

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “밀의 물추출물을 활용한 기억력개선용 건강기능제품의 개발에 관한 연구”
과제의 보고서로 제출합니다.

2015년 01월 30일

주관연구기관명 : 대 구 가 톨 릭 대학교

주관연구책임자 : 이 종 원

세부연구책임자 : 이 종 원

연 구 원 : 최 홍 집

연 구 원 : 임 선 하

연 구 원 : 김 기 홍

협동연구기관명 : 계 명 대 학 교

협동연구책임자 : 장 정 희

협동연구기관명 : 동 아 원 (주)

협동연구책임자 : 최 우 섭

협동연구기관명 : 전 북 대 학 교 병 원

협동연구책임자 : 채 수 완

요 약 문

I. 제 목

밀의 물추출물을 활용한 기억력개선용 건강기능제품의 개발

II. 연구개발의 목적 및 필요성

1. 목적

- 기능성분을 많이 함유하는 밀품종을 선별하여 통밀 또는 밀기울을 열수추출한 후 추출물 전체를 드럼건조한 추출물 (“추출혼합물”) 또는 상등액을 인체시험을 통해 기억력개선용 개별인증형 건강기능제품으로 개발하고자 함.

2. 필요성

- 실험실 규모에서 통밀을 분쇄하여 열수추출한 후 얻은 상등액을 건조한 통밀추출물을 이용하여 세포 및 동물시험을 실시한 결과 기억력을 개선시키는 기능이 있는 것을 선행연구에서 밝혔음. 이러한 연구결과를 이용하여 밀추출물을 광고 등을 통해 일반인이 섭취가 가능하도록 하기 위해서는 식품의약품안전처에서 인정하는 인지기능개선용 건강기능식품으로 허가를 받는 것이 필수적임. 이를 위해서는 우선 기능성원료로 인정을 받아야 하며 이를 위해서는 필요한 자료 (제조방법, 원료의 특성, 지표성분에 대한 규격, 안전성, 기능성)를 확보하는 다양한 실험을 실시할 필요성이 있음.

III. 연구개발 내용 및 범위(필요에 따라 제목을 달리할 수 있음)

1. 내용

- 전체 내용은 밀추출물을 인지기능개선용 기능성원료로 인정을 받은 후 이를 이용하여 건강기능제품으로 개발하는 것임. 이 과정에서 섭취량을 줄이기 위해 기능성분 (아라비노자일란과 아라비노갈락탄-펩티드) 고함유 밀품종을 선별하는 것도 포함하고 있음.

2. 범위

가. 인지기능개선용 기능성원료 인정 획득

- 원료확보 (추출혼합물)를 위한 제조방법 확립
- 추출혼합물의 기능 (지표)성분 규격설정
- 추출혼합물의 비인체실험 (*in vitro*, *in vivo*)을 통한 기능성 확인
- 추출혼합물의 독성유무 확인을 통한 안전성 확인
- 추출혼합물의 장기보존시험 등을 통한 안정성 확인
- 추출혼합물의 인체시험을 통한 기능성 확인
- 추출혼합물의 기능성원료로 식약처 인정획득

나. 인지기능개선용 건강기능제품

- 대표적으로 프리믹스로서의 가능성 타진

다. 기능성분 고함유 밀품종 선별 및 재배

- 문헌상으로부터 아라비노자일란을 많이 포함하는 국내외 밀품종 선별
- 선별된 밀품종의 국내재배
- 선별된 밀품종의 아라비노자일란 함량 측정
- 선별된 밀품종으로부터 얻어진 추출혼합물에 대한 기억력개선에 관련된 효능조사
- 대량재배 (적은 섭취량으로 동일 효능이 확인될 경우)

IV. 연구개발결과

가. 인지기능개선용 기능성원료 인정 획득

- o 현재까지 식약처에서 인지기능개선용 기능성원료로 인정받기 위해 필요한 모든 시험을 성공적으로 수행하여 식약처로부터 인정을 받기 위해 필요한 서류를 작성 중에 있음. 현재까지 수행된 중요한 연구결과는 다음과 같음.
 - 원료확보를 위한 제조방법의 확립: 대량구매가 가능한 밀품종 중에서 기능성분인 아라비노자일란과 아라비노갈락탄-펩티드를 대표하는 성분으로 아라비노스를 많이 포함하는 밀품종을 조사하여 우리나라 토종밀인 A밀을 원재료로 선정하였음. 원재료로부터 기능성분을 많이 함유하는 원료를 생산하기 위해서는 전분의 제거가 필수적인데 이를 위해 전분을 적게하는 밀기울을 사용하고 전분을 열수처리하기 전에 입자형태로 제거하는 공정을 도입하여 대량으로 신청원료 (밀기울추출물)를 생산하는 공정을 확립하였음.
 - 신청원료의 기능 (지표)성분 규격설정: 기능성분인 다당류를 직접 분석하는 방법이 어려우므로 이의 구성성분의 하나이면서 기능을 나타내는 아라비노스 (ara)를 지표성분으로 하는 규격을 개발하였음. 우선 다당류를 산처리로 분해하여 얻은 ara를 alditol acetate화 시켜 함량을 분석하는 방법에 대한 실험방법 밸리데이션을 실시하였음. 이 후 이 방법으로 신청원료에 포함된 ara의 함량의 분석을 한국기능식품연구원에 의뢰하여 인정서를 받았음.
 - 신청원료의 비인체실험 (*in vitro*, *in vivo*)을 통한 기능성 확인: 세포시험에서는 알츠하이머병을 유발하는 베타아밀로이드를 배양한 신경세포에 첨가하면 세포자살에 의해 신경세포가 죽게되는데 신청원료를 첨가하면 이를 줄이는 것이 확인되었음. 이의 연장으로 베타아밀로이드를 생쥐의 뇌에 주입하여 기억력상실을 유발한 경우에 신청원료를 섭취하게 하면 기억력이 개선되었음. 이러한 효능은 아세틸콜린의 생성의 증가, BDNF의 발현의 증가, 세포사멸의 억제와 연관되었음. 또한, 스코폴라민을 주사하여 발생시킨 건망증모델에서도 기억력을 개선시켰으며 이러한 효능도 아세틸콜린의 생성, BDNF의 발현증가 등과 연관되었음. 마지막으로 총경동맥을 묶어 발생시킨 혈관성치매모델에서 백색질의 손상을 억제시켰으며, 이 중에서도 시각로의 손상을 억제하여 동공반응을 개선시켰음. 이러한 결과는 신청원료가 인지기능을 개선시키는 효능이 있다는 것을 나타내었음.
 - 신청원료의 독성유무 확인을 통한 안전성 확인: 식약처에서 제시한 의사결정도에 의해 독성시험을 실시할 필요가 없는 것으로 판정되었음. 이를 뒷받침하기 위해 섭취근거정보 등 요구되는 자료들을 확보하였음.
 - 신청원료의 장기보존시험 등을 통한 안정성 확인: “건강기능식품 품목제조 신고”시 필요한 기능성원료에 대한 안정성을 확인하기 위해 여러 가지 온도에서 신청원료를 조사한 결과 230일까지 보관하

여도 지표성분 등에서 변화가 관찰되지 않아 안정하다는 것을 확인하였음.

- 신청원료의 인체시험을 통한 기능성 확인: 밀기울추출물과 동물시험을 통해 효능이 없는 것이 확인된 쌀전분을 플라시보로 하여 1일 3g을 각각 시험군과 플라시보군 각각 35명에게 12주간 섭취하게 한 후 인지기능을 조사한 결과 시지각 인지기능과 삶의 질에서 유의하게 개선시켰으며 인체에는 안전하다는 것을 확인하였음.
- 신청원료의 기능성원료로 식약처 인정획득: 이상의 결과를 근거로 현재 제출서류를 작성하여 기능성원료로 인정받기 위한 준비를 하고 있는 중임.

나. 인지기능개선용 건강기능제품

- 신청원료 (밀기울추출물)를 포함하는 건강기능제품으로 프리믹스를 고려하여 프리믹스에 신청원료를 첨가하여 동물시험을 시행한 결과 신청원료를 첨가한 프리믹스에서만 기억력개선 효능이 관찰되어 건강기능제품으로서의 가능성을 확인하였음.

다. 기능성분 고함유 밀품종 선별 및 재배

○ 대량 구매가 가능한 품종의 비교

- 국내외 밀품종을 비교한 결과 우리나라 토종밀인 A밀이 ara의 함량이 높은 것을 확인하고 원재료로 사용하였음.

○ 순수품종의 선별

- A밀이 혼종이라서 이로부터 순수품종을 재배한 후 ara의 함량 등을 비교한 후 효능을 조사하여 순수품종 2종 (A11-8 및 A12-8)을 선별하였음. 이 순수품종은 기존에 아라비노자일란의 함량이 높다고 보고된 외국산 (Y밀)과 비교하여도 손색이 없었음.

V. 연구성과 및 성과활용 계획

가. 연구성과

- 밀기울추출물을 인지기능개선용 기능성원료로 인정받기 위한 시험이 완료되어 허가를 받기 위한 준비 중에 있음. 이 과정에 독점권을 행사하는데 필요한 특허를 6편을 등록 또는 출원하였으며 관련된 논문도 4편 발표하고 3편은 심사 중에 있음.

나. 성과활용 계획

- 참여기업에 기술이전을 실시 (15년 3월말 경)하여 기능성원료로 인정받은 후 (15년 9월) 상품화 (건강기능제품으로 출시)가 1건 이상 이루어지도록 할 예정 (16년 상반기)임.
- 선별된 밀품종 (A11-8 및 A12-8)에 대해서는 생산량을 늘려 특성 등을 보다 심도깊게 조사한 후 대량재배할 수 있도록 준비할 예정임.

SUMMARY

I. TITLE

Development of nutraceuticals for improving memory from water extract of wheat

II. OBJECTIVES AND IMPORTANCE OF THE PROJECT

In our previous studies we found that dried supernatant of hot water extract of milled whole wheat was effective in improving memories in various rat models mimicking memory loss, such as Alzheimer's disease, vascular dementia, and amnesia. In this study we aimed to develop the extract as a health functional food improving cognitive functions that satisfies the regulations imposed by KFDA. To receive approval as a functional food from KFDA, it is necessary to get a certificate as a functional ingredient in advance. Thus, it is prerequisite to perform further experiments and prepare documents related to manufacturing method, characteristics of the ingredient, specification on marker compound, safety, and the functionality contents.

III. CONTENTS AND SCOPE OF THE PROJECT

First, we performed experiments required to get approval as a functional ingredient. Experiments will include manufacturing methods and related data, characteristics of the the ingredient, specification on marker compound and data on test method, and functionality contents and related data. To determine whether the functional ingredient is still effective when mixed with other food ingredient, we prepared a pre-mix containing the ingredient. Finally, we selected a wheat variety containing the highest amount of functional components.

IV. RESULTS OF THE PROJECT

We got all the data necessary to apply for the functional ingredient improving cognitive function:

- 1) Selection of a wheat variety containing higher amount of arabinoxylan (AX) and arabinogalactan-peptide (AGP), active constituents: We tested 14 wheat varieties commercially available domestically and abroad. We measured arabinose (ara) content in the wheat extract prepared in laboratory scale, and chose a domestic variety (A wheat) as a raw material.
- 2) Manufacturing methods and related data: To increase content of AX and AGP in the final product, we chose wheat bran as a raw material that contains less amount of starch. In addition, we removed starch granules using processes combining

extraction of starch granules in the wheat bran and removal of starch granules with a decanter centrifuge before hot water-extraction. Finally, we designated the functional ingredient as wheat bran extract (WBE).

- 3) Specification on marker compound and data on test method: We chose ara as a marker compound because ara is a common pentose consisting of both AX and AGP. To analyze the content of ara in WBE, we modified a protocol approved by AOAC: hydrolysis of the wheat extract with an acid, reduction of monosaccharides, acetylation of the reduced monosaccharides, and analysis by gas chromatography. We performed method validation for the process we adopted. Finally, we got the written documents regarding examination and analysis data issued by Korea Health Supplement Institute.
- 4) Safety: We determined whether toxicological study is necessary by following decision tree for safety evaluation, from which we concluded that toxicological study is exempt. To meet criteria set by KFDA, we collected documents related to the evidence of consumption, safety information on functional component, evaluation of consumption amount, etc.
- 5) Functionality contents and related data: In *in vitro* study, we showed that WBE improved cell survival by inhibiting apoptosis when the cultured neuronal cells were damaged by beta amyloid. As an extension of the *in vitro* study, we showed that supplementation with WBE improved memory by increasing acetylcholine in the brain when beta amyloid was injected into the mouse ventricle. We also observed memory improvement by WBE supplementation when memory loss was caused by injection of scopolamine. Finally, WBE supplementation reduced damage in the white matter in a rat model of vascular dementia, which was prepared by bilateral common carotid artery (BCCAO).

In addition, when pre-mix containing WBE was supplemented, memory was also improved. The findings indicate that health functional foods can be prepared with WBE as a functional ingredient.

V. PLANS FOR UTILIZING THE RESULTS

DongA One Inc. participating in the project will prepare documents required for approval as a functional ingredient and develop a health functional food improving cognitive function once it gets a certificate as a functional ingredient

CONTENTS

Chapter 1 Introduction	10
1. Preceding Research	10
2. Necessity of the Project	12
3. Scope of the Project	13
Chapter 2 Current Status of Technology Development	15
1. Overview	15
2. Position of the Results in the Current Status	18
Chapter 3 Contents and Results of the Project	19
Chapter 4 Degree of Achievements of the Aims and Its Contribution to the Related Fields	241
1. First Year	241
2. Second Year	250
2. Third Year	258
Chapter 5 Outcome of the Study and Planning for the Utilization of the Outcome..	265
1. Outcome	265
2. Planning	270
Chapter 6 Information Collected While Performing the Project	271
1. Studies for wheat varieties	271
Chapter 7 Facilities and Apparatuses	271
Chapter 8 References	272

목 차

제 1 장 연구개발과제의 개요	10
제 1절 선행연구	10
1. 밑에 대한 요약설명.....	10
2. 선행연구	12
제 2절 연구개발의 목적	12
제 3절 연구개발의 필요성	12
1. 기능성 원료로 인정을 받기 위해 필요한 구비서류.....	12
2. 연구개발의 필요성	12
제 4절 연구의 범위	13
1. 기능성분 고함유 품종의 선별	13
2. 원료확보 (제조방법 확립)	13
3. 기능 (지표)성분 규격설정	13
4. 기능성 확인 (비인체 시험)	14
5. 안전성 확인 (독성시험)	14
6. 안정성 확인 (장기보존시험)	14
7. 기능성 확인 (인체적용시험)	14
제 2 장 국내외 기술개발 현황	15
제 1절 국내외 관련분야에 대한 기술개발현황	15
1. 국내	15
2. 국외	15
제 2절 연구결과가 국내·외 기술개발현황에서 차지하는 위치	18
1. 국내외에서 조사된 효능에 대한 요약.....	18
2. 본 연구에서의 결과가 차지하는 위치	18
제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과	19
제 1절 기능성원료로 인정받기 위해 필요한 자료의 준비상황	19
1. 제출자료 체크리스트.....	19
2. 전체 내용 요약	19
3. 전체 내용설명	24

제 2절 이론적, 실험적 접근방법, 연구내용, 연구결과	49
1. 요약	49
2. 구체적인 연구수행방법 및 연구결과.....	61
제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도	241
제 1절 1차년도	241
1. 요약설명	241
2. 구체적인 연구목표, 달성도 및 관련분야의 기술발전예의 기여도	245
제 2절 2차년도	250
1. 요약설명	250
2. 구체적인 연구목표, 달성도 및 관련분야의 기술발전예의 기여도	253
제 3절 3차년도	258
1. 요약설명	258
2. 구체적인 연구목표, 달성도 및 관련분야의 기술발전예의 기여도	261
제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획	265
제 1절 연구개발 성과	265
1. 연구성과 부분.....	265
2. 연구성과 활용 부분.....	269
제 2절 연구성과활용 계획.....	270
1. 실용화 산업화 계획.....	270
2. 특허, 품종, 논문 등 지식재산권 확보계획.....	270
제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보	271
제 1절 밀품종에 대한 연구 (Healthgrain)	271
제 7 장 연구시설·장비 현황	271
제 8 장 참고문헌	272

제 1 장 연구개발과제의 개요

* 제1장에서는 본 연구가 이루어지게 된 선행연구에 대한 내용을 밀의 구성성분과 함께 설명하며 (제1절), 이를 근거로 연구개발의 목적과 필요성에 대해 설명함 (제2 및 3절). 연구개발의 범위에서는 본 연구에서 목적으로 하는 밀기울의 물추출물을 기억력개선용 건강기능식품을 인정받기 위해 이루어진 연구개발 내용도 함께 설명함 (제4절).

제 1 절 선행연구 (본 과제 시작 전)

* 본 과제는 선행연구 (교과부 21세기 프론티어사업 중 자생식물이용기술개발사업단)에서 얻은 기초연구 결과를 활용하여 건강기능제품으로 개발하는 “후속연구사업”으로, 최종적으로는 밀의 열수추출물 (밀기울추출물)을 인지기능개선용 기능성원료로 개별인정을 받아 건강기능제품으로 개발하는 것임.

1. 밀에 대한 요약설명

가. 밀의 구조

○ 밀은 전분, 단백질 등 영양성분을 가지는 배유부분, 밀알을 보호하는 표피부분 및 발아에 필요한 배아부분으로 이루어져 있음 (그림 1, 11쪽). 이 밀을 제분하면 배유부분으로 이루어진 밀가루 및 표피부분과 배유부분 (소량)으로 구성된 밀기울을 얻게 됨. 이러한 밀은 세포로 구성되어 있으며 배유부분에서의 세포는 전분, 단백질로 채워져 있고 이를 세포벽이 둘러싼 형태로 되어 있는 반면에 표피부분의 세포는 세포벽이 주를 이룸. 세포를 보호하는 세포벽은 아라비노자일란 (arabinoxylan, AX), 아라비노갈락탄-펩티드 (arabinogalactan-peptide, AGP) 및 베타글루칸 (beta-glucan, B-Glu) 등의 다당류로 구성되어 있음 (그림 2, 11쪽). AX는 5탄당인 자일로스 (xylose, xyl)의 backbone에 아라비노스 (arabinose, ara)가 side chain으로 연결되어 있으며, AGP는 갈락토스 (galactose, gal)의 backbone에 ara가 side chain으로 연결되어 다당류를 이룬 후 이 다당류 (arabinogalactan, AG)가 다시 peptide에 연결되어 있음 (그림 2). 반면에 B-Glu는 전분과 마찬가지로 포도당 (glucose, glc)으로 구성되어 있으나 전분과는 달리 포도당끼리 beta 위치에 연결되어 있음. 사람은 이러한 다당류 (AX, AGP 및 B-Glu)에 대한 소화 효소가 없어 소장에서 소화되지 않고 대장으로 넘어가 대장에 있는 미생물에 의해 일부 발효되는 식이 섬유로 작용함.

나. 밀의 세포벽 구성성분의 조성

○ 밀에 들어있는 AX은 물에 녹는지 여부에 따라 수용성 AX (WEAX)와 비수용성 AX (WUAX)로 분류되며, 각각의 함량은 그 부위에 따라 달라짐. 예를 들면, 130여종의 밀품종 (빵밀, *Triticum aestivum* L.)에 대해 조사한 결과 밀가루에는 전체 AX (TOTAX)가 1.9%인 반면에 WEAX는 0.5% (7 °C) 물에서 추출하여 전분은 호화되지 않았음)이었으며, 밀기울에는 TOTAX가 18%인 반면에 WEAX는 0.4%였음 (J Agric Food Chem 2008, **56**, 9740-9749). 이로부터 밀기울에는 밀가루에 비해 훨씬 많은 AX가 있지만 거의 대부분 물에 녹지 않는 AX (WUAX)로 구성되어 있음을 알 수 있음. 그럼에도 불구하고 밀가루와 밀기울에서 WEAX의 함량은 비슷하였음. 한편, 동일한 연구에서 밀전체에 들어있는 B-Glu의 함량은 0.75%였음.

○ 다른 식물로부터 얻어진 AG는 비교적 물에 잘 녹으며 [예를 들면 서양잎갈나무로부터 얻어진 AG (Carbohydrate Polymers, **86**(4), 1739-1744)와 밀로부터 얻어진 AGP (Aust J Biol Sci 1974, 27, 117-132; Cereal Chemistry 1998, 75(6), 815-819)가 있음], 이 때 밀의 밀가루에서 물에 녹는 AGP (상온에서 물로 추출)의 함량은 약 0.3%였음 (Cereal Chemistry 1998, **75**(6), 815-819).

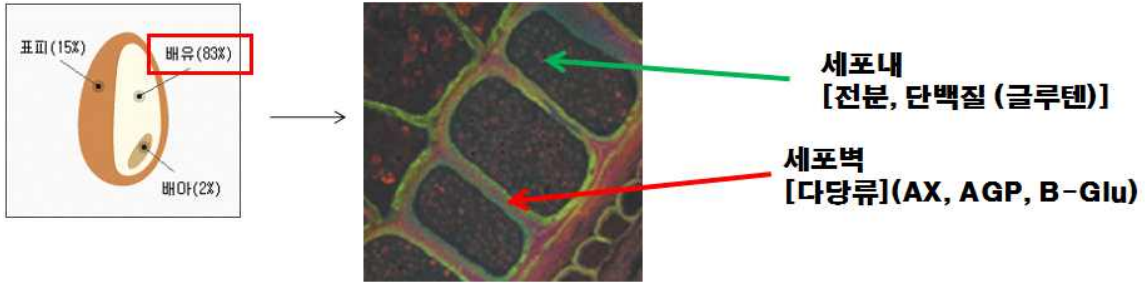


그림. 1 밀의 구조

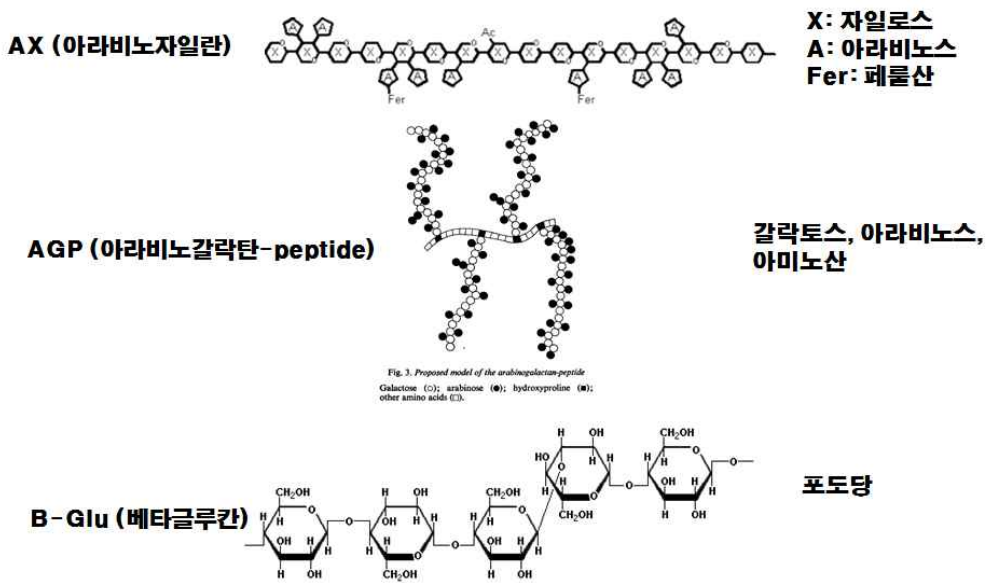


그림 2. 밀의 세포벽을 이루는 다당류들의 구조

2. 선행연구

- 선행연구에서는 통밀을 분쇄한 분쇄통밀을 열수로 추출한 후 원심분리하여 얻은 상등액을 동결건조한 시료 (통밀상등액)가 알츠하이머병을 유발하는 것으로 알려진 베타아밀로이드의 독성을 억제하는 것을 세포실험을 통해 확인하고 다양한 기억력관련 동물모델 (건망증, 알츠하이머병 및 혈관성치매)에서 기억력을 개선시키는 효능을 관찰하였음. 또한 치매의 한 원인이 되는 뇌경색에도 염증반응을 억제하여 경색면적을 줄이는 것을 확인하고 이러한 결과들을 SCI(E) 논문 3편 발표 (Phytother Res 2010, **24(1)**, 76-84; J Med Food 2010, **13(3)**, 572-578; Current Topics in Nutraceutical Research 2008, **6(1)**, 47-54) 및 국내특허 등록 1건 (등록번호 10-0723950-0000)이 이루어졌음. 아울러 혈관성치매 모델에서는 구매한 밀유래 순수AX와 이 AX를 구성하는 5탄당인 ara가 염증반응을 억제하여 세포손상을 줄임으로써 기억력을 개선시키는 것도 확인하였음 (J Med Food 2010, **13(3)**, 572-578).

제 2 절 연구개발의 목적

- 본 연구는 이러한 선행연구 결과를 바탕으로 밀기울추출물을 인지기능개선용 건강기능식품으로 개발하고자 하는 것임.
- 이를 위해 먼저 식품의약품안전처로부터 인지기능개선용 기능성원료로 인정을 받아야 하고, 이를 근거로 식품의 유형 등을 결정하여 건강기능식품으로도 인정을 받아야 함 (건강기능식품 기능성 원료 및 기준·규격 인정에 관한 규정).
- 본 연구에서는 우선 기능성원료로 인정을 받는 것을 목표로 함.
- 이를 바탕으로 참여기업이 기술이전을 받은 후 건강기능식품으로 인정을 받아 판매로 이루어지게 됨.

제 3 절 연구개발의 필요성

1. 기능성 원료로 인정을 받기 위해 필요한 구비서류

- 밀기울추출물을 기능성 원료로 인정을 받기 위해서는 세포와 동물을 이용하여 기능성을 확인하는 것 이외에도 다음과 같은 10가지 종류의 서류를 구비하는 것이 필요함.
- (1) 제출자료 전체의 총괄 요약본
- (2) 기원, 개발경위, 국내·외 인정 및 사용현황 등에 관한 자료
- (3) 제조방법에 관한 자료
- (4) 원료의 특성에 관한 자료
- (5) 기능성분(또는 지표성분)에 대한 규격 및 시험방법에 관한 자료 및 시험성적서
- (6) 유해물질에 대한 규격 및 시험방법에 관한 자료
- (7) 안전성에 관한 자료
- (8) 기능성 내용에 관한 자료
- (9) 섭취량, 섭취 시 주의사항 및 그 설정에 관한 자료
- (10) 의약품과 같거나 유사하지 않음을 확인하는 자료

2. 연구개발의 필요성

- 선행연구에서 사용된 밀 추출물은 소규모 실험실에서 이루어진 것이므로 원료를 대량으로 제조하는 방법을 우선적으로 개발하여야 하고, 이 원료를 특정지을 수 있는 지표성분을 선정하여 이에 대한 규격을 설정하여야 할 뿐만 아니라 인체적용시험도 하여야 하므로 기능성 원료로 인정받기 위해서는 다양한 추가실험이 필요함.

제 4 절 연구개발의 범위

* 본 과제에서의 연구는 기능성원료로 인정을 받기 위해서 필요한 자료를 확보하는 것을 중심으로 하여 그림 3 (14쪽)에서와 같은 실험이 이루어짐.

1. 기능성분 고함유 품종의 선별

- 선행연구에서 기능성분의 하나로 확인된 AX를 다량 함유하고 있는 품종을 선별하기 위해 기존에 재배되거나 또는 확보한 품종에 대해 당분석을 실시하여 AX가 많이 함유된 품종을 선별함. 이를 근거로 이 품종들을 재배하여 동일한 재배조건에서 선별된 품종을 재확인함.
- 아울러 선별된 품종에 대해 보다 순수한 품종을 확보하기 위해 동일한 포기에서 나온 밀을 다시 재배하여 순품종을 확보함.
- 이 부분은 기능성 원료 제출자료에서 “(2) 기원, 개발경위, 국내·외 인정 및 사용현황 등에 관한 자료”에서 좋은 원재료 (밀)를 확보하는데 기여함.

2. 원료 확보 (제조방법 확립)

- 밀은 입자형태의 전분을 많이 함유하고 있어 열수로 처리하면 이 전분이 호화되고, 이 호화된 전분이 노화되더라도 죽같은 형태로 되어 입자형태로는 돌아오지 않으므로 대량생산에 사용되는 연속원심분리기로 이를 제거하는 것이 불확실할 수 있으므로 기능성성분의 함량을 높이기 위해서는 전분을 제거하는 것이 중요함.
- 실제로는 전분의 함량이 적은 밀기울을 사용하고, 냉수로 밀기울에 있는 전분입자를 미리 제거한 후 열수처리하여 원하는 원료 (밀기울추출물)를 확보할 수 있었음.
- 이 부분은 기능성 원료 제출자료에서 “(3) 제조방법에 관한 자료”의 확보에 해당함.

3. 기능 (지표)성분 규격설정

- 신청원료의 품질을 관리하기 위해 지표성분을 설정하고 신청원료에서 지표성분의 범위를 설정하는 것임.
- 지표성분으로 아라비노스 (ara)로 설정하고, 신청원료에서 ara의 함량을 결정함. 이를 위해 ara의 함량을 측정하는 실험방법이 적절한지를 실험방법 밸리데이션을 실시함.
- 실제로 ara를 지표성분으로 할 경우 신청원료에서의 ara의 함량이 2.5%인 것을 기능식품연구원을 통해 확인하였으며 이를 근거로 규격 2-3% (wt%)로 하였음.
- 이 부분은 기능성 원료 제출자료에서 “(5) 기능성분(또는 지표성분)에 대한 규격 및 시험방법에 관한 자료 및 시험성적서”의 확보에 해당함.

4. 기능성 확인 (비인체 시험)

- 시험관시험와 동물시험을 통해 신청원료 (밀기울추출물)의 기억력개선에 관련된 내용을 조사하는 것임.
- 시험관시험에서는 세포실험을 통해 신청원료가 베타아밀로이드에 의한 독성을 완화시키고, 동물시험에서 베타아밀로이드를 주입한 생쥐에서 기억력을 개선시키는 것을 확인함.
- 또한 스코폴라민을 주사하여 기억상실이 유발된 쥐에 대해 신청원료가 기억력을 개선하는 효능이 있는지를 수동회피실험과 물미로 실험을 통해 확인함. 아울러 쥐의 총경동맥을 묶어 발생된 혈관성치매 모델에서 신청원료가 조직 (백색질)의 손상이 억제되는지 조사하고 이에 따른 효능으로 동공반응에 미치는 영향도 조사함.
- 이 부분은 기능성 원료 제출자료에서 “(8) 기능성 내용에 관한 자료” 중 비인체시험 자료의 확보에 해당함.

5. 안전성 확인 (독성시험)

- 원료가 섭취 범위 내에서 독성을 나타내지 않는다는 근거를 제시하여야 함.
- 원재료로 사용된 밀을 제분하고 남은 부산물인 밀기울로부터 열수를 이용하여 추출한 것이므로 안전성에 대한 의사결정도에 의거하여 독성시험이 면제될 수 있는 근거자료를 제시함.
- 이 부분은 기능성 원료 제출자료에서 “(7) 안전성에 관한 자료”에 해당함.

6. 안정성 확인 (장기보존시험)

- 원료에 대한 안정성을 정하기 위한 장기보존시험은 기능성원료로 인정받을 때는 필수적이지 않으나, 향후 건강기능식품으로 판매하기 위해 필요한 “건강기능식품 품목제조 신고”시 필요하므로 이에 대한 자료를 확보하고자 함.

7. 기능성 확인 (인체적용시험)

- 기능성원료로 인정받기 위해 필수적인 준건강인을 대상으로 한 인체시험을 실시하는 것임.
- 건강인과 준건강인 각각 35명에 대해 이중맹검으로 12주 동안 신청원료를 섭취하는 경우 인지기능이 개선되는를 조사함.
- 이 부분은 기능성 원료 제출자료에서 “(8) 기능성 내용에 관한 자료” 중 인체시험 자료의 확보에 해당함.

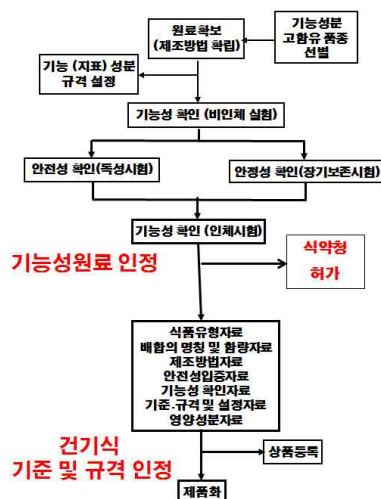


그림 3. 본 연구개발에서의 연구내용 및 목표

제 2 장 국내외 기술개발 현황

제 1 절 국내외 관련분야에 대한 기술개발현황

* 밀기울과 밀기울 유래 성분들에 대해서는 국내외적으로 다양한 기능이 조사되어 일부는 건강기능식품 또는 식품으로 개발되어 있거나 개발되고 있음.

1. 국내

가. 밀로부터 유래한 밀식이섬유 (밀기울 및 전분제조공정 부산물)

o 밀로부터 유래한 밀식이섬유 (밀기울 및 전분제조공정 부산물)는 아래와 같은 연구결과를 근거로 식품의약품안전처에서 식후혈당상승 억제용 및 배변활동 원활용 건강기능식품 (고시형)으로 인정되어 있음 (II.2.4.4.7 밀식이섬유).

(1) 식후혈당상승 억제용

o 밀가루 제조공정 (밀가루와 물로 반죽을 만든 후 이를 물로 씻어 내면서 전분과 글루텐을 분리해내는 공정)중 부산물에서 식이섬유를 분리한 후 식용에 적합하도록 한 것으로 밀식이섬유로서 1일 6-12 g 섭취하도록 함.

o 본 기능을 인정하면서 인용된 문헌 (Lu et al., 2000)에서 사용한 식이섬유는 밀가루로부터 전분과 활성글루텐을 생산하고 남은 부산물로서 그 조성에 있어서 AX가 다량으로 포함되어 있는 식이섬유임 [AX가 전체의 63%, 전분이 14.8%, 단백질이 9.5% (중량비)를 차지함]. 이 중에서 ara의 함량을 계산하면 약 25%로 본 개발에서 사용하고자 하는 추출건조물의 약 2.5%에 비해 훨씬 높은 ara의 함량 (10배)을 가진 식이섬유임.

(2) 배변활동 원활용

o 밀의 외피 (밀기울) 또는 줄기를 세정, 건조, 분쇄시킨 후 식용에 적합하도록 한 것으로 밀식이섬유로서 일일 36 g을 섭취하도록 함.

o 본 기능으로 인정하면서 인용된 문헌 (Hamberg et al., 1989)에서 사용한 식이섬유는 밀기울로서 식이섬유가 약 10% 포함되었음.

2. 국외

* 통밀을 포함한 밀기울과 밀기울 유래 성분들은 국내외적으로 건강기능식품으로 개발되어 있거나 개발되고 있을 뿐만 아니라 새로운 기능을 찾기 위한 연구가 진행되고 있음.

가. 통밀

o 통밀 (wholegrain)이 나타내는 효능은 심혈관질환 (Fardet, 2010; Gil et al., 2011; Seal, 2006; Kelly et al., 2007; Flight & Clifton, 2006), 제2형 당뇨병 (Fardet, 2010; Gil et al., 2011; Belobrajdic & Bird, 2013), 대장암 (Fardet, 2010; Gil et al., 2011) 등의 예방에 효능이 있는 것으로 조사되었음.

나. 밀기울

- 밀기울을 그 자체 또는 시리얼, 빵 등에 첨가한 형태의 시험용으로 자체 제조하여 적용한 인체시험이 실시되었거나 또는 밀기울로 제조된 시리얼인 All-Bran을 이용한 인체시험이 이루어졌음.

(1) 효능연구

- 밀기울은 그 자체 또는 시리얼, 빵 등에 첨가한 형태로 다양한 종류의 인체시험이 이루어졌음. 예를 들면, 장의 기능 및 장내 대사에 미치는 영향 (Parisi et al., 2002; Smith et al., 1981; Heller et al., 1980; Wyman et al., 1976; Fuchs et al., 1976; Tomlin & Read, 1988; Anson et al., 2011), 혈중지질대사에 미치는 영향 (Pomare et al., 1976; Kestin et al., 1990; Anderson et al., 1991; Jenkins et al., 1999; Huijbregts et al., 1980; Stasse-Wolthuis et al., 1979; Moore et al., 1985; Sanders & Reddy, 1992), 대장암을 예방하는 효과 (Alberts et al., 2000; Jacobs et al., 2002a; Alberts et al., 1996; Earnest et al., 1999; Martinez et al., 1998; Ho et al., 1991; Macrae et al., 1997; Lampe et al., 2001; Hickey et al., 1972; Jacobs et al., 2002b; MacLennan et al., 1995) 및 페놀화합물 등의 흡수에 미치는 영향 (Price et al., 2008; Hamill et al., 2009; Keagy et al., 1988) 등에 대해서 인체시험이 이루어졌음.

(가) 장기능에 대한 영향 조사

- 하루 밀기울 자체 30 g을 과민성 장염이 있는 어른 188명이 12주 동안 섭취하였음 (Parisi et al., 2002).
- 하루 밀기울 자체 20 g을 diverticular disease 환자 24명이 4주 동안 섭취하였을 때 장운동에 미치는 영향을 조사하였음 (Smith et al., 1981).
- 하루 밀기울 30 g을 섞어 만든 빵을 건강한 청년 9명이 4주 동안 섭취하였을 때 대변양이 증가하는 기전에 대해 조사하였음 (Chen et al., 1998).
- 하루 밀기울 32 g/day을 섞어 만든 빵을 건강한 청년 24명이 4주 동안 섭취하였을 때 대장의 기능에 미치는 영향에 대해 조사하였음 (Heller et al., 1980).

(나) 지질대사에 대한 영향 조사

- 하루 밀기울 자체 57 g을 담석증환자 6명이 4-6주 동안 섭취하였을 때 담즙염 대사에 미치는 영향에 대해 조사하였음 (Pomare et al., 1976).
- 하루 밀기울 35 g을 섞어 만든 빵을 약한 고지혈증이 있는 남자 28명이 4주 동안 섭취하였을 때 혈중지질 등에 미치는 영향에 대해 조사하였음 (Kestin et al., 1990).
- 하루 밀기울 40 g을 섞어 만든 시리얼이나 머핀을 고지혈증이 있는 남자 10명이 3주 동안 섭취하였을 때 혈중지질 등에 미치는 영향에 대해 조사하였음 (Anderson et al., 1991).

(2) 제품화

- Kellog 회사에서는 All-Bran을 식이섬유를 많이 함유하고 있는 밀기울을 시리얼로 개발하여 판매하고 있으며, 인체시험을 통해 암예방, 이소플라본 및 대장에서의 기체발생에 대한 영향 등에 대해 조사되었음.

(가) 암예방에 대한 영향

- o 하루 All-Bran 45g (식이섬유 양은 약 13.5 g, 밀기울 약 27 g에 해당)을 adenoma 제거된 720명이 최대 3개월 동안 섭취 (Alberts et al., 2000; Jacobs et al., 2002) 또는 All-Bran 2 온스 (56 g, 밀기울 37 g에 해당)를 노인 45명이 3개월간 섭취하였을 때 대장암의 발생이 억제되는지 조사하였음 (Ho et al., 1991).
- o 하루 All-Bran 38 g (밀기울 25 g에 해당)을 adenoma가 관찰된 사람 20명이 18주 (4개월)동안 섭취하였을 때 대장의 상피세포의 증식에 영향을 미치는지를 조사하였음 (Macrae et al., 1997).

(나) 이소플라본에 대한 영향

- o 하루 All-Bran 50 g (밀기울 약 33 g에 해당)을 폐경 전 여성 13명에게 2개월 동안 섭취하도록 하였을 때 isoflavan인 equol의 방출에 영향을 미치는지를 조사하였음 (Lampe et al., 2001).

(다) 대장에서의 기체발생에 대한 영향

- o 건강한 남성에서 All-Bran 150 g (생밀기울 약 100 g)을 단회 섭취하였을 때 장에서 발생하는 수소기체의 양을 조사하였음 (Hickey et al., 1972).

다. 아라비노자일란 고함유 식이섬유 (혼합물)

- o 밀기울에 다량 함유된 AX를 밀가루로부터 전분과 활성글루텐을 얻고 난 후의 부산물로부터 얻은 AX를 주성분으로 하는 식이섬유 (혼합물)가 혈당이나 장기능에 미치는 영향에 대해 인체시험이 실시되었음.

(1) 혈당조절

- o Lu 등 (Lu et al., 2000; Lu et al., 2002)은 질량비로 AX 63%, 전분 15%, 단백질 10% 등으로 이루어진 밀식이섬유가 정상인과 제2형 당뇨병환자의 식후 혈당에 미치는 영향을 조사하였음. 예를 들면, 하루 밀식이섬유 12 g을 빵으로 만들어 정상인 14명이 3일 동안 섭취하였을 때 식후혈당을 낮추는 효능에 대해 조사하였음 (식약처에서 밀식이섬유를 건강기능식품으로 인정할 때 인용된 문헌) (Lu et al., 2000). 또한, 하루 밀식이섬유 14-17 g을 빵으로 만들어 제2형 당뇨병환자 7명이 5주 동안 섭취하였을 때 식후혈당을 낮추는 효능에 대해 조사하였음 (Lu et al., 2002). 이 자료는 국내에서 밀기울을 건강기능식품으로 인정되는데 사용되었음.
- o Garcia 등 (Garcia et al., 2007; Garcia et al., 2006)은 질량비로 AX 57%, 단백질 17% 및 AGP와 BGlu 등으로 이루어진 밀식이섬유가 내당능 장애가 있는 사람들의 식후 혈당에 미치는 영향을 조사하였음. 예를 들면, 하루 밀식이섬유 15 g을 내당능 장애가 있는 사람 11명이 6주 동안 빵과 분말형태로 섭취하였을 때 식후혈당을 낮추는 효능에 대해 조사하였음.

(2) 장기능조절

- o Grasten 등 (Grasten et al., 2003)은 질량비로 AX 50%, AGP 15%, 단백질 30% 등으로 이루어진 밀식이섬유 (Courtin & Delcour, 1998)가 정상인의 장기능에 미치는 영향에 대해 조

사하였음. 예를 들면, 하루 밀식이섬유 13 g을 정상인 14명이 3주 동안 빵의 형태로 섭취하였을 때 장기능에 미치는 영향에 대해 조사하였음.

제 2 절 연구결과가 국내·외 기술개발현황에서 차지하는 위치

* 현재까지 국내외에서 조사된 효능을 요약하고 이를 근거로 본 연구에서 개발하고자 하는 건강기능식품의 효능인 인지기능개선의 독창성에 대해 논의하고자 함.

1. 국내외에서 조사된 효능에 대한 요약

○ 제품화 (건강기능식품 및 식품)되거나 또는 인체시험 등을 통해 조사가 이루어진 효능에 대해 요약함. 이를 요약하면 조사된 효능은 대사증후군에 관련된 식후혈당상승 억제, 지질대사에 대한 영향 및 배변활동 원활과 대장암 예방 등의 관점에서 주로 조사되었음.

가. 건강기능식품 및 식품

(1) 건강기능식품

○ 국내에서 밀기울 및 밀기울 유래 산물은 식후혈당상승 억제용이나 배변활동 원활용으로 그 기능이 인정되어 있음.

(2) 식품

○ 미국의 Kellogg 회사에서는 밀기울을 All-Bran이라는 제품으로 판매하고 있으며, 이에 대해서는 암예방, 이소플라본 및 대장에서 기체발생에 대한 영향 등이 임상시험을 통해 조사되었음.

나. 효능조사

○ 밀기울 자체에 대해서는 장기능 (장운동 등)에 대한 영향, 지질대사에 대한 영향 (혈중지질, 담즙산 대사) 및 대장암을 예방하는 효능 등이 조사되었음.

○ AX 고함유 식이섬유에 대해서는 혈당조절, 장기능조절 등에 대해 조사되었음.

2. 본 연구에서의 결과가 차지하는 위치

○ 현재까지 국내외에서 밀기울 또는 통밀이 인지기능을 개선시킨다는 연구는 보고된 바가 없음. 따라서 밀기울로부터 인지기능개선용 건강기능식품으로 개발하면 세계 최초이어서 밀기울에 대해 새로운 기능을 부여하게 됨.

○ 아울러 밀을 제분할 때 발생하는 부산물인 밀기울을 활용하여 제품화하면 부가가치를 높일 수 있고 새로운 시장도 개척할 수 있을 것으로 사료됨.

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

* 이 부분에서는 우선 본 연구개발의 핵심이 되는 밀기울추출물을 인지기능 개선용 기능성 원료로 인정받기 위해 식품의약품안전처에 제출해야 할 내용이 준비된 상황에 대해 제1절에서 우선 설명한 후, 본 연구개발에서 수행한 전체 내용 및 결과에 대해 설명하고자 함.

제 1 절 기능성원료로 인정받기 위해 필요한 자료의 준비상황

- 이 보고서를 제출할 시점 (2014년 12월 9일)에서 식품의약품안전처에서 요구하는 시험들이 인체적용시험까지 모두 완료되었으며, 특히 인체적용시험에서 시각인지기능이 향상되는 등 유의한 효능이 확인되어 식품의약품안전처에 제출할 자료를 작성하기 위한 준비 중에 있음.
- 식약처에 제출하여야 하는 제출자료 총괄요약본은 **제출자료 체크리스트**와 **전체내용요약** 부분으로 구성됨.
- 그리고 식약처에 제출하여야 하는 제출자료 체크리스트에 대해 보다 자세한 내용은 “3. 전체 내용 설명” (24쪽)에서 논의됨.

1. 제출자료 체크리스트 (표 1, 20쪽)

○ 제출자료 체크리스트는 식품의약품안전처에 제출할 다음과 같은 내용으로 구성되어 있음.

- (1) 제출자료 전체의 총괄 요약본
- (2) 기원, 개발경위, 국내·외 인정 및 사용현황 등에 관한 자료
- (3) 제조방법에 관한 자료
- (4) 원료의 특성에 관한 자료
- (5) 기능성분(또는 지표성분)에 대한 규격 및 시험방법에 관한 자료 및 시험성적서
- (6) 유해물질에 대한 규격 및 시험방법에 관한 자료
- (7) 안전성에 관한 자료
- (8) 기능성 내용에 관한 자료
- (9) 섭취량, 섭취 시 주의사항 및 그 설정에 관한 자료
- (10) 의약품과 같거나 유사하지 않음을 확인하는 자료

2. 전체 내용 요약 (표 2, 24쪽)

○ 식품의약품안전처에서 제시한 전체 내용 요약은 1. 원재료명, 2. 원재료, 3 기능(지표)성분, 4. 제조공정, 5. 규격 및 시험방법, 6. 안전성 및 7. 기능성 항목으로 구성되어 있음.

