

발간등록번호
11-1543000-000748-01

난대성 특화작물 산업화 연구단

(Industrializations research organization of warm temperate zone plants)

한국인스팜주식회사

농림축산식품부

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “난대성 특화작물 산업화 연구단” 과제의 보고서로 제출합니다.

2014 년 12 월 2 일

주관연구기관명 : 한국인스팜주식회사
주관연구책임자 : 김 용 재
핵심연구기관명 : 한국인스팜주식회사
핵심연구책임자 : 김 용 재
핵심연구기관명 : (재)전남생물산업진흥원
천연자원연구원
핵심연구책임자 : 김 선 오
세부연구기관명 : 농업회사법인(주)산들촌
세부연구책임자 : 차 민 석
세부연구기관명 : 남부대학교 산학협력단
세부연구책임자 : 황 권 택
세부연구기관명 : 전남대학교 산학협력단
세부연구책임자 : 진 우 진
세부연구기관명 : 경희대학교 산학협력단
세부연구책임자 : 이 정 민
세부연구기관명 : 수원대학교 산학협력단
세부연구책임자 : 이 유 현

요 약 문

I. 제 목

난대성 특화작물 산업화 연구단

II. 연구개발의 목적 및 필요성

국내 농업은 매우 다양한 생물자원을 생산하고 있는 반면 산업화율은 미비한 실정이므로 비교우위 생물자원을 효율적으로 산업화하여 고부가가치 제품으로 활용할 방안 제시가 필요하다. 생물자원의 산업화를 통하여 수요가 안정적인 작물 재배가 가능하며, 경쟁력이 부족한 작물에 대한 대체효과와 고부가가치 창출에 따라 농가소득 증대에 기여할 것이다.

국내의 건강기능식품 시장은 75% 이상이 수입에 의존하고 있으며 이중 건강기능식품 원료 시장은 90% 이상을 수입에 의존하고 있는 것으로 알려져 있다. 건강기능식품의 시장은 제품 시장에서 원료 시장으로 발전하고 있어 원천기술이 확보되는 건강기능식품 원료 즉, 소재화 연구에 중점을 두어야한다. 특히 이러한 소재화 연구는 원료인 농산물의 안정적인 공급이 필수요건으로 원료 수급이 용이한 국내산 원료를 활용한 산업화 연구가 절대적으로 필요하다.

난대성 자원으로 산업화 가능성이 높은 것으로 알려진 울금(鬱金, *Curcuma longa* L., Turmeric)은 전남 진도군이 국내 주산지이며 울금은 재배가 쉽고, 벼농사를 대체 할 수 있는 고소득 작물로 자리 잡고 있으나 효능확인을 통한 산업화가 미비하여 확산에 어려움이 있다. 전라남도 진도군의 2010년 울금 친환경 재배면적이 45ha, 생산량은 생물기준으로 약 2,000톤에 달하나 대부분 원료, 단순 추출가공 식품으로 유통되고 있다.

또한, 전남 남해안에서 재배되고 있는 난대성 특화작물인 비파나무(*Eriobotrya japonica* (Thunb.) Lindl)의 경우 열매는 과실로 유통되고 있으나 잎(비파엽, 枇杷葉, *Eriobotryae Folium*)의 이용은 미미하다. 본 연구단은 선행연구를 통하여 비파나무 잎의 기억력개선 효과를 확인한바 있으며 산업화를 위한 제제화 연구가 필요하다.

III. 연구개발 내용 및 범위

1. 개별인정형 건강기능식품 산업화

1) 개별인정형 건강기능식품 원료 인정 연구

개별인정형 건강기능식품을 산업화하기 위해서는 식품의약품안전처의 심의를 거쳐 개별인정형 건강기능식품 원료 인정을 획득하여야 한다. “발효울금”의 간건강과 “비파엽추출물”의 기억력개선 인정 획득을 위하여 원료 인정신청서의 각 항목을 작성하여 식품의약품안전처에서 심의를 받고 인정을 획득하고자 하였다.

2) 건강기능식품 원료 산업화 연구

“발효울금”과 비파엽추출물 “의 개별인정형 건강기능식품 원료 인정을 획득한 후 원

료 유통기한 설정연구(가속성 연구)를 수행하여 “발효울금” 과 비파엽추출물 “을 건강기능 식품 원료로 품목신고하고 산업화 하고자 하였다

3) 건강기능식품 제품 산업화 연구

“발효울금” 과 비파엽추출물 “ 건강기능식품 원료를 함유하는 건강기능식품 제품을 산업화 하고자 캡슐, 정제로 제형을 개발하고, 유통기한 설정연구(가속성 연구)를 수행하여 “발효울금” 과 비파엽추출물 “을 함유하는 건강기능식품 제품으로 품목신고하고 산업화 하고자 하였다

2. 건강기능식품 소재 개발

울금과 발효울금을 이용한 항스트레스, 체지방감소, 면역증강, 전립선건강 활성평가를 위하여, 실온 물추출, 열수(물, 20%주정, 80%주정) 추출물을 제작하여 *in vitro*, *in vivo* 활성평가에 활용하고자 하였다.

각 활성평가 결과를 반영하여 최대 활성을 가지는 각 추출물을 선정하고, 각 추출물별 제조공정과 지표성분을 분석하여 표준화하고자 하였다.

3. 건강지향식품 산업화

발효울금과 비파엽추출물을 함유하는 유기농 건강지향식품을 개발하여 국내·외에 산업화 하고자 하였다. 국내산 유기농곡물과 본사업의 소재인 발효울금과 비파엽추출물을 이용하여 유기농인증 기준의 배합비를 개발하고, 가공공정을 표준화하여 국내 유기농식품 인증을 획득하고자 하였다.

국내 친환경시장 및 대형유통업체, 그리고 온라인에서의 판촉행사를 통해 신제품을 알리고, 해외식품전문박람회에 다수 참가하여 최종제품을 개발함에 있어 바이어 의견을 반영한 유기농제품을 개발하여 글로벌산업화를 하고자 하였다.

4. 항스트레스 건강기능식품 소재개발

스트레스를 제어하는 방법으로는 치료적인 접근보다 예방을 목적으로 하는 기능성 식품으로 충분히 제어할 수 있으므로, 스트레스 해소에 도움을 주는 건강기능성식품의 개발을 위한 연구와 제품 개발이 절실히 필요하다. 따라서 본 사업의 소재인 울금(*Curcuma longa* L.)을 대상으로 항스트레스 활성소재의 기능성을 평가 하여 고부가가치 기능성 식품을 개발하고자 하였다.

5. 간기능 개선 활성 기작구명/체지방 감소 건강기능식품 소재개발

5.1. 간기능 개선 활성 기작구명

발효울금의 간기능 개선 활성물질을 밝히기 위해 발효울금 실온추출물의 정제물 대상 HepG2/2E1 세포를 이용하여 알코올성 간세포 손상 보호 활성을 평가하고, 발효울금 분말의 알코올성 간손상 억제 활성 기작을 밝히기 위해 실험동물의 혈청 및 간 조직의 효소 수준 및 활성을 평가하고자 하였다. 또한 시중에 유통중인 개별인정형 건강기능식품(밀크씨슬)을 양성대조군으로 하여 *in vivo* 알코올성 간손상 보호 활성을 비교 평가하고자 하였다.

5.2. 체지방 감소 건강기능식품 소재개발

선행연구를 통해 제시된 체지방 감소 활성을 갖는 발효울금주정추출물을 산업화 소재로 개발하기 위해 발효울금 50%주정 추출물의 기능성성분 및 항산화 활성을 평가하고 3T3-L1 cell에서 지방형성 억제능을 평가하고자 하였다. 또한 60% high fat 식이섭취 SD-rat에서 체지방 감소 활성을 평가하고자 하였다. 발효울금 50%주정 추출물의 체지방 감소 활성물질을 밝히기 위해 분획물을 대상으로 3T3-L1 cell에서 지방형성 억제 및 그

기작을 밝히고자 하였다.

6. 면역증강 건강기능식품 소재개발

1) 울금 추출물과 발효울금 추출물로부터 *in vitro* 세포계 통한 면역증강 효능 평가

울금 추출물과 발효울금 추출물의 세포독성을 평가하여 안전한 농도에서 대식세포와 자연살해세포의 활성화에 미치는 영향과 바이러스 유전자 복제 억제능을 평가하고자 하였다.

2) *In vitro* test결과로부터 얻어진 추출물 중 1종을 선택하여 동물 모델에서 독성 및 적정 용량을 검증, 면역증강효능 평가

In vitro test결과로부터 얻어진 추출물 중 1종의 안전성 평가를 위하여 동물에게 2주 동안 경구투여를 시켜 안전성을 평가하고자 하였다. 안전농도를 확인한 후 농도별로 정상상태의 동물과 면역결핍 동물에서의 추출물의 식이섭취에 따른 면역조절능력을 평가하고자 하였다.

3) 울금 20%주정 추출물의 면역조절 기전 규명

울금 20%주정 추출물의 면역조절의 기전을 밝히기 위하여 자연살해세포와 T세포에 미치는 영향을 관찰하고자 하였다.

7. 전립선건강 건강기능식품 소재개발

1) 울금 추출물의 전립선건강 *in vitro* 평가

울금과 발효울금 각각의 소재에서 열수, 20%, 80% 주정추출물을 대상으로 *in vitro* assay계에서 시료의 유효범위와 활성을 평가하여 전립선건강 건강기능식품소재를 선정하고자 하였다.

2) 울금 추출물의 전립선건강 *in vivo* 평가

울금 열수 추출물을 대상으로 *in vivo* assay계에서 활성을 검토하고 양성대조군 및 현재 유통되는 전립선건강 건강기능식품과 비교하여 소재의 효과를 평가하고자 하였다.

3) 울금 추출물의 전립선건강 기작 검토

울금 열수 추출물 급여 동물의 전립선조직과 혈액을 이용하여 5- α reductase효소의 수준을 검토하고 염증관련인자 및 항산화효소의 변화로 그 기작을 검토하고자 하였다.

IV. 연구개발결과

1. 개별인정형 건강기능식품 산업화

1) 발효울금 개별인정형 건강기능식품 산업화(원료 1건, 제품 5건)

울금을 황국(*Aspergillus oryzae*)을 이용하여 발효울금을 개발하였으며, 식품의약품안전처로부터 간 건강 개별인정형 건강기능식품 원료 인정을 획득하였으며(“발효울금”, 제2013-4호, 2013.03.06, 식품의약품안전처), 유통기한 설정연구를 완료하여 건강기능식품 원료로 “발효울금”(제2012-광주청-0004-0001호, 2013.06.28)을 신고하였다.

발효울금을 함유한 제품으로 “천양지차 발효울금캡슐”(제2004-경인청-0017-0329호, 2013.09.02), “인스팜 발효울금캡슐”(제2013-광주청-006-0001호, 2013.11.28), “인스팜 발효울금분말”(제2012-광주청-0004-0002호, 2014.06.12, “천양지차 발효울금골드”(제2013-광주청-0006-0002호, 2014.10.07), “인스팜 발효울금정”(제2013-광주청-0006-0003호, 2014.10.07) 5건의 제품은 산업화 하였다.

2) 비파엽추출물 개별인정형 건강기능식품 산업화(원료 1건, 제품 1건)

비파나무의 잎(비파엽)을 추출하여 “비파엽추출물”을 개발하였으며, 식품의약품안전처

로부터 기억력개선 개별인정형 건강기능식품 원료 인정을 획득하였으며(“비파엽추출물”, 제2014-46호, 2014.10.02, 식품의약품안전처), 유통기한 설정 연구를 완료하여 “비파엽추출물”(제2013-광주청-0006-0004호, 2014. 10.21)”을 건강기능식품 원료로 신고하였다.

비파엽추출물을 이용한 제품으로 “메모리업”(제2014-광주청-0006-0005호, 2014.11. 10) 1건의 제품은 산업화 하였다.

2. 건강기능식품 소재 개발(소재개발 4건)

울금을 이용한 항스트레스, 체지방감소, 면역증강, 전립선건강 활성평가를 실시하여, 항스트레스 활성을 가지는 울금 80%주정 추출물, 체지방감소 활성을 가지는 발효울금 50%주정 추출물, 면역증강 활성을 가지는 울금 20%주정 추출물, 전립선건강 활성을 가지는 울금 열수 추출물을 건강기능식품 소재로 개발 하였다.

3. 건강지향식품 산업화(유기가공식품 2건)

발효울금과 국내산 유기농곡물을 이용하여 국내시장에 지금까지 없었던 옐로우 컬러의 라이스칩을 개발하여 “유기농 와이칩”으로 품목제조보고 신고를 하였으며, 비파엽추출물과 해조류 및 유기농곡물을 이용하여 그린 컬러의 “유기농 지칩”을 개발하고 품목제조보고 신고를 하였다.

국내 26곳의 친환경전문업체와 홈플러스 등 대형유통업체에 입점을 하였으며, 적극적인 해외마케팅을 통해 미국, 중국, 홍콩, 싱가포르 등에 수출하여 글로벌 산업화 하였다.

4. 항스트레스 건강기능식품 소재개발(특허출원 1건, 논문 3건, 학술발표 3건)

울금 및 발효울금을 이용한 항스트레스 활성평가를 실시한 결과 스트레스 유발물질인 CORT에 의해 증가됐던 세포독성이 울금 80%주정 추출물에 의해 감소하는 것을 확인하였고, 스트레스와 연관이 있는 NMDA 수용체의 발현을 확인한 결과 울금 80%주정 추출물에 의해 NMDA 수용체의 활성이 감소하는 것을 확인하였다. 또한 ICR mouse에서 기억력감퇴 동물 모델을 이용한 활성기전 규명한 결과 $A\beta_{1-42}$ 에 의해 유도되었던 기억력 감퇴가 울금 80%주정 추출물에 의해 회복이 되는 것을 확인하였다.

5. 간기능 개선 활성 기작구명/체지방 감소 건강기능식품 소재개발(특허출원 1건, 논문 3건, 학술발표 6건)

5.1. 간기능 개선 활성 기작구명

발효울금 실온추출물의 정제물 중 Amberlite column 정제물 FCC-25M에서 알코올성 간 손상 보호활성이 나타남으로써 FCC-25M에 알코올성 간손상 보호활성의 유효성분이 함유되어 있을 것으로 추정할 수 있었다. 동물모델에서 나타난 발효울금 분말의 알코올성 간손상 보호 활성은 발효울금 분말 섭취에 따른 항산화효소 활성 증가 및 CYP2E1 발현 억제를 통한 산화적 스트레스 감소에 기인함을 확인하였다. 발효울금 분말과 밀크씨슬을 비교한 연구에서 유사한 *in vivo* 알코올성 간손상 보호 활성을 나타내었다.

5.2. 체지방 감소 건강기능식품 소재개발

발효울금 50%주정 추출물은 3T3-L1 cell에서 지방형성 억제효과를 나타내었고, 60% high fat식이섭취 SD-rat에서 체중 감소 및 체지방 감소 활성을 나타내었다. 발효울금 50%주정추출물은 혈중 중성지방, 총콜레스테롤, HDL-콜레스테롤 등의 회복에 기여하였고, 지방조직 형성인자들을 억제하였으며, 지방분해인자들을 상승시켰다. 발효울금 50%주정 추출물 분획물 중 에틸아세테이트 층의 지방형성 억제 및 지방분해 활성을 확인하였다.

6. 면역증강 건강기능식품 소재개발(특허출원 1건, 논문 3건, 학술발표 2건)

울금 추출물과 발효울금 추출물의 세포계 실험에서 면역증강 효능을 평가한 결과에서 울금 20%주정 추출물에서 가장 효능이 우수하였음을 관찰하였다. 울금 20%주정 추출물은 LP-BM5 바이러스를 이용한 면역결핍 동물모델에서 Th1/Th2 cytokine불균형을 억제시키고 NK cell활성을 증가시켰음을 확인하였다. 또한 기전연구를 통하여 CD4+ T 세포보다는 CD8+ T 세포를 증가시켰음을 확인하여 감염된 세포나 종양 세포 제거에 효과가 있을 것을 예상 할 수 있었다.

7. 전립선건강 건강기능식품 소재개발(특허출원 1건, 논문 3건, 학술발표 4건)

전립선건강 활성소재로 선정된 울금 열수 추출물은 *in vitro* 및 *in vivo* 활성평가를 통하여 혈중 혹은 조직 테스토스테론 수준 및 전립선조직의 무게를 양성대조군과 유사한 수준으로 유의적으로 감소시켰으며, 이러한 결과는 울금 열수 추출물 처리에 따른 활성 테스토스테론으로 전환을 담당하는 5-alpha reductase의 수준감소, 전립선비대 관련 염증인자의 감소 및 항산화효소의 증가에 따른 것으로 확인하였다.

V. 연구성과 및 성과활용 계획

국내산 울금과 비파엽을 이용하여 개별인정형 건강기능식품 원료 인정을 획득함으로써 울금의 간 건강과 비파엽의 기억력개선 효과를 직접광고 가능하게 되었다. 발효울금과 비파엽추출물을 함유한 다양한 제품이 간 건강과 기억력개선 건강기능식품으로 개발되어 산업화가 확산될 것이다.

농업인구의 고령화와 젊은 귀농인이 난대성 특화작물의 재배로 안정적인 농가소득을 창출하게 되었으며, 재배 확산이 기대된다.

또한, 울금과 비파엽을 이용한 유기가공식품이 산업화되어 국내외 친환경 매장에서 판매되고 있다.

울금을 이용한 건강기능식품 소재 개발이 완료되어 울금이 향후 항스트레스, 체지방감소, 면역증강, 전립선건강 건강식품의 소재로 활용가능하게 되었다.

SUMMARY

This research tried to present the possibility of development on domestic agricultural products as a material of health functional food indicating *Curcuma longa* L. (Turmeric) and Eriobotryae Folium which are specialized crops and are grown in warm temperate zone. Turmeric ferments using *Aspergillus oryzae* and get recognition of ingredient as “Fermented turmeric“ of health functional food for liver’s health, so that ingredients and products have been industrialized.

Eriobotryae folium are extracted and get recognition of ingredient as “Eriobotryae folium extract“ of health functional food for memory improvement, so that ingredients and products have been industrialized.

Organic Y chip and organic G chip have been developed as color-concept of organic health-oriented food using organic grain including Fermented turmeric and Eriobotryae folium extract and than industrialized with items manufacturing report. They have been shown in green market and large distribution enterprise and have globally been industrialized exporting to four countries through offensive overseas marketing

We examined effect of *Curcuma longa* L. (CL) and fermentation CL on corticosterone-induced cell to check the anti-stress effect. CL 80% EtOH extract had protective effect against NMDA or corticosterone-induced neurotoxicity and intracellular ROS levels in cerebral cortex neuron cells. Also CL 80% EtOH extract has neuroprotective effects against $A\beta_{1-42}$ -induced neuronal toxicity. These results suggest that CL 80% EtOH extract will be have anti-stress effect.

Mechanistic elucidation of fermented *Curcuma longa* L. (FC) on hepatoprotection /Development of material for health functional foods in relation to fat reduction from fermented *Curcuma longa* L. (FC)

FCC-25M, a purified fraction from fermented *Curcuma longa* L. (FC) revealed a hepatoprotective activity on HepG2/2E1 cells. FC displayed the protective effect on ethanol-induced liver damage by the alleviation of oxidative stress via suppressing CYP2E1. These results suggest that FC could be a functional material for ethanol-induced liver damages.

50% ethanolic extract (FCE50) of FC inhibited preadipocyte differentiation and adipogenesis in 3T3-L1 cells. *In vivo*, FCE50 administration decreased body fat accumulation and mRNA expression level of adipogenesis. Ethyl acetate fraction of FCE50 revealed the inhibition of adipogenesis in 3T3-L1 cells. These results suggest that FCE50 could be a functional material for fat reduction against obesity.

The present study investigates the immunomodulatory effects of *Curcuma longa* L. ethanol extracts. The treatment of *Curcuma longa* L. ethanol extracts inhibited Th1/Th2 cytokine imbalance and pro-inflammatory cytokine production in LP-BM5 MuLV-induced murine AIDS. In addition, we found that *Curcuma longa* L. ethanol extracts could enhance the immune response through activation of NK cells and cytotoxic T cells, resulted from proliferative shift of antigen presentation from MHC II to MHC I, presumably.

We determined the inhibitory effect of hot water extract from *Curcuma longa* L.(CLHW) *in vitro* and *in vivo* on benign prostatic hyperplasia (BPH). From those assay systems, Results showed that CLHW at does from 50 to 100 mg/kg in vivo (25-100 µg/mL in vitro) significantly inhibited prostatic hyperplasia. Also, CLHW also decreases the proinflammatory cytokines including TNF- α related to endogenous enlargement of BPH tissues. These results demonstrated that CLHW may be a potential candidate to develop the specific functional food for BPH.

Thus Turmeric and Eriobotryae folium which are specialized crops and are grown in warm temperate zone have been industrialized as organic food processing and health functional food for liver's health and memory improvement. The development of health functional food material for antistress, reduction of body fat, increase of immunity and health of prostate are completed using Turmeric.

CONTENTS
(영 문 목 차)

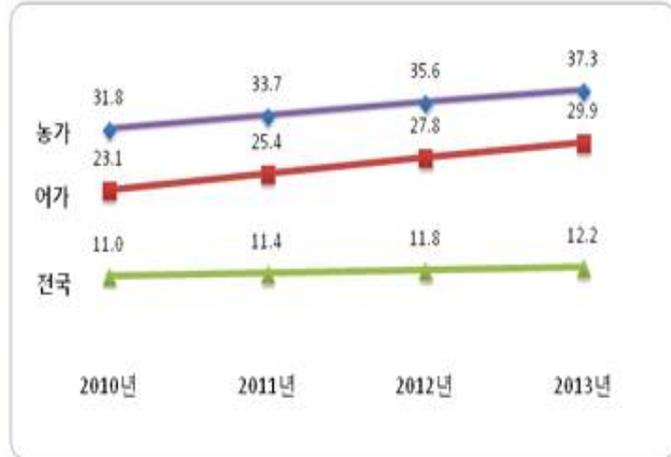
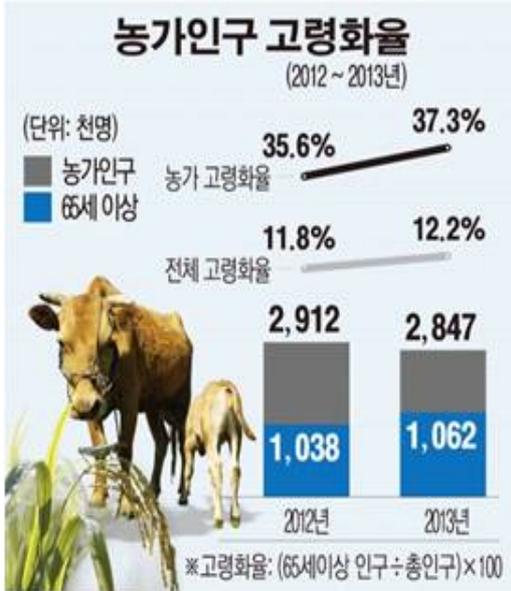
Chapter I . Introduction	11
Chapter II . Research and development status in domestic and abroad	16
Chapter III . Research contents and results	19
Chapter IV . Achievement and contribution	335
Chapter V . Plans for the use of the results	339
Chapter VI . International trend and scientific information	353
Chapter VII . Equipment	363
Chapter VIII . References	364

목 차

제 1 장	연구개발과제의 개요	11
제 2 장	국내외 기술개발 현황	16
제 3 장	연구개발수행 내용 및 결과	19
	1 절. 발효율금 간 건강 개별인정형 건강기능식품 산업화	19
	2 절. 비과엽추출물 기억력개선 개별인정형 건강기능식품 산업화	37
	3 절. 시료제작 결과보고서	53
	4 절. 유기농 건강지향식품 산업화	56
	5 절. 항스트레스 건강기능식품 소재 개발	108
	6 절. 간 기능 개선 및 체지방 감소 건강기능식품 소재 개발	152
	7 절. 면역증강 건강기능식품 소재 개발	222
	8 절. 전립선건강 건강기능식품 소재 개발	301
제 4 장	목표달성도 및 관련분야에의 기여도	335
제 5 장	연구개발 성과 및 성과활용 계획	339
제 6 장	연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보	353
제 7 장	연구시설·장비 현황	363
제 8 장	참고문헌	364

제 1 장 연구개발과제의 개요

1. 농가 인구 고령화 심각, 조방적농업이 대안

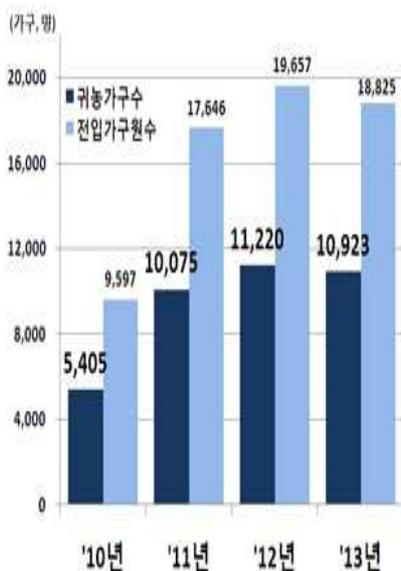


농. 여가의 고령화율(통계청. 2013)

○ 우리나라는 고령사회에 진입하였으며 특히 농가의 고령화율은 전체 고령화율에 3배가 넘고 있어 노동 집약적인 농업에서 자본과 노동력은 적게 들고 자연력에 의존하는 조방적농업(粗放的農業)으로 변화가 필요한 시점임

2. 젊은 귀농인 고소득 창출 작물 필요

<연도별 귀농가구수 및 전입가구원수>



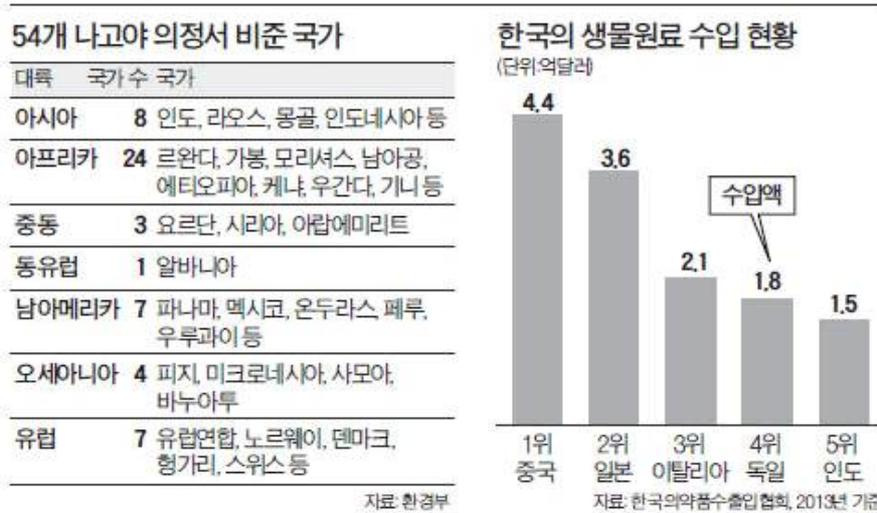
• 귀농의 인식변화

은퇴 후 여가 생활 → 젊은 전업 농가 증가

• 특화작물 재배는 젊은 귀농 농가에 농가소득 창출 가능

○ 젊은 귀농 인구가 증가하면서 귀농의 개념이 은퇴 후 여가 생활에서 젊은 전업농가로 변화하고 있음, 관행농업에서 고소득창출이 가능한 농업으로 변화하여 젊은 귀농농가에 소득창출의 기회를 제공하여야 함

3. 국내산 원료 건강기능식품 산업화 필요



- 나고야의정서 체결 이후 의정서 비준 국가가 증가하고 있어 자국 생물자원의 중요성이 대두되고 있으며 수입원료 의존도가 높은 건강기능식품은 생물자원 국제 분쟁의 증가가 예상되고 있음

4. 대상 특화작물

울금(鬱金)




과명 : 생강과(Zingiberaceae)
학명 : *Curcuma longa* Linne
주요성분 : Curcumin
주요 산지 : 전남 진도(전국 80%), 해남, 화순, 전북 임실
약리작용 : 간기능장애 개선, 생리통을 완화, 항생, 항암, 항치매, 소염작용

- 전라남도 진도군에서 국립농산물품질관리원으로부터 지리적표시에 등록됨으로써 국내산 울금의 고향으로 인정받은바 있음(2014.5.7.)

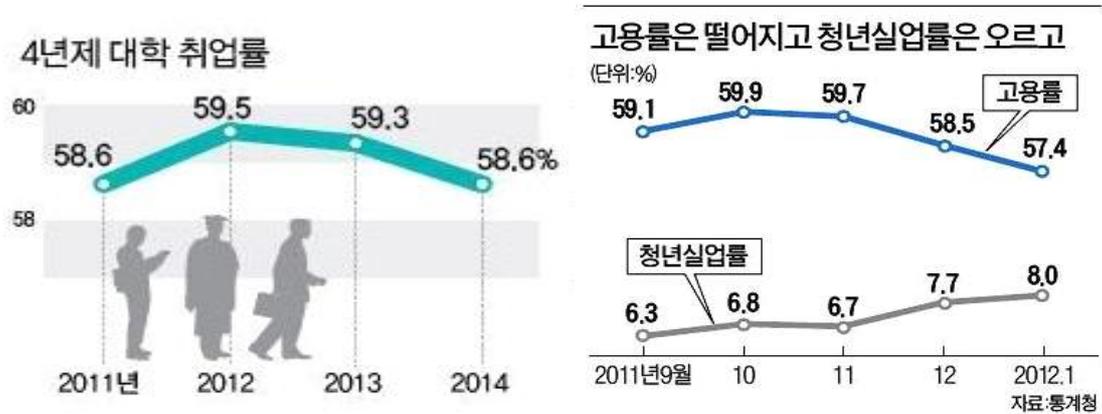
비파엽(枇把葉)




과명 : 장미과(Rosaceae)
학명 : *Eriobotrya japonica* (Thunb.) Lindl
주요성분 : 과육에는 카로티노이드(carotenoid)류, 비타민A, 엽에는 정유성분 farnesol, nerolidol, tannin, vitamin B·C
주요 산지 : 전남 장흥, 완도
약리작용 : 알콜성간보호, 기억력장애 개선

- 한국인스팜에서는 선행 연구를 통하여 비파엽추출물의 알콜성간보호에 대한 특허를 보유하고 있음

5. 양질의 청년 일자리 창출 필요



- 고용노동부의 발표에 따르면 최근 5년(2008~2013) 청년층의 대기업 취업률이 마이너스 (-20.5%)를 기록하고 있으며 많은 청년층이 비정규직으로 몰려 서비스업(54.01%)과 음식점업(49.3%)의 고용이 증가하고 있다고 함

6. 대안은 특화작물 재배와 효능 연구 전문 연구원 양성

- 특화작물의 효능을 규명하고 건강기능식품 원료로 활용함으로써 안정적인 수요처를 확보하여 고령 농업인과 젊은 귀농인에게 소득 창출 기회를 제공 할 수 있음
- 또한, 청년들에게 특화작물의 효능 연구에 참여 기회를 제공하고 졸업 후 관련 산업에 취업할 수 있는 기회를 제공할 수 있음

7. 개별인정형 건강기능식품 연구는 중소기업 적합 사업

개별인정형 건강기능식품 소재 개발

소재 선정 및 안전성평가
선정 소재의 재배현황조사, 오염도 평가, 원료원가, 기원, 채취시기 등

소재 가공공정 개발
추출(추출용매 결정)

In vitro 활성평가
선정된 소재의 추출물을 대상으로 세포독성, 활성 평가

원료 제조공정 표준화
반복(3회) 생산을 통한 제조공정, 품질관리 표준화

In vivo 활성 및 안전성 평가
동물 모델에서 활성(3회) 및 안전성(GLP) 평가

인체적용시험
임상 Protocol 및 CRF 개발, IRB승인, 무작위배정, 이중맹검, 플라세보 대조

개별인정형 건강기능식품 원료 인정서 작성
개별인정형 건강기능식품 원료 인정 신청서 작성

개별인정형 건강기능식품 원료 인정 신청

식품의약품안전처

- 개별인정형 건강기능식품 소재개발은 최소 5년 이상 약 10억원의 연구비가 소요되는 사

업으로 성공시 고부가가치 창출이 가능하지만 성공 가능성이 낮은 분야로서 대기업의 진입이 어려운 사업임

농·산·학·연 공동연구

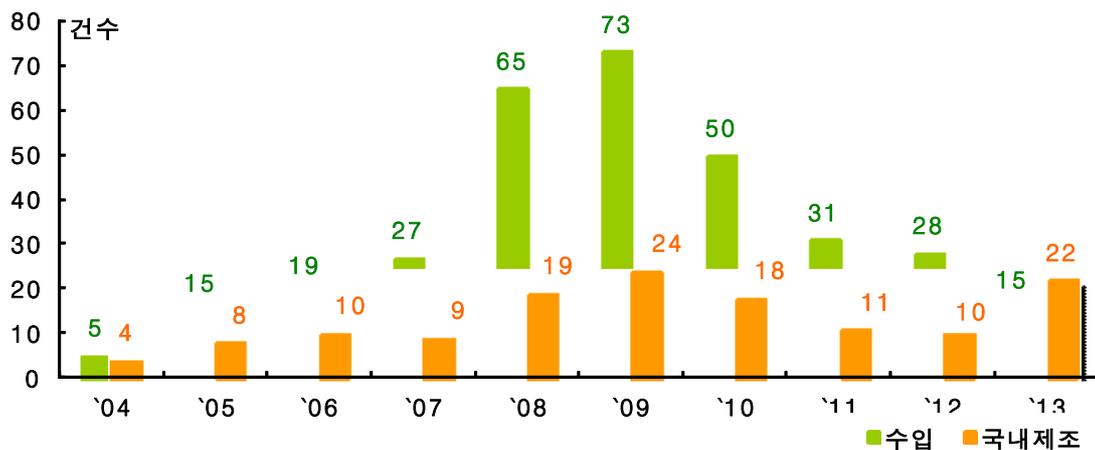


○ 농·공·산·학이 참여하는 공동연구로 각 기관별 철저한 역할분담으로 개별인정형 건강기능식품 소재 개발 성공 가능성을 높일 수 있음

8. 개별인정형 건강기능식품 연구는 성장 가능성 높은 분야

【개별인정형 건강기능식품 원료 인정 현황】

('13.12.31.기준, 출처: 식약처)



- 2013년 건강기능식품 생산실적을 분석한 결과, 총 생산액은 1조 4,820억원으로 2012년(1조 4,091억원)에 비해 5% 증가하였음
- 건강기능식품 생산은 국내외 경기침체에도 건강에 대한 관심이 높아지면서 새로운 기능성을 찾는 다양한 계층의 소비자 욕구가 반영되어 성장세가 지속되는 것으로 분석되었음
- 2013년 건강기능식품 기능성원료 인정 현황을 분석한 결과, 개별인정형 건강기능식품 인정

건수가 전반적으로 줄어드는 추세 속에서 국내 제조 원료의 인정은 급증한 반면 수입 원료의 인정은 감소한 것으로 나타났음

- 2013년 국내 제조원료의 기능성 인정은 '12년(10건)에 비해 1.2배(22건) 증가하였으나 수입원료는 같은 기간 28건에서 15건으로 감소하였음
- 이는 국내 건강기능식품 제조업체들이 국내 천연생물자원을 활용한 다양한 기능성 원료 개발에 집중하는 반면 수입 소재의 신규 발굴은 주춤한데 따른 것으로 분석됨
- ※ 개별인정 현황 : '09년(97건)→'10년(68건)→'11년(42건)→'12년 (38건)→'13년(37건)
- ※ 국내 제조원료 인정 비율 : ('09)25%→('10)27%→('11)29%→('12)26%→('13)59%

9. 연구개발 범위



<선행연구 결과물을 바탕으로 기술개발 단계 설정>

- 본 연구는 선행 연구 결과를 바탕으로 울금과 비파엽을 이용한 개별인정형 건강기능식품 산업화 연구와 유기가공식품 산업화 연구, 울금을 이용한 건강기능식품 소재개발 연구를 수행하고자 하였다.
- 울금을 발효하여 “발효울금”을 간 건강 개별인정형 건강기능식품으로 산업화 하고자 식품의약품안전처에 원료 인정을 획득하고, “발효울금”을 건강기능식품 원료로 산업화 하며, “발효울금”을 함유하는 건강기능식품 제품으로 산업화 하였다.
- 비파엽을 추출하여 “비파엽추출물”을 기억력개선 개별인정형 건강기능식품으로 산업화 하고자 식품의약품안전처에 원료 인정을 획득하고, “비파엽추출물”을 건강기능식품 원료로 산업화 하며, “비파엽추출물”을 함유하는 건강기능식품 제품으로 산업화 하였다.
- 또한, 울금과 비파엽을 함유하는 유기가공식품을 생산하여 국내외 친환경 매장에서 판매하고 있다.
- 울금을 이용하여 항스트레스, 체지방감소, 면역증강, 전립선건강 활성연구를 수행하고, 각 기능별 최적 추출물을 선정하고 제조공정을 표준화하여 건강기능식품 소재로 개발하였다.

제 2 장 국내외 기술개발 현황

1. 국내·외 개발기술동향

가. 국내

- 2013년 건강기능식품 기능성원료 인정 현황을 분석한 결과, 기능성 인정 건수가 전반적으로 줄어드는 추세 속에서 국내 제조 원료의 인정은 급증한 반면 수입 원료의 인정은 감소하였음
- 지난해 국내 제조원료의 기능성 인정은 '12년(10건)에 비해 1.2배(22건) 증가하였으나 수입 원료는 같은 기간 28건에서 15건으로 감소하였음
- 이는 국내 건강기능식품 제조업체들이 국내 천연생물자원을 활용한 다양한 기능성 원료 개발에 집중하는 반면 수입 소재의 신규 발굴은 주춤한데 따른 것으로 분석됨
 - ※ 개별인정 현황 : '09년(97건)→'10년(68건)→'11년(42건)→'12년 (38건)→'13년(37건)
 - ※ 국내 제조원료 인정 비율 : ('09)25%→('10)27%→('11)29% →('12)26% →('13)59%
- 현재까지 홍삼제품(한국인삼공사)이 건강기능식품의 40%를 차지하고 있으나 2011년 이후 지속적으로 감소하고 있음
- 기능성별로는 면역기능 개선 관련 제품의 점유율이 25%로 가장 높았고, 혈행개선(22%), 항산화(21%), 영양소 보충(7%), 장 건강 (5%) 제품 순임
- 본 사업을 통하여 개발되는 최종제품은 개별인정형 건강기능식품으로서 연구 완료 후 단독 제품으로 산업화 가능하며 국내산 농산물을 이용하여 산업화함으로써 국내산 농산물을 이용한 연구에 선도 모델로 제시 될 수 있음
- 또한, 원료로 사용된 농산물 기능이 확인됨으로서 단순 가공하여 식품으로 생산된 제품들의 위상이 제고 될 것으로 예상됨

나. 국외

- 고령화 사회에 접어들며, 만성질환이 증가하고 삶의 질 향상에 대한 욕구가 높아지면서 건강에 대한 관심이 더욱 고조되고 있음, 이러한 여파로 건강관련 산업은 지속적으로 성장세를 보이고 있으며, 2010년 세계 건강식품 시장(Global Health Food Industry) 규모는 약 301,386백만 달러로 조사되었음(2013년 건강기능식품 시장 현황 및 소비자실태 조사, 한국건강기능식품 협회)
- 세계 건강식품 시장은 2009년 성장률이 3.8%로 감소하는 현상을 보였으나, 2010년 전년대비 연평균 6% 성장률을 보이며 꾸준한 성장세를 이어갈 것으로 보임, 향후 세계 건강식품시장은 평균 7.2%의 성장률로 2015년에는 426,098백만 달러로 성장할 것으로 전망됨
- 세계 건강식품 시장(Global Health Food Industry)의 품목은 Supplements, Natural/Organic Food, N&OPC & Household Products, Functional Food 4가지로 분류되며, 2010년 품목별 세계 건강식품 시장현황은 Functional Food 101,836백만 달러(33.8%)로 가장 높았고, Supplements 84,500백만 달러(28%), Natural/Organic Food 84,064백만 달러(27.9%), N&OPC & Household Products 30,985백만 달러(10.3%) 순임

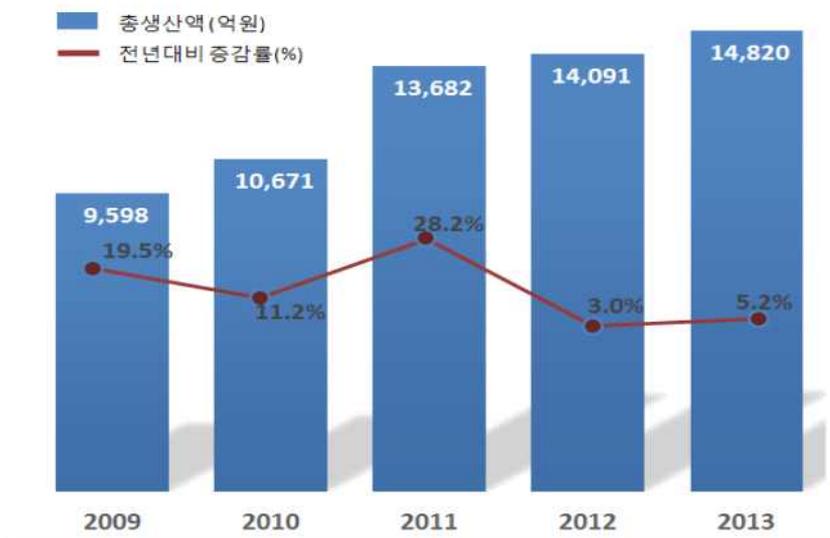
2. 국내외 경쟁·대체기술 동향

가. 국내

- 국내 2013년 건강기능식품 생산실적을 분석한 결과, 총 생산액은 1조 4,820억 원으로 '12년(1조 4,091억 원)에 비해 5% 증가로 나타났음
- 지난해 성장은 새로운 기능성 원료를 사용한 '개별인정형' 제품(전년대비 29% 증가)과 프로바이오틱스 제품(전년대비 55% 증가)이 주도한 것으로 나타났음
 - ※ 개별인정형: 고시된 품목 이외에 안전성, 기능성을 개별로 인정받은 원료로 제조한 건강기능식품(백수오등복합추출물, 당귀혼합추출물 등)
 - ※ 프로바이오틱스: 유산균을 주원료로 사용하여 배변활동에 도움을 주는 기능성을 가진 건강기능식품
- 또한 '13년 국내 건강기능식품 시장규모는 1조 7,920억 원으로 조사되어 '09년 이후 지속적인 성장세를 유지하고 있음
 - ※ 국내 시장규모(억 원): 11,600('09) → 12,804('10) → 16,855('11) → 17,039 ('12) → 17,920('13)
 - ※ 국내 시장규모: 생산+수입-수출
수출은 754억 원으로 '12년(584억 원)보다 29% 증가했으며, 수입도 3,854억 원으로 '12년(3,532억 원)보다 9% 증가하였음
- 2013년 건강기능식품 생산은 국내외 경기침체에도 건강에 대한 관심이 높아지면서 새로운 기능성을 찾는 다양한 계층의 소비자 욕구가 반영되어 성장세가 지속되는 것으로 분석되었음
- 2013년 건강기능식품 기능성원료 인정 현황을 분석한 결과, 기능성 인정 건수가 전반적으로 줄어드는 추세 속에서 국내 제조 원료의 인정은 급증한 반면 수입 원료의 인정은 감소한 것으로 나타났음, 개별인정형 건강기능식품의 생산은 2,324억 원으로 '12년 1,807억 원에 비해 29% 증가하였음

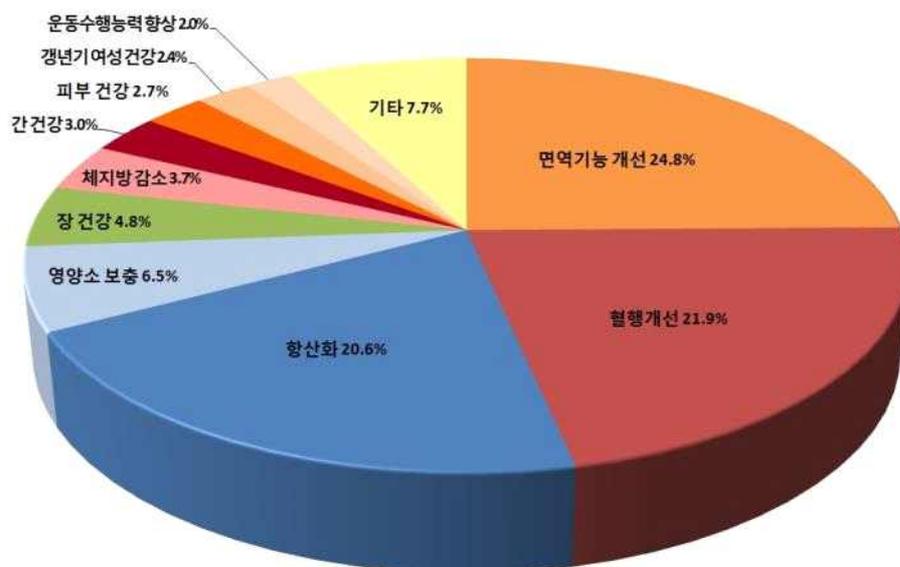
【연도별 건강기능식품 생산실적】

('13.12.31.기준, 출처: 식약처)



【기능성별 건강기능식품 생산실적(점유율)】

('13.12.31.기준, 출처: 식약처)



나. 국외

- 세계적으로 식품제조업은 2009년부터 지속적인 흑자 성장을 해왔으며, 2011년의 성장률은 10.8%로 가장 높았음, 2009년부터 2013년까지 연평균 성장률은 6%를 기록하고 있으며, 2013년 2.6% 성장하였으며, 시장가치는 약 4조7,311억 달러로 평가 되고 있음

표 1 세계 식품제조업 시장가치

연도	시장 가치 (달러)	성장률(%)
2009	3조 7,483억	
2010	4조 230억	7.3
2011	4조 4,566억	10.8
2012	4조 6,109억	3.5
2013	4조 7,311억	2.6
연평균성장률		6.0

자료: MARKETLINE(2014).

3. 연구의 기술적 위치

- 본 연구는 개별인정형 건강기능식품 산업화를 목표로 하고 있어 국내 건강기능식품 산업화의 가장 높은 기술적 위치를 가지고 있음
- 울금을 이용하여 시험관, 동물 모델에서 활성연구와 인체적용 임상연구를 통하여 개별인정형 건강기능식품으로 개발함으로써 “건강기능식품에 관한 법률”에서 정한 건강기능식품으로 산업화하는 일련의 기술을 확보 가능함

제 3 장 연구개발 수행 내용 및 결과

1절. 발효율금 간건강 개별인정형 건강기능식품 산업화

1. 서론

본 연구는 전남 진도산 울금(鬱金, *Curcuma longa* L.)을 이용하여 간 건강에 도움이 되는 개별인정형 건강기능식품을 개발하고자 하였다. 이취와 쓴맛으로 섭취가 제한적인 울금을 황국(*Aspergillus oryzae*)을 이용하여 발효함으로써 이취와 쓴맛을 개선하여 섭취가 용이하도록 제조방법을 개발하고, 동물실험과 인체적용 임상연구에서 간 건강 활성을 확인하였으며, 식품의약품안전처에서 개별인정형 건강기능식품 원료로 인정받하고자 하였다. 개별인정형 건강기능식품 원료 인정을 획득한 후 건강기능식품 원료 “발효율금”의 원료 품목신고와 발효율금을 이용한 완제품을 품목신고하고 산업화하고자 하였다.

2. 방법 및 결과

가. 발효율금 개별인정형 건강기능식품 원료 인정

(1) 원료표준화

(가) 방법

- ① 원재료 : 울금(건조분말, 수분함량 5% 이하)을 고체발효기에 투입
- ② 1차멸균 : 121℃로 20분 가압멸균
- ③ 접종 및 발효 : 울금 중량 대비 2% 황국조제종국을 접종한 후 온도 25±2℃, 습도 50±5%로 36시간 발효
- ④ 2차멸균 : 121℃로 20분 가압멸균
- ⑤ 건조 : 65±5℃, 20시간 건조(건조감량 3%이하)
- ⑥ 분쇄 및 포장



(나) 결과

- 발효공정을 3회 반복한 결과, 평균 93.1%의 수율을 보였다.

Lot NO.	울금량 (kg)	황국조제종국량 (kg)	생산량 (kg)	수득률 (%)	건조감량 (%)
발효-1	100	2	94	92.2	3.9
발효-2	100	2	96	94.1	3.1
발효-3	100	2	95	93.1	3.3
평균	100	2	95	93.1	3.4

(2) 기준규격

(가) 방법

** 식품의약품안전처 “식품공전”에 따라 시험함(1)

① 지표성분

- 대한약전 9개정, “강황”의 정량법을 변경하여 자사 시험방법을 설정하였다.

㉠ 검액준비

- 검체 1 g을 정밀하게 달아 methanol 100 mL를 넣고 60분간 초음파 추출을 한다. 추출이 끝나면 0.45 μm nylon filter로 여과하고, 여액을 검액으로 한다.

㉡ 표준액조제

- Curcumin 표준품 약 15 mg을 정밀하게 달아 용량플라스크에 넣고 ethanol 100 mL로 하여, 150 ppm 용액을 제조하고, 150 ppm Curcumin 표준액 1,000 μL를 20 ml 용량플라스크에 넣고 희석액으로 잘 혼합하여 7.5 ppm Curcumin 표준액을 표준용액으로 사용하였다.

㉢ 액체크로마토그래피 조작조건

- 검출기 : Diode array detector (측정과장 425 nm)

- 칼럼 : Shiseido Capell-pak UG 250*4.6mmI.D

- 칼럼온도 : 35°C

- 이동상 : 2% Acetic acid (45% ACN)

- Flow rate : 1.0 ml/min

- Injection volumn : 10 μL

- 계산식

(검액의 피크면적 - 직선성의 y절편)/직선성의 기울기 (ug/mL) × 검액의 최종부피 (mL) × 표준품 농도

검체 칭량(g) × 1000 (ug/mg)

② 중금속

- 식품공전 제 10. 일반시험법> 7. 식품 중 유해물질시험법> 7.1.2 금속별 시험> 7.1.2.1.납(Pb), 1)시험용액의 조제, 가)습식분해법, (1) 황산-질산법, 2)측정, 가) 원자흡광광도법(AAs)

③ 대장균군

- 식품공전 제 10. 일반시험법> 3. 미생물 시험법> 3.7 대장균군> 3.7.1 정성시험> 가. 유당배지법에 준하여 실험

④ 곰팡이독소(총 아플라톡신)

- 식품공전 제 10. 일반시험법> 6. 식품 중 곰팡이독소시험법> 6.1 곰팡이독소> 6.1.1 아플라톡신(B₁, B₂, G₁ 및 G₂)> 6.1.2.2 액체크로마토그래피에 의한 시험

⑤ 잔류농약

- 식품공전 제 10. 일반시험법> 4. 식품 중 잔류농약 분석법 > 4.1.2 다중농약다 성분분석법> 4.1.2.2 다중농약다성분분석법

(나) 결과

시험항목	제안 기준 및 규격	실측치 (시험성적서)			
		FCL-0202	FCL-0209	FCL-0216	
성상	이미, 이취가 없고 고유의 향미를 가진 갈색분말	이미, 이취가 없고 고유의 향미를 가진 갈색분말			
지표성분 (mg/g)	0.64~0.96	0.77	0.74	0.77	
중금속 (mg/kg)	납	1	0.2189	0.3530	0.1633
	총비소	1	0.0265	0.0388	0.0919
	카드뮴	1	0.2774	0.3090	0.0550
	총수은	0.5	0.01	불검출	불검출
미생물	대장균군	음성	음성	음성	음성
	세균수(cfu/g)	-	-	-	-
곰팡이독소	총 아플라톡신 (B ₁)	10 µg/kg (6 µg/kg)	불검출	불검출	불검출

(3) 동물실험(선행연구 결과)

(가) 전남대학교

- 발효율금을 투여한 랫드에서 간보호 활성 확인
- 발효율금 300mg/kg/day 투여군에서 ALT 50%감소, AST 20% 감소 확인

▪ Changes in Antioxidant Enzyme Activities by Fermented *Curcuma longa* L. on CCl₄-induced Hepatotoxicity

Group	CAT ^b	GST ^b	GR ^b	GPx ^b
	(U/mg protein)	(U/mg protein)	(U/mg protein)	(U/mg protein)
Normal control	2.73 ± 0.06a ^d	37.76 ± 0.49a	2.99 ± 0.05a	6.06 ± 0.09a
CCl ₄ control	2.20 ± 0.05b	29.12 ± 0.59c	2.73 ± 0.05b	5.02 ± 0.21b
FCL ^c	2.41 ± 0.01c	33.07 ± 0.90b	3.20 ± 0.08a	5.81 ± 0.11a
FCH ^c	2.85 ± 0.06a	34.42 ± 0.89b	3.13 ± 0.03a	5.88 ± 0.09a

Changes in enzymatic antioxidant activities by the administration of fermented *Curcuma longa* L. to CCl₄-treated rats^a

^aData express the mean ± S.D. for 6 rats.

^bCAT: catalase, GST: glutathione-S-transferase, GR: glutathione reductase, GPx: glutathione peroxidase.

^cFCL: pretreated with 30 mg/kg b.w. of fermented *Curcuma longa* L. plus CCl₄.

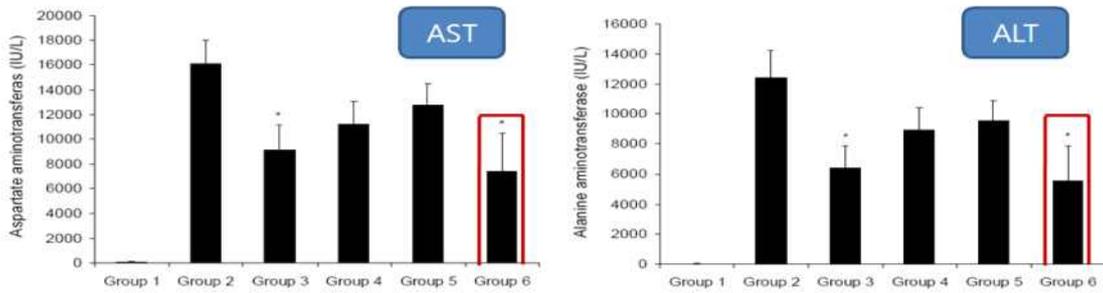
FCH: pretreated with 300 mg/kg b.w. of fermented *Curcuma longa* L. plus CCl₄.

^dValues with different letters in a column are significantly different by Duncan's multiple range test ($p < 0.05$).

(나) 케온(GLP 인증기관)

- 발효율금을 5g/kg/day 투여한 랫드에서 무독성 확인
- 발효율금 300mg/kg/day 투여군에서 ALT 55%감소, AST 54% 감소 확인
- 간장약 실리마린을 투여한 랫드와 유사한 활성을 확인하였다

Effects of Fermented *Curcuma longa* L. on GalN-induced Hepatotoxicity

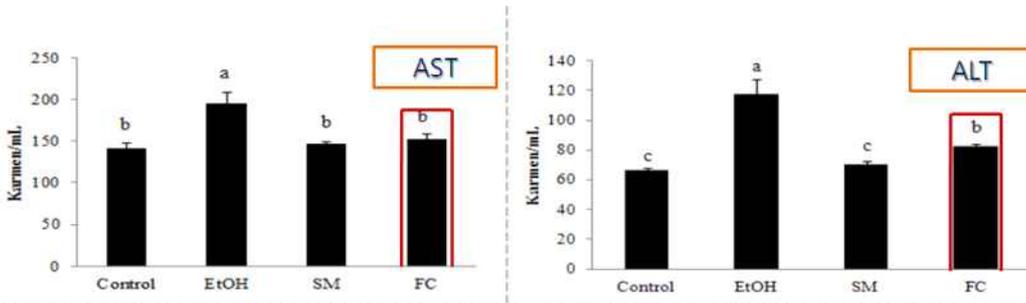


Effects of fermented *Curcuma longa* L. on the serum aspartate aminotransferase activity in galactosamine-intoxicated rats.

Group 1 (0.5% carboxymethylcellulose),
 Group 2 (0.5% carboxymethylcellulose + galactosamine),
 Group 3 (150 mg/kg b.w. of silymarin with 0.5% carboxymethylcellulose + galactosamine),
 Group 4 (30 mg/kg b.w. of FC with 0.5% carboxymethylcellulose + galactosamine),
 Group 5 (100 mg/kg b.w. of FC with 0.5% carboxymethylcellulose + galactosamine),
 Group 6 (300 mg/kg b.w. of FC with 0.5% carboxymethylcellulose + galactosamine).
 Each value was expressed as the mean±SD.
 Asterisk (*) above the bar is statistically different as compared to Group 2 ($p < 0.05$).

(다) 전남대학교

- 발효율금의 알콜성간보호 효과연구
- 밀크씨슬과 발효율금 300mg/kg/day 투여군에서 동등한 수준의 ALT, AST 감소 확인(발효율금 투여량은 밀크씨슬 대비 1/10투여, 성인 기준)



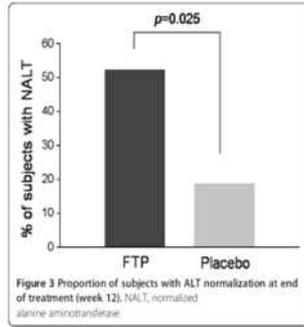
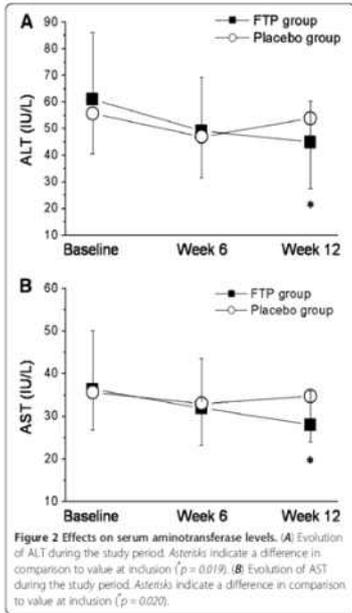
- 발효율금과 밀크씨슬 투여에 의해 AST 및 ALT 수치가 저하됨으로써 간보호 활성 확인
 - 발효율금과 밀크씨슬은 유사한 활성을 나타내는 것으로 확인 (300 mg/kg b.w./day)

< 건강기능식품 1일 섭취량 >

- 발효율금 분말 : 3g/day
- 밀크씨슬 : 실리마린으로서 130mg/일(밀크씨슬 추출물로서 약 300mg/일)

(4) 인체적용시험(선행연구 결과)

- 연구명 : 간손상 소견을 보이는 피험자를 대상으로 발효율금 분말의 간기능 개선에 대한 유효성과 안전성을 평가하기 위한 12주간 인체 적용시험(피험자 60명)
- 수행기관 : 전북대학교병원 기능성식품 임상시험지원센터
- 결과요약 : 발효율금 투여군의 전/후 비교에서 ALT, AST 감소 확인, 총콜레스테롤, LDL 감소가 확인되었으며, 위약투여군과 비교하여 혈중 중성지방 수치가 감소되었음, 이는 발효율금 섭취로 간기능을 개선시키고, 그 결과로 혈중 중성지방 조절효과를 나타냈다.



발효율금 투여군의 전/후 비교에서 ALT, AST 감소 확인
 총콜레스테롤, LDL 감소가 확인되었으며, 위약투여군과
 비교하여 혈중 중성지방 수치가 감소되었음
 이는 발효율금 섭취로 간기능을 개선시키고, 그 결과로
 혈중 중성지방 조절효과를 나타냄

(5) 개별인정형 건강기능식품 인정 획득

- 간 건강에 도움을 줄 수 있으나 관련 인체적용시험이 미흡함 (생리활성기능 3등급)
- 제2013-4호(2013.03.06)

건강기능식품 기능성 원료 인정서		국내	수입
		○	
제2013-4호			
대표자 : 오규철 업체명 : 한국인스팜(주) 소재지 : 전라남도 화순군 동면 운농리 1034-1번지 원료명 : 발효율금			
수출국 :		수출국 제조회사명 :	
		수출국 제조회사 소재지 :	
「건강기능식품 기능성 원료 및 기준·규격 인정에 관한 규정」 제10조제1항에 따라 건강기능식품 기능성 원료로 인정합니다.			
2013년 3월 일			
식품의약품안전청장			
■ 붙임서류 1. 원료명 2. 제조기준(원재료, 제조방법, 기능성분(또는 지표성분), 제조 시 유의사항) 3. 규격 4. 제품표 요건(기능성 내용, 일일섭취량, 심취 시 주의사항, 기타사항) 5. 시험방법			

나. 발효율금 개별인정형 건강기능식품 원료 품목신고

(1) 유통기한 설정시험

(가) 방법

** 식품의약품안전처 고시 설정기준 및 시험가이드라인(가속시험)에 따라 시험함(2~4)

① 제품의 특성

구분	신규제품
식품유형	건강기능식품
성상	이미, 이취가 없고 고유의 향미가 있는 갈색분말
사용원료	발효율금
제조·가공공정	원재료(율금)→멸균(121℃, 00분)→접종 및 발효(00시간) →멸균(121℃, 00분)→건조→분쇄→알루미늄 호일포장(최종제품)
포장재질	알루미늄 호일
포장방법	기밀
포장단위	50g, 100g, 500g, 1kg, 5kg, 10kg, 20kg
보존 및 유통온도	실온
보존료사용여부	미사용
제품사진	

② 검체의 채취 및 취급방법

- 시험기간 : 2012. 10. 25 ~ 2013. 05. 31
- 시험기준 : 안정성시험(가속시험)
- 시험조건 : 본 시험에 사용된 제품은 한국인스팜(주)가 시판을 위해 알루미늄 호일 포장지로 포장한 최종 제품 3루트(FCL 1015, FCL 1018, FCL 1022)를 25℃, 40℃, 45℃ 항온항습기에 6개월간 보관하면서 기준 및 규격에 따라 시험을 수행하였다. 이 때, 성상, 지표성분, 대장균군, 곰팡이독소 시험은 매 1개월마다, 중금속 시험은 0개월과 6개월에 시험을 진행하였다.

(나) 결과

① 안정성시험(6개월 가속시험) 결과 평가

- 성 상 : 이미, 이취가 없고 고유의 향미가있는 갈색분말로 변화없음
- 지표성분 : 시험 시 최저값은 0.733 mg/g이었으며, 이 값은 기준값 0.8 mg/g의 최저 기준 80%인 0.64mg/g 보다 높은 값으로 기준에 적합함
- 대장균군 : 음성으로 적합함
- 곰팡이독소 : 불검출로 적합함
- 중금속 : 납, 카드뮴, 비소, 수은 모두 기준치 이하로 적합함

② 저장온도별 품질변화

㉠ 품질지표별 25℃ 저장온도에서의 품질변화

시험항목	기준 및 규격	시험기간 (개월)						
		0	1	2	3	4	5	6
지표성분 (mg/g)	0.8~0.64	0.836	0.833	0.825	0.818	0.810	0.794	0.783
성상	이미, 이취가 없고 고유의 향미가 있는 갈색분말	적합	적합	적합	적합	적합	적합	적합
대장균군	음성	음성	음성	음성	음성	음성	음성	음성
곰팡이독소	불검출	불검출	불검출	불검출	불검출	불검출	불검출	불검출
중금속 (mg/kg)	납(Pb) :1.0이하	0.70						0.67
	카드뮴(Cd):1.0이하	0.06	-	-	-	-	-	0.25
	비소(As) : 1.0이하	0.25						0.26
	수은(Hg) : 0.5이하	0.05						0.05

㉞ 품질지표별 40℃ 저장온도에서의 품질변화

시험항목	기준 및 규격	시험기간 (개월)						
		0	1	2	3	4	5	6
지표성분 (mg/g)	0.8~0.64	0.836	0.825	0.812	0.795	0.786	0.755	0.750
성상	이미, 이취가 없고 고유의 향미가 있는 갈색분말	적합	적합	적합	적합	적합	적합	적합
대장균군	음성	음성	음성	음성	음성	음성	음성	음성
곰팡이독소	불검출	불검출	불검출	불검출	불검출	불검출	불검출	불검출
중금속 (mg/kg)	납(Pb) :1.0이하	0.70						0.70
	카드뮴(Cd):1.0이하	0.06	-	-	-	-	-	0.06
	비소(As) : 1.0이하	0.25						0.25
	수은(Hg) : 0.5이하	0.05						0.05

㉞ 품질지표별 45℃ 저장온도에서의 품질변화

시험항목	기준 및 규격	시험기간 (개월)						
		0	1	2	3	4	5	6
지표성분 (mg/g)	0.8~0.64	0.836	0.811	0.778	0.767	0.753	0.746	0.733
성상	이미, 이취가 없고 고유의 향미가 있는 갈색분말	적합	적합	적합	적합	적합	적합	적합
대장균군	음성	음성	음성	음성	음성	음성	음성	음성
곰팡이독소	불검출	불검출	불검출	불검출	불검출	불검출	불검출	불검출
중금속 (mg/kg)	납(Pb) :1.0이하	0.70						0.66
	카드뮴(Cd):1.0이하	0.06	-	-	-	-	-	0.07
	비소(As) : 1.0이하	0.25						0.24
	수은(Hg) : 0.5이하	0.05						0.05

③ 품질지표 반응속도(K) 상수

- 안정성시험 시 변화가 가장 큰 지표성분을 가지고 상수를 산출하였다

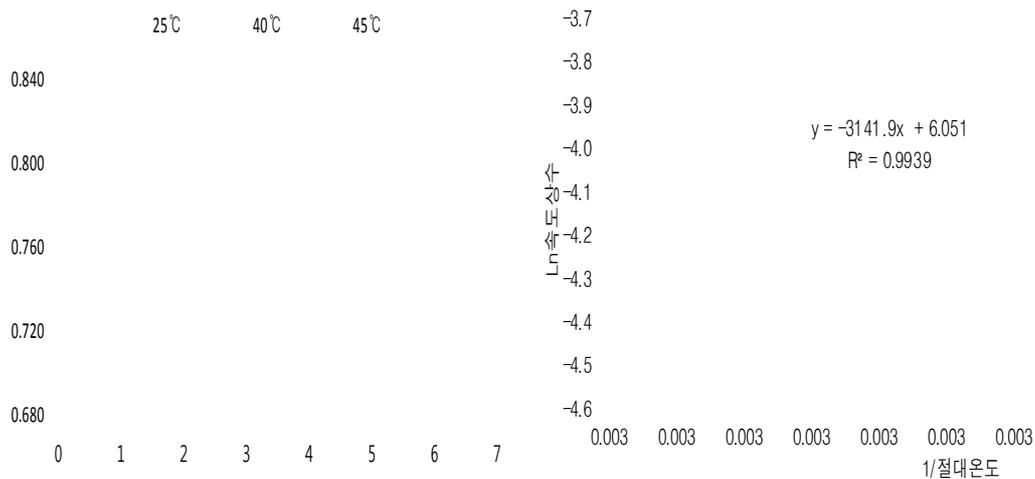
반응차수	저장온도(℃)	기울기	Y절편	결정계수
0	25	-0.0090	0.8411	0.9634
	40	-0.0151	0.8396	0.9769
	45	-0.0166	0.8245	0.9393
1	25	-0.0111	-0.1726	0.9604
	40	-0.0191	-0.1739	0.9739
	45	-0.0212	-0.1924	0.9470

④ 품질지표의 활성화에너지와 반응식차트

㉞ 활성화 에너지 산출

저장온도	절대온도	1/절대온도(X축)	속도상수 K	LnK (Y축)
25℃	298	0.003356	0.011115	-4.499424
40℃	313	0.003195	0.019122	-3.956920
45℃	318	0.003145	0.021235	-3.852082

Slope(K)	Intercept	R ²	Ea
-3141.90	6.051	0.9939	-6242.96



㉞ 활성화 에너지를 이용한 시험하지 않은 온도구간의 속도상수 산출

저장온도	절대온도	1/절대온도(X축)	LnK (Y축)	속도상수 K
10℃	283	0.00353	-5.051097	0.006402
15℃	288	0.00347	-4.858352	0.007763
20℃	293	0.00341	-4.672185	0.009352
30℃	303	0.00330	-4.318283	0.013323

⑤ 품질지표별 유통기간 산출

㉗ 연간변화량 산출

온도	예상유통 개월(A)	반응속도상수(B)	변화량(A*B)
10	5	0.006402	0.03
15	1	0.007763	0.01
20	2	0.009352	0.02
25	2	0.011115	0.02
30	2	0.013323	0.03
합계	12		0.11

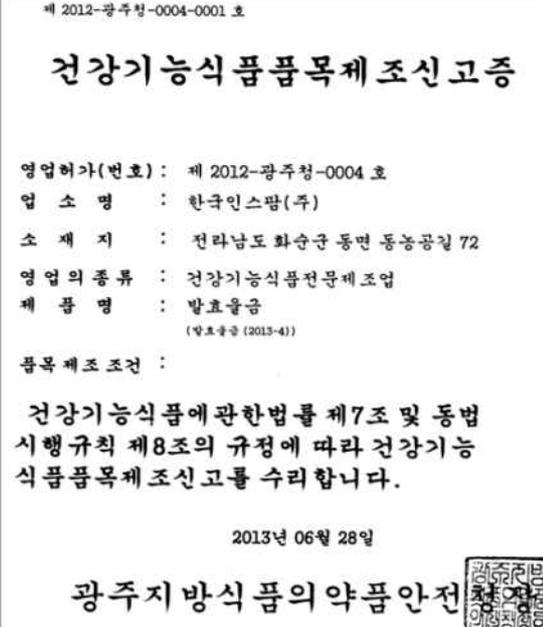
㉘ 유통기간 산출

최초함량(A)	품질규격(B)	(A-B)	변화량(C)	유통기간(개월)
-0.18	-0.46	0.28	0.11	31.27

(다) 결론

발효율금을 가속시험조건(25, 40, 45℃)에서 6개월 동안 안정성 시험을 수행한 결과, 성상, 대장균군, 곰팡이독소, 지표성분, 중금속 모두 기준규격에 적합하였고, 지표 성분 Curcumin의 1차 반응식을 근거로 하였을 때, 실온유통 시 유통기간은 31.27개월로 산출되었다. 산출된 유통기간에 유통과정 중의 안전을 고려하고자 안전계수를 곱하여 최종 유통기간은 24개월로 결정하였다.

(2) 발효율금 건강기능식품 품목신고완료

 <p>검사성적서</p> <p>제출번호: 1303-10040</p> <p>검사일자: 2013.06.28</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>항목명</th> <th>검출결과</th> <th>검사항목</th> <th>검사결과</th> <th>검사항목</th> <th>검사결과</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>외관</td> <td>정상</td> <td>중금속</td> <td>정상</td> <td>미생물학적검출</td> <td>정상</td> </tr> <tr> <td>수분함량</td> <td>13.0%</td> <td>중금속</td> <td>정상</td> <td>중금속</td> <td>정상</td> </tr> <tr> <td>산도</td> <td>0.0010</td> <td>중금속</td> <td>정상</td> <td>중금속</td> <td>정상</td> </tr> <tr> <td>Curcumin</td> <td>100.0 mg/kg</td> <td>중금속</td> <td>정상</td> <td>중금속</td> <td>정상</td> </tr> <tr> <td>...</td> <td>...</td> <td>...</td> <td>...</td> <td>...</td> <td>...</td> </tr> </tbody> </table> <p>검사기관: (재)전라남도생물산업진흥재단 식품산업연구센터</p>	항목명	검출결과	검사항목	검사결과	검사항목	검사결과	외관	정상	중금속	정상	미생물학적검출	정상	수분함량	13.0%	중금속	정상	중금속	정상	산도	0.0010	중금속	정상	중금속	정상	Curcumin	100.0 mg/kg	중금속	정상	중금속	정상	 <p>제 2012-광주청-0004-0001 호</p> <p>건강기능식품품목제조신고증</p> <p>영업허가(번호): 제 2012-광주청-0004 호</p> <p>업 소 명 : 한국인스팜(주)</p> <p>소 재 지 : 전라남도 화순군 동면 동농공길 72</p> <p>영업의종류 : 건강기능식품전문제조업</p> <p>제 품 명 : 발효율금 (당효율금 (2013-4))</p> <p>품목제조조건 :</p> <p>건강기능식품에관한법률 제7조 및 동법 시행규칙 제8조의 규정에 따라 건강기능식품품목제조신고를 수리합니다.</p> <p>2013년 06월 28일</p> <p>광주지방식품의약품안전청</p>
항목명	검출결과	검사항목	검사결과	검사항목	검사결과																																
외관	정상	중금속	정상	미생물학적검출	정상																																
수분함량	13.0%	중금속	정상	중금속	정상																																
산도	0.0010	중금속	정상	중금속	정상																																
Curcumin	100.0 mg/kg	중금속	정상	중금속	정상																																
...																																
<p>발효율금 검사성적서</p>	<p>발효율금 품목제조신고증</p>																																				

다. 발효율금 함유 건강기능식품 완제품 품목신고

(1) 발효율금 캡슐

(가) 유통기한 설정시험 방법

** 식품의약품안전처 고시 설정기준 및 시험가이드라인(가속시험)에 따라 시험함(2~4)

① 제품의 특성

구분	신규제품
식품유형	건강기능식품
성상	이미, 이취가 없고 고유의 향미가 있는 갈색분말을 내용물로 한 적갈색의 경질캡슐
사용원료	발효율금
제조·가공공정	원료→칭량→과립→혼합→충진 및 탈분 →PTP포장→지함포장→검사→출하대기
포장재질	PTP
포장방법	PTP 및 지함
포장단위	(601mg×6cap*5개)×6개
보존 및 유통온도	실온
보존료사용여부	미사용
제품사진	

② 검체의 채취 및 취급방법

- 시험기간 : 2012년 11월 21일 ~ 2013년 05월 24일
- 시험기준 : 안정성시험(가속시험)
- 시험조건 : 본 시험에 사용된 제품은 한국인스팜(주)가 시판을 위해 PTP로 포장한 최종 제품 3ロット(FCL C 1113-A, FCL C 1113-B, FCL C 1113-C)를 25℃, 40℃, 45℃ 항온항습기에 6개월간 보관하면서 기준 및 규격에 따라 시험을 수행하였다. 이 때, 성상, 지표성분, 대장균군, 붕해도 시험은 매 1개월 마다, 곰팡이독소(총 아플라톡신), 중금속 시험은 실험시작과 6개월에 시험을 진행하였다.

(나) 유통기한 설정시험 결과

① 안정성시험(6개월 가속시험) 결과 평가

- 성 상 : 이미, 이취가 없고 고유의 향미가있는 갈색분말로 변화없음
- 붕 해 도 : 물에서 평균 7.97분에 모두 붕해되었음
- 지표성분 : 시험 시 최저값은 0.731 mg/g이었으며, 기준값 0.8 mg/g의 최저 기준 80%인 0.64mg/g 보다 높은 값으로 기준에 적합함
- 대장균군 : 음성으로 적합함
- 곰팡이독소 : 불검출로 적합함
- 중금속 : 납, 카드뮴, 비소, 수은 모두 기준치 이하로 적합함

② 저장온도별 품질변화

㉠ 품질지표별 25℃ 저장온도에서의 품질변화

시험항목	기준 및 규격	시험기간 (개월)						
		0	1	2	3	4	5	6
지표성분 (mg/g)	0.8~0.64	0.844	0.845	0.836	0.822	0.816	0.806	0.791
성상	이미, 이취가 없고 고유의 향미가 있는 갈색분말	적합	적합	적합	적합	적합	적합	적합
붕해도	물에서 20분 이내	7.71	7.98	7.88	7.95	7.94	7.85	7.96
대장균군	음성	음성	음성	음성	음성	음성	음성	음성
곰팡이독소	불검출	불검출	-	-	-	-	-	불검출
중금속 (mg/kg)	납(Pb) :1.0이하	0.68						0.68
	카드뮴(Cd):1.0이하	0.07						0.07
	비소(As) : 1.0이하	0.22	-	-	-	-	-	0.26
	수은(Hg) : 0.5이하	0.05						0.06

㉡ 품질지표별 40℃ 저장온도에서의 품질변화

시험항목	기준 및 규격	시험기간 (개월)						
		0	1	2	3	4	5	6
지표성분 (mg/g)	0.8~0.64	0.844	0.832	0.826	0.803	0.794	0.763	0.757
성상	이미, 이취가 없고 고유의 향미가 있는 갈색분말	적합	적합	적합	적합	적합	적합	적합
붕해도	물에서 20분 이내	8.03	7.68	7.84	8.26	8.00	8.05	8.11
대장균군	음성	음성	음성	음성	음성	음성	음성	음성
곰팡이독소	불검출	불검출	-	-	-	-	-	불검출
중금속 (mg/kg)	납(Pb) :1.0이하	0.68						0.70
	카드뮴(Cd):1.0이하	0.07						0.07
	비소(As) : 1.0이하	0.22	-	-	-	-	-	0.26
	수은(Hg) : 0.5이하	0.05						0.05

㉢ 품질지표별 45℃ 저장온도에서의 품질변화

시험항목	기준 및 규격	시험기간 (개월)						
		0	1	2	3	4	5	6
지표성분 (mg/g)	0.8~0.64	0.844	0.812	0.786	0.771	0.755	0.742	0.731
성상	이미, 이취가 없고 고유의 향미가 있는 갈색분말	적합	적합	적합	적합	적합	적합	적합
붕해도	물에서 20분 이내	7.81	8.19	7.78	7.92	8.16	8.07	8.10
대장균군	음성	음성	음성	음성	음성	음성	음성	음성
곰팡이독소	불검출	불검출	-	-	-	-	-	불검출
중금속 (mg/kg)	납(Pb) :1.0이하	0.68						0.67
	카드뮴(Cd):1.0이하	0.07						0.07
	비소(As) : 1.0이하	0.22	-	-	-	-	-	0.23
	수은(Hg) : 0.5이하	0.05						0.06

③ 품질지표 반응속도(K) 상수

- 안정성시험 시 변화가 가장 큰 지표성분을 가지고 상수를 산출하였다

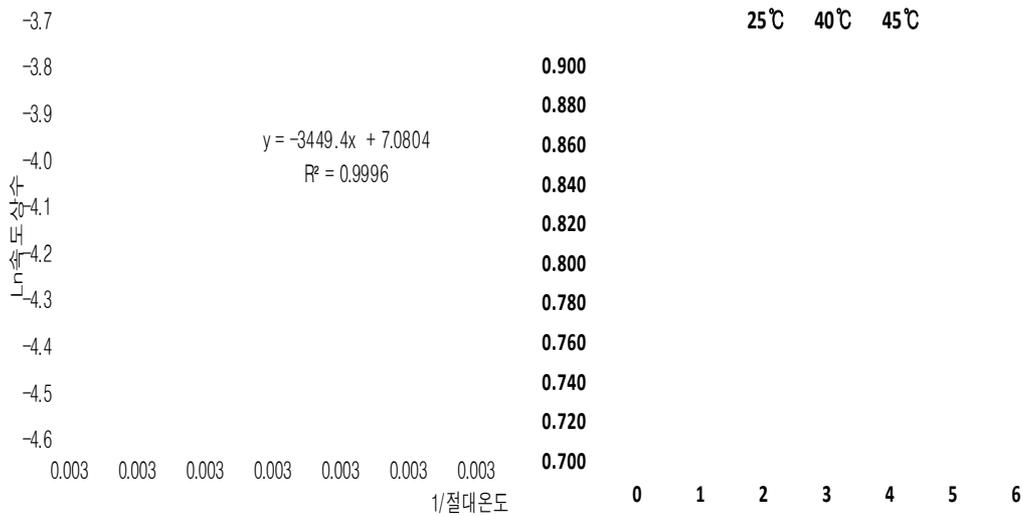
반응차수	저장온도(°C)	기울기	Y절편	결정계수
0	25	-0.0092	0.8504	0.9601
	40	-0.0154	0.8489	0.9679
	45	-0.0182	0.8319	0.9616
1	25	-0.0112	-0.1617	0.9582
	40	-0.0193	-0.1627	0.9647
	45	-0.0233	-0.1833	0.9693

④ 품질지표의 활성화에너지와 반응식차트

㉞ 활성화 에너지 산출

저장온도	절대온도	1/절대온도(X축)	속도상수 K	LnK (Y축)
25°C	298	0.003356	0.011189	-4.492851
40°C	313	0.003195	0.019295	-3.947915
45°C	318	0.003145	0.023267	-3.760716

Slope(K)	Intercept	R ²	Ea
-3449.4	7.0804	0.9996	-6853.93



㉞ 활성화 에너지를 이용한 시험하지 않은 온도구간의 속도상수 산출

저장온도	절대온도	1/절대온도(X축)	LnK (Y축)	속도상수 K
10°C	283	0.00353	-5.108254	0.006047
15°C	288	0.00347	-4.896646	0.007472
20°C	293	0.00341	-4.692259	0.009166
30°C	303	0.00330	-4.303723	0.013518

⑤ 품질지표별 유통기간 산출

㉞ 연간변화량 산출

온도	예상유통 개월(A)	반응속도상수(B)	변화량(A*B)
10	5	0.006047	0.03
15	1	0.007472	0.01
20	2	0.009166	0.02
25	2	0.011189	0.02
30	2	0.013518	0.03
합계	12		0.11

㉟ 유통기간 산출

최초합량(A)	품질규격(B)	(A-B)	변화량(C)	유통기간(개월)
-0.17	-0.45	0.28	0.11	31.49

(다) 결론

발효율금(캡슐, PTP포장)을 가속시험조건(25, 40, 45℃)에서 6개월 동안 안정성 시험을 수행한 결과, 성장, 붕해도, 대장균군, 곰팡이독소, 지표성분, 중금속 모두 기준규격에 적합하였고, 지표성분 Curcumin의 1차 반응식을 근거로 하였을 때, 실온유통 시 유통기간은 31.49개월로 산출되었다. 산출된 유통기간에 유통과정 중의 안전을 고려하고자 안전계수를 곱하여 최종 유통기간은 24개월로 결정하였다.



검사 성적서

식품안전관리공단
식품안전관리공단

유기번호 : 2013-07-100 발판시점(가) : 2013.07.18 검사번호 : 1307-02-058

원산지 : 경상남도 함안군 의뢰인명 : 449-805 의뢰사항 : 동서바이오파 유통기한 : -	검사목적 : 축적신뢰 소 과 지 : 경기도 용인시 처인구 이월면 검사일자 : 2013.07.18 검사결과 : 2013.07.18	검사기관 : 2013.07.31 시험장소 : 1090-20 시험일자 : 2013.07.31	검사인 : 김민서 확인인 : 김민서
---	--	---	--------------------------------------

시험 항목 및 결과

시험항목	단위	결과	비고
납	1.0 mg/kg 이하	0.3 mg/kg	-
카드뮴	1.0 mg/kg 이하	0.2 mg/kg	-
수은	1.0 mg/kg 이하	0.2 mg/kg	-
몰리브덴	0.5 mg/kg 이하	0.0 mg/kg	-
Curcumin	2.4 mg/kg(300mg 표시량의 80~20%)	89%	-
대장균군	cfu/g	불검	-
동아형대사(비1)	10(배) up/kg	0/0	-
붕해도	물 20ml 이가 이하 한다.	8분에 완주 불명	-
성장	배양액에 10배 희석한 용액이 24시간 동안 증식하지 않음	배양액에 10배 희석한 용액이 24시간 동안 증식함	-



Jeonnam Bioindustry Foundation

원산지 : 적합 **검사지** : 김민서, 김민서, 김민서
확인인 : 김민서, 김민서, 김민서

이 성적은 의뢰자가 제출한 주제의 상기 분석결과에 한하며, 의뢰자의 이외의 상용선 및 일반적 용도나
 기타 용도의 용도로 사용될 수 없음

본 성적서는 의뢰한 시험항목에 한함

2013년 07월 31일
(재)전라남도생물산업진흥재단
식품산업연구센터 소장

520-330 전라남도 나주시 용수읍 선15-1 TEL : 061-339-9620 FAX : 061-338-9621

(라) 발효율금 캡슐 건강기능식품 품목신고완료

<p>제 2013-광주청-0006-0001 호</p> <p>건강기능식품품목제조신고증</p> <p>영업허가(번호) : 제 2013-광주청-0006 호 업 소 명 : 한국인스팜(주) 소 재 지 : 전라남도 화순군 동면 대포리 1065번지 영 업 의 종 류 : 건강기능식품제조업 제 목 명 : 인스팜 발효율금캡슐 (당도공급 (2013-41))</p> <p>품목제조조건 :</p> <p>건강기능식품에관한법률 제7조 및 동법 시행규칙 제8조의 규정에 따라 건강기능 식품품목제조신고증을 수여합니다.</p> <p>2013년 11월 28일</p> <p>광주지방식품의약품안전청장 </p>	
<p>발효율금 캡슐 품목제조신고증</p>	<p>인스팜 발효율금 캡슐 제품</p>

(2) 발효율금 정제

(가) 유통기한 설정시험 방법

** 식품의약품안전처 고시 설정기준 및 시험가이드라인(가속시험)에 따라 시험함(2~4)

① 제품의 특성

구분	신규제품
식품유형	건강기능식품
성상	갈색의 원형 정제
사용원료	발효율금, 비타민 B2
제조·가공공정	원료→칭량→사별→혼합→액조제→연합→과립→건조 →최종혼합→타정 및 탈분→포장→보관출하
포장재질	유리병
포장방법	유리병 및 지함
포장단위	(300mg×450정)×1개
보존 및 유통온도	실온
보존료사용여부	미사용
유당·유처리	-
살균 또는	-
멸균방법	-
제품사진	

② 검체의 채취 및 취급방법

- 시험기간 : 2014년 01월 20일 ~ 2014년 07월 30일

- 시험기준 : 안정성시험(가속시험)
- 시험조건 : 본 시험에 사용된 제품은 한국인스팜(주)가 시판을 위해 갈색의 유리병로 포장한 최종 제품 3ロット(FCLT 14001-A, FCLT 14001-B, FCLT 14001-C)를 25℃, 40℃, 45℃ 항온항습기에 6개월간 보관하면서 기준 및 규격에 따라 시험을 수행하였다. 이 때, 정상, 지표성분, 비타민 B2(리보플라빈), 대장균군, 봉해도 시험은 매 1개월 마다, 중금속, 시험곰팡이독소(총 아플라톡신)은 실험시작 시, 6개월에 시험을 진행하였다.

(나) 유통기한 설정시험 결과

① 안정성시험(6개월 가속시험) 결과 평가

- 성 상 : 이미, 이취가 없고 고유의 향미가있는 갈색분말로 변화없음
- 봉 해 도 : 물에서 평균 8분 이내에 모두 봉해되었음
- 지표성분 : 시험 시 최저값은 2.262 mg/4,500 mg이었으며, 이 값은 기준값 2.40 mg/4,500 mg의 최저 기준 80%인 1.92 mg/4,500 mg 보다 높은 값으로 기준에 적합함
- 비타민 B2(리보플라빈) : 시험 시 최저값은 1.749 mg/4,500 mg이었으며, 이 값은 기준값 1.44 mg/4,500 mg의 최저 기준 80%인 1.152 mg/4,500 mg 보다 높은 값으로 기준에 적합함
- 대장균군 : 음성으로 적합함
- 곰팡이독소 : 불검출로 적합함
- 중금속 : 납, 카드뮴, 비소, 수은 모두 기준치 이하로 적합함

② 저장온도별 품질변화

㉠ 품질지표별 25℃ 저장온도에서의 품질변화

시험항목	기준 및 규격	시험기간 (개월)							
		0	1	2	3	4	5	6	
지표성분 (mg/4500mg)	1.92 ~ 2.88	2.601	2.589	2.559	2.538	2.514	2.490	2.469	
비타민 B2 (mg/4500mg)	1.152 ~ 2.952	2.046	2.043	2.034	2.013	2.001	1.983	1.971	
정상	갈색의 원형정제	적합	적합	적합	적합	적합	적합	적합	
봉해도	물에서 30분 이내	7.71	7.98	7.88	7.95	7.94	7.85	7.96	
대장균군	음성	음성	음성	음성	음성	음성	음성	음성	
곰팡이독소	불검출	불검출	-	-	-	-	-	불검출	
중금속 (mg/kg)	납(Pb) : 1.0이하	0.2476						0.3478	
	카드뮴(Cd) : 1.0이하	0.4464						0.3836	
	비소(As) : 1.0이하	0.4158	-	-	-	-	-	0.4978	
	수은(Hg) : 0.5이하	0.2721						0.2683	

㉔ 품질지표별 40℃ 저장온도에서의 품질변화

시험항목	기준 및 규격	시험기간 (개월)						
		0	1	2	3	4	5	6
지표성분 (mg/4500mg)	1.92 ~ 2.88	2.601	2.559	2.532	2.448	2.403	2.346	2.331
비타민 B2 (mg/4500mg)	1.152 ~ 2.952	2.046	2.043	1.995	1.959	1.917	1.893	1.842
성상	갈색의 원형정제	적합	적합	적합	적합	적합	적합	적합
붕해도	물에서 30분 이내	7.71	7.98	7.88	7.95	7.94	7.85	7.96
대장균군	음성	음성	음성	음성	음성	음성	음성	음성
곰팡이독소	불검출	불검출	-	-	-	-	-	불검출
중금속 (mg/kg)	납(Pb) : 1.0이하	0.2476						0.4146
	카드뮴(Cd) : 1.0이하	0.4464	-	-	-	-	-	0.3356
	비소(As) : 1.0이하	0.4158						0.4728
	수은(Hg) : 0.5이하	0.272						0.2639

㉕ 품질지표별 45℃ 저장온도에서의 품질변화

시험항목	기준 및 규격	시험기간 (개월)						
		0	1	2	3	4	5	6
지표성분 (mg/4500mg)	1.92 ~ 2.88	2.601	2.532	2.448	2.415	2.346	2.298	2.262
비타민 B2 (mg/4500mg)	1.152 ~ 2.952	2.046	2.016	1.956	1.938	1.893	1.836	1.749
성상	갈색의 원형정제	적합	적합	적합	적합	적합	적합	적합
붕해도	물에서 30분 이내	7.71	7.98	7.88	7.95	7.94	7.85	7.96
대장균군	음성	음성	음성	음성	음성	음성	음성	음성
곰팡이독소	불검출	불검출	-	-	-	-	-	불검출
중금속 (mg/kg)	납(Pb) : 1.0이하	0.2476						0.2179
	카드뮴(Cd) : 1.0이하	0.4464	-	-	-	-	-	0.3729
	비소(As) : 1.0이하	0.4158						0.4803
	수은(Hg) : 0.5이하	0.272						0.2682

③ 품질지표 반응속도(K) 상수

- 안정성시험 시 변화가 가장 큰 지표성분을 가지고 상수를 산출하였다

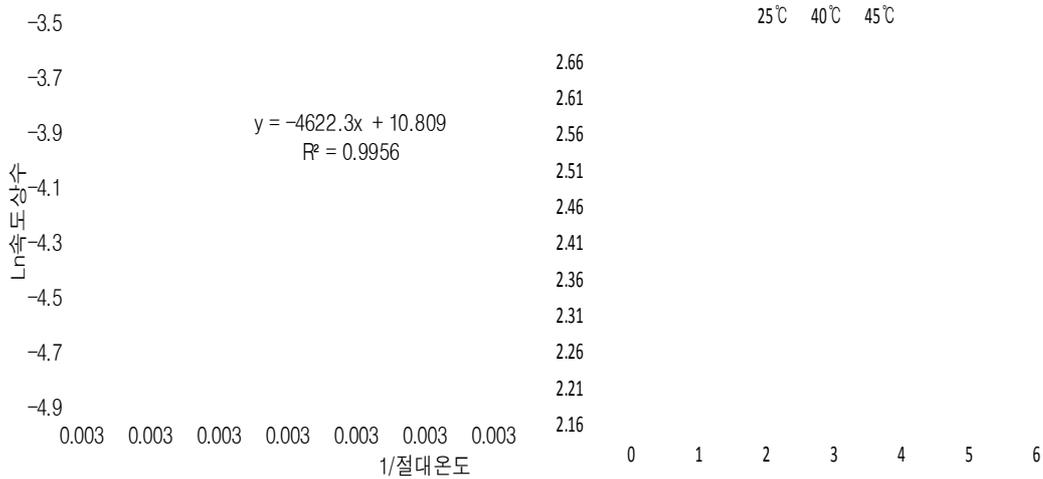
반응차수	저장온도(℃)	기울기	Y절편	결정계수
0	25	-0.0228	2.6056	0.9956
	40	-0.0488	2.6063	0.9801
	45	-0.0567	2.5846	0.9859
1	25	-0.0090	0.9579	0.9955
	40	-0.0198	0.9588	0.9804
	45	-0.0234	0.9506	0.9895

④ 품질지표의 활성화에너지와 반응식차트

㉖ 활성화 에너지 산출

저장온도	절대온도	1/절대온도(X축)	속도상수 K	LnK (Y축)
25℃	298	0.003356	0.008999	-4.710659
40℃	313	0.003195	0.019818	-3.921177
45℃	318	0.003145	0.023409	-3.754653

Slope(K)	Intercept	R ²	Ea
-4,622.28	10.8092	0.9956	-9,184.47



㉔ 활성화 에너지를 이용한 시험하지 않은 온도구간의 속도상수 산출

저장온도	절대온도	1/절대온도(X축)	LnK (Y축)	속도상수 K
10℃	283	0.00353	-5.523925	0.003990
15℃	288	0.00347	-5.240364	0.005298
20℃	293	0.00341	-4.966480	0.006968
30℃	303	0.00330	-4.445830	0.011727

⑤ 품질지표별 유통기간 산출

㉔ 연간변화량 산출

온도	예상유통 개월(A)	반응속도상수(B)	변화량(A*B)
10	5	0.003990	0.02
15	1	0.005298	0.01
20	2	0.006968	0.01
25	2	0.008999	0.02
30	2	0.011727	0.02
합계	12		0.08

㉔ 유통기간 산출

최초합량(A)	품질규격(B)	(A-B)	변화량(C)	유통기간(개월)
0.96	0.73	0.22	0.08	33.34

(다) 결론

인스팜 발효율금 정 (유리병포장)을 가속시험조건(25, 40, 45℃)에서 6개월 동안 안정성 시험을 수행한 결과, 성상, 봉해도, 대장균군, 곰팡이독소, 지표성분, 비타민 B2(리보플라빈), 중금속 모두 기준규격에 적합하였고, 비타민 B2의 1차 방정식을 근거로 하였을 때, 43.19개월, 지표성분 Curcumin의 1차 반응식을 근거로 하였을 때, 실온 유통 시 유통기한은 33.34개월로 산출되었다. 이 때, 지표성분인 Curcumin의 유통기한 산출 기간이 더 짧아, Curcumin의 1차반응식을 근거로 유통기한을 산출하고자 하였으며, 산출된 유통기한에 유통과정 중의 안전을 고려하고자 안전계수를 곱하여 최종 유통기한은 24개월로 결정하였다.

검사 성적서

(재)전남생물산업진흥원 식품산업연구원

발급번호: 호교원-1418-001	검사번호: 1409-02-052
제 목: 인스팜 발효율금 정	검사일자: 2014.08.29
시험목적: 인스팜 발효율금 정 중 대장균군, 곰팡이독소, 지표성분, 비타민 B2	검사장소: 호교원시험실
주요사항: 인스팜 발효율금 정	시험주요인: 17
시험방법: 한국표준협회(KS)	시험기준: KS M 6812
유통기한: 2014-08-19	제조일자: 2014-08-20
출 품 처: 호교원	수 출 처: 호교원

시험항목	기준	결과	비고
성상	상외의 이상을 보이지 않음	상외의 이상을 보이지 않음	적합
Curcumin	2.4 mg/g (500mg)	2.4 mg/g (500mg)	적합
비타민 B2	1.0 mg/g (500mg)	1.0 mg/g (500mg)	적합
중금속 (Pb)	1.0 mg/kg 이하	0.5 mg/kg	적합
중금속 (Cd)	0.5 mg/kg 이하	0.2 mg/kg	적합
중금속 (Cu)	6.0 mg/kg 이하	0.5 mg/kg	적합
중금속 (Zn)	150.0 mg/kg 이하	120.0 mg/kg	적합
대장균군	10 ⁶ CFU/g 이하	10 ⁴ CFU/g	적합
봉해도	봉해율 90% 이상	95%	적합

Jeonnam Bioindustry Foundation

(재)전남생물산업진흥원
식품산업연구원

2014년 10월 07일

(라) 발효율금 정제 건강기능식품 품목신고완료

<p style="text-align: center;">제 2013-광주형-0006-0003 호</p> <p style="text-align: center;">건강기능식품품목제조신고증</p> <p>영업허가(번호): 제 2013-광주형-0006 호 업 소 명: 한구인스팜(주) 소 제 지: 전라남도 화순군 동면 동능골길 17 영업의종류: 건강기능식품벤처제조업 제 품 명: 인스팜 발효율금 정 (발효율금 (2013-41, 비타인B2))</p> <p>품목제조조건:</p> <p>건강기능식품에관한법률 제7조 및 동법 시행규칙 제8조의 규정에 따라 건강기능식품품목제조신고서를 수리합니다.</p> <p style="text-align: right;">2014년 10월 07일</p> <p style="text-align: center;">광주지방식품의약품안전청장</p>	
발효율금 캡슐 품목제조신고증	인스팜 발효율금 캡슐 제품

3. 결론

전남 진도군의 지리적표시 농산물은 울금은 친환경으로 재배되고 있는 농산물로서 우리나라에서는 1,500톤/년 생산되고 있다. 울금은 고유의 이취와 고미로 우리나라 사람에게는 섭취가 매우 제한적인 소재였다. 그러나 인도, 일본, 미국에서는 건강소재로 알려져 우리나라 보다 4~10배/일 많은 양을 섭취하고 있다.

본 연구에서는 황국을 이용하여 울금을 발효하여 이취와 고미를 상쇄 시킬 수 있었으며, 발효울금을 대상으로 선행연구된 동물, 인체적용 임상연구를 바탕으로 식품의약품안전처에서 건강 개별인정형 건강기능식품 원료 인정을 획득하였다. 인정 획득 후 발효울금 원료 유통기한 설정연구를 실시하여 산업화 하였다.

발효울금을 함유한 제품으로 분말, 캡슐, 정제 제제연구와 유통기한 설정연구를 수행하여 분말 1품목 캡슐 3품목, 정제 1품목을 산업화 하였다.

발효울금은 국내에서 친환경으로 재배된 울금을 원료로 하고 있어 건강기능식품 원료로 산업화됨으로서 그 파급 효과가 매우 큰 원료이다.

2절. 비파엽추출물 기억력개선 개별인정형 건강기능식품 산업화

1. 서론

본 연구는 전남산 비파나무의 잎(비파엽, *Eribotrya japonica*(Thunb.) Lindl)을 이용하여 기억력개선에 도움이 되는 개별인정형 건강기능식품을 개발하고자 하였다. 비파엽 5% 주정 추출물을 이용하여 추출하고 분무 건조하여 “비파엽추출물” 제조방법을 개발하고, 동물실험과 인체적용 임상연구에서 기억력 개선활성을 확인하였으며, 식품의약품안전처에서 개별인정형 건강기능식품원료로 인정받고자 하였다. 개별인정형 건강기능식품 원료 인정을 획득한 후 건강기능식품 원료 “비파엽추출물”의 원료 품목신고와 “비파엽추출물”을 이용한 완제품(메모리업)을 품목신고하고 산업화 하고자 하였다.

2. 방법

가. 비파엽추출물 개별인정형 건강기능식품 원료 인정

(1) 원료표준화

(가) 방법

- ① 원재료 : 비파엽 시험검사 후 적합품만 선별 사용
- ② 추출 : 원재료에 5%주정으로 100℃로 4시간 추출
- ③ 농축 : 43±3℃, 760mmHg에서 농축하여 37±3 Brix 맞춤
- ④ 부형제 혼합 : 말토덱스트린 20%를 혼합하여 27±3 Brix 맞춤
- ⑤ 분무건조 : 분무건조기에서 혼합액을 분무건조
- ⑥ 원료완성 및 포장



(나) 결과

- 분무공정을 3회 반복한 결과, 평균 20.1%의 수율을 보였다.

Lot NO.	비과량 (kg)	용매량 (L)	생산량 (kg)	수득률 (%)	건조감량 (%)
EJ-001	90	1,000	18.1	20.1	5.01
EJ-002	90	1,000	17.9	19.9	4.85
EJ-003	90	1,000	18.4	20.4	5.78
평균	90	1,000	18.1	20.1	5.2

(2) 기준규격

(가) 방법

** 식품의약품안전처 “식품공전” 에 따라 시험함(2~4)

① 지표성분

건강기능식품협회에서 시험법검토를 통해 분석법을 확립하고, 자사시험방법을 설정하였다.

㉠ 검액준비

- 검체 1 g을 취한 후 60% 에탄올 40 mL, 6N 염산 5 mL을 가하여 95℃ 수욕 상에서 2시간 환류 추출한 후 여과지로 여과하여 용량플라스크에 넣고 60% 에탄올로 50 mL로 맞추어 0.45 um 필터로 여과한 용액을 검액으로 한다

㉡ 표준액조제

- 표준품 Quercetin 14 mg 을 100 mL 용량플라스크에 넣고 Ethanol로 충분히 녹인 후 100 mL로 하여, 137.2 ppm 용액을 제조하고, 137.2 ppm Quercetin 표준액 1,000 uL를 10 mL 용량 플라스크에 넣고 희석액으로 잘 혼합하여 13.72 ppm Quercetin 표준용액으로 사용하였다

㉢ 액체크로마토그래피 조작조건

- 이동상 : H₂O : 5% Acetic acid : Acetonitrile (40:30:30)
- Injection Vol. : 10 µl
- Column Oven Temp. : 35℃
- Sample Rack Temp. : 실온
- Detector : Diode Array Detector (UV 370 nm)
- Run time : 20 min
- Flow Rate : 0.8 mL/min

- 계산식

$$\frac{\text{표준품 농도 (mg/mL)}}{\text{검체농도 (g/mL)}} \times \frac{\text{검체면적}}{\text{표준품면적}} \times \text{표준품순도 (\%)}$$

② 중금속

식품공전 제 10. 일반시험법> 7. 식품 중 유해물질시험법> 7.1.2 금속별 시험> 7.1.2.1.납(Pb), 1)시험용액의 조제, 가)습식분해법, (1) 황산-질산법, 2)측정, 가)원자 흡광광도법(AAs)

③ 대장균군

식품공전 제 10. 일반시험법> 3. 미생물 시험법> 3.7 대장균군> 3.7.1 정성시험> 가. 유당배지법에 준하여 실험

④ 잔류농약

식품공전 제 10. 일반시험법> 4. 식품 중 잔류농약 분석법 > 4.1.2 다중농약다성분분석법> 4.1.2.2 다중농약다성분분석법

(나) 결과

시험항목		제안 기준 및 규격	실측치 (시험성적서)		
성상		이미, 이취가 없고 고유의 향미를 가진 진한 갈색분말	이미, 이취가 없고 고유의 향미를 가진 진한 갈색분말		
지표성분 (mg/g)		Quercetin 0.56~0.84	0.68	0.68	0.71
중금속 (mg/kg)	납	7 이하	3.3644	4.6618	3.3833
	총비소	40 이하	25.9318	26.2959	26.3488
	카드뮴	1 이하	0.2974	0.2776	0.2831
	총수은	0.5 이하	0.009	0.007	0.011
미생물	대장균군	음성	음성	음성	음성
	세균수(cfu/g)	-	-	-	-
곰팡이독소	총 아플라톡신 (B ₁)	해당없음	-	-	-

(3) 동물실험(선행연구 결과)

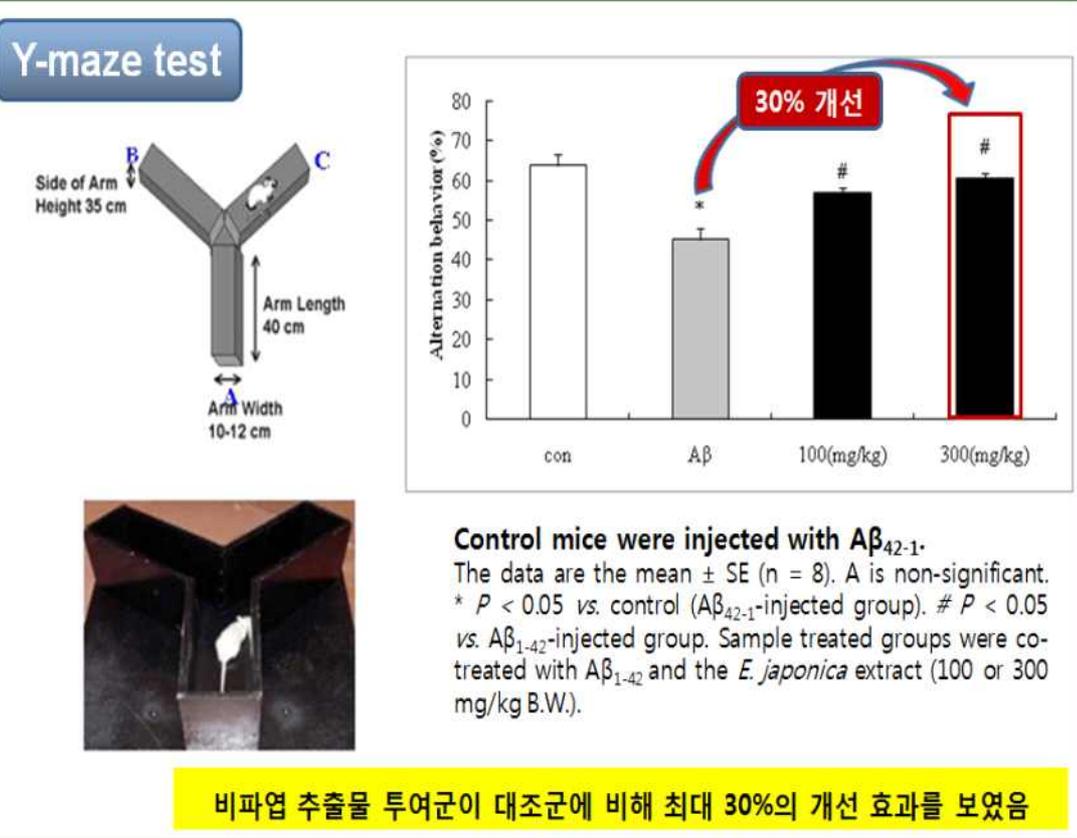
(가) 연세대학교 의과대학 분자생물학교실

- 비파엽추출물을 투여한 마우스에서 기억력개선 활성 확인
- 비파엽추출물 300mg/kg/day을 투여한 기억력 손상군에서 비파엽추출물을 투여하지 않은 기억력 손상군 보다 높은 활성 확인

Effect of the *E. japonica* extract on GSH content, SOD activity, and lipid peroxidation in $A\beta_{1-42}$ -injected mouse brain.

Experimental group	GSH content ($\mu\text{g}/\text{mg}$ protein)	SOD (U/mg protein)	MDA (nmol/mg protein)
Control	4.4 ± 1.3	7.6 ± 1.0	9.0 ± 2.0
$A\beta_{1-42}$	$1.6 \pm 1.6^*$	$4.1 \pm 0.8^*$	$19.1 \pm 4.4^*$
$A\beta_{1-42} + 100 \text{ mg/kg B.W}$	$2.8 \pm 0.4^{**}$	$5.1 \pm 0.7^{**}$	$15.2 \pm 8.0^{**}$
$A\beta_{1-42} + 300 \text{ mg/kg B.W}$	$3.5 \pm 0.25^{**}$	$6.5 \pm 0.7^{**}$	$12.7 \pm 3.1^{**}$

- 비파엽추출물 300mg/kg/day을 투여군에서 항산화 효과를 확인하였다



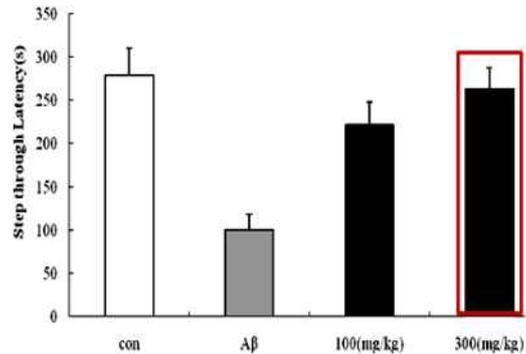
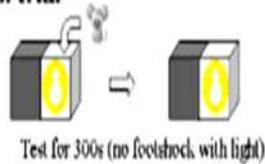
- 기억력개선을 확인하는 Y-maze 시험결과 비파엽추출물 투여군에서 비파엽추출물을 투여하지 않은 군보다 30%의 기억력 개선을 확인하였다

Passive avoidance test

In the acquisition trial



In the retention trial



Control mice were injected with $A\beta_{42-1}$. The data are the mean \pm SE (n = 8). * $P < 0.05$ vs. control ($A\beta_{42-1}$ -injected group). # $P < 0.05$ vs. $A\beta_{1-42}$ -injected group. Sample treated groups were co-treated with $A\beta_{1-42}$ and the *E. japonica* extract (100 or 300 mg/kg B.W.).

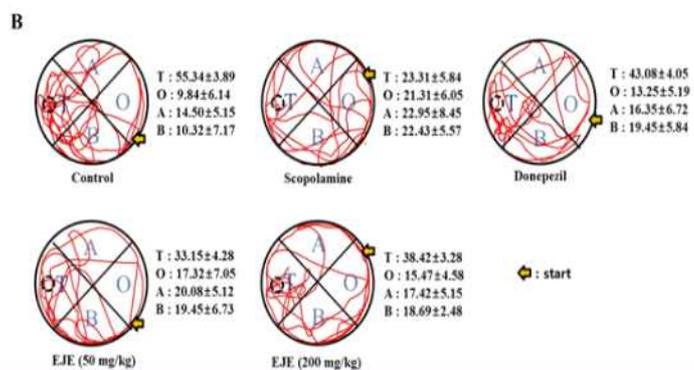
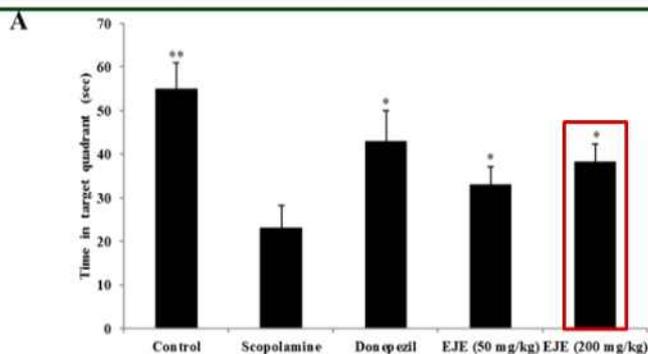
- 비파엽추출물 투여군은 기억력이 손상되지 않은 정상군과 유사한 정도로 기억력이 개선됨을 확인하였다

(나) 전남천연자원연구원

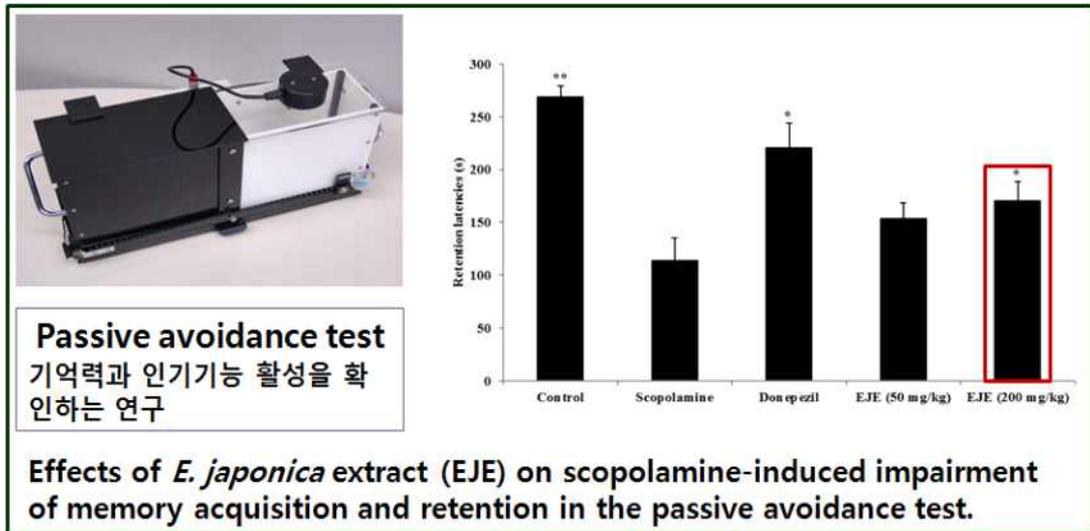
- 기억력과 인지기능이 감퇴된 랫드에 비파엽추출물 200mg/kg/day를 투여하여 기억력 및 인지기능 개선 확인
- 치매치료제 Donepezil 처리군과 유사한 활성 확인



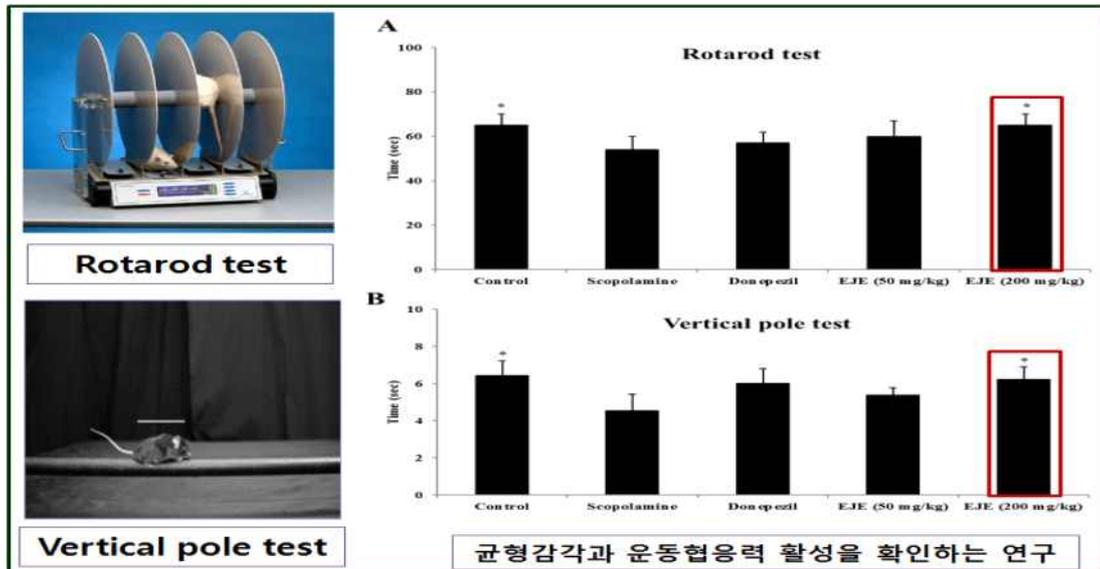
Water maze test
기억력과 인지기능 활성을 확인하는 연구



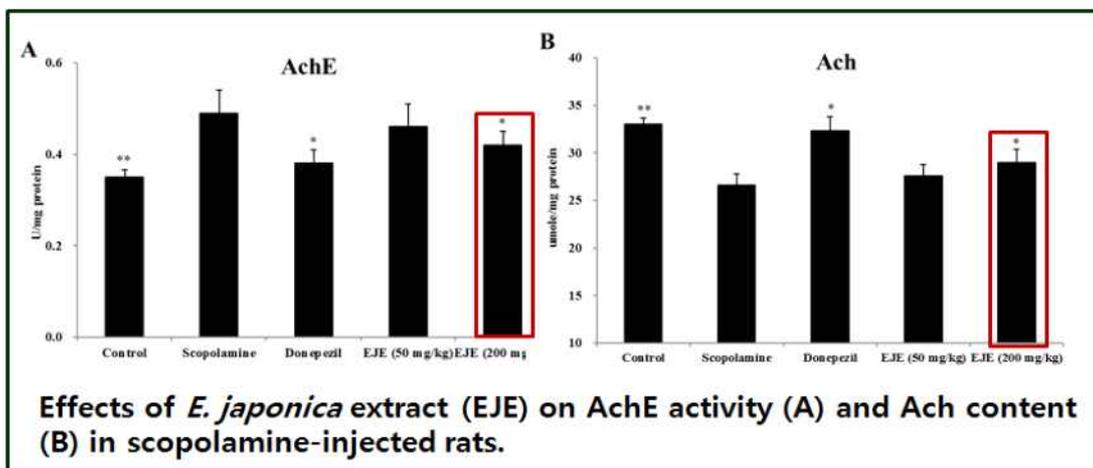
- 비파엽추출물 투여군에서 기억력과 인지기능이 치매치료제를 투여한 군과 유사한 정도로 활성이 있음을 확인하였다



- 비파엽추출물 투여군에서 기억력과 인지기능이 떨어지지 않음을 확인하였다



- 비파엽추출물 투여군에서 균형감각과 운동협응력이 떨어지지 않았음을 확인하였다



- AchE 활성의 증가와 Ach 함량의 감소는 인지능력 저하와 연관이 있는 것으로 학계에 널리 알려져 왔다
- 비파엽추출물 투여군에서 AchE는 감소하였으며, Ach는 증가하였음을 확인하였다

(4) 인체적용 임상시험(선행연구 결과)

비파엽추출물의 기억력 개선에 대한 유효성 및 안전성을 평가하기 위한 12 주간의 무작위배정, 이중눈가림, 플라세보 대조 인체적용시험

- 수행기관 : 전북대학교병원 기능성식품 임상시험지원센터
- 만 16~19세의 청소년 80명을 대상으로 비파엽추출물의 기억력개선 확인
- 비파엽추출물 섭취군(본약군), 비파엽추출물 비섭취군(위약군) 비교 연구에서
 - 1차 유효성평가 (K-MMSE)

K-MMSE(간이정신상태검사)에서 비파엽추출물 섭취 12주 후 평가에서 K-MMSE 총점 증가 ($p=0.043$), K-MMSE 항목 중 기억회상 점수 증가 ($p=0.014$), 방문별 K-MMSE 항목 중 기억회상 점수 증가 ($p=0.009$) 하였다.

Table 5. 섭취 전 · 12주 후 K-MMSE 점수 변화

	비파엽추출물군 (n=37)		p-value ¹⁾	플라세보군 (n=35)		p-value ¹⁾	p-value ²⁾
	스크리닝	3차방문		스크리닝	3차방문		
시간 지남력	4.86 ± 0.35	4.97 ± 0.16	0.091	4.86 ± 0.36	4.91 ± 0.28	0.460	0.607
장소 지남력	5.00 ± 0.00	4.97 ± 0.16	0.324	4.94 ± 0.24	5.00 ± 0.00	0.160	0.082
기억등록	3.00 ± 0.00	3.00 ± 0.00	-	3.00 ± 0.00	3.00 ± 0.00	-	-
주의집중 및 계산	4.57 ± 0.87	4.76 ± 0.72	0.051	4.80 ± 0.53	4.71 ± 0.75	0.539	0.101
기억회상	2.86 ± 0.35	3.00 ± 0.00	0.023*	3.00 ± 0.00	2.97 ± 0.17	0.324	0.014*
언어능력	8.00 ± 0.00	8.00 ± 0.00	-	7.97 ± 0.17	7.94 ± 0.24	0.562	0.550
그리기	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00	-	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00	-	-
총점	29.30 ± 0.94	29.70 ± 0.74	0.003**	29.57 ± 0.65	29.54 ± 0.85	0.869	0.043*

Values are presented as mean ± SD
¹⁾ Analyzed by paired t-test
²⁾ Analyzed by linear mixed model for repeated measures data
* P < 0.05, ** P < 0.01

- 2차 유효성평가(Ray-Kim 기억검사)

기억지수(MQ) 및 언어기억검사(K-VALT), 지연회상 항목에서 위약군에 비교하여 증가하는 경향보임($p=0.061$, $p=0.061$, $p=0.098$), 혈중 BDNF 플라세보군에 비교하여 증가($p=0.080$)

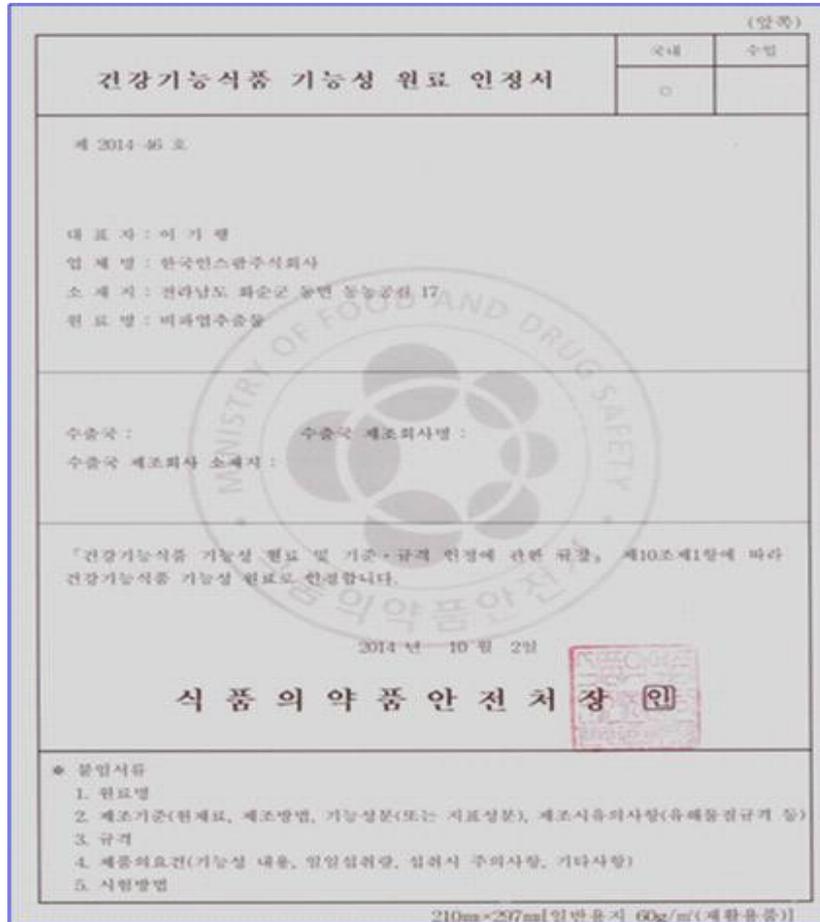
Table 8. 섭취 전 · 12주 후 BDNF 변화

	비파엽추출물군 (n=37)		p-value ¹⁾	플라세보군 (n=35)		p-value ¹⁾	p-value ²⁾
	1차방문	3차방문		1차방문	3차방문		
BDNF (pg/mL)	25596.76 ± 8481.76	27816.19 ± 7825.60	0.058	25007.94 ± 8087.15	24445.23 ± 8043.60	0.604	0.080

Values are presented as mean ± SD
¹⁾ Analyzed by paired *t*-test
²⁾ Analyzed by linear mixed model for repeated measures data

(5) 개별인정형 건강기능식품 인정 획득

- 기억력개선에 도움을 줄 수 있음(생리활성기능 2등급)
- 제2014-46호, 2104.10.02



나. 비파엽추출물 개별인정형 건강기능식품 원료 품목신고

(1) 유통기한 설정시험

(가) 방법

** 식품의약품안전처 고시 설정기준 및 시험가이드라인(가속시험)에 따라 시험함(2~4)

① 제품의 특성

구분	신규제품
식품유형	건강기능식품
성상	연한 갈색분말
사용원료	비과엽추출물
제조·가공과정	원재료(비과엽) → 추출 → 여과 → 농축 → 혼합 → 분무건조 → 포장(최종제품)
포장재질	외부:종이, 내부:PE
포장방법	기밀
포장단위	1kg, 5kg, 10kg, 20kg
보존 및 유통온도	실온
보존료사용여부	미사용
제품사진	

② 검체의 채취 및 취급방법

- 시험기간 : 2014. 02. 01 ~ 2014. 08. 31
- 시험기준 : 안정성시험(가속시험)
- 시험조건 : 본 시험에 사용된 제품은 한국인스팜(주)가 시판을 위해 지대포장(내부 PE, 외부 종이)으로 최종 포장한 제품 3ロット(EJ 14001, EJ 14002, EJ 14003)를 25℃, 40℃, 45℃ 항온항습기에 6개월간 보관하면서 기준 및 규격에 따라 시험을 수행하였다. 이 때, 성상, 지표성분, 대장균군, 시험은 매 1개월마다, 중금속 시험은 0개월, 3개월, 6개월에 시험을 진행하였다.

(나) 결과

① 안정성시험(6개월 가속시험) 결과 평가

- 성 상 : 연한 갈색분말
- 지표성분 : 시험 시 최저값은 0.601 mg/g이었으며, 이 값은 기준값 0.8 mg/g의 최저 기준 80%인 0.56mg/g 보다 높은 값으로 기준에 적합함
- 대장균군 : 음성으로 적합함
- 중금속 : 납, 카드뮴, 비소, 수은 모두 기준치 이하로 적합함

② 저장온도별 품질변화

- ㉠ 품질지표별 25℃ 저장온도에서의 품질변화

시험항목	기준 및 규격	시험기간 (개월)						
		0	1	2	3	4	5	6
지표성분 (mg/g)	0.7 (기준값의 80~120% 이내)	0.747	0.741	0.730	0.721	0.713	0.709	0.692
성상	연한 갈색분말	적합	적합	적합	적합	적합	적합	적합
대장균군	음성	음성	음성	음성	음성	음성	음성	음성
중금속 (mg/kg)	납(Pb) : 2.0이하 카드뮴(Cd): 1.0이하 비소(As) : 4.0이하 수은(Hg) : 0.5이하	0.2291 0.3602 0.4667 0.1351	- - -	- -	0.3235 0.4035 0.4831 0.2303	- -	- -	0.4435 0.3304 0.4998 0.1551

㉞ 품질지표별 40℃ 저장온도에서의 품질변화

시험항목	기준 및 규격	시험기간 (개월)						
		0	1	2	3	4	5	6
지표성분 (mg/g)	0.7 (기준값의 80~120% 이내)	0.747	0.738	0.710	0.704	0.683	0.679	0.664
성상	연한 갈색분말	적합	적합	적합	적합	적합	적합	적합
대장균군	음성	음성	음성	음성	음성	음성	음성	음성
중금속 (mg/kg)	납(Pb) : 2.0이하 카드뮴(Cd): 1.0이하 비소(As) : 4.0이하 수은(Hg) : 0.5이하	0.2291 0.3602 0.4667 0.1351	- -	- -	0.2995 0.3784 0.4770 0.2378	- -	- -	0.2545 0.2801 0.4855 0.1516

㉞ 품질지표별 45℃ 저장온도에서의 품질변화

시험항목	기준 및 규격	시험기간 (개월)						
		0	1	2	3	4	5	6
지표성분 (mg/g)	0.7 (기준값의 80~120% 이내)	0.747	0.722	0.683	0.672	0.657	0.636	0.601
성상	연한 갈색분말	적합	적합	적합	적합	적합	적합	적합
대장균군	음성	음성	음성	음성	음성	음성	음성	음성
중금속 (mg/kg)	납(Pb) : 2.0이하 카드뮴(Cd): 1.0이하 비소(As) : 4.0이하 수은(Hg) : 0.5이하	0.2291 0.3602 0.4667 0.1351	- -	- -	0.1005 0.3535 0.4765 0.2361	- -	- -	0.3264 0.2779 0.4941 0.1534

③ 품질지표 반응속도(K) 상수

- 안정성시험 시 변화가 가장 큰 지표성분을 가지고 상수를 산출하였다

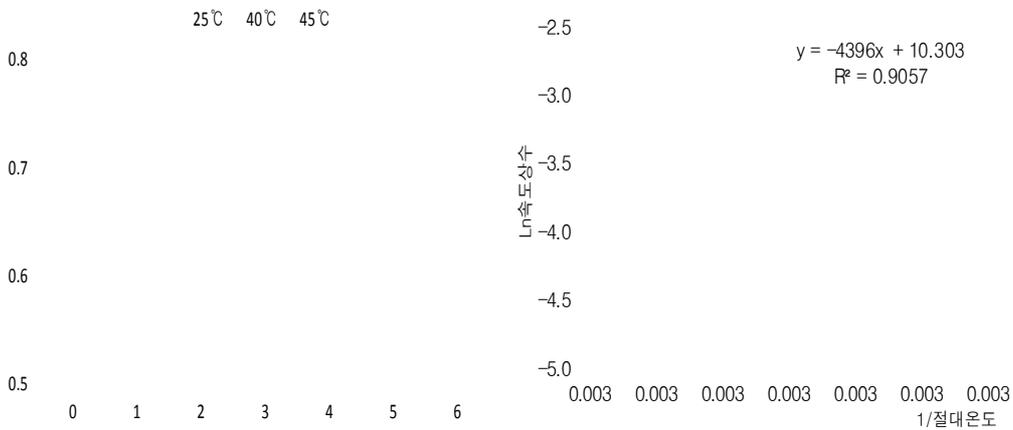
반응차수	저장온도(°C)	기울기	Y절편	결정계수
0	25	-0.0088	0.7482	0.9820
	40	-0.0141	0.7458	0.9717
	45	-0.0227	0.7421	0.9774
1	25	-0.0122	-0.2897	0.9803
	40	-0.0200	-0.2925	0.9744
	45	-0.0337	-0.2956	0.9776

④ 품질지표의 활성화에너지와 반응식차트

㉞ 활성화 에너지 산출

저장온도	절대온도	1/절대온도(X축)	속도상수 K	LnK (Y축)
25°C	298	0.003356	0.012189	-4.407224
40°C	313	0.003195	0.019956	-3.914231
45°C	318	0.003145	0.033746	-3.388907

Slope(K)	Intercept	R ²	Ea
-4395.95	10.303157	0.9057	-8,734.76



㉞ 활성화 에너지를 이용한 시험하지 않은 온도구간의 속도상수 산출

저장온도	절대온도	1/절대온도(X축)	LnK (Y축)	속도상수 K
10°C	283	0.00353	-5.230240	0.005352
15°C	288	0.00347	-4.960563	0.007009
20°C	293	0.00341	-4.700090	0.009094
30°C	303	0.00330	-4.204933	0.014922

⑤ 품질지표별 유통기간 산출

㉞ 연간변화량 산출

온도	예상유통 개월(A)	반응속도상수(B)	변화량(A*B)
10	5	0.005352	0.03
15	1	0.007009	0.01
20	2	0.009094	0.02
25	2	0.012189	0.02
30	2	0.014922	0.03
합계	12		0.11

㉔ 유통기간 산출

최초함량(A)	품질규격(B)	(A-B)	변화량(C)	유통기한(개월)
-0.29	-0.58	0.29	0.11	32.56

(다) 결론

비파엽추출물을 가속시험조건(25, 40, 45℃)에서 6개월 동안 안정성 시험을 수행한 결과, 성상, 대장균군, 지표성분, 중금속 모두 기준규격에 적합하였고, 지표성분 Quercetin의 1차 반응식을 근거로 하였을 때, 실온유통 시 유통기한은 32.56개월로 산출되었다. 산출된 유통기한에 유통과정 중의 안전을 고려하고자 안전계수를 곱하여 최종 유통기한은 24개월로 결정하였다.

(2) 발효율금 건강기능식품 품목신고완료

<p>비파엽추출물 검사성적서</p>	<p>비파엽추출물 품목제조신고증</p>

다. 비파엽추출물 함유 건강기능식품 완제품 품목신고

(1) 비파엽추출물 정제

(가) 유통기한 설정시험 방법

** 식품의약품안전처 고시 설정기준 및 시험가이드라인(가속시험)에 따라 시험함(2~4)

① 제품의 특성

구분	신규제품
식품유형	건강기능식품
성상	암갈색의 삼각형 제피정제
사용원료	비과엽추출물
제조·가공공정	원료 → 칭량 → 사별 → 혼합 → 1차 타정 → 정립 → 최종혼합 → 타정 및 탈분 → 코팅 → 중간검사 → 포장 → → 검사 → 보관출하
포장재질	PTP 및 종이
포장방법	기밀
포장단위	500mg*90정
보존 및 유통온도	실온
보존료사용여부	미사용
제품사진	

② 검체의 채취 및 취급방법

- 시험기간 : 2014년 02월 20일 ~ 2014년 08월 31일
- 시험기준 : 안정성시험(가속시험)
- 시험조건 : 본 시험에 사용된 제품은 한국인스팜(주)가 시판을 위해 기밀포장(PTP 및 종이)으로 최종포장한 제품 3ロット(EJ T 14001-A, EJ T 14001-B, EJ T 14001-C)를 25℃, 40℃, 45℃ 항온항습기에 6개월간 보관하면서 기준 및 규격에 따라 시험을 수행하였다. 이 때, 성상, 지표성분(Quercetin), 대장균군, 봉해도 시험은 매 1개월 마다, 중금속 시험은 0개월, 3개월, 6개월에 시험을 진행하였다.

(나) 유통기한 설정시험 결과

① 안정성시험(6개월 가속시험) 결과 평가

- 성 상 : 암갈색의 삼각형 제피정제
- 봉 해 도 : 물에서 평균 26분에 모두 봉해되었음
- 지표성분 : 시험 시 최저값은 0.881 mg/g이었으며, 이 값은 기준값 1.05 mg/g의 최저 기준 80%인 0.84mg/g 보다 높은 값으로 기준에 적합함
- 대장균군 : 음성으로 적합함
- 중금속 : 납, 카드뮴, 비소, 수은 모두 기준치 이하로 적합함

② 저장온도별 품질변화

㉑ 품질지표별 25℃ 저장온도에서의 품질변화

시험항목	기준 및 규격	시험기간 (개월)						
		0	1	2	3	4	5	6
지표성분 (mg/g)	1.05mg/3,000mg (기준값의 80~120% 이내)	1.120	1.101	1.082	1.078	1.063	1.053	1.043
붕해도	물에서 60분 이내	26.7	26.5	27.2	26.4	25.9	26.3	27.1
성상	암갈색의 삼각형 제피정제	적합	적합	적합	적합	적합	적합	적합
대장균군	음성	음성	음성	음성	음성	음성	음성	음성
중금속 (mg/kg)	납(Pb) : 2.0이하	0.2260			0.3074			0.3152
	카드뮴(Cd): 1.0이하	0.2656			0.1655			0.2405
	비소(As) : 4.0이하	0.3941	-	-	0.4272	-	-	0.4756
	수은(Hg) : 0.5이하	0.2563			0.2514			0.2537

㉒ 품질지표별 40℃ 저장온도에서의 품질변화

시험항목	기준 및 규격	시험기간 (개월)						
		0	1	2	3	4	5	6
지표성분 (mg/g)	1.05mg/3,000mg (기준값의 80~120% 이내)	1.120	1.063	0.982	0.977	0.954	0.943	0.925
붕해도	물에서 60분 이내	25.9	26.5	26.4	26.7	27.5	25.4	26.6
성상	암갈색의 삼각형 제피정제	적합	적합	적합	적합	적합	적합	적합
대장균군	음성	음성	음성	음성	음성	음성	음성	음성
중금속 (mg/kg)	납(Pb) : 2.0이하	0.2260			0.30210			0.1754
	카드뮴(Cd): 1.0이하	0.2656			.2168			0.2595
	비소(As) : 4.0이하	0.3941	-	-	0.5056	-	-	0.4944
	수은(Hg) : 0.5이하	0.2563			0.2603			0.2532

㉓ 품질지표별 45℃ 저장온도에서의 품질변화

시험항목	기준 및 규격	시험기간 (개월)						
		0	1	2	3	4	5	6
지표성분 (mg/g)	1.05mg/3,000mg (기준값의 80~120% 이내)	1.120	0.996	0.973	0.952	0.937	0.905	0.881
붕해도	물에서 60분 이내	25.7	26.9	26.4	27.2	25.8	26.6	26.5
성상	암갈색의 삼각형 제피정제	적합	적합	적합	적합	적합	적합	적합
대장균군	음성	음성	음성	음성	음성	음성	음성	음성
중금속 (mg/kg)	납(Pb) : 2.0이하	0.2260			0.1996			0.2923
	카드뮴(Cd): 1.0이하	0.2656			0.2040			0.2622
	비소(As) : 4.0이하	0.3941	-	-	0.5120	-	-	0.4766
	수은(Hg) : 0.5이하	0.2563			0.2583			0.2484

③ 품질지표 반응속도(K) 상수

- 안정성시험 시 변화가 가장 큰 지표성분을 가지고 상수를 산출하였다

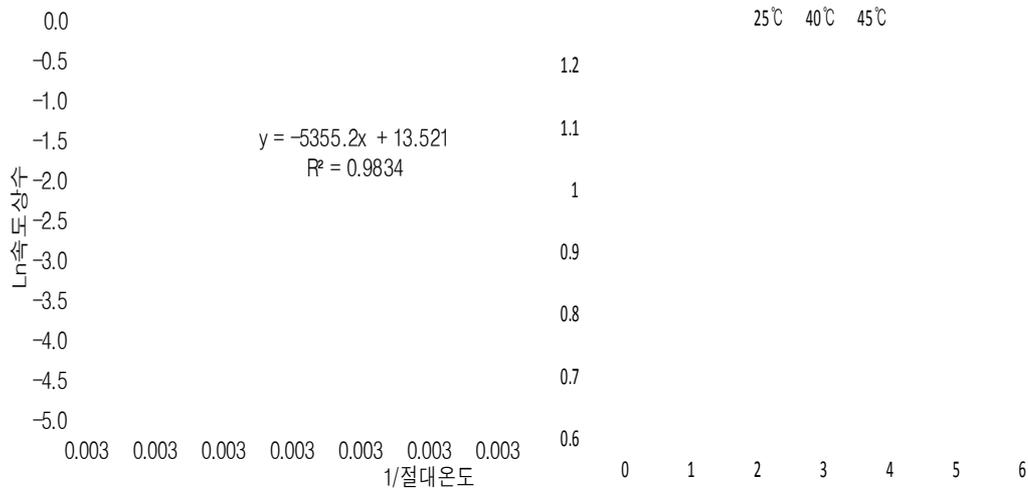
반응차수	저장온도(°C)	기울기	Y절편	결정계수
0	25	-0.0124	1.1142	0.9764
	40	-0.0305	1.0863	0.8654
	45	-0.0334	1.0665	0.8520
1	25	-0.0114	0.1084	0.9789
	40	-0.0301	0.0830	0.8793
	45	-0.0339	0.0647	0.8770

④ 품질지표의 활성화에너지와 반응식차트

㉗ 활성화 에너지 산출

저장온도	절대온도	1/절대온도(X축)	속도상수 K	LnK (Y축)
25°C	298	0.003356	0.011448	-4.469922
40°C	313	0.003195	0.030085	-3.503745
45°C	318	0.003145	0.033907	-3.384125

Slope(K)	Intercept	R ²	Ea
-5355.22	13.520801	0.9834	-10,640.83



④ 활성화 에너지를 이용한 시험하지 않은 온도구간의 속도상수 산출

저장온도	절대온도	1/절대온도(X축)	LnK (Y축)	속도상수 K
10°C	283	0.00353	-5.402243	0.004506
15°C	288	0.00347	-5.073718	0.006259
20°C	293	0.00341	-4.756405	0.008596
30°C	303	0.00330	-4.153197	0.015714

⑤ 품질지표별 유통기간 산출

㉗ 연간변화량 산출

온도	예상유통 개월(A)	반응속도상수(B)	변화량(A*B)
10	5	0.004506	0.02
15	1	0.006259	0.01
20	2	0.008596	0.02
25	2	0.011448	0.02
30	2	0.015714	0.03
합계	12		0.10

㉔ 유통기간 산출

최초합량(A)	품질규격(B)	(A-B)	변화량(C)	유통기한(개월)
0.11	-0.17	0.29	0.10	34.42

(다) 결론

비파엽추출물 정제(메모리업)를 가속시험(25, 40, 45℃)에서 6개월 동안 안정성 시험을 수행한 결과, 색상, 붕해도, 대장균균, 지표성분, 중금속 모두 기준규격에 적합하였고, 지표성분 Quercetin의 1차 반응식을 근거로 하였을 때, 실온 유통 시 유통기한은 34.42개월로 산출되었다. 산출된 유통기한에 유통과정 중의 안전을 고려하고자 안전계수를 곱하여 최종 유통기한은 24개월로 결정하였다.



검 사 성 적 서

(재)전남생물산업진흥원 (주) | 전남생물산업진흥원 | 전남생물산업진흥원

대표전화 : 010-1411-6977 | 팩스번호 : 010-62-6966

차 례	대포이 과		검사완료일	2014.10.24	
시험유형	비파엽추출물	검사목적	가속시험(가속시험조건) 가속시험	2014.11.02	
주요번호	119-080	소 재 지	전남 목포시 동면 동남로길	배부주소	12
담당자명	조국민(소속(주))	검체명	비파엽	검출물	검출
유통기한	2016-09-30	제조일자	2014-10-01	출 수 자	소속사

시험 항목 및 결과

시험항목	기준(단위)	결과	비고
색상	안정성의 가속시험 조건(25, 40, 45℃) 1.05 mg/3,000mg	안정성의 가속시험 조건(25, 40, 45℃) 1.11 mg/3,000mg	적합
Quercetin	(비파엽의 함량 1.2%) 2.5 mg/kg 이하	(비파엽의 함량) 3.0 mg/kg	적합
납	4.0 mg/kg 이하	0.2 mg/kg	적합
주석	1.0 mg/kg 이하	0.1 mg/kg	적합
중금속	0.6 mg/kg 이하	0.6 mg/kg	적합
대장균균	음성	음성	적합
붕해도	음성	음성	적합



Jeonnam Bioindustry Foundation

대표 : 박현 | 검사지 : 신지현, 송현우, 양수경
 책임자 : 유수경, 송현우, 신동석

이 성적본, 분석지가 최종판 권위를 상가 분석결과에 한하며, 의뢰목적 이외의 사용성 및 정확성 검토나 변경, 재분석 등으로 사용될 수 없음

* 상기내용은 해당된 시험항목에 한함

2014년 11월 05일

(재)전남생물산업진흥원
 식품산업연구원장

520-330 전라남도 나주시 목포구부도길 80-5 | TEL : 001-330-0823 | FAX : 001-330-3627

(라) 비파엽추출물 정제 건강기능식품 품목신고완료

<p>제 2013-광주청-0006-0005 호</p> <p>건강기능식품품목제조신고증</p> <p>영업허가(번호) : 제 2013-광주청-0006 호 업 소 명 : 한국인스팜(주) 소 재 지 : 전라남도 화순군 동면 동농로길 17 영 업 회 류 류 : 건강기능식품벤처기업 제 품 명 : 메모리업 (비파엽추출물 제 2014-44 호)</p> <p>품목제조조건 :</p> <p>건강기능식품에 관한 법률 제7조 및 동법 시행규칙 제8조의 규정에 따라 건강기능식품품목제조신고증을 수리합니다.</p> <p>2014년 11월 10일</p> <p>광주지방식품의약품안전청장</p>	
<p>메모리업 품목제조신고증</p>	<p>메모리업 제품</p>

3. 결론

비파엽은 장미과의 상록 교목으로, 일본, 중국 등지에서 많이 재배되고 있으며, 우리나라에서는 전남 완도, 장흥 등 남해안을 중심으로 재배되고 있다. 비파의 경우 열매를 주로 섭취하였고, 잎의 경우에는 차로 이용되어 왔다.

