발간등록번호
11-1543000-000744-01

항비만바이오신소재사업단

(New BioMaterials Center for Antiobesity)

성신여자대학교

식품영양학과 (비만과학연구소)

농림축산식품부

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “기술사업화지원사업” 과제 (세부과제 “항비만바이오신소재사업단)의 보고서로 제출합니다.

2014 년 11 월 20 일

주관연구기관명 : 성신여자대학교
주관연구책임자 : 이 명 숙 (식품영양학과)
세부연구책임자 : 전 용 필 (생명과학·화학부)

협동연구기관명 : 경기대 대체의학대학원
협동연구책임자 : 김 애 정 (식품치료전공)
협동연구기관명 : 고려대학교
협동연구책임자 : 이 철 구 (생명공학부)
협동연구기관명 : 경희대학교
협동연구책임자 : 임 윤 숙 (식품영양학과)
협동연구기관명 : 제주대학교
협동연구책임자 : 전 유 진 (해양의생명과학부)
협동연구기관명 : 한양대학교
협동연구책임자 : 박 용 순 (식품영양학과)
협동연구기관명 : 우송대학교
협동연구책임자 : 손 영 호 (국제경영학부)
협동연구기관명 : 가천대학교
협동연구책임자 : 최 철 수 (국가지정 대사성질환 약리효능 평가센터)
협동연구기관명 : ㈜서진바이오텍
협동연구책임자 : 김 학 주
협동연구기관명 : 아쿠아그린텍㈜
협동연구책임자 : 장 지 태
협동연구기관명 : ㈜고을
협동연구책임자 : 임 범 균
협동연구기관명 : ㈜마린바이오
협동연구책임자 : 이 배 진
협동연구기관명 : ㈜동진제약
협동연구책임자 : 김 재 경
협동연구기관명 : (주)헬스케어크레임스엔드멘내지멘트
협동연구책임자 : 하 기 찬
협동연구기관명 : ㈜바이오톡스텍
협동연구책임자 : 강 종 구

요 약 문

Ⅰ. 제 목

관리번호	811003(1-3)	공개가능여부	■가 □부
사 업 단 명	항비만 바이오 신소재 사업단 (NBiCA)		
연구사업단장	(성 명) 이명숙	성신여자대학교 식품영양학과 (비만과학연구소)	
색인어 (5개 이내)	ATM 염증 비만 모델, 줄기세포, Yeast Genomics, 당뇨형비만 예방, 항비만 유효타겟물질 DB 구축		

Ⅱ. 연구성과 목표 대비 실적 (질적 및 양적)

(1) 1 년차 (2011-2012)

핵심별 목표	연구개발 실적	달성도
1-1: ATM 모델과 지방유래 줄기 세포 모델을 이용한 항염증성 비만연구	○ ATMΦs model 표준화 시험/표지물질 screening (추가:ATMΦs의 in vivo적용 및 염증마커 확보) ○ 피하지방 및 복부지방 줄기세포주 확보/배양 및 대량생산기반 구축	150%
1-2: Genomics와 *in vivo* DIO 모델을 이용한 농수산물 유래 항비만 유효소재의 항염증성 기전규명	○ DIO mouse model을 이용한 염증유도 관련 항산화조절기전 규명 (추가: 반복시험시행) ○ 효모세포 기반 항비만 잠재소재 탐색 및 DIO 결과관련 표지물질의 항산화성 검사(추가)	150%
2-1: 핵심기술을 활용한 흑삼제조 공정 표준화/항비만 제품개발	○ 흑삼 제조 시 막걸리의 응용방안 강구 ○ 흑삼추출물의 안전성/일반분석(ginsenosides 포함) 분석완료. (추가) ○ 시제품제작 3건, 특허출원 2건, 상표출원 2건, 비SCI 논문 2건, 언론홍보 1건	150%
2-2: 항비만 소재 분류/DB 구축 및 추출물 전임상 실험	○ 항비만 소재 분류/DB 1000건 구축(214건 추가) ○ 농수산물 추출물 5종 전임상 실험 (추가: 표지 물질 8종 확보)	200%
2-3: 수산물 유효소재 (미더덕, 감태, 모자반)의 항비만표지 물질 규명	○ 수산물 유효소재 대량생산 시스템 구축 및 소재 대량 확보 ○ 수산물 유효소재의 다양한 생리기능성 확인 (체중감소 이외 항산화, 항당뇨, 항고혈압 등)	100%
Total 평균		**150%**

(2) 2 년차 (2012-2013)

핵심별 목표	연구개발 실적	달성도
1-1: 검정콩 표지물질인 3G/D3G의 항비만 효과를 재검증하기 위하여 원료, 소재, 공정과정표준화, 독성/안전성 및 반복성 검사시행	○ 원료 및 지표성분의 표준화; 원료지표물질의 표준화를 위하여 원료대비 추출수율, 추출물 대비 안토시안 확보율 ○ 일반성분,색도 pH, 미생물, 중금속 분석 ○ 지표물질의 항비만 유효성 검증 (in vitro, in vivo 시험) & 인체유효시험 농도 결정 ○ 효모세포 기반 검정콩소재 유래 단일물질인 C3G, D3G의 항비만 및 항산화능 확인. ○ 발현유전체 연구기반으로 항비만 기전 탐색을 통한 항비만 소재 가치 확보 및 항비만 표적 마커 발굴	200%
1-2: 녹두의 원료, 소재, 공정과정표준화, 독성/안전성 검사시행	○ 녹두 로스팅 공정 표준화 ○ 로스팅 녹두 및 기타 항비만 식품소재를 활용하여 티백차 형태의 시제품 제조 ○ Roasted 녹두티백의 간이임상실험 실시(관능평가추가) ○ 원료/지표성분 및 공정과정의 표준화 ○ 단백질 정량, 총당, 항산화 활성, 미백활성 등 영양성분 분석 추가	140%
1-3: 표지물질인 vitexin의 항비만 효과를 재검증	○ 각 부위 줄기세포주 doubling time을 기반하여 Golden standard화를 위한 지속적 반복 ○ 지표유효성분이 줄기세포 및 3T3 L1 세포 수준에서 미치는 영향 분석 ○ screening system을 이용한 주요 공정 과성 산물의 생리활성 효능 분석	140%
2-1: 감태의 표지물질인 dieckol의 항비만 효과를 재검증하기 위하여 원료, 소재, 공정과정표준화	○ 유효수산물(감태)로부터 유효 성분 대량시스템 구축을 통한 기능성 유효소재의 표준화 ○ 고농도 제품의 표준화 공정시스템 개발, 제형개발 ○ 독성 및 안전성 평가 추가	150%
2-2: DIO mouse 모델을 이용한 유효물질의 항염증, 항비만 기능성 및 독성 검증	○ 체지방축적, 에너지소비, 에너지대사 조절 ○ 항 염증 기능성 평가를 위한 염증성 마커의 mRNA 및 protein 발현 측정 ○ 간 및 조직 내 독성 평가	100%
2-3: 다시마의 소재, 원료, 공정과정의 표준화 및 독성/안전성 검사시행	○ 다시마를 이용한 최적 추출공정 개발 및 최적 전처리 공정 개발을 통한 기능성 물질의 최적화 생산공정 표준화 ○ 물리 화학적 특성 규명 및 소재의 표준화를 위한 기능(지표) 성분분석법의 표준화 ○ 식품섭취억제 및 수분섭취억제 시험	100%
2-4: 표지물질인 glutamate와 GABA의 항비만 효능 검증 및 항비만소재 DB 구축	○ 항비만 keyword로 obesity, appetite, 3T3-L1, lipid, fat, adipocyte, weight, diet, AMPK를 사용한 비만연구 검색. ○ 1차년은 농산물, 2차년은 해양생물 346건 구축	100%
Total 평균		**132.9%**

(3) 3 년차 (2013-2014)

핵심별 목표	연구개발 실적	달성도
1-1: 비만개선용 개별인정 소재의 전임상 및 임상 시험	**①개별인정을 위한 임상시험 시행 [성신여대]** ○ 비만개선용 개별인정 소재(안토시안-rich 검정콩껍질 추출물)의 임상시험결과의 validation 검토 • 소재의 독성 test (GMP 기관) • IRB 승인/피험자동의서, 시험진행의 타당성, 통계처리 보고서 • CRO기관과 임상시험기관과의 협력성 • 개별인정신청을 위한 타당도 검증 ○ 1 & 2차년 전임상연구와의 replication (추가: 전임상시험 간 비교) **② 안전성 및 안정성 test** **③ 유효 농수산물 대상 전임상 반복시험** (가천의대 협력) ○ 농산물 수산물중 1건 반복시험예정. (추가: 각각 1건씩 총 2건) ○ 항비만의 예방(prevention) 및 치료(treatment)시험방법 분리 (추가)	150%
2-1:비만개선 기능성 소재를 이용한 상품화 및 산업화 기반 구축	**① 검정콩껍질 에타놀추출물 소재의 표준화 및 제형적합성** ○ 소재 및 표지물질(C3G, D3G)의 표준화 및 공정과정표준화, 소재의 중금속 및 영양성분 분석, 소재의 재형성 및 시제품개발을 확립함. **② 추출과정의 부산물을 이용한 제품화기술개발** ○ 부산물 0, 3, 6, 9, 12% 식빵 및 부산물 0, 2, 4, 6, 8% 쿠키를 제조한 후 관능평가 및 9대 영양소 분석 ○ 빵 시제품 출시(2014. 07. 21.) ○ 빵과 쿠키 시제품의 색도, 물성측정, 항산화 4종, 항균활성측정 ○ DPPH radical 소거활성,ABTS radical 소거활성, Total polyphenols contents 총 페놀함량(항산화 활성 1종 추가 측정)(>110%), 미생물 6종(*S.aureus, S.epidermidis, B. subtilis, B. cereus, E. coli, S.typhimurium* 등)분석(>150%)	120%
2-2: 항비만소재의 기전연구 및 제품개발기반 구축	**① 산화적 스트레스 과부하세포에서의 항비만소재 표지물질의 효능 평가 (Yeast 모델 적합도 시험)** ○ 항산화 효능 평가 시스템 구축 및 C3G의 항산화 효능 평가: 결실 효모 종을 제작하여 항산화 효능 평가 시스템을 구축함. 이 시스템으로 C3G의 항산화 효능을 평가함.	100
	② 항비만소재 표지물질의 지방줄기세포 분화기작 규명 (줄기세포 모델 적합도 시험) ○ 지방줄기세포의 분화 단계에 따른 C3G와 D3G의 영향을 세포수준 및 분자 수준에서 분석 및 확증, ○ lineage 관련한 지방전구세포의 분화에 미치는 영향 분석(추가분석)	130
	③ 제품개발 기반구축 [비만과학연구소 & 컨설팅] ○ 비만 농수산물소재의 DB 구축 완료 ○ 산업화기반구축을 위한 자문/컨설팅 ○ 시제품 경제성 분석 ○ 개발된 시제품 선호도 분석기술이전을 위한 자문/컨설팅	100
Total 평균		**120%**

(4) 정량적 실적대비 (자체평가보고서 자료활용)

구 분	지식재산권		논문		학술발표	기술거래	교육지도	사업화	기술인증	인력양성	정책활용	홍보전시	기타	
	출원	등록	SCI	비SCI									시제품	임상시험
최종목표	7	3	8	12	-	3	3	1	-	29	-	3	5	-
연구기간 내 달성	7	0	8	13	25	3	13	7	-	66	-	7	11	1
달성율(%)	100	-	100	108	250	100	433	700	-	227	-	233	220	100

실적달성 작성지준

1) 특허 출원: 7개 완료. 2014.11.13. 현재까지 등록은 없으나 계속 추진중임

2) SCI 논문: 특허와 관련된 SCI논문이 2차년(2013년)에 출원 후 3차년(2014년)에 제출되어 accepted 2건, revised 1건을 포함하여 실적을 완료함. 그러나, 추가실적으로 심사중 1건, 투고중 3건 등 SCI급 논문4편이 포함되면 150% 초과달성 예정.

3) 비SCI 논문: 항비만사업단의 기관(성신여대) matching지원금으로 게재된 논문 4건 포함.

4) 학술발표: 계획단계에서 목표가 없었음

5) 기술거래: 기술지도한 상품화실적 3건으로 표기. (기술이전은 아님)

6) 사업화: 상품화실적(기술거래 실적)을 포함하여 원료 및 상품판매실적 등을 표기.

7) 정책활용: 계획단계에서 목표가 없었음

8) 기타: 시제품 11건 (상품화실적 3건 포함), 임상시험 1건,

Ⅲ. 연구개발의 목적 및 필요성

연구개발의 목적
첨단과학기술(New 생물바이오시스템: ATM 염증-비만모델, stem cell, Yeast DNA microarray등)을 바탕으로 국내 농림수산식품으로부터 비만개선용 신소재 및 bio-지표물질을 확보함으로써 ① Gene, mRNA, 단백질수준에서 **비만관련 기전의 상관성 및 기작규명** (체지방개선, 염증성 adipokines 발현조절) ② 지표물질으로부터 건강기능식품을 산업화하여 **세계기능성식품 시장에서의 우리농수산물의 국가경쟁력을 향상함** ③ 성인 10명중 3명꼴로 발생하는 비만을 예방■치료함으로써 **국민건강개선 및** 국가의료비 저감화를 목적으로 함.

연구개발의 필요성	
비만인구 증가 및 항비만 식품요구도 증가	• 한국의 비만증가율은 1998년(25.1%)이후 10년간 (2010년:36.3%) 1.5배 증가. • 특히, 초고도비만의 급증(2001년: 0.74%, 2011년: 1.26%) 30-40대 남성복부비만증가, 폐경기이후 여성비만 증가, 소아청소년비만 증가(25%> OECD 23%) 도시형비만(서울시민 4명 중 1명꼴) 등의 특징을 보임. • 스스로비만임을 인지하지만 운동 및 식사요법 등을 비롯한 생활습관변경 등을 모색하는 경우는 희박. • WHO에 따르면 비만은 “21C 신종 전염병”으로 규정하고 비만시장은 전 세계적으로 매년 20%이상 성장하고 있는 추세로 비만과 대사질환을 치료하는 약물과 기능성식품개발은 필수적임. • ‘한국건강기능식품협회’에서 소비자를 대상으로 건강기능식품 기능성 우선순위를 조사한 보고에 의하면 1위 비만 38%, 2위 면역력 증진 22%, 그리고 3위가 아토피 순으로 비만의 관심도가 높음.
항비만 연구시스템 문제	• 항비만소재 스크리닝기법 문제: In vitro 시스템에서 항비만 및 대사질환 효능개선을 신속하게 스크리닝할 수 있는 도구의 제한성으로 Good biomodel을 바탕으로 한 One-Targeting biomarker 개발이 시급함. • 재현성문제: *In vitro* 결과의 *in vivo* 시험상의 상호 재현성부재 원인파악 시급. • 학제간 연구문제: 식물유래 소재와는 달리 해양소재인 경우 기능성 효율이 매우 좋으나 특유의 비릿 내와 짠 맛 때문에 원료사용이 제한적임. 따라서 발효공법 및 새로운 공화학적 공법분야 등 학제 간 network을 통한 효율적 연구필요. • 국가차원의 R & D지원: 건강기능식품을 추출물 등 복합성분의 효능검사를 통한 전임상 결과만으로 인체효능의 effect size를 결정하기 어려우므로 반드시 임상시험이 필요하므로 국가적 지원이 필요. • **다양한 항비만소재 스크리닝법 및 다양한 비만기전규명 등을 위하여 새로운 in vitro 및 in vivo model 개발이 시급함.**
항비만 기능성소재의 산업화 부진 (한국농산물의 신소재개발 시급)	• 2007년도 ‘바이오푸드네트워크 사업보고서’에 의하면, 기업체의 향후 우선 연구분야로 1위 비만, 2위 면역기능, 3위 고지혈증, 4위 당뇨 등으로 비만이 우선순위를 차지하지만 항비만기능성소재의 산업화는 미비함. • IRB(Institutional Review Board)의 문제: 대부분의 병원의 임상 IRB심의 기준이 약품에 맞춰져 있기 때문에 건강기능성 식품을 심사대상에서 제외하는 경우가 다수 발생하여 임상시험에 어려움. (Ex: 용량 및 순응도 등 이유로 placebo 제조가 불가능한 경우에 이를 위한 보조적 GLP 산업의 활성화 지원 필요) • 건강기능성 식품은 약물에 비하여 결과가 나타나는 효능시간이 매우 길어서 부정확한 결과로 인한 오해가 과학적 근거마련에 저해요인이 되므로 정부중심의 표준화된 연구시스템 지원 및 network 구성 필요. • 국민 의료수가 부담의 저감화를 위해서, 만성적 염증질환 모델을 기반으로 한 임상중재 연구를 통한 기전을 규명하고 이를 토대로 한 기능성식품 개발을 포함한 다각적 분야(의학, 한방, 식품 생명과학 등)의 노력이 절실. • **합성의약품의 부작용 사례때문에 천연물치료제 필요성으로 확대된 세계 기능성식품시장에 대항할 한국농산물의 신소재개발과 국가경쟁력향상을 위하여 정부가 나서야할 때임.**

Ⅳ. 연구개발 내용 및 범위

단계별 추진목표	추진내용	수행연구 범위
1차년 항비만기능성 소재후보설정 스크리닝	항비만 소재중심 스크리닝 (농산물, 수산물)	• 농수산물 소재 >5종 대상(흑삼,검정콩,녹두,진피, 뽕잎, 오디, 감태, 모자반, 미더덕, 톳, 다시마, 우뭇가사리 등) • 표지물질(gensenosides, anthocyanins, isovetexin, vitexin, genistein, chlorogenic acid, phlorotannins, diechol, GABA, peptides, 한천 등) 검증
	새로운 항비만 소재 스크리닝 도구 개발 및 표준화	• 기존방법의 반복성 (3T3L-1 in vitro & DIO in vivo) • **새로운 방법모색** (ATMΦs 및 Co-culture model, 피하 및 내장지방조직 유래 stem cell, Yeast DNA microarrays, ATMΦs과 IHC 연관성 system 등) • 새로운 모델을 중심으로 염증성비만의 표적유전체발현 기전을 규명하여 항비만 후보물질 기능성 검증 및 표준화/제어 기반지식 구축 표준화
	농산물 항비만 소재 분류/DB구축	• Pub MED와 Web of Science 이용: 국외논문대상 검색 • 녹차 789건, 해조류 94건, 마늘 72건, 인삼 60건, 포도 48건, 버섯 45건, 양배추 43건, 생강 24건, 고추 22건, 메밀 14건, 치커리 9건 등 총 1,214건 DB화.
2차년 검정콩, 녹두, 감태, 다시마 소재의 표지 물질을 중심으로 항비만 효과 검증	소재의 공정 표준화개발	• 원료 및 소재의 표지물질 수율확보를 위한 생산공정의 최적화 및 표준화 시스템 개발
	항비만기작 규명	• C3G/D3G-rich 검정콩껍질추출물의 **항비만효능시험** (1차 표지물질을 이용하여 ATMΦs model을 이용한 신소재의 표지물질의 2차 In vitro ATMΦs model의 표준화 및 phenotypes와 In vivo 효능검증) • Vitexin/isovitexin-rich 녹두껍질의 항비만효과 (지방줄기 세포 & yeast genomics 이용, DIO in vivo) • **로스팅녹두의 중년여성대상 short term 비만개선효과** • Diechol-rich 감태의 농도의존적 항비만효과 (DIO, SHR & db/db mice in vivo) • GABA/Glutamate-rich 다시마의 식품섭취억제효과 (DIO in vivo)
	수산물 항비만 소재분류/DB구축	• 미세조류 110건, 해조류 65건, 미역 61건, 다시마 31건, 모자반 30건, 조개류 28건, 감태 7건, 패 6건, 톳 5건, 우뭇가사리 3건 등 총 346건 DB화
3차년 항비만 기능성 소재의 개별 인정기반 구축	독성, 안전성 test	• 원료 추출물의 독성 및 안정성, 반복인증검사(실험실) • **GMP기관:** 단회 경구투여 독성시험, 복귀돌연변이시험, 유전자돌연변이 유발성, 염색체이상시험, 소핵시험 시행
	개별인정근거 마련을 위한 임상시험	• 유효소재 대상 전임상 반복시험 (기작규명: GLP기관) • **검정콩껍질 추출물을 이용하여 비만인 대상 임상시험:** 8weeks, double-blinded, test-placebo(CRO 기관연계) • 개별인정신청을 위한 타당도 검증
	산업화기반 구축	• 소재의 표준화, 제형적합성 및 제품표준화공정 시스템개발, 시제품제조 및 제형적합성 (콩껍질추출물 시제품) • 추출과정의 부산물이용: 기존 제품보다 영양, 관능적으로 우수한 제품 개발 (영양, 항균성분석 완료) • 산업화기반구축을 위한 자문/컨설팅

Ⅴ. 연구개발결과

1) 항비만기능성 Screening 결과

① 3T3L-1 *in vitro* 시험

○ 추출물

- 흑삼 1-9포 열수추출물: 농도의존적으로 세포생존율 증가. 지질축적도 영향이 없음.
- 흑삼 1-9포 에탄올추출물: 5포와 9포 중 5포의 결과가 진피추출물와 함께 3T3L-1 세포생존율 및 지질축적 모두 농도 의존적으로 유의적으로 감소.
- 녹두껍질 및 검정콩껍질 에타놀추출물: 300ug/ml까지 증가하여도 세포의 생존율에는 변화가 없으며 고농도 처치시 세포내의 지질축적은 50%까지 감소하는 경향. 검정콩 추출물(100-1000 ug/ml)은 농도의존적으로 PPAR-r, C/EBP-a와 지방구내 지질합성 key-Enz인 ACC발현을 억제함.
- 톳, 미더덕, 다시마 & 감태 에타놀추출물: 톳은 세포생존율과 지질축적형상에 영향이 없으며 미더덕은 대조군보다 지방세포 분화 및 증식효과가 200%이상임. 감태의 경우 세포생존율 변화없이 300ug/ml에서 지질축적이 현저히 저하하여 가장효과적임. 다시마로부터 추출된 3종류의 표지물질 (glutamate 7%, GABA 5%, Glutamate:GABA= 5:5)추출물중에서 glutamate7%가 PPARr, HSL 단백질 발현에 효과적.

○ 표지물질

- 녹두와 검정콩의 표지물질인 vitexin과 C3G/D3G 처치: vitexin 50-200uM, C3G/D3G 100-200uM농도에서 지질축적이 50-60%로 감소하여 추출물과 표지물질의 경향이 일치함. C3G 200uM 투여 시 pro-inflammation marker인 TNF-a 를 감소, 항염증인자인 IL-10을 증가시킴. D3G는 100uM까지 IL-10을 증가시키다가 200 uM에서 감소.
- 감태추출물의 Dieckol: 25, 50, 100 μg/ml 의 농도로 처리하였을 때, 대조군에 비하여 농도의존적으로 oil red 염색부위가 감소하는 것을 확인함.
- 감태추출물의 유효 물질인 eckol, phloroglucinol, dieckol: phloroglucinol은 IC_{50}: >5 mM, eckol은 IC_{50}: 1.3 mM, dieckol은 IC_{50}: 315 μM을 나타내어, dieckol이 ACE 저해활성에 있어 다른 유효 물질보다 우수함

② ATMΦs & Co-culture model 시험

○ ATMΦs model

- **수산물**: 감태추출물 100-300ug/ml은 대조군에 비하여 M1인자인 TNF-a, MCP-1을 200%이상 억제하였고 미더덕 추출물 75-300ug/ml은 TNF-a을 200%이상 억제함.
- **농산물**: M2를 증가시키거나 유사한 효과를 가지는 소재로 흑삼 5포, 진피가 적은용량 75ug/ml에서 대조군보다 증가하였음. M1과 M2의 효과를 동시에 보이는 물질은 감태가 유일하였음.

○ Co-culture model

- 3T3L-1에 insulin 처치 2일후 RAW264와 HepG2 cell을 injection하여 배양 9일 째 Contact co-culture system: 녹두추출물은 marcrophage에 의하여 TNF-a, Il-6 모두 증가하였고 HepG2에 의하여 TNF-a, Il-10은 큰 변화가 없고 IL-6는 크게 증가함. 다른 추출물은 조건확인이 어려움.
- 3T3L-1에 insulin 처치 2일후 RAW264 injection에 의한 contact Co-Culture후 9일 째 염증인자 M1형 (MCP-1)과 M2형 (Il-10) 분비능 결과: 흑삼 5포와 진피추출물을 처치 시 농도가 증가할수록 M1도 약간 증가하였으나 M2가 M1보다 더 많이 증가함. 검정콩의 경우, 주정추출물보다 표지물질인 D3G 100uM의 항염증 효과가 매우 큼. 반면, 감태는 고농도에서 M1과 M2가 감소하나 M1이 더 증가함. 미더덕은 M2가 증가하다가 고농도에서 감소하였으나 M2가 M1보다 더 증가함.

③ H & E staining 과 mast cell IHC screening법

- 대조군에 비하여 HF군의 세포크기가 증가하였고 orlistat는 감소함. 추출물 중에는 흑삼 5포와 9포를 제외하고 대체적으로 HF보다 크기가 감소함.
- 대조군에 비하여 mast cell이 증가한 군은 HF, 흑삼 5포, 미더덕, 진피 등 이었고 대조군에 감소한 군은 orlistate임. 녹두, 검정콩, 톳 추출물은 대조군과 유사한 경향을 보임.
- 검정콩추출물의 C3G & D3G는 염증성-대식세포가 지방구를 감싼 crown-like structure (ATMΦs model M1)을 확인하고 자 Epididymal fat에서 Galectin-3 (Mac-2)항체를 이용하여 IHC시행한 결과 검정콩 투여로 M1형성이 억제 되었으며 이는 orlistst의 억제효과와 매우 유사함

④ 지방유래 줄기세포모델을 이용한 항염증성 비만 screening

- *In vivo* 상태에서 피하지방줄기세포와 복부지방줄기세포의 증식 속도를 비만 생쥐의 것에 비하여 감소시키는 표적물질은 흑삼 9포 , 미더덕, 톳이며 이외의 표적물질은 in vivo에서 피하지방줄기세포와 복부지방줄기세포의 증식 속도 억제 효능이 없음으로 분석됨.
- **농산물**: 흑삼 5포 에타놀추출물이 비만 형성에 미치는 영향: in vivo에서 피하지방줄기세포와 복부지방줄기세포의 증식을 억제하는 효과가 없으나, in vitro에서 피하지방줄기세포의 증식 속도가 감소하는 특징이 있음. 흑삼 9포는 in vivo에서 피하지방과 복부지방 줄기세포의 증식을 억제함.
- **수산물**: 미더덕은 in vivo와 in vitro의 모든 상황에서 피하지방줄기세포와 복부지방줄기세포의 증식을 억제함. 톳은 in vivo상태에서는 내장지방 줄기세포의 증식에 필요한 시간이 정상대조군과 유사하게 유지되어 비만 유도과정에서 톳을 처리하지 않은 것에 비하여 증식 속도가 감소하였음. 내장지방줄기세포의 특성이 정상대조군에 비하여 달라지지 않았음.
- **생쥐지방줄기세포이용**: 검정콩 및 녹두 추출물은 200 μg/ml 농도에서는 유효물질이 생쥐의 지방줄기세포가 지방세포 로 분화하는 것을 억제. 따라서 생쥐의 줄기세포를 이용한 screening system은 천연물 추출물이 지방줄기세포가 지방세포로 분화하는데 미치는 영향을 분석하는데 사용될 수 있음.
- **사람지방줄기세포이용**: 검정콩 추출물은 50 μg/ml 농도 이상에서 녹두 추출 물은 200 μg/ml 농도에서 유효물질이 사람의 지방줄기세포가 지방세포로 분화하는 것을 억제.

⑤ Yeast based Genomics Biosystem을 이용한 잠재적 항비만 소재 screening

- 뽕잎 (Mulberry Leaf extracts), 오디 (Mulberry Fruit extracts) 및 검은콩 (Black bean testa extracts) 추출물을 각각 yeast cell 내 지방 축적을 억제 시킬 수 있는 가능성이 있음.
- 감태, 미더덕, 녹두 추출물, 톳 추출물, 흑삼 5포 추출물, 흑삼 9포 추출물, 진피의 추출물은 yeast cell 내 지방 축적 억제효과에 유의한 차이를 나타내지 않음.
- 표지물질인 genistein 또한 yeast cell 내 지방축적억제효과에 유의한 차이를 나타내지 않음.
- 검정콩의 표지물질인 C3G & D3G: 효모세포내 total ROS(주로 H_2O_2)의 생성에 유의한 차이가 없음. C3G는 고농도(100 μM)를 처리했을 때 효모세포에서 mitochondrial superoxide의 발생을 감소시키는 효과를 보여주고 있음. (P value * < 0.05) D3G는 저농도에서 pro-oxidant 활성을 보이고 있으며, 고농도(100 μM)를 처리했을 때만 효모세포내 mitochondrial superoxide 양을 감소시키는 효과가 있으나 통계적 유의성이 약함.(P value * < 0.05) 따라서 결과를 종합해보면 C3G가 고농도에서 항산화 활성이 있음을 알 수 있고, 이 천연물에 대한 발현유전체 정보를 측정함.

⑥ Cox-2 inhibition rate(%)를 이용한 수산물의 항염증 screening (10mM indomethacin 대조)

- 10mM indomethacin의 항염증 활성 67.8%을 기준으로 감태(*Ecklonia cava*)가 72.8%로 가장 높음.
- 그 외 모자반 57.8%> 큰잎모자반 43.0%> 뼈지누아리 40.8%> 지충이 29.6%> 짝잎모자반 23.5%> 톳 20.1%> 우뭇가사리 13.0%> 진두발 15.0%> 패 *3.5%* >참까막살 2.4%> 파래 0% 등 순서로 나타남.

2) DIO mouse 모델을 이용한 항비만기전 규명

① 염증유도관련 항산화조절기전

- 고농도 감태추출물(HG)는 투여 6주차 이후 지속적으로 고지방 대조군(high fat diet; HF)과 유의적 차이를 나타났으나 흑삼 5포, 흑삼 9포, 톳은 차이가 없음.
- 부고환, 장간막, 후복막 및 서혜부 지방무게 합 (SUM-I): HF군에 대하여 감태에서 감소. 서혜부 지방(inguinal fat tissue)을 제외한 나머지 3 부위의 지방무게 합 (SUM-II; epididymal, mesenteric, and retroperitoneal fat tissue)은 흑삼과 감태에서 HF군에 비하여 감소.
- 혈중지질개선: 감태는 혈중 TG 및 TC수치 비록하여 동맥경화지수[(TC-HDLc)/HDLc]를 대조군 수준으로 낮춤으로서 지질개선에 효과를 나타냄. 흑삼은 5포보다 9포가 혈중 TG 저하효과를 보인 반면, HDLc는 9포가 더 증가함. TC 및 동맥경화지수는 CON 수준으로 낮춤.
- 지질과산화물 함량: 흑삼은 HF와 유의적인 차이가 없었으나 감태군 중 LG 군에서는 오히려 증가하는 경향을 나타났고 MG에서는 MDA를 낮추는 경향.

② 45% Fat-obese model (10주 DIO+12주 처치, high fat & Orlistat 대조)

- **체지방**: 부고환 및 장간막 지방이 감소한 녹두, 진피, 미더덕, 톳 및 검정콩 등의 추출물은 근육량이 증가하여 총 체중의 변화는 없음. 녹두 및 진피추출물: 체중에 비하여 부고환지방(epididymal fat)이 가장 크게 감소한 orlistat와 유사함.흑삼 5 & 9포, 미더덕, 톳: high fat보다는 약간 감소하였으나 orlistat의 효과보다 적은 경향임. 검정콩추출물은 부고환지방 증가, 장간막(mesentric fat) 지방은 가장 크게 감소.
- **혈액수치**: HF에 비하여 검정콩추출물만 FBS 및 TC 를 유의적으로 감소(Oristat 수준). 혈중 leptin은 부고환 지방세포가 감소한 진피 추출물에서 HF에 비하여 유의적으로 감소하였고 흥미롭게도 orlistat는 지방흡수감소, 체지방 감소와 함께 leptin분비도 억제함으로써 향후 leptin resistance이 우려됨.
- **간의 지질함량**: HF와 비교하여 간의 TG 함량은 미더덕> 녹두, 흑삼9포, 진피 및 검정콩 > 톳의 순으로 나타남. 간의 TC 함량은 녹두, 흑삼9포, 검정콩> 미더덕> 진피 순으로 미더덕과 톳이 간의 콜레스테롤함량을 저하시킴. 검정콩은 혈중 및 간의 TC를 모두 낮추는 효과를 보인 반면 녹두, 진피 및 톳은 혈중의 지질개선보다 간의 지질은 낮추는 효과를 보임. 따라서 간의 중성지방 합성 혹은 간의 지질 uptake가 감소한 것인지 향후 검증이 필요.
- **지질합성 및 분해(AMPK, ACC, PPARr, SREBP-1, FAS, LPL, HSL, CPT-1, UCP1) 단백질발현**: ACC감소 효과는 흑삼 9포, 녹구, 검정콩, 미더덕에서, C/EBP와 PPARr 감소효과는 흑삼과 미더덕에서, AMPK 증가효과는 검정콩, 미더덕, 톳, 감태에서 각각 나타남. 검정콩, 톳 및 감태추출물의 AMPK 발현효과가 가장 크며 톳의 경우 PPARr 발현을 억제함으로써 지방분해효과가 가장 큼. 녹두와 흑삼 9포는 PPARr의 발현이 증가하여 지방세포 증식이 예상됨. 지방합성마커인 FAS와 지방 축적과 관련된 인자인 LPL는 감태군에서 비만대조군에 비하여 농도의존적(100mg/Kg-500mg/Kg)으로 감소함. 또한 지방산의 산화를 촉진하는 CPT1과 열발생 UCP1 단백질발현은 감태의 저농도 처치군에서도 증가하였음.
- **지질합성 및 분해(AMPK, ACC, CPT, SREBP-1, FAS, LPL, HSL) mRNA발현**: ACC mRNA 발현 정도는 HF가 가장 크며 Orlistst과 미더덕이 대조군과 비슷한 수준이며 나머지는 지방산 합성인자인 ACC를 억제함. 반면 검정콩과 톳이 HSL mRNA발현을 증가시킴으로써 중성지방분해를 대조군의 200-400배 가량 증가시킴.
- **염증발현인자들 (iNOS2, COX-2, leptin, CRP, p-iKB-a, IKB-a, IL-6, IL-10, TNF-a, 등) 단백질발현**: HF에 비하여 검정콩과 톳은 M1인자인 IL-6을 2-3배 가량 증가시키지만 2가지 추출물이 M2 인자인 IL-10을 동시에 발현시킴으로써 M2인자로써 Arg1의 추가분석을 고려중임. P-iKB-a/IKB-a 비율은 HF보다 모두 낮으며 흑삼 5 & 9포, 녹두, 진피 및 톳이 모두 염증발현을 억제하는 상위신호체계를 발현시킴. COX-2와 CRP의 수준은 비만시 증가하나 감태 고농도 투여에 의해 정상 수준으로 낮아짐.

③ 60% fat-DIO(10주+ 추출물처치)를 이용한 항비만 시험

○ 검정콩껍질 추출물의 농도의존시험(125mg/Kg, 250mg/Kg) 12주 처치

- **체지방(Micro-CT) 결과**: 125mg/Kg(C3G+D3G=1.56mg/Kg), 250mg/Kg(C3G+D3G=3.23mg/Kg)처치군은 HF에 비하여 visceral fat이 각각 10, 20% 각각 감소. 내장지방의 total volume과 해부 후 mesenteric fat(g)결과와 일치함. 250mg/Kg 처치군은 visceral fat 및 leptin 분비도 감소됨.
- TNF-a는 세포실험 결과에서 200uM에서 감소하듯이 250mg/Kg에서 감소하여 추출물 농도에 매우 민감한 반응을 보임. 125 및 250mg/Kg 처치군은 HF에 비하여 adiponectin 분비를 증가시키며 오히려 CON 보다 증가함.

○ 한천포함 우뭇가사리 에타놀추출물 (300mg/Kg) 12주 처치

- 총체중 및 총지방량의 감소는 차이가 없었으나 피하지방의 감소가 현저하였는데 근육의 증가, 혈중 leptin 및 인슐린 감소와 관련이 있음. 또한 부고환 지방에서 MCP-1 & TNF-a항체를 이용하여 IHC를 시행한 결과. M1형성이 억제됨.
- 혈당억제: OGTT검사 시 120분 후 대조군 유사하게 혈당이 감소함 고지방식이와 유의적인 차이를 보임.

○ 한천 free-우뭇가사리 에타놀추출물 농도의존실험 (250, 300, 500, 1000mg/Kg) 8주 처치

- **Prevention study**: 모든 처치 군에서는 체중, 식이섭취, 혈중지질(콜레스테롤, 중성지방, 혈당) 등 이 어떠한 경향도 나타나지 않아서 우뭇가사리의 항비만 prevention 효과는 없다고 판정함. 단 총지방량과 근육량의 비율차이를 살펴보면, 250mg/Kg 처치군에서 유의적으로 감소하였는데 이는 250mg/Kg 처치군에서 근육량(QD)이 가장 크게 증가한 것이 원인으로 나타남. Epididymal fat에서 anti-inflammation 인자인 IL-10을 분석한 결과 유의적으로 항염증 효과가 있는 것으로 나타남. ($p < 0.05$) 특히 GA-500 mg/kg의 농도까지는 농도 의존적으로 효과가 증가하였으나, 고농도(GA-1000 mg/kg)에서는 오히려 다시 감소하는 추세를 보임.
- **Treatment Study**: GA-300mg/Kg 에서만 체지방(mesentric fat)양이 감소하였고 기타 투여군에서는 체지방의 감소 효과가 없는 현상은 food intake가 증가하였기 때문으로 보임. 혈중지질은 모든 처치군에서 유의적인 차이가 없으며 300 mg/Kg 투여군에서만 대조군에 비하여 혈당감소를 보임. Epididymal fat에서 anti-inflammation 인자인 IL-10을 분석한 결과, 한천을 포함하지 않은 우뭇가사리의 에타놀 추출물의 항염증 효과가 모든 처치군에서 대조군에 비하여 유의적으로 증가함. ($p< 0.05$)

④ *db/db* mouse model의 Diechol rich 감태추출물의 항당뇨, 항비만, 항산화 효능평가

- 항당뇨: Dieckol 20mg/kg을 처리시 혈중 인슐린감소가 현저 dieckol 10, 20mg/kg의 처리시 p-AMPK와 p-AKT 단백질의 발현량 증가.
- 항산화: dieckol 10, 20 mg/kg 처리시 대조군에 비하여 SOD와 GR항산화효소발현증가하고 MDA 생성이 감소함.

⑤ SHR mice에서 미더덕의 항고혈압 효능

- 미더덕 가수분해물로부터 ACE 저해 및 혈관확장 효과를 가지는 펩타이드를 분리한 결과 Ala-His-Ile-Ile-Ile의 분자량 565.3 Da의 펩타이드임. 이를 SHR (선천성고혈압쥐) 동물모델에 경구투여 후 Tail-cuff method를 통하여 24시간혈압을 측정함. 대조군으로 사용되어진 Amlodipine(칼슘채널 차단제) 보다는 약하지만 시간이 경과 할수록 생리식염수 투여군 보다 혈압강하가 우수함. 또한 12시간째 amlodipine 투여군과 비슷한 혈압강하효과를 보임.

3) 인체-임상시험

① 로스팅 녹두 티백 차 섭취가 중년여성의 비만개선효과 (Acute 임상시험)

- 시료: 로스팅한 녹두(12g)를 70℃ 물 100 mL에 10분간 침출함. (관능검사 기반).
- 대상자: 서울시에 거주하며 질병치료 및 약물복용을 하지 않는 평균 연령 52.80± 5.73세, BMI>25 과체중 중년여성으로 대조군(10명: 동일량의 물섭취)과 실험군(10명: 로스팅 녹두 티백차 섭취)으로

무작위 배분함. 실험군은 1일 3회 녹두 티백차(약 12g)를 4주 동안 식사 후 음용하게 하였으며 별도로 식사제한은 하지 않았음.

- 체지방 및 신체지수: 실험 전/후 대조군과 실험군의 체성분의 변화는 없으나 녹두 티백차 4주 섭취 후 체지방량과 WHR이 감소 경향(유의성 없음). 실험기간의 연장으로 녹두종피에 함유된 생리활성물질인 vitexin과 isovitexin의 비만 개선 효과가 있을 것으로 기대.
- 혈중지질개선: 대조군과 비교하여 **녹**두 티백차 2주, 4주 섭취후 혈중 TC가 유의적으로 감소함. 혈중 TG는 녹두 티백차 4주섭취 후 유의적인 감소를 보임. 즉, 녹두종피에는 vitexin과 isovitexin 뿐만 아니라, 지방산과 복합다당류의 복합체가 존재하므로 혈중 TC 감소효과가 나타난 것으로 보임.

② 검정콩껍질 추출물임상시험 (8weeks, double-blinded, test-placebo;CRO 기관연계)

- **대상자**: 만 19세 이상, 65세 이하인 성인 남녀중 검사당시 BMI>25kg/㎡ 이상 또는 허리둘레가 남성> 90cm, 여성> 85cm 이상인 비만
- **실험군과 위약군**: 검정콩껍질 추출물군(TEST:40명)은 1일 3회, 1회 2캡슐(검정콩껍질추출물로써 2.5g/일)을 아침, 점심, 저녁 식전 경구섭취하고 위약군(PLACEBO:40명)은 1일 3회, 1회 2캡슐(전분 2.5g/일)을 아침, 점심, 저녁 식전 경구섭취를 각각 8주간 시행.
- **체지방 및 복부지방 변화**: 계획서 순응 피험자군 (Per Protocol Set) 63명을 대상으로 1차 유효성 평가항목인 체지방량은 유의한 차이가 없음. 복부지방을 표현하는 허리둘레는 test군에서 유의적으로 감소하였으나(p<0.0001) 대조군은 변화가 없음.
- **지질개선**: 2차 유효성 평가항목인 TG, LDLc, Non-HDLc(TC-HDLc), LDLc/HDLc, (TC-HDLc)/ HDLc 분석 결과, 섭취 전과 섭취 8주 후 LDLc, non-HDLc 및 /LDL/HDL은 검정콩껍질추출물군과 위약군 두섭취군 간의 차이를 보이며 혈중 TC, LDLc, HDLc, Non-HDLc, VLDLc 지표는 검정콩껍질추출물군과 위약군 모두 통계적으로 유의하게 감소하였으나 두 섭취군 간의 차이는 없음.
- **식이섭취조사 및 신체활동조사**(MET-minutes/week): '배정된 대로 분석(Intention-to-treat; ITT)' 원칙에 따라 등록피험자 총 80명 분석 시, test와 위약군간의 식이섭취량 및 신체활동량의 차이가 없음.
- **안전성 평가**: 최소 1회 이상 연구용제품을 섭취한 피험자 80명(Safety군)을 대상으로 이상반응, 임상병리 검사(혈액학적 검사, 혈액생화학적 검사, 뇨검사), 활력징후 등의 측정 결과를 분석한 결과, 총 80명의 피험자 중 17명의 피험자에서 총 19건의 경도 또는 중등도 이상반응이 발생하였으나 두 섭취군 간 이상반응 발생에 차이가 없었으며, 연구용제품 섭취와 인과관계가 없다고 판단함.

4) 제조공정의 최적화

① 흑삼제조공정에서 막걸리를 활용한 효능 최적화

- **유효성분 추출법**: 70% 에탄올 추출법이 진세노사이드 추출수율을 증가함. 흑삼 5포의 추출수율이 높으므로 흑삼제조 시 5포까지 제조하고 70% 에탄올을 사용하여 추출하는 것이 유용성분 용출에 효과적.
- **총 페놀 함량** : 증포 과정이 진행될수록 증가하는데 이는 갈변이 진행됨에 따라 생성되는 melanoidine 분자가 비교적 안정한 유리기를 가지고 있는 것으로 유추. 막걸리로 증자할 때 더욱 높음. 또한 미숙성군에 비해서 숙성군이 총 페놀함량이 증가. 숙성과정 중 melanoidine 분자가 안정화에 기여함.
- **DPPH법에 의한 항산화 활성**: 총 페놀함량의 경우 숙성과정을 거치면서 증가하는 경향을 보였으나 일반군의 경우 DPPH법에 의한 항산화 효과는 오히려 감소함 막걸리 증자 숙성군이 가장 우수함.
- **ABTS법에 의한 항산화 활성** : 증포가 진행됨에 따라 증가하고 숙성함에 따라 감소된 경향이 막걸리 증자로 인하여 증가함. 결론적으로 막걸리를 사용하여 증자시킨 후 숙성을 하는 경우 가장 우수한 형태의 흑삼을 제조 가능한 것으로 보임. 반면 증포가 진행됨에 따라 활성이 증가하지만 4-5포에서도 일반 군 9포와 활성이 유사하므로 막걸리를 사용하여 4-5포까지 증자시키는 것이 제품의 활성면, 시간과 금전적인 면에서 가장 효과적인 제조방법임.

② 녹두의 로스팅공법에 의한 효능최적화

- 20kg 녹두를 20L 에탄올로 추출하여 1.33L까지 농축한 후 HPLC를 이용하여서 농축액의 vitexin과 isovitexin을 분리함. 각각의 함량은 vitexin이 18.05%, isovitexin이 20.87%임
- 로스팅 온도가 높아질수록 항산화능이 증가하지만 110℃ 처리군이 DPPH radical 소거활성 (10.8%), ABTS radical 소거활성 (34.8%), Xanthine oxidase 저해활성 (48.6%)로 기장 좋으며 그 이상 온도에서는 역효과. 아질산염 소거활성은 로스팅 온도가 높아질수록 증가하고 pH가 높아질수록 활성이 감소되는 경향. 총 플라보노이드 함량: 30분 로스팅한 군에서 383 mg/g으로 가장 높으며 생 녹두에서 275 mg/g으로 가장 낮음.

③ 폴리페놀(45%)/ Diechol rich-감태추출물 공정과정 확립

- 폴리페놀(45%)/ Diechol (순도97%) rich-감태추출물(AG-Dieckol)의 효과적인 대량추출을 위해 1차적으로 당분해효소를 투입 후 24시간동안 추출하여 다당류를 추출/확보함. 확보된 1차 공정 후 남은 감태의 10배량의 주정을 가하여 상온에서 24시간 추출하고, 추출 후 데칸터 및 필터 프레스로 여과함. 여과된 제주산 감태 유래의 AG-Dieckol을 농축 후 동결건조 및 포장단위에 따라 포장하여 사용.
- 기능성 소재의 표준화는 고시 제2011-34호에 따라 기능/지표성분의 분석을 진행함. 특이성(Specificity) 평가 직선성(Linearuty)의 평가, 검증 중 범위(Range)정확성(Accuracy) 평가, 안전성(Stability)의 평가 시행.
- AG-Dieckol의 안전성 평가: Sprague-Dawley(SD) 계통 암컷 랫드를 이용하여 시험물질을 단회 경구투여 급성독성 및 LD_{50} 평가함.

④ 안토시아닌이 풍부한 검정콩 껍질의 제형성 및 시제품 생산

- 검정콩 껍질첨가량이 0, 20, 40, 60, 80%으로 증가할수록 경도(hardness),탄력성(springiness), 검성(gumminess), 씹힘성(chewiness) 등이 증가하다가 60%, 80%에서 감소하므로 40% 첨가시의 물성이 가장 좋음.
- 당도의 경우 콩껍질 추출물 첨가량이 증가할수록 높아짐. 양갱 제조시 콩껍질이 함유한 당 성분만큼 설탕사용량을 주리면 단당류 섭취감소 효과.
- 관능평가 결과 콩껍질 추출물 40% 첨가 양갱이 색, 맛, 향, 전체적인 기호도면에서 가정 좋지만 앙금 245g, 물 195g, 콩껍질 추출물 10g, 설탕 45g, 한천 5g으로 제조한 콩껍질 첨가 양갱이 우수한 모델임.

⑤ 검정콩껍질분리후 부산물 이용제품의 효능검증 (식빵과 쿠키)

- 검정콩부산물 9% 첨가 식빵: 씹힘성(chewiness), 검성(gumminess), 탄력성(Springiness)등 물성평가, 색(color), 향(flavor), 질감(texture), 촉촉함(moistness), 부드러움(softness), 맛(taste), 전체적인 기호도(overall quality) 등 관능평가, DHPH, ABTS 라디컬 소거능, 총 페놀량, 총 플라보노이드 등 항산화능이 가장 우수함.
- 검정콩부산물 6% 첨가 쿠키: 향(flavor), 질감(texture), 촉촉함(moistness), 맛(taste), 전체적인 기호도(overall quality)면에서 가장 우수함.
- 검정콩부산물 9% 첨가 식빵 및 6% 첨가 쿠키 모두 항균활성이 있음.

5) 농수산물 소재분류 및 DB 구축

○ 2012년 5월29일-2012년 6월 7일까지 Pub MED와 Web of Science검색포털을 이용하여 국제 SCI에 게재된 논문을 중심으로 항비만 keyword(obesity, appetite, 3T3-L1, lipid, fat, adipocyte, weight, diet, AMPK)를 사용하여 검색함.

① 농수사물 소재: 녹차 789건, 해조류 94건, 마늘 72건, 인삼 60건, 포도 48건, 버섯 45건, 양배추 43건, 생강 24건, 고추 22건, 메밀 14건, 치커리 9건 등이며 총 1,214건이 DB화됨.

② 수산물소재: 미세조류 110건, 해조류 65건, 미역 61건, 다시마 31건, 모자반 30건, 조개류 28건, 감태 7건, 패 6건, 톳 5건, 우뭇가사리 3건 등 총 346건 DB화

6) 시제품 및 산업화 기반구축 마케팅전략

(1) 시제품제조

① 5포 흑삼을 활용한 시제품의 제작 3건 : 경기대학교 & (주) 동진제약

<고려 흑홍삼차골드> :홍삼과 흑삼의 mixture 형태의 제품으로 흑삼을 현재 실용화 되어 있는 제품에 응용하고자 하였음	<흑홍삼 녹용수> :홍삼과 녹용 추출물의 mixture 형태의 제품으로 흑홍삼(흑삼전단계로 원가 절감)을 제폼화하고자 기능성 시장에서 인기가 높은 녹용수에 응응하고자 하였음.	<흑삼함유 33차> :녹차와 흑삼의 mixture 형태의 제품으로 소비자 선호도 및 인지도가 높은 녹차의 시장성을 활용하고자 하였음.

② 로스팅 녹두 티백차 제조 : 경기대학교& (주) 서진바이오텍

:녹두의 비릿한 맛 감소 및 녹두의 찬 성질을 보완하고자 현미와 계피를 혼합한 침출차 형태의 제품으로, 간이 임상시험에서도 혈중지질 수준을 저감하는데 효과적이었음.

○ 영양성분 및 원가계산

	1회 분량	1회 분량 당 함량					
		열량	탄수화물	단백질	지방	콜레스테롤	나트륨
녹두 티백차	13 g	45 Kcal	8.2g	2.4g	0.3g (포화, 트랜스지방 0)	0 mg	50 mg

	수량	kg->g	원가(won)	1g당	Tea 1개 당 들어가는양(g)	단가(won)
녹두	20Kg	20,000	148,000	7.4	10	74
계피	300g	300	3,000	10	0.06	0.6
현미	10kg	10,000	23,000	2.3	2	4.6
티백	100EA	100	6,000	60	1	60
					총 단가(12g)	₩ 139.2

③ 로스팅녹두 과립차 제조 2건

: 로스팅 녹두 추출물과 무수결정 포도당을 혼합하여 과립차 제조(A) 후 맛의 개선을 위해 비타민 C와 구연산을 첨가한 형태의 제품(B) 으로 관능평가가 우수하지는 않았음.

A: 무수결정 포도당(CJ) 500 g에 녹두추출물 97.5 g(19.5%)을 넣고 혼합한 후 30분 동안 안정화시킨 다음 지름 1 mm인 타공망을 전착한 과립제조기 (5HP)를 사용하여 과립을 제조한 후 40Å로 열풍건조하여 과립차 형태로 제조하였음.	
B: A형태의 맛의 개선을 위해 무수결정 포도당(CJ) 500 g에 녹두추출물 97.5 g(19.5%)에 **비타민 c 15 g, 구연산 0.5 g**을 첨가하여 넣고 혼합한 후 30분 동안 안정화시킨 다음 지름 1 mm인 타공망을 전착한 과립제조기 (5HP)를 사용하여 과립을 제조한 후 40Å로 열풍건조하여 과립차 형태로 제조하였음.	

④ AG-Dieckol 첨가 다양한 제형의 시제품 생산: (주)아쿠아그린텍

제주산 감태 유래 항비만 소재인 AG-Dieckol을 다양한 제형을 연구/개발하여 3가지의 시제품을 개발하였음. 아래 3가지 외 다른 제형 제품의 가능성에 대해서 현재 진행중에 있음.

1번:AG-Dieckol을 첨가하여 환형태의 아쿠아폴리놀.	2번: 타블릿 형태로 제작한 감태 디에콜 정 (미정).	3번: 액상 상태로 제작한 감태 디에콜 추출액(미정).

⑤ 검정콩껍질을 이용한 양갱제조 : 경기대학교 & (주)고을

:검정콩 껍질 추출물의 높은 항산화활성, 혈중 지질개선 및 체중 저감화 효과를 활용하고자 제조한 형태의 시제품으로 임상시험이 종료되어 개별인정을 신청할 예정이므로 기술이전에 따른 사업화가 가능함.

Control	SY20	SY40	SY60	SY80

⑥ 검정콩껍질 분리후 부산물 이용 시제품개발 [식빵 및 쿠키 제조] : (주)고을

: 검정콩 껍질 제거 후 남은 부산물인 콩알맹이를 첨가하여 식빵 형태로 제조한 제품으로 (주)고을에서 시제품으로 판매를 시도하여 1500만원 정도의 매출이 있었고, 현재 지속적으로 제조 하여 판매하고 있음

시험항목	control	부산물9%함유식빵
열량(kcal)	302	304
탄수화물(g)	51	51
당류(g)	4	7
단백질(g)	4	12
지방(g)	11	6
포화지방(g)	0	3
트랜스지방(g)	0	0.1
콜레스테롤(g)	11	5
나트륨(mg)	447	218

검 사 성 적 서

㈜에코바이오코리아

(2) 산업화 기반구축 [BBT-CD3G 신제품 마케팅 전략]

○ 항비만 기능식품 시장 현황

- 웰빙 열풍, 고령화, 소득 증대 등으로 건강기능식품에 대한 국내 및 세계 시장이 지속적으로 증가하고 있으며, 특히 다이어트에 대한 관심 증대로 항비만 관련 시장이 확대되고 있음
- 현재 국내에 시판중인 항비만 기능식품은 700종 이상이며,
- 대부분 20-40대 여성을 대상으로 하며, 다이어트, 피부미용, 배변활동 촉진 등의 다양한 기능을 제공. 화장품 회사들이 항비만 기능식품 시장에 본격적으로 진출하고 있음
- 항비만 기능식품에 대한 소비자의 관심은 높으나, 섭취 후 만족도가 낮은 편이며 제품 및 원료물질의 안정성을 구매 시 가장 중시하는 요인임

○ BBT-CD3G 신제품 마케팅 전략

- 표적시장 선정: 30-50 대 남성이 비만율이 가장 높으나 항비만 활동이 비교적 적고 또 남성용 제품이 거의 없기 때문에 이 집단을 표적 시장으로 선정
- 포지셔닝 전략: 남성전용의 고가 항비만 기능식품으로 포지셔닝하며, 소비자에게 고가를 납득시킬 수 있는 제품 설계가 필요함
- 제품전략: 원료물질을 다량 포함시켜 신속한 효과를 얻게하며, 액상(젤) 형태로 낱개 포장
- 가격전략: 1개월 기준 7만~8만원대로 기존 남성용 제품에 비해 고가전략 채택
- 유통전략: 기존 유통망(약국, 건강기능식품 전문점 등)을 포함하여 고가의 이미지에 맞는 선별적 유통망 채택. 골프장과 고급 헬스클럽 등의 스포츠 시설 활용, 남성용품 제조사와 제휴한 마케팅 등이 가능함
- 마케팅 커뮤니케이션 전략: 다이어트 이후의 바람직한 모습을 강조한 긍정적 메시지를 활용. 본 신제품에 효과적인 미디어는 맞춤형 다이어트 상담이 가능한 블로그를 통한 사이버 입소문, 체험을 통한 입소문, 이벤트, 남성용 잡지, 교통방송 등임.

Ⅵ. 연구성과 및 성과활용 계획

1) 산학연학제간 융학학문적 항비만연구시스템 확립 (New 생물바이오시스템기법을 활용한 항비만 소재개발 스크리닝법 활용)

① 산학연 연구과제를 통한 산학에서 필요한 연구시스템을 도입하려는 위한 노력으로 연구의 실용화에 기여함으로써 산학연 융합형 연구시스템 확립 및 융합형기술을 기반으로 하는 산업체전문 인력양성가능

② 식품영양, 생명과학, 의학, 한방 등 다양한 분야의 학제 간 network을 통한 항비만을 위한 효율적인 convergent 연구시스템 확립이 가능.

③ New in vitro 스크리닝 법 (지방분화 STEM CELL 혹은 YEAST GENOMICS기반)은 장기간 시험기간이 필요한 in vivo 시험디자인을 위한 pilot 시험으로 중요한 결정을 조속히 할 수 있어서 비만증가율에 대응하는 기전적 개발이 학문적으로 다양하게 시도될 수 있음.

2) 항비만연구시스템 개선에 따른 새로운 산업적 분야 구축

① New in vitro 스크리닝법은 배양조건의 표준화, 대량생산 표준화 및 standard DB 구축(임상/in vivo 결과와의 상대비교군 data축적, 대사질환에서의 효율 screening 예측 DB 구축) 등이 선행된다면 이와 관련된 새로운 산업분야 창출이 가능함. 예를 들면 One-Step 항비만스크리닝 KIT개발, 혹은 기전적 실험모델 혹은 임상모델이 개발을 위한 GLP기관설립 등 새로운 산업분야의 개척이 가능함.

③ 유효성분 및 지표물질이 규명된 농림수산물 추출물 또는 복합물 형태의 비만개선용 건강기능식품개발 및 산업화로 약물과 유사한 농가의 고부가가치실현

④ 건강기능식품을 이용하는 고개의 연령, 수입, 직업 등에 따른 맞춤형 다이어트프로그램 등을 개발하는 새로운 산학연 마케팅분야 창출 가능.

3) 국가 경쟁력우위 선점

① 소아비만인구의 증가는 향후 10년 이내 전 국민의 3명중 1명꼴로 비만과 만성질환으로 전이될 가능성을 제시함. 대다수 국민이 비건강인 또는 비경제인구로 전환될 뿐만 아니라 국가의료비용 부담 등으로 점차 국가경쟁력을 상실함. 더욱이 합성의약품사용은 부작용을 유발하여 국민건강의 미래를 해결할 수 없으므로 기능성이 우수한 식품의 개발은 매우 중요한 영향을 줄 것임.

② 국산농수산물을 이용한 기능성 제품의 우수성 및 차별화로 비만관련 국제 기능성식품시장의 경쟁력우위 선점 및 해당업체 고부가가치창출에 기여

SUMMARY
(영문요약문)

Ⅰ. Title: Antiobesity New Biomaterial Project Team

File No.	811003(1-3)	Public Availability	¢ Yes £ No
Name of Project Team	**Antiobesity New Biomaterial Porject Team**		
Project Team Leader	**(Name) Myoungsook Lee**	**(Scientist Registration Number) 1005-4860**	
	(Affiliated Institution) Sungshin Women's University	(E-mail) mlee@sungshin.ac.kr	(Phone No.) 02-920-7211
	(Area) Seoul	(Major) Biochemical Nutrition	(Degree) Ph.D. from Ohio State University in the U.S.
Chief Researcher	(Name) Myoungsook Lee	(Scientist Registration Number) 1005-4860	
Keywords	ATM model for obesity-induced inflammation (ATMΦs model), Stem cell, Yeast genomics, Diabesity prevention, DB generation for antiobesity target materials		

Ⅱ. Research Goal vs. Research Accomplishments (Qualitative and Quantitative)

(1) First Year (2011-2012)

Objectives by Core Area	R&D Accomplishments	Output
1-1: Anti-inflammatory obesity research using the ATMΦs model and adipose tissue derived stem cell model	▪ Testing standardization of the ATMΦs model; marker csreening (addition:*in vivo a*pplication of ATMΦs model and obtaining an inflammatory marker) ▪ Obtaining stem cell lines for subcutaneous visceral fat tissues; establishing the basis for cultivation and mass production	150%
1-2: Identifying the mechanism of anti-inflammation in the anti-obesity target materials derived from agricultural and fishery products using genomics & in vivo DIO.	▪ Identifying the antioxidative regulation mechanism for the inducement of inflammation using DIO model (addition: conducting repeated tests) ▪ Searching for yeast cell based antiobesity potential materials and testing antioxidative effects of the markers regarding the results of DIO model (added)	150%
2-1: Standardizing production process of black ginseng using core technology/developing antiobesity products	▪ Devising ways to utilize makgeolli(Korean rice wine)in black ginseng production ▪ Completing safety analysis/general analysis (including ginsenosides) of black ginseng extract (added) ▪ Producing 3 prototypes, 2 patent applications, 2 trademark applications, 2 non-SCI papers, and 1 media promotion	150%
2-2: Classifying antiobesity materials/creating DB and conducting all of the clinical trials for the extracts	▪ Classifying antiobesity materials/creating 1000 DBs(214 DBs added) ▪ Conducting a clinical trial for each of the 5 kinds of extracts of agricultural and fishery products (addition: obtaining 8 types of markers)	200%
2-3: Identifying antiobesity markers for effective fishery materials (sea squirt, Ecklonia cava, gulfweed)	▪ Establishing mass production system for effective fishery materials and obtaining materials in large quantity ▪ Verifying various physiological functions of effective fishery materials (antioxidative effects, antidiabetic effects, antihypertensive effects besides antiobesity effects)	100%
Total Average		**150%**

(2) Second Year (2012-2013)

Objectives by Core Area	R&D Accomplishments	Output
1-1: Tests for raw materials, materials, process standardization, toxicity/safety, and repeatability to revalidate the antiobesity effects of black bean markers, C3G/D3G	▪ Standardizing raw materials and marker compounds; extraction yield from raw materials, and anthocyanin yield from the extracts ▪ Analyzing general materials, chromatic pH, microbes, and heavy metals ▪ Verifying antiobesity effects of the markers (*in vitro* and *in vivo* tests) & determining the concentration level for clinical trial for humans ▪ Confirming antiobesity and antioxidative effects of the yeast cell-based black bean-derived single materials such as C3G & D3G ▪ Obtaining the value of antiobesity materials and finding antiobesity target markers by searching for the antiobesity mechanism based upon studies on gene expression	200%
1-2: Tests for raw materials, materials, process standardization and toxicity/safety for mung beans	▪ Standardizing mung bean roasting process ▪ Making prototypes of roasted mung beans teabag tea and other antiobesity materials ▪ Conducting a simplified clinical trial for the roasted mung bean teabag tea (sensory evaluation added) ▪ Standardizing raw material/marker compounds and production process ▪ Adding analysis of nutritional contents such as protein quantity, total sugar quantity, antioxidant activity, whitening activity, etc.	140%
1-3: Revalidation of the antiobesity effects of the marker, vitexin	▪ Establishing the golden standard through continuous repetition based upon the doubling time of each part's stem cell lines ▪ Analyzing the effects of the standard effective components at the stem and 3T3L-1 cell levels. ▪ Analyzing the effects of the physiological activities of the by-products derived from the key process using the screening system	140%
2-1: Standardization of raw material, materials and production process to revalidate the antiobesity effects of the marker for Ecklonia cava, Diechol	▪ Standardizing the functional effective materials by building a mass production system with the effective fishery product (Ecklonia cava) ▪ Developing standardized production system and dosage forms for high-concentration products ▪ Adding Toxicity and safety evaluation	150%
2-2: Validation of anti-inflammatory and antiobesity functions and toxicity of the effective materials using the DIO model	▪ Regulating the accumulation of body fat, energy consumption, and energy metabolism ▪ Measuring mRNA and protein expressions of the inflammatory markers to evaluate anti-inflammatory functions ▪ Evaluating toxicity in the liver and tissues	100%
2-3: Tests for the raw materials, materials, process standardization, and toxicity/safety for sea tangle	▪ Standardizing optimized production process for functional materials by developing optimized extraction process and pre-treatment process with sea tangle ▪ Standardizing the analysis method for the functional (standard) compounds to identify physical and chemical properties and to standardize materials ▪ Testing inhibition of food and fluid intake	100%
2-4: Antiobesity effect validation of the markers such as glutamate and GABA and creating DBs for the antiobesity materials	▪ Searching for the studies on obesity using antiobesity keywords such as obesity apetite, 3T3L-1, lipid, fat adipocyte, weight, diet and AMPK ▪ Creating 346 DBs on agricultural products in the first year and marine life in the second year	100%
Total Average		**132.9%**

(3) Third Year (2013-2014)

Objectives by Core Area	Research & Development Accomplishments	Output
1-1: Pre-clinical and clinical trials for the individually recognized materials for reducing obesity	**1) Conducting a clinical trial for individual recognition [Sungshin Women's University]** ▪ Reviewing validation of clinical trial results of individually recognized materials for reducing obesity (anthocyanin-rich black bean testa extract) • toxicity test for the materials (the GMP institute) • IRB approval/informed consent forms, validation for conducting a test, and a statistical analysis report • Cooperation between the CRO and the clinical research center • Verifying validation for individual recognition application • Replication with the pre-clinical studies conducted in the first year and the second year (addition: comparison among pre-clinical trials) **2) Safety and safety test** **3) Repeating pre-clinical trials for effective agricultural products** (cooperation with Gachon medical school) ▪ Scheduled to repeat a test for one of the agricultural/ fishery products (addition: a total of 2 tests, one test for each) ▪ Separating test methods between prevention and treatment of antiobesity (added)	150%
2-1: Establishing basis for commoditization and industrialization of functional materials for reducing obesity	**1) Standardization of ethanol extract of black bean testa and suitability of dosage form** **2) Developing a technology to commercialize extraction by-products** ▪ Making bread with 0, 3, 6, 9, or 12% of the by-product and cookies with 0, 2, 4, 6, and 8% of the by-product, conducting a sensory evaluation, and analyzing 9 nutrients ▪ Releasing bread prototype (21 JUL 2014) ▪ Measuring chromaticity, physical properties, 4 types of antioxidants, and antibacterial activity of the bread and the cookie prototypes ▪ Analyzing DPPH radical scavenging activity, ABTS radical scavenging activity, total polyphenol contents, total phenol contents (additional measurement of 1 antioxidant activity) (>110%), and 6 kinds of microbes (*S.aureus, S.epidermidis, B. subtilis, B. cereus, E. coli, and S.typhimurium*) (>150%)	120%
2-2: Studying mechanism for antiobesity materials and establishing the basis for the development of production lines	**1) Evaluating the effects of antiobesity material marker in oxidative stress-overloaded cells (testing suitability of yeast model)** ▪ Establishing evaluation system for antioxidative effects and evaluating antioxidative effects of C3G: establishing evaluation system for antioxidative effects by making fruit yeast and evaluating antioxidative effects of C3G with this system.	100
	2) Identifying mechanism for the adipose stem cell differentiation in the antiobesity material marker ▪ Analyzing and verifying the effects of C3G and D3G by the stages of adipose stem cell division at the cellular and the molecular levels ▪ Analyzing the effects on preadipocyte differentiation regarding lineage (additional analysis)	130
	3) Establishing basis for product development [Obesity Research Institute & Consulting] ▪ Completion of DBs for obesity agricultural materials ▪ Consultation for building the basis for industrialization ▪ Economic feasibility analysis of the prototypes ▪ Preference analysis for the developed prototypes and consultation for technology transfer	100
Total Average		**120%**

(4) Quantitative Research Accomplishments

	IPR		Paper		APC	TT	E & G	Indus	TA	MT	PUP	Advertisement	Et cetera	
	Application	Registration	SCI	non-SCI									prototype	Clinical Test
Final goal	7	3	8	12	-	3	3	1	-	29	-	3	5	-
Achievement within the period	7	0	8	13	25	3	13	4	-	66	-	4	8	1
Output (%)	100	-	100	108	250	100	433	400	-	227	-	133	160	100

Supplementary Explanation

1) Intellectual Property Rights (IPR): Seven patents were applied but patent registration was not achieved yet.
2) SCI paper: SCI paper related to patents were postponed until the patent was applied. Therefore, the two paper, one was accepted and one was just finished the review, were included in the above accomplishments. However, After the total four paper which are under reviewing will be able to publish within the 1 year, total 150% output will be accomplished.
3) non-SCI paper: The four papers published by matching supports from Sungshin Women's University were included in the above table.
4) Academic Publication in the conference (APC): Without the final goal at the beginning, 25 oral or poster presentation were achieved.
5) Technology Transfer(TT): We represented by three results of commercialization
6) E & G = Education and Guidance
7) Industrialization(Indus): Except three results of commercialization, the pure sales record for raw materials or products were included.
8) Technology Accreditation (TA)
9) Manpower Training (MT)
10) Practical use of policy (PUP): The final goal was not set-up at the beginning.
11) Et cetera: We had 8 prototypes except three results of commercialization, and one clinical test.

Ⅲ. Purpose and Need for R&D

Purpose of R&D
By obtaining new antiobesity materials and biomarkers from domestic agricultural/fishery products using the advanced science and technology (new biological biosystems such as ATMΦs model, stem cell, yeast DNA microarray), this study aims 1) **to identify obesity-associated mechanisms** (reducing body fat and regulating the expression of inflammatory adipokines) **and their correlations** at the gene, mRNA, and protein levels, 2) **to improve the national competitiveness of our agricultural/fishery products in global functional foods market** by promoting the industrialization of the health functional foods based upon the markers, and 3) **to improve public health** and to reduce the national medical budget by preventing and treating obesity, which occurs in 3 out of 10 adults.

Need for R&D	
Increase in obesity prevalence and need for antiobesity products	▪ In South Korea, obesity prevalence increased 1.5 times in 10 years—from 25.1% in 1998 to 36.3% in 2010. ▪ Specifically, it showed the following characteristics: the morbid obesity had a sudden increase (2001: 0.74% and 2011: 1.26%); there was an increase in abdominal obesity in men in their 30s and 40s; there was an increase in obesity in post-menopause women; there was an increase in obesity in children and adolescents (25%> OECD 23%); and obesity prevailed in the cities (1 out of 4 citizens in Seoul). ▪ Self-awareness of obesity exists but lifestyle changes including exercise and a diet therapy are rarely sought. ▪ WHO identified obesity as "the new epidemic of the 21st Century" and the obesity market tends to increase over 20% each year all around the world so it is necessary to develop drugs and functional foods to treat obesity and metabolic disorders. ▪ According to the survey by the 'Korea Health Functional Foods Association' on consumers' functionality preference about functional health foods, obesity ranked number 1 (38%), followed by immune system improvement (22%) and atopy, thus demonstrating a high interest in obesity among South Koreans.
Problems with antiobesity research system	▪ Problem with the screening method of antiobesity materials: There is an urgent need for developing one-targeting boimarker based upon a good biomodel because there are limited tools that can rapidly screen the improvement of the effects on antiobesity and metabolic disorders *in vitro*. ▪ Problem with repeatability: It is urgent to identify the cause for the lack of mutual repeatability between the results of *in vitro* and *in vivo*. ▪ Problem with interdisciplinary studies: unlike plant-derived materials, seafood materials are very effective in terms of functions but they have limited use as raw materials due to their unique fishy smell and salty taste. Therefore, effective research through interdisciplinary networking is required such as the field of fermentation and the field of new chemical engineering. ▪ R & D support at the national level: It is difficult to determine the health functional foods' effect size on humans only based upon the pre-clinical trial results on the effectiveness of complex components such as health functional foods' extracts, which requires clinical trials and support is necessary at the national level. **It is urgent to develop *in vitro* and *in vivo* models to identify various screening methods for antiobesity materials and numerous obesity-related mechanisms**
Slow industrialization of antiobesity functional materials (urgent need for developing new Korean agricultural materials)	▪ According to the "Biofood Network Report" in 2007, obesity ranked number 1, followed by immunization, hyperlipidemia, and diabetes in the corporate priority for future studies, which shows that obesity is given the highest priority. However, industrialization of antiobesity functional materials has been very slow. ▪ Problem with the IRB (Institutional Review Board): Because the standards applied in the clinical IRB in most hospitals are laid down for drugs, functional foods are often excluded from the evaluation, which creates difficulties for clinical trials (i.e.: when it is impossible to make a placebo due to dose and compliance issues, support is required to promote the supplementary GLP industry). ▪ Compared to drugs, functional health foods take longer to manifest their effects. Consequently, misunderstandings due to inaccurate results can impede the establishment of a scientific basis. Therefore, a government-centered standardized system for research is required and a network should be established. ▪ To reduce the burden of the out-of-pocket costs, multilateral efforts from various fields, such as medicine, traditional herbal medicine, food science and biotechnology, are urgently needed so that mechanisms can be determined through clinical interventions using the chronic inflammatory disease model and functional foods can be developed on the basis of these studies. **Incidences of synthetic drugs' side-effects have kindled general awareness of natural treatment, and the global functional food market is expanding. It is time for government to step up and develop new materials from Korean agricultural products and to improve their competitiveness in the global market.**

IV. Content and Scope of R & D

Objectives per Phase	Content	Scope of Research
	Antiobesity materials screening (agricultural and fishery products)	▪ Materials from agricultural and fishery products (at least 5 product type from black ginseng, black bean, mung bean, dried orange peel, mulberry leaf, mulberry fruit, Ecklonia cava, gulfweed, sea squirt, Sargassum fusiforme (commonly called "tot" in Korea and "hijiki" in Japan), sea tangle, red algae, etc.) ▪ Verification of the markers (gensenosides, anthocyanins, isovetexin, vitexin, genistein, chlorogenic acid, phlorotannins, diechol, GABA, peptides, agar, etc.)
1 yr **Choosing and screening candidates for antiobesity functional materials**	**Developing and standardizing new tools for antiobesity screening**	▪ Repeatability of the existing method (3T3L-1 *in vitro* & DIO *in vivo*) ▪ **Searching for a new method** (ATMΦs and Co-culture model, subcutaneous and visceral adipose tissue-derived stem cell, Yeast DNA microarrays, a system connecting ATMΦs and IHC, etc.) ▪ Identifying the expression mechanism for the targeted gene of the inflammatory obesity based upon a new model, and verifying the functions of the candidate materials and establishing and standardizing knowledge base for their standardization/control.
	Classifying natural product antiobesity materials; creating DBs	▪ Using Pub MED and Web of Science to search domestic and international articles ▪ Creating a total of 1,214 DBs including 789 DBs for green tea, 94 DBs for seaweed, 72 DBs for garlic, 60 DBs for ginseng, 48 DBs for grape, 45 DBs for mushroom, 43 DBs for cabbage, 24 DBs for ginger, 22 DBs for pepper, 14 DBs for buckwheat, 9 DBs for chicory, etc.
	Developing a standardized process for the materials	▪ Developing a system to optimize and standardize the production process in order to obtain the markers' yield from the raw materials and the materials.
2 yr **Verifying antiobesity effects based upon the black bean, mung bean, Ecklonia cava, and sea tangle –based markers**	**Identifying antiobesity mechanisms**	▪ **Testing antiobesity effects** of C3G/D3G-rich black bean testa extract (standardizing the secondary *in vitro* ATMΦs model for the markers for new materials using the primary markers-based ATMΦs model and validating the effects in phenotypes and *in vivo*) ▪ Antiobesity effects of vitexin/isovitexin-rich mung bean testa extraits (using adipose stem cell & yeast genomics, DIO *in vivo*) ▪ **Short-term effects of roasted mung beans in reducing obesity in middle-aged women** ▪ Diechol-rich Ecklonia cava's concentration-dependent antiobesity effects (DIO, SHR & db/db mice *in vivo*) ▪ GABA/glutamate-rich sea tangle's effects on food intake inhibition.(DIO)
	Classifying fishery products-based antiobesity materials; creating DBs	▪ Creating a total of 346 DBs, including 110 DBs for microalgae, 65 DBs for seaweed, 61 DBs for sea mustard, 31 DBs for sea tangle, 30 DBs for gulfweed, 28 DBs for shell fish, 7 DBs for Ecklonia cava, 6 DBs for Ishige sincola, 5 DBs for Sargassum fusiforme, and 3 DBs for red algae.
	Toxicity and safety tests	▪ Continuous toxicity and safety testing of the extracts of raw materials (laboratory) ▪ **GMP Institute:** conducting tests such as single dose oral toxicity test, reverse mutation test, mutagenicity test, chromosome aberration test, and *in vitro* micronucleus test
3 yr **Establishing basis for the accredi -tation of individual antiobesity functional materials**	**Clinical trials to obtain basis for individual recognition**	▪ Repeating the pre-clinical trials with the effective materials (identification of mechanisms: GLP Institute) ▪ **Clinical trial on black bean testa extract with obese people:** 8 weeks, double-blinded, test-placebo (in affiliation with a CRO Institute) ▪ Validity tests of individual materials in preparation for the applications for accreditation.
	Establishing basis for industrializa-tion	▪ Standardization of materials, suitability of dosage form, and development of a standardized process system for products, production of prototypes and suitability of dosage form (trial products of bean testa extract) ▪ Utilization of extraction by-products: developing better products than the existing products in terms of nutrition and sensory aspects (the analysis of nutrition and antibacterial characteristics completed) ▪ Consultation for establishing basis for industrialization

Ⅴ. R&D Achievements

1. Results of antiobesity functionality screening

1.1 3T3L-1 *in vitro* Test

Extracts

- 1-9 teabags of black ginseng hot water extracts showed concentration-dependent increase of cell viability, but no effect on fat accumulation.
- 1-9 teabags of black ginseng ethanol extracts: From the extracts from 5 and 9 black ginseng teabags, 5 teabag extracts showed significant concentration-dependent decrease in both 3T3L-1 cell viability and fat accumulation; dried orange peel extract showed similar effects as well.
- Mung bean testa and black bean testa ethanol extracts: When concentrations were increased up to 300ug/ml, no changes in the cell viability were observed. At high concentrations fat accumulation displayed a downward tendency till it reached 50%. The black bean extract (100-1000 ug/ml) inhibited the expressions of PPAR-r, C/EBP-a and ACC synthase, a key enzyme for fatty acid biosynthesis in fat globules, in a concentration-dependent manner.
- Ethanol extracts of Sargassum fusiforme, sea squirt, sea tangle, and Ecklonia cava: Sargassum fusiforme had no effects on cell viability and fat accumulation; sea squirt was 200% more effective on the differentiation and proliferation of adipocytes compared to the control group; Ecklonia cava triggered a dramatic decrease in fat accumulation at the 300ug/ml level without any change in cell viability, thus proving most effective. Out of the three markers extracted from sea tangle (glutamate 7%, GABA 5%, and Glutamate:GABA= 5:5), glutamate7% was effective in the expressions of PPARr and HSL proteins.

Markers

- Administration of vitexin and C3G/D3G, markers for mung bean and black bean: fat accumulation was reduced to 50-60% at the concentration levels of vitexin 50-200uM and C3G/D3G 100-200uM, where extracts and markers' tendencies were aligned with each other. When C3G 200uM was administered, TNF-a, pro- inflammation marker, was reduced and IL-10, anti-inflammatory factor, was increased. D3G increased IL-10 up to 100uM and decreased it at 200 uM
- Dieckol of Ecklonia cava extract: When it was administered at the concentration levels of 25, 50, and 100 μg/mls, the oil-red stained region was reduced in a concentration-dependent manner compared to that of the control group.
- Eckol, phloroglucinol, and dieckol, effective materials from the Ecklonia extract: IC_{50}: >5 mM for phloroglucinol; IC_{50}: 1.3 mM for eckol; IC_{50}: 315 μM for dieckol, which shows that dieckol is more effective than other effective materials in terms of ACE inhibitory activity.

1.2 ATMΦs & Co-culture model tests

ATMΦs model

- **Fishery products**: Ecklonia cava extract, 100-300ug/ml, inhibited TNF-a and MCP-1, M1 factor, over 200% more compared to the control group; sea squirt extract, 75-300ug/ml inhibited TNF-a over 200% more.
- **Agricultural products**: 5 teabag black ginseng tea increased M2 or yielded a similar effect; dried orange peel increased it more than the control group at the concentration level of 75ug/ml. The only material having simultaneous effects on both M1 and M2 was Ecklonia cava.

Co-culture model

- RAW264 and HepG2 cells were injected two days after administering insulin to 3T3L-1, and cultured for 9 days in a contact co-culture system: macrophage increased both TNF-a and Il-6 in the mung bean extract; HepG2 did not make any changes on TNF-a and Il-10 but increased IL-6 considerably. It is difficult to verify the conditions of the other extracts.

- RAW264 was injected two days after administering insulin to 3T3L-1 and cultured for 9 days in a contact co-culture. The results of secretion capacity of M1 type (MCP-1) and M2 type (Il-10), inflammatory factors, on the thday of contact co-culture: when the 5 te abag black ginseng tea and the dried orange peel extracts were administered, M1 slightly increased when the concentration in creased. However, M2 increased more than M1. When the black bean was administered, the marker D3G 100uM had greater anti-inflammatory effects than the alcohol extracts.Incontrast, when Ecklonia cava was administered, M1 and M2 decreased in high concentrations but M1 increased even more. When Seasquirt was administered, M2 increased and it decrease in high concentration. However, M2 increased more than M1.

1.3. H & E staining and mast cell IHC screening methods

- Compared to the control group, the cell sizes in the high-fat (HF) group increased whilst those in the orlistat group decreased. The sizes of the cells in most extracts except the 5 teabag and 9 teabag black ginseng were reduced more than those of the HF group.
- Compared to the control group, the groups where mast cells increased were the HF group, 5 teabag black ginseng, sea squirt and dried orange peel, etc. and the group where mast cells decreased was orlistat. Mung bean, black bean, and Sargassum fusiforme extracts showed a similar tendency as the control group.
- It was confirmed that C3G & D3G of the black bean extract had a crown-like structure (ATMΦs model M1) in which inflammatory macrophages surround fat globules. IHC was conducted on epididymal fat using Galectin-3 (Mac-2) antibodies. The results showed that formation of M1 was inhibited when black beans were administered, which was very similar to the inhibitive effect of orlistat.

1.4. Anti-inflammatory obesity screening with adipose-derived stem cell model

- Markers that reduce the proliferation speed of subcutaneous and visceral adipose stem cells more than that of the obese rat *in vivo* were 9 teabag black ginseng, sea squirt, and Sargassum fusiforme. Analysis showed that other markers excluding these markers had no effects on inhibiting proliferation of the stem cells for subcutaneous fat and abdominal fat *in vivo*.
- **Agricultural products:** The effects of 5 teabag black ginseng, and the ethanol extracts on obesity development: having no effects on inhibiting the proliferation of the stem cells for subcutaneous fat and abdominal fat *in vivo*, but the proliferation speed of the stem cells for subcutaneous fat was reduced *in vivo*. 9-teabag black ginseng inhibited proliferation of the stem cells for subcutaneous fat and abdominal fat *in vivo*.
- **Fishery products:** Sea squirt inhibited proliferation of subcutaneous and visceral adipose stem cells *in vivo* and *in vitro*. However, *in vivo*, the time required for the proliferation of the stem cells for visceral adipose stem cells in Sargassum fusiforme remained similar to that of the normal control group, which showed a decrease in the proliferation speed compared to the untreated Sargassum fusiforme during induction of obesity. Characteristics of the visceral adipose stem cells were not changed from that of the normal control group.
- **Using the adipose stem cells of rats:** In black bean and mung bean extracts, effective materials inhibited the differentiation of adipose stem cells into adipocytes at the 200μg/ml concentration, which indicated that the screening system with rats' stem cells can be used in the analysis of the natural product extracts' effects on the adipose stem cells' differentiation into adipocytes.
- **Using human adipose stem cells:** Effective materials inhibited the adipose stem cells' differentiation into adipocytes at over 50μg/ml concentration in the black bean extract, and at the 200μg/ml concentration in mung bean extract.

1.5. Potential antiobesity material screening using yeast based Genomics Biosystem

- The mulberry leaf extract, mulberry fruit extract and extract have the potential to inhibit fat

accumulation in yeast cells.

- The Ecklonia cava, sea squirt, mung bean, Sargassum fusiforme, 5-teabag black ginseng, 9-teabag black ginseng, dried orange peel extract did not yield significant effects on fat accumulation inhibition in yeast cells.
- The marker genistein did not show a significant effect on fat accumulation inhibition in yeast cells.
- Black bean markers C3G & D3G did not interfere with the formation of total ROS (mainly, H_2O_2) in yeast cells.
- C3G showed the effects in inhibiting the mitochondrial superoxide production in yeast cells when administered in high concentration (100 μM), (P value * < 0.05). D3G induced pro-oxidant conditions when administered in low concentration, and showed the effects of inhibiting mitochondrial superoxide production in yeast cells only when administered in high concentration (100 μM), but without reaching a statistical significance (P value * < 0.05). To summarize the results, C3G displays significant antioxidant activity in high concentrations, and the expressed sequence tags of this natural product could be measured.

1.6. Anti-inflammatory screening of fishery products using Cox-2 inhibition rate (%)

- Ecklonia cava showed the highest anti-inflammatory activity (72.7%), outperforming the reference drug indomethacin (10 mM; 67.8%)
- Anti-inflammatory activities of other materials (in decreasing order): Sargassum fulvellum 57.8%, Sargassum coreanum 43.0%, Grateloupia divaricata 40.8%, 29.6%, 23.5%,Sargassumfusiforme20.1%,Chondrusocellatus15.0%,13.0%,Ishigeokamurai3.5%,Polyopesaffinis 2.4%,andEnteromorphaprolifera 0%.

2. Antiobesity mechanism using DIO mouse model

2.1. Inflammation-induction and antioxidative control mechanism

- After 6 weeks of administration, the high-concentration Ecklonia cava extract (HG) showed significant difference from the HF group. Black ginseng 5, black ginseng 9, and Sargassum fusiforme did no show any difference.
- Decrease in fat tissues: Ecklonia cava showed decrease in the sum of epididymal, mesenteric, retroperitoneal, and inguinal fat tissues (SUM-I) compared to the HF group. Black ginseng and ecklonia cava showed decrease in the sum of epididymal, mesenteric, and retroperitoneal fat tissues (SUM-II) compared to the HF group.
- Improvement in blood fat: Ecklonia cave decreased the blood TG and TC as well as atherogenic index (AI) [(TC-HDLc)/HDLc] to the level of the HF group. Black ginseng 9 showed a higher reduction in TB than Black ginseng 5, but showed a higher increase in HDLc. In both concentration, TC and AI were reduced to the level of the the HF group.
- Lipid peroxide concentration: while black ginseng did not show significant difference compared to the HF group, from the Ecklonia cava group showed an increasing tendency, and MG group tended to lower MDA.

2.2. 45% Fat-obese model (10-week DIO + 12-weak treatment, HF vs. Orlistat)

- Total body fat: Extracts of mung bean, dried orange peel, sea squirt, Sargassum fusiforme, and black bean, which decreased epididymal and mesenteric fat, did not cause any changes in the total body weight due to the increase in muscle mass. Mung bean and dried orange peel extracts showed levels of decrease similar to that shown by orlistat, which proved to be most effective in reducing epididymal fat with respect to body weight. Although 5- and 9-teabag black ginseng, sea squirt, and Sargassum fusiforme extracts showed a slightly higher decrease than the HF group, less efficient than orlistat. Black bean extract was most effective in reducing mesenteric fact, but tended to increase epididymal fat.
- Physiological parameters of blood: Only black bean extract showed a significant decrease in FBS and TC compared to the HF group (level of decrease comparable to that of orlistat). Serum

leptin was significantly decreased by the dried orange peel extract, whose effect in decreasing epididymal adipocytes was proven previously, compared to the HF group. Interestingly, orlistat inhibited leptin secretion along while decreasing fat uptake and body fat.

- **Hepatic fat content**: Compared to the HF group, the hepatic TG content was shown to be high in the order of sea squirt> mung, 9-teabag black ginseng, dried orange peel, and black bean > Sargassum fusiforme. That of TC was shown to be mung, 9-teabag black ginseng, black bean> sea squirt> dried orange peel, thus demonstrating that sea squirt and Sargassum fusiforme were effective in decreasing TG and TC, respectively. While black bean was shown to be effective in decreasing both blood and liver TC, mung bean, dried orange peel, and Sargassum fusiforme showed higher effect in decreasing hepatic fat content than improving blood lipid levels. In this connection, it will have to be validated in future research whether the decrease relates to reduced hepatic TG synthesis or reduced lipid uptake.
- **Protein expression of fat synthesizing and degrading enzymes enzymes (AMPK, ACC, PPARr, SREBP-1, FAS, LPL, HSL, CPT-1, UCP1)**: ACC-decreasing effect was exhibited by 9-teabag black ginseng, mung bean, black bean, sea squirt, and C/EBP and PPARr were decreased by black ginseng and sea squirt. Black bean, sea squirt, seaweed fusiforme, and Ecklonia cava increased AMPK. Black bean, Sargassum fusiforme, and Ecklonia cava exhibited the highest AMPK-expressing effects. Sargassum fusiforme inhibited the expression of PPARr, thus demonstrating the highest lipid decomposition performance. ACC-decreasing mung bean and 9-teabag black ginseng triggered the increase in PPARr expression and is hence expected to increase adipocytes. When compare with the obesity control group, Ecklonia cava group yielded a concentration-dependent decrease (100mg/Kg-500mg/Kg) in the marker (fatty acid synthase) FAS and LPL related to fat accumulation. The expression of CPT 1 that accelerates the oxidation of fatty acids and the thermogenic protein UCO 1 also increased in the low-concentration Ecklonia cava group.
- **mRNA expression of fat synthesizing and degrading enzymes (AMPK, ACC, PPARr, SREBP-1, FAS, LPL, HSL)**: The highest degree of ACC mRNA expression was exhibited by the HF group, with orlistat and sea squirt showing levels similar to that of the control group. All remaining groups inhibited ACC associated with fatty acid synthesis. On the other hand, black bean and Sargassum fusiforme increased the expression of HSL mRNA, thereby promoting the TG decomposition 200-400-fold compared to the control group.
- **Protein expression of inflammatory mediators (iNOS2, COX-2, leptin, CRP, p-iKB-a, IKB-a, IL-6, IL-10, TNF-a)**: When compared with the HF, black bean and Sargassum fusiforme doubled or tripled the M1 factor IL-6 but concomitantly expressed M2 factor IL-10; thus, an additional analysis of Arg1 as M2 factor is being considered. P-iKB-a/IKB-a ratio was lower than HF in all cases, and 5- and 9-teabag black ginseng, mung bean, dried orange peel, and Sargassum fusiforme expressed upstream signal transduction pathway suppressing inflammatory mediators. Obesity is associated with the increase in COX-2 and CRP levels, and the high-concentration Ecklonia cava administration decreased them to the normal levels.

2.3. Antiobesity test using 60% fat-DIO (10 weeks + extract treatment)

12-week concentration-dependence test (125mg/Kg, 250mg/Kg) of Black bean testa extract

- **Result of total body fat (Micro-CT)**: The treatment groups [125mg/Kg (C3G+D3G=1.56mg/Kg) and 250mg/Kg (C3G+D3G=3.23mg/Kg)] showed decrease in visceral fat by 10 and 20%, respectively. The total volume of visceral fat matched the post-mortem measure of mesenteric fat (g). In the 250-g group, both visceral fat and leptin secretion were reduced.
- TNF-a decreased in the 250-mg group as did in the 200 uM cell test, showing a highly sensitive reaction to the extract concentration. Both 125- and 250-mg groups showed increase in adiponectin compared to HF, even to a greater extent than the control group.

12-week treatment of ethanol extracts of red algae containing agar

- Although no difference in decrease was observed in the total body weight and fat mass, subcutaneous fat was considerably increased, which is associated with increase in muscle mass and decrease in serum leptin and insulin. Additionally, the results of IHC that was performed

using MCP-1 and TNF-a antibodies in epididymal fat revealed that the M1 formation was suppressed.

- Blood glucose suppression: OGTT test revealed that after 120 minutes, the blood glucose in the control group was reduced at a similar level to the control group, showing a significant difference from the HF group.

8-week treatment of ethanol extracts of agar-free red algae agar for concentration-dependence test (250, 300, 500, and 1000mg/Kg)

- Prevention study: In all treatment groups, no clear tendencies were observed in terms of total body weight, dietary intake, blood lipids (cholesterol, triglycerides, and glucose), which led us to determine that red algae did not have any antiobesity effect. Looking at the percentage difference in total body fat and muscle mass ratio, however, 250-mg group showed a significant decrease, presumably due to the fact that 250-mg group showed the largest increase in muscle mass (QD). The result of analyzing the anti-inflammation factor IL-10 revealed that it has a significant anti-inflammatory effect in epididymal fat ($p < 0.05$). Interestingly, the increase was linearly concentration-dependent up to GA-500 mg/kg, but at high-concentration (GA-1000 mg/kg), the effect tended to decrease.
- Treatment study: GA-300 mg/Kg was the only concentration at which body fat (mesenteric fat) was reduced. Other concentration groups did not show and significant body fat, presumably due to the increase in food intake. As for blood lipids, no significant differences were observed in all treatment groups, with the 300-mg group showing glucose reduction compared to the control group. The result of analyzing the anti-inflammation factor IL-10 Epididymal fat revealed that the anti-inflammatory effect of the ethanol extracts of agar-free red algae was significantly higher in all treatment groups compared to the control group ($p < 0.05$).

2.4. Antidiabetic, antiobesity, and antioxidant efficacy of the Diechol-rich Ecklonia cava extract in the *db/db* mouse model

- Antidiabetic effect: When dieckol 20mg/kg was administered, insulin was considerably decreased, and the expression levels of p-AMPK and p-AKT protein increased protein at the dieckol concentration levels of 10 and 20 mg/kg.
- Antioxidant effect: The treatment with dieckol 10 and 20 mg/kg increased the expression of antioxidant enzymes SOD and GR compared to the control group, and MDA synthesis was reduced.

2.5. Antihypertensive effect of sea squirt in SHR mice

- The result of isolating the peptide that functions as ACE inhibitor and vasodilator from the sea squirt hydrolyzate revealed it to be an Ala-His-Ile-Ile-Ile peptide with molecular weight of 565.3 Da. This was orally administered to the SHR (spontaneously hypertensive rat) animal model, and blood pressure was measured at 24 h via tail-cuff method. Although weaker than amlodipine (calcium channel blocker) that was used as a control, its blood pressure lowering effect was superior to that of the saline treatment group over time. At 12 h, it showed a blood pressure lowering effect similar to that of the amlodipine treatment group.

3. Human-subject clinical trials

3.1. Antiobesity effect of roasted mung bean tea on middle-aged women (acute clinical trial)

- Test specimen: roasted mung bean (12 g) brewed in 100 mL water at 70°C for 10 min (base on sensory evaluation)
- Subjects: 20 obese middle-age women (BMI > 25; average age: 52.80± 5.73) living in Seoul currently under no medication or disease treatment were randomly assigned to the control group (n = 10; same-amount water intake) and experimental group (n = 10; roasted mung bean tea intake). The experimental group was instructed to drink a bag of roasted mung bean tea (~12 g) after each meal (3 times/d) for 4 weeks without imposing any dietary constraints.

- **Total body fat and BMI**: No pre-post changes in body composition were observed both in the experimental and control groups. The total body fat and waist-hip ratio (WHR) were decreased after 4 weeks of mung bean bagged tea intake, but without reaching a statistical significance. A prolonged trial period is expected to yield the level of antiobesity effect comparable to vitexin and isovitexi that are physiologically active substances contained in the mung testa.
- **Improvement of blood lipids**: Compared with the control group, blood TC significantly decreased after the tea intake of 2 and 4 weeks. Blood TG showed a significant decrease after 4 weeks' of mung bean teabag tea drinking. This effect of blood TC reduction is considered to be attributable to the composites of fatty acids and complex polysaccharides contained in mung bean testa in addition to vitexin and isovitexin.

3.2 Antiobesity effect of Black bean testa extract on obese subjects(8weeks, double-blinded, test-placebo; CRO collaboration)

- **Subjects inclusion:** 19-65 years old obese people(BMI>25kg/㎡ or waist circumferences(WC) >90cm for men amd >85cm for women)
- **Test & Placebo:** Randomly assigned test group (n=40) took the extracts form black bean testa 3 times s day(two capsules pet one times; 2.5g/day) and the placebo group(n=40) took same amount of starch instead of test materials for 8 weeks.
- **Body fat composition:** To the final subjects allowed protocol (Per Protocol Set; n=63), the body fat composition was not different between two groups. However, WC that representative for abdominal fat was significantly decreased in the test group compared to the placebo.(p<0.0001)
- **Lipid profiles:** TG, LDLc, Non-HDLc(TC-HDLc), LDLc/HDLc and (TC-HDLc)/HDLc were differe netween two groups before and after experiments. LDLc, non-HDLc and /LDL/HDL were also different between two groups. Since TC, LDLc, HDLc, Non-HDLc and VLDLc were decreased in both two groups, the significant difference between two groups were not found.
- **Diet and Physical activity(MET-minutes/week):** By the analysis of Intention-to-treat(ITT), we could not find the differences of diet and physical activity between test and placebo.
- **Safety assessment**: For all 80 subjects who took at least once the study material (safety group), the measurement results concerning adverse events, clinicopathological examination (hematological tests, biochemical tests, urinalysis), and vital signs were analyzed. As a result, 19 cases of mild or moderate/severe adverse reactions in 17 subjects out of 80 occurred, but there was no intergroup difference in the occurrence of adverse reactions such that no cause-effect relationship regarding the study product can be drawn from this.

4. Optimization of production process

4.1. Efficacy maximization using makgeolli in the black ginseng production process

- **Active ingredient extraction**: 70% ethanol extraction of ginsenoside increases the extraction yield. Because the 5-teabag extraction yield is high, for the elution of active ingredients, it is efficacious to produce up to amount of 5 teabags and then extract using 70% ethanol.
- **Total phenolic content:** Phenolic content increased in proportion to the number of teabags, which led us to believe that melanoidine molecules that are generated as browning progresses have a relatively stable free radicals. This effect increased when steamed with makgeolli. The total phenolic content increased in aging group than in immature group. Melanoidine molecules contribute to the stabilization of the aging process.
- **DPPH-mediated antioxidant activity**: While the total phenolic content tended to increase while undergoing the process of aging, DPPH-mediated antioxidant activity decreased in regular groups. In this regard, the makgeolli steaming group showed outperformed all other groups.
- **ABTS-mediated antioxidant activity**: Antioxidant activity increased in proportion to the number of teabags and decreased with the aging, which was compensated for and increased again with the steaming with makgeolli. It may be concluded that aging under makgeolli steaming yields the

black ginseng of optimal quality. On the other hand, although antioxidant activity increases as the number of teabags increases, given that 4-5 teabags show similar level of activity to the 9-teabag group, use of 4-5 teabags under makgeolli steaming can be considered the optimal production process in terms of activity level of the product and time and financial budgets.

4.2. Achievement of optimal effectiveness with mung bean roasting method

- 20 kg mung bean is extracted with 20 L ethanol and concentrated to 1.33L. The extract is then separated into vitexin and isovitexin using HPLC, yielding the contents of 18.05% and 20.87%, respectively.
- The higher the roasting temperature rises, the higher the antioxidant activity becomes. However 110°C proved to be optimal for the treatment group in terms of DPPH radical scavenging activity (10.8%), ABTS radical scavenging activity (34.8%), xanthine oxidase inhibition activity (48.6%) more than the temperature counterproductive. Higher temperatures were counter-effective. Nitrite scavenging activity tends to be increased with the increase in the roasting temperature and decreased with the increase in pH. The 30-min roasting group showed the highest total flavonoid content (383 mg/g) and unroasted group, the lowest (275 mg/g).

4.3. Establishment of extraction process of polyphenol (45%)/Dieckol-rich Ecklonia cava

- To achieve an efficacious mass production of polyphenols (45%)/Dieckol (purity 97%) rich-Ecklonia cava extract (AG-Dieckol), glycolytic enzymes are first introduced and the polysaccharide extracted/secured for 24 h. After the completion of the first process step, the residual Ecklonia cava is added with 10-fold amount of ethanol and extracted for 24 h at room temperature, followed by filtering using a decanter and filter press. The AG-Dieckol derived from the filtered Jeju Ecklonia cava is then concentrated, freeze-dried, and packaged in accordance with the packing units.
- The standardization of functional materials includes the analysis of functional/marker components in compliance with the Official Notice No. 2011-34. Evaluations of specificity, linearity, range accuracy and stability are performed.
- The stability assessment of AG-Dieckol: Sprague-Dawley (SD) linage female rats are used for the assessment acute toxicity and oral LD_{50}inasingleoraladministration.

4.4. Anthocyanin-rich black bean testa formulations and prototype production

- Black bean testa is added at the percentages of 0, 20, 40, 60, and 80%, and its brightness, color, physical properties (TPA test: hardness, springiness, gumminess, chewiness, cohesiveness), and sweetness are measured.
- The addition of black bean testa up to 80% increases the sugar content, but its physical properties of hardness, springiness, gumminess, and chewiness deteriorates, with cohesiveness unchanged.

4.5. Effectiveness evaluation of the by-products recycling products after separating testa from black bean (bread or cookie)

- Bread with 9% black bean by-products showed the most excellent qualities in physical properties such as chewiness, gumminess, springiness, cohesiveness; sensory evaluation such as color, flavor, texture, moistness, softness, taste, and overall quality; and antioxidant abilities such as DPPH, ABTS radical scavenging activities, total amount of phenol, total flavonoids, etc.
- Cookies with 6% black bean by-products showed the most excellent qualities in flavor, texture, moistness, taste, and overall quality.
- Both bread with 9% and cookies with 6% black bean by-products showed antimicrobial activities.

5. Agricultural material classification and DB generation

- From May 29, 2012 to June 07, 2012, international SCI-level papers published were screened on the Pub MED and Web of Science search portals with the antiobesity keywords (obesity, appetite, 3T3-L1, lipid, fat , adipocyte, weight, diet, AMPK).

5.1. Agricultural materials

A total of 1,214 DBs were generated including 789 DBs for green tea, 94 DBs for seaweed, 72 DBs for garlic, 60 DBs for ginseng, 48 DBs for grape, 45 DBs for mushroom, 43 DBs for cabbage, 24 DBs for ginger, 22 DBs for pepper, 14 DBs for buckwheat, and 9 DBs for chicory.

5.2. Fishery materials

A total of 346 DBs were generated including 110 DBs for microalgae, 65 DBs for seaweed, 61 DBs for sea mustard, 31 DBs for sea tangle, 30 DBs for gulfweed, 28 DBs for shell fish, 7 DBs for Ecklonia cava, 6 DBs for Ishige sincola, 5 DBs for Sargassum fusiforme, and 3 DBs for red algae.

6. Prototypes and marketing strategies for establishing the basis for industrialization

6.1. Prototypes

1) Three variations of test products using 5 teabag black ginseng

a) Korea Black-Red Gingeng Gold

b) Black-Red Ginseng/Antler Drink

c) black ginseng tea mix

2) Roasted mung bean teabags

Dietary information

	1 portion size	Concentration per one portion size					
		Kcal	carbohydrate	protein	fat	cholesterol	sodium
Mung bean tea	13 g	45 Kcal	8.2g	2.4g	0.3g (Saturated fat) 0g (Trans fat)	0 mg	50 mg

3) Two cases of roasted mung bean granule tea

a) 97.5 g mung bean extract is blended with 500 g anhydrous crystalline glucose (CJ) (extract/glucose = 19.5%). After being left to stand to be stabilized for 30 minutes, the mix is crushed into granules with a granule-making machine (5 HP) with the perforating mesh diameter of 1-mm. The granules are then hot-air dried at to 40Å and prepared in the form of granule tea.	
b) To improve the taste of Type A, the mix of 97.5 g mung bean extract and 500 g anhydrous crystalline glucose (CJ) (extract/glucose = 19.5%) is added with **15 g vitamin c** and **0.5 g citric acid**. After being left to stand to be stabilized for 30 minutes, the mix is crushed into granules with a granule-making machine (5 HP) with the perforating mesh diameter of 1-mm. The granules are then hot-air dried at to 40Å and prepared in the form of granule tea.	

4) Diverse types of trial products added with AG-dieckol

Three trial products have been developed after an extensive R&D of a variety of formulations for using AG-dieckol, an antiobesity agent derived from Jeju Ecklonia cava. In addition to these three prototypes, there is an ongoing R&D to develop additional products with different formulations.

a) By the addition of AG-Dieckol ring form of the Aqua Poly play

b) Ecklonia cava produced in the form of a tablet Dieter Jung calls (TBD).

c) Produced in a liquid state Ecklonia cava extract Dieter call (TBD).

5) Black bean testa jelly (varied according to the testa contents)

a) Control b) SY20 c) SY40 d) SY60 e) SY80

6) Trial products using the by-products after separating testa from black bean (bread or cookie)

Additional stickers will be attached to the PB products of the company Haegaon (Ltd.) under current development. Also, there are ongoing negotiations with Olive Co-op and Green Village (Ltd.)

시험항목	control	부산물9%함유식빵
열량(kcal)	302	304
탄수화물(g)	51	51
당류(g)	4	7
단백질(g)	4	12
지방(g)	11	6
포화지방(g)	0	3
트랜스지방(g)	0	0.1
콜레스테롤(g)	11	5
나트륨(mg)	447	218

검 사 성 적 서

6.2. Creation of the basis for industrialization [BBT-CD3G New Product Marketing Strategy]

1) Industrial analysis of the antiobesity functional foods

- The demand for the health functional foods has increased in the domestic and international market due to wellbeing trend, aging society and increase in income. Customers' interest in the weight control rises, and the related market is expanding.
- In the domestic market there are more than 700 kinds of the antiobesity functional foods which target mostly women of age twenty to forty. The foods have diverse functions like weight control, skin care and vitalizing bowel movement. Cosmetic companies are entering the market briskly.
- Users' satisfaction level with the antiobesity functional foods is low compared with the high interest in the foods. The safety of the core materials is the critical factor in buying decision.

2) Marketing strategy of the new BBT-CD3C product

- Target market: The male of age 30-50 is the target segment since this group has the highest obesity rate, and is not active in the weight control. Also, there are few products which target obese men.
- Positioning strategy: Premium product with high quality and high price
- Product strategy: Product with rapid effect by containing large dose of the raw material. Liquefied(gel) form in an individual package for an easy use.
- Pricing strategy: Premium pricing with 70,000 - 80,000 won for one month
- Channel strategy: Selective marketing channels like sport facilities, pharmacies and speciality stores. Alliance with manufacturers of male products
- Marketing communication strategy: focus on the positive message by emphasizing the desirable body type. Active use of helath-realted blogs, words of mouth, participation in the promotional events, high-quality magazines for men, and the traffic broadcasting.