표 1. 제출자료 체크리스트

연번	제출자료	제출여부	첨부분 호	비고
1. 제출자료 전체의 총괄 요약본		■ 예 □ 아니오		
2. 기원, 개발경위, 국내·외 인정 및 사용현황 등에 관한 자료				
2.1	기원	■ 국내 □ 국외		
2.2	개발경위	■ 국내 □ 국외		
2.3	국내·외 인정·허가 현황	■ 국내 ■ 국외		
2.4	국내·외 사용 현황	■ 국내 ■ 국외		
3. 제조방법 및 그에 관한 자료				
3.1	제조공정표 ※ 수입건강기능식품인 경우 제조회사가 발행한 자료	■ 예 □ 아니오		
3.2	원재료부터 단위공정별 제조방법 설명	■ 예 □ 아니오		
3.3	사용된 원료·첨가물이 식품 및 첨가물공전에 적합한지 여부	■ 예 (모두, 일부) □ 아니오		
3.4	주요공정별 기능성분(또는 지표성분) 함량변화	■ 예 □ 아니오		
3.5	주요공정별 수율 변화	■ 예 □ 아니오		
4. 원료의 특성에 관한 자료				
4.1	원료를 특징지을 수 있는 성상, 물성 등	■ 예 □ 아니오		
4.2	기능성분(또는 지표성분) 및 근거	■ 예 □ 아니오 □ 기능성분 ■ 지표성분		
4.3	영양성분정보자료	■ 예 □ 아니오		
5. 기능성분(또는 지표성분) 규격 및 시험방법에 관한 자료				
5.1	기능성분(또는 지표성분)의 규격 및 근거	■ 예 □ 아니오		
	※ 기능성분(또는 지표성분)의 시험성적서 및 분석자료 포함 * 여러 번(3 LOT)의 시험성적서	■ 예 □ 아니오		기능식품연구원을 통해 확보
5.2	표준품 정보 (자사표준품의 경우 순도, 구조동정, 유효기간 등 정보 추가)	■ 예 □ 아니오 ■ 시판 표준품 □ 자사 표준품		
5.3	기능성분(또는 지표성분)의 시험방법	■ 예 □ 아니오 ■ 공인 시험방법 ■ 자사 시험방법		공인된 방법의 변형
	자사방법인 경우 밸리데이션 자료 추가	추가		

연번	제출자료	제출여부	첨부번호	
6. 유해물질에 대한 규격 및 시험방법에 관한 자료				
6.1	유해물질 규격 항목(납, 카드뮴, 총비소, 총수은)의 규격 및 근거 ※ 유해물질 규격 항목의 시험성적서 및 분석자료 포함	■예 □ 아니오		
6.2	유해물질 규격 미설정 항목(잔류농약)의 시험성적서 및 분석자료	■예 □ 아니오		
6.3	필요시 추가 항목의 규격 및 근거 (예: 곰팡이독소, 미생물 등) ※ 추가 항목의 시험성적서 및 분석자료 포함	■예 □ 아니오		
6.4	유해물질(중금속, 잔류농약, 미생물 등)의 시험방법	■예 □ 아니오		
7. 안전성에 관한 자료 (의사결정도 :)				
7.1	섭취근거 정보	■예 □ 아니오		
7.2	기능성분 또는 관련 물질에 대한 안전성 검색 정보	■예 □ 아니오		
7.3	섭취량 평가 정보	■예 □ 아니오		
7.4	영양평가, 생물학적유용성, 인체적용시험 정보	■예 □ 아니오		
7.5	독성시험 * GLP기관 확인 여부	단회투여독성시험	□예 ■ 아니오	면제 (통밀추출물에 대해서는 실시)
		3개월 반복투여독성시험	□예 ■ 아니오	면제
		유전독성시험	□예 ■ 아니오	면제
		특수독성 (생식, 항원성, 면역, 발암성)	□예 ■ 아니오	면제
8. 기능성 내용 및 그에 관한 자료				
8.1	시험관시험	□ 신청원료 (논문 0편) * 시험기관 :	1편 심사 중 (동물시험과 함께)	
		□ 유사원료 (논문 1편)	통밀추출물	
8.2	동물시험	□ 신청원료 (논문 3편) * 시험기관 : 계명대, 대구가톨릭대	1편 발표, 2편 심사 중	
		□ 유사원료 (논문 3편)	통밀추출물 (건강증, 알츠하이머병, 혈관성치매, 뇌경색)	
		□ 유사원료 (논문 2편)	구성성분 (AX, AG) 1편 발표	
8.3	인체적용시험	□ 신청원료 (IRB 승인 보고서 1편, 논문 0편) * 인체적용시험기관 : 전북대학교 병원 (기능성식품 임상지원센터)	완료	
		□ 유사원료 (IRB 승인 보고서 0편, 논문 0편)	세계최초여서 없음.	
9. 섭취량, 섭취방법, 섭취 시 주의사항 및 그 설정에 관한 자료				
9.1	섭취량 및 근거	■예 □ 아니오		
9.2	섭취방법 및 근거	■예 □ 아니오		
9.3	섭취 시 주의사항 및 근거	■예 □ 아니오		
10. 의약품과 같거나 유사하지 않음을 확인하는 자료				
10.1	1. 건강기능식품에 사용할 수 없는 원료 여부	□예 ■ 아니오		
10.2	2. 의약품과 같거나 유사한 건강기능식품 여부	□예 ■ 아니오		

표 2. 전체 내용 요약

항 목	3. 주요 내용
1. 원료명	밀기울 추출물
2. 원재료	밀 (소맥) (학명: <i>Triticum aestivum</i> L., 사용부위 : 알곡의 부산물인 밀기울)
3.기능 (지표)성분	지표 성분 : L-아라비노스 (L-arabinose)
4. 제조 공정	밀기울 → 체거름 → 냉수추출 → 체거름 (여과액+잔유물) → 원심분리 (상등액) → 열수추출 (상등액+잔유물) → 체거름 → 체거름 → 농축 → 분무건조 → 신청 원료
5. 규격 및 시험방법	1) 색상 : 미백색의 분말, 끝에 쓴맛 2) L-아라비노스 (기능또는 지표성분) : 2.5% (중량) 3) 납(mg/kg) : 0.044이하 4) 총비소(mg/kg) : 0.122이하 5) 카드뮴(mg/kg) : 0.011이하 6) 총수은(mg/kg) : 불검출 7) 대장균군 : 음성 8) 총아플라톡신, 오크라톡신A, 테옥시니발레롤, 제랄레논: 불검출
	기능(지표) 성분 시험법 ○ 공인된 방법 (AOAC Official method 994.13)의 일부변형, 시험방법 밸리데이션 실시 ○ 산분해 (TFA), 환원 (수소화붕소나트륨), 아세틸화 (아세트산무수물), GC 분석 (SGE BPX70 column) ○ 공인기관 (한국기능식품연구원)의 인정서 확보
	규격외 (잔류농약) ○ 신청원료 (밀기울추출물)의 원재료인 밀에 해당하는 59종의 잔류농약 항목의 함량을 식품위생검사기관 (한국건강기능식품연구원)에 의뢰하여 분석한 결과, 전 항목이 불검출되어 건강기능식품원료로써 안전함을 확인하였음.
6. 안전성	의사결정도 ○ 섭취경험이 있는 밀기울 (<i>Triticum aestivum</i> L, 식품의 주원료)을 냉수 및 열수 추출한 것으로 알려진 부작용이 적고, 섭취량이 일상 섭취량보다 증가하지 않아 의사결정도 '나'에 해당
	섭취 근거 <인정현황> ○ 국내 : 밀 (밀기울 포함)은 식품원재료로 허가, 밀식이섬유 (밀기울 포함)는 건강기능식품 (고시형)으로 인정. 밀의 구성성분인 다당류 AG와 단당류 xyl는 식품첨가물로 허가 ○ 미국 : AX로부터 얻은 올리고당 (AXOS)와 AG는 GRAS로 허가, xyl와 ara는 EAFUS로 등재 ○ 일본 : AG, xyl 및 ara는 식품첨가물로 인정, ara는 FOSHU로 인정. <사용현황> ○ 국내 : 밀기울과 통밀은 식빵제조용으로 판매 ○ 미국, 일본, 중국 등 : 통밀이 식빵제조용으로 판매
	안전성 정보 ○ 안전성 정보 DB : 제빵사천식 (밀알레르기) 및 만성소화장애증 (밀못견딤증)에 대해 논문 20개 이상 ○ 섭취시 주의사항으로 밀섭취시 부작용 경험이 있는 분은 삼갈 것

	섭취량 평가	<ul style="list-style-type: none"> ◦ 신청원료의 섭취량 : 신청원료로서 3-10 g/일: - 최대안전섭취량 100 g/일 (Hickey et al., 1972) • 유사원료(밀기울과 밀식이섬유가 고시형건강기능식품, II.2.4.4.7 밀식이섬유) 1일섭취량 : 밀기울 36 g/일, 밀식이섬유 6-12 g (ara 25% 함유, 신청원료의 10배) • 신청원료의 원재료인 밀기울로 환산시, 30 g/일에 해당 • “All-Bran” (시리얼) 1인 1회 분량: 밀기울 20 g 해당 (켈로그회사) • 문헌에 의한 통상섭취량 (인체시험) (원재료인 밀기울기준): 57 g/일 (4-6주 섭취) <p>⇒ 제안된 최대 섭취량은 통상섭취량(유통제품 등)과 유사하고(또는 3배 이내 이고), 최대안전섭취량, 일일허용섭취량 이내임</p>
	인체적용 시험	심각한 이상반응은 확인되지 않음.
	독성 시험	<ul style="list-style-type: none"> ◦ 독성시험 면제 ◦ 유사원료 (동밀열수추출물)로 단회투여독성시험에서 독성이 나타나지 않음 (쥐를 대상으로 2 g/kg)
	기타 사항	- 없음
	섭취시 주의 사항	<ul style="list-style-type: none"> ◦ 밀섭취시 부작용 (밀알레르기와 만성소화장애증)이 나타나는 사람은 섭취하지 말 것. ◦ 일반적인 밀섭취에서 나타나는 흔치 않은 부작용 (동양인에게는 1% 미만)인 밀알레르기와 만성소화장애증이 나타날 수 있음.
7. 기능성	신청 기능성	인지기능 개선
	신청 일일섭취량	신청원료로서 3 g/일
	시험관시험	◦ 알츠하이머병 모델을 모사한 실험으로 신청원료가 세포자멸사를 억제함으로써 이 병을 유발하는 베타아밀로이드에 의한 세포독성을 완화시키는 효능이 관찰되었음.
	동물시험	<p>[신청원료]</p> <ul style="list-style-type: none"> ◦ 건망증모델: C57-BL/6 mice, 400~800 mg/kg/day, 7일, 경구투여 - 스코폴라민에 의해 유도된 건망증모델에서 신청원료가 기억력을 개선시키는 것을 수동회피 및 물미로실험에서 확인 (대조군 대비, p<0.05) - 대뇌피질과 해마에서 기억력과 관련된 신경전달 물질인 아세틸콜린 양 및 아세틸콜린 합성 효소의 발현을 증가 ◦ 혈관성치매모델(논문발표): SD rat, BCCAO 모델에 의한 만성저관류 유도, 400 mg/kg, 30일, 사료에 혼합 - 동공반응조사에서 동공반응손실이 감소, 수초 (myelin)의 손상억제 - 미세아교세포와 별아교세포의 활성화 억제 <p>※시험물질 : 신청원료</p>
	인체적용 시험	<p>[신청원료]</p> <ul style="list-style-type: none"> ◦ 건강한 성인 (n=70), 3 g/일, 12 주 (RCT, DB) <p>※인체적용시험기관 : 전북대병원 기능성식품 임상지원센터 (2013-2014), 시험책임자 : 채수완</p> <ul style="list-style-type: none"> ◦ 결과: 시지각 인지기능이 향상되었음

3. 전체 내용설명

- o 표 1 (20쪽)에서 요약된 내용에 대해 보다 구체적으로 설명함.
- o 내용은 기능성원료로 인정을 받기 위해서 필요한 자료 위주로 설명하며, 실험의 전체 내용은 “제 2 절 이론적, 실험적 접근방법, 연구내용, 연구결과”에서 보다 상세하게 기술됨.

(1) 제출자료 전체의 총괄요약본

- o 품목명, 목표기능, 섭취량, 원료의 성분 (지표성분) 및 기준규격 (지표성분)에 대해 요약하여 작성하였음.

(가) 품목명

- o 원재료: 밀 (소맥) (*Triticum aestivum* L.)
- o 신청원료의 개요: 우리나라 토종밀 (A밀)로부터 얻은 밀기울에서 전분의 일부분을 냉수추출과 원심분리를 통해 제거하고, 이 때 얻은 상등액과 밀기울을 함께 열수추출한 후 밀껍질 부분을 제거한 상등액을 분무건조하여 얻은 건조물 (밀기울 열수 추출건조물로서 앞으로는 “밀기울추출물”로 명명)임.

(나) 목표기능

- o 인지기능 개선

(다) 섭취량

- o 3 g/일 (원료기준)

(라) 원료의 성분

	지표성분명	지표성분의 기능	구조
	L-아라비노스 (L-arabinose)	- 인지기능 개선	<p>The image shows the chemical structure of L-arabinose. On the left is the Fischer projection, a vertical chain of four carbon atoms. The top carbon (C1) is an aldehyde group (CHO). The second carbon (C2) has an H atom on the left and an OH group on the right. The third carbon (C3) has an HO group on the left and an H atom on the right. The bottom carbon (C4) has an HO group on the left and an H atom on the right, with a CH2OH group attached below it. On the right is the Haworth projection, a five-membered ring with an oxygen atom at the top. The substituents are: C1 (left) has an OH group pointing up; C2 (right) has an OH group pointing down; C3 (left) has an OH group pointing up; C4 (right) has an OH group pointing down.</p>

(마) 기준 규격 (지표성분)

- o 1일 섭취량 기준: 지표성분 섭취량 75 mg (60-90 mg: 섭취량의 80-120%)

(2) 기원, 개발경위, 국내·외 인정 및 사용현황 등에 관한 자료

- o 식약처가 요구하는 작성순서대로 기원, 개발경위, 국내·외 인정·허가 현황 및 국내·외 사용 현황으로 나

누어져 있음.

(가) 기원

○ 신청원료의 개요: 우리나라 토종밀 (A밀: CU-1)로부터 얻은 밀기울에서 전분의 일부분을 냉수추출과 원심분리를 통해 제거하고, 이 때 얻은 상등액과 밀기울을 함께 열수추출한 후 밀껍질 부분을 제거한 상등액을 농축 후 분무건조하여 얻은 건조물임.

<원재료의 기원에 관한 정보>

원재료명	밀 (소맥)	비고(참고)
학명	<i>Triticum aestivum</i> L.	보통계밀 (Common wheat)
원산지	대한민국	토종밀
사용부위	밀기울	밀껍질+호분층+ 배유

(나) 개발경위

○ 제1장 제1절 선행연구부분 (12쪽) 참조.

(다) 국내·외 인정·허가 현황

① 국내

㉠ 식품원재료

○ 밀은 우리나라 식품의약품안전처에서 식품원재료로 허가가 되었으며, 이에 는 밀가루뿐만 아니라 밀기울 (소맥부)도 포함되어 있음.

㉡ 건강기능식품

○ 밀로부터 유래한 밀식이섬유 (밀기울 포함)는 식약처 건강기능식품 (고시형)으로 식후혈당상승 억제용 및 배변활동 원활용으로 인정되어 있음 (II.2.4.4.7 밀식이섬유).

㉢ 식품첨가물

○ 밀의 구성성분의 하나인 AGP와 유사한 서양잎갈나무 (서양단풍나무) (*Larix occidentalis*)로부터 유래한 AG (arabinogalactan)는 우리나라 식약처에서 식품첨가물 (식품첨가물 공전 천연첨가물 138번)로 허가가 나 있음.

○ AX의 구성성분인 xyl (D-xylose)는 우리나라에서 식품첨가물 (식품첨가물 공전 천연첨가물 69번)로 허가가 나 있음.

② 국외

㉠ 건강기능식품

○ 밀로부터 유래한 AX를 효소를 이용하여 밀기울로부터 제조한 올리고당 (AXOS) (밀기울추출물로 명명)이 장내 유익세균의 번식을 촉진하는 프리바이오틱 (prebiotic)으로 개발되어 미국에서 GRAS로 허가를 받았음.

㉡ 식품첨가물

- 일본에서는 AG가 후생노동성에서 허가하는 식품첨가물 (19번)로 허가가 나있음.
- 일본에서는 AX의 구성성분인 ara (L-arabinose)와 xyl 모두 후생노동성에서 허가하는 식품첨가물 (각 20번과 80번)로 허가가 나있음. 또한, ara는 “식후 혈당치의 상승을 완화한다”는 표시를 할 수 있는 특정보건용식품 (FOSHU)로 허가되어 있음.
- 미국에서는 AG가 GRAS (generally recognized as safe)로 허가 (허가번호: 000017, 000047 및 000084)가 나 있으며, ara와 xyl 모두가 FDA에서 허가하는 EAFUS (Everything Added to Food in the Unites States)에 등재되어 있음 (Doc No. 0088 및 1567).

(라) 국내.외 사용 현황

- 원재료인 밀기울 부분을 식용으로 사용하는 경우는 밀기울 자체를 이용하는 경우와 밀기울이 포함된 통밀을 사용하는 경우가 있음.

① 국내

㉠ 밀기울

- 밀기울을 빵 제조용 등으로 실제 판매도 이루어지고 있음.

㉡ 통밀

- 밀기울이 포함된 통밀은 빵 등의 재료에 사용 되고 있으며, 전남 구례 등에서 생산되는 통밀을 분쇄한 통밀가루의 판매가 이루어지고 있으며, 실제 통밀이 포함된 통밀빵도 뚜레쥬르에서 판매 되고 있음.

② 국외

㉠ 밀기울

- 가공된 밀기울에 설탕, 맥아향 만으로 제조된 시리얼 (Kellogg's All-Bran)을 켈로그에서 판매하고 있으며, 이 All-Bran 30 g에는 밀 식이섬유가 약 10 g 포함되어 있고, 이는 약 20 g의 생밀기울에 해당함.

㉡ 통밀

- 미국 등 외국에서도 통밀가루가 제빵용 등으로 판매되고 있음.

(3) 제조방법 및 그에 관한 자료 (특허출원)

- 식약처가 요구하는 순서대로 원재료, 개요 및 제조공정표의 순으로 되어 있으며, 여기에 추가하여 제조공정표가 실제로 이루어진 공정과정을 제시하였음.

(가) 원재료

- 원재료로는 국내산 (A밀: CU-1) 밀기울을 사용하였으며, 실제 추출에는 체로 전분을 제거한 밀기울을 사용하였음.

(나) 개요 (3줄 이내)

- 체로 전분이 제거된 밀기울 (50 kg)을 500 L의 추출기에서 5배의 냉수 (250 L)로 교반하였음. 이를 체로 거른 후 잔유물과 여과액을 얻고 여과액에 포함된 전분을 데칸터 (원심분리기)로 제거하고 상등액을 얻었음. 이 상등액을 잔유물과 함께 열수추출한 후 체로 거른 다음 얻은 상등액을 다시 체로 거르고

농축한 후 분무건조하였음.

(다) 제조공정표

o 식약처에서 요구하는 제조공정표 (표 3, 27쪽)와 이 과정을 요약한 과정을 제시함.

① 제조공정표

o 제조공정표는 표 3과 같으며, 여기에는 제조공정 단계, 각 공정단계에서의 첨가된 물질, 공정조건, 중요 단계에서의 지표성분인 ara의 함량 (%) 및 수율 (kg)을 제시하였음. 제조공정표를 실제 생산된 4회를 평균한 값이며, 이 4회로부터 인체시험에 충분한 신청원료 (약 15 kg)를 확보하였음.

표 3. 제조공정표 (1회당)

제조공정	공정/식품첨가물	조건	기능/지표성분 함량변화(%)	수율(kg 및 %)
(밀기울추출물)				
원재료(밀기울)				
↓				
체 거름		250 μm		
↓ 밀기울				50(100%)
냉수추출	냉수 (250 L)	4-15℃, 1시간, 70 rpm	1.10	15.2(30.4%)
↓ 추출물				
체 거름	냉수 (250 L)	4-20℃		
(잔유물 확보) ↓ 여과액		잔유물도 확보		
원심분리		테칸터, 4000 rpm, 200 L/hr	2.01	6.4(12.8%)
(+잔유물) ↓ 상등액		잔유물과 상등액 혼합		
열수추출	열수	95-100℃, 1시간, 70 rpm	2.38	
↓ 추출물				
체 거름		250 μm		8.3(16.5%)
↓ 여과액				
체 거름		125 μm		8.3(16.6%)
↓ 여과액				
농축		연속농축기	2.45	7.3(14.6%)
↓ 농축액				
건조		분무건조	2.49	6.6(13.2%)
↓ 포집물		포집기 확보물		
밀기울추출물		신청원료	2.49 (2.0-3.0)	3.9(7.8%)

② 제조공정 과정의 요약

- o 제조공정표에 제시된 단계를 이해하기 쉽도록 그림 (그림 4) (29쪽)으로 제시하고, 이에 대한 설명으로 기술함.
- o 대량생산용 데칸터 (춘천바이오산업진흥원)를 이용하여 생산을 시도하여 최적조건을 다음과 같이 확립하였음.

㉠ 제조공정 과정

- a. 밀기울을 체로 거른 후 잔유물을 얻었음 (그림 4의 1)
 - 동아원에서 A밀의 밀기울을 250 μm 체로 걸러서 가지고 옴.
- b. 밀기울 잔유물을 교반하여 추출물 얻었음 (그림 4의 2)
 - 밀기울 50 kg을 500 L 발효기에 250 L의 냉수를 넣고 70 rpm에서 1시간 동안 교반하였음.
 - 냉수의 온도는 생산시기에 따라 8-28 $^{\circ}\text{C}$ 에서 실시되었음.
- c. 추출물을 체로 걸러 여과액과 잔유물을 얻었음 (그림 4의 3)
 - 추출물을 250 μm 체로 걸러 냈음
 - 교반된 추출물을 체 (250 μm)로 밀겉질을 걸러내 여과액을 1차로 얻고, 이 밀겉질에 250 L의 냉수로 1회 씻어 합쳐진 전체 여과액을 얻었음 (용액 1) (그림 4의 5). 그리고 체에 남은 잔유물 (밀겉질 1)를 얻었음 (그림 4의 6).
- d. 데칸터를 이용하여 전분을 제거하였음 (그림 4의 7, 8, 9)
 - 용액 1을 데칸터 (Tomoe Eng Co LTD, 약 4000 rpm)를 이용하여 시간당 얻어지는 상등액의 양이 약 200 L/hr가 되는 조건에서 원심분리를 실시하여 상등액 (상등액 1)을 얻었음 (그림 4의 8).
 - 그리고, 나머지 침전물 (잔사 1)을 얻었음.
- e. 열수추출 및 농축을 실시하였음 (그림 4의 10)
 - 밀겉질 1과 상등액 1을 추출기 (500 L)에 함께 넣고 약 95 $^{\circ}\text{C}$ 에서 1시간 동안 70 rpm에서 교반하면서 추출하였음 (그림 4의 10).
 - 95 $^{\circ}\text{C}$ 의 추출물을 약 70 $^{\circ}\text{C}$ 로 냉각한 후 체로 거르고 여과액 (용액 2) (그림 4의 11)과 잔유물 (밀겉질 2) (그림 4의 12)을 얻고, 이 용액 2를 다시 체 (125 μm)로 걸러 여과액 (그림 4의 13)과 잔유물 (잔사 2) (그림 4의 14)를 얻었음.
 - 얻은 여과액 (그림 4의 13)을 감압농축 (연속) (그림 4의 15)을 실시하여 농축액 (상등액 2)을 얻었음.
- f. 분무건조를 실시하였음 (그림 4의 17)
 - 농축액 (상등액 2)을 분무건조하여 건조물을 얻었음 (그림 4의 18).
 - 이 건조물은 분무건조기 아래에 떨어지는 분말 (정상)과 분무되지 않고 분무건조기의 벽면에 붙은 분말 (air)로 나누어 확보하였음.

③ 제조공정에 대한 결론

- o 대량생산을 통해 인체시험용 신청원료가 확보되었음.
- 인체시험용 신청원료는 지표성분인 ara의 함량이 2.5%인 밀기울추출물이 4회에 걸쳐 1회당 3.9 kg으로 총 약 15.5 kg이 생산되었으며, 동물실험용과 분석용 및 손실 등으로 인해 현재 확보하고 있는 것은 약 13 kg임.

- 인체시험은 35명의 신청원료를 섭취할 피시험자가 12주에 걸쳐 1일 3 g을 섭취하는 것으로 결정되었음 (45쪽, “인체적용시험” 부분 참조). 이를 위해 필요한 신청원료의 양은 약 9 kg이며, 여분으로 2주 분을 추가하면 약 10.5 kg임. 따라서 현재 확보된 신청원료 (약 13 kg)가 인체시험을 완료할 때까지 필요한 양 (10.5 kg)을 넘어서 충분하게 확보되었음.

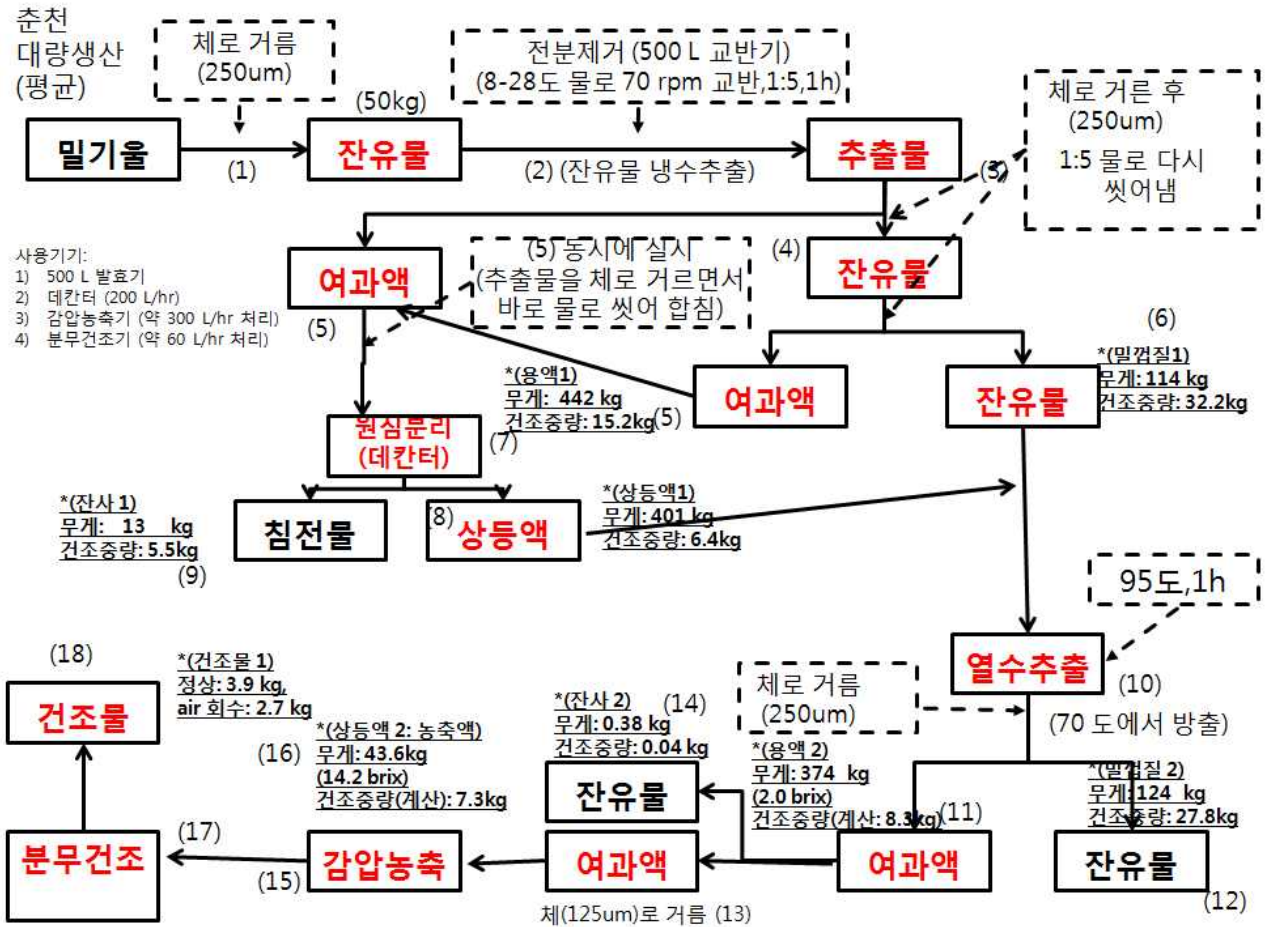


그림 4. 제조공정 요약도

(4) 원료의 특성에 관한 자료

o 식약처가 요구하는 순서대로 원료를 특징지을 수 있는 성상, 물성 등, 기능성분(또는 지표성분) 및 근거, 영양성분정보자료를 제시하였음.

(가) 원료를 특징 지을 수 있는 성상, 물성 등 (표 4)

o 성상: 약간 어둡고 누런빛을 띠는 회황색의 고운 분말로 이취가 없고 약간의 쓴맛이 있음.
o 물성: 공기 노출 시 흡습하는 성질을 가지고 있음.

표 4. 신청원료의 성상

시료 특성	신청원료	
	6/3 생산	6/4 생산
외관 (사진)		
외관 (색)	- 약간 어둡고 누런빛을 띠는 회황색	
외관 (성상)	- 고운 분말 형태	
맛	- 끝에 쓴맛이 느껴짐.	
향	- 미세한 구수한 향과 밀기울 특유의 이취가 미세하게 느껴지나 대체적으로 두드러지는 향이 없음.	

(나) 기능성분(또는 지표성분) 및 근거

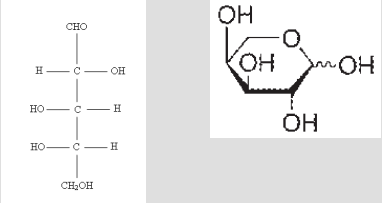
o 지표성분으로 L-아라비노스 (L-arabinose)로 선정하였음.

① 지표성분으로서의 근거

o "26쪽, (3) 제조방법 및 그에 관한 자료"에서의 공정을 거쳐 확보한 추출건조물에는 전분, 단백질 이외에 식이섬유인 비전분 다당류로 아라비노자일란 (AX), 아라비노갈락탄-펩타이드 (AGP) 및 베타글루칸 (BGlu)이 포함되어 있음. 그런데 선행연구에 의하면 AX, AG 및 BGlu가 기억력감소모델 (혈관성치매, 스코폴라민에 의한 건망증)에서 효능을 나타내는 기능성분인 것이 확인되었음.

○ 그런데 신청원료 (밀기울추출물) 내에 들어있는 AX와 AGP의 함량을 측정하기 위해서는 다당류 자체로 분석하는 것은 불가능하고 이 다당류들을 산으로 분해하여 단당류의 함량을 측정한 후 계산식에 의해 AX와 AGP의 함량을 구함. 따라서 지표성분으로 기능성분의 함량을 간접적으로 나타내는 단당류로 선택하였으며 이 중에서 기능성분인 AX와 AGP에 모두 포함되어 있는 ara로 선정하였음.

② 지표성분에 대한 자료

○ 지표성분 : L-(+)-아라비노스 [L-(+)-Arabinose] 2.0-3.0 mg/g	
구조	
일반명	L-아라비노스 (L-arabinose) (CAS 번호: 5328-37-0)
분자식	C ₅ H ₁₀ O ₅
분자량	150.13

(다) 영양성분정보자료

○ 신청원료 (밀기울추출물)를 한국기능식품연구원에 의뢰하여 영양성분을 분석한 결과, 100 g 당 열량 (Kca)은 311.20 Kcal/100g 이고 탄수화물 6.44%, 조단백질 15.15%, 조지방 0.94%, 수분 3.33%, 회분 14.14%, 나트륨 224.57 mg/100g 이며, 탄수화물 중 식이섬유는 수용성 식이섬유는 11.81%이고 불용성 식이섬유는 검출되지 않았음 (표 5).

표 5. 신청원료 (밀기울추출물)의 영양성분 분석 결과

항목	결과
열량 (Kcal/100g)	311.20 Kcal/100g
탄수화물 (%)	66.44% (수용성 식이섬유 11.81%, 불용성 식이섬유 0.00% 함유)
조단백질 (%)	15.15%
조지방 (%)	0.94%
수분 (%)	3.33%
회분 (%)	14.14%
나트륨 (mg/100g)	224.57mg/100g

(5) 기능성분(또는 지표성분)에 대한 규격 및 시험방법에 관한 자료 및 시험성적서

o 식약처의 순서대로 기능성분(또는 지표성분)의 규격 및 근거, 기능성분(또는 지표성분) 표준품 정보, 기능성분(또는 지표성분) 시험방법 (시험방법 밸리데이션 포함)을 제시하였음.

(가) 기능성분(또는 지표성분)의 규격 및 근거

o 기능성분 (또는 지표성분)의 규격 및 설정 근거에 대해 요약하였음.

① 기능성분 (또는 지표성분)의 규격

o 신청원료 (밀기울추출물)에 평균적으로 ara가 25 mg/g (2.5 %) 함유되어 있으며, 허용범위를 80-120%로 하였을 때 그 범위는 20-30 mg/g (2.0-3.0 %)에 해당하였음.

② 설정근거

o 한국기능식품연구원에 본 연구에서 확립한 실험방법을 이용하여 확인한 결과 본 연구에서 측정된 값과 동일하다는 결과를 얻었음 (그림 5). 3개 이상의 LOT에 대해 실시하여 허용범위 내에 위치하는 것을 확인하였음.

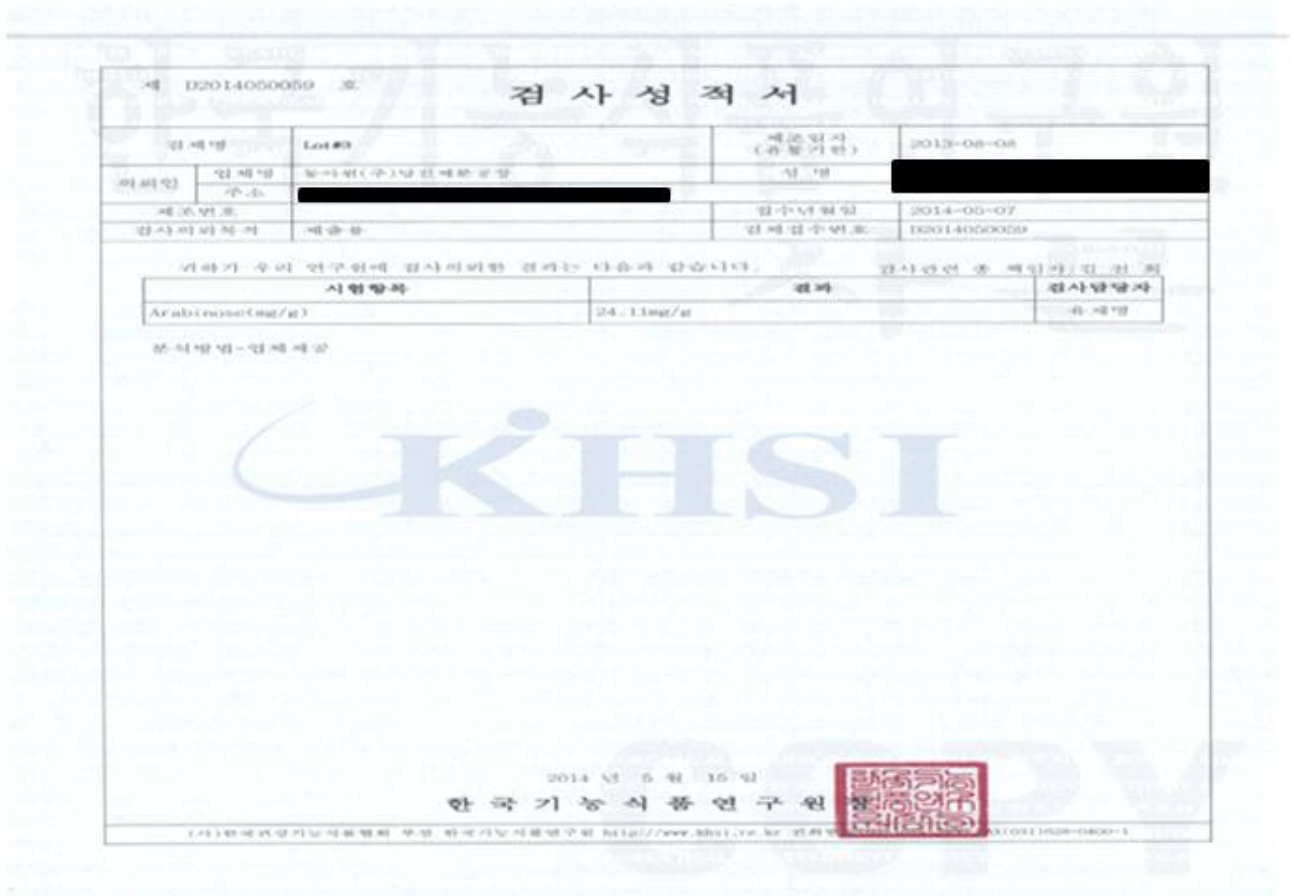


그림 5. 신청원료 (밀기울추출물) 지표성분에 대한 시험성적서

③ 지표성분의 분석결과 (자체 분석)

㉠ 단당류들에 대한 alditol acetate법 적용

- 일반적으로 식물의 세포벽에서 관찰되는 단당류 (rhamnose, fucose, ribose, arabinose, xylose, mannose, galactose, glucose)와 내부표준 (internal standard)으로 고려한 allose와 myo-inositol을 구매하여 동일한 양에 대해 alditol acetate법을 적용한 결과 참고문헌 (Rumpel & Dignac, 2006)에서 제시된 바와 같이 완전하게 분리된 피크들을 얻었음 (그림 6).

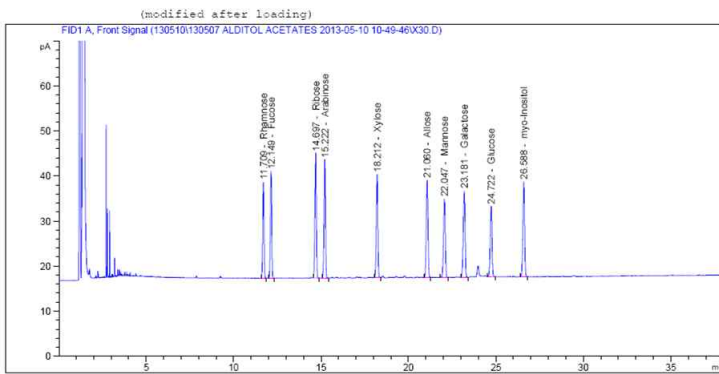


그림 6. Alditol acetate법에 의해 얻어진 단당류들의 크로마토그램

㉡ 기능성 원료의 분석

- 원료로 사용된 밀기울추출물에 대해 alditol acetate법을 이용하여 분석한 결과 그림 7과 같은 결과를 얻었음.
- 원료 내에서 관찰되는 단당류로는 ara, xyl, gal 및 glc가 주를 이루었으며, 이는 추출건조물을 이루는 다당류로는 AX, AGP 및 전분이 주를 이루고 있음을 알 수 있음.
- 면적의 계산을 통해 함량 (질량 %)을 조사한 결과 ara 2.51, xyl 3.81, gal 3.01 및 glc 39.6% 이었음.
- 인체시험에서 사용할 원료는 ara의 함량이 2.51%과 더불어 2.59%, 2.60% 및 2.26%인 시료들을 합하여 이루어진 것이며, 이를 단순 평균을 취하면 약 2.5%임. 이를 근거로 지표성분의 범위를 2.5%를 기준으로 하여 80%-120% 사이인 2.0%-3.0%로 설정하였음.

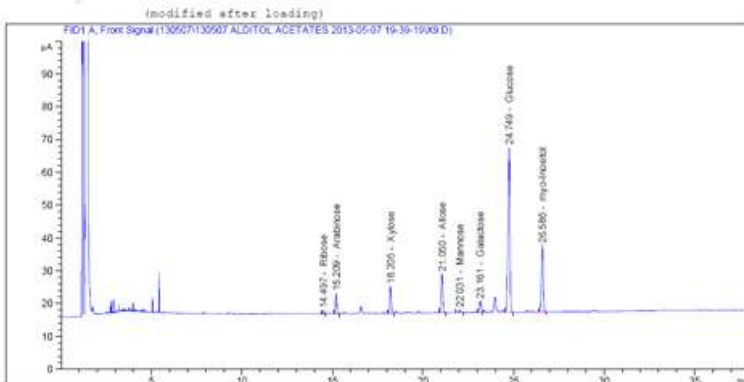


그림 7. Alditol acetate법에 의한 원료 (추출건조물)의 크로마토그램

(나) 기능성분 (또는 지표성분) 표준품 정보

- 식약청에서 제시한 양식으로 작성하였음.
- 시그마-알드리치 회사로부터 구매하였으므로 “시판되는 표준품”에 해당하게 작성하였음.

□ 시판되는 표준품	표준품명	L-(+)-아라비노스 [L-(+)-Arabinose]
	제조·판매회사명	시그마-알드리치 (Sigma-Aldrich)
	구조식	$ \begin{array}{c} \text{CHO} \\ \\ \text{H} - \text{C} - \text{OH} \\ \\ \text{HO} - \text{C} - \text{H} \\ \\ \text{HO} - \text{C} - \text{H} \\ \\ \text{CH}_2\text{OH} \end{array} $
	CAS No.	5328-37-0

(다) 기능성분(또는 지표성분) 시험방법

- 추출건조물에 포함된 ara의 함량은 식이섭유 내에 존재하는 중성단당류의 함량을 측정하는 공인된 방법 (AOAC Official method 994.13)을 변형한 방법 (Melton & Smith, 2001)으로 측정하였음. 이를 활용하여 시험법 검증 (method validation)을 확립하였음.

① 분석방법의 요약

- 분석은 크게 나누어 ㉠ 원료 (추출건조물)의 산처리에 의한 단당류 생성 ㉡ 단당류의 환원에 의한 alditol 생성 ㉢ Alditol의 acetyl화에 의한 alditol acetate 생성 ㉣ Alditol acetate화 된 단당류들의 기체 크로마토그래피 (GC)에 의한 분석으로 나누어짐 (그림 8) (35쪽).

㉠ 원료의 산처리

- 원료를 산 (TFA, trifluoroacetic acid)으로 처리하면 다당류인 AX, AGP, BGlu 및 전분을 구성하는 단당류로 가수분해 되어 ara (아라비노스), xyl (자일로스), gal (갈락토오스) 및 glc (포도당) 등이 생성됨. 단, TFA 처리 시 셀룰로오스는 분해되지 않음.

㉡ 단당류의 환원 (그림 9) (35쪽)

- Ara와 xyl 등의 오탄당은 aldopentose로, gal과 glc 등의 육탄당은 aldohexose로 각각 aldehyde group을 가지고 있음. 이 aldehyde group에는 휘발성을 좋게 하는 acetate가 직접 결합할 수 없으므로 우선 이를 환원시켜 alditol 형태로 만드는 것이 필요함.
- 이를 위해 산분해된 단당류를 환원제인 수소화붕소나트륨 (NaBH₄)로 처리하면 aldehyde는 alcohol로 바뀌어 ara는 arabinitol, xyl는 xylitol, galactose는 galactitol, glucose는 glucitol로 각각 바뀌게 됨.

㉢ Alditol의 아세틸화 (그림 9)

- 생성된 단당류의 alditol이 휘발성이 좋도록 하기 위해 아세틸화를 시켜 alditol acetate를 생성함.
- 이를 위해 alditol을 아세트산무수물 (acetic anhydride)로 처리하면 각각의 alditol에 대해 alditol acetate가 생성됨. 예를 들면, arabinitol은 arabinitol pentaacetate로, glucitol은 glucitol hexaacetate로 각각 변함.

㉣ GC 분석

- 휘발성이 좋게 된 alditol acetate를 GC로 걸면 크로마토그램이 얻어지고 이의 면적을 계산

하면 원료에 포함된 각각 당당류의 함량을 구할 수 있음 (Rumpel & Dignac, 2006) (그림 8).

- 각 단계마다의 반응성 등을 고려하기 위해 internal standard가 필요하며, 본 실험에서는 시료에는 없는 allose를 internal standard로 사용하였음.

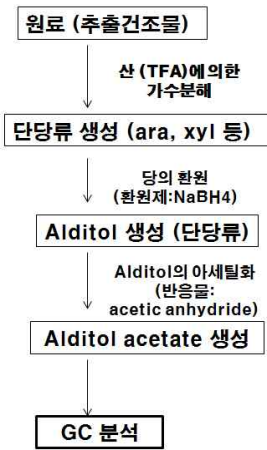


그림 8. 지표성분 분석방법의 개략도

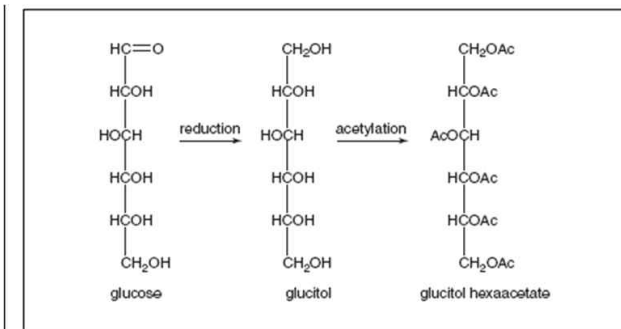


Figure E3.2.2 Reaction scheme for formation of alditol acetates.

그림 9. Aldose인 당의 환원과 아세틸화 과정

- ② 지표성분 시험방법
 - 구체적인 성분분석방법은 “3장 2절 (5) 기능성분[또는 지표성분] 규격 및 시험방법에 관한 자료” 부분 (68쪽) 참조.
- ③ 시험방법 밸리데이션
 - 시험방법 밸리데이션에서 식약처에서 요구하는 자료는 특이성, 직선성, 정밀성, 정확성 및 범위에 대한 밸리데이션이며, 이에 대한 자료는 아래와 같음.
 - ㉠ 특이성
 - 특이성은 분석하고자 하는 성분에 대해 특이적으로 반응하는 시험법이고, 주변 간섭물질로부터 선택적으로 분석이 가능한지 확인하는 것임.

