 위해 24시간 이상 예비동결을 시켰다. 예비동결이 완료된 시료는 동결건조를 위해 판 위에다 적정량을 깔아 함유된 수분이 날아갈 때까지 동결건조를 시켰다. 시료가 완전히 건조될 때 까지 약 4~5일이 걸리며 외피의 수분이 남아 있을 수 있으므로 막자사발을 이용해 확인한다. 건조가 완료된 시료는 믹서기를 이용해 '약'의 세기에서 10초 이내로 돌려 분말화했다. 시료를 믹서기에 오래 돌리게 되면 덩어리가 지므로 주의한다. 분쇄한 천문동 분말은 50 mesh 체를 이용해 걸러내어 걸리는 것은 모아서 다시 믹서에 10초 이내로 돌려 체를 통과 할 수 있게 한다, 외피는 질겨서 믹서기로 갈리지 않으므로 최대한으로 간 다음 분말화된 천문동과 섞어서 시료를 사용하였다. 천문동 성분들을 추출하기 위해 유리병에 500ml의 D.W와 75g의 천문동을 넣은 다음 골고루 섞이게 저어준다. 추출은 열수 추출을 이용하였고 동서추출기를 이용해 0.3Mpa 미만의 압력을 걸어 121°C에서 45분간 추출을 이행하였다. 추출물은 잔사의 제거를 위해 Advantec No.2 여과지를 이용하여 감압 여과를 하였다. 이때 고열로 인한 수분 손실을 매우고 농도를 맞추기 위해 D.W를 감압 여과기에 있는 잔사에 통과시켜 불림</p>

		(500ml)을 맞추었다. 감압여과가 완료된 추출액은 골고루 잘 섞여 tube에 담아 예비동결 후 동결건조 시켜 시료로 사용하였다.
	KER (에테르분획)	생리 활성물질이 에테르 층에 녹아 나오는지 확인을 위해 에테르로 분획추출을 실시한다. 앞서의 열수 추출에서 여과까지의 과정은 같다. 여과가 완료된 천문동 추출물 500ml에 200ml의 에테르를 둥근 플라스크에 넣은 다음 골고루 세계 흔들어 준다. 충분히 흔든 뒤 플라스크의 뚜껑을 열어 1시간동안(층이 나뉠때까지) 방치한다. 이 과정을 3회 반복한다. 분획이 완료된 에테르층의 추출물을 예비 동결 후 동결건조하여 시료로 사용하였다.
	LW	천문동을 분쇄한 후 그 분말을 80% 메탄올로 25°C, 12시간씩 3회 추출한 후 filter paper(Whatman No. 2)로 여과하였고, 얻어진 여액은 감압농축기(EYESA, N-1100 series, Tokyo)에서 농축하여 메탄올 추출물을 얻었다. 각각의 추출물은 동결 건조하여 용매를 제거한 뒤 실험에 사용하였다.
에탄올	LE (70%)	천문동을 분쇄한 후 그 분말을 80% 메탄올로 25°C, 12시간씩 3회 추출한 후 filter paper(Whatman No. 2)로 여과하였고, 얻어진 여액은 감압농축기(EYESA, N-1100 series, Tokyo)에서 농축하여 메탄올 추출물을 얻었다. 각각의 추출물은 동결 건조하여 용매를 제거한 뒤 실험에 사용하였다.
	LEt (75%)	천문동을 분쇄한 후 그 분말을 75% 에탄올로 70°C, 3시간씩 3회 추출한 후 filter paper(Whatman No. 2)로 여과하였고, 얻어진 여액은 감압농축기(EYESA, N-1100 series, Tokyo)에서 농축하여 에탄올 추출물을 얻었다. 각각의 추출물은 동결 건조하여 용매를 제거한 뒤 실험에 사용하였다.
메탄올	LM (80%)	천문동을 분쇄한 후 그 분말을 80% 메탄올로 25°C, 12시간씩 3회 추출한 후 filter paper(Whatman No. 2)로 여과하였고, 얻어진 여액은 감압농축기(EYESA, N-1100 series, Tokyo)에서 농축하여 메탄올 추출물을 얻었다. 각각의 추출물은 동결 건조하여 용매를 제거한 뒤 실험에 사용하였다.
에틸아세트에이트	KEa	Ethyl acetate 추출은 시료 50g에 각각의 용매 500ml을 진탕향운수조(SHWB-30/45, Woori science Instrument co.,Gyeonggi-do, Korea)에 50°C 110rpm에서 24시간 추출하였다. 추출물은 speed vacuum으로 건조시켜 시료로 사용하였다.
	도라지 추출물	<b>추출방식</b>
열수	LHw	도라지 무게 대비 20배 부피의 용매 비율에 해당하는 물로 추출기(DW-290, 대웅바이오텍(주), 피산, 한국)에서 2시간 30분간 추출한 후 filter paper(Whatman No. 2, Whatman, Maidstone, UK)로 여과하였고, 얻어진 여액은 감압농축기(EYELA, N-1100 series, Tokyo, Japan)에서 농축하여 열수 추출물을 얻었다.

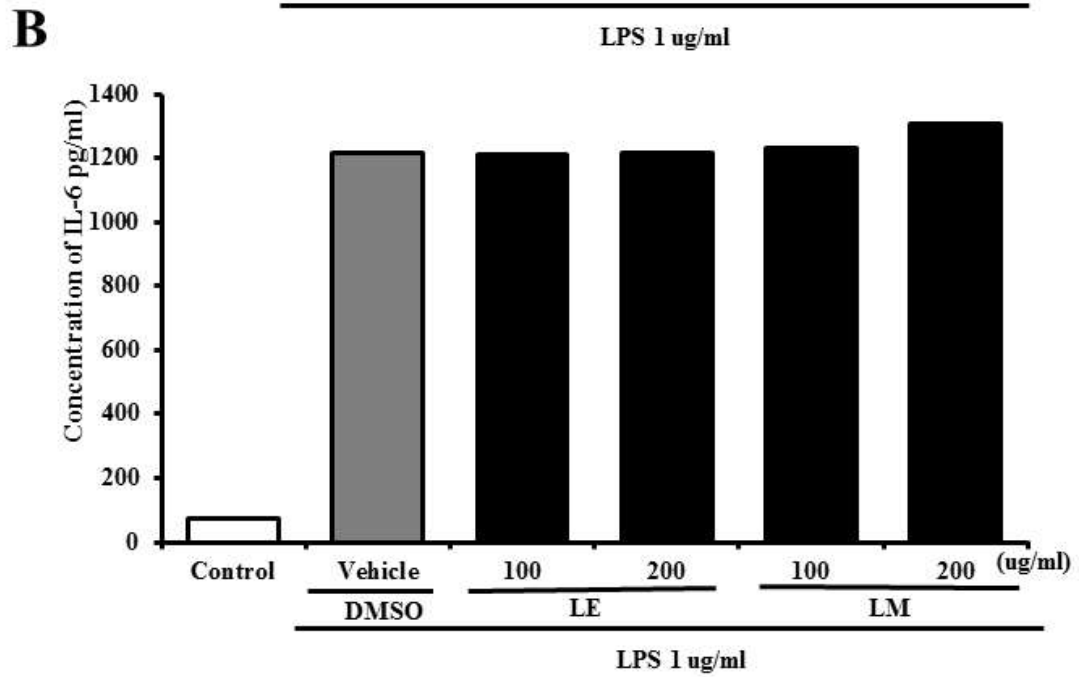
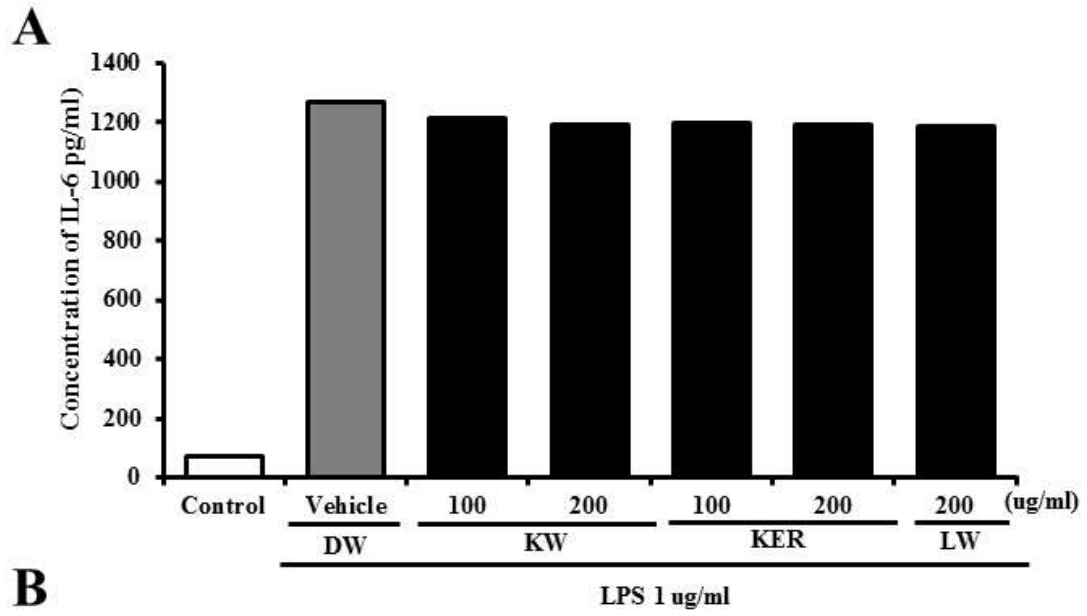


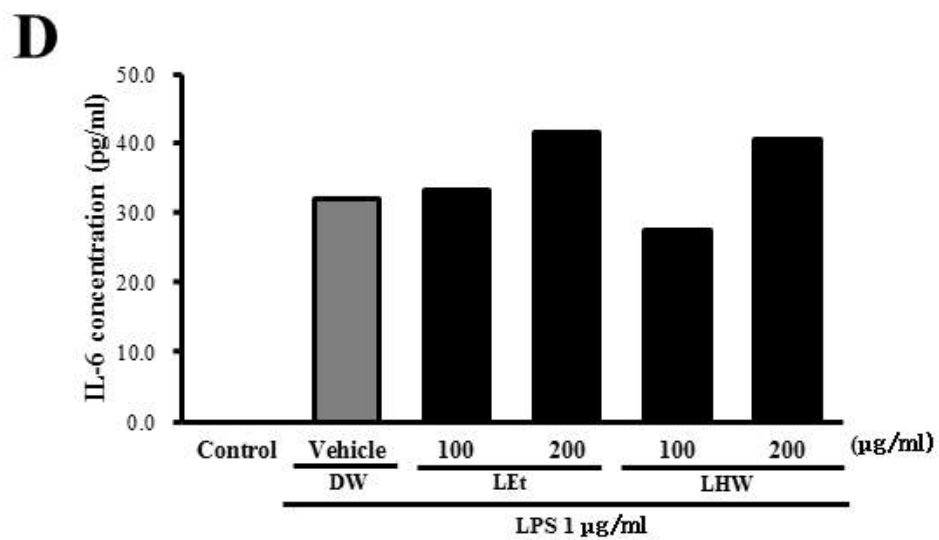
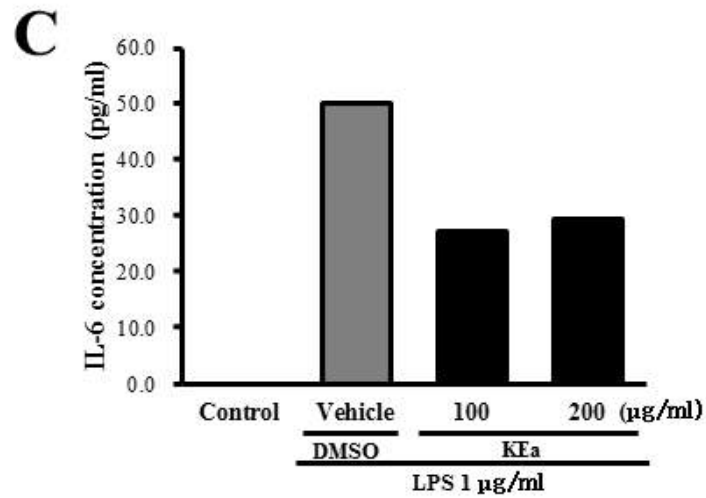
(나) 다양한 용매로부터 추출된 천문동이 염증 사이토카인(IL-6) 분비에 미치는 영향

천문동 열수 추출물(KW, LW), 에테르 추출물(KER), 에탄올 추출물(LE, LEt), 메탄올 추출물(LM), 에틸아세테이트 추출물(KEa) 및 양성 대조군으로서 도라지 열수추출물(LHW)이 자극이 유도된 대식세포주 및 소신경교세포주로부터 분비된 사이토카인의 분비량에 미치는 영향을 평가하기 위하여, 각 추출물을 100 µg/ml, 200 µg/ml의 농도로 2시간 선처리 후, Lipopolysaccharide (LPS) 1 µg/ml을 후처리하여 24시간 배양하였다. 배양 후 상층액을 취하여 IL-6 분비량을 IL-6 ELISA Kit (Mercodia)를 이용하여 측정하였다. 배양 후 배양액을 microcentrifuge tube에 회수하여 15,000 rpm에서 원심분리하여 침전시킨 후, 상층액을 IL-6 항체가 부착된 96 well plate의 각 well에 100 µl를 첨가하여 2시간 동안 실온에서 반응시켰다. 반응 후 용액 제거 및 세척과정을 실시하고, detection 항체를 100 µl씩 첨가하여 1시간 동안 실온에서 반응시켰다. IL-6와 항체를 결합시킨 후 용액 제거 및 세척과정을 실시하고, avidin HRP solution 100 µl를 첨가하여 30분 동안 실온에서 반응시켰다. 반응 후 용액 제거 및 세척과정을 실시하고, 100 µl의 substrate (TMB)을 첨가하여 20분 동안 실온에서 차광상태로 보관하여 반응시켰다. 그 후, 50 µl의 stop solution을 첨가하여 ELISA-reader (VERSA max, micro-reader, MDS. Co, USA,)를 이용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하였다. 그 결과, 대식세포주를 이용한 실험에서 KW, LW, KER, LE, LEt, LM 및 LHW 에서 LPS로 유도된 염증 사이토카인 양을 억제하는 추출물 및 농도는 나타나지 않았으나(Figure 3A, 3B, 3D), KEa 100, 200 µg/ml에서 두 배이상 염증을 억제하는 효과를 나타내었다(Figure 3C). 한편, 소신경교세포주를 이용한 실험에서 KW 및 KEa를 처리하였을 때 염증 사이토카인을 억제하는 효과는 나타나지 않았다(Figure 4A-B).

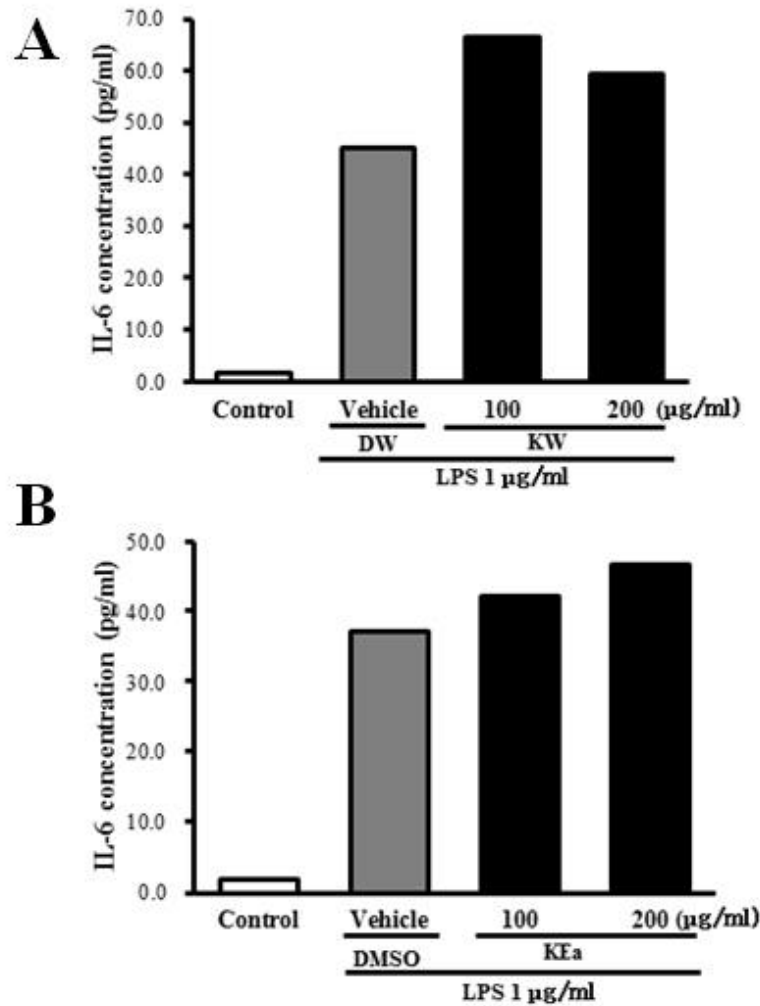
(다) 다양한 용매로부터 추출된 천문동이 Nitric oxide (NO) 생성에 미치는 영향

천문동 열수 추출물(KW, LW), 에테르 추출물(KER), 에탄올 추출물(LE, LEt), 메탄올 추출물(LM), 에틸아세테이트 추출물(KEa) 및 양성 대조군으로서 도라지 열수추출물(LHW)이 자극이 유도된 대식세포주의 NO 생성량에 미치는 영향을 평가하기 위하여, 각 추출물을 100 µg/ml, 200 µg/ml의 농도로 2시간 선처리 후, Lipopolysaccharide (LPS) 1 µg/ml을 후처리하여 24시간 배양하였다. 배양 후 상층액을 취하여 배양액 중에 존재하는 NO<sub>2</sub>의 양을 Griess 시약을 이용하여 측정하였다. 상층액을 96 well plate에 각각 100 µl 분주한 후 Griess reagent (1% sulfanilamide, 5% phosphoric acid, 0.1% N-(1-naphtyl) ethylenediamine dihydrochloride)을 100 µl 첨가하였다. 실온에서 10분간 반응시킨 후, ELISA-reader (VERSA max, micro-reader, MDS. Co, USA,)를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 그 결과, KW, KER 및 LEt 에서 농도별로 처리하였을 때 NO가 유의적으로 감소하는 농도는 나타나지 않았으며, LM 50 µg/ml에서 NO의 양이 유의적으로 증가하였다(Figure 5A-C). 반면, KEa, LEt, LHW는 LPS 처리로 인해 vehicle 그룹에 비하여





**Figure 3.** Determination of IL-6 concentration in cultured RAW264.7 cells. After collection of supernatants, the concentration of IL-6 was determined using a IL-6 ELISA kit that could detect IL-6 at 2 pg/mL. Data represent the means  $\pm$  SD of three replicates. a,  $p < 0.05$  compared to control group. b,  $p < 0.05$  compared to the vehicle group.



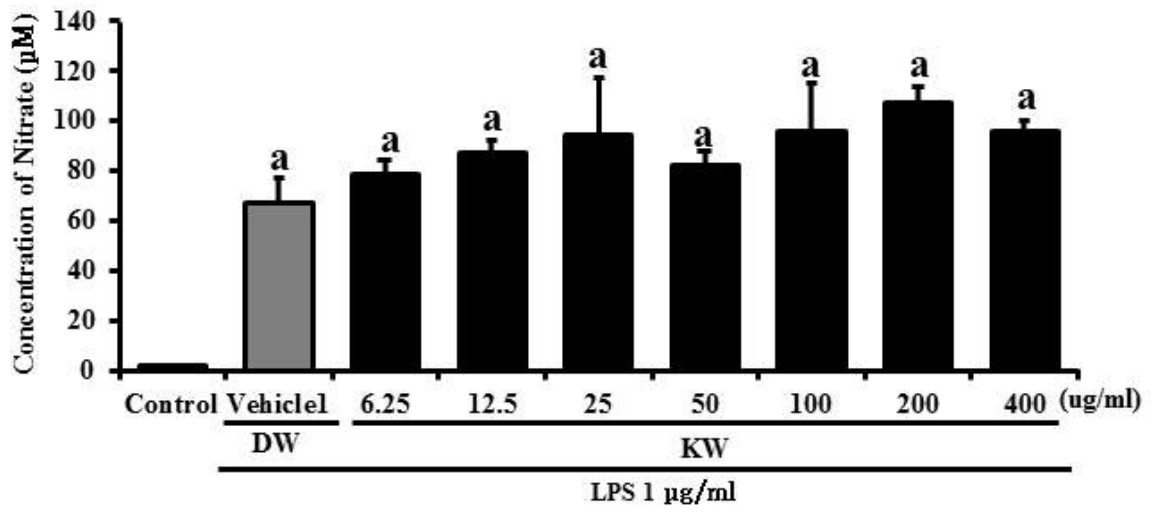
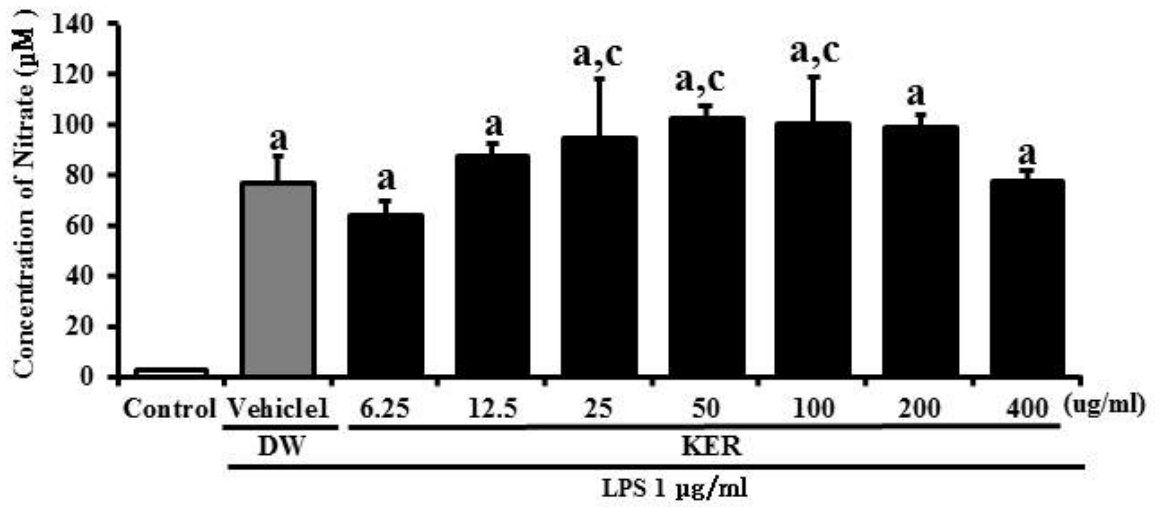
**Figure 4.** Determination of IL-6 concentration in cultured BV-2 cells. After collection of supernatants, the concentration of IL-6 was determined using a IL-6 ELISA kit that could detect IL-6 at 2 pg/mL. Data represent the means  $\pm$  SD of three replicates. a,  $p < 0.05$  compared to control group. b,  $p < 0.05$  compared to the vehicle group.

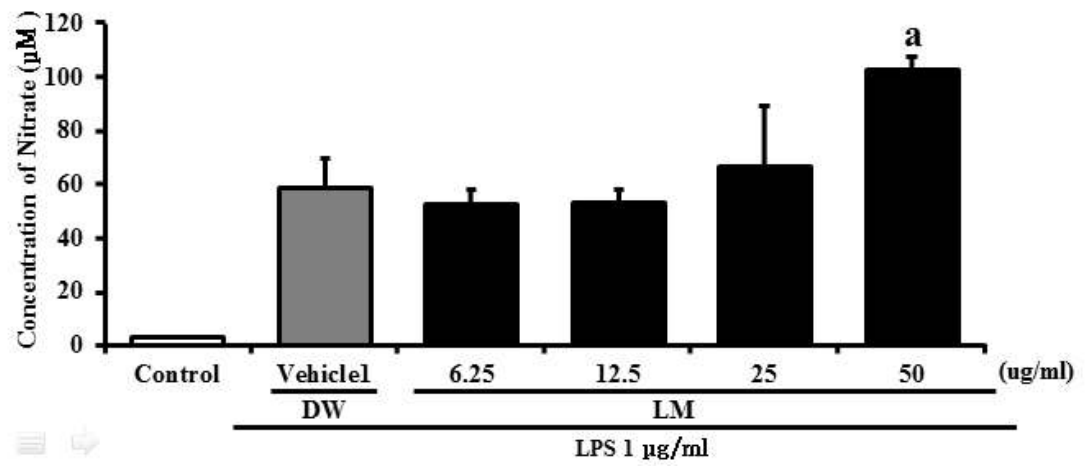
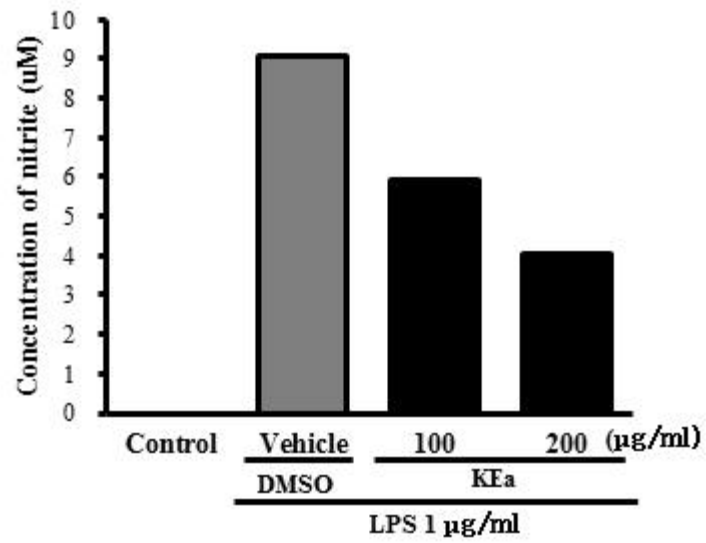
KEa 100  $\mu$ g/ml 및 200  $\mu$ g/ml에서 농도의존적으로 NO의 양이 감소하였으며, 양성대조군으로서 실험한 도라지 열수 추출물(LHW)보다 더욱 많이 감소하였다(Figure 5D-E).

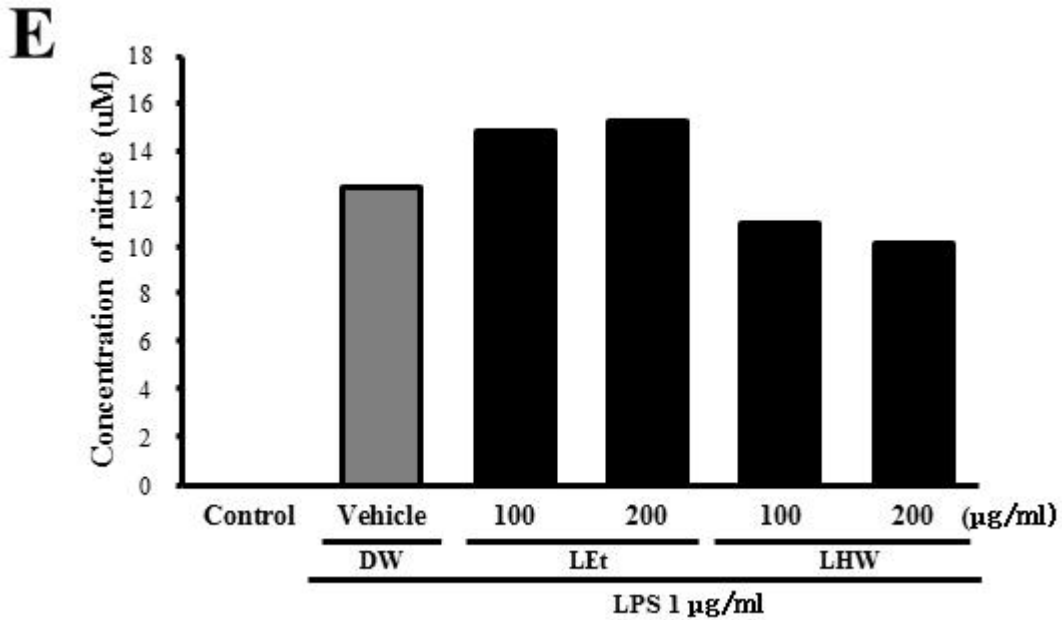
## (2) 질병의 발병기전에 미치는 영향분석

### (가) 다양한 용매로부터 추출된 천문동이 염증매개물질 생성에 미치는 효과

앞서 자극이 유도된 RAW264.7 세포주로부터 염증관련 사이토카인 분비량 및 염증을 일으키는 nitric oxide의 생성량을 억제시키는 추출물을 선별하여, 염증매개물질 유전자 발현에 미치는 영향을 분석하였다. 각각의 천문동 추출물을 2시간 선처리 및 LPS 후처리 후 24

**A****B**

**C****D**



**Figure 5.** Determination of NO production in cultured RAW264.7 cells. After collection of supernatants, nitrite concentration was determined by Griess assay. Data represent the means SD of three replicates. a,  $p < 0.05$  compared to control group. b,  $p < 0.05$  compared to the vehicle group.

시간 배양한 RAW264.7 세포에서 RNA를 분리하여 RT-PCR을 실시하였다. 세포주로부터 배지를 모두 제거한 후 RNeasy (Qiagen, 74104)를 이용하여 세포로부터 RNA를 추출하였다. RNeasy 추출물에 포함된 단백질은 chloroform을 이용하여 추출한 후 isopropanol을 이용하여 RNA를 침전시켜 수확하였다. 분리된 전체 RNA는 260 nm 흡광도에서 양을 측정하고, 5 µg을 RT반응에 사용하였다. RT반응은 먼저 3-5 µg의 RNA에 0.5 µg의 oligo dT (Invitrogen, 18418-012)를 처리하고, 70°C에서 10분 동안 반응하여 oligo dT를 RNA에 결합시켰다. 여기에 5X 완충용액, 10 mM dNTP, 0.1 M DTT, Superscript II (Invitrogen, 18064-014, 200 U/µl)를 첨가하여 실온에서 10분 동안 방치 후 42°C에서 50분 동안 RT반응을 수행하였다. RT반응이 끝나면 RNaseH (Invitrogen, 18021-071)를 3.2 U/µl 처리하여 37°C에서 20분 동안 반응하여 RNA를 분해하였다. 합성된 cDNA를 주형으로 94°C (30 sec), 62°C (30 sec), 72°C (42 sec) 30cycle로 IL-10 특이적 서열 (sense primer: 5'-cca agc ctt atc gga aat ga-3' 5'-CCA AGC CTT ATC GGA AAT GA-3', anti-sense primer: 3'-TTT TCA CAG GGG AGA AAT CG-5'), 94°C (30 sec), 62°C (30 sec), 72°C (42 sec) 28cycle로 TNF-α 특이적 서열 (sense primer: 5'-TTG ACC TCA GCG CGG ACT TG-3', anti-sense primer: 3'-CCT GTA GCC CAC GTC GTA GC-5'), 94°C (30 sec), 62°C (30 sec), 72°C (45sec) 30cycle로 iNOS 특이적 서열 (sense primer: 5'-TTG TGT TGG AGG TGA CCA TGG AGC-3', anti-sense primer: 3'-CCT GTC TCA GTA GCA AAG AGG ACT G-5')과 actin 특이적 서열 (sense

primer:5'-GTG GGG CGC CCC AGG CAC CAG GGC-3', anti-sense primer: 5'-CTC CTT AAT GCT ACG CAC GAT TTC-3')을 이용하여 PCR을 실시하였다. 증폭된 유전자는 1% agarose gel에서 전기영동을 실시한 후 UV에서 관찰하였다. 그 결과, KEr 200 µg/ml의 농도에서 TNF-α의 발현이 유의적으로 감소하였으며(Figure 6B), iNOS의 경우 KEr 100 µg/ml 및 200 µg/ml 농도에서 모두 감소함을 관찰하였다(Figure 6C). 한편, IL-10은 KEr에서 염증 감소효과가 유의적으로 나타나지 않았으나 KW 100 µg/ml의 농도에서 유의적으로 감소함을 나타내었다(Figure 6D). 따라서 이러한 결과는 천문동 추출물이 염증매개물질의 생성을 저해하며 이는 추출물의 용매에 따라 각기 다른 사이토카인의 생성을 저해함으로써 염증반응을 억제시킬 수 있는 가능성을 시사하고 있다.

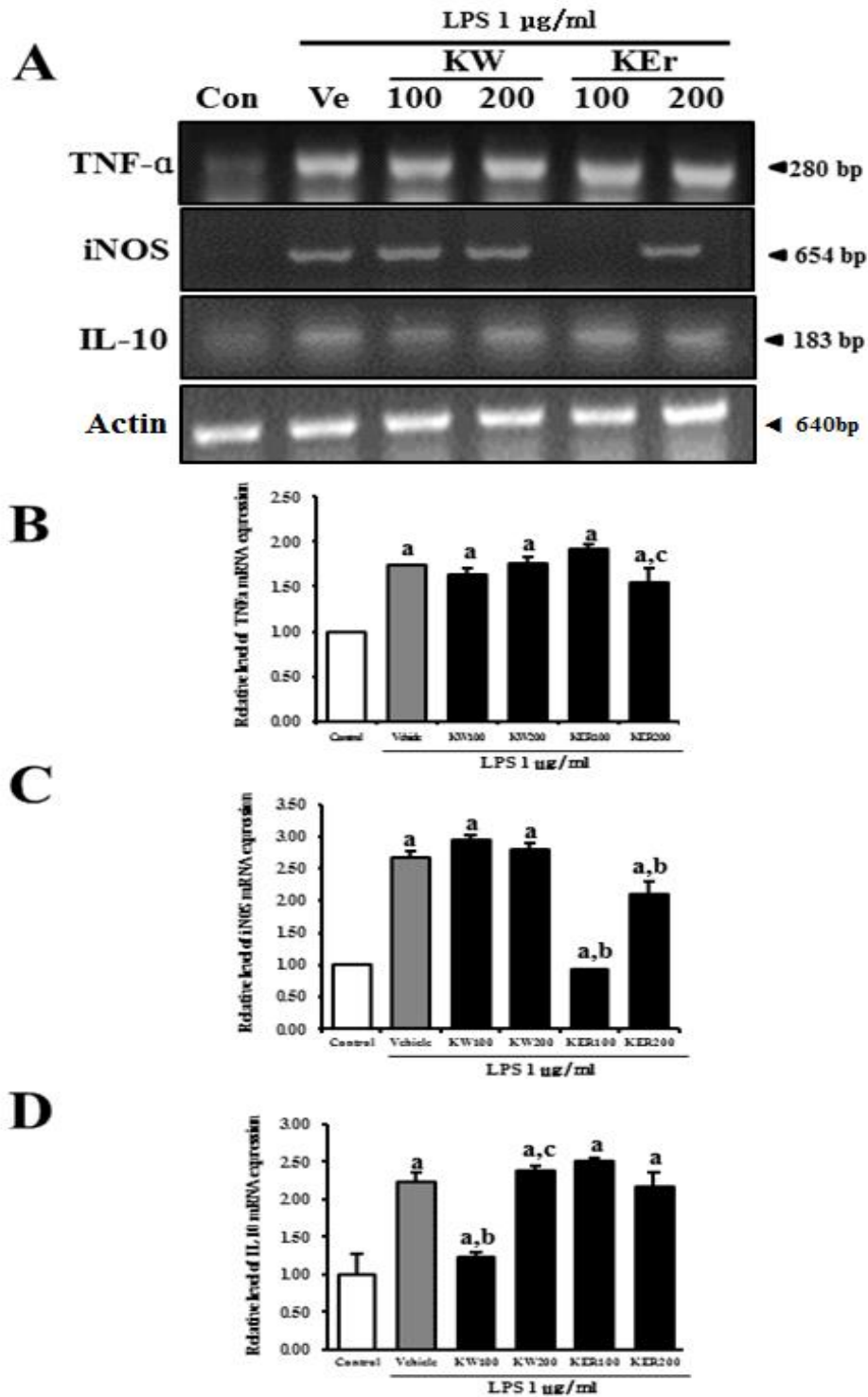
(나) 다양한 용매로부터 추출된 천문동이 MAPK signaling에 미치는 효과

세포는 다양한 자극을 통해 세포 내 신호전달 경로를 거치게 되며 그 중 성장인자 및 스트레스 등에 의해 조절되는 수용체로 활성화되는 MAPK는 MAPK/ERK, SAPK/JNK, p38MAPK 등으로 크게 분류하고 있다. MAPK signaling은 복잡하게 연계된 단백질인 산화효소 캐스케이드(자극>MAPKKK>MAPKK>MAPK>반응)을 통하여 다양한 표적 유전자의 발현을 조절하는데, 성장인자에 의해 활성화되는 ERK 경로는 주로 세포의 분화 및 증식을 조절하며 스트레스, 사이토카인등에 의해 활성화 되는 JNK와 p38 경로는 세포 사멸, 세포 증식, 분화 과정을 조절하는데 중요한 역할을 한다고 알려져 있다.

Vehicle(dH<sub>2</sub>O)과 천문동 열수 추출물, 에테르 추출물을 2시간 선처리후 LPS를 후처리하여 24시간 배양한 세포에 PRO-PREP Protein Extraction Solution (iNtRON Biotechnology, Korea)을 첨가하여 추출한 후 13,000 rpm에서 5분 동안 원심분리하여 단백질을 분리하였다. 분리된 단백질의 농도는 SMARTTM BCA Protein Assay Kit (iNtRON Biotechnology)을 이용하여 정량하였으며, 50-100 mg의 단백질을 western blot에 사용하였다. 먼저, 4-20% SDS-PAGE gel에 단백질을 전기영동한 후 Enhanced Chemiluminescence (ECL) membrane (Amersham Life Science, Piscataway, NJ)에 전이하고, 5% skim milk에서 1시간 동안 블로킹하였다. 각 membrane은 anti-ERK (Santa Cruz Biotechnology, Inc.), anti-p-ERK (Santa Cruz Biotechnology, Inc.), anti-JNK Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA), anti-p-JNK (Cell Signaling Technology), anti-p38 (Cell Signaling Technology), anti-p-p38 (Cell Signaling Technology), anti-actin (Sigma-Aldrich Co.)등의 1차 항체로 4℃에서 밤새 배양한 후 HRP-conjugated된 secondary 항체를 첨가하여 ECL Kit (Amersham Life Science, Piscataway, NJ)를 이용하여 발현을 확인하였다.

그 결과, ERK의 활성화는 천문동 열수 및 에테르 추출물을 처리함으로써 저해되었으나 KEr 200 µg/ml 농도에서 정상수준으로 회복됨을 나타내었으며(Figure 7B), p38은 LPS로 염증반응을 유도하였을 때 증가하였으나 천문동 추출물을 처리함으로써 정상수준으로 회복

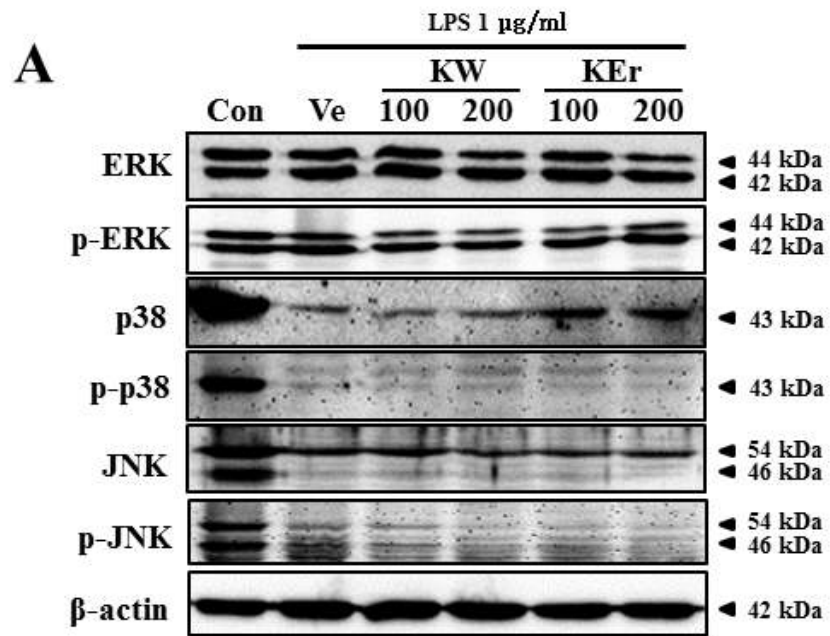


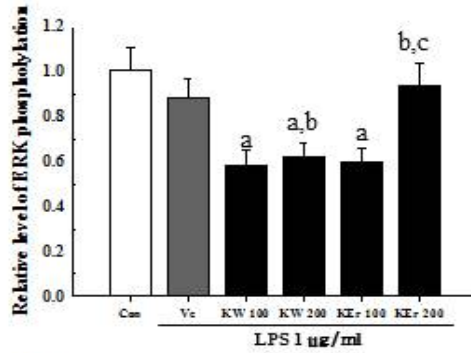
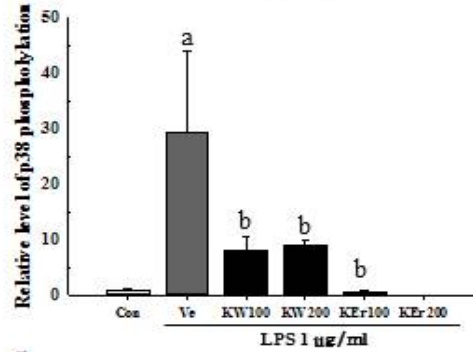
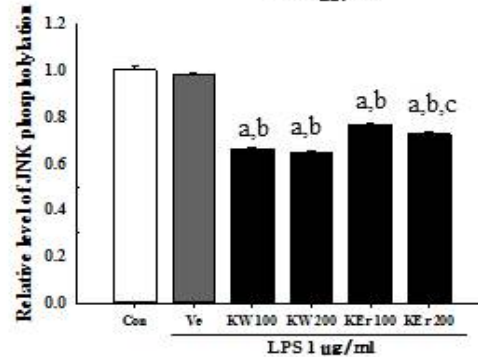


**Figure 6.** IL-10, TNF- $\alpha$ , iNOS expression of RAW264.7 cells. The  $\beta$ -actin signal was used as the endogenous control, and the transcript (650-bp) indicates the RNA loading. Data represent the means SD of three replicates. a,  $p < 0.05$  compared to control group. b,  $p < 0.05$  compared to the vehicle group.

됨을 나타내었다. 특히, ERK와 마찬가지로 KEr 200  $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 정상수준으로 회복하였다(Figure 7C). 한편, JNK는 천문동의 처리로 활성이 감소하였다(Figure 7D). 따라서 이러

한 결과는 천문동의 처리가 ERK 경로 및 p38 경로를 통하여 활성을 억제하여 MAPK signaling에 영향을 미침을 제시하고 있다.



