

발간등록번호

11-1543000-000636-01

곤충자원의 식·약용 소재화를 위한 약리성 검정 및 독성 평가

(Evaluation of pharmacological action and toxicity of insect resources for development as food and medicinal material)

국립농업과학원

농림축산식품부

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “곤충자원의 식·약용 소재화를 위한 약리성 검정 및 독성 평가”의 보고서로 제출합니다.

2014년 11월 일

주관연구기관명 : 국립농업과학원

주관연구책임자 : 윤 은 영

세부연구책임자 : 윤 은 영

연 구 원 : 황 재 삼

연 구 원 : 구 태 원

연 구 원 : 김 미 애

연 구 원 : 최 영 철

협동연구기관명 : 동아대학교

협동연구책임자 : 진 미 라

협동연구기관명 : 울산과학기술대학교

협동연구책임자 : 강 병 현

협동연구기관명 : 안전성평가연구소

협동연구책임자 : 문 경 식

협동연구기관명 : 월드웨이(주)

협동연구책임자 : 이 정 용

요 약 문

I. 제 목

곤충자원의 식·약용 소재화를 위한 약리성 검정 및 독성 평가

II. 연구개발의 목적 및 필요성

2010년 “곤충산업육성법” 시행 이후 곤충산업육성과 농가 소득 증대를 위한 곤충산업 활성화 대책 방안의 일환으로 곤충의 식·약용으로의 이용이 시급함에도 불구하고, 식품공전에서 식품원료로 인정되어 식용으로 판매 가능한 곤충은 예전부터 먹어왔기 때문에 식품공전에 등록되어져 있는 메뚜기와 누에 번데기, 백강잠 외에는 전무한 실정이었다. 따라서 곤충을 식용으로 이용하기 위해서는 식품의약품안전처에서 마련한 새로운 식품원료 인정을 위한 “한시적 인정 신청제도”에 필수자료를 구비하여 신청 후 새로운 식품원료로 인정을 받아야만 가능하다. 그러므로 본 연구에서는 우선적으로 한시적 인정 신청제도에 필수적인 연구를 수행하였다. 이 때 대상 곤충으로는 갈색거저리 및 흰점박이꽃무지를 선정하였는데 그 이유는 국내·외에서 식용이나 민간요법으로 사용한 사례가 많으며 이미 대량사육시스템이 확립되어져 국내 사육농가가 다수 존재하기 때문이다.

유엔식량농업기구(FAO)는 2050년쯤 세계 인구가 약 90억 명에 달할 것으로 추정됨에 따라 현재보다 두 배 이상의 식량이 필요할 것으로 예상하고 있으나, 바다가 남획되고 기후변화와 물 부족 등의 문제로 식량 생산에 있어서 양 및 질적 저하와 함께 다수의 기아가 발생할 것이라 예측하여 미래의 대체식량으로 곤충의 잠재력을 높이 평가하고 있다. 그 이유는 곤충은 닭고기, 돼지고기, 소고기, 심지어 물고기 등의 대안이라고 생각할 수 있을 만큼 단백질과 몸에 좋은 지방이 풍부하고 칼슘, 철, 아연 등 무기질 함량이 높을 뿐만 아니라 이미 여러 국가에서 많이 먹어 오고 있기 때문이다. 곤충은 세대가 짧고, 개체가 작은 특징으로 인해 시간적, 공간적 및 인력적인 측면에서 자원 확보 및 이용에 있어서 매우 효율적이고 경제적인 자원이므로 보다 광범위하고 다양한 곤충자원을 이용한 유용물질 생산, 즉 신기능 생물소재나 생체활성물질 개발이 필요하다. 그러나 현재까지 식물을 대상으로 하는 생리활성 물질의 탐색은 상대적으로 활발하게 진행되고 있으나 아직 곤충으로부터 활성 물질 탐색, 구조 결정, 신약후보물질 개발 등의 연구 추진은 시작 단계에 머물러 있어 관련된 연구에 대한 적극적인 연구 개발 투자와 지속적인 연구가 필요하다.

이에 본 연구에서는 갈색거저리 및 흰점박이꽃무지를 새로운 식품원료로 등록하기 위해 제조공정 확립, 영양성분 분석, 독성시험 등의 과학적인 안전성 입증 등의 연구를 수행하였고, 대표 물질 선정, 유통기한 설정과 시제품까지 개발하였다. 그 외에도 갈색거저리 및 흰점박이꽃무지의 인체에 대한 유용성을 높이기 위한 다양한 기능성 검정, 기전 연구 및 활성지표물질 추적 연구를 수행하였다.

Ⅲ. 연구개발 내용 및 범위

- 대상곤충 : 굽벥이, 거저리
- 대상곤충별 최적조건 확립
 - 다양한 먹이원, 발육시기 및 분말전처리 등의 조건별 시료 독성 검정 및 기능성 검증을 통해 최소독성, 최대기능성의 곤충조건 확립
 - : 다양한 세포주를 대상으로 독성 및 기능성 평가
- 대상곤충 영양성분분석 및 섭취량 평가
 - 식약처 지정 식품위생검사기관에 대상곤충의 영양성분분석 의뢰를 통해 식품등록요청에 적합한 데이터 확보
 - 렫드를 대상으로 사료섭취량, 무해용량 등을 고려하여 일일 최대 섭취량 분석
- 대상곤충 각각의 대표적인 지표성분 추출, 추출법 확립, 곤충 단위무게당 지표성분 함량 분석
 - 건조시료의 80% ethanol로 추출 후 농축 및 Hexane, chloroform, EtOAc, n-BuOH로 분획 후 감압농축 후 대표성분 설정 및 활성추적을 통한 지표성분 분리 후 단위무게당 대표 및 지표성분 함량 분석
- 대상곤충의 다양한 기능성 분석 : 항염증, 항산화, 항당뇨 등
 - 항염증: 대식세포에 곤충추출물 처리 후 염증관련 cytokine 항체를 이용한 다양한 분석
 - 항비만 : 지방세포주를 대상으로 곤충추출물 처리 후 Leptin 등 비만관련 유전자의 전사체 및 단백질 발현분석
 - 항당뇨 : 췌장세포주에 당뇨유도물질 처리한 다음 곤충추출물 부가 후 인슐린 생성량 조사
- 곤충으로부터 분리된 약리 물질의 간암 모델에서의 항암효과 검증(전임상 실험 포함)
 - 간암세포주를 대상으로하는 항암약효 high throughput screening system 확립
 - 간암동물모델에서의 항암활성 검증 시스템 확립
 - 항암약리활성 물질의 약물작용기전 연구를 통한 약효 검증
- 식품으로 등록을 위한 식·약용 곤충 2종에 대한 신뢰성 있는 GLP 안전성시험자료 생산
 - 조제물 분석법 validation 확립
 - 일반독성 및 유전독성 평가를 통한 식약청의 식품허가에 적합한 GLP 안전성시험자료 생산
- 대상곤충을 식품소재로 개발하기 위한 제조공정의 표준화 확립 및 유통기한 설정을 통한 시제품 제조
 - 제조공정의 표준화
 - 포장재질별 가속실험, 자가 규격 및 유통기한 설정
 - 개발 원료를 활용한 다양한 제형의 제품 개발
- 곤충의 식품으로서 국내·외 인정·허가 및 사용현황 등에 관한 자료수집 : 논문, 저서 등 문헌 조사
- 식약처에 식품원료로 인정요청
 - 식품원료의 한시적 기준 및 규격 인정신청서 작성 및 관련 자료의 식약처 제출

Ⅳ. 연구개발결과

- 곤충 특유의 좋지 않은 맛과 냄새를 없앤 후 살균, 세척, 동결건조 등 제조공정 확립
- 확립된 제조공정에 의해 제조된 갈색거저리 및 흰점박이꽃무지 유충 분말의 영양성분 분석 : 일반성분, 성상, 아미노산 조성, 지방산 조성, 비타민 및 무기질 조성

- 갈색거저리 및 흰점박이꽃무지의 유해물질 분석 : 세균, 중금속, 잔류농약, 곰팡이독소, 화합물, 알레르기 유발물질
- 갈색거저리 및 흰점박이꽃무지 유충 분말 추출물의 항비만, 항염증, 항당뇨 효능 검정
- 갈색거저리 및 흰점박이꽃무지의 기원 및 개발경위, 국내·외 인정 및 사용현황 등에 관한 자료 작성
- 갈색거저리 및 흰점박이꽃무지의 추출, 세부 분획 및 분석(일반성분, 지방산 정량, 정유성분 등)을 실시함
- GC 성분분석을 통해 갈색거저리/흰점박이 꽃무지의 대표물질을 올레산으로 선정함
- 갈색거저리/흰점박이 꽃무지 분획물 및 대표지방산의 *in vitro* 항산화능, BACE1 저해활성 및 A β 유도독성으로부터의 신경세포보호효과를 확인함
- 갈색거저리/흰점박이 꽃무지 대표물질인 올레산의 NF- κ B 신경전달 체계 관련 항 염증 반응을 통한 알츠하이머성 치매 예방 메커니즘을 규명함
 - 갈색거저리와 흰점박이꽃무지 추출물들의 암세포주에 대한 세포독성 및 세포죽음 유도기전을 규명하였고, 발암동물모델에서 항암활성을 확인함
 - 곤충추출물의 간질환에 대한 보호효과를 간독성유도 동물실험에서 규명함
- 갈색 거저리와 흰점박이꽃무지 조제시험물질의 균질성, 함량 및 안정성을 분석할 수 있는 분석법을 확립함
- 갈색거저리 및 흰점박이꽃무지의 안전성평가를 위해 동물모델을 이용하여 급성, 4주 및 13주 독성시험을 실시한 결과, 독성이 나타나지 않음
- 갈색거저리 및 흰점박이꽃무지의 유전독성을 평가하기 위해 복귀돌연변이, 소핵, 염색체이상 시험 및 comet assay를 실시한 결과, 모두 음성이거나 독성이 나타나지 않음
- 갈색거저리와 꽃무지 유충에 대한 멸균 온도, 멸균시간 및 동결 온도, 시간, 진공도 등 건조조건 설정
- 각각의 원재료에 대한 생산 설비 및 작업 조건 표준화에 의한 제조공정 표준화 완료
- 표준화된 제조공정으로 제조된 원료에 대하여 반복실험을 통해 성상, 이물, 수분, 조 단백질 함량, 미생물에 대한 자가 규격 설정
- 동결건조유충을 방습성이 우수한 포장 재질의 기밀용기에 포장하여 가속실험 기간동안 지표물질의 변화를 관찰하고 아레니우스 방정식에 의한 유통기한 설정
- 제품특성을 고려한 디자인제작 및 분말형태의 제형인 시제품 제조
- 시제품에 대한 가속실험으로 자가 규격항목 및 지표물질의 변화를 관찰하고 유통기한 설정
- 동결건조 갈색거저리 및 흰점박이꽃무지 유충에 대한 한시적 인정 요청서 작성
- 동결건조 갈색거저리 유충 새로운 식품원료로 한시적 인정('14. 7. 15.)
- 동결건조 흰점박이꽃무지 유충 새로운 식품원료로 한시적 인정('14. 9. 30.)

V. 연구성과 및 성과활용 계획

- 본 연구결과를 통해 기존에 혐오식품으로 인식되고 있는 곤충을 친환경적이며 영양이 풍부한 미래 식량자원으로 인식 변화 가능
 - 곤충 특유의 고단백, 고불포화지방산 등 영양성분 및 고기능성 등 인체에 유익한 점 홍보 강화
 - 곤충에 대한 기존의 혐오식품이라는 인식으로부터 곤충과 다양한 식품 재료와 양념류와의

- 조합으로 다양한 레시피 개발을 통해 맛있는 먹거리라는 개념으로 인식 전환 가능
- 곤충을 이용한 레시피 책자 개발을 통해 일반인의 곤충을 이용한 요리에 대한 접근성을 향상시키고, 메뉴개발 책자를 통해 영양사 등 요리전문가의 곤충 요리에 대한 관심 유도
 - 곤충을 이용한 노인식, 환자식, 유아식 등 곤충의 영양적 가치를 이용한 특수의료용도식이 개발을 통한 소비 확대
 - 추후 식품공전에 등록된 곤충의 다양한 인체에 유익한 기능성 발굴을 통한 건강기능식품 등록 및 개발 가능
 - 현재 주 단백질원인 17조 원 규모의 국내 육류 시장을 고단백 곤충식품이 1%만 대체하여도 약 1700억 원 규모의 곤충식품시장이 형성될 수 있을 것으로 기대
 - 갈색거저리 및 흰점박이꽃무지 유충이 새로운 식품원료로 인정됨에 따라 앞으로 곤충사육 농가의 소득 증대는 물론 곤충산업이 크게 성장할 것으로 전망

SUMMARY

I. Title

Evaluation of pharmacological action and toxicity of insect resources for development as food and medicinal material

II. Summary

In this study, we established optimal powder manufacturing process for *Protaetia brevitarsis* and *Tenebrio molitor* larva for using as a novel food. For this purpose, it should be feed with the oak sawdust sterilized by water vapor for 3–5 days, starved without water or food for 3 days, and then the larvae were sterilized before freeze-drying. The sterilized *P. brevitarsis* and *T. molitor* was lyophilized and grinded by a blender. A safety of the powder as a food was validated by evaluation of Raw 264.7 macrophage cytotoxicity using MTS assay. As above results, we propose that optimal powder manufacturing process established in this study can be used in industrial production of *P. brevitarsis* and *T. molitor* as a novel food.

To evaluate *P. brevitarsis* and *T. molitor* as food materials, we investigated their composition of nutritional and harmful components. Analysis of nutritional composition (moisture, crude protein, crude fat, crude ash, crude fiber and carbohydrates) showed that the content of crude protein, fat, carbohydrate were by 58%, 18%, 8% in *Protaetia brevitarsis* powder, and 53%, 31%, 9% in *T. molitor* powder, respectively. We also confirmed that all bacteria as well as all heavy metals analyzed in this study were not detected in lyophilized *T. molitor*. In *P. brevitarsis*, all bacteria were not detected, but small amount of Hg (0.1 ± 0.042 mg/kg) and Pb (0.70 ± 0.49 mg/kg) were detected. And, we also investigated whether their extract have anti-inflammatory, anti-obesity, or anti-diabetic effect on various cell lines and mice.

Alzheimer's disease (AD) is an progressive neurodegenerative disorder characterized by neuronal loss and extracellular senile plaques containing β -amyloid peptide ($A\beta$). $A\beta$ is proteolytically produced by β - and γ -secretase from a single transmembrane amyloid precursor protein (APP). The progressive accumulation of insoluble $A\beta$ peptide is considered to initiate a pathogenic cascade of AD. Considerable evidence has been suggesting that the reactive oxygen species (ROS) are involved in the apoptotic mechanism and inflammatory response of $A\beta$ -mediated neurotoxicity. The present study was designed to demonstrate the anti-AD effect of both *T. molitor* and *P. brevitarsis* larvae extracts and their major compounds through the regulation of *in vitro* BACE1, $A\beta$ -induced neurotoxicity and $A\beta$ -induced inflammatory response. The isolated major compounds showed novel neuroprotective properties not only *via* the selective and specific inhibition of BACE activity but also through the alleviation of $A\beta_{25-35}$ -induced

toxicity. Moreover, the results implied that extracts and their isolated compounds attenuated neuroinflammatory responses through the inactivation of NF- κ B by NF- κ B dependent inflammatory pathways and phosphorylation of MAPK in A β ₂₅₋₃₅-induced PC12 cells.

In vitro and *in vivo* hepatocellular carcinoma and hepatotoxic mouse models have been analyzed to examine anti-neoplastic and hepato-protective activities of *T. molitor* and *P. brevitarsis* larval extracts. The effects of *T. molitor* and *P. brevitarsis* larval extracts on cellular signaling of metabolism, growth, and death of hepatocellular carcinoma cells were analyzed by high-throughput screening and high resolution molecular imaging. *In vivo* hepatocellular carcinoma and hepatotoxic model systems were established and anticancer and hepato-protective activities of the extracts were examined. The extracts showed strong cytotoxicity against hepatocellular carcinoma cells *in vitro* through the mechanism of apoptosis and autophagy and the antitumor activity was confirmed in vivo mouse xenograft model. Toxic chemical induced hepatotoxic mouse model system was established, where the extract showed strong hepatoprotective activities.

To Evaluate pharmacological action and toxicity of insect resources for development as food and medicinal material, we assess the safety of the edible insects under the GLP condition followed by the registration of the edible insects as a food source. The safety and toxicity assessment for edible insects will contribute to secure the food source in the future. This research is significant to secure the initiating technology in the relevant filed. We carried out the establishment of validation method for *T. molitor* and *P. brevitarsis*, the general toxicity studies for *T. molitor* and *P. brevitarsis*, and the genotoxicity studies for *T. molitor* and *P. brevitarsis*. As a result, the validation method for the homogeneity, contents and stability analysis of *T. molitor* and *P. brevitarsis* was established. In the results of acute, 4 weeks and 13 weeks toxicity studies of *T. molitor* and *P. brevitarsis*, there were no toxicity findings in any studies. In the results of Ames, chromosomal aberration, micronucleus and comet assay, there were negative findings or no toxicity finding in any studies. The safety of *T. molitor* and *P. brevitarsis* was established and these insects will be available for the food sources.

Freeze-dry condition (time, temperature, vacuum level) and sterilization condition (time, temperature) setting in insect resource (*P. brevitarsis*, *T. molitor*) for standardization of production process. Also, setting self standard test (appearance, moisture, foreign substance, crude protein content etc.) with standardization of production process based on the Korea Food Standards Codex. Check self standard test and material change on the acceleration test with regard to insect resource. And expiration date set at by the Arrhenius equation. Also, finished producing a prototype of powder form with package design considering product characteristic and check self standard test and material change on the acceleration test with regard to prototype.

Based on the result above, freeze-dring *T. molitor* and *P. brevitarsis* registered as a temporary food on Ministry of Food and Drug Safety and reported their manufacturing on city hall.

CONTENTS

Application	1
Summary in Korean	2
Summary in English	6
Contents in English	9
Contents in Korean	11
Chapter 1. Introduction	13
1. Purpose of research	13
2. Necessity of research	13
3. Contents of research	15
Chapter 2. Present state of the technical development	16
1. Internal stage of the technical development	16
2. International stage of the technical development	16
3. Technical level of the research team	18
Chapter 3. Contents of research and results	19
1. Annual plan of research	19
1) The first year	19
2) The second year	20
3) The third year	21
2. Methods and results	22
1) Establishment of optimal condition for manufacturing of insects as food and functional analysis	22
a. Survey for insect breeding farm	22
b. Optimal condition for manufacturing of insects as food	22
c. Nutritional analysis	29
d. Harmful component analysis	33
e. Functional analysis of insect extract	35
f. Functional analysis of sub-fraction from insect extract	65
g. Data collection about recognition, permission, use of insects as food ..	68
h. Submission of the food registration request to MFDS	71
2) Determination of index substance, component analysis	73
a. <i>Tenebrio molitor</i>	73
b. <i>Protaetia brevitarsis</i>	84
c. The neuroprotective effect of index substance	92

3) Anticancer activity of larval extracts	100
a. Anticancer activity of <i>T. molitor</i> ethanol extracts	100
b. Anticancer activity of <i>T. molitor</i> extracts	100
c. Mechanism of cytotoxic activity of <i>T. molitor</i> extracts	102
d. Combination anticancer activity of the hexane extract	103
e. Anticancer activity of the hexane extract in vivo	104
f. Effect of <i>T. molitor</i> extracts on (ROS) metabolism	105
g. Pharmacological activity of <i>T. molitor</i> hexane extract	106
h. Hepato-protective activity of <i>P. brevitarsis</i> larva	109
i. Anticancer activity of <i>P. brevitarsis</i> extracts	111
j. Mechanism of cytotoxic activity of <i>P. brevitarsis</i> extracts	112
4) Toxicity assessment of edible insects for the food source registration	115
a. Analysis method establishment for <i>T. moiltor</i> and <i>P. brevitarsis</i>	115
b. General and Genotoxicity studies for <i>T. moiltor</i> and <i>P. brevitarsis</i> ..	116
5) Development of prototype and manufacturing process standardization of insect powder	133
a. Characterization and Freeze-dry condition setting in insect	133
b. Freeze-dry condition setting	138
c. Standardization of production process and self standard test setting ..	141
d. Expiration date set of the freeze-dried insect larvae	145
e. Manufacturing of prototype	162
f. Expiration date set of the prototype	163
g. Registered a temporary food and reporting items manufacturing	178
 Chapter 4. Contribution to related field	 179
 Chapter 5. Achievement and plan for practical use	 182
 Chapter 6. References	 186

목 차

제출문	1
요약문	2
SUMMARY	6
CONTENTS	9
목차	11
제 1 장 연구개발과제의 개요	13
제 1 절 연구개발의 목적	13
제 2 절 연구개발의 필요성	13
제 3 절 연구개발의 범위	15
제 2 장 국내외 기술개발 현황	16
제 1 절 국내 연구개발 현황	16
제 2 절 국외 연구개발 현황	16
제 3 절 본 연구팀의 국내·외 기술개발현황에서 차지하는 위치	18
제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과	19
제 1 절 연차별 세부(협동)과제별 연구개발의 목표 및 개요	19
1. 1차년도 세부/협동과제별 연구목표 및 연구내용	19
2. 2차년도 세부/협동과제별 연구목표 및 연구내용	20
3. 3차년도 세부/협동과제별 연구목표 및 연구내용	21
제 2 절 연구개발 수행방법 및 결과	22
1. 곤충자원의 식약용 소재화를 위한 최적조건 확립 및 기능검정	22
가. 대상곤충별 농가사육 현황 조사	22
나. 대상곤충별 최적화 조건 확립	22
다. 곤충 영양성분 분석	29
라. 곤충 유해물질 분석	33
마. 곤충 추출물을 이용한 다양한 효능 검정	35
바. 곤충 분획물을 이용한 다양한 효능 검정	65
사. 곤충의 식품으로서 국내·외 인정·허가 및 사용현황 등에 관한 자료 작성	68
아. 곤충분말의 식약처에 식품원료로 인정요청 자료 작성 및 제출	71
2. 곤충자원의 지표물질 도출 및 성분연구	73
가. 갈색거저리의 지표물질 도출 및 성분연구	73
나. 흰점박이꽃무지의 지표물질 도출 및 성분연구	84
다. 분리물질의 특성 구명	92
3. 곤충추출물의 간암모델에서의 약리활성 검증	100
가. 갈색거저리 에탄올 추출물의 항암활성	100

나.	갈색거저리 추가분획물의 항암활성	100
다.	갈색거저리 분획물의 세포독성기전 분석	102
라.	Hexane 추출물의 항암약물과의 병용요법	103
마.	발암동물모델 확립 및 hexane 추출물의 in vivo에서의 항암활성	104
바.	갈색거저리 추출물들의 물질대사(활성산소)에 대한 영향	105
사.	갈색거저리 hexane 추출물의 추가 분획물에 대한 약리활성 평가	106
아.	흰점박이꽃무지 추출물의 간보호 효과	109
자.	흰점박이꽃무지 추출물의 암세포증식 억제 효능	111
차.	흰점박이꽃무지 추출물의 약물기전 분석	112
4.	곤충자원의 식품등록을 위한 독성평가	115
가.	갈색거저리 및 흰점박이꽃무지 분석법 확립	115
나.	갈색거저리 및 흰점박이꽃무지 일반독성시험	116
5.	곤충분말의 제조공정 표준화 및 시제품 개발	133
가.	곤충에 대한 특성 파악 및 동결건조 조건 설정	133
나.	동결건조 조건설정	138
다.	제조공정의 표준화 및 자가규격 설정	141
라.	동결건조물 곤충유층의 유통기한 설정	145
마.	시제품 제조	162
바.	시제품의 유통기한 설정	163
사.	한시적 식품등록 및 품목제조 보고	178
제 4 장	목표달성도 및 관련분야에의 기여도	179
제 5 장	연구개발 성과 및 성과활용 계획	182
제 6 장	참고문헌	186

제 1 장 연구개발과제의 개요

제 1 절 연구개발의 목적

본 연구의 최종목표는 곤충산업의 활성화와 미래의 식량으로 활용하기 위해 곤충자원(갈색 거저리, 흰점박이꽃무지)을 새로운 식품원료로 식품의약품안전처에 등록하는 것이다. 이를 위해 식품으로 활용가능하도록 곤충 특유의 좋지 않은 맛과 냄새를 없앤 후 살균 처리한 다음 동결 건조해 원래 형태나 분말 형태로 사용하는 제조공정을 확립하고, 대표물질 선정 및 분석법 확립, 곤충 성분 및 유해물질 분석, 인체안전성 입증을 위한 GLP 독성평가, 시제품을 개발하는 것이다. 그 외에도 곤충의 활용성을 높이기 위해 항염증, 항당뇨, 항치매, 항비만 등 다양한 활성을 검증하는 것이 본 연구과제의 목표이다.

제 2 절 연구개발의 필요성

1. 연구개발의 사회적 필요성

- 2010년 곤충산업육성법 시행에 따라 곤충 수요 증가를 위한 다양한 형태의 곤충산업 절실히 요구
- 고령화, 참살이 등 생활패턴의 변화로 천연물 유래 고기능 소재에 대한 소비자의 관심이 고조됨에 따라 천연물 신약으로 개발 가능한 다양한 물질이 함유되어 있을 것으로 사료되는 곤충에 대한 수요가 증가할 것으로 전망
- 지구상 유일한 미개발 자원으로 잠재력이 무궁한 곤충을 약용으로 사용했다는 기록은 동서양을 통해 잘 알려져 온 사실로써, 인류는 곤충의 종류마다 다른 천연 화합물질의 독특한 특성을 경험적으로 이용해 왔음
 - 약용곤충 목록 : 동의보감(95종), 본초강목(106종), 중국약용동물지(143종) 등
 - 곤충은 기주식물 섭취 후 강한 태양광선, 다양한 미생물, 고온 다습한 기후 등 극한 외부 환경조건하에서 생존하기 위해 체내에 고기능성 2차 대사산물을 함유하고 있으므로 인간의 질병치료를 위한 천연물 신약이나 기능성 식품소재, 기능성 화장품소재 등 산업용 생물소재로서의 유용성이 매우 높음
 - 특히 동양의 경우 한약재 시장에서 절대적 우위를 차지하고 있으며, 우리나라는 곤충 중 약 100여종을 한약재로 사용하고 있음
- 그러나, 현재 곤충산업육성과 농가 소득 증대를 위해 곤충을 식용 및 약용으로 판매가 필요하나 식품위생법상 식품 원료로 인정되지 않고 “혐오식품”으로 분류되어 판매 및 유통이 금지되어 있음
- 굼벵이(딱정벌레목 유충)의 경우 현재 민간요법으로 신장·간장질환, 중풍, 당뇨병, 암 등

의 치료제로 사용되고 있음

- 메뚜기와 누에를 제외한 곤충은 식품위생법에 의한 식품공전상 식품원료로 인정되지 않아 식·약용으로 판매·유통이 불가하므로 과학적이고 체계적인 성분분석 및 약리효과 구명이 필요함
- 특히, 식품원료로 인정받기 위해서는 GLP(Good Laboratory Practice) 기관을 통해 안정성 및 건전성이 입증될 수 있는 급성 경구독성을 비롯한 체계적인 독성 실험을 수행하여 인체에 독성이 없음을 입증할 필요성이 있음
- 곤충을 식약용으로 인정받기 위해 우선적으로 현재 민간요법으로 이용되고 있으며 대다수의 사육농가가 조성된 곤충자원(장수풍뎅이, 흰점박이꽃무지, 갈색거저리)의 식·약용 소재화를 위한 약리성 검정 및 독성 평가를 통해 식품원료로 등재가 시급히 요구됨

2. 연구개발의 기술적 필요성

- 곤충을 약용으로 사용했다는 기록은 동서양을 통해 잘 알려져 온 사실로써, 인류는 곤충의 종류마다 다른 천연 화합물질의 독특한 특성을 경험적으로 이용해 왔음
 - 약용곤충 목록 : 동의보감(95종), 본초강목(106종), 중국약용동물지(143종) 등
 - ※ 약용곤충의 약리작용 : 매미껍질(바람기 해소), 벌꿀(윤하작용), 벌나방(해열작용), 귀뚜라미(이뇨작용), 벌독(거풍습작용), 구향충(기 소통 원할), 등뎅이(발혈과 여혈 해제), 등중하초(보익작용), 오배자(호르몬 조정작용), 각지벌레(근육피로 해소), 가뢰(해독작용), 메뚜기(심신 안정), 매미껍질(진통 및 안신작용), 잠사(지혈작용), 반딧불(눈을 맑게), 양충(소염 및 진해작) 등
- 곤충 자원은 지상 최대의 미개발 자원으로서 국내외 곤충자원을 조기에 개발하여 신약후보물질을 개발함으로써 국내 곤충시장확대 및 세계 시장 선점 가능
- 2010년 곤충산업육성법 시행 후속으로 곤충 유래 고부가 바이오 신소재 개발을 통해 곤충산업을 활성화시키고 신소득 작목으로 육성할 필요성이 있음
 - 곤충자원을 이용한 신소득 관련 사업은 많이 시도되었으나 이의 연구 및 기능성 활용에 대한 연구는 부족한 실정임
 - 곤충 소재 추출물은 다량의 기능성 성분이 함유되어 있으나 대부분 경험적 효능으로 사용되고 과학적이고 체계적인 연구 및 이를 활용한 기능성 성분에 대한 연구는 미진한 실정임
 - 곤충 소재를 이용한 기술개발에 대해 관심은 높으나 실제 이용은 애완용, 학습용, 사료용 등으로 한정되어져 있음

3. 연구개발의 경제적 필요성

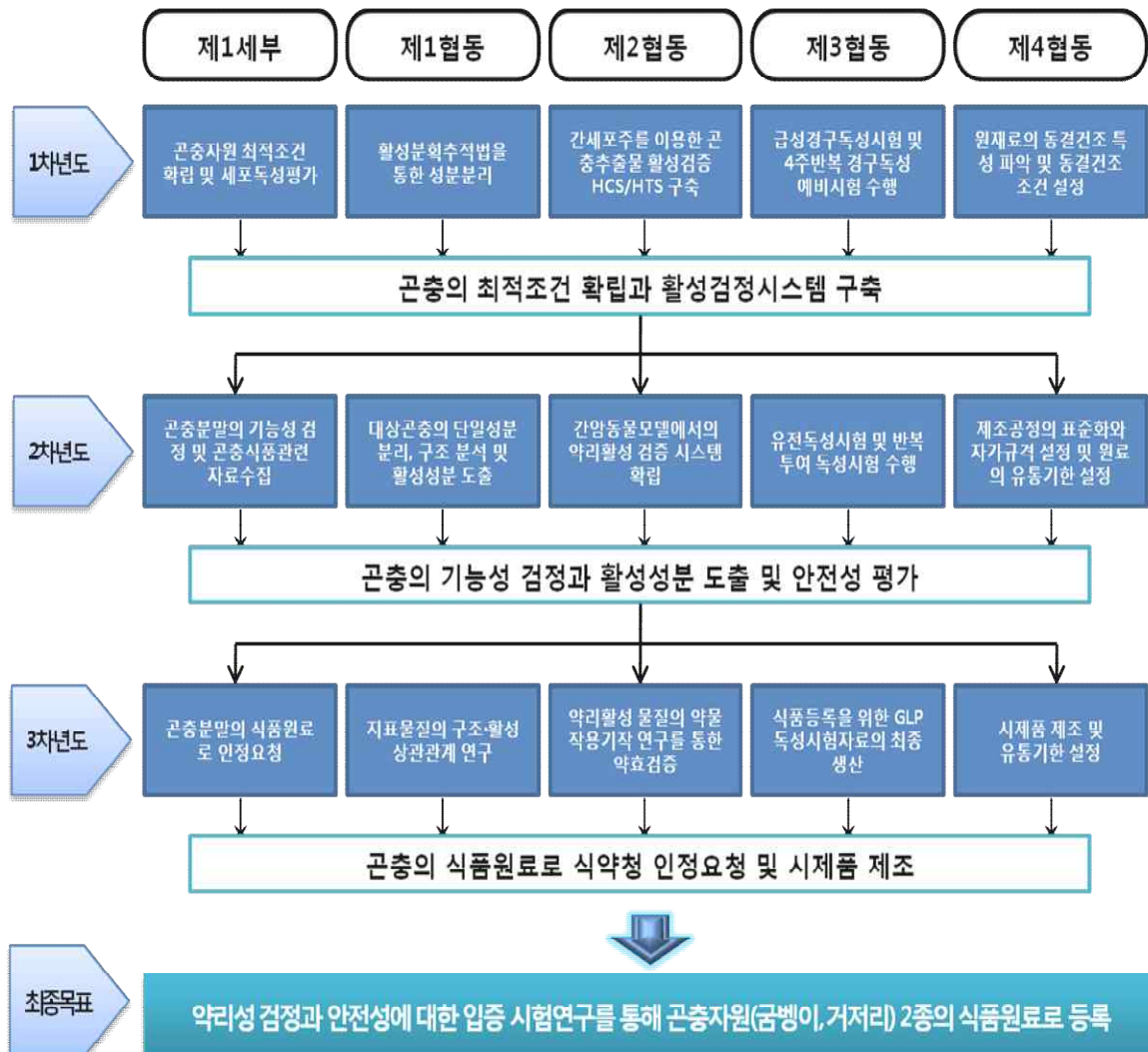
- 곤충은 21세기 녹색 신성장 산업으로서 중요한 위치를 차지하고 있으며, 국내외 곤충자원을 이용한 신약후보 물질 개발을 통해 국내 곤충시장을 확대해야 함
- 다양한 질병이나 환경오염으로 인한 식량부족시 현존 생물 중 가장 많은 종을 차지하고 있는 곤충을 미래식량으로 활용할 경우 경제적인 가치가 매우 높음
- 다양한 국내 및 외래 곤충의 가치를 재평가하고 잠재된 곤충의 식·약용으로의 가치를 발

굴할 경우 고부가가치 창출 가능

- 제약시장 개방이라는 시장 환경 변화를 맞아 우리나라 제약기업들이 자생력을 갖추기 위해서는 국제경쟁력의 확보가 최우선 과제이므로 현존 생물 중 가장 많은 종을 차지하고 있는 곤충은 천연물 신약개발의 밑거름이 되기에 충분함.
- 국내 천연물 의약품 시장은 약 3500억원 규모로 70 여개 제약회사에서 100여 품목을 생산하고 있으며, 이 중 세계 식물 및 식물 추출약물 시장은 '08년도에 195억불에 달하였으므로 미개척 분야인 곤충 천연물 의약품 개발 분야의 미래가치는 무한할 것으로 기대됨

제 3 절 연구개발의 범위

- 현재 민간요법으로 이용되고 있는 흰점박이꽃무지, 갈색거저리의 곤충사육 농가가 식약용 소재로 인정받기 위해 약리성 검정과 독성평가 등 안정성에 대한 입증 시험연구를 통해 식품원료로 등록하고자 수행한 연구의 범위 및 추진체계는 다음과 같다.



제 2 장 국내외 기술개발 현황

제 1 절 국내 연구개발 현황

- 곤충으로부터 고지혈증, 당뇨, 비만, 항암, 간질환, 간염증에 효능이 있는 활성 물질 탐색 및 구조 결정, 신약후보물질 개발 등의 연구가 추진되었으나 분석단계에 제한되어 실용화 성과는 거의 전무함
 - 100여종의 곤충으로부터 고지혈증, 당뇨, 비만, 항암, 간질환, 간염증에 효능이 있는 활성 물질 탐색 및 구조 결정, 신약후보물질로 연구추진(2000, 박등)
 - 곤충 추출물로부터 생리활성물질(2차대사산물)의 초고속 활성검정(2006, 이등)
- 흰점박이꽃무지 추출물의 간에 미치는 영향 분석(2000, 강등)
- 장수풍뎅이 유충으로부터 지표성분 분리를 하였으나 단편적인 지표성분 분석연구로 한정되었음(2000, 이등)
- 흰점박이꽃무지 추출물의 간독성 회복효과에 대한 연구가 시도되었으나 지표성분 분리나 독성평가 내용이 전무함(2012, 전등)
- 메뚜기와 누에를 제외한 곤충은 식용으로 허가된 것이 전무하며 몇몇 곤충의 대량증식기술은 확립되었으나, 곤충의 기능성 및 독성검정에 대한 연구가 미흡한 실정임
- 최근에 유전자원으로서의 곤충자원에 대한 중요성을 인식하고 ‘유용생물자원산업’, ‘과학기술 2000 계획’, ‘국가기술 분류체계 및 과기처 지원’, ‘곤충자원 이용기술 연구회’등을 통해 국가정책 차원에서 관련 사업을 지원 또는 수행 중에 있음
- 곤충의 식·약용 소재화 연구는 2012년 농촌진흥청 국책과제로 “장수풍뎅이 식품등록을 위한 원료특성 분석 및 인체 위해성 평가” 과제가 수행되고 있으나 대상곤충을 장수풍뎅이로 제한하여 수행되고 있음

제 2 절 국외 연구개발 현황

- 유엔 식량농업기구(FAO)가 기아 퇴치, 영양 보충, 환경오염 저감을 위한 신무기로 식용 곤충을 지목했으며, 인류, 가축, 애완동물의 식량으로 식용 곤충을 적극 권장하였음(13. 5.)
 - FAO 보고서에서 전 세계 20억 명이 이미 단백질과 미네랄이 풍부한 곤충을 먹고 있으며 곤충 식이가 환경적으로 도움이 된다고 보고하였음
- 낙농강국인 네덜란드가 미래 식량문제의 대안이자 친환경적 먹거리로 식용곤충에 주목하여, 네덜란드 농업자연식품품질부는 유럽 최고 농업분야 연구개발(R&D)·교육 기관인 네덜란드 와게닝겐대학에 식품체인의 곤충활용과 지속 가능한 생산의 혁신연구를 위해 2010년부터 2013년까지 4년간 약 100만 유로 지원
 - 와게닝겐대학의 Arnold van Huis, Marcel Dicke 등의 곤충학 교수는 곤충을 미래 식량 대안으로 적극 제안

- NWO-스피노자상 수상자인 Dicke 교수는 “2020년경에는 슈퍼마켓에서 벌레를 사게 될 것”이라고 전망하고 “유럽인들은 의식하지 못한 채 연평균 약 500g의 곤충을 섭취하고 있다”고 보고
- 네덜란드 곤충사육업체협회는 노드-브라반트주에서 3만5000유로의 경제강화지원금을 받고 식품공급업체, 사료업체 HAS 대학과 공동으로 투자금을 조성해 총 7만 유로를 투자해 곤충식품 개발을 위한 연구소 건립 추진 중임
- 네덜란드 내 대형 식품 공급업체인 Sligro Food Group는 2008년 이후 네덜란드 최초로 식품으로서의 곤충을 도매유통하고 있으며, 메뚜기, 밀웬, 외미거저리(Lesser mealworm) 등을 판매하고 있음
- 네덜란드 와게닝겐 대학교(Wageningen University)에서 곤충 생육이 지속가능성 있는 단백질 생산에 기여 여부 조사 결과, 곤충고기 1 kg은 소고기와 돼지고기 1 kg보다 훨씬 적은 양의 온실가스를 생산하므로 곤충고기는 전형적인 고기 형태에 대한 하나의 대안이 될 수 있다고 보고함(‘10. 12)
- 곤충 제품 1kg당 생성된 온실가스-메탄가스(CH₄)와 아산화질소(N₂O)-량을 정량한 결과 돼지 한 마리는 거저리와 비교했을 때, kg당 수십 배 내지 수백 배의 온실가스를 더 생산하였음
- 지표수의 산성화와 부영양화를 초래하는 암모니아 배출량도 곤충이 훨씬 적다는 것을 확인함
 - * 돼지 한 마리는 집귀뚜라미에 비해 1 kg 성장당 여덟 배 내지 열두 배 더 많은 양의 암모니아를, 메뚜기에 비해서는 50배 가량 더 많은 암모니아 생산
- 또한, 와게닝겐대학에서는 곤충이 포유동물에 비해 섭취한 음식물을 고기로 더 빨리 전환시키므로 전통적인 가축 고기의 단백질에 대한 친환경적인 대체물이 가능할 것임을 보고함(‘10. 12)
- 일본은 바이오농약, 곤충이용 의약품생산, 곤충이용 환경정화, 곤충이용 농업 등 곤충산업 시장규모를 연간 2조원 이상으로 추측하고 있으며 “곤충기능 이용기술 개발연구”를 1993년도부터 국가생명공학 관련 연구 최우선과제의 하나로 중점 수행하고 있을 뿐만 아니라, 일본 농림수산성에서도 곤충 식·약용 소재화를 위하여 관련 법률을 정비하고 신규 분야 개척에 4년간 20억엔을 투자하였음
 - 일본은 「관리법(애완곤충)」, 「식품위생법(식용곤충)」 등 관련법을 정비하여 곤충산업 활성화에 힘쓰고 있음
- 곤충유래 신물질은 부가가치가 매우 높은 바이오신소재로 식·약용 등 활용범위가 넓고 관련 산업에 미치는 영향이 지대하여 미래 성장동력원으로 개발 가치가 매우 높다고 판단함
 - 미국, 일본 등 선진국은 곤충 생물을 통한 신소재 개발을 미개척 자원의 보고(寶庫)로 인식, 이들을 발굴하고 고부가 소재로 활용하려는 노력이 경쟁적으로 추진되고 있음
 - 20년 후의 10대 미래기술에 곤충이용 신약개발 포함(’05 세계미래학회)
 - 100여종의 곤충으로부터 175개의 신물질 연구 수행(프랑스 등)
- 중국은 약용곤충의 사육, 증식기술 및 약용자원의 탐색 등 다방면의 연구 추진
 - 박쥐나방, 오배자, 진딧물, 구향충(九香蟲), 풍뎅이, 가리, 귀뚜라미, 땅강아지, 동충하초

등에 대한 중점 연구 추진

- 곤충 유래 항암 활성물질 개발 : 바퀴벌레 추출물, 똥풍뎅이 추출물 등
- 혈관 내 손상된 내막 및 혈액흐름 개선하는 곤충 의약품 '통심락'을 개발('99)하여 한국 (일양약품)에서 출시('06)
- 중국의 약학서인 본초강목에는 106종의 약용곤충이 수록되어 있으며, 그 후 중국에서 편찬된 중화인민공화국약전, 중약지에 약용곤충들이 소개되었고 중국약용동물지에 143종의 약용곤충이 수록되었는데 그 중 40여 종이 주로 많이 이용되는 것으로 보고됨

제 3 절 본 연구팀의 국내·외 기술개발현황에서 차지하는 위치

- 최근 국내 및 국외에서 미래의 식량부족에 대한 위기감과 환경문제 등에 직면하여 새로운 먹거리로서 곤충에 대한 관심 급증함에도 불구하고 본 연구전까지 식품으로 등록된 곤충은 예전부터 먹어왔기 때문에 식품공전에 등록된 메뚜기 및 누에 중 번데기와 백강잠 외에는 전무하였음
- 본 연구를 통해 예전부터 먹어왔기 때문이 아니라 과학적 성분분석 및 안전성평가 등을 통해 2014년 7월 국내 최초로 갈색거저리를 새로운 식품원료로 식품의약품안전처에 등록하였을 뿐만 아니라 후속으로 흰점박이꽃무지의 식품등록을 준비중에 있음
- 또한 본 과제의 참여기업인 월드웨이(주)는 갈색거저리 제품의 품목제조 허가를 받은 후 제품을 출시하였음
- 이러한 결과는 2010년 시행된 곤충산업육성법과 함께 곤충산업 분야에 획기적 전기 마련을 통해 곤충농가 및 관련 산업체에 고소득 창출할 것으로 기대됨
- 또한 이러한 결과는 다양한 형태의 곤충식품 제조 및 건강기능식품 개발을 위한 초석이 될 것이라 사료됨

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 1 절 연차별 세부(협동)과제별 연구개발의 목표 및 개요

1. 1차년도 세부/협동과제별 연구목표 및 연구내용

세부과제명	연구목표	연구개발 수행내용
곤충자원의 식약용 소재화를 위한 최적조건 확립 및 기능검정(제1세부)	○ 곤충자원 최적조건 확립	<ul style="list-style-type: none"> - 대상곤충별 최적조건 확립 : 먹이원별, 발육시기별, 분말전처리 등 - 다양한 먹이원과 시기에 따른 곤충별 독성 검정 : 세포기반 high-throughput screening(HTS)
곤충자원의 지표물질 도출 및 성분연구(제1협동)	○ 활성분획추적법을 통한 성분분리	<ul style="list-style-type: none"> - 굼벵이 및 거저리 (>20 kg) 추출 및 분획 · 건조시료의 80% ethanol로 추출 후 농축 · Hexane, chloroform, EtOAc, n-BuOH로 분획 후 감압농축 · 각 분획을 활성평가를 위해 타세부과제에 제공 - 분획물의 기능성 검정 - 단일성분 추적 및 분리 · 활성이 있는 분획을 open column chromatography를 시행하여 sub-fraction 분획화 - 곤충 단위무게당 대표성분 함량 분석
곤충추출물의 간암모델에서의 약리활성 검증(제2협동)	○ 간세포주를 이용한 곤충추출물 활성검증 HCS/HTS 구축	<ul style="list-style-type: none"> - 곤충추출물의 약효 평가를 위한 간유래 세포주를 이용한 HCS 확립 · 형광표지자와 대용량 형광이미지분석을 통한, ROS 발생을 촉진하거나 억제하는 활성의 세포수준에서의 측정 - 세포의 물질대사, 성장, 세포죽음에 대한 추출물 영향평가를 위한 HTS 확립 · 미토콘드리아 활성 측정을 통한 물질대사교란, 세포분열, 세포사멸 능력의 세포수준에서의 대용량 검색
곤충자원의 식품등록을 위한 독성평가(제3협동)	○ 급성경구독성시험 및 4주반복 경구독성 예비시험 수행	<ul style="list-style-type: none"> - 급성경구독성 예비 및 본 시험 · 식·약용 곤충분말을 시험동물 랫드에 1회 경구 투여하였을 때 나타나는 독성을 non-GLP로 실시하여 급성독성시험을 위한 용량 설정 · 곤충분말 2종을 SD 계통 암수 랫드 경구투여 · 사망률, 일반증상, 체중측정, 부검조건 관찰을 GLP로 실시 · approximate lethal dose (ALD) 산출 및 4주 반복 투여 예비시험 용량 설정 - 4주반복 경구투여독성 예비시험 · 곤충분말 2종을 SD 계통 암수 랫드에 1일 1회 4주간 반복 경구투여 · 동물의 사망과 일반증상관찰, 체중측정, 사료섭취량 측정, 혈액학적검사, 혈액생화학적검사, 부검조건 관찰, 장기중량측정을 non-GLP로 실시 · 13주 본시험을 위한 용량을 설정 - 유전독성 예비시험
곤충분말의 제조공정 표준화 및 시제품 개발(제4협동)	○ 원재료의 동결건조 특성 파악 및 동결건조 조건 설정	<ul style="list-style-type: none"> - 원재료 각각에 대한 동결건조 특성파악 - 각각의 원재료에 대한 표준 동결건조 조건 확립 - 동결건조 분말의 입도 및 수분함량 조건 설정

2. 2차년도 세부/협동과제별 연구목표 및 연구내용

세부과제명	연구목표	연구개발 수행내용
<p>곤충자원의 식약용 소재화를 위한 최적조건 확립 및 기능검정(제1세부)</p>	<p>○ 곤충분말의 기능성 검정 및 곤충식품관련 자료수집</p>	<ul style="list-style-type: none"> - 영양성분 분석 - HTS 시스템을 이용한 곤충추출물의 다양한 기능성 분석 <ul style="list-style-type: none"> · 항염증 : 대식세포에 곤충추출물 처리 후 염증관련 cytokine 항체를 이용하여 Elisa 및 Western blot 분석 · 항비만 : 지방세포주를 대상으로 곤충추출물 처리 후 Leptin 등 비만관련 유전자의 전사체 및 단백질 발현분석 · 항당뇨 : 췌장세포주에 당뇨유도물질 처리한 다음 곤충추출물 부가 후 인슐린 생성량 조사 - 곤충의 식품으로서 국내·외 인정·허가 및 사용현황 등에 관한 자료수집
<p>곤충자원의 지표물질 도출 및 성분연구(제1협동)</p>	<p>○ 대상곤충의 단일성분 분리, 구조분석 및 활성성분 도출과 정량분석</p>	<ul style="list-style-type: none"> - 활성추적분획법을 통한 활성성분 분리 <ul style="list-style-type: none"> · 활성 평가 후 효과를 나타낸 분획을 silica gel open column chromatography로 세분화 · 활성평가와 sub-fraction 세분화 반복을 통해 순수 물질을 분리함 (silica gel, sephadex LH-20, preparative HPLC 등 이용) - 분리한 순수물질의 화학적 구조 규명 <ul style="list-style-type: none"> · Thin layer chromatography, HPLC를 이용하여 순수 분리 물질의 순도확인 · ¹H, ¹³C, COSY, DEPT, HMBC, NOESY 등 NMR, IR, UV, MS/MS 등을 이용하여 분리 물질의 화학적 분자 구조 분석 - 활성 지표물질의 도출 <ul style="list-style-type: none"> · 활성평가 관련 타 세부과제에 단일성분을 제공하여 활성물질 도출 및 정량분석
<p>곤충추출물의 간암모델에서의 약리활성 검증(제2협동)</p>	<p>○ 간암동물모델에서의 약리활성 검증 시스템 확립</p>	<ul style="list-style-type: none"> - 동물질병모델을 이용한 곤충 추출물의 약리활성검증 시스템 확립 및 전임상 실험 <ul style="list-style-type: none"> · 간암세포의 피하주사 및 간에 직접 주사를 통한 발암동물모델 확립 · 다양한 암세포에서 간암전이 및 간암세포의 전이동물모델 확립 · 곤충추출물의 간암동물모델에 대한 항암, 항산화 활성 측정
<p>곤충자원의 식품등록을 위한 독성평가(제3협동)</p>	<p>○ 유전독성시험 및 반복투여 독성시험 수행</p>	<ul style="list-style-type: none"> - 유전독성 분시험 <ul style="list-style-type: none"> · 복귀돌연변이시험 : 곤충분말 2종을 각각 대사활성계 적용 및 미적용시 살모넬라 균주와 Frame-shift형 균주에 대한 복귀돌연변이 유발성 여부 검증 · 염색체이상 시험 : 곤충분말 2종의 Chinese Hamster Lung (CHL)에 대한 염색체이상 유발성 여부 검증 · 소핵시험 : 시험물질의 ICR 마우스 골수세포에 대한 소핵 유발성 여부 조사 - 13주반복투여독성시험
<p>곤충분말의 제조공정 표준화 및 시제품 개발(제4협동)</p>	<p>○ 제조공정의 표준화와 자가규격 설정 및 원료의 유통기한 설정</p>	<ul style="list-style-type: none"> - 표준 동결건조 조건에 따라 제조공정의 표준화 확립 및 pilot 생산 - 표준화된 제조공정 원료로 반복실험을 통해 성상, 이물, 수분, 조 단백질 함량, 대장균 군 등 자가 규격을 설정 - 포장재질별 가속실험을 실시하여 자가 규격항목 및 지표물질의 변화를 관찰하고 유통기한을 설정

3. 3차년도 세부/협동과제별 연구목표 및 연구내용

세부과제명	연구목표	연구개발 수행내용
곤충자원의 식약용 소재화를 위한 최적조건 확립 및 기능검정(제1세부)	○ 곤충분말의 식품 원료로 인정요청	<ul style="list-style-type: none"> - HTS 시스템을 이용한 곤충추출물의 다양한 기능성 분석 : 항염증, 항산화, 항비만, 항당뇨 등 - 곤충의 식품으로서 국내·외 인정·허가 및 사용현황 등에 관한 자료수집 - 곤충분말의 식약정에 식품원료로 인정요청 자료 작성 및 제출
곤충자원의 지표물질 도출 및 성분연구(제1협동)	○ 지표물질의 구조·활성 상관관계 연구	<ul style="list-style-type: none"> - 활성 지표성분 추가적인 제공, 활성과 구조와의 상관관계 정립 (structure activity relationship) · 기전연구 및 동물실험을 위해 필요한 활성 성분을 추가 제공하기 위해 단일 물질의 재분리 · 곤충의 성분분석을 통하여 다양한 활성물질을 분리하여 구조·활성 상관관계 구명
곤충추출물의 간암모델에서의 약리활성 검증(제2협동)	○ 약리활성 물질의 약물작용기작 연구를 통한 약효 검증	<ul style="list-style-type: none"> - 다양한 세포주에서의 약물 활성 기작 연구 및 이를 통한 약효의 검증 · 세포 성장, 물질대사, 죽음유도 등과 관련된 세포내 신호전달 기작에 대한 곤충 추출물의 영향 평가 · 주요 세포소기관에 대한 약리성분 영향평가
곤충자원의 식품 등록을 위한 독성 평가(제3협동)	○ 식품등록을 위한 GLP 독성시험자료의 최종생산	<ul style="list-style-type: none"> - 13주반복투여독성시험 (계속) · 곤충분말 2종을 SD 계통 암수 랫드 1일 1회 13주간 반복 경구투여 · 동물의 사망과 일반증상관찰, 체중측정, 사료섭취량 측정, 안검사, 노검사, 혈액학적검사, 혈액생화학적 검사, 부검소견 관찰, 장기중량측정, 조직병리학적 검사를 GLP로 실시 · 표적장기선정, 무해용량(NOAEL) 및 safety factor 고려하여 TDI 설정 - Data 처리 및 독성학적 평가 - GLP 독성 최종보고서 작성
곤충분말의 제조공정 표준화 및 시제품 개발(제4협동)	○ 시제품 제조 및 유통기한 설정	<ul style="list-style-type: none"> - 개발 원료를 활용한 다양한 제형의 시제품 제조 (powder, granule, tablet 등) - 시제품으로 가속실험을 실시하여 자가규격항목 및 지표물질의 변화를 관찰하고 유통기한을 설정

제 2 절 연구개발 수행방법 및 결과

1. 곤충자원의 식약용 소재화를 위한 최적조건 확립 및 기능검정(제1세부)

가. 대상곤충별 농가사육 현황 조사

: 농가 11개, 재래시장 2개 방문 및 현황 조사

(1) 흰점박이꽃무지(*Protaetia brevitarsis*, white-spotted flower chafer)

- 먹이 종류 : 참나무톱밥(미생물발효), 목초(돈분), 벧짚(자연발효)
 - 목초 : 제주에서만 사용하였고, 돈분을 이용해서 발효를 시키므로 건조한 꽃무지 분말에서 돈분 냄새가 남
 - 벧짚 : 소수의 농가만 이용, 벧짚 자연 발효 3~4년 소요, 사료 및 유충가격이 고가
 - 참나무 톱밥 : 대다수의 농가에서 이용, 사료가격이 저렴
- 약용 : 3령 유충
- 판매금액 : 약 20만원 / kg

(2) 갈색거저리(*Tenebrio molitor*, mealworm)

- 먹이 종류 : 밀기울(+엿기름, 야채류, 땅콩껍질 등 추가)
 - * 전국 갈색거저리 사육 농가별 사용 먹이가 유사하므로 국내 최대 사육농가의 갈색거저리를 실험곤충으로 사용
- 현재 애완동물 사료용으로 전국적으로 판매 중
 - * 건조 갈색거저리 뿐만 아니라 2011년도에 갈색거저리 생체도 수입허가가 나서 국내에 시판중인 갈색거저리는 대부분 중국산임.
- 사료용 : 종령 유충

나. 대상곤충별 최적화 조건 확립

(1) 흰점박이꽃무지의 최적화 조건 확립 (특허출원 및 등록, 2012/2014)

(가) 사료별(참나무톱밥, 목초, 벧짚) 특성 조사

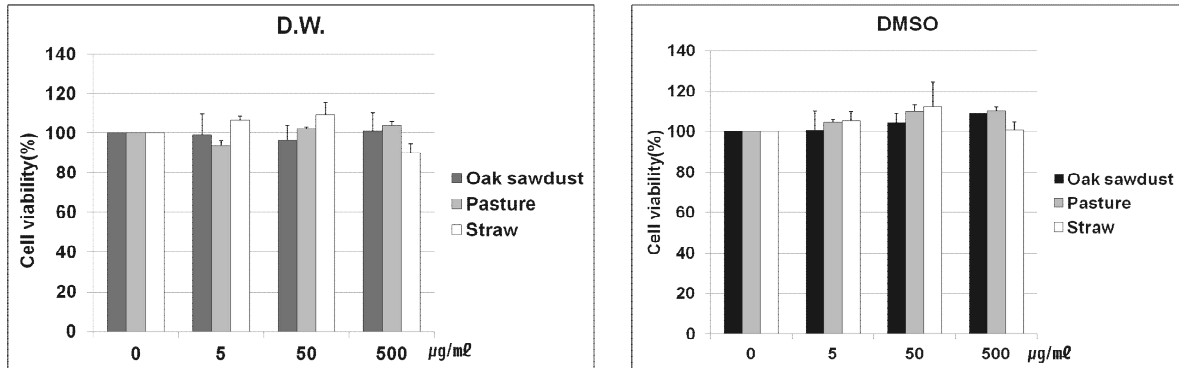
① 사료별 일반적인 특성 조사

	참나무톱밥	목초	벧짚
가격(kg당)	1,300원	13,000원	2,000원
발효방법	미생물 배합	돈분	자연발효
발효소요시간	3개월	발효없이 돈분과 혼합하여 바로 사육	3~4년
사용 농가	대다수	소수 (제주지역만)	소수 (전국 5농가 미만)
꽃무지 판매가격(kg당)	15~20만원	15~20만원	30만원

② 사료별 흰점박이꽃무지의 세포독성 검정

- 곤충분말을 멸균수 혹은 DMSO에 녹인 후 sonication하여 시료 준비
- 대식세포주인 Raw 264.7 cell과 96-well plate를 이용하여 MTS 방법으로 microplate reader기를 이용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하여 단시간에 많은 시료 독성 평가

- 세포기반 high-throughput screening(HTS)에 의한 사료별 독성평가
- 벚짚을 먹인 꽃무지 분말의 D.W.에 녹인 현탁액에서 경미한 독성검출



<먹이별 흰점박이꽃무지 유충의 세포독성 평가>

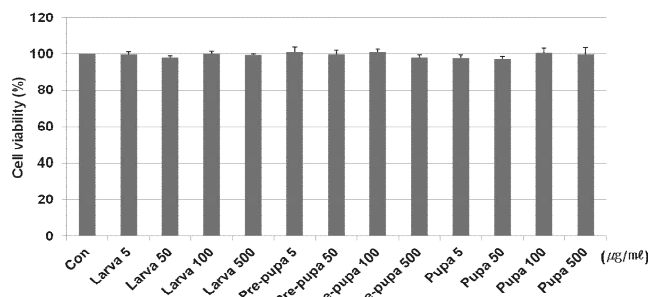
농가실태조사 결과 흰점박이꽃무지 사육을 위한 사료는 크게 참나무톱밥, 목초 및 벚짚 3가지가 주로 사용되었으며, 모든 사료는 발효시킨 후 먹이로 사용되고 있었으며, 원재료의 가격은 참나무톱밥이 가장 저렴하였음. 참나무톱밥의 경우 미생물과 배합하여 발효시켰고, 목초는 돈분으로, 그리고 벚짚은 자연발효를 시켰다. 흰점박이꽃무지 유충을 식품으로 사용하기 위해서는 사료를 먹은 후 유충에서 독성이 없어야 하므로 대식세포주인 Raw 264.7 cell을 대상으로 MTS법으로 세포생존률 확인을 통해 사료의 세포독성을 확인한 결과, 벚짚을 먹인 유충 분말을 멸균수에 녹인 현탁액에서 경미한 독성이 검출되었고, 참나무톱밥과 목초를 먹인 흰점박이꽃무지 분말은 세포독성이 없었으므로 가장 저렴하고 널리 사용되고 있는 발효 참나무 톱밥으로 사육한 흰점박이꽃무지가 식품화하기에 적합한 것으로 판단되었음

(나) 발육시기별 특성 조사

① 발육시기별 일반적 특성 조사

	3령 유충	용화직전 유충	번데기
약용	○	×	×
가격(kg당)	20만원	30만원	30만원

② 발육시기별 흰점박이꽃무지의 세포독성 검정



<발육시기별 흰점박이꽃무지 분말의 세포독성 검정>

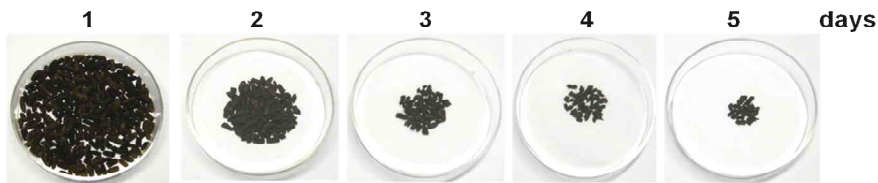
발육시기별 흰점박이꽃무지의 세포독성을 확인한 결과 최대성장단계인 3령유충, 용화직전 유충 및 번데기의 모든 처리구에서 세포독성이 없음을 확인할 수 있었다. 따라서 실험에 사용한 모든 시기의 흰점박이꽃무지가 식품으로 사용하기에 문제는 없을 것으로 판단되나 용화직전 혹은 번데기 상태의 흰점박이꽃무지는 채취하기도 힘들 뿐만 아니라 판매가격도 유충에 비해 약 1.5배 정도 고가이므로 세포독성이 없고 고서에 약용으로 보고되고 있으며 가격이 저렴하고 구하기 용이한 3령 유충이 식용으로 적합한것으로 결정하였음

(다) 약취 감소 조건 확립

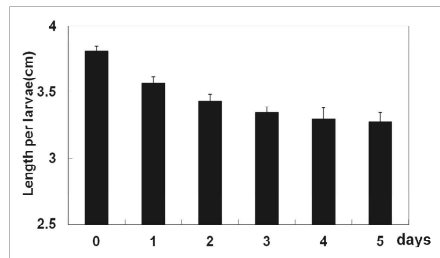
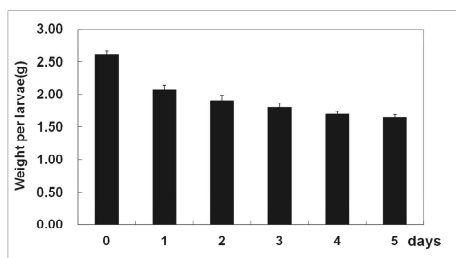
- ① 사료로 사용한 참나무톱밥 및 흰점박이꽃무지 분말 살균조건 설정
 - 참나무톱밥 고온살균 조건(증기로 찌는 방식)

Sample No.	찌는 시간(분)	미생물 (cfu/g)
1	×	7.5×10^4
2	5	-
3	10	-
4	20	-
5	30	-

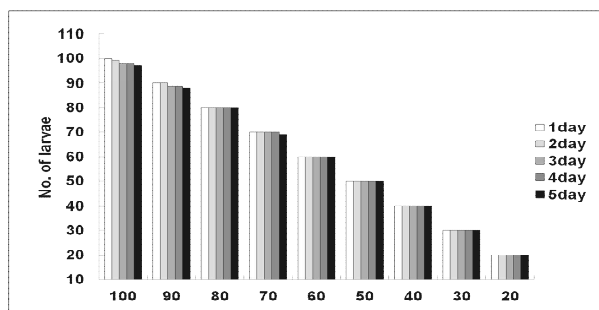
- ② 흰점박이꽃무지 굵긴 후 날짜별 배변량 확인



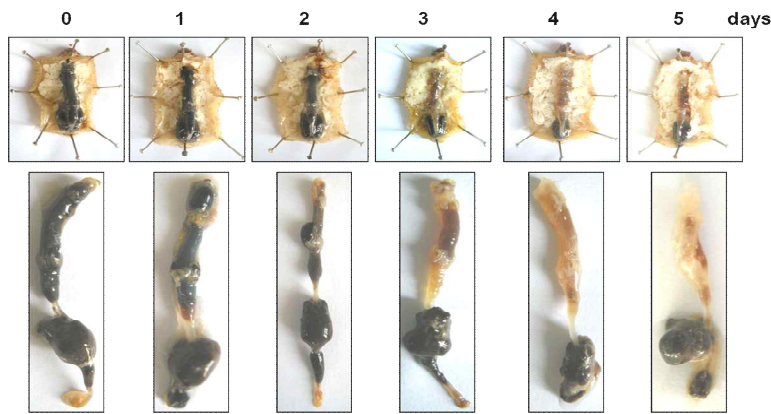
- ③ 흰점박이꽃무지 굵긴 후 날짜별 체중 및 길이



- ④ 흰점박이꽃무지 굵길 때 동일면적(12×13×5 cm³) 내 밀도별 생존 두수

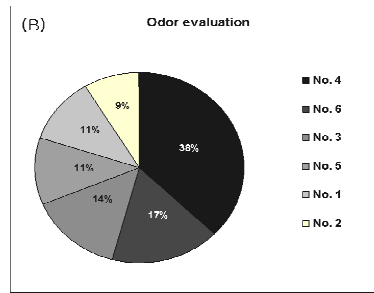
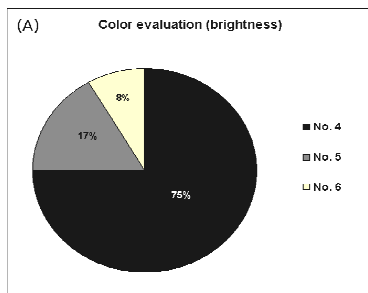


⑤ 흰점박이꽃무지 굶긴 후 날짜별 장 이미지 관찰

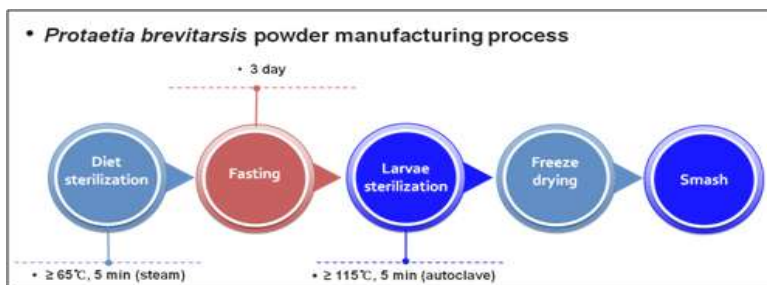


⑥ 참나무톱밥 멸균 여부 및 굶긴 일수에 따른 냉동건조분말 색 및 냄새 관능평가(n=20)

Sample No.	High temperature and high pressure sterilization	Fasting day	Food sterilization
1	×	0	○
2	115℃, 0.9 kgf/cm ² , 5min	1	○
3	115℃, 0.9 kgf/cm ² , 5min	2	○
4	115℃, 0.9 kgf/cm ² , 5min	3	○
5	115℃, 0.9 kgf/cm ² , 5min	4	○
6	115℃, 0.9 kgf/cm ² , 5min	5	○



⑦ 식품화를 위한 흰점박이꽃무지 분말 제조를 위한 최적조건 확립



대부분의 곤충의 경우 기존에 식품으로 섭취하지 않았기 때문에 영양적인 면이나 기능적인 면에서 대체식품으로 가치가 높게 평가되더라도 그 외형으로 인해 소비자에게 혐오감을 줄 수 있으므로 본 연구에서는 고유의 성분은 함유하고 혐오감을 줄이기 위해 흰점박이꽃무지

유충을 동결건조하여 분쇄기로 갈아서 분말을 제조하였다. 그런데 제조한 분말에서 악취가 났으며, 이러한 악취는 장 내 물질로 인해 발생한 것으로 추정하여 장내 물질의 배변을 실시하였음. 한편, 배변에 앞서 흰점박이꽃무지의 먹이로 사용하고 있는 참나무톱밥의 경우에도 미생물을 배합하여 발효시켰으므로 많은 종류의 미생물을 함유하고 있을 것이라 생각되어 참나무톱밥을 증기로 쪄서 살균과정을 거친 후 미생물 존재여부를 확인하였다. 그 결과 5분간만 쪄도 미생물이 완전히 제거됨을 확인할 수 있었으므로 식품으로 동결건조하기 전 3일 이상을 살균한 참나무톱밥을 먹여서 사육하는 것이 흰점박이꽃무지 체내에 미생물 수를 줄이는데 좋을 것으로 판단되었음

흰점박이꽃무지 유충의 배변 유도를 위해 물이나 먹이를 공급하지 않고 굶겼는데 흰점박이꽃무지가 굶기는 과정에서 배설한 변을 다시 섭취할 수 있으므로 변은 빠지고 흰점박이꽃무지는 빠지지 않을 정도의 망을 바닥에서 떨어진 위치에 설치하여 망위에 흰점박이꽃무지를 놓고 1일부터 5일까지 굶겼으며, 5일간 24시간 간격으로 배변량을 확인한 결과 굶긴 후 1일째에 많은 양의 변을 배설하였고, 2일째부터의 배변량은 상대적으로 적은양임을 확인할 수 있었음. 이 때 각각 개체의 무게나 길이에 어느 정도의 영향을 미치는지 확인한 결과 굶기는 날짜에 비례하여 무게와 길이가 줄어듦을 확인할 수 있었고, 배변을 통하여 장 내 물질이 얼마만큼 제거가 되었는지 확인하기 위하여 유충을 해부한 후 장을 적출하여 확인한 결과 굶긴 후 3일째부터 중장이 깨끗하게 비워진 것을 확인할 수 있었음

(2) 갈색거저리의 최적화 조건 확립 (특허출원, 2013)

(가) 사료별(참나무톱밥, 목초, 벣짚) 특성 조사

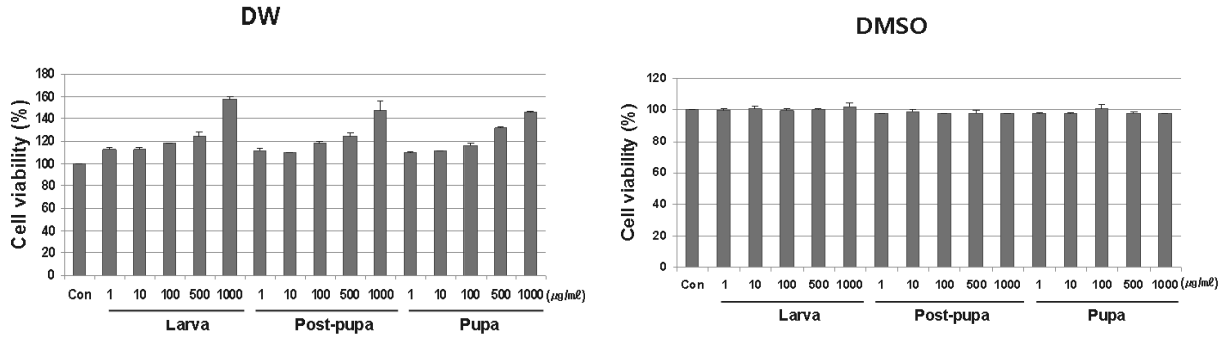
① 사료별 일반적인 특성 조사

	종령 유충	번데기
식용(중국)	○	○
사료용	○	×
가격(국산, kg당) 생체수입 허가 전	20만원	30만원
가격(국산, kg당) 생체수입 허가 후	8~10만원	15만원(?)
가격(중국산, kg당)	2만원	-

- * 중국현지에서 갈색거저리 가격 : 8,000~10,000원
- * 중국과 국내종 : 동일한 품종

- 먹이 종류 : 전국 갈색거저리 사육 농가별 사용 먹이가 유사하므로 국내 최대 사육농가의 갈색거저리를 실험근충으로 사용

(나) 발육시기별 갈색거저리 분말의 세포독성 검정



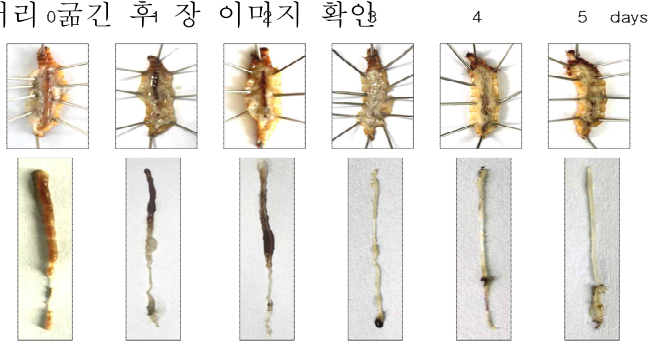
갈색거저리는 고성곤충생태원(경남 고성시)에서 28~35 mm 길이의 최대성장 유충을 사용하였으며, 사육온도는 25℃를 유지하였음. ‘령(領)’이란 곤충류에서 유충의 발육단계를 구분할 때 사용하는 용어인데 갈색거저리의 경우에는 최대령이 15령으로 빠른 속도로 탈피하면서 성장하며, 약 3~8령까지는 크기의 차이가 뚜렷하지만 8령 이상부터는 사료공급을 중단시켜도 생장에 영향을 미치지 않고 크기차이 또한 구분할 수 없었으므로 본 연구에서는 갈색거저리 유충의 사육특성상 정확한 령(領)을 알 수 없기 때문에 길이가 28~35mm가 되고, 직경이 5~7mm가 되는 최대성장단계에 해당되는 유충을 선별하였고, 갈색거저리 먹이로는 발효 밀기울과 5분간 고온의 증기로 찌서 멸균한 발효 밀기울을 이용하여 크게 2개 군으로 나누어 실험을 진행하였음. 갈색거저리의 대식세포인 Raw 264.7에 대한 독성 효과를 측정하기 위해 세포에 갈색거저리의 현탁액을 처리하고 24시간 경과시 MTS{3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5(3-carboxymethoxyphenol)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium} 시약을 넣고 36℃에서 4시간 더 배양한 후 microplate reader(Beckman, USA)를 이용하여 450 nm에서 흡광도를 측정 한 결과, 발육시기별 갈색거저리의 세포독성을 확인한 결과 최대성장 유충, 용화직후 및 번데기의 모든 처리구에서 세포독성이 없음을 확인할 수 있었음. 따라서 실험에 사용한 모든 시기의 갈색거저리가 식품으로 사용하기에 문제는 없을 것으로 판단되나 갈색거저리의 발육 특성 상 최대 15령까지 탈피를 하면서 성장하며 탈피속도가 매우 빠르기 때문에 채취하기도 힘든 용화직후 혹은 번데기 상태의 갈색거저리 보다는 가격이 저렴하고 구하기 용이한 최대성장 유충이 식용으로 적합한 것으로 결정하였음

(다) 약취 감소 조건 확립

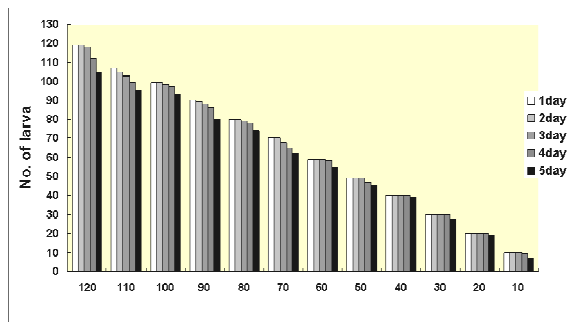
① 밀기울 살균조건 설정을 위한 미생물 검사

Sample No.	Steaming hours (min)	Bacteria (cfu/g)	Fungi (cfu/g)
1	×	2×10^3	3×10^3
2	5	-	-
3	10	-	-
4	20	-	-
5	30	-	-

② 갈색거저리 o 굵긴 후 장 이미지 확인

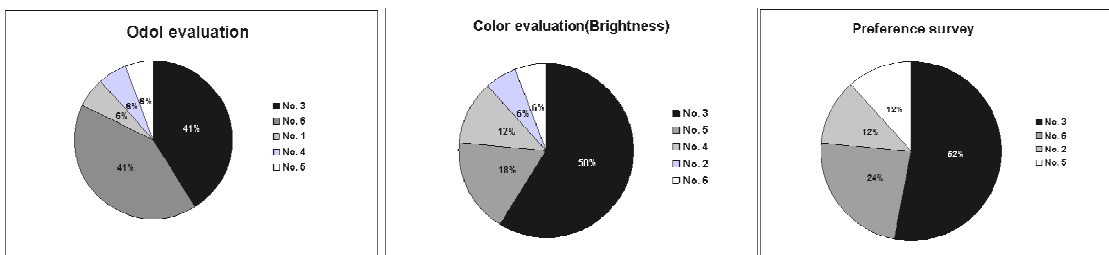


③ 유충 금식시 카니발리즘 여부 확인을 위해 동일면적(7×7×7 cm³) 내 밀도별 생존 두수 확인

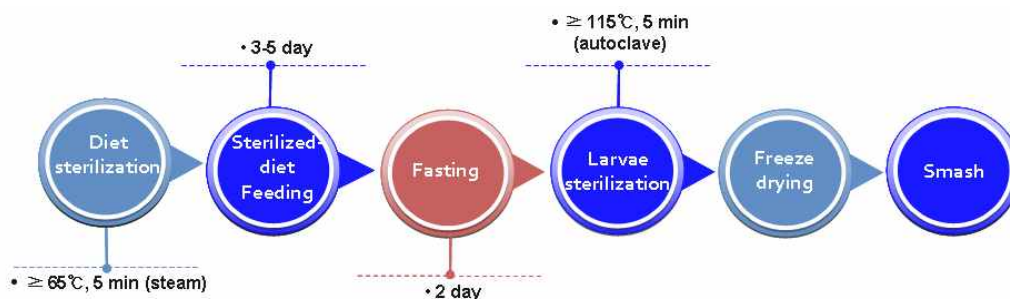


④ 갈색거저리의 굵긴 일수에 따른 냉동건조분말 색 및 냄새 관능평가(n=20)

Sample No.	High temperature and high pressure sterilization	Fasting day	Food sterilization
1	×	0	○
2	115°C, 0.9 kgf/cm ² , 5min	1	○
3	115°C, 0.9 kgf/cm ² , 5min	2	○
4	115°C, 0.9 kgf/cm ² , 5min	3	○
5	115°C, 0.9 kgf/cm ² , 5min	4	○
6	115°C, 0.9 kgf/cm ² , 5min	5	○



⑤ 갈색거저리 분말 전처리 과정



갈색거저리 유충을 식품화하기 위한 전처리 조건으로써 밀기울을 먹이로 사육한 최대성장된 유충을 이용하는 것이 세포독성도 없을 뿐만 아니라 채취하기 용이하며 경제적이기 때문에 갈색거저리 유충을 식품화 하는 것이 효율적임을 확인할 수 있었고 분말 전처리 조건으로 5분 동안 고온 증기로 찌서 세균을 제거한 밀기울을 3일 이상 먹인 유충을 2일간 끓인 후, 115℃, 0.9 kgf/cm²의 고온고압멸균을 5분간 실시하여 살균하고 동결 건조하여 제조한 분말이 미생물도 존재하지 않았고 분말의 색 및 냄새가 좋은 것을 확인할 수 있었음

다. 곤충 영양성분 분석 : 식품위생전문검사기관을 통해 분석

(1) 흰점박이꽃무지의 영양성분 분석

(가) 일반성분

시험항목	결과
열량(kcal/100g)	442.59
탄수화물(g/100g)	16.85
조단백질(g/100g)	57.85
조지방(g/100g)	17.85
수분(g/100g)	2.13
회분(g/100g)	5.31
식이섬유(g/100g)	8.43

(나) 아미노산 구성 및 함량

구성 아미노산 항목	결과 (mg/100g)
티로신(Tyrosine)	4829.91
글리신(Glycine)	3201.69
세린(Serine)	3277.71
알라닌(Alanine)	2452.91
글루탐산(Glutamic acid)	7376.16
라이신(Lysine)	3370.52
루이신(Leucine)	3072.64
메티오닌(Methionine)	519.59
발린(Valine)	2450.49
아르기닌(Arginine)	2541.40
아스파라긴산(Asparic acid)	4062.71
이소루이신(Isoleucine)	1879.86
트레오닌(Threonine)	2075.46
페닐알라닌(Phenylalanine)	2226.60
프롤린(Proline)	6306.66
히스티딘(Histidine)	1775.64
시스틴(Cysteine)	125.83
트립토판(Tryptophan)	706.99

(다) 지방산 구성 및 함량

(□):포화지방산

항목	결과(%)
미리스토투레익에시드(C14:1)	0.14
팔미톨레익에시드(C16:1)	10.81
엘라이딕에시드(C18:1n9t)	0.18
리놀레라이딕에시드(C18:2n6t)	0.12
아라키딕에시드(C20:0)	0.53
시스-11-에이코제노익에시드(C20:1)	0.33
에루키키에시드(C22:1n9)	0.27
아라키도닉에시드(C20:4n6)	0.26
시스-13,16-도코사펜텐노익에시드(C20:5n3)	0.14
라우릭에시드(C12:0)	0.04
미리스틱에시드(C14:0)	0.79
펜타데카노익에시드(C15:0)	0.20
팔미틱에시드(C16:0)	17.89
헵타데카노익에시드(C17:0)	0.13
스테아릭에시드(C18:0)	2.54
올레익에시드(C18:1n9c)	57.89
리놀레익에시드(C18:2n6c)	6.43
감마-리놀레닉에시드(C18:3n6)	0.11
리놀레닉에시드(C18:3n3)	0.97
시스-11,14-에이코사디에노익에시드(C20:2)	0.05
시스-8,11,14-에이코사디에노익에시드(C20:3n6)	0.04
시스-11,14,17-에이코사디에노익에시드(C20:3n3)	0.11
트리코사노익에시드(C23:0)	0.04

지방 중 심혈관 개선효과가 있는 불포화지방산이 전체 지방산 중 77%를 차지하고 있었으며, 특히 흰점박이꽃무지 유충 분말 100 g 중 올레산이 약 14 g 존재하는 특성이 있었다.

