

삶의 질 향상을 위한 스트레스 완화 및

숙면 촉진용 건강기능식품

Health supplement for stress reduction

and sleeping aid

실험동물을 이용한 스트레스 완화용 소재의

효능 평가

Animal experiment to evaluate the effect of  
walnut or lotus seed extract on stress reduction

수면 보조 효능을 지닌 식품소재 연구

Study on foodstuffs with sleep-aid potential

주관연구기관 : 한국식품연구원

협동연구기관 : 네추럴 F&P

협동연구기관: 동덕여자대학교

# 제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “삶의 질 향상을 위한 스트레스 완화 및 숙면 촉진용 건강기능식품” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2007년 5월 24일

주관연구기관명 : 한국식품연구원

총괄연구책임자 : 한대석

세부연구책임자 : 이창호

연 구 원 : 김인호

연 구 원 : 김영언

위 축 연 구 원 : 고민경

위 축 연 구 원 : 정나라

협동연구기관명 : 네추럴 F&P

협동연구책임자 : 김동우

협동연구기관명 : 동덕여자대학교

협동연구책임자 : 김석중

# 요 약 문

## I. 제 목

삶의 질 향상을 위한 스트레스 완화 및 숙면 촉진용 건강기능식품

## II. 연구개발의 목적 및 필요성

정신적인 스트레스는 작게는 스트레스는 냉담함이나 졸음이 오고 심하면 우울증 같은 질병과 자살에 이르게 한다. 육체적인 스트레스는 작게는 식욕을 잃게 하거나 메스꺼움을 유발하고, 심하면 심장에 문제가 있고 심장발작을 일으킨다. 영국 TUC(Trades Union Congress)가 조사한 안전보고에 의하면 직장인이 작업 중 가장 중요한 관심사가 무엇인가를 질문하면 약 60% 정도가 스트레스를 가장 커다란 관심사라고 답했다고 하였다([www.tuc.org.uk](http://www.tuc.org.uk)). 이런 상황은 우리나라도 별로 다르지 않다고 생각된다. 즉, 평범한 사람들이 일상생활에서 겪는 스트레스는 커다란 문제를 일으키기 전에 이를 해소할 방안을 시급히 모색해야 한다. 스트레스 해소용 기능성식품이 하나의 좋은 대안으로 판단된다.

수면은 인간의 정신적, 육체적 휴식뿐 아니라 건강 유지에 필수적이다. 그러나 불행히도 최근 사회활동의 증가, 스트레스, 불규칙한 생활, 인위적 조명, 노령화, 잦은 해외여행으로 인한 jet-lag 등으로 인해 수면장애와 수면의 질이 떨어져 건강을 위협하고 있다. 이는 정상적인 활동에 지장을 줌은 물론 우울증, 면역 기능 저하, 고혈압, 부정맥, 치매 가능성을 높이는 것으로 알려져 있다. 이러한 수면 장애와 질의 개선을 위해 다양한 수면 보조제들이 개발되고 있으며 관련시장 또한 급격히 성장하고 있다. 하지만 상당수의 수면 보조제들은 새로이 합성된 물질로서 심각한 부작용이나 내성 등의 문제를 가지고 있다. 최근 부작용이 없는 수면 보조제로서 melatonin이 주목받고 있는데 이는 뇌의 송과선에서 분비되는 호르몬으로 수면의 조절과 관련이 깊은 것으로 알려져 있다. 미국 등지에서 그 화학적

합성품이 주로 tablet형태로 판매되고 있으며 가공제품은 전무한 실정이다. 이에 안전한 새로운 형태의 수면 보조 식품으로서 천연소재에서 유래된 melatonin을 함유하는 제품의 개발은 의의가 있다고 하겠다. 그리고 이를 위해서는 melatonin 함량이 높은 소재를 발굴하고, 그 함량을 높이는 방법 등이 필수적이라 하겠다. 특히 이러한 수면보조 식품은 melatonin의 강력한 항산화 작용으로 인해 항산화 기능성 식품으로서의 가치도 크다고 할 수 있다.

### III. 연구개발 내용 및 범위

스트레스를 효과적으로 완화할 수 있는 천연물질을 함유한 기능성 식품을 개발하기 위해 식품 소재의 효과에 관한 동물실험과 인체시험을 수행하고 과학적 효능검증을 통한 산업화 가능한 시제품의 개발을 목표로 한다.

우선, 우리나라 사람들이 일상생활에서 스트레스 정도를 자율신경 균형 검사기를 이용하여 분석하고 한국인의 스트레스 상태를 파악한다. 흔히, 흡연자들은 흡연이 스트레스를 해소해 준다고 생각하며 담배를 피우는데, 본 연구에서는 이것이 사실인지를 확인하는 실험을 한다.

예로부터 신경안정, 현대 용어로는 스트레스 해소에 도움이 된다고 알려진 호두 또는 연꽃 종자 추출물이 스트레스 해소에 끼치는 영향에 대하여 동물실험과 인체시험을 통하여 효과를 평가한다.

식용식물체, 종자 및 발아싹, 유산균 발효유제품을 대상으로 melatonin 함량을 분석하여 함량이 높은 식품소재를 발굴하고 수면 보조 식품으로 가공하였다. 또한, 발아싹과 발효유제품에서 melatonin의 함량 증진 방안도 조사하였다. 그리고 상추와 치커리에서의 sesquiterpenoid lactones 분석 및 캡슐화 방안도 고려하였다.

#### IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

일상생활에서 겪는 스트레스를 완화할 수 기능성 식품을 개발하기 위한 기초자료를 얻고자 한국인의 스트레스 대하여 시험 자원자 238 명을 대상으로 심박변이도를 측정하여 분석하였다. 자율신경 균형검사기를 이용하여 측정한 결과 주파수범위 및 시간범위 분석의 평균치는 모두 정상적인 수준이었다. 이는 개인의 상태를 나타내는 것이 아니라 스트레스 유무와 상관없이 모든 피검자의 검사치 평균값이기 때문에 외견상 나타난 현상이었다. 개인별로 스트레스 상태를 살펴보면 연구대상자 238 명 중 일상생활에서 69 명은 심한 스트레스 상태에 있으며, 33 명은 정상과 스트레스 상태의 경계에 있고, 나머지 136 명은 정상 상태인 것으로 나타났다. 질병은 아니지만 우리 국민의 29% 이상이 불편하고 때로는 심각한 문제를 일으키는 스트레스를 겪고 있는 실정에 비추어 이에 대한 해소 방안을 시급히 모색해야 하며 스트레스 해소용 기능성식품이 한 대안이라고 생각한다.

또 다른 연구는 일부 흡연자들이 주장하는 흡연의 효과 즉, 흡연이 일시적으로나마 스트레스를 완화시킨다는 효과가 실제로 나타나는지 확인하기 위하여 수행하였다. 연구 대상자는 20~50 대 남성 흡연자 중 실험 자원자로 선정하였다. 스트레스 강도는 자율신경 균형검사기를 이용하여 분석하였다. 이 스트레스 검사법은 심박변이도를 시간과 주파수 영역으로 자동 분석하여 자율 신경계의 활성 및 균형 정도를 나타낸다. 실험은 흡연 전·후의 스트레스 정도를 측정하였고, 그 자료를 SPSS 10.0 Win으로 분석하였다. 연구 결과 시간 범위 분석에서 SDNN은 유의적 차이로 감소하였으며 PSI는 증가하였다. 주파수 범위 분석에서 LF/HF ratio가 유의적 차이로 증가하였다. 또한 자동검진에서 자율신경 활성화도와 심장 안정도는 감소하였으며 반면에 자율신경 균형도와 평균 심박동수는 증가하였다. 이 결과는 유의적인 차이를 나타냈다. 결과적으로 흡연이 자율신경 활성을 저하시킴과 동시에 불균형을 초래하였다. 따라서 본 연구에서는 흡연이 스트레스를 증가시키는 것으로 판단하였다.

동물실험에서, 마우스를 이용하여, 강제적인 구금 스트레스 또는 바닥에

깔린 정신적 스트레스 유발 기구를 이용하여 스트레스를 가한 다음, 호두, 연자육, 연근, 호두/연자육 추출 혼합물을 지속적으로 공급하여, 이들 물질이 스트레스에 의해서 유의적으로 증가한다고 알려져 있는 호르몬인 혈중 코티코스테론과 뇌조직의 교감신경 말단에서 신경전달물질로서 분비되는 노르아드레날린의 대사산물인 MHPG-SO<sub>4</sub>(3-methoxy-4-hydroxyphenylethyleneglycol sulfate) 등의 농도를 유의적으로 감소시키는 것을 확인하였다, 또한 스트레스와 연관된 뇌의 부위인 편도체 (amygdala)에서 신경활성에 관계된 c-fos의 발현을 유의적으로 감소시키는 것을 확인하였다. 이러한 결과를 바탕으로 본 연구진은 호두, 연꽃 종자육, 연근, 호두/연꽃 종자 추출 혼합물에 대한 시제품을 만들어 한국식품연구원에 공급하였으며, 현재 본 제품에 대한 상업화를 설계 중에 있다.

본 연구의 최종 목적은 스트레스 대처능을 증진시켜 개체의 항상성과 건강을 유지한다고 알려져 있고, 신경쇠약, 불면증 등에 효과가 있다고 민간에서 사용하고 있는 호두와 예로부터 한의학에서 불면증 치료제로 널리 쓰였던 연꽃 종자를 이용하여 부작용이 없으며 간단하고 효과적인 스트레스 해소용 기능성식품을 개발하는데 있다. 이들의 효능을 평가하기 위하여 한남대 인체시험승인위원회의 승인을 받고 인체시험을 수행하였다. 시험은 48 명의 일반인을 대상으로 실험집단과 위약집단(n= 12)으로 나누어 실험집단은 호두 추출물(n= 12), 연꽃 종자 추출물(n= 12) 또는 호두와 연꽃 종자 추출 혼합물(n= 12)을 정제 형태로 제조하여 아침, 저녁 하루 2 회, 1 회에 2 정씩 2 주간 섭취하도록 하였다. 스트레스 강도 측정 도구로는 자율 신경균형 검사기(SA-3000P, Medicore Co. Ltd., Seoul, Korea)와 배경 뇌파검사기(QEEG-8(LEX-3208), Laxtha Co., Korea)를 사용하였고, 설문에 의한 판정 방법으로는 박순영(1999)이 개발한 스트레스 측정 검진표를 이용하여 스트레스를 분석하였다. 모든 피검자들은 시제품 섭취 전과 후에 검사를 받았으며, 그 자료를 SAS two-way ANOVA(P<0.05)로 분석하였다. 연구 결과, 자율 신경 균형 검사에서 스트레스 저항도와 심장안정도는 유의적으로 증가하였고, 피로도, 스트레스 지수는 유의적으로 감소하였다. 또한 시간범위 분석에서도 SDNN이 유의적으로 증가하였다, 또한 박순영

(1999)이 개발한 스트레스 측정도구 설문에서도 심리적, 신체적 스트레스 두 항목 모두에서 유의적인 감소를 나타내는 등 호두 추출물과 연꽃 종자 추출물은 스트레스에 완화에 효과적인 식품소재로 판단되었다.

호두 또는 연꽃 종자 추출물은 인체에 무해하여 부작용을 발생시키지 않으므로 이를 포함하는 조성물은 스트레스 해소용 건강기능식품으로 유용하게 이용될 수 있다. 이를 통하여 기존의 과학적 근거 없는 스트레스 해소제의 수입과 밀수가 근절되고 연간 50 억원 이상의 수입대체 효과를 볼 수 있을 것으로 예측한다. 향후 더 진보된 연구를 통하여 고부가가치 상품으로 발전시켜 본격적으로 국내에서 상용화될 수 있는 근거를 구축하고 아울러 일본 등 아시아지역을 넘어 미국 등 구미시장으로 진출할 수 있는 발판을 구축하고자 한다.

수면 유도 및 숙면에 효능이 있는 것으로 알려진 melatonin의 함량이 높은 소재를 발굴하기 위해 HPLC와 ELISA 방법으로 187종의 식용식물체에 대해 그 함량을 분석하였다. 그 결과, 레몬, 삼백초, 용아초, 곡기생, 칩 등이 두 방법 모두에서 높은 melatonin 함량을 나타냈으며 50% ethanol이 methanol 추출에 효과적이었다. 최종 제품에서의 기호성 및 추출수율 등을 고려하여 선정된 쌀, 삼백초, 용아초, 레몬, 칩의 추출물을 이용해 melatonin 함량이 높은 드링크 제품을 제조하였다. 한편, 26종의 종자 및 발아싹에 대해 melatonin 함량을 분석한 결과, 대부분 품목에서 발아를 시키면 melatonin 함량이 크게 증가하는 것으로 나타났으며 특히 해바라기, 다채, 치커리, 알팔파, 적케일, 브로콜리 싹에서 2,000 pg/g 이상, 유채싹에서 1,900 pg/g 이상이 함유되어 있었으며, 해바라기나 알팔파싹에서는 전구체인 tryptophan 처리로 melatonin 함량이 증대되는 것으로 나타났다. 한편, 발아 및 전구체 처리에 따른 항산화 활성과 polyphenol 함량도 melatonin과 유사한 경향을 나타냈다. 골다공증, 불면증 등의 폐경기 중후군에 효과가 있는 isoflavone 함량은 발아시 해바라기, 치커리, 알팔파 싹에서는 감소하였으나 유채 및 적케일 싹에서는 증가하였다. 김치에서 선발한 38종의 유산균을 비롯해 *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus casei* 등을 이용해 skim milk를 발효시켜 얻은 yogurt형의 발효유제품에 대하여

melatonin 분석을 실시하였다. 이를 바탕으로 *Streptococcus thermophilus* 를 이용한 발효 시 tryptophan을 첨가하여 melatonin 함량을 3.8 배 이상 (409 pg/g) 증대시킨 발효유제품을 제조할 수 있었다. 한편, 상추의 수면 유도 효과물질로 알려진 sesquiterpenoid lactone류를 분석한 결과, 적치마 상추의 latex에서는 lactucopicrin, 청치마상추에서는 lactucin과 8-deoxylactucin 계열의 함량이 상대적으로 높았다. 이 물질의 쓴맛을 개선하기 위해 alginate와 chitosan 입자에 포집시킨 후 방출특성을 분석한 결과, model gastric juice에서 30분 내에 최대로 방출되었으며 chitosan 입자에서의 방출이 더 빨랐다.



# SUMMARY

## I. Title

Health supplement for stress reduction and sleeping aid

## II. Purpose and Significance of the Study

The mental symptoms of stress range from sleeplessness and listlessness through to clinical depression and suicide. The physical effects range from appetite loss and nausea through to heart damage and stroke. A TUC survey has found that stress is still the biggest problem amongst employees facing UK workplaces. Six out of 10 union safety reps (61 per cent) questioned by the TUC reported stress to be their most pressing concern at work. The situation may be similar in our country. It is necessary and urgent for layman in everyday life to find therapy or stress management program. Development of the health supplement for stress reduction appears to be the most useful and alternative approach of tackling stress.

## III. Contents and Scope of the study

In order to develop a natural health supplement for stress reduction, animal experiment and human study was performed. The ultimate goal of this study is the development of prototype product with scientific evidence which will be launched in the market.

Firstly, stress level of layman in Korea was analyzed by measuring heart rate variability(HRV) using autonomic balance analyzer. Secondly,

the effect of cigarette smoking on stress was studied, since smokers believe that smoking helps them control stress and acts positively to their mental state or depression. Another scope of this study is to reveal if smoking is one of the useful method to relieve stress.

It is written in the traditional Korean medical books that walnut or lotus seed helps person calm because it acts like a sedative. Animal experiment and human study were tried to collect scientific evidence to show if the extract of walnut or lotus seed has a beneficial effect on stress reduction.

Melatonin content was measured in edible plants, seeds and their sprouts, and yogurts fermented by lactic acid bacteria to select foodstuffs containing high amount of melatonin, in turn, which processed into sleep-aid products. The way to raise melatonin content was also studied in sprouts and yogurts. Sesquiterpenoid lactones of lettuce and chicory was analyzed and their encapsulation was performed.

#### IV. Results and Recommendation

To collect basic data for the development of a health supplement which could relieve stress, stress level of 238 layman in Korea was analyzed by measuring HRV with autonomic balance analyzer (SA-3000P, Medicores Co., Seoul, Korea). Parameters of time domain and frequency domain analyses was in a normal range. This is an apparent result, since parameter value is an average of all volunteers who are normal, under stress and in good state. stress of individual obtained from the data of autonomic balance report showed that 69(29 %) were in bad state, 33(14 %) were in a border of normal and stressed out, and 136 were normal. Considering that stress is uncomfortable, and in

some cases, it may lead to diseases like hypochondria, it is not the second to none to find a solution to stress. As food scientists, we recommend our society to invest more efforts and research to develop a health supplement for stress reduction.

The stress decreases an autonomic activity and it breaks an autonomic balance. The purpose of this study is to observe the effect of smoking on stress. The subjects were male smokers in twenties~fifties. Their stress were examined by autonomic nervous balance analyzer. As this stress examination analyzes automatically heart variability by time and frequency domain analysis, the examination shows activity and balance degree of autonomic system. In the experiment, stress degree of volunteers were examined before and after smoking a cigarette, and the data were analyzed using SPSS 10.0 Win software program. Analysis of stress indices showed a decrease in SDNN parameter and an increase in PSI with significant difference in time domain analysis. The LF/HF ratio increased with significant difference in frequency domain analysis. Also result of direct diagnostic reading report showed decrease of autonomic activity and heart stability, and increase of autonomic nerve balance degree and mean heart rate. The results were significantly different( $p < 0.05$ ). As a result, the smoking deceased autonomic activity and induced imbalance of autonomic system, simultaneously. In conclusion, this study indicated that cigarette smoking increased stress of male smokers.

The extracted mixture of walnuts and ripe lotus significantly decreased both the concentration of blood corticosterone, a hormone known to be increased by stress, and the concentration of MHPG-SO<sub>4</sub>[3-methoxy-4-hydroxyphenylenylethyleneglycol sulfate], a metabolic matter of nor-adrenaline which is secreted as dopamine at sympathetic nerve endings of brain tissue. In addition, the extracted

mixture also can be practically used as a composite for stress release because it has a function of reducing the revelation of c-fos, which is related to nerve activity, from amygdala, the brain part closely related to stress.

This study aims to development a health supplement for stress reduction which is safe and effective. According to the traditional Korea medicine books, walnut and lotus seed helps person calm because it acts like a sedative. They are natural and safe food. As such, it was expected that their administration in stressed out people would result in the improvement of mental and physical stress. Upon the admission on human study from Institutional Review Board of Hannam University, 48 volunteers were divided into a control group and 3 treatment groups administered walnut extract, lotus seed extracts or a mixture of extracts of walnut and lotus seed. They had to take 2 tablets in the morning and night *i.e.*, two times a day for 2 weeks. Their mental and physical stress were measured by wave analyzer and autonomic balance analyzer, respectively. Stress was checked more with questionnaire sheet designed by Park(1999). The data from autonomic balance report showed that stress resistance and heart stability increased significantly, while fatigue index decreased in 3 treatment groups. In time domain analysis, SDNN became significantly better after taking the extracts. The result from questionnaire sheet showed that both mental and physical stresses was decreased significantly. These results indicated that both walnut and lotus seed extracts were beneficial to stress reduction.

The each extract and a mixture of walnut and ripe lotus seed are harmless to human body and do not have any side effect, so a composite including walnut or ripe lotus seed could be taken as a functional health food. This study proved that they had an effect on

stress reduction. If this healthy composite would be developed into a certified item for the public use, the import and smuggling of the unauthentic stress-killer will be eliminated. Based on evidence-based answer, The extracts would be processed into a high-value-added health supplement. We have a plan to launch the prototype product not only in domestic market but also in foreign market including Japan, Europe, America, *etc.*

Among 187 kinds of edible plant, it was revealed the extracts of lemon, lizard' tail, Agrimoniae herba, Yadorigi and Kudzu vine possess relatively higher amount of melatonin through both HPLC analysis and ELISA, and 50% ethanol was most effective for melatonin extraction. From the consideration of acceptability and extraction yield in addition to melatonin content, it was finally selected and processed the extracts of lemon, lizard' tail, Agrimoniae herba, Kudzu vine and rice into drink-type product. Germination of seed into sprout could raise the melatonin content which was reached more than 2,000 pg/g in sprouts of sunflower, Tah tasai Chinese cabbage, chicory, alfalfa, red kale and broccoli, and 1,900 pg/g in rape. The treatment of tryptophan, precursor of melatonin, increased melatonin content in sprouts of sunflower and alfalfa. The change of antioxidant capacity and polyphenol content in sprout showed similar tendency as that of melatonin content according to germination and precursor treatment. The content of isoflavone, which is known to prevent and/or cure the menopause symptoms such as osteoporosis and insomnia etc, was lowered by germination in chicory, sunflower and alfalfa but raised in rape and red kale. The content of melatonin was increased through yogurt fermentation using *Streptococcus thermophilus* up to about 3.8 times(409 pg/g) under treatment of 4 mM tryptophan, but fermentation by 38 kinds of *kimchi*-originated lactic acid bacteria, *Streptococcus thermophilus*,

*Lactobacillus casei* and *Lactobacillus bulgaricus*. weren't effective for melatonin production. Among sesquiterpenoid lactones, known as compounds of lettuce to induce sleep, the content of lactucopicrin was higher in latex of red lettuce than that of green lettuce, but those of lactucin and 8-deoxylactucin were vice versa. Sesquiterpenoid lactones encapsulated in alginate or chitosan gel beads to improve their bitter taste could be released into model gastric juice within 30 min, and chitosan was better for their release.

# CONTENTS

Chapter 1. Overall view of this R&D project .....	17
Chapter 2. Status of domestic and foreign technology .....	23
Chapter 3. Analysis of stress of Korean by HRV measurement .....	25
Chapter 4. Smoking of even a cigarette increases stress of male smokers .....	35
Chapter 5. Animal experiment to evaluate the effect of walnut or lotus seed extract on stress reduction .....	48
§ 1. Stress-inducing test .....	49
§ 2. Stress-reducing effect through the measuring of numerical value of blood plasma corticosterone .....	50
§ 3. Stress-reducing effect through the measuring of MHPG-SO <sub>4</sub> in brain tissue .....	52
§ 4. Gastrointestinal disorder improvement effect of the extracts of walnuts, ripe lotus seed or Flabean .....	53
§ 5. Stress-killing effect through the dyeing of c-fos in brain tissue .....	54
§ 6. Development of the prototype product from the extracted of walnuts, ripe lotus seed or mixture and lotus root .....	56
§ 7. The inhibitive action of prototype product through the measuring of blood plasma corticosterone .....	57
§ 8. MHPG-SO <sub>4</sub> diminution effect of prototype product in brain tissue .....	59
§ 9. Gastrointestinal disorder improvement effect of prototype product .....	60
§ 10. References .....	62
Chapter 6. Effect of mate tea on stress reduction .....	64
Chapter 7. Human study on stress reduction of walnut or lotus seed extract .....	71
Chapter 8. Study on foodstuffs with sleep-aid potential .....	135
§ 1. Methods .....	135

1. Screening and utilization of edible plants containing melatonin	·135
2. Screening of seeds and their sprouts containing melatonin	·····138
3. Preparation of yogurt containing melatonin using lactic acid bacteria	··········140
4. Analysis and utilization of sesquiterpenoid lactones of lettuce and chicory	··········142
§ 2. Results and Discussion	··········144
1. Screening and utilization of edible plants containing melatonin	·144
2. Screening of seeds and their sprouts containing melatonin	·····166
3. Preparation of yogurt containing melatonin using lactic acid bacteria	··········185
4. Analysis and utilization of sesquiterpenoid lactones of lettuce and chicory	··········193



# 목 차

제 1 장 연구개발과제의 개요 .....	17
제 2 장 국내외 기술개발 현황 .....	23
제 3 장 심박변이도 측정에 의한 한국인의 스트레스 상태 분석 .....	25
제 4 장 한 개비의 담배도 남성 흡연자의 스트레스를 증가 시킨다 .....	35
제 7 장 실험동물을 이용한 스트레스 완화용 소재의 효능 평가 .....	48
제 1 절 스트레스 유발 실험 실시 .....	49
제 2 절 혈장 코르티코스테론 수치 측정을 통한 스트레스 해소 효과	50
제 3 절 뇌조직에서 MHPG-SO4의 측정을 통한 스트레스 해소 효과	53
제 4 절 호두, 연자, Flabeau 추출물의 위장장애 개선효과 .....	53
제 5 절 뇌조직에서 c-fos 염색을 통한 스트레스 해소 효과 .....	54
제 6 절 호두, 연자육, 연근, 호두/연자육 추출물의 시제품 제작 ..	56
제 7 절 시제품의 혈장 코르티코스테론 억제효과 확인 .....	57
제 8 절 시제품의 뇌조직에서 MHPG-SO4 감소효과 .....	59
제 9 절 시제품의 위장장애 개선효과 .....	60
제 10 절 참고문헌 .....	62
제 6 장 마테차의 스트레스 완화효과에 대한 연구 .....	64
제 7 장 호두 또는 연꽃 종자 추출물의 스트레스 해소에 관한 인체시험	71
제 8 장 수면 보조 효능을 지닌 식품소재 연구 .....	135
제 1 절 실험방법 .....	135
가. 식용 식물체로부터 melatonin 함유 식품소재의 발굴 및 활용 ..	135
나. 종자 및 발아씨으로부터 melatonin 함유 소재의 발굴 .....	138
다. 유산균을 이용한 melatonin 함유 발효유제품 제조 .....	140
라. 상추 및 치커리로부터 sesquiterpenoid lactones의 분석 및 활용	142
제 2 절 결과 및 고찰 .....	144
가. 식용 식물체로부터 melatonin 함유 식품소재의 발굴 및 활용 ..	144
나. 종자 및 발아씨으로부터 melatonin 함유 소재의 발굴 .....	166
다. 유산균을 이용한 melatonin 함유 발효유제품 제조 .....	185
라. 상추 및 치커리로부터 sesquiterpenoid lactones의 분석 및 활용	193

## 제 1 장 연구개발과제의 개요

삶의 질이란 건강, 경제, 사회, 문화, 환경 등 고려해야 할 요소가 많지만 본 과제에서는 식품과학 측면에서 접근할 수 있는 식품소재에 한정한다. 삶의 질 향상 소재(lifestyle enhancer)는 면역기능 증진, 스트레스 해소, 熟眠 등 세 가지 요소를 묶어서 일상생활을 편하게 영위할 수 있는 보조제를 의미하지만 면역기능에 대해서는 이미 많이 연구되었으므로 본 과제에서는 식품과학 분야에서 거의 연구 결과가 없으며 또 상호 보완 또는 의존성이 있는 스트레스와 숙면 두 가지 분야에 대해 연구하고자 하였다.

스트레스란 우리 심신에 자극이 가해지면 우리의 심신이 이에 대응하기 위해 긴장하는 상태를 말한다. 이때 해로운 인자나 자극을 스트레서(Stressor)라 하고, 이때의 긴장상태를 스트레스라 한다. 스트레스가 일정한 정도로 지속될 때에는 우리의 심신에 있는 항상성(homeostasis) 원리가 작용해서 심신을 일정한 균형 상태로 유지하므로 과히 두려워할 필요는 없다. 그런데 이러한 외적 또는 내적 자극을 한 개인이 감당할 능력이 약화되거나, 이러한 상태에 오랫동안 또는 반복적으로 노출되면, 스트레스는 만성화되어 정서적으로 불안과 갈등을 일으키고, 자율신경계의 지속적인 긴장을 초래하여 결국, 정신적 또는 신체적인 기능장애나 질병이 나타나게 되는 것이다. 스트레스에 의해 유발되어 질병 단계로 진전된 우울증 등은 의학에서 다루어야 할 영역이며 본 과제에서는 일상생활에서 간간히 겪게 되는 스트레스를 다루고자 한다.

한편, 삶의 질 향상과 관련해서는 면역기능 증진, 스트레스 해소, 숙면 3 요소가 조화를 이루는 것이 중요한데 이중 숙면과 관련하여, 사람은 인생의 1/3을 잠자는 것으로 보내는데 수면은 호흡처럼 반드시 필요한 생리 현상이다. 이러한 수면의 기구나 작용에 대해서는 많은 것이 알려지지 않았지만 수면을 통하여 인간은 정신적, 육체적으로 휴식을 취하게 되며, 또한 수면 중의 다양한 생리적 변화를 통하여 건강을 유지하게 된다는 데에는 이견이 없다. 그러므로 이 같은 수면에 장애가 발생하는 경우는 신체적, 정신적 기능이 저하되어 정상적인 활동에 문제가 생김은 물론 우울증, 면

역 기능 저하, 고혈압, 부정맥, 치매의 가능성이 높아진다고 알려져 있다.

본 과제에서는 삶의 질을 향상시킬 수 있는 방안으로 스트레스 완화 소재와 숙면을 촉진할 수 있는 천연물 소재를 발굴하고 산업화와 연관된 연구를 수행하고자 하였다.

#### 1) 기술적 측면

스트레스로 인해 유발된 각종 질병에 대해서는 의학적 치료가 가능하지만 현재까지 일상생활에서 겪는 스트레스에 대해서는 의학적 접근도 거의 없이 대증요법 또는 자가치료에 의존하는 경우가 많았다. 특히 이런 스트레스는 실체가 없고 판정 방법도 없었기 때문에 식품 분야에서는 접근조차 할 수 없는 불모지였다고 생각한다. 그러나 최근 심박변이도(heart rate variability)를 분석하여 스트레스 정도를 판정할 수 있는 방법이 개발됨으로써 의료인이 아니더라도 스트레스 분석이 가능하게 되었다. 본 과제는 기술적으로 Digital stress analyzer(DSA)라는 새로운 기기가 발명됨에 따라 식품과학자가 스트레스와 관련된 연구를 수행할 수 있게 됐으며, 결국 시장 규모가 무한한 새로운 분야를 개척하려는 첨단기술 개발에 착수할 시점이라고 판단된다.

최근에 수면의 양과 질을 향상시키기 위한 다양한 종류의 수면보조제들이 개발되고 있으나 주로 의약품 계통으로 약물의존성, 다양한 부작용들이 문제가 되고 있어 좀 더 안전한 제품의 개발에 관심이 증대되고 있다. 지금까지 알려진 수면과 관련이 깊은 기관 중의 하나로 인간의 뇌조직 중 송과선을 들고 있다. 송과선에는 다양한 neurochemical이 존재하고 이들 중 일부가 빛의 양과 관련하여 melatonin이라는 물질의 합성을 유도하고 이것이 수면유도와 관련이 된다고 알려져 있다.

이 melatonin은 수면장애가 있는 사람, 특히 노인들의 경우에 매우 적게 분비되어 노인들의 수면장애가 유도되는 것으로 여겨지고 있다. 특히 melatonin은 최근에 강력한 항산화작용을 지닌이 보고되어 스트레스, 각종 질병, 노화 등에 따라 증가하는 산화적 스트레스성 물질을 소거시킴으로서 뇌조직을 보호하는 능력도 있는 것으로 추정되고 있다. 이와 관련하여 미

국 등지에서는 현재 melatonin 제제를 수면보조 및 노화방지 food supplement로 판매하고 있다. 한편, melatonin 이외에도 valerian, kava kava 등의 식물체를 사용한 제품들도 시판되고 있으며 이들의 작용기구에 대해서도 연구가 활발히 진행 중이다. 이에 반해 국내에서는 식품형태의 수면보조제에 대한 연구는 매우 미흡한 실정이고 melatonin의 경우 합성제품이 허가되어 있지 않다. 이에 천연물 유래의 melatonin 소재의 발굴이나 체내 melatonin 유도효능을 지닌 식품소재의 발굴, 그리고 새로운 기작을 지닌 소재를 식품소재로부터 발굴하여 이용하는 것은 의의가 있는 일이라 하겠다.

## 2) 경제·산업적 측면

식품 관련 전문지인 Food Technology 2002년 4월호에 게재된 ‘The top 10 functional food trend: The next generation’ 원고를 보면 면역, 스트레스, 숙면을 서로 매우 밀접한 관계에 있는 요소로 목고 관련 산업의 신장율이 높다고 분석하였다. 숙면은 스트레스와 연관하여 미국인 7,000만 명이 때때로 겪는 문제로 부각되고 있으면 현재 charmomile과 valerian 등을 원료로 한 제품이 판매되고 있다. 삶의 질과 관련하여 향후 성장성이 돋보이는 분야로 판단된다.

스트레스와 관련하여서는 gum과 candy 제품이 판매되고 있으나 이제 막 飛上하기 시작하는 단계로 아직 시장규모는 매우 작다. 이 이유는 아직 식품 분야에서 스트레스와 관련된 소재의 연구가 거의 전무한 때문이다. 그러나 아래에 서술한 바와 같이 태동기에 있는 이 분야에서 과학적 근거가 있는 신소재가 발굴되어 산업화된다면 시장이 급속도로 신장할 수 있는 분야라고 판단된다.

숙면과 관련하여, 현재 세계적으로 수면장애를 겪는 인구는 점차 증가하는 추세로 선진화 및 노령화사회의 도래에 따라 그 발생은 더욱 증가하고 있다. 이에 따라 미국의 경우에 수면보조제 관련 시장은 10억 달러에 달하고 있으며 연 30% 가까이 증가하고 있다. 그러므로 많은 제약업체들이 이 시장에 참여하고 있으며 계속하여 새로운 제품개발을 위해 노력하고

있다. 그러나 많은 사람들이 여러 가지 부작용 등으로 인하여 약품으로서의 수면보조제에 대한 두려움과 거부감을 가지고 있는 상황이다. 이에 기능성 식품으로서 부작용이 없고 안전한 수면보조제가 개발된다면 그에 대한 수요는 매우 높을 것으로 여겨지며 특히 인체에 유용한 생리적 기능을 가진 소재라면 시장성이 매우 밝다고 생각된다.

### 3) 사회·문화적 측면

영국 TUC(Trades Union Congress)가 근로자를 대상으로 건강과 위험에 관해 실시한 조사에 의하면 근로자가 직장에서의 위험요인으로 스트레스와 과로를 1순위로 꼽았고, 분야별 작업장에서 받는 주요 위험요인으로 1, 2 위를 차지하는 문제는 거의 모든 분야에서 아래 표와 같이 스트레스와 과로로 알려져 있다. 비록 우리나라에서는 아직 조사된 바는 없지만 상황은 유사하리라고 생각된다. 즉, 스트레스는 가장 많은 사람들이 겪는 일상생활의 문제임을 알 수 있고 이에 대한 대책이 시급하다고 판단되며, 나아가 이는 전세계 모든 사람들의 문제이기 때문에 스트레스를 완화할 수 있는 소재의 개발은 인류의 삶의 질 향상 측면에서 활발한 연구가 필요하다고 생각한다.

Table 1. Main hazards at work

Hazard	% cited by safety representatives in 2000
Stress or overwork	66%
Backstrains	41%
Display screen equipment	36%
Working alone	32%

Table 2. Main workplace hazards by sector

Sector	Main hazard	2nd hazard
Agriculture and Fishing	Stress or overwork(50%)	Backstrain(48%)
Health Services	Stress or overwork(74%)	Backstrain(67%)
Distribution and Hotels	Back Strains(76%)	Stress or overwork(60%)
Banking and Finance	Stress or overwork(86%)	Display screen equipment(60%)
Voluntary Sector	Stress or overwork(82%)	Working alone (56%)
Education	Stress or overwork(82%)	Display screen equipment(36%)
Manufacturing	Noise(57%)	Machinery hazards(54%)
Energy and Water	Stress or overwork(64%)	Slips, trips and falls on level(51%)
Leisure Services	Stress or overwork(64%)	Backstrains(51%)
Construction	Back strains(57%)	Dusts (55%)
Local Government	Stress or overwork(73%)	Display screen equipment(76%)
Central Government	Stress or overwork(81%)	Display screen equipment(76%)
Transport & Communication	Stress or overwork(68%)	Back strains(51%)
Other Services	Stress or overwork(59%)	RSI(44%)

또한 현대인들은 과거에 비해 많은 사회적 활동, 다양한 스트레스, 불규칙한 생활, 환경오염, 인위적 조명, 콜라 등의 카페인 음료 섭취 등, 다양한 원인으로 인해 생체의 24 시간 주기시스템에 교란이 발생하고 이에 따른 수면장애, 수면의 질 열화 등이 증대되고 있으며, 잦은 국제 여행 등으로 인해 시차적응 문제(Jet-lag)도 우리가 자주 경험하는 예이다. 특히, 노령화 사회가 도래되면서 수면 장애를 겪는 노인의 수가 증가하고 있다. 그리고

이 같은 수면장애는 잠자기 힘든 경우, 밤에 자주 깨는 경우, 불만족스런 잠을 자는 양상으로 나타나게 된다.

미국이나 우리나라의 경우를 보면 10명중 1-2명 정도(17%), 현재 미국의 경우 인구의 6-17.4%, 프랑스인의 경우는 28-41% 정도가 수면장애를 겪고 있는 것으로 조사되었으며 이러한 사람들은 어떠한 형태로든 도움을 청한다. 수면장애는 정신적, 육체적 문제를 야기하여 알콜 중독, 자제력과 집중력 감소, 교통사고 또는 작업장에서의 사고를 유발하여 정상적인 사회 활동에 지장을 줌은 물론 다양한 질병의 원인으로도 여겨지고 있다. 이에 따라 많은 사람들이 정상적이고 질 높은 수면을 원하고 있으며 연령이 증가함에 따라 그 욕구가 증대하여 수면보조제 관련시장은 태동기를 거쳐 점차 확대되고 있는 실정이다.

## 제 2 장 국내외 기술개발 현황

스트레스란 원인이 다양하고 나타나는 현상도 복잡하여 의학적으로도 일정한 판정 기준이 없는 용어이며, 또한 스트레스가 심각하여 우울증으로 진행되기 전에는 스트레스 자체를 질병으로 판정하기도 곤란한 애매한 영역에 속한 문제이다. 스트레스에서 유래하여 상태가 심각한 환자의 경우 의학적인 치료 프로그램과 약물요법을 병행하여 의학적 처치가 가능하지만 일시적으로 나타나는 스트레스 현상은 의사의 처방을 받기도 애매하고 자신의 인내로 극복하거나 휴식, 안정 등 자가치료에 의존하여 해소할 수밖에 없다. 결국 아직까지는 일시적인 스트레스를 치유할 적극적인 방법은 없다고 판단되며, 따라서 본 과제가 추구하는 스트레스 완화용 소재의 개발은 의약품이 아니지만 대다수 스트레스를 받는 사람들의 조속한 스트레스 극복에 크게 기여할 수 있는 기술로 판단된다.

수면보조제 제품과 관련하여서는 국외에서는 현재 제약회사들을 위주로 하여 다양한 치료약제들이 개발되고 있으나 부작용 등으로 인하여 현재 졸피뎀과 잘레플론 두 종류가 주로 사용되고 있으며 인드플론과 에스조피클론 등도 개발 중이다. 한편, food supplement로서 판매되고 있는 수면보조제로서 melatonin이 허가되어 있는데 대개 정제형태로서 1-4 mg을 함유하고 있으며 가격측면에서 유리한 합성품을 활용하고 있다. 기타 제품으로 수면에 효과가 있다고 알려진 GABA (gamma amino butylic acid), passionflower, valerian, kava kava, hop, English hawthome, chormomile 등의 추출물을 활용한 제품들도 시판되고 있는 실정이다.

학술적으로는 수면기구의 구멍 및 수면촉진, 억제 등과 관련되어 많은 연구가 진행되고 있는데 특히 melatonin 및 이의 합성 효소의 작용 등에 대해 깊이 있는 연구가 이루어지고 있다. 특히 melatonin에 대해서는 생체조직 보호작용과 관련되어 최근 10여 년 간 활발히 연구가 진행되고 있다.

한편, 국내에서 시판되고 있는 수면보조제는 외국에서 개발된 제품으로 대부분 수면을 위한 치료약제이다. 예전부터 수면에 좋은 다양한 소재에 대해 민간요법 차원에서 이용되고 있는 식품들이 있지만 기능성 식품으로



개발된 사례는 거의 없으며 미국 등지에서 시판이 허가된 품목의 상당수도 국내에서 식품으로 허가되지 않는 품목이 많다. 예를 들면 탁월한 수면보조효능이 있는 것으로 평가되고 있는 melatonin의 경우에도 합성호르몬 제제로 인식하여 허가되지 않아 국외여행자들이 비밀리에 들여오는 등의 문제점을 안고 있다. 최근에 국내 기업에서 melatonin 성분을 함유한 타로를 음료화 하여 불면증이나 피로감 해소가능성 식품으로 개발한 바 있다.

한편, 수면과 관련하여서는 다른 분야에 비해 학술연구도 매우 미진한 편으로 전통적으로 활용되고 있는 식품소재나 한약소재에 대한 체계적인 연구 및 제품개발이 매우 낙후된 수준이다. 이에 최근 수요가 증대되고 있는 수면보조제 분야에서 기존 식품소재의 새로운 가능성을 발굴하고 이를 활용하는 것은 매우 의의가 있다고 판단된다.

### **앞으로 전망**

앞에서 살펴본 바와 같이 정신적 피로 현상은 모든 사람이 처하는 문제이고 일상생활의 활력을 위해 해소해야 할 1, 2 위를 다투는 문제이다. 따라서 간편하고 접근하기 용이한 스트레스 처치법은 시장규모가 방대할 뿐만 아니라 시장의 연속성도 매우 높아 향후 발전 전망이 좋다고 판단된다. 현재 직·간접적으로 건강증진 가능성을 주장하는 각종 기능성식품, 건강보조식품, 영양보충용식품 등이 다양하지만 과학적 검증이 이루어지지 않아 이제 소비자들은 비슷한 부류의 신제품에 관심이 줄어들고 있는 추세이다. 따라서 앞으로는 in vitro, in vivo, 동물실험, 특히 인체를 대상으로 과학적 효능이 입증된 제품이 가장 유망하다고 판단된다.

사회의 발달과 더불어 점차 고령화, 스트레스, 약물남용 등 다양한 원인에 의한 수면장애 역시 증대되고 이의 해소와 관련된 수요는 증가할 것으로 예상되고 있다. 기존의 수면약제에 대한 거부감, 부작용 등으로 천연물에 대한 욕구는 증대할 것으로 판단된다. 산업 측면에서 새로운 가능성을 지닌 식품개발에 대한 관심이 증대되고 있고, 식품소재의 새로운 용도 발굴이라는 측면에서 의의가 있다고 판단되며 이를 통해 관련 식품소재의 부가가치를 증대시킬 수 있을 것이다.

# 제 3 장 심박변이도 측정에 의한 한국인의 스트레스 상태 분석

## 제 1 절 서론

스트레스란 본래 개체에 가해지는 압력이나 물리적 힘을 가리키는 것으로 물리학에서 흔히 사용되다가 인체에 적용되면서 압박감이나 근육의 긴장과 같은 신체적 반응처럼 정신과 신체간의 관계에서 예측할 수 있는 흥분상태를 의미하게 되었다. 스트레스 연구의 선구자인 Hans Selye(1976)는 스트레스를 어느 요구에 대한 신체의 비특이적 반응이라 정의하였다. 즉, 스트레스란 우리 심신에 자극이 가해지면 우리의 심신이 이에 대응하기 위해 긴장하는 상태를 말한다. 이때 해로운 인자나 자극을 스트레서(Stressor)라 하고, 이때의 긴장상태를 스트레스라 한다. 최근에는 스트레스를 개인에 의해 의미 있는 것으로 지각되는 외적 및 내적 자극으로 보고 이것이 감정을 야기 시키고 마침내 건강과 생존을 위협하는 생리적 변화까지 일으키는 것으로 보고 있다.

영국 TUC(Trades Union Congress)가 근로자를 대상으로 건강과 위험에 관해 실시한 조사에 의하면 근로자가 직장에서의 위험요인으로 스트레스와 과로를 1순위로 꼽았고, 분야별 작업장에서 받는 주요 위험요인으로 1, 2 위를 차지하는 문제는 거의 모든 분야에서 스트레스와 과로로 조사되었다(TUC, 2006). 우리나라에서는 아직 체계적으로 조사된 바는 드물지만 상황은 유사하리라고 생각된다.

스트레스가 일정한 정도로 지속될 때에는 우리의 심신에 있는 항상성(homeostasis) 원리가 작용해서 심신을 일정한 균형 상태로 유지하므로 과히 두려워할 필요는 없다. 약간의 긴장과 같은 적절한 스트레스는 삶의 원동력이 되며 효율성과 생산성을 높여 주기 때문에 이런 정도의 스트레스는 오히려 인체에 유익한 방향으로 작용한다고 하겠다. 그러나 이러한 외적 또는 내적 자극을 한 개인이 감당할 능력이 약화되거나, 이러한 상태에 오

랫동안 또는 반복적으로 노출되면 자율신경계의 활성을 저하시키고 그 균형을 깨뜨리며, 정서적으로 불안과 갈등을 일으키고, 자율신경계의 지속적인 긴장을 초래하여 결국, 정신적 또는 신체적인 기능장애나 질병이 나타나게 되는 것이다. 그러므로 스트레스를 잘 인지하고 관리하는 것이 건강 유지 및 증진에 반드시 필요하다.

스트레스를 관리하기 위해서는 무엇보다도 스트레스 상태를 우선적으로 파악할 필요가 있으며, 따라서 본 연구에서는 우리나라 사람들이 일상생활을 할 때 받고 있는 스트레스 상태에 대하여 심박변이도 분석 방법을 이용하여 분석하였다.

## 제 2 절 실험방법

### 연구대상자

연구의 피검자로 자원한 사람은 만 20~50 대의 남녀로 본 실험에 동의하는 자를 250 명 선발하였다. 사전검사 대상자 중에서 극심한 스트레스 상태를 나타내는 경우와 이상 심박동수가 5회 이상 발견되는 등 실험에 적합하지 않다고 판단되는 경우는 실험에서 제외시켰다. 실험 자원자들은 실험 전날의 음주 및 실험 2 시간 전에는 카페인 함유된 음료와 흡연 등을 금하도록 하였다.

### 실험 방법

스트레스 분석은 외부 환경에 의해 영향을 받지 않도록 실내 온도를 23℃ 정도로 유지하였고, 조명은 밝게 유지하였다. 외부의 소음이 없는 상태에서 진행하였으며, 동일한 의자를 사용하고 가급적 동일한 자세를 유지하도록 주의하였고, 측정 시간대를 일정하게 하여 신체 상태가 매일 유사한 상태에서 수행하였다. 검사를 준비하면서 실험에 대해 최소한 5 분간 설명하면서 피검자가 자연스럽게 안정을 취한 후에 측정에 응하도록 유도하였다.

### 심박변이도 측정

심박변이도는 자율신경검사기(SA-3000, Medicores Co., Ltd., Seoul, Korea)을 이용하여 좌우 손목과 발목에 전극을 부착하고 5 분간 측정하였다. 얻어진 자료는 기기에 내장된 시간영역분석(time domain analysis) 프로그램이 자동으로 통계처리 한 데이터이다.

### 통계분석

본 실험의 결과에 대한 자료 분석은 SPSS Win 10.0 통계프로그램을 이용하였다. 본 실험 결과에서는 연구 대상자 250 명 중 재검사에도 이상 심박동수가 5회 이상 발견된 자는 분석 자료에서 제외시키고 통계처리 하였다.

## 제 3 절 결과 및 고찰

스트레스로 인해 유발된 각종 질병에 대해서는 의학적 치료가 가능하지만 현재까지 일상생활에서 겪는 스트레스에 대해서는 의학적 접근도 거의 없이 대중요법 또는 자가치료에 의존하는 경우가 많았다. 변광호(2002)가 지적했듯이 스트레스는 용어의 정의가 여러 가지로 제시되고 내용이 추상적인 면이 많고 너무 광범위한 의미를 담고 있다. 또한 스트레스는 측정과 진단에 개관적인 방법이 별로 없어 우울증 같은 질병으로 진행되어야 진단이 가능하며 만성적인 스트레스를 비롯한 일상생활에서 느끼는 가벼운 스트레스를 측정할 마땅한 지표가 없다는 문제가 있다.

그러나 최근 심박변이도(heart rate variability, HRV)를 분석하여 스트레스 정도를 판정할 수 있는 방법이 개발됨으로써 스트레스 판정의 새로운 계기가 되었다. HRV란 심장의 리듬은 내/외부 환경의 변화에 따라 시시각각 변화하는 자율신경계에 영향을 받는데 이러한 시간에 따른 심박의 주기적인 변화를 의미한다. 즉, 하나의 심박 주기로부터 다음 심박 주기 사이의 미세한 변이를 뜻한다. Task force of the European society of cardiology and the North American society of pacing and electrophysiology는 HRV

의 표준측정법, 생리적 해석과 임상 응용에 관해 일목요연하게 가이드라인을 제시한 바 있으며(1996), 최환석(2005)은 스트레스 평가방법으로서의 HRV의 이용에 관해 정리한 바 있다. HRV 분석은 HRV의 시간범위 분석과 주파수 범위 분석을 이용한다. 첫째, 시간 범위 분석에서는 기록시간 동안의 R-R interval 변화 정도를 통계 처리하는 방법으로 Mean HRT, SDNN, RMS-SD를 기록한다. 둘째, 주파수 범위 분석에서 R-R interval의 변화를 각 주파수 대역별 파형으로 분리하여 분석하는 방법으로 TP, VLF(very low frequency), LF(low frequency), HF(high frequency), normalized HF, normalized LF, LF/HF ratio를 기록한다.

우리나라 사람이 일상생활에서 받고 있는 스트레스 정도를 자율신경 검사기(스트레스 검사기 SA3000P)를 이용하여 측정된 결과를 아래에 나타냈다. Table 1에서 이상반응이 없는 238명의 피검자를 대상으로 한 일상생활에서의 평균 심박동수는 76.11로 나타났는데, 이는 성인의 일반적인 평균 심박동수가 60~90 범위에 있으므로 정상임을 의미한다.