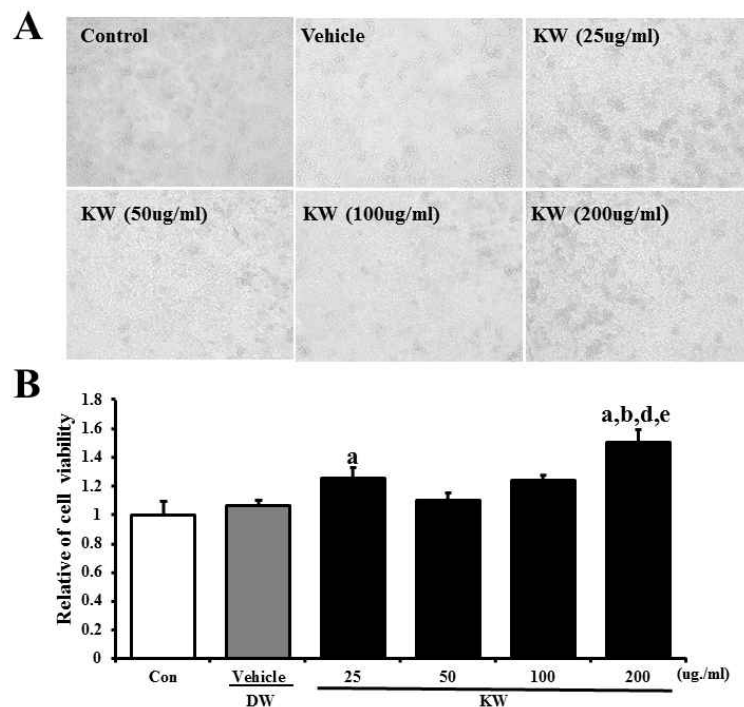
**B****C****D**

**Figure 7.** Analysis of the MAP kinase signaling pathway. The intensity of each band was determined using an imaging densitometer and the relative level of each protein was calculated based on the intensity of actin protein as an endogenous control. Data represent the means  $\pm$  SD of three replicates. a,  $p < 0.05$  compared to control group. b,  $p < 0.05$  compared to the vehicle group.

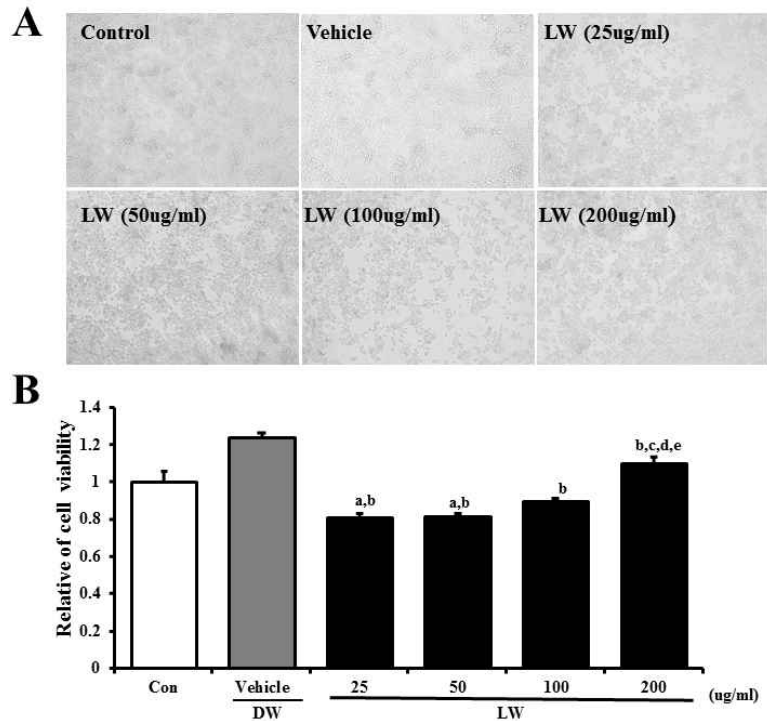
### (3) 각 세포주에 미치는 독성평가

다양한 용매로부터 추출된 천문동 추출물이 RAW264.7 세포주의 생존율에 미치는 영향을 평가하기 위하여, RAW264.7 세포주에 각각의 추출물을 25, 50, 100, 200  $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 24시간 처리한 후 세포생존율을 측정하였다. 세포 생존율은 MTT (3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diohenyl tetrazolium bromide, Sigma chemical Co. USA)방법을 통하여 분석하였다. MTT는 살아있는 세포 내 미토콘드리아 내막에 존재하는 oxido-reductase의 효소 작용에 의해 환원되어 보라색의 formazan을 형성하게 되는데, 용해액 내 보라색 formazan의 발색정도를 흡광도로 측정함으로써 세포 생존율을 예측하는 실험방법으로 이용되고 있다. 먼저 RAW264.7 cell을 96 well ( $5 \times 10^4$  cells/well)에 분주하

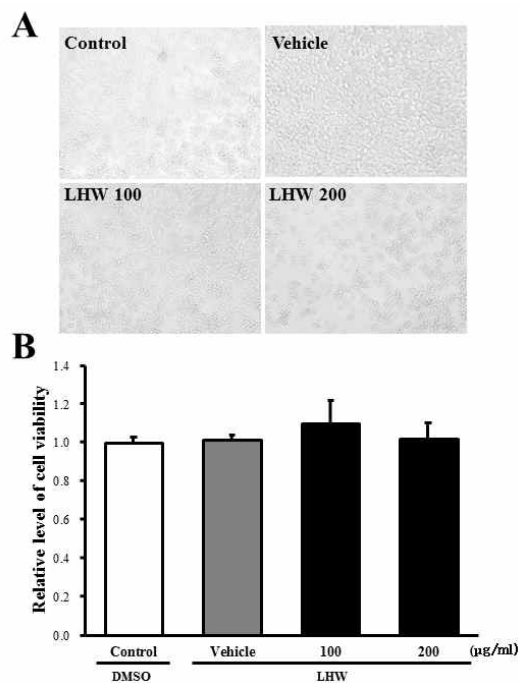
여 24시간 배양한 뒤, Vehicle (dH<sub>2</sub>O, DMSO), 천문동 열수 추출물(KW, LW), 에테르 추출물(KER), 에탄올 추출물(LE, LEt), 메탄올 추출물(LM), 에틸아세테이트 추출물(KEa)을 농도별로 처리하고, 24시간 동안 배양하였다. 배양용 배지를 제거하고, 새 배지 200 $\mu$ l와 MTT용액을 50  $\mu$ l 첨가한 뒤, 4시간 동안 추가 배양하였다. 세포 내에 보라색 결정이 생성되면 well 내의 용액을 제거하고 Dimethyl sulphoxide (DMSO, Sigma Co.) 용액을 150  $\mu$ l씩 넣어 formazan을 녹였다. 각 well에 나타난 색깔의 변화를 ELISA-reader (VERSA max, micro-reader, MDS. Co, USA)를 이용하여 570 nm에서 측정하였다. 그 결과, KW 25, 100  $\mu$ g/ml에서 세포의 활성도가 증가하였으며(Figure 8), LW에서는 물질의 처리로 활성도가 다소 감소하였으나 200  $\mu$ g/ml 고농도에서 정상수준으로 증가하였다(Figure 9). 또한, KER의 처리는 농도의존적으로 세포 활성도를 증가시켰다(Figure 10), 나머지 추출물질인 LE, LM, KEa, LEt, LHW는 물질의 처리로 인해 세포의 활성도에 유의적인 변화가 나타나지 않았으므로 추출물의 처리가 RAW264.7 세포주에 독성을 나타내지 않음을 제시하고 있다(Figure 11-15).



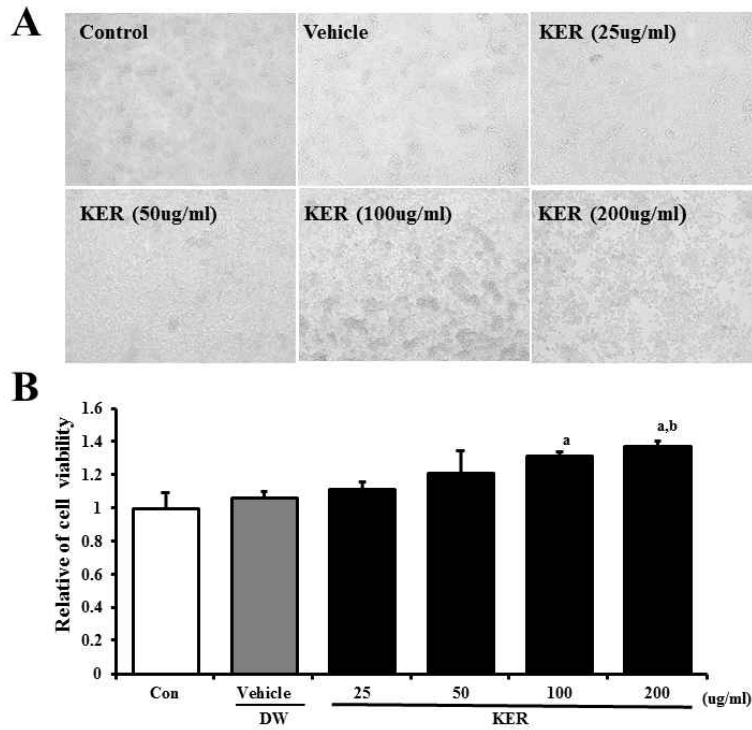
**Figure 8.** Effects of extraction of *A. cochinchinensis* (KW) on cytotoxicity in RAW264.7 cells. Cells were cultured with one of seven different extracts and their viability was measured via MTT assays. Data represent the means SD of three replicates. a,  $p < 0.05$  compared to control group. b,  $p < 0.05$  compared to the vehicle group.



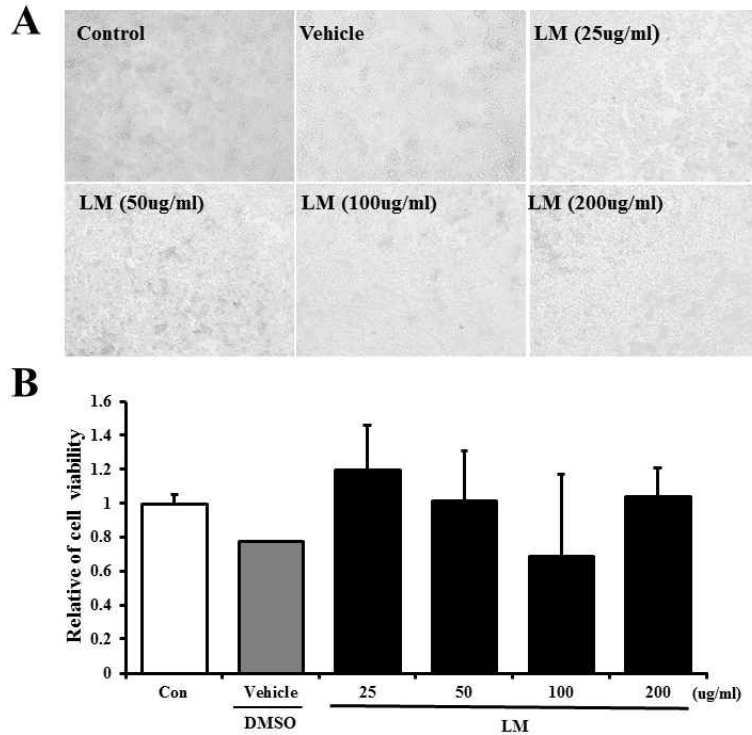
**Figure 9.** Effects of extraction of *A. cochinchinensis* (LW) on cytotoxicity in RAW264.7 cells. Cells were cultured with one of seven different extracts and their viability was measured via MTT assays. Data represent the means SD of three replicates. a,  $p < 0.05$  compared to control group. b,  $p < 0.05$  compared to the vehicle group.



**Figure 15.** Effects of extraction of *A. cochinchinensis* (LHW) on cytotoxicity in RAW264.7 cells. Cells were cultured with one of seven different extracts and their viability was measured via MTT assays. Data represent the means of three replicates. a,  $p < 0.05$  compared to control group. b,  $p < 0.05$  compared to the vehicle group.



**Figure 10.** Effects of extraction of *A. cochinchinensis* (KER) on cytotoxicity in RAW264.7 cells. Cells were cultured with one of seven different extracts and their viability was measured via MTT assays. Data represent the means SD of three replicates. a,  $p < 0.05$  compared to control group. b,  $p < 0.05$  compared to the vehicle group.



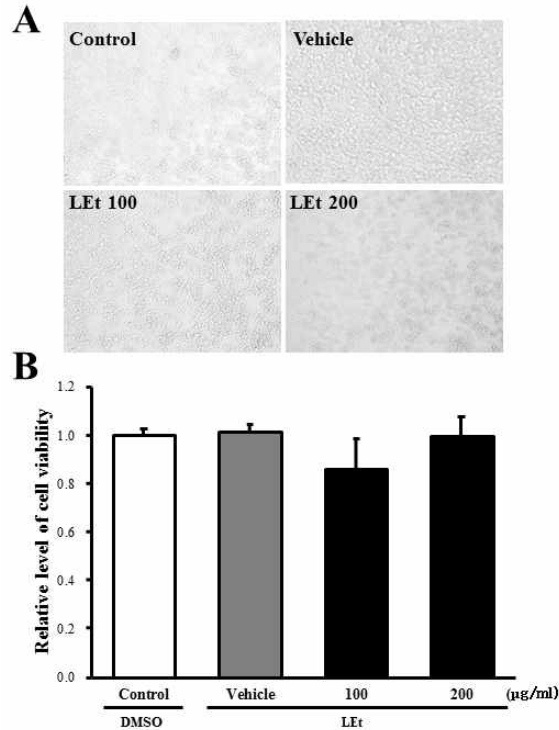
**Figure 11.** Effects of extraction of *A. cochinchinensis* (LM) on cytotoxicity in RAW264.7 cells. Cells were cultured with one of seven different extracts and their viability was measured via MTT assays. Data represent the means SD of three replicates. a,  $p < 0.05$  compared to control group. b,  $p < 0.05$  compared to the vehicle group.

## 2. 모델동물을 이용한 천문동의 생리활성 및 기능성 분석

### 가. 효능분석을 위한 모델동물 확립

#### (1) 호흡기질환 모델동물의 확보

호흡기질환에 대한 천문동의 완화 효능을 확인하기에 앞서, 천식유발동물을 확립하고자 호흡기질환 모델동물을 생산하였다. 본 실험은 부산대학교 동물실험윤리위원회에서 윤리성과 과학성에 대한 심사를 거쳐 승인번호 PNU-2015-0779를 받고 실험을 실시하였다. 실험에서 사용한 동물은 샘타코(Osan, Korea)로부터 천식실험에 흔히 사용되는 Balb/c (6주령, 암컷)를 구입하여 실험에 사용하였다. 물과 사료(Purina corn., Seongnam, Korea)는 자유급식하였고, 모든 동물은 12시간의 조명주기(08:00~20:00)로 specified pathogen-free (SPF) 상태에서 온도  $22 \pm 1^\circ\text{C}$ , 상대습도  $50 \pm 5\%$ 의 조건으로 관리되고, 국제실험동물인증협회(AAALAC international, 인증번호: 001525)의 인증을 획득한 부산대학교 청정실험동물센터에서 사육하였다.



**Figure 13.** Effects of extraction of *A. cochinchinensis* (LEt) on cytotoxicity in RAW264.7 cells. Cells were cultured with one of seven different extracts and their viability was measured via MTT assays. Data represent the means SD of three replicates. a,  $p < 0.05$  compared to control group. b,  $p < 0.05$  compared to the vehicle group.

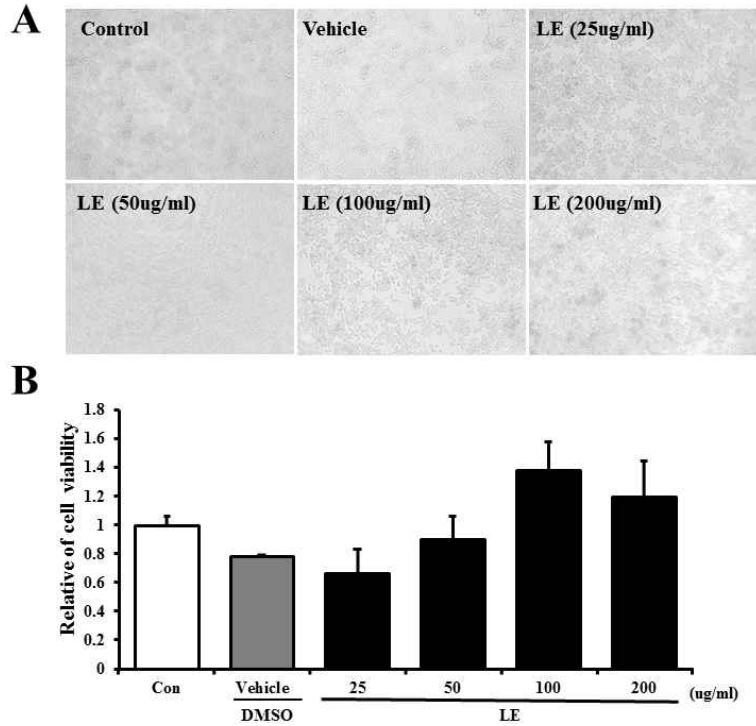
(가) 실험동물

천문동 추출물이 호흡기질환에 미치는 영향을 평가하기에 앞서, 호흡기질환 유발 동물을 확립하기 위하여 Balb/c 마우스를 실험에 사용하였다. 실험에 사용된 실험동물은 specified pathogen-free (SPF) 상태의 female Balb/c 마우스(6주령)로서 샘타코(Osan, Korea)에서 구매하여 사용하였다. 모든 마우스는 방사선이 조사된 사료(Purina Com., Seongnam, Korea)를 자유급식 하도록 하였고, 12시간의 조명주기(08:00~20:00)로 SPF 상태인 부산대학교 청정실험동물센터(온도  $22 \pm 1^\circ\text{C}$ , 상대습도  $50 \pm 5\%$ )에서 사육하였다(Figure 16).



**Figure 16.** Image of Balb/c mice



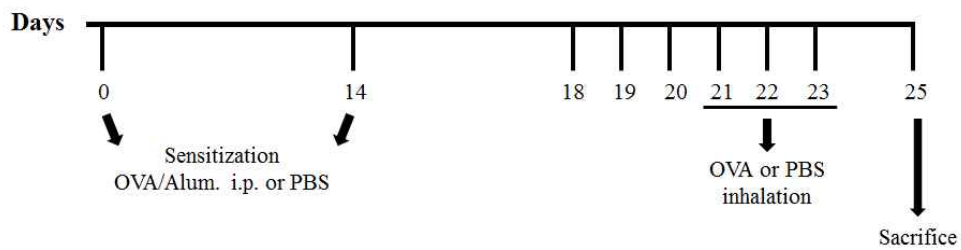


**Figure 12.** Effects of extraction of *A. cochinchinensis* (LE) on cytotoxicity in RAW264.7 cells. Cells were cultured with one of seven different extracts and their viability was measured via MTT assays. Data represent the means SD of three replicates. a,  $p < 0.05$  compared to control group. b,  $p < 0.05$  compared to the vehicle group.

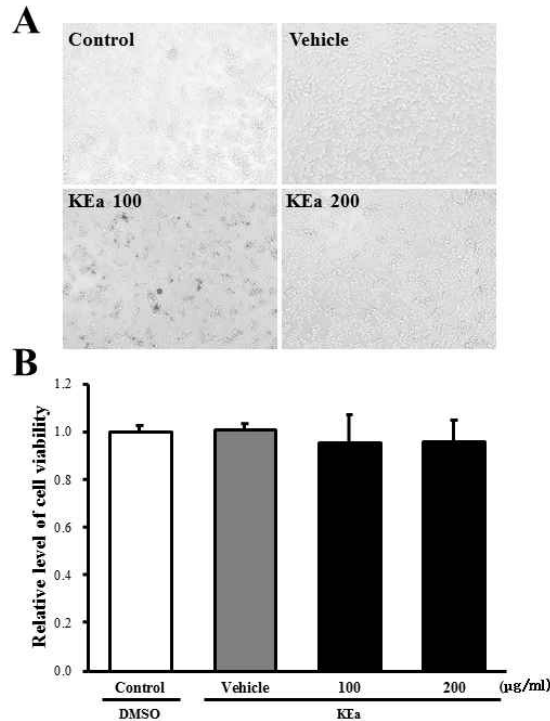
(나) 호흡기질환 유도기법 확립

○ 호흡기질환 유도스케줄 확립

호흡기질환을 유도하기 위해 먼저 실험동물을 No그룹, Low OVA그룹, Hig OVA그룹으로 분류하고(Table 2), Figure 17에서 제시된 바와 같이 실험을 실시하였다.



**Figure 17.** Experimental schedule for induction of respiratory disease.



**Figure 14.** Effects of extraction of *A. cochinchinensis* (KEa) on cytotoxicity in RAW264.7 cells. Cells were cultured with one of seven different extracts and their viability was measured via MTT assays. Data represent the means SD of three replicates. a,  $p < 0.05$  compared to control group. b,  $p < 0.05$  compared to the vehicle group.

**Table 2.** Experimental groups.

Group	물질 처리
No	PBS를 I.P. & Inhalation
Low OVA	20 ug OVA를 I.P. & 1% OVA Inhalation
High OVA	40 ug OVA를 I.P. & 2% OVA Inhalation

○ 호흡기 질환의 유도기법 확립

[Sensitization] : 호흡기질환을 유발시키기 위하여 알레르겐인 ovalbumin (OVA, 계란흰자단백질)을 사용하였다. 1주일간의 순화기간을 거친 후, 급성 호흡기질환을 유발하기 위해 PBS (200µl, pH 7.4)에 20 µg Ovalbumin (OVA)과 2 mg aluminum hydroxide (Alum)를 녹인 용액을 0일과 14일에 두 차례 마우스에 i.p 하여 sensitization시켰다. No그룹의 경우 PBS를 동일하게 처리하였다. 실험에 사용된 aluminum hydroxide은 면역증강제로서 ovalbumin에 대한 면역반응을 증가시키기 위해 함께 섞어 사용하였다.

[Inhalation] Sensitization 이후, 21일부터 23일까지 3일간 2% OVA 용액으로 inhalation 시켜 호흡기질환을 유발하였다. 먼저 chamber에 마우스를 넣고, 네블라이저 (오프론 NE-C28, 0.25ml/분)를 사용하여 2% ovalbumin을 aerosol화하여 30분간 마우스를 노출시

켰다. No 그룹의 경우, PBS를 동일 조건에서 inhalation 시켰다(Figure 18).

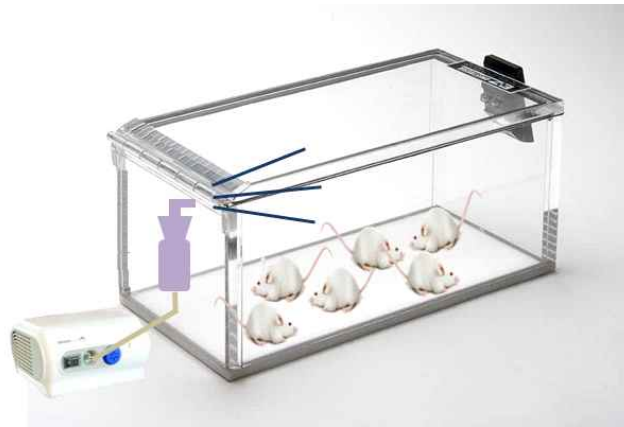


Figure 18. Device for inhalation.

(다) 호흡기질환 유도확인(최적 OVA농도의 설정)

○ 기관지 세척액(bronchoalveolar lavage fluid, BAL fluid) 내 총 세포수 측정

25일에 마취시킨 후, 기도를 통해 PBS를 넣고 다시 채취하여 기관지 세척액을 획득하였다. 이를 원심분리 (2000 xg, 10분) 하여, 상층액은 이후 분석을 위해 -70도 냉장고에 보관하고 펠렛은 PBS에 희석하여 총 세포수를 hemacytometer로 측정하였다(Figure 19).

그 결과, No 그룹과 Low OVA 그룹을 비교해 보았을 때, No 그룹의 총 세포수에 비하여 Low OVA 그룹의 총 세포수가 증가함을 확인하였다. 이와 같은 결과를 통해 Low OVA 농도에서 기관지 내의 세포의 수가 증가하며(Figure 20), 이는 확립한 호흡기질환 유발 기법을 통해 정상적으로 호흡기질환이 유발되었음을 시사한다.

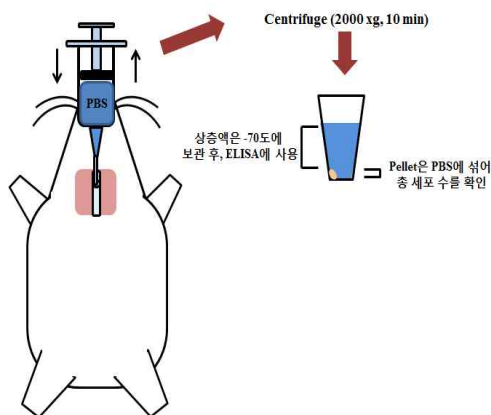


Figure 19. Scheme of collection for BALF

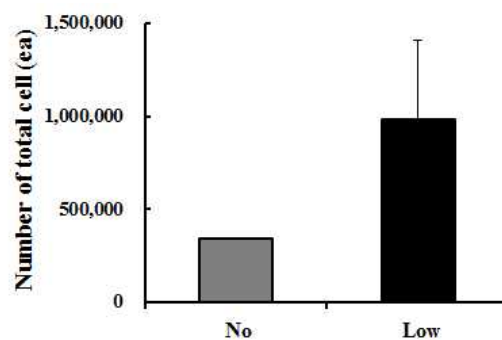


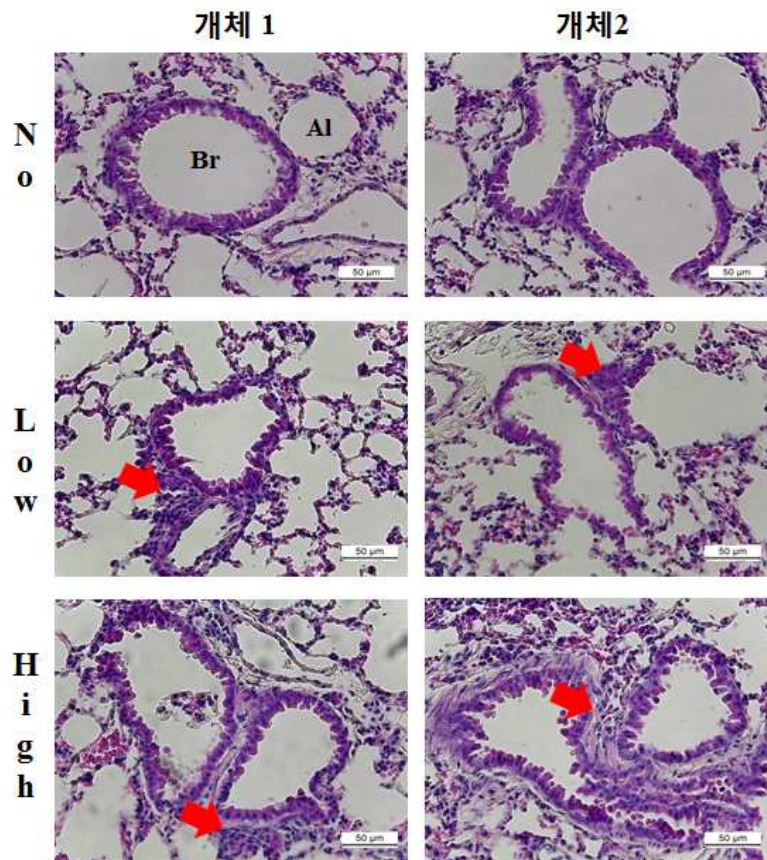
Figure 20. Total cell number in BALF

○ 조직학적 분석

기관지 세척액을 얻은 폐조직은 10% 포르말린으로 48시간이상 고정한 뒤, 폐의 오른쪽 가장 큰 엽을 절단하여 카세트에 넣었다. 카세트에 담긴 조직은 조직처리기를 이용해서 70,

80, 90, 95, 100% alcohol에 각각 1, 1, 1, 3, 3시간씩 처리하고, xylene으로 3시간 처리하였다. 이후 파라핀으로 포매하여 블록을 만들고, -20℃에서 24시간 보관한 뒤 Leica microtome (Leica Microsystems, Bannockburn, IL, USA)을 사용하여 4 μm로 박절하였다. 조직 슬라이드는 xylene으로 탈파라핀(deparaffin)하고, alcohol으로 탈수(dehydration)한 후, hematoxylin과 eosin (H&E)으로 염색하고 광학현미경(Leica Microsystems, Wetzlar, Germany)으로 조직을 관찰하였다.

그 결과, No 그룹에 비하여 Low OVA 그룹과 High OVA 그룹의 세포수가 증가한 것을 관찰할 수 있었으며, 기관지 주변으로 세포가 몰려 있는 것을 확인하였다. 또한 Low 그룹에 비하여 High 그룹의 세포수 또한 증가하였다(Figure 21). 이는 호흡기 질환이 유발되었을 때 기관지 주변에 염증세포가 많아진다는 기존의 연구결과에 부합하는 결과로써, Low 그룹과 High 그룹 모두에서 천식이 유발되었으며 확립한 호흡기질환 유발 기법을 통해 정상적으로 호흡기질환이 유발되었음을 시사한다.



**Figure 21.** Histological structure of lung in balb/c mice after inhalation.

○ 혈청 내 IgE 양 확인

복대정맥으로부터 혈액을 채취하고 혈청 분리 튜브에 넣은 후 원심분리하여 혈청을 분리하였다. 혈청 내 IgE의 농도는 ELISA kit를 이용하여 권장방법에 따라 측정하였다. 먼저, 포

획항체(capture antibodies)를 immunoplate에 분주하여 실온에서 1시간동안 부착시키고, 미 부착된 항체는 세척용액(washing solution, 50 mM tris, 0.14 M NaCl, 0.05% Tween 20, pH 8.0)으로 3번 세척하여 제거하였다. 포획항체가 결합된 immunoplate의 각 well에 마우스로부터 분리된 혈청과 희석된 표준 IgE (standard IgE)를 첨가하여, 1시간동안 결합시킨 뒤, 미 부착된 용액을 제거하고, 고추냉이 과산화효소(horseradish peroxidase)가 결합된 항체를 첨가하였다. 최종적으로 기질용액(substrate solution)을 첨가하고 어두운 실온에서 30분간 배양하여 반응을

유도한 후 2M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>용액을 첨가해서 반응을 정지시켰다. 반응 결과는 Microplate Reader (Molecular Device Co., Sunnyvale, CA, USA)를 이용하여 450 nm에서 확인하였다.

그 결과, No 그룹에 비해 low OVA 그룹과 High OVA 그룹에서 더 높은 값의 IgE 농도를 나타냄을 확인하였다. IgE는 Th2 cell이 관여하는 다양한 염증반응에 중요한 지표이므로 IgE의 값의 증가는 Low OVA와 High OVA 농도에서 정상적으로 호흡기질환이 유발되었음을 제시하고 있다(Figure 22). 이러한 실험을 통해 OVA의 최적농도는 20 ug으로 설정하였다.

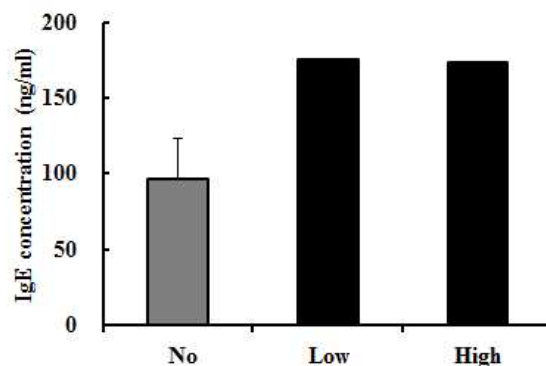


Figure 22. IgE concentration in blood serum.

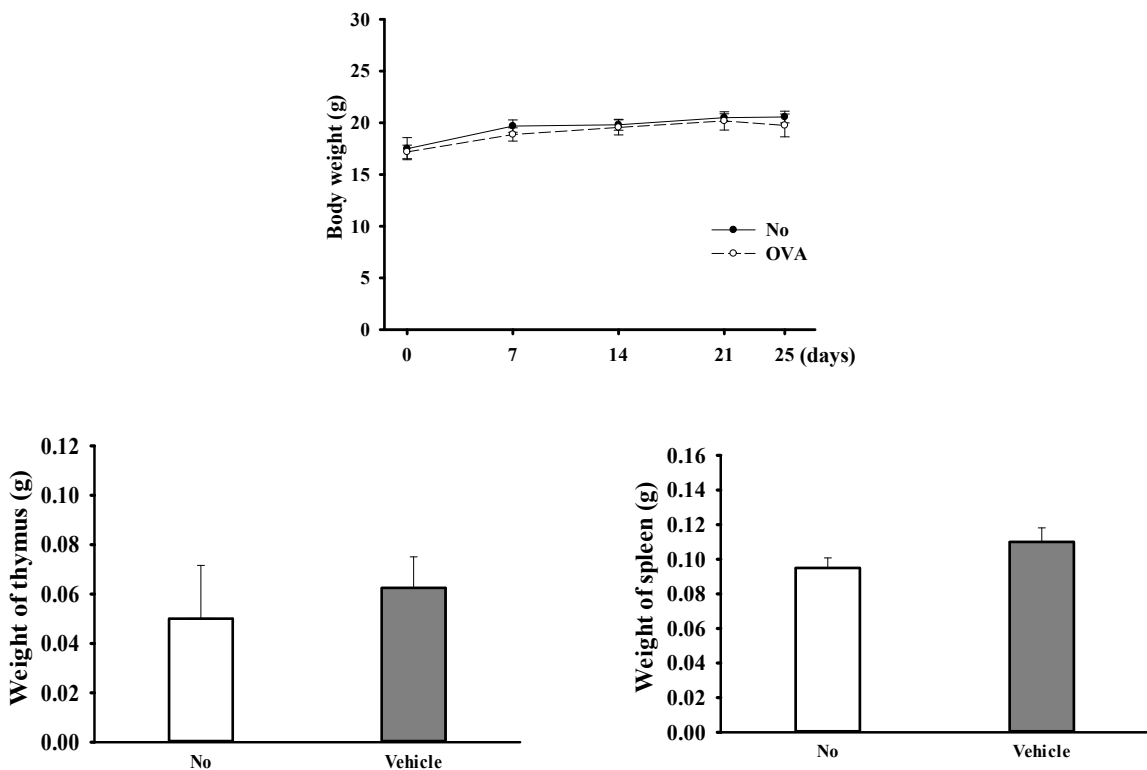
## (2) 모델동물의 대량생산 및 기초생리자료 확보

### (가) 호흡기모델동물 대량생산

이전 실험에서 확립된 OVA의 최적농도(20 ug)를 바탕으로 sensitization과 inhalation스케줄에 따라 모델동물을 대량생산하였다. 천문동의 효능평가를 위해서는 군당 7마리의 모델동물이 필요하며, 4개군에 총 28-30마리를 한번에 대량생산하여 효능평가를 수행하였다.

### (나) 체중 및 장기의 무게

No그룹과 OVA처리에 의한 체중 및 면역장기 무게의 변화를 비교하기 위하여, 일주일 간격으로 체중을 측정하였다. 그 결과, 실험 종료시까지 두 그룹간의 유의적인 차이를 보이지 않았으며, 두 그룹 모두 점진적으로 체중이 증가하는 양상을 보였다. 한편, Spleen의 무게를 측정한 결과, No 그룹과 비교하였을 때 OVA 처리 그룹에서 유의적으로 증가하는 양상을 보였다(Figure 23). 마찬가지로 Thymus를 측정한 결과에서도 No 그룹과 비교하였을 때 OVA 처리 그룹에서 유의적으로 증가하는 양상을 보였다(Figure 2). 이러한 결과는 OVA처리가 독성을 나타내지는 않으나, 체내 면역반응을 유발하여 면역장기의 무게를 증가시킴을 보여준다.

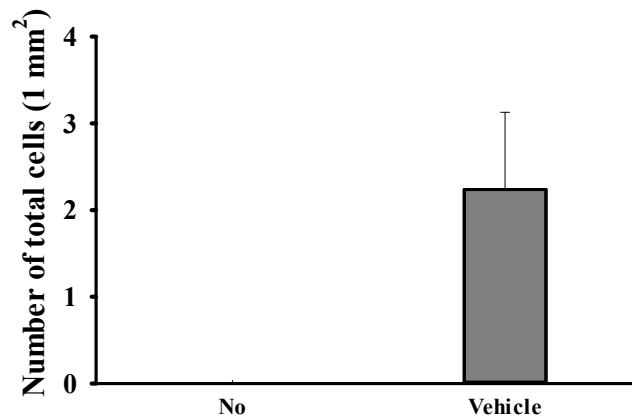


**Figure 23.** Measurement of body weight and organ weight. The body weights of all mice were measured throughout the experimental period. Following final treatment, mice from each group were sacrificed under anesthesia, after which spleen and thymus were harvested and weighed.

(다) 기관지 세척액 내 total cell의 수 측정

기관지 세척액 내 총 세포의 수를 확인하기 위하여, 기관지 세척술을 실시하였다. 마지막 OVA 흡입 후, 48시간 뒤인 25일째 날에 알팍산(Alfaxalone®, careside, Jurox Pty Ltd, Australia)으로 마취시킨 후, 기도부분을 절개하여 카테터를 삽관하고, 봉합사를 사용하여 카테터를 기관지에 고정시켰다. 이후 0.6 ml의 차가운 PBS (pH 7.4)를 삽입하고 회수하여 기

기관지 세척액을 얻었다(수율 80%). 수확된 기관지 세척액은 원심분리 (2000 xg, 10분) 하여, 상층액과 세포를 분리 시켰고, 상층액은 이후 분석을 위하여 -70도 냉장고에 보관하고 펠렛은 PBS에 희석하여 총 세포수 측정에 사용하였다. 총 세포수 측정은 Trypan blue를 사용하여 hemacytometer로 측정하였다. 그 결과, No 그룹과 비교하였을 때, OVA 그룹의 총 세포수가 3배 이상 증가함을 확인하였다(Figure 24). 이와 같은 결과를 통해 OVA를 처리함에 따라 기관지 내 세포의 수가 No 그룹에 비해 3배 이상 증가하며, 이는 천식이 유발됨에 따라, Eosinophil 및 macrophage가 기관지로 모여들어 나타나는 것으로 보여진다.



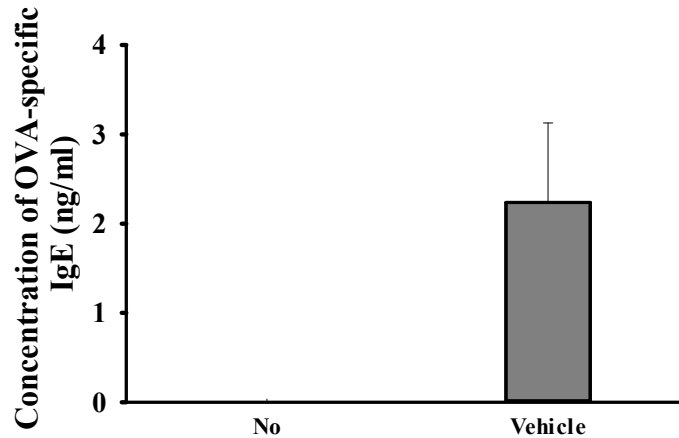
**Figure 24.** Total cell count of bronchoalveolar lavage (BAL) fluid. Cells in BALF were isolated by centrifugation, and stained with Hematocilin solution. Total number of cells was determined by counting within 1 mm<sup>2</sup> under a light microscope.

(라) 혈청 내 OVA 특이 IgE ELISA

OVA를 처리함에 따른 혈청 내 OVA 특이적인 IgE의 양을 확인하기 위하여, 마지막 OVA 흡입 후 회복하여 복대정맥으로부터 혈액을 채취하고, 혈청분리튜브(BD)에 넣은 후, 원심분리 (2000 xg, 15분)하여 혈청을 분리하였다. 혈청 내 IgE의 농도는 ELISA kit를 이용하여 권장방법에 따라 측정하였다. 먼저, 포획항체(capture antibodies)를 immunoplate에 분주하여 실온에서 1시간동안 부착시키고, 미 부착된 항체는 세척용액(washing solution, 50 mM tris, 0.14 M NaCl, 0.05% Tween 20, pH 8.0)으로 3번 세척하여 제거하였다. 포획항체가 결합된 immunoplate의 각 well에 마우스로부터 분리된 혈청과 희석된 표준 IgE (standard IgE)를 첨가하여, 1시간동안 결합시킨 뒤, 미 부착된 용액을 제거하고, 고추냉이 과산화효소(horseradish peroxidase)가 결합된 항체를 첨가하였다. 최종적으로 기질용액(substrate solution)을 첨가하고 어두운 실온에서 30분간 배양하여 반응을 유도한 후 2 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>용액을 첨가해서 반응을 정지시켰다. 반응 결과는 Microplate Reader (Molecular Device Co., Sunnyvale, CA, USA)를 이용하여 450 nm에서 확인하였다. 그 결과, No 그룹과 비교하였을 때, OVA 그룹에서 2.2배 더 높은 값의 IgE 농도를 나타냄을 확인하였다(Figure 25). 이러한 결과는 Th2 cell이 관여하는 다양한 염증반응에 중요한 지표인 IgE의 천식이 유도됨에



따른 증가율을 제시한다.

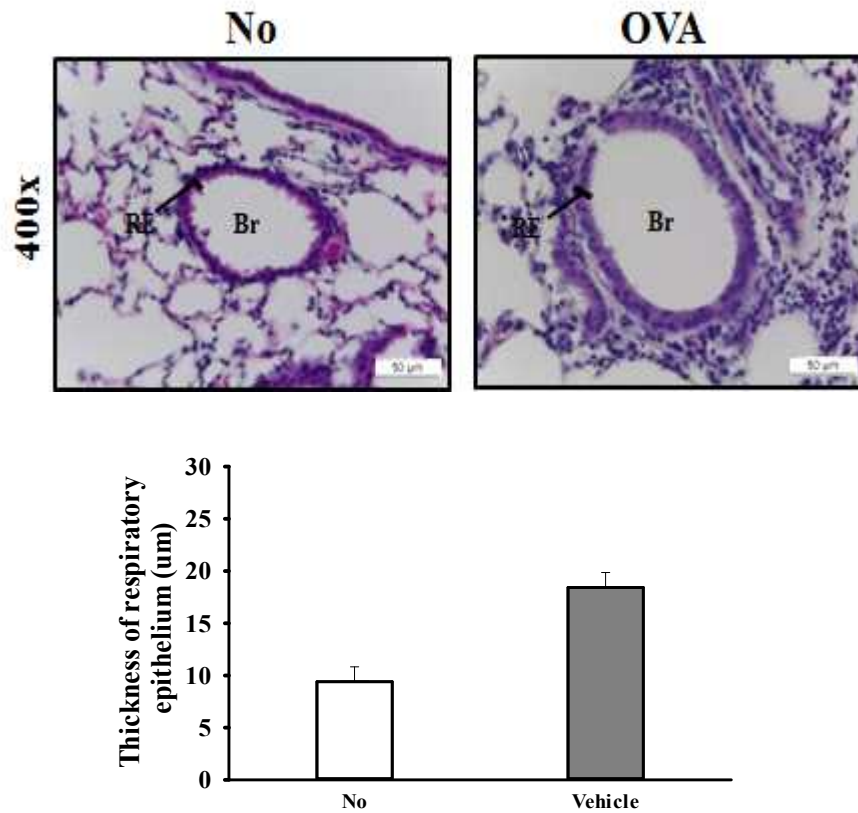


**Figure 25.** Detection of OVA-specific IgE concentration. The serum was prepared from blood samples collected from the abdominal veins of mice. The serum concentration of OVA-specific IgE was quantified by an enzyme-linked immunosorbent assay.