(라) 비타민 및 무기질 함량

① 비타민 함량

항목	결과
비타민 A	불검출
비타민 C	불검출
비타민 D	불검출
비타민 E	불검출
비타민 B6	불검출
비타민 B3(나이아신)	8.81 mg/100 g
비타민 B5	4.26 mg/ 100 g
비타민 B9(엽산)	139.13 ug/100 g

② 무기질 함량

항목	결과
구리	30.62 mg/kg
마그네슘	3663.00 mg/kg
망간	38.37 mg/kg
인	724.10 mg/100 g
아연	144.20 mg/kg
철	5.83 mg/100 g
칼슘	174.6 mg/100 g
칼륨	1597.00 mg/100 g

(2) 갈색거저리의 영양성분 분석

(가) 일반성분

시험항목	결과
열량	544.67 kcal/100 g
탄수화물	10.26%
조단백질	48.26%
조지방	35.81%
수분	2.47%
회분	3.17%
식이섬유	5.89%

(나) 아미노산 구성 및 함량

구성 아미노산 항목	결과 (mg/100 g)
티로신(Tyrosine)	314.011
글리신(Glycine)	2356.35
세린(Serine)	2187.03
알라닌(Alanine)	3259.14
글루탐산(Glutamic acid)	5961.14
라이신(Lysine)	2561.48
루이신(Leucine)	3231.82
메티오닌(Methionine)	593.01
발린(Valine)	2490.85
아르기닌(Arginine)	2402.51
아스파라긴산(Aspartic acid)	3706.87
이소류이신(Isoleucine)	1759.30
트레오닌(Threonine)	1835.70
페닐알라닌(Phenylalanine)	1680.61
프롤린(Proline)	3689.18
히스티딘(Histidine)	1440.29
시스틴(Cysteine)	49.49
트립토판(Tryptophan)	469.19

(다) 지방산 구성 및 함량

항목	결과(%)
트리데카노익에시드(C13:0)	0.07
미리스톨레익에시드(C14:1)	0.21
팔미톨레익에시드(C16:1)	2.34
리놀레라이딕에시드(C18:2n6t)	0.28
아라키딕에시드(C20:0)	0.12
시스-11-에이코세노익에시드(C20:1)	0.10
베헤닉에시드(C22:0)	0.05
라우릭에시드(C12:0)	0.39
미리스틱에시드(C14:0)	3.93
펜타데카노익에시드(C15:0)	0.10
팔미딕에시드(C16:0)	16.65
헵타데카노익에시드(C17:0)	0.10
스테아릭에시드(C18:0)	2.67
올레익에시드(C18:1n9c)	48.36
리놀레익에시드(C18:2n6c)	23.76
리놀레닉에시드(C18:3n3)	0.82
시스-11,14-데이코사디에노익에시드(C20:2)	0.06

지방 중 심혈관 개선효과가 있는 불포화지방산이 전체 지방산 중 77%를 차지하고 있었으며, 특히 갈색거저리 유충 분말 100 g 중 올레산이 약 17 g, 리놀레산이 약 8.5 g 존재하는 특성이 있었다.

(라) 비타민 및 무기질 함량

① 비타민 함량

항목	결과
비타민 A	불검출
비타민 C	불검출
비타민 D	불검출
비타민 E	불검출
비타민 B6	불검출
비타민 B3(나이아신)	7.83 mg/100 g
비타민 B5	2.56 g/ 100 g

② 무기질 함량

항목	결과
구리	7.83 mg/kg
마그네슘	2388.00 mg/kg
망간	9.16 mg/kg
인	680.80 mg/100 g
아연	106.70 mg/kg
철	4.65 mg/100 g
칼슘	37.02 mg/100 g
칼륨	656.90 mg/100 g

라. 곤충 유해물질 분석 : 식품위생전문검사기관을 통해 분석

(1) 흰점박이꽃무지의 유해물질 분석

(가) 세균 검사

시험항목	결과
대장균	음성
세균수 (cfu/g(ml))	250
살모넬라	음성
황색포도상구균	음성
여시니아엔테로콜리티카	음성
리스테리아모노사이토제네스	음성
바실러스세레우스	음성
장염비브리오	음성
캠필로박터제주니	음성
클로스트리디움퍼프린젠스	음성
엔트로박터사카자키	음성

검사 결과, 흰점박이꽃무지 유충 분말내에 대장균은 존재하지 않았으며 일반세균수는 250 cfu/g이 검출되었으나 이는 살균 직후에는 전혀 검출되지 않았으나 포장, 배송 및 분석 과정에서 유입된 것으로 판단된다. 병원성 세균인 살모넬라, 황색포도상구균, 여시니아엔테로콜리티카, 리스테리아모노사이토제네스, 바실러스세레우스, 장염비브리오, 캠필로박터제주니, 클로스트리디움퍼프린젠스, 엔트로박터사카자키 검사 결과 전혀 검출되지 않았다.

(나) 곰팡이독소 검사

번호	시험항목	결과
1	총아플라톡신 (B1, B2, G1, G2)	불검출
2	오크라톡신 A	불검출
3	데옥시니발레놀	불검출
4	제랄레논	불검출
5	푸모니신 (B1, B2)	불검출

흰점박이꽃무지 유충 분말의 곰팡이독소 검사 결과 시험항목 모두 검출되지 않았다.

(다) 중금속 검사

번호	시험항목	결과
1	납	0.7 mg/kg
2	비소	불검출
3	카드뮴	불검출
4	주석	불검출
5	수은	0.13 mg/kg

흰점박이꽃무지 유충 분말에서 비소, 카드뮴, 주석은 전혀 검출되지 않았고, 납 0.7 mg/kg, 수은 0.132 mg/kg이 검출되었으며 이러한 수치는 일반식품허용기준 중 납의 경우 연체류 및 패류 기준인 2.0 mg/kg 이하이며, 수은의 경우 어류 및 연체류 기준인 0.5 mg/kg 이하였다.

(라) 잔류농약 검사

α -BHC, β -BHC, γ -BHC(Lindane), δ -BHC,Bifenthrin,Carbofuran,Chlorfenapyr,Chlorothalonil,Chlorpyrifos,Chlorpyrifos-methyl,Cyhalothrin(lafmbda),Cypermethrin,Cyprodinil,4,4'-DDD,4,4'-DDE,4,4'-DDT,2,4'-DDT,Diazinon,Dichlorvos,Dicofol,Dimethoate, α -Endosulfan, β -Endosulfan,Endosulfan-sulfate,EPN,Ethoprophos,Fenarimol,Fenitrothion,Fenpropathrin,Fenvalerate,Fludioxonil,Fluquinconazole,imazalil,iprodione,isoprothiolane,Malathion,Methidathion,Methomyl,Paclbutrazol,Parathion,Parathion-methyl,Pendimethalin,Permethrin,Phenthoate,Phosmet,Phosphamidon,Pirimicarb,Prochloraz,Procymidone,Pyrazophos,Quintozene,Methyl pentachlorophenyl sulfide,Pentachloroaniline,Terbufos,Tetradifon,Triadimefon,Triazophos,Triflumizole,Vinclozolin

흰점박이꽃무지 유충 분말에서 잔류농약은 50종 모두에서 전혀 검출되지 않았다.

(마) 화합물 검사

번호	시험항목	결과
1	벤조피렌	불검출
2	이산화황	불검출
5	타르색소	불검출

흰점박이꽃무지 유충 분말의 화합물 검사 결과 시험항목 모두 검출되지 않았다.

⑥ 알레르기 유발물질 검사

알레르기 유발물질 검사는 우유, 대두, 복숭아, 토마토, 돼지고기, 계, 메밀, 밀, 달걀, 고등어 및 땅콩 11종의 알레르겐을 PCR로 분석한 결과 모두 검출되지 않았다.

(2) 갈색거저리의 유해물질 분석

(가) 세균 검사

시험항목	결과
대장균수	음성
세균수(cfu/g(ml))	490

대장균은 존재하지 않았으며 일반세균수는 490 cfu/g이 검출되었으나 이는 살균 직후에는 전혀 검출되지 않았으나 포장, 배송 및 분석 과정에서 유입된 것으로 판단된다.

(나) 곰팡이독소 검사

번호	시험항목	결과
1	총아플라톡신(B1, B2, G1, G2)	불검출
2	오크라톡신 A	불검출
3	데옥시니발레놀	불검출
4	제랄레논	불검출
5	푸모니신(B1, B2)	불검출

갈색거저리 유충 분말의 곰팡이독소 검사 결과 시험항목 모두 검출되지 않았다.

(다) 중금속 검사

번호	시험항목	결과
1	납	불검출
2	비소	불검출
3	카드뮴	불검출
4	주석	불검출
5	수은	불검출

갈색거저리 유충 추출물에서 중금속은 전혀 검출되지 않았다.

(라) 잔류농약 검사

α-BHC,β-BHC,γ-BHC(Lindane),δ-BHC,Bifenthrin,Carbofuran,Chlorfenapyr,Chlorothalonil,Chlorpyrifos
 Chlorpyrifos-methyl,Cyhalothrin(lafmbda),Cypermethrin,Cyprodinil,4,4'-DDD,4,4'-DDE,4,4'-DDT,2,4'-DDT,
 Diazinon,Dichlorvos,Dicofol,Dimethoate,α-Endosulfan,β-Endosulfan,Endosulfan-sulfate,EPN,Ethoprophos,
 Fenarimol,Fenitrothion,Fenpropathrin,Fenthion,Fenvalerate,Fludioxonil,Fluquinconazole,Imazalil,Iprodione,Isoprothiolane,
 Malathion,Methidathion,Methomyl,Paclbutrazol,Parathion,Parathion-methyl,Pendimethalin,Permethrin,Phenthoate,
 Phosmet,Phosphamidon,Pirimicarb,Prochloraz,Procymidone,Pyrazophos,Quintozene,Methyl pentachlorophenyl sulfide,
 Pentachloroaniline,Terbufos,Tetradifon,Triadimefon,Triazophos,Triflumizole,Vinclozolin

갈색거저리 유충 분말에서 잔류농약은 50종 모두에서 전혀 검출되지 않았다.

(마) 화합물 검사

번호	시험항목	결과
1	벤조피렌	불검출
2	이산화황	불검출
5	타르색소	불검출

갈색거저리 유충 분말의 화합물 검사 결과 시험항목 모두 검출되지 않았다.

(바) 알레르기 유발물질 검사

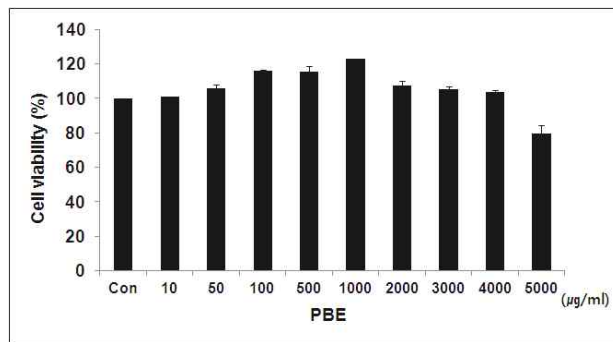
알레르기 유발물질 검사는 우유, 대두, 복숭아, 토마토, 돼지고기, 계, 메밀, 밀, 달걀, 고등어 및 땅콩 11종의 알레르겐을 PCR로 분석한 결과 모두 검출되지 않았다.

마. 곤충 추출물을 이용한 다양한 효능 검정

(1) 곤충 추출물의 항염증 효능 검정

(가) 흰점박이꽃무지 추출물(PBE)의 항염증 효능 검정

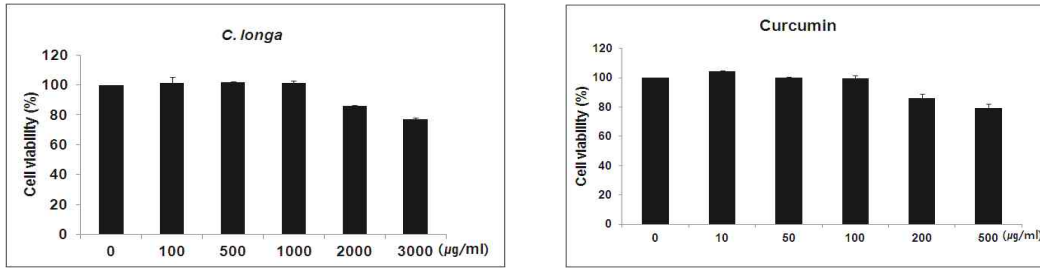
① 흰점박이꽃무지 추출물(PBE) 처리시 세포 성장률 및 독성 분석



<대식세포(RAW264.7)에 대한 PBE 독성 검정 : MTS assay>

흰점박이꽃무지 추출물(PBE)은 4000 µg/ml의 농도까지 RAW264.7 세포에 대한 독성을 보이지 않았고, 5000 µg/ml의 농도에서 21% 정도 세포생장을 저해하였음

② 양성대조군 추출물 처리시 세포 성장률 및 독성 분석



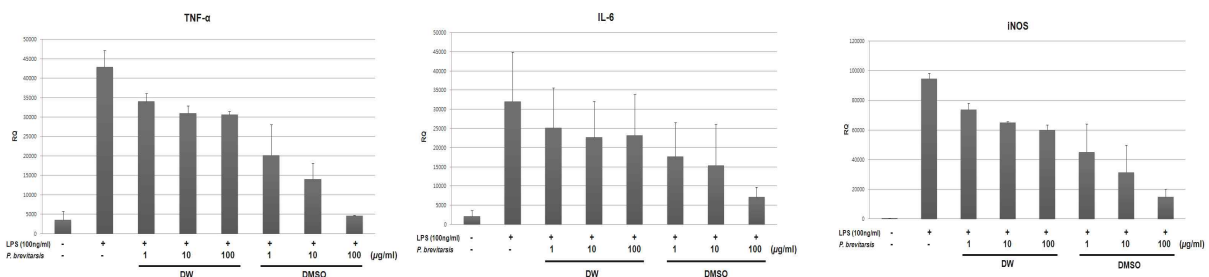
<RAW264.7 세포에 대한 강황추출물 및 curcumin의 독성 검정 : MTS assay>

항염증 효능을 갖고 있는 것으로 보고된 천연물질인 강황(*Curcuma longa*)과 이의 항염증 효능을 나타내는 주요성분인 curcumin을 양성대조군으로 사용하기 위해 RAW 264.7 세포에 24 시간 처리한 후 세포독성을 확인한 결과, 강황은 1000 µg/ml, curcumin은 50 µg/ml의 농도까지 세포성장율을 저해하지 않았으므로 추후 실험에서 이 농도로 실험을 수행하였음

③ 흰점박이꽃무지 추출물 처리시 사이토카인 및 염증매개물 전사체 발현 억제 확인

Name	Sequence
GAPDH	Forward 5'-GCCTCACCCCATTTGATGTT-3'
	Reverse 5'-GGGAAGCCCATCACCATCT-3'
IL-6	Forward 5'-TTGGGAGTGGTATCCTCTGT-3'
	Reverse 5'-CCACGGCCTTCCCTACTTC-3'
iNOS	Forward 5'-TGAAGCGTTTCGGGATCTG-3'
	Reverse 5'-CCACGGCCTTCCCTACTTC-3'
TNF-α	Forward 5'-ACAGCACCCGAGTACCTGAG-3'
	Reverse 5'-CCACGGCCTTCCCTACTTC-3'

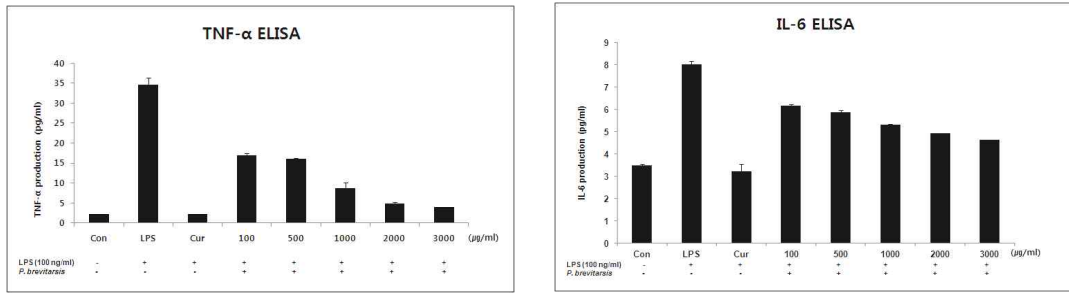
<Real-time PCR primers의 염기서열 >



<흰점박이꽃무지 유충 추출물에 의한 염증성 매개물의 발현 관찰>

Real-time PCR에 의한 Raw 264.7 세포 분석에서 흰점박이꽃무지 추출물의 항염증효과 측정 결과에 관한 것임(TNF-α: TNF-α primer를 사용한 군, IL-6: IL-6 primer를 사용한 군, iNOS: iNOS primer를 사용한 군, DMSO: 추출물 제조에 DMSO를 사용한 군, D.W.: 추출물 제조에 D.W.를 사용한 군)

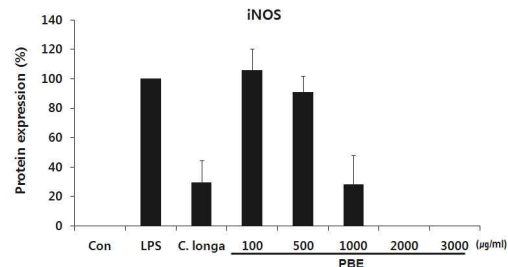
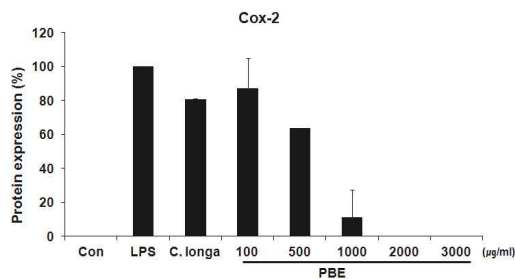
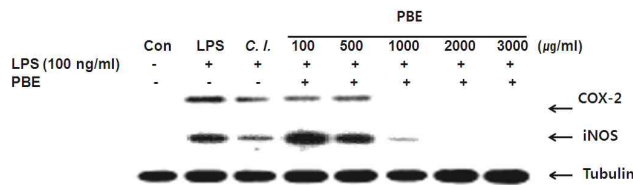
④ 흰점박이꽃무지 유충 추출물 처리시 사이토카인 단백질 발현 억제 확인



<염증유도된 RAW264.7 세포에 PBE 처리후 사이토카인 발현량 확인 : ELISA>

LPS에 의해 염증 유도된 RAW264.7 세포에 흰점박이꽃무지 추출물(PBE) 처리 후 염증관련 사이토카인의 발현량을 ELISA 분석에 의해 확인할 결과, 농도 의존적으로 발현이 억제됨을 확인

⑤ 흰점박이꽃무지 추출물(PBE) 처리시 염증매개물질인 COX-2와 iNOS 단백질 발현 억제 확인

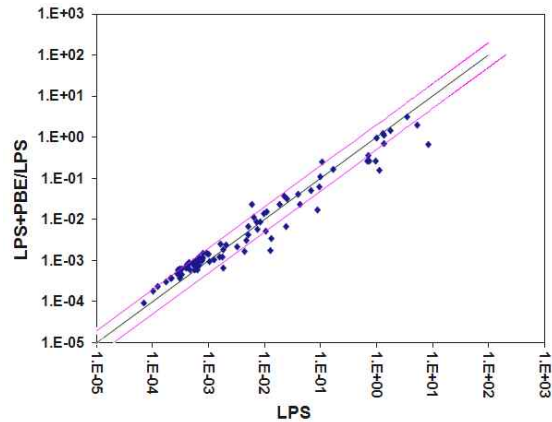
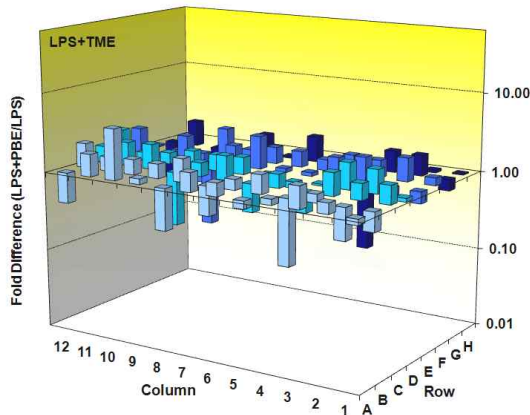


<염증유도된 RAW264.7 세포에 PBE 처리후 염증매개물질 발현 확인 : Western blot>

염증유도된 RAW264.7 세포에 흰점박이꽃무지 추출물(PBE) 처리 후 발열 및 부종을 생성하여 염증을 증폭하는 prostaglandin E2를 생성하는 효소인 COX-2의 발현량을 확인해 본 결과 대조인 C. longa(1000 μg/ml) 처리시 COX-2 발현이 19.5% 억제된데 비해 PBE 500 μg/ml 처리시에 37%, 1000 μg/ml 처리시에는 100% 발현이 저해됨을 확인할 수 있었음

한편, COX-2는 혈전을 예방하고 혈관을 확장하는 물질인 prostacyclin I2의 생성도 촉진하는 효소이므로 염증은 감소되더라도 혈전이 생성되어 혈압이 올라가는 부작용이 생기면 안되므로 혈관을 확장시키는 NO를 생성하는 iNOS가 발현을 분석한 결과, 500 μg/ml 까지는 iNOS 발현이 거의 정상과 동일하므로 이 농도가 효율적일 것이라 판단되며, 이 때 대조인 C. longa (1000 μg/ml) 처리시 iNOS가 80%정도 감소되므로 염증을 줄이더라도 혈전생성 및 혈압상승을 야기할수 있을 것으로 판단되며, 전체 결과를 통해 강황보다 PBE가 염증을 줄이는 효과가 더 좋으면서 부작용 또한 감소시킬 수 있을 것이라 추정됨

⑥ 염증유도된 RAW264.7 세포에 흰점박이꽃무지 추출물(PBE) 처리 후 염증신호전달과정 유전자 발현양상 변화분석



	A	B	C	D	E	F	G	H
1	Abcf1	Ccl22	Ccr3	Cxcl12	Il11	Il1r2	Lia	Gusb
2	Bcl6	Ccl24	Ccr4	Cxcl13	Il13	Il20	Ltb	Hprt
3	Cxcr5	Ccl25	Ccr5	Cxcl15	Il13ra1	Il2rb	Mif	Hsp90abl
4	C3	Ccl3	Ccr6	Pf4	Il15	Il2rg	Aim1	Gapdh
5	Caspl	Ccl4	Ccr7	Cxcl5	Il16	Il3	Spp1	Actb
6	Ccl1	Ccl5	Ccr8	Cxcl9	Il17b	Il4	Tgfb1	MGDC
7	Ccl11	Ccl6	Ccr9	Cxcr3	Il18	Il5ra	Tnf	RTC
8	Ccl12	Ccl7	Crp	Ccr10	Il1a	Il6ra	Tnfrsf1a	RTC
9	Ccl17	Ccl8	Cx3cl1	Ifng	Il1b	Il6st	Tnfrsf1b	RTC
10	Ccl19	Ccl9	Cxcl1	Il10	Il1f6	Cxcr2	Cd40lg	PPC
11	Ccl2	Ccr1	Cxcl10	Il10ra	Il1f8	Itgam	Tollip	PPC
12	Ccl20	Ccr2	Cxcl11	Il10rb	Il1r1	Itgb2	Xcr1	PPC

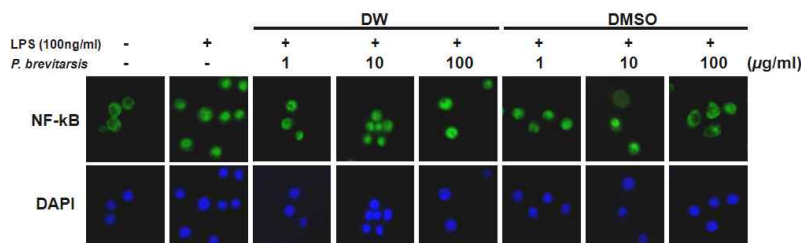
	A	B	C	D	E	F	G	H
1	-1.19	-1.74	1.71	-1.11	-1.40	1.25	-1.38	-1.03
2	1.36	-2.52	1.6	1.99	-1.35	1.97	1.82	-1.08
3	1.90	1.27	1.93	2.16	2.14	1.66	1.85	-1.06
4	1.30	-6.73	-1.8	1.05	1.91	1.74	-11.04	1.08
5	-1.26	1.74	1.48	-1.2	1.11	1.37	-1.82	1.08
6	1.47	1.36	-2.25	1.12	1.12	1.58	2.10	-
7	1.74	-2.35	2.0	1.65	2.60	1.61	1.05	-
8	-3.37	1.97	1.49	1.59	1.79	1.36	1.85	-
9	1.17	1.52	-4.68	1.62	-6.50	2.31	-1.05	-
10	4.40	1.56	2.07	1.38	1.97	-2.46	-3.50	-
11	1.92	1.51	2.0	1.26	-1.09	-1.66	2.08	-
12	-2.43	2.00	1.61	2.27	2.05	1.05	-3.18	-

■ ≥2-fold up regulation ■ ≥2-fold down regulation

<염증유도된 RAW264.7 세포에 PBE 처리 후 염증신호전달 관련 유전자 발현 분석 : PCR array>

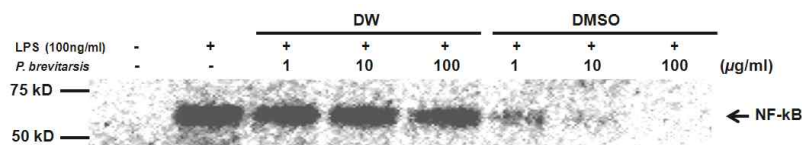
PCR array를 이용하여 염증유도된 RAW 264.7 세포에 흰점박이꽃무지 추출물(PBE)을 3000 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 처리한 후 염증신호전달과정 관련 유전자 84개의 발현 변화 분석 결과, PBE 처리전에 비해 2배 이상 발현량의 변화가 있는 유전자는 24개 였으며 이들 중 PBE 처리 후 발현량이 증가된 것은 12개 였으며 chemokine(C-C motif) ligand 1, 9, 15, chemokine (C-C motif) receptor 2, 9, interleukin 10 receptor, beta, interleukin 13 receptor, alpha 1, interleukin 18, interleukin 1 receptor, type I, iInterleukin 6 signal transducer, transforming growth factor, beta 1, toll interacting protein이 있었고, PBE 처리 후 발현량이 감소된 것도 12개 였으며 chemokine (C-C motif) ligand 3, 6, 8, 12, 20, 24, chemokine (C-X3-C motif) ligand 1, chemokine (C motif) receptor 1, chemokine (C-X-C motif) receptor 2, interleukin 1 beta, aminoacyl tRNA synthetase complex-interacting multifunctional protein 1, CD40 ligand가 있었으며, 추후 재검정할 계획임

⑦ 흰점박이꽃무지 분말 처리시 NF- κ B 핵으로 translocation 억제 확인



면역형광염색을 통한 세포내의 NF-κB의 위치확인 결과에 관한 것임(DMSO:추출물제조에 DMSO를 사용한 군 D.W.:추출물제조에 D.W.를 사용한 군, NF-κB: 면역형광염색을 시행한 군, DAPI: DAPI염색을 시행한 군)

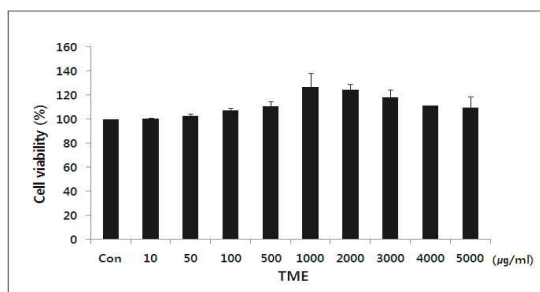
⑧ 흰점박이꽃무지 분말 처리시 NF-κB 핵에서 발현 억제 확인



세포에서 분리한 핵에서의 NF-κB 발현량을 western blot으로 확인한 결과사진임

(나) 갈색거저리 유충 추출물(TME)의 항염증 효능 검정

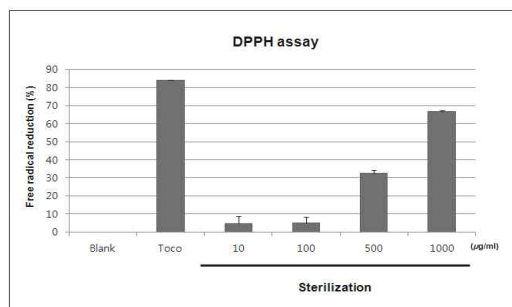
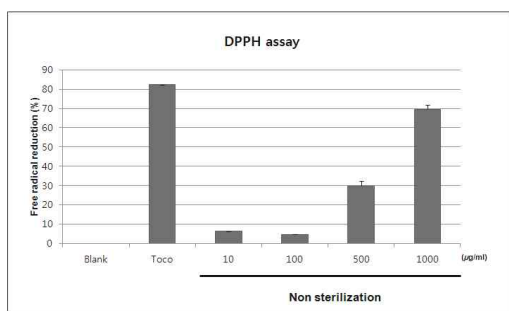
① 갈색거저리 추출물(TME) 처리시 세포 성장률 및 독성 분석



<대식세포(RAW264.7)에 대한 TME 독성 검정 : MTS assay>

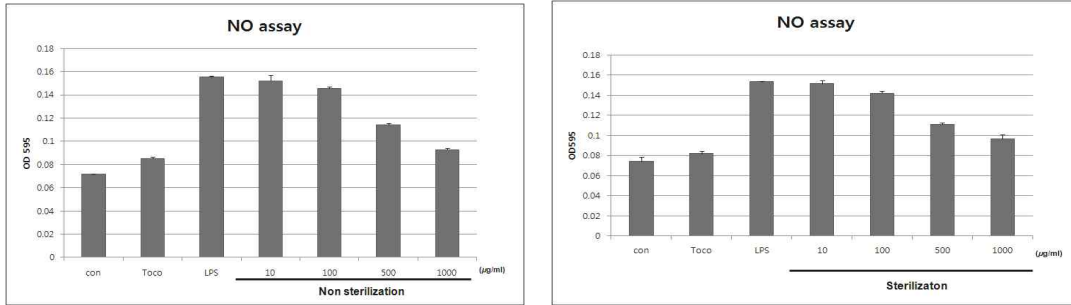
갈색거저리로 분말을 제조하여 70% 에탄올에 용해시킨 후 초음파를 이용하여 추출물 제조하고 건조하여 농도를 확인한 후 이를 농도별로 RAW 264.7 세포에 처리한 후 CellTiter 96@AQueousONE Solution Cell Proliferation Assay Kit(MTS assay kit, Promega)를 이용하여 세포 성장률 확인 결과 5000 μg/ml의 고농도에서도 독성을 보이지 않음을 확인하였음

② Free radical 소거능 검정



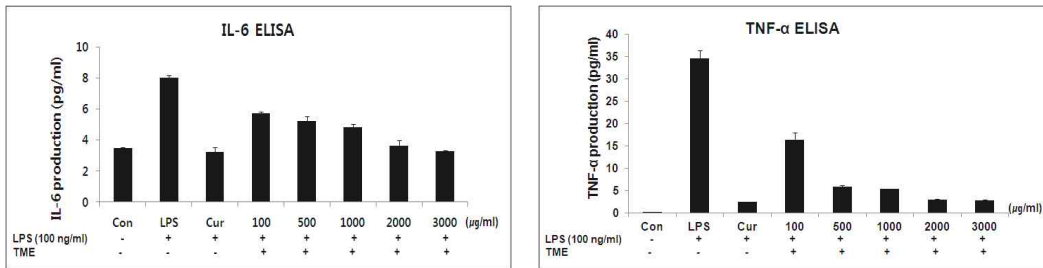
갈색거저리추출물을 DPPH (Sigma) 시약을 이용하여 소거능을 조사한 결과, 멸균한 그룹과 비멸균한 그룹 모두 500 μg/ml의 농도부터 유의 있는 소거능을 보이기 시작하여 분말제조 시 미생물 제거를 위한 고온고압 멸균의 영향이 free radical의 소거능에 영향을 주지 않음을 확인할 수 있었음

③ Nitric Oxide의 소거능 검증

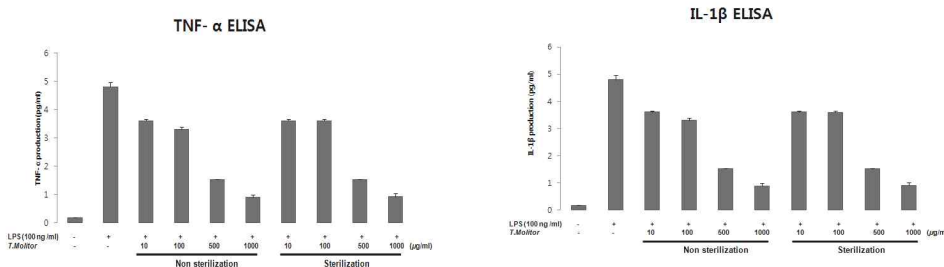


갈색거저리추출물을 Nitric Oxide detection kit (Intron biotechnology)를 이용하여 소거능을 조사한 결과 멸균한 그룹과 비멸균한 그룹 모두 500 µg/ml의 농도부터 유의 있는 소거능을 보이 기 시작하여 멸균의 영향이 Nitric Oxide의 소거능에 영향을 주지 않음을 확인하였음

④ 갈색거저리 추출물(TME) 처리시 염증성 사이토카인 발현 억제 확인



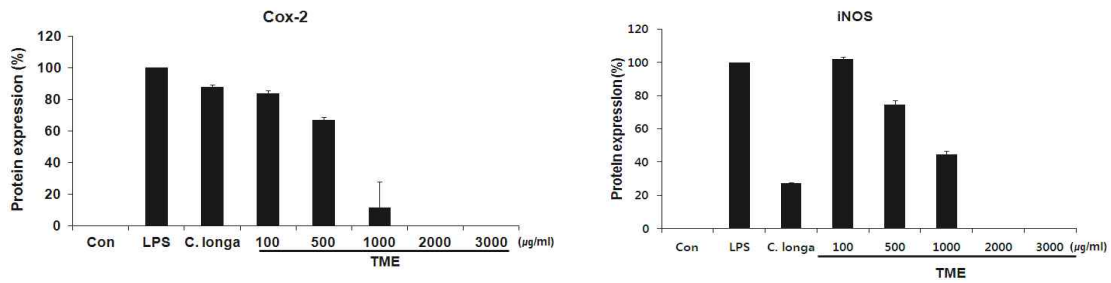
<갈색거저리 분말처리 후 real-time PCR에 의한 사이토카인 전사체 발현양상 확인>



<갈색거저리 분말처리 후 Western blot에 의한 사이토카인 단백질 발현양상 확인>

LPS를 통해 염증반응을 유도한 Raw 264.7 세포에 갈색거저리 추출물을 처리하여 cytokine의 유전자 발현량과 세포 외로 분비되는 cytokine 양을 Real-time PCR을 통해 유전자 수준에서 조사하였고, ELISA 기법을 이용해 단백질 수준에서 cytokine의 양을 확인한 결과, 두 가지 모두의 멸균여부에 관계없이 농도에 의존적으로 cytokine의 양을 감소시키는 경향을 보여 염증 소거능이 있음을 알 수 있었고 멸균의 영향이 항염증 효능에 영향이 없는 결과를 재차 확인

⑤ 갈색거저리 추출물(TME) 처리시 염증매개물질인 COX-2와 iNOS 단백질 발현 억제 확인

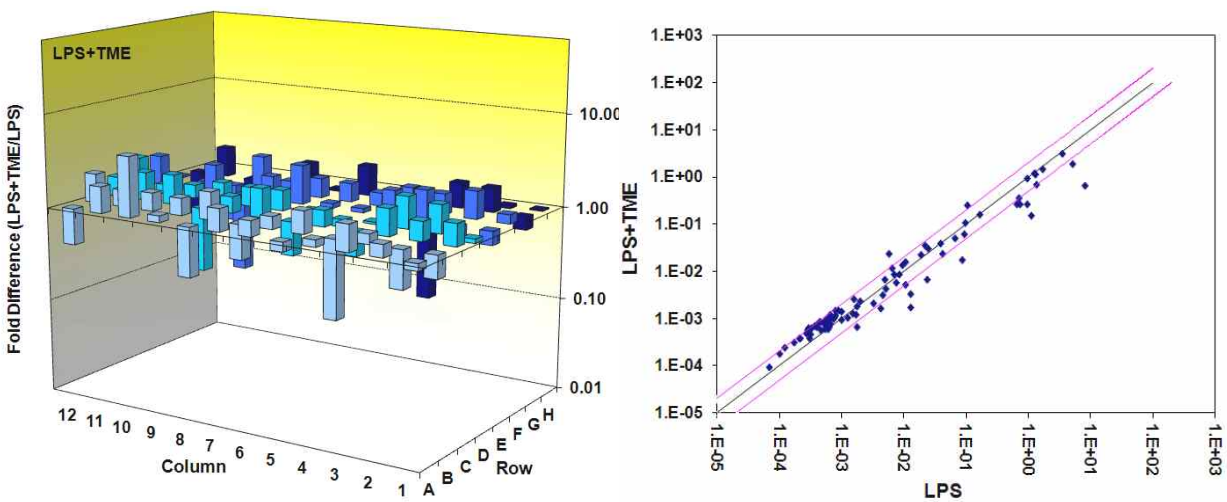


<염증유도된 RAW264.7 세포에 TME 처리후 염증매개물질 발현 확인 : Western blot>

염증유도된 RAW264.7 세포에 TME 처리 후 발열 및 부종을 생성하여 염증을 증폭하는 prostaglandin E2를 생성하는 효소인 COX-2의 발현량을 확인해 본 결과 대조인 C. longa(1000 µg/ml) 처리시 COX-2 발현이 14% 억제되는데 비해 TME 500 µg/ml 처리시에 32%, 1000 µg/ml 처리시에는 100% 발현이 저해됨을 확인할 수 있었음.

한편, COX-2는 혈전을 예방하고 혈관을 확장하는 물질인 prostacyclin I2의 생성도 촉진하는 효사이므로 염증은 감소되더라도 혈전이 생성되어 혈압이 올라가는 부작용이 생기면 안되므로 혈관을 확장시키는 NO를 생성하는 iNOS가 발현을 분석한 결과, 500 µg/ml 까지는 iNOS 발현이 약 11% 감소되므로 이 농도가 효율적일 것이라 판단되며, 이 때 대조인 C. longa(1000 µg/ml) 처리시 iNOS가 72%정도 감소되므로 염증을 줄이더라도 혈전생성 및 혈압상승을 야기할 수 있을 것으로 판단되며, 전체 결과를 통해 강항보다 TME가 염증을 줄이는 효과는 더 좋으면서 부작용 또한 감소시킬 수 있을 것이라 추정됨

⑥ 염증유도된 RAW264.7 세포에 갈색거저리 추출물(TME) 처리 후 염증신호전달과정 유전자 발현양상 변화분석



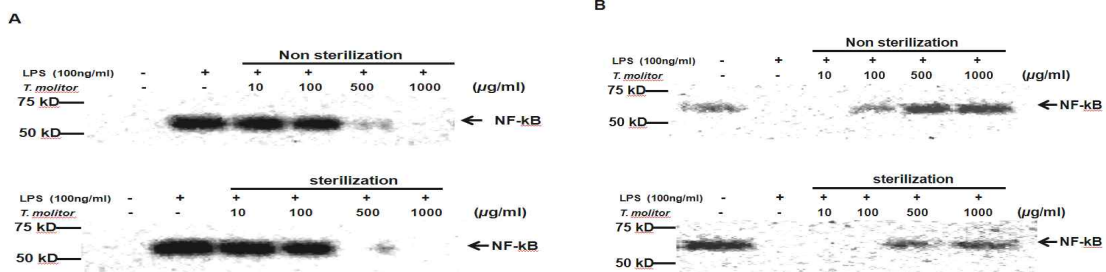
	A	B	C	D	E	F	G	H		A	B	C	D	E	F	G	H
1	Abcf1	Ccl22	Ccr3	Cxcl2	Il11	Il1r2	Lta	Gusb	1	-1.15	-1.97	1.22	1.05	-1.13	1.17	-1.50	1.00
2	Bcl6	Ccl24	Ccr4	Cxcl3	Il13	Il20	Ltb	Hprt	2	1.23	-2.53	1.16	1.36	1.09	1.47	1.15	-1.11
3	Cxcr5	Ccl25	Ccr5	Cxcl5	Il13ra1	Il2rb	Mif	Hsp90ab1	3	1.35	1.18	1.54	1.38	1.42	1.23	1.44	-1.03
4	C3	Ccl3	Ccr6	Pf4	Il15	Il2rg	Aim1	Gapdh	4	1.48	-5.83	-1.56	1.50	1.35	1.31	-8.77	1.10
5	Casp1	Ccl4	Ccr7	Cxcl5	Il16	Il3	Spp1	Actb	5	-2.54	1.24	2.12	1.15	1.05	1.47	-2.62	1.04
6	Ccl1	Ccl5	Ccr8	Cxcl9	Il17b	Il4	Tgfb1	MGDC	6	1.34	1.27	-3.65	1.03	-1.81	1.35	1.38	-
7	Ccl11	Ccl6	Ccr9	Cxcr3	Il18	Il5ra	Tnf	RTC	7	1.26	-3.51	1.44	1.44	1.54	1.62	-1.01	-
8	Ccl2	Ccl7	Ccrp	Ccr10	Il1a	Il6ra	Tnfrsf1a	RTC	8	-6.11	1.73	1.33	1.29	1.31	1.20	1.35	-
9	Ccl7	Ccl8	Cx3cl1	Ifng	Il1b	Il6st	Tnfrsf1b	RTC	9	1.42	1.12	-7.07	1.53	-9.37	1.47	-1.96	-
10	Ccl9	Ccl9	Cxcl1	Il10	Il1f6	Cxcr2	Cd40lg	PPC	10	4.65	-1.19	1.40	1.46	1.33	-2.48	-3.12	-
11	Ccl2	Cer1	Cxcl10	Il10ra	Il1f8	Itgam	Tollip	PPC									
12	Ccl20	Ccr2	Cxcl11	Il10rb	Il1r1	Itgb2	Xcr1	PPC									

 ≥2-fold up regulation
 ≥2-fold down regulation

<염증유도된 RAW264.7 세포에 TME 처리 후 염증신호전달 관련 유전자 발현 분석 : PCR array>

PCR array를 이용하여 염증유도된 RAW 264.7 세포에 갈색거저리 추출물(TME)을 3000 µg/ml의 농도로 처리한 후 염증신호전달과정 관련 유전자 84개의 발현 변화 분석 결과, TME 처리전에 비해 2배 이상 발현량의 변화가 있는 유전자는 16개 였으며 이들 중 TME 처리 후 발현량이 증가된 것은 chemokine (C-C motif) ligand 19, chemokine (C-C motif) receptor 7로 2개 였으며, TME 처리 후 발현량이 감소된 것은 14개로 caspase 1, chemokine (C-C motif) ligand 3, 6, 8, 12, 20, 24, chemokine (C-X3-C motif) ligand 1, chemokine (C motif) receptor 1, chemokine (C-X-C motif) receptor 2, interleukin 1 beta, Aminoacyl tRNA synthetase complex-interacting multifunctional protein 1, secreted phosphoprotein 1, CD40 ligand가 있었으며, 추후 재검정할 계획임

⑦ NF-κB의 세포내 위치 확인



(A: Nucleus fraction, B: Cytosol fraction)

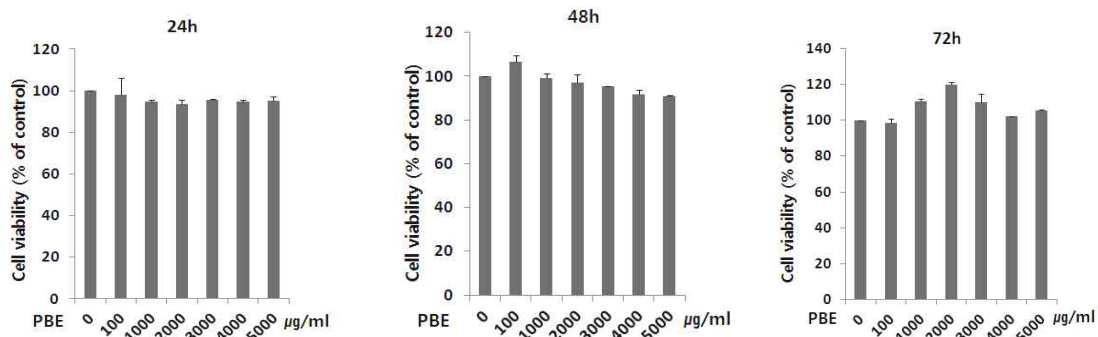
위와 같이 처리한 Raw 264.7 세포를 핵질과 세포질로 분리하여 Western blot을 통해 NF-κB의 세포내 위치를 확인한 결과, LPS로 염증이 유도된 세포는 핵에서 뚜렷하게 NF-κB가 확인 되었으며, 염증을 유발한 Raw 264.7 cell에 70% 에탄올에 녹인 갈색거저리 추출물을 500 µg/ml의 농도로 처리한 대조군은 세포질에 NF-κB가 존재함을 확인함으로써 NF-κB 핵으로 이동을 차단하는 효과를 확인 하였으며, 이를 통하여 갈색거저리의 뚜렷한 항염증 효능을 보이는 것을 확인함

(2) 곤충 추출물의 항비만 효능 검증

(가) 흰점박이꽃무지 추출물(PBE)의 항비만 효능 검증

① 비만유도와 동시에 PBE 처리 시 항비만 효능 검증

② 지방전구세포에 PBE 처리 후 세포 생존률 확인



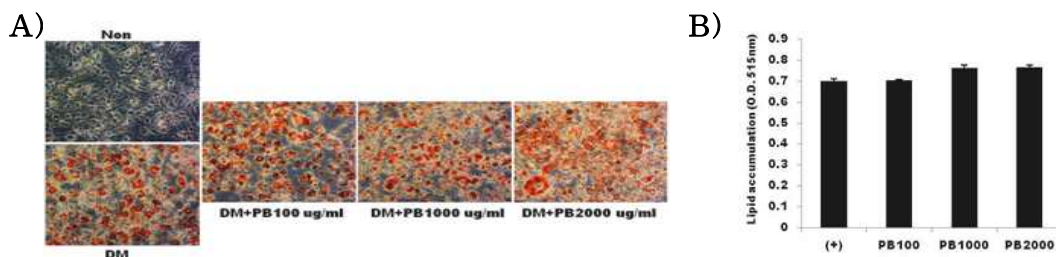
<3T3-L1 세포에 PBE의 처리 시간 및 농도별 세포독성 확인>

3T3-L1 지방전구세포(한국세포주은행)을 이용하여 PBE의 세포독성 측정을 위해 1×10^6 cells/well로 분주된 지방전구세포에 PBE를 농도별(100, 500, 1000, 3000, 5000 $\mu\text{g/ml}$)로 처리하고 24, 48, 72시간 동안 배양 후 MTS assay 수행 결과, 5000 $\mu\text{g/ml}$ 의 고농도에서 72시간 동안 처리시에도 세포독성 없음을 확인하였음

㉔ 3T3-L1 지방 전구세포를 지방세포로 분화시키는 동시에 PB 처리 후 분화율 확인

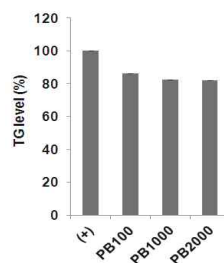
- pre-adipocyte(3T3-L1) cell culture 후 differentiation inducer* 및 PBE 동시처리

*Differentiation inducer : 10% FBS/DMEM+IBMX(3-isobutyl-1-methylxanthine)+Insulin+Dexamethasone



<지방세포 분화유도시 PB 처리후 oil-red O staining한 세포 이미지(A) 및 총지방축적량 분석(B)>

본 실험의 경우 2013년도 보고서에 지방세포 분화 유도 시 PB 동시처리한 후 8일째 oil-red O staining에 의해 지방세포 분화억제 효능을 확인한 결과, PB 2000 $\mu\text{g/ml}$ 농도의 처리군에서 약 23% 분화가 억제됨을 확인할 수 있었다고 보고한 바 있으나, 지속적인 검증을 한 후 평균적으로 보았을 때 분화억제가 관찰되지 않는 바 PB에 의한 세포수준에서의 지방세포 분화 억제율은 관찰되지 않는 것으로 정정 보고 함

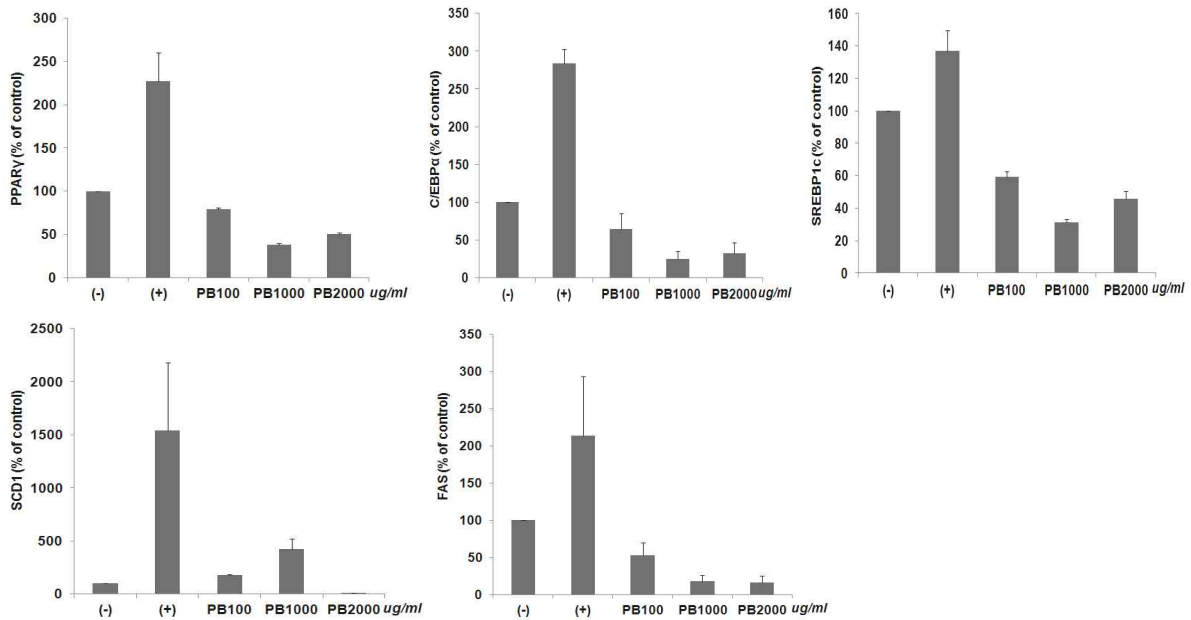


<지방세포 분화유도시 PBE 처리후 중성지방량 분석>

지방세포 분화 유도시 PBE 동시처리한 후 8일째 중성지방(triglyceride) 측정에 의해 지방세포 분화억제 효능을 확인하였으며, 그 결과 PBE 2000 $\mu\text{g/ml}$ 처리시 중성지방이 약 18% 감소

함을 확인하였음

㉔ 지방세포 분화유도시 PBE 동시처리 후 지방세포분화 및 지방합성관련 유전자 발현 억제 확인

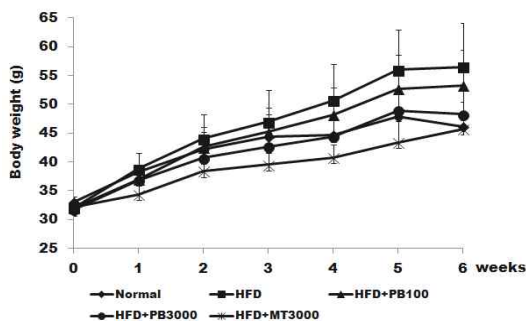


<지방세포 분화유도시 PBE 처리후 지방세포분화 및 지방합성 관련 유전자 발현 분석>

지방전구세포를 지방세포로 분화 유도시 PBE 동시처리하고 8일 경과시 지방세포 분화에 관여하는 전사인자 PPAR- γ 와 C/EBP α 유전자 및 지질합성에 관여하는 SREBP, FAS, LPL 및 SCD 유전자의 전사체 발현 양상을 real-time PCR을 통해 확인한 결과, 시료 1000 $\mu\text{g/ml}$ 이상의 농도에서 지방세포 분화 및 지방합성에 관여하는 인자들의 유전자 전사체 발현양이 모두 80% 이상 감소함을 확인 할 수 있었음. 이상의 결과를 통해 PBE의 adipogenesis 억제 효과가 있음을 확인하였으므로 PBE는 비만 예방에 효율적으로 사용가능할 것임을 추정할 수 있음

㉕ DIO (diet induced obese) ICR계 마우스를 이용한 흰점박이꽃무지 현탁액의 체중감소 효과 확인

: High fat diet (HFD 45% fat contain; Rodent diet D12492, Research diet, New Brunswick, NJ, USA)유도 동시 흰점박이꽃무지 현탁액을 6주간 100, 3000 mg/kg/day로 경구 투여하여 체중감소효과를 측정하였으며, 양성대조군으로 마테 추출물을 사용하였음



Group	Body weight (g)		Weight gain (g)
	Initial	Final	
ND	32.95 \pm 1.33	46.07 \pm 3.28	0.40 \pm 0.13
HFD	32.011 \pm 1.37	56.53 \pm 7.64	0.76 \pm 0.29
HFD+PB 100	32.03 \pm 1.86	53.31 \pm 6.14	0.66 \pm 0.24
HFD+PB 3000	31.67 \pm 1.22	48.27 \pm 7.21	0.52 \pm 0.27
HFD+MT3000	32.1 \pm 1.33	45.72 \pm 4.74	0.42 \pm 0.18

<고지방식이 및 흰점박이꽃무지 현탁액 동시 처리에 의한 체중감소 효과, n=9>

고지방식이를 통해 비만을 유도하는 동시에 흰점박이꽃무지현탁액을 100, 3000 mg/kg의 농도로 경구 투여 한 결과 흰점박이꽃무지 현탁액 3000 mg/kg/day를 경구 투여한 경우 체중은 약 31.5% 정도 감소함을 확인하였음

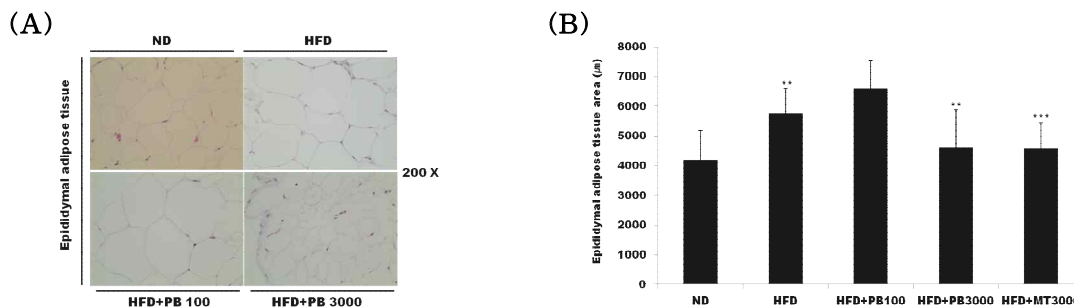
- ㉞ DIO (diet induced obese) ICR계 마우스를 이용한 흰점박이꽃무지 현탁액 경구투여 후 장기상대 중량 측정
: High fat diet (HFD 45% fat contain; Rodent diet D12492, Research diet, New Brunswick, NJ, USA)유도 동시 흰점박이꽃무지 현탁액을 6주간 100, 3000 mg/kg/day로 경구 투여하여 주변 지방조직 및 부고환 지방 조직의 상대중량을 측정하여 지방의 감소를 확인

Diet groups	Peripheral fat	Epididymal fat
ND	3.55 ± 1.5	0.177 ± 0.01
HFD	7.52 ± 1.5	0.178 ± 0.03
HFD+PB 100	6.97 ± 2.5	0.161 ± 0.02
HFD+PB 3000	5.76 ± 3.5	0.195 ± 0.03
HFD+MT 3000	4.29 ± 0.9	0.185 ± 0.02

<고지방식이 및 흰점박이꽃무지 현탁액 동시 처리에 의한 지방조직의 상대중량 측정, n=3>

고지방식이를 통해 비만을 유도하는 동시에 흰점박이꽃무지 현탁액을 100, 3000 mg/kg의 농도로 경구 투여 한 결과 주변지방조직의 경우 각각 7.3%, 23.4%의 지방조직의 무게 감소를 확인할 수 있었음

- ㉞ DIO (diet induced obese) ICR계 마우스를 이용한 흰점박이꽃무지 현탁액 경구 투여 후 부고환 지방의 크기 변화 확인
: High fat diet (HFD 45% fat contain; Rodent diet D12492, Research diet, New Brunswick, NJ, USA)유도 동시 흰점박이꽃무지 현탁액을 6주간 100, 3000 mg/kg/day로 경구 투여하여 내장 지방량을 확인 할 수 있는 생식기 지방의 크기 확인을 위해 부고환 지방의 크기를 측정하였음

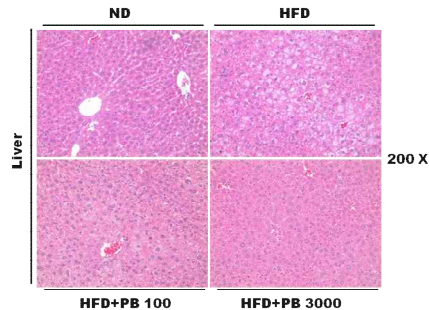


<고지방식이 및 흰점박이 꽃무지 현탁액 동시 처리 후 부고환 지방의 크기 변화 측정>

고지방식이를 통한 비만 유도 동시 흰점박이꽃무지 현탁액 3000 mg/kg/day로 6주간 처리한 후 부고환 지방의 크기변화를 측정한 결과 약 20% 감소함을 확인할 수 있었음

㉔ DIO (diet induced obese) ICR계 마우스를 이용한 흰점박이꽃무지 현탁액 경구 투여 후 간 지방침착 정도 확인

: High fat diet (HFD 45% fat contain; Rodent diet D12492, Research diet, New Brunswick, NJ, USA)유도 동시 장수풍뎅이 현탁액을 6주간 100, 3000 mg/kg/day로 경구 투여하여 간에 침착된 지방의 정도를 확인하였음

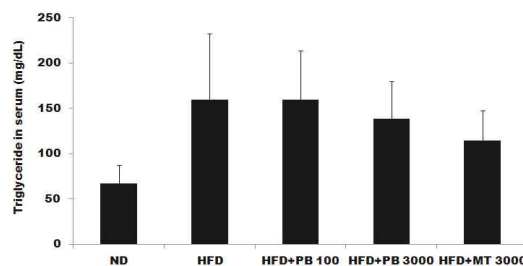


<고지방식이 및 흰점박이꽃무지 현탁액 동시 처리 후 간 지방침착 정도 측정>

고지방식을 통한 비만 유도 동시 흰점박이꽃무지 현탁액 100, 3000 mg/kg/day로 6주간 처리한 후 간 지방 침착 정도를 측정한 결과 고지방식으로 유도한 비만 mouse의 간과 비교시 흰점박이꽃무지 현탁액을 경구 투여한 mouse 군에서 농도 의존적으로 지방 침착 정도가 줄어드는 것을 확인할 수 있었음

㉕ DIO (diet induced obese) ICR계 마우스를 이용한 흰점박이꽃무지 현탁액 경구 투여 후 혈액학적 분석

: High fat diet (HFD 45% fat contain; Rodent diet D12492, Research diet, New Brunswick, NJ, USA)유도 동시 흰점박이꽃무지 현탁액을 6주간 100, 3000 mg/kg/day로 경구 투여한 후 혈액 내 중성지방함량

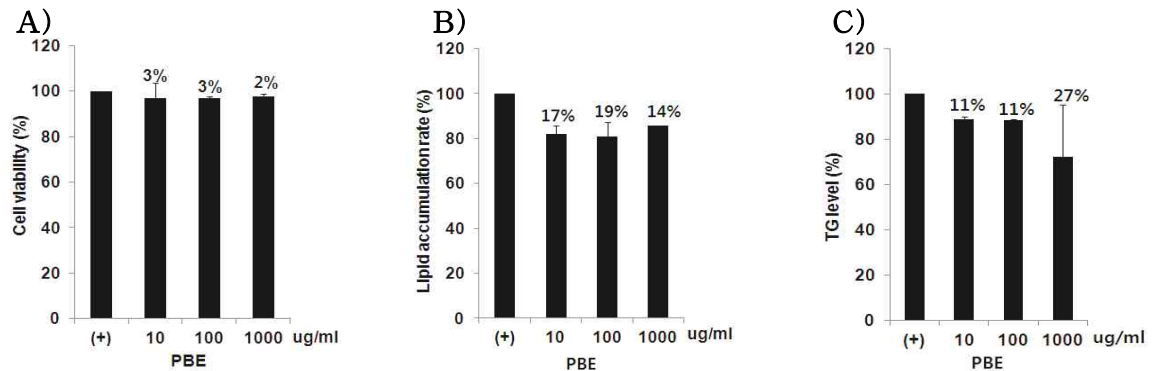


<고지방식이 및 흰점박이꽃무지 현탁액 동시 처리 후 혈액학적 분석: 중성지방함량>

High fat diet (HFD 45% fat contain; Rodent diet D12492, Research diet, New Brunswick, NJ, USA)유도 동시 흰점박이꽃무지 현탁액을 6주간 100, 3000 mg/kg/day로 경구 투여한 후 혈액 내 중성지방함량을 측정한 결과 3000 mg/kg/day 처리 군에서 약 13% 혈액내 중성지방 함량이 감소함을 확인하였음

① 비만유도 후 PBE 처리 시 항비만 효능 검증

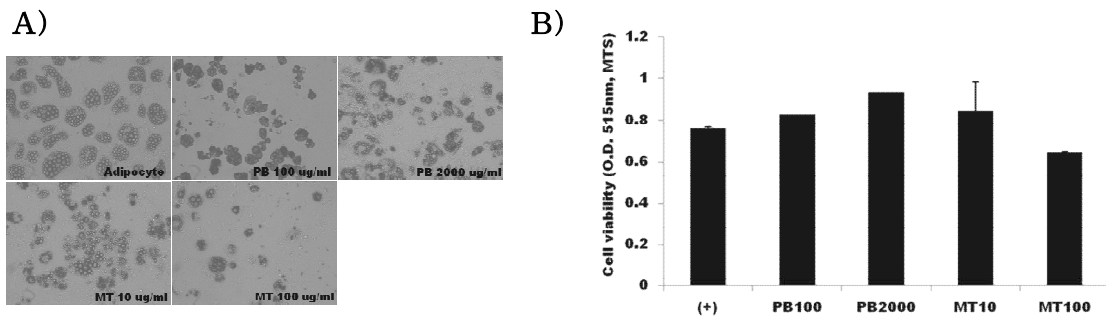
㉞ PBE의 성숙한 지방세포 사멸효과 확인



<성숙한 지방세포에 PBE 처리후 세포생존률(A), 총지방축적률(B) 및 중성지방합성률(C) 분석>

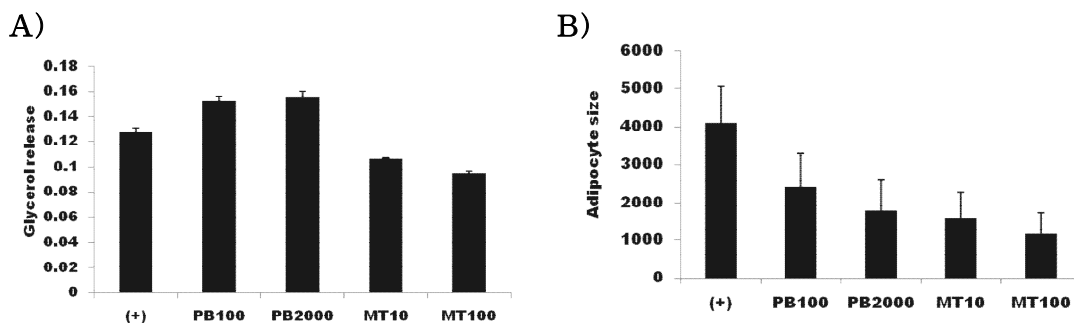
지방전구세포를 성숙한 지방세포로 분화시킨 후 PBE 24시간 처리한 다음 MTS로 세포 생존률 확인을 통해 PBE의 지방세포사멸 효과를 확인하였으며, 이 때 총지방축적률 및 중성지방합성률 또한 감소됨을 확인함으로써 PBE는 비만에 대한 치료효과가 있음을 추정할 수 있음

㉟ 지방세포 분화 후 흰점박이꽃무지 추출물의 지방분해에 미치는 영향



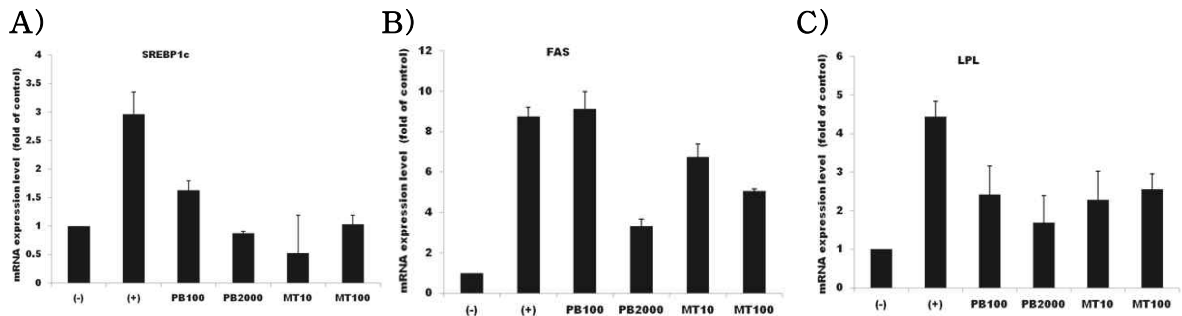
<지방세포 분화 유도 후 흰점박이꽃무지 추출물 (PB) 처리에 대한 Oilred O staining(A)과 MTS에 의한 세포생존을 측정(B)>

2013년 보고서에 따르면 성숙한 지방세포에 대한 지방세포 사멸효과의 데이터를 제시한 바 있으나 재반복하여 검증한 결과 지방세포 사멸효과를 확인할 수 없었음 이에 성숙한 지방세포에 대한 흰점박이 꽃무지 추출물의 지방세포 사멸효과에 대한 데이터를 정정 보고함



<지방세포 분화 유도 후 흰점박이꽃무지 추출물 처리에 대한 glycerol 방출양 (A)과 지방세포 크기 측정 (B)>

지방전구세포를 지방세포로 분화 유도한 후 흰점박이꽃무지 추출물 72시간 처리 후 지방세포에서 중성지방이 분해되면서 방출되는 glycerol 방출량을 측정해본 결과 흰점박이꽃무지 추출물 2000 ug/ml 처리 군에서 약 21% 가량 glycerol 방출량이 증가하는 것을 확인할 수 있었으며, 또한 이에 지방세포 크기를 측정해본 결과 약 2000 ug/ml 처리 군에서 약 60% 이상 지방세포의 크기가 줄어드는 것을 확인할 수 있었음