VI. Study achievements and achievement application plan

1. Establishment of antiobesity research system based on joint pursuit of industry and university through academic-industrial convergence study

1.1. Specialized industrial human resources can be trained based on the establishment of an academia-industry joint research system and convergence technology by contributing to the practical application of research in an effort to introduce the necessary industry-university research system through academic-industrial joint research projects.

1.2. Efficacious convergent research system can be established for integrated antiobesity study through interdisciplinary networks of various related fields such as nutritional science, life science, medicine, and herbal medicine.

1.3 New *in vitro* screening method (based on adipogenic differentiation stem cell or yeast genomics) can be used as a pilot trial in support of *in vivo* trial design that requires a long-term trial period, thus makes it possible to make important decisions rapidly in response to the rapidly increasing obesity prevalence so that its pathogeic mechanism and etiology can be studied in various approaches at academic level.

2. Establishment of a new industrial sector driven by the antiobesity research system reform

2.1. New *in vitro* screening method can serve as the basis for creating a new industrial sector, provided that it is preceded by the standardization of culture conditions, standardization of mass production, and generation of standard DB (data storage regarding comparison groups against which clinical/*in vivo* results can be checked, DB generation regarding the effective screening prediction in metabolic). For example, a new industrial field can be created, such as GLP institutions, in order to promote the development of one-step antiobesity screening KIT, pathogenic mechanism experimental model or clinical model.

2.2. By developing and industrializing agricultural and fishery product extracts whose active ingredients and markers are identified or composite-type obesity improving functional health foods, farming households cultivating similar products can have opportunities to transform farming into a high value-added activity.

2.3. A new industry-university marketing field can be created by developing customized diet program tailors to specific operational groups, age, and income of the customers consuming functional health foods.

3. Achievement of the national competitive edge in the global competition

3.1. The current trend in the increase in childhood obesity prevalence strongly suggests that it is likely to be transferred to obesity and chronic diseases in one out of three of the entire population within 10 years to come. The majority of people are at risk of becoming unhealthy or economically disabled individuals, imposing increasing burden to national medical expenditure, leading to gradual loss of national competitiveness. Furthermore, synthetic pharmaceuticals induce side-effects and are hence no contributing factor to healthy future of general public. For this reason, development of foods with high functional performance will have a valuable impact on public health.

3.2. By enhancing the excellence and differentiation of functional products using domestic agricultural fishery products, the project will greatly contribute to occupying the first competitive edge in the obesity-related international functional food market and the high added-value creation of the companies concerned.

CONTENTS
(영 문 목 차)

Chapter 1	The overview and goal of the research & development project	p38
Chapter 2	The development in the domestic and foreign technical progress	p46
Chapter 3	Contents and results of the R & D project	p50
Chapter 4	Achievement of the final goal and contribution to the related fields	p192
Chapter 5	R &D accomplishments and the application plan for the achievements	p200
Chapter 6	Global scientific informatics collected during the R & D progress of	p211
Chapter 7	Research equipments and facilities status	p213
Chapter 8	References	p214
Annex	Outline of Patent, paper or market analysis reports	p216

목 차

제 1 장 연구개발과제의 개요 및 성과목표
* 연구개발의 목적, 필요성 및 범위 등을 기술
* 연구성과 목표 대비 실적

제 2 장 국내외 기술개발 현황
* 국내.외 관련분야에 대한 기술개발현황과 연구결과가 국내.외 기술개발현황에서 차지하는 위치 등을 기술

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과
* 이론적, 실험적 접근방법, 연구내용, 연구결과를 기술

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도
* 연도별 연구목표 및 평가착안점에 입각한 연구개발목표의 달성도 및 관련분야의 기술발전에의 기여도 등을 기술

제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획
* 실용화.산업화 계획(기술실시 등)
* 교육.지도.홍보 등 기술확산 계획 등
* 특허, 품종, 논문 등 지식재산권 확보계획 등
* 추가연구, 타연구에 활용 계획 등
* 연구기획사업 등 사업별 특성에 따라 목차는 변경 가능함

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

제 7 장 연구시설·장비 현황
* 도입·개발한 연구시설·장비 현황 및 국가과학기술종합정보시스템 장비 등록번호를 기술

제 8 장 참고문헌
* 보고서 작성 시 인용된 모든 참고문헌을 열거

<첨부> 특허, 논문 및 시장분석 보고서

제 1 장 연구개발과제의 개요 및 성과목표

1. 연차별 연구개발의 목적, 필요성 및 범위

가. 1차년

(1) 연구개발 목표

○ 항염증성 비만 연구를 위한 ATM moel의 확립 및 phenotypes의 적용 ○ 피하지방 줄기세포주와 복부지방 줄기세포주의 확보 ○ 항비만 마커 개발 transcriptome DB 구축 ○ 핵심기술(구증구포기술에 막걸리 응용)을 이용한 흑삼 제조공정의 표준화 및 안정성 검토 ○ 농수산물 항비만 소재 분류 및 Data base 구축 ○ 흑삼과 농수산물에 대한 전임상 연구

(2) 세부목표 및 평가착안점

세부연구목표	가중치	평가의 착안점 및 기준
1-1: 염증-지방세포분화 ATM heterogenecity model 개발 및 표준화 및 피하지방 줄기세포주와 복부지방 줄기세포주의 확보	25 %	○ 염증-지방세포분화 ATMΦs model 개발 및 process 표준화 시험 (1차년 70%) ○ 사람, 생쥐의 복부 및 피하지방 줄기 세포주 확충 및 유지 ○ 줄기세포분화기술 이용한 특정세포 확보 및 기반구축과 표적물질 효율 검증
1-2: 유효소재의 phytochemicals 을 이용한 Yeast내 지방 축적 변화 및 염증관련 산화적 스트레스 측정/ DIO mouse model을 이용한 염증 유도 항산화 조절 기전 규명	25 %	○ 효모세포 기반 항비만 잠재소재 탐색 ○ 항비만 잠재소재의 항산화 작용 측정 ○ DIO mouse model을 이용한 염증 유도 관련 항산화 조절 기전 규명
2-1: 핵심기술을 활용한 black ginseng 제조공정 표준화 및 항비만 제품개발	20 %	○ 흑삼의 진세노사이드(Rg3, Rh1 등) 함량 증강을 위한 흑삼제조 공정 표준화 ○ 핵심기술(구증구포공법)에 막걸리를 접목하여 제조한 흑삼의 안전성시험 및 영양성분 분석 ○ 막걸리를 이용하여 흑삼지표물질 극대화 및 흑삼 제조공정 표준화
2-2: 항비만 소재 분류/DB 구축 및 유효소재 전임상 실험	15 %	○ 항비만 농수산물소재의 유효물질 분류 및 DB 구축 ○ 비만으로 유도된 동물모델을 통해 홍삼 및 유효 농수산물 전임상 연구
2-3: 수산물 유효소재 (미더덕, 감태, 모자반)의 항비만표지 물질 규명	15 %	○ 가공기법의 다양화를 통한 생리기능별 특성연구 ○ 항비만 생리기능성연구 (항산화, 항비만, 항염증, 항당뇨, 항균, 세포독성 등) 및 경구독성 및 세포독성 시험 ○ 수산물(감태, 미더덕)로부터 추출물 확보 및 항비만 전임상실험 및 기능성시험

(3) 연구수행범위 및 내용

세부	연 구 범 위	연구수행방법 (이론적·실험적 접근방법)	구체적인 내용
1-1	○ 염증-지방세포분화 ATM model 표준화 시험 ○ 사람, 생쥐의 복부 및 피하지방 줄기세포주 확충 및 유지 ○ 줄기세포분화기술 이용한 특정세포 확보 및 기반구축과 표적 물질 효율 검증	A. 염증-지방세포 ATMΦs model 표준화 시험 ○ ATM Model 디자인: 3T3L-1 cell을 이용하여 신소재를 screening하여 염증인자와의 관련성 확인: M1과 M2 status 조사 ○ Immunofluorescence lipid staining (IHC; H&E/mast) ○ 염증-지질합성 유전자마커 개발 (ELISA)	• 3T3L-1 cell과 DIO model 에서의 ATMΦs model 표준화시험 1차년 70% 완성: M2마커(Ym1,Arg1,Mrc1,Clec7a, IL-10) M1마커(IL-6, NOS2, TNF-α, MCP-1)를 중심으로 M1-M2활성에 염증인자관여 증명. • obese adipocyte으로 전환되면 F4/80 (+)CD11c(+) phenotypes화 되는데 이의 전단계로 H&E, mast cell 염색으로 확인함. (2차년 완성 예정) • PPARγ2, C/EBPα, SREBP1c, aP2, GAPDH, TNF-a, IL-6 etc
		B. 피하지방 줄기세포주와 복부지방 줄기세포주의 확보를 통한 대량생산 기반 구축	• 줄기세포 증식 기술의 표준화 및 대량생산 기반 구축 • 피하 및 복부지방 조직 줄기세포 특성 유지 기술 및 표준화
1-2	○ DIO mouse model을 이용한 염증 유도 관련 항산화 조절 기전 규명 소재에 의한 ○ Yeast 세포 내 지방 축적 변화 및 염증관련 산화적 스트레스 측정	A. Diet induced obesity (DIO) 모델 유발 ○ 체중 및 식이 섭취량 측정, 혈당 측정, 조직시료 채취 후 무게 측정, 혈장 lipid profile, 혈장 호르몬 측정, 조직 내 산화적 스트레스 마커 분석	• C57BL/6(4주령)에 45%fat-DIO 유도 각 소재를 12주간 OT로 공급 • 체중, 식이섭취량 측정 • 혈당 및 내당능 측정(Intraperitoneal glucose tolerance test:IPGTT) • Lipid profile(TC, TG, HDLc) & AI • 혈장 호르몬 측정 • 산화Markers : MDA, HO-1, SOD, catalase, Gpx, Nrf-2
		B. 소재에 대한 지방 축적 변화를 BODIPY® 493/503(Molecular probes) Lipid Probes를 이용하여 측정.	• BODIPY probe 로 staining 후 FACS (BD Facscalibur)를 이용하여 지방 축적의 변화도를 측정.
2-1	○ 막걸리를 활용한 흑삼의 제조 ○ 흑삼의 성분분석 ○ 막걸리를 활용한 흑삼의 생리활성 효과 검증 ○ 흑삼 활용 시제품의 개발	A 흑삼의 진세노사이드 (Rg_3, Rh_1 등)함량 증강을 위한 흑삼제조 공정 표준화 B. 핵심기술(구증구포공법)에 막걸리를 접목하여 제조한 흑삼의 안전성 시험 및 영양성분분석 C. 막걸리를 이용하여 흑삼의 지표물질(Rg3, Rh1 등) 극대화 시킨 Korea black ginseng 제조공정 표준화	• 막걸리를 침지 또는 증자(훈증법)하여 흑삼제조하여 흑삼제조 등 막걸리의 적절한 활용방안 강구 • HPLC 등 기기분석을 통해 사포닌의 종류별 함량 분석 • 총페놀, DPPH, ABTS 등 다양한 실험방법을 통해 효과 검증 • 음료 및 기타 시제품, 저칼로리식품치료식 등 개발 1) 시제품개발 및 특허출원: 동진 2) 논문발표를 통한 항비만식품치료식 품질평가: 경기대

세부	연 구 범 위	연구수행방법 (이론적·실험적 접근방법)	구체적인 내용
2-2	○ 항비만 농수산물 소재의 유효물질 분류 및 DB 구축 ○ 비만으로 유도된 동물모델을 통해 홍삼 및 유효 농수산물 전임상 연구	A. 항비만 농수산물소재의 유효물질 분류/DB 구축 B. 농수산물 추출물 5종을 이용한 전임상 시험 - 항비만효과(지질합성 및 분해) - 항염증효과	• Pub MED와 Web of Science를이용한 국외논문만 검색대상 (1,000건 계획) • 흑삼과 시너지를 이룰 농수산물 5종 (흑삼5포, 흑삼 9포, 녹두, 검정콩, 진피, 등 고려)을 DIO 모델에서 항염증성 항비만억제 효과 검증
2-3	○ 수산물 유효소재 (감태, 미더덕)의 추출물 확보 ○ 수산물 유효소재 (감태, 미더덕)의 생리기능성 연구	A. 지표물질이 고농도로 농축된 소재의 대량 생산 공정 표준화 B. *db/db* mouse 동물 모델을 통한 체중감소, 혈당강하 및 항산화 효과 분석 C. ACE 저해 및 혈관확장을 통한 항고혈압 효과 분석 D. 3T3-L1 preadipocytes를 통한 Adipogenesis 억제 효과 측정	• 유효소재의 대량생산 시스템 구축 • *db/db* mouse(비만형 당뇨 모델)에 경구투여 후 체중감소 및 혈당강하 효과 확인 • 근육에서 Glucose uptkae에 관여하는 Akt와 AMPK의 활성화 • ACE저해 및 혈관확장을 통한 항고혈압 효과확인 • SHR (선천성 고혈압쥐) 동물 모델을 통한 혈압강하 효과 확인 • Oil-Red-O staining을 통한 3T3-L1preadipocytes의 분화 억제 효과 확인

나. 2 차년

(1) 연구개발 목표

● 1차 년도 스크리닝 결과 항비만 식품으로 가능성을 보인 녹두, 검정콩, 감태를 중심으로 소재/원료 및 표지물질의 공정과정의 표준화, 독성/안정성 및 반복성 test 등을 시험함으로써 개별인정형 항비만 기능성소재 여부를 검토함.

최 종 목 표	내 용	비 고
농림수산식품관련 기술을 바탕 으로 비만개선용 농림수산 신소재를 확보하여 인슐린 저항성 개선 및, 염증성 비만 조절을 위한 건강기능식품의 기반을 구축	1 핵심: 농산물 소재 개발	1-1: 검정콩 표지물질인 C3G/D3G의 항비만 효과를 재검증하기 위하여 원료, 소재, 공정과정표준화, 독성/안전성 및 반복성 검사시행 1-2 녹두의 원료, 소재, 공정과정표준화, 독성/안전성 검사시행 1-3 표지물질인 vitexin의 항비만 효과를 재검증
	2 핵심: 수산물 소재 개발	2-1: 감태의 표지물질인 diechol의 항비만 효과를 재검증하기 위하여 원료, 소재, 공정과정표준화, 2-2: DIO 모델을 이용한 유효물질의 항염증, 항비만 기능성 및 독성 검증 2-3: 다시마의 소재, 원료, 공정과정의 표준화 및 독성/안전성 검사시행 2-4: glutamate 와 GABA의 항비만 효능 검증 및 항비만소재 DB 구축

(2) 세부목표 및 평가착안점

세부연구목표	가중치	평가의 착안점 및 기준
1-1: 검정콩 항비만 기능성소재 개발	30 %	○ 항비만 효과가 있는 Target compound (C3G, D3G)의 소재, 원료, 공정과정의 표준화 ○ 산지별 원료 수급현황 분석/ 원료품질관리 기준설정 ○ 1차 표지물질을 이용하여 ATMΦs model을 이용한 신소재의 표지물질의 2차 In vitro (ATMΦs model의 표준화 및 phenotypes)와 In vivo 효능검증 ○ Genomics 연구와 DIO model을 이용한 연구 결과를 바탕으로 후보소재의 항비만 유효용량 설정/검증 ○ Transcriptomics 연구 결과를 2차년도 *in vivo* 연구 결과와 비교 분석하여 효능을 재평가하여 항염증-비만 바이오마커 확인 ○ 기술이전 평가를 위한 컨설팅 ○ 독성검사, 안정성/안정성 검사 총괄책임 (GMP/GLP 기관연계 3차년 CRO 임상시험 가능한 개별인정 물질 검토 책임)
1-2: 녹두소재의 표준화 및 제품 개발	25 %	○ 항비만 효과가 있는 Target compound (Vitexin)의 소재, 원료의 표준화 ○ 제품화 응용기술개발 및 대량생산 생산공정 표준화 ○ 항비만 농수산 천연자원을 이용한 항비만/면역능 강화 제품개발 및 표지물질 시제품 제작 및 경제성분석:공정별 생산단가 분석/판매가격 조사 분석 ○ 시제품 제작 및 경제성분석:공정별 생산단가 분석/판매가격 조사→시제품의 영양소 함량 및 원가계산을 첨부.
1-3: 녹두소재의 항비만 효능성		○ 지방줄기세포의 증식 기작에 대한 이해 확대와 분화 기작에 대한 이해 확대를 통한 기능적 효과 제어 기반 지식 구축
2-1: 감태소재의 표준화	25	○ 항비만 효과가 있는 Target compound (Diechol)의 소재, 원료, 공정과정의 표준화 ○ 소재추출물의 독성, 안전성 검사
2-2: 감태소재의 효능성 검증		○ DIO모델을 이용한 유효물질의 항염증, 항비만 기능성 및 독성 검증
2-3: 다시마소재의 표준화 및 식품 섭취억제 효능	20 %	○ 항비만 효과가 있는 Target compound(Glutamate, GABA)의 소재, 원료, 공정과정의 표준화 ○ DIO 동물모델을 통해 식품섭취억제기전 규명
2-4: 다시마소재의 항비만 효능성 검증 및 DB 구축		○ 신소재 발굴을 위한 항비만 관련인자 선정 및 측정도구개발 ○ 항비만 농수산물소재의 유효물질 분류 및 DB 구축 에 따른 항염증성 후보소재의 diaobesity 예방 효과 검증

(3) 연구수행범위 및 내용

세부	연구범위	연구수행방법 (이론적·실험적 접근방법)	구체적인 내용
1-1	**검정콩의 항비만 기능성소재 개발**	○ 성신여대: 항비만성 안토시안 보유 검정콩 소재의 개발을 위하여 원료 , 소재 및 공정의 표준화, 안전성/ 안정성 test, 지표물질의 전임상 유효성 평가, 인체시험 용량설정 등의 개발과정 검증.	• 원료 및 지표성분의 표준화; 원료지표물질의 표준화를 위하여 원료대비 추출수율과 추출물 대비 안토시안 확보율 등 • 일반성분,색도 pH, 미생물, 중금속 분석 • 지표물질의 항비만 유효성 검증 (in vitro, in vivo 시험) • 인체유효시험 농도 결정
		○ 고려대: 효모세포 기반 항비만 잠재소재 탐색 모델 및 항비만 소재 탐색 시스템:	• 효모세포 기반 검정콩소재 유래 단일물질인 C3G, D3G의 항비만 및 항산화능 확인. • 발현유전체 연구기반으로 항비만 기전 탐색을 통한 항비만 소재 가치 확보 및 항비만 표적 검출 kit 개발을 위한 마커 발굴
1-2	**녹두소재의 표준화 및 제품 개발**	○ 경기대: 로스팅 녹두제품개발 및 항비만효과	• 녹두 로스팅 공정 표준화 • 로스팅 녹두 및 기타 항비만 식품소재를 활용하여 티백 형태의 시제품 제조 • Roasted 녹두티백의 간이임상실험 실시
		○ 서진바이오: 녹두의 원료/소재 및 공정과정의 표준화	• 녹두의 원료/지표성분 및 공정과정 표준화, 표지물질 수율 확보 • 일반성분,색도 pH, 미생물, 중금속 분석 • 산업화 기반 구축을 위한 고찰
1-3	**녹두의 항비만 효능검사**	○ 성신 생명과학부: 지방줄기세포, 3T3-L1세포를 이용한 선별재료의 유효성분에 대한 세포수준에서의 생리활성에 미치는 영향을 분석하여 대상 물질의 표준화와 산업화 기반 구축	• 각 부위 줄기세포주 doubling time을 기반하여 Golden standard화를 위한 지속적 반복 • 지표유효성분이 줄기세포 및 3T3 L1 세포 수준에서 미치는 영향 분석 • screening system을 이용한 주요 공정과 성산물의 생리활성 효능 분석
2-1	**감태소재의 표준화**	○ 아쿠아그린텍: 감태의 유효 성분의 추출, 분리, 공정과정 표준화 및 유효소재의 표준화	• 유효수산물(감태)로부터 유효 성분 대량시스템 구축을 통한 기능성 유효소재의 표준화 • 고농도 제품의 표준화 공정시스템 개발, 제형개발
2-2	**감태의 효능성 평가**	○ 경희대 식품영양: 감태의 항비만 기능성 검증 (in vivo)	• 체지방축적, 에너지소비, 에너지대사 조절 • 항 염증 기능성 평가를 위한 염증성 마커의 mRNA 및 protein 발현 측정 • 간 및 조직 내 독성 평가
2-3	**다시마소재의 표준화**	○ 마린바이오: 다시마 표지물질(glutamate, GABA)의 항비만 기능성 개별인정 소재화를 목표로 최적 추출공정 개발, 최적 전처리 공정 개발을 통한 최적화 생산공정개발과 함께 효능검사 반복시험	• 다시마를 이용한 최적 추출공정 개발 및 최적 전처리 공정 개발을 통한 기능성 물질의 최적화 생산공정 표준화 • 물리 화학적 특성 규명 및 소재의 표준화를 위한 기능(지표) 성분분석법의 표준화 • 식품섭취억제 및 수분섭취억제 시험
2-4	**항비만 효증성 검증 및 소재 분류/DB구축**	○ 성신 비만과학연구소:항비만 효증성 검증 및 소재분류/DB구축	• 항비만기능성 효과. • 항비만 keyword로 obesity, appetite, 3T3-L1, lipid, fat, adipocyte, weight, diet, AMPK를 사용한 비만연구 검색. • 1차년은 농산물, 2차년은 해양생물에 집중

다. 3 차년

(1) 연구개발 목표

최 종 목 표	내 용	비 고
농림수산물 기능성 소재를 통한 비만개선용 식품개발	1 핵심: 항비만 농수산물 소재의 개별인정 기반구축	1-1: 비만개선용 개별인정 소재의 전・임상시험 (GLP, CRO기관 협력기관)
	2 핵심: 항비만 제품개발 및 산업화 기반구축	2-1: 비만개선 기능성소재를 이용한 상품화 및 산업화 기반 구축 1. 2-3: 한국형 비만유형에 따른 맞춤형 다이어트 2. 제품개발 및 응용프로그램 개발

(2) 세부목표 및 평가착안점

세부연구목표	가중치	평가의 착안점 및 기준
1-1: 비만개선용 개별인정 소재의 전・임상시험	40%	○ 개별인정을 위한 임상시험 시행 [성신여대] • 비만개선용 개별인정 소재(안토시안-rich 검정콩추출물)의 임상시험결과의 validation 검토 - 소재의 안정성/독성 test (GMP 기관) - IRB 승인, 시험과정의 타당성, 시험관리, 통계관리, 보고서 등 - CRO기관과 임상시험기관과의 협력성 - 개별인정신청을 위한 타당도 검증 • 1& 2차년 전임상연구와의 replication(전임상결과와의 비교검토) ○ 소재의 안정성 독성 test (GMP기관) ○ 유효 농수산물 대상 전임상 반복시험 (GLP기관 협력)
2-1: 비만개선 기능성소재를 이용한 상품화 및 산업화 기반 구축	25%	○ 산업화 기반구축 [경기대 & 고을(주)] • 소재의 표준화, 제형적합성 및 제품표준화공정 시스템개발 • 추출과정의 부산물을 이용한 제품화기술개발 • 검은콩 부산물을 활용한 제품개발 (빵류 1종, 쿠키류 1종 개발) • 부산물을 활용하여 기존 제품보다 영양, 관능적으로 우수한 제품 개발 • 빵, 쿠키 recipe 내 부산물 함량을 높힌 상품 개발
2-2: 항비만소재의 기전연구 및 제품개발을 위한 산업화 기반구축	20%	○ 다이어트 제품개발을 위한 기전연구[고려대& 성신여대 생물전공] ○ 한국형 비만유형에 따른 항비만 신소재 발굴법 구축 및 관련인자/측정도구 개발 (New biosystem screening (ADSC, ATMΦs, Yeast Genomics 등 이용) • 효모를 이용한 항산화효능 검정 시스템 구축 및 C3G의 항산화 효능 검정 • 줄기세포 증식 및 분화기작 연구확인
	15%	○ 제품개발 기반구축 [성신여대 식영과 & 컨설팅] • 비만 농수산물소재의 DB 구축 완료 • 산업화기반구축을 위한 자문/컨설팅 • 시제품 경제성 분석: 공정별 생산단가 분석, 판매가격/ 산지별 원료 수급 현황 분석/ 원료품질관리 기준설정 직항 • 개발된 시제품 선호도 분석기술이전을 위한 자문/컨설팅

(3) 연구수행범위 및 내용

세부	연 구 범 위	연구수행방법 (이론적·실험적 접근방법)	구체적인 내용
1-1	비만개선용 개별인정 소재의 전・임상시험	○ 유효 농수산물(검정콩 추출물) 대상 임상시험 시행 ○ GMP 기관의 안전성 & 안정성 test (독성 검사) ○ 유효 농수산물 대상 전임상 반복시험 (GLP기관 협력)	• 비만개선용 개별인정 소재(안토시안-rich 검정콩추출물)의 임상시험결과의 validation 검토 - 소재의 독성 test (GMP 기관) - IRB 승인 & 시험과정의 타당성, - 안전성 및 안정성 test, - 통계관리, 보고서 등 - CRO기관과 임상시험기관과의 협력성 - 개별인정신청을 위한 타당도 검증 • 1& 2차년 전임상연구와의 replication - 전임상결과와의 비교검토 ○ 소재의 안정성 독성 test ○ 유효 농수산물 대상 전임상 반복시험 (GLP기관 협력)
2-1	비만개선 기능성소재를 이용한 상품화 및 산업화 기반 구축	○ 산업화전략 - 소비자 선호도가 높은 제과와 제빵 형태를 선정하여 검정콩 부산물을 첨가한 신제품 제조를 시도하고자 하였음 ○ 검정콩 부산물 첨가 식빵과 쿠키 제품 개발 및 품질평가 - 색도 및 관능검사 - 기계적 물성측정 ○ 완료된 제품에 대한 물리화학적 평가 - 항산화활성 - 9종 영양소 함량 분석 등)분석 - 미생물(항균활성)분석 ○ 완료된 제품에 대한 영양성분, 항산화, 유통기한 설정실험을 통한 제품화	○ 산업화전략 • 소재의 표준화, 제형적합성 및 제품표준화공정 시스템개발 • 추출과정의 부산물을 이용한 제품화기술개발 ○ 부산물을 이용한 제품화 및 품질평가(식빵) • 식빵에 첨가될 적정 첨가 함량 선정: 식빵의 주 재료인 밀가루를 100기준으로 하여 부산물인 검은콩 알맹이의 함량을 0, 3, 6, 9, 12% 첨가한 식빵을 제조 후 품질평가(색도, 기계적 물성, 관능평가)를 통해 적정 첨가함량을 선정하고자 하였음 • 부산물 첨가 함량 결정을 위한 품질평가: 색도(L, a, b값), 관능평가는 패널 30명을 대상으로로 9점 척도법으로 색, 맛, 향기, 질감, 전체적인 기호도 평가, 기계적 물성은 texture analyzer로 측정한 후 3가지 평가항목을 종합적으로 평가하여 적정 첨가 함량을 결정하였음 ○ 부산물을 이용한 제품화 및 품질평가(쿠키) • 쿠키의 주 재료인 밀가루를 100 기준으로 하여 부산물인 검은콩 알맹이 함량을 0, 2, 4, 6, 8% 첨가한 쿠키를 제조하여 식빵과 동일한 방법으로 품질평가를 수행하였음 ○ 완료된 식빵과 쿠기에 대한 물리화학적 평가 • 제과, 제빵의 상품화를 위한 9대 영양소 분석 • 식빵과 쿠키빵의 항산화 활성: DPPH radical 소거활성, ABTS radical 소거활성, Total polyphenols content, 총 페놀함량 측정) • 식빵과 쿠키의 항균활성 분석(*S.aureus, S.epidermidis, B. subtilis, B. cereus, E. coli, S.typhimurium* 등 총 6종을 Paper disc diffusion법으로 측정).

세부	연구 범위	연구수행방법 (이론적·실험적 접근방법)	구체적인 내용
2-2	○ 항비만 소재 의 기전연구 및 제품개발 을 위한 산업화 기반 구축	○ 항비만소재의 기전연구 • Cyanidin 3-glucoside (C3G)에 의한 산화적 스트레스 과부하 효모 세포에서의 항산화 효능 평가 • C3G와 D3G가 지방줄기세포 증식, 분화 기작 밝힘	○ C3G에 의한 산화적 스트레스 과부하 효모 세포에서의 항산화 효능 평가 • ROS superoxide를 특이적으로 없애주는 superoxide dismutase 효소 정보를 가지는 두 개의 유전자가 각각 제거된 효모세포주를 생산함. ROS 과산화수소를 특이적으로 없애주는 catalase 효소 정보를 가지는 두 개의 유전자를 각각 제거된 효모세포주를 생산함. • 특이적 산화적 부화가 걸린 효모세포주에서 C3G 효능평가 - 결실 효모종에서 자체 ROS 생성 증가 대비 C3G에 의한 ROS 억제효능평가 (ROS 종류별 특이적 평가) - 결실 효모종에서 C3G에 의한 ROS 생성 억제를 통한 효능 평가 (세포 수명) ○ C3G와 D3G가 지방줄기세포 증식, 분화 기작구명 • 2차년도 연구결과 기반 • 지방세포로의 분화 유도 과정에서의 영향 분석 -분화 억제 효과 예측 - translation- 또는 transcription 수준에서의 분석 (PPARγ 등) - adiponectin 등의 발현 분석
		○ 제품개발 기반구축	○ 농산물 및 수산물의 항비만 신소재 DB구축 ○ 산업화기반구축을 위한 자문/컨설팅 • 시제품 경제성 분석 • 개발된 시제품 선호도 분석기술이전을 위한 자문/컨설팅

2. 연차별 연구성과 목표 대비 실적

가. 1 차년

(1) 목표 대비 달성도

목 표	연구개발 수행내용	달성도
1-1: ATM 모델과 지방유래 줄기 세포 모델을 이용한 항염증성 비만연구	○ ATMΦs model 표준화 시험/표지물질 screening ○ 피하지방 줄기세포주와 복부지방 줄기세포주 의 확보를 통한 대량생산 기반 구축	150%
1-2: Genomics와 *in vivo* DIO 모델을 이용한 농수산물 유래 항비만 유효소재의 항염증성 기전규명	○ DIO mouse model을 이용한 염증유도 관련 항산화 조절 기전 규명 ○ 효모세포 기반 항비만 잠재소재 탐색	150%
2-1: 핵심기술을 활용한 흑삼제조 공정 표준화/항비만 제품개발	○ 흑삼 제조 시 막걸리의 응용방안 강구 ○ 시제품제작, 특허출원, 상표출원, 논문발표 ○ 흑삼의 ginsenosides 함량 분석완료.	150%
2-2: 항비만 소재 분류/DB 구축 및 추출물 전임상 실험	○ 항비만 소재 분류/DB 1000건 구축 ○ 농수산물 추출물 5종 전임상 실험	200%
2-3: 수산물 유효소재 (미더덕, 감태, 모자반)의 항비만표지 물질 규명	○ 수산물 유효소재 대량생산 시스템 구축 및 소재 대량 확보 ○ 수산물 유효소재의 다양한 생리기능성 확인	100%

나. 2 차년

(1) 목표 대비 달성도

목 표	연구개발 수행내용	달성도
1-1: 검정콩 표지물질인 3G/D3G의 항비만 효과를 재검증하기 위하여 원료, 소재, 공정과정표준화, 독성/안전성 및 반복성 검사시행	• 원료 및 지표성분의 표준화; 원료지표물질의 표준화를 위하여 원료대비 추출수율, 추출물 대비 안토시안 확보율 • 일반성분,색도 pH, 미생물, 중금속 분석 • 지표물질의 항비만 유효성 검증 (in vitro, in vivo 시험) & 인체유효시험 농도 결정 • 효모세포 기반 검정콩소재 유래 단일물질인 C3G, D3G의 항비만 및 항산화능 확인. • 발현유전체 연구기반으로 항비만 기전 탐색을 통한 항비만 소재 가치 확보 및 항비만 표적 마커 발굴	200%
1-2: 녹두의 원료, 소재, 공정과정표준화, 독성/안전성 검사시행	• 녹두 로스팅 공정 표준화 • 로스팅 녹두 및 기타 항비만 식품소재를 활용하여 티백 형태의 시제품 제조 • Roasted 녹두티백의 간이임상실험 실시 (관능평가추가) • 원료/지표성분 및 공정과정의 표준화 • 단백질 정량, 총당, 항산화 활성, 미백활성 등 영양성분 분석 추가	140%
1-3: 표지물질인 vitexin의 항비만 효과를 재검증	• 각 부위 줄기세포주 doubling time을 기반하여 Golden standard화를 위한 지속적 반복 • 지표유효성분이 줄기세포 및 3T3 L1 세포 수준에서 미치는 영향 분석 • screening system을 이용한 주요 공정 과성 산물의 생리활성 효능 분석	140%
2-1: 감태의 표지물질인 dieckol의 항비만 효과를 재검증하기 위하여 원료, 소재, 공정과정표준화	• 유효수산물(감태)로부터 유효 성분 대량시스템 구축을 통한 기능성 유효소재의 표준화 • 고농도 제품의 표준화 공정시스템 개발, 제형개발 • 독성 및 안전성 평가 추가	150%
2-2: DIO mouse 모델을 이용한 유효물질의 항염증, 항비만 기능성 및 독성 검증	• 체지방축적, 에너지소비, 에너지대사 조절 • 항 염증 기능성 평가를 위한 염증성 마커의 mRNA 및 protein 발현 측정 • 간 및 조직 내 독성 평가	100%
2-3: 다시마의 소재, 원료, 공정과정의 표준화 및 독성/안전성 검사시행	• 다시마를 이용한 최적 추출공정 개발 및 최적 전처리 공정 개발을 통한 기능성 물질의 최적화 생산공정 표준화 • 물리 화학적 특성 규명 및 소재의 표준화를 위한 기능(지표) 성분분석법의 표준화 • 식품섭취억제 및 수분섭취억제 시험	100%
2-4: 표지물질인 glutamate와 GABA의 항비만 효능 검증 및 항비만소재 DB 구축	• 항비만 keyword로 obesity, appetite, 3T3-L1, lipid, fat, adipocyte, weight, diet, AMPK를 사용한 비만연구 검색. • 1차년은 농산물, 2차년은 해양생물에 집중	100%

다. 3 차년

(1) 목표 대비 달성도

목 표	연구개발 수행내용	달성도
1-1: 비만개선용 개별인정 소재의 전・임상시험	○ **개별인정을 위한 임상시험 시행 [성신여대]** • 비만개선용 개별인정 소재(안토시안-rich 검정콩추출물)의 임상시험 결과의 validation 검토 - 소재의 독성 test (GMP 기관) - IRB 승인/피험자동의서, 시험진행의 타당성, 통계처리 보고서 등 - CRO기관과 임상시험기관과의 협력성 - 개별인정신청을 위한 타당도 검증 • 1& 2차년 전임상연구와의 replication - 전임상결과와의 비교검토 ○ **안전성 및 안정성 test** ○ 유효 농수산물 대상 전임상 반복시험 (가천의대 협력) • 농산물 수산물중 1건 반복시험예정이었으나 각각 1건 **총 2건으로 반복시험을 추가함. (150% 달성)**	150%
2-1: 비만개선 기능성소재를 이용한 상품화 및 산업화 기반 구축	○ **검정콩껍질 에타놀추출물 소재의 표준화 및 제형적합성** • 소재 및 표지물질(C3G, D3G)의 표준화 및 공정과정표준화, 소재의 중금속 및 영양성분 분석, 소재의 재형성 및 시제품개발을 확립함. ○ **추출과정의 부산물을 이용한 제품화기술개발** • 부산물 0, 3, 6, 9, 12% 식빵 및 부산물 0, 2, 4, 6, 8% 쿠키를 제조한 후 관능평가 및 9대 영양소 분석 • 빵 시제품 출시(2014. 07. 21.) • 빵과 쿠키 시제품의 색도, 물성측정, 항산화 4종, 항균활성측정 • DPPH radical 소거활성,ABTS radical 소거활성, Total polyphenols contents 총 페놀함량(항산화 활성 1종 추가 측정)(>110%), 미생물 6종(*S.aureus, S.epidermidis, B. subtilis, B. cereus, E. coli, S.typhimurium* 등)분석(>150%)	120%
2-2: 항비만소재의 기전 연구 및 제품개발기반 구축	○ **산화적 스트레스 과부하세포에서의 항비만소재 표지물질의 효능 평가 (Yeast 모델 적합도 시험)** • 항산화 효능 평가 시스템 구축 및 C3G의 항산화 효능 평가: 결실 효모 종을 제작하여 항산화 효능 평가 시스템을 구축함. 이 시스템으로 C3G의 항산화 효능을 평가함. • 항산화 효능 평가만 할 예정이었으나, C3G에 의해 yeast cell에서 **지방 축적에 변화가 있는지를 추가적으로 연구함. (150% 달성)**	150
	○ **항비만소재 표지물질의 지방줄기세포 분화기작 규명 (줄기세포 모델 적합도 시험)** • 지방줄기세포의 분화 단계에 따른 C3G와 D3G의 영향을 세포수준 및 분자 수준에서 분석 및 확증, • lineage 관련한 지방전구세포의 분화에 미치는 영향 분석(추가분석)	130
	○ **제품개발 기반구축 [비만과학연구소 & 컨설팅]** • 비만 농수산물소재의 DB 구축 완료 • 산업화기반구축을 위한 자문/컨설팅 • 시제품 경제성 분석 • 개발된 시제품 선호도 분석기술이전을 위한 자문/컨설팅	100

제 2 장　국내외 기술개발 현황

* 국내.외 관련분야에 대한 기술개발현황과 연구결과가 국내.외 기술개발현황에서 차지하는 위치 등을 기술

가. 국내 항비만형 농림수산식품소재의 고부가가치산업화 및 문제점 제안

① 국내 항비만소재 상황

○ 2007년 보건복지부보고서에 의하면 우리나라 사망률 1위는 암, 2위는 순환계 질환으로 나타나 국민건강 보건적 차원의 대책으로 식생활 개선을 통한 식의약적 접근이 필요함.

○ WHO에 따르면 비만은 "21C 신종 전염병"으로 규정하고 비만시장은 전 세계적으로 매년 20%이상 성장하고 있는 추세로 비만과 대사질환을 치료하는 약물과 기능성식품개발은 필수적임.

○ '2007년도 바이오푸드네트워크 사업보고서'에 의하면, 기업체의 향후 우선 연구분야로 1위 비만, 2위 면역기능, 3위 고지혈증, 4위 당뇨 등으로 비만이 우선순위를 차지함[1].

○ 한국건강기능식품협회에서 소비자를 대상으로 건강기능식품 기능성 우선순위를 조사한 보고에 의하면 1위 비만 38%, 2위 면역력 증진 22%, 그리고 3위가 아토피 순으로 비만의 관심도가 높음[2].

○ 인간들이 이용해 왔던 천연물 중 생체에 다양한 생리기능을 수행하는 물질이 함유되어 있다고 알려져 왔으며 이를 **생체반응 조절제(biological response modifier, BRM)**라 하며, 생체 내 각종 반응을 조절하여 항상성을 유지시켜 준다고 알려짐[3].

○ 2009년 4월 각국의 생물자원에 대한 접근과 활용에 따른 이익 공유를 담은 **'Bonn 가이드라인'**이 합의되면서, 천연자원의 활용과 그에 따른 이익창출에 국제적 관심이 고조되고 있음.[4]

② 비만, 당뇨, 고혈압, 이상지혈증 4개의 질병에 대한 특허를 합치면 400여건이 되나 항비만 질환을 억제하는 식품산업화가 미진한 이유는 ?

○ In vitro 시스템에서 항비만 및 대사질환 효능개선을 신속하게 스크리닝할 수 있는 도구 제한적 즉, **good biomodel을 바탕으로한 One-Targeting biomarker 개발이 미흡하기 때문임**[5]

○ *In vitro* 결과가 *in vivo* 상에서 동일하게 재현되지 못한다는 점

○ IRB(Institutional Review Board)의 문제: 대부분의 병원의 임상 IRB심의 기준이 약품에 맞춰져 있기 때문에 건강기능성 식품을 심사대상에서 제외하는 경우가 다수 발생하여 임상시험에 어려움. (Ex: 용량 및 순응도 등 이유로 placebo 제조가 불가능한 경우)

○ 건강기능식품을 추출물 둥 복합성분의 효능검사를 통한 전임상 결과만으로 인체효능의 effect size를 결정하기 어려우므로 반드시 필요한 임상시험을 위한 국가 R&D지원 필요함.

---

1) 바이오푸드네트워크 사업보고서, 2007.
2) 한국건강기능식품협회.
3) J Natl Cancer Inst 70:789-796, 1983
4) Bonn Guidelines on Access to Genetic Resources and Fair and Equitable Sharing of the Benefits Arising out of their Utilization, COP 6 Decision VI/24, ABS (Access and benefit-sharing as related to genetic resources)J Natl Cancer Inst 70:789-796, 1983.
5) Insulin Resistance-The Metabolic Syndrome, Edited by G.M. Reaven, A. Laws. Atherosclerosis, 152, 533. (2000)

○ 건강기능성 식품은 약물에 비하여 결과가 나타나는 효능시간이 매우 길어서 부정확한 결과로 인한 오해가 과학적 근거마련에 저해요인이 되므로 표준화된 연구시스템을 지원하고 이를 바탕으로 한 정보 network을 통한 효율적 연구가 필요함.

○ 식물유래 소재와는 달리 해양소재인 경우 기능성 효율이 매우 좋으나 특유의 비린내와 짠맛 때문에 원료사용이 제한적임. 따라서 발효공법 등의 새로운 공화학적 공법 등의 학제간 연구가 필요함.

○ 국민 의료수가 부담의 저감화를 위해서, 만성적 염증질환 모델을 기반으로 한 임상중재 연구를 통한 기전을 규명하고 이를 토대로 한 기능성식품 개발을 포함한 다각적 분야(의학, 한방, 식품 생명과학 등)의 노력이 절실함[6].

③ 합성의약품의 부작용 사례때문에 천연물치료제 필요성으로 확대된 세계 기능성식품시장에 대항할 한국농산물의 신소재개발과 국가경쟁력향상을 위하여 정부가 나서야할 때임.

○ 천연소재를 이용한 비만 억제물질과 다이어트식품에 관한 연구는 국내·외적으로 활발하게 진행되고 있으나, 육해공자원의 다양한 소재를 이용한 개발이 활발하지 않기 때문에 본 연구에서 시도함. 특히 해양생물소재만을 이용하여 소재의 특성별 본초학적, 영양학적 분류와 더불어 체질에 따라 그 처방을 달리하여 제품화한 연구는 거의 전무한 실정으로, 각종 성인병 예방과 육체적, 정신적, 경제적으로 부담을 크게 줄일 수 있는 제품의 개발이 무엇보다 중요할 것으로 판단됨.

나. 연구개발 대상 기술의 국내외 현황 및 새로운 모델의 필요성

1) 국내 항비만기작 연구현황

① in vitro 연구: 국내에서 세포를 이용한 비만연구는 거의 100%가 비만전구세포인 3T3L-1 cell에 소재물질을 투여하여 adipogenesis을 분석하는 것으로 항염증인자 발현연구는 1편에 불과하며 새로운 모델개발은 없는 상태임.

대상	기전	결과	Ref
3T3L1	Adipo-genesis	3T3-L1 fibroblasts -> 3T3-L1 adipocytes =>gherilin은 adipocyte proliferation 촉진 =>LXR활성은 ABCA1,ABCG1, SREBP1c, FAS gene 발현 =>α-MSH는 PKA, ERK pathway 통해 lipolysis 증가 =>carvacrol 처치시 분화 감소 =>고추장 추출물 처치 glycerol 증가 =>진세노이드 Rd 처치시 분화 감소 =>진세노이드 Rh2 처치시 분화 감소	김 등[7][8] 조 등[9][10] 공 등[11] 김 등[12] 황 등[13]
	Anti-inflammat ion	3T3-L1와 RAW264.7 co-culture, cyanidin과 cyanidin-3-O-β-D-glucoside(C3G) 처치 ①대식세포의 migration이 감소 ②MCP-1, MRP-2의 활성이 억제	채 등[14]

6) Yusuf S et al., "INTERHEART Study investigators. Lancet, 2004, 364, 937.
7) MS Kim et al Molecular Endocrinology 2004;18(9):2291-2301
8) KH Kim et al, J. Lipid. Res.,51(12):3425-3433.2010
9) KJ Cho et al. Journal of Cellular Biochemistry 96:869–878 (2005)

② *In vivo* 연구: 국내에서 동물을 이용한 비만연구는 거의 100%가 C57BL/6J strain이며 목표 또한 adipogenesis 혹은 food Intake/body weight 증감을 확인하는 경우가 대부분이며 *in vivo* 상에서 타조직과의 염증관계 등 지방세포자체연구 및 상관성연구는 5편 정도로 매우 미비함.

○ C57BL/6J strain-adipogenesis (food Intake/body weight 증감포함)

• **Angptl4** (-/-) mice -> 백색지방조직 증가 **=>** Angptl4주입-> 식이섭취 및 체중 감소	김등[15]
• HFD로 비만 유도 후, **crude saponin** 처치 =>식이섭취, 체중 및 지방조직 무게 감소	김등[16]
• DIO mice (20%HFD), **resveratrol** 처치--> 체중과 지방조직 무게 감소/PPARg2, C/EBPa, SREBP-1c, FAS, LPL, aP2, leptin mRNA발현감소	김등[17]
• DIO mice (20%HFD), **carvacrol** 처치-> 체중 및 지방무게 감소/Cyc-D, E2F1,SREBP-1c, PPARg2, C/EBPa, LXR, leptin, aP2, LPL mRNA발현감소	조등[12]
• DIO mice(45%calHFD), **생약복합 추출물** 처치--> 체중과 지방조직감소 / SREBP1-a, FAS, SCD1 mRNA발현감소/lipolysis gene(CD36,PPAR-a)mRNA발현증가	원등[18]
• Sprague-Dawley rats(39%HFD),**향나무추출액** 처치--> PPARg2, aP2, SREBP1c mRNA발현증가, thermogenesis(UCP2, UCP3) mRNA발현증가	김 등[19][20]
• DIO mice(45%K/calHFD), **인진쑥** 처치-->체중/난소주위 지방무게/복벽지방두께 감소	김등[21]
• DIO mice(39%HFD), **Garcinia cambogia** 처치--> 지방조직/지방세포 표면적 감소	
• **흑삼추출물** 처치 =>부고환 및 복부지방 무게 감소	송등[22]

○ C57BL/6J strain-anti-inflammation 기전연구

1. pro-inflammatory cytokines 감소	
• DIO mice(20%HFD), **resveratrol** 처치 =>TNFa, IFNa, IFNb, IL-6 mRNA발현감소 =>TLR2,TLR4억제->지방조직cytokine생산 약화	김 등[23]
• DIO mice(20%HFD), **carvacrol** 처치 =>TLR2,TLR4억제->지방조직cytokine생산 약화	조 등[12]
• DIO mice(45%HFD), **Capsaicin** 처치 =>TNF α, MCP-1, IL-6 mRNA발현감소	강 등[24]
2. AMPK활성 DIO mice(60%HFD) => **ampkinone(AKN)**는 AMPK pathway 활성화	오 등[25]
3. energy balance 조절 => **Foxo1-3A**주입 ①식이섭취 및 체중, 부고환지방 무게 증가 ②AGRP발현 증가, POMC발현 감소	김 등[26]

10) S Cho et al, J Nutr Biochem. 2011, in press
11) CS Kong et al, g. J of Food Science and Nutrtion, 2006; 11: 110-114
12) MS Kim et al. Korean Journal of Biotechnology and Bioengineering, 2007; 22(5): 341-344
13) JT Hwang et al, BBRC 2007;364:1002-1008
14) MR Choe et al. J of Food Science and Nutrtion, 2007; 12: 148-153
15) HK Kim et al, Diabetes. 59(11):2772-2780.2010
16) JH Kim et al, Journal of Pharmacological Sciences, 2005; 97: 124-131
17) MS Kang et al, Biochemical and Biophysical Research Communications, 2008; 369: 333–338
18) HD Yuan et al, Yakhak Hoeji, 2009; 53(5): 286-292
19) SJ KIM et al, Biological & Pharmaceutical Bulletin 31:1415-1421 (2008)
20) KY KIM et al, Biotechnology, and Biochemistry 72(7):1772-1780(2008) 21)
21) HT Kim et al Journal of Veterinary Clinics ;2010; 27(4): 348-365
22) GY Song et al, Korean J Pharmacog 2006;50:381-385
23) S Kim et al, Biochemical Pharmacology 81:1343-1351(2011)
24) JH Kang et al, Obesity, 2010; 18: 780–787
25) S Oh et al, J. Med. Chem 2010;53(20):7495-7413
26) MS Kim et al, Nature Neuroscience 2006;9(7):901-906

2) 국외 항비만기작 연구현황

① Adiogenesis (세포분화조절) 신호전달체계 연구

○ 지방조직생성은 지방전구세포(preadipocyte)가 증식 및 분화과정을 거쳐 성숙한 지방세포(adipocyte)로 변화되는 과정이며, 세포의 형태학적 변화 및 유전자 발현양상의 변화 등이 수반됨.

○ 따라서 지질축적과정에 fatty acid binding protein (FABP2), lipoprotein lipase (LPL), adipsin과 같은 유전자가 발현되고 peroxisome proliferator activated receptor gamma (PPAR γ), CCAAT enhancer-binding proterins(C/EBPs), sterol regulatory binding protein-1c (SREBP-1c) 등 transcription factor가 조절중추 역할을 담당함.

○ Adipogenic trsncription factor를 조절하는 상위 신호전달체계는 Wnt10b-mediated signaling, galanin 및 FGF1-mediated signaling, BMP-mediated signaling 등으로 추정됨.

② AMPK-Fat 분해조절(β-oxidation)

○ **비만상태는** adrenalin 농도 및 Phospholipase Cβ 발현감소로 cAMPK 및 AMPK 인산화가 감소됨.

○ 비만으로 인한 adiponectin 분비감소 또한 세포막에서 adipo R1/R2, APPL1 (domain: BAR,PH,PTB)과 결합하여 AMPK인산화 감소로 인한 FAT synthesis(ACoACBX)를 증가시킴. 즉, AMPK증가는 Carnitine palmitoyl transferase 1와 연계된 지방산 β-oxidation을 증가시킴.

③ Thermogenesis 조절 신호전달체계

○ 비만이 되면 부신수질의 adrenaline 분비감소로 β3-AR(ADRB3)유전자발현 역시 감소하고 adenylate cyclase-cAMP-PKA 발현이 감소되면서 Hormone sensitive lipiase (HSL)과 CREB의 인산화를 감소시켜 미토콘드리아의 지방산산화가 감소됨. 비만상태에서의 SIRT1 발현감소는 PGC-1α 유전자 발현이 감소되고, 핵전사인자들 (RAR, RXR, PPARα,/β,/γ2,ER,C/EBPα/β)와 함께 UCP enhancer에 결합하여 UCP1의 발현을 증가시킴.

④ Insulin-Glut4 translocation 신호전달체계

○ **PI3K/AKT pathway**: Insulin이 IR에 결합하여 IRS1의 Tyr628이 인산화되면, PI3K 인산화를 거쳐서 AKT를 활성화시켜서 GLUT4를 세포질로부터 세포막 쪽으로 translocation함.

○ **RAS/MAPK pathway**: Insulin이 insulin receptor(IR)에 결합하여 GRB2가 IR과 결합하게 되면 SOS에 의해 RAS가 활성화되면서 RAF-1K/MAPKK인산화/ERK와 JNK인산화가 연결됨. ERK는 IRS1의 Ser612를, JNK는 Ser302를 인산화 시키면서 IRS1을 불활성화시켜 궁극적으로 GLUT4 translocation을 감소시킴. 또한 RSK발현증가로 mTOR complex1 (mTORC1)인산화와 S6K1 인산화로 IRS의 Ser612를 인산화시킴(불활성화). TSC1/2을 억제하고 Rheb 발현을 증가시켜 mTOR complex1 (mTORC1)을 인산화하기도 함.

○ **SIRT1/AMPK pathway**: SIRT1은 LKB1를 거쳐 AMPK를 활성화함. 활성화된 AMPK는 두가지 경로를 통해 인슐린저항성을 개선시킴

- AMPK는 IRS1의 Ser789를 인산화시켜 GLUT4 translocation을 증가시킴.

- AMPK는 TSC1/2를 증가시키고 mTORC1를 감소시켜 궁극적으로 IRS1의 불활성화를 억제하고 GLUT4 translocation을 증가시킴.

(3) 새로운 항비만 기전적 모델 필요

① ATM(Adipose tissue macrophage) 모델의 phenotypes (heterogenecity) 제안

○ 지방세포분화에 따른 비만에서의 "인슐린저항성"과 "염증"의 역할을 보여주는 좋은 모델로 ATM이 제시되고 있음. [27)28)]

○ 지방전구세포가 분화될 때 prolinflammatory cytokines (TNF-a)를 발현함으로써 macrophage(**MΦs**)가 infiltration되고 이런 **MΦs**를 ATM이라함. 특히 human에서의 내장지방과 높은 상관성을 가짐.

○ ATM은 C11c positive **MΦs**에 의하여 지방에 침윤됨. ATM의 유입을 조절하는 factor연구가 중요함.

○ ATM의 hetergenecity형으로 M1과 M2형이 존재하는데, 전자는 Th1 cytokines((IFN-γ)에 의한 염증반응 활성형으로 proinlammatory cytokine expression, compliment-mediated phagocytosis가 증가함. 후자는 Th2 cytokines(IL-4, IL-13)발현으로 염증반응 종결 혹은 조직손상보호역할을 맡음[29)].

○ 고지방식이를 투여한 DIO model 혹은 obese adipocyte에서는 M2형 마커(Ym1, Arg1, Mrc1, Clec7a, IL-10)가 감소하고 lean adipocytes의 M1형 마커(IL-6, NOS2, TNF-α, MCP-1)가 증가함. 즉, lean adipocyte가 obese adipocyte으로 전환되면 F4/80(+)CD11c(-)이 F4/80(+)CD11c(+) population으로 phenotypes의 switch가 발생하므로 M1-M2 activation에 염증인자(NF-kB/PPARs)의 관여는 매우 중요함[30)].

○ **인슐린저항성 & lipid metabolism 관련**: Type II환자에서 아스피린(sodium salicylate) 투여가 ATM과 염증발현이 감소하고 인슐린저항성도 감소시키므로 향후 ATM유입조절 인자, ATM activation 인자, ATM subpopulation 영향인자등과의 관련성연구가 계속되어야함. 또한 **MΦs**에서 분비되는 AIM은 CD36에 의한 endocytosis이후 fatty acid synthase활성 억제함으로써 lipid droplet이 감소함.

② 지방줄기세포 모델 및 영향인자 연구 필요성

○ **지방줄기세포 모델의 중요성**

- 비만의 원인은 과한 에너지원의 식이 결과에 의한 지방세포의 부피 및 수의 증가가 원인이 됨.
- 지방줄기세포 증식 또는 지방세포로의 분화에 대한 이해를 통해 비만을 조절할 가능성이 열림.
- 염증성 비만은 피하지방의 축적보다는 복부지방의 증가가 원인이 됨.
- 지방조직유래 줄기세포는 상대적으로 획득하기 용이함(인체 및 실험동물)
- 피하지방 세포수의 증가가 염증성 비만에서는 그렇지 않은 것에 비해 유의하게 감소함.
- 피하지방 줄기세포와 내장지방 줄기세포의 증식정도 차이와 분화 정도 차이를 이용하면 염증성 등의 물질대사질환 관련 효능 여부를 예측할 수 있음.
- 증식과 분화 정도를 판단하는 근거를 표준화(수치화) 가능. 따라서 비만 및 비만관련 질환 조절과 예

---

27) CN Lumeng et al , J Clin Invest,117, 89-184, 2007
28) CN Lumeng, Diabetes, 56, 16-23, 2007
29) FO Martinez et al, alternative activation of macrophage, Annu Rev Immunol, 27, 451-83, 2009
30) JI Odegaard et al, Nature, 447, 1116-20, 2007

측에 매우 유용한 모델이 될 수 있음.

○ 비만과 관련된 사람의 물질대사 관련 질병 유무에 따른 지방줄기세포의 증식 특성

- 피하지방조직 내 지방줄기세포의 증식과 분화는 비만과 비례적 관계가 없음이 in vitro 실험을 통하여 제안됨 31)
- 물질대사 이상이 없는 정상여성 체형 여성의 피하지방 줄기세포의 분화율이 물질대사 이상인 비만여성의 피하지방 줄기세포 보다 높음(Park, Cheon 등 2010)
- 흥미롭게도 복부지방 줄기세포의 증식율에는 이들간에 차이가 발견되지 않음(Park, Cheon 등 2010)

③ 항비만시스템생물학적 접근 필요성

○ 비만 및 항비만에 대한 연구는 다각적으로 진행되어 왔으며, 최근 염증과 관련하여 지방세포의 대사능이 결정될 수 있다는 새로운 가능성도 제기되고 있음. 따라서 비만을 단순한 대사성 질환으로 규정하고 항비만 신소재를 탐색하는 데에는 많은 제약이 발생함. 또한 비만 기전과 관련하여 전반적인 생리활성을 분석, 평가할 수 있는 플랫폼의 개발이 미진한 상태임.

○ 기존의 항비만 소재 탐색 연구 방법은 천연물 또는 그 유래 화합물의 생리활성을 평가하기 위해 한 가지 표적 유전자나 표적 단백질을 설정하고 그에 맞는 약물탐색 시스템을 구축한 뒤 천연물 유래 화합물 library를 탐색하였으며, 동시에 여러 방면의 분석을 진행하기에는 표적의 부재, 그리고 시간과 인력, 비용면에서 큰 부담이 존재함.

○ 잠재적 항비만 소재를 놓치지 않고 탐색할 수 있는 새로운 수준의 표적 유전자 및 표적 단백질 탐색이 필요함.

3) 국내외 특허 현황

① 국내 : 현재(2011. 4월)까지 '체지방 감소' 기능성을 인정받은 139건 건강기능성 식품의 개별인정형 원료로는 아래와 같이 총 12건임. 그러나 유효성분이 검증된제품은 없으며, 녹차추출물을 포함한 모든 소재가 외국에서 이미 연구된 점에서 **국내기술로 개발된 신규소재는 없음.**

② 국외 :

○ **식이섭취조절**: 메르디아와 리덕틸(Knoll pharmaceuticals)로 알려진 시부트라민 (sibutramine)은 세로토닌과 노르아드레날린의 재흡수를 억제함 으로서 식욕을 낮추며, 열대사량을 증가시킴. 두통, 구갈, 식욕부진, 불면, 입마름 및 변비 등의 부작용으로 판매중지 되었음. 그러나,미국 FDA승인이 후 2009년 특허 만료까지 판매 되다가 2010년 판매가 중지.

○ 지방흡수 억제:제니칼 (Roche)은 박테리아의 리페이즈 저해제의 유도체로서 췌장의 리페이즈를 저해함으로서 ttriglyceride의 소화를 감소시킴. 배설되는 지방의 양을 30% 까지 증가시키는 효과를 나타낸다고 알려져 있음. 부작용으로는 장관에 생기는 문제가 가장 많이 보고되고 있지만 심각한 수준은 아님.

○ 에너지소비증가: 에페드린과 카페인의 병용에 의하여 열대사(thermogenesis)가 증가되는 것으로 알려져 있음.

---

31) Permana PA et al, Am J Physiol Endocrinol metab 286:E958-962. 2004

31) N Tandon et al, Alignment and elongation of human adipose-derived stem cells in response to direct-current electrical stimulation. Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc 2009:6517-6521.2009.

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

1. 1차년 핵심별 연구결과

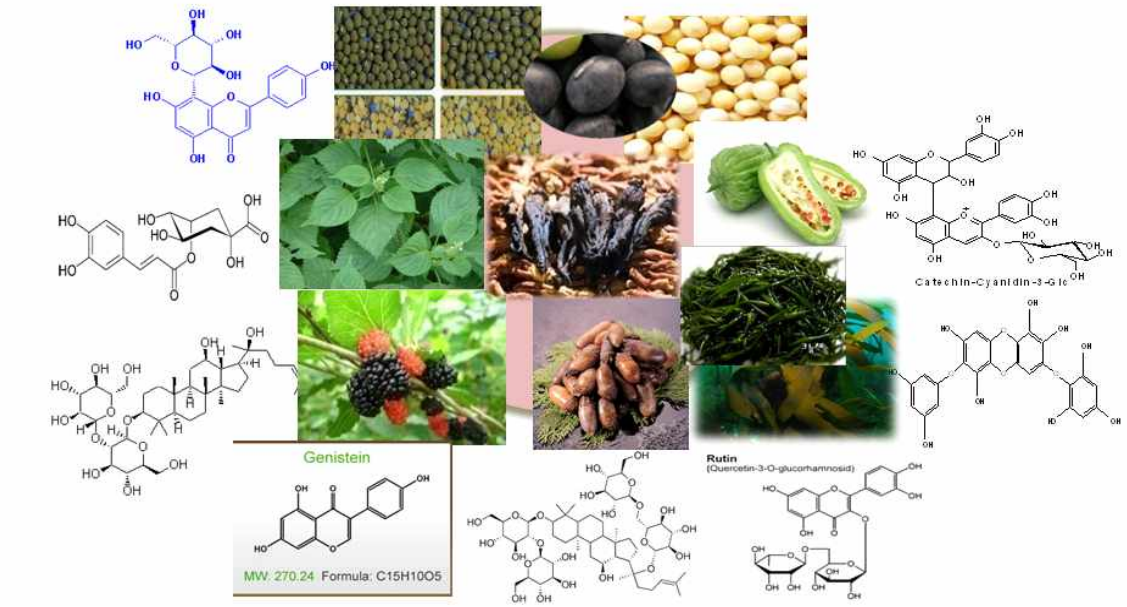
가. 1핵심 1세부:

ATMΦs model 및 지방유래 줄기세포모델을 이용한 항염증성 비만연구
(성신여자대학교 식품영양학과 이명숙/생물학과 전용필교수)

(1) 농수산소재 유효물질 항비만효과 screening *(3T3L-1 in vitro)*

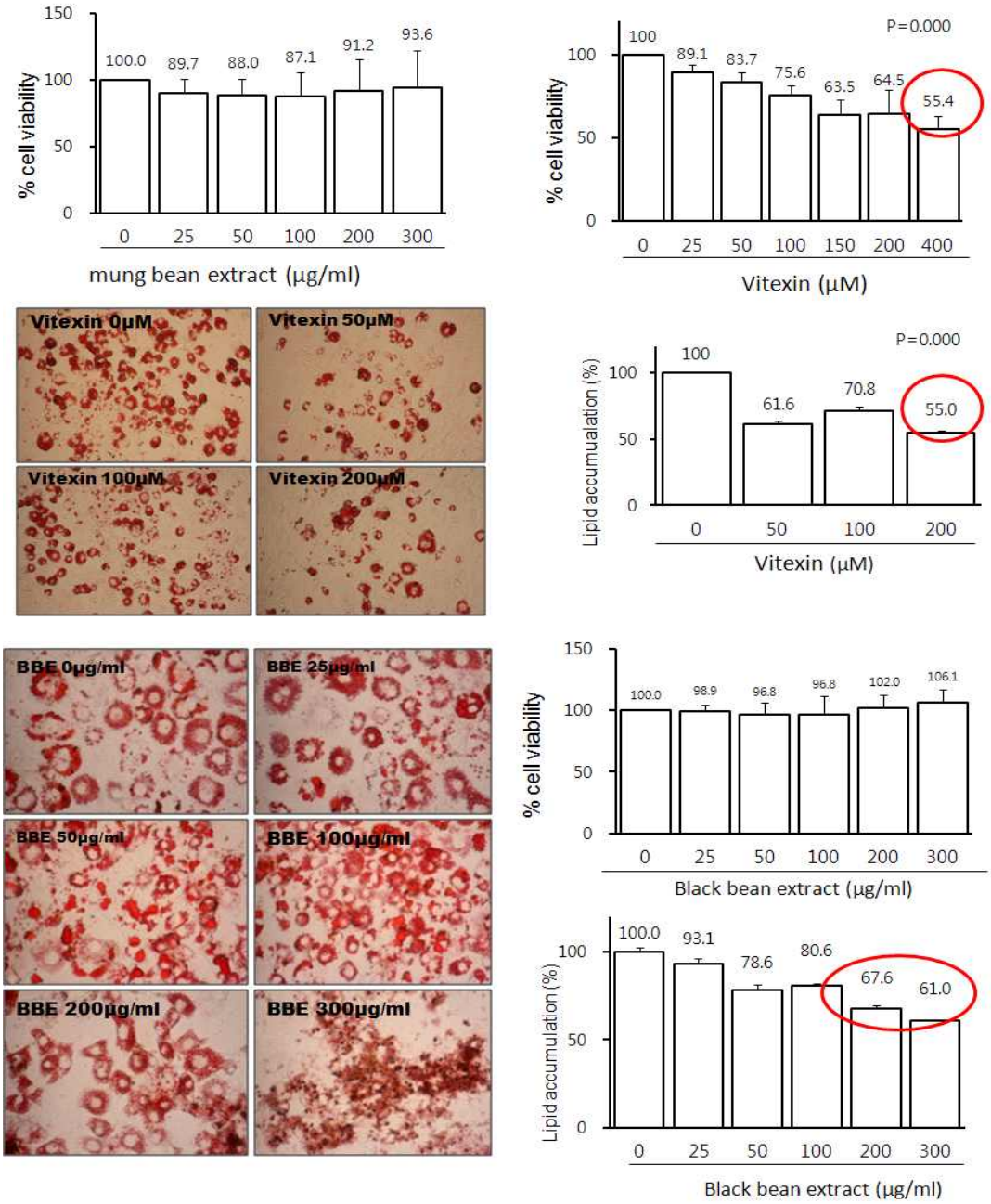
본 실험에 사용한 농수산물소재 추출물은 구증구포 흑삼 열수/에탄올 추출 1~9포, 뽕잎, 녹두, 검정콩, 진피, 감태, 톳, 미더덕 등.

농수산물의 후보소재 5종 (흑삼 5포/9포, 검정콩, 녹두, 막걸리, 뽕잎, 오디, 감태, 미더덕, 톳)의 확인된 표지물질 약 10종 (Chlorogenic acid, 안토시안, 플로로타닌, genistein, Rg3, Rh1, Rb1, vitexin, isovetexin, etc)을 New Biosystem (ATMΦs, stem cell, yeast genomics & DIO)으로 탐색하여 상호 시너지한 항비만 기능성식품 개발 및 상품화를 목적으로 함.



① 농수산물 소재:

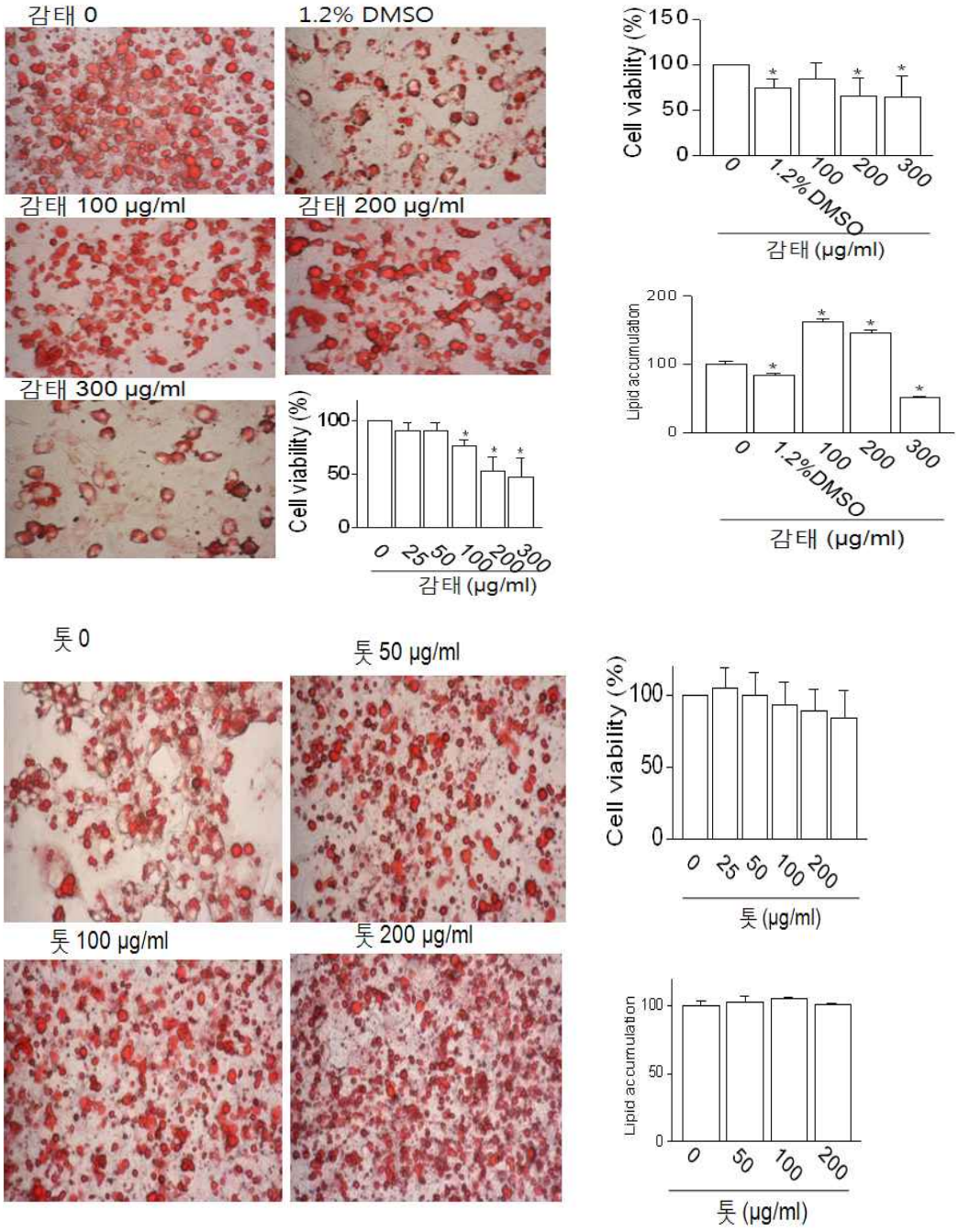
- 흑삼 1-9포 열수추출물: 농도의존적으로 세포생존율 증가. 지질축적도 영향이 없음.
- 흑삼 에탄올추출물: 5포와 9포 중 5포의 결과가 진피추출물와 함께 3T3L-1 세포생존율 및 지질축적 모두 농도 의존적으로 유의적으로 감소.
- 녹두와 검정콩추출물: 300ug/ml까지 증가하여도 세포의 생존율에는 변화가 없으며 고농도 처치시 세포내의 지질축적은 50%까지 감소하는 경향. 특히 녹두와 검정콩의 표지물질인 vitexin과 C3G/D3G를 처치하였을 때도 vitexin 50-200uM, C3G/D3G 100-200uM농도에서 지질축적이 50-60%로 감소하여 추출물과 표지물질의 경향이 일치함.



[Fig 1-1] 녹두(위)와 검정콩(아래) 껍질 추출물의 지질축적억제 효과

② 수산물소재

○ 톳은 3T3L-1 세포생존율과 지질축적형상에 영향이 없으며 미더덕은 대조군보다 지방세포 분화 및 증식효과가 200%이상임. 감태의 경우 세포생존율 변화없이 300ug/ml에서 지질축적이 현저히 저하하여 가장효과적임.



[Fig 1-2] 감태(좌)와 톳(우) 추출물의 지질축적억제 효과

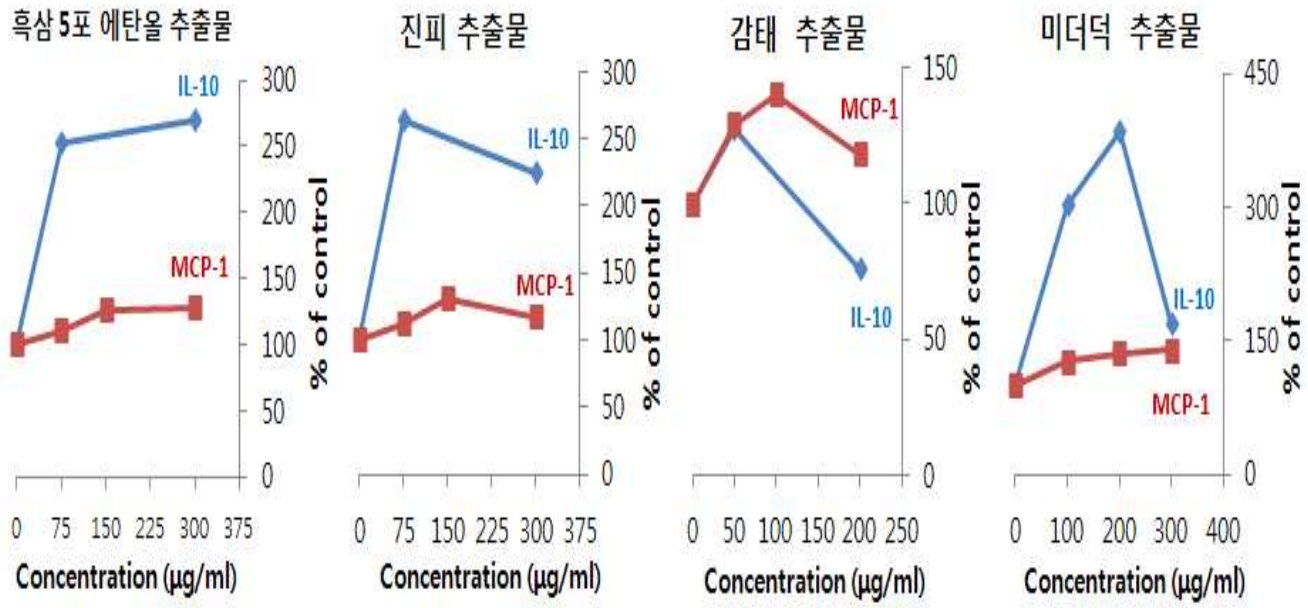
(2) M1 & M2 마커를 이용한 항비만 효과 screening

① **방법**: 우선 3T3L-1 preadipocyte로부터 adipocyte로의 전환되는 progress 중 MIX, Dex, Insulin 처치시 분화와 증식이 이루어지면서 adipocyte에서의 지질축적이 3배 가량 증가하였음. 따라서 세포의 증식과 지방축적이 종료된 배양 9일째 수거된 배지에서 단핵구/대식세포에서 분비되어 지방세포의 연증반응에서 기여하는 M2 (anti-inflammation effects)마커로 IL-10을, M1(proinflammation effect)마커로 IL-6, TNF-a을 분석하여 분화된 지방세포의 증식에 지질축적현상이 기여하는지 확인함.

② **수산물의 효과**: 감태추출물 100-300ug/ml은 대조군에 비하여 M1인자인 TNF-a, MCP-1을 200%이상 억제하였고 미더덕 추출물 75-300ug/ml은 TNF-a을 200%이상 억제함.
③ **농산물의 효과**: M2를 증가시키거나 유사한 효과를 가지는 소재로 흑삼 5포, 진피가 적은용량 75ug/ml에서 대조군보다 증가하였음. M1과 M2의 효과를 동시에 보이는 물질은 감태가 유일하였음.

(3) Co-Culture를 통한 ATMΦs model 표준화시험 확립 (추가성과)

① **디자인**: 3T3L-1 세포와 대식세포, 3T3L-1 세포와 간세포의 co-culture는 in vivo 실험 시 지방세포와 주요 반응하는 조직 간의 interaction에 미치는 영향을 규명하고 자 디자인된 실험으로 M1와 M2에서 명확한 차이가 없는 경우 어떤 기전이 우세한 지 또한 규명이 가능함.
② **방법**: 1차적으로 3T3L-1에 insulin 처치 2일후 RAW264 및 HepG2 cell을 injection하여 배양 9일 째 Contact co-culture system으로 실험한 결과 녹두 추출물은 marcrophage에 의하여 TNF-a, Il-6 모두 증가하였고 HepG2에 의하여 TNF-a, Il-10은 큰 변화가 없고 IL-6는 크게 증가함. 다른 추출물도 확인 중임.
③ **결과**: 3T3L-1에 insulin 처치 2일후 RAW264 injection에 의한 contact Co-Culture후 9일 째 염증인자 M1형 (MCP-1)과 M2형 (Il-10) 분비를 살펴본 결과, 흑삼 5포와 진피추출물을 처치 시 농도가 증가할수록 M1도 약간 증가하였으나 M2가 M1보다 더 많이 증가함. 반면, 감태는 고농도에서 M1과 M2가 감소하나 M1이 더 증가함. 미더덕은 M2가 증가하다가 고농도에서 감소하였으나 M2가 M1보다 더 증가함.
④ **결론**: 3T3L-1에만 추출물을 투여한 경우, 염증인자 M1과 M2의 경향에 관한 해석이 모호하였으나 Co-culture 후 macarophage과 3T3L-1의 ineraction을 확인하는 중요한 실험으로 향후 3T3L-1 증식에 M1과 M2가 미치는 영향을 지속적으로 관찰하여 실험을 보완함으로써 2차년에 완성할 계획임.



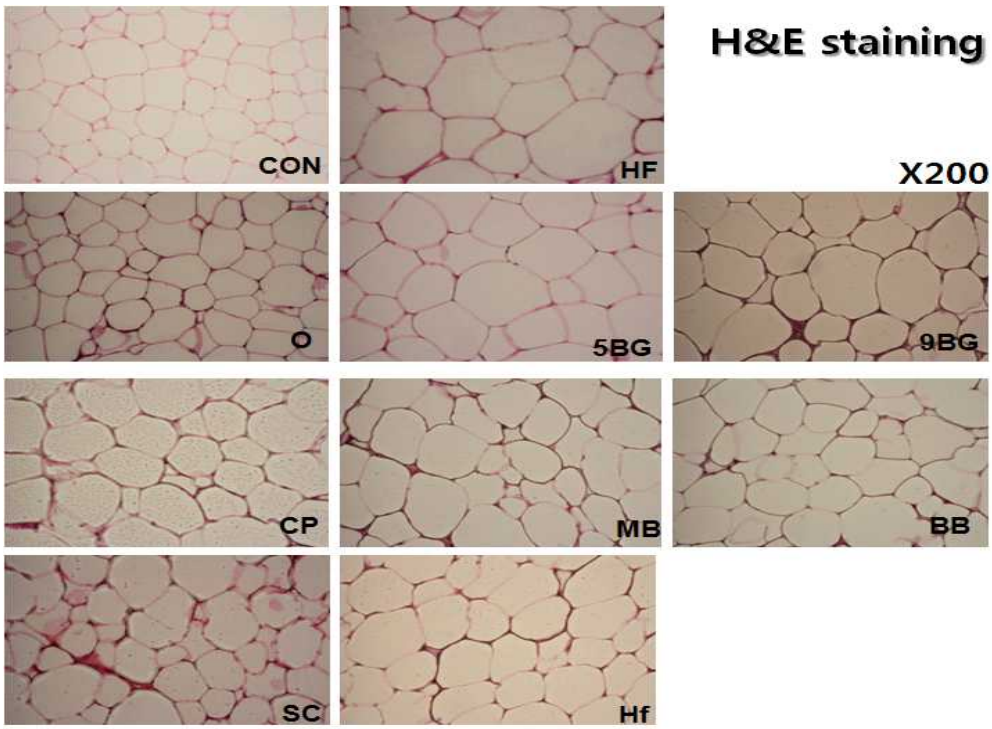
[Fig 1-3] ATMΦs model을 이용한 추출물의 항염증 효과

(4) H & E staining & mast cell IHC 를 통한 screening (추가성과)

① **디자인 및 방법**: 지방조직의 박절편을 제작하여 H&E 염색(staining with hematoxylin and eosin)을 실시. 적출한 조직을 포르말린 용액에 12시간 이상 고정시킨 뒤, 흐르는 물에 10시간 이상 수세하고, 탈수(50%, 70%, 80%, 90%, 95% 100% 에탄올), 에탄올 100%과 xylene을 1:1로 1시간, xylene으로 투영(xylene Ⅰ, xylene Ⅱ), xylene과 파라핀을 1:1로 1시간, 파라핀 침투과정을 거쳐 포매함. 제작된 파라핀 블록을 회전형 박절기(Leica Co. Michigan, US)를 사용하여 4um두께의 박절편을 제작하여 함수하고 H&E 염색 하였다. Xylene에 탈 paraffin한 후, 탈수(100%, 100%, 95%, 95%, 70% 에탄올)하여 흐르는 물에 수세하였다. Harris hematoxylin 용액에 옮겨 30초간 핵을 염색하여 흐르는 물에 수세하고 Eosin용액에 10초간 세포질에 염색한 후 탈수(95%, 95%, 100%, 100% 에탄올), 청명 과정(Xylene Ⅰ, Xylene Ⅱ)을 거친 후 Canada balsam으로 봉입하여 검경함.

② DIO mice의 fat pad에서 H&E staining

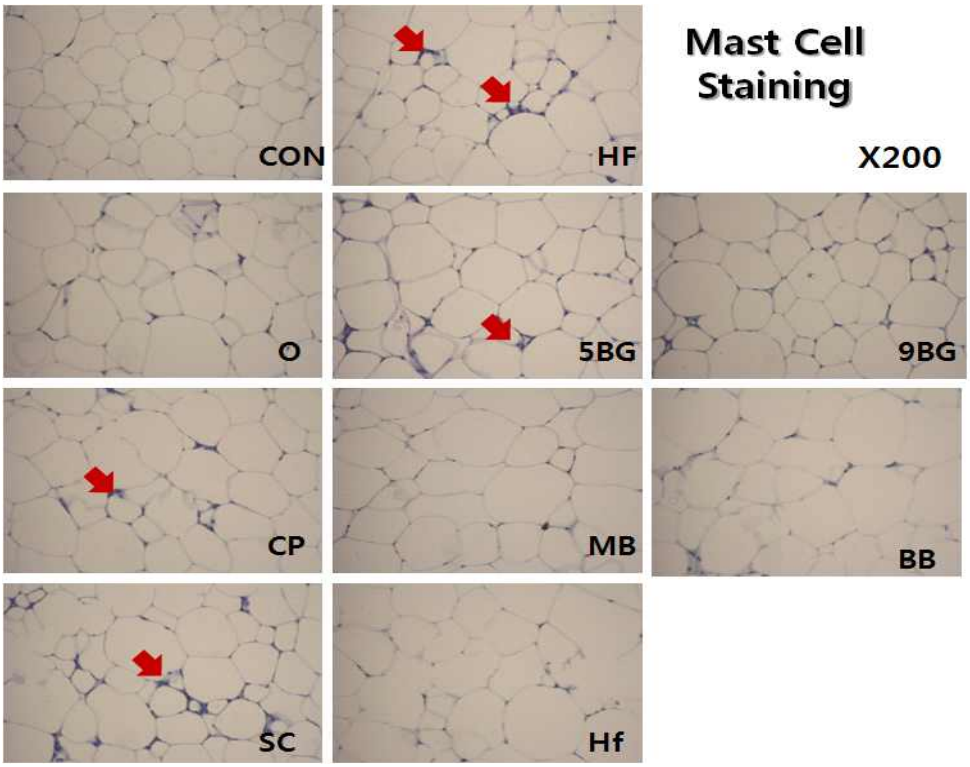
대조군에 비하여 HF군의 세포크기가 증가하였고 orlistat는 감소함. 추출물 중에는 흑삼 5포와 9포를 제외하고 대체적으로 HF보다 크기가 감소함.



[Fig 1-4] DIO mice의 fat pad에서 H&E staining(좌) & mast IHC(우) 결과 (CON: control, HF: high-fat, O: orlistat, BG: 흑삼(5, ②9포) SC: 미더덕, MB: 녹두, CP: 진피, BB: 검정콩, Hf: 톳)

③ DIO mice의 fat pad에서 mast cell 확인

대조군에 비하여 mast cell이 증가한 군은 HF, 흑삼 5포, 미더덕, 진피 등 이었고 대조군에 감소한 군은 orlistate임. 녹두, 검정콩, 톳 추출물은 대조군과 유사한 경향을 보임.



[Fig 1-4] DIO mice의 fat pad에서 mast cell IHC 결과 (CON: control, HF: high-fat, O: orlistat, BG: 흑삼(5, 9포) SC: 미더덕, MB: 녹두, CP: 진피, BB: 검정콩, Hf: 톳)

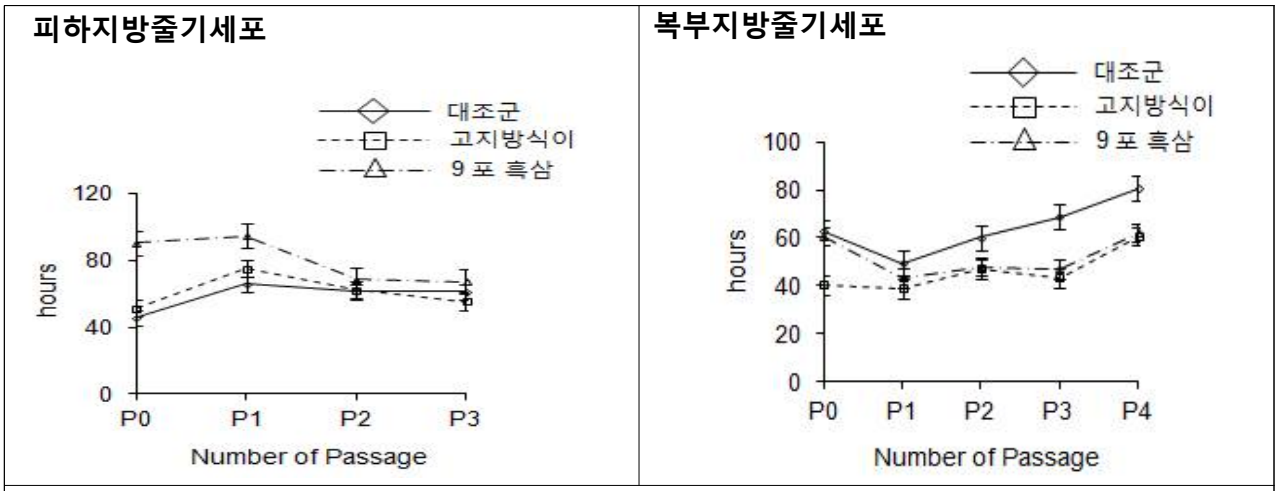
(5) 지방유래 줄기세포모델을 이용한 항염증성 비만연구 screening

① **대조군, 고지방식이, orlistat 효율검증**: 정상과 비만 유도된 생쥐, 그리고 비만 유도 과정에서 Orlistat와 표적물질 처리에 따른 부위별 지방줄기세포의 특성 변화: 피하지방줄기세포의 증식정도 특성의 변화는 고지방식이에 의한 비만에 의해 달라지지 않으나 복부지방줄기세포의 증식 속도가 빨라진 것을 알 수 있음. Orlistat은 피하지방줄기세포의 증식을 억제하는데 매우 효용이 높으나 생쥐의 경우에 있어서는 복부지방줄기세포의 증식이 촉진됨.

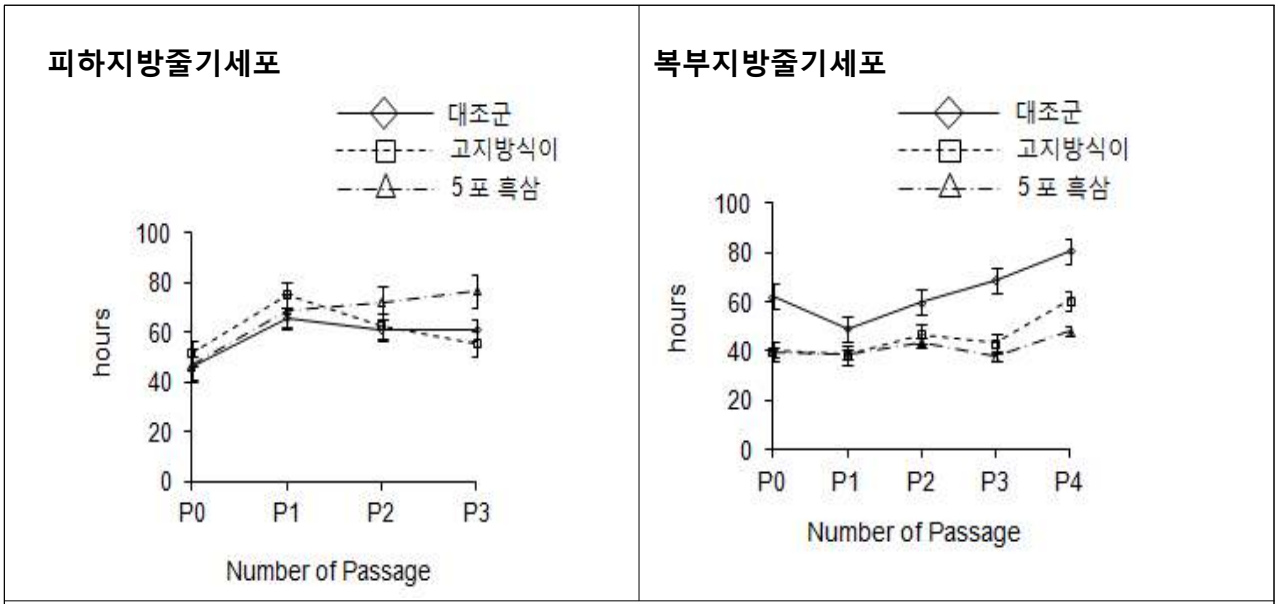
② **방법**: 고지방식이를 통하여 비만유도하고 유지하는 동안 12주 표적물질 처리에 의한 부위별 지방줄기세포의 증식속도와 이후 체외에서의 특성 회귀에 대한 분석을 수행.

③ **결과**: in vivo 상태에서 피하지방줄기세포와 복부지방줄기세포의 증식 속도를 비만 생쥐의 것에 비하여 감소시키는 표적물질은 흑삼 9포 , 미더덕, 톳이며 이외의 표적물질은 in vivo에서 피하지방줄기세포와 복부지방줄기세포의 증식 속도 억제 효능이 없음으로 분석됨.

○ **농산물: 흑삼 5/9포 효율검증** : 5 포 흑삼이 비만 형성에 미치는 영향: in vivo에서 피하지방줄기세포와 복부지방줄기세포의 증식을 억제하는 효과가 없으나, in vitro에서 피하지방줄기세포의 증식 속도가 감소하는 특징이 있음. 흑삼 9포는 in vivo에서 피하지방과 복부지방 줄기세포의 증식을 억제함.



[Fig 1-3] 9 포 흑삼 처리군에서 doubling time의 변화



[Fig 1-4] 5 포 흑삼 처리군에서 doubling time의 변화

○ **수산물**: 미더덕은 in vivo와 in vitro의 모든 상황에서 피하지방줄기세포와 복부지방줄기세포의 증식을 억제함. 톳은 in vivo상태에서는 내장지방 줄기세포의 증식에 필요한 시간이 정상대조군과 유사하게 유지되어 비만 유도과정에서 톳을 처리하지 않은 것에 비하여 증식 속도가 감소하였음. 내장지방줄기세포의 특성이 정상대조군에 비하여 달라지지 않았음.

(6) 기전연구결과

① 지질합성 및 분해(AMPK, FABP, PPAR-r, ACC, HSL) 염증발현(iNOS2, COX-2, p-iKB-a, IKB-a, IL-6, IL-10, TNF-a, 등) 인자 확인.

○ 우선 세포시험에서 기초적인 결과가 있는 흑삼 5초, 진피, 미더덕, 감태를 중심으로 지질합성 및 분해 인자인PPARr/ p-PPARr, AMPK/ p-AMPK, FABP)와 염증인자 TNF-a를 살펴본 결과 미더덕 300ug/ml에서 TNF-a 및 a-FABP의 감소가 뚜렷이 나타남. p-AMPK/AMPK의 특성은 나타나지 않지만 3T3L-1세포에서의 p-PPAR/PPARr의 경우는 흑삼5포, 진피, 미더덕, 감태 모두 농도를 증가시킬수록 감소하여 지방합성을 감소하는 경향을 보이나 감태의 경우 FABP가 증가하여 세포내 지질대사의 저류성이 나타남.
○ 염증발현(iNOS2, COX-2, p-iKB-a, IKB-a, IL-6, IL-10, TNF-a, 등) 인자는 분석결과가 일관성이 없음.

나. 1핵심 2세부:

Genomics와 *in vivo* DIO 모델을 이용한 농수산물 유래 항비만 유효소재의 항염증성 기전규명
(경희대학교 식품영양학과 임윤숙/고려대학교 생명과학부 이철구 교수)

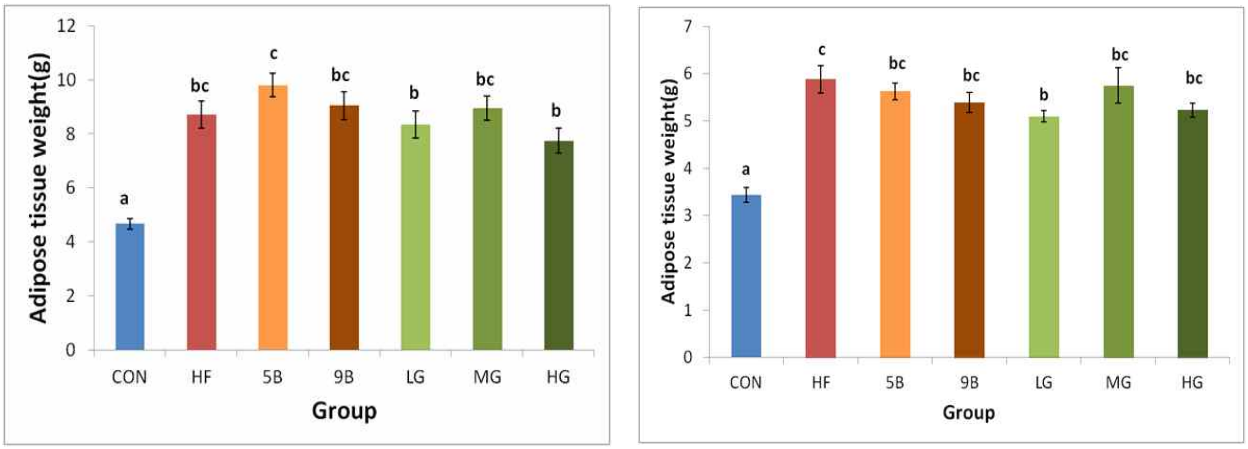
(1) DIO mouse 모델을 이용한 염증유도관련 항산화조절기전 규명

① DIO 디자인

: 생후 15주령 을 이용하여 고지방 식이(45%) 11주 공급하여 비만을 유도한 후 150%이상체중이 증가하지 않은 쥐는 제외하고 각 처치군 간 체중(g)과 체중증가율(%)의 유의적 차이가 없도록 함. 흑삼 5포 열수추출물(5B:100mg/kg), 흑삼 9포 열수추출물(9B:100mg/kg), 톳 열수추출물 (T:200mg/kg)과 농도를 달리한 감태추출물(LG:100mg/kg, MG:300mg/kg, HG:500mg/kg)을 각각 12주 간 투여하여 고지방 대조군(high fat diet; HF) 및 정상식이군(CON)과 비교함.

② 결과:

- **체중과 체중증가율**: 고농도 감태추출물(HG)는 투여 6주차 이후 지속적으로 고지방 대조군(high fat diet; HF)과 유의적 차이를 나타났으나 흑삼 5포, 흑삼 9포, 톳은 차이가 없음.
- **혈당**: Intraperitoneal Glucose Tolerance Test(IPGTT)를 이용함. IPGTT는 각 추출물의 12주간의 투여를 마친 후, 16시간 절식하여 50% glucose solution을 2g/kg의 용량으로 복강 내에 주사하여 0, 15, 30, 60, 90, 120분 후 각 time point 마다 혈당을 체크하여 내당능을 조사함. 흑삼의 경우 9B의 AUC(Area Under the Curve)가 감소하는 경향을 나타내었고, 감태는 용량 의존적으로 AUC가 감소하여 HG군에서는 유의적으로 감소하였음.
- **지방무게**: 부고환, 장간막, 후복막 및 서혜부 지방무게 합 (SUM-I)은 HF군에 대하여 감태에서 감소함. 서혜부 지방(inguinal fat tissue)을 제외한 나머지 3 부위의 지방무게 합 (SUM-II; epididymal, mesenteric, and retroperitoneal fat tissue)은 흑삼과 감태에서 HF군에 비하여 감소함.



[Fig 1-5] 추출물에 따른 지방무게 SUM-I(좌)와 지방무게 SUM-II(우)의 변화

- **혈중지질개선**: 감태는 혈중 TG 및 TC수치 비록하여 동맥경화지수[(TC-HDLc)/HDLc]를 대조군 수준으로 낮춤으로서 지질개선에 효과를 나타냄. 흑삼은 5포보다 9포가 혈중 TG 저하효과를 보인 반면, HDLc는 9포가 더 증가함. TC 및 동맥경화지수는 CON 수준으로 낮춤.

○ **간의 지질과산화물 함량**: 흑삼은 HF와 유의적인 차이가 없었으나 감태군 중 LG 군에서는 오히려 증가하는 경향을 나타났고 MG에서는 MDA를 낮추는 경향.

(2) Yeast based Genomics Biosystem을 이용한 잠재적 항비만 소재 screening

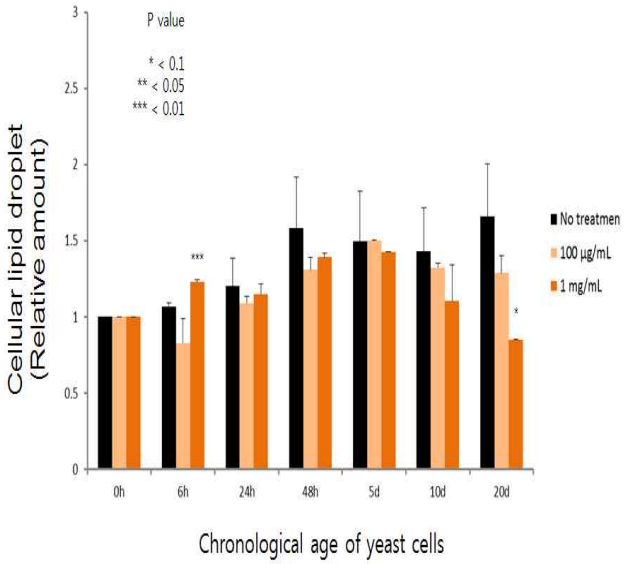
① 실험디자인:

: Yeast 배양은 YPD (Yeast extracts/Peptone/Dextrose) media에서 이루어지며, 소재에 대한 toxicity, 지방 축적 변화, 항산화 활성등을 측정함. 항산화 활성은 DCF를 이용한 ROS 측정을 통해 평가함. YPD배지등에 배양한 S. cerevisiae BY4741 strain을 1 mL씩 취함. 3,000 rpm에서 2분간 원심분리하여 세포를 침전시킨 후, 1 mL의 1× Phosphate-buffered saline (PBS, pH 7.4)에 pellet을 resuspension시킨 후 이를 2회 반복하여 세포 세척. 준비된 세포에 10 μM 2′,7′-dichlorodihydrofluorescein diacetate (2′,7′-dichlorofluorescin diacetate; H2DCFDA) (DCF)를 첨가한 1× PBS (pH 7.4)를 1 mL 첨가하여 resuspension한 뒤 30 °C에서 1 시간 동안 방치. DCF로 염색된 yeast의 ROS 생성을 FACS (BD Facscalibur)를 이용하여 측정. 같은 방식으로 Red 형광 다이를 사용하여 지방 축적의 변화도 측정함.

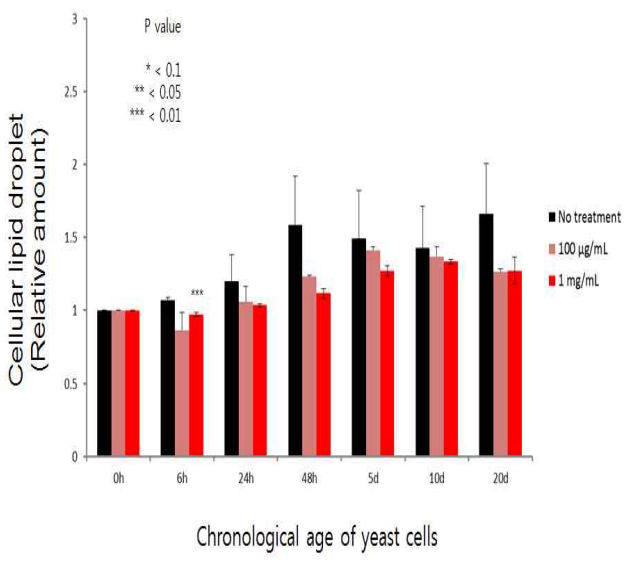
② 결과:

○ 뽕잎 (Mulberry Leaf extracts), 오디 (Mulberry Fruit extracts) 및 검은콩 (Black bean testa extracts) 추출물을 각각 yeast cell 내 지방 축적을 억제 시킬 수 있는 가능성이 있음.
○ 감태, 미더덕, 녹두 추출물, 톳 추출물, 흑삼 5포 추출물, 흑삼 9포 추출물, 진피의 추출물은 yeast cell 내 지방 축적 억제효과에 유의한 차이를 나타내지 않음.
○ 표지물질인 genistein 또한 yeast cell 내 지방축적억제효과에 유의한 차이를 나타내지 않음.

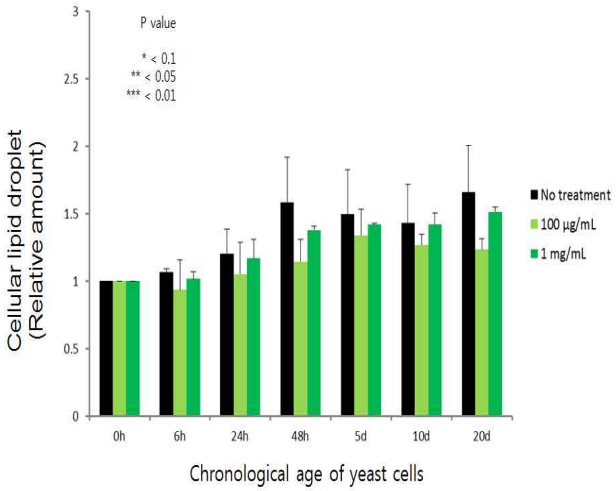
Mulberry Leaf Extract (뽕잎 추출물)



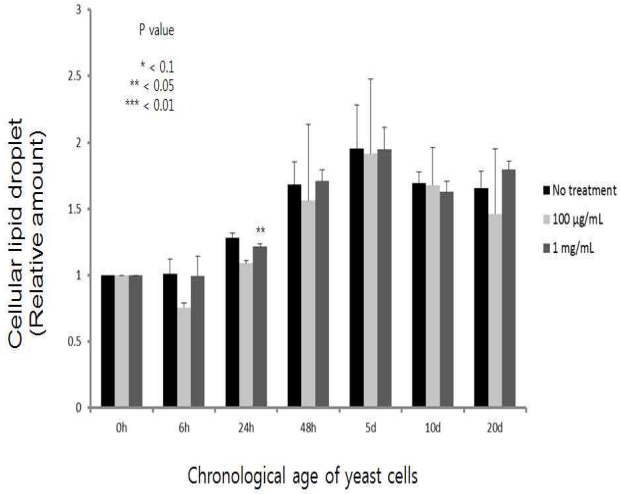
Mulberry Fruit Extract (오디 추출물)



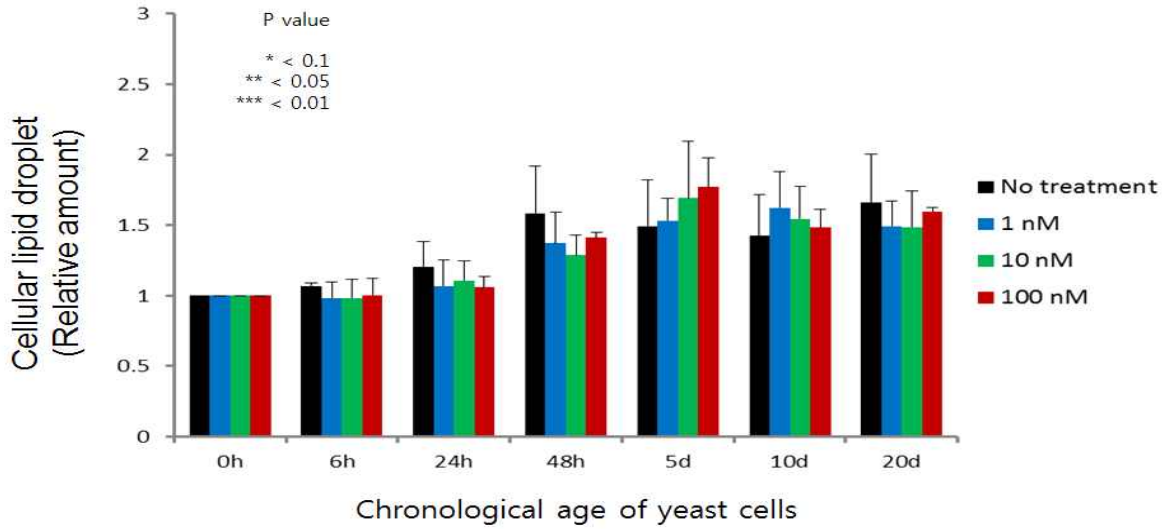
Black bean Extract (검은 콩 추출물)



Ecklonia cava Extract (감태 추출물)



Genistein



[Fig 1-6] Yeast-Genomics Biosystem을 이용한 추출물의 항비만효과

다. 2핵심 1세부:

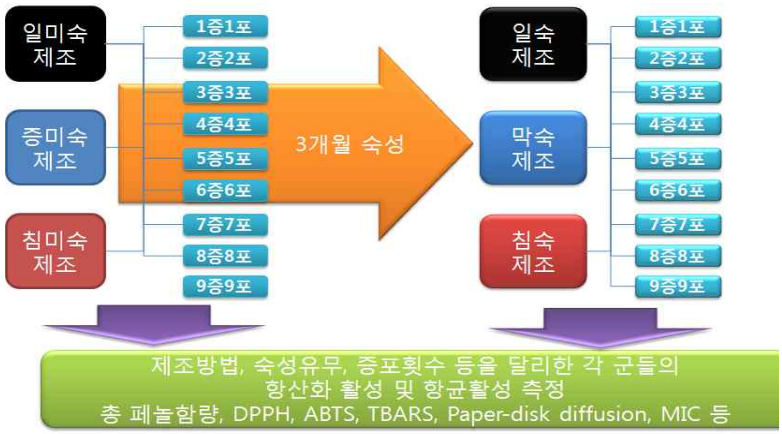
핵심기술을 활용한 흑삼제조 공정 표준화 및 항비만 제품개발
(경기대학교 대체의학대학원 김애정 교수/ (주)동진제약)

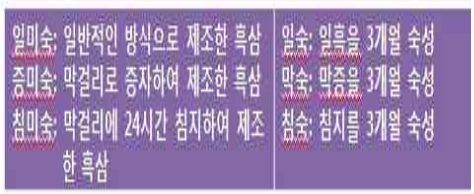
(1) 핵심기술을 활용한 흑삼제조 공정 표준화

① 막걸리를 활용한 흑삼제조공정 최적화

: 95℃에서 90분 동안 증자, 48℃에서 120분 건조하기를 9회 반복하는 조건으로 막걸리를 사용하여 훈증하는 방법을 선정하여 흑삼 제조공정 표준화를 확립하였음.