(마) 조직병리학적 분석

OVA를 처리함에 따른 조직 내의 염증 세포 세기관지의 양상을 확인하기 위하여 H&E 염색 및 PAS 염색을 실시하였다. 먼저, 안락사한 동물로부터 Lung을 적출하여 10% 포르말린에 48시간 이상 고정하고, 폐의 오른쪽 가장 큰 엽을 절단하여 카세트에 넣었다. 카세트에 담긴 조직은 조직처리기를 이용해서 70, 80, 90, 95, 100% alcohol에 각각 1, 1, 1, 3, 3시간씩 처리하고, xylene으로 3시간 처리하였다. 이후 파라핀으로 포매하여 블록을 만들고, -20℃에서 24시간 보관한 뒤 Leica microtome (Leica Microsystems, Bannockburn, IL, USA)을 사용하여 4 μm로 박절하였다. 조직 슬라이드는 xylene으로 탈파라핀(deparaffin)하고, alcohol으로 탈수(dehydration)한 후, hematoxylin과 eosin (H&E)으로 염색하고 광학현미경(Leica Microsystems, Wetzlar, Germany)으로 조직을 관찰하였다. 그 결과, No 그룹에 비하여, OVA를 처리함에 따라 세기관지 주변으로 cell이 더 많이 증가하였으며, 세기관지의 표피 두께가 2배 이상 증가하는 경향을 보였다. 또한, goblet cell의 Mucin 분비량을 확인하기 위해, PAS 염색을 실시하였다. 그 결과, 두꺼워진 표피두께와 마찬가지로, OVA를 처리함에 따라 Musin 분비량이 증가함을 확인할 수 있었다(Figure 26). 이러한 결과는, OVA를 처리하였을 때, 세기관지의 표피두께가 증가하고, 염증 세포의 침투 또한 증가하며, 점액의 분비량 또한 증가하는 양상을 띄며, 그 증가율은 2-3배 이상임을 제시한다.





**Figure 26.** Histological analysis of lung. Lung tissues were fixed, sectioned at 4 um thickness, and stained with H&E solution followed by observation at 400× magnification. Br, Bronchus; RE, Respiratory epithelium.

#### 나. In vivo 생리활성 효능

##### (1) 모델동물을 활용한 천문동의 생리활성(호흡기질환) 효능 분석

##### (가) 그룹배정

0일과 14일에 Ovalbumin (+ Aluminum hydroxide)로 감작시킨 마우스를 무작위로 8마리씩 각 그룹에 배정하였다. 그룹은 Negative control로서 PBS로 감작 및 흡입시킨 No그룹, OVA/Alum으로 감작 후, 2% OVA Solution을 흡입시키며 동시에 용매인 0.5% Tween 20 Solution(in dH2O)을 먹인 Vehicle그룹, 약물 Positive control을 먹인 Dex그룹(Dexamethasone, 3 mg/kg), 천문동에틸아세테이트 추출물을 먹인 EaEACH그룹(500 mg/kg)으로 구분하였다(Table 3). 18일부터 23일까지 6일간 각 그룹별로 시료를 경구투여 하였으며, 21-23일까지 총 3일간 nebulizer로 OVA Solution을 흡입시켰다. 마지막 흡입 후 48시간 뒤인 25일에 안락사하고, 시료를 채취하여 분석을 진행하였다.

본 연구에서 사용된 양성 대조물질은 현재 상용되고 있는 호흡기질환 치료제인 Dexamethasone을 선정하였다. Dex는 일종으로 글루코코르티코이드유사의 생리활성을 하는 합성스테로이드로서 강력한 항염증작용이나 항충격작용을 이용한 약품으로 사용하고 있다. 또 부(-)의 되먹임조절로 하수체에서의 부신피질자극호르몬(ACTH) 생산을 억제하기 때문에 부신피질호르몬의 억제시험시의 투여약제로 이용한다. 스테로이드호르몬과 마찬가지로 수용체와 더불어 핵 내로 이행되어 전사촉진 혹은 억제의 기작에 따라 생리활성을 발휘하는 것으로 고려되고 있다 (Figure 27).

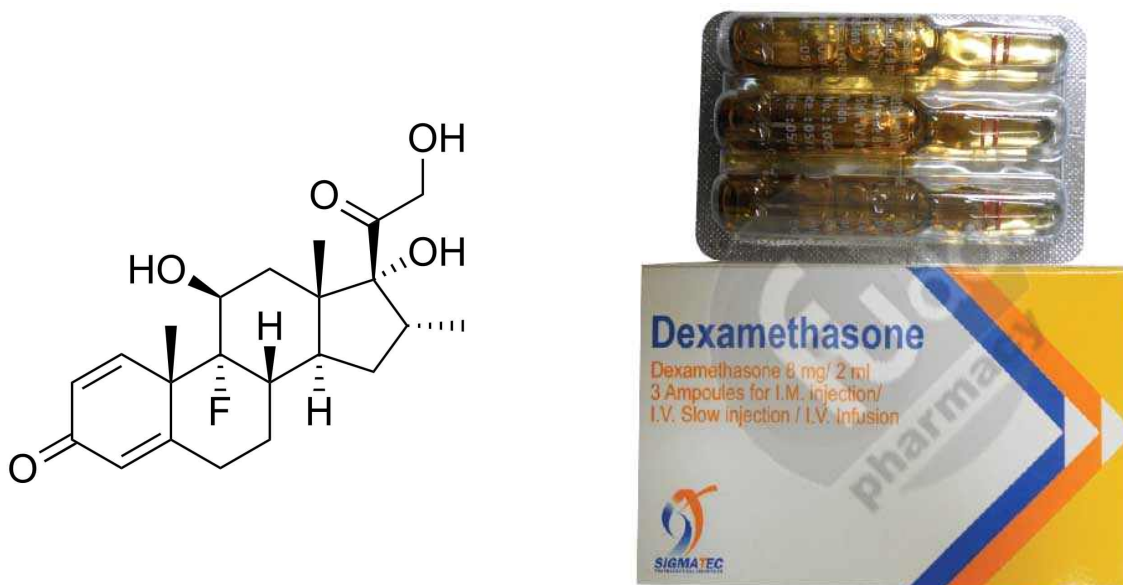


Figure 27. Chemical structure of dexamethasone.

Table 3. 동물실험그룹당 투여 물질

	그룹명	감작물질	흡입물질	경구투여물질
1	No	PBS (복강주사)	PBS (30분간 흡입시킴)	x
2	OVA+ Vehicle	20 ug OVA+ 2 mg Alum (복강주사)	OVA (30분간 흡입시킴)	0.5% Tween 20 Solution
3	OVA+ Dex	20 ug OVA+ 2 mg Alum (복강주사)	OVA (30분간 흡입시킴)	Dexamethasone (3 mg/kg)
4	OVA+ EaEAC	20 ug OVA+ 2 mg Alum (복강주사)	OVA (30분간 흡입시킴)	EaEAC (250 mg/kg)

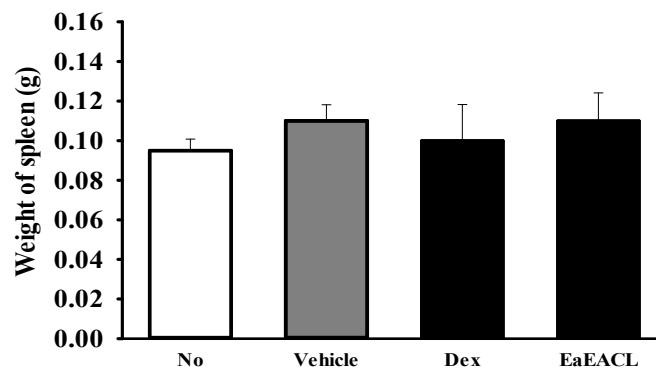
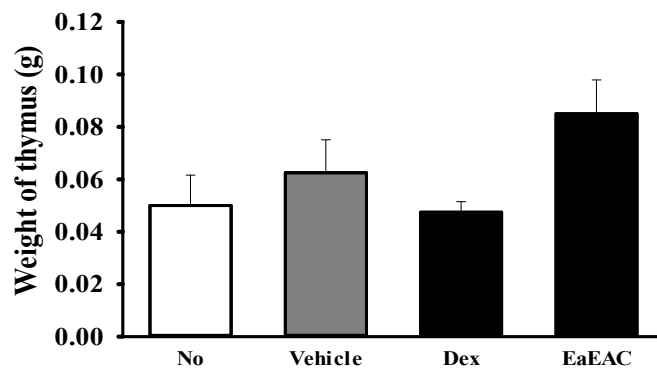
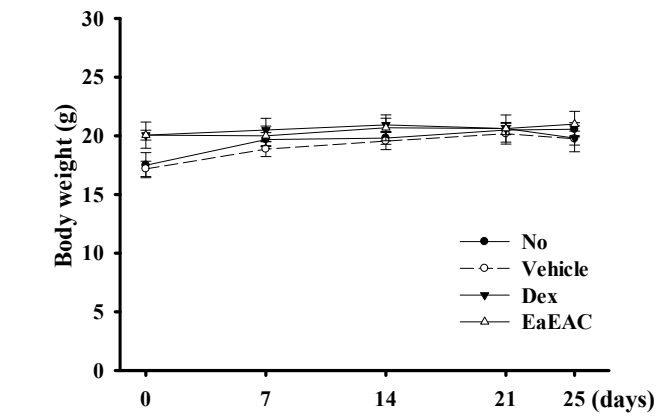
(나) 체중 및 장기무게의 변화

성장의 지표인 동시에 일반적인 건강상태의 민감한 지표인 체중을 확인하기 위하여 일주일에 한번씩 체중을 측정하였다. 그 결과, No 그룹과 비교하였을 때, Ovalbumin 처리 후,

각 시료를 경구투여한 각각의 그룹에서 유의적인 차이를 나타내지 않았다(Figure 28). 이러한 결과는 실험에서 사용한 용매 및 Dex, EaEAC가 독성을 나타내지 않음을 나타내고 있다. 또한 각 시료의 면역기관에 끼치는 영향을 확인하기 위하여, 면역 장기인 Thymus와 Spleen의 무게를 측정하였다. 그 결과 체중과 마찬가지로 유의적인 차이를 보이지 않았다. 이러한 결과 또한 각 시료가 독성을 나타내지 않음을 나타낸다.

(다) 기관지세척액 속 total cell의 수

기관지 세척액 내 총 세포의 수를 확인하기 위하여, 기관지 세척술을 실시하였다. 마지막 OVA 흡입 후, 48시간 뒤인 25일째 날에 알팍산(Alfaxalone®, careside, Jurox Pty Ltd, Australia)으로 마취시킨 후, 기도부분을 절개하여 카테터를 삽관하고, 봉합사를 사용하여 카테터를 기관지에 고정시켰다. 이후 0.6 ml의 차가운 PBS (pH 7.4)를 삽입하고 회수하여 기관지 세척액을 얻었다(수율 80%). 수확된 기관지 세척액은 원심분리 (2000 xg, 10분) 하여, 상층액과 세포를 분리 시켰고, 상층액은 이후 분석을 위하여 -70도 냉장고에 보관하고 펠렛은 PBS에 희석하여 총 세포수 측정에 사용하였다. 총 세포수 측정은 Trypan blue를 사용하여 hemacytometer로 측정하였다. 그 결과, No 그룹에 비교하였을 때, OVA에서 BALF용액 내에 셀의 수가 3배 이상 증가하였으며 이는 Dex와 EaEAC를 처리함에 따라 감소하는 양상을 보였으며 이는 Dex에서 더 큰 감소양상을 보였다(Figure 29). 이러한 결과는 EaEAC가 BALF 내 cell의 수를 감소시키며 이는 양성대조군인 Dex보다는 효과적이진 않음을 제시하고 있다.

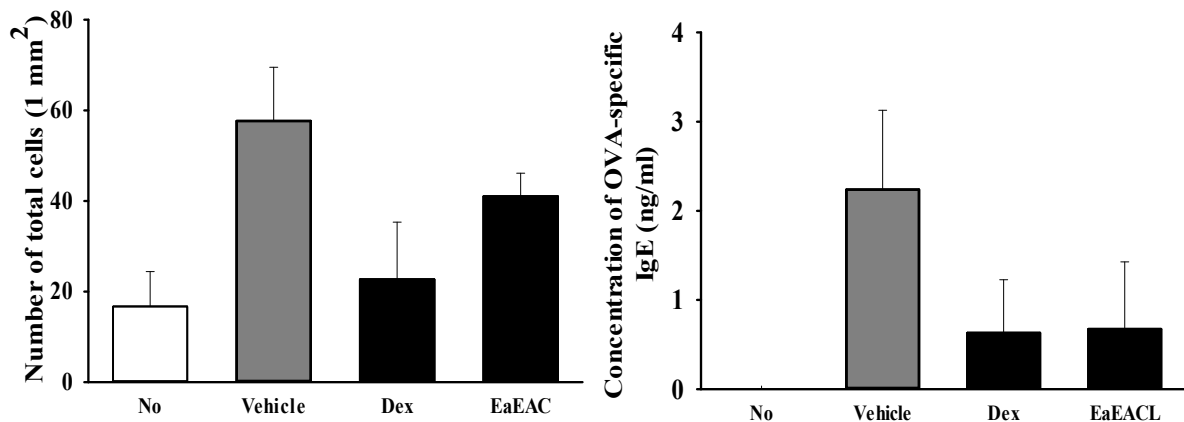


**Figure 28.** Body and immune organ weight. The body weights of all mice were measured throughout the experimental period. Following final treatment, mice from each group were sacrificed under anesthesia, after which spleen and thymus were harvested and weighed.

(라) 혈청 내 OVA 특이적인 IgE의 양 측정

OVA를 처리함에 따른 혈청 내 OVA 특이적인 IgE의 양을 확인하기 위하여, 마지막 OVA

흡입 후 개복하여 복대정맥으로부터 혈액을 채취하고, 혈청분리튜브(BD)에 넣은 후, 원심분리 (2000 xg, 15분)하여 혈청을 분리하였다. 혈청 내 IgE의 농도는 ELISA kit를 이용하여 권장방법에 따라 측정하였다. 먼저, 포획항체(capture antibodies)를 immunoplate에 분주하여 실온에서 1시간동안 부착시키고, 미 부착된 항체는 세척용액(washing solution, 50 mM tris, 0.14 M NaCl, 0.05% Tween 20, pH 8.0)으로 3번 세척하여 제거하였다. 포획항체가 결합된 immunoplate의 각 well에 마우스로부터 분리된 혈청과 희석된 표준 IgE (standard IgE)를 첨가하여, 1시간동안 결합시킨 뒤, 미 부착된 용액을 제거하고, 고추냉이 과산화효소(horseradish peroxidase)가 결합된 항체를 첨가하였다. 최종적으로 기질용액(substrate solution)을 첨가하고 어두운 실온에서 30분간 배양하여 반응을 유도한 후 2 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>용액을 첨가해서 반응을 정지시켰다. 반응 결과는 Microplate Reader (Molecular Device Co., Sunnyvale, CA, USA)를 이용하여 450 nm에서 확인하였다. 그 결과, No 그룹과 비교하였을 때, OVA 그룹에서 2.2배 더 높은 값의 IgE 농도를 나타냄을 확인하였다(Figure 29). 이러한 결과는 Th2 cell이 관여하는 다양한 염증반응에 중요한 지표인 IgE의 천식이 유도됨에 따른 증가율을 제시한다.

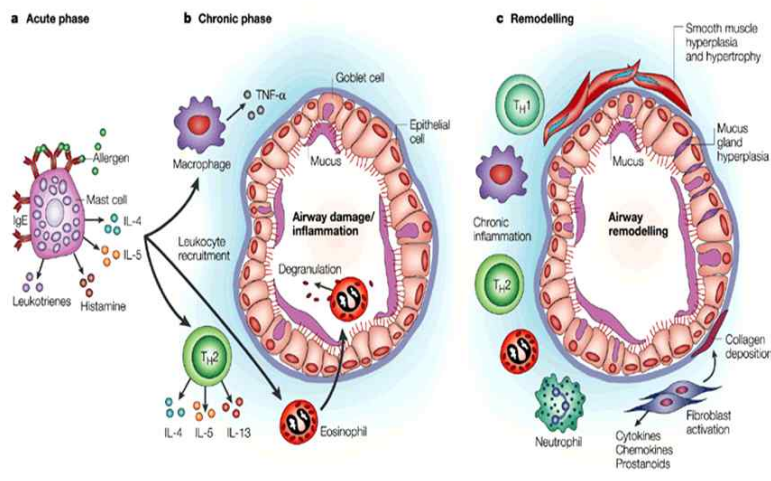


**Figure 29.** Number of total cells in the bronchoalveolar lavage (BAL) fluid and OVA-specific IgE levels in serum. Cells in BALF were isolated by centrifugation, and stained with Hematocytin solution. Total number of cells was determined by counting within 1 mm<sup>2</sup> under a light microscope. The serum was prepared from blood samples collected from the abdominal veins of mice. The serum concentration of OVA-specific IgE was quantified by an enzyme-linked immunosorbent assay.

(2) 질환의 발병기전에 미치는 천문동의 작용기전 분석 및 연구

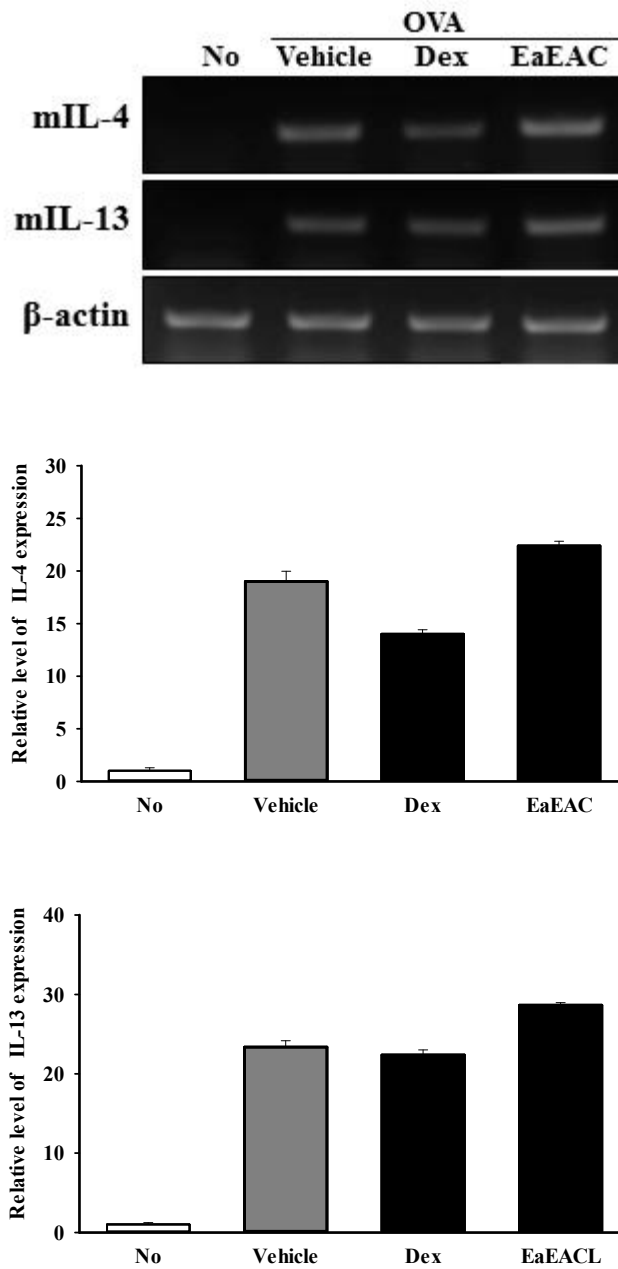
(가) T세포에서 분비되는 사이토카인에 미치는 영향연구

일반적으로 호흡기질환에서 폐기도가 좁아지거나 완전히 막혀서 정상적인 호흡이 곤란해지는 경우가 많으며, 이러한 질환은 약물에 의해 회복되는 질환이다. 이러한 과정에서 다양한 염증세포와 매개체들이 관여하는 기도의 염증질환은 비만세포, 호산구, T림프구, 수지상세포, 대식세포, 중성구 등이 관여하며, 케모카인, 시스테인 류코트리엔, 사이토카인, 히스타민, NO, 프로스타글란딘 D2 등에 의해 매개되며 자세한 작용기전은 다음과 같다.



Th2 cell이 관여하는 질환인 천식에 대한 EaEAC의 완화효능을 확인하기 위하여, Th0 cell을 Th2 cell로 성숙시키고, 이러한 Th2 cell로부터 유래되어 분비되어지는 사이토카인의 유전자 발현을 확인하였다. 먼저, 실험종료 후, 안락사시킨 마우스로부터 얻은 Lung조직 50 mg을 RNazol Bee용액에 담귀 homogenizer를 이용하여 분쇄한 후 RNA를 추출하였다. RNazol 추출물에 포함된 단백질은 chloroform을 이용하여 추출한 후 isopropanol을 이용하여 RNA를 침전시켜 수확하였다. 분리된 전체 RNA는 260 nm 흡광도에서 양을 측정하고, 3  $\mu$ g을 RT반응에 사용하였다. RT반응은 RNA에 Oligo dT (Invitrogen, 18418-012)을 처리하고, 70 $^{\circ}$ C에서 10분 동안 반응하여 Oligo dT를 RNA에 결합시켰다. 여기에 5x 완충용액, 10 mM dNTP, 0.1 M DTT, Superscript II(Invitrogen, 18064-014, 200 U/ $\mu$ l)를 첨가하여 실온에서 10분 동안 방치한 후 42 $^{\circ}$ C에서 50분 동안 RT 반응을 수행하였다. RT반응이 끝나면 RNaseH (Invitrogen, 18021-071)를 처리하여 37 $^{\circ}$ C에서 20분 동안 반응하여 RNA를 분해하였다. 합성된 cDNA를 주형으로 94 $^{\circ}$ C(45 sec), 62 $^{\circ}$ C(30 sec), 72 $^{\circ}$ C(45 sec) 30 cycle로 유전자 특이적인 서열(IL-4, 5'-CCA GCT AGT TGT CAT CCT GCT CTT C-3', 5'-GTG ATG TGG ACT TGG ACT CAT TCA TGG-3'; IL-13, 5'-CCT TAA

GGA GCT TAT TGA GGA GCT GAG-3', 5'-CAG TTG CTT TGT GTA GCT GAG CAG-3')과 actin의 특이적 서열(5'-TGGAA TCCTG TGGCA TCCAT GAAAC-3'and 5'-TAAAA CGCAG CTCAG TAACA GTCCG-3')을 이용하여 PCR을 실시하였다. 증폭된 유전자는 1% agarose gel에서 전기영동을 실시한 후 UV에서 관찰하였다. 그 결과, IL-4와 IL-13의 발현양은 No 그룹에 비해 OVA처리후 시료를 먹인 그룹에서 10배 이상 증가함을 확인하였다(Figure 30). 양성대조군인 잘 알려진 치료약물인 Dex를 먹인 그룹에서 이러한 발현양이 감소하는 양상을 보였으며, EaEAC를 처리한 그룹에서는 감소하지 않았다. 이러한 결과는 EaEAC가 Glucosteroid제제인 Dex와는 다른 메커니즘에 의해 천식을 완화한다는 또하나의 가설을 제시하고 있다.



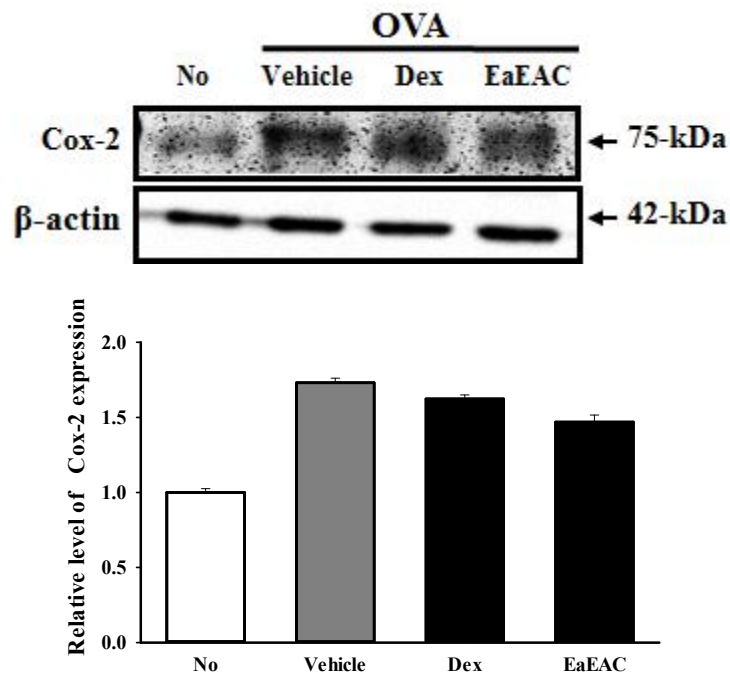
**Figure 30.** mRNA expression of inflammatory cytokines in lung tissue. The levels of IL-4 and IL-13 transcript in the lung were detected by RT-PCR analysis using specific primers. The intensity of each band was determined using an imaging densitometer and the relative level of each protein was calculated based on the intensity of b-actin transcript as an endogenous control.

(나) 염증유발 단백질의 변화에 미치는 영향

한편, lung 조직내 Cox-2 단백질의 양을 확인하기 위하여 Western blot을 실시하였다. cox-2는 정상적인 체내에는 소량 존재하지만, 염증반응이 유발됨에 따라, 생성되어지는 단백질로 잘 알려져 있다. 먼저, 50 mg의 lung을 PRO-PREP Protein Extraction Solution



(iNtRON Biotechnology, seongnam, korea)에 첨가하여 glass homogenizer (Wheaton Industries, Millville, NJ, USA)를 이용하여 분쇄한 후, 30분간 배양하고, 13,000 rpm에서 10분 동안 원심 분리하여 상층액을 수확하였다. 분리된 단백질의 농도는 SMARTTM BCA Protein Assay Kit (iNtRON Biotechnology)을 이용하여 정량하였으며, 30 µg의 단백질을 실험에 사용하였다. 먼저, 10~12% SDS-PAGE gel에 단백질을 전기영동 한 후 Enhanced Chemiluminescence (ECL) 막(Amersham Life Science, Piscataway, NJ, USA)에 전이하고, 5% skim milk에서 1시간 동안 blocking을 실시하였다. 단백질이 전이된 막은 Cox-2 antibody(1:1000, cellsignaling))로 4°C에서 밤새 배양한 후, HRP-conjugated된 secondary antibody를 첨가하고 ECL Kit를 이용하여 발현을 확인하였다. 그 결과, No 그룹에 비교하였을 때, Vehicle 그룹에서 증가하는 양상을 보였으며 Dex를 처리함에 따라 Cox-2의 발현양이 감소하였으며, 이는 EaEAC를 처리하였을 때 더 감소하는 양상을 보였다 (Figure 31). 이러한 결과는 EaEAC가 Cox-2의 발현양을 억제함으로써 천식을 완화시키며, 이는 약물인 Dex보다 뛰어난 효과를 제시하고 있다.

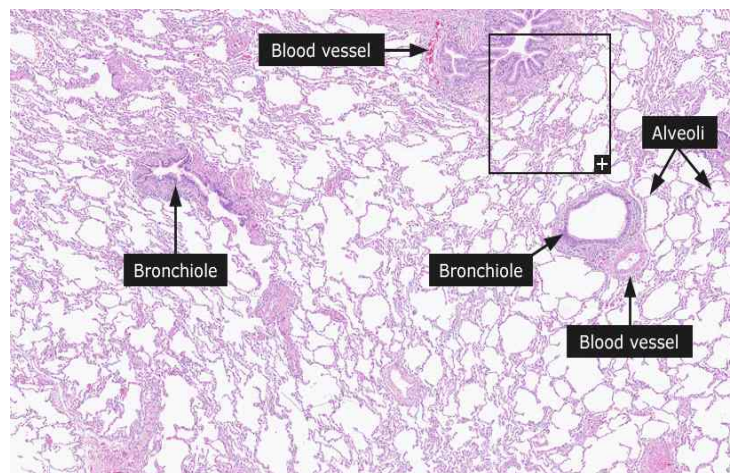


**Figure 31.** Analysis of protein expression in ear tissues. The levels of IL-6 and VEGF in the ear tissue of IL-4/Luc/CNS-1 Tg mice from subset groups were detected by Western blot analysis using specific antibodies. The intensity of each band was determined using an imaging densitometer and the relative level of each protein was calculated based on the intensity of actin protein as an endogenous control.

### (3) 폐, 기관지 등의 조직학적 특성 분석

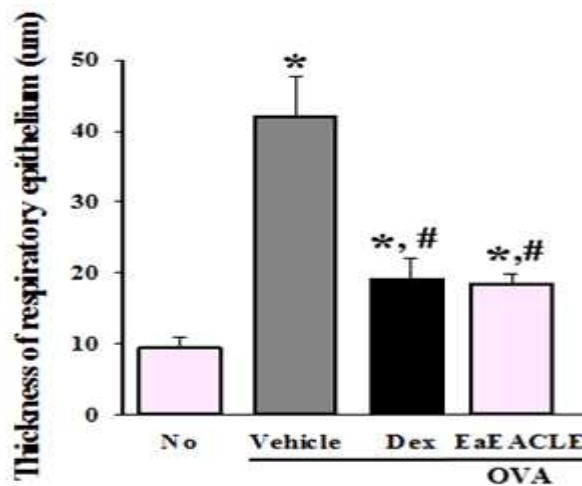
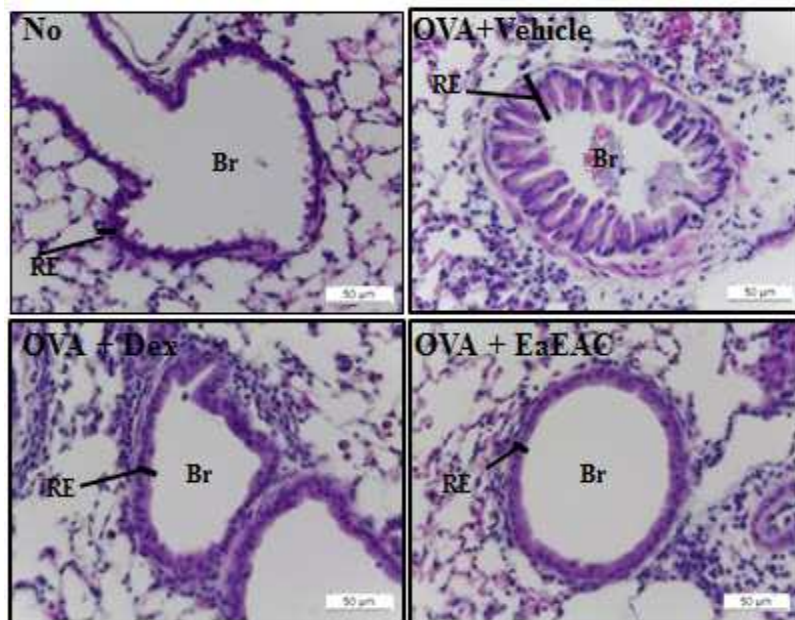
(가) 폐조직의 구조적 변화의 회복에 미치는 영향

일반적으로 폐는 탄산가스를 방출하는 일종의 선이며, 통상의 외분비선과 상동의 구조를 나타낸다. 즉 기관지에서 종말 세기관지까지는 선의 도관부이며, 거기에서 앞의 호흡세기관지, 폐포관, 폐포낭의 벽으로 열린 폐포는 선의분비부에 해당된다. 기관지의 상피를 둘러싼 결합조직층은 연골, 평활근을 포함하나 기관지가 가늘어짐에 따라서 얇아지며, 폐포 주위에서는 극히 소량이 된다. 가스교환을 위해서 폐에 들어가는 폐동맥은 폐포의 상피하에 접해서 조밀한 모세혈관망을 형성하며, 마침내는 폐정맥으로 폐를 나간다. 기관지동·정맥은 폐조직의 영양에 관계하는 혈관으로 그 주위의 조직에 영양을 보급하는 외에 일부는 폐포를 둘러싸서 발달하는 모세혈관망과 문합한다. 정상적인 폐조직의 구조는 다음과 같다.



본 연구에서는 OVA를 처리함에 따른 조직 내의 염증 세포의 침투양, 세기관지의 양상을 확인하기 위하여 H&E 염색 및 PAS 염색을 실시하였다. 먼저, 안락사한 동물로부터 Lung을 적출하여 10% 포르말린에 48시간 이상 고정하고, 폐의 오른쪽 가장 큰 엽을 절단하여 카세트에 넣었다. 카세트에 담긴 조직은 조직처리기를 이용해서 70, 80, 90, 95, 100% alcohol에 각각 1, 1, 1, 3, 3시간씩 처리하고, xylene으로 3시간 처리하였다. 이후 파라핀으로 포매하여 블록을 만들고, -20℃에서 24시간 보관한 뒤 Leica microtome (Leica Microsystems, Bannockburn, IL, USA)을 사용하여 4 µm로 박절하였다. 조직 슬라이드는 xylene으로 탈파라핀(deparaffin)하고, alcohol으로 탈수(dehydration)한 후, hematoxylin과 eosin (H&E)으로 염색하고 광학현미경(Leica Microsystems, Wetzlar, Germany)으로 조직을 관찰하였다. 그 결과, No 그룹에 비하여, OVA를 처리함에 따라 세기관지 주변으로 cell이 더 많이 증가하였으며, 특히 표피의 두께가 증가하는 경향을 보였다. 또한, Dex를 처리한 그룹과 EaEAX를 처리한 그룹에서는 두께의 증가가 적었으며, 특히 EaEAC 처리 그룹에서는 염증세포의 침투는 또한 크게 감소하는 양상을 보였다, 한편, goblet cell의 Mucin 분비량을 확인하기 위해, PAS 염색을 실시하였다. 그 결과, 두꺼워진 표피두께와 마찬가지로,

OVA를 처리함에 따라 Musin 분비량이 증가하였고, Dex와 EaEAC처리 그룹에서 감소함을 확인할 수 있었다(Figure 32). 이러한 결과는, OVA를 처리하였을 때, 세기관지의 표피두께가 증가하고, 염증 세포의 침투 또한 증가하며, 점액의 분비량 또한 증가하는 양상을 띄며, 그 증가율은 2-3배 이상임을 제시하고 있다.



**Figure 32.** Histopathological structure in lung tissue. (A) After staining with H&E solution, the infiltration of inflammatory cells in the peribronchiolar region and the bronchial thickness were observed in lung tissue at 400× magnification. Br, Bronchus; RE, Respiratory epithelium. (B) Thickness of respiratory epithelium was measured using the Leica Application Suite. Data shown are the means ± SD (n=5). \*,  $p < 0.05$  compared to the No treated group. #,  $p < 0.05$  compared to the OVA+ Vehicle treated group.

(다) 뮤신분비 goblet hyperplasia에 미치는 영향

한편, 동물의 뇌하수체, 위점막, 연골, 침, 혈액, 콧물 등에 존재하는 올리고당과 당단백질로 구성된 점액물질로, 생체 기능의 윤택 작용 및 보호 작용을 합니다. 특히 위에서 펩신과 위산에 의한 손상을 방지하는 역할을 해서 위산과다와 위궤양 치료에 사용되는데, 비피더스균의 증식을 활발하게 하는 락투로오스를 함유한 조제분유에 뮤신을 첨가하면 락투로오스의 상승 작용으로 뮤신의 활성이 높아지고 변을 좋게 한다고 알려져 있습니다. 또한 아미노산이나 지방의 흡수를 돕습니다.

특히 호흡기관인 폐조직에서 뮤신분비의 지속적인 분비는 호흡기질환의 예방과 치료에 매우 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 따라서 천문동 추출물이 뮤신분비에 미치는 영향을 분석하기 위하여 PAS용액으로 폐조직을 염색하여 뮤신분비세포인 goblet hyperplasia를 관찰하였다. 그 결과, OVA+ Vehicle그룹에서는 goblet hyperplasia가 강하게 관찰되었지만 No 그룹에서는 특별한 변화가 없었다. 그러나, OVA+EaEACH와 OVA+Dex처리그룹에서는 유의적으로 이러한 변화가 감소하는 것으로 관찰되었다(Figure 33). 따라서 이러한 결과는 천문동이 goblet hyperplasia를 회복시켜주는 중요한 기능을 통해 호흡기질환은 완화시키는 효과가 있음을 제시하고 있다.

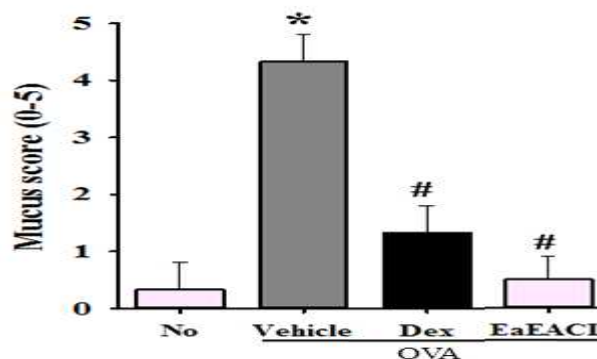
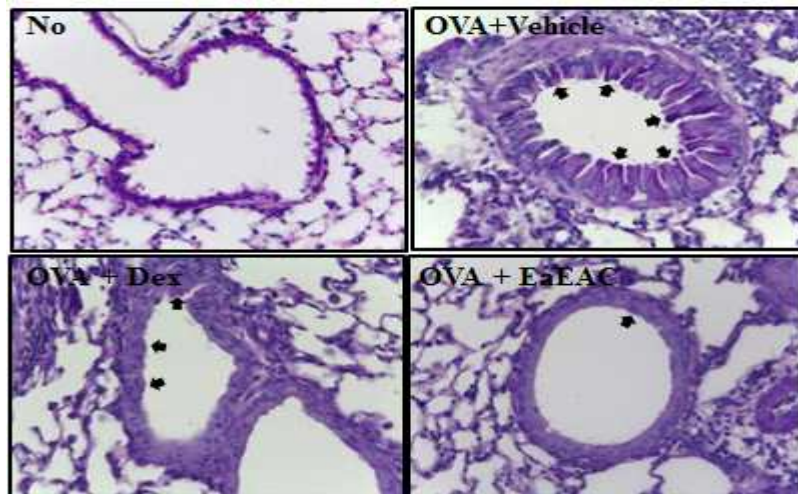


Figure 33. Goblet hyperplasia in lung tissue. After staining with Periodic Acid Schiff (PAS), goblet hyperplasia was observed in lung tissue at 400× magnification. Mucus score were performed by four

independent investigators in a single-blind study analysis based on four different random locations using a microscope. 0, no mucus; 1, < 5% of the epithelium, 2, 5%–10% of the epithelium, 3, 10%–20% of the epithelium, 4, 20%–30% of the epithelium, 5, 30%–40% of the epithelium. Data shown are the means  $\pm$  SD (n=5). \*,  $p < 0.05$  compared to the No treated group. #,  $p < 0.05$  compared to the OVA+Vehicle treated group.

#### 다. 천문동과 다른 기능성물질의 효능비교 분석

##### (1) 천문동과 다른 기능성물질(도라지 추출물)의 효능 분석

일반적으로 도라지는 사포닌, 칼슘, 철분, 무기질, 단백질, 비타민 및 섬유질이 풍부한 알카리성 식품으로 예전부터 뱃속의 냉기와 한열을 없애주고, 폐기능을 활성화시키며, 인후의 보호작용 등 호흡기질환에 좋은 소재로 알려져 있다.

- 소화흡수작용: 음식물의 고분자물질을 저분자물질로 분해하는 반응속도를 증진시킴으로서 음식물의 분해와 흡수를 향상시킨다.
- 항염증작용: 도라지는 백혈구를 운반하고 백혈구의 활동을 도움으로 신체장기에 부작용을 초래하지 않고 항염증작용을 수행한다.
- 분해배출작용: 신체내의 공해물질 등 각종 노폐물을 배출시키는 역할을 한다.
- 혈액정화작용: 도라지는 혈관내의 흐름을 방해하는 혈전, 노폐물, 독소 등을 직접제거하기도 하고, 혈전성분을 분해할 수 있는 효소를 활성화시킴으로서 체내 혈액순환을 돕는다.
- 면역력강화: 면역체계 강화와 세포의 대사기능을 활성화시켜 낡은 세포와 새로운 세포를 신속히 교체시켜주는 역할을 한다.

##### (가) 동물실험계획

0일과 14일에 Ovalbumin (+ Aluminum hydroxide)로 감작시킨 마우스를 무작위로 8마리씩 각 그룹에 배정하였다. 그룹은 Negative control로서 PBS로 감작 및 흡입시킨 No그룹, OVA/Alum으로 감작 후, 2% OVA Solution을 흡입시키며 동시에 용매인 0.5% Tween 20 Solution(in dH<sub>2</sub>O)을 먹인 Vehicle그룹, 도라지추출물을 처리한 AePG그룹(Aqua extract of Platycodon grandifloras, 100 mg/kg), 천문동에틸아세테이트 추출물을 먹인 EaEAC(250 mg/kg)으로 구분하였다. 18일부터 23일까지 6일간 각 그룹별로 시료를 경구투여 하였으며, 21-23일까지 총 3일간 nebulizer로 OVA Solution을 흡입시켰다. 마지막 흡입 후 48시간 뒤인 25일에 안락사하고, 시료를 채취하여 분석을 진행하였다(Table 4).



Table 4. 동물실험그룹 처리물질

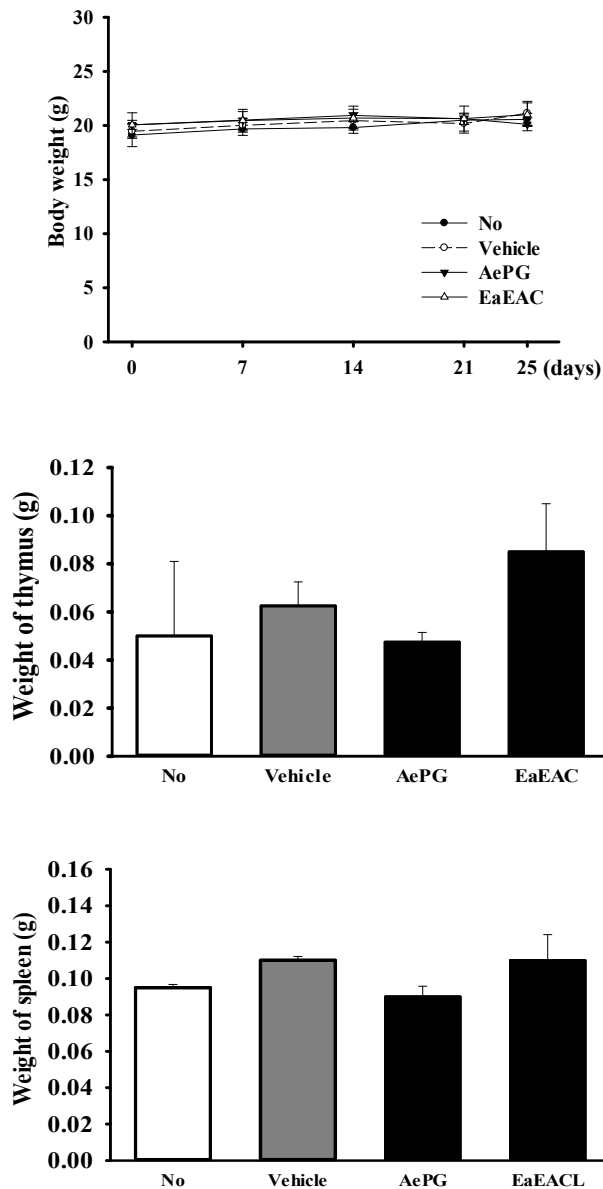
	그룹명	감작물질	흡입물질	경구투여물질
1	No	PBS (복강주사)	PBS (30분간 흡입시킴)	x
2	OVA+ Vehicle	20 ug OVA+ 2 mg Alum (복강주사)	OVA (30분간 흡입시킴)	0.5% Tween 20 Solution
3	OVA+ AePG	20 ug OVA+ 2 mg Alum (복강주사)	OVA (30분간 흡입시킴)	AePG (도라지열수추출물) (3 mg/kg)
4	OVA+ EaEAC	20 ug OVA+ 2 mg Alum (복강주사)	OVA (30분간 흡입시킴)	EaEAC (500 mg/kg)

※ 실험동물에서 처리된 천문동의 농도는 미국 FDA의 기준에 따라 아래와 같이 계산하여 사람에게 처리되는 농도를 산출할 수 있음

$$\text{Human Equivalent Doses (HED)}(500 \text{ mg/kg in rats}) = 50 \text{ mg/kg} \times (6 \text{ kg/m}^2 / 37 \text{ kg/m}^2) = 8.1 \text{ mg/kg in human}$$

(나) 체중 및 장기무게의 변화

성장의 지표인 동시에 일반적인 건강상태의 민감한 지표인 체중을 확인하기 위하여 일주일에 한번씩 체중을 측정하였다. 그 결과, No 그룹과 비교하였을 때, Ovalbumin 처리 후, 각 시료를 경구투여한 각각의 그룹에서 유의적인 차이를 나타내지 않았다. 이러한 결과는 실험에서 사용한 용매 및 AePG, EaEAC가 독성을 나타내지 않음을 나타내고 있다. 또한 각 시료의 면역기관에 끼치는 영향을 확인하기 위하여, 면역 장기인 Thymus와 Spleen의 무게를 측정하였다. 그 결과 체중과 마찬가지로 유의적인 차이를 보이지 않았다(Figure 34). 이러한 결과 또한 각 시료가 독성을 나타내지 않음을 나타낸다.