본 연구에서는 열매에 비해 이용률이 낮았던 잎(비파엽)을추출하여 선행연구된 동물, 인체 적용 임상연구를 바탕으로 식품의약품안전처에서 청소년의 기억력개선에 도움을 주는 개별인정형 건강기능식품 원료 인정을 획득하였다. 인정 획득 후 비파엽 원료 유통기한 설정연구를 실시하여 산업화 하였다.

비파엽추출물을 함유한 제품으로 정제 제제연구와 유통기한 설정연구를 수행하여 정제 1 품목을 산업화 하였다. 앞으로, 산제, 과립제, 음료 등 여러 형태의 제제연구를 통해 제품을 산업화 할 예정이다

3절. 시료제작 결과보고서

1. 서론

본 연구단의 1핵심기관에서는 난대성 특화작물의 산업화를 목표를 하고 있으며 2핵심에서는 난대성 특화작물을 이용한 건강기능식품 소재 개발을 목표로 하고있다. 2핵심에서 개발된 소재를 원료로 하여 1 핵심에서 산업화하기 위해서는 2핵심의 각 세부기관에서 사용할 시료 제작에 일관성이 필요하므로 본 연구에서 시료를 제작하여 2 핵심의 각 세부기관에 전달하고자 한다. 시료의 제작은 울금과 발효울금을 추출용매를 달리하여 시료를 제작하고자 한다. 추출용매와 방법으로는 열수 및 실온 물 추출물, 20%주정, 80%주정 추출물을 제작하고자 한다.

2. 방법

전남 진도군의 하늘땅바다에서 구입한 울금을 감별과정을 거친 후 적합품을 칭량하여 시료 제작에 사용하였다. 발효울금은 2011년 12월에 발효한 발효울금을 사용하였다. 시험 추출은 한국인스팜중앙연구소에서 진행하였으며, 시험에 사용한 기기는 진탕기(SK-760A, JEIOTECH), 히팅맨틀(MS-DS8604, MTOPS), 농축기(Rotary Evaporator N-1100, EYELA), 동결건조기(천연자원연구원)를 사용하였다. 시험에 사용된 증류수는 한국인스팜중앙연구소에서 제조하였으며, 발효에탄올(이하 주정)은 대한약전 Assay 95.1~95.6 v/v%(수성약품주식회사)를 사용하였다. 추출용매는 정제수(실온), 정제수(열수), 20% 주정, 80%주정을 이용하였다.

기능성 평가 결과와 경제성을 고려하여 발효울금 50%주정추출물 시료를 추가적으로 제작하였다. 추출물 제조 과정은 (1) 원료확인 (2) 추출 (3) 농축 (4) 동결건조 과정으로 진행 하였다.

(1) 원료평량

추출에 사용할 소재를 정밀히 칭량하고 비율에 맞게 주정과 정제수를 투입하였다.

(2) 추출

실온 물 추출물은 진탕기를 이용하여 74rpm으로 5시간 추출을 2회 반복 한다. 열수 추출물, 20%주정 추출물, 80%주정 추출물은 히팅맨틀을 이용하여 용매에 따라 온도를 달리하여 4시간 추출하였다.

시료명 (울금/발효울금)	추출용매(%)	추출온도(℃)	시간(hr)	진탕/활류
CL-CW / FCL-CW	물 : 100	실온	5	진탕
	주정 : 0			
CL-HW / FCL-HW	물 : 100	100	4	환류
	주정 : 0			
CL-20 / FCL-20	물 : 80	95.7	4	환류
	주정 : 20			
FCL-50	물 : 50	89.2	4	환류
	주정 : 50			
CL-80 / FCL-80	물 : 20	79.0	4	환류
	주정 : 80			

(3) 농축

농축기를 이용하여 45℃ 1000mmHg 조건으로 농축하였다.

(4) 동결건조

동결건조기를 이용하여 건조하였다. 건조 완료시 건조감량을 측정하고 수득률을 산정하였다.

3. 결과

상기 기술한 2. 방법을 통하여 시료를 제작한 결과 다음과 같은 결과를 얻었다.

(1) 울금

용매		CL-CW	CL-HW	CL-20	CL-80
추출	울금(g)	800	510	510	340
	용매량(L)	32	5.1	5.1	3.4
	온도/시간	실온/5hr.	100°C/4hr.	95°C/4hr.	75°C/4hr.
	추출량(L)	30	4.5	4.6	3
농축	온도/감압	45°C/1,000	45°C/1,000	45°C/1,000	45°C/1,000
	농축량(L)	4	1.5	1.5	1
건조	건조량(g)	132.26	46.66	42.42	29.10
	건조감량(%)	2.24	1.37	2.05	2.21
	수득률(%)	16.5	9.1	8.3	8.5



(2) 발효울금

용매		FCL-CW	FCL-HW	FCL-20	FCL-50	FCL-80
추출	발효울금(g)	800	510	510	500	340
	용매량(L)	32	5.1	5.1	5	3.4
	온도/시간	실온/5hr.	100°C/4hr.	95°C/4hr.	89.2°C/4hr	75°C/4hr.
	추출량(L)	30	4.5	4.5	4.5	3
농축	온도/감압	45°C/1,000	45°C/1,000	45°C/1,000	45°C/1,000	45°C/1,000
	농축량(L)	4	1.5	1.5	1.4	1
건조	건조량(g)	155.08	39.07	31.07	36.40	27.38
	건조감량(%)	1.34	1.65	1.20	1.36	1.88
	수득률(%)	19.3	7.6	6.0	7.3	8.0

정제수(실온) : FCL-CW	정제수(열수) : FCL-HW	20%주정 : FCL-20	50%주정 : FCL-50	80%주정 : FCL-80
				

4. 결론

울금과 발효울금의 추출물별 기능평가를 위하여 본 연구에서는 추출용매에 따라 9가지의 시료를 제작하였다. 각각 추출한 결과, 울금은 정제수(실온)추출물 수득률 16.5%, 정제수(열수)추출물 수득률 9.1%, 20%주정 추출물 수득률 8.3%, 80%주정 추출물 수득률 8.5%를 나타냈고, 발효울금은 정제수(실온)추출물 수득률 19.3%, 정제수(열수)추출물 수득률 7.6%, 20%주정 추출물 수득률 6.0%, 50%주정 추출물 수득률 7.3%, 80%주정 추출물 수득률 8.0%를 나타냈다. 이를 세부기관에 제공하여 각 질환별 추출물의 기능평가에 활용하도록 할 예정이다.

본 연구에 특이사항은 없었으며 각 세부기관의 기능평가 완료 후 선정된 소재의 추출물에 대한 추출법 표준화연구를 수행할 예정이다.

4절. 유기농 건강지향식품 산업화

1. 유기농스낵 산업화를 위한 시장조사

가. 방법

- 국내시장에 대한 자료는 각 제조업체의 홈페이지 또는 검색사이트를 이용하였으며, 필요에 따라 논문 검색과 농림수산식품부에서 발간하는 책자를 인용하여 조사하였다.
- 제품 수의 경우는 동일제품 다른 맛의 경우 다른 제품으로 계수하였다.
- 대상 제조업체는 표1과 같다.

[표1] 제조업체별 제품 수

제조업체명	제품 수
오리온	17
해태제과	15
클라운제과	16
롯데제과	11
농심	28
빙그레	4
삼양식품	3

- 발효율금의 경우, 카레맛으로 정한 후 제품을 조사하였으며, 비파업의 경우, 제품컨셉이 color에 맞추어짐에 따라 green color 컨셉의 제품을 조사하였다.

나. 결과

(1) 스낵 및 제과업체 동향

- 2009년 스낵시장은 4천 4백억원 규모로 비스킷 다음으로 시장이 크며, 증가율도 파이 다음으로 높게 성장하는 시장임. 또한 2009년도 식품 및 식품첨가물 생산실적에 따르면, 과자의 국내 출하액 중 스낵은 49.3%를 차지하여, 비스킷(45.4%), 한과(5.3%)보다 높은 것으로 나타났다(5).
- 신제품은 주로 안전성 또는 튀기지 않은 저열량 제품 위주로 출시되는 경향을 보이는데 이는 소비자들이 멜라민 파동, 광우병 파동 등 일련의 식품안전사고를 겪으면서 안전성에 민감하게 되었다(5).
- 특히, 농심과 오리온은 각각 식약청의 HACCP 인증을 받음으로서 소비자에게 안전한 먹을거리를 공급하는 시스템을 갖추어 가고있다.

[그림1. 농심 자연지향 제품]



- 스낵을 포함한 제과시장의 상위 4개사 시정점유율은 롯데제과(39.4%)가 가장 높고, 다음으로 오리온(26.8%), 클라운제과(17.1%), 해태제과(16.7%) 순으로 나타났다(5).
- 과자생산 상위기업은 스낵을 포함한 비스킷, 파이, 껌, 캔디, 빙과 등 다양하게 생산하고 있으며 각 기업별 주요 스낵제품은 표2와 같다.

[표 2] 기업별 생산품목과 스낵 제품

품목	생산 품목	주요 스낵 제품명
롯데제과	비스킷, 껌, 캔디, 초콜릿, 빙과, 스낵, 기타	꼬깔콘, 치토스 등
오리온	스낵, 비스킷, 파이, 기타	포카칩, 오징어 땅콩 등
농심	스낵, 음료, 라이스, 냉동식품 등	새우깡, 바나나킥 등
크라ун제과	비스킷, 스낵, 파이, 캔디류	조리퐁, 콘칩 등
해태제과	비스킷, 스낵, 빙과, 냉동제품	맛동산 등
삼양식품	면, 유제품, 스낵, 기타	짬구, 별뿔빠이, 꽃게랑 등

출처 : 각 기업 홈페이지

- 2010년 12월 기준 전제 매출액 중 스낵 매출액 비중이 가장 높은 기업은 오리온, 크라운제과, 농심, 삼양식품, 롯데제과 순으로 나타났다.

(2) 스낵의 주원료

- 소재에 따라 소맥분, 옥수수, 쌀, 감자를 주원료로 설탕(정백당), 코코아가루, 탈지대두, 조미분 등의 원료가 부재료로 사용된다.
- 주원료 중 밀(소맥분), 옥수수(옥분), 팜유는 100% 수입하고 있으며, 쌀과 감자는 국내산과 수입산을 병행하고 있으며, 감자는 생감자와 반제품의 형태로 수입되는데, 국산 66%, 수입 34% 비중으로 수입되고 있다(5).

[표 3] 원료의 원산지 및 원산지별 비중(2010년 기준)

구분	주요원산지	원산지비중(%)	
		수입	국산
밀(소맥분 등)	미국	100	0
옥수수(옥분 등)	호주, 뉴질랜드, 미국	100	0
쌀(미분 등)	국내(이천), 태국	50	50
감자(생감자, 감자 펠렛)	국내(강원도), 미국, 호주	34	66
팜유	말레이시아	100	0

출처 : 2011년 2월 기업 설문조사

- 주원료를 대부분 수입산에 의존하고 있고 이에 따라 원료 선택의 제한을 받을 뿐 아니라 가격변동과 품질변화가 많은 실정이다.

(3) 스낵의 제형

- 국내 스낵의 제형은 갈수록 다양화되고 있으나 나누어 분류해보면 칩(모양 상관없이 얇은 상태)형태, 스틱형태, 구형태(링형포함), 기타형태로 분류할 수 있다.

[표4] 제과업체의 형태별 제품 수

제조업체 \ 제형	칩	스틱	구	기타
오리온	13	2	1	1
해태제과	6	4	3	2
크라운제과	2	6	4	4
롯데제과	4	4	2	1
농심	8	10	3	8
빙그레	2	1	-	1
삼양식품	-	-	-	3
합계	35	27	13	19

- 총 94 종류의 스낵 중 가장 많은 것을 차지하고 있는 것은 칩으로 35 종류였으며, 그 다음으로 스틱이 차지하고 있다. 이는 칩의 경우 칩 제품이 가지는 특유의 바삭 거림과 일반적인 형태로 소비자에 대한 거부감이 없어 가장 많은 제형을 차지하고 있다.

(4) 국내 카레 스낵

- 현재 시중에 판매되는 카레 스낵은 주요 제과업체에서 생산되는 2가지와 친환경소핑물인 생협에서 판매되는 1가지로 총 3종류가 있다.
- 해태제과의 ‘생생카레칩’의 경우는 감자를 얇게 슬라이스하여 기름에 튀겨낸 유당처리제품으로 꾸준히 판매되고 있으며 바삭한 식감을 가지며, 농심의 ‘비29’는 많은 소비자의 요구로 인해 중단되었다가 재생산된 제품으로 옥수수를 퍼핑하여 부드럽게 녹아내리는 식감을 지녔다. 생협의 ‘라이스 콘 스낵’은 친환경시장에서 나오는 유일한 카레스낵으로 ‘비29’와 비슷한 형태와 식감을 가지나 주원료의 차이가 있다.
- [표 5] 제품 중에서 소비자의 꾸준한 판매를 이루고 있는 것은 ‘생생카레칩’으로 스낵이 가지는 바삭거림과 씹힘성에 대한 만족도가 높은 것에 기인되는 것으로 보인다.

[표 5] 국내 카레 스낵에 대한 사항

제품사진			
제조회사	해태제과	농심	생협
제품명	생생카레칩	비29	라이스콘 스낵(카레맛)
중량(g)	116	50	40
칼로리(kcal)	680	265	-
제조방법	유탕처리제품	유처리제품	퍼핑제품
원료	감자(미국산), 혼합 식용유[팜올레인유(말레이시아산), 해바라기유(수입산)], 복합조미식품(카레맛시즈닝)	옥수수(호주산), 미강유(태국산), 팜유, 카레맛시즈닝(카레맛베이스, 치킨맛시즈닝분말, 설탕, 가수분해동물성단백분말, 분말유크림), 소맥분(밀), 정백당 등	무농약옥수수, 유기농현미, 참깨, 카레(무농약백밀가루, 생협카레분, 한우맛내기가루, 옥수수전분, 간장분말), 황토알카리소금, 유기스테비아분말
제형	감자칩	고리형 콘 스낵	고리형 콘 스낵
			
울금함유량 (mg/g)	10.68	2.14	35.53

(5) 국외 카레 스낵

- 카레는 인도에서 기원되었으나 17세기 서구로 넘어가면서 조리법의 변화와 그 나라에 입맛에 맞는 카레로 변하면서 전세계적인 음식이 되었다. 카레스낵의 경우도 여러 나라에서 다양한 형태로 출시되고 있으나 감자칩의 형태가 주를 이루고 있다.
- 감자칩을 얇게 슬라이스하여 유탕 또는 유처리하여 카레분시즈닝을 코팅한 형태가 가장 많았다.

[표6 국외 카레 스낵]

제품사진						
제품명	PRINGLES	TERRA	FINEST SELECTION CHIPS	Lays	Sticks& Twigs	MAX
제조국	미국, 말레이시아	미국	미국	멕시코	미국	영국
제형	칩	칩	칩	칩	스틱	칩

(6) Green color 제품조사

(가) 원료에 따른 분류

원료명	제품명 (판매원)	제품유형	제품사진
녹차	빅샌드 (홈플러스)	과자류	
녹차	웰빙연양갱 (크라운제과)	제과류	
	투게더 (빙그레)	빙과류	
	갸또 그린티 (롯데)	제과류	

	그린티라떼 (베지밀)	두유	
클로렐라	요미요미 유기농쌀과자 (매일유업)	과자류	
	클로렐라컵면 (뉴트리)	라면	
	클로렐라엔요 (매일유업)	발효유	

(나) 포장디자인 color에 따른 분류

제품사진		맛
		양파
포카칩(농심)	프링글스(P&G)	
		파인애플
롯데샌드(롯데)		
		야채
야채크래커(롯데)	야채타임(빙그레)	

		사과
후렌치파이(해태)	그랑셀(청우)	
		오징어
오징어칩(해태)	오징어아삭(청우)	

다. 결론

국내 주요 제조업체의 제형을 살펴본바 칩 형태가 가장 많은 비중을 차지하고 있었으며 카레 스낵의 경우도 칩 형태의 만족도가 높은 것으로 평가되어 칩 형태의 제형으로 개발하였다. 제품 컨셉이 컬러별 제품으로 발효율금의 경우 yellow color를 구현하는 원료로 카레를 사용하였으며, 비파엿은 green color 구현을 위해 클로렐라를 사용하여 유기농 건강 지향식품을 개발하였다.

2. 유기농스낵 형성 곡물 원료의 개발 및 선발

가. 방법

시험에 사용되는 유기농 소재는 스낵에 사용되는 소재를 중심으로 조사되었고, 지역에서 생산되는 소재의 생산량, 재배면적은 국가 통계자료를 인용하였으며, 유기농 스낵가능 소재의 영양적 측면, 기능적 측면에 고려하여 선정하였다.

나. 결과

(1) 유기농스낵 형성 곡물 원료의 개발 및 선발

본 과제에서 세부주관인 산들촌에서는 유기농 과자와 스낵류를 생산하여 어린이 대상의 제품을 개발하고 있어 유기농관련 재료와 지역적 생산과 관련하여 특히 쌀을 주재료로 하는 제품개발을 하고자 하여 재료선정을 하였다.

미과제품의 주원료인 쌀은 식물중의 벼의 열매를 탈곡, 도정한 것으로서 식품의 원재료로 이용된다. 쌀, 즉 벼의 원산지는 동남아시아, 특히 인도, 중국 남부지역으로 전해지며 최초로 재배된 것은 기원전 2000~3000년경으로, 기후 조건이 가장 적당한 열대 몬순지역 즉 동남아시아 일대에서 가장 많이 재배하고 있으며, 세계의 생산량의 약 90%가 이 지역에 집중되어 있다. 벼의 열매, 즉 쌀은 대부분이 주식용으로 이용되나 그 밖에도 쌀과자, 술, 떡, 과자, 엿, 간장, 된장, 식초 등을 만드는데 이용된다.

쌀의 영양학적 성분비를 보면 쌀은 현재까지 여러나라에서 재배되면서 많은 개량을 거쳐와서 그 종류가 많이 있으며 품종이나 나라에 따라 단위면적당 생산량과 특성은 다

소 차이가 있다. 일반적인 우리나라 쌀의 경우로 볼 때 그 영양학적 성분비는 표와 같다. 쌀을 도정할 때 껍질, 호분층, 배아 등이 떨어져 나가 특히 이들 중에 함유량이 높은 지방, 비타민B1의 양이 감소한다.

쌀의 영양학적 측면에서 현미를 이용한 식품의 개발이나 그 이용법은 연구의 여지가 많다. 함유량이 많은 것은 아니지만 알부민, 글로부린, 글루테린, 플로라민 등으로 구성되는 단백질은 쌀이 주요 단백질 공급원이 되고 있는 아시아인의 식생활에 주요한 의의를 갖는다. 또 소량의 지질 중에는 Linoleic Acid, Oleic Acid, Palmitic Acid 등의 불포화 지방산이 주요 구성 지방산이므로 대단히 중요하다. 특히 Linoleic Acid는 전체 지질의 50%정도를 차지한다. 당류로는 주로 Amylose와 Amylopectin이 거의 차지하며 이들 성분의 차이에 의해 멥쌀과 찰쌀로 구분되고, 밥 등의 취반적성이나 식미를 좌우한다. 특히 비타민은 Branch 다수이며 비타민은 주로 배아부에 집중되어 있어서 도정정도에 따라 함유량이 크게 차이 있다.

[스낵에 사용되는 재료의 영양소 비교]

	칼로리	수분 %	단백질 g	지질 g	탄수화물		회분	비타민		나이아신 mg
					당질	섬유소		B1	B2	
현미	338	15.5	7.4	3.0	71.8	1.0	1.3	0.54	0.06	4.5
정백미	352	15.5	6.8	1.3	75.5	0.3	0.6	0.10	0.03	1.4
소맥분	366	14.5	11.7	1.8	71.4	0.2	0.4	0.05	0.05	0.9
식빵	260	38	8.4	3.8	48	0.1	1.7	0.07	0.07	0.7

(2) 유기농쌀가루

이 중에서 유기농 쌀가루의 영양성분을 보면 아래표와 같으며 1회제공량에 대하여 탄수화물이 전체의 42%를 차지하고 이중 식이섬유가 15%이다.

Nutrition Factor	
158g 제공량	
Calories 578	
% Daily Value	
Total Fat 2g	3%
Saturated Fat 1g	3%
Trans Fat	
Cholesterol	0mg
Sodium 0mg	0mg
Total Carbohydrate 127g	42%
Dietary Fiber 4g	15%
Sugar 0g	
Protein 9g	
Vitamin A	0%
Vitamin C	0%
Calcium	2%
Iron	3%

아래 전체 제공되는 량의 칼로리 분포를 보면 1회제공량이 일일전체 칼로리의 29%

에 해당하며 각기 탄수화물, 단백질, 지방순으로 칼로리의 함유 비율을 보이고 있다. 그러나 유기농 쌀가루에서 절대적인 것은 탄수화물로부터 제공되는 량이 524 Kcal/578 Kcal로서 제일 크다.

Amounts Per	Selected Serving	%DV
Calories	578 (2420 kJ)	29%
From Carbohydrate	524(2194kJ)	
From Fat	18.8(78.7kJ)	
From Protein	35.9(150kJ)	

아래의 성분 중에 단백질과 amino acid의 성분을 보다 자세히 보면 전체 일일 필요 calory 부분의 19%를 차지하고 있으며, 쌀의 특질인 Lysine의 함량과 methionine의 함량이 낮고, cystine이 낮은 것을 볼 수 있지만 다른 아미노산의 경우 충분한 함량을 보이고 있다.

Protein & Amino Acids		
Amounts Per	Selected Serving	%DV
Protein	9.4g	19%
Tryptophan		114mg
Threonine		332mg
Isoleucine		386mg
Leucine		771mg
Lysine		327mg
Methionine		228mg
Cystine		169mg
Phenylalanine		501mg
Tyrosine		496mg
Valine		550mg
Arginine		815mg
Histidine		235mg
Alanine		525mg
Asparti acid		867mg
Glutamic acid		1733mg
Glycine		422mg
Proline		439mg
Serine		490mg
Hydroxyproline~		

유기농 쌀가루에 함유하고 있는 지방은 전체 제공되는 양이 일일 필요 에너지의 3% 밖에 차지하고 있지 않으며, 조성은 다음과 같다.

Fats & Fatty Acids		
Amounts Per Selected Serving %DV		
Total Fat		2.2g 3%
Saturated Fat	0.6g	3%
MonounsaturatedFat	0.7g	
PolyunsaturatedFat	0.6g	
Totaltransfattyacids~		
Totaltrans-monoenoicfattyacids~		
Totaltrans-polyenoicfattyacids~		
TotalOmega-3fattyacids	106mg	
Total Omega-6 fatty acids	495mg	

유기농 쌀가루의 무기성분의 경우, 마그네슘, 인, 망간과 셀레늄 등이 풍부하게 들어 있어 무기물질의 충분한 보급이 가능한 소재로 평가된다.

Minerals		
Amounts Per Selected Serving		%DV
Calcium	15.8mg	2%
Iron	0.6mg	3%
Magnesium	55.3mg	14%
Phosphorus	155mg	15%
Potassium	120mg	3%
Sodium	0.0mg	0%
Zinc	1.3mg	8%
Copper	0.2mg	10%
Manganese	1.9mg	95%
Selenium	23.9mcg	34%
Fluoride~		

(3) 유기농 현미가루

현미와 백미의 차이를 설명할 때 현미는 살아있는 쌀로서 벼의 왕겨만 한번 벗겨낸 쌀을 현미라고 하고 백미는 열 번 이상 벗긴 쌀로 정미소에서 일괄적으로 도정 한다. 이 때, 쌀의 영양분이 많은 부분이 사라지고 백미는 현미의 30% 정도의 영양분이 남는다. 나머지의 영양분은 쌀겨와 쌀눈으로 유실되어지고 있어, 현미가 영양학적으로 매우 높은 영양가를 보여주고 있다.

현미의 표준적 화학조성을 보면 수분 15.5%, 단백질 7.4%, 지질 3%, 당질 71.8%, 섬유소 1%, 무기질 1.3%, vitamin B1 0.54mg/100g 쌀로 당질이 대부분을 차지하고 단백질이나 지방은 적은 편이며, vitamin B1은 많은 편이다. 현미는 백미에 비하여 저장성이 좋고 충해나 미생물의 피해가 적으며, 또한 도정을 한 백미에 비하여 현미는 영양적인 손실이 적으며, 지방, 단백질, vitamin B1의 함량이 풍부하다.

현미의 씨눈속에는 phytic acid가 백미에 비하여 6배정도, 단백질, 지방, 탄수화물외에 섬유질과 vitamin B1, B3, B6, B15, B17, vitamin E, C, pantothenic acid, choline, potassium, calcium, sodium 등의 함량이 백미에 비하여 높다. 그러나 이에 비하여 영양

소간의 결합을 유도하는 킬레이트 유도인자도 함유하고 있다.

[화성품종의 현미, 백미의 무기물 함량비교]

Mineral	백미	현미
Ca	10.7±0.5	4.4±0.3
P	91±4	229±13
Fe	0.7±0.6	1.9±0.5
Na	10.5±2.6	14.5±2.9
K	106±3.0	251±6.0
Zn	1.4±0.0	2.3±1.0
Mg	33.3±1.2	118.8±1.5

도정에 따른 전체적인 무기질 함량의 변화를 보면 인, 철, 나트륨, 칼륨, 아연, 마그네슘의 경우 도정률이 증가할수록 함량이 감소되고 있는 반면, 칼슘은 도정률이 증가할수록 함량이 증가하는 경향을 보이고 있다.

백미의 무기질 함량의 크기순으로 배열하면 칼륨>인>마그네슘>칼슘>나트륨>아연>철 순으로 많은 함량을 보이고 있고, 현미의 경우 칼륨>인>마그네슘>나트륨>칼슘>아연>철 순으로 나타나고 있으며 한국인영양권장량에서 제시한 식품영양가표에서 제시한 자료에는 백미가 칼륨>인>칼슘>나트륨>아연>철 순으로 현미는 인>칼륨>철>아연>나트륨>철 순으로 함유량이 제시되어 백미는 식품영양가표에 제시한 것과 같으나 현미의 경우 재배지나 품종별로 차이가 있음을 예측할 수 있다.

유기농 현미와 백미의 지방산조성에서 백미는 포화지방산이 20-33% 범위이고 단일불포화지방산(MUFA)가 34-44%, 다중불포화지방산(SFA)가 24-42%를 차지하였고, 현미의 경우 포화지방산이 19-21%, 단일불포화지방산이 39-45%, 다중불포화지방산은 33-40%로 백미와 차이를 보인다.

현미의 경우 쌀 품종별로 포화지방산, 불포화지방산의 비율에 있어서 차이가 없는 것으로 보아 백미의 경우 많은 차이를 보이는데 이는 쌀 외층과 배유부분의 지방산 분포는 품종별로 다소 차이가 있는 것으로 예상된다.

한편 조지방에서 백미의 조지방 함량이 현미의 약 1/5정도를 보이는데 도정률의 증가에 따라 조지방이 감소하는 것을 알수 있었고, 한국인 영양권장량의 식품영양가표에서 제시한 현미와 백미의 지방 함량은 각각 2.7g/100g, 0.4g/100g으로 백미와 현미 중 비슷한 지방함량을 보이고 있으나 현미가 적은 것으로 판단된다.

(4) 유기농 수수가루

수수(*Sorghum*, *Sorghum bicolor* L. Moench)는 외떡잎식물 벼목 화본과의 한해살이풀로 쌀, 보리, 밀, 옥수수에 이어 중요한 잡곡의 하나이며, 주로 식용으로 소비된다.

열대아프리카가 원산지인 건조지대에서 가장 많이 재배되고 용도에 따라서 곡용수수(grain sorghum), 단수수(sorgo), 소경수수(장목수수; broom-corn)가 재배되고 있으며, 아시아, 아프리카 및 중미 지역에서 재배되고 있는 주요 식량자원이다. 수수에는 식이섬유, phenolic compounds 등의 유효성분이 다량 함유되어 있다. Phenolic compounds의 플

라보노이드, 탄닌, 페놀산 등으로 구성되어 있고 대부분 플라보노이드로 알려져 있으며, 최근 수수의 생리적 기능성에 관한 연구들이 보고되고 있다. 수수에 함유되어 있는 페놀 화합물은 강한 항돌연변이원성의 활성이 있는 것으로 보고되고 있으며, 수수 추출물은 강력한 항산화활성을 나타내는 것으로 알려졌다.

그 외에 수수의 기능성에 대한 연구로는 25종의 수수를 메탄올 추출하여 순차적 용매분획한 후 항산화 및 항균활성을 검정한 연구, 수수 안토시아닌의 항산화활성을 측정 한 연구, 수수에 함유되어 있는 페놀산, 플라보노이드, 탄닌 등의 페놀성분에 대한 연구 보고가 있다.

[수수에 함유된 단백질의 아미노산 조성]

Protein & Amino Acids	
	g/100g protein
Protein	100g
Tryptophan	0g
Threonine	3.48g
Isoleucine	2.65g
Leucine	11.79g
Lysine	2.22g
Methionine	1.79g
Cystine	1.50g
Phenylalanine	4.45g
Tyrosine	3.90g
Valine	3.85g
Arginine	4.04g
Histidine	3.54g
Alanine	8.84g
Aspartic acid	7.66g
Glutamic acid	19.81g
Glycine	3.66g
Proline	8.77g
Serine	5.44g

유기농 수수의 경우 위의 표에서 보는 바와 같이 glutamic acid와 leucine 그리고 alanine, proline순으로 많은 함량을 보이고 있으며 tryptophan은 수수에 보이지 않는 아미노산으로 나타나고 있다.

2011년 통계에 따르면 전남 지역에서 생산되는 유기농 수수는 55,117㎡에 년 13.4톤이 생산되고 있어 충분한 공급이 가능하고 대부분이 유기농 매장에 소량씩 판매되고 있어, 계약재배를 통한 농가소득의 안정화와 지속적 산업화가 가능하다. 수수의 도정부위별 메탄올 추출물의 총 polyphenol 함량을 hull, bran 및 grain에서 각각 30.57±0.40, 61.47±0.45 및 3.40±0.27 mg/g의 함량을 보여 bran과 hull에 폴리페놀이 다량 함유되어 있는 것으로 조사되었다.

Flavonoid는 주로 anthocyanidins, flavonols, flavones, catechins 및 flavanones 등으로 구성되어 있으며, 그 구조에 따라 특정 flavonoid는 항산화 및 항균성 등 다양한 생리활성을 갖고 있는 것으로 보고되고 있다. 도정부위별 총 flavonoid 함량은 hull, bran 및 grain에서 각각 14.47±0.55, 15.71±0.52 및 4.61± 0.47 mg/g의 함량을 보여 bran과 hull에 flavonoid가 다량 함유되어 있는 것으로 조사되었다.

Tannin은 차의 가장 중요한 성분의 하나로 차의 맛, 향기 및 색에 깊이 관여하며, 여러 가지 생리작용을 가지는 성분으로 알려져 있으며 도정부위별 총 tannin 함량은 hull, bran 및 grain에서 각각 13.37 ± 1.03 , 47.25 ± 0.66 및 2.22 ± 0.33 mg/g의 함량을 보여 bran과 hull에 탄닌이 다량 함유되어 있는 것으로 조사되었다.

(5) 유기농 보리

보리는 세계적으로 많이 소비되는 곡물 중에 하나이며, 단백질, 지방 및 무기질 등의 영양성분을 고르게 함유하여 영양학적으로 매우 우수하다. 보리는 껍질이 잘 분리되어 식용으로 사용하는 쌀보리(naked barley)와 껍질이 분리되지 않아서 사료로 사용하는 겉보리(hulled barley)로 나눌 수 있으며, 쌀보리는 다시 아밀로스와 아밀로펙틴의 함량에 따라서 찰보리(glutinous barley, waxy barley)와 메보리(non waxy barley)로 나누는데, 찰보리는 메보리보다 아밀로펙틴의 함량이 높은 특성을 가지고 있으며, 취반특성과 식감을 개선되어 소비자들이 식용으로 주로 이용된다. 최근에는 보리에 존재하는 β -glucan이 혈당상승 억제 및 콜레스테롤 저하와 같은 기능이 밝혀지면서 기능성 식품소재로서의 이용이 증가하고 있으나, 보리에 함유된 phytic acid와 전분의 강한 결합구조로 인하여 관능성 또는 식감이 떨어지는 단점이 있다.

보리를 발아시키면 phytic acid와 전분이 분해되어 식감과 소화성을 개선할 수 있을 뿐만 아니라 amylase, protease, phytase, β -glucanase 등의 다양한 효소들에 의해서 γ -aminobutyric acid(GABA), 유용 아미노산, arabinoxylan, vitamin E 등의 다양한 생리활성 물질들의 함량을 증가시킬 수 있어서 발아는 보리의 기능성과 관능을 증가시키기 위한 가공처리 방법이라 할 수 있다.

유기농 보리의 경우 전남지역에서 283,497.6㎡에서 년 117.466톤의 보리가 생산되어지고 있으며 대부분이 유기농매장과 생식제조, 선식제조의 원료로 사용되어지고 있으며 충분한 판매가 이뤄지고 있지않아 재배면적이 몇 년째 소폭의 상승을 이루고 있는 현실이며 유기농 과자의 생산에 소비되어 진다면 적절한 소비처로 판단되어지고 건강기능식의 높은 기능적 특성 때문에 제품에 적용이 매우 긍정적이다.

여러 생리활성 물질 중에서도 비단백질 구성 아미노산의 일종인 GABA는 glutamate decarboxylase(GAD)의 탈탄산 작용에 의해 glutamic acid로부터 전환되며, 혈압상승, 혈중 콜레스테롤 및 중성지방 증가 억제, 뇌의 혈류 개선, 항비만, 항불안 및 통증 완화 등의 다양한 생리활성을 가지고 있어 기능성 식품소재로 많이 이용되는 물질이다.

일반적으로 곡물의 발아 과정에서는 GABA 함량이 증가하며, GABA의 생성은 수분, 온도, 칼슘제제, 키토산 제제, glutamate, 기계적 자극, 산소결핍 등의 외부적 환경요인을 조절하여 증가시키는 방법들이 보고되었다. 보리는 Ca 함량이 높아서 일반적으로 발아 현미보다 발아 보리에서 GABA의 생성 효율이 높은 것으로 알려져 있다.

[보리의 도정에 따른 영양성분]

	Crude protein(%)	Crude fat(%)	Crude ash(%)
Naked barley(쌀보리)	12.0±0.1	6.2±0.1	1.9±0.1
Hulled barley(겉보리)	11.8±0.1	5.8±0.1	1.7±0.2
Glutinous barley(찰보리)	12.5±0.01	7.9±1.1	1.7±0.1

[보리도정에 따른 무기성분의 함량변화]

	Mineral contents(mg/100g)								
	Na	Mg	K	Ca	Fe	Cu	Zn	P	Total
Naked barley (쌀보리)	27.6±1.0	135.0±0.5	372.1±0.9	74.5±8.2	6.8±0.1	0.4±0.0	3.3±0.1	331.4±4.8	951.1±15.8
Hulled barley (겉보리)	25.0±0.2	116.0±0.7	284.2±2.4	65.3±4.3	6.5±0.2	0.3±0.0	2.2±0.0	225.4±2.5	699.9±7.8
Glutinous barley(찰보리)	12.7±0.1	148.0±0.5	305.2±2.8	57.2±4.3	4.4±0.1	0.3±0.0	3.1±0.1	346±2.4	864.2±8.4

[보리도정에 따른 지방조성의 변화]

	Composition(%)					
	Palmitic acid	Stearic acid	Oleic acid	Linoleic acid	α -Linolenic acid	Total
Naked barley (쌀보리)	31.2±0.1	1.3±0.1	10.6±0.0	52.1±0.2	4.8±0.1	100
Hulled barley (겉보리)	22.7±0.1	1.2±0.0	13.5±0.2	56.9±0.1	5.7±0.1	100
Glutinous barley(찰보리)	26.8±0.1	1.1±0.0	13.2±0.1	54.6±0.1	4.3±0.1	100

(6) 기타

유기농 밀은 전남지역 통계를 보면 1,204,780.4㎡에서 년 437.603톤이 생산되고 있으며, 우리밀 산업을 이끌고 있어 무척 고무적이다. 그러나 유기농 밀은 해외에서 수입되는 밀과 큰 차별화가 없고 유기농 밀도 많이 수입되어지고 있는 단계이며, 본과제와 관련하여 서두에서 설명한 바와 같이 유기농 쌀을 중심으로 스낵의 제조와 밀의 글루텐을 대표로하는 단백질로부터 유래되는 것으로 의심되는 알러지나 셀리악병에 대한 의구심을 줄이기 위하여 본 과제에서 제외하였다.

이외에 유기농의 표시를 위해서는 전체 첨가물에 5%미만만을 사용하여야 하므로 모든 첨가물의 유기농 확인과 비유기농 첨가물을 최소화 하여야 한다. 또한 어린이의 기호를 고려하여 감미에 대한 첨가도 고려하여야 하므로 설탕에서도 유기농 사용을 권장하여야 하며 유기인증제품의 사용이 이뤄져야 할 것이다.

다. 결론

전남지역에서 유기농 및 친환경 농업이 크게 확장하고 있어 유기농재료의 공급이 원활

해 졌고, 안전한 먹거리에 대한 요구가 높아져 수요가 증가하고 있다. 소재의 수급과 유기농소재의 경제성, 건강기능성을 고려하여 쌀을 주재료로 하는 스낵이 적합하며 또한 쌀가루, 현미, 찹쌀가루를 주요 재료로 선정, 스낵의 적합물성을 조절하고 여기에 기능적 측면에서 수수나 보리의 첨가가 적합할 것으로 판단된다.

3. 유기농 스낵의 비유탕, 플레이크 타입의 개발 및 최적 제조공정 개발

가. 방법

- 제조공정의 선정은 제조방법에 따라 선정하였는데, (주)산들촌의 보유장비와 원하는 제품을 고려하여 선정하였다.
- 첨가되는 원료의 선정 : 비파엽 추출물(분말기준)을 스낵베이스에 스낵의 흐름성과 성형성의 영향을 크게 미치지 않는 첨가되는 량을 정하고, 또한 기호에 크게 미치지 않는 조건을 탐색하였다.
- (주) 산들촌 보유 장비기준으로 파칭시스템의 맞추어 적절한 정도에 적합한 비파엽추출물의 첨가량을 결정하였다. 스낵 firmness는 측(Sun Co. CR- 200D, Japan) 이용하여 측정하였다. 스낵은 5mm 와 7mm로 제조하였으며, 스낵을 파칭 후 포장(지퍼백에 제조 즉시 넣어 냉장보관)한 후, 사용시는 실온에서 지퍼백을 30분간 방치 후 firmness 측정하였으며, 측정조건은 head speed가 200 mm/min, 변형율은 50%로 하였다.
- 비파엽추출물의 첨가량 결정에서 색도보정을 위한 색소성분 첨가량의 결정을 위해 간이 기호도(9점 척도법)를 연구자 중심으로 실시하여 결정하고, 전체적인 경제적 증가분을 고려하여 최종선정 하였다.

나. 결과

스낵의 제조에는 크게 6가지로 나눌수 있는데, 방법은 아래와 같다. 본 방법 중에서 (주)산들촌에서 구입하고 상용하고자 하는 장비를 구성을 확인하였다.

(1) 압연성형스낵 (Rolling snack)

원료계량 -> 배합 -> 압연(rolling) -> 숙성-> 유탕 -> 씨즈닝(seasoning)
-> 포장

(2) 압출성형스낵(Extruding snack)

원료계량 -> 배합 -> 압출-> 저장 -> 1차건조 -> 코팅 (coating) -> 2차건조 -> 포장

(3) 퍼핑 스낵 (Puffing snack)

원료계량 -> 배합 -> 퍼핑(puffing) -> 코팅 (coating) -> 건조 -> 포장

(4) 포테이토칩 (Potato chip)

Natural Potato chip 생감자로 원료 계량 -> 탈피 -> 수세 -> 절단 -> 유탕
Simulated Potato chip 감자가루로 반죽 -> 압연 -> 유탕

(5) 라이스스낵 (Rice snack)

쌀을 원료 -> cooking 및 성형 -> oven으로 roasting

(6) 콘 칩 (Corn chip)

옥수수로 마사 (masa)를 제조 -> backed & frying 및 압출성형

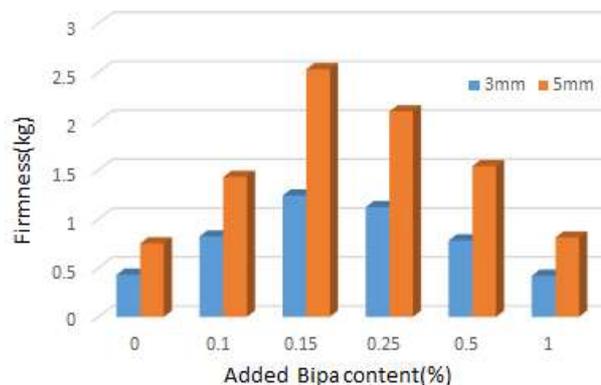
본 장비에서 확인되는 점은 압출성형과 비유탕 처리인 파칭(parching)을 이용한 스낵의 제조방식과 이후 외면에 감미성분을 코팅하는 방식으로 제조되는 시스템을 구축하고 있다. 결론적으로 압출성형방식과 파칭(볶는 단계)에 적합한 제조공정을 가지고 있어 일정정도의 경도와 유탕처리에 따르는 유지에 첨가로 상승하는 칼로리 과다는 피할 수 있다.

비파엽추출물의 첨가량의 결정은 기존 스낵제조의 베이스에 첨가될 수 있는 비파추출물의 양을 결정하는데 1차년도 발효율금 스낵의 제조에서도 이와 같은 조성의 베이스 조합이 사용되어졌으며, 이러한 조성에 발효율금의 양을 달리하여 기호도가 높은 조성을 찾았고 또한 제조과정을 고려하여 제조과정에서 파손 및 제품화과정에 문제점이 없는 조성을 선택하였다.

[표 1. 스낵제조에 사용된 베이스 조성물]

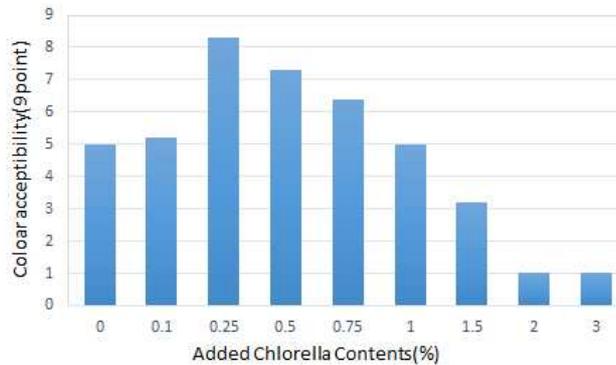
재료명	A 함량비(%)	B 함량비(%)
유기농쌀가루	58.73	57.34
콘그릿츠	7.83	7.65
고구마전분	7.83	7.65
식이섭유	1.57	1.53
코코넛파우더	1.17	1.15
식염	0.78	0.76
소계(펠릿)	78.3	76.45
백포도농축액	16.18	16.82
해바라기유	5.15	5.35
해조류분말	0.37	1.38
소계(코팅액)	21.7	23.55
합계	100%	100%

위의 기본조성에 비파엽추출분말을 기본 스낵베이스 대비 0-1% 까지의 첨가량에 의해 경도의 변화를 조사하였는데 3mm와 5mm 모두 기본 베이스 대비 0.15%까지는 경도가 비례하게 증가하였고 그 이후 농도에서는 경도가 급격하게 감소하는 경향을 보이고 있어 첨가량에 의해 물성이 크게 변화하는 것을 알 수가 있었다. 한편 시편의 두께가 5mm의 경우, 경도가 크게 증가하여 스낵으로서 기호도가 크게 떨어지는 것을 시험관계자 및 1-2 세부 연구자 모두 동의하여, 시편의 두께도 3mm로 결정하였다.



[그림 1. 비파엽추출물 첨가량에 따른 경도의 변화]

비파엽추출물의 첨가량에 클로렐라 분말을 첨가하였는데 비파엽추출물은 성상이 짙은 연두색을 나타내고 있으나 비파엽추출물의 색이 녹색을 띠고 있어 색도의 보정을 위하여 클로렐라 분말을 첨가하였다. 클로렐라 분말의 첨가에 따른 1-2, 1-3 세부의 연구자간의 간이 녹색에 대한 기호도를 측정하여 결정하였다. 아래 제시된 표와 같이 연구자 중심으로 녹색을 보강하기 위한 간이 기호도 조사였으며, 9점 척도법에 따라 측정하였고 측정결과 0.25%에서 녹색에 대한 높은 기호도를 보여줬으며, 전 시료에 대하여 첨가하는 기준으로 삼았다.



[그림 2. 클로렐라 첨가량에 따른 녹색에 대한 기호도의 변화]

비파엽추출물 첨가량과 클로렐라 첨가량을 경제적인 측면에서 업체에 문의해본 결과, 실제 생산원가에 미치는 영향이 약 3-5% 이하의 미만으로 판단되어져 위에 대한 시험결과를 반영기로 하였다.

다. 결론

유기농스낵을 제조하기 위하여 공정선택과 최적화 과정을 수행하였다. 현 (주)산들촌의 보유장비와 친환경 건강 유기농스낵의 컨셉에 맞게 공정의 선택은 압출공정에 플레이크 타입의 생산과정이 적절하였고, 플레이크의 두께는 0.5mm보다는 0.3mm에서 경도가 적정하게 유지되는 것을 알 수 있었다. 한편, 건강소재인 비파엽추출물을 0-1%의 농도로 기존 스낵 베이스에 첨가하였고 0.15%의 비파엽추출물에서 경도를 적절히 유지하는 것으로 평가되었다.

첨가 비파 추출물의 경우 0.15%로는 색보정이 필요한바, 녹색의 색을 나타내는데 클로렐라 분말을 선정하여 0-3%까지 농도를 달리하여 9점 척도법의 간이 시험을 실시하여 색에 대한 선호도를 조사하였다. 0.25%에서 적합한 평가가 나왔고 그 이상에서는 진한 녹색 컬러로 오히려 거부감과 식감에 대한 나쁜 평가를 내렸다. 이하의 농도에서는 정확한 색의 발현이 부족하다는 평이 지배적이며 0.25%를 선정하였다. 한편 비파엽추출물과 클로렐라 분말의 농도가 원가에 미치는 영향이 비교적 미미하여 본 농도를 최종결정하여 시제품에 반영하였다.

4. 유기농스낵 제조공정표준화

가. 방법

본 제품은 Twin Screw Extruder를 이용하여 사각 모양의 생지를 사출한 후 rolling,

cutting, drying, cooling 공정을 거쳐 Pellet을 제작하고 숙성을 시킨 후 parching, coating, packing 공정을 거쳐 완제품을 만든다.

(1) 발효율금 함유 유기농스낵

제품명	유기농와이칩 (발효율금함유)	제품유형	과자류
품목허가	유처리식품	특정성분 함량	유기농쌀54%, 유기농보리20.13%, 유기농백포도농축액 10.69%, 카레분3.07% (발효율금함유)
표시중량	30g	바코드	8809184830883
소비자가격	1,450원	포장재질	PE
유통기한	제조일로부터 9개월	비닐 규격	
주원료	유기농쌀, 유기농찹쌀, 유기농보리, 유기농수수, 유기농백포도 농축액, 유기농고올레산해바라기유, 카레(발효율금포함)		

(2) 비파엽추출물 함유 유기농스낵

제품명	유기농지칩 (비파엽추출물함유)	제품유형	과자류
품목허가	유처리식품	특정성분 함량	유기농쌀 62.81%, 유기농백포도농축액 13.28%, 유기농옥수수 8.22%, 비파엽추출물0.15%, 클로렐라 0.22%
표시중량	30g	바코드	8809184830890
소비자가격	1,450원	포장재질	PE
유통기한	제조일로부터 9개월	비닐 규격	
주원료	유기농쌀, 유기농옥수수, 유기농찹쌀, 유기농백포도농축액, 유 기농해바라기유, 클로렐라, 비파엽		

나. 결과

공정순서와 사용설비를 결정하고 배합비 확인 및 가동 전 점검사항, 세부공정조건 및 공정검사기준, 완제품규격 및 검사기준을 표준화하였다.

(1) 공정순서

배합→ 압출→ 압착→ 절단→ 건조→ 냉각→ 1차선별→ 숙성→ 파칭→ 맛내기→ 냉
각→ 2차선별→ 금속검출기→ 포장→ 출하

(2) 사용설비

설비명	규격	수량	비고
배합기	리본형 믹서(300kg/1배합)	1EA	
익스트루더	트윈 스크류형(300kg/1hr)	1EA	
- 압착롤러		1EA	
- 회전컷팅기		1EA	
건조기	열풍 알루미늄 벨트형	1EA	
* 펠렛 작업 완료 / 2~3일 숙성 과정 진행			
파칭기	고열 소금 파칭기(300kg/1hr)	1EA	
코팅기	드럼식 분말코팅기(300kg/1hr)	1EA	
금속 검출기	금속성 이물검출기	1EA	
전자저울	자동계량방식(80ea/1m)	1EA	
자동포장기	자동삼면포장기(60ea/1m)	1EA	



Extruder



압출부분



건조기



파칭기



코팅기



자동포장기

(3) 배합비

(가) 발효율금 함유 유기농스낵

재료명	함량비(%)	비고
유기농쌀	54.00%	유기농
유기농옥수수	20.13%	유기농
유기농카레(발효율금 포함)	3.70%	유기농
유기농수수	1.84%	유기농
유기농보리	1.84%	유기농
감자전분	1.68%	일반
식이섬유	1.68%	일반
천일염	0.59%	일반
소계(펠릿)	85.46%	
유기농백포도농축과즙	10.69%	유기농
유기농고올레산해바라기유	3.85%	유기농
소계(코팅액)	14.54%	
합계	100%	

(나) 비과엽추출물 함유 유기농스낵

재료명	함량비(%)	비고
유기농쌀	62.81%	유기농
유기농옥수수	8.22%	유기농
유기농잡쌀	6.65%	유기농
감자전분	1.58%	일반
식이섬유	1.47%	일반
코코넛분말	0.79%	일반
천일염	0.47%	일반
클로렐라	0.24%	일반
비과엽추출물	0.17%	일반
과래분말	0.05%	일반
멸치분말	0.04%	일반
소계(펠릿)	82.49%	
유기농백포도농축액	13.28%	유기농
유기농고올레산해바라기유	4.05%	유기농
멸치해조류분말	0.18%	일반
소계(코팅액)	17.51%	
합계	100%	

(4) 가동 전 점검사항

구분	점검 사항	점검 내용	비고
원재료	원재료	입고확인 및 검사, 계량	원산지 및 입도 확인 입고시 업체제시 규격서 확인 사용전 육안입도 및 색상확인
부재료	플라스틱상자 스티커	청소상태 표시사항	
기계 부분	Extruder Steam 에어 컴프레서 보일러 냉각기 건조기 파칭기 드럼코팅기 선별컨베이어 금속검출기 자동계량기 자동포장기	정상작동 유무 및 예열 정상작동 유무, 온도 및 압력 정상작동 유무, 압력 정상작동 유무, 스팀압력 및 순환 정상작동 유무, 온도 및 순환 정상작동 유무, 온도 및 건조시간 정상작동 유무, 온도 및 작동시간 정상작동 유무 정상작동 유무 정상작동 유무, 체, 자석 정상작동 유무 정상작동 유무	냉각수 및 스팀압력 정상작동여부 확인 정상작동여부 확인 정상작동여부 확인 정상작동여부 확인
청소 확인	전 생산 라인	이물질	

(5) 세부공정 조건 및 공정검사기준

검사	↔	원부재료입 고	입고된 원부재료는 제품 검수 후 사용																																				
		원료송풍	150kg/1배합, 혼합시간 : 15~20분 배합당 사용시간 : 27분(204kg/hr 투입시)																																				
		사출	<p>Extruder parameter</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>구분</th> <th>측정치</th> <th>세팅치</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Die</td> <td></td> <td>0.7*20mm</td> </tr> <tr> <td>Die Hole</td> <td></td> <td>6EA</td> </tr> <tr> <td>Feed(Hz)</td> <td>6.3</td> <td>6.5</td> </tr> <tr> <td>RPM(Hz)</td> <td>42</td> <td>41</td> </tr> <tr> <td>AMP(A)</td> <td>61</td> <td>73</td> </tr> <tr> <td>Pressure</td> <td>58</td> <td>77</td> </tr> <tr> <td>Water EXT</td> <td>0.66</td> <td>0.62</td> </tr> <tr> <td>Temp1 °C</td> <td>50~60°C</td> <td>70~80°C</td> </tr> <tr> <td>Temp2 °C</td> <td>35~45°C</td> <td>40~50°C</td> </tr> <tr> <td>Temp3 °C</td> <td>20~30°C</td> <td>30~40°C</td> </tr> <tr> <td>Temp4 °C</td> <td>20~30°C</td> <td>20~30°C</td> </tr> </tbody> </table>	구분	측정치	세팅치	Die		0.7*20mm	Die Hole		6EA	Feed(Hz)	6.3	6.5	RPM(Hz)	42	41	AMP(A)	61	73	Pressure	58	77	Water EXT	0.66	0.62	Temp1 °C	50~60°C	70~80°C	Temp2 °C	35~45°C	40~50°C	Temp3 °C	20~30°C	30~40°C	Temp4 °C	20~30°C	20~30°C
구분	측정치	세팅치																																					
Die		0.7*20mm																																					
Die Hole		6EA																																					
Feed(Hz)	6.3	6.5																																					
RPM(Hz)	42	41																																					
AMP(A)	61	73																																					
Pressure	58	77																																					
Water EXT	0.66	0.62																																					
Temp1 °C	50~60°C	70~80°C																																					
Temp2 °C	35~45°C	40~50°C																																					
Temp3 °C	20~30°C	30~40°C																																					
Temp4 °C	20~30°C	20~30°C																																					
		압착	두께 1.2mm 이하로 압착																																				
		절단	SIZE : 20*40mm 수분 14% ± 1																																				
		1차건조	온도 50°C, 40분, 수분 10.5% ± 0.5																																				
		선별/계량	육안, 10kg/1pallet 적재																																				
		숙성	2~3일, 수분평행(내심, 외심)																																				
		파칭	130°C, 40±5hz, 최종수분 2% ± 0.5																																				
		코팅	70±10°C, 35±5hz, 300kg/1hr, 60 Brix																																				
		2차건조	98°C, 30분, 300kg/1hr, 수분 3% ± 0.5																																				
		2차선별	육안, 4명																																				
		금속검출기	금속 직경1.0mm, 스테인레스 2.0mm, 감도 90																																				
		자동포장	포장량 60ea/m, 3회/1일 실링테스트																																				
		검사	유통기간표시, 제품입수, 물류박스 기준 검사																																				

(6) 완제품 규격 및 검사기준

사 양	규 격	측정 방법
중량	30g	전자저울
수분	3±0.5%이하	시험표준서 참조
두께	1.2mm이하	버니아캘리퍼스
크기	40±2.0mm *20±1.0mm	버니아캘리퍼스
납(pb)	0.2ppm이하	공인시험 의뢰
카드뮴(Cd)	0.2ppm이하	공인시험 의뢰
비소(As)	0.2ppm이하	공인시험 의뢰
세균 수(g당)	1000이하	시험표준서 참조
대장균 수(g당)	음성	시험표준서 참조
진균수	100이하	공인시험 의뢰
총 Aflatoxin B1	15.0µg/kg이하	공인시험 의뢰
푸모니신	1 mg/kg이하	공인시험 의뢰
오크라톡신 A	5.0µg/kg이하	공인시험 의뢰
데옥시니발레놀	2 mg/kg 이하	공인시험 의뢰
제탈레논	200µg/kg이하	공인시험 의뢰
잔류농약	불검출	공인시험 의뢰
멜라닌	2.5 mg/kg 이하	공인시험 의뢰
이물	불검출	육안검사
성상	옥수수색의 직사각형	육안검사
관능	맛, 냄새, 조직감, 산패취	표준시료와 비교
Sealing	Air	수조 압력 검사

다. 결론

본 연구에서는 연구단의 1-3세부와 협력하여 발효율금과 비파엽추출물을 함유하는 건강지향식품의 산업화를 위하여 제조공정을 표준화하였다.

압출성형공정은 단일공정으로 단시간동안 압출성형기 내부에서 분쇄, 가열, 살균, 반응, 팽화 등의 단위조작을 연속적으로 수행할 수 있어 다른 처리 공정에 의해 생산된 제품들보다 기능성, 관능적 특성이 우수할 뿐만 아니라 생산단가도 낮은 편이고 고품질의 제품생산이 가능하여 각종 식품제조에 활발히 사용되고 있다(6).

압출성형기는 다양한 제품의 생산, 높은 열역학적 효율, 생산단가의 절감, 낮은 노동력과 장소를 요구하기 때문에 다른 열처리공정보다 효율적인 편이며, 특별한 원료의 배합과 압출성형기의 구조에 의해 제조한 제품은 새로운 소비자의 욕구와 시장을 확대하는 수단으로 압출성형공정의 적용이 가능하다(7).

압출성형공정의 조건설정에는 복잡한 고분자 유기물인 식품성분들의 성상에 따라 많은 공정변수가 작용한다. 특히 압출조리 정도나 호화도 및 최종제품의 품질 결정에 가장 중요한 역할을 하는 부분은 원재료의 함유수분이나 스크루우의 회전속도에 따른 압력 및 물질의 흐름기작과 깊은 상관관계를 지닌 것으로 알려져 있다(8). 참여기업인 농업회사법인(주)산들촌에서 2012년 1월 신축공장 준공과 함께 Twin Screw Extruder 설비를 신규 구축하였으며, 본 연구에서는 수차례의 시제품 테스트를 시행하여 적정 원재료의 배합비를 결정하였다. Extruder의 작동변수인 점도, 층밀림속도, 유속, 압력, 동력, 체류시간, 온도, 수분함량, 제품특성을 고려한 압출성형공정을 표준화하였다. 또한, 비유탕 제품으로써 소금위에서 굽는 파칭 공정과 분말코팅으로 맛을 내는 공정을 표준화 하였다.

이를 바탕으로 안정적인 품질의 유지와 생산 효율화를 달성이 가능하게 되어 발효율금 및 비파엽추출물 함유 건강지향식품의 산업화를 이루고자 한다.

5. 발효율금 및 비파엽추출물 함유 건강지향식품 시제품 개발

가. 방법

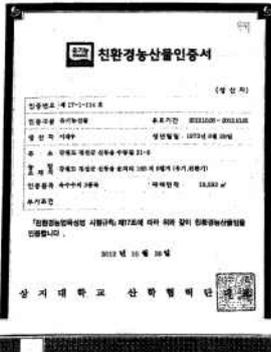
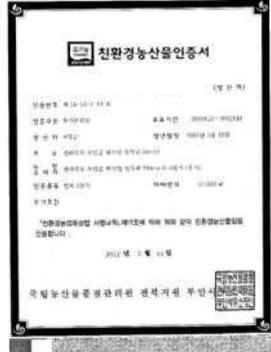
본 시제품은 고온단시간 공정이면서 전분과 단백질의 조리를 통한 소화율의 향상과 갈변의 최소화, 비타민과 필수아미노산의 가열을 통한 손실률의 최소화, 가공과정 동안 이취의 최소화 등의 장점을 가지고 있는 압출성형방식의 Twin Screw Extruder를 이용하여 생산하였다. 원료의 선정은 연구단의 1-3세부와 협력하여 유기농 곡류와 추출물을 함유한 과자의 생지를 압출 성형하고 곡물의 투입량과 온도조건, 수분함량 등 Extruder 작동변수를 구분하여 생산하였다.

시제품의 생산 과정은 아래와 같이 원료의 확인, 혼합, 압출성형, 파칭, 맛내기 과정으로 진행된다.

(1) 원료확인

시제품 제작에 사용할 원료들을 배합비에 맞춰 정밀히 칭량한다.

* 주원료의 유기농 인증서

		
<p>유기농 쌀</p>	<p>유기농 옥수수</p>	<p>유기농 보리</p>
		
<p>유기농 백포도농축액</p>	<p>발효율금</p>	<p>비파엽추출물</p>

(2) 혼합

대형 리본믹서기에 넣고 15~20분간 혼합한다. 혼합된 원료는 호퍼에 모아지고 원료 이송관을 따라 압축성형기로 유입된다.



원료 배합 모습

압축성형의 결과물에 따라 곡물의 성상을 파악하고 유기농 곡물의 양과 각 추출물의 함량을 달리하여 시생산하였다.

* 시생산의 원료 배합비

(가) 발효율금 함유 유기농스낵

재료명 (%)	배합비	A	B	C	D	비고
유기농쌀		60.00%	55.00%	53.00%	54.00%	유기농
유기농옥수수		20.13%	26.89%	19.87%	20.13%	유기농
유기농카레(발효율금 포함)		4.70%	3.70%	2.70%	3.70%	유기농
유기농수수		5.12%	5.84%	1.84%	1.84%	유기농
유기농보리		5.12%	4.62%	1.84%	1.84%	유기농
감자전분		2.28%	1.68%	1.68%	1.68%	일반
식이섬유		1.98%	1.68%	1.68%	1.68%	일반
천일염		0.67%	0.59%	0.48%	0.59%	일반
소계(펠렛)		100%	100%	83.09%	85.46%	
유기농백포도농축과즙				13.45%	10.69%	유기농
유기농고올레산해바라기유				3.46%	3.85%	유기농
소계(코팅액)				16.91%	14.54%	
합계		100%	100%	100%	100%	

(나) 비과엽추출물 함유 유기농스낵

재료명 (%)	배합비	A	B	C	D	비고
유기농쌀		55.81%	67.74%	62.81%	62.81%	유기농
유기농옥수수		16.21%	11.91%	8.32%	8.22%	유기농
유기농찹쌀		15.87%	10.38%	6.68%	6.65%	유기농
감자전분		4.58%	4.58%	1.68%	1.58%	일반
식이섬유		4.58%	2.49%	1.47%	1.47%	일반
코코넛분말		1.61%	1.79%	0.79%	0.79%	일반
천일염		0.47%	0.50%	0.48%	0.47%	일반
클로렐라		0.24%	0.32%	0.24%	0.24%	일반
비과엽추출물		0.15%	0.18%	0.17%	0.17%	일반
과래분말		0.28%	0.06%	0.04%	0.05%	일반
멸치분말		0.2%	0.05%	0.04%	0.04%	일반
	소계(펠렛)	100%	100%	82.72%	82.49%	
	유기농백포도농축액			13.28%	13.28%	유기농
	유기농고올레산해바라기유			3.82%	4.05%	유기농
	멸치해조류분말			0.18%	0.18%	일반
	소계(코팅액)			17.28%	17.51%	
	합계	100%	100%	100%	100%	

(3) 압출 성형

성형 사출기의 Die는 6Hole 0.7*20mm 규격을 사용하여 성형하였으며, Feed 곡물투입량과 압력, 수분함량 등의 조건을 조절하면서 생산하였다.



Twin Screw Extruder



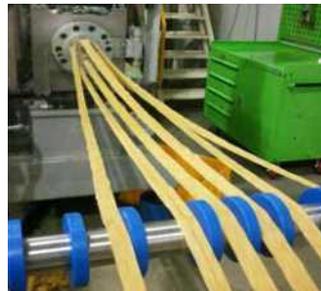
다이모양



컨트롤시스템



롤링/컷팅기



압출모습1



압출모습2

(4) 파칭

고온 자동 파칭기를 이용하여 130℃, 45hz의 회전속도로 파칭한다.



자동파칭기



파칭기 컨트롤



투입모습



배출모습

(5) 맛내기(시럽코팅)

유기농백포도농축액, 유기농고올레산해바라기유를 sprinkle 하면서 배합에 놓은 시럽을 뿌려준다.



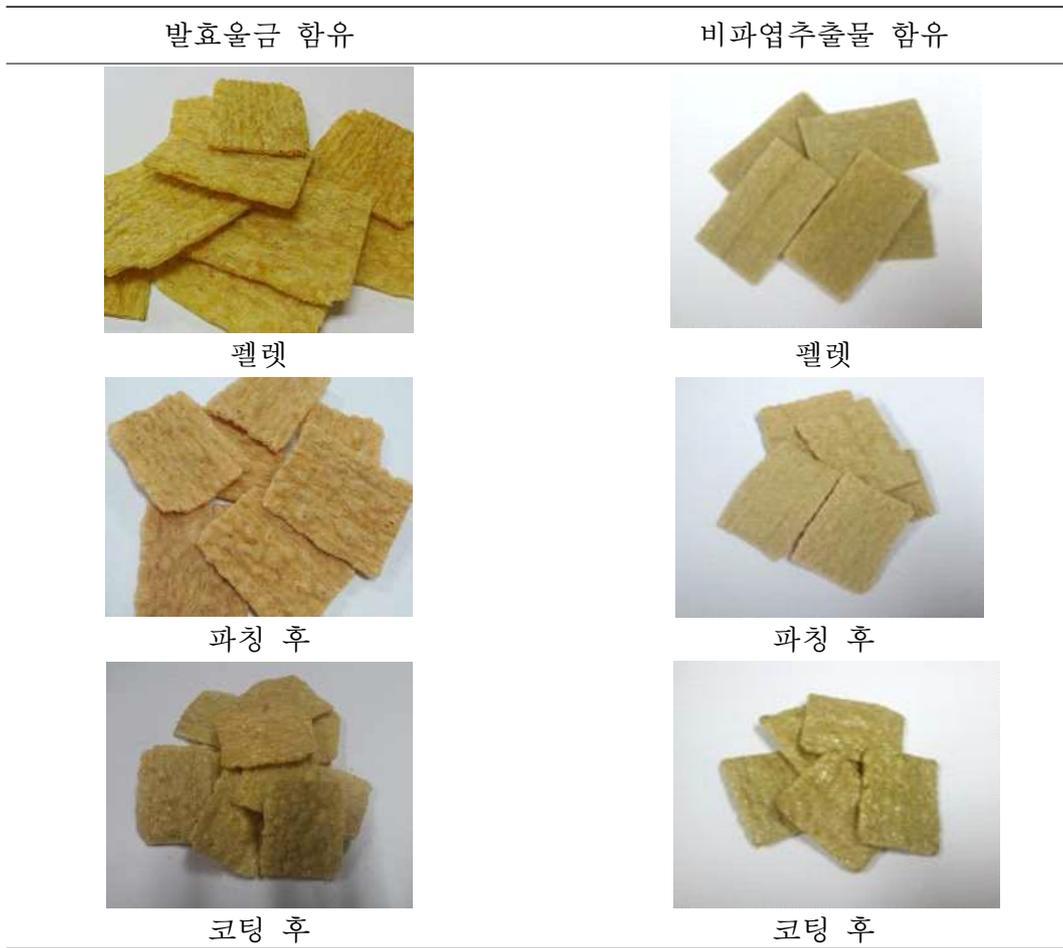
드럼코팅기



분말투입기

나. 결과

상기 기술한 방법을 통하여 각 추출물을 함유한 건강지향식품 시제품을 생산하였다.



다. 결론

본 연구에서는 각 추출물을 함유하는 건강지향식품 시제품 생산을 완료하였다. 압출성형의 제형을 결정하기 위해 유기농곡물의 성장에 따른 배합비를 달리하여 시생산한 결과 두 추출물 모두 'D'의 원료 배합비를 최종으로 결정하였다. 또한, Extruder parameter의 조건(투입량, Screw속도, 온도, 수분)을 측정, 보정하여 펠렛에서 Air cell 생기는 현상을 바로 잡고 제품화 수준의 시제품을 완성하였다. 향후 본 연구단 1-3세부기관에 시제품을 전달 시제품 기호도 평가를 반영하여 각 추출물을 함유한 건강지향식품 산업화를 하고자 한다.

6. 유기농스낵 기호도 평가 및 관능평가

가. 발효율금 함유 유기농 스낵

(1) 방법

기호도의 측정은 9점 척도법과 어린이(유치원 5,6세), 어린이의 보호자를 대상으로 측정하였다. 본 관능시험조사에 사용되는 스낵은 1-2세부기관인 산들촌에서 최종적으로 제조 조성과 맛에 대하여 확정된 발효율금스낵으로 제공하여 실시하였다. 제공된 시료에 대하여 남부대학교 산하 우암유치원 원생 30명과 부모 20-30명을 대상을 중심으로 기호도 조사를 할 예정이며, 이를 위해 랜덤화 완전 블록 방법(replicated randomized

complete block design)에 따라 기호도 조사를 하였다.

조사 항목은 주관적인 평가로 색(Color), 맛(taste), 향(flavor), 질감(texture), 전체적 기호도(overall acceptance)로 조사를 하였으며 종합적인 평가로 9점법을 사용하였는데 5점을 중심으로 1에 가까울수록 나쁜 것이었고 9에 가까울수록 좋다는 인식을 느낀 것을 나타내었고 객관적인 평가로는 후각적 지각인 산취, 매운향, 단향, 이취와 미각적 지각인 신맛(sour flavor), 고미, 삼미(astringe flavor)으로 평가하였으며 그 정도는 1에 가까울수록 감지 불가능하고 9에 가까울수록 강하게 감지하는 것으로 나타내었다.

후각적 지각으로는 코로 감지되는 것으로 평가하였고 미각적 지각은 여러 차례 입 안에서 맛을 느낀 후 신내와 신맛은 산에 의해 나타나는 감각, 삼미는 tannin과 같은 물질이 수렴성 작용에 의해 입맛이 텁텁내지는 짧은 맛으로 정제가 부적절하게 이뤄진 맛으로 정의하였다. 모든 자료를 통합하여 그래프로는 향, 맛, 색, 안정성, 전체적인 선호도로 나타내었다.

본 연구의 수집된 자료의 통계분석은 SAS(Statistical Analysis System, version 8.1, SAS Institute INC.)프로그램을 이용하여 분석하고자 하고, 조사대상자의 일반적인 특성은 빈도(N)와 백분율(%)로 나타내었으며, 조사아동의 일반적 특성에 따른 스낵의 섭취현황 및 스낵의 선호에 관한 차이를 알아보기 위하여 χ^2 -검정을 실시하여 유의성을 검증하고자 하며 아동의 특수성에 따라 질의응답식의 설문조사를 실시하였다.

(2) 결과

기호도의 보정결과, 유기농 매장에서 판매되는 유사한 색과 제조방식이 동일한 유기농 스낵을 구입하여 2차로 제조한 기호도에 대한 평가결과,



(A사)



(주) 산들촌

외관에 대한 친근감, 유기농제품으로서 강한맛이 아닌 적절성, 과자에서 제조과정의 이취나 강한 취의 정도, 질감에 대하여 평가를 하였고 최종적인 전체 기호도를 확인하였다. 외관에 대한 기호도에서는 1차 기호도 조사시 나타났던 탁도, 붉은 색의 정도는 보다 우호적으로 줄어든 것을 알 수 있었고, 색에 대한 호감도는 오히려 증가하였다. 또한 발효율금의 탁도와 함께 증가하였던 yellow값은 상대적으로 농도를 줄이므로 감소하였다.

기호도 평가 중 맛에 대한 평가는 감미를 제외한 모든 값에서 우수 내지 유사한 것으로 나타났는데 비교제품의 경우 감미성분이 매우 강하였는데 이는 외피에 강한 감미성분이 배합되어 있는 것으로 판단되며, 보정의 결과, 전체적인 맛의 증진과 발효율금 첨가용량의 증가가 삼미가 감소하여 기호도 증진이 되어지는 것을 알 수 있었다. 또한

더불어 첨가물의 용량감소가 이미의 감소도 함께 줄어들었음을 확인하였다

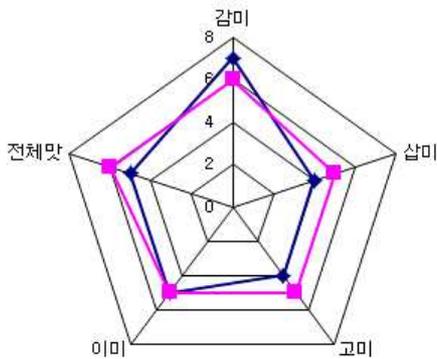


그림 1. 외관에 대한 기호도

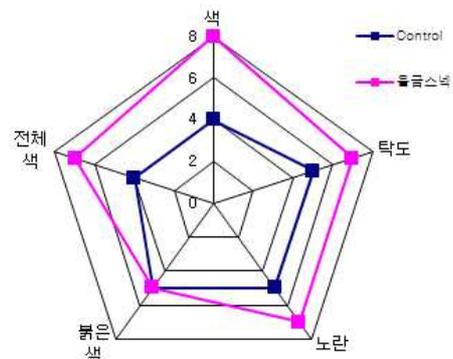


그림 2. 맛에 대한 기호도

기호도 평가항목 중 냄새 항목에서 첨가량을 줄였는데도 발효율금 특유성분인 강황의 매운성분의 저감은 어려운 것으로 판단된다. 그러나 평가자들이 느끼는 값들은 크게 불쾌하게 느끼지 않음을 알 수 있다. 또한 이취, 산취, 감미취 등에서 보다 개선되고 제품화를 증진시키는 요인으로 개선효과가 작용했음을 알 수가 있다.

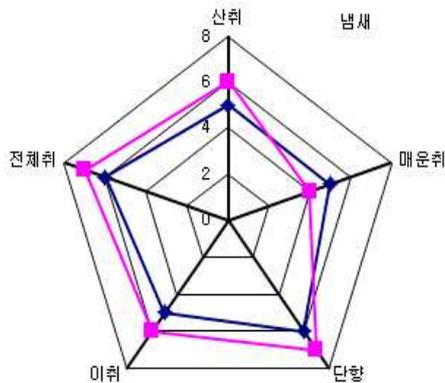


그림 3. 냄새에 따르는 기호도

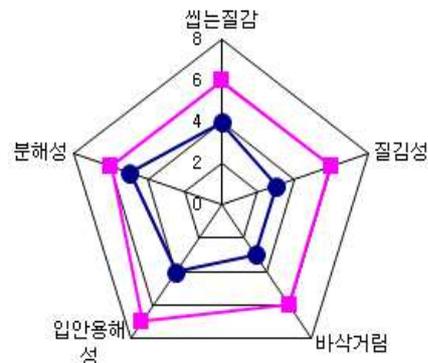


그림 4. 질감에 따르는 기호도

플레이크 타입의 제조과정 중에 파칭과정이 있어 유당처리 제품과는 달리 표면과 내면의 경화가 진행되는 것은 일반적인 특징이다. 그러나 이러한 특징은 오히려 유당의 연한 질감보다는 부스러뜨리는 질감증진과 상반성이 있어 이에 대한 보정이 있었다. 결과에 따르면 공정의 변화가 크게 있었던 것이 아니기 때문에 전체적인 값의 변화는 몇 가지에 제한적으로 증진되는 것을 알 수 있었다. 비교제품과의 증진의 차이는 입안에서의 용해성과 분해성이 상대적으로 증진된 것을 알 수 있었다.

나. 비파염추출물 함유 유기농 스낵

(1) 타제품과의 비교 관능평가

(가) 연구방법

① 패널 선정 및 훈련

20~40세 광주보건대학 재학생을 대상으로 미각테스트를 통해 30명을 선발했으

며, 패널의 관능평가 훈련은 삼점검사, 일-이점 검사, 단순차이 검사, 묘사분석 등의 평가방법을 활용하여 훈련했다. 또한 기호도 검사에는 대학의 평생교육원 강좌를 수강하는 일반인(22명)과 남부대학교 학생(52명)을 패널로 참여토록 하였다.

② 기호도 분석

비파엽추출물 첨가 스낵류(비파엽과자)와 기존 시장에 판매되고 있는 유사한 종류의 스낵과 비교하여 기호도를 조사하였다. 비파엽과자에 대한 향미 프로필을 정리하였을 때 나타난 관능 특성과 유사한 과자류를 비교대상 요건으로 정하였다. 즉, 바삭한 질감과 약간의 달콤함, 외형적으로 시럽 코팅이 되어 있는 고구마깡(농심사)과 깨소미(정든식품)를 비교대상 과자로 선정하였다. 관능평가 점수는 7점척도 평가법을 이용하였다.

③ 통계분석

비파엽 과자의 관능적 특성 및 기호도분석은 독립 T 검정(t-test) 방법을 이용하여 관능평가 결과에 대한 유의성을 검증하였다. 비파엽 과자와 다른 과자와의 비교를 통한 관능적 특성 분석은 SPSS 10.1 통계프로그램을 이용하여 ANOVA 분석 후 5% 유의수준에서($\alpha = 0.05$) Tukey's 및 Duncan's multiple range test를 이용하여 유의성을 검증하였다.

관능평가 대상 시료



비파엽추출물 첨가 스낵



비교분석을 위한 시중 판매 과자류

(나) 연구결과

① 다른 제품과의 관능특성 및 기호도 비교

비파과자의 관능특성을 상대적으로 비교하기 위해 시중에 유통되고 있는 깨소미(정든식품)와 고구마깡(농심)을 비교시료로 선정하여 비파과자와 함께 패널에게 제시하여 관능특성을 평가하였다. 깨소미와 고구마깡은 비파과자의 묘사분석에서 나타난 바삭한 질감, 단맛, 코팅된 외관 등을 고려하여 선정하였다. 관능특성 비교평가에 참여한 패널은 104명으로 여성 82명, 남성 22명으로 구성되었으며, 식품영양 전공 학생이 아닌 일반인도 22명 포함되었다.

구분	전체	여성	남성	훈련된 패널	식품관련 학생	일반인
참여자 (명)	104	82	22	30	52	22

② 판매 스낵류와의 관능특성

패널 전체 평가									
제품	구수한향	이취	고소한맛	짠맛	단맛	이미	바삭한 정도	딱딱한 정도	기호도
비파과자	3.43 ^b	2.76 ^b	4.70 ^b	3.20	4.08 ^c	2.83 ^b	5.95 ^a	4.35 ^b	4.40 ^b
깨소미 (정든식품)	4.65 ^a	2.57 ^b	5.36 ^a	3.03	4.71 ^b	2.61 ^b	5.13 ^b	5.29 ^c	4.68 ^b
고구마깡 (농심)	4.69 ^a	1.76 ^a	5.49 ^a	3.01	6.00 ^a	1.77 ^a	6.17 ^a	3.18 ^a	5.87 ^a

*a,b,c : ANOVA 분산분석후, Tukey test 및 Duncan의 다중비교분석에 의한 결과
 그룹간 동일 알파벨은 유의차가 없음(p<0.05).
 1: 가장 특성 및 강도가 낮음, 7: 가장 특성 및 강도가 높음

비파과자와 시중에 유통되고 있는 유사 과자류 2종과 비교하였을 때, 비파과자의 기호도는 단맛이 큰 고구마깡(농심)과는 유의적인 차이가 있었으나, 깨소미과자(정든식품)와는 기호도에 유의적인 차이가 없었다. 이러한 결과는 비파과자의 시장에서 소비자의 호감을 얻을 가능성이 충분히 크다는 의미를 내포한다. 소비자에게 잘 알려져 친숙한 고구마깡의 모양이나 맛을 감안하고, 거기다가 유명제과사 제품은 아닐지라도 참깨가 들어가 고소한 맛이 느껴지는 깨소미 과자의 맛 또한 소비자에게 낯설지 않은 점, 시장에서 익숙하지 않은 신제품의 기호도 평가가 높게 평가되기 어려운 점 등을 고려해 본다면 깨소미과자와 유의차가 없게 평가된 비파과자의 기호도는 의미있는 결과이다.

고구마깡이나 깨소미 과자와 유의차가 느껴지게 영향을 미친 평가 부문은 단맛과 구수한향, 바삭한 정도, 딱딱한 정도이다. 특히, 단맛은 다른 향이나 맛 등의 관능평가와 기호도 평가에 크게 영향을 미치는 항목으로 잘 알려져 있는데, 비파과자의 단맛과 짠맛의 조화가 다른 두 과자에 비해 부족한 것으로 평가되었다. 평가 점수가 크지는 않았으나, 이상한 향이나 맛(이취이미)도 비파과자의 기호도를 낮추는 요인으로, 김과자 또는 썩이나 녹차향 같은 애매한 특유의 낯선 향과 맛이 기호도에 영향을 준 것으로 평가되었다.

③ 판매스낵류와의 관능특성 요인별 비교

참여 패널 별 결과비교- 구수한 향						
	전체	여성	남성	훈련된 패널	식품관련 학생	일반인
비파과자	3.43 ^b	3.49 ^b	3.23 ^b	3.70 ^b	3.18 ^b	3.65 ^b
깨소미 (정든식품)	4.65 ^a	4.67 ^a	4.59 ^a	5.27 ^a	4.53 ^a	4.13 ^{ab}
고구마깡 (농심)	4.69 ^a	4.71 ^a	4.64 ^a	4.73 ^a	4.51 ^a	5.04 ^a

*a,b,c : ANOVA 분산분석후, Tukey test 및 Duncan의 다중비교분석에 의한 결과
 그룹간 동일 알파벨은 유의차가 없음(p<0.05).
 1: 가장 특성 및 강도가 낮음, 7: 가장 특성 및 강도가 높음

구수한향에 대해 평가에 참여한 패널들은 고구마깡에 비해 비파과자가 구수한향이 낮다고 평가하였으며, 또한 평가 점수도 보통(4점) 보다 낮아 비파과자의 구수

향함은 약한 것으로 나타났다. 평가에 참여한 패널의 그룹으로 비교하여도 성별대비, 관능평가를 훈련 받은 경험의 유무와 상관없이 비파과자의 구수한향은 보통(4점)보다 낮게 평가되었다. 다만, 일반인의 경우 구수한향에 대해 비파과자와 깨소미과자가 유의차를 크게 느끼지 않는 것으로 나타났다.

참여 패널 별 결과비교- 이취(이상한 향 또는 냄새)						
	전체	여성	남성	훈련된 패널	식품관련 학생	일반인
비파과자	2.76 ^b	2.62 ^b	3.27 ^b	2.73	2.69 ^b	2.96 ^b
깨소미 (정든식품)	2.57 ^b	2.73 ^b	1.95 ^a	2.47	2.35 ^{ab}	3.17 ^b
고구마깥 (농심)	1.76 ^a	1.67 ^a	2.09 ^a	1.80	1.71 ^a	1.83 ^a
*a,b,c : ANOVA 분산분석후, Tukey test 및 Duncan의 다중비교분석에 의한 결과 그룹간 동일 알파벨은 유의차가 없음(p<0.05). 1: 가장 특성 및 강도가 낮음, 7: 가장 특성 및 강도가 높음						

향 및 냄새에 대해 고구마깥에 비해 비파과자나 깨소미를 좀 더 부정적으로 평가한 것으로 나타났다. 남성이 여성에 비해 비파과자를 다른 두 비교시료에 비해 부정적이었으며, 여성은 고구마깥을 가장 긍정적으로 평가한 데 비해 남성은 깨소미를 조금 더 긍정적으로 평가하였고, 일반인의 경우 깨소미를 비파과자보다 좀 더 부정적으로 평가한 것으로 나타나 스낵류의 불쾌취에 기준이 다른 것으로 나타났다.

참여 패널 별 결과비교- 고소한 맛						
	전체	여성	남성	훈련된 패널	식품관련 학생	일반인
비파과자	4.70 ^b	4.90 ^b	3.95 ^b	5.00	4.61 ^b	4.52 ^b
깨소미 (정든식품)	5.36 ^a	5.35 ^b	5.36 ^a	5.57	5.39 ^a	5.00 ^b
고구마깥 (농심)	5.49 ^a	5.60 ^a	5.09 ^a	5.37	5.39 ^a	5.87 ^a
*a,b,c : ANOVA 분산분석후, Tukey test 및 Duncan의 다중비교분석에 의한 결과 그룹간 동일 알파벨은 유의차가 없음(p<0.05). 1: 가장 특성 및 강도가 낮음, 7: 가장 특성 및 강도가 높음						

고소한 맛에 대해서는 비파과자가 다른 두 과자에 비해 강도가 낮은 것으로 평가되었다. 여성은 고구마깥을 더 고소하게 느꼈고, 남성은 깨소미를 더 고소하게 느꼈다. 훈련된 패널 관능평가는 세 과자의 고소한 맛에 대한 유의차가 없는 것으로 평가되었으며, 대체로 세 종류의 과자를 고소하다고 평가하였다.

참여 패널 별 결과비교- 짬맛						
	전체	여성	남성	훈련된 패널	식품관련 학생	일반인
비파과자	3.20	3.17	3.32	2.80	3.31	3.49
깨소미 (정든식품)	3.03	3.11	2.73	2.87	2.86	3.61
고구마깡 (농심)	3.01	3.10	2.68	2.60	3.06	3.43
*a,b,c : ANOVA 분산분석후, Tukey test 및 Duncan의 다중비교분석에 의한 결과 그룹간 동일 알파벨은 유의차가 없음(p<0.05). 1: 가장 특성 및 강도가 낮음, 7: 가장 특성 및 강도가 높음						

짬맛에 대해 느끼는 강도는 세 종류의 과자에 대해 비슷했다. 남성이 여성에 비해 유의차는 없었으나 비파과자를 다른 두 과자에 비해 좀 더 짜다고 느끼는 것으로 나타났다.

참여 패널 별 결과비교- 단맛						
	전체	여성	남성	훈련된 패널	식품관련 학생	일반인
비파과자	4.08 ^c	4.18 ^b	3.68 ^b	4.37 ^b	3.80 ^c	4.30 ^b
깨소미 (정든식품)	4.71 ^b	4.65 ^b	4.95 ^a	4.77 ^b	4.49 ^b	5.13 ^b
고구마깡 (농심)	6.00 ^a	6.10 ^a	5.64 ^a	6.23 ^a	5.80 ^a	6.13 ^a
*a,b,c : ANOVA 분산분석후, Tukey test 및 Duncan의 다중비교분석에 의한 결과 그룹간 동일 알파벨은 유의차가 없음(p<0.05). 1: 가장 특성 및 강도가 낮음, 7: 가장 특성 및 강도가 높음						

단맛에 대한 강도는 고구마깡이 가장 높았고, 다음으로 깨소미, 비파과자 순으로 나타나서, 비파과자가 다른 두 과자류에 비해 단맛의 강도가 낮은 것으로 평가되었다. 여성은 비파과자와 깨소미의 단맛 강도에 유의차를 느끼지 못했으나, 남성의 경우 비파과자의 단맛을 보통보다 낮게 평가하였다.

참여 패널 별 결과비교- 이미(이상한 맛)						
	전체	여성	남성	훈련된 패널	식품관련 학생	일반인
비파과자	2.83 ^b	2.72 ^b	3.27 ^{ab}	2.53	2.75 ^b	3.43 ^b
깨소미 (정든식품)	2.61 ^b	2.67 ^b	2.36 ^b	2.53	2.37 ^b	3.22 ^b
고구마깡 (농심)	1.77 ^a	1.71 ^a	2.00 ^a	1.73	1.65 ^a	2.09 ^a
*a,b,c : ANOVA 분산분석후, Tukey test 및 Duncan의 다중비교분석에 의한 결과 그룹간 동일 알파벨은 유의차가 없음(p<0.05). 1: 가장 특성 및 강도가 낮음, 7: 가장 특성 및 강도가 높음						

이미에 대한 평가는 비파과자와 깨소미 간에는 유의차가 없었으나, 비파과자와 고구마깡 간에는 유의차가 나타났고, 고구마깡에 비해 비파과자나 깨소미의 맛이 좀 더 익숙지 않은 것으로 나타났다. 그러나 훈련된 패널의 경우 세 과자류간의 이미에 대한 유의차가 나타나지 않아서, 훈련과 평가를 위해 비파과자를 좀 더 자주 접한 경우에는 비파과자의 맛을 낮설게 느끼지 않는 것으로 판단되었다. 남성의 경우는 고구마깡에 비해 더 고소하게 느꼈던 깨소미를 비파과자의 맛 보다 좀 더 낮설게 느끼는 것으로 나타났다.

참여 패널 별 결과비교- 바삭한 정도						
	전체	여성	남성	훈련된 패널	식품관련 학생	일반인
비파과자	5.95 ^a	6.09 ^a	5.45	6.13 ^a	6.06 ^a	5.49 ^{ab}
깨소미 (정든식품)	5.13 ^b	5.07 ^b	5.36	4.80 ^b	5.53 ^b	4.70 ^b
고구마깡 (농심)	6.17 ^a	6.32 ^a	5.64	6.20 ^a	6.16 ^a	6.17 ^a
*a,b,c : ANOVA 분산분석후, Tukey test 및 Duncan의 다중비교분석에 의한 결과 그룹간 동일 알파벨은 유의차가 없음(p<0.05). 1: 가장 특성 및 강도가 낮음, 7: 가장 특성 및 강도가 높음						

비파과자와 고구마깡 간에 바삭한 정도에는 유의차가 없는 것으로 나타났다. 남성의 경우 세 종류의 과자간 바삭한 정도에 대해 유의차를 느끼지 않는 것으로 나타났다. 다른 과자와 비교분석하지 않고 비파과자의 관능특성만 평가한 경우에 비파과자의 바삭한 정도는 6.3점으로 높게 평가되었으나, 다른 과자류와 비교분석시에 나타난 비파과자의 바삭한 정도는 5.95로 상대적으로 낮게 평가되었다.

참여 패널 별 결과비교- 딱딱한 정도						
	전체	여성	남성	훈련된 패널	식품관련 학생	일반인
비파과자	4.35 ^b	4.27 ^b	4.64 ^{ab}	5.00 ^b	3.92 ^b	4.43 ^b
깨소미 (정든식품)	5.29 ^c	5.26 ^c	5.41 ^b	5.90 ^c	5.17 ^c	4.74 ^b
고구마깡 (농심)	3.18 ^a	3.00 ^a	3.86 ^a	3.50 ^a	3.02 ^a	3.13 ^a
*a,b,c : ANOVA 분산분석후, Tukey test 및 Duncan의 다중비교분석에 의한 결과 그룹간 동일 알파벨은 유의차가 없음(p<0.05). 1: 가장 특성 및 강도가 낮음, 7: 가장 특성 및 강도가 높음						

깨소미가 가장 딱딱한 질감을 갖고 있고, 다음으로 비파과자, 고구마깡순으로 평가되었다. 일반인의 경우 비파과자와 깨소미 간의 딱딱한 정도에 대한 유의차를 느끼지 않는 것으로 나타났으며, 남성의 경우 비파과자와 고구마깡 간의 딱딱한 정도에 유의차를 느끼지 않는 것으로 나타났다.

참여 패널 별 결과비교- 기호도						
	전체	여성	남성	훈련된 패널	식품관련 학생	일반인
비파과자	4.40 ^b	4.59 ^b	3.73 ^b	4.77 ^b	4.22 ^c	4.35 ^{ab}
깨소미 (정든식품)	4.68 ^b	4.59 ^b	5.05 ^a	4.53 ^b	5.04 ^b	4.09 ^b
고구마깡 (농심)	5.87 ^a	5.94 ^a	5.59 ^a	5.97 ^a	6.06 ^a	5.30 ^a
*a,b,c : ANOVA 분산분석후, Tukey test 및 Duncan의 다중비교분석에 의한 결과 그룹간 동일 알파벨은 유의차가 없음(p<0.05). 1: 가장 특성 및 강도가 낮음, 7: 가장 특성 및 강도가 높음						

고구마깡의 기호도가 가장 높았으며, 비파과자와 깨소미 간의 기호도에 유의차가 나타나지 않아, 비파과자는 시중에 유통되고 있는 깨소미 과자의 기호도와 유사한 기호도를 갖는 것으로 판단되어 향후 시장 판매시 소비자의 호감을 유도에 어려움이 크지 않을 것으로 판단되었다. 고구마깡이 비파과자나 깨소미에 비해 높은 기호도도 평가 된 것은, 고구마깡이 단맛, 고소한 정도, 바삭한 정도가 높았으며, 이미나 이취가 낮았기 때문인 것으로 판단되었다.

비파과자가 깨소미보다 단맛, 고소한 맛, 구수한 향이 낮게 평가되었으나, 이취나 이미에 대해서는 유의차가 없었고, 딱딱한 정도가 깨소미에 비해 낮게 평가되어 기호도에서 유의차를 느끼지 못하게 된 이유로 판단되었다. 그러므로 단맛, 고소한맛이나, 바삭한 질감에 변화를 주는 것도 중요하나, 부정적인 영향을 주는 이미나 이취, 딱딱한 질감 등의 관능특성을 고려하여 최소화 시키는 것도 개발한 비파과자의 기호도를 높이는데 기여할 것으로 판단되었다.

(2) 기호도 평가

(가) 연구방법

① 패널 선정 및 훈련

20~40세 광주보건대학 재학생을 대상으로 미각테스트를 통해 30명을 선발했으며, 패널의 관능평가 훈련은 삼점검사, 일-이점 검사, 단순차이 검사, 묘사분석 등의 평가방법을 활용하여 훈련했다. 또한 기호도 검사에는 대학의 평생교육원 강좌를 수강하는 일반인(22명)과 남부대학교 학생(52명)을 패널로 참여토록 하였다.

② 관능적 특성 분석

비파엽추출물 첨가 스낵류의 맛(단맛, 짠맛, 고소한맛, 이상한 맛), 향기(구수한향, 이취), 질감(바삭함, 딱딱함), 전체적 선호도 등을 조사하였고, 관능평가 점수는 7점척도 평가법을 이용하였다.

③ 통계분석

비파엽 과자의 관능적 특성 및 기호도분석은 독립 T 검정(t-test) 방법을 이용하여 관능평가 결과에 대한 유의성을 검증하였다. 비파엽 과자와 다른 과자와의 비교를 통한 관능적 특성 분석은 SPSS 10.1 통계프로그램을 이용하여 ANOVA 분석 후 5% 유의수준에서($\alpha=0.05$) Tukey's 및 Duncan's multiple range test를 이용하여 유의성을 검증하였다.

관능평가 준비 및 관능평가 모습



(나) 연구결과

① 비파엽추출물 첨가 스낵(비파엽과자)에 대한 묘사분석

훈련된 패널 30명을 대상으로 서술식으로 제품의 관능적 특성을 평가하는 묘사분석을 진행하였다. 평가항목은 외관, 향 및 냄새, 맛 및 향미, 질감의 4가지 서술항목과 7점 척도 평가법에 의한 기호도로 구성하였다.

평가에 의한 결과, 광택의 느낌이 달고 바삭할 것 같은 인상을 주었고, 색깔이

녹차나 해조류의 맛을 연상시키는 것으로 나타났으며, 실제 맛을 본 결과도 김이나 해조류가 첨가된 맛, 또는 녹차나 쭈과 같은 것이 첨가된 듯한 맛으로 일반적인 스낵류와는 다른 독특한 풍미를 지닌 것으로 표현되었다. 질감은 딱딱하거나 거칠지는 않으나 긍정적인 바삭한 질감으로 표현하였고, 바삭하면서도 부드럽게 목넘김이 되는 것으로 표현하였다. 기호도는 7점 기준에서 4.8점으로 보통(4점) 보다는 높게 평가되었다. 묘사분석에서 나타난 평가 내용을 다음과 같이 정리하였다.

② 비파엽 추출물 첨가 스낵(비파엽과자)에 대한 관능평가

비파과자 관능평가는 총 2차례 진행되었으며, 참여자 수는 82명으로 남성 21명, 여성 61명이며, 모두 식품영양학과 학생으로 구성되었다. 이들 중 30명은 패널훈련에 참여하고 또 비파과자의 묘사분석에 참여한 훈련된 패널이었다.

	전체	여성	남성	훈련된 패널	식품관련 학생
참여자 (명)	82	61	21	30	52

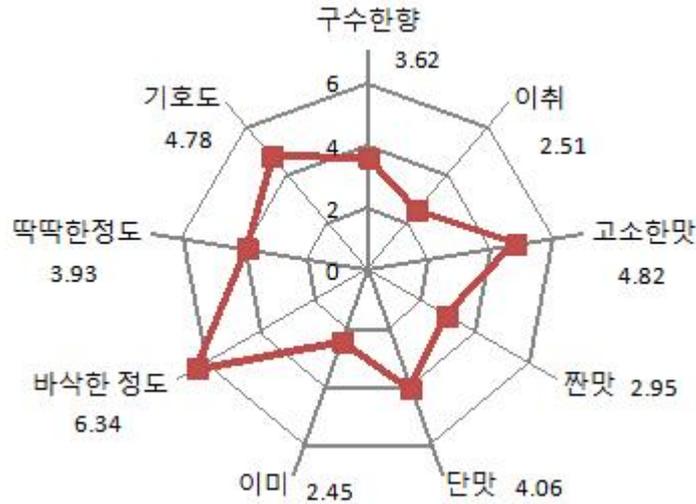
③ 비파과자의 관능적 품질특성

비파과자의 관능적 품질특성 (패널 전체 참여)									
	구수한 향	이취	고소한 맛	짠맛	단맛	이미	바삭한 정도	딱딱한 정도	기호도
1차	3.81	2.45	4.89	2.98	3.96	2.40	6.33	3.98	4.82
2차	3.43	2.56	4.74	2.92	4.16	2.50	6.35	3.88	4.74
유의 확률	0.749	0.916	0.665	0.156	0.725	0.719	0.978	0.202	0.339
평균	3.62	2.51	4.82	2.95	4.06	2.45	6.34	3.93	4.78

* 유의확률 : 1차 및 2차 값의 독립 T검정(t-test)에 의한 유의성 검정.
 유의확률이 0.05보다 낮은 경우 유의성이 있다고 봄
 1: 가장 특성 및 강도가 낮음, 7: 가장 특성 및 강도가 높음

차례 평가한 비파과자의 관능평가 결과 바삭한 질감이 가장 특징적인 관능적 품질 요인이었으며(6.34점), 다음으로 고소한 맛(4.82점)이었다. 외관으로 볼 때 반 짝거리는 코팅에 의해 단맛이 강할 것 같으나 실제로 단맛은 보통의 단맛(4.06) 수준으로 평가 되었다. 바삭한 질감의 강도는 높게 평가 되었으나 상대적으로 딱딱한 정도(3.93점)는 보통으로 평가되어 바삭하지만 딱딱하게는 느껴지지 않는 것으로 나타나 묘사분석의 결과와 유사한 결과이다.

기호도는 4.78로 훈련된 패널에 의한 묘사분석에서 평가된 값 4.80과 유사한 결과값으로 나타났으며, 크게 맛있거나 호감을 주는 맛으로 평가되지 않았다.



④ 관능특성 요인별 분석

참여 패널 별 결과비교- 구수한 향						
	전체	여성	남성	훈련된 패널	식품관련 학생	일반인
1차	3.81	3.92	3.52	4.53	3.40	4.55
2차	3.43	3.44	3.43	3.93	3.15	
유의확률	0.749	0.840	0.620	0.981	0.905	
평균	3.62	3.68	3.48	4.23	3.28	
* 유의확률 : 1차 및 2차 값의 독립 T검정(t-test)에 의한 유의성 검정. 유의확률이 0.05보다 낮은 경우 유의성이 있다고 봄 1: 가장 특성 및 강도가 낮음, 7: 가장 특성 및 강도가 높음						

구수한향에 대해 반복하여 평가에 참여하지 않은 일반인이 비파과자에 대해 좀 더 구수하게 느낀 것으로 나타났다. 반복평가에 참여한 패널 중 남성보다는 여성이 조금 더 강하게 느꼈고, 훈련된 패널의 경우 강도를 더 크게 느낀 것으로 나타났다. 반복 평가에서 유의차가 나타나지 않아 반복하여 평가하여도 평가결과에 큰 영향을 미치지 않는 것으로 나타나 평가실험 전반에 오차가 크지 않은 것으로 나타났다.

참여 패널 별 결과비교- 이취(이상한 향 및 냄새)						
	전체	여성	남성	훈련된 패널	식품관련 학생	일반인
1차	2.45	2.44	2.48	2.67	2.33	3.27
2차	2.56	2.52	2.67	2.67	2.50	
유의확률	0.916	0.650	0.508	0.476	0.695	
평균	2.51	2.48	2.57	2.67	2.41	
* 유의확률 : 1차 및 2차 값의 독립 T검정(t-test)에 의한 유의성 검정. 유의확률이 0.05보다 낮은 경우 유의성이 있다고 봄 1: 가장 특성 및 강도가 낮음, 7: 가장 특성 및 강도가 높음						

반복평가에 참여하지 않은 일반인이 구수한 향에 대해서 강하게 느끼는 것처럼 상대적으로 이상한 향 및 냄새에 대해서도 다른 패널에 비해 강하게 느끼는 것으로 나타났다. 이취에 대해서는 여성 및 남성, 훈련의 유무에 크게 차이가 나지 않았다.

참여 패널 별 결과비교- 고소한맛						
	전체	여성	남성	훈련된 패널	식품관련 학생	일반인
1차	4.89	5.10	4.29	5.10	7.77	4.45
2차	4.74	4.93	4.19	5.20	4.48	
유의확률	0.665	0.565	0.690	0.466	0.735	
평균	4.82	5.02	4.24	5.15	4.63	
* 유의확률 : 1차 및 2차 값의 독립 T검정(t-test)에 의한 유의성 검정. 유의확률이 0.05보다 낮은 경우 유의성이 있다고 봄 1: 가장 특성 및 강도가 낮음, 7: 가장 특성 및 강도가 높음						

고소한 맛에 대해서는 코로만 향을 맡아 평가한 구수한향에 대해서보다 더 높은 강도로 평가되었다. 여성이 남성보다 훈련된 패널이 상대적으로 고소한 맛에 대해 더 강하게 느끼는 것으로 평가되었다. 반복평가에 참여하지 않은 일반인의 경우 구수한향과 유사한 수준으로 고소하게 비과과자의 관능특성을 느낀 것으로 나타났다.

참여 패널 별 결과비교-짠맛						
	전체	여성	남성	훈련된 패널	식품관련 학생	일반인
1차	2.98	3.02	2.90	3.03	2.96	3.27
2차	2.92	2.97	2.81	2.73	3.04	
유의확률	0.156	0.097	0.949	0.446	0.175	
평균	2.95	2.99	2.86	0.288	3.00	
* 유의확률 : 1차 및 2차 값의 독립 T검정(t-test)에 의한 유의성 검정. 유의확률이 0.05보다 낮은 경우 유의성이 있다고 봄 1: 가장 특성 및 강도가 낮음, 7: 가장 특성 및 강도가 높음						

대체로 비과과자를 짜다고 느끼지는 않는 것으로 나타났다. 반복평가에 참여하지 않은 일반인은 비과과자를 좀 더 짜게 느낀 것으로 나타났다.

참여 패널 별 결과비교- 단맛						
	전체	여성	남성	훈련된 패널	식품관련 학생	일반인
1차	3.96	3.90	4.14	4.40	3.71	4.95
2차	4.16	4.11	4.29	4.23	4.12	
유의확률	0.725	0.978	0.622	0.610	0.823	
평균	4.06	4.01	4.21	4.32	3.91	
* 유의확률 : 1차 및 2차 값의 독립 T검정(t-test)에 의한 유의성 검정. 유의확률이 0.05보다 낮은 경우 유의성이 있다고 봄 1: 가장 특성 및 강도가 낮음, 7: 가장 특성 및 강도가 높음						

단맛에 대한 평가는 4.1점 수준으로 단것도 달지않은 것도 아닌 보통의 단맛 수준으로 평가되었다. 반복평가에 참여하지 않은 일반인은 비과과자를 다른 패널에 비해 달다고 느끼는 것으로 나타났다. 남성이 여성에 비해 비과과자에 대해 좀 더 달게 느끼는 것으로 나타났다.

참여 패널 별 결과비교- 이미(이상한 맛)						
	전체	여성	남성	훈련된 패널	식품관련 학생	일반인
1차	2.40	2.31	2.67	2.20	3.71	2.41
2차	2.50	2.41	2.76	2.43	4.12	
유의확률	0.719	0.878	0.481	0.202	0.831	
평균	2.45	2.36	2.71	2.32	3.91	
* 유의확률 : 1차 및 2차 값의 독립 T검정(t-test)에 의한 유의성 검정. 유의확률이 0.05보다 낮은 경우 유의성이 있다고 봄 1: 가장 특성 및 강도가 낮음, 7: 가장 특성 및 강도가 높음						

표사분석에 의해 표현된 다양한 맛과 특징에 비해 비과과자의 맛이 많이 낮설거나 부정적으로 독특하지는 않은 것으로 평가되었다. 반복평가에서도 평가간 유의적인 차이가 없었다. 여성이 남성에 비해 비과과자에 대해 호의적인 것으로 평가하였다.

참여 패널 별 결과비교- 바삭한 정도						
	전체	여성	남성	훈련된 패널	식품관련 학생	일반인
1차	6.33	6.48	5.90	6.20	6.401	6.14
2차	6.35	6.49	5.95	6.13	6.49	
유의확률	0.978	0.775	0.425	0.635	0.482	
평균	6.34	6.48	5.93	6.17	6.44	
* 유의확률 : 1차 및 2차 값의 독립 T검정(t-test)에 의한 유의성 검정. 유의확률이 0.05보다 낮은 경우 유의성이 있다고 봄 1: 가장 특성 및 강도가 낮음, 7: 가장 특성 및 강도가 높음						

바삭한 질감은 다른 관능특성에 비해 높게 평가되었다. 여성이 남성에 비해 바삭한 정도를 더 크게 느끼는 것으로 나타났다.

참여 패널 별 결과비교- 딱딱한 정도						
	전체	여성	남성	훈련된 패널	식품관련 학생	일반인
1차	3.98	3.93	4.10	4.43	3.71	3.91
2차	3.88	3.80	4.10	4.47	3.54	
유의확률	0.202	0.470	0.090	0.729	0.543	
평균	3.93	3.87	4.10	4.45	3.63	
* 유의확률 : 1차 및 2차 값의 독립 T검정(t-test)에 의한 유의성 검정. 유의확률이 0.05보다 낮은 경우 유의성이 있다고 봄 1: 가장 특성 및 강도가 낮음, 7: 가장 특성 및 강도가 높음						

딱딱한 정도는 보통으로 평가되었으며, 남성이 여성에 비해 더 딱딱하게 느꼈으며, 훈련된 패널이 더 딱딱하게 평가한 것으로 나타났다.

참여 패널 별 결과비교- 기호도						
	전체	여성	남성	훈련된 패널	식품관련 학생	일반인
1차	4.82	5.07	4.10	5.00	4.71	4.59
2차	4.74	4.92	4.24	4.80	4.71	
유의확률	0.760	0.585	0.782	0.508	0.976	
평균	4.78	5.00	4.17	4.90	4.71	
* 유의확률 : 1차 및 2차 값의 독립 T검정(t-test)에 의한 유의성 검정. 유의확률이 0.05보다 낮은 경우 유의성이 있다고 봄 1: 가장 특성 및 강도가 낮음, 7: 가장 특성 및 강도가 높음						

기호도는 대체로 보통보다는 맛있다고 평가하였다. 여성이 남성에 비해 비파과자에 대해 맛있다고 평가하였는데, 여성은 고소한맛과 바삭한 정도를 남성에 비해 더 높은 강도를 평가했고 상대적으로 이미나 이취에 대해서는 남성에 비해 낮은 강도로 평가했다. 남성의 경우 비파과자에 대해 조금 더 단맛을 느낀 것으로 나타났으나 비파과자의 기호도에 영향을 미친 가장 큰 특성은 고소한 맛과 바삭한 질감인 것으로 나타났다.

7. 발효율금 및 비파엽추출물 함유 유기농스낵 제품화

가. 산업화를 위한 품목제조보고 및 영양성분검사, 자가품질검사

본 사업을 통해 개발된 제품의 판매를 위해 국가공인시험기관에 12종의 영양성분분석 및 자가품질검사를 의뢰하여 결과를 얻었으며, 담양군 위생계에 품목제조보고를 제출하고 산업화를 위한 법적서류를 갖추었다.

유기농와이칩			
	품목제조보고서	영양성분검사	자가품질검사
유기농지칩			
	품목제조보고서	영양성분검사	자가품질검사

나. 제품화

디자인은 한국디자인진흥원(KIDP)에서 우수디자인업체로 선정된 디자인 전문회사와 제품의 컨셉과 특징에 적합한 디자인을 선정하여 제품화하였다.

유기농와이칩		
	디자인	패키지
유기농비칩		
	디자인	패키지

다. 제품화

본 사업의 소재인 발효율금으로는 참여기관만의 유기농카레분을 별도로 제작하여 카레의 상징적인 컬러인 ‘Yellow’ 를 특징으로 한 ‘유기농와이칩’ 을 비파엽추출물로는 면역기능 증진에 도움을 주는 클로렐라를 함께 이용하여 ‘Green’ 을 특징으로 한 ‘유기농지칩’ 을 산업화하였다. 건강지향식품의 산업화를 위해 품목제조보고를 신고하였으며, 포장디자인을 완성하고 제품을 양산하여 국내·외 시장에 샘플 및 설명서를 전달하여 적극적인 마케팅을 수행 중이다. 이후 생산효율성을 반영한 대량생산 구축과 국내·외 마케팅을 통해 글로벌 산업화를 이루고자 한다.

8. 개발된 유기농 건강지향식품의 국내·외 산업화

가. 유기농스낵의 국내·외 시장동향

(1) 유기농식품 정의 및 필요성

- 유기농식품’ 이란 유기농산물과 유기가공식품을 합한 것으로, 유기농산물은 전환기간(다년생 작물 3년, 그 외 작물 2년) 이상을 유기합성 농약과 화학비료를 사용하지 않고 재배한 것을 의미하며, 유기가공식품은 유기농산물로 인증을 받은 원료로 95% 이상 사용한 식품을 말한다.

- 21세기에 들어오면서 우리나라를 포함한 OECD 국가에서는 환경오염 및 잔류 농약 등의 문제로 화학농약과 화학비료의 사용을 줄이는 친환경 농업정책을 적극 추진하고 있다.
- 소비자들의 소득수준 향상과 건강에 대한 관심이 급증하면서 안전한 먹거리, 즉 유기농산물을 포함한 유기농식품에 대한 수요가 크게 증가하고 있다.

(2) 국외시장현황

(가) 유기농업

세계 유기 농경지 면적은 전체 농경지 면적의 약 1% 정도수준이나 2002년 이래 매년 20% 정도 증가하여, 2012년 기준 164개국 총 3,750만 ha에서 이루어지고 있다. 대륙별로는 오세아니아가 1,216만 ha로 가장 넓으며, 유럽 1,117만 ha, 라틴아메리카 684만 ha, 아시아 322만 ha, 북아메리카 301만 ha, 아프리카 115만 ha의 순이며, 유럽의 경우 2007년부터 2012년까지 연평균 7.53%로 빠르게 증가하고 있다. 국가별 자료를 살펴본 결과, 호주가 약 1,200만 ha로 가장 넓은 유기농경지 면적을 가지고 있으며, 아르헨티나(360만 ha), 미국(220만 ha), 중국(190만 ha), 스페인(160만 ha) 등의 순이었다. 또한 유기농업 주요작물을 살펴본 결과, 곡류(255만 ha), 커피(60만 ha), 올리브(54만 ha), 유지종자류(50백만 ha) 등의 순이었다(5).

[세계 지역별 유기농업 면적의 변화추이]



자료: FiBL-IFOAM survey(2014)

(나) 유기농식품

세계 유기 농업의 성장과 더불어 유기 식품 시장 역시 2000년 179억 달러에서 2012년 638억 달러(약 500억 유로, 44%)로 빠르게 성장하고 있으며, 농협중앙회 자료에 의하면 2015년 881억 달러 규모로 성장할 것으로 예상된다. 국가별 자료를 살펴보면 2012년 기준, 미국이 226억 유로(약 287억 달러)로 전체 시장의 44%를 차지하며, 그 뒤로 독일 70억 유로(약 89억 달러, 14%), 프랑스 40억 유로(약 51억 달러, 8%) 등의 순이었다. 미국과 유럽 선진국을 중심으로 유기농식품 시장은 매년 20% 내외의 지속적인 성장세를 보이고 있다(9).

[세계 유기농식품 시장규모]

(단위: 억 달러)

구분	연도	시장규모						CAGR(%)	
		2000년	2004년	2006년	2008년	2010년	2012년		2015(E)년
세계 시장		179	278	402	510	591	638	881	11.36

자료: FiBL and IFOAM, Organic Monitor, 농협중앙회

(3) 국내시장현황

(가) 유기농업

2013년 기준, 친환경 농산물의 총 재배 농가는 126,752호, 재배면적은 141,652 ha 이며, 총 출하량은 1,181,426톤이었다. 이 중, 무농약 농산물 출하량이 전체의 58.5%로 가장 많았으며(691,238톤), 저농약 농산물 31.4%(370,898톤), 그리고 유기 농산물 10.1%(119,290톤)의 순이었다. 저농약 농산물의 경우 2008년 1,519,070톤으로 전체 친환경 농산물 출하량의 69%로 가장 많은 비중을 차지하였으나, 2010년 신규인증 중단, 2016년 인증제 완전 폐지로 경작농가와 재배면적이 급격히 감소하고 있다. 저농약 농산물의 급격한 감소로 인해 전체 친환경 농산물의 출하량은 감소하고 있으나, 유기농산물과 무농약 농산물의 경우 2012년까지 농가 수와 재배 면적이 꾸준히 증가하고 있는 상황이다. 유기 농산물의 품목별 출하량을 살펴보면, 2013년 기준, 곡류가 48,512톤(41.5%)으로 가장 많았으며, 채소류 40,623톤(34.7%), 과일류 9,644톤(8.2%), 서류 4,006톤(3.4%), 특용작물 2,890톤(2.5%) 등의 순이었다(9).

[국내 연도별 친환경 농업 추이]

구분	연도	2008년	2009년	2010년	2011년	2012년	2013년
		유기 농산물	농가 수(호)	8,460	9,403	10,790	13,376
	면적(ha)	12,033	13,343	15,517	19,311	25,467	21,210
	출하량(톤)	114,649	108,810	122,243	123,314	168,256	116,991
무농약 농산물	농가 수(호)	45,089	63,653	83,136	89,765	90,325	89,992
	면적(ha)	42,938	71,039	94,533	95,253	101,657	98,233
	출하량(톤)	554,592	879,930	1,039,576	979,791	841,513	693,296
저농약 농산물	농가 수(호)	119,004	125,835	89,992	57,487	36,025	22,797
	면적(ha)	119,136	117,306	83,956	58,108	37,165	22,209
	출하량(톤)	1,519,070	1,369,034	1,053,702	749,136	488,466	371,138
합계	농가 수(호)	172,553	198,891	183,918	160,628	143,083	126,752
	면적(ha)	174,107	201,688	194,006	172,672	164,289	141,652
	출하량(톤)	2,188,311	2,357,774	2,215,521	1,852,241	1,498,235	1,181,425

자료: 국립농산물품질관리원 친환경인증통계정보

(나) 유기농식품

외국과 마찬가지로 국내 유기농식품 시장 역시 2000년대 중반부터 CJ, 대상, 동원 등 대기업이 시장에 참여하며 그 규모를 점차 키우고 있다. 2006년 국내 유기농식품 시장은 2,533억 원 규모에서 2011년 6,777억 원 규모로 연평균 21% 이상 성장하고 있으며, 2015년 1만 4,467억 원, 2020년 3만 1,769억 원에 이를 것으로 전망된다. 유통

분야에서도 유기농 전문점 초록마을이 2011년 263개 매장에서 2014년 6월 기준 351개로 그 수를 크게 늘렸으며, 올가홀푸드는 같은 기간 51개에서 84개로 매장을 확대했다. 생협은 매장 수도 계속 증가하여 한살림은 2011년 134개에서 2014년 3월 기준 168개, 아이쿱생협은 107에서 151개, 두레생협은 75개에서 95개로 늘어났다. 또한 국내 유기농식품 수입량 역시 매년 증가하여 2006년 35개국 1만 4,635톤(2만 7,486천 달러)에서 2012년 48개국 2만 5,551톤(5만9,864천 달러)으로 증가하였으며, 주요 수입국으로는 미국, 독일, 이탈리아, 중국, 프랑스 등이다(9).

[국내 유기농식품 시장규모]

(단위: 억 원)

구분	연도	시장규모					CAGR(%) (*11~20)	
		2006년	2007년	2008년	2011년	2015년(E)		2020년(E)
유기농산물		1,114	1,427	1,885	3,000	6,510	14,296	18.94
유기가공식품		1,419	1,719	2,158	3,777	7,957	17,473	18.55
합계		2,533	3,146	4,043	6,777	14,467	31,769	18.73

자료: 한국농수산식품공사

(2015, 2020년 예측값: 한국농촌경제연구원 유기농산물 예측 자료 기반 산출)

나. 발효올금 및 비파염추출물 함유 유기농스낵 마케팅 전략 수립

(1) 최근 스낵시장 특징

(가) 수요 증가에 따라 물량 및 금액 측면에서 시장 규모 확대 추세

- 기존 주요 스낵 시장인 미국·유럽뿐만 아니라 아시아·라틴아메리카 지역 수요 증가
- 글로벌 브랜드 보급에 따른 개발도상국에서의 수요 증가
- 여성의 사회진출 증가, 여가시간 증대 등 생활 패턴 변화에 따른 수요 증가

(나) 시장 공략 주요 전략은 휴대하기 쉽고 먹기 쉬운 편리함, 실용성 있는 포장, 저칼로리 • 저탄수화물 • 유기농 재료 사용 • 설탕 함유량 줄이기 등 웰빙(Well-being) 조리법에 포커스를 맞춤

- 바빠진 라이프스타일 및 여행 빈도 증가 등에 따라 최근 소비자는 한입에 먹을 수 있거나 들고 다니면서 먹을 수 있는 스낵 선호
- 자동차 킵홀더에 맞는 포장용기, 재밀봉 가능한 포장 등 휴대하기 쉽거나 보관하기 쉬운 포장 선호
- 과거 정크 푸드(Junk Food)로 인식된 스낵류는 비만 인구 증가 등 최근 소비자들의 건강에 대한 관심도가 높아지면서 주요 기업들은 웰빙에 부합하는 상품을 출시하고 있음

* 최근 출시된 신상품의 약 40%가 건강에 좋은 특색을 지닌 상품임

(2) 국내 주요 유통채널 동향

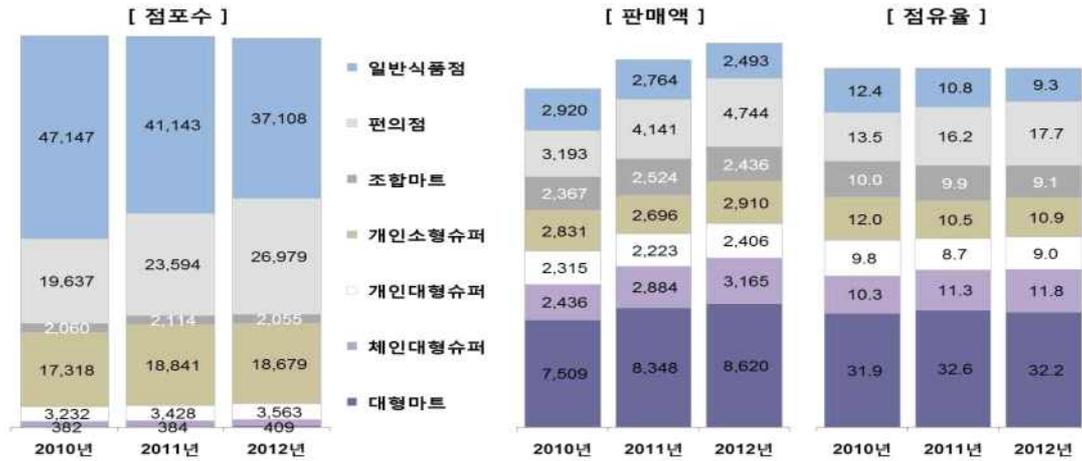
(가) 소비자들이 음식료품을 구매하는 주요 채널을 보면 대형마트, 슈퍼마켓(체인, 개인대형 및 소형), 조합마트, 편의점, 일반식품점으로 구분된다.

(나) 소매 유통채널의 점포수 변화를 보면 체인슈퍼, 편의점의 점포수는 지속적인 증

가세를 보이는 반면에, 일반식품점의 점포수는 지속적으로 감소하는 모습을 보이고 있다.

[그림 3-1-1] 주요 유통채널 현황

(점포수 : 개, 판매액 : 십억원, 점유율 : %)



(3) 소비 트렌드 변화

- (가) 제조사별 장수 브랜드 제품에 대한 소비자들의 보수적 구매행태가 지속되면서 맛과 향, 패키지 등의 기존 제품을 변경한 리뉴얼 상품이 지속적으로 출시되는 트렌드가 나타나고 있다.
- (나) 제조업체들에게는 위험 부담이 큰 신제품 출시보다는 비교적 안정적인 기존 스테디셀러 제품의 판매를 통해 신제품 개발 비용에 대한 비용을 절감하는 효과와 함께 기존 제품에 대한 리뉴얼을 통해 차별화 노력이 확대되었다.
- (다) 업계에서는 제과업계의 지속적인 성장에 대하여 ‘닥터유(Dr. You)’, ‘마켓오(Market O)’ 등 프리미엄 제과 시장의 안착, 30~40대 성인의 기존 제품에 대한 수요 증가와 지속적 판매 성과, 여성 소비자들의 증가, 그리고 외국산 제품들의 판매 성장이 지속되고 있다.



- (라) 대용량 또는 다양한 소용량 제품의 묶음 제품들의 판매, 수입산 제품들의 확대 및 지속적 출시로 매출이 확대될 전망이다
 - 비스킷, 스낵 품목 등에서 다양한 제품을 하나로 포장한 골라담기류의 특정 상품에 대한 대용량 포장이 인기이다.
- (마) 과자는 최근 맛과 향을 즐기기 위한 기호식품에서 식사 대용품으로 영역이 확대

되고 있으며, 제품의 프리미엄화가 빠르게 이루어지고 있다.

(바) 국내 주요 제조업체들이 프리미엄급 제품을 출시하였다.

- 소비자들의 소득 수준 증가 및 외식 수준 변화 추이에 맞추어 고급화, 다양화, 건강지향의 소비패턴을 반영한 웰빙 트렌드 제품이 강세를 보이고 있다.

(4) 마케팅 전략

(가) 국내 친환경전문시장

- 세부기관인 “산들촌”은 국내친환경시장내의 과자류 전문제조업체로서 유기가공인증에 필요한 원료의 선발과 가공인증기준에 적합한 가공라인을 확보하고 있다.
- 2009년부터 유기가공식품인증을 획득하여 현재까지 매년 정기심사를 이어오고 있는 만큼 본 사업을 통해 개발되는 건강지향식품의 유기가공식품 인증을 획득하여 친환경 웰빙제품으로 마케팅하고자 한다.
- 생협, 초록마을, 한살림, 풀무원 올가, 백화점 등 국내 친환경전문마켓 약 1,500개 매장에 유기농컬러칩을 입점시킬 계획이다.

(나) 국내 대형유통업체 및 온라인 판매망 구축

- 유기농쌀을 주원료로 하는 간편식사대용식으로 홍보할 예정이며, 건강이미지의 현대적인 해석과 감성적인 패키지를 개발하고자 한다.
- 홈플러스 내의 유기농존, GS편의점 및 일반마켓의 친환경전문코너에 입점시키고자 한다.
- 쿠팡 등 소셜커머스 업체를 활용하여 소비자 반응을 살피고 파워블로거를 통해 온라인 홍보를 하고자 한다.

(다) 해외 시장

- 본 사업을 통해 확보된 기능성의 과학적인 데이터를 활용한 마케팅계획을 수립하고 활용할 예정이다.
- 기존의 바이어들을 통한 수출 및 판촉행사 진행
- 신규시장 진출 및 기존 수출국가의 매출확대를 위한 해외식품전문전시회에 5회 이상 참가하고자 한다.

다. 국내·외 마케팅 결과

(1) 국내 오프라인 및 온라인 산업화

(가) 국내친환경시장의 대표적인업체인 생협(i-coop)에 입점이 되었으며, 소비자마케팅을 위하여 매장에서 소비자 판촉행사를 진행하였다.



<자연드림 매장>



<홍보 및 시식행사>

(나) 대형유통업체인 홈플러스스 유기농존에 입점하였다.

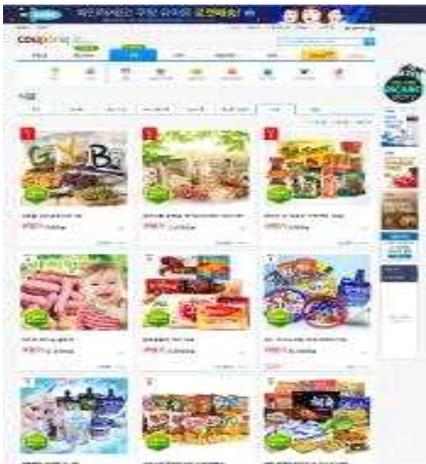


<홈플러스스 유기농존>



<컬러칩 입점모습>

(다) 소셜커머스 “쿠팡” 입점 및 파워블로거 홍보



<쿠팡 식품류 1위>



<파워블로거 평가>



<쿠팡 입점모습>



<소비자 댓글반응>

(2) 해외마케팅을 통한 글로벌산업화

(가) 2012년 해외마케팅



<싱가포르박람회>



<동경식품박람회>



<상해식품박람회>



<말레이시아식품박람회>

(나) 2013년 해외마케팅



<미국 애너하임박람회>



<호주 시드니박람회>



<홍콩 식품박람회>



<태국박람회>



<뉴욕 팬시푸드>



<독일 쾰른박람회>

(다) 2014년 해외마케팅



<미국 에너지박람회>



<싱가포르 박람회>



<모스크바 식품박람회>



<필리핀 식품박람회>

(3) 국내·외 글로벌 산업화 결과

(가) 국내

- 본 사업을 통해 개발된 발효율금 및 비파엽추출물을 함유하는 유기농와이칩과 유기농 지칩을 생협, 초록마을 등을 비롯한 26개 국내친환경전문업체에 입점을 하였다.
- 쿠팡, 위메프 등 소셜커머스 업체와 온라인 판매업체에서 활발한 온라인 판매활동을 진행하고 있다.

(나) 해외

- 싱가포르, 홍콩, 미국, 중국에 수출을 하고 있으며 인도네시아, 말레이시아, 일본의 바이어들과는 수출에 대한 협의를 진행 중에 있다.

5절. 항스트레스 건강기능식품 소재 개발

1. 서론

전라남도는 전국대비 1위의 작물을 포함하여 매우 많은 생물자원을 생산하고 있는 반면 산업화율은 매우 미미한 실정이다. 예로서 황칠나무는 전국 생산량의 100%를 전남이 차지하

고 있으나 산업화 비율은 고작 10%도 못 미치고 있다. 따라서 풍부한 비교우위 생물자원을 지역경제를 주도할 수 있는 원동력으로 성장시키기 위하여, 비교우위 생물자원의 효율적이고 고부가가치를 창출하기 위한 활용방안의 제시가 이루어져야 한다. 따라서 전남 특산자원을 HTS(고속생리활성검색)를 이용한 소재 탐색 및 기능성 검색이 필수적이고, 첨단 생명공학적인 기법을 이용한 생리활성 검색, 기능성 소재 안정성/안전성 검토 및 임상시험을 통해 개별인정형 기능성원료소재 인증을 통한 건강기능식품 개발이 농림산업 발전의 유일한 해결책이다. 만병의 근원이라고 알려져 있는 스트레스는 각종 질환을 유발하는 주요 요인으로 현대 의학적으로 규명 되어 있고 우울증과 같은 사회적으로 부담이 되는 질병의 주요 원인이다. 스트레스는 항상성과 기관의 균형이 파괴되었을 때 나타나는 심리적, 신체적 변화로, 스트레스를 받는 동안 항상성을 유지하기 위해 여러 기관에서 이에 대처하는 특이적인 반응들이 활성화된다(10). 가장 일반적인 생리적인 반응으로 시상하부-뇌하수체-부신피질 축(hypothalamus-pituitary-adrenal gland ; HPA axis)에 의해 조절되며, 스트레스가 주어지면 시상하부에서 부신피질 자극 호르몬 방출호르몬(Corticotropin releasing hormon, CRH)이 생성되어 뇌하수체 전엽을 자극, 부신피질자극호르몬(adrenocorticotropic hormon, ACTH)을 방출하고, 이는 부신피질에 분비되어 부신의 cortisol 등 glucocorticoid의 혈액 중으로의 분비를 증가시켜, 신체 각 기관으로 전달된다(11). glucocorticoid는 스트레스에 대해 반응하여 각종 물질 대사, 면역 활성, 심혈관계 활성 및 뇌기능 등 다양한 생리적 적응 반응을 유도하는 스트레스 호르몬으로 알려져 있다(12).

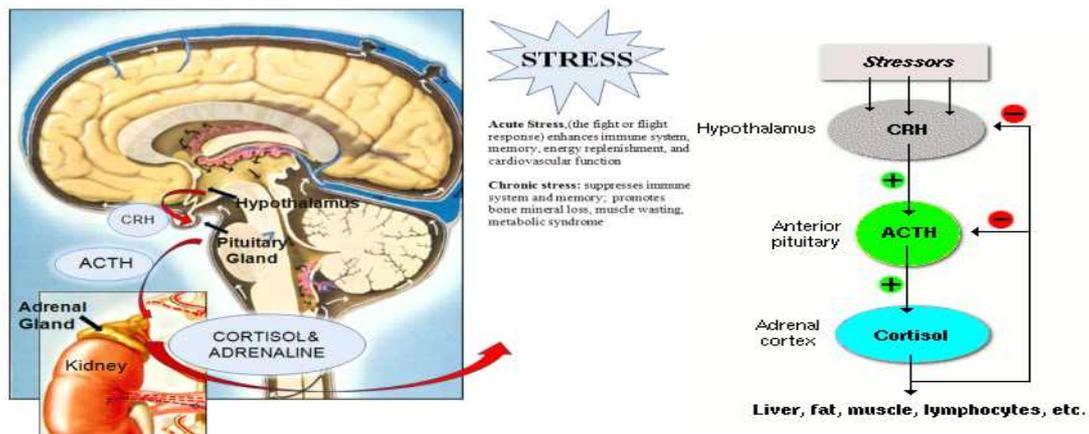


Fig. 1. Cortisol secretion is suppressed by classical negative feedback loops.

그리고 glucocorticoid가 만성스트레스에 의하여 혈중농도가 높아지고, 장기간 노출되면 기억과 학습을 담당하는 해마의 위축 및 손상뿐만 아니라, 신경계와 연관된 다양한 정신적 질병(불안증, 우울증, 정신장애 및 수면장애) 또한 발생할 수 있다(13).

스트레스와 정신적 질환은 서로 많은 연관을 가지고 있으며, 최근 별개로 연구되고 있던 HPA axis과 세로토닌은 만성스트레스 상태에서 상호작용한다는 새로운 관점이 제시되고 있다. 각 시스템의 중추적 부위인 실방핵(paraventricular nucleus)과 해마(hippocampus)는 뇌의 변연계에 해당하며, 이는 각성, 수면, 식욕, 감정뿐만 아니라 기억 및 인지능력과 관련이 있다(14). 세로토닌(serotonin, 5-hydroxytryptamine, 5-HT)은 뇌 중추영역에서 다양한 작용을 하는 신경전달물질의 일종으로, 중뇌 봉선핵(dorsal raphe nuclei)에서 합성되며, 시상하부에서 선조체와 미상핵(caudate nucleus)을 지나 대뇌를 거쳐 해마로 전달되어 뇌 전체에 분포한다.

세로토닌 수용체는 크게 7군 14종으로 분류된다(5-HT₁₋₇)(15). Cyclic adenosine monophosphate (cAMP) 신호전달경로와 neurotrophic factor 신호전달경로가 알려져 있으며, 체온, 혈압, 내분비활동, 감정, 중독, 학습, 식욕, 성욕, 움직임, 구토, 통증 등 다양한 생리적 기능이 조절되는 것으로 알려져 있다(16).

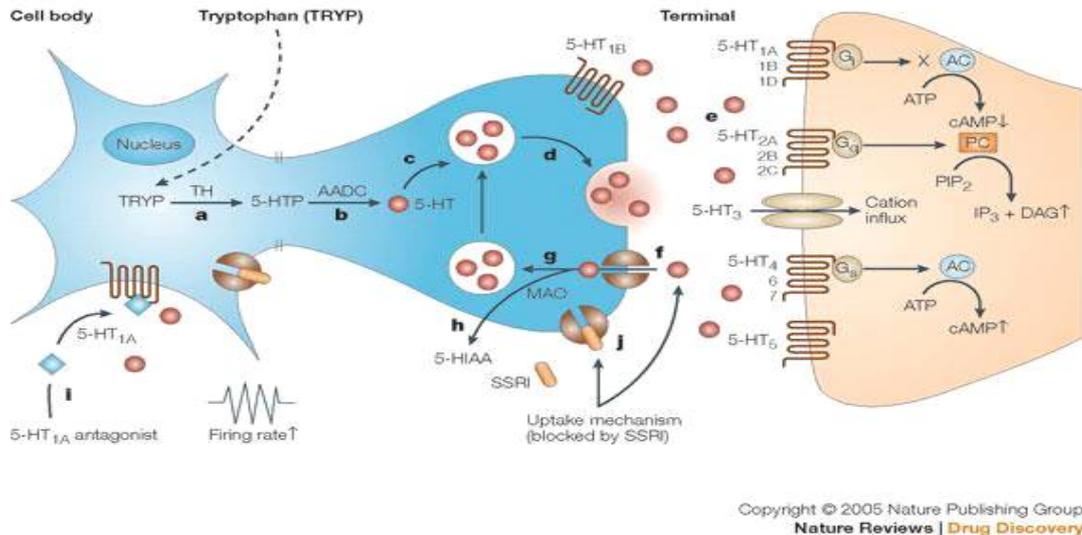


Fig. 2. Schematic of processes associated with serotonergic neurotransmission.

cAMP 이차 전령계는 활성 인자와 억제 인자들의 복잡한 상호작용에 의해 조절되고 있는데 5-HT_{4,5A,6,7} 수용체는 cAMP 경로를 활성화시키고, 5-HT_{1A,1B,1D,1E}는 억제한다. 신경전달물질이 해당 수용체와 결합하면 G 단백질을 경유하여 adenylyl cyclase (AC)를 활성화시키고, AC는 adenosine triphosphate (ATP)에서 cAMP의 생성을 증가시키고, cAMP는 다시 cAMP-dependent protein kinase (PKA)를 활성화시킨다(17,18). PKA는 수용체, 이온 통로(ion channel), G 단백질, 효소, 전사인자(transcriptional factor)를 포함한 특별한 단백질의 인산화를 통해 세포 기능을 조절한다(19).

NMDA 수용체와 스트레스는 많은 연관성을 가지고 있으며, 특히 해마에서 기억과 많은 연관성을 가지고 있다(20). NMDA 수용체의 활성화는 AMPA 수용체의 활성화를 유도하여, 신경세포의 spine 증가, 신경전달의 활성화 등 장기기억에 많은 영향을 주는 것으로 알려져 있다(21). NMDA 수용체는 도파민 D1 수용체와 직접적인 상호작용을 하면서 상호작용의 결과에 따라 세포의 사멸을 조절하거나, 정상적인 세포 사이의 통신을 유도하는 기능을 한다(22). 이는 D1 수용체와 NMDA 수용체 사이에 일어나는 상호작용에 따라 세포의 사멸이 조절된다는 것을 의미하는 동시에, NMDA 수용체가 세포의 사멸에 직접적으로 관여한다는 것을 의미한다. 더욱이 NMDA 수용체가 D1 수용체와 상호작용할 때는 세포의 사멸과 세포 사이의 신호전달 조절기능이 서로 다른 기작을 통해 독립적으로 진행된다. 다시 말해 세포의 사멸과 세포 사이의 신호전달 기능이 다른 하나의 기능에는 영향을 미치지 않고, 서로 다른 기능만을 선택적으로 조절하면서 진행된다(23). 이를 바꾸어 말하면, NMDA가 관여하는 세포 사멸 기능을 줄일 수 있는 방법만 개발되면, 뇌세포의 사멸을 막을 수 있다는 말이 된다. 이 때문에 뇌졸중, 정신분열증, 골다공증, 간질, 치매 등 각종 질환을 치료하기 위한 일환으로 NMDA 수용체에 대한 다양한 연구가 이루어져 왔다. 예를 들어, 술을 마신 뒤 기억이 나지 않는 현상, 곧 '블랙

아웃' 현상도 알코올이 뇌에 작용해 NMDA수용체의 활동을 차단하기 때문에 일어난다는 것이 학계의 정설이다. NMDA 활동이 차단되면, 뇌의 신경세포 사이에서 신호를 전달하는 매개 역할을 하는 글루탐산염도 활동을 멈추기 때문이라는 것이다(24). 따라서 NMDA 수용체를 활성화하거나, NMDA가 매개하는 세포의 사멸만 줄일 수 있다면, NMDA 수용체의 활성이 비정상적인 상태를 보이는 정신분열증 등 각종 질병을 치료할 수 있는 길이 열리게 되는 것이다.

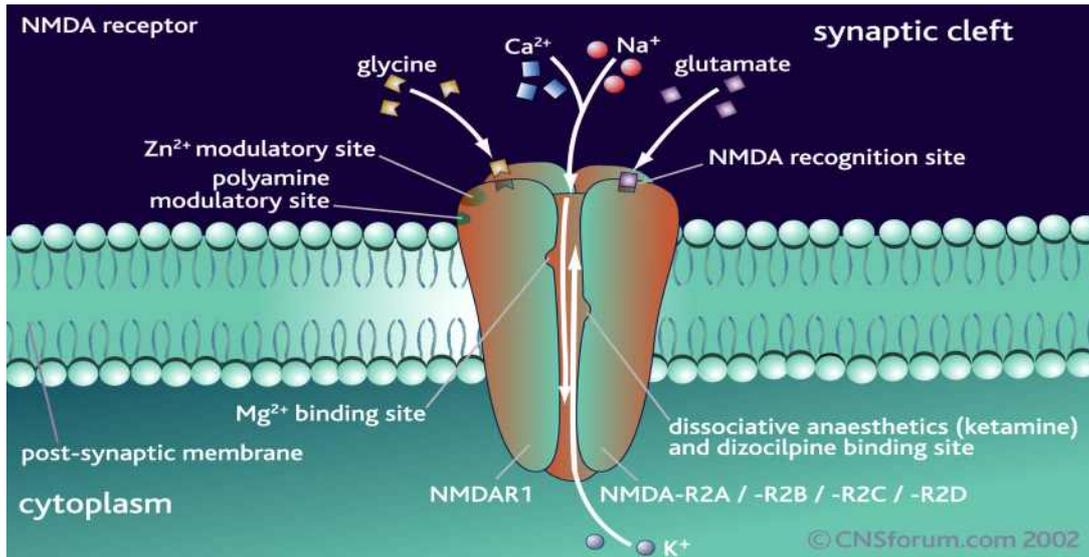


Fig. 3. NMDA receptor, showing different subtypes.

그리고 신체 내 산소에 의하여 유래되는 superoxide, hydroxy peroxy alkoxyl, hydroperoxyl radical, nitric oxide 등과 같은 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)은 호흡 과정이나 세포 대사과정에서 자연스럽게 생성되며 여러 가지 세포 반응을 조절하는 역할을 한다. 하지만 과도한 스트레스, 흡연, 음주 등 여러 가지 원인으로 인하여 과도하게 생성된 활성산소는 노화는 물론, 알츠하이머, 파킨슨 증후군 등과 같은 퇴행성 뇌질환을 일으키는 원인으로 알려져 있다. Heme oxygenase (HO)는 세포의 항산화 시스템에 중요한 구성요소로서 HO 유도체중 하나인 HO-1은 세포내의 heme을 분해하여 일산화탄소, 철, billiverdin을 만든다. 분해된 생성물인 일산화탄소, 철, billiverdin과 HO-1 그 자체적으로 세포손상 및 사멸의 억제, 염증 및 항산화 작용을 하는 것으로 알려져 있으며, 다양한 질병의 타겟으로 주목을 받고 있다(25). 특히 최근에는 HO-1과 그 부산물들이 항산화 작용을 통하여 산화적 스트레스에 의한 뇌 세포 손상을 억제 한다는 많은 연구가 보고되고 있다.

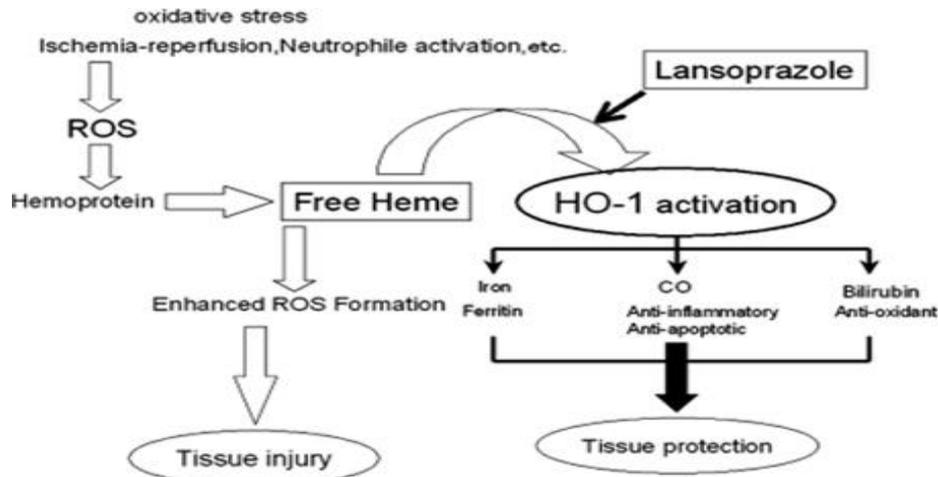


Fig. 4. Protective role of heme oxygenase-1 (HO-1) in oxidative tissue injuries. Oxidative stresses results in the production of free heme.