- 확립된 GC 조건에서 arabinose, 신청원료 (밀기울추출물), arabinose를 spike처리한 밀기울추출물 그리고 arabinose를 포함한 9개의 sugar standard에 대해 alditol acetate법으로 실시하여 얻어진 네 개의 크로마토그램을 동일한 스케일로 비교한 결과 기능 성분인 arabinose는 순수하거나 다당류 형태로 있거나 막론하고 동일한 위치에 나타났으며, 다른 단당류와 구분이 가능하였음. 위에서 얻어진 네 개의 크로마토그램을 동일한 스케일로 비교한 결과 기능 성분인 arabinose의 특이성을 확인하였음.
- 특이성의 또 다른 수행 방법으로 GC의 분석 조건을 바꾸어서 retention time은 같이 변화하나 arabinose의 면적에는 변함이 없음을 증명하여 다른 어떤 성분과도 겹쳐있지 않음을 증명하였음.

㉞ 직선성

- 분석하고자 하는 물질 양에 대한 기기적인 신호값이 직선적으로 관찰되었는지 확인하는 것으로 통상적으로 상관계수(correlation coefficients)는 0.995 이상인 경우 인정함.
- 분석하고자 하는 arabinose의 유도체인 arabinitol acetate에 대한 peak의 면적이 분석농도 구간에서 직선적으로 관찰되는지를 확인하기 위해서 arabinose를 6개의 다른 농도로 분석한 결과 지표성분인 arabinose의 r^2 는 0.999로 요구하는 0.995를 넘었음. 이상으로부터 arabinose에 대해 직선성이 확인되었음. 이 때 분석하고자 하는 신청원료 (밀기울추출물)내의 arabinose 양이 표준물질의 직선성 범위 내에 들어있도록 범위를 잡아 직선성을 입증하였음.

㉟ 정밀성

- 시료속의 분석대상물질이 여러 회의 반복시험을 통하여 통계적으로 유의한 차이가 없는 범위에 속하는지 [단순반복성(repeatability), 측정날짜간, 사람간, 기기간, 실험실간]를 조사하는 것임. 이 때 RSD가 5% 이하인 경우 인정함.

(a) 일내 반복 정밀성

- 균일한 밀기울추출물로부터 여러 번 채취하여 분석했을 때 밀기울추출물속의 분석대상인 arabinose의 양이 통계적으로 유의한 차이가 없는 범위에 속하는지를 보기위한 일환으로 repeatability를 시험한 결과 일내 반복 정밀성은 RSD (relative standard deviation)가 3.09% (허용치 5% 이하)로 정밀성이 확인되었음.

(b) 일간 반복 정밀성

- 균일한 밀기울추출물로부터 여러 번 채취하여 분석했을 때 밀기울추출물속의 분석대상인 arabinose의 양이 통계적으로 유의한 차이가 없는 범위에 속하는지를 보기위한 일환으로 repeatability를 측정날짜를 달리하여 세 번 시험한 결과 일간 반복 정밀성은 RSD (relative standard deviation)가 4.92% (허용치 5% 이하)로 정밀성이 확인되었음.

㊱ 정확성

- 분석하고자 하는 성분이 원료(매트릭스)에서 분리할 수 있는가를 확인하는 항목 (traceability)으로, 알고 있는 참값을 원료에 가하여 참값을 정확히 회수할 수 있는가를 회수율 (recovery)로서 실험한 것인지 확인하는 것임.
- 정확성 평가 방법으로 CRM, RM, Spiking & Recovery를 사용함.
- Spiking & Recovery 방법을 사용하여 밀기울추출물에 arabinose를 첨가 한 후 회수율을 구

한 결과 98.7%의 평균회수율이 r^2 이 0.999 (RSD는 4.5%)의 정확성으로 입증하였음.

㉞ 범위

o arabinose 50 μg ~ 1.2 mg 까지의 범위에서 직선성을 확보하였음.

(6) 유해물질에 대한 규격 및 시험방법에 관한 자료

(가) 유해물질 규격항목(납, 카드뮴, 총비소, 총수은)의 규격 및 근거

o 식약처에서 고시한 건강기능식품 기능성 원료 및 기준·규격 인정에 관한 규정 중 유해물질규격설정항목 (제14조 제6호 가목 관련)에 준하여 신청원료의 납, 카드뮴, 총비소, 총수은, 대장균군의 규격을 한국 기능식품연구원에 의뢰하여 확인한 결과, 납 0.0437 mg/kg, 카드뮴 0.0110 mg/kg, 총비소 0.1222 mg/kg, 총수은은 불검출 및 대장균군은 음성으로 분석되어 모두 유해물질규격에 적합한 것으로 확인되었음 (표 6).

표 6. 신청원료의 유해물질 규격항목 분석 결과

항목	결과
대장균군	음성
납(mg/kg)	0.0437
카드뮴(mg/kg)	0.0110
총수은(mg/kg)	불검출
총비소(mg/kg)	0.1222

(나) 유해물질 규격 미설정항목(잔류농약)의 시험성적서 및 분석자료

o 신청원료 (밀기울추출물)의 원재료인 밀에 해당하는 59종의 잔류농약 항목의 함량을 건강기능식품연구원에 의뢰하여 분석하였음.

(다) 필요시 추가항목의 규격 및 근거

① 곰팡이독소

o 신청원료 (밀기울추출물)의 원재료인 밀에 적용되는 곰팡이독소 항목 (총아플라톡신, 오크라톡신A, 데옥시니발레놀, 제랄레논)을 한국기능식품연구원에 의뢰하여 분석하였음 (표 7).

표 7. 신청원료의 곰팡이독소 분석 결과

항목	결과
총아플라톡신($\mu\text{g}/\text{kg}$)	불검출
오크라톡신A($\mu\text{g}/\text{kg}$)	불검출
데옥시니발레놀($\mu\text{g}/\text{kg}$)	불검출
제랄레논($\mu\text{g}/\text{kg}$)	불검출

(7) 안전성에 관한 자료

○ 식약처의 순서대로 의사결정도, 섭취근거 정보, 기능성분 및 관련물질의 안전성(부작용·독성 등) DB 검색 정보, 섭취량 평가 정보, 영양평가·생물학적 유용성·인체적용시험 정보 및 독성시험에 대한 자료를 제시하였음.

(가) 건강기능식품 기능성원료의 안전성평가를 위한 의사결정도

- 식품의약품안전처 (식약처) 고시 “건강기능식품 기능성 원료 및 기준 · 규격 인정에 관한 규정”의 별표 3 (건강기능식품 기능성 원료의 안전성 평가를 위한 의사결정도)에 의거하여 본 원료를 판단하면 그림 10 (39쪽)과 같음.
- 이로부터 판단하면 의사결정도의 “나”에 해당하며, 이를 근거로 “제출되어야 하는 안전성 자료의 범위”는 섭취근거자료, 해당 기능성분 또는 관련물질에 대한 안전성 정보 자료, 섭취량 평가자료임 (표 8) (39쪽).

(나) 섭취근거정보

○ 국내·외 인정·허가 현황 (25쪽) 및 국내·외 사용 현황 (26쪽)에 덧붙여 인체시험이 시행된 정보를 추가하였음.

① 국내·외 인정·허가 현황

○ 국내·외 인정·허가 현황 부분 (25쪽)에서 설명하였음.

② 국내·외 사용현황

○ 국내·외 사용 현황 부분 (26쪽)에서 설명하였음.

③ 국내·외에서 시행된 인체시험

㉠ 밀기울에 대해 시행된 인체시험

○ 밀기울에 대해서는 제품화된 All-Bran을 이용한 인체시험과 밀기울을 그 자체 또는 시리얼, 빵 등에 첨가한 형태의 시험용으로 자체 제조하여 적용한 인체시험이 이루어졌음.

(a) All-Bran을 이용한 인체시험

○ All-Bran을 이용한 인체시험은 암예방 (Alberts et al., 2000; Jacobs et al., 2002; Ho et al., 1991; Macrae et al., 1997), 이소플라본 (Lampe et al., 2001) 및 대장에서의 기체발생에 대한 영향 (Hickey et al., 1972) 등에 대해 조사되었음.

(b) 자체 제조한 밀기울 첨가식품을 이용한 인체시험

○ 밀기울은 그 자체 또는 시리얼, 빵 등에 첨가한 형태로 다양한 종류의 인체시험이 이루어졌음. 예를 들면, 장의 기능 및 장내 대사에 미치는 영향 (Parisi et al., 2002; Smith et al., 1981; Heller et al., 1980; Wyman et al., 1976; Fuchs et al., 1976; Tomlin & Read, 1988; Anson et al., 2011), 혈중지질대사에 미치는 영향 (Pomare et al., 1976; Kestin et al., 1990; Anderson et al., 1991; Jenkins et al., 1999; Huijbregts et al., 1980; Stasse-Wolthuis et al., 1979; Moore et al., 1985; Sanders & Reddy, 1992), 대장암을 예방하는 효과 (Alberts et al., 2000; Jacobs et al., 2002a; Alberts et al., 1996; Earnest et al., 1999; Martinez et al., 1998; Ho et al., 1991; Macrae et al., 1997; Lampe et al., 2001; Hickey et al., 1972; Jacobs et al., 2002b; MacLennan et al., 1995) 및 페놀화합물 등의 흡수에 미치는 영향 (Price et al., 2008; Hamill et al., 2009; Keagy et al., 1988) 등에 대해서 인체시험이 이루어졌음.

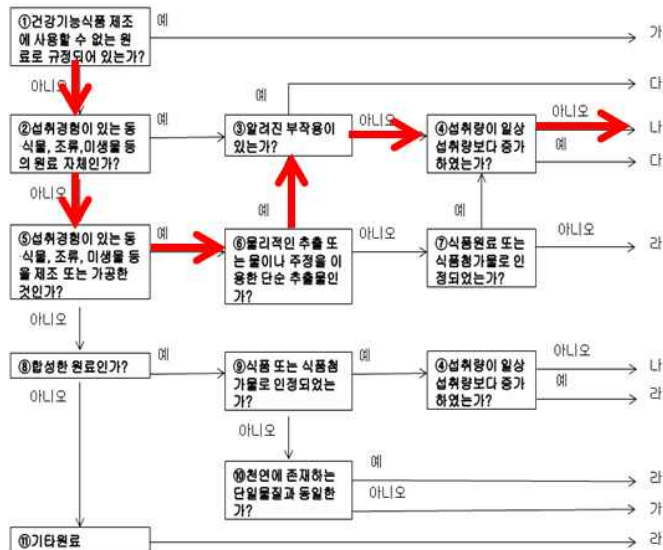


그림 10. 건강기능식품 기능성 원료의 안전성 평가를 위한 의사결정도

표 8. 제출되어야 하는 안전성 자료의 범위

제출되어야 하는 안전성 자료	가	나	다	라
건강기능식품으로 신청할 수 없음	√			
섭취 근거 자료 ¹⁾	√	√	√	√
해당 기능성분 또는 관련물질에 대한 안전성 정보 자료 ¹⁾	√	√	√	√
섭취량평가자료 ¹⁾	√	√	√	√
영양평가자료, 생물학적유효성자료, 인체시험자료 ¹⁾		√	√	√
독성시험자료 ¹⁾				√

㉔ 통밀에 대해 시행된 인체시험

- 밀을 제분하여 얻은 밀가루보다는 밀기울이 포함된 밀전체 (wholegrain)를 섭취하면 심혈관 질환 (Fardet, 2010; Gil et al., 2011; Seal, 2006; Kelly et al., 2007; Flight & Clifton, 2006), 제2형 당뇨병 (Fardet, 2010; Gil et al., 2011; Belobrajdic & Bird, 2013), 대장암 (Fardet, 2010; Gil et al., 2011) 등의 예방에 효능이 있는 것으로 알려져 국내 및 국외에서 통밀을 빵 등의 재료용 또는 이를 이용하여 만든 제품으로 판매하고 있음.

(다) 기능성분 및 관련물질의 안전성(부작용·독성 등) DB 검색정보

- ① Toxline, Pubmed, PDRhealth 및 Natural Medicines로부터 각각 아래의 검색어로 조사하였을 때 아래와 같은 결과를 얻었음.
 - 이 결과를 요약하면 밀로부터 발생하는 부작용으로는 밀알레르기 (wheat allergy)와 밀못견딤증 (wheat intolerance)이 있으며 (PDRhealth), 밀알레르기에는 제빵사천식 (baker's athma)가 대표적이며, 밀못견딤증에는 만성소화장애증 (celiac disease)가 있음.
 - Toxline, Pubmed 등에서 주어진 검색어에 대해 밀 또는 밀기울의 부작용 내용들도 모두 밀알레르기와 밀못견딤증에 관한 것이었음.

검색데이터베이스	검색어	검색결과	안전성 관련 정보 여부	첨부번호
Toxline	(wheat) And (safety or adverse or toxic)	8개	3개	
	(wheat) And (bran) And (safety or adverse or toxic)	2개	0개	
Pubmed	(wheat) And (safety or adverse or toxic)	2649개	18개/400개 (최신)	
	(wheat) And (bran) And (safety or adverse or toxic)	124개	0개	
PDRhealth	'wheat'	약 1000개	2개 (wheat allergy 및 wheat intolerance)	
Natural Medicines	'wheat'	0개	0개	

② 밀알레르기와 밀못견딤증

- 밀알레르기는 면역반응으로 IgE가 밀에 있는 gluten과 결합하여 생긴 복합물이 히스타민 등을 분비하도록 하여 발생하며, 밀못견딤증 중 만성소화장애증은 자가면역질환으로 유전적으로 소질을 가진 사람이 transglutaminase 등에 대한 항체를 생성하고 이것이 transglutaminase의 작용을 억제하여 발생함 (Sapone et al., 2012; Guandalini & Newland, 2011; Pietzak, 2012).

(라) 섭취량 평가정보

- 독성시험면제에 대한 평가자료로 섭취량평가자료를 제시함.
- 이 모두에 의해 평가한 결과 신청원료의 섭취량은 안전한 것으로 판단되었음.

① 섭취량 평가자료

㉔ 신청원료 (밀기울추출물)에 대한 자료

(a) 신청원료의 제안 섭취량 (요약)

- 추출건조물: 3 g/일 [지표성분 (ara): 75 mg]
- 밀기울 (원재료): 30 g/일 (수율 약 10%)

(b) 신청원료의 제안 섭취량 (근거자료)

- 신청원료는 원재료 (밀기울)로부터 약 10% 수율 (중량비)로 얻었으며, 이 원료에는 지표성분인 ara가 약 2.5% 함유되어 있음.
- 생쥐를 이용한 동물실험에서 400 mg/kg/day에서 효능을 나타내고, 이러한 결과를 사람에게 적용할 경우 필요한 용량을 계산하기 위해 미국 FDA 산하기관인 CDER (Center for Drug Evaluation and Research)에서 제시한 지침을 활용하였음 (Guidance for industry: Estimating the maximum safe starting dose in initial clinical trials for therapeutics in adult healthy volunteers. July 2005). 이 지침에 의하면 생쥐를 실험동물로 사용할 때 60 kg 사람에 대해서는 단위 무게 당 0.08을 제안하고 있음. 이를 고려하면 신청원료인 경우 60 kg 사람인 경우 1일 약 2 g의 원료를 섭취하게 됨 (400 mg/kg x 0.08 x 60 kg). 60 kg 보다 큰 사람까지 고려하여 그 여유분 (margin)을 1.5배로 하면 신청원료의 1일 섭취량은 3 g이 되고, 이를 섭취하는 ara의 총량으로 계산하면 약 75 mg임.

㉠ 원재료 섭취량에 의거한 안전성 평가

- 섭취량은 원재료인 밀기울의 섭취량과 지표성분인 ara의 섭취량의 관점에서 비교설명함.

(a) 밀기울

㉡ 일상적인 섭취량에 의한 평가

- 밀기울에 대한 일상적인 섭취량에 대한 자료를 확보하기 어려워 켈로그회사에서 밀기울을 이용하여 만들어 시리얼 형태로 판매하는 All-Bran 한끼 식사량을 근거로 판단함. 이 시리얼 중 “Original”에는 한끼에 해당하는 1/2컵 (serving size)에는 시리얼이 31 g이고 여기에는 밀식이섬유가 10 g이 포함되어 있음. 한편, 켈로그회사의 호주지사에서 판매하는 All-Bran 38 g에는 식이섬유가 11 g 포함되어 있으며 이 식이섬유에 해당하는 가공되지 않은 밀기울 (생밀기울)은 25 g에 해당하였음 (Macrae et al., 1997). 이상으로부터 All-Bran 30 g에는 밀식이섬유가 약 10 g 포함되어 있고, 이는 약 20 g의 생밀기울에 해당하고, 1일 매끼마다 All-Bran을 섭취하는 경우에는 60 g에 해당함.
- 1일 섭취량의 신청원료 (밀기울추출물)를 제조하는데 사용한 밀기울 30 g이므로, All-Bran을 회사에서 추천하는 한끼로 섭취할 경우 섭취하는 밀기울 20 g의 1.5배에 해당하고, 3끼를 All-Bran으로 섭취하는 밀기울 60 g의 0.5배에 해당함. 따라서 최악의 경우에도 원재료 평균섭취량의 1.5배에 해당하여 극단적인 양을 평가하는 기준인 3배를 넘지 않음.

㉢ 인체시험 섭취량에 의한 평가

- 인체시험에서 사용한 밀기울의 양을 가장 장기적으로 시행한 인체시험, 중장기적으로 가장 많은 양을 복용한 인체시험 및 가장 많은 양을 섭취한 단기적인 인체시험으로 나누어서 설명함.
 - 최장 인체시험: 하루 All-Bran의 식이섬유의 양 13.5 g (시리얼의 양은 약 45 g, 밀기울 양 약 27 g에 해당)을 adenoma가 제거된 사람 720명이 최대로 평균 34개월 (Alberts et al.,

2000; Jacobs et al., 2002) 시행한 인체시험임.

- 가장 많이 복용한 증장기 인체시험: 하루 밀기울 자체 57 g을 담석증환자 6명이 4-6주 동안 섭취하였을 때 담즙염의 대사에 미치는 영향에 대해 조사 (Pomare et al., 1976)한 인체시험임.
- 가장 많이 복용한 단기 인체시험: 건강한 남성에게 All-Bran 150 g (생밀기울 약 100 g)을 단기 섭취하였을 때 장에서 발생하는 수소기체의 양을 조사 (Hickey et al., 1972)한 인체시험임.
- o **이상으로부터 예로 들은 인체시험에서 사용한 밀기울의 양은 모두 1일 섭취량의 신청원료를 제조하는데 사용한 밀기울 30 g과 같거나 많은 양을 섭취하고 있어 신청원료의 섭취량이 안전한 것을 알 수 있음.**

(마) 영양평가, 생물학적 유용성, 인체적용시험 정보

① 영양평가 정보

- o 밀기울은 아연과 칼슘 등의 이온의 흡수는 방해하였으나, 철의 흡수에는 영향을 미치지 않았음.
- o 밀기울은 folic acid의 흡수는 촉진하였으며, 비타민 B-6의 흡수는 방해하지 않았음.

② 생물학적 유용성

③ 인체적용시험 정보

㉠ 밀기울

(a) 장기능에 대한 영향 조사

- o 밀기울을 섭취하면 대변양이 증가하고, 장을 통과하는 시간이 단축되었음.
- o 밀기울을 섭취하면 과민성장염이 개선되는 효능이 있었음.

(b) 지질에 대한 영향 조사

- o 담석증이 있는 환자에 대해서는 혈중 콜레스테롤 농도를 낮추는 효능이 관찰된 반면에 고지혈증이 있는 환자에게는 혈중 콜레스테롤에 영향을 미치지 않았음.

(c) 대장에서의 기체발생에 대한 영향 조사

- o 밀기울을 섭취하면 장에서의 기체발생이 증가하였음.

㉡ 밀식이섬유

- o 밀가루로부터 전분과 활성글루텐을 얻고 난 후의 부산물로 얻은 AX를 주성분으로 하는 식이섬유 (혼합물)가 혈당이나 장기능에 미치는 영향에 대해 인체시험이 실시되었음.

(a) 혈당조절에 대한 영향 조사

- o 밀식이섬유는 정상인과 제2형 당뇨병환자 모두에게서 혈당과 혈중 인슐린 농도를 낮추는 효능이 관찰되었음.

(b) 장기능조절에 대한 영향 조사

- o 밀식이섬유는 대장에서의 발효를 촉진시키고, 부티르산의 생성을 증가시켰음.

(바) 독성시험

- 의사결정도에 의해 동물을 이용한 독성시험은 면제됨.
- 하지만 통밀을 분쇄하여 얻은 추출물을 열수추출한 후 원심분리에 의해 밀껍질을 제거하고 얻은 상등액을 동결건조한 건조물에 대해 쥐를 이용한 단회투여 독성시험을 2006년도에 식약처로부터 공인된 GLP시설을 갖춘 대구가톨릭대 바이오안전성센터 (현재 GLP 센터로 개명: <http://www.glpcenter.co.kr/zbxe/>)에 의뢰하여 실시하였음. 그 결과 열수추출물을 먹이는데 한계인 2 g/kg에서 독성이 관찰되지 않았음 (Data not shown).

(8) 기능성 내용 및 그에 관한 자료

- 여기에서는 신청원료 (밀기울추출물)에 대해만 설명하며, 나머지 시료들 (플라시보, 프리믹스, 유사원료 및 순수성분에 대한 설명은 “제 2 절 이론적, 실험적 접근방법, 연구내용, 연구결과” (49쪽)에서 기술됨.

(가) 비인체시험

① 신청원료 (밀기울추출물)에 대한 효능조사

㉞ 시험관시험 (세포실험)

(a) 알츠하이머병모델 (심사 중)

- 신청원료가 알츠하이머병을 유발하는 원인물질인 베타아밀로이드의 독성을 완화시키는지 조사하기 위해 다양한 신경세포주(SH-SY5Y neuroblastoma 세포, BV-2 micriglia 세포, C6 glioma 세포)들을 세포독성, 사멸에 대한 신청원료의 보호 효능과 신경영양인자의 발현에 미치는 영향을 MTT, TUNEL 염색법 및 Western blotting으로 측정하였음.
- 그 결과, 추출혼합물은 SH-SY5Y, BV-2, C6 세포에서 베타아밀로이드로 인한 신경세포 독성을 유의적으로 보호하였음. 더 나아가, SH-SY5Y 신경세포에서 신청원료 (밀기울추출물)은 베타아밀로이드로 인한 신경세포 사멸, apoptosis 매개 단백질의 발현 및 미토콘드리아 막전압 감소를 농도의존적으로 억제하였음. 또한, 신청원료는 상위조절인자인 CREB의 활성화를 통해 BDNF의 발현을 증가시켰음.

㉞ 동물시험 (쥐 또는 생쥐실험)

(a) 알츠하이머병 (심사 중)

㉞ 신청원료의 효능조사

- 베타아밀로이드를 생쥐의 뇌측실내에 주입하여 발생시킨 알츠하이머병 모델에서 신청원료가 기억력을 개선시키는지 물미로 실험을 통해 조사하였음.
- 그 결과 신청원료를 400 mg/kg/day 이상으로 투여한 경우 물미로 실험 기억력을 유의하게 개선시키는 효능이 관찰되었음.

㉞ 신청원료의 작용기전 조사

- 아세틸콜린 합성/분해 효소, 신경세포 사멸, 신경영양인자 BDNF, 산화적 및 염증적 손상, 상위조절 전사인자의 활성을 조사함.
- 그 결과 기억력과 관련된 신경전달 물질인 아세틸콜린 합성 효소의 발현과 뇌신경세포의 생존 등에 관련된 BDNF의 발현을 증가시킴. 이는 상위조절인자 CREB의 활성화로 매개됨.
- 신경세포사멸 매개 단백질인 Bax의 발현을 감소시키고 보호 단백질인 Bcl-2의 발현을 증가시킴.

○ 항산화 전사인자 Nrf2와 하위 표적 HO-1의 발현 증가를 통해 산화적 손상 지표인 지질과산화물을 억제하였으며, 염증적 손상 지표인 사이토카인 TNF- α 의 발현을 감소시킴.

(b) 건망증모델 (심사 중)

㉠ 신청원료의 효능조사

○ 아세틸콜린 수용체의 길항제인 스코폴라민을 주사하여 기억력 상실을 유발시킨 생쥐에 대해 신청원료가 기억력을 개선시키는지 수동회피 실험(passive avoidance test) 및 물미로 실험(Morris water-maze test)으로 조사하였음.

○ 그 결과 신청원료를 800 mg/kg/day 이상으로 투여한 경우 수동회피실험과 물미로 실험 모두에서 기억력을 유의하게 개선시키는 효능이 관찰되었음.

㉡ 신청원료의 작용기전 조사

○ 그 작용기전을 기억력전달에 관여하는 유전자 (ChAT, BDNF 등)의 발현에 미치는 영향을 조사하였음.

○ 그 결과 신청원료는 대뇌피질과 해마에서 기억력과 관련된 신경전달 물질인 아세틸콜린 양 및 아세틸콜린 합성 효소의 발현을 증가시킴. 동일한 조건에서 아세틸콜린 분해효소 및 수용체의 발현에는 큰 변화가 없었음.

○ 또한 신청원료는 대뇌피질과 해마에서 뇌신경세포의 생존 등에 관련된 BDNF의 발현을 증가시켰으며, 이는 상위 조절 전사인자인 CREB와 인산화 효소인 Akt의 활성화에 의해 매개되는 것으로 사료됨.

(c) 혈관성치매모델 (논문 발표)

○ 쥐의 양쪽 총경동맥을 묶어 (bilateral common carotid arteries occlusion, BCCAO) 발생시킨 만성 관류저하 모델 (chronic hypoperfusion model)을 혈관성치매 모델로 이용하여 신청원료 (밀기울추출물)의 효능을 조사하였음.

○ 이 모델에서는 수초 (말이집) (myelin)의 와해로 인한 쥐의 백색질 (white matter) 부분이 먼저 손상을 입게 되고 이로 인해 신경전달이 되지 않게 됨. 손상을 많이 받는 부위로는 뇌들보 (corpus callosum, cc), 속섬유막 (internal capsule, ic) 및 시각로 (optic tract, opt)가 있으며, 이 중에서 특히 예민한 시신경을 연결하는 시각로 (opt)가 손상이 되면 동공이 확대되지 않는 증상이 나타남. 아울러 염증반응에 의해 죽은 세포를 제거하는 미세아교세포 (microglia)가 활성화되고, 독성을 나타내는 글루탐산 (glutamate)을 흡수하는 별아교세포 (astrocyte)도 활성화됨.

○ 본 시험에서는 신청원료를 400 mg/kg/day로 양측 총경동맥을 묶기 5일 전부터 사료에 섞어 먹이기 시작하여 묶고 난 후 30일 동안 섭취하게 하였을 때 쥐를 이용한 혈관성치매 모델에서 나타나는 손상을 억제하는 것을 다음과 같은 관점에서 조사하고 그 결과를 확인하였음.

㉠ 신청원료의 효능조사

○ 신청원료는 빛의 밝기에 따라 조리개가 줄어들고 늘어나는 정도를 조사하는 동공반응조사에서 신청원료를 먹인 쥐에서 동공반응손실이 감소하는 것 (한 동공이상에서의 손상이 78%에서 50%로 감소)이 관찰되어 그 효능이 관찰되었음.

○ 수초의 손상을 염색법 (luxol fast blue)으로 조사한 결과 cc와 opt (시신경 연결 관장) 그 중에서도 특히 opt 지역에서의 손상이 감소하여, opt 지역에서의 손상감소가 동공반응조사에서의 효능으로 이어진 것을 알 수 있음.

㉞ 신청원료의 작용기전 조사

- 만성 관류저하 상태에서 활성화되는 미세아교세포의 상태를 미세아교세포에 특이적으로 결합하는 항체를 이용한 조직염색화학법으로 조사한 결과 opt 지역에서의 발색의 강도와 면적으로 평가한 활성화가 약 50% 정도 감소하였음. 마찬가지로 별아교세포에 대해서도 실시한 결과 cc 지역에서의 활성화가 감소하였음.
- 결론적으로 신청원료는 혈관성치매 모델에서 수초손상을 줄임으로써 미세아교세포와 별아교세포의 활성화를 억제하여 추가적인 손상을 억제하고, 수초의 손상이 줄어들었으므로 동공반응 이상도 줄이는 효능이 관찰되었음.

(나) 인체적용시험 (시험 완료)

- 동물시험을 통해 효능을 나타내지 않는 플라시보를 찾은 다음 이 플라시보와 신청원료에 대해 인체적용시험을 실시하였음.

① 신청원료 캡슐 및 플라시보 캡슐의 제조

- 플라시보 선정: 선행연구에서 효능이 없을 것으로 예상되는 후보물질 (플라시보1 : 볶은쌀, 플라시보2 : 쌀 전분, 플라시보3 : 옥수수 전분, 플라시보4 : 옥수수 텍스트린)에 대해 기억력 개선효능이 있는지를 건망증모델에 대해 조사하였음. 그 결과 플라시보2 (쌀전분)가 기억력 개선효능이 전혀 없으며 행동양상에 영향을 주지 않음을 확인함. 이를 근거로 플라시보로 사용할 시료로는 쌀전분으로 선정하였음.

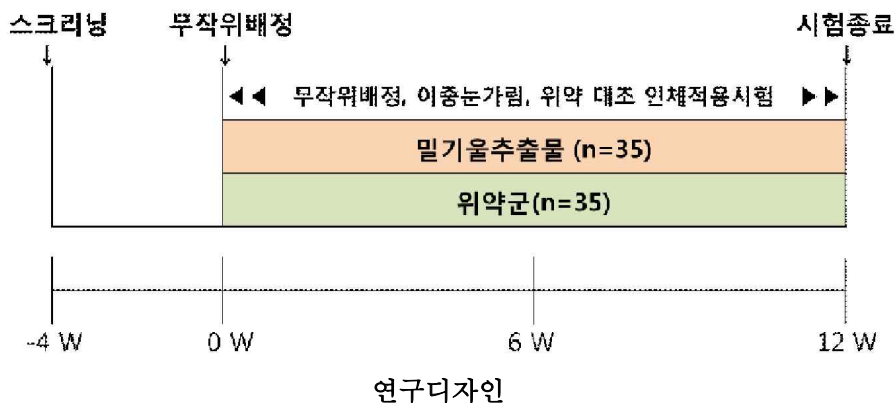
② 섭취

- 신청원료와 플라시보를 부형제와 함께 500 mg 캡슐에 충전하였으며, 신청원료와 플라시보를 1일 3g 섭취하도록 하였음 (부형제까지 고려하면 캡슐 3개를 1일 3회 식전에 섭취하도록 하였음).

③ 인체적용시험 설계

㉠ 연구디자인 설계 및 평가항목 선정

- (a) 연구디자인: 12주, 무작위배정, 이중눈가림, 위약 대조 연구



(b) 평가항목

㉡ 유효성 평가항목

㉢ 1차 유효성 평가항목

- CNT (computerized neurocognitive function test)

: 시각 기억 검사 (visual learning test)

o WMT (working memory test)

: 시각 작업기억 과제 (visual working memory test)

㉔ 2차 유효성 평가항목

o CNT

: 지속검사, 단기 기억 검사(숫자 따라하기, 시각 단기 기억), 언어기억 검사, 기호잇기 검사

o WMT

: 언어성 작업기억 과제 (verbal working memory test)

o K-MMSE (Korean mini-mental status examination; 간이정신상태검사)

o BCRS (brief cognitive rating scale; 단기인지기능평가)

o PRMQ (prospective and retrospective memory questionnaire; 과거회상기억 및 미래예측기억)

o PSS (perceived stress scale; 스트레스 검사)

o SF-36 (36-item short form health survey; 삶의 질 설문지)

o 혈중 BDNF (brain-derived neurotrophic factor; 뇌유래신경영양인자)

㉕ 안전성 평가항목

o 자·타각 증상 등 이상반응 모니터링

o 신체검진, 진단검사의학검사, 심전도 및 활력징후

㉖ 인체적용시험계획서 및 증례기록서 개발

o 인체적용시험계획서, 전자증례기록서 개발을 완료하였음.



㉔ IRB 심의

- 인체적용시험계획서는 연구대상자의 안전을 충분히 고려하여 작성되었으며, 전북대학교병원의 기능성식품인체시험윤리위원회(IRB)가 심의하여 인체적용시험 수행을 결정하였음.
- 최초승인일: 2013. 10. 15

④ 인체적용시험 수행

㉕ 연구자 개시모임

- 2013. 10. 31 연구자 개시모임을 진행하였음.

㉖ 연구대상자 모집 및 인체적용시험 수행

- 본 인체적용시험 등록 목표 연구대상자 수는 70명, 중도탈락 20%를 고려한 종료 목표 연구대상자 수는 56명으로 하여 연구대상자 적합성 평가를 통해 70명이 적격 연구대상자로 선정되었음. 최종적으로 탈락자를 제외하면 종료 목표 연구대상자 56명을 초과한 총 64명(밀기울 추출물군 32명, 위약군 32명)이 인체적용시험계획서에 명시된 모든 절차를 수행 완료하였음.

㉗ 인체적용시험 모니터링

- 26차 모니터링을 완료하였음.

⑤ 인체적용시험 결과 분석

- 1차 유효성평가 항목과 2차 유효성 평가항목에 대해 조사하여 분석한 결과 본 인체적용시험을 통해 인지기능 저하를 보이는 사람에게서 밀기울추출물의 섭취가 시지각 인지기능 및 삶의 질을 유의하게 개선시키며 인체에 안전함을 확인할 수 있었음.

(9) 섭취량, 섭취 시 주의사항 및 그 설정에 관한 자료

- 식약처의 순서대로 섭취량 및 근거, 섭취방법 및 근거, 섭취 시 주의사항 및 근거를 제시하였음.

(가) 섭취량 및 근거 (원료기준)

① 섭취량

- 원료의 섭취량을 3 g-10 g으로 설정하였음.

② 근거

㉕ 기능성 기준 섭취량 계산 (최소)

- 쥐와 생쥐에서의 실험을 기준으로 90 kg 사람에게서 까지 효능이 나타나는 섭취량으로 FDA에서 제안한 계산법에 의해 1일 3 g으로 설정되었음.

㉖ 안전성 기준 섭취량 계산 (최대)

- 밀기울을 이용하여 켈로그에서 제조하여 판매하는 All-Bran을 기준으로 하여 밀기울 섭취량은 일반적으로 밀기울 20 g (하루 한끼)에서 60 g (하루 세끼)임. 이에 대해 극단적인 양 (3배)으로 계산하면 60 g에서 180 g임. 이는 원료의 1일 섭취량 (3 g이며 이는 밀기울 30 g에 해당함)의 2배에서 6배에 해당함.

- 중장기적인 인체시험 (Alberts et al., 2000; Jacobs et al., 2002; Pomare et al., 1976)에서 사용한 밀기울의 1일 섭취량은 27 g에서 57 g이었음. 이를 기준으로 극단적인 양 (3배)으로

계산하면 81 g과 171 g이었음. 이는 원료의 1일 섭취량 (밀기울 30 g)의 2.7배에서 5.7배였음.

- 가장 많이 복용한 단기 인체시험: 건강한 남성에게 All-Bran 150 g (생밀기울 약 100 g)을 단기 섭취하였을 때 장에서 발생하는 수소기체의 양을 조사 (Hickey et al., 1972)한 인체시험임.
- 이상으로부터 극단적인 밀기울의 1일 섭취량은 60-180 g에 해당하고 이를 평균하면 120 g에 해당함. 이를 기준으로 원료의 1일 밀기울 섭취량 (30 g)의 4배에 해당하고 이를 원료로 환산하면 12 g에 해당함. 하지만 단기 인체시험에서 건강한 남성에게 실제 실시한 시험에서는 밀기울 약 100 g을 섭취한 시험을 실시 (Hickey et al., 1972)하였으므로 이를 고려하여 신청원료의 수율이 10%인 것을 감안하여 최대섭취량을 신청원료 10 g으로 설정하였음.

(나) 섭취방법 및 근거

① 섭취방법

- 캡슐형태로 하였음.

② 근거

- 캡슐형태로 설정한 근거: 섭취 후 흡수의 효율성으로는 분말형태가 유리하나 본 신청원료 자체로는 먹기가 불편하였음. 따라서 섭취 용이성과 섭취 후 흡수성을 고려하여 캡슐형태로 설정하였음.

(다) 섭취 시 주의사항 및 근거

① 섭취시 주의사항

- 밀섭취시 부작용 (밀알레르기과 만성소화장애증)이 나타나는 사람은 섭취하지 말 것.
- 인체시험 실시 전 피험자를 대상으로 과거 이러한 부작용이 있었는지 확인하고 이러한 피험자는 제외하는 방향으로 진행하면 될 것임.

② 근거

- 일반적인 밀섭취에서 나타나는 흔치 않은 부작용 (동양인에게는 1% 미만)인 만성소화장애증이 나타날 수 있음.

(10) 의약품과 같거나 유사하지 않음을 확인하는 자료

(가) 건강기능식품에 사용할 수 없는 원료 여부

- 건강기능식품에 사용할 수 없는 원료에 관한 규정 [식품의약품안전청 고시 제2004-13호 (2004.01.31, 제정) 및 제2010-16호(2010. 4.13. 개정)]의 별표 1-4에 명기된 원료에 해당하지 않았음.

(나) 의약품과 같거나 유사한 건강기능식품 여부

- 건강기능식품에 사용할 수 없는 원료에 관한 규정 [식품의약품안전청 고시 제2004-13호 (2004.01.31, 제정) 및 제2010-16호(2010. 4.13. 개정)]의 제3조의 기존 처방 (기존 한약서에 대한 잠정 규정, 한약처방의 종류 및 조제방법에 관한 규정)에 저촉되지 않을 뿐만 아니라, 신청원료 (밀기울추출물)는 1가지 식물추출물로 구성되어 제3조 1항의 “3가지 이하의 원료로 구성된 것은 의약품과 같거나 유사한 것으로 간주하지 않는다”에 해당하므로 사용에 문제가 없음.

제 2 절 이론적, 실험적 접근방법, 연구내용, 연구결과

- 순서는 기능성원료로 인정받기 위해 필요한 자료를 얻은 순서대로 기재하되, 그림 3에서 제시한 바와 같이 실제 본 연구개발에서 시행한 내용을 연구개발과정을 포함하여 작성하였음.
- 이해를 돕기 위해 연구범위, 연구수행방법 (이론적·실험적 접근방법) 및 연구결과를 요약한 내용을 먼저 제시하고, 이에 대한 구체적인 내용 (연구수행 방법, 연구수행 결과)을 작성하였음.

1. 요약

연구범위	연구수행방법 (이론적·실험적 접근방법)	연구결과
(1) 제출자료 전체의 총괄 요약본 (제1세부)	1. 현재까지 얻어진 자료요약	1. 얻어진 자료를 품목명, 목표기능, 섭취량, 원료의 성분 및 지표성분의 기준규격 순으로 요약하여 작성하였음.
(2) 기원, 개발경위, 국내외 인정 및 사용현황 등에 관한 자료 및 품종재배		
(가) 자료조사 (제1세부)	1) 문헌조사 및 연구개발결과 요약	1) 기원, 개발경위, 국내외 인정.허가 현황 및 국내외 사용 현황으로 나누어 작성하였음.
(나) 기능성분 고함유 품종의 선별	1) 대량으로 확보가 가능한 품종에 대해서는 당분석을 실시하여 활성성분이면서 지표 성분인 아라비노스 (ara)의 함량이 높은 품종을 후보로 선별하였음. 반면에 소량으로 확보된 품종에 대해서는 경북농업기술원에서 재배하여 수량을 늘린 후 당분석을 실시하여 후보로 선별하였음. 이를 위해 통밀가루로 만든 후 열수추출하여 그 상등액의 건조물에 대해 ara의 함량을 측정하고 기억력을 개선시키는 효능을 조사하였음.	1) 1차년도에는 대량으로 확보가 가능한 외국산 10종과 국내산 4종에 대해 당분석을 실시한 결과 국내토종인 CU-1 (A밀)의 ara 분율이 높고 수율도 높아 이 것을 대량생산에 사용하기로 함. 한편, 소량으로 확보된 5종에 대해서 재배한 결과 A밀이 문헌상 ara의 함량이 가장 높다고 보고된 품종과 비슷하여 A밀을 선정한 타당성이 있었음. 2) 하지만 구입한 A밀은 순수하지 않을 뿐만 아니라 재배연도별로도 차이를 나타내었음. 이로부터 순품종을 얻기 위해 11년도산 (A11)과 12년도산 (A12) 밀로부터 형태적 특성 등이 다른 line 각각 8종을 선별하여 계통육성을 하였음 (2, 3차년도). 이렇게 얻어진 순수품종들에 당분석을 실시하여 ara의 분율과 전체량이 가장 많은 품종 3가지에 대해 조사한 결과 11년도산 line (A11-8)과 12년도산 line (A12-8)이 가장 좋아 이 2종류를 최종 선별된 품종으로 확정하였음.