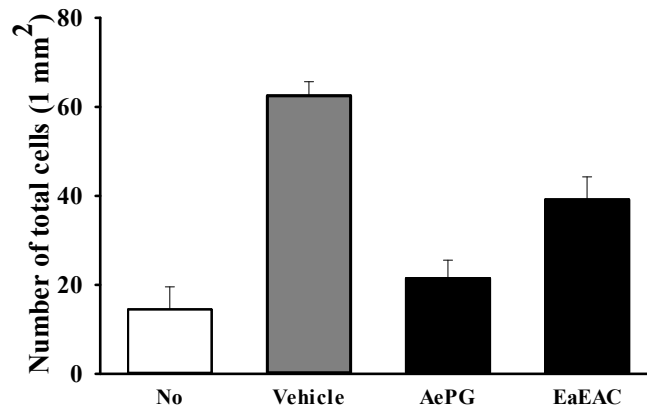


**Figure 34.** Body and immune organ weight. The body weights of all mice were measured throughout the experimental period. Following final treatment, mice from each group were sacrificed under anesthesia, after which spleen and thymus were harvested and weighed.

(다) 기관지세척액 속 total cell의 수의 비교

기관지 세척액 내 총 세포의 수를 확인하기 위하여, 기관지 세척술을 실시하였다. 마지막 OVA 흡입 후, 48시간 뒤인 25일째 날에 알팍산(Alfaxalone®, careside, Jurox Pty Ltd, Australia)으로 마취시킨 후, 기도부분을 절개하여 카테터를 삽관하고, 봉합사를 사용하여 카테터를 기관지에 고정시켰다. 이후 0.6 ml의 차가운 PBS (pH 7.4)를 삽입하고 회수하여 기관지 세척액을 얻었다(수율 80%). 수확된 기관지 세척액은 원심분리 (2000 xg, 10분) 하여, 상층액과 세포를 분리 시켰고, 상층액은 이후 분석을 위하여 -70도 냉장고에 보관하고 펠렛

은 PBS에 희석하여 총 세포수 측정에 사용하였다. 총 세포수 측정은 Trypan blue를 사용하여 hemacytometer로 측정하였다. 그 결과, No 그룹에 비교하였을 때, OVA에서 BALF용액 내에 셀의 수가 3배 이상 증가하였으며 이는 AePG와 EaEAC를 처리함에 따라 감소하는 양상을 보였으며 이는 AePG에서 더 큰 감소양상을 보였다(Figure 35). 이러한 결과는 EaEAC가 BALF 내 cell의 수를 감소시키며 이는 잘 알려진 천식완화 천연물인 AePG보다는 효과적이진 않음을 제시하고 있다.

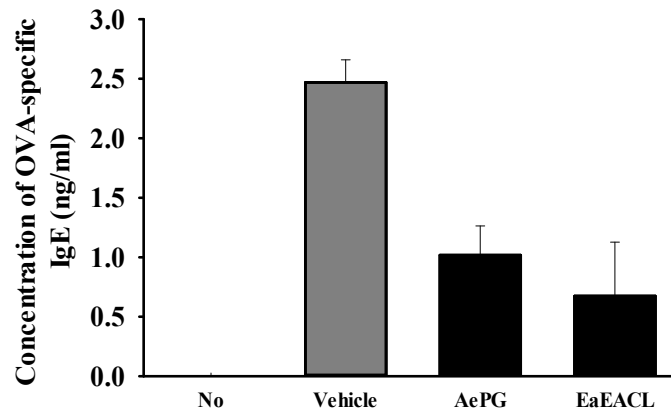


**Figure 35.** Number of total cells in the bronchoalveolar lavage (BAL) fluid. Cells in BALF were isolated by centrifugation, and stained with Hematocilin solution. Total number of cells was determined by counting within 1 mm<sup>2</sup> under a light microscope.

(라) 혈청 내 OVA 특이적인 IgE의 양의 비교

OVA를 처리함에 따른 혈청 내 OVA 특이적인 IgE의 양을 확인하기 위하여, 마지막 OVA 흡입 후 회복하여 복대정맥으로부터 혈액을 채취하고, 혈청분리튜브(BD)에 넣은 후, 원심분리 (2000 xg, 15분)하여 혈청을 분리하였다. 혈청 내 IgE의 농도는 ELISA kit를 이용하여 권장방법에 따라 측정하였다. 먼저, 포획항체(capture antibodies)를 immunoplate에 분주하여 실온에서 1시간동안 부착시키고, 미 부착된 항체는 세척용액(washing solution, 50 mM tris, 0.14 M NaCl, 0.05% Tween 20, pH 8.0)으로 3번 세척하여 제거하였다. 포획항체가 결합된 immunoplate의 각 well에 마우스로부터 분리된 혈청과 희석된 표준 IgE (standard IgE)를 첨가하여, 1시간동안 결합시킨 뒤, 미 부착된 용액을 제거하고, 고추냉이 과산화효소(horseradish peroxidase)가 결합된 항체를 첨가하였다. 최종적으로 기질용액(substrate solution)을 첨가하고 어두운 실온에서 30분간 배양하여 반응을 유도한 후 2 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>용액을 첨가해서 반응을 정지시켰다. 반응 결과는 Microplate Reader (Molecular Device Co., Sunnyvale, CA, USA)를 이용하여 450 nm에서 확인하였다. 그 결과, No 그룹과 비교하였을 때, OVA 그룹에서 더 높은 값의 IgE 농도를 나타내었으며, AePG와 EaEAC그룹에서 감소하는 양상을 보임을 확인하였다(Figure 36). 이러한 결과는 AePG와 EaEAC가 천식완화에 효능이 있으며, 이는 혈청 내 IgE 양에서 EaEAC가 더 큰 효능을 나타냄을 제시한다.



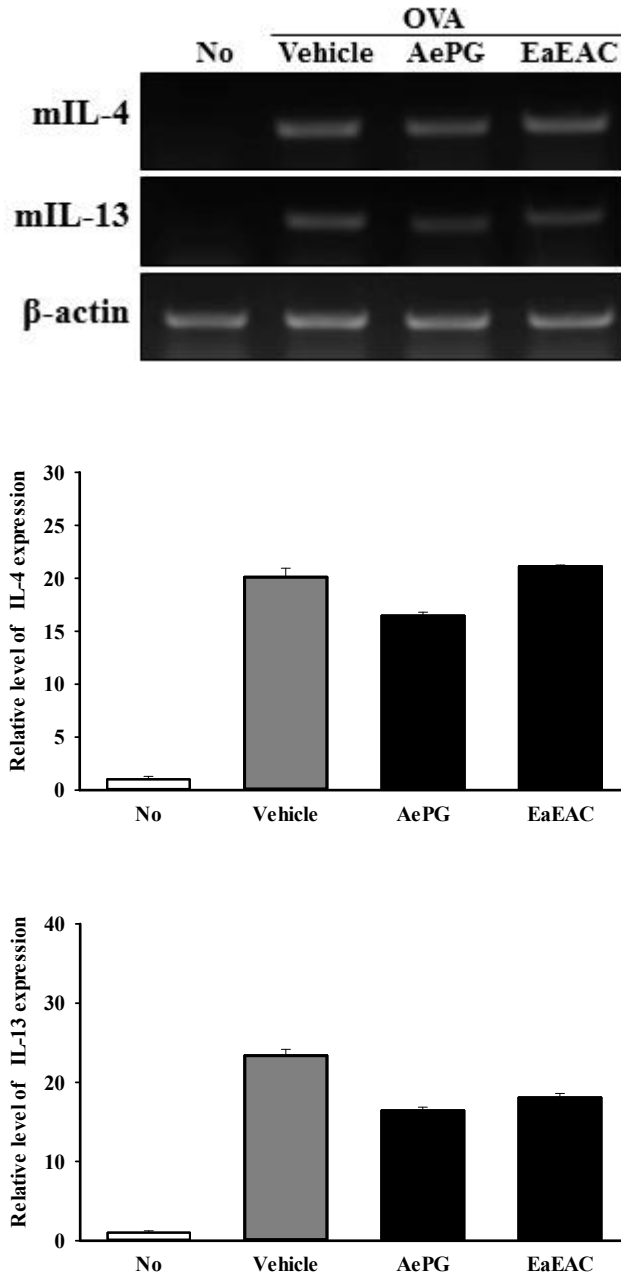


**Figure 36.** OVA-specific IgE levels in serum. The serum was prepared from blood samples collected from the abdominal veins of mice. The serum concentration of OVA-specific IgE was quantified by an enzyme-linked immunosorbent assay.

(마) T세포분비 싸이토카인 비교

Th2 cell이 관여하는 질환인 천식에 대한 EaEAC의 완화효능을 확인하기 위하여, Th0 cell을 Th2 cell로 성숙시키고, 이러한 Th2 cell로부터 유래되어 분비되어지는 싸이토카인의 유전자 발현을 확인하였다. 먼저, 실험종료 후, 안락사시킨 마우스로부터 얻은 Lung조직 50 mg을 RNazol Bee용액에 담귀 homogenizer를 이용하여 분쇄한 후 RNA를 추출하였다. RNazol 추출물에 포함된 단백질을 chloroform을 이용하여 추출한 후 isopropanol을 이용하여 RNA를 침전시켜 수확하였다. 분리된 전체 RNA는 260 nm 흡광도에서 양을 측정하고, 3  $\mu$ g을 RT반응에 사용하였다. RT반응은 RNA에 Oligo dT (invitrogen, 18418-012)을 처리하고, 70°C에서 10분 동안 반응하여 Oligo dT를 RNA에 결합시켰다. 여기에 5x 완충용액, 10 mM dNTP, 0.1 M DTT, Superscript II(Invitrogen, 18064-014, 200 U/ $\mu$ l)를 첨가하여 실온에서 10분 동안 방치한 후 42°C에서 50분 동안 RT 반응을 수행하였다. RT반응이 끝나면 RNaseH (Invitrogen, 18021-071)를 처리하여 37°C에서 20분 동안 반응하여 RNA를 분해하였다. 합성된 cDNA를 주형으로 94°C(45 sec), 62°C(30 sec), 72°C(45 sec) 30 cycle로 유전자 특이적인 서열(IL-4, 5'-CCA GCT AGT TGT CAT CCT GCT CTT C-3', 5'-GTG ATG TGG ACT TGG ACT CAT TCA TGG-3'; IL-13, 5'-CCT TAA GGA GCT TAT TGA GGA GCT GAG-3', 5'-CAG TTG CTT TGT GTA GCT GAG CAG-3')과 actin의 특이적 서열(5'-TGGAA TCCTG TGGCA TCCAT GAAAC-3'and 5'-TAAAA CGCAG CTCAG TAACA GTCCG-3')을 이용하여 PCR을 실시하였다. 증폭된 유전자는 1% agarose gel에서 전기영동을 실시한 후 UV에서 관찰하였다. 그 결과, 양성대조군인 잘 알려진 천연물인 AePG를 먹인 그룹에서 IL-4의 발현양이 감소하는 양상을 보였으며, EaEAC를 처리한 그룹에서는 감소하지 않았다(Figure 37). 한편 IL-13의 발현양에서

는 AePG와 EaEAC를 처리한 그룹에서 감소하는 양상을 보였다.

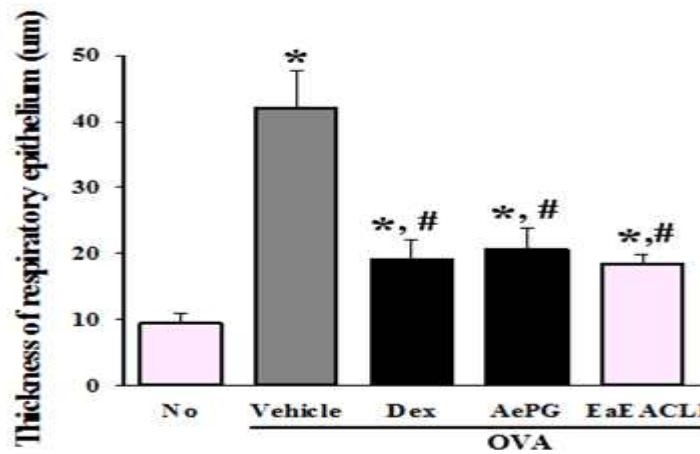
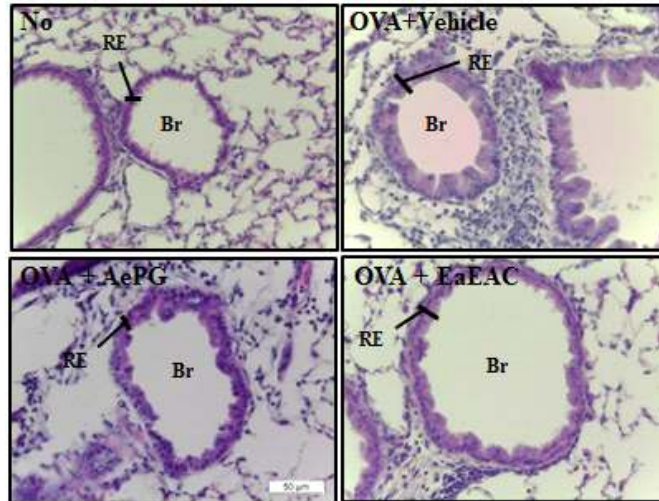


**Figure 37.** mRNA expression of inflammatory cytokines in lung tissue. The levels of IL-4 and IL-13 transcript in the lung were detected by RT-PCR analysis using specific primers. The intensity of each band was determined using an imaging densitometer and the relative level of each protein was calculated based on the intensity of b-actin transcript as an endogenous control.

(바) 조직학적 변화의 비교

OVA를 처리함에 따른 조직 내의 염증 세포 세기관지의 양상을 확인하기 위하여 H&E 염색 및 PAS 염색을 실시하였다. 먼저, 안락사한 동물로부터 Lung을 적출하여 10% 포르말린

에 48시간 이상 고정하고, 폐의 오른쪽 가장 큰 엽을 절단하여 카세트에 넣었다. 카세트에 담긴 조직은 조직처리기를 이용해서 70, 80, 90, 95, 100% alcohol에 각각 1, 1, 1, 3, 3시간씩 처리하고, xylene으로 3시간 처리하였다. 이후 파라핀으로 포매하여 블록을 만들고, -20℃에서 24시간 보관한 뒤 Leica microtome (Leica Microsystems, Bannockburn, IL, USA)을 사용하여 4 μm로 박절하였다. 조직 슬라이드는 xylene으로 탈파라핀(deparaffin)하고, alcohol으로 탈수(dehydration)한 후, hematoxylin과 eosin (H&E)으로 염색하고 광학현미경(Leica Microsystems, Wetzlar, Germany)으로 조직을 관찰하였다. 그 결과, No 그룹에 비하여, OVA를 처리함에 따라 세기관지 주변으로 cell이 더 많이 증가하였으며, 세기관지의 표피 두께가 2배이상 증가하는 경향을 보였다. 그러나 이러한 효과는 도라지 추출물과 천문동 추출물에서 매우 유사하게 관찰되었으며, 유의적인 차이는 없었다 (Figure 38). 이러한 결과는, 비록 세부적인 농도에 대한 연구가 필요하지만 천문동이 도라지와 유사한 효능이 있음을 보여주고 있다. 천문동의 최적농도와 작용시간 등 약리적인 효능에 대한 연구는 3차년도에 수행할 수 있도록 계획을 수립하였다.



**Figure 38.** Lung tissues were fixed, sectioned at 4 um thickness, and stained with H&E solution followed by observation at 400× magnification.

### 3. 호흡기질환 예방제품에 대한 독성 및 효능검증

#### 가. 천문동 및 제품의 독성평가

##### (1) 독성시험프로토콜 확립

독성시험프로토콜은 식품의약품안전처의 「의약품등의 독성시험기준」(식품의약품안전청 고시 제2012-86호, 2012.8.24.)을 기반으로 확립하였으며 세부내용은 다음과 같다.

##### 1. 개요

단회투여독성시험은 시험물질을 실험동물에 단회투여(24시간이내의 분할 투여하는 경우도

포함)하였을 때 단기간 내에 나타나는 독성을 질적·양적으로 검사하는 시험을 말한다. 설치류에 있어서 기존에 요구되어 왔던 반수치사용량(이하LD50)은 고정된 것이 아니며 시험조건의 차이에 의해 수치의 변동이 큰 생물학적 지표이다. 더욱이 동물복지의 관점에서 다수의 동물을 희생함으로써 LD50을 구하는 것이 문제가 되었다. 따라서 LD50을 요구하기 보다는 오히려 시험물질을 투여한 후에 일어나는 모든 변화(독성변화)와 용량과의 관계를 파악하는 것에 초점을 둔 시험이 바람직하다고 판단된다. 비설치류의 경우 반복투여독성시험의 예비시험 등이 적절한 용량의 선택과 관찰이 수행된 경우에는 그 시험을 비설치류의 단회투여독성시험으로 대체할 수 있다.

## 2. 시험방법

### 가. 실험동물

#### (1) 동물 종

시험물질에 대한 생체반응에는 종차, 계통차 등이 있다고 알려져 있다. 동물종을 선택함에 있어서 효능 또는 대사 양상이 인간과 유사한 동물 종이 바람직하다. 그러나 단회투여독성시험을 실시하는 단계에서는 위의 사항을 만족하는 동물 종 혹은 계통을 선택하는 것이 어려울 수 있으므로, 통상적으로 다루기 쉽고 질적으로도 균일하며 배경 자료도 풍부한 동물을 선택하게 된다. 「의약품등의 독성시험기준」(식품의약품안전청 고시)에서는 두 종 이상의 동물을 사용하도록 요구하고 있고, 그 중 한종은 설치류, 또 다른 한종은 토끼 이외의 비설치류를 제시하고 있다. 비설치류에서 얻어지는 정보는 인간에서의 안전성을 예측하는 측면에서 보다 중요한 자료가 된다. 따라서 비설치류에서는 반복투여독성시험의 예비시험 등에서 적절한 용량선정과 관찰이 이루어진 경우 이를 단회투여독성시험으로서 대체할 수 있다. 예비시험이란 반복투여독성시험의 용량설정 등을 위해 급성징후가 파악될 수 있는 간격으로 동일 동물에 수회로 충분히 높은 용량까지 투여한 시험을 의미한다. 일반적으로 단회투여독성시험에 사용되는 동물 종으로는 반복투여독성시험에서 사용한 동물 종과의 대응을 고려할 때, 설치류는 랫드가, 비설치류는 개가 현재 가장 많이 사용되고 있다. 설치류로는 마우스, 비설치류로는 원숭이 등도 고려할 수 있다.

#### (2) 성

동물시험에서 독성의 발현에 성차가 인정되는 예가 단회와 반복투여독성시험에서 보고되고 있다. 따라서 적어도 1종의 동물은 암수 동물 모두에서 시험을 하여야 한다.

#### (3) 동물 수

동물 수는 시험결과를 해석할 수 있는 충분한 수로 한다. 동물 수를 결정할 때에는 용량단계, 성별 등을 고려해야 한다.

## 나. 투여방법

### (1) 투여경로

투여경로에 따라 시험물질의 흡수율, 흡수속도 등에 변화가 일어날 수 있고 그로인해 독성 작용에 차이가 발생할 수 있다. 따라서 시험물질의 임상 적용경로에서 안전성 정보를 얻는다는 목적에서 임상적용경로를 포함하는 것이 필요하다. 경구투여하기 전에 통상 일정기간 동물을 절식시키는데 이는 위에 내용물이 있으면 대량의 시험물질을 강제 투여하는 것이 어려우며 위의 내용물에 의해 독성반응에 차이가 생길 수 있기 때문이다. 그러나 절식시간에 따라 약물대사효소의 활성이 변동되거나, 또는 시험물질에 의해 장관흡수가 변동되는 경우도 있다. 「의약품등의 독성시험기준」(식품의약품안전청 고시)에서는 절식시간을 정하지는 않았지만, 적어도 위 내용물이 비워지는 최소한의 시간동안 절식하는 것이 필요하다.

척수강내와 관절강내에 적용되는 시험물질과 점안제, 흡입제와 같은 시험물질등을 임상 적용경로에 따라 투여할 때 동물 종에 대한 단회투여독성시험으로 급성독성 징후를 파악하기에 충분한 양으로 투여하는 것이 곤란한 경우가 있다. 따라서 이와 같은 경우에는 다른 투여경로를 선택하는 것을 고려한다.

### (2) 투여횟수

투여횟수는 원칙적으로 단회(1회)이지만 단회투여하는 것이 곤란한 시험물질에 대해서는 24시간 이내에 분할 투여하는 경우도 단회투여에 포함하는 것으로 볼 수 있다. 분할하여 투여한 경우는 그 이유를 명확히 하는 것이 필요하다.

### (3) 용량단계

설치류의 경우 개략의 치사량을 구하기에 적절한 단계를 설정하고, 비설치류의 경우는 독성증상을 명확히 관찰하기에 적절한 단계를 설정한다. 추정 임상용량이 미량이고 동시에 현저히 독성이 약한 시험물질에 대해서는 과학적인 근거에 기초하여 용량단계를 개별적으로 고려한다. 용량 단계 설정 시 ICH나 OECD의 관련 가이드라인을 참고할 수 있다(참고문헌).

## 다. 관찰 및 평가 항목

### (1) 관찰 기간

보통 시험물질 투여 후 72시간 내에 사망 유무가 결정되는 경우가 많지만, 스테로이드와 같이 상당히 오랜 기간이 지난 후 사망하는 경우도 있다. 「의약품 등의 독성시험기준」(식품의약품안전청 고시)에서는 관찰기간을 2주간으로 하였지만 명확한 증상이 지속되거나 사망이 지연될 경우 그 이상으로 할 수 있다.

### (2) 관찰 및 평가 항목

일반상태의 추이와 사망에 이르는 경과를 상세히 기록한다. 그러기 위해서는 투여 후

수 시간은 연속해서, 그 후는 1일 1회 이상 관찰하는 것이 필요하다. 일반상태의 관찰에서는 각종 자극에 대한 반응, 운동(행동), 호흡, 경련, 피모 및 피부, 배설물 등의 상태와 정도, 발현과 결과를 관찰·기록한다. 비설치류에 대해서는 맥박, 체온, 동공반사 등 설치류에서는 관찰하기 어려운 사항에 대해 특별히 주의해서 충분히 검사한다. 체중변화도 독성징후에 당연히 포함되도록 한다. 체중측정의 빈도는 그 추이를 알 수 있도록 하여야 하며 시험기간 중 최소 3회 이상 측정한다. 관찰기간 중에 사망한 동물 및 관찰기간이 완료된 시점에서 생존해 있던 모든

동물을 부검한다. 부검 시 육안적 이상소견이 관찰된 장기·조직은 필요에 따라 적출하여 병리조직학적 검사를 한다. 설치류에 대해 요구하고 있는 개략의 치사량은 시험물질을 대량으로 단회 투여할 때 나타나는 독성징후와 동물의 사망에 이르기까지의 과정에서 구할 수 있는 개략적인 최소 치사량이다. 비설치류는 독성증상을 명확하게 관찰할 수 있는 용량도 가능하다.

## (2) 단회독성시험 등 독성시험 실시

### (가) 천문동 추출물의 독성 평가

천문동 추출물의 독성 유발 여부를 확인하기 위하여 실험 전과 후의 체중 및 장기무게 변화를 측정하였으며 소변지표 및 혈청 내에 간, 신장 독성 지표인 blood urea nitrogen (BUN), creatine (CRE), alkaline phosphatase (ALP), aspartate transaminase (AST), alanine transaminase (ALT)을 측정하였다. 또한 간과 신장을 H&E 염색하여 조직학적으로 독성여부를 분석하였다. 그 결과, 체중 및 장기무게는 천문동 추출물의 처리 전·후에 모든 그룹 간에 유의성이 없었으며(Table 5), 소변지표(Table 6) 및 간독성지표와 신장독성지표 또한 마찬가지로 각 그룹간의 유의성이 없었다(Table 7). 또한 간과 신장의 조직학적 분석에서도 상응하게 각 그룹간의 유의적인 차이를 나타내지 않았다(Figure 39 and 40). 따라서 이러한 결과는 세 농도의 천문동 추출물 모두 실험동물에 특이적인 생리활성이나 독성을 유발하지 않음을 제시하고 있다.

Male				
Category	Vehicle	SEACL	SEACM	SEACH
Body weight (g)	35.7±1.030	35.8±1.327	36.8±2.804	36.7±0.927
Testis (g)	0.201±0.030	0.226±0.028	0.241±0.010	0.232±0.013
Kidney (g)	0.545±0.064	0.557±0.074	0.581±0.026	0.6±0.018
Spleen (g)	0.125±0.010	0.131±0.013	0.147±0.018	0.148±0.008
Liver (g)	1.905±0.112	2.043±0.257	2.173±0.296	2.094±0.164
Thymus (g)	0.038±0.007	0.043±0.006	0.049±0.008	0.046±0.006
Heart (g)	0.19±0.016	0.188±0.020	0.209±0.032	0.203±0.012
Lung (g)	0.217±0.010	0.215±0.013	0.230±0.014	0.236±0.003
Female				
Category	Vehicle	SEACL	SEACM	SEACH
Body weight (g)	29.8±0.678	30.9±1.428	30.6±1.855	29.2±1.122
Ovary (g)	0.033±0.008	0.031±0.005	0.028±0.004	0.026±0.005
Kidney (g)	0.311±0.009	0.333±0.011	0.338±0.019	0.337±0.019
Spleen (g)	0.130±0.009	0.145±0.008	0.147±0.022	0.137±0.005
Liver (g)	1.44±0.277	1.585±0.074	1.405±0.109	1.534±0.136
Thymus (g)	0.084±0.013	0.092±0.022	0.062±0.009	0.076±0.012
Heart (g)	0.132±0.007	0.134±0.006	0.139±0.013	0.134±0.018
Lung (g)	0.27±0.012	0.283±0.024	0.262±0.014	0.241±0.011
Brain (g)	0.506±0.031	0.51±0.014	0.519±0.010	0.515±0.020

Table 5. Alteration of body and organ weights of female and male ICR mice treated with saponin-enriched extract of *A.cochinchinensis* (SEAC) for 14 days

Male				
Category	Vehicle	SEACL	SEACM	SEACH
Bilirubin (μmol/L)	10.60±3.20	10.60±3.20	12.20±3.92	13.00±4.00
Urobilinogen (μmol/L)	36.00±24.49	31.98±11.45	33.00±8.00	36.00±24.49
Leucocytes (WBC/μL)	43.75±24.21	47.22±24.85	44.29±27.05	37.50±21.65
Protein (g/L)	3.60±3.32	5.00±4.15	4.60±4.41	3.20±3.49
pH	7.60±0.20	7.30±0.24	7.10±0.37	7.30±0.24
Specific gravity	1.02±0.00	1.03±0.00	1.02±0.01	1.03±0.00
Ketones (mg/dL)	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00
Female				
Category	Vehicle	SEACL	SEACM	SEACH
Bilirubin (μmol/L)	11.67±3.77	11.67±3.77	9.00±0.00	10.00±3.77
Urobilinogen (μmol/L)	32.67±23.57	49.33±23.57	41.00±25.00	40.00±22.00
Leucocytes (WBC/μL)	58.33±23.57	62.50±21.65	44.29±27.05	54.29±22.05
Protein (g/L)	1.00±0.00	0.83±0.30	1.67±0.94	3.20±0.30
pH	8.00±0.00	8.00±0.00	7.38±0.48	7.30±0.24
Specific gravity	1.02±0.00	1.02±0.00	1.02±0.01	1.02±0.02
Ketones (mg/dL)	1.00±0.00	0.75±0.25	0.94±0.17	0.86±0.25

Table 6. Alteration on the urine parameters in male and female ICR mice after saponin-enriched extract of *A. cochinchinensis* (SEAC) treatment



Male				
Category	Vehicle	SEACL	SEACM	SEACH
ALT (U/L)	31.20±3.19	31.40±3.83	28.25±4.15	38.67±5.25
AST (U/L)	77.60±7.96	74.60±7.58	64.00±11.70	76.50±9.86
ALP (U/L)	74.80±12.73	87.00±17.76	90.67±15.41	78.75±16.98
LDH (U/L)	832.97±76.07	741.35±80.00	858.67±225.37	878.55±99.45
BUN (mg/dL)	26.40±4.57	26.37±5.11	29.41±3.06	28.34±4.73
Cr (mg/dL)	0.28±0.10	0.28±0.04	0.22±0.07	0.20±0.00
Female				
Category	Vehicle	SEACL	SEACM	SEACH
ALT (U/L)	31.60±7.96	28.00±2.55	28.00±2.10	28.80±3.66
AST (U/L)	88.60±9.20	80.75±10.62	78.80±6.14	81.6±8.01
ALP (U/L)	117.25±23.97	100.00±2.83	100.60±17.43	108.40±22.81
LDH (U/L)	1.23±0.39	0.87±0.31	0.81±0.17	0.81±0.34
BUN (mg/dL)	31.08±4.23	27.33±2.70	28.40±1.88	28.46±2.80
Cr (mg/dL)	0.37±0.05	0.30±0.00	0.34±0.08	0.36±0.08

Table 7. Alteration on the serum parameters in male and female ICR mice after saponin-enriched extract of *A. cochinchinensis* (SEAC) treatment

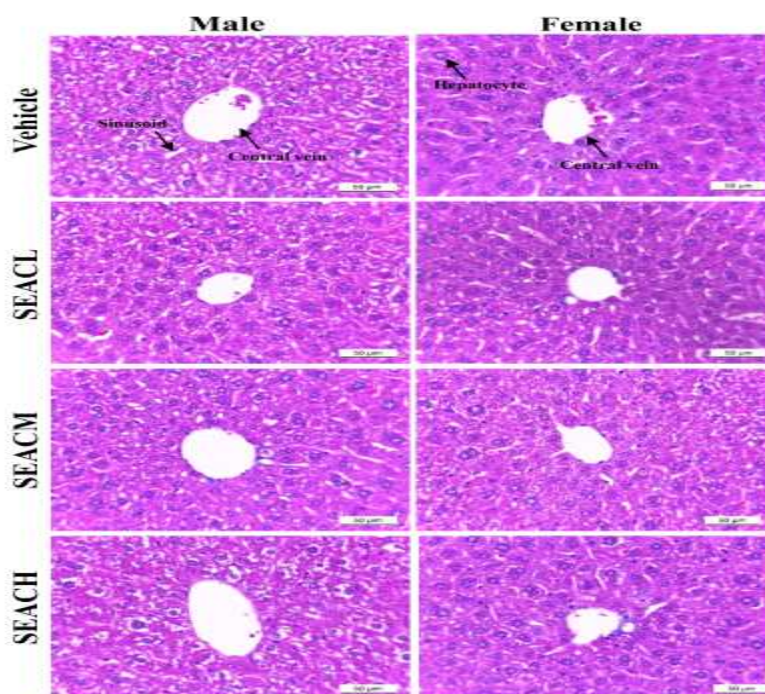


Figure 39. Effects of SEAC on liver toxicity in ICR mice. Liver tissues of male and female ICR mice were stained with H&E and histological structure was viewed at 400× magnification.

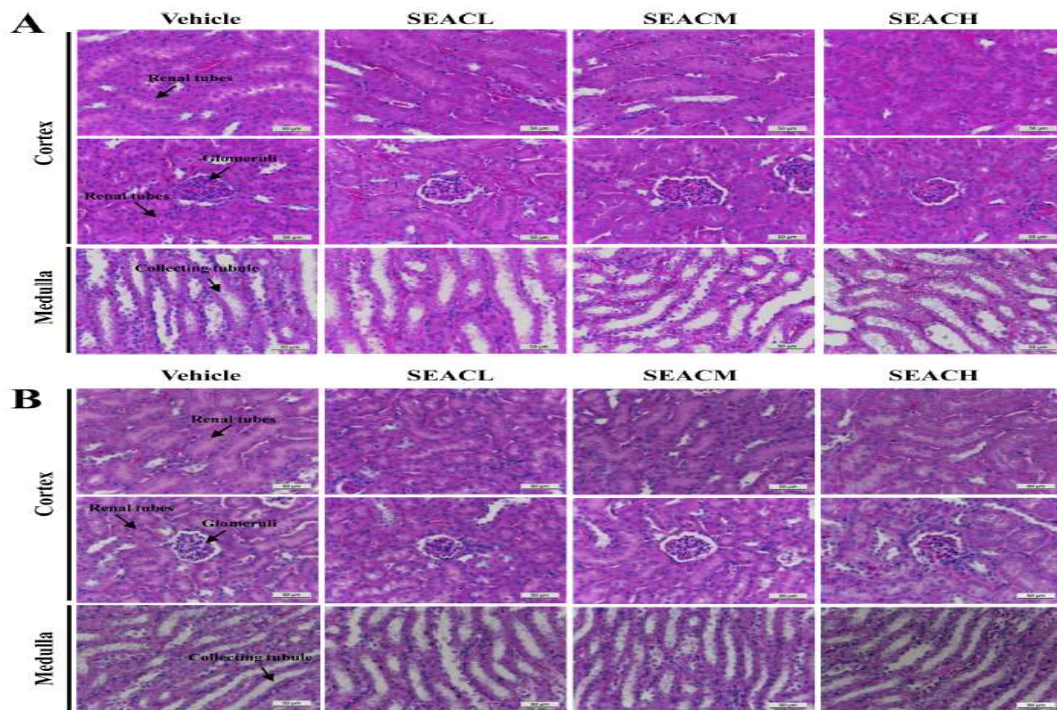


Figure 40. Effects of SEAC on the kidney toxicity in ICR mice. Kidney tissues of male (A) and female (B) ICR mice were stained with H&E, and histological structure was viewed at 400× magnification.

#### 나. 약리 효능평가

##### (1) 약리효능시험 프로토콜 확립

##### (가) 비임상 약리에 관한 효력시험 종류

비임상시험은 사람을 대상으로 하는 시험 이전에 당해 의약품의 안전성과 유효성에 대한 최소한의 정보를 마련하기 위해 요구되는 시험이다. 그 중에서도 질병의 진단, 치료 및 예방의 목적에 사용하는 “약물”의 생체에 대한 작용기전, 흡수, 분포, 대사, 배설, 용법, 용량 등에 관하여 연구하는 것을 약리학(pharmacology)이라고 하며 약물을 개발할 때 임상에 적용하기 이전에 이들 약리에 관한 자료를 마련하여 제출할 것이 요구된다. 비임상시험 단계로서 약리효과 및 그 작용기전을 설명하는 것과 더불어, 표적기관외 다른 기관에서의 바람직하지 않은 효과를 평가하여 바람직하지 아니한 약리작용을 예측하고 약물의 체내동태를 알아보기 위하여 비임상에서의 약리작용에 관한시험을 실시한다. 비임상 약리에 관한 자료로써 효력시험 자료가 마련되어야 하며 그 지침은 아래와 같다.

Table 8. In vitro, ex vivo, in vivo 효력시험

효력시험의 목적 및 고려 사항	
<i>In vitro</i> 시험	<p>목적 : 세포주 등을 이용하여 시험관 내에서 약물에 대한 반응을 확인</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 적절한 세포주 모델 설정 및 목표 질병에 대한 유효성 확인방법 설정</li> <li>- 유효농도/용량의 결정</li> </ul>
<i>Ex vivo</i> 시험	<p>목적 : 동물의 장기등을 적출하여 시험관 내에서 약물에 대한 반응을 확인</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 적출한 장기의 동물 종, 적출기관, 적출 조직 및 보존상태의 적절성</li> <li>- 시험물질의 적용 농도와 vehicle 설정</li> </ul>
<i>In vivo</i> 시험	<p>목적 : 질환모델 동물을 이용하여 약물에 대한 반응을 확인</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 동물 종, 투여방법(투여량, 투여기간, 투여시기)</li> <li>- 중간 차 유무, 동물 종별 유효용량</li> <li>- 약리 작용이 가역적인지 비가역적인지 여부</li> <li>- 병리모델에서 선택적으로 작용하는지(정상동물과 병리모델 동물에서의 비교)</li> <li>- 특정 동물 중에서 약물 투여방법 및 기타 조건을 달리하였을 경우 그 효력의 차이</li> <li>- 기 실시된 임상시험에서의 목표 질병에 대한 약리 작용과 동물에서의 약리작용의 일관성 여부 및 동물종 간 유효용량의 차이</li> <li>- 각종 병리모델 동물에서의 효력시험을 실시한 경우, 유효성 파라미터의 수치변화</li> <li>- 모약물 및 대사체의 작용을 설명. 모약물의 대사기전과 대사 중 생성되는 대사물의 종류 및 모약물과 가 대사물의 약리작용 유무</li> </ul>

\* 출처 : ‘Map of new drug application’, 식품의약품안전청, 식품의약품안전평가

(나) 호흡기질환(천식)약리효능 시험방법

<p>1. 개요</p> <p>천식의 일과성모델은 ovalbumin inhalation을 통한 모델제작과 human dust mite를 통한 모델제작으로, ovalbumin의 경우 inhalation 기간(횟수)과 ovalbumin inhalation 후 회복기간에 따른 최적화 모델성립여부를 확인하였으며 human dust mite의 경우 intranasal instillation 기간(횟수)에 따른 최적화 모델성립여부를 확인한다. 이를 통해서 각각 "5-days ovalbumin inhalation model"과 "35-days human dust mite intranasal instillation model"이라는 제목의 제작안내서를 준비한다. 특히 발병시점(1일 - 7일간 ovalbumin inhalation, human dust mite 투여 후 35일에 확인), 질병정도(폐의 병리조직학적 소견 - H&amp;E stain, PAS stain), 발병지속시간(0 hr - 72 hr 회복기), 바이오마커 (cell surface molecules - CD3, CD4, CD8, CD19, CD68, MHC class II; Th1-related</p>
---

cytokines - IFN- $\gamma$ , IL-12p35, IL-12p40; Th2-related cytokines - IL-4, IL-5, IL-13; proinflammatory cytokines - TNF- $\alpha$ , IL-6) 등의 분석을 실시한다.

## 2. 시험방법

### 가. 실험동물

#### (1) 동물 종

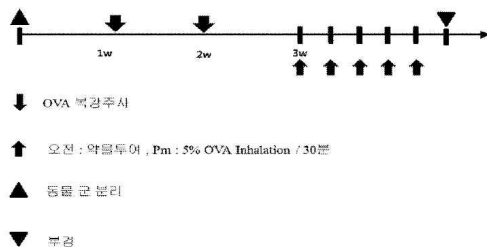
동물 종: 시험물질에 대한 동물종을 선택함에 있어서 효능 또는 대사 양상이 인간과 비슷한 동물 종을 선택한다. 시험에 사용하는 마우스는 특정병원체 부재(SPF) 마우스, BALB/c 종을 선택한다. 시험에 시용된 동물은 풍부한 시험 기초 자료가 축적되어 있으며 시험결과의 해석 및 평가에 참고할 수 있다.

#### (2) 동물 수

동물 수는 시험결과를 해석할 수 있는 최소한의 충분한 수로 산정하며 동물 수는 투여 기간에 따라 총 3개의 군으로 나누었으며 각 군을 10마리씩 산정한다. 산정기준은 부검 시 5마리는 BALF 채취, 5마리는 폐 조직을 얻기 위하여 10마리로 산정한다.

### 나. 투여방법

동물실험일정은 아래 그림과 같다. 입수 후 5일간 동물사육실에서 순화기간을 가지고 실험시작 1주일 전에 군분리를 실시하였다. 군분리 후 1주와 2주되는 날 2회 복강주사로 감작을 실시하였다. 3주째부터 5 일간 5 % OVA solution inhalation 후 다음날 부검을 실시한다.



복강투여용 물질은 관련문헌 에 근거하여 OVA 20  $\mu$ g + alum hydrate 1 mg + normal saline 500  $\mu$ L/head 로 투여한다. 예를 들어 투여해야할 동물 마리수가 총 10 마리라면 OVA 200  $\mu$ g + alum hydrate 10 mg + normal saline 5 mL로 환산하여 조제했다. 주 1회로 2주간 복강주사로 감작시키고 1 mL Syringe를 이용하여 주사한다.

Inhalation용 물질은 OVA 1 g + normal saline 20 mL (5% OVA Solution)로 만들어 voltexing하여 투여한다. neublizer (OMRON, NE-U17)를 사용하여 5일 동안 강제 흡입을 실시하고 흡입챔버(inhalation exposure chamber)를 이용하여 전신에 노출 시킨다.

### 다. 관찰 및 평가 항목

#### (1) BALF에서 White blood cell 및 Differential cell count

혈구분석기를 통한 BALF의 WBC 및 differential cell count를 측정한다. BALF 채취를 통해 얻은 1번 튜브는 3000 rpm/5 min으로 원심분리 후 상층액을 3번 튜브로 옮긴다. 3번 튜브에 상층액을 옮긴 후 바로 냉동실 보관한다. 그리고 1번의 남은 Pellet에 PBS 20  $\mu$ L를 넣고 섞어 준다. 2번 튜브 또한 3000 rpm/5 min으로 원심분리 후 상층액을 버리고 남은 pellet에 PBS 60  $\mu$ L을 넣고 섞어준다. 1번의 20  $\mu$ L와 2번의 60  $\mu$ L를 섞어 총 80  $\mu$ L를 만든 후 혈구분석을 실시한다.

#### (2) IgE 분석

Mouse IgE ELISA set (BD Biosciences, 555248, CA, USA)을 사용하며 시약은 Kit의 Data sheet에 맞게 준비한다. Coat micro well에 Coating Buffer에 희석한 Capture Ab를 100  $\mu$ L씩 넣고 커버를 덮고 4  $^{\circ}$ C에서 overnight한다. wash buffer로 3번 washing 후 각 well에 Assay Diluent를 200  $\mu$ L씩 넣고 실온에서 1시간 incubation한다. wash buffer로 3번 washing 후 각 well에 Assay Diluent로 희석한 standard, sample를 100  $\mu$ L씩 넣고 실온에서 2시간 incubation한다. wash buffer로 5번 washing 후 각 well에 Working Detector (Detection Antibody + SA<sub>v</sub>-HRP reagent)를 100  $\mu$ L씩 넣고 실온에서 1시간 incubation한다. wash buffer로 7번 washing 후 각 well에 Substrate Solution을 100  $\mu$ L씩 넣고 실온의 암조건에서 30분 incubation한다. 각 well에 Stop Solution을 50  $\mu$ L씩 넣고 30분 이내에 450 nm에서 측정한다.

#### (3) 폐조직의 Hematoxylin & eosin (H&E) stain

부검을 통해 채취한 폐조직을 10% 포르말린 용액에 Fixation을 시킨 후, processing 후 embedding을 실시했다. 파라핀 제거 및 수화과정으로 Xylene 5분 => Xylene 5분 => Xylene 5분 => 80% 알코올 1분 => 90% 알코올 1분 => 100% 알코올 1분의 과정을 실시한다. 탈수과정 후 1차 증류수 또는 수돗물에 5분 동안 수세를 실시한다. 물기를 잘 닦아준 후에 Hematoxylin 1분 30초 동안 담가 염색한다. 염색 후 1차 증류수 또는 흐르는 수돗물에 15분간 washing을 실시한다. 청명과정 및 탈수과정으로 95% 알코올 5분 => Eosin 10분 => 95% 알코올 1분 => 95% 알코올 1분 => 100% 알코올 1분 => 80% 알코올 1분 => 90% 알코올 1분 => 100% 알코올 1분 => Xylene 2분 => Xylene 2분 => Xylene 2분 동안 한 후에 Mounting 과정으로 조직봉입을 실시한다. 준비된 조직은 현미경으로 관찰한다.