○ 실험개요





:

② 실험방법 및 제조공정

- **흑삼의 제조공정**: 수삼을 95℃의 열수(또는 막걸리)에 90분 증자하고(1증) 48℃의 건조기에서 120분 건조(1포)시키는 과정을 총 9회 반복하고 각각 샘플을 바로 채취한 것은 미숙성군, 48℃에서 3개월간 숙성시킨 숙성군에 대한 실험을 진행하였음.

- **측정시험**: 실험군은 열수추출을 하였으며 독성실험, 추출수율, 총 페놀함량, DPPH법에 의한 항산화활성, ABTS법에 의한 항산화 활성 등을 검증하였음.막걸리를 사용한 흑삼의 제조 최적화를 위해 총 6개의 실험군을 설정하였고 각 실험군 하에 다시 세부적으로 9개의 실험군을 설정하였음.

- 일반 미숙성흑삼 1증1포 ~ 9증9포까지 9군
  일반 숙성흑삼 1증1포 ~ 9증9포까지 9군
  막걸리 증자 미숙성흑삼 1증1포~9증9포까지 9군
  막걸리 증자 숙성흑삼 1증1포 ~ 9증9포까지 9군
  막걸리 침지 미숙성흑삼 1증1포~9증9포까지 9군
  막걸리 침지 숙성 흑삼 1증1포 ~ 9증9포까지 9군
  총 54개의 세부 실험군을 설정하였음.

③ 증포과정에서의 흑삼 사포닌 함량 변화

○ 참여기업(동진제약)에서 제조한 흑삼(5포, 9포)을 열수 및 70% 에탄올로 추출하여 진세노사이드별 함량을 측정함.(HPLC)

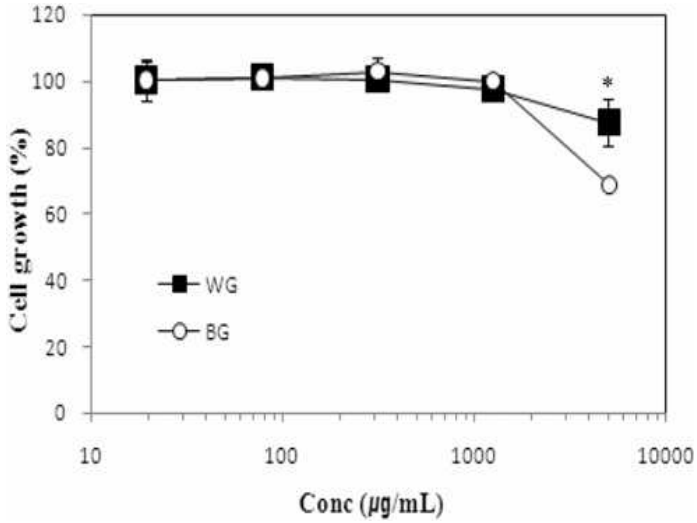
○ 에탄올 추출에서 진세노사이드의 추출수율이 증가함. 70% 에탄올과 물, 진세노사이드의 극성 차이에 기인한 것임. 5포 흑삼의 추출수율이 높음. 흑삼제조 시 5포까지 제조하고 추출물 제조 시 70% 에탄올을 사용하는 것이 유용성분을 용출시키는 데에는 가장 효과적임.

Ginsenoside(mg/g)	H_2O추출		70% EtOH추출	
	5포	9포	5포	9포
Rg1	0.000	0.000	0.000	0.000
Re	0.000	0.000	0.000	0.000
Rf	0.634	0.551	1.580	0.579
Rg2	0.355	0.287	1.513	0.527
Rh1	0.000	0.000	3.166	1.387
Rb1	0.105	0.000	0.767	0.121
Rc	0.303	0.196	0.427	0.071
Rd	0.553	0.573	0.366	0.045
Rg3	12.604	9.877	12.062	8.382
Rh2	0.000	0.000	0.127	0.128

④ 독성실험

○ 막걸리 구증구포 흑삼의 독성여부를 파악하고자 대조군을 백삼으로 하여 정상 생쥐 비장세포를 72시간동안 두 종류의 인삼(백삼과 흑삼)을 다양한 농도수준(5000-40 mg/mL)으로 96 well plates에서 배양하였다. 비장세포에 대한 세포독성여부는 cell counting kit를 이용하여 450 nm 조건에서 microtiter plate reader로 분석하였음.

- **결과:** 백삼에 비해 고농도에서도 구증구포 흑삼의 세포 생존율이 높게 나타나 기능성 제품 개발 시 문제가 없을 것으로 생각됨.



⑤ 결과

○ **추출수율**: 일반흑삼과 막걸리 증자 흑삼간의 수율은 큰 차이를 보이지 않았으나 막걸리에 침지한 흑삼의 경우 추출 수율이 감소하였음. 침지과정 중 일부 성분이 용출되어짐을 추정.

- 미숙성 군: 증포 과정을 거칠수록 추출수율이 증가함. 이는 증포 과정을 거칠수록 수분이 쉽게 제거되어 추출 전 원물의 무게가 감소함으로써 상대적으로 수율이 높아진 것으로 유추됨.
- 숙성기간을 거치면 미숙성 군에 비해 추출수율이 감소하는 경향을 나타내었고 증포 과정을 거칠수록 추출수율이 감소하는 경향을 보여주었는데 이는 휘발성 성분들의 생성량, 그리고 숙성 기간에 따른 휘발성 성분들의 감소 등이 영향을 미친 것으로 유추.

○ **총 페놀 함량** : 총 페놀함량은 추출물 1 mL을 취하여 2%(w/v) Na2CO3 용액 1 mL를 가하여 3분간 방치한 후, 50% Folin-Ciocalteu 시약 0.2 mL를 가하여 반응시켜 750 nm에서 흡광도를 측정하였음. 총 페놀 함량은 tannic acid를 이용하여 작성한 표준곡선으로 tannic acid로 환산하여 나타내었음.

- 막걸리 침지 미숙성 군의 경우 총 페놀 함량이 가장 낮다. 침지과정 중 페놀성분이 유출된 것으로 유추되어짐. 증포 과정이 진행될수록 값이 높아지는 경향을 보이는데 이는 갈변이 진행됨에 따라 생성되는 melanoidine 분자가 비교적 안정한 유리기를 가지고 있는 것으로 유추되어짐.
- 막걸리 증자 군의 경우 일반군에 비해 비교적 높은 총 페놀함량을 보여주었다. 막걸리로 증자하였을 경우 막걸리의 알코올 등 휘발성 성분이 melanoidine 분자의 유리기에 영향을 미친 것으로 유추되어짐. 미숙성군, 숙성군간의 비교를 해보면 숙성군이 대체적으로 총 페놀함량이 증가하는 경향을 보여주었음. 숙성과정 중 melanoidine 분자가 생성되어 영향을 미쳤을 것으로 유추되어짐.

○ **DPPH법에 의한 항산화 활성** : DPPH법에 의한 항산화 활성은 여러 농도의 시료를 4 mL의 methanol에 녹여 1.5 X 10-4 M DPPH methanol 용액 1 mL를 첨가한 후, 30분간 실온에 방치하여 517 nm에서 흡광도를 측정하였음. 시료를 첨가하지 않은 대조군의 흡광도를 1/2로 감소시키는데 필요한 시료의 양(㎍)을 RC(Reduction Concentration)50으로 나타냈으며, 기존 항산화제인 BHA와 비교하였음.

- 미숙성 군: 막걸리 침지 군의 경우 가장 낮은 값. 이는 총 페놀 함량이 가장 낮은 결과와 일치하였음. 총 페놀함량의 경우 숙성과정을 거치면서 증가하는 경향을 보였으나 일반군의 경우 DPPH법에 의한 항산화 효과는 오히려 감소하는 경향을 보여주었고,
- 막걸리 침지군의 경우 증가하는 경향을 보여주는 등 군별로 상이한 양상을 보여주었음. 막걸리 증자 숙성군의 경우 가장 우수한 활성을 나타내었음.

○ **ABTS법에 의한 항산화 활성** : ABTS법에 의한 항산화 활성은 여러 농도의 시료 20 uL에 0.1 M PBS (pH 5.0) 100 ul, 1.0 mM hydrogen peroxide 20 uL을 혼합하여 37℃에서 5분간 방치한 후 1.25 mM ABTS 30 ul, peroxidase(1 unit/ml) 30uL을 혼합하여 405 nm에서 흡광도를 측정하였다. 시료를 첨가하지 않은 대조군의 흡광도를 1/2로 감소시키는데 필요한 시료의 양(㎍)을 RC(Reduction Concentration)50으로 나타냈으며, 기존 항산화제인 BHA와 비교하였음.

- 앞선 DPPH의 결과와 유사하게 증포가 진행됨에 따라 비교적 우수한 활성을 보여주었음.
- 미숙성군과 숙성군의 차이는 일반군, 막걸리 침지군의 경우 숙성함에 따라 활성이 감소하는 경향을 막걸리 증자군의 경우 활성이 증가하는 경향을 보여주었음. 결론적으로 막걸리를 사용하여 증자시킨 후 숙성을 하는 경우 가장 우수한 형태의 흑삼을 제조 가능한 것으로 보이나 미숙성 군과 차이가 크지 않음을 감안해보면 숙성기간을 거치지 않는 것이 더 효과적인 것으로 판단되어짐. 또한 증포가 진행됨에 따라 활성이 증가하는 경향을 보여주기는 하지만 4-5포까지만 행해도 일반 군 9포와 활성이 유사하게 나타나는 것을 감안해 보면 막걸리를 사용하여 4-5포까지 증자시키는 것이 제품의 활성면, 시간과 금전적인 면에서 가장 효과적인 제조방법이라 판단되어짐.

(2) 흑삼을 이용한 항비만 제품개발 (5포 흑삼을 활용한 시제품의 제작 및 특허 출원)

① 시제품 3건 제조 및 성분 분석 및 시제품의 특허출원 2건

< 고려 흑홍삼차골드: 흑홍 삼차 2>

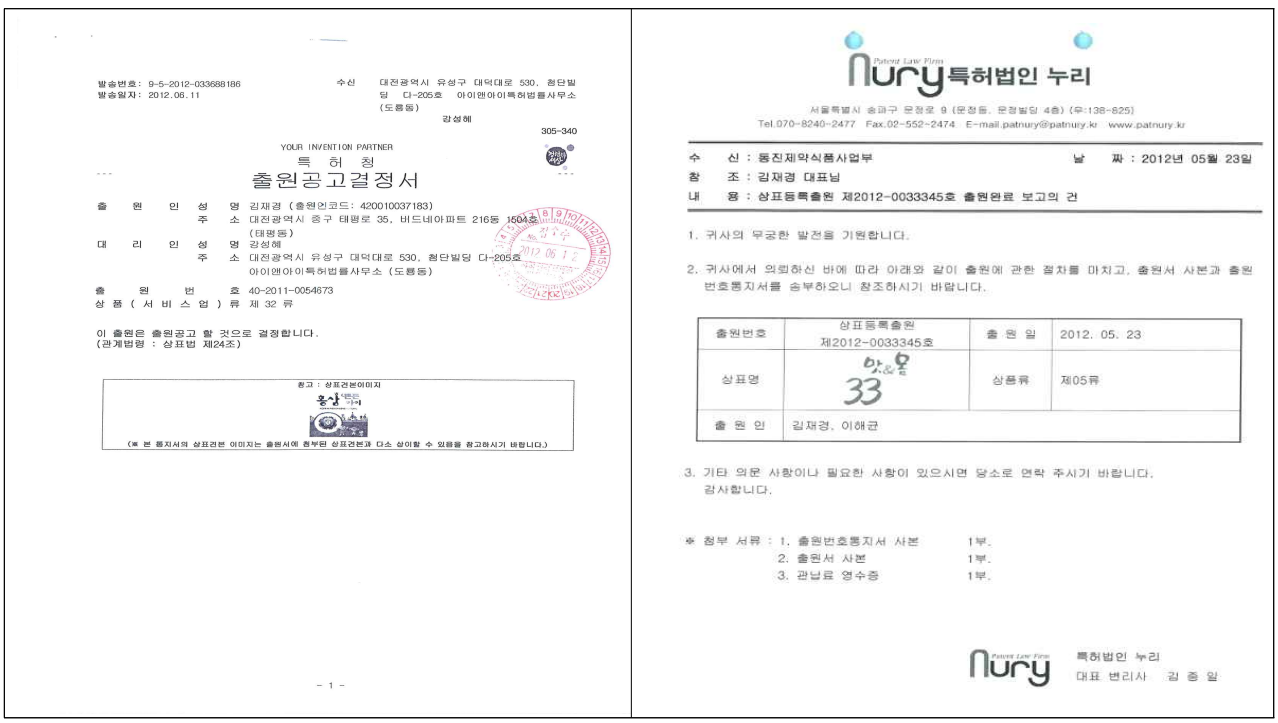
영양성분		
1회 제공량 : 1포(7g) 총 20회 제공량 140g		
1회 제공량	함량	*영양소 기준치
열량	26.4Kcal	
탄수화물	6.4g	0%
단백질	0.02g	0%
지방	0.05g	0%
나트륨	0.4g	0%
*영양소기준치 : 1일 영양소 기준치에 대한 비율		

<흑홍삼 녹용수: 흑삼음료>

영양성분		
1회제공량 : 1포(50ml)		
1회제공량당	함량	*영양소기준치
열량	60.2kcal	
탄수화물	14.8g	4.5%
당류	10.16g	-
단백질	0.19g	0.3%
지방	0g	0.0%
포화지방	0g	0.0%
트랜스지방	0g	-
나트륨	21.5mg	1.1%
콜레스테롤	0g	
*영양소기준치: 1일 영양소기준치에 대한 비율		

<흑삼함유 33차>

② 상품 등록 2건



발송번호 : 9-5-2012-033688186
발송일자 : 2012.06.11

수신 대전광역시 유성구 대덕대로 530, 첨단빌딩 다-205호 아이앤아이특허법률사무소 (도룡동)
강성혜
305-340

YOUR INVENTION PARTNER
특 허 청

출원공고결정서

출 원 인 성 명 김재경 (출원인코드: 420010037183)
주 소 대전광역시 중구 태평로 35, 비브네아파트 216동 1604호 (태평동)
대 리 인 성 명 강성혜
주 소 대전광역시 유성구 대덕대로 530, 첨단빌딩 다-205호 아이앤아이특허법률사무소 (도룡동)
출 원 번 호 40-2011-0054673
상 품 (서 비 스 업) 류 제 32 류

이 출원은 출원공고 할 것으로 결정합니다.
(관계법령 : 상표법 제24조)

참고 : 상표견본이미지
홍삼

(※ 본 등지서의 상표견본 이미지는 출원서에 첨부된 상표견본과 다소 상이할 수 있음을 참고하시기 바랍니다.)

- 1 -

Patent Law Firm Nury 특허법인 누리

서울특별시 송파구 문정로 9 (문정동, 문정빌딩 4층) (우:138-825)
Tel.070-8240-2477 Fax.02-552-2474 E-mail.patnury@patnury.kr www.patnury.kr

수 신 : 동진제약식품사업부 날 짜 : 2012년 05월 23일
참 조 : 김재경 대표님
내 용 : 상표등록출원 제2012-0033345호 출원완료 보고의 건

1. 귀사의 무궁한 발전을 기원합니다.

2. 귀사에서 의뢰하신 바에 따라 아래와 같이 출원에 관한 절차를 마치고, 출원서 사본과 출원번호통지서를 송부하오니 참조하시기 바랍니다.

출원번호	상표등록출원 제2012-0033345호	출 원 일	2012. 05. 23
상표명	맛&몸 33	상품류	제05류
출 원 인	김재경, 이해균		

3. 기타 의문 사항이나 필요한 사항이 있으시면 당소로 연락 주시기 바랍니다.
감사합니다.

※ 첨부 서류 : 1. 출원번호통지서 사본 1부.
2. 출원서 사본 1부.
3. 관납료 영수증 1부.

Nury 특허법인 누리
대표 변리사 김 종 일

라. 2핵심 2세부:

항비만 소재 분류/DB 구축 및 추출물 전임상 실험
(성신여자대학교 비만과학연구소)

(1). 항비만 소재 분류/DB 구축

① 소재분류 검색방법

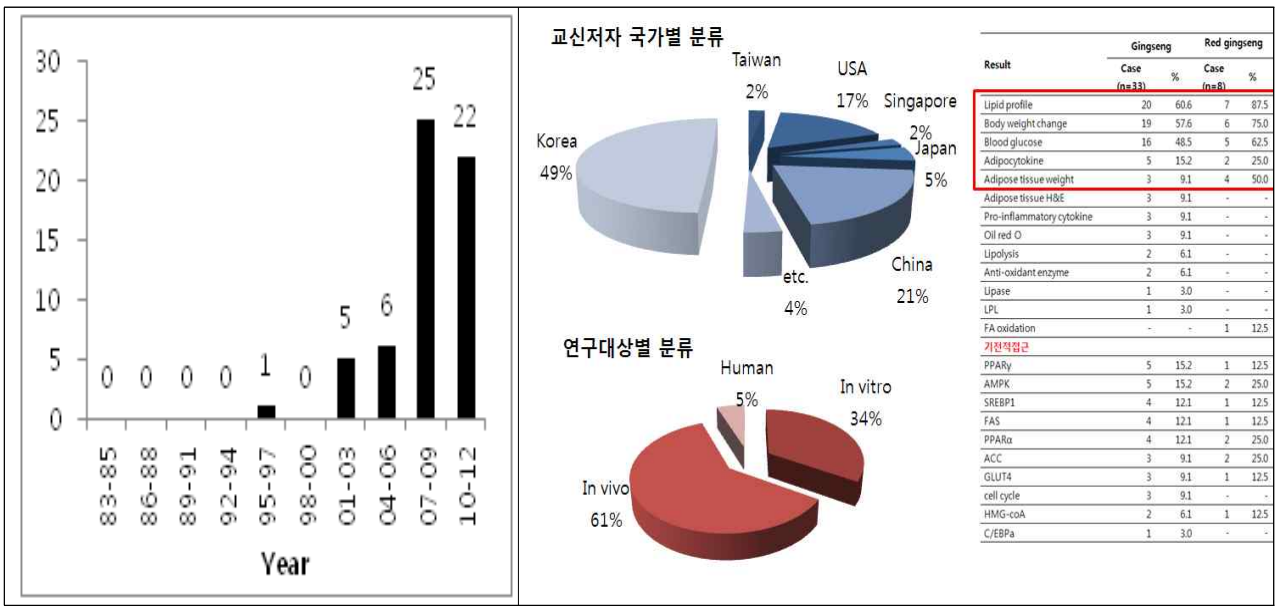
○ 자료의 조사는 2012년 5월29일부터 2012년 6월 7일까지 이루어졌으며 Pub MED (www.pubmed.com)와 Web of Science(www.webofscience.com)검색 포털을 이용하여 1차적으로 국내 논문은 배제하고 국제 SCI에 게재된 국외논문을 중심으로 검색함. 농수사물 소재 중 항비만 keyword로 obesity, appetite, 3T3-L1, lipid, fat, adipocyte, weight, diet, AMPK를 사용한 비만연구를 검색한 결과 가장 다수 검색된 소재순서로 녹차 789건, 해조류 94건, 마늘 72건, 인삼 60건, 포도 48건, 버섯 45건, 양배추 43건, 생강 24건, 고추 22건, 메밀 14건, 치커리 9건 등이며 **총 1,214건이 DB화됨**. (Table 참조)

Table. Summarization of anti-obesity DB identified with keywords of the natural sources(green tea, seaweed, marine plant, garlic, ginseng, grape, mushroom, brassica, ginger, pepper, buckwheat & chicory) and keywords of obesity(obesity, appetite, 3T3-L1, lipid, fat, adipocyte, weight, diet, AMPK and so on)

Sources	Experimental Methods				계	Mechanism	Ref.
	In vitro	*In vivo*	Human	Review			
Green tea	141	360	197	85	783	MCP-1, C-RP, IL-6, GCSF in plasma↓	1
Seaweed	18	43	32	1	94	PPARγ, CEBP/α, FAS protein level↓, SIRT1, AMPK, FOXO1, FOXO3a protein level↑,	2
Galic	14	42	15	1	72	ACC, FAS, PPARγ in liver↑	3
Ginseng	16	40	4	0	60	ABCA1, ABCG5, LDLR mRNA in liver↑, SREBP1C mRNA in liver↓	4
Grape	8	26	7	7	48	GLUT4, NRF1 mRNA↑, CD36 gene & protein in muscle↓	5
Mushroom	7	36	2	0	45	PPARγ, SREBP-1c, CEBP/α, FAS, ACS1, FABP4, FATP1 in 3T3-L1↓	6
Brassica	6	29	7	1	43	beta3-AR, HSL, adipose TG, UCP2, AMPK in 3T3-L1↑	7
Ginger	4	16	3	1	24	SREBP-1c, ACC, FAS mRNA in liver ↓	8
Pepper	4	8	10	0	22	HSL, CPTI-α, UCP2 mRNA in 3T3-L1↑	9
Buckwheat	2	9	2	1	14	IRS2, AMPK protein in pancreatic β cell↑	10
Chicory	3	3	2	1	9	CEBP/α, PPARγ2, Ap2 mRNA in 3T3-L1↓, SIRT1, PGC1-α, PPARα, UCP1, UCP3 mRNA, ERK protein in epididymal adipose tissue↑	11

1. Chen YK dt al J Agric Food Chem. 2011. 59(21). 11862-11871.
2. Lai CS, et al J Agric Food Chem. 2012. 60(4). 1094-1101.
3. Ban JO et al. Phytother Res. 2012. PMID:22228551.
4. Ji W. & Gong B., Journal of ethnopharmacology. 2007. 1130. 318-324.
5. Aoun M et al Br J Nutr. 2011. 106(4). 491-501.
6. Thyagarajan-Sahu A et al , BMC Complement Altern Med. 2011. 19. 11(1). 74-87.
7. An S et al, J Med Food. 2010. 13(2). 406-414.
8. Okamoto M et al. J. Med Chem. 2011. 54(18). 6295-6304.
9. Lee MS et al Phytother Res. 2011. 25(6). 935-939.
10. Cai EP & Lin JK. J Agric Food Chem. 2009. 57(20). 9817-9827.
11. Choi Y et al. J Nutr Biochem. 2012. PMID:22569347.

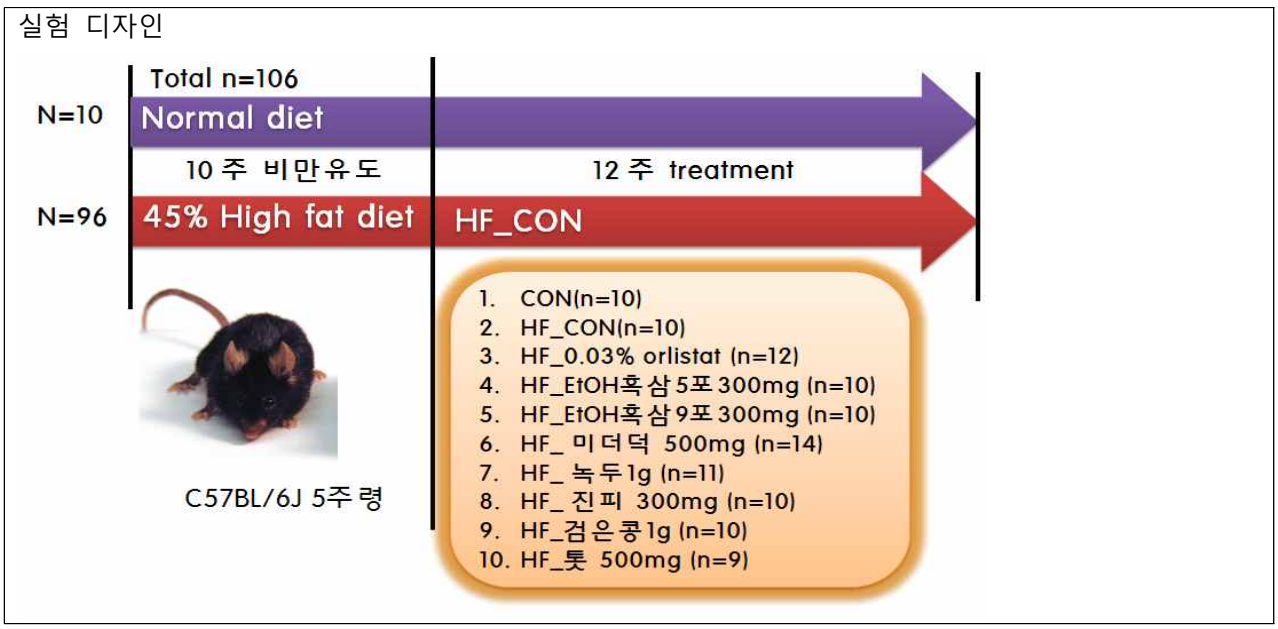
② DB 구축: 논문은 검색방법(자원>표지물질>저자국가>저자>실험방법>Abstract:Mechanism>PDF paper> Journal>연도, 권 & page)에 따라 DB로 구축되었으며 인삼의 경우 예를 들면, 인삼>ginsenosides>미국>Ji W., Gong B.>in vitro>Abstract> PDF>J. of ethnopharmacology> 2007. 1130 318-324로 검색되며 연도별, 저자국가별, 방법별, mechanism 별 정리된 인삼의 결과를 요약하면 다음과 같음.



Result	Gingseng Case (n=33)	%	Red gingseng Case (n=8)	%
Lipid profile	20	60.6	7	87.5
Body weight change	19	57.6	6	75.0
Blood glucose	16	48.5	5	62.5
Adipocytokine	5	15.2	2	25.0
Adipose tissue weight	3	9.1	4	50.0
Adipose tissue H&E	3	9.1	-	-
Pro-inflammatory cytokine	3	9.1	-	-
Oil red O	3	9.1	-	-
Lipolysis	2	6.1	-	-
Anti-oxidant enzyme	2	6.1	-	-
Lipase	1	3.0	-	-
LPL	1	3.0	-	-
FA oxidation	-	-	1	12.5
기전적접근				
PPARγ	5	15.2	1	12.5
AMPK	5	15.2	2	25.0
SREBP1	4	12.1	1	12.5
FAS	4	12.1	1	12.5
PPARα	4	12.1	2	25.0
ACC	3	9.1	2	25.0
GLUT4	3	9.1	1	12.5
cell cycle	3	9.1	-	-
HMG-coA	2	6.1	1	12.5
C/EBPa	1	3.0	-	-

⑵ 농수산물 소재의 완제품을 위한 추출물 전임상시험

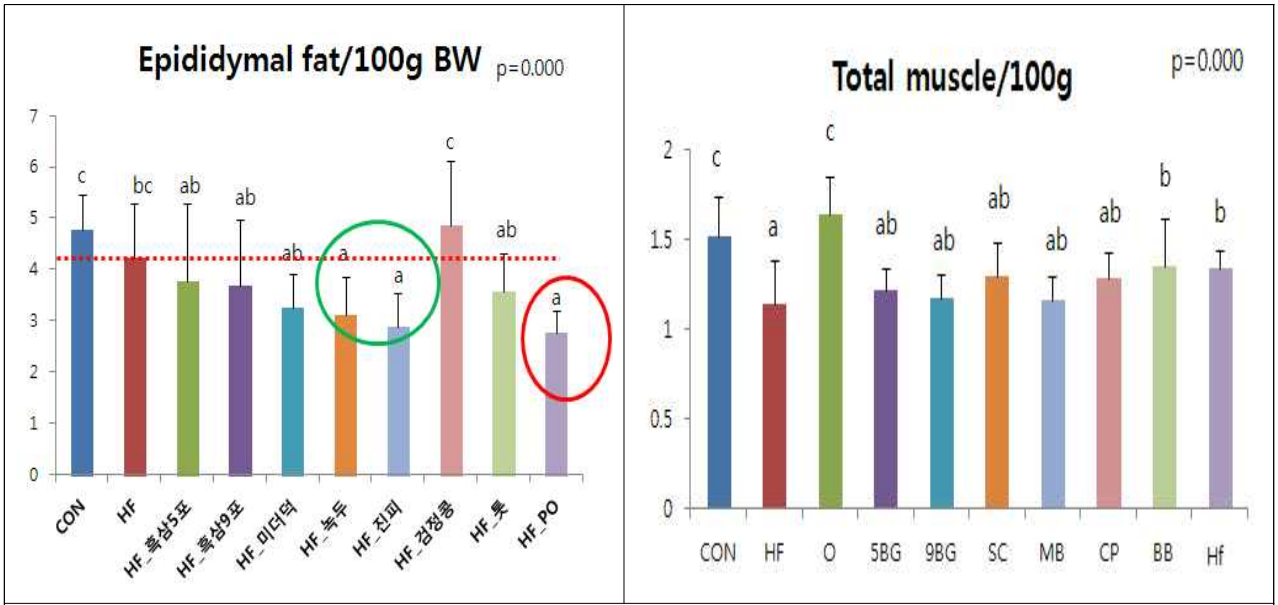
○ **실험디자인**: C57BL/6J 5주령 mice를 이용하여 45% High fat으로 10주 간 DIO model을 유도하여 normal diet를 대조로 확인한 다음 실험물질(흑삼5, 9포, 녹두, 검은콩, 톳, 미더덕)을 12주간 처치하여 high fat 군을 negative control, 0.03% Orlistat를 positive control로 비교분석함.



○ **체중, 부고환지방 및 근육량 변화 :**

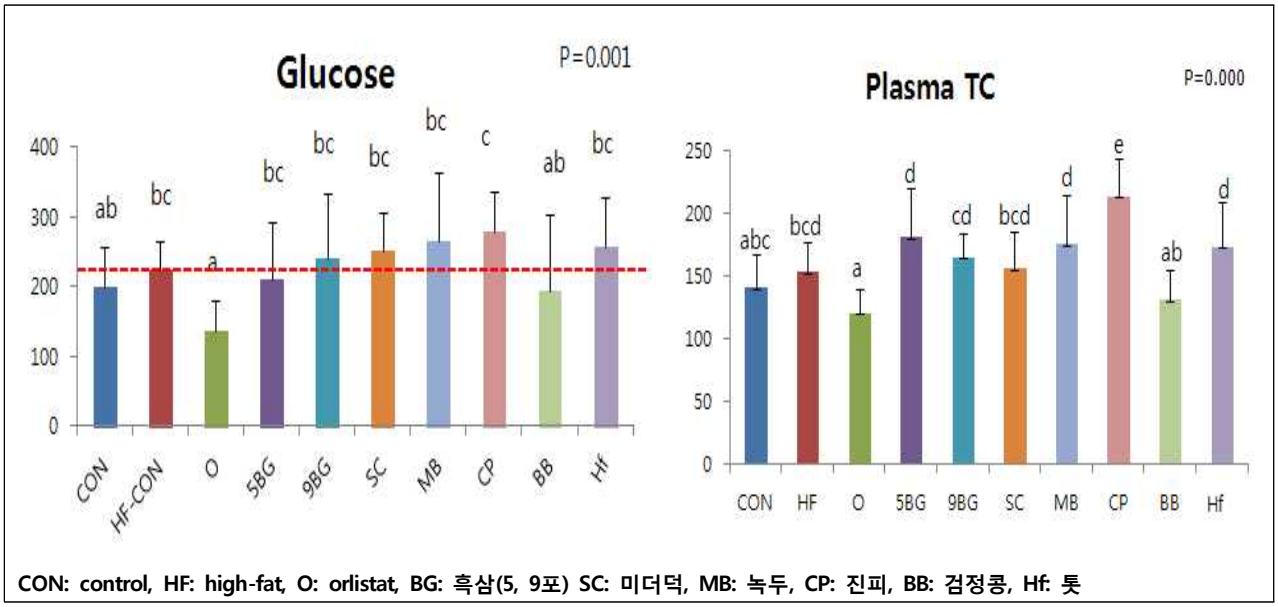
- Orlistat가 약 12% 체중감소로 가장 크게 감소되었으며 high fat군 보다 감소한 추출물의 결과는 없음. (22주 후 최종 체중은 orlistat가 가장 적었으며 검정콩만 유일하게 high fat보다 적음; data not shown)
- 녹두 및 진피추출물: 체중에 비하여 부고환지방(epididymal fat)이 가장 크게 감소한 orlistat와 유사함.

- 흑삼 5 & 9포, 미더덕, 톳: high fat보다는 약간 감소하였으나 orlistat의 효과보다 적은 경향임.
- 검정콩추출물: 부고환지방은 증가하였으나 장간막(mesentric fat) 지방은 가장 크게 감소함. 반면, 총 근육량(100g체중으로 환산)은 high fat 군을 제외하고 모든 군에서 근육량이 유의적으로 증가함.
- **요약: 부고환 및 장간막 지방이 감소한 녹두, 진피, 미더덕, 톳 및 검정콩 등의 추출물은 근육량이 증가하여 총체중의 변화는 없음.**



CON: control, HF: high-fat, O: orlistat, BG: 흑삼(5, 9포) SC: 미더덕, MB: 녹두, CP: 진피, BB: 검정콩, Hf: 톳

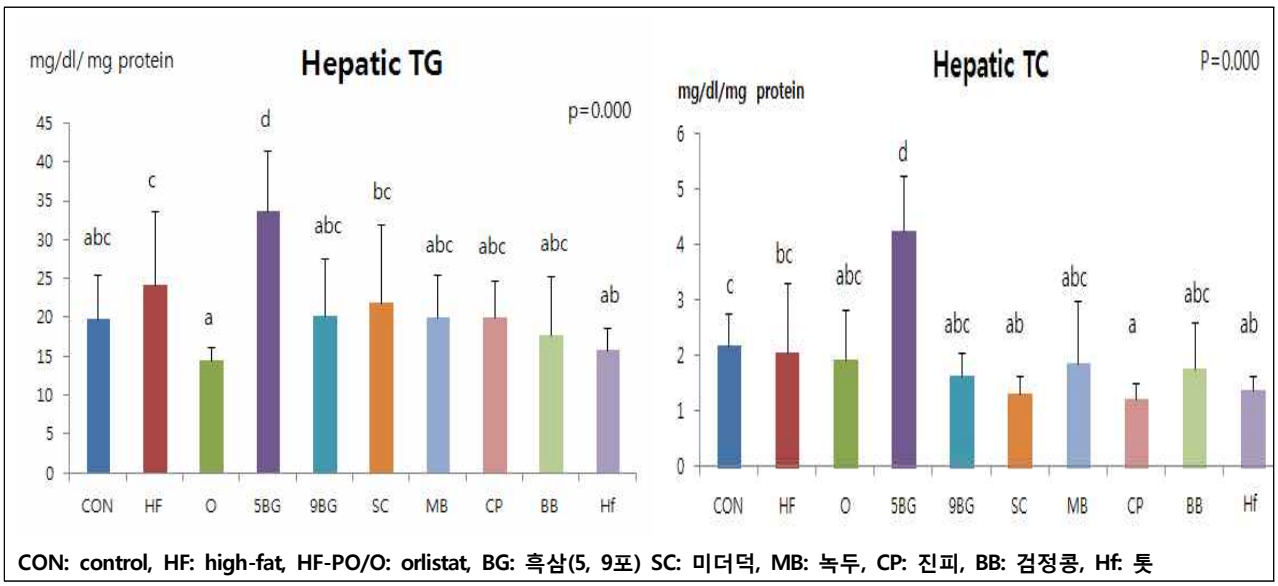
○ **혈액수치**: HF에 비하여 검정콩추출물만 FBS 및 TC 를 유의적으로 감소(Oristat 수준). 혈중 leptin은 부고환 지방세포가 감소한 진피 추출물에서 HF에 비하여 유의적으로 감소하였고 흥미롭게도 orlistat는 지방흡수감소, 체지방감소와 함께 leptin분비도 억제함으로써 향후 leptin resistance이 우려됨.(data nnot shown)



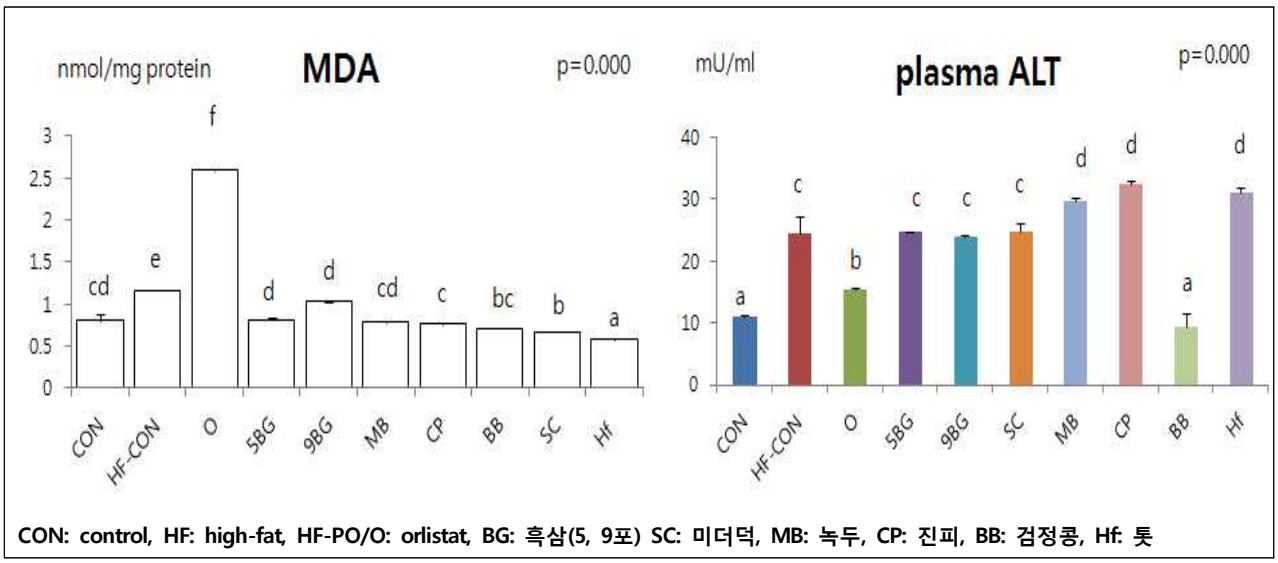
CON: control, HF: high-fat, O: orlistat, BG: 흑삼(5, 9포) SC: 미더덕, MB: 녹두, CP: 진피, BB: 검정콩, Hf: 톳

○ 간의 지질함량::

- HF와 비교하여 간의 TG 함량은 미더덕> 녹두, 흑삼9포, 진피 및 검정콩 > 톳의 순으로 나타남.
- 간의 TC 함량은 녹두, 흑삼9포, 검정콩> 미더덕> 진피 순으로 미더덕과 톳이 간의 콜레스테롤함량을 저하시킴.
- 검정콩은 혈중 및 간의 TC를 모두 낮추는 효과를 보인 반면 녹두, 진피 및 톳은 혈중의 지질개선보다 간의 지질은 낮추는 효과를 보임. 따라서 간의 중성지방 합성 혹은 간의 지질 uptake가 감소 한 것인지를 향후 검증이 필요함.



CON: control, HF: high-fat, HF-PO/O: orlistat, BG: 흑삼(5, 9포) SC: 미더덕, MB: 녹두, CP: 진피, BB: 검정콩, Hf: 톳



CON: control, HF: high-fat, HF-PO/O: orlistat, BG: 흑삼(5, 9포) SC: 미더덕, MB: 녹두, CP: 진피, BB: 검정콩, Hf: 톳

○ Western Blotting: 간에서의 대사관련 단백질을 western blotting 으로 분석한 결과, 지질합성 및 분해(AMPK, ACC, CPT, SREBP-1, HL) 염증발현(iNOS2, COX-2, p-iKB-a, IKB-a, IL-6, IL-10, TNF-a, 등) 인자를 확인함.

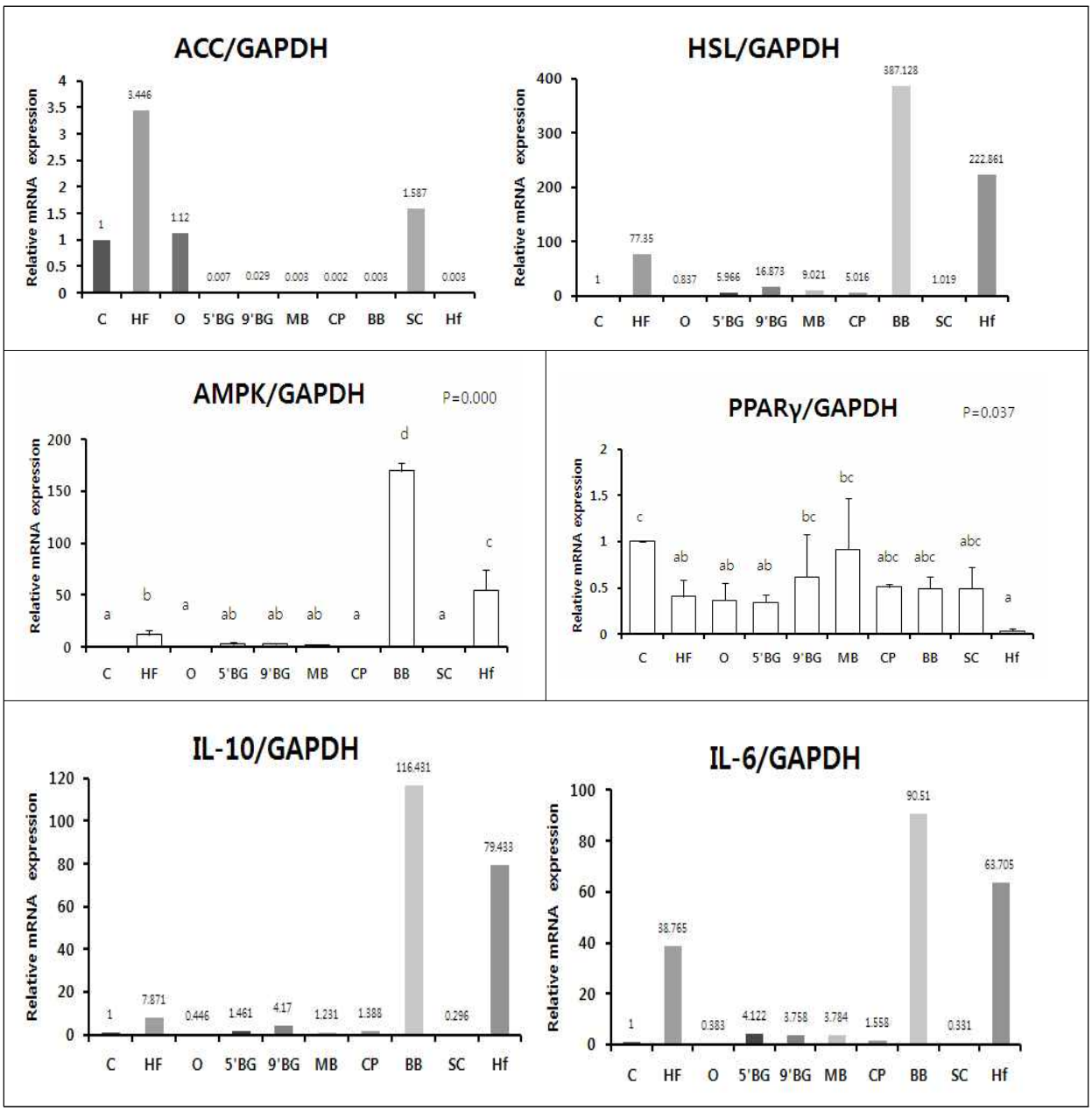
- ACC감소 효과(흑삼 9포, 녹구, 검정콩, 미더덕), C/EBP와 PPARr 감소효과(흑삼, 미더덕), AMPK 증가효과는(검정콩, 미더덕, 톳)이 나타남.
- P-iKB-a/IKB-a 비율은 HF보다 모두 낮으며 흑삼 5 & 9포, 녹두, 진피 및 톳이 모두 염증발현을 억제하

는 상위신호체계를 발현시킴. 또한 TNFa인 경우 25KDa insoluble form만 발현되고 17KDa activated soluble form은 발현되지 않아서 lever에서의 TNF-a system에 대하여 고려해야할 사항임.

○ **RT-PCR**: 부고환지방에서의 지방합성 및 분해와 관련된 유전자발현을 살펴보기 위하여 PPAR-r, SREBP-1, C/EBP-a, ACC, HSL, AMPK, IL-6, IL-10, TNF-a PCR을 시행함. ACC, HSL, IL-6, Il-10, TNF-a, CEBP-a의 결과는 아래와 같고 그 외는 분석 중임.

- **지방합성과 분해**: ACC mRNA 발현 정도는 HF가 가장 크며 orlistst과 미더덕이 대조군과 비슷한 수준이며 나머지는 지방산 합성인자인 ACC를 억제함. 반면 검정콩과 톳이 HSL mRNA발현을 증가시킴으로써 중성지방분해를 대조군의 200-400배 가량 증가시킴.

- AMPK & PPARr 시그널: 검정콩과 톳이 AMPK 발현효과가 가장 크며 톳의 경우 PPARr 발현을 억제함으로써 지방분해효과가 가장 큼. 녹두와 흑삼 9포는 PPARr의 발현이 증가하여 지방세포 증식이 예상되나 in vitro 상에서는 녹두의 지질축적억제효과가 나타남으로써 cepp to cell interaction 연구가 필요함.
- **염증인자**: HF에 비하여 검정콩과 톳은 M1인자인 IL-6을 2-3배 가량 증가시키지만 2가지 추출물이 M2인자인 IL-10을 동시에 발현시킴으로써 M2인자로써 Arg1의 추가분석을 고려중임. TNF-a도 검정콩에서 증가함.


ACC/GAPDH
Relative mRNA expression
4
3.5
3
2.5
2
1.5
1
0.5
0
1
3.446
1.12
0.007
0.029
0.003
0.002
0.003
1.587
0.003
C HF O 5'BG 9'BG MB CP BB SC Hf
HSL/GAPDH
Relative mRNA expression
400
300
200
100
0
1
77.35
0.837
5.966
16.873
9.021
5.016
387.128
1.019
222.861
C HF O 5'BG 9'BG MB CP BB SC Hf
AMPK/GAPDH
P=0.000
Relative mRNA expression
200
150
100
50
0
a
b
a
ab
ab
ab
a
d
a
c
C HF O 5'BG 9'BG MB CP BB SC Hf
PPARγ/GAPDH
P=0.037
Relative mRNA expression
2
1.5
1
0.5
0
c
ab
ab
ab
bc
bc
abc
abc
abc
a
C HF O 5'BG 9'BG MB CP BB SC Hf
IL-10/GAPDH
Relative mRNA expression
120
100
80
60
40
20
0
1
7.871
0.446
1.461
4.17
1.231
1.388
116.431
0.296
79.433
C HF O 5'BG 9'BG MB CP BB SC Hf
IL-6/GAPDH
Relative mRNA expression
100
80
60
40
20
0
1
38.765
0.383
4.122
3.758
3.784
1.558
90.51
0.331
63.705
C HF O 5'BG 9'BG MB CP BB SC Hf

마. 2핵심 3세부

수산물 유효소재의 항비만표지 물질 규명 (주:아쿠아그린텍 전유진/ 서진 바이오텍 김학주)

(1) 수산물 유효소재의 항비만표지 물질 규명

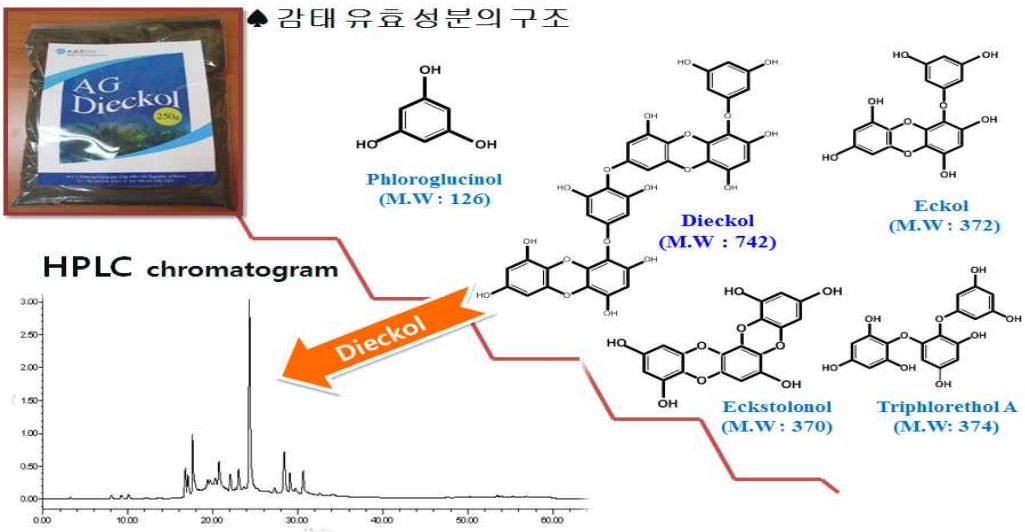
① 해조류인 감태의 일반 성분 분석과 유효 성분의 추출 및 분리

○ 감태: 제주산 해조류인 감태를 채집하여 AOAC 분석법을 통한 일반성분을 분석한 결과, 수분은 11.6%, 회분은 1.39%, 단백질은 18.1%, 지질은 3.78%, 탄수화물은 65.1%를 함유하는 것을 확인. 감태로부터 유효 성분을 얻기 위하여 주정을 이용하였으며, 추출 공정은 다음 그림과 같은 공정을 통하여 유효 성분을 추출하여 최종적으로 AG-Dieckol이라는 감태 유효 추출물을 제조.

○ AG-Dieckol: AOAC 분석법을 통하여 일반성분을 분석한 결과, 수분은 6.09%, 회분은 5.12%, 탄수화물은 15.69%, 단백질은 4.95%, 지질은 13.66%, 폴리페놀은 45.99%을 함유하는 것을 확인하였으며, 이중 폴리페놀 함량이 가장 많음을 확인 할 수 있었기에 이로부터 유효 성분을 분리하였음.

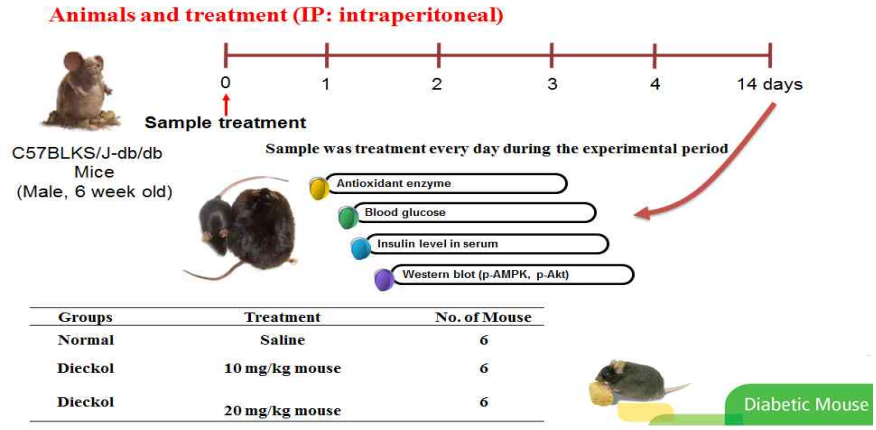
○ AG-Dieckol의 유효성분 분리:

- 유기용매 분획 공정과 Silica, LH-20 컬럼 및 HPLC를 통하여 유효 성분을 분리하였으며, 그 공정은 아래과 같다.
- 분리되어진 감태의 유효성분의 구조을 확인한 결과, 총 다섯 개의 유효성분을 분리함.
- 폴리페놀성분인 phloroglucinol, triphlorethol A, dieckol eckol, eckstolonol 등을 확인.
- AG-Dieckol을 HPLC로 분석한 결과 5개의 폴리페놀 성분중에서 dieckol이 가장 많이 함유되어져 있음을 확인.



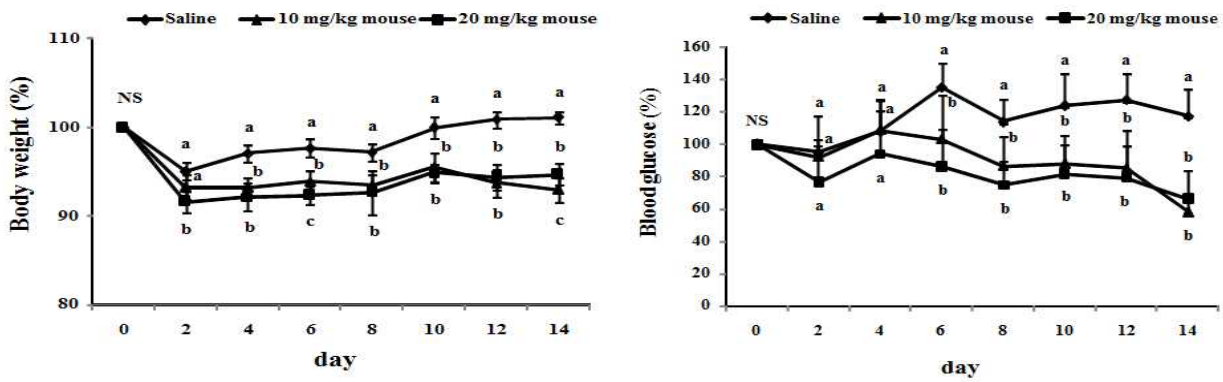
② 감태의 유효물질인 dieckol의 db/db mouse model에서의 효능 평가

○ 감태에서 분리된 유효 물질인 dieckol의 효능을 알아보기 위하여, db/db mouse model에서 체중감소, 항산화효소, 혈당강하, lisulin level 감소, 및 항당뇨 작용기작에 대하여 확인하였으며, 테스트 방법은 다음과 같음.

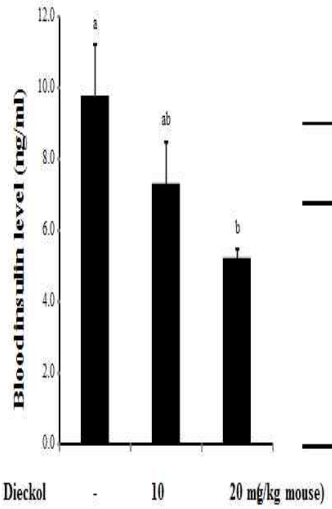


Groups	Treatment	No. of Mouse
Normal	Saline	6
Dieckol	10 mg/kg mouse	6
Dieckol	20 mg/kg mouse	6

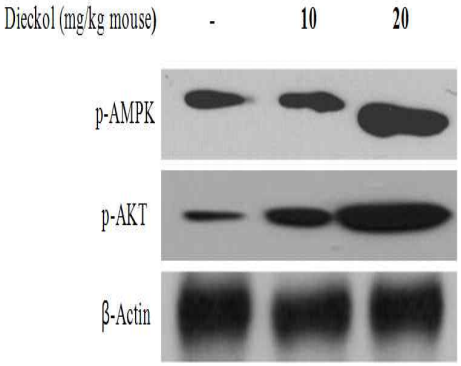
○ **체중 감소 효과 및 혈당 강화 효과**: Dieckol을 db/db mouse에 각기 10mg/kg, 20mg/kg을 처리하였을 때, saline 만을 처리한 control group 보다 체중 감소 효과 및 혈당 강화 효과가 유의적으로 나타남.



○ **항당뇨 작용**: dieckol 20mg/kg을 처리시 혈중 인슐린감소가 현저하여 insulin 민감도가 높음을 예상함. 대조군(saline)에 비하여 dieckol 10, 20mg/kg의 처리시 p-AMPK와 p-AKT 단백질의 발현량이 증가하므로 2가지 작용기전을 통하여 dieckol이 항당뇨 효과를 나타내는 것으로 보임.



Group	Blood insulin level (ng /ml)	STD (±)
Saline treatment	9.75 a	1.45
10 mg/kg mouse	7.26 ab	1.20
20 mg/kg mouse	5.20 b	0.27

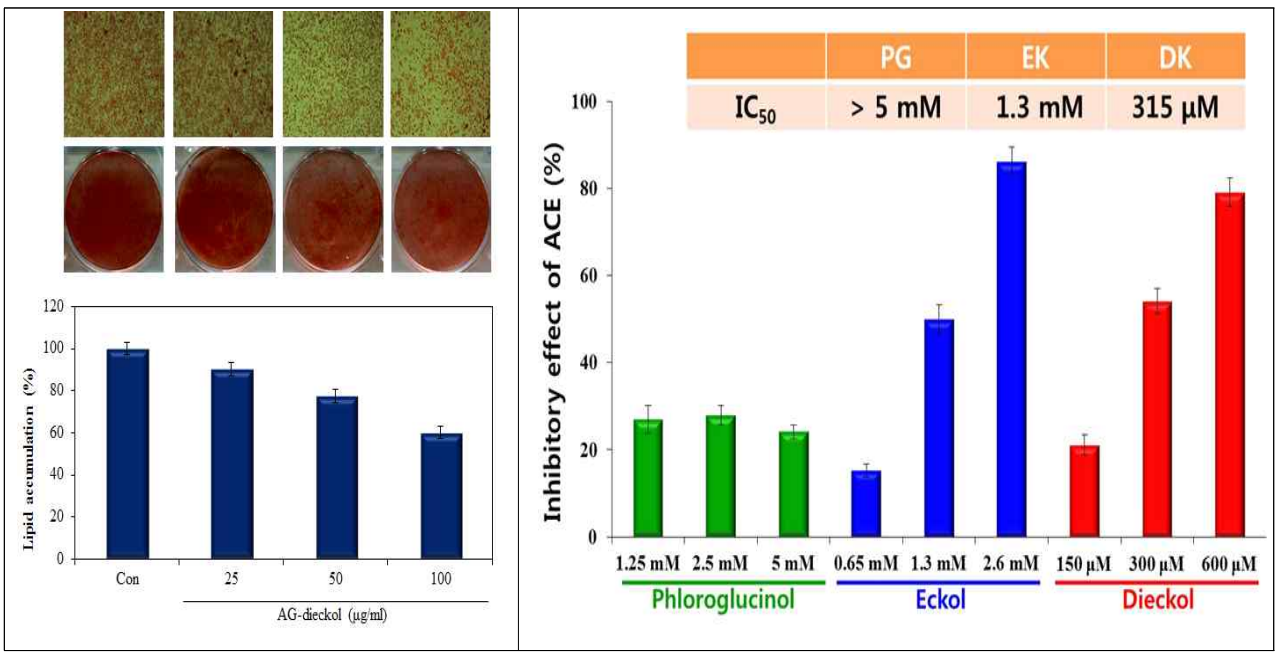


○ **항산화효소작용과 MDA 생성억제효과**: 항산화 효소인 SOD와 GR의 경우 diekcol을 처리한 그룹은 대조군에 비하여 현저히 증가하였고 dieckol 10, 20 mg/kg 처리시 대조군에 비하여 MDA 생성이 감소함.

③ 감태의 유효물질의 항비만 효과

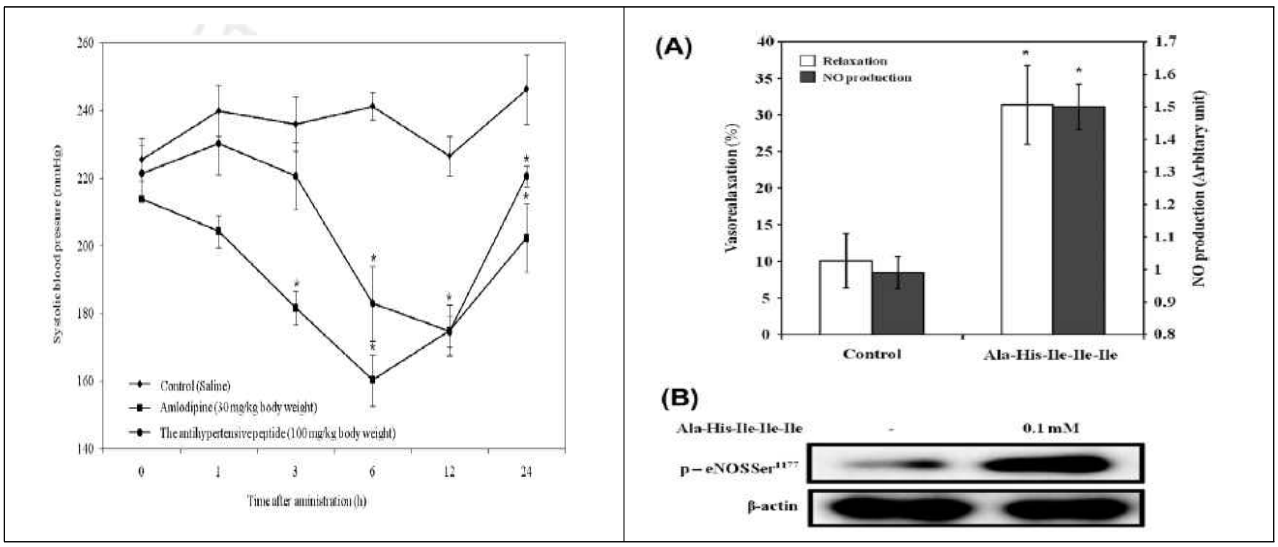
○ **AG-Dieckol의 항비만시험 (3T3L-1 In Vitro)**: AG-Dieckol의 항비만 효과를 측정하기 위하여 지방세포인 3T3-L1 세포를 이용하였으며, AG-dieckol을 25, 50, 100 μg/ml 의 농도로 처리하였을 때, 대조군 에 비하여 농도의존적으로 oil red 염색부위가 감소하는 것을 확인함.

○ **ACE 저해 활성**: 감태로부터 분리된 유효 물질인 eckol, phloroglucinol, dieckol의 ACE에 대한 저해활성을 측정한 결과, phloroglucinol은 IC_{50}: >5 mM, eckol은 IC_{50}: 1.3 mM, dieckol은 IC_{50}: 315 μM을 나타내어, dieckol 이 ACE 저해활성에 있어 다른 유효 물질보다 우수함.



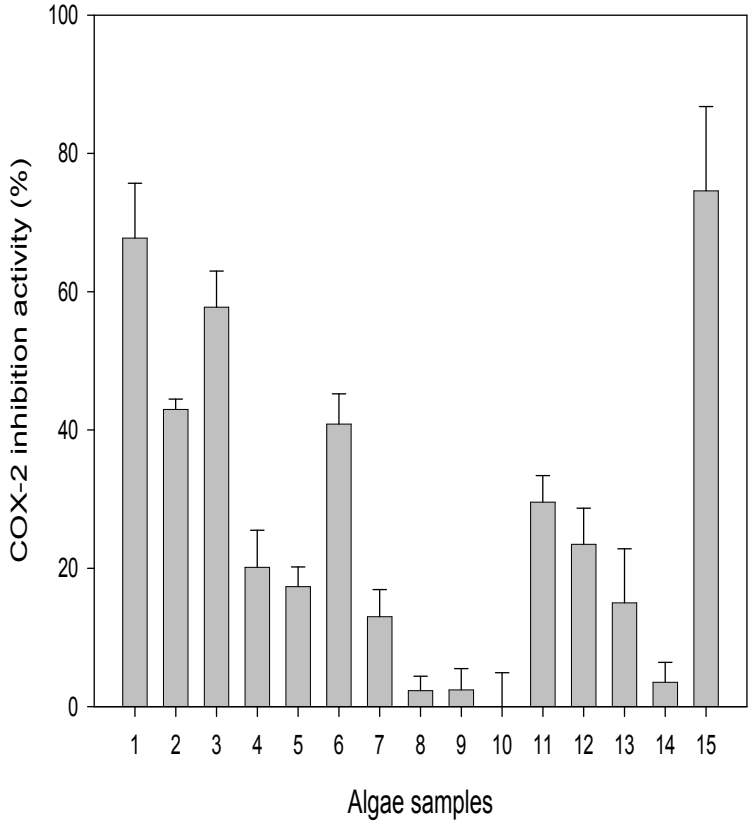
④ 미더덕 가수분해물로부터 획득한 펩타이드의 항고혈압 효과

- 미더덕 가수분해물로부터 ACE 저해 및 혈관확장 효과를 가지는 펩타이드를 분리하여, 구조를 확인한 결과 Ala-His-Ile-Ile-Ile의 분자량 565.3 Da의 펩타이드를 분리함
- 미더덕으로부터 분리한 펩타이드의 SHR(선천성고혈압쥐) 동물모델에 경구투여 후 Tail-cuff method를 통하여 24시간혈압을 측정함. 대조군으로 사용되어진 Amlodipine(칼슘채널차단제) 보다는 약하지만 시간이 경과 할수록 생리식염수 투여군 보다 혈압강하는 우수하다는 것을 확인함. 또한 12시간째 amlodipine 투여군과 비슷한 혈압강하효과를 보임.
- **ACE 저해효과**: 미더덕 가수분해물로부터 분리한 펩타이드의 ACE 저해효과는 37.1 uM을에서 나타남. 혈관내피세포 (HUVECs)를 통해 혈관확장을 유도한다고 알려진 NO생성 및 eNOS이 발현됨.



⑤ 수산물 유효소재의 항염증물질 스크리닝

- 70% ethanol로 추출한 14개의 시료와 positive control로 사용한 10mM indomethacin과 항염증 활성을 COX-2 저해율로 비교한 결과 파래(*Ulva pertusa*)를 제외한 13개 시료에서 항염증활성을 확인함.
- 10mM indomethacin의 항염증 활성은 67.8%였으며, 큰잎모자반(*Sargassum ringgoldianum*) 43.0%, 모자반(*Sargassum fulvellum*) 57.8%, 톳(*Hijikia fusiforme*) 20.1%, 톳(*Hijikia sp.*) 17.3%, 뼈지누아리(*Grateloupia divaricata*) 40.8%, 우뭇가사리(*Gelidium amansii*) 13.0%, 우뭇가사리(*Gelidium* sp.) 2.3%, 참까막살(*Carpopeltis affinis*) 2.4%, 파래(*Ulva pertusa*) 0%, 지충이(*Sargassum thunbergii*) 29.6%, 짝잎모자반(*Sargassum hemiphyllum*) 23.5%, 진두발(*Chondrus ocellatus*) 15.0%, 패(*Ishige okamurae) 3.5%*, 감태(*Ecklonia cava*) 72.8%로 확인되었다. 시료 중 감태의 항염증 활성이 72.8%로 positive control로 사용한 10mM indomethacin 67.8%보다 높은 항염증 활성이 있는 것으로 확인됨.



1; Indomethacin 10mM,
2; Sargassum ringgoldianum
3; Sargassum fulvellum
4; Hizikia fusiforme
5; Hizikia sp.
6; Grateloupia divaricata,
7; Gelidium amansii
8; Gelidium sp
.9; Carpopeltis affinis
10; Ulva pertusa
11; Sargassum thunbergii
12; Sargassum hemiphyllum,
l3; Chondrus ocellatus
14; Ishige okamurai,15; Ecklonia cava

2. 2차년 핵심별 연구결과

가. 1핵심 1세부:

검정콩껍질에타놀추출물의 항비만 기능성소재 개발
[성신여대 이명숙, 농진청 이병원, 고려대 이철구)

⊙ 결론

- C3G와 D3G를 3:1로 함유된 검정콩 주정추출물의 공정표준화(3% 소재의 표준화)
- 3T3-L1 및 ATMΦs model에서 지질축적 및 염증관련 지방분화 연계인자를 억제하여 검정콩의 비만개선 표지물질로 보임
- 검정콩 주정추출물의 in vivo 시험에서 지방조직 감소 및 지방합성 관련 유전자 발현을 억제함
- C3G 고농도(100 μM)에서 효모세포의 mitochondrial superoxide 발생을 억제함.
- C3G는 유전자 발현에 영향을 주지 않는 순수 항산화제로 확인됨.

(1) 검정콩 표지물질의 비만개선효과 [성신여대 이명숙]

① Cyanidin 3-glucoside(C3G) / Delphinidin 3-glucoside(D3G)의 지질축적억제효과(3T3-L1)

○ 검정콩 주정추출물은 3T3-L1 세포 300ug/ml투여시 40%이상 지질축적을 억제함. C3G와 D3G 모두 200uM 투여시 30%지질축적을 억제함 [Fig 2-1]

○ 검정콩의 주정추출물은 3T3-L1 pre-adipocyte가 adipocyte가 되는 과정에서 발현되는 PPAR-r, C/EBP-a와 지방구내 지질합성 key-Enz인 ACC발현을 억제함. C3G와 D3G에서도 같은 결과를 보임. [Fig 2-2]

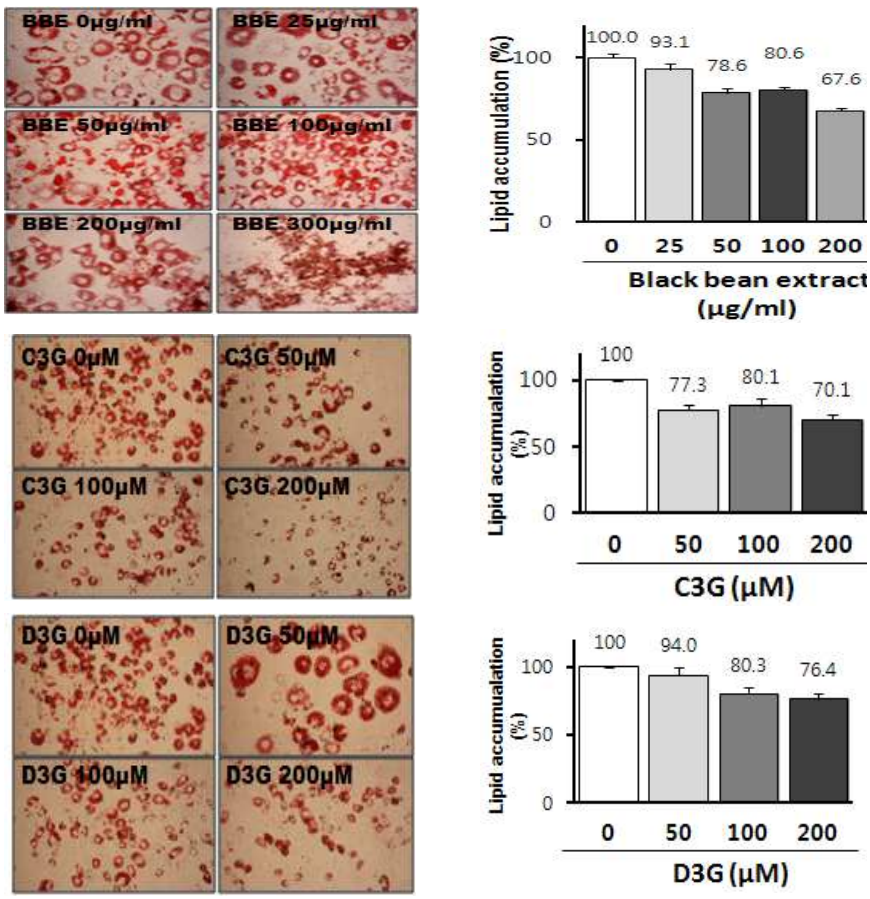
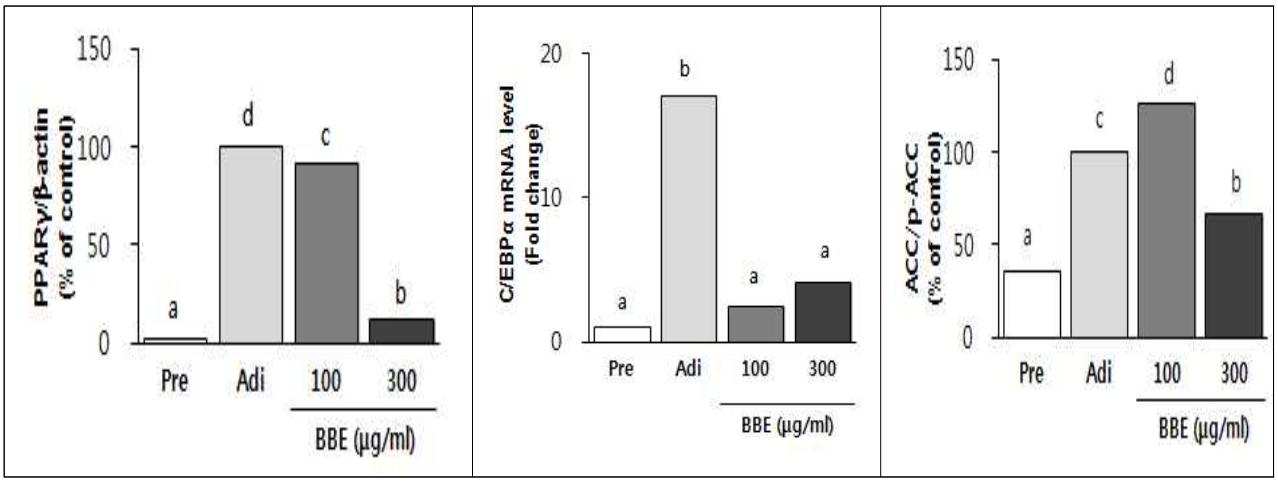


Fig 2-1] 검정콩 껍질추출물, 표지물질인 C3G & D3G의 지질축적억제 효과 (in vitro)

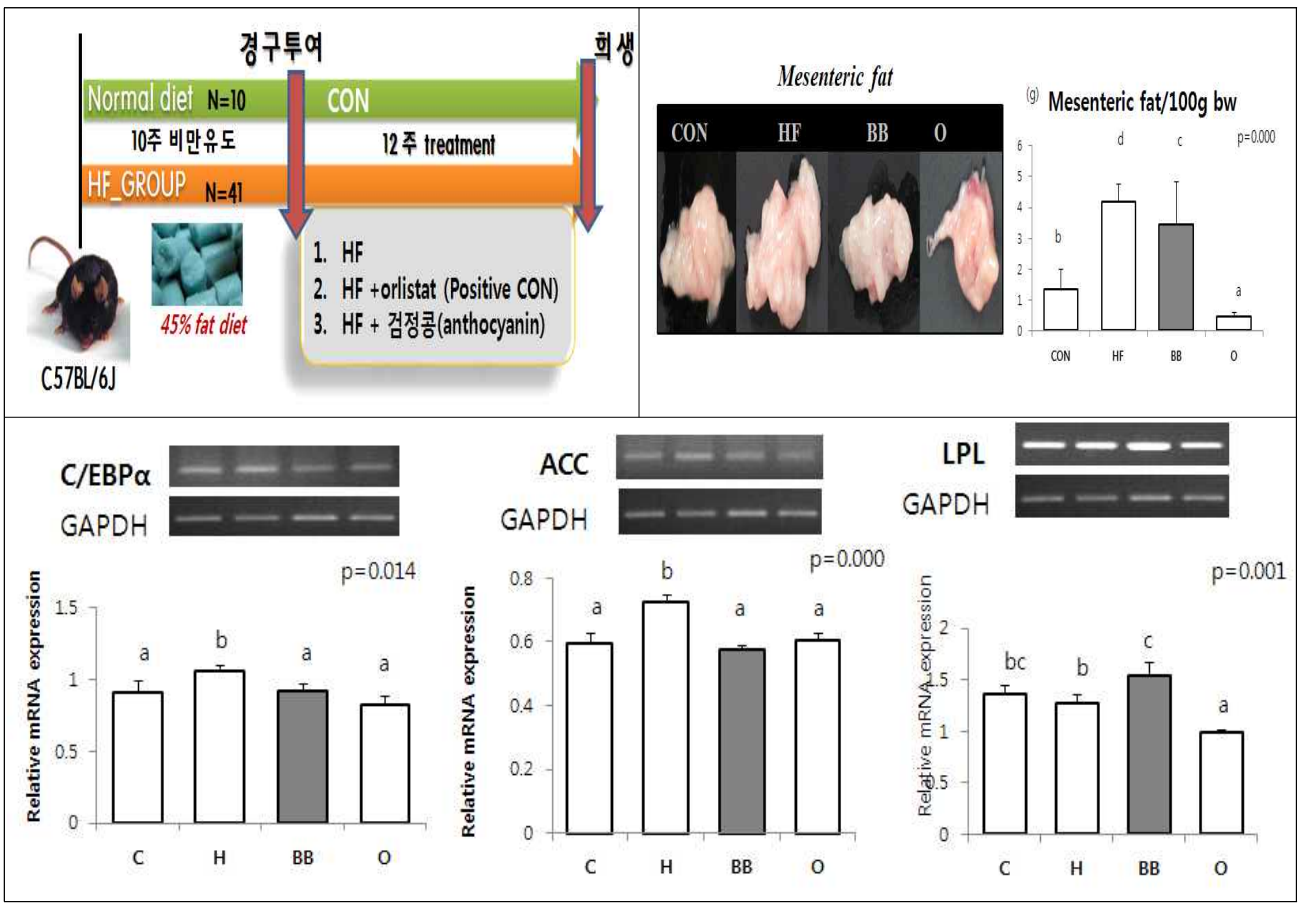


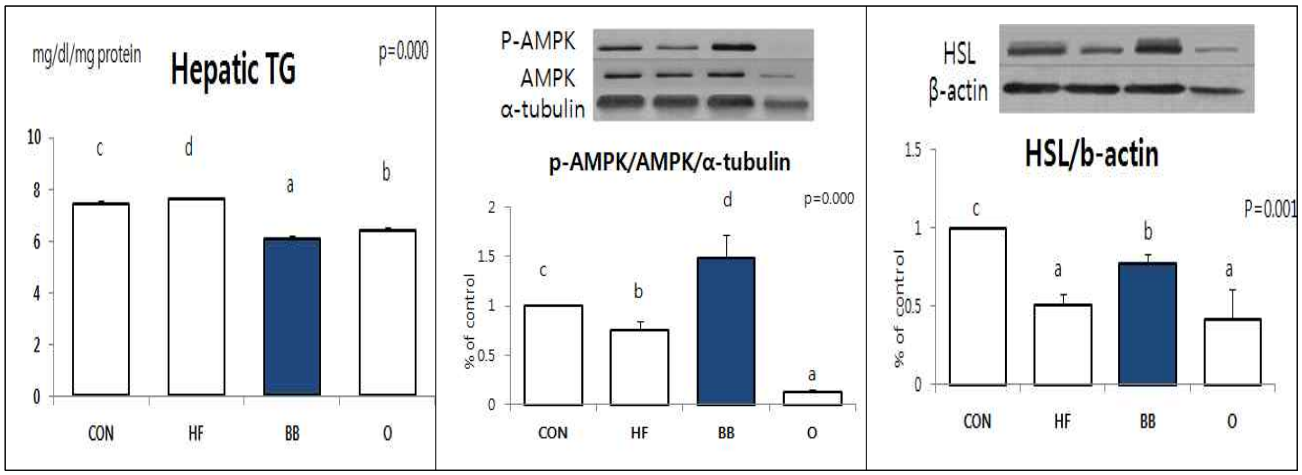
[Fig 2-2] 검정콩 껍질추출물, 표지물질인 C3G & D3G의 항비만기전분석 (in vitro)

② *in vivo* 시험

○ 1차 시험

- 검정콩 주정추출물 1g/Kg 투여(C3G: D3G=3 :1)시 장간막지방의 지질축적을 25% 감소시킴.
- 지방조직에서 C/EBPa, ACC를 억제하며 지질축적억제효과는 orlistat 항비만 약물과 유사한 수준임. [Fig 2-3]
- 지방조직에서 AMPK, HSL 및 LPL활성은 증가하며 지질분해효과는 orlistat 보다 우수함
- 간조직에서는 중성지방합성, 지방지질과산화물(MDA)생성 및 간독성(AST) 등도 억제함.

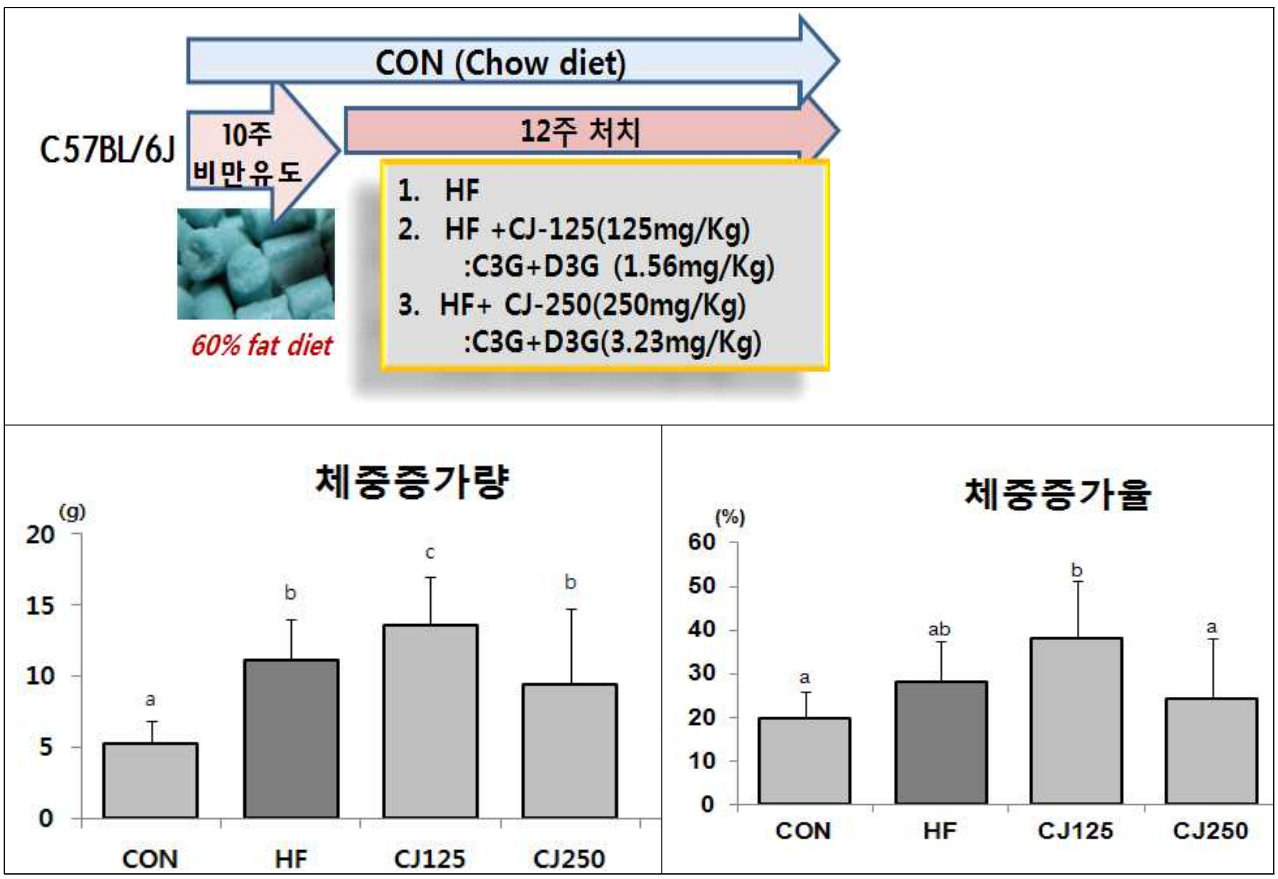


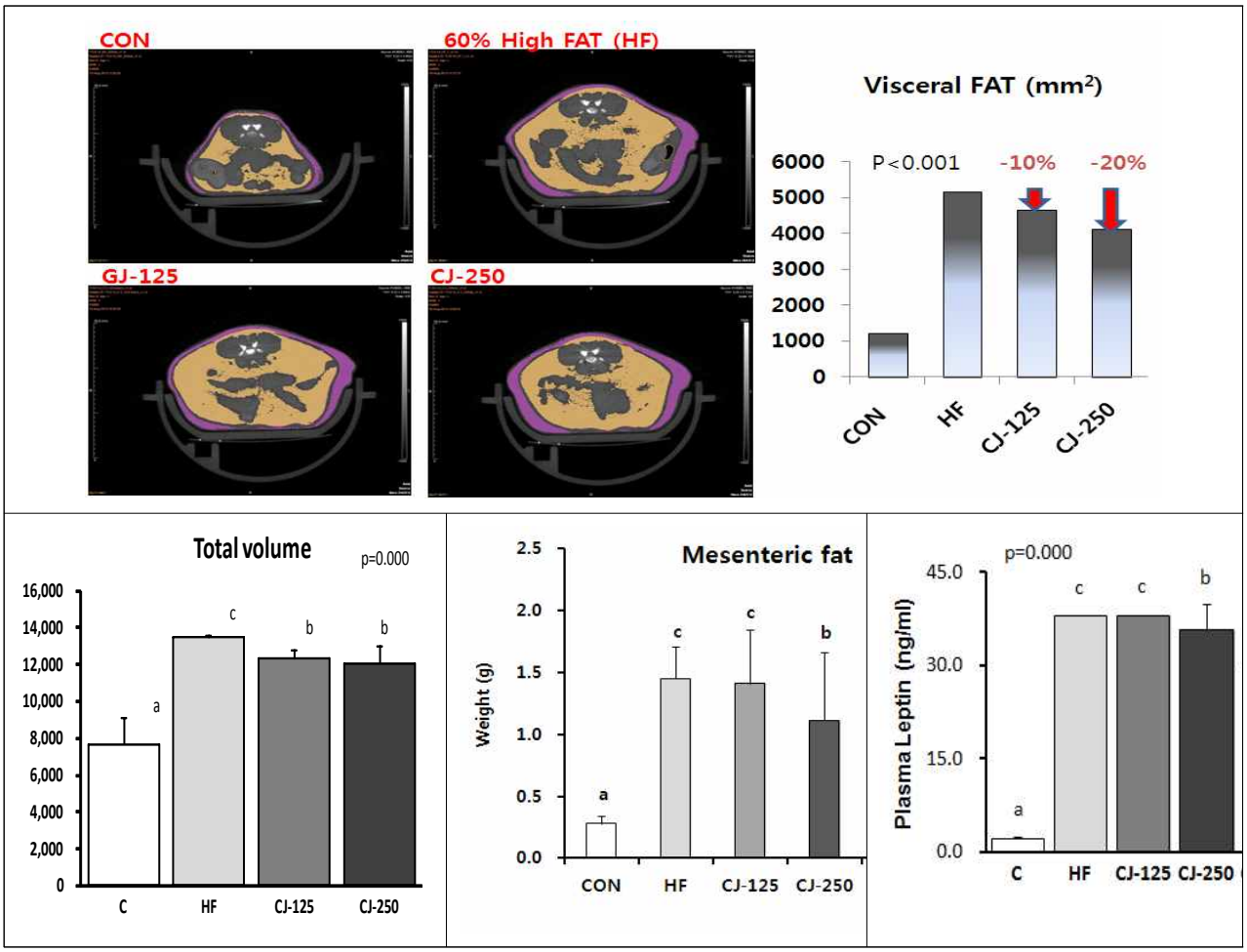


[Fig 2-3] 검정콩 껍질추출물의 체지방억제와 기전분석 (in vivo)

○ 2차 시험 [Fig 2-4]

- CJ-125, CJ-250처치는 HF에 비하여 체중증가가 유의적으로 적음. 또한 간독성이 없음 (ALT 결과)
- Micro-CT 결과에서 CJ-125, CJ-250은 HF에 비하여 visceral fat이 10, 20% 각각 감소. (P<0.001)
- Micro-CT 결과는 내장의 total volume 과 해부후 mesenteric fat(g)과 일치함.
- CJ-250은 visceral fat의 감소시킨 만큼 leptin 분비도 감소됨.



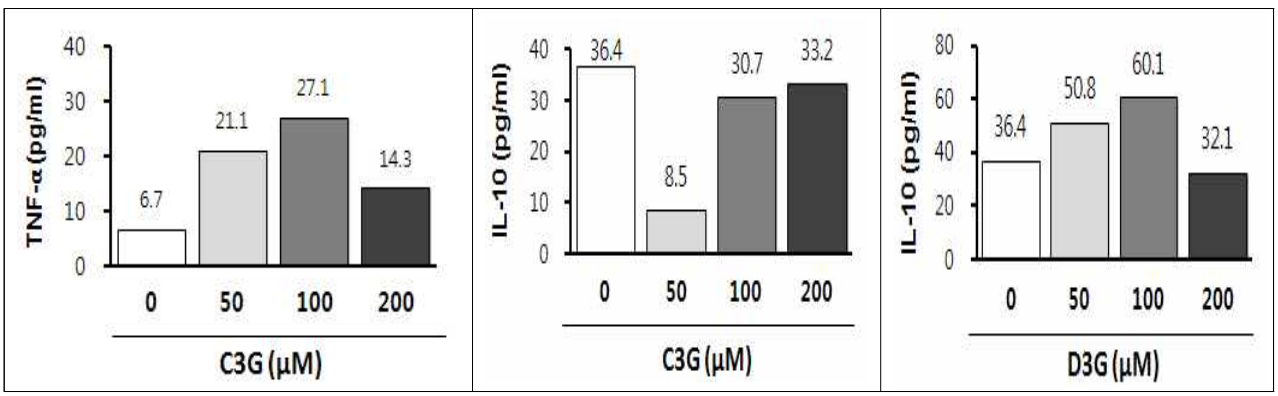


[Fig 2-4] 검정콩 껍질추출물 농도별 체지방억제와 기전분석 (in vivo)

(2) Cyanidin 3-glucoside(C3G)/Delphinidin 3-glucoside(D3G)의 항염증성 효과

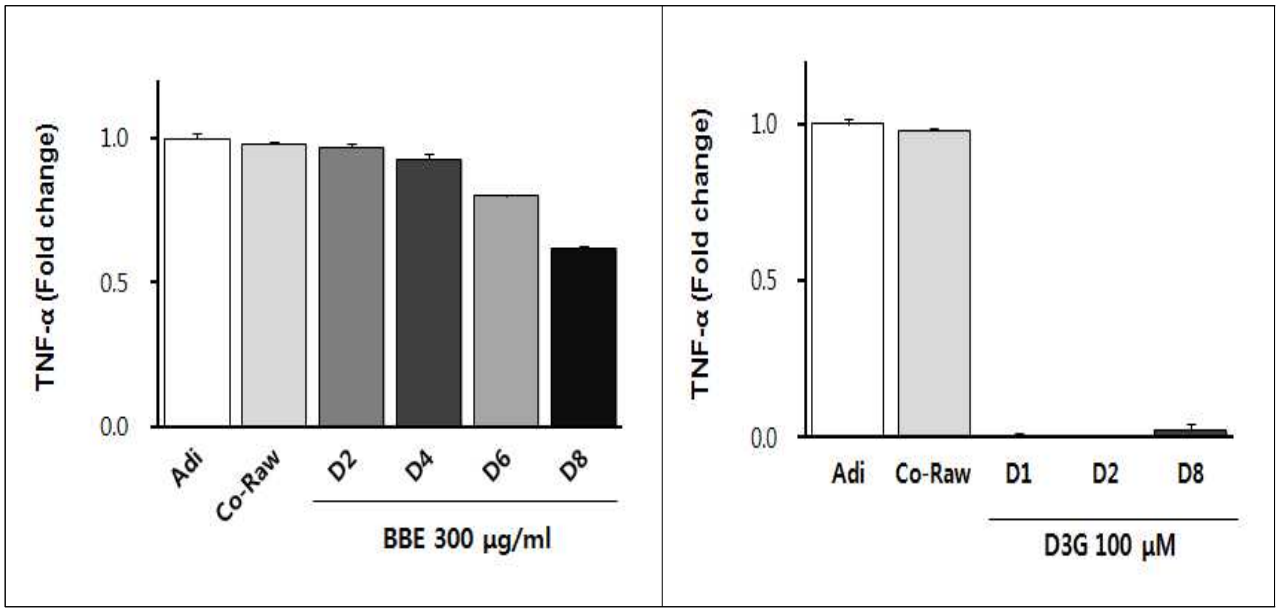
① *in vitro* 시험

○ 3T3-L1 model: C3G 200 uM 투여 시 pro-inflammation marker인 TNF-a 를 감소시키고 항염증인자인 IL-10을 증가시킴. 반면, D3G는 100uM 까지 IL-10을 증가시키다가 200 uM에서 감소됨. [Fig 2-5]



[Fig 2-5] 3T3L-1 모델에서 검정콩추출물의 항염증효과

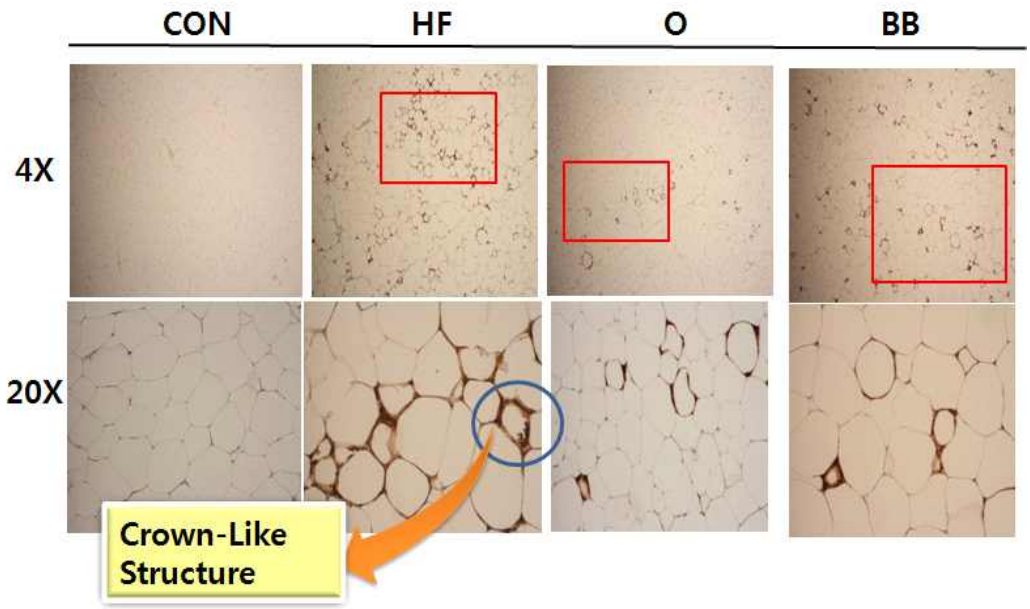
○ **ATM model**: RAW264과 3T3-L1을 co-culture한 ATM model에서의 염증성 마커 확인한 결과 검정콩 주정추출물보다 D3G 100uM의 항염증 효과가 매우 큼. **[Fig 2-6]**



[Fig 2-6] ATM 모델에서 검정콩추출물의 항염증효과

② *in vivo* 시험

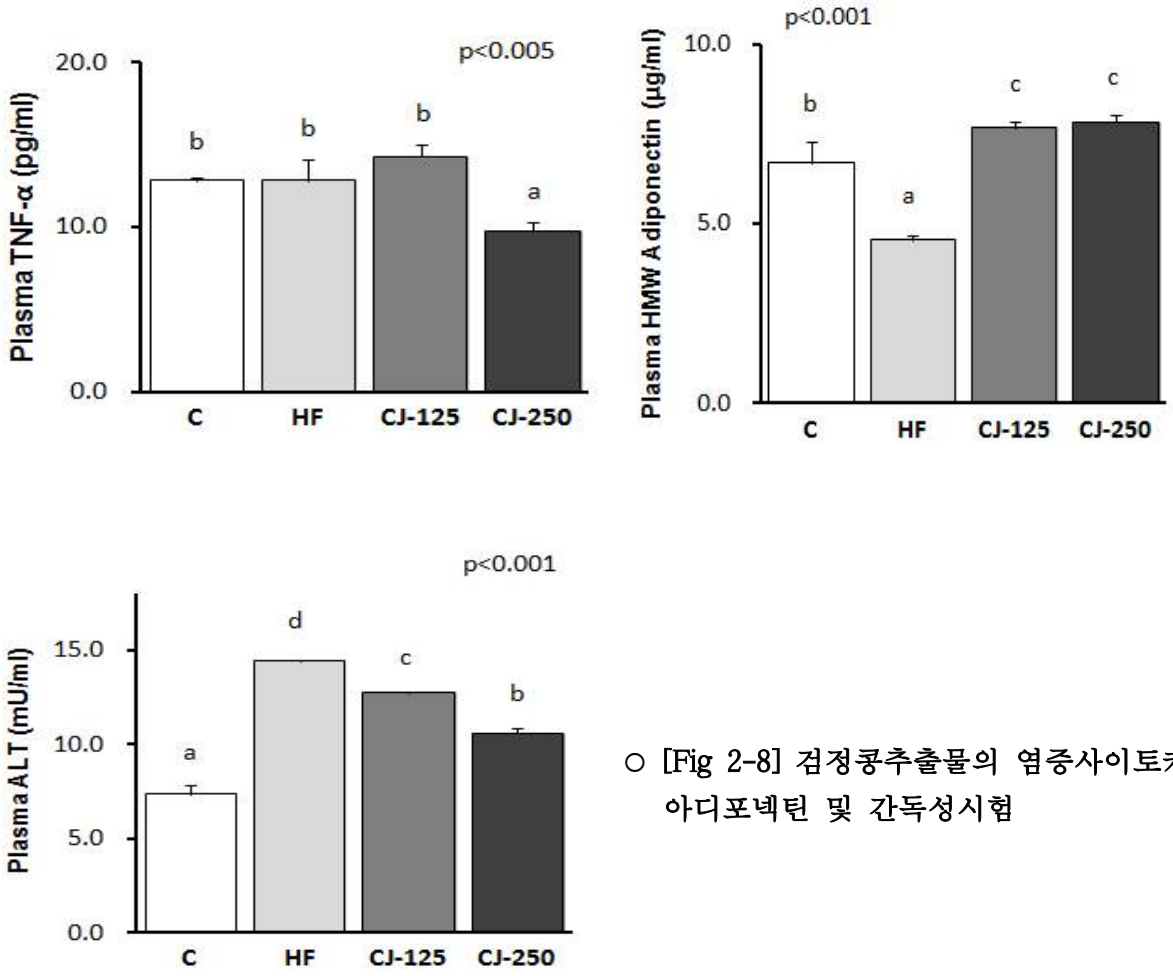
○ **1차 시험**: C3G & D3G는 염증성-대식세포가 지방구를 감싼 crown-like structure(ATMΦs model M1)을 확인하고 자 Epididymal fat에서 Galectin-3 (Mac-2)항체를 이용하여 IHC시행함. 검정콩 투여로 M1형성이 억제 되었으며 이는 orliststst의 억제효과와 매우 유사함.**[Fig 2-7]**



[Fig 2-7] 검정콩추출물의 ATMΦs model의 M1억제효과

○ **2차 시험**: TNF-a는 세포실험 결과에서 200uM에서 감소하듯이 CJ-250에서 감소하여 CJ-추출물 농도에 매우 민감한 반응을 보임. CJ-125, CJ-250은 HF에 비하여 adiponectin 분비를 증가시키며 오히려 CON 보다 증가함. **[Fig 2-8]**

○ CJ-125, CJ-250은 HF에 비하여 혈중 ALT수치가감소하여서 간독성은 없음을 알 수 있음.



○ [Fig 2-8] 검정콩추출물의 염증사이토카인, 아디포넥틴 및 간독성시험

3) 검정콩 표지물질의 항산화능 [고려대 이철구]

C3G와 D3G 2종의 항산화능 평가를 위하여 H_2DCFDA(Molecular probe), MitoSox Red (Molecular probe)를 Total ROS, Mitochondrial superoxide양을 측정하기 위한 dye로 사용함.

① 항산화능 평가 1: Total ROS

C3G & D3G 모두 효모세포내 total ROS(주로 H_2O_2)의 생성에 유의한 차이가 없음.

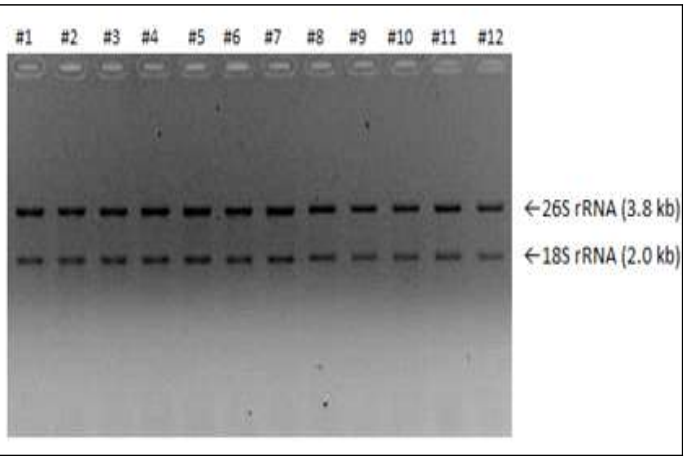
② 항산화능 평가 2: Mitochondrial superoxide

C3G는 고농도(100 μM)를 처리했을 때 효모세포에서 mitochondrial superoxide의 발생을 감소시키는 효과를 보여주고 있음. (P value * < 0.05) D3G는 저농도에서 pro-oxidant 활성을 보이고 있으며, 고농도(100 μM)를 처리했을 때만 효모세포내 mitochondrial superoxide 양을 감소시키는 효과가 있으나 통계적 유의성이 약함.(P value * < 0.05) 따라서 결과를 종합해보면 C3G가 고농도에서 항산화 활성이 있음을 알수 있고, 이 천연물에 대한 발현유전체 정보를 측정함.

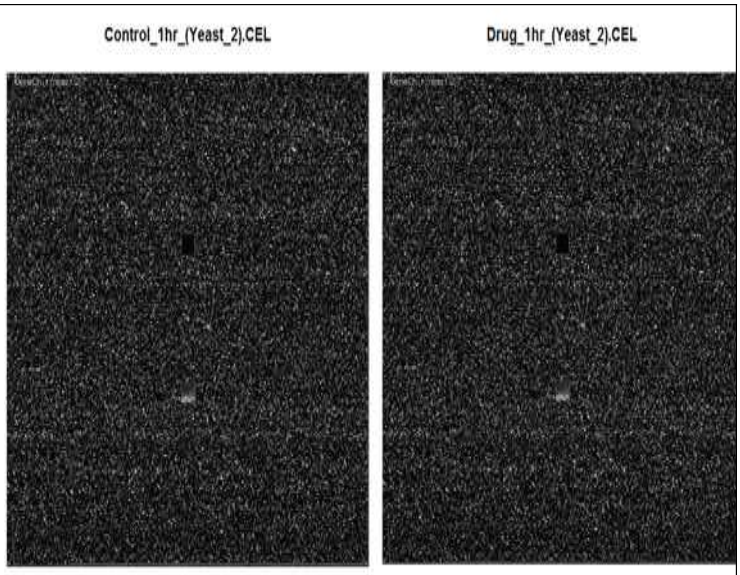
③ C3G 발현체 측정 및 분석

○ microarray 실험설계 및 절차

- 2% glucose 배지(control)-yeast와 C3G가 첨가된 2% glucose배지 -yeast를 1시간 culture 후 prep
- RNA isolation & 정량 (RNA 250ng 사용)
- fragmented cRNA는 전기영동-size distribution 확인
- **[Fig. 2-9] RNA quality 확인:** Yeast로부터 추출한 total RNA를 FA-gel에 loading한 image



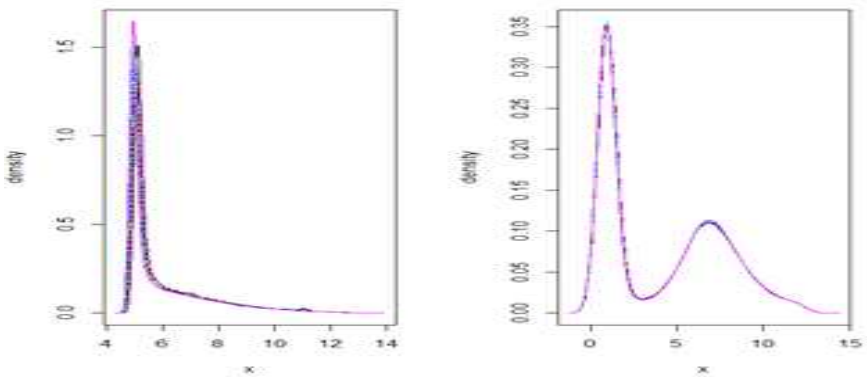
- Staining후 Genechip scanner 3000 system으로 array signal detection함 Affymetrix사의 Yeast genechip 2.0을 사용하여 gene expression profile을 얻음
- R statistics를 이용하여 microarray의 raw signal을 RMA로 background correction 및 quantile normalization을 수행
- **[Fig. 2-10] Yeast microarray data:** Scan 후 array image 예시 실험조건은 두 가지 (control-1시간, C3G-1시간)이며 각 조건의 biological triplicate수행함 (총 6장사용).



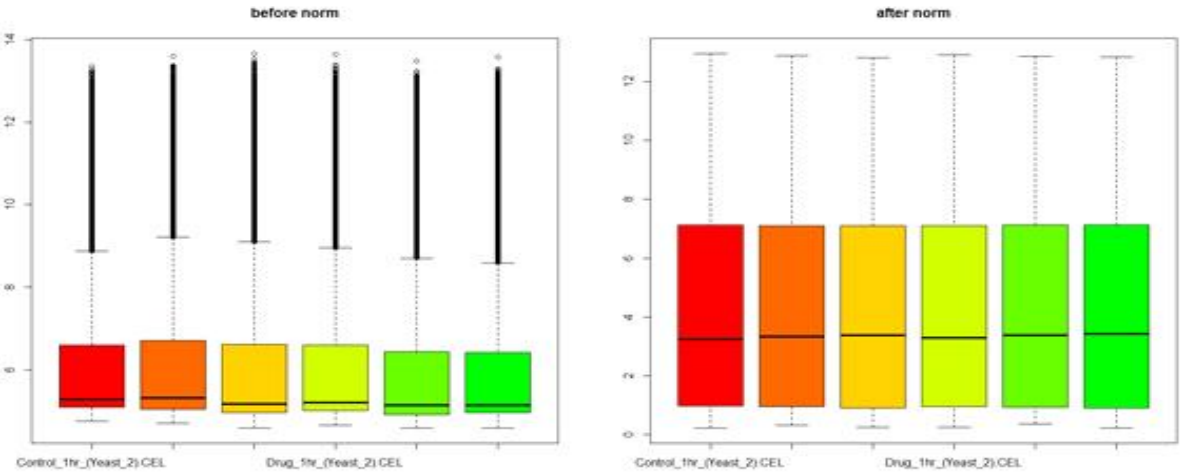
- Normalized data를 이용 control과 실험군간의 차이 나는 유전자선별. (T-test를 수행한 뒤 false discovery rate (FDR)으로 보정).

④ 실험결과

○ Array signal에 대하여 표준화 (normalization) 작업: RMA로 back ground correction함. 표준화 이후 각 조건 별 array간의 signal이 맞추어 진 것을 확인함.