<지방세포 분화 유도 후 흰점박이꽃무지 추출물(AD) 72 h 처리 후 지방합성 관련 유전자 발현 분석>

㉔ DIO (diet induced obese) ICR계 마우스를 이용한 흰점박이꽃무지 유충 현탁액의 체중 감소효과 확인

: High fat diet (HFD 60% fat contain; Rodent diet D12492, Research diet, New Brunswick, NJ, USA)유도 후 흰점박이꽃무지 유충 현탁액을 6주간 100, 3000 mg/kg/day로 경구 투여하여 체중감소효과를 측정하였으며, 양성대조군으로 마테 추출물을 사용하였음

Group	Body weight (g)		Weight gain (g)
	Initial	Final	
ND	30.04±1.58	50.06±4.26	0.67±0.19
HFD	30.4±0.75	72.13±2.43	1.37±0.11
HFD+PB100	29.32±1.21	67.64±3.36	1.31±0.17
HFD+PB3000	30.6±1.91	66.06±2.21	1.16±0.17
HFD+MT3000	30.4±1.62	66.68±1.77	1.20±0.15

<고지방식이로 비만 유도 후 흰점박이꽃무지 유충 현탁액 처리에 의한 체중감소 효과, n=7>

고지방식이를 통해 비만을 유도한 후 흰점박이꽃무지 유충 현탁액을 3000 mg/kg의 농도로 6주간 경구 투여 한 결과 고지방식이로 비만 유도 유도한 군에 비해 체중 증가율이 약 15% 감소하는 것을 확인할 수 있었음

㉕ DIO (diet induced obese) ICR계 마우스를 이용한 흰점박이꽃무지 유충 현탁액 경구투여 후 장기 상대 중량 측정

Diet groups	Relative organ weight (%)		
	Liver	Peripheral	Epididymal
ND	4.7253296	3.16819816	0.18298042
HFD	5.4551756	4.90508318	0.1577634
HFD+PB100	5.41336487	5.74992608	0.17482259
HFD+PB3000	4.64214351	5.22656171	0.19224947
HFD+MT3000	4.27930622	3.08462919	0.16297847

<고지방식이로 비만 유도 후 흰점박이꽃무지 유충 현탁액 처리에 의한 지방조직의 상대중량 측정, n=5>

고지방식을 통해 비만을 유도한 후 흰점박이꽃무지 유충 현탁액을 100, 3000 mg/kg의 농도로 경구투여 한 후 장기의 상대중량을 비교시 HFD group에 비해 3000 mg/kg/day로 경구투여한 군에서, 간조직 무게의 경우 약 약 14% 무게 감소가 관찰되었음

㉞ DIO (diet induced obese) ICR계 마우스를 이용한 흰점박이꽃무지 유충 현탁액 경구투여 후 혈액학적 분석

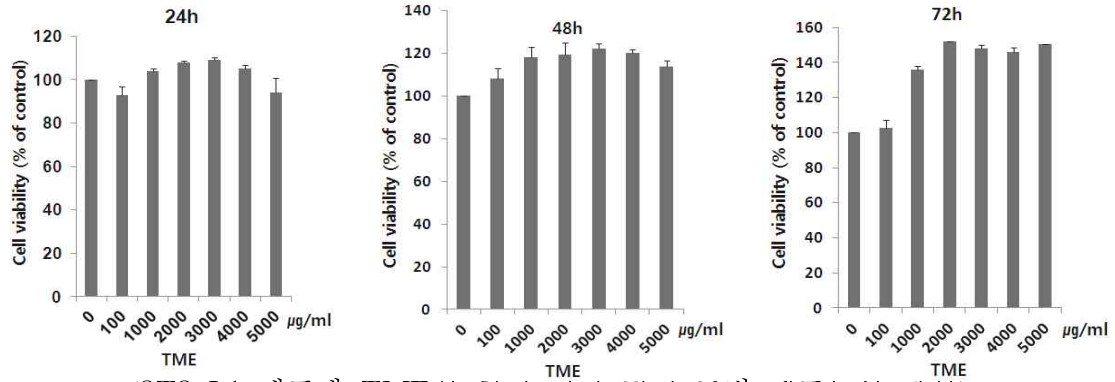
Groups	ALP	AST	ALT	T.Chol	TG	LDL	HDL
ND	47±28.9	663.6±104.1	78.8±15.8	171.6±18.7	71.7±11.7	23.1±6.1	>120
HFD	41.8±14.8	541.6±144.2	132.7±17.2	204.8±20.5	79.4±15.1	27.8±10.8	>120
HFD+PB100	39.8±6.9	663.4±128.7	119.5±13.7	214.2±15.3	93±22.7	23.7±9.4	>120
HFD+PB3000	34.2±8.8	493±91.7	89.6±30.8	203.3±27.2	109.7±16.1	18.8±7.3	>120
HFD+MT3000	33.7±4.2	599.5±71.4	141±41.6	183±19.5	85.6±14.8	16.6±2.8	>120

<고지방식이로 비만유도 후 흰점박이꽃무지 유충 현탁액 처리에 대한 혈액학적 분석, n=6>

High fat diet (HFD 60% fat contain; Rodent diet D12492, Research diet, New Brunswick, NJ, USA) 유도 후 흰점박이꽃무지 유충 현탁액을 6주간 100, 3000 mg/kg/day로 경구 투여한 후 혈액 내 간손상 지표 및 지질관련 지표를 측정된 결과 지방간 유도시 ALT의 함량이 증가함을 확인하였고, 이에 대해 흰점박이 꽃무지 유충 추출물 처리군의 경우 지방간지표인 ALT의 함량을 농도 의존적으로 각각 9%, 12% 감소시켰으며, 지질대사이상시 관찰되는 LDL의 수치의 경우에도 농도 의존적으로 각각 약 14%, 32% 감소함을 확인하였음

(나) 갈색거저리 추출물(TME)의 항비만 효능분석

- ① 비만유도와 동시에 TME 처리 시 항비만 효능 검증
- ② 지방전구세포에 TME 처리 후 세포 생존률 확인

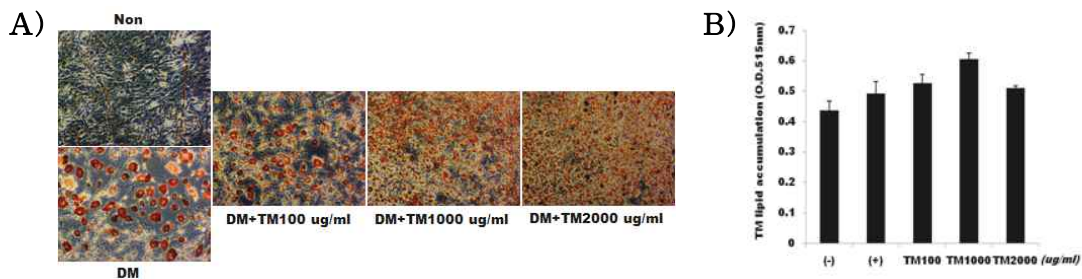


<3T3-L1 세포에 TME의 처리 시간 및 농도별 세포독성 확인>

3T3-L1 지방전구세포(한국세포주은행)을 이용하여 TME의 세포독성 측정을 위해 1×10^6 cells/well로 분주된 지방전구세포에 TME를 농도별(100, 500, 1000, 3000, 5000 $\mu\text{g/ml}$)로 처리하고 24, 48, 72시간 동안 배양 후 MTS assay 수행 결과, 5000 $\mu\text{g/ml}$ 의 고농도에서 72시간 동안 처리시에도 세포 독성이 없을 뿐만 아니라 TME 처리시 세포생존률이 약 50% 정도 증가됨을 확인하였음

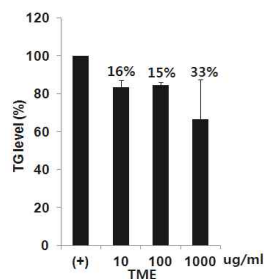
④ 지방세포 분화 유도시 TME 동시처리 후 지방세포 분화 여부 확인

- pre-adipocyte(3T3-L1) cell culture 후 differentiation inducer* 및 TME 동시처리



<지방세포 분화유도시 TM 처리후 oil-red O staining한 세포 이미지(A) 및 총지방축적량 분석(B)>

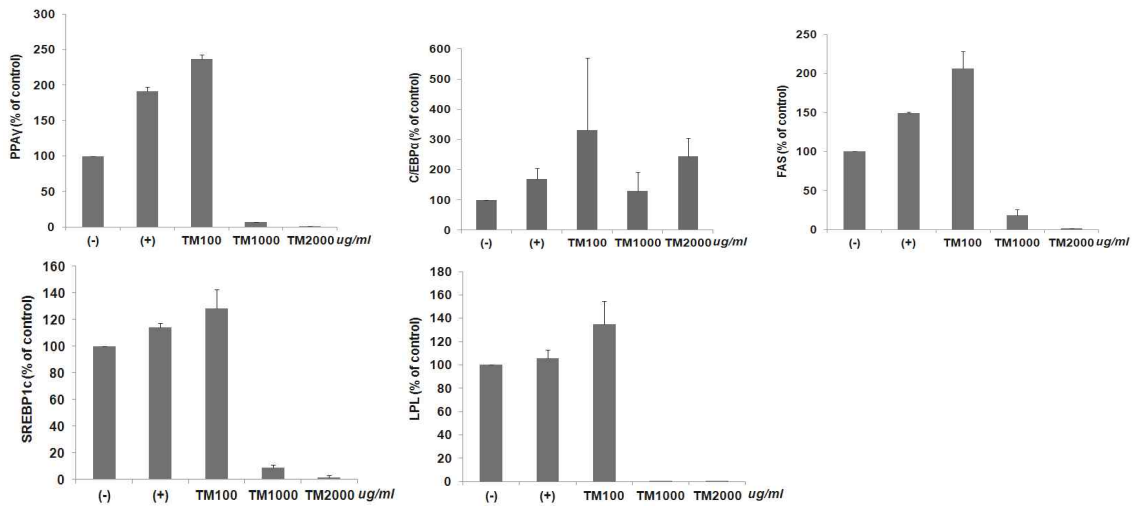
본 실험의 경우 2013년도 보고서에 지방세포 분화 유도 시 TM 동시처리한 후 8일째 oil-red O staining에 의해 지방세포 분화억제 효능을 확인한 결과, TM 2000 $\mu\text{g/ml}$ 농도의 처리군에서 약 19% 분화가 억제됨을 확인할 수 있었다고 보고한 바 있으나, 지속적인 검증 을 한 후 평균적으로 보았을 때 분화억제가 관찰되지 않는 바 TM에 의한 세포수준에서의 지방세포 분화 억제율은 관찰되지 않는 것으로 정정 보고 함



<지방세포 분화유도시 TME 처리후 중성지방량 분석>

지방세포 분화 유도시 TME 동시처리한 후 8일째 중성지방(triglyceride) 측정에 의해 지방 세포 분화억제 효능을 확인하였으며, 그 결과 TME 1000 $\mu\text{g/ml}$ 처리시 중성지방이 약 33% 감소함을 확인하였음

㉔ 지방세포 분화유도시 TME 동시처리 후 지방세포분화 및 지방합성관련 유전자 발현 억제 확인

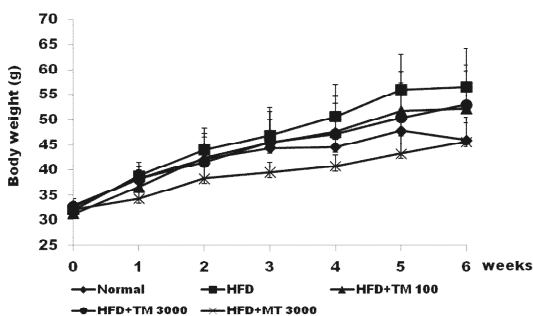


<지방세포 분화유도시 TME 처리후 지방세포분화(A) 및 지방합성(B) 관련 유전자 발현 분석>

지방전구세포를 지방세포로 분화 유도시 TME 동시처리 후 8일 경과시 지방세포 분화에 관여하는 전사인자 PPAR- γ 와 C/EBP α 유전자 및 지방합성에 관여하는 SREBP, FAS, LPL 및 SCD 유전자의 전사체 발현 양상을 real-time PCR을 통해 확인한 결과, PPAR γ 및 C/EBP α 와 같은 지방세포 분화관련 유전자 전사체의 발현은 1000 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 약 27% 이상 감소함을 확인하였고, 분화와 동시에 지방 합성에 관련하는 인자인 SREBP 및 지방합성 관련 유전자 발현은 1000 $\mu\text{g/ml}$ 이상의 농도에서 90% 이상 감소됨을 확인할 수 있었음. 이상의 결과를 통해 TME의 adipogenesis 억제 효과가 있음을 확인하였으므로 TME는 비만 예방에 효율적으로 사용가능할 것임을 추정할 수 있었음

㉕ DIO (diet induced obese) ICR계 마우스를 이용한 갈색거저리 현탁액의 체중감소효과 확인

: High fat diet (HFD 45% fat contain; Rodent diet D12492, Research diet, New Brunswick, NJ, USA)유도 동시갈색거저리 현탁액을 6주간 100, 3000 mg/kg/day로 경구 투여하여 체중감소효과를 측정하였으며, 양성대조군으로 마테 추출물을 사용하였음



Group	Body weight (g)		Weight gain (g)
	Initial	Final	
ND	32.95 \pm 1.33	46.07 \pm 3.28	0.40 \pm 0.13
HFD	32.01 \pm 1.37	56.53 \pm 7.64	0.76 \pm 0.29
HFD+TM 100	31.27 \pm 1.97	52.23 \pm 7.62	0.67 \pm 0.30
HFD+TM 3000	32.75 \pm 1.01	52.98 \pm 7.99	0.61 \pm 0.28
HFD+MT3000	32.10 \pm 1.33	45.72 \pm 4.74	0.42 \pm 0.18

<고지방식이 및 갈색거저리 현탁액 동시 처리에 의한 체중감소 효과, n=9>

→ 고지방식이를 통해 비만을 유도하는 동시에 갈색거저리현탁액을 3000 mg/kg의 농도로 경구 투여 한 결과 갈색거저리 현탁액 3000 mg/kg/day를 경구 투여한 경우 체중은 약 8% 정도 감소함을 확인하였음

㉞ DIO (diet induced obese) ICR계 마우스를 이용한 갈색거저리 현탁액 경구투여 후 장기 상대 중량 측정

: High fat diet (HFD 45% fat contain; Rodent diet D12492, Research diet, New Brunswick, NJ, USA)유도 동시 갈색거저리 현탁액을 6주간 100, 3000 mg/kg/day로 경구 투여하여 주변 지방조직 및 부고환 지방 조직의 상대중량을 측정

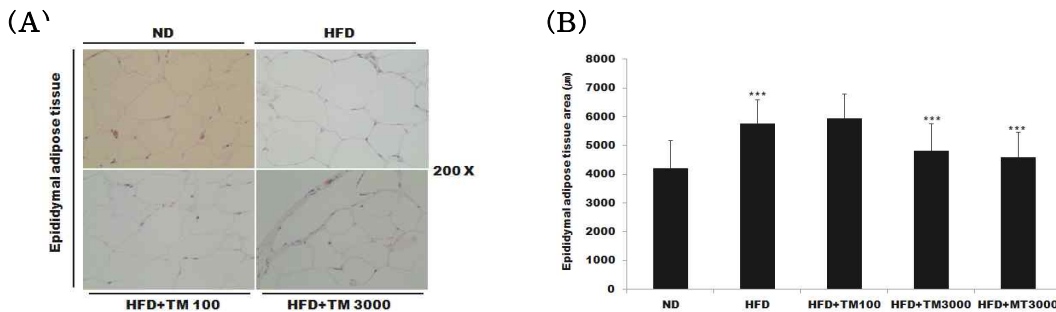
Diet groups	Peripheral fat	Epididymal fat
ND	3.55 ± 1.5	0.177 ± 0.01
HFD	7.52 ± 1.5	0.178 ± 0.03
HFD+TM 100	7.44 ± 1.8	0.161 ± 0.03
HFD+TM 3000	8.53 ± 2.5	0.146 ± 0.02
HFD+MT 3000	4.29 ± 0.9	0.185 ± 0.02

<고지방식이 및 갈색거저리 현탁액 동시 처리에 의한 지방조직의 상대중량 측정, n=3>

고지방식이를 통해 비만을 유도하는 동시에 갈색거저리 현탁액을 100, 3000 mg/kg의 농도로 경구 투여 한 결과 부고환지방의 상대중량의 각각 10%, 17.9%의 무게 감소를 확인할 수 있었음

㉞ DIO (diet induced obese) ICR계 마우스를 이용한 갈색거저리 현탁액 경구 투여 후 부고환 지방의 크기 변화 확인

: High fat diet (HFD 45% fat contain; Rodent diet D12492, Research diet, New Brunswick, NJ, USA)유도 동시 갈색거저리 현탁액을 6주간 100, 3000 mg/kg/day로 경구 투여하여 내장 지방량을 확인 할 수 있는 생식기 지방의 크기 확인을 위해 부고환 지방의 크기를 측정하였음

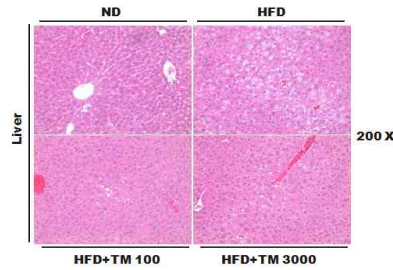


<고지방식이 및 갈색거저리 현탁액 동시 처리 후 부고환 지방의 크기 변화 측정>

고지방식이를 통한 비만 유도 동시 갈색거저리 현탁액 3000 mg/kg/day로 6주간 처리한 후 부고환 지방의 크기변화를 측정한 결과 약 16% 감소함을 확인할 수 있었음

㉞ DIO (diet induced obese) ICR계 마우스를 이용한 갈색거저리 현탁액 경구 투여 후 지방침착 정도 확인

: High fat diet (HFD 45% fat contain; Rodent diet D12492, Research diet, New Brunswick, NJ, USA)유도 동시 갈색거저리 현탁액을 6주간 100, 3000 mg/kg/day로 경구 투여하여 간에 침착된 지방의 정도를 확인하였음

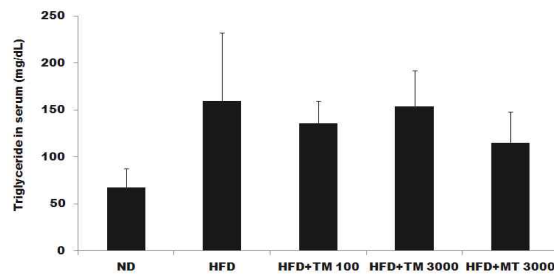


<고지방식이 및 갈색거저리 현탁액 동시 처리 후 간 지방침착 정도 측정>

고지방식이를 통한 비만 유도 동시 갈색거저리 현탁액 100, 3000 mg/kg/day로 6주간 처리한 후 간 지방 침착 정도를 측정한 결과 고지방식으로 유도한 비만 mouse의 간과 비교시 갈색거저리 현탁액을 경구 투여한 mouse 군에서 농도 의존적으로 지방 침착 정도가 줄어드는 것을 확인할 수 있었음

㉞ DIO (diet induced obese) ICR계 마우스를 이용한 갈색거저리 현탁액 경구 투여 후 혈액학적 분석

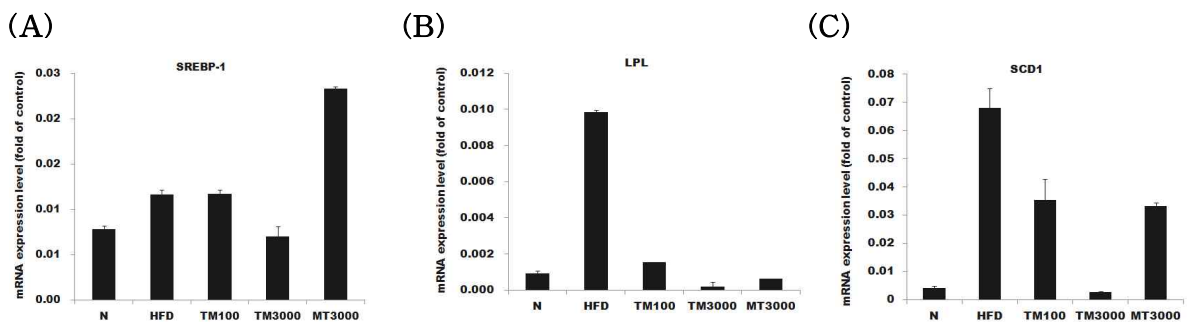
: High fat diet (HFD 45% fat contain; Rodent diet D12492, Research diet, New Brunswick, NJ, USA)유도 동시 갈색거저리 현탁액을 6주간 100, 3000 mg/kg/day로 경구 투여한 후 혈액 내 중성지방함량 분석



<고지방식이 및 갈색거저리 현탁액 동시 처리 후 혈액학적 분석: 중성지방함량>

High fat diet (HFD 45% fat contain; Rodent diet D12492, Research diet, New Brunswick, NJ, USA) 유도 동시 갈색거저리 현탁액을 6주간 100, 3000 mg/kg/day로 경구 투여한 후 혈액 내 중성지방함량을 측정한 결과 유의적인 차이는 확인할 수 없었음

㉞ DIO (diet induced obese) ICR계 마우스를 이용한 갈색거저리 현탁액 경구 투여 후 부고환 지방조직에서 지방세포 분화 및 지방합성 관련 유전자 발현 억제 확인

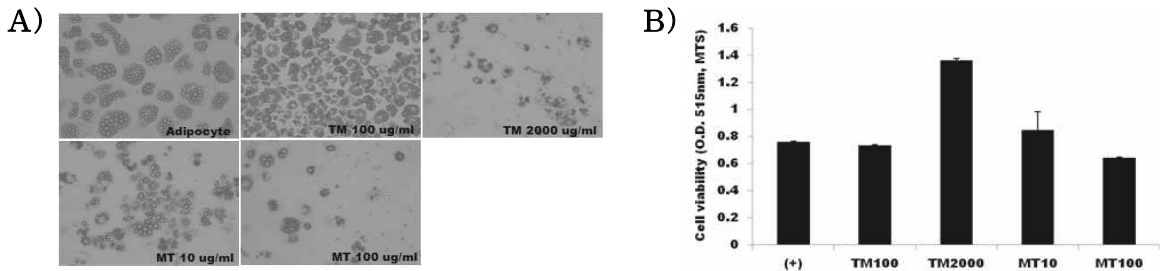


<지방세포 분화 유도시 갈색거저리 현탁액 처리 후 부고환 지방에서 지방합성 관련 유전자 발현 측정>

High fat diet (HFD 45% fat contain; Rodent diet D12492, Research diet, New Brunswick, NJ, USA) 유도 동시 갈색거저리 현탁액을 6주간 100, 3000 mg/kg/day로 경구 투여한 후 부고환 지방 조직으로부터 지방합성 관련 유전자 발현을 확인한 결과 고지방식으로 비만 유도 한 군에 비해 각각의 유전자 발현 수준이 유의적으로 감소함을 확인할 수 있었음

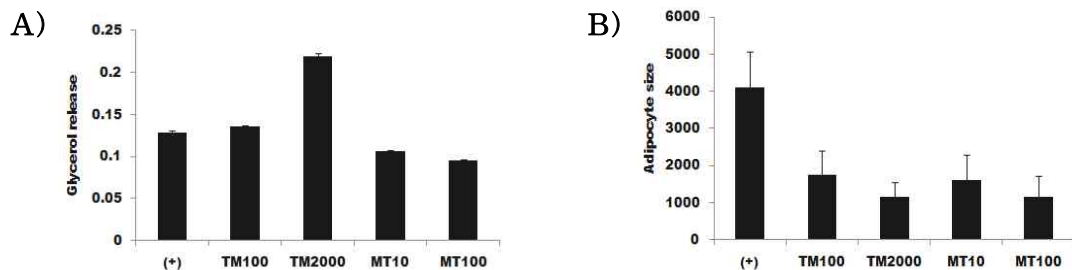
② 비만유도 후 TME 처리 시 항비만 효능 검증

㉞ 지방세포 분화 후 갈색거저리 추출물의 지방분해에 미치는 영향



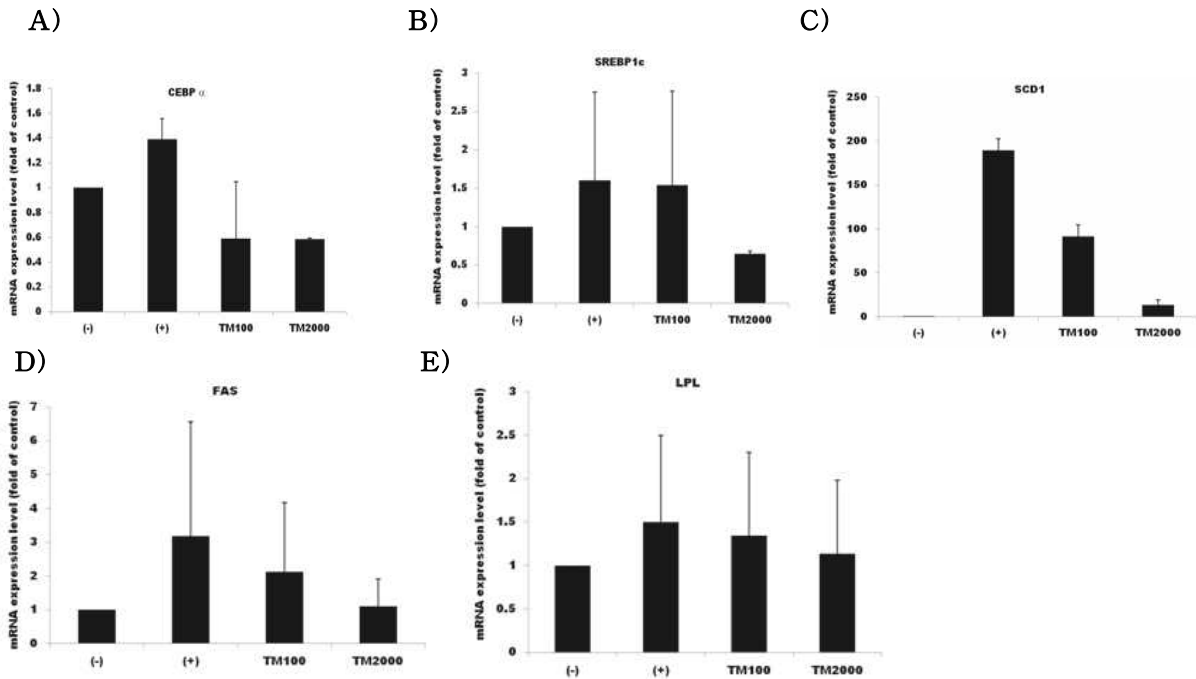
<지방세포 분화 유도 후 갈색거저리 (TM) 처리에 대한 Oilred O staining(A)과 MTS에 의한 세포생존율 측정(B)>

2013년 보고서에 제시한 성숙한 지방세포에 대한 지방세포 사멸효과에 대한 데이터를 재반복하여 검증한 결과 지방세포 사멸효과를 확인할 수 없었음. 이에 성숙한 지방세포에 대한 갈색거저리 추출물의 지방세포 사멸효과에 대한 데이터를 정정보고함



<지방세포 분화 유도 후 갈색거저리 추출물 처리에 대한 glycerol 방출양(C)과 지방세포 크기 측정(D)>

지방전구세포를 지방세포로 분화 유도한 후 갈색거저리 추출물 72시간 처리 후 지방세포에서 중성지방이 분해되면서 방출되는 glyceorl 방출량을 측정해본 결과 갈색거저리 추출물 2000 ug/ml 처리 군에서 약 71% 가량 glycerol 방출량이 증가하는 것을 확인할 수 있었으며, 또한 이에 지방세포 크기를 측정해본 결과 약 2000 ug/ml 처리 군에서 약 60% 이상 지방세포의 크기가 줄어드는 것을 확인할 수 있었음



<지방세포 분화 유도 후 갈색거저리 추출물(TM) 72 h 처리 후 지방분화 및 지방합성 관련 유전자 발현 분석>

지방세포 분화 후 장수풍뎅이 추출물 72 h 처리 후 지방합성 관련 유전자 발현 분석을 한 결과 C/EBP α , SREBP1c, SCD1, FAS 및 LPL 유전자 발현율이 크게 감소함을 확인할 수 있었음. 위의 결과에 따르면 갈색거저리 추출물의 지방세포 사멸효과는 확인할 수 없었으나, 성숙한 지방세포의 중성지방 합성을 억제함으로써 지방세포의 크기를 현저하게 줄이며 지방합성에 관여하는 유전자의 발현을 감소시킴으로써 갈색거저리 추출물은 항비만 활성을 갖는다고 할 수 있음

㉞ DIO (diet induced obese) ICR계 마우스를 이용한 갈색거저리 유충 현탁액의 체중감소 효과확인

Group	Body weight (g)		Weight gain (g)
	Initial	Final	
ND	30.04±1.58	50.06±4.26	0.67±0.19
HFD	30.4±0.75	72.13±2.43	1.37±0.11
HFD+TM100	29.31±0.87	66.06±3.68	1.25±0.16
HFD+TM3000	29.6±1.10	60.8±4.56	1.05±0.19
HFD+MT3000	30.4±1.62	66.68±1.77	1.20±0.15

<고지방식이로 비만 유도 후 갈색거저리 유충 현탁액 처리에 의한 체중감소 효과, n=6>

고지방식이 (HFD 60% fat contain; Rodent diet D12492, Research diet, New Brunswick, NJ, USA)를 통해 비만을 유도한 후 갈색거저리 유충 현탁액을 3000 mg/kg의 농도로 6주간 경구투여 한 결과 고지방식이로 비만 유도 유도한 군에 비해 체중 증가율이 약 23% 감소하는 것을 확인할 수 있었음

㉔ DIO (diet induced obese) ICR계 마우스를 이용한 갈색거저리 유충 현탁액 경구투여 후 장기상대 중량 측정

Diet groups	Relative organ weight (%)		
	Liver	Peripheral	Epididymal
ND	4.7253296	3.16819816	0.18298042
HFD	5.4551756	4.90508318	0.1577634
HFD+TM100	4.66226034	6.51372351	0.19677094
HFD+TM3000	4.65888158	4.68366228	0.16899671
HFD+MT3000	4.27930622	3.08462919	0.16297847

<고지방식이로 비만 유도 후 갈색거저리 유충 현탁액 처리에 의한 지방조직의 상대중량 측정, n=5>

고지방식이를 통해 비만을 유도한 후 갈색거저리 유충 현탁액을 100, 3000 mg/kg의 농도로 경구투여 한 후 장기의 상대중량을 비교시 HFD group에 비해 3000 mg/kg/day로 경구투여한 군에서, 간조직 무게의 경우 약 약 14% 무게 감소가 관찰되었음

㉕ DIO (diet induced obese) ICR계 마우스를 이용한 갈색거저리 유충 현탁액 경구 투여 후 혈액학적 분석

Groups	ALP	AST	ALT	T.Chol	TG	LDL	HDL
ND	47±28.9	663.6±104.1	78.8±15.8	171.6±18.7	71.7±11.7	23.1±6.1	>120
HFD	41.8±14.8	541.6±144.2	132.7±17.2	204.8±20.5	79.4±15.1	27.8±10.8	>120
HFD+TM100	38.2±6.6	539±97.5	122.7±13.1	197.2±25.3	85.4±15.3	24.3±9.7	>120
HFD+TM3000	38.7±4.2	477.2±83.8	101.7±19.5	188±24.8	91.7±14.4	19.6±7.4	>120
HFD+MT3000	33.7±4.2	599.5±71.4	141±41.6	183±19.5	85.6±14.8	16.6±2.8	>120

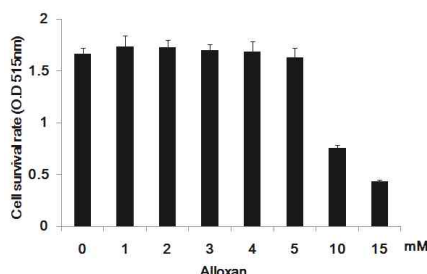
<고지방식이로 비만유도 후 갈색거저리 유충 현탁액 처리에 대한 혈액학적 분석, n=5>

High fat diet 유도 후 갈색거저리 유충 현탁액을 6주간 100, 3000 mg/kg/day로 경구 투여한 후 혈액 내 간손상 지표 및 지질관련 지표를 측정된 결과 지방간 유도시 ALT의 함량이 증가함을 확인하였고, 이에 대해 갈색거저리 유충 추출물 처리군의 경우 지방간지표인 ALT의 함량을 농도 의존적으로 각각 7%, 23% 감소시켰으며, 지질대사 이상시 관찰되는 LDL의 수치도 농도 의존적으로 각각 약 12%, 29% 감소함을 확인하였으며, 콜레스테롤 수치 역시 각각 농도 의존적으로 3%, 8% 감소함을 확인하였음

(3) 곤충 추출물의 항당뇨 효능 검증

(가) 췌장세포인 HIT-T15에서 당뇨 유발 조건 확립

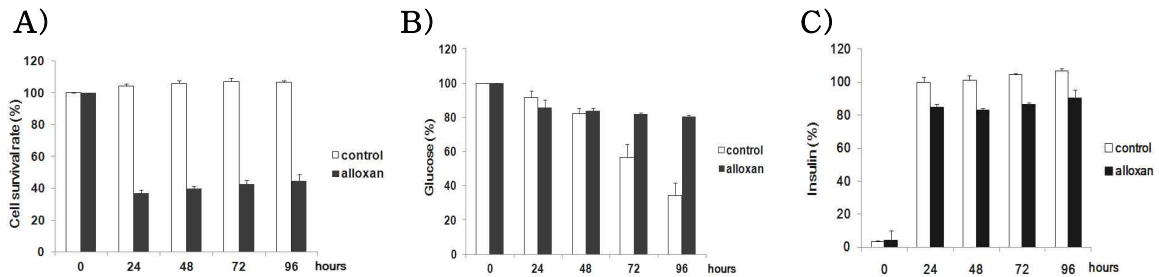
① 췌장세포에 alloxan 처리 농도별 세포 생존률 확인 : 반수치사농도(LD₅₀) 확인



<Alloxan 처리 농도별 췌장세포 생존률 분석>

HIT-T15 cell(한국세포주은행)에 alloxan으로 당뇨를 유발하기 위해 alloxan 처리 후 세포 반수치사농도를 측정하였음. 2×10^5 cells/well로 분주된 췌장세포에 alloxan을 농도별(0, 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15 mM)로 1시간 처리하고 배지 교체 후 23시간 동안 배양한 다음 MTS assay 수행 결과, 10 mM의 농도에서 약 50%의 세포독성을 확인하였고, 추후 췌장세포를 이용한 실험에 10 mM alloxan을 사용하였음

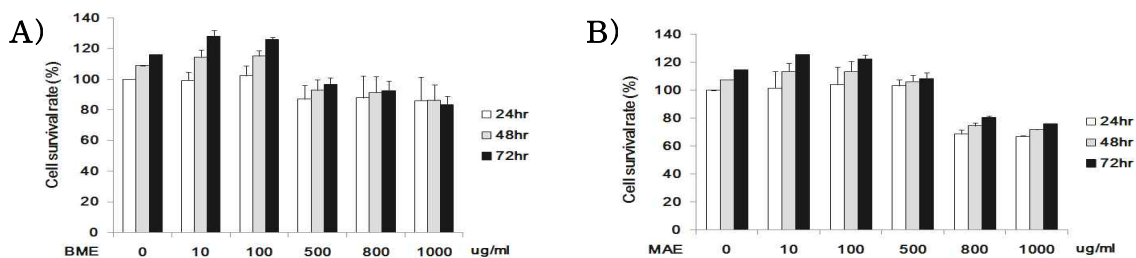
② 반수치사농도로 alloxan 처리한 췌장세포에서 시간경과별 세포생존률과 glucose 및 insulin 양 분석



<Alloxan 처리후 시간경과별 세포생존률(A), glucose(B) 및 insulin(C) 분석>

Alloxan으로 췌장세포(HIT-T15 cell)에 당뇨를 효율적으로 유발했는지를 확인하기 위하여 2×10^5 cells/well로 분주된 췌장세포에 alloxan을 10 mM로 처리하고 0, 24, 48, 72, 96시간 경과 후 정상군 대비 alloxan 처리군의 시간경과별 생존률과 glucose 및 insulin 양을 확인한 결과, 세포생존률은 정상 대비 약 40% 였고, 96시간 경과시 media 내 glucose양은 정상군에서는 무처리 대비 약 70%정도 감소된 반면 alloxan 처리군에서는 약 20%정도만이 감소되었으므로 alloxan 처리시 media 내에 있는 glucose가 세포내로 효율적으로 유입되지 않음을 확인할 수 있었고, insulin도 alloxan 처리시 다소 감소되었으므로 insulin 합성이 다소 저해됨을 확인할 수 있었음

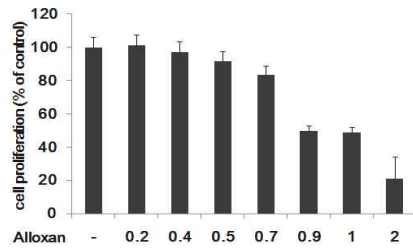
③ 양성대조로 사용할 누에추출물(*Bombyx mori* extract, BME) 및 뽕잎추출물(*Morus alba* extract, MAE)의 무해독성용량 확인



<췌장세포에 BME(A) 및 MAE(B) 처리 후 세포생존률 분석>

췌장세포(HIT-T15 cell)에 BME 및 MAE를 각각 0, 10, 100, 500, 800, 1000 $\mu\text{g/ml}$ 로 처리하고 24, 48, 72시간 경과 후 세포생존률 확인 결과, BME의 경우 500 $\mu\text{g/ml}$ 에서 다소 독성이 있었고, MAE는 800 $\mu\text{g/ml}$ 이상에서 독성이 있었으므로 앞으로의 실험에서 대조로 사용시 BME 및 MAE 사용농도를 500 $\mu\text{g/ml}$ 로 결정하였음

- ④ free-glucose media에서 췌장세포인 HIT-T15에서 당뇨 유발 조건 확립
 : 췌장세포에 alloxan 처리 농도별 세포 생존률 확인 : 반수치사농도(LD₅₀) 확인

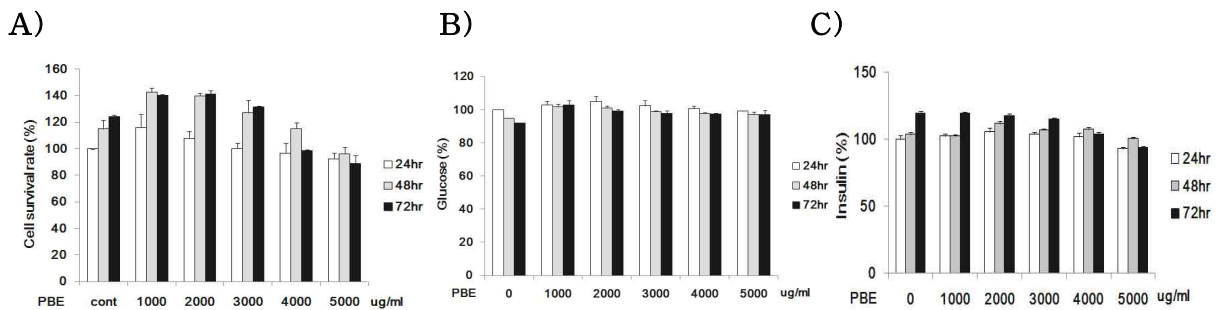


<Alloxan 처리 농도별 췌장세포 생존률 분석>

2×10⁵cells/well로 분주된 well에 free-glucose media로 교체한 뒤 췌장세포에 alloxan을 농도별(0, 0.2, 0.4, 0.5, 0.7, 0.9, 1, 2 mM)로 1시간 처리하고 배지 교체 후 23시간 동안 배양한 다음 MTS assay 수행 결과, 1 mM의 농도에서 약 50%의 세포독성을 확인하였고, 추후 췌장세포를 이용한 실험에 1 mM alloxan을 사용하였음

(나) 흰점박이꽃무지 추출물(PBE)의 항당뇨 효능분석

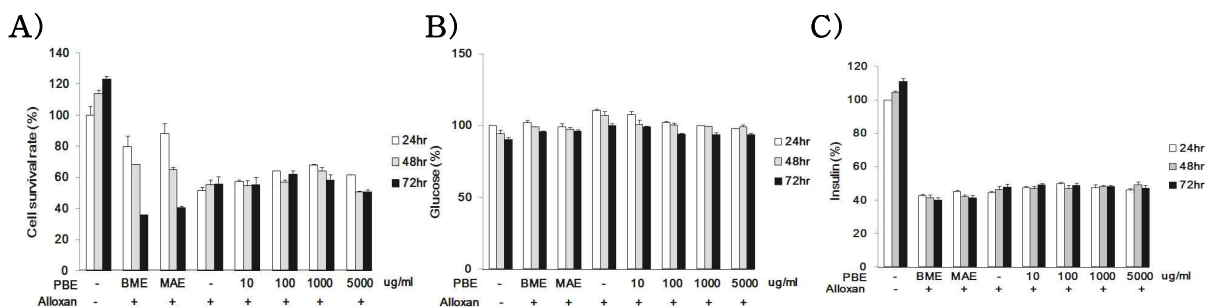
- ① 정상 췌장세포에 PBE 처리 후 세포 생존률과 glucose 및 insulin 양 확인
 ㉠ Normal media 사용한 경우



<정상췌장세포에 PBE 처리후 농도 및 시간경과별 세포생존률(A), glucose(B) 및 insulin(C) 분석>

정상 HIT-T15 cell에서의 PBE의 세포독성과 glucose 및 insulin 존재량을 측정하기 위해 2×10⁵ cells/well로 분주한 췌장세포에 PBE를 농도별(1000, 2000, 3000, 4000, 5000 μg/ml)로 처리하여 24, 48, 72시간 경과에 따른 세포생존률 확인 결과, 3000 μg/ml의 농도에서는 96시간까지 독성이 전무했으나 4000 μg/ml에서는 72시간부터, 5000 μg/ml의 농도에서는 48시간부터 세포생존률이 다소 감소함을 확인할 수 있었고, glucose 및 insulin의 양은 PBE 처리시 큰 차이가 없었으나 세포독성때문인지 insulin 합성량은 PBE 5000 μg/ml 처리시 다소 감소되었음

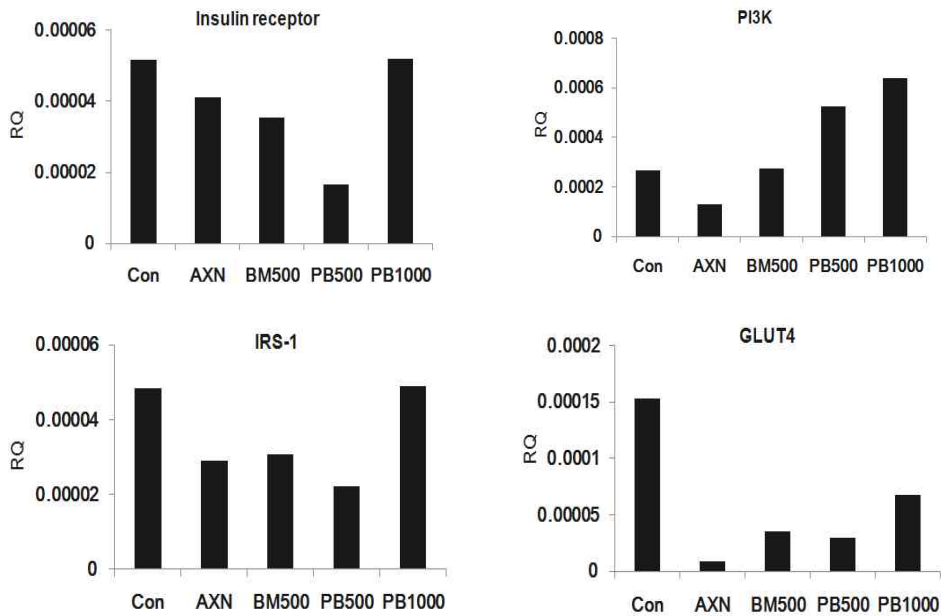
- ② Alloxan에 의해 손상된 췌장세포에 PBE 처리 후 세포 생존률과 glucose 및 insulin 양 확인



<손상된 췌장세포에 PBE 처리후 농도 및 시간경과별 세포생존률(A), glucose(B) 및 insulin(C) 분석>

Alloxan 처리에 의해 생존률, glucose의 세포내 유입 등이 손상된 HIT-T15 cell에 대한 PBE의 효능을 확인하기 위해 2×10^5 cells/well로 분주된 췌장세포에 alloxan 1시간 처리 후 alloxan이 들어있는 배지를 제거하고 새로운 배지에 PBE를 농도별(1000, 2000, 3000, 4000, 5000 $\mu\text{g}/\text{ml}$)로 처리하여 24, 48, 72시간 경과시 세포생존률 확인 결과 4000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도까지는 PBE 처리 농도 및 처리시간에 의존적으로 세포생존률이 증가됨을 확인할 수 있었고, insulin의 양도 다소 증가됨을 확인할 수 있었음

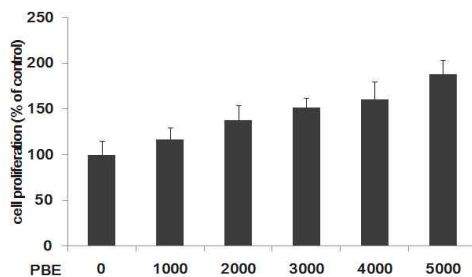
③ PBE 처리 후 insulin pathway 관련 유전자 발현양 변화 확인



<손상된 췌장세포에 PBE 처리 후 유전자 발현량 분석>

손상된 췌장세포에 PBE를 처리하여 혈당 감소에 관련 있는 인슐린 작용경로의 유전자 활성을 확인하기 위해 insulin receptor(IR), phosphatidylinositol 3-kinase(PI3K), insulin receptor substrate-1 (IRS-1), Glucose transporter type 4(GLUT4)의 발현량을 real-time PCR을 통해 확인한 결과, IR과 IRS-1, PI3K, GLUT4의 발현량이 추출물 처리시 당뇨유발 세포에 비해 크게 증가하여 세포 내 인슐린 저항성이 감소하고 glucose의 세포내 유입 등이 개선됨을 확인할 수 있었음

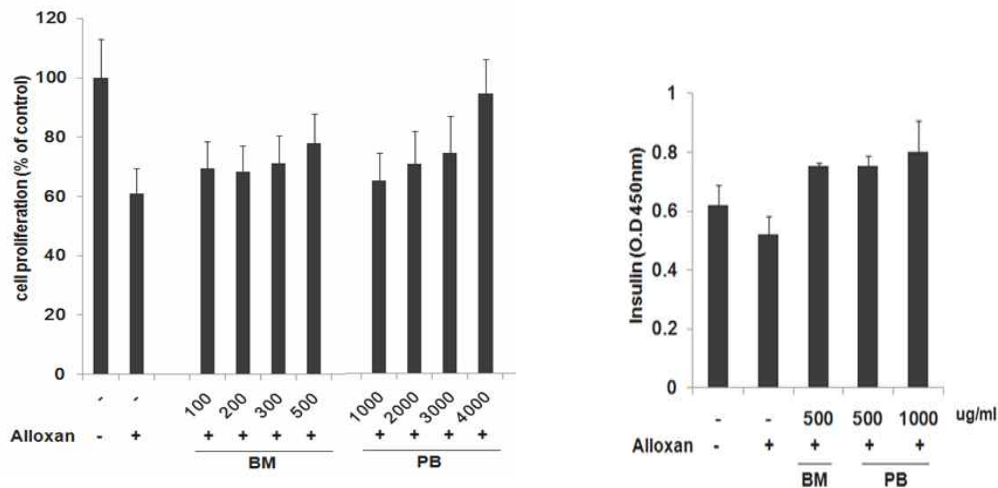
④ Free-glucose media 내에서 정상 췌장세포에 PBE 처리 후 세포 생존률 확인



<Free-glucose media 내에서 정상췌장세포에 PBE 처리 후 농도별 세포생존률 분석>

Free-glucose media 내에서 정상 HIT-T15 cell에서의 PBE의 세포독성을 측정하기 위해 2×10^5 cells/well로 분주된 well에 free-glucose media로 교체한 뒤 췌장세포에 PBE를 농도별(1000, 2000, 3000, 4000, 5000 $\mu\text{g}/\text{ml}$)로 처리하여 24시간 뒤 세포생존율을 확인 결과 세포생장이 크게 증가함

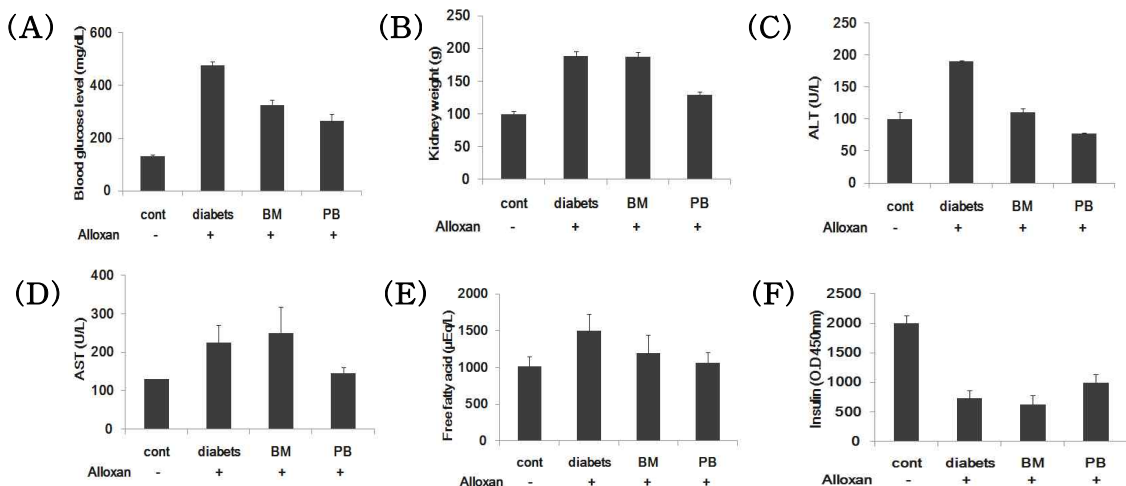
⑤ Free-glucose media에서 Alloxan에 의해 손상된 췌장세포에 PBE 처리 후 세포 생존률 및 insulin 양 확인



<Alloxan 처리 췌장세포에 PBE 처리 후 농도별 세포생존률, insulin 분석>

Alloxan 처리에 의해 생존률, glucose의 세포내 유입 등이 손상된 HIT-T15 cell에 대한 PBE의 효능을 확인하기 위해 2×10^5 cells/well로 분주된 well에 free-glucose media로 교체한 췌장세포에 alloxan 1시간 처리 후 alloxan이 들어있는 배지를 제거하고 새로운 배지로 교체하여 24시간 경과시 세포생존률 확인 결과 PBE 처리농도에 의존적으로 세포생존율이 증가하였고 4000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 처리한 경우 거의 정상과 유사한 수준으로 회복되었으며 insulin의 양도 500, 1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 크게 증가됨을 확인할 수 있었음

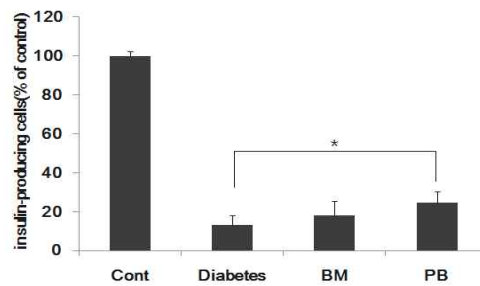
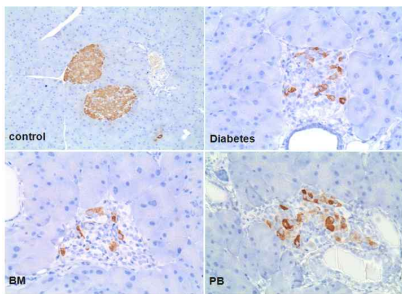
⑥ 흰점박이꽃무지 현탁액(PB)을 경구투여한 당뇨유발동물모델의 신장무게 및 혈액 분석



<당뇨유발동물모델에서 PB를 5주간 경구투여 후 혈당(A) 및 신장무게(B)와 혈액학적(C, D, E, F) 분석 cont, diabetis, BM(n=5), PB(n=5)>

Alloxan에 의해 당뇨가 유발된 ICR mouse에 대한 PB의 효능을 확인하기 위해 PB를 3000 mg/kg로 5주간 경구투여 후 동물의 혈당 및 신장의 무게, 혈액을 측정된 결과 혈당(A)의 경우 정상군에 비해 당뇨군의 혈당이 크게 증가하였고 누에군은 당뇨군에 비해 약 30%정도 혈당이 감소하였고 흰점박이꽃무지의 경우 45% 감소하였음. 신장 무게(B)의 경우 당뇨가 유발되면 신장의 무게가 증가하였고 누에는 변화가 없었으나 흰점박이꽃무지군에서 약 30%정도의 신장무게가 감소하였고, 인슐린 저항성과 관련이 있는 FFA(E)의 경우 당뇨가 유발이 되면 FFA가 증가하나 누에와 흰점박이꽃무지를 경구투여한 경우 FFA가 누에는 20%정도 흰점박이꽃무지는 30%정도 감소하였음. 간은 당분을 저장하는 곳으로서 우리 몸에 에너지가 필요할 때에 당분을 방출하는 곳으로, 당뇨병으로 당대사에 이상이 생기면 간이 영향을 받아 지방이 축적되면 비대해지면서 지방간이 되므로 이를 확인하기 위해 본 간수치의 경우 ALT(C), AST(D) 둘 다 정상군에 비해 당뇨군에서 약 50% 크게 증가하였으나 흰점박이꽃무지 처리군의 경우 ALT 및 AST 수치가 크게 감소하는 것을 확인할 수 있었음. 또한 혈액에서 insulin(F)을 확인한 결과 insulin 분비는 정상군에 비해 당뇨군이 크게 감소하였고, 당뇨군에 비해 누에는 차이가 없으나 PB의 경우 약 33%정도 증가하였음

⑦ 조직학적 분석 결과



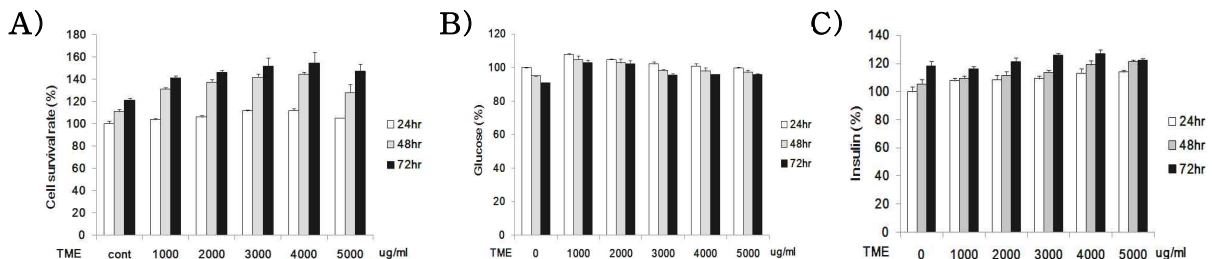
<췌장조직에 대하여 인슐린에 대한 면역조직화학적염색>

5주간 경구 투여한 동물을 해부한 뒤 췌장조직을 고정시킨 후 인슐린에 대한 면역조직화학적염색을 실행한 결과 당뇨유발 군에 비해 누에 추출물 처리 군 및 흰점박이꽃무지 현탁액 처리군의 경우 각각 약 4% 및 11% 췌장세포에서 염색된 인슐린의 양이 증가함을 확인할 수 있었음

(다) 갈색거저리 추출물(TME)의 항당뇨 효능분석

① 정상 췌장세포에 TME 처리 후 세포 생존률과 glucose 및 insulin 양 확인

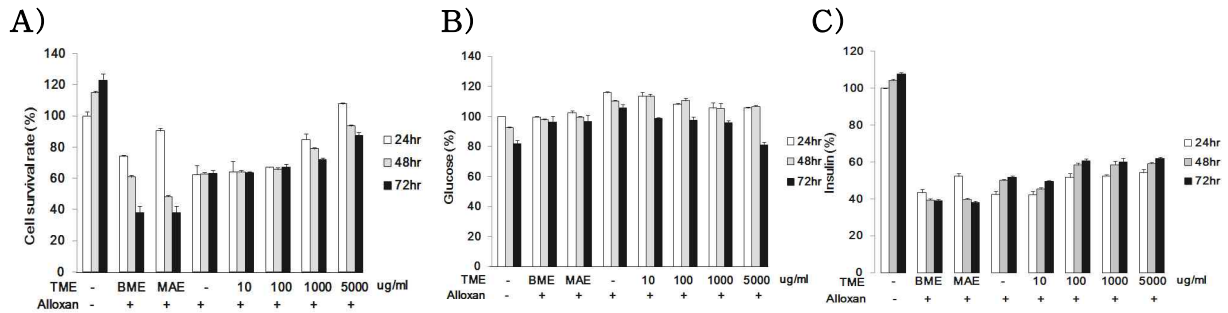
㉞ Normal media 사용한 경우



<정상췌장세포에 TME 처리후 농도 및 시간경과별 세포생존률(A), glucose(B) 및 insulin(C) 분석>

정상 HIT-T15 cell에서의 TME의 세포독성과 glucose 및 insulin 존재량을 측정하기 위해 2×10^5 cells/well로 분주한 췌장세포에 TME를 농도별(1000, 2000, 3000, 4000, 5000 $\mu\text{g/ml}$)로 처리하여 24, 48, 72시간 경과에 따른 세포생존률 확인 결과, 최고 농도인 5000 $\mu\text{g/ml}$ 로 96시간 처리시에도 독성이 전혀 없었으므로 TME의 췌장세포에 대한 독성은 없음을 확인할 수 있었고, TME 처리 전과 후에 glucose 양은 거의 유사하였으며, insulin 양은 TME 처리 농도에 의존적으로 증가하였음

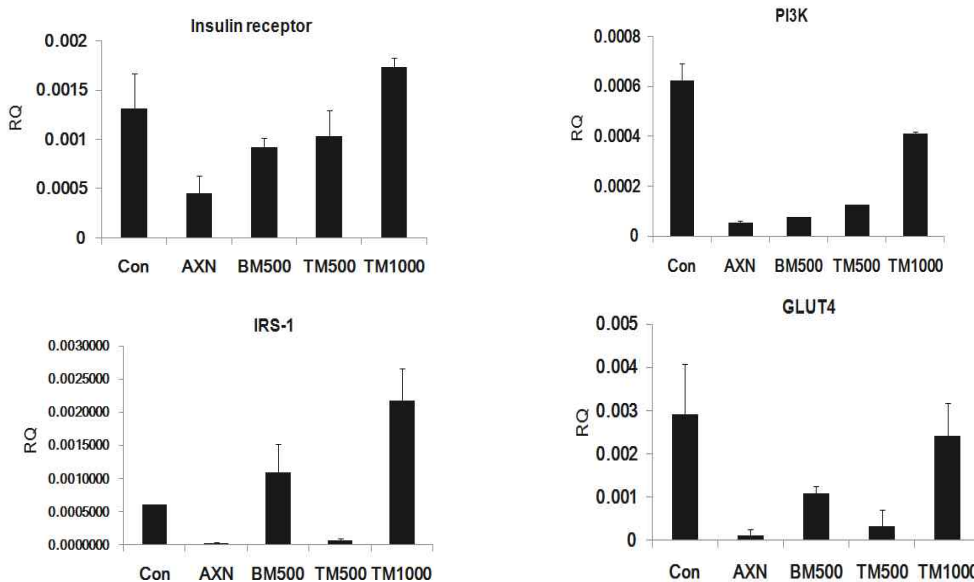
② Alloxan에 의해 손상된 췌장세포에 TME 처리 후 세포 생존률과 glucose 및 insulin 양 확인



<손상된 췌장세포에 TME 처리 후 농도 및 시간경과별 세포생존률 분석>

Alloxan 처리에 의해 생존률, glucose의 세포내 유입 등이 손상된 HIT-T15 cell에 대한 TME의 효능을 확인하기 위해 2×10^5 cells/well로 분주된 췌장세포에 alloxan 1시간 처리 후 alloxan이 들어있는 배지를 제거하고 새로운 배지에 TME를 농도별(1000, 2000, 3000, 4000, 5000 $\mu\text{g/ml}$)로 처리하여 24, 48, 72시간 경과시 세포생존률 확인 결과 alloxan만 처리한 경우에 비해 TME 처리 농도에 의존적으로 세포생존률이 증가되었고 5000 $\mu\text{g/ml}$ 처리시 거의 정상과 유사한 수준으로 회복되었으며, glucose 양도 alloxan 처리 시 보다 TME 5000 $\mu\text{g/ml}$ 처리 후 72시간 경과시 24% 감소하여 거의 정상 수준이었으며, insulin도 alloxan 처리 후 처리 농도 의존적으로 생성량이 증가되어 alloxan 처리 후 동시간대 대비 약 10% 정도 증가되었음

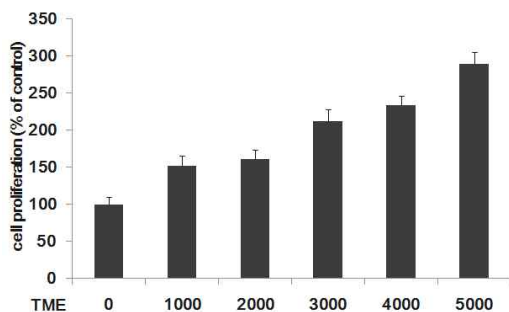
③ TME 처리 후 insulin pathway 관련 유전자 발현량 변화 확인



<손상된 췌장세포에 TME 처리 후 유전자 발현량 분석>

TME를 이용하여 혈당 감소에 관련 있는 인슐린 작용경로의 유전자 활성을 확인하기 위해 insulin receptor(IR), phosphatidylinositol 3-kinase(PI3K), insulin receptor substrate-1 (IRS-1), Glucose transporter type 4(GLUT4)의 발현양을 real-time PCR을 통해 확인한 결과 IR과 IRS-1, PI3K, GLUT4의 발현양이 추출물 처리시 당뇨유발세포에 비해 크게 증가하여 세포 내 인슐린 저항성이 감소하고 glucose의 세포내 유입 등이 개선됨을 확인할 수 있었음

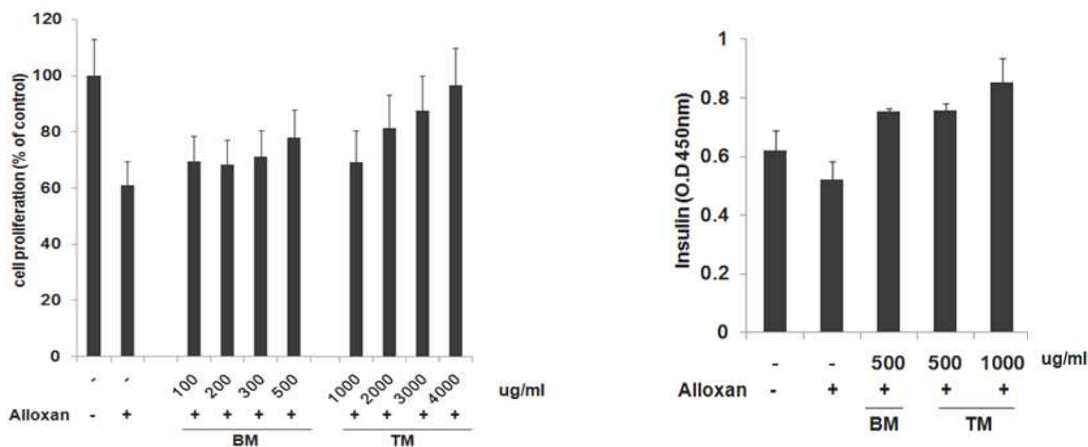
④ Free-glucose media 내에서 정상 췌장세포 TME 처리 후 세포 생존률 확인



<정상췌장세포에 TME 처리 후 농도별 세포생존률 분석>

Free-glucose media 내에서 정상 HIT-T15 cell에서의 TME의 세포독성을 측정하기 위해 2×10^5 cells/well로 분주된 well에 free-glucose media로 교체한 뒤 췌장세포에 TME를 농도별(1000, 2000, 3000, 4000, 5000 μg/ml)로 처리하여 24시간 뒤 세포생존율을 확인 결과, 독성은 없었고 세포생장률이 증가하는 경향을 나타내었음

⑤ Free-glucose media 내에서 Alloxan에 의해 손상된 췌장세포에 TME 처리 후 세포 생존률 및 insulin 양 확인

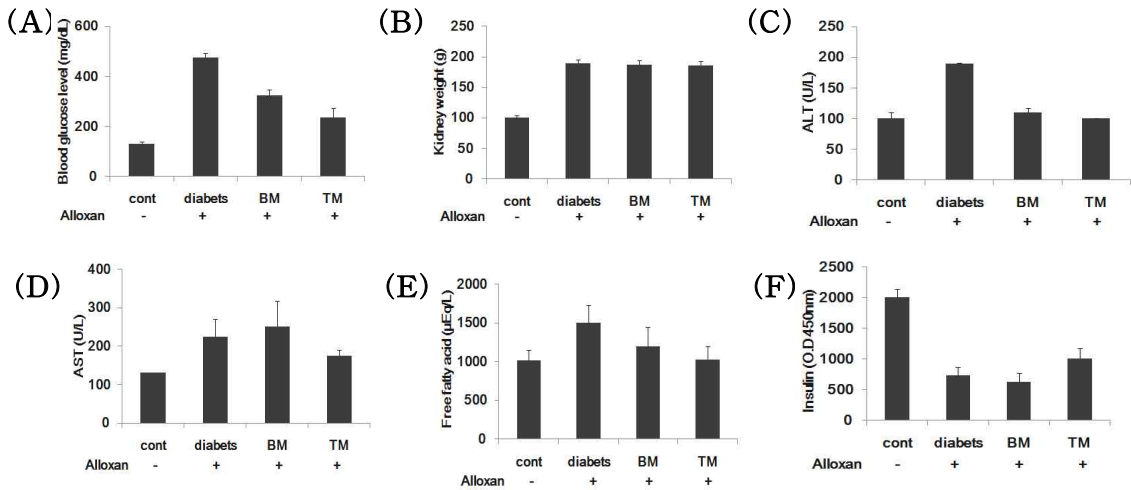


<손상된 췌장세포에 TME 처리 후 농도별 세포생존률 및 insulin 분석>

Alloxan 처리에 의해 생존률, glucose의 세포내 유입 등이 손상된 HIT-T15 cell에 대한 TME의 효능을 확인하기 위해 2×10^5 cells/well로 분주된 well에 free-glucose media로 교체한 췌장세포에 alloxan 1시간 처리 후 alloxan이 들어있는 배지를 제거하고 새로운 배지로 교체하여 24시간 경과시 세포생존률 확인 결과, TME 처리농도에 의존적으로 세포생존

율이 증가하였고 4000 $\mu\text{g/ml}$ 처리한 경우 거의 정상과 유사한 수준으로 회복되었으며 insulin의 양도 500, 1000 $\mu\text{g/ml}$ 에서 크게 증가됨을 확인할 수 있었음

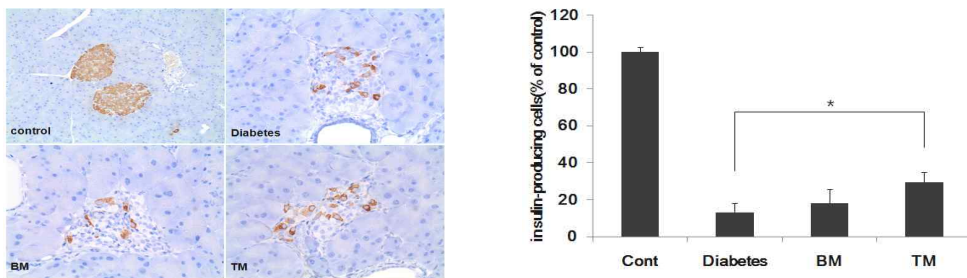
⑥ 갈색거저리 현탁액(TM)을 경구투여한 당뇨유발동물모델의 신장무게 및 혈액 분석



<당뇨유발동물모델에 TM를 5주간 경구투여 후 혈당(A) 및 신장무게(B)와 혈액학적(C, D, E, F) 분석 cont, diabetes, BM(n=5), TM(n=5)>

TM을 이용한 항당뇨 *in vivo* 조건 실험 분석을 한 결과 당뇨군이 정상군에 비해 혈청 glucose level이 크게 증가하였으나 TM을 처리한 군은 당뇨군에 비해 약 20% 정도 감소되었으며 혈액에서 insulin을 확인한 결과 insulin 분비는 정상군에 비해 당뇨군이 크게 감소되었고 TM의 경우 약 26%정도 증가한 것을 확인하였고 인슐린 저항성과 관련이 있는 FFA의 경우 당뇨가 유발이 되면 FFA가 증가하나 누에와 TM을 경구투여한 경우 FFA가 누에는 20%정도 감소하고 2종 곤충은 30%정도 감소되었으며 지방간이 유도되었는지 확인하기 위해 본 간수치의 경우 ALT, AST 둘 다 정상군에 비해 당뇨군에서 약 50% 크게 증가하였으나 ALT, AST는 PB에서 유의적으로 감소하는 것을 확인할 수 있었음

⑦ 조직학적 분석 결과



<췌장조직에 대하여 인슐린에 대한 면역조직화학적염색>

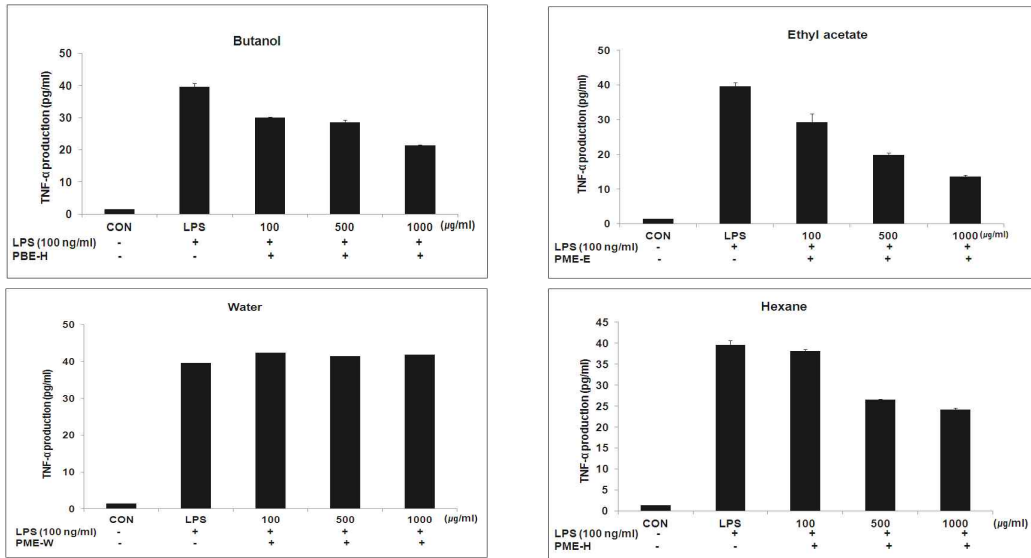
5주간 경구투여한 동물을 해부한 뒤 췌장조직을 고정시킨 후 인슐린에 대한 면역조직화학적염색을 실행한 결과 당뇨유발 군에 비해 누에 추출물 처리 군 및 갈색거저리 추출물 처리군의 경우 각각 약 4% 및 15% 췌장세포에서 염색된 인슐린의 양이 증가함을 확인할 수 있었음

바. 곤충 분획물을 이용한 다양한 효능 검정 : 제1협동과제에서 분획 후 제공

(1) 곤충 분획물의 항염증 효능 검정

(가) 흰점박이꽃무지 분획물의 항염증 효능분석

① 흰점박이꽃무지 분획물 처리시 사이토카인(TNF- α) 단백질 발현 억제 확인: ELISA

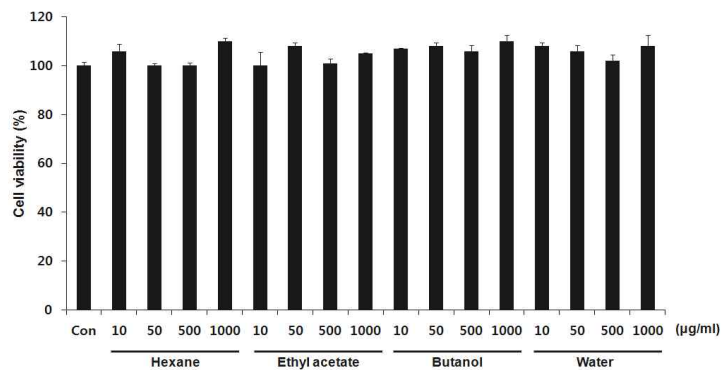


<흰점박이꽃무지 분획물 처리후 TNF- α 발현량 확인>

Butanol 및 Ethyl acetate 층에서 항염증 효능이 우수함을 확인

(나) 갈색거저리 분획물의 항염증 효능분석

① 갈색거저리 분획물 처리시 세포 성장률 및 독성 분석

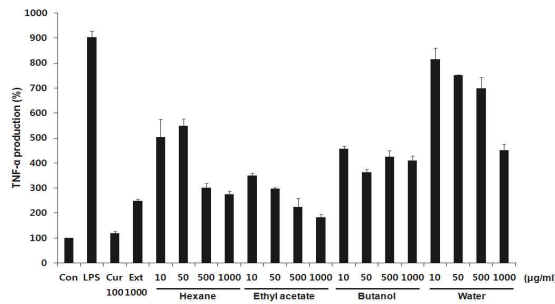


<대식세포(RAW264.7)에 대한 갈색거저리 분획물 독성 검정 : MTS assay>

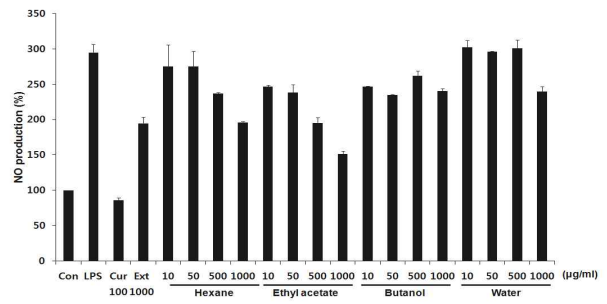
갈색거저리 4가지 추출용매에 대한 분획물은 모두 1000 μ g/ml의 농도까지 RAW264.7 세포에 대한 독성이 발견되지 않았으므로 최고 농도를 1000 μ g/ml의 농도로 정하고 처리하였음

② 갈색거저리 분획물 처리시 염증 매개물질의 생성 억제 확인

(A)



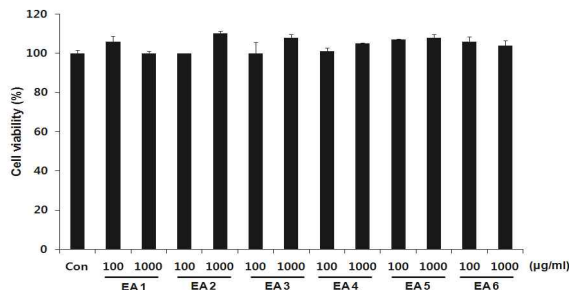
(B)



<염증유도된 RAW264.7 세포에 갈색거저리 분획물 처리후 염증매개물질 확인>

LPS에 의해 염증 유도된 RAW264.7 세포에 갈색거저리 분획물 처리 후 염증매개물인 TNF-α (A)와 NO (B)의 생성을 확인한 결과, 에틸아세테이트(EA) 분획에서 농도 의존적으로 염증매개물질의 발현이 억제됨을 확인하였으므로 EA층을 세부분획으로 나누어 항염증 활성을 추적함

③ 갈색거저리 EA 1차 분획물 처리시 세포 성장률 및 독성 분석

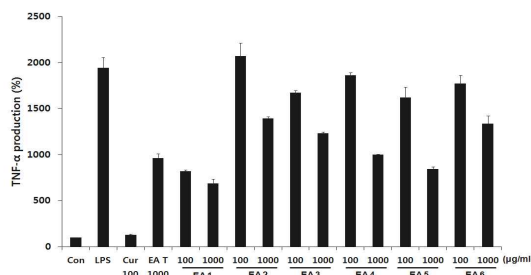


<대식세포(RAW264.7)에 대한 갈색거저리 EA 1차 분획물의 독성 검정 : MTS assay>

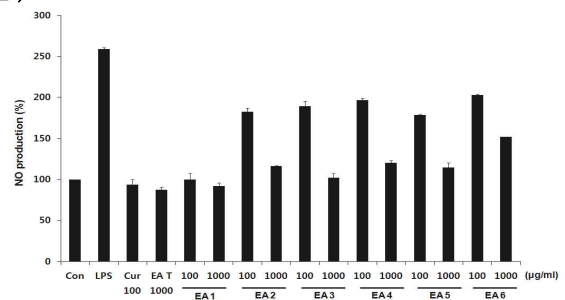
갈색거저리 EA 1차 분획물은 모두 1000 μg/ml의 농도까지 RAW264.7 세포에 대한 독성을 보이지 않았으므로 분획물의 최고 처리농도를 1000 μg/ml까지로 처리하였음

④ 갈색거저리 EA 1차 분획물 처리시 염증 매개물질의 생성 억제 확인

(A)



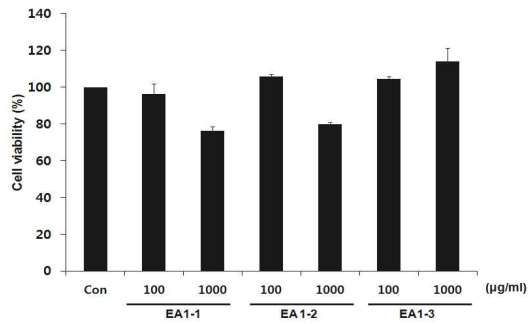
(B)



<염증유도된 RAW264.7 세포에 갈색거저리 EA 1차 분획물 처리후 염증매개물질 확인>

LPS에 의해 염증 유도된 RAW264.7 세포에 갈색거저리 EA 분획물 처리 후 염증매개물인 TNF-α (A)와 NO (B)의 생성을 확인한 결과, 에틸아세테이트(EA) 1번 분획에서 염증매개물질의 발현이 강하게 억제됨을 확인하였으므로 EA 1번 분획을 세부분획으로 나누어 항염증 활성을 추적함

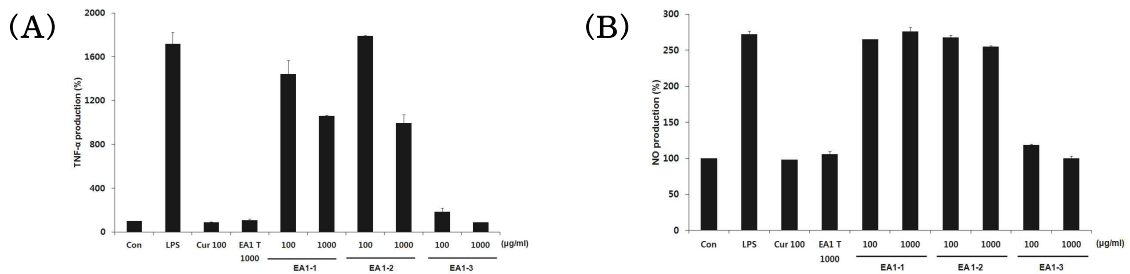
⑤ 갈색거저리 EA 2차 분획물 처리시 세포 성장률 및 독성 분석



<대식세포(RAW264.7)에 대한 갈색거저리 EA 2차 분획물의 독성 검정 : MTS assay>

갈색거저리 EA 1번 세부 분획물은 1번과 2번이 1000 µg/ml의 농도에서 독성이 발견되었으며 세부분획 3번이 독성이 발견되지 않음

⑥ 갈색거저리 EA 2차 분획물 처리시 염증 매개물질의 생성 억제 확인



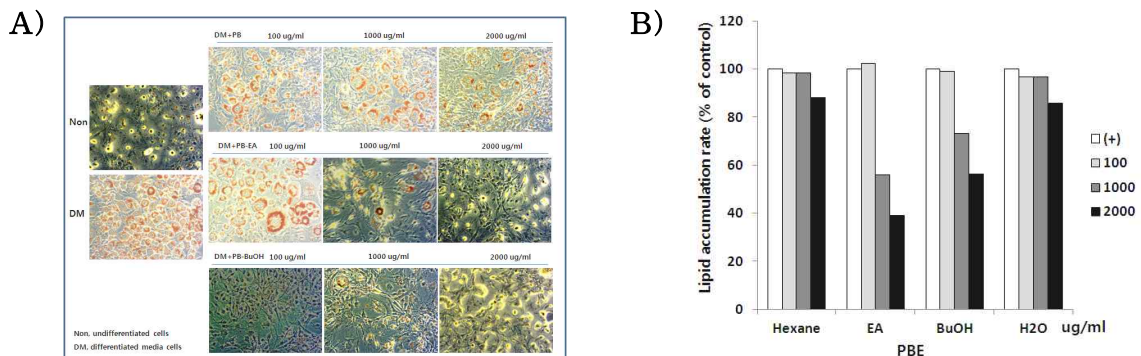
<염증유도된 RAW264.7 세포에 갈색거저리 EA 2차 분획물 처리후 염증매개물질 확인>

LPS에 의해 염증 유도된 RAW264.7 세포에 갈색거저리 EA 2차 분획물 처리 후 염증매개 물질인 TNF-α (A)와 NO (B)의 생성을 확인한 결과 EA 1번 분획물에서 재분획한 3번 분획물에서 염증매개물질의 발현이 강하게 억제됨을 확인하였으므로 이 분획을 세부분획으로 나누어 항염증 활성을 추적할 예정임

(다) 곤충 분획물의 항비만 효능 검정

① 흰점박이꽃무지 분획물의 항비만 효능분석

㉠ 지방세포 분화 유도시 흰점박이 꽃무지 분획물 동시처리 후 지방세포 분화 여부 확인



<지방세포 분화유도시 PBE의 분획물 처리후 oil-red O staining한 세포 이미지(A) 및 총지방축적량 분석(B)>

PBE를 극성 및 비극성 용액으로 4가지 분획으로 나눈 후 pre-adipocyte(3T3-L1) cell에 differentiation inducer 및 PBE 분획물 동시처리하고 8일 경과시 oil-red O staining에 의해

지방세포 분화억제 효능을 확인한 결과, PBE 분획 중 ethyl acetate 분획(PBE-E) 및 butanol 분획(PBE-B) 1000 $\mu\text{g/ml}$ 처리시 각각 45% 및 27%의 분화 억제률을 확인할 수 있었으므로 활성 분획이 PBE-E으로 이행됨을 확인할 수 있었음

사. 곤충의 식품으로서 국내·외 인정·허가 및 사용현황 등에 관한 자료 작성

(1) 식·약용 곤충 국외 이용 사례

(가) 곤충유래 신물질은 부가가치가 매우 높은 바이오신소재로 식·의약용 등 활용범위가 넓고 관련 산업에 미치는 영향이 지대하여 미래 성장동력원으로 개발 가치가 매우 높다고 판단함

- 미국, 일본 등 선진국은 곤충 생물을 통한 신소재 개발을 미개척 자원의 보고(寶庫)로 인식, 이들을 발굴하고 고부가 소재로 활용하려는 노력이 경쟁적으로 추진되고 있음

(나) 전 세계의 식용가치 있는 곤충(약 3600여종)으로는 나비목(1,560종), 메뚜기목(735종), 딱정벌레목(475종) 및 그 외 300여종이 알려져 있으며, 현재 일부곤충에 대한 식용으로의 개발이 진행 중에 있음

(다) 유엔 식량농업기구(FAO)가 기아 퇴치, 영양 보충, 환경오염 저감을 위한 신무기로 식용 곤충을 지목했으며, 인류, 가축, 애완동물의 식량으로 식용 곤충을 적극 권장하였음 ('13. 5.)