연구범위	연구수행방법 (이론적·실험적 접근방법)	연구결과
<p>(3) 제조방법 및 그에 관한 자료 (제1세부, 제2협동, 제1협동)</p> <p>(가) 대량생산조건 확립</p> <p>(나) 인체시험용 신청원료의 대량생산</p>	<p>1) 대용량 추출기를 이용하여 밀기울추출물을 생산하는 최적조건 확립</p> <p>1) 인체시험에 필요한 신청원료 (밀기울추출물)를 확보하고, 이의 특성을 조사하였음.</p>	<p>1) 실험실에서 소규모 (1 L)로 추출하여 상등액을 건조하는 경우에 통밀 (A밀)을 분쇄하여 추출하는 것 (통밀추출물)과 밀기울 (A밀)을 추출하는 것 (밀기울추출물)을 비교한 결과 밀기울로부터 얻은 추출물이 ara의 함량과 전체 ara 수율이 높았음. 한편 통밀추출물과 밀기울추출물 모두 100-200 mg/kg/day의 용량에서 기억력을 개선시키는 효능이 관찰되었음.</p> <p>○ 하지만 통밀과 밀기울을 대규모 (500-1,000 L)로 열수추출하는 경우에는 연속원심분리를 하더라도 호화된 전분이 제거되지 않았음. 이러한 문제점들을 극복하기 위해 전분을 적게 함유하는 밀기울을 원재료로 하고 전분을 열수처리하기 전에 냉수로 처리하고 데칸터로 전분입자를 제거하는 공정을 도입한 결과 효율적으로 전분을 제거 (약 50%)하는 것이 가능하였음. 이렇게 생산된 시료는 기억력을 개선시키는 효능이 관찰되었음.</p> <p>1) 최적화된 공정을 이용하여 인체시험용 신청원료를 확보하였음 (35명이 1일 3g씩 12주에 걸쳐 섭취하는데 필요한 양이 약 9 kg인데 총 13 kg을 확보하였음).</p> <p>○ 공정과정 상에서 요구되는 자료들 (지표 성분 농도, 지표성분 수율 등)을 확보하였음.</p> <p>○ 아울러 이 신청원료의 효능을 수동회피실험을 통해 기억력을 개선시키는 것을 확인하였으며, 이 원료의 지표성분 (ara)의 함량이 약 2.5%인 것을 확인하였음.</p>

연구범위	연구수행방법 (이론적·실험적 접근방법)	연구결과
<p>(4) 원료의 특성에 관한 자료(제2협동)</p> <p>(가) 원료를 특징 지울 수 있는 성상, 물성 등</p> <p>(나) 기능성분(또는 지표성분) 및 근거</p> <p>(다) 영양성분자료</p>	<p>1) 신청원료의 특성을 파악하였음.</p> <p>1) 기능성분(또는 지표성분)을 정하고 설정 근거를 제시하였음.</p> <p>1) 신청원료의 성분 분석</p>	<p>1) “신청원료인 밀기울추출물”은 이취가 없고 고유의 향미가 있는 밝은 회황색의 분말로 약간의 쓴맛을 가짐.</p> <p>1) 기능을 나타내는 성분은 다당류인 AX와 AGP이나 이를 직접 측정하는 방법이 없어 AX와 AGP에 공통으로 존재하면서 기능을 나타내는 ara를 지표성분으로 선정함. 이를 위해서는 AX와 AGP를 분해하여 생성된 ara의 함량을 측정함.</p> <p>1) 추출물의 영양성분을 분석하였음. 탄수화물 66.4%, 단백질 15.2%, 조지방 0.9%, 회분 14.1%, 수분 3.3% 열량은 311.2Kcal로 분석되었음.</p>
<p>(5) 기능성분[또는 지표성분] 규격 및 시험방법에 관한 자료(제2협동, 제1세부)</p> <p>(가) 기능성분(또는 지표성분)의 규격</p> <p>(나) 설정근거</p> <p>(다) 기능성분(또는 지표성분) 시험방법</p>	<p>1) 기능성분(또는 지표성분)의 규격을 설정하였음.</p> <p>1) 기능성분(또는 지표성분)의 규격이 설정된 근거를 제시하였음.</p> <p>1) 지표성분의 분석방법을 제시하고, 이러한 시험방법의 근거가 되는 시험방법 밸리데이션을 실시하였음.</p>	<p>1) 추출혼합물 대량 생산(총 5개 Lot.)으로 제조한 시료의 arabinose를 분석하여 2.5%(중량)로 규격 설정</p> <p>1) 본 연구팀에서 공인분석법(AOAC Official method 994.13)을 일부 변경한 분석법(alditol acetate법)을 이용하여 지표성분 분석법을 확립하였음. 이 방법을 활용하여 한국건강기능식품협회 부설 한국기능식품연구원에서도 측정한 결과 동일한 결과를 얻었음.</p> <p>1) 신청원료를 산처리로 단당류를 생성한 후 환원에 의해 alditol의 생성, alditol의 acetyl화에 의해 alditol acetate 생성, alditol acetate화 된 단당류의 함량을 GC로 분석함.</p> <p>2) 이 시험방법에 대해 특이성, 직선성, 정밀성, 정확성 및 범위의 관점에서 밸리데이션하였음.</p>

연구범위	연구수행방법 (이론적·실험적 접근방법)	연구결과
<p>(6) 유해물질에 대한 규격 및 시험방법에 관한 자료(제2협동)</p> <p>(가) 유해물질 규격항목(납, 카드뮴, 총비소, 총수은)의 규격 및 근거</p> <p>(나) 유해물질 규격 미설정 항목(잔류농약)의 시험성적서 및 분석자료</p> <p>(다) 유해물질(중금속, 잔류농약, 미생물 등)의 시험방법</p> <p>1) 납 2) 총비소 3) 카드뮴 4) 대장균군 5) 잔류농약</p> <p>(라) 필요시 추가항목의 규격 및 근거</p>	<p>1) 식약처에서 고시한 건강기능식품 기능성 원료 및 기준·규격 인정에 관한 규정을 참고함.</p> <p>1) 유해물질로서 잔류농약은 식품공전상의 일반 기준과 밀 관련 품목의 기준을 참고함. 자체 분석과 함께 외부 공인기관의 분석 성적서 확보.</p> <p>1) 식품공전의 분석 방법 적용</p> <p>1) 밀에 적용되는 곰팡이독소인 총아플라톡신, 오크라톡신A, 데옥시니발레놀, 제랄레논의 함량을 측정</p>	<p>1) 추출혼합물의 유해물질 검출 결과와 60kg 성인 1인 1일 섭취량에 따라 규격을 설정하였음.</p> <p>2) 신청원료에 대해 한국기능식품연구원에 의뢰하여 확인한 결과, 납 0.0437 mg/kg, 카드뮴 0.110 mg/kg, 총비소 0.1222 mg/kg, 총수은은 불검출 및 대장균군은 음성으로 분석되어 모두 유해물질규격에 적합한 것으로 확인되었음.</p> <p>1) 신청원료에 대해 59종의 잔류농약 항목의 함량을 한국기능식품연구원에 의뢰하여 분석한 결과, 전 항목이 불검출되어 건강기능식품원료로써 안전함을 확인하였음.</p> <p>1) 신청원료 (밀기울추출물)의 원재료인 밀에 적용되는 곰팡이독소 항목(총아플라톡신, 오크라톡신A, 데옥시니발레놀, 제랄레논)을 건강기능식품연구원에 의뢰하여 분석한 결과, 전 항목이 불검출되어 기능성원료로써 안전함을 확인하였음.</p>

연구범위	연구수행방법 (이론적·실험적 접근방법)	연구결과
<p>2-7. 안전성에 관한 자료 (제1세부)</p> <p>(가) 건강기능식품 기능성 원료의 안전성평가를 위한 의사결정도</p> <p>(나) 섭취근거정보</p> <p>(다) 기능성분 및 관련물질의 안전성(부작용, 독성 등) DB 검색정보</p> <p>(라) 섭취량 평가정보</p> <p>(마) 영양평가, 생물학적 유용성, 인체적용시험 정보</p> <p>(바) 독성시험</p>	<p>1) 식약처 고시 “건강기능식품 기능성 원료 및 기준, 규격 인정에 관한 규정”에 제시된 기준에 의해 판단</p> <p>1) 국내, 외 인정, 허가 현황 및 국내, 외 사용 현황에 덧붙여 인체시험이 시행된 정보를 추가하였음.</p> <p>1) 식약처에서 예시로 제시한 방식을 따름.</p> <p>1) 신청원료의 적절한 섭취량을 문헌조사를 통해 조사하였음.</p> <p>1) 각 필요한 정보들을 문헌조사를 통해 조사하고 요약하였음.</p> <p>1) 독성시험이 필요하지 않은 근거를 제시하였음.</p>	<p>1) 의사결정도를 따라 판단한 결과 독성시험이 면제되는 것으로 판정되었음.</p> <p>1) 국내에서 밀기울을 포함하는 밀식이섭유가 배변활동을 원활하게 하고 혈당을 낮추는 기능이 건강기능식품으로 인정되었음. 이외에 다수의 인체시험이 실시된 예들을 제시하였음.</p> <p>1) 식약처에서 제시한 DB (Toxline, Natural Medicines DB, PDR health, Pubmed 등)을 조사하여 밀이 밀알레르기 및 만성소화장애증을 유발할 수 있는 부작용으로 보고된 예들을 제시하였음.</p> <p>1) 원재료인 밀 또는 밀기울은 식품으로 사용하고 있으므로 제안된 원료의 섭취량 (3g/day)이 일상적으로 섭취하는 원재료 평균섭취량의 3배 또는 극단량 (95 백분위수)보다 적은 것을 확인하였음. 뿐만 아니라 ara의 섭취의 관점에서도 섭취량이 안전한 것을 확인하였음.</p> <p>1) 신청원료의 원재료인 밀기울은 금속이온과 미세영양성분의 흡수에 영향을 미쳤음. 2) 밀기울이나 밀식이섭유가 건강지표에 이상반응을 일으키는 예는 발견되지 않았으며, 오히려 혈당이나 콜레스테롤을 낮추는 등 건강지표에 도움을 주는 효능들이 관찰되었음.</p> <p>1) 의사결정도에 의해 판단하였음. 2) 통밀추출물에 대해서는 단회투여 독성시험을 식약처에서 공인된 기관 (대구가톨릭대 바이오안전성센터)에 의뢰하여 실시한 결과 실험상 섭취한계인 2 g/kg에서 독성이 관찰되지 않았음.</p>

연구범위	연구수행방법 (이론적·실험적 접근방법)	연구결과
<p>(8) 기능성 내용 및 그에 관한 자료 (제1세부, 제1협동, 제2협동, 제3협동)</p> <p>(가) 비인체시험 ① 신청원료 (밀기울추출물)에 대한 효능조사 ② 시험관시험 (세포시험) (a) 알츠하이머병모델 (제1협동)</p> <p>㉠ 동물시험 (a) 건망증 모델 (제1협동)</p>	<p>1) 알츠하이머병을 유발하는 베타아밀로이드에 대한 세포생존 및 사멸 보호효과 조사</p> <p>1) 알츠하이머병을 유발하는 베타아밀로이드에 대한 세포생존 및 사멸 보호효과 조사</p> <p>1) 스코폴라민에 의한 기억력 상실 억제효과 조사. 아울러 이에 대한 기전도 조사.</p>	<p>1) 세포시험: 알츠하이머 치매의 원인 물질인 베타아밀로이드를 처리하여 세포독성 및 사멸을 유발하였음.</p> <p>* 세포생존율 및 사멸 측정을 위하여 MTT와 TUNEL 염색법을 이용함. 세포사멸 매개 단백질의 발현 및 미토콘드리아 막전압 감소를 Western blot과 MMP 형광염색법으로 확인함.</p> <p>* SH-SY5Y, BV-2, C6 세포에서 베타아밀로이드로 인한 신경세포 독성을 유의적으로 보호하였음. 더 나아가, SH-SY5Y 신경세포에서 신청원료는 베타아밀로이드로 인한 신경세포 사멸, apoptosis 매개 단백질의 발현 및 미토콘드리아 막전압 감소를 농도의존적으로 억제하였음.</p> <p>1) 동물시험: 아세틸콜린 수용체의 길항제인 스코폴라민을 주사하여 기억력 상실을 유발하였음.</p> <p>* 기억력 측정을 위하여 수동회피 실험 (passive avoidance test) 및 물미로 실험 (Morris water-maze test)을 수행하였음.</p> <p>* 밀기울추출물을 400 mg/kg 이상으로 투여한 경우 수동회피실험과 물미로 실험 모두에서 기억력을 유의하게 개선시키는 효능이 관찰되었음.</p> <p>* 작용기전 규명을 위하여 기억력 증진에 관여하는 아세틸콜린 양, 아세틸콜린 합성/분해 효소, 신경영양인자 BDNF의 발현, 상위 조절 전사인자 및 인산화 효소의 활성을 조사하였음.</p> <p>* 밀기울추출물은 대뇌피질과 해마에서 기억력과 관련된 신경전달 물질인 아세틸콜린 양 및 아세틸콜린 합성 효소의 발현을 증가시킴. 동일한 조건에서 아세틸콜린 분해효소 발현에는 큰 변화가 없었음.</p> <p>* 밀기울추출물은 대뇌피질과 해마에서 뇌신경세포의 생존 등에 관련된 BDNF의 발현을 증가시켰으며, 이는 상위 조절 전사인자인 CREB와 인산화 효소인 Akt의 활성화에 의해 매개되는 것으로 사료됨.</p>

연구범위	연구수행방법 (이론적·실험적 접근방법)	연구결과
<p>(8) 기능성 내용 및 그에 관한 자료 (제1세부, 제1협동, 제2협동, 제3협동)</p> <p>(b) 알츠하이머병 모델 (제1협동)</p> <p>(c) 혈관성치매 모델 (제1세부) (논문발표)</p>	<p>1) 베타아밀로이드에 의한 기억력 상실 억제효과 조사. 아올러 이에 대한 기전도 조사.</p> <p>1) 동물실험은 경총동맥 결찰에 의한 손상 보호효과로 조사. 치료기전연구는 염색법에 의한 뇌조직 손상 정도와 단백질 발현정도에 의한 보호기전으로 확인</p>	<p>1) 동물실험: 알츠하이머 치매의 원인 물질인 베타아밀로이드를 뇌실에 주입하여 기억력 상실을 유발하였음. * 기억력 측정을 위하여 물미로 실험을 수행하였음. * 밀기울추출물을 400 mg/kg/day 이상으로 투여한 경우 물미로 실험에서 기억력을 유의하게 개선시키는 효능이 관찰되었음. * 작용기전을 규명하기 위하여 아세틸콜린 합성/분해 효소, 신경세포 사멸, 신경영양인자 BDNF, 산화적 및 염증적 손상, 상위 조절 전사인자의 활성을 조사함. * 밀기울추출물은 기억력과 관련된 신경전달물질인 아세틸콜린 합성 효소의 발현과 뇌신경세포의 생존 등에 관련된 BDNF의 발현을 증가시킴. 이는 상위조절인자 CREB의 활성화로 매개됨. * 밀기울추출물은 신경세포사멸 매개 단백질인 Bax의 발현을 감소시키고 보호 단백질인 Bcl-2의 발현을 증가시킴. * 밀기울추출물은 항산화 전사인자 Nrf2와 하위 표적 HO-1의 발현 증가를 통해 산화적 손상 지표인 지질과산화물을 억제하였으며, 염증적 손상 지표인 사이토카인 TNF-α의 발현을 감소시킴.</p> <p>1) 효능조사 o 동공에 빛을 쬐었을 때 반응이 나타나는 정도를 조사한 결과 신청원료를 섭취한 쥐들의 동공 반응이 대조군에 비해 확실히 많은 쥐들이 정상에 가깝게 유지되고 있는 것을 확인하였음. o Luxol fast blue 염색법에 의해 뇌조직의 손상을 조사한 결과 신청원료를 섭취한 쥐들의 시각로 (optic tract)에서의 손상이 감소하였음.</p> <p>2) 기전조사 o 염증반응에 관여하는 미세아교세포의 활성화에 미치는 영향을 조사한 결과 신청원료를 섭취한 쥐에서 그 활성화 정도가 약 50% 감소하였음. o 별아교세포의 활성화에 미치는 영향을 조사한 결과 신청원료를 섭취한 쥐에서 그 활성화가 낮게 나타났음.</p>

연구범위	연구수행방법 (이론적·실험적 접근방법)	연구결과
(8) 기능성 내용 및 그에 관한 자료 (제1세부, 제1협동, 제2협동, 제3협동)		
② 플라시보의 건망증에 대한 효능조사 (제1협동)	1) 효능을 나타내지 않는 플라시보를 선정하기 위해 스코폴라민에 의한 기억력 상실 억제효과 조사.	1) 동물실험: 스코폴라민을 주사하여 기억력 상실증 유발하였음. 기억력 측정을 위하여 수동회피 실험을 수행하였음. * 인체시험에 사용할 플라시보는 기억력을 개선시키는 효능이 없어야 함. 이를 위해 선행 연구에서 효능이 없을 것으로 예상되는 후보물질 (플라시보1 : 볶은쌀, 플라시보2 : 쌀전분, 플라시보3 : 옥수수 전분, 플라시보4 : 옥수수 텍스트린)에 대해 기억력 개선효능이 있는지를 조사하였음. * 그 결과 플라시보2 (쌀전분)가 기억력 개선효능이 전혀 없으며 행동양상에 영향을 주지 않음을 확인함. 이를 근거로 플라시보로 사용할 시료로는 쌀전분으로 선정하였음.
③ 프리믹스의 제조 및 효능조사(제1협동)	1) 밀기울추출물을 함유한 프리믹스의 스코폴라민에 의한 기억력 상실 억제효과 조사.	1) 동물실험: 스코폴라민을 주사하여 기억력 상실증 유발하였음. 기억력 측정을 위하여 수동회피 실험을 수행하였음. * 밀기울추출물이 포함된 프리믹스(Premix w/ WBE)와 불포함된 프리믹스(Premix w/o WBE)에 대해 비교 효능 실험이 이루어 졌음. * 그 결과 밀기울추출물이 포함된 프리믹스를 800 mg/kg 이상으로 투여한 경우 수동회피 실험에서 기억력을 유의하게 개선시키는 효능이 관찰되었음. 동일한 용량 및 실험 조건에서 밀기울추출물이 불포함된 프리믹스의 경우 활성이 관찰되지 않았음.
④ 유사원료 (통밀추출물)	A밀을 선별하는 과정에서 소규모로 생산한 통밀추출물에 대한 효능 조사	
㉞ 건망증 모델 (제1협동)	1) 원료의 형태 및 추출조건에 따른 최적 추출물을 도출하기 위해 스코폴라민에 의한 기억력 상실 억제효과 조사.	1) 동물실험: 스코폴라민을 주사하여 기억력 상실증 유발하였음. 기억력 측정을 위하여 수동회피 실험을 수행하였음. * 원료의 형태(분쇄통밀 vs 밀기울) 및 추출조건(상등액 vs 전체)에 따라 기억력 개선효능에 차이가 있는지를 조사하였음. * 그 결과 통밀상등액과 밀기울상등액에서 각각 100과 200 mg/kg에서 기억력을 유의하게 개선시키는 효능이 관찰되었음.

연구범위	연구수행방법 (이론적·실험적 접근방법)	연구결과
㉔ 혈관성치매 모델 (제1세부)	1) 동물실험은 경총동맥 결찰에 의한 손상 보호효과로 조사. 치료기전연구는 염색법에 의한 뇌조직 손상 정도와 단백질 발현정도에 의한 보호기전으로 확인	1) 효능조사와 기전조사가 이루어졌음.
⑤ 기능성분 고함유 밀추출물	(2)-(나) (49쪽)에서 고함유 품종을 선별하는 과정에서 시행되는 효능조사	
㉕ 건망증 모델 (제1협동)	1) 기능성분 고함유 밀 추출혼합물의 스코폴라민에 의한 기억력 상실 억제효과 조사.	1) 동물실험: 스코폴라민을 주사하여 기억력 상실증 유발하였음. 기억력 측정을 위하여 물미로 실험을 수행하였음. * 기능성분 고함유 밀 추출혼합물 3종에 대해 비교 효능 실험이 이루어 졌음. * 그 결과 중C의 활성이 가장 높았으며, 100 mg/kg의 용량에서부터 공간기억력을 유의하게 개선시키는 효능이 관찰되었음.
⑥ 순수성분에 대한 효능 조사		
㉖ 구매된 AX, AG 등에 대한 효능조사		
(a) 건망증 모델 (제1협동)	1) 스코폴라민에 의한 기억력 상실 억제효과 조사. 아울러 이에 대한 기전도 조사	1) 동물실험: 아세틸콜린 수용체의 길항제인 스코폴라민을 주사하여 기억력 상실증 유발하였음. * 구매한 순수 아라비노자일란(AX, 밀 유래), 아라비노갈락탄(AG, 잎갈나무 유래), 아라비노즈(ara), 자일로즈(xyl)에 대해 기억력 개선효능이 있는지를 조사하였음. 기억력 측정을 위하여 수동회피 실험을 수행하였음. * 그 결과, AX와 AG를 5 mg/kg의 용량으로 먹었을 때 최대 효능이 관찰되었음. 구성 단당류 ara와 xyl는 1 mg/kg 이상으로 먹었을 때 효능이 관찰되었음. 2) 기전실험: 아세틸콜린 합성/분해 효소, 무스카린성 아세틸콜린 수용체, 신경영양인자 BDNF의 발현, 상위 조절 전사인자 및 인산화 효소의 활성을 조사하였음. * AX와 AG는 뇌신경세포의 생존 등에 관련된 BDNF의 발현을 증가시켰으며, 이는 상위 조절 전사인자인 CREB와 인산화 효소인 Akt의 활성화에 의해 매개되는 것으로 사료됨. 특히, AX는 아세틸콜린 합성 효소 및 무스카린성 아세틸콜린 수용체 (M ₁ mAChR)의 발현을 증가시켰음. Ara의 경우 역시 BDNF의 발현을 증가시킴.

연구범위	연구수행방법 (이론적·실험적 접근방법)	연구결과
⑥ 순수성분에 대한 효능조사 ㉔ 구매된 AX, AG 등에 대한 효능조사 (b) 혈관성 치매 모델 (제1세부)	1) 동물실험은 경총동맥 결찰에 의한 AG의 손상 보호효과로 조사. 치료기전연구는 염색법에 의한 뇌조직 손상 정도와 단백질 발현 정도에 의한 보호기전으로 확인	1) 효능조사 ○ Luxol fast blue 염색법에 의해 뇌조직의 손상을 조사한 결과 AG를 섭취한 쥐들의 뇌량 (corpus callosum, cc)에서의 손상이 감소하였음. 2) 기전조사 ○ 염증반응에 관여하는 미세아교세포의 활성화에 미치는 영향을 조사한 결과 AG를 섭취한 쥐의 시각로에서 그 활성화 정도가 약 45% 감소하였음.
(c) 심근경색 모델 (제1세부) (논문투고 중)	1) 쥐의 관상동맥을 묶었다가 푸는 허혈-재관류 모델에서의 효능조사 및 작용기전조사	1) 효능조사 ○ AG를 100 mg/kg/day로 섭취하게 한 경우 허혈 30분, 재관류 3시간 모델로 실험을 실시한 후 TTC 염색으로 경색면적이 줄어드는지를 조사한 결과 경색부피가 약 27% 정도 감소하였음. 아울러 AG를 구성하는 ara도 효능을 나타내는 반면에 gal은 그 효능이 관찰되지 않았음. 2) 기전조사 ○ 세포자살을 측정하는 TUNEL assay를 실시한 결과 경계지역에서 세포자살이 현저하게 감소하였음. ○ 이를 유전자발현과의 연관성으로 설명하기 위해 유전자 (caspase-3, Bcl-2, Bax)의 발현 정도를 면역조직화학법에 의해 측정하였음. 그 결과 AG를 섭취한 쥐에서 procaspase-3로부터 caspase-3의 생성이 줄어들고, Bcl-2/Bax 비율이 증가하였음. ○ 이렇게 AG가 나타내는 효능이 ara와 관련이 있는지를 조사하기 위해 ara만 포함하는 arabinan과 gal만 포함하는 galactan에 대해 실험을 실시한 결과 arabinan만 그 효능이 관찰되었음. 뿐만 아니라 AG와 ara를 정맥을 통해 주사를 한 경우 ara만 효능이 관찰되었음. 이로부터 ara가 AG의 발효생성물로서 효능을 나타내는 성분임을 확인하였음.

연구범위	연구수행방법 (이론적·실험적 접근방법)	연구결과
⑥ 순수성분에 대한 효능조사 ④ 분리정제된 AX와 AGP에 대한 효능조사 (a) 분리정제된 AX에 대한 효능조사 ① AX의 분리정제	1) 밀기울추출물에 효소로 전분을 제거한 후 에탄올분획(20-60%)을 실시. 이를 다시 효소처리하여 남은 전분, 단백질 및 베타글루칸을 제거	1) GPC로 조사한 결과 peak가 약 69 kD에 나타나는 1개로 확인되어 순수 AX를 확보하였음. 이 분자량은 문헌의 보고와 일치하였으며, ara/xyl의 비율이 0.48로 Megazyme에서 판매하는 것과 동일 비율인 것을 확인하였음.
⑥ 분리정제된 AX의 기능 ⑦ 분리정제된 AX의 심근경색에 대한 효능 (제1세부)	1) 분리정제한 순수AX에 대해 효능을 구매한 AX와 비교	1) 본 연구에서 분리정제한 AX와 Megazyme으로부터 구매한 AX 모두 5 mg/kg/day에서 경색을 동일하게 줄이는 것이 관찰되었음. 이로부터 분리정제된 것이 구매한 것과 동일하다는 것을 확인함.
(b) 분리정제된 AGP에 대한 기능조사 ① AGP의 분리정제	1) 밀가루로부터 글루텐 제거, 수용성 AGP 추출, 에탄올분획(60-80%)에 의한 조AGP 확보 및 황산암모늄 침전에 의해 순수 AGP 확보	1) GPC로 조사한 결과 분자량 15,500에서 1개의 peak가 관찰되어 순수한 것을 확인하였음. 중성당을 분석한 결과 ara 40%, gal 57.7%로 AGP의 특성을 만족시켰음.
⑥ 분리정제된 AGP의 효능 ⑦ 건망증 모델 (제1협동)	1) 스키폴라민에 의한 기억력 상실 억제효과 조사	1) 동물실험: 아세틸콜린 수용체의 길항제인 스키폴라민을 주사하여 기억력 상실증 유발하였음. * 분리정제한 AGP에 대해 기억력 개선효능이 있는지를 수동회피실험으로 조사하였음. * 그 결과, AGP를 2.5 mg/kg 이상으로 먹었을 때 기억력 개선 효능이 관찰되었음.
① 심근경색모델 (제1세부) (논문투고 준비 중)	1) 쥐의 관상동맥을 묶었다가 푸는 허혈-재관류 모델에서의 효능조사 및 작용기전조사	1) AGP를 1-100 mg/kg/day로 투여한 경우 경색부피를 26% 유의하게 감소시켰음. 2) AGP를 100 mg/kg/day로 투여한 경우 TUNEL assay에서 경계지역에서 세포자살을 억제하였음. 또한 Western blotting에 의해 Bax/Bcl-2 비를 조사한 결과 감소하였으며, p38, JNK 및 ERK 모두 대조군에 비해 인산화가 감소하였음. 이러한 결과는 AGP가 심근경색부피를 감소시키는 효과는 세포자살에 관련된 유전자들의 발현을 조절하거나 인산화를 조절하여 일어나는 것을 나타냄.

연구범위	연구수행방법 (이론적·실험적 접근방법)	연구결과
<p>(8) 기능성 내용 및 그에 관한 자료 (제1세부, 제1협동, 제2협동, 제3협동)</p> <p>(나) 인체시험 (제2협동, 제3협동)</p> <p>① 신청원료 캡슐 및 플라시보 캡슐의 제조 (제2협동)</p> <p>② 섭취</p> <p>③ 인체적용시험 설계</p> <p>④ 인체적용시험 수행</p> <p>⑤ 인체적용시험 결과 분석</p> <p>(9) 섭취량, 섭취방법, 섭취시 주의사항 및 그 설정에 관한 자료 (제1세부)</p> <p>(가) 섭취량 및 근거 (원료기준)</p> <p>(나) 섭취방법 및 근거</p> <p>(다) 섭취시 주의사항 및 근거</p> <p>(10) 의약품과 같거나 유사하지 않음을 확인하는 자료 (제1세부)</p> <p>(가) 건강기능식품에 사용할 수 없는 원료 여부</p> <p>(나) 의약품과 같거나 유사한 건강기능식품 여부</p>	<p>1) 인체시험용 샘플과 위약 제조</p> <p>1) 섭취할 양과 섭취횟수를 결정하였음.</p> <p>1) 인체적용시험 디자인 설계</p> <p>2) 평가항목 선정</p> <p>3) 인체적용시험계획서 및 증례기록서 개발</p> <p>4) IRB 심의</p> <p>1) 연구자 개시모임</p> <p>2) 연구대상자 모집</p> <p>3) 인체적용시험 수행</p> <p>4) 인체적용시험 모니터링</p> <p>1) 결과 통계 분석</p> <p>1) 문헌조사 및 실험결과를 이용하여 설정</p> <p>1) 활성성분의 성질을 이용하여 결정</p> <p>1) 문헌조사를 이용하여 근거 제시</p> <p>1) 규정활용</p> <p>1) 규정활용</p>	<p>1) 신청원료로 인체시험용 샘플을 제조하였고, 싣전분을 원료로 위약을 제조하였음.</p> <p>1) 디자인: 12주, 무작위배정, 이중눈가림, 위약 대조 연구</p> <p>2) 전산화신경인지검사(CNT), 작업기억과 체검사(WMT), 인지기능 관련 설문지, 뇌신경유래인자(BDNF) 등</p> <p>3) 계획서 1건, 증례기록서 1건 개발</p> <p>4) IRB 승인(v1.3)</p> <p>1) 2013. 10. 31 개시모임 진행</p> <p>2) 70명 등록 완료</p> <p>3) 인체적용시험 수행 완료 (2014. 9. 25)</p> <p>4) 인체적용시험수탁기관 (CRO) 26차 모니터링 완료</p> <p>1) 시지각 인지기능에 유의한 개선이 있었음.</p> <p>1) 3-10g (3g은 인체적용시험으로부터, 10g은 섭취량 문헌조사로부터 결정).</p> <p>1) 섭취방법은 캡슐형태 (섭취의 용이성)</p> <p>1) 밀에 알레르기를 나타내는 사람은 섭취 제한</p> <p>1) 식약청 고시로부터 사용가능한 것임.</p> <p>1) 식약청 고시로부터 의약품과 상관이 없음을 확인함.</p>

2. 구체적인 연구수행방법 및 연구결과

가. 구체적인 연구수행방법

(1) 제출자료 전체의 총괄요약본 (제1세부)

○ 품목명, 목표기능, 섭취량, 원료의 성분 (지표성분) 및 기준규격 (지표성분)에 대해 요약하여 작성하였음.

(2) 기원, 개발경위, 국내·외 인정 및 사용현황 등에 관한 자료

(가) 자료조사 (제1세부)

○ 기원, 개발경위, 국내외 인정·허가 현황 및 국내외 사용 현황에 대해 작성하였음.

○ 기원, 국내외 인정·허가 현황 및 국내외 사용 현황은 문헌조사로 이루어졌으며, 개발경위는 이제까지 수행한 연구내용에 대해 설명하였음.

(나) 기능성분 고함유 품종의 선별 (제1세부)

○ 대량으로 확보가 가능한 품종에 대해서는 당분석을 실시하여 활성성분이면서 지표성분인 아라비노스 (ara)의 함량이 높은 품종을 후보로 선별하였음. 반면에 소량으로 확보된 품종에 대해서는 경북농업기술원에서 재배하여 수량을 늘린 후 당분석을 실시하여 후보로 선별하였음.

① 대량재배 가능품종으로부터의 선별

㉠ 1차년도

○ 대량재배가 이루어지고 있는 밀품종은 외국산 10종 [NS, SWW10.5, SWW9.5, SRW (이상 미국), CWRS, COW (이상 캐나다) 및 ASW, AOW, AH (이상 호주)]는 동아원(주)으로부터, 국내육종 품종 [CU-2 (금강밀), CU-3, CU-4]는 경북농업기술원으로 각각 제공받았으며, 국내토종인 CU-1 (A밀)은 이를 재배하는 영농조합으로부터 구매하였음.

○ 통밀상등액의 추출은 약탕기를 이용하여 물:통밀 = 10:1 또는 15:1로 하여 이루어졌으며, 구체적으로는 “(3) 제조방법 및 그에 관한 자료”에서와 같은 방법으로 이루어졌으며, 당함량은 alditol acetate 법을 이용하여 측정되었음.

② 소량재배 가능품종으로부터의 선별

㉠ 재배품종

(a) 1차년도

○ 소량재배 품종으로는 문헌상 (J. Agric Food Chem 2008, 56, 9740-9747)으로 수용성 아라비노자일란의 함량이 높은 것으로 밝혀진 국산육종 품종 (CU-6) (S)과 외국산 CU-7 (Y), CU-8 (J) 및 CU-9 (9)을 경북농업기술원에서 재배하였음 (CU-6은 국립농업유전자원센터로부터, CU-7 (Y), CU-8 (J) 및 CU-9 (9)는 외국기관을 통해 확보하였음). 이를 수확한 후 얻은 통밀상등액에 대해 당함량분석을 실시하였음.

(b) 2차년도

○ 1차 년도에 기능성분인 아라비노자일란을 고함유한 밀품종을 선별하였으며, 2차 년도에는 이 선별된 밀품종을 재배하여 그 양을 확보하고 재배특성을 조사하였음. 아울러 재배된 품종의

특성이 균일하지 않아 유전자원을 계통육성하기 위해 유전적 특성이 다른 개체를 별도로 파종하였음.

- 증식시킨 품종 (2012년 가을에 재배하여 2013년 6월경에 수확된 것)은 다음과 같음.
 - CU-1 (A밀): 우리나라 토종으로 2011년산 [A밀('11): A11]과 2012년도산 [A밀('12): A12]임.
 - CU-7 (Y밀)과 CU-8 (J밀): 중국에서 개발된 품종임.
 - 비교품종: 현재 우리나라에서 재배되고 있는 밀품종 (조경밀, 금강밀, 우리밀)임.
- 개체의 별도 파종
 - 각 품종별로 유전적 특성 (키 등)이 다른 14점을 선별하여 파종하였음.

(c) 3차년도

- 증식은 A11밀 (A11 bulk), J밀 및 Y밀에 대해 시행하였으며, 아울러 A11밀과 A12밀에 대해 증식을 실시한 결과 기존 자원에서 특성이 차이가 나거나 형태적 특성이 분리되는 개체를 분리하여 총 16종의 밀에 대하여 증식재료로 하였음 (표 9).

표 9. 2014년도 밀 증식자원

구분	자원수	자원명
증식자원	3종	Y밀, J밀, A11밀
계통육성	16 계통	A11밀 (A11) 8계통, A12밀 (A12) 8계통

㉔ 재배조건

(a) 파종

- 포장준비 : 매년 10월 말경 20일 대구시 북구 동호동 189번지 경북농업기술원 작물연구과 맥류시험포장에 밀표준재배에 필요한 비료와 퇴비량을 살포하고 (표 10) 경운 정지 작업을 한 후 파종하였음. 자원 종자량이 적어 1립씩 줄간격 25 cm 포기간격 5cm로 하여 점파하였음.

표 10. 밀 자원증식 재배 개요

재배 토양	표고 (m)	토성	비옥도	파종일 (월.일)	파종량 (kg/10a)	휴폭 (cm)	파폭 (cm)	시비량(kg/10a)				
								N		P ₂ O ₅	K ₂ O	퇴비
								기비	추비			
밭	60	양토	상	10.26	14	25	5	7.0	4.8	7.4	3.9	1000

※밀 표준 파종량 : 14 kg/10a

(b) 파종후 관리

- 파종 후 제초제 (알라립제)를 처리하여 잡초를 방제 하였고, 월동 후 다음 해 2월 중순 (생육재생기)에 질소비료 4.8 kg/10a을 처리하였음.

(c) 주요 조사항목 및 조사방법

- 출아기(월.일) : 파종립수의 40%가 지표면 위로 출아한 날
- 출아양부 : 파종한 총립수에 대한 지표면 위로 출현한 개체비율

- 1 : 양(80%이상 출아), 2 : 중(60~79%출아), 3 : 불량(59%이하)
- 출수기(월.일) : 총경수의 40%가 출수한 날
- 성숙기(월.일) : 대부분의 이삭이 황화한 날로, 곡립이 경화되며 수분이 35% 정도 되어 수확할 수 있는 날
- 간장(cm) : 지면에서 이삭 목까지의 길이
- 수장(cm) : 이삭 목부터 이삭 끝까지 길이(까락은 제외, 0.1cm까지 조사)
- 1수립수(개) : 생육이 균일한 장소에서 무작위로 20수를 채취하여 탈곡조사
- 1ℓ 중(g) : 설립을 제거한 종실에서 1ℓ 중 측정기를 사용, g으로 표시하고, 3회 측정 평균
- 천립중(g) : 설립을 제거한 종실에서 1,000립을 측정(3회 측정), 0.1g까지 표시
- 기타 : 농업과학기술 연구조사 분석기준('03. 11) 참고

(3) 제조방법 및 그에 관한 자료 (제1세부, 제2협동, 제1협동)

(가) 실험실 규모 생산 [원료 (통밀 vs 밀기울), 추출조건 (상등액 vs 전체)] (1차년도)

① 분쇄통밀 및 밀기울의 추출

o 통밀 [CU-1 (A11: A밀 11년도) 및 CU-2 (금강밀)]을 제분기를 이용하여 분쇄한 통밀 100 g을 1.5 L (물:통밀 = 15:1)의 증류수를 첨가하여 추출하였음; 상온에서 일부 증류수에 미리 계워 둔 100 g 분쇄통밀을 전기 약탕기 (대용약탕기 DWP-5000M, 대용)에 미리 끓인 증류수에 넣어 1시간 동안 끓였음. 끓인 통밀을 상온에서 식힌 후 전체나 또는 원심분리한 [SUPRA 22K, 9000 rpm (14,000 g), 4 °C, 20분] 상등액을 60 °C에서 열풍건조시켰음. 건조된 상등액을 믹서기에 갈아 통밀전체와 통밀상등액을 얻었음.

o 구매한 밀기울 [CU-1 (A11) 및 CU-2 (금강밀)] 100 g을 1.5 L (물:통밀 = 15:1)의 증류수를 첨가하여 추출하였음; 우선 전기 약탕기 (대용약탕기 DWP-5000M, 대용)에 증류수를 1.5 L를 넣고 끓인 후 밀기울을 넣어서 섞은 후 잘 저었음. 다시 끓게 되면 그때부터 1시간 더 끓인 후 상온에서 식혔음. 끓인 밀기울을 상온에서 식힌 후 전체나 또는 원심분리한 [SUPRA 22K, 9000 rpm (14,000 g), 4 °C, 20분] 상등액을 60 °C에서 열풍건조시켰음. 건조된 상등액을 믹서기에 갈아 밀기울전체와 밀기울상등액을 얻었음.

② 추출물의 당함량분석

o 추출물을 “(5) 기능성분[또는 지표성분] 규격 및 시험방법에 관한 자료”에서와 같이 alditol acetate 법으로 구성 단당류로 분리한 후 면적으로부터 그 함량을 계산하였음.

(나) 대량생산조건 확립 (2차년도)

- o 인체시험용 원료를 생산하기 위해 대용량 추출기 (500 L)에서의 최적조건을 확립하기 위한 실험을 다음과 같은 다양한 조건에서 수행하여 최종적으로 대량생산이 가능한 조합을 찾아 내었음.
- o 이를 위해 원재료 (밀기울, 분쇄통밀), 밀껍질을 제거하기 위한 체 (sieve) (250 및 125 μm), 추출기 (1 L, 20 L 및 500 L), 원심분리기 [batch type (실험실용), continuous type (산업용; decanter, disk stack 및 tubular)], 농축기, 건조기 (분무건조기, 동결건조기)의 다양한 조합을 이용하여 실시하였음.

① 원재료 (밀기울, 분쇄통밀)

- 추출을 하기 위한 원재료로는 1차 년도에서 AX의 함량이 제일 높은 것으로 선별된 CU-1 (A밀)을 사용하였으며, 밀기울은 A밀의 산지로부터 구매하고 분쇄통밀은 통밀을 산지로부터 구매한 뒤 실험실용 제분기를 이용하여 분쇄하여 사용하였음.

② 체 (sieve) (250 및 125 μm)

- 밀기울을 원재료로 사용하는 경우 체 (250 μm)로 걸러 전분을 미리 제거하였으며, 이 밀기울을 열수추출한 후 밀겉질을 제거하는 경우에도 250 μm 체를 사용하였음. 하지만 열수추출 후 250 μm 의 체로 거른 후 이를 통과한 밀겉질을 제거하기 위해 125 μm 체로 다시 한 번 걸렀음. 대용량인 경우에는 직접 제작하여 사용하였음.

③ 추출기 (1 L, 20 L 및 500 L)

- 실험실 규모에서의 생산은 1 L 생산이 가능한 약탕기 (그림 11의 a), 10 L 생산이 가능한 중규모 추출기 (그림 11의 b)로 생산을 시도하였고, 대규모 생산은 최대 500과 1,000 L 생산이 가능한 대규모 추출기 (그림 11의 c) 등을 사용하여 생산을 시도하였음.
- 소규모추출기 (약탕기)는 생산방법이 간단한 반면에 추출온도가 끓는 온도 (약 100 $^{\circ}\text{C}$)에서 시행되어 온도조절이 불가능하고, 수증기의 증발이 차단되지 않아 중간에 물을 계속 보충하여야 하는 단점이 있음. 한편, 중규모추출기 (실험실용 추출기)는 생산방법이 비교적 간단하면서도 온도제어기가 달려 있어 온도제어가 가능함. 하지만 추출기 내의 온도를 일정하게 유지하기 위해서는 뚜껑을 열고 계속 저어 주어야 하는 어려움이 있을 뿐만 아니라 이로 인해 증발이 일어나 물을 여전히 보충해 주어야 함. 마지막으로 대규모추출기는 생산방법은 복잡하지만 추출기의 온도제어가 가능할 뿐만 아니라 교반기도 달려있어 밀폐된 공간에서의 추출이 가능하여 증발이 일어나지 않는 장점이 있음.

④ 원심분리기 [batch type (실험실용), continuous type (산업용; decanter, disk stack 및 tubular)]

- 아래의 설명에서와 같은 원심분리기의 장단점을 고려하여 실험실용인 btach type [SUPRA 22K; 한일과학산업, 대한민국]으로는 열수추출물을 4 $^{\circ}\text{C}$ 에서 9,000 rpm (14,000 g)에서 20분간 원심분리하였음. 연속원심분리가 가능한 디스크연속원심분리기 (Clara 200; Alfa Laval Inc., Richmond, VA, USA)를 사용하여 분리되었으며, 열수추출물은 약 70 $^{\circ}\text{C}$ 에서 300 L/hr로 공급되고 원심분리는 약 7,500 rpm (12,000 g)에서 진행되었음. 전분입자를 미리 제거하기 위해 사용한 데칸터는 시험용데칸터인 경우는 데칸터 제작업체인 부산의 부성엔지니어링에서 보유한 것을 사용하였으며, 실제 대량생산인 경우에는 춘천바이오산업진흥원에서 보유한 데칸터 (Tomoe Eng Co LTD, Tokyo, 일본)를 약 4000 rpm로 회전시키면서 유속은 200 L/hr로 하여 운행하였음.
- 실험실용으로 쓰는 batch type (그림 12의 a)은 원심력에 의해 혼합물 내의 액체와 고체가 각각 상등액과 침전물로 되며, 상등액을 얻기 위해서는 원심분리기를 멈추고 얻어야 하므로 불연속 생산만이 가능함. 한편, tubular type (그림 12의 b)은 혼합물이 연속적으로 들어와 원심력에 의해 상등액과 침전물로 분리되어 상등액은 연속적으로 나가나 침전물은 벽면에 쌓이게 됨. 따라서 침전물이 많아지면 원심분리기를 멈추어 침전물을 제거한 후 다시 사용이 가능하므로 semi-continuous type임. Disk type (그림 12의 c)은 혼합물이 연속적으로 들어와 아래로 기울어진 판 (disk)이 많이 쌓여있는 틈사이를 원심력에 의해 분리되어 상등액은 위로 연속적으로 방출되고 침전물은 아래에 모이게 됨. 이렇게 모인 침전물은 주기적으로 방출하게 되어 있어 continuous type임. 마지막으로 decanter type (그림 12의 d)은

원심분리기가 누운 형태로 되어 있어 혼합물이 중간으로 들어오면서 원심분리되면 침전물은 벽면에 붙게 되나 벽면 가까이까지 도달하는 screw 형태의 판에 의해 제거되어 한쪽으로 방출됨. 그리고 액상은 다른 쪽으로 연속적으로 방출되므로 decanter type이 진정한 의미에서의 continuous type임.

- 이러한 원심분리기들의 특징을 요약하면 표 11과 같음. Batch type는 연속생산은 불가능하지만, 원심력이 높고 체류시간이 길게 조절할 수 있으므로 침전물을 완전하게 분리하는데 적절함. 반면에 연속생산이 가능한 tubular, disk 및 decanter type은 체류시간이 짧아 고체의 입자가 크지 않는 경우 batch type만큼 깨끗하게 분리하는 것이 어려움. 한편, tubular type은 침전물이 계속 제거되지 못하므로 침전물이 많은 혼합물의 분리에는 부적절함. 연속생산이 가능한 disk와 decanter type을 비교하면 disk type은 원심력이 커 상대적으로 분리능이 커나 disk간의 간격이 좁아 입자가 크거나 분리 중에 응집이 생기면 원심력이 균형을 이루지 못해 작동이 멈추어 버리는 어려움이 있는 등 운전조건이 까다로움. 반면에 decanter는 원심력이 낮아 분리능이 좋지 않으나 기계자체가 튼튼하여 침전물의 크기, 점도 등에 영향을 받지 않는 등 운전조건이 쉬운 장점이 있음.

⑤ 농축기

- 열수추출물의 농축은 춘천바이오산업진흥원이 보유한 농축기 (효성기공)를 이용하여 500 L/hr의 속도로 농축하였음.

⑥ 건조기 (분무건조기, 동결건조기)

- 건조는 분무건조와 동결건조가 시도되었음.
- 건조방법은 여러 가지가 있으나 동결건조, 분무건조 및 열풍건조가 고려되었음. 동결건조 (그림 13의 a)는 일단 건조할 상등액을 얼린 후 보통 감압상태에서 승화로 액체를 제거하며, 분무건조 (그림 13의 b)는 액체를 작은 입자 (분무)로 만든 후 분사시키면서 열풍으로 순간적으로 건조시키며, 열풍건조 (그림 13의 c)는 판형에 놓여있는 상등액 위로 열풍을 흘려보면서 건조시킴.
- 동결건조는 낮은 온도에서 건조시킴으로써 건조물이 안전하다는 장점은 있지만 건조단가가 높다는 단점이 있으며, 열풍건조는 건조장치가 간단하고 단가가 낮은 반면에 열풍에 의해 밀기울추출물에 심한 갈변이 일어나는 단점이 있음. 반면에 분무건조는 건조방법이 동결건조와 열풍건조의 중간적인 성격을 띠어 밀추출물의 건조에 가장 이상적이기는 하나 전분 등에 의한 점도가 높으면 분무가 되지 않아 건조가 되지 않는 단점이 있음.
- 건조에는 모두 물을 증발시켜 없애는 것이므로 전처리로 농축을 하는 것이 바람직하며 특히 건조단가가 높은 동결건조에 있어서는 필수적이며, 분무건조에서도 분무에 필요한 적절한 농도를 유지하기 위해서도 농축이 고려되어야 함.

(다) 인체시험용 신청원료의 대량생산 (2차년도)

- (나) (63쪽)에서 찾은 최적조건을 이용하여 인체시험용 원료 (밀기울추출물)의 대량생산은 건강기능식품 GMP 시설을 갖춘 춘천바이오산업진흥원에서 이루어졌음 (그림 14).
- 최종적으로 **확정된 공정에서의 가장 큰 특징은 밀기울을 원재료로 사용하고, 불필요한 전분을 열수추출하기 전에 미리 냉수추출로 제거하는 것임.**
- 이러한 실험과정은 다음과 같이 이루어졌음.
 - ① 밀기울을 체로 거른 후 잔유물을 얻었음 (그림 14의 1)
 - 동아원에서 A밀의 밀기울을 250 μm 체로 걸러서 가지고 옴.
 - ② 밀기울 잔유물을 교반하여 추출물 얻었음 (그림 14의 2)

- 밀기울 50 kg을 500 L 발효기에 250 L의 냉수를 넣고 70 rpm에서 1시간 동안 교반하였음.
- 냉수의 온도는 생산시기에 따라 8-28 °C에서 실시되었음.
- ③ 추출물을 체로 걸러 여과액과 잔유물을 얻었음
 - 추출물을 250 μm 체로 걸러 냈음 (그림 14의 3)
 - 교반된 추출물을 체 (250 μm)로 밀집질을 걸러내 여과액을 1차로 얻고, 이 밀집질에 250 L의 냉수로 1회 씻어 합쳐진 전체 여과액을 얻었음 (용액 1) (그림 14의 5). 그리고 체에 남은 잔유물 (밀집질 1)를 얻었음 (그림 14의 6).
- ④ 데칸터를 이용하여 전분을 제거하였음 (그림 14의 7, 8, 9)
 - 용액 1을 데칸터 (Tomoe Eng Co LTD, 약 4000 rpm)를 이용하여 시간당 얻어지는 상등액의 양이 약 200 L/hr가 되는 조건에서 원심분리를 실시하여 상등액 (상등액 1)을 얻었음 (그림 14의 8).
 - 그리고, 나머지 침전물 (잔사 1)을 얻었음.
- ⑤ 열수추출 및 농축을 실시하였음 (그림 14의 10)
 - 밀집질 1과 상등액 1을 추출기 (500 L)에 함께 넣고 95°C, 1h 동안 70 rpm에서 교반하면서 추출하였음 (그림 14의 10).
 - 95°C의 추출물을 체로 거르고 여과액 (용액 2) (그림 14의 11)과 잔유물 (밀집질 2) (그림 14의 12)을 얻고, 이 용액 2를 다시 체 (125 μm)로 걸러 여과액 (그림 14의 13)과 잔유물 (잔사 2) (그림 14의 14)를 얻었음.
 - 얻은 여과액 (그림 14의 13)을 감압농축 (연속) (그림 14의 15)을 실시하여 농축액 (상등액 2)을 얻었음.
- ⑥ 분무건조를 실시하였음 (그림 14의 17)
 - 농축액 (상등액 2)을 분무건조하여 건조물을 얻었음 (그림 14의 18).
 - 이 건조물은 분무건조기 아래에 떨어지는 분말 (정상)과 분무되지 않고 분무건조기의 벽면에 붙은 분말 (air)로 나누어 확보하였음.