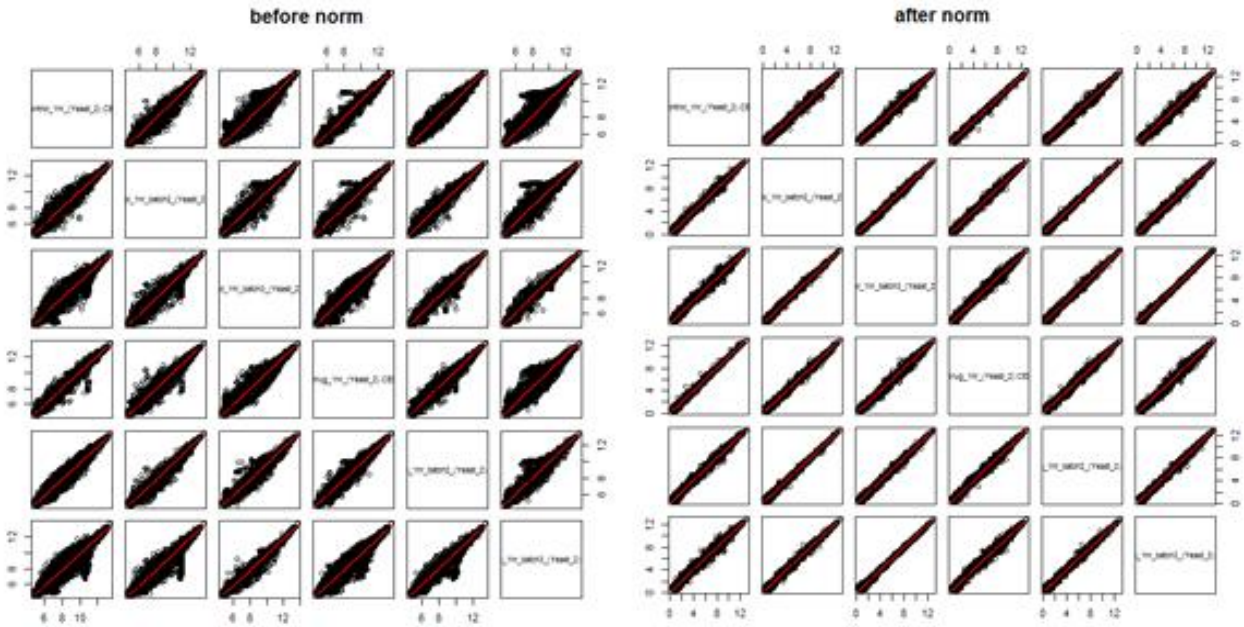


○ Array signal의 표준화 전과 후를 boxplot 으로 비교함.



[Fig 2-11.] Microarray data의 표준화 전 (좌측) 과 후 (우측) 의 signal에 대한 boxplot

○ 표준화 전과 후의 scatter plot을 비교하여 표준화가 제대로 이루어졌음을 확인함. (그림 5)

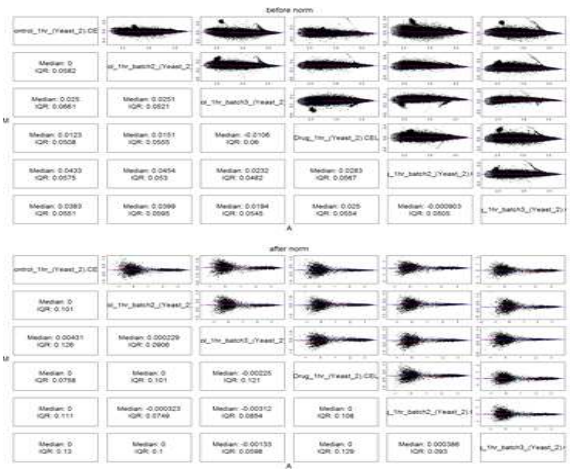


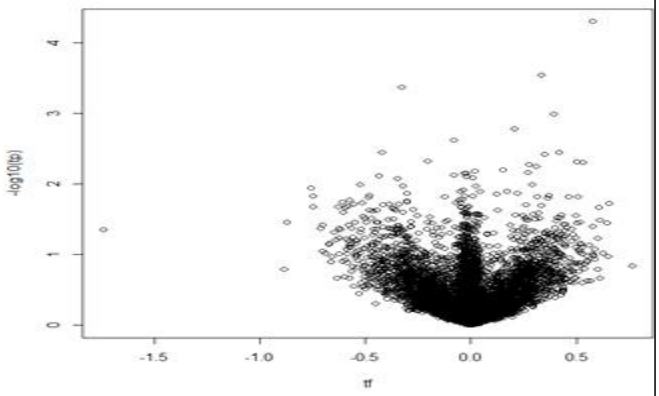
[Fig 2-12]. 표준화 전 (좌측) 과 후 (우측) 의 데이터에 대한 scatter plot 결과

○ 표준화 전과 후의 MA plot을 비교하여 표준화가 제대로 이루어짐을 확인함. (Fig. 표준화 전 (위) 과 후 (아래)의 데이터에 대한 MA plot 결과

○ 1시간 culture 후의 control 그룹과 실험군간 비교시 raw p-value가 0.05 이하인 array probe개수는 225개였으나 이를 FDR을 통한 multiple testing correction을 하면 adjusted p- value가 0.1이하인 유전자는 없음

○ **결론: C3G는 고농도에서 항산화 효능이 존재하며, C3G는 세포의 유전자 발현에 영향을 주지 않는 순수 항산화제로 확인됨.**

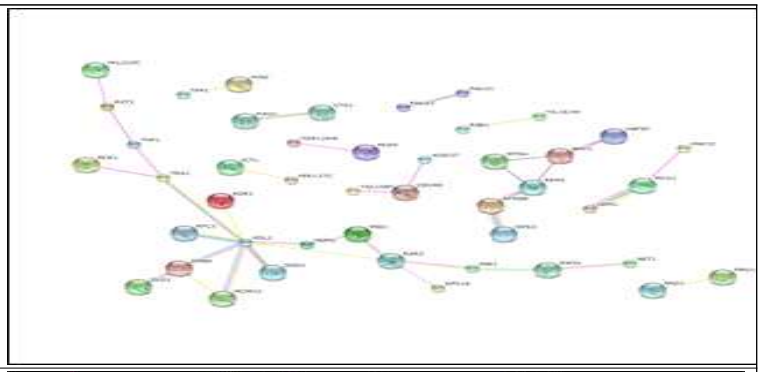




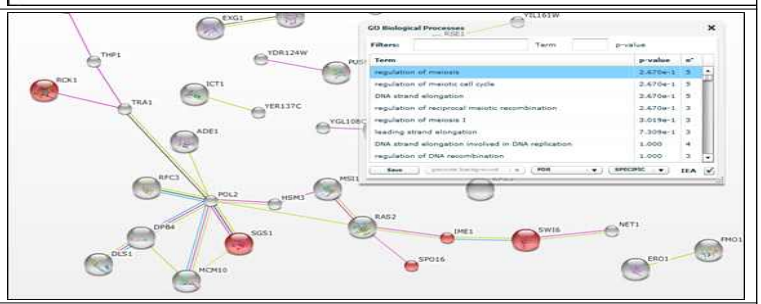
[Fig. 2-13]. P-value (y축)와 그룹간 fold-change (x축)에 대한 volcano plot (adjusted-p value가 0.1이하일 경우 red dot으로 표시, red dot이 전혀 없으므로 두 그룹 간 차이가 없음

○ **Raw p-value <0.05 인 유전자에 대한 생물학적 기능 분석**

- C3G의 잠재적 기능을 규명하기 위해서 Raw p-value가 0.05 이하인 유전자 225개 중 S. cerevisiae에서 coding하는 유전자 89개를 선별함. 이를 가지고 유전자간 interaction 분석을 수행함 [Fig 2-14].
- **[Fig 2-14] STRING 9.1을 활용한 gene network 분석**



- 89개의 선별된 유전자 집단에서는 yeast의 cell cycle (meiosis) 및 DNA elongation 과 연관된 유전자들이 enrich 되었음을 알 수 있음 [Fig 2-15].
- **[Fig 2-15]. Enriched GO biological process 분석 결과**



- Yeast GO slim term 분석에서도 위와 유사한 결과를 얻었으며 89개 중 24개 유전자는 아직 그 기능이 밝혀지지 않은 상태임. 89개 중 11%에 해당하는 유전자들은 DNA damage에 반응하거나 DNA repair에 관련된 유전자로 약물이 세포의 DNA의 보존에 관여함으로써 세포의 수명을 증가시킬 수도 있음을 시사함 [Fig 2-16].
- **[Fig 2-16]. GO slim mapper를 활용한 유전자 기능 분석 결과**

SGD Gene Ontology Slim Mapper

This page displays genes from your query that are annotated directly or indirectly (via a parent:child relationship) to the GO Slim terms of your choice.

Results for the mapping of 89 genes to the Yeast GO-Slim Process

GO-Slim term	Cluster frequency	Genome frequency	Genes annotated to the term
biological process unknown	24 out of 89 genes, 27%	1153 of 6334 genes, 18.2%	DGR1, DSF1, ECL1, ECM19, ICS2, NRP1, PAU21, PAU22, YAR075W, YCR023C, YCR099C, YDR124W, YER137C, YFR032C-B, YGL108C, YGL235W, YGR201C, YIL161W, YJL027C, YKL222C, YNR073C, YPL277C, YPR097W, YPR117W
response to DNA damage stimulus	10 out of 89 genes, 11.2%	287 of 6334 genes, 4.5%	DPB4, HSM3, MCM10, NSE1, POL2, RFC3, SGS1, THP1, TPP1, TRA1
DNA repair	10 out of 89 genes, 11.2%	238 of 6334 genes, 3.8%	DPB4, HSM3, MCM10, NSE1, POL2, RFC3, SGS1, THP1, TPP1, TRA1
regulation of cell cycle	7 out of 89 genes, 7.9%	195 of 6334 genes, 3.1%	IME1, NET1, POL2, RCK1, SGS1, SPO16, SWI6
mitotic cell cycle	6 out of 89 genes, 6.7%	304 of 6334 genes, 4.8%	CDC46, MCM10, NET1, POL2, SGS1, SWI6
chromatin organization	5 out of 89 genes, 5.6%	230 of 6334 genes, 3.6%	DPB4, MSI1, POL2, TRA1, UAF30
DNA recombination	5 out of 89 genes, 5.6%	156 of 6334 genes, 2.5%	MCM10, POL2, SGS1, SPO16, SWI6
DNA replication	5 out of 89 genes, 5.6%	144 of 6334 genes, 2.3%	DPB4, MCM10, POL2, RFC3, SGS1
meiotic cell cycle	5 out of 89 genes, 5.6%	165 of 6334 genes, 2.6%	IME1, RCK1, SGS1, SPO16, SWI6
sporulation	5 out of 89 genes, 5.6%	123 of 6334 genes, 1.9%	OSW2, RAS2, SPO16, SPR6, SUR7
transcription from RNA polymerase II promoter	5 out of 89 genes, 5.6%	459 of 6334 genes, 7.2%	IME1, RXT2, SWI6, THP1, TRA1

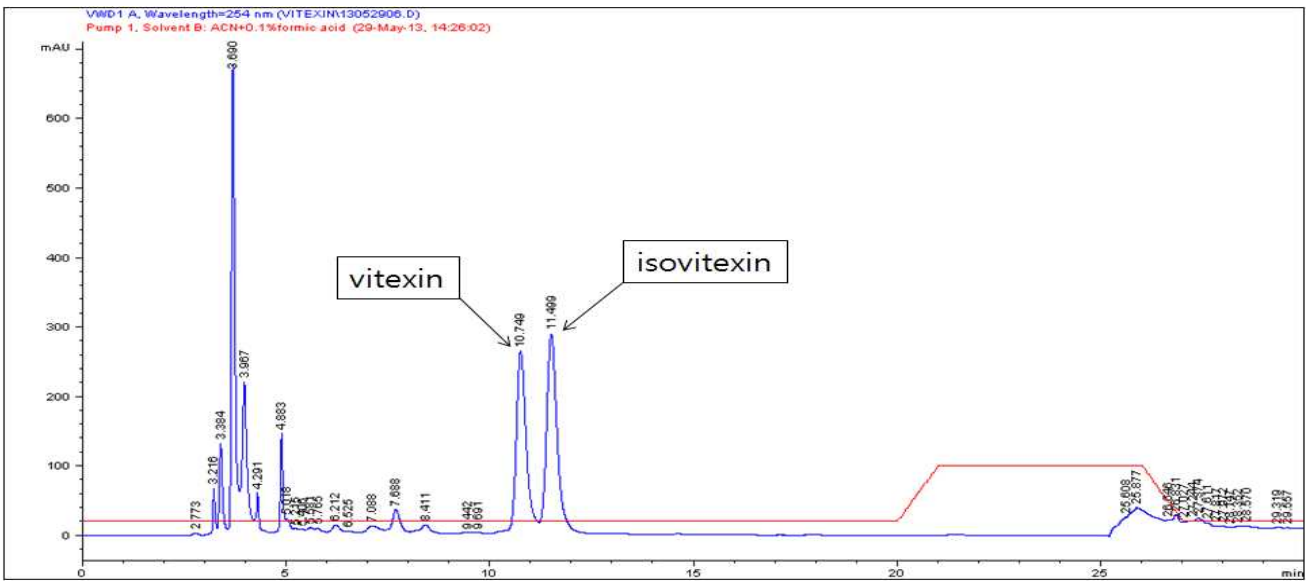
나. 1핵심 2세부:

녹두소재의 표준화 및 제품 개발 [경기대학교 대체의학대학원 김애정 교수/(주)서진바이오텍]
⊙ **결론** • **녹두의 Vitexin, Isovitexin 함량 확인** • **녹두의 로스팅 조건 표준화** • **로스팅 조건에 따른 성분 분석** • **로스팅 후 생리활성의 증가 확인** • **티백차의 제조 등 로스팅 녹두의 응용기술개발 및 생산공정 표준화** • **시제품 제작, 영양소분석 및 원가 계산**

(1) 녹두에서 vitexin과 isovitexin 표지물질 추출효율을 위한 공정개발 [서진바이오텍]

① **방법**: 녹두를 주정추출하여 시료로 사용하였으며 HPLC를 이용하여 분석한 결과 vitexin과 isovitexin을 분리할 수가 있었음. sample의 단백질 함량과 탄수화물 함량을 정량화하였으며, 동결건조기를 이용하여 분말상태로 만들었으며 무게를 측정하여 수율을 확인하였음. 각 정제 단계에서 protein 정량은 BCA Protein Assay Kit (Pierce)를 사용하였음. 시료를 사용하여 총당 정량 (Phenol-H2SO4 method), 항산화 실험(DPPH radical scavenging activity), 항염증 활성 분석(COX-2), 미백활성 (tyrosinase), collagenase 저해활성 등을 검증하였음.

② **녹두 추출물**: 전라남도 나주에서 구입한 어울녹두를 EtOH로 추출한 경우 수율에 대해 측정한 결과는 [Table 2-1]과 같음. 20kg 녹두를 20L 에탄올로 추출하여 1.33L까지 농축한 후 HPLC를 이용하여서 농축액의 vitexin과 isovitexin을 분리함. 각각의 함량은 vitexin이 18.05%, isovitexin이 20.87%이었음 [Fig 2-17]. 농축액을 동결건조기로 건조한 결과 28.5g의 건조물을 얻을 수 있었음. 따라서 추출 수율은 0.14%이었음.



[Fig 2-17]. Vitexin/Isovitexin 추출물질의 HPLC data

[Table 2-1] 녹두추출물의 특징

녹두 사용량	에탄올 사용량	농축액 량	농축액의 수분함량	농축액의 vitexin 함량	농축액의 isovitexin 함량	건조 후 추출물 량	추출 수율
20kg	20L	1.33L	97.6%	18.05%	20.87%	28.5g	0.14%

③녹두추출물의 기초영양소 함량

[Table 2-2] 녹두추출물의 단백질/ 총당량:

농축액(1 mL)당 영양소 함량	Mean ± SD
protein (mg/mL)	5.00 ± 0.01
glucose (mg/mL)	8.8269 ±0.02

○ **녹두 추출물의 항산화 활성**: DPPH측정은 물질의 환원력(항산화력)을 PUFA라디칼의 모델로 안정한 유리라디칼인 Diphenyl-1-picryl hydrazyl (DPPH)를 사용하여 시료용액과의 반응에서 DPPH라디칼이 감소되는 정도를 흡광도로 측정함. 간접적 항산화능 측정 실험으로 DPPH고유색인 보라색이 노란색의 diphenypicryl hydrazine으로 환원되는 정도를 측정함. 화학적 유도 radical이지만, 간편하고 신뢰성이 높아서 널리 이용됨. 녹두 추출물의 항산화활성을 확인함. [Table 2-3]

[Table 2-3] 녹두 추출물의 DPPH radical scavenging assay

sample	희석배수	DPPH radical scavenging assay (%)	표준편차
negative control		0	
BHA (1mg/mL)		78.77	±1.01
녹두 추출농축액	100	-1.42	±0.64
	50	0.35	±0.96
	20	4.15	±0.67
	10	12.81	±0.81

○ **항염증활성**: 녹두추출농축액의 항염증 효과는 COX-2효소에 대한 활성저해능으로 평가함. 그 결과 추출액의 COX-2활성저해능은 100배 희석하여서 10 μg처리 시 79.88% 억제능을 보였으며, 10배 희석 시 99.47% 보이는 것을 보아 높은 항염증 활성을 확인함. 대조군으로 사용한 10 mM Indomethacin(35.779 μg)의 COX-2저해활성은 27.72%가 나타났음 [Table 2-4]

[Table 2-4] 녹두 추출물의 항염증 활성

sample	희석배수	COX-2 inhibition assay (%)	표준편차
Indomethacin (10mM)		27.72	±4.69
녹두 추출농축액	100	79.88	±3.29
	50	88.86	±5.56
	20	97.22	±8.08
	10	99.47	±2.82

○ **미백활성**: **멜**라닌 생성에 중요한 역할을 하는 효소인 tyrosinase에 대한 저해는 멜라닌 과다로 인한 색소침착, 기미, 주근깨의 치료에 효과적임. 따라서 녹두추출농축액에 대한 tyrosinase활성을 측정하였음. mushroom tyrosinase를 효소원으로 하여 기질인 L-DOPA와의 반응으로 생성된 L-dopaquinone의 흡광도로 측정하기 위해 microplate reader를 이용하여 490 nm에서 흡 광도를 측정하였음. 그 결과 가장 높은 저해활성을 나타낸 녹두추출농축액은 2배 희석한 것으로서 89.86±4.59%이며, 100배희석한 값인 64.85±4.05%보다 높음. 다른 희석 비율들도 확인해본 결과 녹두추출농축액이 미백 활성을 가진다고 말 할 수 있겠음(표 2-5).

[Table 2-5] 녹두 추출물의 미백활성

sample	희석배수	tyrosinase inhibition assay (%)	표준편차
		0	
negative control		64.25	±4.05
	100	16.63	±4.46
Arbutin (1mg/ml)	50	18.80	±3.31
	20	50.54	±4.79
녹두 추출농축액	10	58.12	±5.04
	2	89.86	±4.59

○ **collagenase**: 세포외 기질 (extracellulat matrix)의 주요 구성 성분인 collagen은 피부의 섬유아세포에서 생성되는 주요 기질 단백질임. 이러한 collagen은 연령 및 자외선 조사에 의한 광노화에 의해 감소하며, 이는 피부의 주름 형성과 밀접한 연관이 있다고 알려져 있음. 또한 collangen 은 트립신 등의 단백질 분해효소의 작용을 받지 않으나, collagenase에 의해 분해된다는 보고가 있다.collagenase의 활성을 억제하는 것 주름개선에 효과를 기대할 수 있음. 녹두추출농축액의 희석배수별 활성을 실험 한 결과 농도가 높아질수록 활성이 증가하는 것을 확인하였으며, 따라서 collagenase의 활성을 억제 할 수 있다고 볼 수 있음.(표 2-6).

[Table 2-6] 녹두 추출물의 collagenase inhibition assay

sample	희석배수	collagenase inhibition assay (%)	표준편차
negative control		0	
ascorbic acid (1mg/mL)		62.32	±0.75
녹두 추출농축액	100	-4.92	±3.94
	50	1.64	±1.21
	20	15.17	±1.00
	10	41.00	±1.22

(2) 녹두의 생리활성 극대화를 위한 로스팅 처리공정 표준화 [경기대]

① 실험방법

○ **최적 로스팅 온도와 시간 결정.**

- 예비실험으로 녹두를 90℃, 100℃, 110℃, 120℃로, 20분간 로스팅하여 시료로 사용하였음. 온도별 로스팅 녹두 시료의 pH, 환원당, 일반성분 함량을 측정하였으며 에탄올추출 후 총페놀함량, 총플라보노이드 함량, DPPH radical 소거활성, ABTS radical 소거활성, xanthine oxidase 저해활성, 아질산염 소거활성 등을 통해 생리활성효과를 검증하였음.

○ **로스팅 시간에 따른 수율**: 로스팅 온도가 올라갈수록 추출수율이 증가함. 로스팅으로 인해 녹두의 잔여수분이 증발함으로서 로스팅 온도가 높은 군의 시료가 상대적으로 수분함량이 낮아짐. 로스팅시간에 따른 수율 및 로스팅 온도가 올라갈수록 수율이 증가함 (표 2-7)

- 상기 방법을 통해 확정된 온도인 110℃에서 시간을 달리하여 10분, 20분, 30분간 로스팅하여 시료로 사용한 후 상기 실험들을 동일하게 수행하였음.

[Table 2-7] Yield from 70% ethanol extract of mung bean according to roasting temperature

Temp (℃)	Roasting Time (min)	Yield (%)
0	0	9.03
90	20	9.36
100	20	9.89
110	20	10.19
120	20	10.44

② 로스팅 온도에 따른 pH와 환원당 함량: pH 6.1에서 6.3사이의 값을 보여줌. 커피원두는 로스팅 시간과 온도가 증가함에 따라 커피의 유기산의 분해로 인하여 pH는 증가함. 본 연구에서는 로스팅 온도에 따른 특별한 경향성은 없음. 이는 커피와 녹두의 유기산 성분 함량의 차이에 기인한 것으로 판단되어짐. 로스팅 녹두의 환원당 함량을 측정한 결과, 생 녹두의 환원당 함량이 3.13 mg/mL로 가장 높았고 로스팅 온도가 높아질수록 환원당 함량이 낮아짐. 커피를 로스팅함에 따라 단당류 함량이 30%이상 줄어드는 결과 등을 참조할 때 본 결과도 유사함. (표 2-8)

[Table 2-8] The pH and reducing sugar contents of mung bean according to roasting temperature

Temp (℃)	Time (min)	pH	Reducing sugar contents (mg/mL)
0	0	6.2±0.1[1)a2)]	3.14±0.12[a]
90	20	6.1±0.2[a]	2.14±0.15[b]
100	20	6.2±0.1[a]	0.86±0.11[c]
110	20	6.2±0.1[a]	0.62±0.04[d]
120	20	6.3±0.1[a]	0.71±0.06[cd]

[1)]Mean±SD, n=3, [2)]Means with different letters in the same column are significantly different at $p<0.05$ by Duncan's multiple range test.

⑤ 로스팅 조건별 녹두의 일반성분:

로스팅 온도가 증가할수록 수분함량이 감소함. 생 녹두가 10.08%로 가장 수분 함량이 높게 나타났고, 120℃에서 로스팅 한 녹두에서 8.21%로 가장 낮음. (표 2-9)

[Table 2-9] General compositions of mung bean according to roasting temperature

Temp (℃)	Time (min)	Moisture (%)	Crude ash (%)	Crude protein (%)	Crude fa t(%)	Carbohydrate (%)
0	0	10.08±0.23[1)a2)]	5.02±0.01[a]	17.31±0.23[a]	0.49±0.02[a]	67.10±0.15[a]
90	20	9.07±0.23[b]	5.12±0.01[ab]	17.25±0.40[a]	0.50±0.01[ab]	68.06±0.05[b]
100	20	8.63±0.18[c]	5.43±0.38[bc]	17.27±0.06[a]	0.53±0.01[bc]	68.14±0.34[b]
110	20	8.45±0.20[cd]	5.54±0.05[c]	17.30±0.16[a]	0.55±0.02[cd]	68.16±0.05[b]
120	20	8.21±0.10[d]	5.69±0.01[c]	17.33±0.09[a]	0.57±0.02[d]	68.20±0.35[b]

[1)]Mean±SD, n=3, [2)]Means with different letters in the same column are significantly different at $p<0.05$ by Duncan's multiple range test.

⑥ 로스팅 온도에 따른 녹두의 페놀 및 플라보노이드 성분 변화:

로스팅 녹두의 총 페놀함량은 로스팅 온도가 증가할수록 증가함. 이러한 결과는 Maillard 반응에 의해 생성되는 갈색 반응생성물인 melanoidin의 증가에 의한 것으로 판단됨. 다만 120℃군에서는 오히려 총 페놀함량이 낮아짐. 이는 과한 로스팅에 의해 페놀성분의 분해가 유발된 것으로 생각되어지며 고온에서의 로스팅은 저분자의 휘발성 페놀성분들을 많이 생성시킴. 따라서 로스팅과정 중에는 총 페놀화합물의 농도는 다소 증가하다가 감소하는 경향으로 나타난다는 결과와 일치함. 로스팅 녹두의 총 플라보노이드 함량은 로스팅 온도에 따른 유의적인 차이 없이 30 mg/g 안팎의 함량을 나타냈음. (표 2-10)

[Table 2-10] Total phenol contents, Total flavonoid contents of mungbean according to roasting temperature

Temp (℃)	Time (min)	Total phenol contents (mg/g)	Total flavonoid contents (mg/g)
0	0	275.63±9.87[1)b2)]	32.96±4.59[a]
90	20	311.85±10.97[c]	33.42±6.40[a]
100	20	354.72±10.98[d]	32.98±13.20[a]
110	20	359.43±13.99[e]	29.04±13.10[a]
120	20	225.34±10.11[a]	37.93±7.63[a]

[1)]Mean±SD, n=3, [2)]Means with different letters in the same column are significantly different at $p<0.05$ by Duncan's multiple range test.

⑦ 로스팅 온도에 따른 녹두의 항산화능 변화

○ DPPH radical 소거활성: 로스팅 온도가 높아질수록 DPPH radical 소거활성은 유의적으로 증가함. 그 중 110℃ 처리군이 10.81%로 가장 좋은 DPPH radical 소거활성을 보였으나 120℃ 구간에서는 활성이 오히려 감소되는 경향을 나타냈음.

○ ABTS radical 소거활성: 로스팅 온도가 높아질수록 활성이 유의적으로 증가하는 경향을 나타냈음. 110℃ 처리군이 34.18%로 가장 우수한 활성을 보여주었으나 120℃ 구간에서는 25.94%로 활성이 감소되는 경향을 나타냈음.

○ Xanthine oxidase 저해활성: xanthine 또는 hypoxanthine을 산화하여 요산을 생성하게 하는 효소임. 이들 xanthine oxidase와 xanthine과 같은 기질과의 반응은 일반적인 라디칼 형성반응으로 알려져 있음. 로스팅 녹두의 xanthine oxidase 저해활성 역시 로스팅 온도가 높아질수록 활성이 유의적으로 증가하는 경향을 나타냈다. 110℃ 처리군이 48.57%로 가장 우수한 활성을 보여주었으나 역시 120℃ 구간에서는 29.48%로 활성이 감소되는 경향을 나타냈음.

○ 결론: (표 2-11) 이들 항산화 활성은 총 페놀 함량의 변화와 유사한 결과를 보여주는데 페놀성분이 항산화활성에 영향을 미치는 주요 물질이므로 유사한 경향을 보임. 또한 이들 결과는 Colombia arabica 커피를 약함, 중간, 강함의 3단계로 로스팅하여 항산화 활성을 측정한 결과 중간정도 세기로 로스팅 한 커피가 가장 뛰어난 항산화 활성을 보여주었다는 결과와 중간단계의 로스팅 커피가 가장 뛰어난 항산화 활성을 보여 주었다는 연구결과와도 일치하는 경향을 보여주었음.

[Table 2-11] Antioxidative activity of mung bean according to roasting temperature

Temp (℃)	Time (min)	DPPH radical inhibition (%)	ABTS radical inhibition (%)	Xanthine oxidase inhibition (%)
0	0	6.21±0.10[1)a2)]	20.50±0.43[a]	23.47±5.83[a]
90	20	7.61±0.88[a]	21.95±2.27[a]	31.07±3.63[ab]
100	20	9.86±0.72[c]	24.47±1.35[b]	36.53±8.53[b]
110	20	10.81±1.95[bc]	34.18±0.77[c]	48.57±2.39[c]
120	20	6.62±1.94[ab]	25.94±0.64[b]	29.48±5.47[ab]

[1)]Mean±SD, n=3, [2)]Means with different letters in the same column are significantly different at $p<0.05$ by Duncan's multiple range test.

⑧ 로스팅 온도에 따른 녹두의 Nitrite scavenging activity

아질산염 소거활성은 로스팅 온도가 높아질수록 증가하고 pH가 높아질수록 활성이 감소되는 경향. (표 2-12) 식품의 가공, 저장 및 조리 중에 용이하게 생성되는 Maillard 반응 생성물의 아질산염 소거능은 비교적 우수한 것으로 알려져 있는데 본 결과에서도 생녹두에 비해 로스팅 처리한 군의 활성이 좋게 나온 결과와 일치함을 알 수 있었음.

[Table 2-12] Nitrite scavenging activity of mung bean according to roasting temperature

Temp (℃)	Time (min)	Nitrite scavenging activity (%)		
		pH 1.2	pH 4.0	pH 6.0
0	0	19.89±2.83[1)ab2)]	10.27±3.22[a]	6.06±1.49[ab]
90	20	32.67±6.17[a]	17.99±10.71[a]	14.28±2.30[a]
100	20	32.04±5.84[b]	15.22±1.63[a]	13.14±2.11[b]
110	20	32.16±2.16[ab]	26.14±8.69[a]	14.21±4.30[ab]
120	20	38.44±5.74[ab]	22.76±4.56[b]	14.31±1.19[ab]

[1)]Mean±SD, n=3, [2)]Means with different letters in the same column are significantly different at p<0.05 by Duncan's multiple range test.

⑨ 로스팅 온도에 따른 녹두의 pH와 환원당 변화

로스팅 녹두의 pH를 측정한 결과 30분간 로스팅한 녹두의 pH가 6.1로 가장 낮은 값을 나타냈고 나머지 군은 6.2로 동일한 값을 나타냈으나 유의적인 차이는 없었음. (표 2-13)

[Table 2-13] The pH and Reducing sugar contents of mung bean according to roasting time

Temp (℃)	Time (min)	pH	Reducing sugar contents (mg/mL)
110	0	6.2±0.1[1)a2)]	3.14±0.12[a]
	10	6.2±0.1[a]	1.03±0.21[b]
	20	6.2±0.1[a]	0.63±0.04[c]
	30	6.1±0.2[a]	0.53±0.06[c]

[1)]Mean±SD, n=3, [2)]Means with different letters in the same column are significantly different at p<0.05 by Duncan's multiple range test.

⑩ 로스팅 시간에 따른 녹두의 일반성분

로스팅 온도가 증가할수록 수분함량이 감소함. 30분간 로스팅한 녹두에서 8.39%로 가장 낮은 값을 보였고 생녹두에서 10.08%로 가장 높은 값을 보였음. (표 2-14)

[Table 2-14] General compositions of mung bean according to roasting time

Temp (℃)	Time (min)	Moisture (%)	Crude ash(%)	Crude protein(%)	Crude fat(%)	Carbohydrate (%)
110℃	0	10.08±0.23[1)a2)]	5.02±0.01[a]	17.31±0.23[a]	0.49±0.02[a]	67.10±0.15[a]
	10	8.54±0.17[b]	5.48±0.07[b]	17.29±0.05[a]	0.54±0.02[b]	68.15±0.05[b]
	20	8.45±0.20[b]	5.54±0.05[b]	17.30±0.16[a]	0.55±0.02[b]	68.16±0.05[b]
	30	8.39±0.60[b]	5.55±0.04[b]	17.32±0.56[a]	0.56±0.02[b]	68.18±0.24[b]

[1)]Mean±SD, n=3, [2)]Means with different letters in the same column are significantly different at p<0.05 by Duncan's multiple range test, [NS)]Not significant.

⑪ 로스팅 시간에 따른 녹두의 항산화 성분(총 페놀, 총 플라보노이드) 변화

로스팅 조건별 녹두의 항산화 성분 변화를 알아보고자 총 페놀, 총 플라보노이드 함량을 측정한 결과는 로스팅 녹두의 총 페놀함량은 로스팅 시간이 증가할수록 증가하여 30분 로스팅한 군에서 383 mg/g으로 가장 높으며 생 녹두에서 275 mg/g으로 가장 낮음. 로스팅 녹두의 총 플라보노이드 함량은 로스팅 시간에 따른 유의적인 차이가 없음.

[Table 2-15]. Total phenol & flavonoid contents of mungbean according to roasting time

Temp (℃)	Time (min)	Total phenol contents (mg/g)	Total flavonoid contents (mg/g)
110℃	0	275.63±9.87[1)a2)]	32.96±4.59[a]
	10	343.00±15.99[b]	34.44±0.01[a]
	20	359.43±13.99[c]	29.04±13.10[a]
	30	383.99±10.14[d]	37.57±0.00[a]

[1)]Mean±SD, n=3, [2)]Means with different letters in the same column are significantly different at $p<0.05$ by Duncan's multiple range test.

⑫ 로스팅 시간에 따른 녹두의 항산화활성 변화

로스팅 조건이 강할수록 DPPH radical 소거활성 및 ABTS radical 소거활성이 유의적으로 증가함. (표 2-16) 30분 처리군이 47.64%로 가장 우수한 활성을 보였고 생녹두는 20.5%로 가장 낮은 활성을 나타내었음. 로스팅 녹두의 xanthine oxidase 저해활성 역시 로스팅 조건이 강할수록 활성이 유의적으로 증가함. 30분 처리군이 5.129%로 가장 우수한 활성을 보였고 생녹두는 23.47%로 가장 낮은 활성을 나타내었음. 이들 항산화 활성은 앞의 총 페놀 함량의 변화와 유사한 결과를 보여주었음. 이러한 결과는 Maillard 반응에 의해 생성되는 갈색 반응생성물인 melanoidin의 항산화 효과에 의한 것으로 판단됨.

[Table 2-16]. Antioxidative activity of mung bean according to roasting time

Temp (℃)	Time (min)	DPPH radical inhibition (%)	ABTS radical inhibition (%)	Xanthine oxidase inhibition (%)
110℃	0	6.21±0.10[1)a2)]	20.50±0.43[a]	23.47±5.83[a]
	10	6.49±1.68[b]	30.91±2.82[b]	30.03±5.28[a]
	20	10.81±1.95[c]	34.18±0.77[b]	48.57±2.39[b]
	30	13.46±0.68[d]	47.64±2.58[c]	51.29±9.38[b]

[1)]Mean±SD, n=3, [2)]Means with different letters in the same column are significantly different at $p<0.05$ by Duncan's multiple range test.

⑬ 로스팅 시간에 따른 녹두의 아질산염 소거능 변화

로스팅한 녹두의 아질산염 소거활성을 pH별로 측정한 결과는 표 2-17과 같음. 대체적으로 로스팅 시간이 길어질수록 활성이 증가되는 경향을 보여주었고 pH가 높아질수록 활성이 감소되는 경향을 보여주었음.

[Table 2-17]. Nitrite scavenging activity of mung bean according to roasting time

Temp (℃)	Time (min)	Nitrite scavenging activity (%)		
		pH 1.2	pH 4.0	pH 6.0
110℃	0	19.89±2.83[1)a2)]	10.27±3.22[a]	6.06±1.49[a]
	10	27.5±4.91[b]	17.01±4.17[ab]	12.32±4.00[b]
	20	32.16±2.16[b]	26.14±8.69[b]	14.21±4.30[b]
	30	47.60±2.23[c]	36.46±8.67[c]	17.27±0.83[b]

[1)]Mean±SD, n=3, [2)]Means with different letters in the same column are significantly different at $p<0.05$ by Duncan's multiple range test.

(3) 산업화 기반구축을 위한 사전시험 [경기대/서진바이오텍]

① 로스팅 녹두 티백차 및 로스팅 녹두 과립차 제조 [경기대 보충]

○ **로스팅 녹두 티백차 제조공정**: 녹두 300g을 1분간 washing하고 물기를 제거함. 온도 90, 100, 110, 120℃에서 10, 20 and 30 분간 roasting한 다음 분쇄함.

[Fig 2-18] 녹두 티백차 시제품

[Table 2-18] 녹두티벡차의 영양성분

	1회 분량	1회 분량 당 함량					
		열량	탄수화물	단백질	지방	콜레스테롤	나트륨
녹두 티백차	13 g	45 Kcal	8.2g	2.4g	0.3g (포화, 트랜스지방 0)	0 mg	50 mg

○ **원가계산 : 원료에 대한 계산이므로 대량생산 시 변화될 수 있음.**

	수량	kg->g	원가(won)	1g당	Tea 1개 당 들어가는양(g)	단가(won)
녹두	20Kg	20,000	148,000	7.4	10	74
계피	300g	300	3,000	10	0.06	0.6
현미	10kg	10,000	23,000	2.3	2	4.6
티백	100EA	100	6,000	60	1	60
					총 단가(12g)	₩ 139.2

② 녹두 과립차 제조공정

A: 무수결정 포도당(CJ) 500 g에 녹두추출물 97.5 g(19.5%)을 넣고 혼합한 후 30분 동안 안정화시킨 다음 지름 1 mm인 타공망을 전착한 과립제조기(5HP)를 사용하여 과립을 제조한 후 40℃로 열풍건조하여 과립차 형태로 제조하였음.	
B: A형태의 맛의 개선을 위해 무수결정 포도당(CJ) 500 g에 녹두추출물 97.5 g(19.5%)에 **비타민 c 15 g, 구연산 0.5 g**을 첨가하여 넣고 혼합한 후 30분 동안 안정화시킨 다음 지름 1 mm인 타공망을 전착한 과립제조기(5HP)를 사용하여 과립을 제조한 후 40℃로 열풍건조하여 과립차 형태로 제조하였음.	

③ 로스팅 녹두 티백차 품질평가 및 간이임상시험

○ **시험디자인**: 로스팅한 녹두를 12g씩 넣은 후 70℃ 끓는 물 100 mL에 10분간 침출하여 관능평가를 실시하였음. 참가자는 서울시에 거주하며 질병치료 및 약물복용을 하지 않는 평균 연령 52.80± 5.73세, BMI>25 과체중 중년여성으로 실험참가에 동의한 20명을 대상으로 대조군(10명)과 비교군으로 로스팅 녹두 티백차 섭취실험군(10명)으로 실시하였음. 실험군은 1일 3회 녹두 티백차(약 12 g)를 4주 동안 식사 후 음용하게 하였으며 별도로 식사제한은 하지 않았음. 단, 대조군에게는 비교군과 동일한 조건의 물을 마시도록 하였음. (그림 2-19)

[Fig 2-19] Experimental design.

Variables		after 2 weeks (14 days)									after 2 weeks (14 days)								after 4 weeks (28 days)
Anthropometric measurements	0									0									0
Blood sampling	0									0									0
Control group		water consumption																	
RMT[1)] consumption group		RMT consumption																	

[1)] Roasted mung bean (at 110℃ for 30 min) tea bag.

○ **로스팅 온도에 따른 녹두 티백차의 관능평가 결과**: 관능적 요소는 가장 먼저 평가되는 품질 기준으로써 제품의 품질가치평가에 있어 관능적 특성은 매우 중요한 요인임. 로스팅 온도별 4 종류의 로스팅 녹두의 관능평가 결과, 로스팅 녹두의 고유특성을 살리면서 녹두의 기능성을 나타낼 수 있는 것은 110℃ 30분간 로스팅한 녹두(RM1 10-30)가 종합적으로 가장 좋은 평가가 나옴. 항비만 효과가 있는 커피대용음료로써 가장 부합할 것이라 생각됨. (표 2-19)

[Table 2-19]. Sensory evaluation of mung bean according to roasting temp.

Groups	Color	Odor	Sweet taste	Acidic taste	Astringent taste	Bitter taste	Total favorite value
RMT 90-30[1)]	2.80 ±1.62[5)b6)]	2.00±1.15[c]	2.70±1.64[b]	1.70±0.82[NS6)7)]	2.80 ±1.62[NS]	2.50 ±1.51[NS]	2.80±1.55[c]
RMT 100-30[2)]	3.20 ±1.48[b]	3.90±1.29[b]	2.80±1.55[b]	2.50±1.18	2.80±1.40	2.80±1.62	3.10±1.10[bc]
RMT 110-30[3)]	4.80 ±1.79[a]	5.00±1.89[ab]	4.90±1.78[ab]	2.70±1.57	2.80±1.87	2.50±1.35	4.90±1.78[a]
RMT 120-30[4)]	5.05 ±1.65[a]	5.40±1.35[a]	5.10±1.52[a]	2.10±1.45	2.30±1.57	1.50±0.71	5.10±1.70[a]

④ 로스팅 녹두 티백 차 섭취가 중년여성의 비만개선효과 (Acute 임상시험)

○ **체성분에 미친 영향**: 대조군과 실험군의 실험 전/후의 체성분의 변화는 없음. 체지방량과 WHR의 경우 녹두 티백차 4주 섭취 후 감소하는 경향이 있으나 유의성이 없음. 4주 임상시험의 결과로 실험기간의 연장으로 녹두종피에 함유된 생리활성물질인 vitexin과 isovitexin의 비만 개선 효과가 있을 것으로 기대.

[Table 2-10]. Ameliorating effect of RMT consumption on the body compositions in overweight middle-aged women

Variables	Pre-treatment			After 2 weeks			After 4 weeks		
	Control	Case	Significance	Control	Case	Significance	Control	Case	Significance
Weight (kg)	67.40 ±7.06[3)]	68.57 ±16.89	NS	66.99 ±6.66	67.23 ±15.90	NS	67.48 ±6.44	66.56 ±15.86	NS
Body fat mass(kg)	21.33 ±3.33	20.65 ±6.43	NS	20.99 ±4.41	20.38 ±6.54	NS	21.65 ±2.22	19.55 ±6.55	NS
BMI (kg/m^2)[1)]	25.51 ±6.56	24.58 ±4.56	NS	24.99 ±1.15	24.15 ±4.28	NS	24.55 ±5.57	23.88 ±4.25	NS
WHR[2)]	0.89 ±0.11	0.88 ±0.07	NS	0.90 ±0.09	0.87 ±0.06	NS	0.89 ±0.07	0.85 ±0.04	NS

1) BMI: body mass index 2) WHR: Waist-hip ratio 3) Mean±SD [NS]: not significant.

○ **혈중 지질개선**: **녹**두 티백차를 2주, 4주 섭취 모두 대조군과 비교하여 혈중 TC가 유의적으로 감소함. 혈중 TG는 녹두 티백차 4주섭취 후에야 대조군과 유의적인 차이를 보임. LDLc과 HDLc는 군간 차이가 없음. (표 2-21). 즉, 녹두종피에는 vitexin과 isovitexin 뿐만 아니라, 지방산과 복합다당류의 복합체가 존재하므로 혈중 TC 감소효과가 나타난 것으로 보임.

[Table 2-21] Ameliorating effect of RMT consumption on the blood lipid levels in overweight middle-age women

Variables	Pre-treatment			After 2 weeks			After 4 weeks		
	Control	Case	p-value	Control	Case	p-value	Control	Case	p-value
TC (mg/dl)	190.22 ±10.99[1)]	190.66 ±14.81	NS	190.44 ±12.88	184.83 ±11.33	*	190.77 ±10.66	181.50 ±7.55	*
TG (mg/dl)	165.33 ±2055	168.92 ±26.92	NS	168.22 ±16.93	154.08 ±25.94	NS	170.21 ±14.23	140.25 ±24.05	*
LDL-c (mg/dl)	133.55 ±11.22	137.34 ±14.64	NS	134.77 ±11.64	122.92 ±17.70	NS	136.31 ±16.24	120.25 ±16.78	NS
HDL-c (mg/dl)	53.11 ±3.45	51.50 ±7.87	NS	53.50 ±6.22	50.17 ±3.46	NS	50.00 ±1.86	50.25 ±5.59	NS

다. 1핵심 3세부:

녹두 표지물질인 vitexin의 항비만 효과 재검증-줄기세포이용 [성신여대 전용필]
⊙ **결론** • 지방줄기세포의 확보 전략에 대한 기본 지식을 구축함 (1차년도에 이어 2차년도에 지속적으로 진행됨) • 분화 시간을 최초 21일에서 14일로 단축하여 분석할 수 있도록 방법 개발 • 유효성분인 vitexin과 isovitexin, 그리고 녹두추출물이 이 지방줄기세포의 활성에 있어서의 영향이 종간에 서로 다름을 밝힘. 예)사람의 지방줄기세포의 활성을 억제하는 효과가 크나 생쥐의 것에는 미미함. • C3G와 D3G, 그리고 검정콩 추출과 녹두추출물이 보이는 지방줄기세포의 활성과 분화에 미치는 영향이 vitexin처럼 종에 따른 차이를 보임을 증거함 • 유효 성분에 따라 종간 유사하거나 차이가 있음을 밝힘 • 물질에 따라 생쥐 유래 지방줄기세포를 사용해도 무방하나, 사람 유래 지방줄기세포를 이용하는 것이 보다 유효한 결과를 가져올 것으로 판단됨. • 임상실험과의 비교를 통하여 그 유효성을 확인 할 필요가 있음.

(1) 지방줄기세포의 확보

- 해부학적으로 동일한 위치에서 분리된 생쥐의 지방줄기세포와 사람의 지방줄기세의 특성이 종 특이성 때문에 다를 수 있다.
- 그러나 지방줄기세포의 획득과 이용에 있어서 지방줄기세포를 생쥐에서 얻는 것이 경제성이나 윤리성 등의 여러 측면에서 좋다.
- 사람의 지방조직에서 유래한 줄기세포와 생쥐의 지방조직에서 유래한 줄기세포가 지방으로의 분화 유도반응에 대한 차이 여부를 실험적으로 알아보았다.
- 2차년도 실험에서는 지방세포의 전구세포인 3T3-L1과 생쥐와 사람 유래 지방줄기세포가 지방세포로의 분화 유도에 대한 방응성이나 농산물소재의 유효성분과 추출물에 대한 세포학적 반응차이를 알아봄.

○ 1차년도 대비 생주 지방줄기세포 확보

- 피하지방 유래 줄기세포 : 60계대까지 배양 (3배 증가)
- 내장지방 유래 줄기세포 : 60계대까지 배양 (3배 증가)
- 생식소지방 유래 줄기세포 : 60계대까지 배양 (3배 증가)

○ 1차년도 대비 사람 지방줄기세포 확보

- 피하지방 유래 줄기세포 : 13 vial 증가 (계대 배양 결과)
- 내장지방 유래 줄기세포 : 증가 없음

(2) 특정물질의 지방줄기세포의 분화유도방법에서의 효율성 및 screening system

- 3T3-L1 지방전구세포와 지방조직 유래 줄기세포가 지방세포로 분화 유도되는 데 있어 현상적 차이는 관찰되지 않았다.
- 그러나 유효 성분과 해당 식재료 추출물에 대한 반응은 서로 달랐다.
- 이 과제는 지방전구세포와 줄기세포에 대한 반응 정도를 비교 분석하고 이를 바탕으로 줄기세포의 증

식과 분화에 대한 영향을 알아보는 것을 주된 목적으로 하고 있다.

- 따라서 지방조직에서 유래한 지방줄기세포를 중심으로 결과를 도출하였다.

① 지방줄기세포의 지방세포로의 분화 유도기간 단축 (21일 →14일)

- 1차 년도에 지방줄기세포를 지방세포로 분화 유도하는데 21일을 사용하였으며 이 산물을 기준으로 분화에 미치는 영향 정도를 예측하였다.
- 2차 년도에는 지방줄기세포를 지방세포로 분화 유도하는데 14일을 사용하였으며, 이 산물을 기준으로 분화에 미치는 영향 정도를 예측할 수 있었다.

② screening system

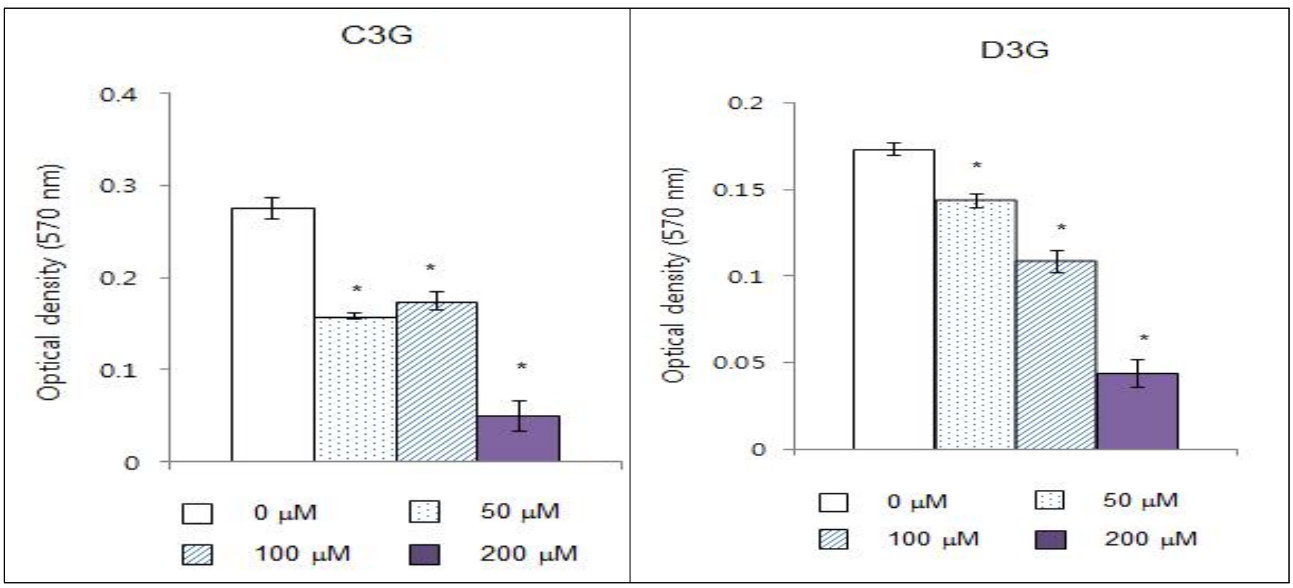
- 96-well plate를 이용하여 Oil Red-O staining 후 그 정량값을 이용하여 분화 정도를 측정하였다.
  - 일정수의 지방줄기세포를 96-well에서 배양, 분화 유도, Oil Red-O염색
  - 흡광도 측정 및 그래프 작성

(3) 생쥐의 지방줄기세포를 이용하여 표지물질들이 지방분화에 미치는 영향

① 생쥐 지방줄기세포의 활성과 증식에 미치는 C3G, D3G, Vitexin, Isovitexin의 영향

○ MTT assay 방법을 통하여 생쥐 지방줄기세포 활성에 미치는 영향.

- 96 well plate에 일정 수의 생쥐 지방줄기세포를 seeding후 MTT assay protocol에 따라 수행함. Seeding후 24시간에 C3G, D3G, Vitexin, Isovitexin 처리, 44시간 후에 MTT 분석용 시약을 넣어 반응유도, 2시간 후 OD 570nm 측정함.
- C3G와 D3G 모두 농도 의존적으로 지방줄기세포의 세포활성을 억제. 처리 농도군 모두 유의하게 활성이 억제. C3G가 D3G에 비하여 저농도에서 지방줄기세포 활성을 억제하는 능력.
- 결론: C3G와 D3G 모두는 지방줄기세포의 세포 활성을 억제하는 효과가 있음.

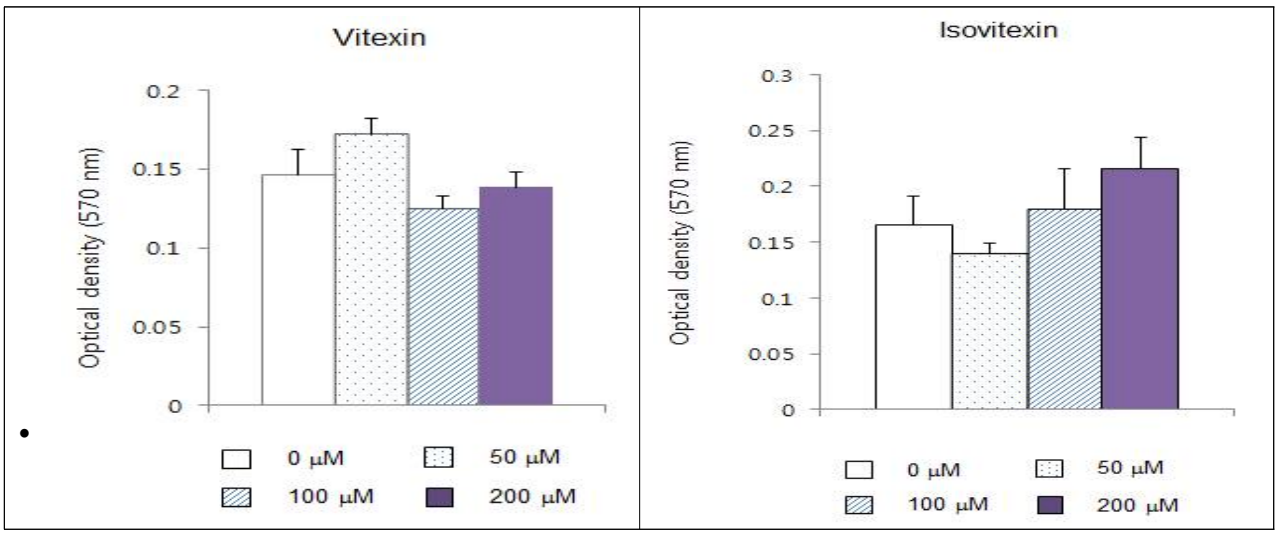


[Fig 2-19] C3G & D3G의 생쥐 지방줄기세포 활성에 미치는 영향

② 생쥐 지방줄기세포의 활성과 증식에 미치는 Vitexin과 Isovitexin의 영향

○ MTT assay 방법을 통하여 생쥐 지방줄기세포 활성에 미치는 영향.

- 96 well plate에 일정 수의 생쥐 지방줄기세포를 seeding후 MTT assay protocol에 따라 수행함. Seeding후 24시간에 Vitexin, Isovitexin 처리, 44시간 후에 MTT 분석용 시약을 넣어 반응 유도, 2시간 후 OD 570nm 측정.
- Vitexin은 50 μM 농도에서는 지방 줄기세포의 활성을 촉진, 100 μM, 200 μM 농도에서는 세포 활성억제 경향. 유의적이지는 않음. isovitexin은 50 μM 농도에서 지방 줄기세포 활성억제, 100 μM, 200 μM 농도에서는 세포활성을 촉진시키는 경향. 유의적이지는 않음.
- **결론**: Vitexin은 100 μM, 200 μM 농도에서, Isovitexin은 50 μM 농도에서 생쥐의 지방줄기세포의 활성을 억제하는 효과.

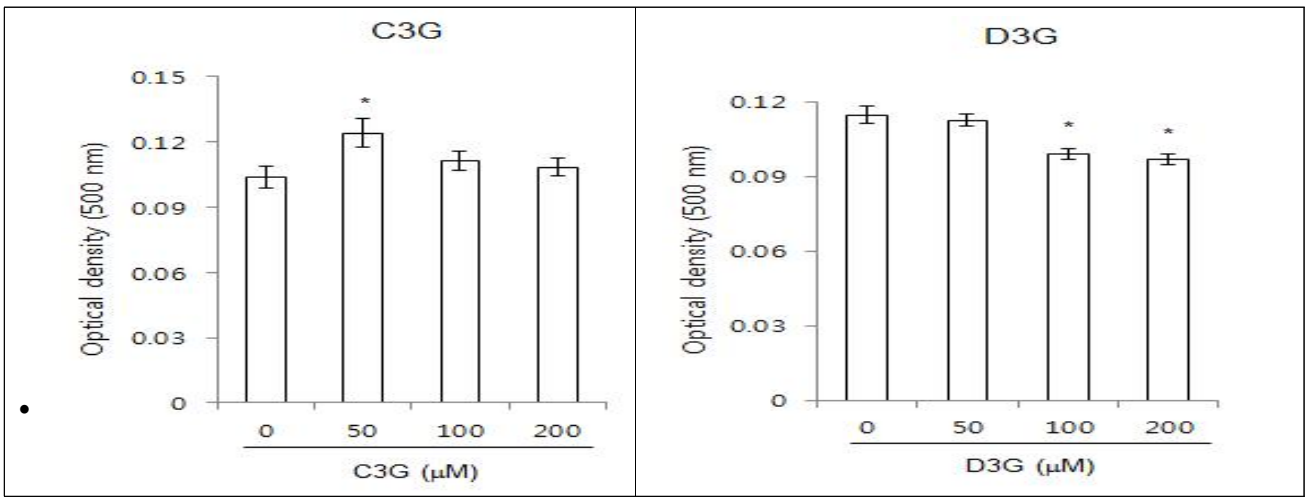


[Fig 2-20] Vitexin과 Isovitexin의 생쥐 지방줄기세포 활성에 미치는 영향

③ 생쥐 지방줄기세포의 분화에 미치는 C3G와 D3G의 영향

○ Oil Red-O assay 방법을 이용하여 유효물질이 생쥐 지방조직 유래 지방줄기세포의 분화 촉진 또는 억제에 대한 효과를 확인함. 96 well plate에 일정 수의 생쥐 지방줄기세포를 seeding후 지방세포로의 분화 유도 방법에 따라 수행하. 분화 유도하면서 C3G, D3G 처리, 이틀 간격으로 세포의 형태적 분석, 14일 후 Oil Red-O 염색방법에 따라 염색, OD 500nm 측정 및 분석

- C3G는 지방줄기세포의 지방세포로 분화를 억제하지 못함. D3G는 100 μM 농도 이상에서 지방 줄기세포가 지방세포로 분화하는 것을 유의적으로 억제
- 결론: C3G는 지방줄기세포가 지방세포로 분화되는 것을 억제 하지 못함. D3G는 100 μM 이상의 농도에서 지방세포 분화억제함. D3G는 지방줄기세포의 물질대사 정도를 억제하고 지방으로의 분화를 억제하는 효과를 가짐.



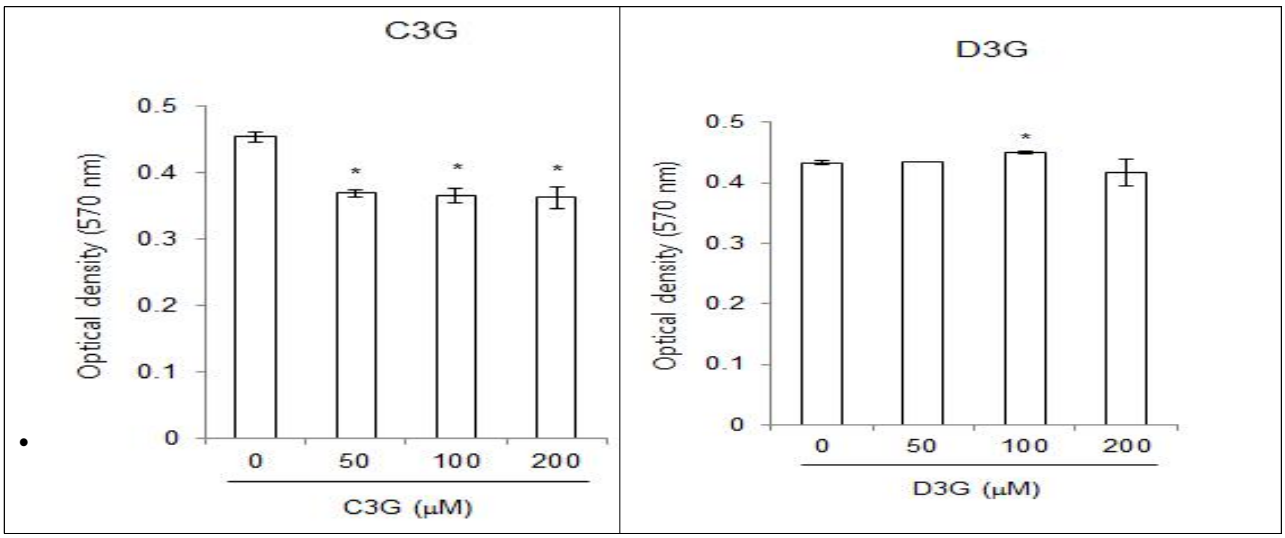
[Fig 2-21] C3G & D3G의 생쥐 지방줄기세포 분화에 미치는 영향

(4) 사람의 지방줄기 세포를 이용하여 표지물질들이 지방분화에 미치는 영향

① 사람 지방줄기세포의 활성과 증식에 미치는 C3G, D3G, Vitexin, Isovitexin의 영향

○ MTT assay 방법을 통하여 사람의 지방줄기세포 활성에 미치는 영향을 확인함. 96 well plate에 일정 수의 사람 지방줄기세포를 seeding후 MTT assay protocol에 따라 수행함. Seeding후 24시간에 C3G, D3G, Vitexin, Isovitexin 처리, 44시간 후에 MTT 분석용 시약을 넣어 반응유도, 2시간 후 OD 570nm 측정함.

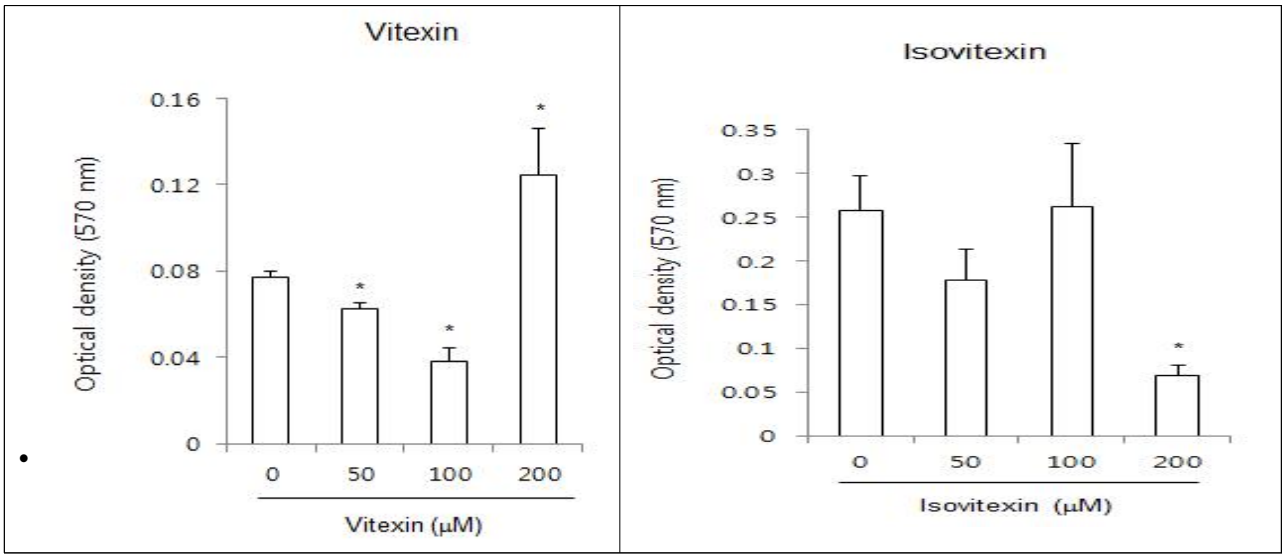
- C3G의 모든 처리농도에서는 농도 비의존적으로 지방줄기 세포의 세포활성 억제. D3G는 100 μM 농도의 경우 세포활성을 유발.
- **결론**: C3G만 사람의 지방줄기 세포의 세포 활성을 억제하는 효과가 있음. D3G는 세포활성을 억제하는 효과는 없었으며, 100 μM 농도에서 사람 지방 줄기세포의 세포 활성을 촉진.



[Fig 2-22] C3G & D3G의 사람 지방줄기세포 분화에 미치는 영향

② 사람 지방줄기세포의 활성과 증식에 미치는 Vitexin과 Isovitexin 영향 (MTT assay)

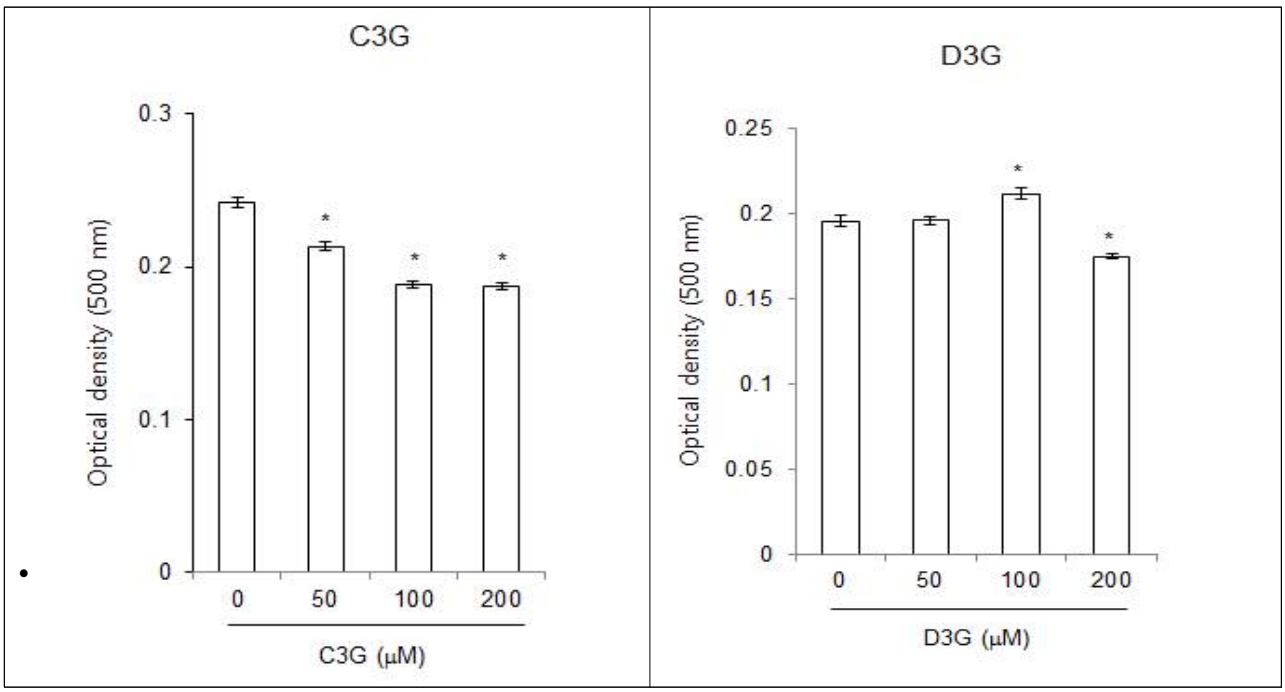
- vitexin은 50 μM,100 μM 농도에서는 지방줄기세포의 세포 활성 억제, 200 μM 농도에서는 세포의 활성을 촉진. isovitexin은 200 μM농도에서만 지방줄기세포의 세포활성을 억제함.
- vitexin과 isovitexin은 서로 상반된 경향.



[Fig 2-23] Vitexin과 Isovitexin의 사람 지방줄기세포 활성에 미치는 영향

③ 사람 지방줄기세포의 분화에 미치는 C3G, D3G 영향 (Oil Red-O assay)

- C3G는 처리한 모든 농도에서 지방줄기세포가 지방세포로 분화하는 것을 억제. D3G 100 μM 농도에서 지방줄기세포의 지방세포 분화를 유의적으로 촉진. 200 μM 농도에서는 억제.
- 결론: C3G는 지방줄기세포가 지방세포로 분화되는 것을 유의하게 억제하고 D3G는 200 μM 이상의 농도에서 지방세포로 분화하는 것을 억제.

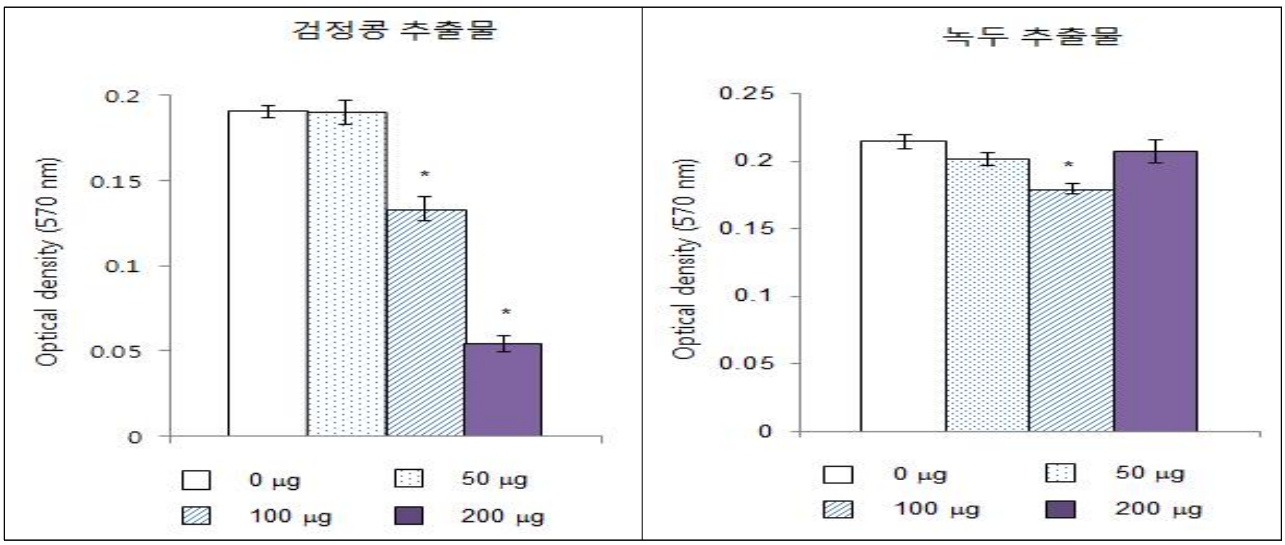


[Fig 2-24] C3G & D3G의 사람 지방줄기세포의 분화에 미치는 영향

(5) 원재료물질을 이용한 추출 가장 중요한 공정 단계인 마지막 단계 산물이 생쥐 지방줄기세포의 지방세포로의 분화에 미치는 영향 분석

① 생쥐 지방줄기세포의 활성과 증식에 미치는 영향 (MTT assay 방법)

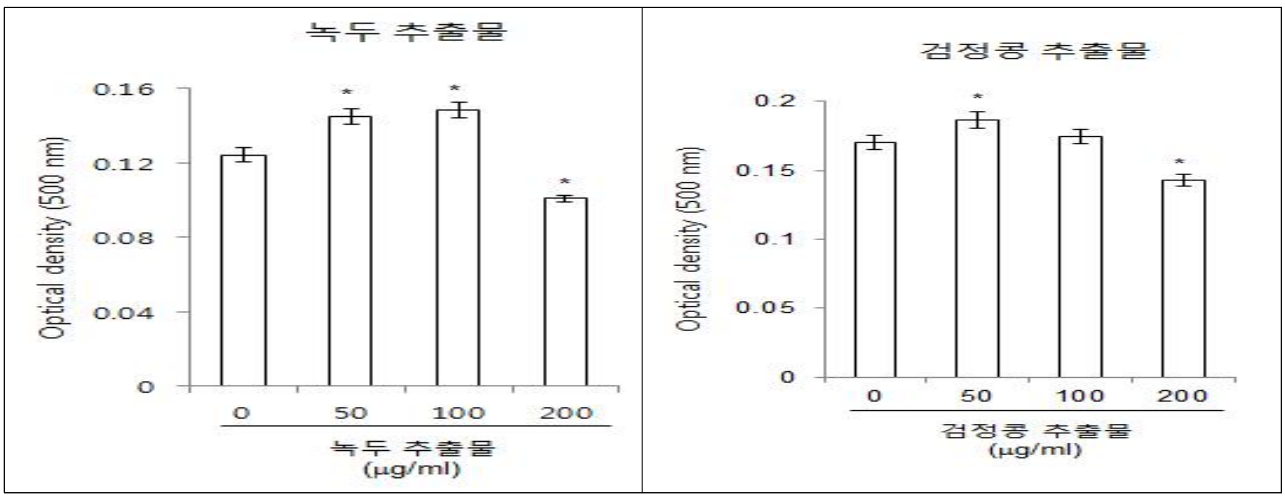
- 검정콩 추출물은 100㎍/ml 농도 이상에서 지방줄기세포 활성을 유의하게 억제.
- 녹두 추출물의 지방줄기세포 활성억제효과는 종 모양을 보여 100㎍/ml 농도에서만 유의하게 지방줄기세포 활성이 억제.
- 결론: 검정콩의 유효성분이 단독으로 처리된 것과 일부 상이한 측면이 있는 것을 의미. 비만 억제를 통한 관련 질환 예방과 치료를 위해서는 적절한 접근법의 개발이 필요함.



[Fig 2-25] 검정콩 및 녹두 추출물의 생쥐 지방줄기세포 분화에 미치는 영향

② 생쥐 지방줄기세포의 분화에 미치는 영향 (Oil Red-O assay)

- 검정콩 및 녹두 추출물은 200㎍/ml 농도에서는 유효물질이 생쥐의 지방줄기 세포가 지방세포 로 분화하는 것을 억제.
- 지방줄기세포가 지방세포로 분화하는 것을 검정콩 추출물과 녹두 추출물을 이용하여 억제 가능성을 확인.

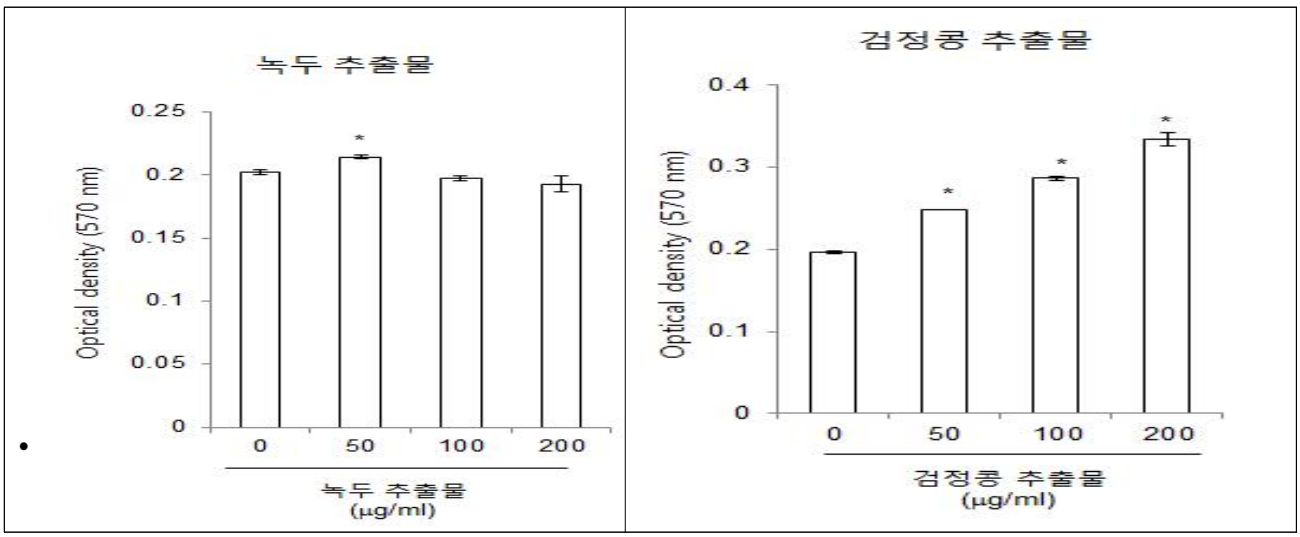


[Fig 2-26] 검정콩 및 녹두 추출물의 생쥐 지방줄기세포 분화에 미치는 영향

(6) 원재료물질을 이용한 추출 가장 중요한 공정 단계인 마지막 단계 산물이 사람 지방줄기세포의 지방세포로의 분화에 미치는 영향 분석

① 사람 지방줄기세포의 활성과 증식에 미치는 영향 (MTT assay)

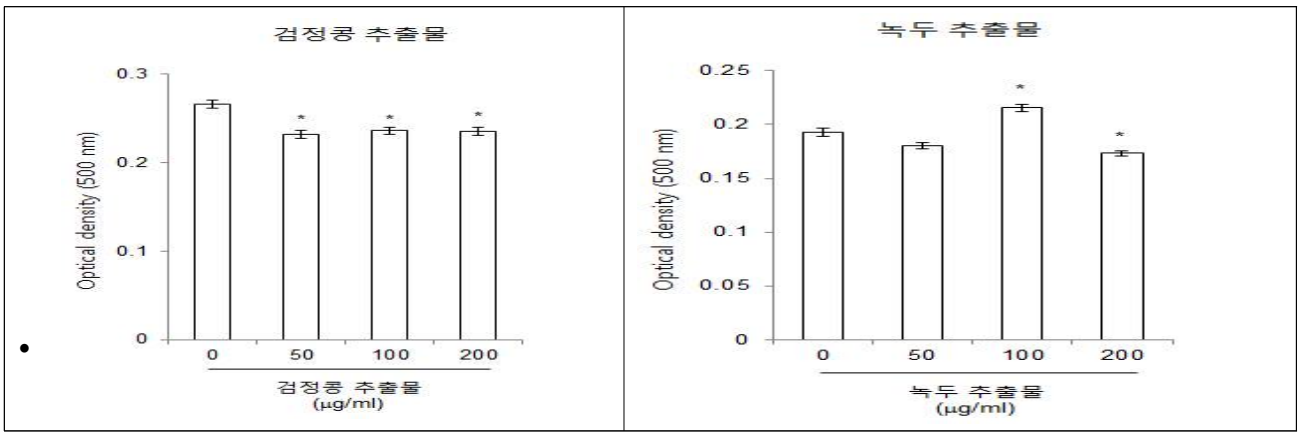
- 검정콩 추출물은 농도 의존적 으로 사람지방줄기세포 활성을 촉진.
- 녹두 추출물은 사람 지방줄기 세포의 활성을 50㎍/ml의 낮은 농도에서는 촉진하였으나 이보다 높은 농도에서는 영향이 없음.
- 결론: 검정콩 추출물은 지방줄기 세포의 활성을 촉진함. 이는 검정콩의 유효성분의 결과와 대조적임. 검정콩의 유효성분이 단독으로 처리된 것과 일부 상이한 측면이 있음.



[Fig 2-27] 검정콩 및 녹두 추출물의 사람 지방줄기세포 분화에 미치는 영향

② 사람 지방줄기세포의 분화에 미치는 영향 (Oil-red O method)

- 검정콩 추출물은 처리한 모든 농도에서 지방줄기 세포가 지방세포로 분화 하는 것을 억제.
- 녹두 추출물은 100㎍/ml 농도에서는 지방세포로 분화하는 것을 촉진. 200 ㎍/ml 농도에서는 억제.
- 검정콩 추출물은 50㎍/ml 농도 이상에서 녹두 추출 물은 200㎍/ml 농도에서 유효물질이 사람의 지방 줄기세포가 지방세포로 분화 억제.
- 사람 지방줄기세포의 활성과 분화는 검정콩 추출물에 의해 서로 다르게 조절될 가능성을 제시. 반면 녹두의 경우는 활성변화없이 지방으로의 분화를 억제할 수 있는 가능성.



[Fig 2-28] 검정콩 및 녹두 추출물의 사람 지방줄기세포 분화에 미치는 영향

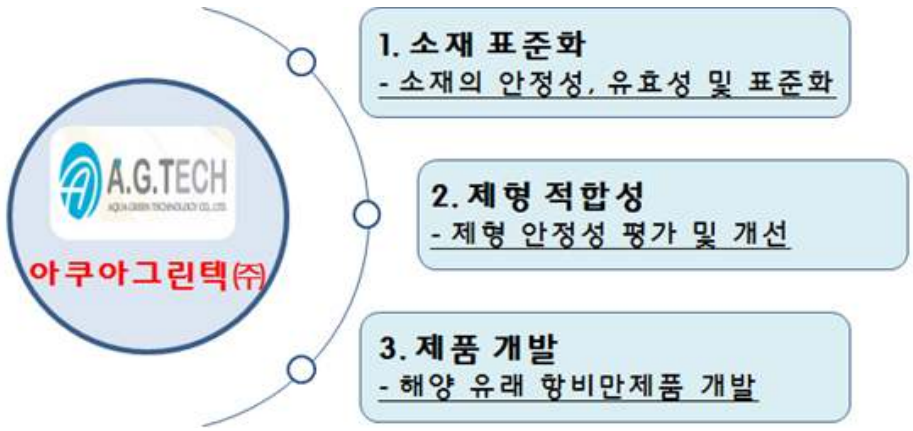
(7) 본 연구의 제안점

- 생쥐와 사람의 지방줄기세포는 단일 chemical에 따라 세포활성억제 특이성이 다름. 개**발한 screening system을 이용하여 생쥐의 지방줄기세포를 가지고 사람의 지방줄기세포 활성에 미치는 영향을 알아보기 위해서는 화학물질별 특이성을 고려해야 함**.
- 추출물일 경우에는 지방줄기세포의 활성에 대한 평가에서는 사람의 지방조직에서 유래한 지방줄기세포를 이용하여 분석하는 것이 사람에게 적용할 대상일 경우 정확한 예측을 하는 방향임.
- 생쥐 지방줄기세포와 사람 지방세포는 단일 chemical에 따라 지방줄기세포가 지방세포로 분화하는 것을 억제하거나 촉진하는 것에 있어서 일정한 경향성이 없음. **개발한 screening system을 이용하여 생쥐의 지방줄기세포를 가지고 사람의 지방줄기세포가 지방줄기세포로 분화하는 것에 미치는 영향을 알아보기 위해서는 종 특이적인 지방줄기세포의 특이성을 고려해야 할 것**으로 고려.
- 추출물일 경우에는 지방줄기세포가 지방세포로 분화하는 것을 억제 또는 활성 유도에 대한 평가는 고농도에서 줄기세포의 종에 따른 유래와 관련 없이 모두 동일한 경향. 식품 추출물이 지방줄기세포가 지방으로 분화하는데 미치는 영향을 개발한 screening system을 이용할 경우 생쥐의 줄기세포를 사용하여도 유의한 결과를 얻을 수 있을 것으로 사료된다.
- **생쥐의 줄기세포를 이용한 screening system은 천연물 추출물이 지방줄기세포가 지방세포로 분화하는데 미치는 영향을 분석하는데 사용될 수 있음**. 따라서 차기년도에는 종에 따른 이러한 **생물학적 차이 원인을 규명**하여 다양한 분석이 가능하게 한다면 그리고 **생쥐와 사람의 지방줄기세포를 동일하게 만드는 생물학적 일은 산업과 경제 발전에 크게 기여예상.**

라. 2핵심 1세부

감태소재의 표준화 [아쿠아그린텍 장지태]
⊙ **결론** • 제주산 해조류인 감태에서 우수한 항비만 효과를 갖는 Target compound 인 AG-Dieckol 를 밝혀냄. • AG-Dieckol의 성분분석 및 다양한 시험법 검증을 통해 감태 유래 AG-Dieckol이 항비만 소재로서 안정성을 평가한 결과, 표준물질인 AG-Dieckol의 안정성을 갖는 소재로 증명함. • AG-Dieckol의 독성/안전성 검사에서도 기능성 소재로서의 AG-Dieckol의 독성 및 안전성에서 문제가 발견되지 않음. • 따라서, 제주산 감태 유래 AG-Dieckol은 우수한 항비만 소재로서 사용될 수 있을 것으로 판단되어, 산업적인 적용을 위해 다양한 제형의 시제품을 개발함.

(1) 항비만 효과가 있는 Target compound (AG-Dieckol)의 소재, 원료, 공정과정의 표준화.



① 제주산 감태 유래의 AG-Dieckol의 소재화를 위한 공정순서.

- 먼저 원료 확보를 위해 식품규격에 적합한 감태를 국내에서 채집 및 구매하고, AG-Dieckol의 효과적인 대량 추출을 위해 1차적으로 당분해효소를 투입 후 24시간동안 추출하여 다당류를 추출/확보함.
- 확보된 1차 공정 후 남은 감태의 10배량의 주정을 가하여 상온에서 24시간 추출하고, 추출 후 데칸터 및 필터 프레스로 여과함.
- 여과된 제주산 감태 유래의 AG-Dieckol을 농축 후 동결건조 및 포장단위에 따라 포장하여 사용.
- 건강기능성식품 원료제조 및 신청자격은 GMP시설을 갖춘 기능성 식품제조 회사에서 인가를 받아야 함으로 제주 테크노파크에 구축된 GMP생산시설을 통해 대량 생산 공정을 수행하였음.

[Fig 2-29] AG-Dieckol)의 소재, 원료, 공정과정의 표준화.

② 제주산 감태 유래 AG-Dieckol의 성분 분석

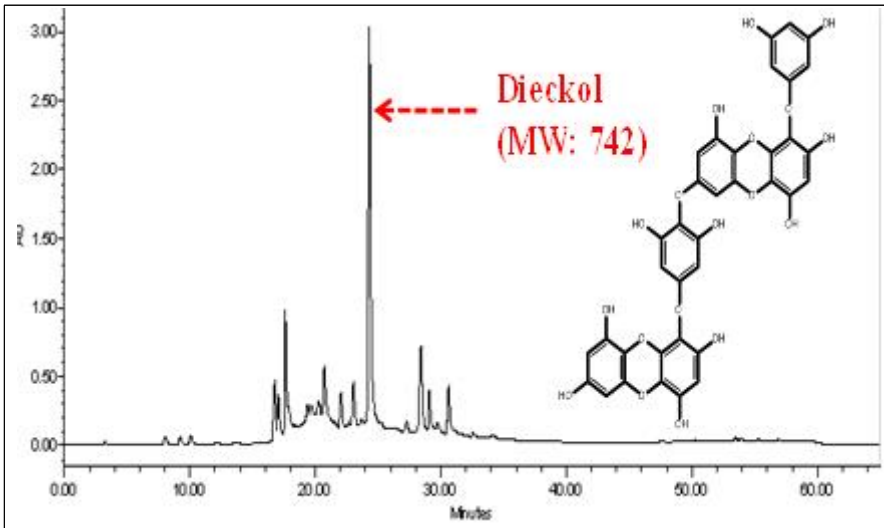
- 암갈색의 분말로 고유의 향미를 가지는 성상을 보이며, Folin-ciocalteau 방법을 이용하여 성분을 분석한 결과, **폴리페놀의 함량이 약 45% 이상**으로 높은 폴리페놀의 함량을 보였음.
- AG-Dieckol의 지표성분 분석을 위해 HPLC 분석 조건.
- 지표성분의 함량기준은 AG-Dieckol의 지표성분인 Dieckol (순도 97%이상)의 HPLC의 chromatogram상의 면적을 이용하여 정량선을 작성하였으며, 샘플내의 지표성분의 함량을 비교 정량한 결과, 지표성분 디에콜 함량은 10%로 확인되었음.
- 소재의 HPLC chromatogram 결과를 보면, 23분에 나타나는 피크가 제일 높은 것을 확인 할 수 있었으며, 이 성분은 Dieckol 피크로서 제품의 주요 성분인 것을 확인 할 수 있음.
- Dieckol 성분 확인은 보유한 표준 물질과 MS, NMR을 통하여 확인하였음.

Condition of HPLC analysis				
Company	ThermoFisher Scientific			
Column	Thermo Hypersil-Gold C18 (1.9 μm, 2.1 × 100 ㎜)			
Mobile phase	A : Methanol			
	B : Water			
Gradient	Time	A%	B%	Flow
	0 min	10	90	200 uL/min
	40 min	100	0	200 uL/min
	50 min	100	0	200 uL/min
	52 min	10	90	200 uL/min
	60 min	10	90	200 uL/min

[Table 2-22]

■ HPLC 분석조건

- Thermo Fisher Scientific 장비
- ODS 컬럼 Hypersil-Gold 사용
- 이동상: 물/메탄올
- 용매는 HPLC grade
- Gradient 조건으로 40분까지 10 →100% 메탄올함량 증가시켜 분석



- AG-Dieckol의 지표성분명은 Dieckol,
- 분자량:742
- 구조식:$C_{36}H_{22}O_{18}$

[Fig 2-30] AG-Dieckol의 표준화분석.

③ 기능성 소재 표준화

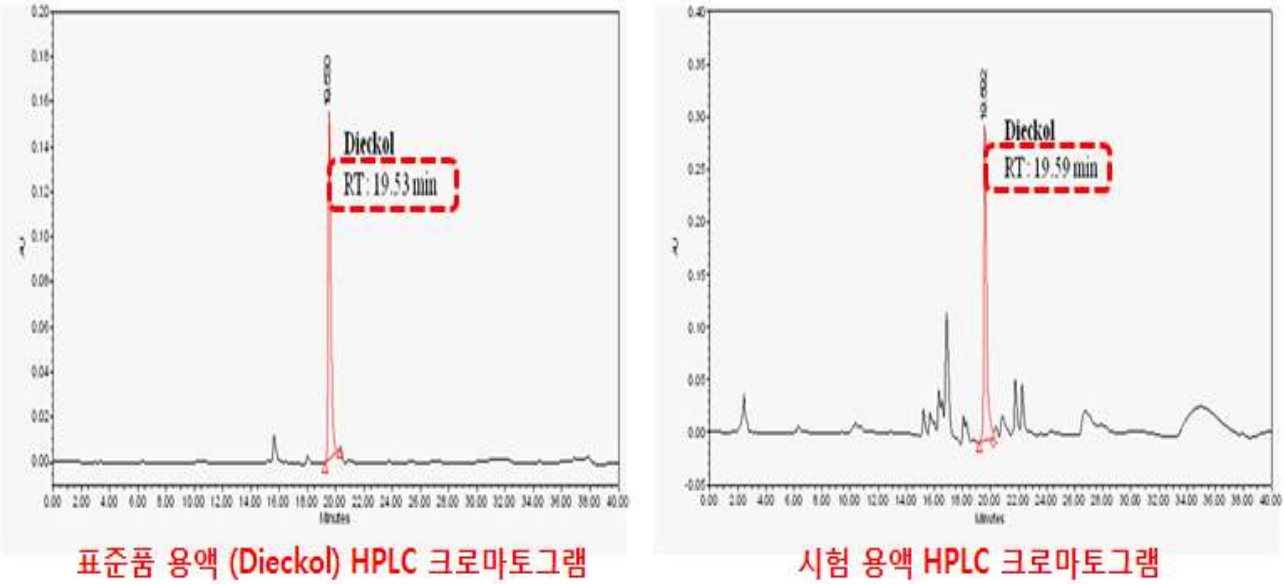
기능성 소재의 표준화는 고시 제2011-34호에 따라 기능/지표성분의 분석을 진행함에 있어 공인된 방법이 없거나 더 타당하다고 판단할 수 있는 분석법 적용 시 제시한 시험방법의 타당성을 검증하는 과정으로 고시에서 제시하는 검토 항목에 대하여 식품의약품안전청장이 지정 또는 국내외 검사기관의 시험결과와 분석자료를 제출 하여야 하는 시험범 검증을 통해서 이루어 짐.

[Table 2-23] AG-Dieckol의 기능성 소재 표준화 평가방법

항 목	평 가 방 법
특이성	HPLC 분석 시 검출시간, 스펙트럼, peak purity 검토
직선성	표준물질에 대한 5개 농도에서 직선성 확인
	시료에 대한 8개 농도에서 직선성 확인
정확성	시료 중 3개 농도로 표준물질 첨가하여 회수율 검토
정밀성	3일간 2명의 시험자가 2종의 기기로 반복 재현성, 일간, 기기간, 시험자간 정밀성 평가
범위	직선성, 정확성, 정밀도 고려 후 설정
안정성	소재를 저온에서 pH별, 기간별 조건에서 표준물질 함량 검토

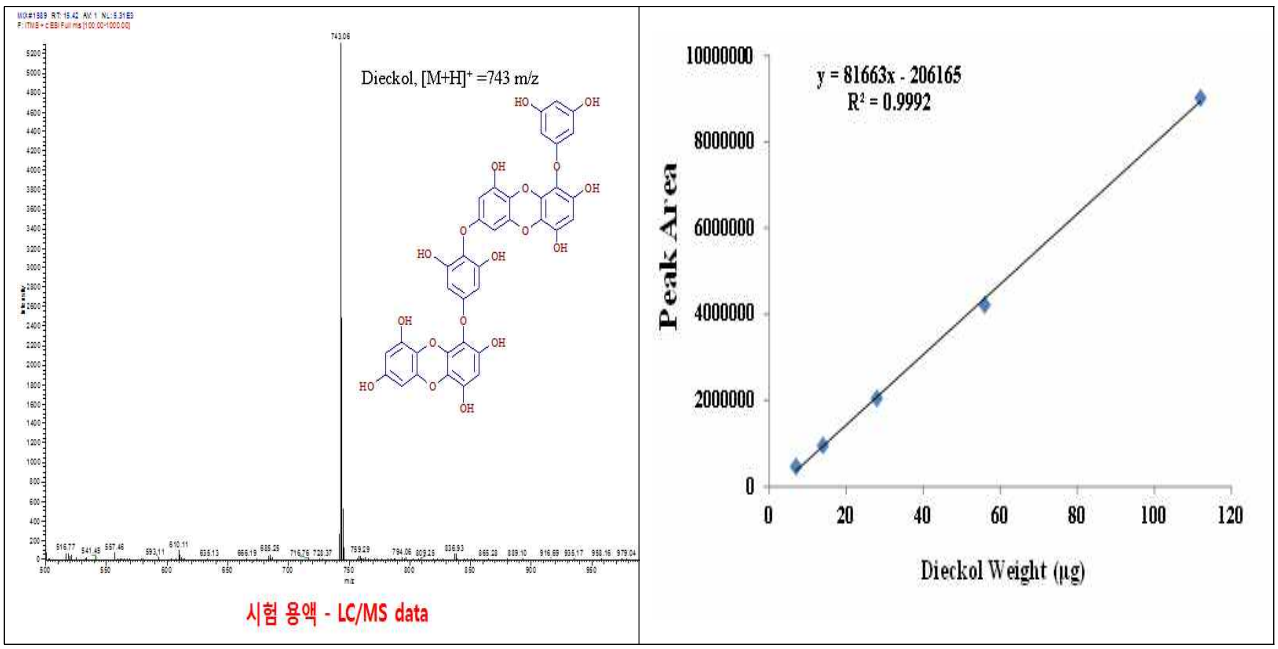
○ 시험법 검증 중 특이성(Specificity) 평가

: HPLC와 LC/MS를 이용하여 분석하였음. HPLC 분석결과 기존 표준품 peak가 나타나는 retention time이 15.9 min으로 동일하게 나타나는 것을 확인 하였고, LC/MS data 분석결과, $[M+H]^+$=743 m/z로 Dieckol임을 확인함.



[Fig 2-31] AG-Dieckol 표준품과 시료의 표준화분석.

○ **직선성(Linearuty)의 평가** : 표준품의 함량 농도인 7~112 ug/ml의 범위에서 직선성을 확인한 결과 다음과 같은 0.9992의 추세선 R^2 값을 확인 함.



[Fig 2-32] AG-Dieckol의 표준화분석(직선성).

○ **시험법 검증 중 범위(Range)** : 이전에 실시한 정밀성, 정확성 및 직선성 평가의 결과를 토대로 표준품의 농도의 범위와 동일한 7 ~112 ug/mL를 제시할 수 있음.

○ 정확성(Accuracy) 평가:

- 표준품인 dieckol을 함유하고 있는 시료 용액을 3가지 농도로 희석하여 표준품의 함량을 HPLC 이용하여 분석한 결과에서도, 단계농도의 평균 회수율이 99.6%에 달하는 것을 확인하였음.
- 시험법 검증 중 동일하고 균질한 샘플인지 확인을 위해 반복적으로 분석하여 %RSD를 계산하여 평가하는 정밀성(Precision) 평가에서도 3번의 반복 결과, Dieckol의 함량 평가 결과 50.83 ± 0.41 ug 로 %RSD 값이 0.80을 나타내어 정밀한 평가에서도 기능성 소재로의 표준화 가능성이 높은 것으로 평가되었음.

[Table 2-24] AG-Dieckol의 기능성 소재 표준화(정확성)

Solution	No	Area	Conc. Found (%)	Accuracy/Recovery (%)
50% spiked	1	1914822	26.0	102.2
	2	1800100	24.6	96.7
	3	1856582	25.3	99.4
	Mean		25.3	99.4
	Std. Dev		0.7	2.8
	RSD(%)		2.8	2.8
100% spiked	1	3982074	51.3	100.9
	2	3904629	50.3	99.0
	3	3961324	51.0	100.4
	Mean		50.9	100.1
	Std. Dev		0.5	1.0
	RSD(%)		1.0	1.0
200% spiked	1	8079257	101.5	99.8
	2	8015223	100.7	99.0
	3	7979257	100.2	98.6
	Mean		100.8	99.1
	Std. Dev		0.6	0.6
	RSD(%)		0.6	0.6
			Mean (n=9)	99.6

[Table 2-25] AG-Dieckol의 기능성 소재 표준화 (균질성)

No.	Area	Dieckol (μg)
1	3964123	51.07
2	3906637	50.36
3	3964188	51.07
Mean		50.83
STDEV		0.41
RSD (%)		0.80

○ 안전성(Stability)의 평가: pH 5~9에서의 성분 변화가 거의 없는 것을 확인하였고, 기간별로 확인한 결과에서도 0~180 일간 성분의 변화적 차이가 거의 없음을 확인 하였음.

[Table 2-26] AG-Dieckol의 기능성 소재 표준화 평가방법 (안정성)

Dieckol (μg)	pH. 5	pH. 7	pH. 9
0 day	55.8	55.0	55.0
30 day	55.0	54.7	55.5
60 day	54.1	55.3	54.5
180 day	54.7	55.0	55.8

- 위와 같은 시험법 건증을 토대로 AG-Dieeckol의 기능성 소재로의 가능성은 충분하다고 사료됨.

⑵ 항비만 기능성 소재(AG-Diecko)l의 독성, 안전성 검사.

① 일반사항

- 제주산 감태는 국내에서 식품의 원료로 사용가능한 갈조식물 다시마목 미역과의 다년생 해조류로 식용이 가능함.
- 국외의 경우 미국에서 감태에서 추출된 저분자량의 폴리페놀 화합물인 ‘씨놀’이라는 소재가 2008년 미국 FDA로부터 NDI(New Dietary Ingredient)로 인증 받은 사례가 있음.
- 부작용, 독성 등과 같은 안전성을 확인을 위한 DB검색에서도 기본적으로 갈조류 전체에서 보이는 부작용인 “요오드 함량이 높아 여드름을 유발 할수 있음(DrugDigest)” 및 “개인의 따라 갈조류 섭취시 설사, 매스꺼움이 나타날 수 있으나, 일반적으로 몇일 후면 사라짐(DrugDigest)”, “임산부, 수유부 섭취에 대한 자료가 충분하지 않으니 섭취에 주의(Natural Medicines Comprehensive DB)”와 같은 기본적인 주의사항만 존재하고 있음.
- 또한 섭취량 평가에서도 우리나라에서도 일부지역만 섭취를 하고 있고, 과거의 비해 식용하는 지역이 거의 없는 실정으로 섭취량에 대한 명확한 자료 확보가 어려움.

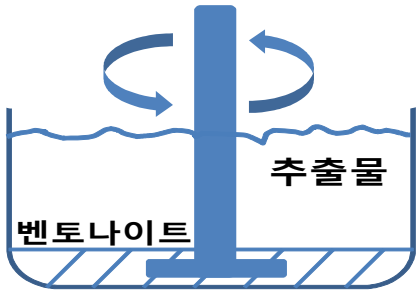
② AG-Dieckol의 영양성분 및 중금속 검사.

- 중금 속 함량 중 총비소의 함량이 99.4933 mg/kg로 측정 되었는데 이를 식품 내 첨가하여 사용시, WTO에서 지정한 주간섭취허용량(PTWI)인 15 ug/kg(body weight) 보다 높은 수치를 섭취하게 되는 것으로 사료됨.
- 제주산 감태 내의 함유된 비소는 중금속에 명시된 무기비소가 아닌 유기비소로서 WTO에서 명시한 기준과는 다르게 판단해야 할 것으로 사료됨.
- 하지만 최근 식품에 대한 소비자들의 기준이 높아짐에 따라, 그 함량을 줄이기 위한 방법으로 AG-Dieckol 생산 공정 중, 여과 처리 공정에서 벤토나이트를 이용하여 추출물의 과량 함유된

비소를 저감화 시키는 기술을 도입함.

- AG-Dieckol의 추출 공정 중 추출물에 벤토나이트를 첨가한 후 추출기를 이용하여 6시간 교반하였음. 교반 후 1시간 동안 추출물 잔사와 벤토나이트를 침전시켰으며, 그 후 상층액을 필터프레스를 이용하여 여과하였음. 여과된 추출물은 다음 공정인 농축과 동결건조 공정을 실시하였음.
- 벤토나이트를 이용한 추출공정을 수행하여 얻은 AG-Dieckol의 비소함량을 측정한 결과, 고형분(15):벤토나이트(1)의 비율로 추출한 AG-Dieckol에서 12.0 mg/kg로 기존에 99.4933 mg/kg 보다 8배이상 감소시키는 것을 확인하였으며, 이러한 저감 방법을 통해 생산된 AG-Dieckol는 기능성 식품소재로 사용에 문제가 없다고 판단됨.
- 제주산 감태 내의 함유된 비소는 중금속에 명시된 무기비소가 아닌 유기비소로서 WTO에서 명시한 기준과는 다르게 판단해야 할 것으로 사료됨.
-

검체명	시험항목	기준	결과	항목판정
15:1	비소	-	12.0 mg/kg	-



[Table 2-27] 감태(AG-Dieckol)의 기능성소재표준화 (중금속평가)

시험항목	결과	검사담당자
성상	이미,이취가 없고 고유의 향미가 있는 어두운 회갈색의 분말	강윤희
납(mg/kg)	0.1797mg/kg	연주혜
총비소(mg/kg)	99.4933mg/kg	연주혜
카드뮴(mg/kg)	0.0631mg/kg	연주혜
총수은(mg/kg)	0.001mg/kg	조연주
대장균군	음성	홍서연
비에치씨(mg/kg)	불검출	홍영철
디디티(mg/kg)	불검출	홍영철
알드린(mg/kg)	불검출	홍영철
디엘드린(mg/kg)	불검출	홍영철
엔드린(mg/kg)	불검출	홍영철
열량(Kcal/100g)	293.56Kcal/100g	정은숙
탄수화물(%)	68.00%	정은숙
조단백질(%)	4.49%	박경덕
조지방(%)	0.40%	김영옥
수분(%)	3.07%	강윤희
회분(%)	24.04%	강윤희
나트륨(mg/100g)	4015.56mg/100g	강윤희

③ AG-Dieckol의 안전성 평가

- AG-Dieckol를 이용하여 **급석독성 및 LD_{50} 평가함**. Sprague-Dawley(SD) 계통 암컷 랫드를 이용하여 시험물질을 단회 경구투여 하였음. 시험군의 구성은 다음과 같음.

[Table 2-28] AG-Dieckol의 기능성 소재 표준화 평가방법 (독성평가)

군	성별	동물수 (마리)	동물번호	투여액량 (㎖/kg)	투여량 (mg/kg)
300 mg/kg 투여군(1st)	Female	3	1~3	20	300
300 mg/kg 투여군(2nd)	Female	3	4~6	20	300
2,000 mg/kg 투여군(3rd)	Female	3	7~9	20	2,000
2,000 mg/kg 투여군(4th)	Female	3	10~12	20	2,000

- **1단계**: 300 mg/kg 투여군에서는 시험기간 동안 사망동물 및 특이한 일반증상이 관찰되지 않았음. 체중 증가역시 정상적인 체중증가가 관찰되었고, 실험종료 시 모든 생존 동물의 부검셜과 특이한 육안 결과가 관찰되지 않았음.
- **2단계**: 300 mg/kg 투여군에서도 1단계와 동일하게 특이한 사항이 확인되지 않았음.
- **3단계**: 2,000 mg/kg 투여군을 확인한 결과에서도, 시험기간 동안 사망한 동물은 관찰되지 않았음. 8번 및 9번 시험동물에서 투여 후 3시간부터 6시간째까지 설사 및 항문주위오염이 관찰되었으나, 투여 후 1일째에 회복되었음. 다른 동물에서는 특이한 현상이 관찰되지 않음.체중 측정 결과, 9번 시험동물에서 투여 후 14일째에 체중감소가 관찰되었으나, 다른 시험돌물에서는 정상적인 체중증가가 관찰됨.
- **4단계**: 2,000 mg/kg 투여군 반복 실험함. 10번과 12번 시험동물에서 3단계와 같은 설사가 관찰 되었으나 동일하게 투여 1일 후 회복됨. 다른 특이한 사항은 관찰 되지 않음.
- **결론**: 모든 실험군에서 사망동물은 발생하지 않았으며, 3단계와 4단계 각각 2마리씩에서 일시적인 설사와 항문주의오염이 투여 초기에 관찰. 기타 특이한 증상은 없음.
- 실험 종료 후 모든 생존 동물의 부검결과에서도 특이한 사항을 확인 할수 없었음.
- 이상의 결과로 보아 시험물질 AG-Dieckol은 GHS 구분 5(LD_{50} cut-off:≥2,000 mg/kg b.w)로 사료됨. 이 모든 결과를 토대로 제주산 감태 유래 항비만 소재인 AG-Dieckol은 기능성 소재로의 충분한 가능성과 안전성을 갖춘 것으로 판단됨.

(3) AG-Dieckol 첨가 다양한 제형의 시제품 생산

제주산 감태 유래 항비만 소재인 AG-Dieckol을 다양한 제형을 연구/개발하여 3가지의 시제품을 개발하였음. 아래 3가지 외 다른 제형 제품의 가능성에 대해서 현재 진행중에 있음.

1번:AG-Dieckol을 첨가하여 환 형태의 아쿠아폴리놀.

2번: 타블릿 형태로 제작한 감태 디에콜 정 (미정).

3번: 액상 상태로 제작한 감태 디에콜 추출액(미정).

[Fig 2-33] AG-Dieckol의 다양한 시제품(환, 정, 및 액상 형태)

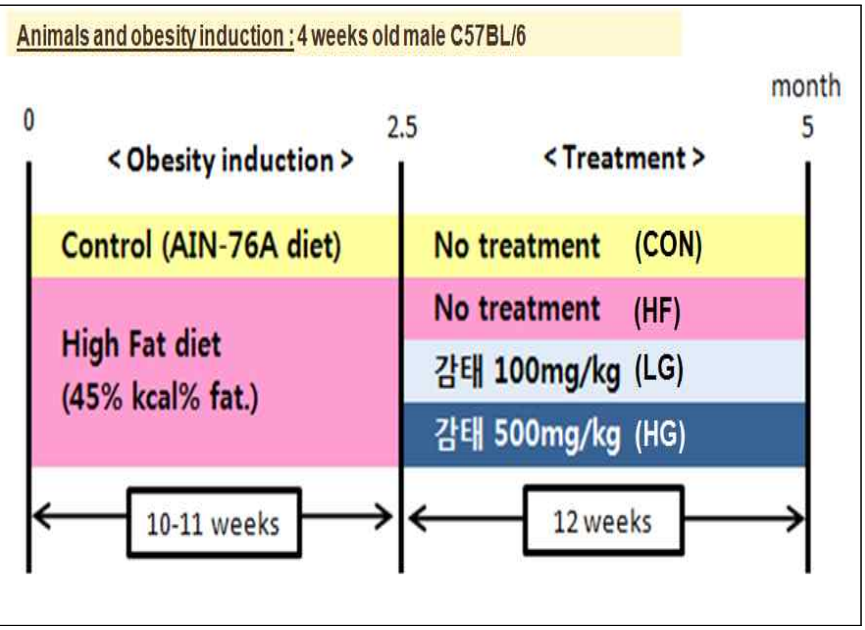
마. 2핵심 2세부

감태 소재의 효능성 검증 [경희대 임윤숙]
⊙ 결론 • 고농도 감태 보충은 고지방 식이에 의한 체중의 증가를 지연시킴 • 감태 보충은 고지방 식이에 의해 증가한 지방산 합성과 감소된 지방 분해 및 지방 산화를 정상화 시킴 • 감태 보충은 간 독성없이 고지방 식이에 의해 증가된 염증 반응을 완화시킴.