- FAO 보고서에서 전 세계 20억 명이 이미 단백질과 미네랄이 풍부한 곤충을 먹고 있으며 곤충 식이가 환경적으로 도움이 된다고 보고하였음

(라) 낙농강국인 네덜란드가 미래 식량문제의 대안이자 친환경적 먹거리로 식용곤충에 주목하여, 네덜란드 농업자연식품품질부는 유럽 최고 농업분야 연구개발(R&D)·교육 기관인 네덜란드 와게닝겐대학에 식품체인의 곤충활용과 지속 가능한 생산의 혁신연구를 위해 2010년부터 2013년까지 4년간 약 100만 유로 지원

- 와게닝겐대학의 Arnold van Huis, Marcel Dicke 등의 곤충학 교수는 곤충을 미래 식량 대안으로 적극 제안

- NWO-스피노자상 수상자인 Dicke 교수는 “2020년경에는 슈퍼마켓에서 벌레를 사게 될 것” 이라고 전망하고 “유럽인들은 의식하지 못한 채 연평균 약 500g의 곤충을 섭취하고 있다” 고 보고

- 네덜란드 곤충사육업체협회는 노드-브라반트주에서 3만5000유로의 경제강화지원금을 받고 식품공급업체, 사료업체 HAS 대학과 공동으로 투자금을 조성해 총 7만 유로를 투자해 곤충식품 개발을 위한 연구소 건립 추진 중임

- 네덜란드 내 대형 식품 공급업체인 Sligro Food Group는 2008년 이후 네덜란드 최초로 식품으로서의 곤충을 도매유통하고 있으며, 메뚜기, 밀웜, 외미거저리(Lesser mealworm) 등을 판매하고 있음

(마) 네덜란드 와게닝겐 대학교(Wageningen University)에서 곤충 생육이 지속가능성 있는 단백질생산에 기여 여부 조사 결과, 곤충고기 1 kg은 소고기와 돼지고기 1 kg보다 훨씬 적은 양의 온실가스를 생산하므로 곤충고기는 전형적인 고기 형태에 대한 하나의 대안이 될 수 있다고 보고함('10. 12)

- 곤충 제품 1kg당 생성된 온실가스-메탄가스(CH₄)와 아산화질소(N₂O)-량을 정량한 결과 돼지 한 마리는 거저리와 비교했을 때, kg당 수십 배 내지 수백 배의 온실가스를 더

생산하였음

- 지표수의 산성화와 부영양화를 초래하는 암모니아 배출량도 곤충이 훨씬 적다는 것을 확인함

* 돼지 한 마리는 집귀뚜라미에 비해 1 kg 성장당 여덟 배 내지 열두 배 더 많은 양의 암모니아를, 메뚜기에 비해서는 50배 가량 더 많은 암모니아 생산

(바) 또한, 와게닝겐대학에서는 곤충이 포유동물에 비해 섭취한 음식물을 고기로 더 빨리 전환시키므로 전통적인 가축 고기의 단백질에 대한 친환경적인 대체물이 가능할 것임을 보고함('10. 12)

(사) 중국은 약용곤충의 사육, 증식기술 및 약용자원의 탐색 등 다방면의 연구 추진

- 박쥐나방, 오배자, 진딧물, 구향충(九香蟲), 풍뎅이, 가뢰, 귀뚜라미, 땅강아지, 동충하초 등에 대한 중점 연구 추진
- 곤충 유래 항암 활성물질 개발 : 바퀴추출물, 똥풍뎅이 추출물 등
- 혈관 내 손상된 내막 및 혈액흐름 개선하는 곤충 의약품 '통심락'을 개발('99)하여 한국(일양약품)에서 출시('06)

(아) 중국의 약학서인 본초강목에는 106종의 약용곤충이 수록되어 있으며, 그 후 중국에서 편찬된 중화인민공화국약전, 중약지에 약용곤충들이 소개되었고 중국약용동물지에 143종의 약용곤충이 수록되었는데 그 중 40여 종이 주로 많이 이용되는 것으로 보고됨

(2) 식용 가능 곤충

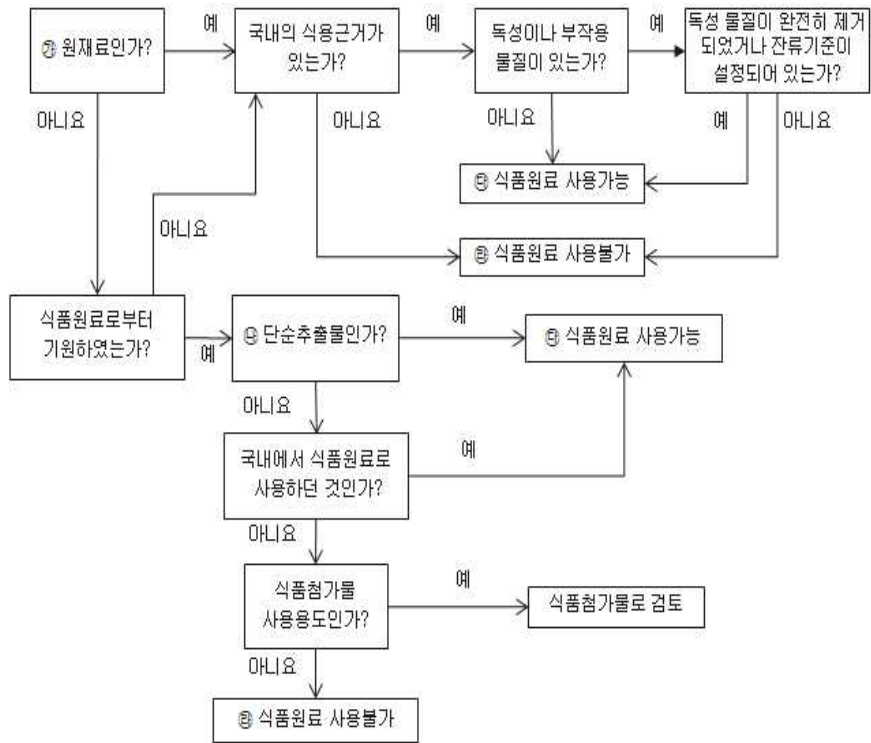
(가) 식품원료란, ① 식품을 제조, 가공하는데 사용되는 원료, ② 현행 식품원료 관리는 크게 세 가지(식품에 사용할 수 있는 원료, 식품에 제한적으로 사용할 수 있는 원료, 식품에 사용할 수 없는 원료)로 구분되어 관리

(나) 식품원재료 데이터베이스에 제시되어 있지 않은 경우에는, 식품공전 제2. 2. 2)식품원료 판단 기준에 따라 자료를 제출하여 식품원료로 승인받을 수 있음(한시적인정요청에 따른 “새로운 식품 원료의 안전성 평가가이드라인”에 따라 승인)

(다) 현재 곤충산업육성과 농가 소득 증대를 위해 곤충을 식용 및 약용으로 판매가 필요하나 식품위생법상 메뚜기와 누에를 제외한 곤충은 식품위생법에 의한 식품공전상 식품원료로 인정되지 않아 식·약용으로 판매·유통이 불가하므로 과학적이고 체계적인 성분분석 및 약리효과 구명이 필요함

(라) 굼벵이(딱정벌레목 유충)의 경우 현재 민간요법으로 신장·간장질환, 중풍, 당뇨병, 암 등의 치료제로 사용되고 있음

(마) 특히, 식품원료로 인정받기 위해서는 GLP(Good Laboratory Practice) 기관을 통해 안정성 및 건전성이 입증될 수 있는 급성 경구독성을 비롯한 체계적인 독성 실험을 수행하여 인체에 독성이 없음을 입증할 필요성이 있음



(3) 약용 가능 곤충

(가) 약용의 판단 근거는 약리적 효능 여부에 따라 결정되며, 이때 약용으로 사용가능한지의 여부는 약사법에 따라 대한민국의약전(大韓民國藥典) 및 대한약전의 한약(생약)규격집을 토대로 사용가능

<개정 2007.10.17, 2008.2.29, 2009.12.29, 2010.1.18, 2011.6.7, 2013.3.23.>

생약명	곤충명	학명	자료집	식용가능여부		
				가능	제한적	불가능
누고	땅강아지	<i>Grylotalpae Corpus</i>	생약규격집	?	?	?
동충하초	동충하초균	<i>Cordyceps</i>	생약규격집	data base에 없음		
맹충	등에류 또는 기타 동속곤충	<i>Tabanus</i>	생약규격집	data base에 없음		
반묘(斑猫)	띠먼가리, 중국가리, 줄먹가리	<i>Cantharides</i>	생약규격집			○
백강잠	누에	<i>Bombycis Corpus</i>	생약규격집	누에/누에번데기	누에 고치	누에 나방
상표초	사마귀 또는 기타 동속 근연동물	<i>Mantidis Ootheca</i>	생약규격집	data base에 없음		
선퇴(蟬退)	말매미 또는 기타 근연곤충	<i>Cicadidae Periostracum</i>	생약규격집	data base에 없음		
오공(蜈蚣)	왕지네	<i>Scolopendrae Corpus</i>	생약규격집			○
제조	금색곰뱀이 또는 기타 근연곤충	<i>Holotrichia</i>	생약규격집			○

<식약청/생약정보시스템/대한약전의 한약생약규격집에 등재되어있는 약제리스트>

(나) 대한약전 및 대한약전의 한약규정집에 등재되어 있으나 식품원료로 사용할 수 있는 원료에 등재되어 있지 않은 이유는 그러한 약제들에 대한 국내 식용 근거가 없기 때

문이며, 따라서 식품원료로 사용하기 위해서는 식약청에서 고시하는 ‘한시적인정제도’에 따라 ‘새로운 식품원료의 안전성평가 가이드라인’에 부합하는 법적 근거 자료를 마련하여 허가를 받아야 됨

- ③ 식품원료로 사용할 수 없으나 약리적 효능을 발휘할 경우 약용으로 사용 가능하고, 식품원료로 사용가능한 원료이면서 약리적 효능을 나타낼 경우 건강기능성 식품으로서의 허가를 통해 건강기능성식품으로 사용 가능함

(4) 현재 연구 수행중인 곤충 선정 이유

- (가) 식품등록 연구 대상 곤충 : 흰점박이꽃무지, 갈색거저리
- (나) 식품 등록 연구를 위한 대상 곤충 선정시 식품으로 허가되어 산업화가 되면 원재료의 공급이 원활하게 이루어져야하므로 대다수의 사육농가가 조성되어져 있고 대량사육시스템이 확립되어져 있는 곤충을 우선적으로 선정하였음
- (다) 또한, 현재 국내·외에서 민간요법으로 널리 이용되거나 식용으로 이용되는 등 소비층이 어느 정도 형성되어져 있는 곤충을 선택하였는데 그 이유는 이러한 곤충을 우선적으로 식품 등록하는 것이 곤충산업 육성에 유리할 것으로 판단하였기 때문임

(5) 현재 연구 수행중인 곤충의 식품으로 인증·허가 및 사용현황

(가) 흰점박이꽃무지

- ① 국내에서 식품으로 이용되지는 않지만 국외(네덜란드, 멕시코, 중남미, 중국 등)에서 다양한 형태의 식품(쿠키, 빵, 스파게티 등)으로 이용되고 있음
- ② 현재 수행중인 과제를 통해 일반성분 및 유해물질을 분석한 결과 영양적 가치가 풍부하였으므로 식품으로서의 가치가 높음
- ③ 한국 KFDA, 미국 GRAS, 유럽연합 novel food, 호주/뉴질랜드 novel food, Codex 등에 식품원료로 등재되지 않았으므로 현재 GLP 기관에서 평가중인 독성평가를 통해 과학적으로 안전성 입증 후 새로운 식품원료가 가능할 것으로 판단됨

(나) 갈색거저리

- ① 국내에서는 동의보감 등 고서를 근거로 민간요법으로 분말 등의 형태로 간 기능 회복을 위해 이용되고 있으며, 국외에서 식품으로 이용되고 있음
- ② 현재 수행중인 과제를 통해 일반성분 및 유해물질을 분석한 결과 영양적 가치가 풍부하였으므로 식품으로서의 가치가 높음
- ③ 현재 GLP 기관에서 평가중인 독성평가를 통해 유전독성(복귀돌연변이, 소핵, 염색체이상) 및 4주 독성평가 결과 음성이었고, 추후 3개월투여 후 독성이 없을 경우 새로운 식품원료가 가능할 것으로 판단됨

아. 곤충분말의 식약청에 식품원료로 인정요청 자료 작성 및 제출

(1) 갈색거저리

- 한시적인정요청서 작성(농과원) 후 식약처에 새로운 식품원료로 한시적 인정 요청은 현재 제조업자나 수입업자만이 가능하므로 제4협동연구기관인 월드웨이(주)에 작성한 신청서

제출 요청 → 새로운 식품원료로 갈색거저리 한시적 인정('14. 7. 15.)

(2) 흰점박이꽃무지

- 현재 한시적인정요청서 식약처 제출
- 새로운 식품원료로 한시적 인정 요청은 현재 제조업자나 수입업자만이 가능하므로 갈색 거저리의 경우와 마찬가지로 제4협동연구기관인 월드웨이(주)에 작성한 신청서 제출 및 요청('14. 9. 23.)

2. 곤충자원의 지표물질 도출 및 성분연구(제1협동)

가. 갈색거저리의 지표물질 도출 및 성분연구

① 갈색거저리 분말의 추출 및 분획

- 갈색거저리 분말 1.2 kg에 EtOH을 첨가하여 추출물 380 g을 얻은 후, 용매의 극성을 달리하여 순차적으로 용매를 분획한 결과 hexane분획은 313.90 g (82.61%), dichloromethane분획은 0.42 g (0.11%), ethyl acetate 분획은 0.78 g (0.21%), butanol 분획은 24.80 g (6.53%), water 분획은 39.03 g (10.27%)로 나타남 (Fig. 1)

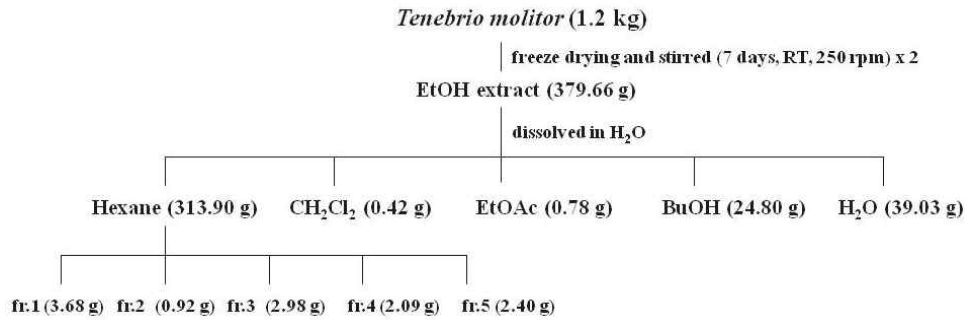


Fig. 1. Extraction and fractionation of *Tenebrio molitor*

② 갈색거저리 분말의 일반 성분 분석

- 갈색거저리의 일반성분 분석은 AOAC법에 의해 수분함량은 105°C 상압가열건조법으로 회분함량은 600°C 회화법, 조단백질함량은 Kjeldahl법, 조지방함량은 Soxhlet법으로 분석함. 조단백질 함량은 50.01±0.34%, 조지방 함량은 39.67±0.42%, 조회분 함량은 3.23±0.01%, 수분 함량은 2.28±0.01%, 탄수화물은 5.84±0.77% 로 나타남 (Table 1). 분석 결과를 토대로 동결 건조한 최대 성장 단계의 갈색거저리 분말에서는 조단백질 함량과 조지방 함량이 높은 것을 확인할 수 있었음

Table 1. Composition of *Tenebrio molitor*

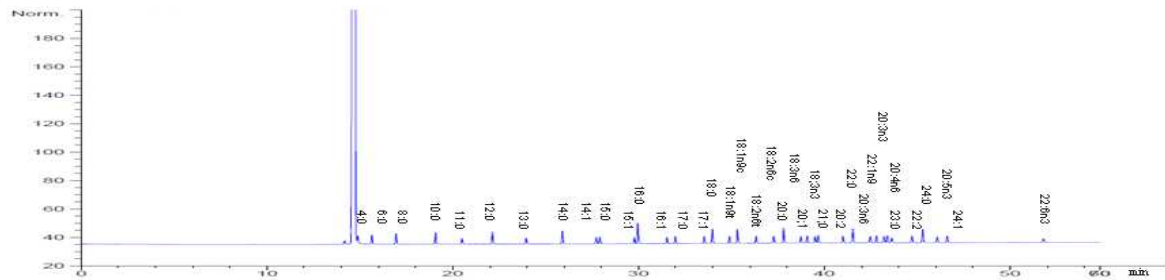
Ingredients	Content (%)
	<i>Tenebrio molitor</i>
Moisture ²⁾	2.28±0.01
Crude protein ³⁾	50.01±0.34
Crude fat ⁴⁾	39.67±0.42
Crude ash ⁵⁾	3.23±0.01
Carbohydrate ⁶⁾	5.84±0.77

③ Gas chromatography (GC)를 이용한 지방산 정량 분석

- 갈색거저리의 일반성분 분석은 AOAC법에 의해 수분함량은 105°C 상압가열건조법으로 지방산 성분 분석을 통해 갈색거저리의 대표 물질을 밝혀내기 위하여 GC 분석을 수행하였고, 37개의 standard fatty acid ester의 retention time과 비교 분석한 결과는 다음과 같음. 갈색거저리에 존재하는 총 지방산 함량은 34.89%로 나타났으며, 16개의 지방산 성분이 검출됨. 전체 지방산 함량에서 올레산(oleic acid)이 46.3%으로 가장 높은 함량을 차지하고 있음을 확인할 수 있었음. 올레산(oleic acid) 외 리놀레산(linoleic acid) 27.8%, 팔미트산(palmitic acid) 14.99%, 미리스트산(myristic acid) 4.41%, 스테아르산(stearic

acid) 2.29%로 5개의 주 지방산의 함량이 전체 지방산 함량의 96.6%를 차지하였음 (Fig. 2, Table 2). 이러한 결과는 갈색거저리 분말 100 g당 올레산(oleic acid)이 16.15 g 존재하는 것으로 나타남. 이에 본 연구의 결과를 종합해보면, 갈색거저리의 경우 특이적으로 유지성분 함량이 매우 높았으며 그 중 올레산의 함량이 눈에 띄게 높으므로 갈색거저리의 대표물질을 올레산(oleic acid)으로 선정함

(a)



(b)

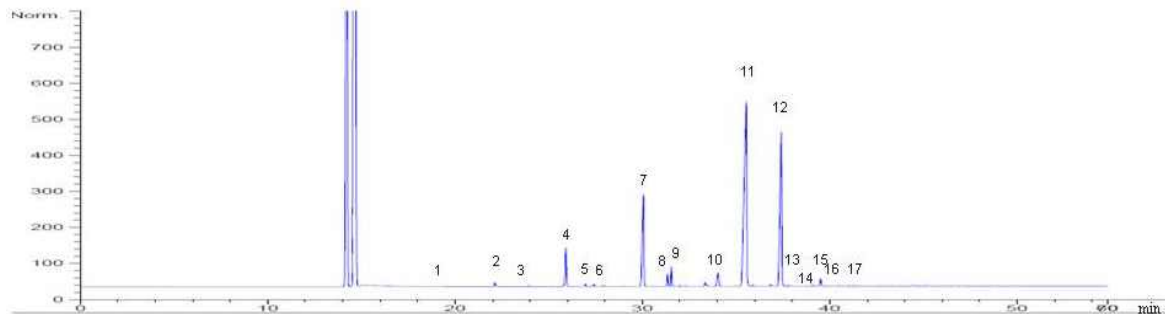


Fig. 2. GC chromatogram of standard fatty acid ester (a) and *Tenebrio molitor* (b)

Table 2. Profile of fatty acids from *Tenebrio molitor*

Peak No.	Components	RT ^a	Peak area (%) ^b	mg/kg ^c	Peak No.	Components	RT ^a	Peak area (%) ^b	mg/kg ^c
		14.204	26.0873				33.444	0.01926	
		14.59	58.6353		10	Stearic acid	34.038	0.33798	8,003.96
1	Capric acid	19.07	0.00274	64.88	11	Oleic acid	35.539	6.82067	161,527
2	Lauric acid	22.124	0.06498	1,538.96			35.883	0.02998	
3	Tridecanoic acid	23.948	0.01383	327.57			36.846	0.03155	
		25.775	0.01477		12	Linoleic acid	37.411	4.09515	96,981.46
4	Myristic acid	25.911	0.6503	15,400.46			37.707	0.01273	
		26.527	0.00384		13	Arachidic acid	37.819	0.0129	305.46
		26.956	0.04143		14	cis-11-Eicosenoic acid	39.088	0.02347	555.72
		27.411	0.03804		15	Linolenic acid	39.51	0.13191	3,123.78
5	Myristoleic acid	27.728	0.00404	95.57	16	Heneicosanoic acid	39.696	0.00371	87.84
6	Pentadecanoic acid	27.918	0.01799	426.1			39.991	0.00328	
		28.935	0.00782				40.482	0.01189	
7	Palmitic acid	30.051	2.20894	52,312.09	17	cis-11,14-Eicosadienoic acid	41.009	0.00933	220.94
		30.628	0.0063				41.362	0.00832	
		31.338	0.20673				44.451	0.01451	
8	Palmitoleic acid	31.547	0.31686	7,503.95			45.185	0.01374	
9	Heptadecanoic acid	31.993	0.01747	413.63	38		47.032	0.0046	
		32.3	0.00663		39		47.173	0.00447	
		33.349	0.06527		40				

④ 갈색거저리 분획물의 BACE1 활성저해능

- 갈색거저리의 일반성분 분석은 AOAC법에 의해 수분함량은 105°C 상압가열건조법으로 갈색거저리의 분획물의 recombinant β -secretase (BACE1) 활성저해능을 조사한 결과는 다음과 같으며 이때 BACE1 inhibitor로 알려진 resveratrol을 positive control로 사용하였음 (Fig. 3)
- 뇌혈관 질환 (21%)은 한국인의 사망원인 중 1위인 암 (27%) 다음으로 높은 사망률을 차지함. 특히 치매는 노인인구 증가에 따라 매년 증가 추세임
- 우리나라 치매환자 수는 약 43만에서 56만명으로 추정하고 있으며 이 중 알츠하이머성 치매 (AD)가 약 50%정도 차지함. AD의 가장 유력한 원인으로 지목받고 있는 베타-아밀로이드 단백질($A\beta$)은 APP(amyloid protein precursor)라는 전구단백질로부터 α , β , γ -secretase의 작용을 받아 분해됨. 치매환자의 경우, β -secretase (BACE1)에 의해 가용성 APP단편 (sAPP β)을 유리시키고, γ -secretase가 C-terminal 단편 C99에 작용하여 $A\beta_{42-43}$ 를 생성함(2001, Cheeler)
- $A\beta$ 는 직접적인 독성으로 인해 신경세포사멸을 유도할 뿐만 아니라 활성산소를 형성하고 astrocytes 등의 염증관련세포를 활성화시킴으로써 산화적 스트레스 및 염증반응을 가중시켜 세포사를 촉진함(1995, Anderson등; 1993 Pike등; 2000, Yuan등). $A\beta$ 형성에 관여하는 주요효소인 β -, γ -secretase가 AD 연구의 주 target으로 부각되었으나 γ -secretase의 저해는 Notch pathway에 부작용을 나타내었고 이 효소의 저해로 인해 생성되는 C99 단편에 의한 세포독성이 관측됨(2002, Wolfe 등).
- BACE1 deficient mice의 경우 $A\beta$ 가 생성되지 않았으며 BACE1 저해시 부작용없이 $A\beta$ 및 C99 단편의 생성을 억제함. 기존 BACE1에 대한 저해제 개발은 거의 대부분이 합성 화합물에 기초하고 있음(2001 Luo등). 이미 OM 99-1, OM 99-2, MG 123 등의 β -secretase 합성 저해제가 보고되었고, 현재까지 천연물 유래 BACE1 저해제는 상대적으로 미미한 실정임
- 또한 이러한 합성 저해제들의 대부분이 분자량이 큰 oligo peptide성 화합물로 blood brain barrier (BBB)를 통과하지 못하는 단점이 있으므로 현실적인 AD 치료제로 개발되기에는 한계가 있음(2001, Gao등). 반면, 천연물 유래 활성화합물은 2차 대사산물로서 대부분 저분자, 저극성 화합물이므로 BBB를 통과하기 쉽다는 점을 감안할 때 천연물을 대상으로 $A\beta$ 형성 효소 저해제 및 $A\beta$ 로부터의 뇌세포 보호물질을 탐색하는 것이야말로 항치매 선도물질 개발에 유리할 것으로 판단됨
- 갈색거저리 분획물의 BACE1 저해능 비교 시, 50 μ g/mL 수준에서 hexane fraction (35.9 \pm 5.6%), EA fraction (37.2 \pm 3.7%), BuOH fraction (36.8 \pm 4.0%), H2O fraction (26.07 \pm 2.9%) 이 유의적인 차이를 보이지 않았으나 100 μ g/mL 농도에서는 EA fraction (68.1 \pm 4.6%)이 hexane fraction (54.2 \pm 4.7%), BuOH fraction (42.4 \pm 3.4%), H2O fraction (48.8 \pm 2.3%)에 비해 상대적으로 높은 저해효과를 나타냄. 그러나 분획물 중 hexane fraction의 수율이 가장 높았으므로 hexane fraction에 초점을 맞추어 다음 실험을 진행하였음

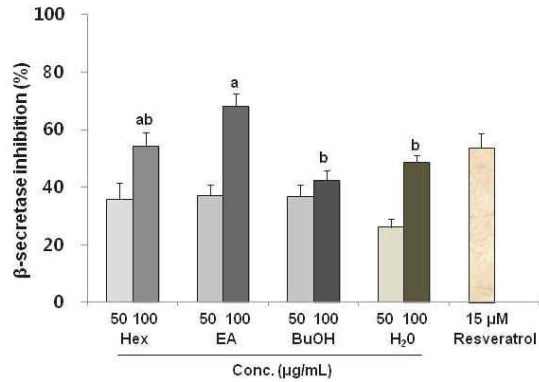


Fig. 3. β -Secretase inhibitory activity of solvent fractions from *Tenebrio molitor*

⑤ 갈색거저리의 hexane fraction 세부분획의 BACE1 활성저해능

- 갈색거저리의 hexane fraction으로부터 다시 세부분획한 분획물 Fr. 1-5의 BACE1 활성저해능을 조사한 결과는 다음과 같음 (Fig. 4). 전반적으로 Fr.3(18.7 \pm 0.6%, 38.86 \pm 3.3%) 이 Fr.1(17.83 \pm 0.1%, 34.8 \pm 0.6%), Fr.2(14.8 \pm 1.1%, 20.0 \pm 2.1%), Fr.4(20.9 \pm 1.7%, 31.8 \pm 2.9%), fr.5(4.7 \pm 0.6%, 16.1 \pm 1.2%)에 비해 상대적으로 높은 저해효과를 나타냄

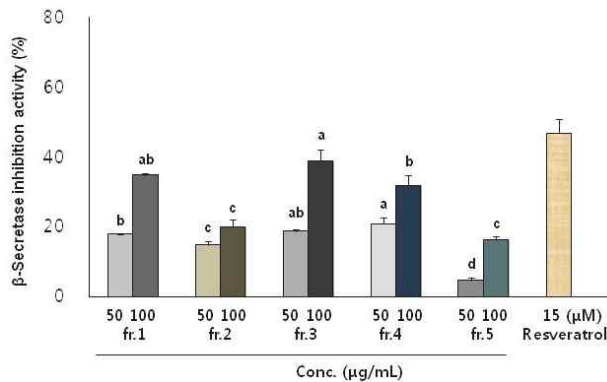


Fig. 4. β -Secretase inhibitory activity of solvent fractions from hexane fraction of *Tenebrio molitor*

⑥ 갈색거저리 대표 지방산의 BACE1 활성저해능

- 갈색거저리의 major 지방산인 oleic acid, linolenic acid, myristic acid, palmitic acid 및 linoleic acid BACE1 활성저해능을 조사한 결과는 Fig. 5와 같음. 다섯 가지 물질 모두 농도 의존적인 저해능을 나타내었으며, 각 농도 별로 유의적인 차이를 가졌음 (** $p < 0.001$, * $p < 0.01$, * $p < 0.05$). 10, 100 μM 수준에서는 oleic acid (24.0 \pm 1.6%, 76.7 \pm 1.6%)가 linoleic acid (13.9 \pm 1.3%, 33.8 \pm 1.1%), linolenic acid (40.5 \pm 2.3%, 49.8 \pm 0.1%), myristic acid (32.9 \pm 3.1%, 43.4 \pm 0.2%), palmitic acid (14.3 \pm 1.3%, 36.1 \pm 4.9%) 수준의 저해능을 보였으며 특히 갈색거저리에서 가장 많이 함유되어있는 oleic acid의 경우 탁월한 BACE1 저해 효과를 보임을 알 수 있음

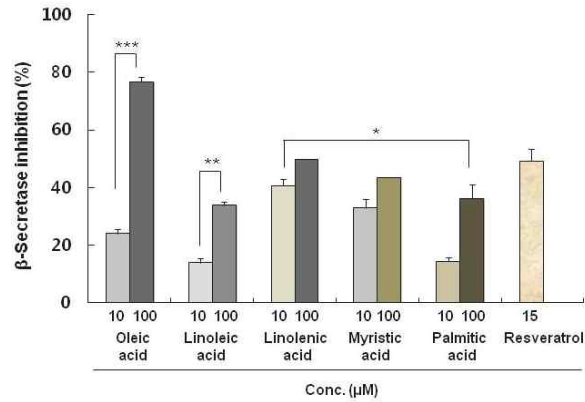


Fig. 5. β-Secretase

Tenebrio molitor

⑦ 갈색거저리 대표물질의 BACE1 효소 특이성 연구

- BACE1에 대한 효소 특이성을 검토하기 위하여 amyloidogenic process에 관여하는 TACE (α-secretase) 및 chymotrypsin, trypsin 등의 serine proteases에 대한 oleic acid, linolenic acid, myristic acid, palmitic acid 및 linoleic acid의 억제 능력을 조사한 결과 Table 3과 같음. 다섯 가지 순수물질 모두 chymotrypsin 및 trypsin에 대한 유의적인 저해효과는 보이지 않았으며 이 다섯 가지 물질이 BACE1에 대한 선택적인 특이성을 지니는 저해제 (specific inhibitor of BACE1)로 판단할 수 있음

Table 3. Inhibitory activity of oleic acid, linolenic acid, myristic acid, palmitic acid and linoleic acid against α-Secretase and other serine proteases

	Conc.(μM)	Trypsin	Chymotrypsin	α-Secretase(TACE)
Oleic acid	50	5.50±1.97	5.00±0.19	5.81±1.00
	100	3.74±1.97	9.45±0.39	11.22±2.27
Linolenic acid	50	4.77±0.31	2.88±1.94	6.34±1.72
	100	7.62±1.04	4.18±0.10	13.62±1.95
Myristic acid	50	8.28±1.41	2.16±0.69	4.68±2.08
	100	10.71±0.00	2.58±0.30	18.72±3.12
Palmitic acid	50	5.36±0.11	7.17±0.49	3.83±0.22
	100	11.18±1.32	3.25±0.99	9.34±3.51
Linoleic acid	50	8.62±1.21	3.41±0.30	2.48±0.64
	100	8.54±0.44	1.62±0.35	14.50±3.16

⑧ 갈색거저리 대표물질인 oleic acid의 BACE1 저해 양상

- 갈색거저리에 함유된 major 지방산 중 강력한 BACE1 활성 억제능을 나타낸 oleic acid의 효소 저해 패턴을 Dixon plot을 이용하여 연구해 본 결과 각각 IC₅₀, 6.1x10⁻⁵ M, Ki, 3.43x10⁻⁵ M (Fig. 6)을 나타내었으며 Ki값이 x절편인 것으로 미루어 볼 때, oleic acid는 비경쟁적으로 BACE1을 저해하는 양상을 지님을 알 수 있음

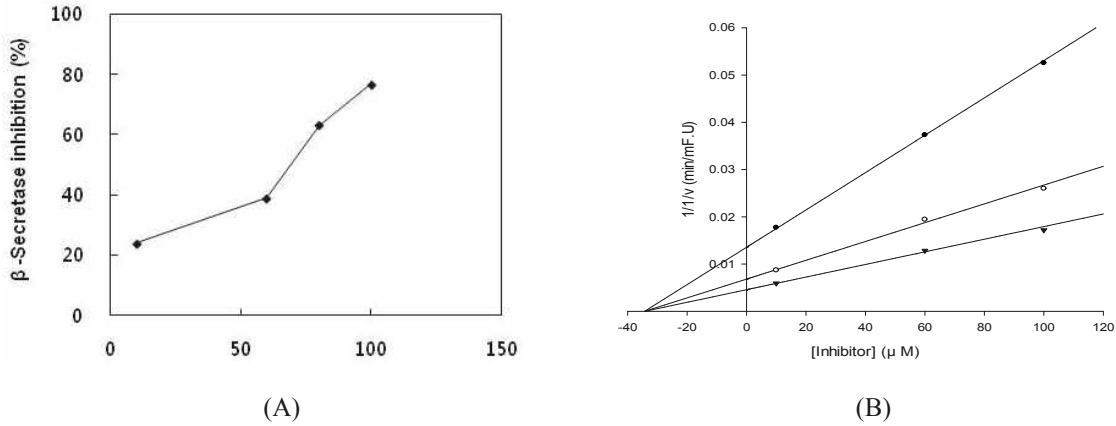


Fig. 6. Concentration dependent inhibition of BACE1 activity by oleic acid (A), Dixon plot of oleic acid (B). Substrate concentration: -▼-; 750 nM, -○-; 500 nM, -●-; 250 nM

⑨ 갈색거저리 분획물별 항산화능 측정

- 갈색거저리 분획물별 항산화능을 실험한 결과는 다음과 같음 (Table 4, Fig. 7). 10, 50 μg/mL 수준에서 ABTS ($p < 0.001$), DPPH ($**p < 0.01$, $*p < 0.05$)의 경우 EA fraction이 다른 fraction에 비해 상대적으로 항산화능이 높게 나타남. FRAP 실험에서도 마찬가지로 EA fraction ($27.81 \pm 0.25 \mu\text{M/Trolox equivalent}$)이 환원력이 가장 높게 나타내었으나 LOX 실험에서 EtOH fraction에서 저해율이 가장 높게 나타남

Table 4. ABTS and FRAP of *Tenebrio molitor* extraction

Sample	Conc. (μg/mL)	content (%)	
		ABTS assay	FRAP assay
EtOH	10	$0.51 \pm 0.15^{\text{d}}$	$1.70 \pm 0.44^{\text{d}}$
	50	$0.87 \pm 0.29^{\text{d}}$	$3.25 \pm 0.06^{\text{d}}$
Hexane	10	$0.32 \pm 0.49^{\text{d}}$	$-2.06 \pm 0.31^{\text{e}}$
	50	$0.35 \pm 0.10^{\text{d}}$	$-2.17 \pm 0.07^{\text{f}}$
MC	10	$1.69 \pm 0.37^{\text{c}}$	$0.53 \pm 0.26^{\text{d}}$
	50	$4.95 \pm 0.58^{\text{c}}$	$8.73 \pm 0.27^{\text{e}}$
EA	10	$4.86 \pm 0.30^{\text{a}}$	$6.59 \pm 0.30^{\text{a}}$
	50	$20.10 \pm 1.16^{\text{a}}$	$27.81 \pm 0.25^{\text{a}}$
BuOH	10	$3.49 \pm 0.29^{\text{b}}$	$3.34 \pm 0.35^{\text{c}}$
	50	$12.02 \pm 0.57^{\text{b}}$	$11.34 \pm 0.19^{\text{c}}$
H ₂ O	10	$1.93 \pm 0.12^{\text{c}}$	$5.10 \pm 0.60^{\text{b}}$
	50	$4.48 \pm 0.14^{\text{c}}$	$4.96 \pm 0.21^{\text{b}}$

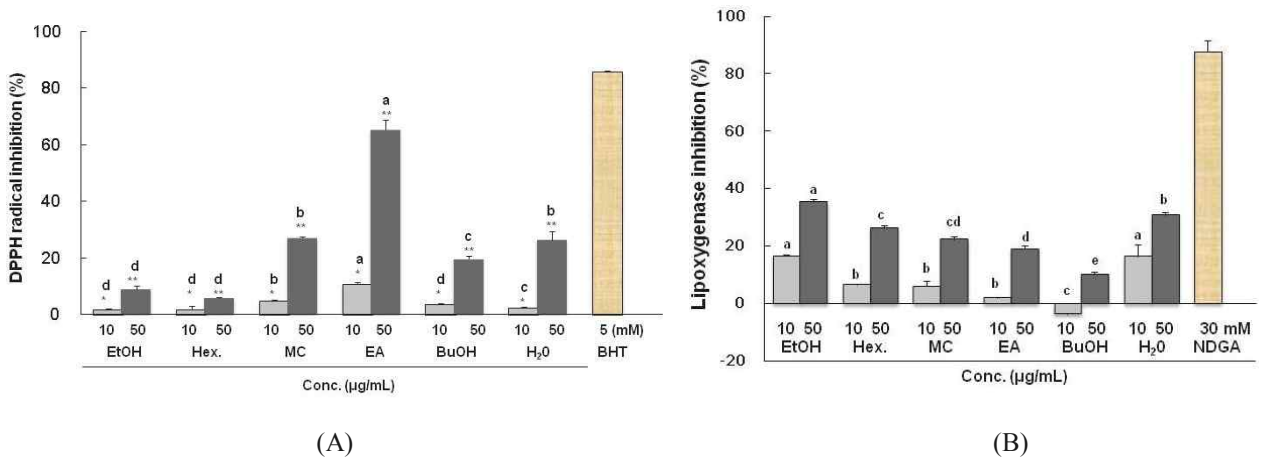


Fig. 7. Effect of *Tenebrio molitor* extraction on DPPH radical scavenging activities (A) and lipoxygenase inhibition (B) BHT and NDGA as positive control were used at the concentration of 5 mM. Same concentrations of EtOH extraction and each fractions are significantly different at * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

⑩ 갈색거저리의 정유성분 분석

- SDE(simultaneous distillation extraction)를 이용하여 추출한 갈색거저리 분말의 휘발성 정유성분 (essential oil)을 GC/MS 분석한 결과 Tetradecanoic acid가 23.684%, Butylated Hydroxytoluene 14.357%, n-Hexadecanoic acid 11.876% 2,4-Bis(dimethylbenzyl)-6-t-butylphenol 5.359% 순으로 나타났으며 Hydrocarbons 형태가 많이 존재하는 것으로 나타내었음 (Table 5)

Table 5. Distribution of Identified Volatile Components in *Tenebrio molitor*

NO	RT	Volatile components	NO	RT	Volatile components
Acids			21	16.318	Docosane
1	5.405	Dodecanoic acid	22	17.983	Eicosane
2	8.714	Tetradecanoic acid	23	19.595	Tetracosane
3	12.238	n-Hexadecanoic acid	24	20.971	2,4-Diphenyl-4-methyl-1-pentene
4	15.617	1,4,7,10,13,16-Hexaoxacyclooctadecane	25	21.153	Octadecane
Aldehydes			26	22.65	Hexacosane
5	13.231	Octadecanal	27	24.101	Heptacosane
Alcohols			28	25.499	Heneicosane
6	13.494	Phenol,2-(1,1-dimethylethyl)-4-(1-methyl-1-phenylethyl)-	29	26.858	Nonacosane
7	14.333	Phenol, 2,6-bis(1,1-dimethylethyl)-4-(1-methyl-1-phenylethyl)-	30	28.165	Triacontane
8	21.291	Phenol, 2,4-bis(1-methyl-1-phenylethyl)-	31	29.436	Heptadecane, 8-methyl-
9	21.651	2,4-Bis(dimethylbenzyl)-6-t-butylphenol	Ketones		
10	28.472	Phenol, 2,4,6-tris(1-methyl-1-phenylethyl)-	32	5.637	Cyclohexanone, 2-methyl-5-(1-methylethyl)-, trans-
Esters			Others		
11	9.192	Tetradecanoic acid, ethyl ester	33	4.921	Butylated Hydroxytoluene
12	12.391	Ethyl 9-hexadecenoate	34	11.096	Hexasiloxane, tetradecamethyl-
13	12.76	Hexadecanoic acid, ethyl ester	35	13.91	1,2-Benzenedicarboxylic acid, bis(trimethylsilyl) ester

14	14.636	7-Octadecenoic acid, methyl ester	36	14.504	Pyrrolidine, 1-(1H-inden-3-yl)-
15	15.7	Linoleic acid ethyl ester	37	14.891	Borinic acid, diethyl-, 1-phenyl-1-propenyl ester
16	15.798	Ethyl Oleate	38	15.289	1,2-Benzisothiazole,
17	21.92	Di-n-octyl phthalate	39	15.617	3-(hexahydro-1H-azepin-1-yl)-, 1,1-dioxide
Hydrocarbons			40	16.106	1,4,7,10,13,16-Hexaoxacyclooctadecane
18	9.296	2,4-Diphenyl-4-methyl-1-pentene	41	28.975	Bicyclo[11.3.0]hexadecane-2,14-dione
19	10.038	2,4-Diphenyl-4-methyl-2(E)-pentene	42	29.316	Piperidine-3-carboxylic acid, 1-ethylthiocarbamoyl-, amide
20	13.739	10,18-Bisnorabieta-8,11,13-triene			1-Allyl-5-bromo-6-hydroxypyridazin-6-one

㉠ 갈색거저리의 hexane fraction 세부분획의 BACE1 활성저해능

- Hexane 세부분획물 fr. 1-5의 BACE1 활성저해능을 조사한 결과는 다음과 같음 (Fig. 13). Fr.3의 경우 90.40±1.32%의 높은 저해능을 보임 (100 ppm, p<0.001). Fr.3의 경우, TLC결과 free fatty acids인 것으로 판명. Prep-TLC를 통해 oleic acid 및 linoleic acid 분리함

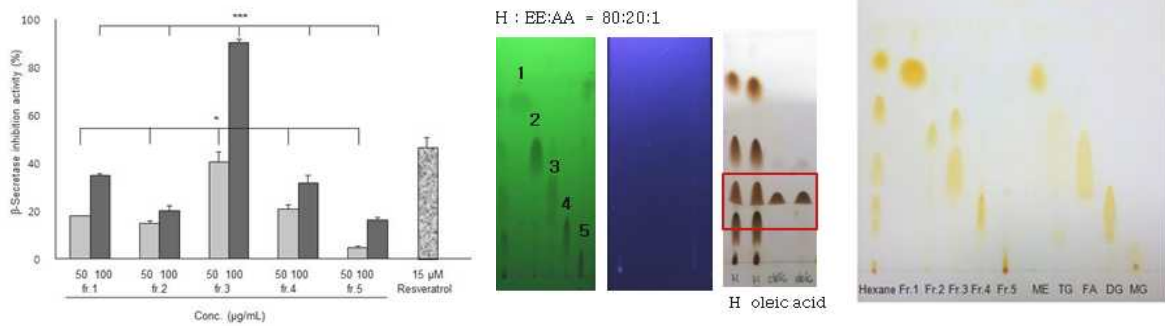
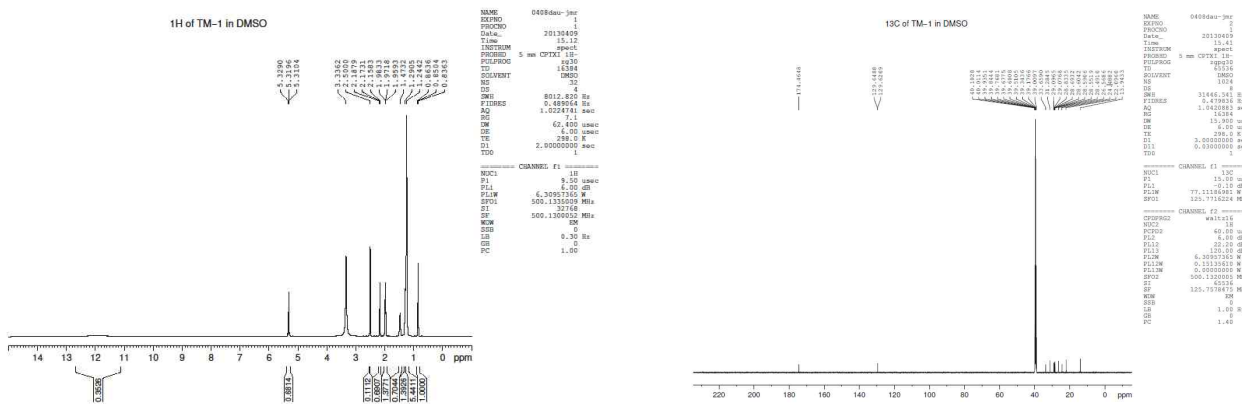
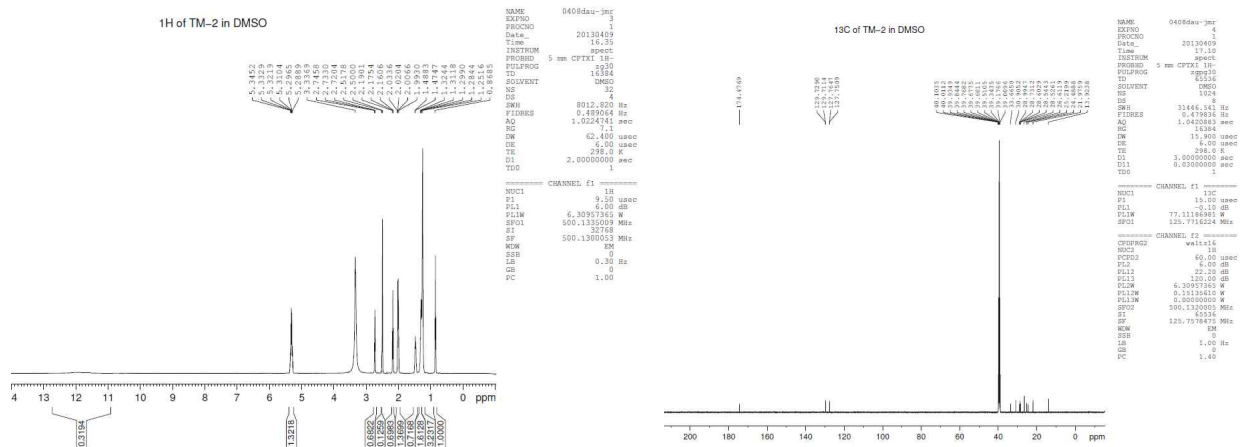


Fig. 13. β -Secretase inhibitory activity of sub-fractions from hexane fraction of *Tenebrio molitor*



(A)



(B)

Fig. 13-1. (A) ^1H - and ^{13}C -NMR spectra of oleic acid and linoleic acid isolated from *Tenebrio molitor*

⑫ 갈색거저리 분획물의 A β (25-35) 유도독성으로부터의 세포사멸 저해효과

- 불용성 A β 는 뇌 속에 축적되어 신경독성을 일으킴으로써 뇌세포 사멸을 유도하여 치매를 유발함. BACE1을 저해하여 A β 생성을 억제하는 것이 AD 예방의 일차적인 목표라 할 수 있고, 이미 생성된 A β 독성으로부터 뇌세포를 보호하는 것은 이차적인 AD 예방이 될 수 있음. PC12 세포를 이용하여 갈색거저리 분획물의 세포 보호효과를 실험한 결과, 분획물 모두 A β 유도독성으로부터 세포보호능이 관측되었고 특히 EtOAc과 EtOH fraction이 다른 분획물에 비해 강한 뇌세포 보호능이 있는 것으로 판단됨 (Fig. 14)

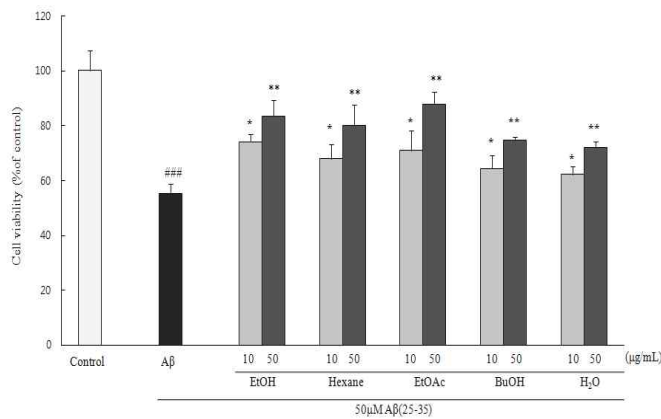


Fig. 14. Protective effects of solvent fractions from *Tenebrio molitor* on A β (25-35)-induced cell death. PC12 cells were pretreated with solvent fractions for 1 hr and further treated with 50 μM of A β (25-35) for 24 hr. Cell viability was assessed by measuring MTT reduction. ###P<0.001 vs control group. **P<0.01 and *P<0.05 vs the group treated with A β (25-35) alone. Data represent the mean \pm SD of three independent experiments.

⑬ Aβ(25-35) 유도독성으로부터의 ROS formation 저해효과

- 갈색거저리 분획물의 Aβ유도 활성산소(ROS) 억제능을 조사한 결과는 다음과 같음 (Fig. 15, 16). 갈색거저리 분획물 모두 Aβ 유도독성으로부터 ROS 저해능이 관측되었고 모든 분획물이 유의적인 ROS 저해효과를 나타냄

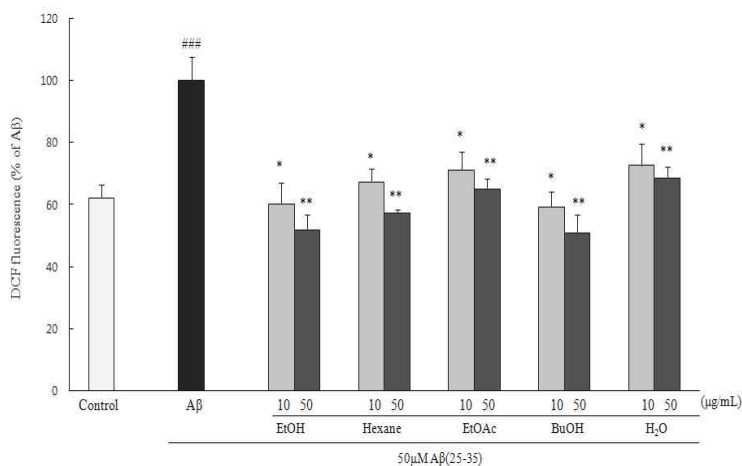


Fig. 15. Inhibitory effects of solvent fractions from *Tenebrio molitor* on Aβ (25-35)-induced intracellular ROS accumulation. PC12 cells were pretreated with solvent fractions for 1hr and further treated with 50 μM of Aβ(25-35) for 24 hr. ROS production was measured using the CM-H2DCFDA fluorescent dye. ###P<0.001 vs control group. **P<0.01 and *P<0.05 vs the group treated with Aβ(25-35) alone. Data represent the mean±SD of three independent experiments.

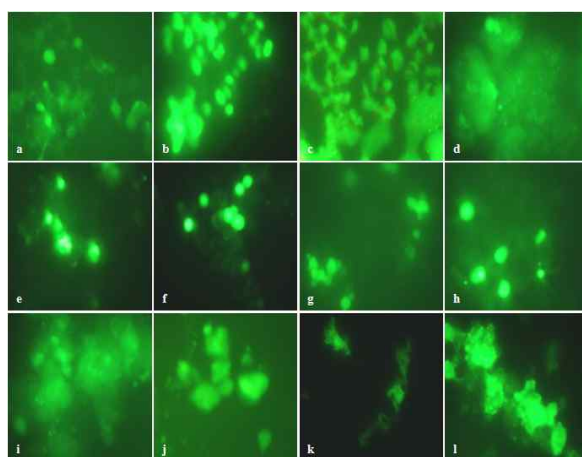


Fig. 16. Levels of ROS damaged by Aβ(25-35) and protective effect of *Tenebrio molitor* fractions in PC12 cells. (a) Control, (b) 50 μM Aβ(25-35), (c) 50 μM Aβ (25-35) + 10 μg/ml EtOH, (d) 50 μM Aβ(25-35) + 50 μg/ml EtOH, (e) 50 μM Aβ(25-35) + 10 μg/ml Hexane, (f) 50 μM Aβ(25-35) + 50 μg/ml Hexane, (g) 50 μM Aβ(25-35) + 10 μg/ml EA, (h) 50 μM Aβ(25-35) + 50 μg/ml EA, (i) 50 μM Aβ(25-35) + 10 μg/ml BuOH, (j) 50 μM Aβ(25-35) + 50 μg/ml BuOH, (k) 50 μM Aβ(25-35) + 10 μg/ml H₂O, (l) 50 μM Aβ(25-35) + 50 μg/ml H₂O.

⑭ Apoptosis 저해능에 대한 영향

- Aβ(25-35)에 대한 갈색거저리의 구체적인 세포사멸 저해능을 조사한 결과 분획물의 Aβ(25-35) 유도 apoptosis 저해효과를 관찰할 수 있었으며 특히 hexane/EtOAc 분획물의 세포사멸 저해능이 높음을 알 수 있음 (Fig. 19). Hexane 50 μM 처리한 경우 Aβ 처리하지 않은 대조군과 거의 유사한 형태를 유지함을 관찰할 수 있음 (Fig. 17)

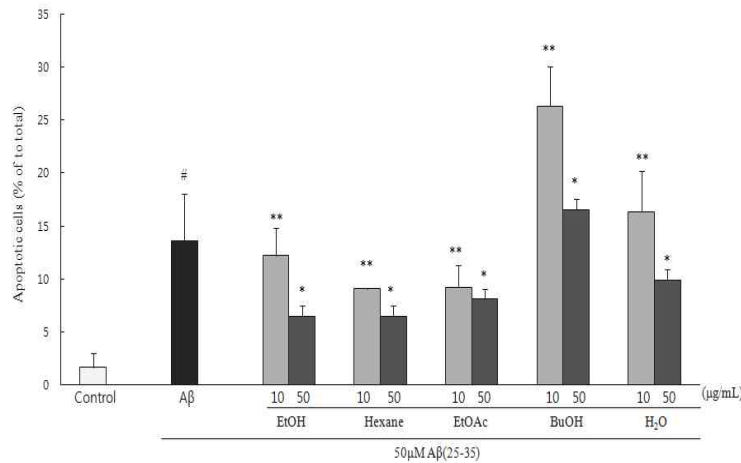


Fig. 17. Inhibitory effects of solvent fractions from *Tenebrio molitor* on Aβ(25-35)-induced apoptosis. PC12 cells were pretreated with solvent fractions for 1hr and further treated with 50 μM of Aβ(25-35) for 24 hr. Morphological apoptosis was determined by Hoechst 33342 staining under fluorescence microscopy (magnification ×400). #*P* < 0.05 versus control group. ***P* < 0.01 and **P* < 0.05 vs the group treated with Aβ(25-35) alone. Data represent the mean ± SD of three independent experiments.

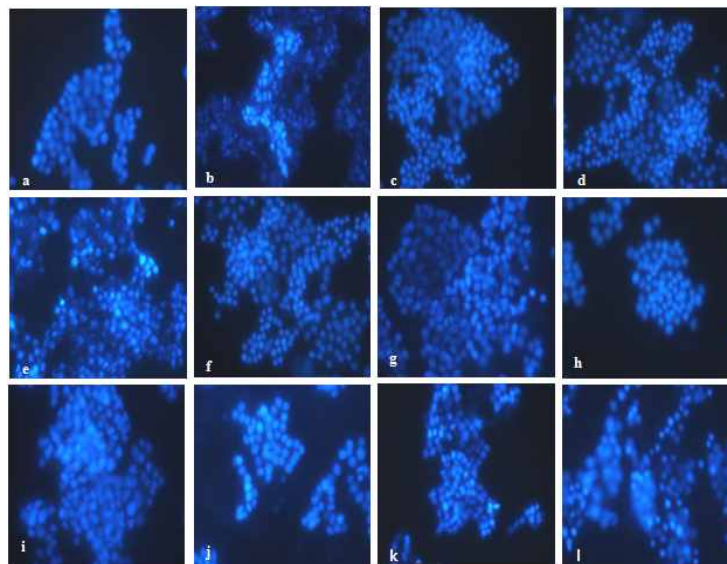


Fig. 18. Microscopic analysis of solvent fractions from *Tenebrio molitor* on Aβ(25-35)-induced apoptosis. Representative images of PC12 cells with Aβ(25-35) treatment in the presence or absence of solvent fractions from *Tenebrio molitor*. (a) Control, (b) 50 μM Aβ(25-35), (c) 50 μM Aβ(25-35) + 10 μg/ml EtOH, (d) 50 μM Aβ(25-35) + 50 μg/ml EtOH, (e) 50 μM Aβ(25-35) + 10 μg/ml Hexane, (f) 50 μM Aβ(25-35) + 50 μg/ml Hexane, (g) 50 μM Aβ(25-35) + 10 μg/ml EA, (h) 50 μM Aβ(25-35) + 50 μg/ml EA, (i) 50 μM Aβ(25-35) + 10 μg/ml BuOH, (j) 50 μM Aβ(25-35) + 50 μg/ml BuOH, (k) 50 μM Aβ(25-35) + 10 μg/ml H₂O, (l) 50 μM Aβ(25-35) + 50 μg/ml H₂O.

⑮ Caspase-3 저해능에 대한 영향

- Aβ(25-35)에 대한 갈색거저리 분획물의 구체적인 caspase-3 저해효과를 조사한 결과 대부분의 용매분획에서 Aβ(25-35) 유도 caspase-3 저해능을 확인하였으며, 특히 hexane fractio:

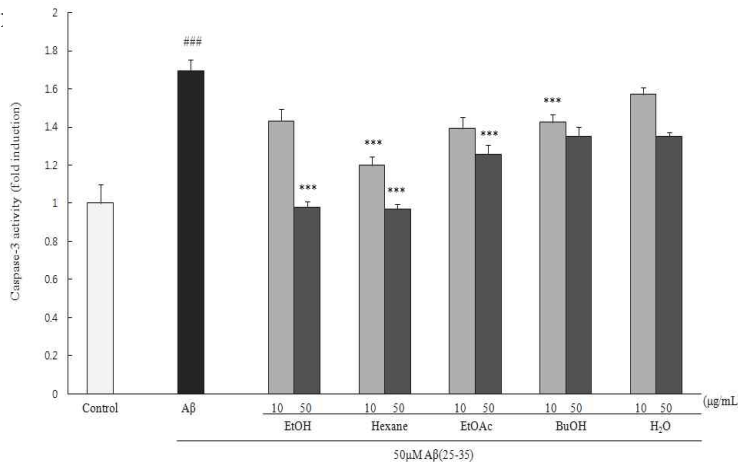


Fig. 19. Protective effects of *Tenebrio molitor* on Aβ(25-35)-induced caspase-3 activation. Protective effects of *Tenebrio molitor* fractions on Aβ(25-35)-induced caspase-3 activation, PC12 cells were pretreated with *Tenebrio molitor* fractions for 1hr and further treated with 50 μM of Aβ(25-35) for 24hr. ###*P* < 0.001 vs control group. ****P* < 0.001 vs the group treated with Aβ(25-35) alone. Data represent the mean±SD of three independent experiments.

나. 흰점박이꽃무지의 지표물질 도출 및 성분연구

① 흰점박이꽃무지의 추출 및 분획

- 흰점박이꽃무지 분말 1 kg에 EtOH을 첨가하여 추출물 239.25 g을 얻은 후, 용매의 극성을 달리하여 순차적으로 용매를 분획한 결과 hexane분획은 153.57 g (64.19%), dichloromethane분획은 0.58 g (0.24%), ethyl acetate 분획은 1.81 g (0.76%), butanol 분획은 25.15 g (10.51%), water 분획은 46.49 g (19.43%)로 나타남 (Fig. 8).

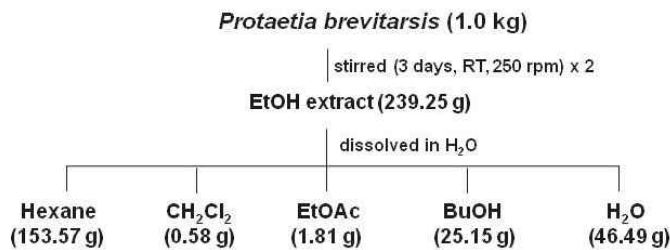


Fig. 8. Extraction and fractionation of *Protactia brevitarsis*

② 흰점박이꽃무지의 일반 성분 분석

- 흰점박이꽃무지의 일반성분 분석은 AOAC법에 의해 수분함량은 105°C 상압가열건조법으로 회분함량은 600°C 회화법, 조단백질함량은 Kjeldahl법, 조지방함량은 Soxhlet법으로

Table 7. Profile of fatty acids from *Protaetia brevitarsis*

Peak No.	Components	RT ^a	Peak area (%) ^b	mg/kg ^c	Peak No.	Components	RT ^a	Peak area (%) ^b	mg/kg ^c
		14.22	14.50699		6	Heptadecanoic acid	31.992	0.00878	138.92
		14.614	75.73706				32.173	0.00762	
		25.785	0.02805				32.400	0.01133	
1	Myristic acid	25.904	0.06542	1,035.61			33.286	0.03789	
		26.886	0.08907			Cis-10-heptadecanoic acid	33.450	0.02752	435.6
		27.323	0.03045		8	Stearic acid	33.998	0.16823	2,663.14
2	Myristoleic acid	27.733	0.01429	226.15	9	Oleic acid	35.482	5.96388	94,411.62
3	Pentadecanoic acid	27.926	0.01001	158.5			35.855	0.01747	
		28.926	0.04315				37.181	0.02063	
4	Palmitic acid	30.013	1.47488	23,348.21	10	Linoleic Acid	37.301	0.43585	6,899.68
		30.488	0.01509		11	Arachidic Acid	37.819	0.04980	788.32
		30.594	0.00608		12	γ-linolenic acid	38.749	0.00462	73.13
		30.978	0.03246		13	cis-11-eicosenoic acid	39.086	0.04134	654.48
		31.340	0.05357		14	Linolenic Acid	39.509	0.02179	344.91
		31.418	0.02320		15	Heneicosanoic Acid	39.697	0.00860	136.21
5	Palmitoleic acid	31.565	0.96809	15,325.38	16	Tricosanoic Acid	43.642	0.02143	339.29
		31.821	0.05538						

④ 흰점박이꽃무지 분획물 BACE1 활성저해능

- 흰점박이꽃무지 분획물의 BACE1 활성 저해능을 조사한 결과는 Fig. 10에 나타내었음. 50 µg/mL, 100 µg/mL 수준에서는 hexane fraction (23.86±0.8%, 49.63±0.5%), EA fraction (45.5±0.23%, 66.3±2.83%), BuOH fraction (13.12±1.14%, 35.02±1.1%), H2O fraction (23.55±0.12%, 45.87±1.24%)에 로 유의적인 차이를 가졌음(***p<0.001)

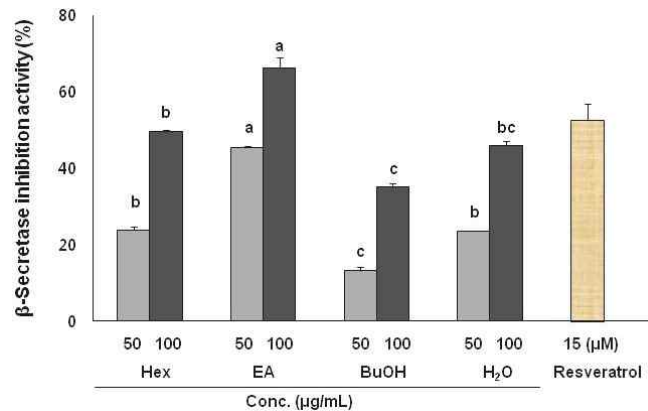


Fig. 10. β-Secretase inhibitory activity of solvent fractions from *Protaetia brevitarsis*

⑤ 흰점박이꽃무지 대표 지방산의 BACE1 활성저해능

- 흰점박이꽃무지의 대표지방산인 oleic acid와 갈색거저리 대표지방산과 비교시 차별화되는 gamma linolenic acid BACE1 활성 저해능을 조사한 결과는 다음과 같으며 이때 BACE1 inhibitor로 알려진 resveratrol을 positive control로 사용하였음 (Fig. 11). 세가지 물질 모두 농도 의존적인 저해능을 나타내었으며 각 농도별로 유의적인 차이를 가졌음

(***p<0.001, *p<0.05)

- 흰점박이꽃무지의 대표지방산인 oleic acid (24.0±1.6%, 76.7±1.6%)가 linolenic acid (36.16±1.49%, 42.86±0.19%)와 linolenic acid (14.1±0.11%, 50.70±0.52%)에 비해 상대적으로 높은 저해 효과를 나타내었음. Gamma-linolenic acid의 경우, linolenic acid (alpha-linolenic)에 비해 상대적으로 높은 BACE1저해능이 관측되었음

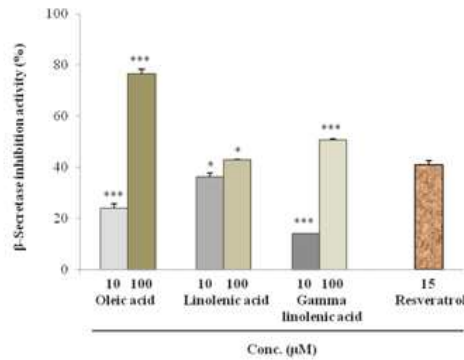


Fig. 11. β-Secretase inhibitory property of major compounds from *Protoetia brevitaris*.