#### (4) Western blot

Western blot를 하기 위해 sample 준비를 먼저 한다. Tissue preparation을 위해 사용 전에 -4 $^{\circ}$ C centrifuge를 켜고 1 mL tube 안에 조직을 넣고 300  $\mu$ L lysis buffer를 넣고 homogenizer를 이용해 분쇄한다. 그 후 -4 $^{\circ}$ C centrifuge/15 min/12000 rpm으로 돌리고 상층액을 통해 실험을 실시하고 향후 사용을 위해 남은 sample은 -70 $^{\circ}$ C에 보관한다. 일정한 총 단백질을 활용하기 위해서 단백질 정량을 실시한다. SMART<sup>TM</sup> BCAProtein Assay Kit(Cat. No 21071)를 이용하여 단백질을 정량한다. 제조사 protocol에 맞게 단백



질 정량을 실시한 후 96-well plate 세로 8개 well에 번호순에 맞게 standard를 25  $\mu$  L+working solution 200  $\mu$ L를 넣고, 나머지는 sample 개수에 맞게 sample을 D.W와 섞어 25  $\mu$ L 씩 넣고 그 위에 working solution을 200  $\mu$ L 넣어서 total 225  $\mu$ L를 맞춰주고, 37°C에서 30 min간 incubation을 실시한다. 그 후 96-well plate를 ELISA READER기 562 nm에서 측정하여 단백질을 정량한다. gel은 antibody의 kDa에 따라서 separating %를 결정하여 protocol대로 만들고 5% stacking도 만든다. Sample은 일정한 양에 맞춰서 계산한 결과대로 sample과 D.W를 넣고 1:1 비율로 dye를 넣고 95°C에서 10분간 heating 후 냉동에 보관한다. sample을 만들어놓은 gel에 넣고 80V/40min, 120V/6-min 동안 전기영동을 실시하고 75V/45min 동안 transfer를 실시한다. membrane을 5% skim milk로 blocking을 1시간 30분간 실시한다. TBS-T로 15분간 3번 washing을 실시한다. Primary antibody를 붙인 후 냉장상태에서 overnight한다. TBS-T로 15분간 3번 washing하고 secondary antibody를 2시간동안 결합시킨다. TBS-T로 15분간 3번 washing하고 ECL로 발색하여 Chemidoc으로 형광을 검출한다.

\* 식품의약품안전처 용역연구개발과제 최종보고서 (2013) 호흡기질환 모델동물개발 및 생약제제 유효성평가활용연구

## (2) 천문동제품의 질환개선 작용메커니즘 연구

대표적인 호흡기질환인 천식은 airway inflammation, remodeling, hyperresponsiveness와 같은 3가지의 특징적인 체내 변화를 일으키며, 이 세가지 변화는 상호 보완적으로 작용한다. 본 연구에서는 이 중에서 airway inflammation, remodeling에 관여하는 Factor들을 확인하여 발효천문동 제품이 어떠한 작용 메커니즘에 의해 천식을 완화시키는지 확인하고자 하였다.

### (가) 천식질환 모델동물 확립

호흡기질환에 대한 발효천문동의 완화 효능을 확인하기에 앞서, 천식유발동물을 확립하고자 호흡기질환 모델동물을 제작하였다. 일주일간의 순화기간을 거친 뒤, 체내 면역반응을 유도(Sensitization, 감작)하기 위하여 항원물질인 Ovalbumin (20  $\mu$ g)과 면역증강제인 Aluminum hydroxide (2 mg)를 1:100 비율로 섞어서 제조한 용액을 마리당 200  $\mu$ l씩 0, 14일에 복강투여 하여 감작반응을 유발하였다. 이후, 21일-23일, 3일간 Chamber에 마우스를 넣고 nebulizer를 사용하여, 30분간 2% Ovalbumin을 aerosol화하여 마우스들이 흡입하도록 유도하였다. 한편, 천식 유발 그룹과 비교분석하기 위한, No 그룹은 PBS를 사용하여 동일한 과정을 수행하였다. 마지막 흡입 후, 48시간 뒤인, 25일에 마우스를 안락사 시키고 기관지세척액 및 혈청, RNA 및 단백질 분석용 샘플과 조직병리분석을 위한 샘플을 수확하여 분석을 실시하였다(Figure 41).

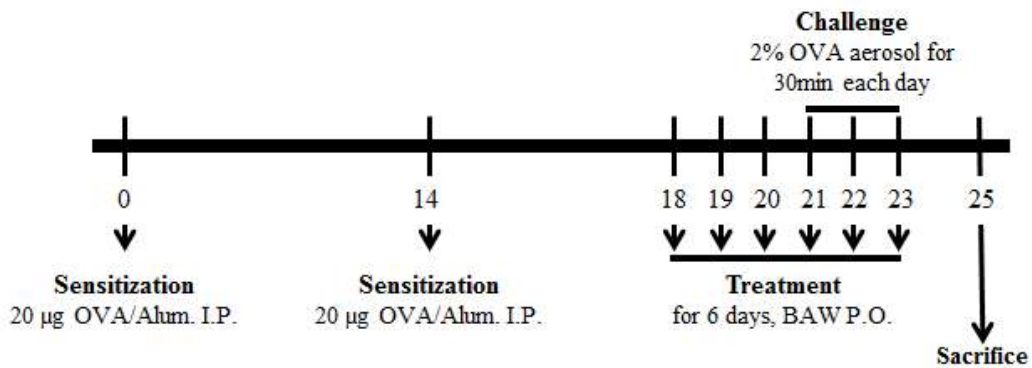
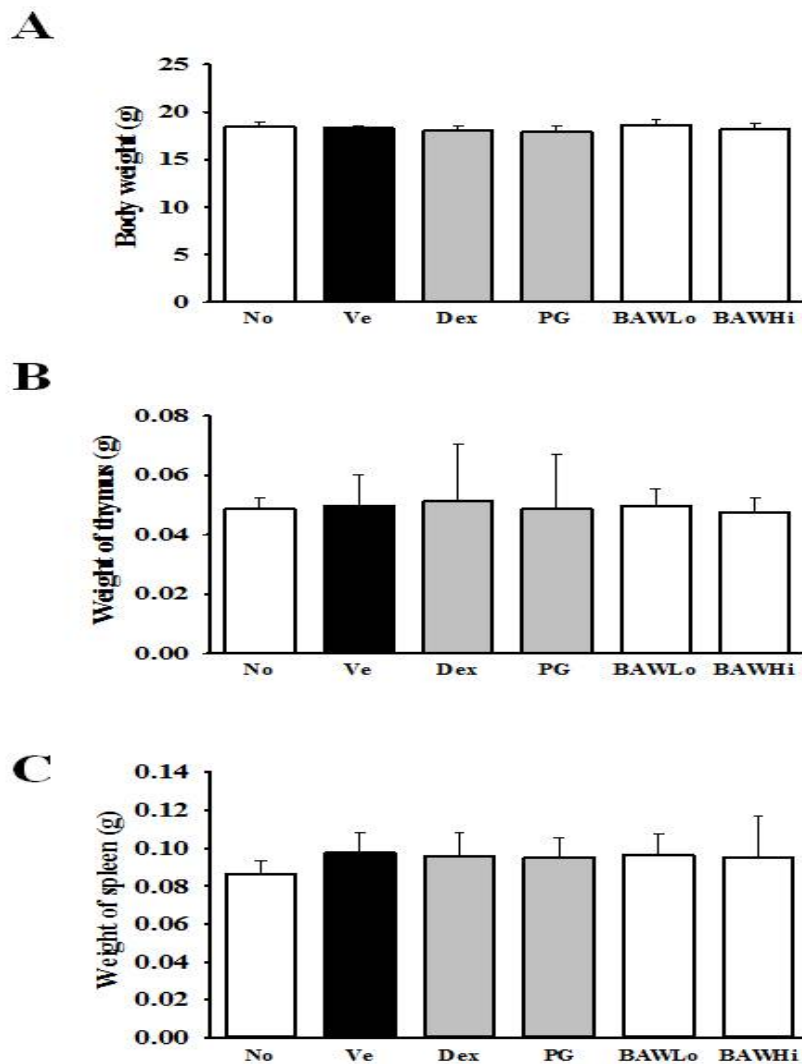


Figure 41. Experimental schedule for animal study.

(나) 체중 및 면역장기 무게의 변화

성장의 지표인 동시에 일반적인 건강상태의 민감한 지표인 체중을 확인하기 위하여 마지막 Ovalbumin 흡입시키고 48시간 후 부검 직전에 체중을 측정하였다. 그 결과, No 그룹과 비교하였을 때, Ovalbumin 처리 후, 각 시료를 경구투여한 각각의 그룹에서 유의적인 차이를 나타내지 않았다. 이러한 결과는 실험에서 사용한 용매 및 Dex, PG, BAWLo, BAWHi가 독성을 나타내지 않음을 나타내고 있다. 또한 각 시료의 면역기관에 끼치는 영향을 확인하기 위하여, 면역 장기인 Thymus와 Spleen의 무게를 측정하였다(Figure 42). 그 결과 체중과 마찬가지로 유의적인 차이를 보이지 않았다. 이러한 결과 또한 각 시료가 독성을 나타내지 않음을 나타낸다.



**Figure 42.** Measurement of body weight and organ weight. The body weights of all mice were measured throughout the experimental period. Following final treatment, mice from each group were sacrificed under anesthesia, after which spleen and thymus were harvested and weighed.

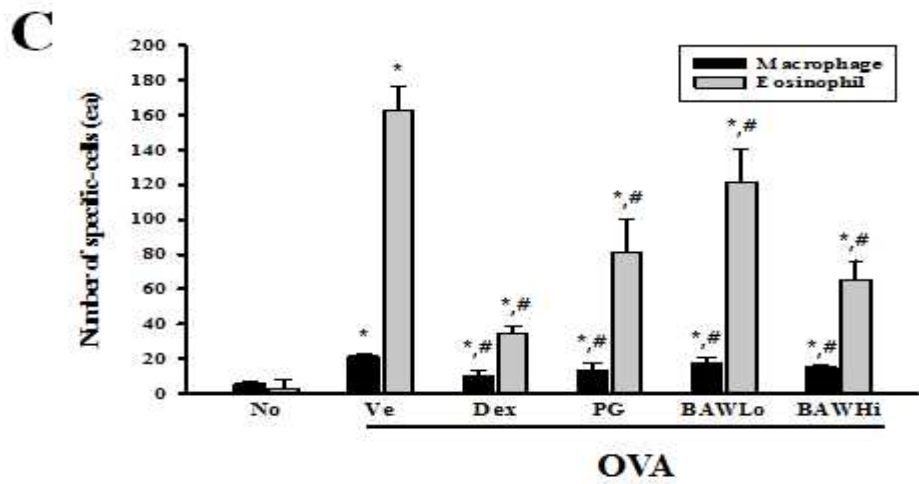
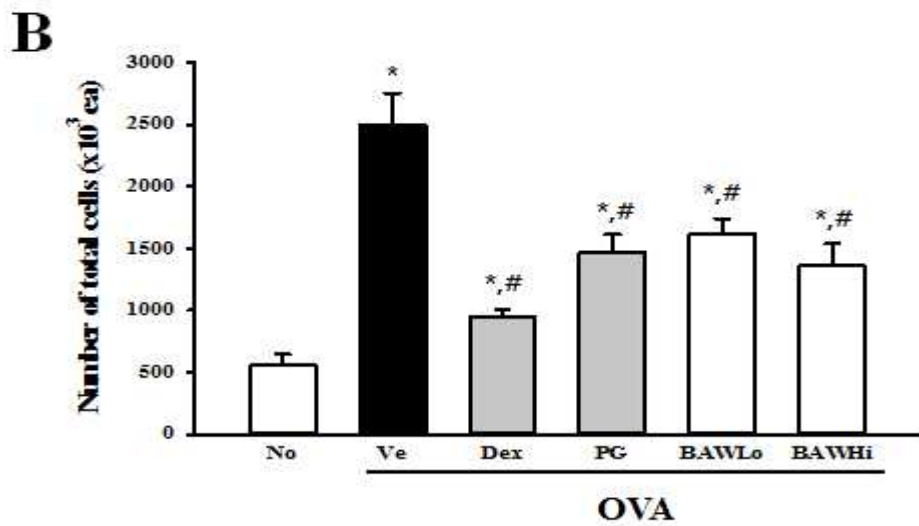
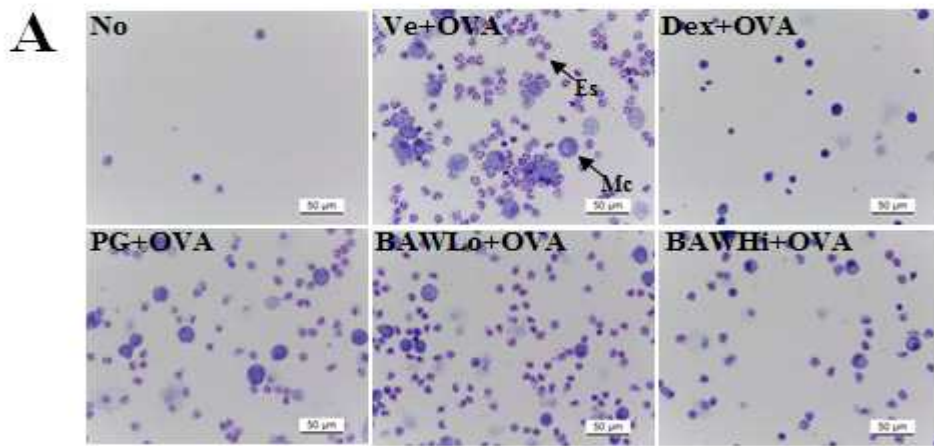
(다) 기관지 세척액 내 total cell의 수 및 macrophage, eosinophil 수 측정

기관지 세척액 내 총 세포의 수를 확인하기 위하여, 기관지 세척술을 실시하였다. 마지막 OVA 흡입 후, 48시간 뒤인 25일째 날에 실험동물을 마취시키고 기도부분을 절개하여 카테터를 삽관하였다. 다음으로 봉합사를 사용하여 카테터를 기관지에 고정시켰다. 이후 1 ml의 차가운 PBS (pH 7.4)를 삽입하고 회수하여 기관지 세척액을 얻었다(수율 80%). 수확된 기관지 세척액은 원심분리 (2000 xg, 10분) 하여, 상층액과 세포를 분리 시켰고, 상층액은 이후 분석을 위하여 -70도 냉장고에 보관하고 펠렛은 PBS에 회석하여 총 세포수 측정에 사용하였다. 총 세포수 측정은 Trypan blue를 사용하여 hemacytometer로 측정하였다. 실험



의 정확성을 위하여 hematocytometer의 4분면의 수를 세고 평균을 내어 세포수를 계산하였다. 그 결과, No 그룹과 비교하였을 때, OVA+Ve 그룹의 총 세포수가 5배정도 증가하였으며 이는 Dex, PG, BAWLo, BAWHi를 각각 처리함에 따라 현저하게 감소하는 양상을 보였다. 이 중에서도 BAWHi는 잘 알려진 천식완화 천연물인 PG보다 total cell 수를 더 효과적으로 감소시켰다(Figure 43).

한편, 이러한 세포 내에서 특이적인 면역세포의 수를 확인하기 위하여, cytospin(한일, Cellspin)을 사용하여 세포를 slide에 부착시키고, Giemsa 염색을 실시하여 관찰하였다. 먼저, OVA처리 그룹 기준으로 세포침전물에 500 ul의 생리식염수를 넣었고, 한 슬라이드 당 50 ul씩 처리하였다. 이후 건조과정을 거친 뒤, 메탄올로 세포를 고정하였고 Giemsa 염색약(Sigma Aldrich)과 May Grunwald 용액을 사용하여 세포를 염색시켰다. 에탄올 처리를 통한 탈수과정 및 투명화과정을 거친 후 mounting하였고 400X에서 세포의 핵모양 및 세포 크기로 세포를 구분하고 그 수를 측정하였다. 그 결과, macrophage의 경우 OVA+Ve 그룹( $21.50 \pm 1.73$ )에 비해 BAWLo 그룹과 BAWHi 그룹(각각  $18.00 \pm 2.82$ ,  $15.25 \pm 1.70$ )이 유의하게 감소되었다. 특히 알레르기 염증세포인 eosinophil도 OVA+Ve 그룹( $162.75 \pm 14.24$ )에 비해 BAWLo 그룹과 BAWHi 그룹(각각  $121.66 \pm 18.44$ ,  $65.25 \pm 11.11$ )이 농도의존적으로 감소되었다(Figure 43). 이러한 결과는 BAW가 BALF내의 면역세포 수를 효과적으로 감소시킴을 제시하고 있다.



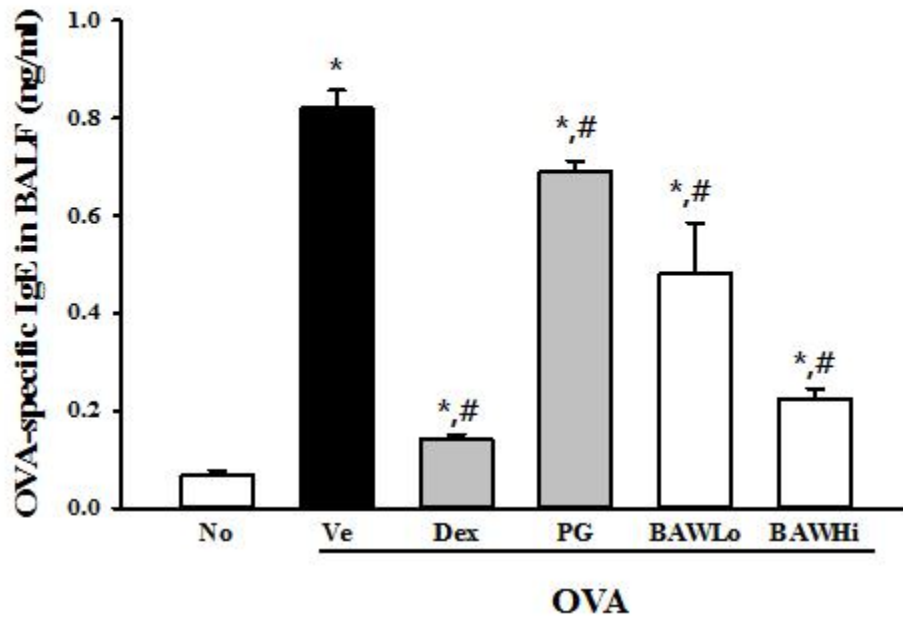
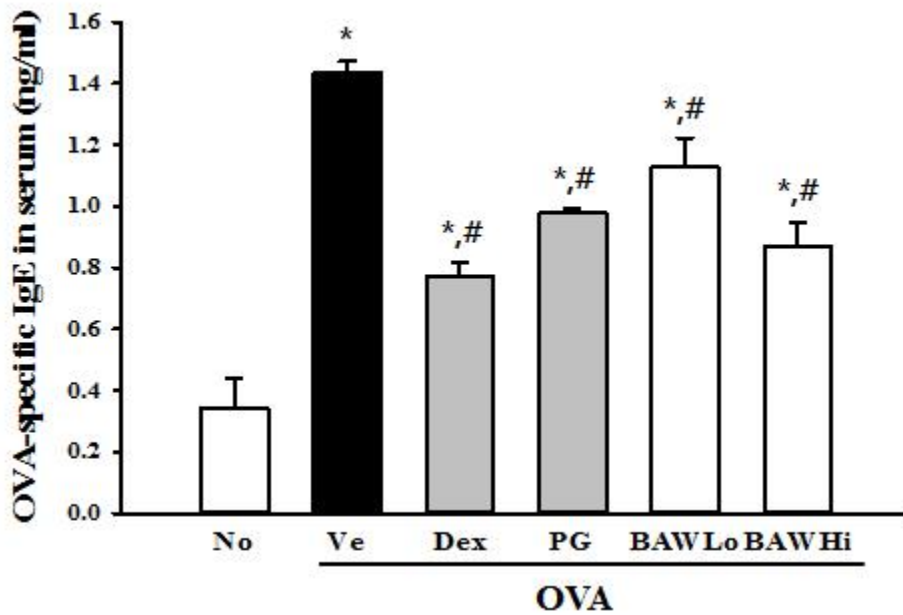
**Figure 43.** The count of total cells and specific immune cells in bronchoalveolar lavage (BAL) fluid

(라) BALF 및 혈청 내 OVA 특이적인 IgE 양 비교

천식은 호흡을 통하여 외부로부터 천식의 원인물질인 항원이 폐 내로 들어왔을 때 이에

대한 반응으로 기도의 알레르기성 염증이 발생하게 된다. 이때 항원의 제거의 일차적인 역할은 폐포의 대식세포가 담당하게 되고 활성화된 대식세포는 항체를 생산하도록 B 세포를 자극하여 항원 특이성 IgE를 생산한다. IgE는 비만세포를 활성화시키고 항원과 IgE가 결합하면 비만세포에서 탈과립이 일어나 초기 천식반응을 유발하게 된다.

OVA를 처리함에 따른 혈청 내 OVA 특이적인 IgE의 양을 확인하기 위하여, 마지막 OVA 흡입 후 회복하여 복대정맥으로부터 혈액을 채취하였고, 혈청분리튜브(BD)에 넣은 후, 원심분리 (2000 xg, 15분)하여 혈청을 분리하였다. BALF 및 혈청 내 OVA 특이적인 IgE의 농도는 ELISA kit를 이용하여 권장방법에 따라 측정하였다. 먼저, 포획항체(capture antibodies)를 immunoplate에 분주하여 실온에서 1시간동안 부착시켰고, 미부착된 항체는 세척용액(washing solution, 50 mM tris, 0.14 M NaCl, 0.05% Tween 20, pH 8.0)으로 3번 세척하여 제거하였다. 포획항체가 결합된 immunoplate의 각 well에 마우스로부터 분리된 혈청과 희석된 표준 IgE (standard IgE)를 첨가하여 1시간동안 결합시킨 뒤 미 부착된 용액을 제거하였고, horseradish peroxidase가 결합된 항체를 첨가하였다. 최종적으로 기질용액(substrate solution)을 첨가하고 어두운 실온에서 30분간 배양하여 반응을 유도한 후 2 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>용액을 첨가해서 반응을 정지시켰다. 반응 결과는 Microplate Reader (Molecular Device Co., Sunnyvale, CA, USA)를 이용하여 450 nm에서 확인하였다. 그 결과, No 그룹과 비교하였을 때, OVA+Ve 그룹에서 더 높은 값의 IgE 농도를 나타내었으며 BAWLo와 BAWHi 그룹에서 감소하는 양상을 보임을 확인하였다. BALF와 혈청 모두에서 Dex 그룹이 가장 크게 감소되었고, BAWHi 그룹은 PG 그룹에 비해서 OVA 특이적인 IgE 양이 더 크게 감소되었다(Figure 44). 이러한 결과는 PG와 BAW가 천식완화에 효능이 있으며, 이는 BALF 및 혈청 내 IgE 양에서 BAWHi가 더 큰 효능을 나타냄을 제시한다.

**A****B**

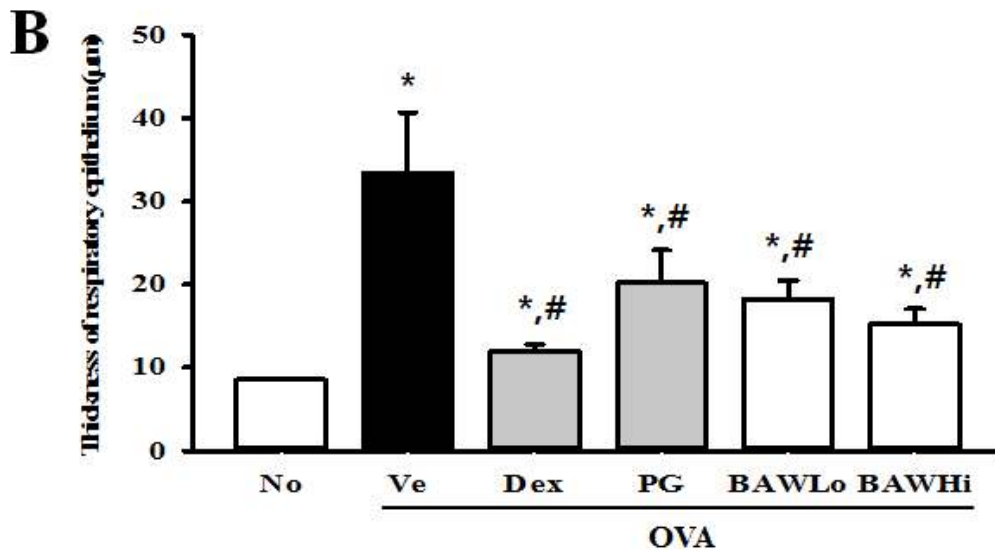
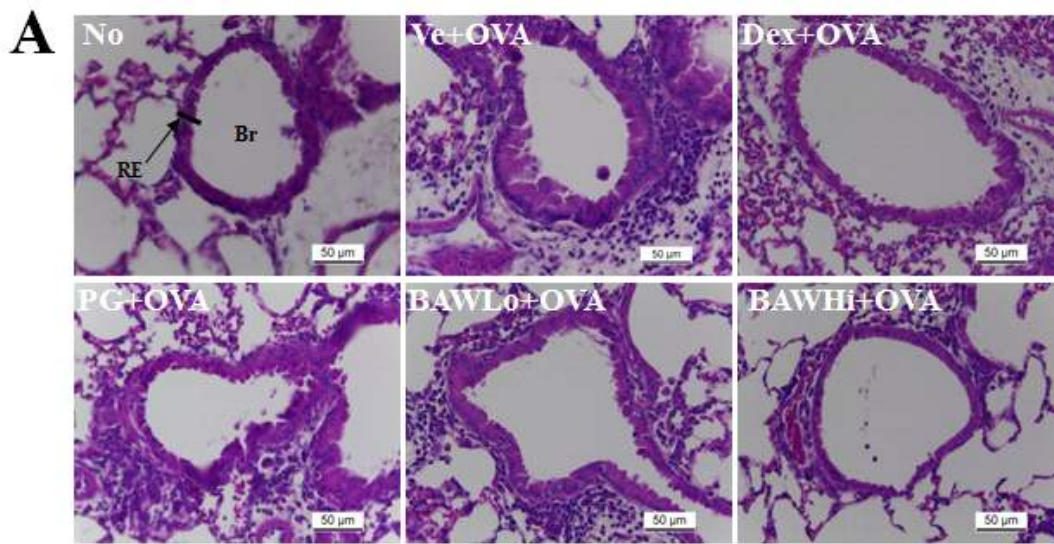
**Figure 44.** Detection of OVA-specific IgE concentration. The both concentration of OVA-specific IgE in BALF (A) and serum (B) were quantified by an enzyme-linked immunosorbent assay.

(마) 폐, 기관지 등의 조직학적 특성 분석

○ 폐조직의 구조적 변화의 회복에 미치는 영향

OVA를 처리함에 따른 조직 내의 염증 세포 세기관지의 양상을 확인하기 위하여 H&E 염

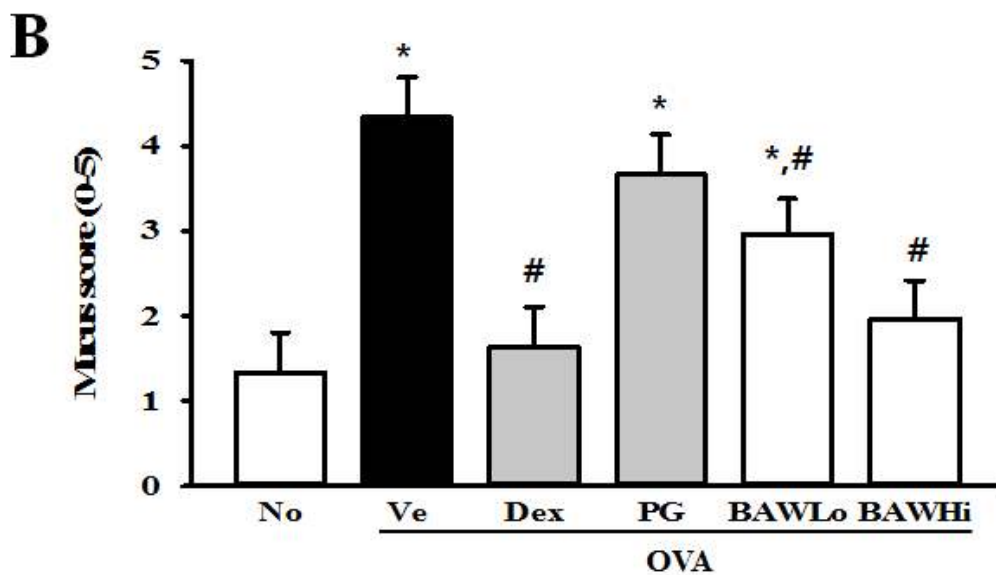
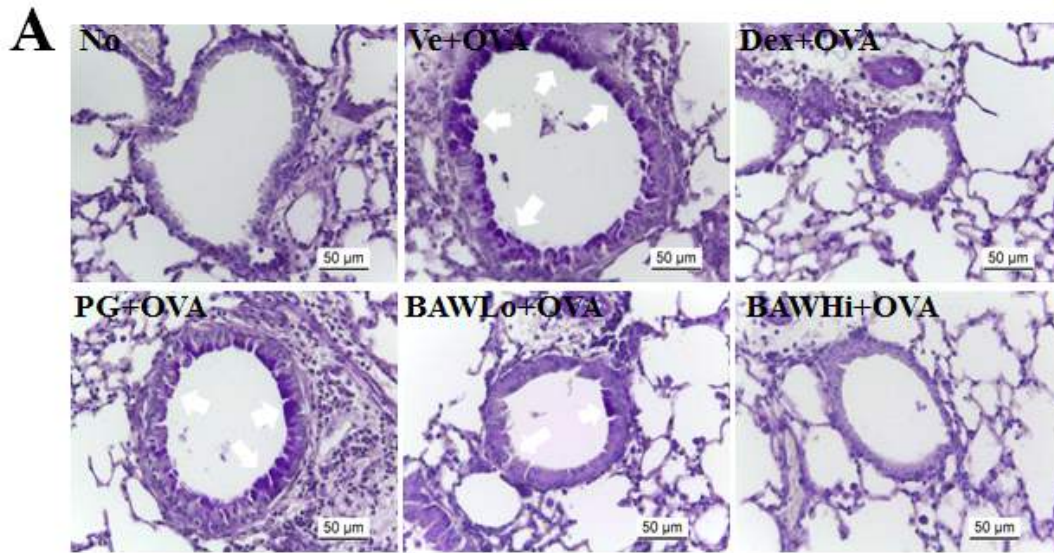
색 및 PAS 염색을 실시하였다. 먼저, 안락사한 동물로부터 Lung을 적출하여 10% 포르말린에 48시간 이상 고정하고, 폐의 오른쪽 가장 큰 엽을 절단하여 카세트에 넣었다. 카세트에 담긴 조직은 조직처리기를 이용해서 70, 80, 90, 95, 100% alcohol에 각각 1, 1, 1, 3, 3시간씩 처리하고, xylene으로 3시간 처리하였다. 이후 파라핀으로 포매하여 블록을 만들고, -20℃에서 24시간 보관한 뒤 Leica microtome (Leica Microsystems, Bannockburn, IL, USA)을 사용하여 4 µm로 박절하였다. 조직 슬라이드는 xylene으로 탈파라핀(deparaffin)하였고, alcohol으로 탈수(dehydration)한 후, hematoxylin과 eosin (H&E)으로 염색하였고 광학현미경(Leica Microsystems, Wetzlar, Germany)으로 조직을 관찰하였다. 그 결과, No 그룹에 비하여, OVA를 처리함에 따라 세기관지 주변으로 cell이 더 많이 증가하였으며, 세기관지의 표피 두께가 유의적으로 2배 이상 증가하는 경향을 보였다. 또한, Dex와 PG, BAW를 처리한 그룹에서 각각 증상이 완화되었음을 확인하였다. 이러한 효과는 도라지 추출물과 발효천문동 추출물에서 매우 유사하게 관찰되었으며, 유의적인 차이는 없었다. 특히 BAWHi 처리 그룹에서는 염증세포의 침투 또한 크게 감소하는 양상을 보였다(Figure 45).



**Figure 45.** Histological analysis of lung tissue. Lung tissues were fixed, sectioned at 4 μm thickness, and stained with H&E solution followed by observation at 400× magnification. Br, Bronchus; RE, Respiratory epithelium.

○ goblet hyperplasia 및 mucin분비에 미치는 영향

발효천문동 추출물이 mucin분비에 미치는 영향을 분석하기 위하여 PAS용액으로 폐 조직을 염색하여 mucin분비세포인 goblet cell의 hyperplasia를 관찰하였다. 그 결과, 두꺼워진 표피두께와 마찬가지로, OVA를 처리함에 따라 goblet hyperplasia가 강하게 일어났으며 mucin 분비량이 증가하였지만 Dex와 PG, BAW 처리 그룹에서 유의적으로 감소함을 확인하였다(Figure 46). 따라서 이러한 결과는 발효천문동이 goblet hyperplasia를 회복시켜주는 중요한 기능을 통해 호흡기질환은 완화시키는 효과가 있음을 제시하고 있다.



**Figure 46.** Goblet hyperplasia in lung tissue. After staining with Periodic Acid Schiff (PAS), goblet hyperplasia was observed in lung tissue at 400× magnification. Mucus score were performed by four independent investigators in a single-blind study analysis based on four different random locations using a microscope. 0, no mucus; 1, < 5% of the epithelium, 2, 5%–10% of the epithelium, 3, 10%–20% of the epithelium, 4, 20%–30% of the epithelium, 5, 30%–40% of the epithelium. Data shown are the means ± SD (n=5). \*,  $p < 0.05$  compared to the No treated group. #,  $p < 0.05$  compared to the OVA+Vehicle treated group.

(바) 기관지세척액 및 혈청 내 mouse IL-4 측정

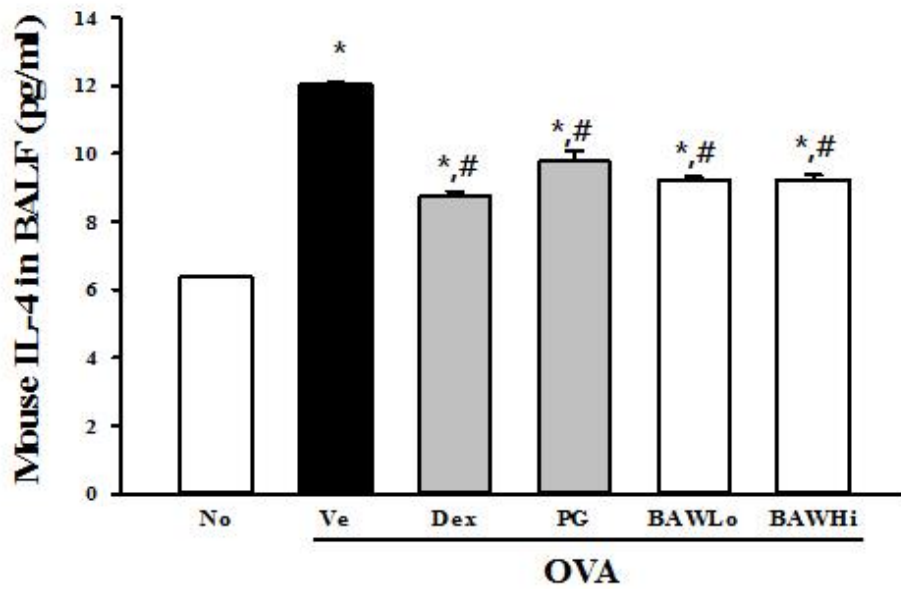
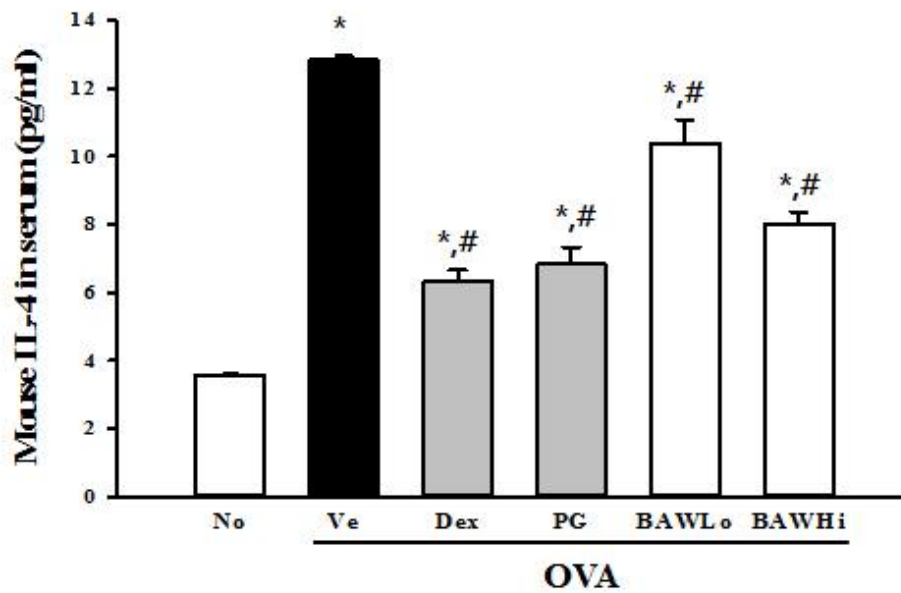
항원에 노출된 B 세포는 CD4 T 세포를 자극하여 T helper 2 (Th2) 세포로 분화되고, 분화된 Th2 세포는 IL-4,5,6,9,13 등을 분비하여 호산구를 자극하고 후기 알레르기성 기도



반응을 유발한다. 이중 IL-4의 경우 B세포를 자극하여 IgE 생산을 촉진시키고 염증세포들을 자극하여 염증매개 물질들을 분비시켜 기관지과민성과 기도폐쇄를 일으켜 천식증상을 일으킨다. 이처럼 천식의 경우 IL-4 등이 관여하는 Th 2 세포반응이 Th 1 세포반응보다 우세하다고 알려져 왔다.

기관지세척액 및 혈청 내 mouse IL-4의 양은 ELISA kit (biolegned)를 이용하여 회사의 권장방법에 따라 측정하였다. 먼저, 포획항체(capture antibodies)를 immunoplate에 분주하여 실온에서 1시간 동안 부착시키고, 미부착된 항체는 세척용액(washing solution, 50 mM Tris, 0.14 M NaCl, 0.05% Tween 20, pH 8.0)으로 3번 세척하여 제거하였다. 포획 항체가 결합된 immunoplate의 각 well에 마우스로부터 분리된 혈청과 희석된 표준 IL-4 (standard IL-4)를 첨가하여 1시간 동안 결합시킨 뒤 미부착된 용액을 제거하였고, horseradish peroxidase가 결합된 항체를 첨가하였다. 최종적으로 기질용액(substrate solution)을 첨가하여 어두운 실온에서 30분간 배양하여 반응을 유도한 후 2 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 용액을 첨가해서 반응을 정지시켰다. 반응 결과는 Microplate Reader (Molecular Device Co., CA, USA)를 이용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하여 확인하였다. 그 결과, OVA을 처리하였을 때 BALF 및 혈청 내에서 IL-4의 농도가 증가하는 것을 관찰하였다. 또한, OVA 자극으로 증가된 IL-4의 양이 Dex와 PG, BAW를 투여함으로써 유의하게 감소하는 것으로 나타났다. 천연물질인 PG와 BAW를 비교하였을 때, BALF 내에서는 BAW 그룹에서 IL-4가 더 크게 감소하지만 혈청 내에서는 PG 그룹에서 더 크게 감소하였다(Figure 47). 이러한 결과는 발효천문동 추출물이 Th2 사이토카인인 IL-4의 분비를 억제하였으며 이는 알레르기 면역반응으로의 진행을 막음으로써 천식을 개선시킬 수 있음을 제시한다.



**A****B**

**Figure 47.** Mouse IL-4 levels in BALF (A) and serum (B). The both concentration of Mouse IL-4 in BALF and serum were quantified by an enzyme-linked immunosorbent assay.

(사) Angiogenesis의 지표인 VEGF의 발현량 비교 및 signaling pathway 분석

○ 폐 조직 내 VEGF의 양의 확인

Vascular endothelial growth factor (VEGF)는 천식의 발병에 따른 폐기관의 구조적인

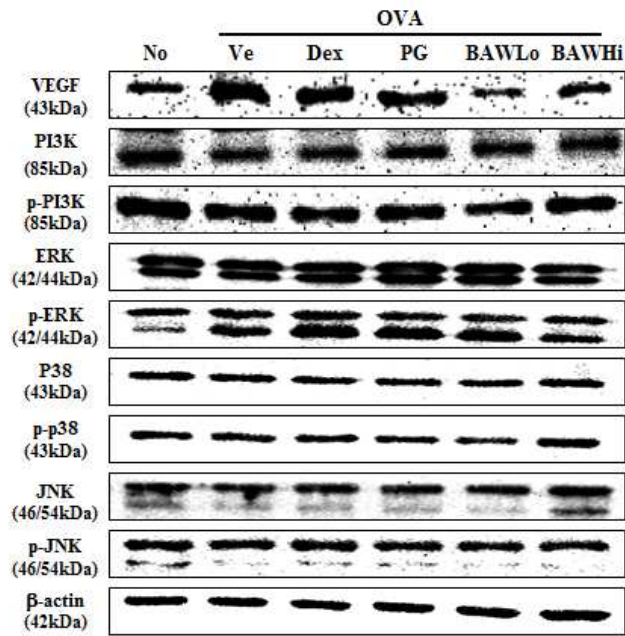
변화에 중요한 역할을 하는 Factor로서 혈관형성에 관여하여 remodeling을 돕는 것으로 알려져 있다. 따라서 폐 조직 내의 VEGF의 양을 확인하기 위하여, Western blot을 실시하였다. lung에 PRO-PREP Protein Extraction Solution (iNtRON Biotechnology, seongnam, korea)에 첨가하여 glass homogenizer (Wheaton Industries, Millville, NJ, USA)를 이용하여 분쇄한 후, 13,000 rpm에서 10분 동안 원심 분리하여 상층액을 수확하였다. 분리된 단백질의 농도는 SMARTTM BCA Protein Assay Kit (iNtRON Biotechnology)을 이용하여 정량하였고, 30 µg의 단백질을 실험에 사용하였다. 먼저, 10% SDS-PAGE gel에 단백질을 전기영동 한 후 Enhanced Chemiluminescence (ECL) 막(Amersham Life Science, Piscataway, NJ, USA)에 전이하고, 5% skim milk에서 1시간 동안 blocking을 실시하였다. 단백질이 전이된 막은 1차 항체로 4°C에서 밤새 배양시킨 후, HRP-conjugated된 secondary antibody를 첨가하였고 ECL Kit를 이용하여 발현을 확인하였다. 그 결과, 폐 조직 내의 VEGF 발현량이 OVA 처리에 의해 증가하였으나 BAWLo와 BAWHi를 투여한 그룹에서 현저히 감소하였다. 특히, BAWHi 그룹은 잘 알려진 천식완화 천연물인 PG 그룹보다 더욱 효과적으로 감소함을 확인하였다(Figure 48). 이러한 결과를 통해 발효천문동 추출물은 혈관내피성장요인의 작용을 억제시킴으로써 천식 치료에 효과가 있으므로 사료된다.