(1) in vivo 실험 디자인

감태의 항비만 및 항염증성에 대한 효능성을 검증하기 위하여 다음과 같은 동물실험을 하였음. 비만을 유도하지 않은 군(control; CON)과 비만을 유도한 군 (High fat diet only; HF), 감태를 저농도(LG; 100mg/kg) 및 고농도(HG; 500mg/kg)으로 농도를 달리하여 경구투여 한 군으로 나누어 실험을 수행하였음.

[Fig 2-32] 감태 in vivo 시험디자인



(2) 항비만 관련 마커 측정

① 체중증가

고농도 감태 보충군에서 체중 증가율이 정상군 수준으로 유지됨을 알 수 있어 고지방 식이에 의한 체중 증가를 방지하는 것으로 사료됨.

[Table 2-29] 감태 농도별 12주 처치시의 체중변화

Group	Body weight before treatment (g)	Body weight after treatment (g)	Body weight gain (g)[1)]
CON	29.60 ± 0.592 [a 2)]	36.99 ± 0.767 [a]	7.39 ± 0.369 [a]
HF	38.82 ± 0.968 [b]	49.22 ± 0.863 [c]	10.40 ± 0.721 [cd]
LG	38.95 ± 1.154 [b]	48.68 ± 0.991 [c]	9.73 ± 0.700 [bcd]
HG	37.56 ± 1.058 [b]	45.31 ± 1.169 [b]	7.75 ± 0.736 [ab]

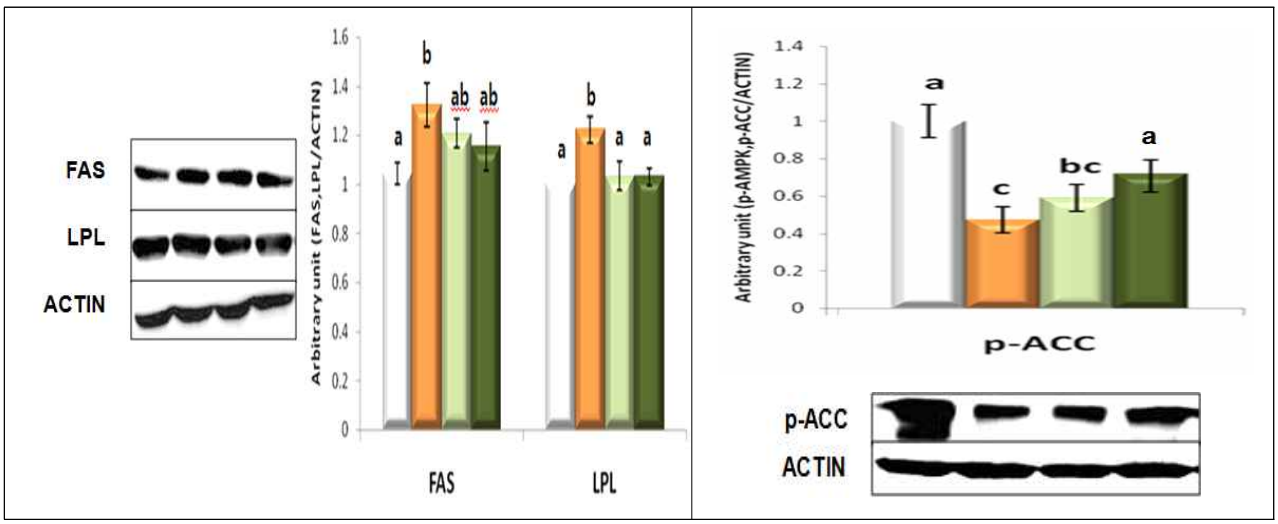
② 지방 축적 및 합성 마커

○ 간 에서의 Fatty Acid Synthase (FAS)와 Lipoprotein Lipase (LPL) 발현

- 지방 합성과 관련된 마커인 FAS는 감태를 투여한 군에서 비만대조군에 비하여 감소하는 경향을 나타냈고, 지방 축적과 관련된 인자인 LPL는 감태를 투여한 경우 비만대조군에 비해 유의적으로 감소하였음.

○ 간 에서의 Acetyl CoA Carboxylase (ACC) phosphorylation

- ACC는 malonyl CoA의 양을 증가시켜 지방산 생합성을 증가시키는 마커로, 인산화가 될 경우 그 활성이 감소함. 따라서 비만으로 인해 증가된 ACC의 활성이 감태를 투여한 경우에 ACC의 인산화를 촉진하여 지방산 생합성을 억제하는 것으로 사료됨.

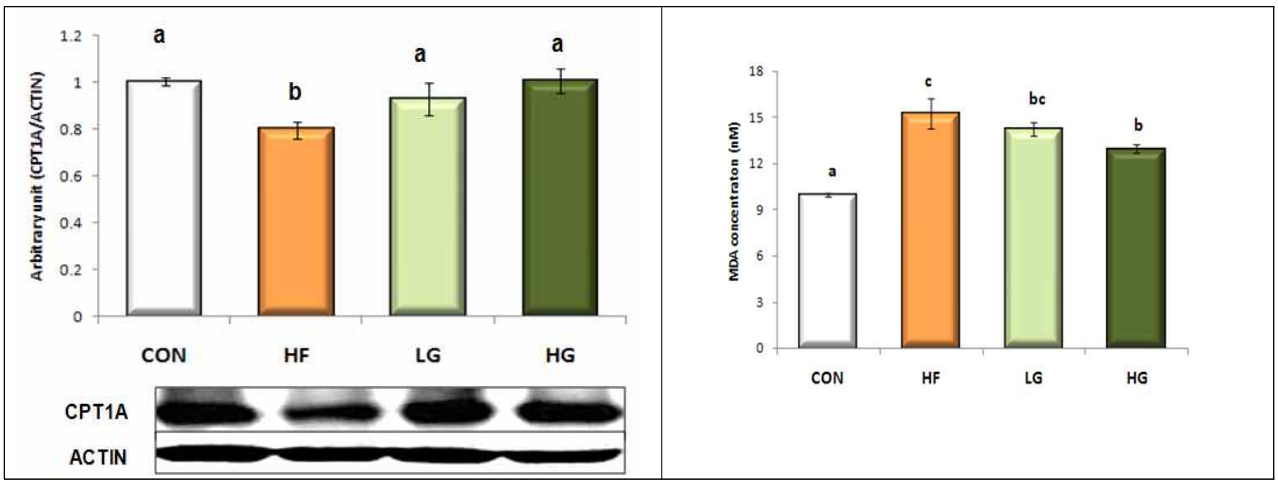


[Fig 2-33] 농도별 감태추출물의 지방대사

③ 에너지소비 관련 마커 측정

○ Hepartic Carnitine Palmitoyltransferase 1A (CPT1A): 지방산의 산화를 촉진하는 CPT1의 단백질 수준이 저농도와 고농도 감태 보충군에서 정상 수준으로 증가하였음.

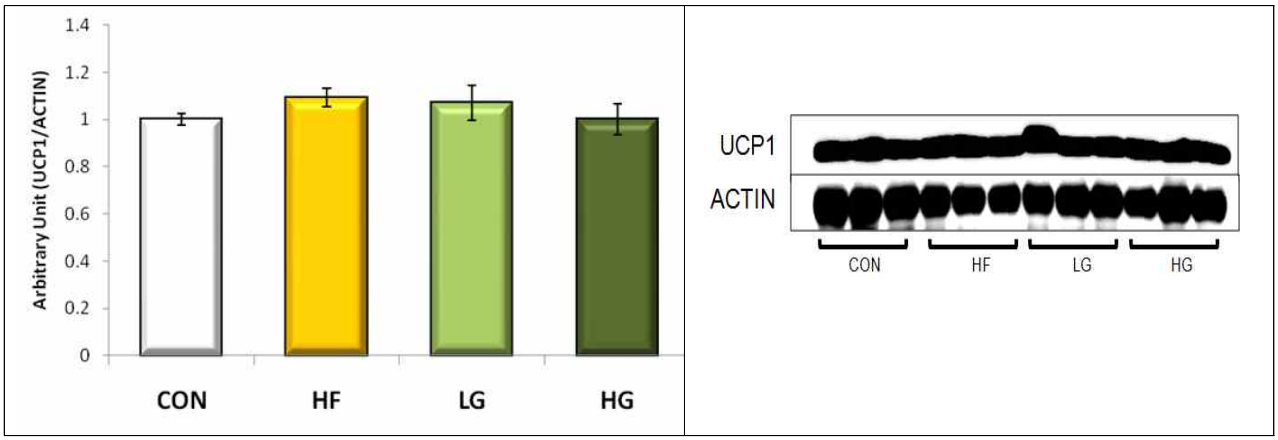
○ MDA(Malondialdehyde; fat metabolites) : 지방산화 관련 인자인 MDA 수준이 감태 보충 농도에 의존적으로 유의적으로 감소함.



[Fig 2-34] 농도별 감태추출물의 에너지대사

④ 열생성 관련 마커

○ **갈색지방에서의 Uncoupling Protein 1 (UCP1) 발현 측정**: UCP1의 단백질 농도는 각 군당 유의적인 차이가 없음.

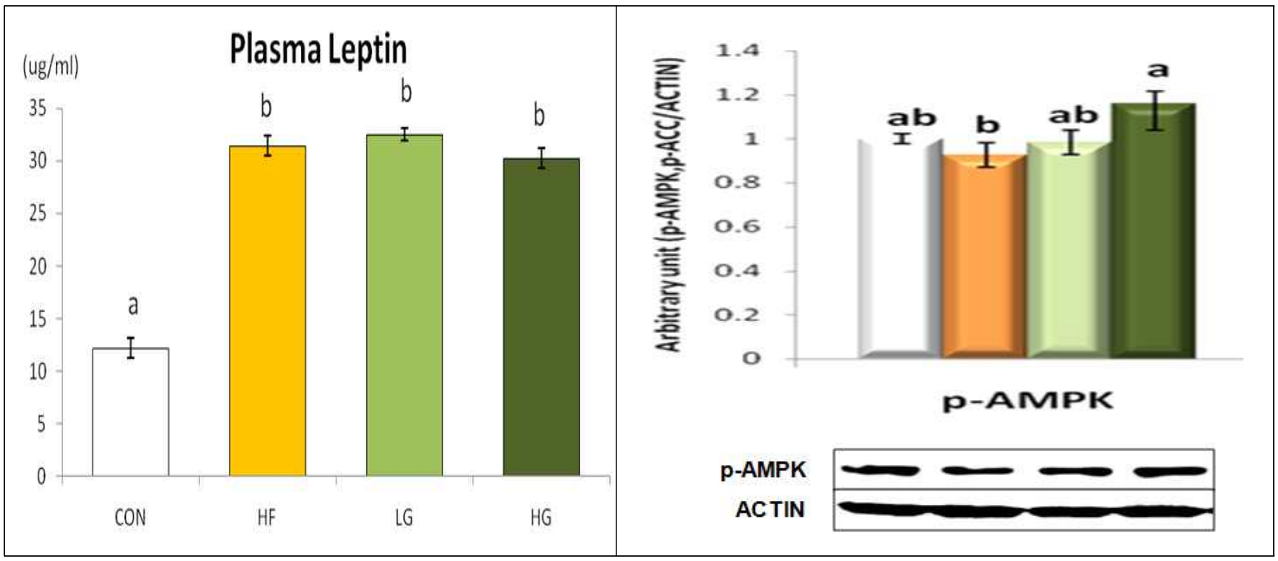


[Fig 2-35] 농도별 감태추출물의 열생성대사

⑤ 에너지 대사 조절 관련 마커 측정

○ **Leptin**: 비만 시 증가하는 혈중 Leptin의 농도는 감태 투여군과 비만대조군 간의 유의적 차이가 없음.

○ **AMPK phosphorylation** : 에너지 대사의 주요 조절인자인 AMPK는 인산화에 의해 활성이 조절 되는데, 고농도 감태 투여군에서 그 활성이 비만대조군에 비해 유의적으로 증가하는 것으로 나타남.

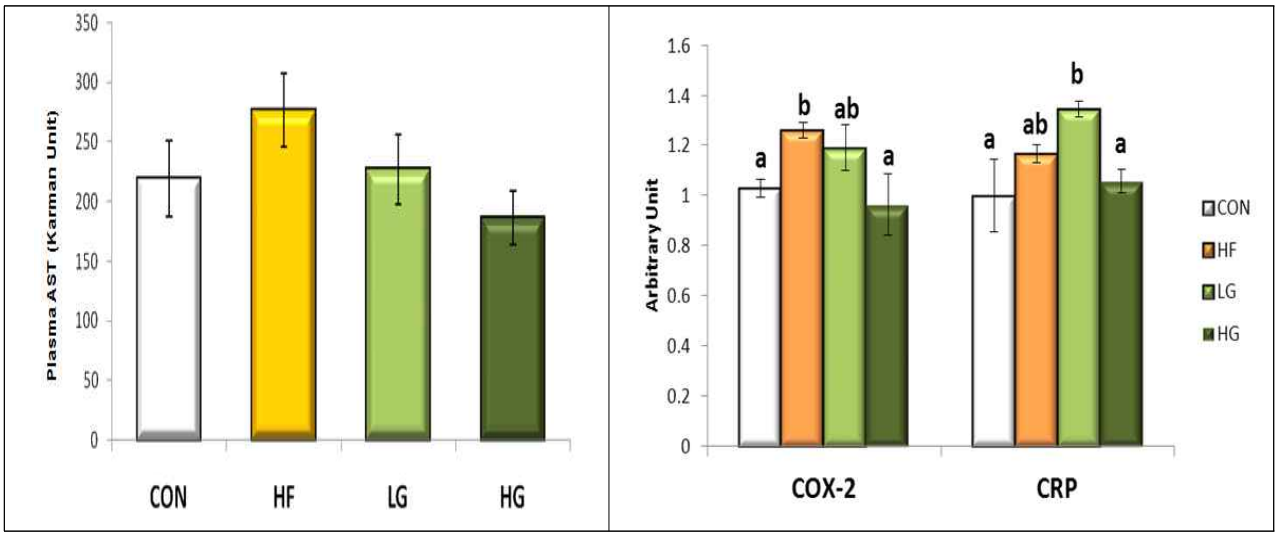


[Fig 2-36] 농도별 감태추출물의 에너지대사 조절마커

⑶ 간 독성 및 항염증 기능성 검증실험

○ **간 손상지표에 의한 간 독성 검증실험** :Aspartate Transaminase (AST) 측정 결과, 각 군 간의 유의적인 차이는 없었음. 감태의 투여가 간 독성을 일으키지는 않는 것으로 사료됨.

○ **항염증성 평가**: 염증 반응 관련 인자인 COX-2와 CRP의 수준은 비만시 증가하나 감태 고농도 투여에 의해 정상 수준으로 낮아짐.



[Fig 2-37] 농도별 감태추출물의 염증성비만 마커

바. 2핵심 3세부:

다시마소재의 표준화 [마린 바이오]
⊙ 결론 • 섭취충동 억제 효능이 알려진 Glutamic acid 및 GABA 함량의 최적화를 위해 소재 생산 공정 개발 완료 • 다시마 추출물 및 발효물을 기본으로 한 여러 가지 소재를 식이 제한 동물모델에서 급성 식이 시 다시마 발효액에서 식이 조절(섭취충동) 효능을 확인함.

⑴ 다시마를 이용한 최적의 공정개발

① 원료의 선별 및 전처리 공정 개발

○ 원료선정: 기능성 물질인 GABA(gamma aminobutyric acid)의 전구물질로 작용하는 glutamic acid를 다량으로 함유하고 있는 다시마 선정함.

○ 전처리 공정: 전처리 공정에는 이물질 제거를 위한 수세공정, 염분을 제거하는 탈염공정(다시마:급수=1:2 비율로 혼합하여 30～60분 동안 2～3회 침지과정), 효율적인 추출을 위한 분쇄공정(습식 분쇄기로 가로세로 0.5～1cm 크기로 분쇄)을 포함함.

○ 추출공정: 다시마에 물 혹은 50%주정 1:15의 비율로 혼합 후, 70℃에서 30분간 열수추출함. 다시마 추출액과 다시마 박을 20 mesh 망을 이용하여 분리한 후, 추출액은 정밀여과 공정에 적합한 온도(40℃ 이하)로 냉각함.

○ 정밀여과 공정: 다시마에 함유되어 있는 천연의 정미성분(glutamate 등) 뿐만 아니라 기능성 다당류(후코이단 등)을 추출함. 추출 배수가 낮을수록 추출액의 brix(%)가 높아 추출 수율면에서는 양호하였지만 NaCl의 농도가 높고 해조취 등의 이미, 이취가 강하여 제품으로서의 기능에 악영향을 미침. 추출 배수가 높을수록 brix(%)가 낮아, 추출수율이 떨어지는 단점이 있음. 따라서 적합한 추출은 50%주정을 15배수, 즉 다시마와 50%주정을 1:15의 비율로 추출하는 것이 가장 바람직함. 또한 물로 다시마 추출과정에서 다시마의 섬유질 내로 흡수하는 수분에 비해 수득할 수 있는 추출액의 양이 적어 가공적성에는 부적절함.

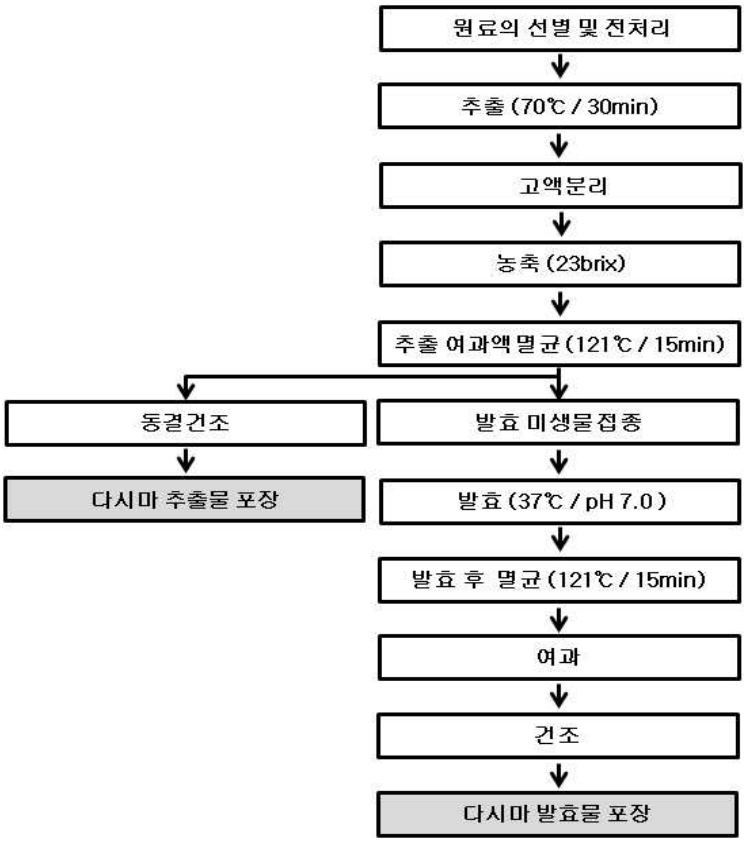
○ 추출액의 일반적인 특성은 아래의 [표 2-30]과 같다.

[Table 2-30] 급수량에 따른 다시마 추출액의 특성

구 분	pH	Brix (%)	NaCl (%)	Glutamate 함량 (%)
100% 물	6.9~7.2	2.0~3.2	2.0~2.2	3.32
50% 주정	6.5~7.2	5.0~6.2	0.9~1.3	7.0
70% 주정	6.8~7.0	3.5~4.5	0.6~0.7	5.8

② 소재생산의 공정 확립

○ **다시마 추출물**: 50%주정으로 추출한 다시마 추출액을 농축, 멸균, 동결건조를 거쳐 Glutamic acid 함량의 손실이 없는 다시마 추출액 분말 생산함



[Fig 2-38] 기능성 다시마 추출액 제조공정도 (좌) 및 다시마 발효물 제조공정도 (우)

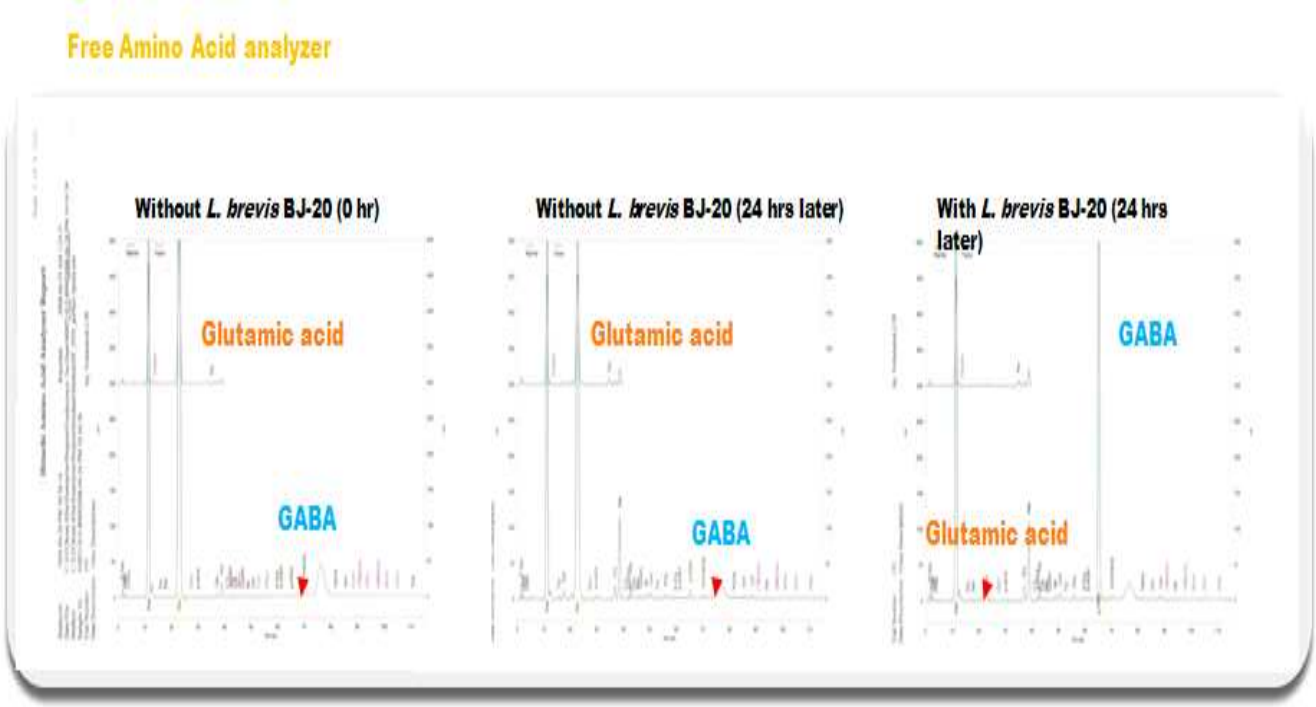
○ **다시마 발효물**

- 50% 주정으로 추출한 다시마추출액과 물을 혼합한 후 발효를 위하여 120~125℃에서 15~30분간 고온가압 멸균함. 다시마에 함유된 유리아미노산과 미네랄, 해조 다당류를 비롯한 각종 영양성분의 용출촉진을 위하여 유산균의 배양과정에서 배지의 영양성분으로 이용하고 동시에 원료내를 멸균. 즉 다시마에 함유된 천연 아미노산과 탄수화물(다당류)을 질소(N)원과 탄소(C)원으로 하고 칼륨, 칼슘, 철 등 천연 미네랄을 발효과정에서 접종유산균의 우수한 영양원으로 활용하였으며, 고온가압멸균 후에 미생물의 최적 생육온도까지 냉각함.
- 멸균한 다시마 추출물에 분리한 유산균 *Lactobacillus brevis* BJ-20을 접종한 후 37±1℃에서 2일간(48시간) 발효하였다. 발효단계에서는 고온가압멸균 단계에서 다시마로부터 추출된 천연 Glutamate가 GABA(γ amino butyric acid 또는 4-amino butyric acid)로 전환될 뿐만 아니라 발효 단계에서도 지속적으로 다시마로부터 Glutamate가 추출되어 GABA로의 전환이 지속됨. 아울러, 다시마에 함유된 해조 다당류 (예, fucoidan)가 단당류(예, fucose) 및 올리고당으로 분해되어 GABA와 해조 다당류 유래의 단당류와 해조올리고당을 함유한 다시마발효산물을 얻음. 발효 후에 발효산물을 추가로 120~125℃에서 15~30분간 고온가압 멸균함.

- 발효로 얻은 다시마 추출액은 고액분리 후 disc separation을 통해 균체를 제거하고 농축 후 동결건조 공정을 통하여 다시마 발효물을 분말화함.

③ 소재내 기능성분 함량 분석

- Glutamic acid와 GABA의 정량을 위하여, 아미노산 분석기를 통해 발효 전후에 glutamic acid 함량과 GABA의 함량의 상관관계를 확인함. HPLC로 두 성분의 표품 (Glutamic acid: CAS No. 56-86-0, GABA: CAS No. 56-12-2, Sigma-Aldrich co. LLC., USA)으로 standard curve를 그린 후, 발효 전후 두 성분 함량을 정량. HPLC에 의한 분석법의 타당성을 확보하기 위하여 식약청 가이드라인에 의하여 분석방법을 설정하였고, 분석방법이 확립되는 동안은 아미노산 분석과 HPLC 분석 방법을 병행하여 함량의 적정성을 확립함.



[Fig 2-39] 다시마 발효 전후의 glutamic acid와 GABA의 정량

○ Glutamic acid 와 GABA 분석 방법 확립

- 개발 소재의 생산시 quality control (QC)을 위하여, 기능성분(지표성분) 함량 분석법을 확립하고, 이를 통해 발효시간 및 최종 기능성분의 함량을 조절을 위하여 분석법을 확립함.
- 유산균 발효 다시마 추출물의 GABA 함량을 측정하기 위하여 유리아미노산의 함량을 측정함. 유산균 발효 다시마 추출물의 pH를 0.02 N HCl로 조정한 후 0.20㎛ membrane (DIS MIC 25^{CS}, Toyo Roshi Kaisha, Japan)으로 여과하여 제조. 유리아미노산의 분석은 시료의 일정량 (20 μL)을 HPLC (Dionex ultimate 3000 HPLC system, Korea) system과 Dionex Bonded Silica Products (C_{18} 5 μm 120Å 4.6 × 250 mm)를 이용하여 분석함. (표 2-3-2)
-
-

[Table 2-31] 고속액체크로마토그래프 조건

항목	조건		
주입량/ 칼럼온도	20 ㎕/ 40℃		
이동상	A 용매 - 50 mM Sodium acetate, pH 6.5 B 용매 - Acetonitrile : MeOH : D.W. 45 : 45: 10 (v/v/v)		
유속	1 mL/min		
검출기 파장	338 nm		
이동상 조건	Time (min)	용매	
		A (%)	B (%)
	0	90	10
	12	60	40
	13	10	90
	17	10	90
	17	90	10
	23	90	10

** 기능(지표)성분의 분리・동정, 지표성분 설정 및 표준화시 식품의약품안전청의 “건강기능식품 기능성 원료 인정에 관한 규정 (2010-76)에 의거해서 분석법을 설정하였고, 그 기준은 다음 표와 같다.

•

④ 소재표지물질 표준화 시험법

기능성 소재의 표준화는 고시 제2011-34호에 따라 기능/지표성분의 분석을 진행함에 있어 공인된 방법이 없거나 더 타당하다고 판단할 수 있는 분석법 적용 시 제시한 시험방법의 타당성을 검증하는 과정으로 고시에서 제시하는 검토 항목에 대하여 식품의약품안전청장이 지정 또는 국내외 검사기관의 시험결과와 분석자료를 제출 하여야 하는 시험범 검증을 통해서 이루어 짐. (표 2-3-3)

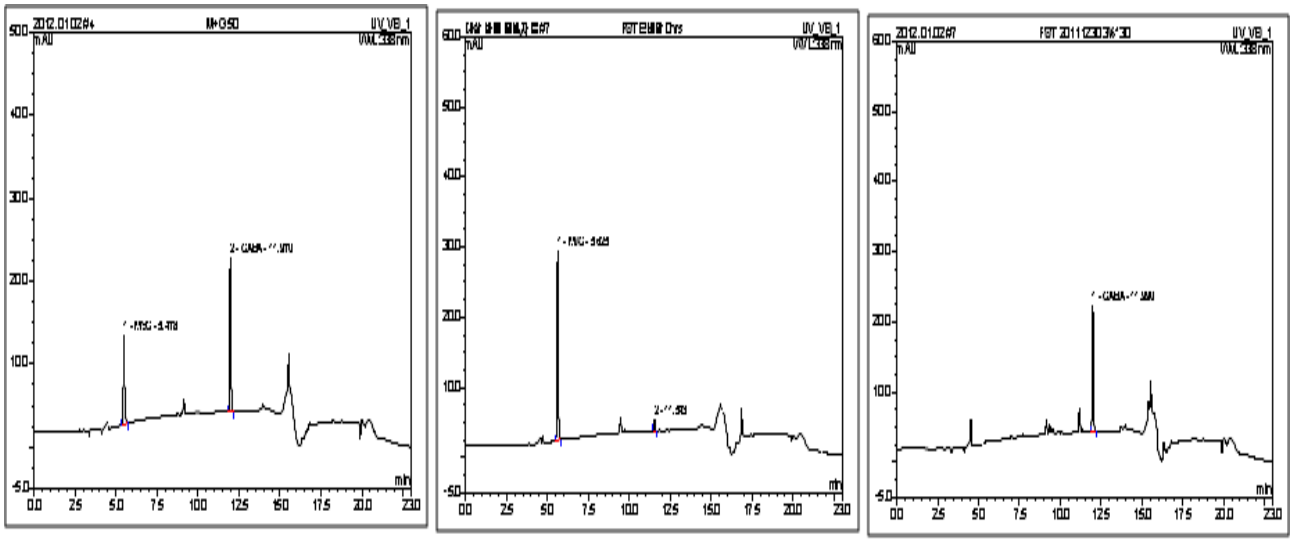
[Table 2-32] 시험방법 타당성 (벨리데이션) 검토 항목의 정의 및 적용

항목	정의	적용		
		기능성분		유해물질 (정량)
		정량시험	확인시험	
특이성 (Specificity)	불순물, 분해물, 배합성분 등의 혼재 상태에서 분석대상 물질을 선택적으로 정확하게 측정할 수 있는 능력	예	예	예
정확성 (Accuracy)	측정값이 이미 알고 있는 참값이나 표준값에 근접한 정도	예	아니오	예
정밀성 (Precision)	균일한 검체로부터 여러 번 채취하여 얻은 시료를 정해진 조건에 따라 측정하였을 때 각각의 측정값들 사이의 근접성(분산정도)	예	아니오	예
정량한계 (Quantitation Limit)	적절한 정밀성과 정확성을 가진 정량값으로 표현할 수 있는 검체 중 분석대상물질의 최소량	아니오	아니오	예
직선성 (Linearity)	시험방법이 일정 범위에 있는 검체 중 분석대상물질의 양(또는 농도)에 대하여 직선적인 측정값을 얻어낼 수 있는 능력	예	아니오	예
범위 (Range)	적절한 정밀성, 정확성 및 직선성을 충분히 제시할 수 있는 검체 중 분석대상물질의 양(또는 농도)의 하한값 및 상한값 사이의 영역	예	아니오	아니오

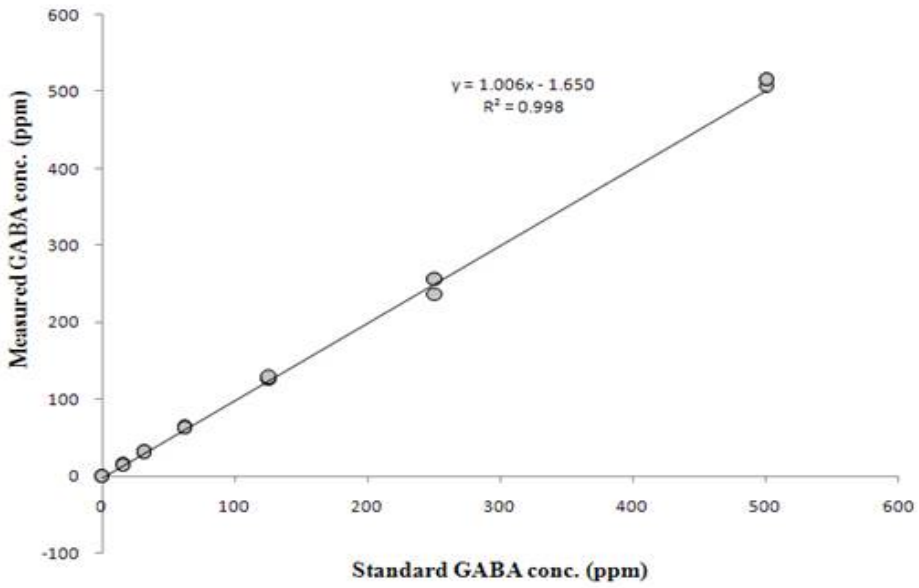
○ **특이성**: 지표성분인 GABA와 배합성분 등과 혼재되어 있는 해양생물발효물의 분석상의 특이성을 확인하기 위해, 표준품(SIGMA-ALDRICH, CAS No.56-12-2) 과 비교 분석한 결과 표준품 대비하여 특이적으로 분석됨을 확인함.

○ **직선성**: 표준품인 GABA를 농도별 (0-500ppm)로 분석한 결과 직선성이 확인되었음

○ **정량한계**: 적절한 정밀설과 정확성을 가진 정량값으로 표현할 수 있는 검체 중 분석대상물질의 정량한계를 확인한 결과, 측정한계는 3-1,000ppm으로 설정하였음



[Fig 2-40] 다시마추출물 표지물질의 표준화 (특이성)



[Fig 2-41] 다시마추출물 표지물질의 표준화 (직선성)

○ 정확성: 각 생산제품에 대한 분석의 정확성을 위해, 각 sampledmf 3회 분석하고, 상대표준편차 (%RSD)는 GABA 0.96-3.07%로 나타났다. (표 2-3-4)

○ 정밀성: 해양생물의 GABA 함량 분석에 대한 정밀성을 조사하기 위해 반복 재현성을 확인하고, 분석법의 정밀성에 영향을 미치는 요인인 실험일자 및 실험자를 달리하여 분석을 진행함.

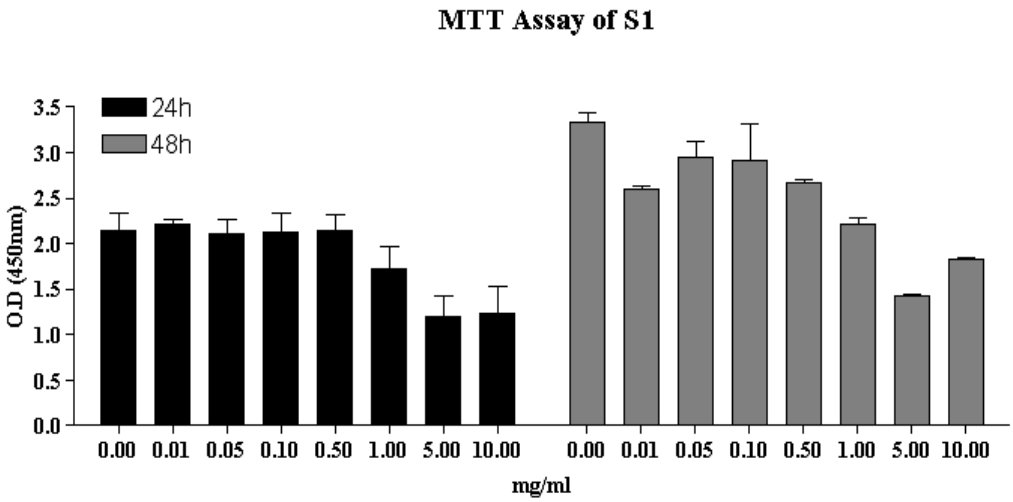
○ **지표성분의 분석범위**: 해양생물발효물의 분석시 GABA농도가 3.2-4.7% 농도에서 표준편차(SD)가 낮은 것으로 확인되었음. 따라서 타 분석기관의 분석 결과 및 제조 원료인 해양생물의 생산지별, 채취일별에 따른 변화를 검토하여, 검채별 측정 하한치 및 상한치를 80-120 (GABA 4-6%)%로 설정하였음.

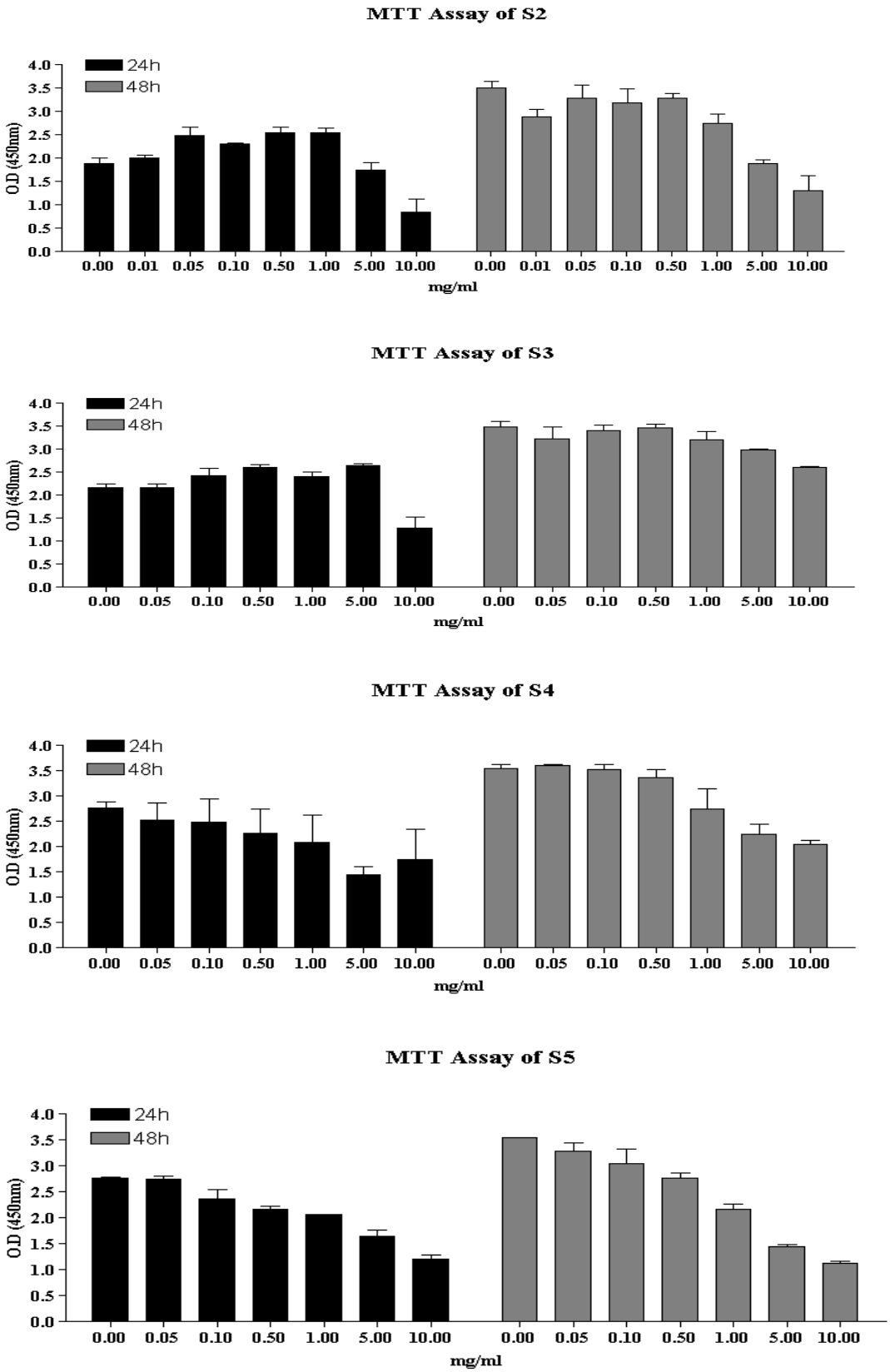
[Table 2-34] 다시마발효물의 GABA 함량에 대한 정확성 분석결과

시료명	분석 횟수	농도 (ppm)	GABA 함량 (%)	GABA 함량 평균 (%)	표준편차 (SD)	상대표준편차 (%RSD)
GABA표준품 (31.25ppm)	1	31.27	-	31.12	0.18	0.58
	2	30.92	-			
	3	31.16	-			
sample 1	1	2092.00	5.23	5.27	0.05	0.96
	2	2131.00	5.33			
	3	2102.50	5.26			
sample 2	1	2271.50	5.68	5.43	0.21	3.94
	2	2121.00	5.30			
	3	2125.50	5.31			
sample 3	1	2099.00	5.25	5.35	0.16	3.07
	2	2217.50	5.54			
	3	2109.00	5.27			

⑵ 기능성 소재의 섭취충동억제 효능 검증

① **세포독성 검사** : L6 rat skeletal muscel cell (CRL-1458, KCLB, Korea)을 이용하여 세포독성을 확인한 결과, S1~3까지는 5mg/mL에서 세포독성이 나타났고, S4~S5는 1mg/mL 이상에서 세포독성을 확인함. (그림 2-42)



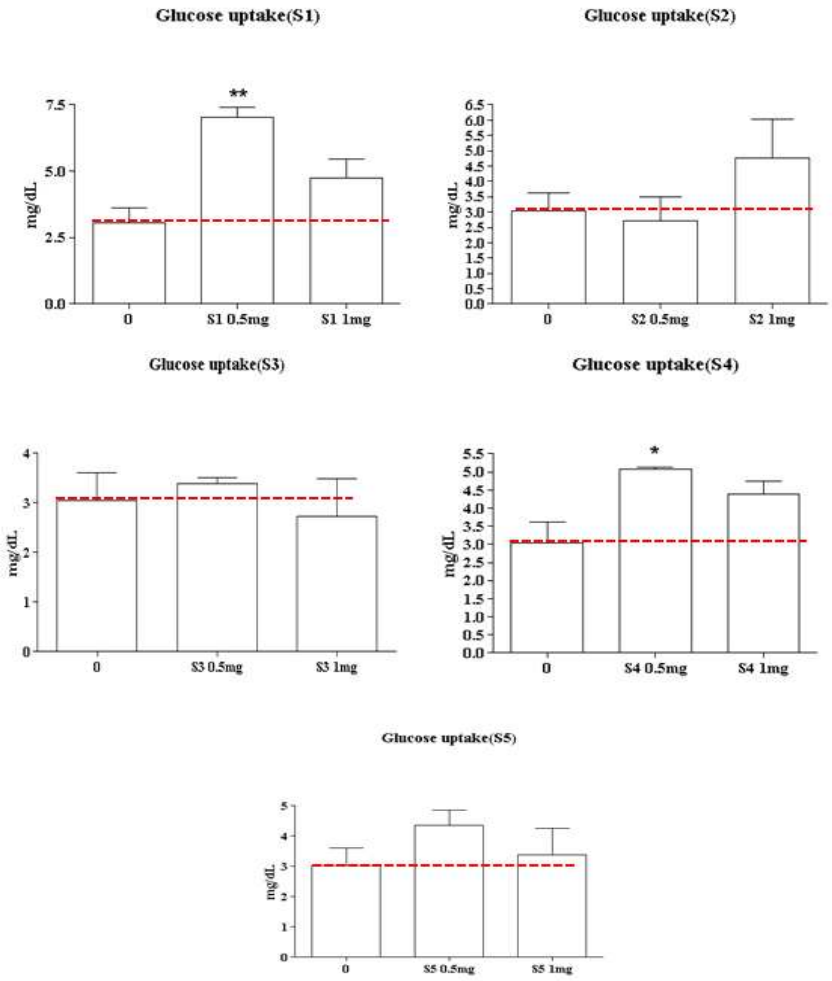


[Fig 2-42] 기능성 소재의 세포독성 효과. [S1: 다시마 발효물 (GABA5%), S2: 다시마 반발효물 (GABA 5%+Glutamic acid 5%), S3: 다시마추출물 (Glutamic acid 7%), S4: 굴다시마 발효물, S5: 굴 발효물)]

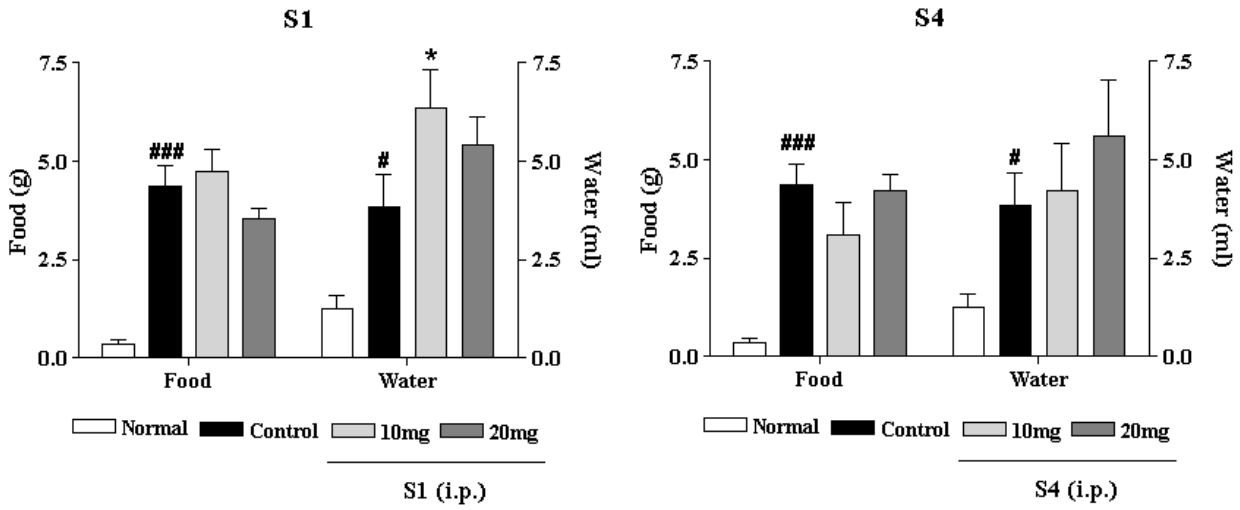
② Glucose uptake 효능: 세포독성 실험에서 모든 샘플에서 독성이 나타나지 않는 0.5, 1.0mg/mL을 처리하여 glucose uptake 효능을 검증하였다. 그 결과, S1과 S4가 0.5mg/mL의 농도에서 Glucose uptake가 처리하지 않는 군에 비해 유의적으로 상승함을 확인함. (그림 2-43)

③ Food & water intake 효능

- L6 cell에서 Glucose uptake에 효과가 있는 S1, S4 추출물을 이용하여 실험동물 행동연구를 진행하였다. 식이 박탈 24시간 후, 추출물을 10, 20mg복강 투여한 후 30분 후, 음식과 물을 제공하고 1시간 동안 섭취한 양을 측정하였다.
- 24시간 식이를 박탈한 Control군은 Normal군에 비해 음식과 물의 섭취량이 통계적으로 유의미하게 증가하였다. (#, $p<0.01$; ### $p<0.001$ vs. Normal group)
- S1 추출물 20mg을 처치한 군에서 음식 섭취양이 감소하는 경향을 보임. S4 추출물 10mg을 처치한 군에서 음식 섭취양이 감소함. 그러나, 물의 섭취양은 두 군 모두 증가하는 경향을 보였으며, S1 10mg 군에서 유의한 증가를 보임.(*, $p<0.05$ vs. Control)



[Fig 2-43] 기능성 소재의 glucose uptake 효과. [S1: 다시마 발효물 (GABA5%), S2: 다시마 반발효물 (GABA 5%+Glutamic acid 5%), S3: 다시마추출물 (Glutamic acid 7%), S4: 굴다시마 발효물, S5: 굴발효물]



[Fig 2-44] 기능성 소재의 섭취조절 효능. [S1: 다시마 발효물 (GABA5%), S2: 다시마 반발효물 (GABA 5%+Glutamic acid 5%), S3: 다시마추출물 (Glutamic acid 7%), S4: 굴다시마 발효물, S5: 굴 발효물]

사. 2핵심 4세부:

항비만 효증성 검증 및 소재분류/DB구축 [성신여대 비만과학연구소]
⊙ **결론** • 농산물 1,214건, 수산물 346건의 항비만 SCI 논문을 검색 후 DB화함 • 해양생물을 이용한 비만개선효과 시험 (추가 진행 중)

(1) 소재분류 검색방법 및 DB 구축

○ 자료의 조사는 201년 2월1일부터 2013년 8월 15일까지 이루어졌으며 Pub MED (www.pubmed.com)와 Web of Science(www.webofscience.com)검색 포털을 이용하여 국내논문은 배제하고 국제 SCI에 게재된 국외논문을 중심으로 검색함. 해양수산물 소재 중 항비만 keyword로 obesity, appetite, 3T3-L1, lipid, fat, adipocyte, weight, diet, AMPK를 사용한 비만연구를 검색한 결과 가장 다수 검색된 소재순서로 미세조류 110건, 해조류 65건, 미역 61건, 다시마 31건, 모자반 30건, 조개류 28건, 감태 7건, 패 6건, 톳 5건, 우뭇가사리 3건 등이며 **총 346건이 DB화됨**. 이는 1차년의 농산물 DB건수(1,214건)에 비하여 1/3수준으로 해양생물의 비만연구가 향후 개척분야로 보임, (표 2-35)

[Table 2-35] 해양생물의 항비만효과

Table. Summarization of anti-obesity DB identified with keywords of the natural sea weeds sources (microalgae, green lavar, sea mustard, kelp, gulfweed, shell, ecklonia cava, ishige okamurae, fusiforme, ceylon moss) and keywords of obesity(obesity, appetite, 3T3-L1, lipid, fat, adipocyte, weight, diet, AMPK and so on)

Sources	Experimental Methods				계	Mechanism	Ref.
	In vitro	*In vivo*	Human	Review			
Microalgae	17	67	19	7	110	Adiponectin, C/EBPa ↑ in adipose tissue, AdipoR1, AdipoR2 ↑ in liver	1
Green lavar	26	25	4	10	65	TC, LDLc, TG ↓ in serum	2
Sea mustard	9	33	9	10	61	C/EBPa, PPARγ, aP2, TNFa, MCP-1, PAI-1 ↓ in 3T3-L1	3
Kelp	3	22	6	0	31	TNF-a, Leptin ↓ Adiponectin, PPARa, UCP2, UCP3, CPT-1 ↑ in plasma	4
Gulfweed	4	19	3	4	30	TC, TG, LDLc, MDA, NO, leptin, TNF-a ↓, HDLc, adiponectin ↑ in plasma	5
Shell	6	17	4	1	28	PPARγ, C/EBPa, FABP ↓, p-AMPK ↑ in 3T3-L1	6
Ecklonia cava	3	2	1	1	7	PPARγ2, C/EBPa, SREBP-1c, FAS, p-AMPK/AMPK ↑, TNFa, IL-1β, F4/80 ↓ in epididymal fat	7
Ishige okamurae	3	1	1	1	6	FAS, Bax/Bcl-2, caspase-3, caspase-9 ↑, PARP ↓ in 3T3-L1	8
Fusiforme	1	2	1	1	5	TC, LDLc, FC, TG ↓ in serum	9
Ceylon moss	2	1	0	0	3	PPARγ, aP2, NOX4 ↓ in 3T3-L1	10

1. Ichimura M et al, Nutr Res, 2013, 33(5), 397-405
2. BelHadj S et al, ARCHIVES OF PHYSIOLOGY AND BIOCHEMISTRY, 2013, 119(2), 81-87
3. Lee BY et al, NUTRITION RESEARCH, 2012, 32(6), 439-447
4. Jang WS et al, Evid Based Complement Alternat Med, 2013, PMID: 23365609
5. Ahmed HH et al, Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2012, 16(3), 112-120
6. Takahashi K et al, FISHERIES SCIENCE, 2012, 78(4), 897-903
7. Jun HS et al, EVIDENCE-BASED COMPLEMENTARY AND ALTERNATIVE MEDICINE, 2012, 418912
8. Park MH et al, Phytother Res, 2013, 27(6), 931-936
9. Amano H et al, FISHERIES SCIENCE, 2005, 71(5), 1160-1166
10. Lee BY, Preventive Nutrition and Food Science, 2012, 17(2), 129-135

○ 모든 논문이 검색방법(자원>표지물질>저자국가>저자>실험방법>Abstract:Mechanism>PDF paper> Journal>연도, 권 & page)에 따라 DB로 구축되었으며 다시마를 예로 들면, 다시마>ginsenosides>미국>Ji W., Gong B.>in vitro>Abstract> PDF>J. of ethnopharmacology> 2007. 1130 318-324로 검색되며 연도별, 저자국가별, 방법별, mechanism 별 정리된 다시마의 결과를 요약하면 다음 표 2-36와 같음.

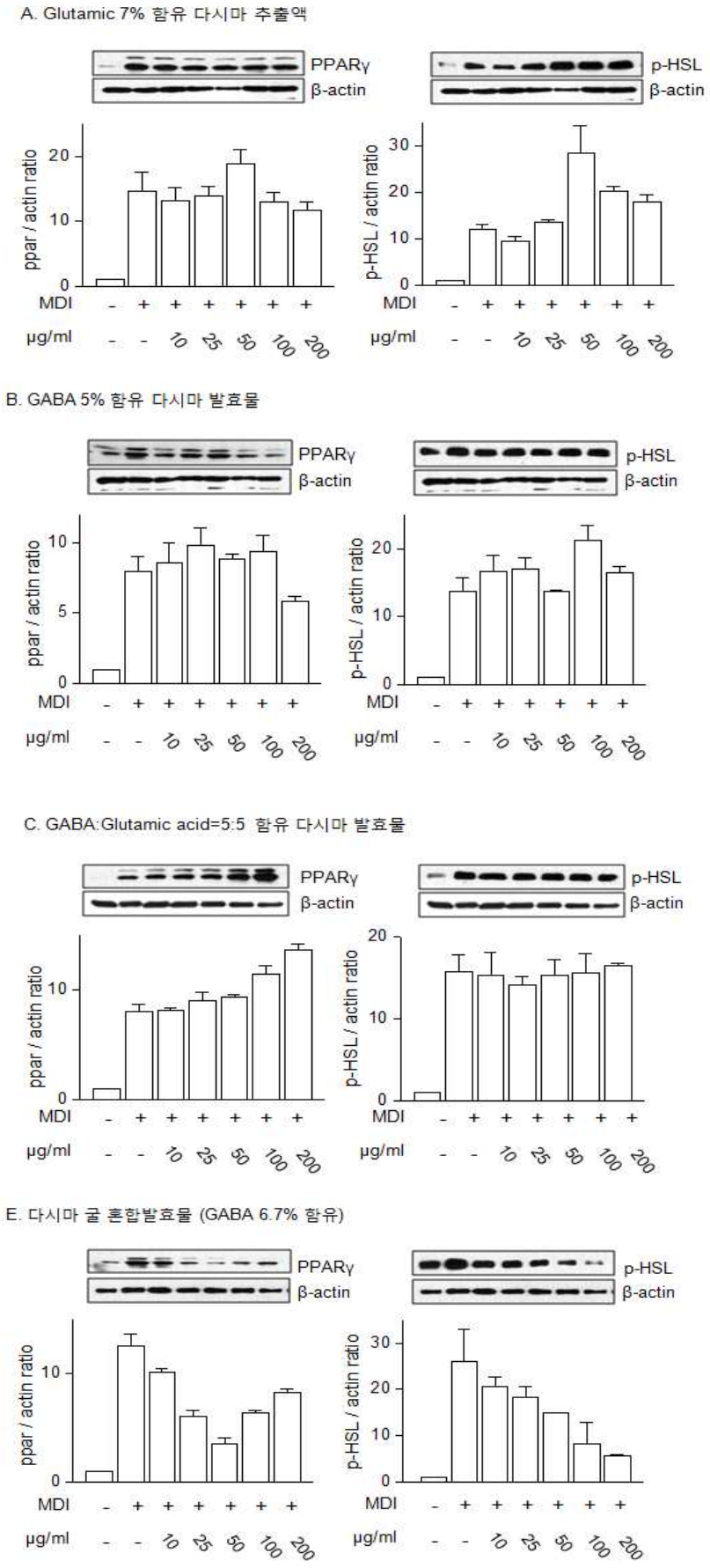
[Table 2-36] 다시마의 항비만연구 DB분석체계

날짜	논문	구분	학술지	식품	논문년도	제목	저널	교신저자	나라	실험종류	실험대상
20130617	○	국외	학술	다시마	2009	Anti-obesity effect on rodents of the traditional Japanese food, tororokombu, shaved Laminaria.	Biosci Biotechn	Miyata M	Japan	in vivo	mice
20130617	○	국외	학술	다시마	2013	Plutonium concentration and 240Pu/239Pu atom ratio in biota collected from Amchitka Island, Alaska: recent measurements using ICP-SFMS.	J Environ Radioact	Bu k	USA	in vitro	
20130617	○	국외	학술	다시마	2012	Expressed sequence tags (ESTs) based identification of genes and expression analysis of leukocyte cell-derived chemotaxin-2 (LECT2) from Epinephelus bruneus.	Gene	Harikrishnan R	South Ko	In vivo	
20130617	○	국외	학술	다시마	2013	Antiobesity Effects of the Ethanol Extract of Laminaria japonica Areshoung in High-Fat-Diet-Induced Obese Rat.	Evid Based	Jang WS	Korea	In vivo	rats
20130617	○	국외	학술	다시마	2012	The herbal composition GGEx18 from Laminaria japonica, Rheum palmatum, and Ephedra sinica inhibits high-fat diet-induced hepatic steatosis via hepatic PPARα activation.	Pharm Biol	Shin SS	Korea	In vivo	mice
20130617	○	국외	학술	다시마	2012	Effect of purified β-glucans derived from Laminaria digitata, Laminaria hyperborea and Saccharomyces cerevisiae on piglet performance, selected bacterial populations, volatile fatty acids and pro-inflammatory cytokines in the gastrointestinal tract of pigs	Br J Nutr	Sweeney T	Ireland	In vivo	pig
20130617	○	국외	학술	다시마	2011	Laminaria japonica as a food for the prevention of obesity and diabetes.	Adv Food	Shirosaki M	Japan	In vivo	mice
20130617	○	국외	학술	다시마	2010	Effect of alginate on satiation, appetite, gastric function, and selected gut satiety hormones in overweight and obesity	Obesity	Odunsi ST	USA	human	
20130625	○	국외	학술	다시마	2000	Effect of haidonghua powder(HDHP) on hypothalamic obesity in rats	Zhongguo Zhong	Wang W	China	In vivo	rat
20130625	○	국외	학술	다시마	1996	Effects of soluble sodium alginate on cholesterol excretion and glucose tolerance in rats.	J Ethnoph	Kimura Y	Japan	In vivo	rat
20130625	○	국외	학술	다시마	2012	Effects of Laminaria japonica on the physico-chemical and sensory characteristics of reduced-fat pork patties	Meat Sci	Choi YS	Korea	in vitro	
20130625	○	국외	학술	다시마	2013	Evaluation of 8-week body weight control program including sea tangle (Laminaria japonica) supplementation in Korean female college students.	Nutr Res Pract	YOU JS	Korea	human	여대생
20130625	○	국외	학술	다시마	2012	Effect and mechanism of fucoidan derivatives from Laminaria japonica in experimental adenine-induced chronic kidney disease.	J Ethnoph	Wang J	China	In vivo	rat
20130625	○	국외	학술	다시마	2002	Supplementation of algae to the diet of pigs: a new possibility to improve the iodine content in the meat.	J Anim Physiol	He ML	Germany	In vivo	pigs
20130626	○	국외	학술	다시마	2013	The effects of liquid versus spray-dried Laminaria digitata extract on selected bacterial groups in the piglet gastrointestinal tract (GIT) microbiota	Anaerobe	Murphy P	Ireland	In vivo	piglets
20130626	○	국외	학술	다시마	2008	Suppression of thyroid function during ingestion of seaweed "Kombu" (Laminaria japonoca) in normal Japanese adults.	Endocr J	Japan	Miyai K	human	
20130626	○	국외	학술	다시마	2008	Effects of seaweed supplementation on blood glucose concentration, lipid profile, and antioxidant enzyme activities in patients with type 2 diabetes	Nutr Res Pract	Korea	Kim MS	human	
20130710	O	국외	학술	다시마	2013	The Effect of kelp on serum lipids of hyperlipidemia in rats	JOURNAL OF	Guo, Yunjiang	China	in vivo	rat
20130710	X	국외	학술	다시마	2012	The herbal composition GGEx18 from Laminaria japonica, Rheum palmatum, and Ephedra sinica reduces obesity via skeletal muscle AMPK and PPAR alpha	PHARMACEUTICAL	Yoon, Michung	Korea	in vivo in vitro	mice skeletal muscle
20130710	O	국외	학술	다시마	2009	Dietary Supplementation of Sea Tangle (Laminaria japonica) Improves Blood Glucose and LipidMetabolism in the Streptozotocin-induced Diabetic Rats	FOOD SCIENCE AND	Kim, Hyeon-A	Korea	in vivo	Rat

(2) 수산물 소재의 항비만효과 반복시험

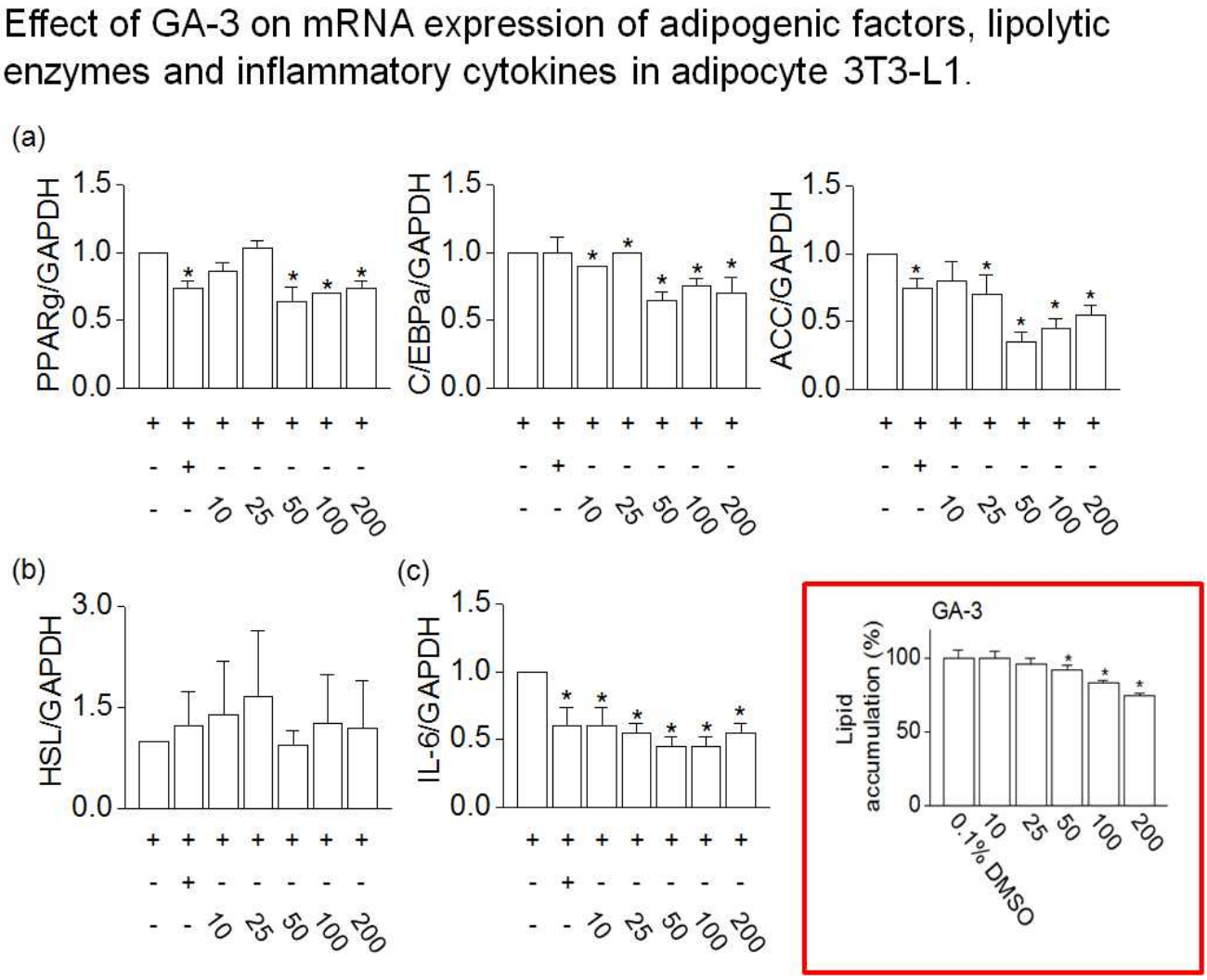
(1) 갈조류(다시마) 열수추출물의 지질합성 및 지질분해능 (in vitro)

다시마로부터 추출된 3종류의 표지물질 (glutamate 7%, GABA 5%, Glutamate:GABA= 5:5)로 구성된 추출물을 이용하여 지질합성 (PPARr) 지질분해능(HSL) 단백질 발현을 살펴본 결과, glutamate 7%가 가장 효과적임. GABA 5%는 경향이 보이지않고 Glutamate:GABA= 5:5는 PPARr만 증가시킴. 그 외 다시마-굴혼합물, 다시마-녹차혼합물은 PPARr, HSL 모두 감소시킴.



[Fig 2-45] 다시마 열수추출물의 지질합성 및 지질분해능

(2) 홍조류 GA-3의 비만개선 효과



[Fig 2-46] 홍조류의 지질합성 및 지질분해능

3. 3차년 핵심별 연구결과

3. 3차년 핵심별 연구결과

가. 1핵심 1세부

비만개선용 개별인정 소재의 전·임상시험 [성신여대 이명숙, 용역: 한양대학교 박용순교수 임상시험, CRO:
⊙ **결론** ○ GMP기관의 안정성 및 독성 test (단회 경구투여 독성시험, 복귀돌연변이시험, 유전자돌연변이 유발성, 염색체이상시험, 소핵시험 시행) 결과, 이상반응이 없으므로 검정콩껍질추출물 섭취가 인체에 안전하다고 판정함. ○ 비만인 피험자에서 검정콩껍질추출물 섭취에 따른 총 체지방량 개선 효과는 없었으나 검정콩껍질추출물 섭취는 복부지방지표인 허리둘레가 유의적으로 감소하였으며 복부지방과 관련성이 높은 혈중 TG 및 LDL-C 등 동맥경화지수를 통계적으로 유의하게 억제하여 혈중지질 개선에 유효함. ○ 유효 농수산물 대상 전임상 반복시험은 GMP기관인 가천의대 동물실에서 사육 관리하였으며 최초로 prevention treatment 실험디자인으로 시행함. (한천-Free 우뭇가사리 추출물 & 검정콩 껍질추출물이용)

(1) 비만개선용 개별인정 소재(안토시안-rich 검정콩추출물)의 임상시험

(가) 임상시험 IRB 승인과정 요약:

연구계획서 번호	SSWU-BF-GE (2014년 04월 10일 한양대학교 IRB 승인)
연구제목	**검정콩껍질추출물의 섭취가 체지방과 혈중 지질에 미치는 영향**
목적	○ **1차 목적** : 검정콩껍질추출물이 체지방량(DEXA)에 미치는 영향을 위약과 비교하여 평가. ○ **2차 목적** : 검정콩껍질추출물이 체지방률과 제지방량(DEXA), 신체계측지표, 지질대사지표, 염증매개 사이토카인에 미치는 영향을 위약과 비교 평가.
연구 책임자	한양대학교 식품영양학과 박용순 교수, 공동:한양대학교병원 가정의학과 박훈기
선정기준	1) 스크리닝 검사당시 연령이 만 19세 이상, 65세 이하인 성인 남녀 2) 검사당시 BMI>25kg/㎡ 이상 또는 허리둘레가 남성> 90cm, 여성> 85cm 이상 3) 본 연구에 대한 자세한 설명을 듣고 완전히 이해한 후, 자의로 참여를 결정하고 주의사항을 준수하기로 서면 동의한 자

제외기준	1) 스크리닝 검사 전 3개월 이내에 10%이상 체중이 감소한 자 2) 스크리닝 검사 전 4주 이내에 비만치료제, 지질저하제 등 연구결과에 영향을 미칠 수 있는 의약품이나 건강기능식품을 섭취한 경험이 있는 자(단, 첫 섭취일 전 4주간의 휴약기간을 거쳐 참가가능) 3) 질병: 심혈관계 질환, 면역 관련 질환 또는 중증의 간, 신부전이 있거나 과거력이 있는 자, 위장관계 질환(예: 크론병)이나 위장관계 수술(단, 단순맹장수술이나 탈장수술은 제외)의 과거력이 있는 자 4) 약물 및 건강기능식품에 임상적으로 유의한 과민반응의 병력이 있는 자, 스크리닝 검사 전 2개월 이내에 항정신병 약물치료를 받은 경험이 있는 자, 약물 또는 알코올 남용 병력이 있는 자 5) 스크리닝 검사 전 2개월 이내에 타 연구에 참여한 자 6) 임상병리 검사에서 다음에 해당하는 결과를 보이는 자 ☞ AST, ALT > 참고범위 상한치의 3배 ☞ Serum Creatinine >2.0mg/dL, Creatine Kinase(CK)> 참고범위 상한치의 3배 6) 수축기혈압 180mmHg, 이완기혈압이 110mmHg이상인 자 7) 폐경 여성, 임신 혹은 수유중인 여성, 임신 가능성이 있는 가임기여성 중 적절한 피임법의 시행을 수용하지 않은 경우(단, 불임수술을 받은 여성은 제외) 8) 기타 사유로 연구 참여에 부적합하다고 판단한 자
피험자 수	총 80 명 (섭취군별 40명씩 총 80 명)
연구방법	○ **[스크리닝 검사]** 자원자에 한하여 1차 방문 예정일로부터 4주 이내에 서면동의서 작성, 임상병리 검사 등 스크리닝 검사gn 적합선을 판정함. ○ **[0 week :1차 방문]** 1차 방문 예정일에 신체계측 후 피험자를 최종 선정한 후 검정콩껍질추출물 섭취군과 위약 섭취군에 1:1 무작위배정함. 피험자는 4주 분량의 연구용제품을 제공받고 이후 4주간 연구용제품을 섭취하며 일상생활을 함. ○ **[4 week :2차 방문]** 피험자는 2차 방문 예정일에 지난 4주간 섭취하고 남은 연구용제품을 반납하고, 정해진 검사를 실시한 다음 4주 분량의 연구용제품을 제공받고 이후 4주간 연구용제품을 섭취하며 일상생활을 함. ○ **[8 week: 3차 방문]** 피험자는 3차 방문 예정일에 한양대학교 식품영양학과에 방문하여 지질대사지표 검사, DEXA 촬영 등의 정해진 검사를 수행하며, 지난 4주간 섭취하고 남은 연구용제품을 반납하고, 총 8주간의 연구 참여를 종료함.
섭취방법	○ 검정콩껍질 추출물군(TEST): 1일 3회, 1회 2캡슐(검정콩껍질추출물로써 2.5g/일): 아침/점심/저녁 식전 경구섭취 ○ 위약군(PLACEBO): 1일 3회, 1회 2캡슐(2.5g/일): 아침/점심/저녁 식전 경구섭취

평가기준 및 방법	○ **유효성 평가** 1) 1차 유효성 평가: 체지방량(DEXA) 2) 2차 유효성 평가 • 체지방률, 제지방량(DEXA) • 신체계측지표(체중, BMI, 허리둘레, 엉덩이둘레, 허리・엉덩이둘레비) • 지질대사지표 검사(Total cholesterol, Triglyceride, LDL-C, HDL-C, Non HDL-C) • 염증매개 사이토카인검사(TNF-α, IL-6, IL-10, MCP-1) ○ **안전성 평가** • 자・타각 증상 등 이상반응 모니터링 • 임상병리 검사 • 활력징후
통계분석	○ 인구학적 자료는 기술통계학적 분석시행. ○ 유효성 평가항목인 체지방량(DEXA), 체지방률, 제지방량(DEXA), 신체계측지표, 지질대사지표, 염증매개 사이토카인 등은 섭취군 간 차이를 비교하기 위하여 RM-ANOVA 혹은 linear mixed-effects model 등 적용. 각 섭취군의 방문 별, 연구용제품 섭취 전 후의 변화에 대해 RM-ANOVA, linear mixed effects model, paired t-test 등을 적용하여 검정함. 각 피험자의 특성에 따른 정상화율의 차이는 Chi-square test) 혹은 Fisher's exact test 등 이용함. ○ 안전성 평가를 위해 이상반응 발생 양상 등을 비교. ○ 임상병리 검사, 활력징후 등은 기술통계학적으로 분석하고, 섭취 전 후 변화 양상 등을 비교.

(나) 검정콩껍질추출물 섭취가 체지방 및 혈중 지질에 미치는 효과와 안전성을 평가하기 위한 8 weeks-radomization-double blind-placebo control research의 결과.

① 목표 피험자수 (63명) 및 탈락률/ 탈락사유

○ 총 133명의 자원자가 서면동의서에 동의 후 스크리닝 검사를 통해 총 80명이 적격 피험자로 선정됨.

○ 선정된 피험자는 무작위배정, 이중눈가림 방법으로 검정콩껍질추출물군, 위약군에 1:1 무작위 배정됨

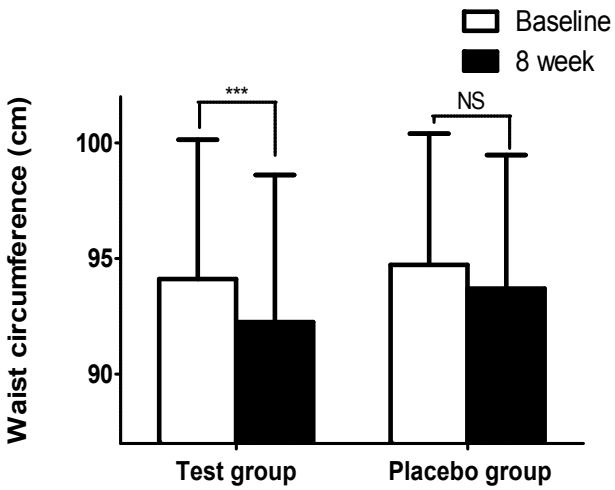
○ 검정콩껍질추출물군 40명 중 8명, 위약군 40명 중 9명의 피험자가 중도탈락함에 따라, 총 63명 (검정콩껍질추출물군 32명, 위약군 31명)의 피험자가 연구계획서 (프로토콜)에 명시한 바에 따라 완료함. [Table 3-1]

[Table 3-1] 탈락현황

섭취군 중도탈락 사유	Test group	Placebo group	Total
동의철회	2	2	4
프로토콜 위반	-	1	1
이상반응	-	1	1
순응도미달	6	5	11
Total	8	9	17

② 신체계측지표

- **체지방변화**: 계획서 순응 피험자군 (Per Protocol Set) 63명을 대상으로 1차 유효성 평가 항목인 체지방량을 비교한 결과, test와 control 두 섭취군 간 통계적으로 유의한 차이가 없음 (p>0.05).
- **복부지방변화**: 복부지방을 표현하는 허리둘레는 test군에서 유의적으로 감소하였으나 (p<0.0001) 대조군은 변화가 없음. [Fig 3-1]
- 복부지방 지표인 허리둘레는 검정콩껍질추출물군에서 유의하게 감소되었다. 섭취 전 · 8주 후 체지방량 변화는 BMI (r=0.484, p<0.0001)의 변화량과 정의 상관성(positive correlation)를, 허리둘레지표는 BMI (r=0.413, p=0.001) 및 WHR(r=0.686, p<001)지표들과 유의적으로 정의 상관성(positive correlation)을 보임.
-



[Fig 3-1] 검정콩추출물의 8 weeks-radomization-double blind-placebo control 임상시험에서 허리둘레(waist circumference)의 변화 (***; p<0.0001)

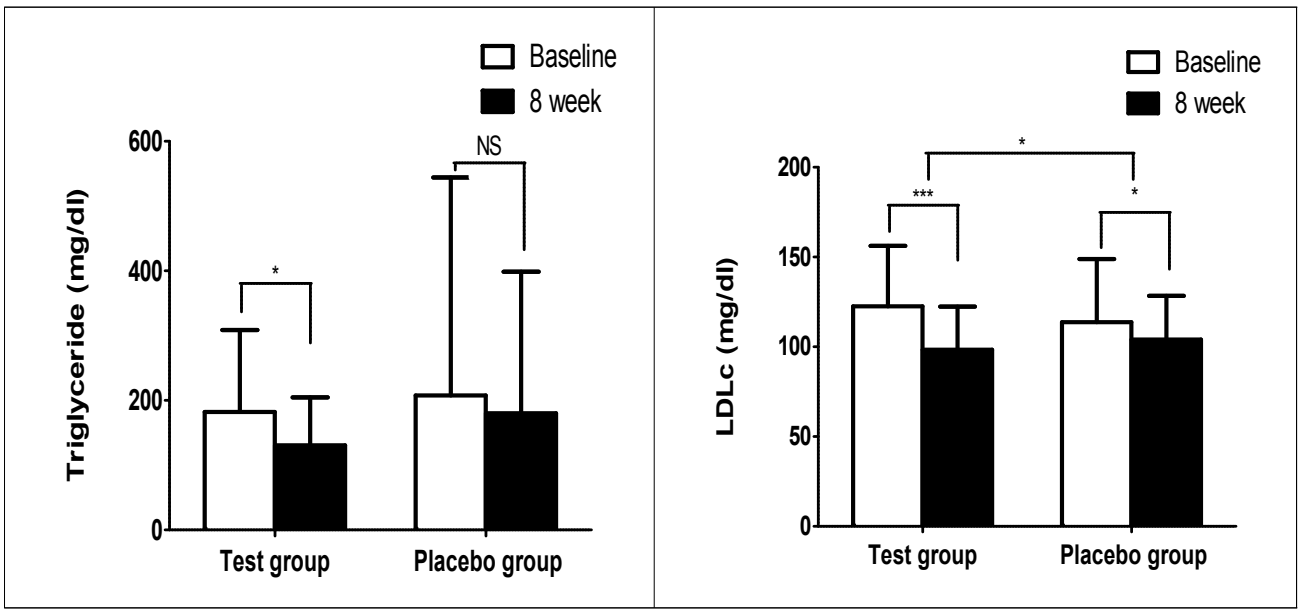
③ 지질대사지표 변화:

- 2차 유효성 평가항목인 TG, LDLc, Non-HDLc(TC-HDLc), LDLc/HDLc, (TC-HDLc)/HDLc 분석 결과, 섭취 전과 섭취 8주 후 LDLc, non-HDLc 및 /LDL/HDL은 검정콩껍질추출물군과 위약군 두섭취군 간의 차이를 보이며 혈중 TC, LDLc, HDLc, Non-HDLc, VLDLc 지표는 검정콩껍질추출물군과 위약군 모두 통계적으로 유의하게 감소하였으나 두 섭취군 간의 차이는 없음. [Table 3-2] [Fig 3-2]

[Table 3-2] 섭취 전·섭취 8주 후 지질대사지표 변화

지표	Test group (n=32)			Placebo group (n=31)			p-value[2)]
	Baseline	8 week	p-value[1)]	Baseline	8 week	p-value[1)]	
TC (mg/dl)	227.63 ± 39.66	178.56 ± 31.44	<.0001***	222.58 ± 47.55	186.81 ± 37.78	<.0001***	0.071
TG (mg/dl)	182.41 ± 126.23	130.53 ± 74.19	0.012*	207.74 ± 336.57	180.03 ± 218.68	0.283	0.451
LDLc (mg/dl)	122.50 ± 33.71	98.47 ± 23.91	<.0001***	113.81 ± 35.16	104.06 ± 24.39	0.024*	0.011*
HDLc (mg/dl)	56.00 ± 6.44	49.78 ± 7.23	<.0001***	56.06 ± 8.47	49.42 ± 7.96	<.0001***	0.799
Non-HDLc (mg/dl)	171.63 ± 38.08	128.78 ± 32.19	<.0001***	166.52 ± 46.45	137.39 ± 37.24	<.0001***	0.047*
VLDLc (mg/dl)	49.13 ± 17.11	30.31 ± 17.4	<.0001***	52.71 ± 29.97	33.32 ± 25.74	<.0001***	0.904
TC/HDLc	4.10 ± 0.74	3.67 ± 0.88	0.0003***	4.07 ± 1.26	3.87 ± 1.05	0.068	0.135
LDL-C/HDLc	2.21 ± 0.64	2.02 ± 0.60	0.015*	2.04 ± 0.57	2.15 ± 0.58	0.108	0.004**
TG/HDLc	3.34 ± 2.43	2.72 ± 1.73	0.115	4.81 ± 11.65	4.09 ± 6.30	0.489	0.919
(TC-HDLc)/HDLc	3.10 ± 0.74	2.67 ± 0.88	0.0003***	3.07 ± 1.26	2.87 ± 1.05	0.068	0.135

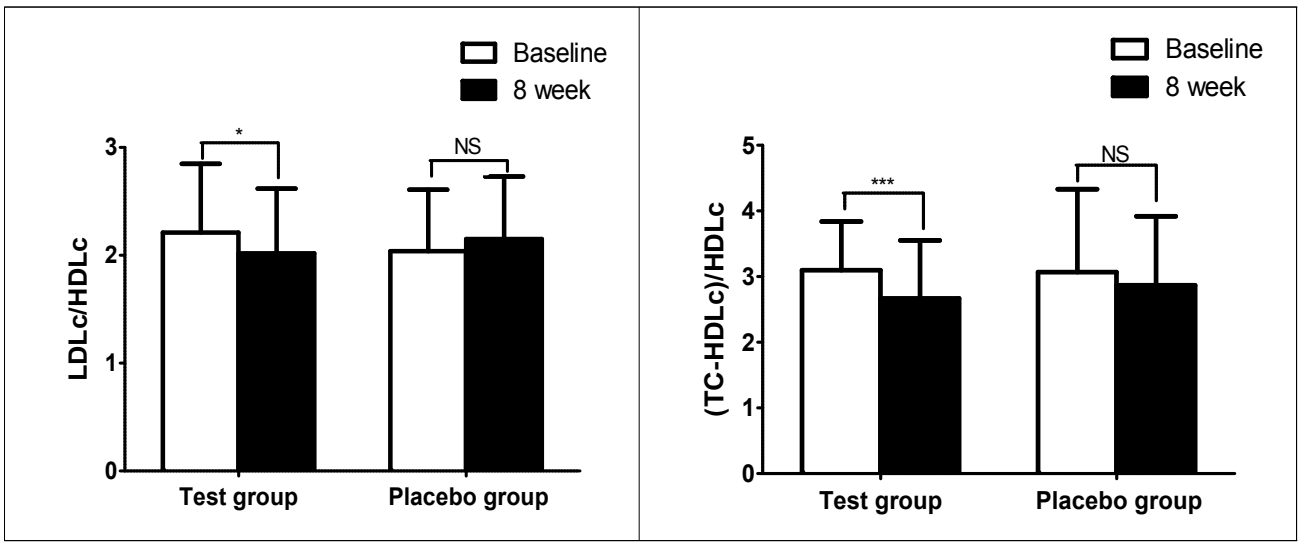
Values are presented as mean ± SD, [1)] Analyzed by paired *t*-test,[2)] Analyzed by RM ANOVA; *$p<0.05$, **$p<0.01$, ***$p<0.001$



[Fig 3-2] 검정콩추출물의 8 weeks-radomization-double blind-placebo control 임상시험에서 혈중 중성지방과 LDLc의 변화 (***; $p<0.0001$)

- 혈중 TG 및 혈중 지질대사지표를 이용한 동맥경화지수인 TC/HDLc, LDLc/HDLc, (TC-HDLc)/HDLc 등은 검정콩껍질추출물군에서 유의하게 감소하였으나 위약군에서는 차이가 없었다. TG/HDLc은 검정콩껍질추출물군과 위약군 모두 유의적인 차이가 없었다. 특히,

검정콩껍질추출물군은 복부지방 지표인 허리둘레를 유의하게 감소시켰으며, 아울러 복부지방과 연관성이 높은 TG, LDLc 및 동맥경화지수를 억제하여 일관성 있는 결과로 보임. [Fig 3-3]



[Fig 3-3] 검정콩추출물의 8 weeks-radomization-double blind-placebo control 임상시험에서 동맥경화지수의 변화 (***; p<0.0001)

④ 식이섭취 및 신체활동량 변화:

- 모든 피험자를 대상으로 식이섭취조사 및 신체활동조사를 하였으며, '배정된 대로 분석(Intention-to-treat; ITT)' 원칙에 따라 등록피험자 총 80명을 대상으로 분석 시, 검정콩껍질추출물군과 위약군의 열량영양소 및 식이섬유 섭취량에 대한 두 섭취군간의 차이가 없음.
- 신체활동량지수인 MET-minutes/week은 test군에서 감소하고 placebo군에서 증가하는 경향이 있으나 두 섭취군 간 통계적으로 유의한 차이가 없음. 결론적으로 피험자들이 연구에 참여하는 동안 일상생활을 일정하게 유지하였음을 알 수 있었고, 식이섭취와 신체활동이 본 연구 결과에 미치는 영향이 거의 없을 것으로 판단함. [Table 3-3]

[Table 3-3] 방문별 신체활동조사

	Test group (n=40)				Placebo group (n=40)				p-value[1)]
	Baseline	4 week	8 week	p-value[1)]	Baseline	4 week	8 week	p-value[1)]	
MET-minutes/week	3924.50 ± 6194.52	2892.31 ± 4299.00	2491.58 ± 2978.86	0.055	2985.20 ± 3521.98	2892.97 ± 3762.92	3761.62 ± 4962.55	0.410	0.064

⑤ 안전성 평가

최소 1회 이상 연구용제품을 섭취한 피험자 80명(Safety군)을 대상으로 이상반응, 임상병리 검사(혈액학적 검사, 혈액생화학적 검사, 뇨검사), 활력징후 등의 측정 결과를 분석한 결과, 총 80명의 피험자 중 17명의 피험자에서 총 19건의 경도 또는 중등도 이상반응이 발생하였으나 두 섭취군 간 이상반응 발생에 차이가 없었으며, 연구용제품 섭취와 인과관계가 없다고 판단함.

⑥ 요약

본 연구를 통해 비만인 피험자에서 검정콩껍질추출물 섭취(test)에 따른 총 체지방량 개선 효과는 없었으나 검정콩껍질추출물 섭취는 복부지방지표인 허리둘레가 유의적으로 감소하였으며 복부지방과 관련성이 높은 혈중 TG 및 LDL-C 등 동맥경화지수를 유의하게 억제하여 혈중지질 개선에 유효함. 또한 본 연구가 진행되는 동안 임상적으로 의미 있는 이상반응이나 신체변화가 관찰되지 않아서 검정콩껍질추출물 섭취가 인체에 안전하다고 판단함.

임상시험 CRO: [(주)헬스케어크레임스엔드멘내지멘트]→계획서(p79), 보고서(p61), 증례기록서(p71)

SSWU-BF-GE Confidential October 2014

계획서번호	SSWU-BF-GE
연구용제품	검정콩껍질추출물

연 구 결 과 보 고 서

검정콩껍질추출물의 섭취가 체지방과 혈중 지질에 미치는 영향

2014년 10월

CONFIDENTIAL

본 연구는 Good Clinical Practice(GCP)를 준수하여 수행되었습니다. 이 성적서는 기밀사항이며, 의뢰자의 승인 없이 다시 작성하거나 공개할 수 없습니다

SSWU-BF-GE Confidential October 2014

■ 연 구 결 과 보 고 서

연구제목	검정콩껍질추출물의 섭취가 체지방과 혈중 지질에 미치는 영향
단계	연구
연구실시기관	한양대학교 식품영양학과
연구책임자	한양대학교 식품영양학과 부교수 박 용 순
공동연구책임자	한양대학교병원 가정의학과 교수 박 혜 기
연구담당자	한양대학교 식품영양학과 허은경
참여연구원	한양대학교 식품영양학과 김은영, 진유리, 김수현, 오유나, 조은유, 이지혜, 김유나, 고유경, 이주선
의뢰자	성신여자대학교 식품영양학과 교수 이영숙
연구용제품명	연구제품 - 검정콩껍질추출물 대조제품 - 위약

⑵ GLP 기관으로부터의 안정성 및 독성평가 시험결과 [바이오톡스텍: Biotoxtech]

① 시험군 투여량에 따른 독성 평가 [본 연구실]

○ 검정콩 유래 CJ-C3G+D3G를 이용하여 **급성 및 장기 독성검사 평가를 함**. 독성검사를 위하여 C57BL/6J계통 수컷 mice를 이용하여 시험물질을 경구투여한 시험군의 구성은 다음과 같음.

○ **결론**: 이상의 결과로 보아 시험물질 CJ-C3G+D3G은 GHS 구분 5(LD_{50} cut-off:≥2,500 mg/kg b.w)로 사료됨. 이 모든 결과를 토대로 제주산 감태 유래 항비만 소재인 CJ-C3G+D3G은 기능성 소재로의 충분한 가능성과 안전성을 갖춘 것으로 판단됨. [Table 3-4]

[Table 3-4] 단계별 투여량 및 평가

step	투여량 (mg/Kg)	동물수	비고
1 단계	1000 mg/Kg	8	• 12주 투여시 2마리에서 털이 빠졌으나 사망수 없음.
2 단계	1250 mg/Kg	8	• 투여 후 72시간 동안 사망수 없음.
3 단계	2500 mg/Kg	8	• 투여 후 72시간 째 2마리 사망.
4 단계	5000 mg/Kg	8	• 투여 후 24시간 50% 사망함.
5 단계	125 mg/Kg	10	• 12주 투여 기감동안 사망동물 및 특이한 일반증상이 관찰되지 않았음.
6 단계	250 mg/Kg	10	

② 검정콩 추출물의 Sprague-Dawley 랫드를 이용한 단회 경구 투여 독성시험 [Biotoxtech:B13783]

○ 시험목적: 암수 Sprague-Dawley 랫드를 이용하여 시험물질인 검정콩의 추출물을 단회 경구투여시 나타나는 독성반응을 관찰하고, 개략의 치사량을 구하기 위하여 실시. [Table 3-5]

○ 시험방법

- 투여경로 및 투여횟수 ; 단회 경구투여
- 군구성 및 투여용량 (시험물질의 임상적용 예정용량 : 약 2.5g/human)
- 투여 후 14일 동안, 일반증상의 관찰 및 체중측정을 실시하였고, 관찰기간 종료 시에 안락사 시켜 부검 (부검시 육안소견이 관찰되지 않아, 조직병리학적 검사를 실시하지 않음)

○ 관찰 : 투여군에서 사망례는 관찰되지 않았고, 투여군에서 투여 후 1일에 시험물질색변이 관찰되었으나, 투여 후 2일부터 일반증상의 이상은 관찰되지 않았음

○ 결론: 검정콩추출물을 랫드에 단회 경구투여한 결과, 개략의 치사량은 암수 모두 5,000 mg/kg 을 상회하는 것으로 판단됨.

[Table 3-5] 단회경구투여 독성시험의 투여용량

군		투여용량 (mg/kg)	투여액량 (ml/kg)	동물수(개체번호)	
				수컷	암컷
G1	대조군	0	10	5 (1101~1105)	5 (2101~2105)
G2	시험물질 투여군	5,000	10	5 (1201~1205)	5 (2201~2205)

[Table 3-6] 단회경구투여 독성시험의 일반증상의 관찰 및 체중측정

Group/ Dose	Animal (Female)	day's after dosing					Necropsy findings	
		0	1	3	7	14	Organs	findings
G1	mean	133.9	154.0	166.1	183.0	218.0	all	Unremarkable findings
	S.D	6.0	7.6	8.3	8.9	16.2		
	N	5	5	5	5	5		
G2	mean	133.5	151.9	166.0	184.5	218.0	all	Unremarkable findings
	S.D	2.7	2.6	3.6	8.1	11.0		
	N	5	5	5	5	5		

[Table 3-7] 단회경구투여 독성시험의 일반증상의 관찰 및 체중측정

Group/ Dose	Animal (Male)	day's after dosing					Necropsy findings	
		0	1	3	7	14	Organs	findings
G1	mean	149.3	171.7	193.6	234.5	300.7	all	Unremarkable findings
	S.D	3.3	4.2	6.0	6.5	11.8		
	N	5	5	5	5	5		
G2	mean	149.4	172.5	193.9	234.5	299.6	all	Unremarkable findings
	S.D	5.0	5.4	6.0	7.2	9.8		
	N	5	5	5	5	5		

③ 검정콩추출물의 세균을 이용한 복귀돌연변이시험 [Biotoxtech: B13784]

○ 시험목적: 검정콩 추출물의 유전자돌연변이 유발성을 히스티딘 요구성인 살모넬라균(TA98, TA100, TA1535 및 TA1537 균주)과 트립토판 요구성인 대장균(WP2*uvr*A(pkM101)균주)을 이용하여 대사활성화 비존재하 및 존재하의 경우에 대해 각각 검토.

○ 시험방법: 투여경로 및 투여횟수: 복강내 투여, 용량설정 (음성대조군 및 양성대조군 설정) [Table 3-8]

[Table 3-8] 복귀돌연변이시험의 투여경로 및 횟수와 용량설정

균주명	S9 mix	본시험의 용량(ug/plate)
TA98, TA1535, TA1537, WP2*uvr*A(pkM101)	-	5,000, 2,500, 1,250, 625, 313
TA100	-	1,250, 625, 313, 156, 78.1, 39.1
TA98, TA100, TA1535, TA1537, WP2*uvr*A(pkM101)	+	5,000, 2,500, 1,250, 625, 313

○ 관찰 : 대사활성화 비존재 및 존재하의 TA98 균주의 2,500 및 5,000ug/plate에서 복귀변이 콜로니수가 음성대조군과 비교하여 각각 1.5~1.9배, 대사활성화 존재하의 TA100 및 TA1537 균주의 5,000ug/ plate에서 약 1.5~1.8배 증가가 관찰되었음 (양성대조군의 복귀변이 콜로니수는 음성대조군과 비교하여 2배 이상 증가)

○ 대사활성화 비존재 및 존재하의 TA98 균주, 대사활성화존재하의 TA100 및 TA1537 균주에서 1.5~1.9배 재현성있게 증가하였으나, 2배 이상 증가하지 않음. 검정콩추출물의 유전자돌연변이 유발성은 음성으로 판정.

[Table 3-9] 검정콩껍질 추출물의 유전자돌연변이 유발성

Strain	Test substance	Dose level (ug/plate)	Absence		presence	
			mean	S.D	mean	S.D
TA98	negative (water)	0	15	5	32	4
	Black soybean extract	5,000	26	6	44	12
	Positive (2-NF)	5.0	682	28	356	6
TA100	negative (water)	0	84	13	104	15
	Black soybean extract	1,250	89	11	160	13
	Positive (SA)	1.5	525	77	706	66
TA1535	negative (water)	0	10	1	5	1
	Black soybean extract	5,000	9	0	7	1
	Positive (SA)	1.5	445	55	125	25
TA1537	negative (water)	0	6	1	17	2
	Black soybean extract	5,000	8	3	30	2
	Positive (9-AA)	80.0	352	48	134	10
WP2*uvr*A	negative (water)	0	102	10	146	15
	Black soybean extract	5,000	113	13	169	4
	Positive (AF-2)	0.005	646	64	443	29

④ 검정콩추출물의 포유류 배양세포를 이용한 염색체이상시험 [Biotoxtech: B13785]

- ○ 시험목적 : 염색체이상 유발성을 포유류 배양세포주 (Chinese Hamster Lung(CHL/IU) cell line)를 사용하여 검토
- ○ 시험방법: Chinese Hamster Lung(CHL/IU) 배양세포를 이용한 계대배양. [Table 3-10]
- ○ 관찰 : 구조이상을 가진 세포의 출현빈도는 단시간처리법의 대사활성화비존재하 및 존재하, 연속처리법의 대사활성화비존재하에서 5%미만으로, 음성대조군과 비교하여 통계학적인 유의성은 없음. 수적이상을 가진 세포의 출현빈도는 단시간처리법의 대사활성화 비존재하의 313 ug/ml 용량에서 3.5%로, 음성대조군과 비교하여 통계학적인 유의성은 관찰되었으나, 5% 미만으로 음성임. 단시간처리법의 대사활성화존재하 및 연속처리법의 대사활성화비존재에서 염색체이상을 가진 세포의 출현빈도는 5% 미만으로 염색체이상 유발작용은 없으며, 음성대조군과 비교하여 통계학적인 유의성은 관찰되지 않음.
- ○ 결론 : 본 시험조건하에서 시험물질인 검정콩추출물은 염색체이상을 유발하지 않는 것으로 판단.

[Table 3-10] 배양세포를 이용한 계대배양조건

계 열	S9 mix	본시험의 용량(ug/ml)
단시간처리법 (6시간처리)	-	313. 156, 78.1, 39.1
	+	4,200, 2,100, 1,050, 525
연속처리법 (24시간처리)	-	76.0, 38.0, 19.0, 9.50

[Table 3-11] 검정콩추출물의 염색체이상시험

Test substance	Dose (ug/ml)	S9 mix	Trt-Rec Time(hr)	Number of cell analyzed	Number of cells with structural aberrations	Number of cells with numerical aberrations
negative (water)	0	-	6-18	100	0	0
Black soybean extract	313	-	6-18	100	0	3.5 (3.5%)
Positive (MMC)	0.1	-	6-18	100	20 (20%)	0
negative (water)	0	+	6-18	100	0.5 (0.5%)	0
Black soybean extract	4,200	+	6-18	100	3.5 (3.5%)	1 (1.0%)
Positive (B[a]P)	20	+	6-18	100	25 (25%)	0
negative (water)	0	-	24-0	100	0.5 (0.5%)	0
Black soybean extract	76.0	-	24-0	100	0	0.5 (0.5)
Positive (MMC)	0.1	-	24-0	100	47 (47%)	0

⑤ 검정콩추출물의 마우스를 이용한 소핵시험 [Biotoxtech: B13786]

○ 시험목적 : 검정콩추출물의 마우스 골수세포에 대한 소핵유발유무를 평가하기 위하여 ICR 마우스를 이용하여 단회 경구투여하여 검토

○ 시험방법: 투여 후 24, 48 및 72시간에 골수를 채취하여 소핵유발빈도를 관찰한 결과, 모든 관찰 시간대에서 소핵유발은 증가되지 않음. 즉 일반적으로 사용되는 투여 후 24시간을 본 시험의 골수채취시간으로 설정

[Table 3-12] 군 구성 및 투여용량

군		투여용량 (mg/kg)	투여액량 (ml/kg)	투여횟수	투여경로	마리수 (개체번호)
G1	음성대조	0	10	1	경구	5 (1101-1105)
G2	저용량	1,250	10	1	경구	5 (1201-1205)
G3	중용량	2,500	10	1	경구	5 (1301-1305)
G4	고용량	5,000	10	1	경구	5 (1401-1405)
G5	양성대조 (Mytomycin C)	2	10	1	복강내	5 (1501-1505)

○ 관찰: 시험물질군에서는 다염성적혈구 (Polychromatic erythrocyte, PCE) 중 소핵다염성 적혈구 (Micronucleated polychromatic erythrocyte, MNPCE)의 출현빈도는 음성대조군과 비교하여 유의한 증가는 관찰되지 않음. 또한 총적혈구에 대한 다염성적혈구의 비율도 음성대조군과 비교하여 유의한 차이는 없음. 양성대조군에서는 다염성적혈구 중 소핵다염성적혈구의 출현빈도가 음성대조군에 비교하여 유의하게 증가함. 총 적혈구중 다염성적혈구의 비율은 음성대조군에 비하여 차이가 없음.

○ 결과 : 검정콩추출물은 본시험 조건하에서 마우스 골수세포의 소핵유발에 영향이 없음.

[Table 3-13] 검정콩추출물의 마우스 골수세포의 소핵유발

Group	Dose (mg/kg)	Route	Hours after administration	PCE/ (PCE+NCE)	% (Mean±S.D)	MNPCE/ PCE	% (Mean±S.D)
negative (water)	0	P.O	24	772/2500	30.9±3.07	4/1000	0.040±0.055
Black soybean extract	1,250	P.O	24	656/2500	26.2±3.32	5/1000	0.050±0.035
	2,500	P.O	24	805/2500	32.2±2.94	0/1000	0.000±0.000
	5,000	P.O	24	801/2500	32.0±2.70	1/1000	0.010±0.022
Positive (MMC)	2	I.P	24	695/2500	27.8±3.32	598/1000	5.980±1.100

(3) 유효 농수산물 대상 전임상 반복시험 (가천의대 협력)

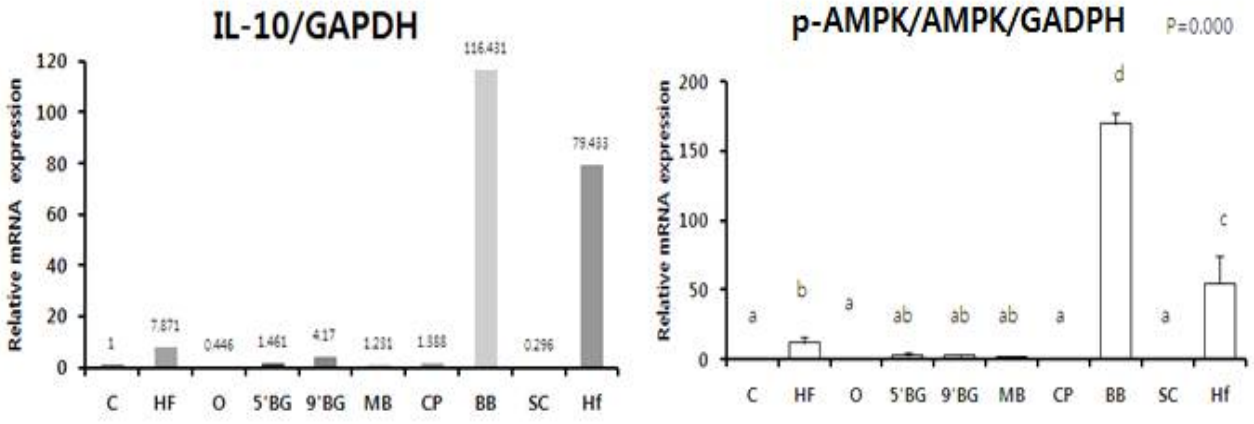
(가) 검정콩껍질 에타놀 추출물

① 1차년의 3T3L-1를 이용한 농수산물 항비만효과 *in vitro* 스크리닝 결과

- 농수산물 소재의 추출물질은 흑삼(구증구포) 열수 및 에탄올추출 각각 1-9포, 녹두, 검정콩, 진피, 감태, 톳, 미더덕 등 이며 흑삼, 녹두, 검정콩, 감태 등이 농도의존적으로 지질축적을 억제함.
- 특히, 검정콩추출물 농도(-300ug/ml)증가에도 세포 생존율은 변화가 없으며 고농도에서 지질축적은 50% 까지 감소하는 경향을 보임. 검정콩의 표지물질인 C3G 및 D3G 100-200uM농도에서 지질축적이 50-60%로 감소하여 추출물과 표지물질의 경향이 일치함.
- C3G 200 uM 투여 시 pro-inflammation marker인 TNF-a 를 감소시키고 항염증인자인 IL-10을 증가시킴. 반면, D3G는 100uM 까지 IL-10을 증가시키다가 200 uM에서 감소됨.

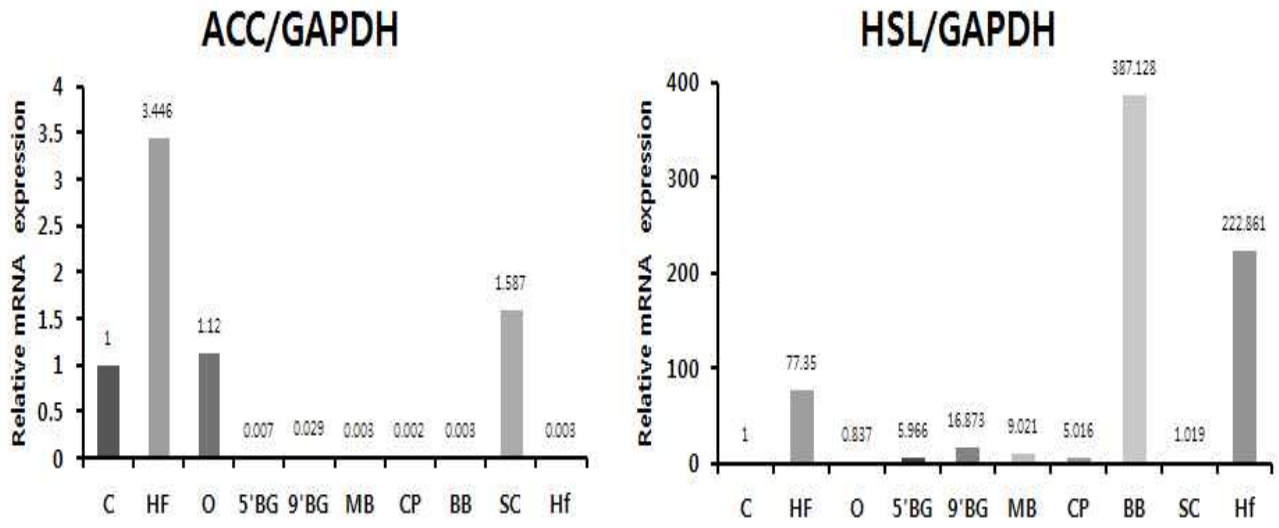
② 1차년 C57BL/6J-DIO model(45% fat 10주)을 이용한 농수산물 항비만효과 *in vivo* 스크리닝 결과

- 농산물로써 흑삼, 녹두, 진피, 검정콩을, 수산물로써 감태, 미더덕, 톳을 이용하여 부고환지방에서의 항비만지표 (p-AMPK 등), 지방합성억제(ACC 등), 지방분해증가(HSL 등), 항염증지표(IL-10 등)을 검토한 결과 검정콩과 톳이 orlistat 항비만 약물과 유사한 수준의 효과를 보임. [Fig 3-4 & 3-5]
- 그러나 감태는 비소 등 독성문제로 톳은 *in vitro*시험에서 효과가 없어서 제외함.