**Table 1. Time domain analysis of Korean in everyday life by HRV**

Time Domain Analysis(n= 238)	
Mean HRT(bpm)	76.11±9.11
SDNN(ms)	44.09±14.44
PSI	39.69±36.61

전체 NN 간격의 표준편차(Standard deviation of the NN interval, SDNN)는 심박동의 변화가 얼마나 되는지를 가늠할 수 있는 지표로 평균 44.09로 나타나 이 평균치 역시 정상 범위 안에 있었다. SDNN이 큰 경우에는 심박 변동 신호가 그만큼 불규칙하다는 것을 의미하며, 반대의 경우 심박 변동 신호가 단조롭다는 의미이다. 건강할수록 HRV 신호가 불규칙하고 복잡한 점을 고려하면 일반인이 생각하는 것처럼 일상생활에서의 스트레스가 전체적으로는 심각하지 않다고 판단된다. 육체적 스트레스 지표(physical stress index, PSI)는 조절 시스템에 가해지는 압력(pressure)인데 전체 평균 39.69는 그리 높은 수치는 아니었다. PSI의 경우 표준편차가 크게 나타났는데 이는 개개인의 상태가 크게 다르기 때문인 것으로 해석할 수 있다.

시험 자원자의 주파수범위분석 결과를 Table 2에 나타냈다. 분석 시간 5 분간 Tp는 1,547.38이어서 전체 평균적으로는 자율신경계 조절능력이 강한 상태에 있다는 의미이다. 저주파(low frequency, LF)는 교감신경계와 부교감신경계의 활동을 동시에 반영하나 대부분 교감신경 활동의 지표로 활용되며 스트레스의 증가는 LF의 증가로 나타난다. 이러한 변화는 지진, 대학시험 등의 일상생활에서 급성 스트레스 및 만성화된 스트레스로 인한 분노상태에서도 나타나게 된다. 이 값은 474.84였고 표준편차가 크게 나타났는데 이는 개인의 급성 및 만성 스트레스 정도의 차이가 크다고 볼 수 있다.

Table 2. Frequency domain analysis of Korean in everyday life by HRV

Frequency Domain Analysis(n= 238)	
TP(ms <sup>2</sup> )	1547.38±1013.27
LF(ms <sup>2</sup> )	474.84±422.64
HF(ms <sup>2</sup> )	378.61±343.15
LF/HF	2.13.±2.15

고주파(high frequency, HF)는 부교감신경계(미주신경)의 활동에 관한 지표인데 심장의 전기적인 안정도와 밀접한 관련이 있다. 연령이 많아지거나 심폐 기능이 노화되어 있으면 HF가 낮게 나타나는 점으로 미루어 자원자들의 HF값 378.61은 지속적인 stress, 공포, 불안 상태에 있지는 않다는 의미이다. 계산하면 나타나지만 자율신경 전체의 균형을 반영하는 LF/HF 비율은 평균 2.13으로 비교적 자율신경의 균형이 잘 유지되고 있음을 의미한다.

Table 3에는 심박변이도 측정치를 바탕으로 데이터 처리를 거쳐 분석기에 자동적으로 기록되는 항목을 나타냈다. 자율신경 활성화도는 90 이상, 자율신경 균형도는 50 이하가 정상범위인데 자율신경 활성화도 93.08, 자율신경 균형도 50.26을 나타냈다. 이는 신체 불균형 상태를 교정하고 평형을 담당하는 교감 신경과 부교감 신경으로 이루어진 자율신경 활성화도는 정상이나 균형도가 정상 경계 범위 이하라는 것을 나타낸다. 자율 신경 균형도가 불균형 하다는 것은 신체 불균형 상태를 교정하고 평형을 유지하는 기능이 불균형 해진다는 것인데 교감이 우세 할 경우 불안, 격노, 주의 산만, 등이 우려 되고 부교감이 우세 할 경우 무기력, 만성 신경 쇠약, 우울등이 우려된다. 스트레스 저항도 90 이하 스트레스 지수 110 이상 피로도가 110 이상이 스트레스 상태로 스트레스 저항도 94.82, 스트레스 지수 96.79, 피로도 107.88 으로 스트레스 상태도 정상인 것으로 나타났다. 하지만 피로도의 경우 107.36으로 정상 범위의 경계에 가까워 세심한 관리가 필요할 것으로 생각 된다. 또한 심장 안정도는 94.79로 정상범위를 나타냈다. 스트레스가

높으면 자율신경계의 기능을 저하시키고, 이는 심장의 안정도를 떨어뜨려 각종 질병을 야기하게 되는데 90이하의 범위가 심장안정도가 떨어졌다는 것을 의미한다.

**Table 3. Autonomic balance report of Korean in everyday life based on HRV data**

Automatic Examination(n= 238)	
Autonomic activity	93.08±11.99
Autonomic balance	50.26±37.25
Stress resistance	94.82±13.79
Stress index	96.79±11.95
Fatigue index	107.88±14.84
Electro-cardiac stability	94.79±17.76

본 연구의 자원자 전체적으로는 심박변이도 측정값이 거의 정상 수준에 있기 때문에 일견 우리나라 사람은 자신이 생각하는 것과는 다르게 스트레스를 전혀 받지 않고 있다고 판단할 수 있으나 이는 모든 데이터의 평균값으로 표시하는데서 비롯된 오해이다. 실제로 개개인의 스트레스 정도를 분류하고자 SDNN 수치를 나누어 표시한 결과를 Fig. 1에 나타냈다. 그림에서 30 미만은 심한 스트레스 상태를 의미하며, 30~40은 경계에 있는 스트레스 상태를 의미하고 40을 초과하면 정상 상태임을 의미한다. 따라서 본 실험에서 연구대상자 238 명의 개인별 스트레스는 일상생활에서 69 명은 심한 스트레스 상태에 있으며, 33 명은 정상과 스트레스 상태의 경계에 있고, 나머지 136 명은 정상 상태인 것으로 나타났다.



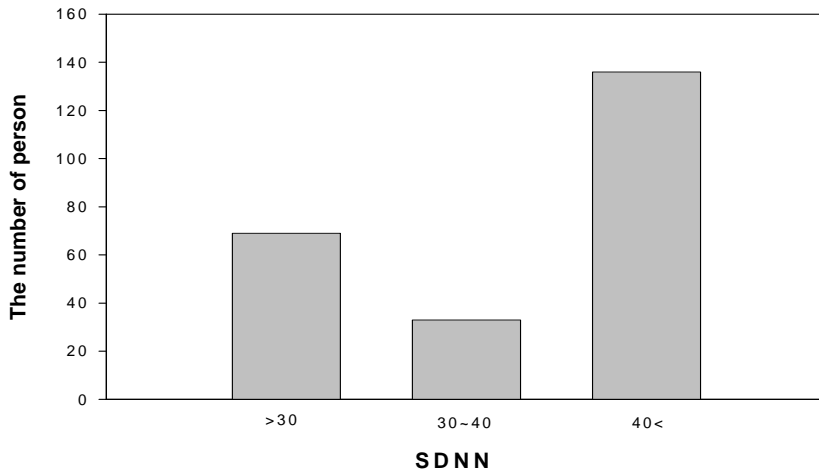
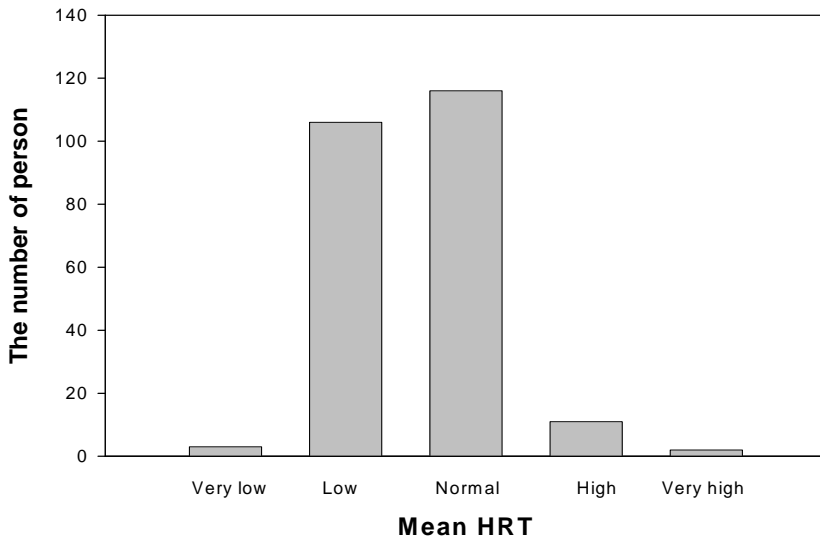


Fig. 1. Classification of the volunteers by SDNN

영국 TUC 조사에 따르면 영국의 작업장에서 닥치는 가장 큰 문제는 스트레스라고 하였으며, 2004년 조사에 따르면 근로자의 58%가 작업 중 가장 압박(pressure)을 받는 요소가 스트레스라고 하였다. 정신적인 스트레스는 작게는 스트레스는 냉담함이나 졸음이 오고 심하면 우울증 같은 질병과 자살에 이르게 한다. 육체적인 스트레스는 작게는 식욕을 잃게 하거나 메스꺼움을 유발하고 심하면 심장에 문제가 있고 심장발작을 일으킨다. HSE(Health and Safety Executive's) 조사에 따르면 영국에서 노동자의 스트레스로 인해 국가가 치르는 사회적 비용이 한해에 £37억에 달한다고 한다. 이러한 상황은 우리나라라고 예외는 아니라고 판단한다. 따라서 질병의 범위가 아닌 일반적인 스트레스를 치유할 방안을 모색해야 하며, 대체요법으로 스트레스를 완화할 건강기능식품의 개발이 시급하다고 생각된다.

**Table 4. Classification of the volunteers by automatic examination**

	Autonomic activity	Stress resistance	Stress index	Fatigue index	Electro-cardiac stability
Very bad	3	10	5	4	3
bad	106	27	17	42	106
normal	116	191	190	91	116
Good	11	7	26	92	11
Very good	2	3	0	9	2



**Fig. 2. Classification of the volunteers by Mean HRT**

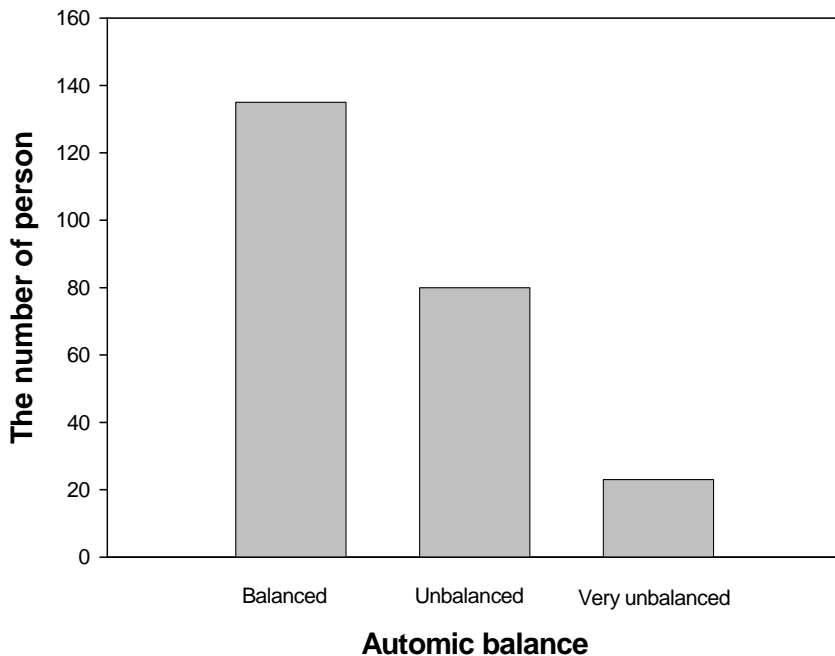


Fig. 3. Classification of the volunteers by Autonomic balance

#### 제 4 절 참고문헌

변광호. 스트레스 평가와 관리의 최신개념. 대한스트레스학회지. 10(1): 1-6 (2002)

Hans Selye. Stress in health and disease. Butterworth, London (1976)

Task force of the European society of cardiology and the North American society of pacing and electrophysiology. Heart rate variability: standards of measurement, physiological interpretation, and clinical use. European Heart J. 17: 354-381 (1996)

Trades Union Congress. Stress still the biggest problem at work. <http://www.tuc.org.uk>(2006)

- 1) Trades Union Congress. Stress still the biggest problem in UK workplaces. <http://www.tuc.org.uk>(2006)

## 제 4 장 한 개비의 담배도 남성 흡연자의 스트레스를 증가 시킨다

### Abstract

The stress decreases an autonomic activity and it breaks an autonomic balance. The purpose of this study is to observe the effect of smoking on stress. The subjects were male smokers in twenties~fifties. Their stress were examined by autonomic nervous balance analyzer(SA-3000P, Medicore Co., Seoul, Korea). As this stress examination analyzes automatically heart variability by time and frequency domain analysis, the examination shows activity and balance degree of autonomic system. In the experiment, stress level of volunteers were examined before and after smoking a cigarette, and the data were analyzed using SPSS 10.0 Win software program. Analysis of stress indices showed a decrease in SDNN parameter and an increase in PSI with significant difference in time domain analysis. The LF/HF ratio increased with significant difference in frequency domain analysis. Also result of direct diagnostic reading report showed decrease of autonomic activity and heart stability, and increase of autonomic nerve balance degree and mean heart rate. The results were significantly different( $p < 0.05$ ). As a result, the smoking deceased autonomic activity and induced imbalance of autonomic system, simultaneously. In conclusion, this study indicated that cigarette smoking increased the stress of male volunteers.

## 제 1 절 서론

스트레스에 대한 정의는 다양하지만 Kenneth Hambly는 자극이나 변화에 대해 인체가 적절히 적응하지 못하여 발생하는 부적응 상태라 하였는데, 스트레스를 과하게 받으면 교감신경계가 부적절하게 과활성화 되어 신체적, 심리적, 행동적인 문제를 일으키게 된다. 따라서 스트레스는 모든 사람에게서 당연히 해소되어야 할 문제이다. 스트레스 해소 방법으로는 심리 혹은 정신 치료 요법, 바이오피드백 요법, 점진적 이완 요법, 운동 요법 등이 있다. 일반인이 스스로 손쉽게 스트레스를 해소할 수 있는 방법으로는 휴식과 충분한 수면, 명상, 요가, 운동, 음악 감상 등을 꼽을 수 있다. 그러나 정신과 치료, 바이오피드백 요법, 한의학적 치료 및 향기치료(aromatherapy) 등은 전문가의 도움이 필요하기 때문에 일반인이 혼자서 해결하기 어려운 방법이다. 여하튼, 스트레스 원인에 따라 각자 자신에게 가장 적합한 방법을 선택하여 스트레스를 해소한다면 스트레스가 건강에 미치는 나쁜 영향을 덜 받으며 살아갈 수 있겠다.

한편, 흔히 애연가들은 흡연이 매우 손쉬운 스트레스 해소법으로 인식하는 경우가 많다. 담배를 피우면서 연기를 휘 내뿜으면 스트레스가 함께 날아간다고 생각하여 흡연이 긴장 이완의 수단으로 유용하다며 큰 의미를 부여하곤 한다. 이 부류의 흡연자들은 흡연이 자신들을 진정시키고 작업능력을 향상시킨다고 생각하고 있다. 이런 심리적인 효과가 담배를 계속 피우게 되는 이유이기도 하다. 학문적으로는 스트레스가 흡연과 매우 밀접한 관련이 있다는 보고(Cartwright 등, 1959)가 있으며, 흡연자들은 흡연 시 이완되고 니코틴이 없을 때 긴장하게 되므로 흡연은 일상생활에서 스트레스를 관리하는데 도움이 된다(Warburton, 1992)는 연구결과가 보고된 바가 있다. 그러나 금단 증상으로 인한 불안 시 니코틴은 이완을 줄 수 있으나 흡연이 직접적으로 정서적인 피로에 영향을 주는 것은 아니며 (Parrott, 1999) 오히려 흡연자가 비 흡연자에 비해 스트레스 수준이 다소 높았다(Lloyd & Lucas, 1997)는 연구결과가 나오기도 했다. 미국 심리학회 학술지(American Psychology, 2001)의 최신호에는 일반적으로 흡연자들이 주

장하는 것과는 달리 흡연은 스트레스를 완화시켜 주기보다는 오히려 스트레스의 직접적인 원인이 된다는 연구결과가 발표된바 있다.

전문가들의 이러한 상반된 연구 결과는 일반인 흡연자가 흡연이 스트레스를 경감시킨다는 주장을 믿게 하여 흡연을 스트레스 해소법으로 여기고 계속 흡연을 하게 하는 원인이 되고 있다. 이미 흡연은 폐암을 비롯한 여러 암의 위험 인자일 뿐만 아니라 심혈관 질환을 포함한 심각한 합병증을 초래하는 각종 질환을 발생시켜 삶의 다양한 측면을 위협하고 있다. 삶의 질 향상을 위해 금연이 강조되어 가고 있는 현 상황에서 흡연이 스트레스에 어떠한 영향을 미치는가는 관심의 대상이 아닐 수 없다. 따라서 본 연구에서는 흡연이 스트레스에 미치는 영향을 분석하여 흡연자에게 올바른 건강 정보를 제공하기 위하여 수행되었다.

본 연구에서는 심박변이도(heart rate variability, HRV)의 시간 및 주파수 범위 분석방법을 통하여 스트레스 정도를 정량화하여 나타내는 자율신경 균형 검사기를 이용하여 흡연이 스트레스에 미치는 영향에 대해 살펴본 연구결과이다.

## 제 2 절 실험방법

### 연구대상

자원한 20~50대의 남성흡연자를 대상으로 하였다. 사전검사 대상자 중에서 극심한 스트레스 상태를 나타내는 경우와 이상 심박동수가 5회 이상 발견되는 등 실험에 적합하지 않다고 판단되는 경우는 실험에서 제외시키고, 이 연구에 참여하기를 동의하는 자 49 명을 선정하여 측정하였다. 실험 자원자들은 실험 전날의 음주 및 실험 2 시간 전에는 카페인 함유된 음료와 흡연 등을 금하도록 하였다.

### 실험 방법

스트레스 분석은 외부 환경에 의해 영향을 받지 않도록 실내 온도를 23℃ 정도로 유지하였고, 조명은 밝게 유지하였다. 외부의 소음이 없는 상태

에서 진행하였으며, 동일한 의자를 사용하고 가급적 동일한 자세를 유지하도록 주의하였고, 측정 시간대를 일정하게 하여 신체 상태가 매일 유사한 상태에서 수행하였다. 검사를 준비하면서 실험에 대해 최소한 5 분간 설명하면서 피검자가 안정을 취하면서 실험에 응하도록 하였다. 본 연구의 피검자로 적합하다고 판단되는 자원자를 대상으로 흡연 전에 스트레스 검사를 실시하고 결과를 기록하였다. 바로 직후 검사실 외부에 지정된 장소에서 담배를 1 개비 피우게 하고, 피검자는 흡연 후 바로 검사실에서 2차 스트레스 검사(흡연 후 스트레스 검사)를 실시하였다. 1차 측정 완료에서 2차 측정 완료까지의 시간은 약 10분이 소요되었다.

#### 심박변이도 측정

HRV는 자율신경 균형검사기(SA-3000P, Cardio-Peri, Medicore Co., Ltd., Seoul, Korea)를 이용하여 좌우 손목과 발목에 전극을 부착하고 5 분간 측정하였다. 분석기는 시간범위 분석(time domain analysis)과 주파수범위 분석(frequency domain analysis)을 이용하며, 얻어진 자료는 Fast Fourier Transform을 거쳐 Power spectral density를 보여준다. 본 기기는 서울 백병원 등 8개 대학병원을 중심으로 연구한 HRV 규격과 기준을 바탕으로 정상적인 한국인의 data를 적용하여 기기에 내장된 프로그램으로 스트레스 지수 등을 direct diagnostic reading report를 표시한다.

#### 통계처리

본 연구에서의 분석치는 SPSS Win 10.0 software program을 이용하여 각 데이터의 평균과 표준편차를 나타냈고 유의성을 검증하였다.

### 제 3 절 결과 및 고찰

심박변이도란 심장의 리듬은 내/외부 환경의 변화에 따라 시시각각 변화하는 자율신경계의 영향을 받는데 이러한 시간에 따른 심박의 주기적인 변화를 의미하며 하나의 심박 주기로부터 다음 심박 주기 사이의 미세



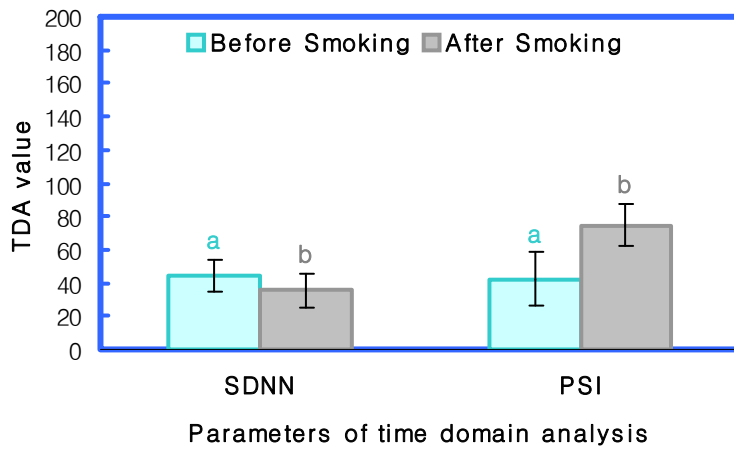
한 변이를 뜻한다. 이는 내외적인 환경요인, 스트레스에 대한 자율신경계의 항상성(homeostasis) 조절 메커니즘을 추적할 수 있는 평가 수단이다. 스트레스 상태를 추정할 수 있는 이론 중 하나로(메디코아 자료) 건강한 사람의 경우 HRV가 크고 복잡하게 나타나지만, 질병 또는 스트레스 상태에서는 현저히 감소한다.

시험 자원자의 흡연 전과 후의 주파수범위분석 결과를 Table 1에 나타냈다. 분석 시간 5 흡연 전 1,556에서 낮아졌는데 이는 자율신경계 조절능력이 건강한 상태에 비해 낮아졌다는 의미이다. 저주파(low frequency, LF)는 고감각신경계와 부교감신경계의 활동을 동시에 반영하나 대부분 교감신경 활동의 지표로 활용된다. 흡연 전에는 544 ms<sup>2</sup>였지만 이 수치 역시 낮아졌다. 인체 내 에너지 공급에 관여하는 교감신경의 활동이 낮아졌다는 것은 인체 에너지 손실을 잘 나타내며 피로 상태로 떨어진다는 의미이다. 즉, 흡연은 육체 피로를 유발한다고 해석할 수 있다. 고주파(high frequency, HF)는 부교감신경계(미주신경)의 활동에 관한 지표인데 심장의 전기적인 안정도와 밀접한 관련이 있다. 연령이 많아지거나 심폐 기능이 노화되어 있으면 HF가 낮게 나타나는 점으로 미루어 흡연 후 HF 감소는 지속적인 stress, 공포, 불안 상태로 전환됨을 의미한다. 계산하면 나타나지만 자율신경 전체적인 균형을 반영하는 LF/HF 비율은 흡연 전 약 3.0에서 흡연 후 4.9 수준으로 높아져 자율신경의 균형이 무너지고 있음을 나타내었다. 즉, LF/HF 비율의 증가는 흡연 후 교감 신경이 더 활성화됨을 의미한다. 이런 상태는 심장 관상동맥질환과 말초혈관 폐쇄질환의 원인으로 작용할 수 있으며 이와 관련하여 HF 값의 감소 또한 심장에 가해지는 부교감 신경의 활성화도 저하를 반영하며 이런 상태가 지속되면 즉, 담배를 계속 피우게 되면 심혈관계 질환의 원인이 될 수도 있다는 의미이다.

**Table 1. Change of frequency domain analysis value before and after smoking**

FDA parameter	Smoking	
	before	after
TP(ms <sup>2</sup> )	1,556.33±1028.12	1,141.43±1092.76
LF(ms <sup>2</sup> )	544.16±418.01	380.75±369.72
HF(ms <sup>2</sup> )	251.06±198.99	150.99±148.21
LF/HF	2.98±2.19	4.88±5.66

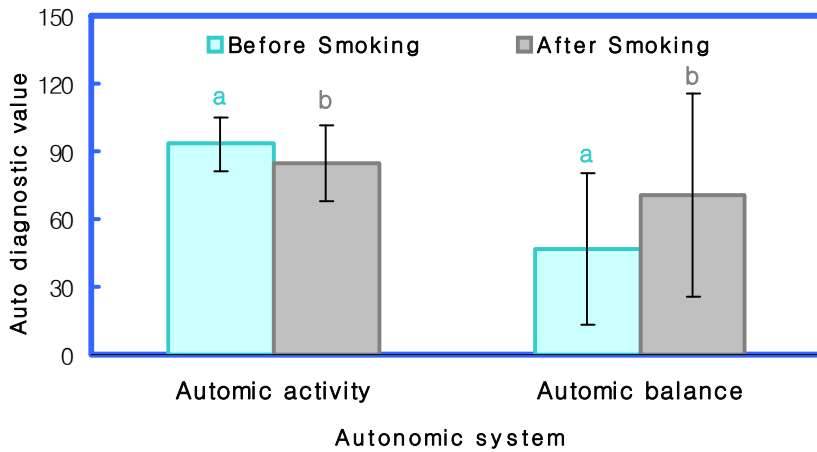
Figure 1에 나타난 전체 NN 간격의 표준편차(Standard deviation of the NN interval, SDNN)는 심박동의 변화가 얼마나 되는지를 가늠할 수 있는 지표인데 유의적으로 감소하였다. SDNN이 큰 경우에는 심박 변동 신호가 그만큼 불규칙하다는 것을 의미하며, 반대의 경우 심박 변동 신호가 단조롭다는 의미이다. 건강할수록 HRV 신호가 불규칙하고 복잡한 점을 고려하면 1 회의 흡연에 의한 SDNN 감소는 지속적인 효과는 아니겠지만 여하튼 건강에 나쁜 영향을 미치고 있음을 시사한다. 육체적 스트레스 지표(physical stress index, PSI)는 조절 시스템에 가해지는 압력(pressure)인데 흡연 후 크게 증가하였다. 이 값의 표준편차가 높게 나타난 이유는 결과가 개인 차원이 아니라 자원자 전체의 결과를 나타내기 때문에 연령 또는 건강 상태에 따라 흡연에 대한 반응 크기가 다르기 때문으로 풀이된다.



**Fig. 1. Change of time domain analysis value before and after smoking**

<sup>ab</sup>Superscripts within an item indicate significant difference( $P < 0.05$ ).

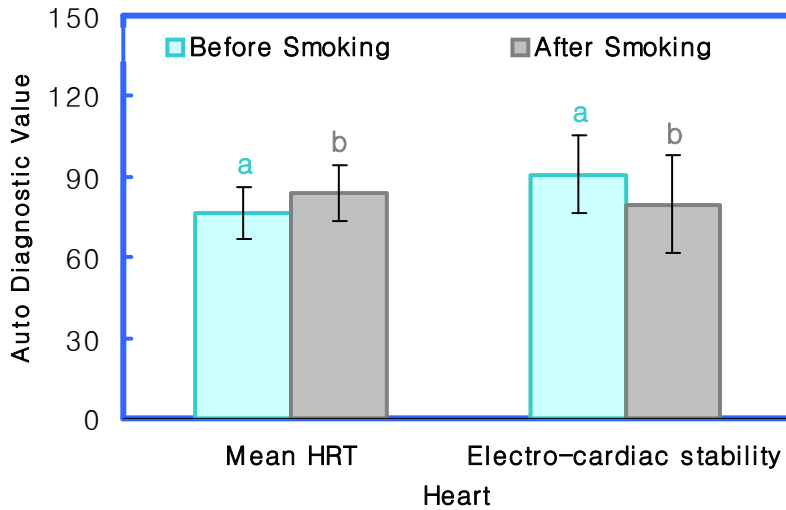
Figure 2에서 자율신경 균형도가 흡연 전 35.26에서 흡연 후 59.74로 증가하여 유의적( $P < 0.05$ ) 차이를 보였다. 이는 자율신경 균형도 상태가 균형에서 불균형으로 변화함을 나타내며 따라서 흡연이 급성 스트레스로 영향을 미치는 것이라 판단되었다. 자율신경계의 불균형 상태가 오랜 시간 지속될 경우 정신적 또는 육체적 질환 발병위험이 높아질 수 있음을 고려할 때 흡연이 건강에 악영향을 미치는 것으로 사료되었다.



**Fig. 2. Effect of smoking on autonomic nervous activity and autonomic nervous balance**

<sup>ab</sup>Superscripts within an item indicate significant difference( $P < 0.05$ ).

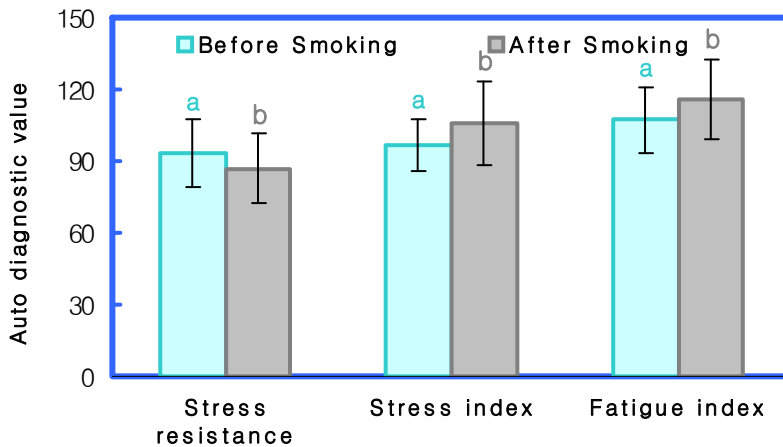
Figure 3에서 평균 심박동수가 흡연 전 76.15에서 흡연 후 81.67로 증가하여 약 5.5회 유의적으로 증가하는 경향을 보였다. 두 수치 모두 정상 범위 내에 있음으로 의미 있는 변화로 볼 수 없다고 생각될 수 있지만, 단 1 개비의 흡연으로 심박동수가 이렇게 증가한다는 사실은 흡연의 영향이 크다는 뜻으로 해석된다. 또한, 심장 안정도도 흡연 전 95.44에서 흡연 후 86.07로 감소하여 유의적( $P < 0.05$ ) 차이를 보였는데, 이는 심장 안정도 상태가 정상 범위에서 나쁜 범위로 변화했음을 보여주는 것이다. 이와 같은 평균 심박동수와 심장 안정도의 변화는 흡연이 심장에 부담을 주는 것으로 판단되었다.



**Fig. 3. Effect of smoking on Mean HRT and heart stability**

<sup>ab</sup>Superscripts within an item indicate significant difference ( $P < 0.05$ ).

자동진단 보고 결과 흡연 후 자율신경 활성화도는 93.43에서 84.76으로 감소( $p=0.004$ )하였고 자율신경 균형도가 46.76에서 70.33으로 증가( $p=0.004$ )하여 흡연이 자율신경계의 활성을 저하시키고 불균형을 초래함을 나타내었다. 스트레스 관련 항목에서 스트레스 저항도는 93.35에서 87.04로 감소 ( $p=0.031$ ), 지수는 96.90에서 105.98로 증가( $p=0.002$ ), 피로도는 107.18에서 115.84로 증가( $p=0.007$ )하여 흡연이 스트레스로 작용하여 피로도가 증가함을 보여주었다.



**Fig. 4. Effect of smoking on stress resistibility, stress index and, fatigue index**

<sup>ab</sup>Superscripts within an item indicate significant difference( $P < 0.05$ ).

대부분의 흡연자들은 흡연이 심리적인 효과가 있어 자신을 진정시키고 작업능력을 향상시킨다고 생각하는 경향이 있다. 이것이 사실이라면 흡연자들은 비흡연자들에 비해 정신적인 안정을 취할 수단이 한 가지 더 있기 때문에 정신건강이 더 좋아야 할 것이다. 그러나 이제까지 어느 연구결과도 흡연자의 정신건강이 비흡연자 보다 좋다고 한 적이 없다. Silverstein은 1976년 흡연자에게 전기적인 자극을 주는 실험을 하였는데, 그 결과 심한 흡연자에게 있어 흡연은 불안을 감소시키는 효과가 있는 것이 아니며, 흡연을 하지 않는 것 혹은 불충분한 니코틴이 불안을 증가시키는 경향이 있다는 결과를 보고하였다. 이후 Perlick(1977)은 심한 소음을 stressor로 사용한 실험에서 흡연자들은 담배를 피우고 시간이 지날수록 니코틴 양이 줄어드는 것 또는 흡연을 하지 않는다는 것이 흡연자를 불안정한 상태를 만들고 이때 흡연자는 스트레스가 쌓인다고 느끼며 이 시점에서 담배를 피우면 그 스트레스가 경감된 듯 생각하지만 실상은 부족한 니코틴이 공급되어

니코틴의 미약하지만 흥분작용에 의해 안정감을 느낄 따름이라고 한 바 있다. 또한 또 Heimstra등은 담배가 비흡연자에 비해 흡연자에게 기분을 향상시키거나 진정시키는 것은 아니며, 작업의 효율도 증가시키지 않는다고 하였다. 이뿐만 아니라 흡연과 흡연 사이의 니코틴의 결핍이 스트레스의 느낌을 유도한다는 가설에 근거해서, 흡연자가 비흡연자에 비해 오히려 심한 스트레스를 가지게 된다는 주장도 있다.

서론에서 언급한대로 Parrot(1999)의 연구에서 연구 대상자를 성인흡연자, 새로 담배를 피우기 시작한 청소년 그리고 금연한 사람 등의 세 그룹으로 나누어 조사하였는데 성인흡연자들은 담배를 안 피우는 동안 스트레스가 증가되고 이 때 담배를 피우면 다시 정상수준의 스트레스가 된다고 했다. 즉 흡연자들은 금단증상을 막기 위해 담배를 피우는 것이며 담배를 피우지 않는 동안의 스트레스가 반복적으로 나타나기 때문에 더 스트레스 속에서 산다는 것이다. Parrot은 또한 최근 연구에서 흡연자에게 며칠 동안 흡연을 하게 하면서 기분상태를 측정하는 연구를 한 결과, 흡연을 한 직후에는 기분이 향상되는 변화가 있었지만, 흡연의 사이에는 기분의 악화가 있었다고 하였다.

흡연자들이 경험적으로 환경으로부터의 스트레스에 대응하기 위해 담배를 사용한다고는 하지만, 이제까지 보고된 연구를 종합해 보면 흡연이 스트레스를 진정시키는 효과가 있다는 근거는 없다고 판단된다. 그리고 본 연구결과를 요약해 보면, 흡연이 스트레스 요인으로 작용하여 인체의 스트레스를 증가시킴으로써 자율신경계의 활성을 저하시키고 불균형을 초래하는 것으로 판단되었으며 저하된 자율신경의 영향으로 심장의 안정도 저하와 평균 심박동수의 증가를 유발하는 것으로 판단되었다.

#### 요약문

본 연구의 일부 흡연자들이 주장하는 흡연의 효과 즉, 흡연이 일시적으로나마 스트레스를 완화시킨다는 효과가 실제로 나타나는지 확인하기 위하여 수행되었다. 연구 대상자는 20~50대의 남성 흡연자 중 실험 자원으로 선정하였다. 스트레스 강도는 자율신경 균형검사기를 이용하여 분석하였다.

이 스트레스 검사법은 심박 변이도를 시간과 주파수 영역으로 자동 분석하여 자율 신경계의 활성 및 균형 정도를 나타낸다. 실험은 흡연 전·후의 스트레스 정도를 측정하였고, 그 자료를 SPSS 10.0 Win으로 분석하였다. 연구 결과 시간 범위 분석에서 SDNN은 유의적 차이로 감소하였으며 PSI는 증가하였다. 주파수 범위 분석에서 LF/HF ratio가 유의적 차이로 증가하였다. 또한 자동검진에서 자율신경 활성도와 심장 안정도는 감소하였으며 반면에 자율신경 균형도와 평균 심박동수는 증가하였다. 이 결과는 유의적인 차이를 나타냈다. 결과적으로 흡연이 자율신경 활성을 저하시킴과 동시에 불균형을 초래하였다. 따라서 본 연구에서는 흡연이 육체적인 스트레스를 증가시키는 것으로 판단하였다.

## 제 4 절 참고문헌

고경봉 : 스트레스와 정신신체의학. 일조각, 3~23 (2002)

고경봉 : 내과계 입원환자에서 정신신체장애의 유병율과 스트레스지각. 신경정신의학 27, 525~534 (1988)

Bol, P. Smoking and pregnancy. Ned. Tijdschr. Tandheelkd. 106, 404-407 (1999)

Blake, J & Ridker, PM. Inflammatory bio-markers and cardiovascular risk prediction. J. Inter. Medicine. 252, 283-294 (2002)

Dimsdale JE, Keefe HJ, and Stein MB. Stress and Psychiatry. In: Comprehensive Textbook of Psychiatry. Vol. 2, 7th Ed. by Sadock BJ, Sadock VA, Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins, 1835~1846 (2000)

Girdano DA & Everyg G. Controlling stress and tension: a holistic approach. New Jersey, Pren-tice-Hall, Inc., 3-7 (1979)

Holmes TH and Rahe RH : The social readjustment rating scale. J. Psychosom Res. 11, 123-136 (1967)

Kim MS. A Study on Health-related Quality of life, Smoking



Knowledge, Smoking Attitude, and Smoking Cessation Intention in Male Smokers. *J. Korean Acad. Nurs*, 35(2), 344-352 (2005)

Lipowski ZJ. *Psychomatic medicine and liaison psychiatry*. New York, Plenum Medical Book Co. 3~90 (1985)

Lloyd B & Lucas K. *Smoking in adolescence: Images and identities*. London, Routledge (1997)

Parrott AC. Does cigarette smoking cause stress? *American Psychologist*. 54: 817-820 (1999)

Parrot AC. Cigarette smoking does cause stress. *American Psychologist*. 55: 1159-1160 (1999)

Reiser MF : *Psychophysiology of stress and its sequelae*. In: *Mind, Brain, Body: toward a convergence of psychoanalysis and neurobiology*. Ed. by Reiser MF, New York, Basic Books, Inc. 161~185 (1984)

Seong HM, Lee JS, Kim WS, Lee HS, Yoon YR and Shin, TM. The Analysis of mental stress using time-frequency analysis of heart rate variability signal. *J. Biomed. Eng. Res.* 25(6), 581-587 (2004)

Task force of the European society of cardiology and the North American society of pacing and electrophysiology. *Heart rate variability: standards of measurement, physiological interpretation, and clinical use*. *European Heart J.* 17: 354-381 (1996)

Warburton DM. Smoking within reason. *J. Smoking-related disorders*. 3: 55-59 (1992)

## 제 5 장 스트레스 해소에 관한 동물실험

스트레스란 개인으로 하여금 적응에의 요구를 강요하는 신체적 또는 심리적인 압박 상태를 말한다. 스트레스는 일상에 만연 되어 있는 요소로 유발되며 거의 모든 정신과적 질환과 의학적 질병의 발생에 기여한다. 하지만 이에 성공적으로 대처하지 못하고 스트레스라고 인지되면 우울, 불안, 피로, 분노, 기분변화와 같은 심리반응이 초래되고, 뇌파 중  $\alpha$  파감소, 혈압과 맥박수의 증가 등의 생리 반응이 초래 하게 되는데 이러한 반응이 계속 반복 되면 질병이 나타나고 개인, 가족 그리고 사회적 손실을 야기하며, 개인의 삶의 질을 낮추는 원인이 된다 (Trask, 2004). 지금까지 스트레스를 치유하기 위하여 진정제, 수면제 투여, 호르몬 요법 등 많은 약물 요법이 연구되고 있으나 이러한 약물요법은 장기간 사용 시 약물에 대한 내성 및 부작용의 위험이 있어 지속적 이용이 불가능하기 때문에 부작용이 없는 간단하고 효과적인 방법이 요구 되고 있다 (Clark 등, 1986; Nilsson, 1990; Fish, 1991). 호두는 널리 재배되는 낙엽수로 높이 20 m 가량 자라고 4-5월에 꽃이 피어 9월경에 열매가 익고 푸른 외피에 단단한 종자가 안에 들어 있다. 한방에서는 속씨를 호도인이라고 하며 자양, 강장, 진해, 보신고정, 온폐, 진천, 윤장의 효능이 있고 신허천수, 요통, 양위, 유정, 비뇨, 대변조절을 치료하고 즐기껍질을 호두수피라고 하며, 살충, 하리, 음낭의 피부염, 소양증을 치료하며 잎을 호도열이라고 하며 살충해독이 있고 백대하, 개선, 하지 상피증을 치료한다. 호두에는 시트룰린, 주글론, 비타민 C, 즐기껍질에는 시토스테롤, 레투린, 탄닌, 잎에는 엘리직 아시드, 리모네네, 주글론, 주그라닌, 히페린 등이 함유되어 있다. 호두에는 일명 당추자라고 하는데 예로부터 자양강장에 좋은 식품으로 알려져 있고 양질의 단백질과 불포화 지방산이 들어 있을 뿐만 아니라 비타민, 미네랄, 등도 풍부하여 머리를 좋게 하고 살결을 곱게 해주며 두발을 검게 해주는 효능이 있다고 알려져 있다. 호두는 알칼리성 식품으로 냉한 성질을 가지고 있으며 ‘동의보감’에는 호두가 살을 찌게하고 몸을 튼튼하게 하며 피부를 윤택하게 하며 머리털을 검게 하고

기혈을 보호하여 하초명문을 보한다고 기록되어 있고, ‘본초 강목’에는 호두가 기를 보호하고 혈을 기른다. 조를 윤하게 해주고 담을 없애 주며 수염과 머리카락을 윤택하게 해주며 중독을 풀어 버린다고 기록되어 있고 호두가 폐를 오나게 하고 장을 윤하게 해준다. 또한 천식, 요통, 심복의 모든 통증을 다스린다고 기록되어 있다. 호두는 영양가가 높고 리놀산, 리놀렌산, 올레인산 함유가 높기 때문에 콜레스테롤을 제거하는데도 도움이 되며 혈관의 노화를 방지하기 때문에 동맥경화, 고혈압, 신장병이 있는 사람에게도 좋다고 알려져 있다. 호두는 기원전 63년 독과 전염병 예방약으로서 호두를 처방해 주었다는 기록이 있을 정도로 오래전부터 호두를 이용하였다 (Aibaenezhad 등, 2003; 깬 등, 2004; Fukuda 등, 2004; Chauhan 등, 2004; Blomhoff 등, 2006). 연자육은 저수지에서 많이 볼 수 있는 연꽃의 종자로서, 비장의 기능을 튼튼히 하고 신장에 기를 더하여 정기를 견고히 하며 정신을 안정시키는 효능이 있는 약재이다 (Mukherjee 등, 1996, 1997; Ling 등, 2005; Lim 등, 2006). 주로 비장이 허약한 증상에 많이 사용되며, 정액이 자기도 모르는 사이에 나오는 증상을 치료하고 가슴이 마구 뛰고 불면증의 증상을 치료한다고 알려져 있으나 실질적인 증명 실험은 많지 않은 상황이다. 이에 본 연구에서는 호두 및 연자 추출물이 스트레스에 의한 코티코스테론의 혈중 농도를 억제하며, 스트레스의 지표물질인 노르에피네프린의 대사산물인 MHPG-SO<sub>4</sub>의 뇌조직내 농도를 효과적으로 억제하며, 뇌에서 감정 및 심리 변화와 관계가 있는 편도체에서 신경세포활성 표지인자인 c-fos의 발현을 효과적으로 억제하는 것을 확인하였다.

## 제 1 절 스트레스 유발 실험 실시

호두, 연자육, flabeau 추출물의 스트레스 해소 효과를 확인하기 위하여 사회·심리적 스트레스 측정용 장치는 크기가 64×64×40 cm로서 16 개의 작은 방(16×16 cm)으로 되어 있고, 그 중에서 사선으로 표시된 8 개의 방바닥에 1.3 cm 간격으로 직경 0.5 cm 굵기의 동선을 깔고 foot

shock으로 전기적 충격을 부하할 수 있도록 전기장치(Tech. Serv. Inc. Japan)에 연결되도록 설계하였다. 이들 16 개의 방 사이에는 투명한 플라스틱으로 설치하여 foot shock에 의한 전기적 충격을 방지할 수 있도록 설치했다. 전기적 foot shock은 2.0 mA의 전류를 10 초 동안 진행되며 120 초 간격으로 다시 foot shock이 부하되도록 설계되어 있다. 매일 10시부터 실험동물마다 1 시간의 foot shock이 부하된다. 실험동물은 체중 25 - 30 g의 수컷 ICR 마우스 (대한바이오링크, 대한민국) 40 마리를 사용하였고, 오전 7시부터 오후 7시까지 빛을 가하는 일정한 명암주기 하에서 온도  $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$ , 상대습도  $55 \pm 10\%$ 에서 사육하였으며, 음식과 물은 자유로이 섭취하게 하였다. 이들 Communication box를 사용하여 사회·심리적 스트레스를 부하하기 위해서는 실험동물을 다음과 같이 세 그룹으로 구분하여 스트레스 부하실험을 실시하였다. 하나는 스트레스를 전혀 유발하지 않은 군이며, 다른 하나는 스트레스를 유발하되, 호두 및 연자육 추출물을 녹인 용매를 투여한 군이며, 나머지 한 군은 스트레스를 유발하되, 상기 실시예 1에서 얻은 호두 및 연자육 추출물을 녹여 투여한 군으로, 28 일간 스트레스를 유발 한 다음 28 일째 되는 날에 동물을 희생하였다.

## 제 2 절 혈장 코르티코스테론 수치 측정을 통한 스트레스 해소 효과

스트레스 유발을 직후 혈액을 얻어 원심분리를 통해 혈장을 분리한 다음, 혈장 1.0 ml을 석유에테르의 3 배의 양으로 30 초간 격렬하게 흔들어 준 다음, 원심분리 후 용매층은 버린다. 정제된 혈장을 증류수 5.0 ml로 희석시킨 후, 원심분리용 튜브에 15.0 ml의 메틸렌 클로라이드(methylene chloride)로 30 초간 흔들면서 추출시킨다. 추출액을 0.1N NaOH 용액 1.0 ml을 담은 튜브에 첨가한 후 빠른 시간 내 흔들어주고 원심분리한다. 원심분리 후 알칼리층은 버리고 메틸렌 클로라이드의 10.0 ml을 30N 황산 2.0

ml을 담은 튜브에 넣는다. 약 30초간 흔들어주고 1~2 분간 원심분리 후 상층 용매층은 버리고 하층 2.0 ml을 가지고 30~90 분간 실온에 방치한 후 excitation 470 nm, emission 530 nm에서 측정한다. 코르티코스테론 표준용액은 코르티코스테론 20 mg을 5.0 ml 에탄올에 녹인 후 증류수 1,000 ml로 희석시킨 후 0.1~0.5 µg의 사이에서 표준검량선에 의해 위의 과정에 의해 코르티코스테론의 함량(µg/dl plasma)을 정량하였다 (Chattopadhyay 등, 1971; Gross 등, 1972). 각 실험군에서 코르티코스테론 정량 결과를 Fig.1 에 표시하였다. 그 결과 호두 추출물, 연자 추출물, flabeau 추출물 투여군 모두에서 혈중 코르티코스테론의 함량을 유의적으로 억제하는 것을 확인할 수 있었다 (표 1).

표 1. 코르티코스테론의 함량에 미치는 스트레스 해소 추출물의 영향

구	분	코르티코스테론의 함량 (µg/dl plasma)	대 비 (%)
심리적 스트레스 부하그룹 (psychological stress)		24.12±1.12	100.0%
스트레스 해소 추출물 투여군			
호두 추출물 투여그룹 (0.5% extract)		17.11±2.45	70.9
연자 추출물 투여그룹 (0.5% extract)		15.43±2.93	64.0
Flabeau 추출물 투여그룹 (0.5% extract)		15.99±3.23	66.3

☞ Mean±SD with 10 mice per group.

### 제 3 절 뇌조직에서 MHPG-SO<sub>4</sub>의 측정을 통한 스트레스 해소 효과

뇌조직에서 MHPG-SO<sub>4</sub>의 정량을 위해서 스트레스 실험 28 일째에 티오펜탈 소듐(thiopental sodium, 유한양행, 한국)을 체중 kg 당 각각 40 mg의 용량으로 복강 내 주사하여 마취시킨 다음 뼈절단기를 이용하여 머리뼈공간을 열어 뇌를 적출하였다. 뇌조직은 0.1% 메타비스황산나트륨(Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>5</sub>)을 포함한 0.2N 황산 4.0 ml로 저온실에서 마쇄한 후 8000×g에서 5 분간 원심분리하였다. 시료는 0.3N 수산화바륨용액을 pH 6.0~6.5로 조정 한 다음, 모든 시료는 증류수로 동일한 양으로 표준화하였다. 다시 8000×g에서 10 분간 원심분리한 후 상층액은 캡튜브에 옮긴 다음, 실험 전까지 -45℃에 저장하였다. MHPG-SO<sub>4</sub>의 측정을 위한 파이렉스 칼럼(pyrex column; 직경 6 mm, 높이 25 cm)은 유리솜(glass wool)으로 막고 정확히 6.0 cm의 높이에 DEAE sephadex A-25로 채웠다. MHPG-SO<sub>4</sub>는 0.1%메타비스황산나트륨을 포함한 0.4N PCA의 2.0 ml로써 칼럼으로부터 추출하였다. MHPG-SO<sub>4</sub>의 분리 즉시 0.2% 시스테인의 0.1 ml와 70% PCA의 0.1 ml을 첨가한 후 이들 반응혼합물을 90~95℃에서 25 분간 수조 속에서 끓였다. 이때 blank의 경우는 가열처리의 과정 없이 첨가하였다. 그 후 에틸렌디아민(ethylenediamine)의 0.3 ml을 첨가한 후 모든 시료는 5 분간 열탕수조(hot bath)속에 넣은 다음, 냉각시켰다. MHPG-SO<sub>4</sub>의 형광물질 (fluorescence)은 excitation 325 nm, emission 465 nm에서 측정하였다 (Roffman 등, 1979; Kohno 등, 1981). MHPG-SO<sub>4</sub> 표준용액(100 µg/ml)은 0.5% 메타비스황산나트륨(Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>5</sub>) 농도로써 준비하여 표준검량선에 따라 위의 과정에 의해 MHPG-SO<sub>4</sub> (ng/g brain)의 함량을 정량하였다. 각 동물에서 MHPG-SO<sub>4</sub> 정량 결과를 표 2에 표시하였다. 심리적 스트레스 유발군을 기준으로 해서 본 실험에 사용한, 호두 추출물, 연자 추출물, flabeau 추출물 투여군을 비교하여 보면, 심리적 스트레스 부하군에 비해 호두, 연자, flabeau를 투여한 군 모두에서 MHPG-SO<sub>4</sub>의 함량이

유의적으로 감소하는 것을 확인할 수 있었으며, 특히 flabean 추출물 투여군에서 매우 큰 효과를 보이는 것을 확인할 수 있었다.