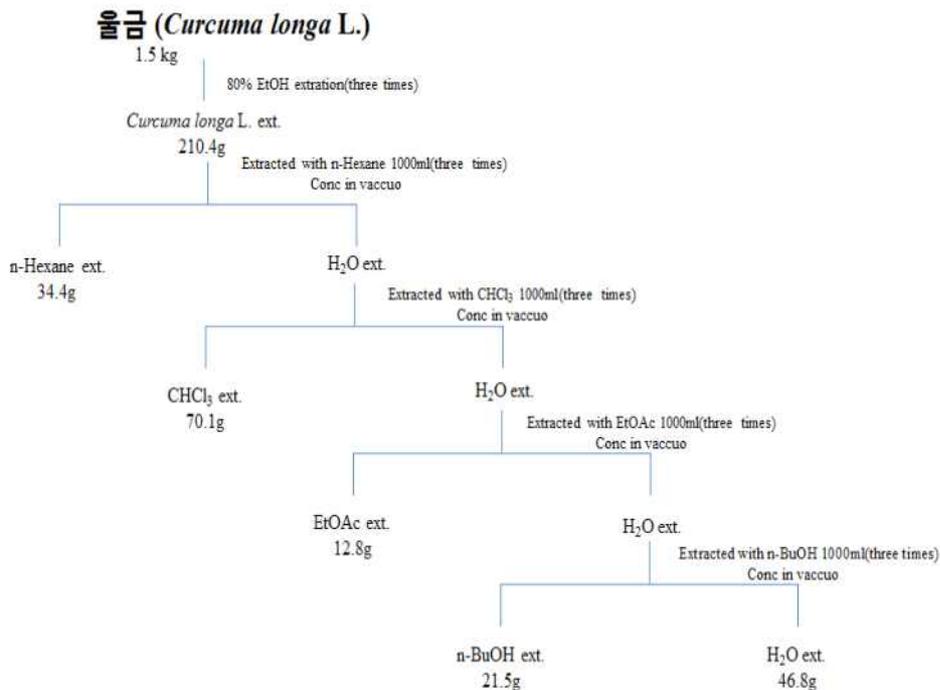
스트레스를 제어하는 방법으로는 치료적인 접근보다 예방을 목적으로 하는 기능성 식품으로 충분히 제어할 수 있으므로, 스트레스 해소에 도움을 주는 건강기능성식품의 개발을 위한 연구와 제품 개발이 절실히 필요하다. 따라서 본 사업의 소재인 울금(*Curcuma longa* L.)을 대상으로 항스트레스 활성소재의 기능성을 평가하여 고부가가치 기능성 식품을 개발하고자 한다.

2. 방법

가. 울금의 활성성분 추출 및 분획

(1) 울금으로부터 curcuminoid 및 Ar-turmerone 추출 및 분획

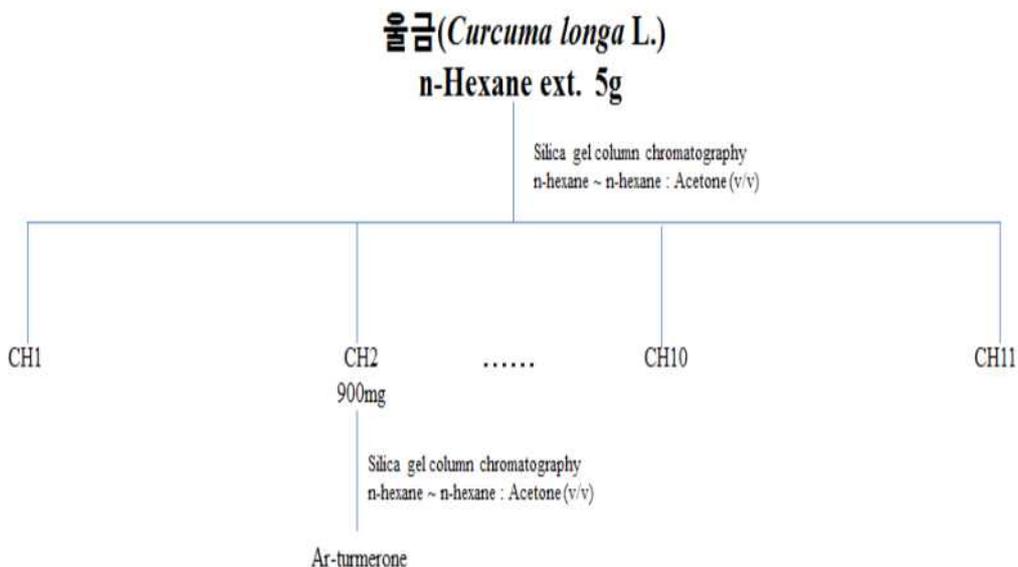
울금 1.5kg을 80% 주정으로 추출, 감압 농축하여 이 농축물을 물로 충분히 현탁하여 2배 부피의 n-hexane으로 1차 용매이행을 3회 수행하여 물층 과 n-hexane ext. (34.4g)로 분리하였다. 물층을 다시 2배 부피의 chloroform으로 2차 용매이행을 3회 수행하여 CHCl₃ ext. (70.1g)를 분리 하였고, 물층을 다시 2배 부피의 ethylacetate로 3차 용매이행을 3회 수행하여 EtOAc ext. (12.8g)를 확보하였다. 마지막으로 n-butanol로 4차 용매이행을 3회 수행하여 n-BuOH ext. (21.5g)과 H₂O ext. (46.8g)를 확보하였다 (Scheme 1).



Scheme 1. Fractionation procedure of *Curcuma longa* L.

(가) 울금 n-Hexane 층으로부터 Ar-turmerone의 분리

울금의 n-Hexane ext. 을 silica gel column chromatography (6×70 cm)을 이용하여 n-Hexane : Acetone(100:0 ~ 1:1= v/v)순으로 단계적으로 극성을 높여가면서 open column chromatography를 실시하였고 TLC로 모니터링 하면서 11개의 소분획을 얻었음. 그 중 2번째 sub-fraction에서 TLC와 GC-MS를 이용하여 ar-turmerone을 확인하였고, 2차 silica gel column chromatography를 실시하여 n-Hexane → n-Hexane : Acetone 순으로 단계적으로 극성을 높여가면서 open column chromatography를 진행하였다 (scheme 2).



Scheme 2. Isolation of turmerone from the Hexane ext. of *Curcuma longa* L.

(나) HPLC에 의한 curcuminoid 분석

울금의 curcuminoid 분석은 시료 2~5g에 에탄올 100ml을 첨가하여 2시간동안 환류냉각 추출한 후, membrane filter(0.45 μ m)로 여과하여 시료용액으로 사용하였다. 전처리된 시료는 HPLC(Futecs, NS-4000)를 이용하여 분석하였다. HPLC 분석조건은 table 1. 과 같으며, Sigma사의 curcuminoid를 표준품으로 사용하였다.

Table 1. HPLC operating condition for the analysis of curcuminoid

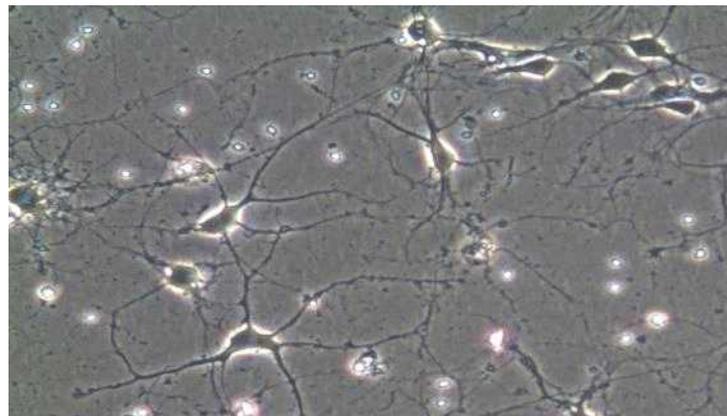
Items	Conditions
HPLC	Futecs NS-4000
column	20-5-C18-ace-EPS 5.0 μ m(250mm x 4.60mm)
detector	UV 420nm
Mobaile phase	ACN:0.1%acetic acid=7:3
Flow rate	1.0ml/min
Injection volum	20 μ l

나. 울금의 *in vitro* 및 *in vivo* 항스트레스 활성평가

(1) 울금의 *in vitro* 항스트레스 활성평가

(가) E18 Sprague Dawely (SD) rat 태아로부터 cerebral cortex neuron cell 분리

E18 Sprague Dawely rat 태아로부터 sucrose/glucose/HEPES가 포함된 ice-cold dissection solution에 cerebral cortex를 분리하였다. 분리한 cerebral cortex를 0.25% trypsin-EDTA에 넣고 37 $^{\circ}$ C에서 15분간 녹인 후 HBSS 버퍼로 옮겨 single cell을 얻었다. poly-L-lysine이 코팅된 플레이트에 cerebral cortex neuron cell을 분주하여 일주일동안 배양하였다.



(나) 세포독성 테스트

가공기술을 달리한 각 시료의 추출물 (실온, 고온, 20%, 80%주정 추출물)을 대상으로 MTT [(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide)]를 이용하여 cell cytotoxicity 하고 18일 된 Sprague Dawley rat으로부터 cerebral cortex neuron cell을 배양하여 시료의 독성을 측정하였다. 상기 독성검사를 끝으로 최대 활성, 유효효능 및 무독성을 보인 시료를 최종시료로 선정하여 나머지 *in vitro* test를 실시하였다.

(다) CORT에 의한 cell death에 대한 neurotoxicity 보호효과

각 시료의 *in vitro* 상에서의 CORT에 대한 neurotoxicity 보호효과를 보기 위해 다음과 같이 측정하였다. cerebral cortex cell을 2% B27 이 포함된 neurobasal medium에 배양하고 96-well plate에 세포수가 10^4 - 10^6 cell/ml가 되도록 seeding 한 후 일주일 이 지난 후에 CORT 및 각각의 시료를 처리하였다. 시료 처리 후 24시간 뒤에 cell death를 유도하여 그 protection 효과를 측정하였다.

(라) 1차 선정된 시료를 이용하여 *N*-methyl-D-aspartate (NMDA)에 의한 cell death에 대한 neurotoxicity 보호효과 검색.

각 시료의 *in vitro* 상에서의 NMDA에 대한 neurotoxicity 보호효과를 보기 위해 다음과 같이 측정하였다. cerebral cortex cell을 2% B27 이 포함된 neurobasal medium에 배양하고 96-well plate에 세포수가 10^4 - 10^6 cell/ml가 되도록 seeding 한 후 일주일 이 지난 후에 HEPES buffer로 1회 washing 후 다시 HEPES buffer에서 30분간 NMDA 및 각각의 시료를 처리하여 cell death 유도하였다. 시료 처리 후 30분 뒤에 condition media로 교체하고 그 protection 효과를 측정하였다.

(마) 울금으로부터 분리한 curcumin 및 Ar-turmerone을 대상으로 *in vitro* 상에서의 CORT에 의해 유도된 cell death에 대한 neurotoxicity 보호효과 확인

① MTT assay

curcumin 및 Ar-turmerone을 이용하여 *in vitro* 상에서의 CORT 및 NMDA에 대한 neurotoxicity 보호 효과를 보기 위해 다음과 같이 측정하였다. cerebral cortex cell을 2% B27 이 포함된 neurobasal medium에 배양하고 96-well plate에 세포수가 10^4 - 10^6 cell/ml가 되도록 seeding 한 후 일주일 이 지난 후에 CORT 및 각각의 시료를 처리하였다. 시료 처리 후 24시간 뒤에 cell death를 유도하여 그 protection 효과를 확인하기 위해 MTT assay를 수행하였다.

② LDH assay

cytotoxicity를 측정하는 또 다른 방법으로 LDH (Lactose dehydrogenase) assay를 수행하여 curcumin의 CORT 및 NMDA에 대한 neurotoxicity 보호 효과를 확인하였다. 세포에서 방출한 젖산 탈수소효소를 고감도로 측정하는 방법으로써, LDH는 세포질에 존재하는 효소로 통상은 세포막을 통과하지 않으나 세포막이 손상되면 세포 외부 즉 배지 중으로 방출된다. LDH는 젖산의 탈수소화를 촉매 작용해 pyruvate와 NADH를 생성한다. 이 NADH는 diaphorase의 촉매에 의해 테트라졸리움염 (INT)을 환원시켜 490 nm의 흡수를 갖는 적색의 formazan 색소를 형성함. 따라서 LDH 활성을 490 nm의 흡광도의 증대로 측정할 수 있다.

(바) 울금 및 발효울금의 가공법을 달리한 추출물을 대상으로 CORT 와 NMDA 에 의해 유도된 cell death에 대한 neurotoxicity 보호효과 확인

① MTT assay

1차 선정된 시료를 대상으로 *in vitro* 상에서의 CORT와 NMDA에 대한

neurotoxicity 보호효과를 보기 위해 다음과 같이 측정하였다. cerebral cortex cell 을 2% B27 이 포함된 neurobasal medium에 배양하고 96-well plate에 세포수가 10^4 - 10^6 cell/ml가 되도록 seeding 한 후 일주일이 지난 후에 HEPES buffer로 1회 washing 후 다시 HEPES buffer에서 15분간 CORT 및 각 시료들을 처리한다. 다시 15분 후에 NMDA를 처리하여 cell death 유도한다. 시료 처리 후 condition media 로 교체하고 그 protection 효과를 확인하기 위해 MTT assay를 수행하였다.

② LDH assay

cytotoxicity를 측정하는 또 다른 방법으로 LDH assay를 수행하여 울금 및 발효 울금의 CORT 와 NMDA에 대한 neurotoxicity 보호 효과를 확인하였다.

(2) 울금의 *in vivo* 항스트레스 활성 평가

(가) 실험동물의 구속스트레스 부여

1차 선정된 시료 중에서 울금 80%추정 추출물을 대상으로 immobilization stress 실험을 수행하였다. ICR mice (5주령) 3주간 하루 2시간 동안 (a.m 10시~p.m 12시) 높이 20 cm, 직경 7 cm의 아크릴 구속 상자에서 지속적인 구속 스트레스를 부여함(Fig. 5. 새로운 약물은 0.85% NaCl에 녹여, 매일 스트레스를 주기 1시간 전에 200ul 씩 경구 투여 하였으며, 대조군과 스트레스군은 0.85% NaCl 을 경구 투여하였다. 실험동물군은 군당 5마리로 다음과 같이 나누었다.

- i 제1군 대조군 (Vehicle) : 3주간 구속 스트레스 없이 0.85% NaCl 투여
- ii 제2군 스트레스 단독 처치군 (Vehicle+Stress) : 3주간 매일 2시간 구속 스트레스 처치와 함께 0.85% NaCl 동시처리
- iii 제3군 스트레스와 울금 추출물 동시 처치군 : 3주간 구속 스트레스와 함께 울금 추출물 동시 투여

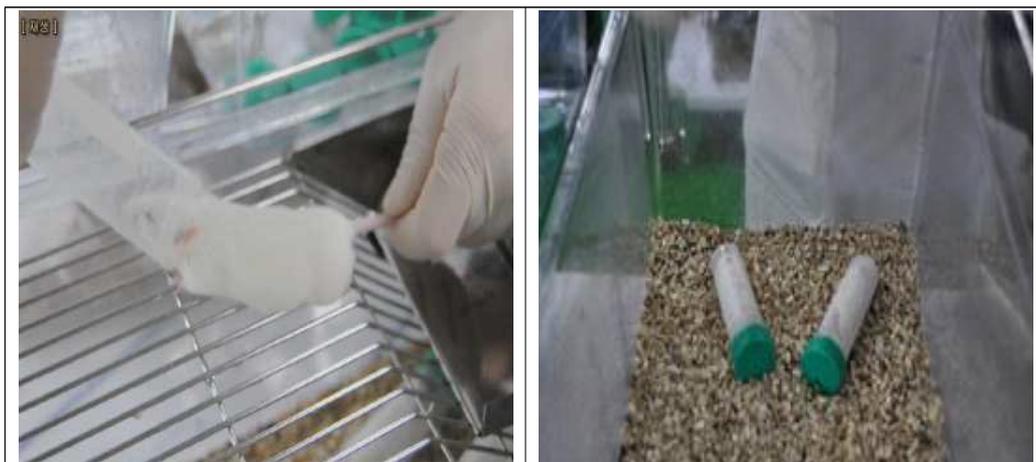


Fig. 5. immobilization stress model (구속 스트레스)

(나) 실험동물의 강제수영 테스트부여

1차 선정된 시료 중에서 울금 80%추정 추출물을 대상으로 Forced swimming test (강제수영 테스트)를 수행하였다. 첫째 날 15분간 강제수영 시키는 예비실험과 24시간 후에 시행하는 본 시험으로 구분하여 시행하였다.

실험동물 : ICR male mice 5주령

① 예비실험 첫째 날

유리나 plexiglas로 된 투명한 원통 (50cm 깊이 X 30 cm 직경)에 25℃ 내외의 물을 mouse 꼬리가 바닥에 닿지 않을 정도의 높이까지 채워 넣고 흰쥐를 15분간 물에 빠뜨린다.

② 24시간 후에 흰쥐를 5분 동안 물에 빠뜨려 본 실험을 진행

매 5초마다 부동자세(immobility), 수영(swimming), 등반(climbing)으로 구분하여 시간, 횟수 측정하며, 실험동물군은 군당 8마리로 다음과 같이 나누었다.

i 제1군 대조군(Vehicle) : 0.85% NaCl 투여

ii 제2군 스트레스 단독 처치군(0.85% NaCl+Stress)

iii 제3군 : 항우울제 단독 처치군 (Fluoxetin, sigma사, F132, 30mg/kg) : 본 실험 30분 전에 복강주사

iv 제4군 스트레스와 울금 추출물 동시 처치군



Fig. 6. Forced swimming test model

다. 초고속생리활성 검색 시스템을 이용하여 울금의 효능 검색

(1) Caspase-3 activity

항스트레스 확인 인자 중 caspase-3의 activity를 검색하였다. 예정세포사멸 (apoptosis)과 염증에 관련된 생화학지표인 caspase-3 검색을 위하여 일주일 동안 배양한 cerebral cortex neuron cell에 CORT 와 NMDA를 함께 처리하여 세포독성을 유도하였고, 동시에 울금추출물을 처리하여 24시간 후에 세포 고정 후 세포독성 보호효과를 HCS 장비를 이용하여 측정하였다.

(2) HO-1 activity

항스트레스를 확인할 수 있는 또 다른 인자 중 heme oxygenase-1 (HO-1)의 activity를 검색하였다. HO-1은 스트레스 반응하여 분비되는 효소로써 항산화제 역할을 하여 외부환경으로부터 세포손상을 막아준다. HO-1 activity를 측정하기 위하여 일

주일 동안 배양한 cerebral cortex neuron cell에 CORT 와 NMDA를 함께 처리하여 세포독성을 유도하였고, 동시에 울금추출물을 처리하여 24시간 후에 세포 고정 후 세포독성 보호효과를 HCS 장비를 이용하여 측정하였다.

라. 울금의 항스트레스 기전 규명

(1) Protein expression 확인

In vitro 상에서의 CORT에 대한 neurotoxicity 보호 효과를 보기 위해 다음과 같이 측정하였다. Cerebral cortex neuron cell을 2% B27 이 포함된 neurobasal medium에 배양하고 poly-L-lysine이 코팅된 60 mm plate에 세포수가 1×10^6 cell/ml가 되도록 seeding 한 후 일주일 이 지난 후에 스트레스 유도체인 corticosterone (CORT) 및 *N*-methyl-D-aspartate (NMDA)를 처리하였다. 이와 동시에 시료를 처리하여 cell death를 유도하고 24시간 뒤에 protection 효과를 측정한다.

마. 울금 80%주정 추출물에 대한 면역증강 실험 (2차년도 평가의견 반영)

(1) NO assay

면역세포에서 울금 80%주정 추출물의 면역증강 실험을 하기 위한 NO assay를 수행하였다. NO 생성 정도는 24 well plate에 5×10^5 cell/well의 RAW 264.7 cell을 배양하여 세포를 well에 부착시킨 후 FBS를 뺀 DMEM 배지로 24시간 배양하였다. 각 시료들을 농도별로 처리하여 37°C, 5% CO₂에서 1시간 배양한 후 100ng/mL의 LPS(lipopolysaccharide)를 처리하여 18시간 배양하였다. 세포 배양액 50 μ L에 Griess reagent인 1% sulfanilamide (Sigma chemical Co., St. Louis, MO, USA)가 포함된 5% phosphoric acid 50 μ L와 0.1% naphthylethylenediamine dihydrochloride (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) 50 μ L를 첨가하여 10분 간 반응시킨 후 microplate reader (Molecular Device, Sunnyvale, CA, USA)를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

(2) ROS assay

면역세포에서 울금 80%주정 추출물의 면역증강 실험을 하기 위한 ROS assay를 수행하였다. ROS 생성 정도는 48 well plate에 1×10^5 cell/well의 RAW 264.7 cell을 배양하여 부착시킨 후 각 시료들을 농도별로 처리하여 37°C, 5% CO₂에서 1시간 배양하였다. positive control로는 H₂O₂ 200 μ M을 처리하였다. 약물 처리 후 세포를 수확하기 30분 전에 5 μ M DCFH-DA를 처리한 후 Excitation 490 nm 파장과 Emission 526 nm 파장에서 분석하였다.

바. 세로토닌 수용체 활성 조절 (cAMP) 모델에서의 울금 80%주정 추출물 및 울금 single compounds의 보호효과 비교 및 탐색

CHO-K1 cells를 이용하였고, 세포를 24시간 배양 후 세로토닌 수용체를 48시간 동안 transfection하였다. 이후 상등액 배지를 제거하고 phosphodiesterase inhibitors IBMX (0.5mM)와 Ro 20-1724 (0.1 mM)를 포함한 PBS 로 배지 교체 후 울금 80%주정 추출물 및 울금 single compounds (curcumin, tetrahydrocurcumin, a azulene, kaempferol)와 serotonin

(5-HT) 100uM를 15분 동안 동시 처리 후 lysis한 시료를 R&D Systems cAMP Assay kit 실험 방법에 따라 활성 측정하였다. 올금 single compounds는 시그마 사에서 구입하였다.

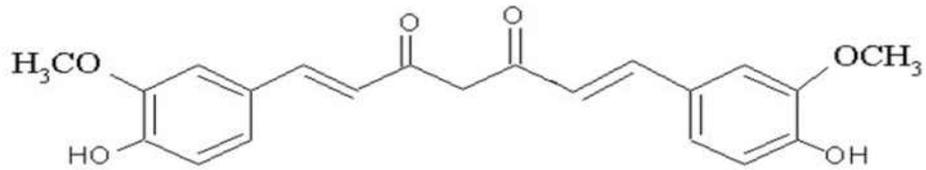


Fig. 7. Structure of Curcumin

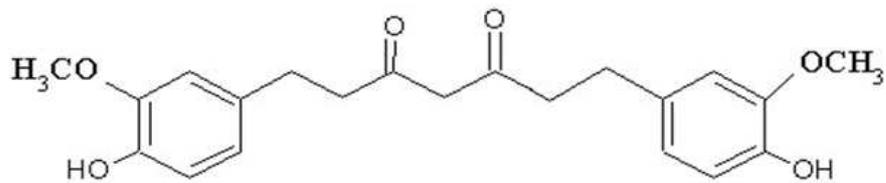


Fig. 8. Structure of tetrahydrocurcumin

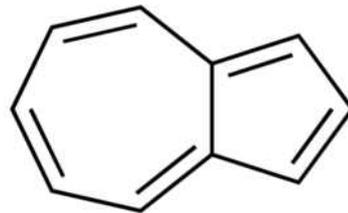


Fig. 9. Structure of Azulene

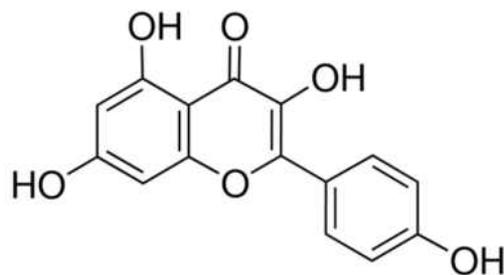


Fig. 10. Structure of Kaempferol

사. 기억력 감퇴 동물모델을 이용한 스트레스와 기억력 증가 및 신경보호 상관관계 규명

(1) 기억력 감퇴 모델

ICR mouse 4주령 수컷을 그룹핑 하여 각 군당 7마리씩 순화하였다.

Group 1 : control 군

- Group 2 : A β 1-42 (4 μ g) 로 치매유발
- Group 3 : BF-7 (기억력 개선 치료약물)
- Group 4 : 치매 유발 + 울금 100mg/kg b.w.
- Group 5 : 치매 유발 + 울금 300mg/kg b.w.
- Group 6 : 치매 유발 + 울금 500mg/kg b.w.

3일간 순화시킨 후 isoflurane (3%, i.a.)으로 마취시켜 A β 1-42 (4 μ g)를 1 μ l/min 율로 해마에 주입하였고 구멍은 dental acrylic cement로 덮어주었다. 수술 후 뒷다리에 penicillin(100,000 U)을 주입하였다. 모든 행동테스트는 수술 후 2일이 지나서 시작하였다.

(2) Morris water maze test

circular pool (diameter: 100 cm, height: 50 cm)에 25 \pm 1 cm 높이로 물을 채우고 투명한 platform(24 cm)을 물표면 보다 1 cm 낮게 침수시킨다. non-fat milk를 넣어서 불투명하게 만든다. 실험 첫째 날 platform 없는 상태에서 60초 동안 swim training 시킨다. 다음날 5분 간격으로 4번의 session이 주어져 수영을 실시하였다. 전체 테스트 기간 동안 시작점은 각 세션에 대해 변경되지만, 플랫폼의 위치는 고정시켰고, 플랫폼에 도달하는 시간을 측정하였다. 마지막 3일 째 훈련 후 당일, 각 마우스를 플랫폼이 존재하지 않는 상태에서 프로브 테스트를 90초간 실시하였다.

(3) Passive avoidance test

기억력 테스트의 일종으로, 장치는 두 구획으로 분리되어 밝은 곳과 어두운 박스로 구성되어있다. 어두운 구획은 스테인리스 충격 그리드 바닥이 설치되어 있다. 시험기간 동안 마우스를 밝은 챔버에 넣어 60초 동안 습관화 시킨 후 도어를 개방하고 어두운 챔버로 들어가기까지의 시간을 측정하였다. 마우스가 어두운 챔버로 들어가는 즉시 도어를 닫고 전기충격(75 V, 0.2 mA, 50 Hz)을 3초 동안 가했다. 5초 후에 마우스를 어두운 챔버에서 제거하여 cage에 돌려보냈다. 8시간 후에 이 실험을 다시 반복하였고 어두운 챔버로 들어가는 대기 시간을 기록하였다.

(4) ACh content alc AChE activity assay

ACh content는 뇌 파쇄액 20 μ l와 1% hydroxylamine 50 μ l를 96-well plate에 넣고 at 25° C에서 15분간 incubation 한 후, FeCl₃ (in 0.1N HCl, pH 1.2 \pm 0.2) 250 μ l를 넣고 540nm의 흡광도를 측정하였다. AChE activity assays는 DTNB (0.01 mM, 20 μ l) 와 0.1 mM sodium phosphate buffer (pH 8.0) 에 파쇄한 뇌 파쇄액 10 μ l를 96-well plate에 넣고 25° C에서 10분간 incubation 하였다. 0.1 M acetylthiocholine 10 μ l를 넣음으로써 반응을 개시하였다. 아세틸콜린의 가수분해는 thiocholine DTNB와의 반응의 결과로서 of yellow 2-nitro-5-sulfidobenzene-carboxylate 음이온의 형성을 412nm의 파장에서 10분 동안 모니터링 하였다.

(5) TUNEL staining

마우스를 마취시키고 0.1M 인산나트륨 완충액 (pH 7.4)에서 4% 포름알데하이드로 관

류 고정한 후 뇌 조직을 제거하여 4% 포르말데하이드 버퍼에 넣고 4° C overnight 하였다. 이 후 뇌조직을 파라핀 절편을 통해 5- μ m section을 획득하였다. 0.1 M citrate buffer (pH 6.0)가 담긴 plastic jar에 조직을 넣어 고정을 시킨다. 이후 슬라이드를 750W wave irradiation에 1분 동안 노출시키고 double-distilled water에 넣어 신속하게 cooling 한다. 그 다음 슬라이드를 Tris-HCl (0.1 M, pH 7.5, containing 3% BSA and 20% normal bovine serum)에 30분간 담그고 PBS로 3회 행구어 준다. TUNEL reaction mixture를 각 section에 분주하고 cover glass로 덮은 후 암실 37 ° C에서 60분 동안 incubation 하고 형광현미경으로 TUNEL-positive cell을 counting 하였다.

아. 원료표준화

(1) 건강기능식품 소재 제조공정 표준화(울금 80%주정 추출물)

울금은 전남 진도산을 경일약품사(전남, 순천시)에서 구입하여 사용하였으며, 그 일부는 한국인스팜 중앙연구소에 보관하고 있다. 추출/농축과 분무건조 공정은 본사인 한국인스팜(전남 화순군)의 추출/농축기(대신기공, 2Ton)와 분무건조기(천연자원연구원, 전남 장흥군, 미르코 2kg/h)를 이용하였다. 발효에탄올(이하 주정)은 대한약전 Assay 95.1~95.6 v/v%(수성약품주식회사)를 사용하였으며 물은 먹는물을 사용하였다.

80kg을 3회 실시 하였으며, 제조공정은 아래와 같이 (가) 원료평량 (나) 추출 (다) 농축 (라) 부형제 혼합 (마) 살균 (바) 분무건조 (사) 포장 및 보관 과정으로 진행하였다.

(가) 원료평량

- 추출에 사용할 원료와 용매를 확인하고 칭량하여 추출기에 투입한다.

원료명	Lot	원료량(kg)	용매량(L)
울금	1	80	물 : 160 주정 : 640
	2	80	물 : 160 주정 : 640
	3	80	물 : 160 주정 : 640
합계	3 회	240	물 : 480 / 주정 : 1,920

(나) 추출

- 울금 80kg을 3회 추출한다.

- 추출기를 이용하여 79 °C에 도달 후 4시간 압력 0.7~0.75 Kg/cm²의 조건에서 추출한다.

(다) 농축

- 농축기를 이용하여 45 °C, 1,000 mmHg 조건에서 농축한다.

(라) 부형제 혼합

- 농축액의 고형물 대비 130%에 해당하는 말트린100(그레인프로세스, 미국)을 넣어 1시간 혼합하고, 20~30 Brix가 되도록 물을 투입한다.

(마) 살균

- 상기 (4)번의 농축액을 살균기에 넣고 70 °C로 30분간 살균한다.

(바) 분무건조

- Lot(1~3)을 200 °C로 사출하여 각각 분무건조하고 건조감량과 수득률을 측정한다.
- (사) 포장 및 보관
- 개별포장하여 저온창고에 보관한다.



(2) 울금 80%주정 추출물 지표성분 정량법 - Curcumin

① 검액준비

울금 원재료(건조물) 및 추출물 1 g을 정밀하게 달아 methanol 100 mL를 넣고 60분간 초음파 추출을 한다. 추출이 끝나면 0.45 μ m nylon filter로 여과하고, 여액을 검액으로 한다.

② 표준액 조제

Curcumin 표준품 약 15 mg을 정밀하게 달아 용량플라스크에 넣고 ethanol 100 mL로 하여, 150 ppm 용액을 제조하고, 150 ppm Curcumin 표준액 1,000 μ L를 20 ml 용량플라스크에 넣고 희석액으로 잘 혼합하여 7.5 ppm Curcumin 표준액을 표준용액으로 사용하였다.

③ 시험

검액 및 표준액 10 μ L씩을 가지고 다음

조건으로 액체크로마토그래프법에 따라 시험하여 각각의 액의 Curcumin의 피크 면적 A_T 및 A_S 를 측정한다.

④ 조작조건

- 검출기 : Diode array detector (측정파장 425 nm)
- 칼럼 : Shiseido Capell-pak UG 250*4.6mmI.D
- 칼럼온도 : 35°C
- 이동상 : 2% Acetic acid (45% ACN)
- Flow rate : 1.0 ml/min

⑤ 계산식

$$\text{Curcumin (mg/g)} = \frac{\text{표준용액농도(mg/mL)} \times \text{검체면적값} \times \text{부피} \times \text{표준품순도}}{\text{표준품면적값} \times \text{시료채취량(g)}}$$

3. 결과

가. 울금의 활성성분 추출 및 분석

(1) 울금 n-Hexane층으로 부터 ar-turmerone의 분리

울금의 n-Hexane ext. 을 silica gel column chromatography에 의해 얻은 소분획에 대해 TLC를 실시한 결과 그 중 2번째 sub-fraction에서 ar-turmerone이 뚜렷하여 이들 분획에 대해 화합물의 분리를 시도하였다. 2차 silica gel column chromatography를 실시하여 ar-turmerone을 얻을 수 있었고, $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$ 등의 분광학적인 방법 및 문헌치와 비교하여 ar-turmerone임을 확인 할 수 있었다.

<ar-turmerone>

EI-MS (m/z) : 216(M^+)

$^1\text{H-NMR}$ (400MHz, CDCl_3) δ 1.20 (3H, d, $J=7\text{Hz}$), 1.84 (3H, d, $J=2\text{Hz}$), 2.03 (3H, d, $J=2\text{Hz}$), 2.25 (3H, s), 2.63 (2H, d, $J=2\text{Hz}$), 3.22 (1H, m), 6.10 (1H,m), 7.06 (4H, s):

$^{13}\text{C-NMR}$ (400MHz, CDCl_3) δ 20.8, 21.0, 22.6, 27.6, 37.0, 53.5, 125.1, 127.7, 130.0, 136.6, 144.6, 157.0, 202.5.

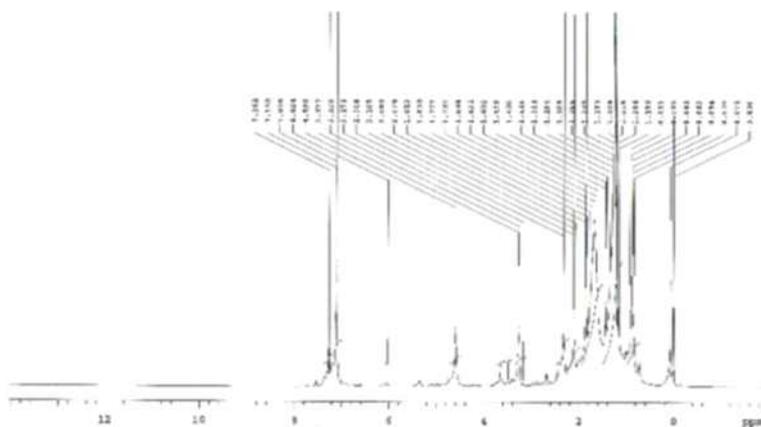


Fig. 11. $^1\text{H-NMR}$ spectrum of ar-turmerone

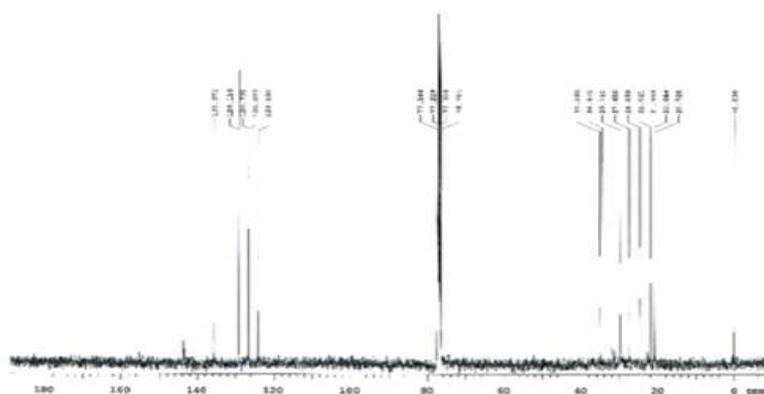
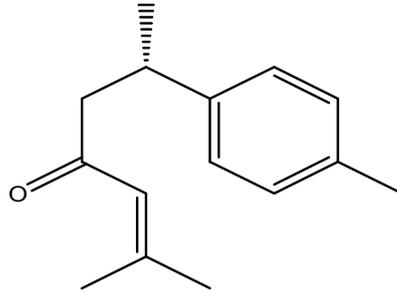


Fig. 12. $^{13}\text{C-NMR}$ spectrum of ar-turmerone



Turmerone

C₁₅H₂₀O
 Exact Mass: 216.15
 Mol. Wt.: 216.32
 m/e: 216.15 (100.0%), 217.15 (16.2%), 218.16 (1.5%)
 C, 83.28; H, 9.32; O, 7.40

Fig. 13. The chemical structure of ar-turmerone

(2) HPLC에 의한 curcuminoid 분석

울금의 대표적인 유효성분인 curcumin, demethoxycurcumin, bisdemethoxycurcumin은 색소성분으로서 curcuminoid라 한다. curcuminoid 성분의 HPLC 크로마토그램은 Fig. 10과 같으며, 진도산 울금의 curcuminoid 성분은 180.6mg%의 함량을 나타냈다.

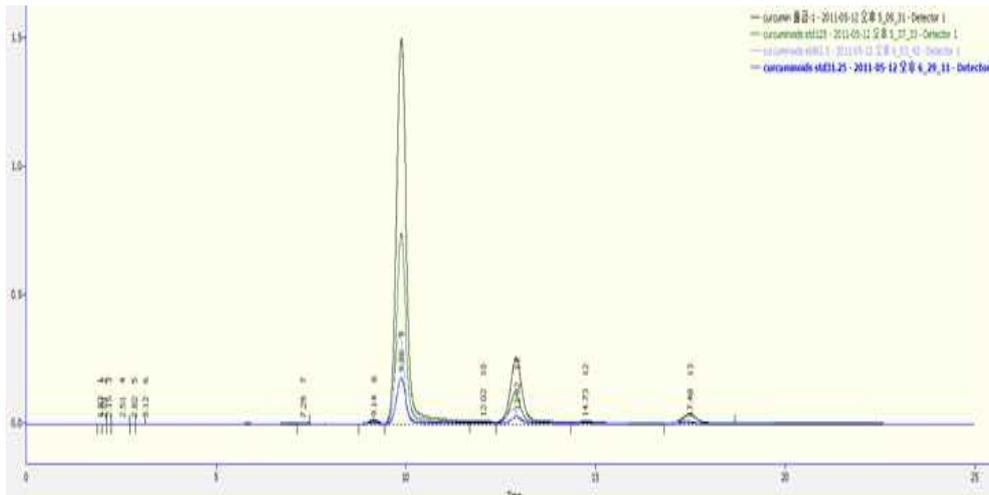


Fig. 14. HPLC chromatogram of curcuminoid

나. 울금의 *in vitro* 및 *in vivo* 항스트레스 활성평가

(1) 울금 및 발효울금의 *in vitro* 항스트레스 활성평가

(가) 세포독성 테스트

가공기술을 달리한 각 시료의 추출물 (실온, 열수, 20%, 80%주정 추출물)을 대상으로 MTT [(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl) -2,5-diphenyl -tetrazolium bromide)]를 이용하여 cell cytotoxicity 측정하였다. 각 추출물의 자체 독성을 측정한 결과 모든 추출물의 경우 최대 3µg 까지 독성이 나타나지 않았다.

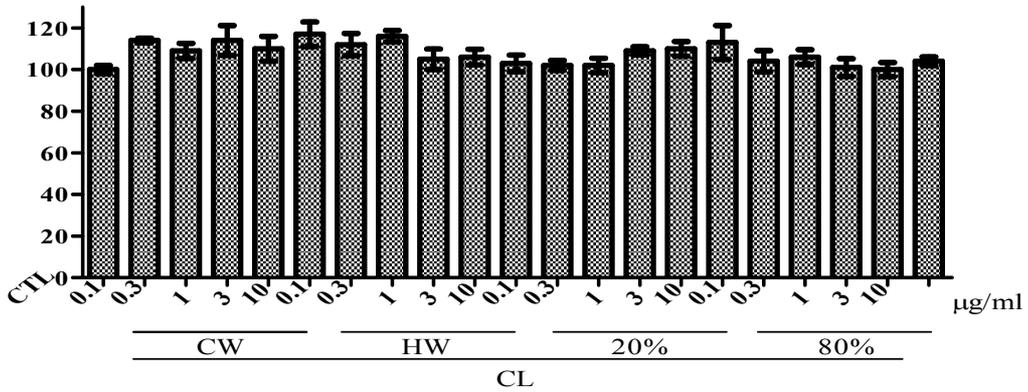


Fig. 15. Cell viability of samples.

- CL CW : 울금 실온 추출물, CL HW : 울금 열수 추출물, CL 20% : 울금 20%주정 추출물, CL 80% : 울금 80%주정 추출물
- 모든 추출물sample은 d.w 및 5%DMSO에 녹임

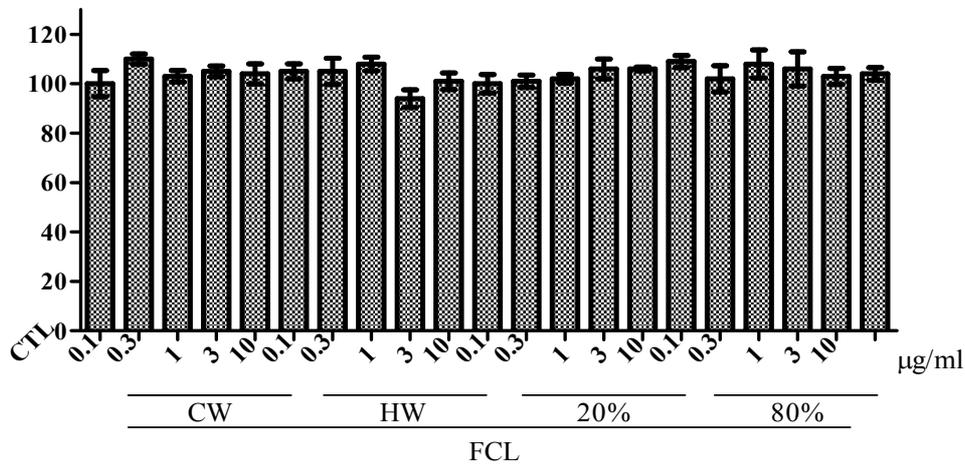


Fig. 16. Cell viability of samples.

- FCL CW : 발효울금 실온 추출물, FCL HW : 발효울금 열수 추출물, FCL 20% : 발효울금 20% 주정 추출물, FCL 80% : 발효울금 80%주정 추출물
- 모든 추출물sample은 d.w 및 5% DMSO에 녹임.

(나) CORT에 의한 cell death에 대한 neurotoxicity 보호효과

각 시료의 *in vitro* 상에서의 CORT에 대한 neurotoxicity 보호 효과를 보기 위해 독성을 확인한 결과 울금 추출물의 경우 80%주정 추출물에서 가장 높은 보호효과를 보였으며 (120%, $P < 0.05$) 발효울금보다 울금 추출물에서 CORT에 의해 유도된 cell death로부터 보호효과가 있음을 확인하였다.

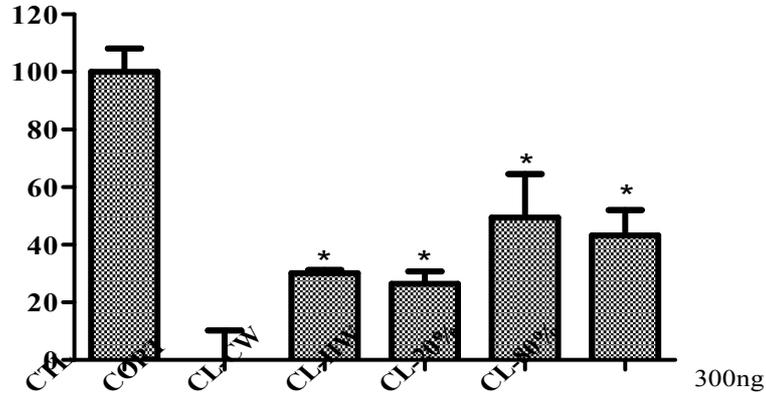


Fig. 17. Protection effects of extracts against corticosterone

- CL CW : 울금 실온 추출물, CL HW : 울금 열수 추출물, CL 20% : 울금 20%주정 추출물, CL 80% : 울금 80%주정 추출물
- CORT : corticosterone, 1mM, 24h
- sample : 300 ng 고정
- 모든 추출물sample은 5%DMSO에녹임.

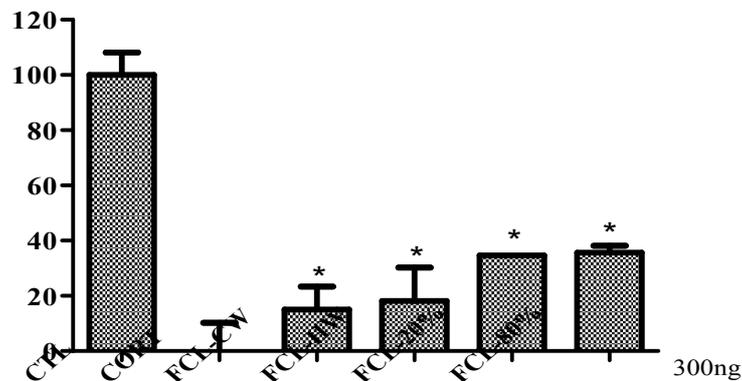


Fig. 18. Protection effects of extracts against corticosterone

- FCL CW : 발효울금 실온 추출물, FCL HW : 발효울금 열수 추출물, FCL 20% : 발효울금 20% 주정 추출물, FCL 80% : 발효울금 80%주정 추출물
- CORT : corticosterone, 1mM, 24h
- sample : 300 ng 고정
- 모든 추출물sample은 5%DMSO에녹임.

(다) 방법NMDA에 의한 cell death에 대한 neurotoxicity 보호효과 검색

각 시료의 *in vitro* 상에서의 NMDA에 대한 neurotoxicity 보호 효과를 보기 위해 MTT 수행한 결과 울금 추출물의 경우 80%주정 추출물에서 가장 높은 보호효과를 보였으며 (158%, $P < 0.05$) 발효울금보다 울금 추출물에서 NMDA에 의해 유도된 cell death로부터 보호효과가 있음을 확인하였다.

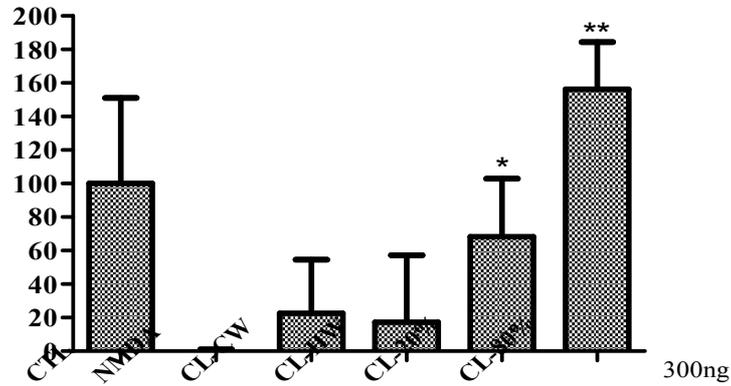


Fig. 19. Protection effects of extracts against NMDA

- CL CW : 울금 실온 추출물, CL HW : 울금 열수 추출물, CL 20% : 울금 20%주정 추출물, CL 80% : 울금 80%주정 추출물
- NMDA : *N*-methyl-D-aspartate, 50uM, 30min
- sample 농도는 300 ng으로 고정

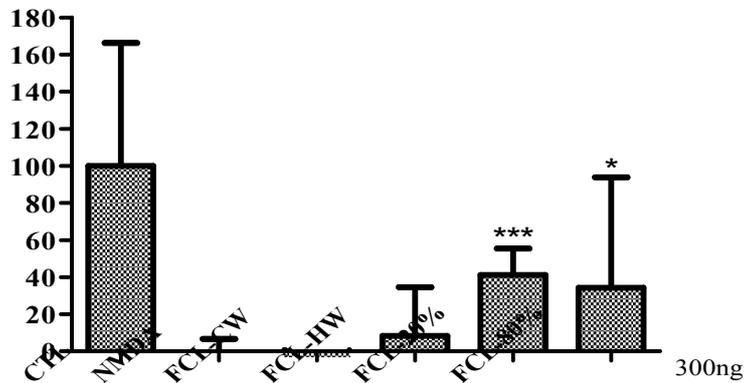


Fig. 20. Protection effects of extracts against NMDA

- FCL CW : 발효울금 실온 추출물, FCL HW : 발효울금 열수 추출물, FCL 20% : 발효울금 20% 주정 추출물, FCL 80% : 발효울금 80%주정 추출물
- NMDA : *N*-methyl-D-aspartate, 50uM, 30min
- sample 농도는 300 ng으로 고정

(라) Curcumin 및 Ar-turmerone을 대상으로 *in vitro* 상에서의 CORT 및 NMDA에 의해 유도된 cell death에 대한 neurotoxicity 보호효과 확인

① MTT assay 및 LDH assay

curcumin을 이용하여 *in vitro* 상에서의 CORT 및 NMDA에 대한 neurotoxicity 보호 효과를 보기 위해 독성을 확인하였다. curcumin의 자체 독성 실험한 결과 최대 1μg까지 독성이 나타나지 않았다. 이 농도를 이용하여 CORT에 의해 유도된 cell death에 대한 보호효과를 확인하기 위해 MTT assay를 수행한 결과 농도의존

적으로 보호효과가 있음을 확인하였으며, NMDA에 의해 유도된 cell death에 대한 보호효과를 확인한 결과 농도의존적으로 보호효과가 있음을 확인하였다. 또한 LDH assay를 수행하여 CORT 및 NMDA에 의해 유도된 cell death에 대한 보호효과를 확인한 결과 curcumin에 의해 농도의존적으로 cytotoxicity가 감소하는 것을 확인하였다.

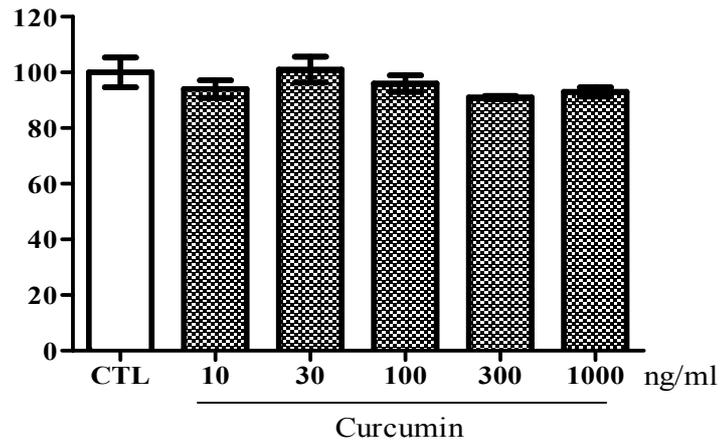


Fig. 21. Cell viability of curcumin.

- sample : curcumin
- sample은 5%DMSO에 녹임.

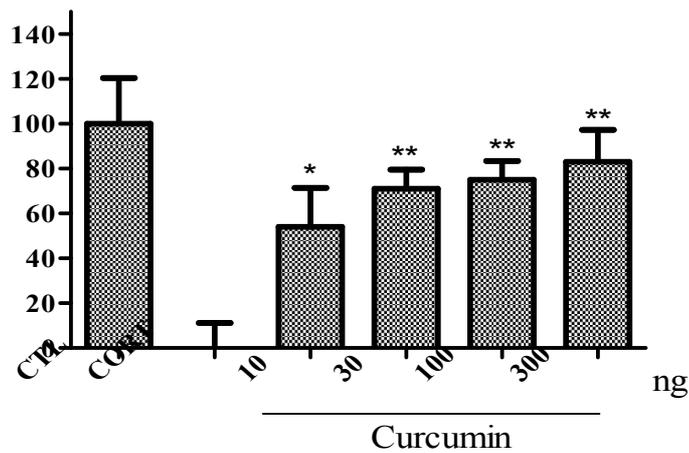


Fig. 22. Protection effects of extracts against corticosterone

- CORT : corticosterone. 1mM, 24h

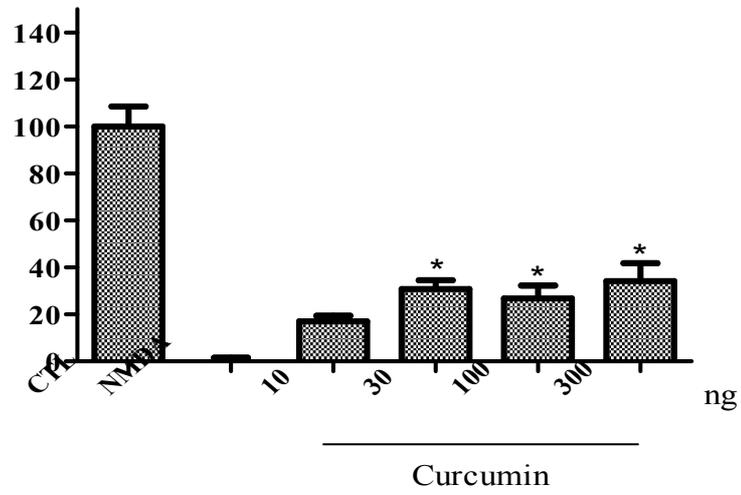


Fig. 23. Protection effects of extracts against NMDA

- NMDA : *N*-methyl-D-aspartate, 50uM, 30min

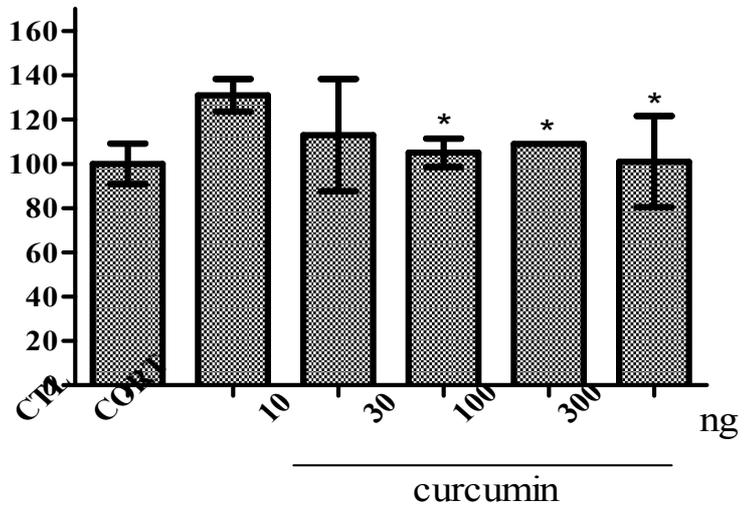


Fig. 24. Cytotoxicity measured by the LDH assay

- CORT : corticosterone. 1mM, 24h

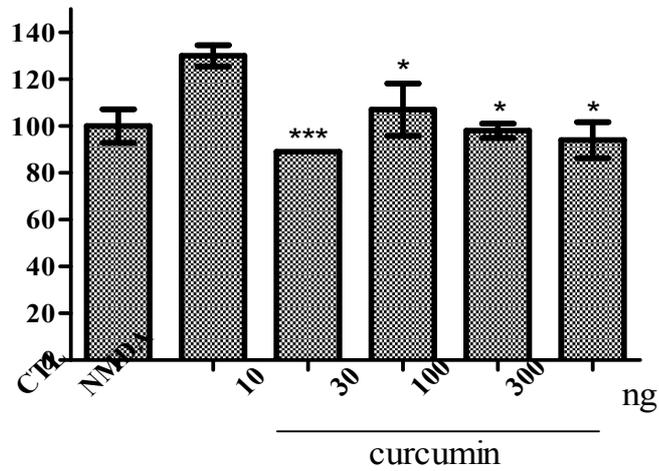


Fig. 25. Cytotoxicity measured by the LDH assay

- NMDA : *N*-methyl-D-aspartate, 50uM, 30min

Ar-turmerone 이용하여 *in vitro* 상에서의 CORT에 대한 neurotoxicity 보호 효과를 보기 위해 독성을 확인하였다. Ar-turmerone에 대한 자체 독성확인한 결과 최대 10uM까지 독성이 나타나지 않았다. 이 농도를 이용하여 CORT에 의해 유도된 cell death에 대한 보호효과를 확인한 결과 농도의존적으로 보호효과가 있음을 확인하였다.

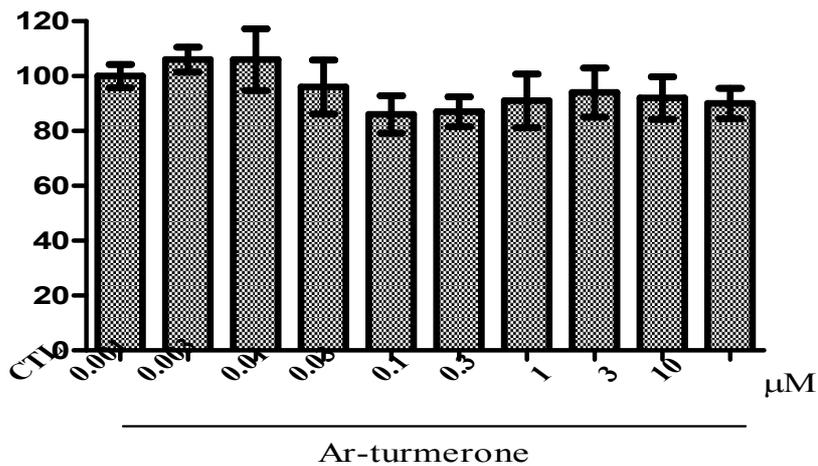


Fig. 26. Cell viability of samples.

- Ar-turmerone (울금의 오일 성분)
- sample은 80% DMSO에 녹임

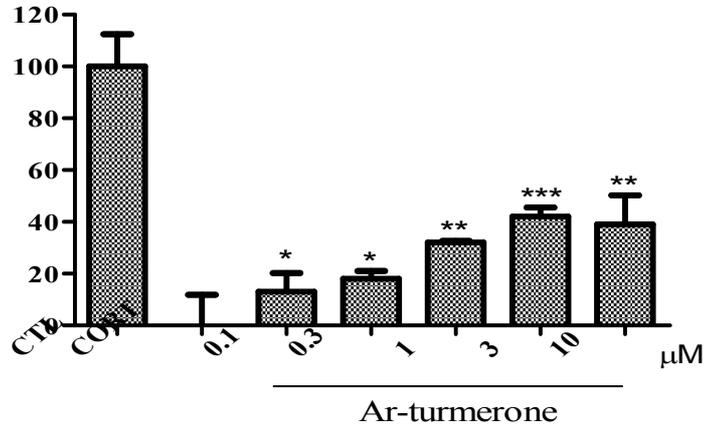


Fig. 27. Protection effects of extracts against corticosterone

- CORT : corticosterone
- sample : Ar-turmerone (울금의 오일 성분)
- sample은 80% DMSO에 녹임

(마) 울금의 CORT + NMDA에 의한 cell death에 대한 neurotoxicity 보호효과

① MTT assay 및 LDH assay

1차 선정된 시료를 대상으로 *in vitro* 상에서의 CORT와 NMDA에 대한 neurotoxicity 보호 효과를 보기 위해 세포독성을 테스트하였다. 그 결과 CORT+NMDA에 의해 감소된 cell viability가 울금 추출물별 300ng에 의해 회복되는 것을 확인 하였다 (52%, 49%, 80%, 134%, $p < 0.05$, Fig. 20). 반면 발효울금 추출물 별에 의한 neurotoxicity 보호효과는 미미한 것으로 확인되었다 (18%, 7%, 0%, 4%, Fig. 21). CORT+NMDA에 의한 cell death로부터 neurotoxicity 보호효과를 좀 더 알아보기 위해 울금 및 발효울금 각각의 추출물을 dose별로 세포독성을 확인한 결과 울금 실온 추출물에서 30%, 39%, 55%의 보호효과가 있었음을 확인하였고, 열수 추출물에서 70%, 80%, 46%, 17%의 보호효과가 있었으며, 20% 주정 추출물에서는 80%, 74%, 80%, 34%의 보호효과를 보였음. 마지막으로 80%주정 추출물에서 34%, 56%, 71%, 30%의 보호효과를 보였음. 발효울금 추출물의 경우 실온추출물에서 32%, 34%, 47%, 18%의 보호효과를 확인하였고, 열수 추출물의 경우 43%, 47%, 51%, 20%의 보호효과를 보였으며, 20%주정 추출물에서 21%, 4%, 19%, 18%의 보호효과를 확인하였다. 마지막으로 80%주정 추출물에서 27%, 30%, 36%, 44%의 보호효과를 확인하였다. 울금 및 발효울금 추출법 중에서 80%주정 추출물을 대상으로 cytotoxicity를 확인하기 위해 LDH assay를 수행하였다. 그 결과 CORT+NMDA에 의해 증가된 LDH가 울금 80% 추출물에 의해 농도의존적으로 (30ng:89%, 100ng:82%, 300ng:80%, 1000ng:72%) 감소하는 것을 확인하였으며, 발효울금 80%주정 추출물에 의해 LDH가 감소하는 것 (30ng:110%, 100ng:102%, 300ng:103%, 1000ng:88%)을 확인하였다. 그러나 울금 80%주정 추출물이 발효울금 80%주정 추출물보다 LDH 감소 능력이 약 20% 더 뛰어난 것을 확인하였다.

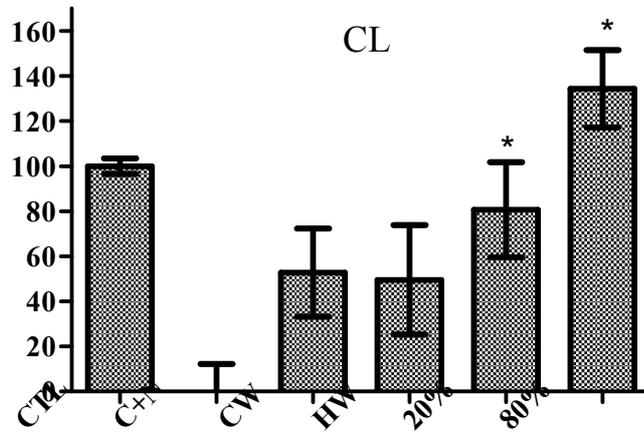


Fig. 28. Protection effects of extracts against CORT+NMDA

- C+N : corticosterone 100nM +N-methyl-D-aspartate 50uM, 30min
- sample : 울금 추출물법
- sample 농도 : 300 ng

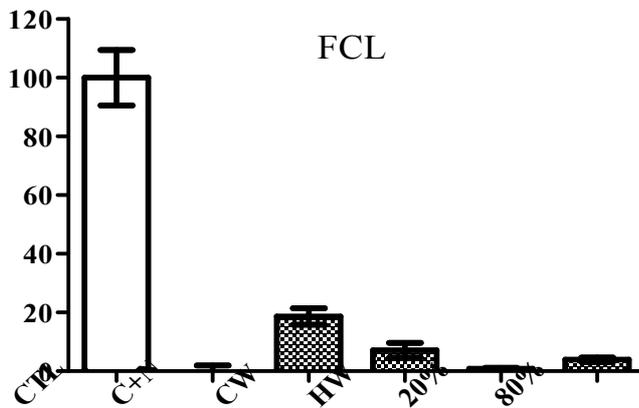


Fig. 29. Protection effects of extracts against CORT+NMDA

- C+N : corticosterone 100nM +N-methyl-D-aspartate 50uM, 30min
- sample : 발효울금 추출물법
- sample 농도 : 300 ng

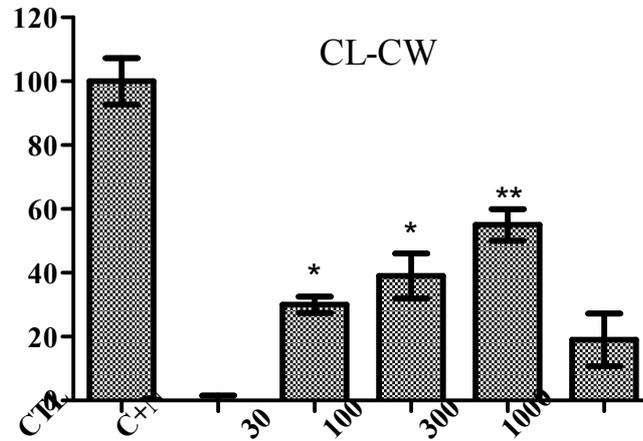


Fig. 30. Protection effects of extracts against CORT+NMDA

- C+N : corticosterone 100nM +N-methyl-D-aspartate 50uM, 30min
- sample : 울금 실온 추출물
- sample 농도 단위 : ng

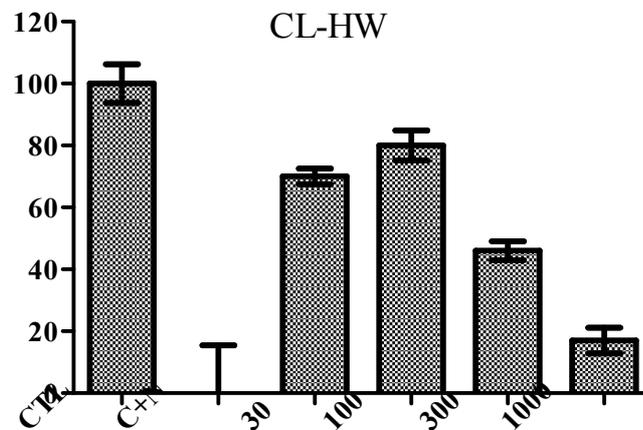


Fig. 31. Protection effects of extracts against CORT+NMDA

- C+N : corticosterone 100nM +N-methyl-D-aspartate 50uM, 30min
- sample : 울금 열수 추출물
- sample 농도 단위 : ng

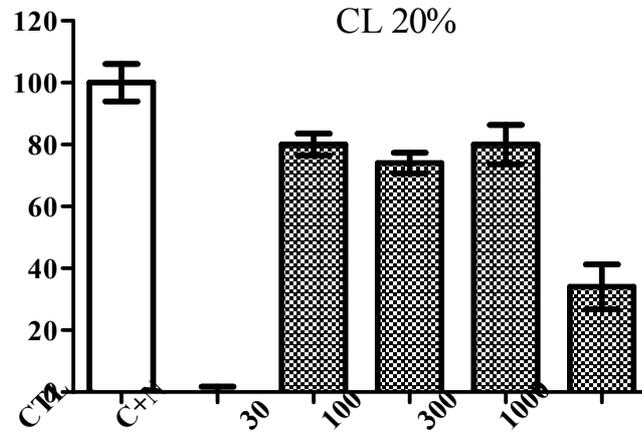


Fig. 32. Protection effects of extracts against CORT+NMDA

- C+N : corticosterone 100nM +*N*-methyl-D-aspartate 50uM, 30min
- sample : 울금 20%주정 추출물
- sample 농도 단위 : ng

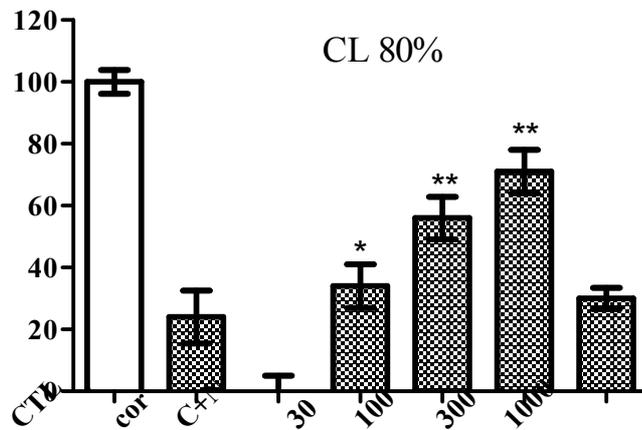


Fig. 33. Protection effects of extracts against CORT+NMDA

- C+N : corticosterone 100nM +*N*-methyl-D-aspartate 50uM, 30min
- sample : 울금 80%주정 추출물
- sample 농도 단위 : ng

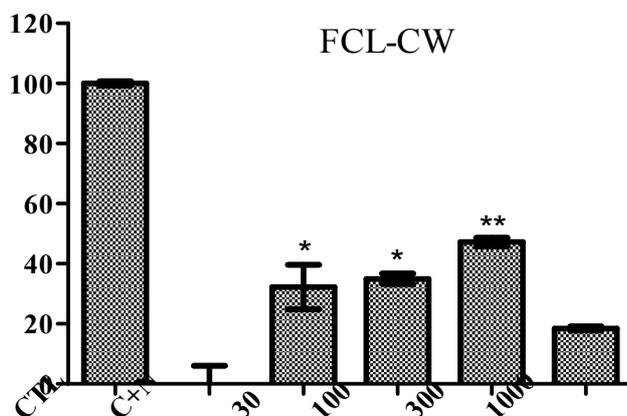


Fig. 34. Protection effects of extracts against CORT+NMDA

- C+N : corticosterone 100nM +*N*-methyl-D-aspartate 50uM, 30min
- sample : 발효울금 실온 추출물
- sample 농도 단위 : ng

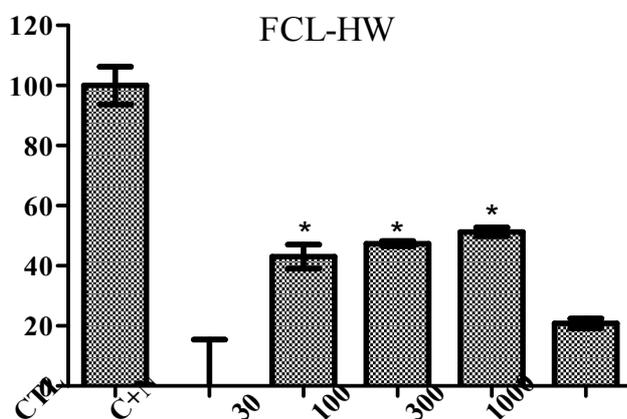


Fig. 35. Protection effects of extracts against CORT+NMDA

- C+N : corticosterone 100nM +*N*-methyl-D-aspartate 50uM, 30min
- sample : 발효울금 열수 추출물
- sample 농도 단위 : ng

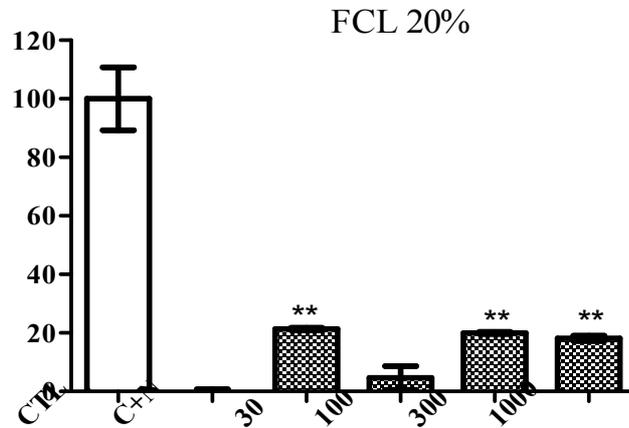


Fig. 36. Protection effects of extracts against CORT+NMDA

- C+N : corticosterone 100nM +N-methyl-D-aspartate 50uM, 30min
- sample : 발효율금 20%주정 추출물
- sample 농도 단위 : ng

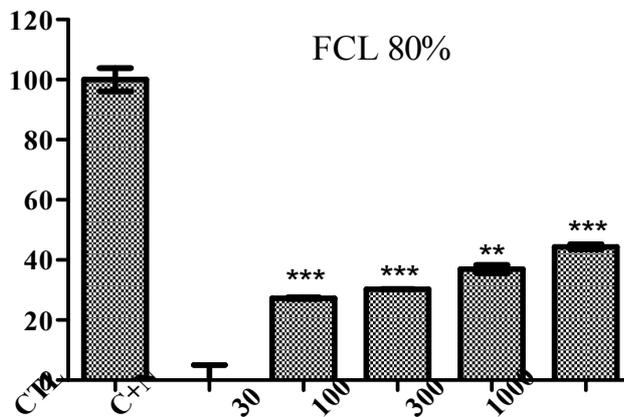


Fig. 37. Protection effects of extracts against CORT+NMDA

- C+N : corticosterone 100nM +N-methyl-D-aspartate 50uM, 30min
- sample : 발효율금 80%주정 추출물
- sample 농도 단위 : ng

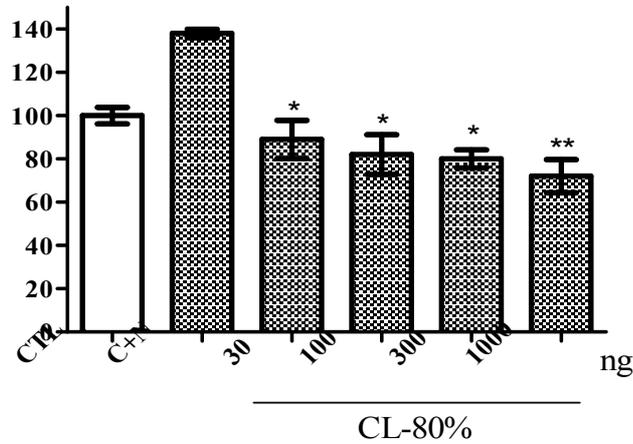


Fig. 38 Cytotoxicity measured by th LDH assay

- C+N : corticosterone 100nM +N-methyl-D-aspartate 50uM, 30min
- sample : 울금 80%주정 추출물

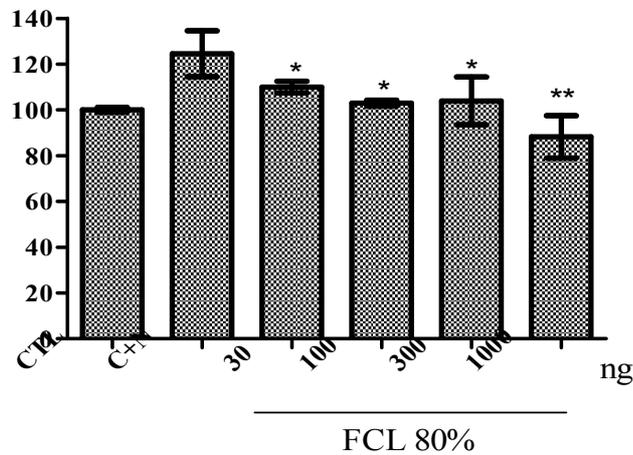


Fig. 39. Cytotoxicity measured by th LDH assay

- C+N : corticosterone 100nM +N-methyl-D-aspartate 50uM, 30min
- sample : 발효울금 80%주정 추출물

(2) 울금의 *in vivo* 항스트레스 활성평가

(가) 실험동물 행동평가

스트레스성 우울증에 대한 효과를 확인하기 위해서 ICR mice 5주령을 15일간 구속 스트레스를 부여하고 이와 동시에 1차 선정된 시료 중에서 울금 80%주정 추출물과 curcumin을 경구투여 하였다. 마지막 날에 강제 수영 테스트를 수행하였고, 비디오로 녹화 하였다. 이 비디오 판독을 통해 각 군마다 immobility와 climbing time을 확인하였다. Positive control로써 fluoxetine을 사용하였다. 울금 80%주정 추출물에서 스트레스군 (21.63초, $p < 0.05$)에 비해 immobility가 감소하는 것을 확인 (100mg/kg; 8.38초 $p < 0.05$), 500mg/kg; 8.50 초 $p < 0.05$) 하였고, curcumin 처리군에서도 스트레스군에 대비하여 농도

의존적으로 증가하는 것 (5mg/kg:9.63초 $p<0.05$), 10mg/kg:8.50초, $p<0.05$)을 확인하였다 (Fig. 33). 또한 울금 80%주정 추출물과 curcumin에서 climbing time을 확인한 결과, 스트레스군 (38.4초, $p<0.05$)에 비해 울금 80%주정 추출물 100mg/kg:51.6초, 500mg/kg:51.5초로 climbing time이 증가하였고, curcumin 5mg:50.4초, 10mg/kg:51.5초로 climbing time이 증가한 것을 확인하였다.

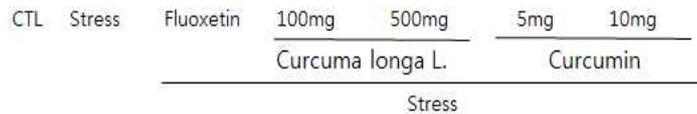


Fig. 40. Effect of CL 80% EtOH extraction and curcumin (p.o) on behavior

- CTL : normal ICR mice without stress
- Stress : restraint stress and forced swimmmed stress
- Fluoxetine : positive control (antidepressant drug), 30mg/kg (i.p)
- samples : CL 80% EtOH and curcumin

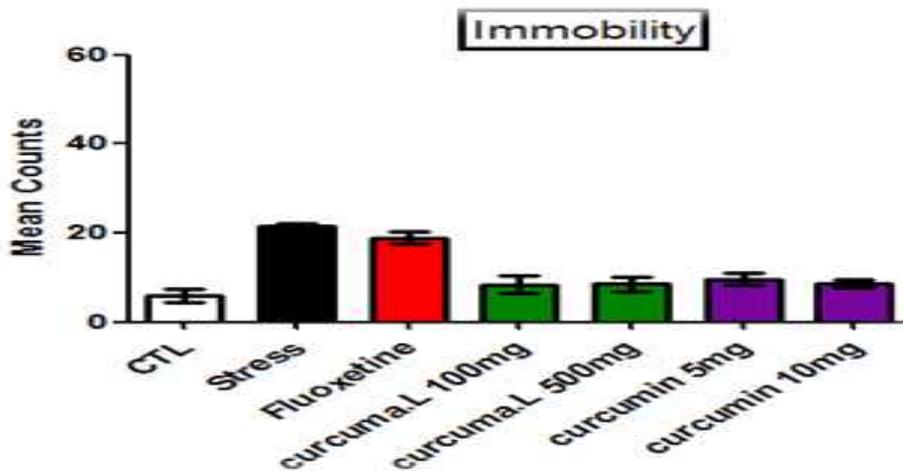


Fig. 41. Effect of CL 80% EtOH extraction and curcumin (p.o) on behavior

- Treatment with in the forced swimming test decrease occurrences of immobility
- CTL : normal ICR mice without stress

- Stress : restraint stress and forced swimmmed stress
- Fluoxetine : positive control (antidepressant drug), 30mg/kg (i.p)
- samples : CL 80% EtOH 추출물 and curcumin

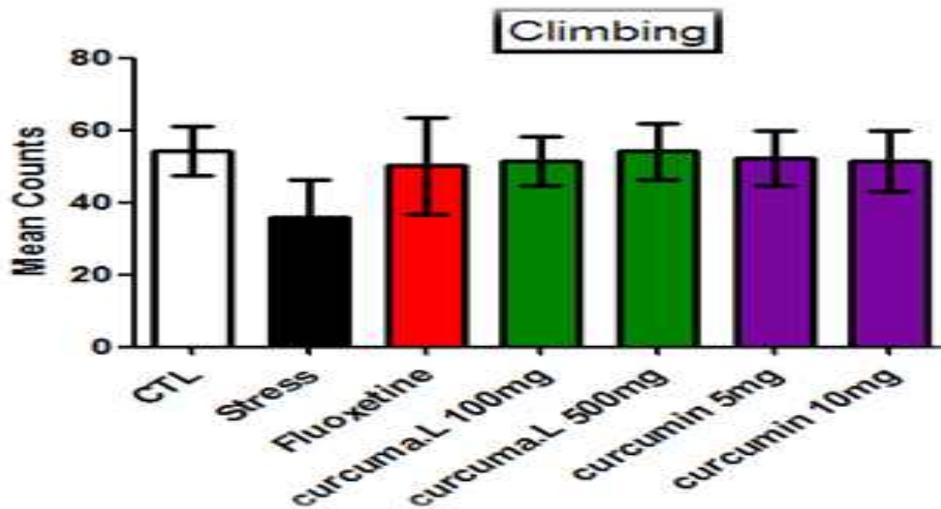


Fig. 42. Effect of CL 80% EtOH extraction and curcumin (p.o) on behavior

- Treatment with in the forced swimming test increased occurrences of climbing
- CTL : normal ICR mice without stress
- Stress : restraint stress and forced swimmmed stress
- Fluoxetine : positive control (antidepressant drug), 30mg/kg (i.p)
- samples : CL 80% EtOH 추출물 and curcumin

다. 초고속생리활성 검색 시스템을 이용하여 울금의 효능 검색

(1) Caspase-3 및 HO-1 activity 측정

스트레스성 우울증에 대한 효과를 확인하기 위해 항스트레스 확인 인자 중 caspase-3의 활성을 HCS 장비로 측정된 결과 CORT와 NMDA를 함께 처리한 군에서 caspase-3의 활성이 증가하였으며, 가공방법을 달리한 울금 추출물 (CL)과 발효울금 추출물 (FCL)을 각각 동시 처리한 결과 caspase-3의 활성이 감소하는 것을 확인하였다. 특히 울금 80%주정 추출물 (Fig. 43)이 발효울금 추출물 (Fig. 44)보다 더 세포독성 보호 효과가 있음을 확인하였다.

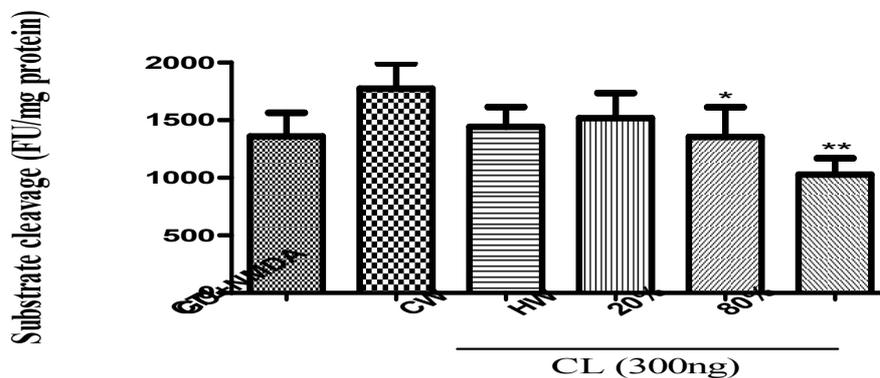


Fig. 43. Detection of caspase-3 activity in rat cerebral cortex cells by HCS equipment

- CTL : normal cerebral cortex cells
- GC+NMDA : Treat with corticosterone and *N*-methyl-_D-aspartate
- samples : different extraction of CL 300ng

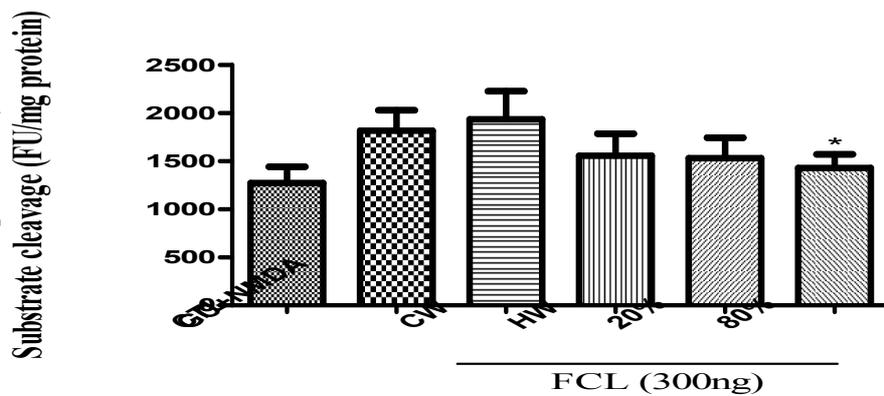


Fig. 44. Detection of caspase-3 activity in rat cerebral cortex cells by HCS equipment

- CTL : normal cerebral cortex cells
- GC+NMDA : Treated with corticosterone and *N*-methyl-_D-aspartate for 24h
- samples : different extraction of FCL 300ng

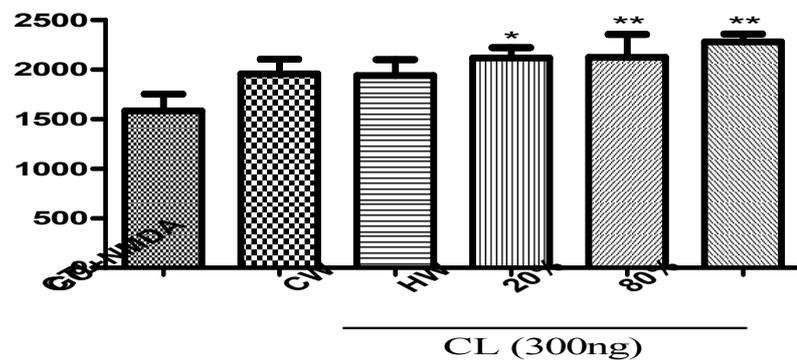


Fig. 45. Detection of HO-1 activity in cerebral cortex neuron cells

- CTL : normal cerebral cortex cells
- GC+NMDA : Treated with corticosterone and *N*-methyl-_D-aspartate for 24h
- samples : different extraction of CL 300ng

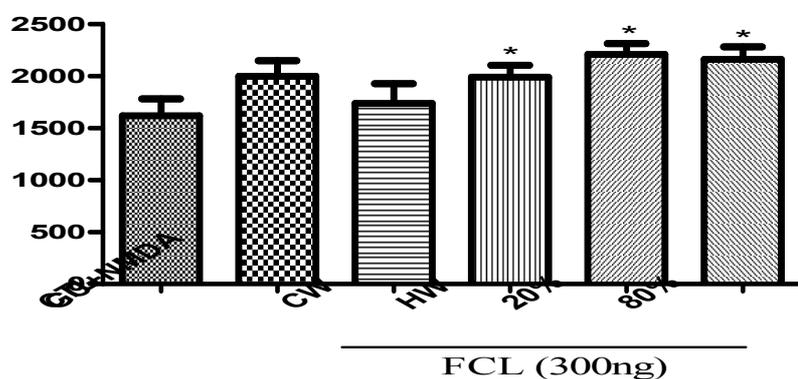


Fig. 45. Detection of HO-1 activity in cerebral cortex neuron cells

- CTL : normal cerebral cortex cells

- GC+NMDA : Treated with corticosterone and *N*-methyl-D-aspartate for 24h
- samples : different extraction of FCL 300ng

라. 울금의 항스트레스 기전 규명

(1) NR2B protein expression 확인

1차년도 결과를 토대로 선정된 울금 80%주정 추출물의 항스트레스 기전을 규명하기 위해 단백질 발현을 확인하였다. CORT 및 NMDA로 스트레스를 유도한 결과 스트레스 기전에 관련된 NMDA receptor의 한 종류인 NR2B 단백질의 발현이 증가하였다.

CORT 및 NMDA에 의해 증가했던 NR2B의 단백질 발현이 울금 80%주정 추출물에 의해 감소함을 확인하였다.

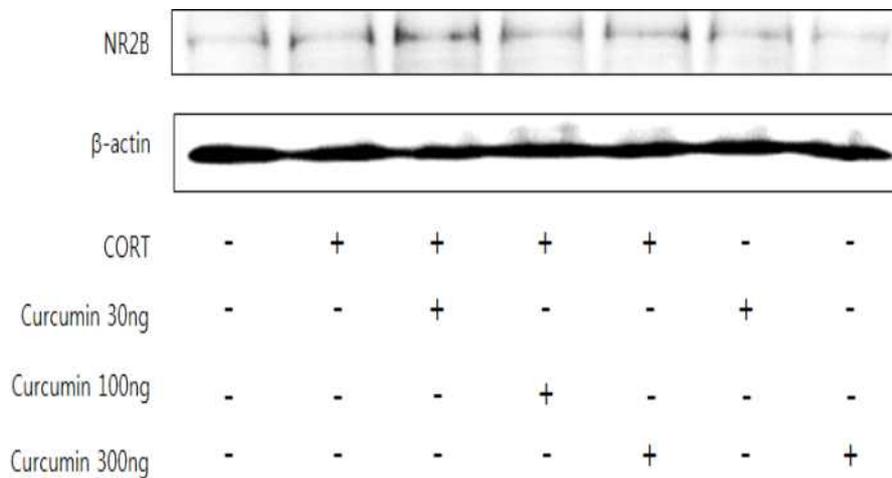


Fig. 46. Curcumin down regulated NR2B protein expression against CORT in cerebral cortex neuron cells.

- CORT : 100 mM

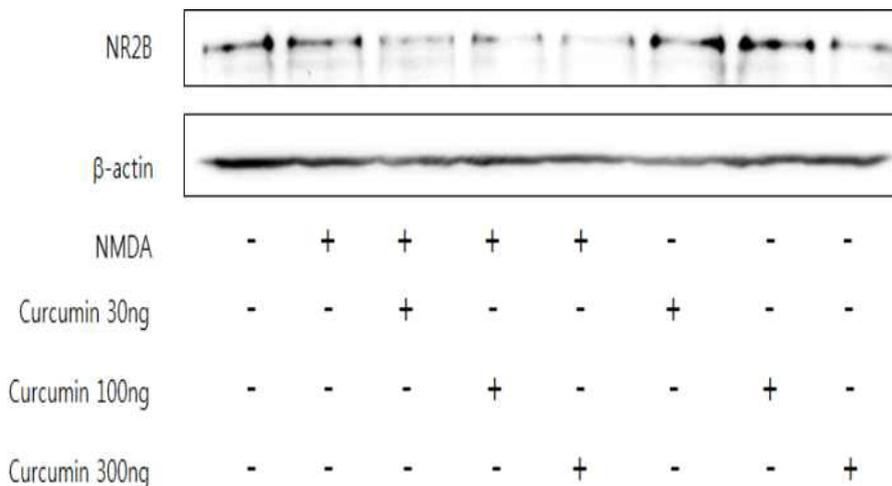


Fig. 47. Curcumin down regulated NR2B protein expression against NMDA in cerebral cortex neuron cells.

- NMDA : 25 uM

마. 울금 80%주정 추출물에 대한 면역증강 실험 (2차년도 평가의견 반영)

(1) NO assay

면역세포에서 울금 80%주정 추출물의 면역증강 실험을 하기 위한 NO assay를 수행한 결과 LPS에 의해 증가했던 NO 생성량이 (0.9 ± 0.03) 울금 80% 주정추출물을 처리함에 따라 농도의존적으로 NO 생성량을 감소시키는 것을 확인하였다. (30ug/ml ; 0.97 ± 0.01, 100ug/ml ; 0.63 ± 0.1, 300ug/ml ; 0.22 ± 0.01)

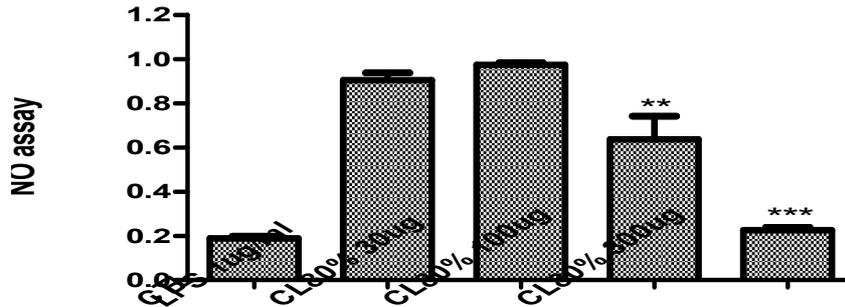


Fig. 48. Influence of CL 80% EtOH 추출물 on NO release.

(2) ROD assay

면역세포에서 울금 80%주정 추출물의 면역증강 실험을 하기 위한 ROS assay를 수행한 결과 H₂O₂에 의해 증가됐던 ROS level이(533 ± 24.1) 울금 80%주정 추출물에 의해 농도 의존적으로 감소하는 것을 확인하였다(30ug/ml ; 463 ± 35.9, 100ug/ml 37; 363 ± 18.2, 300ug/ml ; 343 ± 14).

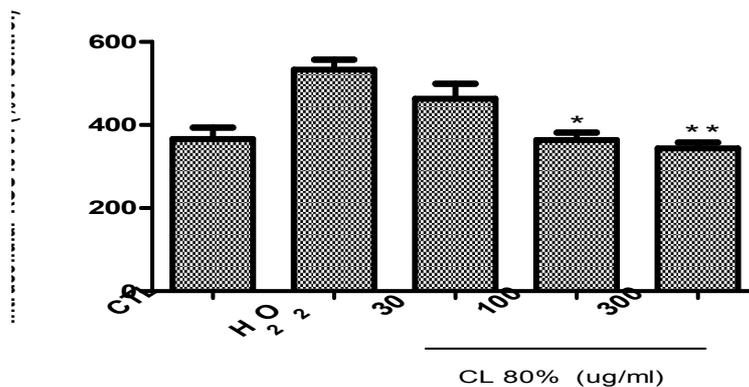


Fig. 49. Influence of CL 80% EtOH 추출물 on intracellular reactive oxygen species levels.

바. 세로토닌 수용체 활성 조절 (cAMP) 모델에서의 울금 80%주정 추출물 및 울금 single compounds의 보호효과 비교 및 탐색

(1) cAMP assay

울금 80%주정 추출물 및 울금 single compounds의 세로토닌 수용체 활성 조절을 확인하기 위해서 세로토닌 리셉터 (5-HT 1~5-TH7)를 트랜스펙션 한 후 cAMP assay를 수행한 결과 세로

토닌 리셉터 중에서 5-HT 7A에서 antagonist 활성이 나타났으며, 이후 실험에서는 5-HT 7A 리셉터만 트랜스펙션하여 진행하였다. 5-HT 7A 리셉터를 트랜스펙션하여 울금 80%주정 추출물을 농도별로 처리하였더니 농도별로 cAMP inhibition율이 증가하는 것을 확인하였다.

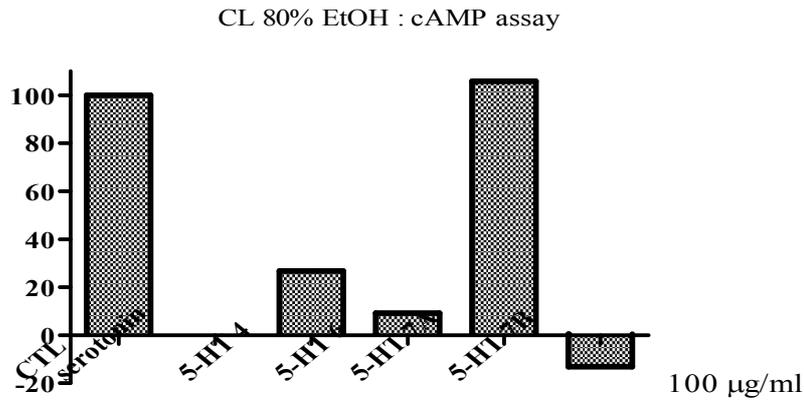


Fig. 50. Inhibition of cAMP in transfected serotonin receptors by treated with CL 80% EtOH extraction in CHO-K1 cells.

- Serotonin : 100 uM

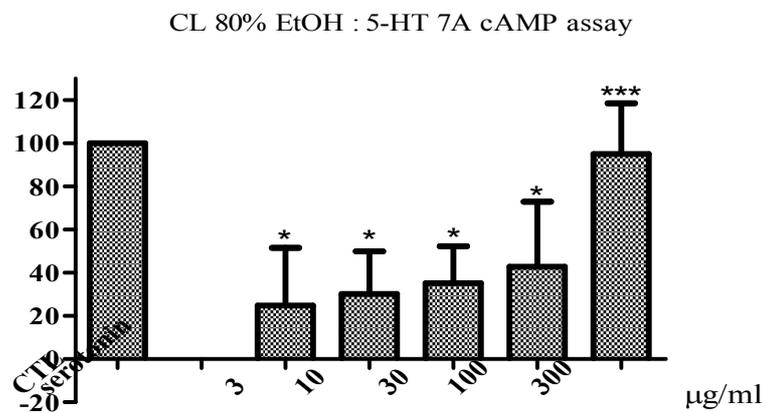


Fig. 51. Inhibition of cAMP by CL 80% EtOH extraction in CHO-K1 cells as measured by ELISA

- Serotonin : 100 uM

(2) PKA signal 확인

울금 80%주정 추출물의 항스트레스 기전을 규명하기 위해 CHO-K1 cell에 serotonin receptor 7A를 48시간 동안 transfection 한 후 세로토닌과 울금 80%주정 추출물을 15분 간 동시처리 하여 여러 가지 단백질 발현을 확인한 결과 serotonin에 의해 증가되었던 ERK와 p-38 level이 울금 80%주정 추출물에 의해 감소하는 것을 확인하였다.

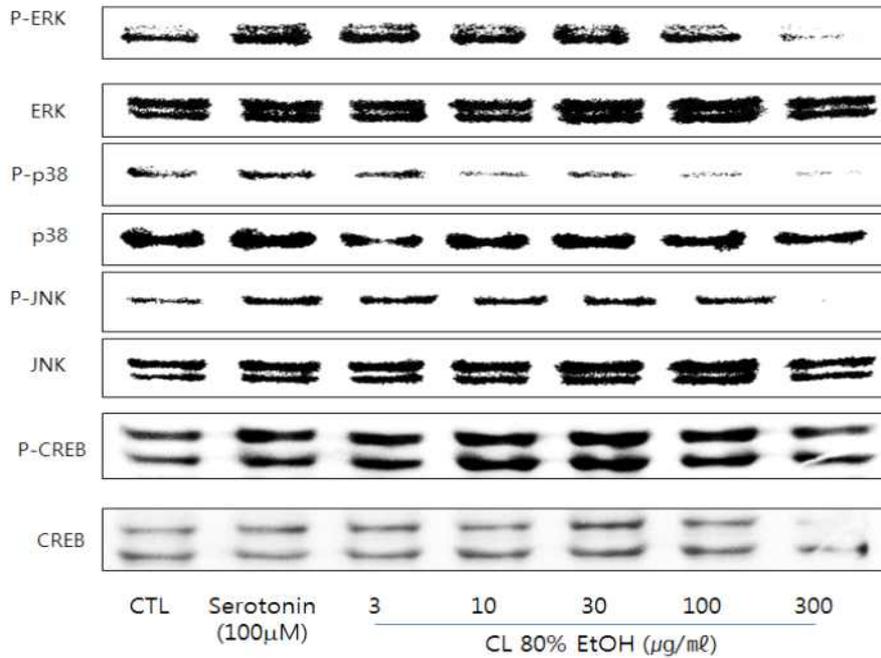


Fig. 52. CL 80% EtOH down regulated ERK and p-38 protein expression against serotonin in CHO-K1 cells.

- Serotonin : 100 uM

(3) 울금 single compounds의 cAMP 활성 억제효과 확인

울금으로부터 분리한 단일 컴파운드들의 활성도 확인하기 위해 CHO-K1 cell에 serotonin receptor 7A를 48시간 동안 transfection 한 후 세로토닌과 울금 단일 컴파운드 (curcumin, tetrahydrocurcumin, ar-turmerone, Azulene, Kaempferol)를 15분간 동시처리 하여 cAMP assay를 진행한 결과 curcumin과 tetrahydrocurcumin에서 cAMP 활성을 각각 50 ~ 60% inhibition하는 것을 확인하였다.

CL 80% EtOH : 5-HT 7A cAMP assay

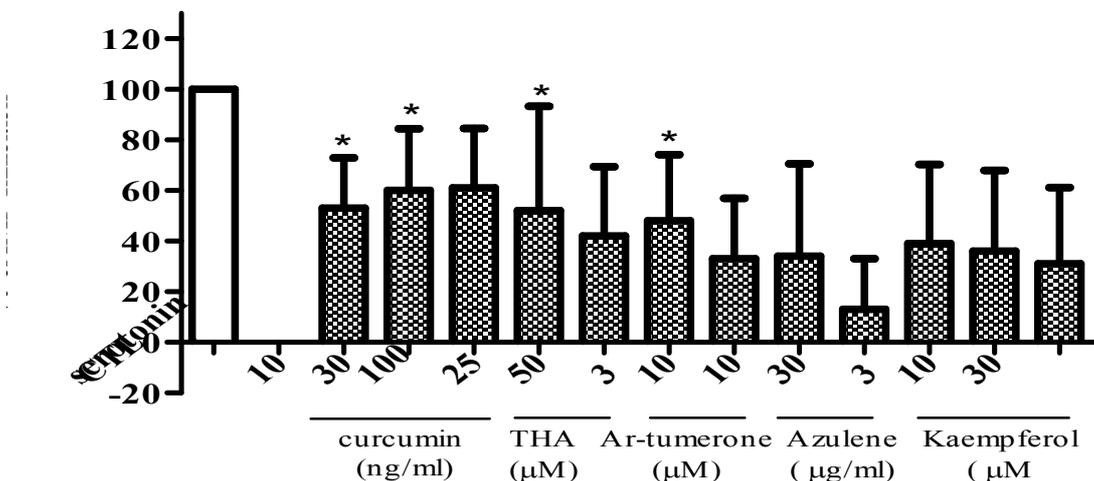


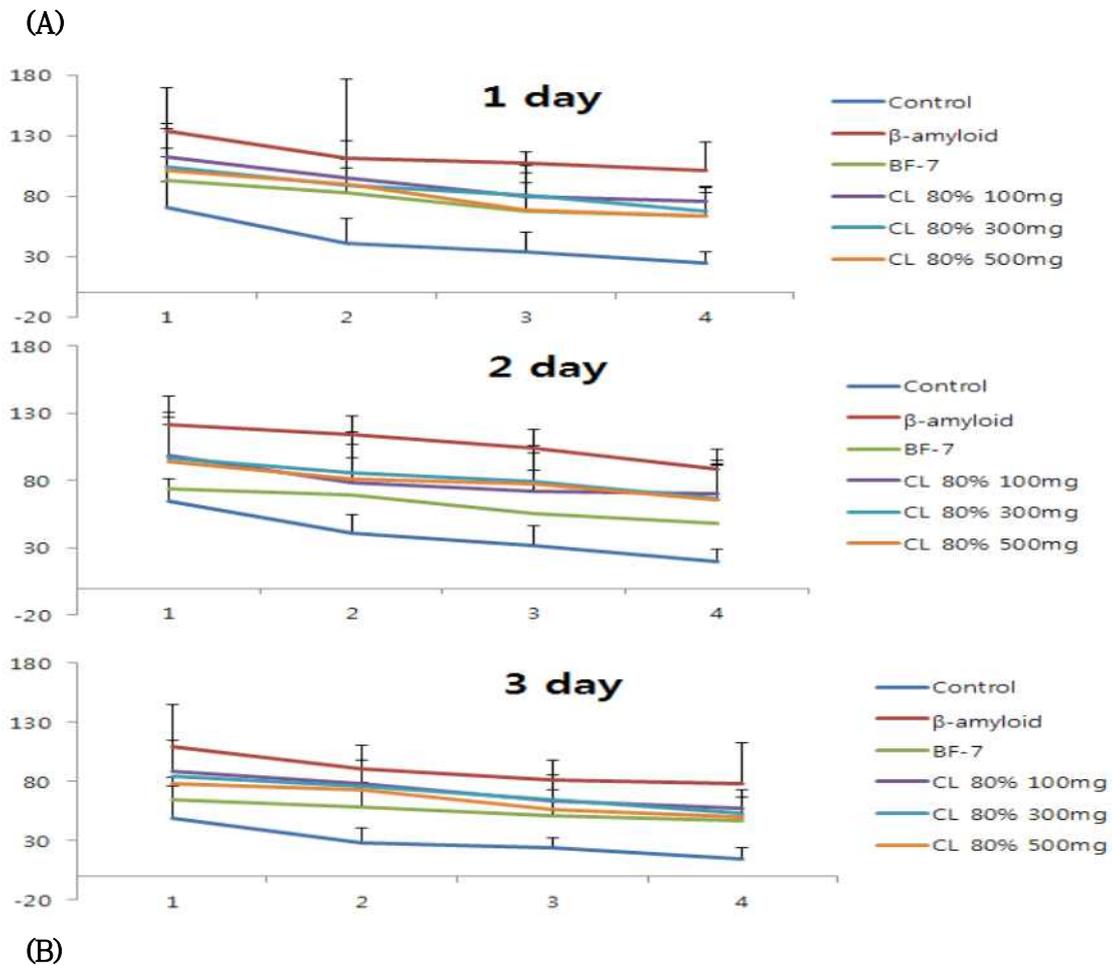
Fig. 53. Inhibition of cAMP by CL single compounds in CHO-K1 cells as measured by ELISA

- Serotonin : 100 uM

사. 기억력 감퇴 동물모델을 이용한 스트레스와 기억력 증가 및 신경보호 상관 관계 규명

(1) Morris water maze test

Morris water maze test를 위해 ICR mouse 4주령 수컷을 6군으로 나누어 실험을 진행하였다. Morris water maze 테스트를 수행한 결과 첫째 날, A β ₁₋₄₂로 기억력 감퇴를 유발한 그룹이 플랫폼을 찾는 데까지 걸린 시간은 평균 120±30초였으나 울금 80%주정 추출물을 농도별로 처리한 그룹에서는 각각 100mg/kg (99±25초), 300mg/kg (95±26초), 500mg/kg (91±23초)로 기억력 회복증세를 보였으며 세 번째 날에는 기억력 감퇴 유발한 그룹이 평균 89±24초가 소요됐으며, 울금 80%주정 추출물은 각각 100mg/kg (67±21), 300mg/kg (62±23초), 500mg/kg (60±20초)가 소요되었다.



(C)

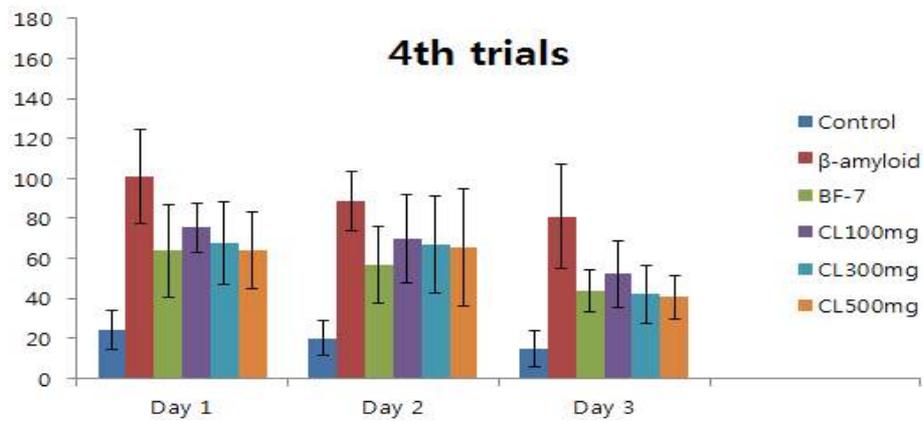


Fig. 54. Combined effects of CL 80% EtOH on $A\beta_{1-42}$ -induced impairments in memory acquisition and retention in the Morris water maze test.

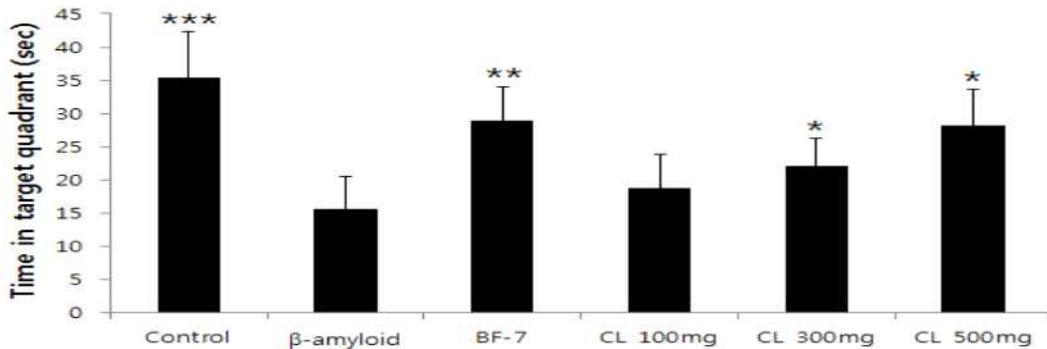
$A\beta_{1-42}$ ($4 \mu\text{L}$)로 주입하기 전에 21일 동안 울금 80%주정 추출물을 경구투여 하였다. 3일 동안 water maze test를 진행하면서 4번씩 trial 을 부여하였다.

(A) $A\beta_{1-42}$ -로 기억력 감퇴를 유발한 후 water maze test를 3일 동안 수행하였다.

(B) 3일 동안 진행된 Morris water maze test 중에서 첫 번째 시도 때 플랫폼에 도달한 시간을 측정하였다.

(C) 3일 동안 진행된 Morris water maze test 중에서 네 번째 시도 때 플랫폼에 도달한 시간을 측정하였다.

(A)



(B)

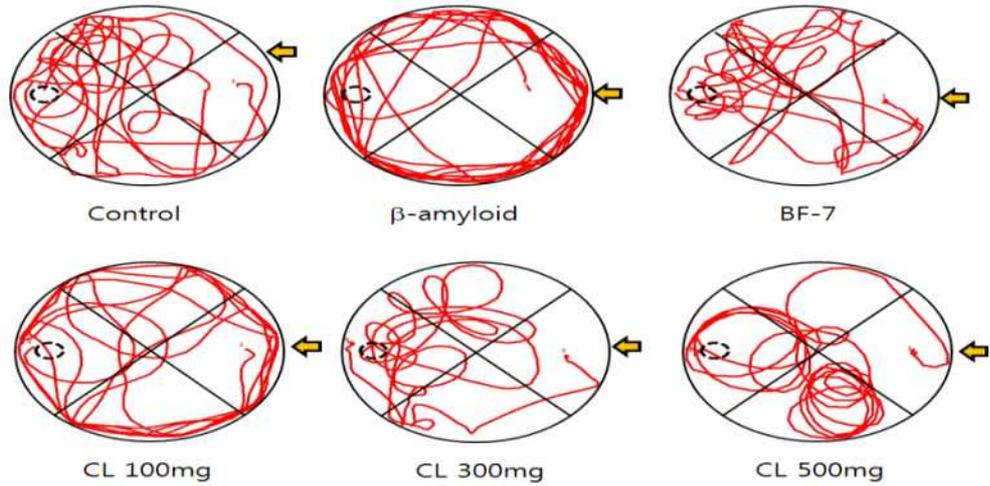


Fig. 55. Combined effects of CL 80% EtOH on $A\beta_{1-42}$ -induced impairments in memory acquisition and retention in probe trials.

(A) Morris water maze test를 수행하고 마지막 날 올금 80%주정 추출물의 probe trial 효과를 보여줌.

(B) probe trial test는 90초 동안 수행되었으며 각 구획에 머무는 시간을 그림으로 표현하였다.

(2) Passive avoidance test

Passive avoidance test는 시험기간 동안 마우스를 밝은 챔버에 넣어 60초 동안 습관화 시킨 후 도어를 개방하고 어두운 챔버로 들어가기까지의 시간을 측정하였다. 마우스가 어두운 챔버로 들어가는 즉시 도어를 닫고 전기충격(75 V, 0.2 mA, 50 Hz)을 3초 동안 가했다. 5초 후에 마우스를 어두운 챔버에서 제거하여 cage에 돌려보냈다. 8시간 후에 이 실험을 다시 반복하였고 어두운 챔버로 들어가는 대기 시간을 기록한 결과, control 그룹은 평균 235 ± 47 , $A\beta_{1-42}$ -그룹은 119 ± 42 , 100mg/kg 134 ± 32 초, 300mg/kg 144 ± 35 초, 500mg/kg 177 ± 58 초로 지연되는 것을 확인하였다.

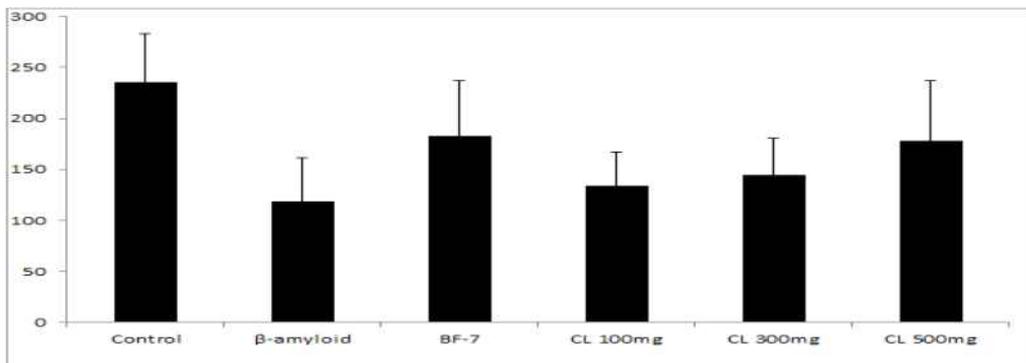


Fig. 56. Effects of CL 80% EtOH on $A\beta_{1-42}$ -induced behavioral deficits (passive avoidance).

(3) ACh content 및 AChE activity assay

마우스의 뇌를 이용하여 ACh content와 AChE activity assays를 실시한 결과 ACh contents는 control 그룹에서 $19.71 \pm 1.88 \mu\text{M}/\text{mg}$, $A\beta_{1-42}$ 그룹은 $14.15 \pm 2.39 \mu\text{M}/\text{mg}$, CL 100mg에서는 $16.15 \pm 2.65 \mu\text{M}/\text{mg}$, CL 300mg $16.43 \pm 1.47 \mu\text{M}/\text{mg}$, CL 500mg $16.97 \pm 1.94 \mu\text{M}/\text{mg}$ 의 protein 양을 확인하였고, AChE activity assays를 수행한 결과 $A\beta_{1-42}$ 그룹은 $0.32 \pm 0.07 \text{ U}/\text{mg}$, CL 100mg에서는 $0.29 \pm 0.07 \text{ U}/\text{mg}$, CL 300mg $0.25 \pm 0.04 \text{ U}/\text{mg}$, CL 500mg $0.22 \pm 0.04 \text{ U}/\text{mg}$ 의 protein 양을 확인하였다.

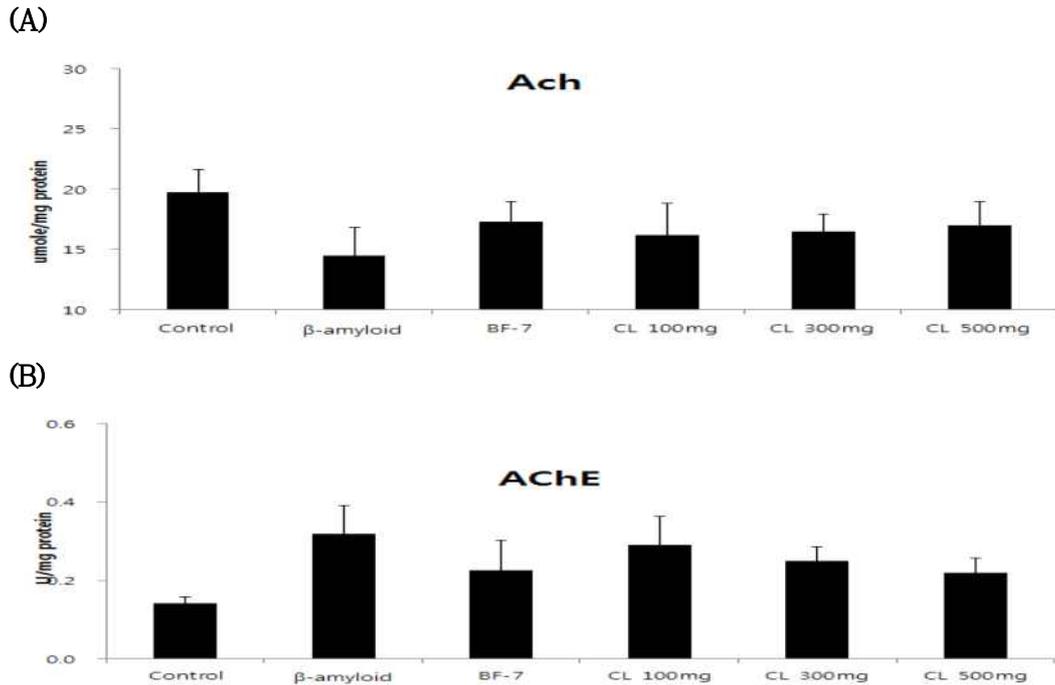


Fig. 57. Combined effects of CL 80% EtOH on AChE activity (A) and ACh content (B) in $A\beta_{1-42}$ -injected ICR mouse.

(4) TUNEL staining

형광 현미경을 통해 TUNEL staining 실험을 수행하여 TUNEL-positive cell을 counting 한 결과, $A\beta_{1-42}$ 그룹은 TUNEL-positive cell이 115.8 ± 14.5 counting 되었으며, 울금 80%주정 추출물 각각에서는 18.4 ± 2.8 , 14.6 ± 2.6 그리고 6.8 ± 2.3 개의 cell이 counting 되었다.

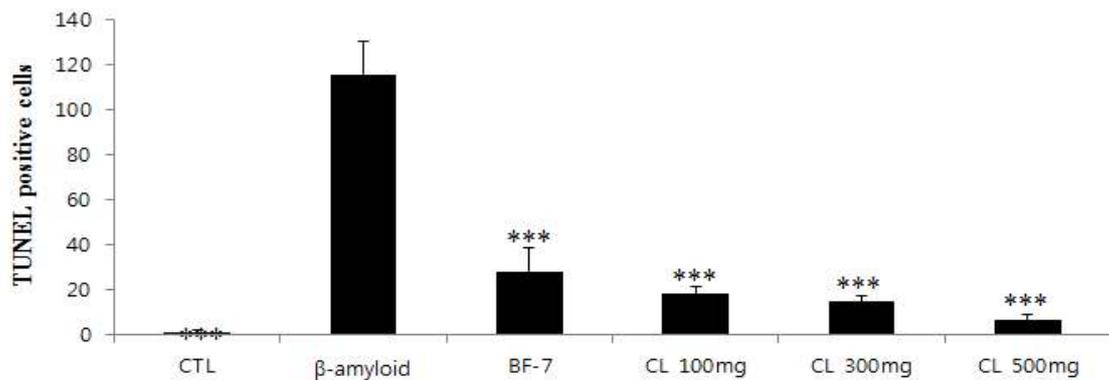
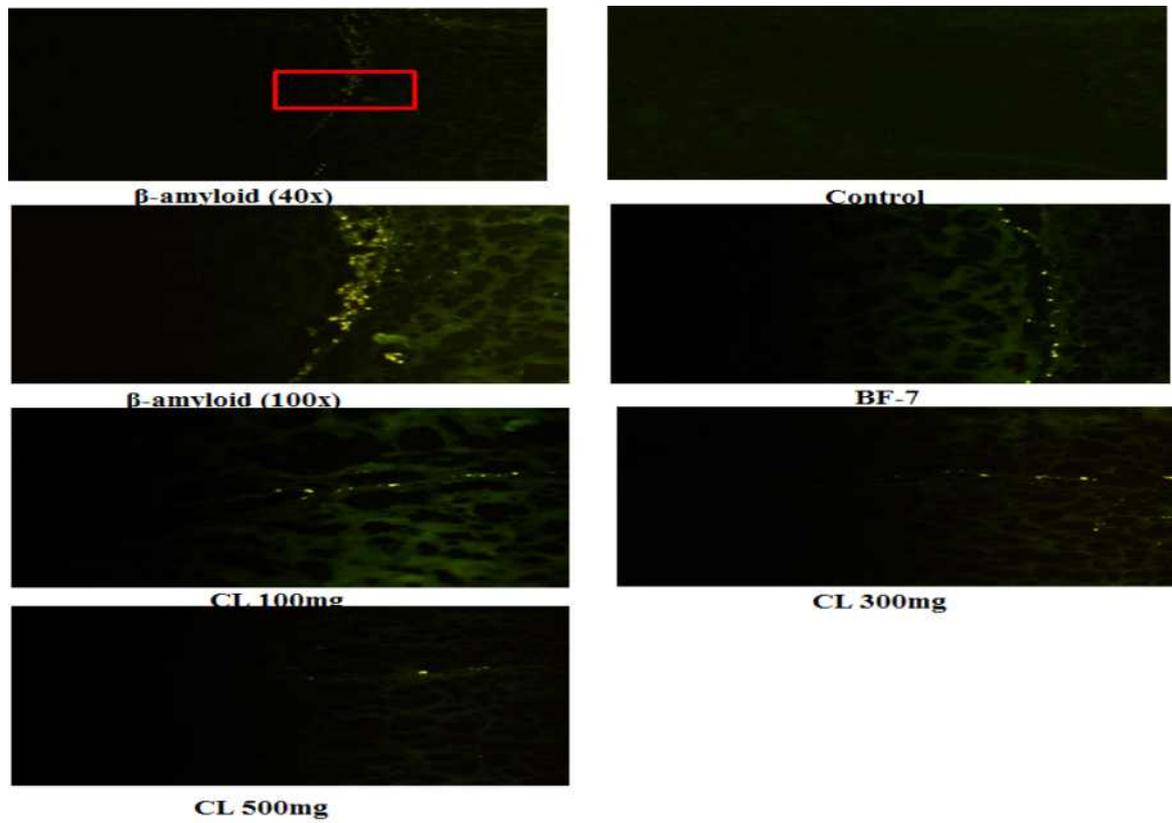


Fig. 52. Effects of CL 80% EtOH on $A\beta_{1-42}$ -induced neuronal apoptosis assessed by TUNEL assays.

아. 울금 80%주정 추출물 제조공정 표준화 결과

(1) 건강기능식품 소재 제조공정 표준화(울금 80%주정 추출물)

Lot NO.	원료량(kg)	부형제(kg)	생산량(kg)	건조감량(%)	수율(%)
1	80	28.6	34.8	1.2	43.5
2	80	27.8	35.6	1.3	44.5
3	80	28.1	35.1	1.3	43.9
평균	80	28.2	36.8	1.3	44.0



(2) 울금 80%주정 추출물 지표성분 정량결과

시료명	실험결과 (Curcumin, 단위 mg/g)			평균 (mg/g)
	1회	2회	3회	
CL80SD- 1	0.39	0.39	0.40	0.39
CL80SD- 2	0.33	0.33	0.33	0.33
CL80SD- 3	0.34	0.35	0.34	0.34

4. 결론

문명이 발달되고 사회가 점점 복잡해짐에 따라 스트레스로 인한 우울증 및 각종 신경계 질환의 발생빈도는 점점 증가하고 있어, 이 분야의 연구 및 개발은 절실히 요구 되고 있고, 또한 스트레스를 제어할 수 있는 제품의 시장은 향후 기능성 식품의 주요 시장이 될 것으로 예상되고 있다. 만병의 근원이라고 알려져 있는 스트레스는 각종 질환을 유발하는 주요 요인으로 현대 의학적으로 규명이 되어 있고 우울증과 같은 사회적으로 부담이 되는 질병의 주요 원인이다. 스트레스를 제어하는 방법으로는 치료적인 접근보다 예방을 목적으로 하는 기능성 식품으로 충분히 제어할 수 있으므로, 스트레스 해소에 도움을 주는 건강기능성식품의 개발을 위한 연구와 제품 개발이 절실히 필요하다. 따라서 본 연구는 전남 약용자원 중 가공기술을 달리한 울금을 이용하여 *in vitro* 및 *in vivo* 평가를 통하여 선정 소재의 스트레스 개선 효능 검증과 유효성분을 발굴하여 항스트레스 활성소재의 가공기술 (추출법)을 결정하고자 하였고, 선정된 건강기능식품 소재의 소재가공기술을 표준화하기 위한 활성/지표성분을 분리/정제/분석함으로써 원료표준화 및 가공기술을 표준화하고자 하였다.

가공방법을 달리한 울금 및 발효울금을 대상으로 stress hormone인 corticosterone (CORT)에 의해 유도된 cell death로부터 neurotoxicity 보호효과를 확인한 결과 울금과 발효울금 추출물 300ng (CL CW, CL HW, CL 20%, CL 80%주정 추출물, FCL CW, FCL HW, FCL 20%,

FCL 80%주정 추출물)에서 보호효과가 있었으며 특히 CL 80%주정 추출물에서 가장 큰 보호효과가 있었음을 확인하였다. 또한 이들 추출물에 cell death 유도물질인 *N*-methyl-D-aspartate (NMDA)를 처리한 결과 CL 80%주정 추출물에서 보호효과가 두드러지게 나타났다. CORT 및 NMDA에 의해 유도된 cell death로부터 curcumin과 ar-turmerone에 대한 세포독성 보호효과를 확인한 결과 두 활성물질에서도 모두 neurotoxicity 보호효과가 농도의존적으로 증가하는 것을 확인하였다. 그 다음 CORT 와 NMDA 처리에 의해 유도된 cell death로부터 가공법을 달리한 울금 및 발효울금을 대상으로 neurotoxicity 보호효과를 확인한 결과 울금 추출물 300ng (CL CW, CL HW, CL 20%, CL 80%주정 추출물)에서 CORT+NMDA (0%) 에 비해 2%, 49%, 80%, 134% ($p < 0.05$)로 보호효과가 증가하였으며, 발효울금 추출물 300ng (FCL CW, FCL HW, FCL 20%, FCL 80%주정 추출물)에서 18%, 7%, 0%, 4%의 보호효과를 보였다. 각각의 추출물에 대한 dose별로 CORT 와 NMDA 처리에 의해 유도된 cell death 보호효과를 확인한 결과 울금 추출물이 발효울금 추출물보다 평균 30% 더 보호효과를 나타냈다. 이제까지 실험을 통해 선정된 시료를 대상으로 *in vivo* 상에서의 스트레스성 우울증 동물모델을 이용한 항스트레스 활성 검색하였다. ICR 5주령 mice를 15일간 매일 2시간동안 구속스트레스를 부여하고 마지막 날에 강제수영테스트를 수행하였으며, positive control로 항우울제로 잘 알려져 fluoxetine을 사용하였다. 강제수영 테스트 결과 스트레스군(21.63초)에 비해 울금 80%주정 추출물 100mg/kg 과 500mg/kg에서 각각 8.38초, 8.50초로 immobility가 감소하는 것을 확인하였고, climbing time은 스트레스군 (38.4초)에 비해 울금 80%주정 추출물 100mg/kg 과 500mg/kg에서 각각 51.6초와 51.5초로 증가하는 것을 확인하였다. 또한 cucumin에 의해서 immobility가 5mg/kg에서 9.63초, 10mg/kg에서 8.50초로 감소하였고, climbing time은 5mg에서 50.4초, 10mg/kg에서 51.5초로 증가함을 확인하였다. 가공기술을 달리한 울금 및 발효울금의 효능 검색을 초고속생리활성 검색시스템 (HTS)를 이용하여 검색하는 실험은 현재 진행 중이다. 결과적으로 가공법을 달리한 울금 및 발효울금 추출물 중에서 발효울금보다 울금 추출물에서 neurotoxicity에 대한 보호효과가 뛰어난 것을 확인하였다. 추출물법 중에서는 80%주정 추출물에서 가장 뛰어난 보호효과가 있었음을 확인하였고, 이후 실험에서는 울금 80%주정 추출물을 사용하였다. 2차년도에는 선정된 소재를 대상으로 *in vitro* 및 *in vivo* 평가를 통해 스트레스 개선 효능 검증하고자 하였다. 가공기술을 달리한 울금 및 발효울금의 효능 검색을 초고속생리활성 검색시스템 (HTS)를 이용하여 측정하였다. 예정세포사멸(apoptosis)과 염증에 관련된 생화학지표인 caspase-3 activity 억제능을 측정하기 위하여 CORT 및 NMDA를 처리하였다. 그 결과 caspase-3 activity가 CORT 와 NMDA를 함께 처리한 군에 의해 증가하였고 가공 방법을 달리한 울금 추출물을 동시처리한 결과 caspase-3 activity가 감소하였다. 특히 울금 80%주정 추출물에서 CORT와 NMDA를 함께 처리한 군 보다 50% 감소시킴을 확인하였다. 또한 가공방법을 달리한 발효울금의 caspase-3 activity 억제능을 확인한 결과 발효울금 80%주정 추출물에서 약 20%의 억제능을 확인하였다. 스트레스에 반응하여 분비되는 효소이며 항산화제 역할을 하여 외부환경으로부터 세포손상을 막아주는 것으로 알려진 HO-1 activity를 측정하였다. 그 결과 가공방법을 달리한 울금 및 발효울금에서 HO-1 activity를 미미하게 증가시킴을 확인하였고, 울금 및 발효울금 추출물 별 차이는 크게 나타나지 않았다. 외부로부터 스트레스 자극이 전달되면 NMDA receptor에 glucocorticoid가 결합하게 되고 이로 인해서 하위 시그널이 진행되면서 세포사멸이 진행되게 된다. 그러나 아직까지 스트레스에 관련된 하위 시그널은 정확하게 밝혀지지 않은 실정이다. 따라서 항스트레

스 관련 기전을 규명하기 위해 울금 80%주정 추출물을 이용하여 NMDA receptor 중 하나인 NR2B 단백질 발현을 확인하였다. 먼저 CORT에 의해 세포독성을 유도하였고 동시에 curcumin을 농도별로 처리한 결과 CORT에 의해 증가된 NR2B 단백질 발현량이 curcumin에 의해 농도의존적으로 감소하는 것을 확인하였다. 또한 NMDA에 의한 NR2B 단백질 발현량이 curcumin에 의해 감소하는 것을 확인하였다. 세포막에 있는 수용체의 기전은 NR2B를 통해 매개됨을 확인하였으며 하위 시그널 PKA 를 확인한 결과 ERK와 p38 시그널을 감소시킴으로써 antagonist 기능을 하는 것으로 추정된다. 또한 기억력 감퇴 동물모델을 이용한 스트레스와 기억력증가 및 신경보호 상관관계를 규명하고자 $A\beta_{1-42}$ 를 이용하여 기억력 감퇴를 유발하여 다양한 행동평가 및 TUNEL staining 실험을 진행하였다. 우선 Morris water maze 테스트를 수행한 결과 $A\beta_{1-42}$ 에 의해 유도되었던 기억력 감퇴 증상이 (120±30 sec) 울금 80%주정 추출물에 의해 회복되는 것을 확인하였으며 (100mg/kg ;99±25초, 300mg/kg ;95±26초, 500mg/kg ;91±23초) passive avoidance 테스트를 수행한 결과 $A\beta_{1-42}$ 그룹에서는 119±42초 소요되었으나, 울금 80%주정 추출물에서는 100mg/kg 134±32초, 300mg/kg 144±35초, 500mg/kg 177±58초로 증가되는 것을 확인하였다. 아세틸콜린의 함량 및 아세틸콜린 합성을 저해하는 아세틸콜린에스터레이즈의 합성량을 확인한 결과 울금 80%주정 추출물에 의해 아세틸콜린 함량은 $A\beta_{1-42}$ 에 비해 (14.15±2.39 μ M/mg,) 각각 CL 100mg에서는 16.15±2.65 μ M/mg, CL 300mg 16.43±1.47 μ M/mg, CL 500mg 16.97±1.94 μ M/mg으로 증가하는 것을 확인하였고, 아세틸콜린에스터레이즈의 함량은 $A\beta_{1-42}$ 에 비해 (0.32±0.07 U/mg) CL 100mg에서는 0.29±0.07 U/mg, CL 300mg 0.25±0.04 U/mg, CL 500mg 0.22±0.04 U/mg으로 감소하는 것을 확인하였다. $A\beta_{1-42}$ 를 마우스의 뇌에 주입함으로써 유발되는 세포사멸은 TUNEL staining을 통해 확인하였다. 그 결과 $A\beta_{1-42}$ 그룹에서는 115.8±14.5 개의 cell이 counting 되었으며, 울금 80%주정 추출물 각각에서는 18.4± 2.8, 14.6±2.6 그리고 6.8±2.3 개의 cell이 counting 되었다. 이와 같은 결과를 통하여 가공방법을 달리한 울금 및 발효울금의 항스트레스 효능 활성을 검색한 결과 울금 80%주정 추출물에서 CORT에 의해 유도된 신경세포 독성을 보호하는 것을 확인하였고, NMDA 수용체의 발현을 억제함으로써 스트레스에 저항하는 것으로 사료된다. 또한 하위 시그널 중에서 ERK와 p38의 단백질 발현을 감소시킴으로써 antagonist의 역할을 하는 것으로 사료된다. 이와 더불어 기억력 감퇴 동물모델을 이용하여 울금 80%주정 추출물의 신경보호 기전을 확인한 결과 $A\beta_{1-42}$ 에 의해 유도되었던 기억력 감퇴 증상이 울금 80%주정 추출물에 의해 완화되는 것을 확인함으로써 항스트레스와 기억력 증가에 기여하는 것으로 사료된다.

*In vitro*와 *in vivo* 연구에서 항스트레스 활성 소재로 선정된 울금 80%주정 추출물을 대상으로 추출공정 표준화 연구를 수행하였다. 추출물의 수율은 44.0%였으며, 지표성분으로 설정한 Curcumin은 0.36mg/g이 검출되었다. 이로서 울금 80%주정 추출물은 항스트레스 활성을 가지는 건강소재로 산업화 가능성을 확인하였다.

6절. 간기능 개선 및 체지방 감소 건강기능식품 소재 개발

1. 서론

가. 간기능 개선 활성 기작구명

2010년 사망원인 통계조사에서 간질환은 한국인 사망원인의 8위를 나타내고 있다. 또한 남성이 여성보다 높은 간질환 사망률을 보이고 있고, 40~59세 사망원인의 3위를 기록하고 있다. 간질환은 사망률 순위 2위인 고의적 자해(자살), 3위인 악성신생물에 의한 사망 다음으로 높은 질환 사망률이 보고되었다(26). 간질환은 원인에 따라 바이러스성 간질환, 알코올성 간질환, 약물 독성성 간질환, 비알코올성 간질환, 원인불명의 간질환 등으로 분류된다.

국내 알코올성 간질환 유병률 통계를 살펴보면, 알코올 관련 질환에 의한 사망수는 한 해 4,701명으로 인구 10만 명당 9.6명이고, 이는 전체 간질환 사망이 7,314명으로 10만 명당 15.5명의 사망수인 것을 비교해 보면 알코올이 국민건강에 미치는 영향이 매우 지대함을 알 수 있다(27). 2010년 통계자료에서 알코올 관련 총 사망자수는 전년대비 2.4% 증가하였고, 50대 남성의 알코올 관련 사망률이 5.1% 증가되었다. 남성이 여성보다 9.67배의 높은 알코올 관련 사망률을 나타내었고, 전체적으로 급증한 알코올 관련 사망율은 30대 이후 급증하여 50대를 정점으로 감소하는 경향을 나타내었다(26).

알코올성 간질환은 간경변증, 간염, 간암으로 임상 진단되고 있다. 미국의 알코올성 간질환 통계에 의하면 습관적 음주자의 10~15%는 간경변으로 발전하며, 음주자 중 간경변 환자의 대부분을 자신이 간경변을 가지고 있는지 모른채로 살다가 30~40% 정도의 사람들이 부검에 의해 간경변 환자로 밝혀지고 이들의 5년 생존율은 계속 음주를 하는 경우 68.2% 정도로 알려져 있다. 국내의 경우도 과음, 폭음, 잦은 음주의 형태로 인하여 알코올성 간질환 유병율이 높게 나타나고 있다(26).

알코올은 사회적으로 사람의 감정을 풍부하게 하고, 분위기를 즐겁게 하고, 적당한 알코올 섭취는 혈액순환을 도와주는 역할을 갖는 긍정적인 면을 갖고 있지만, 과음, 폭음, 무절제한 음주습관 등으로 인한 알코올 의존증, 알코올성 간경변 등의 만성적 알코올 질환을 유발할 수 있는 부정적인 면을 갖고 있는 기호식품이다.

최근 알코올성 간질환 치료제 개발을 위해 산화스트레스, 사이토카인의 역할, 면역세포와의 상호작용 등이 *in vitro* 및 *in vivo*에서 연구되고 있으나, 간염 치료제로써 1971년 도입된 스테로이드와, 사이토카인 생산 억제 작용을 갖는 펜톡시필린 치료제를 제외하고 아직까지 간질환 치료에 임상 효과가 있다고 밝혀진 약물은 없는 실정이다. 또한 알코올성 간질환을 치료하는 방법으로는 금주 이외의 특별한 대안치료가 없는 것으로 알려져 있다(28). 이에 치료보다는 예방법에 더 주안점을 두어야 하는 질환인 알코올성 간질환의 예방법으로 절주 하는 것 이외에 간세포 보호 활성을 갖는 생리활성소재의 발굴과 이를 활용하여 개발된 기능성 식품들을 이용하는 부분에 관심이 집중되고 있다.

알코올이 간질환을 일으키는 기전은 여러 가지 요인에 의한 것이나 알코올의 소비량, 알코올대사효소의 유전적 다양성, 성별·영양상태·C형 간염바이러스의 중복 감염 등이 동시에 작용하는 것으로 알려져 있다. 알코올은 1 g당 7.1 kcal의 에너지를 낼 수 있으나 다른 영양소를 전혀 가지고 있지 않은 식품이다. 섭취된 알코올은 위장과 소장의 사부에서 확산 작용에 의해 쉽게 흡수되며, 섭취된 에탄올은 거의 완전히 흡수되어 각 조직으로 운반되며 일부는 대사되지 않은 채 폐를 통해 배출되거나 소변 및 땀으로 배설된다. 알코올은 저장되지 않고 거의 대사되며, alcohol dehydrogenase(ADH), microsomal ethanol-oxidizing system(MEOS), catalase 등의 효소계에 의해 산화되어 acetaldehyde로 산화되며 acetaldehyde는 acetaldehyde dehydrogenase(ALDH)의 도움으로 대사되어 acetate를 생성하며 이 acetate는 acetyl-coA로 전환되어 TCA회로를 거쳐 에너지를 발생하거나 콜

레스테롤과 지방산 합성에 이용된다. MEOS는 간세포 내 endoplasmic reticulum에 결합되어 있고 cytochrome p450의 효소를 보유하고 있어 과량의 알코올 섭취시 다량 발현되어 알코올의 산화에 작용한다(29-32). 이 효소 반응의 산물로 산화스트레스가 유발되고 지질과산화물의 다량 생산과 단백질 및 핵산에 손상을 유발시킬 수 있다. 카탈라제(catalase)는 peroxisome에 존재하며 물과 함께 알코올의 산화에 작용한다. 과량 및 만성 알코올 섭취자의 간세포 손상은 알코올 섭취에 따른 CYP2E1 대사에 의한 과도한 산화스트레스가 병인으로 주목 받고 있다. 즉 이 과정에서 발생하는 활성산소의 생성과 항산화계 활성의 감소는 간손상의 주요 원인으로 보고되고 있다(33). 이러한 활성산소로 인한 간세포 손상을 억제하는 방법은 직접적으로 항산화효소를 증강 및 활성산소를 제거하는 것, 간접적으로 반응성이 강한 중간체를 만들어 cytochrome P450 계열 효소의 활성을 조절하는 두 가지 기전을 제시하고 있다. 알코올성 간질환과 예방 및 치료에 유효한 활성소재의 개발연구에서 cytochrome P450 효소들의 활성에 작용하는 영향과 조직 내 항산화계의 활성을 연구하는 부분이 알코올성 간세포 손상을 보호하는 소재를 연구하는 중요한 연구 방향으로 알려져 있다.

국내 식생활 및 경제적 여건의 발달로 식품의 생체조절 기능에 대한 관심이 집중되고 있다. 국내 기능성 원료는 매년 추가적으로 늘어나고 있으며 특히 개별인정형 시장은 꾸준한 증가를 보이고 있다. 특히 개별인정형 건강기능식품의 대표적 사례로 2008년 헛개나무 열매추출물의 식품의약품안전처 인증을 살펴보면, 알코올성 간손상 보호 기능을 인정받은 헛개나무과병추출물은 인증 받은 이후 헛개나무과병추출물을 활용한 쿠퍼스를 비롯하여 관련 제품을 식품 시장에 출시하면서 건강기능식품의 시장 확대를 가져왔다. 더 나아가 개별인정형 건강기능식품의 개발과 인정을 촉진하는 효과를 보여, 매년 개별인정형 건강기능식품의 신청 및 인정 건수 증가를 나타내고 있다. 2010년 간건강과 관련된 개별인정형 건강기능식품의 등록 건수는 12건으로 ‘혈행개선’ 및 ‘체지방 감소’에 활성을 갖는 개별인정형 건강기능식품보다 건수가 높았다. 간건강에 유효한 개별인정형 건강기능식품으로는 브로콜리스프라우트분말, 표고버섯균사체추출물, 표고버섯균사체, 밀크씨슬추출물, 복분자추출분말, 유산균 발효다시마추출물, 헛개나무과병추출물이 있으며, 그 중 밀크씨슬 추출물은 실리마린을 유효성분으로 함유하여 간손상을 예방하고 손상된 간을 회복시키는 추출물로 보고되고 있다(34).

이에 본 연구에서 선행연구를 통해 간손상 억제활성 잠재력을 갖는 발효율금 실온추출물 및 그의 정제물을 대상으로 *in vitro* 알코올성 간세포 손상 보호활성을 평가하고, 발효율금 분말을 대상으로 *in vivo* 상에서 알코올성 간보호활성을 평가하며 알코올성 산화스트레스에 대한 보호활성을 분자수준에서 기작을 규명하고자 하였다. 또한 발효율금 분말과 개별인정형 건강기능식품인 밀크씨슬을 양성대조군으로 하여 *in vivo* 상에서 알코올성 간손상에 대한 보호활성을 평가하여 상업화를 위한 기초 자료를 제시하고자 하였다.