⑥ 흰점박이꽃무지 대표 지방산의 효소 특이성 연구

- BACE1에 대한 효소 특이성을 검토하기 위하여 amyloidogenic process에 관여하는 TACE (α-secretase) 및 chymotrypsin, trypsin 등의 serine proteases에 대한 oleic acid, linolenic acid, gamma linolenic acid의 억제능을 조사한 결과 Table 8와 같음. 세가지 순수물질 모두 TACE를 비롯하여 chymotrypsin 및 trypsin에 대한 유의적인 저해효과는 보이지 않았으며 이 세가지 물질이 BACE1에 대한 선택적인 특이성을 지니는 저해제 (specific inhibitor of BACE1)로 판단할 수 있음

Table 8. Inhibitory activity of oleic acid, linolenic acid, gamma linolenic acid against α-Secretase and other serine proteases

	Conc.(μM)	Trypsin	Chymotrypsin	α-Secretase(TACE)
Oleic acid	50	5.50±1.97	5.00±0.19	5.81±1.00
	100	3.74±1.97	9.45±0.39	11.22±2.27
Linolenic acid	50	4.77±0.31	2.88±1.94	6.34±1.72
	100	7.62±1.04	4.18±0.10	13.62±1.95
Gamma linolenic acid	50	1.62±0.18	3.34±1.18	2.36±0.19
	100	1.30±0.37	0.21±0.10	4.83±0.84

⑦ 흰점박이꽃무지 대표물질인 oleic acid의 BACE1 활성 저해 양상

- 갈색거저리와 마찬가지로 대표물질로 선정된 oleic acid의 효소 저해 패턴을 Dixon plot을 이용하여 연구해 본 결과 각각 IC₅₀, 6.1x10⁻⁵ M, Ki, 3.43x10⁻⁵ M (Fig. 12)을 나타내었으며 Ki값이 x절편인 것으로 미루어 볼 때, oleic acid는 비경쟁적으로 BACE1을 저해하는 양상을 지님을 알 수 있음

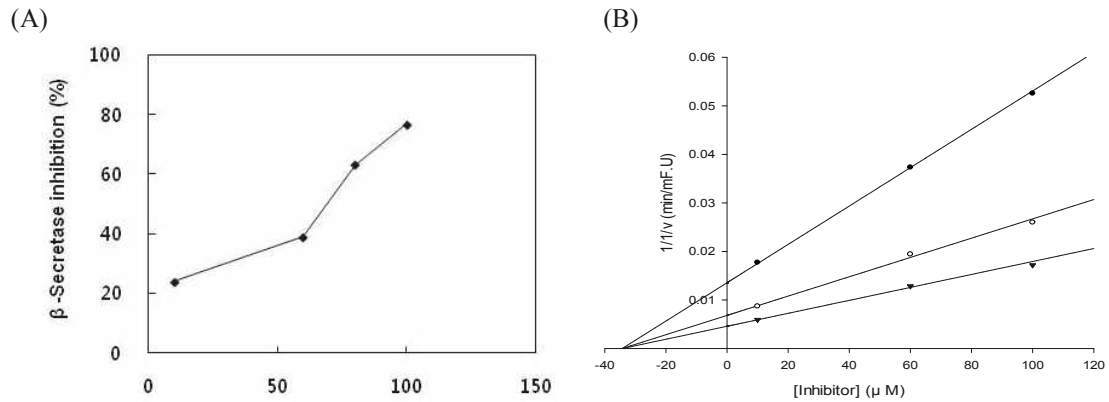


Fig 12. Concentration dependent inhibition of BACE1 activity by oleic acid (A), Dixon plot of oleic acid (B). Substrate concentration: -▼-; 750 nM, -○-; 500 nM, -●-; 250 nM

⑧ 흰점박이꽃무지 hexane fraction 세부 분획화

- 1차년도 수행 과제에서 흰점박이 꽃무지 분획물의 BACE1 저해 효과를 비교 하였을 때, 50 μg/mL, 100 μg/mL 농도에서 EtOAc 분획 (45.5±0.2%, 66.3±2.8%)과 hexane (23.9±0.8%, 49.6±0.5%) 분획이 BuOH (13.1±1.1%, 35.0±1.1%), H₂O (23.6±0.1%, 45.9±1.2%) 분획물에 비해 상대적으로 높은 저해효과를 나타내었음 (p<0.001) (Fig. 20). 그러나 흰점박이꽃무지 분획물 중 hexane fraction의 수율이 가장 높았기 때문에 hexane fraction에 초점을 맞추어 open column chromatography를 진행하였음. 갈색거저리 성분과 유사하여 추가진행하지 않음

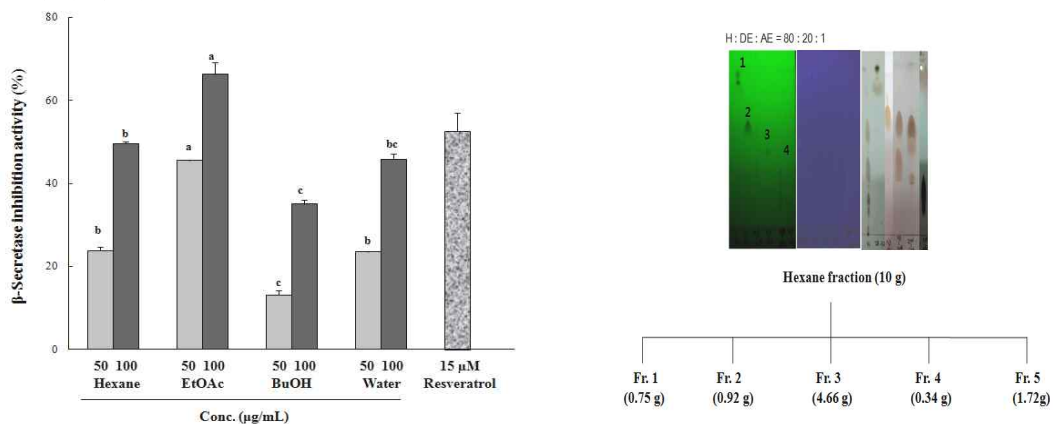


Fig. 20. β-Secretase inhibitory activity of solvent fractions from *Protactia brevitrasis*. The activities (%) are expressed as mean±SE of independent experiments. Same concentrations of each compound are significantly different at p<0.001.

⑨ 흰점박이 꽃무지 분획물의 Aβ(25-35) 유도독성으로부터의 세포사멸 저해효과

- 흰점박이 꽃무지 분획물을 이용하여 PC12 세포의 보호 효과를 실험한 결과, 분획물 모두 Aβ 유도독성으로부터 세포보호능이 관측되었고 특히 EtOH fraction과 EtOAc fraction 이 다른 분획물에 비해 강력한 뇌세포 보호능이 있는 것으로 판단됨 (Fig. 21)

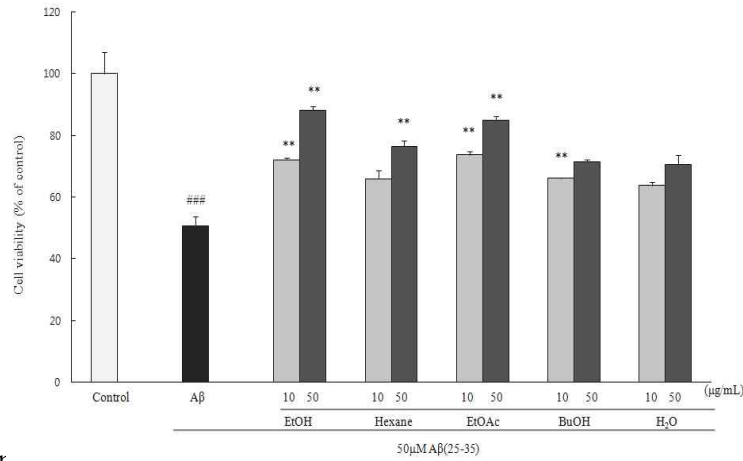


Fig. 21. Protective effects of solvent fractions from *Protactia brevitarsis* on Aβ(25-35)-induced cell death. PC12 cells were pretreated with solvent fractions for 1hr and further treated with 50µM of Aβ(25-35) for 24 hr. Cell viability was assessed by measuring MTT reduction. ### $P < 0.001$ vs control group. ** $P < 0.01$ versus the group treated with Aβ(25-35) alone. Data represent the mean±SD of three independent experiments.

⑩ 흰점박이꽃무지 분획물의 Aβ(25-35) 유도 ROS 생성 저해효과

- Aβ에 의하여 유도되는 활성 산소 (ROS) 저해 효과 실험을 통하여 흰점박이 꽃무지 분획물의 신경세포 보호효과를 확인하였음 (Fig. 22, 23). 흰점박이 꽃무지 분획물 모두 Aβ 유도독성으로부터 ROS 저해 효능이 관측됨

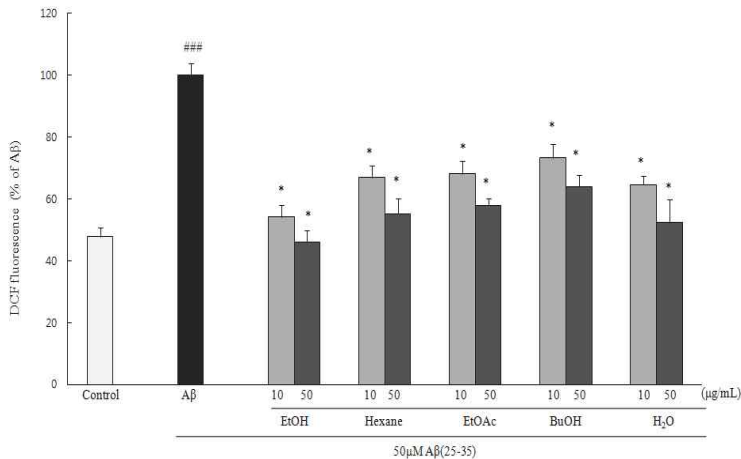


Fig. 22. Inhibitory effects of solvent fractions from *Protactia brevitarsis* on Aβ(25-35)-induced intracellular ROS accumulation. PC12 cells were pretreated with solvent fractions for 1hr and further treated with 50 µM of Aβ(25-35) for 24 hr. ROS production was measured using the CM-H₂DCFDA fluorescent dye. ### $P < 0.001$ vs control group. * $P < 0.05$ vs the group treated with Aβ(25-35) alone. Data represent the mean±SD of three independent experiments.

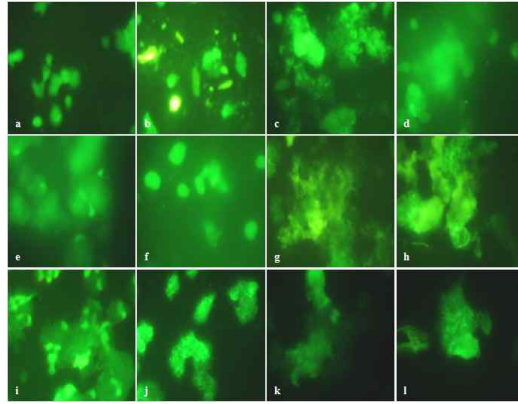


Fig. 23. Levels of ROS damaged by A β (25-35) and protective effect of *Protoetia brevitarsis* fractions in PC12 cells. (a) Control, (b) 50 μ M A β (25-35), (c) 50 μ M A β (25-35) + 10 μ g/ml EtOH, (d) 50 μ M A β (25-35) + 50 μ g/ml EtOH, (e) 50 μ M A β (25-35) + 10 μ g/ml Hexane, (f) 50 μ M A β (25-35) + 50 μ g/ml Hexane, (g) 50 μ M A β (25-35) + 10 μ g/ml EA, (h) 50 μ M A β (25-35) + 50 μ g/ml EA, (i) 50 μ M A β (25-35) + 10 μ g/ml BuOH, (j) 50 μ M A β (25-35) + 50 μ g/ml BuOH, (k) 50 μ M A β (25-35) + 10 μ g/ml H₂O, (l) 50 μ M A β (25-35) + 50 μ g/ml H₂O.

⑪ 흰점박이꽃무지 분획물의 A β (25-35) 유도 Apoptosis 저해능에 대한 영향

- A β (25-35) 에 대한 흰점박이 꽃무지의 세포사멸 저해능을 조사한 결과 분획물의 A β (25-35) 유도 apoptosis 저해효과를 관찰할 수 있었으며 특히 hexane 분획물이 다른 분획물에 비해 세포사멸 저해능이 높음을 알 수 있음 (Fig. 24). A β 유도독성으로 인한 세포의 morphology 변화를 관찰한 결과, hexane 50 μ M 처리한 경우 A β 처리하지 않은 대조군과 거의 유사한 형태를 유지함을 관찰할 수 있음 (Fig. 25)

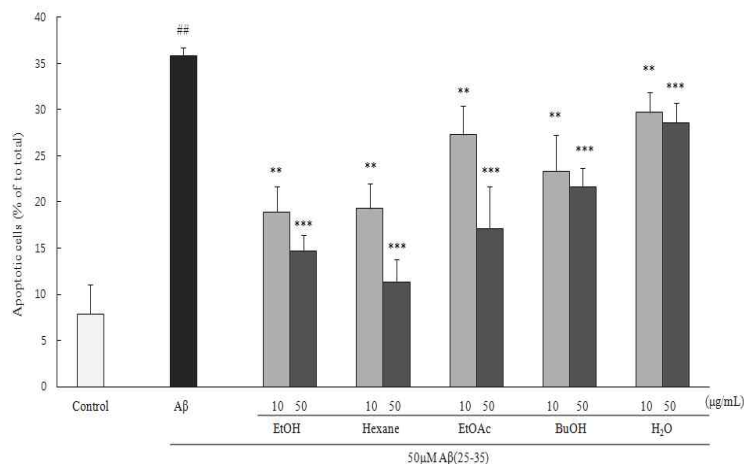


Fig. 24. Inhibitory effects of solvent fractions from *Protoetia brevitarsis* on (25-35)-induced apoptosis. PC12 cells were pretreated with solvent fractions for 1hr and further treated with 50 μ M of A β (25-35) for 24 hr. Morphological apoptosis was determined by Heochst 33342 staining under fluorescence microscopy (magnification \times 400). $^{##}P < 0.001$ vs control group. $^{**}P < 0.01$ and $^{*}P < 0.05$ vs the group treated with A β (25-35) alone. Data represent the mean \pm SD of three independent experiments.

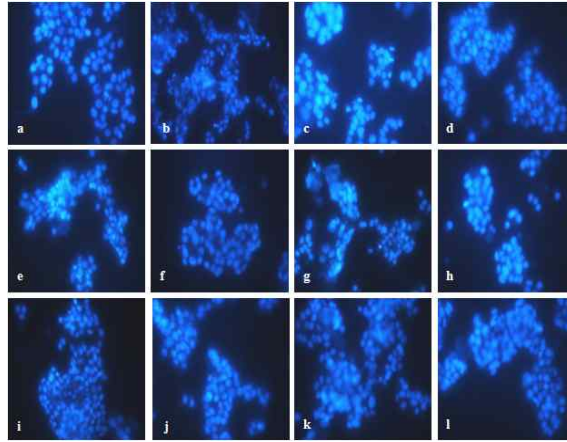


Fig. 25. Microscopic analysis of solvent fractions from *Protactia brevitarsis* on A β (25-35)- induced apoptosis. Representative images of PC12 cells with A β (25-35) treatment in the presence or absence of solvent fractions from *Protactia brevitarsis* (a) Control, (b) 50 μ M A β (25-35), (c) 50 μ M A β (25-35) + 10 μ g/ml EtOH, (d) 50 μ M A β (25-35) + 50 μ g/ml EtOH, (e) 50 μ M A β (25-35) + 10 μ g/ml Hexane, (f) 50 μ M A β (25-35) + 50 μ g/ml Hexane, (g) 50 μ M A β (25-35) + 10 μ g/ml EA, (h) 50 μ M A β (25-35) + 50 μ g/ml EA, (i) 50 μ M A β (25-35) + 10 μ g/ml BuOH, (j) 50 μ M A β (25-35) + 50 μ g/ml BuOH, (k) 50 μ M A β (25-35) + 10 μ g/ml H₂O, (l) 50 μ M A β (25-35) + 50 μ g/ml H₂O.

⑫ 흰점박이꽃무지 분획물의 Caspase-3 저해효과

- A β (25-35)에 의한 흰점박이 꽃무지 분획물의 caspase-3 저해능을 조사하였음. 대부분의 분획물에서 A β (25-35) 유도 caspase-3 저해 효과를 확인하였으며, EtOH과 hexane fraction의 경우 다른 fraction에 비해 강력한 저해효과를 보였음 (Fig. 26)

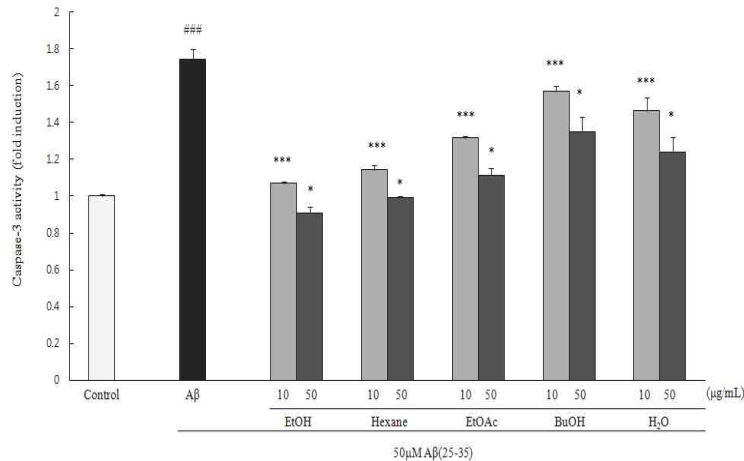


Fig. 26. Protective effects of *Protactia brevitarsis* on A β (25-35)-induced caspase-3 activation. PC12 cells were pretreated with *Protactia brebitarsis* fractions for 1hr and further treated with 50 μ M of A β (25-35) for 24hr. ### $P < 0.001$ vs control group. *** $P < 0.001$ and * $P < 0.05$ vs the group treated with A β (25-35) alone. Data represent the mean \pm SD of three independent experiments.

다. 분리물질의 특성 구명

① 분리물질 oleic acid의 세포보호효과

- Oleic acid의 PC12 세포보호효과를 flow cytometry 통해 관찰함. 왼쪽 파란색 원은 live cell, 오른쪽 빨간색 원은 dead cell을 의미 함. oleic acid 처리시 농도 의존적으로 세포보호 효과를 나타내었으며 특히 25 μ M에서 대조군과 유사한 효과를 나타냄 (Fig. 27).

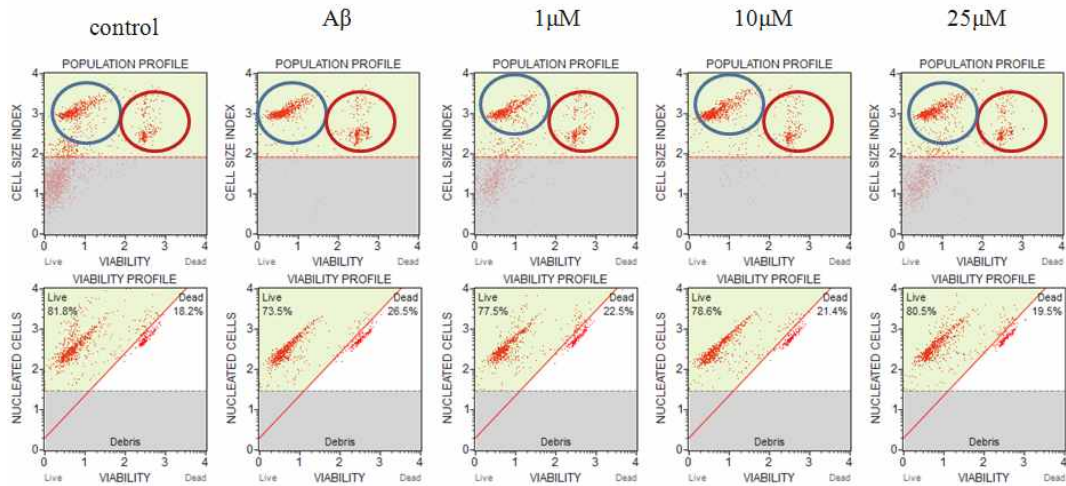


Fig. 27. Protective effects of Oleic acid on A β (25-35)-induced cell death. viability profile of PC12 cells were pretreated with Oleic acid for 1hr and further treated with 50 μ M of A β (25-35) for 24 hr with Muse™ cell analyzer (Millipore).

② Oleic acid: cell cycle assay

- A β (25-35)를 처리한 PC 12 세포에 대한 oleic acid의 cell cycle에 미치는 영향을 관찰한 결과, A β 처리한 경우에는 G0/G1기 증가 S기 감소함. 반면에 sample처리 군의 경우 G0/G1기 감소, S기 증가함을 볼 수 있음 (Fig. 28)

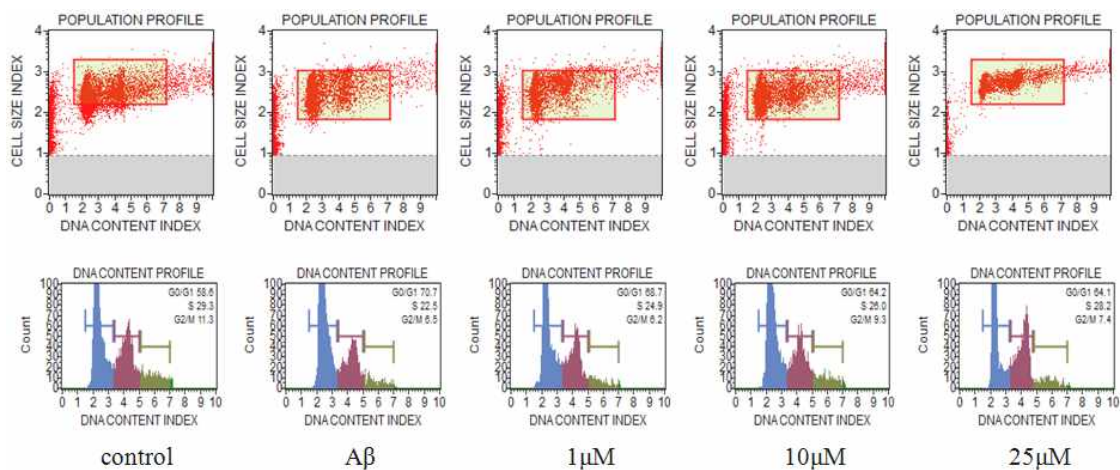


Fig. 28. Effect of Oleic acid on PC12 cell cycle. Cell cycle profile of PC12 cells were pretreated with solvent fractions for 1 hr and further treated with 50 μ M of A β (25-35) for 24 hr with Muse™ cell analyzer(Millipore).

③ Oleic acid의 apoptosis 저해효과

- Aβ(25-35)에 대한 oleic acid의 세포 사멸 저해능을 flow cytometry를 이용하여 더욱 구체적으로 살펴본 결과, live cell은 농도 의존적으로 증가하고 early 및 late apoptosis는 감소함 (Fig. 29)

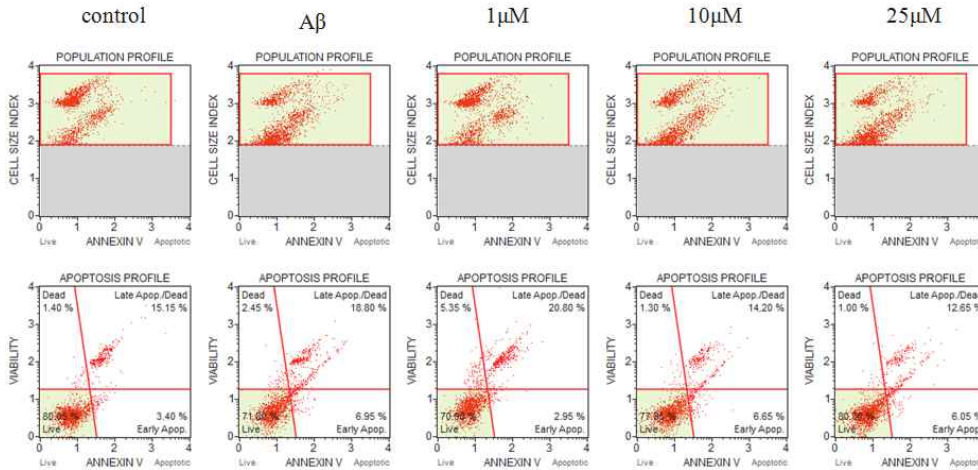


Fig. 29. Inhibitory effects of Oleic acid on Aβ(25-35)-induced apoptosis. Apoptosis profile of PC12 cells were pretreated with oleic acid for 1 hr and further treated with 50 μM of Aβ(25-35) for 24 hr with Muse™ cell analyzer (Millipore).

④ oleic acid의 apoptosis 저해효과 (MANUAL-Hoechst staining)

- Aβ(25-35)의 유도독성에 대한 oleic acid 세포사멸 저해능을 조사한 결과는 다음과 같음. oleic acid 전 농도 구간에서 농도 의존적인 저해양상을 보였으며 특히 25 μM에서 가장 좋은 효과 나타냄. (Fig. 30). Aβ(25-35)에 의해 손상을 입은 세포는 oleic acid를 처리한 결과 Aβ(25-35)를 처리하지 않은 대조군과 거의 유사한 형태를 유지함 (Fig. 31)

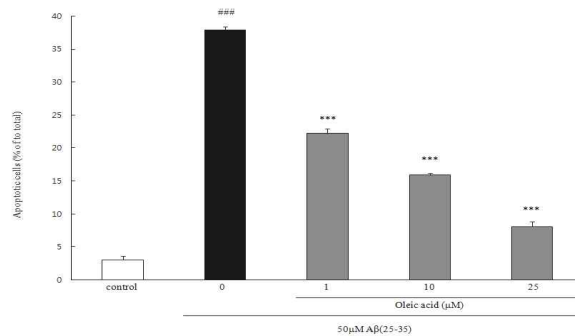


Fig. 30. Inhibitory effects of oleic acid on Aβ(25-35)-induced apoptosis. PC12 cells were pretreated with oleic acid for 1hr and further treated with 50 μM of Aβ(25-35) for 24 hr. Morphological apoptosis was determined by Hoechst 33342 staining under fluorescence microscopy (magnification ×400).

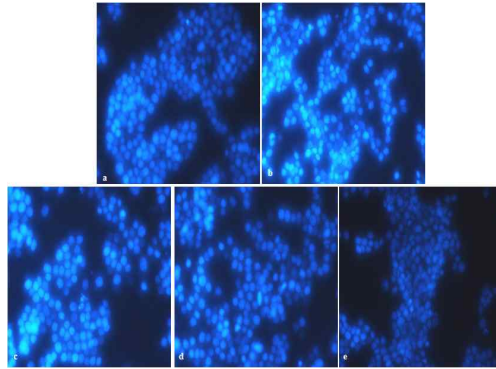


Fig. 31. Microscopic analysis of oleic acid on A β (25-35)-induced apoptosis. Representative images of PC12 cells with A β (25-35) treatment in the presence or absence of oleic acid. (a) Control, (b) 50 μ M A β (25-35), (c) 50 μ M A β (25-35) + 1 μ M oleic acid, (d) 50 μ M A β (25-35) + 10 μ M oleic acid, (e) 50 μ M A β (25-35) + 25 μ M oleic acid

⑤ oleic acid의 caspase-3 저해효과

- Oleic acid의 A β (25-35)에 의한 caspase-3 활성 저해능은 아래와 같음. 전체 농도구간에 서 강력한 농도 의존적인 저해를 보였으며 특히 A β (25-35)를 처리하지 않은 대조군보다 도 낮은 caspase-3 활성을 나타냄 (Fig. 32)

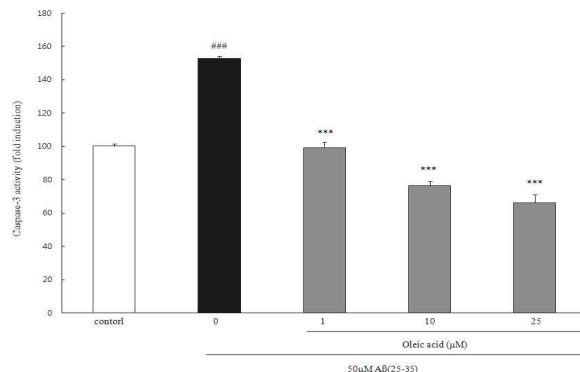


Fig. 32. Protective effects of oleic acid on A β (25-35)-induced caspase-3 activation. PC12 cells were pretreated with Oleic acid for 1hr and further treated with 50 μ M of A β (25-35) for 24hr. ### $P < 0.001$ vs control group. *** $P < 0.001$ vs the group treated with A β (25-35) alone. Data represent the mean \pm SD of three independent experiments.

⑥ 구조, 활성 관계: *In silico* docking simulation study of oleic acid, linoleic acid and γ -linolenic acid

- Alzheimer's disease 치료제로 주목받고 있는 BACE1 저해제가 해결해야 할 과제는 뛰어난 저해능 뿐만 아니라 blood brain barrier (BBB) 통과 여부임. In vitro BACE1 활성 저해 평가에서 높은 저해 능력을 지녔던 곤충 유래 oleic acid, linoleic acid 및 γ -linolenic acid는 이미 BBB를 통과할 수 있다는 것 또한 여러 연구를 통해 밝혀짐.
- *In vitro* BACE1 활성 저해 평가에서 높은 저해 능력을 지닌 것으로 밝혀진 oleic

acid, linoleic acid 및 γ -linolenic acid의 결합 모델링(binding modeling) 알아보기 위해 docking simulation을 실시함.

- 세 지방산은 기질과 결합하는 catalytic center (Asp32, Asp228, marked in red color)와 다른 allosteric sites (marked in blue and green color)에 결합함으로써 biological evaluation 결과와 동일하게 비경쟁적 저해제임이 밝혀짐 [Fig. 35, (A), (C), (E)]. Oleic acid, linoleic acid 및 γ -linolenic acid의 결합 에너지는 각각 -6.0, -5.9, -6.2 kcal/mol로 나타남
- BACE1과의 결합 자리는 oleic acid의 경우, SER10, ALA157, GLN303, ARG307, PRO308, CYS319, TYR320, VAL336, linoleic acid는 TYR14, ALA157, VAL170, THR232, GLN304, ALA323, ALA335, GLU339, HIS360, VAL361이고 γ -linolenic acid는 LYS9, SER10, TYR14, LEU154, CYS155, GLN304, TYR305, ARG307, GLU339, CYS359, HIS360, VAL361임 [Fig. 33, (B), (D), (F)].
- 결합 방법의 경우, oleic acid는 BACE1의 CYS319 (-OH), TYR320 (-NH3)등과 수소 결합을 이루고, linoleic acid는 BACE1의 GLN304 (-C=O), γ -linolenic acid는 CYS359 (-OH)와 수소결합을 이루는 것으로 나타남.
- 위의 결과를 통해 곤충 유래 지방산들과 BACE1과의 결합상태(binding mode)를 구현함으로써, 파마코포어 (pharmacophore) 탐색과 저해활성 기작 규명뿐 만 아니라 새로운 BACE1 저해제 개발을 위한 방향을 제시함.

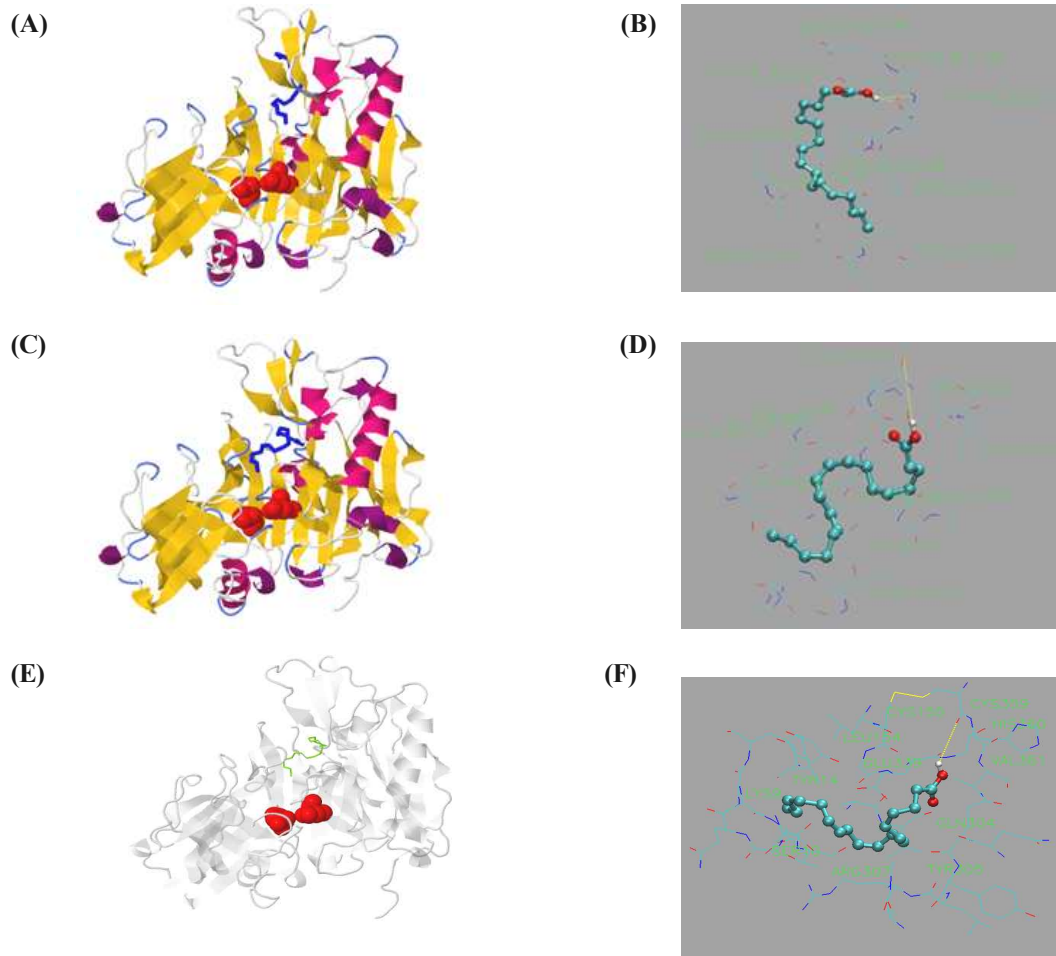


Fig. 33. *In silico* molecular docking poses for oleic acid, linoleic acid and γ -linolenic

acid with human BACE1. (A),(C),(E): The complete view of the docking poses of oleic acid, linoleic acid and γ -linolenic acid, respectively. Human BACE1 is expressed as a solid ribbon diagram and oleic, linoleic and γ -linolenic acid as a branch depiction. Asp32 and Asp228 are the active catalytic center residues marked in red color. (B),(D),(F): The close up figures of oleic acid-BACE1, linoleic acid-BACE1 and gamma linolenic acid-BACE1 docking modes, spectively. Hydrogen bond interactions between fatty acids and the human BACE1 residues are displayed as yellow lines. The structural ligands were performed by AutoDock Vina.

⑦ 갈색거저리 활성물질 탐색 및 구조 동정

- BACE1 및 abeta 유도독성으로부터의 세포보호 실험에서 가장 뛰어난 효과를 지닌 EtOAc층을 대상으로 open column chromatography를 실시함. 수율문제로 인해 (EtOAc fr. 0.78g /1.2 kg freeze dried T. molitor powder)로 인해 5 kg 갈색거저리 분말을 이용하여 다시 대량 추출함
- 갈색거저리 분말 5 kg으로부터 Fig. 36과 같은 방법으로 EtOAc 분획 10.02 g (0.84%)을 최종 획득함
- EtOAc 분획물을 확인용매로 (MC:EtOAc:MeOH=20:1:0.5)로 전개시킨 결과, 6개의 major compound가 있는 것으로 나타남. 현재 이들 compounds를 분리하기 위하여 EtOAc 분획물의 open column (MC:EtOAc= 5:1/3:1/1:1/EtOAc)을 진행 중에 있음

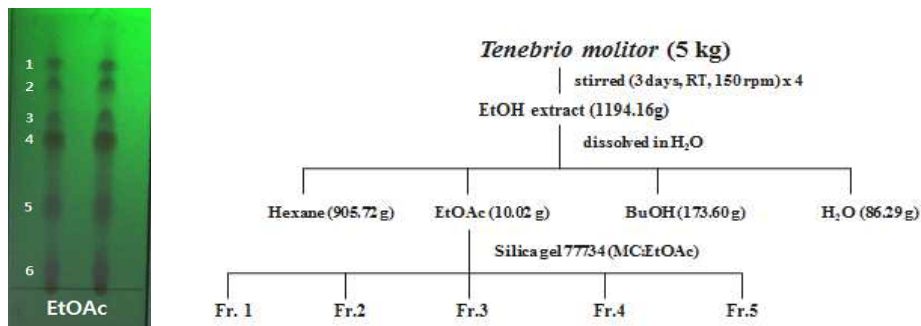


Fig. 34. Activity-guided isolation scheme of *Tenebrio molitor*

- EtOAc fraction과 hexane fraction이 겹치는 부분이 있는지 확인하기 위하여 hexane: ethyl ether: acetic acid=80:20:1로 thin layer chromatography를 실시함 (Fig. 35). EtOAc fraction은 hexane fraction 및 지방산에 비해 훨씬 아래쪽에 존재하는 것으로 밝혀짐으로 hexane 분획층과는 다른 active compound가 존재할 것으로 기대됨



Fig. 35. Thin layer chromatography (TLC) of hexane fraction and ethyl acetate fraction from *Tenebrio molitor*

- ⑧ 갈색거저리/흰점박이꽃무지의 대표성분인 올레산의 A β ₂₅₋₃₅유도 TNF- α 생성 저해효과
 - A β ₂₅₋₃₅에 의해 현저히 증가한 TNF- α 의 발현을 올레산 처리 시 농도 의존적으로 저해하였으며 전체 농도구간에서 유의적인 활성을 보임 (p<0.01, Fig. 36).

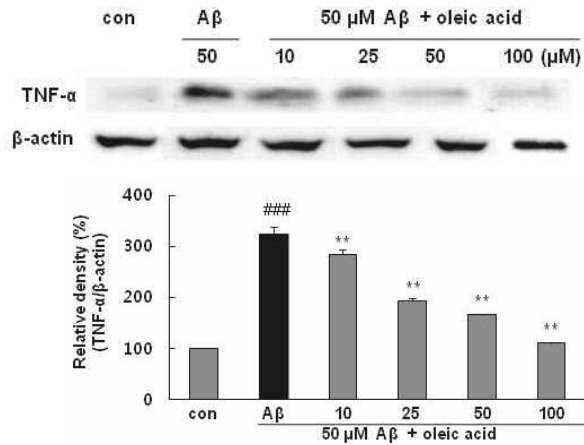
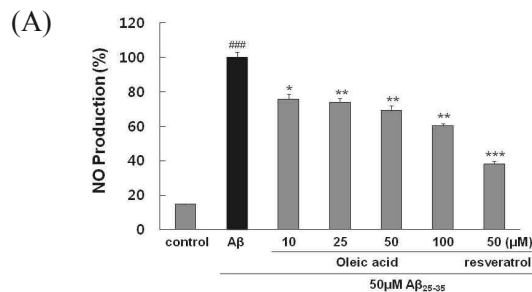


Fig. 36. Effects of oleic acid on A β ₂₅₋₃₅-induced TNF- α expression in PC12 cells

- ⑨ 올레산의 A β ₂₅₋₃₅ 유도 NO생성 및 iNOS 발현 저해효과
 - A β ₂₅₋₃₅ 처리 시 증가한 NO생성량이 올레산에 의해 농도 의존적인 저해양상을 보였으며 특히 모든 농도에서 유의적인 억제 효과를 보임 [Fig. 37(A)]. NO 생성 억제효과가 iNOS의 발현과 관련이 있는지를 확인하기 위해 iNOS 단백질 발현을 조사한 결과 A β ₂₅₋₃₅에 의해 3 배 이상 증가된 iNOS는 올레산 처리 시 현저한 감소를 보임 [Fig. 37(B)].



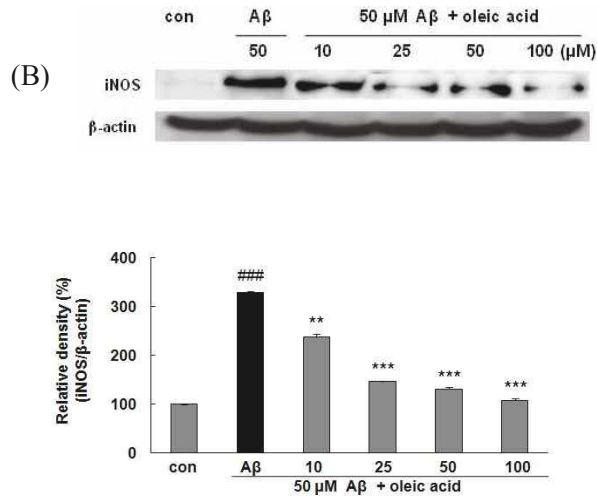


Fig. 37. Effects of oleic acid on A β_{25-35} -induced NO production and iNOS protein expression in PC12 cells

⑩ 올레산의 A β_{25-35} 유도 COX-2 발현 저해효과

- PGE2 생성에 관여하는 효소로 알려진 COX-2의 단백질 발현량은 올레산 25 μ M에서 유의성 있는 저해효과를 보였으며 특히 100 μ M 농도에서 가장 뛰어난 활성을 보임 (Fig. 38)

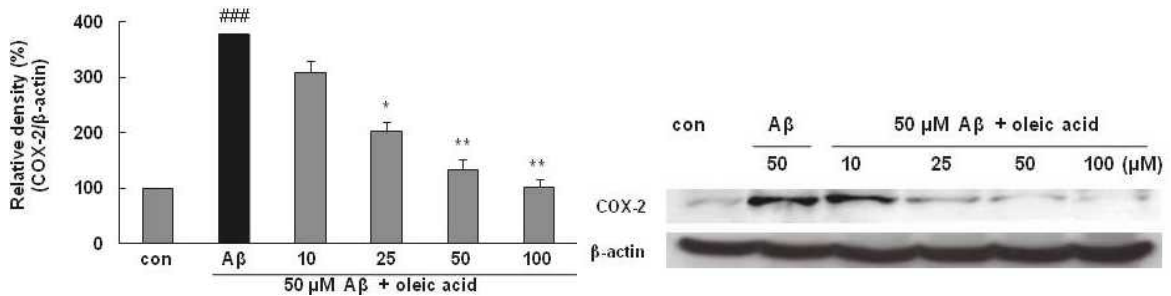


Fig. 38. Effects of oleic acid on A β_{25-35} -induced COX-2 protein expression in PC12 cells

⑪ 올레산의 A β_{25-35} 유도 NF- κ B 생성 저해 효과

- TNF- α , iNOS 및 COX-2 생성에 관여하는 전사인자인 NF- κ B p65는 A β_{25-35} 유도 독성에 의해 2배 이상 증가하였으나 ($p < 0.01$) 올레산 처리 시 농도 의존적인 감소 양상을 보임. I- κ B의 경우 올레산 10 μ M을 제외한 나머지 농도에서 유의적인 활성 저해 양상을 보임 (Fig. 39)

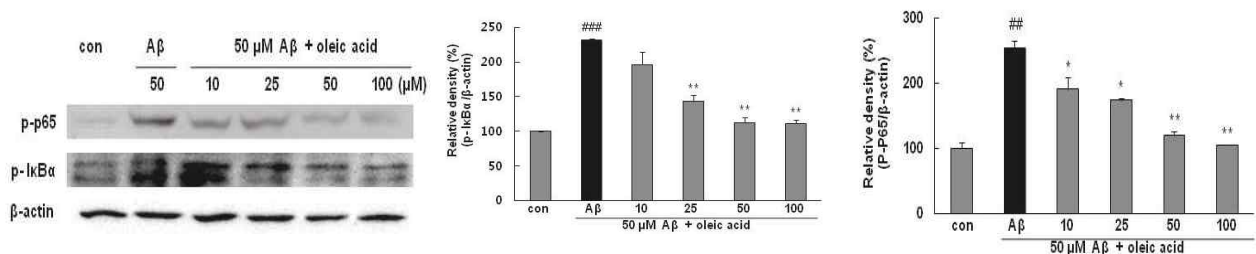


Fig. 39. Effects of oleic acid against A β_{25-35} -induced NF- κ B expression in PC 12 cells

⑫ 올레산의 A β ₂₅₋₃₅ 유도 MAPKs 인산화 저해효과

- A β ₂₅₋₃₅ 유도 독성은 MAPK family인 p-38, ERK 및 JNK을 모두 급격히 인산화 시킴 (Fig. 40). 올레산 처리 시 p-38은 농도 의존적으로 활성이 감소하였고 10 μ M을 제외한 모든 농도에서 유의적인 저해활성을 보임. p-ERK1/2는 모든 농도구간에서 유의적인 발현 저해 효과를 나타냈으며 특히 25 mg/L에서부터 탁월한 효과를 보임. JNK의 경우 p-38 및 ERK보다 다소 약한 저해능을 보였으나 50, 100 μ M에서는 유의적인 효과를 보임

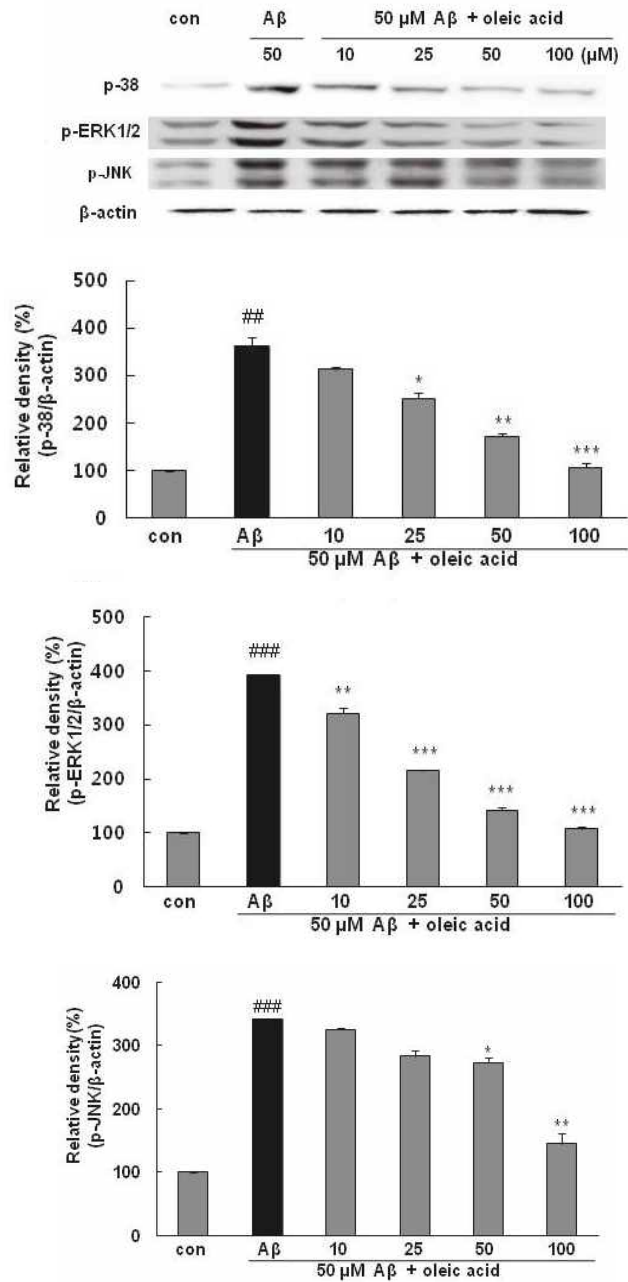
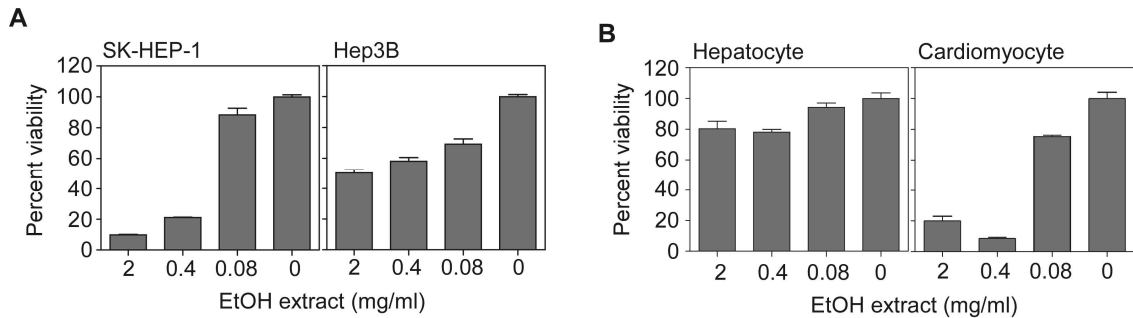


Fig. 40. Effects of oleic acid against A β ₂₅₋₃₅-induced phosphorylation of MAPKs in PC12 cells

3. 곤충추출물의 간암모델에서의 약리활성 검증(제2협동)

가. 갈색거저리 에탄올 추출물의 항암활성

- ① 갈색거저리 분말에 대한 에탄올 추출물질에 대한 항암활성을 보기위해서 간암세포주인 SK-HEP-1, Hep3B에 대한 세포독성을 MTT 분석으로 조사함. MTT 분석은 96 well plate에 배양된 세포에 24 시간동안 약물을 처리하고, 3-(4,5-dimethyl thiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide을 4시간 추가로 처리하여 배양액을 제거한 뒤 DMSO로 녹여서 plate reader기를 사용하여 600 nm에서 흡광도를 측정함
- ② 정상세포에 대한 갈색거저리 추출물의 세포독성을 조사하기 위해 정상쥐의 간과 심장에서로부터 분리한 hepatocyte 및 cardiomyocyte를 대상으로 MTT분석하여 비교함

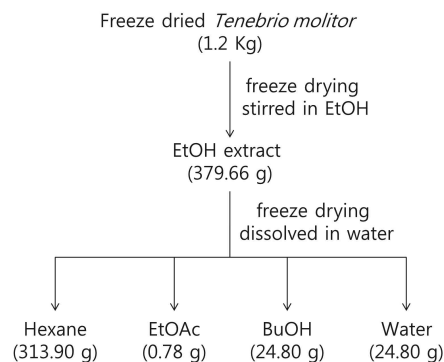


[그림] 세포독성분석. (A) 간암세포주에 대한 세포독성 MTT 분석. 갈색거저리 에탄올추출물을 주어진 농도조건에서 24시간 처리후 MTT 분석함. (B) 정상 간 및 심장세포에 대한 세포독성 분석. BALB/c 실험쥐의 간과 심장에서로부터 분리한 정상 간(primary hepatocyte) 및 심장세포 (primary cardiomyocyte)에 대한 세포독성을 MTT로 분석함. 주어진 농도조건에서 24시간 처리후 분석

[결론] 갈색거저리 에탄올 추출물은 암세포에 대한 독성뿐만 아니라 정상세포 특히 심근세포에 대한 독성이 높음을 확인함

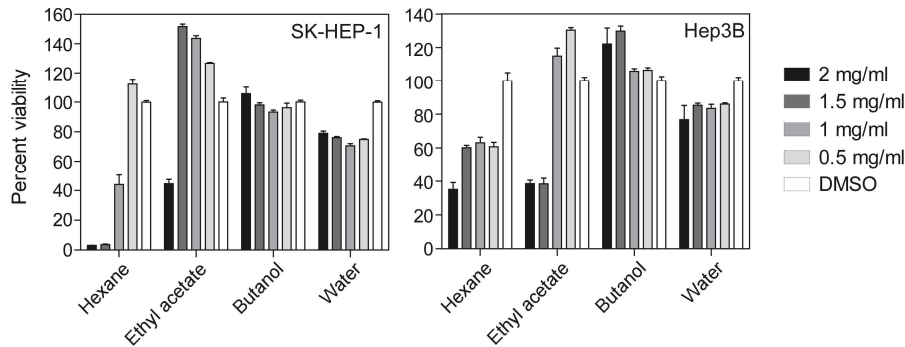
나. 갈색거저리 추가분획물의 항암활성

- ① 동아대학교 전미라교수팀에서 갈색거저리 에탄올 추출물에 대한 추가분획을 실시하여 hexane, ethylacetate, butanol, water fraction을 제공함
- ② 이들 추가분획물에 대한 항암활성을 다양한 암세포주에 대한 세포기반 활성분석시스템을 활용하여 활성을 검증함



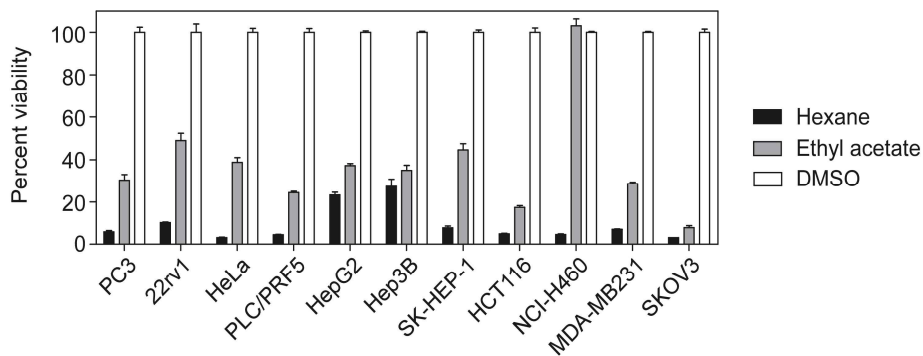
[그림] 갈색거저리 분말의 분획. 에탄올 추출물로부터 hexane, ethyl acetate (EA), butanol, water 분획을 확보함

- ③ 4종의 추출물에 대해서 2종의 암세포주를 대상으로 세포독성분석을 실시함: 아래의 그림과 같이 hexane 추출물이 암세포주 모두에서 강한 세포독성이 있음을 확인함. 반면, butanol과 water 추출물들은 상대적으로 약한 활성을 가지고 있었고, EA의 경우에는 hexane 보다는 약하지만 세포독성 활성이 있음을 확인함



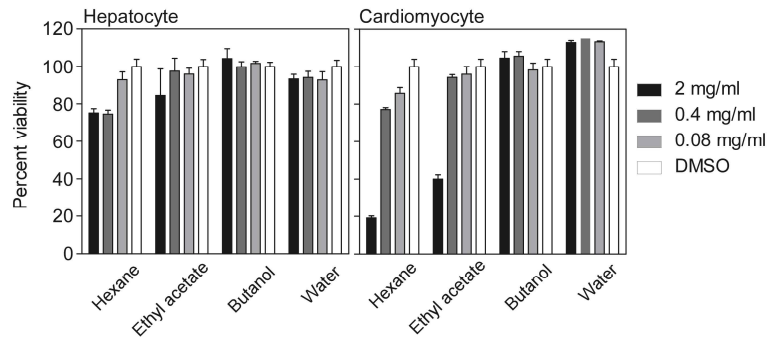
[그림] Hexane, ethyl acetate (EA), butanol, water 추출물들의 간암세포주에 대한 세포독성. 표시된 농도조건에서 24시간 처리후 MTT로 분석함

- ④ 간암세포주에 대해서 활성을 보이는 hexane과 EA 추출물을 대상으로 다양한 암세포주에서의 세포독성을 분석함. 분석에 사용된 암세포주는 다음과 같음: 전립선암(PC3, 22Rv1), 자궁경부암(HeLa), 간암 (PLC, HepG2, Hep3B, SK-HEP-1), 직장암 (HCT116), 폐암 (NCI-H460), 유방암(MDA-MB-231), 난소암 (SK-OV3)
- ⑤ Hexane 추출물은 분석에 사용된 모든 암세포주에서 강한 세포독성을 보여주었고, EA 추출물은 세포독성이 있으나 hexane 추출물보다는 약한 활성을 가짐. 또한 일부암세포주 (NCI-H460)에서 EA는 전혀 독성을 보이지 않음



[그림] Hexane, ethyl acetate (EA), butanol, water 추출물들의 간암세포주에 대한 세포독성. 2mg/ml의 농도에서 24시간 처리 후, MTT로 분석함

- ⑥ 정상세포에 대한 독성분석을 위해 BALB/c 쥐의 간과 심장으로부터 분리된 정상 간세포 및 심장세포에 대한 세포독성을 확인함

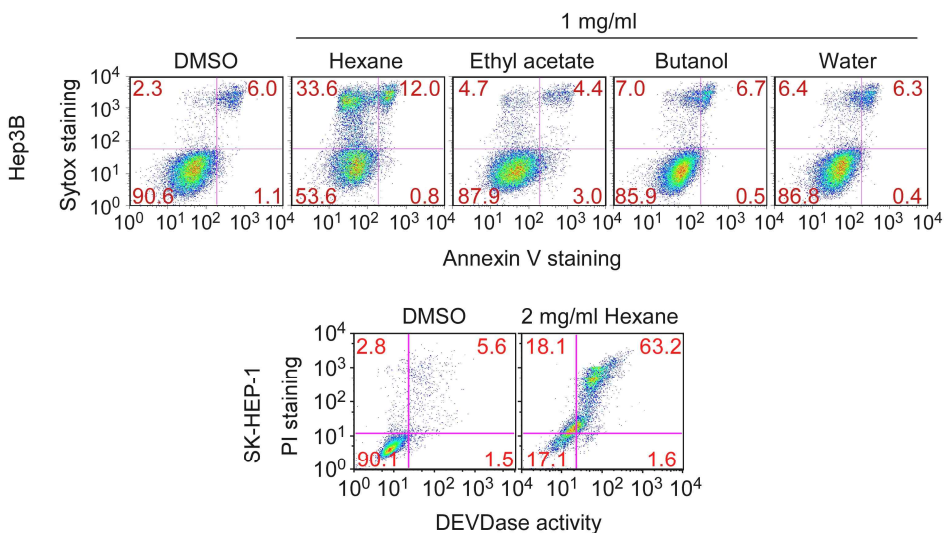


[그림] Hexane, ethyl acetate (EA), butanol, water 추출물들의 정상세포에 대한 세포독성. 쥐의 간과 심장으로부터 추출된 primary hepatocyte 및 primay cardiomyocyte에 주어진 농도조건의 추출물을 24시간 동안 처리한 후 세포독성을 MTT로 분석함

[결론] 갈색거저리 에탄올추출물을 추가분획하여 얻은 hexane 추출물은 정상세포에 대한 독성은 제한적이면서 암세포에 대한 세포독성이 강한 성분을 가지고 있음을 확인함

다. 갈색거저리 분획물의 세포독성기전 분석

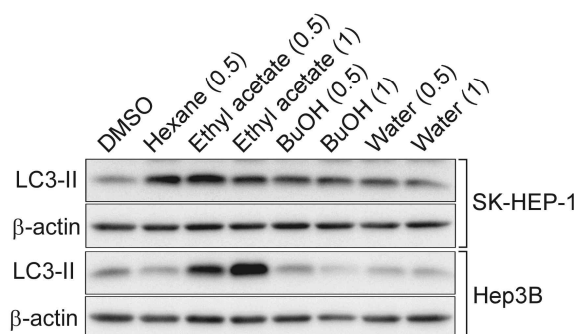
- ① 세포독성을 유도하는 약물기전 분석을 위해, 대표적인 세포죽음기전인 apoptosis가 활성화 되는지 확인함
- ② 세포에 약물을 24시간 처리한 후, trypsin으로 세포를 harvest하고, PBS로 세척한 후, AnnexinV와 Sytox로 염색을 하여 flow cytometry로 분석함으로써 apoptosis 및 necrosis 유도여부를 확인함
- ③ 다른 추출물과 비교하였을 때, hexane 추출물에서 Sytox만 염색되는 세포비율 및 AnnexinV와 Sytox에 동시에 염색되는 세포 비율이 Hep3B에서 확연히 증가함을 확인함; 비슷한 결과로, 다른 간암세포주인 SK-HEP-1에서 FITC-DEVD-fmk를 1시간 처리하고 propidium iodide (PI)로 동시에 염색하여 DEVDase 활성과 세포막투과성을 flow cytometry로 분석하여 DEVDase 및 PI double positive 세포 비율이 hexane 추출물 처리로 증가됨을 확인함
- ④ 이를 통해 hexane 추출물을 처리하게 되면, 세포괴사(necrosis) 및 세포자살(apoptosis)이 모두 활성화되어 암세포들의 세포죽음을 유도할 수 있음을 확인함



[그림] Hexane, ethyl acetate (EA), butanol, water 추출물들의 세포죽음유도기전. Hep3B(위)

및 SK-HEP-1(아래) 세포주에 대해서 표시된 농도조건에서 추출물들을 24시간 처리한 후, Sytox 및 AnnexinV (위) 혹은 DEVDase, propidium iodide (PI) 염색후 (아래) 형광염색정도를 flow cytometry로 분석함

- ⑤ 세포죽음 기전으로 알려진 autophagy 유도능에 대한 분석을 위해, 추출물들을 처리한 후 autophagy marker로 흔히 사용되고 있는 lipidated LC3 form (LC3-II)를 western blotting으로 확인함
- ⑥ EA에서 서로 다른 두가지 세포주에 대해서 강한 autophagy유도능을 확인함. Hexane 추출물의 경우에는 SK-HEP-1에서만 LC3-II를 만들었으나, 이것도 세포죽음유도로 인한 효과일수 있을 것으로 추출됨



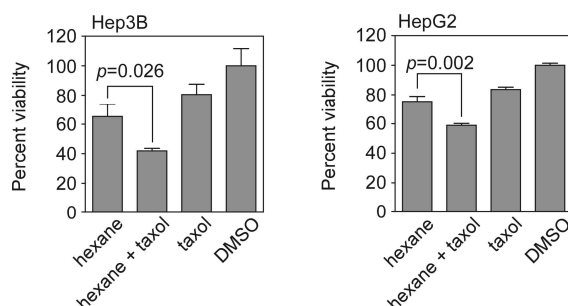
[그림] Hexane, ethyl acetate (EA), butanol, water 추출물들의 autophagy 유도능. 추출물들을 주어진 농도 (괄호안) 조건에서 SK-HEP-1(위)와 Hep3B(아래)에 처리한 후 24시간 후, western blotting으로 분석함

[결론] Hexane 추출물의 암세포주에 대한 세포독성유도기전은 주로 apoptosis와 necrosis와 같은 직접적인 세포죽음 기전유도가 주 원인인 것으로 생각되며, EA의 경우에는 autophagy와 같은 metabolic dysfunction에 의해서 유도되는 세포죽음기전으로 사료됨

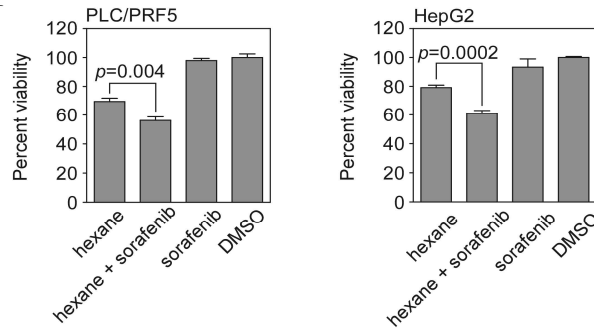
라. Hexane 추출물의 항암약물과의 병용요법

- ① 최근 항암치료전략은 단독투여가 아닌, 여러 항암약물 및 기술들을 병용으로 활용하는 것이 대세임. 따라서, 가장 좋은 항암활성을 보여준 hexane 추출물에 대해서 임상에서 다양한 암환자들에게 처방되고 있는 항암약물들과의 병용요법이 효과가 있는지 확인함: 탁솔, 소라페닙, 독소루비신의 3종의 항암물질을 활용함

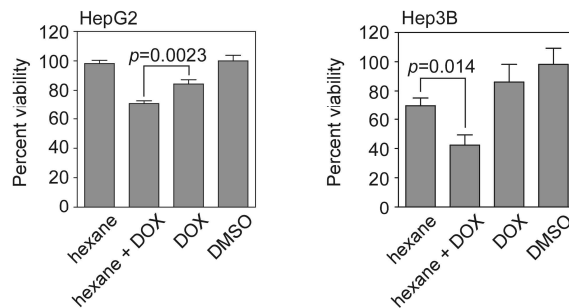
[결론] 약물간 효능의 차이는 있으나, 실험에 사용된 모든 병용요법에서 additive이상의 약물 상승효과가 있음을 확인함



[그림] Hexane 추출물과 항암제 탁솔과의 병용요법. Hep3B, HepG2 세포주에 대해서 0.2 mg/ml hexane과 2 μ M (Hep3B) 혹은 1 μ M (HepG2) 탁솔을 각각 혹은 함께 24시간 처리한 후, MTT로 분석함



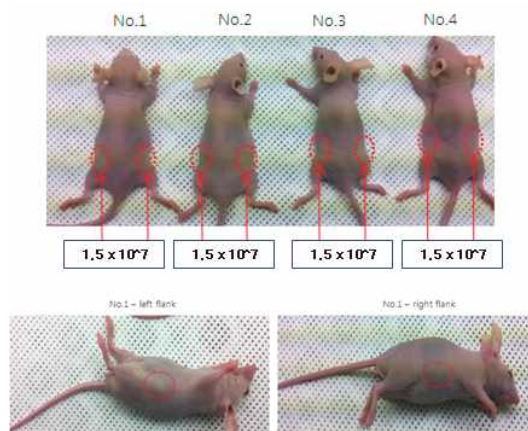
[그림] Hexane 추출물과 항암제 소라페닙과의 병용요법. PLC/PRF5, HepG2 세포주에 대해서 0.2 mg/ml hexane과 10 μ M 소라페닙을 각각 혹은 함께 24시간 처리한 후, MTT로 분석함



[그림] Hexane 추출물과 독소루비신 항암제와의 병용요법. Hep3B, HepG2 세포주에 대해서 0.2 mg/ml hexane과 5 μ M 독소루비신(아드리아마이신)을 각각 혹은 함께 24시간 처리한 후, MTT로 분석함

마. 발암동물모델 확립 및 hexane 추출물의 *in vivo*에서의 항암활성

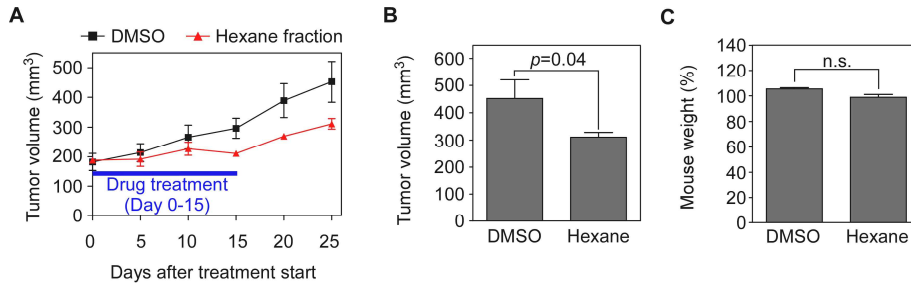
- ① 항암효능 및 독성실험을 위해서 면역기능이 억제된 nude mouse를 대상으로 SK-HEP1 간암세포주를 대상으로 피하에서 암을 키우는 쥐모델을 확립함
- ② 다양한 숫자의 암세포를 nude mouse에 피하에 주사하여 이들이 어느 정도의 시간이 지나면 암덩어리를 만들어내고 얼마나 빨리 암이 성장해 나가는지 최적의 조건을 확립함



[그림] 마취한 nude mouse 피하에 간암세포주인 SK-HEP1을 표시된 숫자만큼 PBS에

resuspend하여 injection한 직후의 모습. 이렇게 한 후 종양조직의 성장을 외부에서 직접 크기를 측정함으로써 확인함

- ③ SK-HEP-1 세포주 1X10⁷개를 피하에 이식하여, 그 크기가 180 mm³까지 성장하였을 때, 20% Cremophor (in PBS)에 hexane 추출물 혹은 DMSO를 녹여서 복강주사함. Hexane 추출물은 1g/Kg씩 매일 주사함

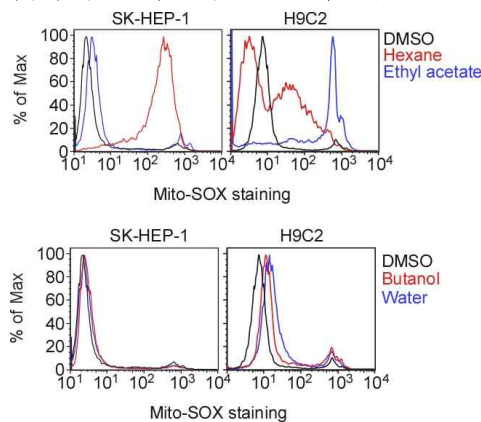


[그림] hexane 추출물의 in vivo 항암활성. (A) 종양 성장측정. 15일간 매일 hexane 추출물을 처리 하면서 종양크기를 측정한 결과. 15일 후 약물처리를 중단하면서 종양크기가 증가함. (B) 25일후 종양의 크기. Hexane 추출물을 주사한 후 25일후 종양을 분리하여 크기를 비겨한 결과. 유의미한 정도의 크기차이가 있음. (C) 25일후 몸무게 비교. 의미없는 수준의 몸무게 차이를 확인함

[결론] Hexane 추출물의 항암활성을 in vivo 동물모델 (xenograft)에서 검증함

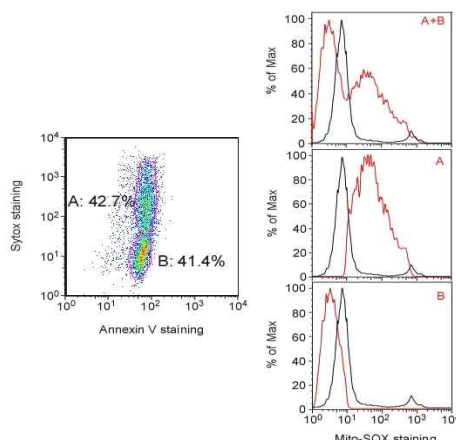
바. 갈색거저리 추출물들의 물질대사(활성산소)에 대한 영향

- ① 동아대팀의 결과를 바탕으로 하면, 4종의 모든 추출물에서 redox 활성을 보이는 물질이 존재하지 않는 것으로 확인됨. 따라서, 곤충추출물들이 세포의 다양한 신호전달 기전에 영향을 주어 활성산소의 발생을 억제하거나 촉진할 수 있는지 확인함
- ② Annexin-V, Sytox 염색과 더불어서 미토콘드리아에서 활성산소를 탐지할 수 있는 형광염료인 Mito-SOX를 활용하여 3개 형광염료를 동시에 염색하여 flow cytometry로 분석함: 이때 사용한 세포주는 간암세포주인 SK-HEP-1과 정상 심근세포주로 알려진 H9C2
- ③ Butanol 및 water추출물들에서는 활성산소의 증감효과가 테스트에 사용된 세포주들 모두에서 미미한 수준이었음
- ④ 반면, EA추출물의 경우에는 암세포주에서 활성산소에 대한 효과가 없었으나, 정상심근세포주에서는 활성산소를 뚜렷하게 높이는 것으로 확인됨



[그림] hexane, ethyl acetate (EA), butanol, water 추출물의 활성산소 유도능. 간암세포주

(SK-HEP-1) 및 정상 심근세포주 (H9C2)에서 1 mg/ml 추출물을 처리한 후 24시간 후 Mito-SOX 염색하고 flow cytometry로 분석한 결과



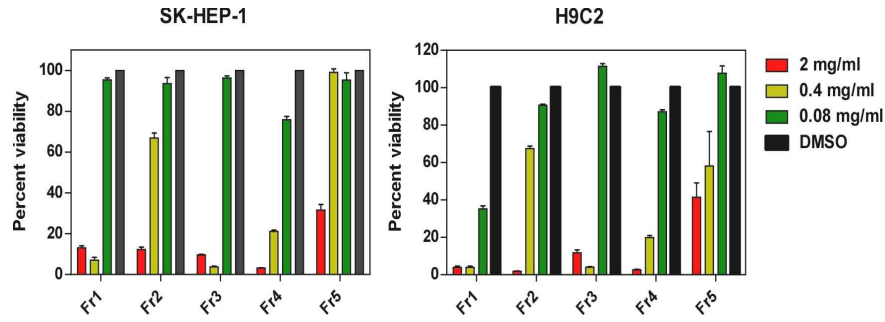
[그림] Sytox, AnnexinV, Mito-SOX 분석. (왼쪽) H9C2에서 hexane 추출물을 처리한 후 Sytox, AnnexinV염색결과. Sytox positive cell을 “A” population (42.7%), Sytox negative cell을 “B” population (41.4%)으로 지정하여 해당 population에서 Mito-SOX signal을 분석함 (오른쪽)

- ⑤ Hexane 추출물의 경우에는 간암세포주에서는 활성산소를 뚜렷하게 증가시키나, 정상심근세포주에서는 활성산소를 감소시키거나 증가시키는 것으로 확인함: hexane 추출물이 세포독성을 가지고 있다는 것을 고려하면, 세포독성으로 인한 활성산소의 증가여부를 인 것으로 예상될 수 있음
- ⑥ 위 그림에서 보듯이, hexane 추출물의 경우에 정상심근세포에서의 활성산소 증가 효과는 세포죽음유도로 인한 것인지 직접적인 ROS증가유도와는 무관한 것으로 사료됨

[결론] Hexane 추출물의 경우에 암세포주에서는 활성산소를 높이고 심근세포주에서는 활성산소를 낮출 수도 있음. 반면에 EA, butanol, water 추출물들은 활성산소 대사에 끼치는 영향이 제한적일 것으로 사료됨. 활성 산소를 높이는 효능은 곤충추출물의 산화활성이 있기 때문이라기보다는, 세포신호전달 교란이 원인인 것으로 사료됨

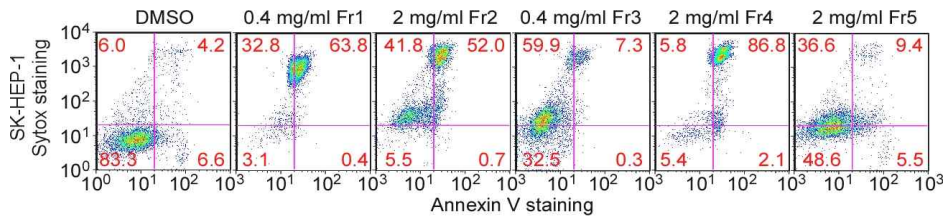
사. 갈색거저리 hexane 추출물의 추가 분획물에 대한 약리활성 평가

- ① 제1협동과제에서 갈색거저리 hexane 분획물에 대한 추가 분획을 실시함. 총 5종의 분획물을 확보함: Fr1, Fr2, Fr3, Fr4, Fr5. 각 분획물을 DMSO에 녹여 2mg/ml, 0.4ml/ml, 0.08 mg/ml로 처리한 후 MTT assay를 수행함
- ② 모든 분획물에서 간암세포주와 정상세포주 사이에 비슷한 수준의 세포대사를 억제하는 것으로 확인이 됨. 특히 분획 Fr1, Fr3, Fr4의 경우 기존의 hexane 분획물 대비 최소 5 배이상 활성이 증가한 것으로 평가됨