표 2. MHPG-SO<sub>4</sub>의 함량에 미치는 스트레스 해소 추출물의 영향

구 분	MHPG-SO <sub>4</sub> 의 함량 (ng/g brain)	대 비 (%)
심리적 스트레스 부하군 (psychological stress)	165.3±11.1	100.0%
호두 추출물 투여그룹 (0.5% extract)	146.1±8.3	88.4%
연자 추출물 투여그룹 (0.5% extract)	138.3±9.9	83.7
Flabean 추출물 투여그룹 (0.5% extract)	129.1±12.7	78.1

☞ Mean±SD with 10 mice per group.

## 제 4 절 호두, 연자 또는 Flabean 추출물의 위장장애 개선효과

호두 추출물, 연자 추출물, flabean 추출물 투여군 모두에서 위장장애를 나타내지 않았으며, 심리적인 스트레스를 유발한 군의 경우 일부 출혈소견이 보이긴 하였으나, 심한 소견을 보이진 않았음 (Fig 1). 이러한 원인은 본 연구에서 가한 스트레스가 매일 지속적인 스트레스이며, 매우 짧은 시간에 유발된 것이기 때문인 것으로 생각되었다.



Fig 1. 스트레스 유발 후 위조직의 소견으로 정상과 유사한 소견을 보이고 있음.

## 제 5 절 뇌조직에서 c-fos 염색을 통한 스트레스 해소 효과

스트레스 유발동물을 티오펜탈 소듐(Thiopental sodium, 유한양행, 한국)을 체중 kg 당 각각 30 mg의 용량으로 복강 내 주사하여 마취시킨 다음, 1,000 ml 당 헤파린 1,000 IU를 함유한 4 °C의 생리식염수를 좌심실로 주입하여 관류 세척하였다. 관류 세척이 끝난 동물은 바로 4°C의 4% 파라포름알데하이드(in 0.1 M phosphate buffer; PB, pH 7.4)로 관류 고정을 하였다. 관류 고정이 끝난 동물을 뼈절단기를 이용하여 머리뼈공간을 열어 뇌를 적출한 다음, 동일 고정액에서 6 시간 동안 후고정하였다. 후고정이 끝난 뇌는 30% 슈크로스 용액(in 0.1 M phosphate buffer)에 넣어 바닥에 가라앉을 때까지 침강 시킨 후, 슬라이드 마이크로톰(sliding microtome, Reichert-Jung, Germany)으로 조직을 30 $\mu$ m 두께로 잘라 보존액(storing solution)이 들어있는 6웰 플레이트에 넣어 사용시까지 4°C에서 보관하였다. 각 조직절편 중에서 편도체(amygdala)가



잘 나와 있는 조직을 선택하였고, 조직에 묻어있는 보존액을 세척하기 위해 0.01M PBS로 10분씩 3회 세척한 다음, 면역조직화학염색을 실시하였다. 우선 비특이적인 반응을 억제하기 위해 5% normal goat serum으로 처리를 한 다음 1차항체인 rabbit anti-c-fos IgG (1:1,000, Calbiochem, USA)를 희석한 후에 24시간 반응시켰다. 반응이 끝난 조직은 0.01M PBS로 3회 세척을 한 다음 2차항체인 goat anti-rabbit IgG (vector, USA)로 2시간 반응을 하였으며, 이후 0.01M PBS로 3회 세척을 한 다음 ABC kit (Vector, USA)로 반응시킨 다음 DAB를 기질로 하여 발색을 실시하고 일반적인 탈수 및 청명화 과정을 거쳐 봉입한 후 관찰을 실시하였으며, 가장 일반적인 부분을 골라 악시오캠(Axiocam, Carl Zeiss, Germany)이 달려있는 악시오엠1 현미경 (AxioM1, Carl Zeiss, Germany)로 사진 촬영을 실시하여 Fig 2 와Fig. 3에 나타내었다.

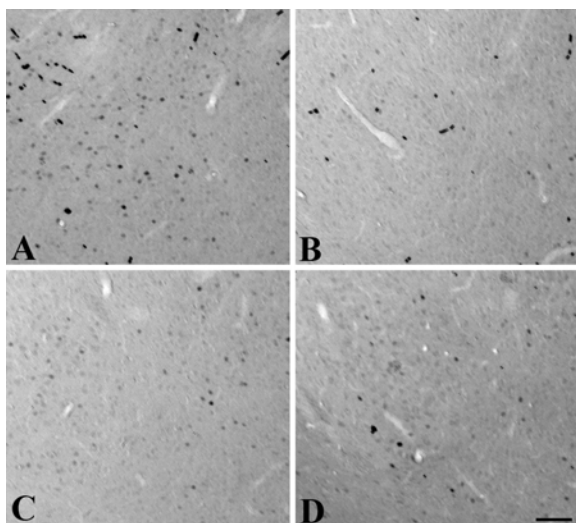


Fig. 2. 스트레스를 유발한 후에 용매 (A), 호두 (B), 연자 (C), flabeau (D)을 투여한 후 c-fos에 대한 면역조직화학염색을 실시한 사진.

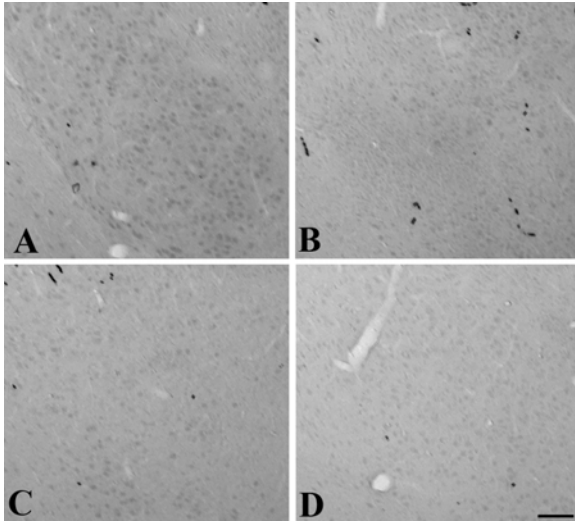


Fig. 3. 스트레스를 유발한 후에 용매 (A), 호두 (B), 연자 (C), flabeau (D)을 투여한 후 c-jun에 대한 면역조직화학염색을 실시한 사진.

용매만을 먹인 스트레스 유발군에서 c-fos 면역반응을 보인 세포가 다수 관찰되었다. 그러나 호두, 연자육 또는 호두/연자육 추출 혼합물을 먹인 군에서는 c-fos의 면역반응이 급격히 감소하는 것을 확인할 수 있었으며, 특히 호두/연자육 추출 혼합물을 투여한 군에서 c-fos 면역반응이 급격하게 감소하여 c-fos 면역반응이 거의 사라지는 것을 확인할 수 있었다.

## 제 6 절 호두, 연자육, 연근, 호두/연자육 추출물의 시제품 제조

호두, 연자육, 연근, 호두/연자육 추출물이 구급스트레스로 인해서 유도되는 위장관 질환 및 혈중 corticosterone, MHPG-SO<sub>4</sub>의 농도를 유의적으로 감소시키는 것을 확인한 결과를 토대로 본 연구진은 사람 및 동물에서 이들 혼합물 및 시제품이 효능이 있는지를 확인하기 위해 시제품을 제작하였다 (Fig. 4). 플라시보(placebo) 효과에 대한 대조군을 설정하기 위해 대조물질로는 옥수수전분을 사용하였으며, 호두추출물 (Sw), 연자육추출물(Ss), 연근추출물(Sr), 호두/연자육 추

출혼합물(Rr)을 만들어 동물실험은 직접 실시하였으며, 사람을 대상으로 한 임상실험을 위한 시료는 한국식품연구원에 공급하였다.



Fig. 4. 시제품 제작. 대조물질로는 옥수수전분(Co-100)을 사용하였으며, 호두추출물 (Sw-100), 연자육추출물(Ss-100), 연근추출물(Sr-100), 호두/연자육 추출혼합물 (Rr-100)

## 제 7 절 시제품의 혈장 코르티코스테론 억제효과 확인

스트레스 유발을 직후 혈액을 얻어 원심분리를 통해 혈장을 분리한 다음, 혈장 1.0 ml을 석유에테르의 3 배의 양으로 30 초간 격렬하게 흔들어 준 다음, 원심분리 후 용매층은 버린다. 정제된 혈장을 증류수 5.0 ml로 희석시킨 후, 원심분리용 튜브에 15.0 ml의 메틸렌 클로라이드(methylene chloride)로 30 초간 흔들면서 추출시킨다. 추출액을 0.1N NaOH 용액 1.0 ml을 담은 튜브에 첨가한 후 빠른 시간 내 흔들어주고 원심분리한다. 원심분리 후 알칼리층은 버리고 메틸렌 클로라이드의 10.0 ml을 30N 황산 2.0

ml을 담은 튜브에 넣는다. 약 30초간 흔들어주고 1~2 분간 원심분리후 상층용매층은 버리고 하층 2.0 ml을 가지고 30~90 분간 실온에 방치한 후 excitation 470 nm, emission 530 nm에서 측정한다. 코르티코스테론 표준 용액은 코르티코스테론 20 mg을 5.0 ml 에탄올에 녹인 후 증류수 1,000 ml로 희석시킨 후 0.1~0.5 µg의 사이에서 표준검량선에 의해 위의 과정에 의해 코르티코스테론의 함량(µg/dl plasma)을 정량하였다 (Chattopadhyay 등, 1971; Gross 등, 1972). 각 실험군에서 코르티코스테론 정량 결과를 Fig.5 에 표시하였다. 스트레스만을 유도한 동물에서 코르티코스테론 함량은 24.12 µg/dl로 관찰되었으며, 호두추출물, 연자육 추출물, 호두 및 연자육 추출혼합물을 투여하는 경우 혈중 코르티코스테론 함량이 유의적으로 감소한 것을 확인하였으며, 특히 호두 및 연자육 추출혼합물을 투여한 경우 14.41 mg/dl로 관찰되어 호두/연자육 추출물이 혈중 코르티코스테론의 함량을 가장 크게 감소시키는 것을 확인할 수 있었다.

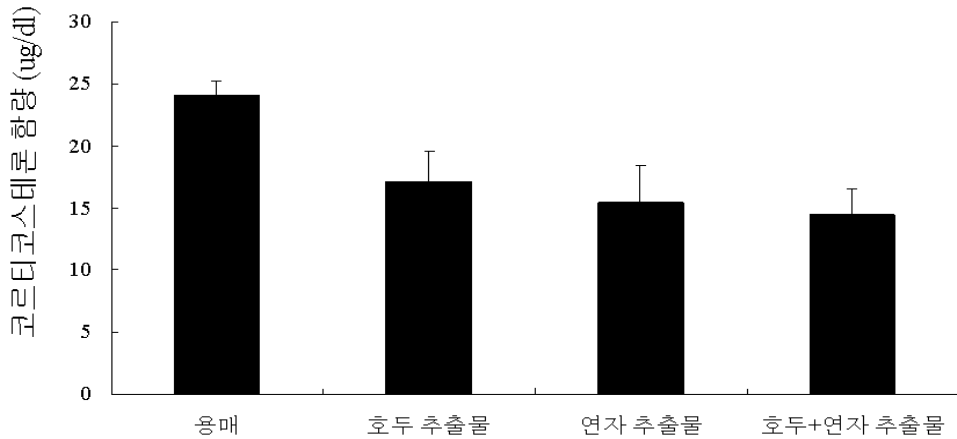


Fig. 5 스트레스 해소 추출물에 따른 코르티코스테론(corticosterone) 함량의 영향

## 제 8 절 시제품의 뇌조직에서 MHPG-SO<sub>4</sub> 감소효과

뇌조직에서 MHPG-SO<sub>4</sub>의 정량을 위해서 스트레스 실험 28 일째에 티오펜탈 소듐(Thiopental sodium, 유한양행, 한국)을 체중 kg 당 각각 40mg의 용량으로 복강 내 주사하여 마취시킨 다음 뼈절단기를 이용하여 머리뼈공간을 열어 뇌를 적출하였다. 뇌조직은 0.1% 메타비스황산나트륨(Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>5</sub>)을 포함한 0.2N 황산 4.0 ml로 저온실에서 마쇄한 후 8000×g에서 5 분간 원심분리하였다. 시료는 0.3N 수산화바륨용액을 pH 6.0~6.5로 조정한 다음, 모든 시료는 증류수로 동일한 양으로 표준화하였다. 다시 8000×g에서 10 분간 원심분리한 후 상층액은 캡튜브에 옮긴 다음, 실험 전까지 -45℃에 저장하였다. MHPG-SO<sub>4</sub>의 측정을 위한 파이렉스 칼럼(pyrex column; 직경 6 mm, 높이 25 cm)은 유리솜(glass wool)으로 막고 정확히 6.0 cm의 높이에 DEAE sephadex A-25로 채웠다. MHPG-SO<sub>4</sub>는 0.1%메타비스황산나트륨을 포함한 0.4N PCA의 2.0 ml로써 칼럼으로부터 추출하였다. MHPG-SO<sub>4</sub>의 분리 즉시 0.2% 시스테인의 0.1 ml와 70% PCA의 0.1 ml를 첨가한 후 이들 반응혼합물을 90~95℃에서 25 분간 수조 속에서 끓였다. 이때 blank의 경우는 가열처리의 과정 없이 첨가하였다. 그 후 에틸렌디아민(ethylenediamine)의 0.3 ml를 첨가한 후 모든 시료는 5 분간 열탕수조(hot bath)속에 넣은 다음, 냉각시켰다. MHPG-SO<sub>4</sub>의 형광물질(fluorescence)은 excitation 325 nm, emission 465 nm에서 측정하였다. MHPG-SO<sub>4</sub> 표준용액(100 µg/ml)은 0.5% 메타비스황산나트륨(Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>5</sub>) 농도로써 준비하여 표준검량선에 따라 위의 과정에 의해 MHPG-SO<sub>4</sub> (ng/g brain)의 함량을 정량하였다. 각 동물에서 MHPG-SO<sub>4</sub> 정량 결과를 Fig. 6에 표시하였다. 스트레스만을 유도한 동물에서 MHPG-SO<sub>4</sub> 함량은 165.3 ng/g으로 관찰되었으며, 호두추출물, 연자육 추출물, 호두 및 연자육 추출혼합물을 투여하는 경우 뇌조직에서의 MHPG-SO<sub>4</sub> 농도는 유의적으로 낮게 나타났다. 호두 추출물을 투여한 군에서는 146.1 ng/g, 연자육추출물을 투여한 군에서는 138.3 ng/g으로

관찰되었으며, 특히 호두 및 연자육 추출물을 투여한 군에서는 114.3 ng/g을 확인하여 스트레스로 인한 MHPG-SO<sub>4</sub> 농도를 증가를 유의적으로 감소시키는 것을 확인할 수 있었다.

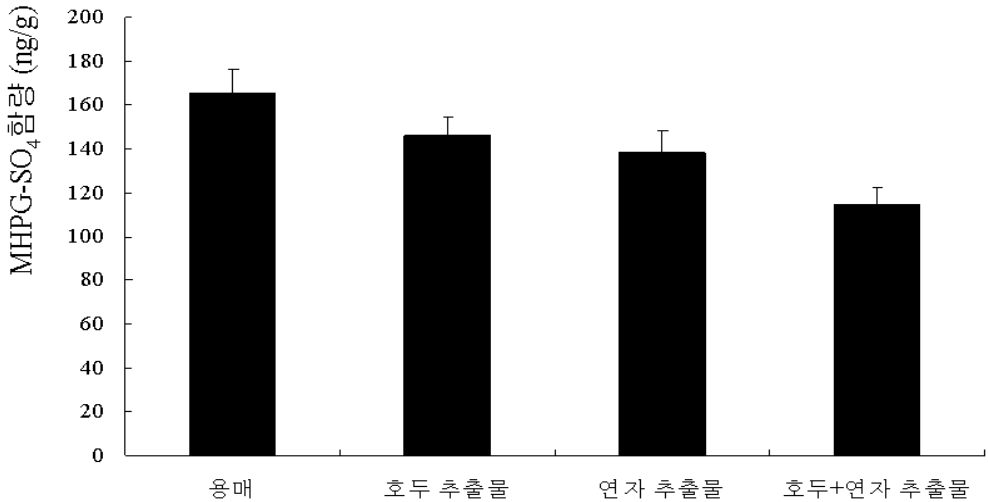


Fig. 6 스트레스 해소 추출물이 MHPG-SO<sub>4</sub>의 함량 영향

## 제 9 절 시제품의 위장장애 개선효과

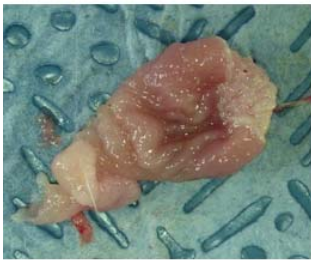
호두, 연자육, 연근, 호두/연자육 추출물이 스트레스로 인하여 유발되는 위장관의 발적 및 장애에 어떠한 영향을 미치는지 확인하기 위해 동물에 적어도 3주 이상의 구급스트레스를 유발하면서 이들 물질을 경구로 지속적으로 급여하였다. 그 결과 용매를 투여한 군 (control)의 경우 위벽의 발적이 유발되었다. 그러나 호두 (Sw), 연자육 (Ss), 연근(Sr), 호두/연자육 추출물(Rr)을 투여한 결과 위벽의 발적이 유의적으로 감소하는 것을 확인할 수 있었다 (그림 7).



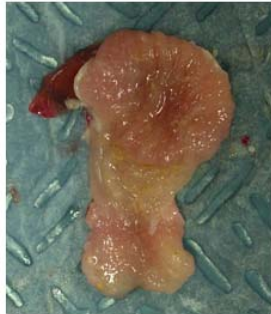
**Control**



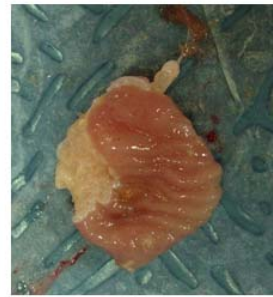
**Rr**



**Sr**



**Ss**



**Sw**

Fig. 7. 스트레스 유발 후 위조직의 소견.

## 제 10 절 참고문헌

- Blomhoff R, Carlsen MH, Andersen LF, Jacobs DR Jr. Health benefits of nuts: potential role of antioxidants. *Br J Nutr.* 96 Suppl. 2:S52-S60 (2006).
- Chauhan N, Wang KC, Wegiel J, Malik MN. Walnut extract inhibits the fibrillization of amyloid beta-protein, and also defibrillizes its preformed fibrils. *Curr Alzheimer Res.* 1: 183-188 (2004).
- Clark WC, Yang JC, Janal MN. Altered pain and visual sensitivity in humans: the effects of acute and chronic stress. *Ann N Y Acad Sci.* 467: 116-129 (1986).
- Fish DN. Treatment of delirium in the critically ill patient. *Clin Pharm.* 10: 456-466 (1991).
- Fukuda T, Ito H, Yoshida T. Effect of the walnut polyphenol fraction on oxidative stress in type 2 diabetes mice. *Biofactors.* 21: 251-253(2004).
- Kohno Y, Tanaka M, Nakagawa R, Toshima N, Nagasaki N. Regional distribution and production rate of 3-methoxy-4-hydroxyphenylethyleneglycol sulphate (MHPG-SO<sub>4</sub>) in rat brain. *J Neurochem.* 36: 286-289 (1981).
- Lim SS, Jung YJ, Hyun SK, Lee YS, Choi JS. Rat lens aldose reductase inhibitory constituents of *Nelumbo nucifera* stamens. *Phytother Res.* 20: 825-830 (2006).
- Ling ZQ, Xie BJ, Yang EL. Isolation, characterization, and determination of antioxidative activity of oligomeric procyanidins from the seedpod of *Nelumbo nucifera* Gaertn. *J Agric Food Chem.* 53: 2441-2445 (2005).
- Mukherjee PK, Das J, Saha K, Giri SN, Pal M, Saha BP. Antipyretic activity of *Nelumbo nucifera* rhizome extract. *Indian J Exp Biol.*



- 34: 275-276 (1996).
- Mukherjee PK, Saha K, Pal M, Saha BP. Effect of *Nelumbo nucifera* rhizome extract on blood sugar level in rats. *J Ethnopharmacol.* 58: 207-213 (1997).
- Nilsson A. Autonomic and hormonal responses after the use of midazolam and flumazenil. *Acta Anaesthesiol Scand Suppl.* 92: 51-54 (1990).
- Roffman M, Reigle T, Orsulak P, Cassens G, Schildkraut JJ. Further studies of the effects of morphine on the levels of MHPG-SO<sub>4</sub> in rat brain. *Neuropharmacology.* 18: 483-487 (1979).
- Ros E, Nunez I, Perez-Heras A, Serra M, Gilabert R, Casals E, Deulofeu R. A walnut diet improves endothelial function in hypercholesterolemic subjects: a randomized crossover trial. *Circulation.* 109: 1609-1614 (2004).
- Trask PC. Quality of life and emotional distress in advanced prostate cancer survivors undergoing chemotherapy. *Health Qual Life Outcomes.* 2: 37(2004).
- Zibaenezhad MJ, Rezaiezadeh M, Mowla A, Ayatollahi SM, Panjehshahin MR. Antihypertriglyceridemic effect of walnut oil. *Angiology.* 54: 411-414(2003).

# 제 5 장 마테차의 스트레스 완화효과에 대한 연구

## 1. 연구대상자

- 1) 만 20~30대의 남녀
- 2) 스트레스 상태에 있는 자
- 3) 임신하지 않은 자
- 4) 현재 신체적, 정신적 질병으로 치료를 받거나 약물을 복용하지 않는 자
- 5) 이 연구에 참여하기를 동의하는 자

## 2. 연구방법

### (1) 예비검사

자원한 20~30대의 남녀를 대상으로 SA3000P를 이용하여 스트레스 검사를 실시하고 그 결과 스트레스 상태에 있는 사람을 선별하였다. 이때 이상 심박동수가 5 회 이상 보이는 자원자는 재검사를 실시하였으며 재검에서도 이상 심박동수가 5 회 이상 나타나는 등 실험에 부적합하다고 판단되는 자원자는 제외시켰다.

### (2) 사전검사

예비검사에서 스트레스 상태에 있다고 선별된 남녀를 대상으로 총 3 회의 스트레스 검사를 실시하였으며 1 회 검사일과 3 회 검사일 간격은 최소 2 주 이상으로 실시하였다. 3회의 스트레스 검사를 토대로 스트레스 상태를 유지하고 있으면서 이상 심박동수가 5 회 이상 나타나지 않는 등 실험에 적합하다고 판단되는 자를 최종 연구대상자로 선정하였다.

### (3) 실험처치

사전검사에서 선정된 대상자에게 7 일 동안 마테차를 복용하게 하였다. 피검자에게 마테차의 음용법을 설명해주고 아침, 점심, 저녁으로 하루 3 회

섭취하게 하였다.

#### (4) 사후조사

7 일간의 마테차 섭취가 끝난 후 피검자의 스트레스 상태를 SA-3000P를 이용하여 검사하였다.

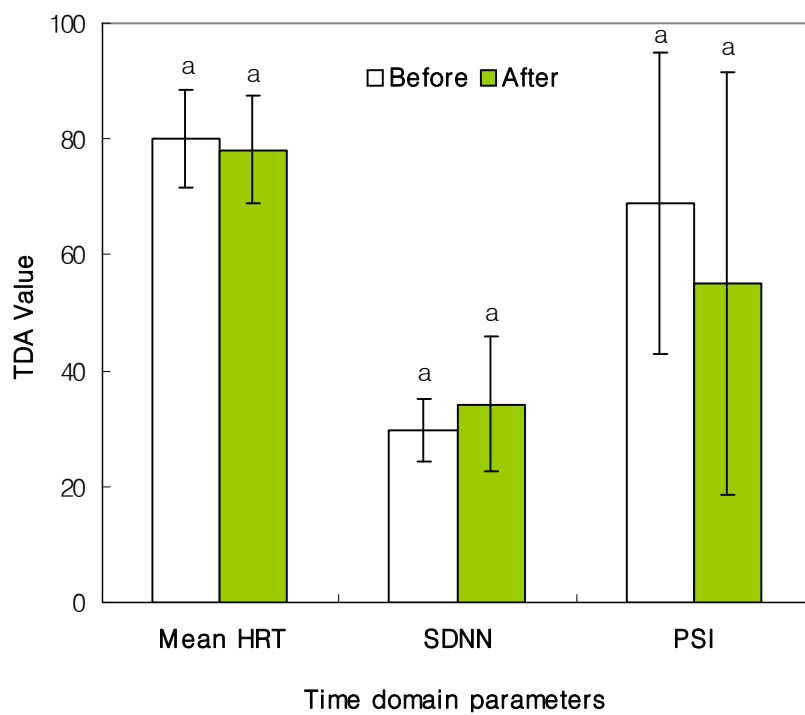
#### (5) 통계분석

본 실험의 결과에 대한 자료분석은 SPSS Win 10.0 통계프로그램을 이용하였다. 통계분석에서는 선정된 연구대상자 17 명 중에서 마테차에 대한 상이한 거부반응으로 구토 증상을 일으킨 1명의 대상자를 제외시켰으며, 감기의 발병으로 약물을 섭취한 1 명과 마테차 섭취 분량을 제대로 지키지 않은 자 또는 개인적 사정 등에 의한 6 명을 제외시켰다.

### 3. 결과

마테차가 스트레스 완화에 미치는 영향에 대한 실험 결과는 다음의 Fig. 1-4 및 Table 1과 같다. 본 실험에서는 유의적인 차이는 보이지 않았지만 SDNN이 마테차 섭취 전 31.33에서 마테차 섭취 후 37.56으로 상승하였고, TP는 780.72에서 1042.25로 증가하였다. 또한 평균 심박동수가 마테차 섭취 전 78.89에서 마테차 섭취 후 76.11로 감소하였고 PSI가 62.60에서 46.60으로 감소하였다.

이는 자율신경 활성화도에 영향을 미친다고 판단되는 부분이며 항상성 조절 메커니즘의 향상을 의미하는 것으로 사료되었다. 더 나아가 스트레스 이완에 대한 효과를 내포하는 것으로 판단되었다.



**Fig. 1. Change of time domain analysis value before and after drinking mate tea**

Mean±SD of 17 panelists.

<sup>a</sup>Same superscripts within an item indicate no significant differences( $P>0.05$ ).

**Table 1. Change of Frequency domain analysis value before and after drinking mate tea**

FDP	Drinking mate tea(N= 17)	
	Before	After
TP(ms <sup>2</sup> )	701.38±244.06 <sup>a</sup>	948.46±419.59 <sup>b</sup>
LF(ms <sup>2</sup> )	199.31±109.64 <sup>a</sup>	309.03±259.81 <sup>a</sup>
HF(ms <sup>2</sup> )	104.23±80.75 <sup>a</sup>	159.56±112.60 <sup>a</sup>
LF/HF	3.02±1.65 <sup>a</sup>	3.26±3.82 <sup>a</sup>

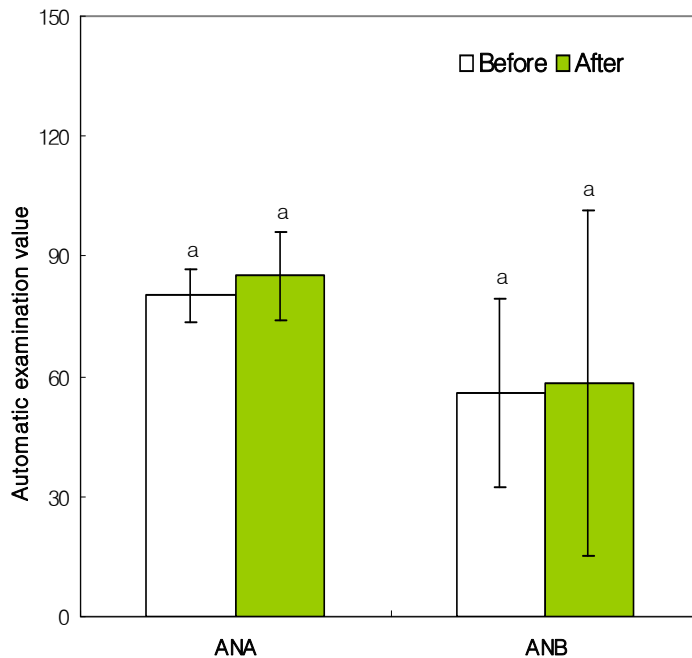
Mean±SD of 17 panelists.

<sup>ab</sup>Different superscripts within an item indicate significant differences(P< 0.05).

<sup>a</sup>Same superscripts within an item indicate no significant differences(P> 0.05).

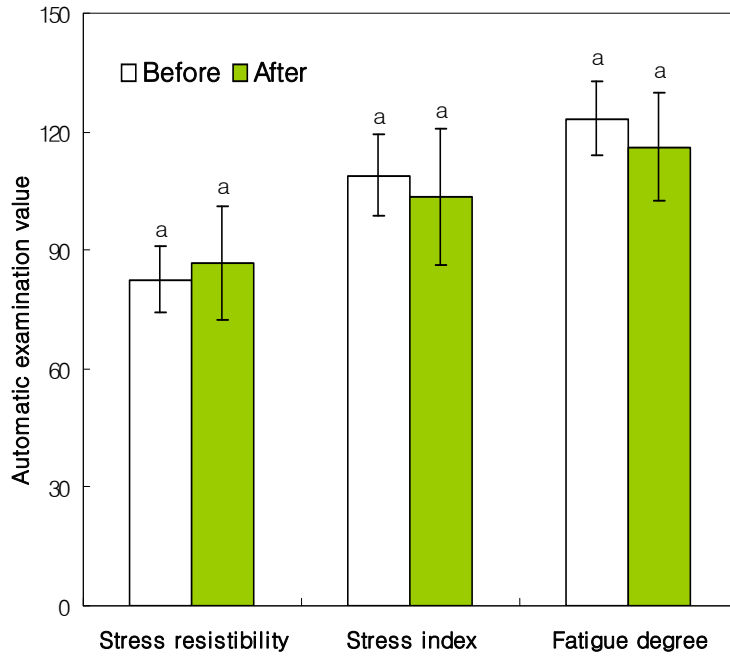
자동검진 결과 항목에서 스트레스 저항도가 마테차 섭취 전 85.22에서 마테차 섭취 후 91.00으로 증가하였는데 이는 스트레스 저항도 상태가 나쁨의 범위에서 정상 범위로 변화되었음을 의미한다. 스트레스 저항도는 환경의 변화 또는 스트레스에 대해 인체가 적절하게 적응하여 안정된 상태를 유지할 능력이 있는지를 나타내는 항목으로서 이의 정상 범위로의 변화를 가져온 실험 결과는 마테차의 섭취가 스트레스에 대한 대처 능력을 향상시키는 것으로 판단되었다. 이외의 자동검진 항목에서 유의적 차이의 변화는 아니지만 자율신경 활성도와 심장 안정도의 증가 및 자율신경 균형도, 스트레스 지수, 피로도의 감소를 보여주었는데 이는 미약하나마 마테차가 스트레스 완화에 영향을 미치는 것으로 사료되었다.

이상의 결과로 살펴볼 때 본 실험에서는 마테차가 스트레스 완화에 미치는 효과가 여러 검사 항목들에서 유의적 차이는 보이지는 않았으나 스트레스 저항도의 상태가 나쁨의 범위에서 정상 범위로 변화하는 결과를 나타내었고, SDNN증가 TP의 증가와 더불어 여러 항목들이 미약하나마 스트레스 완화효과에 영향을 미치는 것으로 판단되는 바 보다 다수의 자원자를 대상으로 철저한 관리와 함께 시간 등의 변수로 작용할 수 있는 요인들을 통제하여 보다 정확한 검사가 이루어질 수 있는 여건에서 연구되어진다면 보다 명확한 효과가 나타날 것으로 기대되었다.



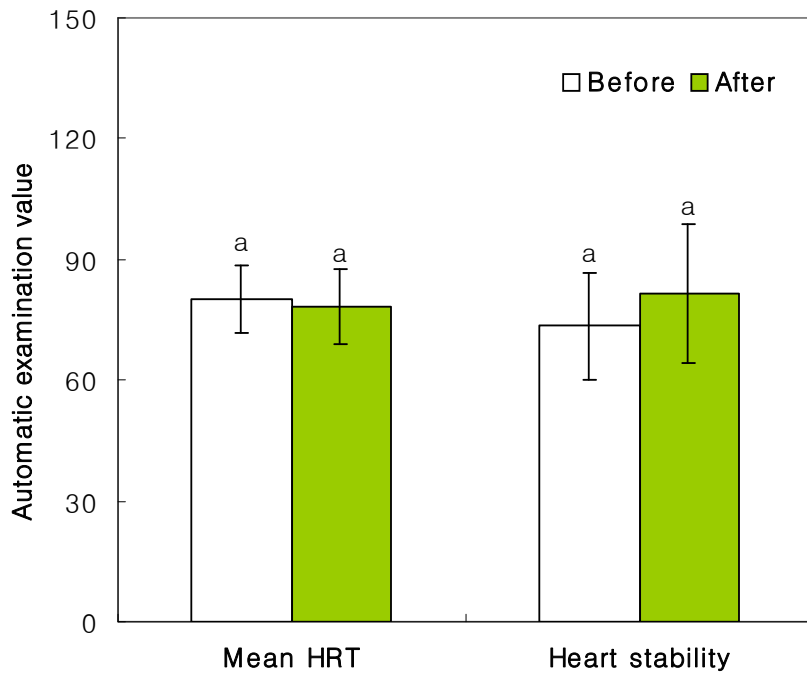
**Fig. 2. Effect of mate tea on autonomic nervous activity(ANA) and autonomic nervous balance(ANB)**

<sup>a</sup>Same superscripts within an item indicate no significant differences( $P > 0.05$ ).



**Fig. 3. Effect of mate tea on stress resistibility, stress index and fatigue degree**

<sup>a</sup>Same superscripts within an item indicate no significant differences ( $P > 0.05$ ).



**Fig. 4. Effect of mate tea on Mean HRT and heart stability**

Mean±SD of 17 panelists.

<sup>a</sup>Same superscripts within an item indicate no significant differences( $P>0.05$ ).



# 제 7 장 호두 또는 연꽃 종자 추출물의 스트레스 해소에 관한 인체시험

## 제 1 절 서론

스트레스란 개인으로 하여금 적응에의 요구를 강요하는 신체적 또는 심리적인 압박 상태를 말한다. 스트레스는 일상에 만연 되어 있는 요소로 유발되며 거의 모든 정신과적 질환과 의학적 질병의 발생에 기여한다. 하지만 이에 성공적으로 대처하지 못하고 스트레스라고 인지되면 우울, 불안, 피로, 분노, 기분변화와 같은 심리반응이 초래되고, 뇌파 중  $\alpha$  파 감소, 혈압과 맥박수의 증가 등의 생리 반응이 초래 하게 되는데 이러한 반응이 계속 반복 되면 질병이 나타나고 개인, 가족 그리고 사회적 손실을 야기하며, 개인의 삶의 질을 낮추는 원인이 된다.

지금까지 스트레스를 치유하기 위하여 진정제, 수면제 투여, 호르몬 요법 등 많은 약물 요법이 연구되고 있으나 이러한 약물요법은 장기간 사용 시 약물에 대한 내성 및 부작용의 위험이 있어 지속적 이용이 불가능하기 때문에 부작용이 없는 간단하고 효과적인 방법이 요구 되고 있다.

호두는 널리 재배되는 낙엽수로 큰 키나무 높이 20 m 가량 자라고 4-5월에 꽃이 피어 9월경에 열매가 익고 푸른 외피에 단단한 종자가 안에 들어 있다. 한방에서는 속씨를 호도인 이라고 하며 자양, 강장, 진해, 보신고정, 온폐, 진천, 윤장의 효능이 있고 신허천수, 요통, 양위, 유정, 비뇨, 대변조절을 치료하고 줄기껍질을 호두수피라고 하며, 살충, 하리, 음낭의 피부염, 소양증을 치료하며 잎을 호도잎이라고 하며 살충해독이 있고 백대하, 개선, 하지 상피증을 치료한다.

호두에는 시트룰린, 주글론, 비타민 C, 줄기껍질에는 시토스테롤. 레투린, 탄닌. 잎에는 엘리직 아시드, 리모네네, 주글론, 주그라닌, 히페린 등이 함유되어 있다. 호두에는 일명 당추자라고 하는데 예로부터 자양강장에 좋은 식품으로 알려져 있고 양질의 단백질과 불포화 지방산이 들어 있을 뿐

만 아니라 비타민, 미네랄. 등도 풍부하여 머리를 좋게 하고 살결을 곱게 해주며 두발을 검게 해주는 효능이 있다고 알려져 있다. 호두는 알칼리성 식품으로 냉한 성질을 가지고 있으며 ‘동의 보감’에는 호두가 살을 찌게 하고 몸을 튼튼하게 하며 피부를 윤택하게 하며 머리털을 검게 하고 기혈을 보호하여 하초명문을 보한다고 기록되어 있고, ‘본초 강목’에는 호두가 기를 보호하고 혈을 기른다. 조를 윤하게 해주고 담을 없애 주며 수염과 머리카락을 윤택하게 해주며 중독을 흩어 버린다고 기록되어있고, ‘본초비요’에는 호두가 폐를 오나게 하고 장을 윤하게 해준다. 또한 천식, 요통, 심복의 모든 통증을 다스린다고 기록되어 있다. 호두는 영양가가 높고 리놀산, 리놀렌산, 올레인산 함유가 높기 때문에 콜레스테롤을 제거하는데도 도움이 되며 혈관의 노화를 방지하기 때문에 동맥경화, 고혈압, 신장병이 있는 사람에게도 좋다고 알려져 있다. 호두는 기원전 63년 독과 전염병 예방약으로서 호두를 처방해 주었다는 기록이 있을 정도로 오래전부터 호두를 이용하였다.

연자육은 수련과의 연꽃(*Nelumbo nucifera Gaertner*)의 씨로서 종피를 벗겨 말린 약재(한국)를 말하며, 일본에서는 연육(蓮肉), 중국에서는 같은 식물의 씨앗을 연자(蓮子), 성숙한 씨앗 안의 건조된 어린잎과 어린뿌리를 연자심(蓮子心)이라 부르며, 예로부터 한의학에서 연자육은 불면증 치료제로 널리 사용되었다. 연자육에는 단백질, 지방 등의 주요 영양소와 비타민 C, 비타민B1, B2, 철분, 칼슘, 인, 나이아신, 아스파라긴, 구리, 망간, 넬륨빈, 라피노즈 등의 미량 성분이 고루 들어 있는 우수한 영양식품이다. 연자육에는 진정작용을 하는 플라보노이드가 많이 들어 있어 강심, 진정작용을 하며 특히 가슴이 두근거리고 수면장애를 개선시키는 작용이 강하다. 연자육은 연꽃의 성숙한 종자로서 저수지와 같은 연못에서 자라는 수생식물이다. 뿌리는 연근이라 하여 음식재료로 사용하며 관상용으로도 널리 재배되고 있다. 연자육은 옛 부터 비위를 돕고 정신과 기운 돋우며 오랫동안 섭취하면 몸이 가벼워지고 늙지 않으며 배고프지 않고 수명이 길어진다고 하여 널리 애용하던 보약재이다. 연밥의 배아(싹)는 맛이 쓰고 성질이 차서 열로 인해 가슴이 답답하고 불안한 증상에 좋으며, 신경의 피로를 회복시

켜주는 작용도 있어 신경의 불안정, 불면증, 자율신경실조 등의 예방 및 치료에 도움이 된다고 알려져 있고, 꿈이 많은 사람, 이질치료 각종 지혈작용을 하며, 불안하고 번민이 많은 사람들에게 예로부터 널리 사용되어왔다.

이와 같이 대처능을 증진시켜 개체의 항상성과 건강을 유지한다고 알려져 있고, 신경 쇠약, 불면증 등에 효과가 있다고 민간에서 사용하고 있는 호두와 한의학에서 우울증이나 불면증 개선을 목적으로 사용 되어져 왔던 연자육의 실질적 이용 효과를 알아 보기위해 인체시험을 실시하였다. tablet형태로 만든 식이 보조제를 아침, 저녁 하루 두 번 2 정을 21 일간 섭취하게 하였고, 사전검사, 사후검사를 통하여 호두의 스트레스 개선 효과를 알아보았다. 스트레스 효능 검증방법으로는 자율신경 균형 검사 (HRV ; Heart Rate Variability), 뇌파 검사 (EEG ; Electroencephalography)와 뇌파를 이용한 학습 능력 검사와 박순영(1999)이 개발한 스트레스 측정 도구를 이용하여 스트레스를 측정하였다.

건강기능식품법에 따라 인체시험에 대해서는 인체시험승인위원회의 허가를 받아야 함으로 서론이나 실험방법 등에서 본 보고서 내용과 약간 중복되는 내용이 있지만 아래에 관련 서류의 전문을 실었다.

## 제2절 인체시험계획서

- 호두 또는 연꽃 종자 추출물 섭취가 성인의 스트레스 해소에 미치는  
영향 -

2007. 3. 26

연구책임자 : 한 대 석

직 명 : 책임연구원

소 속 : 한국식품연구원

경기도 성남시 분당구 백현동 산 46-1

e-mail: imissu@kfri.re.kr

☎ 031-780-9246

H.P.

의 퇴 자 : 한국식품연구원

경기도 성남시 분당구 백현동 산 46-1

## I. 인체시험 계획에 대한 개요

1. 제목 : 호두 또는 연꽃 종자 분말 섭취가 성인의 스트레스 해소에 미치는 영향

2. 연구 목표 : HRV(심박변이도) 검사 상 스트레스 소견을 보이거나 스트레스와 정상 상태의 경계에 있으며 정상생활을 하고 있는 20세~60세의 성인 남녀에게 호두 또는 연꽃 종자 분말을 섭취하게 하여 HRV와 뇌파 검사를 통한 스트레스 해소 효과를 평가하고자 한다.

3. 시험 책임자

① 연구 책임자 : 한대석, 한국식품연구원, 책임연구원

② 공동 연구원 : 김동우, 내추럴 F&P, 공동 연구

③ 참여 연구원 : 정나라, 한국식품연구원, 위촉연구원

4. 시험 기간 : 2007년 4월 18일 ~2007년 5월 17일(30일)

6. 시험 내용 및 방법

① 대상자 : 20세 ~ 60세의 정상적인 생활을 하면서 HRV상 스트레스 소견을 보이거나 스트레스와 정상 상태의 경계에 있는 남녀 위약군 12명과 각 시험군 12명(추적손실률 5%와 순응도 80%를 포함)등 총 48명

② 시험기간 : 피험자당 3 주 예정. 분석을 위해 시험 착수일은 개인에 따라 다르며 총 시험기간은 21 일임.

③ 시 료 : 호두 또는 연꽃 종자를 주성분으로 하는 정제 및 위약

④ 측정 인자(parameters)

a. 대상자들의 스트레스 상태에 대한 문진

b. 섭취 전과 섭취 후 대상자들의 신체 계측

c. 거부반응에 대한 문진

d. HRV와 뇌파 검사를 통한 스트레스 수치 변화 관찰

e. 섭취 후 대상자들의 스트레스 상태에 관한 문진

## II. 제품의 개발 목적

스트레스란 본래 개체에 가해지는 압력이나 물리적 힘을 가리키는 것으로 물리학에서 흔히 사용되다가 인체에 적용되면서 압박감이나 근육의 긴장과 같은 신체적 반응처럼 정신과 신체간의 관계에서 예측할 수 있는 흥분상태를 의미하게 되었다. 스트레스를 개체에 부담을 주는 외적 사건이나 자극으로 보는가 하면 스트레스인자에 대한 개체의 반응으로 보기도 한다. 또한 스트레스를 사람 개체와 환경간의 상호작용에 의해서 개체가 위협받는 상태로 일컫기도 한다. 이처럼 스트레스란 용어가 오래 전부터 널리 사용되고 있음에도 불구하고 아직 일반적으로 인정될 수 있는 정의는 확립되어 있지 않다.

최근에는 스트레스를 개인에 의해 의미 있는 것으로 지각되는 외적 및 내적 자극으로 보고, 이것이 감정을 야기하고 마침내 건강과 생존을 위협하는 생리적 변화까지 일으키는 것으로 보고 있다. 국내 조사에 의하면 내과계 입원 환자들의 약 71%가 정신신체장애, 즉, 스트레스로 인해 발병되거나 기존 신체적 질병이 악화되는 경우에 해당될 정도로 상당수의 신체질환 환자들이 크고 작은 스트레스의 영향을 받고 있는 것으로 나타났다. 대부분의 정신신체장애에 있어서는 급성의 심한 충격적 스트레스보다는 오히려 만성적으로 일상적인 스트레스가 누적되어 점차 기관의 조직 및 생리에 파괴적 변화를 초래하는 것으로 보고 있다.

또한 정신신체장애 환자들은 불안 및 우울 장애와 같은 정서장애 환자들에 비해서 스트레스지각이 더 낮다. 따라서 정신신체장애환자들이 자신이 스트레스를 받고 있는 때를 잘 인식하지 못함으로써 자기도 모르게 누적된 스트레스가 신체적 질병을 일으키거나 악화시킬 가능성이 높다. 이런 정신신체장애에는 긴장성 두통, 편두통, 고혈압, 관상동맥질환, 기관지천식, 과호흡 증후군, 위 십이지장궤양, 궤양성대장염, 과민성대장증후군, 류마티스성 관절염, 신경성 피부염, 암, 월경통 등 각종 신체적 질병 및 신체증상들이 망라되어있다.

이외에 신체적 이상이 발견되지 않았음에도 불구하고 신체증상을 계속

호소하거나 실제 가지고 있는 신체적 이상의 정도에 비해 터무니없이 과장된 신체증상을 호소하는 신체형 장애가 있다. 스트레스는 이런 신체증상이나 신체적 질병 이외에도 불안장애, 우울장애, 적응장애, 급성정신병, 자살 시도 등을 일으키나 그 상관성의 크기는 전자에 비해 적은 것으로 알려졌다.

지금까지 스트레스를 감소시키기 위하여 진정제, 수면제 투여, 호르몬 요법 등 많은 약물 요법이 연구되고 있으나 이러한 약물 요법은 장기간 사용 시 약물에 대한 내성 및 부작용의 위험이 연구되어 있어 지속적인 이용이 곤란하다. 따라서 부작용이 없는 간단하고 효과적인 방법이 요구되고 있다.

### III. 시험제품에 관한 정보

1. 제품 유형: 호두 또는 연꽃 종자 추출물을 주원료로 하는 가공 식품

2. 안전성: 호두와 연꽃 종자는 식품의약품안전청의 식품원재료 분류상 식용 가능한 원료로 등재되어 있다(첨부 5, 호두와 연꽃 종자에 관한 식약청 자료 참조). 연꽃은 꽃, 잎, 씨가 식용 가능한 재료로 등재되어 있는데, 씨는 껍질을 벗긴 종자를 사용하도록 하였다. 따라서 이들을 원료로 하여 제조한 가공제품은 안전에 문제가 없다고 판단된다.

3. 성 상

① Sw-100(호두) : 이미, 이취가 없는 회황색의 정제(tablet)

② Ss-100(연꽃 종자) : 이미, 이취가 없는 회분홍색의 정제

③ Sr-100(호두+연꽃 종자) : 이미, 이취가 없는 흐린 황갈색의 정제

4. 주성분 :

재료 \ 제품	Sw-100	Ss-100	Sr-100	Co-100(위약)
호두 추출물	25.0%		25.0%	
연꽃 종자 추출물		50.0%	25.0%	
결정 셀룰로오스101	12.5%	25.0%	25.0%	
결정 셀룰로오스102	20.0%			30.0%
유당분말	24.0%	24.0%	24.0%	44.0%
스테아린 마그네슘	1.0%	1.0%	1.0%	1.0%
텍스트린	17.5%			24.95%
식용색소(레드 브라운)				0.05%

5. 내용량 : 500 mg/tablet (1회 2정 섭취, 1일 2회 섭취)

6. 시험 제품의 가공

1) 시험제품 호두(Sw-100)는 식약청에서 제시한 식품공전을 기본으로 하여 호두 1 kg을 물 20 L에 첨가하여 121℃에서 7 시간 끓여 추출해 낸 것을 동결건조하여 분말화 한다. 시험제재 호두에는 호두 열수추출물 이외의 다른 부재료는 첨가하지 않는다.(정제를 만들기 위한 결정 셀룰로오스101, 유당분말, 스테아린마그네슘, 결정 셀룰로오스102, 텍스트린은 첨가됨) 호두 추출물의 분말은 1일 2회, 1회 2 정 분량의 정제로 제조하여 피험자에게 제공한다.

2) 시험제품 연꽃 종자(Ss-100)는 식약청에서 제시한 식품공전을 기본으로 하여 연꽃 종자 1 kg을 물 20 L에 첨가하여 121℃에서 7 시간 끓여 추출해 낸 것을 동결건조하여 분말화 한다. 시험제재 연꽃 종자에는 연꽃 종자 열수추출물 이외의 다른 부재료는 첨가하지 않는다.(정제를 만들기 위한 결정 셀룰로오스101, 유당분말, 스테아린마그네슘은 첨가됨) 연꽃 종자 추출물의 분말은 1일 2회, 1회 2 정 분량의 정제로 제조하여 피험자에 제공한다.



3) 시험제품 호두+연꽃 종자(Sr-100)는 식약청에서 제시한 식품공전을 기본으로 하여 호두 1 kg을 물 20 L에 첨가하여 121℃에서 7 시간 끓여 추출해 낸 것을 동결건조하여 분말화 한다.(연꽃 종자 동일-위의 1,2번 참조) 시험제 호두+연꽃 종자에는 호두+연꽃 종자 열수추출물 이외의 다른 부재료는 첨가하지 않는다.(정제를 만들기 위한 결정 셀룰로오스101, 유당분말, 스테아린마그네슘은 첨가됨) 연꽃 종자 추출물의 분말은 1일 2회, 1회 2 정 분량의 정제로 제조하여 피험자에 제공한다.