CON: control, HF: high-fat, HF-PO/O: orlistat, BG: 흑삼(5, 9포) SC: 미더덕, MB: 녹두, CP: 진피, BB: 검정콩, Hf: 톳

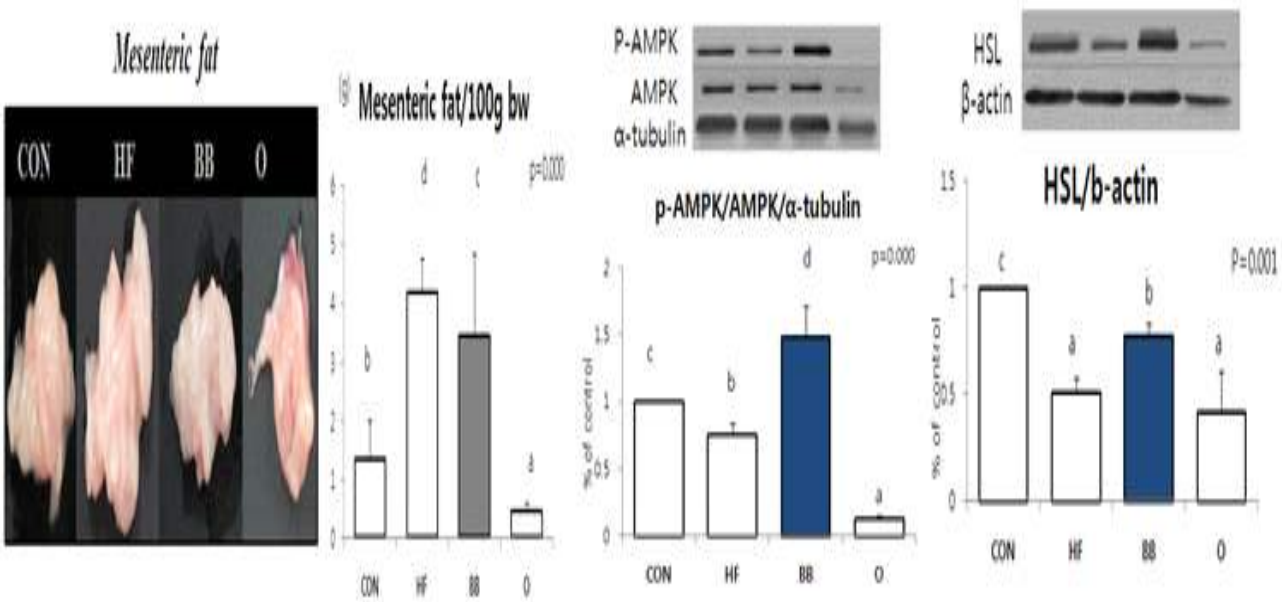
[Fig 3-4] 검정콩추출물의 항염증효과 및 AMPK발현 효과(RT-PCR 결과)

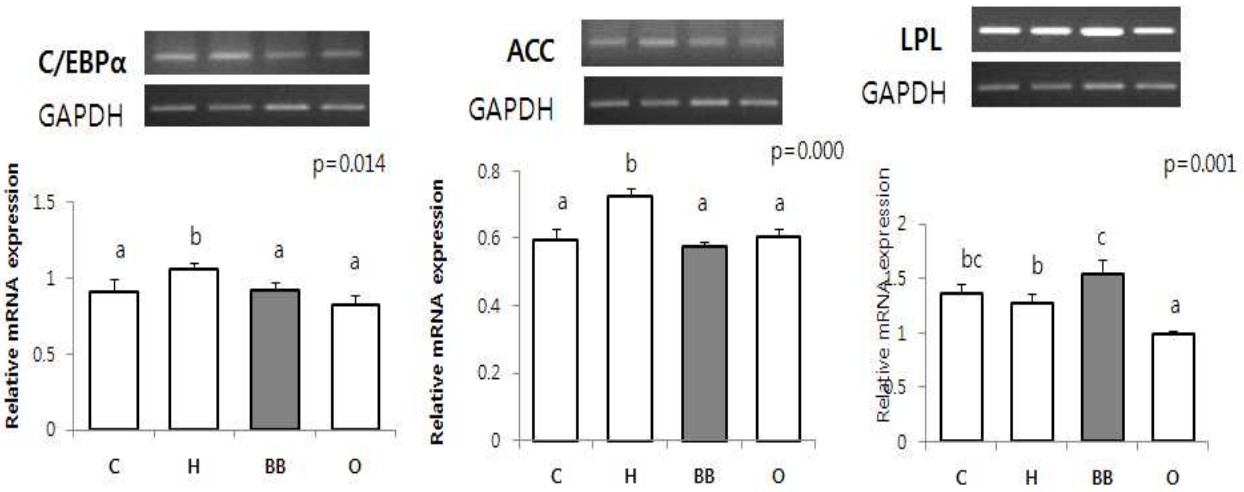


[Fig 3-5] 검정콩추출물의 지질합성(ACC) 및 지질분해(HSL)결과 (RT-PCR 결과)

③ 2차년 C57BL/6J-DIO model(45% fat 10주) 을 이용한 검정콩껍질 에타놀 추출물(1g/Kg) 12주 투여 결과

- 검정콩 주정추출물 1g/Kg 투여(C3G: D3G=3 :1)시 장간막지방의 지질축적을 25% 감소시킴.
- 지방조직에서 C/EBPa, ACC를 억제하며 지질축적억제효과는 orlistat 항비만 약물과 유사한 수준임. 지방조직에서 AMPK, HSL 및 LPL활성은 증가하며 지질분해효과는 orlistat 보다 우수함. [Fig 3-6]
- 간조직에서는 중성지방합성, 지방지질과산화물(MDA)생성 및 간독성(AST) 등도 억제함.

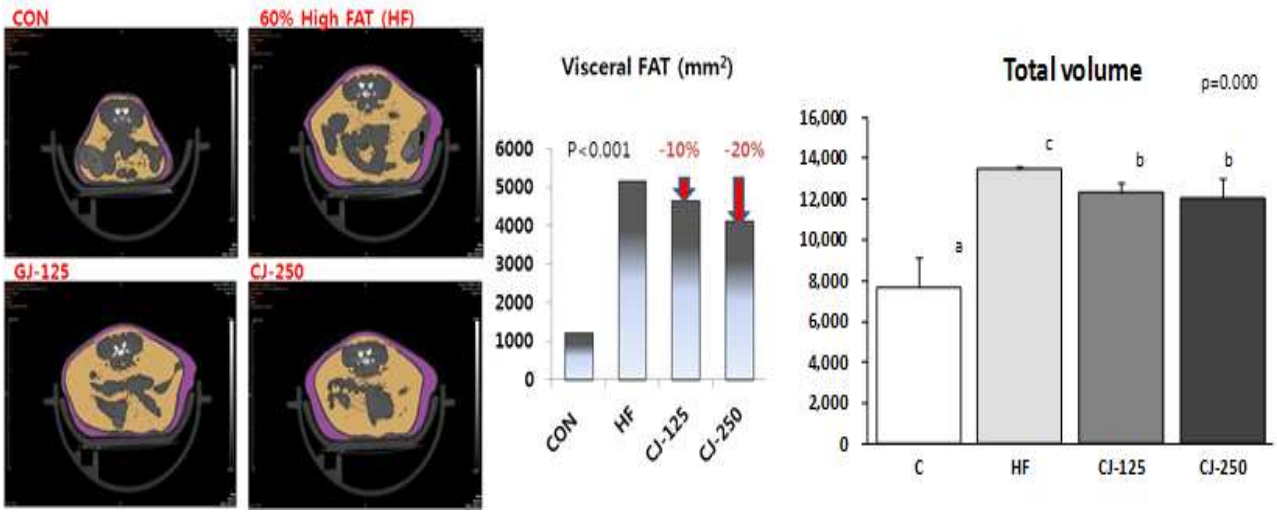




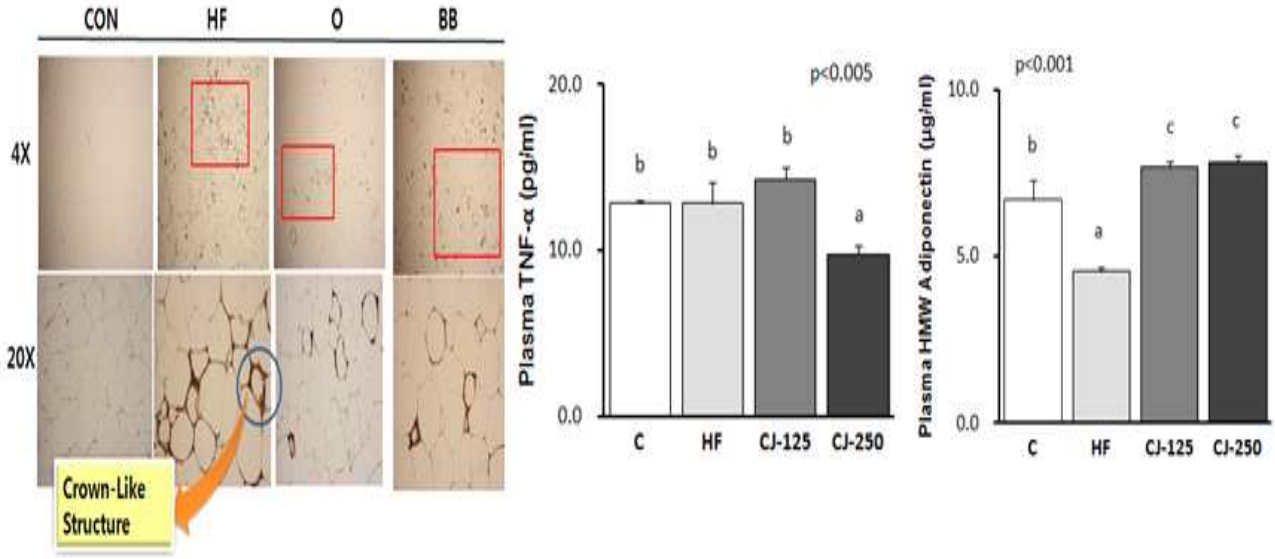
[Fig 3-6] 검정콩추출물의 2차 항비만효과(Western & rt-PCR)

④ 3차년 C57BL/6J-DIO model(60% fat 10주)을 이용한 검정콩껍질 에타놀추출물 (125mg/Kg, 250mg/Kg) 12주 투여 반복시험

- CJ-125 (C3G+D3G=1.56mg/Kg), CJ-250(C3G+D3G=3.23mg/Kg), 처치는 HF에 비하여 체중증가가 유의적으로 적음. 또한 간독성이 없음 (ALT 결과)
- Micro-CT 결과에서 CJ-250은 HF에 비하여 visceral fat이 10, 20% 각각 감소하였고 (P<0.001) 내장의 total volume 과 해부후 mesenteric fat(g)과 일치함. [Fig 3-7]
- 염증성-대식세포가 지방구를 감싼 crown-like structure(ATMΦs model M1)을 확인하고 자 Epididymal fat에서 Galectin-3 (Mac-2)항체를 이용하여 IHC를 시행한 결과. 검정콩 투여로 M1형성(TNF-a)이 억제 되었으며 이는 orlistst의 억제효과와 매우 유사함. [Fig 3-8]
- CJ-250은 visceral fat의 감소시킨 만큼 leptin 분비도 감소되었으며 HF에 비하여 adiponectin 분비를 증가시킴. (오히려 CON보다 증가). [Fig 3-8]



[Fig 3-7] 검정콩추출물의 3차 항비만 (micro-CT)

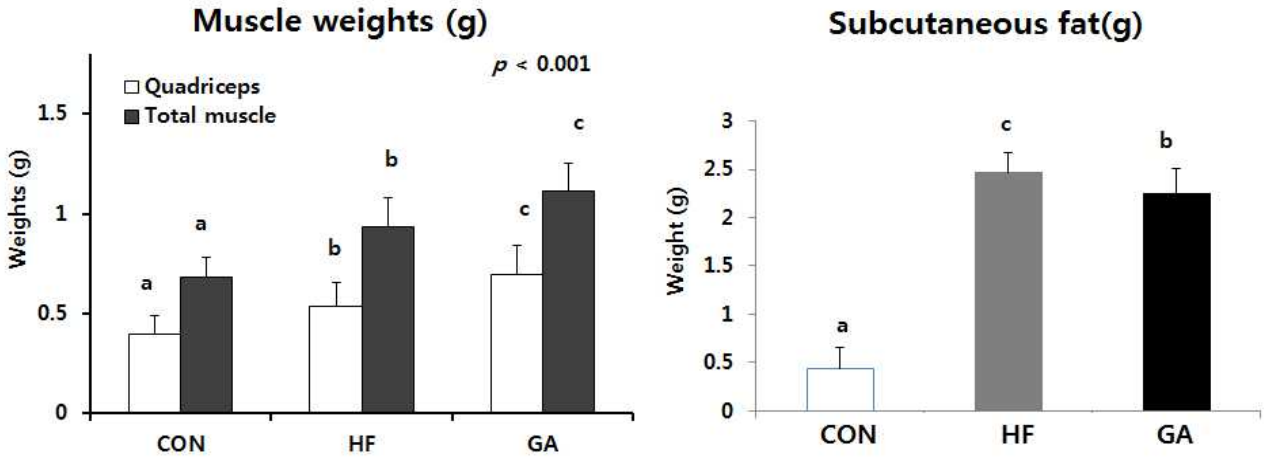


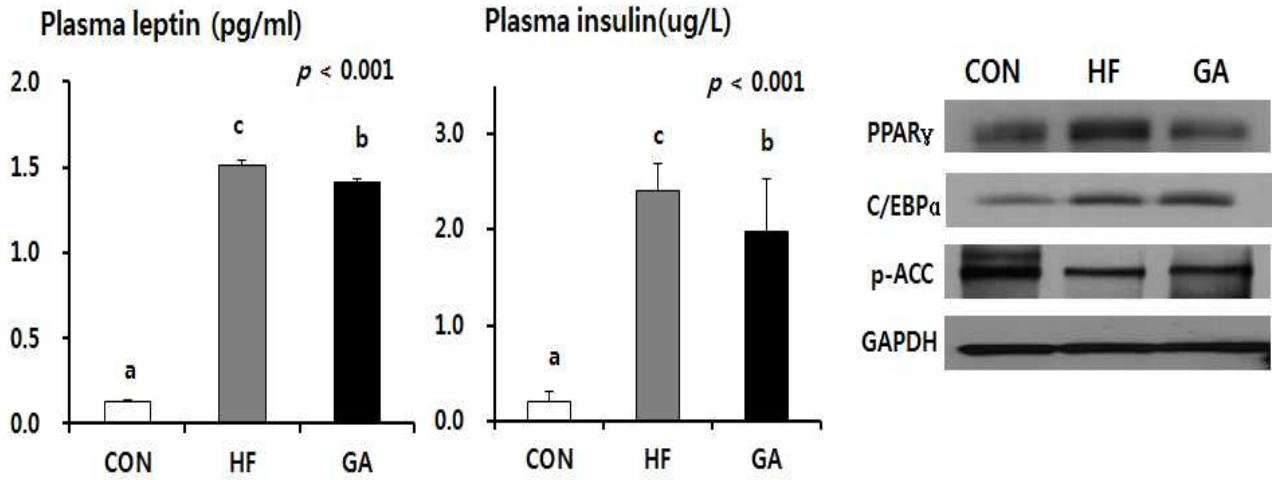
[Fig 3-8] 부고환지방에서의 검정콩추출물의 3차 항염증효과 (IHC & ELISA)

(나) 우뭇가사리 에타놀추출물

① C57BL/6J-DIO model(60% fat 10주)을 이용한 한천포함 우뭇가사리 에타놀추출물 (300mg/Kg) 12주 투여

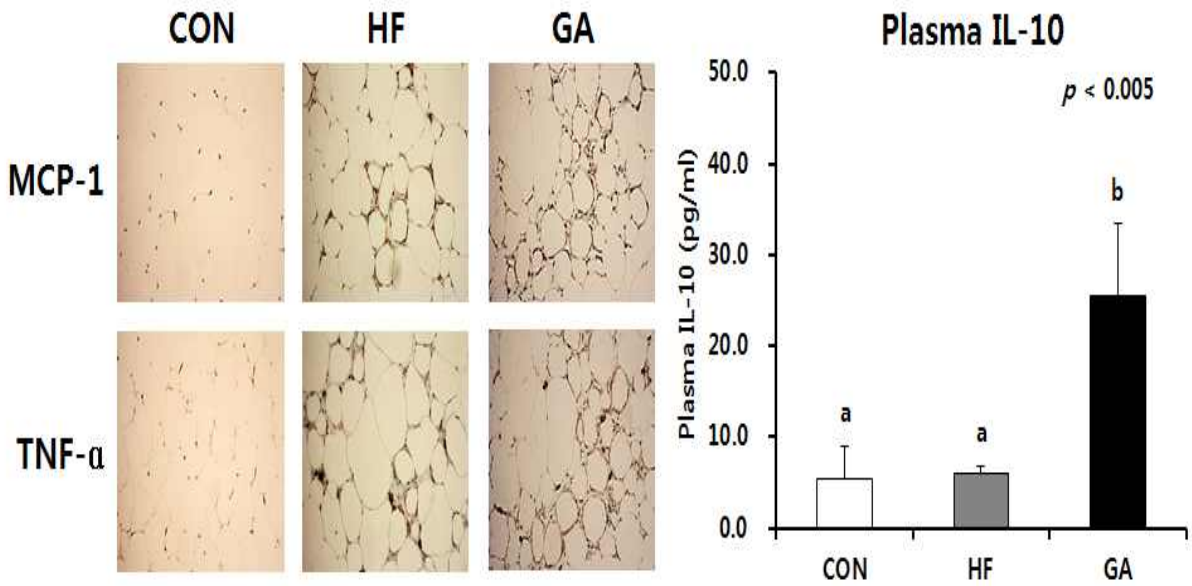
- 우뭇가사리 에타놀추출물의 독성효과(ALT)는 없으며 HF에 비하여 총체중 및 총지방량의 감소는 차이가 없었으나 피하지방의 감소가 현저하였는데 근육의 증가, 혈중 leptin 및 인슐린 감소와 관련이 있음. [Fig 3-9]





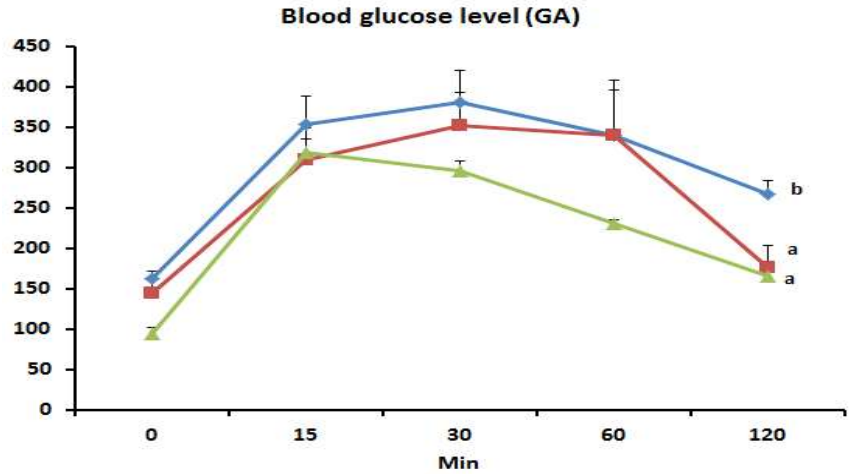
[Fig 3-9] 우뭇가사리의 항비만효과 (IHC, ELISA, Western)

- 염증성-대식세포가 지방구를 감싼 crown-like structure(ATMΦs model M1)을 확인하고 자부고환 지방에서 MCP-1 & TNF-a항체를 이용하여 IHC를 시행한 결과. M1형성이 억제됨. [Fig 3-10]



[Fig 3-10] 부고환지방에서의 우뭇가사리의 항염증효과 (IHC, ELISA, Western)

- **혈당억제효과**(OGTT): **우뭇가사리** 추출물(빨강)은 Fig 7과 같이 OGTT 검사에서 투여 후 120분 후 대조군(초록)과 거의 유사하게 혈당이 감소하여 고지방식이(파랑)과 유의적인 차이를 보임. [Fig 3-11]



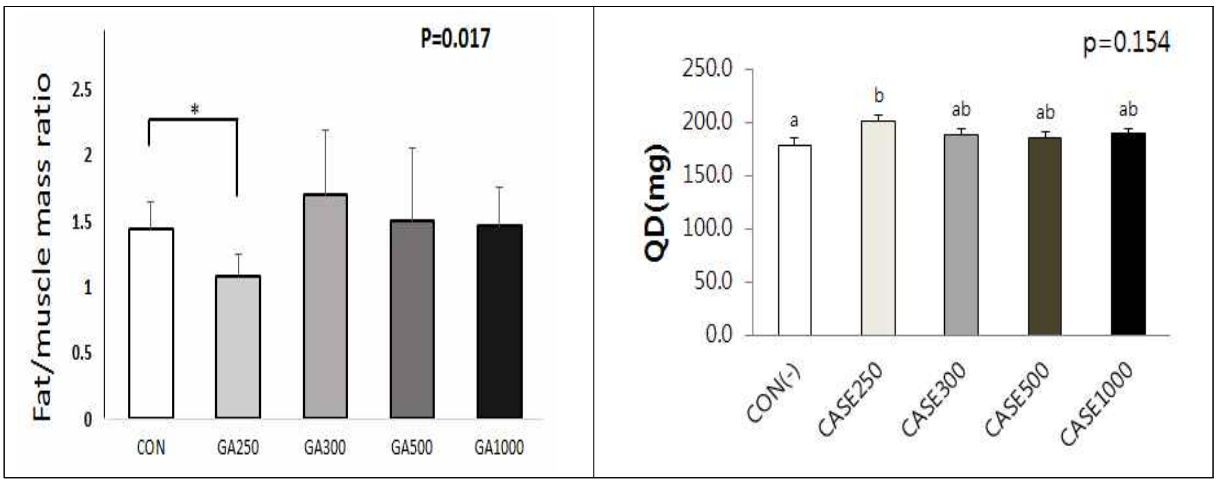
[Fig 3-11] 우뭇가사리추출물의 OGTT 검사

② 3차년 C57BL/6J-DIO model(60% fat 5주)을 이용한 한천 free-우뭇가사리 에타놀추출물 농도의존실험 (250, 300, 500, 1000mg/Kg) 8주 투여 반복시험

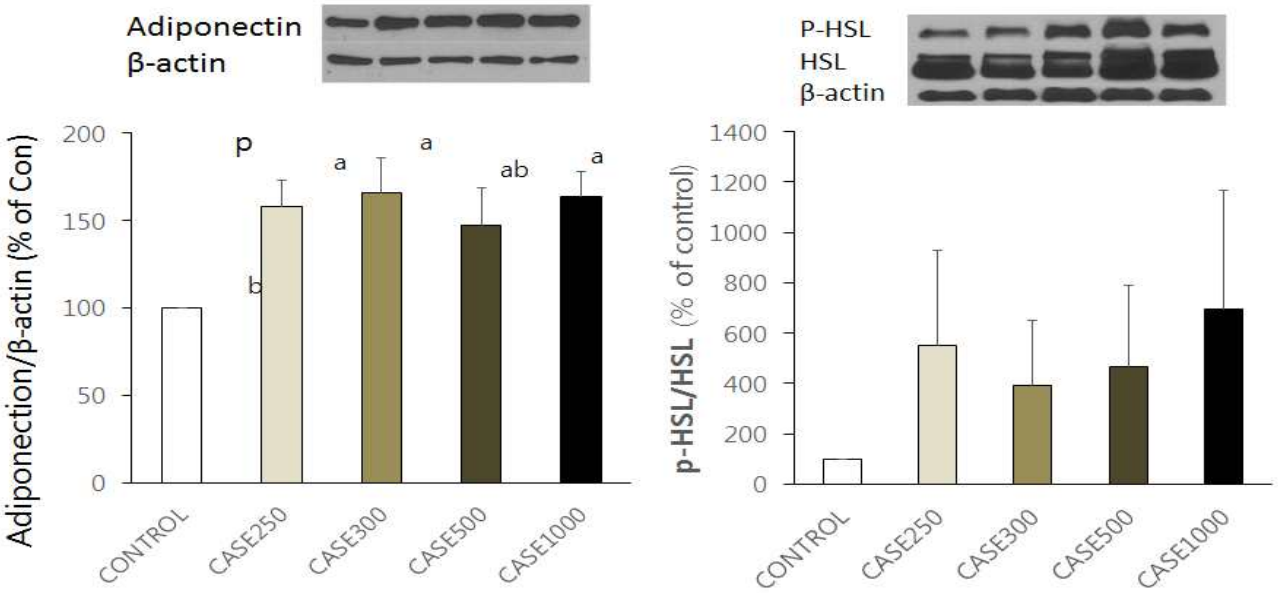
○ Study Ⅰ & Ⅱ design

	CON	Case Ⅰ	Case Ⅱ	Case Ⅲ	Case Ⅳ
Study Ⅰ: 9주령 Prevention	60%HFD+PBS	60%HFD+ GA-250	60%HFD+ GA-300	60%HFD+ GA-500	60%HFD+ GA-1000
Study Ⅱ:14주령 Treatment	60%HFD+PBS	60%HFD+ GA-250	60%HFD+ GA-300	60%HFD+ GA-500	60%HFD+ GA-1000

- 처치군 모두 체중 증가량과 실험기간 평균 식이섭취량 간에 높은 정의 상관관계를 나타냄.
- Study Ⅰ: 모든 처치 군에서는 체중, 식이섭취, 혈중지질(콜레스테롤, 중성지방, 혈당) 등 이 어떠한 경향도 나타나지 않아서 우뭇가사리의 항비만 prevention 효과는 없다고 판정함. 단 총지방량과 근육량의 비율차이를 살펴보면, 250mg/Kg 처치군에서 유의적으로 감소하였는데 이는 250mg/Kg 처치군에서 근육량(QD)이 가장 크게 증가한 것이 원인으로 나타남.
-

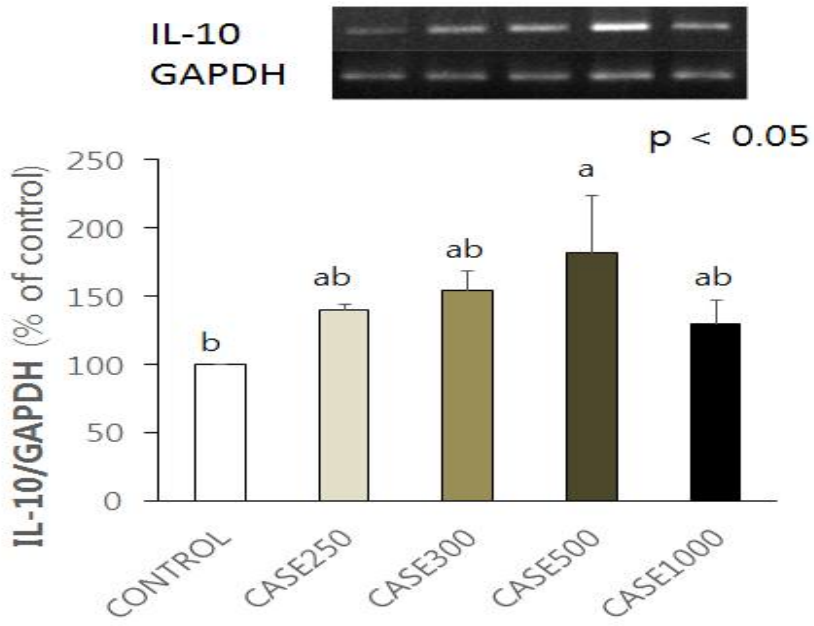


- **지방분해(Lipolysis) 인자**: Mesentric fat에서 lipolysis의 인자인 p-HSL/HSL을 분석한 결과 유의적인 분해 효과가 없었으나 대조군에 비하여 확연한 증가가 보임. 또한 adiponectin은 모든 처치군에서 대조군에 비하여 유의적으로 증가하였고 ($p < 0.05$) 특히 GA-300 mg/kg 까지는 농도 의존적인 증가를 보임. **[Fig 10]**



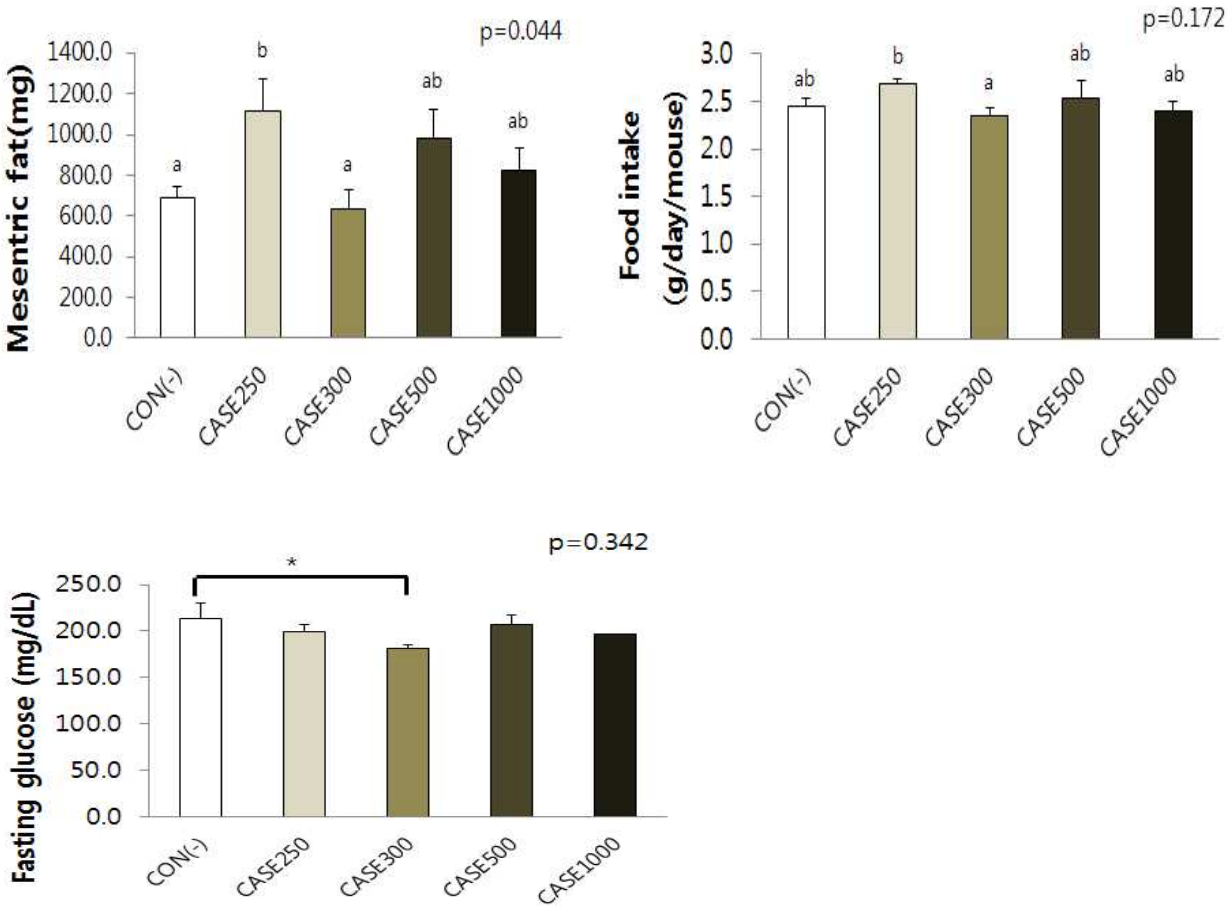
[Fig 3-12] 우뭇가사리추출물의 항비만 예방효과(Prevention)

- Epididymal fat에서 anti-inflammation 인자인 IL-10을 분석한 결과 유의적으로 항염증 효과가 있는 것으로 나타남. ($p < 0.05$) 특히 GA-500 mg/kg의 농도까지는 농도 의존적으로 효과가 증가하였으나, 고농도 (GA-1000 mg/kg)에서는 오히려 다시 감소하는 추세를 보임. **[Fig 3-13]**
-



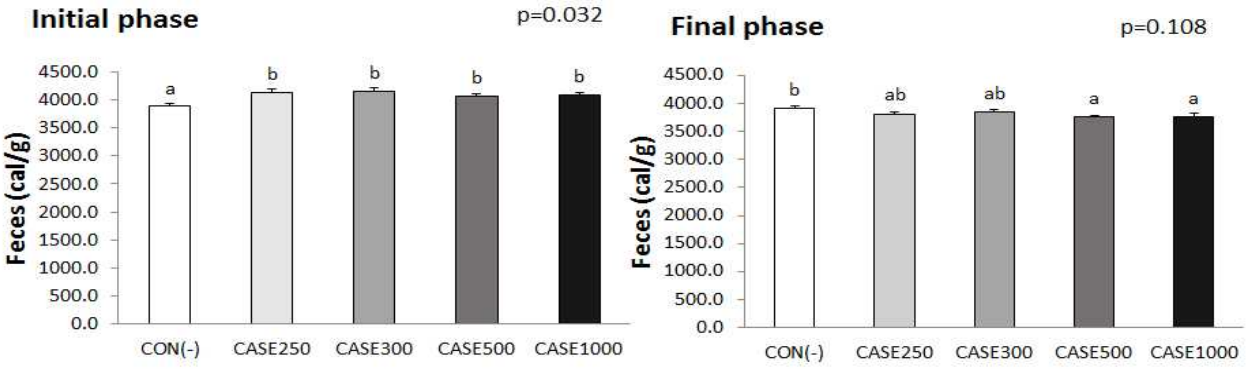
[Fig 3-13] 우뭇가사리추출물의 항염증효과

○ **Study Ⅱ**: Treatment study 에서 CASE Ⅱ (GA-300) 에서만 체지방(mesentric fat)양이 감소하였고 기타 투여군에서는 체지방의 감소효과가 없는 현상은 food intake가 증가하였기 때문으로 보임. 혈중지질은 모든 처치군에서 유의적인 차이가 없으며 Case Ⅱ (300 mg/Kg) 투여군에서만 대주군에 비하여 혈당감소를 보임. **[Fig 3-14]**



[Fig 3-14] 우뭇가사리추출물의 OGTT 검사

③ 배설열량: 전 처치군에서 검정콩 1회 처치 시(initial) 배설물의 열량(Cal/g)이 대조군에 비해 유의적으로 증가하였으나 처치 8주후(final)에는 농도 의존적으로 감소함. 이러한 원인이 체중 변화량 및 식이섭취량의 변화에 영향을 줄 수 있을 것으로 판단함. **[Fig 3-15]**

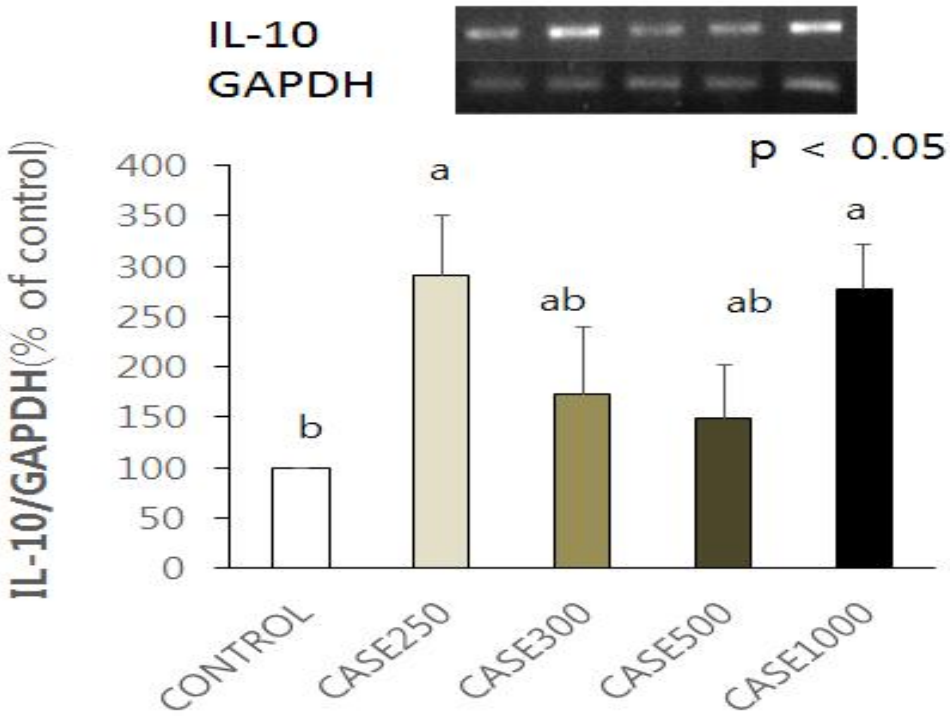


[Fig 3-15] 우뭇가사리추출물의 배설열량 (Cal/g)변화

④ 항비만 기능성 인자:

○ 지방합성(Adipogenesis) 및 지방분해(Lipolysis) 인자: Epididymal fat에서 adipogenesis의 인자인 PPARγ, C/EBPα 및 SREBP1를, mesentric fat에서 ACC를 각각 분석한 결과 adipogenesis에는 영향이 없음. 또한 lipolysis 인자인 adiponectin과 p-HSL/HSLeh 모든 처치군에서 변화가 없음. 따라서 한천이 포함되지 않은 우뭇가사리의 에타놀 추출물은 항비만효과(지방합성 및 지방분해) 모두에 영향이 없음.

○ 항염증(Anti-inflammation 인자: Epididymal fat에서 anti-inflammation 인자인 IL-10을 분석한 결과, 한천을 포함하지 않은 우뭇가사리의 에타놀 추출물의 항염증 효과가 모든 처치군에서 대조군에 비하여 유의적으로 증가함. ($p < 0.05$) [Fig 3-16]



[Fig 3-16] DIO모델에서 우뭇가사리의 항비만 기능성 인자(anti-inflammation)에 미치는 효과

나. 2핵심 1세부:

공정과정의 표준화 및 추출과정의 부산물을 이용한 제품기술개발 **[경기대 김애정 교수, ㈜서진 & 고을(주)]**
⊙ **결론** • 검정콩껍질 에타놀추출물의 소재 및 표지물질(C3G, D3G)의 표준화 및 공정과정표준화, 소재의 중금속 및 영양성분 분석, 소재의 재형성 및 시제품개발을 확립함. • 검정콩에서 유효성분이 제거되어진 부산물일지라도 기초 영양소인 식이섬유, 단백질, 탄수화물 등의 함량은 높음. • 유효성분은 고부가가치 식품 원료로 제조된 후 발생되어진 식품제조부산물의 재활용이라는 점에서 그 의미가 큼. • 본 과제는 이러한 콩 제품의 부산물을 활용한 제과류를 제조할 수 있는 생산 시스템을 개발하여 상품화하는데 목적이 있음.

⑴ 검정콩껍질추출물의 최적의 공정개발

① 원료의 선별 및 전처리 공정 개발 [Fig 3-17]

○ 원료선정:
○ 전처리 공정:
○ 추출공정:
○ 정밀여과 공정:

② 소재생산의 공정 확립 [Fig 3-18]

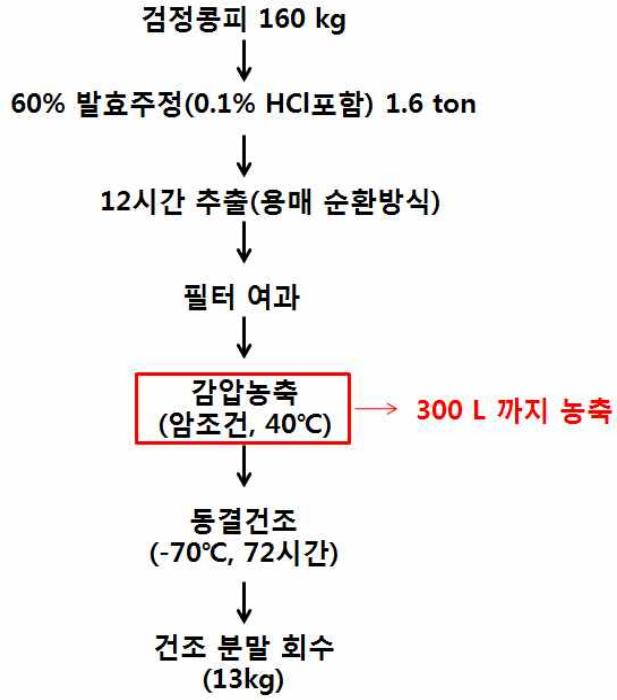
○ **검정콩껍질 추출물**: 60% 주정으로 추출한 추출액을 농축, 멸균, 동결건조를 거쳐 안토시아닌 함량의 손실이 없는 검정콩추출액 분말 생산함	

그림 2-3-1. 기능성 다시마 추출액 제조공정도 (좌) 및 다시마 발효물 제조공정도 (우)

② 소재의 성분 분석 (한국기능식품연구원)

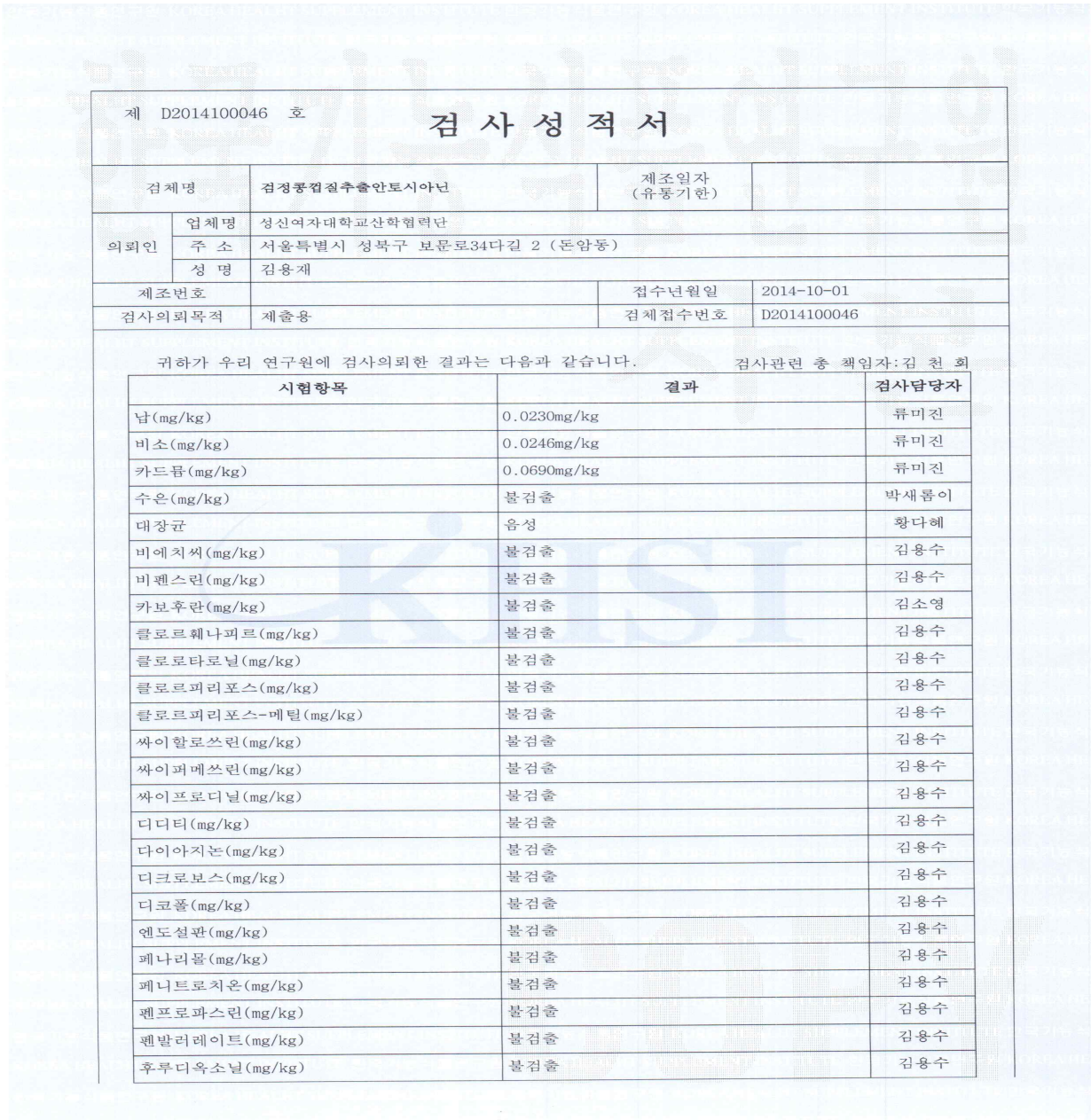
열량	330.73kcal/100g	검정콩껍질에는 표지물질인 안토시아닌이외에 당질이 풍부하여 열량이 높다. 특히 칼륨이 풍부하여 나트륨섭취가 높은 한국식단에 적절하고 판토텐산 함량이 풍부함. <불검출된 영양소> 포화지방산, 불포화지방산, 트랜스지방산, 콜레스테롤, EPA, DHA, 알파리논렌산, 리놀레산, 아라키돈산, Vit A,D,E,K,C, 나이아신, 비오틴, 엽산
탄수화물	72.10%	
조단백질	7.38%	
조지방	1.43%	
당류(과당,포도당,자당, 매아당,유당)	376.77mg/g	
식이섬유	0.03%	
비타민B1	0.64mg/100g	
비타민B2	0.70mg/100g	
비타민B6	0.42mg/100g	
판토텐산	1153.14mg/100g	
칼슘	154.17mg/100g	
인	142.86mg/100g	
나트륨	61.30mg/100g	
철	0.9mg/100g	
마그네슘	386.61mg/100g	
칼륨	4280.55mg/100g	
아연	9.94mg/100g	
구리	1.47mg/100g	
망간	0.64mg/100g	
셀레늄	14.92ug/100g	
대두이소플라본(비배당체)	5.71mg/g	

③ 중금속 함량 분석 (한국기능식품연구원)

○ 중금 속 함량 중 납, 비소 및 카드뮴이 검출되었으나 농산물품질관리원 규정 및 WTO에서 지정한 주간 섭취허용량(PTWI)을 초과하지 않는다.

○ 식품의약품안전처 고시 제2013-261호(농산물중금속기준)에 의하면 기준치를 초과하지 않음

시험항목	시료의 결과	식품의약품안전처 고시 제2013-261호
납	0.0230mg/kg	0.2 mg/kg
비소	0.0246mg/kg	미설정
카드뮴	0.0690mg/kg	0.1 mg/kg
수은	불검출	미설정
잔류농약 59종	불검출	



제 D2014100046 호

검 사 성 적 서

검체명	검정콩껍질추출안토시아닌	제조일자 (유통기한)	
의뢰인 업체명	성신여자대학교산학협력단		
의뢰인 주 소	서울특별시 성북구 보문로34다길 2 (돈암동)		
의뢰인 성 명	김용재		
제조번호		접수년월일	2014-10-01
검사의뢰목적	제출용	검체접수번호	D2014100046

귀하가 우리 연구원에 검사의뢰한 결과는 다음과 같습니다. 검사관련 총 책임자:김 천 회

시험항목	결과	검사담당자
납(mg/kg)	0.0230mg/kg	류미진
비소(mg/kg)	0.0246mg/kg	류미진
카드뮴(mg/kg)	0.0690mg/kg	류미진
수은(mg/kg)	불검출	박새롬이
대장균	음성	황다혜
비에치씨(mg/kg)	불검출	김용수
비펜스린(mg/kg)	불검출	김용수
카보후란(mg/kg)	불검출	김소영
클로르훼나피르(mg/kg)	불검출	김용수
클로로타로닐(mg/kg)	불검출	김용수
클로르피리포스(mg/kg)	불검출	김용수
클로르피리포스-메틸(mg/kg)	불검출	김용수
싸이할로쓰린(mg/kg)	불검출	김용수
싸이퍼메쓰린(mg/kg)	불검출	김용수
싸이프로디닐(mg/kg)	불검출	김용수
디디티(mg/kg)	불검출	김용수
다이아지논(mg/kg)	불검출	김용수
디크로보스(mg/kg)	불검출	김용수
디코폴(mg/kg)	불검출	김용수
엔도설판(mg/kg)	불검출	김용수
페나리몰(mg/kg)	불검출	김용수
페니트로치온(mg/kg)	불검출	김용수
펜프로파스린(mg/kg)	불검출	김용수
펜발러레이트(mg/kg)	불검출	김용수
후루디옥소닐(mg/kg)	불검출	김용수

(2) 안토시아닌-rich 검정콩껍질 소재의 표준화시험 [서진]

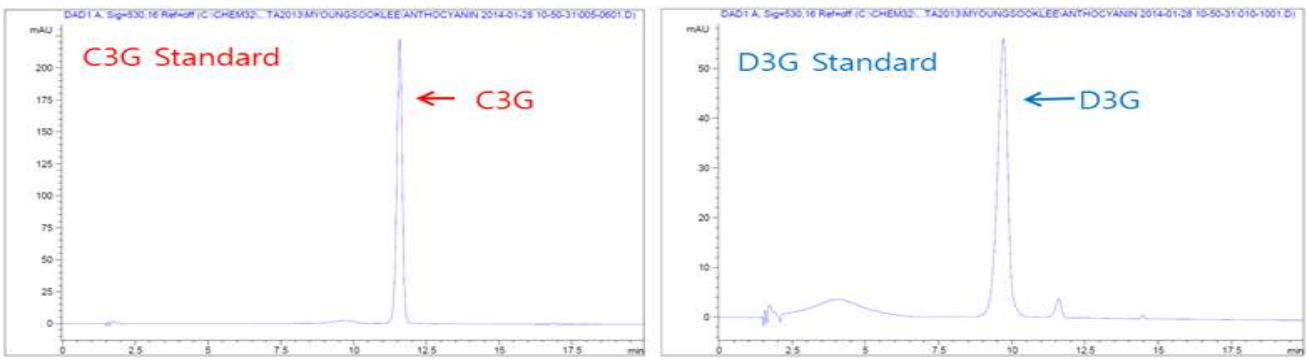
기능성 소재의 표준화는 고시 제2011-34호에 따라 기능/지표성분의 분석을 진행함에 있어 공인된 방법이 없거나 더 타당하다고 판단할 수 있는 분석법 적용 시 제시한 시험방법의 타당성을 검증하는 과정으로 고시에서 제시하는 검토 항목에 대하여 식품의약품안전청장이 지정 또는 국내외 검사기관의 시험결과와 분석자료를 제출 하여야 하는 시험법 검증을 통해서 이루어 짐.

① **특이성** (Specificity): 불순물, 분해물, 배합성분 등의 혼재 상태에서 분석대상물질을 선택적으로 정확하게 측정할 수 있는 능력으로 지표성분인 C3G+D3G 배합성분 등과 혼재되어 있는 검정콩껍질의 특이성을 확인하기 위해, 아래의 HPLC조건에 따라 표준품 (SIGMA-ALDRICH, CAS No.56-12-2)과 비교 분석한 결과 표준품 대비하여 특이적으로 분석됨을 확인함. [Fig 3-19]

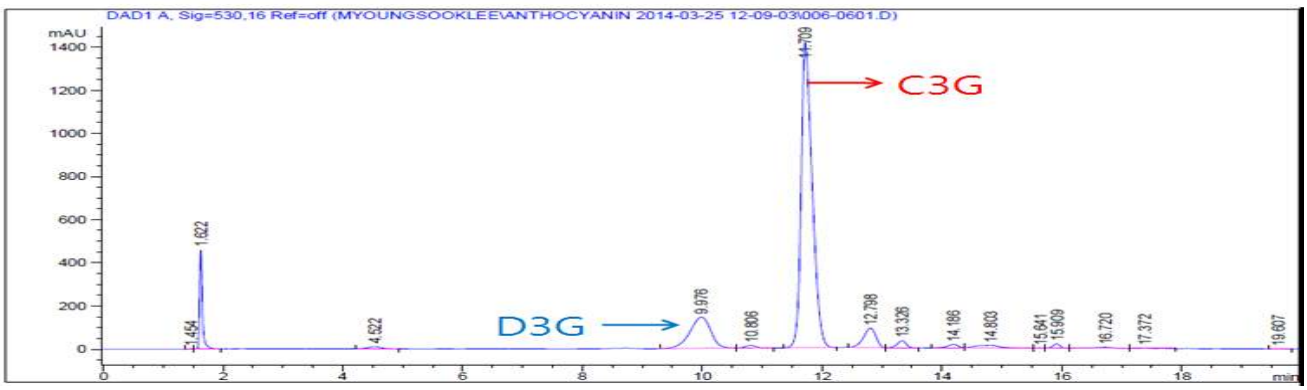
HPLC 분석조건

Condition					
Company Column Mobile phase	HEWLETT PACKARD SERIES 1100 Gemini C_{18} column (100 mm * 4.6 mm, 3 μm) Solvent A: Acetonitrile Solvent B: Distilled water Solvent C: 0.5 M Oxalic acid				
Gradient	Time	A%	B%	C%	Flow
	0 min	10	85	5	0.8 ml/min
	5 min	10	85	5	0.8 ml/min
	20 min	25	70	5	0.8 ml/min

C3G 및 D3G 표준품 크로마토그램

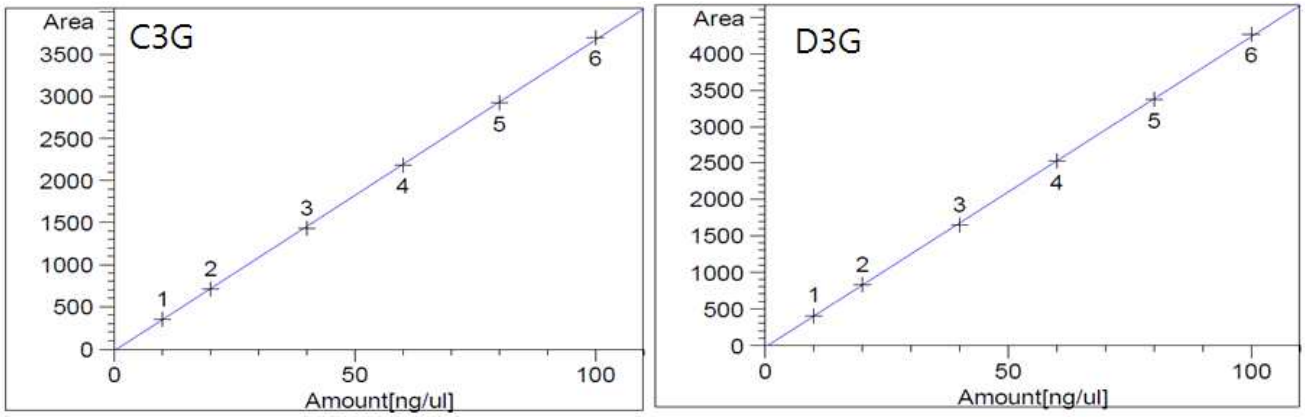


검정콩껍질추출물 크로마토그램



[Fig 3-19] 안토시아닌-rich 검정콩껍질 소재의 특이성 시험(HPLC)

○ **직선성 및 정량한계**:: 표준품인 C3G, D3G를 각각 농도별 (10-100ppm)로 분석한 결과 직선성이 확인되었음. 정량한계는 적절한 정밀설과 정확성을 가진 정량값으로 표현할 수 있는 검체 중 분석대상물질의 정량한계를 확인한 결과, 측정한계는 10-1,00ppm으로 설정하였음.



[Fig 3-20] 안토시아닌-rich 검정콩껍질 소재의 직선성 시험(HPLC)

○ **지표성분의 분석범위**: 검정콩껍질추출물 분석시 C3G, D3G농도가 각각 0-4000ppm농도에서 표준편차 (SD)가 낮은 것으로 확인되었음. 따라서 타 분석기관의 분석 결과 및 제조 원료인 해양생물의 생산지별, 채취일별에 따른 변화를 검토하여, 검채별 측정 하한치 및 상한치를 80-120%(C3G, D3G로 설정하였음.

② **정확성(Accuracy) 및 정밀성 (Precision)**:측정값이 이미 알고 있는 참값이나 표준값에 근접한 정도와 균일한 검체로부터 여러 번 채취하여 얻은 시료를 정해진 조건에 따라 측정하였을 때 각각의 측정값들 사이의 근접성(분산정도)을 측정함 각 생산제품에 대한 분석의 정확성을 위해, 각 sample을 3회 분석하고, 상대표준편차 (%RSD)는 0.48-8.0%로 나타났다. [Table 3-14]

[Table 3-14] 검정콩껍질 추출물의 표자물질함량에 대한 정확성 분석결과

시료명	분석 횟수	C3G		D3G	
		함량(mg/g)	평균 및 표준편차 (SD)	함량 (mg/g)	평균 및 표준편차(SD)
sample A	1	8.536227	8.5730 ±0.034491	1.567821	1.5597 ±0.007775
	2	8.578488		1.559022	
	3	8.604574		1.552319	
sample B	1	8.611199	8.7021 ±0.080362	1.565865	1.5750 ±0.009393
	2	8.731478		1.584636	
	3	8.763664		1.574593	
sample C	1	8.065455	8.09779 ±0.028434	1.301349	1.3075 ±0.006576
	2	8.118856		1.314430	
	3	8.109086		1.306701	
sample D	1	8.151684	8.1461 ±0.004886	1.319137	1.3432 ±0.003694
	2	8.144294		1.322680	
	3	8.142453		1.315294	

⑶ 안토시아닌이 풍부한 검정콩 껍질의 제형성 및 시제품 생산

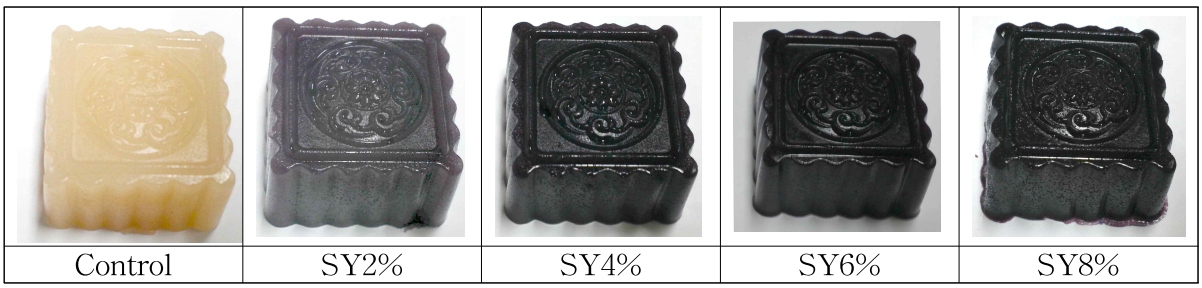
① 양갱 제조

콩껍질 추출물을 첨가한 양갱의 재료배합비는 Table 3-15, 제조 공정은 Fig. 3-21와 같음.

[Table 3-15] Formulas of soybean seed coats *Yanggaeng*

	Samples				
	Control	SY2%	SY4%	SY6%	SY8%
Wite bean sediment	250	247.5	245	242.5	240
Water	200	197.5	195	192.5	190
Soybean seed coats extracts	0	5	10	15	20
Sugar	45	45	45	45	45
Agar	5	5	5	5	5

Control : yanggaeng prepared with 0% soybean seed coats extracts
SY20 : yanggaeng prepared with 20% soybean seed coats extracts
SY40 : yanggaeng prepared with 40% soybean seed coats extracts
SY60 : yanggaeng prepared with 60% soybean seed coats extracts
SY80 : yanggaeng prepared with 80% soybean seed coats extracts



Control	SY2%	SY4%	SY6%	SY8%

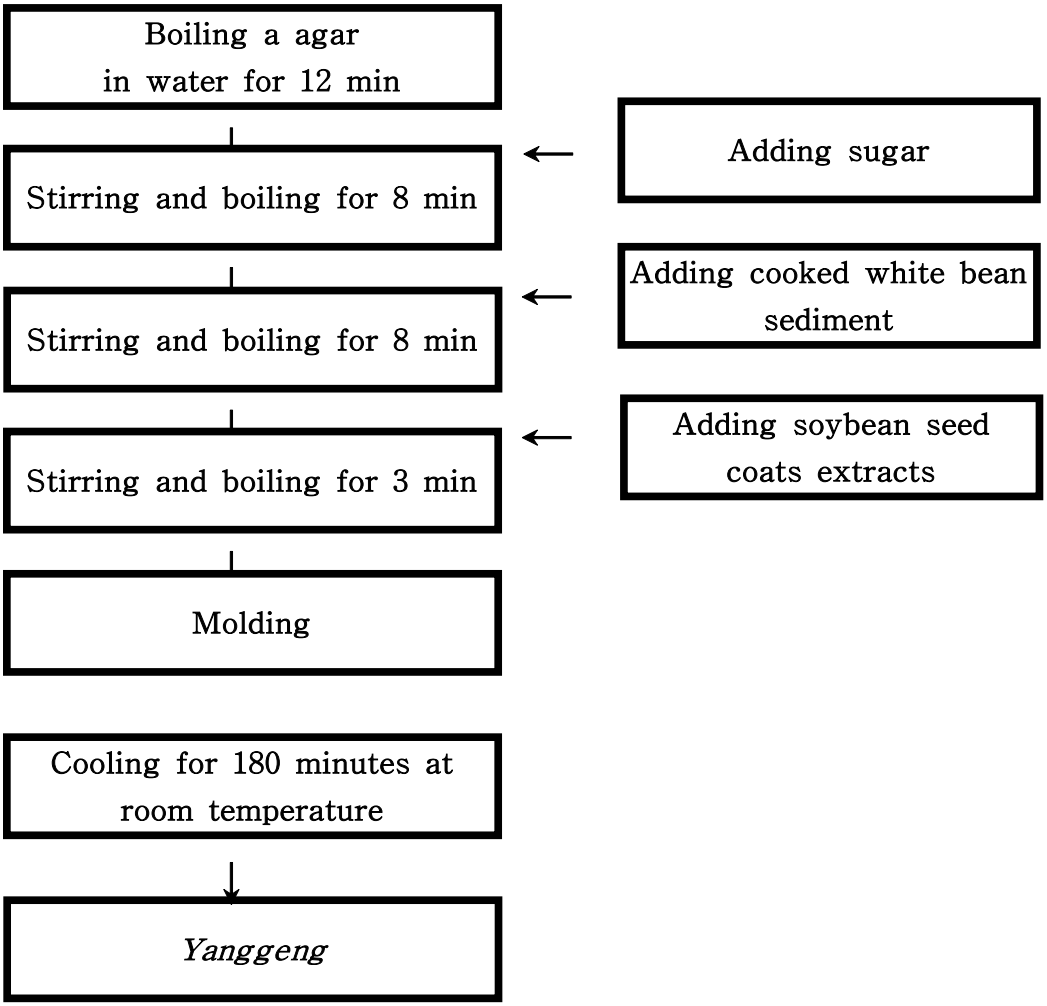
② 색도 측정물성

양갱의 색도 측정은 색차계(Chroma Meter Cr-300, Minolta, Tokyo, Japan)를 사용하여 명도(L, lightness), 적색도(a, redness), 황색도(b, yellowness) 값으로 표시하였으며, 각 시료 당 3회 반복 측정하여 그 평균값을 나타냄. 이 때 표준 백색판의 L, a, b값은 각각 90.69, +1.34, -4.47임.

Table 3-16. Hunter's L, a, b values of soybean seed coats *Yanggaeng*

Variables	L	a	b
Control	49.94±0.33	-0.81±0.03	2.85±0.05
SY2%	26.09±0.21	4.82±0.06	-3.17±0.02
SY4%	20.62±0.49	3.61±0.12	-2.24±0.01
SY6%	21.66±0.47	3.02±0.08	-2.08±0.01
SY8%	22.69±0.47	2.43±0.04	-1.91±0.02

Control : 0% soybean seed coats extracts, SY20: 20%, SY40: 40%, SY60: 60%, SY80: 80%



[Fig. 3-21]. Procedure of soybean seed coats *Yanggaeng*

③ 기계적 물성

제조된 양갱의 물성은 식품물성측정기(Texture Analyser,TA, XT Express v2.1, England)를 사용하여 3회 반복 측정한 후 평균값으로 나타냄. 양갱은 복원력이 강하므로 TPA test 분석으로 경도(hardness), 탄력성(springiness), 검성(gumminess), 씹힘성(chewiness), 응집성(cohesiveness)을 측정함. Texture Analyser의 조건은 Table 3-17과 같음. 측정시료는 지름 3.1 cm×높이 1.5 cm의 원형 크기로 절단하여 사용함.

[Table 3-17] Operating conditions for texture analyzer

Analysis condition	
Instrument	Texture Analyzer
Type	TPA (Texture Profile Analysis)
Probe	36 mm cylinder radius probe-SMS P/35
Pre-test speed	2.0 mm/s
Test speed	2.0 mm/s
Post-test speed	2.0 mm/s
Distance	4.0 mm
Time	1.0 s
Trigger Force	3.0 g

[Table 3-18]. Textural characteristics of soybean seed coats *Yanggaeng*

	Samples				
	Control	SY2%	SY4%	SY6%	SY8%
Hardness	2691.17±9.96	2881.63±133.05	3186.73±14.82	3017.37±17.49	2934.07±32.79
Springiness	0.94±0.00	0.92±0.01	0.93±0.00	0.94±0.00	0.91±0.02
Chewiness	1264.51±19.05	1410.88±56.47	1522.84±12.2.	1477.46±22.90	1381.54±22.40
Gumminess	1357.33±23.60	1530.39±48.38	1631.66±8.68	1582.96±21.69	1515.52±17.29
Cohesiveness	0.50±0.01	0.53±0.01	0.51±0.00	0.52±0.00	0.51±0.00

④ 당도 측정

제조된 양갱의 당도는 물 9 ml에 양갱 1g를 넣고 중탕하여 녹인 후 40℃로 식힌 후 당도계를 이용하여 측정 하였다. 측정된 값에 10을 곱하여 양갱의 당도를 표시함.

[Table 3-19]. Brix of soybean seed coats *Yanggaeng*

	Samples				
	Control	SY2%	SY4%	SY6%	SY8%
Brix	27.00±0.00	29.67±0.47	31.00±0.00	32±0.00	33.33±0.94

⑤ 결론

- 검정콩 껍질첨가량이 0, 2, 4, 6, 8%으로 증가할수록 경도(hardness),탄력성(springiness), 검성(gumminess), 씹힘성(chewiness) 등이 증가하다가 6%, 8%에서 감소하므로 4% 첨가시의 물성이 가장 좋음.
- 당도의 경우 콩껍질 추출물 첨가량이 증가할수록 높아짐. 양갱 제조시 콩껍질이 함유한 당성분만큼 설탕사용량을 주리면 단당류 섭취감소 효과.
- 관능평가 결과 콩껍질 추출물 4% 첨가 양갱이 색, 맛, 향, 전체적인 기호도면에서 가정 좋지만 앙금 245g, 물 195g, 콩껍질 추출물 10g, 설탕 45g, 한천 5g으로 제조한 콩껍질 첨가 양갱이 우수한 모델임.

(4) 추출과정의 부산물을 이용한 제품화기술개발

최종목표	내 용	연구범위
유효성분이 제거된 검정콩 부산물을 활용한 제과 및 제빵 제품의 개발	· 제빵 제조 · 쿠키 제조	· 레시피 개발 · 물리적 특성 분석 · 화학적 특성 분석 · 미생물학적 특성 분석 · 관능평가

○ **최종 목표**: 검정콩에서 유효성분이 제거되어진 부산물일지라도 기초 영양소인 식이섬유,단백질, 탄수화물 등의 함량은 높다. 또한 유효성분은 고부가가치 식품 원료로 제조된 후 발생되어진 식품제조부산물의 재활용이라는 점에서 그 의미가 크다. 본 과제는 이러한 콩 제품의 부산물을 활용한 제과류를 제조할 수 있는 생산 시스템을 개발하여 상품화하는데 목적이 있다.

(가) 검정콩 부산물을 활용한 상품(제과・제빵 총 2종) 레시피 개발

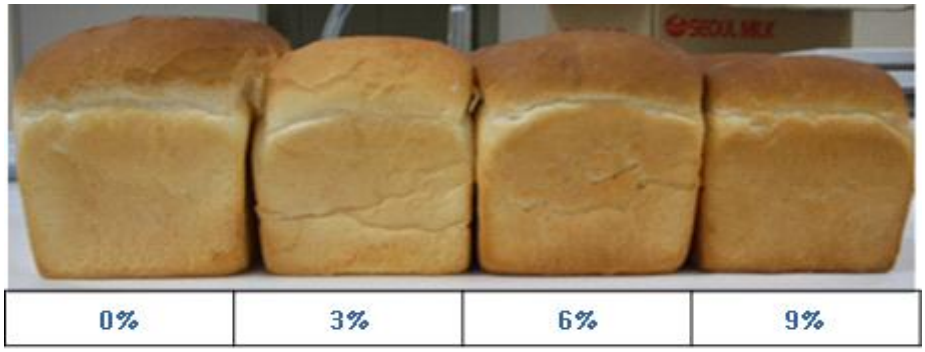
① 검정콩 부산물 알맹이 첨가율을 달리한 식빵 샘플 제조

○ 우리밀빵 전문 제조업체인 (주)고을의 기존 레시피를 이용하여 검정콩 부산물을 분태와 분말 형태로 1차 샘플링하여 관능테스트를 실시하였음. 결과는 [Fig. 3-22& 3-23]에 제시된 바와 같음. [Table 3-20 & 3-21]

[Table 3-20]. Formula for white bread prepared with black bean by-product according to different levels

재료	0%	3%	6%	9%	12%
우리밀	56.0%	53.0%	50.0%	47.0%	44.0%
검정콩부산물	0.0%	3.0%	6.0%	9.0%	12.0%
우유	24.0%	24.0%	24.0%	24.0%	24.0%
버터	6.0%	6.0%	6.0%	6.0%	6.0%
유기농설탕	4.8%	4.8%	4.8%	4.8%	4.8%
생이스트	2.2%	2.2%	2.2%	2.2%	2.2%
글루텐	1.4%	1.4%	1.4%	1.4%	1.4%
소금	1.0%	1.0%	1.0%	1.0%	1.0%
물엿	4.6%	4.6%	4.6%	4.6%	4.6%

※ 12%의 경우 빵의 형태가 갖추어지지 않아 예비실험 후 실험군에서 삭제하였음.



[Table 3-21] Formula for cookie prepared with black bean by-product according to different levels

재료	0%	2%	4%	6%	8%
우리밀	29.9%	27.8%	26.0%	23.9%	21.8%
검정콩부산물	0.0%	2.1%	3.9%	6.0%	8.1%
버터	29.9%	29.9%	29.9%	29.9%	29.9%
유기농설탕	13.4%	13.4%	13.4%	13.4%	13.4%
코코넛파우더	17.9%	17.9%	17.9%	17.9%	17.9%
계란	9.0%	9.0%	9.0%	9.0%	9.0%

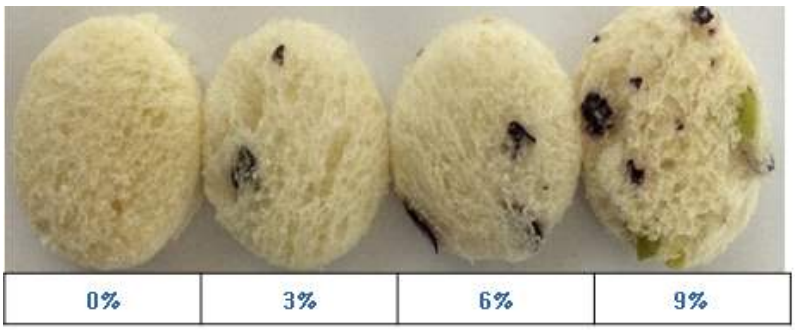


Fig. 3-22. Appearance of white bread prepared with black bean by-product according to different levels.

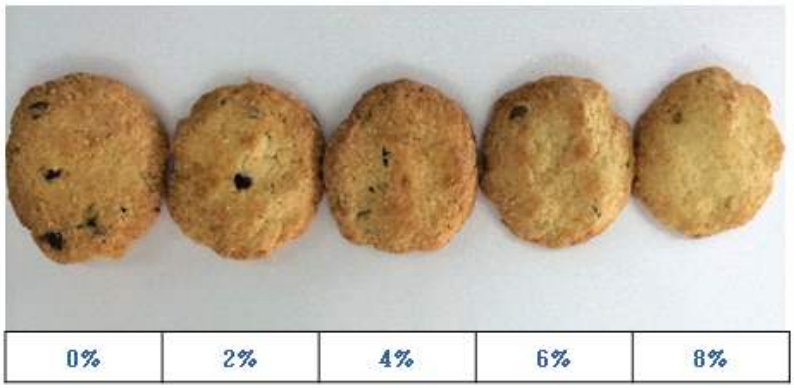


Fig. 3-23. Appearance of cookies prepared with black bean by-product according to different levels.

② 관능평가

○ 검정콩 부산물을 첨가하여 제조한 식빵의 색(color), 향(flavor), 질감(texture), 촉촉함(moistness), 부드러움(softness), 맛(taste), 전체적인 기호도(overall quality) 등을 (주)고을 직원 16명과 (주)해가온 직원 14명 총 30명을 대상으로 9점 척도법으로 실시하여 평균을 산출하였음.

○ 관능평가 결과는, 검정콩 부산물 첨가량이 9%인 빵 그룹에서 향(flavor), 맛(taste), 전체적인 기호도(overall quality)에서는 가장 우수한 점수가 보여졌음. [Table 3-22 & 3-23]

○ 쿠키의 관능평가에서는 검정콩 부산물 첨가량 6% 쿠키에서 향(flavor), 질감(texture), 촉촉함(moistness), 맛(taste), 전체적인 기호도(overall quality)면에서 가장 우수한 점수가 나타났음.

[Table 3-22] Sensory evaluation of white bread prepared with black bean by-product according to different levels

	Color	Flavor	Texture	Moistness	Softness	Taste	overall quality
Control (0%)	5.86±0.76	4.72±0.22	5.44±0.34	5.94±0.12	5.66±0.33	4.94±0.75	4.98±0.85[b]
3%	5.68±0.66	5.43±0.54	5.76±0.76	5.78±0.78	5.44±0.12	5.10±0.44	5.66±0.55[ab]
6%	5.99±0.79	6.00±0.66	6.27±0.45	6.21±0.74	6.56±0.80	6.20±1.20	6.20±1.10[a]
9%	**5.88±0.75**	**6.28±0.82**	**6.10±0.10**	**6.00±0.22**	**6.21±0.12**	**6.45±0.54**	**6.59±0.94[a]**

[Table 3-23]. Sensory evaluation of cookie prepared with black bean by-product according to different levels

	Color	Flavor	Texture	Moistness	Softness	Taste	overall quality
Control (0%)	5.28±0.82	5.41±0.14	5.67±0.76	5.01±0.10	6.13±0.31	6.05±0.50	5.92±0.29[ab]
2%	5.88±0.75	6.28±0.82	6.10±0.11	5.40±0.04	6.21±0.12	6.22±0.27	6.20±0.02[a]
4%	6.29±0.33	6.02±0.27	6.05±0.50	5.30±0.03	6.56±0.65	6.20±0.22	6.30±0.22[a]
6%	**6.13±0.30**	**6.10±0.01**	**6.20±0.02**	**6.01±0.22**	**6.25±0.52**	**6.30±0.30**	**6.40±0.50[a]**
8%	5.65±0.56	5.20±0.07	4.88±0.66	5.00±0.66	4.70±0.70	5.10±0.12	5.20±0.22[b]

③ 상품화를 위한 제과·제빵 영양소 성분 분석

○ 관능검사를 통해 가장 높은 기호도를 나타낸 검정콩 부산물 9%(식빵), 6%(쿠키) 첨가된 제품을 상품화를 위한 100 g당 영양소 분석을 실시하여 아래와 같은 결과를 얻었음.

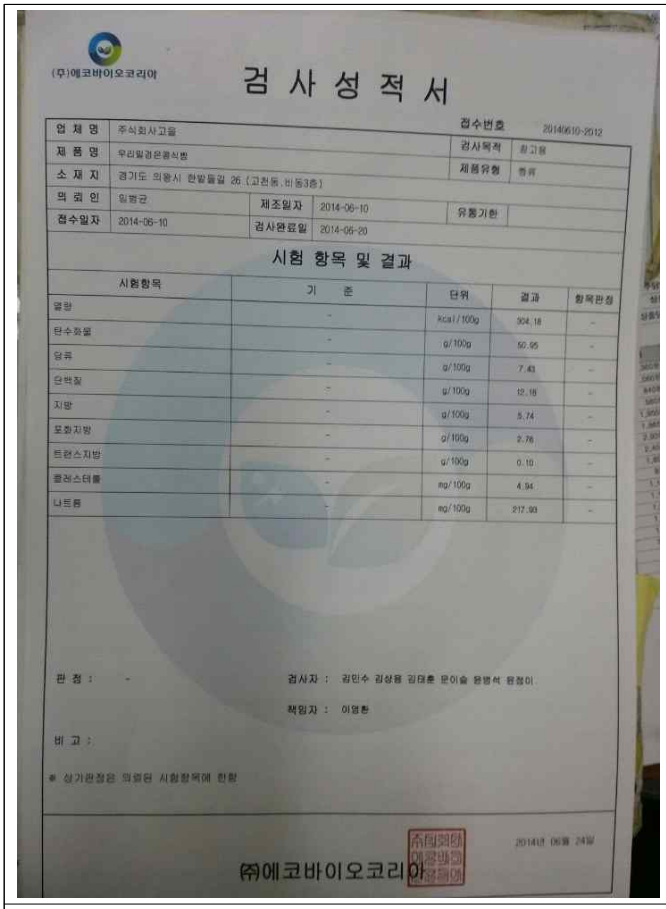
○ 대조군에 비해 단백질 함량이 3배 높게 나타났으며 지방 함량은 50% 낮게 나타났고 나트륨 함량도 50% 낮은 결과를 보였음. [Table 3-24 & 3-25]

[Table 3-24] Proximate composition in white bread black bean by-product according to different levels

Composition	Black bean by-product Contents (%)	
	0%	9%
Energy(kcal)	302	304
Carbohydrate(g)	51	51
Saccharide(g)	4	7
Protein(g)	4	12
Fat(g)	11	6
Saturated fat(g)	0	3
Trans fat(g)	0	0.1
Cholesterol(g)	11	5
Sodium(mg)	447	218

[Table 3-25]. Proximate composition in cookies black bean by-product according to different levels

Composition	Black bean by-product Contents (%)	
	0%	6%
Energy(kcal)	560.76	537
Carbohydrate(g)	52.44	51.21
Saccharide(g)	11.8	15.92
Protein(g)	9	0.99
Fat(g)	35	33.02
Saturated fat(g)	0.5	27.05
Trans fat(g)	0.3	0.60
Cholesterol(g)	28.2	56.92
Sodium(mg)	217.78	53.39



(주)에코바이오코리아

검 사 성 적 서

업 체 명	주식회사고을			검사목적	참고용
제 품 명	우리밀검은콩식빵			제품유형	빵류
소 재 지	경기도 의왕시 한발들길 26 (고천동,비동3층)				
의 뢰 인	임병균	제조일자	2014-06-10	유통기한	
접수일자	2014-06-10	검사완료일	2014-06-20		

검수번호 2014061O-2012

시험 항목 및 결과

시험항목	기 준	단위	결과	항목판정
열량	-	kcal/100g	304.18	-
탄수화물	-	g/100g	52.95	-
당류	-	g/100g	7.43	-
단백질	-	g/100g	10.18	-
지방	-	g/100g	5.74	-
포화지방	-	g/100g	2.78	-
트랜스지방	-	g/100g	0.10	-
콜레스테롤	-	mg/100g	4.94	-
나트륨	-	mg/100g	217.93	-

판 정 : -

검사자 : 김민수 김상용 김태훈 문이슬 윤병석 윤정이

책임자 : 이영환

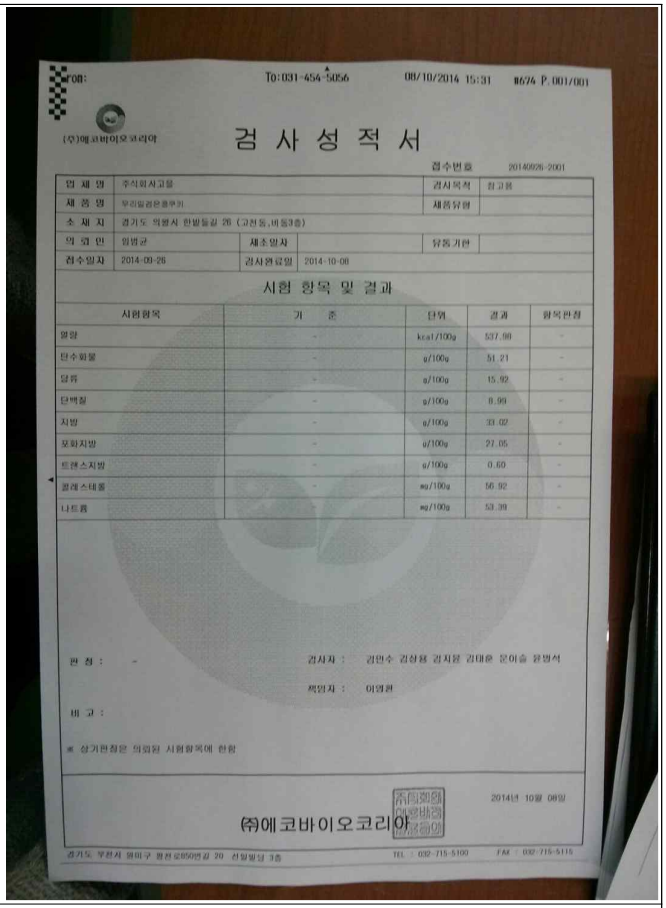
비 고 :

* 상기판정은 의뢰된 시험항목에 한함

2014년 06월 24일

㈜에코바이오코리아

빵 9가지 영양소 검사 성적서



(주)에코바이오코리아

검 사 성 적 서

업 체 명	주식회사고을			검사목적	참고용
제 품 명	우리밀검은콩쿠키			제품유형	
소 재 지	경기도 의왕시 한발들길 26 (고천동,비동3층)				
의 뢰 인	임병균	제조일자		유통기한	
접수일자	2014-09-26	검사완료일	2014-10-08		

접수번호 20140926-2001

시험 항목 및 결과

시험항목	기 준	단위	결과	항목판정
열량	-	kcal/100g	537.00	-
탄수화물	-	g/100g	51.21	-
당류	-	g/100g	15.92	-
단백질	-	g/100g	0.99	-
지방	-	g/100g	33.02	-
포화지방	-	g/100g	27.05	-
트랜스지방	-	g/100g	0.60	-
콜레스테롤	-	mg/100g	56.92	-
나트륨	-	mg/100g	53.39	-

판 정 : -

검사자 : 김민수 김상용 김지원 김태훈 문이슬 윤병석

책임자 : 이영환

비 고 :

* 상기판정은 의뢰된 시험항목에 한함

2014년 10월 08일

㈜에코바이오코리아

쿠키 9가지 영양소 검사 성적서

④ 색도 측정

○ 검정콩 부산물을 첨가하여 제조한 식빵의 색도측정은 색도계(Colormeter CR-200, Minolta, Co., Osaka, Japan)로 L((lightness, 명도), a(redness, 적색도), b(Yellowness, 황색도)의 값을 측정하였음.

○ 검정콩 부산물을 첨가한 식빵의 색도 결과, L값(명도)은 검정콩 부산물 9% 첨가군이 73.72으로 가장 낮게 나타났으며, 검정콩 부산물 첨가량이 증가할수록 유의적으로 감소하였음. a값(적색도)은 검정콩 부산물 9% 첨가 식빵이 0.51로 가장 높았으며, 검정콩 부산물 함량이 높을수록 a값은 증가하였음. b값(황색도)은 대조군이 13.54로 검정콩 부산물 첨가량이 증가할수록 유의적으로 증가하였음. [Table 3-26]

[Table 3-26] Color values of white bread prepared with black bean by-product according to different levels

Variables	L	a	b
Control	86.18±0.07^{a}	0.10±0.04^{c}	10.84±0.96^{c}
3%	79.96±0.73^{b}	0.17±0.04^{bc}	11.92±0.47^{b}
6%	76.00±1.41^{c}	0.24±0.02^{b}	12.29±0.18^{b}
9%	73.72±0.93^{d}	0.51±0.08^{a}	13.54±0.05^{a}

○ 검정콩 부산물을 첨가한 쿠키의 색도 결과, L값(명도)은 검정콩 부산물 8% 첨가군이 65.78으로 가장 낮게 나타났으며, 검정콩 부산물 첨가량이 증가할수록 유의적으로 감소하였음. a값(적색도)은 검정콩 부산물 8% 첨가 쿠키가 8.06로 가장 높았으며 검정콩 부산물 함량이 높을수록 a값은 증가하였음. b값(황색도)은 대조군이 35.46으로 검정콩 부산물 첨가량이 증가할수록 유의적으로 증가하는 경향을 보였음. [Table 3-27]

[Table 3-27] Color values of cookies prepared with black bean by-product according to different levels

Variables	L	a	b
Control	72.02±1.18^{a}	3.48±0.23^{d}	35.46±2.38^{b}
2%	71.15±0.56^{a}	5.41±0.33^{c}	36.63±1.38^{ab}
4%	68.93±0.54^{b}	7.45±0.65^{b}	39.44±1.31^{a}
6%	68.40±0.93^{b}	6.38±0.107^{a}	36.99±1.19^{ab}
8%	65.78±0.36^{c}	8.06±0.28^{a}	38.54±1.21^{a}

⑤ 물성 측정

○ 검은콩 부산물을 첨가하여 제조한 식빵의 물성은 texture analyzer (TAXT Express V2.1, London, England)를 사용하여 3회 반복 측정하여 평균값을 나타내었음. 텍스쳐 측정값은 stablemicro systems(TAXT Express V2.1, London, England)프로그램을 통해 결과 값을 나타내었음. TPA(texture Profile Analysis) test 방법으로 경도(hardness), 탄력성(spinginess), 검성(gumminess), 씹힘성(chewiness), 응집성(cohesiveness)을 측정하였음.

○ 검정콩 부산물을 첨가하여 제조한 식빵의 물성측정 결과, 검정콩 부산물 첨가량을 달리한 식빵의 경도(hardness)는 대조군이 179.17으로 대조군과 비교하여 검정콩 부산물 첨가량이 증가

할수록 유의적으로 높게 나타났음. 점착성(Adhesiveness), 검성(gumminess)음 검정콩 부산물의 첨가량에 따라 증가하였고, 응집성(cohesiveness), 탄력성(Springiness)은 대조군에 비해 큰 차이가 없었고, 씹힘성(chewiness)은 검정콩 부산물 첨가량이 증가할수록 증가하였음. [Table 3-28].

[Table 3-28]. Textural properties of white bread prepared with black bean by-product according to different levels

Variables	Control	3%	6%	9%
Hardness	179.17±35.40^{b}	190.17±12.85^{b}	193.47±26.80^{b}	315.37±24.37^{a}
Adhesiveness	0.10±0.17^{NS}	0.20±0.00	0.20±0.00	0.17±0.06
Springiness	5.88±0.13^{a}	6.11±0.14^{a}	6.20±0.6^{a}	5.13±0.60^{b}
Chewiness	913.79±181.17^{NS}	1026.21±99.51	1031.28±152.78	1224.78±189.78
Gumminess	155.92±34.30^{b}	167.72±14.36^{b}	166.26±23.81^{b}	238.15±17.89^{a}
Cohesiveness	0.87±0.02^{a}	0.88±0.02^{a}	0.86±0.03^{a}	0.75±0.01^{b}

○ 검정콩 부산물을 첨가하여 제조한 쿠키의 물성측정 결과, 검정콩 부산물 첨가량을 달리한 쿠키의 경도(hardness)는 검정콩 부산물 첨가량이 증가할수록 낮아졌음. 씹힘성(chewiness), 검성(gumminess), 탄력성(Springiness)은 대조군보다 검정콩 부산물 첨가량이 증가할수록 낮아졌음. 점착성(Adhesiveness)은 대조군에 비해 증가하였고, 검정콩 부산물 첨가가 응집성에는 거의 영향을 미치지 않았음. [Table 3-29]

[Table 3-29] Textural properties of cookies prepared with black bean by-product according to different levels

Variables	Control	2%	4%	6%	8%
Hardness	3058.87±201.61^{a}	2695.87±170.68^{b}	2604.17±136.73^{b}	1809.30±253.42^{c}	1299.27±89.94^{d}
Adhesiveness	-57.87±22.82^{b}	-28.00±10.55^{a}	-23.07±13.98^{a}	-6.90±0.72^{a}	-3.43±2.54^{a}
Springiness	0.94±0.09^{a}	0.77±0.03^{ab}	0.71±0.04^{ab}	0.70±0.11^{ab}	0.59±0.28^{b}
Chewiness	627.57±65.22^{a}	307.16±75.03^{b}	280.48±78.60^{b}	224.22±59.80^{bc}	137.31±65.76^{c}
Gumminess	680.73±137.44^{a}	399.95±109.09^{b}	398.47±126.14^{b}	316.52±48.08^{b}	234.33±19.86^{b}
Cohesiveness	0.22±0.03^{NS}	0.15±0.05	0.16±0.05	0.18±0.02	0.18±0.04

⑥ 항산화 활성 평가

○ **총 페놀 함량**: 총 폴리페놀 함량은 Dewanto 등의 방법에 따라 Folin-Ciocalteu reagent가 추출물의 폴리페놀성 화합물에 의해 환원되어 몰리브덴 청색으로 발색하는 원리를 이용하였음. 검정콩 부산물 빵 에탄올 추출물 시료 100 uL에 2% $NaCO_3$ 용액을 2 mL씩 가한 후 3분간

방치하고 50% Folin-Ciocalteu reagent 100 uL를 첨가하여 30분간 반응시킨 다음 반응액의 흡광도를 750 nm에서 측정하였음. gallic acid(Sigma, St Louis, Mo, USA)를 표준물질로 사용하여 검량선을 구했으며, 시료의 총 폴리페놀 함량은 gallic acid equivalent(mg GAE/mL)로 나타냄.

- 검정콩 부산물로 만든 식빵의 폴리페놀 결과는 Table 2-1-11에 제시된 바와 같음. 총 폴리페놀 함량은 9% 첨가군이 0.067 mg GAE/mL 로 가장 많은 페놀을 함유 하였으나, 검정콩 부산물의 첨가량에 따라 큰 차이를 나타내지는 않았음.
- 쿠키의 총 폴리페놀 함량 결과, 총 폴리페놀 함량은 시료 8% 첨가군이 0.097 mg GAE/mL 로 가장 많은 페놀을 함유 하였으나, 검정콩 부산물의 첨가량에 따라 큰 차이를 나타내지는 않았음. [Table 3-30].

○ **총 플라보노이드 함량** : 총 플라보노이드 함량은 Kang 등(1996)의 방법에 따라 측정하였음. 시료액 1 mL에 90% diethylenglycol 10 mL와 1 N NaOH 1 mL를 가하여 37℃ water bath에서 1시간 동안 반응시킨 후 420 nm에서 흡광도를 측정하였음. Rutin을 표준물질로 하여 0～1 mg/mL의 농도 범위에서 얻어진 표준 검량선으로부터 추출물의 총 페놀 함량을 계산하였음.

- 식빵의 총 플라보노이드 함량 분석결과, 시료의 총 플라보노이드 함량은 rutin을 기준으로 9% 첨가군에서 1.245 mg GAE/mL 으로 나타났음.
- 쿠키의 총 플라보노이드 함량 분석결과는 Table 3-31에 제시된 바와 같음. 시료의 총 플라보노이드 함량은 rutin을 기준으로 8% 첨가군에서 1.240 mg GAE/mL 로 나타났음.

[Table 3-30]. Total polyphenol and flavonoid contents of 70% ethanol extracts (white bread lack bean by-product) according to different levels. (mg GAE/mL)

Sample	Polyphenol	Flavonoid
Control(0%)	0.063±0.027^{NS}	1.230±1.178^{NS}
3%	0.063±0.025	1.231±1.188
6%	0.065±0.026	1.243±1.121
9%	0.067±0.025	1.245±1.134

[Table 3-31] Total polyphenol and flavonoid contents of 70% ethanol extracts (cookies black bean by-product) according to different levels. (mg GAE/mL)

Sample	Polyphenol	Flavonoid
Control(0%)	0.090±0.025^{NS}	1.210±1.172^{NS}
2%	0.092±0.012	1.214±1.122
4%	0.093±0.022	1.225±1.112
6%	0.095±0.024	1.233±1.149
8%	0.095±0.015	1.240±1.124

○ **DPPH법에 의한 항산화 활성**: DPPH법에 의한 free radical 소거활성은 Naik의 방법을 변형하여 측정하였음. 시료가 1000 μg/mL의 농도가 되도록 제조한 다음 시료 100 μL과 0.1mM DPPH ethanol 용액 100 μL을 첨가한 후, 30분간 실온에 방치하여 517 nm에서 흡광도를 측정하였고, 기존 항산화제인 BHA와 비교하였음. 이 때 농도별 전자 공여 능력은 백분율로 표현하였음.

- DPPH는 짙은 자색을 띄는 비교적 안정한 free radical로서 cystein, glutathione과 같은 아미노산과 ascorbic acid, BHA등에 의해 환원되어 탈색되므로 다양한 천연소재로부터 항산화물질을 검색하는데 많이 이용되고 있음. Free radical은 인체 내에서 지질 또는 단백질 등과 결합하여 노화를 일으키기 쉬운데 페놀성 화합물의 경우 free radical을 환원시키거나 상쇄시키는 능력이 강해 인체 내에서 free radical에 의한 노화를 억제하는 척도로 이용할 수 있음. 검정콩 부산물의 농도가 증가할수록 DPPH 라디칼 소거활성도 증가하였음. [Table 3-32].
- 동결건조한 식빵 시료 대조군은 5.61%의 DPPH 라디칼 소거활성을 보였음. 3%, 6%, 9%는 각 10.09%, 10.62%, 10.85%의 DPPH 라디칼 소거활성을 보였음.
- 쿠키의 DPPH 라디칼 소거능활성: 검정콩 부산물의 농도가 증가할수록 DPPH 라디칼 소거활성이 증가하는 경향을 보였음. 대조군은 1.65%의 DPPH 라디칼 소거활성을 보였으며 2%, 4%, 6%, 8%는 각 3.27%, 4.06%, 5.61%, 5.94%의 DPPH 라디칼 소거활성을 보임. [Table 3-33].

[Table 3-32]. DPPH radical scavenging activity of 70% ethanol extracts (white bread black bean by-product) according to different levels

Sample	Concentration (1000 ug/mL)
Control	5.61 ± 0.65^{b}
3%	10.09 ± 4.79^{a}
6%	10.62 ± 3.34^{a}
9%	10.85 ± 4.66^{a}

[Table 3-33]. DPPH radical scavenging activity of 70% ethanol extracts (cookies black bean by-product) according to different levels

Sample	Concentration (1000 ug/mL)
Control	1.65 ± 0.86^{d}
2%	3.27 ± 2.39^{c}
4%	4.06 ± 2.71^{b}
6%	5.61 ± 0.80^{a}
8%	5.94 ± 0.41^{a}

○ **ABTS법에 의한 항산화 활성**: ABTS 법에 의한 free radical 소거활성은 Park 등의 방법을 변형하여 측정하였음. 7.4 mM ABTS 용액에 2.6 mM Potassium persulphate를 첨가한 뒤, 24시간 냉동보관 후, 1X PBS buffer 용액을 15배 희석하여 732 nm에서 흡광도를 0.700±0.030로 맞추어 ABTS regent로 사용하였음. 시료가 1000 μg/mL의 농도가 되도록 제조한 다음 시료 50 μL과 제조한 ABTS regent 950 μL 넣어 잘 혼합한 다음 실온에서 5분간 반응 시킨 후, 732nm 에서 흡광도를 측정하였음.

- 검정콩 부산물로 만든 식빵 추출물의 ABTS 라디칼 소거활성은 농도(63-1000 μg/mL) 의존적으로 증가하였음. 식빵 추출물 대조군의 경우 1000 μg/mL에서는 4.21%의 ABTS라디칼 소거능을 보였음. 3%, 6%, 9%는 각각 5.44%, 5.12%, 2.51%의 ABTS 라디칼 소거활성을 보였음. [Table 3-34]
- 검정콩 부산물로 만든 쿠키의 ABTS 라디칼 소거활성의 경우 1000 μg/mL에서는 1.99%의 ABTS라디칼 소거능을 보였으며 2%, 4%, 6%, 8%는 각 2.19%, 5.12%, 1.97%, 0.73% 의 ABTS 라디칼 소거활성을 보였음. [Table 3-35].

[Table 3-34]. ABTS radical scavenging activity of 70% ethanol extracts from white bread black bean by-product according to different levels

Sample	Concentration (1000 ug/mL)
Control	2.51±0.78[b]
3%	4.21±0.30[a]
6%	5.12±2.45[a]
9%	5.44±2.00[c]

[Table 3-35]. ABTS radical scavenging activity of 70% ethanol extracts from cookies black bean by-product according to different levels

Sample	Concentration (1000 ug/mL)
Control	0.73±0.58[c]
2%	1.97±0.44[b]
4%	1.99±0.90[a]
6%	2.19±0.55[c]
8%	5.12±2.45[d]

⑦ 항균 활성 평가

○ **항균력 확인을 위해 검정콩 부산물을 이용한 식빵과 쿠키를 에탄올 70%로 추출하여 시료로 사용함**

○ 실험에 사용한 시료는 관능평가 결과 대조군과 기호도가 가장 높게 나타난 검정콩 부산물 첨가 식빵 9%, 쿠키 6%를 실험에 사용하였음.

○ Paper disc diffusion법을 이용한 항균활성 측정:검정콩 부산물 빵과 쿠키 추출물의 항균활성

은 minimal inhibition concentration(MIC)을 측정하는 비색법보다 항균활성을 육안으로 뚜렷하게 관찰할 수 있는 paper disc diffusion법을 실시하였음. 즉, 일정시간 동안 배양하면서 paper disc 주위에 clear zone 생성 유무를 확인하고 크기를 캘리퍼를 이용하여 측정한 후에 디지털 카메라(Nicon D70, Japan)로 촬영하였음.

○ 사용균주 및 배양 조건: 실험에 사용된 공시 균주는 병원성 세균(식중독 균주) 6종을 사용하였음. 병원성세균(식중독 균주)은 *S.aureus, S.epidermidis, B. subtilis, B. cereus, E. coli, S.typhimurium* 등 총 6종을 항균실험에 이용하였음. *S. aureus, S. epidermidis, S. Typhimurium*은 한국 세포주은행으로 부터 분양받았고, *B. subtilis*는 미생물자원센터로부터, *B. cereus, E. coli*는 한국미생물 보존센터로부터 분양받아 계대배양 후 사용하였음. 일반세균(식중독 균주)의 배양조건은 YB 배지에 각각 접종하여 30℃, 37℃에서 24시간 배양하면서, 2대 계대 배양하였음. **[Table 3-36].**

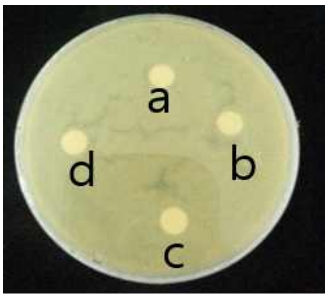
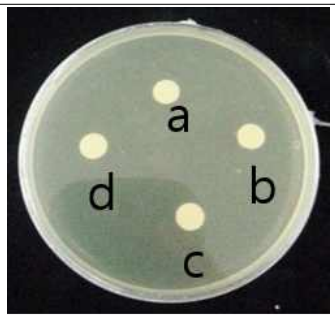
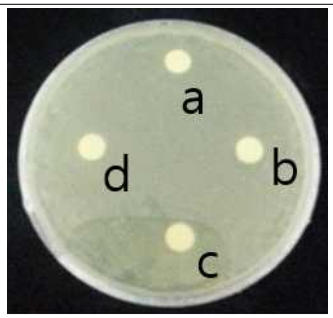
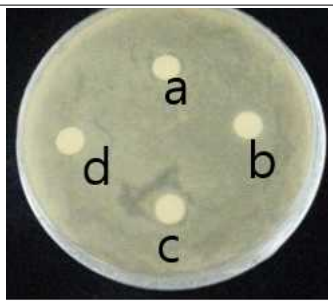
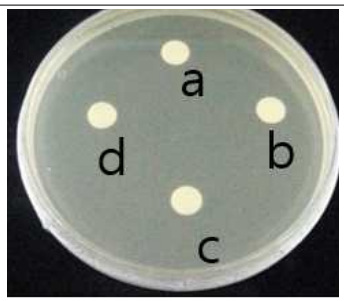
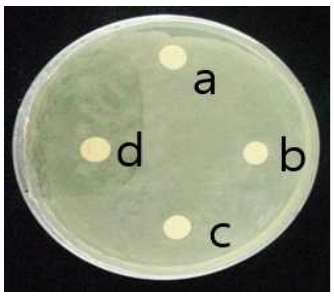
[Table 3-36]. Culturing and culture condition of six strains for antibacterial activity

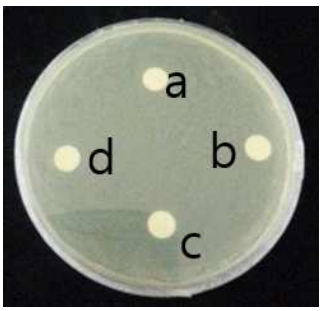
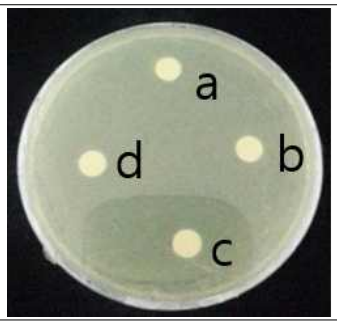
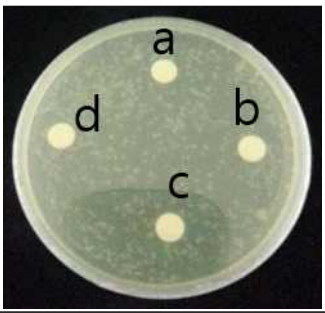
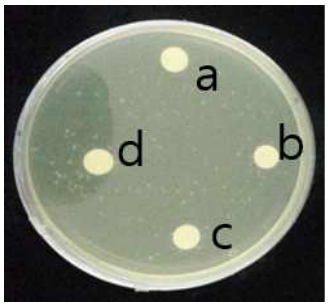
	균주 이름	균주 번호	배지	배양조건
일반세균 (식중독균)	*S.aureus*	ATCC19111	Nutrient agar	37℃, 24 hr
	S.epidermidis	ATCC1228	MSA mediun	37℃, 24 hr
	B. subtilis	KCTC1022	Nutrient agar	30℃, 24 hr
	B. cereus	KCCM11341	Nutrient agar	30℃, 24 hr
	E. coli	KCCM32835	Nutrient agar	30℃, 24 hr
	S.typhimurium	ATCC25923	Nutrient agar	37℃, 24 hr

○ 생육 저해환경 (clear zone) 측정: 시료(빵과 쿠키 에탄올 추출물)의 항균활성 검색은 paper disc method 이용하여 측정하였음. 평판배지에 2% agar를 첨가하여 멸균한 후 공시균주를 접종하여 plate를 만들어 사용하였으며, plate를 건조시킨 후 paper disc (Φ8 mm, Whatman)를 공시균주에 접종한 plate 표면 위에 올려놓고 항균활성을 확인하고자하는 시험용액을 흡수시켜 37℃ incubator에서 24시간 배양하여 paper disc 주위의 clear zone의 직경(mm)을 측정하였음.

○ 실험결과 [a: 쿠키 1, b: 쿠키 4, c: 식빵 1, d: 식빵 4; (mm)] **[Fig 3-24]**

	쿠키 ①	쿠키 ④	식빵 ①	식빵 ④
S.aureus	-	-	-	-
L.monocytogenes	-	-	-	-
Salmonella spp.	-	-	-	-
B. cereus	-	-	-	-
E. coli	-	-	-	-

균주	L.monocytogenes	B. cereus	E. coli
1회			
2회			

균주	S.aureus	Salmonella spp.
1회		
2회		

[Fig 3-24] 시료(빵과 쿠키 에탄올 추출물)의 항균활성 검색

⑧ 시제품출시

○ 7월 21일부터 친환경 유통전문 업체인 (주)동아원의 계열사인 (주)해가온의 직영점과 전국 30여개의 가맹, 공급점을 통해 시제품을 판매하였음(2014.07.21.). [Fig 3-25]

(주)해가온의 PB상품용으로 개발중인 패키지에 스티커를 추가로 제작예정임.
그외 올리브협동조합, ㈜초록마을 입점상담 진행중.

시험항목	control	부산물9%함유식빵
열량(kcal)	302	304
탄수화물(g)	51	51
당류(g)	4	7
단백질(g)	4	12
지방(g)	11	6
포화지방(g)	0	3
트랜스지방(g)	0	0.1
콜레스테롤(g)	11	5
나트륨(mg)	447	218

[Fig 3-25] 패키지상품으로써 시제품 개발

⑨ 예상판매가 (원가계산표 산출)

○ 식빵의 경우 300 g 기준 3,800원으로 산정하였음.
○ 쿠키의 경우 300 g 기준 3,800원으로 산정하였음.

다. 2핵심 2세부:

항비만소재의 기전연구 및 제품개발기반 구축 **[고려대 이철구교수, 성신여대 전용필 & 비만과학연구소]**
○ **산화적 스트레스 과부하세포에서의 항비만소재 표지물질의 효능 평가 (Yeast 모델 적합도 시험)** • Yeast knock out strain을 확보하여 in vivo 효모 세포에서 생물학적 의미가 있는 항산화 능력을 평가할 수 있는 시스템을 구축함. • C3G의 항산화 능력은 in vivo 효모 세포에서는 나타나지 않음. 따라서, C3G는 세포내의 신호경로에 영향을 주어 세포 특성을 변경시켜 어떤 효능을 나타내는 것으로 평가됨. C3G는 효모 모델에서는 지방 축적 및 수명 연장에 효능이 없는 것으로 평가됨. ○ **검정콩 추출물 및 유효성분의 지방줄기세포 분화에서의 기작에 대한 연구 (줄기세포 모델 적합도 시험)** • 1 & 2차년도에서 지방줄기세포의 증식이나 분화와 연관되어 검정콩추출물의 항비만효과 확인하고 항비만소재의 스크리닝 방법으로 지방줄기세포를 이용한 지식기반구축함. • 3차년도에서는 검정콩추출물의 항비만효과에 대한 validation을 위한 반복실험을 시행하고 재확인함. 특히 추출물의 주 구성분인 C3G와 D3G의 조합에 의해 항비만 효과가 최대로 발현 하는 것임을 세포 및 분자수준에서 밝힘. • 부가적으로 lineage 분화에 따른 영향을 일부분 확인함. • 결론적으로 검정콩추출물 및 유효성분은 지방줄기세포가 지방세포로 분화하는 과정을 억제함으로써 비만을 억제할 수 있음을 확인함. 더욱이 유효성분의 유용성 검증에 따라 콩의 효율적 처리에 따른 건강식품이나 의약품 수준의 제품도 개발이 가능하여 산업적 가치가 커질 것으로 예측함. ○ **제품개발을 위한 산업화 기반 구축 [BBT-CD3G 신제품 마케팅 전략]** • 표적시장 선정: 30-50 대 남성이 비만율이 가장 높으나 항비만 활동이 비교적 적고 또 남성용 제품이 거의 없기 때문에 이 집단을 표적 시장으로 선정 • 포지셔닝 전략: 남성전용의 고가 항비만 기능식품으로 포지셔닝하며, 소비자에게 고가를 납득시킬 수 있는 제품 설계가 필요함 • 제품전략: 원료물질을 다량 포함시켜 신속한 효과를 얻게하며, 액상(젤) 형태로 낱개 포장 • 가격전략: 1개월 기준 7만~8만원대로 기존 남성용 제품에 비해 고가전략 채택 • 유통전략: 기존 유통망(약국, 건강기능식품 전문점 등)을 포함하여 고가의 이미지에 맞는 선별적 유통망 채택. 골프장과 고급 헬스클럽 등의 스포츠 시설 활용, 남성용품 제조사와 제휴한 마케팅 등이 가능함 • 마케팅 커뮤니케이션 전략: 다이어트 이후의 바람직한 모습을 강조한 긍정적 메시지를 활용. 본 신제품에 효과적인 미디어는 맞춤형 다이어트 상담이 가능한 블로그를 통한 사이버 입소문, 체험을 통한 입소문, 이벤트, 남성용 잡지, 교통방송 등임

](1) 산화적 스트레스 과부하세포에서의 항비만소재 표지물질의 효능 평가 (Yeast 모델 적합도 시험)
[고려대 생명과학대학 생명공학부 이철구]

① Yeast knock out strain 제작 및 C3G 평가

○ 목적: C3G가 표적으로 하는 산화물질의 종류를 invivo 효모세포 시스템에서 확인하고, 특정 ROS 억제가 세포 활성에 주는 영향과 특성을 규명함.