(a)



(b)



(c)

그림 11. 추출기 종류들

본 연구개발에서 사용한 추출기들. (a) 약탕기 (1 L 규모), (b) 중규모추출기 (10 L 규모), (c) 대규모추출기 (500 L 규모)

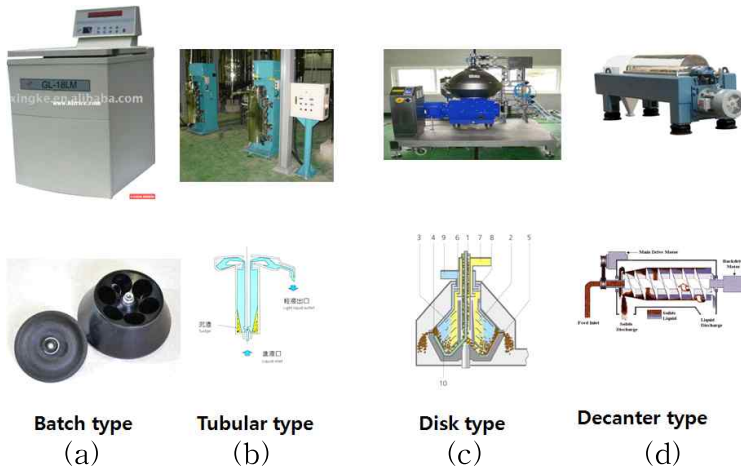


그림 12. 원심분리기 종류들

본 연구개발에서 사용한 원심분리기들. (a) 실험실용 (batch), (b) 산업용 (tubular), (c) 산업용 (disk stack), (d) 산업용 (decanter)

표 11. 원심분리기의 특성

	Batch type	Tubular type	Disk type	Decanter type
분리의 연속성	x	△	o	o
원심력 (g force)	높음	높음	높음	낮음
체류시간	길음	짧음	짧음	짧음
운전조건	쉬움	쉬움	어려움	쉬움
용도	실험실용	산업용	산업용	산업용



그림 13. 건조기 종류들

본 연구개발에서 사용한 건조기들. (a) 동결건조기, (b) 분무건조기, (c) 열풍건조기

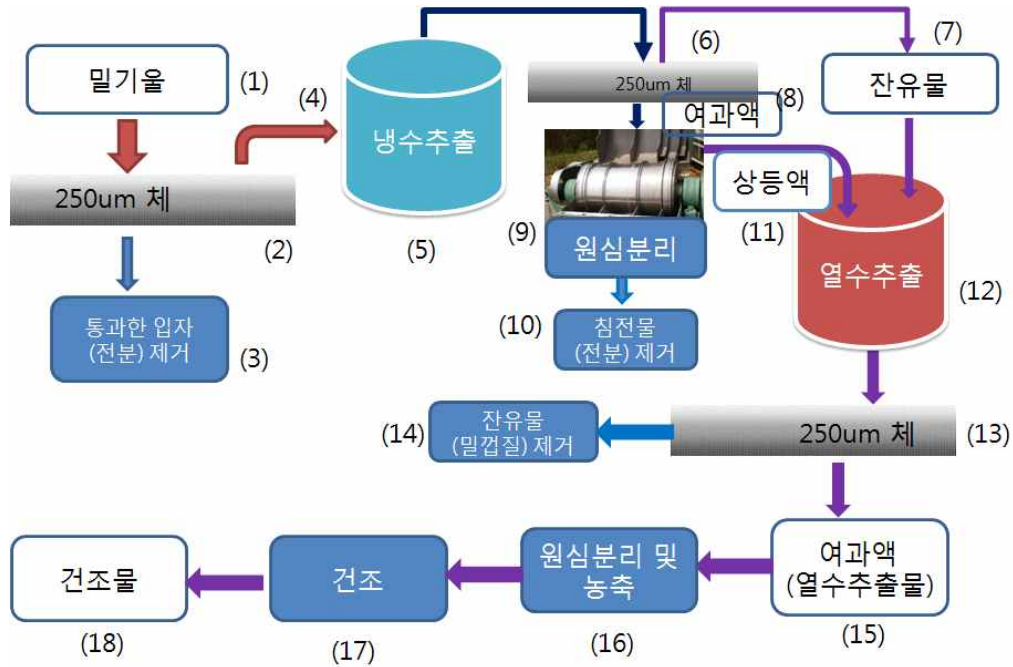


그림 14. 신청원료 생산공정의 개략도

(4) 원료의 특성에 관한 자료 (제2협동)

(가) 원료를 특징 지을 수 있는 성상, 물성 등

- o 한국건강기능식품협회 부설 한국기능식품연구원에 의뢰하여 식품공전 (제10. 일반시험법, 9. 일반시험법, 9.1. 성상(관능시험)과 산업자원부 기술표준원의 한국표준색에 준하여 시료의 이미, 이취를 확인한 후 한국표준색과 색상을 비교하고 형태를 관찰하여 시험함.

(나) 기능성분(또는 지표성분) 및 근거

- o 기능성분(또는 지표성분)을 정하고 설정 근거를 제시하였음.
- o 정의, 화학구조, 물리화학적 성질, 구조식, 분자식, CAS No. 등을 제시하였음.

(다) 영양성분자료

- o 밀기울추출건조물의 영양성분은 식약처 식품공전의 일반시험법 중 일반성분시험법에 따라 수분(%), 탄수화물(%), 조단백질 (%), 조지방 (%), 회분 (%), 나트륨 (mg/100 g), 수용성 및 불용성 식이섬유(%) 함량을 측정하고 열량계산법에 따라 열량 (Kcal/100g)을 계산함.

(5) 기능성분[또는 지표성분] 규격 및 시험방법에 관한 자료 (제1세부, 제2협동)

(가) 기능성분(또는 지표성분)의 규격 및 근거

- o 기능성분 (또는 지표성분)의 규격 및 설정 근거에 대해 요약하였음.

① 기능성분 (또는 지표성분)의 규격

② 설정근거

- 현재까지는 자체 분석자료를 제시하나 궁극적으로는 공인시험기관 (예를 들면, 한국기능식품 연구원)의 시험 성적서를 첨부할 예정이다.

(나) 기능성분 (또는 지표성분) 표준품 정보

- 식약처에서 제시한 양식으로 작성하였음.

(다) 기능성분(또는 지표성분) 시험방법

- 식약처에서 제시한 양식대로 작성하였음.
- 추출건조물에 포함된 ara의 함량은 식이섬유 내에 존재하는 중성단당류의 함량을 측정하는 공인된 방법 (AOAC Official method 994.13)을 변형한 방법 (Melton & Smith, 2001)으로 측정하였음. 이 변형된 방법에 대한 시험법 검증 (method validation)을 실시하고 이 방법을 활용하여 한국기능식품연구원에서 신청원료에 대해 지표성분인 ara에 대한 함량을 측정하였음..

① 분석방법의 요약

- 분석은 크게 나누어 ㉠ 원료 (추출건조물)의 산처리에 의한 단당류 생성 ㉡ 단당류의 환원에 의한 alditol 생성 ㉢ Alditol의 acetyl화에 의한 alditol acetate 생성 ㉣ Alditol acetate화된 단당류들의 기체 크로마토그래피 (GC)에 의한 분석으로 나누어짐 (그림 15).

㉠ 원료의 산처리

- 원료를 산 (TFA, trifluoroacetic acid)으로 처리하면 다당류인 AX, AGP, BGlu 및 전분을 구성하는 단당류로 가수분해 되어 ara (아라비노스), xyl (자일로스), gal (갈락토오스) 및 glc (포도당) 등이 생성됨. 단, TFA 처리시 셀룰로오스는 분해되지 않음.

㉡ 단당류의 환원 (그림 16)

- Ara와 xyl 등의 오탄당은 aldopentose로, gal과 glc 등의 육탄당은 aldohexose로 각각 aldehyde group을 가지고 있음. 이 aldehyde group에는 휘발성을 좋게 하는 acetate가 직접 결합할 수 없으므로 우선 이를 환원시켜 alditol 형태로 만드는 것이 필요함.
- 이를 위해 산분해된 단당류를 환원제인 수소화붕소나트륨 (NaBH₄)로 처리하면 aldehyde는 alcohol로 바뀌어 ara는 arabinitol, xyl는 xylitol, galactose는 galactitol, glucose는 glucitol로 각각 바뀌게 됨.

㉢ Alditol의 아세틸화 (그림 16)

- 생성된 단당류의 alditol이 휘발성이 좋도록 하기 위해 아세틸화를 시켜 alditol acetate를 생성함.
- 이를 위해 alditol을 아세트산무수물 (acetic anhydride)로 처리하면 각각의 alditol에 대해 alditol acetate가 생성됨. 예를 들면, arabinitol은 arabinitol pentaacetate로, glucitol은 glucitol hexaacetate로 각각 변함.

㉣ GC 분석

- 휘발성이 좋게 된 alditol acetate를 GC로 걸면 크로마토그램이 얻어지고 이의 면적을 계산하면 원료에 포함된 각각 단당류의 함량을 구할 수 있음 (Rumpel & Dignac, 2006) (그림 16).
- 각 단계마다의 반응성 등을 고려하기 위해 internal standard가 필요하며, 본 실험에서는 시

료에는 없는 allose를 internal standard로 사용하였음.

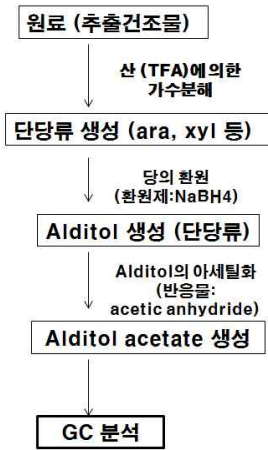


그림 15. 지표성분 분석방법의 개략도

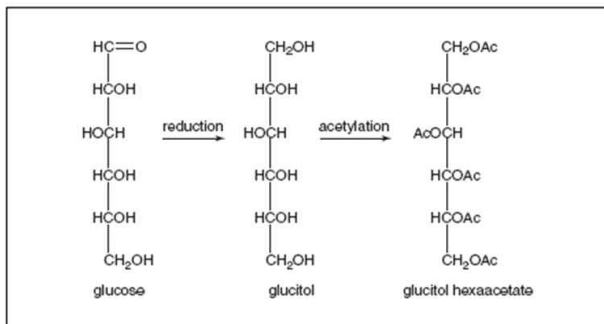


Figure E3.2.2 Reaction scheme for formation of alditol acetates.

그림 16. Aldose인 당의 환원과 아세틸화 과정

(나) 지표성분 시험방법

<input checked="" type="checkbox"/> 공인시험방법	출처: AOAC 994.13 방법의 변형
<input type="checkbox"/> 자사시험방법	<input type="checkbox"/> 시험방법 타당성(밸리데이션) 자료 제출 여부
<시험방법>	
<p>1. 장비와 재료</p> <p>1.1 실험실 장비 및 소모품</p> <p>1.1.1 15-ml borosilicate glass tubes and caps with Teflon-lined insert</p> <p>1.1.2 1-inch wide PTFE tape</p> <p>1.1.3 3-ml syringe</p> <p>1.1.4 0.22-μm PTFE filters (Millipore)</p> <p>1.1.5 40 °C water bath</p> <p>1.1.6 진탕기 (Vortex)</p> <p>1.2 분석장비</p> <p>1.2.1 가스크로마토그래프 (Agilent 7890A)</p> <p>1.2.2 BPX-70 open tubular fused silica column (25 m long, 0.32 mm I.d., and 0.25 μm film thickness; SGE Chromatography Products)</p> <p>2. 표준물질 및 일반시약</p> <p>2.1 표준물질: 10 sugar standards:</p> <p>2.1.1 L-Rhamnose monohydrate (Sigma) 분자식 : $C_6H_{12}O_5 \cdot H_2O$, 분자량 : 182.17, CAS No. : 10030-85-0</p> <p>2.1.2 L-(-)-Fucose (Sigma) 분자식 : $C_6H_{12}O_5$, 분자량 : 164.16, CAS No. : 2438-80-4</p> <p>2.1.3 D-(-)-Ribose (Sigma) 분자식 : $C_5H_{10}O_5$, 분자량 : 150.13, CAS No. : 50-69-1</p> <p>2.1.4 L-(+)-Arabinose (Sigma-Aldrich) 분자식 : $C_5H_{10}O_5$ 분자량 : 150.13, CAS No. : 5328-37-0</p> <p>2.1.5 D-(+)-Xylose (Fluka) 분자식 : $C_5H_{10}O_5$, 분자량 : 150.13, CAS No. : 58-86-6</p> <p>2.1.6 D-Allose (Aldrich) 분자식 : $C_6H_{12}O_6$, 분자량 : 180.16, CAS No. : 2595-97-3</p> <p>2.1.7 D-(+)-Mannose (Sigma) 분자식 : $C_6H_{12}O_6$, 분자량 : 180.16, CAS No. : 3458-28-4</p> <p>2.1.8 D-(+)-Galactose (Sigma) 분자식 : $C_6H_{12}O_6$, 분자량 : 180.16, CAS No. : 59-23-4</p> <p>2.1.9 D-(+)-Glucose (Sigma)</p>	

분자식 : $C_6H_{12}O_6$, 분자량 : 180.16, CAS No. : 50-99-7

2.1.10 myo-Inositol (Sigma)

분자식 : $C_6H_{12}O_6$, 분자량 : 180.16, CAS No. : 87-89-8

2.2 일반시약

2.2.1 2 M trifluoroacetic acid (TFA)

2.2.2 Dichloromethane (DCM; HPLC grade)

2.2.3 18 M acetic acid (glacial, analytical grade)

2.2.4 water (HPLC grade)

2.2.5 Nitrogen gas

2.2.6 15 M (concentrated) ammonia

2.2.7 0.5 M sodium borohydride in DMSO (freshly prepared)

2.2.8 1-methylimidazole

2.2.9 Acetic anhydride

2.2.10 Helium gas

3. 시험과정

3.1 표준용액 제조

3.1.1 10 개의 표준 단당류를 40 mg 정도 씩 각 vial 에 weighing 하고 정확한 무게를 기입 한 후, HPLC grade water 2 ml 에 용해하여 표준원액으로 한다. 각 단당류의 농도를 계산한다.

3.1.2 상기 용액 중 필요한 단당류들을 200 μ l 씩 섞어서 9-sugar standard 나 10-sugar standard 로 준비하여 -20 $^{\circ}$ C에서 동결 보관한다. 각 단당류의 농도를 계산한다.

3.2 일반 시약 제조

3.2.1 Sodium borohydride in DMSO, 0.5 M:

0.5 g sodium borohydride 를 유리병에 넣고 25 ml DMSO 를 넣는다. Teflon-lined 마개를 느슨히 닫은 다음 100 $^{\circ}$ C 오븐에서 1 시간 녹인 후 꺼내어 뚜껑을 꼭 잠그고 식힌다. 실험 당일에 fresh 하게 만들어서 사용한다.

3.2.2 Trifluoroacetic acid, 2 M:

TFA는 Sigma에서 99 % purity, 25 ml, $d=1.535$ g/ml, mol. wt. 114.02 를 구입한다. 휘발성이 강한 산이므로 새로 구입한 시약병을 열기 전에 저온 (ice bath) 으로 냉각시킨 후 역시 미리 냉각 시켜놓은 HPLC grade 물에 총량이 166.6 ml 가 되도록 25 ml를 다 넣고 섞는다. 제조 된 2 M TFA는 brown glass bottle 에 나누어 담고 Teflon tape으로 밀봉하고 뚜껑을 닫은 후 또 parafilm으로 감아 4 $^{\circ}$ C에 보관한다.

3.3 Alditol Acetate 제조

• 시료의 acid hydrolysis with TFA

3.3.1 15 ml glass tube에 시료 5 mg 정도를 weighing 하고 정확한 무게를 기입한다.

3.3.2 각 시료에 allose (internal standard) 를 25 μ l (20 mg/ml) 넣는다.

- 3.3.3 별도의 test tube에 100 μ l of 10-sugar standard를 넣는다 (10-sugar standard는 TFA 가수분해 과정과 유도체화 과정에서 시료와 동일하게 처리한다).
- 3.3.4 시료가 담긴 tube rack을 ice bath에 담고, 2 M TFA 0.5 ml 를 살며시 넣는다 (시료가 test tube벽으로 튀어 올라가지 않게 한다). Teflon tape으로 밀봉하고 뚜껑을 꼭 잠근다.
- 3.3.5 121 $^{\circ}$ C dry oven에서 60 분 간 incubate 한다.
- 3.3.6 Cooling후, 가수분해 된 시료를 0.22 μ m PTFE filter를 장착한 syringe에 넣어 깨끗한 test tube에 filter 해 넣는다.
- 3.3.7 Filtrate은 질소가스로 flush하여 완전히 건조한다 (Pasteur pipet을 사용한다).

• **Reduce monosaccharides to corresponding alditols**

- 3.3.8 건조된 hydrolysate에 100 μ l의 물 (HPLC grade) 을 넣는다.
- 3.3.9 별도의 test tube에 물만 100 μ l 를 넣어 blank-control 을 준비하고 이 단계부터 시료와 동일하게 처리한다.
- 3.3.10 각 tube에 15 M ammonia를 20 μ l 씩 넣는다.
*15 M ammonia는 개봉 후 parafilm으로 감아 냉장 보관한다.
- 3.3.11 각 tube에 1 ml of 0.5 M sodium borohydride in DMSO 를 넣고 뚜껑을 닫은 후 vortex 한다.
*NaBH₄ reduction에서 DMSO를 solvent로 쓰고 acetylation 단계에서 1-methylimidazole을 catalyst 로 쓰는 이 방법은 (Blakeney et al. 1983), reduction에서 생성되는 borate를 methanol로 힘들게 없애지 않아도 quantitative acetylation을 이룰 수 있는 획기적인 방법이다.
- 3.3.12 40 $^{\circ}$ C water bath에서 90 분 간 incubate 한다.
- 3.3.13 남아있는 NaBH₄ 를 제거하기 위해 100 μ l of 18 M acetic acid를 넣고 vortex 한다.
*NaBH₄ 가 제거되면서 기포가 생성되는 것을 볼 수 있다.

• **Acetylate the alditols**

- 3.3.14 각 tube에 200 μ l of 1-methylimidazole을 넣는다.
*4 $^{\circ}$ C에서 보관하는 1-methylimidazole은 뚜껑을 열기 전에 상온으로 온도를 올린 후 쓸 만큼의 양을 vial에 덜어 (decant) 사용하고 reagent bottle에 pipet을 집어넣지 않는 것이 좋다.
- 3.3.15 Acetic anhydride를 2 ml 씩 넣고 vortex 한다.
- 3.3.16 10 분 간 상온에서 incubate 한다.
- 3.3.17 남아있는 acetic anhydride를 제거하기 위해 5 ml 의 물을 넣고 vortex 한다.
- 3.3.18 10분 간 상온에서 cool down 한다.
- 3.3.19 Alditol acetate를 추출해 내기 위해 1 ml 의 dichloromethane (DCM) 을 넣고 vortex를 세 번 하여 충분히 mix 되도록 한다. 층이 분리되면 밑에 가라앉은 DCM 층을 Pasteur pipet 을 이용하여 4 ml의 HPLC grade 물이 들어 있는 새로운 test tube로 옮긴다.
*DCM은 휘발성이 강하므로 새 test tube에 물을 먼저 넣어 두어 evaporate 되는 것을 방지한다.
- 3.3.20 남아 있는 aqueous 층에 새로 1 ml 의 DCM을 넣고 추출과정을 반복한다. 이 때 에도 밑에 가라앉은 DCM 층을 꺼내어 새 tube에 담긴 DCM 층과 합친다.
- 3.3.21 합쳐진 DCM 층을 vortex로 mix하고 위의 aqueous 층은 버린다. 이렇게 4ml의 물로

DCM 층을 씻어 내는 과정을 세 번 더 반복한다.

*마지막 과정에서는 DCM 층을 clean vial로 옮겨 담는다. Pasteur pipet으로 aqueous 층을 통과 할 때 공기를 불어내며 집어넣어 pipet 안으로 물이 들어가는 것을 방지하여 DCM 층에 물이 섞여 나오지 않도록 한다.

3.3.22 질소 가스를 이용하여 vial 안의 DCM을 evaporate 한다.

*Alditol acetate 자체가 휘발성이 강하기 때문에 마지막 DCM이 사라지는 순간 질소 flushing 을 멈춘다.

4. 분석 및 계산

4.1 기기분석: 다음의 조건으로 사용하되 적용되는 기기에 따라 조정이 필요할 수 있다.

4.1.1 Run Gas Chromatography

- 기기 : GC - Agilent 7890A
- 컬럼 : SGE BPX70 (Length 25 m , I.D. 0.32 mm, Film 0.25 μ m)
- 주입구온도 : 230 $^{\circ}$ C, split mode (10:1)
- 시료주입량 : 1 μ l
- 칼럼온도 (temperature program) :

$^{\circ}$ C/min	Next	Hold time	Run time
	38	0.5	0.5
50	170	0	3.14
2	230	5	38.14

- 캐리어가스 및 유량 : He, 1.2 mL/min
- 검출기온도 : 250 $^{\circ}$ C

4.2 계산: GC Data Analysis (Internal Standard)

- 시료들과 동일한 실험 조건하에서 얻어진 control (9-sugar standard or 10-sugar standard) 의 면적들로 부터 상대감응인자 (relative response factor) 를 계산한다.

4.2.1 9-sugar standard 의 chromatogram에 분리되어 나타난 각 단당류 유도체 peak의 면적을 각 각의 성분량으로 나누어 감응인자 (response factor) 를 계산한다.

4.2.2 감응인자를 내부 표준물질 (allose or inositol) 의 감응인자로 나누어 상대감응인자를 얻는다.

- 상대감응인자와 표준물질의 양을 이용하여 시료 내 지표성분의 양을 정확히 계산한다.

4.2.3 시료의 chromatograph 상에 분리된 각 peak의 면적을 각 각의 상대감응인자로 나누어 보정 면적을 계산한다.

4.2.4 각 보정면적을 내부 표준물질의 면적으로 나누어 성분의 상대량을 계산한다.

4.2.5 성분의 상대량을 내부 표준물질의 양으로 곱하여 시료 내 실제량을 계산한다.

4.2.6 성분의 실제량을 시료의 무게로 나누어 백분율을 계산한다.

(다) 시험방법 밸리데이션

○ 시험방법 밸리데이션에서 식약처에서 요구하는 자료는 특이성, 정확성, 직선성 및 정밀성에 대한 밸리데이션이며, 이에 대한 방법은 아래와 같음.

① 특이성

○ 특이성은 분석하고자 하는 성분에 대해 특이적으로 반응하는 시험법이고, 주변 간섭물질로부터 선택적으로 분석이 가능한지 확인하는 것임.

② 정확성

○ 분석하고자 하는 성분이 원료(매트릭스)에서 분리할 수 있는가를 확인하는 항목 (traceability)으로, 알고 있는 참값을 원료에 가하여 참값을 정확히 회수할 수 있는가를 회수율 (recovery)로서 실험한 것인지 확인하는 것임. 이 때 정확성 평가 방법으로는 CRM, RM, Spiking & Recovery을 사용함.

③ 직선성

○ 분석하고자 하는 물질 양에 대한 기기적인 신호값이 직선적으로 관찰되었는지 확인하는 것으로 통상적으로 상관계수(Correlation coefficients)는 0.995 이상인 경우 인정함 [이때의 직선성은 분석하고자 하는 물질의 양과 그에 대한 반응 값의 범위는 중심값(측정값)으로부터 상하로 3점 이상에서 확인되었는지].

④ 정밀성

○ 시료속의 분석대상물질이 여러 회의 반복시험을 통하여 통계적으로 유의한 차이가 없는 범위에 속하는지 [단순반복성(repeatability), 측정날짜간, 사람간, 기기간, 실험실간]를 조사하는 것임. 이 때 RSD가 5% 이하인 경우 인정함. 이에는 일내 반복 정밀성과 일간 반복 정밀성이 있음.

(6) 유해물질에 대한 규격 및 시험방법에 관한 자료 (제2협동)

(가) 유해물질 규격항목(납, 카드뮴, 총비소, 총수은)의 규격 및 근거

○ 식약처에서 고시한 건강기능식품 기능성 원료 및 기준·규격 인정에 관한 규정 중 유해물질규격설정항목 (제14조 제6호 가목 관련)에 준하여 납, 카드뮴, 총비소, 총수은, 대장균군의 규격을 확인하고 밀기울 추출건조물 시료 내의 유해물질이 규격 내에 적합 및 부적합 여부를 분석하였음 (그림 17).

(나) 유해물질 규격 미설정항목(잔류농약)의 시험성적서 및 분석자료

○ 식약처에서 고시한 식품의 농약 잔류허용기준 (MRLs for Pesticides in Foods)에 준하여 밀에 해당하는 잔류농약 항목 중 일반적으로 검출되는 59종에 대한 분석을 실시하였음.

-잔류농약 분석항목(mg/kg) : 비에이치씨, 비펜스린, 카보후란, 크로르헥나피르, 크로로타로닐, 크로르피리포스, 클로로피리포스-메틸, 싸이할로쓰린, 싸이퍼메쓰린, 싸이프로디닐, 디디티, 다이아지논, 디크로보스, 디코폴, 엔도설판, 페나리몰, 페니트로치온, 펜프로파스린, 펜발러레이트, 플루디옥소닐, 이마자릴, 이프로디온, 이소프로치오란, 말라치온, 메소밀, 메티다치온, 파클로부트라졸, 파라치온, 파라치온-메칠, 퍼메쓰린, 펜토에이트, 포스메트, 피리미카브, 킨토젠, 트리아디메폰, 트리프루미졸, 트리아조포스, 프로클로라즈, 메톡시페노자이드, 보스칼리드, 아세타미프리드, 아족시스트로빈, 아트라진, 에치온, 이프로발리카브, 카바릴, 캡탄, 톨크로포스

메칠, 트리플루무론, 티아메톡삼, 펜헥사미드, 프로페노포스, 플루벤디아마이드, 플루페녹수론, 피라크로스트로빈, 피리메타닐, 피리미포스-메틸, 헥사프루무론

(다) 유해물질(중금속, 잔류농약, 미생물 등)의 시험방법

① 납

○ 한국건강기능식품협회 부설 한국기능식품연구원에 의뢰하여 식품공전 (제10.일반시험법, 7.식품중 유해물질시험법, 7.1.2 금속별시험, 7.1.2.1 납 (Pb), 1) 시험용액의 조제, 가) 습식분해법, (2) 마이크로웨이브법에 준하여 시험용액을 조제하여 납 함량을 분석하였음. 검체 0.2~0.8 g을 취하여 질산 7 ml, 증류수 3 ml로 처리하여 분해하고 메스플라스크 등에 옮겨 시험용액을 조제 후 ICP-MS로 측정된 검량선 결과를 통해 검출량 (mg/kg)을 도출하였음.

② 총비소

○ 한국건강기능식품협회 부설 한국기능식품연구원에 의뢰하여 식품공전 (제10.일반시험법, 7.식품중 유해물질시험법, 7.1.2 금속별시험, 7.1.2.1 납 (Pb), 1) 시험용액의 조제, 가) 습식분해법, (2) 마이크로웨이브법에 준하여 시험용액을 조제하여 총비소 함량을 분석하였음. 검체 0.2~0.8 g을 취하여 질산 7 ml, 증류수 3 ml로 처리하여 분해하고 메스플라스크 등에 옮겨 시험용액을 조제 후 ICP-MS로 측정된 검량선 결과를 통해 검출량 (mg/kg)을 도출하였음.

③ 카드뮴

○ 한국건강기능식품협회 부설 한국기능식품연구원에 의뢰하여 식품공전 (제10. 일반시험법, 7. 식품중 유해물질시험법, 7.1.2 금속별시험, 7.1.2.1 납 (Pb), 1) 시험용액의 조제, 가) 습식분해법, (2) 마이크로웨이브법에 준하여 시험용액을 조제하여 카드뮴 함량을 분석하였음. 검체 0.2~0.8 g을 취하여 질산 7 ml, 증류수 3 ml로 처리하여 분해하고 메스플라스크 등에 옮겨 시험용액을 조제 후 ICP-MS로 측정된 검량선 결과를 통해 검출량 (mg/kg)을 도출하였음.

④ 총수은

○ 한국건강기능식품협회 부설 한국기능식품연구원에 의뢰하여 식품공전 (제10. 일반시험법, 7. 식품중 유해물질시험법, 7.1.2 금속별시험, 7.1.2.4 수은 (Hg)에 준하여 수은 표준품을 L-cystein으로 희석한 표준용액 및 분말 상태의 시료를 수은분석기 (Mercury analyzer)로 측정하여 수은 함량을 분석하였음.

⑤ 대장균군

○ 한국건강기능식품협회 부설 한국기능식품연구원에 의뢰하여 식품공전 (제10.일반시험법, 3.미생물 시험법, 3.7.대장균군, 3.7.1.정성시험, 가.유당배지법)에 준하여 시료의 대장균군을 분석하였음. 검체 17 g을 9배의 희석수에 균질화한 시험용액 10 ml을 2배 농도의 유당배지에, 1 ml 및 0.1 ml을 유당배지에 각각 3개씩 접종하여 배양 (36°C, 48h)하여 추정시험을 수행하였음. 가스가 발생한 유당배지발효관으로부터 BGLB 배지에 접종하여 배양 (36°C, 48시간)한 후 가스발생이 보인 BGLB 배지로부터 EMB 한천배지에 분리배양 (36°C, 48시간)하여 확정시험을 수행하였음. 적색 또는 금속광택의 전형적인 집락을 확인한 후 유당배지발효관과 보통한천배지에 접종하여 배양 (36°C, 48시간)한 후 가스를 발생한 발효관에 해당되는 한천배지의 집락에 대해 그람음성, 무아포성 간균을 확인하여 대장균군 음성 및 양성을 판정하여 완전시험을 수행하였음.

⑥ 잔류농약

○ 한국건강기능식품협회 부설 한국기능식품연구원에 의뢰하여 식품공전(제10. 일반시험법, 4. 식품 중 잔류농약 분석법, 4.1.2 다중농약다성분분석법, 4.1.2.3 다중농약다성분분석법)에 준하여 표준용액 조제 및 전처리를 통해 GC, GC/MS, GC/MS/MS를 통해 시료의 원료인 밀에 해당하는 잔류농약 59종의 함량을

분석하였음.

- 표준용액조제 : 각 잔류농약성분별 표준품을 유기용매에 녹여 표준원액으로 하여 적당한 농도로 혼합 및 희석함.
- 추출 : 시료를 정밀히 달아 균질용기에 넣고 아세트니트릴 100 ml을 넣은 후 균질화한 후 감압여과하였음. 여과액을 분액깔때기로 옮기고 증류수 20 ml 및 염화나트륨 10~15 g을 가하고 진탕한 후 층이 완전히 분리될 때까지 정치하였음. 아세트니트릴층을 무수황산나트륨으로 탈수, 여과한 후 별도의 아세트니트릴을 가하여 최종 부피가 100 ml이 되게 하였음. 아세트니트릴 40 ml을 취하여 2% 디에틸렌글리콜 함유 아세톤 0.2 ml을 첨가하고 40°C이하의 수욕 중에서 감압농축하여 용매를 날린 잔유물을 20% 아세톤 함유 헥산 4 ml에 녹였음.
- 정제 : 후로리실 카트리지에 헥산 5 ml와 20% 아세톤 함유 헥산 5 ml을 순서대로 초당 2~3 방울 정도의 속도로 유출한 뒤 추출액 4 ml을 카트리지 상단에 넣고 초당 1~2 방울 정도의 속도로 용출시켜 시험관에 받았음. 20% 아세톤 함유 헥산 10 ml을 넣어 용출시켜 동일 시험관에 모았음. 용출액은 40°C 이하 수욕 상에서 질소를 낮은 유속으로 통과시키면서 용매를 날려 보낸 후 20% 아세톤 함유 헥산 4 ml로 녹인 후 멤브레인 필터로 여과하여 시험용액으로 하였음.
- 측정 : 시험용액 및 표준액을 GC, GC/MS, GC/MS/MS로 분석하여 검량선 결과를 통해 검출량 (mg/kg)을 도출하였음.

(라) 필요시 추가항목의 규격 및 근거

① 곰팡이독소

- o 식약처에서 고시한 건강기능식품 기능성 원료 및 기준·규격 인정에 관한 규정 중 유해물질규격설정항목 (제14조 제6호 가목 관련)에 의하면 곰팡이독소 항목은 해당 기준이 식품공전에 설정되어 있는 원료일 경우 식품공전의 규격에 따르면 되나, 신청원료 (밀기울추출물)의 경우 식품공전에 설정되어 있는 기존의 식품원료가 아님. 따라서 시료의 원재료인 밀에 적용되는 곰팡이독소 항목 (총아플라톡신, 오크라톡신A, 테옥시니발레놀, 제랄레논)을 분석하고 규격내에 적합 및 부적합 여부를 확인하였음 (표 12).
- o 한국건강기능식품협회 부설 한국기능식품연구원에 의뢰하여 식품공전 (제10. 일반시험법, 6. 식품 중 곰팡이독소시험법, 6.1 곰팡이독소, 6.1.1 아플라톡신 (B1, B2, G1 및 G2), 6.1.1.2 액체크로마토그래피에 의한 시험)에 준하여 시료의 곰팡이독소를 분석하였음. 검체 25 g을 70% MeOH·1% NaCl 100 ml에 5분간 고속 균질 후 여과한 추출액 10 ml에 1% 트윈 20 용액 30 ml에 혼합하였음. 혼합액 20 ml을 먼역친화성칼럼에 정제하고 세척한 후 아세트니트릴 3 ml에 용출하여 질소농축하였음. Trifluoroacetic acid 0.2 ml을 가하여 15분간 유도체화한 후 20% ACN 0.8 ml을 첨가하여 여과한 여과액을 HPLC/FLD로 분석하였음.

[별표 2]

유해물질규격설정항목(제14조제6호가목 관련)

원료	항목		규격	비고
모든 원료	중금속	납	< 10.8 μ g/일	
		중비소	< 150 μ g/일	
		카드뮴	< 3.0 μ g/일	
		총수은	< 2.1 μ g/일	
	미생물	대장균군	음성	
		세균수	\leq 100/g	액상제품에 한함
용매를 사용한 원료	간류용매	헥산	< 0.005g/kg	
		이소프로필알콜		
		초산에틸	\leq 0.05g/kg	
		메틸알콜		
		아세톤	\leq 0.03g/kg	
해당 기준이 「식품의 기준 및 규격」에 설정되어 있는 원료	동물용의약품			
	곰팡이 독소	총아플라톡신 (B ₁ , B ₂ , G ₁ 및 G ₂ 의 합)		「식품의 기준 및 규격」에 따름
		파롤린		
		오크라톡신		
		기타곰팡이독소		
방사능 오염	¹³¹ I			
	¹³⁴ Cs, ¹³⁷ Cs			

그림 17. 식품의 유해물질 규격설정 항목표

표 12. 밀(곡류)의 곰팡이독소 규격 항목

항목	규격
총아플라톡신 (μ g/kg)	15.0 이하 (단, B1은 10.0 이하이어야 한다)
오크라톡신A (μ g/kg)	5.0 이하
데옥시니발레논 (μ g/kg)	1.0 이하
제랄레논 (μ g/kg)	200 이하

(7) 안전성에 관한 자료 (제1세부)

(가) 건강기능식품 기능성원료의 안전성평가를 위한 의사결정도

- 식품의약품안전처 (식약처) 고시 “건강기능식품 기능성 원료 및 기준·규격 인정에 관한 규정 “의 별표 3 (건강기능식품 기능성 원료의 안전성 평가를 위한 의사결정도)에 의거하여 별표 1 (제출되어야 하는 안전성 자료의 범위)에서 제출하여야 하는 범위를 판정하였음.

(나) 섭취근거정보

- 국내·외 인정·허가 현황 (25쪽) 및 국내·외 사용 현황 (26쪽)에 덧붙여 인체시험이 시행된 정보를 추가하였음.

(다) 기능성분 및 관련물질의 안전성(부작용·독성 등) DB 검색정보

- 식약처에서 예시로 제시한 방식대로 Toxline, Natural Medicines DB, PDR health, Pubmed 등의 DB를 검색하였음.

(라) 섭취량 평가정보

- 원재료인 밀 또는 밀기울은 식품으로 사용하고 있으므로 제안된 원료의 섭취량이 일상적으로 섭취하는 원재료 평균섭취량의 3배 또는 극단량 (95 백분위수)보다 많은지를 확인하였음.
- 밀 또는 밀기울을 섭취한 과학적이고 객관적인 문헌이 있으므로 이를 인용 식품에서 특정성분을 분석한 다양한 논문들을 검색하고 국민영양조사 등의 식품섭취량에 관한 정보를 줄 수 있는 자료들을 조합하여 직접 계산하였음.
- 국내외에서 식품 및 건강기능식품으로 판매되고 있는 제품과 섭취량을 비교하였음.
- 이러한 자료들을 종합하여 식약처에서 예시로 제시한 양식대로 작성하였음.

(마) 영양평가, 생물학적 유용성, 인체적용시험 정보

① 영양평가 정보

- 건강기능식품 기능성 원료가 기타 영양성분의 흡수·분포·대사·배설 등에 미치는 영향을 연구한 자료를 요약하였음.
- 영양소, 식품, 의약품과의 상호작용 등에 관한 자료를 요약하였음.
- 이러한 자료들을 종합하여 식약처에서 예시로 제시한 양식대로 작성하였음.

② 생물학적 유용성 정보

- 건강기능식품 기능성 원료 또는 성분이 체내 흡수 후 생체작용에 반영되는 정도를 연구한 자료를 요약하였음.
- 시간대별로 측정된 기능성분의 AUC(Area under the Curve), 혈중최고농도 도달시간(T_{max}), 혈중최고농도(C_{max}) 등을 제시하였음.
- 이러한 자료들을 종합하여 식약처에서 예시로 제시한 양식대로 작성하였음.

③ 인체적용시험 정보

- 기능성 시험을 위해 인체적용시험을 수행할 때, 안전성지표와 이상반응의 확인 항목이 있으면 이를 기술
안전성 지표의 변화가 관찰되어 안전성 우려가 제기된 경우 이를 구체적으로 기재(섭취 전후 지표 변화, 이상반응 발현빈도 등 raw data 기술), ref 기재.

(바) 독성시험

- 독성시험이 필요없는 근거를 제시하였음.
- 하지만 이전 (2006년도)에 이루어진 분쇄통밀을 열수추출한 건조물에 대해 단회투여 독성시험에 대해 설명하였음.

(8) 기능성 내용 및 그에 관한 자료

- 기능성 시험은 세포 및 동물시험을 포함하는 비인체시험과 사람을 대상으로 하는 인체시험으로 나누어짐.

(가) 비인체시험 (제1세부, 제1협동, 제2협동, 제3협동)

- 비인체시험은 사용한 시료로 분류하면 실제 신청원료 (밀기울추출물), 인체시험용 플라시보 후보 (플라시보), 신청원료를 섞은 프리믹스, 유사원료 (통밀추출물) 및 기능성분 고함유 통밀추출물로 나눌 수 있음.
- 이 외에도 활성을 나타내는 순수성분으로는 AX (구매된 것 및 본 과제에서 분리정제된 것), AG (구매된 AG 및 본 과제에서 분리정제된 AGP)이 있음.

- 이러한 시료들에 대해 사용한 실험은 크게 시험관 시험과 동물시험으로 나누어짐.

① 시험관시험(세포실험)

- 시험관시험은 신청원료 (밀기울추출물)에 대해 수행되었음.

㉔ 알츠하이머병모델: 신경세포 사멸 보호효과

- 세포배양 : SH-SY5Y neuroblastoma, C6 glioma, BV2 microglia 세포를 10% fetal bovine serum (FBS), penicillin (100 IU/ml) 및 streptomycin (100 mg/ml)을 포함하는 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) 배지를 이용하여, 5% CO₂, 37°C 배양기에서 배양하였음. 세포배양 배지는 2일마다 신선한 배지로 갈아주었으며 시약처리 1-2일 전에 실험에 적합한 밀도로 갈아주었음.
- 세포 생존율 측정(MTT reduction assay) : 세포를 48-well plate에 5 × 10⁴개/well의 밀도로 간 다음 Dulbecco's modified eagle medium (DMEM) 90%, fetal bovine serum (FBS) 10% 에서 배양하였음. 이후 베타아밀로이드와 시료를 24시간 처리한 다음 MTT solution (최종농도 1 mg/ml)을 가하여 2시간 동안 반응시켰음. 살아있는 세포내에 생성된 반응산물 formazan을 dimethyl sulfoxide (DMSO)로 용해시켜 540 nm에서 optical density를 microplate reader로 측정하였음. vehicle을 처리한 대조군의 세포 생존율을 100%로하여 상대적인 %를 계산하였음.
- 세포사멸 측정 - DNA fragmentation (*in situ* nick-end labeling TUNEL staining) : TUNEL staining (DNA fragmentation *in situ*)을 이용하여 능동적세포사멸 apoptosis를 측정하였음. 10% neutral buffer로 고정시킨 샘플을 PBS로 세척한 후, H₂O₂ (0.3% in methanol)로 실온에서 1시간 방치하여 endogenous peroxidase를 차단하였음. 이후, 4°C에서 0.1% Triton X-100 in sodium citrate로 2분간 처리하여 cells을 permeable하게 하였음. TUNEL reaction mixture 50 μl를 가하고 37°C에서 1시간동안 배양하여 label시킨 뒤,

peroxidase-conjugated anti-goat antibody 50 μ l를 가하고 37 C에서 30분 동안 반응시켰음. 이후 DAB solution을 50-100 μ l 넣고 10분간 배양시킨 다음 50% glycerol로 mounting 하였음.

- o 미토콘드리아 막전압 측정 (TMRE 형광 색소법) : 미토콘드리아 막전압(mitochondrial transmembrane potential, Ψ)을 측정하기 위하여 TMRE dye를 사용하였음. SH-SY5Y 세포 (5×10^4 cells/ 500 μ l)를 chamber slide에 넣고 베타아밀로이드와 시료를 처리한 다음 37°C에서 24시간 동안 배양하였음. 배지를 덜어낸 후 PBS으로 2회 세척한 뒤 10 nM TMRE를 가하여 37°C에서 30분간 반응을 시켰음. 이후 형광의 변화를 excitation 파장 540nm 및 emission 파장 590nm에서 fluorescence microscopy로 측정을 하였음. 별도의 실험에서는 정량을 위하여 PBS로 2회 세척한 다음 DMSO로 lysis 시킨 후 microplate fluorescence reader로 측정하였음.
- o apoptosis 매개 단백질 발현 측정(Western blot analysis) : 시약처리가 끝난 세포를 RIPA bufer (50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 1 mM EDTA, 10 mM NaF, 1 mM Na_3VO_4 , and complete protease inhibitor cocktail tablet)에 넣고, 0 C에서 20분간 lysis 시킨 다음 15,000 rpm에서 15분간 원심분리하여 상등액을 얻음. 단백질 함량을 bradford reagent로 정량을 한 뒤, 단백질 샘플 30 μ g을 12.5% SDS-PAGE에서 전기영동 함. 전개시킨 gel을 PVDF membrane에 transfer한 후 5% fat-free dry milk-PBST (PBS, 0.1% Tween-20)로 비특이적 항체 결합을 blocking 시킴. 3% fat-free dry milk-PBS에 1차 항체를 4°C에서 overnight으로, PBST용액으로 10분간 3회 washing 한 후, horseradish peroxidase가 붙어있는 2차 항체를 3% fat-free dry milk-PBS에 넣어 1시간동안 붙임. PBST용액으로 다시 10분간 3회 washing 한 다음 enhanced chemi-luminescence (ECL) Western blotting detection reagent (Cyanagen, Italy)를 사용하여 1분간 반응시킨 뒤 영상을 LAS4000 image (Fujifilm, Japan) 장비를 이용하여 촬영함.
- o BDNF 발현 및 상위 조절 전사인자 활성 조사 : Western blot analysis

② 동물시험

- o 동물시험은 신청원료 (밀기울추출물)뿐 만 아니라 위에 언급된 시료들에 대해 일부 또는 전부의 동물모델에 대해 수행되었음.

㉠ 견망증 모델 (제1협동)

(a) 실험동물 및 약물투여

㉠ 신청원료 (밀기울추출물)

- o 7주령의 수컷 C57BL/6 마우스를 효창사이언스에서 구입하여 계명대학교 의과대학 실험동물실에서 1주일간 적응시간을 가진 후 본 연구에 사용하였음. 사육실의 온도는 22-24°C, 습도는 55-65%가 되도록 유지하였으며, 조명은 낮 12시간-밤 12시간 주기로 조절하였음. 물과 식이는 자유롭게 먹을 수 있도록 함.
- o 밀기울추출물은 물에 녹여 적정 용량으로 존대를 사용하여 경구로 투여하였으며, 투여 8일째 복강으로 1 mg/kg의 스키폴라민을 행동실험 실시 30분전에 주사하였음. 기억력을 측정하는 행동실험으로 수동회피 실험(passive avoidance test) 및 물미로 실험(Morris water maze

test)을 순차적으로 실시함.

㉑ 플라시보

○ 신청원료와 동일함. 단, 4가지 후보물질 (플라시보1-볶은쌀, 플라시보2-쌀 전분, 플라시보-옥수수 전분, 플라시보4-옥수수 덱스트린)을 존대를 사용하여 경구로 투여하였으며, 투여 8일째 C57BL/6 마우스에 복강으로 1 mg/kg의 스코폴라민을 행동실험 실시 30분전에 주사하였음.

㉒ 프리믹스

○ 신청원료와 동일함. 단, 신청원료가 포함된 프리믹스와 불포함된 프리믹스를 존대를 사용하여 경구로 투여하였으며, 투여 8일째 C57BL/6 마우스에 복강으로 1 mg/kg의 스코폴라민을 행동실험 실시 30분전에 주사하였음.

㉓ 유사원료 (통밀 및 밀기울추출물)

○ 7주령의 수컷 Sprague-Dawley (SD) 랫트를 호창사이언스에서 구입하여 계명대학교 의과대학 실험동물실에서 1주일간 적응시간을 가진 후 본 연구에 사용하였음. 사육실의 온도는 22-24℃, 습도는 55-65%가 되도록 유지하였으며, 조명은 낮 12시간-밤 12시간 주기로 조절하였음. 물과 식이는 자유롭게 먹을 수 있도록 함.

○ 약물투여: 조사할 추출물(통밀전체, 통밀상등액, 밀기울전체, 밀기울상등액)의 기억력 개선 실험은 마우스 대신에 랫트를 이용한 것 이외에는 ㉑에서와 동일한 방법으로 이루어졌음. 통밀상등액과 밀기울상등액은 물에 녹여 적정 용량으로 존대를 사용하여 경구로 투여하였으며, 통밀전체와 밀기울전체는 투여량이 많아 시료와 함께 분쇄하여 식이로 섭취시켰으며, 행동실험은 정해진 용량의 시료를 모두 섭취한 것을 확인된 시점에서 실시하였음. 투여 8일째 복강으로 0.75 mg/kg의 스코폴라민을 행동실험 실시 30분전에 주사하였음. 기억력을 측정하는 행동실험으로 수동회피 실험을 실시함.

㉔ 기능성분 고함유 통밀추출물

○ 신청원료와 동일함. 단, 기능성분 아라비노 자일란이 고함유된 밀 추출혼합물을 존대를 사용하여 경구로 투여하였으며, 투여 8일째 C57BL/6 마우스에 복강으로 1 mg/kg의 스코폴라민을 행동실험 실시 30분전에 주사하였음.

㉕ 구매된 AX, AG, ara 및 분리정제된 AX와 AGP등에 대한 효능조사

○ 신청원료와 동일함. 시료들을 물에 녹여 적정 용량으로 존대를 사용하여 경구로 투여하였으며, 투여 8일째 C56BL/6 마우스(생쥐)에 복강으로 1 mg/kg의 스코폴라민을 행동실험 실시 30분전에 주사하였음.