4) 위약은 결정 셀룰로오스102와 유당 분말을 혼합하고 정제를 만들기 위해 텍스트린, 스테아린 마그네슘을 첨가하였고, 시험제와 같은 색을 내도록 식용색소 레드브라운 (0.05%)를 첨가한 후 동결건조하여 제조하고 시험제와 동량을 동일한 방법으로 정제로 제조하여 제공한다.

7. 품질관리: 성상, 수분(%), 대장균군, 납(mg/kg), 비소(mg/kg), 나트륨(mg/100 g), 봉해시험 검사는 “한국건강기능식품협회 부설 한국건강기능식품연구원”에 검사를 완료한 상태이며, 검사성적서의 사본은 <별첨 6>에 첨부하였음.

8. 보존료(g/kg) : 첨가하지 않았음

9. 건강기능식품 중 정제 제품의 일반적인 제조 공정

① 원료 : 식품공전에서 정하는 기준 및 규격에 적합한 원료를 자체규격 검사를 거쳐 적합품에 한하여 원료로 사용한다.

② 칭량 : 위의 원료를 제조배합비율에 따라 전자저울(1 g~60 kg)로 각각 미생물의 혼입 우려가 없는 원료 처리실에서 원료를 칭량한다.

③ 혼합 : 각 원료를 혼합기에 투입한 후 균질성이 확보되도록 충분히 혼합한다.

④ 타정 : 혼합된 원료를 타정기에서 펀치를 사용하여 1 정당 500 mg 단위로 일정하게 타정한다.

⑤ 탈분 : 타정된 정제를 탈분기를 이용하여 탈분한다.

- ⑥ 중간검사 : 선별이 완료된 정제를 중간검사를 실시한다.(성상, 중량)
- ⑧ 포장 : 중간검사결과 적합한 시험제품을 자동계수기를 사용하여 일정량을 PE병에 충전한다.
- ⑨ 최종검사 : 포장이 완료에 한하여 일반적인 기준규격에 의한 검사를 실시한다.(성상, 수분, 대장균군, 납, 비소, 나트륨, 봉해시험)

## IV. 본 시험 계획안(Protocol)

### 1. 인체시험의 명칭

호두 또는 연꽃 종자 성분 섭취가 성인의 스트레스 개선에 미치는 영향

### 2. 배경

스트레스는 일상에 만연 되어 있는 요소로 유발되며 거의 모든 정신과적 질환과 의학적 질병에 발생에 기여한다. 하지만 이에 성공적으로 대처하지 못하고 스트레스라고 인지되면 우울, 불안, 분노, 피로, 기분변화와 같은 심리 반응이 초래 되고 개인, 가족 사회적 손실을 야기하며 개인의 삶의 질을 낮추는 원인이 된다. 이에 진정제, 수면제 투여, 호르몬요법 등 많은 약물 요법이 연구되고 있으나 이러한 약물 요법은 장기간 사용 시 약물에 대한 내성 및 부작용의 위험이 있어 지속적인 이용이 곤란하다. 따라서 부작용이 없는 간단하고 효과적인 방법이 요구되고 있다.

호두에는 시트룰린, 주글론, 비타민 C, 줄기껍질에는 시토스테롤, 레투린, 탄닌. 잎에는 엘리직 아시드, 리모네네, 주글론, 주그라닌, 히페린 등이 함유되어 있다. 호두에는 일명 당추자라고 하는데 예로부터 자양강장에 좋은 식품으로 알려져 있고 양질의 단백질과 불포화 지방산이 들어 있을 뿐만 아니라 비타민, 미네랄. 등도 풍부하여 머리를 좋게 하고 살결을 곱게 해주며 두발을 검게 해주는 효능이 있다고 알려져 있다. 호두는 알칼리성 식품으로 냉한 성질을 가지고 있으며 ‘동의보감’에서는 호두는 살이 찌게 하고 몸을 튼튼하게 하며 피부를 윤택하게 하며 머리털을 검게 하고 기혈

을 보호하여 하초명문을 보한다고 기록되어 있다.

또한 호두는 스트레스 대처능을 증진시켜 개체의 항상성과 건강을 유지한다고 알려져 있고, 신경 쇠약, 불면증 등에 효과가 있다고 민간에서 사용하고 있으나 실질적인 증명 실험은 많지 않은 상황이다. [본초강목]에 의하면 호두는 간을 보하고 허리와 무릎을 따뜻하게 해주고 변비를 낮게 하며 가래를 없애준다고 한다. 뿐만 아니라 신장기능을 강화하고 기억력을 증강하며 신경쇠약 치료에도 이용되어 왔다고 기록되어 있다.

예부터 한국에서는 연꽃 종자를 불면증 치료제로 널리 썼다. 연꽃 종자에는 단백질, 지방 등의 주요 영양소와 비타민C, 비타민B1, B2, 철분, 칼슘, 인, 나이아신, 아스파라긴, 구리, 망간 넬롬빈, 라피노즈 등의 미량 성분이 고루 들어 있는 우수한 영양식품이다. 연꽃 종자에는 진정작용을 하는 플라보노이드가 많이 들어 있어 강심, 진정작용을 하며 특히 가슴이 두근거리고 수면장애를 개선시키는 작용이 강하다.

### 3. 목적

정상 생활을 유지하면서 스트레스 소견이 있거나 스트레스와 정상 상태의 경계에 있는반 건강인 남녀를 대상으로 스트레스 해소 식품(호두 또는 연꽃 종자 추출물) 섭취 전후의 스트레스 정도에 대한 HRV와 뇌파 검사 문진 검사를 통해 스트레스 개선 여부를 알아보고자 한다.

### 4. 시험제품에 관한 정보

구분 : 호두 또는 연꽃 종자 추출물을 주성분으로 하는 정제 및 위약

성상 :

- ① Sw-100(호두) : 이미, 이취가 없는 회황색의 정제(tablet)
- ② Ss-100(연꽃 종자) : 이미, 이취가 없는 회분홍색의 정제
- ③ Sr-100(호두+연꽃 종자) : 이미, 이취가 없는 흐린 황갈색의 정제
- ④ 위약 : 위약은 셀룰로오스와 dextrin 유당분말을 혼합하고 시험제와 같은 색을 내도록 식용색소 (레드 브라운)를 첨가한 후 제조하고 시

협제제와 동량을 동일한 방법으로 정제로 제조하였다.

## 5. 시험방법

- ① 위약과 시험제제를 의뢰하여 이중맹검법으로 시험함
- ② 20세 ~ 60세의 정상적인 생활을 하는 남녀
- ③ 문진 또는 HRV 분석 상의 스트레스 소견을 보이거나 스트레스와 정상 상태의 경계에 있는 사람을 선정( HRV 분석 상 검사 리포트 내 스트레스 지수 110 이상, 피로도 110 이상, 스트레스 저항도 90 이하의 사람을 선정 )
- ④ 제외기준 : 췌장질환, 부신피질이나 뇌하수체 질환, 호르몬 제제나 약물 복용자, 소화기관 수술 환자, 고혈압, 당뇨병, 자가면역성, 대사성 및 유전성 간질환자, 알코올성 및 임신성 스트레스 환자 제외

## 6. 목표한 피험자 수 및 그 근거

연구실에서 기존에 실험되었던 다수의 연구과제의 연구결과를 바탕으로 하여 대상자를 산출하였으며 그 산출근거의 통계학적 계산식은 식품의약품 안전청의 인터넷 자료인 “임상연구 설계와 분석을 위한 기본통계(48-49쪽; D-8.3 두 군의 평균비교)<sup>11)</sup>” 에 기술되어 있는 식을 사용하였다.

$$n = \frac{[A + B]^2 \times 2 \times SD^2}{DIFF^2} \quad \text{공식 [1]}$$

n = 각 군에 요구되는 연구 대상수

SD = 일차 결과변수의 표준편차

DIFF = 임상적으로 유의한 효과 크기

A = 유의수준에 의존(표 참조)

B = 검정력에 의존(표 참조)

A와 B에 대한 표

유의수준	A	검정력	B
5%	1.96	80%	0.84
1%	2.58	90%	1.28

여기서는 검정력 80% 유의수준 0.5%로 하여 산출하였으며 HRV와 배 경 뇌파검사 일차 결과변수의 표준편차로는 예비연구가 진행되지 않았으므로 다음의 자료를 활용하였다.

HRV : 이침 요법이 정신적 스트레스를 가한 성인의 심박 변이도에 미치는 영향에서 , HF norm 값이 유의적으로 감소하여 이것을 사용함

뇌파검사 : 향기 흡입이 중년기 여성의 심리와 생리 반응에 미치는 효과에 관한 예비 연구에서  $\alpha$  파가 유의적으로 증가하여 이것을 이용하고 심리 치료를 위한 운동 요법의 개발에서  $\beta$  파가 유의적으로 감소하여 이것을 사용함

설문조사 : 클라리세이지 에센셜 오일을 이용한 향기 흡입법이 중년 여성의 스트레스 감소에 미치는 영향의 심리적 신체적 스트레스 감소가 유의차가 있고 본 실험의 문답과 같아 이것을 사용함

위의 수치들을 공식 [1]에 대입하여 다음의 결과를 얻었다.

$$n = 2 \times 5.46^2(1.96+0.84)^2/7.27^2 \quad n=8.84$$

즉, 표본의 크기는 군당 27명이나, 추적손실률 5%와 대상자의 순응도 80%를 감안하여  $n = 9 \div [(1-0.05) \times 0.8] = 11.842$

따라서 최소 12명의 피험자가 필요하게 된다.

유사한 방법으로 LF, HF norm,  $\alpha$  파,  $\beta$  파, 신체 스트레스점수, 심리 스트레스점수를 위의 수식에 대입하여 다음의 n수를 얻었다.

Age	Sex	LF/HF	$\alpha$ 파	$\beta$ 파	신체 스트레스점수	심리 스트레스점수
20-60	Both	6.57	6.58	10.53	11.84	4.01

따라서 6 개의 Factor(LF, HF norm,  $\alpha$  파,  $\beta$  파, 신체 스트레스점수, 심리 스트레스점수) 모두를 만족하는 각 군의 n의 수는 12명 정도가 된다.

7. 시험제품 : 연구 수행에 사용되는 호두 또는 연꽃 종자 추출물을 주성분으로 하는 정제와 위약은 네추럴 F&P에서 공급한다.

#### 8. 시험군 및 섭취방법

가. 모두 피험자 동의서에 서명하고 본시험 참여에 적합 판정을 받은 대상자들은 제공되는 제품을 지시에 맞게 하루에 2회, 3 주간 섭취하도록 한다. 시험 계획을 올바르게 수행하고 있는가를 확인하기 위해 섭취 상태를 매주에 한번 점검하고 복용 순응도가 85% 이하일 경우 대상자에게 순응도에 대한 주의를 시키고 순응도가 80% 이하가 되면 비순응도 대상자로 분류하여 인체시험에서 탈락시킨다.

나. 일반 상황 조사 : 실험에 미치는 영향을 최소화하기 위하여 전날 음주를 금하고 시험 시작 2시간 전 흡연과 카페인을 금한다. 실험 시작 전 영양제 및 기호식품 섭취를 여부를 조사하여 시제품의 섭취 후 다른 영양제 및 기호식품 섭취를 금한다.

다. 스트레스 측정: 자율 신경 균형 검사기 (SA3000P, Medicore Co. Ltd., Korea) 와 배경뇌파 검사기(QEEG-8(LEX-3208), Laxtha co., Korea)를 이용하여 각각 5 분간 스트레스를 측정한다.

라. 거부반응에 대한 문진 : 대상자에게 섭취에 대한 거부 반응 문진을 시험 시작 후 3 일내에 1회 실시한다.

#### 9. 통계분석

모든 통계분석은 SAS 프로그램을 이용하여 처리하고 시험군 간 평균값의 차이는 two-way ANOVA를 이용하여 유의수준( $P < 0.05$ ) 수준 내에서 검증한다.

## 10. 기능성시험 평가기준, 평가방법 및 해석방법

### 1) 평가기준

- a. 시험 제품에 대한 순응도가 80% 이상이며 중요한 시험 계획서 위반이 없는 자의 시료 섭취 전후 자율신경 균형 검사
- b. a항과 동일한 대상자의 시료 섭취 전후 배경뇌파 검사와 배경 뇌파를 이용한 학습능력검사
- c. a항과 동일한 대상자의 시료 섭취 전과 후 스트레스에 관한 문진

### 2) 평가방법

- a. 자율 신경 균형 검사기로 섭취 전과 섭취 후에 실시한 자율 신경 검사 결과 스트레스 평가가 정상으로 감소한 대상자가 위약군과 비교하여 통계적으로 유의한( $p < 0.05$ ) 차이가 있는지 평가함
- b. 배경 뇌파 검사기로 섭취 전과 섭취 후에 실시한 배경 뇌파 검사 결과 스트레스 평가가 정상으로 감소한 대상자가 위약군과 비교하여 통계적으로 유의한( $p < 0.05$ ) 차이가 있는지 평가함
- c. 스트레스 문진을 통한 위약군과 처리군 간의 평균치 비교

### 3) 해석방법

- a. 자율신경 균형 검사를 통해 스트레스 해소 식품을 섭취한 군과 위약군이 통계적으로 유의한( $p < 0.05$ ) 차이가 있는 경우 스트레스 개선 효과가 있는 것으로 평가함

참조) 스트레스 상태 시 HRV의 수치

Mean HRT - 95 이상 50 이하

SDNN, total power, LF(정신적인 스트레스와 연관),

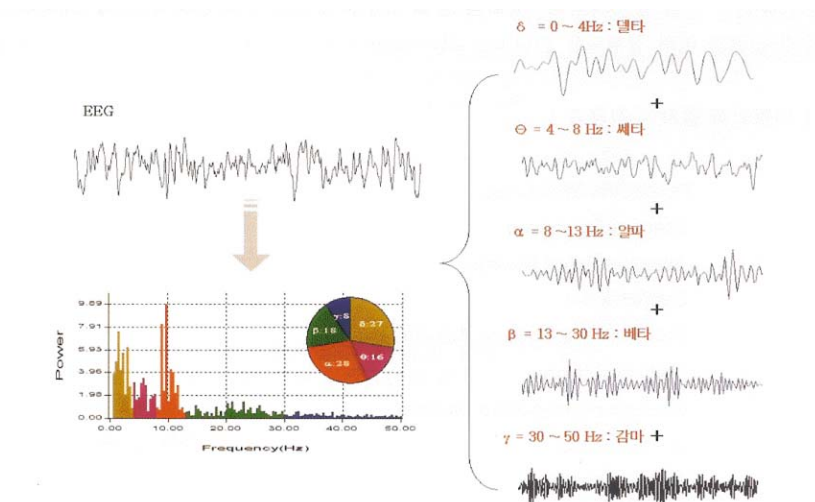
HF(지속적인 스트레스) - 감소

Table 1. SDNN 평균치

구분	남	여
10대	65	60
20대	60	55
30대	54	50
40대	48	45
50대	43	40
60대	37	35

b. 배경 뇌파 검사를 통해 스트레스 해소 식품을 섭취한 군이 위약군에 비해  $\alpha$  파의 증가가 통계적으로 유의한( $p < 0.05$ ) 증가 베타파의 출현이 유의한( $p < 0.05$ ) 감소가 있는 경우 스트레스 개선 효과가 있는 것으로 평가함

참조) 각 파형 파워 스펙트럼 분석



c. 배경 뇌파 검사를 이용한 작업 부화도(Mental Workload)검사를 하여 스트레스 해소식품을 섭취한 군이 위약군에 비해 통계적으로 유의한( $p < .05$ ) 감소가 있을 경우 스트레스가 감소 한 것으로 본다.



참조)작업 부화도(Mental Workload)는 학습 능력 과제 수행 시 느끼는 정신적인 부화정도를 의미한다. 이는 정신적 스트레스 수준 및 정신적 과도한 작성 수준을 의미하는데 정서적으로 불안, 긴장, 초조하거나 과도하게 작성되어 있는 정신적 스트레스 상태일 때 작업부화도가 표준 범위(50%)보다 높게 나타나게 된다.

d. 스트레스 문진을 통해 스트레스 해소 식품을 섭취한 군과 위약군이 통계적으로 유의한 ( $p < 0.05$ ) 차이가 있는 경우 스트레스 개선 효과의 보조 자료로 사용함

## 11. 이상반응을 포함한 안전성 평가방법 및 평가기준

### (1) 이상반응과 평가방법

a. 피험자는 연구진행중에 새로운 증상이나 변화를 경험했을 경우, 그 사실을 알려 모든 변화에 대해 적절히 조사하고 기록한다.

b. 모든 이상반응은 피험자의 섭취 전 상태(피험자 기준에서 증후와 증상)로부터 섭취 시작 후 나타난 모든 변화를 의미한다. 이것은 섭취기간 동안 나타나거나 악화된 임상적으로 의미가 있는 실험실적 비정상과 병발질환을 포함한다.

c. 부작용 주의를 요하는 사건은 다음과 같다.

- 몸이 무겁고 나른하다. 항상 피곤하다.
- 머리가 빠근하고 어깨 팔, 다리가 저리다.
- 잠이 잘 오지 않는다.
- 가슴이 답답하고 숨이 차다.

### (2) 평가기준

이상반응의 정도는 4-point scale(normal, mild, moderate, severe)로 등급을 나누어 연구자 평가에 따라 작성한다.

normal : 생활에 불편이 없이 정상적인 생활

mild : 불편함, 그러나 정상적인 일상생활에는 영향을 끼치지 않음

moderate : 정상적인 일상생활에 영향을 끼칠 만큼 불편함

severe : 정상적인 일상생활 수행 불가능

(3) 시험 음표와의 관계에서 나타나는 이상반응과 인과관계

이상반응 시 연구자는 반드시 증례기록서상의 이상반응 페이지에 기록하고, 시험제품과의 관련성을 다음과 같이 평가한다.

none : 관계없음(계속섭취)

remote : 가능성 희박(분류 중 2가지 항목 해당, 계속섭취)

possible: 관련 가능성을 배제할 수 없음(분류 중 2가지 항목 해당, 계속섭취)

probable: 관련이 의심됨(분류 중 3가지 항목 해당, 섭취 감량 또는 섭취 중단이 필요함)

no assessable : 평가 불가능(섭취 중지)

시험 제품과의 관계분류

이 분류는 시험 제품과 증증도가 관련이 있다고 생각되는 이상반응에 적용한다.

시험제품 섭취로 인해 일시적인 증상이 나타나는 경우

피험자의 임상 상태, 환경 또는 독성요소 등 알려진 특징 또는 피험자에게 실시한 다른 치료방법으로 설명하기 어려운 경우

용량 감소 또는 중지에 의해 증상이 감소되거나 소실된 경우

재섭취 후 재발하는 경우

알레르기

특이체질

과량의 섭취

12. 이상반응 보고 방법

이상반응이란 정해진 시험기간 동안에 발생한 모든 이상반응이나 시험 검사 이상치를 의미하며, 이상반응 발생한지 1 일 이내에 연구원은 연구책임자에게 보고한다.

이상 반응 발생시 조치사항

이상반응 시 시험자는 반드시 심사위원회(IRB)에 문서로 보고한다. 이상반응에 대한 추적관찰을 실시하고, 검사를 재검하여야 하며, 만약 비정상 의 검사치가 있을 경우 정상으로 회복될 때까지 또는 비정상치가 설명되어 질 때까지 피험자를 추적관찰하며, 그 설명을 증례기록서에 반드시 기록한다.

### 13. 피시험자의 안전 보호에 대한 대책

① 시험계획에 입각하여 피시험자의 권리와 복지를 염두에 두고 인체시험 담당자는 인체시험 계획서를 정확히 분석 및 숙지하고 피시험자의 문제점에 적극적으로 대응한다.

② 인체시험에 들어가기 전에 피시험자에게 시험내용 및 시험 식품의 효과, 부작용 및 안전성에 대한 모든 사항을 설명하여 이해시킨 후 피험자 자신이 자발적으로 본 연구에 참여하겠다는 동의서를 받고 인체시험에 들어간다.

③ 인체시험 책임자는 시험 식품의 관리상황을 정기적으로 확인하고 의뢰자에게 주기적으로 부작용, 연구진행 상황, 결과 등에 대하여 보고하며, 의뢰자는 주기적으로 인체시험 진행상황에 대하여 점검한다.

④ 부작용 발생시 즉시 내원하여 진료, 검사, 치료를 받을 수 있도록 관리하며 증상이 완치될 때까지 추후 관리한다.

⑤ 본 시험기간 중 연구자 및 연구책임자는 피험자의 안전에 만전을 기할 것이며, 예측 가능한 부작용 이외의 심각한 부작용 발생시 신고하고 적절한 조치를 위하여 가능한 그 부작용을 최소화 할 수 있게 한다.

⑥ 본 인체시험 중 문제점이 발생할 경우 별첨의 <피해자 보상에 관한 규약>에 의거하여 회사가 최대한 책임지고 이에 대한 적절한 보상을 한다.

### 14. 인체시험의 중지, 탈락 및 분석 제외 기준

피험자는 언제, 어떤 사유로라도 시험을 철회할 권리가 있다. 계획된 평가/방문 시기를 놓친 경우, 이상반응, 인체시험 계획서 위반, 동의철회 시

에 조기 종료한다.

15. 연구원 편성

역할	성명	소속기관 및 부서	직위	최종학위	전공
책임연구자	한대석	한국식품연구원 식품자원이용연구본부	책임연구원	공학박사	식품공학
공동연구자	김동우	네추럴 F&P 중앙연구소	연구소장	이학박사	식품생명과학
참여연구원	정나라	한국식품연구원 식품자원이용연구본부	위촉연구원	전문학사	식품영양

16. 참 고 문 헌

Jang BH, Lee JH, Mun KS, Kim JW and Kwon OS. Effect of auricular for mental Stress on heart rate variability (HRV). *The Journal of Korean Acupuncture & Moxibustion Society* 22(6) : 1732-180 (2005)

Shim IS, Bae HS, Kang MK and Pyun KH. Development of better antidepressant using Nelumbinis Semen in an animal model of depression. *International Congress Series*. 1287 : 345- 349(2006)

Carson CF, Cookson BD, Farrelly HD and Riley TV. Susceptibility of methicillin resistant Staphylococcus aureus to the essential Oil of Melaleuca alternifolia. *J. Antimicrobial Chemotheapy*. 35 : 421-424 (1995)

안윤옥. 임상 실험의 설계. *Korea journal of Epidemiology*. 11(1) : 1-17 (1989)

서혜경, 박경숙. 클라리세이지(Clarysage) 에센셜 오일을 이용한 향시 흡입법이 중년 여성의 스트레스 감소에 미치는 효과. *여성간호학회지*. 9(1) : 70-79 (2003)

표내숙, 안정덕. 심리치료를 위한 운동 요법의 개발. *한국 스포츠 심리학회*

지. 13(1) : 129-151 (2002)

윤중수. 임상 뇌과학. 고려의학. (2004)

임상연구 설계와 분석을 위한 기본통계. 인터넷 자료. KFDA

고경봉. 스트레스와 정신신체 의학. 일조각. (2002)

건강기능식품의 기능성 시험 가이드(수면 및 스트레스 관련 기능성 시험).  
인터넷 자료. KFDA.

건강기능식품의 기능성 시험 가이드(수면 및 스트레스 관련 기능성 시험).  
인터넷 자료. KFDA

<별첨 1>

피험자 동의서

1. 본 인체시험은 단지 연구목적으로만 수행되며, 본 연구는 연꽃 종자 또는 호두를 정제화 한 제재로 스트레스 개선에 대한 효능을 평가하는 목적으로 수행되는 연구입니다.
2. 시험하고자 하는 제재는 연꽃 종자나 호두 또는 연꽃 종자나 호두 정제와 비슷한 성상을 가진 위약으로 두 가지는 인체에 무해합니다.
3. 피험자는 시험 제재를 시험 시작 때 받게 되며 일일 섭취량은 일상식에서 섭취할 수 있는 양 내에 있습니다. 피험자는 위약군과 시험제재군 섭취군 3종등 네 군으로 나누어져 총 21일 동안 제재를 섭취하게 됩니다.
4. 본 연구에 참여하게 되면 시험 시작과 종료에 한 번씩 기본적인 신체검사를 할 것입니다.
5. 본 연구를 위해서 피험자는 시험자(모니터 요원)가 지시하는 대로 식이습관을 유지해야 하며, 정해진 제재를 정해진 양대로 1일 두 번씩 매일 섭취하여야 합니다. 시료는 식품 재료 외에 어떠한 첨가물이나 처리가 가해지지 않았으므로 피험자에게 예견되는 불편이나 위험사항은 없습니다.
6. 시험에 참여하는 동안 섭취하는 제재는 무상으로 지급되며, 발생하는 비용은 전혀 없습니다. 피험자가 원하는 경우에는 피험자 개인의 측정 결과를 제공할 수 있으며 시험 완료 후 시험결과에 근거한 제품의 효능에 대해 알려드릴 수 있습니다.(별첨 『피험자 보상에 관한 규약』 참조)
7. 피험자의 신원에 관한 비밀은 보장되며 시험 자료는 학술적인 목적 외에는 사용되지 않습니다.

본인은 이 동의서를 읽고 이해하였으며, 모든 질문에 대한 답을 들었습니다. 이에 본인은 자발적으로 본 연구에 참여합니다.

주 소 :

---

연 락 처 :

---

2007. 4.

피 험 자 : (성명) (서명)

시험책임자 : (성명) 한대석 (서명)

※ 만일 본 연구에 문의사항이 있으시거나, 또는 인체시험과 관련된 부작용이 발생할 경우 연구실에 연락하여 주시기 바랍니다.

연구실 : 031-780-9073, 한대석 : 정나라

0점 - 전혀 없었다.

1점 - 가끔 느꼈다.

2점 - 자주 느꼈다.

3점 - 항상 느꼈다.

성명:

각 항목에 해당점수를 넣어 주세요!

신체적 스트레스 점수	심리적 스트레스 점수
1. 불면 ( )	1. 매우 긴장하거나 불안한 상태가 되었다( )
2. 심장 두근거림 얼굴 화끈거림 ( )	2. 기분이 매우 동요 되었다 ( )
3. 신체 일부가 경련 ( )	3. 사소한 일에도 매우 신경질 적이 되었다( )
4. 현기증 ( )	4. 소외감 무력감을 느꼈다 ( )
5. 땀이 많이 남 ( )	5. 침착하지 못하다 ( )
6. 감각이 예민 ( )	6. 아침까지 피로가 남고 일에 기력이 솟지 않는다 ( )
7. 요통 ( )	7. 화가 나서 자신의 감정을 억제할 수가 없었다 ( )
8. 눈의 피로 ( )	8. 생각지도 못한 일 때문에 곤혹을 치렀다( )
9. 목이나 어깨 결림 ( )	9. 심각한 고민이 머리를 떠나지 않았다 ( )
10. 두통 ( )	10. 모든 일이 생각대로 되지 않아 욕구 불만에 빠졌다 ( )
11. 감염증 ( )	11. 모든 일에 집중할 수가 없었다 ( )
12. 변비 ( )	12. 남 앞에서 얼굴 내미는 것이 두려웠다( )
13. 발열 ( )	13. 남의 시선을 똑바로 볼 수 없다 ( )
14. 소화불량 ( )	14. 똑같은 실수를 반복했다 ( )
15. 설사 ( )	15. 가족이나 친한 사람과 함께하는 시간도 편하 지가 않았다 ( )

본 연구에서는 박순영(1999)이 개발한 스트레스 측정도구 두 개 영역별 (심리적 스트레스 15문항, 신체적 스트레스 15문항) 총 30 문항을 0-3점 척도로 측정한 점수를 말하며 점수가 높을수록 스트레스가 높음을 의미한다.



<별첨 3>

거 부 반 응 문 진 표

성명 : \_\_\_\_\_ 날짜 : \_\_\_\_\_

※ 증상에 따라 표시해 주세요.

증상	증 상 정 도			
	없음	보통	심함	매우 심함
머리가 빠근하고 어깨, 팔, 다리가 저리다				
허리가 묵직하고 불편하다				
어지럼증이 있다				
잠이 잘 오지 않는다				
생리가 불규칙하고 생리통이 심하다				
몸이 무겁고 나른하다. 항상 피곤하다				
손발이 차다				
가스가 찬 듯하다				
소변을 자주보고, 보고 난 뒤에도 불편하다				
무릎이나 발목이 아프고 다리가 잘 붓는다				
가슴이 답답하고 숨이 차다				

※ 기타 다른 증상이 있으시면 기록하여 주십시오.

<별첨 4>

<피험자 보상에 관한 규약>

한국식품연구원 식물자원연구팀은 본 인체시험 실시 중 건강식품으로 인해 이상반응 등 예기치 않은 사고발생으로 치료 또는 입원이 요구되어 지는 경우 이에 대해 보상한다.

1. 이상반응 처리는 다음 사항에 적합하여야 한다.

인체시험책임자(담당자)가 본 시험의 계획서를 충실히 이행하여야 한다.

본 시험 실시에 대한 책임자(담당자)의 명백한 태만이나 의도적 또는 중대한 손실이 인정되지 않아야 한다.

발생한 이상반응에 대해서는 한국식품연구원 식물자원 연구팀에 즉시 연락을 취하여 이에 대한 준비를 하도록 한다.

2. 다음 경우에는 보상하지 않는다.

한국식품연구원 식물자원연구팀의 후원 하에 집행되지 않거나 한국식품연구원 식물자원연구팀에서 제공하지 않은 건강식품 등의 섭취로 발생한 이상증상에 의한 손상

건강식품 적용증에 대한 효과 또는 혜택을 제공하지 못한데 대한 보상  
서로 합의한 인체시험계획서를 이행하지 않음으로 야기된 손상  
피험자의 부주의로 초래한 손상

3. 보상평가기준

본 건강식품에 기인한 이상반응에 대한 보상이나 피험자 또는 보호자와 분쟁이 발생한 경우 한국식품연구원 식물자원연구팀에서 책임지고 해결한다. 본 책임자는 앞에서 언급한 여러 제반내용을 참고하여, 피험자가 본 시험에 의해 어떤 불이익도 받지 않도록 주의할 것이며, 만약 본 시험으로 문제점이 발생할 경우 보상규약에 의거하여 책임질 것을 서약합니다. (본 피험자 보상에 관한 규약서는 피험자들에게 모두 배부한다.)

2007. 4.

한국식품연구원 식물자원연구팀 한 대 석

별첨 5. 호두와 연꽃 종자에 관한 식약청 자료

!!! 식품 원재료명 검색 !!!

본 자료는 구축중인 자료로 완성된 자료가 아니므로 식용가능여부 판단을 위해서는 반드시 식품의약품안전처홈페이지를 참조하여 주시기 부탁드립니다.

\* 동자료의 효능, 효과란에 기재되어 있는 내용은 참고사항이므로, 식품관련광고등의 목적으로 사용할수 없습니다.

기본검색

질의어 목록 전체 원재료명 학명 이명 생약명

검색

\*호두\*로 검색한 결과입니다.

Total : 4개 / 1 Page

원재료	학명	이명	생약명	식용여부
페르시아 호두나무	Juglans regia L. var. orientis kitaqura	호두(walnut), 호도(胡桃, Juglandis Semen), 치자		가능
호두나무 (Chinese Walnut, Pesian Walnut)	Juglans sinensis Dode, Juglans regia	호도나무, 추자나무	호도인(胡桃仁) - 종인(種仁)	가능
호두조개	Acila mirabilis			
흑호두나무 (Black walnut)	Juglans nigra			

::: 식품 원재료명 검색 :::

본 자료는 구축중인 자료로 완성된 자료가 아니므로 식용가능여부 판단을 위해서는 반드시 식품의약품안전처에서 질의하여 주시기 부탁드립니다.

\* 동자료의 효능,효과 등에 기재되어 있는 내용은 참고사항이므로, 식품관련광고 등의 목적으로 사용할 수 없습니다.

기본검색

질의어 목록 전체 원재료명 학명 이명 생약명

검색

"연꽃"로 검색한 결과입니다.


Total : 9개 / 1 Page

번재료	학명	이명	생약명	식용여부
가시연꽃 (Asian euryale)	Euryale ferox Salisb.	계두, 계두미, 경화, 자인련, 자화연, 개련, 개련밥, 가시연밥, 개연	감실-가시연꽃의 열매	가능
개연꽃 ( Yellow pond lily )	Nuphar japonicum DC.	긴잎종연꽃, 평봉초자 (萍蓬草子), 건연, 평연초, 일본평연초, 평연, 긴잎연꽃, 개연꽃, 개연	천골(川骨)	
노랑어리연꽃 (Floating heart)	Nymphoides peltata (Gmelin) O. Kuntze	금은련화 (金銀蓮花), 어리연꽃		
애기어리연꽃	Nymphoides coreana (L veill) Hara	좀어리연꽃		
어리연꽃 (Water Snowflake, Banana Lily, Floating heart)	Nymphoides indica		금은련화(金銀蓮花-잎)	
연꽃 (Lotus)	Nelumbo nucifera Gaertner	East indian lotus, Chinese Water-lily, 연꽃, 연옥, Nelumbium nuciferum	석연자(=연실) - 성숙한 과실, 연옥 - 곱질을 벗긴 종자, 허엽 - 잎, 연근 - 뿌리	가능
왜개연꽃 (Yellow Pond lily)	Nuphar Pumilum(TIMM.)DC	개연, 개련꽃, 개일련, 왜개련꽃, 천골, 평연초, 평봉초	평봉초자(萍蓬草子-종자), 평봉초근(萍蓬草根) 또는 천골(川骨)-뿌리 줄기	
참개연꽃	Nuphar coreanum			
큰가시연꽃	Victoria amazonica / Victoria regia			

서울특별시 은평구 녹번동 5번지 대표전화 (02)380-1800  
 Copyright © 2002, Korea Food & Drug Administration. All rights reserved.

<별첨 6> 검사성적서



제 R-0702-00888 호				<b>검 사 성 적 서</b>	
검체명	스트레스해소(Sw-100)		제조일자 (유통기한)		
의뢰인	업체명	(주)네추럴에프엔피	성 명	문원국	
	주소	충북 청원군 오창면 송대리 319-11			
제조번호			검사년월일	2007-02-14	
검사의뢰목적	참고용	검체접수번호	D2007020356		
귀하가 우리 연구원에 검사의뢰한 결과는 다음과 같습니다.					
시험항목			결과		
성상			이미, 이취가 없는 회황색 정제		
수분(%)			2.15%		
대장균군			음성		
납(mg/kg)			0.0895mg/kg		
비소(mg/kg)			0.0433mg/kg		
나트륨(mg/100g)			11.70mg/100g		
붕해시험			적합		
2007년 2월 21일					
한국기능식품연구원 					
이 성적은 제출된 검체에 한하며, 의뢰목적 이외의 상품선전 및 상업용에 사용할 수 없음.					



제 R-0702-00889 호

## 검 사 성 적 서

검체명	스트레스해소(Ss-100)	제조일자 (유통기한)	
의뢰인	업체명	(주)네추럴에프엔피	성 명
	주소	충북 청원군 오창면 송대리 319-11	문원국
제조번호		접수년월일	2007-02-14
검사의뢰목적	참고용	검체접수번호	D2007020357

귀하가 우리 연구원에 검사의뢰한 결과는 다음과 같습니다.

시험항목	결과
성상	이미, 이취가 없는 회분홍색 정제
수분(%)	1.23%
대장균군	음성
납(mg/kg)	0.0485mg/kg
비소(mg/kg)	0.0830mg/kg
나트륨(mg/100g)	15.20mg/100g
봉해시험	적합

2007 년 2 월 21 일

한국기능식품연구원장



이 성적은 제출된 검체에 한하며, 의뢰목적 이외의 상품선 진 열 상업용에 사용할 수 없음.



제 R-0702-00890 호

# 검사 성적서

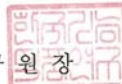
검체명	스트레스해소(Sr-100)	제조일자 (유통기한)	
의뢰인	업체명	(주)네추럴에프엔피	성명
	주소	충북 청원군 오창면 송대리 319-11	문원국
제조번호		접수년월일	2007-02-14
검사의뢰목적	참고용	검체접수번호	D2007020358

귀하가 우리 연구원에 검사의뢰한 결과는 다음과 같습니다.

시험항목	결과
성상	이미, 이취가 없는 흐린 황갈색 경계
수분(%)	1.17%
대장균군	음성
납(mg/kg)	0.1347mg/kg
비소(mg/kg)	0.0938mg/kg
나트륨(mg/100g)	23.05mg/100g
붕해시험	적합

2007년 2월 21일

한국기능식품연구원장



이 성적은 제출된 검체에 한하며, 의뢰목적 이외의 상품선전 및 상업용에 사용할 수 없음.



제 R-0702-00887 호

## 검 사 성 적 서

검체명	스트레스해소(Co-100)	제조일자 (유통기한)	
의뢰인	업체명	(주)네추럴에프앤피	성명
	주소	충북 청원군 오창면 송대리 319-11	문원국
제조번호		접수년월일	2007-02-14
검사의뢰목적	참고용	검체접수번호	D2007020355

귀하가 우리 연구원에 검사의뢰한 결과는 다음과 같습니다.

시험항목	결과
성상	이미, 이취가 없는 흰분홍색 정제
수분(%)	1.55%
대장균군	음성
납(mg/kg)	0.0295mg/kg
비소(mg/kg)	0.0275mg/kg
나트륨(mg/100g)	6.24mg/100g
붕해시험	적합

2007년 2월 21일

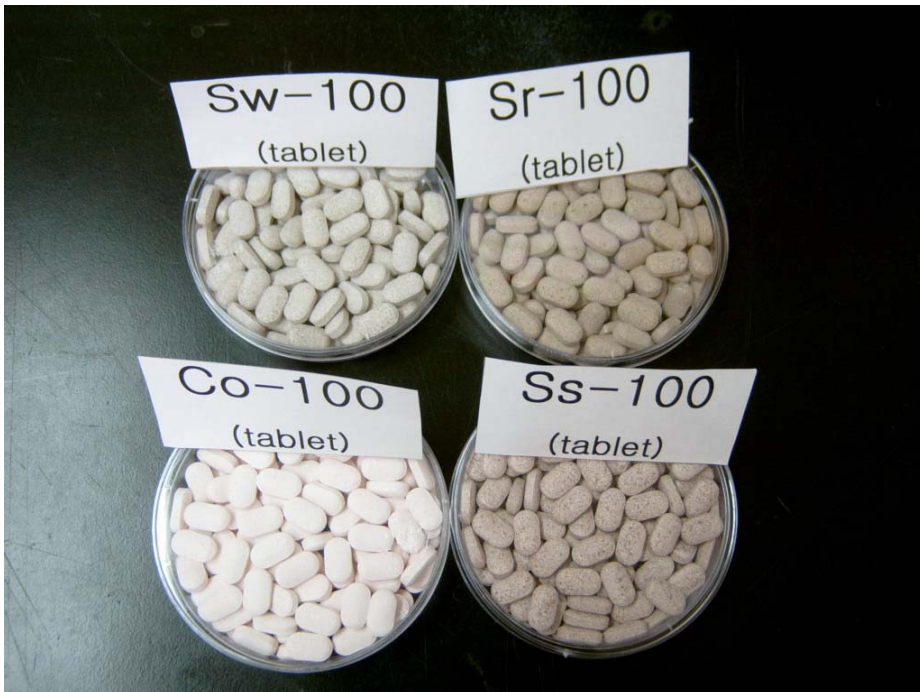
한국기능식품연구원장



이 성적은 제출된 검체에 한하며, 의뢰목적 이외의 상품선전 및 상업용에 사용할 수 없음.



<별첨 7> 시제품 사진



2. 인체시험승인서

한남대학교 식품영양·장수연구소  
인체시험심의위원회(IRB)

수신자 한국식품연구원

(경 유)

제 목 인체시험 연구 신청 승인 결과 통보

1. 귀 원의 무궁한 발전을 기원합니다.
2. 본 인체시험심의위원회(IRB)에 의뢰된 다음의 연구 계획서를 심사한 결과 인체시험연구로 적절하다고 판단되어 이에 승인합니다.


- 다 음 -

접 수	접수번호	2007-0326
	접수일(최초계획서)	2007. 3. 26.
	접수일(수정계획서)	2007. 4. 17.
연구 제목	호두 또는 연꽃 종자 추출물의 스트레스 해소에 관한 인체시험	
연구 책임자	한대석 (한국식품연구원)	
연구 기간	2007년 4월 18일 - 2007년 5월 17일	

끝.

한남대학교 식품영양·장수연구소  
인체시험심의위원회(IRB)

기안자  김도현

위원장  조복호

소장  강명희

협조자

시행 한남IRB 07-01 (2007. 4. 18)

접수 ( )

우 305-811 대전광역시 유성구 전민동 461-6 한남대학교 식품영양·장수연구소 IRB

전화 042-629-8788 전승 042-629-8789 / syona@hanmail.net /

### 제 3 절 실험방법

#### 연구 대상자

연구의 피검 자원자는 만 20~60세의 남녀로 실험참가 목적을 이해하고, 실험참가를 동의한 사람으로 하였다. 자율신경균형 검사기 (SA-3000P, Medicore Co. Ltd., Korea)를 이용하여 측정 후 스트레스가 있거나 경계에 있는 대상자중 이상 심박동수가 5회 이상 발견되는 등 실험에 적합하지 않다고 판단되는 경우는 실험에서 제외시키고 48 명을 선발하여 측정 하였다. 피검 대상자 선발 방법은 자율신경균형검사 Report상 스트레스 지수 110 이상이거나 스트레스 저항도 90 미만 피로도 110 이상인 사람을 선발하였고, 실험 자원자들은 실험 전날의 음주 및 실험 2 시간 전에는 카페인 이 함유된 음료와 흡연 등을 금하도록 하였다.

#### 실험 방법

스트레스 분석은 외부 환경에 의해 영향을 받지 않도록 실내 온도를 23℃ 정도로 유지하였고, 조명은 밝게 유지하였다. 외부의 소음이 없는 상태에서 진행하였으며, 동일한 의자를 사용하고 가급적 동일한 자세를 유지하도록 주의하였고, 측정 시간대를 일정하게 하여 신체 상태가 매일 유사한 상태에서 수행하였다. 검사를 준비하면서 실험에 대해 최소한 5 분간 설명하면서 피검자가 자연스럽게 안정을 취한 후에 측정에 응하도록 유도하였다.

#### 실험 대상군 및 비교 대조군 선정

Double blind test를 통하여 실험 대상자 본인이 실험 대상군과 비교 대조군 중 어느 곳에 속하는지 모르도록 하였고, 무작위 배정법을 통하여 처치 배정의 인적 요소를 최소화 하였다.

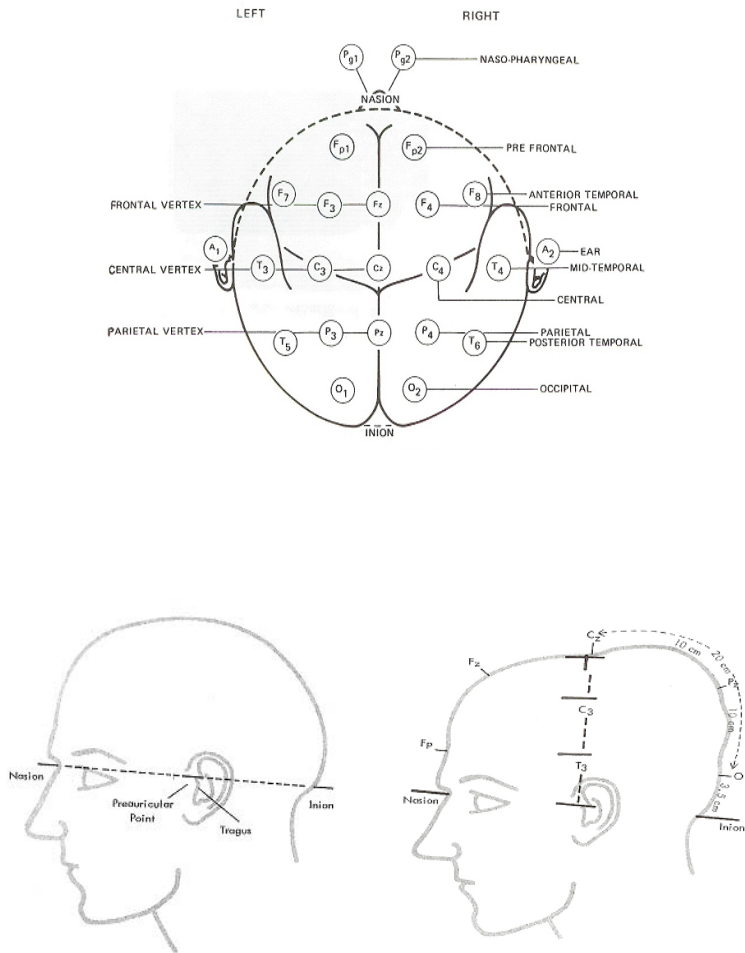
#### 심박변이도 측정

심박변이도는 자율신경검사기(SA-3000, Medicore Co., Ltd., Seoul,

Korea)를 이용하여 좌우 손목과 발목에 전극을 부착하고 5 분간 측정하였다.

### 뇌파 검사 (EEG; Electroencephalography)

배경 뇌파 검사기(QEEG-8(LEX-3208), Laxtha co., Korea)를 이용하여 대상자의 Fp1, Fp2,에 ch1과 ch2를 F3, F4에 ch3과 ch4를 T3, T4, ch5와 ch6을 P3, P4에 ch7과 ch8을 부착하고 REF를 오른쪽 귀 뒤, GRD 왼쪽 귀 뒤에 부착하였다.



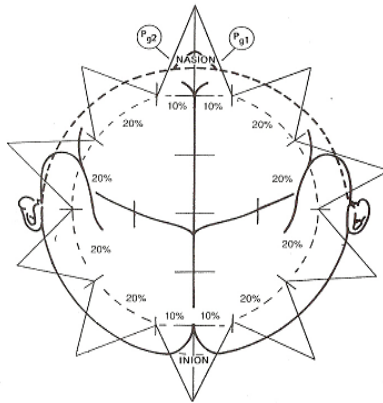
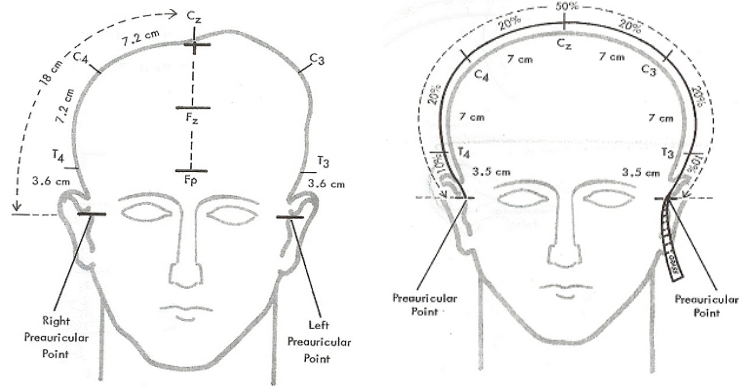


Fig. 1. 10-20 system

### 학습 능력 검사

배경 뇌파 검사기(QEEG-8(LEX-3208), Laxtha co., Korea)를 이용하여 대상자의 Fp1, Fp2, 부위에 ch1과 ch2 전극을 부착하고 REF를 오른쪽 귀 뒤, GRD 왼쪽 귀 뒤에 부착 하였다. 검사 전 주의사항과 검사법을 설명하고, 연습문제를 풀어본 뒤 숙지가 되었을 경우 약 5 분간 안정을 취한 뒤 검사를 시작하였다.

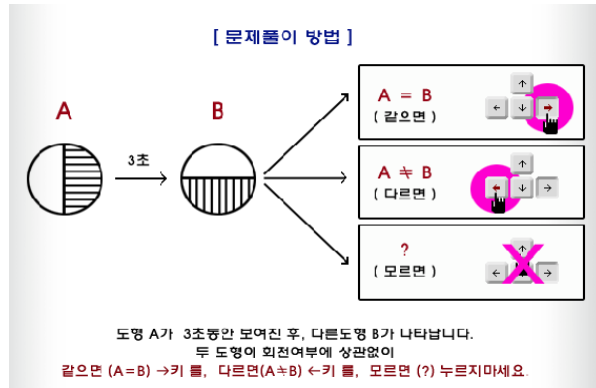


Fig. 2. Cognitive function assessment

### 통계처리

본 연구의 실험 결과는 SAS를 이용 하여 실험군당 평균과 표준 편차를 계산 하였고, Two way ANOVA를 실시한 후  $P < 0.05$  수준에서 평균차간의 유의성을 검증하였다.

## 제 4 절 결과 및 고찰

### 호두(*Juglans semen*) 추출물 섭취 후 스트레스 상태 변화

호두는 가래나무 과에 속하는 낙엽 고목이며, 원산지는 남동 유럽, 중동, 아시아 등이다. 호두는 단백질의 양도 풍부하고, 함량이 육류 보다 많아 회복기 환자에게 널리 쓰이는 식품이다. 또한 단백질 중 50% 이상이 glutelin, tryptophan 및 lysine이 풍부하여 품질이 우수하며 지질은 불포화 지방산이 전체 지방산의 90% 정도를 차지하고 있고 특히 오메가-3가 가장 풍부하게 들어 있는 식물성 식품으로 미국 식품의약국(FDA)은 2004년 3월 단일 식품으로 유일하게 호두 제품의 겉포장에 ‘매일 호두 1온스씩 섭취할 경우 칼로리 섭취량을 줄이고 관상동맥 심장 질환의 위험도 줄일 수 있다’는 문구를 표시할 수 있도록 허가했을 정도로 호두는 영양과 기능이 우수한 식품이다. 또 우울증에 효과적인 나이아신, 뇌 발달에 꼭 필요한 비

타민 A도 많아 호두를 하루에 1개씩 먹으면 뇌의 활동을 좋게 한다고 알려져 있다. 한방에서는 보신익정(補身益精), 강요슬(強要膝), 렬폐정천(斂肺定喘), 윤장(潤腸)등의 효과가 있다고 하며 신장 기능 강화와 기억력을 증강시켜 신경쇠약 치료에도 사용 하고 있다. 하지만 이에 대한 증명 실험은 많지 않은 상황이다.