(1) 연구범위

(가) 발효율금의 간기능 개선 활성물질 규명

- 발효율금 실온추출물의 정제물 대상 HepG2/2E1 세포를 이용하여 알코올성 간세포 손상 보호물질 스크리닝

(나) 발효율금의 항산화 효소 시험

- 발효올금분말 대상 동물모델에서 간보호 활성 평가 : 혈청 biomarker의 평가
 - 발효올금분말 대상 동물모델에서 간보호 활성 기작규명 : 항산화 효소 활성 평가 및 항산화제 함량, CYP2E1 발현 평가
- (다) 시중에 유통중인 개별인정형 건강기능식품을 양성대조군으로 하여 *in vivo* 알코올성 간손상 보호 활성 비교
- C57BL/6 mice 대상 발효올금분말 및 양성대조군(밀크씨슬)의 알코올성 간세포 손상 보호 효과 비교 연구

나. 체지방 감소 건강기능식품 소재 개발

비만은 단순히 과잉체중의 상태를 말하는 것이 아니라, 대사 장애로 인해 체내에 지방이 과잉 축적된 상태를 일컫는다. 즉, 칼로리의 섭취가 신체활동과 성장 등에 필요한 에너지 보다 초과되어 중성지방의 형태로 지방조직에 과잉 축적되어 열량 불균형으로 나타나게 되는 것을 뜻한다(35). 비만은 생리적인 기능을 저하시킬 뿐만 아니라, 뇌졸중, 동맥경화, 심근경색 등의 심혈관계 질환, 당뇨 및 간경변증 등의 만성질환이나 그 빈도를 감소시키고, 퇴행성 관절염, 전립선암, 유방암, 대장암 및 자궁암, 수면 무호흡증, 우울증 등의 발병 위험도를 높여서 사망률을 증가시킨다(36).

최근 건강에 대한 관심이 증가함에 따라 비만의 예방과 치료를 위한 일환으로 의약품이나 천연물에 대한 연구가 활발히 수행되고 있다. 즉, 비만 발생을 예방하거나 억제 및 치료하는 효과가 있는 식품 및 약품 소재를 과학적 기전에 의해 확인하고 이들 소재를 직접·간접적으로 이용하여 비만용 건강기능식품을 개발하고자 하는 연구가 계속 되고 있다.

비만을 대상으로 한 기능성 소재의 개발은 비만인을 대상으로 한 이노, 설사, 식욕억제, 저칼로리 공급 등의 기전을 통해 설명되어 왔다. 최근 현대인의 식이에 다량의 지방섭취가 비만과 비만관련질환의 유병율을 증가시키는 것으로 알려진바, 과량의 지방섭취인 및 비만인을 위한 체지방감소 활성을 갖는 기능성 소재의 개발이 필수적이게 되었다. 2012년 3월 기준으로 식품의약품안전처에 가르시니아캄보지아 껍질추출물, 공액리놀레산(유리지방산 및 트리글리세라이드), 녹차추출물, L-카르니틴 타르트레이트 등 총 13가지의 개별인정형 건강기능식품 원료가 ‘체지방 감소에 도움’의 기능성으로 인정되어 있다(34).

지방세포는 중성지방을 저장하고 분해하여 에너지를 제공하는 대사의 중심적인 역할을 한다. 즉, 지방세포의 대사는 체내 에너지 평형을 유지하기 위해 지방형성과 지방분해에 관여하는 다양한 효소와 조절인자들이 작용을 받으며, 호르몬, 싸이토카인, 성장인자들의 내분비 기능을 수행하는 것으로 알려져 있다(37). 체지방은 피하지방과 내장지방으로 나뉘며, 조직부위에 따라 복부내장지방, 복부피하지방, 등지방, 생식소지방, 신장지방 등으로 분류할 수 있다. 체지방 감소에 유효한 기능성 식품 소재들은 지방세포의 지방 흡수 억제, 지방 산화 촉진, 지방 합성 저해 등의 기전으로 설명되고 있다. 지방형성과정에는 다양한 호르몬과 전사 인자들이 관여한다. 분화초기 CCAAT/enhancer-binding proteins β (C/EBP β), C/EBP δ 와 sterol regulatory element binding protein-1c(SREBP-1c)가 발현하고 이들은 지방세포 내 지방구 형성을 가속화 시킨다. 또한 후기 전사인자인 C/EBP α 와 peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ)의 발현을 증가시킴으로써 전지방세포의 분화를 촉진한다. 발현된 C/EBP α 와 PPAR γ 는 adipocyte protein 2(aP2), lipoprotein liase(LPL) 등의 지방형성 유전자 발현을 유도하며, 렙틴, 아디포넥틴과 같은 지방합성 유전자들의 발현

을 조절한다(38).

SREBP-1c는 fatty acid synthesis(FAS), acyl-CoA carboxylase(ACS) 및 acetyl-CoA carboxylase(ACC)의 발현을 조절하는 지방산합성 관련 효소로 이는 에너지 평형 조절을 위한 대사에서 중요한 역할을 한다(39). AMP-activated protein kinase(AMPK)는 지방산합성을 억제하는 동시에 지방산 베타산화를 촉진함으로써 체내 에너지 평형을 조절하는데 주요한 역할을 한다고 알려져 있다(40).

지방분해는 카테콜아민, ACTH, glucagone과 같은 호르몬의 조절을 받는다. 중성지방의 분해는 protein kinase A(PKA) 또는 G protein-coupled receptors와 cyclic AMP-activated extra cellular signal-regulated kinase(ERK)에 의해 hormone sensitive lipase(HSL)가 인산화되어, 중성지방과 diglyceride(DG)의 분해반응을 일으킨다. Adipose triglyceride lipase(ATGL)은 중성지방에 특이적으로 작용하여, 중성지방분해의 첫 번째 단계인 DG의 생성에 작용하는 효소로 알려져 있다. Perilipin A는 지방구의 막부위에 존재하고 있으며, 이는 지방구의 보호막으로써 외부 물질의 접근을 방해하는 역할을 하는 단백질이다. Perilipin A는 인산화됨으로써 지방구막의 구조를 유연하게 하고 지방구 내의 중성지방에 지방분해효소의 작용을 돕는 것으로 알려져 있다(41).

울금(Turmeric, *Curcuma longa* L.)은 이담작용, 위액 분비 촉진, 이뇨작용, 해독기능, 항암, 항염 작용 및 항산화 작용, 간보호 작용 등이 알려져 있다. 특히, 울금의 주성분인 curcumin은 *in vitro* 및 *in vivo* 상에서 항산화, 항암, 항염증, 항바이러스, 혈중 지질 강하 작용 등이 보고되어 있다(42,43). 이러한 울금의 우수한 생리활성에도 불구하고 울금 특유의 강한 향취와 매운맛은 울금의 섭취에 있어서 실용화 및 산업화의 장애요인이었다. 이에 선행연구에서 미생물에 의해 소화되기 어려운 고분자의 영양성분을 저분자로 분해하여 소화 흡수율을 높이고, 새로운 영양성분을 생성해 유용한 성분을 섭취할 수 있게 하는 발효의 공정을 이용하여, 울금의 관능성을 향상시키고 유효한 생리활성물질을 제공할 수 있는 ‘발효울금’을 개발하고 산업화 하게 되었다(44).

선행연구에서 발효울금의 50%주정 추출물은 체중감소 및 체지방감소 활성을 나타내었다(45). 본 연구에서는 체지방 감소 활성을 갖는 발효울금 주정추출물의 산업화를 위해 발효울금 3T3-L1 세포를 이용하여 50%주정 추출물(FCE50)의 지방구 형성 억제활성을 확인하고, *in vivo* 상에서 Sprague-Dawley rat(SD-rat)를 대상으로 고지방식이 하에 경구투여 된 FCE50의 체중 및 체지방 감소 효과를 평가하였다. 또한 체지방 감소와 관련된 바이오마커들을 분석함으로써 FCE50의 체지방 감소 기작구명을 수행하였다. 또한, 발효울금 50%주정 추출물로부터 분획한 에틸아세테이트(FCEE)층을 대상으로 *in vitro* 상에서 지방세포 지방축적억제 및 지방분해 활성을 평가하고, 대표 유효성분을 대상으로 *in vitro* 상에서 지방세포 지방축적억제 활성을 평가하여 유효성분 규명의 기초 자료를 제공하고자 하였다.

(1) 연구 범위

(가) 발효울금 50%주정 추출물의 기능성성분 및 항산화 활성 평가

- 기능성 성분을 확인하기 위하여 총 페놀성 화합물과 총 플라보노이드 함량을 측정. 항산화 활성을 확인하기 위해 DPPH 라디칼 억제, ABTs cation 라디칼 억제, superoxide anion 라디칼 억제 활성 및 지질과산화 억제 활성 측정

(나) 발효울금 50%주정추출물의 *in vitro* 지방형성 억제능 평가

- 3T3-L1 cell에서 지방구 형성 억제능, 세포내·외 중성지방량 및 3T3-L1 지방세포의 지방구 형성 억제 바이오마커 측정
- (다) 발효율금 50%주정추출물의 *in vivo* 체지방 감소 활성 평가
 - 60% high fat 식이섭취 SD-rat에서 체중, 식이섭취량, 물섭취량, 혈장의 지질 profiles, adipokine 등 체지방 감소 바이오마커 측정
- (라) 발효율금 50% 주정추출물로부터 분리한 에틸아세테이트 분획물의 세포계에서 지방 형성 억제 기작 구명
 - 3T3-L1 세포계에서 분획물의 지방형성억제 효과평가
 - 3T3-L1 세포계에서 분획물의 지방분해 효과평가
 - 3T3-L1 세포계에서 분획물 및 유효성분의 지방형성억제 효과비교

2. 방법

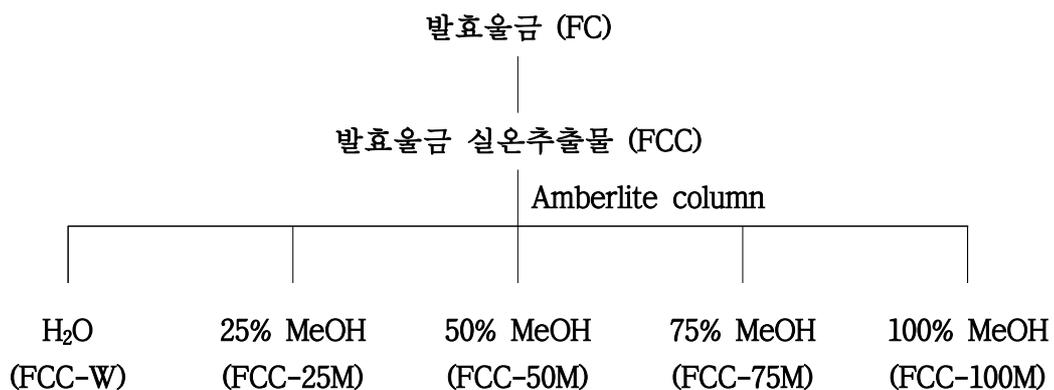
가. 발효율금 실온추출물 정제물 및 발효율금 분말의 *in vitro* 및 *in vivo* 간보호 활성평가

(1) 발효율금 실온추출물 정제물 및 발효율금 분말의 *in vitro* 간보호 활성평가

(가) 실험 대상 재료

① 발효율금 실온추출물의 Amberlite column 정제물

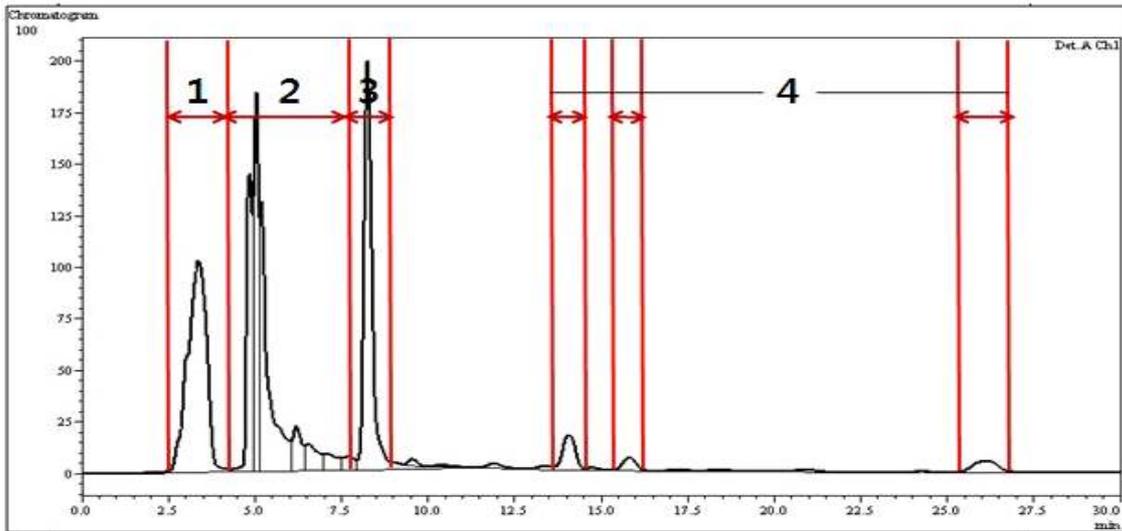
발효율금 실온추출물을 Amberlite 충전 column을 이용하여 물, 25%, 50%, 75%, 100% 메탄올로 chromatography를 수행하여 분리·정제된 총 5가지 연구대상 시료를 주관기관(한국인스팜(주))으로부터 수령하여 각각 FCC-W, FCC-25M, FCC-50M, FCC-75M, FCC-100M로 명명하였다.



〈발효율금 실온추출물의 정제 과정〉

② FCC-25M의 Prep-LC 정제물

활성이 확인된 FCC-25M을 Prep-LC를 통해 분리된 다음의 4개로 분리 정제하고 다음의 크로마토그램에서 제시된 1번 fraciton을 FCC-25M-1, 2번은 FCC-25M-2, 3번은 FCC-25M-3, 4번은 FCC-25M-4로 명명하였다.



(나) DPPH 라디칼 소거활성

각 시료를 대상으로 항산화 활성을 평가하기 위하여 DPPH(1,1- diphenyl-2-picrylhydrazyl) 라디칼 소거활성을 측정하였다. DPPH는 자체가 질소 중심의 라디칼 형태이며, 라디칼 전자의 비 편재화에 의해 안정화된 라디칼 상태로 존재한다. 517 nm에서 특징적인 흡광수를 나타내는 보라색 화합물인 DPPH는 알코올 등에 안정하고 항산화 기작 중 proton-radical scavenger에 의하여 탈색되기 때문에 항산화 활성을 육안으로도 쉽게 관찰 할 수 있어 항산화 활성을 평가하는데 널리 사용되고 있다. 시료 20 uL 200 uM DPPH 용액 380 uL를 가한 후, 상온에서 30분 반응시켜 517 nm에서 흡광도를 측정하고 대조구와의 흡광도 감소 정도를 측정함으로써 DPPH 라디칼 소거능을 평가하였다. DPPH 라디칼 소거율은 다음 식에 의거하여 산출하였다. DPPH radical scavenging activity (%) = $(Abs_{sample} - Abs_{blank}) / Abs_{blank} \times 100$.

(다) ABTs 라디칼 소거활성

ABTS(2,2'-azinbis(3-ethyl-benzothiazoline-6-sulfonic acid))와 potassium persulfate를 혼합하여 24시간 암소에 두어 ABTS 라디칼을 생성시킨 후, 이 특유의 청록색 라디칼과 시료를 반응시켜 그 탈색 정도를 측정함으로써 항산화 능력을 평가하였다. 7.4 mM ABTs와 potassium persulphate 2.6 mM을 24시간 암소에 방치하여 청록색의 ABTs⁺ radical을 형성시켜 냉장고에 보관하여 준비한다(stock solution). Radical stock solution은 734 nm에서 흡광도 값이 0.9~1이 되도록 실험 직전에 phosphate buffered saline (pH 7.4)으로 희석하여 준비한다. 시료 10 uL와 희석한 ABTs를 390 uL를 반응시켜 732nm에서 흡광도를 측정한다. 대조구와의 흡광도 감소 정도를 측정함으로써 ABTs 라디칼 소거능을 평가하였다. ABTs 라디칼 소거율은 다음 식에 의거하여 산출하였다. ABTS radical scavenging activity (%) = $(Abs_{sample} - Abs_{blank}) / Abs_{blank} \times 100$.

(라) HepG2/2E1 세포

본 실험에 사용된 HepG2/2E1 세포는 생리활성물질의 알코올성 산화스트레스 보호 활성을 평가하기 위해서 Cytochrome P450 2E1과 Cytochrome p450 reductase 유전

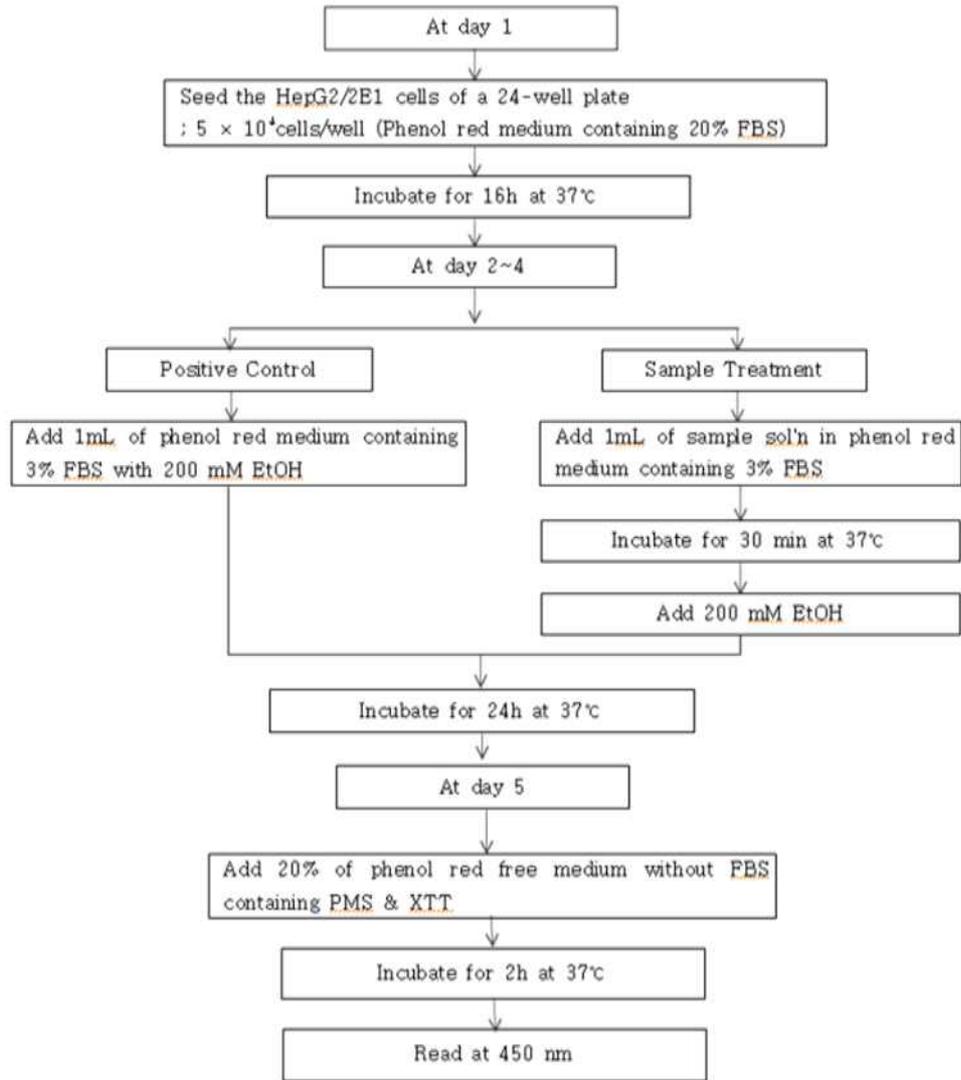
자를 과다 발현되도록 제조되었다. 이 세포는 일반 간암 세포주 및 정상 간세포에서 빠르게 분해되는 되는 효소인 CYP2E1과 알코올성 산화스트레스를 보다 효과적으로 평가할 수 있도록 설계하여 본 *in vitro* 연구에 이용하였다. HepG2/2E1 cell은 0.5%(v/v) penicillin-streptomycin (50 g/mL streptomycin, 50 IU/mL penicillin), 2 mM L-glutamine을 함유한 MEM을 배양액에 10%(v/v) FBS를 첨가하여 사용하였고, 37°C, 5% CO₂, 95% humid air로 조절된 배양기에서 배양하였다. 배지는 2 일마다 교환하였으며, confluency가 80% 되었을 때 0.05% Trypin/EDTA를 처리하여 subculture를 실시하며 배양하였다.

(마) 세포독성

세포독성은 24 wells plate에 2×10^5 cells/well의 세포를 분주한 후 14 시간동안 배양하였다. 이 후 배지를 제거하고 대상 시료가 용해된 3% FBS가 함유된 MEM 배지를 각 1 mL씩 분주하고 재 배양 실시하고, 시료 처리 및 배양을 3일간 반복하였다. 4 일째 되는 날 각 well에 0.25 mL의 XTT-PMS 용액(1 mg XTT and 10 ug PMS/mL of PBS)을 첨가하고 2시간 배양 한 후에 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

(바) 알코올성 간손상 억제 활성

세포독성실험을 바탕으로 안전성이 확인된 농도범위에서 각 시료(정제물)들의 알코올성 간손상 억제 활성을 평가하였다. 24 well plate에 HepG2/2E1 세포를 5×10^4 cells/well로 seeding하여 16 시간 후에 각 시료를 첨가하고, 30분 후에 200 mM의 알코올을 처리하여 24시간 배양하였다. 시료 처리와 알코올 처리는 3일간 반복하였다. 24 시간 후에 각 well에 0.25 mL의 XTT-PMS 용액(1 mg XTT and 10 g PMS/mL of PBS)을 첨가하고 다시 2 시간 동안 배양한 후 450 nm에서 흡광도를 측정하였다. 음성 대조구는 시료 대신 배지를 사용하였으며 양성 대조구로는 200 mM 알코올만을 처리하였다. 실험방법은 다음에 제시하였다.



<알코올성 간손상 억제 활성 평가방법>

(사) HepG2/2E1 세포에서의 알코올성 간손상 보호 기작구명

HepG2/2E1 세포를 20개의 60 mm dish에 2×10^5 /dish 로 seeding 후 16시간 배양한 뒤, 무처리군(N.con)과 200 mM 의 알코올만 처리한 군(P.con), 발효율금 실은추출물 정제물(FCC-25M)을 저농도(25 ug/mL) 및 고농도(50 ug/mL)로 각각 처리한 뒤 200 mM 의 알코올을 30분 후 재처리하였다. 반복 3일 처리, 배양 한 후 4일째 각 세포를 수집하여 카탈라제(catalase), 글루타치온 전환효소(GST), 글루타치온 환원효소(GR), 글루타치온 과산화효소(GPx), 수퍼옥사이드 디스무타제(SOD) 효소활성을 평가하였고, 글루타치온(GSH) 및 지질과산화물인 MDA의 활성을 측정하였다.

① 카탈라제(CAT)

- 카탈라제 활성은 조직액 10 uL에 20 mM H₂O₂용액 290 uL를 첨가하여 kinetic method를 이용하여 3분간 240 nm에서 흡광도의 변화를 측정하였다. 카탈라아제 효소의 활성은 U/mg protein으로 환산하였다.

② 글루타치온 전환효소(GST)

- 글루타치온 전환효소 활성은 phosphate buffered saline 196 uL와 200 mM reduced glutathione 2 uL, 100 mM CDNB 용액 2 uL을 혼합한 기질액을 준비하였다. 조직액 20 uL에 기질액 180 uL를 첨가하여 5분간 340 nm에서 흡광도의 변화를 측정하였다. 글루타치온 전환효소 효소활성은 U/mg protein으로 계산하였다.

③ 글루타치온 환원효소(GR)

- 글루타치온 환원효소는 조직액 20 uL에 100 mM potassium phosphate buffer (pH7.0) 30 uL, 2 mM oxidized glutathione 100 uL, 3 mM DTNB 50 uL를 넣어 잘 혼합한 후, 2 mM NADPH 10 uL를 첨가하여 반응을 유도하고 5분간 412 nm에서 GR 효소활성을 측정하였다. 글루타치온 환원효소 효소활성은 U/mg protein으로 계산하였다.

④ 글루타치온 과산화효소(GPx)

- 글루타치온 과산화효소 활성은 조직액 10 uL에 3.5 mM reduced glutathione 120 uL, 2.5 mM NADPH 20 uL, 0.5 U glutathione reductase 20 uL를 넣어 잘 혼합한 후, 30 mM tert-butyl hydroperoxide 20 uL를 첨가하여 반응을 유도하고 5분간 340 nm에서 글루타치온 과산화효소활성은 U/mg protein으로 계산하였다.

⑤ 수퍼옥사이드 디스뮤타제(SOD)

- 수퍼옥사이드 디스뮤타제 활성은 시료와 대조구에 동일한 시료 20 uL 씩을 준비한 후 WST-1 용액(1-(4-indophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2H-tetrazolium, monosodium salt)를 200 uL 씩 분주한 뒤, xanthine oxidase 용액을 20 uL 씩 첨가하여 37°C 에서 20분 반응시키고 450 nm 에서 흡광도를 측정하였다. 수퍼옥사이드 디스뮤타제 활성은 효소활성은 상용화된 효소 0, 3.125, 6.25, 12.5, 25, 50 U/mL 농도로 작성된 표준곡선으로 계산하고 U/mg protein으로 나타내었다.

⑥ 총 글루타치온 함량(GSH)

- 총 글루타치온 함량은 100 mM potassium phosphate buffer(pH 7.0) 7.54 mL, 6 unit glutathione reductase 228 uL, 3 mM DTNB 228 uL를 혼합하여 기질액을 준비한 후, 조직액 10 uL과 준비한 기질액 150 μ L를 잘 혼합한 후 50 mM NADPH를 50 uL 첨가하여 반응을 유도하고 5분간 412 nm 에서 흡광도의 변화를 측정하였다. 조직내의 GSH량은 GSH 표준곡선을 이용하여 계산하여 umoles/min/mg protein으로 나타내었다.

(아) Reactive oxygen species(ROS) 수준 평가

세포내 ROS 형성능은 DCFH-DA probe를 이용하여 측정하였다. HepG2/2E1 세포를 5×10^4 cells/well로 24 well plate에 24시간 배양하고 DCFH-DA와 시료를 첨가하고 2시간 경과 후 150 mM 알코올을 처리하여 spectrofluormeter로 excitation 485 nm, emission 530 nm에서 측정하였다.

(2) 발효율금 실온추출물 정제물 및 발효율금 분말의 *in vivo* 간보호 활성평가

(가) 실험동물의 사육

본 실험에 사용된 동물은 수컷 C57BL/J mice 구입한 후 1주일간 사육실 환경에 적응 시킨 후 실험에 사용하였다. 조명시간을 아침 7시부터 저녁 7시까지 12시간으로, 실내온도 및 습도는 $23 \pm 3^\circ\text{C}$, $55 \pm 15\%$ 로 조절된 사육실에 사육하였다. 실험동물은 7일간 본 사육환경에 적응시킨 후 실험에 사용하였다. 사료는 AIN-76 diet(Research diet 사), 급수는 수돗물을 사용하였으며 사료와 급수는 제한하지 않았다.

(나) 발효율금 분말대상 동물모델에서 알코올성 간손상 보호 활성평가

실험동물은 각 8마리로 무작위 배정하여 몸무게가 동일하게 4군으로 나누었다. 대조군(N.con), 알코올 대조군(P.con), 발효율금 분말 저농도 투여군(100 mg/kg/day; FC-L), 발효율금 분말 고농도 투여군(300 mg/kg/day; FC-H)으로 나누고 5일간 각 시료를 경구투여 하였다. 시료투여 기간 동안 N.con과 P.con은 물을 시료 투여 용량에 맞추어 경구투여 하였다. 6일, 7일, 8일간 알코올 5 g/kg/day의 양을 P.con, FC-L, FC-H 군에 투여하고 마지막 투여 6시간 후에 해부하여 혈액 및 간 조직을 적출하였다. 8일간 실시되는 실험에서 사용된 모든 동물에 대하여 시험개시일부터 부검일까지 체중을 측정하였다. 시험 종료시 대조군 및 투여군의 모든 생존동물을 부검하였다. 장기의 중량은 습중량(g)을 측정하였다. 알코올성 간손상 보호 활성은 채취한 혈액을 3,000 rpm에서 10분간 원심분리 한 후, 혈청을 취득하여 ALT(alanine aminotransferase) 및 AST(aspartate aminotransferase) 활성을 각 assay kit를 이용하여 측정 평가하였다.

(다) 발효율금 분말대상 동물모델에서 알코올성 간손상 보호 활성 기작구명

① 간조직 균질화

- 적출한 간조직을 0.1 g/mL 농도로 phosphate buffered saline (PBS)에 균질화 시킨 후 13,000 rpm, 30 분 원심분리 하여 얻어진 상등액을 회수하여 다시 PBS로 20배 희석하여 카탈라제(catalase), 글루타치온 전환효소(GST), 글루타치온 환원효소(GR), 글루타치온 과산화효소(GPx), 슈퍼옥사이드 디스뮤타제(SOD) 활성 및 글루타치온(GSH)과 말론디알데하이드(MDA) 함량을 측정하였다.

② 항산화 효소 및 항산화제 함량 평가

- 카탈라제(catalase), 글루타치온 전환효소(GST), 글루타치온 환원효소(GR), 글루타치온 과산화효소(GPx), 슈퍼옥사이드 디스뮤타제(SOD) 활성 및 총 글루타치온(GSH) 함량은 (사)에 제시한 동일한 방법으로 측정하였다.

③ 지질과산화물 함량

- 조직액 내의 지질과산화물의 함량은 지질과산화물이 thiobarbitric acid와 반응하여 생성되는 thiobarbitric acid substance(TBARS)를 생성하는 원리를 이용하여 이 thiobarbitric acid substance인 malondialdehyde(MDA)를 표준물질로 하여 그 함량을 평가하였다. 20배 희석된 조직액 500 μL 에 15% TCA 250 μL 를 첨가하여 10분간 단백질을 침전시킨다. 이 후 4°C , 3000 rpm에서 10분간 원심분리하여 상층액 500 μL 를 새 1.5 mL 튜브로 옮기고 0.375% TBA를 500 μL 첨가하여 잘 혼합하였다. 이 혼합액을 100°C 에서 30분간 끓이고, ice 상에서 10분

간 cooling 하였다. 4°C, 3,000 rpm에서 10분간 원심분리한 후 상층액 만을 535 nm에서 흡광도 측정하였다. TBARS는 MDA표준곡선을 이용하여 계산하였고 M/g tissue로 나타내었다.

(라) Cytochrome P450 효소활성

CYP2E1 효소활성은 colorimetric method로 특이적 기질인 p-nitrophenol(PNP)를 이용하여 간 microsome 획분에서 측정하였다. 0.1 M PBS buffer(pH 7.4), 1 mM PNP, 0.5 mg 간 microsome 액의 혼합액 0.5 mL에 최종농도 0.5 mM NADPH를 가하여 반응을 시작하였다. 반응은 37°C에서 30분간 지속하고 0.2 mL의 20% TCA를 가하여 종결한 후, 10,000 rpm에서 5분간 원심분리하여 상층액을 분리하였다. 분리된 상층액에 0.5 mL의 2 M NaOH를 가하여 발색시키고 535 nm에서 측정하였다.

(마) Reverse transcription polymerase chain reaction

CYP2E1의 mRNA 발현도는 reverse transcription polymerase chain reaction(RT-PCR)를 이용하여 측정하였다. RNA는 RNeasy kit(Qiagen, USA)를 이용하여 수득 하였으며, CYP2E1의 타겟 유전자를 증폭하기 위해 (5'-GCATCTCTTGCCATCCTT-3'),(3'-ATGGACCTACCTGGAAGGACAT-5')를 각각 사용하였다. 총 35회 cycle로서 증폭된 DNA는 2% 아가로스 젤에서 전기 영동하여 그 발현량을 평가하였고, 그 발현율을 Image Lab 4.0 version 프로그램으로 정량하였다.

(3) 통계분석

실험결과는 평균±표준편차 및 평균±표준오차로 나타내었다. 군간의 비교는 one-way ANOVA를 통해 분석하였으며 Duncan의 다중검정법(Duncan's multiple range test)을 이용하여 사후검정을 실시하였다($p < 0.05$).

나. 발효율금분말 및 건강기능식품의 *in vivo* 상 간보호 활성 비교평가

(1) 실험재료

본 연구에서 사용한 발효율금분말(Fermented *Curcuma longa* L.; FC) 및 밀크씨슬(*Silybum marianum* (L.) Gaertn; SM)은 한국인스팜(주)에서 제공받아 연구에 이용하였다.

(2) 실험동물

본 실험에 사용된 동물은 8주령의 수컷 C57BL/6 mice구입한 후 1주일간 사육실 환경에 적응 시킨 후 실험에 사용하였다. 조명시간을 아침 7시부터 저녁 7시까지 12시간으로, 실내온도 및 습도는 23±3°C, 55±15%로 조절된 사육실에 사육하였다. 실험동물은 7일간 본 사육환경에 적응시킨 후 실험에 사용하였다. 사료는 AIN-76 diet (Research diet, USA), 급수는 수돗물을 사용하였으며 사료와 급수는 제한하지 않았다.

(3) 알코올성 간손상 보호 활성평가

실험동물은 각 8마리로 무작위 배정하여 몸무게가 동일하게 4군으로 나누었다. 대조군(Control), 알코올 대조군(EtOH), 밀크씨슬 투여군(300 mg/kg/day; SM) 발효율금분말 투

여군(300 mg/kg/day; FC)으로 나누고 5일간 각 시료를 경구투여 하였다. 시료투여 기간 동안 Control과 EtOH은 물을 시료 투여 용량에 맞추어 경구투여 하였다. 6일, 7일, 8일간 알코올 5 g/kg/day의 양을 EtOH, SM, FC 군에 투여하고 마지막 투여 6시간 후에 해부하여 혈액 및 각조직을 적출하였다. 8일간 실시되는 실험에서 사용된 모든 동물에 대하여 시험개시일부터 부검일까지 체중을 측정하였다. 시험 종료시 대조군 및 투여군의 모든 생존동물을 부검하였다. 장기의 무게는 습중량(g)으로 측정하였다. 알코올성 간손상 보호 활성은 채취한 혈액을 3,000 rpm에서 10분간 원심분리 한 후, 혈청을 취득하여 ALT(alanine aminotransferase) 및 AST(aspartate aminotransferase)활성을 각 assay kit(아산제약, Korea)를 이용하여 측정 평가하였다.

(4) 통계분석

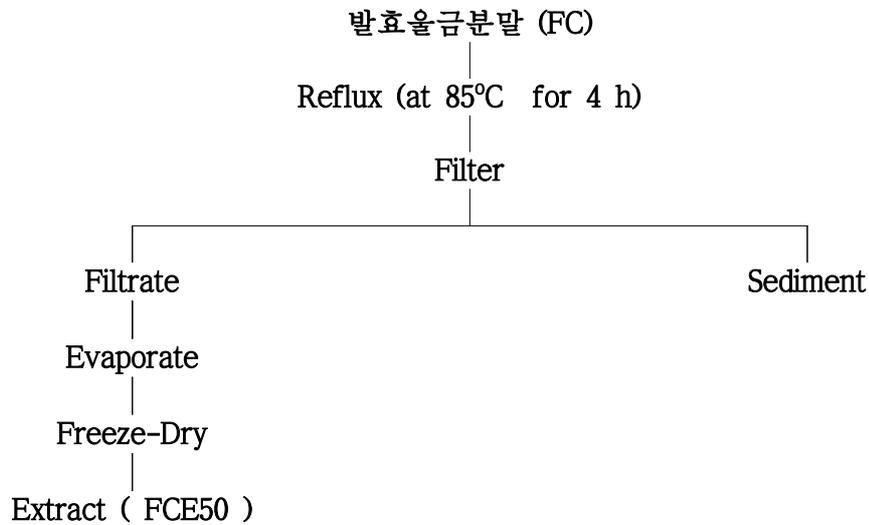
실험결과는 평균±표준편차 및 평균±표준오차로 나타내었다. 군간의 비교는 one-way ANOVA를 통해 분석하였으며 Duncan의 다중검정법(Duncan's multiple range test)를 이용하여 사후검정을 실시하였다($p < 0.05$).

다. 발효율금추출물의 체지방 감소 활성평가

(1) 실험재료 및 시약

본 실험에서 사용된 발효율금 50%주정 추출물 및 가르시니아 캄보지아껍질 추출물은 한국인스팜(주)(Korea)에서 공급받아 사용하였다. Ethanol, XTT, IBMX, DEX, Insulin, Oil red O은 Sigma(St, Louis, MO, USA)사, AdipoRed™(Lonza, USA)사로부터 구입하였으며, 한편 streptomycin, 0.25% trypsin-EDTA, fetal bovine serum(FBS), newborn calf serum(NCS), DMEM은 Hyclone(USA)사로부터 구입하여 사용하였다. 또한 본 연구에 사용된 3T3-L1 전지방 세포는 American Type Culture Collection(ATCC, Rockville, MD, USA)로부터 구입하여 사용하였다.

발효율금분말을 이용하여 50% 주정으로추출한 후(85°C, 4시간), Whatman No 6을 이용하여 감압여과하고 감압농축기로 농축한 후 동결건조하여 연구시료로 제공되었다. 이후 발효율금 50%주정추출물은 FCE50으로 명명하여 연구에 활용하였다. 시중에 유통 중인 개별인정형 건강기능식품, 가르시니아캄보지아 껍질추출물은 본 연구에서 체지방 감소의 양성대조군으로 경구투여 하였다.



〈 발효율금 50%주정추출물의 제조 〉

(2) 발효율금 50%주정추출물의 기능성 성분 및 항산화 활성

(가) 총 페놀성 화합물 함량

총 폴리페놀 함량은 Folin-Ciocalteu' s 비색법으로 측정하였다. 시료 1 mL을 25 mL volumetric flask에 넣고 증류수 9 mL을 첨가한 후, 1 mL의 Folin-Ciocalteu' s phenol reagent 넣고 잘 섞어 상온에 5분간 방치하였다. 7% Na₂CO₃를 10 mL 넣고 총량이 25 mL이 되도록 증류수를 첨가한 후 23°C에서 90분간 방치하고 750 nm에서 흡광도를 측정하였다. 시료의 총 폴리페놀 함량은 gallic acid를 이용한 표준곡선식으로 산출하였고 3회 반복 실험한 후 그 평균값을 %로 제시하였다.

(나) 총 플라보노이드 함량

총 플라보노이드 함량은 Zhushen 등의 비색법으로 측정하였다. 시료 1 mL에 4 mL의 증류수를 첨가하고 5% NaNO₂ 0.3 mL을 넣어 잘 혼합하였다. 상온에 5분간 방치하고 10% AlCl₃ 0.3 mL을 첨가하였다. 상온에 6분간 방치한 후 1 M NaOH 2 mL을 넣고, 증류수 2.4 mL 넣고 510 nm에서 흡광도를 측정하였다. 시료의 총 플라보노이드 함량은 catechin hydrate로 작성된 표준곡선식을 이용하여 산출하였고, 3회 반복실험한 후 그 평균값을 %로 제시하였다.

(다) DPPH 라디칼 소거활성

시료의 DPPH anion 라디칼 소거활성은 선행문헌에 제시된 방법에 따라 측정하였다(Brand-Williams et al., 1995). DPPH는 질소 중심의 라디칼형태이며, 라디칼 전자의 비 편재화에 의해 안정화된 라디칼 상태로 존재할 수 있다. 517 nm에서 특징적인 광흡수를 나타내는 보라색 화합물인 DPPH는 알코올 등에 안정하고, 항산화 활성평가 시 proton-radical scavenger에 의하여 탈색되기 때문에 항산화 활성을 육안으로도 쉽게 관찰 할 수 있어 항산화 활성을 평가하는데 널리 사용되고 있다. 시료 20 uL 200 uM DPPH 용액 380 uL를 가한 후, 상온에서 30분 반응시켜 517 nm에서 흡광도를 측정하고 대조구와의 흡광도 감소정도를 측정함으로써 DPPH 라디칼 소거능을 평가하였다.

DPPH 라디칼 소거율은 다음 식에 의거하여 산출하였다.

$$\text{DPPH radical scavenging activity (\%)} = (\text{Abs}_{\text{sample}} - \text{Abs}_{\text{blank}}) / \text{Abs}_{\text{blank}} \times 100.$$

(라) ABTs 라디칼 소거활성

시료의 ABTs cation 라디칼 소거활성은 선행문헌에 제시된 방법에 따라 측정하였다(Pellegrini et al.,1999). ABTS(2,2'-azinbis(3-ethyl-benzothi-azoline-6- sulfonicacid))와 potassium persulfate를 혼합하여 24시간 암소에 두어 ABTS 라디칼을 생성시킨 후, 이 특유의 청록색 라디칼과 시료를 반응시켜 그 탈색 정도를 측정함으로써 항산화 활성을 평가하였다. 7.4 mM ABTs와 potassium persulphate 2.6 mM을 24시간 암소에 방치하여 청록색의 ABTs⁺ radical을 형성시켜 냉장고에 보관하여 준비하였다(stock solution). Radical stock solution은 734 nm에서 흡광도 값이 0.9~1이 되도록 실험 직전에 PBS(pH 7.4)로 희석하여 준비하였다. 시료 10 uL와 희석한 ABTs를 390 uL를 반응시켜 732 nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조구와의 흡광도 감소 정도를 측정함으로써 ABTs 라디칼 소거능을 평가하였다. ABTs 라디칼 소거율은 다음 식에 의거하여 산출하였다.

$$\text{ABTS radical scavenging activity (\%)} = (\text{Abs}_{\text{sample}} - \text{Abs}_{\text{blank}}) / \text{Abs}_{\text{blank}} \times 100.$$

(마) Superoxide anion 라디칼 소거활성

시료의 superoxide anion 라디칼 소거활성은 선행문헌에 제시된 방법에 따라 측정하였다(Nishikimi,1975). 0.5 mM xanthine과 0.5 mM tetrazolium blue를 0.05 mM EDTA를 함유한 50 mM PBS(pH 7.4)에 잘 혼합하여 기질액을 준비하였다 시료 0.1 mL에 준비한 기질액 0.9 mL을 넣고 1 mL의 xanthine oxidase(0.05 Unit/mL)을 첨가하였다. 37°C에서 30분간 배양한 후, 2 N HCl을 2 mL 넣어 반응을 종료하고 560 nm에서 흡광도를 측정하였다. Superoxide anion 라디칼 소거활성 정도는 NBT 환원 저해율로 표시하였다. Superoxide anion 라디칼 소거율은 다음 식에 의거하여 산출하였다.

$$\text{Superoxide anion radical scavenging activity (\%)} = (\text{Abs}_{\text{blank}} - \text{Abs}_{\text{sample}}) / \text{Abs}_{\text{blank}} \times 100.$$

(바) 지질과산화 억제활성

Lin 등(2000)의 방법을 변형하여 측정하였다. Fe²⁺에 의해 유도된 linoleic acid의 과산화에 대한 억제활성을 TBA(thiobarbituric acid)로 발색시켜 측정하였다. Linoleic acid 0.1 mL와 tween20 0.2 mL, 증류수 19.7 mL을 혼합하여 linoleic acid emulsion을 제조하였다. Linoleic acid emulsion 1 mL에 0.01% FeSO₄ 0.2 mL, 0.56 mM H₂O₂ 0.2 mL, 4% TCA 0.2 mL, 0.8% TBA 2 mL을 첨가하고 잘 혼합한 후 100°C에서 15분간 끓였다. Cooling 한 후 3000 rpm으로 20분간 원심분리 후 532 nm에서 흡광도를 측정하였다. 지질과산화 억제능은 다음 식에 의거하여 산출하였다.

$$\text{Lipid peroxidation inhibition activity (\%)} = (\text{Abs}_{\text{blank}} - \text{Abs}_{\text{sample}}) / \text{Abs}_{\text{blank}} \times 100.$$

(3) 발효율금 50%주정추출물의 *in vitro* 지방구 형성 억제 활성평가

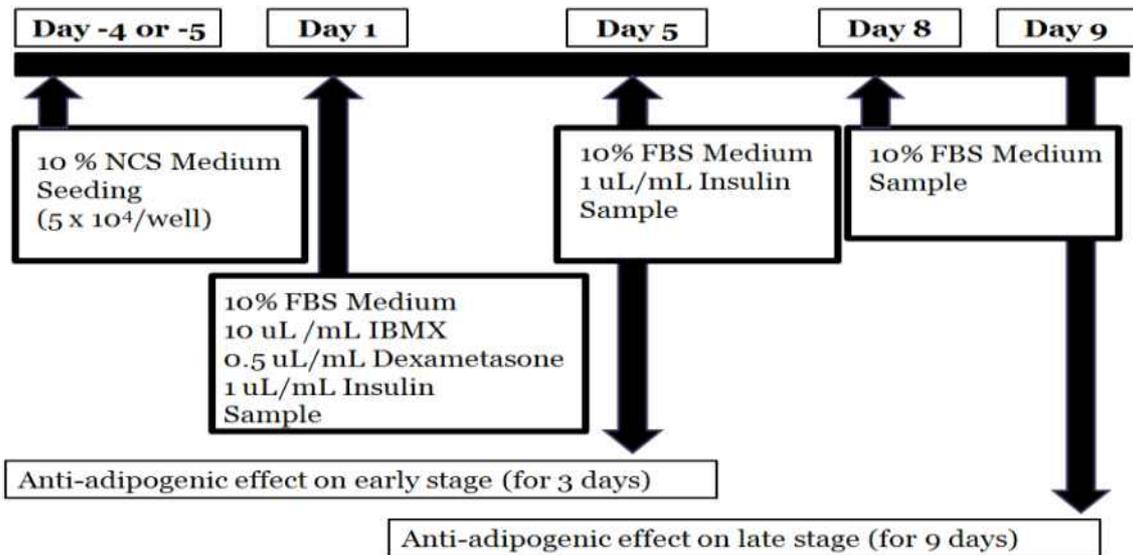
(가) 3T3-L1 세포

3T3-L1 세포는 mouse fibroblast인 3T3 세포에서 유래된 세포주로서 적절한 조건

하에서 배양하면 preadipocyte에서 adipocyte로 분화하는 성질을 가지고 있으며, 분화 촉진 인자들에 의해 분화된 3T3-L1 세포는 세포내 지방이 축적되는 등 지방세포로서의 형태를 나타나게 된다. 분화 시 단백질들의 분비가 촉진되는 등 그 생물학적 특성이 잘 밝혀져 있어 지방세포의 대사과정은 물론 지방축적과 지방세포의 분화과정을 연구하는 모델로 많이 사용되고 있다.

(나) 3T3-L1 세포배양과 분화

3T3-L1 전지방세포를 10% NCS(newborn calf serum)와 100 unit/mL의 페니실린과 100 ng/mL의 스트렙토마이신을 함유한 DMEM(Dulbecco's Modified Eagle Medium, Hyclone)배양액을 사용하여 37°C에서 5% CO₂ 가 유지되는 배양기에서 배양하였다. 이때 매 3 일마다 신선한 DMEM 배양액으로 교환하였다. 세포가 단일층으로 플라스크 바닥에 80% 이상 부착하면 HBSS 용액을 사용하여 세포표면을 세척하였으며, 0.25% trypsin-EDTA(Hyclone) 용액을 첨가한 뒤, 원심분리기(Lager capacity Union 32R, (주)한일과학산업, Korea)를 사용하여 1,500 rpm에서 3 분간 원심분리하였다. 이들 세포를 6-well plate 에 2 X 10⁵ cells을 균등하게 분주하여 100% confluent stage 2 일 후, 10% FBS와 100 unit/mL의 페니실린과 100 ng/mL 스트렙토마이신을 함유한 DMEM 배양액에 adipogenic cocktail 인 Dex 0.5 uL/mL, IBMX 10 uL/mL, Insulin 1 uL/mL과 FCE50이 함유된 배양액으로 교환하여 3일간의 분화를 유도하였다. 이후에는 배양액 교환시 5 ug/mL의 인슐린과 FCE50만을 포함하는 10% FBS를 함유한 DMEM 배양액으로 3일간 처리하였고, 마지막 1일간은 FCE50과 10% FBS를 함유한 DMEM 배양액을 사용하였다. 시료처리와 3T3-L1 지방세포 분화 과정을 아래에 도식화 하였다.



<3T3-L1 세포분화>

(다) 세포독성

FCE50을 대상으로 *in vitro* 상에서 지방구 억제능 평가에 앞서 3T3-L1세포에서 FCE50의 세포독성을 XTT를 이용한 비색법을 이용하여 측정하였다. 세포독성은 24

wells plate에 0.5×10^5 cells/well의 세포를 분주한 후 세포가 100% 밀집되게 한 후 2일간 배양하여, 10% FBS가 함유된 DMEM 배지에 MDI solution(10 uL/mL IBMX, 0.5 uL dexamethasone, 1 ug/mL insulin)과 FCE50을 용해하여 3일간 처리하였다. 그 후 10% FBS가 함유된 DMEM 배지에 insulin과 FCE50을 용해하여 2일간 처리한 후, 10% FBS가 함유된 DMEM배지에 FCE50을 용해하여 24시간이 지나고 XTT 시약을 처리하여, 다시 2시간 배양하고 450 nm에서 흡광도를 측정하였다. FCE50은 0, 250, 300, 400, 500, 600 ug/mL의 농도로 처리하였다. 세포독성은 다음의 계산식에 의거하였다.

$$\text{Cell viability (\%)} = 100 - [(\text{Abs}_{\text{control}} - \text{Abs}_{\text{sample}}/\text{Abs}_{\text{control}}) \times 100].$$

(라) Oil Red O 염색 및 정량

FCE50이 3T3-L1세포 내 지방형성에 미치는 효과를 알아보기 위해, 지방구(lipid droplets)에 특이적으로 반응하는 Oil Red O염색법을 수행하였다. 3T3-L1세포 내의 지방구 염색 상태와 지방구에 착색된 Oil Red O염색액을 용출하여 각 처리군별 그 함량을 측정하였다. 3T3-L1 세포배양 중 각 3, 6, 9일에 분화 시약과 함께 각 농도별 시료들을 용해하여 배양하였고, 9일 후 배양액 성분을 완전히 제거하기 위하여 PBS(pH 7.0)으로 2번 세정한 다음 10% formaldehyde로 10분간 고정시켰다. 증류수로 세척하고 Oil Red O염색용액으로 20분간 염색한 후 증류수로 세척한 다음 세포내 지방 축적을 현미경을 통해 관찰하였으며, 착색된 Oil Red O를 isopropanol로 용출하고 microplate reader(Molecular Devices, USA)를 사용하여 510 nm에서 흡광도를 측정하였다.

(마) 세포내 중성지방 함량

3T3-L1지방세포의 분화과정 중에 처리한 FCE50이 3T3-L1세포 내 지방형성에 영향을 알아보기 위해 AdipoRed™ assay kit(Lonza, USA)를 이용하여 세포내 지방구를 측정하였다. AdipoRed™는 세포내의 triglyceride에 특이적으로 침투하는 Nile Red 염색액을 이용하여 형광도를 측정하였다. 3T3-L1 세포배양 중 각 3, 6, 9일에 분화 시약과 함께 FCE50을 용해하여 배양하였고, 9일 후 배양액 성분을 완전히 제거하기 위하여 PBS(pH 7.0)로 2번 세정한 다음 140 uL의 AipoRed™시약을 첨가하여 10분간 상온에서 방치한 다음 excitation 485 nm와 emission 572 nm에서 형광세기를 측정하여 결과를 얻었다.

(4) 발효율금 50%주정추출물의 *in vivo* 체지방 감소 활성

(가) 실험동물의 사육 및 식이조성

본 실험에 사용된 동물은 Sprague-Dawley rat(SD rat)은 수컷 5주령으로 1주일간 사육실 환경에 적응 시킨 후 실험에 사용하였다. 조명시간을 아침 7시부터 저녁 7시까지 12시간으로, 실내온도 및 습도는 $23 \pm 3^\circ\text{C}$, $55 \pm 15\%$ 로 조절된 사육실에서 사육하였다. 실험에 사용되어진 식이는 일반식이(AIN-76, Research diet, USA)와 60% high-fat 식이(60% high fat diet, Research diet, USA)를 사용하였으며, 식이의 조성은 아래와 같다. 급수는 음용수를 사용하였으며 실험 기간 동안 사료와 급수는 자유롭게 섭취하도록 하였다.

(나) 실험동물 군

실험동물은 각 6마리로 군당 평균 무게가 동일하게 5군으로 분류하였다. 각 군당 rats 6마리씩 대조군(Con, AIN-76), 고지방식이군(P.con, 60% high-fat diet), 양성대조군 (Refernce, 60% high-fat diet, 가르시니아 캄보지아 껍질추출물 500 mg/kg/day), FCE50 저농도 투여군(Low, 60% high-fat diet, FCE50 200 mg/kg/day), FCE50 고농도 투여군 (High, 60% high-fat diet, FCE50 500 mg/kg/day)으로 나누고 12주 동안 각 시료를 경 구투여 하였다. 다음의 표에 실험동물의 식이 및 각 투여량을 요약 제시하였다.

(다) 실험동물의 체중변화, 식이섭취량 및 음수 섭취량

발12주간 실시되는 실험에서 사용된 모든 동물에 대하여 시험 개시일로부터 부검일 까지 체중변화량은 1주에 1회, 식이섭취량 및 음수섭취량은 1주에 2회 동일한 시간에 측정 하였다. 체중변화량은 g/week로 제시하였고, 식이 및 음수섭취량평균은 g/day로 나타내었 다.

(라) 해부 및 장기 무게 측정

12주간 사육 및 투여 후, 16시간 절식시킨 다음 에테르로 마취시킨 후 개복하였다. 혈 액은 하대정맥에서 채취하여 3,000 rpm에서 10분간 원심분리 한 후, 혈청을 분리하였다. 채혈 후 장기 주변을 덮고 있는 신장지방 및 정소지방(white adipose tissue), brown adipose tissue를 적출하여 PBS(pH 7.0)에 장기의 혈액을 세척하였으며, 간, 신장, 비장, 정소를 생리식염수로 씻은 다음 여과지로 수분을 완전히 제거하고 장기의 무게는 습 중량(g)으로 측정하였다. 이화학적 실험에 사용하기 위하여 실험 전까지 모든 샘플은 -70°C 냉동고에서 저장하였다.

<식이조성표>

product #	AIN-76	60% high fat
	kcal%	
Protein	18.8	20
Carbohydrate	69.4	20
Fat	11.8	60
FD&C Blue Dye #1	×	○
Total	100	100
Appearance		

〈식이 및 시료투여량〉

Group	식이	시료 투여량
대조군 (Con)	AIN-76	0 g/kg/day
고지방식이군 (P.con)	60% high-fat	0 g/kg/day
양성대조군 (Reference)	60% high-fat	가르시니아캄보지아 껍질추출물 500 mg/kg/day
FCE50 저농도군 (Low)	60% high-fat	FCE50 200 mg/kg/day
FCE50 고농도군 (High)	60% high-fat	FCE50 500 mg/kg/day

(마) ALT(alanine aminotransferase) 및 AST(aspartate aminotransferase) 활성

간의 손상정도를 확인하기 위하여 채취한 혈액을 3,000 rpm에서 10분간 원심분리 한 후, 혈청을 이용하여 아미노산 전이효소인 ALT(alanine aminotransferase)와 AST(aspartate aminotransferase)활성을 assay kit(아산제약, Korea)를 이용하여 측정 평가하였다. 그 활성은 karmen/mL로 제시하였다.

(바) 혈중 중성지방 함량

혈중 중성지방은 중성지방 측정용 kit(아산제약, Korea)를 사용하여 측정하였다. 혈청과 효소시약을 잘 혼합하여 37°C에서 10분간 방치한 후, 550 nm에서 흡광도를 측정하였다. 혈중 중성지방량은 mg/dL로 제시하였다.

(사) 혈중 총 콜레스테롤 함량

혈중 총 콜레스테롤은 총 콜레스테롤 측정용 kit(아산제약, Korea)를 사용하여 측정하였다. 혈청과 효소시약을 잘 혼합하여 37°C에서 5분간 방치한 후, 500 nm에서 흡광도를 측정하였다. 혈중 총 콜레스테롤 함량은 mg/dL로 제시하였다.

(아) 혈중 HDL 콜레스테롤 함량

혈중 HDL 콜레스테롤은 총 HDL 콜레스테롤 측정용 kit(아산제약, Korea)을 사용하여 측정하였다. 혈청에 분리시약 25 uL를 첨가하여 분리 후, 상층액만을 이용하여 효소시약을 넣고 잘 혼합한 후 37°C에서 5분간 방치한 후, 500 nm에서 흡광도를 측정하였다. 혈중 총 HDL 콜레스테롤 함량은 mg/dL로 제시하였다.

(자) Western blot analysis

FCE50의 체지방 감소에 대한 작용을 밝히기 위하여 지방합성관련 대사 조절인자

인 pAMPK와 SREBP-1c 단백질 발현양을 western blot assay를 이용하여 확인하였다. PBS(pH 7.0)으로 백색지방조직을 분리 수집한 후 RIPA lysis buffer를 이용하여 total protein을 추출하여 Bradford 방법에 따라 단백질을 정량하였다. Western blot을 위하여 biotinylated molecular weight standard marker(actin)와 함께 sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel(10%)로 전기영동하고, electroblotting apparatus를 이용하여 1 시간 동안 nitrocellulose membrane으로 이동시켰다. 이동된 membrane은 Ponceau solution으로 염색 후, blocking buffer(1XTBS.T, 0.1% tween-20 with blocking reagent, 5% skim milk)에 shaking 한 후 1차 항체로 4°C에서 14 시간 반응시켰다. Membrane을 HRP가 중합된 이차항체에 120분간 반응시킨 후 TBS.T로 3회 세척한 다음 chemiluminescent detection system (Phototope®-HRP Western Blot Detection Kit, New England Biolabs, Beverly, MA)을 이용하여 현상하였다. 각 발현도는 actin 대비 각 바이오마커의 양으로 제시하였다.

(차) Real-time polymerase chain reaction(RT-PCR)

FCE50의 체지방 감소에 대한 작용을 밝히기 위하여 지방합성관련 대사 조절인자인 PPAR γ , CEBP α , FAS, aP2, LPL 그리고 adiponectin mRNA 발현양과, 지방분해관련 대사 조절 효소인 ATGL과 HSL mRNA 및 지방산베타산화관련 조절인자인 ACC과 CPT1 mRNA 발현양을 RT-PCR로 확인하였다. 12주간 실험한 실험군의 백색지방조직에 Trizol 시약(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)과 클로로포름을 넣고 13,000 rpm에서 15분간 원심분리 하여 상층액을 얻었다. 상층액과 이소프로판올을 섞은 후 상온에서 10분간 반응시켜 RNA를 침전시킨 후 에탄올로 1회 세척하여 RNA를 분리하였다. 추출된 RNA 1 mg을 QuantiFastTMSYBR®Green RT-PCR kit(Qiagen, catalogue number 204174, Venlo, Netherlands)를 이용하여 GAPDH(5' -TGGCCTCCAAGGAGTAAGAAAC-3'), (3' -GGCCTCTCTCTTGCTCTCAGTATC-5'), ACC(5' -TCCCCAAGTTCTTCACGTTCA-3'), (3' -CAG-GCTCCAAGTGGCGATAA-5'), Adiponectin(5' -AACCCCTGGCAGGAAA-GG-3'), (3' -TGAACGCTGAGCGATACACAT-5'), aP2(5' -TCTCTGGCA-GGCATCTGACA-3'), (3' -GGCAGCAGACTGTGATCAACTT-5'), ATGL(5' -CATTCTCAGGCGAGAGTGACAT-3'), (3' -GACGCGAAGCTCGTGGAT-5'), C/EBP α (5' -CTGCGAGCACGAGACGTCTA-3'), (3' -GCCAGG-AACTCGTCGTTGAA-5'), CPT1(5' -GTGACTGGTGGGAGGAATAC-3'), (3' -GAGCATCTCCATGGCGTAG-5'), PPAR γ (5' -TGACTTGGCCATATTTATAGCTGTCA-3'), (3' -CGATGGGCTTCACGTTTCAG-5'), FAS(5' -GACCCTGACTCCAAGTTATTCGA-3'), (3' -CGTCAAGCGGGAGACAGACT-5'), HSL(5' -CACTAGTCCCTCCCAGTTT-3'), (3' -AGCTG-GCACAGCAGGTCTGT-5'), LPL(5' -CAAGATTCACCTTTTCTGGGACTG-A-3'), (3' -GCCACTGTGCCGTACAGAGA-5') 프라이머와 함께 reverse transcription 반응을 55°C에서 10분 수행한 후, PCR initial activation 반응을 95°C에서 5분 수행하고, denaturation 반응을 95°C에서 5초, annealing과 extension 반응을 60°C에서 10초간 40 cycle을 반응시키고 Rotor-gene 6000 software version 1.7(Corbett, Sydney, Australia)을 이용하여 분석하였다.

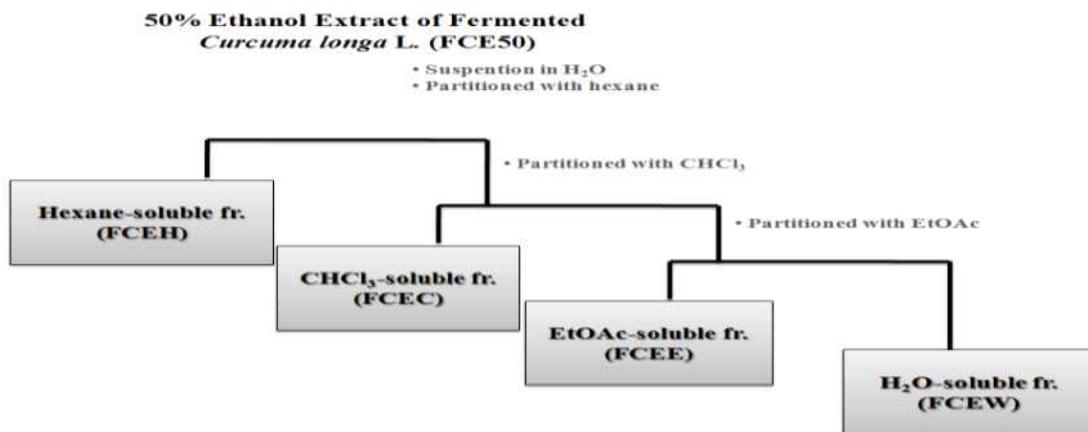
(카) 통계분석

실험결과는 평균±표준편차 및 평균±표준오차로 나타내었다. 군간의 비교는 one-way ANOVA를 통해 분석하였으며 Duncan의 다중검정법(Duncan's multiple range test)를 이용하여 사후검정을 실시하였다($p < 0.05$).

라. 발효율금주정추출물로부터 분획한 에틸아세테이트 층의 체지방 감소 기작구명

(1) 발효율금주정추출물로부터 분리한 에틸아세테이트 분획물 제조

한국인스팜(주)로부터 제공받은 발효율금 분말을 이용하여 50% 로 주정으로 환류 추출한 후, 용액을 흡입 여과하고 감압농축기로 농축한 후 동결건조한 분말을 이용하여 용해도에 따라 헥산, 클로로포름, 에틸아세테이트, 물층으로 분획하였다. 수득한 발효율금 50% 에탄올 추출물로부터 분리한 분획물 중 에틸아세테이트 분획물을 FCEE로 명명하였다.



<발효율금 50% 에탄올 추출물의 분획과정 >

(2) 발효율금 주정추출물로부터 분리한 에틸아세테이트 층의 *in vitro* 상에서의 지방형성 억제 및 지방분해 활성 측정

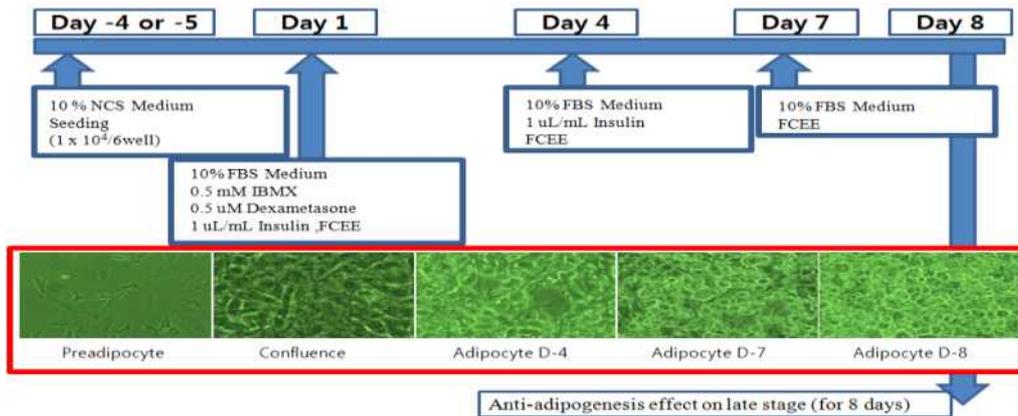
(가) 세포배양과 분화

3T3-L1 전 지방구세포의 배양과 유지는 10% NCS을 넣은 DMEM배지로 5% CO₂, 37°C에서 80% 세포가 자랐을 때 계대 배양하였다. 세포의 분화는 6-well plate에 well 당 1 X 10⁶ 세포를 분주하여 세포가 100% 밀집되게 한 후 2일간 배양하여, 10% FBS가 함유된 DMEM 배지에 MDI solution(10 uL/mL IBMX, 0.5 uL dexamethasone, 1 ug/mL insulin)과 FCE50을 용해하여 3일간 처리하였다. 그 후 10% FBS가 함유된 DMEM 배지에 insulin과 FCE50을 용해하여 2일간 처리한 후, 10% FBS가 함유된 DMEM배지에 FCE50을 용해하여 1일간 처리하였다.

(나) 세포독성

FCEE을 대상으로 *in vitro* 상에서 지방형성 억제능을 탐구하기에 앞서 3T3-L1 cell에서 FCE50의 안전범위를 확인하기 위하여 세포독성을 측정하였다. 세포독성은 24 wells plate에 0.5 × 10⁵ cells/well의 세포를 분주한 후 세포가 100% 밀집되게 한 후 2일간 배양하여, 10% FBS가 함유된 DMEM 배지에 MDI solution(10 uL/mL IBMX, 0.5 uL dexamethasone, 1 ug/mL insulin)과 FCEE을 용해하여 3일간 처리하였다. 그 후 10%

FBS가 함유된 DMEM 배지에 insulin과 FCEE을 용해하여 3일간 처리한 후, 10% FBS가 함유된 DMEM배지에 FCEE을 용해하여 24시간이 지나고 XTT 시약을 처리하여, 다시 2시간 배양하고 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.



<3T3-L1 세포분화>

(다) Oil Red O 염색 및 정량

세포 내 지방형성 억제능을 확인하기 위하여 지방구(lipid droplets)에 특이적으로 반응하는 Oil Red O염색법을 수행하여 축적 중인 지방을 측정하였다. 3T3-L1 세포배양 중 각 1, 4, 7일에 분화 시약과 함께 FCEE를 용해하여 배양하였고, 8일 후 배양액 성분을 완전히 제거하기 위하여 PBS(pH 7.0)로 2번 세정한 다음 10% formaldehyde로 10분간 고정시켰다. 이 후 증류수로 세척하고 Oil Red O염색용액으로 20분간 염색한 후 증류수로 재세척한 다음 세포내 지방 축적을 관찰하였으며 ELISA reader (Molecular Devices, USA)를 사용하여 510 nm에서 흡광도를 측정하였다.

(라) 세포내 중성지방 함량

세포 내 중성지방의 함량은 AdipoRed™ assay kit에 지시되어있는 정량법에 따라 수행하였다. 이 방법은 Nile Red 를 이용하여 중성지방에 특이적으로 염색되는 것으로 알려져 있다. 3T3-L1 세포배양 중 각 1, 4, 7일에 분화 시약과 함께 FCEE를 용해하여 배양하였고, 9일 후 배양액 성분을 완전히 제거하기 위하여 PBS(pH 7.0)으로 2번 세정한 다음 20 uL의 AdipoRed™ 시약을 첨가하여 20분간 추가로 상온에서 배양하여 excitation 485 nm와 emission 572 nm에서 형광신호를 측정하여 결과를 얻었다.

(마) 포도당 유입량 및 글리세롤 방출량 측정

포도당 유입량을 측정하기 위하여 8일간 분화된 3T3-L1 지방세포의 배양액을 제거한 후 PBS로 2번 세척하고 2-NBDG 실험용액을 처리하였다. 이 후 37°C 배양기에서 1시간동안 반응시키고 차가운 PBS로 3번 세척한 후, well당 1 mL의 PBS를 넣은 후 excitation 485 nm, emission 535 nm에서 형광도를 측정하였다. 3T3-L1 지방세포의 글리세롤 방출량은 8일째 수득한 배양액 50 uL에 유리 글리세롤 시약을 50 uL를 혼합하여 37°C에서 10분간 처리한 후, 540 nm에서 흡광도를 측정하여 표준곡선을 이용하여

그 함량을 계산하였다.

(바) Real-time polymerase chain reaction(RT-PCR)

8일간 분화된 3T3-L1 세포를 PBS로 2회 세척한 후 세포를 수득하여 Trizol 시약 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)과 클로로포름을 넣고 13,000 rpm에서 15분간 원심분리 하여 상층액을 얻었다. 상층액과 이소프로판올을 섞은 후 상온에서 10분간 반응시켜 RNA를 침전시킨 후 에탄올로 1회 세척하여 RNA를 분리하였다. 추출된 RNA 1 mg을 QuantiFastMSYBR[®]Green RT-PCR kit(Qiagen, catalogue number 204174, Venlo, Netherlands)를 이용하여 GAPDH(5'-TGGCCTCCAAGGAGTAAGAAAC-3'),(3'-GGCC TCT-CTCTTGCTCTCAGTATC-5'), AMPK (5'-TCCCAAGTTCTTCACGTT-CA-3'),(3'-C AGGCTCCAAGTGGCGATAA -5'), C/EBP α (5'-CTGCGAG-CACGAGACGTCTA-3',3'-GCCAGGAACTCGTCGT TGAA-5'), PPAR γ (5'-TGACTTGGCCATATTTATAGCTGTCA-3',3'-CGATG GGCTTCACGTTTCAG-5'), SREBP-1c (5'-CCAGAGGGTG AGCCTGACAA-3', 3'-AG CCTCTGCAATTTCCAGATCT-5'), ATGL (5'-CATTCTCAGGCGAGA GTGACAT-3', 3'-GACGCGAA GCTCGTGGAT-5'),HSL(5'-CACTAGTCC CTCCCCAGTTT-3', 3'-AGCTGGCACAGCAGGTCTGT-5')와 CPT1(5'-GTG ACTGGTGGGAGGAATAC-3', 3'-GAGCATCTCCATGGCGTAG-5') 프라이머와 함께 reverse transcription반응을 55°C 에서 10분 수행한 후, PCR initial activation 반응을 95°C에서 5분 수행하고, denaturation 반응을 95°C에서 5초, annealing과 extention 반응을 60°C에서 10초간 40 cycle을 반응 시키고 Rotor-gene 6000 software version 1.7 (Corbett, Sydney, Australia)을 이용하여 분석하였다.

(사) 통계분석

실험결과는 평균±표준편차 및 평균±표준오차로 나타내었다. 군간의 비교는 one-way ANOVA를 통해 분석하였으며 Duncan의 다중검정법(Duncan's multiple range test)를 이용하여 사후검정을 실시하였다($p < 0.05$).

마. 발효율금주정추출물 유효성분의 지방구 형성 억제 효과

(1) 발효율금주정추출물로부터 유효성분의 *in vitro* 상에서의 지방형성 억제 활성 측정

(가) 세포배양과 분화

3T3-L1 전 지방구세포의 배양과 유지는 10% NCS을 넣은 DMEM배지로 5% CO₂, 37°C에서 80% 세포가 자랐을 때 계대 배양하였다. 세포의 분화는 6-well plate에 well 당 1×10^6 세포를 분주하여 세포가 100% 밀집되게 한 후 2일간 배양하여, 10% FBS 가 함유된 DMEM 배지에 MDI solution(10 uL/mL IBMX, 0.5 uL dexamethasone, 1 ug/mL insulin)과 curcumin 5 uM와 bisdemethoxycurcumin(BDMC) 2.5 uM을 용해하여 3일간 처리하였다. 그 후 10% FBS가 함유된 DMEM 배지에 insulin과 curcumin과 BDMC를 용해하여 2일간 처리한 후, 10% FBS가 함유된 DMEM배지에 curcumin(5 uM) 과 BDMC(2.5 uM)를 용해하여 1일간 처리하였다.

(나) 세포독성

curcumin과 BDMC를 대상으로 *in vitro* 상에서 지방형성 억제능을 탐구하기에 앞

서 3T3-L1 cell에서 curcumin과 BDMC의 안전범위를 확인하기 위하여 세포독성을 측정하였다. 세포독성은 24 wells plate에 0.5×10^5 cells/well의 세포를 분주한 후 세포가 100% 밀집되게 한 후 2일간 배양하고, 10% FBS가 함유된 DMEM 배지에 MDI solution(10 uL/mL IBMX, 0.5 uL dexamethasone, 1 ug/mL insulin)과 curcumin(5 uM) 또는 BDMC(2.5 uM)를 용해하여 3일간 처리하였다. 그 후 10% FBS가 함유된 DMEM 배지에 insulin 및 curcumin 또는 BDMC를 용해하여 3일간 처리하고, 다시 10% FBS가 함유된 DMEM배지에 curcumin 또는 BDMC를 용해하여 24시간동안 배양한 후, XTT 시약을 처리하고 2시간 재배양하고 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

(다) Oil Red O 염색 및 정량

세포 내 지방형성 억제능을 확인하기 위하여 지방구(lipid droplets)에 특이적으로 반응하는 Oil Red O염색법을 수행하여 축적 중인 지방을 측정하였다. 3T3-L1 세포배양 중 각 1, 4, 7일에 분화 시약과 함께 curcumin(5 uM) 또는 BDMC(2.5 uM)를 용해하여 배양하였고, 8일 후 배양액 성분을 완전히 제거하기 위하여 PBS(pH 7.0)로 2번 세정한 다음 10% formaldehyde로 10분간 고정시켰다. 이 후 증류수로 세척하고 Oil Red O염색용액으로 20분간 염색한 후 증류수로 재세척한 다음 세포내 지방 축적을 관찰하였으며 ELISA reader (Molecular Devices, USA)를 사용하여 510 nm에서 흡광도를 측정하였다.

(라) 세포내 중성지방 함량

세포 내 중성지방의 함량은 AdipoRed™ assay kit에 지시되어있는 정량법에 따라 수행하였다. 이 방법은 Nile Red 를 이용하여 중성지방에 특이적으로 염색되는 것으로 알려져 있다. 3T3-L1 세포배양 중 각 1, 4, 7일에 분화 시약과 함께 curcumin과 BDMC를 용해하여 배양하였고, 9일 후 배양액 성분을 완전히 제거하기 위하여 PBS(pH 7.0)으로 2번 세정한 다음 20 uL의 AdipoRed™ 시약을 첨가하여 20분간 추가로 상온에서 배양하여 excitation 485 nm와 emission 572 nm에서 형광신호를 측정하여 결과를 얻었다.

(마) 포도당 유입량 측정

포도당 유입량을 측정하기 위하여 8일간 분화된 3T3-L1 지방세포의 배양액을 제거한 후 PBS로 2번 세척하고 2-NBDG 실험용액을 처리하였다. 이 후 37°C 배양기에서 1시간동안 반응시키고 차가운 PBS로 3번 세척한 후, well당 1 mL의 PBS를 넣은 후 excitation 485 nm, emission 535 nm에서 형광도를 측정하였다.

(바) Real-time polymerase chain reaction(RT-PCR)

8일간 분화된 3T3-L1 세포를 PBS로 2회 세척한 후 세포를 수득하여 Trizol 시약 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)과 클로로포름을 넣고 13,000 rpm에서 15분간 원심분리하여 상층액을 얻었다. 상층액과 이소프로판올을 섞은 후 상온에서 10분간 반응시켜 RNA를 침전시킨 후 에탄올로 1회 세척하여 RNA를 분리하였다. 추출된 RNA 1 mg을 QuantiFast™ SYBR® Green RT-PCR kit(Qiagen, catalogue number 204174, Venlo,

Netherlands)를 이용하여 GAPDH(5' -TGGCCTCCAAGGAGTAAGAAAC-3'), (3' -GGCC TCT-CTCTTGCTCTCAGTATC-5'), ACC(5' -TCCCCAAGTTCTTCACGTTCA-3'), (3' -C AGGCTCCAAGTGGCGATAA-5') 프라이머와 함께 reverse transcription 반응을 55°C 에서 10분 수행한 후, PCR initial activation 반응을 95°C 에서 5분 수행하고, denaturation 반응을 95°C 에서 5초, annealing과 extension 반응을 60°C 에서 10초간 40 cycle을 반응시키고 Rotor-gene 6000 software version 1.7 (Corbett, Sydney, Australia)을 이용하여 분석하였다.

(사) 통계분석

실험결과는 평균±표준편차 및 평균±표준오차로 나타내었다. 군간의 비교는 one-way ANOVA를 통해 분석하였으며 Duncan의 다중검정법(Duncan's multiple range test)를 이용하여 사후검정을 실시하였다($p < 0.05$).

바. 원료표준화

(1) 건강기능식품 소재 제조공정 표준화(발효율금 50%주정 추출물)

율금은 전남 진도산을 경일약품사(전남, 순천시)에서 구입하여 사용하였으며, 그 일부는 한국인스팜 중앙연구소에 보관하고 있다. 추출/농축과 분무건조 공정은 본사인 한국인스팜(전남 화순군)의 추출/농축기(대신기공, 2Ton)와 분무건조기(천연자원연구원, 전남 장흥군, 미르코 2kg/h)를 이용하였다. 발효에탄올(이하 주정)은 대한약전 Assay 95.1~95.6 v/v%(수성약품주식회사)를 사용하였으며 물은 먹는물을 사용하였다.

80kg을 3회 실시 하였으며, 제조공정은 아래와 같이 (가) 원료평량 (나) 추출 (다) 농축 (라) 부형제 혼합 (마) 살균 (바) 분무건조 (사) 포장 및 보관 과정으로 진행하였다.

(가) 원료평량

- 추출에 사용할 원료와 용매를 확인하고 칭량하여 추출기에 투입한다.

원료명	Lot	원료량(kg)	용매량(L)
율금	1	80	물 : 400 주정 : 400
	2	80	물 : 400 주정 : 400
	3	80	물 : 400 주정 : 400
합계	3 회	240	물 : 1,200 / 주정 : 1,200

(나) 추출

- 율금 80kg을 3회 추출한다.

- 추출기를 이용, 79 °C 에 도달 후 4시간 압력 0.7~0.75 Kg/cm²의 조건에서 추출한다.

(다) 농축

- 농축기를 이용하여 45 °C, 1,000 mmHg 조건에서 농축한다.

(라) 부형제 혼합

- 농축액의 고형물 대비 130%에 해당하는 말트린100(그레인프로세스, 미국)을 넣어

1시간 혼합하고, 20~30 Brix가 되도록 물을 투입한다.

(마) 살균

- 상기 (4)번의 농축액을 살균기에 넣고 70 °C로 30분간 살균한다.

(바) 분무건조

- Lot(1~3)을 200 °C로 사출하여 각각 분무건조하고 건조감량과 수득률을 측정한다.

(사) 포장 및 보관

- 개별포장하여 저온창고에 보관한다.



추출기

⇒



농축기

⇒



분무건조기

(2) 발효율금 50%주정 추출물 지표성분 정량법 - Curcumin

① 검액준비

율금 원재료(건조물) 및 추출물 1 g을 정밀하게 달아 methanol 100 mL를 넣고 60분간 초음파 추출을 한다. 추출이 끝나면 0.45 μ m nylon filter로 여과하고, 여액을 검액으로 한다.

② 표준액 조제

Curcumin 표준품 약 15 mg을 정밀하게 달아 용량플라스크에 넣고 ethanol 100 mL로 하여, 150 ppm 용액을 제조하고, 150 ppm Curcumin 표준액 1,000 μ L를 20 ml 용량플라스크에 넣고 희석액으로 잘 혼합하여 7.5 ppm Curcumin 표준액을 표준용액으로 사용하였다.

③ 시험

검액 및 표준액 10 μ L씩을 가지고 다음조건으로 액체크로마토그래프법에 따라 시험하여 각각의 액의 Curcumin의 피크면적 A_T 및 A_S 를 측정한다.

④ 조작조건

- 검출기 : Diode array detector (측정파장 425 nm)
- 칼럼 : Shiseido Capell-pak UG 250*4.6mmI.D
- 칼럼온도 : 35°C
- 이동상 : 2% Acetic acid (45% ACN)
- Flow rate : 1.0 ml/min

⑤ 계산식

Curcumin (mg/g)	표준용액농도(mg/mL) × 검체면적값 × 부피 × 표준품순도
	표준품면적값 × 시료채취량(g)

3. 결과

가. 발효율금 실온추출물 정제물 및 발효율금 분말의 *in vitro* 및 *in vivo* 상에서의 간보호 활성평가

(1) 발효율금 실온추출물 정제물의 라디칼 소거활성

(가) DPPH 라디칼 소거활성

발효율금 실온추출물 정제물들을 대상으로 DPPH 라디칼을 소거활성을 평가한 결과는 Fig. 1에 나타내었다. 항산화 물질인 Vit C는 5 ug/mL의 농도에서 DPPH 라디칼 소거활성이 82%로 나타났고, 정제물들은 100 ug/mL의 농도에서 FCC-W는 11%, FCC-25M은 90%, FCC-50M은 42%, FCC-75M은 30%, FCC-100M은 40%로 나타났다. 다른 정제물과 비교하여 FCC-25M에서 높은 DPPH 라디칼 소거활성을 나타내었고, 농도는 약 20배 높지만 DPPH 라디칼 소거활성에서 Vit C보다 통계적으로 높은 결과를 나타내었다(10%).

(나) ABTs 라디칼 소거활성

발효율금 실온추출물 정제물들을 대상으로 ABTs 라디칼을 소거활성을 평가한 결과는 Fig. 2에 나타내었다. 항산화 물질인 Vit C는 5 ug/mL의 농도에서 ABTs 라디칼 소거활성이 82%로 나타났고, FCC정제물은 100 ug/mL의 농도에서 FCC-W는 74%, FCC-25M은 97%, FCC-50M은 93%, FCC-75M은 77%, FCC-100M은 80%로 나타났다. 다른 정제물과 비교하여 FCC-25M에서 높은 ABTs 라디칼 소거활성을 나타내었고, 농도는 약 20배 높지만 ABTs 라디칼 소거활성에서 Vit C보다 통계적으로 높은 결과를 나타내었다(18%). DPPH와 ABTs 라디칼 소거활성 결과를 종합하면 FCC-25M 정제물에는 라디칼 소거활성을 갖는 활성물질이 함유 되어 있는 것으로 판단되었다.

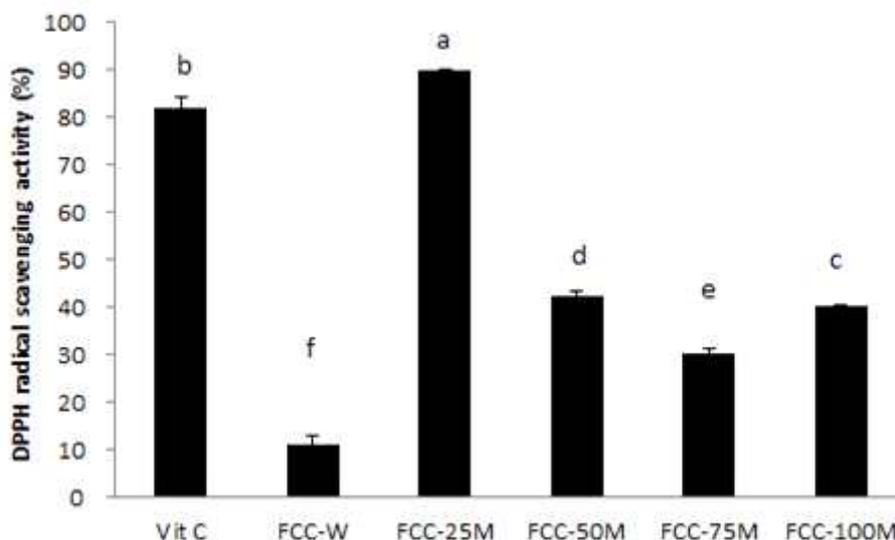


Fig. 1. DPPH radical scavenging activity of partially purified fractions.

Data express the mean \pm S.D. Different letters above the bar are statistically different by Duncan's multiple range test ($p < 0.05$). The final concentration of fractions were 5 ug/mL Vit C, FCC-W, FCC-25M, FCC-50M, FCC-75M, and FCC-100M 100 ug/mL.

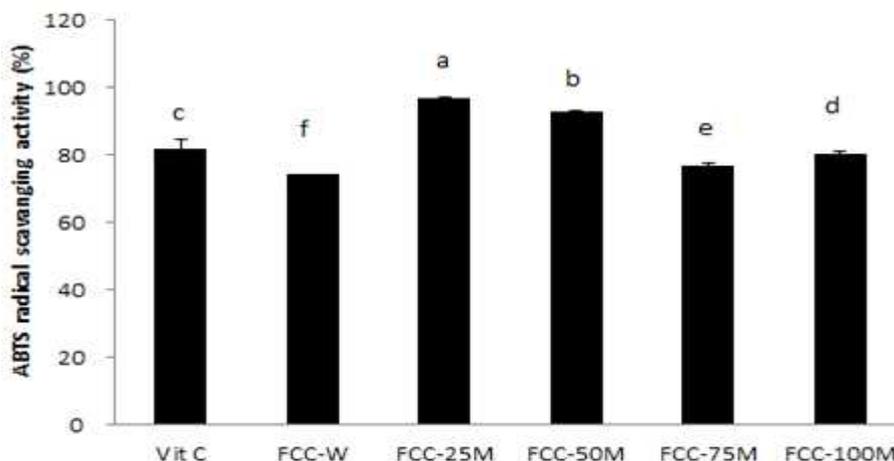


Fig. 2. ABTs radical scavenging activity of partially purified fractions.

Data express the mean \pm S.D. Different letters above the bar are statistically different by Duncan's multiple range test ($p < 0.05$). The final concentration of fractions were VitC 5 ug/mL Vit. C, FCC-W, FCC-25M, FCC-50M, FCC-75M, and FCC-100M 100 ug/mL.

(2) 발효율금 실온추출물 정제물 대상 HepG2/2E1세포에서의 알코올성 간손상 보호 활성 평가

(가) 세포독성 평가

각 정제물 시료를 대상으로 XTT assay 방법을 이용하여 세포독성을 평가하였다. FCC-W는 ~200 ug/mL까지 세포독성을 평가한 결과 세포독성이 나타나지 않았다. FCC-25M와 FCC-50M은 ~150 ug/mL까지 세포독성을 평가한 결과 FCC-25M은 100, 150 ug/mL에서 세포독성이 나타났고, FCC-50M은 50, 100, 150 ug/mL에서 세포독성이 나타났다. FCC-75M과 FCC-100M은 ~25 ug/mL까지 세포독성을 평가한 결과 FCC-75M과 FCC-100M은 12.5 및 25 ug/mL의 농도에서 세포독성이 나타났다. 따라서 FCC-25M의 경우 50 ug/mL, FCC-50M은 25 ug/mL, FCC-75M은 6.25 ug/mL, FCC-100M은 6.25 ug/mL까지 세포독성의 안전범위를 확인하였다(Fig.s. 3~7).

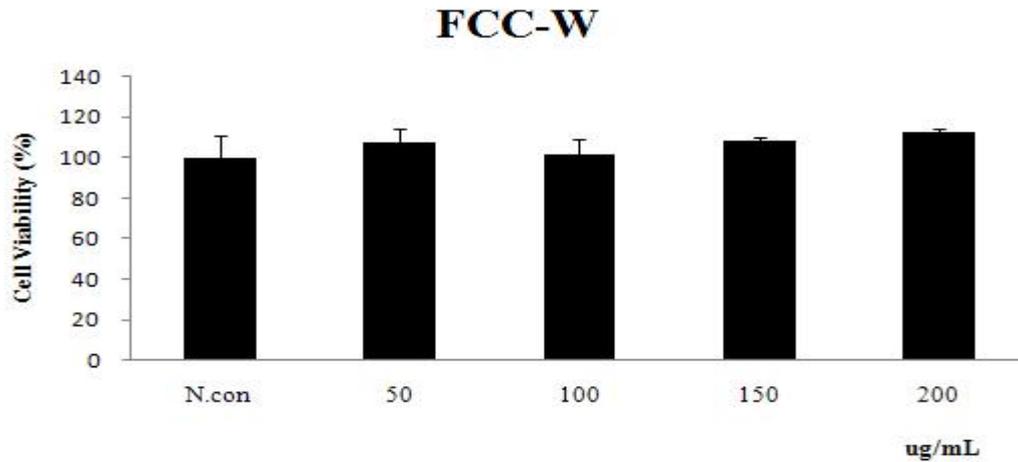


Fig. 3. Cytotoxicity of FCC-W from FCC in HepG2/2E1 cells.

Data are presented as mean \pm S.D. of three replicates.

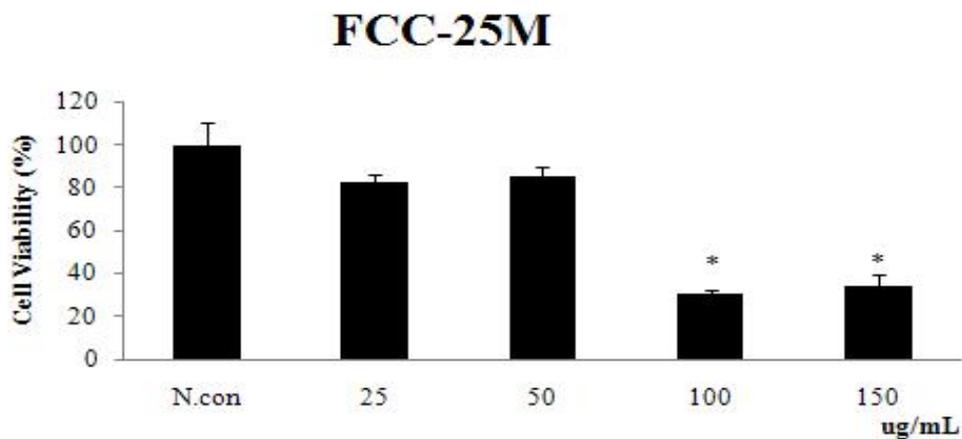


Fig. 4. Cytotoxicity of FCC-25M from FCC in HepG2/2E1 cells.

Data are presented as mean \pm S.D. of three replicates. *Significantly different from the N.con at the level of $p < 0.05$.

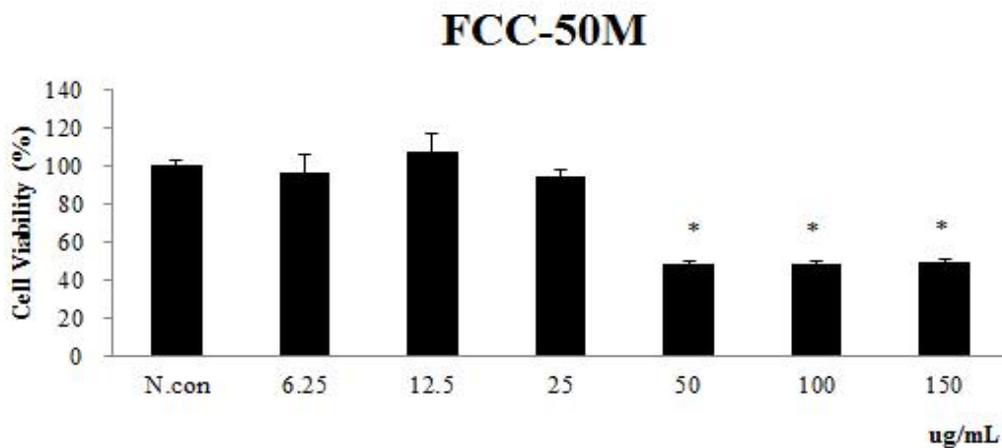


Fig. 5. Cytotoxicity of FCC-50M from FCC in HepG2/2E1 cells.

Data are presented as mean \pm S.D. of three replicates.. *Significantly different from the N.con at the level of $p < 0.05$.

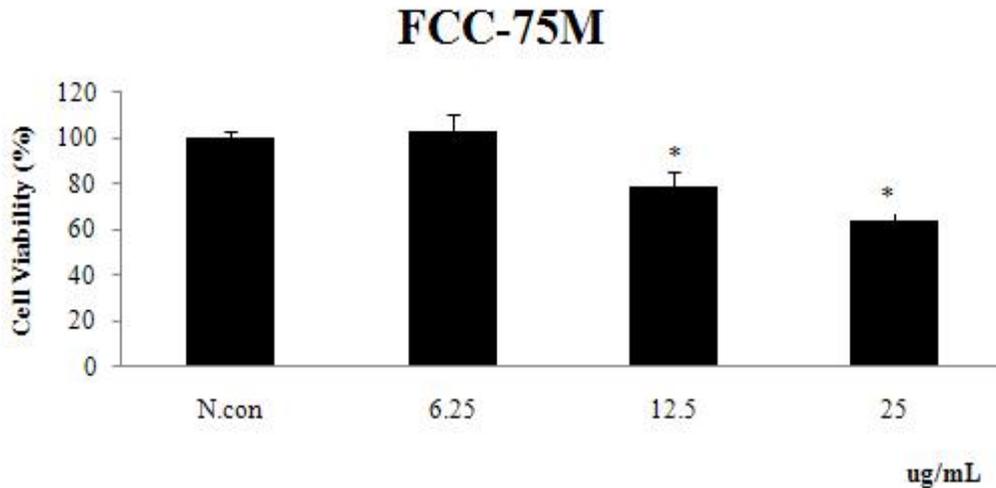


Fig. 6. Cytotoxicity of FCC-75M from FCC in HepG2/2E1 cells.

Data are presented as mean \pm S.D. of three replicates. *Significantly different from the N.con at the level of $p < 0.05$.

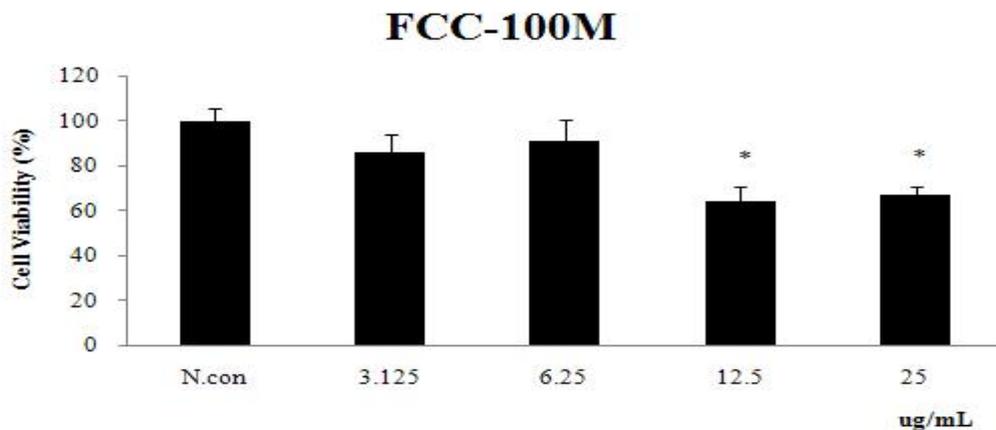


Fig. 7. Cytotoxicity of FCC-100M from FCC in HepG2/2E1 cells.

Data are presented as mean \pm S.D. of three replicates. *Significantly different from the N.con at the level of $p < 0.05$.

(나) 발효율금 실온추출물 정제물 대상 HepG2/2E1세포에서의 알코올성 간손상 보호활성
 본 실험에서 사용된 HepG2/2E1 세포는 약물과 영양성분에 대한 대사가 사람 간 세포에서 이루어지고 있는 것과 동일한 양상을 나타내어 사람의 간에서의 대사를 연구하는데 널리 이용되는 사람 간세포 유래의 배양세포 HepG2에 과량의 알코올대사 반응하여 산화스트레스를 유발하는 cytochrome P450 2E1 효소 유전자를 transfection 하여 제조한 세포이다. 본 연구에서는 이 세포를 이용하여 생체에서 일어나는 과량의 알코올성 산화스트레스에 대한 시료의 세포 보호효과를 평가하였다. 선행된 세포독성 평가를 바탕으로 FCC-W 50 ug/mL, FCC-25M 50 ug/mL, FCC-50M 25 ug/mL, FCC-75M 6.25 ug/mL 및 FCC-100M 6.25 ug/mL과 함께 알코올로 유도된 HepG2/2E1

세포의 알코올성 세포독성에 대한 보호효과를 평가하였다. FCC-W는 68%, FCC-25M은 89%, FCC-50M은 65%, FCC-75M은 44%, FCC-100M은 38%의 세포보호효과가 나타났다 (Fig. 8). 따라서 FCC-25M에는 알코올성 간세포 손상 보호 효과를 갖는 활성물질이 함유 되어 있는 것으로 판단되었다.

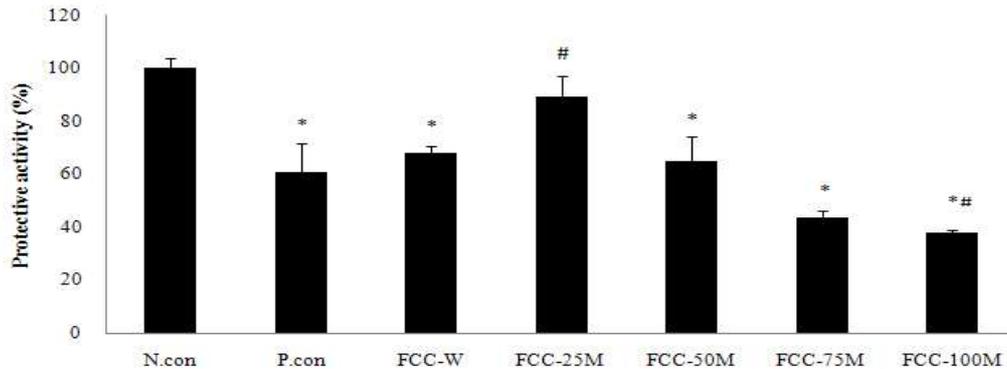


Fig. 8. Hepatoprotective effects of four partially-purified fractions from FCC in HepG2/2E1 cells.

Data are presented as mean \pm S.D. of three replicates. N.con : normal control, P.con : 200 mM ethanol, FCC-W: 200 mM ethanol plus FCC-W 50 ug/mL, FCC-25M : 200 mM ethanol plus FCC-25M 50 ug/mL, FCC-50M : 200 mM ethanol plus FCC-50M 25 ug/mL, FCC-75M : 200 mM ethanol plus FCC-75M 6.25 ug/mL, FCC-100M : 200 mM ethanol plus FCC-100M 6.25 ug/mL. *Significantly different from the control at the level of $p < 0.05$. #Significantly different from the EtOH at the level of $p < 0.05$.

(다) Intercellular ROS 함량

DCF-DA는 세포막을 통해 확산되며 세포내 esterase에 의해 효소적으로 가수분해되어 비형광성 DCF-H가 되며, 세포내 reactive oxygen species(ROS)가 존재할 경우 매우 빠르게 높은 형광을 띤 DCF로 산화된다. 알코올성 간세포 손상 보호효과가 가장 높은 FCC-25M을 25 및 50 ug/mL(25M-L, 25M-H)의 농도에서 DCFH-DA를 이용하여 세포내 ROS 생성량을 측정하였다. 그 결과, Fig. 9에서와 같이 알코올에 의해 세포내 다량 생성된 ROS가 FCC-25M 50 ug/mL에 처리에 의해 억제됨을 확인할 수 있었다.

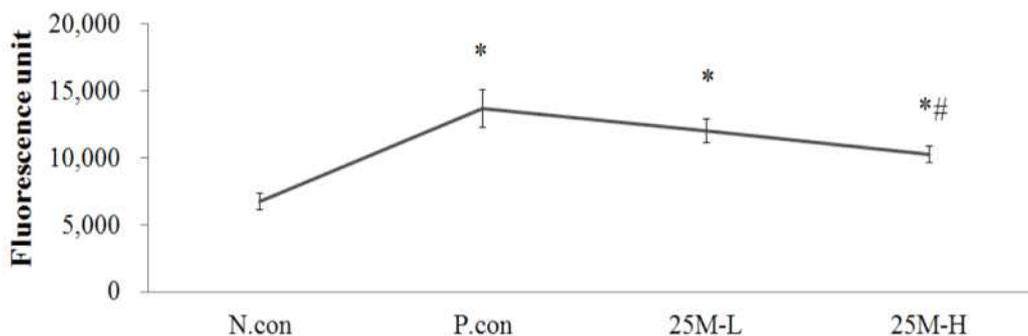


Fig. 9. Effects of FCC-25M from FCC on intracellular ROS level in HepG2/2E1 cells.

Data are presented as mean \pm S.D. of three replicates. N. con: normal control, P. con: 150 mM ethanol, 25M-L: 150 mM ethanol plus FCC-25M 25 ug/mL, 25M-H: 150 mM ethanol plus

FCC-25M 50 ug/mL. *Significantly different from the control at the level of $p<0.05$.
#Significantly different from the EtOH at the level of $p<0.05$.

라) 활성 정제물 FCC-25M의 HepG2/2E1세포에서의 항산화효소 활성 및 항산화물 함량
HepG2/2E1에서 알코올성 간세포 손상 활성물질을 함유 할 것으로 판단 된 FCC-25M을 대상으로 세포내에서의 oxidative stress protection system에 대한 효과를 측정함으로써 알코올성 산화스트레스 보호 활성기작을 밝히기 위해, 세포내의 카탈라제(CAT), 글루타치온 전환효소(GST), 글루타치온 환원효소(GR), 글루타치온 과산화효소(GPx), 슈퍼옥사이드 디스뮤타제(SOD) 활성 및 글루타치온(GSH) 함량을 각 시료처리군에서 측정하였다. CAT은 대부분 조직의 peroxisome에서 과산화수소를 물로 환원시켜 과산화수소 증가에 따른 조직 손상을 방어하는 효과를 갖고 있으며 GPx에 비해 Km 값이 높아 과산화수소 농도가 높을 때 주로 작용하는 효소로서 특히 과량의 알코올이 대사되는데 중요한 역할을 하는 효소이다. 본 연구에서 CAT는 N.con에서 422.98 ± 5.01 U/mg protein으로 나타났고 P.con에서 307.80 ± 10.07 U/mg protein으로 알코올 처리에 따라 HepG2/2E1 세포내 CAT활성이 낮아졌다(27%). 그러나 25M-H에서 349.62 ± 1.78 U/mg protein으로 N.con와 유사하고 알코올 처리에 의해 낮아지는 CAT의 활성이 보호됨을 알 수 있었다(14%). 또한, GST는 체내에서 변이성 물질, 발암성 물질, 독성물질 등의 대사산물 그리고 내인성 독소 들 중에서 친전자성물질 등에 환원형 글루타치온을 포함시켜 glutathione thioester를 형성하는 반응을 촉매하며, 또한 Se-independent GPx활성도를 가지고 있어 지질과산화로부터 생체를 보호하는 특성을 갖는 효소로 알려져 있다. 본 연구에서 GST는 N.con에서 2.55 ± 0.10 U/mg protein으로 나타났고 P.con에서 1.98 ± 0.05 U/mg protein으로 알코올 처리에 따라 HepG2/2E1 세포내 GST활성이 낮아졌다(22%). 그러나 25M-H에서 2.15 ± 0.04 U/mg protein으로 알코올 처리에 의해 낮아지는 GST의 활성이 보호됨을 알 수 있었다(9%). GR는 N.con에서 1.06 ± 0.06 U/mg protein으로 나타났고 P.con에서 0.71 ± 0.05 U/mg protein으로 알코올 처리에 따라 HepG2/2E1 세포내 GR활성이 낮아졌다(34%). 그러나 25M-H에서 1.14 ± 0.03 U/mg protein으로 알코올 처리에 의해 낮아지는 GR의 활성이 보호됨을 알 수 있었다(61%). GPx는 저농도의 과산화수소에 작용하여 산화스트레스를 보호하며, Se을 함유하는 항산화계 효소로서 체내에서 NADP를 전자수용체로 하여 환원형 GSH를 산화형 GSSG, 물 및 기타 과산화물을 생성하는 반응을 촉매함으로써 조직의 과산화적 손상을 방지하고 산화스트레스를 억제하는 효소이다. 본 연구에서 GPx는 N.con에서 0.65 ± 0.02 U/mg protein으로 나타났고 P.con에서 0.45 ± 0.03 U/mg protein으로 알코올 처리에 따라 HepG2/2E1 세포내 GR활성이 낮아졌다(30%). 그러나 25M-H에서 0.61 ± 0.03 U/mg protein으로 알코올 처리에 의해 낮아지는 GR의 활성이 보호됨을 알 수 있었다(34%). SOD는 metalloenzyme으로 함유한 금속이온, 즉 Cu, Zn, Mn, Fe의 종류에 따라 구분되며, O₂분자가 한 개의 전자를 받아들여 불완전하게 산화된 O²⁻ 이온을 과산화수소로 전환시키는 효소이다. 본 연구에서 간조직의 SOD 활성은 N.con에서 2.36 ± 0.25 U/mg protein으로 나타났고 P.con에서 0.94 ± 0.24 U/mg protein으로 알코올 처리에 따라 HepG2/2E1 세포내 GR활성이 낮아졌다(60%). 그러나 25M-H에서 1.68 ± 0.18 U/mg protein으로 알코올 처리에 의해 낮아지는 GR의 활성이 보호됨을 알 수 있었다(79%).

비효소적 생체 산화스트레스 보호 시스템의 주요 구성물질인 환원형 GSH는 glutamic acid, cysteine, glycine으로 된 tripeptide로 cysteine의 SH⁻기에 기인되어 환원성을 가진 GSH가 되며 이는 산화스트레스에 의해 쉽게 산화되어 hexapeptide인 산화형 GSSG로 변하고, 이 반응은 가역적으로 생체내의 산화·환원반응에 중요한 역할을 한다. GSH는 N.con에서 2.12±0.06 mole/mg protein으로 나타났고 P.con에서 1.93±0.03 mole/mg protein으로 알코올 처리에 따라 HepG2/2E1 세포내 GSH활성이 낮아졌다(9%). 그러나 25M-H에서 2.03±0.03 mole/mg protein으로 알코올 처리에 의해 낮아지는 GSH의 활성이 보호됨을 알 수 있었다(5%).

Table 1. Effects of FCC-25M from FCC from FCC on antioxidative activities in HepG2/2E1 cells.

Group	CAT	GST	GR	GPX	SOD	GSH
	U/mgprotein	U/mgprotein	U/mgprotein	U/mgprotein	U/mgprotein	mole/mgprotein
N.con	422.98±5.01 ^a	2.55±0.10 ^a	1.06±0.06 ^a	0.65±0.02 ^a	2.36±0.25 ^a	2.12±0.06 ^a
P.con	307.80±10.07 ^c	1.98±0.05 ^c	0.71±0.05 ^b	0.45±0.03 ^c	0.94±0.24 ^b	1.93±0.03 ^b
25M-L	354.52±7.41 ^b	2.00±0.08 ^c	0.63±0.03 ^b	0.51±0.05 ^c	1.35±0.46 ^a	1.96±0.02 ^b
25M-H	349.62±1.78 ^b	2.15±0.04 ^b	1.14±0.03 ^a	0.61±0.03 ^b	1.68±0.18 ^a	2.03±0.03 ^a

Data are presented as mean ± S.D. of three replicates. N. con: normal control, P. con: 200 mM ethanol, 25M-L: 200 mM ethanol plus FCC-25M 25 ug/mL, 25M-H: 200 mM ethanol plus FCC-25M 50 ug/mL. Different letters in a column are statistically different by Duncan's multiple range test ($p<0.05$).

(마) FCC-25M로부터 Prep-LC를 이용하여 분리된 정제물의 HepG2/2E1세포에서의 알코올성 간손상 보호 활성

본 연구는 HepG2/2E1 세포를 이용하여 알코올로 인한 간손상으로부터 발효율금실은추출물의 간세포 보호 활성물을 규명하기 위해 수행되었다. Amberlite column 정제물들을 대상으로 알코올성 간손상 억제활성을 평가하였다. 이에 FCC-25M가 알코올성 간손상 억제 활성물질을 함유하고 있는 것으로 확인되어, FCC-25M을 대상으로 Prep-LC를 실시하여 4가지로 분리된 정제물들을 주관기관으로부터 제공받아 알코올성 간손상 억제활성을 검토하였다. FCC-25M-1, FCC-25M-2, FCC-25M-3 및 FCC-25M-4를 각각 25 ug/mL 처리하고 알코올성 간손상 보호활성을 평가한 결과 각각 87%, 92%, 45% 및 42%의 알코올성 간보호 활성을 확인하였다. P.con에 비해 FCC-25M-1와 FCC-25M-2은 각 39%와 46% 이상 높은 간보호 활성을 나타내었고, FCC-25M-3과 FCC-25M-4은 P.con에 비해 28%와 33%로 더 낮은 활성을 나타내었다. 이러한 결과를 통해 정제물 FCC-25M-1과 FCC-25M-2에 알코올성 간손상 보호 활성물질이 함유되어 있는 것으로 판단되었다(Fig. 10).

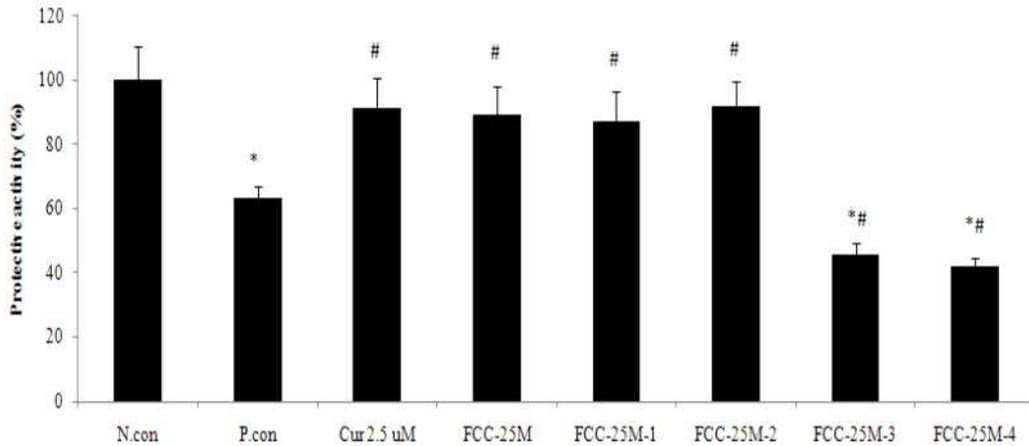


Fig. 10. Hepatoprotective effects of four partially-purified fractions from FCC-25M in HepG2/2E1 cells.

Data are presented as mean \pm S.D. of three replicates. N.con : normal control, P.con : 200 mM ethanol, Cur 2.5 uM : 200 mM ethanol plus Curcumin 2.5 uM, FCC-25M : 200 mM ethanol plus FCC-25M 50 ug/mL, FCC-25M-1: 200 mM ethanol plus FCC-25M-1 25 ug/mL, FCC-25M-2 : 200 mM ethanol plus FCC-25M-2 25 ug/mL, FCC-25M-3 : 200 mM ethanol plus FCC-25M-3 25 ug/mL, FCC-25M-4: 200 mM ethanol plus FCC-25M-4 25 ug/mL. *Significantly different from the control at the level of $p < 0.05$. #Significantly different from the EtOH at the level of $p < 0.05$.

(1) 발효율금 분말대상 동물모델에서 알코올성 간손상 보호 활성 기작구명

(가) 발효율금 분말의 *in vivo* 상에서의 알코올성 간손상 보호 활성

발효율금 분말의 알코올에 의해 유발된 간조직 손상 보호효과를 확인하기 위해 N.con(무처리 대조군), P.con(알코올 투여 대조군), FC-L(알코올 및 100 mg/kg/day 발효율금 분말 투여군) 및 FC-H (알코올 및 300 mg/kg/day 발효율금 분말 투여군)로 나누어 실험동물을 대상으로 5일간 각 농도의 발효율금 분말을 투여하였다. 3일간 5 g/kg/day의 알코올을 경구투여하여 알코올성 간손상을 유발시켰다. 만성 및 과량의 알코올은 대사산물인 아세트알데하이드에 의해 유리라디칼을 생성하여 지질과산화물을 형성하고 간세포 손상과 섬유화를 유도한다. 알코올 대사산물은 체내 산소를 활성화시켜 superoxide anion, hydroxyl radical, singlet oxygen 등의 과량의 ROS를 만들고 체내 항산화 기전을 감소하여 간 손상의 주요 요인이 되고 있다. 발효율금 분말 예비투여 전에 실험동물의 체중은 21.2~22.7 g이었다. 실험기간 동안 체중의 변화와 실험동물의 사망은 관찰되지 않았다. 또한 해부 당일 알코올을 투여하기 전의 무게를 측정된 결과 군간 통계적인 유의차를 나타내지 않았다. 즉 발효율금 분말의 경구투여가 실험동물의 체중에 영향을 주지 않았음을 판단할 수 있었다(Table 2). 해부 후 측정된 간조직의 무게는 N.con이 0.78 ± 0.01 , P.con이 0.94 ± 0.02 로 알코올을 투여한 실험군에서 통계적으로 유의하게 증가된 조직 무게를 나타내었다(Table 3).

본 연구에서 N.con와 비교하여 P.con군에서 AST와 ALT 지표효소들의 활성이 상승되는 것으로 나타난바 이로부터 알코올에 의해 간손상이 유발되었음을 확인 할 수 있었다. Aminotransferase는 아미노기 전이반응을 촉매하는 효소의 총칭으로 임상에서

가장 많이 사용하는 것이 AST와 ALT의 활성 정도이다. 이들 효소는 아미노산과 a-keto acid 사이의 아미노기 전이반응을 촉매하는 것으로 체내에 널리 분포되어 있으며 간 손상 시 세포 밖으로 유출되어 혈중에 그 양이 증가하게 된다. 이러한 과정은 세포내의 에너지 공급이 감소되어 세포내의 K⁺ 이온이 세포외로 유출되고 Na⁺, Ca⁺⁺ 및 수분이 세포내로 유입이 되면서 세포는 팽창되고, 세포막이 늘어나게 되어 세포질에 존재하는 AST 및 ALT가 유출된다. 세포 밖으로 빠져나간 AST와 ALT는 순환 혈액으로 빠르게 유입되어 간질환시 정상치보다 현저히 증가되므로 간 손상 지표로 사용되고 있다. 본 연구에서 AST 활성은 N.con이 91 Karmen/mL, P.con이 173 Karmen/mL으로 알코올을 투여한 군이 1.9 fold 증가된 효소활성을 나타내었다. FC-L와 FC-H는 각각 114 Karmen/mL와 97.53 Karmen/mL로 N.con와 통계적으로 유의하지 않은 결과를 나타내고, P.con와 통계적으로 유의한 차이를 나타내었다. 이는 알코올 투여에 따른 간손상과 혈중 AST 효소활성의 증가가 발효율금 분말 투여로 정상 수준으로 유지되었음을 나타낸다(Fig. 11). 또한, ALT 활성은 N.con이 28 Karmen/mL, P.con이 51 Karmen/mL으로 1.8 fold 증가된 효소활성을 나타내었다. FC-L와 FC-H는 각각 42 Karmen/mL, 32 Karmen/mL로 나타났다(Fig. 12). 이는 알코올 투여에 따른 간손상과 혈중 ALT 효소 활성의 증가가 발효율금 분말 투여로 정상 수준으로 유지될 수 있음을 나타낸다. 이러한 결과로부터 발효율금 분말은 알코올에 의한 간손상 보호 효과를 갖는 것으로 판단된다.

Table 2. Body weight and survival rate of experimental mice for hepatoprotection

Group	No. of Mouse	Initial Weight (g)	Final Weight (g)	Survival Rate (%)
N.con	8	21.24 ± 0.78 ^a	21.36 ± 1.02 ^a	100
P.con	8	22.74 ± 0.66 ^a	21.66 ± 0.76 ^a	100
FC-L	8	22.11 ± 0.84 ^a	21.40 ± 0.87 ^a	100
FC-H	8	21.80 ± 1.55 ^a	21.18 ± 1.06 ^a	100

Data are presented as mean ± S.E. N. con: normal control mice. P. con: 5 g/kg b.w./day ethanol control mice, FC-L: 5 g/kg b.w./day ethanol mice with 100 mg/kg b.w./day of FC. FC-H: 5 g/kg b.w./day ethanol mice with 300 mg/kg b.w./day of FC. Different letters in a column are statistically different by Duncan's multiple range test ($p < 0.05$).

Table 3. Various organ weights of experimental mice for hepatoprotection

	Liver	Kidney	Spleen
N.con	0.78 ± 0.01 ^b	0.32 ± 0.02 ^a	0.06 ± 0.01 ^a
P.con	0.94 ± 0.02 ^a	0.28 ± 0.03 ^a	0.04 ± 0.00 ^a
FC-L	0.94 ± 0.03 ^a	0.28 ± 0.02 ^a	0.04 ± 0.00 ^a
FC-H	0.91 ± 0.04 ^a	0.32 ± 0.05 ^a	0.05 ± 0.00 ^a

Data are presented as mean ± S.E. N. con: normal control mice. P. con: 5 g/kg b.w./day ethanol control mice, FC-L: 5 g/kg b.w./day ethanol mice with 100 mg/kg b.w./day of FC. FC-H:

5 g/kg b.w./day ethanol mice with 300 mg/kg b.w./day of FC. Different letters in a column are statistically different by Duncan's multiple range test ($p < 0.05$).

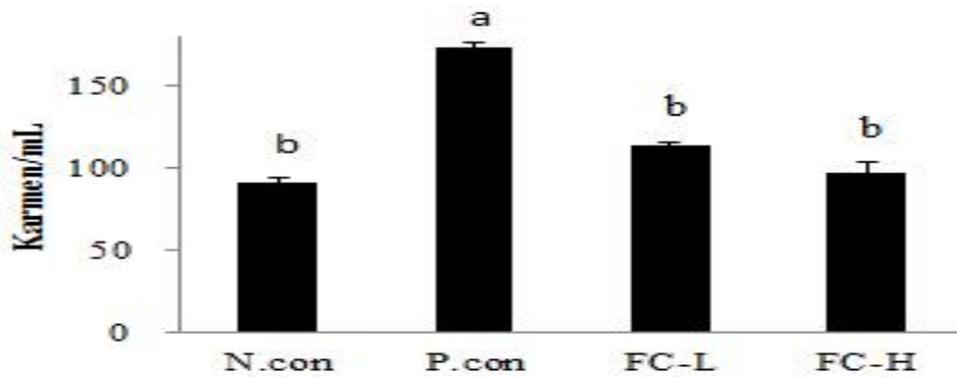


Fig. 11. Effect of fermented *Curcuma longa* on AST level in C57BL/6 mice.

Data are presented as mean \pm S.E. N. con: normal control mice, P. con: 5 g/kg b.w./day ethanol control mice, FC-L: 5 g/kg b.w./day ethanol mice with 100 mg/kg b.w./day of FC. FC-H: 5 g/kg b.w./day ethanol mice with 300 mg/kg b.w./day of FC. Different letters above the bar are statistically different by Duncan's multiple range test ($p < 0.05$).

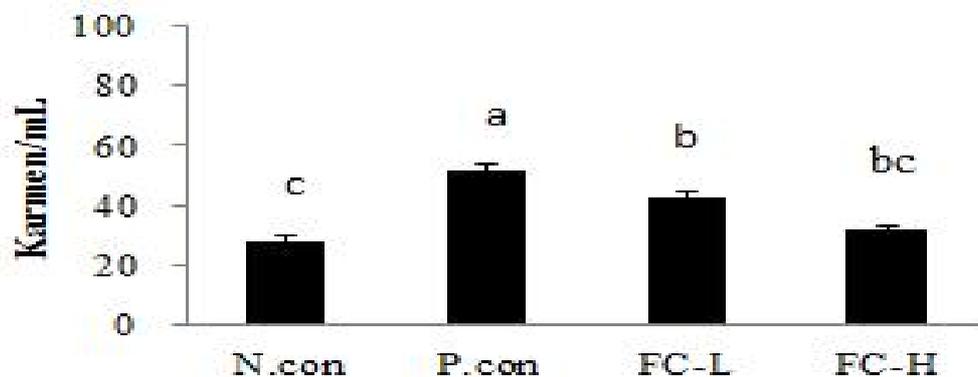


Fig. 12. Effect of fermented *Curcuma longa* on AST level in C57BL/6 mice.

Data are presented as mean \pm S.E. N. con: normal control mice, P. con: 5 g/kg b.w./day ethanol control mice, FC-L: 5 g/kg b.w./day ethanol mice with 100 mg/kg b.w./day of FC. FC-H: 5 g/kg b.w./day ethanol mice with 300 mg/kg b.w./day of FC. Different letters above the bar are statistically different by Duncan's multiple range test ($p < 0.05$).

(나) 발효율금 분말의 *in vivo* 상에서의 항산화 효소 활성 및 항산화물 함량

CAT는 모든 호기성 세포에 널리 분포되어 있는 효소로서 특히 간에 가장 많이 함유되어 있다. 이 효소는 과산화수소를 물과 산소로 분해시키는 역할을 담당하고 있다. Table 4에서와 같이 CAT는 N.con에서 244.80 ± 15.84 U/mg protein으로 나타났고 P.con에서 142.63 ± 14.21 U/mg protein으로 알코올 처리에 따라 마우스의 간 세포내 CAT활성이 낮아졌다(41%). 그러나 FC-L은 212.00 ± 15.16 이고, FC-H는 271.05 ± 8.49 U/mg protein으로 FC-H는 N.con와 유사한 활성을 유지하였다. 이로부터 발효율금 분말 투여군들은 알코올 처리에 의해 낮아지는 CAT의 활성이 보호됨을 확인 할 수 있었다(49%, 90%).

SOD는 반응성이 높으며 독성을 유발하는 라디칼인 superoxide anion radical을 과산화수소수로 dismutation 시키는 역할을 담당하는 매우 효과적인 항산화 효소이다. 본 연구에서 간조직의 SOD 활성은 N.con에서 19.31 ± 0.58 U/mg protein으로 나타났고 P.con에서 16.67 ± 0.54 U/mg protein으로 알코올 처리에 따라 마우스의 간 세포내 GR 활성이 낮아졌다(13%). 그러나 FC-L는 18.01 ± 0.81 이고, FC-H는 22.07 ± 0.89 U/mg protein으로 FC-H는 알코올 처리에 의해 낮아지는 SOD의 활성을 보호하는 것을 확인할 수 있었다(32%).

GSH는 N.con에서 5.21 ± 0.54 mole/mg protein으로 나타났고 P.con에서 3.78 ± 0.25 mole/mg protein으로 알코올 처리에 따라 마우스의 간 세포내 GSH활성이 낮아졌다(27%). 그러나 FC-L는 4.18 ± 0.21 mole/mg protein이고, FC-H는 4.85 ± 0.15 mole/mg protein으로 FC-H는 알코올 처리에 의해 낮아지는 GSH의 함량을 유지하도록 도움을 주는 것을 확인할 수 있었다(28%).

지질과산화는 체내 산화적 손상으로 인한 자유라디칼 생성의 증가 및 항산화 방어능력의 감소로 인해 일어난다. 지질과산화 정도는 thibarbituric acid와 결합하는 지질과산화물을 MDA의 양으로 비색정량 하는 방법을 이용하여 측정하였다. MDA의 양을 측정한 결과 알코올 대조군인 P.con은 0.43 ± 0.01 M/mg protein으로, N.con(0.26 ± 0.01 M/mg protein), FC-L(0.36 ± 0.04 M/mg protein) 및 FC-H(0.36 ± 0.05 M/mg protein)에 비교하여 현저히 증가하였다(Fig. 13). 이러한 결과로부터 발효율금 분말은 지질과산화물 생성을 억제시킬 수 있는 소재로 판단된다.

만성적 알코올 섭취 시 그 분해과정은 cytochrome P450 효소, 특히 CYP2E1이 주도적 역할을 하는 microsomal ethanol oxidizing system(MEOS)에 의존도가 높다. CYP2E1은 알코올을 아세트 알데하이드로 변환시키면서 NADPH가 NADP로 탈수소 되는 과정 중 다량의 ROS를 생성시키는데, 최근 알코올성 간질환에 중추적 역할을 하는 것으로 여겨지면서 주목받고 있다. mRNA 수준에서의 CYP2E1의 발현도를 측정하기 위해 RT-PCR을 이용하였으며, 정확한 비교 대조를 위해 house keeping gene인 GAPDH를 사용하였다. N.con에 비해 알코올만 처리한 군(P.con)에서 CYP2E1의 발현도가 1.9 fold 증가되는 것을 확인할 수 있었다. FC-L와 FC-H 모두 N.con와 유사하며 발효율금 분말의 예비투여는 알코올 투여에 의해 증가되는 CYP2E1 mRNA 발현을 억제시키는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 14).

Table 4. Effects of fermented *Curcuma longa* on hepatic antioxidant activities in C57BL/6 mice

Group	CAT U/mg protein	GST U/mg protein	GR U/mg protein	GPX U/mg protein	SOD U/mg protein	GSH mole/mg protein
N.con	244.80 ± 15.84^a	5.82 ± 0.20^a	1.53 ± 0.05^a	0.76 ± 0.04^a	19.31 ± 0.58^b	5.21 ± 0.54^a
P.con	142.63 ± 14.21^c	4.83 ± 0.17^b	1.33 ± 0.02^b	0.61 ± 0.01^b	16.67 ± 0.54^c	3.78 ± 0.25^b
FC-L	212.00 ± 15.16^b	5.14 ± 0.21^b	1.37 ± 0.03^b	0.62 ± 0.03^b	18.01 ± 0.81^b	4.18 ± 0.21^{bc}
FC-H	271.05 ± 8.49^a	5.06 ± 0.25^b	1.46 ± 0.03^b	0.64 ± 0.02^b	22.07 ± 0.89^a	4.85 ± 0.15^c

Data are presented as mean \pm S.E. N. con: normal control mice, P. con: 5 g/kg b.w./day

ethanol control mice, FC-L: 5 g/kg b.w./day ethanol mice with 100 mg/kg b.w./day of FC. FC-H: 5 g/kg b.w./day ethanol mice with 300 mg/kg b.w./day of FC. Different letters in a column are statistically different by Duncan's multiple range test ($p < 0.05$).

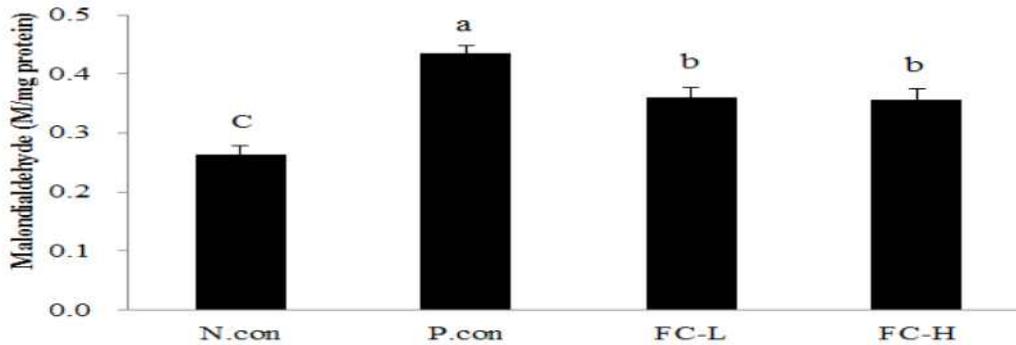


Fig. 13. Effects of fermented *Curcuma longa* on the malondialdehyde (MDA) level in C57BL/6 mice.

Data are presented as mean \pm S.D. N. con: normal control mice, P. con: 5 g/kg b.w./day ethanol control mice, FC-L: 5 g/kg b.w./day ethanol mice with 100 mg/kg b.w./day of FC. FC-H: 5 g/kg b.w./day ethanol mice with 300 mg/kg b.w./day of FC. Different letters above the bar are statistically different by Duncan's multiple range test ($p < 0.05$).

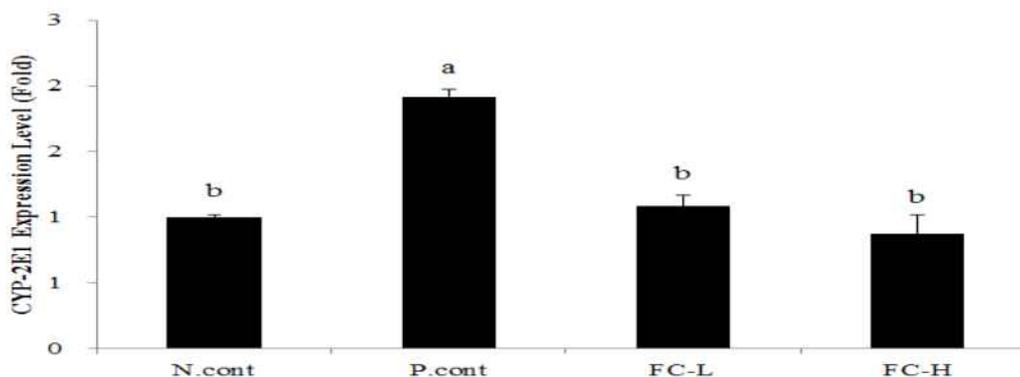


Fig. 14. Effects of fermented *Curcuma longa* on CYP 2E1 expression level.

Data are presented as mean \pm S.E. N. con: normal control mice, P. con: 5 g/kg b.w./day ethanol control mice, FC-L: 5 g/kg b.w./day ethanol mice with 100 mg/kg b.w./day of FC. FC-H: 5 g/kg b.w./day ethanol mice with 300 mg/kg b.w./day of FC. Different letters above the bar are statistically different by Duncan's multiple range test ($p < 0.05$).

나. 발효율금분말 및 건강기능식품의 *in vivo* 상에서 간보호 활성 비교평가

(1) 시료의 *in vivo* 상에서의 알코올성 간손상 보호 활성

만성 및 과량의 알코올은 대사산물인 아세트알데하이드에 의해 유리라디칼을 생성하여 지질과산화물을 형성하고 간세포 손상과 섬유화를 유도한다. 알코올 대사산물들은 체내 산소를 활성화시켜 superoxide anion, hydroxyl radical, singlet oxygen 등의 ROS를 과량 만들고 체내 항산화 기전을 감소시켜 간 손상의 주요 요인이 되고 있다.

발효율금 분말의 알코올에 의해 유발된 간조직 손상 보호 효과를 확인하기 위해 Control(무처리 대조군), EtOH(알코올 투여 대조군), SM (알코올 및 300 mg/kg/day 밀크씨슬 투여군) 및 FC (알코올 및 300 mg/kg/day 발효율금 분말 투여군)으로 실험동물을 대상으로 5일간 각 농도의 시료를 예비투여 하였다. 그 후, 3일간 5 g/kg/day의 알코올을 경구투여 하여 알코올성 간손상을 유발시켜 알코올성 간손상 보호활성을 평가 하였다.

발효율금분말 예비투여 전에 실험동물의 체중은 20.5~21.8 g이었다. 실험기간 동안 체중의 변화와 실험동물의 사망은 관찰되지 않았다. 또한 해부 당일 알코올을 투여 하기 전의 무게를 측정된 결과 군간 통계적인 유의차를 나타내지 않았다. 즉 발효율금 분말의 경구투여가 실험동물의 체중에 영향을 주지 않았음을 판단할 수 있었다(Table 5).

해부 후 측정된 간조직의 체중대비 무게는 Control 군이 5.28 ± 0.07 %, EtOH 군이 5.11 ± 0.05 %로 알코올을 투여한 실험군에서 통계적으로 유의한 조직 무게를 나타내지 않았다(Table 6).

본 연구에서 Control 군과 비교하여 EtOH 군에서 AST와 ALT 지표효소들의 활성이 상승되는 것으로 나타난바 이는 알코올에 의해 간손상이 유발되었음을 확인할 수 있었다(Fig. 15, 16). Aminotransferase는 아미노기 전이반응을 촉매하는 효소의 총칭으로 임상에서 가장 많이 사용하는 것이 AST와 ALT의 활성 정도이다. 이들 효소는 아미노산과 α -keto acid 사이의 아미노기 전이반응을 촉매하는 것으로 체내에 널리 분포되어 있으며 간 손상 시 세포 밖으로 유출되어 혈중에 그 양이 증가하게 된다. 이러한 과정은 세포내의 에너지 공급이 감소되어 세포내의 K^+ 이온이 세포외로 유출되고 Na^+ , Ca^{++} 및 수분이 세포내로 유입이 되면서 세포는 팽창되고, 세포막이 늘어나게 되어 세포질에 존재하는 AST 및 ALT가 유출된다. 세포 밖으로 빠져나간 AST와 ALT는 순환 혈액으로 빠르게 유입되어 간질환시 정상치보다 현저히 증가되므로 간 손상 지표로 사용되고 있다.

본 연구에서 AST 활성은 Control 군이 141.25 Karmen/mL이고 EtOH 군이 195.75 Karmen/mL로 알코올을 투여한 군이 1.3 fold 증가된 효소활성을 나타내었다(Fig. 15). SM와 FC는 각각 147.59 Karmen/mL, 152.66 Karmen/mL으로 Control 군과 통계적으로 유의하지 않은 결과를 나타내고, EtOH와 통계적으로 유의한 차이를 나타내었다. 이는 알코올 투여에 따른 간손상과 혈중 AST 효소 활성의 증가가 발효율금 분말 투여로 정상 수준으로 유지 될 수 있음을 나타낸다. 또한 ALT 활성은 Control 군이 128.97 Karmen/mL, EtOH이 225.45 Karmen/mL로 1.7 fold 증가된 효소활성을 나타내었다(Fig. 16). SM와 FC는 각각 136.14 Karmen/mL, 158.51 Karmen/mL으로 통계적으로 유의한 차이를 나타내었다. 이는 알코올 투여에 따른 간손상과 혈중 ALT 효소 활성의 증가가 발효율금분말 투여로 밀크씨슬과 유사하게 정상 수준으로 유지 될 수 있음을 나타낸다. 이러한 결과로부터 발효율금분말은 밀크씨슬과 유사한 알코올에 의한 간손상 보호 효과를 갖는 것으로 판단된다.

Table 5. Body weight and survival rate of experimental mice for hepatoprotection

Group	No. of Mouse	Initial weight (g)	Final weight (g)	Survival Rate (%)
Control	8	20.93±0.43 ^a	20.60±0.88 ^a	100
EtOH	8	21.80±1.53 ^a	19.28±2.27 ^a	100
SM	8	21.83±0.82 ^a	20.83±0.58 ^a	100
FC	8	20.50±0.76 ^a	20.66±1.02 ^a	100

Data are presented as mean ± S.E. Control: normal control mice. EtOH: 5 g/kg b.w./day ethanol control mice, SM: 5 g/kg b.w./day ethanol mice with 300 mg/kg b.w./day of SM. FC: 5 g/kg b.w./day ethanol mice with 300 mg/kg b.w./day of FC. Different letters in a column are statistically different by Duncan's multiple range test ($p < 0.05$).

Table 6. Various tissue weights of experimental mice for hepatoprotection

Group (mg/kg b.w./day)	Relative tissue weights (%)		
	Liver	Kidney	Spleen
Control	5.28±0.07 ^a	1.17±0.09 ^a	0.24±0.04 ^a
EtOH	5.11±0.05 ^a	1.41±0.27 ^a	0.19±0.04 ^a
SM	4.65±0.28 ^a	1.28±0.15 ^a	0.19±0.05 ^a
FC	4.98±0.57 ^a	1.22±0.07 ^a	0.19±0.03 ^a

Data are presented as mean ± S.E. Control: normal control mice. EtOH: 5 g/kg b.w./day ethanol control mice, SM: 5 g/kg b.w./day ethanol mice with 300 mg/kg b.w./day of SM. FC: 5 g/kg b.w./day ethanol mice with 300 mg/kg b.w./day of FC. Different letters in a column are statistically different by Duncan's multiple range test ($p < 0.05$).

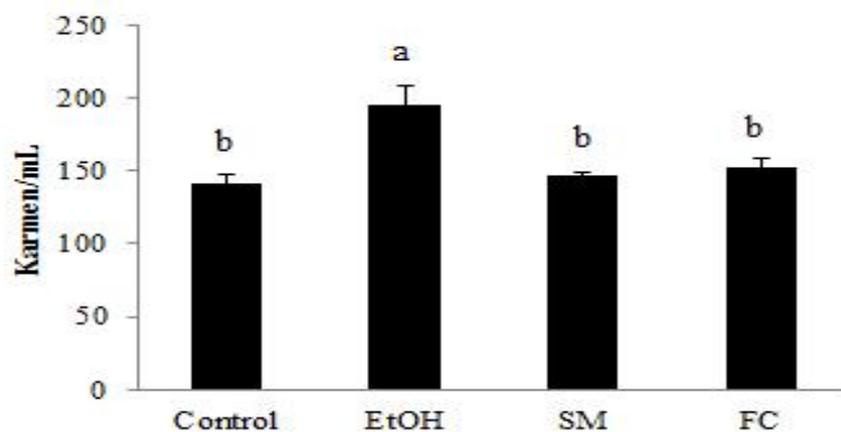


Fig. 15. Effects of Fermented *Curcuma longa* on AST level in C57BL/6 mice.

Data are presented as mean ± S.E. Control: normal control mice. EtOH: 5 g/kg b.w./day ethanol control mice, SM: 5 g/kg b.w./day ethanol mice with 300 mg/kg b.w./day of SM. FC: 5

g/kg b.w./day ethanol mice with 300 mg/kg b.w./day of FC. Different letters above the bar are statistically different by Duncan's multiple range test ($p < 0.05$).

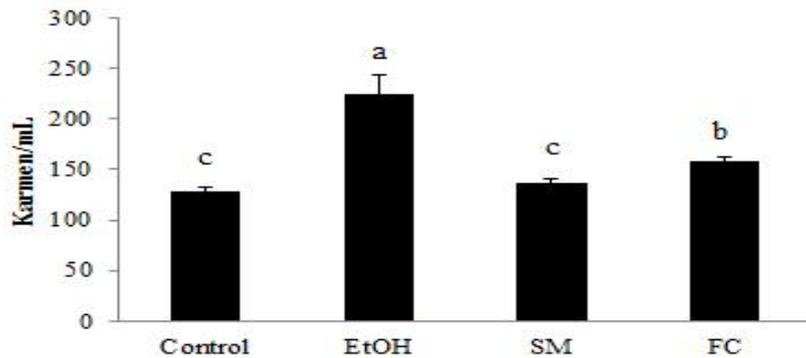


Fig. 16. Effects of Fermented *Curcuma longa* on ALT level in C57BL/6 mice.

Data are presented as mean \pm S.E. Control: normal control mice. EtOH: 5 g/kg b.w./day ethanol control mice, SM: 5 g/kg b.w./day ethanol mice with 300 mg/kg b.w./day of SM. FC: 5 g/kg b.w./day ethanol mice with 300 mg/kg b.w./day of FC. Different letters above the bar are statistically different by Duncan's multiple range test ($p < 0.05$).

다. 발효율금추출물의 체지방 감소 활성평가

(1) 발효율금 50%주정 추출물의 기능성 성분 및 항산화 활성

(가) 발효율금 50%주정 추출물의 총 폴리페놀 및 총 플라보노이드 함량 측정

식물체나 식물성 식품에 함유되어 있는 생리활성 물질 중에 페놀화합물(phenolic compounds)은 많은 비중을 차지하며 이들은 hydroxyl(-OH)기를 가지기 때문에 단백질 및 기타 거대 분자들과 쉽게 결합하고, 항산화, 항암 등의 다양한 생리활성을 가진다. 또한 플라보노이드는 구조적 차이에 의해 각각의 하위그룹인 flavanol, flavanone, flavone, isoflavone, flavonol, anthocyanidin 등으로 나누어지고 그 구조에 따라 특정 flavonoid는 항산화 및 항균성을 갖고 있는 것으로 보고되어져 있다. Flavonoid류는 현재까지 약 5,000종 이상이 알려져 있으며 담황색 및 노란색을 띠는 색소화합물로서 식물 중에는 대부분 당과 결합된 배당체(glycoside)형태로 존재하며, 하루 한 사람 섭취량이 약 23~1,000 mg 정도이고 특이한 부작용이 없는 것으로 알려져 있다. 과채류에 다량으로 존재하는 천연물질인 flavonoid들은 항알러지, 항암, 항바이러스, 항염증 등 다양한 생리활성 기능을 가지고 있다고 보고되어 있다. 이에 FCE50을 대상으로 총 페놀성 화합물 및 총 플라보노이드 함량을 측정한 결과 총 페놀성 화합물은 $2.38 \pm 0.16\%$ 함유되어있으며, 총 플라보노이드는 $1.80 \pm 0.16\%$ 함유되어 있었다(Table 7).

Table 7. Phenolic compound and flavonoid levels of 50% ethanol extract from Fermented *Curcuma Longa*

	FCE50
Phenol compound (%)	2.38 ± 0.16
Flavonoid contents (%)	1.80 ± 0.16

-Data express the mean \pm S.D.

(나) DPPH 라디칼 소거활성

FCE50을 대상으로 DPPH 라디칼 소거활성을 평가한 결과, 항산화제인 Vit C는 5 ug/mL의 농도에서 DPPH 라디칼 소거활성이 91.9%로 나타났고, FCE50은 100 ug/mL의 농도에서 29.0%의 DPPH 라디칼 소거활성을 나타내었다(Table 8).

(다)ABTs 라디칼 소거활성

FCE50을 대상으로 ABTs 라디칼을 소거활성을 평가한 결과, 항산화제인 Vit C는 5 ug/mL의 농도에서 ABTs 라디칼 소거활성이 94.0%로 나타났고, FCE50은 100 ug/mL의 농도에서 42.2%의 ABTs 라디칼 소거활성을 나타내었다(Table 8).

(라) Superoxide anion 라디칼 소거활성

FCE50의 superoxide anion 라디칼 소거 활성을 측정한 결과 Vit C 는 56.52%의 superoxide anion 라디칼 소거활성을 보였으며, FCE50은 34.65%의 superoxide anion 라디칼 소거활성을 보였다(Table 8).

DPPH, ABTs, Superoxide anion 라디칼 소거활성의 결과를 종합해보면 FCE50에는 라디칼 소거활성을 갖는 활성물질 함유 되어 있는 것으로 판단되었다.