(b) 기억력 상실 치료효과

○ 수동회피 실험(passive avoidance test): 수동회피반응 시험 장치는 한 쪽은 조명이 있고 다른 쪽은 조명이 없는 2개의 방 (마우스: 가로 16 cm, 세로 11 cm, 높이 10 cm; 랫트: 가로 26 cm, 세로 28 cm, 높이 15 cm)으로 구성되었음. 바닥에는 전기 전도성 망 (stainless grid)이 깔려져 있으며 guillotine door(마우스: 가로 7 cm, 세로 10 cm; 랫트: 가로 9 cm, 세로 10 cm)에 의해 서로 연결되어 있음. 조건회피반응 시험은 총 2일 동안 진행하였음. 첫째 날에는 칸막이로 나누어진 방 2개중 한쪽 (A)에 실험동물을 넣고 1분 동안 적응 (acclimation)시키고 조명을 켜 다음 칸막이 문을 열어주었음. 일반적으로 실험동물은 조명이 없는 건너편 방 (B)으로 들어가게 되는데, 이 때 자동적으로 칸막이 문이 닫히도록 하고 불이 꺼진 상태에서 바닥의 망을 통해 0.5 mA의 전류를 5초 동안 흘려주어 foot shock을 받게 하

였음. 실험 둘째 날 (24 시간 후), 실험동물을 방 A에 다시 넣어주면 실험동물은 조명이 들어와도 방 B에 들어가기를 꺼려하게 되며, 이때 방 B에 들어갈 때까지의 소요되는 시간(step-through latency time)을 측정하였음.

- 물미로 실험(Morris water-maze test)(마우스) : 물미로 실험은 플랫폼(지름 10 cm, 높이 30 cm)이 설치된 원통의 물탱크(지름 1200 cm, 높이 45 cm)에서 수행됨. 이 때 물의 온도는 20-22°C, 물의 높이는 플랫폼 위 2 cm까지로 함. 원통 주변에 표시된 지표들을 기억하여 마우스가 플랫폼까지 찾아가서 플랫폼에서 20초 이상 머무르면 찾아갈 때까지 걸린 시간을 탈출 잠복기(escape latency)로 하며, 이를 4일의 훈련기간 동안 하루 3회 실시하여 나온 평균값을 평균 탈출 잠복기(mean escape latency)로 함. 이 때 평균 탈출 잠복기가 120 초를 초과하는 경우에는 120 초로 동일한 값을 취함. 아울러 마우스가 플랫폼의 위치를 정확하게 기억하는지를 확인하기 위하여 훈련 마지막 날 플랫폼을 제거한 후 마우스가 이곳을 찾아와 머무는 시간(time spent in platform quadrant)을 측정하였음(probe test).

(c) 기전연구

- 뇌조직 분리 : 모든 행동실험이 종료된 다음 경추탈골로 실험동물을 안락사 시킨 다음 머리 부분을 절단하여 뇌를 적출하였음. 이때 대뇌피질(cortex)과 해마(hippocampus) 부위를 분리하였으며 -80°C에 보관하고 이후 분자생물학적 실험을 위하여 필요시 조직을 꺼내어 분쇄하여 사용함.
- 아세틸콜린 합성/분해 효소, 신경영양인자 BDNF 발현, 상위 조절 전사인자 및 인산화 효소의 활성 조사(Western blot analysis) : 분리한 뇌조직을 RIPA bufer (50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 1 mM EDTA, 10 mM NaF, 1 mM Na₃VO₄, and complete protease inhibitor cocktail tablet)에 넣고, 0°C에서 20분간 lysis 시킨 다음 15,000 rpm에서 15분간 원심분리하여 상등액을 얻음. 단백질 함량을 bradford reagent로 정량을 한 뒤, 단백질 샘플 30 µg을 12.5% SDS-PAGE에서 전기영동 함. 전개시킨 gel을 PVDF membrane에 transfer한 후 5% fat-free dry milk-PBST (PBS, 0.1% Tween-20)로 비특이적 항체 결합을 blocking 시킴. 3% fat-free dry milk-PBS에 1차 항체를 4°C에서 overnight으로, PBST용액으로 10분간 3회 washing 한 후, horseradish peroxidase가 붙어있는 2차 항체를 3% fat-free dry milk-PBS에 넣어 1시간동안 붙임. PBST용액으로 다시 10분간 3회 washing 한 다음 enhanced chemi-luminescence (ECL) Western blotting detection reagent (Cyanagen, Italy)를 사용하여 1분간 반응시킨 뒤 영상을 LAS4000 image (Fujifilm, Japan) 장비를 이용하여 촬영함.
- 아세틸콜린 양 측정 : 아세틸콜린 양을 측정하기 위하여 Amplex[®] Red Acetylcholine Assay Kit (Molecular Probes, Carlsbad CA USA)를 사용하였음. 100 mM acetylcholine solution을 사용하여, acetylcholine standard를 준비하고, 뇌조직을 reaction buffer로 homogenation 하였음. 96-well plate에 standard 또는 각각의 샘플을 100 µl을 넣고 working solution (400 µM Amplex Red reagent, 2 U/ml HRP, 0.2 U/ml choline oxidase, 1 U/ml acetylcholinesterase) 100 µl을 각각의 well에 주입하였음. 차광하여 30 분간 배양시킨 다음 excitation 파장 530-560 nm 및 emission 파장 590 nm에서 형광 강도를 fluorometer로 측정하였음.
- 무스카린성 아세틸콜린 수용체 mRNA 발현 측정(Reverse transcriptase-polymerase chain reaction, RT-PCR) : mRNA는 TRI Reagent (Molecular Research center, OH, 미국)로 실험

동물의 뇌 해마부위로부터 추출하였음. 분리한 mRNA는 M-MLV 역전사 효소(Promega, WI, 미국)를 사용하여 제조사의 프로토콜에 따라 42 °C에서 1시간 동안 역전사 시켰음. cDNA의 증폭은 하기와 같은 합성 프라이머를 사용하여 PCR을 시행하였음. PCR에 의해 증폭된 DNA들은 ethydiumbromide로 염색된 1.5 % 아가로스 겔에서 전기영동 한 뒤 UV를 조사하여 gel documentation system (TCP-20.M, Vilber Lourmat, 프랑스)으로 관찰하였음. Glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)는 동일한 실험 조건 확인을 위한 대조 지표로 사용하였음.

- o Western blot analysis : Western blot은 신경영양인자 BDNF, 상위 전사인자(p-CREB, CREB), 상위 인산화 효소(p-Akt, Akt)의 단백질 발현을 측정하기 위하여 시행하였음.
- o Reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) : RT-PCR은 아세틸콜린 가수분해 효소 (acetylcholinesterase : AChE), 아세틸콜린 합성효소 (choline acetyltransferase : ChAT), 무스카린성 아세틸콜린 수용체(M1 mAChR)의 mRNA 발현을 측정하기 위하여 시행하였음.
- o 면역조직화학염색(immunohistochemistry, IHC) : 인산화된 형태의 CREB의 뇌내 발현 및 분포를 확인하기 위하여 면역조직화학염색을 수행하였음. 기억력 측정 행동실험을 마친 마우스에 50 mg/kg의 zoletil과 rumpun을 복강 주사하여 마취시킨 다음, 오른쪽 심방귀를 절개함과 동시에 좌심실로 50 mM phosphate buffer (pH 7.4) 용액을 5분간, 4% para-formaldehyde (4°C in phosphate buffer)를 20분간 주입하여 관류(perfusion)하였음. 뇌를 적출하여 고정액에 16-18시간 동안 담구어 post-fixation 시키며, 이후 12%, 16% sucrose 용액 1시간씩 각각 순차적으로 2회, 3회 교환해 준 다음 18% sucrose 용액에서 1-2일간 보관하였음. 이후 OTC compound로 조직을 냉동시킨 다음, cryotome을 사용하여 30 μm 두께로 잘라 냉동절편을 제작하였음. 냉동조직 절편을 50 mM phosphate buffer로 15분간 3회 세척한 다음 0.5 mg/ml bovine serum albumin, 1.5% goat serum, 0.3% Triton X-100이 들어있는 일차항체 용액에서 4°C, 24시간 동안 반응시켰음. phosphate buffer로 10분간 3회 세척한 다음 biotinylation 된 이차항체를 실온에서 1시간 반응시켰음. avidin-biotin peroxidase complex로 실온에서 1시간 배양한 이후, 0.003% hydrogen peroxide를 포함한 0.05% 3,3'-diaminobenzidine 용액에서 10분간 발색시켰음. phosphate buffer로 세척한 다음 조직을 gelatin coated slide에 올려 2시간 동안 실온에서 말린 다음 저농도에서 고농도 에탄올로 옮기며 탈수시킨 후 xylene으로 투명화 하여 cover glass를 덮고 현미경으로 관찰하였음.

㉔ 알츠하이머병 모델(제1협동)

(a) 실험동물 및 약물투여

- o 7주령의 수컷 C57BL/6 마우스를 샘타코에서 구입하여 계명대학교 의과대학 실험동물실에서 1주일간 적응시간을 가진 후 본 연구에 사용하였음. 사육실의 온도는 22-24°C, 습도는 55-65%가 되도록 유지하였으며, 조명은 낮 12시간-밤 12시간 주기로 조절하였음. 물과 식이는 자유롭게 먹을 수 있도록 함.
- o 치매를 유발하기 위하여 베타아밀로이드를 뇌실내로 주입함. 졸레틸(Zoletil50, Virbac, 프랑스) 30 mg/kg와 럼퐁(rompun, Bayer, 독일) 10 mg/kg를 동량 혼합한 다음 혼합액과 생리식염수를 1:9로 희석하여, 마우스 몸무게(25 g)당 250 μl를 복강 주사하여 마취시킴. 마우스를 뇌정위 수술대에 고정시킨 다음 약물을 주입할 부위의 두피를 절개하고 AP:-0.08, ML:-1.0,

DV:-2.5의 좌표, 즉 측뇌실(lateral ventricle)이 위치하는 곳에 베타아밀로이드(A β ₁₋₄₂, Invitrogen, 미국)를 1 μ l (600 pmole)의 용량 및 0.1 μ l/min의 유속으로 주입함. 수술 회복기(3일) 이후 밀기울추출물을 용량별로 경구투여하며, 약물투여 8일째부터 기억력을 측정하는 행동실험으로 물미로 실험을 실시하였음.

(b) 기억력 상실 치료효과

㉠ 기억력 측정

o 물미로 실험(Morris water-maze test) : 건망증모델에서와 동일.

㉡ 기전연구

㉢ 아세틸콜린 합성/분해 효소(ChAT/AChE) 발현 측정 : Western blot analysis

㉣ 신경세포 사멸 지표(Bcl-2 및 Bax) 측정 : Western blot analysis

㉤ 신경영양인자 BDNF 발현 및 상위 조절 인자 활성화 조사 : Western blot analysis

㉥ 산화적 손상 및 항산화 방어능 측정 : Western blot analysis

- 지질과산화 지표 4-HNE 생성 측정

- 항산화 전사인자 Nrf2 및 항산화 효소 HO-1 발현 측정

㉦ 염증적 손상 측정 : Western blot analysis

- 염증성 사이토카인 TNF- α 발현 측정

㉧ 혈관성치매 모델 (제1세부)

(a) 실험방법 및 약물투여방법

o 동맥경화에 이어 발생한 혈전에 의해 뇌동맥이 막혀 조직이 죽게 되는 지역이 해마 (hippocampus)와 같은 중요 지역에서 발생하면 치매로 발전하게 되며, 혈관성치매에서 가장 많은 비율을 차지하는 것은 가는 혈관들이 막히거나 또는 혈액공급이 원활하지 못해 발생하는 겉질밑 허혈성 혈관성치매 (subcortical ischemic vascular dementia, SIVD) (전체 혈관성 치매의 35-67% 차지)임 (Roman et al., 2002).

o 겉질밑 허혈성 혈관성치매 (SIVD)에서의 손상은 주로 백색질에서 일어나며 이러한 질환을 닮은 동물 모델을 만들기 위해 다양한 방법들이 사용되고 있음 (Hainsworth & Markus, 2008). 이 중에서 흔히 사용되는 것으로 만성 관류저하 모델 (chronic hypoperfusion model)이 있으며 이 모델에서는 쥐의 양쪽 총경동맥을 묶으면 (bilateral common carotid arteries occlusion, BCCAO) 척추동맥을 통해 공급된 혈액이 윌리스환 (circle of Willis)을 거쳐 뇌에 공급됨. 하지만 공급되는 혈액의 양이 적어 백색질 부분이 선택적으로 죽게 되며 이 지역으로는 뇌들보 (corpus callosum), 속섬유막 (internal capsule) 및 시각로 (optic tract)가 있으며 (Farkas et al., 2007), 이 것이 기억력을 감소시키는 한 요인으로 작용하기도 함 (Ohta et al., 1997).

o 뇌에는 세포체 (cell body)와 축삭 (axon) 등으로 구성된 신경세포 (neuron)외에도 신경세포에 영양분을 공급하고 과잉의 신경전달물질을 제거하는 별아교세포 (astrocyte)와 신경세포를 구성하는 축삭 (axon)을 통해 전기신호전달을 원활하게 하기 위해 필요한 수초 (말이집) (myelin)를 생성하는 희소돌기아교세포 (oligodendrocyte) 및 신경세포가 죽거나 감염되었을 때 죽은 세포를 제거하는 역할을 하는 미세아교세포 (microglia)로 구성되어 있으며 (Allen & Barres, 2009), 세포외기질로는 주로 다당류인 히알루론산 (hyaluronan)으로 구성되어 있음 (Rauch, 2004). 이 중에서 혈관성치매에 관여하는 백색질에는 신경세포의 축삭이 주를 이루고 있기 때문에 조직을 백색질 위주로 관찰함.

o 선별된 ara 고함유 품종인 CU-1 (A밀)의 밀기울 추출물인 원료를 혈관성 치매에 효과가 있는지 확인

하기 위하여 400 mg/kg/day의 농도로 양측 경총동맥을 묶기 5일 전부터 먹이기 시작하여 실험을 마치는 30일 동안 지속적으로 먹였음.

- 혈관성치매 모델은 체중 280-310g의 흰쥐 (Sprague-Dawley)를 흡입마취기 (multiplus)를 이용하여 이소플루란(isoflurane, 하나제약, 대한민국)으로 흡입 마취시킨 후, 두 경총동맥 (common carotid artery)을 수술로 노출시켜 봉합실로 묶는 BCCAO (bilateral common carotid artery occlusion) 방법으로 전체 뇌에 공급되는 혈류량을 4주 동안 감소시켰음. 이에 실험 종료 시 동공 반응을 관찰하고 조직을 얻어 백색질을 중심으로 조직의 손상 정도를 파악하였음.

(b) 신청원료의 효능조사

- 동공 반응 조사 방법 - 혈관성치매가 발생하면 백색질 중 optic tract 의 손상이 가장 먼저 발생하면서 또한 가장 심각하게 발생하게 됨. 급성이든 만성이든 혈액의 저관류에 의해 발생하는 망막의 손상의 지표로 동공 반응이 관련 있음. 따라서 간단 지표로서 동공 반응을 조사하였음. 눈에 밝은 빛을 비추었을 때 약 10 sec 안에 조리개가 줄어들는지 줄어들지 않는지에 따라 pupillary light reflex (PLR) loss 를 조사하였음 (Graefe's Arch Clin Exp Ophthalmol (2006) 244:199-204).
- Luxol fast blue 염색법에 의한 뇌조직 손상 조사 방법 - 먼저, 혈관 (capillary)에 혈액이 공급되지 않으면 에너지 소모는 많고 활성산소종의 발생이 높은 희소돌기아교세포가 세포자살 등에 의해 먼저 죽게 될 뿐만 아니라 (McTigue & Tripathi, 2008), 활성화된 기질 금속단백분해효소 (matrix metalloproteinase)에 의해 수초를 구성하는 단백질인 MBP (myelin-basic protein) 등이 분해되면서 수초가 손상됨 (Arai & Lo, 2009 ; Mctigue & Tripathi, 2008). 이에 따른 수초의 손상은 조직 슬라이드를 백색질이 존재하는 위치인 bregma point 로부터 -2.64 ~ -3.12 mm 위치를 획득하여 (the atlas of Paxinos and Watson) luxol fast blue 용액과 lithium carbonate 용액을 이용하여 staining을 실시하여 수초의 상태에 따라 점수를 매겨 수초의 손상 정도를 판단하였음 (Pistorio et al., 2006). Normal (grade 0), disarrangement of nerve fibers (grade 1), formation of marked vacuoles (grade 2), disappearance of myelinated fibers (grade 3)로 단계를 나누어 점수로 환산하였음. 특히 손상정도가 심한 corpus callosum (cc)와 optic tract (opt) 지역을 중심으로 관찰하였음.

(c) 신청원료의 기전조사

- 기능적으로 동공 반응을 향상시키고 수초의 손상도 줄이는 효과를 나타내는 원료가 뇌조직의 미세소건 또는 단백질 수준에서 어떠한 변화를 나타내는지 조사하기 위해 각종 항체를 이용하여 면역염색법을 실시하였음.
- 미세아교세포(Microglia)의 활성화: 활성산소와 죽은 세포에 의해 활성화된 미세아교세포는 죽은 세포를 제거할 뿐만 아니라 이 과정에서 활성산소종, 신경전달물질인 글루탐산 (glutamate) 및 IL-1 등의 시토카인 (cytokine)을 분비하고 이것이 다시 희소돌기아교세포 (oligodendrocyte)를 세포자살에 의해 죽게 만들 (Butts et al., 2008; Dheen et al., 2007). 미세아교세포는 정상상태에서는 돌기를 가진 형태로 있다가 활성화되면 돌기가 없는 아메바같은 형태로 변하면서 그 수도 증식하게 됨 (Dheen et al., 2007; Garden & Muller, 2006). 이 미세아교세포를 선택적으로 염색하기 위한 항체로는 Iba1(ionized calcium binding adaptor molecule 1)을 사용하였음.
- 별아교세포(astrocyte)의 활성화: 미세아교세포 등에 의해 활성화된 별아교세포 (reactive astrocyte)는 독성을 나타내는 글루탐산을 흡수하거나 VEGF (vascular endothelial growth factor)를 분비하여 혈관 신생을 촉진함으로써 백색질의 손상을 방지하는 등 신경세포의 생존에 유익하나 극단적인 경우에는 글

루탐산을 분비하여 손상을 촉진하기도 함 (Seifert et al., 2006; Chvatal et al., 2008). 별아교세포는 활성화되면 세포체 (cell body)가 커지면서 돌기도 굵어지는 등 세포가 비대 (hypertrophy)해지면서 자극이 심하면 증식하여 세포의 수도 늘어남 (Sorfroniew, 2009). 이 세포가 활성화되면 GFAP (glial filament acidic protein)의 발현이 증가하며 이에 대한 항체를 이용하여 별아교세포의 존재를 확인하였음 (Pekny & Nilsson, 2005).

㉔ 심근경색 모델 (제1세부)

(a) 약물투여 및 효능조사

- o Ketamine (10 mg/kg)과 xylazine (5 mg/kg)을 투여하여 마취를 유도하고 기도 삽관 후 인공호흡기 (Harvard사)를 이용하여 호흡을 유지하였음.
- o 허혈-재관류 모델: 흉부를 연 다음, 심장을 늑간 내부로부터 도출시키고 5-0 prolene 봉합실을 좌전하행관상동맥 (LAD)의 윗부분을 통과시켜서 PE 50을 이용하여 올가미 모양으로 만들어 혈관을 폐색시켜 허혈상태를 30분 동안 유지하고, 다시 죄었던 PE 50을 느슨하게 하여 3시간 동안 재관류를 실시하였음. 심근경색 부위의 조사는 Evans blue dye와 TTC (2,3,5-triphenyltetrazolium chloride) 염색을 통하여 일정군의 경색 부위 크기를 측정하여 추출물의 효과를 다음과 같이 관찰하였음; 먼저 허혈-재관류가 끝난 후 바로 다시 PE 50을 죄어서 허혈상태와 동일한 상태로 만들어 준 후 1% Evans blue dye 용액을 2 ml 정도 정맥투여 하여 쥐 전체를 순환시켜주었음. 그리고 난 후 심장을 적출하여 우심실 및 우심방을 제거하고 2-3 mm의 두께로 자른 뒤 단면적의 사진을 찍어 dye가 염색된 곳과 염색되지 않은 곳의 면적을 측정하여 Risk area (AAR /LV), 즉 혈액이 지나가지 않은 지역의 면적을 구하였음. 그 후 다시 그 심장조각들을 37 °C에서 1% TTC 용액 (Sigma)으로 15분 동안 염색시킨 후 10% formalin 용액에 고정하여 다음날 다시 단면적을 측정하여 전체 면적에 대한 조직이 죽은 흰 지역의 면적, Infarcted Area (IA/LV) 즉 경색부위의 면적을 구하였음. 그리고 AAR에 대한 IA의 비로 대조군과 실험군을 비교하였음.
- o 약물투여: 심근경색은 경구투여로만 행하여졌으며, 순수성분들을 270±30 g의 쥐를 대상으로 시료의 종류에 따라 다른 용량 (AG인 경우에는 10, 50을 및 100, ara인 경우에는 10과 100을, Para-, Pgal-, gal인 경우에는 모두 100 mg/kg/day을 공급)을 사료와 섞어서 3일 동안 자유롭게 먹게 한 후 심근경색 실험을 실시하였음.

(b) 기전조사

- o 관상동맥이 막혀 심근세포가 죽게 될 때 그 방식은 크게 괴사 (necrosis)와 세포자살 (apoptosis)로 이루어지며, 이 중에서 세포자살에 의한 기전은 그림 18에서와 같음.
- o 관상동맥이 막혀 발생한 허혈조건이나 또는 재관류되는 조건에서 심근세포는 세포자살에 의해 죽게 되는데 이 때 이 신호가 전달되는 과정은 MAP kinase가 인산화되어 활성화되고, Bcl-2에 비해 Bax의 양이 상대적으로 많아지면 (그림 18의 5) cytochrome c가 미토콘드리아로부터 방출되고 (그림 18의 6), 이로 인해 procaspase-3이 caspase-3로 변환되면 세포자살의 여러 현상들 (염색체에서의 nick 발생, DNA 조각 생성, 핵 응축)이 관찰됨.
- o 구매된 AG 및 그 구성성분인 ara 가 심근경색의 부피를 줄이는 원인을 조사하기 위해 세포 자살 기전 조사의 대표적인 방법인 TUNEL assay 및 면역조직화법을 실시하였음.
- o TUNEL 방법 - Apop-Taq (*In situ* cell death detection kit, POD Roche Mannheim, Germany)을 이용한 TUNEL 방법으로 조직을 염색하여 세포자살 (apoptosis)을 관찰하였음. 이를 위해 파라핀 포매

조직에서 슬라이드를 획득한 후 세포 내에 존재하는 peroxidase를 제거하기 위하여 proteinase K를 처리하고, Apop-Taq kit를 이용하여 반응시켰음. 그 후 DAB 기질용액으로 반응시키고, methyl green을 이용하여 대조 염색을 실시하였음. 염색을 마친 조직은 IA, AAR 지역을 구분하여 400 배율로 현미경 사진을 촬영하고, 촬영을 마친 슬라이드 사진을 이용하여 세포자살의 정도를 분석하였음. 세포자살의 정량은 IA, AAR 각각의 지역에서 사진 전체 근육세포 수를 세고, 세포자살이 진행된 근육세포수를 센 후, 전체 세포에 대한 백분율도 환산하여 비교하였음.

- o 면역조직화법 - 심장 절편에 cleaved caspase-3, Bcl-2/Bax 등의 일차 항체를 붙인 후 이차 항체를 붙이고 ABC kit를 이용한 후 DAB 발색을 진행하였음. 일정 시간 발색이 진행되면 슬라이드를 봉입하고 현미경 사진을 200배율로 촬영하여 Image J 프로그램을 이용하여 intergral density를 측정하여 발현정도를 비교하였음.
- o Western blotting - Western blot은 Bcl-2와 Bax의 발현과 MAPK의 인산화정도를 측정하기 위하여 시행하였음.

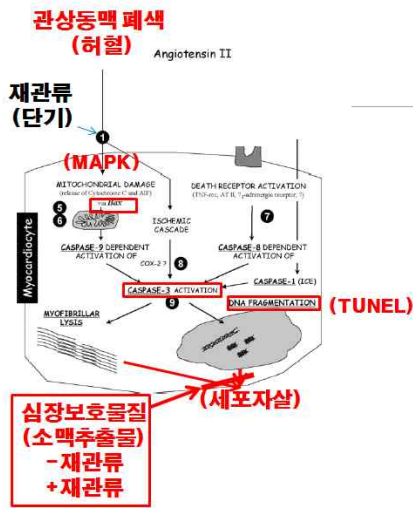


그림 18. 세포자살에 의한 심근세포의 사멸 및 AG의 역할

- ③ 기능성분의 분리정제
 - o 밑에 포함된 기능성분인 AX와 AGP는 다음과 같이 분리정제되었음. 기능은 앞에서 설명된 동물모델을 이용하여 실시하였음.

- ㉔ AX의 분리정제
 - (a) 밑기울 물추출물로부터 전분을 제거한 WEM (water extractable material) 용액의 확보
 - o 대용약탕기 (DWP-5000M)에 물 2 L를 끓인 후 200g의 CU-1 (2011년산) 밑기울을 넣고 1시간 추출하였음. 이를 4 °C에서 밤새 냉각한 후 원심분리하여 (14000g, 20분, 4 °C) 상등액을 얻었음. (이 상등액을 -20 °C에서 얼려놓았다가 해동해서 쓸 경우에는 전분을 다시 한 번 원

심분리 한 후 사용하였음.) 얻어진 1400 ml의 상등액에 Na_2HPO_4 3.02g과 NaH_2PO_4 5.846g을 넣어 pH6.5의 50 mM phosphate buffer로 만들었음. 전분을 분해하기 위해 용액의 온도를 75 °C로 올린 후, Termamyl 120L (Novozyme)을 2 ml (10 $\mu\text{l/g}$ 밀기울) 넣고 온도를 90 °C로 다시 올린 후 1시간 동안 교반시켰음. 이를 50 °C로 냉각한 후 Fungamyl 800L (Sigma)을 80 μl (0.4 $\mu\text{l/g}$ bran) 넣고 30분 간 50 °C에서 교반시킨 후 효소의 활성을 없애기 위해 용액을 100 °C에서 15분 끓인 후 상온으로 냉각시켰음. 분해된 전분을 포도당으로 전환시키기 위해 4N HCl을 넣어 pH를 4.0으로 조정한 후, amyloglucosidase (300 U/ml, Sigma)를 2 ml 넣고 73 °C에서 28시간 항온처리하였음. 이를 4M NaOH로 pH를 7.0으로 조정한 후, 100 °C에서 15분 가열하고, 식힌 후 원심분리하여 (14000g, 20분, 4 °C) 상등액을 얻었음. 상등액을 감압증류하여 부피를 140 ml로 줄인 후 투석 membrane (Spectra/Por, MWCO 1000, 지름 29 mm)에 넣어 72시간 동안 4 °C에서 12시간마다 증류수를 교체하면서 투석시켜 WEM 용액을 얻었음.

(b) WEM 용액으로부터 선별적 에탄올 침전에 의한 조 (crude)AX 및 조AGP의 분리

o WEM 용액을 에탄올 20, 60 및 80%로 차례로 침전시켜 조AX와 조AGP를 다음과 같이 분리하였음; WEM 용액에 95% 에탄올을 넣어 20% 에탄올이 될 때 까지 침전시킨 후에 3시간 교반하고, 4 °C에 밤 새 놓아 둔 후 원심분리 (14000g, 20분, 4 °C) 하여 그 침전물을 제거시키고 상등액은 60% 에탄올 용액을 만든 다음 같은 방법으로 침전물을 모아 에탄올과 아세톤으로 차례로 씻고 60 °C 오븐에 밤 새 말려서 744 mg의 조AX을 얻었음. 같은 방법으로 80% 에탄올 용액에서는 617 mg의 조AGP 침전물을 얻었음.

(c) 조AX로부터 순수AX의 분리정제

o 조AX로부터 남은 전분, 단백질 및 B-Glu를 제거한 후 순수한 AX를 다음과 같이 얻었음; 조AX 606 mg을 증류수 140 ml에 녹이고 90 °C로 가열한 후 전분을 제거하기 위해 Termamyl 120L을 60 μl 넣고 90 °C에서 1시간 교반한 후, 50 °C로 온도를 내려 Fungamyl 800L을 10 μl 넣고 30분간 교반시켰음. 이어서 단백질을 제거하기 위해 Neutralse 0.8L (Novozyme) 600 μl , Alcalase 2.4L (Novozyme) 600 μl 및 Flavourzyme 500L (Novozyme) 20 μl 를 넣고 55 °C에서 4시간 동안 교반하였음. 효소들을 비활성화시키기 위해 100 °C에서 15분간 끓인 후, 상온으로 냉각시켰음. 1.3M HCl을 사용하여 혼합물의 pH를 4.0으로 조정한 후, amyloglucosidase 200 μl 를 넣고 73 °C에서 15시간 교반하고, 100 °C에서 15분간 가열한 후 상온으로 냉각시켰음. 단백질을 제거하기 위해 700 mg의 실리카 (Sigma)를 3.5 ml 증류수 (1:5 w/v)에 섞어 (protein 대 silica 비율은 1:7 w/w) 위의 혼합물에 넣고 pH를 4.65로 조절한 후 30분간 교반하였음 (J Cereal Chem 2002, **35**, 315-326). 원심분리 (14000g, 20 min, 4 °C)하여 얻은 상등액에 남아 있을 수도 있는 β -글루칸 (B-Glu)을 제거하기 위해 lichenase (Megazyme, 1000U/ml) 10 μl 를 넣고 40 °C에서 2시간 교반하고, 100 °C에서 15분간 가열한 후 상온으로 냉각시켰음. 원심분리한 후, 상등액을 4 °C에서 72시간 증류수에 투석 (Spectra/Por membrane, MWCO 1000, 지름 29 mm)시켰음. 투석된 용액에 95% 에탄올을 첨가하여 65% 에탄올로 만들어 30분간 교반한 후 4 °C에 밤 새 두었다가 원심분리하여 침전물을 모아 에탄올과 아세톤으로 씻고 60 °C 오븐에 밤새 말렸음. 302 mg의 백색 가루를 얻었으며, 이에 대해 당함량분석이 이루어졌음.

(d) 순수AX의 분자량측정

- 분리정제된 순수AX의 크기는 한국고분자시험연구소(주)에 의뢰하여 이루어졌으며, 분자량의 측정은 GPC (Gel permeation chromatography)를 이용하여 다음과 같이 이루어졌음; 밀기울에서 분리한 순수AX와 전제된 AGP(v)의 분자량은 Waters GPC system의 TSKgel GMPWx1 (7.8 x 300 mm) 컬럼과 Waters 410 Differential Refractometer를 사용하여 분석하였음. 순수AX과 AGP(v)을 3 mg/1 농도로 duplicate samples를 준비하여 이 중 100 μ l를 주입하고 35 $^{\circ}$ C에서 1.0 ml/min의 유속으로 elution (pH7 buffer) 을 진행하였음. 펌프는 Waters 515가 사용되었으며 데이터는 EMPOWER로 처리되었음. 분자량 표준시료로는 5.9, 11.8, 22.8, 47.3, 212, 404 및 788 kDa의 다당류가 calibration curve에 사용되었음.

㉞ AGP의 분리정제 및 분석

(a) AGP의 분리정제

㉠ 밀가루로부터 글루텐의 제거

- 에탄올에 녹는 글루텐을 다음과 같이 제거하였음.
- 중력분 밀가루 200 g에 80 % 에탄올 1.7 L를 넣고 30 분 간 환류를 시킨 후 상등액은 따라내어 버린 후 침전물이 아직 뜨거울 때 80 % 에탄올 300 ml로 두 번 헹구어 내었음.
- 다시 80 % 에탄올 1.3 L를 넣고 30 분 간 2차 환류시킨 후, 상온에서 20 분간 9000 rpm으로 원심분리하여 상등액은 버렸음.
- 남아 있는 밀가루 덩어리를 잘게 부수어 하루 밤 상온에서 말린 후 500 μ m 이하의 입자크기로 곱게 분쇄하여 180 g 정도의 글루텐이 제거된 밀가루를 얻었음.

㉡ AGP의 추출

- 수용성 AGP를 다음과 같이 추출하였음.
- 글루텐이 제거된 밀가루 200 g에 4 $^{\circ}$ C에서 미리 식혀 둔 물 1.6 L를 넣어 잘 섞은 후 4 $^{\circ}$ C에서 1 시간 동안 magnetic stirrer를 이용하여 추출하였음.
- 밤 새 4 $^{\circ}$ C에서 침전물을 가라앉힌 후 원심분리 (9000 rpm, 4 $^{\circ}$ C, 20 분)하여 상등액을 얻었음.

㉢ 조AGP의 침전

- 추출 상등액은 원래 부피의 500 mL로 감압 증류하여 부피를 줄인 후 95 % 에탄올을 넣어 60 % 에탄올이 되면 3시간 더 교반한 후 4 $^{\circ}$ C에 두어 침전시켰음.
- 60 % 에탄올에 침전된 침전물 (60ppt)을 원심분리하여 제거 한 후 상등액은 다시 원래 부피의 130 mL로 감압 증류하여 부피를 줄인 후 같은 방법으로 80 % 에탄올이 될 때까지 95 % 에탄올을 교반하면서 넣었음.
- 3 시간 더 교반한 후 4 $^{\circ}$ C에 두어 밤 새 침전시켰음.
- 침전물을 원심분리하여 분리 한 후 95 % 에탄올로 두 번 씻고 아세톤으로 한 번 씻은 후 60 $^{\circ}$ C에서 밤새 말려 조AGP (cF80ppt) 0.58g (원래 밀가루의 0.26%)을 얻었음.

㉣ 순수 AGP의 확보

- 400 mg의 조AGP를 15 mL의 0.1M 인산완충용액 (pH 7.15)에 녹이고, 황산암모늄으로 포화시킨 후 밤새도록 교반시켰음.
- 용액을 여과시킨 후 4일 동안 투석시켰음. 투석된 용액을 5 mL로 줄인 후 95% 에탄올을 한 방울씩 첨가하면서 침전시켜 순수한 AGP를 얻었음.

(b) 분리정제된 AGP의 분석

○ 분리정제된 AGP의 순도를 확인하기 위해 당분석과 GPC (gel permeation chromatography)를 실시하였음.

㉠ 당분석

○ 당분석은 “(5) 기능성분[또는 지표성분] 규격 및 시험방법에 관한 자료“에서 사용한 alditol acetate법에 의해 분석하였음.

㉡ GPC 분석

○ GPC 분석은 국제공인시험기관인 한국고분자 시험연구소 (Koptri)에 의뢰하여 분석하였음. 이 때 GPC의 분석조건은 아래와 같음.

㉢ 측정기기: Waters GPC system

㉣ 펌프: Waters 515

㉤ 검출기: Waters 410 Differential Refractometer

㉥ 용매: Buffer 7

㉦ 컬럼: 2 x TSKgel GMPWxl (7.8 x 300 mm)

㉧ 온도: 35℃

㉨ 유속: 1.0 mL/min

㉩ 주입량: 100 μL

㉪ 데이터처리: EMPOWER

㉫ 표준시료: Polysaccharide

(나) 인체시험 (제3협동, 제2협동, 제1협동)

① 신청원료 캡슐 및 플라시보 캡슐의 제조 (제2협동)

○ 인체시험용 캡슐은 충북 오창에 소재한 건강기능식품 전문 제조회사인 네추럴F&P에서 제조하였음.

② 섭취

○ 효능이 나타나는 섭취량을 제시하였음.

③ 인체시험

㉠ 인체적용시험 설계

(a) 연구디자인 설계 및 평가항목 선정

○ 선행연구 및 인지기능 관련 문헌 검토 후 인체적용시험 디자인 설계 및 바이오마커를 선정한다.

(b) 인체적용시험계획서 및 증례기록서 개발

○ 선행연구 결과를 통해 원료의 안전성 및 기능성 관련 자료를 수집한다.

○ 인체적용시험 유효성 및 안전성 평가 분석을 위한 통계적 접근 방법을 모색한다.

○ 인체적용시험계획서 및 증례기록서 개발

- 인체적용시험계획서: 해당 인체적용시험의 배경이나 근거를 제공하기 위하여 인체적용시험의 목적, 연구방법론, 통계적 고려사항, 관련 조직 등을 기술한 문서
- 증례기록서: 각각의 연구대상자 별로 인체적용시험계획서에서 요구한 정보를 기록하여 인체적용시험 의뢰자에게 전달할 목적으로 인쇄하거나 전자 문서화한 문서

(c) IRB 심의

- o 연구대상자의 권리·안전·복지를 보호하고, 연구대상자의 인체적용시험 참여 이유가 타당한지 검토한다.
 - 심의자료: 인체적용시험자자료집, 인체적용시험계획서, 증례기록서, 연구책임자이력서, 연구비소요명세서 등

㉔ 인체적용시험 수행

(a) 연구자 개시모임

- o 연구 수행에 관여하는 모든 연구자(연구책임자, 연구담당자, 모니터 요원 등)들이 모여 연구 수행 사항 및 추후 연구 계획에 대해 사전 조율한다.

(b) 연구대상자 모집

㉑ 연구대상자 선정기준

- ㉒ 주관적 인지기능 저하를 호소하며, 간이정신상태검사(K-MMSE) 24점 이상인 50세 이상 80세 이하 성인 남·여
- ㉓ 본 연구에 대한 자세한 설명을 듣고 완전히 이해한 후, 자의로 참여를 결정하고 주의사항을 준수하기로 서면 동의한 자

㉔ 연구대상자 제외기준

- ㉕ 정신과 치료나 심리치료가 요구되는 임상적 질환들(정신분열병, 정동장애, 불안장애, 해리장애, 성도착증, 물질관련장애, 섭식장애, 치매 및 기타 인지장애 등)로 인한 정신과 치료를 받고 있거나 최근 5년 이내에 치료를 받은 과거력이 있는 자
- ㉖ 임상적으로 유의한 급·만성 질환이 있는 자(뇌신경계 질환, 내분비계 질환, 심혈관계 질환, 신장 및 비뇨기계 질환, 호흡기계 질환, 알러지, 면역계 질환, 혈액·종양 질환 등. 단, 시험책임자 판단에 따라 피험자의 상태를 고려하여 본 연구에 참여할 수 있다.)
- ㉗ 알코올 중독, 약물 남용 또는 의존이 있는 자
- ㉘ 시험용제품 흡수에 영향을 줄 수 있는 위장관계 질환(예: 크론병)이나 위장관계 수술(단, 단순충수돌기절제술이나 탈장수술은 제외) 과거력이 있는 자
- ㉙ 일상적인 의사소통이 어려운 자
- ㉚ 시력장애가 있어 글자 및 그림을 읽거나 보지 못하는 자
- ㉛ 손이나 팔에 장애가 있어 필기가 어려운 자
- ㉜ 스크리닝 검사 4주 이내에 인지기능에 영향을 미칠 수 있는 의약품이나 건강기능식품을 섭취한 자

- ㉘ 약물 및 인체적용시험용제품에 대한 과민반응 혹은 임상적으로 유의한 과민반응의 병력이 있는 자
- ㉙ 스크리닝 검사 전 2개월 이내에 타 인체적용시험에 참여한 자
- ㉚ 진단검사의학 검사 결과를 비롯한 기타 사유로 인하여 시험책임자가 연구 참여에 부적합하다고 판단한 자

(c) 인체적용시험 수행

㉛ 수행방법

㉜ 스크리닝(제-28일~제-1일)

: 자원자에 한하여 인체적용시험 예정일(0주)로부터 4주 이내(제-28일~-1일)에 문진, 신체검진, 진단검사의학 검사 등 스크리닝 검사를 시행하여 본 인체적용시험에 피험자로서 적합하다고 판단되는 자를 선정함.

㉝ 1차방문(제1일)

: 연구대상자는 제1일(0주) 전북대학교병원 기능성식품임상시험지원센터에 방문하여 정해진 검사를 수행함. 연구대상자는 밀기울추출물 섭취군 또는 위약 섭취군에 무작위배정되며 6주 분량의 인체적용시험용제품을 제공받는다. 이후 6주간 매일 인체적용시험용제품을 섭취하며 일상생활을 함.

㉞ 2차방문(제43일)

: 연구대상자는 제 43일(6주) 전북대학교병원 기능성식품임상시험지원센터에 방문하여 정해진 검사를 수행함. 지난 6주간 섭취하고 남은 제품을 반납하고, 다시 6주 분량의 제품을 제공받는다. 이후 6주간 매일 인체적용시험용제품을 섭취하며 일상생활을 함.

㉟ 3차방문(제85일)

: 연구대상자는 제85일(12주) 전북대학교병원 기능성식품임상시험지원센터에 방문하여 정해진 검사를 수행하며 지난 6주간 섭취하고 남은 제품을 반납함. 이로써 총 12주간의 인체적용시험 참여를 마침.

㊱ 유효성 평가

㊲ 1차 유효성 평가

- CNT (computerized neurocognitive function test; 전산화신경인지검사)
- WMT (working memory test)

㊳ 2차 유효성 평가

- K-MMSE (Korean mini-mental status examination; 간이정신상태검사)
- BCRS (brief cognitive rating scale; 단기인지기능평가)
- PRMQ (prospective and retrospective memory questionnaire; 과거회상기억 및 미래예측기억)
- PSS (perceived stress scale; 스트레스 검사)
- GDS (geriatric depression scale; 노인우울척도)
- SF-36 (36-item short form health survey; 삶의 질 설문지)
- BDNF (brain-derived neurotrophic factor; 혈중 뇌유래신경영양인자)

㉔ 안전성 평가

- 자·타각 증상 등 이상반응 모니터링
- 신체검진
- 진단검사의학검사
- 심전도 및 활력징후

(d) 인체적용시험 모니터링

: 인체적용시험의 질과 신뢰성을 보증하기 위하여 전문기관인 인체적용시험 수탁기관 (CRO; contract research organization)에서 인체적용시험 전반 과정에 대해 모니터링을 실시함.

㉕ 모니터링 계획

: 인체적용시험 착수 전, 모니터링 계획을 문서로 수립하며, 모니터 요원은 계획서 및 증례기록서, 연구대상자 동의서, 연구자에게 제공되는 서면 정보, 사용되는 시험용제품 등을 인체적용시험 관리기준 및 관련 규정 및 본 연구를 위하여 수립된 모니터링 계획에 따라 모니터링 실시함.

㉖ 모니터링 방문 및 follow-up

: 사전에 수립된 모니터링 계획서에 따라 담당 수행기관에 대한 개별 모니터링 방문 계획을 세우고 현장 방문 시 확인해야 할 내용 및 만나야 할 대상을 정하여 연구자와 방문 약속을 조정함. 현장 모니터링 시에 모니터 요원이 확인해야 하는 항목들을 현장 방문 시 빠짐없이 기록되도록 확인함.

㉗ Source data verification (SDV)

: 모니터 요원의 모니터링 시에 자료의 질적인 측면을 보장하기 위한 활동으로서 가장 중요한 것이 증례기록서의 source data를 source document를 통하여 대조 확인하는 작업임.

㉘ 모니터링 보고서

: 모니터링 방문 활동 또는 다른 인체적용시험과 관련된 교신은 모니터링 보고서로 작성된다. 개별 모니터링 방문에 대한 보고서는 방문 요약 및 서술적 기술, issues, checklist results 등의 부분으로 구성되며 연구대상자 등재 현황 및 방문의 진행, 데이터 모니터링과 SDV 등 활동 영역이 포함됨.

㉙ 인체적용시험 결과 분석

- 인구학적 자료는 기술통계학적 분석을 실시함.
시험군과 위약군 간 동질성 검정은 각 항목에 따라 chi-square test 또는 Fisher's exact test와 independent *t*-test를 이용하여 실시함.
- 시험군과 위약군 간 유효성 평가항목 기저치 값의 동질성 검정은 independent *t*-test를 이용하여 실시함.
- 유효성 평가는 각 평가항목의 시험군 내 변화를 paired *t*-test를 이용하여 검정함.
시험군 간의 차이는 각 항목의 변화량을 계산하여 independent *t*-test를 이용하거나 linear mixed effects model을 이용하여 검정함.
- 안전성 평가를 위해 이상반응의 발생 양상을 chi-square test 또는 Fisher's exact test

를 이용하여 검정함.

진단검사의학검사, 활력징후 등은 시험군 내 변화를 paired *t*-test를 이용하여 검정함.

시험군 간의 차이는 각 항목의 변화량을 계산하여 independent *t*-test를 이용하거나 linear mixed effects model을 이용하여 검정함.

- 동질성 검정의 유의수준은 10 % 이하, 유효성 및 안전성 평가항목의 유의수준은 5 % 이하로 설정함.

(9) 섭취량, 섭취방법, 섭취 시 주의사항 및 그 설정에 관한 자료 (제1세부)

(가) 섭취량 및 근거

- 제안한 섭취량을 제시하고, 이러한 섭취량을 설정한 근거 내용을 기재하였음.

(나) 섭취방법 및 근거

- 신청원료 (밀기울추출물)의 섭취방법을 제시하고, 이러한 섭취방법을 설정한 근거 내용을 기재하였음.

(다) 섭취 시 주의사항 및 근거

- 섭취원료의 섭취 시 주의사항을 제시하고, 이러한 주의사항을 설정한 근거 내용을 기재하였음.

(10) 의약품과 같거나 유사하지 않음을 확인하는 자료 (제1세부)

(가) 건강기능식품에 사용할 수 없는 원료 여부

- 「건강기능식품의 기준 및 규격(식약청 고시 제2011-25호, '11.06.21)」 I.1-1 '건강기능식품 제조에 사용할 수 없는 원료'에 해당하지 않는다는 것을 제시하였음.

(나) 의약품과 같거나 유사한 건강기능식품 여부

- 「건강기능식품의 기준 및 규격(식약청 고시 제2011-25호, '11.06.21)」 I.1-1 '건강기능식품 제조에 사용할 수 없는 원료' 2)의약품의 용도로만 사용되는 원료 등 섭취방법 또는 섭취량에 대해 의·약학적 전문 지식을 필요로 하는 것에 해당하지 않는다는 것을 제시하였음.

나. 구체적인 연구결과

(1) 제출자료 전체의 총괄요약본 (제1세부)

o 품목명, 목표기능, 섭취량, 원료의 성분 (지표성분) 및 기준규격 (지표성분)에 대해 요약하여 작성하였음.

(가) 품목명

o 원재료: 밀 (소맥) (*Triticum aestivum* L.)

o 신청원료의 개요: 우리나라 토종밀 (A)로부터 얻은 밀기울에서 전분의 일부분을 냉수추출과 원심분리를 통해 제거하고, 이 때 얻은 상등액과 밀기울을 함께 열수추출한 후 밀껍질 부분을 제거한 상등액을 분무건조하여 얻은 건조물 (밀기울 열수 추출건조물로서 앞으로는 “밀기울추출물”로 명명)임.