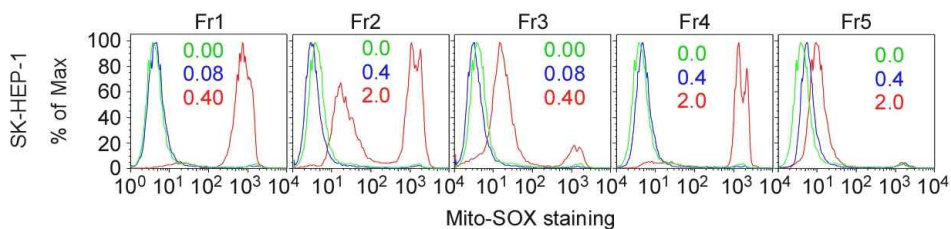
[그림] Fr1-5 추출물들의 MTT결과. 5종의 분획물질을 DMSO에 녹인후 표시된 농도에서 24시간 처리후 MTT 분석함. 기존의 hexane 추출물 대비 Fr1, Fr3, Fr4의 경우에 약 5배이상의 활성이 높아진 것으로 사료됨. 특히 Fr1의 세포독성이 가장 뛰어남

③ 추출물들의 활성기전을 분석하고자, 간암세포주인 SK-HEP-1에서 Sytox 및 AnnexinV 염색을 진행함. 동일한 농도조건에서 비교를 해보면, Fr1이 가장 효과적으로 death cell population (Sytox/AnnexinV double positive)을 만들어 냄. 반면에 다른 Fr들은 비슷한 세포죽음 유도를 위해 상대적으로 높은 농도가 필요함



[그림] Fr1-5 추출물들의 세포죽음 유도기전. SK-HEP-1세포주에 표시된 농도의 Fr를 처리한 후, Sytox, AnnexinV염색 및 flow cytometry로 분석함

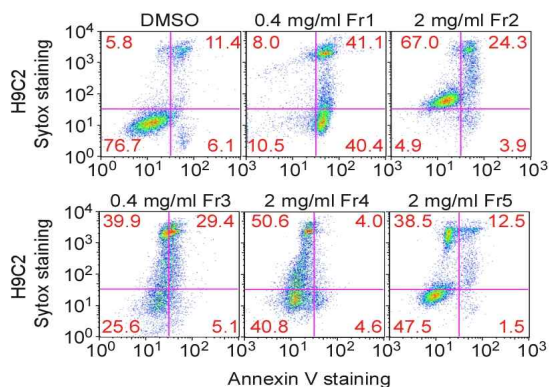
- ④ 결과적으로, Fr1의 경우 hexane 추출물과 동일하게 apoptosis와 necrosis를 통하여 세포 독성을 유도하는 것으로 사료됨
- ⑤ 활성산소유도능력을 보고자, Fr들을 처리하고 Mito-SOX 염색 및 분석을 실시함. 세포독성 유도능력과 유사하게 Fr1의 암세포주에서의 활성산소 생성능력이 가장 우수한 것으로 확인됨. 단, Fr2, Fr3, Fr4에서도 상대적으로 약하기는 하지만 뚜렷한 활성산소의 증가가 확인됨



[그림] Fr1-5의 활성산소 유도능. SK-HEP-1세포주에서 표시된 농도 (mg/ml)의 Fr들을 24시간동안 처리한 후 Mito-SOX로 염색 및 flow cytometry 분석

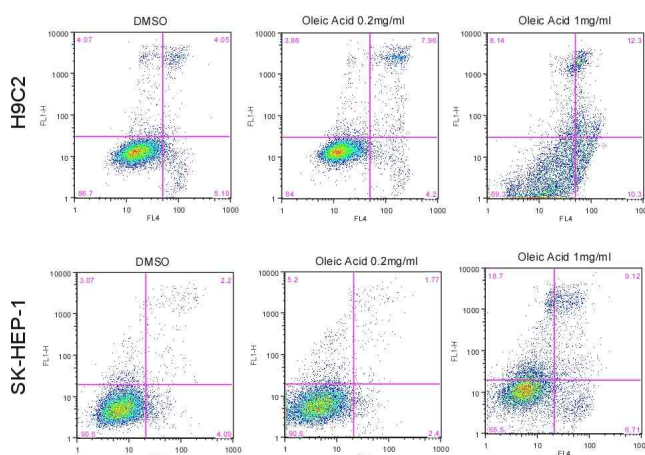
⑥ 갈색겨저리 추출물의 정상세포주에 대한 영향을 보기위해서 여러 농도조건의 Fr1-Fr5를 H9C2 세포에 처리한 후, Sytox, Annexin V로 염색하여 분석함

- ⑦ SK-HEP-1 세포에 대한 영향과 비교하였을 때, Fr1, Fr4는 상대적으로 적은 세포죽음을 유도하는 것으로 확인할 수 있었으나, Fr2, Fr3, Fr5는 보다 높은 세포죽음을 유도하는 경향성을 보여주었음
- ⑧ 따라서, Fr1, Fr4가 암세포 선택적인 세포죽음을 유도한다고 결론내림



[그림] Fr들의 정상심근세포(H9C2)에 대한 효과. 갈색거저리 추출물을 주어진 농도조건으로 H9C2 세포죽에 처리한 후 24시간 지나서 Sytox, Annexin V로 염색하여 flow cytometry로 세포를 분석함

- ⑨ 갈색거저리 대표물질인 Oleic acid를 H9C2 및 SK-HEP-1 세포죽에 처리하여 세포죽음 유도 및 활성산소 발생정도를 측정하여, 앞서 추출물들의 결과가 fatty acid에 의한 비특이적인 현상인지 확인함
- ⑩ 동일한 조건에서 H9C2에 대한 세포죽음 유도효과는 큰 반면에 SK-HEP-1에 대한 세포죽음은 도드라지지 않음을 확인함
- ⑪ 이상의 결과를 바탕으로 적어도 Fr1 및 Fr4의 암세포에 대한 세포죽음 유도 및 심근세포에 대한 낮은 독성은 지방산때문 이라기보다는 특정한 활성물질에 의해 유도되는 특이적인 반응인 것으로 결론을 내림



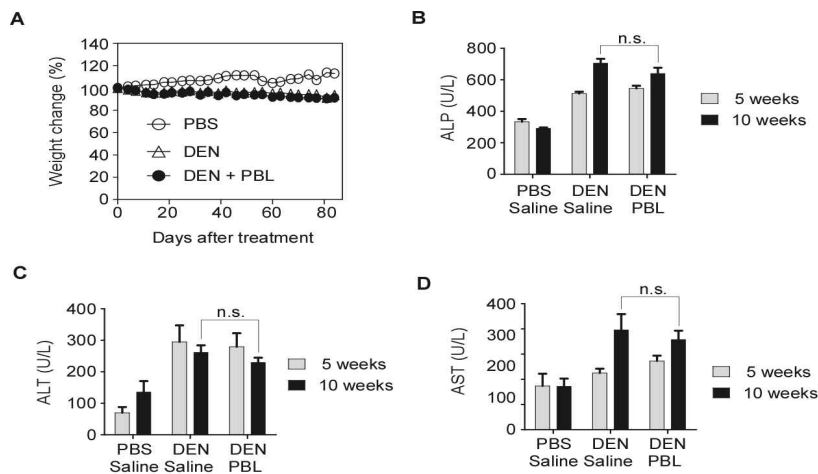
[그림] H9C2와 SK-HEP-1세포주에서 Oleic acid를 표시된 농도만큼 처리한 후 24시간 후 Sytox (FL1), Annexin V (FL4) 염색하여 flow cytometry로 분석한 결과

[결론] hexane 추출물의 추가분획으로 얻은 Fr들에서 5배 이상 암세포에 대한 독성이 증가하는 것으로 확인함. 이는 추출물에 포함된 활성물질이 분획과정에서 농축되어서 나타나는

효과로 사료됨. 추가적인 분획과 활성 및 기전 분석으로 새로운 항암약물발견으로 이어질 수 있을 것으로 기대함

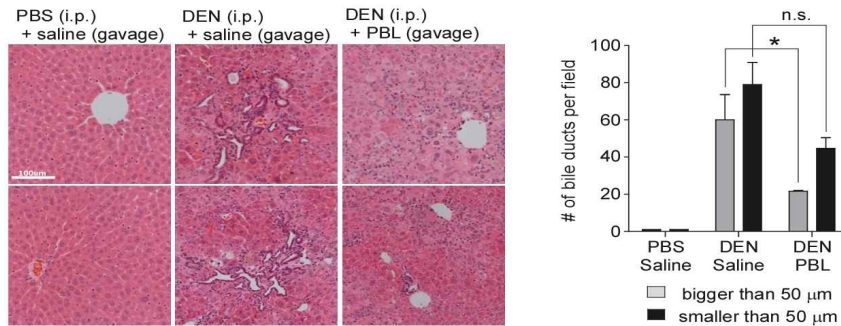
아. 흰점박이꽃무지 추출물의 간보호 효과

- ① Diethylnitrosamine (DEN)은 간독성을 유발하는 물질로, 단기간 실험쥐에 투여시 지방간, fibrosis, cirrhosis를 유도할 수 있는 것으로 알려져 있으며, 장기간 투여하게 되면, 간암으로 진행되는 간암 및 간독성 실험쥐 모델임
- ② 흰점박이 꽃무지 유충의 동결건조 분말을 실험쥐에게 섭취하도록 함으로써, DEN으로 유도되는 단기간손상 (DEN 13주동안 처리)을 억제할 수 있는지 분석함
- ③ 간손상모델을 확립하기 위해 사용된 실험쥐는 C3H/HeN 수컷임
- ④ 곤충동결건조분말의 간독성억제 활성은, 장기적인 관점에서 다양한 간손상으로 인해 발생가능성이 높아지게 되는 간암의 발생 또한 억제할 수 있을 것으로 예상됨



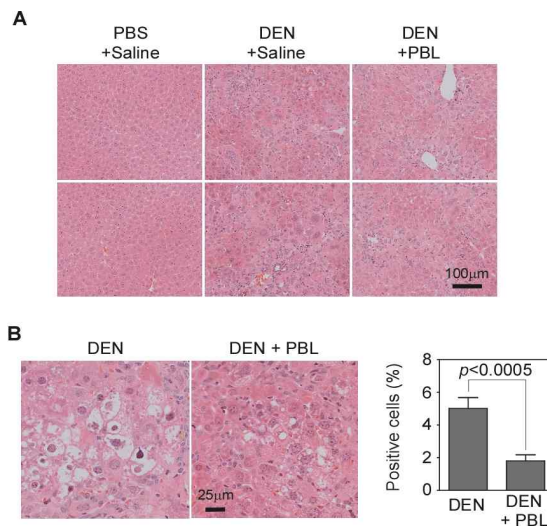
[그림] DEN과 PBS를 복강주사하고, saline과 PLB를 경구투여 후 실험쥐 몸무게 및 혈액분석 결과. (A) 실험쥐의 몸무게를 측정함. (B) ALP, (C) ALT, (D) AST 효소활성을 DEN 처리후 13주째에 혈액샘플을 채취하여 측정함

- ⑤ 50 mg/Kg DEN 혹은 PBS를 복강주사로 주 1회 처리하고, 흰점박이꽃무지 애벌레 분말(PBL)을 0.5g/Kg씩 5일 경구투여후 2일 휴식하는 형태로 5주 혹은 10주 동안 처리한 후 실험쥐로부터 혈액을 채취하여 간독성을 가늠해 볼 수 있는 AST, ALT, ALB 단백질의 수치를 분석함
- ⑥ 간수치를 기준으로 보았을 때 통계적으로 유의미한 간보호 효과를 PBL 처리군에서 확인할 수는 없었음. 다만, 오차수준에서의 약한 보호효과정도만 확인함



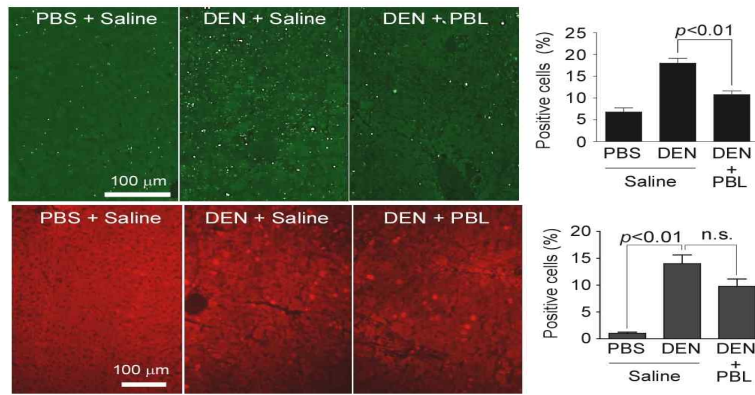
[그림] 간조직에 대한 H&E 검사 및 liver duct 개수. 해당 조직들을 파라핀포매 샘플로 제조하여 H&E 염색을 실시한 후 광학현미경으로 확인함(왼쪽). 이미지 분석에서 측정된 liver duct의 개수를 표로 도식화함 (오른쪽)

- ⑦ 혈액에서는 간보호 효과를 뚜렷하게 볼 수는 없었으나, 해당 간 조직들에 대한 histology 분석결과, liver duct 개수에서 커다란 차이를 볼 수 있었음. 이는 간이 손상되었을 경우에 나타나는 간재생기전의 하나로 ductural reaction이라고 불리움. 이는 간손상의 지표로 쓰일수 있으며 duct 형성이 증가되어 있다는 것은 간손상이 크다는 것으로 해석 가능함
- ⑧ 통계적인 처리를 해보면, 특히 직경이 큰 duct의 개수가 흰점박이 꽃무지 분말을 경구투여한 쥐에서 유의미하게 감소되어 있는 것을 확인함. 이는 PBL의 간보호 효능이 있음을 의미함



[그림] 실험쥐들의 간조직에 대한 histology 분석. (A) hepatocyte hypertropism. (B) fat accumulation (왼쪽), 통계처리 (오른쪽)

- ⑨ 간세포는 손상을 받게 되는 경우에 세포가 커지는 현상이 있음. 이를 hypertropism이라고 부르는데, 이런 현상이 DEN 처리된 쥐의 간에서도 확인됨. 그리고, 이런 hypertropism이 현저하게 감소되어 있는 것을 흰점박이꽃무지를 처리한 실험쥐군에서 확인할 수 있었음. 이는 흰점박이꽃무지의 간보호 효능을 보여주는 또 다른 증거임
- ⑩ DEN에 의해서 손상받은 간은 fat accumulation이 증가되는 steatosis (지방간) 형상을 나타내게 되는데, 실제 DEN 처리된 쥐의 간에서 steatosis의 증상중의 하나인 fat granule들이 다수 발견되었음. 이런 fat accumulation이 흰점박이꽃무지 분말을 경구투여한 쥐에서는 현저하게 줄어들어 있는 것을 확인함. 이는 PBL의 간보호 효능을 보여주는 증거임



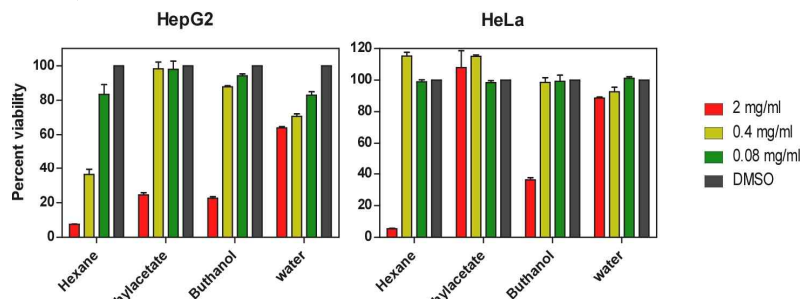
[그림] 실험쥐들의 간조직에 대한 histology 분석. (위) TUNEL 염색 (아래) Ki67 염색

- ① 간보호 효능에 대한 생화학적 근거를 찾기위해서 *in situ*에서 아포토시스를 측정할 수 있는 TUNEL 염색을 실시함. DEN 처리된 쥐의 간은 상당히 많은 TUNEL positive 세포들이 확인되었으며, 흰점박이 꽃무지 경구투여된 쥐에서 이런 positive cell들의 숫자가 현저하게 줄어드는 것을 확인함. 이는 DEN에 의해 유도되는 세포죽음이 흰점박이 꽃무지 분말을 섭취함으로써 상당수준 억제되었다는 것을 의미함
- ② 이와 같은 간보호 효과가 세포분열에 대한 효과가 있는 것인지 확인하기 위해 Ki67 cell proliferation marker 염색을 수행함. Ki67 염색은 DEN만 처리된 간조직과 흰점박이꽃무지분말을 섭취한 실험쥐 그룹에서 큰 차이가 없음. 이런 결과를 바탕으로 PBL이 간세포의 분열에 크게 영향을 주지는 않는 것으로 사료됨

[결론] Histology분석결과들을 종합해보면, 흰점박이꽃무지 유충추출물의 섭취가 DEN에 의해 유도되는 간손상을 억제할 수 있다는 결론을 내릴 수 있음

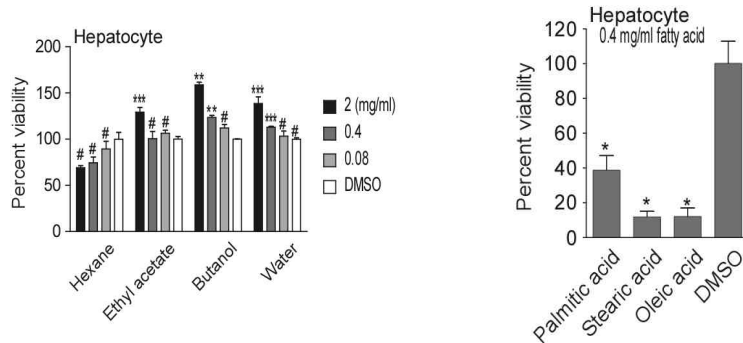
자. 흰점박이꽃무지 추출물의 암세포증식 억제 효능

- ① 흰점박이꽃무지 추출물로부터 hexane, ethyl acetate (EA), butanol, water 분획물을 제1협동연구기관인 동아대연구팀으로 부터 확보함
- ② HepG2, HeLa 암세포주에 대한 세포증식 억제를 MTT assay를 통하여 분석함: hexane 추출물에서 가장 좋은 암세포 증식 억제하는 활성을 확인함. Butanol 추출물에서는 제한적이긴 하지만 증식억제 활성을 확인함. EA는 상대적으로 약한 항암기능을 보임 (특히, HeLa 세포주에서)



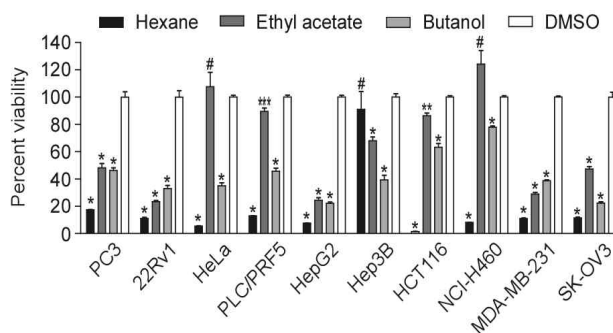
[그림] 암세포주에 대한 세포증식 억제 활성 분석. 간암 (HepG2)와 자궁경부암세포주 (HeLa)에서 주어진 농도조건으로 24시간 처리후 MTT assay로 분석함

- ③ 정상세포에 대한 독성분석을 위해, BALB/c 실험쥐의 간으로부터 primary hepatocyte를 분리하여 추출물에 의한 독성을 분석함: 암세포주에서 확인되었던 세포독성보다는 훨씬 낮은 수준의 독성만이 확인됨. 따라서, 곤충추출물에 의한 세포독성은 상당히 암세포 선택적인 활성인 것으로 사료됨



[그림] 흰점박이꽃무지 추출물들의 정상간세포에 대한 독성. (왼쪽) 분리된 hepatocyte에 표시된 농도의 추출물들을 처리한 후 24시간 후, MTT로 분석함. (오른쪽) 0.4 mg/ml 농도의 fatty acid를 hepatocyte에 24시간 처리후, MTT로 분석함

- ④ 흰점박이 꽃무지 유충에는 상당량의 지방이 포함되어 있고 이들은 비선택적인 세포독성을 유도할 수 있는 것으로 알려짐
- ⑤ 따라서, 지방성분에 의한 비선택적인 세포독성여부를 확인하고자, 흰점박이꽃무지 추출물의 주요 지방성분으로 알려진 palmitic acid, stearic acid, oleic acid에 의한 hepatocyte에 대한 독성정도를 분석함: 추출물과는 달리 낮은 농도에서도 hepatocyte에 대해 상당히 높은 독성을 보여줌
- ⑥ 흰점박이꽃무지 추출물에 대한 암세포의 성장억제정도를 다양한 암세포에서 확인함: 전립선암 (PC3, 22Rv1), 자궁경부암 (HeLa), 간암 (PLC, HepG2, Hep3B), 직장암 (HCT116), 폐암 (NCI-H460), 유방암 (MDA-MB-231), 난소암 (SK-OV3)를 사용함



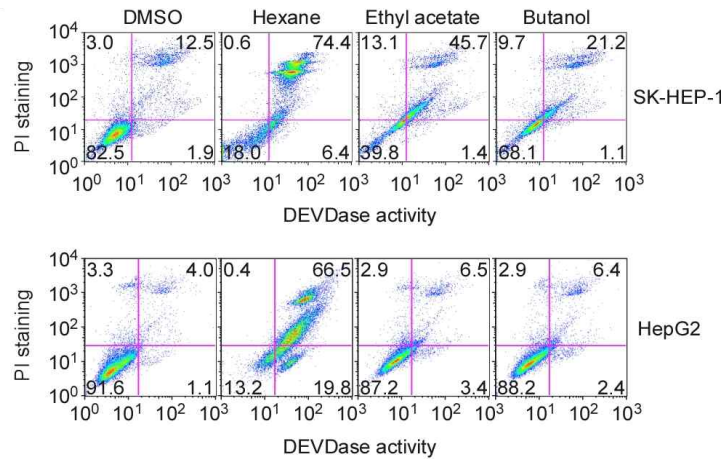
[그림] 흰점박이꽃무지 추출물들의 다양한 암세포주에서의 세포독성. 2 mg/ml 농도의 추출물을 24시간 동안 처리한 후 MTT로 분석함

[결론] 갈색거저리에서와 유사하게, 흰점박이꽃무지에서도 hexane 추출물에서 가장 좋은 암세포에 대한 세포독성을 확인함

차. 흰점박이꽃무지 추출물의 약물기전 분석

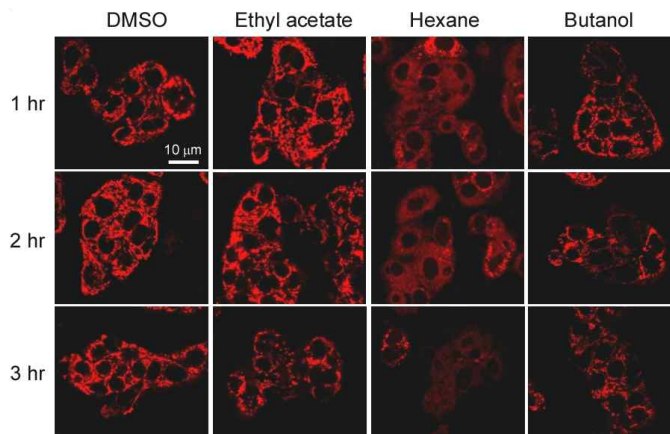
- ① 세포증식억제 기전이 apoptosis, necrosis와 같은 세포죽음 기전을 활성화 시키는지 확인하고자, propidium iodide (PI), DEVDase 염색 및, flow cytometry로 분석함.

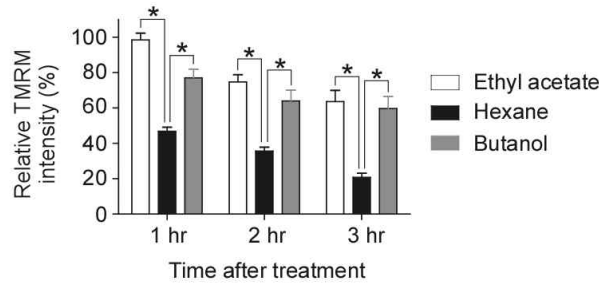
- ② Hexane 추출물에서만 PI와 DEVDase가 동시에 positive인 세포 population이 증가하는 것을 확인함. 반면에 EA에서는 약한 수준의 double positive population의 증가 (SK-HEP-1세포주에서)를 보여주었고 butanol 추출물에서는 이와 같은 증가패턴을 확인할 수 없었음.



[그림] 추출물들의 약물기전 분석. 꽃무지 추출물을 각각 2 mg/ml씩 SK-HEP-1 및 HepG2세포주에 24시간동안 처리한 후, propidium iodide (PI), DEVDase 활성염색 후, flow cytometry로 분석함

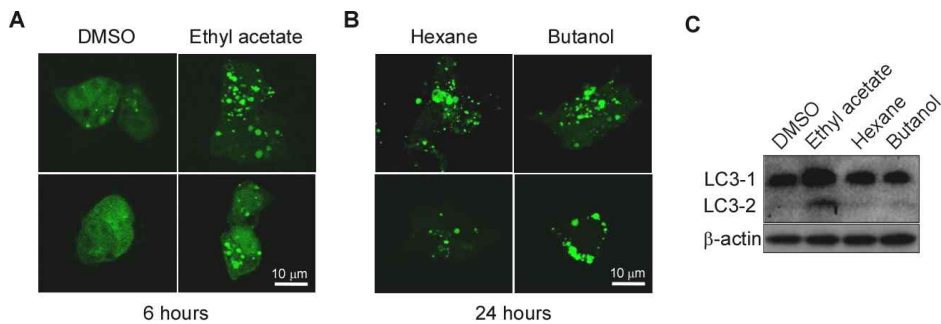
- ③ 세포죽음과정은 미토콘드리아에 대한 직/간접적인 영향을 주게 되는데, 세포죽음을 유도하는 기전이 미토콘드리아에 의존적인지 확인하고자, 막전위에 민감한 형광염료인 TMRM을 사용하여 고해상도 confocal imaging으로 미토콘드리아에 대한 효과를 분석함
- ④ EA, butanol 추출물 처리에서는 미토콘드리아 막전위가 천천히 떨어지는 것을 확인할 수 있음. 반면에 hexane 추출물은 급격하게 미토콘드리아의 막전위가 소실되는 것을 확인할 수 있음. hexane 추출물이 미토콘드리아에 대하여 직접적인 효과를 줄 수 있을 가능성을 배제할 수 없음





[그림] 추출물들의 미토콘드리아 막전위에 대한 영향. 2 mg/ml 추출물을 표시된 시간동안 처리한 후, TMRM으로 염색하여 confocal microscope으로 분석함. 위는 실제 이미지이고 아래는 TMRM 형광신호를 수치화함

- ⑤ 세포죽음 기전 중에서, autophagy 유도능을 확인하고자, LC3-GFP construct를 발현하는 HepG2 세포주에서 autophagosome 형성을 측정함
- ⑤ EA의 경우에 가장 강한 autophagy 유도활성이 있음을 확인함. 반면에 hexane과 butanol 추출물의 경우에는 autophagy 유도활성은 있으나 상대적으로 낮은 것으로 확인됨. 동일한 결과를 autophagy 유도시 형성되는 LC3-2 form의 western blot 검출로도 확인함



[그림] 곤충추출물에 의한 autophagy 유도. (A) EA에 의한 autophagosome 형성. GFP-LC3를 발현하는 HepG2 세포주에서 1 mg/ml 농도의 EA추출물을 처리한 후, confocal microscope으로 분석함. (B) Hexane과 butanol 추출물에 의한 autophagosome형성. (A)와 동일한 세포주에서 1 mg/ml hexane 및 butanol 추출물을 24시간 처리후 confocal imaging. (C) LC3-2 form 형성. SK-HEP-1 세포주에 1 mg/ml

[결론] 흰점박이꽃무지 추출물중에서 hexane은 가장 강력한 apoptosis 혹은 necrosis유도물질을 함유하고 있음. Hexane, EA, butanol 추출물 모두가 autophagy를 유도할 수 있는 활성을 가지고 있으나, EA가 가장 효과적인 autophagy를 유도함. 추가적인 분획물 확보 및 활성/기전 분석으로 유용한 약리활성을 가지는 물질을 분리할 수 있을 것으로 기대함

4. 곤충자원의 식품등록을 위한 독성평가(제3협동)

가. 갈색거저리 및 흰점박이꽃무지 분석법 확립

① 분석 조건

Gas Chromatograph	GC-2010 Plus, SHIMADZU, JAPAN		
Column	Supelco TM SP-2560 capillary column (100 m×0.25 mm ×0.20 μm)		
Oven program	Initial temperature 140 °C (Hold time 5 min) Final temperature 240 °C (Rate 3 °C/min, Hold time 10 min)		
Detector(FID) temperature & Injector temperature	260°C	Carrier gas	Nitrogen
Split ratio	50:1	Injection volume	1 μl

② 분석 결과

Items	Results		Acceptance Criteria
Specificity	No interference		No interference
System suitability	N = 589266.352 ~ 806619.832 CV (%) = 0.76, 1.45, 1.89, 0.41 Tailing factor = 0.742, 0.731, 0.765, 0.731		CV (%) ≤ 10 % 0.7 ≤ tailing ≤ 2 N ≥ 2000
Linearity	Calibration points = 22.5, 45, 90, 180, 360 mg/mL R ² = 0.9999, 0.9999 RF deviation : -3.79 ~ 1.94 %		diff. to mean ≤ ± 10 % R ² ≥ 0.99
Reproducibility of calibration curves	30 mg/mL : 0.80 and 0.81 % 100.8 mg/mL : 0.94 % and 0.94 % 300 mg/mL : 0.60 % and 0.60 %		CV ≤ 20 %
Precision	Intra-day	Inter-day	CV ≤ 15 %
	30 mg/mL : 1.56 % 100.5 mg/mL : 0.71 % 300 mg/mL : 0.72 %	30 mg/mL : 2.95 % 100.5 mg/mL : 0.74 % 300 mg/mL : 0.89 %	
Accuracy	Intra-day	Inter-day	Accuracy ≤ ± 20 %
	30 mg/mL : -9.63 % 100.5 mg/mL : -1.11 % 300 mg/mL : 6.85 %	30 mg/mL : -7.23 % 100.5 mg/mL : -2.15 % 300 mg/mL : 7.11 %	
Homogeneity	(When sampling from top, middle and bottom position) 30 mg/mL : CV = 0.99 % (% Recovery = 91.7) 300 mg/mL : CV = 1.11 % (% Recovery = 105.4)		Variation(Initial) ≤ ± 10 % Recovery ≤ ± 20 %
Stability	Room temperature (6 and 24 hrs)		Variation(Initial) ≤ ± 15 %
	30 mg/mL : CV = -0.03 % and -0.27 % 300 mg/mL : CV = -0.02 % and -0.23 %		
	Refrigerator (3 days)		
	30 mg/mL : CV = -2.20 % 300 mg/mL : CV = 0.31 %		
	Deep freezer (14 and 28 days)		
	30 mg/mL : CV = -1.75 % and 0.99 % 300 mg/mL : CV = -0.56 % and 0.57 %		

나. 갈색거저리 및 흰점박이 꽃무지 일반독성시험

① 단회경구투여 독성시험

㉞ 시험결과, 동결건조 갈색 거저리 및 흰점박이 꽃무지를 SD 랫드에 3000 mg/kg/day의 용량으로 단회 경구 투여하여 사망률, 일반증상 및 체중 측정에 있어서 특이적 이상소견은 관찰되지 않았다. 따라서 급성 경구 투여 본 시험의 용량은 예비시험과 동일하게 0, 300, 1000, 3000 mg/kg/day 가 적절한 것으로 판단된다.

㉟ 동결건조 갈색 거저리를 이용한 단회 경구투여 독성 시험

- 동결건조 갈색거저리를 암컷 SD 랫드에 5000 mg/kg의 용량으로 투여하여 사망률, 일반증상 및 체중 측정에 있어서 투여와 관련된 이상소견은 관찰되지 않았다. 따라서 본 시험에서 갈색 거저리의 단회 경구투여 LD₅₀값은 5000 mg/kg 이상으로 사료된다.

㊱ 동결건조 흰점박이 꽃무지를 이용한 단회 경구투여 독성 시험

- 동결건조 흰점박이 꽃무지를 암컷 SD 랫드에 5000 mg/kg의 용량으로 투여하여 사망률, 일반증상 및 체중 측정에 있어서 투여와 관련된 이상소견은 관찰되지 않았다. 따라서 본 시험에서 갈색 거저리의 단회 경구투여 LD₅₀값은 5000 mg/kg 이상으로 사료된다.

② 4주 반복 경구투여 독성용량설정시험(DRF)

㉞ 동결건조 갈색거저리를 이용한 독성시험

- 동결건조 갈색거저리를 SD 랫드에 0, 300, 1000 및 3000 mg/kg/day의 용량으로 4주간 1일 1회 반복 경구 투여하여 사망률, 임상증상, 체중 측정, 사료섭취량, 안검사, 뇨검사, 혈액학적검사, 혈액생화학적 검사, 부검소견, 장기중량 및 조직학적 검사에 있어서 시험물질 투여와 관련된 변화나 소견은 관찰되지 않았다. 따라서 13주 반복 투여 독성시험 용량으로는 0, 300, 1000, 3000 mg/kg/day 가 적절한 것으로 판단된다. 또한 본 시험에서 동결건조 갈색거저리의 무해용량 (No Observed Adverse Effect Level, NOAEL)은 암수 모두에서 3000 mg/kg/day인 것으로 판단된다.

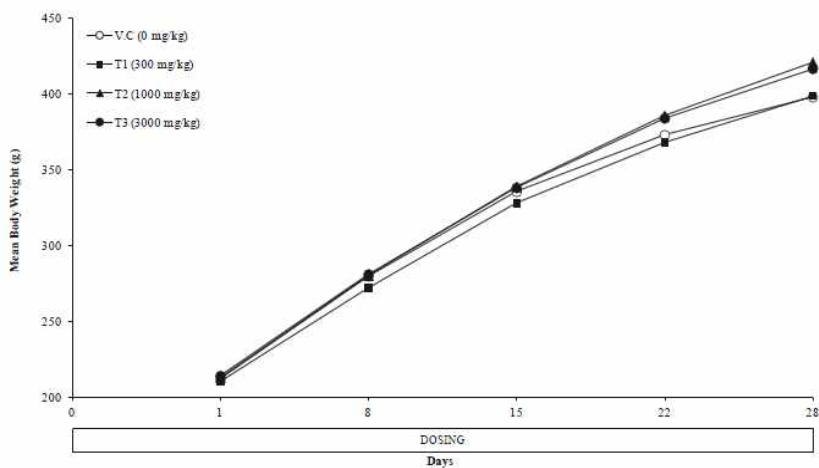


Figure 1 Mean Body Weight of Male

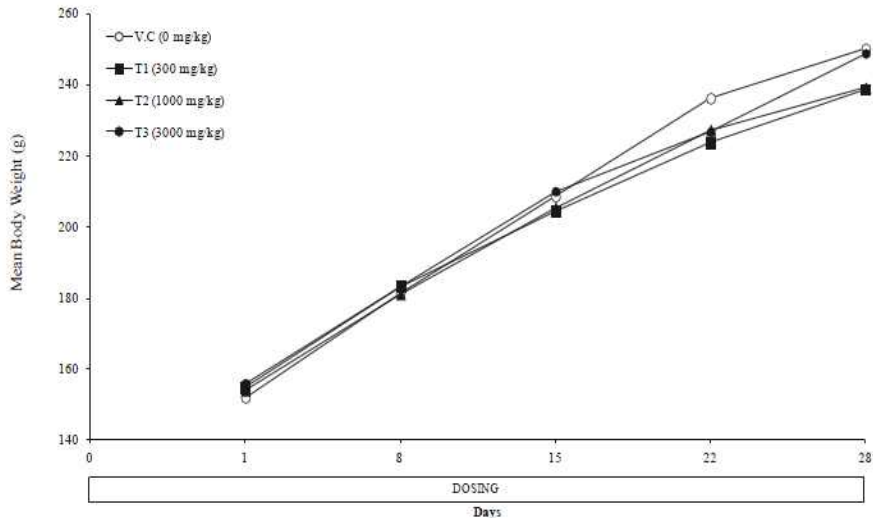


Figure 2 Mean Body Weight of Female

㉞ 동결건조 흰점박이꽃무지를 이용한 독성시험

- 동결건조 흰점박이꽃무지를 SD 랫드에 0, 300, 1000 및 3000 mg/kg/day의 용량으로 4주간 1일 1회 반복 경구 투여하여 사망률, 일반증상, 체중 측정, 사료섭취량, 안검사, 뇨검사, 혈액학적검사, 혈액생화학적 검사, 부검소견, 장기중량 및 조직학적 검사에 있어서 시험물질 투여와 관련된 변화나 소견은 관찰되지 않았다. 따라서 13주 반복 투여 독성시험 용량으로는 0, 300, 1000, 3000 mg/kg/day 가 적절한 것으로 판단된다. 또한 본 시험에서 동결건조 흰점박이 꽃무지의 무해용량 (No Observed Adverse Effect Level, NOAEL)은 암수 모두에서 3000 mg/kg/day인 것으로 판단된다.

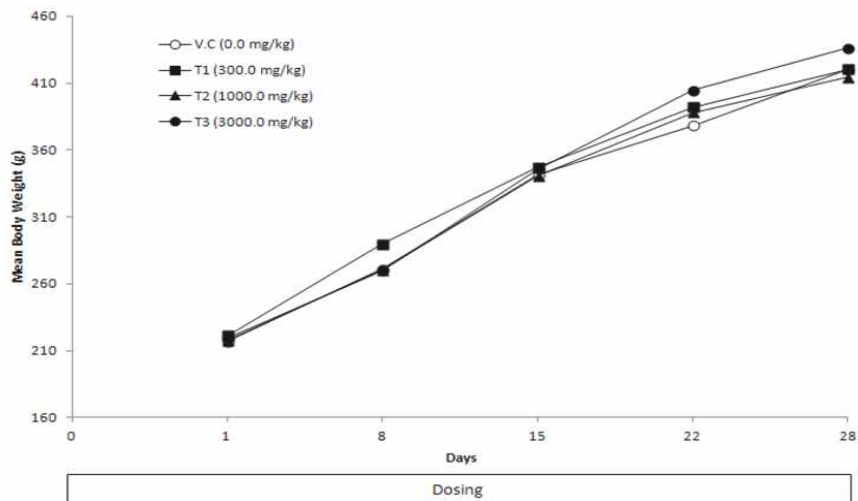


Figure 1 Mean Body Weight of Male

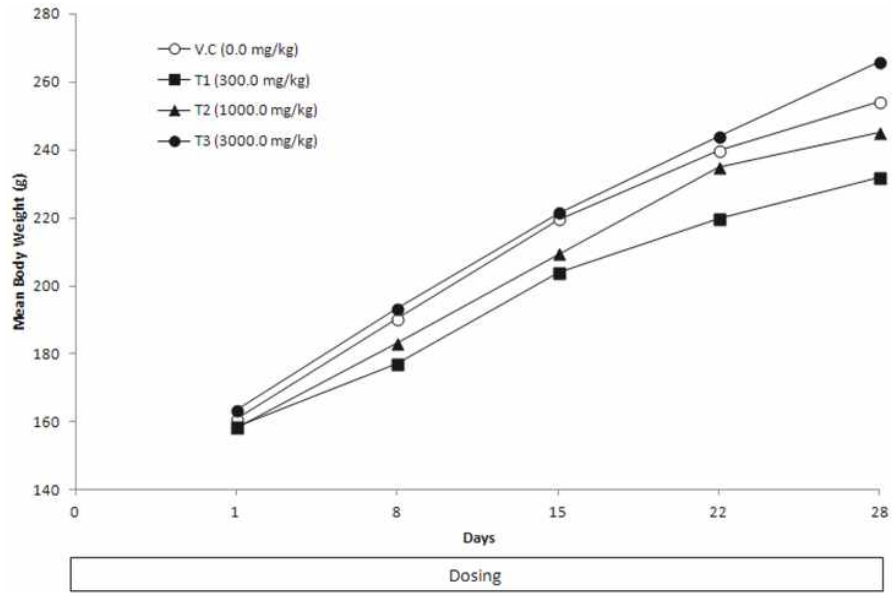


Figure 2 Mean Body Weight of Female

③ 13주 경구투여 독성시험

㉔ 동결건조 갈색거저리를 이용한 13주 반복경구투여 독성시험

- 동결건조 갈색거저리를 3000 mg/kg/day 용량까지 SD 계통 랫드에게 1일 1회 13주간 반복 경구 투여한 결과, 모든 시험항목에서 시험물질 투여와 관련된 이상소견은 관찰되지 않았다. 따라서 본 시험에서 동결건조 갈색거저리의 무해용량(NOAEL, No Observed Adverse Effect Level)은 암수 모두 3000 mg/kg 또는 그 이상인 것으로 판단된다.

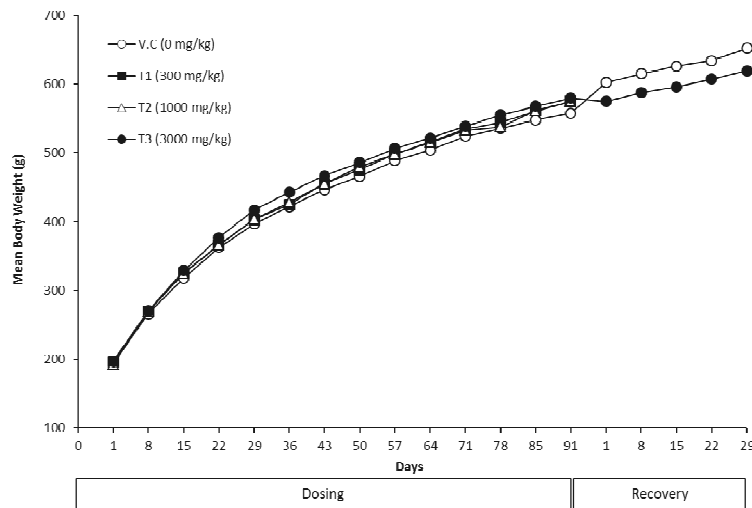


Figure 1 Mean Body Weight of Male

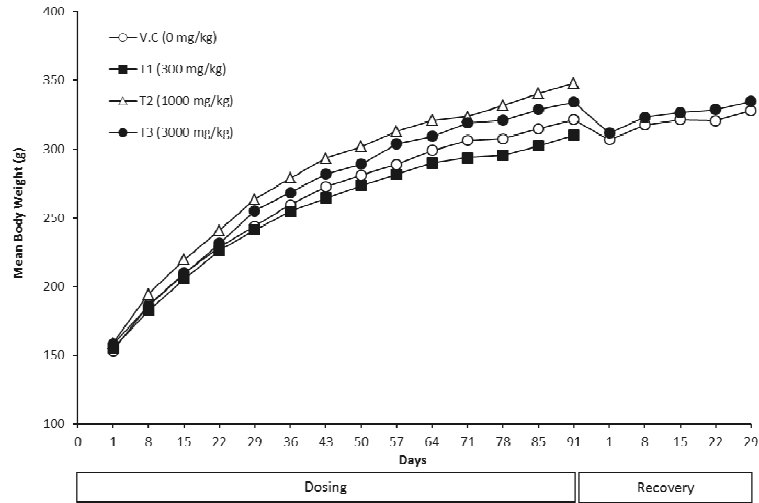


Figure 2 Mean Body Weight of Female

㉔ 동결건조 흰점박이 꽃무지를 이용한 13주 반복경구투여 독성시험

- 동결건조 흰점박이 꽃무지를 3000 mg/kg/day 용량까지 CrI:CD(SD) 계통 랫드에게 1일 1회 13주간 반복 경구 투여한 결과, 모든 시험항목에서 시험물질 투여와 관련된 이상소견은 관찰되지 않았다. 따라서 본 시험에서 동결건조 흰점박이 꽃무지의 무해용량(NOAEL, No Observed Adverse Effect Level)은 암수 모두 최고용량인 3000 mg/kg으로 판단된다.

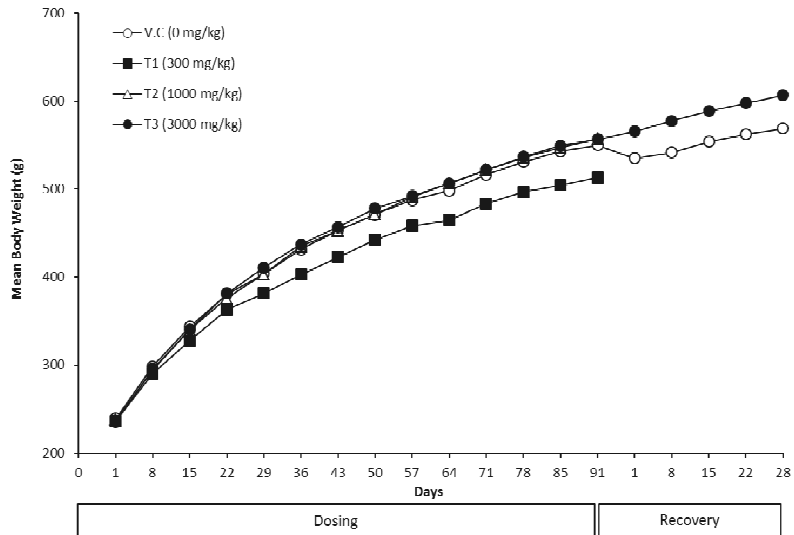


Figure 1 Mean Body Weight of Male

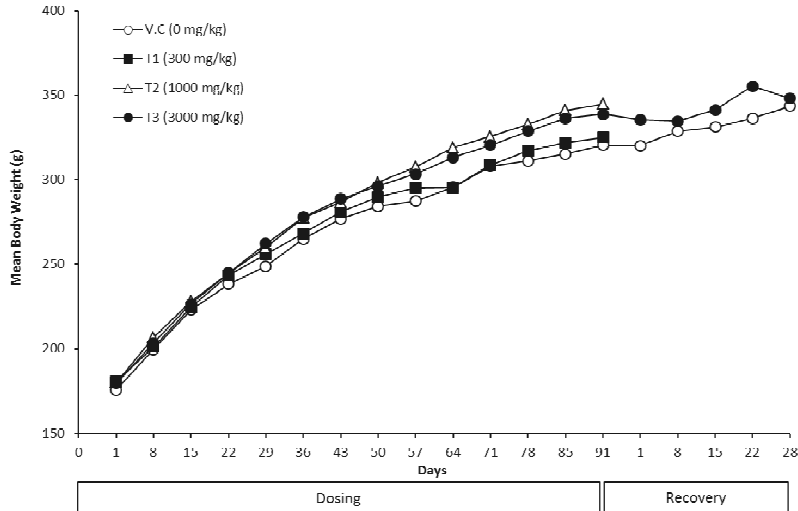


Figure 2 Mean Body Weight of Female

④ 갈색 거저리 및 흰점박이 꽃무지 유전독성 시험

㉠ 예비시험

□ 용해도 시험

○ 동결건조 갈색거저리

- 동결건조 갈색거저리에 대해 부형제를 선택하기 위하여 dimethyl sulfoxide (DMSO), distilled water (DW), 5% ethanol 및 0.5% CMC와 같은 부형제를 이용하여 용해도시험을 실시하였다. 시험물질은 모든 부형제 (DMSO, 500 mg/mL; DW, 50 mg/mL 및 200 mg/mL; 5% ethanol, 50 mg/mL; 0.5% CMC-Na 용액, 200 mg/mL; 1.5% CMC-Na 용액, 200 mg/mL)에 용해되지 않고 현탁상태로 조제되었다. 따라서, DW를 부형제로 선택하였으며, 시험물질용액의 희석에 사용하였다.

○ 동결건조 흰점박이꽃무지

- 동결건조 흰점박이꽃무지에 대해 부형제를 선택하기 위하여 dimethyl sulfoxide (DMSO), distilled water (DW), 5% ethanol 및 0.5% CMC와 같은 부형제를 이용하여 용해도시험을 실시하였다. 시험물질은 모든 부형제 (DMSO, 500 mg/mL; DW, 50 mg/mL 및 200 mg/mL; 5% ethanol, 50 mg/mL; 0.5% CMC-Na 용액, 200 mg/mL; 1.5% CMC-Na 용액, 200 mg/mL)에 용해되지 않고 현탁상태로 조제되었다. 따라서, DW를 부형제로 선택하였으며, 시험물질용액의 희석에 사용하였다.

□ 용량설정 시험

○ 동결건조 갈색 거저리의 복귀돌연변이시험

- 용량설정시험에서는 OECD guideline에 근거하여 5000 µg/plate을 최고농도로 하여 3000, 1000, 200, 40, 8 µg/plate의 6단계 농도군으로 각 농도군당 1매의 플레이트를 사용하였으며, 부형제대조군 및 양성대조군을 포함하여 본시험에 준하여 실시하였다.

- 용량설정시험결과, 대사활성계 적용 여부에 관계없이 시험에 사용된 모든 군주에서 복귀돌연변이 집락수의 증가는 관찰되지 않았다. 또한, background lawn이 얇아지거나 미세집락의

출현 혹은 50% 이상의 복귀돌연변이 집락수 감소와 같은 세포독성도 관찰되지 않았다. 한편, 시험물질용액을 top agar와 혼합했을 때 및 48시간 배양 후에 시험에 사용된 모든 균주의 1000 µg/plate 이상의 농도군에서 시험물질에 의한 침전이 관찰되었다.

○ 동결건조 갈색 거저리의 염색체이상시험

- 용량설정시험에서는 OECD guideline에 따라 5000 µg/mL를 최고농도로 하여 각 농도당 1 플라스크를 사용하는 것을 제외하고 본시험에 준하여 대사활성계 적용(+S) 및 미적용(-S) 하에서 실시하였다. 시험물질 처리 후 상대세포수(RCC)를 산출하여 세포 증식 억제 지표로 하였다.
- 용량설정시험 결과, 시험에 사용된 모든 농도 범위에서 시험물질 처리시 및 처리 종료시에 시험물질의 침전 또는 혼탁/침전이 관찰되었으며, 심한 혼탁과 침전이 관찰되는 농도범위에서는 세포독성도 관찰되었다. 또한, 시험물질의 처리시 및 처리 종료시에 pH meter 및 osmometer를 이용하여 각 처리군의 최고농도군 (5000 µg/mL)에 대하여 배양액의 pH 및 osmolality를 측정된 결과, 부형제대조군에 비해 각각 1 unit 및 50 mOsm/kg 이상의 변화는 관찰되지 않았다.

○ 동결건조 갈색 거저리의 소핵시험

- 용량설정시험에서는 OECD guideline에 따라 14일까지 투여시 한계용량인 2000 mg/kg의 용량을 최고용량으로 하여 부형제대조군과 함께 4단계 처리군 (250, 500, 1000, 2000 mg/kg)에 1일 1회 2일간 경구투여하였다. 투여 전날에 Path/Tox system (version 4.2.2)을 이용하여 각 군당 4마리씩 군분리하였으며, 시험기간 동안, 매일 임상증상을 관찰하였다.
- 용량설정시험 결과, 암수 모두에서 최고농도군에 이르기까지 시험물질과 관련된 임상증상 또는 사망동물이 발견되지 않았다. 그러나, 수컷 2000 mg/kg 용량 투여군 (T3)에서 시험물질 투여 직후 식도천공 (perforation)으로 인해 2마리의 사망동물이 발생하였다. 이는 시험물질 특성상 (시험물질 입자의 크기) 시험물질입자가 손데(sonde) 구멍을 막아서 투여시 발생한 사고사로 사료된다.

○ 동결건조 흰점박이 꽃무지의 복귀돌연변이시험

- 용량설정시험에서는 OECD guideline에 근거하여 5000 µg/plate을 최고농도로 하여 3000, 1000, 200, 40, 8 µg/plate의 6단계 농도군으로 각 농도군당 1매의 플레이트를 사용하였으며, 부형제대조군 및 양성대조군을 포함하여 본시험에 준하여 실시하였다.
- 용량설정시험결과, 대사활성계 미적용 S. typhimurium TA100, TA1535, TA1537 균주 및 대사활성계 적용 S. typhimurium TA100, TA1535, TA1537, E.coli WP2uvrA 균주에서 약간의 복귀돌연변이 집락수 증가가 관찰되었으나, background lawn이 얇아지거나 미세집락의 출현 혹은 50% 이상의 복귀돌연변이 집락수 감소와 같은 세포독성은 관찰되지 않았다. 한편, 시험물질용액을 top agar와 혼합했을 때 및 48시간 배양 후에 시험에 사용된 모든 균주의 40 µg/plate 이상의 농도군에서 시험물질에 의한 침전이 관찰되었다.

○ 동결건조 흰점박이 꽃무지의 염색체이상시험

- 용량설정시험에서는 OECD guideline에 따라 5000 µg/mL를 최고농도로 하여 각 농도당 1 플라스크를 사용하는 것을 제외하고 본시험에 준하여 대사활성계 적용(+S) 및 미적용(-S) 하에서 실시하였다. 시험물질 처리 후 상대세포수(RCC)를 산출하여 세포 증식 억제 지 지표로 하였다.

- 용량설정시험결과, 대사활성계 적용(+S) 6시간 처리군의 경우 78.1 µg/mL 이상의 농도군에서, 대사활성계 미적용(-S) 6시간 및 22시간 처리군의 경우 시험에 사용된 모든 농도 범위에서 시험물질 처리시 및 처리 종료시에 시험물질의 침전 또는 혼탁/침전이 관찰되었으며, 심한 혼탁과 침전이 관찰되는 농도범위에서는 세포독성도 관찰되었다. 또한, 시험물질의 처리시 및 처리 종료시에 pH meter 및 osmometer를 이용하여 각 처리군의 최고농도군 (5000 µg/mL)에 대하여 배양액의 pH 및 osmolality를 측정된 결과, 부형제대조군에 비해 각각 1 unit 및 50 mOsm/kg 이상의 변화는 관찰되지 않았다.

○ 동결건조 흰점박이 꽃무지의 소핵시험

- 용량설정시험에서는 OECD guideline에 따라 14일까지 투여시 한계용량인 2000 mg/kg의 용량을 최고용량으로 하여 부형제대조군과 함께 4단계 처리군 (250, 500, 1000, 2000 mg/kg)에 1일 1회 2일간 경구투여하였다. 투여 전날에 Path/Tox system (version 4.2.2)을 이용하여 각 군당 4마리씩 군분리하였으며, 시험기간 동안, 매일 임상증상을 관찰하였다.
- 용량설정시험 결과, 암수 모두에서 최고농도군에 이르기까지 시험물질과 관련된 임상증상 또는 사망동물이 발견되지 않았다.

□ 갈색거저리를 이용한 유전독성 시험

○ 복귀돌연변이시험

- 동결건조 갈색거저리는 5000 µg/plate 농도까지 *Salmonella typhimurium* 4종 시험균주와 *Escherichia coli* 1종 시험균주에 대해 복귀돌연변이를 유발하지 않는 것으로 사료된다.

Table 1. Results of the Bacterial Reverse Mutation Assay with Freeze-dried Tenebrio molitor - 1st Experiment

Tester Strain	Chemical Treated	Dose (µg/plate)	Study No.: G12078			
			Revertant colonies/plate (Mean) [Factor] ⁴⁾			
			Without S-9 mixture		With S-9 mixture	
TA100	Vehicle	0	107 = 5		116 = 7	
	Test Article	156.3	104 = 4	[1.0]	141 = 8	[1.2]
		312.5 #	114 = 6	[1.1]	132 = 8	[1.1]
		625 #	124 = 5	[1.2]	139 = 12	[1.2]
		1250 #	129 = 9	[1.2]	147 = 9	[1.3]
		2500 #	132 = 6	[1.2]	135 = 12	[1.2]
5000 #	171 = 3	[1.6]	158 = 6	[1.4]		
TA1535	Vehicle	0	8 = 1		10 = 2	
	Test Article	156.3	10 = 1	[1.3]	13 = 1	[1.3]
		312.5 #	10 = 2	[1.3]	11 = 2	[1.1]
		625 #	11 = 2	[1.4]	12 = 3	[1.2]
		1250 #	10 = 3	[1.3]	12 = 2	[1.2]
		2500 #	11 = 3	[1.4]	9 = 1	[0.9]
5000 #	12 = 1	[1.5]	14 = 3	[1.4]		
TA98	Vehicle	0	19 = 1		28 = 2	
	Test Article	156.3	16 = 2	[0.8]	24 = 1	[0.9]
		312.5 #	18 = 1	[0.9]	29 = 3	[1.0]
		625 #	17 = 2	[0.9]	24 = 1	[0.9]
		1250 #	16 = 1	[0.8]	22 = 2	[0.8]
		2500 #	20 = 1	[1.1]	27 = 4	[1.0]
5000 #	19 = 4	[1.0]	29 = 2	[1.0]		
TA1537	Vehicle	0	6 = 1		8 = 1	
	Test Article	156.3	6 = 1	[1.0]	8 = 2	[1.0]
		312.5 #	6 = 2	[1.0]	10 = 1	[1.3]
		625 #	6 = 1	[1.0]	8 = 2	[1.0]
		1250 #	7 = 2	[1.2]	6 = 2	[0.8]
		2500 #	6 = 1	[1.0]	8 = 2	[1.0]
5000 #	6 = 2	[1.0]	8 = 2	[1.0]		
WP2uvrA	Vehicle	0	32 = 1		38 = 3	
	Test Article	156.3	35 = 4	[1.1]	34 = 5	[0.9]
		312.5 #	36 = 2	[1.1]	31 = 2	[0.8]
		625 #	33 = 4	[1.0]	35 = 2	[0.9]
		1250 #	34 = 4	[1.1]	35 = 4	[0.9]
		2500 #	41 = 4	[1.3]	39 = 4	[1.0]
5000 #	42 = 4	[1.3]	42 = 5	[1.1]		

⁴⁾ No. of Revertant colonies of treated plate/No. of Revertant colonies of vehicle control plate

#: Visible precipitation of test article was observed when the test article solutions were mixed with top agar and incubated for 48 hours.

Test Article: Freeze-dried Tenebrio molitor; Vehicle: Distilled Water (DW)

Table 1. (Continued) Results of the Bacterial Reverse Mutation Assay with Freeze-dried Tenebrio molitor - 1st Experiment

Study No.: G12078						
Tester Strain	Chemical Treated	Dose (µg/plate)	Revertant colonies/plate (Mean) [Factor] ^{a1}			
			Without S-9 mixture		With S-9 mixture	
Positive Controls						
TA100	SA	0.5	470	± 18	[4.4]	
TA1535	SA	0.5	229	± 18	[28.6]	
TA98	2-NF	2	374	± 27	[19.7]	
TA1537	9-AA	50	296	± 25	[49.3]	
WP2uvrA	4NQO	0.5	154	± 23	[4.8]	
WP2uvrA	4NQO	1	524	± 21	[16.4]	
TA100	BP	2				483 ± 35 [4.2]
TA1535	2-AA	2	6	± 1	[0.8]	86 ± 12 [8.6]
TA98	BP	2	20	± 4	[1.1]	279 ± 12 [10.0]
TA1537	BP	2				77 ± 5 [9.6]
WP2uvrA	2-AA	4				89 ± 5 [2.3]

^{a1} No. of Revertant colonies of treated plate/No. of Revertant colonies of vehicle control plate.
 SA, Sodium azide; 2-NF, 2-Nitrofluorene; 9-AA, 9-Aminoacridine;
 4NQO, 4-Nitroquinoline N-oxide; 2-AA, 2-Aminoanthracene; BP, Benzo(a)pyrene

Table 2. Results of the Bacterial Reverse Mutation Assay with Freeze-dried Tenebrio molitor - 2nd Experiment

Study No.: G12078						
Tester Strain	Chemical Treated	Dose (µg/plate)	Revertant colonies/plate (Mean) [Factor] ^{a1}			
			Without S-9 mixture		With S-9 mixture	
TA1535	Vehicle	0	9	± 1		9 ± 2
	Test Article	156.3	10	± 2	[1.1]	9 ± 3 [1.0]
		312.5 #	12	± 1	[1.3]	8 ± 2 [0.9]
		625 #	9	± 2	[1.0]	10 ± 2 [1.1]
		1250 #	12	± 1	[1.3]	9 ± 1 [1.0]
		2500 #	12	± 4	[1.3]	12 ± 1 [1.3]
5000 #	10	± 2	[1.1]	10 ± 2 [1.1]		
TA98	Vehicle	0	19	± 4		31 ± 4
	Test Article	156.3	19	± 5	[1.0]	31 ± 4 [1.0]
		312.5 #	17	± 3	[0.9]	34 ± 4 [1.1]
		625 #	18	± 4	[0.9]	25 ± 1 [0.8]
		1250 #	18	± 4	[0.9]	25 ± 2 [0.8]
		2500 #	17	± 2	[0.9]	33 ± 2 [1.1]
5000 #	18	± 5	[0.9]	30 ± 2 [1.0]		
TA1537	Vehicle	0	6	± 2		11 ± 1
	Test Article	156.3	6	± 0	[1.0]	11 ± 2 [1.0]
		312.5 #	6	± 1	[1.0]	10 ± 2 [0.9]
		625 #	6	± 1	[1.0]	10 ± 1 [0.9]
		1250 #	8	± 0	[1.3]	12 ± 3 [1.1]
		2500 #	6	± 1	[1.0]	10 ± 0 [0.9]
5000 #	6	± 2	[1.0]	8 ± 2 [0.7]		
WP2uvrA	Vehicle	0	20	± 2		23 ± 3
	Test Article	156.3	23	± 4	[1.2]	23 ± 0 [1.0]
		312.5 #	21	± 3	[1.1]	20 ± 2 [0.9]
		625 #	20	± 2	[1.0]	21 ± 1 [0.9]
		1250 #	26	± 3	[1.3]	27 ± 2 [1.2]
		2500 #	25	± 5	[1.3]	26 ± 3 [1.1]
5000 #	26	± 4	[1.3]	30 ± 2 [1.3]		

^{a1} No. of Revertant colonies of treated plate/No. of Revertant colonies of vehicle control plate

#: Visible precipitation of test article was observed when the test article solutions were mixed with top agar and incubated for 48 hours.

Test Article: Freeze-dried Tenebrio molitor; Vehicle: Distilled Water (DW)

Table 2. (Continued) Results of the Bacterial Reverse Mutation Assay with Freeze-dried *Tenebrio molitor* - 2nd Experiment

Study No.: G12078					
Tester Strain	Chemical Treated	Dose (µg/plate)	Revertant colonies/plate (Mean) [Factor] ^{a)}		
			Without 5-9 mixture		With 5-9 mixture
Positive Controls					
TA1535	SA	0.5	214 ± 10	[23.8]	
TA98	2-NF	2	300 ± 18	[15.8]	
TA1537	9-AA	50	182 ± 13	[30.3]	
WP2017A	4NQO	0.5	139 ± 24	[7.0]	
WP2017A	4NQO	1	500 ± 16	[25.0]	
TA1535	2-AA	2	6 ± 2	[0.7]	75 ± 11 [8.3]
TA98	BP	2	16 ± 3	[0.8]	307 ± 7 [9.9]
TA1537	BP	2			153 ± 5 [13.9]
WP2017A	2-AA	4			92 ± 6 [4.0]

^{a)} No. of Revertant colonies of treated plate/No. of Revertant colonies of vehicle control plate

SA, Sodium azide; 2-NF, 2-Nitrofluorene; 9-AA, 9-Aminoacridine; 4NQO, 4-Nitroquinoline N-oxide; 2-AA, 2-Aminoanthracene; BP, Benzo(a)pyrene

Table 3. Results of the Bacterial Reverse Mutation Assay with Freeze-dried *Tenebrio molitor* - 3rd Experiment

Study No.: G12078					
Tester Strain	Chemical Treated	Dose (µg/plate)	Revertant colonies/plate (Mean) [Factor] ^{a)}		
			Without 5-9 mixture		With 5-9 mixture
TA100	Vehicle	0	102 ± 6		108 ± 6
	Test Article	156.3	112 ± 9	[1.1]	104 ± 4 [1.0]
		312.5 #	111 ± 6	[1.1]	115 ± 7 [1.1]
		625 #	114 ± 6	[1.1]	121 ± 7 [1.1]
		1250 #	116 ± 10	[1.1]	134 ± 4 [1.2]
		2500 #	139 ± 5	[1.4]	139 ± 9 [1.3]
5000 #	151 ± 8	[1.5]	135 ± 8 [1.3]		
Positive Controls					
TA100	SA	0.5	463 ± 11	[4.5]	
TA100	BP	2	118 ± 6	[1.2]	1186 ± 142 [11.0]

^{a)} No. of Revertant colonies of treated plate/No. of Revertant colonies of vehicle control plate

#: Visible precipitation of test article was observed when the test article solutions were mixed with top agar and incubated for 48 hours.

Test Article: Freeze-dried *Tenebrio molitor*; Vehicle: Distilled Water (DW)
SA, Sodium azide; BP, Benzo(a)pyrene

○ 염색체이상시험

- 대사활성계 적용여부에 관계없이 동결건조 갈색 거저리는 CHL 세포에 염색체 이상을 유발하지 않는 물질인 것으로 사료된다.

Table 1. Chromosome Aberration Assay and Relative Cell Count ^{a)}

Study No. G12079						
Nominal Conc. of Test Article ($\mu\text{g/mL}$)	S-9 Mixture	Time ^{b)} (hours)	Mean Aberrant Metaphases	Mean Total Aberrations	Mean of PP + ER	Relative Cell Counts (%)
6-hour treatment (+S-9)						
0	+	6-18	1.0/0.0 ^{c)}	1.0/0.0	0.0 + 0.0	100
2.5	+	6-18		Not Counted		103
5	+	6-18	1.5/1.5	1.5/1.5	0.0 + 0.0	100
10	+	6-18	1.0/0.5	1.0/0.5	0.5 + 0.0	99
20 #§	+	6-18	1.0/0.0	1.0/0.0	0.5 + 0.0	101
CPA 6	+	6-18	32.5/32.5**	48.5/48.0	0.5 + 0.0	71
6-hour treatment (-S-9)						
0	-	6-18	1.5/1.5	1.5/1.5	0.0 + 0.0	100
2.5 #§	-	6-18		Not Counted		97
5 #§	-	6-18	1.5/1.0	2.0/1.5	1.0 + 0.0	95
10 #§	-	6-18	2.0/1.5	2.5/2.0	2.0 + 0.0	105
20 #§	-	6-18	2.5/2.0	3.0/2.5	1.0 + 0.0	98
EMS 800	-	6-18	28.0/27.5**	42.5/41.0	0.5 + 0.0	67
22-hour treatment (-S-9)						
0	-	22-2	1.0/1.0	1.0/1.0	1.5 + 0.0	100
2.5 #§	-	22-2		Not Counted		104
5 #§	-	22-2	0.5/0.5	0.5/0.5	0.5 + 0.0	106
10 #§	-	22-2	1.5/1.0	2.0/1.5	1.0 + 0.0	110
20 #§	-	22-2	2.0/1.0	2.0/1.0	1.5 + 0.0	109
EMS 600	-	22-2	44.5/44.5**	83.5/82.0	0.5 + 0.0	53

Visible precipitation of test article was observed at the beginning of the treatment.

§ Visible precipitation of test article was observed at the end of the treatment.

** Significantly different from the control at $P < 0.01$.

Vehicle versus test article-treated groups: After carrying out χ^2 -test, performed Fisher's exact test, if $P < 0.05$.

Vehicle versus positive control groups: Fisher's exact test.

Test Article: Freeze-dried *Tenebrio molitor*

Vehicle: Water, sterile-filtered, BioReagent, suitable for cell culture (DW)

^{a)} See Appendix 1, 2, 3 & 4 for individual data

^{b)} Treatment time-recovery time

^{c)} Gaps included/excluded, means of duplicate cultures; 100 metaphases were examined per culture.

Abbreviation:

PP, Polyploid; ER, Endoreduplication;

CPA, Cyclophosphamide monohydrate; EMS, Ethyl methanesulfonate

○ 소핵시험

- 동결건조 갈색거저리는 본 시험에 사용한 투여용량 범위에서는 마우스의 골수세포에 소핵을 유발하지 않았다. 그러므로, 동결건조 갈색거저리는 마우스 소핵시험에서 음성인 것으로 사료된다.

Table 1. Micronucleus Test of Freeze-dried Tenebrio molitor in Male Mice

STUDY NO.: G12080					
GROUP:	V. CONTROL	T1	T2	T3	P. CONTROL
DOSE: (mg/kg)	0	500	1000	2000	70
MNPCEs/2000 PCEs					
MEAN	1.50	0.67	1.67	0.80	96.83 **
S.D.	1.08	1.03	1.03	0.84	16.09
PCEs/(PCEs+NCEs)					
MEAN	0.54	0.61	0.55	0.62	0.50
S.D.	0.07	0.12	0.10	0.07	0.04
N	6	6	6	6	6

** Significant differences from control group ($P<0.01$).

No. of MNPCEs between vehicle and treated group: Kruskal-Wallis H-test and Dunn's Rank Sum test

No. of MNPCEs between vehicle and positive control group: Mann-Whitney U-test

PCEs/(PCEs+NCEs) ratio between vehicle and treated group: ANOVA test and Dunnett's test

PCEs/(PCEs+NCEs) ratio between vehicle and positive control group: Student's t-test

Test Article: Freeze-dried Tenebrio molitor

V.CONTROL: Daihan Water for injection, sterile (DW)

P.CONTROL: Cyclophosphamide monohydrate (CPA)

Abbreviations

MNPCE: PCE with one or more micronuclei

PCE: Polychromatic erythrocyte

NCE: Normochromatic erythrocyte

CPA: Cyclophosphamide monohydrate (Positive control article)

Table 2. Micronucleus Test of Freeze-dried Tenebrio molitor in Female Mice

STUDY NO.: G12080					
GROUP:	V. CONTROL	T1	T2	T3	P. CONTROL
DOSE: (mg/kg)	0	500	1000	2000	70
MNPCEs/2000 PCEs					
MEAN	1.00	1.17	1.17	1.00	64.00 **
S.D.	0.89	0.98	0.75	0.89	13.37
PCEs/(PCEs+NCEs)					
MEAN	0.64	0.65	0.59	0.60	0.48 **
S.D.	0.06	0.08	0.06	0.09	0.07
N	6	6	6	6	6

** Significant differences from control group ($P<0.01$).

No. of MNPCEs between vehicle and treated group: Kruskal-Wallis H-test and Dunn's Rank Sum test

No. of MNPCEs between vehicle and positive control group: Mann-Whitney U-test

PCEs/(PCEs+NCEs) ratio between vehicle and treated group: ANOVA test and Dunnett's test

PCEs/(PCEs+NCEs) ratio between vehicle and positive control group: Student's t-test

Test Article: Freeze-dried Tenebrio molitor

V.CONTROL: Daihan Water for injection, sterile (DW)

P.CONTROL: Cyclophosphamide monohydrate (CPA)

Abbreviations

MNPCE: PCE with one or more micronuclei

PCE: Polychromatic erythrocyte

NCE: Normochromatic erythrocyte

CPA: Cyclophosphamide monohydrate (Positive control article)

□ 흰점박이 꽃무지를 이용한 유전독성 시험

○ 복귀돌연변이시험

- 본 시험 조건하에서 동결건조 흰점박이꽃무지는 5000 µg/plate 농도까지 *Salmonella typhimurium* 4종 시험균주와 *Escherichia coli* 1종 시험균주에 복귀돌연변이를 유발하지 않는 것으로 사료된다. 그러나, 대사활성계 미적용 및 적용시 *S. typhimurium* TA1535 균주에서 양성판정기준에는 미치지 못하지만, 용량상관성 있는 복귀돌연변이 집락수의 증가가 관찰되었다.

Table 1. Results of the Bacterial Reverse Mutation Assay with Freeze-dried *Protaetia brevitarsis* - 1st Experiment

Tester Strain	Chemical Treated	Dose (µg/plate)	Study No.: G12083	
			Revertant colonies/plate (Mean) [Factor] ^{a)}	
			Without 5-9 mixture	With 5-9 mixture
TA100	Vehicle	0	125 ± 5	131 ± 10
	Test Article	20.6	131 ± 6 [1.0]	136 ± 10 [1.0]
		61.7 #	130 ± 3 [1.0]	136 ± 6 [1.0]
		185.2 #	128 ± 11 [1.0]	143 ± 4 [1.1]
		555.6 #	142 ± 10 [1.1]	148 ± 14 [1.1]
		1666.7 #	151 ± 15 [1.2]	164 ± 7 [1.3]
5000 #	153 ± 16 [1.2]	182 ± 10 [1.4]		
TA1535	Vehicle	0	12 ± 2	10 ± 1
	Test Article	20.6	15 ± 1 [1.3]	11 ± 3 [1.1]
		61.7 #	17 ± 2 [1.4]	14 ± 1 [1.4]
		185.2 #	16 ± 1 [1.3]	15 ± 2 [1.5]
		555.6 #	20 ± 1 [1.7]	15 ± 2 [1.5]
		1666.7 #	22 ± 3 [1.8]	17 ± 2 [1.7]
5000 #	23 ± 3 [1.9]	19 ± 2 [1.9]		
TA98	Vehicle	0	18 ± 2	32 ± 1
	Test Article	20.6	21 ± 4 [1.2]	33 ± 3 [1.0]
		61.7 #	23 ± 3 [1.3]	33 ± 2 [1.0]
		185.2 #	23 ± 2 [1.3]	34 ± 2 [1.1]
		555.6 #	25 ± 1 [1.4]	33 ± 3 [1.0]
		1666.7 #	25 ± 1 [1.4]	37 ± 1 [1.2]
5000 #	23 ± 2 [1.3]	32 ± 3 [1.0]		
TA1537	Vehicle	0	10 ± 1	15 ± 3
	Test Article	20.6	12 ± 2 [1.2]	15 ± 2 [1.0]
		61.7 #	10 ± 1 [1.0]	14 ± 2 [0.9]
		185.2 #	12 ± 3 [1.2]	15 ± 3 [1.0]
		555.6 #	12 ± 1 [1.2]	18 ± 2 [1.2]
		1666.7 #	11 ± 2 [1.1]	14 ± 1 [0.9]
5000 #	12 ± 1 [1.2]	20 ± 3 [1.3]		
WP2uvrA	Vehicle	0	34 ± 1	37 ± 2
	Test Article	20.6	35 ± 3 [1.0]	38 ± 1 [1.0]
		61.7 #	31 ± 3 [0.9]	35 ± 3 [0.9]
		185.2 #	36 ± 4 [1.1]	40 ± 2 [1.1]
		555.6 #	38 ± 4 [1.1]	39 ± 2 [1.1]
		1666.7 #	39 ± 3 [1.1]	39 ± 3 [1.1]
5000 #	43 ± 2 [1.3]	38 ± 2 [1.0]		

^{a)} No. of Revertant colonies of treated plate/No. of Revertant colonies of vehicle control plate

#. Visible precipitation of test article was observed when the test article solutions were mixed with top agar and incubated for 48 hours.