Table 8. Radical scavenging activities of 50% ethanol extract from fermented *Curcuma Longa*

Radical scavenging activity	FCE50	Vit C
DPPH	28.98 ± 2.30 ^b	91.98 ± 0.30 ^a
ABTs	42.20 ± 3.36 ^b	93.99 ± 0.75 ^a
NBT	34.65 ± 2.16 ^b	56.52 ± 6.56 ^a

Data express the mean ± S.D. Values with different superscripts are statistically different by student t-test ($p < 0.05$). The final concentration of FCE50 and Vit C were 100 ug/mL and 5 ug/mL Vit C at DPPH and ABTs radical scavenging activities. The final concentration of superoxide anion radical scavenging activity of FCE50 and Vit C were 28 ug/mL and 3 ug/mL.

(마) 지질과산화 억제 활성

FCE50을 대상으로 Fe²⁺와 과산화수소에 의해 유도된 linoleic acid의 과산화물에 대한 억제활성을 TBA로 발색시켜 측정한 결과, quercetin은 62.8%의 지질과산화 억제 활성 나타내었고, FCE50은 38.8%의 지질과산화 억제 활성을 나타내었다(Table 9). 이상의 결과로부터 FCE50에는 지질과산화를 억제시키는 물질이 함유되어 있는 것으로 추정되어졌다.

Table 9. Anti-lipid peroxidation inhibitory activity for 50% ethanol extract from fermented *Curcuma Longa*

	FCE50	Vit C
Anti-lipid peroxidation inhibitory activity	38.79 ± 1.08 ^b	62.79 ± 1.00 ^a

Data express the mean ± S.D. Values with different superscripts are statistically different by student t-test ($p < 0.05$). The final concentration of anti-lipid peroxidation inhibitory activity of FCE50 and quercetin were 483.87 ug/mL and 72.58 ug/mL.

(2) 발효율금 50%주정 추출물의 *in vitro* 지방형성 억제 활성

(가) 3T3-L1세포에서의 세포독성

FCE50을 대상으로 XTT assay 방법을 이용하여 세포독성을 평가하였다. FCE50의 농도를 600 ug/mL까지 세포독성 평가를 실시한 결과 400 ug/mL 농도 이상에서 세포 독성이 나타났다. 따라서 FCE50은 300 ug/mL까지 세포 독성을 나타내지 않음을 확인하였다(Fig. 18). 따라서 이후의 세포실험은 150, 200, 250 ug/mL FCE50의 농도에서 수행하였다.

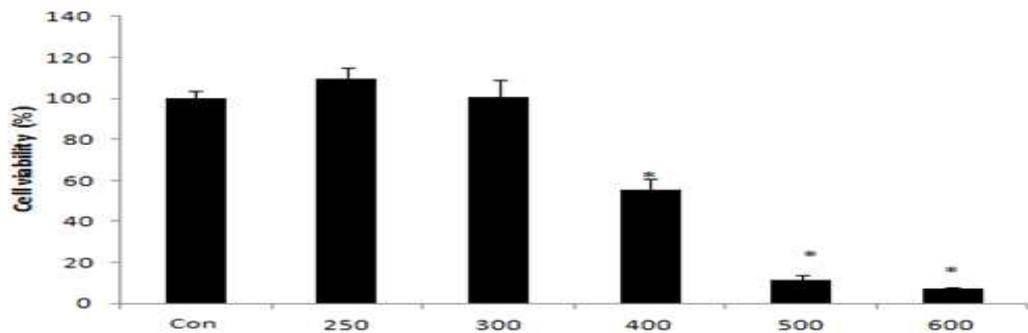
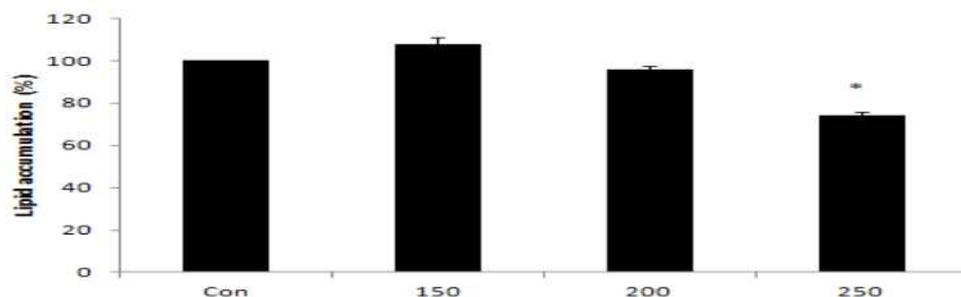


Fig. 18. Cytotoxicity of fermented *Curcuma Longa* in 3T3-L1 cells.

Data are presented as mean ± S.D. *Significantly different from the Con at the level of $p < 0.05$.

(나) Oil Red O 염색 및 정량

FCE50을 9일간 분화유도와 함께 FCE50을 처리하여 분화시킨 3T3-L1 지방세포에서 FCE50이 지방축적(lipid accumulation)에 미치는 효과를 측정하기 위해 Oil Red O 염색을 실시하였다. 그 결과 분화된 adipocyte(Con)와 비교하여 FCE50을 250 ug/mL 처리한 군에서 지방세포의 분화가 통계적으로 유의하게 25% 억제되는 것을 확인하였다(Fig. 19).



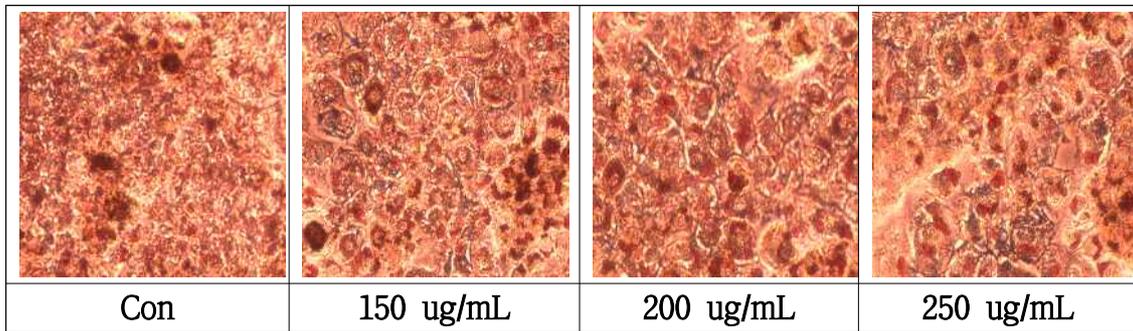


Fig. 19. Effect of 50% ethanol extract from fermented *Curcuma Longa* on lipid accumulation by Oil Red Ostaining.

Data are presented as mean \pm S.D. Con : 3T3-L1 adipocyte. The concentration of FCE50 is 150, 200, 250 ug/mL. *Significantly different from Con at the level of $p < 0.05$.

(다) 세포내 중성지방함량

Oil Red O염색법에 의한 지방형성 억제능에 관한 결과는 Fig. 20에 제시하였다. 9일간 분화시약과 FCE50을 처리하여 분화시킨 3T3-L1 지방세포의 triglyceride의 함량을 측정 한 결과, FCE50을 250 ug/mL처리한 군에서 adipocyte(Con)와 비교하여 유의적으로 29% 억제됨을 확인하였다.

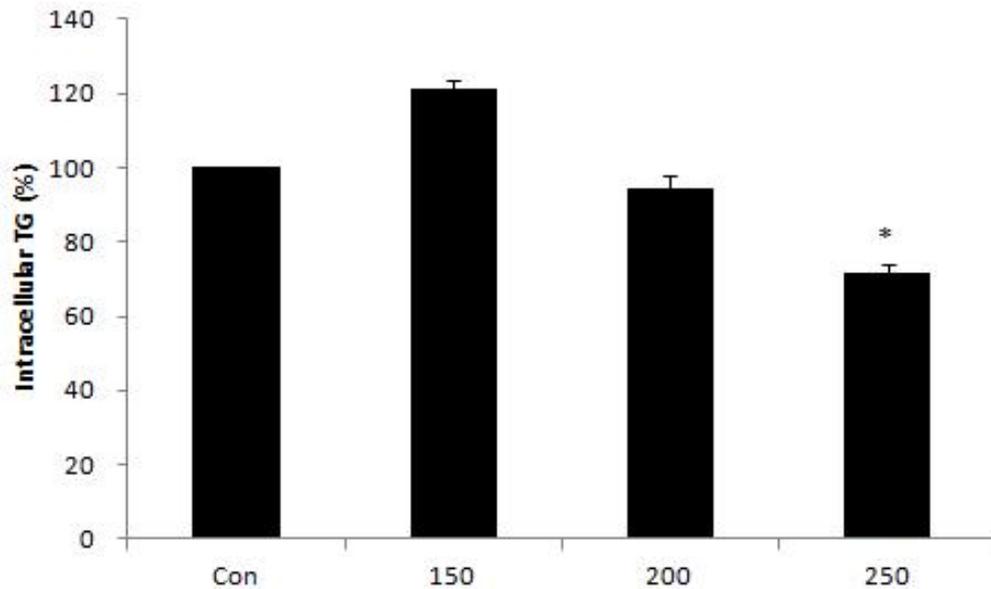


Fig. 20. Effect of 50% ethanol extract from fermented *Curcuma Longa* on Triglyceride in 3T3-L1 adipocytes.

Data are presented as mean \pm S.D. Con : 3T3-L1 adipocyte. The concentration of sample is 150, 200, 250 ug/mL. *Significantly different from the control at the level of $p < 0.05$.

(3) 발효율금 50%주정추출물의 *in vivo* 체지방 감소 활성

(가) 체중 및 장기무게

비만은 유전적 요인뿐만 아니라 환경에 의해서도 많은 영향을 받기 때문에 사람에서 이의 병인을 연구하기에는 매우 어려운 점이 있다. 따라서 비만유도 동물모델의

연구를 통해 비만의 원인을 규명하는 것이 바람직하다. 본 연구에서는 발효율금 50% 주정추출물의 체중 및 체지방 감소 활성을 평가하기 위해 SD-rat을 대상으로 고지방식이 공급 하에 발효율금 50%주정 추출물을 12주간 경구투여 하였다. 실험동물의 체중은 매일 변동이 있고, 특히 비만인 경우 변동의 폭이 크므로 이러한 영향을 최소화하기 위해 항상 동일한 시간에 동일한 환경 조건에서 체중을 측정하였다. Con, P.con, Reference, Low 및 High 군의 실험기간 중 체중변화는 Fig. 21에 제시하였다. 동일한 평균 체중으로 분류된 실험군들은 각 식이 섭취 1주 후 평균 체중이 224.91 ± 0.30 으로 각 군별 체중의 통계적 유의차는 나타나지 않았다. P.con 군은 Con 군과 비교하여 6주 후부터 평균 체중에서 통계적 유의차가 나타났다($441.80 \text{ g vs } 408.84 \text{ g}$, $p < 0.05$). 이러한 체중 증가는 12주까지 계속되어 각 군의 체중은 각각 $578.81 \pm 10.67 \text{ g}$ 및 $499.97 \pm 13.05 \text{ g}$ 으로 나타났다. 12주 후, P.con 군과 비교하여 200 mg/kg/day의 FCE50을 투여한 군(Low)의 평균 체중은 $502.11 \pm 38.64 \text{ g}$, 500 mg/kg/day의 FCE50을 투여한 군(High)은 $487.04 \pm 23.98 \text{ g}$ 로 나타났다. 12주에 High 군은 P.con 군과 비교하여 평균 체중이 약 16% 유의하게 감소하였다($p < 0.05$).

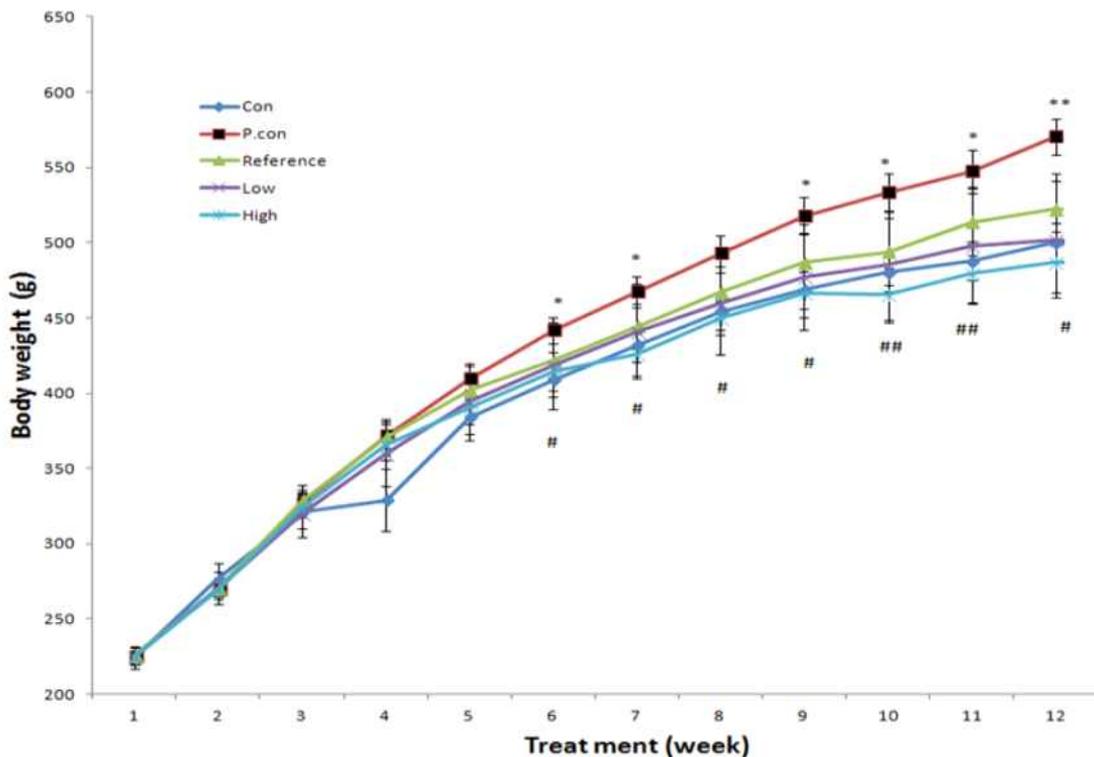


Fig. 21. Changes in body weight gain of experimental rats.

Data are presented as mean \pm S.E. Con : non high fat fed rats, P.con : high fat fed rats, Reference : Garcinia cambogia extract, Low : FCE50 (200 mg/kg/day), High : FCE50 (500 mg/kg/day). Significantly different from the control at the level of * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, Significantly different from the P.con at the level of # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$.

(나) 식이섭취량 및 음수섭취량

Table 10은 식이섭취량과 음수섭취량을 나타낸 것이다. 식이 및 음수섭취량은 주

2회 측정하여 제시하였다. Con 군에 비해서 P.con, Reference, Low 및 High 군의 식이 섭취량에서 통계적인 유의적 차이가 나타났다. 즉 Con 군은 20.83 ± 1.20 g/day으로 AIN-76 diet를 섭취한데 비하여, 60% high fat을 섭취한 나머지군은 $15.63 \pm 1.81 \sim 16.67 \pm 2.40$ g/day를 나타내었다. 식이 섭취량은 고지방식이군이 일반식이를 먹인 군에 비하여 유의적으로 낮았으나, 식이 섭취효율을 계산했을 때, 고지방식이군이 0.89 ± 0.35 g/day이며, 일반식이 군이 0.56 ± 0.44 g/day로 고지방식이군이 유의적으로 높은 것으로 나타났다. 이 결과는 고지방식이가 식이효율을 높였으며, 성공적인 비만유도를 했다고 볼 수 있다. 각 실험군의 음수섭취량은 통계적인 유의적 차이가 나타나지 않은 것을 확인할 수 있었다.

Table 10. Changes in food intake and water intake of experimental rats

Group	Food Intake (g/day)	Water Intake (g/day)
Con	20.83 ± 1.20^a	13.49 ± 4.08^a
P.con	16.67 ± 2.40^b	14.70 ± 3.45^a
Reference	15.76 ± 1.89^b	13.25 ± 4.73^a
Low	15.75 ± 1.70^b	12.49 ± 5.84^a
High	15.63 ± 1.81^b	13.25 ± 4.68^a

Data are presented as mean \pm S.D. Con : non high fat fed rats, P.con : high fat fed rats, Reference : *Garcinia cambogia* extract, Low : FCE50 (200 mg/kg/day), High : FCE50 (500 mg/kg/day). Different letters in a column are statistically different by Duncan's multiple range test ($p < 0.05$).

(다) 조직무게

Table 11은 각 군별 조직의 중량을 제시하였다. 각 군별 간, 비장, 정소, 신장의 무게는 통계적인 유의 차이가 나타나지 않은 것을 확인할 수 있었다.

Table 11. Various organ weights in experimental rats

Group	Relative Tissue Weight (%)			
	Liver	Kidney	Spleen	Testis
Con	13.61 ± 0.39^a	2.93 ± 0.09^a	0.91 ± 0.05^a	3.25 ± 0.55^a
Pcon	13.16 ± 0.75^a	3.21 ± 0.22^a	0.94 ± 0.10^a	3.36 ± 0.62^a
Reference	13.39 ± 0.85^a	3.24 ± 0.23^a	0.92 ± 0.11^a	3.88 ± 0.16^a
Low	13.73 ± 1.01^a	3.44 ± 0.13^a	0.84 ± 0.04^a	3.71 ± 0.07^a
High	12.86 ± 0.65^a	3.19 ± 0.27^a	0.75 ± 0.05^a	3.59 ± 0.22^a

Data express the mean \pm S.E. The different letters above the bar are statistically significant difference by Duncan's multiple range test $p < 0.05$. Con: Normal diet control group. P.con : 60% high-fat diet (HFD) induced group, Reference : HFD with *Garcinia cambogia* 500 mg/kg b.w./day, Low: HFD with 200 mg/kg b.w./day of 50% ethanol extract from fermented *Curcuma*

longa L., High : HFD with 500 mg/kg b.w./day of 50% ethanol extract from fermented *Curcuma longa* L.

(라) White adipose tissue 무게

Table 12는 각 군별 white adipose tissue의 무게를 제시하였다. 각 군별 white adipose tissue의 무게는 Epididymal white adipose tissue 및 Perirenal white adipose tissue를 측정하였다. Epididymal white adipose tissue의 경우 Con, P.con, Reference, Low 및 High 군은 각각 9.33 ± 0.42 g, 16.6 ± 0.86 g, 9.58 ± 1.3 g, 14.51 ± 3.42 g 및 10.92 ± 0.97 g 으로 Con 군에 비하여 통계적으로 유의한 white adipose tissue 무게 차이를 나타내었다. Con 군에 비하여 P.con 군의 지방 축적량은 7.27 g 증가하였으며, High 군은 P.con 군에 비해 7.03 g 감소하였다. 또한, perirenal white adipose tissue의 경우 Con, P.con, Reference, Low 및 High 군은 각각 9.41 ± 0.5 g, 18.48 ± 1.09 g, 10.95 ± 2.1 g, 17.00 ± 3.73 g, and 13.1 ± 1.38 g을 나타냈다. Con 군에 비하여 P.con 군의 지방 축적량은 9.07 g 증가하였으나 High 군은 P.con 군에 비해 7.53 g 감소하였다. 이상의 결과로부터 FCE50 High 군의 고지방식으로 유도한 비만 쥐에서 지방 축적을 억제하는 효과를 확인하였다($p < 0.05$).

Table 12. White adipose tissue and brown adipose tissue weights in experimental rats

Group	Tissue Weights (g)	
	White Adipose Tissues	
	Epididymal White Adipose Tissue	Perirenal White Adipose Tissue
Con	9.33 ± 0.42^b	9.41 ± 0.50^b
P.con	16.60 ± 0.86^a	18.48 ± 1.09^a
Reference	9.58 ± 1.30^b	10.95 ± 2.10^b
Low	14.51 ± 3.42^a	17.00 ± 3.73^a
High	10.92 ± 0.97^b	13.10 ± 1.38^b

Data express the mean \pm S.E. The different letters above the bar are statistically significant difference by Duncan's multiple range test $p < 0.05$. Con: Normal diet control group. P.con : 60% high-fat diet (HFD) induced group, Reference : HFD with *Garcinia cambogia* 500 mg/kg b.w./day, Low: HFD with 200 mg/kg b.w./day of 50% ethanol extract from fermented *Curcuma longa* L., High : HFD with 500 mg/kg b.w./day of 50% ethanol extract from fermented *Curcuma longa* L.

(마) AST 및 ALT 활성

간의 손상정도를 확인하기 위하여 혈청 AST와 ALT를 측정한 결과는 Table 13에 나타난 바와 같다. AST 및 ALT 활성은 실험군 간의 유의적 차이가 없었다.

Table 13. Effects of 50% ethanol extract from fermented *Curcuma longa* on AST and ALT level in experimental rats

Group	Biochemical Parameter (Karmen/mL)	
	AST	ALT
Con	231.30 ± 8.47 ^a	17.17 ± 2.22 ^a
P.con	231.30 ± 6.91 ^a	17.66 ± 1.36 ^a
Reference	230.91 ± 7.43 ^a	18.05 ± 1.52 ^a
Low	224.29 ± 5.28 ^a	18.05 ± 3.13 ^a
High	234.81 ± 5.32 ^a	18.19 ± 1.45 ^a

Data express the mean ± S.E. The different letters above the bar are statistically significant difference by Duncan's multiple range test $p < 0.05$. Con: Normal diet control group. P.con : 60% high-fat diet (HFD) induced group, Reference : HFD with *Garcinia cambogia* 500 mg/kg b.w./day, Low: HFD with 200 mg/kg b.w./day of 50% ethanol extract from fermented *Curcuma longa* L., High : HFD with 500 mg/kg b.w./day of 50% ethanol extract from fermented *Curcuma longa* L.

(바) 혈중 중성지방 함량

중성지방은 글리세롤에 3분자의 지방산이 에스테르 결합한 것으로서 신체 내 지방조직의 주성분으로 생체의 에너지 저장에 관여하고 있다. 혈중 중성지방의 유래에는 외인성(식사성)과 내인성(체내합성)이 있고, 고지방식, 고칼로리식, 고당질식, 비만, 지방간 등에서 증가하는 경향을 보이기 때문에, 중성지방의 측정은 지질대사 이해에 매우 유용한 지표가 된다(46). 비만하게 되면 중성지방의 혈중 농도는 증가됨으로 비만의 유무를 판단할 수 있는 근거가 될 수 있다. 이에 본 연구에서도 각 군의 혈청 중성지방을 함량을 측정하였다. 12주 후 혈장 내 중성지방의 양을 측정한 결과, Con 군은 70.12 ± 3.48 mg/dL, P.con 군은 83.22 ± 3.60 g mg/dL로 P.con 군의 중성지방 함량이 유의적으로 높았다. P.con 군과 비교하여 Reference 군은 49.5 ± 4.43 mg/dL로 40.5% 감소하였으며 Low 군은 53.77 ± 4.30 mg/dL로 35.4% 감소하였다. 또한, High 군은 48.73 ± 4.57 mg/dL로 41.4% 감소하였다. 결과적으로 Reference 군과 Low 및 High 군의 혈중 중성지방 함량은 P.con 군과 비교하여 낮으며 통계적인 유의성이 있었다(Fig. 22).

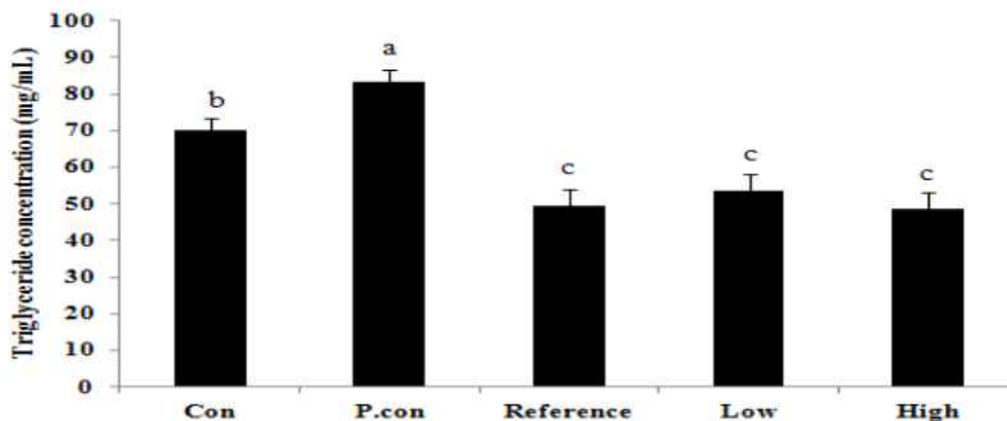


Fig. 22. Triglyceride levels in experimental rats.

Data express the mean ± S.E. The different letters above the bar are statistically significant

difference by Duncan's multiple range test $p < 0.05$. Con: Normal diet control group. P.con : 60% high-fat diet (HFD) induced group, Reference : HFD with *Garcinia cambogia* 500 mg/kg b.w./day, Low: HFD with 200 mg/kg b.w./day of 50% ethanol extract from fermented *Curcuma longa* L., High : HFD with 500 mg/kg b.w./day of 50% ethanol extract from fermented *Curcuma longa* L..

(사) 혈중 총 콜레스테롤 함량

생체 내 콜레스테롤은 세포막, 세포의 미세입자막, 수초 의 구성성분을 이루고 있는 중요한 지질이며 체내에서의 총량은 체중의 0.2% 정도이다. 혈중 콜레스테롤 농도는 주로 간 및 장관에서의 콜레스테롤의 생성, 흡수, 이화에 관계하는 제 인자에 의해 좌우되어 총 콜레스테롤 함량 측정은 체내 지질대사 이상의 지표로서 중요하며, 또한 비만의 정도가 심할수록 총 콜레스테롤 함량은 증가하는 것으로 밝혀져 있어 혈청 총 콜레스테롤 함량은 비만에 유의한 의미를 지니고 있다(46). 실험시작 12주 후 혈장 내 총 콜레스테롤의 양을 측정한 결과 그 값이 Con 군은 67.47 ± 8.93 mg/dL, P.con 군은 83.28 ± 9.28 mg/dL이었다. 이에 비하여 Low 군은 75.14 ± 6.16 mg/dL로 P.con 군과 비교하여 통계적인 유의적 차이는 나타나지 않았으나 Reference 군은 70.00 ± 8.33 mg/dL로 16.0% 감소하였으며, High 군은 73.95 ± 4.31 mg/dL로 11.2% 감소하였다. 이상으로부터 Reference 군과 High 군은 P.con 군과 비교하여 혈중 총 콜레스테롤 함량이 유의적으로 낮음을 알 수 있었다(Fig. 23).

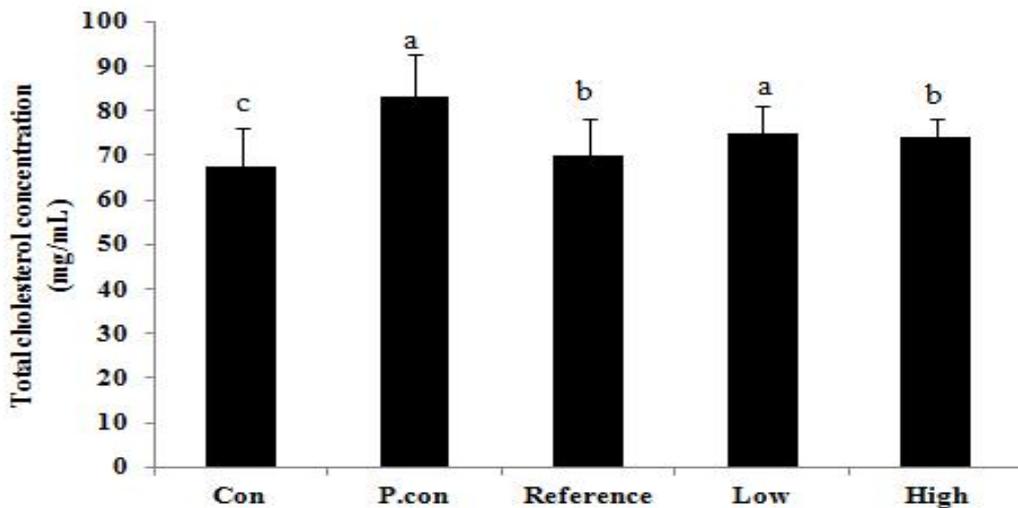


Fig. 23. Total cholesterol levels in experimental rats.

Data express the mean \pm S.E. The different letters above the bar are statistically significant difference by Duncan's multiple range test $p < 0.05$. Con: Normal diet control group. P.con : 60% high-fat diet (HFD) induced group, Reference : HFD with *Garcinia cambogia* 500 mg/kg b.w./day, Low: HFD with 200 mg/kg b.w./day of 50% ethanol extract from fermented *Curcuma longa* L., High : HFD with 500 mg/kg b.w./day of 50% ethanol extract from fermented *Curcuma longa* L..

(아) 혈중 HDL 콜레스테롤 함량

간과 소장에서 합성되어 혈중으로 유출되는 HDL 콜레스테롤은 말초조직으로부터

콜레스테롤을 간으로 운반하여 제거하는 작용을 하여, 혈중농도가 증가하면 각종 동맥경화증을 예방할 수 있으며, 반대로 혈중 농도가 떨어지면 동맥경화증의 위험신호가 되는데 비만, 고혈압, 긴장, 흡연 등이 감소의 요인이 된다(46). 12주 후 혈장 내 HDL 콜레스테롤의 양을 측정한 결과, Con 군에서는 31.62 ± 2.92 g, P.con 군은 23.3 ± 3.99 g, Reference 군은 33.04 ± 5.21 g, Low 군은 27.89 ± 5.92 g 그리고 High 군은 37.34 ± 6.13 g으로 나타났다. P.con 군 과 비교하여 Low 군에서는 통계적인 유의적 차이가 나타나지 않았으나, Reference 군과 High 군은 각각 141%, 160% 통계적으로 유의하게 증가하였다(Fig. 24).

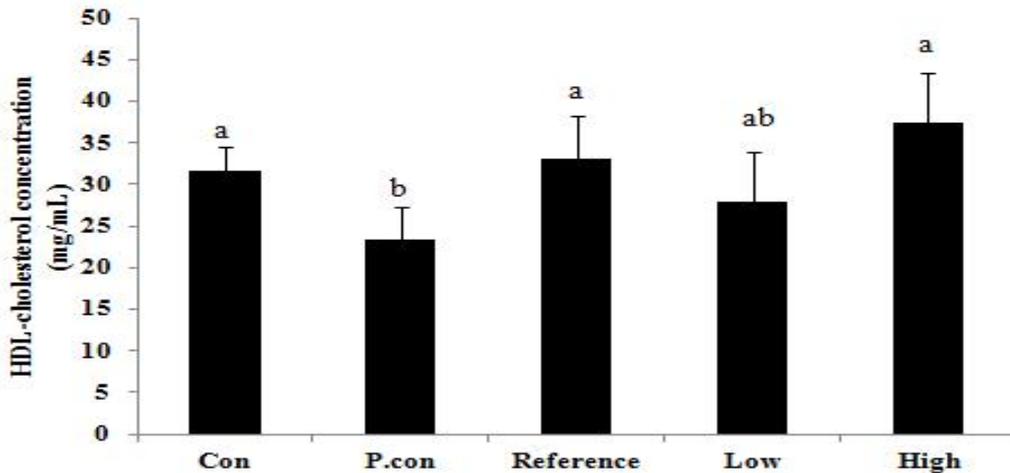


Fig. 24. HDL cholesterol levels in experimental rats.

Data express the mean \pm S.E. The different letters above the bar are statistically significant difference by Duncan's multiple range test $p < 0.05$. Con: Normal diet control group. P.con : 60% high-fat diet (HFD) induced group, Reference : HFD with *Garcinia cambogia* 500 mg/kg b.w./day, Low: HFD with 200 mg/kg b.w./day of 50% ethanol extract from fermented *Curcuma longa* L., High : HFD with 500 mg/kg b.w./day of 50% ethanol extract from fermented *Curcuma longa* L..

(자) Western blot analysis

고지방식이로 비만을 유도한 SD rat의 백색지방에서 pAMPK 와 SREBP-1c 단백질의 발현량에 대한 효과를 확인하기 위해 western blot을 실시하였다. AMPK는 에너지 항상성 유지에 주요한 역할을 하며, 이는 인산화를 통해 활성화된다. 또한 AMPK는 지질의 산화를 증가시키고 지방합성을 억제하는 효과를 가졌다. 인산화된 AMPK의 활성이 증가함에 따라 하위인자인 SREBP-1c의 발현에 영향을 미쳐 지방합성을 억제한다. 따라서 본 연구에서는 지방형성 기작과 관련된 AMPK와 SREBP-1c 단백질 발현량을 확인하였다. 그 결과 pAMPK 단백질 발현량의 경우 P.con 군은 Con 군과 비교하여 단백질 발현량이 유의적으로 감소하였으나, FCE50(low, high)군과 Reference 군은 P.con 군과 비교하여 유의적으로 증가하는 것을 확인하였다. SREBP-1c 단백질 발현량을 확인한 결과, P.con 군은 Con 군과 비교하여 단백질 발현량이 유의적으로 증가하였으나, FCE50 High 군과 Reference 군은 SREBP-1c 단백질 발현량이 유의적으로 감소하였다 (Fig. 25).

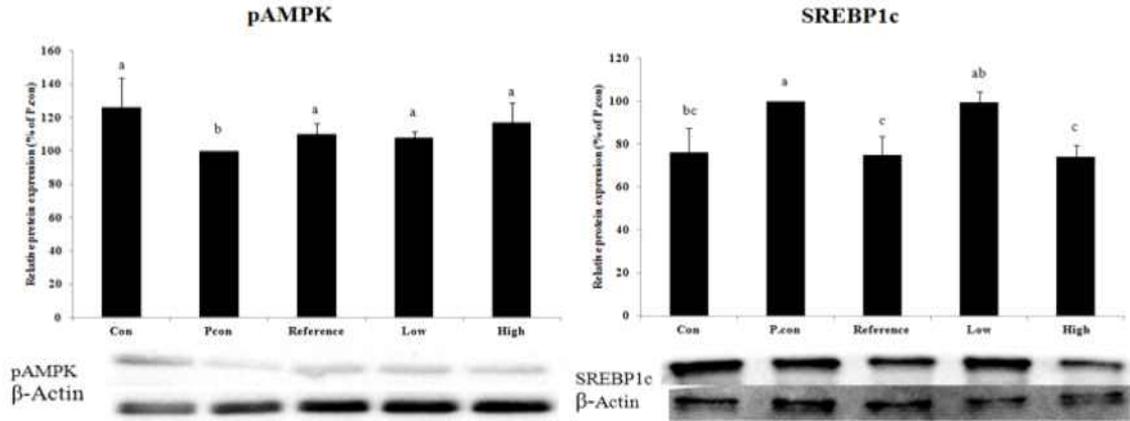


Fig. 25. Effects of 50% ethanol extract from fermented *Curcuma longa* on pAMPK and SREBP-1c protein expressions analyzed by western blot in white adipose tissues of high-fat diet induced obese rats.

Data express the mean \pm S.E. The different letters above the bar are statistically significant difference by Duncan's multiple range test $p < 0.05$. Con: Normal diet control group. P.con : 60% high-fat diet (HFD) induced group, Reference : HFD with *Garcinia cambogia* 500 mg/kg b.w./day, Low: HFD with 200 mg/kg b.w./day of 50% ethanol extract from fermented *Curcuma longa* L., High : HFD with 500 mg/kg b.w./day of 50% ethanol extract from fermented *Curcuma longa* L.

(차) Real-time polymerase chain reaction(RT-PCR)

고지방식이로 비만을 유도한 SD rat의 백색지방에서 FCE50이 지방합성과 관련된 인자인 PPAR- γ , CEBP- α , FAS, aP2, LPL 및 adiponectin의 mRNA 발현에 미치는 영향을 RT-PCR을 이용하여 관찰하였으며, 그 결과는 Fig. 26A에 나타내었다. PPAR- γ , FAS mRNA 발현량은 P.con 군과 비교하여 Reference, Low 및 High 군에서는 통계적으로 유의하게 이 감소하였으나, CEBP- α , aP2와 LPL mRNA의 발현량은 P.con 군과 비교하여 High 군과 Reference 군에서만 감소하는 것을 확인 할 수 있었다. 발효율금 50%주정 추출물이 adipocytokine 중에 하나인 adiponectin의 발현에 미치는 영향을 확인한 결과를 Fig. 26(B)에 나타내었다. P.con 군과 비교하였을 때 Reference와 High군에서 유의적으로 adiponectin mRNA 발현량이 증가하였다. 고지방식이로 비만을 유도한 SD rat의 백색지방에서 FCE50이 지방 분해효소인 ATGL 과 HSL의 발현량을 확인한 결과, P.con 군과 비교하여 ATGL mRNA 발현량은 Reference와 High 군에서 유의적으로 증가하였고, HSL mRNA 발현량은 Reference 및 Low와 High 군에서 모두 유의적으로 증가하였다(Fig. 27). 또한 지방산 베타산화와 관련된 전사인자인 ACC와 CPT1 mRNA의 발현량을 확인한 결과는 Fig. 28에 나타내었다. ACC mRNA 발현량은 Con 군과 비교하여 P.con 군에서 유의적으로 발현량이 증가하였고, P.con 군과 비교하여 Reference 와 High 군에서 유의적으로 감소하였다. CPT1 mRNA 발현량은 Con 군과 비교하여 P.con 군에서 유의적으로 발현량이 감소하였고, P.con 군과 비교하여 Reference, Low 그리고 High 군에서 유의적으로 발현량이 증가하는 것을 확인 할 수 있었다.

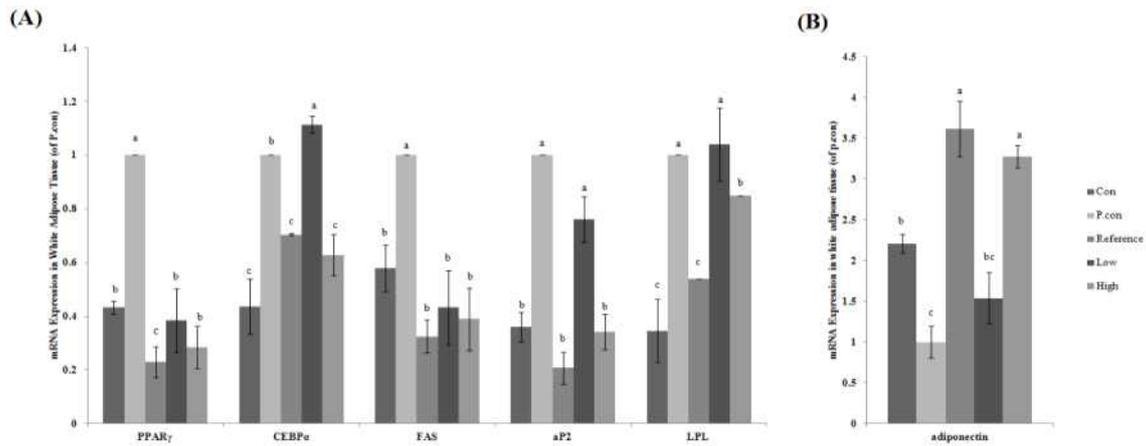


Fig. 26. Effects of 50% ethanol extract from fermented *Curcuma longa* on PPAR γ , C/EBP α , FAS, aP2, LPL, and adiponectin mRNA expressions analyzed by real time polymerase chain reaction in white adipose tissues of high-fat diet induced obese rats.

Data express the mean \pm S.E. The different letters above the bar are statistically significant difference by Duncan's multiple range test $p < 0.05$. Con: Normal diet control group. P.con : 60% high-fat diet (HFD) induced group, Reference : HFD with *Garcinia cambogia* 500 mg/kg b.w./day, Low: HFD with 200 mg/kg b.w./day of 50% ethanol extract from fermented *Curcuma longa* L., High : HFD with 500 mg/kg b.w./day of 50% ethanol extract from fermented *Curcuma longa* L.. (A) Expressions of PPAR γ , C/EBP α , FAS, aP2 and LPL mRNA, (B) expression of adiponectin mRNA.

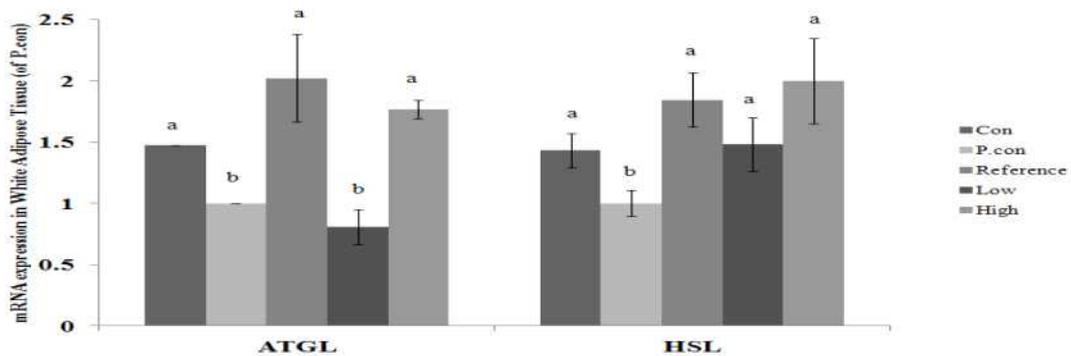


Fig. 27. Effects of 50% ethanol extract from fermented *Curcuma longa* on HSL mRNA expressions analyzed by real time polymerase chain reaction in white adipose tissues of high-fat diet induced obese rats.

Data express the mean \pm S.E. The different letters above the bar are statistically significant difference by Duncan's multiple range test $p < 0.05$. Con: Normal diet control group. P.con : 60% high-fat diet (HFD) induced group, Reference : HFD with *Garcinia cambogia* 500 mg/kg b.w./day, Low: HFD with 200 mg/kg b.w./day of 50% ethanol extract from fermented *Curcuma longa* L., High : HFD with 500 mg/kg b.w./day of 50% ethanol extract from fermented *Curcuma longa* L..

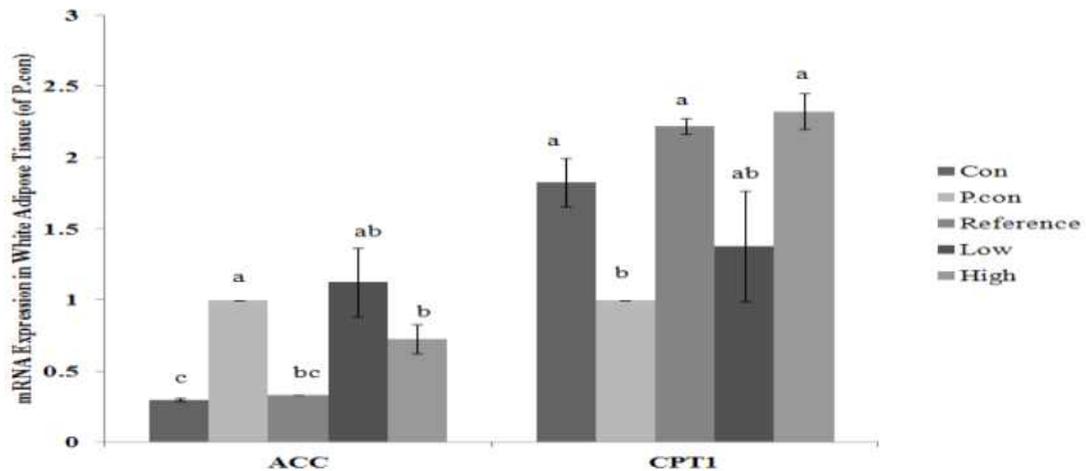


Fig. 28. Effects of 50% ethanol extract from fermented *Curcuma longa* on ACC and CPT1 mRNA expressions analyzed by real time polymerase chain reaction in white adipose tissues of high-fat diet induced obese rats.

-The different letters above the bar are statistically significant difference by Duncan's multiple range test $p < 0.05$. Con: Normal diet control group. P.con : 60% high-fat diet (HFD) induced group, Reference : HFD with *Garcinia cambogia* 500 mg/kg b.w./day, Low: HFD with 200 mg/kg b.w./day of 50% ethanol extract from fermented *Curcuma longa* L., High : HFD with 500 mg/kg b.w./day of 50% ethanol extract from fermented *Curcuma longa* L.

라. 발효율금주정추출물로부터 분획한 에틸아세테이트 층의 체지방 감소 기작구명

(1) 발효율금 분획물의 3T3-L1 세포에서의 세포독성

3T3-L1 세포 분화과정 중 발효율금주정추출물로부터 분획한 헥산층(FCEH), 클로로포름층(FCEC), 에틸아세테이트층(FCEE)을 다양한 농도로 처리하여 분화 8일째에 XTT방법으로 세포독성을 측정하였다. 선행연구에서 확인된 발효율금 50% 주정추출물의 독성 범위인 400 ug/mL의 농도에 기초하여, FCEH, FCEC와 FCEE를 30~300 ug/mL의 농도로 처리한 후 세포생존 정도를 측정한 결과 FCEH와 FCEC는 40 ug/mL부터 유의적으로 세포성장 및 분화에 영향을 나타내었으나, FCEE는 300 ug/mL부터 유의적으로 세포성장 및 분화에 영향을 나타내었다(Fig. 29). 이는 FCEH와 FCEC는 저농도에서부터 세포독성이 나타나지만, 이에 비해 FCEE는 안전범위가 넓음을 의미한다. 따라서 이후의 모든 실험에서는 FCEE에 대하여 50, 100 및 200 ug/mL의 안전한 농도에서 연구를 수행하였다.

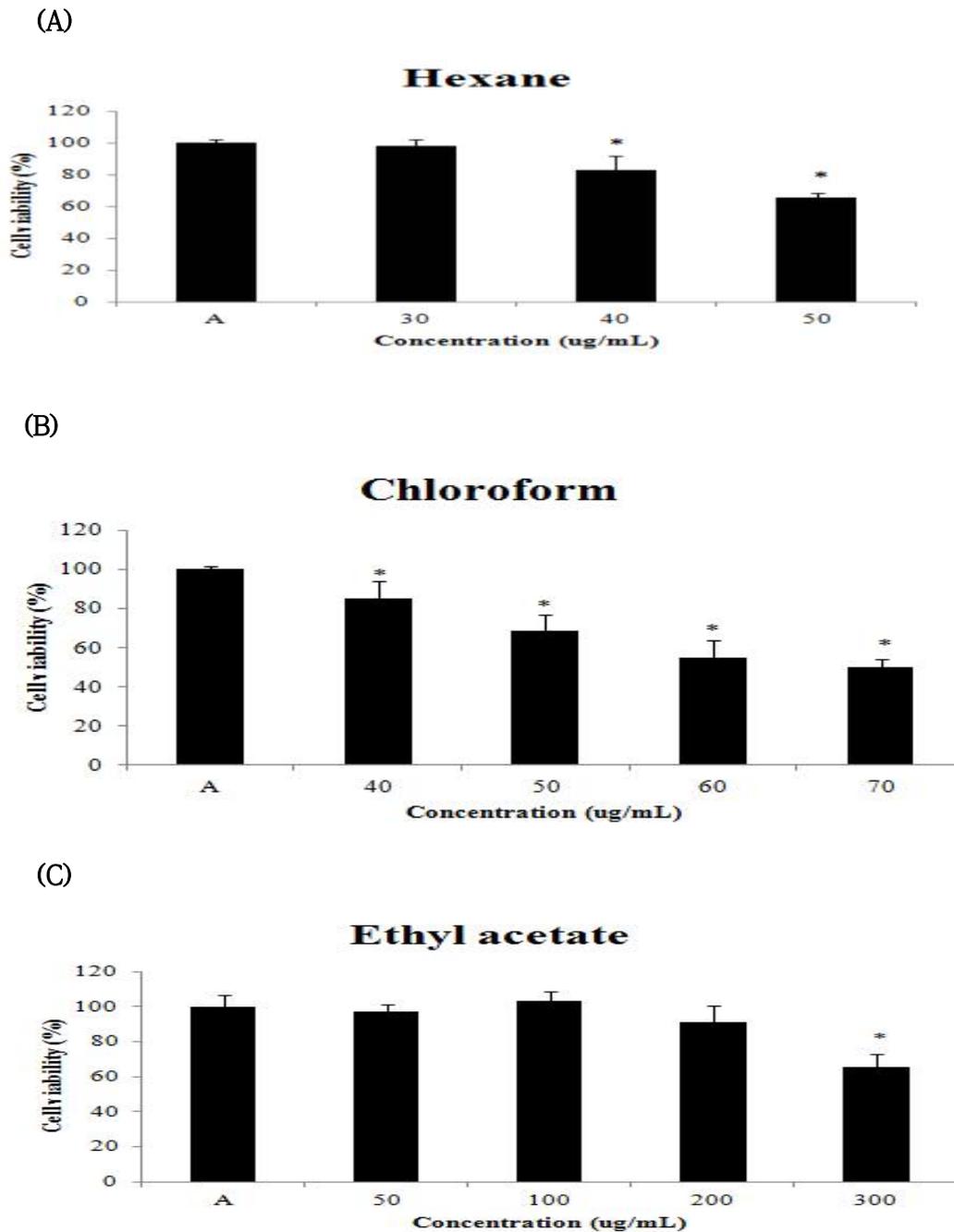


Fig. 29. Effects of hexane, chloroform and ethyl acetate fractions from 50% ethanol extract of fermented *Curcuma longa* on cell viability in 3T3-L1 cells.

Cell viability was determined by XTT assay. Each value is expressed as the mean \pm S.D. of three independent experiments. Asterick (*) above the bar is significantly different from adipocytes, $p < 0.05$. P: preadipocyte, A: adipocyte. (A) Effect of hexane fraction from 50% ethanol extract of fermented *Curcuma longa* L. on cell viability in 3T3-L1 cells, (B) Effect of chloroform fraction from 50% ethanol extract of fermented *Curcuma longa* L. on cell viability in 3T3-L1 cells, (C) Effect of ethyl acetate fraction from 50% ethanol extract of fermented *Curcuma longa* L. on cell viability in 3T3-L1 cells.

(2) 발효율금 분획물의 지방축적 억제효과

FCEE 처리에 의한 3T3-L1 세포의 분화과정 중 지방구의 생성억제 유무를 Oil Red O염색법을 이용하여 측정하였다. 완전히 분화된 지방세포(100%)와 비교 하였을 때, FCEE 50 및 100 ug/mL을 처리한 군에서는 지방축적이 유의적으로 감소하지 않았으나, 200 ug/mL의 농도를 처리한 군에서는 지방축적이 10.2% 유의적으로 감소함으로써 지방구 생성 억제효과가 있음을 확인하였다(Fig. 30A). 또한 염색된 지방구를 현미경으로 관찰한 결과, 전지방 세포와 비교하여 지방세포가 분화된 것을 확인할 수 있었으며, 분화가 유도된 지방세포와 비교하여 FCEE 200 ug/mL를 처리한 군에서는 지방구 염색율이 감소되는 것을 확인 할 수 있었다(Fig. 30B).

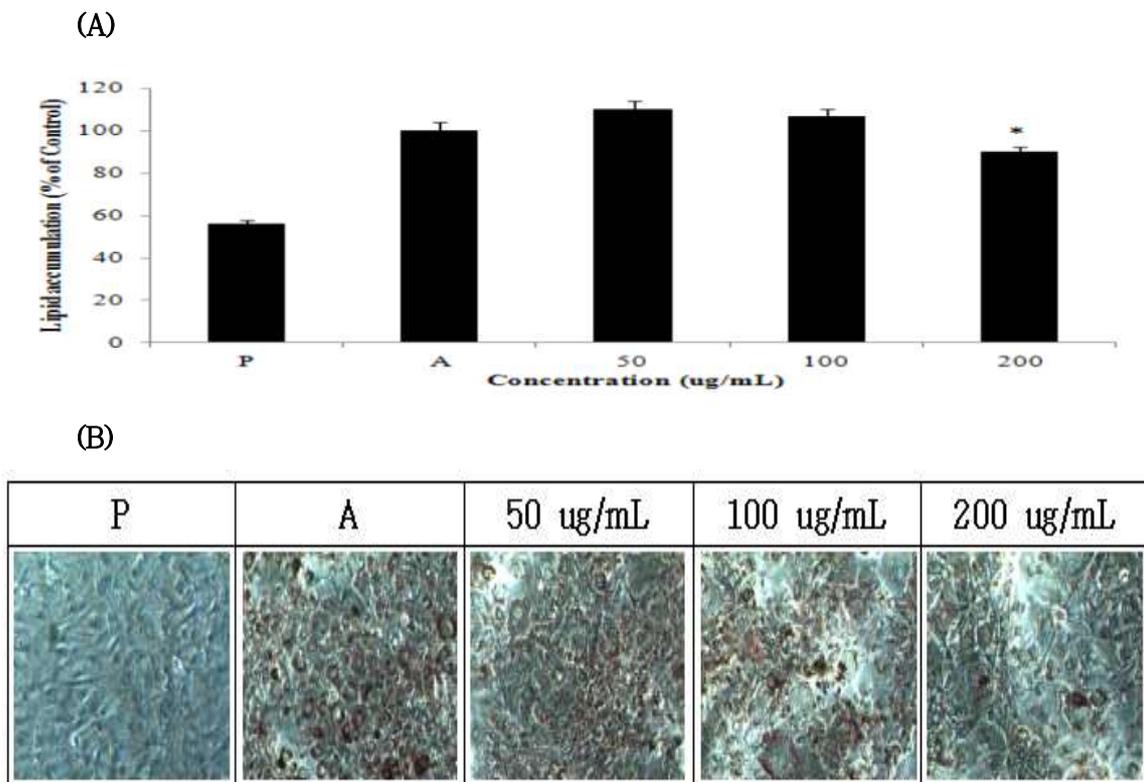


Fig. 30. Inhibitory effect of ethyl acetate fraction from 50% ethanol extract of fermented *Curcuma longa* on lipid accumulation in 3T3-L1 cells.

The lipid accumulation was quantified by Oil Red O staining and calculated as relative values versus untreated control cells. Data express the mean \pm S.D. of three independent experiments. Asterick (*) above the bar is significantly different from adipocytes, $p < 0.05$. P: preadipocyte, A: adipocyte. (A) lipid levels were measured colorimetrically using a spectrophotometer. (B) Cells were observed using microscope (magnification $\times 100$).

(3) 발효율금 분획물의 세포내 중성지방 축적 억제효과

지방구 감소의 확인을 위하여 AdipoRed™ 형광염색법을 이용하여 세포내 중성지방을 측정하였다. Oil Red O염색 결과와 동일하게 FCEE 200 ug/mL 농도에서 지방구 내의 중성지방 함량이 13.7% 유의적으로 감소하는 것을 확인하였다(Fig. 31). 따라서 FCEE는 3T3-L1 지방세포의 분화 유도과정에서 지방구의 생성을 억제하고, 지방 축적이 억제되는 것을 확인할 수 있었다.

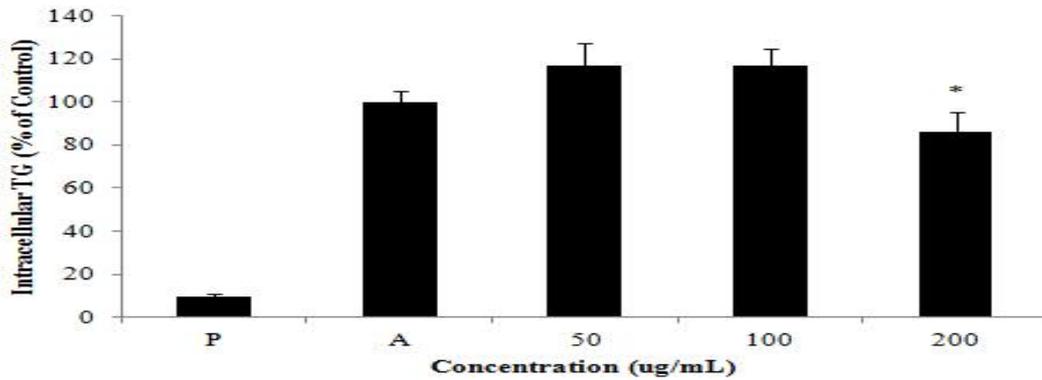


Fig. 31. Inhibitory effect of ethyl acetate fraction from 50% ethanol extract of fermented *Curcuma longa* on intracellular triglycerides in 3T3-L1 cells.

The intracellular triglycerid content was fluorescently quantified by AdipoRed™ assay kit. Each value is expressed as the mean±S.D. of three independent experiments. Asterick (*) above the bar is significantly different from adipocytes, $p<0.05$. P: preadipocyte, A: adipocyte.

(4) 발효율금 분획물의 포도당 유입 억제효과

3T3-L1 지방세포의 분화동안 FCEE를 처리함으로써 FCEE가 지방세포의 분화와 지방축적에 미치는 영향을 확인하고자 포도당 유입량을 측정하였다. 그 결과 FCEE를 200 ug/mL의 농도로 처리했을 때 포도당 유입량이 지방세포와 비교하여 36.63% 유의적으로 감소하는 것을 확인하였다(Fig. 32). 이러한 결과를 토대로 FCEE의 지방합성 억제효과는 일정부분 포도당이 지방세포내로 유입되는 것을 억제하는데 기인하는 것으로 볼 수 있다.

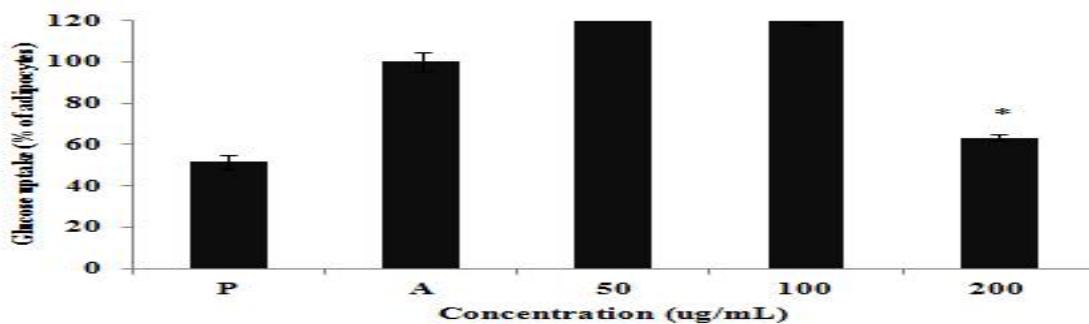


Fig. 32. Inhibitory effect of ethyl acetate fraction from 50% ethanol extract of fermented *Curcuma longa* on glucose uptake in 3T3-L1 cells.

The glucose uptake was fluorescently quantified by 2-NBDG assay kit. Each value is expressed as the mean±S.D. of three independent experiments. Asterick (*) above the bar is significantly different from adipocytes, $p<0.05$. P: preadipocyte, A: adipocyte.

(5) 발효율금 분획물이 유리 글리세롤 방출에 미치는 영향

본 연구에서는 FCEE를 처리하여 8일째에 수득한 배양액에서는 50, 100, 및 200 ug/mL의 농도에서 모두 유의적으로 유리 글리세롤 방출량이 지방세포에 비하여 각각

21.4%, 16.8%, 그리고 57.9% 감소하는 것을 확인할 수 있다(Fig. 33). 특히, FCEE 200 ug/mL을 처리한 군에서 그 방출량이 크게 감소하였다. 지방 분해와 관련된 다른 연구에서는 시료 처리를 통해 유리 글리세롤 방출량이 증가하는 것으로 보고되었지만, 본 연구에서는 FCEE를 처리함으로써 유리 글리세롤의 함량이 감소하는 것으로 확인되었다. 이는 지방세포의 분화과정 중에 FCEE의 처리로 분화가 억제되어, 지방구의 형성이 억제되고, 배양액으로 배출되는 유리 글리세롤의 총량이 감소한 것으로 사료된다.

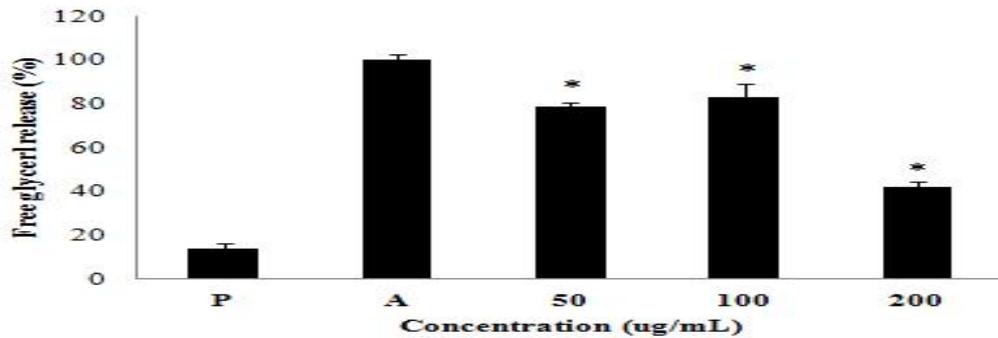


Fig. 33. Inhibitory effect of ethyl acetate fraction from 50% ethanol extract of fermented *Curcuma longa* on free glycerol release in 3T3-L1 cells.

Each value is expressed as the mean±S.D. of three independent experiments. Asterick (*) above the bar is significantly different from adipocytes, $p < 0.05$. P: preadipocyte, A: adipocyte.

(6) 발효율금 분획물이 지방합성 유전자에 미치는 영향

FCEE에 의한 지방축적 감소가 지방형성과 주요하게 관련된 전사인자들의 발현억제로부터 유도되는지를 조사하기 위하여 각 농도별로 시료를 3T3-L1 전지방세포의 분화동안 처리한 후, 지방형성 관련 전사인자로서 AMPK, SREBP-1c, C/EBP α 와 PPAR γ mRNA 발현양을 확인하였다. 전지방세포에서 지방세포로의 분화는 다양한 호르몬과 분화 유도인자들의 작용으로 일어나며 세포내에 지방을 축적한다. 분화 초기에 발현되는 SREBP-1c와 C/EBP- β , - δ 는 지방형성을 가속화시키며, 후기 전사인자인 C/EBP α 와 PPAR γ 의 발현유도에 중요한 역할을 한다고 알려져 있다. 또한 SREBP-1c는 LPL, ACC, stearoyl-CoA desaturase-1(SCD-1) 등을 포함한 다수의 지방형성 유전자의 발현을 촉진시킨다. 발현된 C/EBP α 와 PPAR γ 는 aP2와 FAS등의 지방형성 유전자를 발현시켜 지방형성 과정을 촉진시킨다(38). AMPK는 ATP 농도조절을 위한 대사적 센서로서 작용하며, 에너지 항상성을 조절하는 주요한 역할을 한다. AMPK는 인산화를 통해 활성화되어 SREBP-1c와 PPAR γ 의 발현을 억제하고 FAS와 같은 지방형성 효소의 발현을 억제함으로써 지방형성을 억제시키고, ACC의 억제와 CPT-1의 활성을 통해 지방산 베타산화물을 촉진시킨다(40). 본 연구에서는 FCEE가 AMPK와 SREBP-1c 및 지방형성의 주요 인자인 C/EBP α 와 PPAR γ 의 발현에 어떠한 영향을 미치는지 확인하기 위하여 실시간 중합효소연쇄반응을 실시하여 그 mRNA 발현정도를 비교하였다. AMPK의 경우 완전 분화된 지방세포와 비교하여 FCEE 200 ug/mL의 농도에서 mRNA 발현양이 3배 증가하였다(Fig. 34A). 반면에 SREBP-1c, C/EBP α 와 PPAR γ 의 경우, 완전 분화된 지방세포와 비교하여 FCEE 200 ug/mL의 농도에서 mRNA 발현양이 각각 0.6, 0.6 및 0.8 배 감소하였다(Fig.

34B). 본 연구의 결과를 통해 FCEE에 의하여 AMPK의 활성이 증가됨으로써 SREBP-1c의 발현이 감소되고, SREBP-1c의 타겟유전자이며 지방형성 과정에 주요인자인 C/EBP α 와 PPAR γ 의 발현이 억제되는 것을 알 수 있는데, 이는 3T3-L1 전지방세포에서 지방세포로의 분화억제를 이끌어 세포내 중성지방의 축적이 감소되어지는 것으로 판단된다.

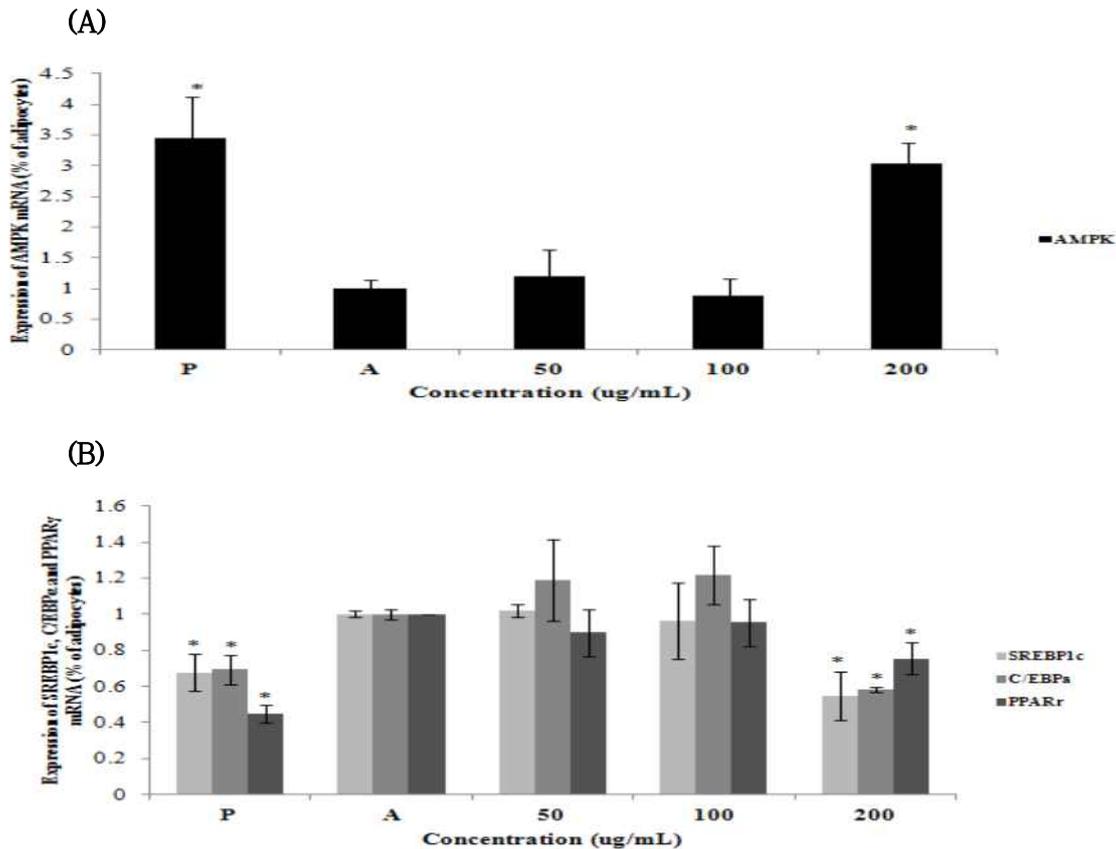


Fig. 34. Effect of ethyl acetate fraction from 50% ethanol extract of fermented *Curcuma longa* on mRNA expressions of adipogenesis-related genes in 3T3-L1 cells.

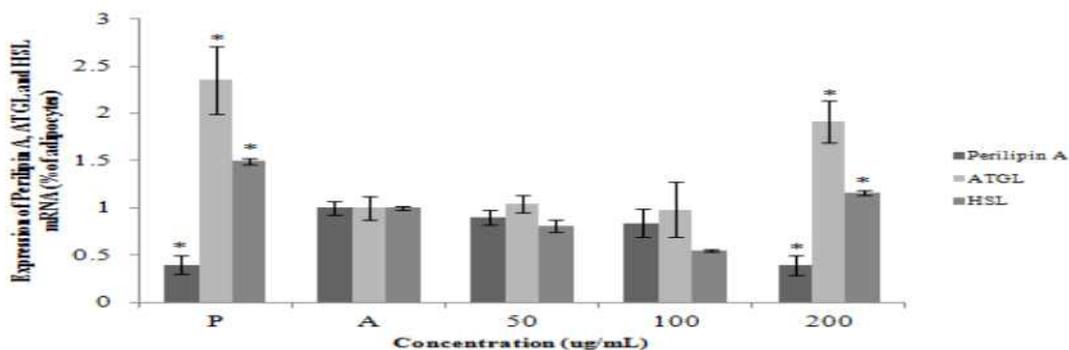
The values were calculated as the relative mRNA expression versus GAPDH as an internal control. Each value is expressed as the mean \pm S.E. of three independent experiments. Asterick (*) above the bar is significantly different from adipocytes, $p < 0.05$. P: preadipocyte, A: adipocyte. (A) The mRNA expression of AMPK, (B) The mRNA expressions of SREBP-1c, and C/EBP α , and PPAR γ .

(7) 발효올금 분획물이 지방분해 효소 및 유전자에 미치는 영향

FCEE에 의한 지방분해가 주요하게 관련된 지방분해효소 및 전사인자들의 발현억제로부터 유도되는지를 조사하기 위하여 각 농도별로 시료를 3T3-L1 전지방세포의 분화동안 처리한 후, 지방형성 관련 전사인자로서 ATGL, HSL과 CPT1 mRNA 발현양을 확인하였다. Perilipin A 단백질은 지방구의 막부위에 있으며, 지방구 형태를 유지하고 지방분해효소 HSL과 ATGL 등의 지방구에 대한 접근을 방해함으로써 효소와 기질의 작용을 억제하는 기전으로 알려져 있다. 지방대사에 관여하는 지방분해 효소는 ATGL 및 HSL과 같은 효소들이 알려져 있다. ATGL 효소는 중성지방의 분해 첫 단계에 작용하여, 중성지방이 diglyceride와 글리세롤로 분해되는 과정에 관여하는 것으로 알려져 있으며, HSL이

diglyceride를 monoglyceride와 글리세롤로 분해시키는데 관여하는 것으로 알려져 있다 (47,48). AMPK는 fatty acid synthase, pyruvate kinase 그리고 acetyl-CoA carboxylase(ACC)를 인산화 및 불활성화 시키며, 유전자 발현을 억제시킨다. ACC효소는 malonyl-CoA를 합성하며, 지방산 합성에 중요한 전구체로써 미토콘드리아의 지방산 산화에 대한 잠재적 억제자로 작용한다(40). AMPK에 의한 ACC의 불활성화는 malonyl-CoA의 농도를 저해시키고, carnitine palmitoyl- transferase -1(CPT-1)의 활성도를 증가시켜 지방산 산화를 증가시킨다. 본 연구에서는 FCEE가 Perilipin A 단백질, ATGL과 HSL 및 CPT1 발현에 어떠한 영향을 미치는지 확인하기 위하여 실시간 중합효소 연쇄반응을 실시하여 그 mRNA 발현정도를 비교하였다. Perilipin A의 경우 완전 분화된 지방세포와 비교하여 FCEE 200 ug/mL의 농도에서 mRNA 발현량이 0.4배 감소하였다 (Fig. 35A). ATGL과 HSL의 경우 완전 분화된 지방세포와 비교하여 FCEE 200 ug/mL의 농도에서 mRNA 발현량이 각각 1.9와 1.2배 증가하였다 (Fig. 35A). CPT1의 경우 완전 분화된 지방세포와 비교하여 FCEE 200 ug/mL의 농도에서 mRNA 발현량이 2.2배 증가하였다 (Fig. 35B). 본 연구의 결과를 통해 FCEE에 의하여 perilipin A mRNA 발현량이 감소되며, ATGL과 HSL의 활성이 증가됨으로써 지방분해가 촉진되어지며, CPT1의 발현이 증가됨으로써 지방산 산화 활성이 증가됨을 확인 할 수 있었다. 이는 완전 분화된 지방세포의 지방분해를 이끌어 세포내 중성지방이 분해되어지는 것으로 판단된다.

(A)



(B)

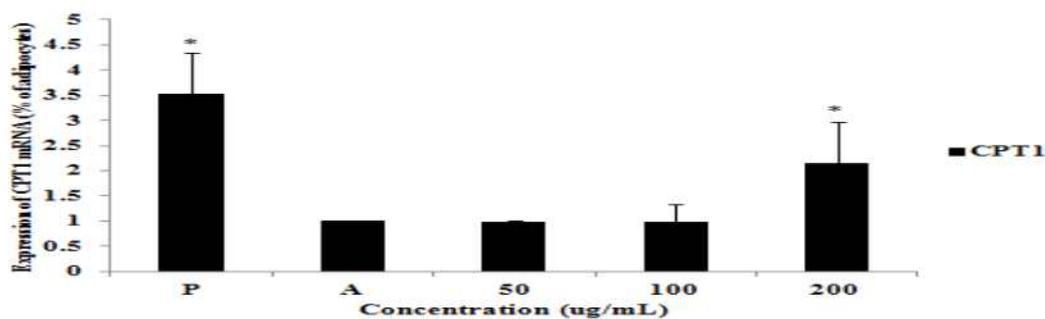


Fig. 35. Effect of ethyl acetate fraction from 50% ethanol extract of fermented *Curcuma longa* on mRNA expressions of perilipin A, ATGL, HSL (A) and CPT1 (B) in 3T3-L1 cells.

The values were calculated as the relative mRNA expression versus GAPDH as an internal control. Each value is expressed as the mean \pm S.E. of three independent experiments. Asterick

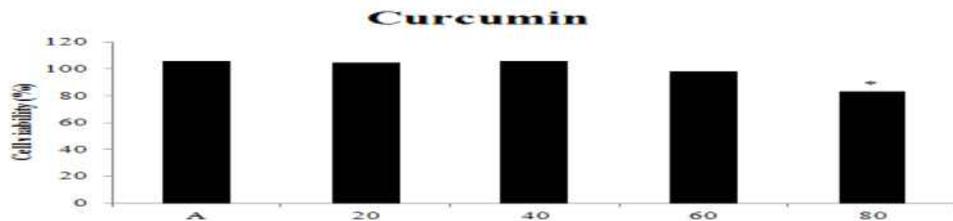
(* above the bar is significantly different from adipocytes, $p < 0.05$. P: preadipocyte, A: adipocyte. (A) The mRNA expression of ATGL and HSL, (B) The mRNA expressions of CPT1.

마. 발효울금주정추출물로 유효성분의 지방구 형성 억제효과

(1) 발효울금주정추출물 유효성분의 3T3-L1 세포에서의 세포독성

3T3-L1 세포 분화과정 중 발효울금주정추출물의 유효성분인 curcumin과 BDMC를 다양한 농도로 처리하여 분화 8일째에 XTT방법으로 세포독성을 측정하였다. Curcumin을 20, 40, 60, 80 uM의 농도를 처리한 후 세포생존 정도를 측정한 결과 80 uM의 농도부터 유의적으로 세포성장에 영향을 나타냈다. Ejaz 등(24)의 연구에서 보고된 curcumin의 지방형성 억제 활성 농도인 5, 10, 20 uM의 농도에 기초하여 BDMC를 1, 2.5 그리고 5 uM의 농도로 처리한 후 세포생존 정도를 측정하였다. 그 결과 BDMC는 5 uM의 농도부터 유의적으로 세포성장과 분화에 영향을 나타내었다(Fig. 36). 따라서 이후의 모든 실험에서는 curcumin은 5 uM, BDMC는 2.5 uM의 안전한 농도에서 연구를 수행하였다.

(A)



(B)

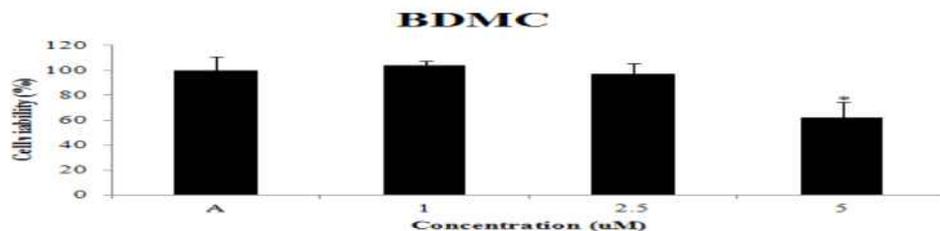


Fig. 36. Effects of curcumin and bisdemethoxycurcumin on cell viability in 3T3-L1 cells.

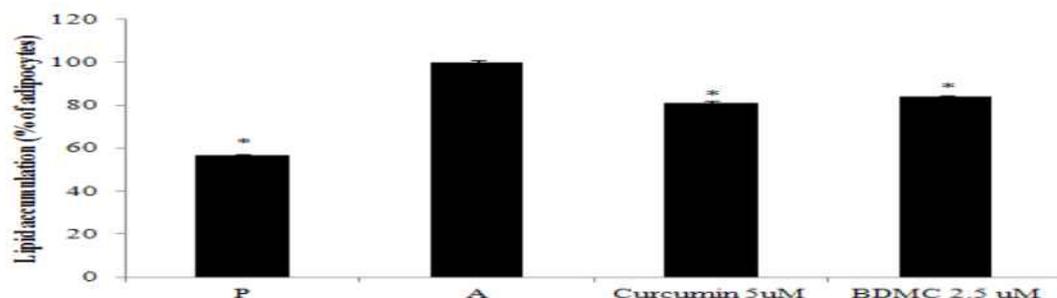
Cell viability was determined by XTT assay. Each value is expressed as the mean \pm S.D. of three independent experiments. Asterick (*) above the bar is significantly different from adipocytes, $p < 0.05$. P: preadipocyte, A: adipocyte, BDMC: bisdemethoxycurcumin.

(2) 발효울금주정추출물 유효성분의 지방축적 억제효과

Curcumin과 BDMC의 처리에 의한 3T3-L1 세포의 분화과정 중 지방형성 억제 효과를 Oil Red O염색법을 이용하여 측정하였다. 완전히 분화된 지방세포(100%)와 비교 하였을 때, curcumin을 5 uM 처리한 군에서는 지방축적이 18.8% 유의적으로 감소하였고, BDMC 2.5 uM의 농도를 처리한 군에서는 지방축적이 15.8% 유의적으로 감소하여, 두 성분 모두 지방축적을 유의적으로 감소시킴을 알 수 있었다. 이 결과 curcumin과 BDMC 모두 지방형성 억제효과가 있음을 확인하였다(Fig. 37A). 또한 염색된 지방구를 현미경으로 관찰한 결과, 전지방세포와 비교하여 지방세포가 분화된 것을 확인할 수 있었으며,

분화가 유도된 지방세포와 비교하여 curcumin과 BDMC를 처리한 군에서는 지방구 염색율이 감소되는 것을 확인 할 수 있었다(Fig. 37B).

(A)



(B)

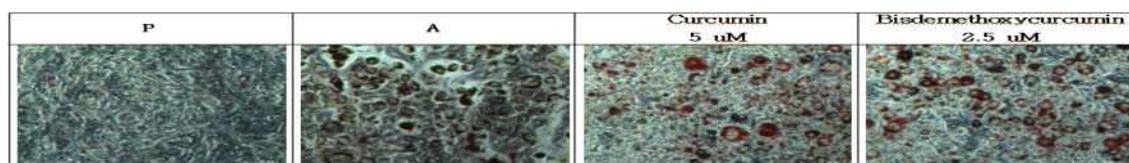


Fig. 37. Inhibitory effects of curcumin and bisdemethoxycurcumin on lipid accumulation in 3T3-L1 cells.

The lipid accumulation was quantified by Oil Red Ostaining and calculated as relative values *versus* untreated control cells. Data express the mean \pm S.D. of three independent experiments. Asterick (*) above the bar is significantly different from adipocytes, $p < 0.05$. P: preadipocyte, A: adipocyte, BDMC: bisdemethoxycurcumin. (A) lipid levels were measured colorimetrically using a spectrophotometer. (B) Cells were observed using microscope (magnification $\times 100$).

(3) 발효율금주정추출물 유효성분의 세포내 중성지방 축적 억제효과

지방구 감소의 확인을 위하여 AdipoRedTM 형광염색법을 이용하여 세포내 중성지방을 측정하였다. Oil Red O염색 결과와 동일한 경향으로 대조군 대비 curcumin 5 uM의 농도에서 38.4%, BDMC 2.5 uM의 농도에서 19.6% 유의적인 지방구 내의 중성지방 함량 감소를 확인하였다(Fig. 38). 따라서 curcumin과 BDMC는 3T3-L1 지방세포의 분화 유도 과정에서 지방구의 생성을 억제하고, 지방 축적을 억제시킴을 알 수 있었다.

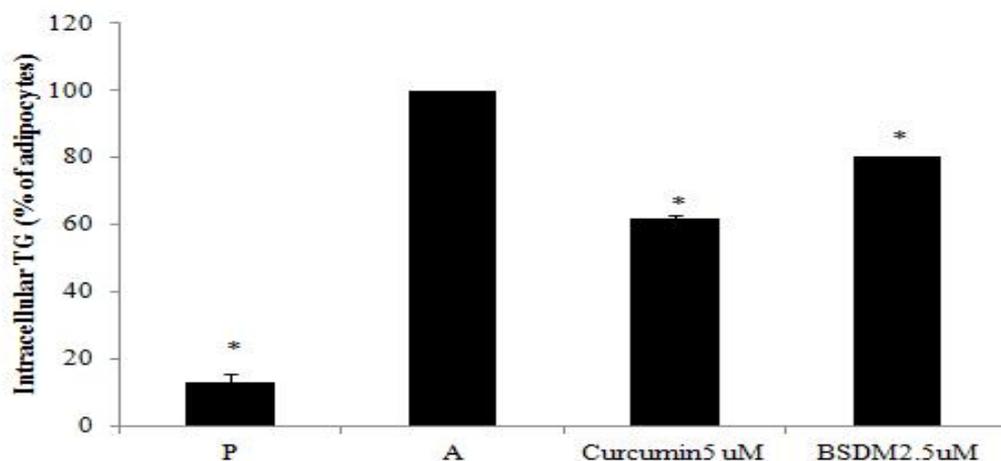


Fig. 38. Inhibitory effects of curcumin and bisdemethoxycurcumin on intracellular triglycerides in

3T3-L1 cells.

The intracellular triglycerid content was fluorescently quantified by AdipoRed™ assay kit. Each value is expressed as the mean±S.D. of three independent experiments. Asterick (*) above the bar is significantly different from adipocytes, $p<0.05$. P: preadipocyte, A: adipocyte, BDMC: bisdemethoxycurcumin.

(4) 발효올금주정추출물 유효성분의 포도당 유입 억제효과

3T3-L1 지방세포의 분화동안 curcumin과 BDMC를 처리함으로써 지방세포의 분화와 지방축적에 미치는 영향을 확인하고자 포도당 유입량을 측정하였다. 그 결과 curcumin 5 uM, BDMC 2.5 uM의 농도에서 포도당 유입량이 지방세포와 비교하여 각각 28.8%, 32.4% 유의적으로 감소하였다(Fig. 39). 이러한 결과를 토대로 curcumin과 BDMC의 지방합성 억제효과는 일정부분 포도당이 지방세포내로 유입되는 것을 억제하는데 기인하는 것으로 볼 수 있다.

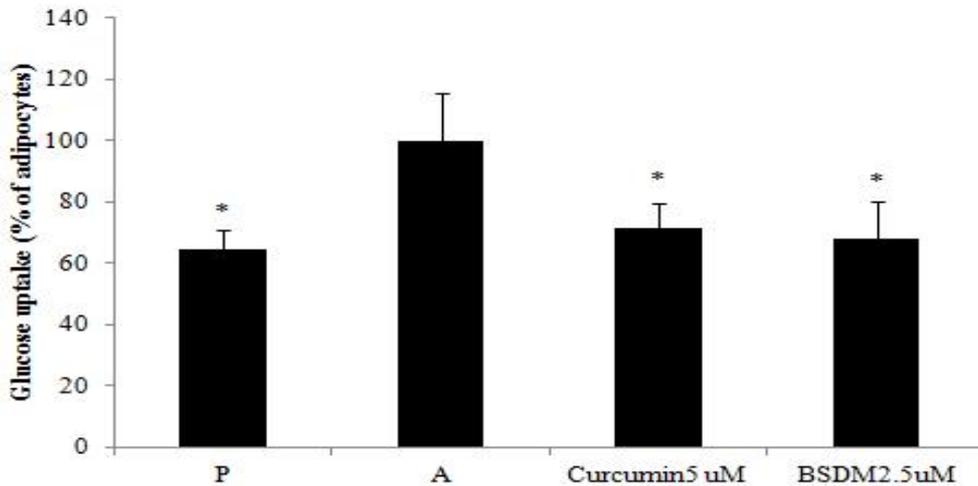


Fig. 39. Inhibitory effect of curcumin and bisdemethoxycurcumin on glucose uptake in 3T3-L1 cells.

The glucose uptake was fluorescently quantified by 2-NBDG assay kit. Each value is expressed as the mean±S.D. of three independent experiments. Asterick (*) above the bar is significantly different from adipocytes, $p<0.05$. P: preadipocyte, A: adipocyte, BDMC: bisdemethoxycurcumin.

(5) 발효올금 분획물의 유효성분의 지방합성 유전자에 미치는 영향

curcumin과 BDMC에 의한 지방축적 감소가 지방형성과 주요하게 관련된 전사인자들의 발현억제로부터 유도되는지를 조사하기 위하여 각 농도별로 시료를 3T3-L1 전지방세포의 분화동안 처리한 후, 지방형성 관련 전사인자으로써 acetyl-CoA carboxylase(ACC) mRNA 발현양을 확인하였다. 지방세포의 분화는 다양한 호르몬과 분화 유도인자들의 작용으로 세포내에 지방을 축적한다. 분화 초기에 발현되는 SREBP-1c와 C/EBP- β , - δ 는 지방형성을 가속화시키며, 후기 전사인자인 C/EBP α 와 PPAR γ 의 발현을 유도한다고 알려져 있다. SREBP-1c는 LPL, ACC, stearoyl-CoA desaturase-1(SCD-1) 등을 포함한 다수의 지방형성 유전자의 발현을 촉진시킨다(13). ACC, FAS 그리고 SCD-1 등을 포함한 효

소의 단백질과 mRNA활성은 중성지방대사에 관련되어있다(25). ACC는 acetyl-CoA를 malonyl-CoA로 축매시킨다. 활성화된 AMPK가 ACC의 활성을 조절한다. 이 결과 malonyl-CoA의 농도가 감소하면 지방생합성이 억제한다. 동시에 long-chain fatty acyl CoA가 미토콘드리아내로 이송에 관여하는 효소인 CPT1이 활성화되어 지방산 베타산화가 증가하게 된다(26). 본 연구에서는 curcumin과 BDMC이 지방형성의 주요 인자인 ACC의 발현에 어떠한 영향을 미치는지 확인하기 위하여 실시간 중합효소 연쇄반응을 실시하여 그 mRNA 발현정도를 비교하였다. ACC는 완전 분화된 지방세포와 비교하여 curcumin 5 uM의 농도 및 BDMC 2.5 uM의 농도에서 mRNA 발현양이 각각 0.7배 감소하였다(Fig. 40). 선행된 연구결과를 통해 발효율금주정추출물(FCE50)과 발효율금주정추출물로부터 분리한 에틸아세테이트층(FCEE)에 의하여 AMPK의 활성이 증가됨으로써 SREBP-1c 발현의 억제를 통해 하위인자들을 조절하고, 이를 통한 지방형성 억제 활성을 확인하였다. 본 연구를 통해 중성지방대사에 주요한 역할을 하는 ACC mRNA의 발현에 curcumin과 BDMC가 억제 효과가 있음을 확인하였다. 이러한 결과로부터 curcumin과 BDMC가 발효율금주정추출물의 지방형성 억제활성에 대한 유효성분인 것으로 사료된다.

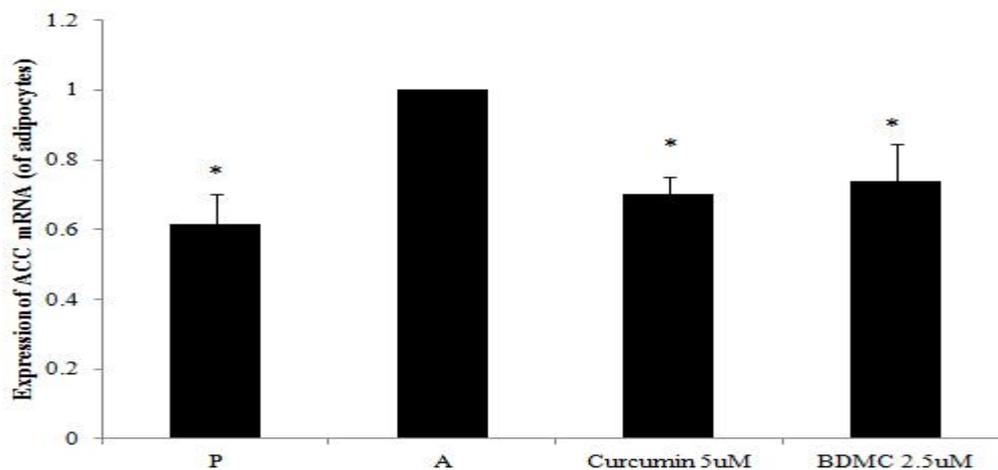


Fig. 40. Effects of curcumin and bisdemethoxycurcumin on mRNA expression of acetyl-CoA carboxylase gene in 3T3-L1 cells.

The values were calculated as the relative mRNA expression versus GAPDH as an internal control. Each value is expressed as the mean±S.E. of three independent experiments. Asterick (*) above the bar is significantly different from adipocytes, $p<0.05$. P: preadipocyte, A: adipocyte, BDMC: bisdemethoxycurcumin.

바. 원료표준화

(1) 발효율금 50%주정 추출물 제조공정 표준화 결과

Lot NO.	원료량(kg)	부형제(kg)	생산량(kg)	건조감량(%)	수율(%)
1	80	33.4	44.8	1.2	56.0
2	80	33.6	45.6	1.3	57.0
3	80	33.3	45.1	1.3	56.4
평균	80	15.2	26.8	1.3	56.5



(2) 발효율금 50%주정 추출물 지표성분 정량결과

시료명	실험결과 (Curcumin, 단위 ug/g)			평균 (ug/g)
	1회	2회	3회	
FCL50 SD- 1 Lot	13.5	12.7	13.6	13.27
FCL50 SD- 2 Lot	15.4	15.6	15.9	15.63
FCL50 SD- 3 Lot	16.3	17.8	17.5	17.20
평균				15.37

4. 결론

가. 간기능 개선 활성 기작구명

(1) 발효율금 실온추출물 정제물 및 발효율금 분말의 *in vitro* 및 *in vivo* 상에서의 간보호 활성평가

선행 연구결과를 바탕으로 발효율금 실온추출물의 알코올성 간손상 보호 유효성분을 밝히기 위해 발효율금 실온추출물의 Amberlite column 정제물을 대상으로 *in vitro* 알코올성 간손상 활성평가를 수행하였다. 모든 연구 시료는 한국인스팜(주)으로부터 공급받아 본 연구에 사용하였다. 알코올성 산화스트레스 평가에 적합한 HepG2/2E1 세포 모델에서 먼저 각 정제물의 세포독성을 평가한 후 간보호 활성을 검토하였다. 발효율금 실온추출

물의 5가지 column 정제물인 FCC-W, FCC-25M, FCC-50M, FCC-75M, FCC-100M을 대상으로 세포독성을 평가하여 세포 안전 범위는 FCC-W의 경우 200 ug/mL, FCC-25M는 50 ug/mL, FCC-50M는 25 ug/mL, FCC-75M는 6.25 ug/mL, 그리고 FCC-100M은 6.25 ug/mL 까지로 확인하였다. 또한 각 최대 안전 범위 농도에서 알코올성 간세포보호 활성을 확인한 결과 FCC-25M이 가장 높은 활성을 나타내었다. 이 결과는 각 정제물의 DPPH 및 ABTs라디칼 소거활성을 평가한 결과와 일치하였다. 즉, 가장 높은 DPPH와 ABTs 라디칼 소거활성을 갖는 정제물인 FCC-25M이 HepG2/2E1 세포에서 알코올성 간손상에 대한 보호 활성도 높게 나타났다. 또한 세포내 알코올로 유도된 ROS 함량을 DCF-DA를 이용하여 평가하였다. FCC-25M 50 ug/mL에서 세포보호활성과 함께 ROS 생성 억제 효과를 나타내었다. 또한 항산화 효소 및 항산화물의 함량을 평가한 결과, 알코올 처리에 의해 통계적으로 유의하게 감소된 CAT, GST, GR, GPx, SOD, GSH의 활성 및 함량이 FCC-25M의 처리에 의해 향상되는 결과값을 얻었다. 이러한 결과를 종합하여 FCC-25M은 알코올성 간손상 보호 유효물질을 함유하고 있는 발효율금 실온추출물의 Amberlite column 정제물로 확인되었다. 이 후 주관기관에서 FCC-25M을 대상으로 Prep-LC를 수행하여 4개의 서로 머무름시간을 갖는 Prep-LC fraction들을 분리하여 제공하였다. 이에 본 연구진은 정제된 Prep-LC를 대상으로 HepG2/2E1 세포에 각 정제물을 동일 농도에서 예비 처리하고 알코올로 세포 손상을 유도한 후 세포보호 활성을 비교하였다. 그 결과, FCC-25M-1과 FCC-25M-2가 FCC-25M과 유사한 알코올성 간손상 보호활성을 나타내었다.

발효율금 분말의 알코올성 간손상 보호활성 및 항산화 방어 효소 시험에 관한 연구는 발효율금 분말을 대상으로 C57BL/J mice를 이용하여 연구하였다. 발효율금 분말을 5일간 예비투여한 후 3일간 5 g/kg/day의 알코올을 투여하고 혈청의 간손상 바이오마커 및 항산화 효소 활성을 평가하였다. 선행연구에서 수행되었던 결과를 바탕으로 시료는 100 mg/kg b.w./day와 300 mg/kg b.w./day로 경구투여하고 마지막 알코올 투여 6시간 후에 실험동물을 해부하여 항산화 효소 활성을 평가하였다. 혈청의 간손상 바이오마커인 AST 및 ALT는 알코올 투여에 의해 현저히 증가되었으나, 발효율금 분말을 투여한 마우스에서는 알코올 투여에 의한 간손상의 억제가 확인되었다. 발효율금 분말의 알코올성 간손상 보호 활성 기작구명을 위해 CAT 등 항산화 효소와 GSH 함량, 지질과산화물의 함량을 평가한 결과, 알코올 투여로 감소되는 항산화 효소의 활성과 GSH의 함량은 발효율금 분말 투여로 인해 항산화 효소인 CAT와 SOD의 활성이 감소하지 않고 보호됨을 확인 할 수 있었다. 또한 알코올 투여군에서 현저히 증가된 지질과산화물의 함량이 발효율금 분말 투여군에서 통계적으로 유의하게 감소되는 것을 확인하였다. CYP2E1 발현을 평가한 결과 알코올에 의해 증가되는 CYP2E1 발현이 발효율금 투여로부터 감소되는 것을 확인하였고 이로써 알코올에 의해 유도되는 ROS 생성 유도를 발효율금 분말 섭취가 감소시킴으로써 산화적 스트레스로부터 간세포 및 조직을 보호할 수 있을 것으로 사료된다.

이상의 결과로부터, 발효율금 실온추출물의 정제물 및 발효율금 분말은 알코올에 의해 유도된 간 손상으로부터 보호효과가 있는 것으로 확인되었다. 발효율금 실온추출물의 Amberlite column 정제물 중 FCC-25M에 알코올성 간 손상 보호 유효성분이 함유되어 있을 것으로 추정할 수 있다. 또한 발효율금 분말을 이용한 *in vivo* 알코올성 간손상 보

호 활성 평가 결과로부터 발효울금 분말의 섭취는 알코올성 간손상을 보호하며, 이는 CAT, SOD와 같은 항산화 효소의 활성 강화 및 GSH 함량의 증가, 지질과산화물의 감소, CYP2E1 mRNA 발현 억제를 통해 알코올성 산화스트레스 조절(억제 및 소거)에 기여할 것으로 추정할 수 있다. 따라서 본 연구 결과는 향후 발효울금을 이용한 알코올성 간손상 보호활성 함유 제품화를 위한 기초 자료로써 활용될 수 있을 것으로 사료된다.

(2) 발효울금분말 및 건강기능식품의 *in vivo* 상 간보호 활성비교 평가

발효울금분말의 알코올성 간손상 보호 활성에 관한 추가 연구로 기존 건강기능식품과 효과 비교를 C57BL/6 mice를 이용하여 수행하였다. 발효울금분말과 밀크씨슬을 5일간 예비투여한 후 3일간 5 g/kg/day의 알코올을 투여하고 혈청의 간손상 바이오마커를 평가하였다. 선행연구에서 수행되었던 결과를 바탕으로 시료는 각 300 mg/kg b.w./day로 경구투여하고 마지막 알코올 투여 6시간 후에 실험동물을 해부하여 혈청의 간손상 바이오마커인 AST 및 ALT를 평가하였다. 투여한 발효울금분말과 밀크씨슬의 경구투여는 실험동물의 체중에 영향을 주지 않았다. 또한, 각 조직의 상대 무게에서 실험군별 차이를 나타내지 않았다. 그러나 알코올 투여에 의해 AST 및 ALT 효소활성은 현저히 증가되었고, 발효울금분말과 밀크씨슬을 투여한 마우스에서 AST 및 ALT 활성이 정상적인 수준으로 나타났다. 따라서 발효울금분말과 밀크씨슬은 유사한 활성을 나타내는 것으로 판단할 수 있으며, 향후 본 연구결과를 추가로 뒷받침할 수 있는 알코올성 간손상 기작연구를 통해 선행연구에서 제시된 과학적 결과에 대한 추가적인 해석을 할 수 있을 것으로 사료된다.

나. 체지방 감소 건강기능식품 소재 개발

(1) 발효울금 주정추출물의 체지방 감소 활성 평가

비만이란 섭취 에너지가 필요 소비 에너지량보다 초과될 때 잉여 에너지가 중성지방의 형태로 지방조직이나 장간막에 축적되어 대사 이상을 초래하여 혈액이나 장기 조직의 지질 성분에 변화가 일어나는 현상을 말한다. 비만은 과도한 음식섭취와 운동부족 등의 환경적 요인, 시상하부 병변, 갑상선 이상, 뇌하수체 전엽 이상, 다른 질환의 이차적 합병증 등의 호르몬 요인, 유전적 요인, 스트레스 등의 심리적 요인, 스테로이드제 등의 약물 남용 등에 의해 발생한다. 단순히 외형상의 문제뿐만 아니라 뇌졸중, 고혈압 및 제 2형 당뇨병, 동맥경화, 고지혈증, 심근경색 등의 심혈관질환, 신장 질환, 담석 및 담관 질환 등의 신체적 및 정신적 건강문제를 발생시킬 수 있는 만성질환들과 밀접한 관계가 있기 때문에 이에 대한 예방 및 관리가 중요한 실정이다(49,50).

울금을 발효한 후 50%주정으로 추출, 감압여과 및 농축, 동결건조 과정을 거쳐 발효울금 50%주정추출물(FCE50)은 제조되었다. 제조된 FCE50을 이용하여 기능성 성분인 페놀성 화합물 함량 및 플라보노이드 함량을 측정하고, 라디칼 소거 활성 및 지질과산화 억제활성을 측정하여 항산화 활성을 평가하였다. 또한 3T3-L1세포를 이용한 *in vitro* assay에서는 분화 중 FCE50을 분화시약과 함께 처리하여 지방구 축적 억제활성을 평가하였으며, *in vivo* assay에서는 SD rat을 대상으로 고지방식이 섭취 하에 12주간 FCE50을 투여하여 체중변화와 식이섭취량 및 음수섭취량, 간의 형태학적 손상 및 변화, 조직들의 무게 변화, 혈청 및 간에서의 지질 profiles 및 체지방 감소 바이오마커들을 측정하

여 FCE50의 체지방 감소 효과를 평가하였다.

FCE50의 기능성 성분 및 항산화 활성을 평가 한 결과 총 페놀성 화합물은 $2.38 \pm 0.16\%$, 총 플라보노이드는 $1.80 \pm 0.16\%$ 를 함유되어 있었으며, DPPH 라디칼 소거 활성이 28.9%, ABTs는 42.2%의 라디칼 소거 활성을 나타내었다. 이러한 기능성 성분 함량 및 라디칼 소거 활성 평가 결과로부터 FCE50은 항산화 활성이 있음을 추정할 수 있다. FCE50의 3T3-L1 세포에 대한 지방형성 억제 실험의 적정농도를 확인하기 위해 세포독성의 정도를 확인한 결과 400 ug/mL의 농도에서 45%의 세포사멸이 나타나 지방구 생성 억제 활성은 유의성 있는 세포독성이 나타나지 않는 농도 범위인 250 ug/mL 이하의 농도에서 활성을 검증하였다.

FCE50의 분화 동안 지방세포에서의 지방형성 억제 활성 정도를 지방구 축적에 따른 Oil Red O염색을 통해 알아본 결과, 대조군과 비교하여 250 ug/mL의 농도에서 25%의 감소 효과를 나타내었다. 또한 세포 내에 함유되어 있는 지방구의 주성분인 중성지방의 함량을 AdiporedTM을 통해 알아본 결과, 대조군과 비교하여 250 ug/mL의 농도에서 29%의 감소효과를 나타냈다. 지방세포는 잉여의 에너지가 공급되면 중성지방의 형태로 지방구내에 저장하고 에너지 공급이 부족하면 이를 분해하여 지방산을 방출하게 되는데, 위의 실험 결과들을 통해 FCE50이 지방세포의 지방구 축적 억제 활성을 가지고 있음을 확인 할 수 있었다.

고지방식이를 섭취한 SD rat에서 FCE50의 체중 및 체지방에 미치는 영향을 관찰한 결과, 일반식이를 섭취한 대조군에 비하여 고지방식이군의 체중이 높게 나타났으며, 500 mg/kg/day의 FCE50 섭취군에서 고지방식이군에 비해 유의적으로 체중이 감소한 결과를 나타내었다. 간, 신장, 비장, 정소 등의 조직 무게에는 식이섭취가 영향을 주지 않았지만, 각 군별 white adipose tissue의 무게인 epididymal white adipose tissue 및 perirenal white adipose tissue의 경우 고지방식이군에 비하여 500 mg/kg/day의 FCE50 섭취군에서 통계적인 유의적 차이를 나타냈다. 이러한 결과로부터, FCE50은 체중과 white adipose tissue의 무게에 유효한 결과를 나타내는 것으로 평가되었다.

FCE50의 식이섭취를 통한 혈청 내 지질 농도를 측정한 결과 중성지방은 고지방식이군과 비교하여 가르시니아캄보지아 껍질추출물과 FCE50 투여군에서 유의적으로 낮은 농도를 나타냈다. 또한, 혈청 총 콜레스테롤은 고지방식이군에 비해 가르시니아캄보지아 껍질추출물과 500 mg/kg/day의 FCE50 섭취군에서 유의적으로 낮게 나타났다. 혈청 HDL 콜레스테롤을 측정한 결과, 고지방식이군과 비교하였을 때, 가르시니아캄보지아 껍질추출물과 FCE50 고농도 군에서 유의적으로 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 중성지방은 각종 지방조직의 주성분으로 생체의 에너지 저장에 관여하고, 고지방식, 고칼로리식, 고당질식, 비만, 지방간 등에서 증가하는 경향을 보이기 때문에, 중성지방의 측정은 지질 대사 이상의 해결에 매우 중요한 지표가 된다(46). 또한, 혈청 콜레스테롤 농도는 주로 간 및 장관에서의 콜레스테롤 생성, 흡수, 이화에 관계하는 인자에 의해 영향을 받기 때문에 총 콜레스테롤의 함량 측정은 체내 지질대사 이상의 지표로서 중요하다(46). 혈중으로 유출되는 HDL 콜레스테롤은 말초조직으로부터 콜레스테롤을 간으로 운반하여 제거하는 작용을 하여, 혈중 HDL 콜레스테롤 농도가 증가하면 각종 동맥경화증을 예방할 수 있다(46). 이러한 FCE50의 혈청 지질 profile에 대한 유효한 효과는 비만 예방 측면에서 긍정적인 결과를 나타낼 것으로 판단 할 수 있었다.

지방형성 기전에 관련된 pAMPK와 SREBP-1c 단백질의 발현양을 western blot을 통해 평가한 결과, pAMPK은 Con 군과 비교하여 P.con 군에서 유의적으로 그 발현양이 감소하였으며, 가르시니아카보지아 껍질추출물과 FCE50 섭취군은 P.con 군과 비교하여 유의적으로 단백질 발현양이 증가하였다. SREBP-1c 단백질 발현양은 Con 군과 비교하여 P.con 군에서 그 발현양이 유의적으로 증가하였으며, 가르시니아카보지아 껍질추출물과 500 mg/kg/day의 FCE50 섭취군은 SREBP-1c 단백질 발현양이 유의적으로 감소하는 것을 확인하였다. 지방합성 기전과 관련된 인자인 PPAR γ , CEBP α , FAS, aP2와 LPL의 mRNA 발현율을 RT-PCR로 평가한 결과, 고지방식이군에 비하여 FCE50 투여군에서 유의적으로 감소하는 경향을 나타내었다. 지방축적을 증가시키는 지방형성 관련 유전자 발현을 자극하는 전사인자들인 C/EBP family 및 PPAR family 등이 협동적으로 촉진하여 지방조직 특이 유전자들의 발현을 유도하고 성숙한 지방조직 형질을 나타나게 하는데 FCE50이 영향을 미치는 것으로 사료된다. 또한, 수많은 펩타이드 등이 지방세포에서 분비되는데, 이러한 분비물질 및 수용체의 이상으로 비만에서 발생하는 다양한 만성질환과 관련된다는 것이 밝혀지고 있으며, 지방세포에서 분비되는 이러한 물질들을 adipocytokine이라 한다(51). 그 대표적인 물질인 adiponectin mRNA 발현량을 확인한 결과, Con 군과 비교하여 P.con 군에서 유의적으로 발현량이 감소하였으며, P.con 군과 비교하여 가르시니아카보지아 껍질추출물 및 500 mg/kg/day의 FCE50 섭취군에서 발현량이 유의적으로 증가하였다. 이러한 결과로부터 FCE50 투여군의 체지방감소는 에너지 항상성에 관여하는 AMPK의 활성화 형태인 pAMPK의 발현양이 증가하여 지방생성과 관련된 SREBP-1c의 발현이 억제됨으로써, 하위인자인 PPAR γ , CEBP α , FAS, aP2와 LPL mRNA의 발현을 감소시키며, adipocytokine 중의 하나인 adiponectin의 발현을 증가시켜 지방합성 기작을 억제함으로써 발생하는 것으로 판단된다.

본 연구를 통해 FCE50은 3T3-L1을 이용한 *in vitro* 연구에서 지방구 형성억제 활성을 보였으며, 고지방식을 섭취한 rat을 이용한 *in vivo* 연구에서 체중 및 체지방 감소를 나타냄을 확인하였다. 또한 혈중 중성지방을 낮추고, 총 콜레스테롤 및 HDL 콜레스테롤에 유의한 결과와 지방합성 유전자의 저해를 나타내었다. 이는 FCE50이 지방세포의 지방형성 억제에 작용을 함으로써 체지방 감소 작용을 나타내었을 것으로 추정할 수 있다. 따라서 FCE50은 산업적으로 응용 가능한 체지방 감소 생리활성을 갖는 소재로써 향후 항비만 기능성 식품개발에 응용될 수 있을 것으로 사료된다.

(2) 발효율금주정추출물로부터 분획한 에틸아세테이트 층의 지방형성 억제활성 및 기작구명

선행 연구결과를 바탕으로 발효율금주정추출물의 체지방 감소 유효성분을 밝히고자 발효율금 주정추출물로부터 분획물을 대상으로 *in vitro* 상에서 지방형성 억제활성에 기전에 관한 연구를 진행하였다. 3T3-L1 세포에 분화과정 중 발효율금주정추출물로부터 분획한 핵산층(FCEH), 클로로포름층(FCEC) 그리고 에틸아세테이트층(FCEE)의 세포독성을 평가한 결과, FCEH와 FCEC는 저농도(40 ug/mL)에서 세포독성을 나타냈지만, 이에 비해 FCEE는 300 ug/mL에서 유의적으로 세포성장과 분화에 영향을 나타내었다. 따라서 안전범위가 넓게 나타나고, 세포독성이 상대적으로 낮은 FCEE를 이후 실험에 사용하였으며, 50, 100 및 200 ug/mL의 안전한 농도에서 연구를 수행하였다. FCEE가 전지방세포

에서 지방세포로의 분화를 억제시키는지 확인하기 위해 지방세포 분화 동안 FCEE를 처리하여, 8일째에 Oil Red O염색을 하였다. Oil Red O염색시약은 중성지질, 콜레스테롤 등과 결합하며, 지방분화로 인해 축적된 대부분의 지질은 중성지방으로 염색된 세포의 붉은색 정도를 통해 분화 정도를 확인 할 수 있다(52). 그 결과 완전히 분화된 세포와 비교하였을 때, FCEE 200 ug/mL의 농도에서 지방세포 양이 10.2% 유의적으로 감소하였다. 더욱 정확한 확인을 위해 세포내 지방구를 AdipoRed™염색을 통해 측정한 결과 완전 분화된 지방 세포에 비하여 FCEE 200 ug/mL를 처리하였을 때 지방세포 양이 13.7% 유의적으로 감소하였다. 이러한 결과는 3T3-L1 전지방세포 분화동안 FCEE가 지방세포 분화를 억제함으로써 지방형성이 억제되는 것으로 사료된다.

지방세포의 분화 시 유입되는 포도당이 중성지방으로 합성, 축적되므로 FCEE가 지방세포 분화억제에 미치는 영향을 확인하기 위하여 세포내 포도당 유입량과 세포배양액으로 방출되는 유리 글리세롤 양을 측정하였다. Glucose transport 4(GLUT4)는 지방세포와 근육세포에서 주로 존재하는 포도당 수용체이며 인슐린의 작용으로 세포내로부터 세포막에 포도당 수송을 원활하게 하며 포도당 유입을 조절한다. 지방세포로 유입된 포도당은 해당과정을 통해 glyceraldehyde-3-phosphate와 dihydroxyacetone-phosphate를 거쳐 글리세롤로 전환되고, 지방산과 결합하여 중성지방을 생성하게 된다. 그러므로 지방세포내로 포도당의 유입은 지방세포 내 지방의 축적에 중요한 역할을 한다고 볼 수 있다(41). 따라서 FCEE가 지방형성 억제에 미치는 영향을 확인하고자 포도당 유입량을 확인한 결과 FCEE를 200 ug/mL의 농도로 처리했을 때 완전 분화된 지방세포와 비교하여 그 양이 36.6% 유의적으로 감소하는 것을 확인하였다.

지방구내 중성지방의 분해와 유리 글리세롤의 배출은 에너지 평형의 조절에 중요하다. 지방세포 내 축적된 지방구에 존재하는 중성지방이 분해되면 글리세롤과 지방산으로 나누어지며, 분리된 글리세롤은 세포외 혈액으로 유리되어 간으로 이송된다(41). 따라서 3T3-L1 지방세포에서 유리된 글리세롤의 함량을 통해 지방구내 중성지방의 분해 정도를 간접적으로 확인할 수 있다. 본 연구 결과, 8일동안 FCEE 50, 100 및 200 ug/mL의 농도로 배양한 배지에서 유리 글리세롤 함량이 각각 21.4%, 16.8% 그리고 57.9%로 통계적으로 유의하게 감소하였다. 이는 3T3-L1 전지방세포의 분화과정 동안 FCEE를 처리함으로써 분화가 억제되어 배양액으로 배출되는 유리 글리세롤의 총량이 감소한 것으로 사료된다. 이 결과들을 토대로 FCEE가 지방세포 분화억제를 통해 지방축적을 억제하는 것을 확인하였다.

FCEE의 지방형성 및 지방분해 기을 밝히기 위해 FCEE를 8일간 처리한 후 관련된 효소와 전사인자들의 발현량을 확인하였다. FCEE의 처리로 에너지 평형에 관여하는 AMPK의 발현량이 증가하였으며, 지방생성과 관련된 SREBP-1c의 발현을 억제하였으며, 하위인자인 C/EBP α 와 PPAR γ 의 발현이 감소하였다. 위의 결과를 종합하여 볼 때 FCEE가 지방합성에 관여하는 전사인자의 mRNA 발현을 조절함으로써 지방합성 기작을 억제하는 것으로 사료된다. 형성된 중성지방은 지방분해 과정을 통해 지방산과 글리세롤로 가수분해 되는데, 중성 지방의 분해는 지방구 표면에 있는 perilipin A 단백질의 보호에 의하여 억제된다. 그러나 인슐린과 에피네프린 등의 호르몬 조절을 통해 protein kinase A(PKA)가 활성화되면, 이는 perilipin A와 HSL를 인산화 시켜 HSL이 지방구 표면으로 이동하고 perilipin A의 역할이 완화되어 지방구 표면의 구조적 변화가 일어난다

(53). 이 후 ATGL과 HSL의 작용에 의하여 지방으로부터 분해된 유리 지방산과 글리세롤은 에너지를 생산하거나 세포 신호전달과 지방합성에 이용된다. 이에 관련된 perilipin A mRNA 발현량이 FCEE 200 ug/mL의 농도에서 감소하고, ATGL과 HSL mRNA 발현량이 FCEE 200 ug/mL 처리한 군에서 증가한 것으로 보아 지방분해 기작을 촉진시키는 것으로 사료된다. 활성화된 AMPK는 acetyl-CoA에서 malonyl-CoA를 합성하는 acetyl-CoA carboxylase의 작용을 억제한다. 이 결과 malonyl-CoA의 농도가 감소하면 long-chain fatty acyl CoA가 미토콘드리아내로 이송에 관여하는 효소인 CPT1이 활성화되어 지방산 베타산화 증가하게 된다. 본 연구의 결과 FCEE 200 ug/mL를 처리한 군에서 CPT1 mRNA의 발현이 증가하는 것으로 보아 지방산 베타산화 기작을 촉진시키는 것으로 사료된다.

위의 결과들을 종합하여 볼 때, FCEE는 3T3-L1 지방세포에서 세포내 중성지방의 축적, 포도당 유입과 유리된 글리세롤합량을 감소시켰다. 이러한 FCEE의 지방구생성억제 활성은 지방합성 유전자 발현을 억제시키고, 지방분해와 지방산 베타산화와 관련된 유전자 발현을 증가시키는 기작과 관련 있는 것으로 추정된다. 따라서 향후 발효올금주정추출물의 유효성분을 탐색하는데 있어 기초자료로서 이용될 수 있을 것으로 사료된다.

(3) 발효올금 주정추출물 유효성분의 지방형성 억제 효과

선행 연구결과를 바탕으로 발효올금주정추출물의 유효성분을 밝히고자 curcumin과 BDMC를 대상으로 *in vitro* 상에서 지방형성 억제활성 기전구명에 관한 연구를 진행하였다. 3T3-L1 세포에 분화과정 중 curcumin과 BDMC의 세포독성을 평가한 결과, FCEE와 FCEC는 저농도(40 ug/mL)에서 세포독성을 나타냈지만, 이에 비해 FCEE는 300 ug/mL에서 유의적으로 세포성장 및 분화에 영향을 나타내었다. 따라서 안전한 농도인 curcumin 5 uM과 BDMC 2.5 uM로 이후 연구를 수행하였다. Curcumin과 BDMC가 전지방세포에서 지방세포로의 분화를 억제시키는지 확인하기 위해 지방세포 분화 동안 시료를 처리하여 Oil Red O염색을 하였다. 그 결과 완전히 분화된 세포와 비교하였을 때, curcumin과 BDMC는 지방세포 양을 유의적으로 감소시켰다. 더욱 정확한 확인을 위해 세포내 지방구를 AdipoRed™염색을 통해 측정된 결과 완전 분화된 지방 세포에 비하여 curcumin과 BDMC의 처리는 지방세포 양을 유의적으로 감소시키는 효과가 있음을 재확인하였다. 이러한 결과는 3T3-L1 전지방세포 분화동안 curcumin과 BDMC가 지방세포 분화를 억제함으로써 지방형성의 감소를 이끈 것으로 판단된다.

지방세포의 분화 시 유입되는 포도당에 대하여 curcumin과 BDMC가 미치는 영향을 조사하고자 세포내 포도당 유입량을 측정하였다. 그 결과, 완전 분화된 지방 세포에 비하여 curcumin과 BDMC의 처리는 지방세포 내 포도당 유입량을 유의적으로 감소시키는 효과가 있음을 확인하였다. 이상의 결과들을 토대로 curcumin과 BDMC가 지방세포 분화 억제를 통해 지방축적을 억제하는 것을 확인하였다.

Curcumin과 BDMC의 지방형성 억제 기작을 밝히기 위해 curcumin과 BDMC를 처리한 후 지방형성과 관련된 효소인 ACC의 발현양을 확인하였다. 선행연구에서, FCEE50과 FCEE의 처리로 에너지 평형에 관여하는 AMPK의 발현양이 증가하였으며, 지방생성과 관련된 SREBP-1c의 발현을 억제하였으며, 하위인자인 C/EBP α 와 PPAR γ 의 발현이 감소하였다. 또한 *in vivo* 실험에서 FCEE50의 영향으로 인산화된 AMPK의 활성이 증가하

고, ACC의 활성을 억제하는 결과를 확인하였다. 따라서, 선행된 연구에서 확인한 인자들 중 지방형성과 관련된 주요 효소인 ACC의 mRNA 발현양을 측정하였다. 본 연구의 결과 curcumin과 BDMC를 처리한 군에서 ACC mRNA의 발현이 감소하는 것으로 보아 curcumin과 BDMC가 발효율금주정추출물이 함유하고 있는 지방생합성 형성 억제 유효성 분임을 확인할 수 있었다.

*In vitro*와 *in vivo* 연구에서 체지방감소 활성 소재로 선정된 발효율금 50%주정 추출물을 대상으로 추출공정 표준화 연구를 수행하였다. 추출물의 수율은 56.5%였으며, 지표성분으로 설정한 Curcumin은 15.37ug/g이 검출되었다. 이로서 발효율금 50%주정 추출물은 체지방감소 활성을 가지는 건강소재로 산업화 가능성을 확인하였다.

7절. 면역증강 건강기능식품 소재개발

1. 서론

율금 추출물의 동물실험 결과를 바탕으로 개별인정형 건강기능식품 원료 인정을 위한 연구를 수행하고자 한다. 식품의약품안전처의 개별인정형 건강기능식품 원료 인정신청서 작성을 위한 “기원, 개발경위, 국내·외 인정 및 사용현황 등에 관한 자료”, “제조방법 및 그에 관한 자료”, “원료의 특성에 관한 자료”, “기능성분(또는 지표성분) 규격 및 시험방법에 관한 자료”, “유해물질에 대한 규격 및 시험방법에 관한 자료”, “안전성에 관한 자료, 기능성 내용 및 그에 관한 자료”, “섭취량, 섭취방법, 섭취 시 주의사항 및 그 설정에 관한 자료”, “의약품과 같거나 유사하지 않음을 확인하는 자료”를 작성하고자 한다.

율금(*Curcuma longa*. L)은 생강과에 속하는 다년생 식물로 구근을 건조하여 분말화한 것을 심황이라고도 부르며 향은 순한 단맛을 지니고 있고 뿌리는 노란색인데 커리와 머스터드의 주원료 중의 하나로서 착색료 및 향신료로 이용되어져 왔다. 원산지가 인도로 알려져 있으며 남방지역에서 많이 재배되어지고 있고 연구를 통하여 여러 기능들이 알려져 있다. 그러나 율금을 실용화 및 산업화함에 있어 강한 향취와 매운맛으로 인하여 그 이용이 저해되어져 왔다. 현재까지 율금을 이용한 연구에서는 일반적으로 추출물을 응용하는 방법들이 대부분을 이루고 있으나 효율성 또는 상업화 가능성을 고려해 볼 때 필수적으로 향취 및 매운맛을 완화시킬 필요성이 있다. 최근 발효 등의 기법을 응용한 생물전환물질의 개발이 기존에 사용해 오던 추출물들의 효율성 및 기능성을 향상시킬 수 있는 새로운 방안으로 등장하고 있다(1-3). 이에 본 연구에서는 율금의 *in vitro* 세포계 예비실험을 통해 면역증강 효과가 탁월한 것으로 확인한 바 있으며, 국내에서 아직 심도 있는 연구가 수행되지 못했던 율금과 발효율금 면역증강 기능성에 대한 보다 구체적인 *in vitro* 분자 작용기전의 확인 및 *in vivo* 동물실험에서의 효과 규명을 수행하고자 하였다.

2. 방법

가. 율금추출물과 발효율금추출물로부터 *in vitro* 세포계 통한 생리활성 확인

(1) 율금 및 발효율금 추출물의 세포 독성시험

각 시료의 분획별 추출물(실온, 열수, 20%주정, 80%주정)을 대상으로 각 시료의 세포

독성을 보기 위해 MTT [(3-(4,5-dimethylthiazol -2-yl)-2,5-diphenyl -tetrazolium bromide)]를 이용하여 cell viability 측정하였다. RAW264.7 cell을 대상으로 하여 시료의 독성을 측정함. 상기 독성검사를 끝으로 최대 활성, 유효효능 및 무독성을 보인 시료를 각 과제별 최종시료로 선정하여 나머지 *in vitro* test를 실시하였다. (주정 80%추출물만 DMSO에, 나머지는 증류수로 녹여서 사용)

RAW 264.7 cell을 10% Fetal Bovine Serum, 1% Penicillin, 0.1% Gentamicin, 1% L-glutamine, 1% sodium pyruvate, 1% HEPES 1M 을 함유한 DMEM 배지에서 배양시켜 96 well plate에 세포수가 10^4 cell / well 가 되도록 seeding 한 후 24시간 지난 후 각각의 시료를 처리한다. 시료처리 후 24시간 뒤에 0.5mg/mL MTT를 각 well에 처리한 후 37° C, 5% CO₂의 조건하에서 3시간동안 배양한 후 상층액을 제거한다. 100% dimethylsulfoxide 200ul를 넣은 다음 20분 간 잘 혼합하여 침전물을 용해시켜 micro plate reader를 사용하여 540nm에서 O.D를 측정하여 cell viability 측정하였다.

(2) 선정된 시료를 대상으로 *in vitro*상에서 대식세포의 활성화 측정

(가) 복강대식세포 및 RAW 264.7 cell line에서의 탐식능 측정

7주령의 Balb/c 마우스에 2ml의 thioglycollate medium(복강에 주사하면 복막에 자극이 되어 1차 면역반응으로 복강 내에 macrophage를 분비하게 됨)을 부검하기 3일 전에 복강주사 한 후, 부검 당일 DMEM medium 8ml을 복강에 넣고 마사지를 충분히 하고 회수한다. RAW 264.7 cell과 회수한 복강대식세포를 96well plate 각 well 당 10^4 cell 씩 seeding하고 37° C, 5% CO₂에 overnight incubation 시킨다.

Sample처리 후 2시간 incubation 후 다음 표와 같이 Zymosan, Inhibitor 10μl 각 well에 처리 후 2시간 incubation시켰다. serum-free medium(DMEM, RPMI) 2회 washing 후 fixation solution 100μl를 첨가하고 상온에서 5분간 incubation 후 1X PBS 2회 washing 한다. 1X blocking reagent 100μl 첨가하여 상온에서 60분 동안 shaking 후 1X PBS 3회 washing 한다. 1X permeabilization solution 100μl을 첨가 후 상온에서 5분 간 incubation 후 washing하여 1X Detection reagent를 100μl씩 첨가 후 상온에서 60분 동안 shaking시킨 다음 1X PBS 3회 washing 한다. 각 well에 detection buffer 50 μl씩 첨가하여 상온에서 10분 동안 shaking한 뒤 100μl substrate를 첨가시켜봄으로써 15분 동안 반응을 일으킨 후 405nm에서 각 well의 흡광도를 읽는다.

Group
cell only
Zymosan 처리
Inhibitor 처리
Inhibitor +Zymosan 처리
울금 및 발효울금 추출물+Zymosan 처리

(나) RAW 264.7 cell에서 발효울금 추출물과 울금 추출물의 nitric oxide 생성능 측정
Nitric oxide (NO-)는 L-arginine이 nitric oxide synthase (NOS)에 의해 citrulline으

로 전변되면서 생성되는 radical으로써 이와 같은 NO-는 macrophage-mediated cytotoxicity의 effector molecules로 mitochondrial respiration이나 DNA synthesis등을 저해하는 역할을 수행한다. 또한 NO는 anti-tumor immune response를 저해하는 suppressive factor의 하나로 인식되면서 많은 관심을 일으키고 있는 물질이다. nitric oxide의 반감기는 매우 짧기 때문에 정확하게 검출할 수 없다는 단점이 있다. 따라서 nitric oxide의 생체 내 전변물질인 nitrite (NO₂-)를 간접적으로 측정함으로써 nitric oxide양을 측정한다. 또한, Nitrite를 이용하여 Standard curve를 그려 정량에 이용한다. 96-well plate의 각 well에 RAW 264.7 cell을 10⁴cell/well 채운 뒤 24시간 배양 후 다음과 같이 처리한다. 72시간 후 배양액 중 NO양을 측정하기 위하여 상층액을 50μl을 96well plate에 옮긴 후 Griess Reagent 50μl를 가한 후 15분 이내에 540nm 흡광도에서 OD값을 측정한다. 산화질소의 생성량이 많을수록 색은 붉은 색에 가깝고, 그와 반대로 생성량이 적을수록 색은 노란색에 가깝다.

Group
cell only
lipopolysaccharide(LPS) 0.1μg/ml
울금 및 발효울금 추출물
LPS 0.1μg/ml +울금 및 발효울금 추출물

(다) RAW 264.7 cell에서 발효울금 추출물과 울금 추출물의 TNF-α 생성능 측정

96 well plate의 각 well에 RAW 264.7 cell을 10⁴cell/well 처리한 후 24시간 동안 37° C, 5% CO₂ 조건하에서 배양한 후 다음 표와 같이 최대농도와 유효농도의 발효울금, 울금의 추출물과 LPS를 1μg/ml의 농도로 well에 넣은 후 2시간동안 배양하여 생성된 TNF-α 양을 DuoSet sandwich ELISA Mouse TNF-α kit(R&D systems)를 사용하여 측정한다.

Group
cell only
lipopolysaccharide(LPS) 1μg/ml
울금 및 발효울금 추출물
LPS 1μg/ml +울금 및 발효울금 추출물

코팅 된 96-well plate에 TNF-α 측정에 특성화 된 1차 항체를 PBS에 희석해 100 μl씩 분주해 하루 동안 처리한다. 그 다음날, washing buffer (PBST, 0.05% Tween 20 in PBS)로 1차 항체를 씻어낸 뒤, 항체가 붙지 않은 plate의 다른 공간을 메워주기 위해 assay buffer (1% BSA in PBS)를 넣어 2시간 동안 처리한 뒤 washing buffer로 씻어낸다. Standard curve를 위한 용액과 위에서 샘플 처리한 RAW 264.7 세포 배양액을 100μl씩 각 well에 넣어 2시간 동안 반응시킨다. 반응이 끝난 뒤 washing buffer로 씻어내고 assay buffer에 2차 항체를 희석시켜 준비한 뒤 각 well에 100μl씩 분주하고 2

시간 동안 처리한다. 이 과정이 끝나면 washing buffer를 이용해 plate를 씻어내고 발색을 도와주는 시약을 넣어 반응 시킨 뒤 570nm에서 흡광도를 측정함. standard curve를 이용해 세포에서 생성된 사이토카인 양을 계산한다. 생성된 사이토카인의 양이 많을수록 진한 파란 빛을 낸다.

(라) YAC-1 세포주에 대한 자연살해 활성화 기능측정

NK 세포(암세포를 직접 파괴하는 면역세포)의 분리 및 배양을 위해 6주령된 C57BL/6 마우스를 경추탈골로 희생시킨 다음 70% 에탄올로 복부를 소독한 후 비장을 무균적으로 적출함. 멸균된 homogenizer로 비장을 균일화 시킨 다음 50ml Cornig tube에 40-mesh 크기의 망을 올려 놓음. 10% Fetal Bovine Serum(FBS), 1% Penicillin이 포함된 RPMI 1640 배양액으로 적신 후 균일화 된 비장을 통과시켜 다시 RPMI 1640으로 2회 washing한다. 적혈구를 제거하기 위해 적혈구 용해 용액과 PBS를 동량으로 혼합한 용액에서 적혈구를 파괴한 다음 PBS용액으로 다시 두 번 동일한 방법으로 washing하여 trypan blue dye exclusion test로 세포의 생존 정도를 확인한 후 배양한다. 조직배양액은 10% Fetal Bovine Serum(FBS), 1% Penicillin이 포함된 RPMI 1640 배양액을 이용하여 37° C, 5%의 CO₂ 배양기에서 배양한다.

NK세포의 세포독성능력을 보는 방법으로 NK세포가 암세포의 일종인 YAC-1 세포(NK sensitive cell line)을 공격하여 파괴된 YAC-1 세포로부터 유리된 LDH를 측정하는 방법(Cytotox 96 Non-radioactiv Cytotoxicity assay)을 이용한다. 96well plate에 1×10³/100μl가 되도록 YAC-1세포수를 조정하고 NK세포와 같이 배양함. Effector-to target 세포비가 1:5가 되도록 세포수를 달리하여 37° C, 5%의 CO₂의 배양기에서 4시간 동안 반응이 되도록 배양한다. 상층액을 채취하기 45분 전 Target cell maximum LDH Realease control이 있는 well에 10μl의 Lysis solution(10X)를 첨가한다. 세포배양 4시간 후 4분간 원심분리하여 LDH가 유리된 상층액 50μl만을 채취하여 96well plate에 다시 옮긴다. reconstitute된 substrate mix 50μl를 각 well에 첨가한 후 30분간 빛을 피해 실온에서 배양시킨 후 490nm에서 흡광도 측정한다. spontaneous LDH측정을 위한 well에는 배양액만을 첨가하고 YAC-1 세포로부터 유리된 LDH의 최대치를 알기 위한 maximum LDH well에는 Lysis solution을 첨가하여 세포가 완전히 용해되도록 배양하고, 독성의 백분율(% of cytotoxicity)은 각각의 배양액으로부터 유리된 LDH로 다음과 같은 공식을 이용한다.

$$\%cytotoxicity = \frac{\text{Experimental} - \text{Effectorspontaneous} - \text{Targetspontaneous}}{\text{Targetmaximum} - \text{Targetspontaneous}} \times 100$$

Experimental : 1:5 cell ratio(avg)-culture medium background(avg)

Effector spontaneous : effector spontaneous(avg)-culture medium background(avg)

Target spontaneous : target spontaneous(avg)-culture medium background(avg)

Target maximum : target maximum(avg)-volume correction control(avg)

(마) 쥐의 면역결핍 유발 바이러스인 LP-BM5 바이러스 유전자의 복제억제능을 측정

6well에 SC-1/LP-BM5 virus cell은 90% 정도 자란 것을 사용하여 최대농도, 유효농도의 발효울금 추출물과 울금 추출물을 첨가하여 4시간 후 배지 제거 후 DPBS로 washing하여 RNeasy mini kit(Qiagen) 사용하여 RNA 추출을 실시한다. 350 μ l RLT 첨가하여 cell scrapper로 cell 긁어준 후 모두 QIA shreader column으로 옮긴 다음 2분간 max speed로 centrifuge시킨 후 collection tube만 빼 후 70% ethanol 400 μ l 첨가한다. 700 μ l씩 RNeasy mini spin column(collection tube에 끼운 상태)에 pipet으로 옮긴 후 max speed로 15초간 centrifuge시킨다. collection tube버리고 column에 새로운 collection tube를 끼운 후 RW1 buffer 700 μ l 넣고 다시 max speed 15초간 centrifuge하여 다시 collection tube 교체 후 buffer RPE 500 μ l 첨가하고 10000rpm 15초간 centrifuge를 하였으며 이를 2회 반복한 후 collection tube 버리고 새로 교체 후 RNase-free water 50 μ l 첨가 후 10000rpm 1분 centrifuge하여 RNA를 추출한다. 추출한 RNA를 정량 한 후 cDNA 합성을 위해 iScript cDNA Synthesis Kit (Bio-Rad Laboratories, Inc., CA,USA)를 사용한다. 유전자들의 발현을 측정하기 위하여 SYBR Green (iQ SYBR Green Supermix, (Bio-Rad Laboratories, Inc., CA,USA))을 이용한 실시간 정량 PCR (real time quantitative PCR)을 실시하였고, 기기는 One step Real-Time PCR(Applied Biosystems)을 사용하였다. 모든 유전자의 PCR 산물의 크기는 100bp 내외로 하였고, T_m (melting temperature) 값도 54 $^{\circ}$ C 부근으로 디자인하였다. 각각의 유전자에 대한 PCR primer의 염기서열은 다음과 같음 : GAPDH forward primer 5'-CAT GGC CTT CCG TGT TCC TA-3', reverse primer 5'-GCG GCA CGT CAG ATC CA-3' LP-BM5 def forward primer 5' TCG ACA CTT CC-3'. reverse primer 5'-TTA AGA AGA GG-3' LP-BM5 eco forward primer 5'-CCA ATG TGT CCA TGT CAT TT-3' riverse primer 5'-GCG ATG AGC AGA GAG AGA AAG Real-time PCR 반응은 총 20 μ l 내에 cDNA 2 μ l와 10 μ l의 2X SYBR mix, primer는 각각 100 pmol/ μ l 1 μ l씩 첨가하였고, 나머지는 증류수로 채워 주었다. 모든 유전자에 대하여 PCR증폭 단계는 다음과 같고 증폭 cycle은 40cycle을 실시하였다. Holding stage에서 95 $^{\circ}$ C에서 8분, cycling stage에서 95 $^{\circ}$ C 15초, 60 $^{\circ}$ C 45초, 72 $^{\circ}$ C 45초, Melt curve stage에서 95 $^{\circ}$ C 15초, 60 $^{\circ}$ C 1분, 95 $^{\circ}$ C 15초를 반복하며 각 cycle의 extension 후에 형광값이 기록되었다. mRNA의 상대적인 함량은 자외선 처리와 물 투여군에 대한 상대적인 양으로 나타내었다. 결과의 분석은 Applied Biosystems에서 제공하는 One step System software v2.1로 분석하였다.

나. *In vitro* test결과로부터 얻어진 추출물 중 1종을 선택하여 동물 모델에서의 효능, 독성 및 적정용량을 검증

(1) 안전농도 선택을 위한 동물독성검사

울금 주정 20%추출물 농도별로 2주일 동안 1회 1일 경구 투여하여 AST, ALT, Creatine, Glucose, Urea 측정, 사망률, 일반증상 관찰한 후 농도를 결정하였다. 동물을 희생시켜 얻은 혈액을 16000 rpm에서 20분 동안 원심 분리하여 serum을 얻어서 다음 시험에 사용하였다.

(가) AST : ELISA용 96-well plate에 각 well당 1×10^6 cells을 200 μ l assay buffer로 homogenize 시킨 후 원심 분리 후 assay buffer로 희석시켰음. 96-well

plate에 각 well당 50 μ l씩 sample을 넣어주고, 100 μ l씩 Reaction mix를 넣어준 후 1시간 동안 37°C 에서 incubation 시킨 뒤 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

(나) ALT : ELISA용 96-well plate에 각 well당 1×10^6 cells을 200 μ l assay buffer로 homogenize 시킨 후 원심 분리 후 assay buffer로 희석시켰다. 96-well plate에 각 well당 20 μ l씩 sample을 넣어주고, 100 μ l씩 Reaction mix를 넣어준 후 1시간 동안 37°C 에서 incubation 시킨 뒤 570 nm에서 흡광도를 측정하였다.

(다) Creatine : ELISA용 96-well plate에 각 well당 50 μ l sample에 50 μ l assay buffer를 섞은 후 50 μ l씩 Reaction mix를 넣어주었다. 1시간 동안 37°C 에서 incubation 시킨 뒤 570 nm에서 흡광도를 측정하였다.

(라) Glucose : ELISA용 96-well plate에 각 well당 2 μ l sample에 50 μ l assay buffer를 섞은 후 50 μ l씩 Reaction mix를 넣어준 후 30분 동안 37°C 에서 incubation 시킨 뒤 570 nm에서 흡광도를 측정하였다.

(마) Urea : ELISA용 96-well plate에 각 well당 2×10^6 cells을 100 μ l assay buffer로 homogenize 시킨 후 원심 분리 후 10 μ l sample에 50 μ l assay buffer를 넣어주고, 50 μ l씩 Reaction mix를 넣어준 후 1시간 동안 37°C 에서 incubation 시킨 뒤 570 nm에서 흡광도를 측정하였다.

(2) LP-BM5 바이러스의 제작

마우스에서 백혈병을 유발하여 면역 체계의 붕괴를 유도하는 설치류성 AIDS 바이러스인 LP-BM5 MuLV 바이러스 혼합물은 비종양성 림프증식성 질환을 가진 성체 마우스에서부터 만들어졌다. 골수의 기질 세포는 바이러스에 감염된 쥐로부터 분리해냈고 그 바이러스를 가진 세포 cell line으로 증식시켰다. 설치류성 RNA 종양 바이러스의 감염은 주로 비장과 림프절과 같은 림프상 기관의 거대화를 유발한다. 숙주의 반응에서 기회감염성 병원균이나 악성 신생물에 대한 저항성 또한 감소시키는 엄청난 면역 억제를 일으킨다. BM5 ecotropic virus의 gag는 65KD 다단백질을 암호화하는 반면에 BM5 defective virus는 60KD의 좀 더 작은 protein을 암호화하고, pol과 env region이 대부분 결손되어 있어 단독으로는 MAIDS를 유도하지 못하기 때문에 BM5 ecotropic virus와 defective virus를 혼합하여 마우스에 주사하면 MAIDS를 유도한다고 알려져 있다. 따라서 마우스의 SC-1 세포에 비종양성 림프증식성 질환을 가진 성체 마우스에서부터 만들어진 LP-BM5 바이러스 DNA를 주입해 세포에서부터 배양액으로 바이러스 입자를 방출하게 하였다.

(3) 실험동물 및 처치

썸타코 실험동물 사육장으로부터 공급받은 20 g 내외의 4주령 암컷 C57BL/6 마우스를 일주일 동안 설치류 사육실에서 적응시킨 후 적응기간 중 일반 상태를 관찰하여 건강한 개체만 실험에 사용하였다. 사육환경은 온도 $23 \pm 3^\circ \text{C}$ 습도 $50 \pm 5\%$ 에서 Light cycle 12 시간으로 유지하였다. 순화기간 중 건강하다고 판정된 동물에 대하여 체중을 측정하고 평균체중에 가까운 개체를 선택하여 무작위법을 이용하여 군 분리를 실시하였

다. 면역과괴 유발 동물 모델을 만들기 위하여 마우스에서 면역체계를 무너뜨리는 바이러스인 LP-BM5를 SC-1 세포의 배양액으로부터 얻은 뒤, 병원균에 민감한 종류인 C57BL/6 마우스에 복강 내 주사로 2회 주입, 바이러스에 감염시켜 백혈병을 유발해 면역을 파괴시켰다. 바이러스에 감염되어 면역 체계가 붕괴된 마우스를 13주 동안 울금 20%주정 추출물을 함유한 식이를 제공하면서 식이량, 체중을 매주 1회씩 측정하고 13주 후 희생시켰다.

Group	면역과괴유발	제공식이
Wild type	-	AIN 93G
Positive control	-	AIN 93G + 홍삼분말 300 mg/kg
울금 (CL)50	-	AIN 93G + 울금 20%주정 추출물 50 mg/kg
울금 (CL)200	-	AIN 93G + 울금 20%주정 추출물 200 mg/kg
울금 (CL)500	-	AIN 93G + 울금 20%주정 추출물 500 mg/kg
Infection	+	AIN 93G
Positive control	+	AIN 93G + 홍삼분말 300 mg/kg
울금 (CL)50	+	AIN 93G + 울금 20%주정 추출물 50 mg/kg
울금 (CL)200	+	AIN 93G + 울금 20%주정 추출물 200 mg/kg
울금 (CL)200	+	AIN 93G + 울금 20%주정 추출물 500 mg/kg

(4) 비장세포 사이토카인 생성 능력 측정 (IL-2, -4, -6, -10, -12, -15, TNF- α , IFN- γ)

비장세포 (Splenic cell)의 분리 및 배양을 위해 실험중인 마우스를 경추탈골로 희생시킨 다음 70% 에탄올로 복부를 소독한 후 비장을 무균적으로 적출한 후, 멸균된 homogenizer로 비장을 균일화 시킨 다음 50 ml Cornig tube에 40-mesh 크기의 망을 올려 놓는다. 10% Fetal Bovine Serum (FBS), 1% Penicillin이 포함된 RPMI 1640 배양액으로 적신 후 균일화 된 비장을 통과시켜 다시 RPMI 1640으로 2회 washing하였다. 적혈구를 제거하기 위해 RBC lysis buffer과 PBS를 동량으로 혼합한 용액에서 적혈구를 파괴한 다음 PBS 용액으로 다시 두 번 동일한 방법으로 washing하여 trypan blue dye exclusion test로 세포의 생존 정도를 확인 한 후 96-well plate에 각 well 당 1×10^6 cells/200 μ l 씩 seeding하였다. Seeding한 96-well plate에 다음 표와 같이 ConA 5 μ g/mL 또는 LPS 5 μ g/mL의 농도로 well에 넣은 후 표에 나온 시간 동안 배양하여 생성된 cytokine의 양을 Duoset sandwich ELISA Mouse kit (R&D system)를 사용하여 측정하였다.