○ 연구방법 :

• Selectable marker를 포함하는 vector를 주형으로 하여 양 끝의 sequence가 knock out 시키

고자하는 gene의 앞, 뒤 부분과 동일한 primer set을 이용하여 pfx DNA polymerase로 PCR 반응을 수행함. Knock out 시킬 yeast colony를 5 mL 1x YPAD에서 overnight 키운 뒤 cell titer를 계산하여 2.5 x 108 cell을 2x YPAD에 접종하여 30 ° C에서 4-6시간 키움. 이후 cell을 centrifugation을 통해 harvest한 뒤 25 mL sterile water로 washing 해 주는 과정을 2 회 반복함. Cell pellet을 1mL sterile water에 부유시켜 100uL를 취해 transformation mix (50% PEG 3350, 1 M LiAc, single stranded DNA, gene disruption cassette)와 잘 섞음.

- 42 ° C에서 40분간 incubation후 centrifugation을 통해 cell만 남긴 뒤 5 mL 1x YPAD에 suspension시켜 30 ° C에서 4시간 동안 키움. 이후 1 ml sterile water로 washing하는 과정을 2 회 반복한 후 selectable marker로 selection이 가능한 plate 상에 spreading하여 30 ° C에서 single colony가 보일 때까지 키움. Selective plate 상에 생긴 single colony의 일부를 취하여 genotyping을 수행함으로써 knock out여부 판단. 확인된 결실 효모종에 C3G를 처리하여 영향을 평가함.

○ **연구결과** : 정상 효모세포 시스템에서 C3G는 고농도에서 항산화 효능이 존재하며, 세포독성과 pro-oxidant로의 변화를 통한 산화적 독성은 없는 것으로 평가됨. 따라서 C3G에 의해 순수한 항산화 작용이 세포의 활성에 어떠한 영향을 주며, 항산화 물질에 대한 순수기능을 평가하는 것이 중요함. 이에, 항산화 특정 기능이 상실된 효모세포를 통한 평가에서 C3G는 직접적 항산화 효능이 아니고, 간접적 효능(신호경로 변화등)을 통해 생리활성을 가지는 것으로 판단됨.

- ROS superoxide를 특이적으로 없애주는 superoxide dismutase 효소 정보를 가지는 두 개의 유전자가 각각 제거된 효모세포주를 생산함. ROS 과산화수소를 특이적으로 없애주는 catalase 효소 정보를 가지는 두 개의 유전자를 각각 제거된 효모세포주를 생산함.
- 특이적 산화적 부화가 걸린 효모세포주에서 C3G 효능 평가

- 결실 효모종에서 자체 ROS 생성 증가 대비 C3G에 의한 ROS 생성 억제 효능 평가

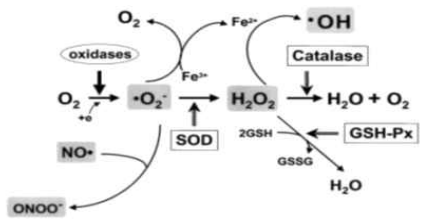
(ROS 종류별 특이적 평가): C3G는 특이적 ROS 억제능이 없는 것으로 평가됨

- 결실 효모종에서 C3G에 의한 ROS 생성 억제를 통한 효능 평가: 항산화능 결실 효모 세포의 수명에 영향을 주지 못함.

Construct of ROS–sensitive yeast cell line for evaluating anti-oxidant ability

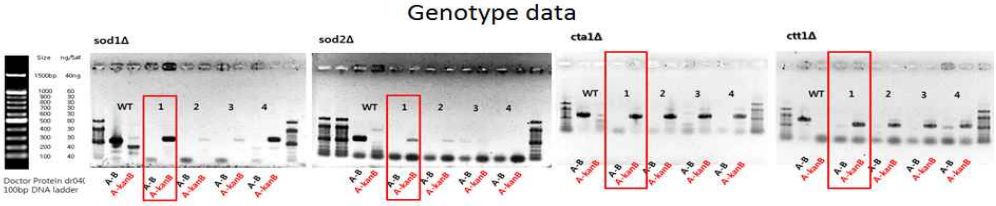
Anti–oxidative genes 선별

Superoxide dismutase genes - *sod1* (cytosol)
sod2 (mitochondria)
Catalase genes - *cta1* (peroxisomal, mitochondria matrix)
ctt1 (cytosol)



Oxidative stress and cardiovascular injury. Circulation, 2003. Griending KK, et al.

Genotype data



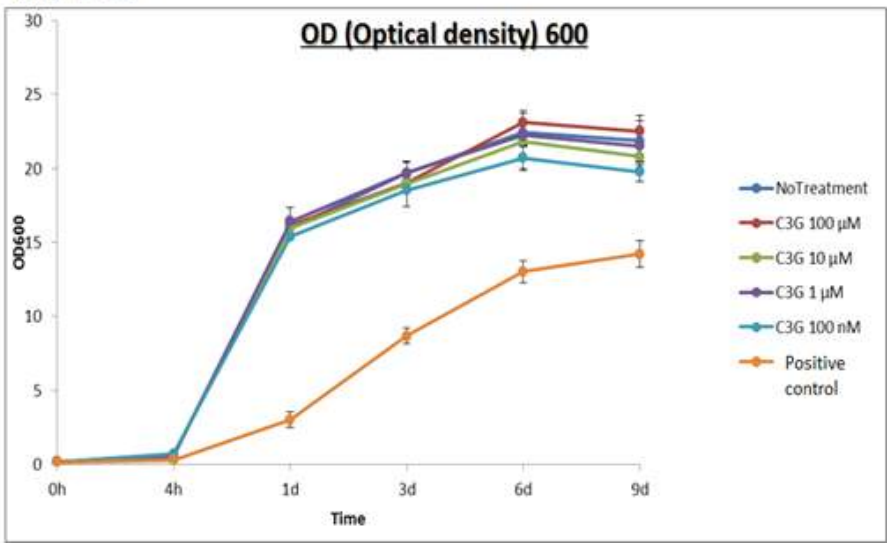
Four ROS–sensitive strains 확보
sod1Δ, sod2Δ, cta1Δ, ctt1Δ

② 효모세포를 이용한 항산화 측정시스템에서의 C3G효과

○ 효모세포를 활용하여 항산화 *in vivo* 상태에서 측정 시스템을 구축함. 이 시스템은 다양한 천연물의 항산화능 평가에 크게 활용할 수 있음.

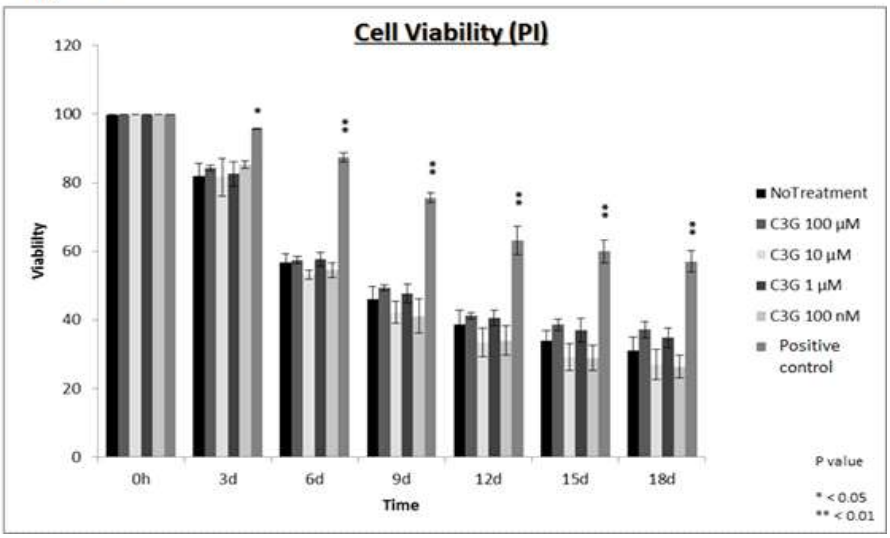
○ C3G 농도별 처리 조건과 C3G를 처리 하지 않은 No Treatment (NT) 간의 차이는 보이지 않음. Optical density (OD) 측정을 통해 그려진, 각 yeast cell의 growth curve를 보면 NT와 C3G 농도별 처리 간의 차이가 없음. **[Fig 3-26].**

Fig 3-26



○ Propidium iodide (PI) assay는 yeast cell의 viability를 측정하는 기법으로, yeast cell이 세포 활성을 유지하고 있으면 PI가 세포 내로 들어가지 못 하고, 세포 활성을 잃은 죽은 상태의 cell 내부로는 침투해 형광 signal을 냄. 이러한 PI assay를 통한 cell viability data에서도 조건 간의 유효한 차이는 없었음. C3G는 수명 연장 효과는 없는 것으로 평가됨. **[Fig 3-27].**

Fig 3-27



○ 항산화 능력 측정을 위해 세포내 Reactive oxygen species (ROS)를 측정하는 염색 시약인 H2DCF, MitoSOX Red를 이용함. H2DCF는 세포내 total ROS를, MitoSOX Red는 mitochondira 내부의 superoxide anion을 탐지하는 시약임. 측정 결과 조건간의 유효한 차이를 보이는 시기는 없음. DCF에 대한 반응은

없었고, MitoSOX에 대한 반응은 고농도에서 발생하였음. 이들 assay를 통해 100 μM C3G 고농도에서 미토콘드리아 관련의 항산화 효능이 관찰됨. [Fig 3-28 & 3-29].

Fig 3-28

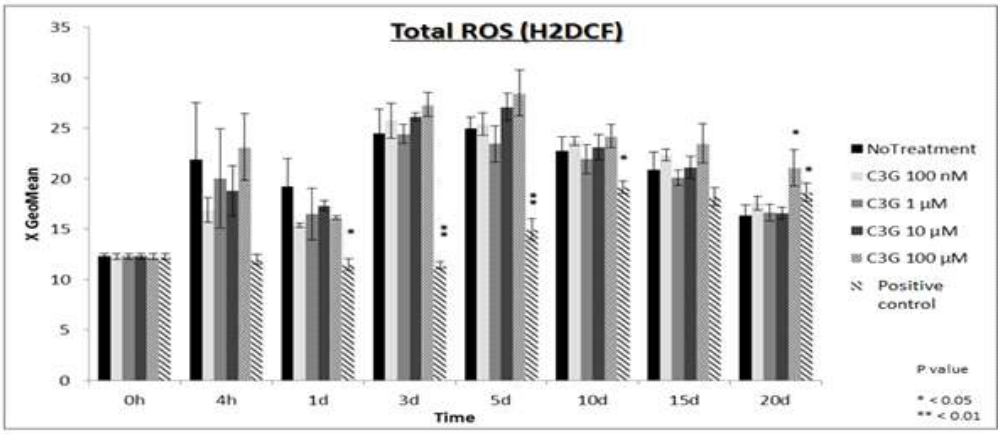
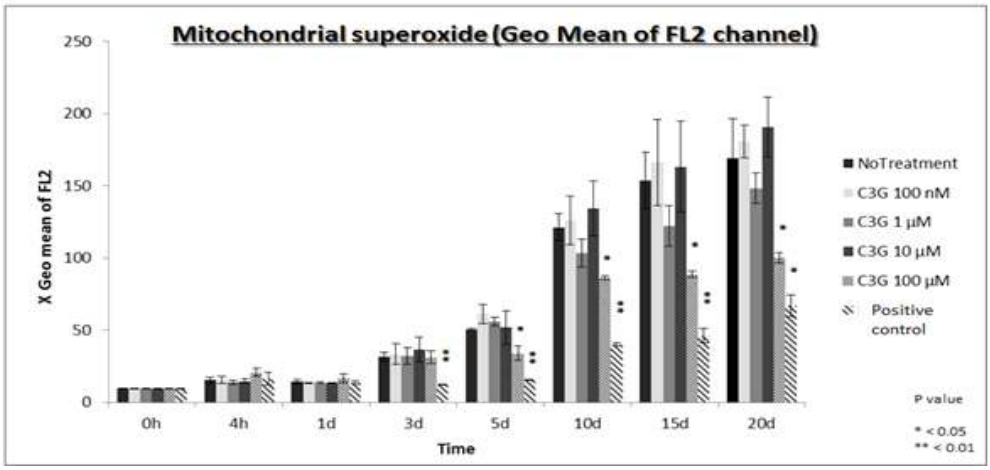
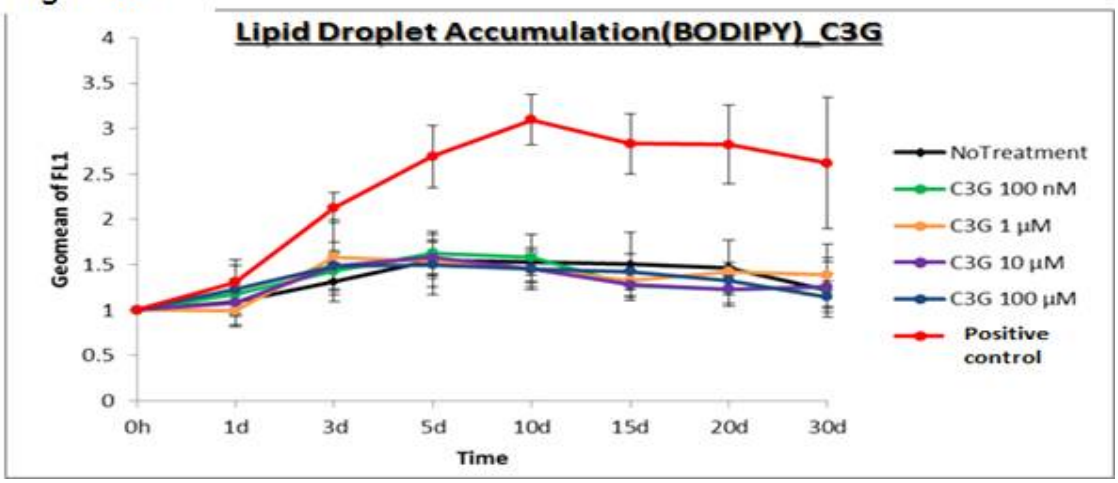


Fig 3-29



○ 추가적으로 C3G의 지방 축적에 있어서 어떠한 효능을 갔는지에 대해 연구함. Yeast cell 내부의 지방을 탐지하는 시약인 BODIPY를 이용하여 실험을 진행함. 이 assay에서도 역시 조건간의 유효한 차이는 나타나지 않음. C3G의 지방 축적 감소 효과는 yeast model에서는 없는 것으로 평가됨 [Fig 3-30].

Fig 3-30



(2) 검정콩 추출물 및 유효성분의 지방줄기세포 분화에서의 기작에 대한 연구 (줄기세포 모델 적합도 시험) [성신여대 생명과학부 전용필]

○ 연구배경

- Proteomics 방법을 이용하여 단백질 분리 및 동정을 통하여 연구 목적에 보다 빨리 다가가는 전략들이 수립되고 있음
- 그러나 특정 현상에 특정 단백질의 관여에 대한 연구는 여전히 전통적인 분자 생화학적 방법에 의하여 분석됨
- 1차년도 및 2차년도 연구 결과에서 검정콩 유래 기능물질인 C3G와 D3G가 농도 의존적으로 종 특이적으로 피하지방줄기세포가 지방세포로 분화되는 것을 억제함을 밝힘
- 검정콩 추출물은 C3G와 D3G의 혼합물로서 지방줄기세포가 지방세포로 분화하는 것을 억제함을 밝힘
- 지방줄기세포에서 C3G와 D3G의 이러한 영향에 대한 기작은 알려져 있지 않음.
- **내용 및 방법**

내용	• 2차년도 결과에서 검정콩 추출물과 그 유효성분인 C3G와 D3G가 지방줄기세포의 지방세포로의 분화가 억제될 수 있음을 밝혀 항비만 물질로 그 가능성을 한층 높임. • 이를 바탕으로 분화 과정에서 검정콩 추출물과 유효성분이 보여준 결과가 어떤 기작에 의한 것인지를 밝히고자 함.
방법	• 1차 연도 및 2차 연도에 축적한 지방줄기세포를 계대배양하여 충분한 양의 줄기세포준비 • 지방생성 분화 유도 과정중에 검정콘 추출룸과 유효성분 단독, 또는 유효성분 혼합물 처리 • glucose transport 능력 조절을 통한 분화 정도 조절 = glucose uptake analysis (biochemical analysis, specific glucose transporter analysis - translation-또는 transcription 수준에서의 분석 • 관련 enzyme 발현 정도 분석(translation-transcription 수준에서의 분석: PPAR γ 등) • 관련 조절물질의 합성 분석 (adiponectin 등의 발현 분석)

① 검정콩 추출물 단독 또는 혼합물의 지방세포로의 분화 억제

○ 지방세포의 분화가 검정콩 추출물에서 억제되었으며, D3G에서도 억제되는 경향이 강하였다.

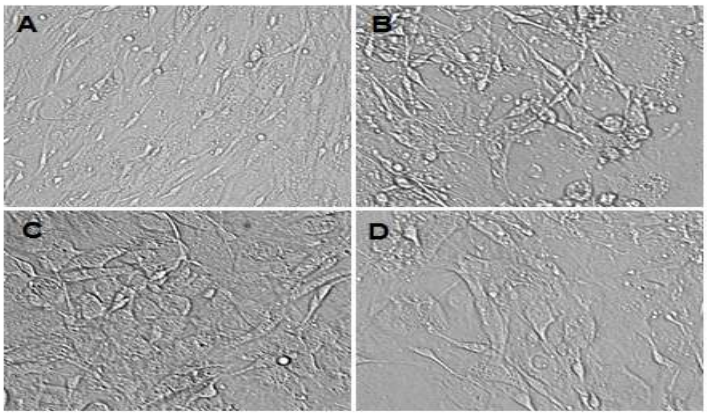
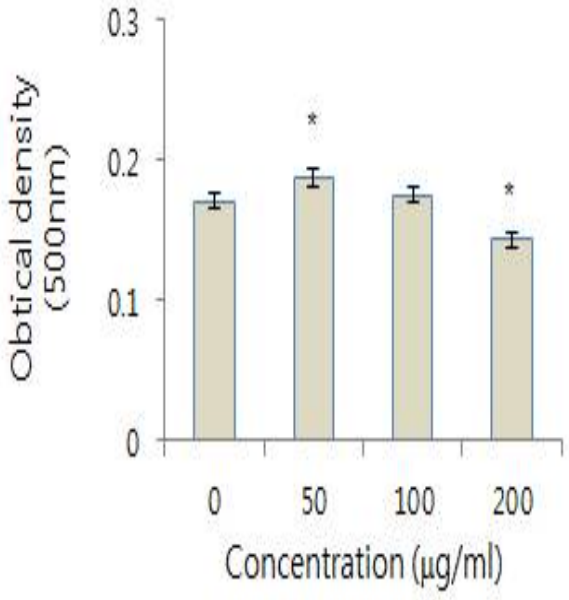


Fig 3-31. 지방줄기세포의 14일 분화 유도 후 사진. A는 분화를 유도하지 않은 대조군, B는 분화를 유도하면도 검정콩 추출물을 처리한 실험군(200 μg/ml), C는 분화를 유도하면도 C3G를 처리한 실험군(200 μM), D는 분화를 유도하면서 D3G를 처리한 실험군(200 μM).

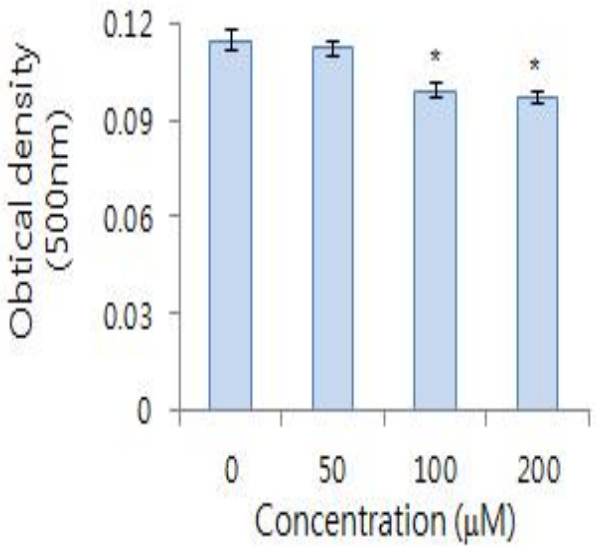
② 검정콩 추출물 단독 또는 혼합물의 지방축적 억제 효과

○ 피하지방줄기세포를 배양하면서 지방세포로 분화 유도하였다. 14일 분화 유도후 Oil-Red-O 염색법으로 염색후 세포를 용해하고 spectrophotometer를 이용하여 분화정도 및 지방축적 정도를 측정하였다. 검정콩 추출물은 200 ㎍/ml 농도에서 지방으로의 분화 그리고 축적 양을 감소시키는 영향이 있었다.

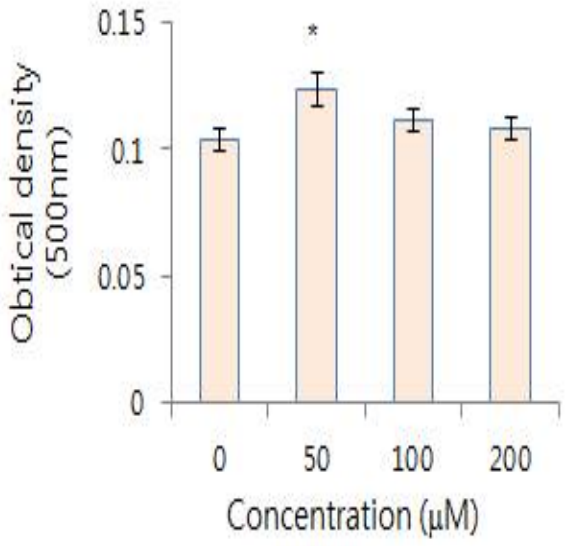
○ 검은콩 추출물의 항비만 효과는 주로 D3G에 의하여 진행됨을 예측함. [Fig 3-32, 3-33, 3-34]



[Fig 3-32] 검정콩 추출물에 의한 사람 지방줄기세포의 지방세포로의 분화과정에서 지방축적 억제. 50 ㎍/ml 농도에서는 증가하였으나 200 ㎍/ml 농도에서는 억제되었다.



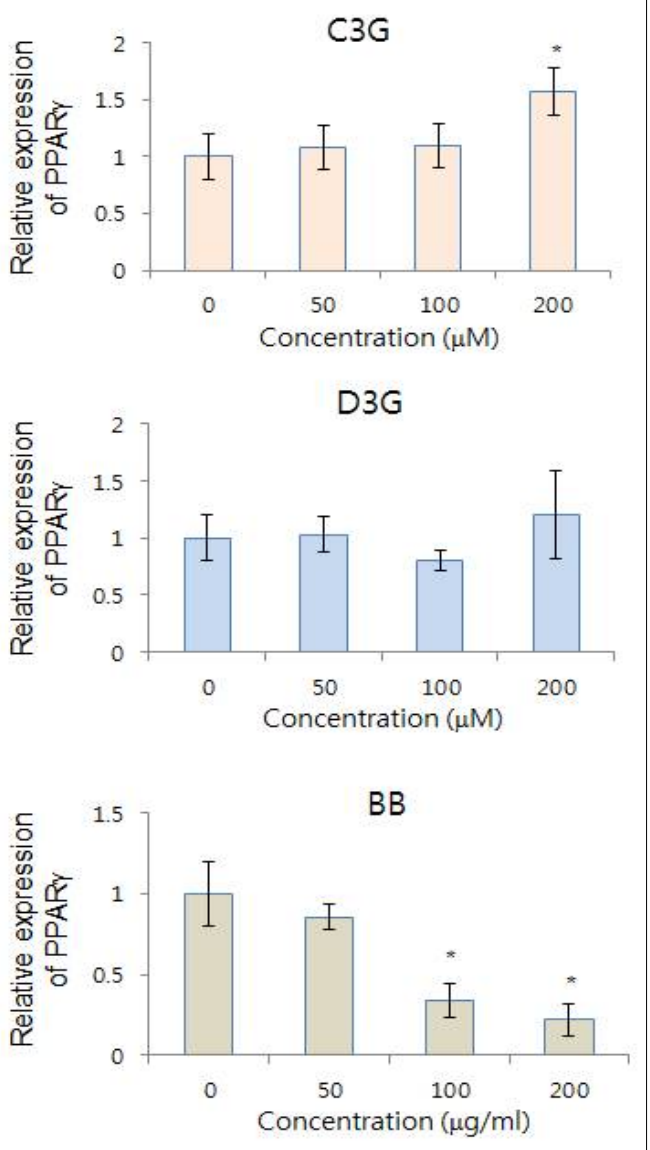
[Fig 3-33] D3G에 의한 사람 지방줄기세포의 지방세포로의 분화과정에서 지방축적 억제. 농도의존적으로 지방으로의 분화를 억제하였다.



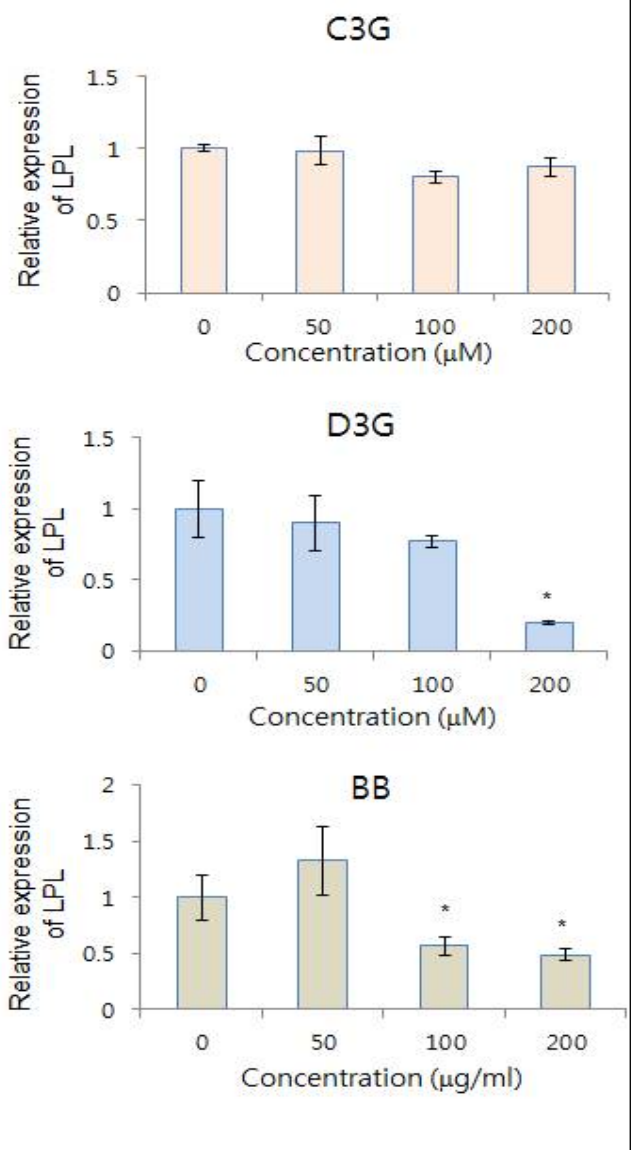
[Fig 3-34] C3G에 의한 사람 지방줄기세포의 지방세포로의 분화과정에서 지방축적 억제. 낮은 농도에서는 증가하였으나 더 높은 농도에서는 유의한 차이가 없었다.

③ 지방분화 마커의 발현 양상 분석을 통한 검정콩 유래 산물의 항비만 조절

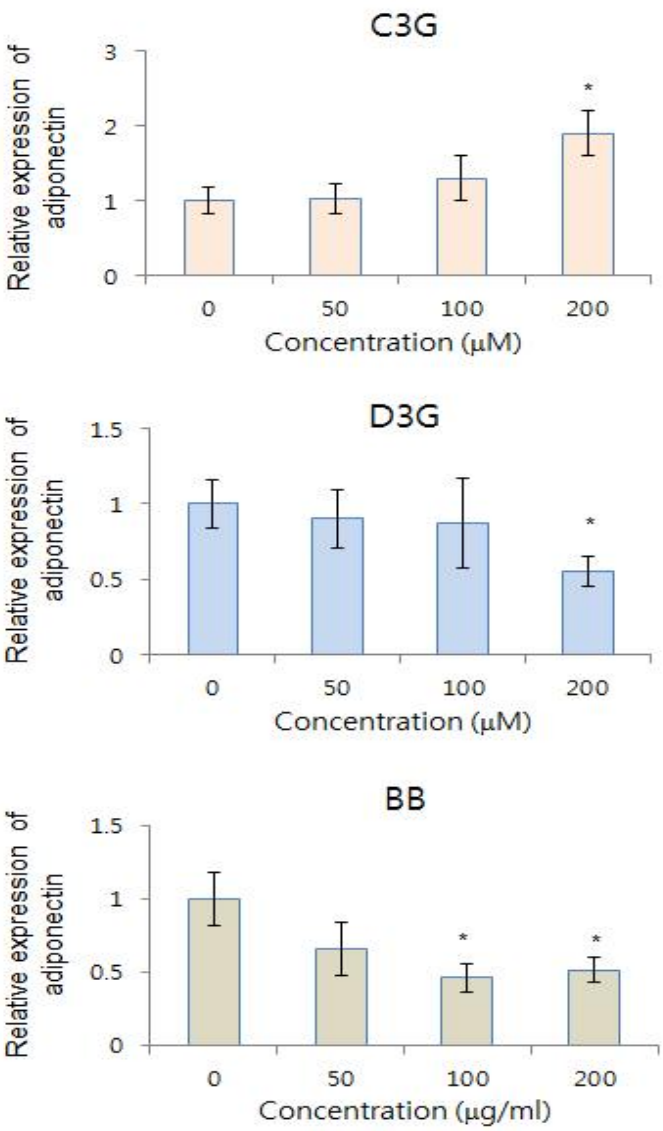
- **PPARγ 유전자 발현의 억제** : 검정콩 추출물은 PPARγ 유전자 발현을 억제하였으나 그 유효 성분인 C3G와 D3G는 그러하지 않았다. 이는 복합적 효과의 가능성을 암시한다. [Fig 3-35]
- lipoprotein lipase (LPL) 유전자 발현: 검정콩 추출물과 그 유효성분인 D3G는 농도 의존적으로 lipoprotein lipase (LPL) 유전자 발현을 억제하였다. 그러나 C3G의 효과는 미미하였다. [Fig 3-36]
- Adipnectin 유전자 발현: 검정콩 추출물과 그 유효 성분인 D3G는 농도 의존적으로 adipnectin 유전자 발현을 억증가시킨 반면 C3G 및 추출물은 높은 농도에서 오히려 감소하였다. [Fig 3-37]
- 분자수준에서의 조절기작을 밝히는 일이 필요하나 이상의 결과에서 검정콩 추출물과 그 유효 성분의 항비만 기작은 분화조절이 그 한 축으로 사료된다.



[Fig 3-35] PPARγ 유전자 발현



[Fig 3-36] Lipoprotein lipase (LPL) 유전자 발현



[Fig 3-37] Adiponectin 발현

(3) 농산물 및 수산물의 상호 시너지효과를 가지는 신소재 DB구축 [성신여자대학교 비만과학연구소]

① 1-2차년 동안 자료조사는 2011년 2월 1일부터 2013년 8월 15일까지 이루어졌으며 Pub MED (www.pubmed.com)와 Web of Science(www.webofscience.com)검색 포털을 이용하여 국내논문은 배제하고 국제 SCI에 게재된 국외논문을 중심으로 검색함. 항비만 keyword로 obesity, appetite, 3T3-L1, lipid, fat, adipocyte, weight, diet, AMPK를 사용한 비만연구를 검색한 결과 1차년의 농산 물 DB건수는 1,214건이며, 2차년 해양생물 검색건수는 총 346건으로 농산물에 비하여 1/3수 준으로 비만연구가 향후 개척분야로 보임. 추가지원이 가능하다면 1-2차년의 우수 소재들 간의 시너지효과를 보이는 소재들의 기전을 중심으로 같은 방법의 DB를 구축할 예정임.

Table. Summarization of anti-obesity DB identified with keywords of the natural sea weeds sources (microalgae, green lavar, sea mustard, kelp, gulfweed, shell, ecklonia cava, ishige okamurae, fusiforme, ceylon moss) and keywords of obesity(obesity, appetite, 3T3-L1, lipid, fat, adipocyte, weight, diet, AMPK and so on)

Sources	Experimental Methods				계	Mechanism	Ref.
	In vitro	*In vivo*	Human	Review			
Microalgae	17	67	19	7	110	Adiponectin, C/EBPa↑in adipose tissue, AdipoR1, AdipoR2↑in liver	1
Green lavar	26	25	4	10	65	TC, LDLc, TG↓ in serum	2
Sea mustard	9	33	9	10	61	C/EBPa, PPARγ, aP2, TNFa, MCP-1, PAI-1↓in 3T3-L1	3
Kelp	3	22	6	0	31	TNF-a, Leptin↓Adiponectin, PPARa, UCP2, UCP3, CPT-1 ↑in plasma	4
Gulfweed	4	19	3	4	30	TC, TG, LDLc, MDA, NO, leptin, TNF-a↓, HDLc, adiponectin↑ in plasma	5
Shell	6	17	4	1	28	PPARγ, C/EBPa, FABP↓, p-AMPK↑in 3T3-L1	6
Ecklonia cava	3	2	1	1	7	PPARγ2, C/EBPa, SREBP-1c, FAS, p-AMPK/AMPK↑, TNFa, IL-1β, F4/80↓in epididymal fat	7
Ishige okamurae	3	1	1	1	6	FAS, Bax/Bcl-2, caspase-3, caspase-9↑, PARP↓in 3T3-L1	8
Fusiforme	1	2	1	1	5	TC, LDLc, FC, TG↓ in serum	9
Ceylon moss	2	1	0	0	3	PPARγ, aP2, NOX4↓in 3T3-L1	10

1. Ichimura M et al, Nutr Res, 2013, 33(5), 397-405
2. BelHadj S et al, ARCHIVES OF PHYSIOLOGY AND BIOCHEMISTRY, 2013, 119(2), 81-87
3. Lee BY et al, NUTRITION RESEARCH, 2012, 32(6), 439-447
4. Jang WS et al, Evid Based Complement Alternat Med, 2013, PMID: 23365609
5. Ahmed HH et al, Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2012, 16(3), 112-120
6. Takahashi K et al, FISHERIES SCIENCE, 2012, 78(4), 897-903
7. Jun HS et al, EVIDENCE-BASED COMPLEMENTARY AND ALTERNATIVE MEDICINE, 2012, 418912
8. Park MH et al, Phytother Res, 2013, 27(6), 931-936
9. Amano H et al, FISHERIES SCIENCE, 2005, 71(5), 1160-1166
10. Lee BY, Preventive Nutrition and Food Science, 2012, 17(2), 129-135

② 해양수산물의 항비만효과 논문조사요약

○ 해조류에는 불소화성 다당류 (식이섬유), 단백질, 무기질, 비타민, 필수아미노산과 불포화지방산이 풍부하게 함유. 건조품 기준으로 볼 때 해조류에는 단백질이 6-42%, 탄수화물은 6-74% 수준으로 단백질과 당질의 함량이 풍부하며, 특히 이런 당질의 대부분이 체내 효소로 소화가 힘든 식이섬유로써 총 건조 무게의 75% (25-75%)임 더불어 해조류는 총 지방 함량은 낮으나, 고도불포화지방산 중 *n*-3계열과 *n*-6계열의 불포화지방산의 조성이 높게 함유.

○ 해조류는 총 식이섬유 중 51-81%가 수용성 식이섬유로 좋은 급원 식품임.. 해조류 유래 식이섬유로는 갈조류의 라미나란 (laminarans), 알긴산염 (alginates), 후칸 (fucans)과 셀룰로오스 (cellulose)가 있으며, 홍조류에는 카라기난(carrageenan), 녹조류에는 전분과 셀룰로오스, 자일란 (xylan), 매넌 (mannans) 등이 있음.

○ *in vitro* 연구결과:

- 3T3-L1세포에 톳 물 추출물을 처치하였을 때 지방분화가 저해되었으며, lipid droplet 및 중성지방의 생성이 대조군에 비해 감소함.
- 미역의 에탄올 추출물 역시 3T3-L1 세포의 지방세포로의 분화를 억제하였으며, 톳 물 추출물의 경우에는 지방분해 효소인 리파아제(lipase) 저해활성을 보유하고 있어 잠재적인 항비만 기능성 원료로 가능성.

○ *in vivo* 연구 결과:

- 고지방식이 유도 비만 rat 모델에게 다시마 에탄올 추출물을 경구 투여 (400 mg/kg) 한 결과, 식이섭취의 감소, 체중증가 감소 효과를 보임. 지방산 산화 기전의 활성, 지방세포 생성저해 등으로 인한 항비만 효과로 해석됨.
- 톳의 물 추출물을 음용으로 제공한 동물모델에서 톳이 항비만에 긍정적인 영향
- 고지방식이를 통해 인슐린 저항성을 유도한 mouse 모델에서, 9주 동안의 고지방식이와 미역 에탄올 추출물 섭취는 고지방식이군와 비교하여 체중증가에는 변화를 주지 못했으나 내장지방은 유의적으로 감소시킴.
- 고지방군과 비교하여 미역 에탄올추출물 첨가 고지방식이군에서 간의 지방축적을 감소시켰으며, 인슐린 저항성을 개선하는 효과를 보임.
- 알쏭이모자반 에탄올 추출물(3%)과 고지방식이를 5주간 급여했을 때 체중 증가와 지방조직의 증가가 고지방식이만을 급여한 군에 비해 유의적으로 감소함.

○ 발표된 *in vitro*와 *in vivo* 해조류의 항비만 효능의 기전으로는 지방 효소(gastric & pancreatic lipases)의 활성저해와 지방세포 분화 억제 및 lipid droplet의 축적 감소, 체지방 축적 감소 및 내장지방 비대 예방, 인슐린 민감도에 큰 영향을 받는 간의 인슐린 저항성 감소 등이 제안됨.

○ 임상연구

- Odunsi (2010년): 48명 과체중 혹은 비만 성인남녀에게 다시마유래 수용성식이섬유인 알긴산염(알약)을 10일 동안 섭취 후, 위장관 기능, 만복감, 식욕, 장 분비 호르몬 등의 변화를 관찰한 결과 placebo 군과 비교하여 유의적인 차이가 없음. 향후 장기적인 식이섭취조절 연구를 위한 뇌-식이중추-호르몬 혹은 신경전달물질-식이섭취의 중추적 연구가 필요함.

4) 제품개발을 위한 산업화 기반 구축 [컨설팅]

1. 건강기능식품 산업의 환경

가. 건강기능식품 산업 현황

○ 건강기능식품이란 인체에 유용한 기능성을 가진 원료나 성분을 사용하여 제조·가공한 식품을 의미함. 건강기능식품은 고시형 건강기능식품과 개별인정형 건강기능식품으로 구분됨, 고시형은 2014년 2월 현재 비타민 등 영양소 28개와 인삼 등 기능성 원료 58개가 있으며, 개별인정형은 27 유형의 기능성에 따라 원료를 분류하고 있으며 체지방 감소 기능으로 개별 인정된 원료는 가르시니아 캄보지아껍질 추출물 등 20가지가 등록되어 있음

○ 2013년 건강기능식품의 국내 시장 규모는 전년 대비 5% 성장한 1조 7,920억원(생산액 기준)이며, 경기 침체에도 불구하고 지속적인 성장을 보임

○ **건강기능식품 산업의 큰 특징은 성공한 제품의 경우 소비자 확산(diffusion) 속도가 빠르다는 것임**. 예로서 프로바이어틱스는 지난 1년간 55.2% 증가, HCA는 23% 증가

나. 항비만기능식품의 산업 환경

○ 국내 비만관련 전체 산업은 3조원, 다이어트 식품 관련 시장은 2조원대로 추정됨

○ 국내 시판중인 대표적인 항비만 기능식품의 원료물질, 제형 및 마케팅 활동은 아래와 같음

[Table 3-37] 대표적인 항비만 기능식품의 마케팅 활동

회사명/브랜드	원료물질/제형	주요 마케팅 활동
LG생활건강/ 청윤진-누벨다 이어트플랜	HCA/ 액상	- 대상: 20대 여성 - 가격: 40,000원(1개월) - 유통: 자체 화장품 매장(보떼) 및 온라인 쇼핑몰 - 사전 체험단 활용하여 입소문 효과 - 시판 열흘 만에 30억 매출 달성
LG생명과학/ 피앙세 다아어트 사이즈핏	HCA/ 액상	- 대상: 20-30대 여성 - 가격: 80,000원(1개월) - 유통: 일반 매장 및 온라인 쇼핑몰 - 단기 다이어트를 강조
아모레퍼시픽/ VB슬리머DX	식이섬유 및 녹차추출물/ 액상	- 대상: 20-30대 여성 - 가격: 53,000(1개월) - 유통: 자체 화장품 매장(아리따움), 백화점 및 온라인 쇼핑몰 - 제품개량 및 스타 마케팅으로 시판 한 달 만에 매출 100억원
애경/ 헬스앤V24	잔티젠/ 연질캡슐	- 대상: 30-50대 여성 - 가격: 70,000원(1개월) - 홈쇼핑, 인터넷 및 모바일 활용 - 2개월 누적판매 60억원 달성
CJ제일제당/ 팻다운아웃도어	HCA/ 액상	- 20-40대 여성 - 가격: 45,000원(1개월) - 갈증해소와 체지방 감소, 다이어트 워터
한국야쿠르트/ 룩	판두라틴/ 액상 및 연질캡슐	- 대상: 20-50대 남녀 - 가격: 1병 2,500원(월 50,00원, 20병) - 유통: 방문판매(야쿠르트아줌마 활용)

풀무원/ 그린체	현미, 대두 등/ 분말형	- 대상: 20-40대 여성 - 가격: 100,000원(1개월) - 유통: 풀무원 홈페이지 헬스어드바이저 - 프리미엄 건강식품 표방 - 다기능 표방: 체중조절 및 균형 영양
스프렉사코리아/ 쓰리아웃	HCA, 프로바이오틱스/ 연질캡슐	- 대상: 20-40대 여성 - 가격: 62,000원(1개월) - 유통: 일반 매장 및 온라인 쇼핑몰 - 다기능 표방: 체지방 감소(HCA) 및 배변활동 촉진
쌍떼꼬르/ 쌍떼꼬르	흑미, 쥐눈이콩, 마테 등 12개 천연원료/ 분말형	- 대상: 20-50대 여성 - 가격: 470,000원/90포(1~3개월) - 유통: 온라인 쇼핑몰 - 프리미엄 장수 브랜드 표방 - 다 기능 표방: 다이어트, 장기능 향상 및 피부미용

(*가격은 G마켓의 리스트 프라이스 참조)

○ 현재 국내에서 성공적인 항비만 기능식품의 특징과 전략적 시사점은 다음과 같음

- 화장품과 다이어트 기능식품의 고객층과 유통경로가 일치하여 **화장품 회사들이 다이어트 기능식품 시장으로 적극적으로 진출하고 있으며 큰 성과를 얻음**
- 기능식품의 안전성에 소비자들이 특히 민감하여, **천연원료로 만든 기능식품이 대세**이며, 체지방 감소뿐만이 아니라 피부미용, 배변 촉진 등 **부가적인 기능을 제공**하는 제품이 증가함
- 경쟁이 비교적 적은 새로운 시장**(블루오션)**을 개척하는 것이 중요함. 현재 국내 항비만 기능식품은 HCA를 사용하여 20-40대 여성을 대상으로 한 제품이 주류를 이룸. **비만 유병율이 같은 나이 대의 여성보다 높은 20-40대 남성을 대상으로 한 항비만 기능식품은 비교적 적으며, 이 집단이 주요 표적 시장이 될 수 있음**

(2) 항비만 기능식품의 소비자 구매 행동

○ 건강기능식품에 대한 소비자 인식은 남녀 성별에 따라 현저한 차이를 보임. 남성의 경우 실제로 과체중인 사람 중에서 자신이 정상이라고 인식하는 비율은 48.1%임(여성의 경우 0%)이며, 이런 현상이 남성의 건강기능식품 사용의향에도 부정적으로 영향을 미침

○ 항비만 기능식품에 대하여 구매의향이 있는 소비자는 41%이며, 구매경험이 있는 소비자 중에 긍정적인 태도를 가진 사람은 46.8%에 불과함. 구매경험자의 태도가 항비만 기능식품에 대해 부정적 것은 아래 두 가지 요인이 작용한 것임

- 체중조절의 높은 실패율은 90%에 달하며, 실패한 원인은 의지 부족 등 본인의 사유로 인한 것이지만, 항비만 건강기능식품을 섭취한 사람이 체중감량에 실패하게 되면 식품의 효능에 불만을 갖게 됨(외부적 歸仁)
- 일반 건강기능식품에 비해 항비만 기능식품은 소비자의 인지도도 현저하게 낮을 뿐만 아니라 제품에 대한 확신도 낮은 편임. 항비만 기능식품의 추천의향도 3.8%에 불과함

○ 일반 건강기능식품을 구매할 때는 소비자들이 다단계판매, 방문판매 및 건강식품 전문 판매점을 주요 이용하나, 항비만 기능식품의 구매는 소비자들이 병원, 약국, 건강식품 전문점을 주로 이용하며, 다단계 판매와 방문판매는 거의 없는 것으로 나타남

2. BBT-CD3G 신제품의 마케팅 전략

가. BBT-CD3G 신제품의 STP 전략

1) 시장세분화 (Segmentation)

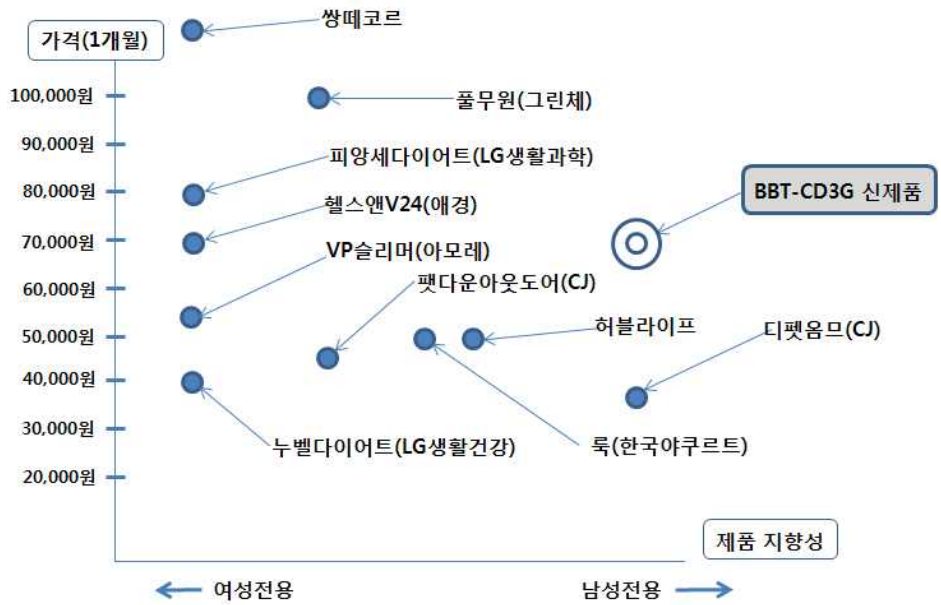
○ 시장세분화 변수 선정: 시장(고객)을 의미있는 집단으로 구분(segmentation)하기 위해 본 연구에 사용하는 세분화 변수는 성별 및 나이 등 두 가지임

2) 표적시장 선정(Targeting)

○ 집단별 분석을 통해 BBT-CD3G 신제품의 가장 매력적인 집단은 30-50대 남성임. 이들은 비만율이 높고, 사회적으로 활발한 시기여서 다이어트에 대한 사회적 압박을 느끼며 또 경쟁제품이 거의 없는 시장임

3) 포지셔닝 전략(Positioning)

○ 포지셔닝 맵(Positioning Map)은 가격과 제품 지향성(여성용 및 남성용) 두 가지 기준에 따라 경쟁 브랜드들의 위치를 나타내고 있으며, BBT-CD3G 신제품의 위치도 나타나 있음



[Fig 3-38] 다이어트 제품의 포지셔닝 맵

(2) BBT-CD3G 신제품의 포지셔닝

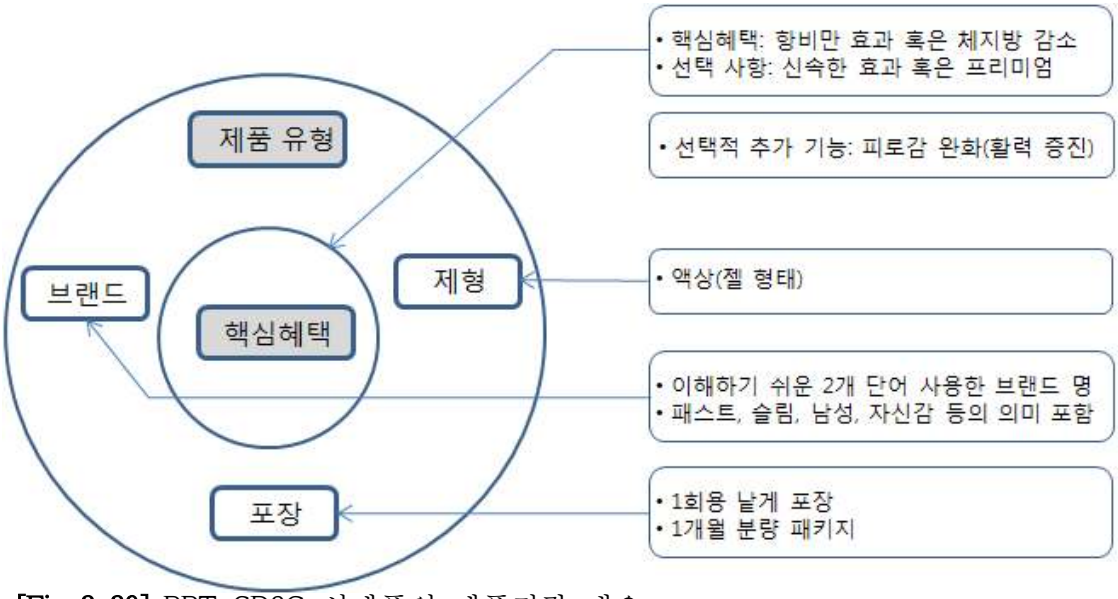
○ BBT-CD3G 신제품은 남성전용(30-50대)이며 가격대는 기존의 남성용 제품인 디펫옴므(월 36,000원)보다 고가인 6만~7만원 대가 적합함. 고가전략이 타당한 이유는 항비만 기능식품은 전문품(Speciality goods)으로서 가격=품질이라는 인식이 강하며, 가격 탄력성이 낮음

2. BBT-CD3G 신제품의 마케팅 4P 전략

1) 제품 전략 개요

○ BBT-CD3G 신제품이 기존 항비만 제품과 차별화를 위한 포인트

- 프리미엄 제품: 기존 제품보다 효과, 품질, 가격 등을 높은 수준에서 책정
- 핵심혜택의 차별화: 신속한 효능 혹은 추가 효능(활력증진 혹은 피로감 완화)



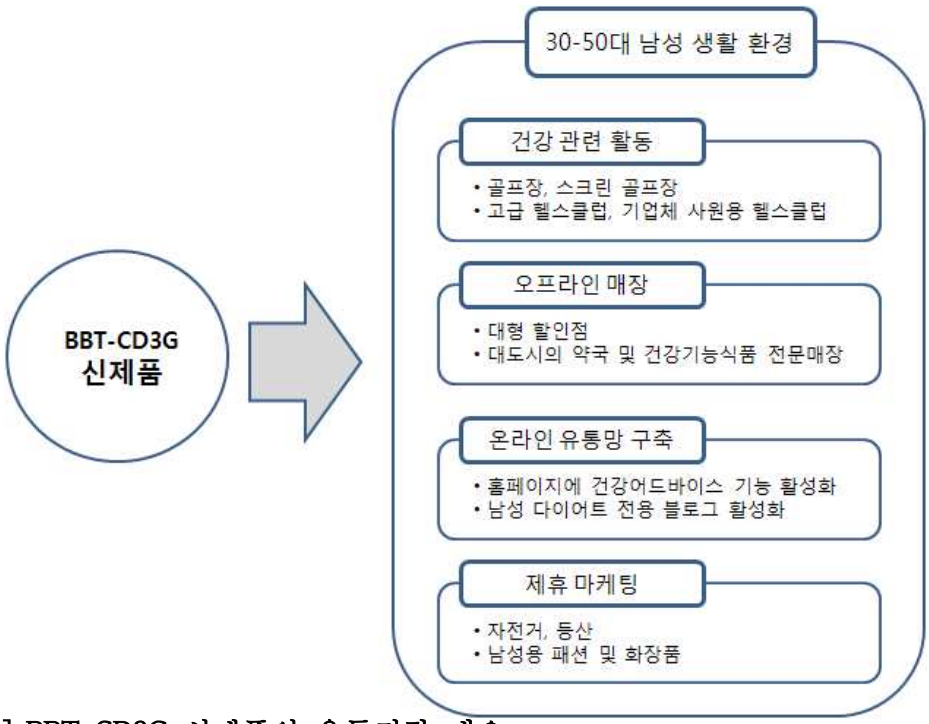
[Fig 3-39] BBT-CD3G 신제품의 제품전략 개요

2) 가격 전략 개요

- 가격: 7만원 ~ 8만원대의 고가전략
- 추가적인 고려사항: 소비자가 고가전략을 저항감 없이 수용할 수 있도록 기능(신속한 효과 혹은 추가기능 제공)과 제형(액상 타입) 등에서도 고가전략과 일관성을 가지도록 함

3) 유통 전략 개요

○ 주 고객층인 30-50대 남성의 생활환경(운동, 쇼핑, 취미, 인터넷 활동 등)에 밀착한 유통경로는 아래 그림과 같음



[Fig 3-40] BBT-CD3G 신제품의 유통전략 개요

4) 마케팅 커뮤니케이션 전략 개요

(1) 메시지의 선택

○ 항비만 기능식품은 반드시 긍정적 소구(positive appeal)로 메시지를 구성하는 것이 바람직함. 즉 체중조절 혹은 항비만 기능식품 섭취 이후의 긍정적인 자신의 모습을 나타내는 메시지가 제품에 대한 관심과 구매를 유도할 가능성이 높음

" 나의 외모에 자신감을 찾고, 가족과 함께 산에 갈수 있고
씩스팩에 도전할 수 있는 가장 빠른 길, BBT-CD3G(브랜드명 표기) "

(2) 미디어 선택

○ BBT-CD3G 신제품의 광고·홍보에 효과가 높은 미디어(매체)와 그 활용 방법은 아래와 같음

- 사이버 소문(WOM: words of mouse): 홈페이지나 블로그를 통해, 건강 및 항비만 활동 등에 관해 정보를 제공함. 헬스 어드바이저를 배치하여 맞춤형 비만 상단이 가능하도록 함
- 입소문(WOM: words of mouth): 본격적인 출시전에 체험단을 모집하여 신제품의 체험 결과(신제품 섭취 전과 후를 비교)를 UCC로 제작하여 인터넷 혹은 모바일 상에 유포시킴
- 이벤트: 직장인 혹은 헬스 센터 등 동호인 그룹의 30-50대 남성을 대상으로 단체 섭취를 하는 이벤트 실시하고, 그 결과를 유포함
- 잡지: 남성용 패션전문지 혹은 스포츠 잡지 등에 신제품을 알리는 광고성 기사 게재
- 라디오: 교통방송 등 30-50대 표적 청중이 주로 시청하는 라디오는 비용대비 효과가 있음
- CATV: 골프, 낚시 등 스포츠 관련 채널에 표적 청중인 30-50대 남성의 시청율이 높으며, 비용 대비 광고효과를 얻을 수 있음

편집순서 1 (표지)

보안과제( ), 일반과제(○) 과제번호: 811003(1-3)

기술사업화지원사업 (항비만바이오신소재사업단)
New BioMaterials Center for Antiobesity

<용역과제: BBT-CD3G 마케팅 전략>

주관기관 :성신여자대학교
주관책임자: 식품영양학과 이명숙 교수 (인)

용역과제기관: 우송대학교
용역과제책임자: 국제경영학과 손영호 교수 (인)

- 농림수산식품부 -

<용역컨설팅보고서>로부터 내용 발췌

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

1. 연도별 연구목표 및 평가착안점에 입각한 연구개발목표의 달성도

가. 1 차년

(1) 목표 대비 달성도

목 표	연구개발 수행내용	달성도
1-1: ATM 모델과 지방유래 줄기 세포 모델을 이용한 항염증성 비만연구	○ ATMΦs model 표준화 시험/표지물질 screening ○ 피하지방 줄기세포주와 복부지방 줄기세포주 의 확보를 통한 대량생산 기반 구축	150%
1-2: Genomics와 *in vivo* DIO 모델을 이용한 농수산물 유래 항비만 유효소재의 항염증성 기전규명	○ DIO mouse model을 이용한 염증유도 관련 항산화 조절 기전 규명 ○ 효모세포 기반 항비만 잠재소재 탐색	150%
2-1: 핵심기술을 활용한 흑삼제조 공정 표준화/항비만 제품개발	○ 흑삼 제조 시 막걸리의 응용방안 강구 ○ 시제품제작, 특허출원, 상표출원, 논문발표 ○ 흑삼의 ginsenosides 함량 분석완료.	150%
2-2: 항비만 소재 분류/DB 구축 및 추출물 전임상 실험	○ 항비만 소재 분류/DB 1000건 구축 ○ 농수산물 추출물 5종 전임상 실험	200%
2-3: 수산물 유효소재 (미더덕, 감태, 모자반)의 항비만표지물질 규명	○ 수산물 유효소재 대량생산 시스템 구축 및 소재 대량 확보 ○ 수산물 유효소재의 다양한 생리기능성 확인	100%

(2) 목표달성도에 대한 자체평가

세부	평가의 착안점	자 체 평 가
1-1	○ 염증-지방세포분화 ATMΦs model 개발 및 표준화 시험	• 3T3L-1 cell과 DIO model 에서의 ATMΦs model 표준화시험 1차년 70% 목표 달성 • Obese adipocyte으로 전환되면 F4/80 (+)CD11c(+) phenotypes화 되는데 이의 전단계로 H&E, mast cell 염색으로 확인함. (2차년 완성예정) • 유효물질을 위한 screening 확인 달성 ○ <u>추가성과:</u> ATMΦs model의 in vivo 적용을 위한 Co-Culture 표준화시험 ○ <u>추가성과:</u> 염증으로 유도된 비만관련 발현 바이오마커 개발(ELISA, Western)
	○ 사람, 생쥐의 복부 및 피하지방 줄기 세포주 확충 및 유지 ○ 줄기세포분화기술 이용한 특정세포 확보 및 기반구축과 표적물질 효율 검증	○ <u>추가성과:</u> 비만 유도에 따른 중기세포의 특성 분석 ○ <u>추가성과:</u> 1-2차년도 추진 계획인 대상 물질의 영향분석 중간단계(대상 줄기세포 배양중임)

세부	평가의 착안점	자 체 평 가
1-2	○ DIO mouse model을 이용한 염증 유도 관련 항산화 조절 기전 규명	○ 농수산 소재에 대한 항비만 효과 확인 ○ **추가성과:** DIO model 중 효과가 높은 소재의 반복 검증 실험이 진행중임 ○ **추가성과:** SCI 논문 2편 투고 진행중
	○ 효모세포에서 지방축적 변화의 측정을 통한 항비만 잠재소재 탐색	○ 잠재적 항비만 소재에 대한 yeast 세포 모델에서의 지방 축적 저해 스크리닝 ○ **추가성과:** 효모 내 항비만 잠재소재의 확증을 위한 정밀평가 실험이 진행 중임
2-1	○ 흑삼의 진세노사이드(Rg_3, Rh_1 등)함량 증강을 위한 흑삼제조 공정 표준화 ○ 핵심기술(구증구포공법)에 막걸리를 접목 하여 제조한 흑삼의 안전성 시험 및 영양성분분석 ○ 막걸리를 이용하여 흑삼의 지표물질(Rg3, Rh1 등) 극대화 시킨 Korea black ginseng 제조공정 표준화	• 기존방법의 흑삼제조(대조군), 막걸리 (훈증, 침숙)로 1증1포-9증9포까지 제조 공정 표준화 • 제조한 흑삼전처리: 열수추출법 표준화/농축 ○ **추가성과:** 흑삼의 안전성, 성분 분석 (Rg3, Rh1 등) 및 일반성분 분석완료 ○ **추가성과:** 흑삼을 활용한 시제품개발 3건, 특허출원 2건 완료 (1건 초과), 상표출원 1건 (1건 초과), 논문게재 2건 완료, 언론홍보 1건 완료
2-2	○ 항비만 농수산물소재의 분류 및 DB 구축 ○ DIO 동물을 이용하여 흑삼, 항비만 농수산물유효 물질 소재 전임상 실험	○ **추가성과:** 항비만 농수산물소재의 유효물질 분류 및 DB 구축 1214건 확보 (214건 초과) ○ **추가성과:** 표지물질 8종 확보(3종 초과) 및 pre-adipocyte를 이용한 in vitro 연구 추가
2-3	○ 가공기법의 다양화를 통한 생리기능별 특성연구 ○ 항비만 생리기능성연구 (항산화, 항비만, 항염증, 항당뇨, 항균, 세포독성 등) 및 경구독성 및 세포독성 시험 ○ 수산물(감태, 미더덕)로부터 추출물 확보 및 항비만 전임상실험 및 기능성시험	○ 수산물 유효소재의 대량생산 시스템 구축 완료 및 소재 대량 확보 ○ 수산물 유효소재의 기능성(항산화, 항당뇨, 항고혈압, 체중감소) 효과 확인

나. 2 차년

(1) 목표 대비 달성도

목 표	연구개발 수행내용	달성도
1-1: 검정콩 표지물질인 3G/D3G의 항비만 효과를 재검증하기 위하여 원료, 소재, 공정과정표준화, 독성/안전성 및 반복성 검사시행	• 원료 및 지표성분의 표준화; 원료지표물질의 표준화를 위하여 원료대비 추출수율, 추출물 대비 안토시안 확보율 • 일반성분,색도 pH, 미생물, 중금속 분석 • 지표물질의 항비만 유효성 검증 (in vitro, in vivo 시험) & 인체유효시험 농도 결정 • 효모세포 기반 검정콩소재 유래 단일물질인 C3G, D3G의 항비만 및 항산화능 확인. • 발현유전체 연구기반으로 항비만 기전 탐색을 통한 항비만 소재 가치 확보 및 항비만 표적 마커 발굴	200%
1-2: 녹두의 원료, 소재, 공정과정표준화, 독성/안전성 검사시행	• 녹두 로스팅 공정 표준화 • 로스팅 녹두 및 기타 항비만 식품소재를 활용하여 티백 형태의 시제품 제조 • Roasted 녹두티백의 간이임상실험 실시 (관능평가추가) • 원료/지표성분 및 공정과정의 표준화 • 단백질 정량, 총당, 항산화 활성, 미백활성 등 영양성분 분석 추가	140%
1-3: 표지물질인 vitexin의 항비만 효과를 재검증	• 각 부위 줄기세포주 doubling time을 기반하여 Golden standard화를 위한 지속적 반복 • 지표유효성분이 줄기세포 및 3T3 L1 세포 수준에서 미치는 영향 분석 • screening system을 이용한 주요 공정 과성 산물의 생리활성 효능 분석	140%
2-1: 감태의 표지물질인 dieckol의 항비만 효과를 재검증하기 위하여 원료, 소재, 공정과정표준화	• 유효수산물(감태)로부터 유효 성분 대량시스템 구축을 통한 기능성 유효소재의 표준화 • 고농도 제품의 표준화 공정시스템 개발, 제형개발 • 독성 및 안전성 평가 추가	150%
2-2: DIO mouse 모델을 이용한 유효물질의 항염증, 항비만 기능성 및 독성 검증	• 체지방축적, 에너지소비, 에너지대사 조절 • 항 염증 기능성 평가를 위한 염증성 마커의 mRNA 및 protein 발현 측정 • 간 및 조직 내 독성 평가	100%
2-3: 다시마의 소재, 원료, 공정과정의 표준화 및 독성/안전성 검사시행	• 다시마를 이용한 최적 추출공정 개발 및 최적 전처리 공정 개발을 통한 기능성 물질의 최적화 생산공정 표준화 • 물리 화학적 특성 규명 및 소재의 표준화를 위한 기능(지표) 성분분석법의 표준화 • 식품섭취억제 및 수분섭취억제 시험	100%
2-4: 표지물질인 glutamate와 GABA의 항비만 효능 검증 및 항비만소재 DB 구축	• 항비만 keyword로 obesity, appetite, 3T3-L1, lipid, fat, adipocyte, weight, diet, AMPK를 사용한 비만연구 검색. • 1차년은 농산물, 2차년은 해양생물에 집중	100%

다. 3 차년

(1) 목표 대비 달성도

목 표	연구개발 수행내용	달성도
1-1: 비만개선용 개별인정 소재의 전・임상시험	○ <u>개별인정을 위한 임상시험 시행 [성신여대]</u> • 비만개선용 개별인정 소재(안토시안-rich 검정콩추출물)의 임상시험 결과의 validation 검토 - 소재의 독성 test (GMP 기관) - IRB 승인/피험자동의서, 시험진행의 타당성, 통계처리 보고서 등 - CRO기관과 임상시험기관과의 협력성 - 개별인정신청을 위한 타당도 검증 • 1& 2차년 전임상연구와의 replication - 전임상결과와의 비교검토 ○ **안전성 및 안정성 test** ○ 유효 농수산물 대상 전임상 반복시험 (가천의대 협력) • 농산물 수산물중 1건 반복시험예정이었으나 각각 1건 **총 2건으로 반복시험을 추가함. (150% 달성)**	150%
2-1: 비만개선 기능성소재를 이용한 상품화 및 산업화 기반 구축	○ **검정콩껍질 에타놀추출물 소재의 표준화 및 제형적합성** • 소재 및 표지물질(C3G, D3G)의 표준화 및 공정과정표준화, 소재의 중금속 및 영양성분 분석, 소재의 재형성 및 시제품개발을 확립함. ○ **추출과정의 부산물을 이용한 제품화기술개발** • 부산물 0, 3, 6, 9, 12% 식빵 및 부산물 0, 2, 4, 6, 8% 쿠키를 제조한 후 관능평가 및 9대 영양소 분석 • 빵 시제품 출시(2014. 07. 21.) • 빵과 쿠키 시제품의 색도, 물성측정, 항산화 4종, 항균활성측정 • DPPH radical 소거활성,ABTS radical 소거활성, Total polyphenols contents 총 페놀함량(항산화 활성 1종 추가 측정)(>110%), 미생물 6종(*S.aureus, S.epidermidis, B. subtilis, B. cereus, E. coli, S.typhimurium* 등)분석(>150%)	120%
2-2: 항비만소재의 기전 연구 및 제품개발기반 구축	○ **산화적 스트레스 과부하세포에서의 항비만소재 표지물질의 효능 평가 (Yeast 모델 적합도 시험)** • 항산화 효능 평가 시스템 구축 및 C3G의 항산화 효능 평가: 결실 효모 종을 제작하여 항산화 효능 평가 시스템을 구축함. 이 시스템으로 C3G의 항산화 효능을 평가함.	100
	○ **항비만소재 표지물질의 지방줄기세포 분화기작 규명 (줄기세포 모델 적합도 시험)** • 지방줄기세포의 분화 단계에 따른 C3G와 D3G의 영향을 세포수준 및 분자 수준에서 분석 및 확증, • lineage 관련한 지방전구세포의 분화에 미치는 영향 분석(추가분석)	130
	○ <u>제품개발 기반구축 [비만과학연구소 & 컨설팅]</u> • 비만 농수산물소재의 DB 구축 완료 • 산업화기반구축을 위한 자문/컨설팅 • 시제품 경제성 분석 • 개발된 시제품 선호도 분석기술이전을 위한 자문/컨설팅	100

(2) 목표달성도에 대한 자체평가

세부	평가의 착안점	자 체 평 가
1-1	○ 8 weeks-randomization-double blind-placebo control 임상시험의 절차는 타당성이 있나?	• IRB 승인, 피험자 동의서, 시험진행의 타당성, 통계관리, 보고서 등 CRO기관의 감독과 임상시험기관과의 협력에 문제가 없었음. • 향후 개별인정신청을 위한 타당도 검증예정
	○ 검정콩껍질추출물 섭취가 인체에 안전한가?	• GLP 기관의 안정성 및 독성 test 결과, 안전함. • 인체시험에서는 이상반응이나 신체변화가 관찰되지 않아서 검정콩껍질추출물 섭취가 인체에 안전하다고 판단함.
	○ 비만인 피험자에서 검정콩껍질 추출물 섭취에 따른 체지방량 개선 효과는?	• 비만인 피험자에서 검정콩껍질추출물 섭취에 따른 총 체지방량 개선 효과는 없었으나 검정콩껍질추출물 섭취는 복부지방지표인 허리둘레가 유의적으로 감소함
	○ 검정콩껍질 추출물 섭취에 따른 혈중지질 개선에 유효한가?	• 복부지방과 관련성이 높은 혈중 TG 및 LDL-C 등 동맥경화지수를 통계적으로 유의하게 억제하여 혈중지질 개선에 유효함.
	○ 유효 농수산물 대상 전임상 반복시험은 반복성이 있나?	• GMP기관과 협력하여 검정콩 및 우뭇가사리 추출물(추가)의 전임상 반복시험을 시행함. 검정콩은 농도의존적인 효과가 나타나지만 우뭇가사리는 한천함유여부에 따라서 상반된 결과를 보임.
2-1	○ 소재의 표준화 및 제형적합성은?	• 소재 및 표지물질(C3G, D3G)의 표준화 및 공정과정표준화, 소재의 중금속 및 영양성분 분석, 소재의 재형성 및 시제품개발을 확립함.
	○ 부산물을 활용한 제품개발과정에서의 제품 및 산업화 활용 가능성은?	• 검은콩 부산물을 넣지 않은 제품에 비해 관능적으로 우수한 레서피를 개발하여 친환경 유통업체인 해가온의 시제품으로 상품화를 시도하였음.
2-2	○ 효모를 이용한 항산화 효능 검정 시스템 구축 및 C3G의 항산화 효능 검정 ○ 제작된 yeast knock out strain은 신뢰성이 있나? ○ C3G의 항산화 효능 평가는 체계적으로 이루어졌나?	• Saccharomyces genome database (SGD)에서 얻은 정보를 통해 knock out 시킬 유전자를 선택하였고, SGD를 통해 얻은 시퀀스 정보를 바탕으로 primer를 제작하여 genotyping을 통해 검증하였음. • C3G의 항산화 효능을 측정하기 위해서 여러 가지 농도를 이용함. C3G 생물학적 항산화 효능에 대해 yeast knock out strain에서 평가함.
	○ 항비만소재 표지물질의 지방줄기세포 분화기작 규명 (줄기세포 모델 적합도 시험)	• 지방줄기세포의 분화 단계에 따른 C3G와 D3G의 영향을 세포수준 및 분자 수준에서 분석 및 확증 • lineage 관련한 지방전구세포의 분화에 미치는 영향 분석 (추가)
	○ 비만 농수산물소재의 DB구축 ○ 항비만 기능성식품상품화의 산업화기반구축을 위한 자문/컨설팅	• 농산물 1,214건, 해양생물 346건으로 향후 비만연구에 대한 해양소재발굴이 개척분야로 보임. • 자문컨설팅결과 고무적임.

2. 관련분야의 기술발전에의 기여도

가. 관련분야 기술발전

(1) ATMΦs Co-Culture model 표준화시험 확립 및 항비만의 new in vitro 스크리닝 법

① 기술적 방법:

○ 3T3L-1 세포와 대식세포의 co-culture는 in vivo 실험 시 지방세포와 주요 반응하는 조직 간의 interaction에 미치는 영향을 규명하고 자 디자인된 실험으로 M1와 M2에서 명확한 차이가 없는 경우 어떤 기전이 우세한 지 또한 규명이 가능함.

○ 1차적으로 3T3L-1에 insulin 처치 2일후 RAW264 및 HepG2 cell을 injection하여 배양 9일 째 Contact co-culture system으로 실험한 결과 녹두 추출물은 marcrophage에 의하여 TNF-a, Il-6 모두 증가하였고 흑삼, 진피, 미더덕의 IL-10 증가가 유의적임.

② 결과의 타당성:

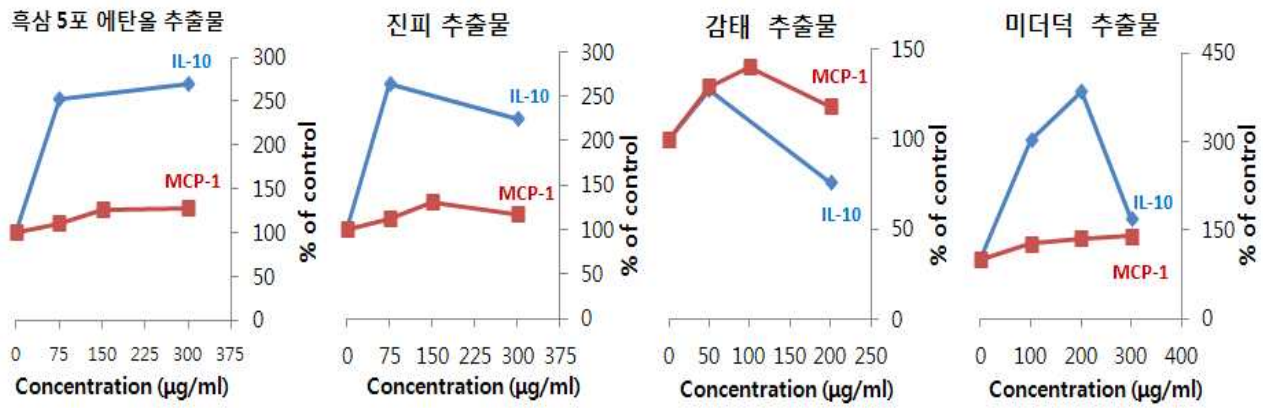
○ 3T3L-1에 insulin 처치 2일후 RAW264 injection에 의한 contact Co-Culture후 9일 째 염증인자 M1형 (MCP-1)과 M2형 (Il-10) 분비를 살펴본 결과, 흑삼 5포와 진피추출물을 처치 시 농도가 증가할수록 M1도 약간 증가하였으나 M2가 M1보다 더 많이 증가함.

○ 반면, 감태는 고농도에서 M1과 M2가 감소하나 M1이 더 증가함. 미더덕은 M2가 증가하다가 고농도에서 감소하였으나 M2가 M1보다 더 증가함.

③ 향후 계획 및 기여도

○ 3T3L-1에만 추출물을 투여한 경우, 염증인자 M1과 M2의 경향에 관한 해석이 모호하였으나 Co-culture 후 macarophage과 3T3L-1의 ineraction을 확인하는 중요한 실험으로 향후 3T3L-1 증식에 M1과 M2가 미치는 영향을 지속적으로 관찰하여 실험을 보완할 예정임.

○ 기여도: 빠른 스크리닝으로 in vivo시험의 pilot 연구로써 실질적인 도움을 주며 이를 통한 kit 개발이 가능함



[Fig 3-41] ATMΦs Co-Culture model 표준화시험의 실례

⑵ 피하지방 줄기세포주와 복부지방 줄기세포주의 확보를 통한 대량생산 기반 구축에 따른 비만관련 질환 예방, 치료 등에서 기능성 효용 검증 및 New 스크리닝법

① **궁극적 목적**: 항비만 소재 개발을 위해 예측의 정확성과 대량 screening이 가능하도록 피하, 복부 질방 줄기세포를 이용하고자 함

② **기술적 방법**: 생쥐의 피하지방줄기세포주, 복부지방줄기세포주를 표와 같이 확보하였음. 기계획에 더하여 생쥐의 생식기 주변 지방줄기세포주를 또한 확보하였음. 복부지방줄기세포의 경우 다른 부위의 지방줄기세포에 비하여 증식능력이 현격히 감소하여 passage 4에서 더 이상 진척되지 않음. 그러나 피하지방줄기세포와 생식소지방줄기세포는 passage 유지가 잘 됨

피하지방줄기세포 형태 및 동결 현황		**복부지방줄기세포 형태 및 동결 현황**	**생식소지방줄기세포 형태 및 동결 현황**	

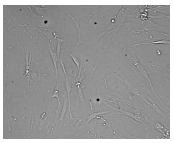
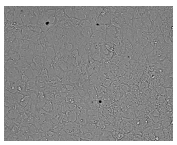
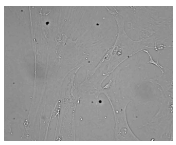
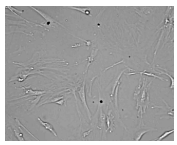
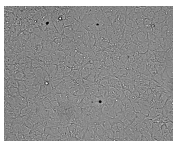

				

그림 1. P2 피하지방줄기세포	그림 2. P14 피하지방줄기세포	그림 3. P2 복부지방줄기세포	그림 4. P2 생식소지방줄기세포	그림 5. P14 생식소지방줄기세포

동결 보존된 생쥐의 각 지방줄기세포 바이알 수($2x10^6$/ml/vial)

	P0 ~ P3	P4 ~ P14
Subcutaneous AS cells	10	58
Visceral AS cells	9	0
Gonadal AS cells	38	103

③ 사람의 지방줄기세포주 확보

피하지방줄기세포 형태 및 동결 현황	**복부지방줄기세포 형태 및 동결 현황**

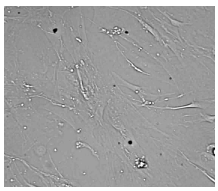
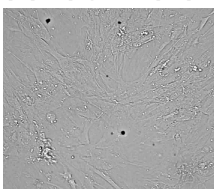

	

그림 6. P1 사람의 지방줄기세포	그림 7. P1 사람의 복부지방줄기세포

표 2. 동결 보존된 사람의 각 지방줄기세포 바이알 수($2x10^6$/ml/vial)

	P0 ~ P3	P4 ~ P14
Subcutaneous AS cells	3	1
Visceral AS cells	29	7

④ 대량생산이 가능한 배양조건의 확보 - 표준화 기반 구축

- 줄기세포의 특성을 유지하는 최적의 배양조건은 일정 면적 내 seeding 되는 세포의 수, 배양액 조성 등으로 본연구진은 피하지방줄기세포, 복부지방줄기세포, 생식소지방줄기세포의 최적배양조건 및 적정 seeding 세포수 표준화 확립.
- 내장지방 유래 지방줄기세포의 Doubling time은 급격히 증가하여 passage 5 이후에 계대 유지가 되지 않는 특징이 관찰되었으나 피하지방과 생식소에서 유래한 지방줄기세포의 Doubling time은 유사함.

⑤ 표준화된 줄기세포/줄기세포주의 지방세포로의 증식과 분화기술을 이용한 목표 물질의 유용성 검증스크리닝 및 비만관련 질환 예방, 치료 등에서 기능성 효용 검증

- Standard DATA 구축: 임상/in vivo 결과와의 상대 비교군으로서의 data 축적, 물질대사 질환에서의 효율 screening 예측 data base 구축
- *in vivo* 실험결과와의 상대 비교값을 이용한 예측 data base 구축: high fat diet에 의한 비만 유도 모델을 이용한 상대 비교, 임상 결과 분석용 data base 구축, 기존 data 및 data의 지속적 축적
- 지방줄기세포의 증식 기작에 대한 이해 확대와 분화 기작에 대한 이해 확대를 통한 기능적 효과 제어 기반 지식 구축
- cell-penetrating sequence를 매개로 특정 조절물질(세포내 신호 또는 전사조절인자)을 이용한 지방줄기세포의 특성 분석을 통한 산업적 적용을 위한 기반 지식의 응용가능함.

(3) ROS 평가를 위한 Yeast knock out strain 제작 및 New 스크리닝법 개발

① 목적: C3G가 표적으로 하는 산화물질의 종류를 in vivo 효모세포 시스템에서 확인하고, 특정 ROS 억제가 세포 활성에 주는 영향과 특성을 규명함.

② 연구방법 :

- Selectable marker를 포함하는 vector를 주형으로 하여 양 끝의 sequence가 knock out 시키 고자하는 gene의 앞, 뒤 부분과 동일한 primer set을 이용하여 pfx DNA polymerase로 PCR 반응을 수행함. Knock out 시킬 yeast colony를 5 mL 1x YPAD에서 overnight 키운 뒤 cell titer를 계산하여 2.5 x 108 cell을 2x YPAD에 접종하여 30 ° C에서 4-6시간 키움. 이후 cell을 centrifugation을 통해 harvest한 뒤 25 mL sterile water로 washing 해 주는 과정을 2회 반복함. Cell pellet을 1mL sterile water에 부유시켜 100uL를 취해 transformation mix (50% PEG 3350, 1 M LiAc, single stranded DNA, gene disruption cassette)와 잘 섞음.
- 42 ° C에서 40분간 incubation후 centrifugation을 통해 cell만 남긴 뒤 5mL 1x YPAD에 suspension시켜 30 ° C에서 4시간 동안 키움. 이후 1 ml sterile water로 washing하는 과정을 2 회 반복한 후 selectable marker로 selection이 가능한 plate 상에 spreading하여 30 ° C에서 single colony가 보일 때까지 키움. Selective plate 상에 생긴 single colony의 일부를 취하여 genotyping을 수행함으로써 knock out여부 판단. 확인된 결실 효모종에 C3G를 처리하여 영향을 평가함.

③ 향후 기여도

- 표준화된 Yeast knock out strain 을 이용하여 항산화성 항비만소재의 유용성 검증스크리닝 및 비만관련 질환 예방, 치료 등에서 기능성 효용 검증:가능.
- 분화기간이 단축되어 산업화가능성 제시.

제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

* 실용화.산업화 계획(기술실시 등)
* 교육.지도.홍보 등 기술확산 계획 등
* 특허, 품종, 논문 등 지식재산권 확보계획 등
* 추가연구, 타연구에 활용 계획 등
* 연구기획사업 등 사업별 특성에 따라 목차는 변경 가능함

1. 연구개발성과

가. 연차별 연구성과 목표(단위 : 건수)

구분		(예시)특허		(예시)신품종				(예시) 유전자원 등록	(예시)논문		기타
		출원	등록	품종 명칭등록	품종생산 수입판매 신고	품종보호			SCI	비SCI	
						출원	등록				
1차 년도	목표	**3**								**4**	
	달성								**1**	**5**	**학술 발표 4**
2차 년도	목표	**3**	**1**						**4**	**4**	
	달성	**6**							**4**	**2**	**학술 발표 11**
3차 년도	목표	**1**	**2**						**4**	**4**	
	달성	**1**							**3[1)]**	**6[2)]**	**학술 발표 10**
계	**목표**	**7**	**3**						**8**	**12**	
	달성	**7**	**0**						**8**	**13**	**25**

[1)] accepted 2건, revised 1건을 포함 (현재 심사 중 2건, 투고 중 2건은 제외함. 추가실적 가능)

[2)] 발표완료 4건, in press 1건, accepted 1건 포함

나. 연구종료 후 연구결과 활용 목표 (단위 : 건수)

구분		기술실시 (이전)	상품화	정책자료	교육지도	언론홍보	기타	
							시제품	임상 시험
활용 건수	목표		3	-	3	3	5	-
	달성		3	-	13	4	11	1
	종료후					1	220	100

다. 논문게재 성과

(1) 1차년

게재 연도	논문명	저자			학술지명	Vol. (No.)	국내외 구분	SCI구분
		주저자	교신 저자	공동저자				
2012	Dieckol isolated from brown seaweed Ecklonia cava attenuates type II diabetes in db/db mouse model.	MC Kang	YJ Jeon	W.A.J.P. Wijesinghe, 이승홍,강성명, 고석천, 양슈동,강나래, 전병태, 김재일,이대호	Fooda nd Chemical Toxicology	53	국외	SCI (IF=3.01)
2012	Decreased contact inhibition in mouse adipose tissue mesenchymal stem cells	Y Jeon	YP Cheon	M Lee	Dev. Reprod	16(4): 329-338	국내	X (성신 matching)
2012	녹두의 vitexin이 비만전구세포에서 세포분화 및 아디포카인 분비능에 미치는 영향	위해리	이명숙	최문지, 최세림, 김애정	한국식품영양과학회지	41(8) 1079-1085	국내	X (성신 matching)
2012	양하분말을 이용한 녹두묵 제조 및 품질 평가(학진)	김현순	김민정 이명숙 이건순	김애정	한국식품영양학회지	25(3): 521-528	국내	X
2012	구기자 침출액을 첨가한 녹두묵의 품질특성(학진)	김애정	정진주 이명숙 주나미	정은경	대한영양사협회지	18(3): 213-221	국내	X
2012	흑삼농축액을 이용한 흑삼두부 제조 및 품질 특성(학진)	김민정	신정희	김애정	동아시아색생활학회지	22(1): 68-74	국내	X

(2) 2차년

게재 연도	논문명	저자			학술지명	Vol (No.)	국내외 구분	SCI구분
		주저자	교신저자	공동저자				
2013	Vitamin D3 supplementation modulates inflammatory responses from th0e muscle damage induced by high-intensity exercise in SD rats	M Choi	M Lee	H Park, S Cho	Cytokine	63(1)	국외	SCI (IF=3.1)
2013	Purification and antioxidative peptide from peptic hydrolysates of Mideodeok (Styela clava) flesh tissue	Nalae kang	YJ Jeon	SC Ko, K Samarakon, EA Kim, MC Kang, SH Lee, JI Kim, YT Kim, JS Kim, H Kim	Food Science and Biotechnology	22(2)	국내	SCIE
2013	Dieckol, a phlorotannin isolated from a brown seaweed, Ecklonia cava, inhibits adipogenesis through AMP-activated protein kinase (AMPK) activation in 3T3-L1 preadipocytes	SC Ko	YJ Joen	M Lee, JH Lee, SH Lee, Y Lim	Environmental Toxicology and Pharmacology	36	국외	SCI (IF=2.05)

게재 연도	논문명	저자			학술지명	Vol (No.)	국내외 구분	SCI구분
		주저자	교신 저자	공동저자				
2013	Combinational treatment of mulberry leaf and fruit extracts reduced obesity related oxidative stress and inflammation in high fat diet induced obese mice	HH Lim	Y Lim	SJ Yang, Y Kim. M Lee	Journal of Medicinal Food	16(8)	국외	SCI (IF=1.64)
2013	로스팅 시간에 따른 녹두의 생리활성 변화	송유빈	이경숙 이명숙	김애정	한국식품영양학회	26(3): 502-507	국내 (학진 등재)	X
2013	Suppressive effects of an Ishige okamurae extract on 3T3-L1 preadipocyte differentiation		전용필		Dev Reprod	2013, 17(4) 451-459	국내	X (성신 matching)

(3) 3차년

게재 연도	논문명	저자			학술지명	Vol.(No.)	국내외 구분	SCI 구분
		주저자	교신저자	공동저자				
2014	Anti-obese effects of anthocyanin-rich black soybean testa in adipose tissue of high fat induced obese mice	S.Kim	M Lee	S Chioi, H Park,	J Functional Food	Revision	국외	SCI
2014	Effects of mung bean (*Vigna radiata L.*) ethanol extracts on proinflammatory cytokines induced lipogenesis in KK-Ay diaobese model	I.Kang	M Lee	TJ Ha, S Choi, M choi, H Wi, BW Lee	J. Medicinal Food	Accepted by 2014. 10.30	국외	SCI
2014	Steroid mixture mimic testicular extract increasing the number of RBC and of bone marrow CD34+ cells without side effects in female fertility	Yong-Pil Cheon	Yong-Pil Cheon	Y Jeon, J Yu, S Pokharel, M Lee, DM Lee, T Chun, KH Lee, I Choi	Endocrinology	심사중	국외	SCI
2014	Brown alga Ecklonia cava polyphenol extract ameliorates hepatic lipogenesis oxidative stress and inflammation by activation of AMPK and SIRT1 in high fat diet-induced obese mice	Eo hyeyoon	Lim Yunsook	Lee Myoungsook, Jeon, You-Jin	J of Agricultural and Food Chemistry	Accepted by 2014 12.08	국외	SCI

게재 연도	논문명	저자			학술지명	Vol.(No.)	국내외 구분	SCI구분
		주저자	교신저자	공동저자				
2014	Beneficial effects of citrus peel extracts on adipogenesis and inflammation in high fat induced obese model	S Choi	M Lee	MJ Kim, JH Jung SY Park SJ Park	Food & Nutritional Science	투고중	국외	SCI
2014	Effects of anthocyanin-rich extracts from the black soybean testa (*Glycine max* L.) on the reduction of visceral fat accumulation and plasma lipid profiles.	R Sorn	M Lee	Y Park H Park	Eur J Clinical Nutrition	투고중	국외	SCI
2014	Mitochondrial efficiency-dependent viability of Saccharomyces cerevisiae mutants carrying individual electron transport chain component deletions	Y Kwon	C Lee	K Choi	BBRC	투고중	국외	SCI
2014	로스팅 녹두의 생리활성 및 과체중 중년여성의 혈중 지질 개선효과(비학진)	정진주	한정순	김애정	한국피부미용 향장학회지	9(2): 81-90	국내	X
2014	로스팅 녹두를 이용한 다식 제조 및 품질특성(학진)	장시성	김민정	김애정	한국생활 과학회지	23(2): 357-366	국내	X
2014	로스팅 온도에 따른 녹두의 항산화 활성 및 품질특성(학진)	김윤태	이명숙	김애정	동아시아식생 활학회지	24(2): 217-223	국내 (학진등재)	X
2014	검정콩을 첨가한 식빵제조 및 품질특성연구		김애정	이명숙	대한피부미용 향장학회	In press at Dec	국내	X
2014	인삼과 진세노사이드의 항비만효과에 대한 문헌고찰	최문지	이명숙	김애정 안진표	동아시아식생 활학회지	24(3): 335-350	국내 (학진등재)	X (성신 matching)
2014	흑삼의 열수 및 에탄올추출물의 항비만 효과	박혜진	이명숙	김애정 전용필	한국시품 영양과학회	Accepted by 11.30	국내 (학진등재)	X (성신 matching)

(4) 1-3차년 학술대회

발표 연도	발표제목	저자			발표기관명	국내외 구분
		주저자	교신저자	공동저자		
2012	Effect of Mungbean seed and testa extracts on anti-obesity related to inflammation in vitro, 3T3L1 cells and in vivo, KK-Ay mice.	이명숙 (Oral 발표)	이명숙		Obesity 30th meeting San Antonio, Texas (2012.9,20-24)	국외
2012	양하의 생리활성을 이용한 식품치료식(양하묵) 제조 및 평가	김현숙	김애정	김민정, 이명숙, 이건순	동아시아식생활학회	국내
2012	Decidual induction of estrogen-primed uterine stromal cells in vitro	Jeons SR	Cheon YP	-	Clinical and Experimental Reproductive Medicine 39	국내
2012	Characteristics of mouse adipose-derived stem cels (mADSC) in contact inhibition	Jeon Y	Cheon YP	Lee MS	Clinical and Experimental Reproductive Medicine 39	국내
2013	Effects of Mung-Bean and Black-Bean ethanol extracts on inflammation related to obesity in the high fat induced obesity model	김민진	이명숙	김소영, 위해리, 박혜진, 최원형	Experimental Biology 2013	국외
2013	Beneficial effects of black soybean on the lipogenesis and lipolysis of mesenteric fat fed high fat diets.	김소영	이명숙	위해리	한국식품과학회 제80차 학술대회 및 정기총회	국내
2013	Effects of Citrus peel ethanol extracts on obesity related to inflammation.	김민진	이명숙	박혜진	한국식품과학회 제80차 학술대회 및 정기총회	국내
2013	Effect of mungbean ethanol extract on the inflammation related to obesity	고석천	이명숙	박혜진, 위해리	한국식품과학회 제80차 학술대회 및 정기총회	국내
2013	막걸리를 사용하여 제조한 흑삼의 증포 횟수별 Rg3 함량의 변화 및 항염증 활성	이수정	김애정	김지연, 이명숙	한국식품과학회 제80차 학술대회 및 정기총회	국내
2013	막걸리를 사용하여 제조한 흑삼의 증포 횟수별 항산화 활성	이경석	김애정	김민정, 이명숙	한국식품과학회 제80차 학술대회 및 정기총회	국내
2013	로스팅 온도에 따른 녹두의 생리활성 변화	이경석	김애정	김혜연, 이명숙	한국식품과학회 제80차 학술대회 및 정기총회	국내
2013	로스팅 시간에 따른 녹두의 생리활성 변화	이경석	김애정	조교회, 이명숙	한국식품과학회 제80차 학술대회 및 정기총회	국내

발표 연도	발표제목	저자			발표기관명	국내외 구분
		주저자	교신저자	공동저자		
2013	Proliferation haricteristics of mouse subcutaneous adipose mesenchymal stem cell: contact inhibition	Jeon Y	Cheon YP	-	36th Korean Society for Cell Biology Summer Conference	국내
2013	Dieckol, a phlorotannin isolated from a brown seaweed, Ecklonia cava, inhibits adipogenesis through AMP-activated protein kinase (AMPK) activation in 3T3-L1 preadipocytes	고석천	전유진	이명숙, 장지태	2013년도 한국식품과학회 제80차 학술대회 및 정기총회	국내
2013	Ecklonia cava Extract Attenuates Lipid Metabolisms and Antioxidant Defense System in High Fat Diet-Induced Obese Mice	HY Eo	Y Lim	M Lee, YJ Jeon	2013년도 한국식품과학회 제80차 학술대회 및 정기총회	국내
2014	Effects of glutamate and GABA extracts from sea tangle (Laminaria japonica) on the inflammation related to obesity in high-fat diet model	고석천	이명숙	박영인, 이배진	Experimental Biology 2014	국외
2014	Beneficial effects of Gelidium amansii ethanol extracts on the adipogenesis in 3T3-L1 preadipocytes	박혜진	이명숙		Experimental Biology 2014	국외
2014	Effects of glutamate and GABA extracts from sea tangle (Laminaria japonica) on the inflammation related to obesity in high-fat diet model	고석천	이명숙	박영인, 이배진	대한비만학회	국내
2014	Attenuate Effects of Gelidium amansii on Obesity and Inflammation in vitro	정주현	이명숙	박혜진	대한비만학회	국내
2014	Inhibitory effects of *Gelidium amansii* ethanol extracts in 3T3-L1 adipocytes and RAW264.7 macrophages	박혜진	이명숙	정민정, 정주현	한국식품과학회 제81차 학술대회 및 정기총회	국내
2014	Comparison of the water and ethanol extracts of black ginseng on the anti-obese effect.	김민정	이명숙	박혜진, 최서진, 정주현	한국식품과학회 제81차 학술대회 및 정기총회	국내
2014	검정콩을 첨가한 식빵과 쿠키제조 및 품질특성연구	고을(주)	김애정	이명숙 김혜연	대한가정학회 제67차 학술대회	국내
2014	Gender differences on alteration of nutrient intake, obesity rate, and HDL peak size of Korean children according to GNB3 polymorphism.	이윤경	이명숙	박성민 최서진	한국영양학회 제48차 학술대회	국내
2014	The association between SIRT1 gene and children obesity: Seoul-Kuro Cohort Study	최세림	이명숙	최서진 정주현 박소영 박수정	한국영양학회 제49차 학술대회 및 정기총회	국내
2015	Effect of Agar-free *Gelidium amansii* (GA) on obesity in DIO C57BL/6J mice model	S Choi	M Lee	H Oh J Jung S Park Y Park S Bak	Experimental Biology 2015	국외

라. 특허 성과

출원된 특허의 경우					등록된 특허의 경우				
출원연도	특허명	출원인	출원국	출원번호	등록연도	특허명	등록인	등록국	등록번호
2013	녹두로부터의 기능성 유효성분의 추출방법	경기대산학협력단	대한민국	10-2013-0079849					
2013	막걸리를 이용한 흑삼의 제조방법	경기대산학협력단	대한민국	10-2013-0082809					
2013	항비만 효과를 가지는 진피 추출물의 제조방법 및 그 방법으로 제조된 진피 추출물	성신여대산학협력단	대한민국	10-2013-0133593					
2013	검정콩 껍질 유래의 안토시아닌을 유효성분으로 함유하는 항비만 조성물	성신여대산학협력단	대한민국	10-2013-0135066					
2013	해조류 및 굴의 발효에 의한 지방축적 및 섭취충동 억제용 발효산물의 제조방법, 이에 따라 제조된 발효산물 및 이를 포함하는 건강기능식품	마린바이오	대한민국	10-2013-0147727					
2013	해조류의 발효에 의한 지방축적 및 섭취충동 억제용 발효산물의 제조방법, 이에 의하여 제조된 발효산물 및 이를 포함하는 건강기능식품	마린바이오	대한민국	10-2013-0147717					
2014	흑삼의 항비만 열수 및 에타놀 추출물	성신여자대학교	대한민국	10-2014-0159801					

마. 기술료 징수 현황

기 징수액	당해년도 징수액	향후 징수액	합계

바. 사업화 현황

사업화명	사업화내용	사업화 업체 개요				기매출액	당해년도 매출액	매출액 합계
		업체명	대표자	종업원 수	사업화 형태			
흑삼관련 제품의 개발	고려흑홍삼 녹용수	(주)동진 제약	김재경	35	제품개발 및 판매	150,000	-	150,000
	고려 흑홍삼 골드					4,214,818	-	4,214,844018
	33차					29,091	-	29,091
녹두소재의 표준화 및 제품개발	톳	(주)서진 바이오텍	김학주	6	소재판매	15,000,000 (1차년 매출액)	-	15,000,000
	3%, 5% (Vitexin/ Isovitexin)					8,200,000 (2차년 매출액	-	8,200,000
제주산 감태를 이용한 항비만 소재 개발	표준화 및 대량생산 과정을 통해 생산된 제주산 감태유래 항비만 소재 타겟 물질인 AG-Dieckol의 제품화	아쿠아 그린텍(주)	장지태	8	제품개발	11,000,000 (1차년 매출액)	10,000,000	21,000,000
검은콩 부산물활용 상품개발	소재표준화 및 대량생산공정의 표준화를 통한 제품개발	고을	임범균	20	제조업	-	13,000,000	13,000,000

사. 인력활용/양성 성과

(1) 인력지원 성과

	지원 총인원	지원 대상 (학위별, 취득자)				성별		지역별		
		박사	석사	학사	기타	남	여	수도권	대전	기타지역
1차년	25	1	14	5	6	3	22	25		
2차년	29	5	8	8	8	5	24	28		1
3차년	12	4	5	3		2	10	12		
합계	66	10	27	16	14	10	56	65		1

⑵ 장·단기 연수지원 성과

장기 (2월 이상)		단기 (2월 미만)	
국내	국외	국내	국외
경기대 안진표-서진바이오 천연물추출농축연수 (2012.04.01.-2012.05.30.)			
NBiCA 사업단 성신여대 여름인턴 프로그램: 이보영외 7명 (2013.06.15.-2013.08.31.)		NBiCA사업단 성신여대 여름인턴 프로그램 : 김소정, 박수정 (2014.07.10.-2014.08.31.)	

⑶ 산업기술인력 양성 성과

① 1차년도

프로그램명	프로그램 내용	교육기관	교육 개최회수	총 교육시간	총 교육인원
성신여자대학교 분자생물학 연수	흑삼 1~9포 처치 후 HepG2 cell 상에서 흑삼의 항비만 관련 기전을 규명하는 기술 연수	성신여대 비만과학연구소	1	12개월	1
Real-time PCR 사용자 교육	한국로슈진단(주)와 산학협력현장 실습지도에 따른 산업인력 양성 및 고습화	한국로슈진단	1	1일	6
Real-time PCR Workshop	(주)BMS와 산학렵력 현장실습지도에 따른 산업인력 양성 및 고급화	BMS Korea	1	1일	9

② 2차년도

프로그램명	프로그램 내용	교육기관	교육 개최회수	총 교육시간	총 교육인원
Nano Drop	UV/Vis Spectrophotometer 를 이용한 정량측정	성신여대 중앙기기실	1	1일	7
Microtome 사용자 교육	Cryocut Microtome Rotary Microtone Tissue processor Embedding center교육	성신여대 중앙기기실	1	1일	7
Microplate Reader 교육	SpectraMax M5-Microplate Reader 교육	성신여대 중앙기기실	1	1일	7

③ 3차년도

프로그램명	프로그램 내용	교육기관	교육 개최회수	총 교육시간	총 교육인원
Real-time PCR 사용자 교육	Real-time PCR 보다 효율적인 활용	바이오라드	1	1일	7
초고속원심분리기 사용교육	지단백질인 HDL분리를 위한 효율적인 활용	히타치	1	1일	7
효율적인 실험테크닉 교육	Cell imaging, Western blot 효율적인 활용방법	라이프테크놀러지	2	2일	5
천연물 추출, 농축법 연수	장단기 산학연 연수, 기술지도 성과(산업기술인력성과)	㈜서진바이오텍	1	2개월	1

아. 경제사회 파급효과

산업지원 성과 (단위 : 건)				고용창출 성과 (단위 : 명)		
기술지도	기술이전	기술평가	합계	창업	사업체 확장	합계
11						

자. 홍보(수상) 및 전시

홍보지	날짜	내용
동아시아식생활학회	2012.4.38	포스터우수상
에쎄EMB/대한급식신문사	2012.8.19	2012 한가위 명절선물 상품전
금산군 축제 추진위원회	2012.9.23	제32회 금산인삼축제
(재)금산국제인삼약초연구소	2012.9.20	2012 지역경제 활성화를 위한 특화사업 성과 전시회
Aesthetic & Spa	2012. 9월호	inner beauty 신소재 흑삼
Aesthetic & Spa	2013, 11월호	inner beauty 신소재 로스팅 녹두
University Line (e-신문)	2013. 8.26-9.3 e-Book	농림수산부 지원 항비만바이오신소재사업단 이명숙성신여대 교수 연구결과 (비만은 '21C 신종 전염병' --)
대한가정학회 2014년 추계	2014. 10. 25	검정콩을 첨가한 식빵과 쿠키제조 및 품질특성 연구 (포스터상 수상)
한국영양학회 2014년 추계학술대회	2014. 11.5-7	비만과학연구소의 항비만연구를 통한 항비만사업단 소개 (학술대회 프로시딩 홍보란)

Library

Inner Beauty 신소재

흑삼

21C 현대인들의 삶의 목표는 건강과 동안이 되었고, 피부와 신체적 건강이 함께 뒷받침이 된 아름다움을 진정한 아름다움으로 받아들이게 되면서 그에 대한 해답을 부작용이 거의 없는 Inner Beauty Food에서 찾으려는 추세에 이르렀다. 이에 웰루킹을 실현시킬 만한 뷰티 신소재로 주목 받고 있는 흑삼을 소개한다.

글 김애정

흑삼의 조성, 고려인삼의 효능

고려 인삼(Panax ginseng CA Meyer)은 한의학적으로 기허(氣虛)에 사용되는 중요한 보기약(補氣藥) 중의 하나이며 체액증강, 소화기, 신경, 면사, 순환기 계통 등의 기능조절을 위한 약 · 식적 명의 구성생약으로 사용되어져 왔다. 인삼의 주된 약리효능을 나타내는 성분인 사포닌은 여러 종류와 형태의 것이 다양한 식물체 내에 존재하지만 인삼의 사포닌은 인삼에만 존재하는 특유한 성분으로 약성이 매우 온화하고 과량투여에도 독성이 거의 없다고 알려져 있다. 이밖에 항산화 활성에 효과가 좋은 페놀성분과 폴리아미딘탄성분, 면역활성, 항균항활성, 혈당강하, 항생항균 등 다양한 활성을 보여주는 다당체 성분 등도 인삼 내에 존재함이 밝혀져 있다. 원형삼류 가공인삼은 밭에서 채취한 상태의 생인삼(수삼)을 원료로 하여 제조 · 가공하는 방법에 따라 백삼, 태극삼, 홍삼 등 3종류로 분류된다. 이러한 가공인삼은 수지법을 달리함으로써 주로 약효 성분인 인삼사포닌(ginsenosi de, 전세노사이드)의 종류와 함량이 달라진다. 저급한지 홍삼과 백삼으로부터 분리한 전세노사이드는 각각 32종 및 24종이 밝혀져 있고, 최근에는 인삼 가공법이 발전함에 따라 백삼이나 홍삼 중 일반 전세노사이드를 특정 기능을 갖는 전세노사이드로 구조를 전환시킬 수 있는 삼리, 화학적, 생물학적 처리방법 등이 개발되고 있다.

웰루킹을 실현시킬 뷰티 신소재, 흑삼

최근에는 전세노사이드 함량을 더 증강시키고자 하는 노력으로 흑삼이라는 새로운 원형삼류 신제품이 개발되어 인삼가공제품의 원료로 사용되고 있다. 흑삼은 원악재 수직법 중의 하나인 구증구포의 원리를 이용해 수삼을 9번 찌고 말리는 과정을 반복하여 제조된 것으로 이 과정에서 인삼의 성분을 변화시켜 용약의 방위를 넓히며 부작용의 감소, 약효보존 및 저장성의 증가를 기져오고 있다.