Test Article: Freeze-dried *Protaetia brevitarsis*; Vehicle: Distilled Water (DW)

Table 1. (Continued) Results of the Bacterial Reverse Mutation Assay with Freeze-dried *Protaetia brevitarsis* - 1st Experiment

Tester Strain	Chemical Treated	Dose (µg/plate)	Study No.: G12083	
			Revertant colonies/plate (Mean) [Factor] ^{a)}	
			Without 5-9 mixture	With 5-9 mixture
Positive Controls				
TA100	SA	0.5	419 ± 12 [3.4]	
TA1535	SA	0.5	361 ± 14 [30.1]	
TA98	2-NF	2	320 ± 27 [17.8]	
TA1537	9-AA	50	877 ± 59 [87.7]	
WP2uvrA	4NQO	0.5	181 ± 10 [5.3]	
WP2uvrA	4NQO	1	309 ± 23 [9.1]	
TA100	BP	2		1094 ± 155 [8.4]
TA1535	2-AA	2	15 ± 5 [1.3]	211 ± 12 [21.1]
TA98	BP	2	18 ± 6 [1.0]	357 ± 13 [11.2]
TA1537	BP	2		186 ± 44 [12.4]
WP2uvrA	2-AA	4		151 ± 19 [4.1]

^{a)} No. of Revertant colonies of treated plate/No. of Revertant colonies of vehicle control plate

SA, Sodium azide; 2-NF, 2-Nitrofluorene; 9-AA, 9-Aminoacridine; 4NQO, 4-Nitroquinoline N-oxide; 2-AA, 2-Aminoanthracene; BP, Benzo(a)pyrene

Table 2. Results of the Bacterial Reverse Mutation Assay with Freeze-dried *Protaetia brevitarsis* - 2nd Experiment

Study No.: G12083									
Tester Strain	Chemical Treated	Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	Revertant colonies/plate (Mean) [Factor] ⁴⁾						
			Without 5-9 mixture		With 5-9 mixture				
TA100	Vehicle	0	134	=	7	147	=	19	
	Test Article	20.6	188	=	3	155	=	1	[1.1]
		61.7 #	183	=	2	178	=	19	[1.2]
		185.2 #	187	=	16	169	=	13	[1.1]
		555.6 #	184	=	10	174	=	15	[1.2]
		1666.7 #	210	=	22	196	=	10	[1.3]
5000 #	242	=	16	206	=	18	[1.4]		
TA98	Vehicle	0	20	=	1	30	=	6	
	Test Article	20.6	23	=	6	33	=	4	[1.1]
		61.7 #	23	=	2	31	=	2	[1.0]
		185.2 #	23	=	1	30	=	2	[1.0]
		555.6 #	26	=	1	34	=	2	[1.1]
		1666.7 #	23	=	2	34	=	1	[1.1]
5000 #	24	=	4	32	=	2	[1.1]		
TA1537	Vehicle	0	11	=	2	13	=	1	
	Test Article	20.6	9	=	1	12	=	2	[0.9]
		61.7 #	11	=	1	11	=	1	[0.8]
		185.2 #	11	=	2	15	=	2	[1.2]
		555.6 #	11	=	1	13	=	1	[1.0]
		1666.7 #	11	=	1	13	=	1	[1.0]
5000 #	12	=	1	14	=	3	[1.1]		
WP2uvrA	Vehicle	0	41	=	3	45	=	4	
	Test Article	20.6	43	=	1	43	=	3	[1.0]
		61.7 #	46	=	1	44	=	4	[1.0]
		185.2 #	42	=	3	47	=	4	[1.0]
		555.6 #	45	=	2	43	=	4	[1.0]
		1666.7 #	44	=	3	44	=	3	[1.0]
5000 #	47	=	5	47	=	4	[1.0]		

⁴⁾ No. of Revertant colonies of treated plate/No. of Revertant colonies of vehicle control plate

#. Visible precipitation of test article was observed when the test article solutions were mixed with top agar and incubated for 48 hours.

Test Article: Freeze-dried *Protaetia brevitarsis*; Vehicle: Distilled Water (DW)

Table 2. (Continued) Results of the Bacterial Reverse Mutation Assay with Freeze-dried *Protaetia brevitarsis* - 2nd Experiment

Study No.: G12083										
Tester Strain	Chemical Treated	Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	Revertant colonies/plate (Mean) [Factor] ⁴⁾							
			Without 5-9 mixture		With 5-9 mixture					
Positive Controls										
TA100	SA	0.5	429	=	11	[3.2]				
TA98	2-NF	2	328	=	23	[16.4]				
TA1537	9-AA	50	294	=	21	[26.7]				
WP2uvrA	4NQO	0.5	359	=	19	[8.8]				
WP2uvrA	4NQO	1	852	=	16	[20.8]				
TA100	BP	2				1056	=	89	[7.2]	
TA98	BP	2	17	=	2	[0.9]	511	=	42	[17.0]
TA1537	BP	2				133	=	12	[10.2]	
WP2uvrA	2-AA	4				141	=	14	[3.1]	

⁴⁾ No. of Revertant colonies of treated plate/No. of Revertant colonies of vehicle control plate

SA, Sodium azide; 2-NF, 2-Nitrofluorene; 9-AA, 9-Aminoacridine; 4NQO, 4-Nitroquinoline N-oxide; 2-AA, 2-Aminoanthracene; BP, Benzo(a)pyrene

Table 3. Results of the Bacterial Reverse Mutation Assay with Freeze-dried *Protaetia brevitarsis* - 3rd Experiment

		Study No.: G12083						
Tester Strain	Chemical Treated	Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	Revertant colonies/plate (Mean) [Factor] ^{a)}					
			Without S-9 mixture		With S-9 mixture			
TA100	Vehicle	0	110	\pm 8		141	\pm 8	
	Test Article	20.6	111	\pm 6	[1.0]	137	\pm 6	[1.0]
		61.7 #	132	\pm 8	[1.2]	144	\pm 11	[1.0]
		185.2 #	129	\pm 12	[1.2]	140	\pm 2	[1.0]
		555.6 #	121	\pm 14	[1.1]	144	\pm 3	[1.0]
		1666.7 #	141	\pm 10	[1.3]	159	\pm 14	[1.1]
5000 #	142	\pm 7	[1.3]	185	\pm 13	[1.3]		
TA1535	Vehicle	0	13	\pm 2		10	\pm 1	
	Test Article	20.6	13	\pm 1	[1.0]	12	\pm 1	[1.2]
		61.7 #	18	\pm 0	[1.4]	14	\pm 2	[1.4]
		185.2 #	18	\pm 1	[1.4]	15	\pm 2	[1.5]
		555.6 #	20	\pm 3	[1.5]	16	\pm 1	[1.6]
		1666.7 #	21	\pm 1	[1.6]	17	\pm 2	[1.7]
5000 #	25	\pm 3	[1.9]	20	\pm 3	[2.0]		
Positive Controls								
TA100	SA	0.5	585	\pm 35	[5.3]			
TA1535	SA	0.5	344	\pm 22	[26.5]			
TA100	BP	2				946	\pm 60	[6.7]
TA1535	2-AA	2	11	\pm 3	[0.8]	400	\pm 23	[40.0]

^{a)}No. of Revertant colonies of treated plate/No. of Revertant colonies of vehicle control plate

#. Visible precipitation of test article was observed when the test article solutions were mixed with top agar and incubated for 48 hours.

Test Article: Freeze-dried *Protaetia brevitarsis*; Vehicle: Distilled Water (DW)
SA, Sodium azide; 2-AA, 2-Aminoanthracene; BP, Benzo(a)pyrene

○ 염색체이상시험

- 대사활성계 적용여부에 관계없이 동결건조 흰점박이꽃무지는 CHL 세포에 염색체 이상을 유발하지 않는 물질인 것으로 사료된다.

Table 1. Chromosome Aberration Assay and Relative Cell Count ^{a)}

		Study No. G12084				
Nominal Conc. of Test Article ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	S-9 Mixture	Time ^{b)} (hours)	Mean Aberrant Metaphases	Mean Total Aberrations	Mean of PP + ER	Relative Cell Counts (%)
6-hour treatment (+S-9)						
0	+	6-18	0.5/0.0 ^{c)}	0.5/0.0	0.5 + 0.0	100
10	+	6-18		Not Counted		95
20	+	6-18	1.0/1.0	1.0/1.0	0.0 + 0.0	95
40 #S	+	6-18	0.5/0.5	2.0/2.0	0.5 + 0.0	101
80 #S	+	6-18	0.5/0.5	0.5/0.5	0.0 + 0.0	102
CPA 6	+	6-18	25.0/24.0**	31.0/29.5	1.0 + 0.0	79
6-hour treatment (-S-9)						
0	-	6-18	0.5/0.5	0.5/0.5	0.0 + 0.0	100
2.5 #S	-	6-18		Not Counted		99
5 #S	-	6-18	0.0/0.0	0.0/0.0	0.0 + 0.0	99
10 #S	-	6-18	0.5/0.0	0.5/0.0	0.0 + 0.0	99
20 #S	-	6-18	1.0/1.0	1.0/1.0	0.5 + 0.0	95
EMS 800	-	6-18	25.0/25.0**	36.0/35.5	0.5 + 0.0	63
22-hour treatment (-S-9)						
0	-	22-2	0.5/0.5	0.5/0.5	0.5 + 0.0	100
2.5 #S	-	22-2		Not Counted		100
5 #S	-	22-2	0.5/0.0	0.5/0.0	0.5 + 0.0	103
10 #S	-	22-2	0.5/0.5	0.5/0.5	1.0 + 0.0	100
20 #S	-	22-2	1.0/0.0	1.0/0.0	0.5 + 0.0	100
EMS 600	-	22-2	42.5/42.5**	70.0/68.5	1.0 + 0.0	57

Visible precipitation of test article was observed at the beginning of the treatment.

S Visible precipitation of test article was observed at the end of the treatment.

** Significantly different from the control at $P < 0.01$.

Vehicle versus test article-treated groups: After carrying out χ^2 -test, performed Fisher's exact test, if $P < 0.05$.
Vehicle versus positive control groups: Fisher's exact test.

Test Article: Freeze-dried *Protaetia brevitarsis*
Vehicle: Water, sterile-filtered, BioReagent, suitable for cell culture (DW)

^{a)} See Appendix 1, 2, 3 & 4 for individual data

^{b)} Treatment time-recovery time

^{c)} Gaps included/excluded, means of duplicate cultures; 100 metaphases were examined per culture.

Abbreviation:

PP, Polyploid; ER, Endoreduplication;

CPA, Cyclophosphamide monohydrate; EMS, Ethyl methanesulfonate

○ 소핵시험

- 동결건조 흰점박이꽃무지는 본 시험에 사용한 투여용량 범위에서는 마우스의 골수세포에 소핵을 유발하지 않았다. 그러므로, 동결건조 흰점박이꽃무지는 마우스 소핵시험에서 음성인 것으로 사료된다.

Table 1. Micronucleus Test of Freeze-dried Propaetia brevitarsis in Male Mice

STUDY NO.: G12085					
GROUP:	V.CONTROL	T1	T2	T3	P.CONTROL
DOSE: (mg/kg)	0	500	1000	2000	70
MNPCEs/2000 PCEs					
MEAN	1.00	0.83	1.17	1.67	63.50 **
S.D.	0.89	0.75	0.75	0.52	9.73
PCEs/(PCEs+NCEs)					
MEAN	0.59	0.61	0.65	0.67 *	0.60
S.D.	0.07	0.02	0.03	0.05	0.05
N	6	6	6	6	6

* Significant differences from control group ($P<0.05$).

** Significant differences from control group ($P<0.01$).

No. of MNPCEs between vehicle and treated group: Kruskal-Wallis H-test and Dunn's Rank Sum test

No. of MNPCEs between vehicle and positive control group: Mann-Whitney U-test

PCEs/(PCEs+NCEs) ratio between vehicle and treated group: ANOVA test and Dunnett's test

PCEs/(PCEs+NCEs) ratio between vehicle and positive control group: Student's t-test

Test Article: Freeze-dried Propaetia brevitarsis

V.CONTROL: Daihan Water for injection, sterile (DW)

P.CONTROL: Cyclophosphamide monohydrate (CPA)

Abbreviations

MNPCE: PCE with one or more micronuclei

PCE: Polychromatic erythrocyte

NCE: Normochromatic erythrocyte

CPA: Cyclophosphamide monohydrate (Positive control article)

Table 2. Micronucleus Test of Freeze-dried Propaetia brevitarsis in Female Mice

STUDY NO.: G12085					
GROUP:	V.CONTROL	T1	T2	T3	P.CONTROL
DOSE: (mg/kg)	0	500	1000	2000	70
MNPCEs/2000 PCEs					
MEAN	0.83	1.17	1.00	1.33	57.50 **
S.D.	0.41	0.75	0.00	0.82	12.53
PCEs/(PCEs+NCEs)					
MEAN	0.60	0.63	0.59	0.64	0.52
S.D.	0.04	0.06	0.03	0.05	0.04
N	6	6	6	6	6

** Significant differences from control group ($P<0.01$).

No. of MNPCEs between vehicle and treated group: Kruskal-Wallis H-test and Dunn's Rank Sum test

No. of MNPCEs between vehicle and positive control group: Mann-Whitney U-test

PCEs/(PCEs+NCEs) ratio between vehicle and treated group: ANOVA test and Dunnett's test

PCEs/(PCEs+NCEs) ratio between vehicle and positive control group: Student's t-test

Test Article: Freeze-dried Propaetia brevitarsis

V.CONTROL: Daihan Water for injection, sterile (DW)

P.CONTROL: Cyclophosphamide monohydrate (CPA)

Abbreviations

MNPCE: PCE with one or more micronuclei

PCE: Polychromatic erythrocyte

NCE: Normochromatic erythrocyte

CPA: Cyclophosphamide monohydrate (Positive control article)

○ Comet Assay

- 동결건조 흰점박이꽃무지는 본 시험에 사용한 투여용량 범위에서는 수컷 랫드 (SD) 의 liver와 stomach 모두에서 DNA 손상을 유발하지 않았다.

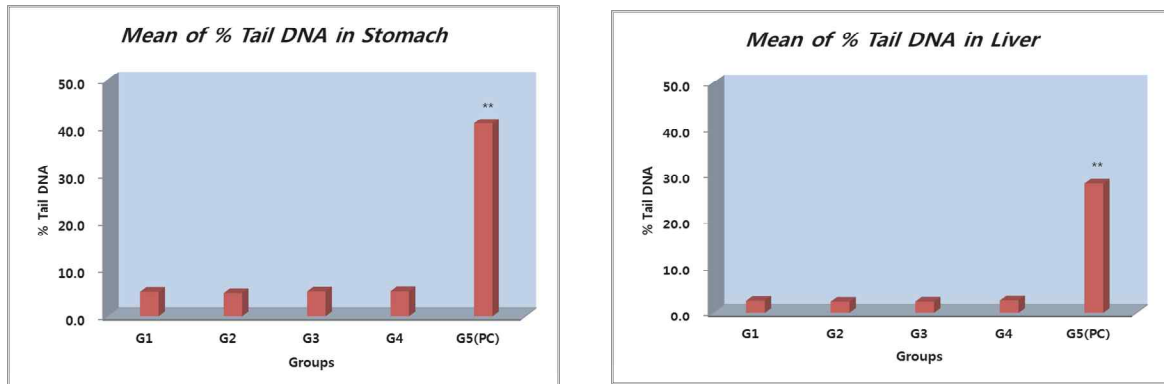


Figure 1. Mean of % tail DNA in Liver and Stomach

** Significant differences from control group (P<0.01).

Test Article: Freeze-dried *Protaetia brevitarsis*

G1: Vehicle Control, Daihan Water for injection, sterile (DW)

G2: 500 mg/kg

G3: 1000 mg/kg

G4: 2000 mg/kg

G5: Positive Control, Ethyl methanesulfonate (EMS), 200 mg/kg

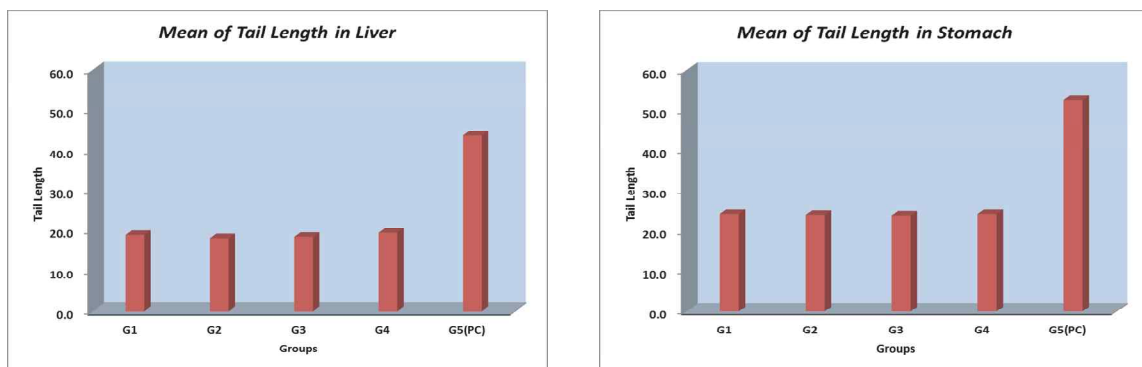


Figure 2. Mean of Tail Length in Liver and Stomach

Test Article: Freeze-dried *Protaetia brevitarsis*

G1: Vehicle Control, Daihan Water for injection, sterile (DW)

G2: 500 mg/kg

G3: 1000 mg/kg

G4: 2000 mg/kg

G5: Positive Control, Ethyl methanesulfonate (EMS), 200 mg/kg

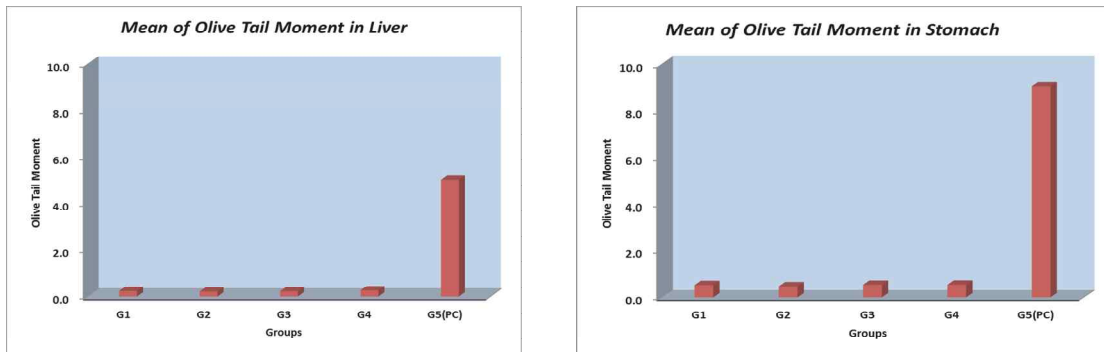


Figure 3. Mean of Olive Tail Moment in Liver and Stomach

Test Article: Freeze-dried *Protaetia brevitarsis*

G1: Vehicle Control, Daihan Water for injection, sterile (DW)

G2: 500 mg/kg

G3: 1000 mg/kg

G4: 2000 mg/kg

G5: Positive Control, Ethyl methanesulfonate (EMS), 200 mg/kg

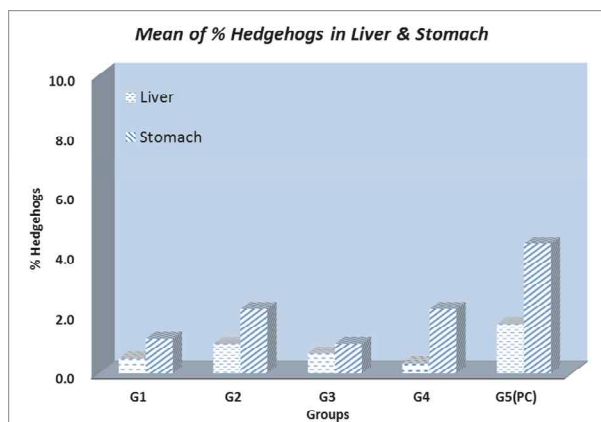


Figure 4. Mean of Hedgehogs in Liver and Stomach

Test Article: Freeze-dried *Protaetia brevitarsis*

G1: Vehicle Control, Daihan Water for injection, sterile (DW)

G2: 500 mg/kg

G3: 1000 mg/kg

G4: 2000 mg/kg

G5: Positive Control, Ethyl methanesulfonate (EMS), 200 mg/kg

5. 곤충분말의 제조공정 표준화 및 시제품 개발(제4협동)

가. 곤충에 대한 특성 파악 및 동결건조 조건 설정




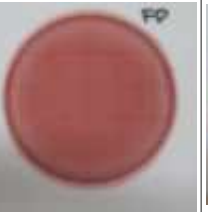

(가) 전처리 조건설정

① 중탕처리에 의한 살균처리

□ 실험방법

- 대장균 사멸을 위해 대장균 사멸온도인 60℃를 최저온도로 시간과 온도를 설정하여 중탕처리 후 동결건조한 분말의 대장균확인실험을 실시함

□ 실험결과

구분	NO,1	NO,2	NO,3	NO,4	NO,5
가열온도	비가열	60℃	60℃	80℃	90℃
가열시간	-	20 min	10 min	5 min	5 min
	양성(+)	음성(-)	음성(-)	음성(-)	음성(-)
결과					


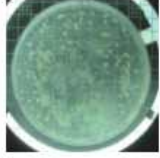




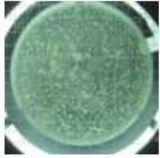




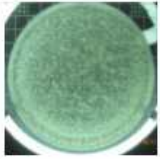

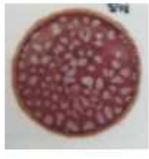






- 실험결과 온도와 시간에 관계없이 모두 대장균 음성으로 검출되었음. 그러나 중탕에 의한 방법은 성분이 물에 용출될 가능성이 있으므로 적합하지 않은 것으로 사료됨

② 동결건조 후 분말화하여 Autoclave를 이용한 후 살균

□ 실험방법

- 살균처리를 거치지 않고 동결 건조한 곤충분말을 인습되지 않도록 멸균병에 담아 완전 밀봉 후 autoclave에서 시간과 온도별로 setting하여 사멸온도 설정실험을 실시함

□ 실험결과

가열온도 (°C)	가열시간 (min)	분말성상	일반세균		대장균 및 대장균군			
			희석배수	결과	판정	대장균군	대장균	
비열처리			100		양성(+)			
60	15		10		양성(+)			
75	3		10		양성(+)			
121	15		10		음성(-)			

○ 실험결과 121°C, 15 min 처리 시 대장균과 일반세균이 완전 사멸되었지만 분말의 색상과 냄새의 변화를 유발하여 제품품질에 영향을 주는 것으로 확인됨









③ 동결건조 후 분말화하여 열풍를 이용한 살균(1차)

□ 실험방법

○ 멸균병에 담아 autoclave로 멸균처리 시 멸균병에 의한 열전달이 확실하지 않을 수 있으므로 동결건조 후 tray에 펼쳐서 열풍건조하여 미생물 사멸여부를 확인함

□ 실험결과

① 갈색거저리

가열 온도	가열 시간	일반세균		대장균 및 대장균군			
		희석배수	결과	판정	대장균군	대장균	
60°C	25min	10		양성(+)			
75°C	20min	10		양성(+)			

㉔ 흰점박이꽃무지

가열 온도	가열 시간	일반세균		판정	대장균 및 대장균군		
		희석배수	결과		대장균군		대장균
60°C	25min	10		양성(+)			
75°C	20min	10		양성(+)			

○ 실험결과 동결건조를 실시한 후에 열풍건조를 하는 것은 세균의 살균효과가 없는 것으로 확인됨

④ 동결건조 후 분말화하여 열풍을 이용한 살균(2차)

실험방법

○ 선행연구에서 동결건조 후 열풍건조 시 미생물이 사멸되지 않았음. 수분이 없는 상태에서는 열전달이 되지 않아 살균력이 떨어질 수 있다고 함. 그러므로 초기부터 고온으로 건조하여 미생물 살균정도를 확인하기 위해 열풍건조를 실시하였음

실험결과

㉑ 갈색거저리

열풍건조물 성상		수분함량	0.74%	조단백	56.52%	조지방	31.65%
건조온도	건조시간	일반세균			판정	대장균 및 대장균군	
		10배 희석	100배 희석	1000배 희석		대장균군	대장균
60°C	60 hr	TNTC	11900 cfu/g	17500 cfu/g	양성(+)		
열풍건조물 성상		수분함량	0.47%	조단백	58.22%	조지방	31.68%
건조온도	건조시간	일반세균			판정	대장균 및 대장균군	
		10배 희석	100배 희석	1000배 희석		대장균군	대장균
75°C	30 hr	TNTC	33900 cfu/g	28000 cfu/g	양성(+)		

㉔ 흰점박이꽃무지

열풍건조물 성상		수분함량	1.47%	조단백	59.96%	조지방	16.43%
건조온도	건조시간	일반세균			판정	대장균 및 대장균군	
		10배 희석	100배 희석	1000배 희석		대장균군	대장균
60°C	60 hr				양성(+)		

- 실험결과 건조시간을 30~60 hr 동안 진행했음에도 불구하고 열풍건조 후 대장균과 일반세균이 모두 검출되었음. 건조방식에 따른 정상변화를 고려하여 조지방과 조단백질을 측정된 결과 건조방식에 따른 변화는 없는 것으로 확인됨

⑤ 스팀처리에 의한 미생물 살균

□ 실험방법

- 농가에서 직접 유통 시 흰점박이꽃무지를 찜통에 넣고 스팀처리 후 열풍건조하여 환제 생산한다고 함. 스팀처리에 의한 미생물 살균이 가능한지 여부 확인을 위해 농가에서 직접 스팀처리한 샘플을 수령하여 대장균 및 일반세균의 살균여부를 확인하였음

□ 실험결과

- 스팀처리 시간에 따른 흰점박이꽃무지 정상

스팀처리	환	무처리	스팀 1분	스팀 3분	스팀 5분
정상					

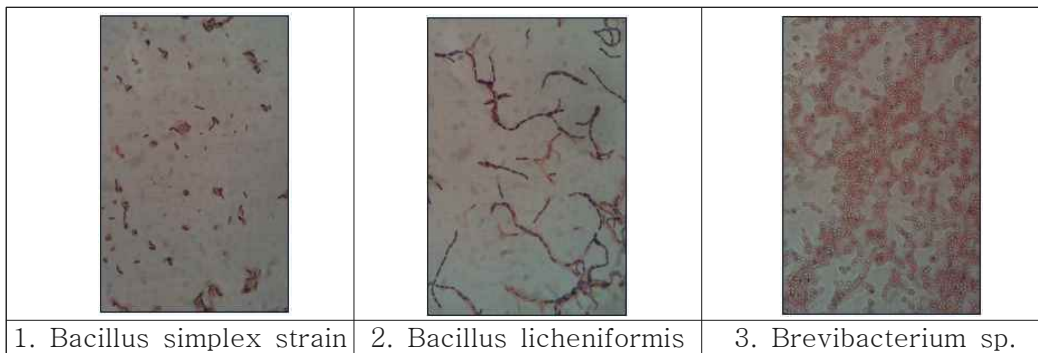
○ 미생물 확인 결과

시료	일반세균		판정	대장균군 및 대장균		
	10배 희석 TNTC	100배 희석 31,000 cfu/g		대장균군	대장균	
환			양성(+)			
무처리 꽃무지			양성(+)			
1분 스팀			음성(-)			
3분 스팀			음성(-)			
5분 스팀			음성(-)			

○ Sequence 확인

스팀처리 후 열풍건조한 꽃무지의 일반세균 및 대장균 확인 실험을 실시한 결과 대장균과 대장균은 음성으로 판정되었으나 일반세균의 모양이 곰팡이와 유사하게 나타나고 스팀에도 사멸되지 않아 다음과 같은 실험을 실시하였음. 다음의 사진은 배지에 자란 균을 종류별로 1 colony 씩 취하여 그람염색 후 현미경으로 확대한 것으로 1번은 곰팡이로 의심되었던 균을 취하여 확대한 것, 2번은 균의 크기가 크고 점질물이 있으며 가운데 노란 핵이 보였던 균을 취한 것, 3번은 일반적인 세균의 모양을 취한 colony를 따서 확인한 것인데 모양은 간균의 모양과 흡사하며 크기가 작고 뭉쳐져는 것을 취한 것임. 염색법에 의한 사진판독으로는 3균 모두 곰팡이일 가능성은 없어보였으며 정확한 판독을 위해 단일 colony를 취하여 재배양 후 sequence을 확인하여 균명을 밝히는 실험을 실시하였음

□ 그람염색 후 현미경으로 관찰한 사진과 sequence 분석을 통한 규명



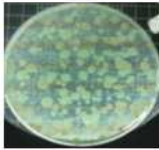



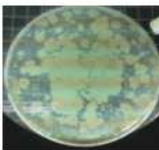



○ 실험결과 스팀처리에 의해서도 일반세균이 검출됨에 따라 균주 확인을 위해 sequence 분석을 실시하였음. 확인결과 *Bacillus* 속으로 인체에 유해한 세균은 아닌 것으로 확인되나 균의 증식형태가 노란 핵이 뚜렷하게 나타나 멸균이 쉽지 않을 것으로 사료됨

⑥ 스팀처리 시간을 증가시킨 후 미생물 분석

□ 실험방법

○ 스팀처리 시 대장균은 검출되지 않았으므로 스팀처리 시간을 증가시켜 일반세균의 사멸정도 확인 실험을 실시함

□ 실험결과

시료	일반세균		대장균군 및 대장균			
			판정	대장균군	대장균	
스팀 20분	21,700 cfu/g		음성(-)			
스팀 30분	8,200 cfu/g		음성(-)			




































○ 실험결과 스팀처리 시간이 증가하여도 세균이 완전 사멸되지 않음

⑦ 고온·고압에 의한 살균

□ 실험방법

- 농가에서 직접 구입한 흰점박이꽃무지를 autoclave에서 고온·고압의 여러 가지 조건에서 미생물의 살균여부를 실험하였음

□ 실험결과

105℃, 20분 Autoclave		4990		streak (-)		streak (-)		streak (-)	
115℃, 5분 Autoclave		0		streak (-)		streak (-)		streak (-)	
115℃, 10분 Autoclave		0		streak (-)		streak (-)		streak (-)	
115℃, 20분 Autoclave		0		streak (-)		streak (-)		streak (-)	
120℃, 5분 Autoclave		0		streak (-)		streak (-)		streak (-)	
120℃, 10분 Autoclave		0		streak (-)		streak (-)		streak (-)	
120℃, 20분 Autoclave		0		streak (-)		streak (-)		streak (-)	

- 실험결과 autoclave 처리 시 105℃, 20분에서는 4,990 cfu/g 검출되었으나 115℃, 5분 부터는 일반세균도 검출되지 않아 현장적용 시 오차를 감안하여 115℃, 10 min 처리로 살균조건을 확립하였음

나. 동결건조 조건설정

(1) 곤충 특성

구분	수분	조단백질	조지방	지방산 중 최저 Melting Point
갈색거저리	60~65%	18~22%	11~13%	α-Linoleic acid -12℃
흰점박이꽃무지	79~84%	10~12%	2.3~3.5%	α-Linoleic acid -12℃

(2) 동결온도, 건조온도 및 시간

① 실험 1

- 유충 : 갈색거저리
- 급속동결 온도/시간 : -40℃ / 12 hr
- 동결건조 온도/시간 : -40℃ → 30℃
- 건조소요시간 : 24 hr
- 실험결과 : 건조가 이루어지지 않은 반건조 상태임

② 실험 2

- 유충 : 갈색거저리
- 급속동결 온도/시간 : -40℃ / 3hr
- 동결건조 온도/시간 : -40℃ → -20℃(4hr) → 0℃(8hr) → 10℃(4hr) → 20℃(4hr) → 30℃ (47hr)
- 건조소요시간 : 67시간
- 실험결과 : 표면에 기름이 묻어나왔으며, 건조는 잘된 것 같았으나 수분 측정 결과 6.8% 었음

③ 실험 3 : 건조 온도를 저온과 고온에서 건조하였을 때 변화를 관찰하고자 함

- 저온건조(25℃)
 - 유충 : 갈색거저리
 - 급속동결 온도/시간 : - / 8hr
 - 동결건조 온도/시간 : -40℃ → -40℃(10hr) → -20℃(5hr) → -20℃(20hr) → 0℃ (10hr) → 20℃(10hr) → 25℃(10hr) → 25℃(종료)
 - 건조소요시간 : 65시간
- 고온건조 (90℃)
 - 유충 : 갈색거저리
 - 급속동결 온도/시간 : -40℃ / 8hr
 - 동결건조 온도/시간 : -40℃ → -20℃(8hr) → 0℃(10hr) → 10℃(2hr) → 10℃(8hr) → 20℃(2hr) → 20℃(8hr) → 60℃(2hr) → 30 (8hr)
 - 건조소요시간 : 48시간
 - 실험결과

구 분	저온건조	㉠ 고온건조
색 상		
수 분	3.42%	0.85%
조지방	37.38%	36.38%
특 징	고온건조 보다 색이 밝고, 묻어나오는 지방의 양이 적음.	저온건조 보다 색이 진하고, 묻어나오는 지방의 양이 많음.

④ 실험 4 : 동결건조시 최대 건조효율을 갖는 적정온도를 설정하고자 함

- 유충 : 갈색거저리
- 급속동결 온도/시간 : -40℃ / 10hr
- 동결건조 온도/시간 : -33℃ → -17℃(32hr) → 0℃(6hr) → 30℃(5hr) → 40℃(22hr)
- 건조소요시간 : 65시간

구 분	동결건조 갈색거저리 유충
색 상	
수 분	1.58%
조지방	-
특 징	저온건조물과 색이 밝기가 유사하고, 묻어나오는 지방의 양도 유사함.

⑤ 실험 5 : 최대 건조효율을 고려하여 갈색거저리 “실험4”와 유사한 조건에서 건조

- 유충 : 흰점박이꽃무지
- 급속동결 온도/시간 : -40℃ / 12hr
- 동결건조 온도/시간 : -40℃ → -16℃(30hr) → 0℃(2hr) → 40℃(5hr) → 50℃(11hr)
- 건조소요시간 : 48시간

구 분	동결건조 흰점박이꽃무지 유충
색 상	
수 분	2.61%
조지방	22.03%
특 징	저온건조물과 색이 밝기가 유사하고, 묻어나오는 지방의 양도 유사함.

⑥ 실험 6 : 동일한 동결조건 조건에서 건조된 갈색거저리유충에 색상 차이가 있는 현상이 있어 이들을 선별하여 비교 분석하였음

□ 실험결과

구 분	에스웬		고성	
	열은색	진한색	열은색	진한색
수 분	1.67%	2.03%	2.02%	3.19%
조지방 (수분보정)	37.08%	36.22%	37.19%	36.13%
고 찰	“실험 3”에서 저온과 고온 건조한 갈색거저리에서 조지방의 함량 차이와 “실험6”에서 동일조건에서 건조된 색상차이를 보이는 갈색거저리에서의 함량 차이가 유사한 것으로 이는 천연물로 생육상태에 따른 차이로 판단됨			

(3) 결론

(가) 전처리 조건 설정

- ① 갈색거저리 및 흰점박이 꽃무지 유충 몸속에 존재하는 미생물을 살균하기 위한 조건으로, 고온·고압 설비인 Autoclave를 이용하여 스팀온도 115℃에서 5분간으로 멸균 할 때 모두 사멸하는 것으로 확인되어 기기 편차 및 작업자의 운전방법 차이를 고려하여 115℃에서 10분으로 설정하였다.

(나) 동결건조 조건 설정

- ① 갈색거저리 및 흰점박이 꽃무지 유충은 고함량의 지방을 함유하고 있다. 이러한 특성으로 인하여 지방산중 어는점(Melting Point)이 가장 낮은 α-Linoleic acid (-12℃)보다 낮은 온도 -30℃이하 그리고 동결시간은 8hr 이면 동결 가능하며, 유충 표피가 각질로 되어 있어 건조가 잘 안되는 특성이 있어 낮은 온도에서는 건조소요시간이 길어 경제성이 떨어지며, 또한 너무 높으면 갈변현상이 심하게 나타나 최적의 조건으로 동결온도 -35-40℃에서 12hr, 건조온도는 관체 제품 온도 45℃이하로 설정 하였다.

다. 제조공정의 표준화 및 자가규격 설정

(1) 전처리 공정 표준화

(가) 연구목적

- ① 곤충자원을 전 처리 없이 동결건조 했을 때 대장균을 포함한 병원성세균이 다량 검출됨에 따라 연구용 장비로 설정된 고온고압 살균법을 대량 생산설비에 적용하여 용량, 시간, 작업방법을 표준화 연구를 실시함

(나) 스팀 의한 살균처리 방법

- ① 부직포에 갈색거저리 와 흰점박이 꽃무지 1kg, 1.5kg, 2kg, 3kg씩 넣어 밀봉한 후, 고압 멸균탱크(6m³)에 넣고 115℃에서 10분간 스팀을 가하여 멸균여부를 확인

공정	작업내용 및 작업시간
분변제거 및 세척	체를 이용하여 분변분리 후 R/O 세척
소분	부직포에 1kg, 1.5kg, 2kg, 3kg씩 소분하여 밀봉
투입	정제수 800L 투입하여 미리 스팀을 공급하여 70~80℃까지 미리 승온, 소분한 굽벥이가 부직포 내에서 뭉치지 않게 선반 위에 펼침
살균 조건	스팀 가열처리 시간 (총 시간 : 90min) 80→115℃승온(70min), 115℃/10min, 115℃→80℃냉각(10min)
냉각 및 수거	압력파기 및 수거 후 동결실로 이송(미생물시험)
입팬 및 예냉	동결기 온도 -40℃로 미리 가동, 멸균된 곤충 동결 팬에 소분하여 냉동기에 투입.
동결건조	-40℃~42℃까지 72hr 건조

시료(높이)	갈색거저리		시료	흰집박이 꽃무지	
	일반세균	대장균군		일반세균	대장균군
1kg(3.0cm)	불검출	음성(-)	1kg(3.0cm)	불검출	음성(-)
1.5kg(4.0cm)	460cfu/g	음성(-)	1.5kg(4.0cm)	1240cfu/g	음성(-)
2kg(5.0cm)	5400cfu/g	음성(-)	2kg(5.0cm)	24000cfu/g	음성(-)
3kg(7.5cm)	TNTC	음성(-)	3kg(7.5cm)	TNTC	음성(-)

- 부직포에 담은 유충들이 쌓인 높이에 따라 스팀이 내부까지 전달되지 않은 것으로 파악됨
- 부직포 재질이 소수성 재질로 스팀 침투가 잘 이루어지지 않았음

② 스테인레스 타공팬 바닥에 부직포를 깔고 갈색거저리 1kg, 1.5kg, 2kg, 3kg씩 넣어 상부에서 열이 충분히 전달되도록 공간을 10cm이상 이격하여 다단식으로 쌓고, 고압 멸균탱크(6m³)에서 115℃, 10분간 스팀을 가하여 살균하였음

시료량	시료 높이	갈색거저리	
		일반세균	대장균군
1kg	1.5 cm	불검출	음성(-)
1.5kg	2.2 cm	불검출	음성(-)
2kg	3.0 cm	불검출	음성(-)
3kg	4.0 cm	80cfu/g	음성(-)

③ 결론

실험결과 스테인레스 타공팬을 사용하여 거저리 두께를 3 cm 이하 및 생산효율을 증가하기 위하여 다단식으로 상부공간을 10 cm이상 확보하고, 115℃에서 10분간 스팀 살균조건을 확립하였음

(2) 동결건조 조건 표준화

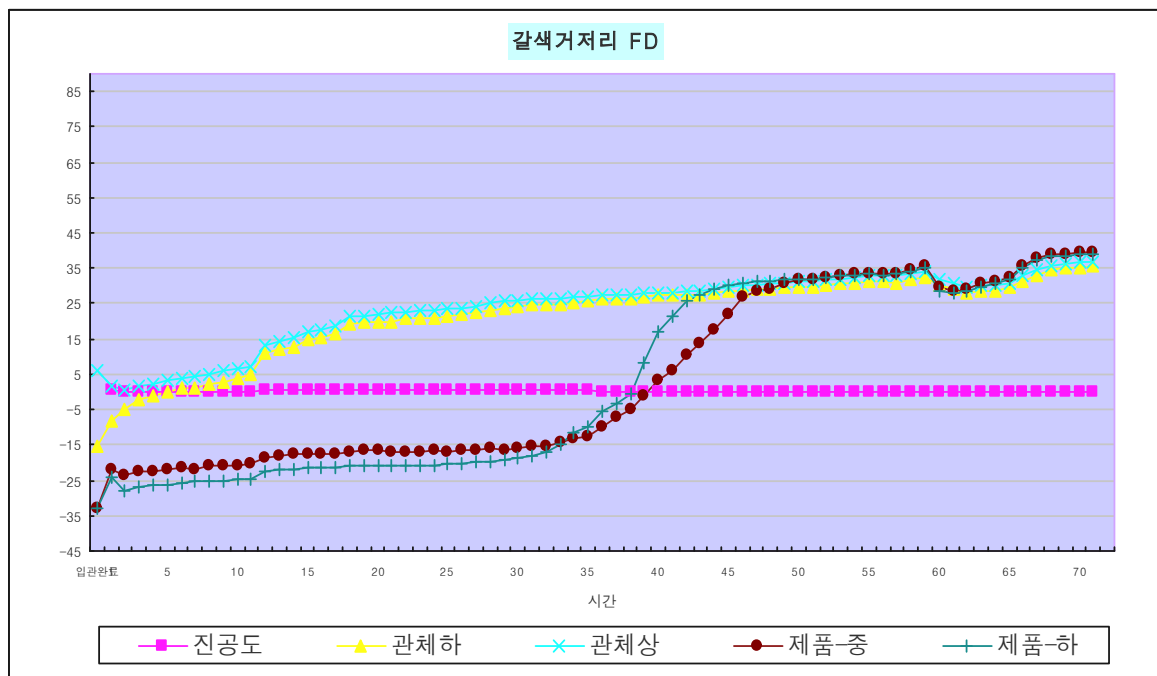
(가) 연구목적

① 곤충(굼벥이,거저리)을 동결건조 했을 때 미건조 되는 현상과 건조시간이 과다(80시간 이상) 소요되어 작업표준화를 이루어 이를 개선하고자 연구를 실시하였음.

(나) 동결건조

① 동결조건 : 동결에 있어 Key point는 건조 대상제품의 빙점, 골격조직의 파괴, 층분리 등 물리적 현상이 없어야한다. 갈색거저리 와 흰점박이꽃무지에는 단백질 및 지방 함량이 높아 동결시 층분리 현상 방지하고자 입팬 전 동결실 온도 -35℃이하로 급속 동결을 실시하였다. 또한 충분한 동결을 위하여 -35~-40℃에서 12 hr 이상 동결을 하였다.

② 건조조건 : 동결실에서 건조기로 이송은 10분 이내로 이송하여 동결유층 표면온도가 녹는 점이상으로 상승하지 않도록하며, 동결된 상태에서 승화 건조가 이루어지기 위해서 지방산의 Melting Point (α -Linoleic acid -12℃)보다 낮은 -15℃ 이하에서 최소 30시간이상 유지, 관체제품 온도 45℃이하, 진공도는 0.5 torr 이하로 건조하였다. 건조기내부 위치에 따라 야간의 차이는 있었지만 수분이 0.61%로 양호한 건조상태를 보였다.



③ 결론

동결건조 표준화 조건으로 동결실 온도 -35℃이하, 12시간 이상 급속 동결을 하며, 건조기 조건으로는 진공도 0.5torr 이하에서 최소 30시간이상 온도-15℃이하를 유지하며, 제품 온도 최대 45℃이하로 설정 하였다.

(3) 자가 기준·규격 설정

(가) 연구목적

① 갈색거저리,흰점박이꽃무지 유충 동결건조물에 대하여 기준규격을 설정하여 일정한 품질이 제조되도록하여 생산 및 품질관리 기준 설정을 통하여 품질보증을 하고자 함.

(나) 기준 및 규격 설정

① 설정 근거 :

- 『건강기능식품기능성원료인정에 관한규정』(고시제2009-176호)에 따라 제품에 대하여 기준 및 규격을 설정
- 단백질 과 지방이 주성분으로 식품공전 식품원재료 분류중 동물성원료/기타 항(메뚜기, 번데기, 식용개구리, 식용달팽이 등)와 식품공전 “식품별 기준 및 규격 외의 일반가공 식품 규격 ” 과 “EPA/DHA 함유식품” 유사하여 이를 참고하여 설정

② 기준 및 규격 설정

- 동결건조 갈색거저리

시험항목	결과			기준.규격 (잠정설정)	비 고
	평균	최대	최소		
성 상		-	-	고유의 맛과 향을 지닌 유충	
수 분(%)	2.20	3.90	1.87	5.0 이하	
산 가(mg/g)	2.45	2.66	1.80	3.0 이하	식용번데기 5.0 이하
과산화물가(meq/g)	8.07	24.63	0.03	30 이하	식용번데기 60 이하 EPA/DHA 15 이하
조단백질(%)	54.57	57.20	48.17	45.0 %이상	평균 80%수준
조 지방(%)	31.36	31.94	31.08	25.0 이상	평균 80%수준
Oleic acid(%)	13.61	14.07	12.73	11.0~16.0	평균 ± 20%
일반세균(cfu/g)	108	373.33	0.00	1,000 이하	건조식품 미설정
대장균군	음 성	0.00	0.00	음 성	

[근거자료]

최대섭취허용량: 3,000mg/kg(Rat) ⇒ 사람환산 1.80g/사람(60kg) (안전성 평가원 제공)

구입 시기별 분석자료

Lot No	T1203001	T1204002	T1208003	T1304001
제조일	2012-03-22	2012-04-16	2012-08-17	2013-04-09
구입처	촌스러운 밀웜농장	에스웜	(주)한국유용곤충 연구소	(주)한국유용곤충 연구소
수 분(%)	2.41	2.49	1.87	2.04
산 가(mg/g)	2.62	2.66	2.66	1.86
과산화물가(meq/g)	2.98	4.64	24.63	0.03
조단백질(%)	53.21	52.41	55.48	57.20
조 지방(%)	31.08	31.12	31.94	31.29
Oleic acid(%)	13.25	13.39	13.73	14.07
일반세균(cfu/g)	30	20	373	7
대장균군	음 성	음 성	음 성	음 성

□ 동결건조 흰점박이꽃무지

시험항목	결과			기준.규격 (잠정설정)	비 고
	평균	최대	최소		
성 상	고유의 맛과 향을 지닌 유충	-	-	고유의 맛과 향을 지닌 유충	
수 분(%)	2.09	2.69	1.66	5.0 이하	
산 가(mg/g)	1.39	1.82	1.09	5 이하	식용번데기 5.0 이하
과산화물가(meq/g)	1.02	1.55	0.55	5 이하	식용번데기 60 이하 EPA/DHA 15 이하
조단백질(%)	60.52	64.70	57.70	50.0 이상	평균 80%수준
조 지방(%)	14.72	16.97	13.49	13.0 이상	평균 80%수준
Oleic acid(%)	7.96	8.76	6.93	6.4~9.5	평균 ± 20%
일반세균(cfu/g)	1314	5500	8	1000 이하	건조식품 미설정
대장균군	음 성	음 성	음 성	음 성	

[근거자료]

최대섭취허용량: 3,000mg/kg(Rat) ⇒ 사람환산 1.80g/사람(60kg) (안전성 평가원 제공)

구입 시기별 분석자료

Lot No	P1203001	P1204002	P1210001	P1210002	P1210003
제조일	2012-03-30	2012-04-26	2012-10-17	2012-10-17	2012-10-17
구입처	스머프곤충나라	스머프곤충나라	스머프곤충나라	스머프곤충나라	스머프곤충나라
수 분(%)	2.69	2.34	1.66	2.05	1.72
산 가(mg/g)	1.82	1.44	1.09	1.22	1.42
과산화물가(meq/g)	1.55	1.43	0.55	0.97	0.60
조단백질(%)	64.70	57.70	59.45	61.62	59.14
조 지방(%)	14.14	16.97	13.49	13.77	15.23
Oleic acid(%)	6.93	8.32	7.85	7.92	8.76
일반세균(cfu/g)	5500	8	15	65	980
대장균군	음 성	음 성	음 성	음 성	음 성

지표물질을 Oleic acid로 설정한 것은 지방 성분 중 함량이 가장 높은 성분으로 생산 및 제조방법에 따라 함량 변이를 갖는 성분으로 표준물질 및 분석법이 범용으로 사용되어 이를 설정

규격설정 정하여지지 않은 단백질과 조지방은 표시량(평균)의 80%수준을 하한 규격으로 적용

규격설정 정하여지지 않은 산가는 가속시험에서 관능평가/산패 취 5점에 도달되는 시점에서의 산가를 설정.

라. 동결건조물 곤충유충(원물)의 유통기한 설정

(1) 유통기한 설정 가속시험 계획

(가) 실험개요

- ① 월드웨이(주)에서 동결 건조한 곤충자원의 PET 병 포장 상태에서 온도와 시간 경과에 따른 경시변화 상태를 관찰하기 위해 유통기한 설정실험을 진행하였으며, 본 시험은 식품의약품안전평가원에서 발행(2011.6)한 안전청고시 제2008-53호(2008. 8. 14) 식품의 유통기한 설정 실험 가이드라인 준하여 작성하였음
- ② 최근 생산된 동결건조물 중 전처리 시점을 달리한 샘플을 3개 선정하여, 각 Lot에 대하여 대조구, 실험구로 나누어 보관하였으며, 총 8회 측정 분량이며, 1회 실험 당 시료수는 2개(관능검사용, 분석용)로 하였음

(나) 저장조건 및 기간

① 저장온도

- 유통온도 : 1~35℃(실온 유통 제품)
- 대조구 : 0~5℃
- 실험구 : 25 ± 2℃, 35 ± 2℃, 40 ± 2℃

저장온도	사 진		
25 ± 2℃			
35 ± 2℃			
40 ± 2℃			

Fig. 1. 저장온도별 보관 사진

- 습도 : 포장재질이 수분 불투과성 재질(PET)로 포장된 제품으로 설정하지 않았음.
 ※ 습도영향이 높은 포장재질 : 에틸렌비닐알콜(EVOH), 폴리아미드/나일론, 폴리카보네이트(PC)



Fig. 2. 유통기한 설정실험을 위해 PET용기에 보관

- 저장기간 : 1년 이상 [현재 유통중인 누에가루분말(유통기한 1년) 참고]

(다) 실험기간 및 주기

- ① 실험 기간 : 6개월 이상
- ② 실험 주기 : 1개월 단위

(라) 포장재질

- ① 내.외 포장재질 : PET

(마) 품질지표

- ① 이화학적 : 수분, 산가, 과산화물가, 지표물질
- ② 관능적 : 색상, 향, 맛, 산패 취, 기호도
- ③ 미생물학적 지표 : 세균수, 대장균군

(바) 실험법

- ① 수분 (식품공전 : 상압가열 건조법)
- ② 산가 (식품공전)
- ③ 과산화물가(식품공전)
- ④ Oleic acid(지표성분) (식품공전)
- ⑤ 미생물(식품공전)
- ⑥ 관능평가(9점 척도법, 기준차이 검사법)

(2) 유통기한 실험 결과

(가) 갈색거저리

- ① 관능평가(n =15) : 산패 취

STEP 1. 저장온도별 저장기간에 따른 각 품질지표의 함량변화 분석

항목	산패 취		
기준	역한 냄새		
Cut off	5점		
저장기간(월)	25℃	35℃	40℃
초기	9.00	9.00	9.00
1월	9.00	9.00	8.93
2월	9.00	9.00	8.73
3월	8.93	8.62	7.93
4월	8.33	7.53	7.47
5월	8.20	7.40	7.00
6월	8.07	7.20	6.93

STEP 2. 각 성분의 저장온도별 저장기간에 따른 각 품질지표의 함량변화 방정식을 산출함.

반응차수	0차 반응			1차 반응		
반응식	$Ae = A_0 - Kt$			$\ln(Ae) = \ln A - Kt$		
온도	25℃	35℃	40℃	25℃	35℃	40℃
Slope	-0.18095	-0.35952	-0.40476	-0.02113	-0.04424	-0.05097
Intercep	9.19048	9.32937	9.21429	2.21961	2.23857	2.22690
corr (R ²)	-0.9168	-0.9322	-0.97399	-0.9169	-0.9317	-0.97400
품질변화의 해석	40℃의 0차 및 1차 반응식에서 R값 0.9740이 가장 큼으로 1차 반응					

STEP 3. 2단계에서 산출한 온도별 K값을 이용하여 활성화에너지를 산출함.

Arrhenius equation : $\ln K = -(E_a/R)(1/T) + \ln A$

온도(℃)	온도(K)	1/T	K	lnK	Ea	-11280.096
25	298	0.0034	0.02113	-3.8571	Slope	-5676.948
35	308	0.0032	0.04424	-3.1181	Intercep	15.222
40	313	0.0032	0.05097	-2.9766	corr	-0.985
10	283	0.0035	0.0079	-4.8375		
15	288	0.0035	0.0112	-4.4892		
20	293	0.0034	0.0157	-4.1528		
25	298	0.0034	0.0218	-3.8277		
30	303	0.0033	0.0298	-3.5134		
35	308	0.0032	0.0404	-3.2092		
40	313	0.0032	0.0542	-2.9148		

STEP 4. 저장온도 및 유통중의 유통기한 계산.

표. 향기 성분의 유통일수 및 변화량

유통온도(℃)	유통개월수(A)	반응속도(B)	연간변화량(A x B)
10	5	0.0079	0.03964

15	1	0.0112	0.01123	
20	2	0.0157	0.03144	
25	2	0.0218	0.04352	
30	2	0.0298	0.05959	
Sum	12	-	0.18542	
최초함량(Ao)	규격하한 값(Ae)	Ao-Ae	연간변화량	유통기한(월)
2.197	1.609	0.59	0.185	38.0

STEP 5 ; 최종 유통기한 설정(안전계수(0.7)를 설정하여 계산함).	
유통기한	38.0 개월 * 0.7 = 26.6 개월

관능평가 향에서 향, 맛, 기호도 평가에서 보관기간이 증가 할수록 대조구보다 고소한 향, 맛을 증가함으로써 유통기한 설정시험 지표로 부적합하여 유통기한 설정지표에서 제외하였음

② 산가

- 품질한계 설정
- 관능검사(산패 취)와 산가 간의 회귀방정식을 구한다.
- 이식에 관능검사의 한계 규격값 5점을 대입한다.
- 산출한 값을 해당 품질지표의 규격값으로 한다.

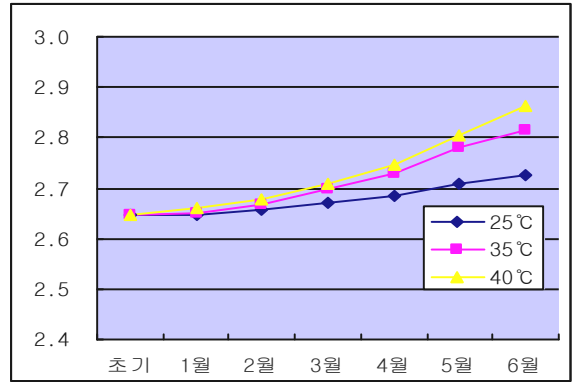
항목	산패 취			산 가		
	25℃	35℃	40℃	25℃	35℃	40℃
저장기간(월)	25℃	35℃	40℃	25℃	35℃	40℃
초기	9.00	9.00	9.00	2.65	2.65	2.65
1월	9.00	9.00	8.93	2.65	2.65	2.66
2월	9.00	9.00	8.73	2.66	2.67	2.68
3월	8.93	8.62	7.93	2.67	2.70	2.71
4월	8.33	7.53	7.47	2.69	2.73	2.75
5월	8.20	7.40	7.00	2.71	2.78	2.80
6월	8.07	7.20	6.93	2.72	2.81	2.86

온도	회귀방정식		산가의 규격
	1차 방정식	2차 방정식	
25℃	$y = -0.0692x + 3.2753$ $R^2 = 0.9064$	$y = 0.0607x^2 - 1.1109x + 7.7313$ $R^2 = 0.9204$	3.69
35℃	$y = -0.0752x + 3.3328$ $R^2 = 0.9098$	$y = 0.0607x^2 - 1.1109x + 7.7313$ $R^2 = 0.9204$	3.69
40℃	$y = -0.0847x + 3.4071$ $R^2 = 0.9069$	$y = 0.0428x^2 - 0.7675x + 6.103$ $R^2 = 0.9586$	3.34

□ 유통기한 설정

STEP 1. 저장온도별 저장기간에 따른 각 품질지표의 함량변화 분석

항목	산가		
Cut off	3.34		
저장기간(월)	25℃	35℃	40℃
초기	2.65	2.65	2.65
1월	2.65	2.65	2.66
2월	2.66	2.67	2.68
3월	2.67	2.70	2.71
4월	2.69	2.73	2.75
5월	2.71	2.78	2.80
6월	2.72	2.81	2.86



STEP 2. 각 성분의 저장온도별 저장기간에 따른 각 품질지표의 함량변화 방정식을 산출함.

반응차수	0차 반응			1차 반응		
반응식	$A_e = A_o - Kt$			$\ln(A_e) = \ln A - Kt$		
온도	25℃	35℃	40℃	25℃	35℃	40℃
Slope	0.01393	0.02960	0.03587	0.00519	0.01087	0.01307
Intercep	2.63552	2.62341	2.62206	0.96917	0.96489	0.96460
corr (R^2)	0.9732	0.9730	0.9701	0.9738	0.9743	0.9724
품질변화의 해석	40℃의 0차 및 1차 반응식에서 R값 0.9743이 가장 큼으로 1차 반응					

STEP 3. 2단계에서 산출한 온도별 K값을 이용하여 활성화에너지를 산출함.

Arrhenius equation : $\ln K = -(E_a/R)(1/T) + \ln A$

온도(℃)	온도(K)	1/T	K	lnK	E_a	-11280.096
25	298	0.0034	0.00519	-5.2603	Slope	-5900.640
35	308	0.0032	0.01087	-4.5213	Intercep	14.564
40	313	0.0032	0.01307	-4.3372	corr	-0.991
10	283	0.0035	0.0019	-6.2864		
15	288	0.0035	0.0027	-5.9244		
20	293	0.0034	0.0038	-5.5748		
25	298	0.0034	0.0053	-5.2369		
30	303	0.0033	0.0074	-4.9102		
35	308	0.0032	0.0101	-4.5940		
40	313	0.0032	0.0137	-4.2880		

STEP 4. 저장온도 및 유통중의 유통기한 계산.

표. 향기 성분의 유통일수 및 변화량

유통온도(℃)	유통개월수(A)	반응속도(B)	연간변화량(A x B)	
10	5	0.0019	0.00931	
15	1	0.0027	0.00267	
20	2	0.0038	0.00758	
25	2	0.0053	0.01063	
30	2	0.0074	0.01474	
Sum	12	-	0.04494	
최초함량(Ao)	규격하한 값(Ae)	Ao-Ae	연간변화량	유통기한(월)
0.973	1.206	0.23	0.045	62.1

STEP 5 ; 최종 유통기한 설정(안전계수(0.7)를 설정하여 계산함).

유통기한	62.1 개월 * 0.7 = 43.5 개월
------	-------------------------

③ 과산화물가

STEP 1. 저장온도별 저장기간에 따른 각 품질지표의 함량변화 분석				
항목	과산화물가			
Cut off	-			
저장기간(월)	25℃	35℃	40℃	
초기	10.7	10.7	10.7	
1월	10.5	8.3	7.1	
2월	9.7	4.7	2.7	
3월	9.2	3.0	2.1	
4월	8.6	2.2	1.5	
5월	7.6	1.5	1.2	
6월	7.0	1.1	0.8	

과산화물가는 가속저장기간이 증가하면 할수록 감소하는 경향이 있어 유통기한 설정 지표항목으로 부적합 함

④ 올레인산

STEP 1. 저장온도별 저장기간에 따른 각 품질지표의 함량변화 분석				
항목	올레인산			
Cut off	11.0			
저장기간(월)	25℃	35℃	40℃	
초기	13.39	13.39	13.39	
1월	13.39	13.35	13.37	
2월	13.35	13.32	13.36	
3월	13.34	13.28	13.28	
4월	13.34	13.30	13.28	
5월	13.32	13.29	13.28	
6월	13.33	13.30	13.26	

STEP 2. 각 성분의 저장온도별 저장기간에 따른 각 품질지표의 함량변화 방정식을 산출함.

반응차수	0차 반응			1차 반응		
반응식	$A_e = A_o - Kt$			$\ln(A_e) = \ln A - Kt$		
온도	25℃	35℃	40℃	25℃	35℃	40℃
Slope	-0.01187	-0.01479	-0.02294	-0.00089	-0.00111	-0.00172
Intercep	13.38607	13.36489	13.38563	2.59422	2.59263	2.59419
corr (R^2)	-0.9338	-0.8268	-0.9192	-0.9339	-0.8267	-0.9192
품질변화의 해석	25℃의 0차 및 1차 반응식에서 R값 0.9339이 가장 큼으로 1차 반응					

STEP 3. 2단계에서 산출한 온도별 K값을 이용하여 활성화에너지를 산출함.

Arrhenius equation : $\ln K = -(E_a/R)(1/T) + \ln A$

온도(℃)	온도(K)	1/T	K	lnK	E_a	-7536.930
25	298	0.0034	0.00089	-7.0261	Slope	-3793.120
35	308	0.0032	0.00111	-6.8043	Intercep	5.656
40	313	0.0032	0.00172	-6.3647	corr	-0.925
10	283	0.0035	0.0004	-7.7474		
15	288	0.0035	0.0005	-7.5147		
20	293	0.0034	0.0007	-7.2900		
25	298	0.0034	0.0008	-7.0728		
30	303	0.0033	0.0010	-6.8627		
35	308	0.0032	0.0013	-6.6595		
40	313	0.0032	0.0016	-6.4628		

STEP 4. 저장온도 및 유통중의 유통기한 계산.

표. 향기 성분의 유통일수 및 변화량

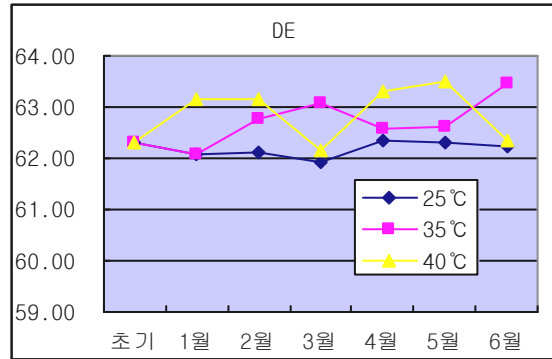
유통온도(℃)	유통개월수(A)	반응속도(B)	연간변화량(A x B)	
10	5	0.0019	0.00216	
15	1	0.0027	0.00054	
20	2	0.0038	0.00136	
25	2	0.0053	0.00170	
30	2	0.0074	0.00209	
Sum	12	-	0.00786	
최초함량(A_o)	규격하한 값(A_e)	$A_o - A_e$	연간변화량	유통기한(월)
2.595	2.398	0.20	0.008	300.3

STEP 5 ; 최종 유통기한 설정(안전계수(0.7)를 설정하여 계산함).

유통기한	300.3 개월 * 0.7 = 210.2 개월
------	---------------------------

⑤ 색도

DE			
온도	25℃	35℃	40℃
초기	62.29	62.29	62.29
1월	62.09	62.09	63.14
2월	62.12	62.78	63.16
3월	61.93	63.08	62.16
4월	62.36	62.59	63.32
5월	62.33	62.63	63.51
6월	62.23	63.45	62.35



온도	회귀방정식	색도의 규격값	결과
		계산과정	
25℃	$y = -0.2192x + 64.088$ R2 = 0.3587	R2 = 0.8 이하로 산패취와 상관성이 낮음	
35℃	$y = -0.2899x + 65.094$ R2 = 0.278	R2 = 0.8 이하로 산패취와 상관성이 낮음	
40℃	$y = -0.0794x + 63.484$ R2 = 0.0163	R2 = 0.8 이하로 산패취와 상관성이 낮음	

⑥ 수분

STEP 1. 저장온도별 저장기간에 따른 각 품질지표의 함량변화 분석

항목	수분		
Cut off	5.0		
저장기간(월)	2.26	2.26	2.26
초기	2.45	2.46	2.57
1월	2.69	2.73	2.79
2월	2.79	2.86	2.95
3월	2.83	2.92	3.04
4월	2.96	3.01	3.08
5월	3.00	3.09	3.11
6월	2.72	2.81	2.86

STEP 2. 각 성분의 저장온도별 저장기간에 따른 각 품질지표의 함량변화 방정식을 산출함.

반응차수	0차 반응			1차 반응		
	$Ae = Ao - Kt$			$\ln(Ae) = \ln A - Kt$		
온도	25℃	35℃	40℃	25℃	35℃	40℃
Slope	0.12067	0.13520	0.13643	0.04568	0.05039	0.05019
Intercep	2.34766	2.35694	2.41944	0.85534	0.85956	0.88355

corr (R ²)	0.9654	0.9647	0.9372	0.9558	0.9540	0.9237
품질변화의 해석	25℃의 0차 및 1차 반응식에서 R값 0.9654이 가장 큼으로 0차 반응					

STEP 3. 2단계에서 산출한 온도별 K값을 이용하여 활성화에너지를 산출함.

Arrhenius equation : $\ln K = -(E_a/R)(1/T) + \ln A$

온도(℃)	온도(K)	1/T	K	lnK	Ea	-1601.718
25	298	0.0034	0.12067	-2.1147	Slope	-806.098
35	308	0.0032	0.13520	-2.0010	Intercep	0.597
40	313	0.0032	0.13643	-1.9920	corr	-0.968
10	283	0.0035	0.1052	-2.2517		
15	288	0.0035	0.1106	-2.2023		
20	293	0.0034	0.1160	-2.1545		
25	298	0.0034	0.1214	-2.1084		
30	303	0.0033	0.1270	-2.0637		
35	308	0.0032	0.1326	-2.0205		
40	313	0.0032	0.1382	-1.9787		

STEP 4. 저장온도 및 유통중의 유통기한 계산.

표. 향기 성분의 유통일수 및 변화량

유통온도(℃)	유통개월수(A)	반응속도(B)	연간변화량(A x B)	
10	5	0.1052	0.52608	
15	1	0.1106	0.11055	
20	2	0.1160	0.23192	
25	2	0.1214	0.24287	
30	2	0.1270	0.25396	
Sum	12	-	1.36538	

최초함량(Ao)	규격하한 값(Ae)	Ao-Ae	연간변화량	유통기한(월)
2.260	5.000	2.74	1.365	24.1

STEP 5 ; 최종 유통기한 설정(안전계수(0.7)를 설정하여 계산함).

유통기한	24.1 개월 * 0.7 = 16.9 개월
------	-------------------------

⑦ 일반세균

미생물 시험 Data에 의한 증식추이 판단

항목	일반세균(cfu/g)		
	1000 이하		
온도	25℃	35℃	40℃
초기	141.11	141.11	141.11
1개월	134.44	143.33	138.89
2개월	134.44	140.00	145.56
3개월	138.89	143.33	142.22
4개월	133.33	150.00	152.22
5개월	147.78	140.00	141.11
6개월	138.89	153.33	162.22

○ 대장균 군 및 바실러스세레우스 실험에서 가속시험 기간동안 모두 불검출로 유통기한 산정에 미치는 영향은 없는 것으로 판단됨

○ 일반세균은 통상적으로 10만cfu/g 이하이나 당사에서는 제조공정을 감안하여 1,000cfu/g 이하로 설정하였으며, 초기대비 미생물 증식현상은 발견되지 않음

⑧ 최종 유통기간 산출

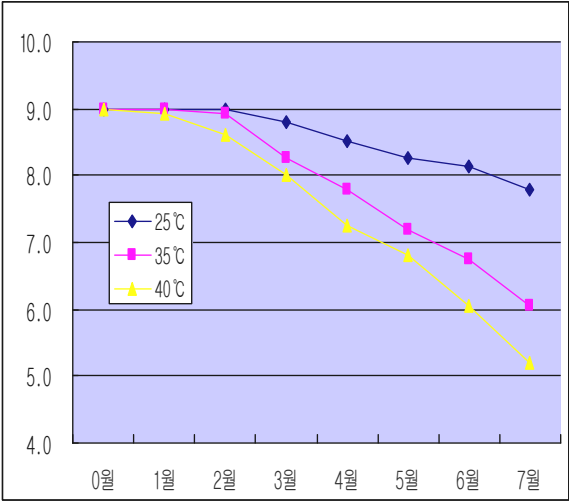
실험항목	품질한계	반응차수	국내 유통온도 반영
관능평가(산패)	5점	1차	26.6 개월
산가	3.34	1차	34.5 개월
과산화물가	-	-	-
올레인산	11.0%	1차	210.2 개월
색도	-	-	-
수분	5 %	0	16.9 개월
일반세균	1000cfu/g	-	-

갈색거저리 유충 동결건조물의 PET병포장 상태에서 가속시험으로부터 산출된 유통기한은 16.9개월로 안정성이 확인됨에 따라 최종 유통기한은 제조일로부터 12개월로 설정

(나) 흰점박이 꽃무지

① 관능평가(n =15) : 산패 취

STEP 1. 저장온도별 저장기간에 따른 각 품질지표의 함량변화 분석				
항목	산패 취			
기준	역한 냄새			
Cut off	5점			
저장기간(월)	25℃	35℃	40℃	
초기	9.00	9.00	9.00	
1월	9.00	9.00	8.93	
2월	9.00	8.93	8.60	
3월	8.80	8.27	8.00	
4월	8.51	7.80	7.27	
5월	8.27	7.20	6.80	
6월	8.13	6.73	6.07	
7월	7.80	6.07	5.20	



STEP 2. 각 성분의 저장온도별 저장기간에 따른 각 품질지표의 함량변화 방정식을 산출함.						
반응차수	0차 반응			1차 반응		
반응식	$A_e = A_o - Kt$			$\ln(A_e) = \ln A - Kt$		
온도	25℃	35℃	40℃	25℃	35℃	40℃
Slope	1.2667	-0.4468	-0.5603	-0.0214	-0.0585	-0.0783
Intercep	-3.2144	9.4389	9.4444	2.2211	2.2592	2.2702
corr (R ²)	0.9382	-0.9740	-0.9828	-0.9609	-0.9669	-0.9698
품질변화의 해석	0차 및 1차 반응식에서 40℃의 R값 0.9828이 가장 큼으로 0차 반응					

STEP 3. 2단계에서 산출한 온도별 K값을 이용하여 활성화에너지를 산출함.						
Arrhenius equation : $\ln K = -(E_a/R)(1/T) + \ln A$						
온도(°C)	온도(K)	1/T	K	lnK	Ea	-14333.671
25	298	0.0034	0.18122	-1.7081	Slope	-7213.725
35	308	0.0032	0.44683	-0.8056	Intercep	22.527
40	313	0.0032	0.56032	-0.5793	corr	-0.9915
10	283	0.0035	0.0517	-2.9627		
15	288	0.0035	0.0804	-2.5202		
20	293	0.0034	0.1233	-2.0927		
25	298	0.0034	0.1864	-1.6796		
30	303	0.0033	0.2780	-1.2802		
35	308	0.0032	0.4091	-0.8937		
40	313	0.0032	0.5948	-0.5196		

STEP 4. 저장온도 및 유통중의 유통기한 계산.				
표. 향기 성분의 유통일수 및 변화량				
유통온도(°C)	유통개월수(A)	반응속도(B)	연간변화량(A x B)	
10	5	0.0517	0.25839	
15	1	0.0804	0.08045	
20	2	0.1233	0.24670	
25	2	0.1864	0.37288	
30	2	0.2780	0.55597	
Sum	12	-	1.51439	
최초함량(Ao)	규격하한 값(Ae)	Ao-Ae	연간변화량	유통기한(월)
9.000	5.000	4.00	1.514	31.7

STEP 5 ; 최종 유통기한 설정(안전계수(0.7)를 설정하여 계산함).	
유통기한	31.7 개월 * 0.7 = 22.2 개월

관능평가 향에서 향, 맛, 기호도 평가에서 보관기간이 증가 할수록 대조구 보다 고소한 향, 맛을 증가함으로써 유통기한 설정시험 지표로 부적합하여 유통기한 설정지표에서 제외하였음

② 산가

품질한계 설정

관능검사(산패 취)와 산가 간의 회귀방정식을 구한다.

이식에 관능검사의 한계 규격값 5점을 대입한다.

산출한 값을 해당 품질지표의 규격값으로 한다.