#### ○ VEGF의 하위 signaling인 MAPK signaling pathway 분석

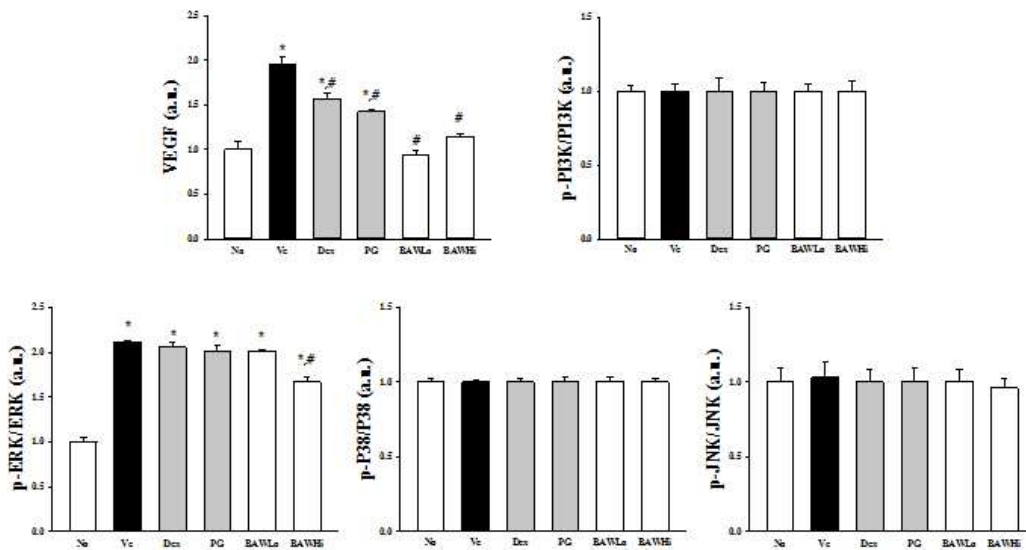
세포는 다양한 자극을 통해 세포 내 신호전달 경로를 거치게 되며 그 중 성장인자 및 스트레스 등에 의해 조절되는 수용체로 활성화되는 MAPK는 MAPK/ERK, SAPK/JNK, p38MAPK 등으로 크게 분류하고 있다. MAPK signaling은 복잡하게 연계된 단백질인 산화효소 캐스케이드(자극>MAPKKK>MAPKK>MAPK>반응)을 통하여 다양한 표적 유전자의 발현을 조절하는데, 성장인자에 의해 활성화되는 ERK 경로는 주로 세포의 분화 및 증식을 조절하며 스트레스, 사이토카인등에 의해 활성화 되는 JNK와 p38 경로는 세포 사멸, 세포 증식, 분화 과정을 조절하는데 중요한 역할을 한다고 알려져 있다. Lung에 PRO-PREP Protein Extraction Solution (iNtRON Biotechnology, seongnam, korea)에 첨가하여 glass homogenizer (Wheaton Industries, Millville, NJ, USA)를 이용하여 분쇄한 후, 13,000 rpm에서 10분 동안 원심 분리하여 상층액을 수확하였다. 분리된 단백질의 농도는 SMARTTM BCA Protein Assay Kit (iNtRON Biotechnology)을 이용하여 정량하였고, 30-50 mg의 단백질을 western blot에 사용하였다. 먼저, 10% SDS-PAGE gel에 단백질을 전기영동한 후 Enhanced Chemiluminescence (ECL) membrane (Amersham Life Science, Piscataway, NJ)에 전이하였고, 5% skim milk에서 1시간 동안 블로킹하였다. 각 membrane은 anti-ERK (Santa Cruz Biotechnology, Inc.), anti-p-ERK (Santa Cruz Biotechnology, Inc.), anti-JNK Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA), anti-p-JNK (Cell Signaling Technology), anti-p38 (Cell Signaling Technology), anti-p-p38 (Cell Signaling Technology), anti-actin (Sigma-Aldrich Co.)등의 1차 항체

로 4℃에서 밤새 배양한 후 HRP-conjugated된 secondary 항체를 첨가하였고 ECL Kit (Amersham Life Science, Piscataway, NJ)를 이용하여 발현을 확인하였다. 그 결과, VEGF의 또 다른 하위 signaling pathway인 PI3K 발현량은 No 그룹과 OVA를 처리한 그룹들 간 유의적인 차이가 나타나지 않았다. 한편, MAPK signaling pathway의 ERK 발현량은 p38과 JNK와는 다르게 OVA를 처리함에 따라 VEGF 발현량과 상응하게 증가하였고 BAWHi 그룹에서 유의적으로 감소하였다(Figure 48). 이러한 결과를 통해 발효천문동 추출물이 VEGF의 발현을 조절하는 데 있어 ERK/MAPK signaling pathway가 관여됨을 확인하였다.

**A**



**B**



**Figure 48.** Expression of VEGF and their downstream signaling pathway member. The expression level of each protein were measured in lung tissue treated with butanol extract from *Asparagus cochinchinensis* roots fermented with *Weissella cibaria* (BAW) using western blot analysis.

(아) 폐 조직 내의 collagen deposition을 비교분석하기 위한 collagenase (MMP-9) 발현량 확인

최근에 MMP-9(matrix metalloproteinases-9)는 천식 환자에서 기관지 재구성에 관여하는 주요한 단백질 중 하나로 알려졌다. 천식 환자에 있어 기관지 재구성은 기도의 세포외간

질(extracellular matrix, ECM)에 있는 다양한 구조적 또는 기능적인 분자들이 관여하는 것으로 알려져 있으며, 결국 기도의 벽에 과도한 ECM이 침착되어 기관지 재구성이 일어난다. 이 단백질은 호산구, 중성구, 림프구를 기저막(basement membrane)을 통해 ECM으로 유도함으로써 기도 염증을 일으키는 것으로 알려져 있다. MMP-9은 정상인에 비해 천식환자의 기관지 조직검사에서 더 높게 검출되었으며, 천식 환자 중 치료를 하지 않은 그룹의 기관지 세척액에서 MMP-9의 농도가 더 높다. 또한 이 단백질은 천식 환자에서 진행성 염증이 있는 경우 매우 높게 증가 된다.

폐 조직 내의 MMP-9의 양을 확인하기 위하여, Western blot을 실시하였다. lung에 PRO-PREP Protein Extraction Solution (iNtRON Biotechnology, seongnam, korea)에 첨가하여 glass homogenizer (Wheaton Industries, Millville, NJ, USA)를 이용하여 분쇄한 후, 13,000 rpm에서 10분 동안 원심 분리하여 상층액을 수확하였다. 분리된 단백질의 농도는 SMARTTM BCA Protein Assay Kit (iNtRON Biotechnology)을 이용하여 정량하였고, 30 µg의 단백질을 실험에 사용하였다. 먼저, 10% SDS-PAGE gel에 단백질을 전기영동 한 후 Enhanced Chemiluminescence (ECL) 막(Amersham Life Science, Piscataway, NJ, USA)에 전이하였고, 5% skim milk에서 1시간 동안 blocking을 실시하였다. 단백질이 전이된 막은 anti-MMP-9 (1:1000) 1차 항체로 4°C에서 밤새 배양한 후, HRP-conjugated된 secondary antibody를 첨가하고 ECL Kit를 이용하여 발현을 확인하였다. 그 결과, No 그룹에 비해서 천식 대조군인 OVA를 처리한 Ve 그룹에서 MMP-9의 발현량이 증가하였으나 각각 Dex, PG, BAWLo, BAWHi를 투여하자 유의적으로 감소하였다. 특히, BAWHi 그룹의 경우 같은 천연물질인 PG 그룹보다 MMP-9의 발현량이 더욱 효과적으로 감소하였다 (Figure 49). 이러한 결과는 발효천문동 추출물이 MMP-9의 분비를 억제시켜서 기관지 및 폐의 재구성을 방지하며, 효과적인 천연물 천식치료제로써 활용될 수 있을 것으로 사료된다.

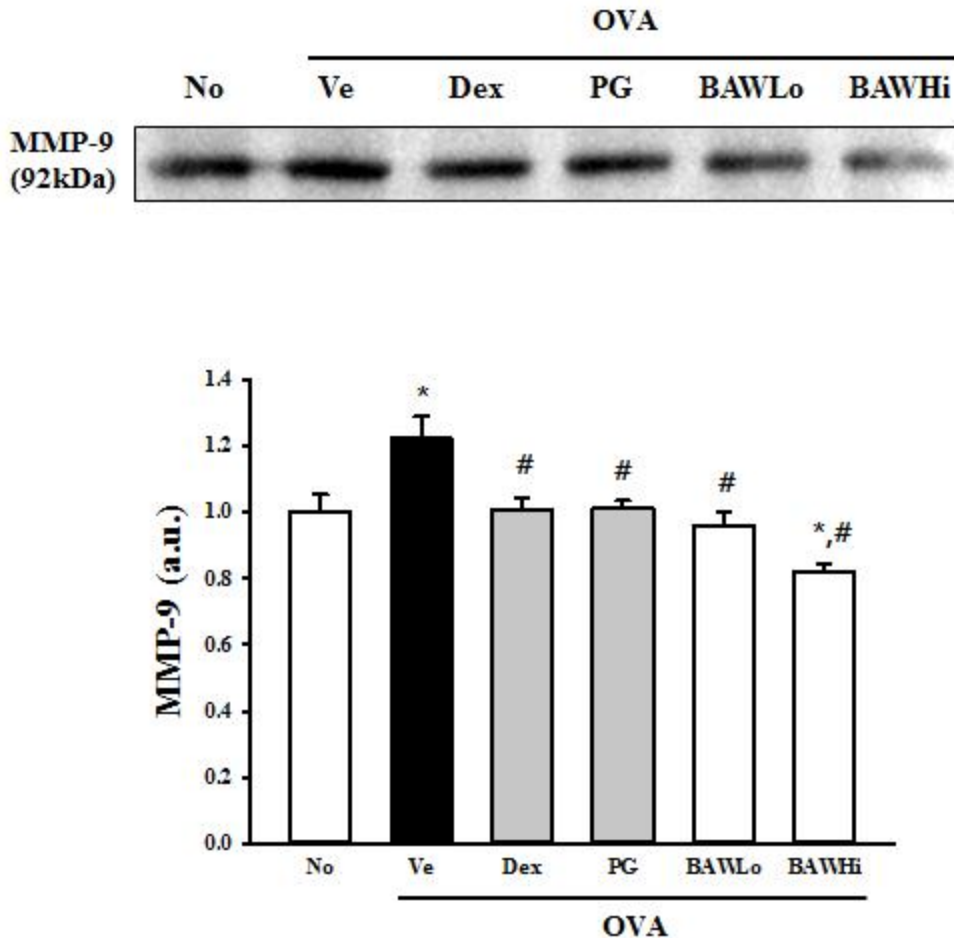


Figure 49. Effect on MMP-9 expression in lung tissue of OVA-induced mice after treatment of BAW.

### (3) 천문동제품의 약리효능 평가

#### (가) 발효천문동 투여량에 따른 호흡기질환 개선능 평가

발효천문동 제품의 투여량에 따른 반응의 차이를 확인하기 위하여 동물실험을 실시하였고, 기관지세척액을 채취하여 총 세포 수 및 세포의 분포를 확인하였고, OVA 특이적인 IgE의 양을 비교분석하였다.

#### ○ 동물실험의 설계

암컷 balb/c 마우스(7주령)에 Ovalbumin(OVA)을 이용하여 천식을 유발하였다. 0일, 7일 두 차례 20 $\mu$ g OVA 용액(mixed 2 mg Aluminum hydroxide in PBS)에 녹인 용액을 i.p하여 마우스를 감염시켰고, 이후 21-23일간 챔버에 마우스를 넣고 2% OVA 용액을 Nebulizer로 30분씩(0.4ml/분) 흡입노출 시켰다. 천문동제품은 500, 250, 125, 62.5, 31.3,

15.6, 7.8, 3.9, 2, 0(Ve) mg/kg 농도(10개)로 18-23일간 경구 투여하고 마지막 흡입노출 후(23일째) 48시간 뒤, 분석을 진행하였다(Figure 50).

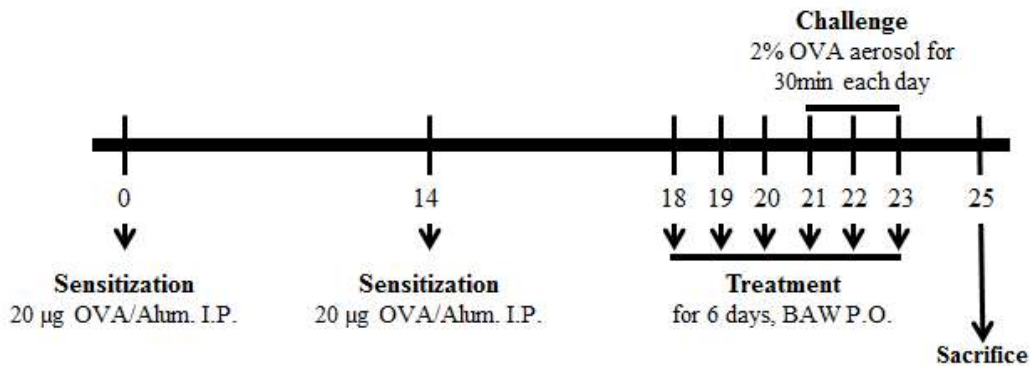


Figure 50. Experimental schedule for animal study.

○ 기관지세척액 내 총 세포 수 측정

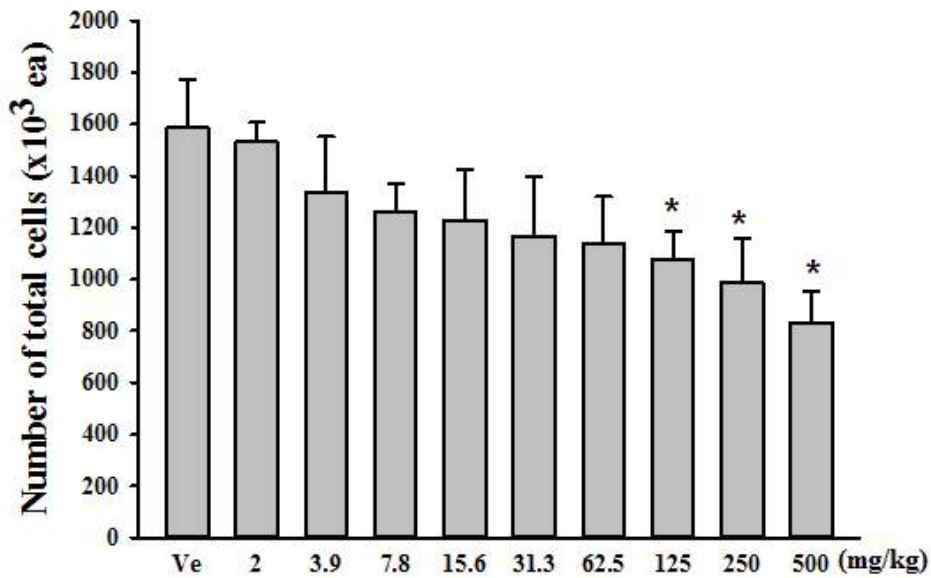
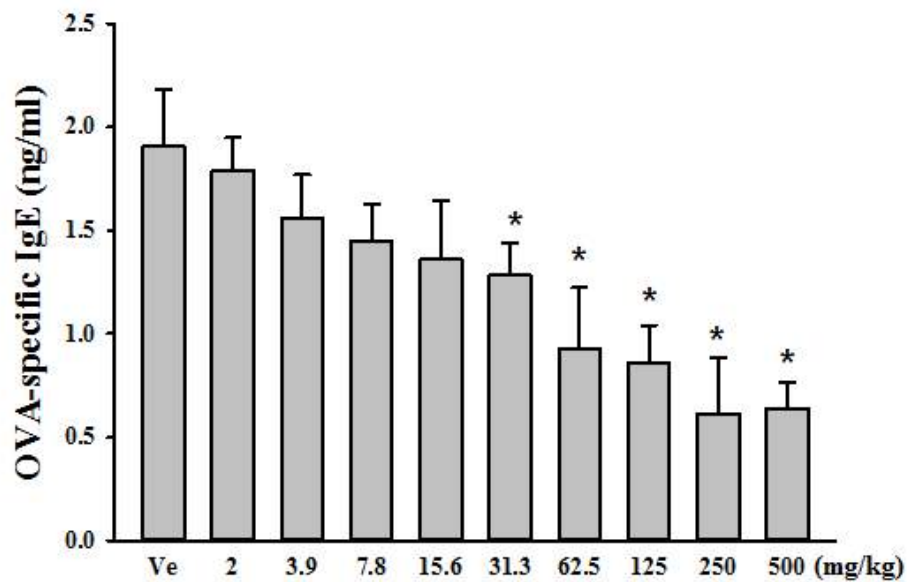
기관지세척액 내 총 세포수를 측정하기 위하여 마지막 흡입 후 48시간 뒤에 실험동물을 마취 시키고, 기도를 열어 카테터를 삽입하였다. 이후 1 ml의 차가운 생리식염수를 이용하여 기관지를 세척하여 세척액을 얻었고 원심분리하여(2000 xg, 10분) 세포를 수확하였다. 상층액은 분리하여 다른 분석에 사용하기 위해 -70°C에 보관하였고, 남은 침전물(세포)에 식염수를 500 µl씩 넣어 잘 섞어주었다. 기관지 세척액 내 총 세포수를 확인하기 위하여, Trypan blue용액으로 염색하였고, Hematocytometer를 사용하여 세포의 수를 측정하였다. 실험의 정확성을 위하여 hematocytometer의 4분면의 수를 세었고 평균을 내어 세포수를 계산하였다. 그 결과, 기관지세척액 내 염증세포는 Ve 그룹에서 가장 많이 관찰되었고 발효천문동 추출물을 처리한 그룹들에서 농도의존적으로 감소하는 경향을 나타내었다. 특히, 125, 250, 500 mg/kg의 발효천문동 추출물을 처리한 그룹에서 유의성 있게 감소함을 확인하였다(Figure 51).

○ 기관지 세척액 내 OVA 특이적 IgE의 양 측정

기관지 세척액내 OVA 특이적인 IgE의 양을 확인하기 위하여 ELISA를 실시하였다. OVA 특이적인 IgE의 농도는 ELISA kit (biolegend)를 이용하여 회사의 권장방법에 따라 측정하였다. 먼저, 포획항체(capture antibodies)를 immunoplate에 분주하여 실온에서 1시간 동안 부착시켰고, 미부착된 항체는 세척용액(washing solution, 50 mM Tris, 0.14 M NaCl, 0.05% Tween 20, pH 8.0)으로 3번 세척하여 제거하였다. 포획 항체가 결합된 immunoplate의 각 well에 마우스로부터 분리된 혈청과 희석된 표준 IgE (standard IgE)를 첨가하여 1시간 동안 결합시킨 뒤 미부착된 용액을 제거하였고, horseradish peroxidase가 결합된 항체를 첨가하였다. 최종적으로 기질용액(substrate solution)을 첨가하여 어두운 실온에서 30분간 배양하여 반응을 유도하였고, 이후 2 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 용액을 첨가해서 반응을 정

지시켰다. 반응 결과는 Microplate Reader (Molecular Device Co., CA, USA)를 이용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하여 확인하였다. 그 결과, 기관지세척액 내 총 염증세포 수 결과와 상응하게 Ve 그룹에서 가장 많은 OVA 특이적인 IgE양이 확인되었고, 발효천문동 추출물을 처리한 그룹들에서 농도의존적으로 감소하는 경향을 나타내었다. 그 중에서도 31.3, 62.5, 125, 250, 500 mg/kg의 발효추출물을 처리한 그룹들에서 각각 1.28, 0.92, 0.85, 0.61, 0.63 ng/ml으로 유의성 있게 감소하였다(Figure 51). 이러한 결과를 통해서 본 연구에서는 발효천문동 추출물의 적정 투여용량을 각각 250, 500 mg/kg으로 설정하였다.



**A****B**

**Figure 51. Number of total cells and OVA-specific IgE levels in BALF.** (A) Cells in BALF were isolated by centrifugation, then stained with hematoxylin solution. The total number of cells was determined by counting within 1 mm<sup>2</sup> under light microscope at 400× magnification. (B) The concentration of OVA-specific IgE in BALF was quantified by an enzyme-linked immunosorbent assay. Data shown are the means ± SD (n=5). \*, *p*<0.05 compared to the Ve treated group.

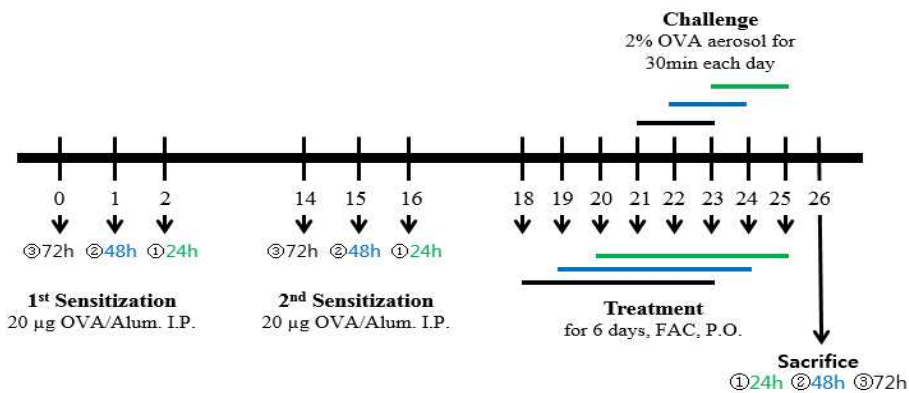
(나) 발효천문동의 호흡기질환 억제반응 지속시간 평가

발효천문동 제품의 약물반응 지속시간을 평가하기 위하여 동물실험을 실시하였고, 기관지

세척액을 채취하여 OVA 특이적인 IgE의 양을 확인하였다. 또한 조직학적 분석을 통해 폐 조직 내 면역 세포의 침윤정도 및 기도벽의 두께 변화 등을 비교분석하였다.

○ 동물실험의 설계

우선 본 실험에 앞서 일주일간의 순화기간을 거친 뒤, 체내 면역반응을 유도 (Sensitization, 감작)하기 위하여 항원물질인 Ovalbumin (20 ug)과 면역증강제인 Aluminum hydroxide (2 mg)를 1:100 비율로 섞어서 제조한 용액을 마리당 200 ul씩 0-2 일차, 14-16일차 두 번 복강투여 하여 감작반응을 유발하였다. 이후, 21일-25일차 기간 동안 그룹에 따라 3일간 Chamber에 마우스를 넣고 nebulizer를 사용하여, 30분간 2% Ovalbumin을 aerosol화하여 마우스들이 흡입하도록 유도하였다. 한편, 천식 유발 그룹과 비교분석하기 위한, No 그룹은 PBS를 사용하여 동일한 과정을 수행하였다. 마지막 흡입노출 후(23일째) 24시간, 48시간, 72시간 뒤 분석을 진행하여 투여 시간별 반응의 차이를 조사하였다. 실험일정표와 그룹지정 및 실험동물의 마릿수는 다음과 같이 설정하였다(Figure 52).



# Treatment 9:00 p.m. → Sacrifice 26일차 9:00 a.m.

1) 실험동물 : 7 주령, Female BALB/c mice (6 주령을 주문하여, 1주일 순화 후 실험진행)

2) 그룹

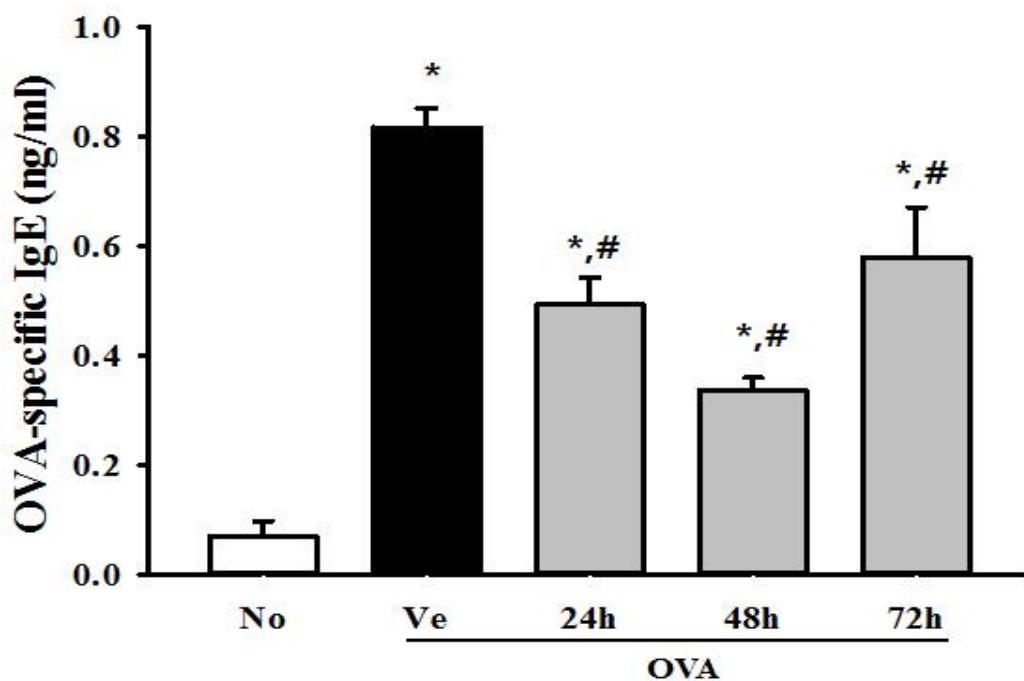
	그룹	마릿수	처리물질
① 24h	OVA + 500mg/kg FAC	5	OVA/Alum I.P.
			500mg/kg FAC P.O.
② 48h	No	3	OVA Inhalation
			-
	OVA + Vehicle	3	OVA/Alum I.P.
			dHzO P.O.
OVA + 500mg/kg FAC	5	OVA Inhalation	
		OVA/Alum I.P.	
③ 72h	OVA + 500mg/kg FAC	5	500mg/kg FAC P.O.
			OVA Inhalation

Figure 52. Experimental schedule for animal study.

○ 기관지 세척액 내 OVA 특이적 IgE의 양 측정

BALF 내 OVA 특이적인 IgE 농도는 ELISA kit를 이용하여 권장방법에 따라 측정하였다.

먼저, 포획항체(capture antibodies)를 immunoplate에 분주하여 실온에서 1시간동안 부착시켰고, 미부착된 항체는 세척용액(washing solution, 50 mM tris, 0.14 M NaCl, 0.05% Tween 20, pH 8.0)으로 3번 세척하여 제거하였다. 포획항체가 결합된 immunoplate의 각 well에 마우스로부터 분리된 혈청과 희석된 표준 IgE (standard IgE)를 첨가하여 1시간동안 결합시킨 뒤 미 부착된 용액을 제거하였고, horseradish peroxidase가 결합된 항체를 첨가하였다. 최종적으로 기질용액(substrate solution)을 첨가하고 어두운 실온에서 30분간 배양하여 반응을 유도한 후 2 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>용액을 첨가해서 반응을 정지시켰다. 반응 결과는 Microplate Reader (Molecular Device Co., Sunnyvale, CA, USA)를 이용하여 450 nm에서 확인하였다. 그 결과, BALF 내 OVA 특이 IgE는 No 그룹(0.0700±0.0285)에 비해 Ve 그룹(0.8175±0.0356)에서 유의하게 증가하였다. 한편, 이 증가된 OVA 특이 IgE양은 마지막 OVA 흡입 24시간 후(0.4937±0.0492)에 유의적으로 감소하였으며, 특히 마지막 OVA 흡입 48시간 후(0.3375±0.0228)에 가장 크게 감소되는 경향을 보였고, 72시간 후(0.5790±0.0927)에 다시 증가됨을 확인하였다(Figure 53).

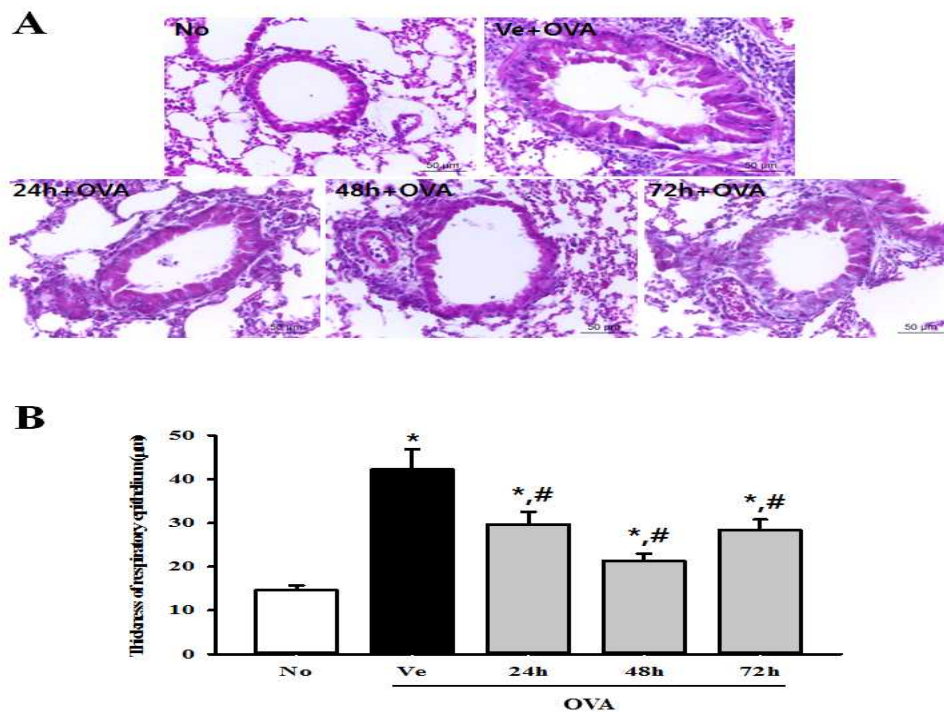


**Figure 53. OVA-specific IgE levels in BALF.** The concentration of OVA-specific IgE in BALF was quantified by an enzyme-linked immunosorbent assay. Data shown are the means ± SD (n=5). \*,  $p < 0.05$  compared to the No treated group. #,  $p < 0.05$  compared to the Ve treated group.

○ 폐, 기관지 등의 조직학적 변화 분석

실험동물에 대하여 발효천문동 추출물의 투여한 시간에 따른 조직 내의 염증 세포 세기관

지의 양상을 확인하기 위하여 H&E 염색 및 PAS 염색을 실시하였다. 먼저, 안락사한 동물로부터 Lung을 적출하여 10% 포르말린에 48시간 이상 고정하고, 폐의 오른쪽 가장 큰 엽을 절단하여 카세트에 넣었다. 카세트에 담긴 조직은 조직처리기를 이용해서 70, 80, 90, 95, 100% alcohol에 각각 1, 1, 1, 3, 3시간씩 처리하고, xylene으로 3시간 처리하였다. 이후 파라핀으로 포매하여 블록을 만들고, -20°C에서 24시간 보관한 뒤 Leica microtome (Leica Microsystems, Bannockburn, IL, USA)을 사용하여 4 µm로 박절하였다. 조직 슬라이드는 xylene으로 탈파라핀(deparaffin)하였고, alcohol으로 탈수(dehydration)한 후, hematoxylin과 eosin (H&E)으로 염색하였고 광학현미경(Leica Microsystems, Wetzlar, Germany)으로 조직을 관찰하였다. 그 결과, 앞선 실험결과들과 마찬가지로 No 그룹에 비하여 Ve 그룹에서 기도로의 염증세포 침윤정도가 가장 심하게 확인되었고, 기도벽 또한 가장 두꺼워졌음을 확인하였다. 특히, 기도벽의 두께는 마지막 OVA 흡입 48시간 후에 가장 감소되었음을 확인하였다(Figure 54). 이러한 결과를 통해 발효천문동 추출물의 천식에 대한 효능은 48시간정도 후에 가장 효과적일 것으로 사료된다.

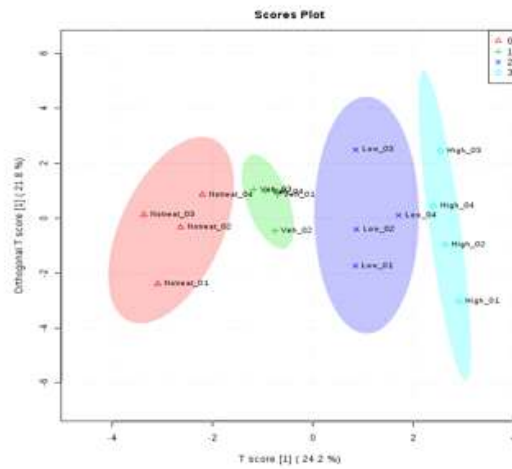


**Figure 54.** Histopathological structure in lung tissue. (A) After staining with H&E solution, the infiltration of inflammatory cells in the peribronchiolar region and the bronchial thickness were observed in lung tissue at 400× magnification. (B) Thickness of respiratory epithelium was measured using the Leica Application Suite. Data shown are the means ± SD (n=5). \*,  $p < 0.05$  compared to the No treated group. #,  $p < 0.05$  compared to the Ve treated group.

○ 발효천문동에 의한 대사체 반응성 조사

대사체 반응성 조사는 특정 생명현상 및 물질대사를 밝히기 위하여 생물학적 시료에 존재하는 모든 저분자량 대사물질을 검출, 정량 분석하는 것이다. 특히, 대사체란 세포 또는 유기체 내에서의 상호작용에 의해 생성되는 최종 산물, 즉 표현 형질이기 때문에 여러 가지 세포 내 메커니즘을 이해하는데 결정적인 정보를 제공한다. 또한 이를 통해 질병의 진단, 약물의 효과 검증이 가능하다. 이러한 Metabolomics analysis를 위해, 우선 실험동물로부터 혈액을 채취하여 Serum seperating tube에 담고 30분간 실온에서 방치하였다. 이후 1500 xg에 15분 원심분리하여 상층의 혈청만을 수확하였다. 수확한 혈청 300ul을 4 mM TSP를 포함하는 300 ul의 D2O 용액에 넣어주었다. 이후 vortexing을 통해 잘 섞어주었고 NMR spectrometry를 사용하여 48시간 이내로 측정하여 분석하였다. 모든 스펙트럼은 26℃에서 Varian Unity Inova 600 MHz spectrometer operating를 사용하여 측정되었다. 이후 모든 분석데이터들은 NMR suite Professional software를 통해 Microsoft Excel로 변환되어 비교분석 되었다. 그 결과, 혈청의 NMR 분석에서 PCA 및 OPLS-DA를 이용한 대사체 패턴 인식은 유의적으로 No 그룹, Ve 그룹, BAWLo 그룹, BAWHi 그룹에서 각각의 집단으로 분리되어 있는 것을 확인하였다. 또한, Heat map 및 VIP scores 결과를 바탕으로 전체 19개의 내인성 대사물질 중에서 발효천문동 추출물의 효과를 나타내는 후보물질 2개 (Tryptophan, Methionine)가 OVA 처리에 의한 천식유발에 대해 다시 회복되는 경향을 나타내었다 (Figure 55). 실제로 대사체 각각의 농도변화를 확인해본 결과, Tryptophan과 Methionine의 농도는 OVA 처리에 의해 감소되었으며 발효천문동 추출물의 투여에 의해 농도의존적으로 다시 증가함을 나타내었다(Figure 56). 이러한 결과를 통해, Tryptophan과 Methionine이 OVA으로 유도된 천식증상을 예측하기 위한 biomarker로 사용될 수 있을 것으로 사료된다.

**A**



**B**

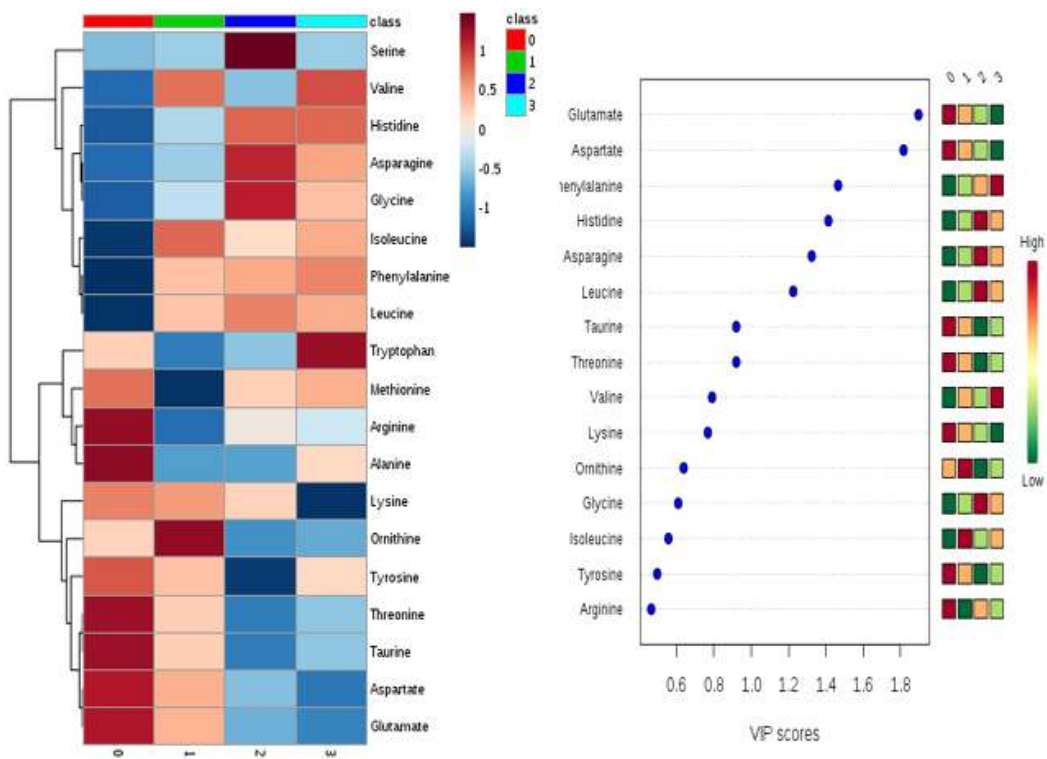


Figure 55. (A) Metabolomics pattern recognition using PCA and OPLS-DA. (B) Heat map and VIP scores.

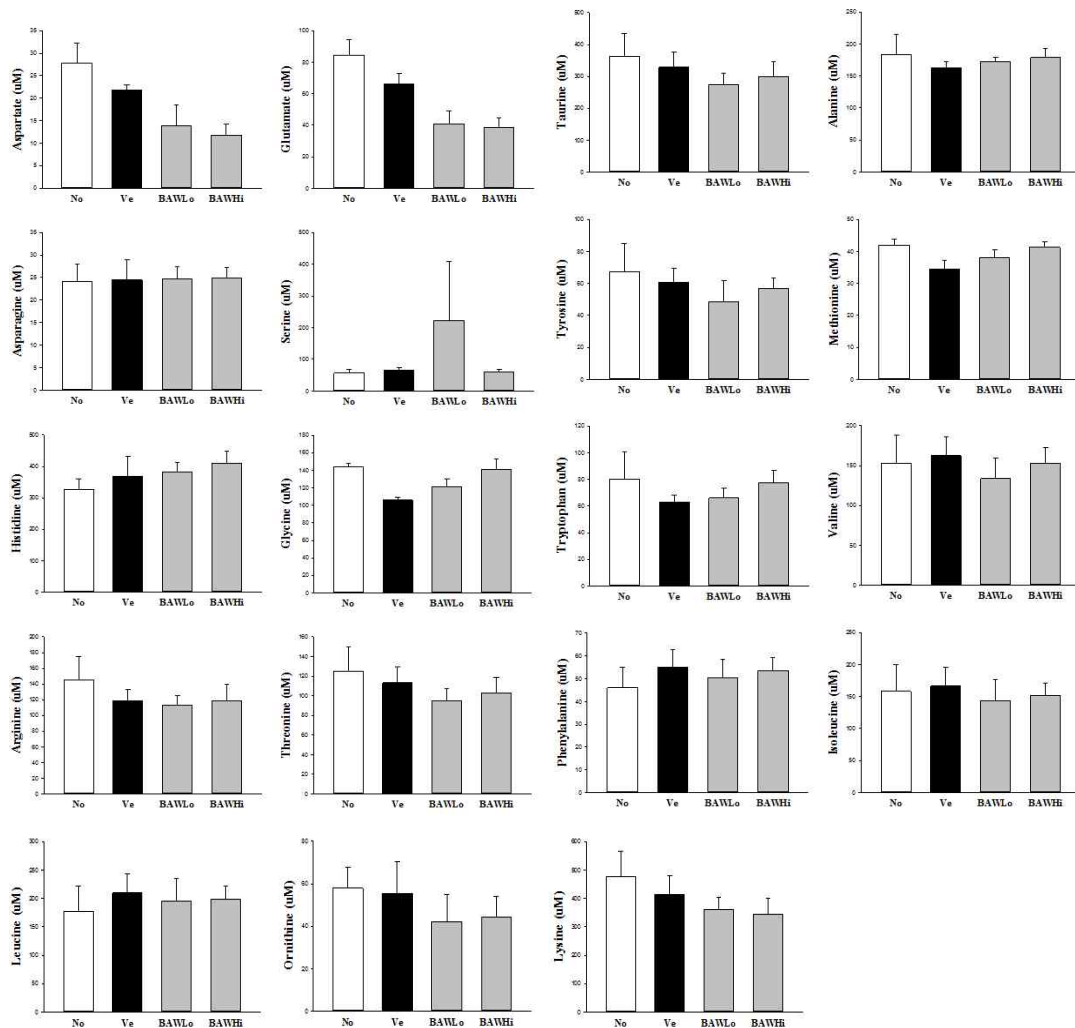


Figure 56. Concentration of nineteen amino acids after OVA administration in BALB/c mice.