Cytokine	Mitogen	Incubation time
IL-2	ConA	24h
IL-4	ConA	24h
IL-6	LPS	24h
IL-10	ConA	24h
IL-12	LPS	48hr
IL-15	LPS	48hr
TNF- α	LPS	24h
IFN- γ	ConA	72h

ELISA용 96-well plate에 각 cytokine 측정에 특성화 된 1차 항체를 PBS에 희석 후 100 μ l씩 분주해 하루 동안 처리한 후, 그 다음날, washing buffer (PBST, 0.05% Tween 20 in PBS)로 1차 항체를 씻어낸 뒤, 항체가 붙지 않은 plate의 다른 공간을 메워주기 위해 assay buffer (1% BSA in PBS (IL-4, -6, -10, -12, -15 TNF- α) 또는 0.1% BSA in TBST (IL-2, IFN- γ))를 넣어 2시간 동안 처리한 뒤 washing buffer로 씻어내었다. Standard curve를 위한 용액과 위에서 seeding한 splenocyte 세포의 배양액을 100 μ l씩 각 well에 넣어 2시간 동안 반응시킨 후, 반응이 끝난 뒤 washing buffer로 씻어내고 assay buffer에 2차 항체를 희석시켜 준비한 뒤 각 well에 100 μ l씩 분주하고 2시간 동안 처리하였다. 이 과정이 끝나면 washing buffer를 이용해 plate를 씻어내고 발색을 도와주는 substrate시약을 100 μ l 넣어 반응 시킨 뒤 570 nm에서 흡광도를 측정하고 Standard curve를 이용해 세포에서 생성된 cytokine의 양을 계산하였다.

(5) T/B 세포의 증식 능력 측정

마취시켜 혈액을 채취한 마우스를 해부하고 비장을 적출하여 PBS로 washing한 후 0.45 cell strainer에 넣고 조직을 갈아낸 뒤 10% FBS를 포함하는 RPMI 1640 배지에 세포를 모아 원심분리 시킨 뒤 적혈구 분해 용액을 넣어 1분간 반응 시킨 뒤 2회 더 원심분리 하였다. 여기에 Trypan blue 염색약으로 세포를 염색시켜 숫자를 센 뒤, 96-well plate에 1×10^7 cells/mL의 농도로 세포를 채운 뒤, LPS와 ConA (각각 5 μ g/ml)를 각각 처리하여 48시간 동안 37 $^{\circ}$ C, 5% CO $_2$ 에서 incubation시켰다. 그 후 EZ-CyTox를 10 μ l씩 분주한 후 4시간 동안 incubation 시킨 뒤 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

(6) 항원 특이 항체 측정 (IgG, IgE, IgA)

동물을 희생시켜 얻은 혈액을 16000 rpm에서 20분 동안 원심분리하여 serum를 얻어서 다음 시험에 사용하였다.

IgE : ELISA용 96 well plate에 IgE 측정에 특성화 된 1차 항체를 PBS에 희석 후 100 μ l씩 분주해 하루 동안 처리한 후, 그 다음날, washing buffer (PBST, 0.05% Tween 20 in PBS)로 1차 항체를 씻어낸 뒤, 항체가 붙지 않은 plate의 다른 공간을 메워주기 위해 assay buffer (10% FBS in PBS)를 넣어 1시간 동안 처리한 뒤 washing buffer로 씻어내었다. Standard curve를 위한 용액과 위에서 채취한 serum 100 μ l씩 각 well에 넣어 2시간 동안 반응시켰다. 반응이 끝난 뒤 washing buffer로 씻어내고 assay buffer에 2차 항체를 희석시켜 준비한 뒤 각 well에 100 μ l씩 분주하고 1시간 동안 처리하였다. 이 과정

이 끝나면 washing buffer를 이용해 plate를 씻어내고 발색을 도와주는 substrate시약을 100 μ l 넣어 반응 시킨 뒤 570 nm에서 흡광도를 측정한다. Standard curve를 이용해 혈 중 내에 생성된 IgE의 양을 계산하였다.

IgG, IgA : IgG, IgA용 96-well plate에 Standard curve를 위한 용액과 위에서 채취한 serum (IgG는 Running buffer에 5만 배 희석, IgA는 Running buffer에 4천배 희석) 100 μ l씩 각 well에 넣어 1시간 동안 반응시켰다. 반응이 끝난 뒤 washing buffer로 씻어내고 Running buffer에 enzyme-antibody conjugate를 희석시켜 준비한 뒤 각 well에 100 μ l씩 분주하고 30분 동안 처리하였다. 이 과정이 끝나면 washing buffer를 이용해 plate를 씻어내고 발색을 도와주는 substrate시약을 100 μ l 넣어 상온에 어두운 상태에서 10분간 반응시킨 후 흡광도 570 nm에서 측정하였다.

(7) Natural killer cell 활성화 평가

분리한 비장세포를 96-well plate에 각 well당 1×10^4 cells/mL을 100 μ l씩 seeding 한 후 effector cell로 이용하였다. Target cell로는 YAC-1 세포를 이용하였으며 effector cell과 target cell의 비율을 1:1로 조정하고 37°C, 5% CO₂ 에 4시간 배양한 후 NK 세포가 암세포의 일종인 YAC-1 세포 (NK sensitive cell line)을 공격하여 파괴된 YAC-1세포로부터 유리된 LDH를 측정하는 방법인 cytotox 96 Non-radioactive Cytotoxicity assay kit를 이용하여 흡광도를 측정하여 Cytotoxicity (%)로 나타내었다.

다. *In vitro*에서 울금 20%주정 추출물의 면역조절 기전 규명

(1) 동물처리

본 실험에서는 6주령인 Balb/C Female 마우스를 중앙실험동물(주)(Seoul, Korea)에서 구입하였다. 온도는 $23 \pm 2^\circ$ C, 상대습도는 $50 \pm 5\%$, 명암은 12시간 (light /dark cycle)인 조건에서 1주간 적응 후 실험에 사용하였다. 식이는 AIN 93G를 공급하였으며, 실험기간 동안 식이와 음용수는 자유롭게 섭취하도록 하였다.

(2) 세포배양

본 실험에서 사용된 YAC-1 세포는 American Type Culture Collection(ATCC, Manassas, VA)에서 분양받았음. 10% fetal bovine serum(Hyclone Laboratories, Logan, Utah, USA), 2 mmol/L glutamine(Hyclone Laboratories, Logan, Utah, USA), 100 mg/L penicillin-streptomycin(Hyclone Laboratories, Logan, Utah, USA)를 첨가한 RPMI 1640(Hyclone Laboratories, Logan, Utah, USA)를 사용하여 37°C, 5% CO₂ 의 조건인 incubator에서 배양하였다.

(3) 자연살해세포 분리

마우스에서 분리한 비장을 10% fetal bovine serum(Hyclone Laboratories, Logan, Utah, USA), 2 mmol/L glutamine(Hyclone Laboratories, Logan, Utah, USA), 100 mg/L penicillin-streptomycin(Hyclone Laboratories, Logan, Utah, USA)를 첨가한 RPMI-1640(Hyclone Laboratories, Logan, Utah, USA)로 세척 하고 0.45 μ m cell strainer 을 사용하여 세포 부유액을 만들었음. Red blood cell lysing buffer(Sigma-Aldrich Co.,

St. Louis, MO, USA)로 적혈구를 용혈시켜 만들어진 비장세포 부유액을 Mouse NK cell enrichment kit(StemCell Technologies, Inc., Vancouver, BC, Canada)를 사용하여 자연살해세포를 분리하였다.

(4) 자연살해세포 활성 측정

효과세포로 이용하기 위하여 자연살해세포를 96 well plate에 1×10^5 cell/well씩 분주하였다. YAC-1 세포를 Target 세포로 하여 각 well에 effector 세포와 target 세포의 비율을 5:1로 조정하여 분주하였으며, 동시에 울금 20%주정 추출물을 20 μ g/mL, 50 μ g/mL, 100 μ g/mL, 150 μ g/mL로 처리하였다. 4시간 동안 incubation 후, cytotox 96 non-radioactive cytotoxicity assay kit(Promega Corporation, Madison, WI, USA)를 이용하여 흡광도 490nm에서 lactate dehydrogenase(LDH)를 측정하여 YAC-1 세포의 cytotoxicity를 계산함으로써 자연살해세포의 활성도를 측정하였다.

(5) 단백질 추출 및 western blot 측정

자연살해세포를 6 well plat에 1×10^6 cells/well씩 분주하였으며, 울금 20%주정 추출물을 20 μ g/mL, 50 μ g/mL, 100 μ g/mL, 150 μ g/mL로 처리하였다. 24시간 동안 incubation시킨 후, harvest하여 1000rpm에서 원심분리 하였다. 세포 pellet만 남긴 후, protease inhibitor cocktail이 포함된 cell lysis reagent(Sigma, St. Louis, MO, USA)를 첨가하여 ice에 1시간 방치한 후, 상층액을 회수하여 -20°C 에 보관하였다. 이렇게 얻어진 세포 단백질은 10% polyacrylamide gel에 120 V에서 1시간 30분 동안 전기영동 한 후, Nitrocellulose membrane(Whatman, Dassel, Germany)에 transfer시켰다. Nitrocellulose membrane을 5% skim milk(BD Biosciences, San Jose, CA, USA)로 1시간 동안 blocking시킨 후, 1000배 희석된 β -actin(Cell signaling, Beverly, MA, USA), CD69(Acris Antibodies GmbH, Hiddenhausen, Germany), CD335(Bioss, Woburn, MA, USA) 일차 항체를 24시간 반응시켰다. 5000배 희석된 Anti-rabbit secondary 항체(antirabbit IgG HRP-linked antibody, Cell signaling, Beverly, MA, USA)를 1시간 동안 반응 시킨 후, ECL(Pierce, Milwaukee, WI, USA)을 처리하여 ChemiDoc imaging system(Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA)을 이용하여 이미지를 얻었다.

(6) mRNA분리 및 Real time-PCR

자연살해세포를 6 well plat에 1×10^6 cells/well씩 분주하였으며, 울금 20%주정 추출물을 20 μ g/mL, 50 μ g/mL, 100 μ g/mL, 150 μ g/mL 처리하여 24시간 동안 incubation 하였다. 1% β -mercaptoethanol이 포함된 RLT (lysis buffer, Qiagen, Valencia, CA, USA)를 사용하여 균질화한 후, RNeasy extraction kit(Qiagen, Valencia, CA, USA)를 사용하여 mRNA 추출을 하였다. cDNA 합성을 위하여 각 1 μ L의 RNA를 사용하여 iScript cDNA synthesis kit(Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA)로 합성하였다. 유전자들의 발현을 측정하기 위하여 SYBR Green(iQ SYBR Green Supermix, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA)을 사용한 실시간 정량 PCR(real time quantitative PCR)을 하였다. 기기는 Real-Time PCR(Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)을 사용하였다. 실험에 사용된 모든 유전자의 PCR primer는 Tm(melting temperature)값을 55°C 부근으로 정하였으며,

각 primer의 염기서열은 다음과 같았다. GAPDH: forward primer 5' CAT GGC CTT CCG TGT TCC TA 3' , reverse primer 5' GCG GCA CGT CAG ATC CA 3' , TNF- α : forward primer 5' CAC AAG ATG CTG GGA CAG TGA 3' , reverse primer 5' TCC TTG ATG GTG GTG CAT GA 3' , IFN- γ : forward primer 5' TTG GCT TTG CAG CTC TTC CT 3' , reverse primer 5' TGA CTG TGC CGT GGC AGT A 3'. Real-time PCR에는 cDNA 2 μ L와 2X SYBR mix 10 μ L, forward, reverse primer는 100 pmol/ μ L로 각각 1 μ L씩 첨가하여 나머지는 H₂O로 총 20 μ L로 맞추어 주었다. 모든 유전자에 대하여 PCR 증폭은 40 cycle로 실시하였다. 증폭 단계는 denaturation을 95°C에서 15초, annealing을 55°C에서 1분, extension을 72°C에서 30초를 반복하였다. 각 cycle의 extension 후에 값이 기록되었으며, 모든 cycle이 완료된 후, melting curve 분석을 실시하였다. 결과의 분석은 Applied biosystems에서 제공하는 One step system software v2.1로 분석하였다.

(7) Flow cytometry

자연살해세포를 24 well plate에 1×10^6 cells/well씩 분주하였으며, 울금 20%주정 추출물을 20 μ g/mL, 50 μ g/mL, 100 μ g/mL, 150 μ g/mL로 처리하였다. 48시간 동안 incubation 후, Anti-mouse MHC class II FITC(eBioscience, San Diego, CA, USA)와 Anti-Mouse CD8a FITC(eBioscience, San Diego, CA, USA), Anti-mouse CD4 PE(eBioscience, San Diego, CA, USA)를 각각 1 μ g/mL농도로 처리한 후 ice에서 암실에서 30분간 방치하였다. 1200 rpm에서 5분간 원심분리한 후, 상층액을 제거하고 세포 pellet을 FACS buffer(1X PBS, 1% BSA, 0.1% sodium azide)에 부유시켜 FACStar plus(Becton Dickinson, Mountainview, CA, USA)로 측정하였다.

라. 원료 표준화

(1) 건강기능식품 소재 제조공정 표준화(울금 20%주정 추출물)

울금은 전남 진도산을 경일약품사(전남, 순천시)에서 구입하여 사용하였으며, 그 일부는 한국인스팜 중앙연구소에 보관하고 있다. 추출/농축과 분무건조 공정은 (주)엠에스씨(경남 울산시)의 생산설비를 이용하였다. 발효에탄올(이하 주정)은 대한약전 Assay 95.1~95.6 v/v%(수성약품주식회사)를 사용하였으며 물은 먹는물을 사용하였다.

200kg을 2회 실시 하였으며, 제조공정은 아래와 같이 (가) 원료평량 (나) 추출 (다) 농축 (라) 부형제 혼합 (마) 살균 (바) 분무건조 (사) 포장 및 보관 과정으로 진행하였다.

(가) 원료평량

- 추출에 사용할 원료와 용매를 확인하고 칭량하여 추출기에 투입한다.

원료명	Lot	원료량(kg)	용매량(L)
울금	1	200	물 : 1,600 주정 : 400
	2	200	물 : 1,600 주정 : 400
합계	2 회	400	물 : 3,200 / 주정 : 800

(나) 추출

- 울금 200kg을 2회 추출한다.
- 추출기를 이용하여 95.7 °C에 도달 후 4시간 압력 0.7~0.75 Kg/cm²의 조건에서 추출한다.

(다) 농축

- 농축기를 이용하여 45 °C, 1,000 mmHg 조건에서 농축한다.

(라) 부형제 혼합

- 농축액의 고형물 대비 66.7%에 해당하는 말트린100(그레인프로세스, 미국)을 넣어 1시간 혼합하고, 20~30 Brix가 되도록 물을 투입한다.

(마) 살균

- 상기 (4)번의 농축액을 살균기에 넣고 70 °C로 30분간 살균한다.

(바) 분무건조

- Lot(1, 2)을 200 °C로 사출하여 각각 분무건조하고 건조감량과 수득률을 측정한다.

(사) 포장 및 보관

- 개별포장하여 저온창고에 보관한다.



추출기

⇒



농축기

⇒



분무건조기

(2) 울금 20%주정 추출물 지표성분정량법 - Curcumin

① 검액준비

울금 원재료(건조물) 및 추출물 1 g을 정밀하게 달아 methanol 100 mL를 넣고 60분간 초음파 추출을 한다. 추출이 끝나면 0.45 μm nylon filter로 여과하고, 여액을 검액으로 한다.

② 표준액 조제

Curcumin 표준품 약 15 mg을 정밀하게 달아 용량플라스크에 넣고 Ethanol 100 mL로 하여, 150 ppm 용액을 제조하고, 150 ppm Curcumin 표준액 1,000 μL를 20 ml 용량플라스크에 넣고 희석액으로 잘 혼합하여 7.5 ppm Curcumin 표준액을 표준용액으로 사용하였다.

③ 시험

검액 및 표준액 10 μL씩을 가지고 다음 조건으로 액체크로마토그래프법에 따라 시험하여 각각의 액의 Curcumin의 피크면적 A_T 및 A_S 를 측정한다.

④ 조작조건

- 검출기 : Diode array detector (측정파장 425 nm)
- 칼럼 : Shiseido Capell-pak UG 250*4.6mmI.D
- 칼럼온도 : 35°C
- 이동상 : 2% Acetic acid (45% ACN)
- Flow rate : 1.0 ml/min

⑤ 계산식

Curcumin (mg/g)	$\frac{\text{표준용액농도(mg/mL)} \times \text{검체면적값} \times \text{부피} \times \text{표준품순도}}{\text{표준품면적값} \times \text{시료채취량(g)}}$
--------------------	--

마. 울금추출물 원료 기준규격

** 식품의약품안전처 “식품공전” 에 따라 시험함(1)

(1) 시험항목

- 성상
- 건조감량
- 지표성분함량
- 중금속
- 곰팡이독소
- 대장균군

(가) 성상

육안으로 보여지는 시료의 양상, 외관을 기록한다.

(나) 건조감량

수분측정기를 이용하여 시료의 무게를 측정하고, 열원(할로겐)을 샘플에 가하여 수분을 감량 후 그 변한 무게값을 백분율로 표시한다.

(다) 지표성분함량

① 표준용액 조제

- 표준품 Curcumin(제조사 : Chromadex, 함량 : ≥98.3%) 15 mg을 10 mL 용량 플라스크에 넣고 Ethanol로 충분히 녹인 후 10 mL로 하여 1474.5 ppm 표준원액을 제조하고, 표준원액 1,000 uL를 20 mL 용량 플라스크에 넣고 희석액으로 혼합하여 73.725 ppm 표준액을 만든다. 다시 다음과 같이 희석하여 4.42 ~ 10.32 ppm 표준용액을 제조하여 사용하였다.

이름	73.725 ppm 용액의 부피 (uL)	최종부피 (mL)	농도 (ppm)
표준용액 1	600	10	4.42
표준용액 2	800	10	5.90
표준용액 3	1000	10	7.37
표준용액 4	1200	10	8.85
표준용액 5	1400	10	10.32

② 검액 조제

- 올금 추출물 1 g을 정밀하게 달아 Methanol 100 mL를 넣고 60분간 초음파 추출을 한다. 추출이 끝나면 0.45 μm nylon filter로 여과하고, 여액을 검액으로 한다.

③ 시험

- 검액 및 표준액 10 μL씩을 가지고 다음 조건으로 액체크로마토그래프법에 따라 시험하여 각각의 액의 Curcumin의 피크면적 A_T 및 A_S 를 측정한다.

④ 조작조건

항목	조건
Instrument	Agilent HPLC
Detector	Diode array detector (UV 425 nm)
Column	Shiseido Capell-pak UG 250*4.6mm.I.D
Mobile Phase	2% Acetic acid (45% ACN)
Column temperature	35°C
Column flow	1.0 mL/min
Injection volume	10 μl

⑤ 계산식

Curcumin (mg/g)	$\frac{\text{검량선결과}(\mu\text{g/ml}) \times \text{최종량(ml)} \times \text{희석배수} \times \text{표준품순도}}{\text{시료채취량(mg)}}$
-----------------	--

(라) 중금속(As, Cd, Pb, Ag)

① 검액의 조제

- 분석용 검체 일정량을 가지고 가루로 하여 그 약 2~5g을 정확하게 달아 비커에 넣고 질산 10~30mL를 넣은 다음 시계접시로 덮어 하룻밤 방치한다. 가열판 위에 올려 놓고 천천히 온도를 높여 갈색연기가 발생하지 않을 때까지 분해한다. 분해가 잘 되지 않는 경우 질산 10mL를 추가로 넣는다. 30% 과산화수소 5~10mL를 넣어 미황색~황색이 될 때까지 완전히 분해한다. 완전히 분해되지 않을 경우 극초단파 시료전처리장치를 사용하여 분해할 수 있다. 이 액을 가열판위에서 1~2mL로 될 때까지 농축시킨다. 식힌 다음 여과지로 여과하여 용량플라스크에 넣고 물을 넣어 적절하게 표준액 농도 범위로 희석하여 검액으로 한다.

로 한다. 비소의 경우 검액 10mL에 요오드화칼륨시액 1mL를 넣은 다음 0.5mol/L 염산으로 정확하게 50mL로 하여 비소 측정용 검액으로 한다. 따로 질산 10~30mL를 가지고 이하 검액조제와 같은 방법으로 조작하여 공시험액으로 한다.

- 수은 검체 2~5g을 250ml 평저플라스크에 넣고 물 50ml, 황산 10ml, 질산 10ml, 과망간산칼륨용액 20ml 넣은 후 95℃ 2시간 환류추출한다. 식힌 후 염산히드록실아민 8ml 넣고 100ml 뷰렛플라스크에 거른 후 물로 100ml을 맞춘다. 측정시 염화제1주석용액 10ml을 넣어 수은 측정용 검액으로 한다.

② 측정

- 검액, 표준액 및 공시험액을 가지고 대한약전 일반시험법 중 원자흡광광도법에 따라 측정한다. 원자흡광광도계를 이용하여 각 중금속의 원자흡광분석용 표준원액(1000mg/L)을 0.5mol/L 질산을 사용하여 적정 농도로 희석하여 검량선을 작성하고 공시험액으로 보정하여 검액의 흡광도(또는 강도)를 측정한다.

③ 계산식

납	$\frac{\text{검량선결과} \times \text{희석배수} \times \text{최종용량}}{\text{검체량} \times 1000}$	=	ppm
비소	$\frac{\text{검량선결과} \times \text{희석배수} \times \text{최종용량}}{\text{검체량} \times 1000}$	=	ppm
카드뮴	$\frac{\text{검량선결과} \times \text{희석배수} \times \text{최종용량}}{\text{검체량} \times 1000}$	=	ppm
수은	$\frac{\text{검량선결과} \times \text{희석배수} \times \text{최종용량}}{\text{검체량} \times 1000}$	=	ppm

(마) 곰팡이독소

① 검액의 조제

- 검체 25g + 70% MeOH · NaCl 100ml을 섞어 5분간 고속 균질 후 여과한다. 추출액 10ml과 1% 트윈20용액 30ml를 혼합하여 여과한다. 혼합액 20ml를 면역친화성 컬럼에 정제 후 물 10ml로 세척하고 아세토니트릴 3 ml로 용출한다. 질소건조하고 Trifluoroacetic acid 0.2ml 가한 후 15분간 유도체화한 후 20% ACN 0.8ml 첨가한다. 실린지 필터로 여과한 후 HPLC/FLD로 분석한다.

② 측정

항목	조건
instrument	Agilent HPLC
Detector	FLD(Ex=360nm,Em=450nm)
Column	SP Column C18 UG(4.6mm×250mm,5 μm)
Mobile Phase	아세토니트릴: 물 (25:75, v/v)
Column temperature	40℃
Column flow	1.0 mL/분
injection volume	10 μl

(바) 대장균군

① 표준용액조제

- 멸균생리식염수 또는 멸균인산완충액
- 유당배지
- BGLB배지
- Endo 한천배지 또는 EMB 한천배지
- 보통한천배지

② 시험용액조제: 검체17g+ 희석수(×9) 균질화한다

③ 추정시험

- 시험용액 10ml를 2배 농도의 유당배지에, 1ml 및 0.1ml를 유당배지에 각각 3개씩 접종하여 36℃에서 48시간 배양한 후 가스발생 여부를 확인한다.

④ 확정시험

- 추정시험에서 가스 발생한 유당배지발효관으로부터 BGLB 배지에 접종하여 36℃에서 48시간 동안 배양한 후 가스발생 여부를 확인한다. 가스발생을 보인 BGLB 배지는 EMB 한천배지에 분리 배양한다. 36℃에서 24시간 배양 후 전형적인 집락이 발생되면 확정시험 양성으로 한다. BGLB배지에서 36℃로 48시간 동안 배양하였을 때 배지의 색이 갈색으로 되었을 때에는 반드시 완전시험을 실시한다.

⑤ 완전시험

- 확정시험의 EMB한천배지에서 전형적인 집락 1개 또는 비전형적인 집락 2개 이상을 각각 유당배지발효관과 보통한천배지에 접종하여 36℃에서 48시간동안 배양한다. 이때 가스를 발생한 발효관에 해당되는 한천배지의 집락에 대하여 그람음성, 무아포성 간균이 증명되면 완전시험은 양성이며 대장균군 양성으로 판정한다.

바. 인체적용 임상연구

(1) 인체적용시험계획서

제 목	울금추출물의 섭취가 면역기능에 미치는 효과 검증을 위한 단일기관, 무작위배정, 이중맹검, 위약대조, 비교 인체적용시험		
인 체 적 용 시 험 책 임 자	경희대학교병원 임상약리학과	교수	임 성 빈
공 동 연 구 자	경희대학교 동서의학대학원	교수	박 유 경
시 험 담 당 자	경희대학교병원 류마티스내과	교수	홍 승 재
실 시 기 관			
의 퇴 자 / 모 니 터	한국인스팜㈜		
목 적	한국인 정상인에서 울금추출물이 면역기능에 미치는 효과와 안전성을 확인하는 것을 목적으로 한다.		

시 험 설 계	단일기관, 무작위배정, 이중맹검, 위약대조, 비교인체적용시험
대 상 자	문맹자를 제외한 만 20세 이상에서 60세 미만의 남성 및 여성으로 혈액검사에서 WBC 수치가 4000/ μ l-8000/ μ l의 범위에 드는 정상인
시 험 대 상 자 선 정 기 준	<p><선정기준> (대상시험대상자들은 다음의 모든 기준에 적합하여야 한다.)</p> <ol style="list-style-type: none"> 1) 문맹자를 제외한 만 20세 이상에서 60세 미만의 남성 및 여성 2) 스크리닝 검사에서 측정된 말초혈액 백혈구 수치가 4000/μl - 8000/μl의 범위에 드는 정상인 3) 인체적용시험동의서에 서면 동의한 자 <p><제외 기준> (다음 조건의 어느 하나라도 해당되는 시험대상자는 본 연구에 참여할 수 없다.)</p> <ol style="list-style-type: none"> 1) 의약품, 건강기능식품 등 복용시 알레르기 등 이상반응을 경험한 시험대상자 2) 치매, 뇌종양, 수두증을 진단받았거나 3개월 이내에 호르몬 대체요법을 시행했거나 시행중인 피험자 3) 뇌졸중, 심질환(심부전, 협심증, 심근경색), 악성종양, 협우각 녹내장(narrow angle glaucoma), 조절되지 않는 고혈압 피험자 또는 폐질환이 있는 시험대상자 4) 심한 신기능 장애 나 간 기능장애가 있는 시험대상자 (serum creatinine > 2.0 mg/dl, ALT, AST, alkaline phosphatase > 정상 상한치 \times 2.5) 5) 혈당강하제로 혈당조절이 어려운 경우 (혈당강하제를 복용하고 있음에도 불구하고 공복혈당 160이상)와 혈소판(15만/mm³이하), 백혈구(4000/mm³이하), 혈색소 수치(남자 9.5g/dL, 여자 9.0g/dL)이하인 시험대상자 6) 최근 3개월 이내에 경구용 스테로이드, 호르몬제 등을 복용하였거나 시험식품의 흡수, 대사, 배설에 영향을 주는 약물 또는 기능성식품 등을 복용한 경험이 있거나 3개월 내 기타 인체적용시험에 참여한 경험이 있는 시험대상자 7) 6개월 내 외과적 수술을 받았거나 1개월 내 금지된 치료(침술이나 혈압강하 목적의 치료 또는 건강식품, 한약 또는 남용우려 있는 약물투여)를 받고 있는 자 8) 위 절제술 등 약물의 흡수에 영향을 줄 수 있는 수술을 한 시험대상자 9) 임신부, 수유부 및 적절한 피임 방법을 사용하지 않는 가임여성 10) 최근 1개월 이내에 혈압강하제 복용자, 다른 시험식품이나 시험약품을 복용한 경험이 있는 시험대상자 11) 최근 2개월 이내에 헌혈을 한 시험대상자 또는 1개월 이내에 성분헌혈을 한 시험대상자 12) 인체적용시험담당자의 소견으로 볼 때, 시험의 준수사항을 따를 수 없다고 판단되거나 기타 의사가 부적합하다고 판단되는 시험대상자

임 상 시 험 식 품	시험식품 : 울금 추출물 (1정 282 mg)												
투 여 용 량	시험군: 울금추출물 6정 (1일 3회 1회 2정) 총 1.692g (울금 추출물 282 mg/정, 6정/day) 위약대조군: 위약 6 정 (1일 3회 1회 2정) 위약성분 (유당, 카라멜 색소, 스테아린산마그네슘, 치자엘로우)												
목 표 시 험 대 상 자 수	최종 평가가능 예수 72례												
시 험 방 법	<p>시험대상자가 인체적용시험에 참여할 것을 서면으로 동의하면, 인체적용 시험계획서에 따라 필요한 검진 및 검사를 실시한 후, 시험대상자 적합성 평가결과 선정기준에 적절한 시험대상자에 한하여 2군에 무작위 배정된다. 무작위 배정된 시험대상자는 8주간 인체적용시험용 식품인 울금추출물을 복용한다.</p> <table border="1" style="margin-left: auto; margin-right: auto;"> <tr> <td>방문 1 (D-28)</td> <td>방문 2 (D 0)</td> <td>방문 3 (D 28±5)</td> <td>방문 4 (D 56 ±5)</td> </tr> <tr> <td>스크리닝 방문</td> <td>무작위배정방문</td> <td>중간 방문</td> <td>종료방문</td> </tr> <tr> <td colspan="4" style="text-align: center;">8 주 투 약</td> </tr> </table>	방문 1 (D-28)	방문 2 (D 0)	방문 3 (D 28±5)	방문 4 (D 56 ±5)	스크리닝 방문	무작위배정방문	중간 방문	종료방문	8 주 투 약			
방문 1 (D-28)	방문 2 (D 0)	방문 3 (D 28±5)	방문 4 (D 56 ±5)										
스크리닝 방문	무작위배정방문	중간 방문	종료방문										
8 주 투 약													
시 험 기 간	각 시험대상자 별로 총 10주(스크리닝 2주, 시험식품투여기간 8주)가 소요되며 전체 72명의대상 지원자를 모집하는데 필요한 기간은 약 12주 이상 예상되며, 총 인체적용시험 실시기간은 최초 모집시점으로부터 약 24주 이상 소요될 것으로 예상된다.												
평 가 기 준	<p><u>유효성 (Functionality)</u> 1차 기능성 평가 (Primary endpoint): • Baseline 대비 NK cell 활성의 변화 2차 기능성 평가 (Secondary endpoint): • Baseline 대비 WBC 수치의 변화 • Baseline 대비 TNF-α, INF-γ, IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-12의 변화</p> <p><u>안전성 (safety)</u> 시험식품 투여 전과 투여 8주 후에 심전도 검사, 실험실적 검사, 활력징후 측정, 이학적 검사 진행을 실시하고 시험식품 투여 2주 후에는 전화 문진을 통하여 이상반응을 평가하고 연구기간 내내 이상반응을 평가한다.</p>												

(2) 인체적용시험 증례기록서

WK-01
Ver. 1.0

CONFIDENTIAL

증례기록지

(CASE REPORT FORM)

Protocol No.: WK-01

울금추출물의 섭취가 면역기능에 미치는 효과 검증을 위한 단일기관,
무작위배정, 이중맹검, 위약대조, 비교 인체적용시험

시험자 정보	시험기관	경희대학교병원						
	시험책임자	임성빈 교수						
시험대상자 정보	시험대상자이니셜	<table border="1"><tr><td> </td><td> </td><td> </td></tr><tr><td>Family</td><td>First Name</td><td></td></tr></table>				Family	First Name	
	Family	First Name						
스크리닝번호	S	<table border="1"><tr><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td></tr></table>						
무작위배정번호	R	<table border="1"><tr><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td></tr></table>						

(주)네추럴웨이

CONFIDENTIAL

본 임상증례기록서와 관련된 모든 정보는 기밀사항이며 한국인스팜㈜
및 경희대학교병원의 소유입니다.

Protocol No.	Screening	Screening No.	Initials	Page
WK-01	-2주 to -1 일	S <input type="text"/>	<input type="text"/>	3

증례기록지의 구성

- 방문 1: 스크리닝 (-14 일~-1 일)
- 방문 2: 투여 직전 (0 일, Week 0)
- 방문 3: 투여 중 4주 ± 5 일 (28 일, Week 4)
- 방문 4 / 조기종료 : 투여 8주 ± 5 일 (56 일, Week 8)
- 추가방문 /추적조사 (필요 시)
- 선행/병용약물 / 이상반응 보고 양식
- 임상시험종료 양식

Protocol No.	Screening	Screening No.	Initials	Page
WK-01	-2 주 to -1 일	S <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/>	<input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/>	4

임상시험 진행일정

인체적용시험 흐름도

(평가일: 방문예정일 ± 5 일)

	스크리닝	치료기간				F/U [®] 필요시
	Visit 1	Visit 2	Visit 3 ¹⁾	Visit 4		
	-14 일 ~ -1 일	0 일 (0 주)	4 주 (28 일)	8 주 (56 일)		
시험대상자 동의	○					
인구학적 조사 ²⁾	○					
활력징후 ²⁾	○	○	○	○	○	
신체검사 ³⁾	○					
생활습관 조사 ⁴⁾		○				
병력 및 동반질환	○					
이학적 검사	○	○	○	○	○	
실험실적 검사 ⁵⁾	○	○	○	○	○	
임신여부 검사(가임기 여성) ⁶⁾	○	○	○	○	○	
선행/병용 약물	○	○	○	○	○	
식이조사		○	○	○		
이상반응			○	○	○	
시험대상자 선정 ⁷⁾	○					
무작위 배정		○				
인체적용시험용 식품 처방		○	○			
복약 순응도 평가				○		

(3) 인체적용시험 시료제작

(가) 인체적용시험 시료(캡슐) 제작

시료 제작에 사용된 원료는 울금 추출물과 유당(식용, 제일팜텍), 카라멜(식용, 제일팜텍), 치자엘로우150CR(식용, (주)엠에스씨), 치자엘로우300CR(식용, (주)엠에스씨), 향료(식용, 솔향, (주)보락), 스테아린산 마그네슘(식용, FACI), 캡슐(0호, 서흥캡슐)을 사

용하였다.

제형개발에 사용된 기기는 혼합기(금성기계) 캡슐충진기(금성기계), 탈분기(금성기계), Blister 포장기(흥아기계)를 사용하였다.

시료 제조 과정은 아래와 같은 1) 원료확인 2) 혼합 3) 캡슐충진 4) 탈분 5) Blister 포장 6) box 포장 과정으로 진행하였다.

1) 원료확인

- 제형개발에 사용할 아래의 재료를 확인하고 칭량한다.

성분	본약군(g)	위약군(g)
울금분무건조물	11,750	-
유당	-	5,350
카라멜색소	-	500
치자엘로우150CR	-	3,000
치자엘로우300CR	-	3,000
향료(솔향)	10	10
스테아린산마그네슘	100	100
합계	11,860	11,860
공캡슐	25,000 Cap.	25,000 Cap.

2) 혼합

- 칭량한 원료를 혼합기에 넣어 혼합한다.

3) 캡슐충진

- 혼합물을 캡슐충진기를 이용하여 474mg/Cap.으로 충전한다.

4) 탈분

- 탈분기를 이용하여 캡슐에 부착된 분진을 제거한다.

5) Blister 포장

- Blister포장기를 이용하여 포장한다.

6) box 포장

- box에 라벨을 부착하고 난수표에 따라 본약과 위약을 넣어 포장한다.

인체적용시험용 제품입니다.	
● 제품의 코드명	INS-CL
● 피험자 코드	INS-01
● 방문	Visit 1
● 유효기한	2015. 08. 13.
● 제조번호	CLSD-13001
● 저장방법	실온보관(1~30℃)
● 제품제조업자의 상호	한국인스팜(주)
“인체적용시험 외의 목적으로는 사용할 수 없습니다	



<혼합기>



<캡슐충진기>



<탈분기>



<Blister포장기>



<box 포장>

사. 울금추출물 지표성분 시험법 밸리데이션

(1) 표준품

- Curcumin (제조사 : Chromadex, 함량 : $\geq 97.7\%$)
- Bisdemethoxycurcumin (제조사 : 식품의약품안전처, 함량 : $\geq 98\%$)

(2) 시험검체

- ① 발효울금 분말 (제조번호 : CL20-13001)
- ② 발효울금 분말 (제조번호 : CL20-13002)
- ③ 발효울금 분말 (제조번호 : CL20-13003)

(3) 분석조건

- ① 이동상 : 2% Acetic acid in 45% Acetonitrile
- ② Injection Vol. : 10 μ l
- ③ Column Oven Temp. : 35 $^{\circ}$ C
- ④ Sample Rack Temp. : 실온
- ⑤ Detector : UV 425nm
- ⑥ Run time : 20min
- ⑦ Flow Rate : 1mL/min

(4) 특이성

(가) 검액제조

- ① 검체 0.5 g을 50 mL 용량플라스크에 넣고 Methanol을 넣은 후 초음파 추출기로

60분간 추출하고 50 mL로 맞추어 0.45 um 필터로 여과한 용액을 특이성 검액으로 사용한다.

- ② 검체내의 Curcumin은 0.48 mg/g으로 예상되며, 특이성 검액에서 Curcumin의 농도는 4.8 ppm (4.8 ug/mL)정도이다.
- ③ 검체는 3Lot 에 대해서 모두 진행한다.

(나) 표준용액제조

- ① 표준품 Curcumin 5 mg을 100 mL 용량플라스크에 넣고 Ethanol로 충분히 녹인 후 100 mL로 하여, 48.85 ppm 표준원액을 제조하고, 표준원액 1,000 uL를 10 mL 용량 플라스크에 넣고 희석액으로 잘 혼합하여 4.885 ppm Curcumin 표준액을 특이성 표준용액으로 사용한다.
- ② 표준품 Bisdemethoxycurcumin 5 mg을 100 mL 용량플라스크에 넣고 Ethanol로 충분히 녹인 후 100 mL로 하여, 49 ppm 표준원액을 제조하고, 표준원액 1,000 uL를 10 mL 용량 플라스크에 넣고 희석액으로 잘 혼합하여 4.9 ppm Bisdemethoxycurcumin 표준액을 특이성 표준용액으로 사용한다.

(다) 특이성 진행

- ① Shimadzu사의 HPLC에 이동상과 컬럼을 연결하고 장비를 1시간동안 안정화한다.
- ② Blank(Methanol), 특이성 검액, 특이성 Curcumin 표준용액, 특이성 Bisdemethoxycurcumin 표준용액을 항 분석조건에 따라 분석을 실시한다. 단, Detector 조건은 200~800 nm로 설정한다.

(5) 직선성

(가) 검액제조

- 해당사항 없음

(나) 표준용액제조

- ① 표준품 Curcumin 5 mg을 10 mL 용량플라스크에 넣고 Ethanol로 충분히 녹인 후 10 mL로 하여, 488.5 ppm 표준원액을 제조하고, 표준원액 1,000 uL를 10 mL 용량 플라스크에 넣고 희석액으로 잘 혼합하여 48.85 ppm Curcumin 표준액을 특이성 표준용액으로 사용한다.
- ② 다음과 같이 희석하여 2.931 ~ 6.839 ppm 표준용액을 제조하여 직선성 표준 용액으로 사용한다.

이름	48.85 ppm 표준원액의 부피 (uL)	표준용액의 최종부피(mL)	표준원액의 농도 (ug/mL)	분석농도 대비%
표준용액 1	600	10	2.931	60
표준용액 2	800	10	3.908	80
표준용액 3	1000	10	4.885	100
표준용액 4	1200	10	5.862	120
표준용액 5	1400	10	6.839	140

(다) 직선성 진행

- ① Shimadzu사의 HPLC에 이동상과 컬럼을 연결하고 장비를 1시간 동안 안정화한다.
- ② Blank(Ethanol), 직선성 Curcumin 표준액을 11. 항 분석조건에 따라 분석을 실시한다.
- ③ 분석반복 : 표준용액제조에 사용된 표준품의 칭량을 1회를 기준으로 직선성 1회로 하고, 총 6회 직선성을 평가한다.
- ④ 1일 진행회수 : 최대 2회

(라) 직선성 기준

- 결정계수(R^2) : 0.999 이상

(6) 정밀성

(가) 검액제조

- ① 검체 0.5 g을 50 mL 용량플라스크에 넣고 Methanol을 넣은 후 초음파 추출기로 60 분간 추출하고 500 mL로 맞추고 0.45 um 필터로 여과한 용액을 특이성 검액으로 사용한다.
- ② 검체의 칭량을 2회 더 진행하여 총 3회 칭량 및 검액을 제조한다.
- ③ 검체내의 Curcumin은 0.48 mg/g으로 예상되며, 정밀성 검액에서 Curcumin의 농도는 4.8ppm 정도이다.
- ④ 검체는 제조번호 3종에 대해서 모두 진행한다.

(나) 표준용액의 제조

- 직선성에 사용된 표준용액을 사용한다.

(다) 정밀성 진행

- 직선성 분석 후 표준액과 제조번호별 교차오염방지를 위해 다음과 같이 분석한다.
- 3종의 제조번호의 3회 칭량(총 9회)을 기준으로 정밀성 1회로 하고 총 6회 정밀성을 평가한다.

- 1일 진행횟수 : 최대 2회

순서	이름	비고
1	Blank (Methanol)	표준액 교차오염 방지
2	검체 1의 검액 1	검체의 제조번호 : CL20-13001
3	검체 1의 검액 2	
4	검체 1의 검액 3	
5	Blank (Methanol)	표준액 교차오염 방지
6	검체 2의 검액 1	검체의 제조번호 : CL20-13002
7	검체 2의 검액 2	
8	검체 2의 검액 3	
9	Blank (Methanol)	표준액 교차오염 방지
10	검체 3의 검액 1	검체의 제조번호 : CL20-13003
11	검체 3의 검액 2	
12	검체 3의 검액 3	

(7) 정확성

(가) 검체 칭량의 제조

- ① 검체 0.5 g을 100 mL 용량플라스크에 9회 칭량하여 넣는다.
- ② 검체는 정밀성 결과 0.48 mg/g에 가장 가까운 검체 1Lot에 대해서 진행한다.

(나) 정확성 검액에 첨가되는 표준원액 제조

- 정확성 검액에 첨가되는 표준원액은 검액(4.8 ug/mL)의 20배 수준인 96 ug/mL로 하기로 한다.
- ① 표준품 Curcumin 9.6 mg을 10 mL 용량 플라스크에 1회 칭량한다.
- ② Ethanol로 10mL을 맞춘 후, 1000 uL를 10 mL 용량플라스크에 넣고 희석액으로 잘 혼합하여 96 ppm 표준용액을 제조한다.(계산용이를 위해 표준품 순도를 100%로 가정하여 계산)

(다) 정확성 검액제조

- ① 검체 0.5 g이 들어있는 100 mL 용량플라스크에 96 ppm 표준용액을 다음과 같이 넣고 Methanol로 녹여 100 mL로 한다.

검체 칭량회수	이 름	96 ppm 표준용액 부피
1회	정확성 검액 1_반복 1	0.5 mL
2회	정확성 검액 1_반복 2	0.5 mL
3회	정확성 검액 1_반복 3	0.5 mL
4회	정확성 검액 2_반복 1	2.5 mL
5회	정확성 검액 2_반복 2	2.5 mL
6회	정확성 검액 2_반복 3	2.5 mL
7회	정확성 검액 3_반복 1	4.5 mL
8회	정확성 검액 3_반복 2	4.5 mL
9회	정확성 검액 3_반복 3	4.5 mL

② 정확성 검액은 다음과 같은 농도로 표준품이 첨가된다.

이 름	Curcumin의 량 (100 mL 당)		분석농도 (0.48mg/100mL) 기준 비율
	검체유래	표준품 유래	
정확성 검액 1	0.24 mg	0.048	60 %
정확성 검액 2	0.24 mg	0.24	100 %
정확성 검액 3	0.24 mg	0.432	140 %

- 검체유래 Curcumin의 량 : 검체의 정량결과 (예측 : 0.48 mg/g, 실제 정밀성결과)*0.5 g
- 표준품유래 Curcumin의 량 : 표준원액의 농도 (96 ppm=0.096 mg/mL)*표준원액의 부피

(라) 정확성용 Curcumin 표준용액제조

- ① 표준품 Curcumin 5 mg을 10 mL 용량플라스크에 넣고 Ethanol로 충분히 녹인 후 10 mL로 하여, 488.5 ppm 표준원액을 제조하고, 표준원액 1,000 uL를 10 mL 용량 플라스크에 넣고 희석액으로 잘 혼합하여 48.85 ppm Curcumin 표준액을 특이성 표준용액으로 사용한다.
- ② 다음과 같이 희석하여 2.931 ~ 6.839 ppm 표준용액을 제조하여 직선성 표준 용액으로 사용한다.

이름	48.85 ppm 용액의 부피 (uL)	최종부피(mL)	농도 (ppm)
표준용액 1	600	10	2.931
표준용액 2	800	10	3.908
표준용액 3	1000	10	4.885
표준용액 4	1200	10	5.862
표준용액 5	1400	10	6.839

(마) 정확성 진행

- ① Shimadzu사의 HPLC에 이동상과 컬럼을 연결하고 장비를 1시간 동안 안정화 한

다.

- ② Blank(Methanol), 정확성 Curcumin 표준용액, 정확성 검액을 11. 항 분석조건에 따라 분석을 실시한다.
- ③ 분석반복 : 표준용액제조에 사용된 표준품의 칭량을 1회를 기준으로 정확성 1회로 하고, 총 3회 정확성을 평가한다.

(바) 정확성 진행

- 회수율 : 80 ~ 120%

회수율 = 검액의 Curcumin 실험치/검액의 Curcumin 기대치*100

회수율 기준 : 회수율의 범위는 목적성분에 농도에 따라 달라짐

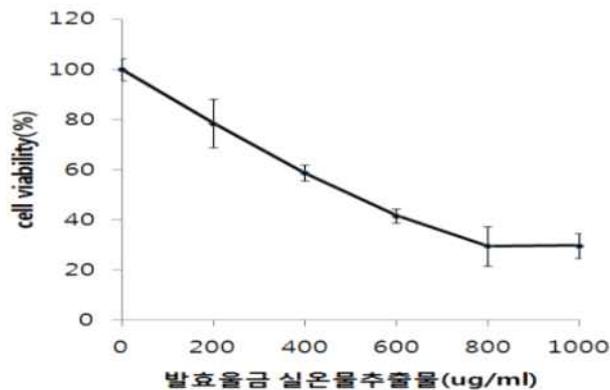
3. 결과

가. 울금 추출물과 발효울금 추출물로부터 *in vitro* 세포계 통한 생리활성 확인

(1) 울금 및 발효울금 추출물의 세포 독성시험

(가) 발효울금 실온추출물의 세포 독성시험

- 향후 실험을 위해 발효울금 실온추출물에 대한 RAW 264.7 cell에 대한 독성을 MTT assay 방법에 의해 확인한 결과, 200 μ g/ml에서 cell viability가 78.47 \pm 9.59%으로 떨어졌으며, 현미경으로 관찰한 결과 또한 200 μ g/ml에서 세포 모양의 변화가 보이기 시작하였다. 이에 따라 발효울금 실온추출물은 유효농도 100 μ g/ml, 최대농도 200 μ g/ml를 선택하여 실험을 진행하였다.



발효울금 실온추출물 100 μ g/ml

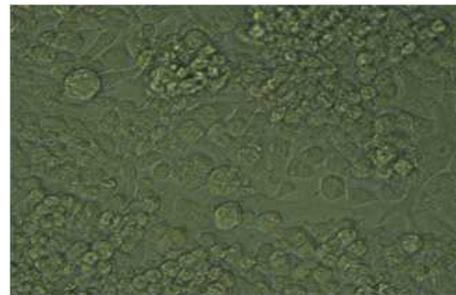
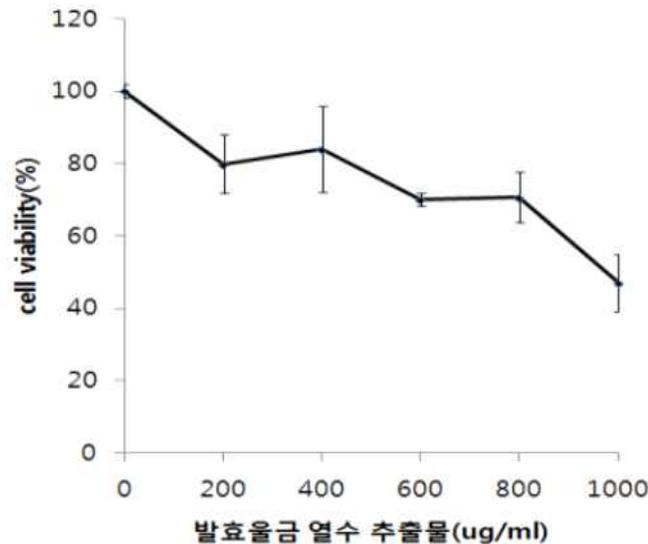


발효울금 실온추출물 200 μ g/ml

<발효울금 실온추출물 세포 독성시험>

(나) 발효울금 열수추출물의 세포 독성시험

- 발효울금 열수추출물에 대한 RAW 264.7 cell에 대한 독성을 MTT assay 방법에 의해 확인한 결과, 200 μ g/ml에서 cell viability가 79.83 \pm 8.18%, 400 μ g/ml에서 cell viability가 83.88 \pm 11.84%으로 나타났으며 600 μ g/ml에서 69.95 \pm 1.70%으로 크게 떨어지면서 독성을 보였다. 현미경으로 관찰한 결과 400 μ g/ml에서 세포 모양의 변화를 보이기 시작하여 발효울금 열수추출물은 유효농도100 μ g/ml, 최대농도400 μ g/ml를 선택하여 실험을 진행하였다.

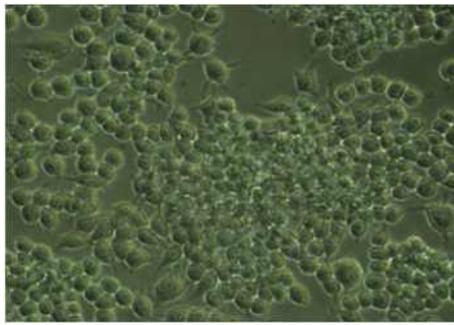
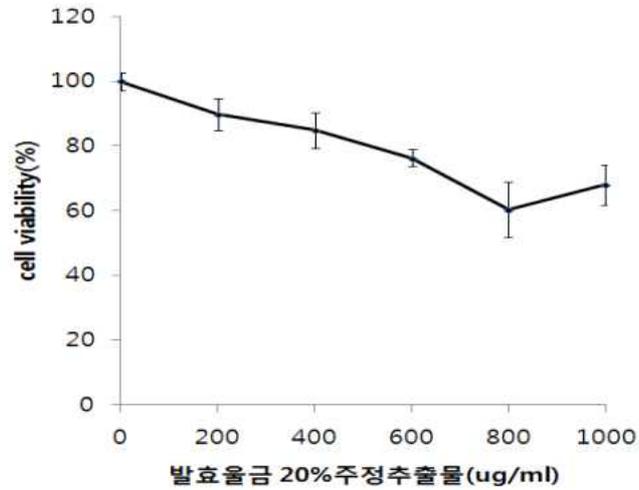


발효울금 열수추출물 100 μ g/ml 발효울금 열수추출물 400 μ g/ml

<발효울금 열수추출물 세포 독성시험>

(다) 발효울금 20%주정 추출물의 세포 독성시험

- 발효울금 20%주정 추출물에 대한 RAW 264.7 cell에 대한 독성을 확인한 결과, 200 μ g/ml에서 cell viability가 89.71 \pm 4.76%였으며 현미경으로 관찰한 결과 또한 200 μ g/ml에서 세포가 사멸되기 시작하는 것을 확인할 수 있었다. 이에 따라 발효울금 20%주정 추출물은 유효농도100 μ g/ml, 최대농도200 μ g/ml를 선택하여 실험을 진행하였다.



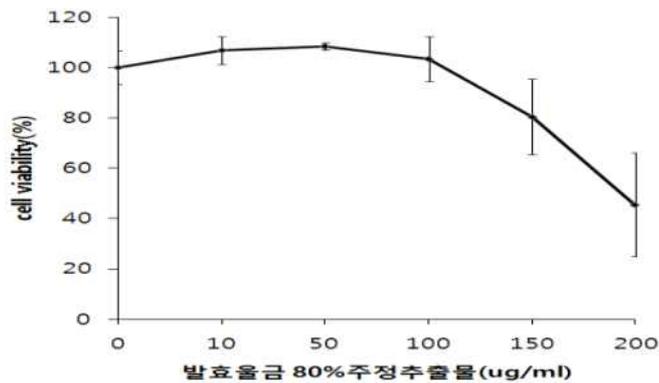
발효율금 20%주정 추출물 100µg/ml

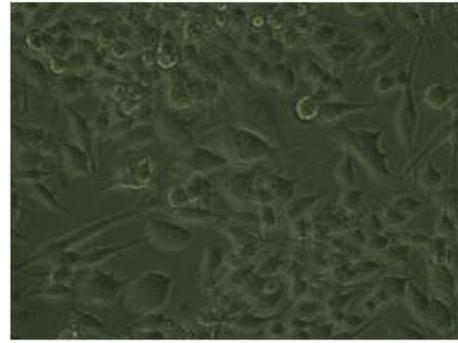
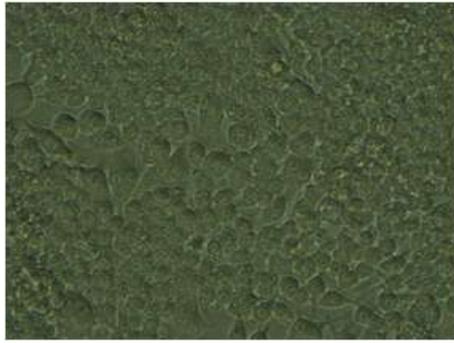
발효율금 20%주정 추출물 200µg/ml

<발효율금 20%주정 추출물 세포 독성시험>

(라) 발효율금 80%주정 추출물의 세포 독성시험

- 발효율금 80%주정 추출물에 대한 RAW 264.7 cell에 대한 독성을 MTT assay 방법에 의해 확인한 결과, 100µg/ml에서 cell viability가 $103.34 \pm 8.97\%$ 으로 독성을 보이지 않았으나 150µg/ml에서부터 독성을 보이기 시작하여 발효율금 80%주정추출물은 유효농도50µg/ml, 최대농도100µg/ml를 선택하여 실험을 진행하였다.





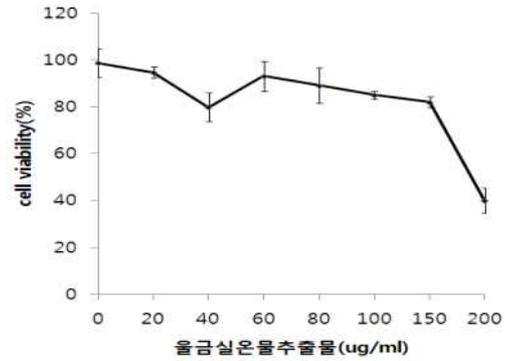
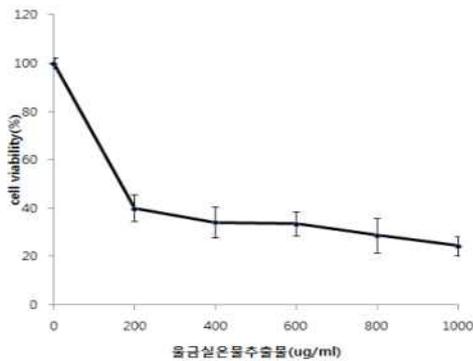
발효울금 80%주정 추출물 50µg/ml

발효울금 80%주정 추출물 100µg/ml

<발효울금 80%주정 추출물 세포 독성시험>

(마) 울금 실온추출물의 세포 독성시험

- 울금 실온추출물에 대한 RAW 264.7 cell에 대한 독성을 MTT assay 방법에 의해 처음 농도를 0에서부터 1000µg/ml까지 확인한 결과, 200µg/ml 농도부터 독성이 나타나기 시작하였다. 다시 0에서부터 200µg/ml까지 재실험을 한 결과, 150µg/ml에서 cell viability가 $82.42 \pm 2.21\%$ 였으나 200µg/ml에서는 $39.97 \pm 5.52\%$ 으로 크게 독성을 보였다. 현미경으로 관찰한 결과 또한 200µg/ml에서 세포사멸이 시작되었음을 관찰하여 울금 실온추출물은 유효농도 100µg/ml, 최대농도는 200µg/ml보다 낮은 150µg/ml를 선택하여 실험을 진행하였다.



울금 실온추출물 100µg/ml

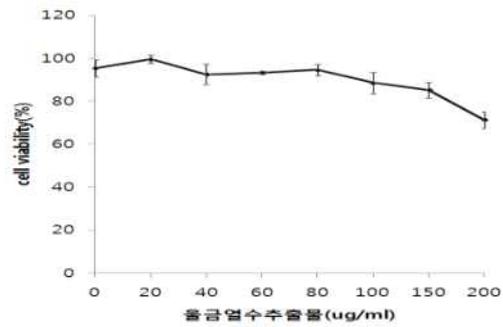
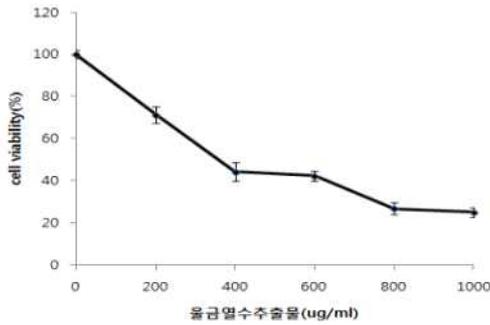
울금 실온추출물 200µg/ml

<울금 실온추출물 세포 독성시험>

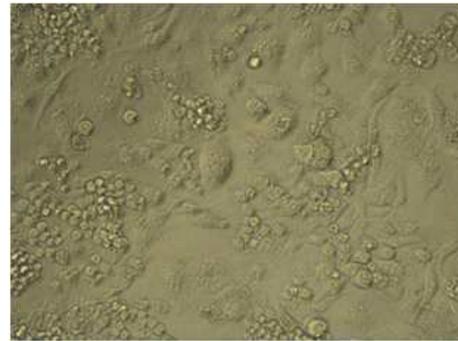
(바) 울금 열수추출물의 세포 독성시험

- 울금 열수추출물에 대한 RAW 264.7 cell에 대한 독성을 MTT assay 방법에 의해

처음 농도를 0에서부터 1000 μ g/ml까지 확인한 결과, 200 μ g/ml농도부터 독성이 나타나기 시작하였다. 다시 0에서부터 200 μ g/ml까지 재실험을 한 결과, 150 μ g/ml에서 cell viability가 85.31 \pm 3.62%으로, 200 μ g/ml에서는 71.24 \pm 3.90%으로 떨어졌다. 현미경으로 관찰한 결과 200 μ g/ml에서 세포 모양의 변화가 보이기 시작하여, 울금 열수 추출물은 유효농도100 μ g/ml, 최대농도는 200 μ g/ml보다 낮은 150 μ g/ml를 선택하여 실험을 진행하였다.



울금 열수추출물 100 μ g/ml

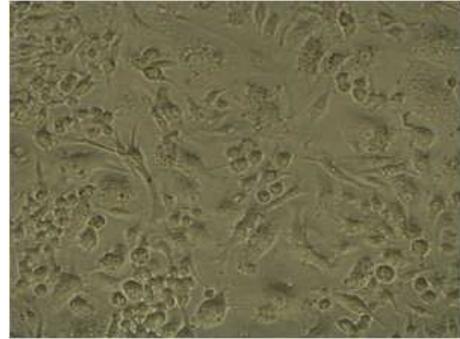
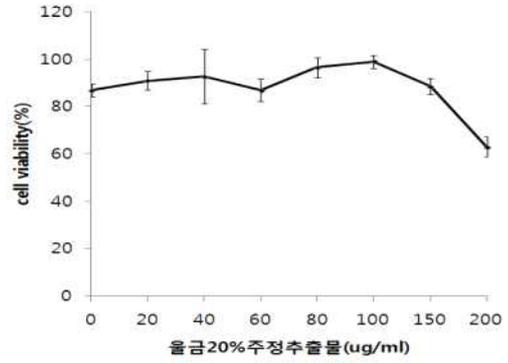
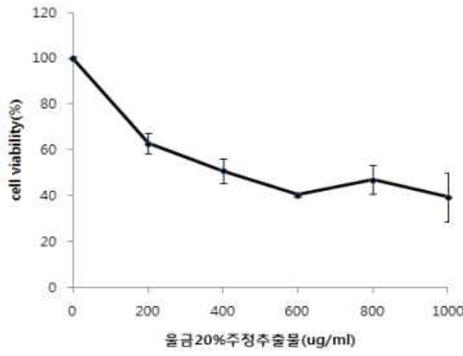


울금 열수추출물 200 μ g/ml

<울금 열수추출물 세포 독성시험>

(사) 울금 20%주정 추출물의 세포 독성시험

- 향후 실험을 위해 울금 20%주정 추출물에 대한 RAW 264.7 cell에 대한 독성을 MTT assay 방법에 의해 처음 농도를 0에서부터 1000 μ g/ml까지 확인한 결과, 200 μ g/ml농도부터 독성이 나타나기 시작한다. 다시 0에서부터 200 μ g/ml까지 재실험을 한 결과, 200 μ g/ml에서 cell viability가 62.95 \pm 4.22%으로 떨어져 독성을 보이기 시작하였다는 확인하였고 현미경으로 관찰한 결과 또한 200 μ g/ml에서 세포 모양의 변화가 있었음을 확인하였다. 이에 따라 울금 20%주정 추출물은 유효농도100 μ g/ml, 최대농도는 세포 모양의 변화가 보이기 시작한 200 μ g/ml보다 낮은 150 μ g/ml를 선택하여 실험을 진행하였다.



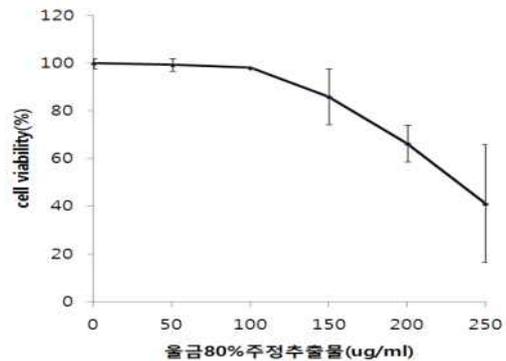
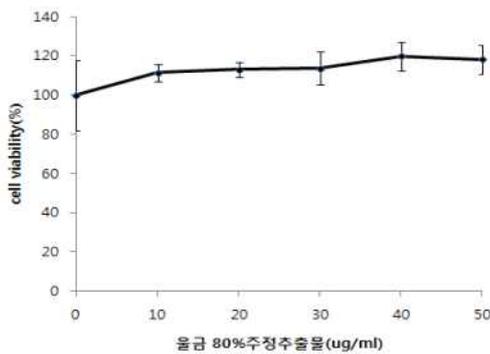
울금 20%주정 추출물 100 μ g/ml

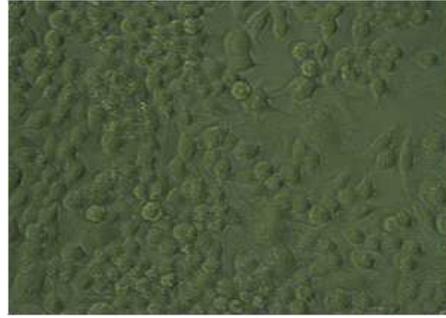
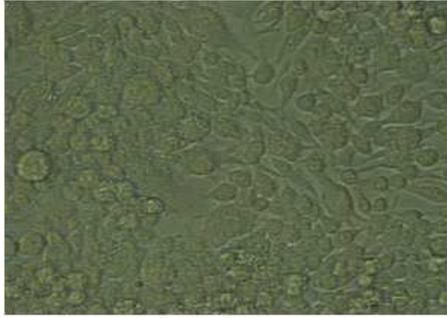
울금 20%주정 추출물 200 μ g/ml

<울금 20%주정 추출물 세포 독성시험>

(아) 울금 80%주정 추출물의 세포 독성시험

- 울금 80%주정 추출물에 대한 RAW 264.7 cell에 대한 독성을 MTT assay 방법에 의해 처음 농도를 0에서부터 50 μ g/ml까지 확인한 결과, 독성이 나타나지 않아, 다시 0에서부터 250 μ g/ml까지 재실험을 한 결과, 100 μ g/ml에서 cell viability가 $98.13 \pm 0.23\%$ 으로 독성을 보이지 않았으나 150 μ g/ml부터 독성을 보이기 시작하였다. 현미경으로 관찰한 결과 200 μ g/ml에서 세포 모양의 변화가 나타나, 울금 80%주정 추출물은 유효농도는 100 μ g/ml보다 낮은 50 μ g/ml, 최대농도는 세포 모양의 변화가 보이기 시작한 200 μ g/ml보다 낮은 100 μ g/ml를 선택하여 실험을 진행하였다.





울금 80%주정 추출물 100µg/ml

울금 80%주정 추출물 200µg/ml

<울금 80%주정 추출물 세포 독성시험>

<세포독성시험을 통해 결정된 최종 실험 농도>

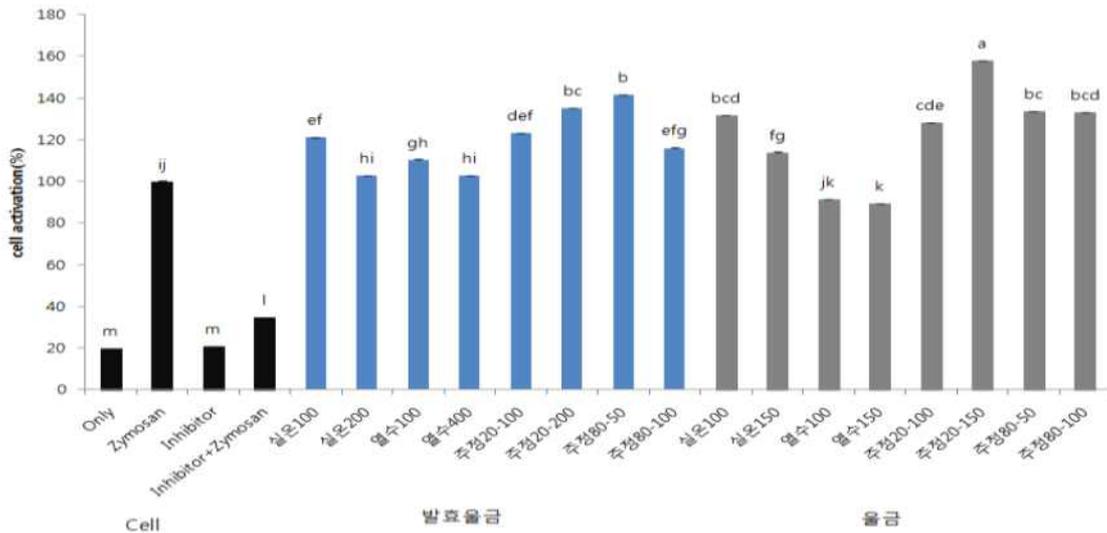
NO.	sample	fraction	concentration
1	발효울금	실온추출물	100µg/ml
2			200µg/ml
3		열수추출물	100µg/ml
4			400µg/ml
5		20%주정 추출물	100µg/ml
6			200µg/ml
7		80%주정 추출물	50µg/ml
8			100µg/ml
9	울금	실온추출물	100µg/ml
10			150µg/ml
11		열수추출물	100µg/ml
12			150µg/ml
13		20%주정 추출물	100µg/ml
14			150µg/ml
15		80%주정 추출물	50µg/ml
16			100µg/ml

(2) 발효울금과 울금 추출물의 정상 상태에서의 면역증강 능력 측정

(가) 복강대식세포에서의 탐식능 측정

- 마우스의 복강에서 대식세포를 분리하여 유효농도와 최대농도의 발효울금과 울금 추출물에 대하여 대식세포의 탐식능을 측정하였다. 대식세포들은 신호물질 등을 통하여 먹어야 하는 고형물질(외부로부터 유입되는 병원체, 혹은 체내의 죽은 세포)을 선별한다. 식세포는 선택된 고형물질에 다가가 세포막을 흡착하며, 이 물질은 돌출된 막에 감싸여 식세포의 형태로 세포 안으로 들어가게 된다. 이 식세포 안에는 리소좀이 있는데, 고형물질은 리소좀에 있는 가수분해효소와 섞이면서 분해되는 것으로 병원체에 대한 대식세포의 대식 활성이 활발해질수록 면역 반응이 적절하게 잘 이루어지고 있다고 말할 수 있다. 인간 정상 세포의 면역기능을 활성화시켜 암세포의 증식과 재발을 억제하고 대식세포를 활성화시켜 암세포가 있는 체내로 들어가 여러 가지 사이토카인의 분비를 촉진시킴으로써 면역세포인 T세포와 B세포의 면역기능을 활성화시켜주는 zymosan을 사용하여 대식세포의 탐식능을 측정하고자 한다(4,5).

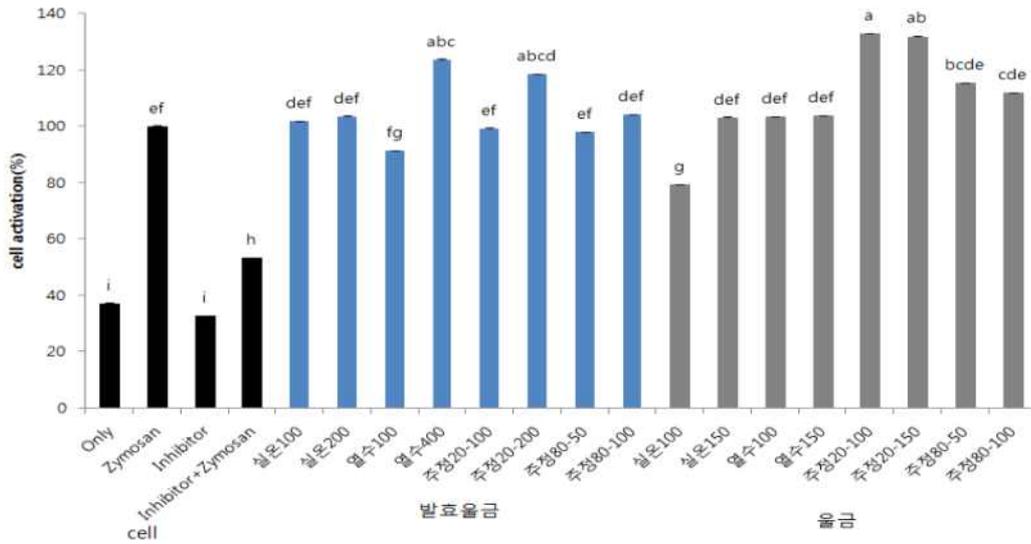
- zymosan만을 처리한 well의 cell activation(%)값을 100%로 하여 발효울금과 울금의 추출물 및 zymosan을 복강대식세포에 처리하였을 때 cell activation의 변화를 살펴보았다. 아무런 처리를 하지 않은 군과 inhibitor를 처리한 군에서는 activation이 현저히 떨어졌음을 확인하였다. 샘플처리에 의한 activation의 변화를 살펴 본 결과 울금 20%주정 추출물 150 μ g/ml에서 157%의 activation을 보여 유의적으로 가장 높은 활성을 보였다. 발효울금 추출물에서는 80%주정 추출물 50 μ g/ml 농도에서 높은 활성을 보였고 다음으로 20%주정 추출물 200 μ g/ml에서 높은 활성을 보였다. 울금과 발효울금 추출물 모두에서 다른 용매 추출물과 달리 20%주정 추출물은 농도 의존적으로 활성이 유의적이게 높아졌음을 확인하였다.



<발효울금 추출물과 울금 추출물의 macrophage cell에서의 탐식능 측정>

(나) RAW 264.7 cell 에서의 탐식능 측정

- RAW 264.7 cell line을 이용하여 위와 동일한 방법으로 대식세포의 활성화를 측정하였다. 그 결과 울금 20%주정 추출물에서 유의적으로 가장 활성이 높았음을 확인하였으며 이는 복강대식세포를 이용하여 측정한 결과와 비슷한 경향을 보였다. 발효울금 추출물에서는 20%주정 추출물이 농도 의존적으로 활성이 높아졌으나 복강대식세포를 이용한 결과와 다르게 열수추출물 400 μ g/ml에서 activation이 높았음을 확인한다. 전체적인 결과를 살펴보았을 때 발효울금과 울금 추출물 모두 20%주정 추출물에서 대식세포의 활성이 증가하였음을 살펴볼 수 있었다.

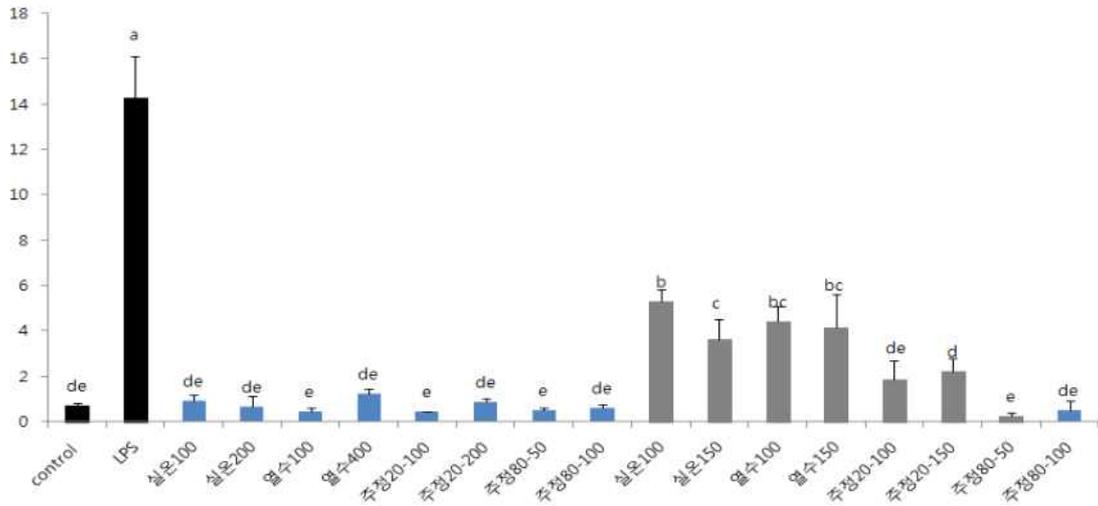


〈발효울금 추출물과 울금 추출물의 RAW 264.7 cell에서의 탐식능 측정〉

(다) RAW 264.7 cell에서 nitric oxide 생성능 측정

- 산화질소(NO)는 체내에서 여러 작용을 하는데, 산화질소는 유전자 활성을 개시/중단 시키는 신호분자이자 혈관 평활근을 조절하는 효과가 있는 물질이다. 또한 뇌신경 세포간 교통을 조절하여 집중력, 정보 인식 기능, 기억력을 강화하며 면역 세포에서 생성된 산화질소는 감염에 대항하고 종양세포를 파괴, 상처치유 기능을 강화시키기도 한다. 그러나 산화질소의 생성이 과하게 이루어 질 경우, 혈류의 흐름을 방해하여 심혈관계, 뇌혈관계 질환을 유발할 뿐만 아니라 면역 세포에서 과잉생성 될 경우- 관절염, 염증성 장질환 등, 자가 면역 질환, 암 등 만성 염증성 질환을 유발할 수도 있다. 또한 과잉 생성된 산화질소에 의해 많은 자유 라디칼이 생성되어 산화를 촉진하게 된다(6).
- 일반적으로 NO의 형성은 박테리아를 죽이거나 종양을 제거시키는 중요한 역할을 하지만 병리학적인 원인 같은 대장균 lipopolysaccharide (LPS)에 의한 과도한 NO의 형성은 염증을 유발시키게 되며 조직의 손상, 유전자 변이 및 신경 손상 등을 유발한다. 면역적인 측면에서 살펴보고자 발효울금과 울금의 처리에 의해서 세포에서 생성되는 NO를 측정하여 LPS를 처리한 군과 비교하였다. LPS를 처리한 군에서 NO의 과도한 분비를 확인하였으며 반면 추출물만 처리한 군에서 적은 양의 NO를 분비하였음을 살펴 볼 수 있다. 이러한 결과는 발효울금과 울금 추출물이 정상적인 상태에서 적당한 NO의 형성을 자극함으로써 면역조절, 혈관 반응 및 신경계 전달 등의 생리학적으로 중요한 역할을 할 수 있음을 기대하는 결과다(7).
- LPS를 처리하지 않은 control군에서 분비되는 NO양은 LPS를 처리하였을 때 현저히 증가하였다. 발효울금과 울금 추출물만 처리하여 생성되는 NO양을 측정한 결과, RAW 264.7 cell로부터 분비되는 NO양은 발효울금은 20%추정 추출물 100µg/ml에서 $0.43 \pm 0.02 \mu\text{M}$, 80%추정 추출물 50µg/ml에서 $0.51 \pm 0.09 \mu\text{M}$, 열수추출물 100µg/ml에서 $0.42 \pm 0.2 \mu\text{M}$ 순으로, 울금은 80%추정 추출물 50µg/ml에서 $0.24 \pm 0.17 \mu\text{M}$, 80%추정 추출물 100µg/ml에서 $0.50 \pm 0.41 \mu\text{M}$, 추정 20%추출물 100

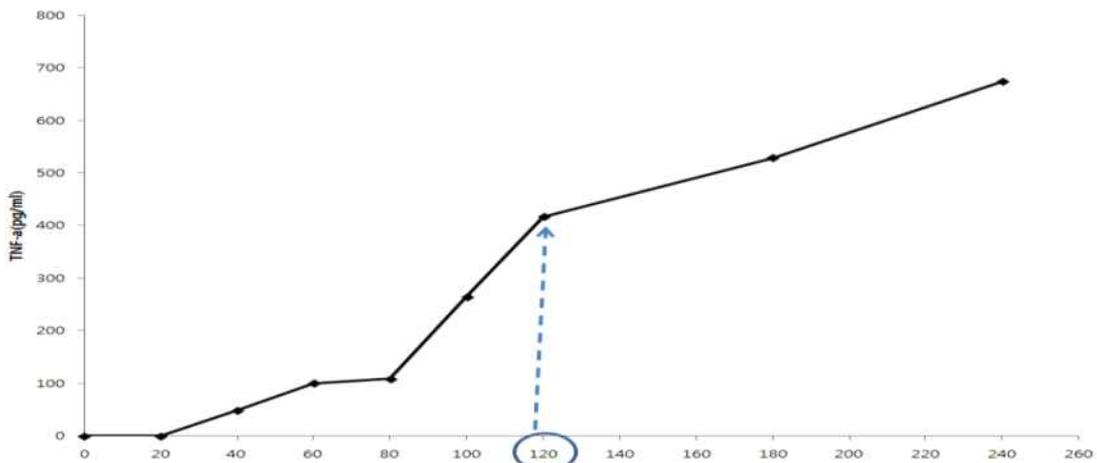
µg/ml 에서 $1.87 \pm 0.83 \mu\text{M}$ 순으로 가장 낮은 NO 생성능을 나타낸다.



<발효울금 추출물과 울금 추출물의 nitric oxide 생성능 측정>

(라) RAW 264.7 cell에서 TNF-α 생성능 측정

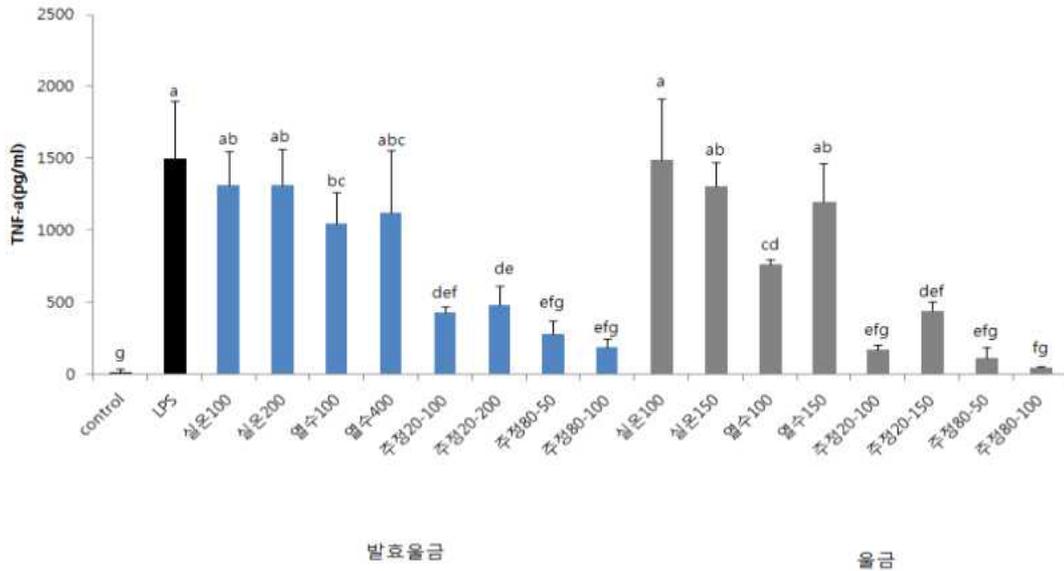
- TNF-α는 암세포를 파괴하는 작용뿐만 아니라 염증작용, 면역세포를 활성화하는 작용을 한다. 체내에 감염원이 유입되었을 때, 면역에 관련된 모든 세포들은 염증을 발생시키는 사이토카인을 분비하게 되는데, 이 염증 매개물질이 병적으로 급격히 과발현되면 체내 세포의 DNA, 지질, 항산화 영양소는 손상을 입게 되고 이로 인해 발암 가능성이 높아질 수 있다. 따라서 염증성 사이토카인의 발현을 억제하면 항염증 효과가 있고, 면역 조절에 도움을 준다고 말할 수 있다(8).
- 측정하기에 앞서 LPS처리 후 TNF-α를 측정했을 때 TNF-α 양이 가장 크게 증가할 때를 알아보기 위해 시간별 농도 변화를 측정하였다. 그 결과 80~120분일 때 가장 크게 증가함을 확인하여 이 후 실험은 120분으로 진행하였다.



<RAW 264.7 cell에서 LPS 처리 후 시간별 TNF-α 농도 변화>

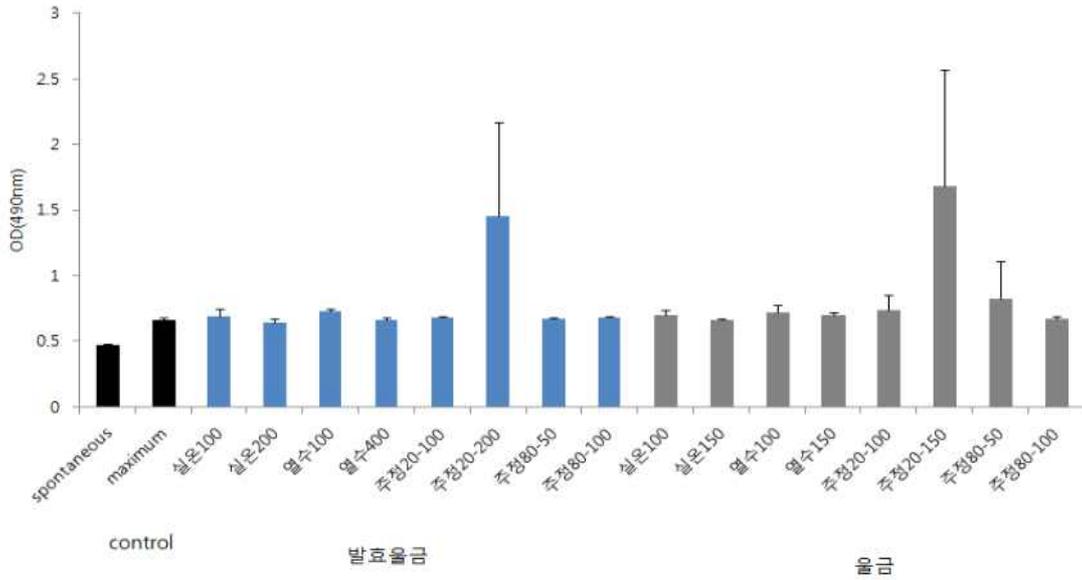
- 발효울금과 울금 추출물만을 처리한 세포에서 전반적으로 LPS로 자극만 준 세포에 비해 염증성 사이토카인인 TNF-α의 생성이 적었으나 울금의 실온추출물 100

µg/ml에서는 유의적인 차이가 없었다. 발효율금의 경우 80%주정 추출물 100µg/ml에서 188.73 ± 53 pg/ml, 주정 20% 추출물 100µg/ml에서 428.21 ± 40.84 pg/ml 순으로, 율금은 80%주정 추출물 100µg/ml에서 41.02 ± 14.21 pg/ml, 80%주정 추출물 50µg/ml에서 109.3 ± 77.59 pg/ml, 20%주정 추출물 100µg/ml에서 167.11 ± 32.66 pg/ml 순으로 낮은 TNF- α 생성능을 보였다.

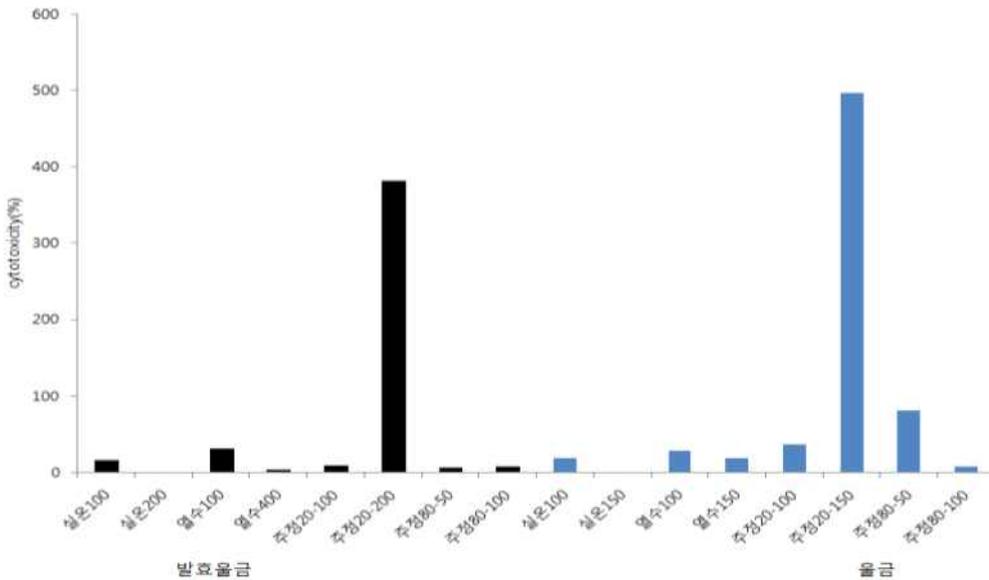


〈발효율금 추출물과 율금 추출물의 TNF- α 생성능 측정〉

- (마) Natural killer cell 활성화 평가 (YAC-1 세포주에 대한 자연살해 활성화 기능측정)
- NK 세포는 림프구의 극히 일부분을 차지하고 있지만 면역방어 기전에 매우 중요한 부분을 차지하고 있는데 T 림프구와 B림프구와는 달리 특별히 항원에 의한 면역이 만들어져 그에 대한 기억이 되어 있지 않아도 어떤 암세포나 바이러스에 감염된 세포들을 자발적으로 공격하는 세포독성을 나타내 표적세포를 살해함으로써 감염이나 이형성 세포의 증식으로부터 우리 몸을 보호한다. 또한 항원과의 반응을 방해하여 일차적인 면역반응을 조절할 뿐 아니라 B림프구의 면역 글로불린 생산을 조절하는 면역계의 억제 세포(suppressor cells)이기도 한다(9).
 - NK cell이 YAC-1 cell을 Target cell로 잡아 공격하여 파괴된 YAC-1 cell로부터 유리된 LDH를 측정함으로써 Natural killer cell 활성화를 평가 할 수 있다. 발효율금의 경우 20%주정 추출물 200µg/ml농도에서 1.44 ± 0.72 , 율금의 경우 20%주정 추출물 150µg/ml농도에서 1.68 ± 0.67 의 가장 높은 흡광도 값이 측정되었다. 흡광도값에 따라 발효율금 20%주정 추출물 200µg/ml농도에서 $0.68 \pm 0.007\%$ 율금 20%주정 추출물 150µg/ml농도에서 $0.69 \pm 0.01\%$ 로 cytotoxicity(%)를 나타내었다. 이는 NK cell의 활성을 증가시켜 YAC-1 cell을 공격하여 YAC-1세포에 대한 NK cell의 자연살해 효과가 보다 뚜렷하게 나타남을 확인할 수 있었다.

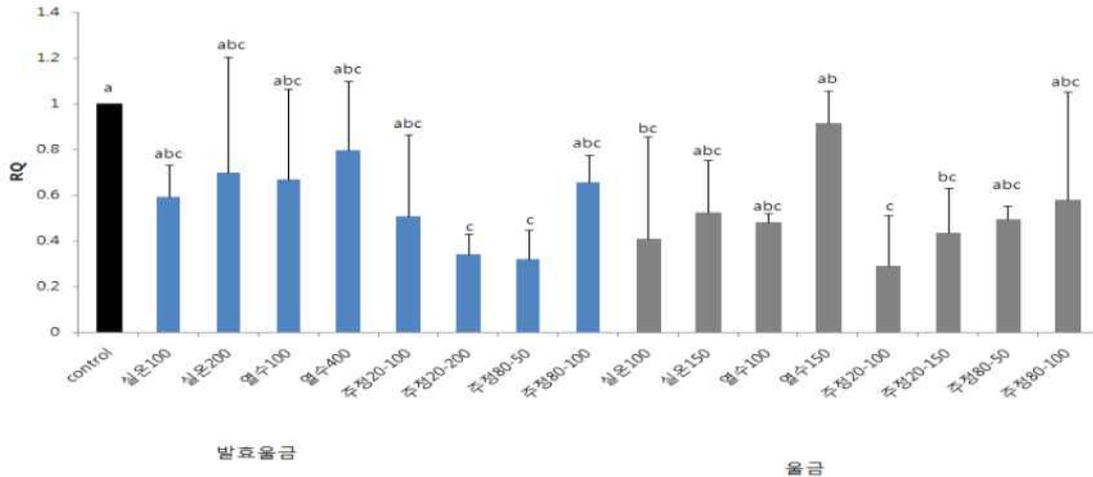


<발효율금 추출물과 울금 추출물의 Effector cell : Target cell ratio 흡광도측정>



<발효율금 추출물과 울금 추출물의 NK cell의 YAC-1 암세포 자연살해 효과에 대한 활성>

(바) 쥐의 면역결핍 유발 바이러스인 LP-BM5 바이러스 유전자의 복제억제능을 측정 - SC-1/LP-BM5 세포주에서 virus 복제 억제능을 Real-time PCR로 LP-BM5 바이러스 유전자 발현을 측정하여 확인하였다. 대체로 발효율금 추출물과 울금 추출물의 농도가 높아질수록 바이러스에 대한 엑티베이션이 높아짐을 볼 수 있었다. control의 RQ값을 1로 했을 때 발효율금은 80%주정 추출물 50 μ g/ml에서 0.31 ± 0.13 , 20%주정 추출물 200 μ g/ml에서 0.33 ± 0.08 , 울금은 20%주정 추출물 100 μ g/ml에서 0.28 ± 0.22 , 80%주정 추출물 50 μ g/ml 0.49 ± 0.05 로 발현량이 control 값 1보다 낮음을 확인할 수 있었으며, 이는 virus가 복제됨을 가장 많이 억제하는 것을 의미한다.



<SC-1/LP-BM5 세포주에서 발효율금 추출물과 울금 추출물의 바이러스 복제 억제능 측정>

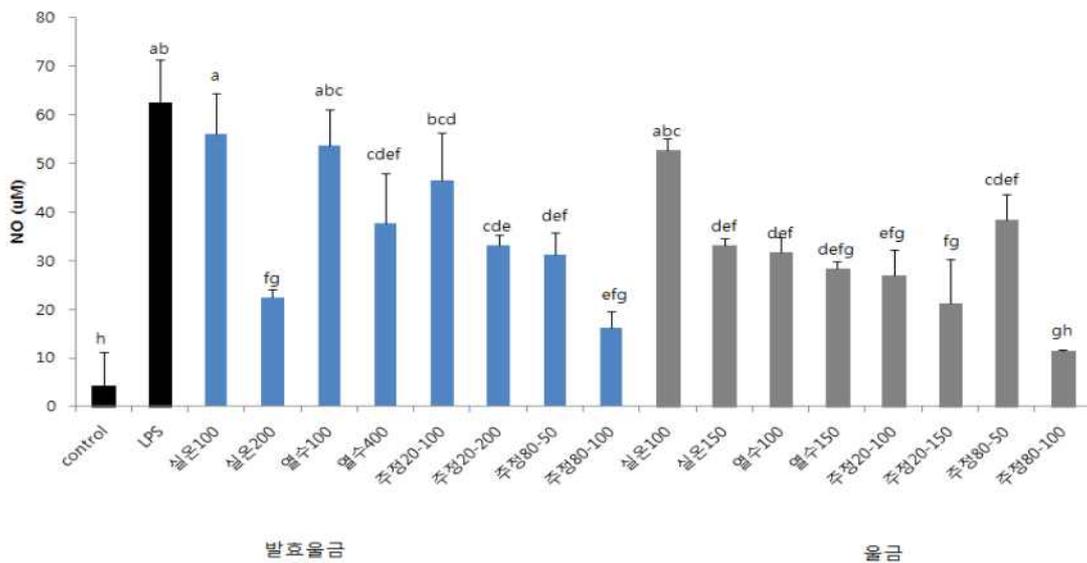
(3) 발효율금과 울금 추출물의 LPS로 유도된 세포에서 항염 활성 측정

(가) RAW 264.7 cell에서 nitric oxide 생성능 측정

- 염증은 외부로부터의 자극에 대한 생체조직의 방어 반응의 하나로, 조직변질, 순환장애와 조직증식의 세 가지를 병발하는 생체의 변화이다. 생체에서 염증반응이 개시되면 다양한 염증매개물질들이 생성되어 발적, 발열, 종창, 동통, 기능장애 등의 증상이 나타난다. 염증반응에 핵심적인 역할을 담당하고 있는 대식세포는 선천면역뿐 만아니라 적응면역 등 다양한 숙주 반응에 관여하여 항상성 유지에 관여하는 것으로 알려져 있다. 대식세포는 LPS와 같은 외부의 자극에 의해 염증반응을 조절하는 핵심적인 전사인자를 활성화 시키며, 그 결과 iNOS, COX-2 등과 같은 효소를 발현시켜 NO, (PGE2 및 염증성 사이토카인 등의 염증매개물질들을 생성한다(10,11). 이러한 염증매개 물질들은 감염초기에 세균을 죽이거나 중양을 제거시키는 역할을 담당하지만, 염증매개물질들의 과도한 형성은 만성염증을 유발시키게 되며 조직의 손상, 유전자 변이 및 신경 손상 등을 유발하는 것으로 알려졌다. 발효율금 추출물과 울금 추출물의 항염증작용을 검토하기 위하여 RAW 264.7 cell에 LPS를 처리하여 염증반응을 유도한 후 NO의 생성, 염증성 사이토카인인 TNF- α 의 분비량을 조사하여 염증반응에 미치는 영향을 관찰함. 내독소로 잘 알려진 LPS는 그람음성균의 세포외막에 존재하며, 대식세포 또는 단핵구에 존재하는 염증성 매개물질의 생성을 증강시키는 것으로 알려졌다. LPS는 대식세포에 존재하는 toll-like receptor(TLR)-4를 활성화시켜 세포내 정보전달 흐름의 활성이 유도되고 결과적으로 다양하면서도 독특한 염증 및 면역반응 관련 유전자들의 전사합성이 이루어진다. 따라서 본 연구에서는 LPS로 RAW 264.7세포를 자극하여 염증반응을 유도하였다(12).
- 산화질소(NO)는 체내에서 여러 작용을 하는데, 산화질소는 유전자 활성을 개시/중단 시키는 신호분자이자 혈관 평활근을 조절하는 효과가 있는 물질이다. 또한 뇌신경 세포간 교통을 조절하여 집중력, 정보 인식 기능, 기억력을 강화하며 면역세포에서 생성된 산화질소는 감염에 대항하고 중양세포를 파괴, 상처치유 기능을 강화시키기도 한다. 그러나 산화질소의 생성이 과하게 이루어 질 경우, 혈류의 흐

를 방해하여 심혈관계, 뇌혈관계 질환을 유발할 뿐만 아니라 면역 세포에서 과잉생성 될 경우 관절염, 염증성 장질환 등, 자가 면역 질환, 암 등 만성 염증성 질환을 유발할 수도 있음. 또한 과잉 생성된 산화질소에 의해 많은 자유 라디칼이 생성되어 산화를 촉진하게 된다(6).

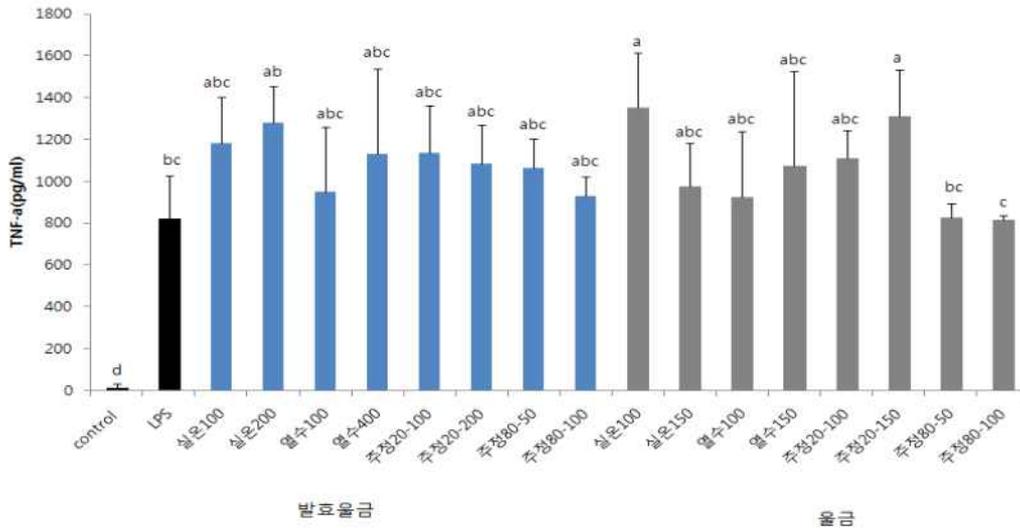
- 일반적으로 NO의 형성은 박테리아를 죽이거나 종양을 제거시키는 중요한 역할을 하지만 병리학적인 원인 같은 대장균 lipopolysaccharide (LPS)에 의한 과도한 NO의 형성은 염증을 유발시키게 되며 조직의 손상, 유전자 변이 및 신경 손상 등을 유발한다. 면역적인 측면에서 살펴보고자 발효율금과 울금의 처리에 의해서 세포에서 생성되는 NO를 측정하여 LPS를 처리한 군과 비교하였다. LPS를 처리한 군에서 NO의 과도한 분비를 확인하였으며 반면 추출물만 처리한 군에서 적은 양의 NO를 분비하는것을 살펴 볼 수 있었다. 이러한 결과는 발효율금과 울금 추출물이 정상적인 상태에서 적당한 NO의 형성을 자극함으로써 면역조절, 혈관 반응 및 신경계 전달 등의 생리학적으로 중요한 역할을 할 수 있음을 기대하는 결과이다(7).
- RAW 264.7 cell을 이용해 nitric oxide를 측정하고자 LPS처리한 군과 발효율금과 울금 추출물만을 처리한 군을 비교하였다. LPS를 처리하지 않은 control군에서 분비되는 NO양은 LPS를 처리하였을 때 현저히 증가하였으며 LPS를 처리하지 않고 추출물만 처리 하였을 때 RAW 264.7 cell로부터 분비되는 NO양은 울금 실온, 열수 추출물에서 control과 비교하였을 때 유의적으로 증가되었음을 확인하였다. 이는 울금 실온, 열수 추출물에 의해 어느정도의 염증과민반응이 일어났음을 의미하며, 발효율금 추출물에서는 80%주정 추출물 100 μ g/ml에서 16.281 μ M를 생성하여 유의적으로 NO의 생성을 가장 크게 억제시켰으며 이에 뒤를 이어 실온추출물 200 μ g/ml이 22.354 μ M NO의 생성하여 억제 시켰음을 확인하였다. 울금 추출물에서는 80% 주정 추출물 100 μ g/ml (11.562 uM), 20%주정 추출물 150 μ g/ml (21.173 μ M), 20%주정 추출물 100 μ g/ml (26.902 μ M) 순으로 NO의 생성을 억제시켰다.



<발효율금 추출물과 울금 추출물의 LPS 처리 후 nitric oxide 생성능 측정>

(나) RAW 264.7 cell에서 TNF- α 생성능 측정

- TNF- α 는 LPS 반응의 주요매개체로 내재면역반응의 중요한 역할을 담당한다. 대식세포나 비만세포에서 분비되는 TNF- α 는 암세포를 파괴하는 작용뿐만 아니라 염증작용, 면역세포를 활성화하는 작용을 한다. 체내에 감염원이 유입되었을 때, 면역에 관련된 모든 세포들은 염증을 발생시키는 사이토카인을 분비하게 되는데, 이 염증 매개물질이 병적으로 급격히 과발현 되면 체내 세포의 DNA, 지질, 항산화 영양소는 손상을 입게 되고 이로 인해 발암 가능성이 높아질 수 있다. 따라서 염증성 사이토카인의 발현을 억제하면 항염증 효과가 있고, 면역 조절에 도움을 준다고 말 할 수 있다(8).
- RAW 264.7 cell을 이용한 TNF- α 생성능 측정된 결과에서도 울금과 발효울금 추출물만을 처리한 군에서 control과 비교하여 증가되었음을 확인하였고, 특히 실은, 열수 추출물에서 그 증가량이 LPS만 처리한 군과 큰 차이 없었다. 이는 울금과 발효울금의 실은, 열수 추출물이 면역과민반응을 일으켰다고 할 수 있다.

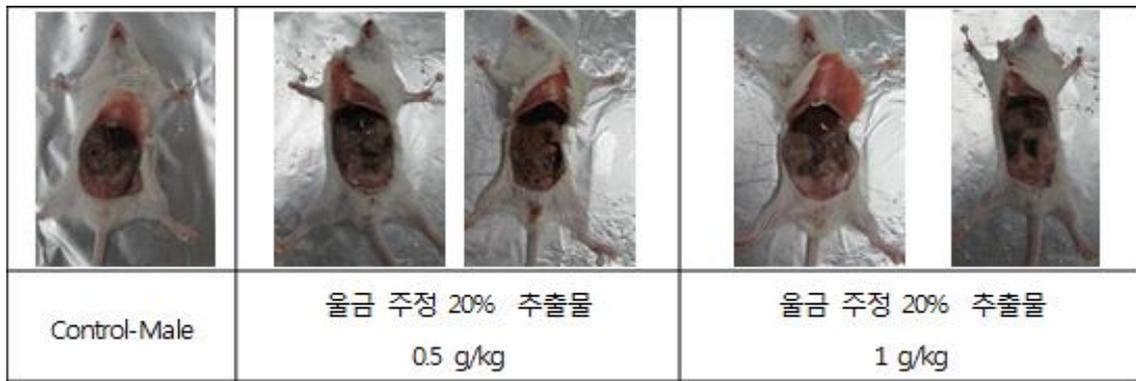


<발효울금 추출물과 울금 추출물의 LPS 처리 후 TNF- α 생성능 측정>

나. *In vitro* test결과로부터 얻어진 추출물 중 1종을 선택하여 동물 모델에서의 효능, 독성 및 적정용량을 검증

(1) 반복 독성검사

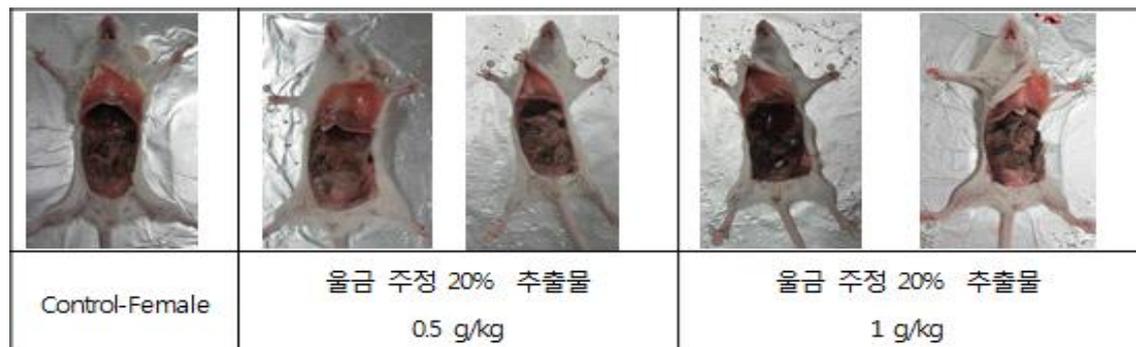
- 동물실험을 수행하기 전 시료의 적정사용 농도를 결정하기 위해 일반 독성검사를 실험실 수준에서 시행하였다.



<Repeated oral administration for 2weeks (Male)>

Group	Control	<i>Curcuma longa L.</i> 20% EtOH	
		0.5 g/kg b.w.	1 g/kg b.w.
Survivability coefficient(%)	100 (5/5)	100 (5/5)	100 (5/5)
FER ¹⁾	1.47±0.40 ^a	0.45±0.46 ^b	1.15±0.32 ^a
AST(mU/ml)	25.38±1.85 ^a	25.66±2.10 ^a	25.53±2.77 ^a
ALT(mU/ml)	47.85±5.67 ^{ab}	42.38±7.63 ^b	53.25±3.68 ^a
Creatine(uM)	51.79±7.53 ^a	54.08±7.35 ^a	51.58±4.11 ^a
Glucose(mM)	4.59±0.71 ^{ab}	3.77±0.81 ^b	5.42±1.03 ^a
Urea(mM)	1.11±0.08 ^a	1.07±0.17 ^a	0.89±0.03 ^a

1) FER(Food efficiency rate) = { weight (g) / food intake (g) } * 100



<Repeated oral administration for 2weeks (Female)>

Group	Control	<i>Curcuma longa L.</i> 20% EtOH	
		0.5 g/kg b.w.	1 g/kg b.w.
Survivability coefficient(%)	100 (5/5)	100 (5/5)	80 (1/5)
FER ¹⁾	1.20±0.53 ^a	0.67±0.26 ^a	0.67±0.49 ^a
AST(mU/ml)	21.71±2.54 ^a	24.46±3.33 ^a	23.50±2.79 ^a
ALT(mU/ml)	26.58±4.53 ^b	33.10±12.96 ^a	41.22±5.4 ^a
Creatine(uM)	53.92±7.53 ^a	54.08±7.35 ^a	51.58±4.11 ^a
Glucose(mM)	2.58±0.39 ^a	3.12±0.68 ^a	3.04±0.19 ^a
Urea(mM)	0.70±0.07 ^a	0.70±0.17 ^a	0.81±0.06 ^a

1) FER(Food efficiency rate) = { weight (g) / food intake (g) } * 100

- 동물모델에서 울금 20%주정 추출물의 면역증강 효과를 확인하기 위하여 각 용매별 추출물을 농도별로 단기 및 반복 독성시험을 실시하여 안전한 농도를 확인하고자 ICR mouse를 이용하여 경구투여를 실시하였다. 그 결과 반복 독성시험(14회) 중 1 g/kg 농도를 투여한 암컷 마우스에서 생존율 80%를 제외하고 나머지에서 생존율 100%를 보였으며 식이효율 및 장기에서는 이상소견 관찰되지 않았다. 또한 AST, ALT, Creatine, Glucose, Urea를 측정된 결과 1 g/kg 농도에서 독성이 나타났다. 독성시험을 통해 안전하다고 판단되는 50 mg/kg, 200 mg/kg, 500 mg/kg 농도로 정하여 실험을 실시하도록 하였다.

(2) 정상마우스에서의 면역조절 결과

(가) 해부학적 변화 소견 및 장기 무게 변화

<주요 장기 무게>

Group	Spleen (g)	Liver (g)	Kidney (g)	Heart (g)
Wild type	0.07 ± 0.01 ^a	0.82 ± 0.06 ^a	0.26 ± 0.01 ^a	0.13 ± 0.01 ^a
Positive control	0.07 ± 0.01 ^a	0.81 ± 0.08 ^a	0.27 ± 0.02 ^a	0.11 ± 0.01 ^a
CL50	0.08 ± 0.03 ^a	0.78 ± 0.14 ^a	0.28 ± 0.03 ^a	0.12 ± 0.01 ^a
CL200	0.09 ± 0.01 ^a	0.84 ± 0.05 ^a	0.26 ± 0.01 ^a	0.10 ± 0.01 ^a
CL500	0.07 ± 0.01 ^a	0.84 ± 0.06 ^a	0.27 ± 0.01 ^a	0.12 ± 0.01 ^a

① 림프절 무게 변화

- LP-BM5 retrovirus의 감염이 활성화 단계에 이르게 되면 면역세포들의 활성화에 따른 지속적인 mitogenesis로 인해 림프절이 급격하게 커지는 현상이 발생하게 되며 이것은 LP-BM5 retrovirus 감염이 정상적으로 발현되고 있음을 나타내는 지표가 되기도 한다(13,14). 따라서 림프절의 크기는 감염의 정도뿐만 아니라 특정 샘플을 섭취시켰을 때 감염의 발현 억제 정도를 간접적으로 확인할 수 있는 수단이 되기도 한다. 본 실험에서 LP-BM5 retrovirus 감염시키지 않은 정상군에서 림프절을 육안으로 관찰하지 못했다.

② 비장무게 변화

- 비장 (spleen)의 무게 변화는 림프절의 변화와 마찬가지로 LP-BM5 retrovirus의 감염에 의해 가장 큰 변화를 나타내는 기관으로 알려져 있다. 비장은 면역 기능을 담당하는 제일 중요한 기관으로서 면역세포가 밀집되어 있고 memory 세포 또한 존재하기 때문에 항원이 제시되었을 때 이에 대해 반응하여 면역세포의 mitogenesis를 동반하여 급격하게 비장의 크기가 증가하는 megasplenocyte를 유발하게 되며 이것은 LP-BM5의 감염에 따른 가장 일반적인 현상으로 인식되어져 왔다(13,14). 본 실험에서 정상군의 경우 0.07 ± 0.01 g으로 나타났으며 양성대조군 및 울금 20%주정 추출물 50 mg/kg, 200 mg/kg, 500 mg/kg 모두에서 비장의 크기가 유의적인 차이가 없었음을 확인하였다.

③ 간 무게 변화

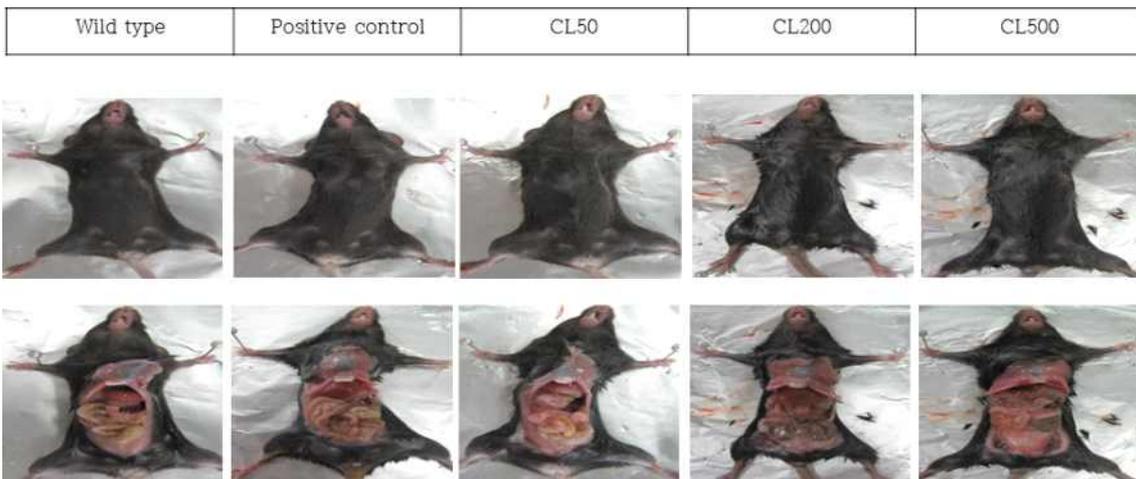
- LP-BM5의 retrovirus의 감염 시 활성산소에 의한 산화적 스트레스가 급격히 증가하는 것으로 알려져 있으며 이렇게 생성된 산화적 스트레스는 간세포에 존재하는 비타민 C와 비타민 E를 포함한 항산화 비타민과 항산화성 물질들에 의해 일부 제거되지만 바이러스 감염에 의한 지속적인 산화적 스트레스의 생성은 간세포 내의 항산화 비타민과 항산화성 물질의 고갈을 초래하게 되고 염증반응을 유발하여 간의 크기가 증가하게 되는 것으로 일반적으로 알려져 있다(15). 본 실험에서 정상군의 간 무게가 0.82 ± 0.06 g으로 나타났으며 양성대조군 및 울금 20%주정 추출물 50 mg/kg, 200 mg/kg, 500 mg/kg 모두에서 비장의 크기가 유의적인 차이가 없었음을 확인하였다.

④ 신장 무게 변화

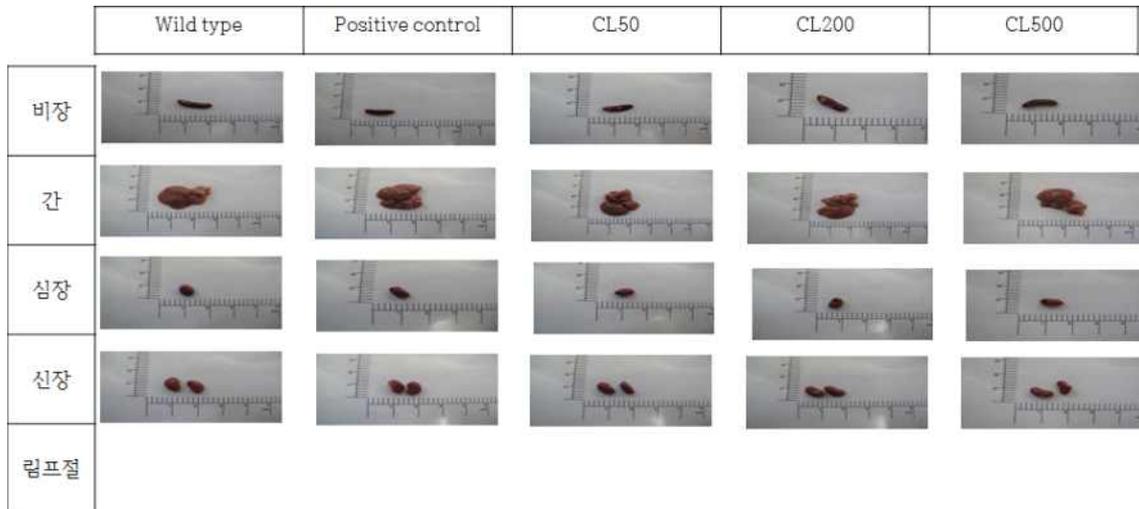
- LP-BM5 retrovirus 감염 시 신장의 무게에 있어서 큰 변화를 보인다는 연구결과는 아직 알려지지 않았다(13,14). 본 실험에서 정상군의 신장 무게가 0.26 ± 0.01 g으로 나타났으며 양성대조군 및 울금 20%주정 추출물 50 mg/kg, 200 mg/kg, 500 mg/kg 모두에서 신장의 크기가 유의적인 차이가 없었음을 확인하였다.

⑤ 심장 무게 변화

- LP-BM5 retrovirus 감염시 심장의 무게 또는 크기가 미세하지만 증가한다는 보고가 일부 있었지만 아직 결정적인 확인은 이루어지지 않았다(13,14). 본 실험에서는 정상군의 심장 무게가 0.13 ± 0.01 g으로 나타났으며 양성대조군 및 울금 20%주정 추출물 50 mg/kg, 200 mg/kg, 500 mg/kg 모두에서 신장의 크기가 유의적인 차이가 없었음을 확인하였다.



<외관 관찰 및 부검 결과>



〈주요 장기 관찰〉

(나) 몸무게 변화량 및 식이효율

식이효율을 알아보기 위하여 실험기간 동안 증가한 무게와 섭취한 식이량을 이용하여 FER { (food efficiency rate = weight gain(g) / food intake (g)) } 를 계산하였다. 그 결과 모든 군 간의 유의적인 차이를 보이지 않았음을 확인하였고 이는 식이효율이 다 음의 실험결과에 영향을 미치지 않았음을 의미한다.

〈식이섭취량, 몸무게 변화량 및 식이효율〉

Group	Food consumption (g/day)	Weight gain ¹⁾ (g/13weeks)	FER ⁴⁾
Wild type	2.57 ± 0.37	6.33 ± 0.65 ^{2)a3)}	0.027 ± 0.002 ^a
Positive control	2.42 ± 0.56	5.73 ± 1.39 ^a	0.026 ± 0.006 ^a
CL50	2.36 ± 0.53	6.13 ± 1.13 ^a	0.029 ± 0.005 ^a
CL200	2.32 ± 0.52	5.65 ± 0.82 ^a	0.027 ± 0.004 ^a
CL500	2.33 ± 0.54	6.45 ± 0.27 ^a	0.030 ± 0.001 ^a

¹⁾ Weight gain(g/13weeks)=final body weight(g)-initial body weight(g).

²⁾ Values are means ±SD, n=6

³⁾ The same superscripts in the same column are not significantly at 5% level by Duncan's multiple test

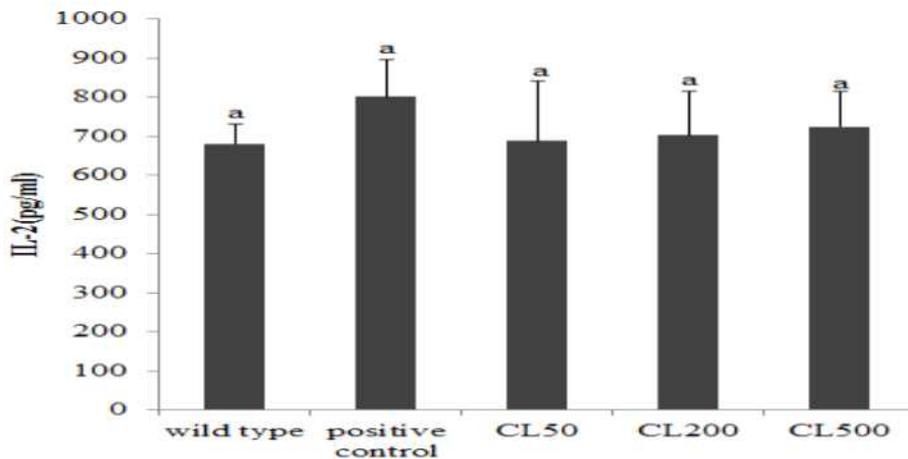
⁴⁾ FER(Food efficiency rate) = { weight (g) / food intake (g) } * 100

(다) 면역상태 확인을 위한 splenocyte의 cytokines 발현 측정과 mitogen에 대한 T와 B 세포의 증식 조절능력 측정

① Th1 type cytokine의 발현 조절

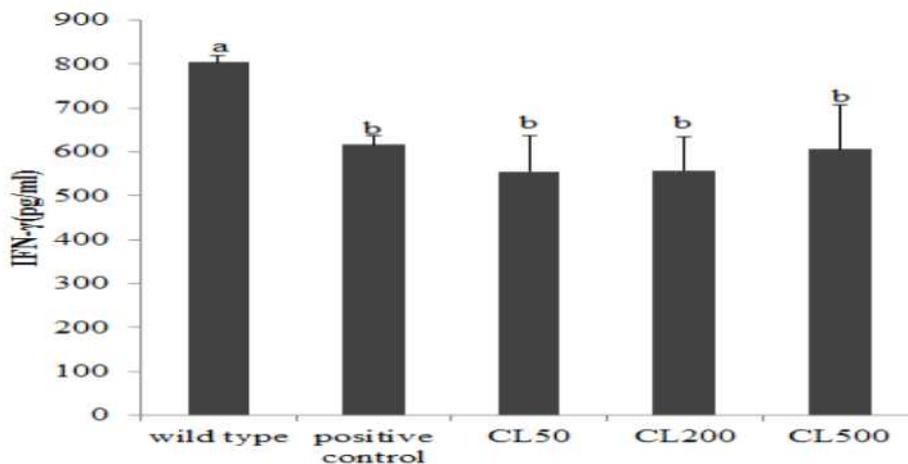
㉓ IL-2 cytokine 발현

- IL-2는 면역조절에 관여하는 단백질로서, T-cell growth factor (TCGF)라고 알려져 있다. T-cell을 증식시키고 T-cell에 작용하여 IFN- γ 을 분비시키는 작용을 하며, B-cell을 자극시키는 활성이 있음. 또한 Natural killer (NK) cells, lymphokine-activated killer cells과 같은 면역세포를 활성화시킨다(16). IL-2의 경우 모든 동물 실험 군에서 유의적인 차이가 없는 유사한 값을 나타내었다. 이는 wild type과 울금 20%주정 추출물 식이 섭취군이 IL-2에 의한 면역계 자체에 영향을 주지 않았다는 것을 확인할 수 있으며 항상성 측면에서도 면역 항상성이 유지가 되었음을 알 수 있다.



<정상군 primary splenocyte에서의 IL-2 발현>

㉔ IFN- γ cytokine 발현

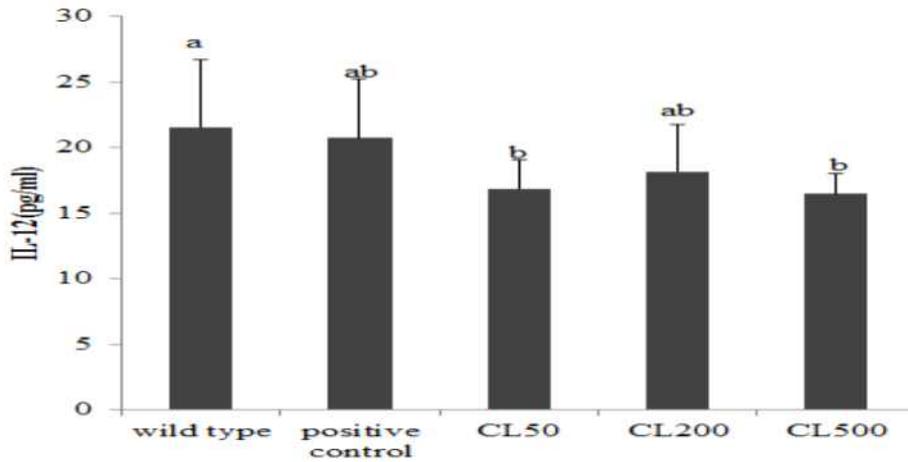


<정상군 primary splenocyte에서의 IFN- γ 발현>

- IFN- γ 는 Th-1의 효과분자인 동시에 Th-1 분화를 유도하는 cytokine이다. IFN- γ 는 주로 자연살해(NK) 세포나 CD8+T 세포, 또는 CD4+T 세포 자신에 의하여 생성되나 수상세포에 의한 생성도 보고하고 있으며 여러 가지에 걸쳐서 세포에서 생성된다고 생각된다. 또한 Th1 type cytokine과 Th2 type cytokine을 상대적으로 보완 조절하는 중요한 역할을 IL-10과 함께 담당하고

있어서 전체적인 면역조절과 항상성 유지에 매우 중요한 cytokine으로 인식되어 왔다(17). IFN- γ 의 경우 울금 20%주정 추출물이 wild type과 유의적인 차이가 있으나 양성대조군과 유의적 차이가 없는 것을 확인하였다.

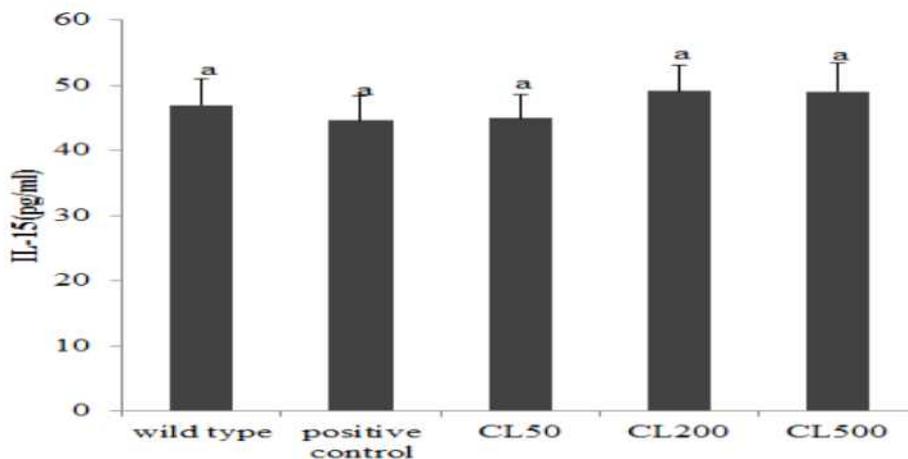
㉔ IL-12의 발현



<정상군 primary splenocyte에서의 IL-12 발현>

- IL-12는 대식세포 혹은 B cell에서 분비되어 cytotoxic T cell의 분화를 촉진하고 NK cell을 활성화하여 외부 이물질을 사멸하는 역할을 한다고 알려져 있다(18). IL-12의 경우 울금 20%주정 추출물 50 mg/kg, 500 mg/kg는 wild type과 유의적인 차이가 있으나 양성대조군과 유의적 차이를 나타내지 않았다. 200 mg/kg는 wild type뿐만 아니라 양성대조군과 유의적 차이가 없는 것을 확인하였다.

㉕ IL-15의 발현



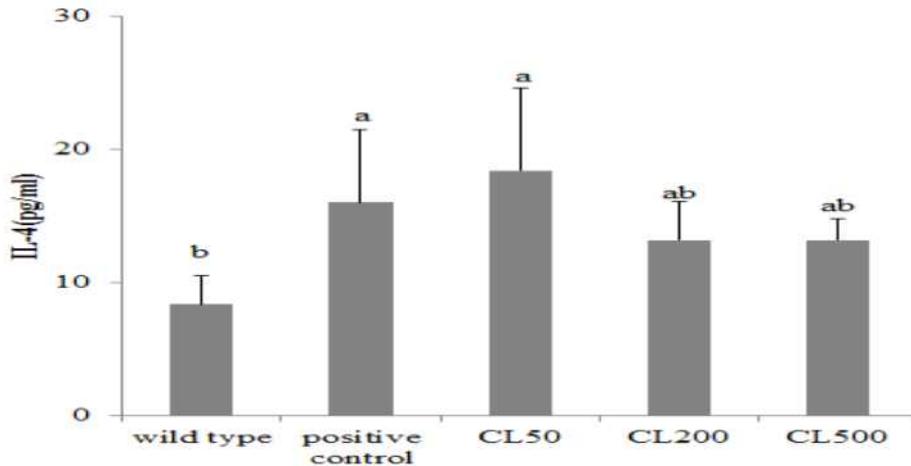
<정상군 primary splenocyte에서의 IL-15 발현>

- IL-15는 IL-2의 생물학적 활성 대부분을 나타낸다. 세포상해성 T세포의 증식, 동종항원 특이적 세포상해성 T세포 및 항원 비특이적 림포카인활성살생세포(LAK)의 시험관 내 작성을 촉진한다(19). IL-15의 경우 모든 동물 실험 군에서 유의적인 차이가 없는 유사한 값을 나타내었다. 이는 wild type과 울금 20%주

정 추출물 식이 섭취군이 IL-15에 의한 면역계 자체에 영향을 주지 않았다는 것을 확인할 수 있으며 항상성 측면에서도 면역 항상성이 유지가 되었음을 알 수 있다.

② Th2 type cytokine의 발현 조절

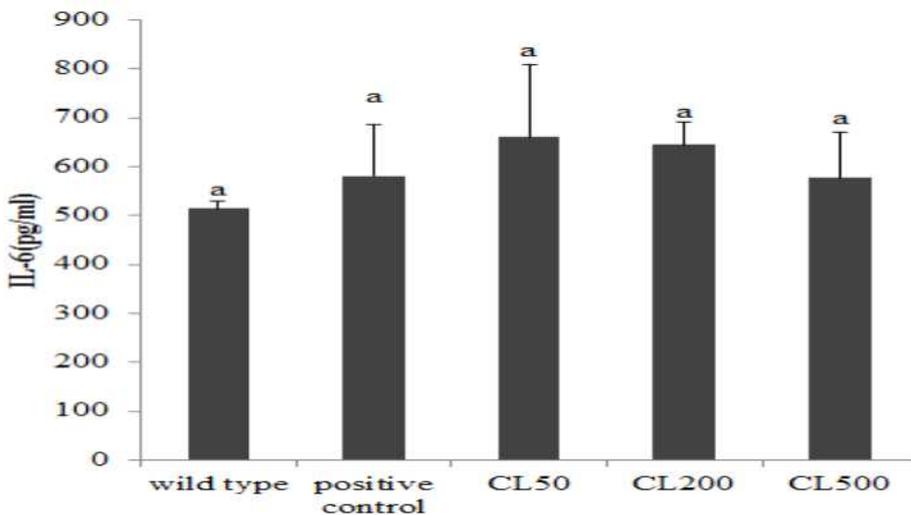
㉠ IL-4 의 발현



<정상군 primary splenocyte에서의 IL-4 발현>

- IL-4는 CD-4 T-cell과 activated mast cell에 의해 만들어지며, B-cell growth factor의 작용을 한다. 또한 B-cell의 immunoglobulin의 class switch에 관여하는 differentiation factor로 작용할 수 있으며, CD4 T-cell과 mast cell, macrophage 등을 활성화하기도 한다(20). IL-4의 경우 울금 20%주정 추출물 식이섭취군과 양성대조군은 유의적 차이가 없었고 식이섭취군 중 200 mg/kg, 500 mg/kg는 wild type과 유의적 차이를 나타내지 않았음을 확인할 수 있었다.

㉡ IL-6 의 발현

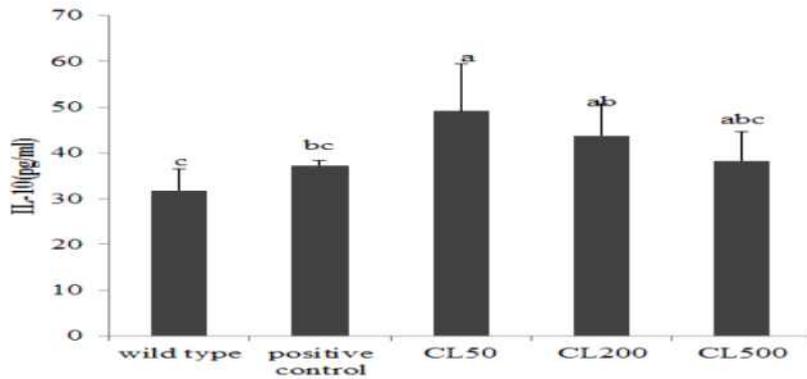


<정상군 primary splenocyte에서의 IL-6 발현>

- IL-6는 여러 가지 기능을 가지고 있는 cytokine으로 염증 반응과 면역 반응을

매개하는 것으로 잘 알려져 있다. IL-6의 중요한 생물학적 작용 중 하나는 B 림프구(B lymphocyte) 성숙의 마지막 단계를 자극 하는 것인데, IL-6의 영향 하에 B 림프구는 성숙한 형질 세포 (plasma cell)로 분화되고, 면역 글로불린 (immunoglobulin)을 분비하며 IL-6는 IL-1 β 와 TNF- α 와 더불어 급성 반응 단백질들을 유도하는데 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다(21). IL-6의 경우는 wild type과 울금 20%주정 추출물에서 IL-6의 생성이 유의적인 차이가 없음을 확인하였다. wild type보다 울금 20%주정 추출물 IL-6 양의 수치가 약간 높게 나왔지만 면역과민현상이 일어났다고 보기는 힘들다.

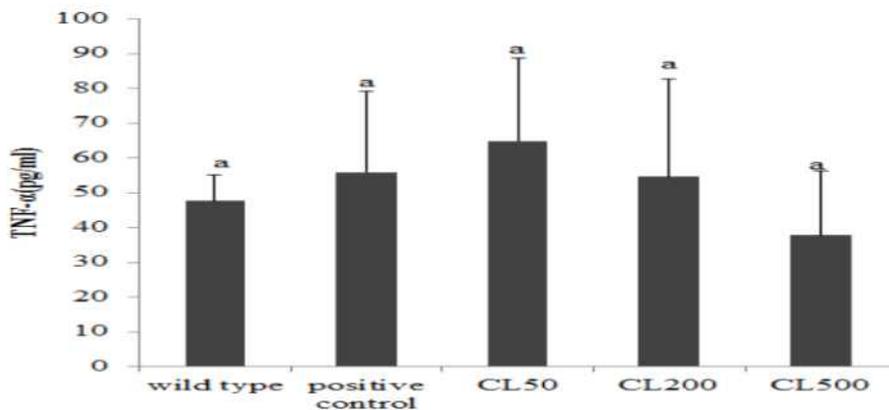
㉔ IL-10 의 발현



<정상군 primary splenocyte에서의 IL-10 발현>

- IL-10의 발현은 Th1 type cytokine을 상대 보완적으로 억제하여 Th1 type과 Th2 type cytokine의 항상성을 유지하는 역할을 담당한다. 그러나 IL-10은 과도하게 증가하면 Th2 type cytokine은 증가시키고 상대적으로 Th1 type cytokine을 억제시켜 항상성을 파괴하는 원인이 되기도 한다(22). 울금 20%주정 추출물 50 mg/kg, 200 mg/kg는 wild type보다 유의적으로 증가되었음을 알 수 있다. 500 mg/kg의 경우 wild type 및 양성대조군과 유의적 차이가 없음을 확인하였다.

㉕ TNF- α 의 발현



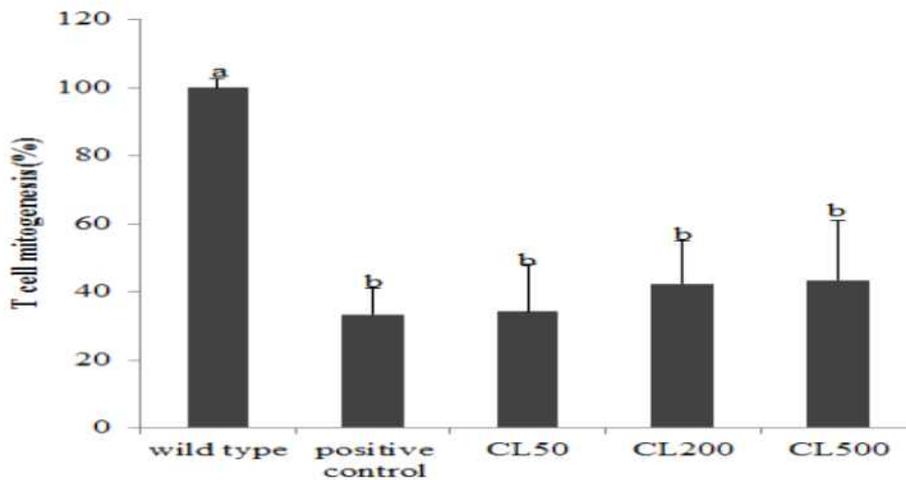
<정상군 primary splenocyte에서의 TNF- α 발현>

- TNF- α 는 암세포를 파괴하는 작용뿐만 아니라 염증작용, 면역세포를 활성화 하는 작용을 한다. 체내에 감염원이 유입되었을 때, 면역에 관련된 모든 세포

들은 염증을 발생시키는 cytokine을 분비하게 되는데, 이 염증 매개물질이 병적으로 급격히 과발현되면 체내 세포의 DNA, 지질, 항산화 영양소는 손상을 입게 되고 이로 인해 발암 가능성이 높아질 수 있다. 따라서 염증성 cytokine의 발현을 억제 하면 항염증 효과가 있고, 면역 조절에 도움을 준다고 말할 수 있다. TNF- α 는 염증을 유발시키는 proinflammatory cytokine의 대표적인 물질이며 일반 세포의 생리활성 뿐만 아니라 면역세포의 활성조절에 있어서도 가장 중요한 물질의 하나로 인식되고 있다(23). TNF- α 의 경우 모든 동물 실험 군에서 유의적인 차이가 없는 유사한 값을 나타내었다. 이는 wild type과 울금 20%주정 추출물 식이 섭취군이 TNF- α 에 의한 면역계 자체에 영향을 주지 않았다는 것을 확인할 수 있으며 울금 20%주정 추출물 식이로 인한 면역과민반응이 발생하지 않았음을 알 수 있다.

③ T & B 세포 증식능 반응성 측정

㉞ T 세포의 mitogen에 대한 증식능 반응성 측정



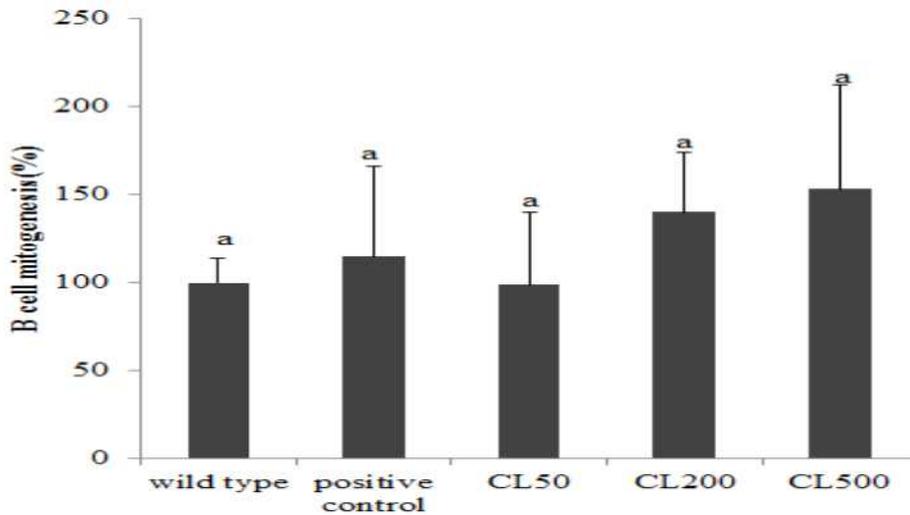
<정상군 primary splenocyte에 존재하는 T세포의 ConA에 대한 증식능 반응성 측정결과>

- LP-BM5 retrovirus의 감염으로 인한 T세포의 활성감소는 CD4 수용체를 경유하는 LP-BM5 retrovirus의 감염경로와 관련이 있는데 주도적으로 T helper 세포가 영향을 받아 사멸하거나 정상적인 작용을 하기 힘든 anergy 상태로 되기 때문이다(24). 따라서 본 실험에서는 세포를 활성화 시킬 수 있도록 mitogen을 처리한 후 각각의 식이를 투여한 군에서 어떠한 반응이 나타나는지 확인하였다. 울금 20%주정 추출물 및 양성대조군이 wild type과 비교했을 때 유의적으로 감소했음을 알 수 있었고 양성대조군과 울금 20%주정 추출물은 유의적 차이를 나타내지 않음을 알 수 있었다.

㉟ B 세포의 mitogen에 대한 증식능 반응성 측정

- T 세포와는 달리 B 세포의 경우 세포성 면역체계가 아닌 항체를 생성하는 면역체계임을 감안할 때 직접적인 감염의 영향은 적을 것으로 생각된다. 하지만 LP-BM5 retrovirus의 감염으로 인해 그 활성은 마찬가지로 감소하는 것으로 알려져 있는데(25,26) 본 실험에서는 wild type과 울금 20%주정 추출물에서 유의적인 차이가 없는 것으로 나타났다. 그 결과, 면역계 자체에 조금도

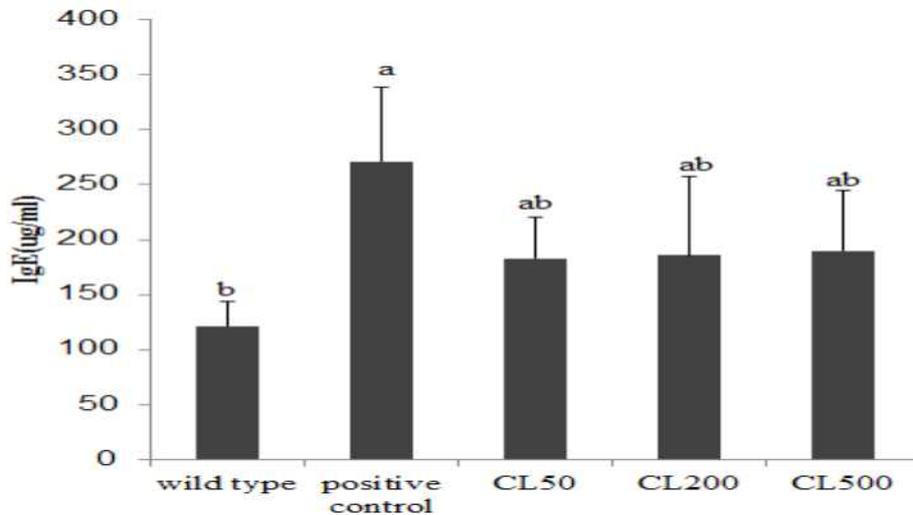
영향이 없다 볼 수 있다.



<정상군 primary splenocyte에 존재하는 B세포의 LPS에 대한 증식능 반응성 측정결과>

(라) 항원특이항체 (IgG, IgE, IgA) 반응성 측정

① IgE 측정

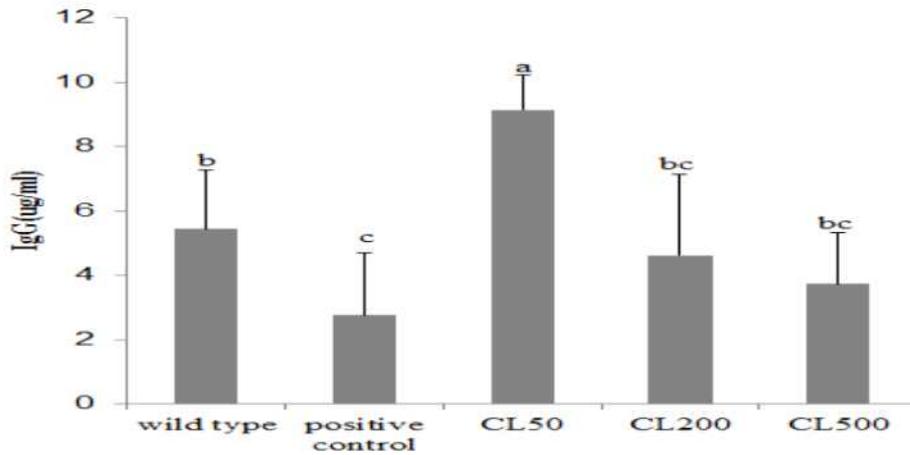


<정상군 IgE levels>

- LP-BM5는 면역계가 무해한 항원에 대해 민감하게 반응하여 신체에 이상반응을 일으키는 것으로, IgE 항체는 분자 내 Fc fragment의 Cε3 domain을 통해 비만세포의 IgE receptor인 FcεR1과 결합한다. 동일한 항원에 의해 비만세포 표면의 IgE가 교차결합 되면 비만세포가 활성화되어 histamine, proteoglycan, esrine protesases, 염증성 cytokine 등과 같은 염증성 매개물들이 분비되고, 이들에 의해 알레르기 염증의 초기 반응이 일어난다. 게다가 이러한 화학 매개체들이 세포로부터 지속적으로 생산되고 방출되면 T-cell과 eosinophil이 관여하는 후기 염증반응을 일으키게 된다. 따라서 바이러스 반응에 직접적으로 작용하는 allergen-specific IgE의 분비를 억제하는 것이 바이러스의 예방과 치료에 유용한

방법으로 발전되고 있다(27). IgE의 경우 wild type은 양성대조군에 비해 유의적으로 감소하였으나 울금 20%주정 추출물 식이 섭취군과 유의적인 차이를 나타내지 않았다.