TIP 흑삼을 이용한 피부를 아름답게 하는 <흑삼한마죽>만드는 법

- 특징-Rg3 강화로 피부염증 및 주름개선에 도움이 되는 미용식품식
- 재료-현미찹쌀 100g, 흑삼농축액 1작은술, 대추 6개, 구기자 15g, 물소금 약간
- 만드는 법
(1) 구기자와 대추는 넣고 물 500cc에 30분간 끓인 후 체에 걸러낸다.
(2) (1)에 불려놓은 현미찹쌀을 넣고 나무주걱으로 저으면서 끓여준다.
(3) 현미찹쌀이 고루 퍼지면 흑삼농축액을 넣고 한 소끔 더 끓여낸다.
(4) 물소금으로 간을 한다.

profile

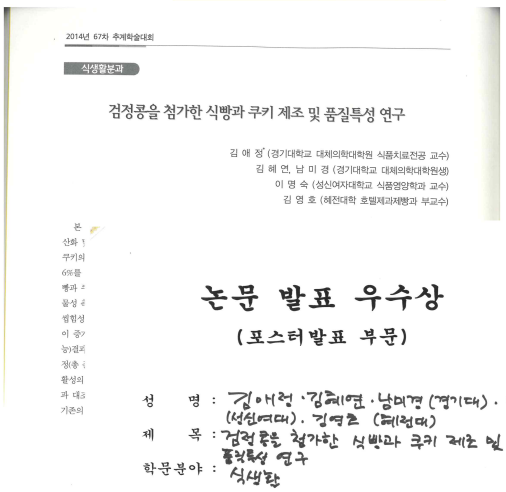
김애정

<로스팅녹두티백차>
비만중년여성의
혈청중성지방수준
저하 효과

연구결과 및 발표 3

비만은 '21C 신종 전염병'
항비만 신소재개발 경쟁력 '충분'

2014년 대한가정학회
제67차 추계학술대회 및 정기총회



2014년 67차 추계학술대회

식생활분과

검정콩을 첨가한 식빵과 쿠키 제조 및 품질특성 연구

김 애 정 (경기대학교 대체의학대학원 식품치료전공 교수)
김 혜 연, 남 미 경 (경기대학교 대체의학대학원생)
이 명 숙 (성신여자대학교 식품영양학과 교수)
김 영 호 (혜전대학 호텔제과제빵과 부교수)

논문 발표 우수상

(포스터발표 부문)

성 명 : 김애정 · 김혜연 · 남미경 (경기대) · 이명숙 (성신여대) · 김영호 (혜전대)

제 목 : 검정콩을 첨가한 식빵과 쿠키 제조 및 품질특성 연구

학문분야 : 식생활

위의 논문은 2014년도 (사)대한가정학회
제67차 추계학술대회에서 포스터발표부문
우수 논문으로 선정되었기에
이 상장을 드립니다.

2014년 10월 25일

사단법인 대한가정학회장 박 미 [illegible]

well-being식품에 대한소비자 선호도에 부응하는 연구로 인정되어 표창됨

비만과학연구소
Research Institute Obesity Science

www.kns.or.kr

2014
한국영양학회 추계국제학술대회
및 제49차 정기총회

2014 International Conference of the Korean Nutrition Society

Brain and Nutrition

Date 2014. 11. 5~7.

Venue Ramada Plaza Jeju Hotel

주최 (사)한국영양학회
주관 제주대학교 식품영양학과 후원 한국과학기술단체총연합회

2. 연구개발성과 활용계획

1) New 생물바이오시스템기법을 활용한 항비만 소재개발 스크리닝법 활용

① 산학연 연구과제를 통한 산학에서 필요한 연구시스템을 도입하려는 위한 노력으로 연구의 실용화에 기여함으로써 산학연 융합형 연구시스템 확립 및 융합형기술을 기반으로 하는 산업체전문 인력양성가능

② 식품영양, 생명과학, 의학, 한방 등 다양한 분야의 학제 간 network을 통한 항비만을 위한 효율적인 convergent 연구시스템 확립이 가능.

③ New 생물바이오 시스템기법을 활용한 항비만 소재개발 스크리닝 법: ATMΦs 염증모델: 3T3L-1 모델만으로 염증성 비만을 확인이 모호(염증인자 M1과 M2의 파악 난해)하나 대식세포와의 co-culture로써 in vivo와 매우 유사한 염증성비만 세포단위시험 모델이 가능. 또한 빠른 스크리닝을 장점으로 in vivo시험의 pilot 연구로써 향후 kit 개발이 가능함.

④ New 생물바이오 시스템기법을 활용한 항비만 소재개발 스크리닝법(지방유래줄기세포 모델): 확립된 배양조건을 통한 스크리닝용 지방줄기세포를 확보함으로써 기존의 in vivo 방법을 대비하여 신속 및 ex vivo 시험을 대체기술 가능성 확인. (ex: EU수출 화장품의 경우, 동물시험을 금지하므로 ex vivo 대체기술 개발이 필요함)

⑤ 지방축적 및 항산화능 동시 측정 유전자 결실 효모종(주요 항산화 단일유전자 결실 4종)을 활용한 스크리닝 기법: 본 핵심 기술은 지속적으로 유용물질 탐색에 활용 될 수 있고, 추후 보다 정밀하고 정량적인 기술을 결부시켜, 본 핵심 기술로 탐색된 기능의 일치성을 향상 시켜, 산업화에 유용한 물질을 제시하는데 기여 할 것으로 기대됨.

따라서 새로운 항비만스크리닝법 (지방분화 STEM CELL 혹은 YEAST GENOMICS기반)은 장기간 시험기간이 필요한 in vivo 시험디자인을 위한 pilot 시험으로 중요한 결정을 조속히 할 수 있어서 비만증가율에 대응하는 기전적 개발이 학문적으로 다양하게 시도될 수 있음.

2) 국가 경쟁력우위 선점

① 비만인구의 증가는 향후 10년 이내 전 국민의 3명중 1명꼴로 비만과 만성질환으로 전이될 가능성을 제시함. 대다수 국민이 비건강인 또는 비경제인구로 전환될 뿐만 아니라 국가의료비용 부담 등으로 점차 국가경쟁력을 상실함. 더욱이 합성의약품사용은 부작용을 유발하여 국민건강의 미래를 해결할 수 없으므로 기능성이 우수한 식품의 개발은 매우 중요한 영향을 줄 것임.

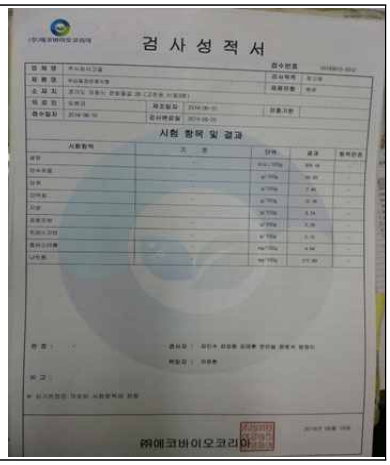
② 국산농수산물을 이용한 기능성 제품의 우수성 및 차별화로 비만관련 국제 기능성식품시장의 경쟁력우위 선점 및 해당업체 고부가가치창출에 기여함. 즉, **유효성분 및 지표물질이 규명된 농림수산물 추출물 또는 복합물 형태의 비만개선용 건강기능식품개발 및 산업화로 약물과 유사한 농가의 고부가가치실현 가능.**

③ 항비만 농수산물 소재분류 및 DB 구축: 선진국에서는 자체농수산물 등을 이용하여 질환별 META-analysis를 완성하는 단계에 있지만 우리는 소재별 DB 조차 부족함. 따라서 이제라도 기초부터 우리농산물의 소재 및 표지물질을 확보하는 **DB를 구축하는 것은 종자은행과 같은 국가농산물의 DATA보존에 기여할 수 있음.**

3) 항비만연구시스템 개선에 따른 새로운 산업적 분야 구축 및 사업화 계획

① New in vitro 스크리닝법은 배양조건의 표준화, 대량생산 표준화 및 standard DB 구축(임상/in vivo 결과와의 상대 비교군 data축적, 대사질환에서의 효율 screening 예측 DB 구축) 등이 선행된다면 이와 관련된 새로운 산업분야 창출이 가능함. 예를 들면 One-Step 항비만스크리닝 KIT개발, 혹은 기전적 실험모델 혹은 임상모델이 개발을 위한 GLP기관설립 등 새로운 산업분야의 개척이 가능함.
② 줄기세포연구의 산업화 계획: 인체 유래 지방조직 유래 줄기세포의 체외 중식 효율을 높이는 표준화된 조건이 구축됨. 이와 함께 생쥐 지방줄기세포의 효율적 체외증식과 분화 표준화조건 구축을 통하여 공급이 제한된 인체 유래 지방줄기세포 공급의 제한을 극복할 수 있는 기반지식이 구축됨. 구축된 screening system을 이용하여 3년차에 유효물질의 항비만 효과를 사업단 내의 결과들을 상대비교하여 온전성을 검증하였음. 따라서 이를 기반으로 사업화를 위한 개발비 등과 관련된 적절한 기회를 만들고자 하며, 이를 통하여 표준화된 screening kit 생산 system 기반 구축 및 관련 업체와의 협업이 가능함. **(주)서진바이오텍, 성신여대 발생학연구실 협력으로 진행.**
③ 효모 Genomics microarray 산업화계획: 지방축적 및 항산화능을 동시에 측정 가능한 유전자 결실 효모종(주요 항상화 단일유전자 결실4종)을 활용한 스크리닝 기법은 지속적으로 유용물질 탐색에 활용 될 수 있고, 추후 보다 정밀하고 정량적인 기술을 결부시켜, 산업화에 유용한 물질을 발굴하는데 활용할 계획임. **기술이전가능성 여부타진 중.**
④ 녹두의 로스팅공법에 의한 효능 최적화 및 제품개발: 녹두를 110℃에서 20분에서 로스팅하였을 때 항산화 활성이 우수함을 검증하였음. 또한 이 조건의 녹두티백차를 제조하여 간이 임상실험을 수행한 결과 혈청 지질수준이 개선되는 효과가 나타남으로써 차후 비만 개선 음료로써 가능성이 있다고 판단됨.
④ 검정콩껍질 분리공정과정에서의 부산물 이용제품개발 및 효능검증: 검정콩 껍질을 분리한 후의 부산물인 알맹이를 이용하여 제과와 제빵을 제조하여 그 품질을 평가한 결과 상품가치 (긍정적인 관능평가 점수와 낮은 나트륨과 트란스 지방산 함량)가 인정되었음. **(주)고을에서** 시제품으로 판매를 시도하여 1300만원 정도의 매출이 있었고, 현재 지속적으로 제조하여 판매가 가능하여 사업화가 활성화됨.

시험항목	control	부산물9%함유식빵
열량(kcal)	302	304
탄수화물(g)	51	51
당류(g)	4	7
단백질(g)	4	12
지방(g)	11	6
포화지방(g)	0	3
트랜스지방(g)	0	0.1
콜레스테롤(g)	11	5
나트륨(mg)	447	218


검 사 성 적 서

⑤ 특히 검정콩 껍질만을 이용하여 양갱을 제조하여 그 품질을 평가한 결과 상품적 가치(긍정적인 관능평가 점수와 높은 항산화 활성)가 인정되었음. 더욱이 항산화활성 뿐만아니라 혈중 지질개선 및 체중 저감화 효과를 활용하고자 제조한 형태의 시제품으로 임상시험이 종료되어 개별인정을 신청할 예

정이므로 기술이전에 따른 사업화가 가능함. 특히 복부비만에 효과적인 임상시험에 따라 시제품(BBT-CD3G)이 10명 중 3명 이상이 복부비만인 한국 중년남성을 타겟팅으로 **대기업에 기술이전을 계획할 예정**이므로 현재 국내 중년남성을 포지셔닝(positioning)한 제품이 없으므로 블루오션 분야로 부각될 것임. 또한 건강기능식품을 이용하는 고개의 연령, 수입, 직업 등에 따른 맞춤형 다이어트프로그램 등을 개발하는 새로운 산학연 마케팅분야 창출 가능함.

Control	SY20	SY40	SY60	SY80

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

가. 국제학술대회참석에 따른 정보수집

(1) 2012년 FASEB 참석

① 발표내용 :Effect of Mungbean seed and testa extracts on anti-obesity related to inflammation in vitro, 3T3L1 cells and in vivo, KK-Ay mice.

② **KK-Ay mice**: KK-Ay는 당뇨와 비만이 함께 나타나는 모델로 흔히 Diaobese model 이라고 하지만 국내에서는 본연구실이 최초로 사용하는 모델이라서 다양한 국제전문가와의 토의가 필요하였음. 대체적으로 아직 안정한 모델은 아니라는 결론에 이르름. 2차년에 시행되는 녹두의 in vivo시험은 C57/B6를 이용한 DIO model로 결정하는 계기가 됨.

(2) 2013년 FASEB참석

① 발표내용 :Effects of Mung-Bean and Black-Bean ethanol extracts on inflammation related to obesity in the high fat induced obesity model

② **BAT(갈색지방) 전문가(Dr. S. Chung)와의 국제협력연구**를 논의하면서 본 사업단 세미나에 초청함. 현재 우리나라에서는 갈색지방에 관한 연구가 활발하지 않지만 국제적으로 그 중요도를 인식하고 있으며 본인 또한 BAT 관련하여 UCP polymorphism과 체지방관련 인체임상시험을 완료하여 Nutrition Research (2013년 게재)한 시점이라서 향후 구체적인 국제공동연구가 가능할 것으로 기대함.

(3) 2014년 FASEB 참석

① 발표내용 I: Effects of glutamate and GABA extracts from sea tangle (Laminaria japonica) on the inflammation related to obesity in high-fat diet model.

② 발표내용 II: Beneficial effects of Gelidium amansii ethanol extracts on the adipogenesis in 3T3-L1 preadipocytes.

③ **California Armond 회장면담**: 한국영양학회 사업이사의 자격으로 관련미팅에 참여하면서 Armond에 함유한 다양한 지방산종류에 따른 항비만효과에 대하여 토론하고 한국영양학회(회장 민혜선)를 통하여 한국의 젊은 과학자양성을 위한 연구비를 조성하고 해마다 우수과학자상을 시상하기로 함.

나. Journal 및 Book 관련 국제Network에 따른 정보수집

① 2013년 J Medicinal Food 저널로부터 **"Korean fermented food" Special issues 저자로 초청**됨. " Doenjang, a Korean fermented soy food, exerts antiobesity and antioxidative activities in overweight subjects with the PPAR-γ2 C1431T polymorphism: 12-week, double-blind randomized clinical trial." 을 2014년 17(1)호 (p119-127)에 게재함. 이에 관련 국내외 reviewer와 긴밀한 토의를 진행함.

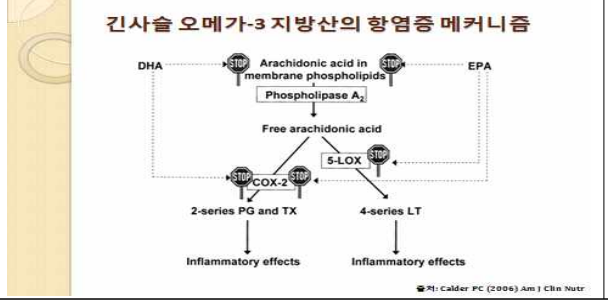
② 2014년 Elsevier와 Academic Press사 주관으로 "Nutrition in the Prevention and Treatment of obdominal obesity" 의 Main Editor인 R.R. Watson으로부터 **book chapter 저자로 초청**받아서 Chapter 22 Fermented Soypaste, doenjang & cheonggukjang, and obesity을 저술하여 2014년 출판함. 이에 복부지방에 영향을 주는 다양한 논제를 접함. 즉, 생활습관(diet and exercise), 알코올, caffeine, whey protein, 밀가루제품, 단당류/이당류, beta-cryptoxanthin, carotenoids, probiotics, w-3지방산을 비롯한 지방산종류, fiber 등이 논의되었고 이같은 식품들과 복부지방축적과의 연관된 기전이 다양하게 update 되어짐. 특히 K Takayanagi 등은 beta-cryptoxanthin이 복부지방을 억제하는 novel carotenoid로써의 기전을 CEBPa와 PPARr 등으로 최종 제안하여 본 연구와 유사한 결과를 나타냄.

③ 2014년 Hindawi Publishing Corporation의 Special Issue Developer인 Wessam Yossry으로부터 "Oxidative Medicine and Cellular Longevity" (IF=3.4) Special Issues의 **Lead Guest Editor**초청을 받음. 3-4인의 Guest editor를 초청하여 Special issue를 만드는 작업으로 국내외 전문가와 긴밀히 토의예정.

④ 2014년 Aperito online Publishing의 "Obesity and Control" 의 editorial board member로 초청됨. Aperito online Publishing은 30개 이상의 저널을 관리하며 Obesity and Control은 Peer-reviewed open access저널로 생물과학, 역학, 임상 등 비만과 관련된 영역을 전반적으로 다룸. 향후 다양한 **국제비만전문가와의 network**를 만들 수 있는 계기가 됨.

다. Lab과의 collaboration

① 대식세포와 지방세포의 상관성을 보여주는 "Crown like structure" 연구의 leading group인 "Tuft 대학의 Dr. Greenburg lab"에서 PostDoc 연구원으로 일한 Dr YK Lee(제주대학교 식품영양학과 교수)lab 과의 지속적인 collaboration을 위한 Lab-lab seminar.



- 2003년 12월: The Pennsylvania State University (M.S.)
- 2008년 5월: The Pennsylvania State University (Ph.D.)
- 2009-2013. Tufts Univ (PostDoc)

제 7 장 연구시설·장비 현황

* 도입·개발한 연구시설·장비 현황 및 국가과학기술종합정보시스템 장비 등록번호를 기술

(1) 구매금액이 3천만원 이상인 연구시설·장비 구매현황

연구시설·장비명	구매금액(원)	구매일자	연구시설·장비 활용용도	설치장소	국가과학기술지식정보시스템 등록번호

* 구매금액이 3천만원 이상인 연구시설·장비는 국가과학기술지식정보시스템(NTIS)에 등록하여야

(2) 대학 메칭지원 기자재현황

연구시설·장비명	구매금액(원)	구매일자	연구시설·장비 활용용도	설치장소
Confocal Laser Scanning Microscope	255,233,190	2012.02.24	시료의 내부까지 깊이 침투하여 살아 있는 세포를 3차원 입체 영상으로 관찰할 수 있기 때문에 CLSM은 생물학 연구의 필수 장비로 활용	중앙기기실
Cryocut Microtome	97,382,866	2013.08.23	생물시료 등을 냉동 후 절단한 후 조직내항원, 항체반응 및 효소검사들을 하고자 할 때 또는 지방 염색시 필수 장비로 활용	중앙기기실
SpectaMax M5 Microplate Reader	95,150,000	2013.10.22	면역화학적 방법으로 단백질을 측정하고, 약물효능 연구에서 쉽게 결과를 도출할 수 있음	중앙기기실

제 8 장 참고문헌 * 보고서 작성 시 인용된 모든 참고문헌을 열거

1) 바이오푸드네트워크 사업보고서, 2007.
2) 한국건강기능식품협회.
3) J Natl Cancer Inst 70:789-796, 1983
4) Bonn Guidelines on Access to Genetic Resources and Fair and Equitable Sharing of the Benefits Arising out of their Utilization, COP 6 Decision VI/24, ABS (Access and benefit-sharing as related to genetic resources)J Natl Cancer Inst 70:789-796, 1983.
5) Insulin Resistance-The Metabolic Syndrome, Edited by G.M. Reaven, A. Laws. Atherosclerosis, 152, 533. (2000)
6) Yusuf S et al., "INTERHEART Study investigators. Lancet, 2004, 364, 937.
7) MS Kim et al Molecular Endocrinology 2004;18(9):2291-2301
8) KH Kim et al, J. Lipid. Res.,51(12):3425-3433.2010
9) KJ Cho et al. Journal of Cellular Biochemistry 96:869-878 (2005)
10) S Cho et al, J Nutr Biochem. 2011, in press
11) CS Kong et al, g. J of Food Science and Nutrtion, 2006; 11: 110-114
12) MS Kim et al. Korean Journal of Biotechnology and Bioengineering, 2007; 22(5): 341-344
13) JT Hwang et al, BBRC 2007;364:1002-1008
14) MR Choe et al. J of Food Science and Nutrtion, 2007; 12: 148-153
15) HK Kim et al, Diabetes. 59(11):2772-2780.2010
16) JH Kim et al, Journal of Pharmacological Sciences, 2005; 97: 124-131
17) MS Kang et al, Biochemical and Biophysical Research Communications, 2008; 369: 333-338
18) HD Yuan et al, Yakhak Hoeji, 2009; 53(5): 286-292
19) SJ KIM et al, Biological & Pharmaceutical Bulletin 31:1415-1421 (2008)
20) KY KIM et al, Biotechnology, and Biochemistry 72(7):1772-1780(2008) 21)
21) HT Kim et al Journal of Veterinary Clinics ;2010; 27(4): 348-365
22) GY Song et al, Korean J Pharmacog 2006;50:381-385
23) S Kim et al, Biochemical Pharmacology 81:1343-1351(2011)
24) JH Kang et al, Obesity, 2010; 18: 780-787
25) S Oh et al, J. Med. Chem 2010;53(20):7495-7413
26) MS Kim et al, Nature Neuroscience 2006;9(7):901-906
27) CN Lumeng et al , J Clin Invest,117, 89-184, 2007
28) CN Lumeng, Diabetes, 56, 16-23, 2007
29) FO Martinez et al, alternative activation of macrophage, Annu Rev Immunol, 27, 451-83, 2009
30) JI Odegaard et al, Nature, 447, 1116-20, 2007
31) Permana PA et al, Am J Physiol Endocrinol metab 286:E958-962. 2004
31) N Tandon et al, Alignment and elongation of human adipose-derived stem cells in response to direct-current electrical stimulation. Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc 2009:6517-6521.2009.
32] F. Sahidi, "Nutraceuticals and functional foods: whole versus processed foods", Trends in Food Science and Tech. Vol. 20, No.9, pp.376-387, 2009.
33] A. Jimenez-Escrig and F. J. Sanchez-Muniz, "Dietary fiber from edible seaweeds: chemical structure, physicochemical properties and effects on cholesterol metabolism", Nutrition Research. Vol.20, No.4, pp585-598, 2000.
33] N. D' Orazio, "Fucoxantin: A Treasure from the Sea", Mar. Drugs, Vol. 10, pp.604-616, 2012.
34] M. Georg Jensen, C. Pederson, M. Kristensen, G. Frost, and A. Astrup, "Review: efficacy of alginate supplementation in relation to appetite regulation and metabolic risk factors: evidence from animal and human studies", Obesity rev. Vol.14, pp.129-144, 2013.
35] 국가통계포털 국제통계: 국제통계연감, 비만인구비율(15세 이상), 2010.
36] K. M. Flegal and R. P. Trorano, "Changes in the distribution of body mass index of adults and children in the US population" Int J Obes Relat Metab Disord, Vol.24, pp.807-818, 2000.
37] 최선남, 최강주, 남해안 해조류의 지방산 조성, 한국식품영양학회지, 제15권, 제1호, pp.58-63, 2002.
38] C. S. Kong, "Inhibition effects of extracts and its solvent fractions isolated from *Limonium tetragonum* on growth of human cancer cells", J Biotechnol Bioeng. Vol.23, pp.177-182, 2008.

39] J. Teas, “ The consumption of seaweed as a protective factor in the etiology of breast cancer: proof of principle”, J Appl. Phycol. Vol.25, pp.771-779. 2013.
40] M. C. Kang, “Melanin inhibitory effect and anti-inflammatory effects of *Dietyota coriacea* extracts derived from adjacent sea of the Jeju island”, Korean J Biotechnol Bioeng. Vol.23, pp.311-316, 2008.
41] C. W. Lim, “The study on antimicrobial and antifungal activity of the wild seaweeds of Jeju island”, J Soc Cosmet Sci korean. Vol.34, pp.201-207, 2008.
42] J. A. Kim, “The changes of biologically functional compounds and antioxidant activities in *Hizikia fusiformis* with drying methods”, Korean J Food Culture. Vol.18, pp.200-208, 2004.
43] S. H. Lee, “Development of functional food and medical drug materials using antidiabetic compounds isolated from brown seaweeds”, Ph.D. thesis, Jeju National University. 2011.
44] B. M. Jung, “ Effects of *Hijikia fusiforme* extracts on lipid metabolism and liver antioxidative enzyme activities in triton-induced hyperlipidemic rats”, J Korean Soc Food Sci Nutr. Vol.30, pp.1184-1189, 2001.
45] M. Miyata, T. Koyama, T. Kamitani, T. Toda, and T. Yazawa, “Anti-obesity effect on rodents of the traditional Japanese food, Tororokombu, Shave Laminaria” Biosci. Biotechnol. Biochem. Vol.73, No.10, pp.2326-2328, 2009.
46] W.S. Jang and S.Y. Choung, “Antiobesity effects of the ethanol extract of Laminaria Japonica Areshoung in high-fat-diet-induced obese rat” Evid Based Complement Alternat Med. Vol.2013, pp.1-17, 2013.
47] A.J. Wanders, M.C. Jonathan, J.J. van den Borne, M. Mars, H.A. Schols, E.J. Feskens, and C. Graaf, ‘The effects of bulking, viscous and gel-forming dietary fibres on satiation “ Br. J. Nutr. Vol.109, No.07, pp.1330-1337, 2013.
48] M. H. Davidson, M.D. McDonald, “Fiber: Forms and functions” Nutr Res. Vol.18, pp.671-674, 1998.
49] S. Mabeu, J. Fleurence, “Seaweed in food products: biochemical and nutritional aspects”, Trends Food Sci Tech, Vol.6, pp.103-107, 1995.S. M. Grundy, “Multifactorial causation of obesity: implications for prevention” Am J Clin Nutr Vol.67, pp.563S-572S, 1998.
50] S. M. Grundy, “Multifactorial causation of obesity: implications for prevention”, Am J Clin Nutr Vol.67, pp.563S-572S, 1998.
51] G. S. Hotamisligil, N.S. Shargill, and B.M. Spigelman, “Adipose expression of tumor necrosis factor-alpha: direct role in obesity-linked insulin resistance” Science, Vol.259, No.5091, pp.87-91, 1993.
52] C. K. Glass and J.M. Olefsky, “Inflammation and lipid signaling in the etiology of insulin resistance”, Cell metabolism. Vol.15, No.5, pp.635-645, 2002.
53] P.D. Cani, J Amar, M.A. Iglesias, M. Poggi et al, “Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance” Vol.56, No.7, pp.1761-1772, 2007
54] F. Cazettes “Obesity-mediated inflammation may damage the brain circuit that regulates food intake “, Brain Res, Vol.10, No.1373, pp.101-109, 2011.
55] C.T. De Souza, “Consumption of a fat-rich diet activates a proinflammatory response and induces insulin resistance in the hypothalamus”, Endocrinology. Vol.146, pp.4192-4199, 2005.
56] Sherwin RS. “Bringing to light the dark side of insulin a journey across the blood-brain barrier” Diabetes. Vol.57, pp.2259-2268, 2008.
57] E.O. Choi, H.S. Kim, M.H. Han, Y.H. Choi, B.W. Kim, J Hwang, and H.J. Hwang, “Effects of Hizikia fusiforme extracts on adipocyte differentiation and adipogenesis in 3T3-L1 preadipocytes” Vol.22, No.10, pp.1399-1406, 2012.
58] H.J. Kim, C.H. Kang, and S.K. Kim, “Anti-adipogenic effect of Undaria pinnatifida extracts by ethanol in 3T3-L1 adipocytes” J. Life Sci., Vol.22, No.8, pp.1052-1056, 2012.
59] 백구 등 “톳 유래 수용성 다당류의 Lipase 저해 활성과 지질 및 체중변화에 미치는 영향”, 한국식품영양과학회지, 제42권, 제4호, pp.556-562, 2013.
60] 장여정 등 “알쏭이모자반 주정추출물의 항비만 효과 ‘ 한국식품과학회지, 43(2), pp.189-194, 2011.
61] S.T. Odunsi, M.I Vazquez Roque, M Camilleri, A. Papathanasopoulos, M.M. Clark, L. Wordrich, M. Lempke, S. McKinzie, M. Ryks, D. Burton, A.R. Zinsmeister, “Effect of alginate on satiation, appetite, gastric function and selected gut satiety hormones in overweight and obesity, Vol.18, No.8, pp.1579-1584, 2009.

<첨부> 특허, 논문 및 시장분석 보고서

1) 특허분석

(1) 기술별

가. 특허분석 범위

대상국가	국내, 국외(미국, 일본, 유럽)
특허 DB	특허정보원 DB(www.kipris.or.kr)
검색기간	최근 5년간
검색범위	제목 및 초록

나. 특허분석에 따른 본 연구과제와의 관련성

개발기술명		*(기술 1)*	*(기술1-1, 2, 3 ,4)*
Keyword		adipose stem cell, differentiation, screening	adipose stem cell, electrical stimulation, differentiation
검색건수		1	1
유효특허건수		0	0
핵심특허 및 관련성	특허명	Induction of differentiation into adipocyte, compound which controls differentiation into adipocyte, and its screening	Method for treating fibrotic lesion combining adipose-derived stem cell and basic fibroblast growth factor
	보유국	일본 (출원 : 11024625)	일본 (출원 : 20203653)
	등록년도	2000	2010
	관련성(%)	0%	0%
	유사점	없음	없음
	차이점		

이 연구를 통하여 할수 있는 예상되는 특허는 줄기세포 특성 유지, 분화 기술로 그 방법적인 측변에서 겹치지 않음

개발기술명		*(기술 2)*	*(기술 2)*
Keyword		흑삼	프로토파낙사디올과 프로토파낙사트리올
검색건수		102건	67건
유효특허건수		9건	9건
핵심특허 및 관련성	특허명	진세노사이드 Rg3 및 Rg2를 포함하는 당뇨 또는 고혈당증 예방 또는 치료조성물	프로토파낙사디올과 프로토파낙사트리올 비율을 조절하여 생리효과를 나타내는 인삼 추출 조성물
	보유국	대한민국 (출원 : 1020090078089)	대한민국 (출원 : 1020080109363)
	등록년도	2009	2008
	관련성(%)	30%	40%
	유사점	진세노이드 Rg3에 주목함 혈중 지질 개선 효과	adipokine분석 및 염증대사
	차이점	혈당조절에 초점	인삼에서 추출한 프로토파낙사디올과 프로토파낙사트리올의 비율을 달리하여 혼합함

개발기술명		*(기술 2)*	*(기술 2)*
핵심특허 및 관련성	특허명	신규제조방법으로 제조된 신규흑삼 및 이의 추출물을 함유하는 당뇨병 예방 및 치료용 조성물	인삼 추출물을 포함하는 비만억제 식품
	보유국	대한민국 (출원 : 1020060078224)	대한민국 (등록 : 1009145040000)
	등록년도	2006	2009
	관련성(%)	30%	20%
	유사점	흑삼 및 이의 추출물의 조성물의 효과	지방세포의 분화억제
	차이점	항당뇨효과에 초점을 두어 당뇨예방 및 치료용 조성물을 강조함	동체와 세근 추출물의 혼합
핵심특허 및 관련성	특허명	구증구포홍삼 농축액과 이를 이용한 당대사조절강화 기능성 식품의 제조방법	11종의 진세노사이드 성분을 유효성분으로 하는 홍삼농축액분말, 비타민 및 미네랄로 조성된 항스트레스, 항고지혈증 및 항비만용 조성물 및 건강기능식품
	보유국	대한민국 (등록 : 1010277070000)	대한민국
	등록년도	2011	2013
	관련성(%)	20%	30%
	유사점	구증구포홍삼(흑삼)의 당대사 조절강화에 의한 기능성	인삼에서 추출된 진세노사이드의 증가된 함량이 항고지혈증, 항비만의 효과를 확인하여 항비만용 조성물로 유용하게 이용될 수 있음
	차이점	흑삼의 추출물과 배합 추출물의 시너지효과를 위한 제조방법의 강조	고지혈증 및 비만관련질환의 예방 및 치료효과를 강조함

※ 1) 개발기술명은 본 연구과제 최종 연구개발 목표기술을 의미
2) keyword는 검색어를 의미하며, 검색건수는 keyword에 의한 총검색건수를, 유효특허건수는 검색한 특허 중 핵심(세부)개발기술과 관련성이 있는 특허를 의미
3) 핵심특허는 개발기술과의 관련성이 높고 인용도가 높은 특허를 기준으로 분석

(2) 성분별

가. 특허분석 범위

대상국가	국내, 국외(미국, 일본, 유럽)
특허 DB	특허정보원 DB(www.kipris.or.kr)
검색기간	최근 10년간
검색범위	제목 및 초록

나. 특허분석에 따른 본 연구과제와의 관련성

① lycopene

개발기술명	*(기술 3)*
Keyword	**lycopene**
검색건수	총 5건
유효특허건수	5건

개발기술명		(기술 3)
핵심특허 및 관련성	특허명	Synergistic combinations for treating hypertension
	보유국	미국 (출원 : 1020107002938)
	등록년도	2010
	관련성(%)	10
	유사점	lycopene 및 lutein을 포함하는 혈압 저하 유효량의 조성물을 환자에게 투여하는 단계를 포함 하나, 환자에서 혈압을 저하하는 방법에 초점
	차이점	
핵심특허 및 관련성	특허명	Nutritional supplement for use under physiologically stressful conditions
	보유국	미국 (등록 : US8202546 B2)
	등록년도	2011
	관련성(%)	10
	유사점	lutein과 lycopene 및 여러 비타민의 보충이 비만과 같은 만성 스트레스와 관련된 건강상의 위험을 줄여주나
	차이점	lutein과 iycopene 외의 vitamin A, vitamin E, vitaminD_3, vitaminC, vitaminB_1, riboflavin, niacin, folicacid, vitaminB_6, biotin, pantothenicacid, vitaminB_{12}, magnesium, zinc, selenium, chromium, copper, iron, alphalipoicacid 등의 보충 효과도 포함됨
핵심특허 및 관련성	특허명	Synergistic compositions for lycopene and vitamin E for the prevention of LDL oxidation
	보유국	미국 (등록 : US 6,515,018 B1)
	등록년도	2003
	관련성(%)	20
	유사점	합성 또는 자연 형태인 lycopene과 vitamin E를 포함하여 상승 효과를 보이는 혼합물 및 LDL 산화 예방을 위한 사용. 동맥경화의 발병을 억제하기 위한 제제 준비와 식이 조성
	차이점	
핵심특허 및 관련성	특허명	Synergistic mixtures of garlic and lycopene for preventing LDL oxidation
	보유국	미국 (등록 : US 6,555,134 B1)
	등록년도	2000
	관련성(%)	20
	유사점	lycopene과 마늘을 포함하여 상승 효과를 보이는 제제 및 식이 조성, LDL의 산화를 막고 동맥경화의 예방 또는 치료를 위한 방법
	차이점	

② 이소플라본, 안토시아닌

개발기술명		(기술 3)	(기술 3)
Keyword		이소플라본	안토시아닌
검색건수		10	5
유효특허건수		4	2
핵심특허 및 관련성	특허명	비만 및 당뇨병 개선용 경구용 조성물	안토시아닌 디사이클로헥실이 결합된 펜던트기를 가지는 화학적으로 증폭된 고분자와 그 제조방법 및 이를 포함하는 레지스트 조성물
	보유국	대한민국 (등록 : 1010695020000)	대한민국 (출원 : 1020020067882)
	등록년도	2011	2002
	관련성(%)	30	40
	유사점	이소플라본 및 L-카르니틴을 유효성분으로 함유하는 비만 및 당뇨병 개선용 경구용 조성물	비만의 예방, 진행의 지연, 치료 및 회복 효과를 나타냄
	차이점		검정콩으로부터 추출된 항비만 활성 안토시아닌 추출물, 상기 추출물과 다른 유효성분이 혼합된 항비만 활성 조성물로 건강보조식품에 관한 것

개발기술명		(기술 3)	(기술 3)
핵심특허 및 관련성	특허명	Composition containing isoflavone material and plant sterol for reducing LDL-cholesterol	노광 장치, 노광 방법, 산출 방법 및 디바이스 제조방법
	보유국	미국	일본 (출원 : 1020090019914)
	등록년도	2001	2009
	관련성(%)	20	30
	유사점	이소플라본, 제니스테인, 식물 스테롤을 포함하는 물질의 구성 및 LDL 콜레스테롤수치를 낮추는 방법	단나무 열매 추출물을 유효성분으로 함유하는 비만, 고혈압, 당뇨 등의 대사관련 질병 및 체력증진 기능성 식품에 관한 것
	차이점		- 단나무 열매 추출물에 안토시아닌과 카로티노이드를 다량 함유하고 있음
핵심특허 및 관련성	특허명	Methods of treating clinical diseases with isoflavones	
	보유국	미국	
	등록년도	2003	
	관련성(%)	20	
	유사점	이소플라본을 포함하는 물질이 대사증후군, 인슐린 저항성, 간경화 같은 질환들을 치료하고 예방하는 방법	
	차이점		

③ 비타민 D, 비타민 E, 제니스틴

개발기술명		(기술 3)	(기술 3)	(기술 3)
Keyword		비타민 D	비타민 E	제니스틴
검색건수		14	34	3
유효특허건수		3	3	1
핵심특허 및 관련성	특허명	Methods for reducing body fat using vitamin D compounds	Tocopherol and tocotrienol anti-obesity medicaments	비만개선용 식품조성물(Food compositions for the improvement of obesity)
	보유국	미국(US 7,053,075 B2)	미국 (US 7,399,784 B2)	대한민국 (등록 : 1005222530000)
	등록년도	2006	2008	2005
	관련성(%)	10	30	30
	유사점	body weight와 body fat을 줄일 수 있는 기능을 갖추고 있음	hypoglycemic 기능을 가지고 있고 satarch blocker, glucose 생산 blocker 기능을 가짐	비만개선용 식품 조성물
	차이점	bone turnover과 osteogenesis에 positive effect가 갱년기 여성에게 효과적임	phytyl substituted chromanol 물질로 구성된 γ-tocopherol, δ- tocopherol, α-tocotrienol, γ- tocotrienol, δ- tocotrienol을 함유한 약품	제니스테인의 Carnitine Palmitoyl Transferase-1 유전자의 발현을 증가시키는 효능 강조

(3) ginsenoside

가. 특허분석 범위

대상국가	미국, 일본, 유럽
논문 DB	pubmed DB(www.ncbi.nlm.nih.gov), 국회도서관(www.nanet.go.kr)
검색기간	최근 5년간
검색범위	ginsenoside*antiobesity

나. 특허분석에 따른 본 연구과제와의 관련성

개발기술명		(기술 4, 7)	(기술 4,7)
Keyword		진세노사이드*항비만	진세노사이드*항비만
검색건수		2,880,400	2,880,400
유효특허건수		9	9
핵심특허 및 관련성	특허명	가공인삼 추출물을 함유하는 비만 예방 및 치료용 조성물	항비만 효과를 갖는 홍삼혼합 조성물
	보유국	한국 (등록 : 1008776040000)	한국 (등록 : 1008152000000)
	등록년도	2008	2008
	관련성(%)	50	20
	유사점	고온 고압처라에 의한 인삼의 진세노사이드 패턴 조정	홍삼추출물
	차이점	유사기술과의 효과성 비교가 안됨	본 과제의 연구 방향인 홍삼의 진세노사이드패턴의 변화 기술과는 전연 관련성 없음

개발기술명		(기술 4, 7)	(기술 4, 7)
Keyword		진세노사이드*항비만	ginsenoside*antiobesity
검색건수		2,880,400	5
유효특허건수		9	1
핵심특허 및 관련성	특허명	비만 억제 치료용 조성물	Phytonutriaceutical synergistic composition for hyperlipidemic condition
	보유국	한국 (등록 : 1008472520000)	미국
	등록년도	2008	2008
	관련성(%)	60	10
	유사점	진세노사이드 패턴 변화 기술	식물성 추출물
	차이점	본 과제에서는 진세노사이드 12개의 패턴 변화에 의한 기술이며 등럭된 기술은 compound K 와 ginsenoside Rf에 한정된 기술임	인삼 사포닌과의 관련성 없음

(4) 해조류

가. 특허분석 범위

대상국가	국내, 국외(미국, 일본, 유럽)
특허 DB	특허정보원 DB(www.kipris.or.kr)
검색기간	최근 5년간
검색범위	해조류*비만, 해조류*발효

나. 특허분석에 따른 본 연구과제와의 관련성

개발기술명		(기술 6,7)	(기술 6,7)
Keyword		해조류*비만	해조류*비만
검색건수		128	128
유효특허건수		9	9
핵심특허 및 관련성	특허명	콜레스테롤 대사개선 및 비만억제 기능성을 동시에 보유한 천연복합 농축액 및 그 제조방법	비만억제용 조성물
	보유국	한국 (등록 : 1007863630000)	한국 (등록번호 : 1010729040000)
	등록년도	2007	2008
	관련성(%)	50	50
	유사점	식용해조류로부터 소재의 분리	함초로부터 사포닌 분리
	차이점	소재가 상이함	소재가 상이함

개발기술명		(기술 6,7)	(기술 6,7)
Keyword		해조류*비만	Seaweed*obesity
검색건수		128	126
유효특허건수		9	14
핵심특허 및 관련성	특허명	해양심층수와 키토산올리고당을 유효성분으로 하는 항비만조성물	AGENT HAVING ANTIOBESITY ACTIVITY AND METHOD OF INHIBITING OBESITY
	보유국	한국 (출원 : 1020080045282)	일본
	등록년도	2008	2005
	관련성(%)	50	70
	유사점	항비만조성물	해조류 추출물의 이용
	차이점	소재가 상이함	소재가 상이함

개발기술명		(기술 6,7)
Keyword		Seaweed*obesity
검색건수		126
유효특허건수		14
핵심특허 및 관련성	특허명	Dietary supplement
	보유국	미국
	등록년도	2000
	관련성(%)	60
	유사점	갈조류추출물 함유 다이어트소재
	차이점	소재가 상이함

2) 논문분석

(1) 흑삼

가. 논문분석 범위

대상국가	미국, 일본, 유럽
논문 DB	pubmed DB(www.ncbi.nlm.nih.gov)
검색기간	최근 5년간
검색범위	흑삼&항비만

나. 논문분석에 따른 본 연구과제와의 관련성

① 흑삼과 항비만 효과

개발기술명		***흑삼***
Keyword		Black Ginseng, anti-obesity
검색건수		275
유효논문건수		34
핵심논문 및 관련성	논문명	Effect of black ginseng on memory improvement in the amnesic mice induced by scopolamine
	학술지명	J. Ginseng Res. (34(1): 51-58)
	저 자	Mi-Ra Lee, Beome-Sik Yun, Lei Liu, Dong-Liang Zhang, Zhen Wang, Chun-Ling Wang, Li-Juan Gu, Chun-Yan Wang, Eun-Kyung Mo, Chang-kuen Sung
	게재년도	2010
	관련성(%)	20
	유사점	추출물의 처치가 MDA 감소시키고, Catalase의 활성을 증가시키는 메카니즘을 확인
	차이점	학습및 기억력저하의 방지효과에 중점
핵심논문 및 관련성	논문명	The effect of Black Gingseng on Body weight and Lipid Profiles in Males Rats Fed Normal Diets
	학술지명	Korean J Pharmacog (50(6): 381-385)
	저 자	Gyu Yong Song, Han Jin Oh, Seong Soo Roh, Young Bae Seo, Yong Jin Park
	게재년도	2006
	관련성(%)	30
	유사점	흑참 추출물 처치군이 체중증가 및 식욕억제가 감소되었으며, 복부지방의 무게가 유의적인 감소를 보였고 TG 수준이 유의적으로 감소됨
	차이점	항염증성 메카니즘의 규명없이 단순한 식욕억제 능력만을 검증

② 사포닌과 항비만 효과

개발기술명		사포닌
Keyword		Saponin, obesity
검색건수		670건
유효논문건수		25
핵심논문 및 관련성	논문명	Weight Gain Reduction in Mice Fed Panax ginseng Saponin, a Pancreatic Lipase Inhibitor
	학술지명	Journal of Agricultural and Food Chemistry (55(8):2824-8)
	저 자	Naama Karu, Ram Reifen, and Zohar Kerem
	게재년도	2007
	관련성(%)	20
	유사점	사포닌의 체중증가 억제 효과의 확인
	차이점	mice에서 단순한 체중증가와 in vitro에서 pancreatic lipase의 활성 변화만을 관찰함
핵심논문 및 관련성	논문명	Effect of Crude Saponin of Korean Red Ginseng on High-Fat Diet-Induced Obesity in the Rat
	학술지명	Journal of Pharmacological Sciences (97(1):124-31)
	저 자	Ji Hyun Kim, Dae Hyun Hahm, Deck Chun Yang, Jang Hyun Kim, Hye Jung Lee, and Insop Shim
	게재년도	2005
	관련성(%)	30
	유사점	인삼 사포닌 성분의 식이섭취량 감소, 체중증가 억제 및 지방 축적 저해함을 관찰함.
	차이점	serum leptin의 농도의 감소에 의한 식이섭취가 감소되어 체중증가가 억제되는 것으로 결론내림.
핵심논문 및 관련성	논문명	Anti-obesity effects of ginsenoside Rh2 are associated with the activation of AMPK signaling pathway in 3T3-L1 adipocyte
	학술지명	Biochemical and Biophysical Research Communications (364(4):1002-8)
	저 자	Jin-Taek Hwang, Soon-Hee Kim, Myoung-Su Lee, Sung Hee Kim, Hye-Jeong Yang, Min-Jung Kim, Hak-Soo Kim, Joohun Ha, Myung Sunny Kim, Dae Young Kim
	게재년도	2007
	관련성(%)	40
	유사점	ginsenoside의 대사기전에서의 항비만효과의 검증(PPARɣ 억제하여 adipocyte differentiation억제, AMPK활성화, CPT-1, UCP-2 유도하여 AMPK inhibitor 처지에 의한 억제효과 등)
	차이점	ginsenoside Rh2로 in vitro 단계에서의 비만에서의 대사기전과 pathway만을 확인함

(2) 지용성비타민

① Lipid soluble vitamins

개발기술명		기술 3
Keyword		Carotenoids
검색건수		335
유효논문건수		19
핵심논문 및 관련성	논문명	The role of carotenoids in human health
	학술지명	Nutr Clin Care (5(2):56-65)
	저 자	Johnson EJ,
	게재년도	2002, 5, 56-65.
	관련성(%)	30
	유사점	임상 연구에서 카로티노이드 섭취의 만성질환과의 위험성 감소 효과 입증
	차이점	심혈관계질환 및 암 등의 만성 질환들의 위험 감소 사이의 관계에서 지방조직 내의 베타카로틴의 생리적 작용에 대한 연구가 미비함.
개발기술명		기술 3
Keyword		리코펜
검색건수		36
유효논문건수		3
핵심논문 및 관련성	논문명	Lycopene inhibits proinflammatory cytokine and chemokine expression in adipose tissue.
	학술지명	J Nutr Biochem, (22(7):642-648)
	저 자	Gouranton E et al
	게재년도	2010
	관련성(%)	50
	유사점	고지방 식이를 섭취한 mouse의 지방세포를 lycopene에 배양한 ex vivo 실험에서 염증성 인자들의 유전자와 단백질의 발현이 모두 감소됨이 관찰
	차이점	동물실험에 국한되어 있음
개발기술명		기술 3
Keyword		비타민 D
검색건수		1
유효논문건수		1
핵심논문 및 관련성	논문명	Dietary intervention with vitamin D, calcium, and whey protein reduced fat mass and increased lean mass in rats
	학술지명	Nutrition Research (28(11):783-790)
	저 자	Siddiqui SM, Chang E, et al

	게재년도	2008
	관련성(%)	30
	유사점	Vitamin D, 칼슘, 유청 단백질의 섭취는 칼로리 수준과 상관없이, 체지방 축적 감소, 제지방 증가 및 인슐린 수용체를 알맞게 증가시킴
	차이점	Wistar rats의 동물실험으로 유청단백질등의 제한군과 섭취군에 따른 결과임.

개발기술명		기술 3
Keyword		**비타민 E**
검색건수		343
유효논문건수		32
핵심논문 및 관련성	논문명	Gamma-tocopherol supplementation alone and in combination with alpha-tocopherol alters biomarkers of oxidative stress and inflammation in subjects with metabolic syndrome
	학술지명	Free Radic Biol Med (44(6):1203-1208)
	저 자	Devaraj S, Leonard S, et al
	게재년도	2008
	관련성(%)	20
	유사점	대사증후군인 그룹에서 gamma-tocopherol과 alpha-tocopherol의 보충은 염증과 산화적 스트레스를 감소시킴
	차이점	항비만관련 연구 부족

(3) Black bean containing phytochemicals

개발기술명		기술 3
Keyword		**이소플라본**
검색건수		107
유효논문건수		4
핵심논문 및 관련성	논문명	Puerarin improves insulin resistance and modulates adipokine expression in rats fed a high-fat diet
	학술지명	Eur J Pharmacol (649(1-3):398-402)
	저 자	Zhang W, Liu CQ, Wang PW, Sun SY, Su WJ, Zhang HJ, Li XJ, Yang SY
	게재년도	2010
	관련성(%)	40
	유사점	이소플라본의 활성형태인 Puerarin의 in vivo 실험 결과, 고지방식이를 섭취한 rat과는 달리 혈당이 감소되고 인슐린과 Glucose 저항성을 개선시켰으며 체중증가도 억제하였음
	차이점	leptin과 resistin등의 adipokine에 의한 기전을 강조함

개발기술명		기술 3
Keyword		제니스테인
검색건수		1
유효논문건수		1
핵심논문 및 관련성	논문명	Genistein and daidzein repress adipogenic differentiation of human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells via Wnt/β-catenin signalling or lipolysis
	학술지명	Cell Prolif (43(6):594-605)
	저 자	Kim MH, Park JS, Seo MS, Jung JW, Lee YS, Kang KS
	게재년도	2010
	관련성(%)	50
	유사점	Mesenchymal stem cells(MSCs)에 Genistein과 daidzein(0.01-100㎛)의 21일간 노출로 지방세포 분화를 억제함. 또한 지방분화 marker인 PPARG, SREBP-1c, Glut4의 발현을 억제하는 것을 확인함
	차이점	Wnt/β-catenin signalling의 촉진으로 인하여 지방분해를 통해 지방세포의 분화를 억제하는 것을 확인함

개발기술명		기술 3
Keyword		안토시아닌
검색건수		37
유효논문건수		6
핵심논문 및 관련성	논문명	Dietary blueberry attenuates whole-body insulin resistance in high fat-fed mice by reducing adipocyte death and its inflammatory sequelae
	학술지명	J Nutr. (139(8):1510-1516)
	저 자	DeFuria J, Bennett G, Strissel KJ, Perfield JW 2nd, Milbury PE, Greenberg AS, Obin MS.
	게재년도	2009
	관련성(%)	30
	유사점	비만 모델 동물에서 MAPKinase와 NFκB 신호기전에 의한 cytoprotective & antiinflammatory 작용이 체중감소, 지질 대사 향상 및 염증 반응 감소시킴
	차이점	Whole blue berry 내의 안토시아닌 성분에 의한 비만관련 대사의 변화임.

(4)홍삼, 흑삼과 항비만

가. 논문분석 범위

대상국가	미국, 일본, 유럽
논문 DB	pubmed DB(www.ncbi.nlm.nih.gov), 국회도서관(www.nanet.go.kr)
검색기간	최근 5년간
검색범위	인삼*홍삼*흑삼*항비만

나. 논문분석에 따른 본 연구과제와의 관련성

개발기술명		(기술 4, 5)	(기술 4, 5)
Keyword		Black ginseng*obesity (흑삼*비만)	red ginseng*obesity (홍삼*비만)
검색건수		국외: 92, 국내: -	국외: 157, 국내: 2
유효논문건수		국외: 2, 국내: -	국외: 12, 국내: 1
핵심논문 및 관련성	논문명	Phenolic compounds, antioxidant activity and in vitro inhibitory potential against key enzymes relevant for hyperglycemia and hypertension of commonly used medicinal plants, herbs and species in Latin America	Korean red ginseng(Panax ginseng) improves insulin sensitivity and attenuates the development of diabetes in Ostuka Long-Evans Tokushima fatty rats
	학술지명	Bioresources Technology	Metabolism
	저 자	Ranilla LG, Kwon TI, Apostolidis E, Shetty K. (101(12):4676-4689)	Lee HJ et al. (26(1): 142-147)
	게재년도	2010	2009
	관련성(%)	50	70
	유사점	허브류의 사포닌 및 페놀성 화합물에 대한 면역 및 생리활성 분석	홍삼 함유 진세노사이드 성분의 동물실험에 의한 항비만 효과 분석
	차이점	소재 상이함	홍삼의 항비만 효과 분석 (소재 상이함)

개발기술명		(기술 4,5)
Keyword		Ginseng*obesity (인삼*비만)
검색건수		국외: 283, 국내: 3
유효논문건수		국외: 21, 국내: 2
핵심논문 및 관련성	논문명	Anti-obesity effects of protopanaxdiol types of ginsenosides isolated from the leaves of American ginseng(Panax quinquefolitus L.) in mice fed with high-fat diet
	학술지명	Fitotetrapia
	저 자	Lie R, Zhang JZ, Liu WC (81(8):1079-1087)
	게재년도	2010
	관련성(%)	60
	유사점	인삼 유래 진세노사이드 성분의 동물실험에 의한 항비만 효과 분석
	차이점	미국삼의 잎으로부터 추출한 추출물의 효과분석(소재 상이함)

(5) 해조류

가. 논문분석 범위

대상국가	미국, 일본, 유럽
논문 DB	pubmed DB(www.ncbi.nlm.nih.gov), 국회도서관(www.nanet.go.kr)
검색기간	최근 5년간
검색범위	Seaweed*antiobesity

나. 논문분석에 따른 본 연구과제와의 관련성

개발기술명		*(기술 6)*	*(기술 6)*
Keyword		Seaweed*obesity	Seaweed*obesity
검색건수		13	13
유효논문건수		3	3
핵심논문 및 관련성	논문명	Single and repeated oral dose toxicity study of fucoxanthin (FX), a marine carotenoid, in mice.	Daily ingestion of alginate reduces energy intake in free-living subjects
	학술지명	J Toxicol Sci. (34(5):501-510)	Appetite (51(3):713-719)
	저 자	Beppu F, Niwano Y, Tsukui T, Hosokawa M, Miyashita K.	Paxman JR, Richardson JC, Dettmar PW, Corfe BM.
	게재년도	2009	2008
	관련성(%)	70	50
	유사점	해조추출물의 독성시험	해조류 유래의 식이섬유 소재
	차이점		

개발기술명		*(기술 6)*
Keyword		Seaweed*obesity
검색건수		13
유효논문건수		3
핵심논문 및 관련성	논문명	Seaweed carotenoid, fucoxanthin, as a multi-functional nutrient.
	학술지명	Asia Pac J Clin Nutr.
	저 자	Maeda H, Tsukui T, Sashima T, Hosokawa M, Miyashita K (17(s1):196-199)
	게재년도	2008
	관련성(%)	60
	유사점	해양생물 유래 다기능영양소재
	차이점	소재가 상이함

3) 제품 및 시장 분석 *※ 최신의 자료로 작성하되, 반드시 출처 명시*

가. 생산 및 시장현황

1) 국내 제품생산 및 시장 현황

(1-1) 국내 건강기능성식품 생산 및 시장 현황

❑ 건강기능식품 생산 현황 ('05 ~ '08)

구 분	총 생산액 (억원)	내수용		수출용	
		생산액(억원)	생산량(톤)	생산액(억원)	생산량(톤)
2005	6,856	6,433	11,844	423	1,128
2006	7,008	6,637	10,933	371	667
2007	7,235	6,888	10,239	346	339
2008	8,031[1)]	7,516	12,990	514[2)]	697
'08/'07(%)	△11.0	△9.1	△26.9	△48.6	△105.7

1) 원 금액 기준, 반올림으로 인한 오차, 2) 1$ = 1,310원 (2008)

❑ 연도별 품목별 총 생산액 현황 (상위 10/20품목)

구 분		총 생산액 (억원)				증가율 ('08/07,%)
		2005	2006	2007	2008	
총 액		6,856	7,008	7,235	8,031	△11
1	**홍삼**	1,920	2,469	3,284	4,184	△27
2	알로에 겔	971	1,031	797	639	▽20
3	비타민 및 무기질	762	636	604	531	▽12
4	개별인정형	79	73	249	416	△67
5	**인삼**	371	364	348	413	△19
	5품목 누적	4,102	4,572	5,283	6,183	△17
6	오메가-3 지방산 함유 유지	153	152	142	266	△88
7	글루코사민	643	368	275	201	▽27
8	프로바이오틱스	144	168	174	190	△ 9
9	효모	196	184	146	179	△22
10	클로렐라	576	325	187	166	▽11
	10품목 누적	5,814	5,769	6,206	7,184	△16
11	감마리놀렌산 함유 유지	153	289	187	145	▽22
12	식이섬유(보충용)	183	207	159	145	▽ 9
13	키토산/키토올리고당	170	136	124	86	▽31
14	스쿠알렌	17	79	84	75	▽12
15	효소	70	67	54	58	△ 8
16	프로폴리스추출물	128	53	64	49	▽23
17	자라	74	95	70	36	▽49
18	스피루리나	31	54	44	34	▽22
19	단백질	15	18	18	34	△93
20	버섯	29	27	20	23	△11
	20품목 누적	6,683	6,795	7,031	7,869	△12
	기타	173	214	204	162	▽21

❑연도별 품목별 내수용생산액현황(상위10/20품목: 식약청, 2008년 건강기능식품 생산실적 통계자료)

구 분		내수용 제품 생산액 (억원)				증가율 ('08/'07,%)
		2005	2006	2007	2008	
총액		6,430	6,632	6,872	7,516	△ 9
1	**홍삼**	1,799	2,360	3,189	4,040	△27
2	알로에 겔	969	1,030	796	638	▽20
3	비타민 및 무기질	757	633	602	525	▽13
4	개별 인정형	79	73	249	415	△67
5	오메가-3 지방산 함유 유지	152	151	138	266	△93
5품목 누적		3,756	4,247	4,974	5,885	△18
6	글루코사민	642	367	274	201	▽27
7	**인삼**	178	188	171	183	△ 7
8	효모	196	184	146	179	△22
9	감마리놀렌산 함유 유지	153	289	187	145	▽23
10	식이섬유(보충용)	183	207	159	144	▽10
10품목 누적		5,108	5,482	5,910	6,736	△14
11	클로렐라	515	297	185	134	▽27
12	프로바이오틱스	110	124	119	108	▽ 9
13	키토산/키토올리고당	167	134	122	84	▽31
14	스쿠알렌	17	77	83	73	▽12
15	효소	70	67	54	55	△ 3
16	프로폴리스추출물	128	53	64	49	▽23
17	자라	74	95	70	36	▽49
18	스피루리나	31	54	44	34	▽22
19	단백질	15	18	18	34	△93
20	버섯	29	26	20	22	△10
20품목 누적		6,263	6,428	6,690	7,368	△10
21	기타 품목	167	204	182	149	▽20

○ 국내 건강기능식품산업은 전반적으로 정체기에 머물고 있으며, 장기적 경제 불황으로 인해 성장 정체는 당분간 지속될 전망이며, 이러한 경제전망 속에서 우리나라뿐만 아니라 세계 식품산업의 경우도 새로운 돌파구를 위한 산업으로써 건강기능식품 분야가 주목받고 있음.

○ 특히, 우리나라에서도 이와 비슷한 추세를 반영하고 있는데, 강력한 구매력을 가진 40대 전후의 소비계층에서 건강지향, 웰빙(well-being) 추구 등을 통해 자신의 삶의 질을 높이려는 욕구가 유기농식품, 건강기능식품의 구매로 이어지면서 새로운 시장을 형성하고 있음.

○ 하지만, 건강보조식품으로 시작된 기능성 식품시장이 지난 10년간 꾸준한 성장을 해오고 있으나, 세계시장에 비추면 매우 미약한 시장을 형성하고 있으며, 소재부분은 수입 원료의 의존도가 매우 높아 국내 생산 건강기능식품의 국제경쟁력은 미약할 수밖에 없는 실정임.(국내 건강기능식품 시장전망 분석 및 발전방향 제시, 2007, 식약청 용역보고서).

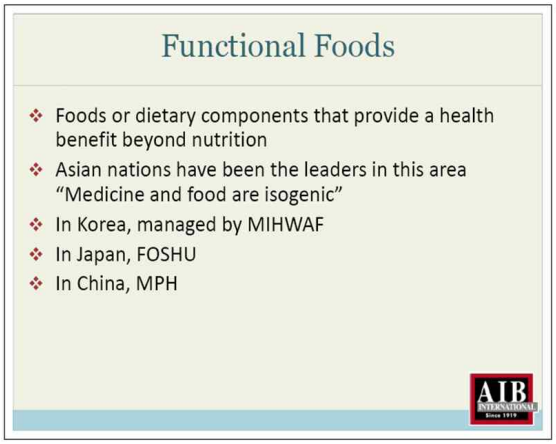
○ 2008년도 건강기능식품 생산실적을 분석한 결과, 건강기능식품 총생산액은 8,031억원으로 2007년 7,235억원에 비해 11%의 증가추세를 보였음(식품의약품안전청). 그 중 홍삼제품이 생산액 1위로 집계됐으며 알로에겔, 비타민 및 무기질, 개별인정형, 인삼 제품이 그 뒤를 이었음.

○ 홍삼제품은 4,184억원으로 전체 생산액의 52%를 차지했으며 전년대비 27% 상승했고, 신규 개발된 개 별인정형 제품의 경우 415억원으로 전체시장의 5.2%에 불과했으나 전년대비 67% 상승하여 급속한 성장 추세를 보였다고 밝혔음.

○ 개별인정형(안전성, 기능성을 개별로 인정받은 기능성 원료로 제조) 제품의 경우, 2006년 이후 급격한 상승 추세로 2808년에는 생산액이 5배이상 증가해 향후 건강기능식품 시장의 새로

운 강자로 부각될 것으로 전망됨. 개별인정형 제품의 기능성별 국내 생산 현황은 '가르시니아 캄보지아 껍질 추출물', '공액리놀렌산'을 이용한 체지방감소 관련 제품 비율이 49%로 가장 높았고, 그 외로 '디메틸설폰', '초록입홍합추출물'을 이용한 관절·뼈 건강 관련제품이 13%, '코엔자임큐텐'을 이용한 항산화 관련제품이 10%, '폴리코사놀'을 이용한 콜레스테롤 개선 제품이 9%의 순이었음.

○ 특히 천연물을 이용한 기능성 식품은 한국, 중국, 일본 등 아시아 국가가 선진국이며, 특히 세계적으로 유명한 한국의 Korea ginseng을 활용한 항비만식품의 전망을 매우 밝을 것으로 기대함.



(1-2) 비만개선용 건강기능식품의 현황

❑체중조절/다이어트 시장

○ 체중조절 기능성 원료 시장은 2007년에 등장하였으며, 비만 및 과체중 인구의 증가로 건강관리에 대한 관심증가, 식품 제조업체들의 마케팅 캠페인 및 제품 공동 브랜딩이 성장 촉진요인이 되고 있으며, 식욕억제 및 포만감 증대 기능성 원료, 탄수화물 흡수 차단제, 지방흡수 차단제, 지방 대체품, 지방 분해제, 대사 조절제 등이 있음.

○ 체중조절 기능성 제품은 식이 보충제 분야에서 나타났으며, 식이 보충제는 전 세계적으로 꾸준한 관심을 받고 있지만, 최근 안전성에 대한 논란으로 기능성 원료 첨가에 대한 붐이 일어나고 있음.

○ 건강기능식품 시장에서 소비자의 기능성 우선순위에 있어 1위 비만(38%), 2위 면역력증진(22%), 3위 아토피(14%), 관절건강(11%) 등으로 비만관련 수요가 증가하고 있음(한국건강기능식품협회, 2008).

❑비만치료제 시장

○ 비만치료제는 2009년까지 꾸준한 성장세로 1,000억원 이상의 시장을 형성하였음.

○ 식욕억제제로, 세로토닌과 norepinephrine의 재흡수 억제효과를 통해 식욕을 억제시키는 sibutramine이 심혈관질환의 위험을 높일 수 있다는 이유로 2010년 우리나라를 포함한 미국, EU 등에서 판매중지 조치되었으며, Cannabinoid receptor CB1에 작용하는 rimonabant가 위약에 비해 여러 부작용 때문에 제조사가 모두 철수하여 식욕억제제 시장은 위축되어 있는 상

황임.

○ 흡수억제제 중에서는 현재 장기간 사용을 통한 체중 유지에 대한 관련 기관의 허가를 가지고 있는 유일한 약제가 올리스타트(orlistat)이나, 위장관계 부작용나 비타민 K의 흡수를 방해하여 와파린의 항응고 작용을 항진시킬 가능성 및 투여 후 급성췌장염의 사례 등이 보고.

○ 항비만 작용기작이 규명되고, 효능이 지속되며 안전성이 확보된 비만개선용 천연존재 혹은 유래 형태의 건강기능식품 개발이 시급함.

○ 현재 비만치료제는 비만의 원인인 지방의 소화 · 흡수를 억제하는 Orlistat 제제 (상품명: 제니칼)와 식욕을 억제하여 음식물 섭취를 줄이고 에너지 소비를 증가시키는 Sibutramine 제제 (상품명: 리덕틸)가 시장을 양분하고 있으며, 생명공학 기술의 발전에 따라 새로운 비만 치료 기전이 밝혀지면서 다양한 천연물로부터 활성물질이 개발되고 있음.

○ 2002년 이후 비만치료제의 출원이 급증한 것은 비만치료에 대한 사회적 관심 증가와 더불어 정부의 천연물 R&D지원정책 및 천연물 관련 바이오벤처기업의 증가 등에 기인한 것으로 사료됨(자료 출처: 일간보사 2009년 9월 20일, 한국경제 2010년 6월 8일, 파인넹셜뉴스 2010년 4월 6일)

2) 국외 제품생산 및 시장 현황

○ 지금까지 외국에서 개발되어 시판되고 있는 비만치료제의 대부분은 화학적으로 제조된 합성화합물 의약품인 반면, 우리나라에서는 천연물로부터 비만치료제를 개발하려는 연구가 활발히 진행 중에 있음. 천연물 의약은 합성의약품에 비해 상대적으로 부작용 및 독성이 적고, 우리나라의 경우 전통의약 관련 전통지식이 다양하게 축적되어 있으므로, 외국에 비해 천연물로부터 비만치료제의 개발에 유리한 입장에 있음.

○ 로슈 “제니컬” 애보트 “리덕틸” 아벤티스 “리머나반트” 글락소 “오리스타트”이 세계 비만 치료시장을 점유하고 있음. 그러나, 해외 제약사들의 제품은 천연물이 아닌 화학제품으로서 항상 안정성 문제가 나타나고 있음. 위의 4개사 모든 제품들이 안정성 문제로 매출이 1/3 수준으로 급감함(우울증 환자에게 우울감과 불안감을 심화시켜 자살 충동을 일으킨다는 분석결과)

○ 천연물 소재의 비만 및 체지방 감소 제품은 거의 없음. 식이섬유를 이용한 식욕억제 수준의 소재와 음료제품 수준임(사이언스 타임즈 2010.7.15,http://blog.naver.dpdiy2).

□ 미국 기능성 식품 시장현황

① 시장규모

○ 기능성 식품은 브랜드 선호도에 큰 영향을 받지 않는 성격으로 인해 인지도가 없는 소규모의 업체들이 비교적 쉽게 시장에 진출할 수 있는 것으로 전문가들은 분석하고 있음.

○ 2005년 기준, 미국 기능성 식품 시장규모는 약 41억 달러로써 2000년에 비해 약 80% 이상의 성장을 보였으며 작년에 비해 8% 증가했음.

○ 이같이 80% 라는 거대한 성장을 보인 기능성 식품 시장은 미국인들의 건강, 웰빙에 관한 관심 증대와 더불어 제품의 맛과 질 개선이 이루어낸 결과로 보이고 있음.

② 기능성식품이란?

○ 기능성 식품은 인체에 유익한 성분을 갖춘 식품으로써 비타민, 미네랄과 같은 영양보충제, 건강식품, 유기농식품, 기능성 스포츠 음료수 등이 이에 해당함.

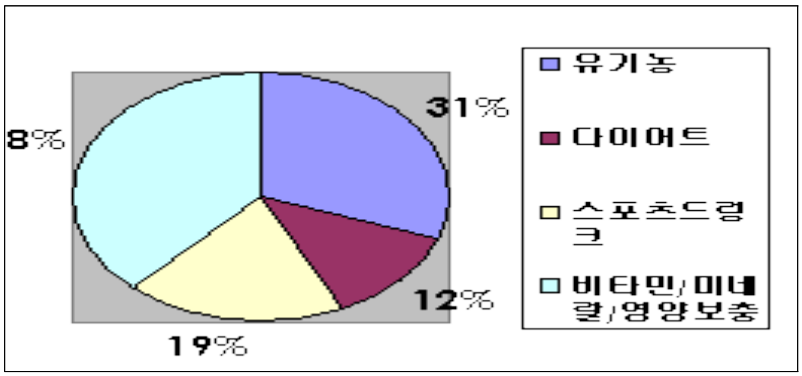
○ 기능성 식품 시장을 이루고 있는 주 품목은 비타민, 미네랄, 유기농식품, 다이어트 식품, 스포츠 드링크, 각종 영양보충제임.

○ 이 중 가장 큰 부분을 차지하고 있는 제품은 비타민, 미네랄, 그 외 영양보충제 품목으로써 전체 시장의 38%를 차지해 약 16억 달러의 규모를 보였음.

○ 가장 큰 성장을 보인 품목은 다이어트 식품으로써 2000년과 2005년 사이 약 95% 이상의 놀라운 성장을 보였음.

○ 유기농 식품은 지난 10년간 매해 23%의 높은 성장률에 이어 2005년 기준, 전체 기능성 시장의 약 32%를 점유하고 있음.

<품목별 시장 점유율>



(자료원: Euromonitor)

③ 시장전망

○ 미국 인구조사(U.S. Census Bureau)에 따르면 미국의 65세 이상의 인구가 2000년과 2010년 사이 54%가 증가 할 것으로 전망하고 있음.

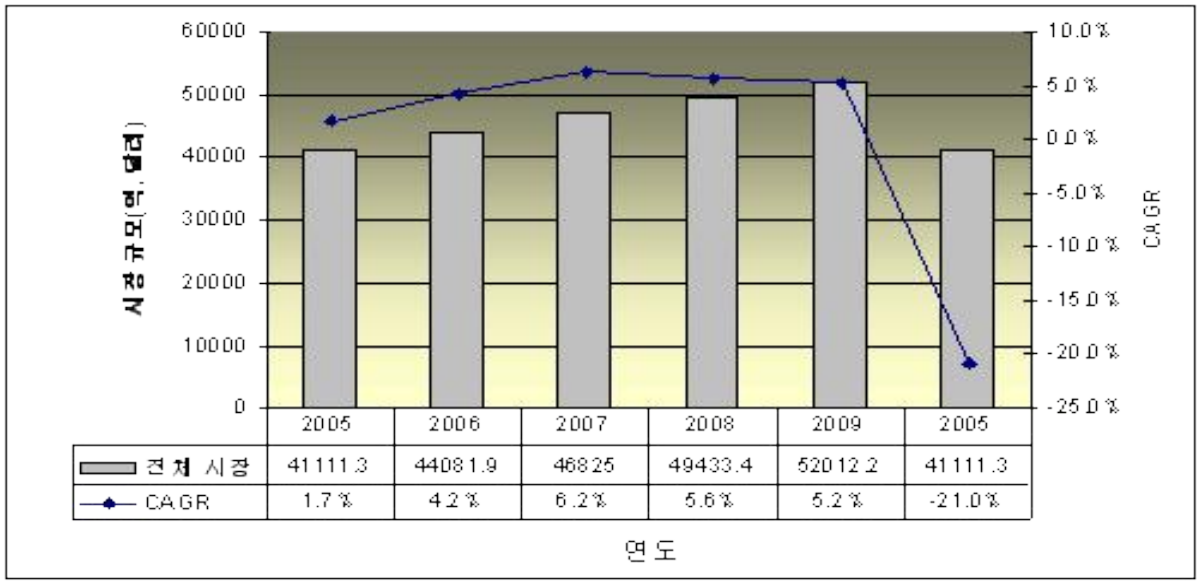
○ 따라서 비타민, 미네랄 및 각종 영양보충제를 포함한 기능성식품 시장은 온라인 판매 형태의 효율적인 판매 방식에 힘입어 2009년에는 시장규모가 52억 달러에 이를 것으로 전망.

○ 유기농 제품은 전체 시장의 34.2%를 차지해 17.8억 달러로 성장할 것이며 다이어트 제품은 가장 큰 성장률을 보일 품목으로써 39%의 성장률과 7억1000달러를 기록할 전망임.

○ 스포츠 음료 품목은 미국의 소비자들이 건강에 대한 관심이 증대함에 따라 스포츠 참여율이 높아짐으로써 9억9000달러의 시장으로 성장할 전망임.

○ 비타민, 미네랄 및 각종 영양보충제 시장은 2009년까지 17억2000달러 시장으로 성장될 전망

<미국 기능성 식품 시장전망> (단위:US$ 백만)



(자료원: Euromonitor)

④ 시장 리더 기업현황

○ 미국 기능성 식품 시장은 전체 시장의 22%가 5대 기능성 식품 및 제약 회사가 차지.

○ 그러나 기능성 식품 개발은 끊임없이 이루어지고 있으며, 아직도 개발 가능성이 큰 관계로 최근 신제품으로 틈새시장을 겨냥한 소규모 기업들의 진출이 활발해 지고 있는 추세임.

<리더기업 시장 점유율>(단위:%)

회사명	시장 점유율
Abbott Laboratories	5.2
Bristol-Myers Squibb Co.	5.1
Wyeth	4.6
General Nutrition Companies	3.7
Herbalife International, Inc.	3.4

(자료원 : Euromonitor)

○ **Abbott Laboratories** : 미국 최대의 제약회사로써 건강식품, 분유부터 제약에 이르는 다양한 제품을 제조하고 있음. 동사 산하에 있는 Ross Products는 각종 건강식품, 다이어트 식품과 영양 보충제를 제조하고 있는 가운데 대표적인 브랜드로는 식사 대용식품인 Ensure, 어린이 영양 식품인 PediaSure, 당뇨병자를 위한 식품인 Glucerna, 분유인 Similac, 두유 분유인 Isomil, 영양바인 ZonePerfect 등이 있음. 또한 이외에도 에이즈 약인 Norvirm, 류머티스 관절염 약인 Humira, 비만 치료약인 Meridia를 제조하고 있음. 본사는 일리노이주 Abbott Park시에 소재하고 있으며 2005년 기준, 19억7000 달러의 매출을 기록했음.

○ **Bristol-Myers Squibb Co.**: Abbott Laboratories 다음으로 최대 규모를 자랑하는 Bristol-Myers Squibb Co.는 건강식품, 영양 보충제, 제약등을 제조하고 있으며, 대표적인 브랜드로는 분유인 Enfamil, 태아를 위한 건강식품인 Expecta 등이 있으며 제약 종류로는 혈소판 반응 억제

제인 Plavix, 콜레스테롤 저하를 위한 Pravachol 등이 간판 제품으로 시판되고 있음. 본사는 뉴욕주 뉴욕시에 위치하고 있으며 2005년 기준, 매출규모는 19억2000 달러를 기록했음.

○ Wyeth: Wyeth사는 제약에 치중하고 있는 가운데 대표적인 약으로는 항울제인 Effexor, 진통제인 Advil, 종합비타민제인 Centrum, 챕스틱, 감기약인 Robitussin 등이 있음. 그러나 1998년에 인수한 영양 보충제 회사인 Solgar Vitamin과 Herb Company를 통해 현재 400개 이상의 영양 보충제를 시판하고 있으며 대표적인 영양 보충제로는 글루코사민 Chondroitin Complex, Vitamin E 400, Formula VM-750, Vitamin C 1000mg with Rose Hips등이 있음. 본사는 뉴저지주 Madison시에 소재하고 있으며 2005년 연 매출 규모는 18억7000 달러를보였음.

⑤ 진출가능 분야 : 유기농 기능성 식품의 원료

○ 기능성 식품은 아직도 개발의 초기 단계에 놓여 있으며 관련자들은 향후 10년 동안 발굴되지 않은 성분의 발견과 개발이 활발히 이루어질 것으로 보고 있음.

○ 특별히 동양 한방으로 쓰이던 약초 종류 등에 세계적인 관심이 쏟아지고 있는 가운데 유기농을 재배된 기능성 원료의 수요는 빠르게 증가하고 있음.

○ 미국의 대표적인 기능성 식품 관련 잡지인 Nutrition Industry Executive에 의하면 미국은 현재 유기농 식품의 수요가 급증하고 있는 반면 공급난을 겪고 있다고 밝혔음.

○ 현재 대부분의 약초 원료가 중국과 인도로 부터 수입되고 있는 실정임. 그러나 이들 국가의 제품은 원료의 정체성, 순도, 위생적으로 인정받지 못하고 있으며, 운송에 따른 많은 문제가 있는 관계로 미국의 제조업체들은 다른 기존의 공급처가 아닌 다른 공급처를 물색하고 있는 실정이라고 함.

⑥ 시사점

○ 미국의 기능성 식품 시장은 주요 기업이 차지하는 부분이 22%밖에 되지 않으며 많은 소규모 기업들이 개발 연구로 이뤄낸 신제품들이 성공을 거두고 있음.

○ 개발 가능성은 무한한 상태이지만 미국 내에서의 원료 공급이 활발히 이루어지지 않아 외국으로의 아웃소싱이 확대되고 있음.

○ 대표적인 아웃소싱 대상국인 중국과 인도의 제품이 인정을 받지 못하고 있는 실정으로써 제3의 공급국가가 물색되고 있는 상황임.

○ 기능성 식품업 컨설팅 업체인 AIBMR Life Sciences의 부사장인 Laura Shauss씨는 “한국의 유기농 원료에 대한 지대한 관심이 있으며 제품 소개를 받을 것을 굉장히 원하고 있는 가운데 특별히 좋은 품질의 인삼과 알로에 등이 큰 수요를 보이고 있다”고 밝혔음.

○ 또한 “많은 중국의 업체들이 자체적으로 공정과정이나 재배과정이 효율적이지 못해 충분한 원료 공급을 하지 못한 상태에서 계약을 체결해 미국의 수입업체가 어려움을 겪고 있으므로 한국 업체가 가장 빠르게 경쟁력을 키울 수 있는 방법은 수요를 충분히 따라오는 공급 능력을 갖추는 것이다”라고 밝혔음.

○ 우리나라 기업은 새로운 원료의 발견과 더불어 유기농 원료 및 약제를 동원해 참신하고 효력이 검증된 완제품 개발에 힘써 새롭게 부상하고 있는 고부가가치의 기능성 식품 시장에 참여해야 할 것임. (자료원: Euromonitor, Nutrition Industry Executive, AIMBR Life Sciences 부사장 전화 인터뷰, 각종 웹사이트)

나. 개발기술의 산업화 방향 및 기대효과

1) 산업화 방향(제품의 특징, 대상 등)

- 복합제제 형태로 변환하고 있음
- 천연재료(고려 인삼류활용)를 이용한 산업화가 경주되고 있음
- B to B, B to C를 통한 TV홈쇼핑, on-off line, 기존 국내 거래처는 물론이고 해외시장 판로개척과 진출 등 적극적인 마케팅과 동시에 지속적인 연구개발로 최고의 제품을 개발 생산하여 국가 경쟁력인 한류와 고려발효흑삼의 브랜드의 경쟁력을 마케팅에 적극적으로 이용함으로서 시장선점을 하고자 함.
- 수산생물소재를 제품에 80% 이상 활용하고자 함.
- 소비자 중심 제형처방을 접목하여 개발하고자 함.
- 수산물가공기술의 개발로 약리효능의 증대와 맛, 냄새 등 제품성과 항비만 효과를 극대화.
- 브랜딩에 사용된 모든 첨가물이 천연 소재로 구성되어 있다.

○ 판매대상

<소재판매> • 국내 식품원료회사 • 국내 기능성식품 제조회사 • 한방제약회사 • 화장품 원료회사 • 제약회사	<제품판매> • 대기업 유통라인 론칭(CJ, 풀무원, 대상 등) • 병/의원, 한의원 • 약 국

2) 산업화를 통한 기대효과

(단위 : 백만원)

산업화 기준 / 항 목	구분	1차년도	2차년도	3차년도	계
직접 경제효과	제 1세부				
	제 2세부				
	제 3세부	1,000	3,000	10,000	14,000
	제 4세부	1,000	3,000	10,000	14,000
경제적 파급효과	제 1세부				
	제 2세부				
	제 3세부	3,000	10,000	10,000	23,000
	제 4세부	5,000	10,000	20,000	35,000
부가가치 창출액	제 1세부				
	제 2세부				
	제 3세부	1,000	20,000	50,000	71,000
	제 4세부	1,000	10,000	50,000	61,000
합 계	제 1세부				
	제 2세부				
	제 3세부	5,000	33,000	70,000	108,000
	제 4세부	7,000	23,000	80,000	110,000

○ 고려발효흑삼이라는 세계적인 브랜드를 이용한 비만치료제 및 다이어트, 성인병 예방을 위한 제품개발이 개발된다면 부작용이 심한 외국 화학비만 치료제가 주류인 국. 내외 시장에서 충분한 경쟁력과 틈새시장 공략할 수 있을 것으로 기대함.
○ 국내 다이어트 시장이 년 1000억 이상을 넘는 상황과 제대로 된 제품이 없는 복합추출물식 제품들이 만연한 시장에서 상당한 시장 점유율과 성공적인 마케팅이 가능 할 것으로 기대함.

다. (특허,논문,제품)분석을 통한 연구추진계획

(1) 홍삼 /흑삼

가. 분석결과 향후 연구계획(특허, 논문, 제품 측면에서 연구방향 제시)

1) 특허분석 측면

○ 주로 백삼과 홍삼에 치중하여 있으며, 흑삼의 경우는 추출한 조성물과 그 농축액에 특허 내용이 치우쳐 있음.
○ 기존 특허는 흑삼의 항암활성 효과와 항당뇨 및 운동능력 증진과 피로회복 증진의 기능 위주로 등록되어있음.
○ 본 연구과제에서는 항비만효과를 Rg3에 초점을 두어 연구를 추진하여 특허 등을 국내 및 국외에 출원할 계획임

2) 논문분석 측면

○ 기존 논문들은 흑삼의 생리활성 효과를 특성 대사단계에 한정하였거나, 제조공정과 제조법에 치중되어 있으므로, 본 연구과제에서는 항염증성 biological mechanism을 이용하여 지표물질에 대한 전임상 단계에서의 항비만 효과를 검증할 계획임.
○ 연구결과를 실용화시키기 위하여 다양한 단계에서의 항비만의 구체적 방향으로 연구를 추진하여 논문 등을 SCI급 학술지 등에 게재할 계획임.

3) 제품 및 시장분석 측면

○ 국내 및 국외시장 분석결과, 흑삼 제품 등의 생산 및 판매가 이루어지고 있으나 단순히 흑삼의 추출물을 음료와 농축물의 정의 형태로 제조하여 판매하고 있음.
○ 본 연구를 통하여 개발되는 건강기능식품원료는 염증성 사이토카인 개선에 따른 내장지방 감소효능에 대한 기능성 인정이 가능하며 효능의 지속성과 안정성을 확보할 것이며, 식품의약품안전청의 개별인정형 건강기능식품 허가기준을 고려한 연구를 수행할 것임.
○ 농가와 계약수매로 농산물을 재배하므로 안정적으로 원료를 공급받고 농가소득에 기여할것으로 기대함.

(2) 항산화물질

가. 분석결과 향후 연구계획(특허, 논문, 제품 측면에서 연구방향 제시)

1) 특허분석 측면

○ 본 연구에 사용되는 유효 성분인 지용성비타민의 항비만에 관한 특허는 carotenoids의 경우는 다른 비타민 또는 무기질과 함께 사용하여 만성 질환의 위험을 낮추거나 산화적 스트레스를 낮추는 것에 대한 특허 출원으로 체지방 감소에 대한 특허는 전무. 비타민 E는 tocopherol과 tocotrienol이 glucose uptake 등을 조절함이 보고됨. 비타민 D의 경우는 체지방 저하 방법으로 특허가 출원됨. 이들 지용성비타민의 경우 비만 상태에서 항염증에 관한 특허는 전무함.

○ soybean containing phytochemicals의 항비만 효과에 관한 특허는 검정콩 (서리태)의 antocyanin 성분의 항비만 효과가 특허로 출원됨. 서목태 (쥐눈이콩)에 대한 특허는 전무함. 대두에 포함된 isoflavone의 항비만 효과에 대한 특허는 다른 성분들과 복합적으로 사용된 물질 특허만 있음.

○ 본 연구과제에서는 항산화보다는 항염증 기전을 중점적으로 조절함으로써 항비만 효과를 규명하여 연구를 추진하여 항염증, 항비만 특허 등을 국내 및 국외에 출원할 계획임

○ 단독 유효 물질로 항비만 효과에 대한 특허는 작용 기전이 분명하지 않아 작용 기전을 명확히 규명하고 각각의 유효 성분 또는 이를 포함한 소재들의 상호 작용을 통해 상승 anto(synergic effect)를 가질 수 있는 최적의 배합 조건에 관한 특허를 출원할 예정임

2) 논문분석 측면

○ 본 연구에서 사용할 유효 성분 중 carotenoid의 경우 항비만 효과가 blood profile 향상시키거나 산화 방지에 한정되어있거나 인슐린 저항성을 낮추는 것에 제한되어 있음. 비타민 D, E, antocyanin의 지방 분화 또는 adipogenesis에 관한 연구는 되어 있으나 지방 분화의 단계에 따른 조절 기전연구가 부족함. 특히, stem cell로부터 각기 다른 지방세포로의 분화에 관한 연구는 전무함.

○ 항비만 연구 소재로 다양하게 사용되지 않았던 지용성 비타민과 phytochemicals과 이를 다량 포함하고 있는 식품 소재들을 이용하여 stem cell로부터 지방 세포로의 분화 단계의 조절과 지방 조직 단독 뿐 아니라 관련 기관과의 상호 작용 기전을 밝힌 논문 등을 국제학술지 등에 게재할 계획임.

3) 제품 및 시장분석 측면

① 국내 제품생산 및 시장 현황

○ 국내 인구 비만율에 대한 심각성과 함께 최근 사회 전반에 불고 있는 웰빙 바람은 비만을 하나의 질병으로 인식하게 됐으며, 여기에 외모에 대한 사람들의 관심은 다이어트에 대한 관심을 불러일으키고 있음.

○ 뷰티산업 중 다이어트 시장 전체 규모가 ‘01년말 이미 1조원을 돌파, ’ 08년에는 약 3조원을 육박함. (삼성경제연구소)

○ 건강기능식품 시장에서 다이어트 식품 시장이 가장 큰 성장세를 기록, ‘08년 약 2천억원선의 규모로 업계는 추산하고 있음.
○ ‘07년 하반기 개별인정 소재인 CLA가 제품화되면서 개별인정형 제품들의 시장 진입이 가속화됨.
○ 체중조절용 식품은 2004년 11억8천79만3천원 규모의 출하액을 기록한 것으로 나타났지만 (식품의약품안전청) 다이어트 식품이 독립된 유형으로 구분되어 있지 않고 영양보충용식품이나 건강보조식품, 건강기능식품, 음료류 등 다양한 품목에서 다이어트를 표방한 제품이 생산되고 있어 그 규모를 파악하는 것은 어려울 것으로 사료됨.
○ 항산화식품소재로서 비타민 E, 베타카로틴의 콜레스테롤 저하와 순환기질환 예방식품으로서 키위의 중성지질 감소 및 혈전증 저하 기능성이 알려져 있음.

② 국외 제품생산 및 시장 현황
○ 당뇨, 고혈압, 동맥경화증, 뇌졸중 등 식생활의 고급화에서 오는 각종 질병들이 지속적으로 늘어나고 있을 뿐만 아니라 의약분업의 시행으로 의료비가 급격히 상승하고 있는 가운데, 식품의 구매패턴이 건강 유지와 증진효과를 우선 고려하는 방향으로 점차 변화하고 있음.
○ ‘04년 전 세계 다이어트 식품 시장은 150억 달러를 형성, ’ 05년에는 전년대비 두 배가 늘어난 300억 달러에 이르는 것으로 보고됨. (유로 RSCG 월드와이드) 미국에서는 50조원, 중국에서도 1조 2천억원대의 규모를 형성하고 있는 것으로 알려짐.
○ 전 세계 캔디시장은 40억불에 달하며, 당뇨와 비만 등 특정질환이나 증상을 완화시켜주기 위한 저칼로리, 당뇨용 기능성제품 (스프렌덜TM)들도 그 시장을 확장해 가고 있음.
○ 다이어트하는 동안 부족 되기 쉬운 영양소를 공급해 주는 뉴트리션널 미얼바나 야외활동이나 운동동안 온도 변화를 견디게 해주는 에너지바로 ‘밸런스 아웃돌M’을 비롯해 콜레스테롤 저하, 당뇨, 기억력, 유당불내증, 근육통, 피로, 운동 등을 위해 고안된 제품들이 속속 등장하고 있음.
○ 체중조절을 위한 저칼로리식품, 지방을 소모시키는 음료나 바 등은 소비자의 요구가 높은 부분임. 미국의 에너지와 스포츠음료시장은 30억불대로 성장, 에너지바 역시 30억불 이상의 매출을 기록함.
○ 고령화, 좌식 생활에 따른 운동부족, 시간에 쫓김, 스트레스 등으로 인해 물리적 또는 정신적인 쾌적함을 줄 수 있는 식품류를 요구하는 경향이 나타남. Quaker사의 ‘PropelTM’과 ‘TorqTM’을 비롯해 코카콜라의 ‘SurgeTM’, 아리조나의 인삼을 가미한 아이스티 등의 판매가 늘고 있으며 정신적 에너지 공급과 맑은 정신 유지의 유용성을 주장하는 M&M/Mars의 ‘MarsTM바’, 위글리사의 ‘Stay AlertTM’ 등이 관심을 끌고 있는 것으로 파악됨
○ 미국시장의 콩 이용 제품

제조사	제 품 명	비 고
Kellog	Smart StartTM	콩단백질 함유 시리얼로 10가지 영양소의 하루필요량 공급
Suiza Foods	Sunsoy 두유	두유
Ross Products	Health SourceTM	Shake용 콩단백분으로 55㎎ 이소플라본, 20ｇ 콩단백, 칼슘 비타민 D등 공급
Now	SoyBeans	볶은 조미콩

○

○ 미국 FDA가 콩의 심장기능관련 유용성 표시를 허용한 이후 매출액이 큰 폭으로 증가해 '02년에는 35억 7천만불 규모로 확대됨.

○ 여성전용으로 개발된 기능성 식품인 Isis (제조사: Proteins International)는 콩과 우유의 단백질 공급제품으로 갱년기 증상완화, 콜레스테롤 저하, 유방암 및 심장질환의 발병률 감소를 겨냥한 제품.

○ 심혈관 기능관련 기능성 식품: 혈중 콜레스테롤이나 트리글리셀라이드의 저하 효과를 지닌 제품들은 고혈압, 심장질환 환자의 급증과 더불어 판매가 급증, 대표적인 상품으로는 스낵바, 오렌지 주스, 비스킷, 초콜리스음료 등이 꼽힘. 더불어 포레바이오틱, 오메가-3지방산, 조효소 Q10, 키토산과 같은 제품들도 심장관련 기능성식품시장에서 중요한 비중을 차지함.

제 조 사	제품명/소재	특 성
Lipton/Unilever	Take ControlTM	콜레스테롤/ Triglyceride 저하
McNeil	BenecolTM	콜레스테롤/ Triglyceride 저하
Novartis	AvivaTM Life Foods	콜레스테롤/ Triglyceride 저하
Novartis	FCP Phytrol 유래물질	목재 sterol 유래 콜레스테롤 저하물질
Cooke Pharma	Heart BarTM	L-arginine를 함유한 심혈관질환 및 혈중콜라그 감소를 위한 치료식
Davisco Foods International	hydrolzed whey protein	angiotensin 감소로 고혈압 감소 효과
Huittestern Lihapojet	콜레스테롤 저하 육제품(소시지, 미트볼 등)	고농도 오메가 3 및 6지방산 함유 Rapeseed oil을 이용한 육제품
Mills DA	Liquid VitaTM 함유 식빵 믹스	Rapeseed oil과 해바라기씨유의 Rapeseed oil과 해바라기씨유의 혼합물인 PUFA oil

(3) 발효인삼

가. 분석결과 향후 연구계획(특허, 논문, 제품 측면에서 연구방향 제시)

1) 특허분석 측면

○ 본 사업 인삼부분의 개발특징은 인삼을 열처리 또는 효소처리 등의 특수 과정을 거치면서 인삼의 진세노사이드 의 패턴의 다양화와 함량의 증대(수삼 사포닌 함량의 수배이상)를 시켜 항비만에 최대 효과를 내는 가공삼을 개발하는 것으로 특허를 검색(키워드:진세노사이드*항비만)하여 찾아낸 유사 기술들은 대부분 국내기술에서 유사기술을 찾을 수가 있었으며 외국 기술은 유사기술을 찾을 수가 없었음.

○ 기 출원되어 있는 특허들은 홍삼과 한약재의 혼합방재가 대부분이며 진세노사이드의 전환기술을 이용한 건수는 3건 정도 screen되고 있으나 모두가 특정 진세노사이드의 할ㅇ비만

효과만을 다루고 있고, 이들 특허들 모두 개발된 제품의 항비만 효과성에 대한 기술이 대부분이며 여타기술과의 비교된 효과는 찾아보기 힘듬.

- 사업에서 개발하고자 하는 기술은 여러 가지 가공기술에서 얻어진 제품의 항비만 효과를 비교 검토하여 기 개발 제품 보다 획기적으로 강화된 항비만능을 가지는 인삼제품의 제조기술을 개발하고자 하는 것이 차별성임.
- 사업이 성공적으로 완성된다면 항비만효능에 최적인 진세노사이드 패턴을 밝힐 수 있을 것이며 인삼성분이 항비만에 관련하는 메카니즘을 정립할 수 있을 것임.
- 천연물 소재별 출원동향을 살펴보면, 식물 추출물에 관한 출원이 전체 출원의 92%로서 광물(2%) 및 동물, 미생물 추출물(6%)에 비해 압도적으로 많음- 조성물 위주의 특허 출원 형태임
- 1종의 천연 추출물에 관한 출원(69%)이 2종 이상의 복합 천연 추출물에 관한 출원(31%)보다 많은 비율 을 차지 각 출원에 기재된 천연물 소재가 대부분 상이한 것으로 보아 다양한 천연물 소재로부터 비만치료제를 개발하려는 연구가 진행되고 있음을 알 수 있음.
- 비만치료제의 작용기전별 특허 출원동향을 살펴보면, 지방 등의 소화흡수 저해제(24%), 지방세포분화 저해제(12%), 호르몬 조절제(10%), 열대사 촉진제(4%), 식욕 억제제(3%), 지방산 생성 억제제(2%), 혈관신생 억제제(2%) 등 생명공학기술의 발전을 통해 규명되고 있는 다양한 비만 발생 기전을 활용하여 새로운 비만치료제를 개발하려는 연구가 활발히 진행되고 있음
- 홍삼이나 인삼을 포함한 항비만 조성물로 등록, 출원된 특허가 총 3건임
- 기존 특허기술은 개발된 제품이나 특별한 기술이 없고 다만, 관련 약용식물이나 천연물 등을 전통 소재에서 스크린하여 조성물과 함께 추출하여 특허 출원하는 정도여서 본 연구과제에서는 발효흑삼을 제조하는 핵심기술을 확보하고 그 효과(항비만)는 임상실험으로 규명하여 국내 및 국외에 출원할 계획임
- 2000년에 5건에 불과하던 출원건수가 2007년에는 31건으로 크게 증가
- 출원건의 90%가 내국인에 의한 출원(50%가 제약업체 및 벤처기업)

2) 논문분석 측면

- 기존 논문은 주로 인삼과 홍삼분야에 대부분 치중되어 있고 흑삼에 대한 연구는 국내에는 20편 이내이며 국외연구도 활발하지 못한 실정임. 또한 발효흑삼에 대한 연구는 국내외에 발표된 연구가 전혀 없는 실정이어서, 본 연구팀에서는 본 연구팀이 보유하고 있는 핵심기술(발효기술 및 구중구포공법)을 이용하여 최적의 발효흑삼 제조공정 표준화 및 항비만 효과(임상실험) 방향으로 연구를 추진한 결과들을 논문으로 작성하여 국내외 저명 학술지 등에 게재할 계획임.

3) 제품 및 시장분석 측면

- 국내 및 국외시장 분석결과 항비만 치료제는 주로 화학제품 등의 생산 및 판매로 이루어지고 현재 쇠퇴기에 접어든 상태임. 본 연구팀에서는 천연물 특히 Korea ginseng에 본 연구팀의 핵심기술인 발효기술을 적용하는 방향으로 연구를 추진하여 발효흑삼제품 등을 생산하여 국내 및 국외에 판매할 계획임.

(4) 해조류

가. 분석결과 향후 연구계획(특허, 논문, 제품 측면에서 연구방향 제시)

1) 특허분석 측면

○ 해조류를 이용한 항비만, 다이어트 소재의 개발에 대하여 기존에 출원 및 등록된 특허에 있어 국내의 경우 소재에 대한 효과 및 생리 독성 및 효과에 대한 검증을 거치지 않고 효과가 있을것으로 판단되는 소재를 중심으로 조성물을 제작하는 분야에 치중되어 있으며, 복합적인 효과를 부각시키는 경우가 많음. 소재 또한 매생이, 파래, 우뭇가사리류와 미역, 다시마가 주를 이루고 있었으며, 해조 다당류(예: 푸코이단)를 중점적으로 다루고 있으므로 본 연구 개발 과제를 통하여 복합 소재를 개발, 이용하면서, 화학적, 생리적 효과 검증을 통한 특허등을 국내 및 해외에 출원할 계획임.

○ 해외의 해조류를 이용한 특정 응용 분야의 특허에 있어서 출원 및 등록 건수가 적으며, 대부분 해조류로부터 다당류의 분리 및 특성에 관한 특허에 치중되어 있어 본 연구 개발 과제를 통하여 복합 소재를 개발, 이용하면서, 화학적, 생리적 효과 검증을 통한 특허 등을 해외에 출원하여 기술 및 소재를 선점함으로서 제품화 및 수출 등에 유리할 것으로 판단됨.

2) 논문분석 측면

○ 해조류를 이용한 항비만, 다이어트 소재의 개발에 대하여 기존 발표 논문은 alginate, 해조다당류, Fucoxanthin 등에 대한 생리화학적 특성 분야에 치중되어 있으므로, 본 연구과제에서는 소재에 대한 철저한 생리활성 기전 및 안전성에 대한 검증을 실시하는 방향으로 연구를 추진하여 소재의 효능, 안전성, 작용기전에 관한 논문을 “Journal of Food Science“ 학술지 등에 게재할 계획임

3) 제품 및 시장분석 측면

○ 우리나라에서는 다른 건강기능식품과 마찬가지로 체중조절 보조식품도 효과를 지나치게 과장해서 광고하는 경우가 흔하고, 여기에 많은 비만인들이 손쉽게 체중감량을 할 수 있으리라는 기대감에 한두 번은 복용을 하거나 경험을 해 본 사람들이 매우 많음.

○ 체중조절은 일종의 삶이기 때문에 먹기, 활동하기 등의 삶의 방식이 근본적으로 바뀌지 않으면 유지하기가 매우 어렵지만 체중조절의 다른 방법과 마찬가지로 식이요법과 운동이 정착되어가는 과정에서 보조식품을 일시적으로 사용하는 것은 자아효율감 (self-efficacy)을 높여 한 역할을 담당할 수 있음.

○ 건강보조식품 중 다이어트와 밀접한 생식의 경우 90년대 말부터 대중화되기 시작해 매년 40% 이상의 고도 성장을 기록하고 있고, 올 시장규모는 2,600억원대에 이를 것으로 예상되며, 시판업체도 이롬라이프와 CJ, 대상, 오성생식, 풀무원 등 100여 개에 육박하고 있음.

○ 생식 소재도 맛과 기능성을 모두 갖춘 소재들이 인기를 얻고 있으며, 아가리쿠스쌀과 약콩, 브로콜리, 부추, 감자를 비롯해 치커리화이바, 대두 펩타이드, 남미의 녹차로 불리는 ‘마테’에 이르기까지 다양해지고 있는 추세임.

① 체중조절을 위한 보조식품의 종류와 효과

○ 체중조절에 도움을 줄 수 있는 보조식품으로는 미네랄 중의 크롬과 칼슘, 대사산물인 pyruvate, 아미노산인 5-hydroxytryptophan과 카르니틴, 지방인 접합리놀레산 (conjugated linoleic acid), 탄수화물로서 섬유질과 키토산, 그리고 생약인 hydrocitric acid, 녹차추출물, 마황/카페인 등이 있음.

○ 보조식품의 체중조절효과는 다른 건강기능식품과 마찬가지로 <표 2>에서와 같이 요약될 수 있음. 단기효과는 약물치료보다는 못하지만 영양치료보다는 나을 수 있으며, 장기효과는 부작용까지 고려한다면 영양치료가 단연 앞섬.

표 1. 체중조절을 위한 보조식품

구 분	종 류	비 고
1. 비타민과 미네랄	Chromium, Calcium, Pyruvate	
2. 아미노산	5-Hydroxytryptophan, L-carnitine	
3. 지방	Conjugated linoleic acid	
4. 탄수화물	Glucomannan, Chitosan, Psyllium, Pectin, Beta-D-glucan (Yeast, Oat), Fructo-oligosaccharide, prebiotics	
5. 식물성 화합물	Hydroxycitric acid, Green tea catechins, Ephedra/caffeine	

표 2. 체중조절 보조식품의 효과

구 분	영양치료	약물치료	보조식품	비 고
1. 복용기간	일생	수개월~일생	수개월~일생	
2. 장기효과	+++	+++	+	
3. 단기효과	-	+++	++	
4. 부작용	-	+++	+	

표 3. 섬유질의 종류

식이섬유	기능성 섬유	비 고
1. Lignin (채소) 2. Cellulose (밀, 현미, 보리) 3. Hemicelluose (곡류, 채소) 4. Pectin (감, 귤, 사과) 5. Gum (두류, 귀리, 보리) 6. Glucomannan (Konjac나무) 7. Psyllium (질경이 씨앗의 껍질) 8. Beta glucan (귀리, 버섯 등) 9. 해조다당류 (다시마, 미역, 김)	1. Pectin의 일부 2. Gum의 일부 3. 저항전분 (Resistant starch) 4. 생물공학적제조: polydextrose, inulin, dextrin, low molecular weight arginin 5. 동물성 탄수화물 (키틴, 기토산, 콘드로이틴, 콜라겐 등)	

○ 가르시니아 캄보지아 (Garcinia cambogia) 추출물/HCA

- 가르시니아 캄보지아에서 추출한 천연과일산으로 hydroxycitrate(HCA)을 함유함.
- HCA는 지방산과 지방합성을 억제하여 비만치료에 작용하며 간에서 당 신생을 촉진함.
- HCA의 체중감량효과에 대해 동물실험에서는 효과가 많이 관찰되었으나, 사람을 대상으로 한 연구에서는 유의성 있는 결과가 아직은 없음.
- 저열량식을 하면서 HCA를 다른 성분과 함께 투여하면 체중감량효과가 나타나는데, 이것이 HCA의 효과인지, 다른 성분의 효과인지는 아직 분명하지 않음.
- 일일 1.5~3g을 복용해야 효과가 있는 것으로 보고되고 있고, 임산부, 수유부, 치매환자는 금기임.

○ 녹차추출물(Green tea catechins)

- 녹차의 성분 중 30%를 차지하는 카테킨이라는 폴리페놀로 Epigallocatechin gallate(EGCG), Epicatechin gallate (ECG), Epicatechin (EC) 등이 있다. 폴리페놀은 신경말단에서 분비되는 노르에프네프린을 분해시키는 COMT(catechol-O-methyl transferase)의 작용을 억제함으로써 cAMP를 증가시키고 열생성을 촉진함.
- 녹차 추출물은 실험실 연구에서 에너지소모를 증가시키며, 호흡교환율을 유의하게 낮추어 지방 산화를 증가시키는 것으로 알려져 있고 현재까지 안전성과 관련된 장기 연구가 없으나, 특별한 부작용은 없을 것으로 보임.

○ 임산부, 수유부는 금기이며, 혈소판 응집을 저해할 수 있어 아스피린, 와파린 복용자나 수술 전에는 섭취하지 않도록 주의해야 함. 하루에 카테킨으로 125~250mg 처방하며, 국내에서는 엑소리제가 일반의약품으로 판매되고 있으며 2캡슐을 아침과 저녁에 복용함.

○ 마황(Ephedra sinica)/ 에페드라(ephedra)

- 마황은 에페드라가 함유된 약용식물로 에페드린과 유사한 작용을 나타내고 에페드린은 맥박, 혈압을 높이고 24시간 에너지 소모를 증가시킴.
- 외국에서 체중감량 목적으로 판매되는 제품에는 카페인을 다량 함유하고 있는 과라나나 콜라열매 성분이 함께 들어있음.
- 에페드린의 열생성 효과는 카페인을 병합했을 때 더욱 증가하는 것으로 알려져 있음.
- 현재까지 임상시험결과를 메타분석한 자료에 의하면, 월 1kg 속도로 4개월 후 초기체중의 약 11% 감량효과가 있는 것으로 나타났고 17예의 사망을 포함한 수많은 부작용이 보고되어 FDA에서는 제품판매를 규제하려 했으나 2000년 2월 이 제안을 철회한 바 있음.
- 국내에서는 에페드라가 의약품으로 규정되어 있어 건강기능식품에 첨가할 수 없게 되어 있고 현재 국내에 ECA제품으로 ephedrine 25mg, caffeine 25mg, aspirin 100mg이 함유된 슈가펜이란 약물이 일반의약품으로 나와있음.
- EC혹은 ECA병합요법의 체중 감량 효과는 인정되고 있으나 EC병합요법은 비만치료제로 FDA 승인은 얻지 못했고, 교감신경계의 부작용 우려로 의사의 처방을 받는 것이 권장됨.

② 연구전망

○ 비만을 ‘21세기 신종 전염병’으로 규정하고 최근 다이어트 국제 가이드라인을 발표한 WHO의 움직임과 우리나라를 포함한 전 세계가 비만과의 전쟁을 선포하고 다이어트 열풍에 휩싸이는 현재의 추세임.

○ 따라서 다이어트 관련 산업의 고도성장은 앞으로도 계속될 전망이지만 현재 국내에서 유통되고 있는 비만 관련 기능성 소재들은 일부를 제외하고는 거의 대부분을 수입에 의존하고 있는 실정이며, 특히 수산생물소재 유래 비만 기능성 소재는 식이섬유로 이용되고 있는 다시마, 미역, 김 기능성식이섬유로 키틴 키토산, 콘드로이친, 어류 콜라겐 수준정도임.

○ 본 연구가 성공할 경우 국내 기능성 소재시장은 물론 제품은 시장에서 큰 반향을 일으킬 수 있을 것으로 전망됨.

○ 또한 처방활용과 소재 활용차원에서 Food stylist나 한의사, 의사들이 이 제품들의 특성을 잘 이해하고 환자에게 정보를 제공해 주거나 직접 처방하고, 개발된 다이어트 프로그램으로 리하면서 홍보한다면 향후 다이어트 시장을 석권할 수 있을 것으로 전망됨.

주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 기술사업화지원사업 (항비만바이오신소재사업단)의 연구보고서입니다.

2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림축산식품부에서 시행한 기술사업화지원사업 (항비만바이오신소재사업단)의 연구결과임을 밝혀야 합니다.

3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니 됩니다.