HRV란 심박동의 미세한 변화를 파형 분석하여 스트레스에 대한 인체의 자율 신경 반응을 가시화하고 현재의 건강 상태 및 정신 생리학적 상태를 확인할 수 있는 측정방법이다. 심전도의 한 주기의 패턴은 차례로 P-Q-R-S-T파로 구성 되는데, R피크 사이의 간격을 R-R간격이라고 한다. R-R간격의 변화율을 (R-R interval Variability, 이하 RRV)은 일정 표준편차 범위 내에서 계속 변화하는 것으로 RRV Tachogram으로 나타내며, 이를 분석한 것이 심박 변이율로, 시간영역 분석법은 통계 분석법과 위상 분포 분석법으로, 주파수영역 분석은 파워 스펙트럼 분석을 통하여 여러 가지 변수로 추출된다.

시간영역 분석 방법은 연속된 R-R간격의 시간 성분을 분석하여 시간에 따른 심박 변동에 대한 전반적인 특징을 알려준다. 시험 자원자의 주파수 범위분석 결과를 Table 1에 나타냈다. 분석 시간 5 분간 TP는 자율신경계 전체의 활성 정도를 반영하며 이는 자율 신경계의 조절 능력을 반영한다. 대개 만성 스트레스나 질병이 있는 경우에 자율신경 조절 능력의 저하로 TP가 건강한 상태에 비해 많이 감소된다. TP를 Table 1에 나타내었는데 TP가 984.5에서 1936.7로 모두에서 증가를 나타내었으나 유의적인 차이는 아니었다. 저주파(low frequency, LF)는 교감신경계와 부교감신경계의 활동을 동시에 반영하나 대부분 교감신경 활동의 지표로 활용되며 스트레스의 증가는 LF의 증가로 나타난다. 컴퓨터 작업등으로 인한 정신적 스트레스가 HF를 감소시키고, LF를 증가시키며, 이러한 변화가 혈압의 변동보다 특이적으로 정신적 스트레스를 측정할 수 있는 도구가 된다고 하였다. 이 값은 219.5에서 567.8로 증가하였으나 유의적인 차이가 아니었고, HF는 286.0에서 564.3으로 유인적인 차이를 보이며 증가했다. 전체적인 자율신경 활성으로 인한 TP 증가로 LF와 HF가 모두 증가한 것으로 생각된다

**Table 1. Effect of walnut extract on frequency domain analysis**

Frequency Domain Analysis				
	So-100(n= 12)		Sw-100(n= 12)	
	Before	After	Before	After
TP(ms <sup>2</sup> )	1046.7 ±417.7 <sup>abc</sup>	1306.6±843.1 <sup>ab</sup>	984.5±466.0 <sup>ab</sup>	1936.7±1238.2 <sup>a</sup>
LF(ms <sup>2</sup> )	225.7±160.2 <sup>b</sup>	338.0±540.9 <sup>abc</sup>	219.5±114.5 <sup>b</sup>	567.8±549.7 <sup>b</sup>
HF(ms <sup>2</sup> )	241.1±123.2 <sup>b</sup>	241.1±170.3 <sup>b</sup>	286.0±161.8 <sup>b</sup>	564.3±427.0 <sup>a</sup>
LF/HF	1.23±1.17 <sup>ab</sup>	1.56±1.28 <sup>ab</sup>	0.91±0.57 <sup>ab</sup>	1.24±0.81 <sup>b</sup>

SDNN이 큰 경우에는 심박 변동 신호가 그만큼 불규칙하다는 것을 의미하며, 반대의 경우 심박 변동 신호가 단조롭다는 의미이다. 건강할수록 HRV 신호가 불규칙하고 복잡하다는 것이며 SDNN 감소는 체내·외부의 환경 변화에 신속하고 적절한 자율 신경계의 항상성 유지 메커니즘의 상실 또는 여러 스트레스에 대한 대처능력 상실 또는 전반적인 건강 상태 저하의 의미를 지니는데 호두 추출물 섭취 후 SDNN 수치가 36.28에서 49.68로 유의적인 증가는 아니었으나 증가하는 경향을 보였다.

PSI는 신체적인 스트레스 지수나 압력의 지수를 나타내는데 이는 HRV와 HR, RR간격의 분포 등의 시간 영역 파라미터를 이용하여 압력의 정도를 보여 준다. 이는 호두 추출물 섭취 전 50.82에서 섭취 후 26.34로 유의적인 차이는 아니었으나, 감소하는 경향을 보였다.



**Table 2. Effect of walnut extract on Time domain analysis**

Time domain analysis				
	So-100(n= 12)		Sw-100(n= 12)	
	Before	After	Before	After
Mean				
HRT(bpm)	73.17±8.45 <sup>b</sup>	79.17±7.40 <sup>b</sup>	81.58±11.68 <sup>ab</sup>	73.08±6.99 <sup>b</sup>
SDNN(ms)	39.86±9.60 <sup>b</sup>	40.92±11.90 <sup>ab</sup>	36.28±8.16 <sup>b</sup>	49.68±15.35 <sup>b</sup>
PSI	35.69±19.32 <sup>b</sup>	36.42±20.73 <sup>b</sup>	50.82±31.57 <sup>ab</sup>	26.34±19.32 <sup>b</sup>

Table 3에는 심박변이도 측정치를 바탕으로 데이터 처리를 거쳐 분석기에 자동적으로 기록되는 항목을 나타냈다. 자율신경 활성화도는 90 이상이 정상범위의 경계이며 높을수록 좋고, 자율신경 균형도는 50 이하가 정상범위이며 낮을수록 자율신경이 균형적으로 발달한 것을 의미한다. 자율신경 활성화도는 자율신경계의 전체적인 활성도를 반영하며대개 만성 스트레스의 경우 자율신경계의 조절 능력 저하로 많이 감소한다. 자율신경 활성화도가 85.8에서 96.8로 유의적(P< 0.05)인 증가를 보였는데 이는 호두 추출물의 섭취가 자율신경계를 활성화 하여 스트레스에 긍정적인 영향을 미칠 수 있다고 생각 된다. 유의적(P< 0.05)인 차이는 아니었으나 자율신경 균형도도 53.3에서 45.5를 나타내 호두 추출물의 섭취가 교감신경과 부교감 신경의 비율을 좀 더 안정적이고 균형 있게 하는데 도움을 준 것으로 생각된다. 스트레스 저항도 90 미만 스트레스 지수 110이상 피로도가 110 이상이 스트레스 상태로 스트레스 저항도는 높을수록 신체의 상태가 환경의 변화 또는 스트레스에 대해 인체가 적절하게 적응하여 안정된 상태를 유지할 능력이 있는지를 표현하고 있는 지표이며, 스트레스 지수와 피로도는 낮을수록 신체내의 스트레스가 적고 스트레스로 인한 신체적, 정신적 피로가 낮다는 것을 의미한다. 스트레스 저항도는 88.1에서 98.5로 유의적(P< 0.05)인 증가를 보였고, 스트레스 지수는 102.5에서 91.4로 유의적(P< 0.05)인 감소를

보였으며, 피로도도 105.0에서 92.7로 유의적( $P < 0.05$ )인 감소를 보였다. 이는 호두 추출물의 섭취가 스트레스에 저항할 수 있는 대처능을 증진시켜 피로도와 스트레스 지수 모두를 감소시키는 것으로 생각된다. 심장 안정도는 90 미만이 심장이 안정적이지 못한 것을 나타낸다. 지속적인 스트레스나 공포, 불안, 근심으로 고생하는 환자나 심장 질환 시 낮게 나타나게 되며, 이는 심장의 전기적 안정도와 밀접한 관련이 있는데, 섭취 전 92.7에서 섭취 후 105.0로 유의적( $P < 0.05$ )인 증가를 보였고 이는 호두 추출물의 섭취가 자율신경계의 기능을 상승시켜 심장의 안정도를 상승시켰다는 의미이다.

**Table 3. Effect of walnut extract on automatic examination**

<b>Automatic Examination</b>				
	So-100(n= 12)		Sw-100(n= 12)	
	Before	After	Before	After
Autonomic activity	88.7±4.9 <sup>ab</sup>	91.3±9.3 <sup>ab</sup>	85.8±8.0 <sup>bc</sup>	96.8±12.0 <sup>a</sup>
Autonomic balance	43.8±38.4 <sup>a</sup>	55.0±32.3 <sup>a</sup>	53.3±38.1 <sup>a</sup>	45.5±42.6 <sup>a</sup>
Stress resistance	92.8±7.5 <sup>ab</sup>	94.0±7.2 <sup>ab</sup>	88.1±38.1 <sup>bc</sup>	98.5±11.2 <sup>a</sup>
Stress index	95.6±6.2 <sup>c</sup>	96.5±5.2 <sup>bc</sup>	102.5±10.3 <sup>ab</sup>	91.4±10.8 <sup>c</sup>
Fatigue index	117.3±12.0 <sup>ab</sup>	113.0±16.7 <sup>bc</sup>	119.5±11.9 <sup>c</sup>	104.9±13.7 <sup>ab</sup>
Electro-cardiac stability	88.7±4.9 <sup>b</sup>	90.8±7.8 <sup>b</sup>	92.7±8.2 <sup>b</sup>	105.0±17.0 <sup>a</sup>

$\alpha$  파는 신경 생리학적으로 두뇌안정 상태를 반영하는 기본파이며 잡파의 영향을 적게 받으므로 전통적으로 인간 행동에 대한 두뇌 좌, 우 반구의 기능 상태를 판정하는데 이용되어 왔다. 알파파가 출현이 증가한다면 식이 보조제 섭취를 통하여 마음이 편안하게 되고 긴장 해소를 가져와 정신건강과 뇌기능 상태에서의 긍정적인 변화를 암시하는 것으로 해석할 수 있다.

Table 4에는 각 채널의  $\alpha$  파 출현 값을 나타내었다. 긴장이완이나 편안한 상태일 때 출현 하는 파형으로 인간의 정신적 과정은  $\alpha$  파가 나타날 때 가장 효율적이며  $\alpha$  파의 출현은 스트레스와 불안이 감소하는 쾌적한 뇌의 상태를 나타내는 척도로 활용 되어 지고 있다. 위약군이 5, 6, 7채널을 제외한 부위에서 감소가 나옴에 반해 호두 추출물 섭취 후 전 채널의  $\alpha$  파 출현이 증가하였으나 유의적인 증가는 아니었다.

**Table 4. Effect of walnut extract on  $\alpha$  Wave**

	$\alpha$ Wave(Hz)			
	So-100(n= 12)		Sw-100(n= 12)	
	Before	After	Before	After
CH1	54.26±37.34	50.18±19.63	42.37±25.69	45.04±29.96
CH2	52.23±36.26	47.88±17.66	41.23±24.42	42.87±26.60
CH3	67.62±50.31	62.24±29.21	49.97±27.54	52.96±30.87
CH4	67.96±56.52	58.03±25.94	45.73±21.18	54.00±32.39
CH5	32.57±24.89	33.30±19.60	25.47±15.09	32.73±23.13
CH6	24.71±21.76	26.92±14.14	19.97±10.58	29.58±31.19
CH7	85.86±88.94	97.70±101.16	56.83±26.26	163.05±326.03
CH8	125.94±121.65	109.72±79.32	117.12±116.84	137.93±163.17

SEF(Spectral Edge Frequency)는 뇌파의 파워스펙트럼 분포가 저주파에 비해 고주파로 상대적으로 얼마만큼 편향되었는지를 정량화한 지표이다. 즉, 파워스펙트럼 그래프에서 Low-Edge(주파수축의 왼쪽)부터 누적한 면적이 전체영역 면적의 90%를 차지하는 시점에 해당하는 주파수 값을 나타낸다. 따라서 SEF지표의 값이 높을수록 뇌파의 각성 수준이 높은 상태를 의미하게 되는데 호두 추출물 섭취군의 채널 1, 2, 5, 8의 값이 증가하였고, 채널 3, 4, 6, 7의 값은 감소하였으나 유의적인 차이는 아니었다.

**Table 5. Effect of walnut extract on SEF90**

	SEF90			
	So-100(n= 12)		Sw-100(n= 12)	
	Before	After	Before	After
CH1	38.53±1.95	38.59±2.39	36.21±4.70	38.15±4.20
CH2	36.50±4.04	37.76±2.63	34.12±8.87	37.86±3.15
CH3	37.74±1.98	38.21±3.10	37.63±4.02	36.75±4.75
CH4	37.25±1.69	38.05±2.71	38.35±2.88	36.61±3.89
CH5	38.83±3.01	37.43±3.00	37.83±4.00	38.37±5.78
CH6	38.68±2.34	36.00±4.56	38.64±3.08	37.29±4.34
CH7	38.20±1.67	38.67±2.43	38.18±3.40	38.01±3.64
CH8	38.02±1.70	37.80±2.63	37.81±3.11	38.48±4.43

작업 부하도(Mental Workload)는 학습 능력 과제 수행 시 느끼는 정신적인 부하정도를 의미한다. 이는 정신적 스트레스 수준 및 정신적 과도한 각성 수준을 의미하는데 정서적으로 불안, 긴장, 초조하거나 과도하게 각성되어 있는 정신적 스트레스 상태일 때 작업부하도가 표준 범위(50%)보다 높게 나타나게 된다. 작업부하도는 50.96에서 49.62로 호두 추출물 섭취 후 감소하였으나 유의적인 차이는 아니었다(Table 6).

**Table 6. Effect of walnut extract on Mental Workload**

Mental workload			
So-100(n= 12)		Sw-100(n= 12)	
Before	After	Before	After
54.50±5.61	56.30±10.54	50.96±9.93	49.62±8.79

본 연구에서는 개인의 스트레스 상태 문진 및 효과를 검증하기 위해 박순영(1999)이 개발한 스트레스 측정 도구를 사용 하였다. 이 도구는 총 30 문항(심리적 스트레스 척도 15문항, 신체적 스트레스 척도 15문항)으로 각 영역별 스트레스 점수는 Likert형 4점 척도로, 0점에서 최고 45점으로 점수가 높을수록 스트레스 정도가 심하다는 것을 의미 한다. 사전 스트레스 측정에서 신체적 스트레스 점수는 최근 3개월을 기준으로 작성하였고, 심리적 스트레스 점수는 최근 3개월 동안을 기준으로 작성하였으며 사후 스트레스 측정에서는 섭취 후 상태를 기준으로 작성하였다.

Table 7.은 호두 추출물 섭취 후 신체적 스트레스 상태를 나타내는 것으로 호두추출물 섭취 후 점수가 15.75에서 10.67로 감소하였으나 유의적인 차이는 아니었다.

Table 7. Effect of walnut extract on physical stress point

	Physical stress			
	So-100(n= 12)		Sw-100(n= 12)	
	Before	After	Before	After
불면	1.17±1.27 <sup>a</sup>	1.00±0.95 <sup>a</sup>	0.92±0.67 <sup>ab</sup>	0.50±0.67 <sup>ab</sup>
심장 두근 거림	1.00±0.60 <sup>ab</sup>	0.58±0.79 <sup>a</sup>	0.67±0.65 <sup>ab</sup>	0.58±0.51 <sup>ab</sup>
얼굴, 신체일부가 경련	0.50±0.67 <sup>a</sup>	0.50±0.67 <sup>a</sup>	0.67±0.65 <sup>a</sup>	0.50±0.80 <sup>a</sup>
현기증	1.00±0.60 <sup>a</sup>	0.75±0.75 <sup>a</sup>	1.08±1.08 <sup>a</sup>	0.75±0.75 <sup>a</sup>
땀이 많이 남	0.50±0.80 <sup>b</sup>	0.42±0.90 <sup>b</sup>	1.42±1.00 <sup>a</sup>	1.00±1.13 <sup>ab</sup>
감각이 예민	1.83±1.03 <sup>bc</sup>	0.83±1.11 <sup>a</sup>	1.08±0.90 <sup>bc</sup>	0.58±0.67 <sup>ab</sup>
요통	0.59±0.79 <sup>ab</sup>	1.75±1.36 <sup>ab</sup>	1.33±0.98 <sup>a</sup>	0.92±1.00 <sup>ab</sup>
눈의 피로	2.00±0.95 <sup>ab</sup>	1.50±1.17 <sup>ab</sup>	2.16±5.78 <sup>a</sup>	1.42±1.24 <sup>abc</sup>
목이나 어깨 결림	1.92±1.08 <sup>ab</sup>	1.08±0.90 <sup>ab</sup>	2.16±0.83 <sup>a</sup>	1.50±0.90 <sup>ab</sup>
두통	1.00±0.95 <sup>ab</sup>	1.00±1.13 <sup>ab</sup>	1.17±0.39 <sup>a</sup>	1.00±0.95 <sup>ab</sup>
감염증(감기, 후두염 등)	0.50±0.90 <sup>ab</sup>	0.67±0.98 <sup>a</sup>	0.25±0.62 <sup>b</sup>	0.00±0.00 <sup>b</sup>
변비	1.16±1.19 <sup>a</sup>	0.50±0.67 <sup>ab</sup>	0.75±1.06 <sup>ab</sup>	0.50±0.67 <sup>ab</sup>
발열	0.17±0.40 <sup>a</sup>	0.50±0.67 <sup>a</sup>	0.50±0.67 <sup>a</sup>	0.41±0.51 <sup>a</sup>
소화불량	1.42±0.90 <sup>a</sup>	1.08±1.24 <sup>a</sup>	1.17±0.72 <sup>a</sup>	0.67±0.65 <sup>ab</sup>
설사	0.75±0.62 <sup>a</sup>	0.58±0.67 <sup>ab</sup>	0.42±0.51 <sup>ab</sup>	0.33±0.49 <sup>ab</sup>
<b>Total</b>	15.50±5.98 <sup>a</sup>	13.00±9.84 <sup>ab</sup>	15.75±4.71 <sup>ab</sup>	10.67±6.58 <sup>ab</sup>

Table 8.은 호두 추출물 섭취 후 신체적 스트레스 상태를 나타내는 것으로 호두추출물 섭취 후 점수가 13.42에서 9.00으로 감소하였으나 유의적인 차이는 아니었다.

**Table 8. Effect of walnut extract on mental stress point**

	Mental stress			
	So-100(n= 12)		Sw-100(n= 12)	
	Before	After	Before	After
매우 긴장하거나 불안한상태가 되었다.	1.00±0.95 <sup>a</sup>	0.75±0.87 <sup>ab</sup>	1.00±0.60 <sup>a</sup>	0.42±0.51 <sup>ab</sup>
기분이 매우 중요 되었다.	1.17±1.03 <sup>a</sup>	0.92±1.08 <sup>a</sup>	0.75±0.75 <sup>a</sup>	0.50±0.52 <sup>a</sup>
사소한 일에도 매우 신경질 적이었다.	1.58±0.90 <sup>a</sup>	0.92±1.00 <sup>abc</sup>	1.08±0.79 <sup>bc</sup>	0.50±0.67 <sup>c</sup>
소외감 무력감을 느꼈다.	1.50±0.90 <sup>a</sup>	1.25±1.00 <sup>ab</sup>	1.25±0.79 <sup>ab</sup>	0.75±0.75 <sup>bc</sup>
침착하지 못하다.	1.50±0.90 <sup>a</sup>	1.00±1.04 <sup>abc</sup>	0.92±0.67 <sup>abc</sup>	0.58±0.79 <sup>bc</sup>
아침까지 피로가 남고 일에 기력이 솟지 않는다.	1.33±0.78 <sup>a</sup>	1.75±0.97 <sup>a</sup>	1.75±0.75 <sup>a</sup>	1.25±1.22 <sup>a</sup>
화가 나서 자신의 감정을 억제 할 수 없었다.	1.75±0.87 <sup>a</sup>	0.83±1.03 <sup>ab</sup>	0.75±0.62 <sup>ab</sup>	0.83±0.83 <sup>ab</sup>
생각지도 못한 일 때문에 곤욕을 치렀다.	1.08±1.00 <sup>ab</sup>	0.75±0.75 <sup>ab</sup>	1.17±0.94 <sup>a</sup>	0.83±0.58 <sup>ab</sup>
심각한 고민이 머리에서 떠나지 않았다.	1.00±0.95 <sup>a</sup>	1.25±1.06 <sup>a</sup>	1.42±0.51 <sup>a</sup>	1.00±0.95 <sup>ab</sup>
모든 일이 생각대로 되지 않아 욕구 불만에 빠졌다.	1.41±1.00 <sup>ab</sup>	1.08±1.16 <sup>ab</sup>	1.08±0.51 <sup>ab</sup>	0.58±0.67 <sup>bc</sup>
모든 일에 집중할 수가 없었다.	1.17±0.94 <sup>ab</sup>	21.17±1.03 <sup>abc</sup>	0.67±0.65 <sup>ab</sup>	0.50±0.52 <sup>b</sup>
남 앞에서 얼굴 내미는 것이 두려웠다.	0.83±0.72 <sup>a</sup>	0.41±0.67 <sup>ab</sup>	0.33±0.49 <sup>ab</sup>	0.17±0.39 <sup>ab</sup>
남의 시선을 똑바로 볼 수가 없다.	0.58±0.67 <sup>a</sup>	0.25±0.62 <sup>ab</sup>	0.16±0.39 <sup>ab</sup>	0.16±0.39 <sup>ab</sup>
똑같은 실수를 반복했다.	0.58±0.67 <sup>a</sup>	0.83±0.83 <sup>a</sup>	0.75±0.45 <sup>a</sup>	0.67±0.78 <sup>a</sup>
가족이나 친한 사람과 함께 있는 시간도 편하지 않았다,	0.25±0.45 <sup>b</sup>	0.83±1.02 <sup>a</sup>	0.33±0.49 <sup>ab</sup>	0.25±0.45 <sup>b</sup>
<b>Total</b>	15.92±8.83 <sup>a</sup>	14.00±11.05 <sup>ab</sup>	13.42±4.27 <sup>ab</sup>	9.00±6.19 <sup>bc</sup>

## 연자(*Nelumbinis semen*) 추출물 섭취 후 스트레스 상태 변화

수련과에 속하는 연꽃의 열매 뿌리를 건조한 것으로, 중국, 아시아 각국, 아프리카, 오스트레일리아 분포하며 중국화북, 화남지역에서 BC400년 경부터 이용하였다. 우리나라에서도 예부터 불면증 치료의 목적으로 연자육을 사용하여 왔으며, 민간에서는 연자를 이용 하여 죽을 쑤어 먹거나 차로 끓여 마시면 마음의 안정을 시켜주며, 정신력을 강화시키고 눈과 귀를 밝게 한다고 알려져 있고, 한방에서는 양심안신(養心安神), 익신고삼(益腎固), 건비지사(建碑止瀉)등의 효능이 있다고 알려져 있다.

Table 9에 시험 자원자의 주파수범위분석 결과를 나타냈다. TP(Total Power)가 745.4에서 995.7로 증가하였으나 유의적인 차이는 아니었다. 교감신경의 활동지표로 주로 사용 되는 저주파(low frequency, LF)는 153.4에서 274.9로 증가하였고, HF또한 180.7에서 327.6으로 증가 하였다. 이 역시 자율신경 활성화로 인한 TP 증가로 LF와 HF가 모두 증가한 것으로 보여 지나 세 가지 지표 모두 유의적인 차이는 아니었다.

**Table 9. Effect of louts seed extract on Frequency domain analysis**

Frequency domain analysis				
	So-100(n= 12)		Ss-100(n= 12)	
	Before	After	Before	After
TP(ms <sup>2</sup> )	1046.7±417.7 <sup>abc</sup>	1306.6±843.1 <sup>ab</sup>	745.4±376.2 <sup>c</sup>	995.7±462.9 <sup>bc</sup>
LF(ms <sup>2</sup> )	225.7±160.2 <sup>b</sup>	338.04±540.9 <sup>abc</sup>	153.4±79.0 <sup>b</sup>	274.9±184.6 <sup>b</sup>
HF(ms <sup>2</sup> )	241.1±123.2 <sup>b</sup>	241.1±170.3 <sup>b</sup>	180.7±204. <sup>b</sup>	327.6±217.4 <sup>ab</sup>
LF/HF	1.23±1.17 <sup>ab</sup>	1.56±1.28 <sup>ab</sup>	1.87±1.86 <sup>ab</sup>	1.65±1.40 <sup>ab</sup>



SDNN 감소는 체 내 외부의 환경 변화에 신속하고 적절한 자율 신경계의 항상성 유지 메커니즘의 상실 또는 여러 스트레스에 대한 대처능력 상실 또는 전반적인 건강 상태 저하의 의미를 지니는데 연자육 추출물 섭취 후 SDNN 수치가 32.29에서 38.47로 유의 적( $P < 0.05$ )인 증가를 보였고, 이는 연자육 추출물의 섭취로 스트레스에 대한 전반적인 대처능력의 증진으로 생각된다(Table 10).

**Table 10. Effect of louts seed extract on time domain analysis**

Time domain analysis				
	So-100(n= 12)		Ss-100(n= 12)	
	Before	After	Before	After
Mean HRT(bpm)	73.17±8.45 <sup>b</sup>	79.17±7.40 <sup>b</sup>	84.58±11.65 <sup>a</sup>	75.17±11.95 <sup>b</sup>
SDNN(ms)	39.86±9.60 <sup>b</sup>	40.92±11.90 <sup>ab</sup>	32.29±10.00 <sup>b</sup>	38.47±10.65 <sup>a</sup>
PSI	35.69±19.32 <sup>b</sup>	36.42±20.73 <sup>b</sup>	79.43±75.61 <sup>a</sup>	46.48±33.27 <sup>b</sup>

Table 11에는 심박변이도 측정치를 바탕으로 데이터 처리를 거쳐 분석기에 자동적으로 기록되는 항목으로 나타났다. 자율신경 활성도가 80.3에서 86.1로 유의적( $P < 0.05$ )인 증가를 보였는데 이는 연자육의 섭취가 자율신경계를 활성화 하여 스트레스에 긍정적인 영향을 미칠 수 있다고 생각된다. 자율신경 균형도는 59.8에서 59.7로 거의 변화가 없었고, 스트레스 저항도는 유의적인 차이는 아니나 98.5에서 90.7로 감소하였다. 스트레스 지수는 110.8에서 100.9로 유의적( $P < 0.05$ )인 감소를 보였는데, 이는 스트레스 지수가 연자육 섭취 전 정상범위를 벗어난 것에 비교해 보면 연자육 섭취 후 유의적인 차이를 보이며 스트레스를 감소시킨 것은 물론 스트레스 지수를 낮춰 정상범위내의 수치를 나타내게 되었다. 이는 연자육 추출물이 스

트레스 해소에 긍정적인 영향을 미친것을 의미한다. 피로도 역시 128.6에서 114.8로 유의적( $P < 0.05$ )인 감소를 보였는데 이는 민간에서 불면증 개선의 목적으로 알려진 바와 같이 숙면을 유도하여 피로도가 낮아지는데 도움을 주었을 것을 의미한다. 심장 안정도는 90 미만이 심장이 안정적이지 못한 것을 나타낸다. 지속적인 스트레스나 공포, 불안, 근심으로 고생하는 환자나 심장 질환 시 낮게 나타나게 되며, 이는 심장의 전기적 안정도와 밀접한 관련이 있는데, 섭취 전 79.5로 정상 범위에서 벗어났으나 섭취 후 90.3으로 유의적인 증가는 아니었으나 정상 범위내의 값이 되었다.

**Table 11. Effect of lotus seed extract on automatic examination**

	Automatic Examination			
	So-100(n= 12)		Ss-100(n= 12)	
	Before	After	Before	After
Autonomic activity	88.7±4.9 <sup>ab</sup>	91.3±9.3 <sup>ab</sup>	80.3±11.4 <sup>ab</sup>	86.1±8.2 <sup>c</sup>
Autonomic balance	43.8±38.4 <sup>a</sup>	55.0±32.3 <sup>a</sup>	59.8±47.0 <sup>a</sup>	59.7±35.4 <sup>a</sup>
Stress resistance	92.8±7.5 <sup>ab</sup>	94.0±7.2 <sup>ab</sup>	98.5±42.6 <sup>abc</sup>	90.7±9.4 <sup>c</sup>
Stress index	95.6±6.2 <sup>c</sup>	96.5±5.2 <sup>bc</sup>	110.8±19.6 <sup>bc</sup>	100.9±11.1 <sup>a</sup>
Fatigue index	117.3±12.0 <sup>ab</sup>	113.0±16.7 <sup>bc</sup>	128.6±16.2 <sup>bc</sup>	114.8±8.1 <sup>a</sup>
Electro-cardiac stability	88.7±4.9 <sup>b</sup>	90.8±7.8 <sup>b</sup>	79.5±17.5 <sup>b</sup>	90.3±19.8 <sup>b</sup>

Table 12.에는 각 채널의  $\alpha$  파 출현 값을 나타내었다. 연자육 추출물의 섭취 후 8채널 모두에서 편안한 상태이거 안정적인 때 발생하게 되는  $\alpha$  파의 증가를 보였으나 유의적인 차이는 아니었다.

**Table 12. Effect of lotus seed extract on  $\alpha$  Wave**

<b><math>\alpha</math> Wave</b>				
	So-100(n= 12)		Ss-100(n= 12)	
	Before	After	Before	After
CH1	54.26±37.34	50.18±19.63	38.37±29.39	43.86±34.52
CH2	52.23±36.26	47.88±17.66	38.45±31.31	43.50±36.47
CH3	67.62±50.31	62.24±29.21	45.43±33.05	48.83±38.98
CH4	67.96±56.52	58.03±25.94	45.63±34.98	50.32±41.32
CH5	32.57±24.89	33.30±19.60	20.42±15.10	29.52±23.06
CH6	24.71±21.76	26.92±14.14	15.50±12.36	24.91±24.81
CH7	85.86±88.94	97.70±101.16	84.85±123.02	117.24±221.08
CH8	125.94±121.65	109.72±79.32	90.21±91.26	95.72±116.34

뇌파의 파워스펙트럼 분포가 저주파에 비해 고주파로 상대적으로 얼마만큼 편향 되었는지를 정량화한 지표인 SEF 90에서 연자육 추출물 섭취 후 대부분의 채널에서 눈에 띄는 변화를 보이는 채널이 없었고 뇌파의 각성 수준이 섭취 전과 섭취 후 비슷한 상태였으나 이 역시 전 채널에서 유의적인 차이를 발견할 수 없었다.

**Table 13. Effect of lotus seed extract on SEF90**

SEF90				
	So-100(n= 12)		Ss-100(n= 12)	
	Before	After	Before	After
CH1	38.53±1.95	38.59±2.39	38.14±2.96	38.20±5.75
CH2	36.50±4.04	37.76±2.63	38.02±2.61	38.42±5.70
CH3	37.74±1.98	38.21±3.10	39.01±2.32	38.40±2.50
CH4	37.25±1.69	38.05±2.71	38.53±2.20	38.74±1.99
CH5	38.83±3.01	37.43±3.00	37.88±2.60	37.61±1.58
CH6	38.68±2.34	36.00±4.56	38.78±2.36	37.28±2.48
CH7	38.20±1.67	38.67±2.43	38.18±2.08	38.82±2.59
CH8	38.02±1.70	37.80±2.63	38.84±2.42	38.69±2.28

학습 능력 검사에서 보여 지는 작업 부하도는 문제 풀이를하는 동안 정신적 스트레스 수준 및 정신적 과도한 각성 수준을 의미 하는데 50.96에서 49.62로 섭취 전과 후의 변화는 거의 없었다.

**Table 14. Effect of lotus seed extract on mental workload**

Mental Workload			
So-100(n= 12)		Sw-100(n= 12)	
Before	After	Before	After
54.50±5.61	56.30±10.54	50.96±9.93	49.62±8.79

스트레스 측정 도구를 사용 하여 점수를 비교해본 결과를 Table 15에 나타내었다. 신체적인 스트레스 점수는 14.83에서 9.00으로 유의적(P< 0.05)인 감소를 보였다. 이는 연자육 추출물의 섭취가 개개인의 신체적 스트레스를 감소하는데 긍정적인 영향을 미친 것을 의미하며 특히, 목이나 어깨 결림이 완화 되었다는 응답은 유의적인 감소를 보였다.

Table 15. Effect of lotus seed extract on mental Physical stress point

	Physical stress			
	So-100(n= 12)		Ss-100(n= 12)	
	Before	After	Before	After
불면	1.17±1.27 <sup>a</sup>	1.00±0.95 <sup>a</sup>	0.92±0.90 <sup>ab</sup>	0.25±0.45 <sup>b</sup>
심장 두근 거림	1.00±0.60 <sup>ab</sup>	0.58±0.79 <sup>a</sup>	0.83±0.72 <sup>ab</sup>	0.58±0.51 <sup>ab</sup>
얼굴, 신체일부가 경련	0.50±0.67 <sup>a</sup>	0.50±0.67 <sup>a</sup>	0.50±0.52 <sup>a</sup>	0.33±0.49 <sup>a</sup>
현기증	1.00±0.60 <sup>a</sup>	0.75±0.75 <sup>a</sup>	1.00±0.60 <sup>a</sup>	0.83±0.72 <sup>a</sup>
땀이 많이 남	0.50±0.80 <sup>b</sup>	0.42±0.90 <sup>b</sup>	1.08±0.10 <sup>ab</sup>	0.58±0.67 <sup>ab</sup>
감각이 예민	1.83±1.03 <sup>bc</sup>	0.83±1.11 <sup>a</sup>	1.08±0.79 <sup>bc</sup>	0.83±0.72 <sup>ab</sup>
요통	0.59±0.79 <sup>ab</sup>	1.75±1.36 <sup>ab</sup>	0.83±1.03 <sup>ab</sup>	0.25±0.45 <sup>b</sup>
눈의 피로	2.00±0.95 <sup>ab</sup>	1.50±1.17 <sup>ab</sup>	1.92±0.79 <sup>ab</sup>	1.08±0.79 <sup>bc</sup>
목이나 어깨 결림	1.92±1.08 <sup>ab</sup>	1.08±0.90 <sup>ab</sup>	2.17±0.83 <sup>a</sup>	1.25±0.75 <sup>bc</sup>
두통	1.00±0.95 <sup>ab</sup>	1.00±1.13 <sup>ab</sup>	1.25±0.62 <sup>a</sup>	1.17±0.72 <sup>ab</sup>
감염증 (감기, 후두염 등)	0.50±0.90 <sup>ab</sup>	0.67±0.98 <sup>a</sup>	0.25±0.45 <sup>b</sup>	0.08±0.29 <sup>b</sup>
변비	1.16±1.19 <sup>a</sup>	0.50±0.67 <sup>ab</sup>	0.50±0.90 <sup>ab</sup>	0.42±0.90 <sup>b</sup>
발열	0.17±0.40 <sup>a</sup>	0.50±0.67 <sup>a</sup>	0.58±0.51 <sup>a</sup>	0.25±0.45 <sup>a</sup>
소화불량	1.42±0.90 <sup>a</sup>	1.08±1.24 <sup>a</sup>	1.17±0.58 <sup>a</sup>	0.58±0.67 <sup>ab</sup>
설사	0.75±0.62 <sup>a</sup>	0.58±0.67 <sup>ab</sup>	0.75±0.75 <sup>a</sup>	0.50±0.67 <sup>a</sup>
<b>Total</b>	15.50±5.98 <sup>a</sup>	13.00±9.84 <sup>ab</sup>	14.83±4.91 <sup>a</sup>	9.00±4.97 <sup>bc</sup>

Table 16은 연자육 추출물 섭취 후 정신적 스트레스 상태를 나타내는 것으로 연자육 추출물 섭취 후 점수가 12.25에서 6.75로 감소하였으나 유의적인 차이를 보이지는 않았다

Table 16. Effect of lotus seed extract on mental physical stress point

	Mental stress			
	So-100(n= 12)		Ss-100(n= 12)	
	Before	After	Before	After
매우 긴장하거나 불안한상태가 되었다.	1.00±0.95 <sup>a</sup>	0.75±0.87 <sup>ab</sup>	0.92±0.67 <sup>a</sup>	0.50±0.67 <sup>ab</sup>
기분이 매우 동요되었다.	1.17±1.03 <sup>a</sup>	0.92±1.08 <sup>a</sup>	0.92±0.67 <sup>a</sup>	0.58±0.79 <sup>a</sup>
사소한 일에도 매우 신경질 적이었다.	1.58±0.90 <sup>a</sup>	0.92±1.00 <sup>abc</sup>	1.08±0.79 <sup>abc</sup>	0.75±0.62 <sup>bc</sup>
소외감 무력감을 느꼈다.	1.50±0.90 <sup>a</sup>	1.25±1.00 <sup>ab</sup>	0.83±0.39 <sup>bc</sup>	0.42±0.51 <sup>c</sup>
침착하지 못하다.	1.50±0.90 <sup>a</sup>	1.00±1.04 <sup>abc</sup>	1.08±0.79 <sup>ab</sup>	0.42±0.67 <sup>bc</sup>
아침까지 피로가 남고 일에 기력이 솟지 않는다.	1.33±0.78 <sup>a</sup>	1.75±0.97 <sup>a</sup>	1.58±0.90 <sup>a</sup>	1.00±0.95 <sup>a</sup>
화가 나서 자신의 감정을 억제 할 수 없었다.	1.75±0.87 <sup>a</sup>	0.83±1.03 <sup>ab</sup>	0.67±0.78 <sup>ab</sup>	0.25±0.45 <sup>b</sup>
생각지도 못한 일 때문에 곤욕을 치렀다.	1.08±1.00 <sup>ab</sup>	0.75±0.75 <sup>ab</sup>	0.83±0.83 <sup>ab</sup>	0.42±0.51 <sup>b</sup>
심각한 고민이 머리에서 떠나지 않았다.	1.00±0.95 <sup>a</sup>	1.25±1.06 <sup>a</sup>	1.17±0.94 <sup>ab</sup>	0.75±0.62 <sup>ab</sup>
모든 일이 생각대로 되지 않아 욕구 불만에 빠졌다.	1.41±1.00 <sup>ab</sup>	1.08±1.16 <sup>ab</sup>	0.83±0.58 <sup>abc</sup>	0.25±0.45 <sup>c</sup>
모든 일에 집중할 수가 없었다.	1.17±0.94 <sup>ab</sup>	21.17±1.03 <sup>abc</sup>	0.67±0.49 <sup>ab</sup>	0.58±0.51 <sup>ab</sup>
남 앞에서 얼굴 내미는 것이 두려웠다.	0.83±0.72 <sup>a</sup>	0.41±0.67 <sup>ab</sup>	0.17±0.40 <sup>ab</sup>	0.00±0.00 <sup>b</sup>
남의 시선을 똑바로 볼 수가 없다.	0.58±0.67 <sup>a</sup>	0.25±0.62 <sup>ab</sup>	0.42±0.51 <sup>ab</sup>	0.17±0.39 <sup>ab</sup>
똑같은 실수를 반복했다.	0.58±0.67 <sup>a</sup>	0.83±0.83 <sup>a</sup>	0.67±0.65 <sup>a</sup>	0.50±0.67 <sup>a</sup>
가족이나 친한 사람과 함께 있는 시간도 편하지 않았다,	0.25±0.45 <sup>b</sup>	0.83±1.02 <sup>a</sup>	0.41±0.67 <sup>ab</sup>	0.17±0.39 <sup>b</sup>
<b>Total</b>	15.92±8.83 <sup>a</sup>	14.00±11.05 <sup>ab</sup>	12.25±6.24 <sup>abc</sup>	6.75±4.52 <sup>cd</sup>

호두(*Juglans semen*)와 연자(*Nelumbinis semen*) 혼합추출물 섭취 후 스트레스 상태 변화

스트레스, 불면, 항 우울 등의 효과를 기대 했던 호두와 연자 추출물의 synergy 효과를 검증하기 위해 두 가지 추출 성분을 혼합하여 21일간 섭취 한 후 그 결과를 분석하였다. Table 17에는 시험 자원자의 주파수범위 분석 결과를 나타냈다. TP(Total Power)가 991.3에서 1192.6으로 증가를 나타내었으나 유의적인 차이는 아니었다. 교감 신경의 활동지표로 주로 사용 되는 저주파(low frequency, LF)는 297.4에서 297.3으로 전과 후의 변화가 거의 없었다. HF또한 217.4에서 201.6으로 감소하였으나 유의적인 차이는 아니었다.

**Table 17. Effect of walnut + lotus seed extract on frequency domain analysis**

Frequency Domain Analysis				
	So-100(n= 12)		Sr-100(n= 12)	
	Before	After	Before	After
TP(ms <sup>2</sup> )	1046.7±417.7 <sup>abc</sup>	1306.6±843.1 <sup>ab</sup>	991.3±696.49 <sup>bc</sup>	1192.6±609.19 <sup>abc</sup>
LF(ms <sup>2</sup> )	225.7±160.2 <sup>bc</sup>	338.04±540.9 <sup>abc</sup>	297.4±341.9 <sup>ab</sup>	297.3±176.8 <sup>ab</sup>
HF(ms <sup>2</sup> )	241.1±123.2 <sup>b</sup>	241.1±170.3 <sup>b</sup>	217.4±217.2 <sup>b</sup>	201.6±142.4 <sup>b</sup>
LF/HF	1.23±1.17 <sup>ab</sup>	1.56±1.28 <sup>ab</sup>	2.62±3.11 <sup>abc</sup>	3.13±4.15 <sup>a</sup>



체내·외부의 환경 변화에 신속하고 적절한 자율 신경계의 항상성 유지 메커니즘의 상실 또는 여러 스트레스에 대한 대처능력 상실 또는 전반적인 건강 상태 저하의 의미하는 SDNN은 혼합 추출물 섭취 후 36.92에서 38.21로 증가를 보였으나 눈에 띄는 변화 양상은 아니었다. 신체적인 스트레스 지수나 압력의 지수를 나타내는 PSI는 혼합 추출물 섭취 후 51.52에서 섭취 후 36.90으로 유의적인 차이는 아니었으나, 감소하는 경향을 보였다.

**Table 18. Effect of walnut + lotus seed extract on time domain analysis**

<b>Time Domain Analysis</b>				
	So-100(n= 12)		Sr-100(n= 12)	
	Before	After	Before	After
Mean HRT(bpm)	73.17±8.45 <sup>b</sup>	79.17±7.40 <sup>b</sup>	76.25±11.79 <sup>ab</sup>	74.50±9.01 <sup>b</sup>
SDNN(ms)	39.86±9.60 <sup>b</sup>	40.92±11.90 <sup>ab</sup>	36.92±13.43 <sup>b</sup>	38.21±7.45 <sup>b</sup>
PSI	35.69±19.32 <sup>b</sup>	36.42±20.73 <sup>b</sup>	51.52±37.33 <sup>ab</sup>	36.90±10.17 <sup>b</sup>

Table 19에는 심박변이도 측정치를 바탕으로 데이터 처리를 거쳐 분석기에 자동적으로 기록되는 항목으로 나타났다. 자율신경 활성도가 86.6에서 90.4로 유의적인 수준은 아니나 증가하는 경향을 보였다. 스트레스 저항도는 유의적인 차이는 아니나 90.2에서 92.75로 증가하였다. 스트레스 지수는 100.2에서 97.75로 유의적인 감소는 아니었다. 피로도는 117.4에서 114.8로 이 역시 감소하였으나 눈에 띄는 변화는 아니었다.

**Table 19. Effect of walnut + lotus seed extract on automatic examination**

<b>Automatic Examination</b>				
	So-100 (n= 12)		Sr-100 (n= 12)	
	Before	After	Before	After
Autonomic activity	88.7±4.9 <sup>ab</sup>	91.3±9.3 <sup>ab</sup>	86.6±8.9 <sup>bc</sup>	90.4±9.4 <sup>ab</sup>
Autonomic balance	43.8±38.4 <sup>a</sup>	55.0±32.3 <sup>a</sup>	67.3±42.4 <sup>a</sup>	61.5±42.9 <sup>a</sup>
Stress resistance	92.8±7.5 <sup>ab</sup>	94.0±7.2 <sup>ab</sup>	90.2±9.0 <sup>abc</sup>	92.75±5.2 <sup>ab</sup>
Stress index	95.6±6.2 <sup>c</sup>	96.5±5.2 <sup>bc</sup>	100.2±10.6 <sup>bc</sup>	97.08±3.6 <sup>bc</sup>
Fatigue index	117.3±12.0 <sup>ab</sup>	113.0±16.7 <sup>bc</sup>	117.4±13.7 <sup>ab</sup>	114.8±8.1 <sup>bc</sup>
Electro-cardiac stability	88.7±4.9 <sup>b</sup>	90.8±7.8 <sup>b</sup>	84.8±19.2 <sup>b</sup>	88.3±11.2 <sup>b</sup>

Table 20에는 각 채널의  $\alpha$  파 출현 값을 나타내었다. 혼합 추출물의 섭취 후 역시 전 채널에서 편안한 상태이거나 안정적인 때 발생하게 되는  $\alpha$  파의 증가를 보였으나 유의적인 차이는 아니었다.

**Table 20. Effect of walnut + lotus seed extract on  $\alpha$  Wave**

$\alpha$ Wave				
	So-100(n= 12)		Sr-100(n= 12)	
	Before	After	Before	After
CH1	54.26±37.34	50.18±19.63	34.08±20.63	43.08±35.22
CH2	52.23±36.26	47.88±17.66	33.13±19.72	40.99±31.96
CH3	67.62±50.31	62.24±29.21	42.71±26.88	51.60±39.22
CH4	67.96±56.52	58.03±25.94	41.98±24.72	52.41±39.86
CH5	32.57±24.89	33.30±19.60	20.98±13.14	27.57±21.81
CH6	24.71±21.76	26.92±14.14	16.13±8.20	23.28±16.32
CH7	85.86±88.94	97.70±101.16	44.59±29.27	55.51±39.53
CH8	125.94±121.65	109.72±79.32	56.51±45.30	80.28±73.70

뇌파의 파워스펙트럼 분포가 저주파에 비해 고주파로 상대적으로 얼마만큼 편향 되었는지를 정량화한 지표인 SEF 90에서 혼합 추출물 섭취 후 대부분의 채널에서 눈에 띄는 변화를 보이는 채널이 없었고 뇌파의 각성 수준이 섭취 전과 섭취 후 비슷한 상태였으나 이 역시 전 채널에서 유의적인 차이를 발견할 수 없었다.

**Table 21. Effect of walnut + lotus seed extract on SEF90**

	SEF90			
	So-100(n= 12)		Sr-100(n= 12)	
	Before	After	Before	After
CH1	38.53±1.95	38.59±2.39	34.55±9.04	38.14±3.13
CH2	36.50±4.04	37.76±2.63	35.42±4.47	36.88±5.12
CH3	37.74±1.98	38.21±3.10	37.03±1.85	36.22±3.87
CH4	37.25±1.69	38.05±2.71	37.78±2.52	36.39±4.10
CH5	38.82±3.01	37.43±3.00	37.85±2.88	35.80±3.35
CH6	38.69±2.34	36.00±4.56	36.36±6.43	35.30±3.69
CH7	38.20±1.67	38.67±2.43	34.90±10.66	35.94±8.00
CH8	38.02±1.70	37.79±2.63	38.01±3.85	37.45±4.09

학습능력검사에서 보이는 작업부하도는 문제 풀이를 하는 동안 정신적 스트레스 수준 및 정신적으로 과도한 각성 수준을 의미하는데 55.09에서 54.30로 섭취 전과 후의 변화는 거의 없었다.

**Table 22. Effect of walnut + lotus seed extract on mental workload**

Mental Workload			
So-100(n= 12)		Sr-100(n= 12)	
Before	After	Before	After
54.50±5.61	56.30±10.54	55.09±6.70	54.30±5.90

스트레스 측정 도구를 사용하여 점수를 비교해본 결과를 Table 23에 나타 내었다. 신체적인 스트레스 점수는 12.50에서 4.75로 유의적( $P < 0.05$ )인 감소를 보였다. 이는 혼합 추출물의 섭취가 개인의 신체적 스트레스를 감소하는데 긍정적인 영향을 미친 것을 의미한다. 혼합 추출물 섭취 후목이나 어깨 결림, 감각이 예민, 눈의 피로, 소화불량이 경감되었다는 응답은 모두 유의적인 감소를 보여 혼합 추출물 섭취 후 개인의 신체 변화가 긍정적인 방향으로 변화 되었다는 것을 알 수 있었다.

**Table 23. Effect of walnut + lotus seed extract on physical stress point**

	Physical stress			
	So-100(n= 12)		Sr-100(n= 12)	
	Before	After	Before	After
불면	1.17±1.27 <sup>a</sup>	1.00±0.95 <sup>a</sup>	0.92±0.90 <sup>ab</sup>	0.25±0.62 <sup>b</sup>
심장 두근 거림	1.00±0.60 <sup>ab</sup>	0.58±0.79 <sup>a</sup>	0.58±0.67 <sup>ab</sup>	0.33±0.49 <sup>b</sup>
얼굴, 신체일부가 경련	0.50±0.67 <sup>a</sup>	0.50±0.67 <sup>a</sup>	0.67±0.65 <sup>a</sup>	0.25±0.45 <sup>a</sup>
현기증	1.00±0.60 <sup>a</sup>	0.75±0.75 <sup>a</sup>	0.83±0.58 <sup>a</sup>	0.42±0.67 <sup>a</sup>
땀이 많이 남	0.50±0.80 <sup>b</sup>	0.42±0.90 <sup>b</sup>	0.50±0.67 <sup>b</sup>	0.42±0.79 <sup>b</sup>
감각이 예민	1.83±1.03 <sup>bc</sup>	0.83±1.11 <sup>a</sup>	1.33±0.65 <sup>ab</sup>	0.50±0.52 <sup>c</sup>
요통	0.59±0.79 <sup>ab</sup>	1.75±1.36 <sup>ab</sup>	0.66±0.89 <sup>ab</sup>	0.17±0.40 <sup>b</sup>
눈의 피로	2.00±0.95 <sup>ab</sup>	1.50±1.17 <sup>ab</sup>	1.92±0.90 <sup>ab</sup>	0.83±0.72 <sup>c</sup>
목이나 어깨 결림	1.92±1.08 <sup>ab</sup>	1.08±0.90 <sup>ab</sup>	1.67±0.89 <sup>ab</sup>	0.58±0.79 <sup>c</sup>
두통	1.00±0.95 <sup>ab</sup>	1.00±1.13 <sup>ab</sup>	0.83±0.58 <sup>ab</sup>	0.42±0.51 <sup>b</sup>
감염증 (감기, 후두염 등)	0.50±0.90 <sup>ab</sup>	0.67±0.98 <sup>a</sup>	0.25±0.62 <sup>b</sup>	0.00±0.00 <sup>b</sup>
변비	1.16±1.19 <sup>a</sup>	0.50±0.67 <sup>ab</sup>	0.25±0.45 <sup>b</sup>	0.17±0.39 <sup>b</sup>
발열	0.17±0.40 <sup>a</sup>	0.50±0.67 <sup>a</sup>	0.50±0.52 <sup>a</sup>	0.17±0.39 <sup>a</sup>
소화불량	1.42±0.90 <sup>a</sup>	1.08±1.24 <sup>a</sup>	1.08±1.16 <sup>a</sup>	0.17±0.39 <sup>b</sup>
설사	0.75±0.62 <sup>a</sup>	0.58±0.67 <sup>ab</sup>	0.50±0.67 <sup>ab</sup>	0.08±0.29 <sup>b</sup>
<b>Total</b>	15.50±5.98 <sup>a</sup>	13.00±9.84 <sup>ab</sup>	12.50±4.52 <sup>ab</sup>	4.75±3.39 <sup>c</sup>

Table 24.는 호두 추출물 섭취 후 신체적 스트레스 상태를 나타내는 것으로 호두추출물 섭취 후 점수가 12.42에서 5.08로 유의적인 차이를 보이며 감소하였고, 전체 응답의 전반적인 감소를 보였다.