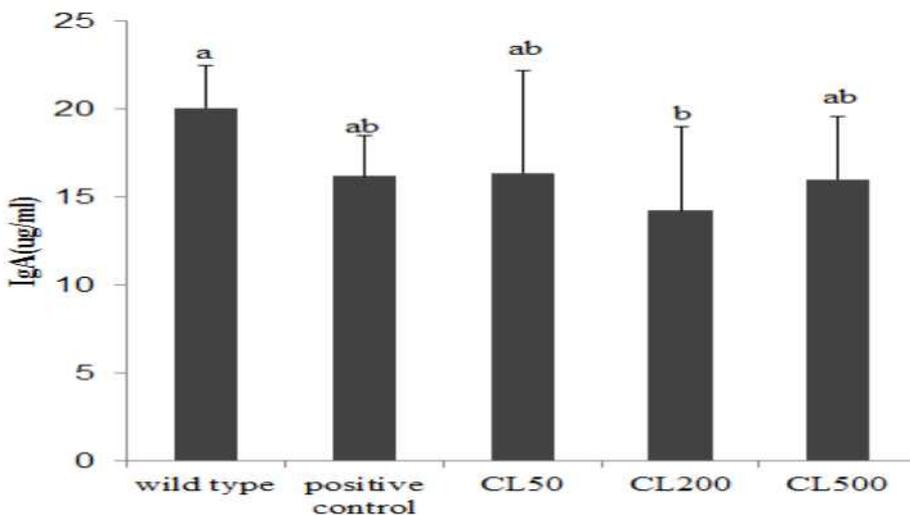
② IgG 측정



<정상군 IgG levels>

- 바이러스 질환에서 IgE의 역할은 잘 규명되어 있으나, IgG의 역할을 아직 확실하게 규명되어지지 않았다. 즉, *in vivo* 및 *in vitro*에서 IgG가 비만세포를 감작시키고, 원숭이에서 IgG를 함유한 혈청 분획이 IgE보다 약하지만 passive cutaneous anaphylaxis 반응을 일으킨다는 것과, 흡입성 항원에 대한 후기 반응은 IgE보다 IgG가 관여하는 것 같다고 보고된 바도 있다(28). IgG의 경우 wild type은 울금 20%주정 추출물 50 mg/kg보다 유의적으로 감소했으나 200 mg/kg, 500 mg/kg과 비교했을 때 유의적인 차이를 나타내지 않았다.

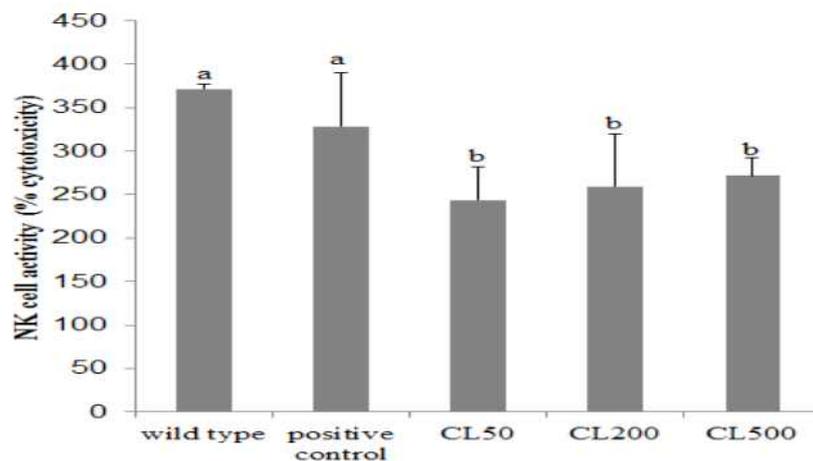
③ IgA 측정



<정상군 IgA levels>

- 점막표면은 외부환경과 직접 연결되어 있어 항상 항원에 노출되어 있는 부위이며 이들 표면을 감싸고 있는 외분비는 숙주방어에 한 면역계를 형성함. 외분비의 주가 되는 immunoglobulin은 IgA (immunoglobulin A)이며, IgA는 혈청 IgA와 점막에서 생성되는 IgA로 나눌 수 있다. 두 IgA는 구조적인 차이를 보이고 있으며, 직장, 대장, 위, 십이지장 그리고 공장의 형질세포에서 형성되고 있다. 이러한 형질세포는 세기관지 및 비점막, 이하선, 편도선, 림프절, 말초혈액 세포에서도 발견됨(29). IgA는 wild type과 비교했을 때 울금 20%주정 추출물 200 mg/kg는 유의적으로 감소했으나 나머지 50 mg/kg, 500 mg/kg과는 유의적 차이를 보이지 않았다.

(마) NK 세포 활성 측정



<정상군 NK cell activity (% cytotoxicity)>

- NK 세포는 림프구의 극히 일부분을 차지하고 있지만 면역방어 기전에 매우 중요한 부분을 차지하고 있는데 T 림프구와 B림프구와는 달리 특별히 항원에 의한 면역이 만들어져 그에 대한 기억이 되어 있지 않아도 어떤 암세포나 바이러스에 감염된 세포들을 자발적으로 공격하는 세포독성을 나타내 표적세포를 살해함으로써 감염이나 이형성 세포의 증식으로부터 우리 몸을 보호한다. 또한 항원과의 반응을 방해하여 일차적인 면역반응을 조절할 뿐 아니라 B림프구의 면역 글로불린 생산을 조절하는 면역계의 억제 세포(suppressor cells)이기도 하다(9). 울금 20%주정 추출물 식이 섭취군에서 NK cell activity가 wild type보다 유의적으로 감소된 것을 확인하였다.

(3) 면역결핍 마우스에서의 면역조절 및 감염저항성 실험 결과

(가) 해부학적 변화 소견 및 장기무게 변화

<주요 장기 무게>

Group	Spleen (g)	Lymph node (g)	Liver (g)	Kidney (g)	Heart (g)
Wild type	0.07±0.01 ^c		0.82±0.06 ^b	0.26±0.01 ^b	0.13±0.01 ^a
Infection	0.84±0.22 ^a	4.71±0.87 ^a	1.44±0.21 ^a	0.29±0.03 ^{ab}	0.10±0.01 ^c
Positive control	0.66±0.13 ^{ab}	2.09±0.78 ^b	1.22±0.03 ^a	0.29±0.02 ^{ab}	0.11±0.01 ^{bc}
CL50	0.76±0.20 ^{ab}	4.11±1.16 ^a	1.36±0.21 ^a	0.28±0.02 ^{ab}	0.11±0.01 ^c
CL200	0.69±0.04 ^{ab}	2.22±0.57 ^b	1.28±0.06 ^a	0.31±0.03 ^a	0.12±0.01 ^{bc}
CL500	0.57±0.21 ^b	2.08±1.47 ^b	1.25±0.28 ^a	0.30±0.02 ^{ab}	0.13±0.02 ^{ab}

- LP-BM5 바이러스 감염을 시킨 군은 정상군에 비해 탈모가 진행되고 목과 양 앞다리와 몸통 사이, 양 뒷다리와 몸통 사이에 존재하는 림프절이 정상군에서 나타나지 않은 반면 감염군에서 나타난 것을 알 수 있다. 이는 바이러스 감염에 의해 체내 면역 반응이 활발해짐에 따른 변화인 것으로 보이며 C57BL/6 마우스는 탈모 유도가 쉬운 동물이며 바이러스의 감염 이후 탈모 반응은 심해졌음을 확인하였다.

① 림프절 무게 변화

- LP-BM5 retrovirus의 감염이 활성화 단계에 이르게 되면 면역세포들의 활성화에 따른 지속적인 mitogenesis로 인해 림프절이 급격하게 커지는 현상이 발생하게 되며 이것은 LP-BM5 retrovirus 감염이 정상적으로 발현되고 있음을 나타내는 지표가 되기도 함. 따라서 림프절의 크기는 감염의 정도뿐 만 아니라 특정 샘플을 섭취시켰을 때 감염의 발현 억제 정도를 간접적으로 확인할 수 있는 수단이 되기도 함(13,14). 본 실험에서 비감염군에서 림프절을 육안으로 관찰하기 어려웠으나 감염군에서는 크기가 커졌으며 무게도 4.71 ± 0.21 g으로 나타났다. 반면 양성대조군에서 림프절 크기가 감소되었음을 볼 수 있었으며 무게도 2.09 ± 0.78 g으로 감소하여 감염군과 통계적으로 유의적인 차이를 보였다. 울금 20%주정 추출물 섭취군 중 200 mg/kg, 500 mg/kg는 양성대조군과 유의적 차이를 보이지 않을 정도로 200 mg/kg에서는 2.22 ± 0.57 g, 500 mg/kg에서는 2.08 ± 1.47 g으로 림프절의 무게가 감소되었으며 농도의 차이에 유의적인 차이를 보이지 않았다. 울금 20%주정 추출물 500 mg/kg에서 림프절의 크기를 가장 많이 감소시키는 것을 알 수 있었다.

② 비장 무게 변화

- 비장 (spleen)의 무게 변화는 림프절의 변화와 마찬가지로 LP-BM5 retrovirus의 감염에 의해 가장 큰 변화를 나타내는 기관으로 알려져 있다. 비장은 면역 기능을 담당하는 제일 중요한 기관으로서 면역세포가 밀집되어 있고 memory 세포 또한 존재하기 때문에 항원이 제시되었을 때 이에 대해 반응하여 면역세포의 mitogenesis를 동반하여 급격하게 비장의 크기가 증가하는 megasplenocyte를 유발하게 되며 이것은 LP-BM5의 감염에 따른 가장 일반적인 현상으로 인식되어져 왔다(13,14). 본 실험에서 정상군의 경우 0.07 ± 0.01

g으로 나타난 반면, 감염군의 경우 0.84 ± 0.22 g으로 유의적으로 비장의 무게가 증가하였다는 것을 확인하였다. 이 결과는 LP-BM5 retrovirus의 감염이 정상적으로 진행이 되었음을 나타내는 결과이며 LP-BM5 외의 다른 병원체에 의한 영향은 없었음을 나타내는 것이다. 양성대조군, 울금 20%주정 추출물 50 mg/kg, 200 mg/kg, 500 mg/kg에서 각각 0.66 ± 0.13 g, 0.76 ± 0.20 g, 0.69 ± 0.04 g, 0.57 ± 0.21 g으로 네 군간의 유의적 차이는 보이지 않았으나 감염군과 비교하였을 때 특히, 500 mg/kg 농도에서 유의적으로 감소되었음을 볼 수 있다.

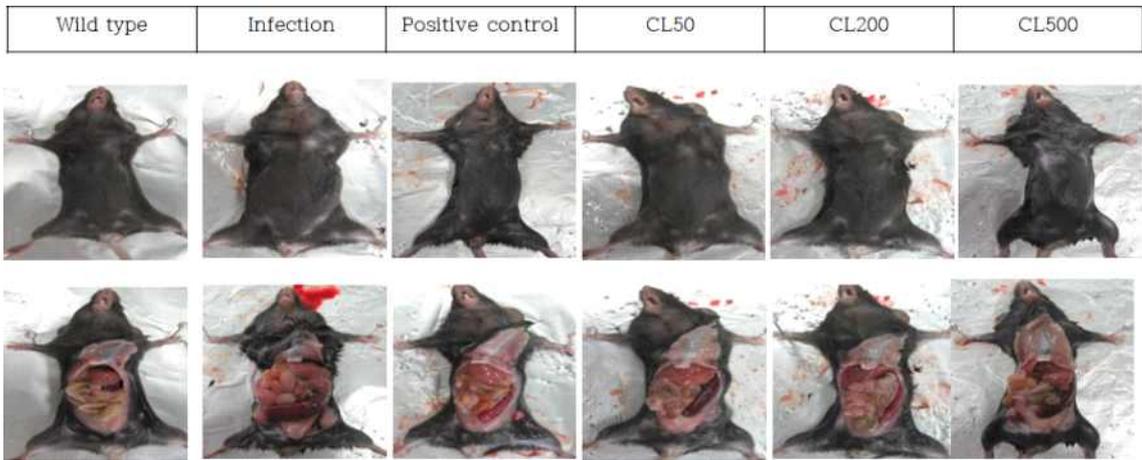
- LP-BM5의 retrovirus의 감염 시 활성산소에 의한 산화적 스트레스가 급격히 증가하는 것으로 알려져 있으며 이렇게 생성된 산화적 스트레스는 간세포에 존재하는 비타민 C와 비타민 E를 포함한 항산화 비타민과 항산화성 물질들에 의해 일부 제거되지만 바이러스 감염에 의한 지속적인 산화적 스트레스의 생성은 간세포 내의 항산화 비타민과 항산화성 물질의 고갈을 초래하게 되고 염증반응을 유발하여 간의 크기가 증가하게 되는 것으로 일반적으로 알려져 있다(15). 본 실험에서 정상군의 간 무게가 0.82 ± 0.06 g으로 나타난 반면, 감염군에서는 1.44 ± 0.21 g으로 정상군과 비교하여 유의적으로 간의 무게가 증가하였다는 것을 확인할 수 있다. 양성대조군, 울금 20%주정 추출물 50 mg/kg, 200 mg/kg, 500 mg/kg에서 각각 1.22 ± 0.03 g, 1.36 ± 0.21 g, 1.28 ± 0.06 g, 1.25 ± 0.28 g으로 나타나 감염군에 비해 유의적인 차이가 없었음을 확인하였다.

④ 신장 무게 변화

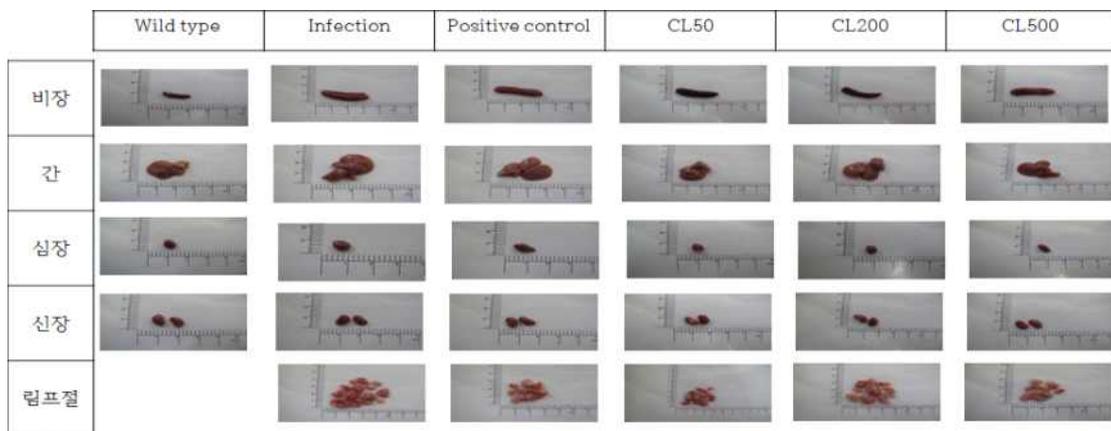
- LP-BM5 retrovirus 감염 시 신장의 무게에 있어서 큰 변화를 보인다는 연구결과는 아직 알려지지 않았다(13,14). 이에 근거하여 본 실험에서는 정상군과 감염군의 신장 무게가 통계적으로 유의적인 차이가 없었으며 양성대조군과 울금 20%주정 추출물 50 mg/kg, 200 mg/kg, 500 mg/kg 모든 군에서 유의적인 차이를 보이지 않았다.

⑤ 심장 무게 변화

- LP-BM5 retrovirus 감염시 심장의 무게 또는 크기가 미세하지만 증가한다는 보고가 일부 있었지만 아직 결정적인 확인은 이루어지지 않았다(13,14). 본 연구에서는 일부 보고와 다르게 정상군 0.13 ± 0.01 g, 감염군 0.10 ± 0.01 g으로 감염군이 유의적으로 감소했음을 확인하였다. 울금 20%주정 추출물 500 mg/kg는 0.13 ± 0.02 g으로 정상군과 유의적인 차이를 보이지 않았다.



<외관 관찰 및 부검 결과>



<주요 장기 관찰>

(나) 몸무게 변화량 및 식이효율

- 실험동물의 식이섭취는 모든 군에서 통계적 유의성을 나타내지 않았으며 이 결과는 실험의 모든 데이터가 식이섭취율의 차이에 의한 것이 아님을 확인 시켜 준 것으로 인식된다. 체중의 증가는 비감염군에 비해 감염군 모두에서 유의적인 증가를 나타내었는데 이것은 LP-BM5 retrovirus 감염 시 부종이 많으며 체내에 염증반응 등으로 체중이 증가하는 현상에 기인한 것으로 생각된다. 식이효율은 나타내는 FER의 경우에도 마찬가지로 비감염군에 비해 감염군 모두에서 FER이 증가한 것으로 나타났으며 각 군마다 유의적 차이가 나타나지 않았다.

〈식이섭취량, 몸무게 변화량 및 식이효율〉

Group	Food consumption (g/day)	Weight gain ¹⁾ (g/13weeks)	FER ⁴⁾
Wild type	2.57 ± 0.37	6.33 ± 0.65 ^{2)b3)}	0.027 ± 0.002 ^b
Infection	2.24 ± 0.28	9.96 ± 2.27 ^a	0.051 ± 0.010 ^a
Positive control	2.37 ± 0.32	10.34 ± 1.79 ^a	0.048 ± 0.008 ^a
CL50	2.30 ± 0.30	10.61 ± 2.46 ^a	0.052 ± 0.011 ^a
CL200	2.43 ± 0.31	12.18 ± 2.85 ^a	0.057 ± 0.013 ^a
CL500	2.44 ± 0.32	11.50 ± 2.89 ^a	0.049 ± 0.012 ^a

1) Weight gain(g/13weeks)=final body weight(g)-initial body weight(g).

2) Values are means ±SD, n=8

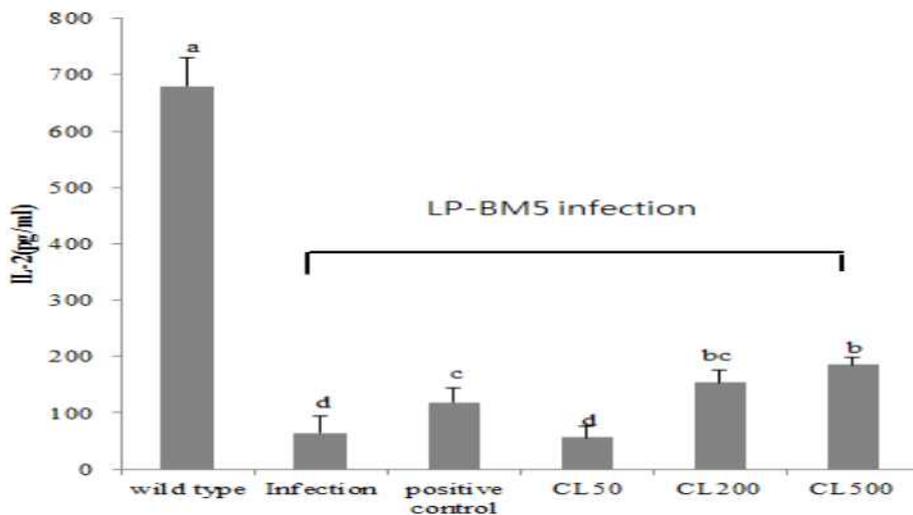
3) The same superscripts in the same column are not significantly at 5% level by Duncan's multiple test

4) FER(Food efficiency rate) = { weight (g) / food intake (g) } * 100

(다) 면역상태 확인을 위한 splenocyte의 cytokines 발현 측정과 mitogen에 대한 T와 B 세포의 증식 조절능력 측정

① Th1 type cytokine의 발현 조절

㉞ IL-2 cytokine 발현

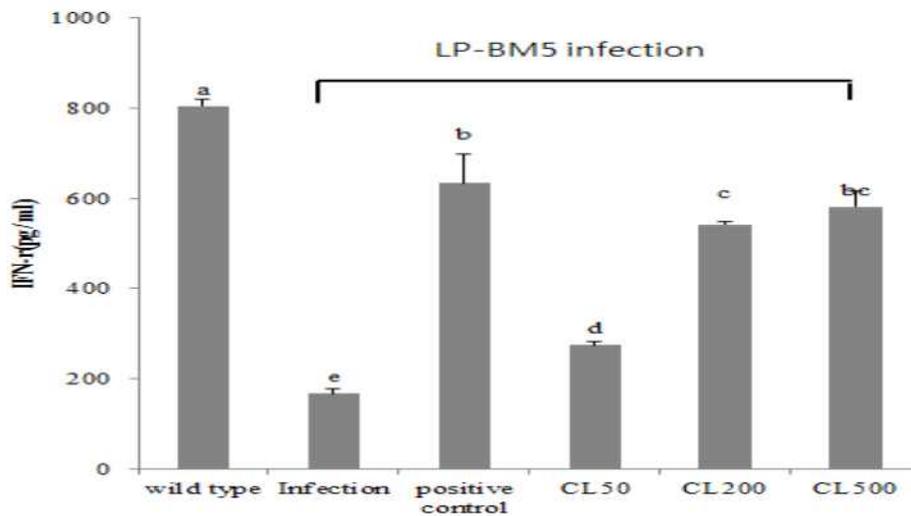


〈LP-BM5 retrovirus의 감염 시 primary splenocyte에서의 IL-2 발현〉

- IL-2는 면역조절에 관여하는 단백질로서, T-cell growth factor(TCGF)라고 알려져 있다. T-cell을 증식시키고 T-cell에 작용하여 IFN- γ 를 분비시키는 작용을 하며, B-cell을 자극시키는 활성이 있다. 또한 Natural killer (NK) cells, lymphokine-activated killer cells과 같은 면역세포를 활성화시킨다. 일반적으로 LP-BM5 retrovirus에 감염이 되면 Th1 type cytokine의 발현은 급격히 감소하는 경향을 나타내며 IL-2의 발현 또한 감소하는 경향을 나타낸다. LP-BM5 retrovirus 감염 시 비장세포의 면역세포의 활성은 상당부분 억제를 받게 되는데 이에 대한 반응성을 확인하고자 mitogen으로서 conA를 처리하여

Th1 type cytokine의 하나인 IL-2의 발현을 확인하였다(16). 그 결과 정상군에서는 679.84 ± 49.29 pg/mL로 나타난 반면, 감염군에서는 64.19 ± 30.75 pg/mL로 유의적으로 크게 감소되었음을 확인하였다. 이는 앞서 말한 LP-BM5 retrovirus가 IL-2 발현을 억제시킨다는 이론과 같은 결과를 보였음을 알 수 있다. 양성대조군에서는 118.60 ± 26.57 pg/mL로 감염군과 비교하여 유의적으로 증가되었음을 확인하였다. 울금 20%주정 추출물 200 mg/kg는 153.85 ± 20.80 pg/mL로 양성대조군과 유의적 차이를 보이지 않았으며 500 mg/kg는 185.44 ± 13.57 pg/mL로 양성대조군과 유의적인 차이를 보이지 않을 정도로 IL-2 발현이 증가되었음을 확인하였다.

㉞ IFN- γ cytokine 발현



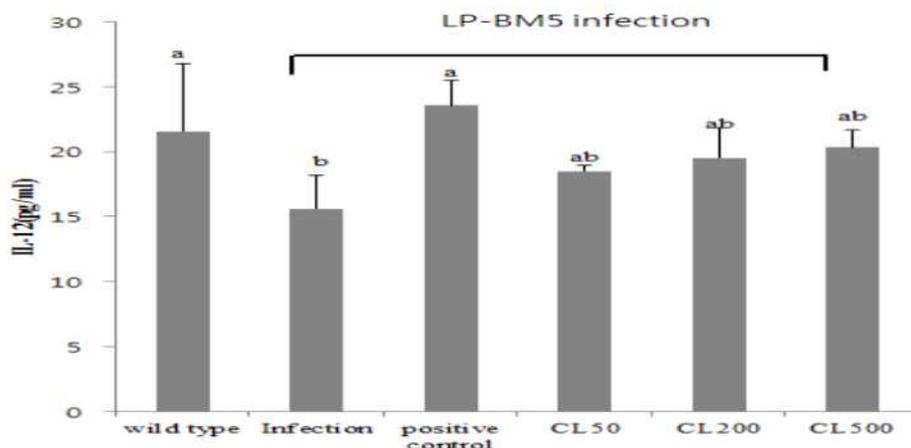
<LP-BM5 retrovirus의 감염 시 primary splenocyte에서의 IFN- γ 발현>

- IFN- γ 의 발현은 Th1 type cytokine과 Th2 type cytokine을 상대적으로 보완 조절하는 중요한 역할을 IL-10과 함께 담당하고 있어서 전체적인 면역조절과 항상성 유지에 매우 중요한 cytokine으로 인식되고 있으며 LP-BM5 retrovirus 감염 시 급격히 감소하여 Th1 type cytokine은 감소하게 되고 Th2 type cytokine은 증가하게 되는 경향을 나타내는 조절 인자이기도 하다(17). 본 실험에서 정상군에서는 804.08 ± 15.42 pg/mL로 유의적으로 가장 높은 발현을 나타냈으며 감염군에서는 166.57 ± 10.92 pg/mL로 유의적으로 감소되었음을 확인하였다. 따라서 앞서 말한 이론과 맞는 결과가 나타나 LP-BM5 retrovirus 유발이 정상적으로 이루어졌음을 알 수 있다. 양성대조군에서는 166.57 ± 10.92 pg/mL로 LP-BM5 retrovirus 감염으로 감소된 IFN- γ 의 발현을 억제시켰음을 확인하였다. 울금 20%주정 추출물 50 mg/kg, 200 mg/kg, 500 mg/kg 각각 감염군과 유의적인 차이가 나도록 발현이 농도의존적으로 증가되었다.

㉞ IL-12의 발현

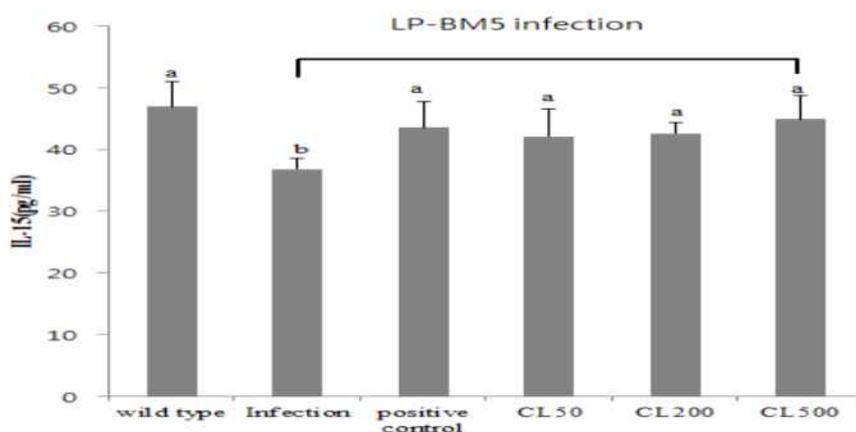
- IL-12는 대식세포 혹은 B cell에서 분비되어 cytotoxic T cell의 분화를 촉진하고 NK cell을 활성화하여 외부 이물질을 사멸하는 역할을 한다고 알려져 있다(18). 본 실험에서 감염군의 IL-12 발현은 정상군에 비해 유의적으로 감소한

것으로 나타났다. 울금 20%주정 추출물 식이섭취군은 감염군뿐만 아니라 정상군과도 유의적 차이를 나타내지 않음을 확인 할 수 있었다.



<LP-BM5 retrovirus의 감염 시 primary splenocyte에서의 IL-12 발현>

㉔ IL-15 의 발현

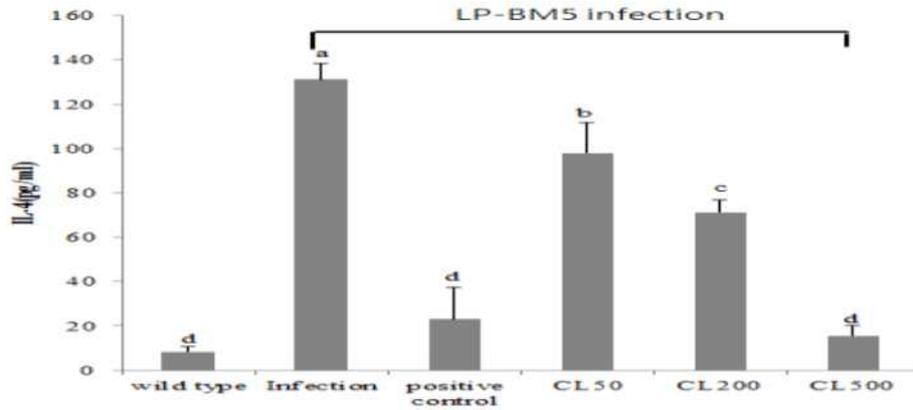


<LP-BM5 retrovirus의 감염 시 primary splenocyte에서의 IL-15 발현>

- IL-15는 IL-2의 생물학적 활성 대부분을 나타낸다. 세포상해성 T세포의 증식, 동종항원 특이적 세포상해성 T세포 및 항원 비특이적 림포카인 활성 살생세포(LAK)의 시험관 내 작성을 촉진한다(19). 본 실험에서 정상군에서는 46.95 ± 4.02 pg/mL로 나타난 반면, 감염군은 36.83 ± 1.79 pg/mL로 유의적으로 감소되었음을 확인하였다. 양성대조군은 43.58 ± 4.23 pg/mL로 감염군과 비교하여 유의적으로 증가되었음을 확인하였다. 또한 울금 20%주정 추출물 50 mg/kg, 200 mg/kg, 500 mg/kg 각각 42.08 ± 4.49 pg/mL, 42.57 ± 1.79 pg/mL, 44.88 ± 3.88 pg/mL로 양성대조군 및 정상군과 유의적 차이를 보이지 않았다.

② Th2 type cytokine의 발현 조절

㉕ IL-4 의 발현

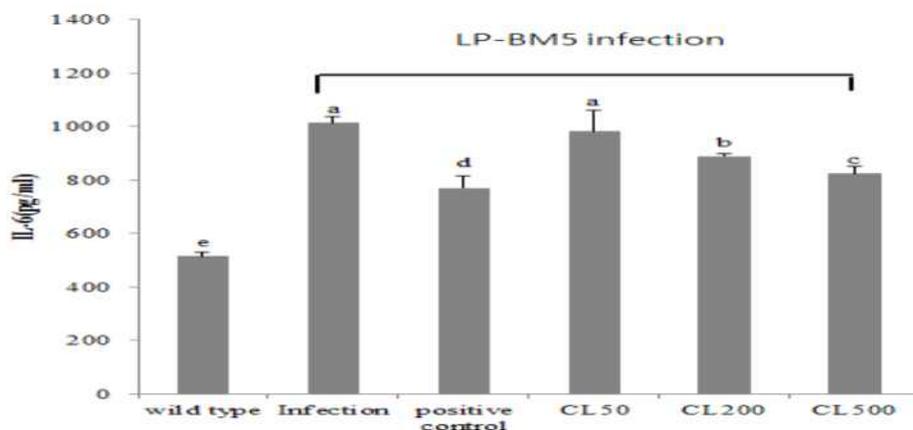


〈LP-BM5 retrovirus의 감염 시 primary splenocyte에서의 IL-4 발현〉

- IL-4는 CD-4 T-cell과 acitivated mast cell에 의해 만들어지며, B-cell growth factor의 작용을 한다. 또한 B-cell의 immunoglobilin의 class switch에 관여하는 differentiation factor로 작용할 수 있으며, CD4 T-cell과 mast cell, macrophage 등을 활성화하기도 하다(20). 본 실험에서는 감염군에서 131.31 ± 7.25 pg/mL로 정상군 8.38 ± 2.16 pg/mL에 비하여 IL-4 발현이 유의적으로 증가하였음을 확인하였다. 울금 20%주정 추출물 50 mg/kg, 200 mg/kg, 500 mg/kg는 각각 98.06 ± 13.73 pg/mL, 71.23 ± 5.75 pg/mL, 15.60 ± 4.77 pg/mL로 발현이 감염군에 비해 유의적으로 감소되었다.

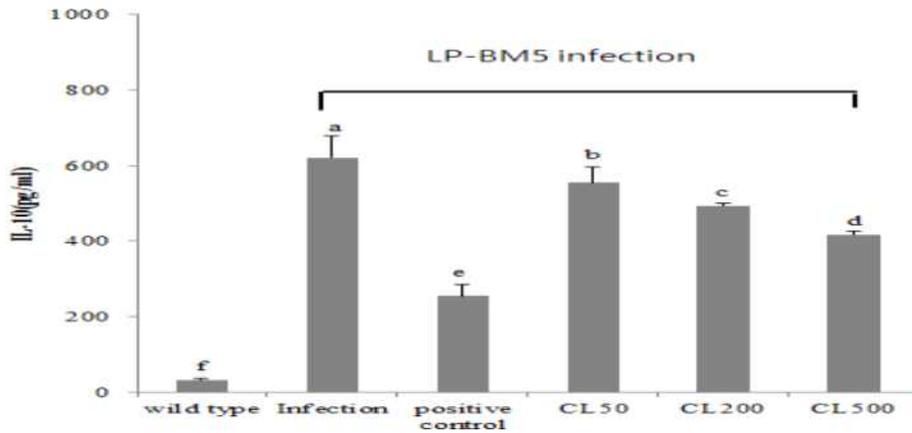
㉠ IL-6 의 발현

- IL-6는 여러 가지 기능을 가지고 있는 cytokine으로 염증 반응과 면역 반응을 매개하는 것으로 잘 알려져 있다. IL-6의 중요한 생물학적 작용 중 하나는 B 림프구(B lymphocyte) 성숙의 마지막 단계를 자극 하는 것인데, IL-6의 영향 하에 B 림프구는 성숙한 형질 세포 (plasma cell)로 분화되고, 면역 글로불린 (immunoglobulin)을 분비하며 IL-6는 IL-1 β 와 TNF- α 와 더불어 급성 반응 단백질들을 유도하는데 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다(21). 본 실험에서 감염군의 IL-6 발현은 정상군에 비해 유의적으로 증가한 것으로 나타났다. 울금 20%주정 추출물 식이섭취군 중 200 mg/kg, 500 mg/kg는 감염군에 비해 농도의존적으로 유의적인 감소를 한 것을 확인 할 수 있었다.



〈LP-BM5 retrovirus의 감염 시 primary splenocyte에서의 IL-6 발현〉

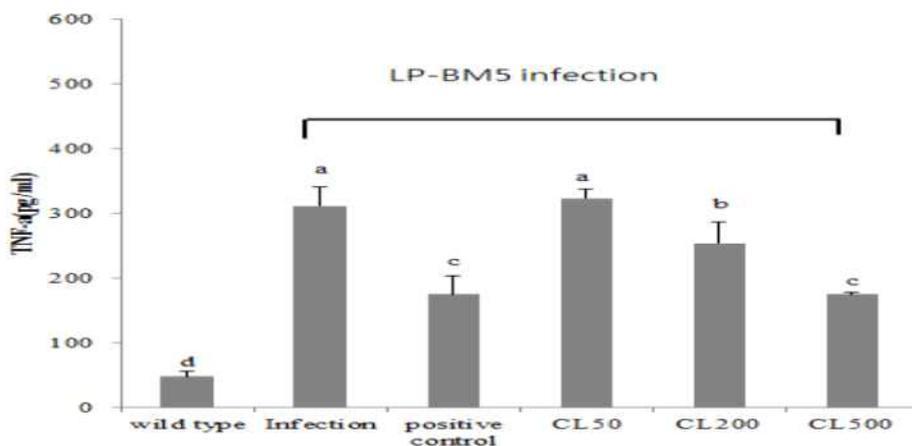
㉔ IL-10 의 발현



〈LP-BM5 retrovirus의 감염 시 primary splenocyte에서의 IL-10 발현〉

- IL-10의 발현은 Th1 type cytokine을 상대 보완적으로 억제하여 비감염시 Th1 type 과 Th2 type cytokine의 항상성을 유지하는 역할을 담당하고 있다. 하지만 LP-BM5 감염시 과도하게 증가하여 Th2 type cytokine은 증가시키고 상대적으로 Th1 type cytokine을 억제시켜 항상성을 파괴하는 원인이 되기도 한다(22). 본 실험에서는 정상군에서 IL-10 발현량이 31.84 ± 4.73 pg/mL인 반면, 감염군에서는 621.19 ± 55.51 pg/mL으로 IL-10발현이 유의적으로 증가하였다. 양성대조군에서 254.38 ± 29.88 pg/mL로 감염군과 비교해 유의적으로 발현이 감소되었음을 확인하였다. 또한 울금 20%주정 추출물 50 mg/kg, 200 mg/kg, 500 mg/kg에서 각각 553.69 ± 41.35 pg/mL, 493.85 ± 7.11 pg/mL, 416.78 ± 10.73 pg/mL로 발현량이 감염군과 비교했을 때 유의적으로 감소하였으며 농도 의존적으로 IL-10발현이 억제되었음을 확인 할 수 있었다.

㉕ TNF- α 의 발현



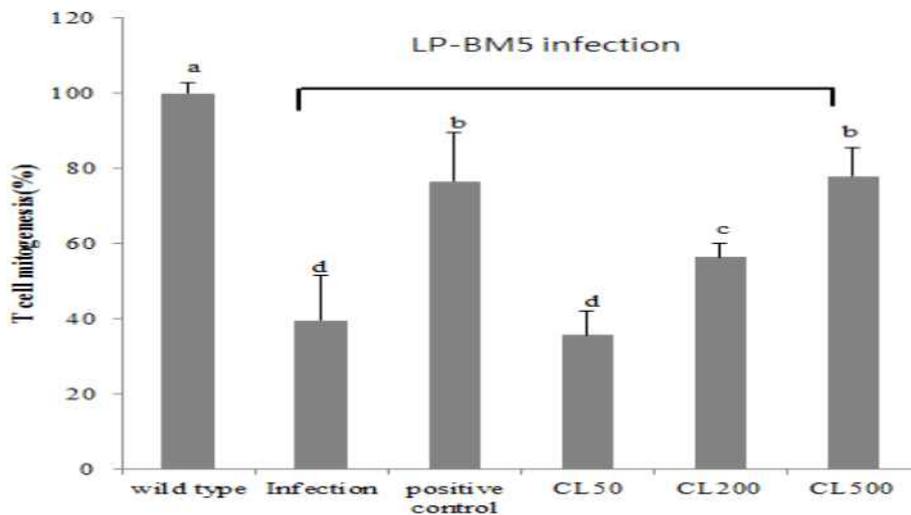
〈LP-BM5 retrovirus의 감염 시 primary splenocyte에서의 TNF- α 발현〉

- TNF- α 는 염증을 유발시키는 proinflammatory cytokine의 대표적인 물질로서 일반 세포의 생리활성 뿐만 아니라 면역세포의 활성 조절에 있어서도 가장 중요한 물질의 하나로 인식되고 있다. 특히 LP-BM5 retrovirus 감염의 경우

TNF- α 의 상승과 더불어 염증반응 및 산화적 스트레스와 관련된 인자로도 알려져 있다(23). 본 실험에서 감염군의 TNF- α 발현은 311.35 ± 29.96 pg/mL로 정상군 47.59 ± 7.61 pg/mL의 발현과 비교하여 유의적으로 증가되었다. 양성대조군은 174.5 ± 29.05 pg/mL로 감염군과 비교하여 유의적으로 감소되었으며 울금 20%주정 추출물 500 mg/kg에서는 174.28 ± 3.05 pg/mL로 양성대조군과 유의적 차이를 보이지 않을 정도로 감소되었다.

③ T & B 세포 증식능 반응성 측정

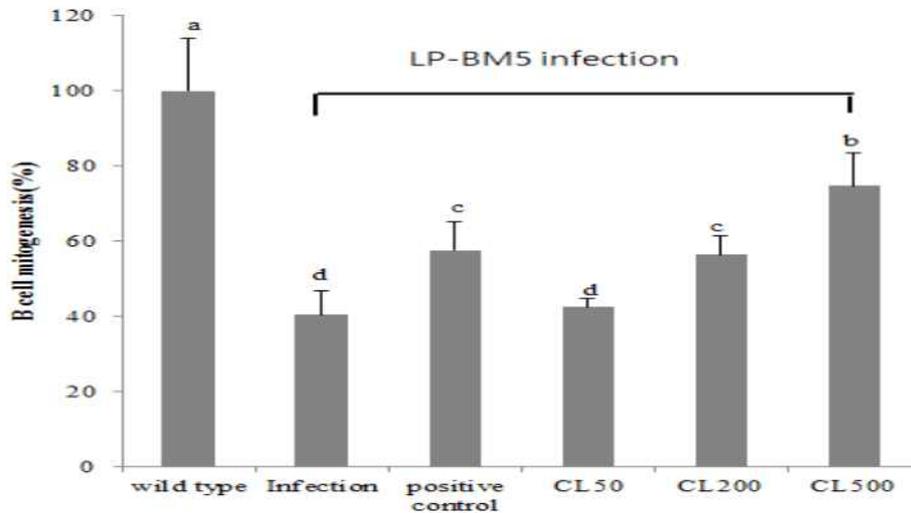
㉞ T 세포의 mitogen에 대한 증식능 반응성 측정



〈LP-BM5 retrovirus의 감염 시 primary splenocyte에 존재하는 T세포의 ConA에 대한 증식능 반응성 측정결과〉

- LP-BM5 retrovirus의 감염으로 인한 T세포의 활성감소는 CD4 수용체를 경유하는 LP-BM5 retrovirus의 감염경로와 관련이 있는데 주도적으로 T helper 세포가 영향을 받아 사멸하거나 정상적인 작용을 하기 힘든 anergy 상태로 되기 때문이다. 따라서 본 실험에서는 세포를 활성화 시킬 수 있도록 mitogen을 처리한 후 각각의 식이를 투여한 군에서 어떠한 반응이 나타나는지 확인하였다(24). 정상군의 T 세포 증식능을 100%로 하였을 때 LP-BM5 retrovirus의 감염군은 $39.54 \pm 12.02\%$ 의 증식능을 보여 정상군에 비해 유의적으로 크게 감소하였음을 확인하였다. 반면 양성대조군에서는 $76.51\% \pm 12.92\%$ 로 감염군에 비해 T 세포 증식능을 유의적으로 증가시켰음을 알 수 있다. 울금 20%주정 추출물 200 mg/kg, 500 mg/kg는 각각 $56.35 \pm 3.48\%$, $77.86 \pm 7.53\%$ 로 감염군에 비해 유의적으로 증가했으며 그 중 500 mg/kg의 경우 양성대조군과 유의적인 차이를 보이지 않을 정도로 감염군에 비해 T 세포 증식능이 증가하였다.

㉟ B 세포의 mitogen에 대한 증식능 반응성 측정



〈LP-BM5 retrovirus의 감염 시 primary splenocyte에 존재하는 B세포의 LPS에 대한 증식능 반응성 측정결과〉

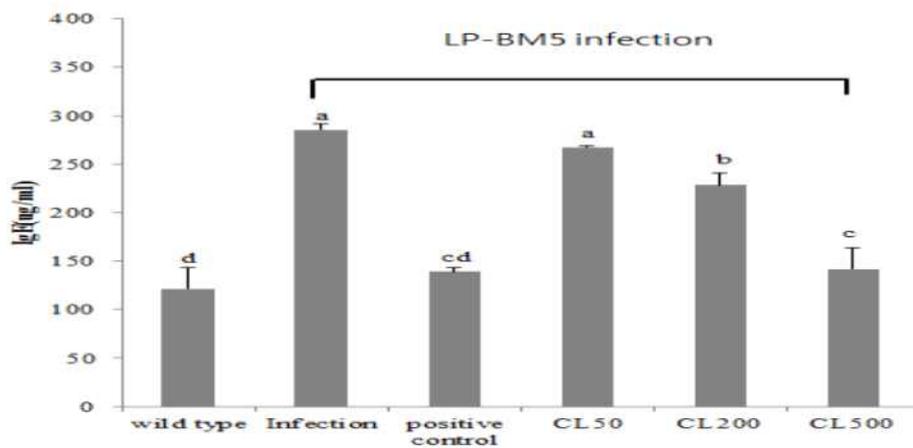
- T 세포와는 달리 B 세포의 경우 세포성 면역체계가 아닌 항체를 생성하는 면역체계를 감안할 때 직접적인 감염의 영향은 적을 것으로 생각된다. 하지만 LP-BM5 retrovirus의 감염으로 인해 활성은 마찬가지로 감소하는 것으로 알려져 있다(25,26). 본 실험에서 정상군의 B 세포 증식능이 100%였을 때 감염군은 40.44 ± 6.27%로 크게 감소되었다. 양성대조군에서 57.46 ± 7.68%로 LP-BM5 retrovirus의 감염으로 감소되었던 B 세포 증식능이 유의적으로 증가되었다. 울금 20%주정 추출물 200 mg/kg는 56.26 ± 5.05%로 양성대조군과 유의적 차이를 나타내지 않았으며, 500 mg/kg의 경우 74.59 ± 8.92%로 양성대조군보다 유의적으로 증가했음을 확인하였다.

(라) 항원특이항체 (IgG, IgE, IgA) 반응성 측정

① IgE 측정

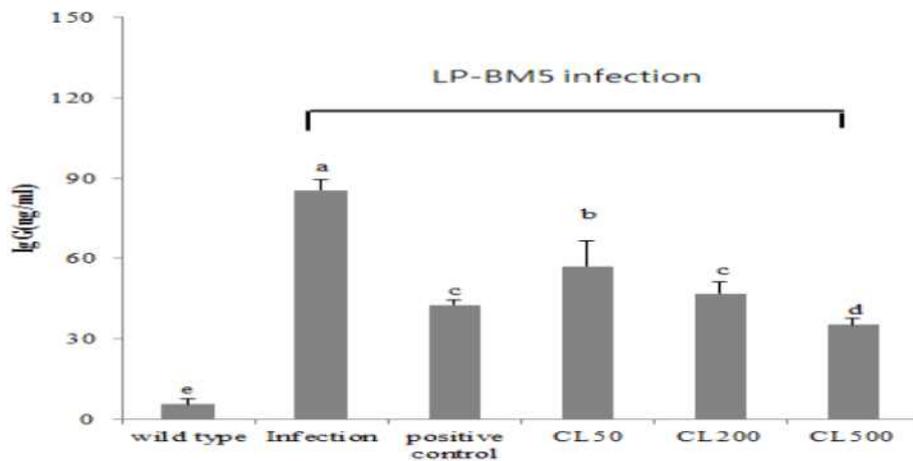
- LP-BM5는 면역계가 무해한 항원에 대해 민감하게 반응하여 신체에 이상반응을 일으키는 것으로, IgE 항체는 분자 내 Fc fragment의 Cε3 domain을 통해 비만세포의 IgE receptor인 FcεR1과 결합한다. 동일한 항원에 의해 비만세포 표면의 IgE가 교차결합 되면 비만세포가 활성화되어 histamine, proteoglycan, esrine protesases, 염증성 cytokine 등과 같은 염증성 매개물들이 분비되고, 이들에 의해 알레르기 염증의 초기 반응이 일어난다. 게다가 이러한 화학 매개체들이 세포로부터 지속적으로 생산되고 방출되면 T-cell과 eosinophil이 관여하는 후기 염증반응을 일으키게 된다. 따라서 바이러스 반응에 직접적으로 작용하는 allergen-specific IgE의 분비를 억제하는 것이 바이러스의 예방과 치료에 유용한 방법으로 발전되고 있다(27). 본 실험에서 감염군의 IgE 발현은 285.58 ± 6.03 μg/mL로 정상군 121.32 ± 22.49 μg/mL의 발현과 비교하여 크게 증가되었다. 양성대조군은 138.85 ± 4.55 μg/mL로 감염군과 비교하여 유의적으로 감소되었으며 울금 20%주정 추출물 식이 섭취군 중 500 mg/kg는

142.10 ± 21.10 µg/mL로 양성대조군과 유의적인 차이를 보이지 않을 정도로 감소되었다.



〈LP-BM5 retrovirus의 감염군 IgE levels〉

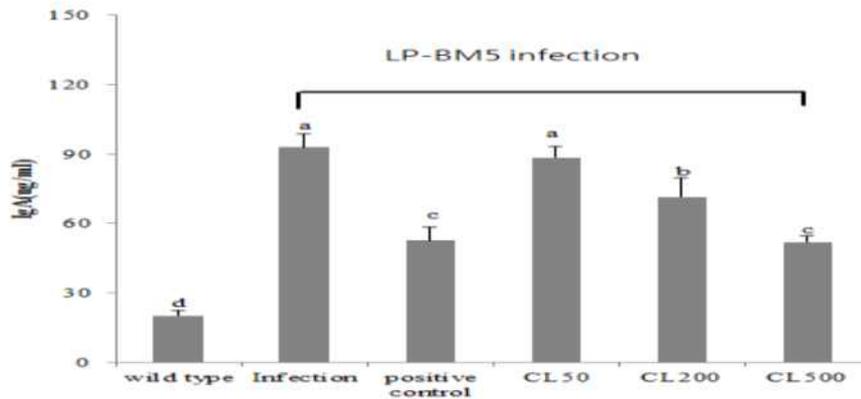
② IgG 측정



〈LP-BM5 retrovirus의 감염군 IgG levels〉

- 바이러스 질환에서 IgE의 역할은 잘 규명되어 있으나, IgG의 역할을 아직 확실하게 규명되어지지 않았다. 즉, *in vivo* 및 *in vitro*에서 IgG가 비만세포를 감작시키고, 원숭이에서 IgG를 함유한 혈청 분획이 IgE보다 약하지만 passive cutaneous anaphylaxis 반응을 일으킨다는 것과, 흡입성 항원에 대한 후기 반응은 IgE보다 IgG가 관여하는 것 같다고 보고된 바도 있다(28). 본 실험에서는 감염군의 IgG 발현은 85.49 ± 3.81 µg/mL로 정상군 5.44 ± 1.84 µg/mL의 발현과 비교하여 크게 증가되었다. 양성대조군은 42.67 ± 1.67 µg/mL로 감염군과 비교하여 유의적으로 감소되었으며 울금 20%주정 추출물 식이섭취군 중 200 mg/kg는 46.79 ± 4.32 µg/mL로 양성대조군과 유의적인 차이를 보이지 않을 정도로 감소되었다. 특히, 500 mg/kg는 35.21 ± 2.39 µg/mL로 양성대조군에 비해 유의적으로 IgG 발현을 감소시켰음을 확인 할 수 있었다.

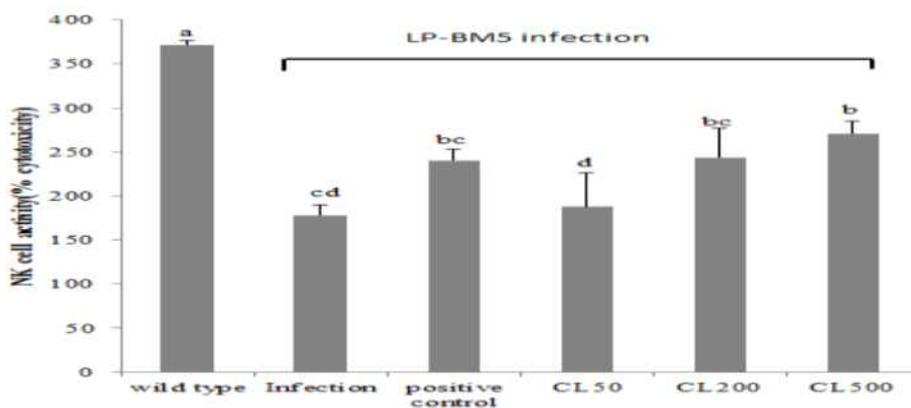
③ IgA 측정



〈LP-BM5 retrovirus의 감염군 IgA levels〉

- 점막표면은 외부환경과 직접 연결되어 있어 항상 항원에 노출되어 있는 부위이며 이들 표면을 감싸고 있는 외분비는 숙주방어에 한 면역계를 형성한다. 외분비의 주가 되는 immunoglobulin은 IgA (immunoglobulin A)이며, IgA는 혈청 IgA와 점막에서 생성되는 IgA로 나눌 수 있다. 두 IgA는 구조적인 차이를 보이고 있으며, 직장, 대장, 위, 십이지장 그리고 공장의 형질세포에서 형성되고 있다. 이러한 형질세포는 세기관지 및 비점막, 이하선, 편도선, 림프절, 말초혈액 세포에서도 발견된다(29). 본 실험에서 감염군의 IgA 발현은 $92.96 \pm 5.91 \mu\text{g}/\text{mL}$ 로 정상군 $20.07 \pm 2.39 \mu\text{g}/\text{mL}$ 의 발현과 비교하여 크게 증가되었다. 양성 대조군은 $52.61 \pm 5.96 \mu\text{g}/\text{mL}$ 로 감염군과 비교하여 유의적으로 감소되었으며 올금 20%주정 추출물 식이 섭취군 중 500 mg/kg는 $51.86 \pm 2.85 \mu\text{g}/\text{mL}$ 로 양성대조군과 유의적인 차이를 보이지 않을 정도로 감소되었다.

(마) NK 세포 활성 측정



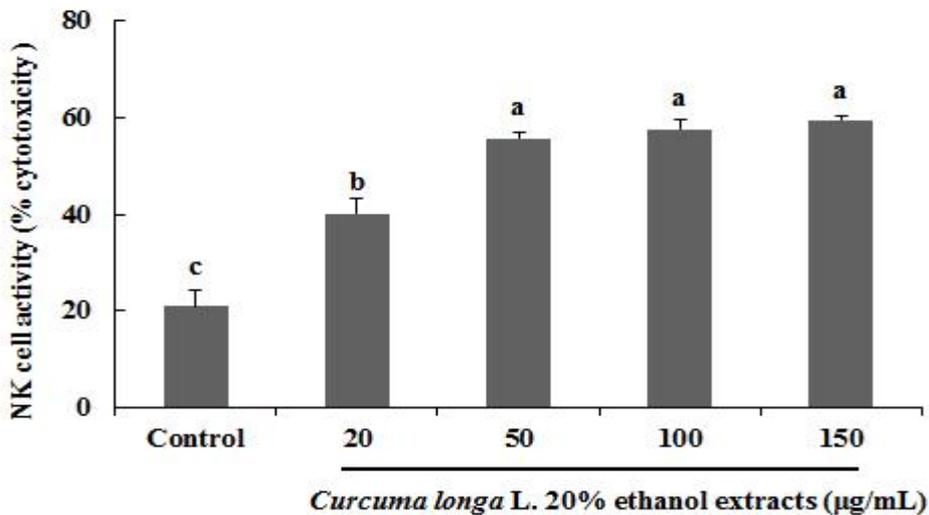
〈LP-BM5 retrovirus의 감염군 NK cell activity (% cytotoxicity)〉

- NK 세포는 림프구의 극히 일부분을 차지하고 있지만 면역방어 기전에 매우 중요한 부분을 차지하고 있는데 T 림프구와 B림프구와는 달리 특별히 항원에 의한 면역을 만들어져 그에 대한 기억이 되어 있지 않아도 어떤 암세포나 바이러스에

감염된 세포들을 자발적으로 공격하는 세포독성을 나타내 표적세포를 살해함으로써 감염이나 이형성 세포의 증식으로부터 우리 몸을 보호한다. 또한 항원과의 반응을 방해하여 일차적인 면역반응을 조절할 뿐 아니라 B림프구의 면역 글로불린 생산을 조절하는 면역계의 억제 세포(suppressor cells)이기도 함(9). 본 실험에서 정상군에서 $371.89 \pm 4.83\%$ 로 나타난 반면, 감염군에서는 $178.16 \pm 11.68\%$ 로 유의적으로 감소되었음을 확인하였다. 양성대조군은 $240.41 \pm 12.69\%$ 로 감염군과 유의적으로 차이가 없음을 확인하였다. 울금 20%주정 추출물 식이섭취군 중 50 mg/kg, 200 mg/kg를 제외한 500 mg/kg의 경우 $270.89 \pm 13.50\%$ 로 양성대조군과 유의적인 차이를 보이지 않을 정도로 NK cell activity가 증가되었음을 확인하였다.

다. *In vitro*에서 울금 20%주정 추출물의 면역조절 기전 규명

(1) 울금 20%주정 추출물이 자연살해세포 활성화에 미치는 영향

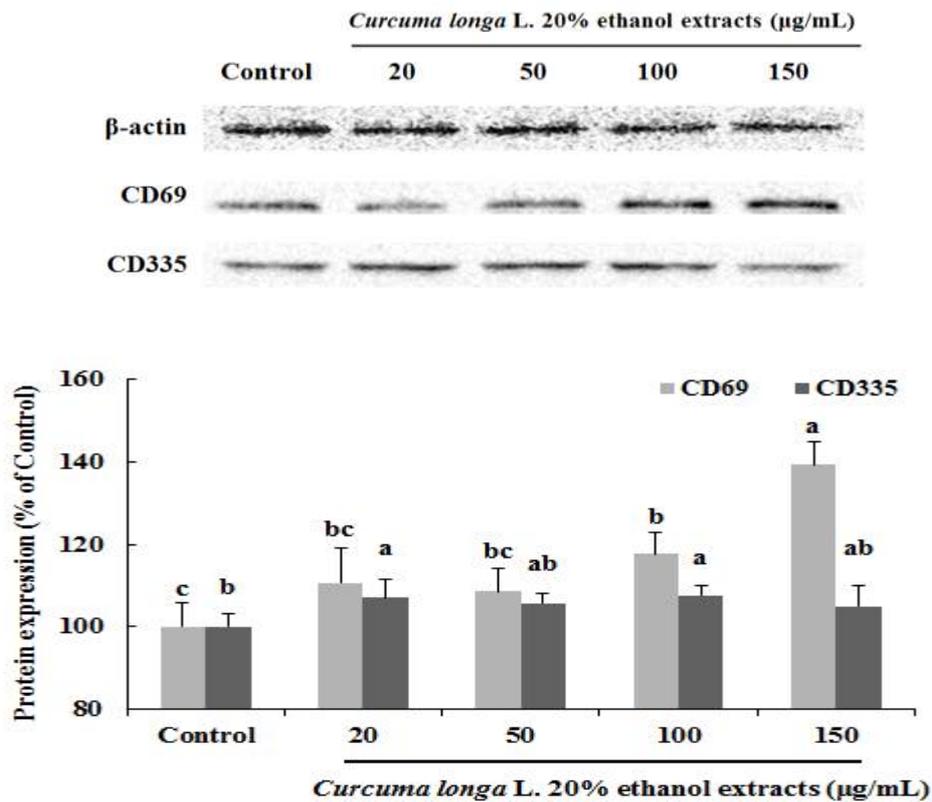


<울금 20%주정 추출물이 자연살해세포 활성화에 미치는 영향>

- 자연살해세포는 다른 면역계 세포들보다 원형질이 풍부하고 크기가 크며 원형질 안에 큰 과립을 가지고 있는 림프구양 세포이다. 자연살해세포는 과거에 감각(sensitization)을 받은 적이 없는 상태에서도 활성화되어 반응하기 때문에 여러 종류의 병인에 대한 인체의 방어능의 제일선을 담당한다(30). 특히 내재면역을 담당하는 세포로 암 또는 감염 질환에서 생체의 초기 면역 방어에 매우 중요한 역할을 한다고 알려져있다(31). 평상시에는 활성을 띄고 있지 않지만 적절한 표적물질과 접촉하게 되면 활성화되어 표적세포를 파괴한다. 자연살해세포는 바이러스와 같은 병원균이 체내에 들어와 복제를 위해 숙주세포 내로 침투하는 것을 막거나, 침투된 세포를 선택적으로 찾아 제거한다(32). 자연살해세포가 파괴할 수 있는 대상은 매우 다양하지만, 이들 중 가장 널리 자연살해세포 활성능에 이용되고 있는 세포는 쥐의 경우 Moloney virus-induced lymphoma 세포주인 YAC-1 세포이다(33). 본 연구에서는 자연살해세포와 YAC-1 세포를 함께 배양하여 활성화를 자극시켜 울금 20%주정 추출물의 처리가 자연살해세포 활성화에 미치는 영향을 관찰하였다.

- 울금 20%주정 추출물을 처리하지 않은 Control군에서는 YAC-1 세포에 대한 사멸 정도가 $21.01 \pm 3.29\%$ 이었다. 반면 울금 20%주정 추출물을 처리한 군들은 Control군과 비교하여 모두 유의적으로 높아졌음을 확인하였다. 울금 20%주정 추출물 20 $\mu\text{g/mL}$, 50 $\mu\text{g/mL}$, 100 $\mu\text{g/mL}$, 150 $\mu\text{g/mL}$ 각각 $40.11 \pm 3.24\%$, $55.64 \pm 1.39\%$, $57.62 \pm 1.93\%$, $59.42 \pm 1.06\%$ 의 활성을 보였다. 농도의존적인 결과를 보이지는 않았으나, 울금 20%주정 추출물을 처리한 군들 중에서 20 $\mu\text{g/mL}$ 에서 유의적으로 가장 낮은 활성을 보였고 50 $\mu\text{g/mL}$, 100 $\mu\text{g/mL}$, 150 $\mu\text{g/mL}$ 는 군간 유의적인 차이가 없이 가장 높은 활성을 보였다($P < 0.05$). 따라서 이러한 결과에 의하여 울금 20%주정 추출물이 자연살해세포 활성을 증가시켜 종양세포 제거에 긍정적으로 기여하였음을 확인할 수 있었다.

(2) 울금 20%주정 추출물이 자연살해세포의 CD69와 CD335발현에 미치는 영향



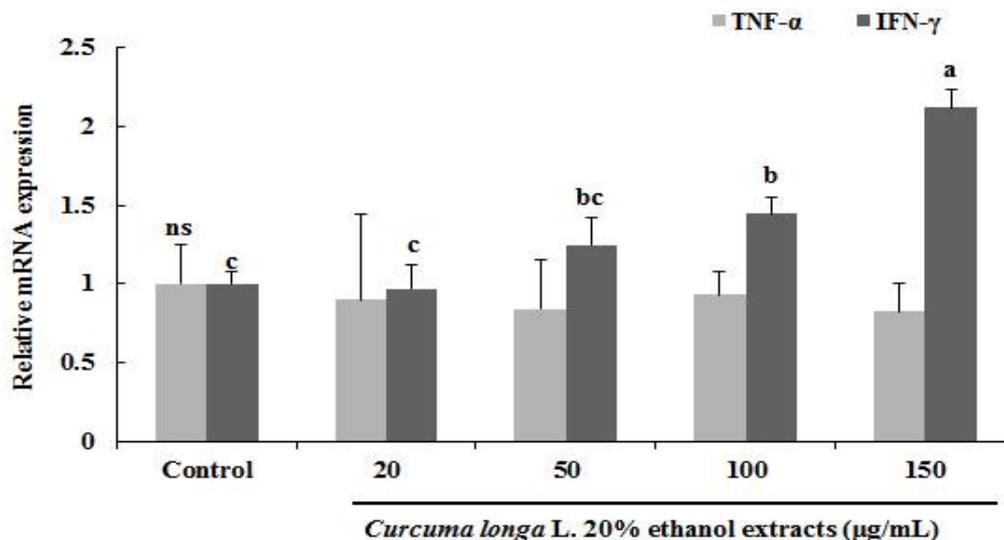
<울금 20%주정 추출물이 자연살해세포의 CD69와 CD335발현에 미치는 영향>

- CD69는 T 세포나 자연살해세포에서 활성화 상태에서 발현되는 분자로 자연살해세포의 활성화 후 짧은 시간에 빠르게 발현됨(34). 따라서 본 연구에서는 자연살해세포의 활성화를 확인하기 위하여 YAC-1 세포와 함께 배양한 자연살해세포에서 울금 20%주정 추출물의 처리가 CD69 단백질 발현에 미치는 영향을 관찰하였다. Control군의 CD69 발현이 $100 \pm 5.74\%$ 였을 때, 울금 20%주정 추출물을 처리한 군들은 20 $\mu\text{g/mL}$, 50 $\mu\text{g/mL}$, 100 $\mu\text{g/mL}$, 150 $\mu\text{g/mL}$ 각각 $110.67 \pm 8.48\%$, $108.58 \pm 5.63\%$, $117.77 \pm 5.30\%$, $139.26 \pm 5.61\%$ 의 CD69 단백질 발현을 보였다. 20 μ

g/mL와 50 μ g/mL의 처리군은 Control과 유의적인 차이를 보이지 않았지만 100 μ g/mL, 150 μ g/mL 처리군에서는 유의적으로 높아졌음을 확인하였고 이는 농도 의존적인 결과를 나타내었다($P < 0.05$).

- CD335는 NKp46 또는 NCR1라고도 알려져 있으며, 이는 자연살해세포가 활성화되었을 때뿐만 아니라 휴식기(resting) 상태에서도 발현이 되어있다고 알려져 있다(35,36). 본 연구에서는 CD335 단백질 발현을 측정함으로써 자연살해세포의 증식능을 간접적으로 측정하였다. Control군의 CD335 발현이 $100 \pm 3.09\%$ 였을 때, 울금 20%주정 추출물을 처리한 군들은 20 μ g/mL, 50 μ g/mL, 100 μ g/mL, 150 μ g/mL 각각 $106.99 \pm 4.39\%$, $105.73 \pm 2.26\%$, $107.65 \pm 2.19\%$, $104.99 \pm 4.88\%$ 의 CD335 단백질 발현을 보였다. Control과 유의적으로 차이 있는 군은 20 μ g/mL와 100 μ g/mL였으나, 울금 20%주정 추출물을 처리한 군들간의 유의적인 차이는 보이지 않았다($P < 0.05$). 위 결과에 따르면 울금 20%주정 추출물의 처리가 자연살해세포의 증식에는 크게 영향을 미치지 않았으나 활성을 증가시키는 결과를 보였음을 알 수 있다.

(3) 울금 20%주정 추출물이 자연살해세포의 사이토카인 발현에 미치는 영향



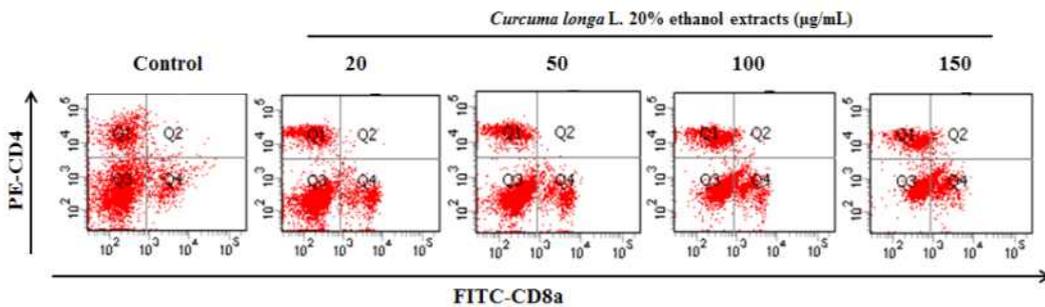
<울금 20%주정 추출물이 자연살해세포의 사이토카인 발현에 미치는 영향>

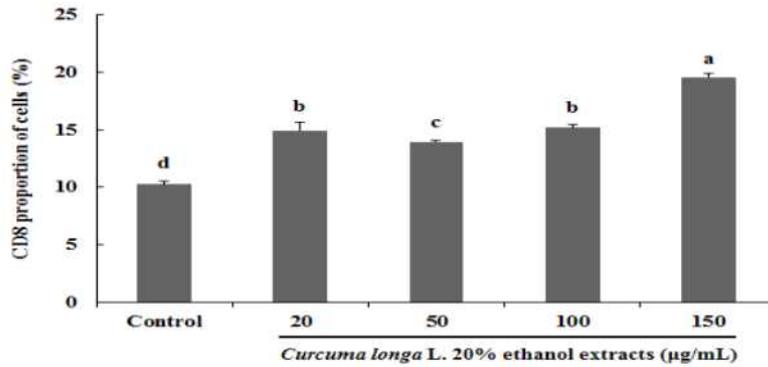
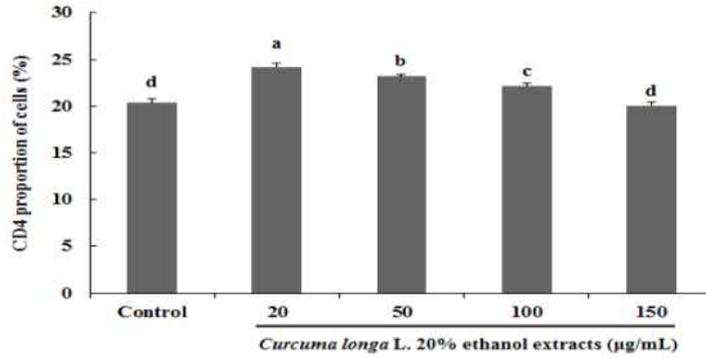
- 여러 사이토카인들이 활성화된 자연살해세포에서 분비되어 염증 반응에 기여하거나 표적세포의 사멸을 유도하게 된다. 자연살해세포가 활성화되면 증가되는 대표적인 사이토카인은 TNF- α 와 IFN- γ 이다(37). 이러한 사이토카인은 염증반응을 유도하고 T세포, B 세포, 대식세포, 수지상세포 등의 다른 면역세포의 활성을 자극시켜 표적세포를 제거한다. 따라서 자연살해세포에서 분비한 사이토카인은 내재 면역계에서 뿐만 아니라 적응 면역계에도 영향을 미친다(38). 본 연구에서는 YAC-1 세포와 함께 배양한 자연살해세포에서 울금 20%주정 추출물의 처리가 사이토카인의 발현에 미치는 영향을 확인하였다.
- TNF- α 의 mRNA 발현에 미치는 영향을 확인한 결과, 모든 군에서 유의적인 차이를 보이지 않았음을 확인하였다. 반면 IFN- γ 의 mRNA 발현에서는 Control군

(1.00 ± 0.08)과 비교하여 울금 20%주정 추출물 저농도 ($20 \mu\text{g/mL}$, $50 \mu\text{g/mL}$) 에서는 유의적인 차이를 보이지 않았으나, $100 \mu\text{g/mL}$ (1.44 ± 0.10), $150 \mu\text{g/mL}$ (2.12 ± 0.12)을 처리한 군에서 유의적으로 발현이 증가되었으며 이는 농도의존적인 결과를 나타내었다($P < 0.05$). 따라서 울금 20%주정 추출물은 자연살해세포의 활성을 증가시키고 이에 따른 $\text{IFN-}\gamma$ 의 발현을 증가시켰음을 확인하였다.

(4) 울금 20%주정 추출물이 T 세포와 MHC II 발현에 미치는 영향

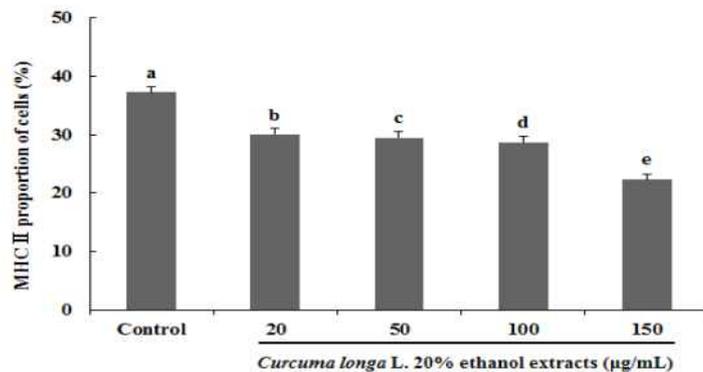
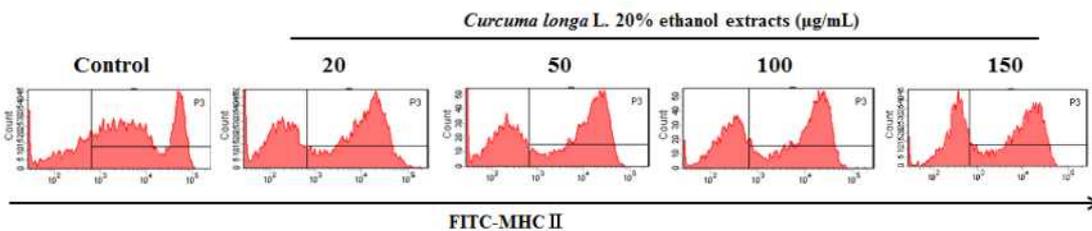
- 적응면역계 중 T 세포는 인지된 MHC분자에 따라 CD4^+ T 세포와 CD8^+ T 세포로 나뉘며 역할을 달리하게 된다. CD4 를 발현하는 성숙한 T 세포는 MHC class II 분자 쪽으로 TCR(T cell receptor) 특이성을 가지며 CD8 을 발현하는 T 세포는 MHC class I 분자와 반응하는 TCR을 가진다(39-41). CD4^+ T 세포는 T helper 세포로서 B 세포와 수지상 세포, 대식세포등과의 상호 작용함으로서 다른 면역 세포들을 활성화시키고 조절하는 역할을 한다(42). CD8^+ T 세포는 세포독성 T세포(cytotoxic T cell)로서 바이러스 등에 감염된 세포나 종양 세포를 파괴한다(43). 본 연구에서는 울금 20%주정 추출물이 T 세포에 미치는 영향을 알아보려고 마우스의 비장세포를 분리하여 울금 20%주정 추출물을 처리하여 CD4^+ T 세포와 CD8^+ T 세포의 비율과 MHC II 발현 변화를 관찰하고 하였다.
- Control군에서 CD4^+ T 세포는 $20.33 \pm 0.47\%$ 였으나 울금 20%주정 추출물을 처리한 군들은 $20 \mu\text{g/mL}$, $50 \mu\text{g/mL}$, $100 \mu\text{g/mL}$, $150 \mu\text{g/mL}$ 각각 $24.23 \pm 0.33\%$, $23.20 \pm 0.22\%$, $22.13 \pm 0.34\%$, $20.07 \pm 0.33\%$ 으로 농도가 높아질수록 감소되었음을 확인하였다. 반면 CD8^+ T 세포의 경우, Control군에서 $10.23 \pm 0.26\%$ 으로 유의적으로 가장 낮았다. 울금 20%주정 추출물을 처리한 군에서는 $20 \mu\text{g/mL}$, $50 \mu\text{g/mL}$, $100 \mu\text{g/mL}$, $150 \mu\text{g/mL}$ 각각 $14.97 \pm 0.69\%$, $13.93 \pm 0.17\%$, $15.20 \pm 0.28\%$, $19.57 \pm 0.37\%$ 으로 나타나 농도가 높아질수록 CD8^+ T 세포의 비율이 증가되었음을 확인하였다 ($P < 0.05$).





<울금 20%주정 추출물이 T 세포 발현에 미치는 영향>

-MHC II 발현 변화를 관찰한 결과에서는, 정상군에서 $37.27 \pm 0.21\%$ 로 유의적으로 가장 높게 관찰되었다. 반면 울금 20%주정 추출물을 처리한 군에서는 20 µg/mL, 50 µg/mL, 100 µg/mL, 150 µg/mL 각각 $30.07 \pm 0.25\%$, $29.47 \pm 0.37\%$, $28.73 \pm 0.21\%$, $22.30 \pm 0.22\%$ 으로 농도가 높아질수록 MHC II 발현이 감소되었음을 확인하였다 ($P < 0.05$).



<울금 20%주정 추출물이 MHC II 발현에 미치는 영향>

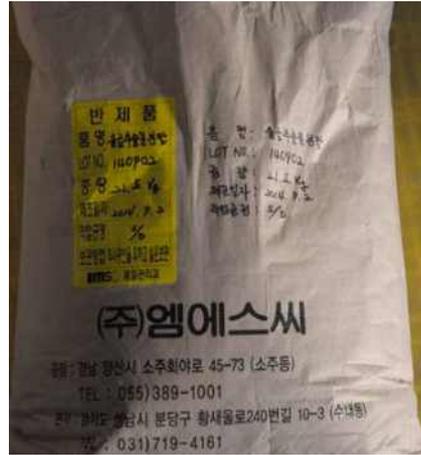
라. 울금 20%주정 추출물 제조공정 표준화 및 지표성분정량 결과

(1) 울금 20%주정 추출물 제조공정 표준화 결과

Lot NO.	원료량(kg)	부형제(kg)	생산량(kg)	건조감량(%)	수율(%)
1	200	5.4	30.4	1.2	15.2
2	200	5.7	31.0	1.3	15.5
평균	200	5.06	30.7	1.3	15.4



울금 20%주정추출물



개별 포장

(2) 울금 20%주정 추출물 지표성분 정량

시료명	실험결과 (Curcumin, 단위 mg/g)			평균 (mg/g)
	1회	2회	3회	
CL 20SD- 1 Lot	0.4750	0.4747	0.4731	0.474
CL 20SD- 2 Lot	0.4641	0.4638	0.4663	0.465
CL 20SD- 3 Lot	0.4634	0.4647	0.4647	0.464

마. 울금추출물 기준규격 결과

(1) 성상

이미, 이취가 없고, 고유의 향미가 있는 미황색 분말

(2) 건조감량

	CL20-1	CL20-2	CL20-3
건조감량	2.7	2.8	2.8

(3) 지표성분함량

시료명	실험결과 (Curcumin, 단위 mg/g)			평균 (mg/g)
	1회	2회	3회	
CL20-1	0.581	0.576	0.584	0.58
CL20-2	0.583	0.581	0.572	0.58
CL20-3	0.583	0.571	0.568	0.57

(4) 중금속

중금속의 경우 동일한 원료이므로 1Lot만 실시하였다

납	1.9881
비소	0.3585
카드뮴	0.2385
수은	0.2919

(5) 곰팡이독소

	CL20-1	CL20-2	CL20-3
Aflatoxin B1	불검출	불검출	불검출
Aflatoxin B2	불검출	불검출	불검출
Aflatoxin G1	불검출	불검출	불검출
Aflatoxin G2	불검출	불검출	불검출

(6) 대장균군

CL20-1	CL20-2	CL20-3
		
음성	음성	음성

(7) 제안 기준 및 규격

시험항목		제안 기준 및 규격	실측치 (시험성적서)		
			CL20-1	CL20-2	CL20-3
성상		이미, 이취가 없고 고유의 향미를 가진 진한 갈색분말	이미, 이취가 없고 고유의 향미를 가진 진한 미황색 분말		
지표성분 (mg/g)		0.48~0.72	0.58	0.58	0.57
중금속 (mg/kg)	납	10.8	1.9881		
	총비소	3	0.3585		
	카드뮴	150	0.2385		
	총수은	2.1	0.2919		
미생물	대장균군	음성	음성	음성	음성
	세균수(cfu/g)	-	-	-	-
곰팡이독소	총 아플라톡신 (B ₁)	10 μ g/kg (6 μ g/kg)	불검출	불검출	불검출

바. 울금추출물의 섭취가 면역기능에 미치는 효과 검증을 위한 단일기관, 무작위배정, 이중맹검, 위약대조, 비교 인체적용시험 결과

총 피험자수 72명을 대상으로 2014년 9월16일 피험자 방문이 종료 되었으며, 현재 기능성평가 및 통계처리가 진행 중에 있음. 최종결과보고서는 12월 중순경 완료될 것으로 예상됨

(1) 인체적용시험 시료(캡슐) 제작 결과

(가) 기술한 방법으로 인체적용시험 시료를 제작하였다.



<인체적용시험 시료>

(나) 1캡슐(474mg)의 성분 조성비는 아래와 같다.

성분	본약군(mg)	위약군(mg)
울금분무건조물	470	-
유당	-	330
카라멜색소	-	20
치자엘로우150CR	-	60
치자엘로우300CR	-	60
향료(솔향)	정량	정량
스테아린산마그네슘	4	4
합계	474	474

(다) 울금추출물의 1일 섭취량은 1,692mg으로 제작하였다.

(라) 인체적용 시료는 피험자 1인당 2박스를 제공하도록 포장하였으며 총 생산량은 아래와 같다.

시료명	Cap./1박스	총생산량(박스)
본약	190	80
위약	190	80

(2) 시험법 밸리데이션 결과

(가) “울금추출물의 정량분석법” 이 사용 목적에 적합한지를 검증하기 위하여 밸리데이션을 통하여 특이성, 직선성, 정밀성, 정확성 및 범위를 검증하였다.

(나) 특이성 결과 울금추출물의 Curcumin 피크는 Curcumin 표준품과 동일한 시간대에 분석되었고, 추출분말내의 다른 물질과 분리됨을 Bisdemethoxycurcumin 표준품과 유지시간의 차이와 Curcumin 인접피크의 분리도 및 Curcumin 피크의 Peak Purity를 Curcumin 피크높이(H)와 전후 1/3, 2/3(H1/3, H2/3)의 UV Spectrum으로 확인하여, 분석조건에 검체의 다른 물질과 특이적으로 Curcumin이 분석됨을 검증하였다.

(다) 직선성 결과 분석조건에서 제조하는 Curcumin 표준용액의 농도구간인 2.931~6.839 ug/mL에서 Curcumin 농도(x Data)와 Curcumin피크면적(y Data)의 결정계수가 0.999 이상으로 농도와 피크면적이 선형적인 관계가 있음을 검증하였다.

(라) 정밀성 결과, 동일 제조번호의 검체에 대해 분석일자내 함량 균일성(Interday Precision)은 상대표준편차(평균/표준편차*100, %RSD)는 1.0 이하, 분석일자간(Intra-day Precision)의 경우 2.0 이하가 얻어지고, 제조번호 별 검체의 함량이 0.473 mg/g(CL20-13001), 0.466 mg/g (CL20-13002), 0.457 mg/g(CL20-13003)이므로, 분석조건에서 제조번호에 따라 유의하고 울금추출물 추출분말의 Curcumin 농도가 재현성있게 얻어짐을 검증하였다.

(마) 정확성 결과, 분석용액에 일정량의 Curcumin을 첨가한 회수율(실험농도/예측농도

*100) 평가에서 회수율이 97~111%로 정확하게 얻어짐을 검증하였다.

(바)범위는 직선성, 정밀성, 정확성이 만족되는 구간인 Curcumin 농도 3.84~5.76 ug/mL 선정하였다.

(사) 분석조건에 따라 3 Lot 분석결과 0.48 mg/g으로 기준을 정하였으며, 0.48 mg/g 대비 80~120 % 범위 내에서 Curcumin 정량은 검체내 다른 성분에 간섭을 받지 않고, 정밀하고 정확한 결과를 얻어지므로, “울금추출물의 정량분석법”은 울금추출물 검체내에 존재하는 Curcumin의 정량법에 타당한 분석법임을 검증하였다.

항 목	기 준	결 과	판 정
특이성	-Blank의 간섭 없음 -유사화학종의 간섭없음 -표준용액과 검액의 Curcumin피크 유지 시간차 :0.2분 이내 -표준용액과 검액의 Curcumin피크 Purity : 일치함	-Blank의 간섭 없음 -유사화학종의 간섭없음 -표준용액과 검액의 Curcumin피크 유지 시간차 :0.2분 이내 -표준용액과 검액의 Curcumin피크 Purity : 일치함	적합
직선성	결정계수 : 0.99이상	결정계수 : 0.999 이상	적합
정밀성	상대표준편차(%RSD) - Inter-day : 2.0% - Intra-day : 5.0%	Inter-day : 1.0% Intra-day : 2.0%	적합
정확성	회수율 : 80~120%	회수율 : 97~111%	적합
범 위	직선성, 정밀성, 정확성을 만족하는 구간	2.931 ~ 6.839 ug/mL 분석농도 4.8 ug/mL 대비 80~120% 구간	적합

사. 원료인정 신청서 요약

항 목	주요 내용
1. 원료명	울금 추출물
2. 원재료	울금 (학명: <i>Curcuma longa</i> L, 사용부위 : 덩이뿌리)
3.기능 (지표)성분	Curcumin
4. 제조 공정	원재료칭량 → 추출 → 농축 → 부원료 혼합 → 분무건조 → 기능성 원료
5. 규격 및 시험방법	1) 색상 : 이미, 이취가 없고 고유의 향미를 가진 진한 갈색분말 2) Curcumin (지표성분) : 0.48 mg/g 3) 납(mg/kg) : 1 이하 4) 총비소(mg/kg) : 1 이하

	<p>5) 카드뮴(mg/kg) : 1 이하</p> <p>6) 총수은(mg/kg) : 0.5 이하</p> <p>7) 대장균군 : 음성</p> <p>8) 곰팡이독소(총 아플라톡신(B₁)) : 10 μg/kg(6 μg/kg)</p>
기능(지표) 성분 시험법	<p>자사시험방법(시험법 밸리데이션 완료)</p> <p>HPLC UV 375nm C₁₈ column (250*4.6mm, 5μm)</p>
규격외 (잔류농약)	<p>수입식품등 검사에 관한 규정」 별표 3. 정밀검사대상 잔류농약 검사항목에 따라 잔류농약에 대하여 국내 식품위생검사기관(한국건강기능식품연구원) 시험결과 59종 중 1종 검출. ‘플루벤디아마이드(0.0009mg/kg)’</p>
6. 안전성	<p>의사결정도</p> <p>섭취경험이 있는 울금(<i>Curcuma longa</i> L., 제한적사용 원료)의 덩이뿌리를 추출한 것으로 의사결정도 ‘다’에 해당</p>
섭취 근거	<p><인정현황></p> <p>◦국내</p> <ul style="list-style-type: none"> - 「식품공전」: 식품공전상 식품에 제한적으로 사용가능한 원료의 목록에 등재 “뿌리(줄기)” - 대한약전 제 9개정 울금으로 등재 - 「대한약전의 의약품등 기준」: ‘울금가루’로 등재 Pulvis Curcumae longae Radicis : 울금을 가루로 한 것 <p>◦국외</p> <ul style="list-style-type: none"> - 일본약국방 : 일본약국방 제 16개정, Turmeric으로 등재 - USP NF : USP35/NF30 Turmeric으로 등재 <p><사용현황></p> <ul style="list-style-type: none"> ◦국내 : 울금 환, 가루, 다류, 카레 등 함유제품 유통 중 ◦미국, 일본, 영국 등 : 울금 함유 제품이 (OEM 생산) 대량유통
안전성 정보	<ul style="list-style-type: none"> - 어린이, 임산부와 수유부는 섭취 시 주의 (Medlineplus, drugdigest, PDR for Herbal Medicines, WHO monograph 참고) - 의약품(혈액항응고제) 복용 시 섭취에 주의 (Medline Plus, NCCAM, DrugDigest, PDR for Herbal Medicines, Health Canada 참고)
섭취량 평가	<ul style="list-style-type: none"> • 신청원료의 섭취량 : 신청원료로서 1.692g/일 • 유사원료(기능성원료, 제2014-2호) 1일섭취량 : 1g/일 • 유사원료의 사용량 (혼합음료, 기타가공품) : 1~5.8g/일 • 울금 원물로 환산시, 11.28 g/일에 해당 • 문헌에 의한 통상섭취량:3~10g/일(동의보감 및 WHO monograph) ⇒ 제안된 최대 섭취량은 통상섭취량(유통제품 등)과 유사하고(또는 3배 이내이고), 최대안전섭취량, 일일허용섭취량 이내임
인체적용 시험	<p>심각한 이상반응은 확인되지 않음 (1.692g/일 섭취 기준)</p>
독성 시험	<ul style="list-style-type: none"> ◦ 단회 투여시험에서 이상반응 및 독성 나타나지 않음 - 최소치사량 2000 mg/kg.bw이상

	기타 사항	- 특이사항, 참작사항 등을 기재
	섭취시주의 사항	- 어린이, 임산부와 수유부는 섭취 시 주의 - 의약품(혈액항응고제) 복용 시 섭취에 주의
7. 기능성	신청기능성	면역증강에 도움을 줌
	신청 일일섭취량	울금추출물로서 1.692 g/일
	시험관시험	[유사원료] ◦RAW 264.7 세포에서 발효울금 추출물의 면역조절 효과 - 탐식작용 : 발효울금 20% 주정추출물에서 118.41±11.21% 증가(대조군 대비, p<0.05) - TNF- α 분비량 : 발효울금 20% 주정추출물에서 477.35±139.13pg/mL 으로 낮아짐(대조군 대비, p<0.05) - LP-BM5 eco 발현 : 발효울금 20% 주정추출물에서 유의적으로 억제(대조군 대비, p<0.05)
	동물시험	[신청원료] ◦C57-BL/6 mice, 50~500mg/kg, 12주, 경구투여(LP-BM5 바이러스 감염모델) - 울금추출물 투여군 농도의존적으로 T세포, B세포 증식능 유의적 상승(대조군 대비, p<0.05) - 울금추출물 500mg/kg투여군 IFN- γ 유의적 상승(대조군 대비, p<0.05) - 울금추출물 200, 500mg/kg투여군 IL-2 유의적 상승(대조군 대비, p<0.05) - 울금추출물 투여군 IL-4, IL-10 유의적 감소(대조군 대비, p<0.05) - 울금추출물 투여군 농도의존적으로 IgG 유의적 감소(대조군 대비, p<0.05) - 울금추출물 200, 500mg/kg투여군 NK 세포활성 유의적 상승(대조군 대비, p<0.05) - 울금추출물 500mg/kg투여군 IL-12, IL-15유의적 상승(대조군 대비, p<0.05) ※시험물질 : 비파엽추출물
	인체적용 시험	[신청원료] ◦건강한 성인(n= 72), 1.692g/일, 8주(RCT, DB) - OO 및 OO 유의적 증가(대조군대비, p<0.05) ※인체적용시험기관 : ('00), 시험책임자 :
	기타 사항	- 특이사항, 참작사항 등을 기재

4. 결론

본 연구에서는 면역증강 건강기능 식품 소재 개발을 위해 발효울금, 울금의 실온추출물, 열수 추출물, 20%주정 추출물, 80%주정 추출물을 *in vitro* 세포계를 통한 생리활성을 확인하고 효능이 좋은 추출물을 선정하여 동물실험을 통한 효능 평가와 기전연구를 수행하였다.

*in vitro*에서의 추출물들의 활성평가를 비교하기 위해 크게 대식세포의 활성화 측정, NK cell 활성화 평가, SC-1 /LP-BM5 세포주에서 virus 복제 억제능을 측정하여 면역증강 기능성을 평가하였다. 세부적으로는 대식세포의 활성화 측정을 하기 위해 복강대식세포와 RAW 264.7 cell에서의 탐식능 측정과 RAW 264.7 cell을 사용한 nitric oxide와 TNF- α 생성능을 측

정하였다. 추가적으로 정상 상태와 염증 상태에서의 면역조절 능력을 측정하기 위해 선정된 시료에 LPS를 처리했을 때와 처리하지 않았을 때를 비교하여 실험하였다. 1차년도 연구를 통하여 발효울금과 울금 추출물의 NO, TNF- α 의 생성능을 측정함으로써 면역 및 염증 반응 조절효과에 대하여 연구하고자 하였다.

1차년도 연구 결과, 발효울금의 경우 20%주정 추출물과 울금의 경우 20%주정 추출물에서 발생하는 효과가 다른 시료에 비해 면역증강의 가능성이 높은 것으로 나타났다. 이 결과를 토대로 하여 2차년도에는 면역과괴 유발 동물모델 및 정상 동물모델에서 울금 20%주정 추출물의 식이섭취를 통한 면역증강 효과를 확인하였다. 울금 20%주정 추출물의 섭취가 면역 반응 조절에 어떠한 영향을 미치는 지 알아보기 위해 실험을 실시하는 기간 동안의 몸무게 변화와 실험기간 끝난 후 싸이토카인 분비량, NK cell 활성능, T/B 세포의 증식을 분석하였다.

우선적으로 의견제시하여야 할 사항은 최근에 면역증강이라는 개념이 도입되면서 건강기능식품 분야의 중요한 자리를 차지하게 되었는데 실제적으로 면역증강이라는 용어는 면역학적 측면에서 보았을 때 불합리한 면이 존재한다. 즉, 모든 면역체계는 항상성을 유지하며 균형을 이루고 있는데 증강시킨다는 의미는 사실상 오히려 병을 유발시킬 수 있거나 균형을 파괴할 수도 있는 점이 있기 때문에 이것을 보다 현실적으로 적용하면 면역조절기능이 옳을 것이다. 면역을 증강시키더라도 정상범위 내에서 증가시킬 수 있는 방안이 필요하며 한 가지 면역증강의 개념을 정립하자면 면역증강 소재를 투여하였을 경우 평소에는 정상적인 상태로 유지하되 외부의 자극이나 감염 또는 스트레스가 주어졌을 때 이런 외부 요인에 대한 저항성(tolerance)이 높게 나타나는 것을 의미한다고 할 수 있다. 따라서 사람의 경우에는 어려우나 동물 실험에서는 미리 면역증강 가능 소재를 일정기간 투여하다가 질병을 유발시킴으로서 면역계의 교란을 방지하고 어느 정도 항상성을 유지하려는 성향이 나타나는 지를 검토하는 것이 실질적인 면역증강의 개념으로 보아야 할 것임. 이러한 측면에서 미리 소재 추출물을 장시간 투여하여 실험쥐가 적응되도록 설계하였고 이에 LP-BM5 retrovirus로 면역결핍을 유도함으로써 투여한 소재가 어느 정도 면역기능을 유지하려고 하는 지에 대해 평가하였으며 정상적인 동물모델에서 식이섭취가 면역시스템에 미치는 영향을 살펴보았다.

정상 동물모델에서 울금 주정 20% 식이가 면역 시스템에 미치는 영향을 살펴보았을 때 해부학적 관찰을 통하여 울금 주정 20%가 유의적인 차이를 일으키지 않았다. 또한 전반적인 cytokine와 면역글로불린에 미치는 영향이 미비하였다. IFN- γ , IL-12, T cell 증식능에서 유의적으로 감소한 결과를 보였으나 이는 실험적인 오류라고 판단된다. LP-BM5 retrovirus의 감염은 정상적으로 잘 진행되었으며 타 병원체에 의한 실험의 간섭은 없는 것으로 확인되었다. 우선적으로 장기의 무게와 크기를 비교한 결과 울금 20%주정 추출물 50 mg/kg, 200 mg/kg, 500 mg/kg에서 림프절과 비장의 크기가 유의적으로 감소하는 것으로 나타났음. 면역의 항상성에 직접적인 영향을 미치고 있는 Th1 type cytokine과 Th2 type cytokine을 확인한 결과, 면역결핍으로 인해 감소된 Th1 type cytokine을 울금 20%주정 추출물 식이 투여가 농도의존적으로 증가시켰으며 증가된 Th2 type cytokine을 울금 20%주정 추출물 식이 투여가 농도의존적으로 감소시켰음을 확인하였다. LP-BM5 retrovirus에 의하여 NK cell의 활성이 감소되어 면역결핍이 유발되었으나 울금 20%주정 추출물의 높은 농도에서 활성을 증가시켰음을 확인하였다. 따라서 울금 20%주정 추출물은 정상적인 동물모델에서는 면역시스템에 미비한 영향을 미쳤으며 면역결핍 모델에서는 농도의존적으로 높은 면역조절 효과를 보였다.

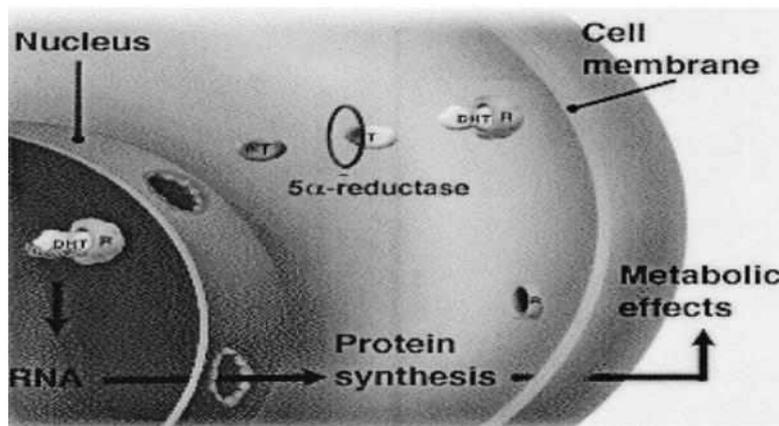
3차년도 연구에서는 동물실험을 통하여 효과를 확인한 울금 20%주정 추출물의 면역 조절 효능에 대한 기전연구를 하고자 세포계에서 대표적인 면역세포인 T 세포와 자연살해세포에 미치는 영향을 관찰하였다. 3차년도 연구 결과를 보았을 때, 울금 20%주정 추출물은 상대적으로 MHC II 발현감소에 의하여 CD4+ T 세포의 비율은 감소되고 CD8+ T 세포의 비율을 증가시켜 효과적으로 세포독성 활동을 수행할 수 있을 것 이라고 추측할 수 있음. 결론적으로 본 연구 결과에 의하면 울금 20%주정 추출물은 자연살해세포의 활성을 증가시켜 효과적으로 종양세포를 제거할 수 있었으며 CD4+ T 세포보다는 CD8+ T 세포를 증가시킴으로서 감염된 세포나 종양 세포 제거를 효과적으로 할 수 있을 것이라고 예상된다. 따라서 울금 20%주정 추출물은 내재면역 뿐만 아니라 적응면역에도 관여하여 면역조절에 영향을 미친것으로 보인다. 이러한 결과는 향후 울금이 면역조절에 도움이 되는 건강기능식품의 원료로 사용하기 위한 과학적인 증거가 될 수 있을 것이라고 기대된다.

*In vitro*와 *in vivo* 연구에서 면역증강 활성 소재로 선정된 울금 20%주정 추출물을 대상으로 추출공정 표준화 연구를 수행하였다. 추출물의 수율은 15.4%였으며, 지표성분으로 설정한 Curcumin은 0.46mg/g이 검출되었다. 이로서 울금 20%주정 추출물은 면역증강 활성을 가지는 건강소재로 산업화 가능성을 확인하였다.

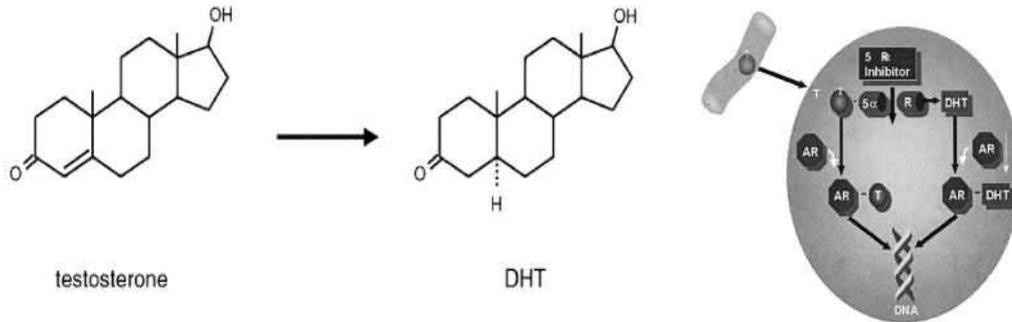
8절. 전립선건강 건강기능식품 소재 개발

1. 서론

전립선비대는 우리나라 남성의 70% 이상이 평생 한번 이상 경험한다고 알려진 질환으로 방광폐색으로 인한 다양한 배뇨장애가 일어나 생활의 불편함을 야기하는 질병이다 (100). 40대 이후에 전립선비대가 시작되며, 노화와 함께 그 비율이 증가한다(101). 전립선비대의 중요한 역할을 담당하는 것은 남성호르몬인 안드로젠으로, 전립선의 발달, 성숙, 기능, 발달에 관여한다(102). 주요 Androgen인 Testosterone(T)은 정소의 Leydig cell에서 분비되고 합성되는데 (103), Testosterone은 5-alpha reductase에 의하여 활성형 testosterone인 dihydrotestosterone(DHT)으로 전환된다(104). 이러한 전환을 매개하는 것은 5-alpha



scheme1. The development of benign prostatic hyperplasia and mechanism (Urology, 2001).



Scheme 2. Conversion from T to DHT with 5- α -reductase in prostate cells(Urology, 2001).

reductase로 Type1과 2로서, type 1 5- α reductase는 주로 피부와 간에서 발현되고, type2는 prostate에서 주로 발현된다(105). 이 효소는 전립선의 stromal cell에 주로 발현되는 nuclear bound steroid enzyme으로 전립선의 정상적인 발달과 성숙에서 중요한 역할을 맡고 있으나, 전립선비대에서는 과발현되어 전립선의 periurethral glands와 transition zone의 stromal cell과 epithelial cell의 변화를 일으킨다(106). 그러므로, 5- α reductase inhibitor를 찾는 것이 전립선 비대치료에 있어서 중요한 key라고 생각되고 있으며, type 2 5- α reductase inhibitor인 Finasteride와 type1, 2의 inhibitor인 dutasteride가 현재 개발된 전립선비대의 치료제이다(103).

전립선건강 건강기능식품은 현재까지 Saw Palmetto 열매추출물이 주축을 이루고 있으며 시장을 형성하고 있고, 노령인구증가에 따라 더욱 활발하게 소재탐색이 이루어질 것으로 생각된다.

전립선비대의 기전은 명확하게 밝혀져 있지 않다. 하지만 전립선비대환자에서 만성적인 전립선 염증이 있다는 사실이 보고되면서, BPH의 발달에서 염증의 역할이 지속적으로 연구되고 있다(107). 산화적손상은 노화와 함께 증가하는 대표적인 증상이며, 전립선비대도 노화에 따라 진행되는 질병이므로 nitric oxide(NO), OH⁻, O₂⁻ 등의 영향을 받게 된다(108). 유리라디칼의 발생은 단백질구조와 기능을 변형시키고 유전자의 변화와 post translational modification을 유도하며 지질과산화는 COX-2를 경유하는 prostaglandin 합성의 시발점이 이 되어 활성산소종을 생산하여 세포의 proliferation을 유도하게 된다(109). 또한, 이러한 활성산소종에 의해 활성화되는 Nuclear factor kappa B(NF- κ b)는 여러 cytokine들의 발현으로 이어져, 염증에 의한 세포의 과성장을 이끄는 결과로 이어지게 된다(108). 그러므로, 노화와 함께 일어나는 여러 변화에서 이러한 염증에 대항할 수 있는 항산화시스템의 불균형이 전립선비대를 이끄는 한 원인이 된다고 생각된다.

본 연구에서는 울금 및 발효울금의 다양한 추출물을 대상으로 5- α reductase의 억제 효과를 갖는 시료를 선정하여 전립선비대 건강기능식품의 소재로 삼고자 하였다. 본 연구는 울금추출물 중 *in vitro in vivo*에서 5- α reductase억제 효과, testosterone 및 dihydrotestosterone의 전환억제효과 등을 중심으로 검토하였으며, 활성이 높은 시료를 선정하여 실제 노화와 함께 진행되는 전립선비대에서 원인 기전으로 생각되는 항산화효소의 감소, 염증기전의 활성화 등을 억제하는 과정을 추적하였다.

2. 방법

가. 울금/발효울금 추출물에서 *in vitro* 전립선비대 억제활성 평가

(1) 실험 대상 재료

울금 추출물의 전립선비대 억제활성을 확인하기 위한 실험대상재료는 울금(하늘땅바다, 전남 진도군)을 감별과정을 거친 후 적합품을 칭량하여 실온, 열수, 20%주정, 80%주정추출을 하고 여과·농축 후 동결건조 한 것을 한국인스팜(주)으로부터 공급받았으며, 발효울금추출물은 *Aspergillus oryzae*로 발효시켜 울금추출물과 동일한 방법으로 추출한 것을 공급받아 실험에 사용하였다.

(2) 울금과 발효울금추출물의 cell viability 측정

각 시료의 세포실험 유효범위의 측정을 위하여 MTT assay 방법을 이용하였으며, 본 실험에 사용된 울금과 발효울금의 8가지 추출물은 모두 0.5% DMSO에 녹여서 assay를 시행하였다. LNCaP 세포를 2×10^4 cells/well로 96 well plate에 seeding함. FBS 10% RPMI 1640에서 18시간동안 incubation 한 후, serum free RPMI 1640으로 교체 후 울금과 발효울금의 8가지 분획을 5, 10, 50, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도로 처리하여 24시간 후 형성된 formazan을 DMSO 100 μl 를 넣어 균질하게 녹인 후 microplate reader를 이용하여 570nm에서 측정하였다.

(3) 울금/발효울금 추출물에서 5-alpha reductase 저해 활성

전립선비대에서 과활성화되어 testosterone을 DHT로 전환시키는 효소인 5-alpha reductase에 대한 억제효과를 울금과 발효울금의 시료에서 검색하기 위하여 ELISA assay를 시행하였다. 각 시료는 상기의 assay와 같이 0.5% DMSO에 균질하게 녹여 사용하였으며, 전립선비대와 관련이 있다고 알려진 5-alpha reductase typeII에 대한 특이적인 저해를 알아보기 위하여, 5-alpha reductase typeII가 주로 발현된다고 알려진 rat의 prostate을 절제하여 균질화시켜 효소원으로 이용하였다. 시료의 효과를 검토하기 위하여 균질화된 rat의 prostate에 testosterone을 첨가하고 효소단백질의 발현정도를 측정하였다.

효소원의 공급을 위하여 15주령 Sprague Dawley rat의 prostate를 적출한 후 pH 7.4 phosphate buffer saline(PBS)로 2회 세척한 후, 동일한 PBS를 무게의 8배를 첨가한 후 glass homogenizer로 균질화하였다. 균질액을 4°C 에서 5,000 rpm에서 원심분리하여 상등액을 취하여 assay를 실시하였으며, 남은 균질액은 -70°C 에 보관하였다. 실험을 간단히 설명하자면, 시료를 처리한 효소원을 Horseradish Peroxidase(HRP)-conjugated SRD5A2와 SRD5A2-specific antibody와 함께 1시간동안 37°C 에서 incubation을 실시하고, incubation 후 기질용액을 첨가하고 15분 후 황산용액으로 반응을 멈춘 후 450 nm에서 10분 이내에 시료별 차이를 측정하였다.

(4) 울금/발효울금 추출물의 DHT 전환 억제 활성 검토

In vitro 상에서의 울금/발효울금 추출물을 처리한 SRD5A2-transfected LNCaP cell line에 testosterone을 처리하여 전환된 DHT를 측정함으로써 시료의 DHT 전환 억제능을 측정하는 방법으로, 인간전립선세포주인 LNCaP 세포에 5-alpha reductase type II의 발현을 위하여 SRD5A2가 삽입되어 있는 pSG5SRD5A2를 Lipofectamine 2000을 이용하여

세포에 transfection 하였다. Transfection 24시간 경과 후, charcoal-stripped serum 10% RPMI 1640을 48시간동안 처리하여 세포 내 Hormone을 depletion 시킨 후, 48시간 뒤에 올금과 발효올금의 각 시료(실온, 열수, 20%주정, 80%주정)를 처리하였다. 다시 16시간 후 testosterone을 처리하고, 4시간 후 100 μ l medium을 취하여 DHT로의 변환을 측정하였다. DHT의 측정은 medium 50 μ l를 대상으로 ELISA assay를 실시하였으며, 450nm에서 측정하였다. 5-alpha reductase typeII의 저해능을 측정하기 위해서 ELISA assay kit(Cusabio, Germany)를 이용하였으며, 460nm에서 측정하고 측정값의 계산은 기준액으로 그린 standard그래프를 이용하여 구하고 BPH군에 대한 백분율(%)로 표기하였다.

(5) 올금열수 및 20% 주정추출물에서 5-alpha reductase 저해 활성

선행에서 검토된 결과로 선정된 2종의 시료를 대상으로 시행하였다. 선정 시료의 농도를 0, 25, 50, 100 μ g/mL로 설정하였으며, 선행했던 것과 동일한 방법으로 rat의 prostate 균질액을 이용하여 5-alpha reductase 저해 활성 검토하였다. 각 시료는 0.5% DMSO에 녹인 것을 사용하였으며, ELISA assay의 다른 모든 조건은 동일하게 시행하였으며, 측정값은 동일하게 계산하였다.

(6) 올금추출물(열수 및 20%주정)에서 전립선세포주에서 DHT 및 5-alpha reductase 저해 활성

선행에서 검토된 결과로 선정된 2종의 시료를 대상으로 선행실험과 같이 SRD5A2-transfected LNCaP에서의 DHT전환 억제활성의 농도별 효과 검토를 실시하였다. 각 시료의 농도는 0,25, 50, 100 μ g/mL로 설정하였으며, 0.5% DMSO에 녹인 것을 사용하였다. LNCaP cell을 12 well plate에 seeding 하고 90% confluence에 이르렀을 때 Lipofectamine 2000으로 transfection을 실시하였다. ELISA assay를 실시하였으며, 450nm에서 측정하였다. 측정값은 시료를 넣지않고 testosterone만을 넣은 control을 100%로 환산하여 이에 대한 상대적인 전환을 저해를 계산하였다.

상기 실험 시행 후, 세포주를 수거하여 pH7.4 PBS로 2회 세척한 후, 각 200 μ l의 PBS를 첨가하여 균질화하고 5,000 rpm에서 원심분리하였다. 원심분리 후 취한 상등액은 희석없이 50 μ l를 취하여 assay를 실시하였다. ELISA assay의 다른 모든 조건은 동일하게 시행하였다. 측정값의 계산은 시료를 넣지 않고 testosterone만을 넣은 control을 100%로 환산하여 이에 대한 상대적인 SRD5A2의 양을 계산하였다.

(7) 올금추출물(열수 및 20%주정)에서 항염활성 검토

전립선비대와 연관되어 잘 나타날 수 있는 전립선염에 대한 시료의 효과를 검토하기 위하여 Raw 264.7 세포주를 이용하여 LPS로 염증을 유발하여 염증관련 인자의 변화를 RT-PCR을 이용하여 검토하였다. Raw 264.7을 12 well plate에 seeding 한 후 40% confluence 가 되었을 때 washing 후 배지를 교체하고 선정 시료를 0, 25, 50 μ g/mL의 농도별로 처리하고 18시간동안 배양하였다.. 18시간이 경과한 후 1 μ g/mL의 LPS를 처리하여 2시간 후 세포를 harvest하고 RNA를 추출하고 DNA를 합성한 후 PCR을 시행하였다. RT-PCR을 위한 primer는 COX-2(F:GAGTGGGAGGCACTTGCATT, R:TGGAGGCGAAGTGGGTTTTTA),iNOS(F:TCYYGGAGCGAGTTGTGGAT,R:GGGTCGTAATGTCCAGGAAGT),

I6-1 β (F:GTTGACGGACCCCAAAAGAT, R:AAGGTCCACGGGAAAGACAC), IL-6(F:TCCATCCAGTTGCCTTCTTG, R:CCACGATTTCCCACAGAACA)로 모두 58°C에서 27 cycle을 증폭하였으며 GAPDH(F:GTGTTCTACCCCAATGTGT, R:AGGAGACAACCTGGTCCT CAGT)로 internal standard를 실시하였으며, PCR의 결과물은 1.5% agarose gel에서 전개하여 결과를 확인하였다.

나. 울금 열수 추출물에서 *in vivo* 전립선 비대 억제 및 개선효과 검토

(1) 최종시료 선정을 위한 1차 *in vivo* 평가

(가) 실험재료

1차년도 *in vitro* 실험 결과를 토대로 최종 건강식품개발에 적합한 시료를 최종선택하기 위하여 활성이 높았던 울금 20% 주정추출물(20% CL EtOH) 및 울금 열수추출물(CL HW)을 대상으로 전립선비대 유도 rat으로 전립선비대억제 및 치료효과를 보고자 시행하였다. 원료인 울금은 전라남도에서 채취한 것으로서 주관기관에서 일괄 공급하였다.

(나) 실험동물의 조건

본 실험은 4주령의 웅성 래트(male rat)를 (주)샘타코 바이오코리아(Osan, Korea)에서 구입하여 실험에 사용하였다. 실험동물의 사육환경은 온도 23 ± 2 °C, 상대습도 55 ± 5%, 명암교대는 약 12시간으로 하였으며 사료와 물은 자유로이 섭취하게 하였다. 실험동물은 사육상자 당 2마리씩 수용하였으며 무게측정과 배당교환은 3일에 한번씩 실시하여 관리하였다. 실험동물은 일주일의 안정화기간을 거쳐서 실험에 사용되었다.

(다) 전립선비대 *in vivo* model의 확립

- 일주간의 안정화 기간 후 intrinsic testosterone의 영향을 배제하기 위하여 거세(castration)를 시행하였다. 실험동물을 에테르 등으로 마취시킨 후 배면이 수술자를 향하게 놓여 고정하고 음낭 끝 부위의 피부를 절개하여 좌우 고환 및 부고환을 잘라낸 후 절개면을 봉합하여 수술을 실시하였다. 본 거세술은 식약청의 수컷 성선비대반응시험법을 참고하여 시행하였다

(http://www.kfda.go.kr/korea/endocrine/reference/education_fr.html)

- 거세를 시행하고 10일 동안 안정화를 시켜 수술부위의 상처를 아물게 하였다. 이후 거세된 래트(castrated rat)에 testosterone propionate(TP)를 투여하여 실험을 개시하였다. 개시 시점의 래트의 몸무게는 250-300 g 범위에 있었으며, 4마리를 한 군으로 하여 총 7그룹으로 나누어 전립선비대 유도 이후의 시료 경구투여에 맞도록 군을 나누었다. 실험동물은 사육상자 당 2마리 이하로 수용되었으며, 다른 군끼리 한 사육상자에 있지 않도록 배려하여 배치하였다. 각 그룹 중 Vehicle인 control group으로 사용될 4마리를 제외하고 나머지 실험동물은 전립선비대 유도를 위하여 testosterone propionate(TP)을 3 mg/kg body weight/day로 injection 하였다. 실험의 오차를 최소화 하기 위하여 3일마다 측정된 실험동물의 무게를 기준으로 총 injection volume은 100 μ l가 되도록 corn oil에 녹여 사용하였다. Control group은 TP없이 corn oil만을 100 μ l씩 injection 하여 vehicle로 사용하도

록 준비하였다. 물과 사료는 자유섭취토록 하였으며 4주 동안 시행하였다.

(라) 시료의 투여

상기와 같이 거세된 래트를 대상으로 TP를 투여하는 4주간 동시에 5개의 그룹으로 나누어 울금 시료선정을 위한 투여실험을 시행하였다(n=4): (A) Control group; corn oil을 injection 하고 생리식염수를 급여한 래트, (B) BPH group; TP(3 mg/kg body weight/day)를 injection 하고 생리식염수만 급여한 래트, (C) BPH+CL-HW 50; 울금 열수추출물 저농도 그룹으로 TP(3 mg/kg body weight/day)를 injection 하고 울금 열수추출물을 50mg/kg body weight/day로 경구투여한 래트, (D) BPH+CL-HW 100; 울금 열수추출물 고농도 그룹으로 TP(3 mg/kg body weight/day)를 injection 하고 울금 열수추출물을 100 mg/kg body weight/day로 경구투여한 래트, (E) BPH+CL-EtOH 50 group; 울금 20%주정 추출물 저농도 그룹으로 TP(3 mg/kg body weight/day)를 injection 하고 울금 20%주정 추출물을 50 mg/kg body weight/day로 경구 투여한 래트, F)BPH+CL-EtOH 100 group; 울금 20%주정 추출물 고농도 그룹으로 TP(3래트, F)BPH+CL-EtOH

Table 1. Group composition of experimental rats

group	Testosterone Propionate	비고
Control	corn oil 투여	생리식염수 투여
BPH	3 mg/kg BW/day	생리식염수 투여
BPH+CL-HW 50	3 mg/kg BW/day	울금 열수추출물 50mg/kg BW/day
BPH+CL-HW 100	3 mg/kg BW/day	울금 열수추출물 100mg/kg BW/day
BPH+CL-EtOH 50	3 mg/kg BW/day	울금 20%주정 추출물 50mg/kg BW/day
BPH+CL-EtOH 100	3 mg/kg BW/day	울금 20%주정 추출물 100mg/kg BW/day
BPH+Finasteride	3 mg/kg BW/day	Finasteride 10mg/kg BW/day

100 group; 울금 20%주정 추출물 고농도 그룹으로 TP(3 mg/kg body weight/day)를 injection 하고 울금 20%주정 추출물을 100 mg/kg body weight/day로 경구투여한 래트, (G) BPH+Finasteride group;TP(3 mg/kg body weight/day)를 injection 하고 finasteride를 10 mg/kg body weight/day로 경구투여한 그룹으로 나누었다. 실험에 있어서 TP은 실험동물의 무게에 따라 조절하여 투여되었으나 총 volume이 100 μ l를 넘지 않도록 하고, injection 부위에 염증이 생기지 않도록 주의하여 투여하였다. 호르몬과 시료의 투여 오차를 줄이기 위하여 실험동물의 무게는 3일마다 측정하고 각 개체에 맞는 농도를 3일마다 계산하여 투여하였다.

(마) 실험동물의 체중변화

실험동물의 무게는 거세술을 시행한 후 10일의 회복기를 거친 후 측정된 몸무게

를 최초의 무게로 하였으며, 이후 3일에 한 번 측정하였다. 4주의 전립선비대유도 및 4주간의 시료투여 후 모든 실험동물은 최후 시료투여 후 overnight 간 절식하고 마지막 무게를 측정하였다. 실험동물의 무게는 실험 개시 시점 마지막의 무게차이를 전체 Weight gain으로 표현하였다.

$$\text{Weight gain(g)} = \text{Final body weight(g)} - \text{Initial body weight(g)}$$

(바) 장기의 무게 측정

모든 실험동물을 마취하고 희생시킨 후 혈액을 수집하고 전립선을 적출하여 무게를 측정하였다. 전립선은 적출하여 PBS에 1회 세척한 후 물기를 가볍게 제거하여 무게를 측정하고 기록하였다. 적출된 전립선은 분석을 위하여 용도별로 처리한 후 -80°C 에 보관되었다. 전립선의 무게는 실험동물의 100 g body weight에 대한 mg으로 계산하여 표기하였다.

(사) 혈액에서의 GOT와 GPT의 분석

실험동물의 혈액은 심장채혈을 통하여 수집되었으며, 수집된 후 3,000 rpm에서 원심분리한 후 혈장 부분을 수집하여 분석에 사용하였다. 혈장에서의 GOT와 GPT의 분석은 아산제약의 GOT kit 및 GPT kit를 이용하여 측정하였으며, Karmen 단위로 표기하여 비교하였다.

(아) 혈청 testosterone 및 dihydrotestosterone의 분석

분리된 혈장에서의 testosterone의 측정은 ELASA assay를 통하여 측정되었으며 측정값은 testosterone standard로 측정된 그래프를 이용하여 계산하였으며 단위는 pg/mL로 표기하였다. 혈장에서의 DHT는 ELASA assay로 측정되었다. 혈장 50 μl 을 goat-anti-rabbit antibody가 미리 coated된 96well microplate에 HRP- conjugated DHT와 DHT-specific antibody와 함께 1시간동안 실온에서 shaking incubation을 실시하였다. incubation 후 기질용액을 첨가하고 15분 후 황산용액으로 반응을 멈춘 후 450 nm에서 10분이내에 시료별 차이를 측정하였다. 측정값의 계산은 DHT 기준액으로 그린 standard 그래프를 이용하였으며 단위는 pg/mL로 표기하였다.

(2) 울금 열수 추출물에서 전립선비대 억제 *in vivo* 평가

(가) 시료의 선정

1차 *in vivo* 실험 결과에 준하여 울금 열수추출물을 최종시료로 선택하여 실험을 진행하였다. 울금 열수추출물을 50-150 mg/kg BW로 전립선비대가 유도된 실험동물에게 지급하였으며, 본 실험결과를 건강기능식품개발의 기초자료로 활용하기 위하여 건강기능식품인 Saw Palmetto 및 전립선비대의 치료제인 finasteride를 이미 발표된 논문 결과에 기초하여 실험동물에 투여하고 결과를 비교하였다. 원료인 울금 열수추출물은 1차 *in vivo* 실험에서 사용된 추출물과 동일한 것을 이용하였다.

(나) 실험동물의 조건 및 전립선비대의 유도

본 실험은 4주령의 웅성 래트(male rat)를 (주)대한바이오링크 (Chungbuk, Korea)

에서 구입하여 실험에 사용하였다. 실험동물의 사육환경은 1차 *in vivo* 실험과 동일하게 유지하였다. 일주일간의 안정화 기간 후, 실험동물의 거세는 1차 실험과 동일한 방법으로 진행되었다. 단, Normal control group으로 사용할 쥐 6군은 거세를 시행하지 않았으며 나머지는 거세를 시행하고 10일 동안 안정화를 시켜 수술부위의 상처를 아물게 하였다. 이후 거세된 래트(castrated rat)에 normal control 및 castrated control group 두 그룹을 제외한 나머지 group에는 testosterone propionate(TP)를 투여하여 실험을 개시하였다. 개시 시점의 래트의 몸무게는 250-300 g 범위에 있었으며, 물과 사료는 자유섭취토록 하였으며 4주 동안 시행하였다.

(다) 시료의 조제와 투여

상기와 같이 거세된 래트를 대상으로 TP를 투여하고 4주가 경과한 후, 8개의 그룹으로 나누어 다시 4주간 울금 열수추출물 투여실험을 시행하였다(n=6): (A)Normal control group: castration을 시행하지 않은 정상군으로 corn oil을 injection 하고 생리식염수를 급여한 래트, (B)control group: corn oil을 injection 하고 생리식염수를 급여한 래트, (C) BPH group; TP(3 mg/kg body weight/day)를 injection 하고 생리식염수만 급여한 래트, (D) BPH+CL-HW 25; 울금 열수추출물 저농도 그룹으로 TP(3 mg/kg body weight/day)를 injection 하고 울금 열수추출물을 25 mg/kg body weight/day로 경구투여한 래트, (E) BPH+CL-HW 50; 울금 열수추출물 중간농도 그룹으로 TP(3 mg/kg body weight/day)를 injection 하고 울금 열수추출물을 50 mg/kg body weight/day로 경구투여한 래트, (F) BPH+CL-HW 100; 울금 열수추출물 중간농도 그룹으로 TP(3 mg/kg body weight/day)를 injection 하고 울금 열수추출물을 100 mg/kg body weight/day로 경구투여한 래트, (G)Saw Palmetto group; Saw Palmetto 투여그룹으로 TP(3 mg/kg body weight/day)를 injection 하고 Saw Palmetto를 100 mg/kg body weight/day로 경구투여한 래트, (H) BPH+Finasteride group;TP(3 mg/kg body weight/day)를 injection 하고 finasteride를 10 mg/kg body weight/day로 경구투여한 그룹으로 나누었다.

Table 2. Group composition of experimental rats

group	Testosterone Propionate	비고
NC (Normal control)	corn oil 투여	비거세군, 생리식염수 투여
CC (Castration)	corn oil 투여	거세군, 생리식염수 투여
BPH	3mg/kg BW/day	생리식염수 투여
BPH+CL-HW 25	3mg/kg BW/day	울금 열수추출물 50mg/kg BW/day
BPH+CL-HW 50	3mg/kg BW/day	울금 열수추출물 100mg/kg BW/day
BPH+CL-HW 100	3mg/kg BW/day	울금 열수추출물 150mg/kg BW/day
BPH+Saw Palmetto	3mg/kg BW/day	Saw Palmetto 100 mg/kg BW/day
BPH+Finasteride	3mg/kg BW/day	Finasteride 10mg/kg BW/day

(라) 실험동물의 체중변화, 장기무게

1차 동물실험과 상동의 방법으로 시행되었으며, 조직은 독성의 평가를 위하여 전립선외에도 간 및 신장도 적출하여 무게를 측정하였다. 장기의 무게는 실험동물의 100g body weight에 대한 mg으로 계산하여 표기하였다. 또한 적출된 전립선은 분석을 위하여 용도별로 처리한 후 -80°C 에 보관되었다. 특히 전립선의 경우는 RNA 추출용으로 RNA-iso에 일부를 보관하고, 병리학적 조직 분석을 위하여 10% formalin에 고정시켜 보관하였다.

(마) GOT와 GPT의 분석

실험동물의 혈액은 심장채혈을 통하여 수집되었으며, 수집된 후 3,000 rpm에서 원심분리한 후 혈장 부분을 수집하여 분석에 사용하였다.

(바) 혈장 및 전립선조직에서 testosterone과 dihydrotestosterone 분석

분리된 혈장 및 전립선 조직 균질액에서의 T 및 DHT 측정은 ELASA assay를 통하여 측정되었으며 측정값은 동일하게 계산되고 표기되었다. 전립선균질액은 전립선무게의 4배의 pH7.4의 phosphate buffer를 가하여 homogenation 후 5,000rpm으로 10분간 원심분리 후 상등액을 취하여 측정하였다.

(사) 전립선조직의 histopathological examination

전립선조직을 10% formalin용액에 침지 후, $4\ \mu\text{m}$ 두께의 파라핀 섹션을 제작하였다. Dewaxing과 탈수과정 후, 일반적인 조직병리학적 검사를 위하여조직을 haematoxylin and eosin (H&E)으로 염색하였으며, x100 배율에서 관찰하고 촬영한 후, 전립선관련 병리학자의 도움을 얻어 분석하였다.

(아) 통계분석

본 실험의 data는 $\text{mean} \pm \text{SD}$ 로 표현되었다. Multiple comparision은 Turkey-Kramer에 따른 one-way ANOVA를 사용하여 시행하였으며, p값의 0.05 수준에서 유의성을 결정하였다. 모든 통계학적 분석은 SPSS (version 18.0)을 이용하여 분석하였다.

다. 울금 열수 추출물의 *in vivo* 상에서의 전립선비대억제기전 탐색

(1) alpha reductase 수준의 변화

전립선을 균질화하고 3000 rpm에서 6분간 원심분리하여 상등액을 수거하고 Bradford 법으로 단백질을 정량하였다. 각 구간 $50\ \mu\text{g}$ protein을 기준으로 8, 10, 15% SDS gel에 전기영동하고 Western blot을 시행하였다. nitrocellulose membrane에 transfer 한 후 5% skim milk로 4°C 에서 16시간 동안 blocking을 시행하였으며, SRD5A2(diluted 1:1,000; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA)를 primary antibody로 하여 진행하고 X-ray film에 인화하였다.

(2) NF- κ B, proinflammatory enzymes 및 cytokines의 발현

염증인자들의 발현은 3.1의 방법과 동일하게 western blot으로 진행하였으며 사용한 antibody의 정보는 다음과 같다. goat polyclonal IgG tumor necrosis factor- α (TNF- α) (diluted 1:1,000; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), rabbit polyclonal IgG interleukin 1 beta (IL-1 β) (diluted 1:1,000; Santa Cruz Biotechnology), rabbit polyclonal IgG interleukin 6 (IL-6) (diluted 1:1,000; Santa Cruz Biotechnology), rabbit polyclonal IgG Cyclooxygenase-2 (COX-2) (diluted 1:1,000; Santa Cruz Biotechnology), rabbit polyclonal IgG inducible NO synthase (iNOS) (diluted 1:1,000; Santa Cruz Biotechnology), rabbit polyclonal IgG 5- α reductase 2 (diluted 1:1,000; Santa Cruz Biotechnology), rabbit polyclonal IgG NF- κ B (diluted 1:1,000; Santa Cruz Biotechnology), rabbit polyclonal IgG Phospho-p65 (diluted 1:1,000; Cell Signaling Technology, Beverly, MA), rabbit polyclonal IgG I κ B (diluted 1:1,000; Cell Signaling Technology, Beverly, MA), rabbit polyclonal IgG phospho-I κ B (diluted 1:1,000; Cell Signaling Technology, Beverly, MA) and actin-mouse MAb (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA; diluted 1:1,000)가 사용되었다.

(3) 전립선조직에서의 SOD의 측정

Superoxide dismutases(SODs)는 살아있는 세포에서 중요한 역할을 하며 Seroxide anion이 과산화수소와 산소가 되도록 촉매하는 역할을 한다. SOD 측정은 SOD assay kit (BioVison, USA)를 사용하여 측정하였으며, 이것은 superoxide anion의 reduction에 따라 수용성 포마잔이 형성되는 것을 이용하였다. 본 측정은 450nm에서 microplate spectrophotometer로 측정되었으며, user's protocol 및 계산법을 따라서 그 활성을 환산하였다.

(4) 통계분석

본 실험의 data는 mean \pm SD로 표현되었다. Multiple comparison은 Turkey-Kramer에 따른 one-way ANOVA를 사용하여 시행하였으며, p값의 0.05 수준에서 유의성을 결정하였다. 모든 통계학적 분석은 SPSS (version 18.0)을 이용하여 분석하였다.

라. 원료표준화

(1) 건강기능식품 소재 제조공정 표준화(울금 열수 추출물)

울금은 전남 진도산을 경일약품사(전남, 순천시)에서 구입하여 사용하였으며, 그 일부는 한국인스팜 중앙연구소에 보관하고 있다. 추출/농축과 분무건조 공정은 본사인 한국인스팜(전남 화순군)의 추출/농축기(대신기공, 2Ton)와 분무건조기(천연자원연구원, 전남 장흥군, 미르코 2kg/h)를 이용하였다. 발효에탄올(이하 주정)은 대한약전 Assay 95.1~95.6 v/v%(수성약품주식회사)를 사용하였으며 물은 먹는물을 사용하였다.

80kg을 3회 실시 하였으며, 제조공정은 아래와 같이 (가) 원료평량 (나) 추출 (다) 농축 (라) 부형제 혼합 (마) 살균 (바) 분무건조 (사) 포장 및 보관 과정으로 진행하였다.

(가) 원료평량

추출에 사용할 원료와 용매를 확인하고 칭량하여 추출기에 투입한다.

원료명	Lot	원료량(kg)	용매량(L)
울금	1	80	물 : 800
	2	80	물 : 800
	3	80	물 : 800
합계	3 회	240	물 : 2,400

(나) 추출

울금 80kg을 3회 추출한다.

추출기를 이용하여 79 °C에 도달 후 4시간 압력 0.7~0.75 Kg/cm²의 조건에서 추출한다.

(다) 농축

농축기를 이용하여 45 °C, 1,000 mmHg 조건에서 농축한다.

(라) 부형제 혼합

농축액의 고형물 대비 130%에 해당하는 말트린100(그레인프로세스, 미국)을 넣어 1시간 혼합하고, 20~30 Brix가 되도록 물을 투입한다.

(마) 살균

상기 (라)번의 농축액을 살균기에 넣고 70 °C로 30분간 살균한다.

(바) 분무건조

Lot(1, 2)을 200 °C로 사출하여 각각 분무건조하고 건조감량과 수득률을 측정한다.

(사) 포장 및 보관

개별포장하여 저온창고에 보관한다.



추출기

⇒



농축기

⇒



분무건조기

(2) 울금 열수 추출물 지표성분 정량법 - Curcumin

① 검액준비

울금 원재료(건조물) 및 추출물 1 g을 정밀하게 달아 methanol 100 mL를 넣고 60분간 초음파 추출을 한다. 추출이 끝나면 0.45 μm nylon filter로 여과하고, 여액을 검액으로 한다.

② 표준액 조제

Curcumin 표준품 약 15 mg을 정밀하게 달아 용량플라스크에 넣고 ethanol 100 mL로 하여, 150 ppm 용액을 제조하고, 150 ppm Curcumin 표준액 1,000 μL를

20 ml 용량플라스크에 넣고 희석액으로 잘 혼합하여 7.5 ppm Curcumin 표준액을 표준용액으로 사용하였다.

③ 시험

검액 및 표준액 10 μ L씩을 가지고 다음 조건으로 액체크로마토그래프법에 따라 시험하여 각각의 액의 Curcumin의 피크면적 A_T 및 A_S 를 측정한다.

④ 조작조건

- 검출기 : Diode array detector (측정파장 425 nm)
- 칼럼 : Shiseido Capell-pak UG 250*4.6mmI.D
- 칼럼온도 : 35°C
- 이동상 : 2% Acetic acid (45% ACN)
- Flow rate : 1.0 ml/min

⑤ 계산식

Curcumin (mg/g)	$\frac{\text{표준용액농도(mg/mL)} \times \text{검체면적값} \times \text{부피} \times \text{표준품순도}}{\text{표준품면적값} \times \text{시료채취량(g)}}$
--------------------	--

3. 결과

가. 울금/발효울금 추출물에서 전립선질환 예방 및 개선을 위한 *in vitro* 평가

(1) 울금과 발효울금추출물에서 cell viability 평가

각 시료의 분획별 추출물(실온, 열수, 20%주정, 80%주정)을 대상으로 MTT [(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide] assay를 실시하여 시료의 농도별 세포독성을 측정하였다. 각 시료는 0, 5, 10, 50, 100 μ g/mL에서 측정하였으며, 모든 시료는 LNCaP 세포주에 다양한 농도로 24시간동안 처리되었다.

발효울금처리군에서는, 80%주정에서 20% 내외의 cell viability의 감소가 100 μ g/mL에서 나타났다(Fig.1). 본 결과를 통하여 발효울금의 경우 50 μ g/mL까지는 모든 시료가 cytotoxicity를 보이지 않는다고 생각되며, 100 μ g/mL의 경우도 80% 주정의 경우 외에 실온, 열수, 20%주정 추출물은 독성을 보이지 않았다.

울금시료를 처리한 군에서는 울금 열수와 울금 20%주정 추출물에서는 가장 높은 농도인 100 μ g/mL까지 cell viability의 변화를 보이지 않았으며, 울금 80%주정 추출물은 100 μ g/mL에서 약 20% viability 감소가 있었고, 울금 실온 추출물의 경우는 50 μ g/mL부터 20% 정도의 cell viability 감소를 보였다(Fig 2). 따라서 울금 열수와 20%주정 추출물의 경우는 전 농도에서 범위를 정할 수 있으며, 울금 실온 추출물의 경우는 50 μ g/mL 미만, 울금 80%주정 추출물의 경우는 50-100 μ g/mL 까지 범위를 정할 수 있다.

위의 결과에서 울금과 발효울금의 각 획분은 두드러지는 독성은 없으나, 울금의 실온 및 80%주정 추출물, 발효울금의 20%주정 추출물을 제외한 다른 분획에서 보인 다소의 독성을 감안할 때 활성 스크리닝은 25-50 μ g/mL에서 실시하도록 하였으며, 차후 시료의 선정 후, 선정시료의 특징에 따라 재검토하여 활성 assay를 실시하도록 하였다.

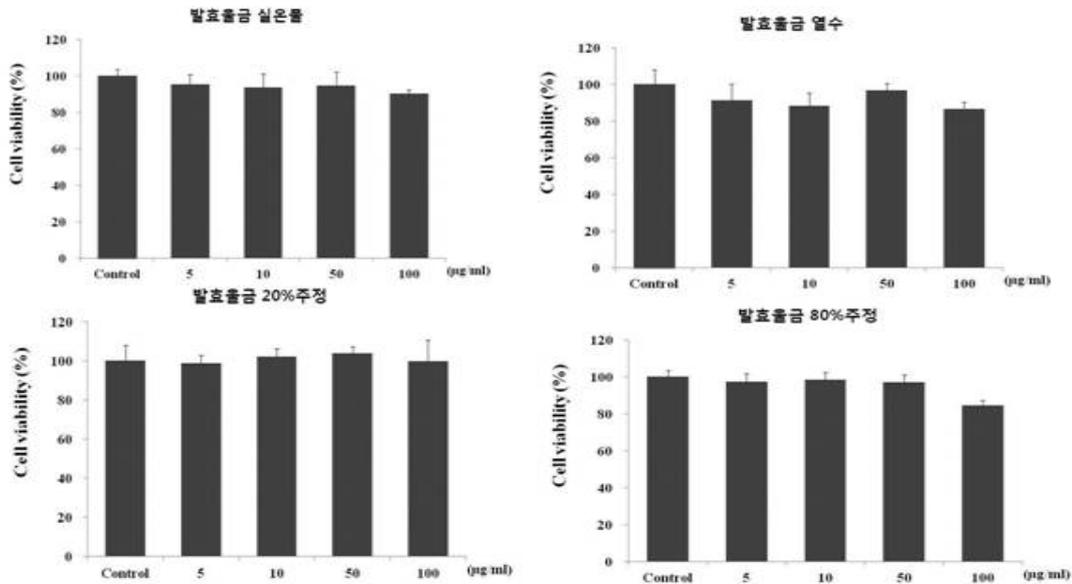


Fig. 1. Cell cytotoxicity with fermented *Curcuma longa* L. in LNCaP cells

- sample conc.: 0, 5, 10, 50, 100 µg/mL.

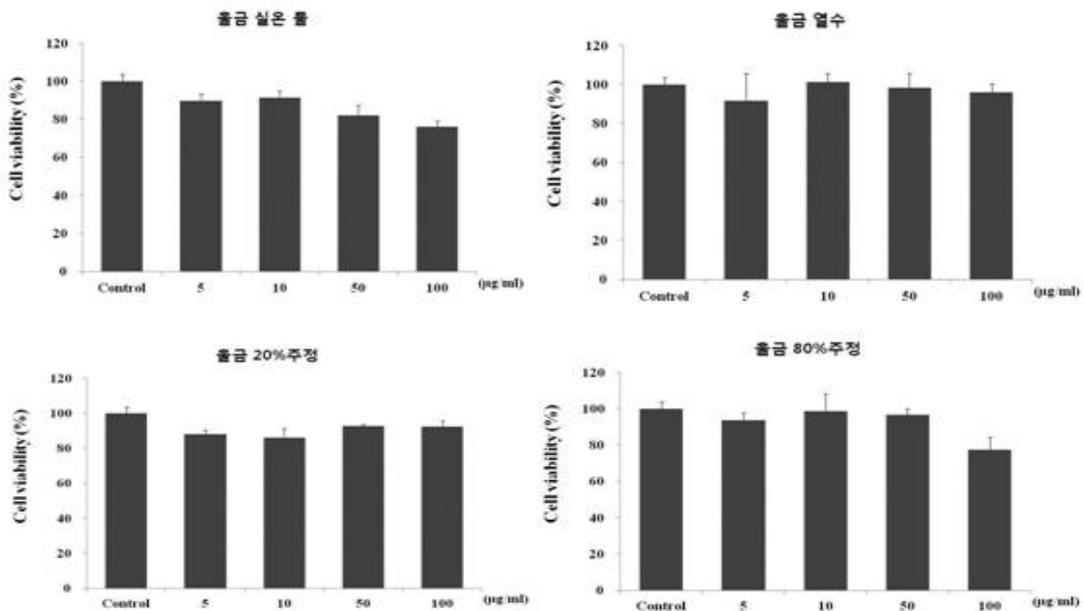


Fig. 2. Cell cytotoxicity with *Curcuma longa* L. in LNCaP cells

- sample conc.: 0, 5, 10, 50, 100 µg/mL

(2) 울금/발효율금 추출물에서 5-alpha reductase 및 DHT 억제 검토

각 시료의 분획별 추출물(실은, 열수, 20%주정, 80%주정)을 대상으로 5-alpha reductase 억제능을 측정하였다. 5-alpha reductase는 testosterone을 DHT로 전환하는데 관여하는 효소로서 본 효소의 억제를 통하여 DHT로의 전환이 낮을 것이라고 예측할 수 있다. 전립선비대에 관여하는 5-alpha reductase typeII에 특이적인 assay를 위하여 이 효소가 발현되는 prostate을 효소원으로 하고 typeII에 특이적인 항체를 사용하여 assay를 시행하였다. 각 시료는 선행된 cell cytotoxicity test의 결과에서 전 농도에서 안전하다고 생각된 50 µg/mL에서 측정하였으며, 본 검색에 사용된 효소의 급원은 rat의 prostate의

균질화층을 assay 시행에 맞게 처리한 후 사용하였다.

본 실험의 결과 발효율금의 경우 냉수, 열수, 20%, 80%주정 추출물에서 거의 저해활성이 관찰되지 않았으며 testosterone만을 첨가한 군과 거의 비슷한 결과를 나타내었다(Fig.3). 그러나 율금의 경우, 80%주정 추출물에서는 거의 저해효과를 보이지 않았으나 열수에서 23%의 억제효과를 보였으며, 20% 주정 추출물에서는 약 70%의 효과를 보여 높은 저해활성을 보였다(Fig.4).

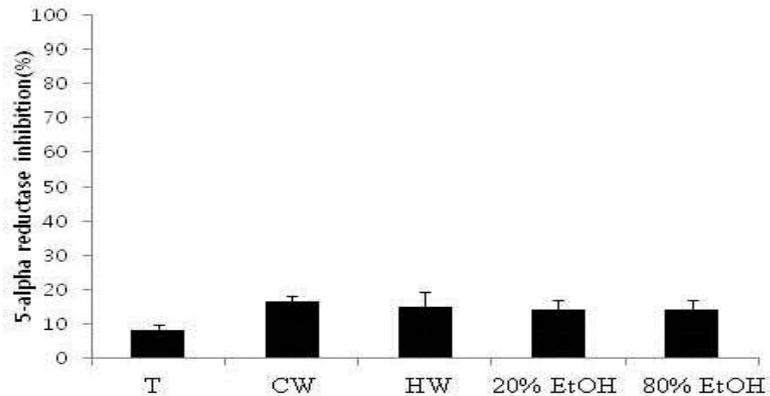


Fig. 3. 5-alpha reductase inhibitory effect of fermented *Curcuma longa* L. in rat prostate homogenate.