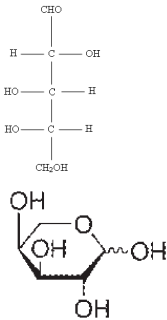
(나) 목표기능

o 인지기능 개선

(다) 섭취량

o 3 g/일 (원료기준)

(라) 원료의 성분

	지표성분명	지표성분의 기능	구조
	L-아라비노스 (L-arabinose)	- 인지기능 개선	

(마) 기준 규격 (지표성분)

o 1일 섭취량 기준: 지표성분 섭취량 75 mg (60-90 mg: 섭취량의 80-120%)

(2) 기원, 개발경위, 국내.외 인정 및 사용현황 등에 관한 자료

o 식약처의 작성순서대로 기원, 개발경위, 국내.외 인정.허가 현황 및 국내.외 사용 현황으로 나누어져 있음. 여기에 추가하여 기능성분 고함유 품종의 원재료 확보에 대한 자료도 제시하였음.

(가) 자료조사 (제1세부)

① 기원

- o 원재료인 밀은 주식으로 사용되어 왔으며, 밀알곡인 통밀 (whole wheat)은 껍질부분인 표피, 제분하여 밀가루로 사용하는 배유 (전체의 약 80%), 싹을 내는데 필요한 배아부분 (전체의 약 3%) 및 밀기울 (껍질 및 호분층으로 구성) (전체의 17%)로 구성되어 있음 (Pomeranz, 1987) (그림 1). 이 통밀의 구성성분으로는 전분 (약 60-70%), 단백질 (10-15%) 및 비전분 다당류 (3-8%)를 포함하는 식이섬유로 구성되어 있음 (Saulnier et al., 2007).
- o 밀기울은 통밀을 제분하여 밀가루를 얻고 난 후의 부산물로서 껍질과 호분층 (17%)으로 구성되나 제분 시 밀가루로 얻어내는 비율 (제분율)에 따라 배유부분도 일부 포함됨. 이를 고려하여 일반적으로 75%의 제분율로 제분을 하게 되면 통밀의 25%가 밀기울로 얻어짐.
- o 우리나라에서는 예전부터 밀기울을 이용한 밀기울 떡으로 만들어 먹었음 (전통 향토음식 용어사전, 농촌진흥청 국립농업과학원 저 교문사 2010.07.05). 아울러 예전에는 밀기울로 만든 누룩인 조국이 소주를 만드는 데에도 사용되었음 (이한창, 1991).
- o 신청원료의 개요: 우리나라 토종밀 (A)로부터 얻은 밀기울에서 전분의 일부분을 냉수추출과 원심분리를 통해 제거하고, 이 때 얻은 상등액과 밀기울을 함께 열수추출한 후 밀껍질 부분을 제거한 상등액을 분무건조하여 얻은 건조물 (밀기울 열수 추출건조물로서 앞으로는 “밀기울추출물”로 명명)임.

<원재료의 기원에 관한 정보>

원재료명	밀 (소맥)	비고(참고)
학명	<i>Triticum aestivum</i> L.	보통계밀 (Common wheat)
원산지	대한민국	토종밀
사용부위	밀기울	밀껍질+호분층+ 배유

② 개발경위

o 1장 1절의 “2. 선행연구”부분 (12쪽) 참조.

③ 국내.외 인정.허가 현황

o 밀기울 및 통밀과 그 구성 다당류 (AX, AGP)와 그 다당류를 구성하는 구성단당류 (ara, xyl 등)에 대한 현황은 다음과 같음.

㉔ 국내

(a) 식품원재료

○ 밀은 우리나라 식품의약품안전처에서 식품원재료로 허가가 되었으며, 이에 는 밀가루뿐만 아니라 밀기울 (소맥부)도 포함되어 있음.

(b) 건강기능식품

○ 밀로부터 유래한 밀식이섬유 (밀기울 및 전분제조공정 부산물)는 식약처 건강기능식품 (고시형)으로 인정되어 있음 (II.2.4.4.7 밀식이섬유).

㉕ 식후혈당상승 억제용

○ 밀가루 제조공정 (밀가루와 물로 반죽을 만든 후 이를 물로 씻어 내면서 전분과 글루텐을 분리해내는 공정)중 부산물에서 식이섬유를 분리한 후 식용에 적합하도록 한 것으로 밀식이섬유로서 일일 6-12 g 섭취하도록 함.

○ 본 기능을 인정하면서 인용된 문헌 (Lu et al., 2000)에서 사용한 식이섬유는 밀가루로부터 전분과 활성글루텐을 생산하고 남은 부산물로서 그 구성에 있어서 AX가 다량으로 포함되어 있는 식이섬유임 [AX가 전체의 63%, 전분이 14.8%, 단백질이 9.5% (중량비)를 차지함]. 이 중에서 ara의 함량을 계산하면 약 25%로 본 개발에서 사용하고자 하는 추출건조물의 약 2.5%에 비해 훨씬 높은 ara의 함량 (10배)을 가진 식이섬유임.

㉖ 배변활동 원활용

○ 밀의 외피 (밀기울) 또는 줄기를 세정, 건조, 분쇄시킨 후 식용에 적합하도록 한 것으로 밀식이섬유로서 일일 36 g을 섭취하도록 함.

○ 본 기능으로 인정하면서 인용된 문헌 (Hamberg et al., 1989)에서 사용한 식이섬유는 밀기울로서 식이섬유가 약 10% 포함되었음.

(c) 식품첨가물

○ 밀의 구성성분의 하나인 AGP와 유사한 서양잎갈나무 (*Larix occidentalis*)로부터 유래한 AG (arabinogalactan)는 우리나라 식약처에서 식품첨가물 (식품첨가물 공전 천연첨가물 138번)로 허가가 나 있음.

○ AX의 구성성분인 xyl (D-xylose)는 우리나라에서 식품첨가물 (식품첨가물 공전 천연첨가물 69번)로 허가가 나 있음.

㉗ 국외

(a) 건강기능식품

○ 밀로부터 유래한 AX를 효소를 이용하여 밀기울로부터 제조한 올리고당 (AXOS) (밀기울추출물로 명명)이 장내 유익세균의 번식을 촉진하는 프리바이오틱 (prebiotic)으로 개발되어 미국에서 GRAS로 허가를 받았음.

○ 벨기에에 소재하는 기업인 Fugeia NV가 개발한 밀기울추출물을 미국 FDA로부터 GRAS (generally recognized as safe)로 허가를 받았음 (GRAS Notice No. GRN 000343, 2010년 11월 22일). 이 밀기울추출물은 전분이 제거된 밀기울을 효소 (hemicellulase)로 분해하여 얻어진 것으로 비수용성 AX가 분해되어 얻어진 올리고당 [arabinoxyloligosaccharide (AXOS)]으로 (Swennen et al., 2006), 한 끼 (serving) 당 2.4-3.2 g 섭취하도록 제안하였음. 이러한 AXOS는 비피더스균 (bifidobacteria) 등 유익한 균의 증식을 촉진하고 (Maki et al., 2012),

콜레스테롤을 수치를 낮출 수 있는 프리바이오틱으로서의 가능성을 제시하였음 (Grootaert et al., 2009).

(b) 식품첨가물

- o 일본에서는 AG가 후생노동성에서 허가하는 식품첨가물 (19번)로 허가가 나있음.
- o 일본에서는 AX의 구성성분인 ara (L-arabinose)와 xyl 모두 후생노동성에서 허가하는 식품첨가물 (각 20번과 80번)로 허가가 나있음. 또한, ara는 “식후 혈당치의 상승을 완화한다”는 표시를 할 수 있는 특정보건용식품 (FOSHU)로 허가되어 있음.
- o 미국에서는 AG가 GRAS (generally recognized as safe)로 허가 (허가번호: 000017, 000047 및 000084)가 나 있으며, ara와 xyl 모두가 FDA에서 허가하는 EAFUS (Everything Added to Food in the Unites States)에 등재되어 있음 (Doc No. 0088 및 1567).

④ 국내.외 사용 현황

- o 밀기울 및 통밀과 그 구성 다당류 (AX, AGP)와 그 다당류를 구성하는 구성단당류 (ara, xyl 등)에 대한 현황은 다음과 같음.

㉠ 국내

(a) 밀기울

- o 밀기울은 우리나라에서 배변활동을 원활하게 하는 건강기능식품으로 등록이 되어 있으며 (II.2.4.4.7 밀식이섬유), 밀기울 빵 등으로 실제 판매도 이루어지고 있음 (유스마일, www.yousmile.co.kr).

(b) 통밀

- o 밀기울이 포함된 통밀은 빵 등의 재료에 사용 되고 있으며, 전남 구례 등에서 생산되는 통밀을 분쇄한 통밀가루의 판매가 이루어지고 있으며, 실제 통밀이 포함된 통밀빵도 뚜레쥬르에서 판매 되고 있음.

㉡ 국외

(a) 밀기울

- o 밀기울이 대변의 양을 증가시킴으로써 변비 완화에 효능을 나타낸다는 것이 알려져 (O’Sullivan, 2012), 이 가공된 밀기울에 설탕, 맥아향 만으로 제조된 시리얼 (Kellogg’s All-Bran)을 켈로그에서 판매하고 있음. 이 시리얼 중 “Original” 한 끼에 해당하는 1/2컵 (serving size, 시리얼 31g)에는 밀 식이섬유 10 g이 포함되어 있음. 한편, 켈로그 호주지사에게서 판매하는 All-Bran 38 g에는 식이섬유 11 g이 포함되어 있으며 이 식이섬유에 해당하는 가공되지 않은 밀기울 (밀기울)은 25 g에 해당하였음 (Macrae et al., 1997). 이상으로부터 All-Bran 30 g에는 밀 식이섬유가 약 10 g 포함되어 있고, 이는 약 20 g의 생밀기울에 해당함.

(b) 통밀

- o 미국 등 외국에서도 통밀을 포함한 전곡이 심혈관질환 등을 예방하는 효능이 있어 (Gil et al., 2011), 통밀가루가 제빵용 등으로 판매되고 있음.

(c)㉢ AX 고함유 식이섬유 (혼합물)

- 쌀겨 (rice bran)를 표고버섯으로부터 얻어진 효소로 처리하여 얻어진 AX 고함유 혼합물 (탄수화물 65-80%, 단백질 8-15% 포함) (MGM-3)을 면역기능을 강화시키는 건강보조식품으로 일본의 다이와 제약회사에서 개발하여 BioBran (혼합물을 250 mg과 1000 mg 정으로 제조)이란 상품명으로 판매하고 있음.

(d)④ 밀구성 식이섬유 및 식이섬유 구성 단당류

- 밀을 구성하는 다당류 식이섬유 중 효능을 나타내는데 기여하는 것으로는 아라비노스 (ara)와 자일로스 (xyl)로 구성된 아라비노자일란 (AX), ara와 갈락토오스 (gal)로 구성된 아라비노갈락탄-펩타이드 (AGP) 등이 있고, 이러한 물질들의 사용현황은 아래와 같음.

㉠ 다당류

㉠ AX

- 벨기에 소재 기업인 Fugeia NV가 밀기울의 AX로부터 개발한 프리바이틱 효능을 나타내는 수용성 AXOS (arabinoxyloligosaccharide) (상품명: Brana Vita)는 미국 FDA로부터 GRAS로 허가를 받은 후 미국 Cargill 회사에 기술이전하여 음료제품 등으로 개발하고자 함 (<http://www.cargill.com/news/releases/2013/NA3071665.jsp>).

㉡ AG

- 잎갈나무로부터 얻어지는 수용성 AG (LW-AG)는 밀로부터 얻어지는 물추출 AGP와 마찬가지로 ara와 gal로 구성되어 있음 (밀의 AGP에서 ara:gal=38:50인 반면에 LW-AG에서 ara:gal=10:75임) (Loosveld & Delcour, 2000).
- LW-AG는 면역증강효능이 있는 것으로 알려져 있으며 (Kelly, 1999; Monograph, 2000), 스위스 Lonza사에서 제조한 LW-AG (상품명: ResistAid)는 감기 예방에 효능이 있음이 임상시험을 통해 확인되었으며 (Riede et al., 2013) 이를 첨가한 제품들이 판매되고 있음.

㉢ 단당류

㉠ L-아라비노스

- 일본에서는 삼화전분주식회사에서 L-아라비노스를 특정보건용식품 (FOSHU)로 허가를 받고 설탕대용으로 설탕과 L-아라비노스를 섞어 “아라비노”라는 상품명으로 판매하고 있음.
- 미국에서는 Pharmachem 회사에서 L-아라비노스를 크롬과 섞어 식후 혈당을 조절하고 혈중 인슐린 농도를 낮추는데 사용하기 위한 제품으로 “Phase 3”라는 상품명으로 판매하고 있음.

(나) 기능성분 고함유 품종의 선별 (제1세부)

- 대량으로 확보가 가능한 품종에 대해서는 당분석을 실시하여 활성성분이면서 지표성분인 아라비노스 (ara)의 함량이 높은 품종을 후보로 선별하였음. 반면에 소량으로 확보된 품종에 대해서는 경북농업기술원에서 재배하여 수량을 늘린 후 당분석을 실시하여 후보로 선별하였음.

① 1차년도

- 가능하면 소량의 섭취로도 기능을 나타내기 위해서는 기능성분인 선정된 수용성 ara를 많이 함유하는 품종을 선별할 필요성이 있어 이미 대량으로 재배하고 있어 구매가 가능한 품종 (대량재배 가능품종) 과 문헌에서 그 함유량이 높다고 나와 있지만 소량으로만 구입이 가능한 품종 (소량재배 가능품종)으로 나누어 접근하였음.
- 대량재배 가능품종에서는 실험에 필요한 통밀은 구매 또는 제공받아 사용하였으며, 소량재배 가능품종에서는 실험에 필요한 통밀은 제1세부과제에 참여하고 있는 경북농업기술원에서 2011년도 가을 (10월)에 파종하여 2012년 (6월)에 수확하여 사용하였음.
- 함량분석을 위해 사용된 시료는 통밀상등액으로 아래의 표 13에서와 같은 추출조건으로 제조하였음.

표 13. 기능성분 고함유 품종선별 (대량재배)을 위해 사용된 통밀상등액의 제조조건

	원재료	원재료 재배 연도	원재료 가공	비율 (물:가공 원재료)	추출 장비	추출 온도	추출 시간	원료	건조 방법
일반 사항	통밀	2011	분쇄 통밀	10:1 또는 15:1	약탕기	100 °C	1 시간	상등액	열풍 건조
비고	외국산, 국산		실험실 용 제분기	- 분쇄 통밀 100 g 사용	- 온도 불가능 - 추출 시 물보충		- 예열 후 추출 시간	- 실험실 용 원심 분리기	60 °C

㉑ 대량재배 가능품종

(a) Ara 고함유 품종의 선별

- 조사품종은 동아원에서 구매하는 외국산 10 (미국산 5, 캐나다 2 및 호주 3)과 국산 4 (국내육종 3, 국내토종 1)로 총 14품종이며 외국산은 동아원에서, 국내육종품종은 경북농업기술원에서 제공받았으며, 국내토종은 구매하여 사용하였음.
- 이러한 품종들의 원재료 (통밀)를 표 7에서 제시된 원료생산 조건 (물:분쇄통밀 = 10:1)을 이용하여 얻어진 원료 (상등액)들에 대해 ara의 함량 (수용성 ara)을 alditol acetate 법에 의해 조사하였음 (표 14). 이 중에서 ara가 높은 것은 호주산인 AOW와 국내토종인 CU-1 및 국내육종인 CU-4이었음.

표 14. 대량품종가능 품종들의 통밀상등액의 arabinose 함량

	NS (미국)	SWW10.5 (미국)	SWW9.5 (미국)	SRW (미국)	HRW (미국)	CWRS (캐나다)	COW (캐나다)
Ara (%)	1.0	1.2	1.1	1.2	1.1	0.95	0.84

	ASW (호주)	AOW (호주)	AH (호주)	CU-1 (국내토종)	CU-2 (국내육종) (금강밀)	CU-3 (국내육종)	CU-4 (국내육종)
Ara (%)	0.76	1.3	0.98	1.5	1.1	1.1	1.4

(b) 선정된 후보 Ara 고함유 품종에 대한 상세조사

- o 스크리닝에서 수용액 ara의 함량이 가장 높았던 AOW, CU-1 및 CU-4에 대해 보다 자세하게 조사하기 위해 100 g의 분쇄통밀에 대해 얻어지는 건조량까지 측정하여 한 batch로부터 얻을 수 있는 전체 ara의 수율을 계산하였음 (대조품종으로 가장 낮은 ASW 포함).
- o 원료생산은 물을 가공원료인 분쇄한 통밀에 대해 15:1 비율로 첨가 (추출과정에서 전분 등이 호화되면서 물을 흡수하여 상등액이 너무 적게 얻어지는 것을 방지하기 위해 10:1 대신에 15:1을 사용하였음)하여 얻은 상등액 (통밀상등액)에 alditol acetate 법으로 조사하였음. (추출은 2개의 lot로 하고 각 lot에 대해 alditol acetate 법을 이용한 검사는 2회 시행) (표 15).
- o 통밀상등액의 수율 (건조량/분쇄통밀량)은 CU-4를 제외하고는 대략 10-12% 정도 얻어졌음. 이는 밀겉 일부분과 더불어 전분이 호화된 후 노화되면서 침전이 되어 제거되었기 때문임.
- o 동일한 조건에서 얻어지는 수율은 CU-4만 특이하게 낮게 나왔으며, 이로 인해 추출물에서의 ara의 함량은 CU-4에서 높게 나왔음. 하지만 전체 ara의 수율 (건조량 x ara 함량)은 CU-1이 가장 높게 나왔으며, 다음으로 CU-4가 얻어졌음. 이러한 결과는 CU-1도 추출시 첨가하는 물의 비율을 줄여 얻어지는 건조량을 줄이면 더 많은 ara의 함량을 가지는 추출물을 얻을 수 있다는 것을 나타내므로, 전체적인 품종의 선별의 관점에서는 국내토종인 CU-1이 가장 바람직하다는 것을 알 수 있음.
- o 원재료 (통밀)의 확보의 관점에서는 외국산은 우리가 그 재배특성을 관리할 수 없다는 점에서 품종 자체가 ara를 월등하게 많이 포함하지 않으면 제외되므로 본 연구에서 사용된 외국산은 고려대상에서 제외됨. 한편, 국내육종 품종인 CU-4는 현재 또 다른 국내육종 품종인 CU-2 (금강밀)에 밀려 대량재배가 이루어지지 않고 있으므로 현 시점에서는 고려대상에서 제외됨. 최종적으로 **국내토종인 CU-1은 경남지역에 영농조합을 중심으로 연간 40-50톤 썩 재배가 이루어지고 있으며, 이를 충분한 밀가루 등을 판매하고 있어 밀기울을 얻는 데에도 어려움이 없음. 아울러 더 많은 양이 필요할시에는 계약재배 면적을 늘려 확보할 수 있다는 것을 영농조합을 직접 방문하여 확인하였음. 이를 근거로 최종 원재료 (통밀) 품종으로 국내토종인 CU-1으로 선정하였음 (차년도에 본 사업참여기관인 경북농업기술원에서 CU-1도 다른 품종들과 함께 재배하여 동일한 재배조건에서의 ara의 함량을 직접 비교하고자 함.)**

표 15. Arabinose 고함유 후보품종들의 통밀상등액 소규모제조 특성

	ASW (호주)	Aow (호주)	CU-1 (국내토종)	CU-4 (국내육종)
원재료 중량 (g)	100	100	100	100
건조량 (g)	11	12	11.5	7
Ara (%)	1.1	1.2	1.8	2.6
전체 ara 수율 (건조량 x ara 함량) (mg)	121	144	207	182

㉠ 소량재배 가능품종

○ 소량재배 품종으로는 문헌상 (J. Agric Food Chem 2008, 56, 9740-9747)에서 세계적으로 대표적 인 300 여종의 밀품종 중에서 배유부분에서 수용성 아라비노자일란의 함량이 가장 높은 것으로 밝혀진 국산육종 품종 (CU-6) (S)과 외국산 CU-7 (Y), CU-8 (J) 및 CU-9 (9)을 경북농업기술원에서 재배하였음 (CU-6은 국립농업유전자원센터로부터, CU-7 (Y), CU-8 (J) 및 CU-9 (9)는 외국기관을 통해 확보하였음).

(a) 아라비노자일란 고함유 품종 선별 밀 자원 증식

㉠ 재배조건 의 개요

○ 증식 자원

- 국내의 아라비노자일란 고함유자원으로 알려진 CU-6등 4종과 국내재배 3품종 [CU-2 (금강밀), CU-3 및 CU-4]

○ 재배방법

- 파종시기 : 2011. 10. 26일
- 재배방법 : 농촌진흥청 밀 표준재배법에 준하여 재배

○ 주요 조사 내용

- 밀 자원의 식물학적 특성, 주요 농업관련 형질, 생육특성 등
- 1년차에는 종자량이 적어 자원 증식을 위주로 실시하였음

㉠ 생육조사 결과

○ 파종에서 출수(이삭출현)기 까지 소요일수는 우리나라 육종인 CU-2 (금강밀)에 비해 CU-9 (9)는 6일정도 늦었고, CU-7 (Y), CU-8 (J)이 10일에서 12일 정도 늦었으며, CU-6 (S)은 19일 정도 늦었음 [(표 16), (그림 28, 29, 30, 31)]. 이는 후보로 선정된 품종들의 출수기가 현재 우리나라에서 재배되고 있는 육종품종들에 비해 늦었으며 특히 CU-6 (S)은 출수기가 너무 늦어 현실적으로 향후 재배품종으로 선정되기 어려움. 따라서 재배의 측면에서 고려대상이 되는 품종은 CU-9 (9), CU-7 (Y) 및 CU-8 (J)임.

o 1년차 재배 후 확보된 각 품종의 양은 kg 이상이므로 2년차 재배로 대량 확보에는 문제가 없음 (표 18).

표 16. 밀 자원의 생육특성

품종 및 자원명	파종시기 (월.일)	발아시기 (월.일)	출수시기 (월.일)	성숙기 (월.일)	수확시기 (월.일)
CU-6 (S)	10.26	11.04	5.14	6.12	6.20
CU-7 (Y)	10.26	11.03	5.05	6.07	6.14
CU-8 (J)	10.26	11.04	5.07	6.07	6.14
CU-9 (#9)	10.26	11.03	5.01	6.05	6.14
CU-2 (금강밀)	10.26	11.03	4.25	6.02	6.10
CU-3	10.26	11.04	4.29	6.01	6.10
CU-4	10.26	11.03	4.23	6.04	6.12

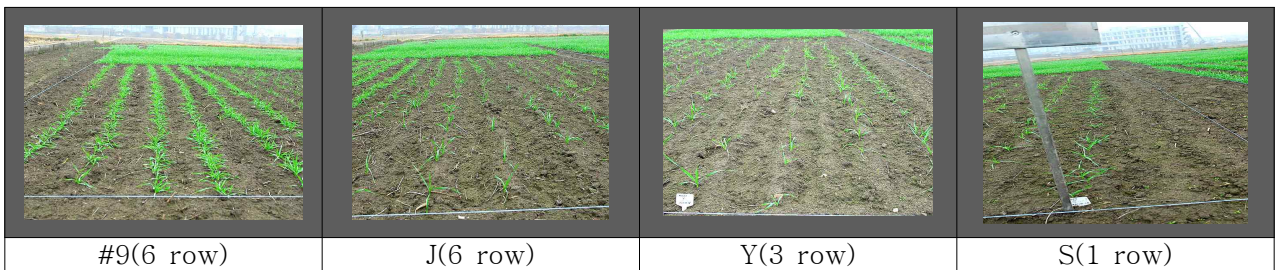


그림 19. 파종 30일 후 밀 자원의 생육상황(2011. 11. 29)

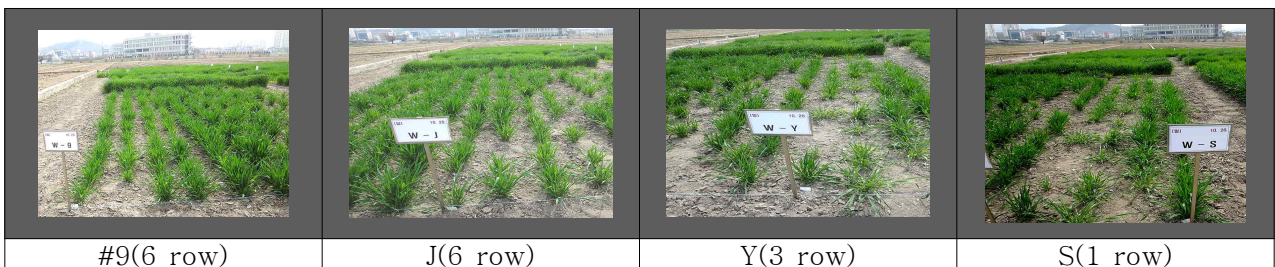


그림 20. 생육재생기 이후 자원별 생육상황(2012.4.15)

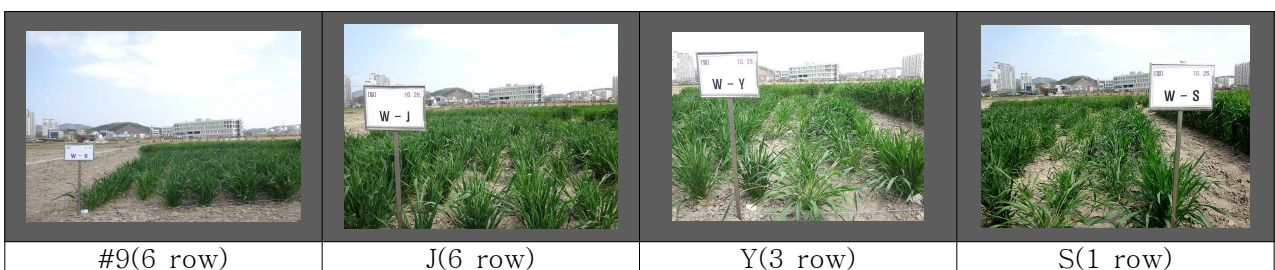


그림 21. 최고 분얼기 생육상황(2012.4.20)

표 17. 밀 자원의 생육 및 수량형질 특성

품종 및 자원명	간장 (cm)	이삭길이 (cm)	수당립수 (개)	천립무게 (g)	1ℓ무게 (g)	병해	충해	까락유무
CU-6 (S)	110.7	10.3	48.7	31.5	840	0	0	유
CU-7 (Y)	58.1	8.9	47.2	48.2	804	0	0	유
CU-8 (J)	81.7	9.4	44.2	47.9	812	0	0	무
CU-9 (#9)	56.4	8.9	37.3	49.9	850	0	0	유
CU-2 (금강밀)	69.5	7.0	31.0	48.2	862	0	0	유
CU-3	69.1	7.7	36.3	50.1	855	0	0	유
CU-4	70.1	7.3	44.0	40.9	837	0	0	유
Mean	73.66	8.50	41.24	45.24	837.14	0	0	-



그림 32. 수확시기의 밀 증식포장 및 밀 자원의 이삭특성(2012. 6. 12)

© 생육조사 결과

표 18. 밀 자원의 파종 및 수확량

자원명	파종량	생산량(g)
CU-6 (S)	30립	1kg
CU-7 (Y)	90립	2kg
CU-8 (J)	30g	5kg
CU-9 (#9)	30g	6kg

(b) 당분석을 통한 기능성분 고함유 품종의 선별

o 소량재배품종의 ara의 함량을 측정하기 위해 표 19에서 제시한 바와 같이 통밀상등액을 제조한 후 당 함량분석을 실시하였음.

표 19. 기능성분 고함유 품종선별 (소량재배)을 위해 사용된 통밀상등액의 제조조건

	원재료	원재료 재배 연도	원재료 가공	비율 (물:가공원재료)	추출 장비	추출 온도	추출 시간	원료	건조 방법
일반 사항	통밀	2011,2012	분쇄 통밀	15:1	약탕기	100 °C	1 시간	상등액	열풍 건조
비고	A (2011, 2012년 산 모두), Y, S, J, 9		실험실용 제분기	- 분쇄 통밀 100g 사용	- 온도 불가능 - 추출 시 물 보충		- 예열 후 추출시간	- 실험실용 원심분리기	60 °C

o 기능성분 고함유 품종의 선별하기 위해 CU-1, CU-6, CU-7, CU-8 및 CU-9의 통밀상등액에 대해 조사한 결과 상등액의 수율은 건조중량 (수율)은 CU-6, CU-7, CU-8이 비교적 높게 나타났으며 CU-1과 CU-9는 낮게 나타났음 (표 20). 한편, ara의 함량 (%)은 통밀전체는 비슷 (약 3%)하게 나타났으나, 상등액은 CU-1, CU-7 및 CU-8이 비교적 높게 나왔음. 최종적으로 건조물 내에 존재하는 ara의 총량은 CU-6, CU-7 및 CU-8이 높게 나타났음. 이러한 모든 결과들을 종합하면 CU-9는 전체 함량이 낮은 이유로, CU-6은 출수기가 너무 낮은 이유로 각각 대량 재배에서 제외되어 CU-7과 CU-8이 2차년도에서 규모를 늘려 경북농업기술원에서 재배할 품종으로 선별되었음.

표 20. 소규모재배품종들의 통밀상등액 소규모제조 특성

	CU-1 [A (2011)]		CU-6 (S)		CU-7 (Y)		CU-8 (J)		CU-9 (#9)	
	통밀 전체	통밀 상등액	통밀 전체	통밀 상등액	통밀 전체	통밀 상등액	통밀 전체	통밀 상등액	통밀 전체	통밀 상등액
원재료 중량 (g)	100		100		100		100			
건조량 (g)	89	10	93	16	81	13	87	14	93	8
Ara (%)	3.2	2.1	2.6	1.5	2.9	2.0	3.0	1.9	3.1	1.8
전체 ara 수율 (건조량 x ara 함량) (mg)	2,780	210	2,420	240	2,350	260	2,610	266	2,880	144

(c) 대량재배 및 소량재배 가능품종의 비교 검토

㉠ 향후 계획 (경북농업기술원에서의 재배 계획)

- 2차년도에서는 현재 소량재배 중이면서 후보품종으로 선별된 CU-7과 CU-8에 대한 재배면적을 늘리고자 함. 한편, CU-1은 대량재배 중이지만 타 지역 (경남)에서 재배되고 있으므로 CU-7과 CU-8과 직접 비교하기 위해 경북농업기술원에서 재배를 실시함. 특히 CU-1에 대해서는 2011년도산과 2012년도산이 다른 특성을 나타내었으므로 (135쪽, 표 31 참조) 이 품종들도 재배하고자 함.
- 결론적으로 경북농업기술원에서 2차년도에 재배할 품종으로는 CU-1 (2011), CU-2 (2012), CU-7 및 CU-8이 선별되었음.

㉡ 2차년도

- 1차년도 기능성분인 아라비노자일란을 고함유한 밀품종을 선별하였으며, 2차년도에는 이 선별된 밀품종을 재배하여 그 양을 확보하고 재배특성을 조사하였음. 아울러 재배된 품종의 특성이 균일하지 않아 유전자원을 계통육성하기 위해 유전적 특성이 다른 개체를 별도로 파종하였음.

㉢ 재배 품종

- 증식시킨 품종 (2012년 가을에 재배하여 2013년 6월경에 수확된 것)은 다음과 같음.
 - CU-1 (A밀): 우리나라 토종으로 2011년산 [A밀('11)]과 2012년도산 [A밀('12)]임.
 - CU-7 (Y밀)과 CU-8 (J밀): 중국에서 개발된 품종임.
 - 비교품종: 현재 우리나라에서 재배되고 있는 밀품종 (조경밀, 금강밀, 우리밀)임.

㉣ 결과

(a) 밀 자원의 생육 및 종실특성

- 현재 원료 (밀기울추출물)생산에 사용되고 있는 CU-1 (A밀)과 비교품종의 생육특성을 비교한 결과 (표 21), 파종에서 출수(이삭출현)기까지 소요일수는 비교품종인 금강밀에 비해 A밀은 1~2일 정도 늦었으며, 성숙기는 비슷하였음.

(b) 밀 자원의 생육 및 수량형질 특성

- A밀과 비교품종의 생육 및 수량형질 특성을 비교한 결과 (표 22 및 그림 23), 2012/2013년도 증식시험을 한 A밀 2종은 간장이 금강밀이나 조경밀에 비해 다소 작았으며, 이삭길이와 이삭당립수는 비교품종인 조경밀과 금강밀과 비슷하였음. 하지만 천립중은 작은 것으로 나타났다음.
- 각각 알곡의 색깔 상의 특징을 보면 (그림 24), 동일한 A밀 (CU-1)이더라도 A밀('11)이 A밀('12)보다는 더 진하게 (적립) 나타났음. 또한 A밀은 모두 조경밀 (백립)과 금강밀 (백립)보다는 진하였으나 우리밀 (적립)과는 비슷하였음. 한편, CU-7 (Y밀)과 CU-8 (J밀)은 모두 백립이었음.

(c) 밀 자원의 증식량

o 재배를 통해 각 품종에 대해 얻은 수확량은 다음과 같음.

- A밀('11): 7 kg
- A밀('12): 15 kg
- J밀 및 Y밀: 5 kg
- 비교품종 (조경밀, 금강밀, 우리밀): 각 10 kg

* 이러한 결과는 파종량 14kg/10a에 대해 약 500-550 kg에 해당하는 수확량이었음.

(e) 밀 유전자원 계통육성

- 2011/2012년도에 증식한 자원 중 아라비노자일란 고함유 순수한 계통을 선별하기 위하여 확보한 자원 중 (J밀 및 Y밀 중심)에서 유전적 특성이 다른 개체를 별도로 선발한 14점 (표 23)을 파종하여 증식시켰음 (그림 25).
- 아울러 A밀('11)도 혼종상태여서 (그림 24), 이 A밀에 대해서도 7점이 분리되었음.
- 이렇게 확보한 개체 (총 21점)는 2013/2014년에 증식하여 순도를 검정하고 각각의 개체에 대해 아라비노자일란 함량을 분석하여 최고의 아라비노자일란 함량을 가지는 품종을 선별할 수 있을 것으로 사료됨.

표 21. 밀 자원의 생육특성

품종 및 자원명	파종일 (월.일)	발아시기 (월.일)	출수시기 (월.일)	성숙기 (월.일)	수확일 (월.일)
A밀-11	10.21	10.30	4.30	6.11	6.15
A밀-12	10.21	10.30	4.30	6.11	6.15
금강밀	10.21	10.29	4.28	6.09	6.13
우리밀	10.21	10.30	5.04	6.13	6.16
조경밀	10.21	10.29	4.29	6.11	6.15

표 22. 밀 자원의 생육 및 수량형질 특성

품종 및 자원명	간장 (cm)	이삭길이 (cm)	수당립수 (개)	천립무게 (g)	1ℓ 무게 (g)	병해	충해	까락유무
A밀(2011)	65.4	7.5	39.8	46.4	850	0	0	유
A밀(2012)	66.2	7.4	41.1	47.9	849	0	0	유
금강밀	68.7	7.7	31.0	48.2	862	0	0	유
우리밀	72.5	7.3	44.0	40.9	837	0	0	유
조경밀	69.3	7.7	36.3	50.1	855	0	0	유
Mean	68.4	7.5	38.4	46.7	850	0	0	-

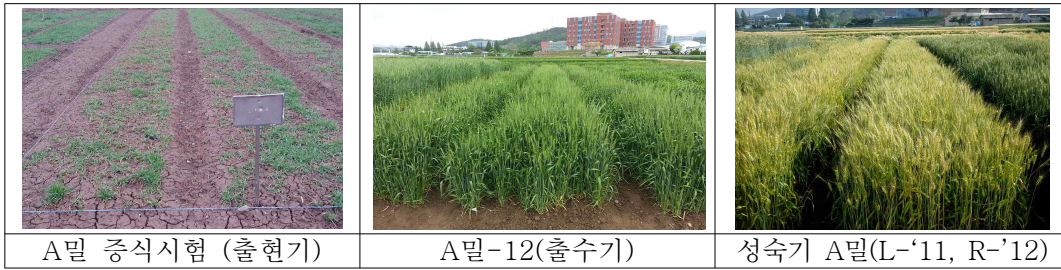


그림 23. 출수기 및 성숙단계의 A밀



그림 24. 각 품종의 알곡비교

표 23. 선별된 개체의 특성

밀자원번호	Source	특징	밀자원번호	Source	특징
12W-1	J밀	tall	12W-8	A밀(2011)	조생
12W-2	J밀-1	short	12W-9	A밀(2012)	조생
12W-3	Y밀-1	short	12W-10	조경밀	일반품종
12W-4	Y밀-2	tall	12W-11	조경밀-1	조기출수
12W-5	Y밀-3	tall	12W-12	금강밀	일반품종
12W-6	S밀	만생,	12W-13	금강밀-1	조기출수
12W-7	#9	tall	12W-14	우리밀	일반품종

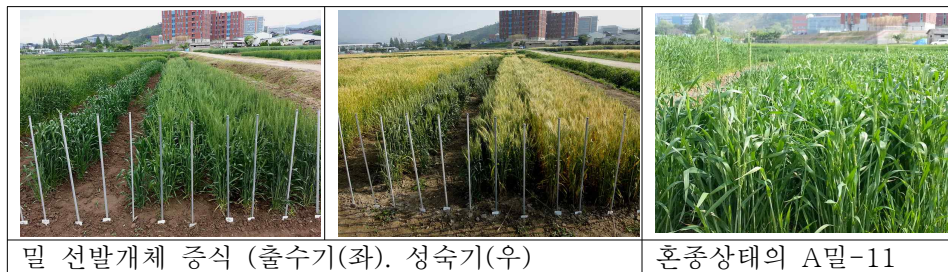


그림 25. 선별된 개체의 증식사진 및 혼종상태의 A밀('11)

③ 3차년도

㉠ 재배 품종

- 대구가톨릭의대에서 국내 재래종 A밀 2종을 수집하여 2012년도에 경상북도농업기술원 시험 포장에서 파종하여 특성조사를 한 결과 수집한 자원은 유전적으로 혼계 상태였음이 확인되어 형태적 특성, 개화기 등이 다른 16 line을 선별하였음. 비교를 위해 A11밀과 외국산인 Y와 J밀도 함께 파종하였음.
- 선별한 16 line을 2013년 10월 22일 파종하여 특성조사를 하였으며 주요 특성은 위의 특성표와 같다. 위 계통을 대상으로 일부종자를 분석시료로 사용하였으며 그중 아라비노자일란 함량이 높은 계통을 확인하였음.

구분	자원수	자원명
증식자원	3종	J밀, Y밀, A11밀
계통육성	16 계통	A11밀 8계통, A12밀 8계통

㉡ 16계통의 주요 특성

- 파종된 16계통의 간장, 이삭길이, 이삭당립수, 천립중 및 종자량은 표 24와 같음

표24. A밀에서 분리한 16계통의 주요 특성

Line No.	간장 (cm)	이삭길이 (cm)	이삭당립수 (개)	천립중 (g)	종자량 (g)	Source
11A-1	65.3	7.7	33.4	47.2	800	12W-8
11A-2	66.2	6.9	35.2	45.3	200	
11A-3	64.7	7.3	36.7	46.4	900	
11A-4	62.8	7.7	38.4	47.7	300	
11A-5	63.2	6.9	35.9	49.1	200	
11A-6	66.9	7.3	36.3	41.8	350	
11A-7	65.4	6.5	36.1	45.7	200	
11A-8	64.2	8.8	37.9	44.6	400	
12A-1	67.5	7.4	37.2	48.2	700	12W-9
12A-2	68.3	7.6	37.3	47.5	500	
12A-3	66.4	7.4	37.1	48.2	300	
12A-4	69.5	7.1	36.6	48.3	700	
12A-5	67.7	7.8	35.2	47.6	700	
12A-6	65.1	7.8	33.7	48.6	200	
12A-7	64.9	7.9	37.7	49.8	200	
12A-8	65.5	7.7	36.9	50.2	600	
조경밀(check)	68.5	8.9	39.6	51.2	-	
Mean	66.0	7.6	36.5	47.5		



그림 26. 생육이 양호한 계통 선발



그림 27. 선발계통의 이삭 형태

○ 선별한 16 line의 이삭형태는 그림에서 보는 바와 같이 4가지 타입으로 나타났으며 주로 A 타입이 많았다 B타입은 이삭이 굵는 형태로 국내 품종 중 조경밀과 유사한 타입임.

㉔ 아라비노스의 함량 측정

(a) 조사할 시료의 생산

○ 밀 20g을 각각 취하여 믹서기에서 1분 동안 분쇄하였음. 물을 20배로 첨가 한 후 100 °C에서 1시간 동안 추출하였음. 이 추출액을 하루 밤 동안 냉장보관한 후 원심분리 (4 °C, 9,000 rpm, 20분)하여 상등액을 취하였음. 열풍건조 후 무게를 측정하였음

(b) 당분석

○ Alditol acetate 법으로 측정하였음.

(c) 결과 (표 25)

○ 후보로 선정되는 기준은 아라비노스 (ara)의 함량이 높을 뿐만 아니라 수율도 높은 즉 총 ara 량이 높은 것이 좋음. 이러한 조건을 만족시키는 것이 A11-8밀 (Ara의 함량: 3.1%, 건조량: 10.5%, 총 ara 량: 0.065). 이는 문헌에서 AX의 함량이 가장 높다고 보고된 Y밀 (Ara의 함량: 3.6%, 건조량: 3.8%, 총 ara 량: 0.028)과 비교하면 함량은 비슷한데 반해 건조량이 월등하게 높아 총 ara 량도 높음. 따라서 A11-8밀은 Y밀에 비교해도 나은 효능을 가질 것으로

예상됨.

㉔ 선별된 품종의 기능조사

(a) 조사할 시료의 생산

- 실제 효능을 조사하기 위해 A11-8밀과 함께 함량이 가장 높은 품종인 A12-8 (Ara의 함량: 4.2%, 건조량: 1.9%, 총 ara 량: 0.016) 및 A11 bulk (선별되지 않고 전체를 파종하였음) (Ara의 함량: 3.4%, 건조량: 3.9%, 총 ara 량: 0.027)를 추출하였음.
- 품종 100g을 (c)에서와 같은 조건에서 추출한 결과 그 수율이 A11-8, A12-8 및 A11 bulk가 각각 10%, 9% 및 8.5%로 20g으로 추출할 때와 차이를 나타내었음. 이러한 결과는 100g 추출에서는 20g 추출에 비해 A11-8은 거의 일정, A12-8의 수율이 5배 증가, A11 bulk는 2.2배 증가하였음. 따라서 기능조사에 사용될 시료에서의 ara 함량은 A11-8에 비해 A12-8은 매우 낮게, A11 bulk는 약간 낮게 측정될 가능성이 높음 (Ara 함량 측정 준비 중).

(b) 기능조사

- 기능은 건망증모델에서 기억력 개선효과를 측정하였음 (113쪽 참조).
- ㉑ 기능성분 아라비노자일란을 다량 함유한 신규 밀품종 3종 [WBE-S1(A11-8), WBE-S2(A12-8), WBE-S3(A11 bulk)]에 대해 상기 최적공정에 의해 밀기울추출물을 제조하고 건망증 모델에서 기억력 개선효능이 있는지 그 기능성을 조사하였음.
- ㉒ 건망증 모델은 아세틸콜린 수용체에 길항제로 작용하는 스코폴라민을 복강에 주사하여 유발하였으며, 기억력 개선 정도는 물미로 실험을 활용하여 측정하였음. 공간지각능력을 측정하기 위하여 물미로 실험을 수행한 결과, 스코폴라민을 복강으로 투여한 그룹에서는 기억력이 손상이 되어 숨겨진 플랫폼을 찾아가는 학습 능력이 떨어져 플랫폼을 찾아가는 시간이 오래 걸렸지만, 기능성분 고함유 밀기울추출물 WBE-S2 및 WBE-S3를 투여한 그룹에서는 훈련 마지막날 정상군(SHAM)과 거의 비슷한 시간에 플랫폼을 찾아 가는 것을 관찰 할 수 있었음(그림 28). 특히, WBE-S3의 경우 비교적 낮은 100 mg/kg의 용량으로 투여한 실험군(A β ₁₋₄₂ + WBE-S3)에도 베타아밀로이드(A β ₁₋₄₂)만 단독으로 투여한 대조군에 비하여 평균 탈출 잠복기가 둘째 날부터 네째째 날까지 유의하게 짧아져 정상군(SHAM)과 유사한 패턴으로 감소됨을 확인함.

㉕ 품종선별에 대한 결론

- 최종적으로 선별된 순수품종은 A11-8로 ara의 함량, 수율 및 효능의 관점에서 가장 적합한 품종으로 사료됨.
- 덧붙여 추출물의 ara의 함량이 높다는 관점에서 A12-8도 선별되었음.

표 25. 밀 선발계통의 Arabinose 함량

Line name	Arabinose(%)			건조량 (g)	총 ara. 량	% in 20g	보유 종자량 (g)
	R1	R2	Average				
A11-1	3.071	3.070	3.0705	0.89	0.0273275	0.1366373	760
A11-2	2.896	3.197	3.0465	0.81	0.0246767	0.1233833	200
A11-3	2.562	2.506	2.5340	1.79	0.0453586	0.2267930	280
A11-4	2.738	2.812	2.7750	1.48	0.0410700	0.2053500	95
A11-5	2.655	2.369	2.5120	1.16	0.0291392	0.1456960	900
A11-6	3.186	3.391	3.2885	0.70	0.0230195	0.1150975	300
A11-7	3.091	2.926	3.0085	0.81	0.0243689	0.1218443	280
A11-8	3.111	3.090	3.1005	2.10	0.0651105	0.3255525	450
A12-1	0.922	0.919	0.9210	7.45	0.0685773	0.3428863	720
A12-2	0.807	0.871	0.8390	9.20	0.0771880	0.3859400	420
A12-3	0.766	0.796	0.7810	8.80	0.0687280	0.3436400	270
A12-4	0.779	0.886	0.8330	9.34	0.0777555	0.3887775	650
A12-5	1.152	1.276	1.2140	3.50	0.0424900	0.2124500	680
A12-6	0.982	1.017	1.0000	5.29	0.0528736	0.2643678	190
A12-7	2.665	2.457	2.5610	0.74	0.0189514	0.0947570	140
A12-8	3.970	4.381	4.1750	0.38	0.0158669	0.0793345	550
A11 bulk	3.620	3.220	3.4200	0.78	0.0266760	0.1338000	3,850
Y밀	3.976	3.550	3.763	0.75	0.0282225	0.1411125	3,850
J밀	2.166	2.484	2.325	1.04	0.0241800	0.1209000	3,750

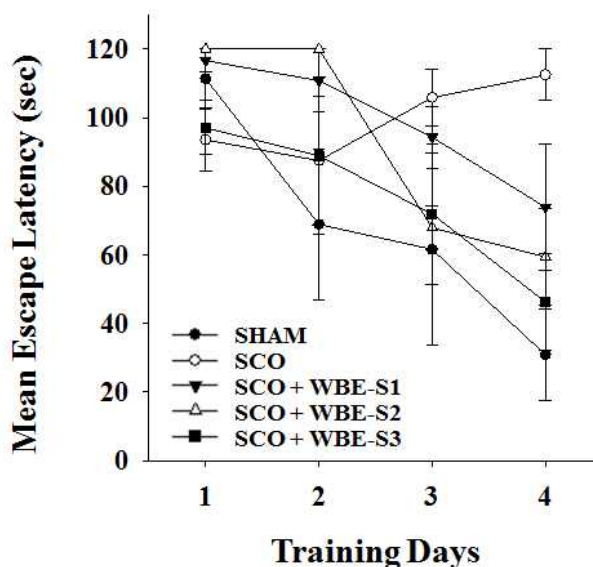


그림 18. 기능성분 고함유 밀기울추출물의 기억력 개선 효능 (스코플라민 건망증 모델-물미로 실험)

C57BL/6 마우스에 베타아밀로이드를 뇌실내로 주입하여 유발된 알츠하이머 치매에 대한 밀기울추출물의 효과를 검증하기 위해 물미로 실험을 실시하여 도피대를 찾아가는데 걸리는 시간, 즉 평균탈출시간 (mean escape latency)을 측정함. SHAM은 정상적인 쥐, $A\beta_{1-42}$ 는 베타아밀로이드만 주사한 쥐, $A\beta_{1-42}$ + WBE는 밀기울추출물을 1일 표기된 용량으로 투여한 쥐를 각각 나타냄.