Table 24. Effect of walnut + lotus seed extract on mental stress

	Mental stress			
	So-100(n= 12)		Sr-100(n= 12)	
	Before	After	Before	After
매우 긴장하거나 불안한상태가 되었다. 기분이 매우 동요 되었다.	1.00±0.95 <sup>a</sup>	0.75±0.87 <sup>ab</sup>	0.83±0.58 <sup>a</sup>	0.17±0.39 <sup>b</sup>
사소한 일에도 매우 신경질 적이었다.	1.17±1.03 <sup>a</sup>	0.92±1.08 <sup>a</sup>	0.75±0.62 <sup>a</sup>	0.50±0.67 <sup>a</sup>
소외감 무력감을 느꼈다.	1.58±0.90 <sup>a</sup>	0.92±1.00 <sup>abc</sup>	1.33±0.98 <sup>ab</sup>	0.50±0.67 <sup>c</sup>
침착하지 못하다. 아침까지 피로가 남고 일에 기력이 솟지 않는다.	1.50±0.90 <sup>a</sup>	1.25±1.00 <sup>ab</sup>	0.58±0.67 <sup>c</sup>	0.33±0.49 <sup>c</sup>
화가 나서 자신의 감정을 억제 할 수 없었다.	1.50±0.90 <sup>a</sup>	1.00±1.04 <sup>abc</sup>	0.83±0.39 <sup>abc</sup>	0.33±0.49 <sup>c</sup>
생각지도 못한 일 때문에 곤욕을 치렀다.	1.33±0.78 <sup>a</sup>	1.75±0.97 <sup>a</sup>	1.67±0.78 <sup>a</sup>	1.00±0.74 <sup>a</sup>
심각한 고민이 머리에서 떠나지 않았다.	1.75±0.87 <sup>a</sup>	0.83±1.03 <sup>ab</sup>	0.83±0.72 <sup>ab</sup>	0.17±0.58 <sup>b</sup>
모든 일이 생각대로 되지 않아 욕구 불만에 빠졌다.	1.08±1.00 <sup>ab</sup>	0.75±0.75 <sup>ab</sup>	0.67±0.49 <sup>ab</sup>	0.33±0.49 <sup>b</sup>
모든 일에 집중할 수가 없었다.	1.00±0.95 <sup>a</sup>	1.25±1.06 <sup>a</sup>	1.17±0.58 <sup>ab</sup>	0.50±0.67 <sup>b</sup>
남 앞에서 얼굴 내미는 것이 두려웠다.	1.41±1.00 <sup>ab</sup>	1.08±1.16 <sup>ab</sup>	1.25±0.45 <sup>a</sup>	0.33±0.65 <sup>c</sup>
남의 시선을 똑바로 볼 수가 없다.	1.17±0.94 <sup>ab</sup>	21.17±1.03 <sup>abc</sup>	1.00±0.43 <sup>ab</sup>	0.50±0.5 <sup>ac</sup>
똑같은 실수를 반복했다.	0.83±0.72 <sup>a</sup>	0.41±0.67 <sup>ab</sup>	0.33±0.49 <sup>ab</sup>	0.00±0.00 <sup>b</sup>
가족이나 친한 사람과 함께 있는 시간도 편하지 않았다,	0.58±0.67 <sup>a</sup>	0.25±0.62 <sup>ab</sup>	0.25±0.62 <sup>ab</sup>	0.83±0.29 <sup>b</sup>
<b>Total</b>	15.92±8.83 <sup>a</sup>	14.00±11.05 <sup>ab</sup>	12.42±4.10 <sup>abc</sup>	5.08±4.78 <sup>d</sup>

국내 조사에 의하면 내과계 입원 환자의 약 71% 정도가 정신신체 장애 즉, 스트레스로 인해 발병 되거나 기존의 신체적 질병이 악화되는 경우에 해당될 정도로 상당수의 신체 질환 환자들이 크고 작은 스트레스의 영향을 받고 있는 것으로 나타났다. 대부분의 정신 신체장애에 있어서는 급성의 심한 충격적 스트레스보다는 오히려 만성적이고 일상 적인 스트레스가 누적되어 점차 기관의 조직 및 생리에 파괴적인 변화를 초래 하는 것으로 알려져 있다. 또한 여러 가지 stressor는 일련의 연구에 의해서 mitogen 유도 림프구 감소 자연 살해 세포활성도가 높아졌고, Galen의 연구 결과 낙천적인 여성 보다 우울한 여성에서 암 발생이 높은 것으로 나타나는 등 심리 사회적 스트레스와 암 발생이 서로 연관이 있다는 견해를 보이고 있다. 이와 같이 스트레스가 면역체계 악화, 암 유발 등 만병의 근원이라고 해도 과언이 아닐 정도로 많은 질환의 원인이 되고 있다. 이러한 스트레스를 해소하지 못하고 반복되고 계속되면 만성화된 스트레스를 유발하여 개인, 가족, 사회에 악영향을 미치게 되므로 스트레스를 신속하게 해소할 수 있는 물질의 개발이 시급 하다. 이를 위해 스트레스 해소나 항우울 성분의 기대 효과가 있는 호두와 연자육, 두 가지 성분의 혼합물, 이 세 가지 추출물을 21일간 복용 후 그 효과에 대하여 살펴보았는데 호두 추출물은 TP와 자율 신경 활성도를 증가 시키고 스트레스 저항도를 증가하여 스트레스 지수를 감소시키는 등 스트레스 해소에 효과적인 물질인 것으로 판단된다.

또한 연자육 역시 피로도가 유의 있게 감소하고 SDNN이 유의 있게 증가하고 스트레스 설문에서 신체적인 스트레스 점수가 유의 있게 감소하는 등 스트레스에 효과적인 물질로 판단된다. 이진우의 연구 결과 에서도 쥐를 이용한 강제 유영 검사에서 연자육 투여 군이 유의성 있는 우울행동 개선 효과를 보이는 등 연자육 역시 스트레스 해소에 적합한 물질로 판단된다. 호두와 연자육의 혼합 추출물은 스트레스 설문에서만 유의적인 차이를 보이고 일련의 검사에서 개선되는 경향은 보였으나 다른 과학적인 근거를 제시 하지 못해 호두와 연자육의 혼합 추출물보다는 호두, 연자육 단일 추출물이 스트레스 해소에 더 긍정적일 것이라고 판단된다.



## 제 5 절 참고문헌

- 고경봉. 스트레스와 정신신체의학. 일조각. (2002)
- 박경숙, 서혜경. 클라리세이지(Clarysage)에센셜 오일을 이용한 향기 흡입법이 중년여성의 스트레스 감소에 미치는 효과. 9(1); 70-79 (2003)
- 표내숙, 안정덕. 심리치료를 위한 운동 요법의 개발. 한국스포츠심리학회지. 13(1): 129-151 (2002)
- 건강생활. 웰빙 푸드 호두. 10. (2005)
- 이진우. 연자육의 항우울 효과 및 프로티옴 분석을 통한 기전 연구. 경희대학교 박사 학위 논문. 53-56 (2004)
- 배기환. 한국의 약용식물. 교학사. 158. (1999)
- 장상문, 손효남, 김광호, 김미옥. 식품재료학. 312-315, 305-306. (2005)
- 최명애, 김금순, 김명애, 박금화, 서순림, 안경애, 이성희, 정재심, 채영란, 홍해숙, 스트레스와 면역. 군자 출판사. (2003)
- Jang BH, Lee JH, Mun KS, Kim JW and Kwon OS. Effect of auricular for mental Stress on heart rate variability (HRV). *The Journal of Korean Acupuncture & Moxibustion Society* 22(6) : 1732-180 (2005)
- Daruna JH, Morgan JE. Psychosocial effects on immune function neuroendocrine pathways. *Psychosomatics*. 31 : 4-12 (1990)
- Nis Hijortskov. etc. The effect of mental stress on heart rate variability and blood pressure during computer work. *Eur J Appl Physiol*. 92 : 84-89 (2004)
- Shim IS, Bae HS, Kang MK and Pyun KH. Development of better antidepressant using Nelumbinis Semen in an animal model of depression. *International Congress Series*. 1287 : 345- 349 (2006)
- Gray G. Bertson, John T. Cacioppo. Heart rate variability. stress and psychiatric condition. 59-53 (2003)

## 요약문

본 연구의 목적은 스트레스 대처능을 증진시켜 개체의 항상성과 건강을 유지한다고 알려져 있고, 신경쇠약, 불면증 등에 효과가 있다고 민간에서 사용하고 있는 호두와 예로부터 한의학에서 불면증 치료제로 널리 쓰였던 연자를 이용하여 부작용이 없으며 간단하고 효과 적인 스트레스 해소 효과를 기대 할 수 있는지를 검증해보는데 있다. 이를 위하여 48 명의 일반인을 대상으로 실험집단과 통제집단(n= 12)으로 나누어 실험집단은 호두 추출 성분(n= 12), 연꽃 종자 추출 성분(n= 12), 호두와 연꽃 종자 추출 성분(n= 12)을 정제로 제조하여 아침, 저녁 하루 2 회, 1 회에 2 정씩 2 주간 섭취하도록 하였다. 스트레스 강도 측정 도구로는 자율신경 균형검사기(SA-3000P, Medicore Co. Ltd., Seoul, Korea)와 배경뇌파검사기(QEEG-8(LEX-3208), Laxtha Co., Korea), 이용하여 분석하였고, 박순영(1999)이 개발한 스트레스 측정 도구를 이용하여 스트레스를 검진하였다. 모든 피검자들은 시제품 섭취 전과 후에 검사를 받았으며, 그 자료를 SAS two-way ANOVA( $P < 0.05$ )로 분석하였다. 연구 결과 자율신경 균형검사에서 스트레스 저항도와 심장안정도는 유의적으로 증가하였고, 피로도, 스트레스 지수는 유의적으로 감소하였다. 또한 시간범위 분석에서도 SDNN이 유의적으로 증가하였다, 또한 박순영(1999)이 개발한 스트레스 측정도구 설문에서도 심리적, 신체적 스트레스 두 항목 모두에서 유의적인 감소를 나타내는 등 호두 추출물과 연꽃 종자 추출물은 스트레스에 완화에 효과적인 식품소재로 판단되었다.

## 제 8 장 수면 보조 효능을 지닌 식품소재 연구

### 1. 실험방법

#### 가. 식용 식물체로부터 melatonin 함유 식품소재의 발굴 및 활용

##### 1) 식물체 시료의 제조

Melatonin 분석에 사용할 식용 식물체는 인근의 슈퍼마켓 및 약재상 등에서 구입하여 수세 후 채로 썰어서 동결 건조한 다음 분쇄하여 -70℃에서 보관하면서 분석에 사용하였다.

##### 2) HPLC를 이용한 melatonin 함량의 분석

###### ① 분석용 melatonin 함유 분획의 제조

HPLC를 이용하여 시료에 존재하는 melatonin의 분석을 위해 먼저 50% ethanol로 5%(w/v) 동결건조분말을 30℃에서 40분간 진탕 추출한 다음, 10,000×g에서 4분간 원심분리하고 상등액을 취해 PVDF filter(0.45 μm, Millipore, USA)로 여과하였다. 이 여과액 30 μL을 TLC plate (silica gel 60 F<sub>254</sub>, Merck, Germany)에 spotting한 후에 acetone을 이용하여 전개시켰다. Melatonin의 위치를 확인하기 위하여 표준 melatonin을 식물체 추출물과 같이 전개시킨 후에 형광조사(254nm)하에서 melatonin 위치에 해당하는 부위를 분리한 다음 500 μL methanol로 40분간 상온에서 진탕 추출하였다. 그리고 추출물을 PVDF filter로 재 여과한 후 HPLC로 melatonin 함량을 분석하였다.

###### ② HPLC를 이용한 melatonin의 분석

Melatonin 함량분석을 위한 HPLC 작동에서 melatonin 분리를 위해 ODS-A column, peak의 확인에 형광검출기를 사용하였다. 이동상으로는 methanol을 사용하였으며 표준곡선 작성을 위한 표준물로는 melatonin 시

약을 사용하였다. HPLC 작동 조건은 Table 1에 나타내었다.

**Table 1. HPLC condition for melatonin analysis**

Item	Condition
HPLC	Model class-LC10, Shimazu
Column	ODS-A column(4.6 mm i.d.×250 mm, S-10 μm, 120A)
Detector	Shimazu fluorescence detector
Flow rate	1 mL / min
Mobile phase	Methanol
Injection	20 μL
Detection	Excitation at 280 nm, emission at 326 nm

### 3) 효소면역분석법(ELISA)에 의한 melatonin 함량의 분석

ELISA 분석을 위한 시료를 제조하기 위해, 50% ethanol로 5%(w/v) 식물체 동결건조분말을 25℃에서 40분간 진탕 추출한 다음 10,000×g에서 4분간 원심분리하고 상등액을 취해 PVDF filter(0.45 μm, Millipore, USA)로 여과하였다. 이중 3 mL 상등액을 취하고 감압농축한 후에 잔사에 1.2 mL의 물을 첨가한 다음 30초간 vortex하였다.

추출물로부터 solid phase extraction을 통해 melatonin 분획을 얻기 위해 Sep-Pak C<sub>18</sub> column(1 mL/100 mg)을 사용하였다. 먼저 column에 1 mL methanol을 첨가하고 1분간 200xg에서 원심분리한 후(2회) 증류수를 1 mL 첨가하고 1분간 200xg에서 재원심분리하여(2회) column을 활성화시켰다. 여기에 추출된 시료 0.5 mL를 넣고 1분간 200xg에서 원심분리한 다음 10% methanol 1 mL을 column에 넣고 500xg에서 1분간 원심분리 후(2회), 1 mL methanol로 용출(1분간 200xg에서 원심분리)하였다. Methanol 분획을 감압증류한 다음 0.15 mL 물을 넣고 1분간 vortex하여 ELISA분석을 실시하였다.

얻어진 분획추출물에서 melatonin 함량의 ELISA 분석을 위해서, 먼저 goat-anti-rabbit antibody로 coating된 96 well microtiter plate의 각 well에 분획시료 각각을 50 μL씩 넣고 50 μL melatonin-biotin, 50 μL antiserum을 차례로 첨가하고 4℃에서 15시간 incubate하였다. 이후 각

well을 세척한 다음 anti-biotin-alkaline phosphatase 용액 150  $\mu$ L을 well에 첨가하고 120분간 상온에서 incubate하였다. 그 다음 50  $\mu$ L의 p-nitrophenyl phosphate 용액을 각 well에 첨가하여 20분간 배양한 다음 세척하고 1 N NaOH를 이용해 기질반응을 멈춘 다음 microtiter reader를 이용해 405nm에서 흡광도를 분석하였다(Reference wavelength는 605nm). Melatonin 정량을 위한 표준곡선을 표준 melatonin을 이용하였다.

#### 4) Melatonin 함유 추출물 조제 및 가공적성

Melatonin 함량이 높은 소재로부터 식품제조용 추출물 조제를 위해 0%, 50%, 100% ethanol에 의한 추출수율 및 melatonin 함량을 분석하였고 이들에 대한 pH, 색도, Bx, 관능적 특성 등을 조사하였다.

#### 5) 조미 배합비의 결정

추출물을 이용한 음료형태제품 개발을 위해 유기산, 당류, 향료 등을 이용해 최적의 조미, 배합비를 선정하였다.

#### 6) 효능평가

Melatonin 함량이 높으며 기호성 및 가공적성 등을 고려하여 소재를 선정하고 이를 이용해 제조된 음료제품을 대상으로 수면보조효과에 대한 평가를 실시하였다. 이를 위해 평가 대상자는 설문조사 결과 취침시간 및 숙면에서 다소 문제가 있는 것으로 답한 16명에게 일상적 취침시간 1시간 전에 섭취하게 한 후 수면과 관련된 효과에 대해 설문조사를 실시하였다. 설문은 음료의 맛, 양, 평소에 비교한 취침시간 및 숙면여부를 1점: 전혀 그렇지 않다, 2점: 그렇지 않다, 3점: 보통이다, 4점: 그렇다, 5점: 매우 그렇다의 5점 척도법으로 실시하였다.

## 나. 종자 및 발아싹으로부터 melatonin 함유 소재의 발굴

### 1) 시료의 조제 및 melatonin 함량의 분석

Melatonin 분석에 사용할 종자는 (주)아시아 종묘에서 구입 후 마쇄하여 분말을 제조하였다. 또한 발아싹에서의 melatonin 함량분석을 위하여 각 종자를 발아시켰다 이를 위해 종자를 멸균수에 4시간 동안 담가 두었다가 발아용기에 파종한 다음 24°C 암조건에서 4일간 발아시킨 후 먼저 싹의 길이를 측정된 뒤 동결건조 후 분쇄하여 분말을 얻었다.

한편, melatonin 전구체로 알려진 tryptophan의 첨가가 발아 및 melatonin 함량변화에 미치는 영향을 분석하기 위하여 0.5 mM과 1.0 mM 농도로 발아 용액에 첨가한 다음 동일한 조건으로 발아시킨 후 동결건조분말을 제조하였다. 얻어진 시료는 ELISA 방법을 통해 melatonin 함량을 분석하였다.

### 2) 항산화 활성과 isoflavone 함량 분석

Melatonin은 수면리듬과 관련된 작용이외에 최근에 강력한 항산화 효능을 지닌 물질로 확인되었으며 생물체내 melatonin의 증가는 항산화 효능 증가와도 밀접한 관련이 있다고 알려져 있다. 이에 종자 및 각 발아조건에서 얻어진 싹에 대해 항산화 효과 지표로서 DPPH 라디칼 소거능을 분석하였고, 항산화 효과에 중요한 영향인자인 polyphenol 함량도 분석하였다. 또한 여성의 폐경기 이후에 나타나는 골다공증, 안면홍조, 불면 등 폐경기 증후군에 대해 효과가 있는 것으로 알려진 phytoestrogen인 isoflavone의 함량 변화도 분석하였다.

#### ① 추출물의 조제

각 분말을 80% methanol에 1% (w/v) 농도로 첨가하고 상온에서 2시간 동안 vortexing하여 추출하였다. 그 다음 10,000xg에서 10분간 원심분리하여 얻어진 상등액을 0.20 µm PVDF filter를 통해 여과한 다음 분석에 이용하였다.

## ② DPPH 라디칼 소거능 분석

대표적인 항산화 효능 평가지표인 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) 라디칼 소거능 분석을 위해서, 0.1 mM의 methanolic DPPH 용액을 methanol로 적절히 희석하여 525nm에서의 흡광도가 0.95-0.99가 되도록 조절한 후에 3 mL DPPH 용액을 추출액 100  $\mu$ L 및 50  $\mu$ L에 첨가하였다. 그 다음 잘 흔들어 30분간 정치 후 525nm에서의 흡광도를 분석한 다음 항산화 효과를 다음의 식에 따라 평가하였다.

$$\text{DPPH radical scavenging capacity (\%)} \\ = [1 - (\text{absorbance}_{\text{sample}} / \text{absorbance}_{\text{control}})] \times 100$$

## ③ Polyphenol 함량의 분석

소재에 함유된 polyphenol의 함량분석을 위하여, 추출물 50  $\mu$ L에 물 1,950  $\mu$ L를 첨가한 다음 2 N Folin-Ciocalteu phenol 시약 200  $\mu$ L를 첨가하여 혼합한 후 상온에서 정치시켰다. 정치 3분 후에 포화  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  용액 400  $\mu$ L를 첨가한 후 혼합한 다음 증류수 1.4 mL를 첨가하여 잘 혼합하였다. 배양 1 시간 후에 765nm에서 흡광도를 분석하였으며 정량을 위한 표준물질로 gallic acid를 사용하여 mg gallic acid/mL로 polyphenol 함량을 표현한 다음 분말 1 g당 함량으로 나타내었다(Fig.1).

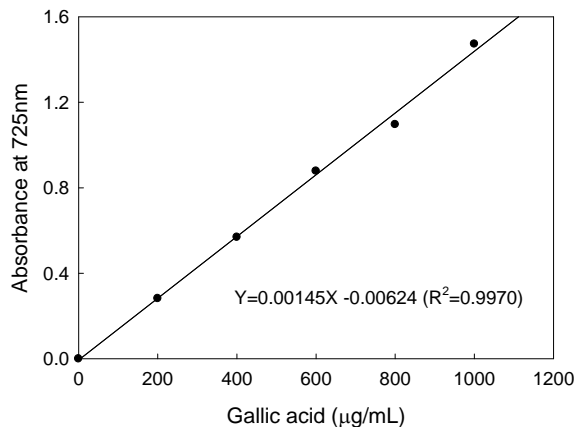


Fig. 1. Standard curve for polyphenol quantification

#### ④ Isoflavone 함량의 분석

각 추출물의 isoflavone은 HPLC를 사용해 SUPELCO™ LC-18 column에서 분리하였으며 정량은 UV/Vis 검출기를 사용하여 254nm에서 흡광도를 이용해 수행하였고 fluorescein을 내부 표준물질로 사용하였다. Isoflavone 분석을 위한 HPLC 작동조건은 Table 2에 나타나 있다.

Table 2. HPLC condition for isoflavone analysis

Item	Condition
HPLC	Waters model 510
Column	Supelco™ LC-18 (5 µm, 25 cm × 4.6 mm)
Detector	Jasco UV-2077 plus UV/Vis detector
Flow rate	1 mL / min
Mobile phase	Water with 1% acetic acid : acetonitrile Gradient from 0 : 100% to 100 : 0% for 20 min and then 0 : 100% for 40 min
Injection	20 µL
Detection	Absorbances at 254 nm

#### 다. 유산균을 이용한 melatonin 함유 발효유제품 제조

##### 1) 발효유제품의 제조 및 melatonin 함량 분석

Melatonin 함유 식품으로서 유산균 발효유제품의 이용 가능성을 확인하기 위하여 널리 알려진 starter인 *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus bulgaricus* 및 *Streptococcus thermophilus*를 사용하여 발효유제품을 제조하였다. 이를 위해 각 균주를 10% skim milk 용액에 1% 농도로 첨가하여 37°C에서 24시간 배양시켜 curd를 형성시키고 이를 다시 10% skim milk 용액에 2% 농도(v/v)로 접종하여 37°C에서 24시간 활성화시킨 다음, 10% skim milk 용액에 2%(v/v)로 재접종하여 37°C에서 24시간 배양시킴으로써 curd를 형성시킨 yogurt형의 발효유제품을 제조한 후 ELISA로 melatonin을 분석하였다.

한편, 발효 시 melatonin의 생성 증진 방안으로 tryptophan 전구체를 10% skim milk 용액 100 mL에 0, 0.5, 1, 2, 4 mM 농도로 첨가한 다음



autoclave하여 살균시킨 후, 37°C에서 24시간동안 활성화된 *Lac. casei*와 *Strep. thermophilus*를 3%(v/v)농도로 첨가하여 37°C에서 24 hr 동안 발효시켜 발효유제품을 제조한 후 melatonin 함량을 분석하였다.

## 2) 신규 유산균주의 분리 및 발효유제품 제조와 melatonin 함량 분석

기존에 발효유 제조에 잘 알려진 균주 외에 melatonin 생성능이 있는 새로운 유산균주를 발굴하기 위해 유산균종이 풍부한 배추김치, 총각김치, 물김치로부터 유산균을 분리하였다. 이를 위해 김치 국물을 0.02% sodium azide 함유 MRS(Difco, USA) 고체배지상에서 streak 하여 균주를 분리한 후 각 colony를 sodium azide 비함유 MRS 고체 배지에 다시 streak 하여 단일 colony를 얻은 다음, MRS broth에서 배양하여 활성화시킨 후 MRS agar slant에 접종하여 37°C에서 24시간 배양하여 4°C에서 보관하면서 발효유의 제조에 사용하였다. 기존에 보유하고 있는 균주와 새로이 얻어진 균주를 포함하여 총 260 종으로부터 MRS broth에서의 생장이 우수한 38 균주를 선정하여 앞에서 제시된 방법에 따라 발효유제품을 제조하고 melatonin 함량을 분석하였다.

## 3) 발효지표의 분석

### ① 생균수의 측정

발효유제품 제조시 유산균의 성장정도를 파악하기 위하여 생균수 분석을 실시하였다. 이를 위해 발효유제품 1 mL를 취하여 0.1% peptone수로 10배 단위로 적정 희석 후 1 mL를 0.02% sodium azide를 포함한 MRS agar에 접종하여 37°C에서 48시간 배양한 후 나타난 colony를 계측하였다.

### ② pH 및 적정산도의 측정

발효정도의 지표로서 pH는 pH meter(ORION 410A, Orion Reserarch Inc. USA)로 측정하였으며, 적정산도의 측정은 시료액 10 mL를 취하여 pH가 8.3에 도달할 때까지 소요되는 0.1 N NaOH의 양을 이용하였다.

#### 4) 항산화 활성 및 polyphenol 함량의 분석

발아삭에서와 동일한 방법으로 DPPH 라디칼 소거능과 총 polyphenol 함량을 분석하였다.

#### 라. 상추 및 치커리로부터 sesquiterpenoid lactones의 분석 및 활용

##### 1) Sesquiterpenoid lactones profile 분석

청치마상추, 적치마상추 및 치커리의 줄기부분을 칼로 절단한 다음 분비되는 흰색의 즙액(latex)을 취하여 1% phosphoric acid 함유 methanol에 1% 농도(w/v)로 혼합한 다음 16,000xg에서 10분간 원심분리하여 얻어진 상등액에 대해 HPLC를 이용한 sesquiterpenoid lactones profile 분석을 실시하였다. 이 때 사용한 HPLC 분석조건을 Table 3과 같았다. 또한 청치마상추, 적치마상추, 치커리의 식물체 전부분에 존재하는 sesquiterpenoid lactones profile 분석을 위하여 각 식물체 동결건조 분말을 5% 농도(w/v)로 50% ethanol로 추출한 다음 이를 HPLC 분석에 사용하였다.

**Table 3. HPLC analysis condition for sesquiterpenoid lactones profile**

Item	Condition
HPLC	Waters model 510
Column	$\mu$ Bodapack C <sub>18</sub> (250 x 4.6mm, S - 5 $\mu$ m)
Flow rate	1 mL/min
Mobile Phase	Gradient from 99: 1(A: B) to 48: 52 for 60min at 35°C A: 0.1% phosphoric acid, B: 90% acetonitrile solution
Injection	20 $\mu$ L
Detection	264 nm

## 2) Alginate 및 chitosan 입자에 유용성분의 포집 및 방출

적치마상추의 latex 물질을 alginate 입자에 포집시키기 위해 250cps와 14,000cps 점도의 alginate를 각각 5% 용액(w/v)으로 50 mL씩 제조한 후 latex의 methanol 추출물 (1:4, w/v) 150  $\mu$ L를 첨가하여 상온에서 1시간동안 교반하였다. 이 용액을 2% calcium chloride 용액에 적하시켜 alginate 입자를 제조하였다.

Latex 추출물을 chitosan 입자에 포집시키기 위해 1% acetic acid 용액에 2% 농도로 223 kDa, 444 kDa, 746 kDa의 chitosan을 각각 녹인 후 alginate와 동일한 양의 latex 추출물을 첨가하고 교반한 다음, 5% NaOH 용액에 적하시키면서 chitosan 입자를 제조하였다.

Alginate 입자와 chitosan 입자에 포집된 sesquiterpene lactones계 물질이 소화기관내에서 방출되는 특성을 조사하기 위하여, 5 mL의 model gastric juice에 각 입자를 넣고 36.8 $^{\circ}$ C를 유지하면서 시간별로 model gastric juice의 흡광도를 264nm에서 분석하였다. Model gastric juice는 2 g NaCl과 7 mL HCl을 1 L의 물에 녹여 pH가 1.8이 되도록 준비하였다.

### 마. 통계처리

실험결과와 유의성 판정을 위하여 SPSS(Statistical Package for Social Sciences, SPSS Inc, Chicago, IL, USA) 프로그램을 이용하였으며 Duncan's multiple range tests를 수행하여  $P < 0.05$  수준에서 유의성을 확인하였다.

## 2. 연구내용 및 결과

### 가. 식용 식물체로부터 melatonin 함유 식품소재의 발굴 및 활용

#### 1) HPLC를 이용한 melatonin 함량의 분석

일반적으로 melatonin을 분석에는 HPLC, radioimmunoassay, ELISA 등이 많이 이용되고 있으나 생물체내에 존재하는 melatonin의 함량이 매우 적고 또 유사구조의 물질들이 많은 관계로 각 방법마다 장단점을 가지고 있다. 본 실험에서는 먼저 HPLC 법을 고려하였는데 그 이유는 radioimmunoassay나 ELISA 등은 실험에서 cross-reactivity를 일으키는 유사구조 화합물 등을 제거하는 과정 및 효소반응 등을 이용하므로 HPLC 법에 비해 복잡하고 고가인 단점이 있기 때문이다. 그리고 melatonin은 형광을 띠는 물질이기에 일반 UV/Vis 검출기보다 감도가 높은 형광검출기를 이용한다면 매우 소량도 분석이 가능한 특징도 지니고 있다.

HPLC를 이용한 최적의 분석조건을 확립하기 위해 먼저 melatonin의 형광특성을 조사하였다. 이를 위해 다양한 파장에서의 excitation과 emission 양상을 조사한 결과, Fig. 2에서와 같이 280nm에서 excitation 시킨 후 326nm에서의 emission을 분석하는 것이 가장 민감도가 높은 것으로 나타나 melatonin의 검출 조건으로 설정하였다. 한편, 표준시료 melatonin을 methanol에 녹여서 HPLC로 분석한 결과 melatonin peak는 RT 6.80min에서 나타났으며(Fig. 3) melatonin을 농도별로 분석하여 얻어진 표준곡선은 Fig. 4와 같았다.

일반적으로 HPLC 분석에서 가장 중요한 것은 원하는 물질이 다른 물질로부터 정확히 분리되는 것이라 하겠다. 이에 추출물 제조시 다른 물질보다 melatonin의 추출이 용이한 조건을 찾는 것은 매우 중요하다고 할 수 있다. 그러므로 indole 화합물인 melatonin의 구조적 특성을 고려하여 184종의 식용식물체에 대해 50% ethanol을 이용하여 추출물을 제조하였다. 그리고 좀더 정제된 melatonin 분획을 얻고자 해당 추출물을 TLC plate에 30  $\mu$ L씩을 spotting한 다음 acetone을 이용하여 전개시켜 추가적인 분리를 하였다.

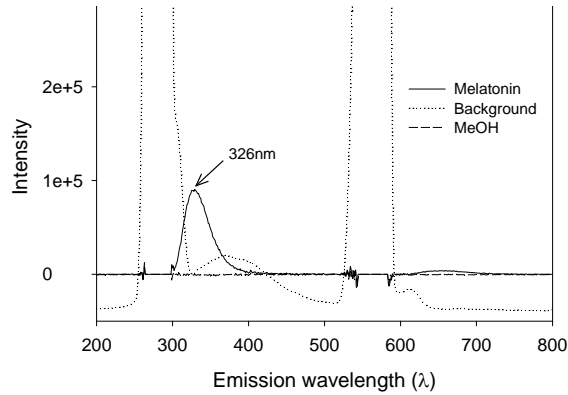


Fig. 1. Emission spectrum pattern of melatonin excited at 280nm

Fig. 2. Emission spectrum pattern of melatonin excited at 280nm

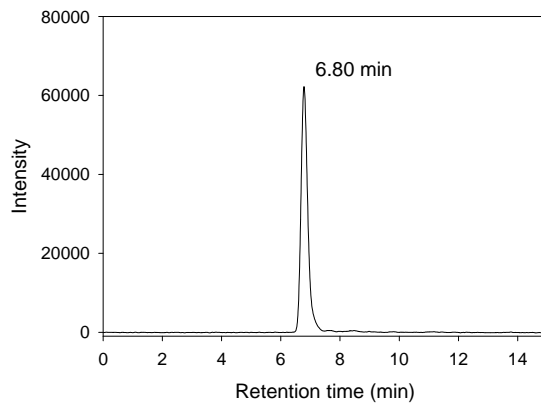


Fig. 2. HPLC analysis of melatonin

Fig. 3. Separation pattern of melatonin by HPLC

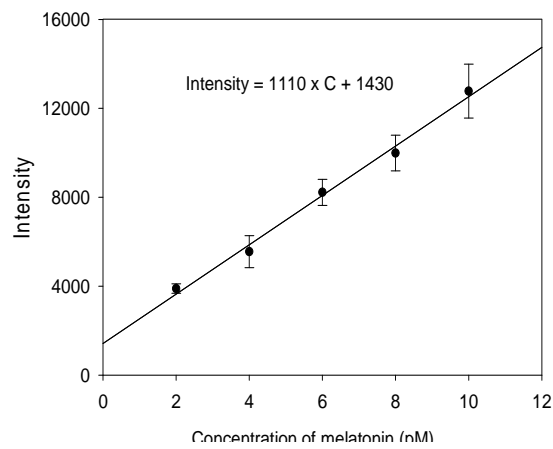
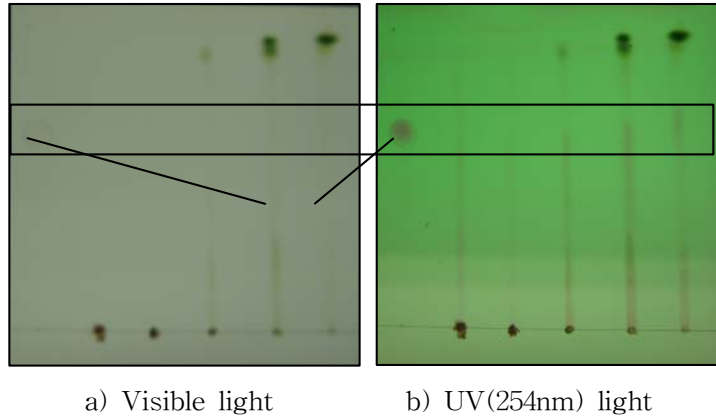


Fig. 4. Standard curve for melatonin quantification



**Fig. 5. TLC separation pattern of melatonin and newgreen extract**

그 결과 Fig. 5와 같은 분리양상을 얻을 수 있었고 가시광선 영역에서는 spot이 확인되지 않는 melatonin 특성상(Fig. 5-a) 전개 위치는 254nm의 형광을 조사하여 확인하였으며(Fig. 5-b), RF값은 0.64로 나타났다. 그러므로 각 추출물의 TLC 전개 후 melatonin이 존재하는 분획을 취하기 위해 동일한 RF값을 보이는 위치를 분리하여 methanol로 재추출하였다.

이와 같이 얻어진 추출물은 여과한 후에 HPLC로 분석하여 표준곡선을 이용해 그 함량을 확인하였다(Table 4-8). 21종의 곡류와 두류를 분석한 결과(Table 4) 쌀에서 503 pg/g, 기장에서 483 pg/g으로 나타나 비교적 높은 농도의 melatonin이 확인되었다. 그리고 대부분의 곡류와 두류에서도 100 pg/g이상이 존재하는 것으로 나타났다. 그러나 황태의 경우에는 melatonin peak가 분리되지 않아서 그 함량을 확인하기 어려웠다.

한편, 73종의 과일, 채소, 서류, 종실류 등에 대한 melatonin 함량을 비교한 결과(Table 5), 녹색파프리카, 레몬, 그리고 최근에 국내시장에 선보인 뉴그린(Toscana)에서 900 pg/g 이상의 melatonin이 확인되었으며 애호박과 콩나물에서 800 pg/g 이상, 수박껍질, 샐러리에서 700 pg/g 이상, 케일, 물물로사 등이 500 pg/g이 검출되어 이들 소재가 melatonin 함량이 높음을 알 수 있었다. 특히 이들은 앞서 조사한 곡류 및 두류에 비해 전반적으로 높은 melatonin 함량을 보여 melatonin 함유 기능성 식품으로의 활용 가능

성이 더 높을 것으로 판단되었다.

**Table 4. Melatonin content of some grains and legumes**

Korean name	English name	Scientific name	Melatonin content	
			pM <sup>1</sup>	pg/g <sup>2</sup>
쌀	Rice	<i>Oryza sativa L.</i>	6.89	503.54
기장	Proso millet	<i>Panicum miliaceum L.</i>	6.61	482.55
찰흑미	Rice, black, glutinous	<i>Oryza sativa L.</i>	5.10	372.59
청차조	Green Foxtail millet	<i>Setaria italica Beauvois</i>	4.73	345.22
찰보리	Glutinous barley	<i>Hordeum vulgare var. Hexastichon Aschers.</i>	4.43	323.57
청태	Soybean, green	<i>Glycine max Merr</i>	3.92	285.99
옥수수	Corn, maize	<i>Zea mays L.</i>	3.64	265.85
향흑미	Black rice	<i>Oryza sativa L.</i>	3.62	264.74
약콩	Rhynchosia Nolubilis	<i>Rhynchosia nolubilis</i>	3.55	259.40
을무	Job's-tear	<i>Coix lachryma-jobi var. Mayuen (Roman.) Stapf</i>	2.51	183.07
찰쌀	Glutinous rice	<i>Oryza sativa L.</i>	2.33	170.50
강낭콩	Kidney bean	<i>Phaseolus vulgaris L.</i>	1.72	125.69
찰쌀현미	Brown rice	<i>Oryza sativa L.</i>	1.64	119.83
현미	Brown rice	<i>Oryza sativa L.</i>	1.59	116.01
통녹두	Mung beans	<i>Phaseolus radiatus L.</i>	1.58	115.62
녹두	Mung bean	<i>Phaseolus radiatus L.</i>	1.54	112.40
흑태	Soybean, black	<i>Glycine max Merr</i>	0.82	59.62
서리태	Soybean, black	<i>Glycine max Merr</i>	0.48	35.01
노란차조	Glutinous millet, yellow	<i>Setaria italica Beauvos</i>	0.34	24.61
차수수	Sorghum	<i>Sorghum bicolor L. Moench</i>	0.05	3.55
황태	Soybean	<i>Glycine max Merr</i>	<sub>-3</sub>	<sub>-3</sub>

<sup>1</sup>melatonin content in methanol extract,

<sup>2</sup>melatonin content in dried powder,

<sup>3</sup>melatonin peak not separated

Table 5. Melatonin content of some fruits and vegetables

Korean name	English name	Scientific name	Melatonin content	
			pM <sup>1</sup>	pg/g <sup>2</sup>
녹색 파프리카	Paprika, green	<i>Capsicum annuum L.</i>	13.65	996.82
레몬	Lemon	<i>Citrus limon</i>	13.54	989.19
뉴그린	Toscano	<i>Brassica oleracea var. botrytis var Italiano L.</i>	13.21	964.90
애호박	Green pumpkin, young	<i>Cucurbita spp.</i>	12.06	880.74
콩나물	Soybean sprout	<i>Glycine max</i>	12.05	880.54
수박껍질	Watermelon skin	<i>Citrullus vulgaris Schrad.</i>	10.66	778.68
샐러리	Celery	<i>Apium graveolens</i>	10.06	734.91
케일	Kale	<i>Brassica oleracea var. Acephala</i>	8.36	610.74
롤로로사	Lollo rossa	<i>Lactuca sativa L. var. Lollo Rossa</i>	7.33	535.06
생강	Ginger	<i>Lindera obtusiloba</i>	6.80	496.50
바나나	Banana	<i>Musa paradisiaca Linne var. Sapientum O. Kuntze</i>	6.16	450.11
토마토	Tomato	<i>Lycopersicon esculentum Mill.</i>	5.76	420.63
갯잎	Perilla leaf	<i>Perilla frutescens</i>	5.04	368.44
썸바귀	Sowthistle	<i>Ixeris dentata (Thunb.) Nakai</i>	4.86	354.95
자몽	Grapefruit	<i>Citrus paradisi</i>	4.31	315.14
흰메론	Melon, white	<i>Cucumis melo</i>	3.68	268.75
아보가이드	Avocado	<i>Persea americana</i>	3.51	256.11
참깨	Sesame	<i>Sesamum indicum L.</i>	3.27	239.07
쑥갓	Crown daisy	<i>Chrysanthemum coronarium var. Spatiosum Bailey</i>	3.26	238.35
고구마	Sweet potato	<i>Ipomoea batatas Lam.</i>	2.98	218.01
참외	Oriental melon	<i>Cucumis melo var. Makuwa Makino</i>	2.96	216.10
석류	Pomegranate	<i>Punica granatum L.</i>	2.62	191.43

Continued



Table 5. Melatonin content of some fruits and vegetables

Korean name	English name	Scientific name	Melatonin content	
			pM <sup>1</sup>	pg/g <sup>2</sup>
(참)두릅 (뿌리)	Japanese angelica-tree	<i>Aralia elata Seem</i>	2.56	186.76
양파	Onion	<i>Allium cepa L.</i>	2.38	173.92
냉이	Shepherd's purse	<i>Capsella bursa-pastoris L. Medicus</i>	2.28	166.29
풋고추	Green pepper	<i>Capsicum annuum L.</i>	2.15	157.14
돈나물 (돌나물)	Stonecrop	<i>Sedum sarmentosum Bunge</i>	2.12	154.91
유채나물	Rutabaga	<i>Brassica campestris subsp. napus var. Nippo-oleifera</i>	1.77	129.18
토란줄기	Taro	<i>Colocasia antiquorum var. EscpLenta Engl.</i>	1.77	129.18
파	Welsh onion	<i>Allium fistulosum L.</i>	1.77	129.11
흑임자	Black perilla seed	<i>Perilla irutescens Britton (P. irutescens var. Japonica Ilara)</i>	1.68	122.73
청경채	Pak-choi	<i>Brassica campestris var. Chinensis</i>	1.48	108.12
마늘	Garlic	<i>Allium sativum</i>	1.39	101.21
삶은고사리	Bracken, boiled	<i>Pteridium aquilinum var. Latiusculum (DESV.) Underw.</i>	1.20	87.32
시금치	Spinach	<i>Spinacia oleracea L.</i>	1.14	83.11
비트	Table beet	<i>Beta vulgaris var. Rubra</i>	0.81	59.36
레몬껍질	Lemon	<i>Citrus limon</i>	0.64	46.99
배	Pear	<i>Pyrus pyrifolia var.</i>	0.62	45.47
신선초	Angelica	<i>Angelica keiskei</i>	0.62	45.47
오이	Cucumber	<i>Cucumis sativus L.</i>	0.62	45.47
자두	Plum	<i>Prunus domestica L.</i>	0.43	31.52
우엉	Common burdock	<i>Arctium lappa L.</i>	0.16	11.58
근대	(Swiss) Chard	<i>Beta vulgaris var. Cicla L.</i>	0	0
망고	Mango	<i>Mangifera indica</i>	0	0
마늘	Garlic	<i>Allium sativum</i>	0	0

Continued

Table 5. Melatonin content of some fruits and vegetables

Korean name	English name	Scientific name	Melatonin content	
			pM <sup>1</sup>	pg/g <sup>2</sup>
비름	Amalanth	<i>Amaranthus magostanus</i>	0	0
적근대	Chard	<i>Beta vulgaris var. Cicla</i>	0	0
무	Radish	<i>Raphanus sativus</i>	0	0
적채	Red cabbage	<i>Brassica oleracea</i>	0	0
노란메론	Melon, yellow	<i>Cucumis melo L.</i>	_ <sup>3</sup>	_ <sup>3</sup>
브로콜리	Broccoli	<i>Brassica oleracea var. italica</i>	-	-
달래	Wild rocambole	<i>Allium monanthum Max.</i>	-	-
감잎	Persimmon	<i>Diospyros kaki Thunberg</i>	-	-
미나리	Water dropwort	<i>Oenanthe javanica</i>	-	-
당근	Carrot	<i>Daucus carota var. Sativa DC.</i>	-	-
교나 (경수채)	Kyona	<i>Brassica juncea L. Czern var. Laciniata Makino</i>	-	-
양파	Onion	<i>Allium cepa L.</i>	-	-
배	Pear skin	<i>Pyrus pyrifolia var.</i>	-	-
흰메론	Melon, white	<i>Cucumis melo</i>	-	-
파슬리	Parsley	<i>Petroselinum crispum (P. milla) Nijm. ex Hill</i>	-	-
부추	Leek	<i>Allium tuberosum Roth.</i>	-	-
노란 파프리카	Paprika, yellow	<i>Capsicum annuum L.</i>	-	-
수박	Watermelon	<i>Citrullus vulgaris Schrad.</i>	-	-
얼갈이	Elgari, Chinese cabbage	<i>Brassica campestris</i>	-	-
천도복숭아	Peach	<i>Prunus persica L. Batsch</i>	-	-
가지	Eggplant	<i>Solanum melongena L.</i>	-	-
귤	Citrus fruit	<i>Citrus unshiu Markovich</i>	-	-
딸기	Strawberry	<i>Fragaria ananassa Duchesne</i>	-	-
들깨	Perilla seed	<i>Perilla frutescens var. Japonica Hara</i>	-	-

Continued

Table 5. Melatonin content of some fruits and vegetables

Korean name	English name	Scientific name	Melatonin content	
			pM <sup>1</sup>	pg/g <sup>2</sup>
양배추	Cabbage	<i>Brassica oleracea var. Capitata L.</i>	-	-
동근호박	Pumpkin, squash	<i>Cucurbita moschata Duchesne</i>	-	-
적겨자	Mustard	<i>Brassica juncea</i>	-	-
감자	Potato	<i>Solanum tuberosum L.</i>	-	-

<sup>1</sup>melatonin content in methanol extract,

<sup>2</sup>melatonin content in dried powder,

<sup>3</sup>melatonin peak not separated

버섯류에서는 운지버섯(456 pg/g)을 제외한 대부분의 버섯에서 melatonin 함량이 그리 높지 않은 것으로 나타나 천연 melatonin을 활용하기 위한 소재로서의 가치는 그리 높지 않다고 판단되었다(Table 6).

Table 6. Melatonin content of some mushrooms

Korean name	English name	Scientific name	Melatonin content	
			pM <sup>1</sup>	pg/g <sup>2</sup>
운지버섯	Coriolus Versicolor	<i>Coriolus versicolor</i>	6.24	455.90
양송이버섯	Common mushroom	<i>Agaricus bisporus Sing.</i>	2.45	179.19
새송이(큰느타리)버섯	Pleurotus eryngii	<i>Pleurotus eryngii</i>	2.15	157.08
아가리쿠스	Agaricus	<i>Agaricus blazei Murill</i>	2.13	155.43
목이버섯	Black mushroom	<i>Auricularia polytricha</i>	1.00	73.31
느타리	Oyster mushroom	<i>Pleurotus ostreatus</i>	<sub>3</sub>	<sub>3</sub>
영지버섯	Ganoderma Lucidum	<i>Ganoderma lucidum (FR) Karst</i>	-	-
팽이버섯	Nameko	<i>Flamm velutipes</i>	-	-

<sup>1</sup>melatonin content in methanol extract,

<sup>2</sup>melatonin content in dried powder,

<sup>3</sup>melatonin peak not separated

57종의 한약재로부터 melatonin을 분석한 결과는 Table 7에 나타난 바와 같이 삼백초, 용아초, 곡기생, 칩, 전호 등에서 1,000 pg/g 이상의 매우 높은 함량이 확인되었다. 특히 삼백초와 용아초의 경우에는 2,000 pg/g 수준의 melatonin이 확인되어 곡기생, 칩, 전호에 비해 2배 이상 높은 것으로 나타났다. 이외에도 백복령, 죽엽, 나복자, 무이, 세신, 단삼 등도 500 pg/g 이상의 melatonin을 함유하고 있는 것으로 확인되어 전반적으로 곡류, 두류, 과일, 채소류, 버섯류 소재보다 많은 양의 melatonin이 존재한다고 여겨졌다.