(4) 천문동제품의 생리활성 검증

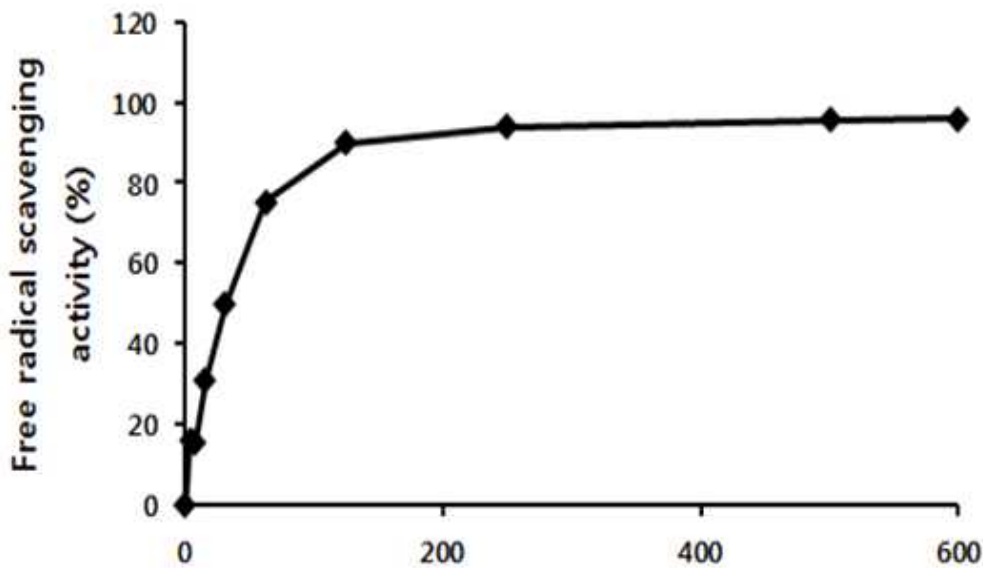
(가) Anti-oxidant concentration 분석

2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH)는 매우 안정한 자유라디칼로, 라디칼 소거활성이 있는 항산화제에 의해 정량적으로 탈색되어 항산화활성을 쉽게 측정할 수 있다. 발효 천문동의 항산화능을 확인하기 위하여, DPPH 라디칼의 소거능을 측정하였다. 우선 각 발효 천문동을 0에서부터 최고 2000 ug/ml로 제조하고 96 well plate에 분주하였다. 0.1 mM의 DPPH 100ml를 첨가하고 차광상태에서 30분간 실온에서 배양하였다. 이후 517 nm에서 Versa-max plate reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)를 사용하여 흡광도



를 측정하였고 시료를 첨가하지 않은 대조군과 비교하여 DPPH 소거효과를 백분율(%)로 나타내었고 DPPH의 활성이 50%가 되는 IC<sub>50</sub> 값을 통해 항산화능을 측정하였다. 그 결과, DPPH 라디칼에 대한 발효 천문동 추출물의 소거 활성은 초기 단계에서 급속히 증가하였고, 후기 단계에서 서서히 증가함을 나타내었으며 IC<sub>50</sub> 값은 31.61 ug/ml로 측정되었다(Figure 57).

$$IC_{50} = 31.62$$



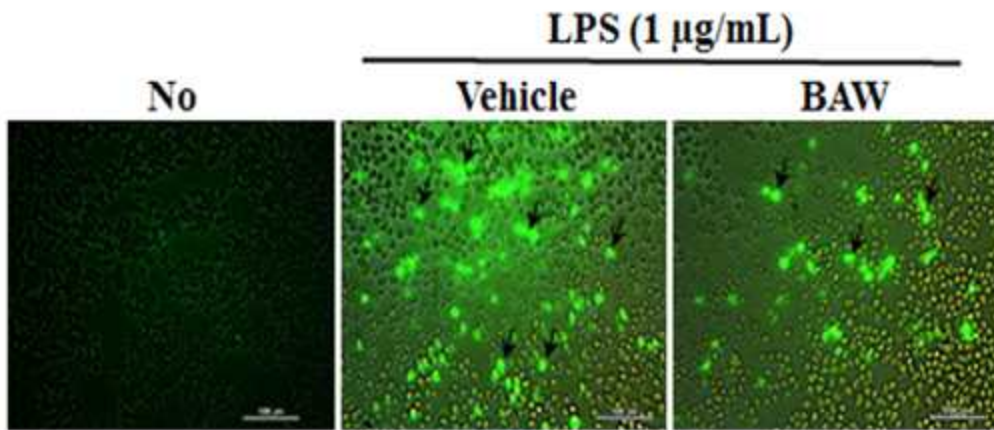
**Figure 57.** Free radical scavenging activity of BAW. DPPH radical scavenging activity was assayed in a mixture containing 0.1 mM DPPH and a range of concentrations of BAW (0-600 µg/ml). DPPH, 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical; IC<sub>50</sub>, half maximum inhibitory concentration.

(나) 세포내 ROS 생산저해에 미치는 효과

발효천문동이 Reactive oxygen species (ROS) 생산저해에 미치는 효과를 알아보기 위해서 RAW264.7 세포 내의 ROS level을 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA; Sigma-Aldrich Co.) 염색하여 측정하였다. DCFH-DA는 에스테라제에 또는 산화적 가수분해에 의해서 비형광성인 DCFH로 탈아세틸화되고 DCFH는 활성산소에 의해 산화되어 강한 형광물질인 2',7'-dichlorofluorescein (DCF)로 전환되는 원리를 이용하였다. 우선 RAW264.7 세포를 6 well plate에 5×10<sup>5</sup> cells/2ml로 배양한 후, 37°C incubator에서 2시간 동안 배양시켰다. 이후 Vehicle과 발효 천문동 추출물 100ug/ml을 선처리후 LPS를 후처



리하여 24시간 배양한 세포에 25 $\mu$ M DCFH-DA를 37 $^{\circ}$ C에서 30분 반응시켰다. 마지막으로 1 $\times$  PBS로 두 번 세척 후, 형광현미경으로 관찰하였다(Eclipse TX100, Nikon, Tokyo, Japan). 그 결과, RAW264.7 세포내의 ROS 분석에서 DCFH로 염색된 세포의 수는 No 그룹에 비해 LPS+ Vehicle 처리 그룹에서 유의하게 증가함을 나타내었다. 한편, 이 염색된 세포들은 LPS+ BAW로 전처리한 세포들에서 현저하게 감소하였다(Figure 58). 이러한 결과를 통해서 발효 천문동 추출물이 세포내 ROS 생성의 증가를 억제시키고, 높은 수준의 항산화능을 함유하고 있음을 확인하였다.



**Figure 58.** ROS level in RAW264.7 cells. A green fluorescence for ROS in cells was observed by fluorescence microscopy at x200 magnification. Arrows indicate cells stained with DCFH-DA.

(다) 폐 조직 내의 Superoxide dismutase (SOD) 활성 조사

발효천문동의 처리에 따른 폐 조직 내의 SOD의 활성을 확인하기 위해서 SOD Assay Kit (Dojindo Molecular Technologies Inc., Japan)를 이용하여 그룹 간 비교분석하였다. 먼저, 폐 조직은 sucrose buffer (0.25 mol/L sucrose, 10 mmol/L HEPES, 1 mmol/L EDTA, pH 7.4)에서 glass homogenizer를 사용하여 분쇄하였고 10,000xg에서 1시간 동안 원심분리한 뒤, 수확하여 1, 1/5, 1/52, 1/53, 1/54, 1/55, 1/56로 희석하였다. 이후 각 샘플을 96 well plate에 분주하였고 WST working Solution을 첨가한 후 enzyme working용액 또한 각 well에 첨가하였다. 20분간 37 $^{\circ}$ C에서 배양하였고 spectrophotometer를 사용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이후 다음의 식을 사용하여 SOD의 활성을 분석하였다.

SOD activity (inhibition rate %)= $[(A_{blank\ 1}-A_{blank\ 3})-(A_{sample}-A_{blank\ 2})]/(A_{blank\ 1}-A_{blank\ 3})\times 100$  (A<sub>blank 1</sub>: absorbance of blank 1, A<sub>blank 2</sub>: absorbance of blank 2, A<sub>blank 3</sub>: absorbance of blank 3, A<sub>sample</sub>: absorbance of sample).

그 결과, No 그룹에 비해 Ve 그룹에서는 OVA 흡입으로부터 SOD 활성의 현저한 감소를 나타내었다. 그러나 발효 천문동 추출물을 각각 250, 500mg/kg의 용량으로 처리한 BAWLo, BAWHi 그룹에서 폐 조직 내의 SOD활성이 농도의존적으로 증가하였다(Figure 59). 이러한 결과를 통해 발효 천문동 추출물이 효과적인 항산화능력도 지니고 있음으로 사료된다.

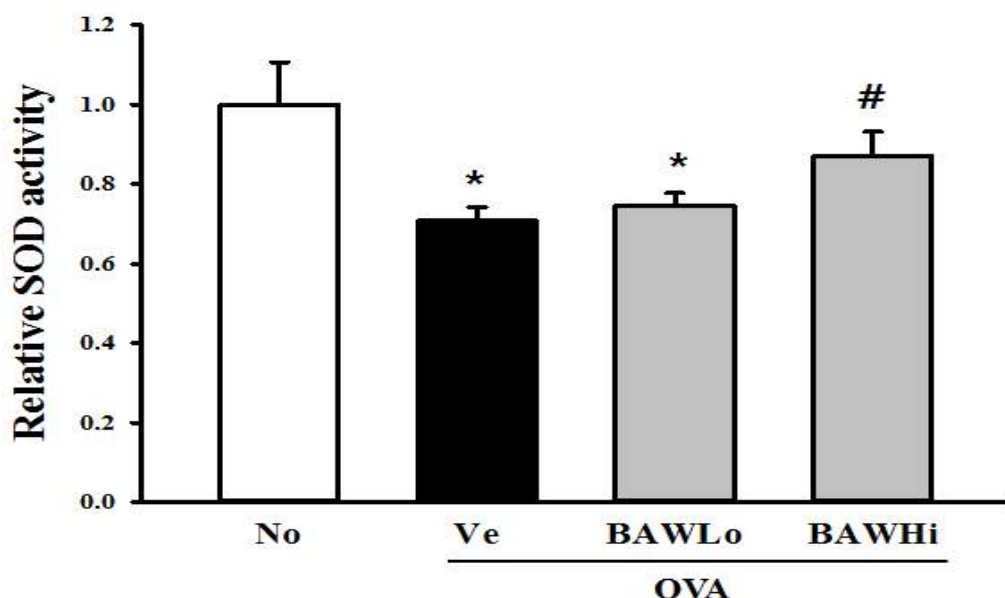


Figure 59. Effect of BAW on SOD activity in OVA-induced asthma model.

다. 약리효능 후보물질에 대한 평가

천문동에는 asparagine,  $\beta$ -sitosterol, 5-methoxy-methylfurfural, 점액질, steroidal saponin, furostanol saponin, phenol 화합물, 단당류, 올리고당류, 다당류 등이 함유된 것으로 알려졌으며, 그 중 protodioscin(PD) 및 caffeic acid(CA)을 선택하여 효능을 평가하였다.

(1) RAW 264.7 세포주에 미치는 독성평가

천문동의 단일물질인 protodioscin 및 caffeic acid가 RAW264.7 세포주의 생존율에 미치는 영향을 평가하기 위하여, RAW264.7 세포주에 각각의 물질을 1.25, 2.5, 5, 10  $\mu$ M의 농도로 24시간 처리한 후 세포생존율을 측정하였다. 세포 생존율은 MTT (3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diohenyl tetrazolium bromide, Sigma chemical Co. USA)방법을 통하여 분석하였다. MTT는 살아있는 세포 내 미토콘드리아 내막에 존재하는 oxido-reductase의 효소 작용에 의해 환원되어 보라색의 formazan을 형성하게 되는데, 용해액 내 보라색 formazan의 발색정도를 흡광도로 측정함으로써 세포 생존률을 예측하는 실

험방법으로 이용되고 있다. 먼저 RAW264.7 cell을 96 well plate (5 x 10<sup>4</sup> cells/well)에 분주하여 37°C에서 24시간 배양한 뒤, vehicle (dH<sub>2</sub>O, DMSO), Protodioscin (PD), Caffeic acid (CA)을 농도별로 처리하고, 24시간 동안 배양하였다. 배양용 배지를 제거하고, 새 배지 200  $\mu$ l와 MTT용액을 50  $\mu$ l 첨가한 뒤, 37°C에서 4시간 동안 추가 배양하였다. 세포 내에 보라색 결정이 생성되면 well 내의 용액을 제거하고 dimethyl sulphoxide (DMSO, Sigma Co.) 용액을 150  $\mu$ l씩 넣어 formazan을 녹였다. 각 well에 나타난 색의 변화를 ELISA-reader (VERSA max, micro-reader, MDS. Co, USA)를 이용하여 570 nm에서 측정하였다. 그 결과, PD를 처리한 그룹에서 세포생존율이 통계학적으로 유의적으로 감소하였으나, CA를 처리한 그룹에서는 물질의 처리로 인해 세포의 활성도에 유의적인 변화가 나타나지 않았다(Figure 60). 이러한 결과는 CA의 처리가 RAW264.7 세포주에 독성을 나타내지 않음을 제시하고 있다.

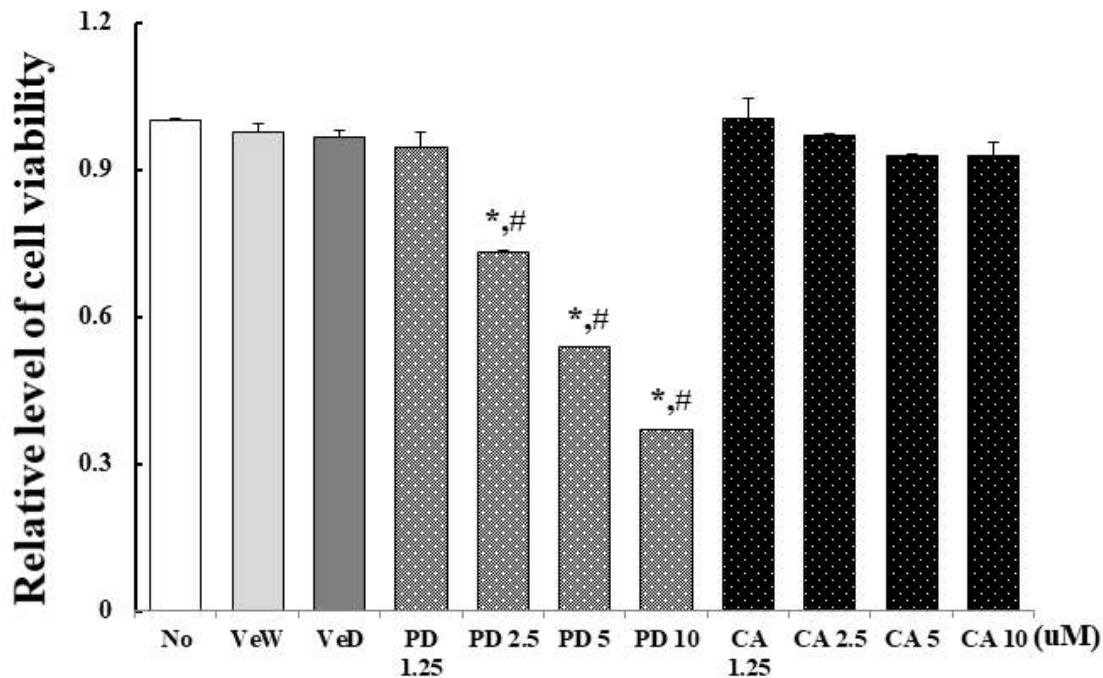


Figure 60. Effects of Protodioscin (PD) and Caffeic acid (CA) on cytotoxicity in RAW264.7 cells. Cells were cultured with PD, CA and their viability was measured via MTT assays. Data represent the means SD of three replicates. \*, p<0.05 compared to No group. #, p<0.05 compared to the VeD group.

(2) CA가 Nitric oxide (NO)생성 억제에 미치는 영향

CA가 lipopolysaccharide (LPS)에 의한 자극이 유도된 대식세포주의 NO 생성량에 미치는 영향을 평가하기 위하여, CA를 1, 1.6, 3.2, 5, 10, 20  $\mu$ M의 농도로 12시간 선처리 후,

LPS 1  $\mu\text{g/ml}$ 을 후처리하여 24시간 배양하였다. 배양 후 상층액을 취하여 배양액 중에 존재하는  $\text{NO}_2$ 의 양을 Griess 시약을 이용하여 측정하였다. 상층액을 96 well plate에 각각 100  $\mu\text{l}$  분주한 후 Griess reagent (1% sulfanilamide, 5% phosphoric acid, 0.1% N-(1-naphtyl) ethylenediamine dihydrochloride)을 100  $\mu\text{l}$  첨가하여 상온에서 10분간 반응시킨 후, ELISA-reader (MDS. Co, USA)를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 그 결과, CA를 농도별로 처리하였을 때 NO 생성량이 농도의존적인 변화를 보이지 않았지만, 전체적으로 VeD 그룹에 비해 감소하는 경향을 보였고, 3.2  $\mu\text{M}$  그룹에서 VeD에 비해 NO의 양이 유의적으로 낮은 수치를 보였다(Figure 61). 따라서 이러한 결과는 천문동에서 항염증효과를 나타내는 주요 물질이 CA일 것이라는 가능성을 제시하고 있다.

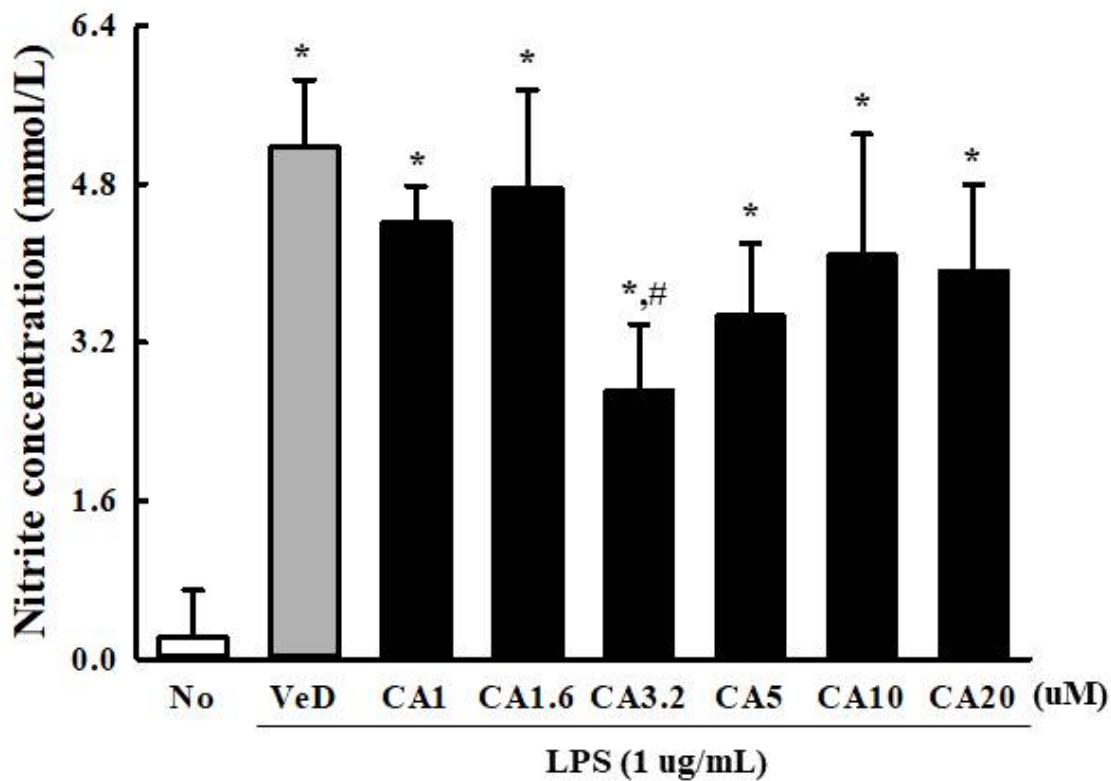


Figure 61. Determination of NO production in cultured RAW264.7 cells. After collection of supernatants, nitrite concentration was determined by Griess assay. Data represent the means SD of three replicates. \*,  $p < 0.05$  compared to No group. #,  $p < 0.05$  compared to the VeD group.

## 제 4절. 연구개발 추진 전략

### 1. 연구개발 추진전략 및 방법

#### 가. 연구개발 추진전략

○ 본 연구를 성공적으로 수행하기 위하여 1개의 세부과제와 2개 협동과제를 구성하였으며, 유기농업 전문기업의 주도하에 부산대학교 연구팀이 참여하여 총 3년간 연구를 수행하고자 함

- 연구과제의 목표 달성을 위하여 3개 과제의 연구내용을 상호 연계하여 구성하였음. 특히 실험시료의 동일성을 부여키 위해 시료의 구입 시 협력하며, 실험을 통하여 획득한 기본자료, 시료 및 제품을 공유하여 연구수행의 진행을 촉진하며 연구결과의 재현성을 확보하고자 함.

- 기술개발 연구 분야를 담당한 세부과제 수행기관들과의 상호 연계하여 실증시험을 통한 상호유기적인 관계를 유지하면서 서로 연구결과를 주기적으로 교환 적용하여 최종 연구결과 도출시 극대화된 상승효과를 얻을 수 있도록 연구 과제를 추진하고자 함.

#### 나. 연구개발 추진 방법

○ 제 1 세부과제에서는 국내에서 자생 또는 재배하는 천문동을 수집, 조사하며 각각의 고품질 원료 조건을 확립하고, 천문동의 기호도 조사 및 마케팅과 홍보전략을 수립하여 다양한 종류의 호흡기 질환 예방 제품을 개발하며, 대량생산을 위한 공정 표준화 및 품질관리 체계를 구축함과 동시에 완제품의 유효성분 분석, 제품의 규격 설정 체계를 확립하고자 함.

○ 제 1 협동과제에서는 천문동의 덩이뿌리(괴근)에 존재하는 호흡기 질환관련 생리활성 물질의 분리·동정을 통한 소재화로 신제품 개발에 활용하고자 하며, 천문동의 기능성 증진을 위한 가공방법(발효, 증숙 등)의 최적 조건을 확립하여 제1세부에서의 기능성 제품 생산을 위한 기초자료로 제공하고자 함. 또한 발효 및 증숙 등에 의한 가공처리에 따라 생성된 호흡기 질환관련 생리활성 성분을 분석 및 분리하여 제2협동에 시료를 제공하여 효능연구를 위한 기초 재료로 공급하고자 함.

○ 제 2 협동과제에서는 천문동의 호흡기 질환과 관련된 생리활성 효능을 *in vitro* 실험을 통하여 확인한 후, 일반실험동물과 모델동물을 통하여 phenotype, IgE분비량, 면역지표 분석과 실험동물의 생리학적 변화를 분석하고자 함. 이후 천문동의 독성 평가 및 약리효능을 평가하여 작용기전을 규명하고 새로운 효능후보물질을 탐색하여 허가를 추진하며, 여기에서 도출된 모든 결과물과 자료는 제1세부과제와 제1협동과제 수행을 위하여 공급하고자 함.



## 2. 연구개발 추진체계

○ 본 연구에서는 “호흡기질환 예방용 천문동 제품개발 및 산업화”라는 목표를 달성하기 위하여 천문동제품을 생산할 중소기업과 기술개발 및 효능평가를 담당할 대학으로 연구팀을 구성하였으며, 그 역할은 다음과 같음

- 기업: 호흡기질환 예방제품의 생산 및 산업화

(제품생산체계 확립, 소비자조사, 제품의 배합 및 공정조건 확립, 홍보전략수립 등)

- 대학: 천문동의 생리활성 성분분석 및 기능성증진 연구/ 천문동의 효능연구

(이화학적 성분분석, 가공처리조건 확립, 소재화, 대량생산방법 연구, 효능분석, 작 용기전 연구, 효능비교 등)

○ 연구기관별 연구개발 추진 내용

- 제1 세부 : 본 과제에서는 천문동의 수확시기별 크기와 무게 및 일반 이화학적 성분을 비교, 분석하였고 천문동의 고품질 원료 최적조건을 구명하기 위하여 건조방법에 따라 천문동의 원료 변화를 연구하였다. 그 결과, 천문동은 가을에 수확하는 것에 비하여 이듬해인 봄에 수확하는 것이 대편화되는 경향이였으며 일반적인 성분변화에서도 수분과 단백질은 감소하는 경향을 나타냈지만, 그 외의 성분에 대해서는 큰 변화가 나타나지 않았다. 또한, 동결건조하여 확보된 천문동을 열수추출하여 차음료로 개발하였으며 이에 대한 소비자 조사를 위한 설문지를 제작하였다. 본 세부과제의 2차년도 연구에서는 천문동의 호흡기질환관련 제품의 생산체계를 구축하기 위하여 이들 제품의 소비자조사를 실시하고 대량생산을 위한 표준



체계를 구축하였으며, 판매전략을 수립하였다. 또한, 제1협동에서 도출된 연구결과를 토대로 천문동제품과 천문동 발효제품의 생산을 위해 기능성 지표물질의 추출최적조건을 확립하고 제품생산을 위한 배합공정, 제조공정 등을 확립하였다. 발효 천문동 시제품생산을 위한 표준화 연구를 통해 도출된 천문동 발효 제품을 제2협동에 제공하여 호흡기질환 동물모델을 활용한 효능평가의 연구에 시료를 제공하였다. 3차년도에서는 증숙 천문동과 관련된 제품의 생산을 위해서 기능성 지표물질을 탐색하고 제품생산을 위한 배합공정, 제조공정 등을 확립하였다.

- 제 1협동 : 본 과제에서는 천문동의 폴리페놀, 플라보노이드 등 생리활성 성분을 조사하고, 동시에 각종 용매추출을 통하여 호흡기관련 세균에 대한 항균활성 분획, 항산화활성 분획 등을 확인하였다. 또한 용매추출물을 대상으로 DPPH 라디칼, 아질산, 히드록시 라디칼능 소거능 등 항산화능을 측정하였고, 이 결과를 바탕으로 TLC, HPLC, Prep-HPLC 등을 이용하여 활성물질을 분리 시도하였다. 이 과정 중 천문동 수확시기에 따라 활성성분의 종류와 농도가 달라진다는 사실을 확인하였다. 본 과제에서 획득한 각종 용매 추출물들은 제2협동과제의 호흡기질환 효능평가 연구를 위하여 제공하였다. 2차년도에서는 천문동의 발효조건을 확립하기 위하여 발효형태별(고체발효 및 액체발효) 최적조건을 확립하고 발효에 따른 이화학적 성분의 변화 등을 분석하였다. 또한, 발효 천문동의 호흡기 질환 생리활성 성분을 분석하기 위해 유기용매별 기능성 성분을 분석하였고 분석된 성분의 기초 효능을 분석하였으며, 제2협동과제에 제공하여 세포나 동물실험에서 효능 평가를 위한 재료를 제공하였다. 또한, 천문동의 발효 최적화와 관련된 연구결과를 제1세부에 제공하여, 제1세부에서 진행하는 발효 천문동 제품의 표준화의 연구수행에 기초자료를 제공하였다. 3차년도에는 천문동의 증숙을 위한 여러 가지 조건을 연구하여 증숙 조건을 확립하였으며, 이를 통해 얻어진 증숙 천문동의 생리활성 물질 및 특성을 탐색하였으며, 그 결과를 제1세부에 제공하여 증숙 천문동 제품의 개발을 위한 자료로 제공하였다.
- 제 2협동 : 1차년도에서는 제1협동과제에서 추출된 천문동추출물의 효능과 독성을 평가하여 우수한 효능을 갖는 추출물을 확인하고자 하였다. 이를 위하여 각기 다른 용매로 추출된 천문동 추출물과 도라지추출물을 호흡기질환에서 면역작용을 하는 다양한 세포주에 처리하여 항염증효능, 생리활성, 독성 등을 평가하였다. 이러한 결과들은 제1협동과제와 제1세부과제에 제공함으로써 우수한 천문동 추출물을 탐색하는 과정에 활용하였다. 2차년도 연구에서는 1차년도에 세포실험을 통해 우수한 효능이 있는 것으로 확인된 천문동 추출물을 호흡기질환모델동물을 이용하여 효능평가를 수행하고자 하였다. 이를 위해 OVA를 이용하여 호흡기질환모델동물을 대량생산기법을 확립하고 이들의 기초생리적 특성에 대한 분석을 실시하였다. 이를 바탕으로 천문동의 추출물을 호흡기질환모델동물에 투여하여 면역학적 사이토카인 등의 작용기전, 폐조직의 병리학적 구조변화 등을 분석하였다. 더불어

천문동의 효능을 일반적으로 알려진 도라지 추출물과 비교분석하였다. 이러한 결과를 통해 천문동이 호흡기질환에 우수한 효능이 있음을 확인하였고 이러한 결과를 제1세부와 제1협동에 제공함으로써 제품개발에 반영하였다. 3차년도에는 제1세부와 제1협동에서 유래된 천문동제품이나 발효천문동 등을 이용하여 실제 제품화전에 필요한 독성평가와 약리효능에 대한 분석을 실험동물을 이용하여 실시하였다. 이를 위해 ICR마우스에 천문동제품을 처리하여 독성평가를 실시하였으며, 호흡기질환모델동물(천식)에 발효천문동을 처리하여 천식질환치료효능에 대한 작용메커니즘을 분석하고, 약리작용시간, 최적작용농도 등을 분석하였다. 또한, 발효천문동의 생리활성을 분석하였고, 천문동에 분포하는 물질 중에서 기능성이 알려진 2가지 후보물질을 대상으로 세포주에서 기능성을 분석하였다. 이러한 연구를 통해 천문동제품이 독성이 없고 호흡기질환에 우수한 약리효능을 나타냄을 규명하였고, 본 협동과제에서 도출된 결과가 다른 세부과제들과 유기적인 연계를 통한 천문동의 사업화 및 효능평가 기전규명에 기여할 것으로 사료된다.



○ 연구개발 추진체계

연구개발과제		총 참여 연구원
과제명	호흡기질환 예방용 천문동 제품개발 및 산업화	주관연구책임자 (이충렬)외 총 14명

기관별 참여 현황		
구분	연구기관수	참여연구원수
대기업		
중견기업		
중소기업	1	2
대학	1	13
국공립(연)		
출연(연)		
기타		

주관연구기관명
과제명
연구책임자명 (이충렬)외 1명
담당기술개발내용
<ul style="list-style-type: none"> <li>- 호흡기 질환 예방 제품 생산체계 구축</li> <li>- 천문동, 발효천문동 및 증숙천문동의 소비자조사 및 기호도조사</li> <li>- 제품생산을 위한 공정 표준화 체계 구축</li> <li>- 제품의 마케팅 및 홍보전략 수립</li> </ul>

협동연구기관명
과제명
연구책임자명 (김동섭)외 13명
담당기술개발내용
<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 호흡기 질환 관련 생리활성 성분분석 및 기능성 증진연구             <ul style="list-style-type: none"> <li>- 천문동 덩이뿌리(괴근)의 이화학적 성분 분석</li> <li>- 천문동의 호흡기 질환 예방관련 성분의 분석, 분리 동정 및 소재화</li> <li>- 천문동 가공처리 조건의 최적화(발효, 증숙 및 로스팅)</li> <li>- 천문동 가공처리에 따른 호흡기 질환 예방 관련 기능성 성분의 분석</li> <li>- 호흡기 질환 예방 관련 기능성 성분의 대량 생산 방법 연구</li> </ul> </li> <li>○ 천문동의 호흡기 질환 효능연구             <ul style="list-style-type: none"> <li>- 천문동의 in vitro 생리활성(호흡기질환) 효능분석</li> <li>- 모델동물을 이용한 천문동의 호흡기질환 효능평가</li> <li>- 천문동의 호흡기질환에 대한 효능비교 (도라지, 쑥 등과의 비교연구)</li> <li>- 신규분리된 소재의 효능 검증 및 융복합 효능 분석</li> </ul> </li> </ul>

### 3. 연구개발 추진일정

1차년도																
일련 번호	연구내용	추진 일정												연구 개발비 (단위: 천원)	책임자 (소속 기관)	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12			
1	천문동 고품질 원료 최적조건확립	■	■	■	■	■									96,700	이충렬 ((주)강 림오가 닉)
2	천문동시제품제작					■	■	■	■	■	■	■	■			
3	천문동소비자 조사 및 기호도조사								■	■	■	■	■	■		
4	마케팅방안수립					■	■	■	■	■	■	■	■	■		
5	천문동 피근의 이화학적 성분분석	■	■	■	■	■	■	■							60,000	김동섭 (부산대 학교)
6	유기용매별 생리활성물질 탐색					■	■	■	■	■	■	■	■	■		
7	유해물질의 분석									■	■	■	■	■		
8	호흡기 질환관련 생리활성물질의 분리 및 정제	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■		
9	생리활성 검증을 위한 세포주 분석	■	■	■	■	■									70,000	황대연 (부산대 학교)
10	천문동의 생리활성 (호흡기질환) 효능 평가				■	■	■	■	■	■	■	■	■	■		
11	질병의 발병기전에 미치는 영향분석								■	■	■	■	■	■		
12	각 세포주에 미치 는 독성평가										■	■	■	■		
2차년도																
일련 번호	연구내용	추진 일정												연구 개발비 (단위: 천원)	책임자 (소속 기관)	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12			
1	공정표준화 체계 구축	■	■	■	■	■	■	■							96,700	이충렬 ((주)강 림오가 닉)
2	발효 천문동시제품제작					■	■	■	■	■	■	■	■	■		
3	발효천문동소비자 조사 및 기호도조사								■	■	■	■	■	■		
4	마케팅방안수립			■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■		
5	천문동 발효 조건 확립	■	■	■	■	■	■	■							60,000	김동섭 (부산대 학교)
6	발효에 따른 특성 분석				■	■	■	■	■	■	■	■	■	■		
7	유기용매 분획별 기능성 성분분석					■	■	■	■	■	■	■	■	■		

8	분리된 분획의 효능분석														
9	효능분석을 위한 모델동물 확립													70,000	황대연 (부산대학교)
10	In vivo 생리활성 효능평가														
11	천문동과 다른 기능성 물질의 효능비교														
3차년도															
일련 번호	연구내용	추진 일정												연구 개발비 (단위: 천원)	책임자 (소속 기관)
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12		
1	천문동원료분석													96,700	이충렬 (주)강림오가 너)
2	천문동증숙시제품 제작														
3	증숙천문동소비자 조사 및 기호도조사														
4	마케팅방안수립														
5	증숙천문동 제조 조건 확립 및 최적화												60,000	김동섭 (부산대 학교)	
6	증숙에 따른 기능성 분석														
7	유기용매 분획별 호흡기 질환관련 생리활성 기능성분의 분석 및 분리														
8	분리된 분획의 효능분석														
9	천문동제품의 독성평가												70,000	황대연 (부산대 학교)	
10	약리 효능평가														
11	약리효능 후보물질에 대한 평가														

## 제 5절. 연구개발 성과

### 1. 논문게재 성과

#### 가. SCI급 논문

(1) 저널 : Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry

저자 : Ji Eun Kim, Jun Go, Eun Kyoung Koh, Sung Hwa Song, Ji Eun Sung, Hyun Ah Lee, Dong Seob Kim, Hong Joo Son, Hee Seob Lee, Chung Yeoul Lee, Jin Tae Hong, Dae Youn Hwang

제목 : Diosgenin effectively suppresses skin inflammation induced by phthalic anhydride in IL-4/Luc/CNS-1 transgenic mice

게재년도, 볼륨, 페이지 : 2015, 21, p.891-901

(2) 저널 : Molecular Medicine Reprints

저자 : Hyun Ah Lee, Eun Kyoung Koh, Ji Eun Sung, Ji Eun Kim, Sung Hwa Song, Dong Seob Kim, Hong Joo Son, Chung Yeoul Lee, Hee Seob Lee, Chang Joon Bae, Dae Youn Hwang

제목 : Ethyl acetate extract from Asparagus cochinchinensis exerts anti-inflammatory effects in LPS-stimulated RAW264.7 macrophage cells by regulating COX-2/iNOS, inflammatory cytokine expression, MAP kinase pathways, the cell cycle and anti-oxidant activity

게재년도, 볼륨, 페이지 : 2017, 15, p.1613-1623

(3) 저널 : Journal of Microbiology and Biotechnology

저자 : Minji Kim, Kim Won-Baek, Kyoung Yoon Koo, Bo Ram Kim, Doohyun Kim, Seoyoun Lee, Hong Joo Son, Dae Youn Hwang, Dong Seob Kim, Chung Yeoul Lee, Heeseob Lee

제목 : Optimal Fermentation Conditions of Hyaluronidase Inhibition Activity on Asparagus cochinchinensis Merrill by Weissella cibaria

게재년도, 볼륨, 페이지 : 2017, 27(4), p.701-708

(4) 저널 : Pharmacognosy Magazine

저자 : Jun Go, Ji Eun Kim, Eun Kyoung Koh, Sung Hwa Song, Hyun Gu Kang, Young Hee Lee, Han Do Kim, Jin Tae Hong, Dae Youn Hwang

제목 : Hepatoprotective effect of gallotannin-enriched extract isolated from Galla Rhois on hydrogen peroxide-induced cytotoxicity in HepG2 cells

게재년도, 볼륨, 페이지 : 2017, 13(Suppl 2), p.S294-S300

(5) 저널 : International Journal of Molecular Medicine

저자 : Ji Eun Sung, Hyun Ah Lee, Ji Eun Kim, Woo Bin Yun, Beum Soo An, Seung Yun Yang, Dong Seob Kim, Chung Yeoul Lee, Hee Seob Lee, Chang Joon Bae, Dae Youn Hwang

제목 : Saponin-enriched extract of *Asparagus cochinchinensis* alleviates airway inflammation and remodeling in ovalbumin-induced asthma model

게재년도, 볼륨, 페이지 : 2017, 40, p.1365-1376

(6) 저널 : Experimental and Therapeutic Medicine

저자 : Hyun Ah Lee, Bo Ram Song, Hye Ryeong Kim, Ji Eun Kim, Woo Bin Yun, Jin Ju Park, Mi Lim Lee, Jun Young Choi, Hee Seob Lee, Dae Youn Hwang

제목 : Butanol extracts of *Asparagus cochinchinensis* fermented with *Weissella cibaria* inhibit iNOS-mediated COX-2 induction pathway and inflammatory cytokines in LPS-stimulated RAW264.7 macrophage cells

게재년도, 볼륨, 페이지 : 2017, 14, p.4986-4994

(7) 저널 : BMC Complementary and Alternative Medicine

저자 : Hyun Ah Lee, Ji Eun Kim, Ji Eun Sung, Woo Bin Yun, Dong Seob Kim, Hee Seob Lee, Jin Tae Hong, Dae Youn Hwang

제목 : *Asparagus cochinchinensis* stimulates release of nerve growth factor and abrogates oxidative stress in the Tg2576 model for Alzheimer's disease

게재년도, 볼륨, 페이지 : 2017, accepted

#### 나. 비SCI급 논문

(1) 저널 : 한국미생물·생명공학회지

저자 : 정민기, 김수인, 정해진, 이충렬, 손홍주, 황대연, 이희섭, 김동섭

제목 : 천문동 추출물의 호흡기 세균에 대한 항균활성 및 항산화

게재년도, 볼륨, 페이지 : 2015, 43(4), p.367-372

(2) 저널 : Laboratory Animal Research

저자 : Jun Go, Ji-Eun Kim, Eun-Kyoung Koh, Sung-Hwa Song, Ji-Eun Seung, Chan-Kyu Park, Hyun-Ah Lee, Hong-Sung Kim, Jae-Ho Lee, Beum-Soo An, Seung-Yun Yang, Yong Lim, Dae-Youn Hwang

제목 : Hepatotoxicity and nephrotoxicity of gallotannin-enriched extract isolated from *Galla Rhois* in ICR mice

게재년도, 볼륨, 페이지 : 2015, 31(3), p.101-110

(3) 저널 : Journal of Life Science

저자 : Eun Ji Seo, Jun Go, Ji Eun Kim, Eun Kyoung Koh, Sung Hwa Song, Ji Eun Sung, Chan Kyu Park, Hyun Ah Lee, Dong Seob Kim, Hong Joo Son, Cung Yeoul Lee, Hee Seob Lee, Dae Youn Hwang

제목 : Suppressive Effects of Epigallocatechin Gallate Pretreatment on the Expression of Inflammatory Cytokines in RAW264.7 Cells Activated by Lipopolysaccharide

게재년도, 볼륨, 페이지 : 2015, 25(9), p.961-969

(4) 저널 : Laboratory Animal Research

저자 : Ji-Eun Sung, Hyun-Ah Lee, Ji-Eun Kim, Jun Go, Eun-Ji Seo, Woo-Bin Yun, Dong-Seob Kim, Hong-Joo Son, Chung-Yeoul Lee, Hee-Seob Lee, Dae-Youn Hwang

제목 : Therapeutic effect of ethyl acetate extract from Asparagus cochinchinensis on phthalic anhydride-induced skin inflammation

게재년도, 볼륨, 페이지 : 2016, 32(1), p.34-45

(5) 저널 : Journal of Life Science

저자 : Hyun Ah Lee, Ji Eun Kim, Sung Hwa Song, Ji Eun Sung, Min Gi Jung, Dong Seob Kim, Hong Joo Son, Chung Yeoul Lee, Hee Seob Lee, Dae Youn Hwang

제목 : Effects of Aqueous Extract from Asparagus cochinchinensis on Regulation of Nerve Growth Factor in Neuronal Cells

게재년도, 볼륨, 페이지 : 2016, 26(5), p.509-518

(6) 저널 : 한국식품영양과학회지

저자 : 구경윤, 김원백, 박소혜, 김민지, 김보람, 황지희, 김민정, 손홍주, 황대연, 김동섭, 이충렬, 이희섭

제목 : 천문동 건근의 항산화 효과에 관한 연구

게재년도, 볼륨, 페이지 : 2016, 45(4), p.524-532

(7) 저널 : 산업식품공학

저자 : 김수인, 이승민, 이충렬, 손홍주, 황대연, 이희섭, 김동섭

제목 : 젖산균 발효 천문동의 항균활성 및 발효 특성

게재년도, 볼륨, 페이지 : 2016, 20(4), p.278-284

(8) 저널 : 산업식품공학

저자 : 이승민, 김수인, 강문선, 이충렬, 황대연, 이희섭, 김동섭

제목 : 증숙 및 발효한 천문동의 항균활성과 특성

게재년도, 볼륨, 페이지 : 2017, 21(2), p.143-149

(9) 저널 : Laboratory Animal Research

저자 : Ji Eun Sung, Jun Young Choi, Ji Eun Kim, Hyun Ah Lee, Woo Bin Yun, Jin Ju Park, Hye Ryeong Kim, Bo Ram Song, Dong Seob Kim, Chung Yeoul Lee, Hee Seob Lee, Yong Lim, Dae Youn Hwang

제목 : Hepatotoxicity and nephrotoxicity of saponin-enriched extract of *Asparagus cochinchinensis* in ICR mice

게재년도, 볼륨, 페이지 : 2017, 33(2), p.57-67

## 2. 특허성과

### 가. 특허 출원

(1) 발명의 명칭: 천문동 추출물을 함유하는 호흡기질환 예방 및 치료용 조성물

출원일자: 2015.06.30

출원번호: 10-2015-0093443

출원인 명칭: 이충렬

발명자 성명: 이충렬, 김동섭, 황대연, 임수복

(2) 발명의 명칭: 천문동 발효진액 및 그 제조방법

출원일자: 2016.06.23

출원번호: 10-2016-0078537

출원인 명칭: 농업회사법인(주)강림오가닉

발명자 성명: 이충렬, 임수복, 김동섭, 황대연, 손홍주, 이희섭, 김민지, 김원백

(3) 발명의 명칭: 생리 활성이 증가된 증숙 천문동 및 그 제조방법

출원일자: 2017.07.27

출원번호: 10-2017-0095417

출원인 명칭: 농업회사법인(주)강림오가닉, 부산대학교 산학협력단

발명자 성명: 이충렬, 임수복, 이희섭, 황대연, 김동섭

### 나. 특허 등록

(1) 발명의 명칭: 천문동 발효진액 및 그 제조방법

등록일: 2017.10.27.