• sample conc.: 50 µg/mL

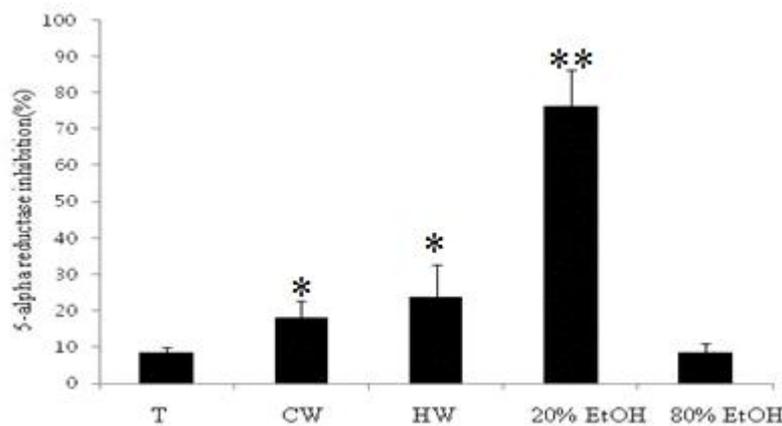


Fig. 4. 5-alpha reductase inhibitory effect of *Curcuma longa* L. in rat prostate homogenate.

• sample conc.: 50 µg/mL

(3) 율금/발효율금에서 농도별 DHT 평가

Rat prostate를 효소원으로 하여 testosterone이 DHT로 전환되는 정도를 ELISA assay를 통하여 검토하였다. 각 시료의 DHT 측정을 실시하여 testosterone에서 DHT로 전환된 정도를 측정하였음. 각 시료는 선행실험과 동일농도에서 실시하였다.

발효율금에서는 앞서 5-alpha reductase의 결과와 동일하게 실온, 열수, 20, 80%주정 추출물에서 전혀 DHT 생성 양의 변화가 없었다(Fig.5). 그러나 율금에서는 실온, 열수,

80%주정 추출물에서는 발효율금과 마찬가지로 변화가 없었으나 울금의 20%주정 추출물에서는 35%의 DHT 생성감소 효과를 보여 위에서 실시된 5-alpha reductase 억제 결과와 일치하였다(Fig.6).

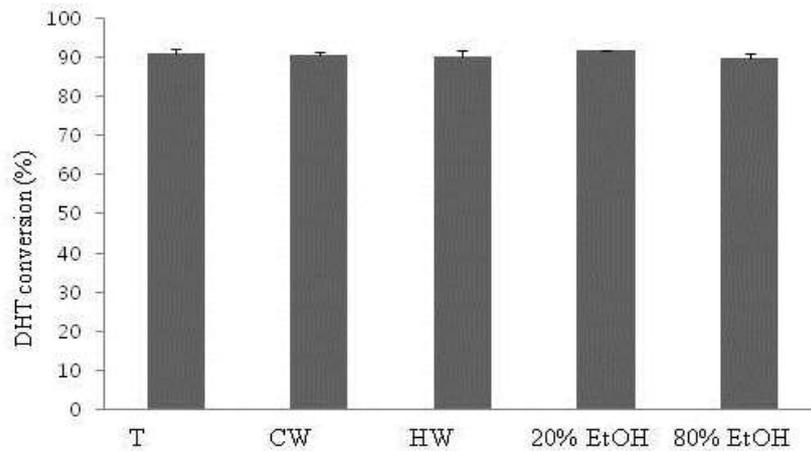


Fig. 5. DHT conversion of fermented *Curcuma longa* L. in rat prostate homogenate.

• sample conc.: 50 µg/mL

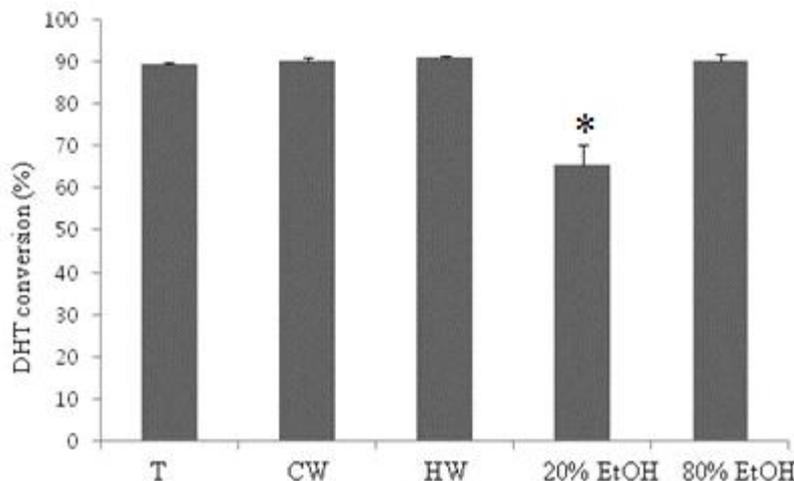


Fig. 6. DHT conversion of *Curcuma longa* L. in rat prostate homogenate.

• sample conc.: 50 µg/mL

(4) 울금/발효율금에서 전립선세포주 상에서의 DHT 평가

인간 전립선 세포주인 LNCaP 세포는 testosterone을 DHT로 전환시키는 5-alpha reductase가 거의 발현되지 않으므로 본 검색을 위하여 SRD5A2를 pSG5 vector에 클로닝하여 LNCaP 세포에 과발현시켜 assay를 진행하였다. 본 실험은 SRD5A2가 과발현된 세포주에 charcoal-stripped FBS 10% RPMI를 이틀간 처리하고 이후 각 시료를 50 µg/mL의 농도로 처리하여 14시간 동안 배양하였다. 14시간 후, testosterone을 25 nM를 처리하여 4시간이 경과한 후 배지를 걷어 DHT를 측정하여 시료의 효과를 검토하였다.

수거된 배지 50 μ l씩을 대상으로 시행된 DHT assay의 결과로서, 발효울금의 경우 실온, 열수, 20, 80%주정 추출물에서 DHT 감소효과를 전혀 보이지 않았으며(Fig.7), 울금의 경우는 20%주정 추출물에서 15%정도의 DHT 감소효과를 보였으며 다른 시료에서는 감소효과를 보이지 않았다 (Fig.8).

rat homogenate와 transfected LNCaP cell을 이용한 검색을 통하여 활성이 높게 나타난 울금 20%주정 추출물을 선택하였으며, 가능성을 보인 울금 열수 추출물도 선택하여 농도별 assay를 실시하였다.

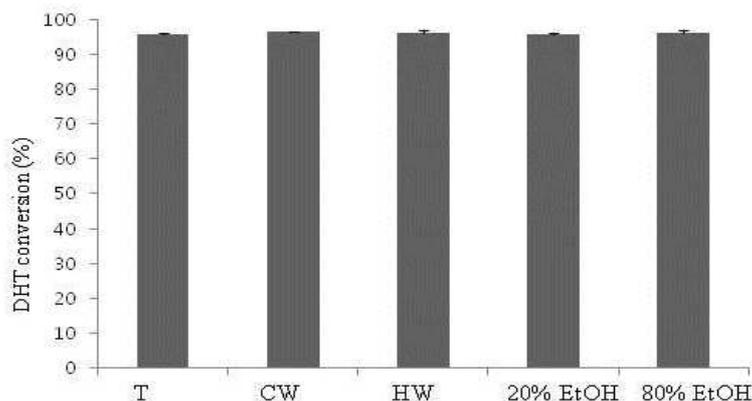


Fig. 7. DHT conversion of fermented *Curcuma longa* L. in SRD5A2 transfected LNCaP cells.

• sample conc.: 50 μ g/mL

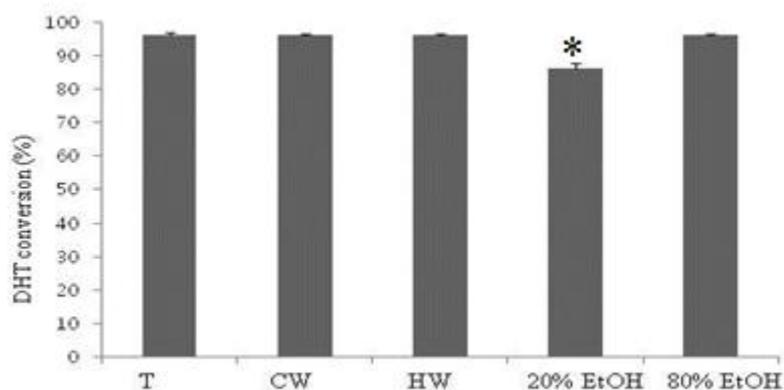


Fig. 8. DHT conversion of *Curcuma longa* L. in SRD5A2 transfected LNCaP cells.

• sample conc.: 50 μ g/mL

(5) 울금추출물(열수 및 20%주정 추출물)에서 5-alpha reductase 억제 효과

앞서 시행한 스크리닝의 결과로 선정된 시료인 울금 열수 및 20%주정 추출물을 대상으로 농도별 활성을 측정하였다. rat prostate homogenate 50 μ l에 0, 25, 50, 100 μ g/mL의 시료를 처리하고 25 nM의 testosterone을 넣은 후 5-alpha reductase 억제능을 측정하였다. 울금 열수 추출물의 경우 0, 25, 50 μ l에서는 거의 활성억제효과가 없었으나 100 μ g/mL에서 두드러진 상승효과를 보였다(Fig.9). 울금 20%주정 추출물의 경우 50 μ g

/mL에서 70% 정도의 높은 활성을 보였으며 농도별 증가로 100 µg/mL에서는 보다 상승된 억제효과를 나타내었다(Fig.10).

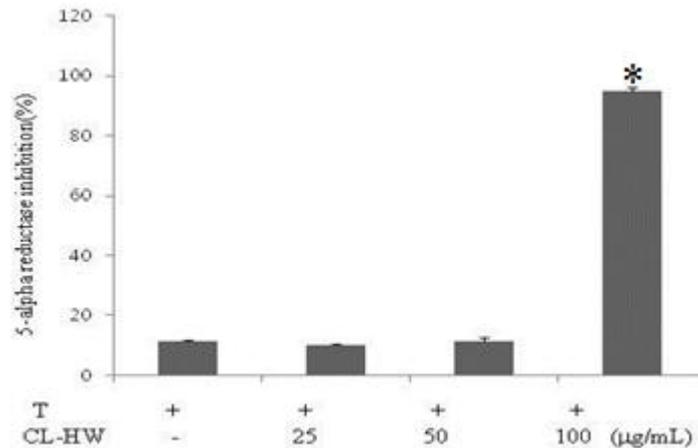


Fig. 9. 5-alpha reductase inhibitory effect of hot water *Curcuma longa* L. extract in rat prostate homogenate.

- sample conc.: 0, 25, 50, 100 µg/mL

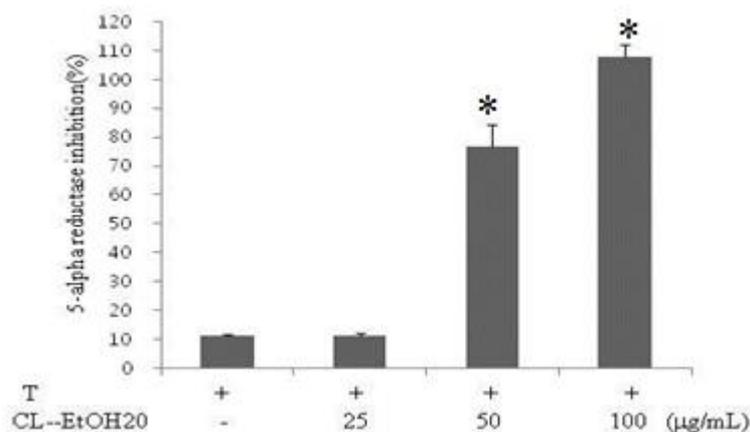


Fig. 10. 5-alpha reductase inhibitory effect of 20% Ethanol *Curcuma longa* L. extract in rat prostate homogenate.

- sample conc.: 0, 25, 50, 100 µg/mL

(6) 울금추출물(열수 및 20%주정 추출물)에서 대상으로 한 전립선세포주에서 DHT 효과

SRD5A2가 transfection되어 있는 LNCaP세포를 Charcoal-stripped medium으로 48시간동안 serum depletion 시킨 후 선정된 시료를 0, 25, 50, 100 µg/mL 처리하였으며 시료 처리 16시간 후, testosterone 25 nM을 4시간 동안 처리하여 DHT를 측정하였다.

울금 열수 추출물의 경우 DHT 생성 억제 효과는 있었으나, 농도의존적으로 나타나지 않았다(Fig.11). 특히 고농도에서는 다소 DHT 전환이 높아지는 양상을 보였으며, 울금 20%주정 추출물의 경우 고농도로 갈수록 억제능이 유의적으로 높아졌으며, 특히 50 µg/mL에서 높은 억제를 보였다(Fig.11).

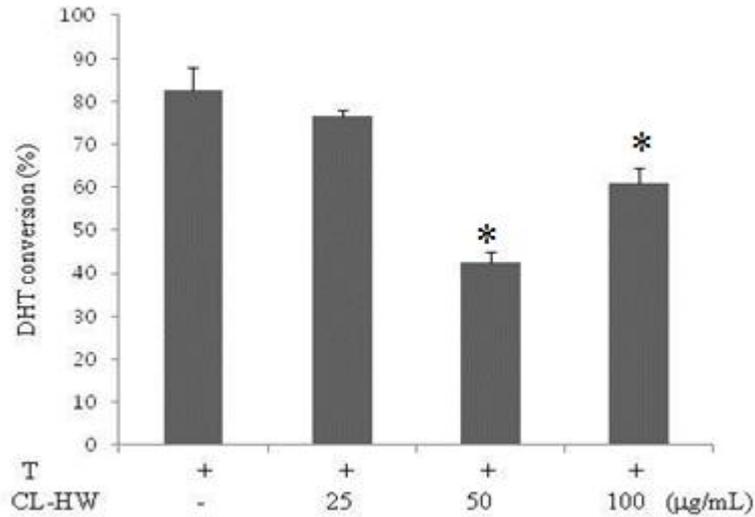


Fig. 11. DHT conversion inhibitory effect of hot water *Curcuma longa* L. extract in LNCaP cells

- sample conc.: 0, 25, 50, 100 µg/mL

(7) 전립선세포주에서 울금추출물(열수 및 20%주정 추출물)의 5-alpha reductase 억제 효과

SRD5A2가 transfection되어 있는 LNCaP세포를 Charcoal-stripped medium으로 48시간동안 serum depletion 시킨 후 선정된 시료를 0, 25, 50, 100 µg/mL 처리하였다. 시료 처리 16시간 후, 세포를 걷어 2회 PBS로 세척하여 상기와 같이 처리하고 균질화하여 효소원으로 사용하였다. 농도별로 시료를 처리한 결과, 울금 열수층에서 약한 저해효과가 나타났으며, 특히 고농도에서는 rat homogenate을 처리한 결과와 같이 상승되는 효과를 보였다(Fig12). 울금 20%주정 추출물에서는 특히 고농도에서 높은 저해활성을 보였다(Fig13).

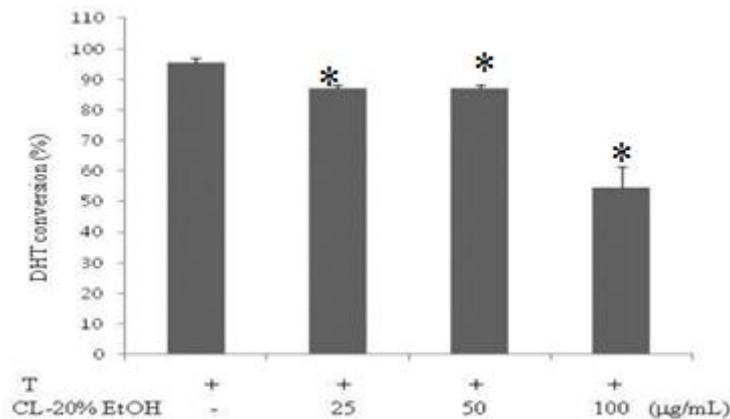


Fig. 12. DHT conversion inhibitory effect of 20% EtOH *Curcuma longa* L. extract in LNCaP cells

- sample conc.: 0, 25, 50, 100 µg/mL

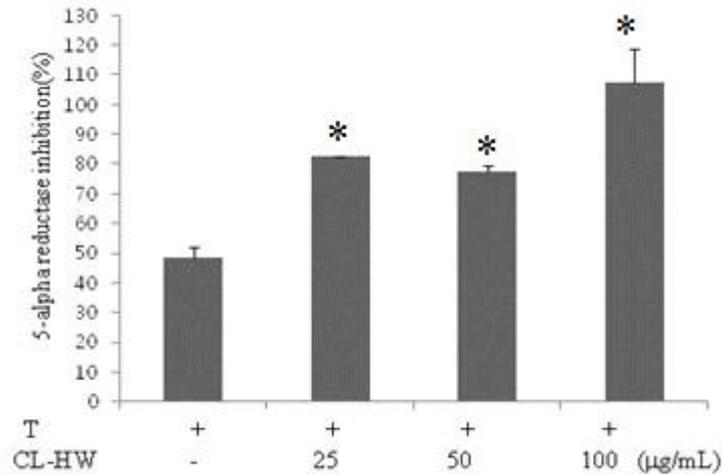


Fig. 13. 5-alpha reductase inhibitory effect of hot water *Curcuma longa* L. extract in LNCaP cells.

- sample conc.: 0, 25, 50, 100 µg/mL

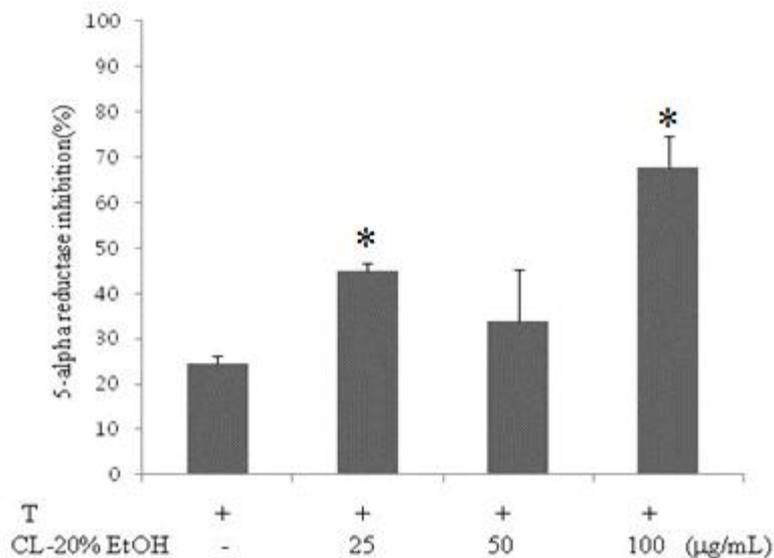


Fig. 14. 5-alpha reductase inhibitory effect of 20% Ethanol *Curcuma longa* L. extract in LNCaP cells.

- sample conc.: 0, 25, 50, 100 µg/mL
- 모든 추출물sample은 0.5% DMSO에 녹여 사용하였음

(8) 울금추출물(열수 및 20%주정 추출물)에서 항염증 평가

RAW 264.7 cell을 대상으로 선정된 시료인 울금 열수 및 20%주정 추출물을 0, 25, 50 µg/mL의 농도로 처리한 후 16시간 후 1 µg/mL의 LPS를 2시간 동안 처리하였다. 이후 세포를 harvest하여 RNA를 추출하고 RT-PCR을 시행하여 항염증 효과를 검토하였다. 울금 열수 추출물에서 COX-2의 농도별 변화가 가장 두드러지게 나타났으며, 이 외

에 IL-6 및 IL-1 β , TNF- α 에서 농도별로 효과를 나타내었으며, 울금 20%주정 추출물에서는 농도별로 염증 관련 mRNA의 약화로 항염증효과를 더욱 뛰어나게 나타내었다 (Fig.15, 16).

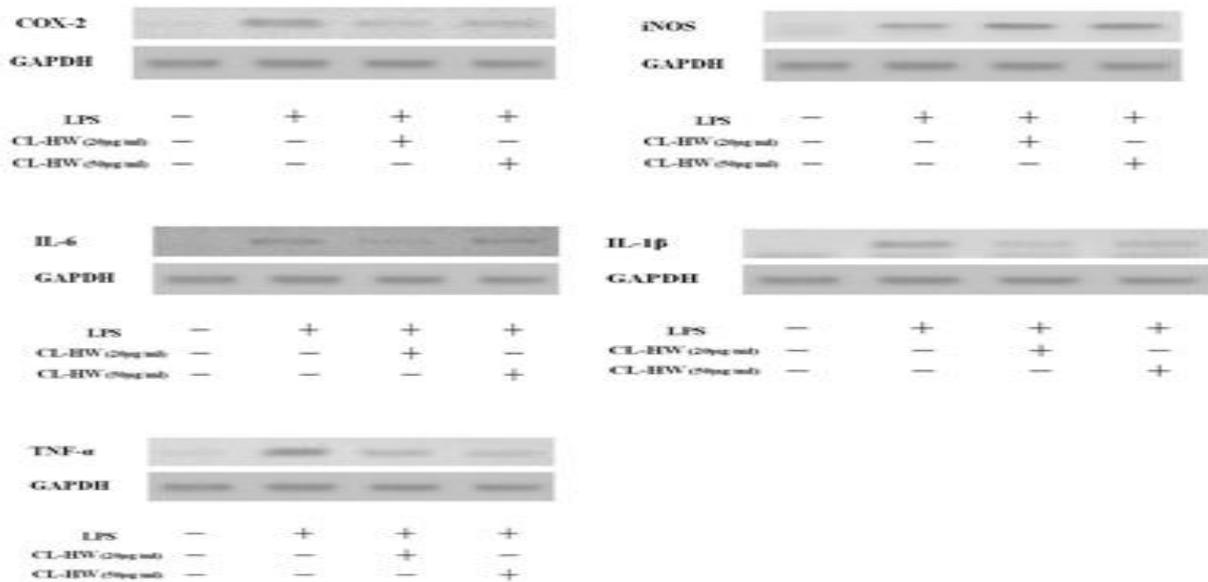


Fig. 15. Antiinflammatory effect of hot water *Curcuma longa* L. extract in Raw 264.7 cells.

• sample conc.: 0, 25, 50 μ g/mL

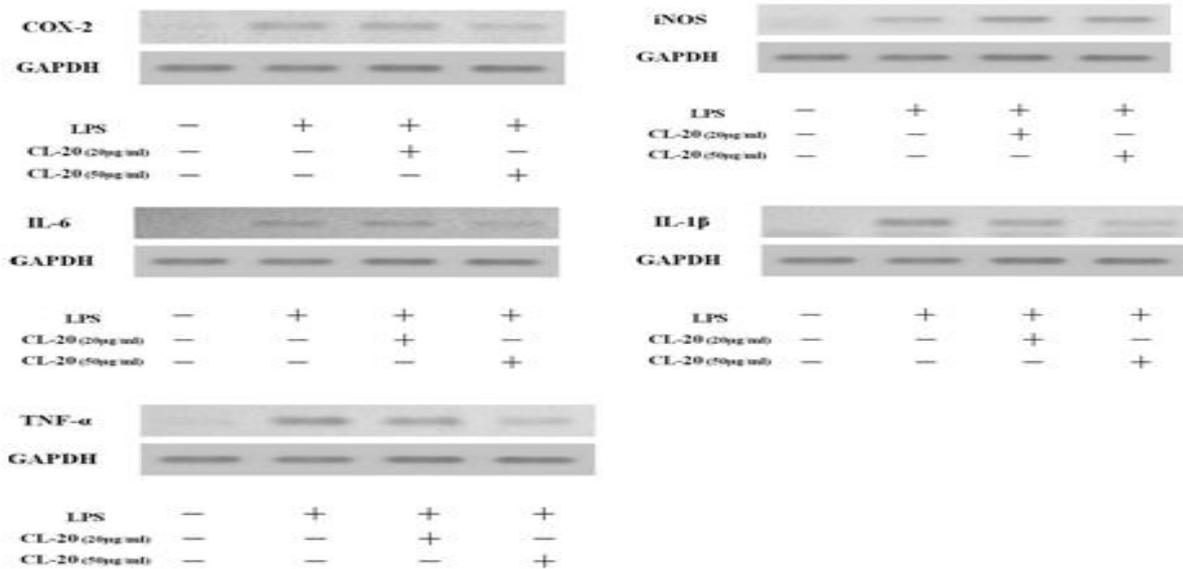


Fig. 16. Antiinflammatory effect of 20% EtOH *Curcuma longa* L. extract in Raw 264.7 cells.

• sample conc.: 0, 25, 50 μ g/mL

나. 울금 열수 추출물에서 *in vivo* 전립선 비대 억제 및 개선효과

(1) 최종시료 선정을 위한 1차 *in vivo* 실험

(가) 실험동물의 생존률

*In vitro*에서 선정된 울금 열수 및 20%주정 추출물을 대상으로 시행한 전립선비대 유도 래트에서 억제효과 실험을 위하여 한달 간 시료를 투여한 결과 생존률을 table 3과 같다. 열수 및 주정추출물 50 및 100 mg/kg body weight를 투여한 래트는 100%의 생존률을 보였다.

Table 3. Survival rates of BPH-induced rats

Group	No of Rats	No of Survival	Survival rate(%)
Control	4	4	100
BPH	4	4	100
BPH+ CL-HW 50	4	4	100
BPH+ CL-HW 100	4	4	100
BPH+ CL-EtOH 50	4	4	100
BPH+ CL-EtOH 100	4	4	100
BPH+Finasteride	4	4	100

(나) 실험동물의 체중 변화

본 실험을 위한 거세 후에 측정된 래트의 몸무게를 초기 몸무게로 하고, 4주 후 실험 종료 시 측정된 래트의 몸무게를 final body weight로 할 때 계산된 결과는 table 4와 같다. 여러 문헌에서 보고된 바와 같이, control군의 몸무게의 유의적인 증가가 관찰되었다. Finasteride 군의 래트가 몸무게 증가폭이 크지 않았으며, 나머지 군에서는 눈에 띄는 차이가 발견되지 않았다.

Table 4. Initial, final body weight, and body weight gain in BPH-induced rats

Groups	Initial BW (g)	Final BW (g)	BW gain (g)
Castration	318.75	370.15	51.39
BPH	305.26	336.05	30.78
BPH + CL HW 50	307.22	350.38	43.16
BPH + CL HW 100	324.08	356.78	32.71
BPH + CL EtOH 50	305.59	340.54	34.95
BPH + CL EtOH 100	338.27	370.68	32.41
BPH + Finasteride	335.29	361.70	26.41

Control: castration group, BPH: BPH-induced group, CL-HW: hot water extract from *Curcuma longa*, CL-EtOH: 20% ethanol extract from *Curcuma longa*.

(다) 실험동물의 전립선무게

울금추출물을 투여한 각 군의 전립선의 무게는 table 5와 같다. Control군과 비교할 때 BPH군의 유의적인 무게 증가가 관찰되었으며, Finasteride군에서는 50%정도의 팽목할 만한 전립선무게 감소가 보였다. 울금추출물 투여효과에 있어서, 울금 20%주정 추출물의 경우는 저농도와 고농도 모두 전립선의 무게감소효과를 볼 수 없었으나, 울금 열수추출물의 경우 고농도군에서 BPH군 대비 30%의 무게 감소를 보여, 유의적인 전립선 무게감소를 보였으며, 양성대조군인 Finasteride와 같은 수준의 유의적인 감소를 보였다.

Table 5. Effects of oral administration of *Curcuma longa* extracts on prostate weight in control and BPH induced rats.

Groups	Prostate (g)	Prostate weight ratio (mg/100g of BW)
Castration	0.028	0.01
BPH	1.037	0.31
BPH + CL HW 50	1.435	0.41
BPH + CL HW 100	0.676	0.19*
BPH + CL EtOH 50	1.077	0.32
BPH + CL EtOH 100	1.249	0.34
BPH + Finasteride	0.735	0.20*

Control: castration group, BPH: BPH-induced group, CL-HW: hot water extract from *Curcuma longa*, CL-EtOH: 20% ethanol extract from *Curcuma longa*.

(라) GOT 및 GPT

실험에 사용된 래트의 GOT, GPT 결과는 table 6과 같다. 전 시료에서 안정된 결과를 보였으며, 울금 열수 추출물, 20%주정 추출물의 저농도 및 고농도에서 GOT 및 GPT의 값이 유의적으로 상승하지 않았다. 이와같은 결과로 볼 때 전립선비대 동물실험의 기간동안 울금 열수 추출물 및 20%주정 추출물의 급여가 독성을 유발하지 않는다고 생각된다.

(마) 혈액에서의 dihydrotestosterone의 평가

본 실험에서 전립선비대를 일으키는 활성형 호르몬인 DHT의 변화는 혈장에서의 DHT 측정으로 확인하였으며 Fig. 17과 같다. Fig. 17에서 나타나고 있듯이, BPH군에서 DHT의 높은 증가율과 비교했을 때, Finasteride는 40% 정도 감소한 결과를 보이고 있다. 울금 열수 추출물과 20% 주정추출물의 경우, 모두 40% 정도의 비슷한 감소효과를 보이고 있으며, 이와같은 결과는 1차년도 결과를 뒷받침한다고 생각된다.

Table 6. GOT and GPT in BPH-induced rat

Groups	GOT (Karmen)	GPT (Karmen)
Castration	11.12	28.18
BPH	28.08	44.03
BPH + CL HW 50	16.37	38.81
BPH + CL HW 100	24.11	41.02
BPH + CL EtOH 50	16.13	30.62
BPH + CL EtOH 100	17.15	40.17
BPH + Finasteride	11.83	43.13

Control: castration group, BPH: BPH-induced group, CL-HW: hot water extract from *Curcuma longa*, CL-EtOH: 20% ethanol extract from *Curcuma longa*.

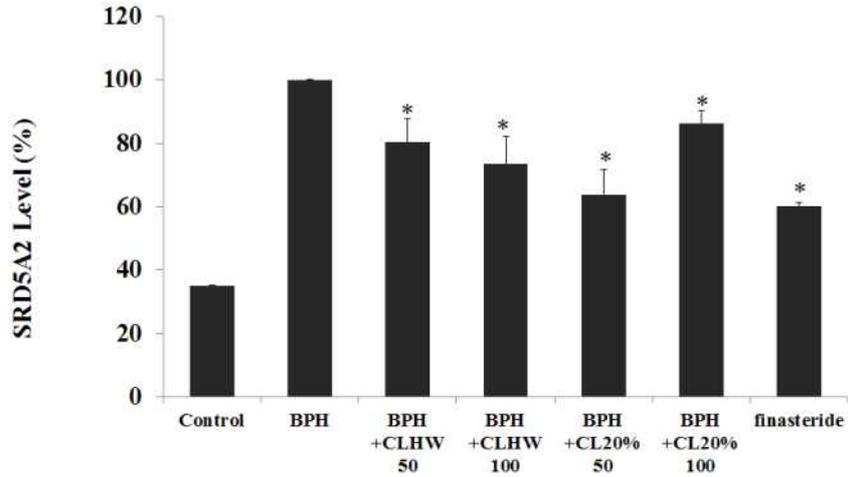


Fig. 17. The effect of various *Curcuma longa* extracts on serum DHT in BPH-induced rats.

(2) 울금 열수 추출물에서 전립선비대역제 *in vivo* 평가

(가) 실험동물의 생존률

1차 *in vivo* 실험결과에서 상대적으로 안정성이 있다고 생각되는 울금 열수추출물을 25, 50, 100 mg/kg BW로 투여하여 전립선비대 억제에 관한 효과를 관찰하기 위한 실험을 시행하였다. 2차 *in vivo* 실험에 있어서는 비거세군(정상군-No Castration)을 추가함으로써 같은 주령의 정상쥐와 전립선비대발생군(BPH)간의 비교를 하였으며, 기존의 Finasteride를 이용한 양성대조군뿐 아니라 현재 전립선건강 건강기능식품으로 이용되는 Saw Palmetto를 투여하여 본 실험에 사용된 울금 열수 추출물과 비교를 하였다. Finasteride는 본 실험에서 기전으로 삼고 있는 5-alpha reductase의 inhibitor로 전립선비대 치료에 사용되는 약제이다. 본 실험에서 각 군을 6마리로 하였으며, testosterone propionate를 매일 투여하여 전립선비대를 4주간 유도한 뒤, 다시 4주간 TP와 시료를 동시에 투여하였다. 본 실험기간 동안 래트의 생존률은 100%로 나타났다.

Table 7. Survival rates of BPH-induced rats

Group	No of Rats	No of Survival	Survival rate(%)
No castration	6	6	100
Castration	6	6	100
BPH	6	6	100
CHW 25	6	6	100
CLHW 50	6	6	100
CLHW 100	6	6	100
Saw Palmetto	6	6	100
Finasteride	6	6	100

No castration: Normal control group, Castration: castration control group, BPH: BPH-induced group, CLHW:BPH-induced+*Curcuma longa*hot water extract administered group, Saw Palmetto:

BPH-induced+Saw Palmetto administered group, Finasteride:BPH-induced+Finasteride administered group

(나) 실험동물의 체중변화

본 실험을 위한 거세 일주일 후에 측정된 래트의 몸무게를 초기 몸무게로 하고, 4주 후 실험 종료 시 측정된 래트의 몸무게를 final body weight로 할 때 계산된 결과는 table 8와 같다. 여러 문헌에서 보고된 바와 같이, No castration 과 castration군의 몸무게의 유의적인 증가가 관찰되었다. BPH군, 울금 열수추출물 투여군 및 양성대조군(Finasteride, Saw Palmetto)군의 래트는 몸무게 증가폭이 크지 않았다.

(다) 실험동물의 전립선 및 장기무게

울금추출물을 투여한 각 군의 전립선의 무게는 table 9와 같다. 전립선의 무게는 BPH군이 가장 무거웠으며, 거세하거나 호르몬투여를 하지 않은 비거세군과 비교할 때도 전립선이 비대해졌다는 것을 알 수 있었다. Finasteride 및 Saw Palmetto를 투여한 양성대조군의 경우 전립선비대군의 40% 이상의 눈에 띄는 유의적 감소를 나타내었다. 본 실험에서 사용된 울금 열수 추출물의 경우 농도의존적인 유의적 감소를 보였다. 간 및 신장의 무게는 table 10과 같다. 간 및 신장 등 장기관찰에서 별다른 이상소견은 관찰되지 않았으며, 무게도 군간의 큰 변화가 보이지 않았다.

Table 8. Initial, final body weight, and body weight gain in BPH-induced rats

	Initial BW (g)	Final BW (g)	BW gain (g)
No Castration	243.56 ± 3.93	413.24 ± 28.07	169.69 ± 28.15
Castration	222.72 ± 6.80	377.03 ± 21.12	154.31 ± 20.18
BPH	232.79 ± 10.06	358.81 ± 30.19	126.01 ± 26.97
BPH + CLHW 25	235.09 ± 8.18	350.70 ± 32.33	115.61 ± 32.84
BPH + CLHW 50	233.41 ± 8.92	357.48 ± 19.03	124.07 ± 19.11
BPH + CLHW 100	224.70 ± 7.75	341.83 ± 12.51	117.13 ± 16.44
Finasteride	221.30 ± 6.47	342.14 ± 20.38	120.84 ± 18.63
Saw Palmetto	223.32 ± 10.41	363.14 ± 13.39	139.82 ± 9.98

- Control: Normal control group, Castration: castration control group, BPH: BPH-induced group, CLHW:BPH-induced+*Curcuma longahot* water extract administered group, Saw Palmetto: BPH-induced+Saw Palmetto administered group, Finasteride:BPH-induced+Finasteride administered group

Table 9. Effects of oral administration of *Curcuma longa* extracts on prostate weight in control and BPH induced rats.

	Prostate (g)	Prostate Weight Ratio (mg/BW)
No Castration	0.56 ± 0.07	0.14 ± 0.01 ^b
Castration	-	-
BPH	1.11 ± 0.23	0.31 ± 0.06 ^a
BPH + CLHW 25	1.06 ± 0.19	0.31 ± 0.06 ^a
BPH + CLHW 50	0.95 ± 0.17	0.27 ± 0.05 ^a
BPH + CLHW 100	0.85 ± 0.10	0.25 ± 0.03 ^a
Finasteride	0.60 ± 0.20	0.18 ± 0.07 ^b
Saw Palmetto	0.67 ± 0.13	0.19 ± 0.04 ^b

No castration: Normal control group, Castration: castration control group, BPH: BPH-induced group, CLHW:BPH-induced+*Curcuma longhot* water extract administered group, Saw Palmetto: BPH-induced+Saw Palmetto administered group, Finasteride:BPH-induced+Finasteride administered group

Table 10. Liver and Kidney weight in BPH-induced rats

	Liver (mg/100g of BW)	Kidney (mg/100g of BW)
No Castration	3.00 ± 0.46 ^a	0.71 ± 0.02 ^b
Castration	2.49 ± 0.14 ^b	0.58 ± 0.05 ^c
BPH	2.75 ± 0.12 ^b	0.93 ± 0.08 ^a
BPH + CLHW 25	2.74 ± 0.11 ^{ab}	0.96 ± 0.05 ^a
BPH + CLHW 50	2.64 ± 0.18 ^{ab}	0.92 ± 0.06 ^a
BPH + CLHW 100	2.72 ± 0.14 ^{ab}	0.93 ± 0.07 ^a
Finasteride	2.80 ± 0.34 ^{ab}	0.92 ± 0.04 ^a
Saw Palmetto	2.82 ± 0.15 ^{ab}	0.91 ± 0.02 ^a

No castration: Normal control group, Castration: castration control group, BPH: BPH-induced group, CLHW:BPH-induced+*Curcuma longhot* water extract administered group, Saw Palmetto: BPH-induced+Saw Palmetto administered group, Finasteride:BPH-induced+Finasteride administered group

(라) GOT 및 GPT 측정

실험에 사용된 래트의 GOT, GPT 결과는 table 11과 같다. 각 군간 수치의 큰 증가는 보이지 않았다.

Table 11. GOT and GPT in BPH-induced rats

	GPT	GOT
No Castration	48.20 ± 21.27 ^a	61.8 ± 8.3 ^a
Castration	51.30 ± 13.57 ^a	64.7 ± 6.0 ^a
BPH	37.27 ± 19.51 ^a	65.7 ± 13.8 ^a
BPH + CLHW 25	40.64 ± 13.37 ^a	59.1 ± 10.2 ^a
BPH + CLHW 50	48.91 ± 10.49 ^a	63.1 ± 4.6 ^a
BPH + CLHW 100	60.63 ± 25.86 ^a	67.4 ± 9.5 ^a
Finasteride	59.72 ± 10.74 ^a	64.4 ± 3.6 ^a
Saw Palmetto	52.33 ± 5.95 ^a	57.1 ± 8.3 ^a

No castration: Normal control group, Castration: castration control group, BPH: BPH-induced group, CLHW: BPH-induced+*Curcuma longahot* water extract administered group, Saw Palmetto: BPH-induced+Saw Palmetto administered group, Finasteride: BPH-induced+Finasteride administered group

(마) 혈액에서 DHT 및 T의 측정

혈액에서의 호르몬 수치 분석은 Fig.18 및 Fig.19과 같다. 혈장에서 DHT의 분석은 Fig. 2에 나타내었다. Fig.18에서 BPH군에서 DHT가 높은 값을 보였으며, 양성대조군을 비롯한 울금 열수추출물에서 DHT 수치가 감소한 양상을 보였다. T의 경우도 비슷한 양상을 나타내었으나, Finasteride의 경우 DHT와 T의 비율을 볼 때 전환이 덜 되었다고 생각되며, 이것은 전환을 담당하는 5-alpha reductase의 저해가 기전이므로 이러한 결과가 나왔다고 생각된다. 울금의 경우도 이러한 경향이 관찰되고 있다. 현재 조직에서 5-alpha reductase activity를 측정하고 있으며, 이 결과에서 억제여부를 확인할 수 있을 것이라고 예상된다.

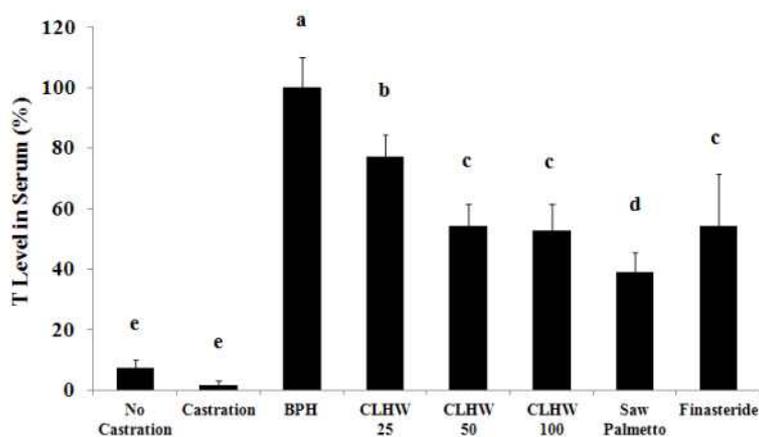


Fig. 18. Serum DHT level in control and BPH-induced rats.

No castration: Normal control group, Castration: castration control group, BPH: BPH-induced group, CLHW: BPH-induced+*Curcuma longahot* water extract administered group, Saw Palmetto: BPH-induced+Saw Palmetto administered group, Finasteride: BPH-induced+Finasteride administered group

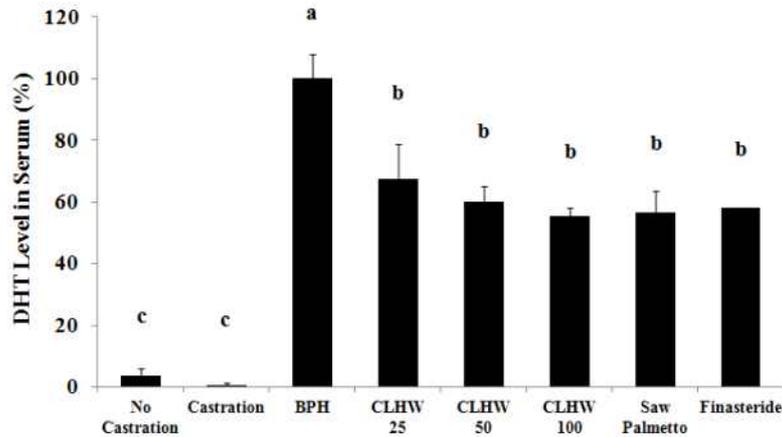


Fig. 19. Serum testosterone level in control and BPH-induced rats.

No castration: Normal control group, Castration: castration control group, BPH: BPH-induced group, CLHW: BPH-induced+*Curcuma longa* hot water extract administered group, Saw Palmetto: BPH-induced+Saw Palmetto administered group, Finasteride: BPH-induced+Finasteride administered group

(바) 조직에서 DHT 및 T의 측정

다음은 조직에서 측정한 DHT 및 T level이다(Fig.20, Fig.21). 조직에서의 결과는 혈장에서 측정한 DHT 및 T 수준과 유사한 경향을 보였다. DHT level의 변화는 정상군 및 거세군 대비 BPH군에서 높은 유의적 증가를 보였으며, 울금 열수 추출물 투여 농도에 따라 유의적으로 감소하는 결과를 나타냈다. 특히 CLHW 100에서는 쏘팔메토 및 Finasteride 등의 양성 대조군과 같은 수준의 약 30% 감소 수준을 보였다.

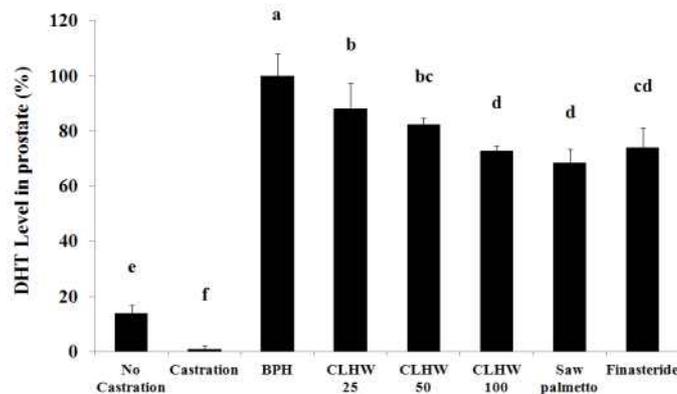


Fig. 20. Effects of oral administration of *Curcuma longa. L* on DHT level in prostate of BPH induced rats.

No castration: Normal control group, Castration: castration control group, BPH: BPH-induced group, CLHW: BPH-induced+*Curcuma longa* hot water extract administered group, Saw Palmetto: BPH-induced+Saw Palmetto administered group, Finasteride: BPH-induced+Finasteride administered group

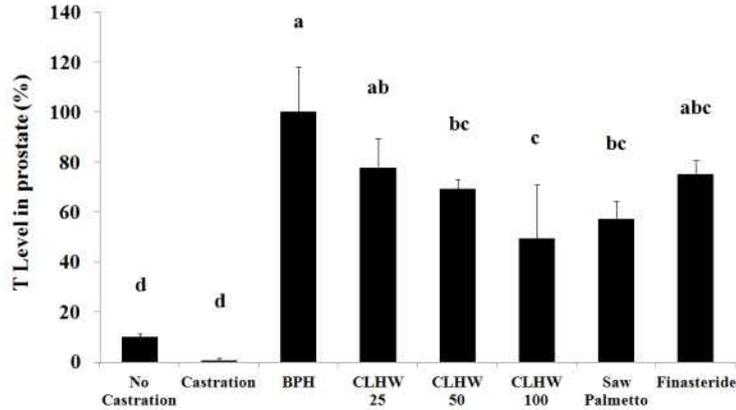


Fig. 21. Effects of oral administration of *Curcuma longa*. L on DHT level in prostate of BPH induced rats.

No castration: Normal control group, Castration: castration control group, BPH: BPH-induced group, CLHW: BPH-induced+*Curcuma longa* hot water extract administered group, Saw Palmetto: BPH-induced+Saw Palmetto administered group, Finasteride: BPH-induced+Finasteride administered group

(사) 전립선조직의 조직병리학적 분석

Fig22 는 각 실험군의 전립선조직의 hematoxylin and eosin 염색결과이다. A는 Sham control이고 B는 정상 전립선조직으로 정상적인 모습의 epithelium이 장방형의 정상크기를 하고 있으나, C의 BPH군에서는epithelial proliferation과 전립선 epithelial height가 눈에 띄게 증가하며 glandular lumen이 감소하는 것을 볼 수 있다. 그러나 CLHW 각 농도의 투여군(D-F), Saw Palmetto, Finasteride의 양성대조군에서는 전형적인 전립선비대의 양식이 눈에 띄게 감소하는 것을 볼 수 있었다.

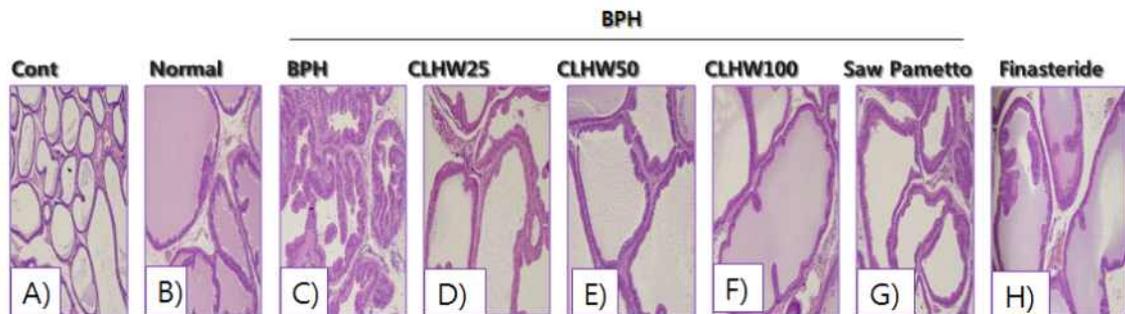


Fig. 22. H&E staining of oral administration of *Curcuma longa*. L in prostate of BPH induced rats (x100 magnification).

A) castration control B) normal control: C) BPH group: D) BPH+CLHW 25 mg/kg:E) BPH+CLHW 50 mg/kg: F) BPH+CLHW 100 mg/kg: G)BPH+Saw Palmetto: H) BPH+Finasteride

다. 울금 열수 추출물의 *in vivo* 전립선비대 억제 기작 구명

(1) CLHW 급여에 따른 5-alpha reductase type 2 조절

CLHW의 전립선비대 억제효과의 기전을 규명하기 위하여 전립선비대 *in vivo* 조직

을 이용하여 전립선비대에서 key enzyme이라고 할 수 있는 5-alpha reductase type 2의 전립선조직에서의 발현을 확인한 결과는 Fig.23과 같다. T를 활성형 DHT로 전환하는 5-alpha reductase는 성선의 경우 type 2가 주를 이루고 있으며, Fig.23에서와 같이 BPH 군에서 증가하는 것으로 나타났다. CLHW급여 농도에 따라 감소하는 경향을 보였으며, CLHW 100 mg/kg 급여군에서는 양성대조군에서와 같은 정도의 발현을 보이는 것으로 나타나, 혈청 DHT와 전립선조직에서 측정된 DHT 수준감소의 결과와 일치하는 것으로 나타났다. 즉, 전립선에서 발현되는 5-alpha reductase type2(SRD5A2)에 의하여 활성형 DHT로 전환이 높아져 전립선비대가 유발된다고 할 때, CLHW는 SRD5A2를 억제하여 DHT로의 전환을 낮추는 것으로 생각된다.

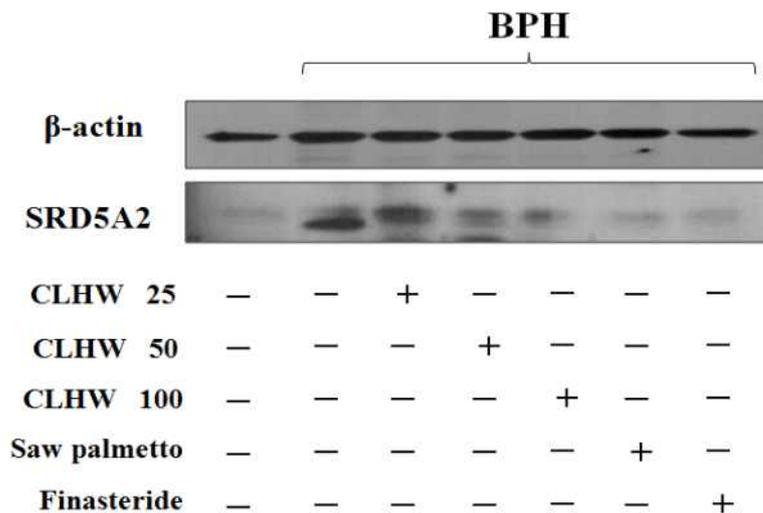


Fig. 23. Western blots for the detection of 5a-Reductase type 2 (in prostate of control and BPH-treated rats. CLHW: *Curcuma longa* hot water extract

(2) 전립선비대 *in vivo* model에서 CLHW처리에 따른 NF-kb의 변화

Nuclear factor kappa B (NF-kB)는 Rel protein family의 p50 및 p65로 구성된 Heterodimer이다. 감염, 염증, 산화적 스트레스 등의 생리학적이자 병리학적인 조건에서 활성화가 일어난다고 알려져있으며, 활성화된 NF-kB(p65) 단위는 염증관련 cytokine 및 chemokine을 포함한 유전자의 조절을 포함한 염증 진행과정으로 유도하는 첫단계가 된다.(106). 실험적으로 유도된 전립선비대에서 NF-kB의 유도가 관찰되는 보고가 다수 있다. Fig.24를 보면 세포질과 핵부위로 분리하지 않아서 p65의 증감이 확인되지는 않지만, NF-kB를 억제하고 있는 IκB가 인산화되어 degradation되고 이에따라 활성화에 따른 인산화가 전립선비대군에서 증가하는 것을 볼 수 있다. 이것은 산화적 손상에 따른 결과라고 생각되며, 이러한 결과는 항산화효소의 저해라는 결과와 연결되어 세포의 손상을 야기한다. Fig25에서 보이는 결과는 항산화효소인 Superoxide dismutase의 inhibition rate를 나타낸 것으로 BPH군에서 유의적인 감소를 보이며, CLHW처리에 따라 증가하는 것을 볼 수 있다.

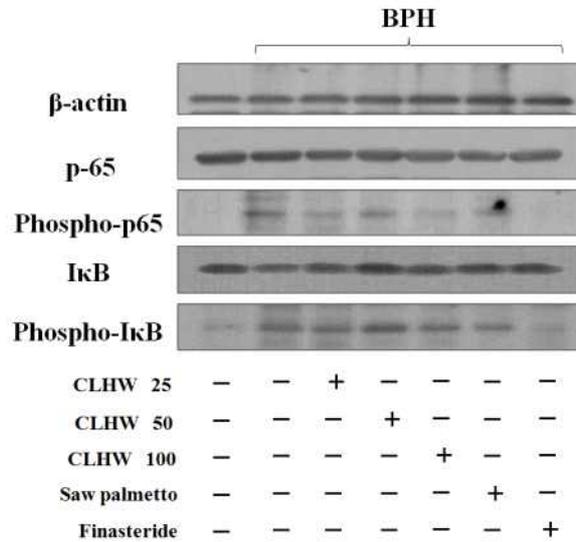


Fig. 24. Phosphorylation of NF-kb and IκB in prostate tissue of control and BPH-treated rats.

- CLHW: *Curcuma longa* hot water extract

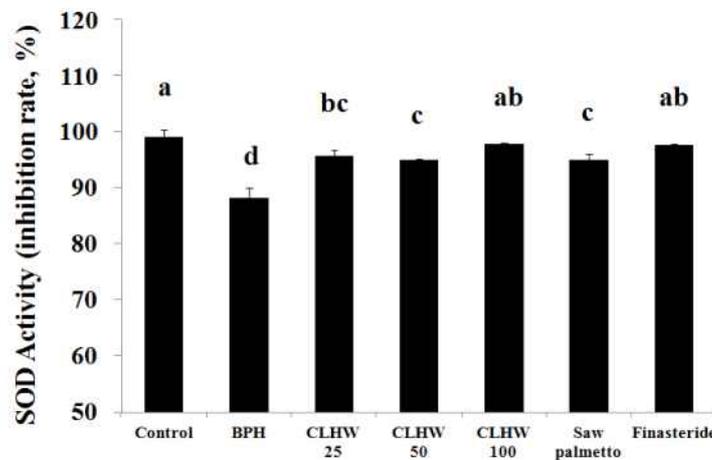


Fig. 25. Change of Superoxide dismutase activity in in prostate tissue of control and BPH-treated rats. CLHW: *Curcuma longa* hot water extract.

No castration: Normal control group, Castration: castration control group, BPH: BPH-induced group, CLHW:BPH-induced+*Curcuma longa*hot water extract adminstered group, Saw Palmetto: BPH-induced+Saw Palmetto adminstered group, Finasteride:BPH-induced+Finasteride adminstered group.

(3) CLHW처리에 따른 proinflammatory cytokines의 변화

이러한 NF-kB의 활성화는 TNF- α 에 의해 유도되었다고 생각할 수 있으며 NF-kB의 활성화로 proinflammatory cytokine의 증가를 야기하게 된다. 전립선비대환자의 조직에서 TNF- α 의 수준이 높아지게 되는데, Fig.26에서도 BPH군에서 높은 level을 보이며, CLHW급여군에서는 그 수준이 점차로 낮아짐을 볼 수 있다. 전립선비대에서 NF-kB의

활성화로 수준이 증가한다고 알려진 proinflammatory cytokine들은 IL-1b, IL-6, IL-8등이 있으며, 각 실험군에서 cytokines들의 변화도 Fig.26과 같으며, 전립선비대군에서 유의적 증가를 보이고 다시 CLHW군에서는 감소를 보이는 것을 알 수 있다.

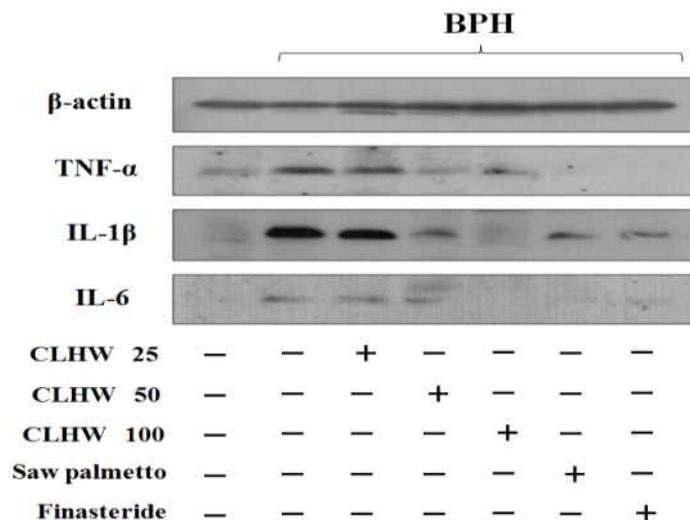


Fig. 26. Expression of TNF- α and proinflammatory cytokines in prostate tissue of control and BPH-treated rats. CLHW: *Curcuma longa* hot water extract

(4) CLHW치리에 따른 proinflammatory enzyme의 변화

전립선비대에서 NF-kb의 활성화는 COX-2와 iNOS같은 염증과정에 관여하는 proinflammatory enzyme의 발현에 영향을 미치므로, 전립선환자의 조직에서 이들 효소의 발현이 높은 것으로 보고된다. 그림에서, COX-2와 iNOS의 발현이 BPH군에서 증가하는 것을 볼 수 있으며, CLHW투여군에서 낮아지는 것을 볼 수 있다.

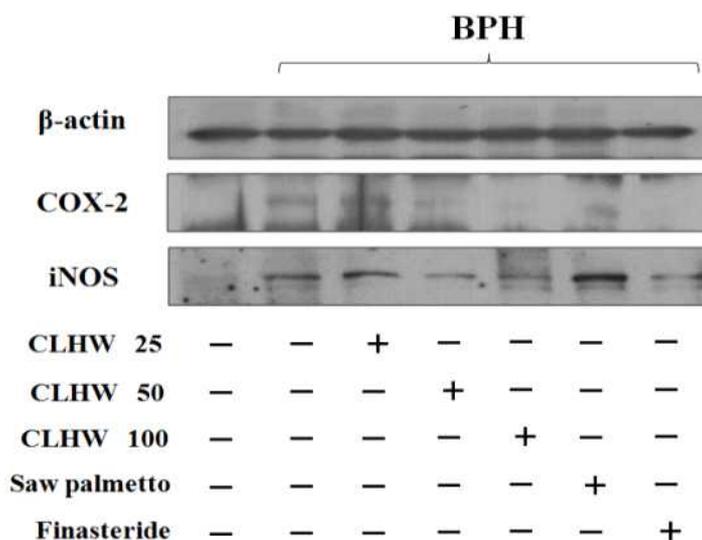


Fig. 27. Expression of proinflammatory enzymes in prostate tissue of control and BPH-treated rats.

- CLHW: *Curcuma longa* hot water extract

라. 원료표준화

(1) 건강기능식품 소재 제조공정 표준화 결과

Lot NO.	원료량(kg)	부형제(kg)	생산량(kg)	건조감량(%)	수율(%)
1	80	2.9	16.5	1.0	20.6
2	80	3.0	16.6	1.1	20.8
3	80	3.1	16.9	1.1	21.1
평균	80	3	26.8	1.1	20.8



(2) 울금 열수 추출물 지표성분정량 결과

시료명	실험결과 (Curcumin, 단위 ug/g)			평균 (ug/g)
	1회	2회	3회	
CLHWSD- 1 Lot	31.3	31.5	31.2	31.33
CLHWSD- 2 Lot	23.0	32.5	27.0	27.50
CLHWSD- 3 Lot	29.8	33.9	32.4	32.03

4. 결론

본 연구는 울금과 발효울금의 다양한 추출물(실온, 열수, 20%주정, 80%주정) 8종을 이용하여 전립선 비대를 대상 질환으로 삼아, 그 효능을 검색하여 가장 뛰어난 활성을 가진 추출물을 찾아 건강기능식품개발의 소재로 삼고자 하였다. 본 연구에서 중심기작은 전립선치료제의 한 축을 이루고 있는 5-alpha reductase 효소의 억제로서, 남성호르몬인 testosterone에서 활성형 dihydrotestosterone(DHT)으로 전환되는데, 노화가 진행될수록 이 전환이 높아지며 이것이 전립선비대 진행의 주요요인으로 생각되고 있다. 그러므로 Finasteride 등의 5-alpha reductase inhibitor는 전립선 약물치료에 매우 주목받고 있으며, 이 중에서도 5-alpha

reductase type2는 주로 전립선에 분포하고 있다.

본 연구에서는 이러한 사항을 참고하여 15주령의 쥐의 전립선을 효소원으로 하여 5-alpha reductase 억제효과, DHT 전환 정도를 검토하였으며, SRD5A2가 trasfection된 LNCaP 세포를 이용하여 역시 5-alpha reductase 억제효과, DHT 전환 정도를 검토하였으며, 8종의 추출물 중 울금 열수 추출물과 20%주정 추출물의 억제활성이 가장 유의적으로 높았으므로, *in vitro* 실험에서 두 가지 활성시료로 선정하였다.

선정된 두 종류의 추출물을 대상으로 전립선비대의 rat 모델을 확립하여 두 가지 시료를 투여하고 그 활성을 비교한 결과, *in vivo*에서는 열수추출물이 유의적인 전립선무게 감소 및 혈장DHT의 30% 이상의 유의적 전환감소를 보임으로써 20% 주정추출물보다 높은 효과를 보였으므로 최종 시료로 울금 열수추출물을 선정하였다.

울금 열수 추출물 50-100mg/kg BW로 급여하여 시행한 *in vivo* 평가는 양성대조군으로 Finasteride 및 현재 시판되고 있는 전립선비대 건강기능식품인 쏘팔메토 투여군과 비교하여 진행하였다. 울금 열수 추출물 투여군은 농도의존적으로 전립선무게의 감소, 혈액 및 전립선 조직에서 DHT 및 T의 감소를 보였으며, 이 결과는 양성대조군과 유사한 수준으로 나타났으며, H&E staining에서 전립선비대를 유도한 조직보다 유의하게 향상된 결과를 보였다.

전립선비대 유도 래트의 전립선조직에서 전립선조직의 superoxide dismutase가 저해되는 결과를 보였으며, TNF- α 의 증가로 연결되었으며, 이러한 증가는 염증인자인 NF-kB의 증가하고 이것은 염증관련 enzyme인 COX-2와 IL-1 β , IL-6등의 증가로 이어졌다. 울금 열수 추출물의 급여결과 농도의존적으로 superoxide dismutase가 증가하고, TNF- α 의 감소, NF-kB의 감소로 나타났으며, COX-2와 IL-1 β , IL-6등의 감소를 나타냈다. 전립선비대에서 노화에 따른 활성산소의 증가는 항산화효소의 감소로 이어지고 이에 따른 염증인자의 증가는 전립선조직의 proliferation 등으로 이어져 전립선비대가 진행된다고 알려져 있다. 이와 같은 결과로서 울금 열수 추출물은 건강기능식품소재의 단독 개발 및 기존 건강식품에 응용에 이용할 수 있으리라 생각되며, 임상시험으로 연결될 수 있는 유용성 있는 소재라고 생각된다.

*In vitro*와 *in vivo* 연구에서 전립선건강 활성 소재로 선정된 울금 열수 추출물을 대상으로 추출공정 표준화 연구를 수행하였다. 추출물의 수율은 20.8%였으며, 지표성분으로 설정한 Curcumin은 30.2 ug/g이 검출되었다. 이로서 울금 열수 추출물은 전립선건강 활성을 가지는 건강소재로 산업화 가능성을 확인하였다.

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

1. 발효울금 개별인정형 건강기능식품 산업화

년차	연구개발 목표	결과	달성도	기술발전 기여도
1차년도	발효울금의 간기능개선 개별인정형 건강기능식품 원료 인정	식품의약품안전처에 인 정 신청서 제출	100%	국내산 울금의 간 건강 활성 확인
2차년도	발효울금의 간기능개선 개별인정형 건강기능식품 제품개발	원료 인정 획득 원료 1건 산업화 제품 1건 산업화	100%	식약처 인정 개별 인정형 건강기능 식품 원료 인정 획득
3차년도	발효울금 함유 건강기능 식품 제품개발	제품 4건 산업화	100%	건강기능식품 산 업화

2. 비파엽추출물 개별인정형 건강기능식품 산업화

년차	연구개발 목표	결과	달성도	기술발전 기여도
1차년도	비파엽 추출물의 기억력 개선 건강기능식품 제품 개발	비파엽추출물 제조공정 표준화 원료 시제품 제작 1건 완제품 시제품 제작 1건	100%	국내산 비파엽을 이용한 추출방법 표준화, 시제품 생산
2차년도	비파엽 추출물의 기억력 개선 개별인정형 건강기능식품 인정 신청	식품의약품안전처에 인 정 신청서 작성	100%	신청서 각 항목 작성(제조방법, 기준규격, 안전성, 기능성 내용 등 작성)
3차년도	비파엽 추출물의 기억력 개선 개별인정형 건강기능식품 산업화	원료 인정 획득 원료 1건 산업화 제품 1건 산업화	100%	비파엽추출물 기억력개선 개별인 정형 건강기능식품 원료 인정 획득

3. 유기농 건강지향식품 산업화

년차	연구개발 목표	결과	달성도	기술발전 기여도
1차년도	발효울금을 함유하는 유기농 건강지향식품 스낵 개발	유기농스낵 제조공정 표준화 시제품 제작 1건	100%	친환경시장에 없는 새로운 제형의 스낵 제조공정 표준화, 시제품 생산
2차년도	비파엽추출물을 함유하는 유기농 건강지향식품 스낵개발	제품 1건 산업화 시제품 제작 1건	100%	발효울금을 함유하는 유기농스낵 품목제조보고
3차년도	유기농 건강지향식품 글로벌 산업화	제품 1건 산업화 해외수출	100%	비 파 엽 추출 물 을 함유하는 유기농 스낵 품목제조보고 유기가공식품 인증 획득

4. 항스트레스 건강기능식품 소재 개발

년차	연구개발 목표	결과	달성도	기술발전 기여도
1차년도	울금 및 발효울금추출물을 HTS을 이용하여 검색 <i>in vitro</i> 및 <i>in vivo</i> 평가를 통하여 항스트레스 최적 활성 추출물 선정 선정된 추출물 활성/지표 성분을 분리/정제/분석함	HTS 를 이용하여 항스트레스 활성을 검색한 결과 울금 80%주정 추출물 선정335vd <i>in vivo</i> 를 통한 구속스트레스 및 강제수영테스트 결과 울금 80%주정 추출물 활성 확인	100%	국내학술발표 1건 완료
2차년도	1차년도 결과를 토대로 선정된 소재를 대상으로 <i>in vitro</i> 및 <i>in vivo</i> 평가를 통하여 항스트레스 기전 규명	스트레스 유도물질인 CORT에 의해 증가된 세포독성이 울금 80%주정 추출물에 의해 회복 확인 NMDA에 의해 증가되었던 NR2B protein expression이 감소	100%	국내학술발표 1건 완료
3차년도	선정소재의 활성성분 결정을 위한 항스트레스 관련 기작 규명 및 유효성 평가	A β_{1-42} -induced neuronal toxicity가 CL 80%주정 추출물 에 의해 회복	100%	SCI 1건 (투고) 비SCI 2건 (투고) 국제학술발표 1건 완료

5. 간기능개선 활성기작규명 / 체지방 감소 건강기능식품 소재개발

년차	연구개발 목표	결과	달성도	기술발전 기여도
1차년도	발효율금의 간기능개선 활성물질 규명 /항산화 효소시험	발효율금 실온추출물 정제물 FCC-25M의 알코올성 간손상 보호 활성 확인 발효율금 분말의 알코올성 간손상 보호 활성 기작구명	100%	국제학술발표 1건 특허 공동출원 1건
2차년도	발효율금 추출물의 <i>in vivo</i> 동물 실험으로 체지방감소 효능평가	High-fat induced rat 모델에서 발효율금 50%주정 추출물의 체지방감소 활성 확인 발효율금 분말과 밀크씨슬의 알코올성 간손상 보호 유사 활성 확인	100%	국제학술발표 2건
3차년도	발효율금 50%주정 추출물 유효분획의 체지방감소 기작구명	발효율금 50%주정 추출물의 에틸아세테이트 분획층에서 체지방감소 활성과 기작구명	100%	SCI 1건(게재) 비SCI 1건(게재) 비SCI 학술논문 1건(투고) 국제학술발표 3건

6. 면역증강 건강기능식품 소재개발

년차	연구개발 목표	결과	달성도	기술발전 기여도
1차년도	율금추출물과 발효율금추출물로부터 <i>in vitro</i> 세포계 통한 생리활성 확인	<ul style="list-style-type: none"> • 율금 및 발효율금 추출물의 세포 독성시험을 통한 적정농도확인 • 발효율금과 율금 추출물의 정상 상태에서의 면역증강 능력 확인 • 발효율금과 율금 추출물의 LPS로 유도된 세포에서 항염 활성 확인 	100%	국내학술발표 1건 비SCI급 학술논문 1건 (게재)
2차년도	<i>in vitro</i> test결과로부터 얻어진 추출물 중 1종을 선택하여 동물 모델에서의 효능, 독성 및 적정용량을 검증	<ul style="list-style-type: none"> • 반복 독성검사를 통한 적정농도 확인 • 정상마우스에서의 면역조절 확인 • 면역결핍 마우스에서의 면역조절 및 감염저항성 확인 	100%	국내학술발표 1건 비SCI급 학술논문 1건 (게재)
3차년도	율금 20%주정 추출물의 면역조절 기전 규명	<ul style="list-style-type: none"> • 자연살해세포 활성화에 미치는 영향 확인 • T 세포와 MHC II 발현에 미치는 영향 확인 	100%	비SCI급 학술논문 1건 (투고)

7. 전립선건강 건강기능식품 소재개발

년차	연구개발 목표	결과	달성도	기술발전 기여도
1차년도	전립선질환 예방 및 개선 을 위한 울금, 발효울금 추출물의 <i>in vitro</i> 활성 성평가	전립선세포주를 이용한 <i>in vitro</i> assay에서 울금 열수 추출물을 시료로 선정함	100%	전립선세포주에서 의 <i>in vitro</i> assay 확립 국내학술발표 1건
2차년도	전립선질환 예방 및 개 선을 위한 울금열수추출 물의 <i>in vivo</i> 활성평가	랫드를 대상으로 선정된 울금열수추출물의 <i>in</i> <i>vivo</i> 전립선비대역제를 검토하였으며 양성대조 군과 비교하였다	100%	국내학술발표 1건 특허 공동출원 1건
3차년도	최종 선정 시료의 <i>in</i> <i>vivo</i> 상에서의 안전성 검 사 및 효능 규명	울금열수추출물의 <i>in</i> <i>vivo</i> 평가에서의 조직과 혈액상에서 염증기작 및 항산화계를 이용한 기전 규명	100%	국내학술발표 2건 비SCI 논문게재 1 건, 투고 1건 SCI 논문투고 1건

제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

1. 실용화·산업화 계획(기술실시 등)

가. 건강기능식품 산업화

(1) 발효율금 개별인정형 건강기능식품 산업화

<원료 인정서>

<원료 품목신고서>

[별지 제3호 서식] (앞쪽)	
건강기능식품 기능성 원료 인정서	국내 수입
제2013-4호 대표자 : 오규철 업체명 : 한국인스팜(주) 소재지 : 전라남도 화순군 동면 운농리 1034-1번지 원료명 : 발효율금	
수출국 : _____ 수출국 제조회사명 : _____ 수출국 제조회사 소재지 : _____	
「건강기능식품 기능성 원료 및 기준·규격 인정에 관한 규정」 제10조제1항에 따라 건강기능식품 기능성 원료로 인정합니다. 2013년 3월 일  식품의약품안전청장	
※ 붙임서류 1. 원료명 2. 제조기준(원재료, 제조방법, 기능성분(또는 지표성분), 제조 시 유의사항) 3. 규격 4. 제품의 요건(기능성 내용, 원일심취량, 섭취 시 주의사항, 기타사항) 5. 시험방법	
210mm×297mm[일반용지 60g/㎡(재활용품)]	

제 2012-광주청-0004-0001 호

건강기능식품품목제조신고증

영업허가(번호) : 제 2012-광주청-0004 호
 업 소 명 : 한국인스팜주식회사
 소 재 지 : 전라남도 화순군 동면 운농리 1034번지 1호 전라남도 화순군 동면 동농골길 72
 영 업 의 종 류 : 건강기능식품전문제조업
 제 품 명 : 발효율금 (발효율금 (2013-4))

품목제조조건 :
 건강기능식품에관한법률 제7조 및 동법 시행규칙 제8조의 규정에 따라 건강기능식품품목제조신고서를 수리합니다.

2013년 07월 01일

광주지방식품의약품안전청장 

<천양지차 발효율금캡슐>

<제품사진>



제 2004-경인청-0017-0329 호

건강기능식품품목제조신고증

영업허가(번호) : 제 2004-경인청-0017 호
 업 소 명 : 동서바이오팜(주)
 소 재 지 : 경기도 용인시 처인구 이동면 경기동로 1090-20
 영 업 의 종 류 : 건강기능식품전문제조업
 제 품 명 : 천양지차 발효율금 캡슐 (발효율금 (2013-4))

품목제조조건 :
 건강기능식품에관한법률 제7조 및 동법 시행규칙 제8조의 규정에 따라 건강기능식품품목제조신고서를 수리합니다.

2013년 09월 02일

경인지방식품의약품안전청장 



<인스팜 발효울금캡슐>

제 2013-광주청-0006-0001 호

건강기능식품품목제조신고증

영업허가(번호) : 제 2013-광주청-0006 호
 업 소 명 : 한국인스팜(주)
 소 재 지 : 전라남도 화순군 동면 대포리 1065번지
 영 업 의 종 류 : 건강기능식품벤처제조업
 제 품 명 : 인스팜 발효울금캡슐
 (발효울금 (2013-4))

품목제조조건 :
 건강기능식품에 관한 법률 제7조 및 동법 시행규칙 제8조의 규정에 따라 건강기능식품품목제조신고를 수리합니다.

2013년 11월 28일

광주지방식품의약품안전청장

<제품사진>



<인스팜 발효울금분말>

제 2012-광주청-0004-0002 호

건강기능식품품목제조신고증

영업허가(번호) : 제 2012-광주청-0004 호
 업 소 명 : 한국인스팜주식회사
 소 재 지 : 전라남도 화순군 동면 운농리 1034번지 1호 전라남도 화순군 동면 동농공길 72
 영 업 의 종 류 : 건강기능식품전문제조업
 제 품 명 : 인스팜 발효울금분말
 (발효울금 (2013-4))

품목제조조건 :
 건강기능식품에 관한 법률 제7조 및 동법 시행규칙 제8조의 규정에 따라 건강기능식품품목제조신고를 수리합니다.

2014년 06월 12일

광주지방식품의약품안전청장

<제품사진>



<천양지차 발효율금골드>

<제품사진>

제 2013-광주청-0006-0002 호

건강기능식품품목제조신고증

영업허가(번호) : 제 2013-광주청-0006 호
 업 소 명 : 한국인스팜(주)
 소 재 지 : 전라남도 화순군 동면 동농공길 17
 영 업 의 종 류 : 건강기능식품벤처제조업
 체 품 명 : 천양지차 발효율금 골드(GOLD)
 (발효율금 (2013-4))

품목 제조 조건 :
 건강기능식품에 관한 법률 제7조 및 동법 시행규칙 제8조의 규정에 따라 건강기능 식품품목제조신고를 수리합니다.

2014년 08월 26일

광주지방식품의약품안전청장



<인스팜 발효율금정>

<제품사진>

제 2013-광주청-0006-0003 호

건강기능식품품목제조신고증

영업허가(번호) : 제 2013-광주청-0006 호
 업 소 명 : 한국인스팜(주)
 소 재 지 : 전라남도 화순군 동면 동농공길 17
 영 업 의 종 류 : 건강기능식품벤처제조업
 체 품 명 : 인스팜 발효율금 정
 (발효율금 (2013-4), 비타민B2)

품목 제조 조건 :
 건강기능식품에 관한 법률 제7조 및 동법 시행규칙 제8조의 규정에 따라 건강기능 식품품목제조신고를 수리합니다.

2014년 10월 07일

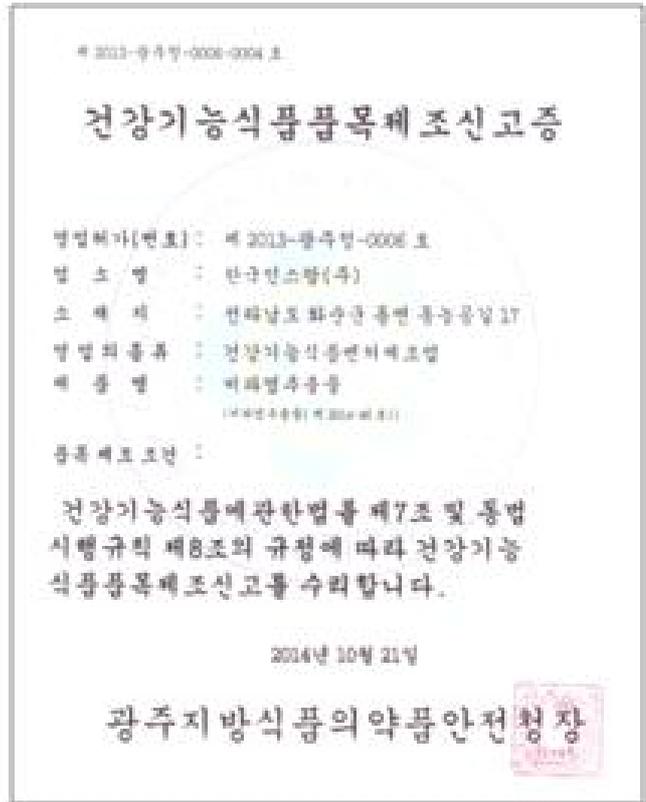
광주지방식품의약품안전청장



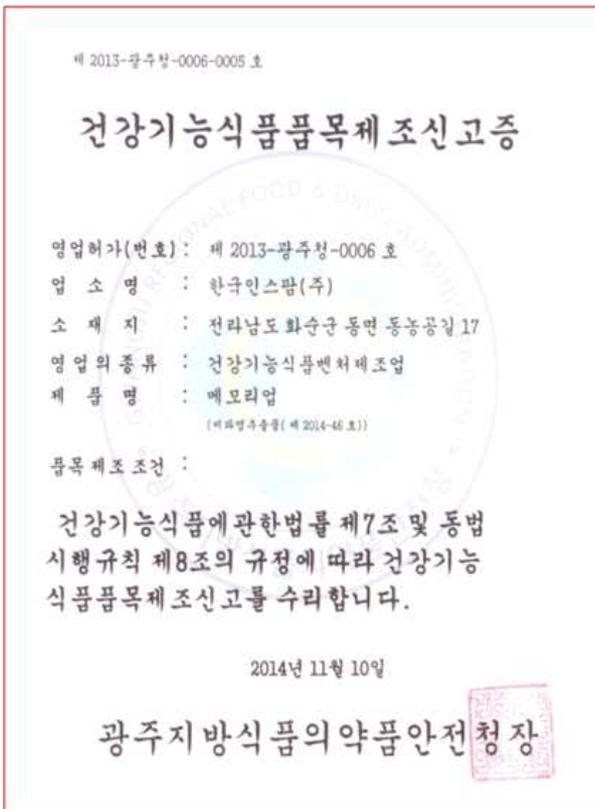
(2) 비파엽추출물 개별인정형 건강기능식품 산업화
 <원료 인정서>



<원료 품목신고서>



<제품 품목신고서>



<제품사진>



2. 교육·지도·홍보 계획

가. 교육·지도

(1) 광주여자대학교 대체의학과

제목 : 발효울금의 개별인정형 건강기능식품 개발

일자 : 2012년 5월 24일

교육인원 : 광주여자대학교 대체의학과 120명



(2) 전남 장흥군 비파엽 및 울금 재배농가 교육

제목 : 비파엽과 발효울금의 개별인정형 건강기능식품 개발

일자 : 2012년 4월 24일

교육인원 : 전남 장흥군 농업기술센터 및 비파연구회 30명



(3) 화순군 명품한약 연구회 및 약용자원 재배농가

제목 : 친환경 약용자원 가공 상업화 교육

일자 : 2012년 4월 12일

교육인원 : 화순군 약용자원 재배농가 및 예비 귀농 농가 50명



(4) 전남농업기술원

제목 : 지역 친환경 농산물을 이용한 개별인정형 건강기능식품 개발

일자 : 2012년 6월 19일

교육인원 : 전남농업기술원 90명



나. 홍보

(아침신문) 전남대, 지역특산자원인 울금, 비파엽 산업화나서 2011-11-07

(광주 MBC) 남도상품이 경쟁력이다 2012-09-26

(중앙일보) 산들촌 'i-yes-mom' 첨가물 없는 '착한과자' 안심하고 드세요 2012-12-12

(희망일보) 엄마의 마음을 담은 진실한 우리아이의 '안심 먹거리' 2012-10-24

(아시아경제) 진도울금 간기능개선 기능식품 원료 개발 2013-03-26

(뉴스 1) 한국인스팜 진도울금 발효 간기능개선 기능식품 원료 개발 2013-03-26

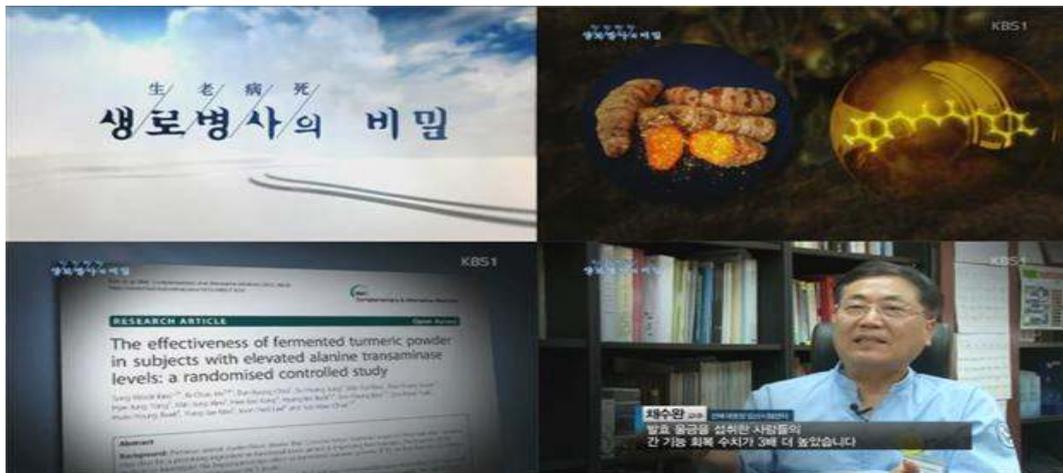
(노컷뉴스) 진도산 울금 간기능 개선 효과 있다 2013-03-26

(세계일보) 진도산 울금 간 건강에 참 좋은데~ 2013-03-27

- (한겨레뉴스) 카레원료 울금, 건강음료로 변신! 2013-03-27
- (연합뉴스) 진도울금활용, 간기능 개선 건강식품 개발 2013-03-27
- (광주일보) 진도 울금 발효 간기능식품 만든다 2013-03-28
- (호남타임즈) 진도 울금 안정적인 판로 확보 2013-04-23
- (연합뉴스) 진도 울금, 안정적 판로 확보 2013-04-23
- (newsis) 진도군-한국인스팜 '울금 유통' 협약 2013-04-23
- (news1) 진도군-한국인스팜 업무협약. 진도울금 판로 확보 2013-04-23
- (중앙통신뉴스) '진도울금' 안정적인 판로 확보, 한국인스팜과 유통협약 2013-04-23
- (전남제일신문) 진도울금 안정적인 판로 확보 2013-04-23
- (엔디엔뉴스) 진도울금 안정적인 판로 확보 2013-04-25
- (아침신문) 진도군, 울금유통활성화 업무협약 체결 2013-04-23
- (광주타임즈) 진도울금 안정적 판로 확보 2013-04-23
- (파이낸셜뉴스) 발효울금, 간보호 활성화 확인 2014-01-21
- (서울신문) 발효울금 간보호효과와 항암효과 탁월 입증 2014-01-21

<p>발효울금, 간보호 활성 확인</p> <p>파이낸셜</p>	<p>사회 가제원료 울금, 건강음료로 변신</p> <p>한겨레</p>	<p>한국인스팜, 진도 울금 발효 간기능 개선 건강식품 원료 개발</p> <p>news1</p>	<p>'진도산 울금' 판로 안정에 힘 쓴다</p> <p>세계일보</p>
<p>발효울금, 간 보호에 항염효과 역할 입증</p> <p>서울신문</p>	<p>간 보호 효과 탁월한 '발효울금', 건강기능식품 사업화 창고 기대</p> <p>헤럴드</p>	<p>'진도산 울금' 안정적인 판로 확보, 한국인스팜과 유통협약</p> <p>중앙통신뉴스</p>	<p>가뭄 가제 원료 울금, 발효시켜 먹으면...</p> <p>매일경제</p>

(생로병사의 비밀) 향으로 건강을 유혹한다. 향신료 2014-03-19



(김경란의 비즈인사이드) 소리없이 병드는 간.. '발효울금'으로 해독하세요 2014-03-18



3. 특허, 논문 등 지식재산권 확보계획

가. 특허

- (1) 특허명 : 발효울금 분말을 함유한 알코올성 간손상 보호용 조성물
 - 출원국 : 대한민국
 - 출원일 : 2012.08.23
 - 출원번호 : 10-2012-0092198
- (2) 특허명 : 울금 비극성용매 가용 추출물 또는 이로부터 분리된 아로매틱-튜메론을 유효성분으로 함유하는 스트레스 관련 질환의 치료 및 예방을 위한 조성물
 - 출원국 : 대한민국
 - 출원일 : 2013.09.30
 - 출원번호 : 10-2013-0115995
- (3) 특허명 : 울금 추출물을 포함하는 면역증강용 조성물
 - 출원국 : 대한민국
 - 출원일 : 2013.09.30
 - 출원번호 : 10-2013-0115997

(4) 특허명 : **울금 추출물을 포함하는 전립선 비대증 예방 및 치료를 위한 조성물**

- 출원국 : 대한민국
- 출원일 : 2013.09.30
- 출원번호 : 10-2013-0115996

* * * * *

관인생략

출원번호통지서

출 원 일 자 2013.09.30
 작 기 사 항 심사청구(유) 공개신청(무)
 출 원 번 호 10-2013-0115996 (접수번호 1-1-2013-0882946-50)
 출 원 인 명 칭 한국인스람(주)(1-2008-027249-1) 외 1명
 대 리 인 명 칭 신동원(0-2000-000156-1)
 발 명 과 성 명 저용량 인공조 효노나 피코신 어정인 김승태 권우진 황권택 이우형 백종영 이기형
 발 명 의 명 칭 울금 비극성용에 사용 추출물 또는 어보우피 분리된 아도메킨-유도체를 주요 성분으로 함유하는 스트레스트라핀 결핍의 치료 및 예방을 위한 조성물

특 히 청 장

<< 안내 >>

1. 귀하의 출원은 위와 같이 정상적으로 접수되었으며, 이후의 심사 진행상황은 출원번호를 통해 확인하실 수 있습니다.
2. 출원에 따른 수수료는 접수일로부터 다음날까지 등록된 납입명세서에 성명, 납부자번호 등을 기재하여 가까운 우체국 또는 은행에 납부하여야 합니다.
 * 납부자번호 : 0121(기관코드) * 접수번호
3. 귀하의 주소, 연락처 등의 변경사항이 있을 경우, 즉시 [출원번호] 정보변경(명칭), 정보신고서]를 제출하여야 출원 이후의 각종 통지서를 정상적으로 받을 수 있습니다.
 * 특허포 [patent.go.kr] 접속 > 민원서비스자문코드 > 특허법 시행규칙 별지 제3호 지시
4. 특허(실용신안등록)출원은 명세서 또는 도면의 보장이 필요한 경우, 등록결정 이전 또는 의견서 제출기간 이내에 출원서에 최초로 첨부된 명세서 또는 도면에 기재된 사항의 범위 내에서 보정할 수 있습니다.
5. 외국으로 출원하고자 하는 경우 PCT 제도(특허, 실용신안)나 아드리프 제도(상표)를 이용할 수 있습니다. 국내출원일을 외국에서 인정받고자 하는 경우에는 국내출원일로부터 일정한 기간 내에 외국에 출원하여야 우선권을 인정받을 수 있습니다.
 * 제도 안내 : <http://www.kipo.go.kr>-특허야랑-PCT아드드리프
 * 우선권 인정기간 : 특허 : 실용신안은 12개월, 상표 : 디자인은 6개월 이내
 * 비국제적당료 등의 인용을 기초로 우리나라에 우선권주장할 수 있음. 인용할 때 비국제적당료, 우선권보장비 16개월 이내에 비국제적당료명에 [전자적교환허가서(TGSB29)]를 제출하거나 우리나라에 우선권 주장비용을 제출하여야 합니다.
6. 본 출원사실을 외국에 표시하고자 하는 경우에는 아래와 같이 하여야 하며, 이를 위반할 경우 권 인정명예에 따라 처벌을 받을 수 있습니다.
 * 특허출원 10-2010-0000000, 상표등록출원 40-2010-0000000
- * 특허출원 10-2010-0000000, 상표등록출원 40-2010-0000000

* * * * *

* * * * *

관인생략

출원번호통지서

출 원 일 자 2013.09.30
 작 기 사 항 심사청구(유) 공개신청(무)
 출 원 번 호 10-2013-0115997 (접수번호 1-1-2013-0882948-41)
 출 원 인 명 칭 한국인스람(주)(1-2008-027249-1) 외 2명
 대 리 인 명 칭 신동원(0-2000-000156-1)
 발 명 과 성 명 어정인 김승태 권우진 김진호 황권택 이우형 백종영 이기형 등
 발 명 의 명 칭 울금 추출물을 포함하는 전립선주장 조성물

특 히 청 장

<< 안내 >>

1. 귀하의 출원은 위와 같이 정상적으로 접수되었으며, 이후의 심사 진행상황은 출원번호를 통해 확인하실 수 있습니다.
2. 출원에 따른 수수료는 접수일로부터 다음날까지 등록된 납입명세서에 성명, 납부자번호 등을 기재하여 가까운 우체국 또는 은행에 납부하여야 합니다.
 * 납부자번호 : 0121(기관코드) * 접수번호
3. 귀하의 주소, 연락처 등의 변경사항이 있을 경우, 즉시 [출원번호] 정보변경(명칭), 정보신고서]를 제출하여야 출원 이후의 각종 통지서를 정상적으로 받을 수 있습니다.
 * 특허포 [patent.go.kr] 접속 > 민원서비스자문코드 > 특허법 시행규칙 별지 제3호 지시
4. 특허(실용신안등록)출원은 명세서 또는 도면의 보장이 필요한 경우, 등록결정 이전 또는 의견서 제출기간 이내에 출원서에 최초로 첨부된 명세서 또는 도면에 기재된 사항의 범위 내에서 보정할 수 있습니다.
5. 외국으로 출원하고자 하는 경우 PCT 제도(특허, 실용신안)나 아드리프 제도(상표)를 이용할 수 있습니다. 국내출원일을 외국에서 인정받고자 하는 경우에는 국내출원일로부터 일정한 기간 내에 외국에 출원하여야 우선권을 인정받을 수 있습니다.
 * 제도 안내 : <http://www.kipo.go.kr>-특허야랑-PCT아드드리프
 * 우선권 인정기간 : 특허 : 실용신안은 12개월, 상표 : 디자인은 6개월 이내
 * 비국제적당료 등의 인용을 기초로 우리나라에 우선권주장할 수 있음. 인용할 때 비국제적당료, 우선권보장비 16개월 이내에 비국제적당료명에 [전자적교환허가서(TGSB29)]를 제출하거나 우리나라에 우선권 주장비용을 제출하여야 합니다.
6. 본 출원사실을 외국에 표시하고자 하는 경우에는 아래와 같이 하여야 하며, 이를 위반할 경우 권 인정명예에 따라 처벌을 받을 수 있습니다.
 * 특허출원 10-2010-0000000, 상표등록출원 40-2010-0000000
- * 특허출원 10-2010-0000000, 상표등록출원 40-2010-0000000
7. 기타 심사 절차에 관한 사항은 등록된 안내서를 참조하시기 바랍니다.

* * * * *

* * * * *

관인생략

출원번호통지서

출 원 일 자 2013.09.30
 작 기 사 항 심사청구(유) 공개신청(무)
 출 원 번 호 10-2013-0115995 (접수번호 1-1-2013-0882946-50)
 출 원 인 명 칭 한국인스람(주)(1-2008-027249-1) 외 1명
 대 리 인 명 칭 신동원(0-2000-000156-1)
 발 명 과 성 명 저용량 인공조 효노나 피코신 어정인 김승태 권우진 황권택 이우형 백종영 이기형
 발 명 의 명 칭 울금 비극성용에 사용 추출물 또는 어보우피 분리된 아도메킨-유도체를 주요 성분으로 함유하는 스트레스트라핀 결핍의 치료 및 예방을 위한 조성물

특 히 청 장

<< 안내 >>

1. 귀하의 출원은 위와 같이 정상적으로 접수되었으며, 이후의 심사 진행상황은 출원번호를 통해 확인하실 수 있습니다.
2. 출원에 따른 수수료는 접수일로부터 다음날까지 등록된 납입명세서에 성명, 납부자번호 등을 기재하여 가까운 우체국 또는 은행에 납부하여야 합니다.
 * 납부자번호 : 0121(기관코드) * 접수번호
3. 귀하의 주소, 연락처 등의 변경사항이 있을 경우, 즉시 [출원번호] 정보변경(명칭), 정보신고서]를 제출하여야 출원 이후의 각종 통지서를 정상적으로 받을 수 있습니다.
 * 특허포 [patent.go.kr] 접속 > 민원서비스자문코드 > 특허법 시행규칙 별지 제3호 지시
4. 특허(실용신안등록)출원은 명세서 또는 도면의 보장이 필요한 경우, 등록결정 이전 또는 의견서 제출기간 이내에 출원서에 최초로 첨부된 명세서 또는 도면에 기재된 사항의 범위 내에서 보정할 수 있습니다.
5. 외국으로 출원하고자 하는 경우 PCT 제도(특허, 실용신안)나 아드리프 제도(상표)를 이용할 수 있습니다. 국내출원일을 외국에서 인정받고자 하는 경우에는 국내출원일로부터 일정한 기간 내에 외국에 출원하여야 우선권을 인정받을 수 있습니다.
 * 제도 안내 : <http://www.kipo.go.kr>-특허야랑-PCT아드드리프
 * 우선권 인정기간 : 특허 : 실용신안은 12개월, 상표 : 디자인은 6개월 이내
 * 비국제적당료 등의 인용을 기초로 우리나라에 우선권주장할 수 있음. 인용할 때 비국제적당료, 우선권보장비 16개월 이내에 비국제적당료명에 [전자적교환허가서(TGSB29)]를 제출하거나 우리나라에 우선권 주장비용을 제출하여야 합니다.
6. 본 출원사실을 외국에 표시하고자 하는 경우에는 아래와 같이 하여야 하며, 이를 위반할 경우 권 인정명예에 따라 처벌을 받을 수 있습니다.
 * 특허출원 10-2010-0000000, 상표등록출원 40-2010-0000000
- * 특허출원 10-2010-0000000, 상표등록출원 40-2010-0000000

* * * * *

* * * * *

관인생략

출원번호통지서

출 원 일 자 2013.09.30
 작 기 사 항 심사청구(유) 공개신청(무)
 출 원 번 호 10-2013-0115997 (접수번호 1-1-2013-0882948-41)
 출 원 인 명 칭 한국인스람(주)(1-2008-027249-1) 외 2명
 대 리 인 명 칭 신동원(0-2000-000156-1)
 발 명 과 성 명 어정인 김승태 권우진 김진호 황권택 이우형 백종영 이기형 등
 발 명 의 명 칭 울금 추출물을 포함하는 전립선주장 조성물

특 히 청 장

<< 안내 >>

1. 귀하의 출원은 위와 같이 정상적으로 접수되었으며, 이후의 심사 진행상황은 출원번호를 통해 확인하실 수 있습니다.
2. 출원에 따른 수수료는 접수일로부터 다음날까지 등록된 납입명세서에 성명, 납부자번호 등을 기재하여 가까운 우체국 또는 은행에 납부하여야 합니다.
 * 납부자번호 : 0121(기관코드) * 접수번호
3. 귀하의 주소, 연락처 등의 변경사항이 있을 경우, 즉시 [출원번호] 정보변경(명칭), 정보신고서]를 제출하여야 출원 이후의 각종 통지서를 정상적으로 받을 수 있습니다.
 * 특허포 [patent.go.kr] 접속 > 민원서비스자문코드 > 특허법 시행규칙 별지 제3호 지시
4. 특허(실용신안등록)출원은 명세서 또는 도면의 보장이 필요한 경우, 등록결정 이전 또는 의견서 제출기간 이내에 출원서에 최초로 첨부된 명세서 또는 도면에 기재된 사항의 범위 내에서 보정할 수 있습니다.
5. 외국으로 출원하고자 하는 경우 PCT 제도(특허, 실용신안)나 아드리프 제도(상표)를 이용할 수 있습니다. 국내출원일을 외국에서 인정받고자 하는 경우에는 국내출원일로부터 일정한 기간 내에 외국에 출원하여야 우선권을 인정받을 수 있습니다.
 * 제도 안내 : <http://www.kipo.go.kr>-특허야랑-PCT아드드리프
 * 우선권 인정기간 : 특허 : 실용신안은 12개월, 상표 : 디자인은 6개월 이내
 * 비국제적당료 등의 인용을 기초로 우리나라에 우선권주장할 수 있음. 인용할 때 비국제적당료, 우선권보장비 16개월 이내에 비국제적당료명에 [전자적교환허가서(TGSB29)]를 제출하거나 우리나라에 우선권 주장비용을 제출하여야 합니다.
6. 본 출원사실을 외국에 표시하고자 하는 경우에는 아래와 같이 하여야 하며, 이를 위반할 경우 권 인정명예에 따라 처벌을 받을 수 있습니다.
 * 특허출원 10-2010-0000000, 상표등록출원 40-2010-0000000
- * 특허출원 10-2010-0000000, 상표등록출원 40-2010-0000000
7. 기타 심사 절차에 관한 사항은 등록된 안내서를 참조하시기 바랍니다.

* * * * *

나. 논문

(1) 제목 : RAW 264.7 세포에서 발효 울금 추출물의 면역 조절 효과

- 저자 : 유선아 외
- 게재지 : 한국식품영양과학회지

(2) 제목 : 면역결핍 동물모델에서 울금 주정 추출물의 면역조절 효과

- 저자 : 김옥경 외

- 게재지 : 한국식품영양과학회지
- (3) 제목 : Prevention of ethanol-induced hepatotoxicity by fermented *Curcuma longa* L. in C57BL/6 mice
 - 저자 : 이모은 외
 - 게재지 : Food science and biotechnology
- (4) 제목 : 울금 추출물의 5-Alpha Reductase II 활성 저해 효과
 - 저자 : 김종연 외
 - 게재지 : 한국식품영양과학회지
- (5) 제목 : 발효울금 주정추출물부터 분리된 에틸아세테이트 분획물에 대한 3T3-L1 세포에서의 지방형성 억제효과
 - 저자 : 김지혜 외
 - 게재지 : 한국식품영양과학회지
- (6) 제목 : 발효울금 50% 에탄올 추출물의 라디칼 소거능 및 지방형성 억제효과
 - 저자 : 김지혜 외
 - 게재지 : 한국식품영양과학회지
- (7) 제목 : Anti-stress effect of n-hexane and n-buOH fraction from *Curcuma longa* Linn against hydrocortisone-induced cell death in SH-SY5Y cells and the forced swimming test in ICR mice.
 - 저자 : 오교녀 외
 - 게재지 : Animal cells ans system
- (8) 제목 : 울금 추출물의 코르티코스테론에 의해 유도된 세포독성에 대한 보호효과
 - 저자 : 오교녀 외
 - 게재지 : 한국식품영양과학회
- (9) 제목 : *Curcuma Longa* Linne protects Cerebral cortex neuron cells from Corticosterone-induced cell death
 - 저자 : 오교녀 외
 - 게재지 : 한국식품영양과학회
- (10) 제목 : 울금 주정추출물이 자연살해세포와 T면역세포에 미치는 영향
 - 저자 : 하예진 외
 - 게재지 : 한국식품영양과학회
- (11) 제목 : 전립선비대 유발 rat에서 울금열수추출물의 염증 조절효과
 - 저자 : 이정윤 외
 - 게재지 : 한국식품영양과학회
- (12) 제목:Effect of Hot Water Extract from *Curcuma longa* L. on Experimental Benign Prostatic Hyperplasia in vivo
 - 저자 : 이정윤 외
 - 게재지 : Food chemistry

다. 학술발표

- 국내학술발표

- (1) 일자 : 2012년 10월 31일~11월 2일
 - 대회명 : 한국식품영양과학회
 - Effect of Various Extracts from *Curcuma longa* L. on 5-Alpha Reductase Activity *in vitro*
 - 김종연외
- (2) 일자 : 2012년 10월 31일 ~ 11월 2일
 - 대회명 : 한국식품영양과학회
 - Inhibitory Activities of Fermented Turmeric and Its Partially Purified Compounds on MDA
 - 이모은외
- (3) 일자 : 2012년 10월 31일~11월 2일
 - 대회명 : 한국식품영양과학회
 - *In vitro* *Curcuma longa* L. and Fermented *Curcuma longa* L extracts inhibit the production of inflammatory mediators in lipopolysaccharide stimulated murine macrophages
 - 유선아외
- (4) 일자 : 2012년 10월 31일~11월 2일
 - 대회명 : 한국식품영양과학회
 - Study to Develop the Method of Processing of *Curcuma longa* Linne for Antidepressant
 - 오교녀외
- (5) 일자 : 2013년 8월 27일 ~ 8월 31일
 - 대회명 : 한국식품과학회
 - Hepatoprotective Effects of Flavonoids on Alcoholic Damage in HepG2/2E1 cells
 - 이모은외
- (6) 일자 : 2013년 8월 27일 ~ 8월 31일
 - 대회명 : 한국식품과학회
 - Anti-adipogenesis Effects of Ethanolic Extract from Fermented *Curcuma longa* L. in 3T3-L1
 - 김지혜외
- (7) 일자 : 2013년 11월 13일 (수) ~ 2013년 11월 15일 (금)
 - 대회명 : 2013년도 국제심포지엄 식품영양과학회 정기학술대회
 - Anti-stress Effect of N-hexane fraction and Ar-tumerone from *Curcuma longa* Linne in Korea Against Corticosterone-induced Cell Death in Cerebral Cortex
 - 오교녀외
- (8) 일자 : 2013년 11월 13일~11월15일
 - 대회명 : 한국식품영양과학회
 - Immunomodulatory effect of *Curcuma longa* L extract on LP-BM5 retrovirus induced immune deficient animal model

- 유선아의
- (9) 일자 : 2013년 11월 13일~11월15일
 - 대회명 : 한국식품영양과학회
 - Anti-adipogenesis Effects of 50% Ethanol Extract from Fermented *Curcuma longa* L.
 - 김지혜외
- (10) 일자 : 2014년 08월 26일
 - 대회명 : 한국식품과학회
 - 50% Ethanol Extract from Fermented *Curcuma longa* L. Regulates Adipogenesis Molecular Pathway in High-fat Diet Induced Obese Rats
 - 김지혜외
- (11) 일자 : 2014년 10월 28일
 - 대회명 : 한국식품영양과학회
 - Anti-inflammatory Effects of *Curcuma longa* L. Extracts on RAW 264.7 Cells
 - 오교녀외
- (12) 일자 : 2013년 10월 29일
 - 대회명 : 한국식품과학회
 - Anti-adipogenesis Effect of Ethyl Acetate Fraction from 50% Ethanol Extract of Fermented *Curcuma longa* L. in 3T3-L1 Cells
 - 김지혜외
- (13) 일자 : 2014년 8월 26일
 - 대회명 : 한국식품과학회
 - Fermented *Curcuma longa* L. (Turmeric) as Functional Food
 - 김용재
- (14) 일자 : 2014년 11월 28일
 - 대회명 : 한국식품저장유통학회
 - 유기농 곡물을 이용한 울금 스낵의 제조와 품질 및 관능특성
 - 김진영외
- (15) 일자 : 2013년 10월 31일
 - 대회명 : 한국식품영양과학회
 - Inhibitory effect of Hot water extract from *Curcuma longa* L. on testosterone propionate induced benign prostatic hyperplasia in vivo
 - 김중연외
- (16) 일자 : 2014년 8월 26일
 - 대회명 : 한국식품과학회
 - Effect of Hot Water Extract from *Curcuma Longa* L. on Proinflammatory Cytokines in BPH-induced Rats
 - 이정윤외
- (17) 일자 : 2014년 10월28일
 - 대회명:한국식품영양과학회

- Effects of Hot Water Extract from *Curcuma longa* L. against inflammation and Oxidative Stress in BPH-induced Rat
- 이정윤외

○ 국외학술발표

(1) 일자 : 2012년 8월 7일

- 장소 : 브라질 이과수 Rafain Palace Hotel & Convention Center
- 발표자 : 이모은외
- 제목 : 16th IUFOST World Congress of Food Science and Technology ‘ Addressing Global Food Security and Wellness through Food Science and Technology’ 학회 학술 발표



4. 추가연구, 타 연구에 활용 계획

가. 울금주정추출물의 항스트레스 연구

본 연구를 통하여 울금 80%주정 추출물의 항스트레스 활성을 확인하였으며, 연구결과를 논문으로 투고 하였으며, 울금의 마케팅에 활용 예정임, 추가 인체적용 임상연구를 통하여 개별인정형 건강기능식품으로 개발 예정임

나. 발효울금추출물의 체지방감소 연구

본 연구를 통하여 발효울금 50%주정 추출물의 체지방감소 활성을 확인하였으며, 연구결과를 논문으로 투고 하였으며, 발효울금의 마케팅에 활용 예정임, 추가 인체적용 임상연구를 통하여 개별인정형 건강기능식품으로 개발 예정임

다. 울금주정추출물의 면역증강 연구

본 연구를 통하여 울금 20%주정 추출물의 면역증강 활성을 확인하였으며, 연구결과를 논문으로 투고 하였으며, 현재 인체적용 임상연구가 진행 중으로서 향후 개별인정형 건강기능식품으로 개발 예정임

라. 울금추출물의 전립선건강 연구

본 연구를 통하여 울금 열수 추출물의 전립선건강 활성을 확인하였으며, 연구결과를 논문으로 투고 하였다, 울금의 마케팅에 활용 예정임, 추가 인체적용 임상연구를 통하여 개별인정형 건강기능식품으로 개발 예정임

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

1. 탄수화물 섭취 줄이면 과민성 대장증후군 안정에 도움돼

TITLE	Carbohydrates may offer IBS relief: Nutritional expert
Published	2014-06-16
Source of news	www.nutraingredients.com
원문	Reducing consumption of carbohydrate foods containing naturally occurring fibres and sugars may offer almost ‘instant’ relief from irritable bowel syndrome(IBS), according to nutrition consultant.

2. 프리바이오틱 섬유질, 비만환자의 신진대사 활동 개선

TITLE	Prebiotic fibers may improve metabolic factors in obese individuals: Study
Published	2014-06-16
Source of news	www.nutraingredients.com
원문	Daily supplements of Inulin-type fructans prebiotics may boost levels of veneficial Bifidybacteria species in the gut of obese people, and reduce metabolic risk factors, says a new study from the Université Catholique de Louvain in Belgium

3. 프리바이오틱, 2세 미만 어린이의 감염위험 낮춰

TITLE	Review links prebiotics with reduction in acute infection risk in children
Published	2014-06-17
Source of news	www.nutraingredients.com
원문	Prebiotics may help reduce the risk of serious infections in children under two years but more research is required, according to meta-analysis.

4. 다양한 폴리페놀 함께 섭취하면 생물학적 이용가능성 높아져

TITLE	Better together: Polyphenol may have greater bioavailability in combo with others
Published	2014-06-18
Source of news	www.nutraingredients.com
원문	The amount of polyphenols absorbed and used by the body may be greater when taken with other polyphenols, according to a research review of the antioxidants.

5. 운동과 고단백 식단 병행하면 장 내 박테리아 다양성 증가돼

TITLE	Exercise and high protein diet may increase gut microbiota diversity: Research
Published	2014-06-18
Source of news	www.nutraingredients.com
원문	Exercise and ‘extreme’ high protein diet could have beneficial impact on gut microbiota diversity, according to research published in the British Medical Journal.

6. 칼슘 플루오로붕산염, 무릎통증 완화에 도움돼

TITLE	Study finds calcium fructoborate lessens knee pain
Published	2014-06-23
Source of news	www.nutraingredients.com
원문	Calcium fructoborate may reduce knee pain as measured on two well-accepted scales, according to a recent study.

7. 프로바이오틱 섭취, 위장 및 상기도 감염 예방에 도움

TITLE	Probiotics may help elite athletes fight infections: Rugby study
Published	2014-06-24
Source of news	www.nutraingredients.com
원문	Daily probiotic supplements may reduce the incidence of gastrointestinal and upper respiratory tract infections for professional rugby players, says a new study from New Zealand.

8. 오메가 3의 골관절염 완화 효능 입증한 연구결과 발표

TITLE	Mouse data: Omega-3s reduce osteoarthritis severity
Published	2014-07-17
Source of news	www.nutraingredients.com
원문	Mice fed omega-3s had healthier joints than those fed diets high in saturated fats and omega-6 fatty acids, Duke University researchers say.

9. 마그네슘, 노년층 여성의 신체적 수행능력 끌어올려

TITLE	Magnesium supplements may boost physical performance for older women: RCT
Published	2014-07-21
Source of news	www.nutraingredients.com
원문	Daily supplementation with magnesium oxide in combination with a mild fitness program may boost the physical performance of healthy older women, says a new study.

10. 베타카로틴 풍부한 아보카도, 비타민 A 흡수 도와

TITLE	Avocado assists vitamin A absorption: Study
Published	2014-07-21
Source of news	www.nutraingredients.com
원문	Lipid-rich fresh avocado and beta-carotene rich foods improve bioavailability of the carotenoids from these foods and convert them into an active form of vitamin A, according to a study published in the Journal of Nutrition.

11. 레스베라트롤의 기억력 향상기능, 독일 연구결과 통해 입증

TITLE	Resveratrol supplements may improve memory performance in older adults: Study
Published	2014-07-30
Source of news	www.nutraingredients.com
원문	Daily supplements containing resveratrol may boost memory performance in association with improved glucose metabolism in older adults, says a new study from Germany.

12. 노년층의 칼슘보충제 섭취, 심장질환 위험과 무관한 것으로 밝혀져

TITLE	Meta-analysis confirms calcium doesn't raise heart disease risk for older women, CRN says
Published	2014-07-31
Source of news	www.nutraingredients.com
원문	A new meta-analysis has found that current evidence does not support the notion that calcium supplements increase the risk of heart disease in elderly women. The study reaffirms the safety and importance of the nutrient, says the Council for Responsible Nutrition.

13. 특수 프리바이오틱, 신바이오틱 개발에 기회가 될 것

TITLE	Is strain-specificity of prebiotics a limitation or opportunity?
Published	2014-08-11
Source of news	www.nutraingredients.com
원문	Strain-specificity of prebiotics is not a limiting factor but rather an opportunity to develop the ‘next generation’ of synbiotic formulations, says Winlove Probiotics in response to unflattering results of a study on synbiotics.

14. 커큐민, 항 우울제와 비등한 효능 입증돼

TITLE	Curcumin ingredient beats placebo in treating depression
Published	2014-08-18
Source of news	www.nutraingredients.com
원문	A recent study on a curcumin formulation branded as BCM-95 has shown the botanical to be more effective than a placebo in treating symptoms of major depression.

15. 해조류 섭취를 통해 요오드 결핍 예방할 수 있어

TITLE	Seaweed an effective alternative for iodine supplementation, study finds
Published	2014-08-18
Source of news	www.nutraingredients.com
원문	A study in the British Journal of Nutrition shows that seaweed supplementation can be an effective alternative for boosting the levels of iodine in women deficient in this vital nutrient.

16. 지속적인 오메가 3 섭취, 루게릭병 발병 위험 낮춰

TITLE	Omega-3 foods linked to Lou Gehrig disease risk reduction
Published	2014-08-21
Source of news	www.nutraingredients.com
원문	Eating foods high Omega 3 fatty acids may reduce the risk of developing the incurable neurodegenerative disease Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) a study suggests.

17. 오메가 3와 스테롤 함께 섭취 시 심혈관 기능에 긍정적 영향

TITLE	Low dose omega-3s and sterols effective for triglyceride and cholesterol reductions: Unilever study
Published	2014-08-28
Source of news	www.nutraingredients.com
원문	A combination of low dose omega-3s and plant sterols can effectively reduce both cholesterol and triglyceride levels in people with elevated cholesterol levels, says a new study that should allay fears over omega-3s negating the effects of sterols.

18. 레스베라트롤 섭취, 면역 시스템 조절에 순기능

TITLE	Resveratrol supplements may boost mitochondrial function: Mouse data
Published	2014-08-29
Source of news	www.nutraingredients.com
원문	Supplements containing the red wine polyphenol resveratrol may counter the detrimental effects of a high fat diet including restoring mitochondrial function suggest results of a study with mice.

-19. 커큐민, 노인 인지능력 및 정서안정에 도움 줄 수있어

TITLE	Curcumin may boost cognition and mood in a healthy older population: RCT
Published	2014-10-16
Source of news	www.nutraingredients.com
원문	Supplements of Longvida curcumin may boost working memory and mood in healthy older adults, say results from a randomized, double-blind, placebo-controlled study from Australia.

20. 혈당 조절 통해 당뇨병 예방하는 지방질 발견돼

TITLE	New class of ‘good’ fat could aid diabetes prevention
Published	2014-10-20
	www.nutraingredients.com
원문	The ‘surprising’ discovery of a previously unidentified class of lipid molecules that enhance insulin sensitivity and blood sugar control could offer a route to the prevention of type 2 diabetes, say researchers.

21. 엽산, 신경관결손 위험개선으로 기능성 표시 획득해

TITLE	Game changer? Folic acid wins EFSA health claim for neural tube defect risk reduction
Published	2014-11-10
Source of news	www.nutraingredients.com
원문	A newly approved EU health claim to say folic acid supplements reduce the risk of infant neural tube defects will bring home the nutrient’s importance to women, say a team of campaigners and trade groups behind the claim.

22. 항스트레스 관련 해외 제품

항스트레스 관련 건강보조식품

Philodenron 추출물 혼합성분으로
제조된 최초의 코티졸 보충제



	Amount per serving	%Daily value
Vitamin C	33 mg	55 %
pantothenic acid	10 mg	10 0%
Calicum	12 mg	1 %
Magmesium	8 mg	2 %
Chromium	20 mcg	17 %
Relora	200 mg	
Green tea extract (<i>Camellia sinensis</i>), 90 mg		
Soy lecithin, 50mg		
ashwaganda extact (<i>Withania somnifera, root</i>) 20 mg		
holy basil extract (<i>Ocimum tenuiflorum</i>) 20 mg		
Reishi mushroom (<i>Ganoderma lucidum</i>), 20 mg		
Banaba extgract (<i>Lagerstroemia speciosa</i>), 4 mg		

항스트레스 관련 건강보조식품

뇌를 깨우는 에너지 음료 (카페인 함유)



	Amount per serving	%Daily value
Calories	45	
Total Fat	0 g	0 %
Sodium	80 mg	3%
Total Carb (sugar)	15 g	5%
Protein (vitamin E, B6, B12)	0 g	0 %

Filter water, Cane sugar, Erythritol, citric acid, citicoline, natural Flavors, sodium citrate, Alpha glyceryl phosphoryl choline, Lycopene, Green Tea extract (95% caffeine), Beta carotene (as color), RebA (Stevia leaf extract), Soy lecithin

항스트레스 관련 건강보조 식품

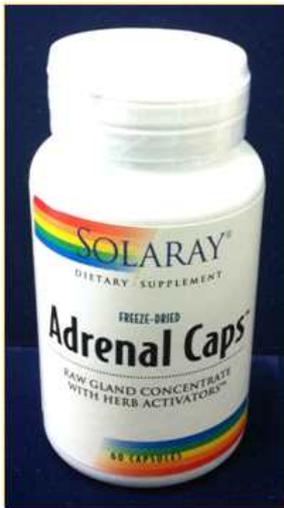
스트레스 완화 에너지 음료 (카페인 무첨가)



	Amount per serving	%Daily value
Calories	37	
Total carbohydrate	8 g	3 %
Sugar	8 g	3 %
PROPRIETARY EXTRACT BLEND	12.5 g	
Schisandra berry (<i>Schisandra chinensis</i>), Holy Basil leaf (<i>Ocimum sanctum</i>), Siberian Rhodiola root extract (<i>Rhodiola rosea</i>), Korean Ginseng root (<i>Panax ginseng</i>), Green Tea leaf (<i>Camellia sinensis</i>), Black Elderberry berries (<i>Sambucus nigra</i>), American ginseng root (<i>Panax quinquefolius</i>), Ginger root (<i>Zingiber officinale</i>), Fresh Nettle seed (<i>Urtica dioica</i>), Nettle leaf (<i>Urtica dioica</i>)		

항스트레스 관련 건강보조 식품

허브 농축액을 동결건조시킨 영양제



	Amount per serving	%Daily value
Adrenal (bovine)	340 mg	
Adrenal caps Proprietary herb activators Eleuthero (<i>Eleutherococcus senticosus</i> , root) Licorice (<i>Glycyrrhiza glabra</i> , root) Clove (<i>Syzygium aromaticum</i> , flower)	430 mg	
Gelatine capsule and 100% natural homeopathic cell salts (Calcium phosphate 3x, Iron phosphate 3x, Potassium phosphate 3x and Sodium phosphate 6x)		

항스트레스 관련 건강보조 식품

항스트레스 및 항상성 유지



	Amount per serving
Calories	20
Siberian Rhodiola root extract (<i>Rhodiola rosea</i>)	120 mg (6 mg Rosavins)
Holy Basil leaf : Supercritical CO ₂ extract (<i>Ocimum sanctum</i>)	50 mg (3.86 mg total Eugenols)
PROPRIETARY EXTRACT BLEND	350 mg
Ashwagandha root (<i>Withania somnifera</i>) Holy Basil leaf (<i>Ocimum sanctum</i>), Wild Oats milky seed fresh (<i>Avena sativa</i>) Schisandra berry (<i>Schisandra chinensis</i>)	

항스트레스 관련 건강보조 식품

아로마테라피 흡입기 (에센셜 오일 함유)
- 뇌기능 향상 및 활기를 복돋아 줌



	Amount per serving	%Daily value
Calories	37	
Total carbohydrate	8 g	3 %
Sugar	8 g	3 %
PROPRIETARY EXTRACT BLEND	12.5 g	
Organic Black Pepper (<i>Piper nigrum</i>), Organic Peppermint (<i>Mentha x piperita</i>), Organic Ginger (<i>Zingiber officinale</i>), Organic Rosemary Cineole (<i>Rosmarinus officinalis var Cineole</i>)		

제 7 장 연구시설·장비 현황

없음

제 8 장 참고문헌

1. 식품의약품 안전처 : 식품공전(2014.10.21.)
2. 식품의약품안전처고시 : 식품, 식품첨가물 및 건강기능식품의 유통기한 설정기준(2014.9)
3. 식품의약품안전처 : 식품의 유통기한 설정 시험 가이드라인(2013.12)
4. 비파엽추출물 건강기능식품 기능성 원료 인정서 2014-46호
5. 농수산물유통공사. 2010. 가공식품 세분화 시장 현황조사 : 스낵시장 편. p 13-30.
6. Harper, J. M. 1989. Food extruders and their applications. p. 1-15. In Mercier et al. (ed.) Extrusion Cooking., St. Paul, MN, American Association of Cereal Chemists
7. Lee GH. 2011. Extrusion Characteristics for the Snack of Corn Using Twin-screw Extruder. *Journal of Agricultural, Life and Environmental Sciences* 23: 47-52.
8. Cheftel, J. C., Kitagawa, M., Queguiner, C. 1992. New protein texturization processes by extrusion cooking at high moisture levels. *Food Reviews International* 8: 235-275.
9. 한국과학기술정보연구원. 2014 KISTI MARKET REPORT 8: 16-19
10. Mora F1, Segovia G, Del Arco A, de Blas M, Garrido P. 2012. Stress, neurotransmitters, corticosterone and body-brain integration. *Brain Res* 2;1476:71-85.
11. R. Bowen. 2006. Control of Cortisol Secretion.
12. Tatro ET1, Everall IP, Kaul M, Achim CL. 2009. Modulation of glucocorticoid receptor nuclear translocation in neurons by immunophilins FKBP51 and FKBP52: implications for major depressive disorder. *Brain Res* 25;1286:1-12
13. McEwen BS. 2005. Glucocorticoids, depression, and mood disorders: structural remodeling in the brain. *Metabolism* 54:20-3
14. Graeff FG1, Guimarães FS, De Andrade TG, Deakin JF. 1996. Role of 5-HT in stress, anxiety, and depression. *Pharmacol Biochem Behav* ;54(1):129-41
15. C. Stasi, M. Bellini, G. Bassotti, C. Blandizzi, S. Milani. 2014. Serotonin receptors and their role in the pathophysiology and therapy of irritable bowel syndrome. *Techniques in Coloproctology* Vol 18, Issue 7, pp 613-621
16. M. Ruat, E. Traiffort, J.M. Arrang, J. Tardivellacombe, J. Diaz, R. Leurs, J.C. Schwartz. 1993. A Novel Rat Serotonin (5-HT6) Receptor: Molecular Cloning, Localization and Stimulation of cAMP Accumulation. *Biochemical and Biophysical Research Communications* Vol 193, Issue1. 268-276
17. Taiwo YO, Levine JD. 1991. Further confirmation of the role of adenylyl cyclase and of cAMP-dependent protein kinase in primary afferent hyperalgesia. *Neuroscience* 44(1):131-135
18. Gary M. Kammer. 1998. The adenylyl cyclase-cAMP-protein kinase A pathway and regulation of the immune response. *Immunology Today* Volume 9, Issues 7-8, 222-229.
19. Chaoyang Xue, Yong-Sun Bahn, Gary M. Cox, and Joseph Heitman. 2006. G Protein-coupled Receptor Gpr4 Senses Amino Acids and Activates the cAMP-PKA Pathway in *Cryptococcus neoformans*. *Molecular Biology of the Cell*. Vol. 17, 667-679.
20. Kevin B. Baker and Jeansok J. Kim. 2002. Effects of Stress and Hippocampal NMDA

Receptor Antagonism on Recognition Memory in Rats. *LEARNING & MEMORY* 9:58-65

21. Mariusz Papp, Elżbieta Moryl. 1994. Antidepressant activity of non- competitive and competitive NMDA receptor antagonists in a chronic mild stress model of depression. *European Journal of Pharmacology* Volume 263, Issues 1-2, 22:1-7
22. Frank J.S. Lee, Sheng Xue, Lin Pei, Brian Vukusic¹, Nadege Chéry¹, Yushan Wang, Yu Tian Wang, Hyman B. Niznik, Xian-min Yu¹, Fang Liu. 2002. Dual Regulation of NMDA Receptor Functions by Direct Protein-Protein Interactions with the Dopamine D1 Receptor. *cell* 219-230
23. Hirotake Takaia, Kei-ichi Katayamaa, Akira Yasoshimaa, Koji Uetsukaa, Hiroyuki Nakayamaa, Kunio Doia. NMDA-induced apoptosis in the developing rat brain. 2003. *Experimental and Toxicologic Pathology* 33-37.
24. Hamin Lee 1, Sungwon Roh 2 and Dai Jin Kim. 2009. Alcohol-Induced Blackout. *International journal of environmental research and public health* 2783-2792.
25. Higuchi K, Yoda Y, Amagase K, Kato S, Tokioka S, Murano M, Takeuchi K, Umegaki E. 2009. Prevention of NSAID-Induced Small Intestinal Mucosal Injury: Prophylactic Potential of Lansoprazole. *J Clin Biochem Nutr* 125-130.
26. Korean National Statistical Office. 2010. Annual report on the cause of death statistics. p 6-7.
27. Korean National Statistical Office. 2007. Annual report on the cause of death statistics. p 6-7.
28. 이진호, 2007. 알코올성 간질환의 치료. *대한내과학회지* 72(1): 113-115
29. Lieber CS. 1994. Alcohol and the liver: 1994 Update. *Gastroenterol* 106: 1085-1105.
30. Ramchandani VA, Bosron WF, Li TK. 2001. Research advances in ethanol metabolism. *Pathol Biol* 49: 676-682.
31. Park SC. 1993. Ethanol oxidation is accelerated by augmentation of malate-aspartate shuttle with aspartate. *Kor J Biochem* 25: 137-143.
32. Jörnvall H, Höög JO, Bahr-Lindström H, Johanson J, Kaiser R, Person R. 1988. Alcohol dehydrogenase and aldehyde dehydrogenase. *Biochem Soc Trans* 16: 223-227.
33. Castillo T, Koop DR, Kamimura S, Triadafilopoulos G, Tsukamoto H. 1992. Role of cytochrome P-450 2E1 in ethanol-, carbon tetrachloride and iron-dependent microsomal lipid peroxidation. *Hepatology* 16: 992-996. 5. García-Ruiz C, Morales A, Ballesta A, Rodés
34. 식품의약품안전청. 2012. 건강기능식품의 기능성원료 인정 현황
35. Kim HJ, Jeon SM, Lee MK, Jung UJ, Shin SK, Choi MS. 2009. Antilipogenic effect of green tea extract in C57BL/6J-Lep^{ob/ob} mice. *Phytother Res* 23:467-471.
36. Kim HJ, Yun YR, Song YB, Song YO. 2008. Anti-lipogenic effects of Tannic acid 3T3-L1 adipocytes and in high fat diet-fed rats. *Food Sci Biotechnol* 17:362-366.
37. Ahima RS, Flier JS. 2000. Adipose tissue as an endocrine organ. *Trends Endocrinol. Metab* 11(8):327-332.
38. White UA, Stephens JM. 2010. Transcriptional factors that promote formation of white adipose tissue. *Mol Cell Endocrinol* 318: 10-14.

39. Kolehmainen M, Vidal H, Alhava E, Uusitupa MI. 2001. Sterol regulatory element binding protein 1c (SREBP-1c) expression in human obesity. *Obes Res* 9: 706-712.
40. Kohjima M, Higuchi N, Kato M. 2008. SREBP-1c, regulated by the insulin and AMPK signaling pathways, plays a role in nonalcoholic fatty liver disease. *Int J Mol Med* 21: 507-511.
41. Cha SY, Jang JY, Lee YH, Lee G, Lee HJ, Hwang KT, Kim Y, Jun W, Lee JM. 2010. Lipolytic effect of methanol extracts from *Iuffa cylindrica* in mature 3T3-L1 adipocytes. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 39: 813-819.
42. Lee KJ, Ma JY, Kim YS. 2012. Identification of curcuminoids from turmeric (*Curcuma longa*) using ultrasonic wave and dipping method. *Korean Soc Biotechnol Bioeng* 27: 33-39.
43. An BJ, Lee JY, Park TS, Pyeon JR, Bae HJ, Song MA, Baek EJ, Park JM, Son JH, Lee CE, Choi KI. 2006. Antioxidant activity and whitening effect of extraction conditions in *Curcuma longa* L. *Korean J Med Crop Sci* 14: 168-172.
44. Kim Y, You Y, Jun W. 2012. Hepatoprotective activity of fermented *Curcuma longa* L. on galactosamine-intoxicated rats. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 41: 790-795.
45. Ho JN, Jang JY, Yoon HG, Kim YJ, Kim SO, Jun WJ, Lee JM. 2012. Anti-obesity effect of a standardised ethanol extract from *Curcuma longa* L. fermented with *Aspergillus oryzae* in *ob/ob* mice and primary mouse. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 92(9):1833-1840.
46. Jang JY. 2010. lipolytic effect of curcuma longa L. ethanol extract fermented by *Aspergillus oryzae* on intracellular lipolysis in 3T3-L1 adipocytes and weight loss in *ob/ob* mice. Kyung hee university Master's Thesis
47. Holm C. 2003. Molecular mechanism regulating hormone-sensitive lipase and lipolysis. *Biochem Soc Trans* 31:1120-1124.
48. Fushiki H, Hayakawa Y, Gomori A, Soe T, Tewaru S, Ozaki S, Yoshimoto R. 2010. In vivo imaging of obesity-induced inflammation in adipose tissue. *Biochem Biophys Res Commun.* 391:674-678.
49. Ejaz A, Wu DY, Kwan P, Meydani M. 2009. Curcumin inhibits adipogenesis in 3T3-L1 adipocytes and angiogenesis and obesity in C57/BL mice¹⁻³. *Am Soc Nutrition* 139(5)919-925.
50. Ho JN, Choi JW, Lim WC, Kim MK, Lee IY, Cho HY. 2012. Kefir inhibits 3T3-L1 adipocyte differentiation through down-regulation of adipogenic transcription factor expression. *J Sci Food Agric* 93(3):485-490.
51. Tong L, Harwood HJ. 2006. Acetyl-coenzyme A carboxylases: versatile targets for drug discovery. *Journal of cellular biochemistry* 99:1476-1488.
52. Freedman DS, Serdula MK, Percy CA, Ballew C, Whittle L. 1997. Obesity levels of lipids and glucose, and smoking among Navajo adolescents. *J Nutr* 127:2120S-2127S.
53. Park HJ, Della-Fera MA, Hausman DB, Rayalam S, Ambati S, Baile CA. 2009. Genestein inhibits differentiation of primary human adipocytes. *J Nurt Biochem* 20:140-148.

54. H. Tilg, AR. Moschen. 2006. Adipocytokines: mediators linking adipose tissue, inflammation and immunity. *Nat Rev Immunol* 6(10): 772-783.
55. McNeel RL, Mersmann HJ. 2003. Effects of isomers of conjugated linoleic acid on porcine adipocyte growth and differentiation. *J Nutr Biochem* 14: 266-274.
56. Clifford GM, Londos C, Kraemer FB, Vernon RG, Yeaman SJ. 2000. Translocation of hormone-sensitive lipase and perilipin upon lipolytic stimulation of rat adipocytes. *J Biol Chem* 27: 5011-5015.
57. Kim MS, Chun SS, Kim SH, Choi JH. 2012. Effect of turmeric (*Curcuma longa*) on bile acid and UDP-glucuronyl transferase activity in rats fed a high-fat and cholesterol diet. *J Life Sci* 22: 1064-1070.
58. Kim HJ, Lee JW, Kim YD. 2011. Antimicrobial activity and antioxidant effect of *Curcuma longa*, *Curcuma aromatica* and *Curcuma zedoaria*. *Korean J Food Preserv* 18: 219-225.
59. An BJ, Lee JY, Park TS, Pyeon JR, Bae HJ, Song MA, Baek EJ, Park JM, Son JH, Lee CH, Choi KI. 2006. Antioxidant activity and whitening effect of extraction conditions in *Curcuma longa* L. *Korean J Medicinal Crop Sci* 14: 168-172.
60. Ghosh DK, Stuehr DJ. 1995. Macrophage NO synthase: characterization of isolated oxygenase and reductase domains reveals a head-to-head subunit interaction. *Biochemistry* 34: 801-807
61. Martinez FO, Sica A, Mantovani A, Locati M. 2008. Macrophage activation and polarization. *Front Biosci* 13: 453-461.
62. Szabó C. 1995. Alterations in nitric oxide production in various forms of circulatory shock. *New Horiz* 3: 2-32.
63. West MA, Bennet T, Seatter SC, Clair L, Bellingham J. 1997. LPS pretreatment reprograms macrophage LPS-stimulated TNF and IL-1 release without protein tyrosine kinase activation. *J Leukoc Biol* 61: 88-95.
64. Tracey KJ, Cerami A. 1994. Tumor necrosis factor: a pleiotropic cytokine and therapeutic target. *Annu Rev Med* 45:491-503.
65. Dokun AO, Kim S, Smith HR, Kang HS, Chu DT, Yokoyama WM. 2001. Specific and nonspecific NK cell activation during virus infection. *Nat Immunol* 2: 951-956.
66. Sarkar D, Fisher PB. 2006. Molecular mechanisms of aging-associated inflammation. *Cancer Lett* 236: 13-23.
67. Fierro IM, Serhan CN. 2001. Mechanisms in anti-inflammation and resolution: the role of lipoxins and aspirin-triggered lipoxins. *Braz J Med Biol Res* 34: 555-566.
68. Higuchi M, Higashi N, Taki H and Osawa T. 1990. Cytolytic mechanism of activated macrophages. Tumor necrosis factor and L-arginine-dependent mechanism act as synergistically as the major cytolytic mechanism of activated macrophages. *J Immunol* 144: 1425-1431.
69. Iida R, Saito K, Yamada K, Basile AS, Sekikawa K, Takemura M, Fujii H, Wada H, Seishima M, Nabeshima T. 2000. Suppression of neurocognitive damage in LP-BM5-infected mice with a targeted deletion of the TNF-alpha gene. *FASEB J* 14:

1023-1031.

70. Liang B, Wang JY, Watson RR. 1996. Murine AIDS, a key to understanding retrovirus-induced immunodeficiency. *Viral Immunol* 9: 225-239.
71. Odeleye OE, Eskelson CD, Watson RR. 1992. Changes in hepatic lipid composition after infection by LP-BM5 murine leukemia virus causing murine AIDS. *Life Sci* 51: 129-134.
72. Zimmerli SC, Harari A, Cellerai C, Vallelian F, Bart PA, Pantaleo G. 2005. HIV-1-specific IFN-gamma/IL-2-secreting CD8 T cells support CD4-independent proliferation of HIV-1-specific CD8 T cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 102: 7239-7244.
73. Biswas P, Poli G, Kinter AL, Justement JS, Stanley SK, Maury WJ, Bressler P, Orenstein JM, Fauci AS. 1992. Interferon gamma induces the expression of human immunodeficiency virus in persistently infected promonocytic cells (U1) and redirects the production of virions to intracytoplasmic vacuoles in phorbol myristate acetate-differentiated U1 cells. *J Exp Med* 176: 739-750.
74. Peacock CD, Price P. 1999. The role of IL-12 in the control of MCMV is fundamentally different in mice with a retroviral immunodeficiency syndrome (MAIDS). *Immunol Cell Biol* 77: 131-138.
75. Yoshikai Y, Nishimura H. 2000. The role of interleukin 15 in mounting an immune response against microbial infections. *Microbes Infect* 2: 381-389.
76. Paul WE. 1991. Interleukin-4: a prototypic immunoregulatory lymphokine. *Blood* 77: 1859-1870.
77. Peters M, Jacobs S, Ehlers M, Vollmer P, Müllberg J, Wolf E, Brem G, Meyer zum Büschenfelde KH, Rose-John S. 1996. The function of the soluble interleukin 6 (IL-6) receptor in vivo: sensitization of human soluble IL-6 receptor transgenic mice towards IL-6 and prolongation of the plasma half-life of IL-6. *J Exp Med* 183: 1399-1406.
78. Vieira PL, Christensen JR, Minaee S, O'Neill EJ, Barrat FJ, Boonstra A, Barthlott T, Stockinger B, Wraith DC, O'Garra A. 2004. IL-10-secreting regulatory T cells do not express Foxp3 but have comparable regulatory function to naturally occurring CD4+CD25+ regulatory T cells. *J Immunol* 172: 5986-5993.
79. Fernández-Ortega C, Dubed M, Ramos Y, Navea L, Alvarez G, Lobaina L, López L, Casillas D, Rodríguez L. 2004. Non-induced leukocyte extract reduces HIV replication and TNF secretion. *Biochem Biophys Res Commun* 325: 1075-1081.
80. Gougeon ML, Lecoœur H, Dulioust A, Enouf MG, Crouvoiser M, Goujard C, Debord T, Montagnier L. 1996. Programmed cell death in peripheral lymphocytes from HIV-infected persons: increased susceptibility to apoptosis of CD4 and CD8 T cells correlates with lymphocyte activation and with disease progression. *J Immunol* 156: 3509-3520.
81. Moir S, Malaspina A, Li Y, Chun TW, Lowe T, Adelsberger J, Baseler M, Ehler LA, Liu S, Davey RT Jr, Mican JA, Fauci AS. 2000. B cells of HIV-1-infected patients bind virions through CD21-complement interactions and transmit infectious virus to activated T cells. *J Exp Med* 192: 637-646.
82. Moir S, Buckner CM, Ho J, Wang W, Chen J, Waldner AJ, Posada JG, Kardava L, O'Shea

- MA, Kottlil S, Chun TW, Proschan MA, Fauci AS. 2010. B cells in early and chronic HIV infection: evidence for preservation of immune function associated with early initiation of antiretroviral therapy. *Blood* 116: 5571-5579.
83. Kawakami T, Galli SJ. 2002. Regulation of mast-cell and basophil function and survival by IgE. *Nat Rev Immunol* 2: 773-786.
84. Unkeless JC, Scigliano E, Freedman VH. 1988. Structure and function of human and murine receptors for IgG. *Annu Rev Immunol* 6 :251-281.
85. Woof JM, Kerr MA. 2004. IgA function-variations on a theme. *Immunology* 113: 175-177.
86. Pedersen BK, Ullum H. 1994. NK cell response to physical activity: possible mechanisms of action. *Med Sci Sports Exerc* 26: 140-146.
87. Whiteside TL, Herberman RB. 1995. The role of natural killer cells in immune surveillance of cancer. *Curr Opin Immunol* 7: 704-710.
88. Lanier LL. 1998. NK cell receptors. *Annu Rev Immunol* 16: 359-393.
89. Wright SC, Bonavida B. 1983. YAC-1 variant clones selected for resistance to natural killer cytotoxic factors are also resistant to natural killer cell-mediated cytotoxicity. *Proc Natl Acad Sci USA* 80: 1688-1692.
90. Borrego F, Robertson MJ, Ritz J, Peña J, Solana R. 1999. CD69 is a stimulatory receptor for natural killer cell and its cytotoxic effect is blocked by CD94 inhibitory receptor. *Immunology* 97: 159-165.
91. Sivori S, Vitale M, Morelli L, Sanseverino L, Augugliaro R, Bottino C, Moretta L, Moretta A. 1997. p46, a novel natural killer cell-specific surface molecule that mediates cell activation. *J Exp Med* 186: 1129-1136.
92. Sivori S, Pende D, Bottino C, Marcenaro E, Pessino A, Biassoni R, Moretta L, Moretta A. 1999. NKp46 is the major triggering receptor involved in the natural cytotoxicity of fresh or cultured human NK cells. Correlation between surface density of NKp46 and natural cytotoxicity against autologous, allogeneic or xenogeneic target cells. *Eur J Immunol* 29: 1656-1666.
93. Wang R, Jaw JJ, Stutzman NC, Zou Z, Sun PD. 2012. Natural killer cell-produced IFN- γ and TNF- α induce target cell cytolysis through up-regulation of ICAM-1. *J Leukoc Biol* 91: 299-309.
94. Vivier E, Raulet DH, Moretta A, Caligiuri MA, Zitvogel L, Lanier LL, Yokoyama WM, Ugolini S. 2011. Innate or adaptive immunity? The example of natural killer cells. *Science* 331: 44-49.
95. Teh HS, Kisielow P, Scott B, Kishi H, Uematsu Y, Blüthmann H, von Boehmer H. 1988. Thymic major histocompatibility complex antigens and the alpha beta T-cell receptor determine the CD4/CD8 phenotype of T cells. *Nature* 335: 229-233.
96. Shedlock DJ, Shen H. 2003. Requirement for CD4 T cell help in generating functional CD8 T cell memory. *Science* 300: 337-339.
97. Powrie F, Coffman RL. 1993. Cytokine regulation of T-cell function: potential for therapeutic intervention. *Immunol Today* 14: 270-274.

98. Furtado GC, Curotto de Lafaille MA, Kutchukhidze N, Lafaille JJ. 2002. Interleukin 2 signaling is required for CD4(+) regulatory T cell function. *J Exp Med* 196: 851-857.
99. Blackburn SD, Shin H, Haining WN, Zou T, Workman CJ, Polley A, Betts MR, Freeman GJ, Vignali DA, Wherry EJ. 2009. Coregulation of CD8+ T cell exhaustion by multiple inhibitory receptors during chronic viral infection. *Nat Immunol* 10: 29-37.
100. Cao N, Haynes JM, Ventura S. 2013. SawPalmetto Is an Indirectly Acting Sympathomimetic in the Rat-Isolated Prostate Gland. *Prostate* 66:115 -123
101. Kim YN1, Kim MS, Chun SS, Choi JH. 2013. Effect of Phellius linteus water extract on benign prostatic hyperplasia. *Nutr Res Pract.* 7:172-7
102. Suzuki M, Ito Y, Fujino T, Abe M, Umegaki K, Onoue S, Noguchi H, Yamada S.2009. Pharmacological effects of saw palmetto extract in the lower urinary tract. *Acta Pharmacol Sin.* 3: 227-81.
103. Kerkhofs S, Dubois V, De Gendt K, Helsen C, Clinckemalie L, Spans L, Schuit F, Boonen S, Vanderschueren D, Saunders PT, Verhoeven G, Claessens F. 2012. A role for selective androgen response elements in the development of the epididymis and the androgen control of the 5 α reductase II gene. *FASEB J.* 26: 4360-72
104. Zhu YS, Imperato-McGinley JL. 2009. 5 α -Reductase Isozymes and Androgen Actions in the Prostate. *Ann N Y Acad Sci.* 1155: 43-56.
105. Steers WD. 2001. 5 α -reductase activity in the prostate, *Urology*, 58: 65-70
106. Gravas S, Oelke M. 2010. Current status of 5 α -reductase inhibitors in the management of lower urinary tract symptoms and BPH. *World J Urol.* 28:9-15.
107. Kramer G, Marberger M. 2006. Could inflammation be a key component in the progression of benign prostatic hyperplasia? *Curr Opin Urol.* 16:25-9.
108. Sciarra A, Mariotti G, Salciccia S, Autran Gomez A, Monti S, Toscano V, Di Silverio F. 2008. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 108:254-60
109. Sikka SC.2003.Role of oxidative stress response elements and antioxidants in prostate cancer pathobiology and chemoprevention—a mechanistic approach. *Curr Med Chem.* 10:2679-92.

주 의

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