**Table 7. Melatonin content of some medicinal plants**

Korean name	English name	Scientific name	Melatonin content	
			pM <sup>1</sup>	pg/g <sup>2</sup>
삼백초	Lizard's tail	<i>Saururus chinensis</i>	28.05	2048.98
용아초 (짚신나물)	Agrimoniae Herba	<i>Agrimonia pilosa</i> <i>Ledebour.</i>	26.01	1899.80
곡기생 (겨우살이)	Yadorigi	<i>Viscum coloratun (Kom.)</i> <i>Nakai</i>	16.32	1191.87
칩	Kudzu vine, Pueraria	<i>Pueraria thunbergiana</i> <i>Benth</i>	14.21	1037.95
전호	Peucedani Radix	<i>Anthriscus sylvestris</i>	14.05	1025.91
백복령	Poria	<i>Poria cocos (Schw.) Wolf.</i>	11.18	816.78
죽엽	Bamboo leaf	<i>Sasa borealis var. Gracilis</i>	10.09	737.02
나복자	Raphani Semen	<i>Raphani semen</i>	9.84	718.46
무이(왕느릅 나무열매)	Ulmi Pasta Semen	<i>Ulmus macrocarpa Hance</i>	8.06	588.56
세신	Asiasari Radix	<i>Asiasarum heterotropoides</i>	7.58	553.36
단삼	Salviae Radix	<i>Salvia miltiorrhiza</i>	7.00	510.98
가자과육	Terminariae Fructus		6.57	480.18
황금	Scutellariae Radix	<i>Scutellaria baicalensis</i>	5.52	403.39
오가목 (섬오갈피)	Five leaf Aralia	<i>Acanthopanax koreanum</i> <i>Nakai</i>	4.80	350.41
고본	Ligustici Sinensis	<i>Ligusticum tenuissimum</i>	3.61	264.01

continued

Table 7. Melatonin content of some medicinal plants

Korean name	English name	Scientific name	Melatonin content	
			pM <sup>1</sup>	pg/g <sup>2</sup>
마치현 (쇠비름)	Portulacae Herba	<i>Portulaca oleracea L. var. Sativa</i>	2.99	218.41
감초	Licorice	<i>Glycyrrhiza uralensis Fisch</i>	1.71	124.64
금국(국화차)	Chrysanthemum	<i>Chrysanthemum morifolium</i>	1.51	110.49
오미자	Schizandrae Fructus	<i>Schisandra chinensis</i>	1.45	105.68
고삼	Sophorae Radix	<i>Sophora flavescens</i>	1.38	101.14
양제(참소루쟁이)	Rumex Japonicus	<i>Rumex japonicus Houttuyn</i>	1.31	95.75
천문동	Asparagi Tuber	<i>Asparagus cochinchinensis</i>	1.23	89.76
천궁	Ligustici Rhizoma	<i>Cnidium officinale</i>	1.17	85.35
해금사	Lygodii Spora	<i>lygodium japonicum (Thunberg) Sw.</i>	1.04	75.68
물미역 (애기다시마)	Brown seaweed	<i>Laminaria religiosa Miyabe</i>	1.00	73.31
다시마	Sea tangle	<i>Laminaria japonica</i>	0.81	59.36
전호	Peucedani Radix	<i>Anthriscus sylvestris Hoffm.</i>	0.65	47.64
무이	μLmi Pasta Semen	<i>μLmus macrocarpa Hance</i>	0.62	45.41
청향목(방기)	Trilobus Coralbeads, Snail Seed	<i>CoccμLus trilobus DC</i>	0.43	31.52
자초	Lithospermi Radix	<i>Lithospermum erythrorhizon Siebold &amp; Zuccarini</i>	0.41	30.27
차전자	Plantaginis Semen	<i>Plantago asiatica</i>	0.35	25.40
치큰(벨지움)	Cichorn	<i>Cichorium endivia L.</i>	0.05	3.55
구기자	Lycii Fructus	<i>Lycium chinense</i>	0	0
택사	Alismatis Rhizoma	<i>Alisma canalicμLatum</i>	0	0
마치현	Portulacae Herba	<i>Portulaca oleracea L.</i>	0	0
위령선	Clematidis Radix	<i>clematis mandshurica Maximowicz</i>	0	0
오가피	Acanthopanax Cortex	<i>Acanthopanax sessilifolrus</i>	- <sup>3</sup>	- <sup>3</sup>

continued

Table 7. Melatonin content of some medicinal plants

Korean name	English name	Scientific name	Melatonin content	
			pM <sup>1</sup>	pg/g <sup>2</sup>
진피	Aurantii Nobilis Pericarpium	<i>Fraxinus rhynchophylla Hance</i>	-	-
약실(우엉씨)	Burdock seed	<i>Trigonella foenum-graecum L.</i>	-	-
천련자	Meliae Fructus	<i>Melia azedarach linne var. Japonica makino</i>	-	-
포공영	Taraxaci Herba	<i>Tarasacum platycarpum H. Dahlstedt</i>	-	-
패장(마타리)	Patriniae Radix	<i>Patrinia scabiosaefolia Fisch.</i>	-	-
왕불유행	Melandrii Herba	<i>Semen vaccariae</i>	-	-
계피	Cinnamon	<i>Cinnamomum cassia</i>	-	-
두충	Eucommiae Cortex	<i>Eucommia <math>\mu</math>Lmoides Oliver</i>	-	-
인진쑥	Mugwort	<i>Artemisia princeps var. Orientalis (Pampan.) Hara</i>	-	-
우이대황	Yellow dock	<i>Rumex crispus L.</i>	-	-
고수	Coriander	<i>Coriandrum sativum</i>	-	-
마두령	Aristolchiae Fructus	<i>Aristolochia contorta Bunge</i>	-	-
관중	Crassirhizomae Rhizoma	<i>Dryopteris crassirhizoma</i>	-	-
백개자	Sinapis Semen	<i>Brassica juncea</i>	-	-
하고초	Prunellae Spica (Herba)	<i>Prunella <math>\mu</math>Lgaris</i>	-	-
대계	Cirsii Radix	<i>Cirsium japonicum De Candole</i>	-	-
민들레	Dandelion	<i>Taraxacum mongolicum</i>	-	-
마	Yam	<i>Dioscorea batatas Decne.</i>	-	-
백선피	Dictamni Radicis Cortex	<i>Dictamnus dsycarpus Turez,(D. albus dasycarpus Kitagawa)</i>	-	-

<sup>1</sup>melatonin content in methanol extract,

<sup>2</sup>melatonin content in dried powder,

<sup>3</sup>melatonin peak not separated

**Table 8. Melatonin content of some spices and herbs**

Korean name	English name	Scientific name	Melatonin content	
			pM <sup>1</sup>	pg/g <sup>2</sup>
아니스종자	Anise seed	<i>Pimpinella anisum</i>	27.55	2012.26
육두구껍질	Mace	<i>Myristica fragrans</i> Houtt.	20.59	1503.85
마요람	Majoram	<i>Majorana hortensis</i>	20.58	1503.13
캐트민트	Catmint	<i>Nepeta cataria</i>	12.07	881.92
민트	Mint	<i>Mentha spp.</i>	7.93	579.28
(독일) 카모마일	German Chamomile	<i>Matricaria chamomille (Camomilla rectita)</i> German	7.49	547.24
향유	Elscholtziae Herba	<i>Elsholtzia ciliata</i>	6.79	495.91
세이지	Sage	<i>Salvia officinalis L.</i>	4.37	319.49
소두구	Cardamom	<i>Elettaria cardamomum</i>	3.76	274.87
레몬밤	Lemon Balm	<i>Melissa officinalis L.</i>	3.50	255.39
겨자	Mustard	<i>Brassica nigra L.</i>	2.95	215.84
(스위트)바질	(sweet) Basil	<i>Ocimum basilicum</i>	2.87	209.66
레몬바질	Lemon Basil	<i>Ocimum basilicum L.</i>	2.80	204.19
alumroot	Alumroot	<i>Heuchera americana</i>	2.17	158.66
페퍼민트	Peppermint	<i>Mentha piperita</i>	1.99	145.50
로즈마리	Rosemary	<i>Rosmarinus officinalis L.</i>	1.74	127.20
레몬그라스	Lemon Grass	<i>Cymbopogon citratus</i>	1.61	117.33
라벤다	Lavender	<i>Lavandula L.</i>	1.35	98.91
베가못	Bergamot	<i>Citrus bergamia</i>	1.12	81.80
펜넬	Fennel seed	<i>Foeniculum vulgare</i>	<sub>3</sub>	<sub>3</sub>
스위트 마요람	Sweet Marjoram	<i>Origanum majorana L.</i>	-	-
투메릭	Turmeric	<i>Curcuma domestica Valet</i>	-	-
타임 (사향초)	Thyme	<i>Thymus vulgaris L.</i>	-	-
레몬버베나	Lemon Verbena	<i>Aloysia triphylla Britt</i>	-	-
로만 카모마일	Roman Chamomile	<i>Anthemis nobilis</i>	-	-

<sup>1</sup>melatonin content in methanol extract,

<sup>2</sup>melatonin content in dried powder,

<sup>3</sup>melatonin peak not separated

최근에 아로마테라피 등으로 관심이 높은 25종의 허브류와 향신료에 대해서도 melatonin 함량을 분석하였다(Table 8). 그 결과 아니스종자가 2,012 pg/g으로 가장 높았으며 육두구껍질과 마요람 등에서 1,500 pg/g 이상이, 캐트민트, 민트, (독일)카모마일 등에서도 500 pg/g 이상의 melatonin 이 확인되어 한약재와 더불어 높은 함량을 보이는 것으로 판단되었다.

## 2) 효소면역분석법(ELISA)에 의한 melatonin 함량의 분석

HPLC를 통해 melatonin을 분석하는 경우에 TLC 등을 수행하였음에도 불구하고 일부 소재의 경우 melatonin peak의 분리가 어려워 melatonin 함량의 분석이 잘 이루어지지 않는 문제점이 나타났다. 이는 HPLC 분석에서 melatonin 함량이 높게 나타난 소재에서도 다른 미분리 물질이 존재할 가능성이 있음을 내포하고 있다. 또한 TLC를 이용한 분리에서 melatonin의 Rf를 확인을 위해 사용한 표준 melatonin이 이웃의 시료를 오염시켜 함량이 높게 나타난 경우도 있어 HPLC에서 얻어진 결과만을 이용하여 고 melatonin 함유 소재를 선별한다면 문제가 될 수 있으므로 HPLC 방법을 보완 해줄 수 있는 분석법으로 효소면역분석법(ELISA)을 고려하였다. 이 분석법은 항원-항체반응을 이용하는 것으로 HPLC 분석에서 분리가 되지 않는 비 melatonin을 배제할 수 있다. 이에 HPLC 분석에 의해 500 pg/g 이상의 melatonin이 확인된 소재들에 대하여 ELISA를 수행하였다. Melatonin 함량의 계산을 위해 melatonin 표준품으로 작성한 표준 곡선은 Fig. 6와 같았다.

HPLC 결과와 ELISA 결과를 비교하였을 때, Table 9에 나타난 바와 같이 melatonin 함량에서 차이를 보인 품목들이 확인되었다. 조사된 품목들은 대개 ELISA 분석에 의해 함량이 증가하는 경우가 좀 더 많았는데 특히 레몬, 셀러리, 칩, 죽엽, 세신 등은 HPLC 분석으로 얻어진 melatonin 량보다 상당히 높게 나타났다. 반면 전호, 아니스 종자, 마요람 등은 오히려 함량이 적게 확인되었다. 삼백초, 용아초, 곡기생 등은 두 방법에서 큰 차이를 보이지 않았다.

Melatonin 분석에 있어서 HPLC가 문제점을 지니는 바와 같이 ELISA



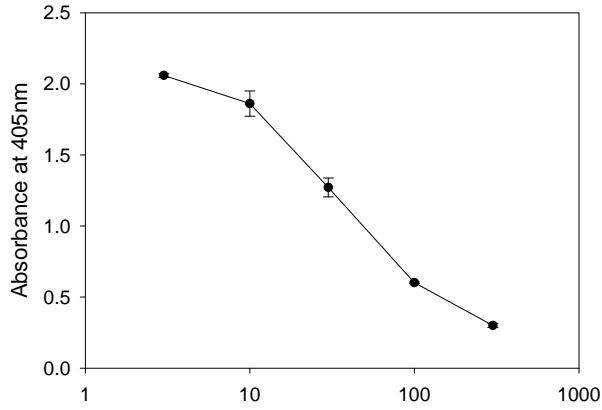


Fig. 6. Standard curve for melatonin quantification by ELISA

Table 9. Comparison of melatonin content according to analysis method

Korean name	English name	Scientific name	Melatonin content		
			HPLC	ELISA	
			pg/g <sup>1</sup>	pM <sup>2</sup>	pg/g <sup>3</sup>
<b>Grain, fruits and vegetables</b>					
쌀	Rice	<i>Oryza sativa L.</i>	503.54	408.08	758.38
녹색파프리카	Paprika, green	<i>Capsicum annuum L.</i>	996.82	432.02	802.86
레몬	Lemon	<i>Citrus limon</i>	989.19	1,102.01	2,047.97
뉴그린	Toscana	<i>Brassica oleracea var. botrytis var Italiano L.</i>	964.90	429.51	798.21
애호박	Green pumpkin, young	<i>Cucurbita spp.</i>	880.74	964.84	1,793.06
콩나물	Soybean sprout	<i>Glycine max</i>	880.54	402.11	747.29
수박껍질	Watermelon skin	<i>Citrullus vulgaris Schrad.</i>	778.68	856.23	1,591.21
셀러리	Celery	<i>Apium graveolens</i>	734.91	1,735.59	3,225.43
케일	Kale	<i>Brassica oleracea var. Acephala</i>	610.74	754.69	1,402.51

Table 9. Comparison of melatonin content according to analysis method

Korean name	English name	Scientific name	Melatonin content		
			HPLC	ELISA	
			pg/g <sup>1</sup>	pM <sup>2</sup>	pg/g <sup>3</sup>
<b>Medicinal plants</b>					
삼백초	Lizard's tail	<i>Saururus chinensis</i>	2048.98	989.94	1,839.71
용아초 (짚신나물)	Agrimoniae Herba	<i>Agrimonia pilosa</i> <i>Ledebour.</i>	1899.80	1,074.53	1,996.92
꼭기생 (겨우살이)	Yadorigi	<i>Viscum coloratum</i> <i>(Kom.) Nakai</i>	1191.87	652.82	1,213.20
쑥	Kudzu vine, Pueraria	<i>Pueraria thunbergiana</i> <i>Benth</i>	1037.95	1,226.76	2,279.81
전호	Peucedani Radix	<i>Anthriscus sylvestris</i>	1025.91	202.93	377.13
백복령	Poria	<i>Poria cocos (Schw.)</i> <i>Wolf.</i>	816.78	244.99	455.29
죽엽	Bamboo leaf	<i>Sasa borealis var.</i> <i>Gracilis</i>	737.02	1,290.15	2,397.62
나복자	Raphani Semen	<i>Raphani semen</i>	718.46	410.53	762.94
무이(왕느릅 나무열매)	μLmi Pasta Semen	<i>μLmus macrocarpa</i> <i>Hance</i>	588.56	965.26	1,793.84
세신	Asiasari Radix	<i>Asiasarum</i> <i>heterotropoides</i>	553.36	1,166.36	2,167.55
단삼	Salviae Radix	<i>Salvia miltiorrhiza</i>	510.98	500.86	930.79
<b>Spices and herbs</b>					
아니스종자	Anise seed	<i>Pimpinella anisum</i>	2012.26	295.90	549.90
마요람	Majoram	<i>Majorana hortensis</i>	1503.13	390.43	725.58
캐트민트	Catmint	<i>Nepeta cataria</i>	881.92	332.01	617.01
민트	Mint	<i>Mentha spp.</i>	579.28	593.88	1,103.67
(독일)카모 마일	German Chamomile	<i>Matricaria chamomille</i> <i>(Camomilla rectita)German</i>	547.24	947.11	1,760.10

<sup>1</sup>melatonin content in dried powder, which was analyzed by HPLC.

<sup>2</sup>melatonin content in concentrated sample solution, which was analyzed by ELISA.

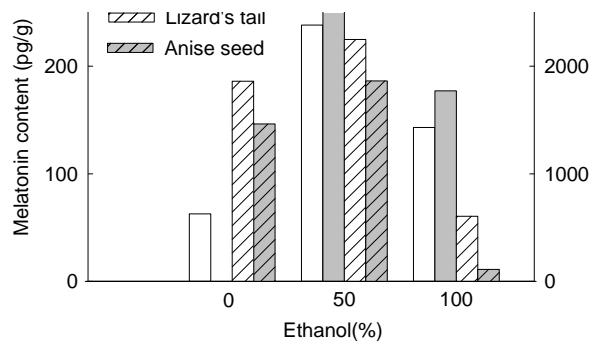
<sup>3</sup>melatonin content in dried powder, which was analyzed by ELISA.

방법 또한 유사물질에 의한 cross-reactivity의 존재 가능성이 있으므로 두 방법 모두에서 함량이 우수한 소재들이 고 melatonin 함유 기능성 식품소재로 적합하다고 판단될 수 있다. 또한 최종 제품화를 위해서는 melatonin 함량 외에 기호성, 가공적성, 안전성 및 안정성, 추출효율, 가격 등도 소재 선정의 중요한 요소가 되므로 이러한 모든 점을 고려하여야 할 것이다.

### 3) 소재 선정 및 추출물 조제

Melatonin 분석 결과, 각 식물군간에 또 분석방법에 의해 차이는 있지만, 곡류에서는 쌀, 과채류에서는 녹색파프리카, 레몬, 뉴그린이, 버섯에서는 운지가, 한약재에서는 삼백초, 용아초, 곡기생, 칩, 세신, 허브류에서는 아니스종자, 육두구, 마요람, 카바모일 등이 기능성 식품 제조를 위한 소재로서 가능성이 있다고 판단되었다.

한편, 이들로부터 효율적인 melatonin 추출조건을 선정을 위하여 각 식물군에서 melatonin 함량이 높은 일부 식물체를 대상으로 0%, 50%, 100%의 ethanol을 사용해 추출하여 melatonin 함량을 비교하였다. 그 결과 Fig. 7에 나타난 바와 같이 조사한 모든 식물체의 경우 50% ethanol 추출물에서 melatonin 함량이 가장 높은 것으로 나타나 식품으로의 가공을 위한 추출은 50% ethanol을 이용하였다.



**Fig. 7. Melatonin content in plant extract prepared with ethanol of different concentration**

**Table 9. Content of soluble solid obtained from plant powder by extraction with ethanol of different concentration**

Plant	Yield(g/100g, %)		
	0% ethanol	50% ethanol	100% ethanol
Rice	0.70	0.79	0.29
Newgreen	5.68	15.28	3.20
Lizard''s tail	4.61	14.29	2.20
Kudzu vine	13.41	27.05	6.06
Anise seed	7.94	25.28	10.74

**Table 10. Melatonin content per soluble solid extracted with 50% ethanol**

Plant	Soluble solid (g/100g)	Melatonin content(pg/g)		Melatonin content per soluble solid (ng/g)	
		HPLC <sup>1)</sup>	ELISA <sup>2)</sup>	HPLC <sup>1)</sup>	ELISA <sup>2)</sup>
Rice	0.79	503.54	758.38	63.74	96.00
Prosomillet	13.77	482.55	- <sup>3)</sup>	3.50	-
Paprika, green	29.43	996.82	802.86	3.39	2.73
Lemon	69.36	989.19	2,047.97	1.43	2.95
Newgreen	15.28	964.90	- <sup>3)</sup>	6.31	-
Coriolus Versicolor	24.34	455.90	- <sup>3)</sup>	1.87	-
Lizard''s tail	14.29	2048.98	1,839.71	14.34	12.87
Agrimoniae Herba	21.53	1899.80	1,996.92	8.82	9.28
Yadorigi	21.89	1191.87	1,213.20	5.44	5.54
Kudzu vine	27.05	1037.95	2,279.81	3.84	8.43
Anise seed	25.28	2012.26	549.90	7.96	2.18
Mace	14.15	1503.85	- <sup>3)</sup>	10.63	-
Majoram	9.81	1503.13	725.58	15.32	7.40

<sup>1)</sup>Melatonin content obtained by HPLC method

<sup>2)</sup>Melatonin content obtained by HPLC method

<sup>3)</sup>Not measured.

그리고 각 추출용매로부터 얻어지는 가용성 고형분 함량을 비교한 결과 (Table 9) melatonin 함량과 마찬가지로 50%에서 가장 많은 추출물이 얻어져서 50% ethanol 추출물을 사용하는 것이 소재의 효율적 활용 측면에서 가장 유리한 것으로 판단되었다.

얻어진 가용성 고형분당 melatonin 함유량을 비교해 보면, Table 10에 나타난 바와 같이 쌀이 다른 식물체에 비해 월등히 높았다(HPLC : 63.74 ng/g, ELISA : 96.00 ng/g). 그 다음으로 용아초와 마요람 등이나 쌀과는 많은 차이가 있었다. 이처럼 추출물 대비 melatonin 함량이 높다는 것은 가공 측면에서 매우 유리한 특성이어서 쌀이 매우 우수한 소재이기는 하나 전체적으로 추출되는 고형분량이 너무 적은 단점이 있었다.

#### 4) 가공적성 및 조미배합비 결정

Table 10에 있는 식물체 추출물들은 조사한 품목 중에서 melatonin 함량이 비교적 많은 소재들이므로 이들의 추출물을 활용해서 melatonin 기초의 기능성 식품개발이 가능하다고 판단되었다. 이 중에서 총 melatonin 함량과 가용성 고형분 중 melatonin 함량을 고려할 경우 쌀, 레몬, 삼백초, 용아초, 곡기생, 칩, 아니스종자, 마요람 등이 대상이 될 수 있다. 그러나 추출물에 대한 관능평가 결과 향신료로 쓰이는 아니스종자, 육두구껍질, 마요람 등은 향이 너무 강해서 높은 melatonin 함량에도 불구하고 현재의 추출물 수준에서는 제품화하기가 적절치 못하여 추출조건 변화나 첨가 flavor의 다양화 등 향 개선이 필요하다고 판단되었다. 반면, 추출물당 melatonin 함량은 낮더라도 전체 melatonin 함량에서는 꽤 높은 레몬과 칩의 경우 가공소재로서의 활용을 고려하였는데, 그 이유는 레몬의 경우, 우수한 관능적 특성으로 제품의 기호도 개선에 유리 할 것으로 판단되었고, 칩은 현재의 낮은 활용도를 높일 수 있는 소재로 부가가치 향상이 기대되기 때문이다.

이와 같은 전반적인 사항들을 고려하여 쌀, 삼백초, 용아초, 레몬, 칩을 가공제품의 원료로 선정하였다. 인로부터 다량의 추출물을 얻기 위해 각 원재료 분말 50 g을 950 mL의 50% ethanol로 30℃에서 40분간 진탕하여

추출하고 Toyo No.2 filter로 여과하였다. 그 다음 여과액을 40℃에서 진공 농축하여 ethanol을 제거하고 나머지 물은 동결건조로 제거하여 건조된 추출물을 얻었다.

이들 추출물의 가공적성을 분석하기 위해 물에 환원시킨 다음 물리적 특성을 분석한 결과(Table 11), 레몬을 제외하고 나머지 추출물의 pH는 중성이었으나 추출물 혼합액은 fp문의 영향으로 pH가 다소 낮게 나타났다. 당도는 전반적으로 매우 낮았고 탁도는 삼백초가 가장 높아 물에 녹지 않는 물질들이 많은 것으로 판단되었다. 한편 색상에서는 삼백초, 칩 등이 명도가 낮으며 적색도를 나타내는 a값이 다른 추출물에 비해 다소 낮고, 황색도를 나타내는 b값은 다른 추출물에 비해 다소 높게 나타나 전체적으로 약제추출물에서 나타나는 특성인 어두운 갈색계열임이 확인되었다. 반면 쌀의 경우 맑은 액 상태이며 레몬은 옅은 노란색을 나타내어 색상과 관련된 기호도 측면에서 우수하다고 평가되었다.

한편, 이 추출물에 Table 12에서와 같은 비율로 당류, 산류, 향료 등을 이용해 조미, 배합하므로 드링크 제품을 제조한 후 30명을 대상으로 5점 척도의 기호도 조사를 실시한 결과 Table 13에서와 같이 쌀과 칩 추출물 함유 제품이 다른 추출물 제품보다 전반적인 기호도가 높았다. 색상에서는 거의 무색인 쌀과 노란색을 띠는 레몬제품이 높게 나타났고 나머지는 갈색의 색상으로 인해 기호도가 낮게 나타났다. 향의 경우에는 대부분 비슷한 점수를 보였는데 이는 첨가 향료에 의해 각 추출물 고유의 향이 마스킹되었기 때문으로 추정되었다. 그러나 맛에 있어서는 삼백초가 특유의 쓴맛을 보이고 용아초가 떫은맛을 나타내어 낮은 기호도를 보였다.

**Table. 11. Physical properties of plant extracts with high melatonin content**

Plant extract	pH	°Bx	Turbidity	Color		
				L	a	b
Rice	6.81	0.1	0.036	73.170	0.653	-2.737
Lemon	3.72	1.3	0.080	75.480	0.523	-1.690
Lizard''s tail	5.37	0.5	1.809	66.077	-1.327	9.513
Agrimoniae Herba	6.22	0.5	0.105	77.640	-0.150	2.543
Kudzu vine	6.10	0.3	0.151	69.150	-0.707	8.353
Mixture	4.02	0.4	0.278	76.527	0.027	0.933

**Table. 12. Recipe for preparation of drink containing natural melatonin**

Constituent	Amount added
Dried extract	0.5 g/100mL
High fructose syrup	15%
Honey	1%
Oligosaccharide	0.35%
Citric acid	0.2%
Sodium citrate	0.018%
Ascorbic acid	0.2%
Drink flavor F-145	200µL

**Table. 13. Acceptability test for drink containing natural melatonin**

Drink with extract of	Color	Flavor	Taste	Overall acceptability
Rice	3.0	3.8	3.5	3.9
Lemon	3.2	3.5	3.3	3.5
Lizard''s tail	2.2	3.6	2.6	3.3
Agrimoniae Herba	2.3	3.7	3.0	3.2
Kudzu vine	2.3	4.0	3.8	3.9
Mixture	2.5	3.7	3.5	3.7

very good: 5, medium: 3, very bad: 1

## 5) 효능평가

드링크 제품의 효능을 평가하기 위하여 예비 설문조사 결과 취침시간 및 숙면에서 다소 문제가 있는 것으로 답한 16명에게 일상적 취침시간 1시간 전에 섭취하게 한 후 수면과 관련된 효과에 대한 평가를 실시하였다. 그 결과 Table 14에서 나타난 바와 같이 조사대상(평균연령 24.4세, 남자 8명, 여자 8명)은 100 mL인 드링크의 용량에 대해서는 대체로 적절하다고 평가하였으나 맛에 대해서는 다소 좋지 않다는 응답이 많았다. 한편, 취침시간 및 숙면에 대한 개선효과에 대해서는 ‘보통이다’라는 평가가 많아 해당 드링크만으로는 기능성 식품으로서 부족하다고 판단되었다.

**Table 14. Evaluation of sensory properties and sleep-aid effect of natural melatonin-containing drink**

Age	Sensory property		Effect on sleep	
	Taste	Amount	Sleeping time	Sleep quality
24.4 ± 5.7	2.6 ± 0.62	2.8 ± 0.4	3.0 ± 1.09	3.1 ± 0.93



## 설문조사서

성별 : 남  여

연령 ( 세)

- 다음은 수면과 관련된 개인의 특성에 관한 내용입니다.  
질문에 답해 주시기 바랍니다.

1. 평소에 잠은 제시 시간에 잘 오는지요?

1. 전혀 그렇지 않다	2. 그렇지 않다	3. 보통이다.	4. 그렇다	5. 매우 그렇다

2. 평소에 잠을 잘 때 숙면을 취하는지요?

1. 전혀 그렇지 않다	2. 그렇지 않다	3. 보통이다.	4. 그렇다	5. 매우 그렇다

- 다음은 숙면을 위한 음료입니다. 음료를 보통 잠자는 시간 1시간 전에 드시고 주무신 다음 아래의 항목에 대해 답해 주시기 바랍니다.

1. 음료의 맛은?

1. 매우 좋지 않다	2. 좋지 않다	3. 보통이다.	4. 좋다	5. 매우 좋다

2. 음료의 양은?

1. 매우 적다	2. 적다	3. 보통이다.	4. 많다	5. 매우 많다

3. 음료섭취 후에 평소보다 잠이 빨리 들었다.

1. 전혀 그렇지 않다	2. 그렇지 않다	3. 보통이다.	4. 그렇다	5. 매우 그렇다

4. 평소보다 숙면을 취했다.

1. 전혀 그렇지 않다	2. 그렇지 않다	3. 보통이다.	4. 그렇다	5. 매우 그렇다

감사합니다.

## 나. 종자 및 발아작으로부터 melatonin 함유 소재의 발굴

### 1) Melatonin 함량

기존의 식물체 외에 새로운 소재로부터 melatonin을 발굴하여 활용해 보기 위해 최근에 건강기능소재로 관심이 높은 종자발아 새싹을 천연 melatonin 소재로 고려하였다. 그 이유로 발아작은 단 기간내에 생장이 가능하고 또한 발아 시 다양한 생리적 변화가 발생하며, 또한 일반 식물체와 달리 생육환경을 쉽게 변화시킬 수 있어, 필요 시 melatonin 함량을 증대시키기 위한 환경의 조절이 가능하리라는 여겨졌기 때문이었다.

먼저 종자 발아 시 melatonin 함량 변화를 조사하였다. 그 결과, Table 15에서와 같이 종자가 발아함에 따라 완두, 무, 적양배추는 melatonin 함량이 감소하였지만 해바라기, 적무, 다채, 치커리, 배추, 유채, 크레스, 클로버 등 많은 종에서 발아 시 melatonin 함량이 크게 증가하는 것으로 나타났다. 이에 종자를 적절하게 발아 시킨다면 종자에 비해 상당히 증가된 양의 melatonin 함유한 싹을 얻을 수 있으리라 판단되었다.

Table 15. Content of melatonin in seed and sprout

Korean name	English name	Scientific name	Melatonin content(pg/g) <sup>1</sup>	
			Seed	Sprout
완두	Pea	<i>Pisum sativum</i>	447.4	299.1
청경채	Pak-choi	<i>Brassica campestris var. Chinensis</i>	510.8	814.1
무	Radish	<i>Raphanus sativus L.</i>	1,493.9	781.1
메밀	Buckwheat	<i>Fagopyrum esculentum</i>	1,984.2	1,236.3
해바라기	Sunflower	<i>Helianthus annuus</i>	862.9	2,702.9
아마	Flax	<i>Elettaria cardamomum</i>	664.2	597.3
적무	Chinese radish	<i>Raphanus sativus var. stipitata Kitalm</i>	471.7	1,631.9

continued

Table 15. Content of melatonin in seed and sprout

Korean name	English name	Scientific name	Melatonin content(pg/g) <sup>1</sup>	
			Seed	Sprout
케일	Kale	<i>Brassica oleracea L.</i>	1,096.7	1,922.7
다채	Tah tasai Chinese cabbage	<i>Brassica campestris L.var. rosu Laris Tsen et Lee</i>	729.9	2,048.0
홍화	Safflower	<i>Carthamus tinctorius</i>	991.3	1,267.9
치커리	Chicory	<i>Cichorium intybus</i>	960.6	2,294.1
배추	Cabbage	<i>Brassica campestris</i>	226.4	1,694.9
브로콜리	Broccoli	<i>Brassica oleracea var. botrytis</i>	1,465.9	2,022.3
알팔파	Alfalfa	<i>Medicago sativa L.</i>	1,532.1	2,100.3
겨자	Mustard	<i>Brassica nigra</i>	862.9	825.7
유채	Rape	<i>Brassica campestris</i>	919.1	1,934.8
적케일	Red kale	<i>Brassica oleracea L.</i>	349.0	2,153.8
크레스	Cress	<i>Nasturtium officinale R. Br.</i>	452.3	1,828.0
SGS 브로콜리	SGS Broccoli	<i>Brassica oleracea var. botrytis SGS</i>	1,153.5	1,110.6
양배추	Cabbage	<i>Brassica oleracea var. capitata</i>	424.6	436.9
적양배추	Red cabbage	<i>Brassica oleracea var. capitata</i>	1,198.0	573.0
클로버	Clover	<i>Trifolium repens L.</i>	442.9	1,456.6
순무	Turnip	<i>Brassica rapa L.</i>	331.7	507.8
당근	Carrot	<i>Daucus carota L.</i>	-	1,863.1
양파	Onion	<i>Allium cepa L.</i>	-	405.9
들깨	Perilla	<i>Perilla frutescens Britt, var. japonicca Hara</i>	-	352.3

<sup>1</sup>melatonin content in dried powder, which was analyzed by ELISA.

## 2) Melatonin 함량에 대한 tryptophan 처리 효과

발아싹 중에서 melatonin 함량이 높은 해바라기, 치커리, 적케일, 유채, 알팔파의 싹에서 melatonin 함량을 증진시킬 수 있는 방법으로 melatonin 합성의 전구체로 알려진 tryptophan을 첨가를 고려하였다.

이에 먼저 tryptophan이 각 종자의 발아자체에 영향을 주는 정도를 살펴보기 위하여 싹의 길이를 측정한 결과, Fig. 8에서 같이 tryptophan 처리에 의해 다소 차이가 있는 것으로 보여졌으나 유의성이 있는 수준은 아니어서 발아에 영향을 주지는 않는 것으로 판단되었다.

한편, tryptophan을 첨가하여 발아시킨 싹에서의 melatonin 함량을 종자 및 일반 발아싹과 비교한 결과 Fig. 9와 같았다. 우선, 종자 중에서는 알팔파가 가장 높은 함량을 보였고(703 pg/g), 치커리(580 pg/g), 유채(561 pg/g), 적케일(444 pg/g), 해바라기(204 pg/g)순으로 melatonin이 함유되어 있었다. 이들 종자를 발아시키면 모두 melatonin 함량이 종자보다 증가하는 것으로 나타났는데 적케일 (2503 pg/g), 유채 (2430 pg/g), 치커리(2038 pg/g), 알팔파(1161 pg/g), 해바라기(768 pg/g) 순으로 melatonin 함량이 높았다. 특히 종자와 발아싹의 melatonin 함량차이를 비교해 보았을 때 적케일 종자가 발아에 의해 melatonin 함량이 가장 많이 증가하는 것으로 나타났으며 유채 및 치커리 종자도 발아에 의해 그 함량 증가가 큰 것으로 나타났다. 알팔파의 경우 종자에서의 melatonin 함량은 상대적으로 높았으나 발아에 의한 함량증가가 크지 않아 발아싹 활용도 측면에서 불리한 것으로 나타났으며 해바라기는 다른 종자나 싹에 비해 melatonin 함량이 낮은 것으로 나타났다. 결론적으로 적케일, 유채, 치커리 싹이 melatonin 함유 기능성 소재로의 활용 가능성이 높은 것으로 나타났다.

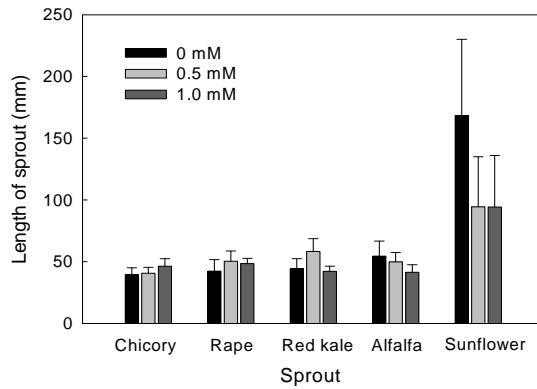


Fig. 8. Length of sprout obtained from seed by 4 days germination under tryptophan treatment

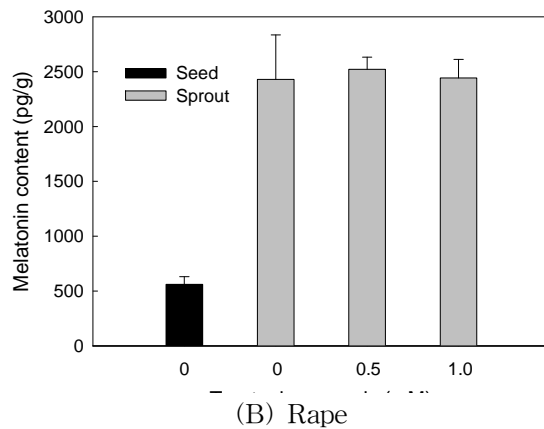
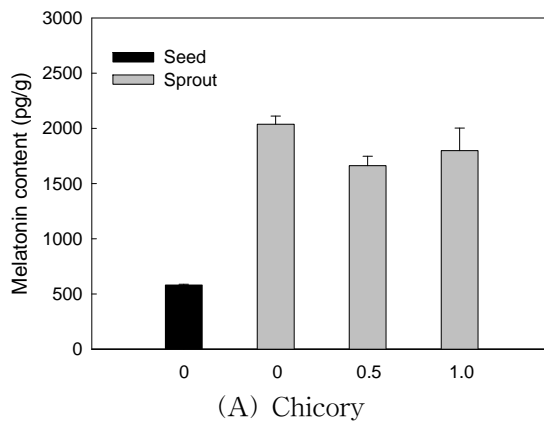


Fig. 9. Change of melatonin content during seed germination under tryptophan treatment (continued)

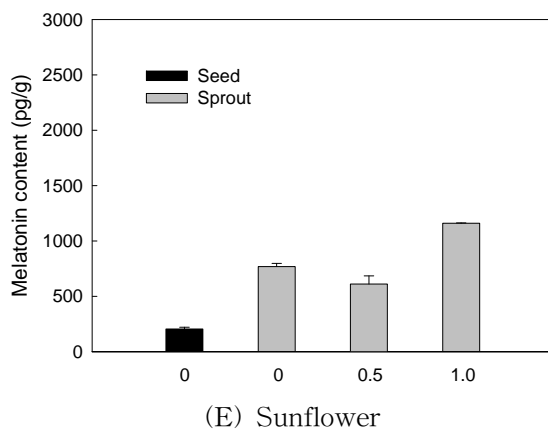
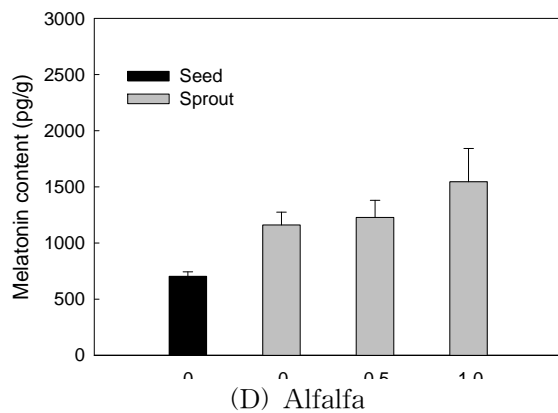
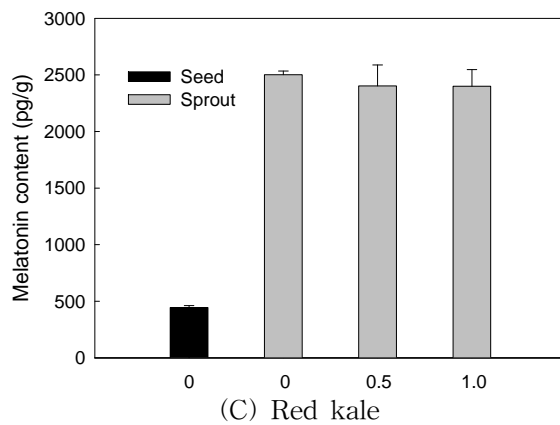


Fig. 9. Change of melatonin content during seed germination under tryptophan treatment

Tryptophan을 0.5 mM 및 1.0 mM 농도로 첨가하여 발아시킨 싹의 melatonin 함량은 종자마다 다소 다른 양상을 보였다. 발아싹에서 melatonin 함량이 높았던 적케일, 유채의 경우 tryptophan 처리 시 melatonin 함량의 유의적인 변화가 없었지만 치커리는 tryptophan 처리에 의해 오히려 melatonin 함량이 줄어들었으며 해바라기의 경우에는 0.5 mM tryptophan에서는 melatonin 함량이 감소하였으나 1 mM 처리에 의해서는 tryptophan 무처리구(768 pg/g)에 비해 높게(1160 pg/g) 나타났다. 알팔과에서는 유의성은 없으나 tryptophan 처리농도에 따라 melatonin 함량이 점차 증가하는 경향을 보였다. 이로써 종자마다 일부 차이는 있다고 할지라도 발아 시 tryptophan을 1 mM 까지 첨가하면 melatonin 함량은 처리하지 않은 경우와 유사하거나 증대되는 것으로 나타나 melatonin 함량증대를 위해 전구체 첨가를 고려할 수 있을 것으로 판단되었다.

### 3) 항산화 효과 및 polyphenol 함량에 대한 tryptophan 처리 효과

Melatonin은 수면촉진과 관련된 작용이외에 최근에 강력한 항산화 효능을 지닌 물질로 확인되었으며 melatonin의 증가는 항산화 효능 증가와도 밀접한 관련이 있는 것으로 알려져 있다. 그러므로 발아 시 melatonin 함량의 변화와 관련하여, DPPH 라디칼 소거능을 이용한 항산화 효능의 변화도 분석하였다. 특히 이러한 항산화에 영향을 주는 물질 군으로 잘 알려진 polyphenol 함량도 분석하였다.

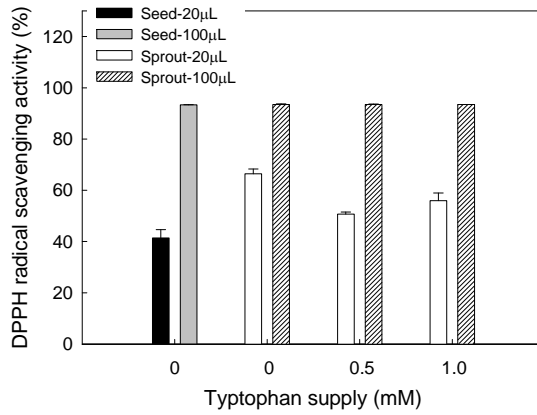
10 mg 분말 시료량에 해당하는 100  $\mu$ L 추출액을 사용하여 DPPH 라디칼 소거능을 분석한 결과, 치커리(Fig. 10), 유채(Fig. 11), 적케일(Fig. 12), 해바라기(Fig. 14) 종자 및 발아싹에서는 거의 90-95% 수준으로 발아 및 tryptophan 처리에 의한 항산화 효능을 비교하기가 어려웠다. 이에 추출물의 양을 20  $\mu$ L로 줄여서 분석한 결과, 치커리, 유채, 적케일 종자의 경우 발아에 의해서 DPPH 라디칼 소거능이 증가하는 것으로 나타났으나 알팔과 종자는 발아시키면 오히려 항산화 활성이 줄어드는 것으로 나타났다(Fig. 13). 해바라기 종자도 발아시키면 항산화 활성이 다소 감소하는 것으로 보여지나 유의적 차이는 없었다.

Tryptophan 처리에 의한 항산화 효능의 변화를 비교한 결과, 치커리의 경우 0.5 mM에서 감소하였으나 1.0 mM에서 다소 증가하였다(Fig. 10). 그러나 tryptophan이 없는 발아싹 보다는 효능이 낮은 것으로 나타났다. 유채와 적케일 발아싹에서는 tryptophan 처리에 관계없이 그 효능이 유사하였으며(Figs. 11, 12) 알팔파에서는 발아에 의해 감소되었던 항산화능이 tryptophan 처리에 의해 다소 증가하는 것으로 나타났다(Fig. 13). 해바라기에서는 0.5 mM 농도에서 가장 낮은 활성을 보였으나 1.0 mM 농도에서 다시 증가하였다(Fig. 14).

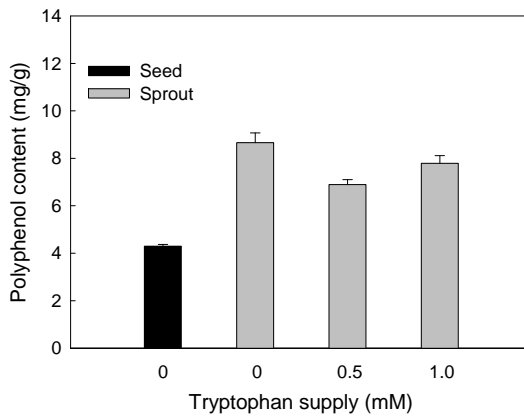
Polyphenol 함량의 경우 DPPH 라디칼 소거능과 동일한 변화 양상을 보였다. 즉, 치커리의 경우 종자에서는 4.3 mg/g이었던 것이 발아에 의해 8.7 mg/g으로 증가하였으나 tryptophan 처리구에서는 각각 6.9 및 7.8 mg/g으로 나타났다(Fig. 10). 유채에서의 polyphenol 양상도 DPPH 라디칼 소거능 양상과 동일하게 발아에 의해 증가하였고 tryptophan에 따른 변화는 없었다(Fig. 11). 그러나 유채의 종자 및 발아싹들의 polyphenol 함량은 치커리의 종자 및 발아싹들에 비해 높은 반면 항산화능은 치커리에 비해 낮은 것으로 보아 DPPH 라디칼 소거능을 보이는 polyphenol 들은 유채보다는 치커리에 더 많은 것으로 판단되었다. 적케일은 유채와 유사한 항산화능과 polyphenol 함량을 나타냈다(Fig. 12). 알팔파는 발아에 의해 항산화 효능이 감소되는 것과는 달리 polyphenol 함량은 종자에 비해 감소하지는 않았으며 tryptophan 처리 농도에 따라 polyphenol 함량이 증가하였다. 그러나 polyphenol의 증가에 비해 항산화 효능의 증가가 크지 않은 것으로 보아 증가된 polyphenol의 항산화능이 다른 종에 비해 크지 않다고 판단되었다(Fig. 13). 해바라기의 경우 발아시 유의적이지는 않더라도 항산화 효능이 감소하였고 polyphenol 함량도 줄어드는 것으로 나타났다(Fig. 14).

한편, 항산화 효능 및 polyphenol 함량의 변화 양상은 melatonin 함량의 변화양상(Fig. 9) 유사한데 이는 강력한 항산화제로도 알려져 있는 melatonin도 환경 및 생리적 변화에 대하여 다른 항산화 성분과 유사하게 대사되기 때문으로 추정된다.



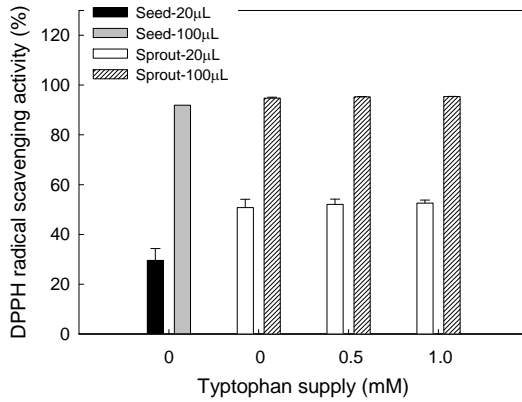


(A) DPPH radical scavenging activity

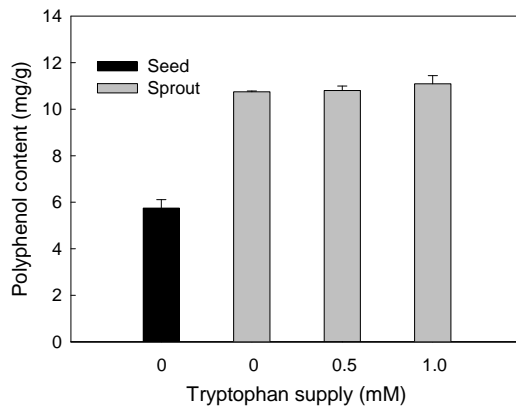


(B) Polyphenol content

**Fig. 10. Change of DPPH radical scavenging activity and polyphenol content during germination of chicory seed under tryptophan treatment**

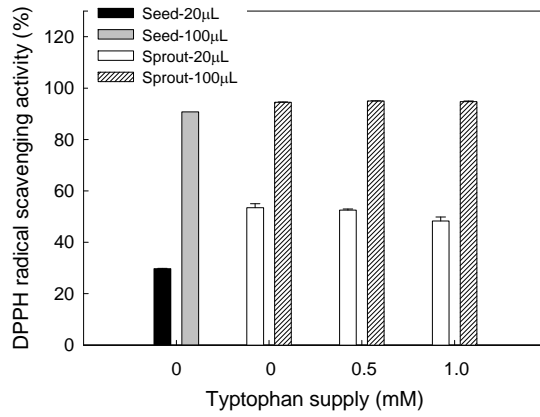


(A) DPPH radical scavenging activity

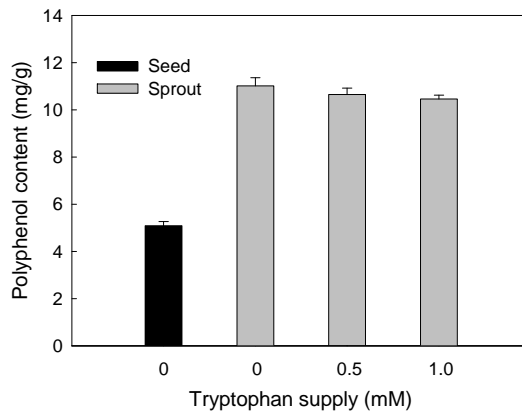


(B) Polyphenol content

**Fig. 11. Change of DPPH radical scavenging activity and polyphenol content during germination of rape seed under tryptophan treatment**

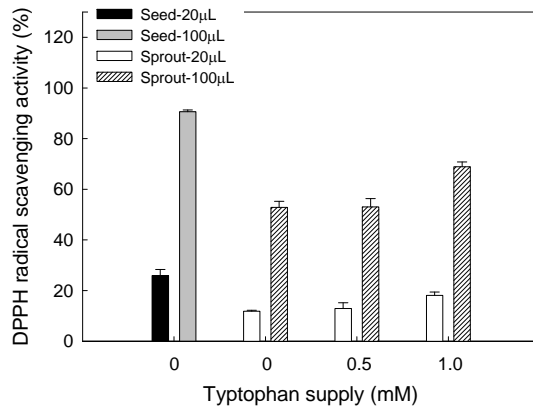


(A) DPPH radical scavenging activity

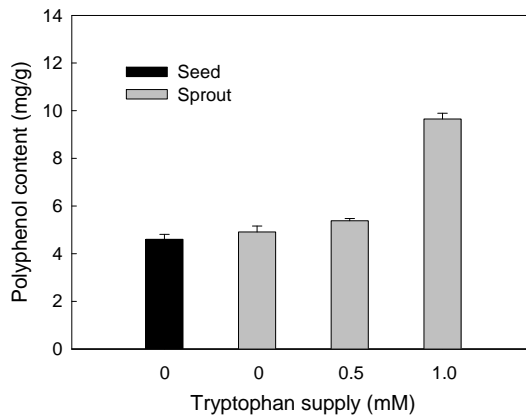


(B) Polyphenol content

**Fig. 12.** Change of DPPH radical scavenging activity and polyphenol content during germination of red kale seed under tryptophan treatment

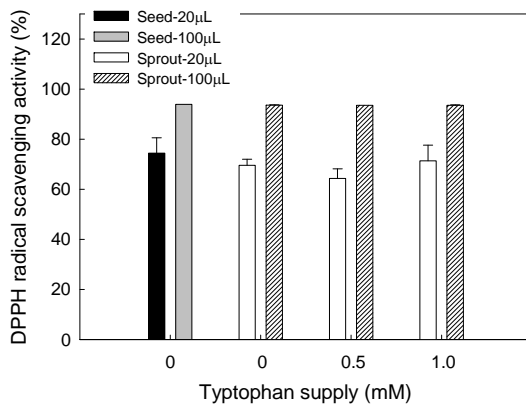


(A) DPPH radical scavenging activity

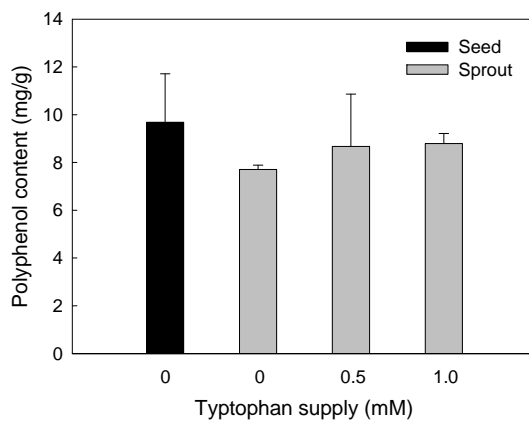


(B) Polyphenol content

**Fig. 13. Change of DPPH radical scavenging activity and polyphenol content during germination of alfalfa seed under tryptophan treatment**



(A) DPPH radical scavenging activity



(B) Polyphenol content

**Fig. 14. Change of DPPH radical scavenging activity and polyphenol content during germination of sunflower seed under tryptophan treatment**

발아나 전구체 처리에 의해 증가되는 polyphenol 당 증가되는 melatonin 함량을 비교하므로써 melatonin 생성의 효율성을 비교해 보았다(Table 16). 그 결과, 모든 종자에서 발아 시 melatonin의 상대적인 함량이 크게 증가하였음을 알 수 있었다. 특히 알팔파 발아싹의 경우에는 polyphenol 증가는 적어도 이에 대한 melatonin 함량 자체는 다른 발아싹보다 큰 것으로 나타나 발아시 생성되는 항산화 성분 중 상당량이 melatonin임을 가늠케 해준다. 반면, 해바라기는 종자 및 발아싹 모두에서 다른 종자에 비해 polyphenol에 대한 melatonin 비율이 낮게 나타났는데 다른 품종에 비해 그리 낮지 않은 polyphenol 함량에도 불구하고 melatonin의 상대적인 함량이 낮기 때문으로 여겨졌다.