특허등록번호 : 10-1793043

출원인 명칭: 농업회사법인(주)강림오가닉

발명자 성명: 이충렬, 임수복, 김동섭, 황대연, 손홍주, 이희섭, 김민지, 김원백

### 3. 연구결과

#### 가. 기술적 성과

- 천문동 증숙 및 발효 공정의 최적화를 통하여 농산물의 기능성 증진 기술의 선진화
- 천문동에 특화된 가공방법의 개발과 제품개발전략에 맞춘 가공기술의 보유
- 호흡기 질환예방관련 고부가가치 식품소재의 개발로 관련산업의 국제 경쟁력 향상에 기여
- 3건의 특허 출원을 통한 지적 재산권 확보
- 사업수행 과정에서 얻어진 자료들을 논문화하여 국내외 학술지에 16편의 논문을 게재함

#### 나. 경제적 성과

- 호흡기 질환 예방을 위한 고부가가치 식품 개발에 따른 기업의 신제품 개발로 경쟁력 제고
- 천문동에 발효 및 증숙의 기술을 적용을 통한 품질 향상으로 다양한 기능성 제품의 생산을 통하여 고부가가치 창출
- 식음료분야 이외의 미용·두피 등 다양한 적용 가능성 창출
- 새로운 제품 개발을 통한 신시장 개척으로 농민들의 소득창출 기회제공

#### 다. 사업화성과 및 매출실적

##### ○ 사업화 성과

항목	세부항목		성 과	
사업화 성과	매출액	개발제품	개발후 현재까지	0억원
			향후 3년간 매출	2.5억원
		관련제품	개발후 현재까지	2억원
			향후 3년간 매출	5억원
	시장 점유율	개발제품	개발후 현재까지	국내 : -% 국외 : -%
			향후 3년간 매출	국내 : 5% 국외 : 2%
		관련제품	개발후 현재까지	국내 : -% 국외 : -%
			향후 3년간 매출	국내 : 7% 국외 : 2%
	세계시장 경쟁력 순위	현재 제품 세계시장 경쟁력 순위		위
		3년 후 제품 세계 시장경쟁력 순위		위



○ 사업화 계획 및 매출 실적

항 목	세부 항목	성 과			
사업화 계획	사업화 소요기간(년)	3년			
	소요예산(백만원)	350			
	예상 매출규모 (억원)	현재까지	3년후	5년후	
		0	3	5	
	시장 점유율	단위(%)	현재까지	3년후	5년후
		국내	0	5	10
국외		0	2	5	
	향후 관련기술, 제품을 응용한 타 모델, 제품 개발계획	천문동과 맥문동 등을 융복합하여 캡슐화로 간편하게 복용할 수 있는 제품을 개발			
무역 수지 개선 효과	(단위: 억원)	현재	3년후	5년후	
	수입대체(내수)	-	-	-	
	수 출	-	2	5	

본 연구결과에서 생산된 제품을 박람회 및 제품홍보전을 통해서 소비자의 반응은 긍정적인 것으로 판단된다. 하지만 본 연구개발을 통해 얻어진 제품을 보다 효율적으로 판매 및 홍보를 위해서는 건강기능식품으로의 제품 출시가 필요한 것으로 분석되었다. 본 연구기관은 GMP시설을 보유하고 있어 현재 건강기능식품의 제조 판매가 가능한 기관이므로, 본 연구개발을 통해서 진행된 제품에 대하여 추가적인 과제의 진행을 통한 건강기능식품의 연구개발을 통해서 판매하는 것이 보다 바람직할 것으로 판단되며, 이를 위해서는 향후 3년정도의 기간이 소요될 것으로 사료되며 그 이후에는 충분한 매출실적을 달성할 수 있을것으로 판단된다.

## 제 4장. 목표달성도 및 관련분야 기여도

		코드번호	D-06	
제 1절. 목표달성도				
구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	달성도 (%)	연구개발 수행내용
1차 년도 (2014 ~2015)	천문동을 활용한 호흡기 질환 예방 제품 개발	천문동 고품질 원료의 최적 조건	100	- 천문동의 수확후 건조방법 - 천문동의 제품화를 위한 가공방법 - 고품질 원료의 최적화
		호흡기 질환 예방 제품 생산 체계 구축	100	- 천문동의 소비자 조사 및 기호도 조사 - 대량 생산을 위한 공정 표준화 체 계 구축 - 마케팅 및 홍보전략 수립
		호흡기 질환 예방 시제품 생산	100	- 천문동 가공제품의 배합 및 공정 과정
	천문동의 호흡기 질환관련 생리활성 물질의 탐색 및 분리	천문동 성분 분석	100	- 천문동 덩이뿌리(괴근)의 이화학적 성분 분석 - 유기용매 분획별 호흡기 질환관련 생리활성물질의 탐색 - 유해 물질의 분석(잔류농약, 중금 속 등 분석)
		호흡기 질환관련 생리활성 물 질의 분리 및 정제	100	- 천문동 생리활성 성분의 분리 및 정제 - 구조분석을 위한 실험 - 분리된 분획의 효능 분석
	천문동의 in vitro 생리활성 및 기능성 분석	생리활성 검증을 위한 세포주 분석	100	- 염증반응 지표세포주인 대식세포 와 소신경교세포주 확보 및 배양 조건 확립
		in vitro 효능평가	100	- 천문동 추출물의 생리활성(호흡기 질환) 염증반응억제 효능 평가 - 염증반응 억제효능의 기전영향 분석 - 천문동 추출물의 각 세포주에 미 치는 독성평가
		In vivo 시험법 확립 (추가연구)	100	- 실험동물에서 호흡기질환 유발 방법 확립 - 호흡기질환 효능평가 기법 확립

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	달성도 (%)	연구개발 수행내용
2차 년도 (2015 ~2016)	발효 천문동을 활용한 호흡기 질환 예방 제품 개발	호흡기 질환 예방 제품 생산 체계 구축	100	- 천문동 및 발효 천문동의 소비 자 조사 및 기호도 조사 - 대량 생산을 위한 공정 표준화 체계 구축 - 제품의 마케팅 및 홍보전략 수 립
		천문동 및 발효 천문동을 활 용한 호흡기질환 예방 제품 생산	100	- 기능성 지표물질의 최적 추출 공정의 확립 - 천문동의 전처리, 추출공정, 배 합 및 제조공정 확립 - 발효 천문동 활용 제품의 배합 및 공정조건 확립
	천문동 발효 최적 조건확립 및 기능성 성분 분석	천문동 발효 조건 확립	100	- 발효형태별 최적 조건 (액체 및 고체 발효) - 발효에 따른 이화학적 특성 및 기능성 분석
		발효 천문동의 호흡기 질환관 련 생리활성성분 분석 및 정 제	100	- 유기용매 분획별 기능성 성분의 분석 및 분리 - 분리된 분획의 효능 분석
	모델동물을 이용한 천문동의 생리활성 및 기능성 분석	효능분석을 위한 모델동물 확 립	100	- 호흡기질환 모델동물의 확보 - 모델동물의 대량생산 및 기초 생리자료 확보
		<i>In vivo</i> 생리활성 효능	100	- 모델동물을 활용한 천문동의 생 리활성(호흡기질환) 효능분석(다른 물질과의 비교) - 질환의 발병기전에 미치는 천문 동의 작용기전 분석 및 연구 - 폐, 기관지 등의 조직학적 특성 분석
		천문동과 다른 기능성물질의 효능비교 분석	100	- 천문동과 다른 기능성물질의 효 능 분석

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	달성도 (%)	연구개발 수행내용
3차 년도 (2016 ~2017)	증속 천문동을 활용한 호흡기 질환 예방 제품 개발	호흡기 질환 예방 제품 생산 체계 구축	100	- 증속 천문동의 소비자 조사 및 기호도 조사 - 대량 생산을 위한 공정 표준화 체계 구축 - 제품의 마케팅 및 홍보전략 수립
		발효 천문동을 활용한 호흡기 질환 예방 제품 생산	100	- 기능성 지표물질의 최적 추출공정의 확립 - 증속 천문동 활용 제품의 배합 및 공정조건 확립
	천문동 증속 최적 조건확립 및 호흡기 질환관련 성분 분석	천문동의 증속조건 확립 및 최적화	100	- 온도, 시간 및 증속 횟수에 따른 증속 천문동 제조 특성 규명 - 증속 천문동 제조 조건의 최적화 및 표준화
		증속 천문동의 호흡기 질환관련 생리활성성분 분석 및 정제	100	- 천문동 증속 단계에 따른 이화학적 성분 분석 - 천문동 증속 단계에 따른 기능성 성분의 분석 - 유기용매 분획별 기능성 성분의 분석 및 분리 - 분리된 분획의 효능 분석
	호흡기 질환 예방 제품에 대한 독성 및 효능 검증	천문동 및 제품의 독성평가	100	- 독성시험프로토콜 확립 - 단회독성시험 등 독성시험 실시
		약리 효능평가	100	- 약리효능시험 프로토콜 확립 - 천문동제품의 질환개선 작용메커니즘 연구 - 천문동제품의 약리효능 평가 - 천문동제품의 생리활성 검증
		약리효능 후보물질에 대한 평가	100	- 추출된 후보물질에 대한 기능연구

제 2절. 관련분야 기여도

연차	세부연구개발 목표	달성도(%)	관련분야의 기술발전예의 기여도
제 1 차 년 도	천문동을 활용한 호흡기 질환 예방 제품 개발	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 천문동의 수확시기별 크기 및 무게 측정함</li> <li>- 천문동의 건조방법에 따른 품질 비교 평가함</li> <li>- 제품화를 위한 차, 파우치 시제품 제조함</li> <li>- 시제품에 대한 소비자 조사 및 기호도 조사를 위한 설문지 작성함</li> <li>- 마케팅 및 홍보 전략 구축하였음</li> <li>- 차음료 및 파우치 시제품 제작하였음</li> </ul>
제 2 차 년 도	발효 천문동을 활용한 호흡기 질환 예방 제품 개발	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 천문동 차음료(파우치) 시제품 제작</li> <li>- 천문동 및 발효 천문동의 시제품에 대한 소비자 조사 및 기호도 조사</li> <li>- 제품의 마케팅 및 홍보전략 수립</li> <li>- 기능성 지표물질의 최적 추출 공정의 확립</li> <li>- 천문동의 배합 및 제조공정 확립</li> <li>- 발효 천문동 활용 제품의 배합 및 공정조건 확립</li> </ul>
제 3 차 년 도	증숙 천문동을 활용한 호흡기 질환 예방 제품 개발	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 증숙 천문동을 활용하여 증숙 천문동 액상차음료 및 캡슐 시제품 생산</li> <li>- 시제품에 대한 기호도 조사를 수행하였음</li> <li>- 증숙 천문동의 배합 및 제조공정 확립을 확립하여 품목제조신고하였음</li> <li>- 증숙 천문동의 기능성 지표물질 최적 추출공정을 확립하였음</li> <li>- 마케팅 및 홍보전략을 수립하였으며, 시제품의 홍보 및 박람회에 참가하였음</li> </ul>

연차	세부연구개발 목표	달성도(%)	관련분야의 기술발전예의 기여도
제 1 협동	1 차년도 천문동의 호흡기 질환관련 생리활성 물질의 탐색 및 분리	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>-천문동 뿌리를 동결건조하여 지방, 당, 플라보노이드 등의 성분을 측정</li> <li>-건조된 천문동 샘플을 열수, 알콜, 에틸아세테이트 등 각종 용매로 추출하여 호흡기 관련 항균 활성을 측정</li> <li>-제품개발을 위한 천문동의 안전성을 확인하기 위해 중금속 성분과 245종의 잔류농약 성분을 검사</li> <li>-천문동의 생리활성 성분을 분리하기 위해 부위별로 항산화 및 기능을 측정하고 함량을 비교</li> <li>-부위별, 용매별 실험을 통해 얻어진 분획을 메타놀 농도별로 분획 추출하고, 추출된 분획에서 항산화능 등 각종 기능을 검토</li> </ul>
	2 차년도 천문동 발효 최적 조건 확립 및 기능성 성분 분석	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 발효 천문동 형태(액상 및 고형 발효)별 항균활성 측정</li> <li>- 발효 천문동의 생균수, pH, 산도 및 일반 성분 측정</li> <li>- 물, 메탄올(MeOH), 에탄올(EtOH), 노르말 헥산(n-hexane), 에틸 아세테이트(EtOAc), 에테르(Ether)등의 용매로 추출</li> <li>- 각 분획 추출물별 항균활성 측정</li> </ul>
	3 차년도 천문동 증숙 최적 조건 확립 및 호흡기 질환관련 성분 분석	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 온도 및 시간에 따른 증숙 천문동을 제조하였음</li> <li>- 증숙 단계에 따른 protodioscin 분석 및 항염증활성을 통한 생리활성 분석</li> <li>- 유기용매 분획별 분획을 통하여 총폴리페놀, 총플라보노이드 함량, 항산화능 및 항염증활성을 분석함</li> <li>- 분획물의 기능성 성분을 탐색하고 분리 및 분석함</li> <li>- 대량생산을 위한 분말화를 위하여 분무건조 조건을 확립하였음</li> </ul>

연차	세부연구개발 목표	달성도(%)	관련분야의 기술발전예의 기여도	
제 2 협 동	1 차 년 도	천문동의 In vitro 생리활성 및 기능성 분석	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 효능평가를 수행하기 위하여, 다양한 염증 반응세포주를 확보하여 배양조건을 확립함.</li> <li>- 천문동 추출물이 염증사이토카인 분비억제에 미치는 영향을 평가함.</li> <li>- 천문동 추출물이 NO생성억제에 미치는 영향을 평가함.</li> <li>- 천문동 추출물이 MAPK 신호전달과정에 미치는 영향을 평가함.</li> <li>- 천문동 추출물이 다양한 세포주에 미치는 독성을 평가함.</li> </ul>
	2 차 년 도	모델동물을 이용한 천문동의 생리활성 및 기능성 분석	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 호흡기질환모델동물을 확립하는 기술을 확보하여 일정하고 안정적으로 천식질환을 유발하는 기술을 확립함.</li> <li>- 천문동 추출물이 혈청내 IgE, IL-4, IL-13, COX-2 등의 분비를 억제함을 확인함.</li> <li>- 천문동 추출물이 폐조직의 기관지벽두께 감소, 뮤신분비억제 등을 촉진함을 확인함</li> <li>- 천문동과 도라지추출물의 효능을 분석하여 다른 것은 유사하지만 IgE분비억제능은 천문동이 우수함을 확인함</li> </ul>
	3 차 년 도	호흡기질환예방제품에 대한 독성 및 효능검증	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 독성시험을 위해, 허가기관의 가이드라인에 맞는 시험프로토콜을 확립하였고, 천문동제품의 독성이 없음을 확인하였음.</li> <li>- 발효천문동제품이 혈청내 IgE, IL-4, IL-13, COX-2 등의 분비를 억제하고, 폐조직의 기관지벽두께감소, 뮤신분비억제 등을 촉진함을 확인함</li> <li>- 발효천문동의 약효지속시간, 최적약효농도 등을 설정하여 약리작용에 대한 기본자료를 확보함</li> <li>- 발효천문동의 생리활성 증진효능을 확인하고 혈청내 대사체분석을 통하여 천문동의 효능평가에 사용할 수 있는 지표물질을 확인함.</li> <li>- 천문동에 분포하는 물질 중에서 약리후보물질로 protodioscin과 caffeic acid를 선정하여 효능을 평가하여 caffeic acid의 효능을 확인함.</li> </ul>

## 제 5장. 연구결과의 활용계획

코드번호

D-07

### 제 1절. 활용방안

#### 기술적 측면

- 천문동의 전래 약효에 대한 과학적 효능검증을 통한 고부가가치화
- 천문동의 호흡기 질환 예방 제품 개발
- 증숙 및 발효기법의 농작물 적용 기술 개발
- 다양한 가공처리방법에 따른 효능 증진

#### 경제적 측면

- 홍삼대체 식품 개발에 따른 저가, 고기능성 사포닌 함유 제품개발
- 새로운 호흡기 질환 예방관련 제품 개발로 신수요 창출
- 천문동 품질향상으로 국내 농가 수익 창출
- 수입 대체에 따른 국내산 천문동 수요 창출

#### 산업적 파급효과

- 천문동의 효능검증에 따른 가공제품의 품질 향상
- 호흡기 질환관련 생리활성물질의 소재화를 통한 식음료분야 이외의 다양한 분야에 적용 가능

- 천문동의 증숙, 발효 및 가공기술 개발을 통하여 생리활성 성분을 함유하는 새로운 천문동 제품을 생산하고, 이 과정에서 획득된 기술 노하우는 특수 기능성 제품 개발에 응용 가능할 것으로 예측되며, 결과적으로 다양한 호흡기 질환 예방 식품 및 제품의 창출 및 국민 건강 증진에 활용할 수 있을 것임.
- 특히 염증반응과 관련된 부분은 호흡기관련 질환뿐만아니라 다양한 면역반응과 관련된 질환과 연관되어 있으므로, 아토피, 천식 등과 관련된 제품의 개발에 활용될 수 있을 것으로 판단됨. 또한, 본 연구개발을 통해 얻어진 연구개발 방법을 활용하여 천문동 이외의 재료에 대한 호흡기 질환 효능 연구를 통해서 타제품의 개발의 적용도 가능할 것임.
- 자생 약용식물의 천문동을 상품화하여 한국 토종약초의 글로벌화로 세계약초강국으로 성장
- 천문동의 전통 약효에 대하여 과학적인 연구를 통해 고가가치 향상
- 고가의 홍삼 대체식품 개발, 고기능성 사포닌 함유 제품 개발을 통하여 국내 천



문동 재배 농가의 확대 및 농가 수익 증가를 유도하고, 중장기적으로 저품질의 수입산 인삼 및 홍삼을 대체할 수 있는 학문적 기초자료로 활용할 수 있음. 호흡기 질환에 효과를 보이는 천문동의 기능성분에 관한 연구를 전임상 단계까지 진행하여 추후 개별인정형 제품허가를 받기위한 자료를 마련함.

- 천문동 성분 표준화, 가공기술 표준화 등을 통하여 기존 천문동 제품과 차별화될 수 있는 천문동의 품질 향상을 꾀할 수 있으며, 나아가 식음료 외의 다양한 제품에 활용할 수 있음.

## 제 2절. 기대성과

- 농민소득의 증대 : 야생에서 버려지던 천문동을 재배하여 새로운 소득원을 제공 함
  - 국내토종 자원을 활용한 녹색성장 기반기술 확립 및 고부가가치 제품 생산
  - 안정적 판매처 확보 및 농민 신 소득원 창출
- 기업매출의 증대 : 천문동을 이용한 새로운 차, 과우치, 농축액, 캡슐 등의 제품을 상품화하고, 현재 기업이 보유하고 있는 대리점, 판매처, 홈쇼핑 등을 통한 마케팅전략으로 기업매출 증진에 기여하고자 함
  - 정량적 지표
    - 호흡기질환 예방제품 출시
    - 특허 : 3건이상 확보
  - 정성적 지표
    - 선진국에 의존하는 의료관련제품 생산기술의 독자적 확보
    - 산학협력 연구개발 분야의 활성화



## 제 6장. 연구과정에서 수집한 해외과학기술정보

코드번호

D-08

### 제 1절. 천문동 유래 신규 물질 정보

천문동은 예로부터 호흡기의 염증관련 질환에 대한 효능으로 인하여 전통한약재로서 활용되고 있다. 최근의 연구에서 천문동 덩이뿌리로부터 dioscin과 methylprotodioscin을 분리하였으며, 이들 물질에 대한 호흡기 관련 효능을 분석하였다. Protodioscin계열의 물질은 Asparagus속에 존재하는 항염증을 나타내는 사포닌 계열을 물질로 널리 알려져 있으나, 천문동(*Asparagus cochinchinensis*)에서는 처음으로 보고가 되고 있으며 또한 호흡기 상피세포에서 MUC5AC mucin의 유전자 발현 및 생산과 관련된 연구를 통해서 폐질환과 관련된 효능이 있음을 보고하고 있다.

최근의 또다른 연구에서, 천문동(*Asparagus cochinchinensis*)의 덩이뿌리 추출물을 이용하여 호흡기 관련 염증질환과 관련된 연구를 수행하였다. 천문동 뿌리의 에탄올 추출물은 IL-1 $\beta$  처리된 폐 상피 세포(A549)에서 IL-6의 발현을 억제하는 것으로 나타났으며 에탄올 추출물의 주요성분은 methylprotodioscin이었으며, 이 물질은 A549 세포에서 IL-6, IL-8 및 종양 괴사 인자- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )의 생성을 10-100 $\mu$ M에서 강력하게 억제 하였다. 또한 lipopolysaccharide에 의해 유도된 급성 폐 손상을 유발 시킨 동물을 이용한 기도 염증의 생체 내 모델에서 검사했을 때, methylprotodioscin은 폐 조직에서 IL-6, TNF- $\alpha$  및 IL-1 $\beta$ 와 같은 전 염증성 사이토 카인의 생성을 억제하는 것을 제시함으로써, 천문동이 기도 염증 치료에 사용되는 한약 치료제로서의 역할을 수행 할 수 있다는 과학적 증거를 제공하였다.

### 제 2절. 호흡기 질환 관련 효능평가 정보

최근까지 천식과 같은 호흡기질환의 치료에 우수한 효능을 갖는 천연물에 대한 여러 가지 연구들이 수행되어 보고되었다. 따라서, 은행나무, 도라지 등의 추출물의 호흡기질환 치료효능과 작용기전에 대한 해외정보를 수집하였으며, 다음과 같이 제시하였다.

1) 은행나무(*Ginkgo biloba*): 은행나무는 가장 널리 사용되는 한방 약재 중 하나이며 그 생물학적 효과로는 자유 라디칼을 제거하고 산화 스트레스를 낮추며 신경 손상, 혈소판 응집 감소, 항염증 및 항종양 작용을 포함한다. *G.biloba*의 GinkgolideB는기도의오래지속되는염증과기관지과민반응을유발할수있는염증매개체인혈소판활성화인자(PAF)의강력한억제제로알려져있다.

2) 상백피(*Morus Bark*): 상백피(桑白皮, *Morus bark*, mulberry root bark)는 뽕나무과에 속한 낙엽교목인 뽕나무속 식물의 근피로써 예로부터 해열, 항경련, 항알레르기, 항염증 작용

과 더불어 이노측진, 또한 보호, 혈당 강하 작용, 항암, 항균, 미백 효과 등 다양한 효과가 있다고 하였다. 상백피 추출물은 인간 기관지 상피세포에서 기도점막의 염증을 유발시키는 IL-8과 GM-CSF mRNA를 유의적으로 감소시켰고, 제1형 알레르기 천식 모델 흰쥐의 BALF 내 면역세포 및 혈청 IgE에 미치는 영향을 살펴 본 결과 BALF내 lymphocyte 수, CD4+/CD8+ 비율이 유의적으로 감소하였고, 혈청 IgE의 양은 수치적으로 억제되었으나 유의성이 없었다고 보고되었다.

3) 마타리(패장)(*Patrinia scabiosaefolia*): 패장은 패장과(마타리과 ; Valerianaceae)에 속한 다년생 초본인 뚝갈(白花敗醬) *Patrinia villosa*(THUNB.) Juss.와 마타리(黃花敗醬, *P. scabiosaefolia*)의 뿌리가 달린 전초를 건조한 것으로, 염증성질환에 양호한 치료효과가 있는 것으로 알려져 있다. 패장에 대한 최신연구로서 Seo 등의 황화패장의 급성췌장염 억제효과, Cho 등의 황화패장메탄추출물의 궤양성대장염 억제효과, Lee 등의 RAW264.7세포주에서 황화패장에틸아세테이트분획의 항염효과, Peng 등의 골수암세포주에서 STAT3억제를 통한 항암효과, Li 등의 백화패장의 항염효과, Xie 등의 백화패장정유성분의 항산화효과, Zhang 등의 백화패장의 항암효과 등이 보고되어 패장으로 활용되는 황화패장(마타리), 백화패장(뚝갈) 각각의 염증억제에 대한 효능이 주류를 이루고 있음을 알 수 있다.

4) 해바라기씨(*Helianthus annuus* Seed): 해바라기(향일규)는 한방에서 다수 이용되어지고 있는데 그 효능으로 잎 또는 꽃은 해열, 류마티스의 치료를 위한 약제로 쓰이고 있으며, 이의 씨는 이노제로 탁월한 것으로 알려져 있다. 또한 해바라기씨의 기름은 비타민 함량이 많아 보건식품으로 권장되고 있다. 이 외에도 해바라기씨의 기름은 다른 식물성 기름보다 비교적 많은 비타민 A, E가 함유되어 있는데, 이는 단백질, 지방 등 열량 영양소의 흡수량을 높여 주고 질병에 대한 저항력도 높여 주는 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 최근에는 해바라기씨가 콜레스테롤의 일종인 저밀도지단백질(LDL)의 혈중수치를 저하시키는 효과가 크다는 연구결과가 보고되어 있다. 한편, 해바라기씨 추출물에 따른 항산화 효과 중 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 의한 산화스트레스에 의한 세포사멸을 강하게 억제함을 보였다. 또한, 마우스를 이용한 천식동물모델에 적용하여 탁월한 천식억제효과를 CD4+세포, IL-4와 IL-13의 발현정도를 통해 확인하였다.

5) 사이프러스(*Cupressus sempervirens*): 사이프러스는 키가 큰 원추형 교목으로, 황적색의 나무 껍질은 단단하고 질기며, 회갈색 열매가 열린다. 한번 베어내면 재생하지 않지만 다른 종에 비하여 완전히 말라 죽기까지 오랜 시간이 걸린다. 지중해 지역에 널리 퍼져 있으며, 특히 그리스에서 많이 자란다. 잎과 열매에서 추출되는 정유는 진정작용이 있어 심리적 장애를 제거하는 데 효과가 있다. 또한 호르몬 불균형과 난소의 기능 부진에도 도움을 주며, 과다출혈과 안면홍조, 발한, 노화피부, 지성 피부 등에도 효과가 있다. 한편,

Ovalbumin으로 천식을 유발시킨 천식 생쥐 모델에서 기도과민성, 호산구 수 및 폐 세포 내 IL-5, IL-13 수치, 혈청 내 IgE 분비량, 폐 세포 내 CCR3, CD3, CD4 세포의 수 등 모든 항목에서 현저한 감소효과를 보였다.

6) 식방풍(植防風; 갯기름나물의 뿌리)(*Peucedani Japonici Radix*): 식방풍(植防風)은 산형과(繖形科: Umbelliferae)에 속하는 갯기름나물(*Peucedanum japonicum* Thunberg)의 뿌리로 성질(性)은 따뜻(溫)하고, 맛(味)은 맵고(辛) 달(甘)며, 두통(頭痛), 중풍(中風), 해열(解熱), 신경통(神經痛)의 주요 효능을 가지고 있다. 식방풍에 대한 실험연구로는 혈관성치매에 대한 예방과 치료효과, 혈압강화작용, 탄력섬유의 재생 및 회복효과, Azoxymethane으로 유도된 대장암마우스에서의 항암효과 등이 보고되었다. 또한 방풍잎(葉)추출물에 대한 연구로 고지방 식이로 유도된 비만마우스에서의 항비만효과, 부탄올분획물의 항산화효과가 보고되었다. 식방풍의 물추출물은 난알부민 유도천식마우스에서 혈청내 난알부민-특이IgE의 분비, Th2사이토카인인 IL-4의 분비를 유의적으로 감소시켰다. 또한, 난알부민 유도천식마우스의 폐조직에서 기관지 및 혈관의 구조적손상을 막고, 염증세포침윤을 억제시킴으로써 염증반응을 억제하였다.

7) 당삼(黨參; 만삼의 뿌리)(*Codonopsis Pilosulae Radix*): 당삼(黨參)은 초롱꽃과(桔梗科: Campanulaceae)에 속한 다년생본초인 만삼(*Codonopsis pilosula* (Fr.) Nannf)의 뿌리로 우리나라의 강원 등의 깊은 산속에 자생 혹은 재배하며, 중국에서는 동북지방과 산서, 섬서, 감숙, 사천 등에 분포하는 한약재이다. 또한, 당삼의 효능과 관련하여 항혈전효과, 신경세포 재생효과, 항당뇨효과, 면역증강, 위궤양에 대한효과, 항암효과에 대한 연구가 이루어져 있다. 당삼의 70%에탄올추출물은 알레르기면역반응 유도매개물질들의 분비를 감소시키고, 면역조절사이토카인의 항상성을 회복시켰다.

8) 잔대(*Adenophora triphylla* var. *japonica*): 잔대는 쌍떡잎식물 초롱꽃목 초롱꽃과의 다년생 식물로서, 사삼(沙蔘), 딱주, 제나라고도 불린다. 초여름에 연한 잎과 줄기를 삶아 나물로 먹으며, 뿌리는 '사삼'이라 하여 식용 및 약용으로 사용되어 왔다. 잔대에 관한 연구로는 잔대 에탄올 추출물과 그 분획물의 항돌연변이와 항종양 효과, 잔대 뿌리의 에틸아세테이트 추출물의 항산화 효과 등이 보고되어 있다. 고지방식이로 유도된 비만 마우스에서 잔대 뿌리의 에탄올 추출물이 항산화 효과와 염증 반응 개선 효과, 인슐린 저항성 개선 효과를 나타낸 연구 결과도 있다. 또한, Chung KJ 등은 사삼을 포함한 한약재의 처방 검역이 기관지 상피세포에서 염증 유발 사이토카인의 발현을 억제하였다고 보고하였다. 천식 동물 모델에서 잔대의 뿌리 추출물은 기도 과민성(airway hyperresponsiveness, AHR)을 개선하고, 폐 기관지 염증세포와 염증 관련 사이토카인 분비를 억제한다는 보고도 있다.

9) 도라지(*Platycodon grandiflorum*): 도라지는 초롱꽃과(Campanulaceae)에 속하는 다년생 초본류로서 중국, 일본 및 우리나라 각지에 자생하고 있으며 예부터 약용과 식용으로 이용되어 최근까지 널리 재배하여 생산되고 있다. 1940년도에 처음으로 도라지에 포함된 유용성분인 사포닌성분 중 aglycone이 분리된 후 현재까지 17종의 saponin 종류가 분리되었고 그 구조도 밝혀졌다. 이외에도 sterol, platycodin D, 향기성분 및 사포닌 함량 등의 조성이 조사되어 있다. 옛 의서인 동의보감과 본초강목의 기록에 따르면 거담, 배농, 진해약, 편도선염, 최유 등에 사용되었으며 신농본초경에 의하면 감기, 천식, 폐결핵에 거담제로서 유용하며 늑막염에도 효과가 있는 것으로 알려지고 있다. 이외에도 항염증작용, 중추신경 억제작용, 혈압강화작용, 용혈작용 및 항보체활성 등이 있는 것으로 보고되고 있어 기관지 천식 치료, 고혈압 환자의 혈압 강화 및 콜레스테롤 수치 저하, 당뇨병 환자의 혈당치 저하, 항진균 기능과 면역증강 및 활성화에 효능이 있는 것으로 밝혀졌다.

## 제 7장. 연구개발결과의 보안등급

코드번호	D-09
<input type="radio"/> 해당사항 없음	

## 제 8장. 국가과학기술종합정보시스템에 등록된 연구시설·장비 현황

구입 기관	연구시설/ 연구장비명	규격 (모델명)	수량	구입 연월일	코드번호		D-10	
					구입 가격 (천원)	구입처 (전화번호)	비고 (설치 장소)	NTIS장비 등록번호
해당사항 없음								



## 제 9장. 연구개발과제 수행에 따른 연구실 등의 안전조치 이행실적

	코드번호	D-11		
<p>(주)강림오가닉은 별도의 안전관리 위원회가 존재하지 않으므로 협동기관인 부산대학교의 기준에 준하여 연구실 안전조치를 이행하고자 한다. 부산대학교는 별도의 안전관리에 관련한 위원회(실험·실습실안전관리위원회, 방사선안전관리위원회, 동물실험윤리위원회)를 두고 실험실 안전을 위한 방안을 실행중에 있으며, 실험·실습실 안전관리규정 및 이에 따른 시행세칙을 제정하여 정기적으로 안전점검 및 연구원의 교육훈련을 실시하고 있다. 각 실험실을 캠퍼스 안전관리부서에 등록하여 위험등급도를 지정하여 소속기관장의 정기적인 점검을 받도록 하고 있으며, 매년 참여 연구원의 현황 및 안전관리교육 이수여부를 점검하고 있다. 또한, 각 연구실은 화재 및 재산종합 보험에 가입되어 있으며, 직원 및 조건을 만족하는 연구원들의 연구활동 중 상해시 보상을 받을 수 있는 단체상해보험에 가입되어 있다.</p> <p>따라서 본 연구팀은 부산대학교의 실험·실습실 안전관리규정을 준수하며, 아래에 기술되어 있는 안전관리 교육의 세부 일정에 따라 연구활동 종사자를 교육하여 연구실 안전에 만전을 기하고자 한다.</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>◦ 연구활동종사자 집합교육               <ul style="list-style-type: none"> <li>- 대상자 : 대학원생</li> <li>- 일 정 : 연간 3차례 계열별 교육 실시</li> <li>- 미이수자에 대한 조치 : “PNU-연구실안전정보망” 에서 사이버교육 이수할 수 있도록 안내</li> </ul> </li> <li>◦ 연구활동종사자 사이버교육               <ul style="list-style-type: none"> <li>- 일 정 : 4월 ~ 11월(8회)</li> <li>- 대상자 : 집합교육 미참석자 및 미수료자와 학부생</li> <li>- 교육내용 : A,B,C 반 정기(대학원 2년차 이상)교육/ A,B,C 반 신규(대학원신입생, 학부생 등) 교육</li> <li>- 교육평가 : 12월</li> </ul> </li> <li>◦ 연구실 안전점검               <ul style="list-style-type: none"> <li>- 일상점검 : 매일 실험 전과 퇴실 전</li> <li>- 자체점검(2회) : 7월, 12월(학기 종료후 15일 이내-부산대 실험실 규정 제10조)                   <ul style="list-style-type: none"> <li>• 점검시행 기관 및 담당자 : PNU-연구실안전정보망 관리대상 연구실 및 각 연구실 안전관리자 정부</li> <li>• 점검 목적 : 연구실 시설물에 대한 안전점검 및 취급, 유지관리</li> </ul> </li> </ul> </li> </ul>				

- 점검 내용 : 일반사항, 산업위생, 화공·소방·전기·기계·가스·생물안전, 폐액관리 등
- 점검 후 조치 사항 : 자체적으로 시정 가능한 것은 자체 처리하고  
자체 처리가 불가능한 것은 시설과 공사 시행

- 정기점검(1회) : 매년 1회

- 점검시행 기관 및 담당자 : 연안법 관련 점검 가능 업체 및 시설과 담당자(박재영)
- 점검 목적 : 부산대 연구실에 대한 전반적인 안전점검
- 점검 내용 : 일반사항, 산업위생, 화공·소방·전기·기계·가스·생물안전, 폐액관리 등
- 점검 후 조치 사항 : 자체적으로 시정 가능한 것은 자체 처리하고  
자체 처리가 불가능한 것은 시설과 공사 시행

- 정밀진단 : 2년 1회

- 점검시행 기관 및 담당자 : 연안법 관련 점검 가능 업체 및 시설과 담당자(박재영)
- 점검 목적 : 부산대 연구실에 대한 정밀한 안전점검
- 점검 내용 : 일반사항, 산업위생, 화공·소방·전기·기계·가스·생물안전, 폐액관리 등
- 점검 후 조치 사항 : 자체적으로 시정 가능한 것은 자체 처리하고  
자체 처리가 불가능한 것은 시설과에서 공사 시행

◦ 연구실 시설개선

- 수요조사 시행과 점검지적사항 현장실사 : 5월 ~ 7월
- 설계 및 발주 : 8월 ~ 9월
- 보완공사 : 10월 ~ 12월

○ 연구활동종사자 안전보험 가입

- 대상인원 : 과학기술분야(예술대 일부 포함) 연구활동종사자  
단, 연구활동종사자 중 4대 보험가입자는 제외(ex.교수, 조교, 연구원 일부 등)
- 보험가입 : 6월
  - 법적기준 : 연구실안전환경조성에관한법률 제14조, 동법 시행령 제15조
  - 보험가입기간 : 1년단위
  - 보험가입회사 : (사)교육시설재난공제회

◦ 연구활동종사자 건강검진

- 건강검진 대상 : 과학기술분야(예술대 일부 포함) 연구활동종사자 중 휘발성유기화합물(TVOC), 포름알데히드(HCHO) 등 측정을 통해 대상 연구실 선정
- 대상자 조사 : 8월
- 건강검진 시행 : 10월 ~ 12월
  - 건강검진 기관 : 부산대학교병원 / 양산부산대학교병원

- 건강검진 종류 : 일반건강검진(문진, 진찰, 혈압, 혈액, 소변검사, 신장, 체중, 시력, 청력측정, 흉부방사선촬영)과 특수건강검진(청력, 폐기능, 간기능, 조혈기계, 치아검사, 소변검사 등)

## 제 10장. 연구개발과제의 대표적 연구실적

번호	구분 (논문 /특허 /기타)	논문명/특허명/기타	소속 기관명	역할	논문게재지/ 특허등록국 가	코드번호		D-12	
						Impact Factor	논문게재일 /특허등록일	사사여부 (단독사사 또는 중복사사)	특기사항 (SCI여부/인 용횟수 등)
1	논문	Diosgenin effectively suppresses skin inflammation induced by phthalic anhydride in IL-4/Luc/CNS-1 transgenic mice	부산대학교	교신저자	Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry	1.295	2016.05.31	단독사사	SCI
2	논문	Saponin-enriched extract of Asparagus cochinchinensis alleviates airway inflammation and remodeling in ovalbumin-induced asthma model	부산대학교	교신저자	International Journal of Molecular Medicine	2.341	2017.09.21	단독사사	SCI
3	논문	Optimal Fermentation Conditions of Hyaluronidase Inhibition Activity on Asparagus cochinchinensis Merrill by Weissella cibaria	부산대학교	교신저자	Journal of Microbiology and Biotechnology	1.750	2017.04.28	단독사사	SCIE
4	논문	Ethyl acetate extract from Asparagus cochinchinensis exerts anti-inflammatory effects in LPS-stimulated RAW264.7 macrophage cells by regulating COX-2/iNOS, inflammatory cytokine expression, MAP kinase pathways, the cell cycle and anti-oxidant activity	부산대학교	교신저자	Molecular Medicine Reports	1.554	2017.04.01	단독사사	SCIE
5	특허	천문동 발효진액 및 그 제조방법	(주)강림오가닉	주발명자	대한민국		2016.06.23	단독사사	

## 제 11장. 기타사항

코드번호	D-13
<input type="radio"/> 해당사항 없음	

## 제 12장. 참고문헌

	코드번호	D-14
1. Koo HN, Jeong HJ, Choi JY, Choi SD, Choi TJ, Cheon YS, Kim KS, Kang BK, Park ST, Chang CH, Kim CH, Lee YM, Kim HM, An NH, Kim JJ. 2000. Inhibition of tumor necrosis factor- $\alpha$ -induced apoptosis by <i>Asparagus cochinchinensis</i> in Hep G2 cells. <i>J Ethnopharmacol</i> 73: 137-143.		
2. Lee SY, Kim SN, Kim JK. 2008. Effects of <i>Asparagus cochinchinensis</i> (Lour.) Merr. on the stimulation of osteoblast differentiation and inhibition of osteoclast generation. <i>J Korean Soc Food Sci Nutr</i> 37: 16-19.		
3. Xiong D, Yu LX, Yan X, Guo C, Xiong Y. 2011. Effects of root and stem extracts of <i>Asparagus cochinchinensis</i> on biochemical indicators related to aging in the brain and liver of mice. <i>Am J Chin Med</i> 39: 719-726.		
4. Zhu GL, Hao Q, Li RT, Li HZ. 2014. Steroidal saponins from the roots of <i>Asparagus cochinchinensis</i> . <i>Chin J Nat Med</i> 12: 213-217.		
5. Shen Y, Xu CL, Xuan WD, Li HL, Liu RH, Xu XK, Chen HS. 2011. A new furostanol saponin from <i>Asparagus cochinchinensis</i> . <i>Arch Pharm Res</i> 34: 1587-1591.		
6. Lee DY, Choo BK, Yoon T, Cheon MS, Lee HW, Lee AY, Kim HK. 2009. Anti-inflammatory effects of <i>Asparagus cochinchinensis</i> extract in acute and chronic cutaneous inflammation. <i>J Ethnopharmacol</i> 121: 28-34.		
7. Huang KC. 1993. The pharmacology of Chinese herbs. CRC Press, Boca Raton, FL, USA. p 361.		
8. Samad NB, Debnath T, Hasnat A, Pervin M, Kim DH, Jo JE, Park SR, Lim BO. 2014. Phenolic contents, antioxidant and anti-inflammatory activities of <i>Asparagus cochinchinensis</i> (Loureiro) Merrill. <i>J Food Biochem</i> 38: 83-91.		
9. Huang KC. 1993. The pharmacology of Chinese herbs. CRC Press, Boca Raton, FL, USA. p 224.		
10. Kim H, Lee E, Lim T, Jung J, Lyu Y. 1998. Inhibitory effect of <i>Asparagus cochinchinensis</i> on tumor necrosis factor- $\alpha$ secretion from astrocytes. <i>Int J Immunopharmacol</i> 20: 153-162.		
11. Lee DY, Choo BK, Yoon T, Cheon MS, Lee HW, Lee AY and Kim H K: Anti-inflammatory effects of <i>Asparagus cochinchinensis</i> extract in acute and chronic cutaneous inflammation. <i>J Ethnopharmacol</i> 121: 28-34, 2009.		
12. Luo J, Long QD, Li CX, Li L, Huang NH, Nie M and Tang PX: Comparison of antitussive, expectorant and anti-asthmatic effect between ALWB and ACM. <i>Guiyang Yi Xue Yuan Xue Bao</i> 23: 132-134, 1998 (In Chinese).		

13. Xiong D, Yu LX, Yan X, Guo C and Xiong Y: Effects of root and stem extracts of *Asparagus cochinchinensis* on biochemical indicators related to aging in the brain and liver of mice. *Am J Chin Med* 39: 719–726, 2011.
14. Sung JE, Lee HA, Kim JE, Go J, Seo EJ, Yun WB, Kim DS, Son H J, Lee CY, Lee HS, et al: Therapeutic effect of ethyl acetate extract from *Asparagus cochinchinensis* on phthalic anhydride-induced skin inflammation. *Lab Anim Res* 32: 34–45, 2016.
15. Yan GH and Choi YH: *Phellinus linteus* extract exerts antiasthmatic effects by suppressing NF- $\kappa$ B and p38 MAPK activity in an OVA-induced mouse model of asthma. *Immune Netw* 14: 107–115, 2014.
16. Lim CY, Moon JM, Kim BY, Lim SH, Lee GS, Yu HS and Cho SI: Comparative study of Korean White Ginseng and Korean Red Ginseng on efficacies of OVA-induced asthma model in mice. *J Ginseng Res* 39: 38–45, 2015.
17. Lee E, Kim SG, Park NY, Park HH, Jeong KT, Choi J, Lee IH, Lee H, Kim KJ and Lee E: KOTMIN13, a Korean herbal medicine alleviates allergic inflammation in vivo and in vitro. *BMC Complement Altern Med* 16: 169, 2016.
18. Kay AB: Asthma and inflammation. *J Allergy Clin Immunol* 87: 893–910, 1991.
19. Ngoc PL, Gold DR, Tzianabos AO, Weiss ST and Celedón JC: Cytokines, allergy, and asthma. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 5: 161–166, 2005.
20. Larché M, Robinson DS and Kay AB: The role of T lymphocytes in the pathogenesis of asthma. *J Allergy Clin Immunol* 111: 450–464, 2003.
21. Jaiswal Y, Liang Z, Ho A, Chen H, Zhao Z. 2014. A Comparative Tissue specific Metabolite Analysis and Determination of Protodioscin Content in *Asparagus* Species used in Traditional Chinese Medicine and Ayurveda by use of Laser Microdissection, UHPLC-QTOF/MS and LC-MS/MS. *Phytochem. Anal.* 25(6): 514–528.
22. Wang M, Tadmor Y, Wu QL, Chin CK, Garrison SA, Simon JE. 2003. Quantification of protodioscin and rutin in asparagus shoots by LC/MS and HPLC methods. *J Agric Food Chem.* 51(21): 6132–6136.
23. Elson LA, Morgan WTJ. 1933. A colorimetric method for the determination of glucosamine and chondrosamine. *Biochem. J.* 27: 1824–1828.
24. Kaegawa H, Matsumoto H, Endo K, Satoh T, Nonaka GI, Noshioka I. 1985. Inhibitory effects of tannins on hyaluronidase activation and on the degranulation from rat mesentery mast cells. *Chem. Pharm. Bull.* 33: 5079–5082.
25. Lee KK, Kim JH, Cho JJ, Choi JD. 1999. Inhibitory effects of 150 plant extracts on elastase activity, and their anti-inflammatory effects. *Int. J. Cosmet. Sci.* 21: 71–82.





1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 고부가가치식품기술개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표하는 때에는 반드시 농림축산식품부에서 시행한 고부가가치식품기술개발사업의 연구 결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.