항목	산패 취			산 가		
	25°C	35°C	40°C	25°C	35°C	40°C
저장기간(월)	25°C	35°C	40°C	25°C	35°C	40°C
초기	9.00	9.00	9.00	1.25	1.25	1.25
1월	9.00	9.00	8.93	1.30	1.32	1.37
2월	9.00	8.93	8.60	1.35	1.48	1.53
3월	8.80	8.27	8.00	1.37	1.61	1.94
4월	8.51	7.80	7.27	1.41	1.89	2.18
5월	8.27	7.20	6.80	1.54	2.08	2.54
6월	8.13	6.73	6.07	1.59	2.57	2.93
7월	7.80	6.07	5.20	1.64	2.93	3.37

온도	회귀방정식		산가의 규격
	1차 방정식	2차 방정식	
25℃	$y = -0.303x + 4.0269 (R^2 = 0.9367)$	$y = -0.0325x^2 + 0.2469x + 1.7057$ $R^2 = 0.9378$	2.13
35℃	$y = -0.532x + 6.0821 (R^2 = 0.9708)$	$y = 0.0714x^2 - 1.628x + 10.204$ $R^2 = 0.9823$	3.85
40℃	$y = -0.546x + 6.223 (R^2 = 0.9955)$	$y = -0.0074x^2 - 0.4397x + 5.852$ $R^2 = 0.9957$	7.87

□ 유통기한 설정

STEP 1. 저장온도별 저장기간에 따른 각 품질지표의 함량변화 분석

항목	산가		
Cut off	7.87		
저장기간(월)	25℃	35℃	40℃
초기	1.25	1.25	1.25
1월	1.30	1.32	1.37
2월	1.35	1.48	1.53
3월	1.37	1.61	1.94
4월	1.41	1.89	2.18
5월	1.54	2.08	2.54
6월	1.59	2.57	2.93
7월	1.64	2.93	3.37

STEP 2. 각 성분의 저장온도별 저장기간에 따른 각 품질지표의 함량변화 방정식을 산출함.

반응차수	0차 반응			1차 반응		
	$Ae = A_0 - Kt$			$\ln(Ae) = \ln A - Kt$		
온도	25℃	35℃	40℃	25℃	35℃	40℃
Slope	0.0579	0.2398	0.3080	0.0403	0.1250	0.1474
Intercep	1.2298	1.0531	1.0586	0.2141	0.1575	0.1867
corr (R^2)	0.9831	0.9685	0.9880	0.9863	0.9897	0.9969
품질변화의 해석	0차 및 1차 반응식에서 40℃의 R값 0.9969이 가장 큼으로 1차 반응					

STEP 3. 2단계에서 산출한 온도별 K값을 이용하여 활성화에너지를 산출함.

Arrhenius equation : $\ln K = -(E_a/R)(1/T) + \ln A$

온도(℃)	온도(K)	1/T	K	lnK	E_a	-16738.94
25	298	0.0034	0.04028	-3.2120	Slope	-8424.232
35	308	0.0032	0.12500	-2.0794	Intercep	25.110
40	313	0.0032	0.14737	-1.9148	corr	-0.979

10	283	0.0035	0.0095	-4.6580		
15	288	0.0035	0.0159	-4.1412		
20	293	0.0034	0.0262	-3.6420		
25	298	0.0034	0.0424	-3.1596		
30	303	0.0033	0.0677	-2.6931		
35	308	0.0032	0.1063	-2.2418		
40	313	0.0032	0.1645	-1.8049		

STEP 4. 저장온도 및 유통중의 유통기한 계산.

표. 향기 성분의 유통일수 및 변화량

유통온도(℃)	유통개월수(A)	반응속도(B)	연간변화량(A x B)
10	5	0.0095	0.04743
15	1	0.0159	0.01590
20	2	0.0262	0.05240
25	2	0.0424	0.08488
30	2	0.0677	0.13534
Sum	12	-	0.33595

최초함량(Ao)	규격하한 값(Ae)	Ao-Ae	연간변화량	유통기한(월)
0.220	2.062	1.84	0.336	65.8

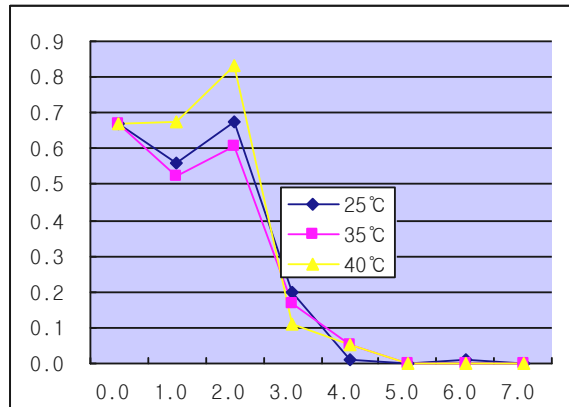
STEP 5 ; 최종 유통기한 설정(안전계수(0.7)를 설정하여 계산함).

유통기한	65.8 개월 * 0.7 = 46.1 개월
------	-------------------------

③ 과산화물가

STEP 1. 저장온도별 저장기간에 따른 각 품질지표의 함량변화 분석

항목	과산화물가		
	-		
Cut off			
저장기간(월)	25℃	35℃	40℃
초기	0.67	0.67	0.67
1월	0.56	0.53	0.68
2월	0.67	0.60	0.83
3월	0.20	0.17	0.11
4월	0.01	0.05	0.05
5월	0.00	0.00	0.00
6월	0.01	0.00	0.00
7월	0.00	0.00	0.00



과산화물가는 가속저장기간이 증가하면 할수록 감소하는 경향이 있어 유통기한 설정 지표항목으로 부적합함

④ 올레인산

STEP 1. 저장온도별 저장기간에 따른 각 품질지표의 함량변화 분석			
항목	올레인산		
Cut off	6.4%		
저장기간(월)	25℃	35℃	40℃
초기	8.18	8.18	8.18
1월	8.10	8.02	8.03
2월	8.03	7.94	7.95
3월	8.02	7.92	7.90
4월	7.94	7.85	7.80
5월	7.88	7.81	7.76
6월	7.89	7.75	7.71
7월	7.83	7.68	7.64

Month	25℃	35℃	40℃
초기	8.18	8.18	8.18
1월	8.10	8.02	8.03
2월	8.03	7.94	7.95
3월	8.02	7.92	7.90
4월	7.94	7.85	7.80
5월	7.88	7.81	7.76
6월	7.89	7.75	7.71
7월	7.83	7.68	7.64

STEP 2. 각 성분의 저장온도별 저장기간에 따른 각 품질지표의 함량변화 방정식을 산출함.

반응차수	0차 반응			1차 반응		
	Ae = Ao - Kt			Ln(Ae) = Ln A -Kt		
온도	25℃	35℃	40℃	25℃	35℃	40℃
Slope	-0.0482	-0.0632	-0.0719	-0.0060	-0.0080	-0.0091
Intercep	8.1531	8.1143	8.1210	2.0985	2.0938	2.0946
corr (R ²)	-0.9840	-0.9768	-0.9846	-0.9846	-0.9785	-0.9862
품질변화의 해석	0차 및 1차 반응식에서 40℃의 R값 0.9862이 가장 큼으로 1차 반응					

STEP 3. 2단계에서 산출한 온도별 K값을 이용하여 활성화에너지를 산출함.

Arrhenius equation : $\text{Ln}K = -(E_a/R)(1/T) + \text{Ln} A$

온도(℃)	온도(K)	1/T	K	lnK	Ea	-5121.146
25	298	0.0034	0.00603	-5.1117	Slope	-2577.325
35	308	0.0032	0.00799	-4.8290	Intercep	3.537
40	313	0.0032	0.00912	-4.6978	corr	-1.000
10	283	0.0035	0.0038	-5.5697		
15	288	0.0035	0.0045	-5.4116		
20	293	0.0034	0.0052	-5.2589		
25	298	0.0034	0.0060	-5.1113		
30	303	0.0033	0.0070	-4.9686		
35	308	0.0032	0.0080	-4.8305		
40	313	0.0032	0.0091	-4.6968		

STEP 4. 저장온도 및 유통중의 유통기한 계산.

표. 향기 성분의 유통일수 및 변화량

유통온도(℃)	유통개월수(A)	반응속도(B)	연간변화량(A x B)
10	5	0.0038	0.01906
15	1	0.0045	0.00446
20	2	0.0052	0.01040

25	2	0.0060	0.01206	
30	2	0.0070	0.01391	
Sum	12		0.05989	
최초함량(Ao)	규격하한 값(Ae)	Ao-Ae	연간변화량	유통기한(월)
2.101	1.856	0.25	0.060	49.1

STEP 5 ; 최종 유통기한 설정(안전계수(0.7)를 설정하여 계산함).

유통기한 49.1 개월 * 0.7 = 34.4 개월

⑤ 수분

STEP 1. 저장온도별 저장기간에 따른 각 품질지표의 함량변화 분석

항목	수분		
Cut off	5.0%		
저장기간(월)	25℃	35℃	40℃
초기	1.81	1.81	1.81
1월	2.10	2.25	2.59
2월	2.35	2.63	2.95
3월	2.54	3.03	3.36
4월	2.67	3.38	3.88
5월	2.84	3.86	4.49
6월	3.03	4.47	5.20
7월	3.26	4.98	5.83

STEP 2. 각 성분의 저장온도별 저장기간에 따른 각 품질지표의 함량변화 방정식을 산출함.

반응차수	0차 반응			1차 반응		
반응식	$Ae = Ao - Kt$			$\ln(Ae) = \ln A - Kt$		
온도	25℃	35℃	40℃	25℃	35℃	40℃
Slope	0.1953	0.4444	0.5512	0.0783	0.1403	0.1557
Intercep	1.8887	1.7453	1.8324	0.6547	0.6527	0.7180
corr (R^2)	0.9948	0.9965	0.9956	0.9844	0.9952	0.9868
품질변화의 해석	0차 및 1차 반응식에서 35℃의 R값 0.9965이 가장 큼으로 0차 반응					

STEP 3. 2단계에서 산출한 온도별 K값을 이용하여 활성화에너지를 산출함.

Arrhenius equation : $\ln K = -(Ea/R)(1/T) + \ln A$

온도(℃)	온도(K)	1/T	K	lnK	Ea	-8824.728
25	298	0.0034	0.07828	-2.5474	Slope	-4441.232
35	308	0.0032	0.14028	-1.9641	Intercep	12.380
40	313	0.0032	0.15569	-1.8599	corr	-0.984

10	283	0.0035	0.0364	-3.3131		
15	288	0.0035	0.0478	-3.0406		
20	293	0.0034	0.0622	-2.7775		
25	298	0.0034	0.0802	-2.5232		
30	303	0.0033	0.1026	-2.2772		
35	308	0.0032	0.1301	-2.0393		
40	313	0.0032	0.1638	-1.8089		

STEP 4. 저장온도 및 유통중의 유통기한 계산.

표. 향기 성분의 유통일수 및 변화량

유통온도(℃)	유통개월수(A)	반응속도(B)	연간변화량(A x B)	
10	5	0.0364	0.18202	
15	1	0.0478	0.04780	
20	2	0.0622	0.12439	
25	2	0.0802	0.16041	
30	2	0.1026	0.20514	
Sum	12		0.71976	

최초함량(Ao)	규격하한 값(Ae)	Ao-Ae	연간변화량	유통기한(월)
1.809	5.000	3.19	0.720	53.2

STEP 5 ; 최종 유통기한 설정(안전계수(0.7)를 설정하여 계산함).

유통기한	53.2 개월 * 0.7 = 37.2 개월
------	-------------------------

⑥ 일반세균

미생물 시험 Data에 의한 증식추이 판단

항목	일반세균(cfu/g)		
	1000 이하		
온도	25℃	35℃	40℃
초기	335.56	335.56	335.56
1개월	301.11	327.78	330.00
2개월	295.56	297.78	297.78
3개월	322.22	321.11	271.11
4개월	298.89	306.67	306.67
5개월	328.89	347.78	287.78
6개월	325.56	313.33	335.56

○ 대장균 군 및 바실러스세레우스 실험에서 가속시험 기간동안 모두 불검출로 유통기한 산정에 미치는 영향은 없는 것으로 판단됩니다.

○ 일반세균은 통상적으로 10만cfu/g 이하이나 당사에서 제조공정을 감안하여 1,000cfu/g 이하로 설정하였으며, 초기대비 미생물 증식현상은 발견되지 않음.

⑦ 최종 유통기간 산출

실험항목	품질한계	반응차수	국내 유통온도 반영
관능평가(산패)	5점	0차	31.7 개월
산가	7.87	1차	46.1 개월
과산화물가	-	-	-
올레인산	6.4%	1차	34.4 개월
색도	-	-	-
수분	5%	0	37.2 개월
일반세균	1000cfu/g	-	-

흰점박이꽃무지 유충 동결건조물의 PET병 포장 상태에서 가속시험으로부터 산출된 유통기한은 31.7개월로 안정성이 확인됨에 따라 최종 유통기한은 제조일로부터 24개월로 설정

마. 시제품 제조

(1) 제품명

(가) 제품명 : 곤충의 유충이 대부분 비호감으로 인지하고 있어, 부드럽고 친근한 느낌을 주면서 부르기 쉬우며 제품의 내용을 쉽게 알 수 있는데 컨셉으로 작명

(나) 갈색거저리 : 테네브리오

① 제품명을 밀웜으로 하였으나 동물용으로 시판되고 있어 차별화 하고자 테네브리오로 변경

(다) 흰점박이 꽃무지 : 꽃무지

(2) 제품 디자인 컨셉

(가) 디자인 선정

- ① 디자인 종류 : 라벨 2종 (테네브리오, 꽃무지)
 소케이스 2종 (테네브리오, 꽃무지)
 증박스 2종 (테네브리오, 꽃무지)

□ 디자인 시안

제품명	테네브리오(밀웜)	꽃무지
원형제품		
분말제품		

(3) 표기사항

(가) 섭취량 : 1일 3회 1회 600mg (1일 1.8g)

(나) 식품의 유형 : 기타 가공품

(다) 섭취시 주의 사항 : 알레르기 유발물질 해당하는 경우 표기

(라) 영양 성분표

① 꽃무지

1회 제공량 : 1.8g/스푼	함량	* 영양소 기준치
열량	10 Kcal	
탄수화물	0 g	0 %
당류	0 g	
단백질	1 g	2 %
지방	0 g	0 %
포화지방	0 g	0 %
트랜스지방	0 g	
콜레스테롤	0 mg	0 %
나트륨	5 mg	0 %

② 테네브리오 (밀웜)

1회 제공량 : 1.8g/스푼	함량	* 영양소 기준치
열량	10 Kcal	
탄수화물	1 g 미만	0 %
당류	0 g	
단백질	1 g 미만	2 %
지방	0.5 g	1 %
포화지방	0 g	0 %
트랜스지방	0 g	
콜레스테롤	0 mg	0 %
나트륨	0 mg	0 %

바. 시제품의 유통기한 설정

(1) 유통기한 설정 가속시험 계획

(가) 실험개요

① 월드웨이(주)에서 동결 건조한 곤충자원의 PS 병 포장 상태에서 온도와 시간 경과에 따른 경시변화 상태를 관찰하기 위해 유통기한 설정실험을 진행하였으며, 본 시험은 식품의약품 안전평가원에서 발행(2011.6)한 안전청고시 제2008-53호(2008. 8. 14) 식품의 유통기한 설정 실험 가이드라인 준하여 작성하였음.

② 최근 생산된 동결건조물 중 전처리 시점을 달리한 샘플을 3개 선정하여, 분말로 분쇄한 다음 각 Lot에 대하여 대조구, 실험구로 나누어 보관하였으며, 총 8회 측정 분량이며, 1회 실험 당 시료수는 2개(관능검사용, 분석용)로 하였음.

(나) 저장조건 및 기간

① 저장온도

- 유통온도 : 1~35℃(실온 유통 제품)
- 대조구 : 0~5℃
- 실험구 : 25 ± 2℃, 35 ± 2℃, 40 ± 2℃

(다) 실험기간 및 주기

- ① 실험 기간 : 6개월 이상
- ② 실험 주기 : 1개월 단위

(라) 포장재질

- ① 내.외 포장재질 : PS

(마) 품질지표

- ① 이화학적 : 수분, 산가, 과산화물가, 지표물질
- ② 관능적 : 색상, 향, 맛, 산패 취, 기호도
- ③ 미생물학적 지표 : 세균수, 대장균군

(바) 실험방법

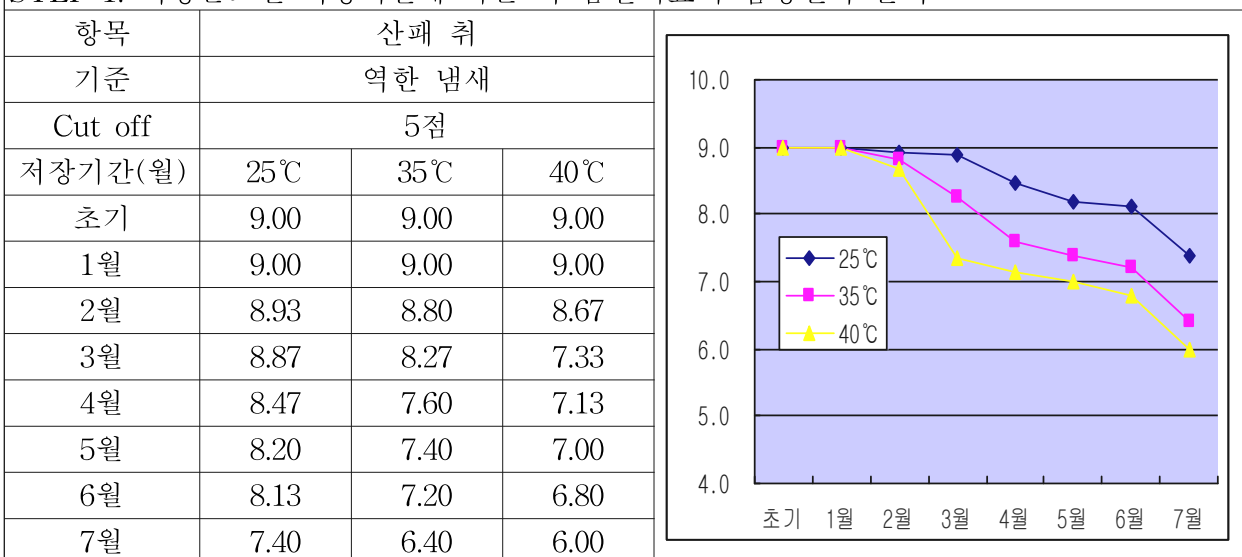
- ① 수분 (식품공전 : 상압가열 건조법)
- ② 산가 (식품공전)
- ③ 과산화물가(식품공전)
- ④ Oleic acid(지표성분) (식품공전)
- ⑤ 미생물(식품공전)
- ⑥ 관능평가(9점 척도법, 기준차이 검사법)

(2) 유통기한 실험 결과

(기) 갈색거저리

- ① 관능평가(n =15) : 산패 취

STEP 1. 저장온도별 저장기간에 따른 각 품질지표의 함량변화 분석



STEP 2. 각 성분의 저장온도별 저장기간에 따른 각 품질지표의 함량변화 방정식을 산출함.

반응차수	0차 반응			1차 반응		
반응식	$A_e = A_o - Kt$			$\ln(A_e) = \ln A - Kt$		
온도	25℃	35℃	40℃	25℃	35℃	40℃
Slope	-0.21587	-0.38175	-0.44286	-0.02595	-0.04888	-0.05843
Intercep	9.25556	9.29444	9.16667	2.22885	2.23877	2.22522
corr (R ²)	-0.9311	-0.9766	-0.9618	-0.9227	-0.9712	-0.9640
품질변화의 해석	0차 및 1차 반응식에서 35℃의 R값 0.9766이 가장 큼으로 0차 반응					

STEP 3. 2단계에서 산출한 온도별 K값을 이용하여 활성화에너지를 산출함.

Arrhenius equation : $\ln K = -(E_a/R)(1/T) + \ln A$

온도(℃)	온도(K)	1/T	K	lnK	Ea	-9111.88
25	298	0.003356	0.215873	-1.53306	Slope	-4585.75
35	308	0.003247	0.381746	-0.963	Intercep	13.87253
40	313	0.003195	0.442857	-0.81451	corr	-0.99227
10	283	0.003534	0.097147	-2.33153		
15	288	0.003472	0.128708	-2.05021		
20	293	0.003413	0.168893	-1.77849		
25	298	0.003356	0.219613	-1.51589		
30	303	0.0033	0.283101	-1.26195		
35	308	0.003247	0.361945	-1.01626		
40	313	0.003195	0.45913	-0.77842		

STEP 4. 저장온도 및 유통중의 유통기한 계산.

표. 향기 성분의 유통일수 및 변화량

유통온도(℃)	유통개월수(A)	반응속도(B)	연간변화량(A x B)	
10	5	0.0971	0.48574	
15	1	0.1287	0.12871	
20	2	0.1689	0.33779	
25	2	0.2196	0.43923	
30	2	0.2831	0.56620	
Sum	12		1.95766	

최초함량(Ao)	규격하한 값(Ae)	Ao-Ae	연간변화량	유통기한(월)
9.000	5.000	4.00	1.958	24.5

STEP 5 ; 최종 유통기한 설정(안전계수(0.7)를 설정하여 계산함).

유통기한	24.5 개월 * 0.7 = 17.2 개월
------	-------------------------

관능평가 향에서 향, 맛, 기호도 평가에서 보관기간이 증가 할수록 대조구 보다 고소한 향, 맛을 증가함으로써 유통기한 설정시험 지표로 부적합하여 유통기한 설정지표에서 제외하였음

② 산가

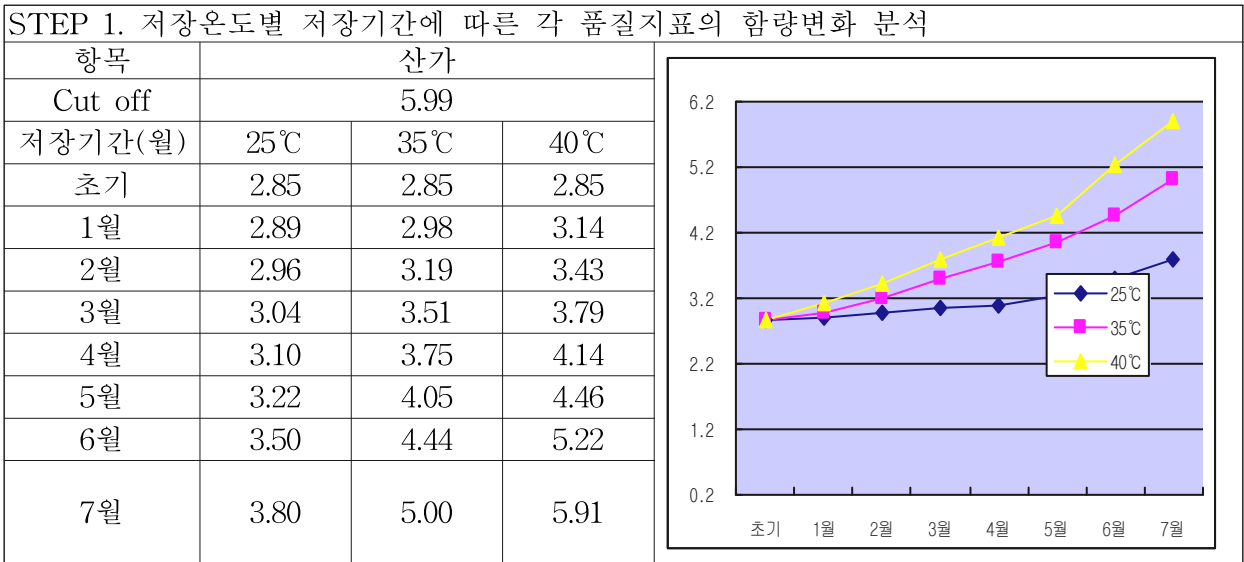
[품질한계 설정]

- 관능검사(산패 취)와 산가 간의 회귀방정식을 구한다.
- 이식에 관능검사의 한계 규격값 5점을 대입한다.
- 산출한 값을 해당 품질지표의 규격값으로 한다.

항목	산패 취			산 가		
	25℃	35℃	40℃	25℃	35℃	40℃
저장기간(월)	25℃	35℃	40℃	25℃	35℃	40℃
초기	9.00	9.00	9.00	2.8	2.8	2.8
1월	9.00	9.00	9.00	2.9	3.0	3.1
2월	8.93	8.80	8.67	3.0	3.2	3.4
3월	8.87	8.27	7.33	3.0	3.5	3.8
4월	8.47	7.60	7.13	3.1	3.7	4.1
5월	8.20	7.40	7.00	3.2	4.1	4.5
6월	8.13	7.20	6.80	3.5	4.4	5.2
7월	7.40	6.40	6.00	3.8	5.0	5.9

온도	회귀방정식		산가의 규격
	1차 방정식		
25℃	$y = -0.5603x + 7.9103$ $R^2 = 0.9380$		-
35℃	$y = -0.7678x + 9.8327$ $R^2 = 0.9692$		5.99
40℃	$y = -0.8706x + 10.7490$ $R^2 = 0.8779$		-

[유통기한 설정]



STEP 2. 각 성분의 저장온도별 저장기간에 따른 각 품질지표의 함량변화 방정식을 산출함.

반응차수	0차 반응			1차 반응		
	$A_e = A_o - Kt$			$\ln(A_e) = \ln A - Kt$		
온도	25℃	35℃	40℃	25℃	35℃	40℃
Slope	0.12581	0.29997	0.42011	0.03870	0.07997	0.10154
Intercep	2.73093	2.67204	2.64824	1.01419	1.01721	1.03254
corr (R^2)	0.9363	0.9839	0.9812	0.9492	0.9947	0.9955
품질변화의 해석	0차 및 1차 반응식에서 40℃의 R값 0.9955이 가장 큼으로 1차 반응					

STEP 3. 2단계에서 산출한 온도별 K값을 이용하여 활성화에너지를 산출함.

Arrhenius equation : $\ln K = -(E_a/R)(1/T) + \ln A$

온도(°C)	온도(K)	1/T	K	lnK	Ea	-12120.06 9
25	298	0.0034	0.03870	-3.2519	Slope	-6099.682
35	308	0.0032	0.07997	-2.5262	Intercep	17.232
40	313	0.0032	0.10154	-2.2873	corr	-0.997
10	283	0.0035	0.0133	-4.3219		
15	288	0.0035	0.0193	-3.9477		
20	293	0.0034	0.0277	-3.5862		
25	298	0.0034	0.0393	-3.2369		
30	303	0.0033	0.0551	-2.8992		
35	308	0.0032	0.0764	-2.5724		
40	313	0.0032	0.1048	-2.2560		

STEP 4. 저장온도 및 유통중의 유통기한 계산.

표. 향기 성분의 유통일수 및 변화량

유통온도(°C)	유통개월수(A)	반응속도(B)	연간변화량(A x B)
10	5	0.0133	0.06638
15	1	0.0193	0.01930
20	2	0.0277	0.05540
25	2	0.0393	0.07857
30	2	0.0551	0.11014
Sum	12		0.32978

최초함량(Ao)	규격하한 값(Ae)	Ao-Ae	연간변화량	유통기한(월)
1.047	1.790	0.74	0.330	27.0

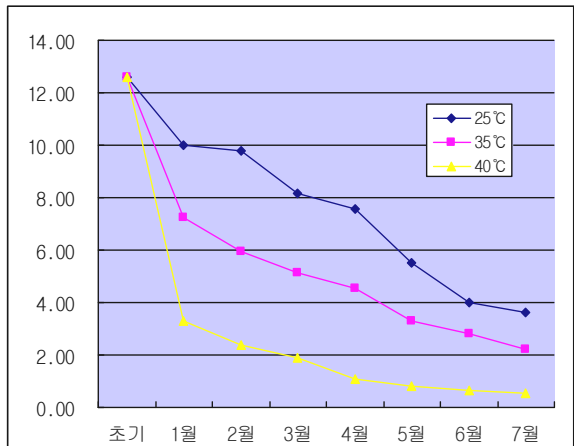
STEP 5 ; 최종 유통기한 설정(안전계수(0.7)를 설정하여 계산함).

유통기한 27.0 개월 * 0.7 = 18.9 개월

③ 과산화물가

STEP 1. 저장온도별 저장기간에 따른 각 품질지표의 함량변화 분석

항목	과산화물가		
	-		
Cut off	-		
저장기간(월)	25°C	35°C	40°C
초기	12.59	12.59	12.59
1월	10.00	7.25	3.32
2월	9.78	5.95	2.39
3월	8.17	5.12	1.88
4월	7.58	4.53	1.07
5월	5.50	3.30	0.80
6월	4.00	2.80	0.65
7월	3.60	2.20	0.55



과산화물가는 가속저장기간이 증가하면 할수록 감소하는 경향이 있어 유통기한 설정 지표항목으로 부적합 함

④ 올레인산

STEP 1. 저장온도별 저장기간에 따른 각 품질지표의 함량변화 분석

항목	올레인산		
Cut off	11		
저장기간(월)	25℃	35℃	40℃
초기	13.00	13.00	13.00
1월	12.93	12.93	12.77
2월	12.84	12.63	12.38
3월	12.66	12.45	12.09
4월	12.48	12.02	11.65
5월	12.31	11.55	11.28
6월	12.13	11.18	10.78
7월	11.98	11.00	10.51

STEP 2. 각 성분의 저장온도별 저장기간에 따른 각 품질지표의 함량변화 방정식을 산출함.

반응차수	0차 반응			1차 반응		
반응식	$A_e = A_o - Kt$			$\ln(A_e) = \ln A - Kt$		
온도	25℃	35℃	40℃	25℃	35℃	40℃
Slope	-0.15283	-0.31475	-0.37048	-0.01222	-0.02621	-0.03157
Intercep	13.07685	13.19704	13.10444	2.57144	2.58271	2.57661
corr (R ²)	-0.9928	-0.9866	-0.9970	-0.9919	-0.9846	-0.9952
품질변화의 해석	0차 및 1차 반응식에서 40℃의 R값 0.9970이 가장 큼으로 0차 반응					

STEP 3. 2단계에서 산출한 온도별 K값을 이용하여 활성화에너지를 산출함.

Arrhenius equation : $\ln K = -(E_a/R)(1/T) + \ln A$

온도(℃)	온도(K)	1/T	K	lnK	Ea	-11284.36 2
25	298	0.0034	0.15283	-1.8784	Slope	-5679.095
35	308	0.0032	0.31475	-1.1560	Intercep	17.204
40	313	0.0032	0.37048	-0.9930	corr	-0.989
10	283	0.0035	0.0571	-2.8632		
15	288	0.0035	0.0809	-2.5149		
20	293	0.0034	0.1132	-2.1783		
25	298	0.0034	0.1567	-1.8531		
30	303	0.0033	0.2147	-1.5387		
35	308	0.0032	0.2910	-1.2344		
40	313	0.0032	0.3907	-0.9398		

STEP 4. 저장온도 및 유통중의 유통기한 계산.

표. 향기 성분의 유통일수 및 변화량				
유통온도(℃)	유통개월수(A)	반응속도(B)	연간변화량(A x B)	
10	5	0.0571	0.28542	
15	1	0.0809	0.08087	
20	2	0.1132	0.22646	
25	2	0.1567	0.31349	
30	2	0.2147	0.42934	
Sum	12		1.33558	
최초함량(Ao)	규격하한 값(Ae)	Ao-Ae	연간변화량	유통기한(월)
12.999	11.000	2.00	1.336	18.0

STEP 5 ; 최종 유통기한 설정(안전계수(0.7)를 설정하여 계산함).

유통기한	18.0 개월 * 0.7 = 12.6 개월
------	-------------------------

⑤ 수분

STEP 1. 저장온도별 저장기간에 따른 각 품질지표의 함량변화 분석

항목	수분		
Cut off	5.0		
저장기간(월)	25℃	35℃	40℃
초기	2.01	2.01	2.01
1월	2.34	2.46	2.50
2월	2.65	2.72	2.79
3월	2.88	3.04	3.12
4월	3.02	3.24	3.34
5월	3.15	3.36	3.47
6월	3.22	3.54	3.67
7월	3.28	3.58	3.71

STEP 2. 각 성분의 저장온도별 저장기간에 따른 각 품질지표의 함량변화 방정식을 산출함.

반응차수	0차 반응			1차 반응		
반응식	Ae = Ao - Kt			Ln(Ae) = Ln A -Kt		
온도	25℃	35℃	40℃	25℃	35℃	40℃
Slope	0.18267	0.22016	0.23836	0.06802	0.07798	0.08255
Intercep	2.18731	2.22361	2.24241	0.78818	0.80695	0.81615
corr (R ²)	0.9677	0.9702	0.9704	0.9491	0.9623	0.9479
품질변화의 해석	0차 및 1차 반응식에서 40℃의 R값 0.9704이 가장 큼으로 0차 반응					

STEP 3. 2단계에서 산출한 온도별 K값을 이용하여 활성화에너지를 산출함.

Arrhenius equation : $\ln K = -(Ea/R)(1/T) + \ln A$

온도(℃)	온도(K)	1/T	K	lnK	Ea	
25	298	0.0034	0.18267	-1.7001	Slope	-3305.633
35	308	0.0032	0.22016	-1.5134	Intercep	-1663.630
						3.884

40	313	0.0032	0.23836	-1.4340	corr	-1.000
10	283	0.0035	0.1361	-1.9946		
15	288	0.0035	0.1507	-1.8926		
20	293	0.0034	0.1663	-1.7940		
25	298	0.0034	0.1829	-1.6987		
30	303	0.0033	0.2006	-1.6066		
35	308	0.0032	0.2193	-1.5175		
40	313	0.0032	0.2390	-1.4312		

STEP 4. 저장온도 및 유통중의 유통기한 계산.

표. 향기 성분의 유통일수 및 변화량

유통온도(°C)	유통개월수(A)	반응속도(B)	연간변화량(A x B)	
10	5	0.1361	0.68031	
15	1	0.1507	0.15068	
20	2	0.1663	0.33258	
25	2	0.1829	0.36583	
30	2	0.2006	0.40113	
Sum	12		1.93053	

최초함량(Ao)	규격하한 값(Ae)	Ao-Ae	연간변화량	유통기한(월)
2.011	5.000	2.99	1.931	18.58

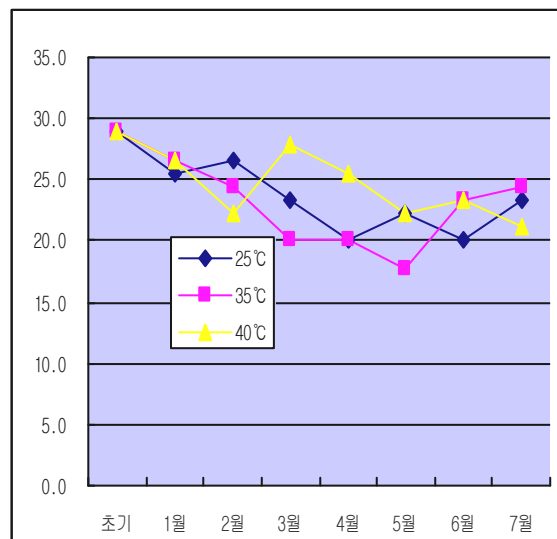
STEP 5 ; 최종 유통기한 설정(안전계수(0.7)를 설정하여 계산함).

유통기한	18.58 개월 * 0.7 = 13.0 개월
------	--------------------------

⑥ 일반세균

□ 미생물 시험 Data에 의한 증식추이 판단

항목	일반세균(cfu/g)		
	25°C	35°C	40°C
기준	1000 이하		
온도	25°C	35°C	40°C
초기	28.89	28.89	28.89
1개월	25.56	26.67	26.67
2개월	26.67	24.44	22.22
3개월	23.33	20.00	27.78
4개월	20.00	20.00	25.56
5개월	22.22	17.78	22.22
6개월	20.00	23.33	23.33
7개월	23.33	24.44	21.11



○ 대장균 균 및 바실러스세레우스 실험에서 가속시험 기간동안 모두 불검출로 유통기한 산정에 미치는 영향은 없는 것으로 판단됨

- 일반세균은 통상적으로 10만cfu/g 이하이나 당사에서는 제조공정을 감안하여 1,000cfu/g 이하로 설정하였으며, 초기대비 미생물 증식현상은 발견되지 않음

⑦ 최종 유통기간 산출

실험항목	품질한계	반응차수	국내 유통온도 반영
관능평가(산패)	5점	0	17.2 개월
산가	6.02	1차	18.9 개월
과산화물가	-	-	-
올레인산	11.0%	0	12.6 개월
색도	-	-	-
수분	5 %	0	13.0 개월
일반세균	1000cfu/g	-	-

갈색거저리 유충 동결건조물의 PS병 포장 상태에서 가속시험으로부터 산출된 유통기한은 12.6개월로 안정성이 확인됨에 따라 최종 유통기한은 제조일로부터 12개월로 설정

(2) 흰점박이꽃무지

① 관능평가(n =15) : 산패 취

STEP 1. 저장온도별 저장기간에 따른 각 품질지표의 함량변화 분석			
항목	산패 취		
기준	역한 냄새		
Cut off	5점		
저장기간(월)	25℃	35℃	40℃
초기	9.00	9.00	9.00
1월	9.00	9.00	9.00
2월	8.96	8.76	8.13
3월	9.00	8.40	7.73
4월	8.53	8.07	7.20
5월	8.40	7.53	6.87
6월	7.84	7.18	6.29
7월	7.53	6.73	5.91

Month	25℃	35℃	40℃
초기	9.00	9.00	9.00
1월	9.00	9.00	9.00
2월	8.96	8.76	8.13
3월	9.00	8.40	7.73
4월	8.53	8.07	7.20
5월	8.40	7.53	6.87
6월	7.84	7.18	6.29
7월	7.53	6.73	5.91

STEP 2. 각 성분의 저장온도별 저장기간에 따른 각 품질지표의 함량변화 방정식을 산출함.

반응차수	0차 반응			1차 반응		
반응식	$Ae = A_0 - Kt$			$\ln(Ae) = \ln A - Kt$		
온도	25℃	35℃	40℃	25℃	35℃	40℃
Slope	-0.21640	-0.34497	-0.47037	-0.02592	-0.04350	-0.06327

Intercep	9.29074	9.29074	9.16296	2.23265	2.23693	2.22797
corr (R ²)	-0.9200	-0.9825	-0.9924	-0.9156	-0.9773	-0.9927
품질변화의 해석	0차 및 1차 반응식에서 35℃의 R값 0.9927이 가장 큼으로 1차 반응					

STEP 3. 2단계에서 산출한 온도별 K값을 이용하여 활성화에너지를 산출함.

Arrhenius equation : $\ln K = -(E_a/R)(1/T) + \ln A$

온도(℃)	온도(K)	1/T	K	lnK	Slope	-4743.495
25	298	0.0034	0.21640	-1.5306	Intercep	14.375
35	308	0.0032	0.34497	-1.0643	corr	-0.996
40	313	0.0032	0.47037	-0.7542	Ea	-9425.324
10	283	0.0035	0.0919	-2.3866		
15	288	0.0035	0.1230	-2.0956		
20	293	0.0034	0.1629	-1.8146		
25	298	0.0034	0.2138	-1.5429		
30	303	0.0033	0.2780	-1.2803		
35	308	0.0032	0.3584	-1.0261		
40	313	0.0032	0.4584	-0.7801		

STEP 4. 저장온도 및 유통중의 유통기한 계산.

표. 향기 성분의 유통일수 및 변화량

유통온도(℃)	유통개월수(A)	반응속도(B)	연간변화량(A x B)	
10	5	0.0919	0.45970	
15	1	0.1230	0.12299	
20	2	0.1629	0.32582	
25	2	0.2138	0.42751	
30	2	0.2780	0.55593	
Sum	12		1.89195	

최초함량(Ao)	규격하한 값(Ae)	Ao-Ae	연간변화량	유통기한(월)
9.000	5.000	4.00	1.892	25.4

STEP 5 ; 최종 유통기한 설정(안전계수(0.7)를 설정하여 계산함).

유통기한	25.4 개월 * 0.7 = 17.8 개월
------	-------------------------

관능평가 향에서 향, 맛, 기호도 평가에서 보관기간이 증가 할수록 대조구 보다 고소한 향, 맛을 증가함으로써 유통기한 설정시험 지표로 부적합하여 유통기한 설정지표에서 제외하였음

② 산가

품질한계 설정

○ 관능검사(산패 취)와 산가 간의 회귀방정식을 구한다.

○ 이식에 관능검사의 한계 규격값 5점을 대입한다.

○ 산출한 값을 해당 품질지표의 규격값으로 한다.

항목	산패 취			산 가		
	25℃	35℃	40℃	25℃	35℃	40℃
저장기간(월)	25℃	35℃	40℃	25℃	35℃	40℃
초기	9.00	9.00	9.00	0.74	0.74	0.74
1월	9.00	9.00	9.00	0.74	0.75	0.77
2월	8.96	8.76	8.13	0.76	0.78	0.79
3월	9.00	8.40	7.73	0.78	0.81	0.83
4월	8.53	8.07	7.20	0.80	0.86	0.89
5월	8.40	7.53	6.87	0.81	0.89	0.93
6월	7.84	7.18	6.29	0.83	0.90	0.95
7월	7.53	6.73	5.91	0.84	0.94	1.00

온도	회귀방정식		산가의 규격
	1차 방정식		
25℃	$y = -0.0647x + 1.3405(R^2 = 0.8289)$		1.02
35℃	$y = -0.0842x + 1.5140(R^2 = 0.9671)$		1.09
40℃	$y = -0.0813x + 1.474(R^2 = 0.9729)$		1.07

③ 유통기한 설정

STEP 1. 저장온도별 저장기간에 따른 각 품질지표의 함량변화 분석

항목	산가		
Cut off	1.07		
저장기간(월)	25℃	35℃	40℃
초기	0.74	0.74	0.74
1월	0.74	0.75	0.77
2월	0.76	0.78	0.79
3월	0.78	0.81	0.83
4월	0.80	0.86	0.89
5월	0.81	0.89	0.93
6월	0.83	0.90	0.95
7월	0.84	0.94	1.00

STEP 2. 각 성분의 저장온도별 저장기간에 따른 각 품질지표의 함량변화 방정식을 산출함.

반응차수	0차 반응			1차 반응		
	$Ae = Ao - Kt$			$\ln(Ae) = \ln A - Kt$		
온도	25℃	35℃	40℃	25℃	35℃	40℃
Slope	0.01652	0.02971	0.03865	0.02101	0.03582	0.04491
Intercep	0.73009	0.72852	0.72750	-0.31306	-0.31208	-0.31013
corr (R ²)	0.9930	0.9948	0.9953	0.9922	0.9944	0.9960
품질변화의 해석	0차 및 1차 반응식에서 40℃의 R값 0.9960이 가장 큼으로 1차 반응					

STEP 3. 2단계에서 산출한 온도별 K값을 이용하여 활성화에너지를 산출함.

Arrhenius equation : $\ln K = -(Ea/R)(1/T) + \ln A$

온도(℃)	온도(K)	1/T	K	lnK	Ea
					-9442.147

25	298	0.0034	0.02101	-3.8629	Slope	-4751.961
35	308	0.0032	0.03582	-3.3293	Intercep	12.087
40	313	0.0032	0.04491	-3.1030	corr	-1.000
10	283	0.0035	0.0091	-4.7043		
15	288	0.0035	0.0121	-4.4127		
20	293	0.0034	0.0161	-4.1312		
25	298	0.0034	0.0211	-3.8591		
30	303	0.0033	0.0274	-3.5959		
35	308	0.0032	0.0354	-3.3413		
40	313	0.0032	0.0453	-3.0949		

STEP 4. 저장온도 및 유통중의 유통기한 계산.

표. 향기 성분의 유통일수 및 변화량

유통온도(℃)	유통개월수(A)	반응속도(B)	연간변화량(A x B)	
10	5	0.0091	0.04528	
15	1	0.0121	0.01212	
20	2	0.0161	0.03213	
25	2	0.0211	0.04218	
30	2	0.0274	0.05487	
Sum	12		0.18658	
최초함량(Ao)	규격하한 값(Ae)	Ao-Ae	연간변화량	유통기한(월)
-0.307	0.065	0.37	0.187	24.0

STEP 5 ; 최종 유통기한 설정(안전계수(0.7)를 설정하여 계산함).

유통기한	24.0 개월 * 0.7 = 16.8 개월
------	-------------------------

④ 과산화물가

STEP 1. 저장온도별 저장기간에 따른 각 품질지표의 함량변화 분석

항목	과산화물가		
	-		
Cut off	-		
저장기간(월)	25℃	35℃	40℃
초기	0.00	0.00	0.00
1월	0.00	0.00	0.00
2월	0.00	0.00	0.00
3월	0.00	0.00	0.00
4월	0.00	0.00	0.00
5월	0.00	0.00	0.00
6월	0.00	0.00	0.00
7월	0.00	0.00	0.00

과산화물가는 유통기한 설정 지표항목으로 부적합 함

⑤ 올레인산

STEP 1. 저장온도별 저장기간에 따른 각 품질지표의 함량변화 분석

항목	올레인산		
Cut off	6.4		
저장기간(월)	25℃	35℃	40℃
초기	7.95	7.95	7.95
1월	7.92	7.90	7.88
2월	7.89	7.83	7.80
3월	7.82	7.77	7.71
4월	7.73	7.66	7.63
5월	7.65	7.58	7.53
6월	7.59	7.50	7.45
7월	7.54	7.45	7.37

STEP 2. 각 성분의 저장온도별 저장기간에 따른 각 품질지표의 함량변화 방정식을 산출함.

반응차수	0차 반응			1차 반응		
반응식	$A_e = A_o - Kt$			$\ln(A_e) = \ln A - Kt$		
온도	25℃	35℃	40℃	25℃	35℃	40℃
Slope	-0.06288	-0.07549	-0.08395	-0.00811	-0.00981	-0.01096
Intercep	7.98103	7.96984	7.95999	2.07732	2.07601	2.07486
corr (R ²)	-0.9919	-0.9971	-0.9996	-0.9915	-0.9969	-0.9994
품질변화의 해석	0차 및 1차 반응식에서 40℃의 R값 0.9996이 가장 큼으로 0차 반응					

STEP 3. 2단계에서 산출한 온도별 K값을 이용하여 활성화에너지를 산출함.

Arrhenius equation : $\ln K = -(E_a/R)(1/T) + \ln A$

온도(℃)	온도(K)	1/T	K	lnK	Ea	-3677.532
25	298	0.0034	0.00811	-4.8144	Slope	-1850.796
35	308	0.0032	0.00981	-4.6249	Intercep	1.393
40	313	0.0032	0.01096	-4.5136	corr	-0.999
10	283	0.0035	0.0058	-5.1466		
15	288	0.0035	0.0065	-5.0330		
20	293	0.0034	0.0073	-4.9234		
25	298	0.0034	0.0081	-4.8174		
30	303	0.0033	0.0090	-4.7149		
35	308	0.0032	0.0099	-4.6157		
40	313	0.0032	0.0109	-4.5197		

STEP 4. 저장온도 및 유통중의 유통기한 계산.

표. 향기 성분의 유통일수 및 변화량

유통온도(℃)	유통개월수(A)	반응속도(B)	연간변화량(A x B)
10	5	0.0058	0.02910
15	1	0.0065	0.00652
20	2	0.0073	0.01455
25	2	0.0081	0.01618

30	2	0.0090	0.01792	
Sum	12		0.08426	
최초함량(Ao)	규격하한 값(Ae)	Ao-Ae	연간변화량	유통기한(월)
7.952	6.400	1.55	0.084	221.1

STEP 5 ; 최종 유통기한 설정(안전계수(0.7)를 설정하여 계산함).

유통기한	221.1 개월 * 0.7 = 154.7 개월
------	---------------------------

⑥ 수분

STEP 1. 저장온도별 저장기간에 따른 각 품질지표의 함량변화 분석

항목	수분		
Cut off	5.0		
저장기간(월)	25℃	35℃	40℃
초기	1.92	1.92	1.92
1월	2.05	2.11	2.15
2월	2.23	2.23	2.45
3월	2.49	2.53	2.73
4월	2.61	2.81	3.07
5월	2.79	3.07	3.26
6월	2.86	3.33	3.53
7월	2.97	3.46	3.78

STEP 2. 각 성분의 저장온도별 저장기간에 따른 각 품질지표의 함량변화 방정식을 산출함.

반응차수	0차 반응			1차 반응		
반응식	$Ae = Ao - Kt$			$\ln(Ae) = \ln A - Kt$		
온도	25℃	35℃	40℃	25℃	35℃	40℃
Slope	0.15714	0.23419	0.27003	0.06474	0.08890	0.09758
Intercep	1.94000	1.86241	1.91546	0.67457	0.65475	0.68481
corr (R ²)	0.9904	0.9955	0.9987	0.9837	0.9978	0.9923
품질변화의 해석	0차 및 1차 반응식에서 35℃의 R값 0.9987이 가장 큼으로 0차 반응					

STEP 3. 2단계에서 산출한 온도별 K값을 이용하여 활성화에너지를 산출함.

Arrhenius equation : $\ln K = -(Ea/R)(1/T) + \ln A$

온도(℃)	온도(K)	1/T	K	lnK	Ea	
25	298	0.0034	0.15714	-1.8506	Slope	-6779.356
35	308	0.0032	0.23419	-1.4516	Intercep	-3411.855
40	313	0.0032	0.27003	-1.3092	corr	9.605
10	283	0.0035	0.0862	-2.4508		-0.998
15	288	0.0035	0.1063	-2.2415		
20	293	0.0034	0.1301	-2.0393		
25	298	0.0034	0.1582	-1.8440		
30	303	0.0033	0.1911	-1.6550		

35	308	0.0032	0.2294	-1.4722		
40	313	0.0032	0.2738	-1.2953		

STEP 4. 저장온도 및 유통중의 유통기한 계산.

표. 향기 성분의 유통일수 및 변화량

유통온도(°C)	유통개월수(A)	반응속도(B)	연간변화량(A x B)
10	5	0.0862	0.43112
15	1	0.1063	0.10630
20	2	0.1301	0.26023
25	2	0.1582	0.31638
30	2	0.1911	0.38218
Sum	12		1.49621

최초함량(Ao)	규격하한 값(Ae)	Ao-Ae	연간변화량	유통기한(월)
1.919	5.000	3.08	1.496	24.7

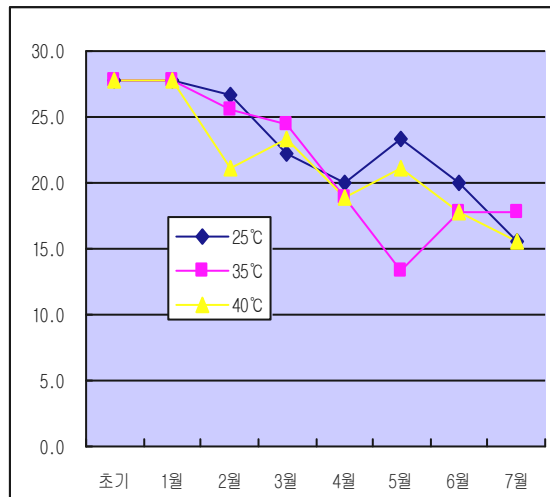
STEP 5 ; 최종 유통기한 설정(안전계수(0.7)를 설정하여 계산함).

유통기한	24.7 개월 * 0.7 = 17.3 개월
------	-------------------------

⑦ 일반세균

□ 미생물 시험 Data에 의한 증식추이 판단

항목	일반세균(cfu/g)		
	25°C	35°C	40°C
기준	1000 이하		
온도	25°C	35°C	40°C
초기	27.78	27.78	27.78
1개월	27.78	27.78	27.78
2개월	26.67	25.56	21.11
3개월	22.22	24.44	23.33
4개월	20.00	18.89	18.89
5개월	23.33	13.33	21.11
6개월	20.00	17.78	17.78
7개월	15.56	17.78	15.56



- 대장균 균 및 바실러스세레우스 실험에서 가속시험 기간동안 모두 불검출로 유통기한 산정에 미치는 영향은 없는 것으로 판단됨
- 일반세균은 통상적으로 10만 cfu/g 이하이나 당사에서는 제조공정을 감안하여 1,000 cfu/g 이하로 설정하였으며, 초기대비 미생물 증식현상은 발견되지 않음

⑧ 최종 유통기간 산출

실험항목	품질한계	반응차수	국내 유통온도 반영
관능평가(산패)	5점	0차	17.8 개월
산가	1.07	1차	16.8 개월
과산화물가	-	-	-
올레인산	6.4%	0차	154.7 개월
색도	-	-	-
수분	5%	0	17.3 개월
일반세균	1000 cfu/g	-	-

□ 결과 : 흰점박이꽃무지 유충 동결건조물의 PS병 포장 상태에서 가속시험으로부터 산출된 유통기한은 16.8개월로 안정성이 확인됨에 따라 최종 유통기한은 제조일로부터 12개월로 설정

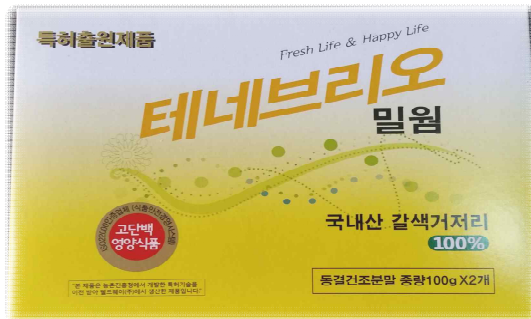
사. 한시적 식품등록, 품목제조보고 및 제품 출시

(1) 갈색거저리 한시적 식품 등록

(가) 한시적 기준 및 규격 인정 신청서 제출

(나) 갈색거저리 새로운 식품원료로 한시적 인정(2014. 7. 15.)

(2) 갈색거저리 품목제조보고 : 테네브리오 밀웬(동결건조 갈색거저리 유충 분말 100%)



2) 갈색거저리 추가 시제품 개발 : 기존의 건강기능식품에 부재료로 갈색거저리 분말 첨가



(2) 흰점박이꽃무지 한시적 식품 등록

(가) 한시적 기준 및 규격 인정 신청서 제출

(나) 흰점박이꽃무지 새로운 식품원료로 한시적 인정(2014. 9. 30.)

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	달성도 (%)	연구개발수행내용
1차 년도 (2011)	곤충자원의 식 약용 소재화를 위한 최적조건 확립 및 기능검 정(제1세부)	대상곤충별 최적제조조 건 확립	100	- 식용으로 사용가능한 이미, 이취를 제 거한 최적조건 확립(절식, 세척, 살균, 동결, 건조)
		다양한 먹이원과 시기에 따른 곤충 추출물별 세 포독성 검정	100	- 다양한 먹이원별, 발육시기별 시료를 대상으로 추출물을 제조하여 세포주를 대상으로 독성검정
	곤충자원의 지 표물질 도출 및 성분연구(제1협 동)	갈색거저리, 흰점박이 꽃 무지의 추출 및 세부 분획화	100	- 갈색거저리 및 흰점박이 꽃무지 ethanol 추출물 획득 후 Hexane, chloroform, EtOAc, n-BuOH로 세부 분획
		곤충 분획물의 기능성 평가 (항알츠하이머성 치매 및 항산화 효능)	100	- β -Secretase(BACE1) 저해효과, 저해 mode 평가 및 특이성 평가 - DPPH, ABTS 라디칼 소거능, FRAP assay 등 평가
		곤충 단위무게당 대표성 분 함량/곤충의 성분연 구	100	- SDE 추출법을 통한 곤충의 정유성분 및 일반성분 분석, 지방산 분석(GC)을 통한 단위무게당 대표성분 함량
	곤충추출물의 간암모델에서의 약리활성 검증 (2협동)	곤충추출물의 약효 평가 를 위한 간유래 세포주 를 이용한 다양한 형광 분석기법확립	100	- 형광표지자를 활용한 대용량 혹은 고 해상 형광이미지분석을 기반으로, 곤 충추출물에 의한 ROS 발생, apoptosis, necrosis, autophagy유도기 전 및 미토콘드리아 막전위 변화 분석
		세포의 물질대사, 성장, 세포죽음에 대한 추출물 영향평가용 HTS 확립	100	- MTT기반으로 미토콘드리아 활성 측 정을 통한 곤충추출물의 물질대사교 란, 세포분열, 세포사멸 능력을 세포수 준에서 대용량 검색
	곤충자원의 식 품등록을 위한 독성평가(제3협 동)	갈색 거저리 및 흰점박 이 꽃무지의 지방산 분 석법 확립	100	- GC를 이용하여 갈색 거저리 및 흰점 박이 꽃무지의 지방산 분석법을 확립 함
		급성경구투여 독성 예비 시험	100	- OECD 가이드라인에서 권고한 대로 시험을 진행하기 위해 예비독성 시 험을 실시
		4주 반복 경구투여독성 시험	100	- OECD 가이드라인에서 권고한 대로 암수 랫드를 이용하여 4주 독성시험을 진행
		유전독성 예비시험	100	- OECD 가이드라인에서 권고한 대로 복귀돌연변이, 염색체이상 및 소핵 시 험을 위한 예비시험을 진행
	곤충분말의 제 조공정 표준화 및 시제품 개발 (제4협동)	원재료의 동결건조 특성 과악	100	- 유충이 지니고 있는 특징인 단백질, 지방 등 여러 가지 성분 함량분석 - 유충에 존재하는 다양한 미생물 분석
		동결건조 조건 설정	100	- 유충에 존재하는 다양한 미생물 살균 방법 및 조건설정 - 유충의 동결온도, 동결시간, 붕괴온도 과악

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	달성도 (%)	연구개발수행내용
2차 년도 (2012)	곤충자원의 식 약용 소재화를 위한 최적조건 확립 및 기능검 정(제1세부)	영양성분 및 유해물질 분석	100	- 영양성분(일반성분, 아미노산조성, 지 방산조성) 및 유해물질(미생물, 잔류농 약, 중금속, 알레르겐 등) 분석
		추출물의 항염증, 항비 만, 항당뇨 효능 검정	100	- 곤충 추출물을 대상으로 세포주 기반 항염 증, 항비만, 항당뇨 효능 및 메카니즘 분석
		곤충의 식품으로서 국 내·외 인정, 허가, 사용 현황 자료수집	100	- 한시적 인정요청서 작성시 필수적인 자료를 논문, 특허, 보고서, 기사 등을 대상으로 자료수집 및 정리
	곤충자원의 지 표물질 도출 및 성분연구(제1협 동)	활성추적분획법을 통한 활성성분 분리	100	- 활성 평가 후 효과를 나타낸 분획을 open column chromatography, prep-HPLC, sephadex LH-20, prep-TLC를 통해 세분화/물질분리
		분리한 순수물질의 화학 적 구조 규명	100	- Thin layer chromatography 및 HPLC 이용하여 순도확인 - NMR, LC/MS 분석 분자구조 분석
		분획물 및 순수물질의 항알츠하이머성 치매 효 능 평가	100	- 분획물 및 순수물질의 BACE1 저해능 평가, 저해 mode 검증 - 분획물 및 순수물질의 Aβ(25-35) 유도독성으로부터의 세포보호능 평가
	곤충 추출물의 간암모델에서의 약리활성 검증 (2협동)	동물질병모델을 이용한 곤충 추출물의 약리활성 검증 시스템 확립	100	- 간암세포주를 활용한 xenograft 간암 모델확립 - DEN으로 유도되는 간독성 모델 확립
		곤충 추출물의 동물질병 모델에서의 약효 검증	100	- 간암 xenograft에서 곤충추출물의 간 암억제효능 확인 - 간독성모델에서 곤충추출물의 간보호 효능 확인
	곤충자원의 식 품등록을 위한 독성평가(제3협 동)	급성경구투여 독성 시험	100	- OECD 가이드라인의 권고대로 암컷 랫 드를 이용하여 급성독성 시험을 실시함 - 동물 모델을 통해 LD50 평가
		4주 및 13주 반복 경구 투여독성 시험 수행	100	- OECD 가이드라인에서 권고한 대로 암수 랫드를 이용하여 4주 및 13주 독 성시험을 진행 - 동물 모델을 통해 NOAEL(No Observed Adverse Effect Level) 평가
		유전독성 시험	100	- OECD 가이드라인에서 권고한 대로 복귀돌 연변이, 염색체이상 및 소핵 시험을 진행
	곤충분말의 제 조공정 표준화 및 시제품 개발 (제4협동)	대상원료 제조공정 표준 화	100	- 부직포 와 쟁반을 살균 용기로 사용 시 115℃ 10분간 처리 했을 경우 곤충3cm이 하 두께, 쟁반 에서 살균 효율이 좋음 - 동결온도 -35~-40℃, 시간 12시간으로 설정 - 건조 조건으로 -15℃이하에서 30시간 이후 최대 45℃까지, 진공도 0.5torr이 하 유지하여 수분함량 1.5%
		자가 기준 규격 설정	100	- 시험법 식품공전 시험법 적용
		원료 유통기한 설정	100	- 관능검사, 산가, 과산화물가, 올레인산, 일반세균, 대장균군, 수분에 대한 지표 성분 변화 측정

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	달성도 (%)	연구개발수행내용
3차 년도 (2013)	곤충자원의 식 약용 소재화를 위한 최적조건 확립 및 기능검 정(제1세부)	추출물의 항염증, 항비 만, 항당뇨 효능 검정	100	- 세포주 및 마우스를 대상으로 곤충의 항염증, 항비만, 항당뇨 효능 검정
		갈색거저리 새로운 식품 원료로 식약처 인정	100	- 갈색거저리에 대한 한시적 인정요청서 작성 및 식약처 인정
		흰점박이꽃무지 새로운 식품원료로 식약처 인정	100	- 흰점박이꽃무지에 대한 한시적 인정요 청서 작성 및 식약처 제출
	곤충자원의 지 표물질 도출 및 성분연구(제1협 동)	분획물 및 순수물질의 NFκB 신호전달체계 관 련 항염증반응을 통한 알츠하이머성 치매 예방 메커니즘	100	- 분획물 및 분리물질의 치매 및 염증관 련 기전 확립 (PGE2와 NO 생성량 측 정 및 COX-2, iNOS 등 염증관련 단 백질의 변화 연구) - 순수물질 및 활성분획물의 NFκB- 신 호전달경로 작용기전 확립 (IκB-α, JNK 관련 molecular target etc)
		활성물질의 분리 및 분 리물질의 구조·활성 상 관관계 연구	100	- 활성성분과 구조와의 상관관계 정립 - 곤충의 성분분석을 통하여 다양한 활 성물질을 분리하여 구조·활성 상관관 계 구명 (BACE1 <i>in silico</i> docking model system)
		필요성분을 추가 제공하 기 위해 단일 물질의 재 분리	100	- 기전연구 및 동물실험을 위해 필요한 활성 성분을 추가 제공하기 위해 단일 물질의 재분리
	곤충추출물의 간암모델에서의 약리활성 검증 (2협동)	동물질병모델을 이용한 곤충 추출물의 약리활성 검증 시스템 확립	100	- 간암세포주를 활용한 xenograft 간암 모델확립 - DEN으로 유도되는 간독성 모델 확립
		곤충 추출물의 동물질병 모델에서의 약효 검증	100	- 간암 xenograft에서 곤충추출물의 간 암억제효능 확인 - 간독성모델에서 곤충추출물의 간보호 효능 확인
	곤충자원의 식 품등록을 위한 독성평가(제3협 동)	13주 반복 경구투여독성 시험 수행	100	- OECD 가이드라인에서 권고한 대로 암수 랫드를 이용하여 13주 독성시험 을 진행 - 동물 모델을 통해 NOAEL(No Observed Adverse Effect Level) 평 가
		유전독성 시험	100	- 흰점박이 꽃무지를 이용하여 Comet Assay 진행
	곤충분말의 제 조공정 표준화 및 시제품 개발 (제4협동)	시제품 제조	100	- 제형, 포장용기, 포장 재질, 포장방법, 표기사항 - 원료의 특징을 잘 나타낼 수 있는 컨 셉트의 디자인 개발
		시제품 유통기한 설정	100	- 시제품에 대한 가속실험을 실시하여 지표물질의 품질변화를 관찰하고 아레 니우스 방정식에 의한 유통기한을 설 정

제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

1. 연구개발결과의 성과 및 활용목표 대비 실적

가. 연구성과 목표 대비 달성도

(단위 : 건수)

구분	특허		신품종				(예시) 유전자원 등록	논문		기타 ¹ (훈포상)
	출원	등록	품종명 명칭등록	품종생산 수입판매 신고	품종보호			SCI	비SCI	
					출원	등록				
1차 년도	목표	1							2	
	달성	4							4	
2차 년도	목표	2					2	1	-	
	달성	5					2	5	1	
3차 년도	목표	2	2				2	1	-	
	달성	3	6				5	2	3	
계	목표	5	2				4	4	-	
	달성	12	6				7	11	4	

¹훈포상수상 : 농림수산식품과학기술대상 장관상 수상(제1세부, 윤은영, 2012. 09. 20.), 농업연구대상(제1세부, 윤은영, 2013. 12. 20.), 한국식품영양과학회 학술진보상(제1협동, 전미라, 2013. 11. 14.), 한국식품영양과학회 우수포스터 발표상(제1협동, 윤금주, 2013. 11. 15.)

나. 연구활용 목표 대비 달성도

(단위 : 건수)

구분	기술실시(이전)	상품화	정책자료	교육지도	언론홍보 ²	기타 ³ (심포지엄 개최)
활용건수	목표	5 (식품원료등록 2건 포함)			10	
	달성	6 (2,565,000원)	9*		156	1

²언론홍보 : SBS 뉴스(2014. 07), MBN 뉴스(2014. 07), CBS 라디오(2014. 09), KBS대구뉴스와이드(2014. 09) 등

³심포지엄 개최 : 곤충자원의 식·약용 소재화를 위한 심포지엄 개최(2012. 10. 26.)

*식품원료등록 2건, 제품출시 2건, 시제품개발 5건

2. 논문게재 성과

게재연도	제 목	학술지명	Vol.(No.)	비고
2012. 05	Primary cultures of <i>Drosophila melanogaster</i> gut cells for studies of intestinal stem cell regulation	Journal of Life Science	22(5)	1세부
2012. 02	Quality characteristics of Sulgi with added fresh of frozen red onions	한국식품영양과학회지	41(2)	1협동
2011. 12	Improving the Functional Quality of Kochujang Added with Red Ginseng and Fermented Wild Herbal Extract	한국식품영양과학회지	40(12)	1협동
2011. 11	Expression of <i>Bombyx mori</i> transferrin gene in response to oxidative stress or microbes	Journal of Life Science	21(11)	1세부
2012. 12	Molecular cloning and analysis of residues associated with iron binding of Spodoptera litura transferrin	Genes & Genomics (SCI)	34(6)	1세부
2013. 06.	In vitro BACE1 Inhibitory Activity of Geraniin and Corilagin from <i>Geranium thunbergii</i>	Planta Medica (SCI)	79(1)	1협동
2013. 02	국산 및 중국산 갈색거저리의 영양성분 및 유해물질 비교분석	한국식품영양과학회지	42(2)	1세부
2013. 03	흰점박이꽃무지의 식품원료화를 위한 전처리 조건 확립	한국식품영양과학회지	42(3)	1세부
2013. 05	Analysis of general composition and harmful material of <i>Protaetia brevitarsis</i>	Journal of Life Science	23(5)	1세부
2013. 06	Fatty acid composition and volatile constituents of <i>Protaetia brevitarsis</i> larvae	Prev. Nutr. Food Sci. (SCOPUS)	18(2)	1협동
2013. 06	갈색거저리의 식품 원료화를 위한 분말제조 조건 확립	한국잠사곤충학회지	51(1)	1세부
2014. 01	Anti-obesity effect of <i>Allomyrina dichotoma</i> (Arthropoda: Insecta) larvae ethanol extract on 3T3-L1 adipocyte differentiation	Entomological Research (SCI)	44	1세부
2014. 02	Effects of solvent fractions of <i>Allomyrina dichotoma</i> larvae through the inhibition of in vitro BACE1 and β -amyloid(25-35)-induced toxicity in rat pheochromocytoma PC12 cells	Entomological Research (SCI)	44	1협동
2014. 06	동결건조 갈색거저리 유충의 제조공정 표준화에 따른 자가규격 및 유통기한 설정	한국잠사곤충학회지	52(1)	1세부/4협동
2014. 06	Evaluation of Genotoxicity and 28-day Oral Dose Toxicity on Freeze-dried Powder of <i>Tenebrio Molitor</i> Larvae (Yellow Mealworm)	한국독성학회지	30(2)	3협동
2014. 06.	Mitochondrial Hsp90s suppress calcium-mediated stress signals propagating from mitochondria to the ER in cancer cells	Mol. Cancer (SCI)	13(148)	2협동
2014. 06.	Combination treatment with doxorubicin and gamitrinib synergistically augments anticancer activity through enhanced activation of Bim	BMC Cancer (SCI)	14(431)	2협동
2014. 08.	Hepatoprotective and antineoplastic properties of <i>Protaetia brebitarsis</i> Larvae	Entomological Research (SCI)	Accepted	2협동

3. 특허 성과

출원연도 (등록연도)	발명의 명칭	출원번호 (등록번호)	비고
2011. 11. (2014. 06)	독소루비신 및 개미트리닌을 유효성분으로 포함하는 암치료용 약학조성물	10-2011-0121724 (10-1406278)	2협동
2012. 06 (2014. 04)	흰점박이꽃무지를 유효성분으로 포함하는 염증성 질환의 예방 및 치료용 조성물	10-2012-0066121 (10-1382400)	1세부
2012. 06 (2014. 01)	식용 흰점박이꽃무지 유충 분말의 제조방법	10-2012-0066122 (10-1359507)	1세부
2012. 03 (2013. 11)	초과리 장세포의 일차배양 방법 및 상기 방법에 의해 배양된 장세포	10-2012-0031296 (10-1334856)	1세부
2012. 08	지방산 비율을 이용한 국내산 갈색거저리의 관별 방법	10-2012-0091705	1세부
2012. 11 (2014. 05)	갈색거저리 추출물을 포함하는 치매 예방 또는 치료용 조성물	10-2012-0126884 (10-1404566)	1세부/1협동
2012. 11 (2014. 07)	갈색거저리 유충을 포함하는 염증성 질환 치료용 조성물	10-2012-0126880 (10-1424125)	1세부
2013. 01	흰점박이꽃무지 현탁액의 제조방법 및 이를 포함하는 항비만 조성물	10-2013-000430	1세부
2013. 04	꽃무지를 유효성분으로 포함하는 알츠하이머성 치매 예방 및 치료용 약학 조성물 및 알츠하이머성 치매 개선용 식품조성물	10-2013-0044532	1세부/1협동
2013. 10	갈색거저리 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 포함하는 항암용 조성물	10-2013-0130661	1세부/2협동
2013. 11	식용 갈색거저리 유충 분말의 제조방법 및 이를 통해 제조된 식용 갈색거저리 유충 분말	10-2013-0132869	1세부
2014. 10.	흰점박이꽃무지 유충 또는 이의 분획물을 유효성분으로 포함하는 항암용 조성물	10-2014-0135592	1세부/2협동

4. 기술료 징수 현황

사용기간	대상 특허	이전업체	징수금액(원)	비고
2013. 3. 26.~2014. 3. 25.	갈색거저리 유충을 포함하는 염증성 질환 치료용 조성물 (10-2012-0126880)	월드웨이(주)	540,000	1세부
2013. 3. 26.~2014. 3. 25.	식용 흰점박이꽃무지 유충 분말의 제조방법 (10-2012-0066122)	월드웨이(주)	810,000	1세부
2013. 3. 26.~2014. 3. 25.	흰점박이꽃무지를 유효성분으로 포함하는 염증성 질환의 예방 및 치료용 조성물 (10-2012-0066121)	월드웨이(주)	540,000	1세부
2014. 9. 28.~2015. 9. 27.	식용 흰점박이꽃무지 유충 분말의 제조방법 (10-2012-0066122)	월드웨이(주)	135,000	1 세부
2014. 9. 28.~2015. 9. 27.	식용 갈색거저리 유충 분말의 제조방법 및 이를 통해 제조된 식용 갈색거저리 유충 분말 (10-2013-0132869)	월드웨이(주)	432,000	1 세부
2014. 9. 28.~2015. 9. 27.	흰점박이꽃무지를 유효성분으로 포함하는 염증성 질환의 예방 및 치료용 조성물 (10-2012-0066121)	월드웨이(주)	108,000	1 세부

제 6 장 참고문헌

1. Anderson AJ, Pike CJ, Cotman CW. Differential induction of immediate early gene proteins in cultured neurons by β -amyloid: association of c-Jun with β -induced apoptosis. *J Neurochem* 65: 1487-1498 (1995)
2. Cheeler F. Processing of the beta-amyloid precursor protein and its regulation in Alzheimer's disease. *J Neurochem* 35: 1431-1444 (1995)
3. Gao J, Winslow SL, VanderVelde D, Aube J, Borchardt RT. Transport characteristics of peptides and peptidomimetics: II. Hydroxyethylamine bioisostere-containing peptidomimetics as substrates for the oligopeptide transporter and P-glycoprotein in the intestinal mucosa. *J Peptide Res* 57: 361-373 (2001).
4. Huis van A, Van J, Harmke I, Esther K, Afton M, Halloran, Muir H, Bantomme P. Edible insects-Future prospects for food and feed security. *FAO FORESTRY PAPER* (2013).
5. Luo Y, Balon B, Kahn S, Bennett BD, Khan SB, Denis P, Fan W, Kha H, Zhang J, Gong Y, Martin L, Louis JC, Yan Q, Richards WG, Citron M, Vassar R. Mice deficient in BACE1, the Alzheimer's β -secretase, have normal phenotype and abolished β -amyloid generation. *Nature* 4: 231-232 (2001).
6. Pike CJ, Burdick D, Walencewicz AJ, Glabe CGm Cotman CW. Neurodegeneration induced by beta-amyloid peptide in vitro: the role of peptide assembly state. *J Neurosci* 13: 1676-1687 (1993)
7. Wolfe MS. APP, notch and presenilin: molecular pieces in the puzzle of Alzheimer's disease. *Int. Immunopharmacol.* 2: 1919-1929 (2002).
8. Yuan J, Yanker BA. Apoptosis in the nervous system. *Nature* 407: 802-809 (2000)
9. 강일준, 김하경, 정차권, 김수진, 오덕환. 굼벵이의 섭취가 에탄올 투여 흰쥐의 지질대사에 미치는 영향. *한국식품영양과학회지* 29: 479-484 (2000).
10. 박호용, 박순식, 신상운, 박두상, 정태숙, 손광희, 김미광, 신동하 서은영, 김정화, 장정순, 김신덕. 곤충유래 유용물질 탐색 및 자원화 기술개발. *한국생명공학연구원* (2005).
11. 이상한, 허진철, 박자영, 김성욱, 장규태. 약용곤충추출물을 이용한 생리활성 물질의 초고속 스크리닝 및 산업적 응용. *경북대학교* (2006).
12. 이진희, 송명중, 양혜정, 방면호, 정동준, 김영채, 김세영, 노영덕, 정성현, 백남인. 장수풍뎅이 유충으로부터 지표성분(Inosine)의 분리 및 정량분석. *한국응용생명과학회지* 49: 334-338 (2000)
13. 전정우, 권해용, 조유영, 여주홍, 이희삼. 사염화탄소에 의해 유발된 흰쥐의 간독성에 미치는 흰점박이꽃무지 추출물의 간보호 효과. *한국잡사곤충학회지* 50: 93-100 (2012)

주 의

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