이와 같은 종자 및 발아싹, 그리고 tryptophan 처리구에서 총 melatonin 함량, 항산화력 및 polyphenol에 대한 상대적인 melatonin 함량 등을 고려해보면 치커리, 유채, 적케일의 발아싹이 melatonin 함량이 높은 기능성식품 개발에 적절한 소재로 판단되었다.

**Table 16. Content of melatonin per gram polyphenol in seed and sprout**

Sample	Tryptophan (mM)	Melatonin content per gram polyphenol (ng/g)				
		Chicory	Rape	Red kale	Alfalfa	Sunflower
Seed	0	135.0	97.6	87.3	152.9	21.1
Sprout	0	235.4	226.1	227.2	236.2	99.7
Sprout	0.5	241.3	233.4	225.7	427.9	70.4
Sprout	1.0	231.0	220.3	229.4	160.0	131.9

#### 4) Isoflavone 함량

여성호르몬 분비감소에 따른 폐경 이후에 안면홍조, 골다공증, 월경전 증후군뿐 아니라 불면 등 여러 가지 증세가 동반되는 데, phytoestrogen인 isoflavone의 투여는 이를 완화시킬 수 있는 방법으로 널리 알려져 있다. 이에 종자 및 발아싹에서도 isoflavone의 변화 양상을 분석함으로써 이들을 폐경 증후군의 개선과 더불어 폐경에 따른 불면증 등을 완화시킬 수 있는 소재로서의 활용을 고려하였다.

현재까지 알려진 isoflavone은 12종류로 aglycone 형태인 daidzein, genistein 및 glycitein, 이들의  $\beta$ -glucosides형인 daidzin, genistin과 glycitin, 그리고 acetyl- $\beta$ -glucosides 형인 6''-O-acetyl- $\beta$ -daidzin, 6''-O-acetyl- $\beta$ -genistin, 6''-O-acetyl- $\beta$ -glycitin, 또한 malayl 유도체인 malonyl- $\beta$ -glucosides, 6''-O-maloyl- $\beta$ -daidzin, 6''-O-malonyl- $\beta$ -glycitin, 6''-O-malonyl- $\beta$ -glycitin 등으로 각 종자, 발아싹 및 tryptophan 처리 발아싹에서의 이들의 함량은 HPLC를 이용하여 분석하였으며 함량은 각 isoflavone의 표준곡선(Fig. 15)으로부터 산출하였다.

Fig. 16에 나타난 바와 같이 총 isoflavone 함량은 각 품종마다 상당한 차이를 보일 뿐 아니라 같은 품종에서도 종자, 발아싹, tryptophan 처리 발아싹 등에서도 함량의 차이가 타나났다. 대상 품목 중에서 총 isoflavone 함량이 상대적으로 높았던 치커리와 해바라기의 경우에는 처리구에 따라 비슷한 함량 변화 양상을 보였다. 즉, 이 두 품목은 종자에서 총 isoflavone 함량이 가장 높았으며 발아에 의해 줄어드는 것으로 나타났고, 1.0 mM의 tryptophan은 처리가 0.5 mM 보다는 isoflavone 함량을 다소 높인 것으로 나타났다. 알팔파 종자는 발아에 의해 isoflavone 함량이 줄어들었으며, tryptophan 처리로 그 함량이 더욱 감소하였다. 반면에 유채와 적케일은 발아에 의해 함량이 증가하는 것으로 나타났지만 tryptophan의 첨가는 별 다른 효과를 주지 못하였다. 결론적으로 총 isoflavone 함량 측면에서는 치커리, 해바라기의 종자가 특히 우수하였으며 유채와 적케일에서는 발아를 통해 그 함량을 증가시킬 수 있었다.

Isoflavone이 체내에 흡수되어 생리활성을 발현하는 데에는 isoflavone

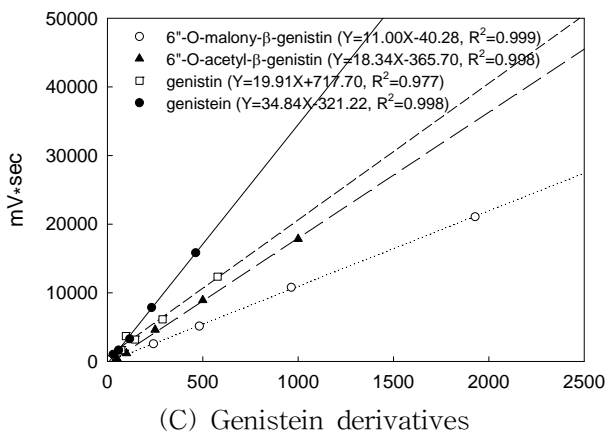
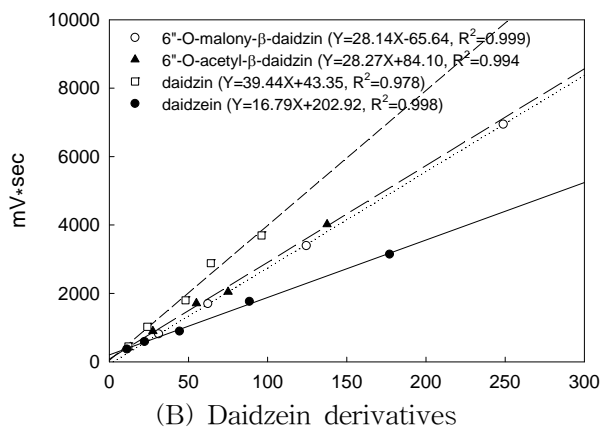
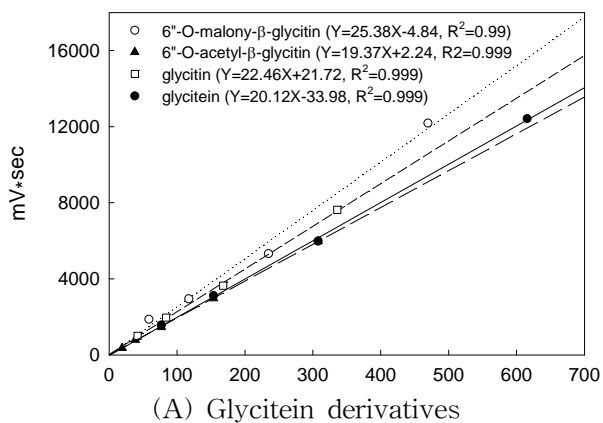


Fig. 15. Standard curve for isoflavone quantification



의 총 함량뿐 아니라 그 조성도 매우 중요한데 특히 비배당체 형태 (glycitein, daidzein, genistein)가 생체내 이용에 유리하다고 일반적으로 보고되어 있다.

각 품종 및 각각의 처리구에서 얻어진 isoflavone 조성을 Table 17에 나타내었다. 치커리에서는 종자에서 가장 많은 존재하는 6''-O-acetyl- $\beta$ -genistin이 발아에 의해서 genistin으로 상당량이 전환된 것을 알 수 있으며(Fig. 17-c), glycitein계열만이 비배당체 형태로 존재하였다(Fig. 17-a). 유채에서는 6''-O-malonyl- $\beta$ -daidzin이 발아에 의해 상당량 증가하였으나 tryptophan 처리에 의해 감소하였으며 이러한 감소는 diadzin의 증가와 관련이 있는 것으로 여겨진다(Fig. 17-b). 적케일은 발아시 glycitein과 daidzin의 함량이 증가하였으며 1 mM tryptophan 처리로 그 증가가 최대가 되었으며 6''-O-malonyl-daidzin의 증가도 관찰되었다(Fig. 17-a, b). 알팔파에서는 종자에 있던 상당량의 6''-O-acetyl- $\beta$ -glycitein이 발아에 의해 glycitein과 glycitein으로 전환되었고(Fig. 17-a), daidzin과 6''-O-acetyl- $\beta$ -genistin은 발아에 의해 감소되는 것으로 나타났다(Fig. 17-b, c). 해바라기는 비배당체인 glycitein이 발아와 더불어 감소하였으며(Fig. 17-a), 상당량의 감소가 daidzin에서도 관찰되었다(Fig. 17-b). 그러나 genistein 계열의 isoflavone은 확인되지 않았다(Fig. 17-c).

이상의 결과에서도 알 수 있듯이 각 품종간, 그리고 동일 품종에서의 처리구간 isoflavone 구성의 양상은 매우 다르기 때문에 종자의 발아나 tryptophan 처리가 isoflavone에 미치는 일반적인 경향을 설명하기 어려웠다. 이러한 결과는 각 품목마다 특이적인 대사의 결과나 isoflavone의 추출 특성 및 안정성 등 다양한 요소에 의한 것으로 판단되지만 현재로서는 정확히 설명하기는 어려웠다. 그러나 생리활성 측면에서 유리하다고 보고된 비배당체 함량의 기준으로 보면 glycitein 함량이 daidzein이나 genistein보다 많이 존재하는 것으로 나타났다. 그리고 각 isoflavone 유도체 함량 기준에서는 발아보다는 종자상태로 활용하는 것이 유리한 것으로 평가되었지만 유채와 적케일에서의 daidzein 유도체 함량은 발아에 의해 증가하기도 하였다.

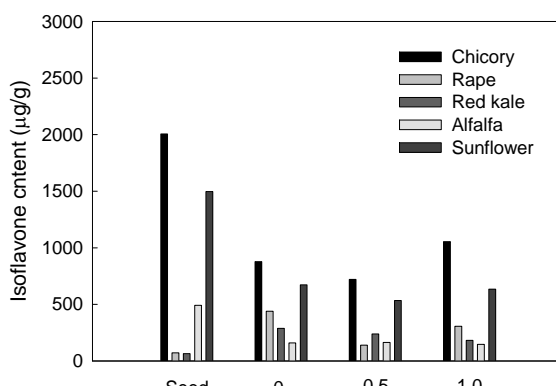


Fig. 16. Change of total isoflavone content in seed and sprout during germination under tryptophan treatment

Table 17-a. Isoflavone profile in seed and sprout germinated under tryptophan treatment

Tryptophan (mM)			Glycitein derivative (µg/g)				
			6"-O-malonyl-β-glycitin	6"-O-acetyl-β-glycitin	glycitin	glycitein	total
Chicory	Seed	0	0.0	0.0	0.0	40.6	40.6
	Sprout	0	0.0	0.0	0.0	58.9	58.9
	Sprout	0.5	0.0	0.0	0.0	97.1	97.1
	Sprout	1.0	0.0	0.0	59.1	0.0	59.1
Rape	Seed	0	0.0	0.0	0.0	21.4	21.4
	Sprout	0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	Sprout	0.5	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	Sprout	1.0	0.0	0.0	174.1	28.8	202.9
Red kale	Seed	0	0.0	0.0	0.0	63.9	63.9
	Sprout	0	0.0	0.0	94.3	6.5	100.8
	Sprout	0.5	0.0	0.0	36.2	7.9	44.1
	Sprout	1.0	0.0	0.0	122.4	0.0	122.4
Alfalfa	Seed	0	0.0	274.1	0.0	7.2	281.2
	Sprout	0	0.0	0.0	0.0	36.0	36.0
	Sprout	0.5	0.0	0.0	2.4	38.2	40.6
	Sprout	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Sunflower	Seed	0	0.0	0.0	0.0	101.4	101.4
	Sprout	0	0.0	0.0	0.0	43.3	43.3
	Sprout	0.5	0.0	0.0	0.0	6.8	6.8
	Sprout	1.0	0.0	0.0	0.0	42.1	42.1

**Table 17-b. Isoflavone profile in seed and sprout germinated under tryptophan treatment**

			Daidzein derivative (µg/g)				
			6"-O-malonyl-β-daidzin	6"-O-acetyl-β-daidzin	daidzin	daidzein	total
Chicory	Seed	0	0.0	0.0	232.6	0.0	232.6
	Sprout	0	0.0	0.0	118.8	0.0	118.8
	Sprout	0.5	0.0	0.0	76.8	0.0	76.8
	Sprout	1.0	0.0	0.0	110.6	0.0	110.6
Rape	Seed	0	12.3	0.0	37.1	0.0	49.5
	Sprout	0	438.9	0.0	0.0	0.0	438.9
	Sprout	0.5	125.7	0.0	12.8	0.0	138.5
	Sprout	1.0	16.5	0.0	87.1	0.0	103.5
Red kale	Seed	0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	Sprout	0	157.2	0.0	30.1	0.0	187.2
	Sprout	0.5	170.6	0.0	23.8	0.0	194.4
	Sprout	1.0	0.0	0.0	59.6	0.0	59.6
Alfalfa	Seed	0	0.0	0.0	22.5	0.0	22.5
	Sprout	0	0.0	0.0	5.3	0.0	5.3
	Sprout	0.5	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	Sprout	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Sunflower	Seed	0	0.0	0.0	1,395.6	0.0	1,395.6
	Sprout	0	0.0	0.0	628.6	0.0	628.6
	Sprout	0.5	0.0	0.0	526.7	0.0	526.7
	Sprout	1.0	0.0	0.0	592.4	0.0	592.4

**Table 17-c. Isoflavone profile in seed and sprout germinated under tryptophan treatment**

			Geinstein derivative ( $\mu\text{g/g}$ )				
			6"-O-malonyl- $\beta$ -genistin	6"-O-acetyl- $\beta$ -genistin	genistin	genistein	total
Chicory	Seed	0	21.9	1,711.6	0.0	0.0	1,733.5
	Sprout	0	0.0	210.2	490.0	0.0	700.2
	Sprout	0.5	0.0	250.4	296.0	0.0	546.5
	Sprout	1.0	0.0	605.9	278.7	0.0	884.6
Rape	Seed	0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	Sprout	0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	Sprout	0.5	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	Sprout	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Red kale	Seed	0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	Sprout	0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	Sprout	0.5	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	Sprout	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Alfalfa	Seed	0	25.7	160.9	0.0	0.0	186.6
	Sprout	0	23.8	94.9	0.0	0.0	118.7
	Sprout	0.5	27.0	95.4	0.0	0.0	122.4
	Sprout	1.0	23.2	123.0	0.0	0.0	146.2
Sunflower	Seed	0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	Sprout	0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	Sprout	0.5	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	Sprout	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0

## 다. 유산균을 이용한 melatonin 함유 발효유제품 제조

### 1) 발효유제품의 제조 및 melatonin 함량 분석

발효유제품을 제조하고 melatonin 함량을 조사함으로써 새로운 수면 보조용 제품으로의 가능성을 조사하였다. 일반적으로 민간에서 수면을 촉진하는 방법 중의 하나로 따뜻한 우유를 섭취하는 것이 있다. 현재 이러한 효과는 우유 속에 존재하는 melatonin 전구체인 tryptophan과 melatonin 등이 관여 될 것으로 추정되고 있으며 최근 유럽에서 우유에 melatonin 함량을 높인 제품이 출시된 바 있다. 이러한 바탕 하에 본 연구에서는 skim milk를 이용하여 발효유제품을 제조 시 유산균 종류 및 발효조건 변화로 melatonin 함량이 높은 발효유제품의 제조를 시도하였다.

예비실험으로서 *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus* 및 *Lactobacillus casei*를 starter로 이용하여 발효유제품을 제조하여 melatonin 함량을 분석하였다. Table 18에서 나타난 바와 같이 skim milk 대조군에는 약 76 pg/g의 낮은 함량의 melatonin이 존재하는데 반해 *Strep. thermophilus*를 이용한 발효유제품에서는 melatonin 함량이 상당히 증가된 것으로 나타나 수면 보조용 유산균 발효유제품 개발이 가능하리라 판단되었다. 반면 *Lac. casei*, *Lac. bulgaricus* 및 *Lac. bulgaricus*와 *Strep. thermophilus*의 혼합배양 등에서는 melatonin 생성 효과가 없는 것으로 나타났다.

### 2) 신규 유산균주의 분리 및 발효유제품의 제조와 melatonin 함량 분석

유산균주에 의한 발효유제품 제조에서 melatonin의 생성 가능성이 확인된 바, melatonin 생성능이 우수한 새로운 유산균주의 선발 및 이용 가능성을 조사하기 위하여 다양한 유산균 함유 발효식품인 배추김치, 총각김치, 물김치로부터 새로운 유산균주를 분리하였다. 이 중에서 MRS broth에서의 성장이 우수한 38균주를 10% skim milk용액에 접종하여 발효유제품을 제조하여 melatonin 함량을 분석하였다. 이들 균주는 완전한 동정이 이루어지지 않는 않았으나 Table 19에서와 같이 젖산을 주로 생산하는 homo-lactic

**Table 18. Melatonin content in yogurt prepared through fermentation by lactic acid bacteria**

Bacterial treatment	Melatonin content	
	pM <sup>1</sup>	pg/g <sup>2</sup>
Control(skim milk)	136.22	75.95
<i>Lactobacillus casei</i>	171.49	95.61
<i>Streptococcus thermophilus</i>	1920.22	1070.56
<i>Lactobacillus bulgaricus</i>	131.90	73.54
Mixture of <i>S. thermophilus</i> + <i>L. bulgaricus</i>	131.11	73.10

<sup>1</sup>melatonin content in concentrated sample solution, which was analyzed by ELISA.

<sup>2</sup>melatonin content in dried powder, which was analyzed by ELISA.

**Table. 19. Melatonin production through fermentation by lactic acid bacteria screened from *kimchi***

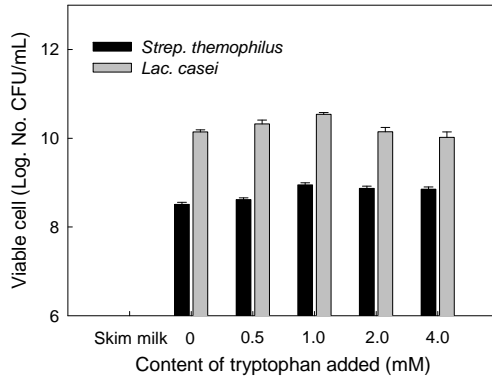
Strain No.	Melatonin (pg/g)	Strain No.	Melatonin (pg/g)
Homo lactic acid bacteria 19	2.0± 0.5	Homo lactic acid bacteria 91	9.1± 0.4
42	6.2± 0.7	93	14.7± 3.9
43	5.8± 3.4	94	6.6± 1.8
46	3.1± 2.0	95	9.3± 3.3
53	9.2± 1.1	96	21.4± 1.5
54-1	7.0± 0.6	97	12.1± 2.5
54	5.5± 0.4	98	11.1± 4.6
55	6.3± 0.6	100	9.3± 3.1
56	7.1± 4.5	192	33.8± 0.5
60	4.8± 0.6	193	5.0± 2.8
63	3.5± 0.3	194	8.7± 3.9
65	6.4± 2.5	195	13.8± 5.1
76	10.3± 2.1	197	15.7± 0.7
77	6.7± 9.2	198	15.5± 2.9
78	12.8± 10.0	260	9.7± 5.7
82	15.8± 4.8	Hetero lactic acid bacteria 123	10.0± 1.3
83	7.1± 2.4	126	14.0± 7.3
88	8.4± 3.7	128	14.8± 13.7
90	10.3± 1.7	187	158.3± 32.0

acid bacteria가 34종, 젖산 외에 기타 대사물을 생산하는 hetero-lactic acid bacteria가 4종 이었다. 각 균주에 의해 얻어진 발효유제품의 분석결과, 대부분 melatonin 함량이 2.0-33.8 pg/g 수준으로 앞서 조사된 *Strep. thermophilus* 발효유제품에 비해 그 함량이 매우 낮을 뿐 아니라 발효하지 않은 대조구보다도 훨씬 낮은 값을 보여 melatonin 생성이 없거나 기존 skim milk에 존재하는 melatonin 마저도 소모하는 성질이 있는 것으로 추정되었다. 다만 No. 187 균주가 158.3 pg/g 정도의 melatonin을 생성할 수 있는 것으로 확인되었다.

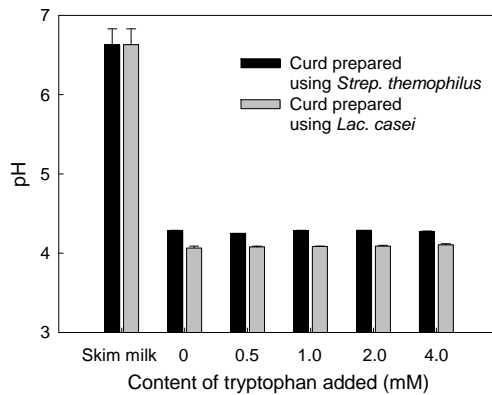
### 3) 발효유제품의 melatonin 함량에 대한 tryptophan 처리 효과

발효유제품 제조에서 melatonin 생성능이 가장 우수하였던 *Strep. thermophilus*를 이용한 발효에서 melatonin 생성에 대한 tryptophan의 첨가 효과를 분석하였으며 비교균으로 *Lact. casei*를 이용해 동일한 실험을 하였다.

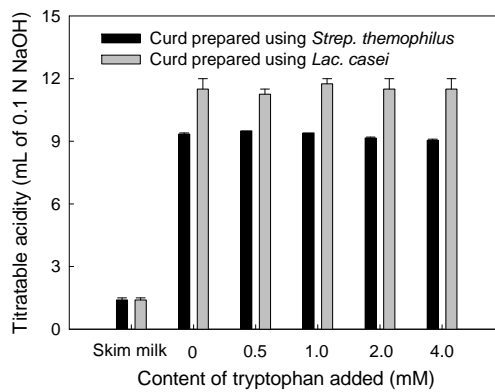
살균한 10% skim milk 용액에 각 균주를 접종하여 37°C에서 24시간 배양한 다음, 먼저 발효의 진행 정도를 파악하기 위하여 발효유제품에서의 생균수, pH 및 적정산도를 분석하였다. 그 결과 두 균주 모두 전형적인 유산균의 발효양상, 즉 생균수 증가, pH의 감소 및 적정산도의 증가가 확인되었다(Fig. 17). 두 균주 중 *Lac. casei*는 *Strep. thermophilus* 보다 생균수가 더 많았던 것으로 나타났으며 이에 따라 발효유제품에서 더 낮은 pH와 높은 산도를 가진 발효유제품을 생성하였다. 그러나 균주 활성화 후 접종 시 정확한 균수를 파악하여 접종하지 않은 관계로 이러한 차이가 균의 성장을 차이에 의한 것인지 혹은 초기 균 접종 수 차이에 의한 것인지는 판단하기가 어려웠다. 한편, tryptophan을 0-4.0 mM 농도로 skim milk 용액에 첨가하여 발효시키면 1.0 mM 까지는 두 균주 모두에서 생균수가 증가하였다. 그러나 그 이상의 농도에서는 오히려 균수가 감소하여 생육이 다소 저하되는 것으로 나타났으나 pH와 산도에 영향을 줄 정도의 저하는 아닌 것으로 확인되었다(Fig. 17).



(A) Number of viable cell



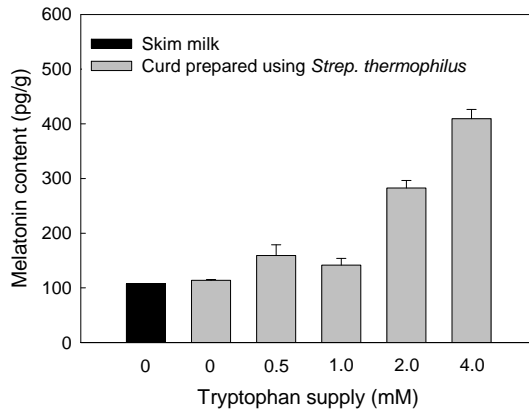
(B) pH



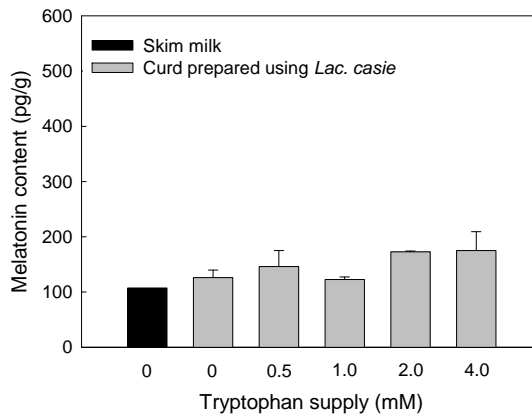
(C) Titratable acidity

Fig. 17. Viable cells, pH and titratable acidity in yogurt prepared through fermentation by lactic acid bacteria under treatment of tryptophan





(A) *Strep. thermophilus*



(B) *Lac. casei*

**Fig. 18. Melatonin content in yogurt prepared through fermentation by lactic acid bacteria under treatment of tryptophan**

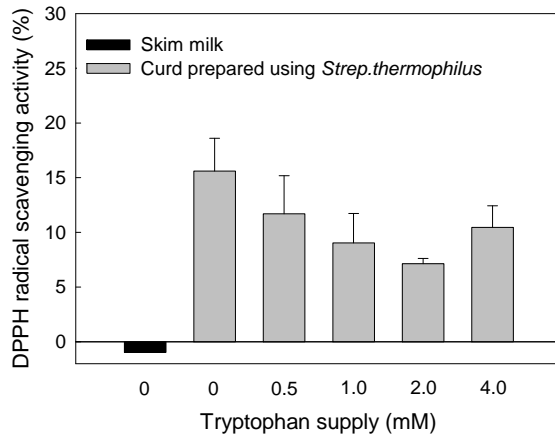
발효 후 melatonin 함량의 변화는 Fig. 18에 나타내었다. 대조구인 skim milk 용액에서의 melatonin 함량이 107 pg/g 수준인데 비해 발효를 하면 *Strep. thermophilus*에 의해 156 pg/g, *Lac. casei*에 의해 125 pg/g으로 다소 증가하였는데 이는 김치에서 분리되었던 유산균 187번에서 얻어진 양과 유사하였다. *Strep. thermophilus*에 의한 발효시 melatonin의 생성이 늘었다고 해도 이전의 실험 결과(1070.56 pg/g)와는 상당한 차이를 보였는데 사용한 균주가 달라졌기 때문이라고(구입기관의 차이) 여겨졌다..

한편, 발효과정에서 tryptophan을 첨가하면 농도의존적으로 melatonin 함량이 증가하였는데 특히 *Strep. thermophilus*을 사용한 발효유제품에 증가가 두드러졌다. 4.0 mM 첨가군에서 *Lac. casei*는 melatonin 함량을 175 pg/g까지 증대시킨데 비해 *Strep. thermophilus*는 409 pg/g까지 증대시켜 비 발효 skim milk 용액 보다 약 3.8배 이상의 melatonin을 생성시킬 수 있었다. 즉 *Strep. thermophilus*를 starter로 한 발효에서 tryptophan을 첨가시킴으로써 melatonin 함량이 증가된 발효유제품을 제조할 수 있었다.

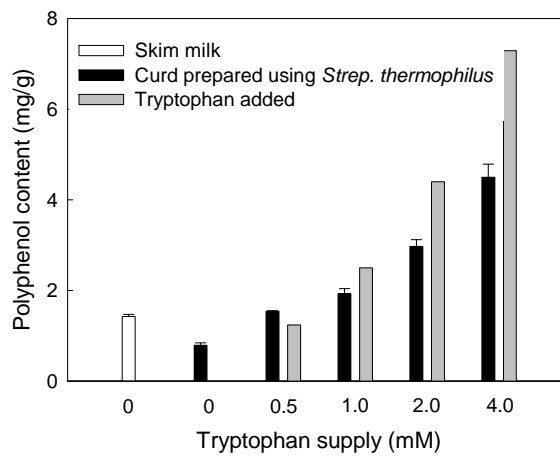
#### 4) 발효유제품의 항산화 효과

Melatonin 함량 분석과 더불어 항산화 효능과 polyphenol 함량도 조사하였다(Figs. 19, 20). 그 결과 두 젓산균 모두에서 발효시 DPPH 라디칼 소거능이 증가하는 것으로 나타났다. 그러나 전구체의 처리시 *Strep. thermophilus* 발효유제품에서는 항산화 효능이 2.0 mM tryptophan 농도까지 다소 감소하는 경향을 보이다 4.0 mM에서 다시 증가하는 양상을 보였으며 *Lac. casei* 발효액에서는 2.0 mM 농도를 제외하고는 전구체에 의해 항산화 효능이 다소 증가하는 것으로 나타났다. 즉, 발효에 의해서 항산화능은 증진되었으나 tryptophan에 의한 효과는 없는 것으로 나타났다. 항산화 효능과는 달리 polyphenol 함량은 전구체 처리에 의해 그 함량이 증가하는 것으로 나타났는데 이는 Folin-Ciocalteu phenol 시약이 tryptophan과도 반응하기 때문인 것으로 방법상 정확한 분석이 어려웠다.

이상의 결과로부터 *Strep. thermophilus*는 발효유제품 제조 시 melatonin 합성을 위한 유용한 균주로 판단되며 항산화 활성도 지닌 발효유제품 제조에 유용하다고 판단되었다. 그리고 tryptophan을 첨가함으로써 melatonin 함량이 증가된 발효유제품의 제조가 가능하였다.

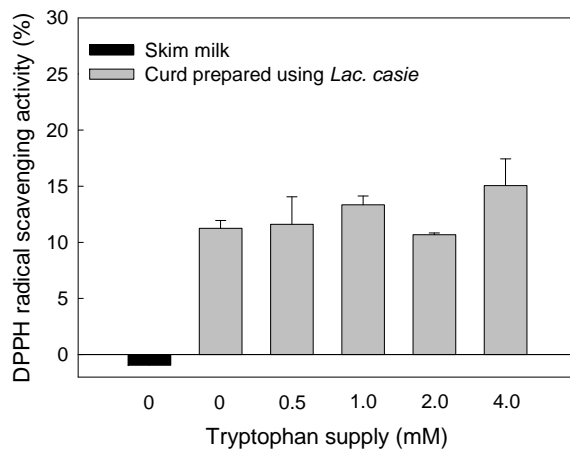


(A) DPPH radical scavenging activity

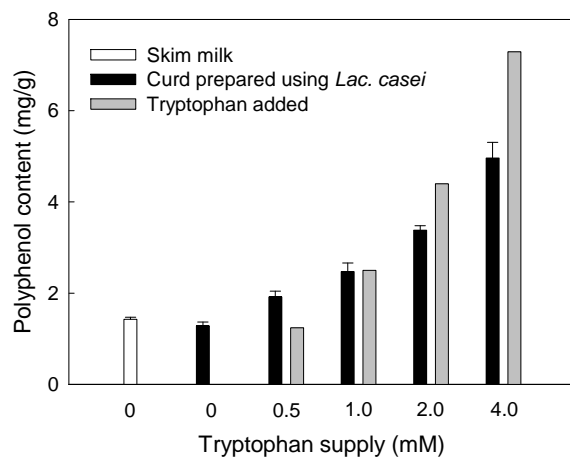


(B) Polyphenol content

**Fig. 19.** DPPH radical scavenging activity and polyphenol content in yogurt prepared through fermentation by *Strep. thermophilus* under treatment of tryptophan



(A) DPPH radical scavenging activity



(B) Polyphenol content

**Fig. 20. DPPH radical scavenging activity and polyphenol content in yogurt prepared through fermentation by *Lac. casei* under treatment of tryptophan**

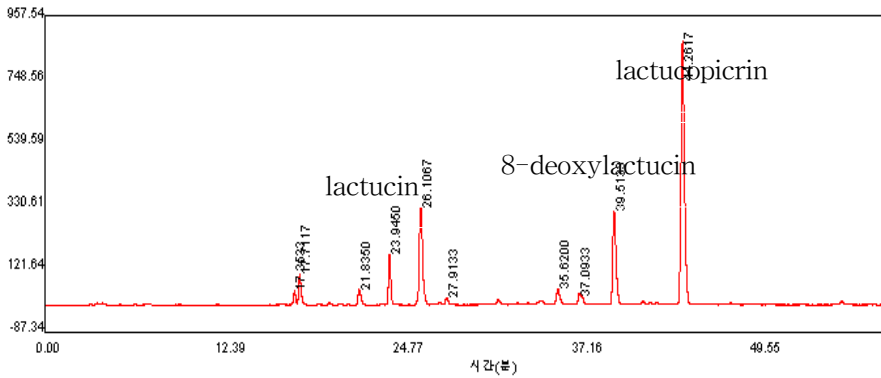
## 라. 상추 및 치커리로부터 sesquiterpenoid lactones의 분석 및 활용

### 1) Sesquiterpenoid lactones profile 분석

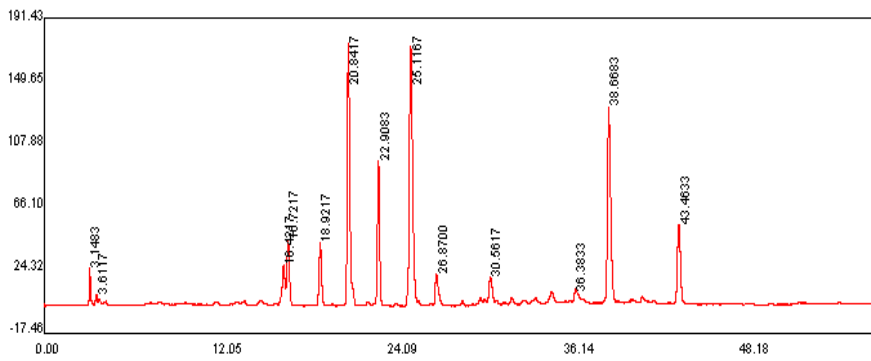
Melatonin 기초의 수면관련 기능성 식품 개발에 있어 수면 보조효과를 더욱 높일 수 있는 방안으로 melatonin 이외에 민간에서 잠을 오게 만드는 효능이 있다고 알려진 상추의 활용을 고려하였다. 상추는 국화과 1년생 초본식물로 식물고유의 쓴맛이 나는데 이는 상추의 잎, 줄기에 상처가 나면 강한 쓴맛을 내는 우유빛 latex를 분비하며 이러한 성분은 진통, 진해, 진정, 항균의 효능이 있다고 알려져 있을 뿐 아니라 상추를 먹었을 때 졸리는 현상과 관련이 있는 것으로 추정되고 있다. 그리고 이러한 쓴맛관련 성분은 2차대사산물인 sesquiterpenoid lactone으로 알려져 있으며 lactucin, 8-deoxylactin, lactucopicrin 등이 주요 성분이며 이외에도 다양한 유도체들이 알려져 있다. 그리고 상추뿐 아니라 치커리에도 이러한 성분들이 많이 존재한다고 알려져 있다. 이에 국내에서 상용되는 적치마상추(Lettuce, red, *Lactuca sativa* L.), 청치마상추(Lettuce, green, *Lactuca sativa* L.), 치커리(Radicchio, *Cichorium intybus*, L)의 활용가능성을 조사하고자 이들로부터 sesquiterpenoid lactones계 물질의 profile을 분석하였다.

Fig. 21에 각 식물체의 줄기에서 분비되는 latex에 존재하는 sesquiterpenoid lactone계 물질의 분포가 나타나 있다. 분리된 각 성분에 대한 구조는 표준품을 구하기 어려운 관계로 정확하게 확인하기는 어려우나 기존의 보고들과 비교해 볼 때, RT 23분대에 나타난 peak가 lactucin, 38분대에 8-deoxylactucin, 44분대에 lactucopicrin으로 여겨지며 각 성분의 주위에 있는 peak 들은 이들의 유도체로 알려져 있다. 그리고 이러한 성분들이 수면효과와 관련이 높은 것으로 알려져 있다.

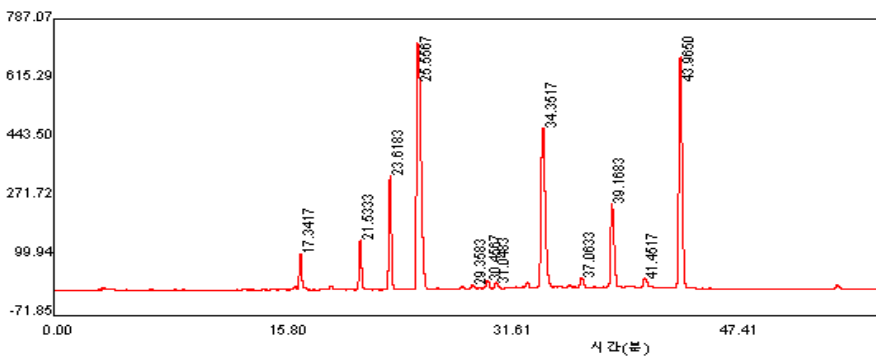
3가지 식물체로부터 sesquiterpenoid lactone 성분들의 조성을 비교해 보면 적상추의 latex는 lactucin과 8-deoxylactucin 계 보다는 lactucopicrin 쪽의 함량이 높고, 청상추에서는 lactucin과 8-deoxylactucin 계가 상대적으로 높았으며, 치커리에서는 이들 구성이 중간정도였다.



(A) Red lettuce

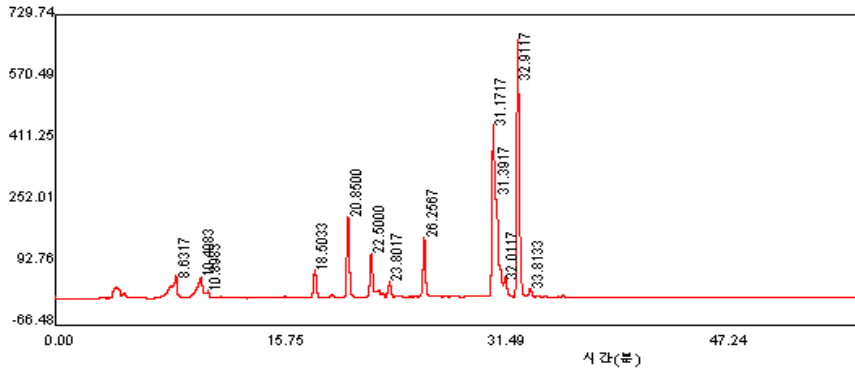


(B) Green lettuce

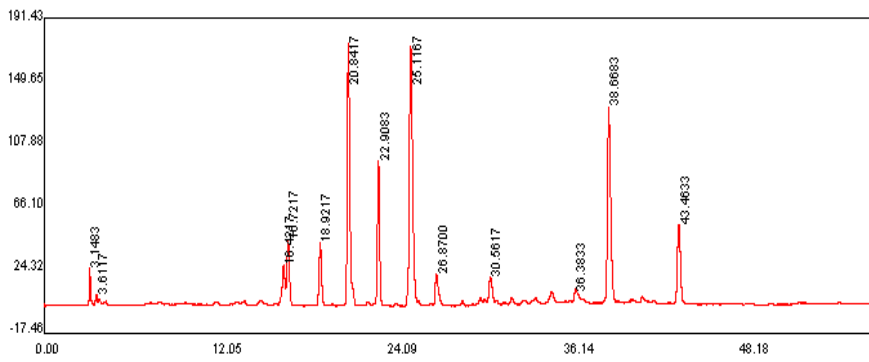


(C) Chicory

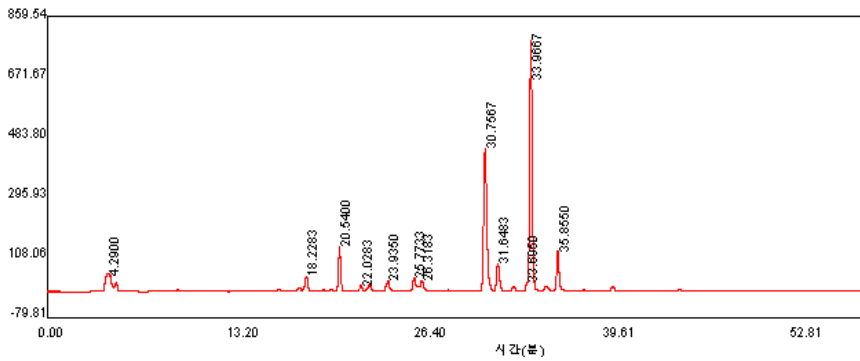
Fig. 21. Comparison of HPLC profiles of sesquiterpenoid lactones in latex of lettuce and chicory



(A) Red lettuce



(B) Green lettuce



(C) Chicory

Fig. 22. Comparison of HPLC profiles of sesquiterpenoid lactones in whole part of lettuce and chicory

한편, 식물전체로부터 sesquiterpenoid lactone의 profile를 분석한 결과 (Fig. 22), 모든 품종에서 경우 lacucin과 8-deoxylactucin 계열 물질들은 확인되었고 특히 latex에서 그 양이 미미한 30-35분대 분리되는 물질 (lactucin 유도체로 추정)의 함량이 높았으며 lactupicrin 성분은 확인되지 않아 latex와 차이를 보였다.

## 2) Alginate 및 chitosan 입자에 유용성분의 포집 및 방출

Sesquiterpenoid lactones계 물질들을 활용해 수면관련 기능성 식품을 개발하는데 있어 가장 문제점이 될 수 있는 것 중의 하나가 쓴맛이다. 약간의 쓴맛은 각 상추, 치커리 등에서 식욕을 돋우는 역할도 할 수 있으나 추출 및 농축을 거쳐 제품화하게 되는 경우에는 기호도에 큰 영향을 주리라 판단된다. 이에 이들 성분의 활용 시 기호도를 개선하고 또한 물질의 안정성을 증대시키기 위하여 alginate와 chitosan 입자내 포집하는 방법을 고려하였다.

적상추의 latex 유래 추출물질의 포집을 위한 alginate 입자제조에 250cps와 14,000cps 점도의 alginate를 사용한 경우 Fig. 23에서와 같이 250cps alginate가 일정한 모양의 입자를 제조할 수 있어서 가공적성이 우수한 것으로 판단되었다. Chitosan 입자제조에서는 223kDa, 444kDa, 746kDa 분자량의 입자 형성을 비교하였는데 746kDa의 chitosan이 일정한 모양의 입자를 형성할 수 있었다(Fig. 24).

한편, 섭취 시 쓴맛 및 안정성을 향상시키기 위해 latex 추출물 성분을 alginate와 chitosan 입자에 포집시켜 섭취하는 경우, 생체내에서의 이용 특성을 파악하기 위하여 위장 내 환경과 유사한 pH 1.8을 나타내는 model gastric juice를 활용하였다. 즉, model gastric juice에 latex 함유 입자들을 넣고 체온과 유사한 36.8°C에서 유지하면서 sesquiterpenoid lactones의 주 흡광파장인 264nm에서 model gastric juice의 흡광도 변화를 조사하였다. 그 결과 Fig. 25에서와 같이 두 입자 모두에서 30분대에 최대치에 근접하므로써 단시간내에 방출되는 것을 알 수 있었다. 그리고 alginate 입자보다는 chitosan 입자를 사용하는 것이 물질의 방출에 유리하였는데 이는



chitosan 입자의 경우 산성용액에서 용해되는 특성이 큰데 기인하는 것으로 판단된다. 입자에 latex 추출물을 포집할 경우 쓴맛을 상쇄시키고 위장관에서 빠른 방출이 가능할 것으로 판단되었다.

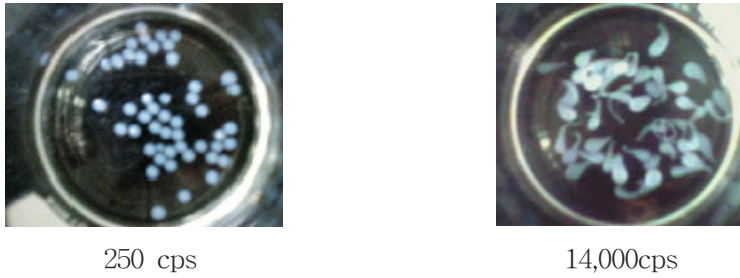


Fig. 23. Preparation of alginate beads containing lettuce latex

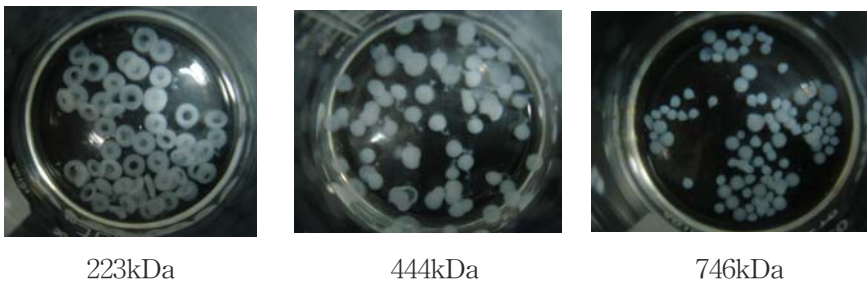


Fig. 24. Preparation of chitosan beads containing lettuce latex

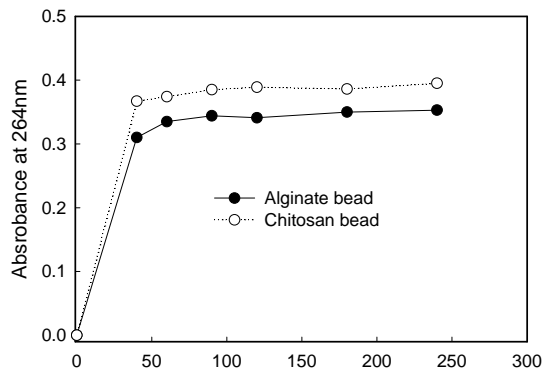


Fig. 25. Release characteristics of latex extract from alginate and chitosan beads in model gastric juice

## 참고문헌

- 1) Larzelere, M.M. and Wiseman, P.: Anxiety, depression, and insomnia. *Prim. Care.* 29(2): 339-360 (2002)
- 2) Henney, J.E.: New drug for sleepness, *J. Am. Med. Assoc.* 282(13): 1218 (1999)
- 3) Wing, Y.K.: Herbal treatment of insomnia. *Hong Kong Med. J.* 7(4): 392-402 (2001)
- 4) Gyllenhaal, C., Merritt, S.L. Peterson, S.D., Block, K.L. and Gochenour, T.: Efficacy and safety of herbal stimulants and sedatives in sleep disorders. *Sleep Med. Rev.* 4(3): 229-251 (2000)
- 5) Cauffield, J.S. and Forbes, H.J.: Dietary supplements used in the treatment of depression, anxiety, and sleep disorders. *Lippincotts Prim. Care Pract.* 3(3): 290-304 (1999)
- 6) Nagtegaal, J.E., Laurant, M.W., Kerkhof, G.A., Smiths, M.G., van der Meer, Y.G. and Coenen, A.M.L.: Effects of melatonin on the quality of life in patients with delayed sleep phase syndrome. *J. Psych. Res.* 48: 45-50 (2000)
- 7) Dubbels, R., Reiter, R.J., Klenke, E., Goebel, A., Schnakenberg, E., Ehlers, C., Schiwara, H.W. and Schloot, W.: Melatonin in edible plants identified by radioimmunoassay and by high performance liquid chromatography-mass spectrometry. *J. Pineal Res.* 18: 28-31 (1995)
- 8) Zeng, W. and Cole P.A.: Serotonin N-acetyltransferase: mechanism and inhibition. *Curr. Med. Chem.* 9(12): 1187-1199 (2002)
- 9) Gupta, B.B., Seidel, A., Spesert, R., Buttner, W., Klauke, N., Spanier, J., Weber, A., Ziemer, D., Vollrath, L.: In vitro effects of putative neurotransmitters on synaptic ribbon numbers and N-acetyltransferase activity in the rat pineal gland. *J. Neural Transm. Gen. Sect.* 89(3): 167-178(1992)

- 10) Ushijima, I., Tanaka, M., Tsuda, A., Koga, S., and Nagasaki. N.: Differential effects of morphine on core temperature in stressed and non-stressed rats. Elsevier Science, 112, pp. 331-337(1985)
- 11) Manchester L.C., Tan, D.X., Reiter, R.J., Park, W., Monis, K., Qi, W. High levels of melatonin in the seeds of edible plants, possible function in germ tissue protection. Life Sci., 67: 3023-3029 (2000)
- 12) Chen, G., Huo, Y., Tan, D.X., Liang, Z., Zhang, W., Zhang, Y. Melatonin in Chinese medicinal herbs. Life Sci. 73: 19-26 (2003)
- 13) Cao, J., Murch, S.J., O'Brien, R., Saxena, P.K. rapid method for accurate analysis of melatonin, serotonin and auxin in plant samples using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. J. Chrom. A. 1134: 333-337 (2006)
- 14) Puerta, C., Carrascosa-Salmoral, M.P., Garcia-Luna, P.P., Lardone, P.J., Herrera, J.L., Fernandez-Montesinos, R., Guerrero, J.M., Pozo, P. Melatonin is a phytochemical in olive oil. Food Chem. 104: 609-612 (2007)
- 15) Hardeland, R., Pandi-Perumal S.R., Cardinali, D.P. Melatonin. Int. J. Biochem. Cell Biol. 38: 313-316 (2006)

## 주 의

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