(3) 제조방법 및 그에 관한 자료 (제1세부, 제2협동, 제1협동)

(가) 실험실 규모 생산 [원료 (통밀 vs 밀기울), 추출조건 (상등액 vs 전체)] (1차년도)

o 실험실 규모 생산은 소규모 생산 (100 g)과 중규모 생산 (1 kg)으로 나누어서 실시하였음.

① 소규모 생산 (100 g) 및 효능조사

o 최종품목으로 선정된 대량생산 가능 국내토종인 CU-1 (A)에 대해 최적생산조건을 선정하기 위해 우선 사용하는 원재료에 대한 제조결과와 이의 효능에 대해 조사하였음. 이를 위해 통밀을 분쇄한 분쇄 통밀과 밀기울에 대해 각각 소규모 (약당기)로 추출 후 전체를 건조한 것 (통밀전체, 밀기울전체)과 이것을 원심분리하여 얻은 상등액을 건조한 것 (통밀상등액, 밀기울상등액) 등 총 4가지 시료들을 표 26과 같은 시료생산조건에서 생산한 후 이 시료들에 대해 alditol acetate 법에 의해 당분석을 실시하였음 (표 27).

㉠ 생산결과에 대한 요약

o 수율: 통밀과 밀기울 전체를 추출하여 건조한 경우에서의 수율은 90% 정도로 이론상 전체 수율 100%에 근접하였음. 한편, 통밀과 밀기울을 추출한 후 얻은 그 상등액 (통밀상등액 및 밀기울상등액)은 밀 껍질과 전분이 제거되어 전체에 비해 그 수율은 각각 13 및 15%로 떨어졌음.

o ara의 함량: 통밀전체의 ara 함량 (3.6%)에 비해 밀기울의 ara 함량 (11%)이 높게 나타났는데 이는 밀기울에서의 AX의 함량이 밀가루에 비해 높아 관찰된 것으로 사료됨. 예를 들면, 전 세계로부터 대표로 선택된 130 품종의 겨울밀에 대해 얻은 밀기울에서의 평균 AX의 함량 (18%)이 밀가루에서의 평균 AX의 함량 (1.9%)의 약 10배에 이르는 것으로 보고되어 있음 (J Agric Food Chem 2008, 56(21), 9740-9749).

o 수용성 및 비수용성 ara의 함량: 한편, 통밀과 밀기울의 상등액에서의 ara는 수용성 AX와 AGP로부터 얻어진 것이고, 통밀과 밀기울의 전체에서의 ara는 수용성 및 비수용성 AX와 AGP의 합으로 이루어진 것임. 이를 고려하여 얻어진 시료의 단위무게당 수용성 및 비수용성 ara의 함량을 계산하면 표 16에서와 같음. 즉, 통밀과 밀기울 전체에서의 시료 단위무게당 수용성 및 비수용성 ara의 함량 (mg/g)을 비교하면 비수용성 ara의 함량 (각각 33.3과 105)이 수용성 ara의 함량 (각각 2.6과 5.1)에 비해 각각 12.8 및 20.6배로 비수용성 ara가 대부분을 차지하고 있는 것을 알 수 있음. 이로 인해 **전체와 상등액에서의 수용성 ara의 함량을 비교하면 통밀상등액과 밀기울상등액 (각각 18 및 30)에서는 전체 (각각 2.6 및 5.1)에 비해 단위시료 무게당 수용성 ara의 함량이 각각 6.9 및 5.9배 높게 나타났음.** 이는 단위시료 무게당 통밀과 밀기울 ara의 함량은 전체에서의 함량 (각각 36 및 110)이 수용액 (각각 18 및 30)에 비해 각각 2.0 및 3.7배 높게 나타났지만, 전체에서의 ara는 거의 대부분이 비수용성 ara (33 및 105)로 이루어져 있어 **효능을 나타내는 시료단위 무게당 수용성 ara의 함량에 있어서는 오히려 상등액에서 매우 높게 나타나게 된 것임** [수용성 ara의 함량이 기능에 영향을 미치는 결과는 116쪽의 기능조사부분 참조].

표 26. CU-1의 원재료 (통밀, 밀기울)에 대한 시료 (전체, 상등액)의 제조조건

	원재료	원재료 재배 연도	원재료 가공	비율 (물:가 공원재 료)	추출 장비	추출 온도	추출 시간	원료	건조 방법
일반 사항	통밀	2011	분쇄 통밀, 밀기울	15:1	약탕기	100 °C	1 시간	상등액, 전체	열풍 건조
비고	CU-1 (국내 토종)		- 통밀분 쇄는 실험 실용 제 분기 이용 - 밀기 울은 영 농 조 합을 통 해 구 매	- 분쇄 통 밀 100 g 사용	- 온 도 불가능 - 추출 시 물 보충		- 예열 후 추 출시간	- 실험 실용 원 심 분 리 기	60 °C

표 27. CU-1 품종의 추출액의 소규모제조 특성

	통밀 전체 (CU-1)	통밀 상등액 (CU-1)	밀기울 전체(CU-1)	밀기울 상등액 (CU-1)
원재료 중량 (g)	100	100	100	100
건조중량 (g)	90	13	89	15
건조중량 (%) [건조중량/ 원재료중량]	90	13	89	15
Ara (%)	3.6	1.8	11	3.0
전체 ara 수율 (건조중량 x ara 함량) (mg)	3,240	234	9,790	450
수용성 ara (mg) /건조중량 (g)	2.6	18	5.1	30
비수용성 ara (mg)/ 건조중량 (g)	33.3	0	105	0

* 통밀전체와 밀기울전체에서의 수용성 ara의 총량은 통밀상등액과 밀기울상등액에서 얻어진 것으로 대체하였음. 실제로는 원심분리시 가라앉은 침전물에도 수용성 ara가 있어, 이를 고려하면 전체에서의 수용성 ara의 함량은 표에서 구해진 것보다는 높음.

㉔ 소규모 추출물 (유사원료)에 대한 기능조사

○ 표 27에서 생산된 전체 (통밀 및 밀기울)와 상등액 (통밀 및 밀기울)과 에 대해 건망증 모델, 혈관성 모델 및 심근경색모델에서의 효능을 조사하였음.

(a) 건망증모델 (제1협동)

㉑ 추출물들의 효능조사

㉒ 개별 추출물의 효능

○ 최종품목으로 선정된 우리밀 품종 CU-1에 대해 원료상태(분쇄통밀 vs. 밀기울) 및 추출조건 (상등액 vs. 전체)에 따라 건망증 모델에서 기억력 개선효능에 차이가 있는지 그 기능성을 조사하였음. 즉, 통밀을 분쇄한 분쇄통밀과 밀기울에 대해 각각 소규모 (약탕기)로 열수 추출 후 전체를 건조한 것 (통밀전체 WHWH, 밀기울전체 BHWH)과 이를 원심분리하여 얻은 상등액을 건조한 것(통밀상등액 WHSP, 밀기울상등액 BHSP)으로 실험을 수행하였음.

○ 건망증 모델은 아세틸콜린 수용체에 길항제로 작용하는 스코폴라민을 복강에 주사하여 유발하였으며, 기억력 개선 정도는 수동회피실험 (passive avoidance test) 기법을 활용하여 측정하였음.

○ 조건회피반응 실험은 총 2일 동안 진행하였음. 첫째 날에는 칸막이로 나누어진 방 2개중 한쪽에 실험 동물을 넣고 1분 동안 적응시키고 조명을 켜 다음 칸막이 문을 열어주었음. 일반적으로 실험동물은 조명이 없는 건너편 방으로 들어가게 되는데, 이 때 자동적으로 칸막이 문이 닫히도록 하고 불이 꺼진 상태에서 바닥의 땅을 통해 0.5 mA의 전류를 3초 동안 흘려주어 foot shock을 받게 하였음 (Retention Trial, Day 1). 실험 둘째 날 (24 시간 후), 실험동물을 방 A에 다시 넣어주면 실험동물은 조명이 들어와도 방 B에 들어가기에 꺼려하게 되며, 이때 실험동물이 방 B에 들어갈 때까지의 소요되는 시간 (latency time)을 측정하였음 (Aquisition Trial, Day 2).

○ 실험결과 그림 29와 그림 30에 나타내는 바와 같이 정상군 (NOR)의 경우에 step-through latency time에서 200.8 ± 25.4 초를 기록하였고, 스코폴라민으로 기억력을 손상시킨 대조군 (SCO)에서는 40.2 ± 8.5 초를 기록하여 통계적으로 유의한 차이를 보여 주었음. 이로보아 스코폴라민에 의해 기억력 손상을 확실히 유발한 것으로 판단됨. 한편, 통밀상등액 (WHSP)을 25, 50, 100, 200 및 400 mg/kg/day의 용량으로 투여한 경우 step-through latency time에서 각각 41.9 ± 16.1 , 101.9 ± 33.2 , 124.4 ± 33.2 , 47.4 ± 23.6 , 62.1 ± 24.5 초로 증가되었으며 (그림 32), 밀기울상등액 (WBSP)을 용량별 25, 50, 100, 200 및 400 mg/kg/day로 투여한 경우 각각 26 ± 9.8 , 71.0 ± 31.2 , 83.5 ± 29.8 , 148.6 ± 39.4 , 106.4 ± 36.1 초로 증가됨을 확인 할 수 있었음 (그림 33). 특히 WHSP 100 mg/kg, WBSP 200 mg/kg 용량에서 대조군 (SCO)에 비해 유의적인 차이를 보여주어, 이들 물질의 투여가 손상된 기억력의 회복에 통계적으로 유의한 효과가 있음을 알 수 있었음.

○ 한편, 통밀전체 (WHWH) (그림 31) 및 밀기울전체 (WBWH) (그림 32) 추출물 먹인 경우에는 4 g/kg/day의 고용량에서도 기억력 향상 효능을 관찰할 수 없었음.

㉓ 추출물 전체에 대한 종합

○ 이상의 네 가지 시료 (통밀전체, 통밀상등액, 밀기울전체 및 밀기울상등액)를 한꺼번에 비교한 결과, 밀기울상등액 (WBSP)이 비교적 넓은 용량 범위에서 가장 높은 효능을 나타내었음 (그림 33). 이 경우 경구로 200 mg/kg/day의 용량으로 일주일 이상 투여하는 것이 바람직한 것으로 사료됨. 이러한 결과는 CU-1을 원재료로 이용하여 기능성원료로 개발하기 위해서는 전체는 사용할 수 없고 상등액만 가능하다는 것을 나타내어 일단 **상등액 (통밀, 밀기울)을 원료로 개발하기 위한 원료 후보로 선정**하고 대용량으로 생산된 시료에 대해 비교실험을 통해 최종후보를 선정할 것이 바람직할 것으로 사료됨.

㉑ 추출물들의 작용기전조사

○ 상등액 (밀기울 및 통밀)이 동물실험에서 효능을 나타내는 기전을 기억력개선에 관련된 유전자 (아세틸콜린수용체, 아세틸콜린 대사관련 효소)와 신경세포생존에 관련된 인자에 관련된 유전자 (신경영양인자 등)들의 발현/활성에 미치는 관점에서 조사하였음.

㉒ 기억력개선에 관련된 유전자들의 발현/활성

○ WBSP 및 WHSP의 인지기억력 향상효과 기전을 검토하기 위하여 기억과 학습에 있어 중심적인 역할을 담당하는 신경전달물질인 아세틸콜린의 생성, 분해 및 작용에 영향을 줄 수 있는 가수분해효소, 전이효소를 비롯한 수용체의 발현을 검토하는 일련의 실험을 수행하였음. 동물모델에서 기억력 감퇴 유발 물질로 통상적으로 쓰이는 스코폴라민은 콜린성 신경계 신경냅스후부 (postsynapse)에 있는 무스카린성 수용체 (muscarinic receptor)의 작동부위에 직접 결합하여 아세틸콜린과 수용체의 결합을 경쟁적으로 차단함에 따라 정보전달을 일시적으로 차단함으로써 학습과 기억력을 손상시키게 됨. 행동실험을 마친 실험동물로부터 해마 (hippocampus)를 분리하여 아세틸콜린의 가수분해에 관여하는 효소인 acetylcholinesterase (AChE)와 아세틸콜린의 합성에 관여하는 효소인 choline acetyltransferase (ChAT), 무스카린성 아세틸콜린 수용체 [M_1 및 M_2 muscarinic acetylcholine receptor (mAChR)]의 mRNA 발현을 각각 RT-PCR로 측정하였음. 그 결과, 스코폴라민을 처리함으로써 해마에서 M_1 및 M_2 수용체 mRNA 발현 자체는 각각 정상군과 비교하여 감소 경향을 보였으며, 이에 비해 밀기울 및 통밀상등액 (WBSP 200 mg/kg; WHSP 100 mg/kg)을 투여한 실험군에서 M_1 및 M_2 수용체의 mRNA 발현이 현저히 증가되는 것을 관찰 할 수 있었음 (그림 34). 한편, 동일한 실험 조건에서 WBSP 및 WHSP는 ChAT와 AChE의 mRNA 발현에는 큰 영향을 주지 않았음 (data not shown).

㉓ 신경세포생존에 관련된 인자에 관련된 유전자들의 발현/활성

○ 밀기울 및 통밀상등액 (WBSP/WHSP)의 작용기전 연구 II :이후 실험에서는 WBSP 및 WHSP가 인지기억력 향상효과를 갖는 또 다른 작용 기전으로 신경영양인자 (neurotrophic factor) 중 BDNF (brain-derived neurotrophic factor)의 발현을 검토하는 일련의 실험을 수행하였음. 단기간의 스코폴라민 투여로 인하여 BDNF의 단백질 발현에는 큰 영향이 없었지만, 밀기울 및 통밀 열수추출물 상등액 (WBSP 200 mg/kg; WHSP 100 mg/kg)을 투여함으로써 BDNF의 양이 현저히 증가됨을 확인할 수 있었음 (그림 35). 한편, 이러한 BDNF의 발현 증가를 매개하는 전사인자 cAMP response element-binding protein (CREB)의 상위 인산화 효소 extracellular signal-regulated kinase (ERK) 또한 WBSP 및 WHSP에 의해 활성화됨을 Western blot으로 확인 할 수 있었음.

㉔ 작용기전조사에 대한 종합

- 밀기울 및 통밀 열수추출물 상등액이 기억력개선에 효능을 나타내는 것은 기억력전달에 관련된 유전자들 (아세틸콜린 수용체)의 발현을 촉진시키고, 신경세포생존에 관련된 유전자 (BDNF)의 발현을 촉진시키고 이에 영향을 미치는 단백질 (CREB)의 인산화에도 영향을 미쳐 일어난 현상임을 알 수 있음.

㉕ 추출물들의 효능과 작용기전에 대한 종합

- 통밀상등액과 밀기울상등액에서 기억력개선에 효능이 나타나는 용량 (각각 100과 200 mg/kg/day) (그림 32와 33)에서 기억력을 개선시키는 기전에도 영향을 미쳤음 (그림 34과 35). 따라서 동물에서 기억력이 개선되는 효능은 이에 상응하는 기전이 뒷받침하는 것을 알 수 있음.

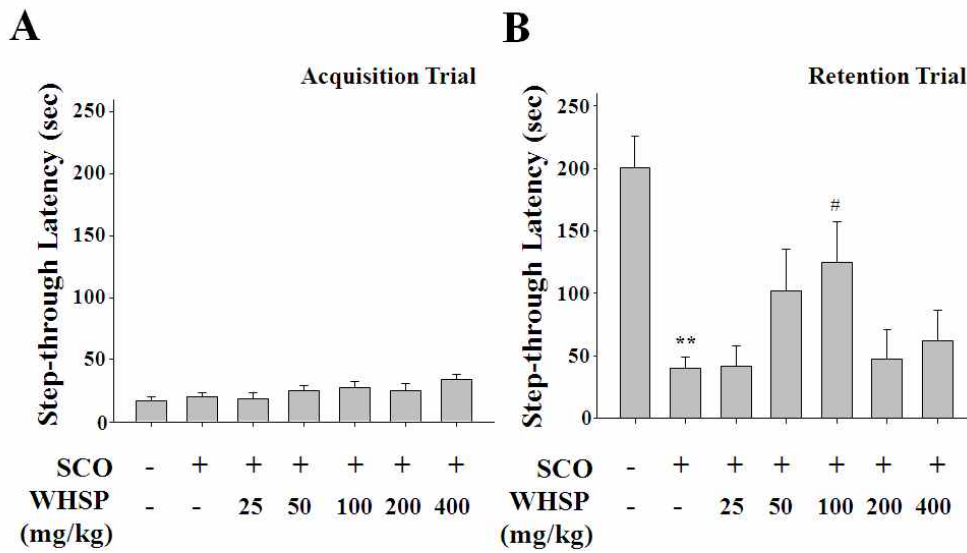


그림 29. 통밀상등액 (WHSP)의 기억력 향상 효능

랫트에 스코폴라민을 주사하여 발생하는 건망증에 대한 통밀상등액 (WHSP)의 효과를 조사하기 위해 수동회피 실험을 실시하여 전기적 충격을 기억하는 평균시간 step-through latency를 측정함. NOR은 정상적인 쥐, SCO는 스코폴라민 (1 mg/kg)만 주사한 쥐, SCO + WHSP는 통밀 열수추출물 상등액을 1일 25, 50, 100, 200 및 400 mg/kg로 투여한 쥐를 각각 나타냄.

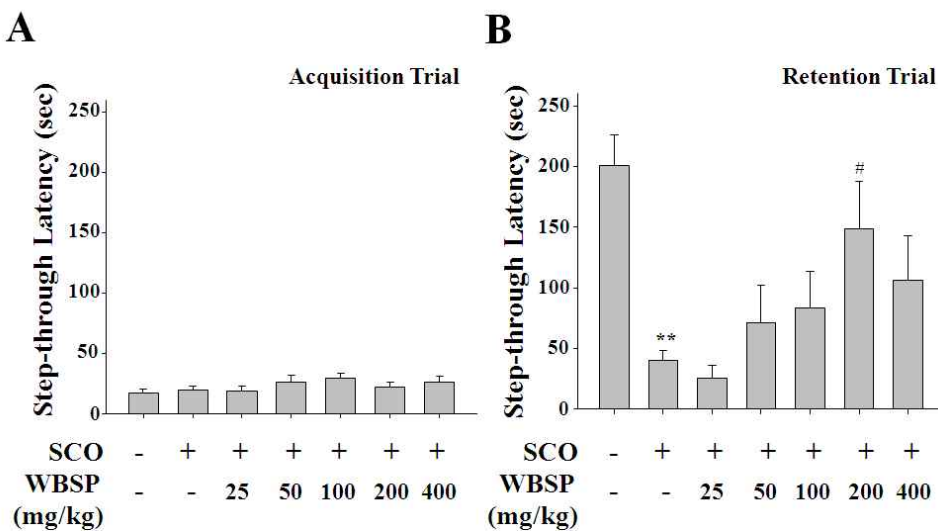


그림 30. 밀기울상등액 (WBSP)의 기억력 향상 효능

랫트에 스코폴라민을 주사하여 발생하는 건망증에 대한 밀기울상등액(WBSP)의 효과를 조사하기 위해 수동회피 실험을 실시하여 전기적 충격을 기억하는 평균시간 step-through latency를 측정함. NOR은 정상적인 쥐, SCO는 스코폴라민 (1 mg/kg)만 주사한 쥐, SCO + WBSP는 밀기울 열수추출물 상등액을 1일 25, 50, 100, 200 및 400 mg/kg로 투여한 쥐를 각각 나타냄.

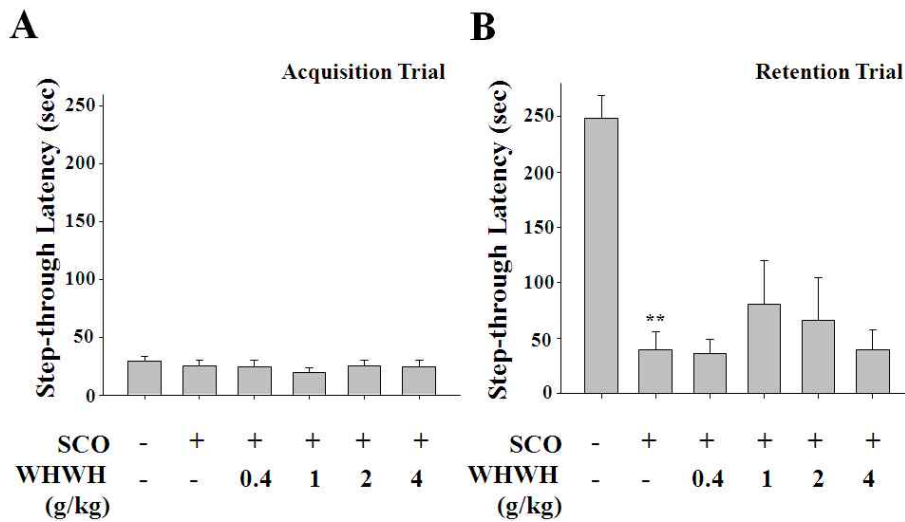


그림 31. 통밀전체 (WHWH)의 기억력 향상 효능

랫트에 스코폴라민을 주사하여 발생하는 건망증에 대한 통밀전체 (WHWH)의 효과를 조사하기 위해 수동회피 실험을 실시하여 전기적 충격을 기억하는 평균시간 step-through latency를 측정함. NOR은 정상적인 쥐, SCO는 스코폴라민 (1 mg/kg)만 주사한 쥐, SCO + WHWH는 통밀 열수추출물 전체를 1일 0.4, 1, 2 및 4 g/kg로 투여한 쥐를 각각 나타냄.

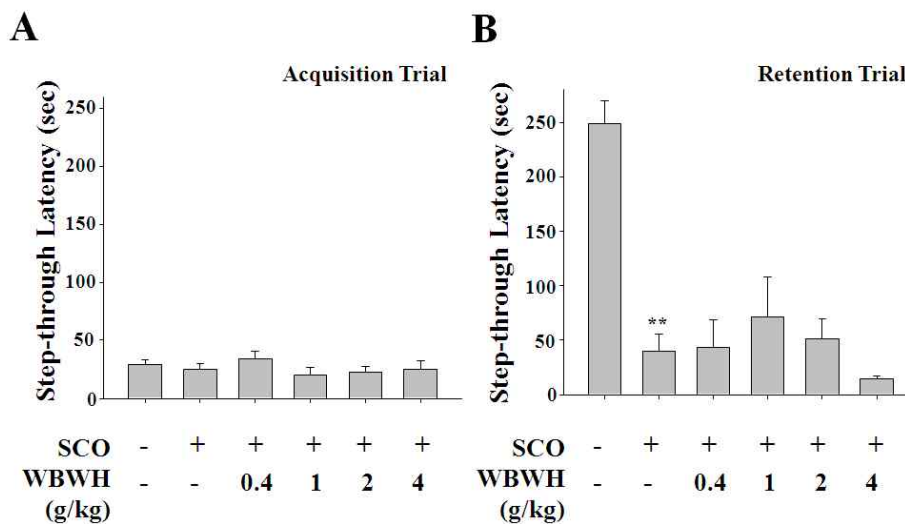


그림 32. 밀기울전체 (WBWH)의 기억력 향상 효능

랫트에 스코폴라민을 주사하여 발생하는 건망증에 대한 밀기울전체 (WBWH)의 효과를 조사하기 위해 수동회피 실험을 실시하여 전기적 충격을 기억하는 평균시간 step-through latency를 측정함. NOR은 정상적인 쥐, SCO는 스코폴라민 (1 mg/kg)만 주사한 쥐, SCO + WBWH는 밀기울 열수추출물 전체를 1일 0.4, 1, 2 및 4 g/kg로 투여한 쥐를 각각 나타냄.

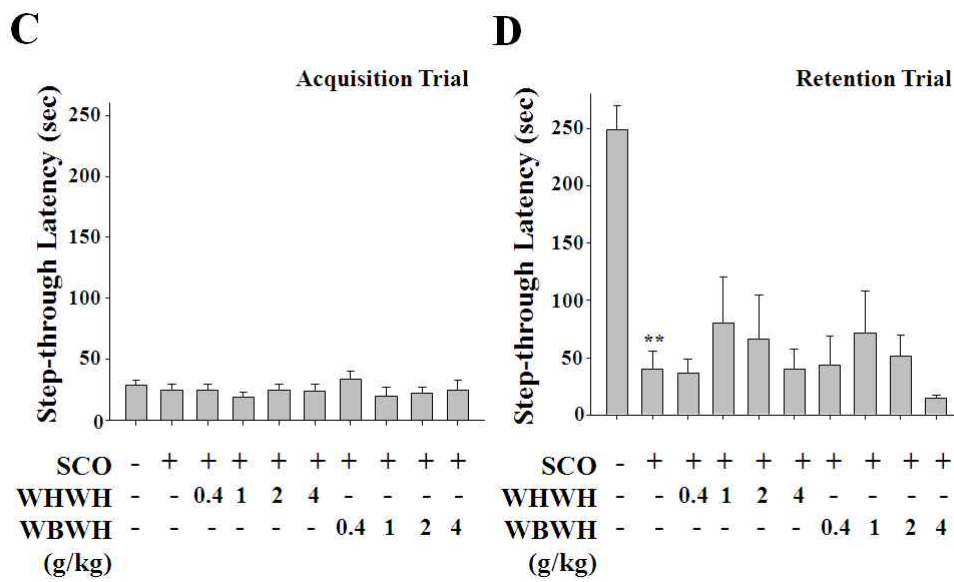
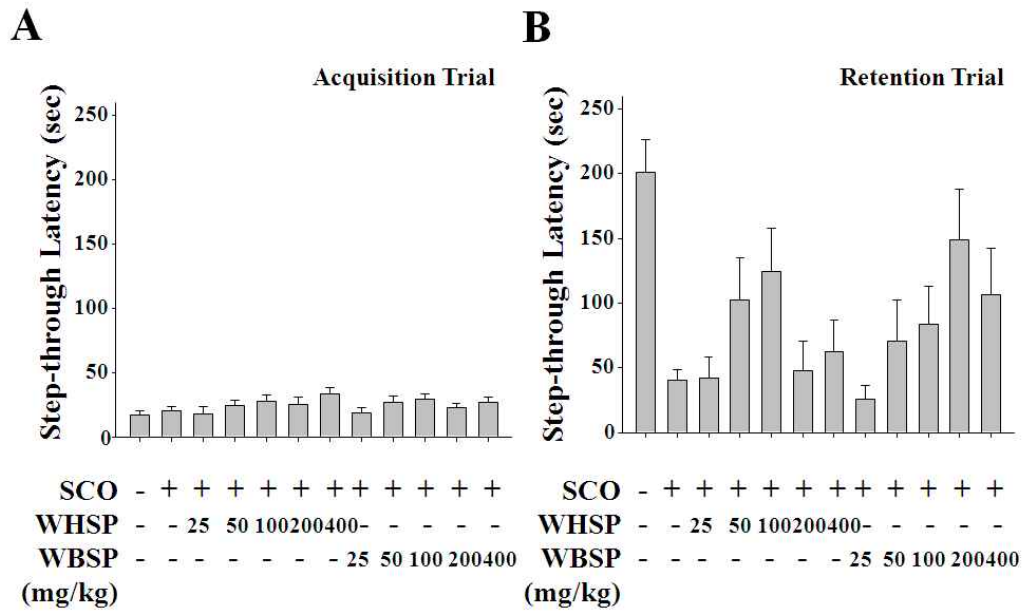


그림 33. 원료상태 및 추출방법에 따른 추출혼합물의 기억력 향상 효능 (종합)

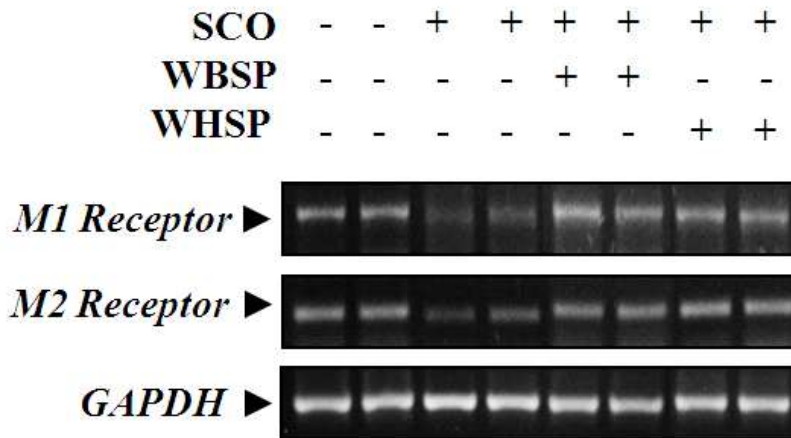


그림 34. 무스카린성 아세틸콜린 수용체 mRNA 발현에 대한 밀기울 및 통밀상등액 (WBSP/WHSP)의 영향

무스카린성 아세틸콜린 수용체 (M_1/M_2 receptors)의 mRNA 발현에 대한 밀기울 및 통밀상등액 (WBSP/WHSP)의 효과를 조사하기 위하여 실험동물의 해마 조직으로부터 mRNA를 분리하여 RT-PCR을 수행하였음. GAPDH는 동일한 실험조건 검증을 위한 대조 지표로 사용함. 밀기울상등액 (WBSP)의 용량은 200 (+로 표시된 2마리의 쥐), 통밀상등액 (WHSP)의 용량은 100 (+로 표시된 2마리의 쥐) mg/kg/day이었음.

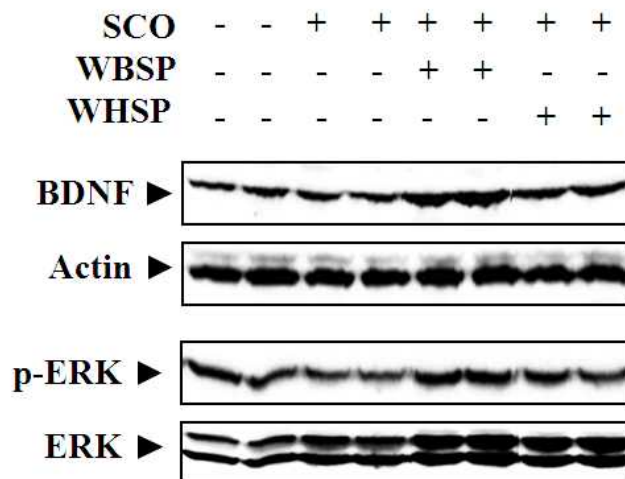


그림 35. BDNF 단백질 발현 및 ERK 활성화에 대한 밀기울 및 통밀상등액 (WBSP/WHSP)의 영향

BDNF 단백질 발현에 대한 밀기울 및 통밀 열수추출물 상등액 (WBSP/WHSP)의 효과를 조사하기 위하여 실험동물의 해마 조직 (2마리)으로부터 단백질을 분리하여 Western blot analysis를 수행하였음. Actin는 동일한 실험조건 검증을 위한 대조 지표로 사용함. 밀기울상등액 (WBSP)의 용량은 200 (+로 표시된 2마리의 쥐), 통밀상등액 (WHSP)의 용량은 100 (+로 표시된 2마리의 쥐) mg/kg/day이었음.

⑥ Ara 함량의 관점에서 순수성분과 추출물의 건망증효능 비교

- 추출물에서의 ara가 기억력개선을 나타내는 기능성분을 대표하는 지표로 사용할 수 있는지를 조사하기 위해 기능성분으로 확인 순수다당류에서의 함량과 서로 비교하였음.

- 순수다당류가 효능을 나타내는 용량에서의 ara 용량: 생쥐를 대상으로 하였을 때 기억력개선에서 최대의 효능을 나타내는 AX (밀가루유래)와 AG (단풍나무유래)의 용량은 모두 약 5 mg/kg/day이었으며, 이것을 쥐를 대상으로 하였을 때의 용량을 미국 FDA 산하기관인 CDER (Center for Drug Evaluation and Research)에서 지침 (Guidance for industry: Estimating the maximum safe starting dose in initial clinical trials for therapeutics in adult healthy volunteers. July 2005)에 의해 환산하면 약 1/2인 약 2.5 mg/kg/day임 (표 28). 한편, 당분석에 의해 얻어진 AX와 AG 내의 ara 함량은 각각 0.34와 0.13이었으므로 2.5 mg/kg/day 내의 AX와 AG에 들어있는 ara의 함량은 각각 0.85 및 0.33 mg/kg/day임 (표 28).

- 추출물 (**통밀상등액**) 내에서 효능을 나타내는 용량에서의 ara 용량: 통밀상등액이 최대의 효능을 나타내는 용량은 100 mg/kg/day이고 이 통밀상등액에서의 ara의 함량이 1.8%이므로 100 mg/kg/day 통밀상등액에는 1.8 mg/kg/day의 ara가 들어 있음 (표 27). 한편, 밀가루에는 수용성 AX와 AGP가 각각 약 0.5% (J Agric Food Chem 2008, 56, 9740-9749)와 0.3% (Cereal Chem 1998, 75, 815-819)가 들어있어 그 비율이 약 2:1임. 한편, CU-1의 통밀상등액에 대해 계산된 AX와 AGP의 함량은 각각 4.7과 1.6%로 그 비율이 약 3:1이었음. 또한, 밀가루로부터 유래한 AX와 AGP에서의 ara의 함량은 약 0.30-0.35와 약 0.40 ((J Agric Food Chem 1997, 45, 1998-2002)임. 이상으로부터 통밀상등액에서 수용액 AX와 AGP의 함량비율이 2:1이고, AX와 AGP에서의 ara의 함량이 동일하다고 가정할 경우 통밀상등액에 들어있는 1.8% ara는 AX와 AGP로부터 온 것이 2:1인 1.2와 0.6%에 해당함 (표 28). 이러한 값은 순수 AX (밀유래)와 순수 AG (단풍나무유래)에서 얻어진 0.85와 0.33 (만약 밀가루유래로 가정하면 1.0)에 가까워 통밀상등액 내에서의 최대효능을 나타내는 AX와 AGP가 들어있다는 것을 알 수 있음. 이는 또한 순수 성분에서 뿐만 아니라 **추출물에서도 ara를 기능성 성분 및 지표성분으로 사용하는 것이 타당하다**는 것을 다시 한 번 확인할 수 있었음.

- 추출물 (**밀기울상등액**) 내에서 효능을 나타내는 용량에서의 ara 용량: 밀기울상등액이 최대의 효능을 나타내는 용량은 200 mg/kg/day이고 이 밀기울상등액에서의 ara의 함량이 3.0%이므로 200 mg/kg/day 밀기울상등액에는 6.0 mg/kg/day의 ara가 들어있어 통밀상등액에서의 함량 (1.8)보다는 3배 가량의 ara가 필요하였음. 통밀상등액과 밀기울상등액에서의 차이점을 설명하기 위해 수동회피실험이외에 보다 다양한 기법의 기억력개선 측정법 (물미로실험, Y 미로 실험)과 기전연구를 통해 최대 효능을 나타내는 용량을 확인할 필요성이 있음.

표 28. 순수성분과 CU-1 상등액의 기억력개선에서의 특성비교

모두 쥐로 환산	AX	AG
	기억력	기억력
최대효능 농도 (mg/kg/day)	2.5	2.5
AX와 AG 내 ara의 함량 (mg/kg/day)	0.85 (ara의 함량 = 34%)	단풍나무 유래: 0.33 (ara의 함량 = 13%) 밀가루 유래: 1.0 (ara의 함량 = 41%)
통밀상등액 100 mg/kg/day Ara의 양	1.8	
통밀상등액 100 mg/kg/day Ara의 기여도	1.2	0.6
밀기울상등액 200 mg/kg/day Ara의 양	6.0	

(b) 혈관성치매에 대한 효능조사 (제1세부)

- o 선별된 ara 고함유 품종인 CU-1의 통밀상등액과 밀기울 상등액을 혈관성 치매에 효과가 있는지 확인하기 위하여 400 mg/kg/day의 농도로 양측 경총동맥을 묶기 5일 전부터 먹이기 시작하여 실험을 마치는 30일 동안 지속적으로 먹였음.

㉠ 통밀추출물의 효능조사

- o Luxol fast blue 염색법에 의한 뇌조직 손상 결과 (그림 36) - 수초의 형태학적인 변화와 존재유무를 측정할 수 있는 luxol fast blue 염색법을 사용하여 손상정도를 살펴보았을 때 백색질 중 대표적인 cc에 대하여 수초의 상태에 따라 점수를 매겨 환산하였음. 그 결과 통밀 추출물을 먹인 군에서는 대조군에 비해 손상점수가 유의하게 감소하는 것을 확인하였음 (1.08 ± 0.24 vs. 1.79 ± 0.11 , $p < 0.05$). 그러나 손상이 잘 일어나는 지역 중 대표적인 opt를 관찰한 결과 통밀 추출물을 먹인 군이 대조군과 손상점수가 크게 차이가 나지 않았음 (1.55 ± 0.40 vs. 1.89 ± 0.34 , $p > 0.05$). 즉 혈관성치매 발생 시 가장 크게 손상되는 지역인 opt 지역에서는 통밀 추출물의 효능이 관찰되지 않았으나 이지역보다 손상정도가 덜 영향 받는 cc 지역에서는 대조군에 비해 통밀 추출물을 먹인 군에서 수초의 손상이 줄어든 것을 알 수 있었음.

㉡ 통밀 추출물의 기전조사

- o 미세아교세포의 활성화 결과 (그림 37) - Microglia 의 활성화 상태를 확인하기 위하여 Iba1을 이용한 조직염색화법을 실시한 결과 손상 정도가 현저하게 관찰되는 opt 지역을 중심으로 분석을 실시하였음. 대조군에서는 정상군에 비해 미세아교세포가 활성화 되어 크기가 커지고 발을 뻗은 형태가 뚜렷하게 관찰되는 수가 증가하였으며 그 염색강도도 강하게 발색이 되었으나 통밀 추출물을 먹인 군에서는 대조군에 비해 미세아교세포가 훨씬 덜 활성화되었으며 발을 뻗은 형태가 뚜렷이 관찰되지 않았음. 이를 색의 강도 및 면적으로 반영하여 정량적 분석을 실시한 결과 역시 통밀 추출물을 먹인 군이 대조군에 비해 미세아교세포의 활성화 정도가 약 60%정도 감소하는 것을 알 수 있었음 ($p < 0.05$).

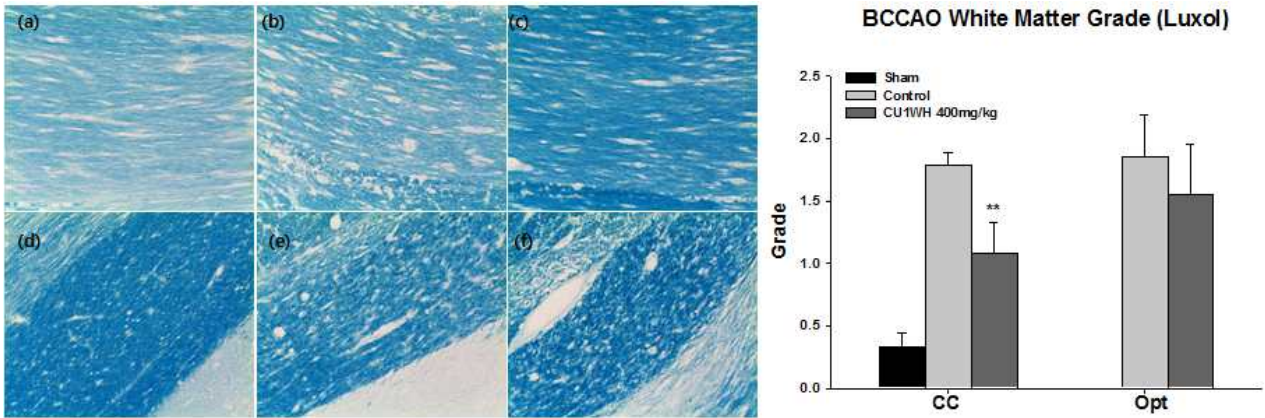


그림 36. 통밀 추출물이 뇌신경축삭 손상에 미치는 효능 조사

통밀 추출물이 총경동맥을 묶어 발생시킨 혈관성 치매에서 뇌의 백색질 (white matter) 중의 뇌랑 (corpus callosum, cc) (a~c) 및 시각로 (optic tract, Opt) (d~f)의 손상을 보호하는 효과를 luxol fast blue staining을 이용하여 확인하였음. 실험 중 (a),(d)는 정상적인 쥐 (sham)이고 (b),(e)는 혈관성치매가 유발된 쥐 (Control) 이며 (c),(f)는 혈관성치매에 통밀 추출물을 먹인 쥐 (CU1WH 400mg/kg)의 대표적인 결과를 각각 나타냄(왼쪽 그림). 수초의 손상정도를 점수로 환산하여 비교한 것을 그래프로 나타냄(오른쪽 그림).

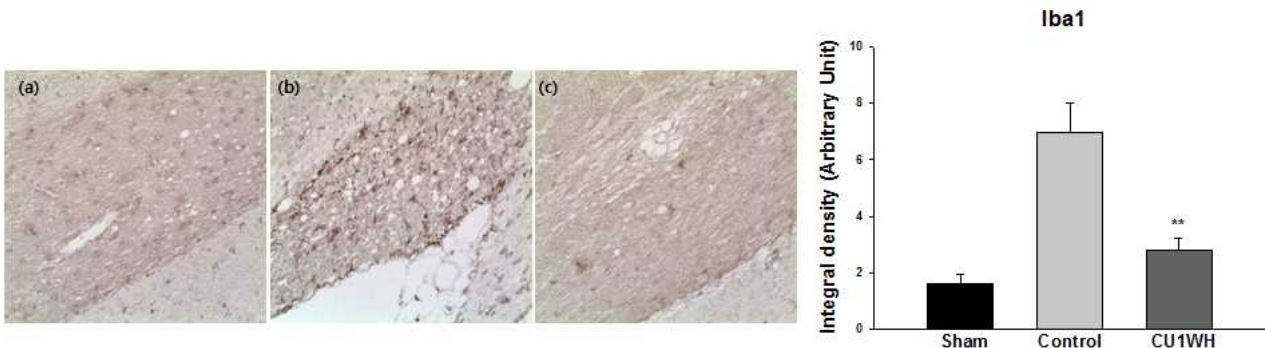


그림 37. 통밀 추출물이 염증세포인 미세아교세포의 활성화에 미치는 효능 조사

통밀 추출물이 총경동맥을 묶어 발생시킨 혈관성 치매에서 뇌의 백색질 (white matter) 중의 시각로 (optic tract, Opt) 의 미세아교세포의 활성화 정도에 미치는 영향을 Iba1을 이용한 면역염색화법으로 확인하였음. 실험 중 (a)는 정상적인 쥐 (Sham)이고 (b)는 혈관성치매가 유발된 쥐 (Control) 이며 (c)는 혈관성치매에 원료를 먹인 쥐 (CU1 WH)의 대표적인 결과를 각각 나타냄(왼쪽 그림). Iba1의 발색정도를 정량화하여 그래프로 나타냄(오른쪽 그림).

(c) 심근경색모델 (제1세부)

o CU-1이 심근경색모델에도 적용되는지를 조사하기 위해 CU-1보다 ara의 함량이 낮으면서 현재 우리나라에서 재배되고 있는 금강밀 (CU-2)의 다양한 추출물 (통밀전체, 통밀상등액, 밀기울전체, 밀기울상등액)에 대해 비교조사하였음.

㉠ 추출물의 특성분석

o 실험에 사용된 시료는 표27에서 사용된 실험조건 중 물:원재료 비율을 10:1로 한 것 이외에는 모두 동일한 조건에서 제조된 후 건조량 등이 측정되었음. 또한 이러한 4가지 추출물에 대한 당분석도 실시하였음.

o ara의 함량비교: 통밀전체와 밀기울전체에서 CU-1의 ara 함량 (3.4와 10%)이 CU-2의 함량 (3.0과 8.1)보다 각각 13과 23% 높은 반면에 통밀상등액과 밀기울상등액에서 CU-1의 ara 함량 (2.5와 3.3%)이 CU-2의 함량 (2.0과 2.2%)보다 각각 25와 50% 정도 높게 나타났음 (표 29). 따라서 CU-1은 CU-2에 비해 전체 ara (수용성 + 비수용성)의 함량도 높지만 이 비율에 비해 효능에 관여하는 상등액 (수용성 ara)의 함량이 상대적으로 더 높아 효능면에 유리할 것으로 예상됨.

표 29. CU-1과 CU-2 (금강밀) 추출물의 소규모제조 특성

	통밀 전체		통밀 상등액		밀기울 전체		밀기울 상등액	
	CU-1	CU-2 (금강밀)	CU-1	CU-2 (금강밀)	CU-1	CU-2 (금강밀)	CU-1	CU-2 (금강밀)
원재료 중량 (g)	100		100		100		100	
건조중량 (g)	87	89	11	16	90	90	12	15
건조중량 (%) [건조중량/ 원재료중량]	87	89	11	14	90	90	12	15
Ara (%)	3.4	3.0	2.5	2.0	10	8.1	3.3	2.2
전체 ara 수율 (건조중량 x ara 함량) (mg)	2,960	2,670	275	280	9,000	7,290	396	330
수용성 ara (mg) /건조중량 (g)	3.2	3.1	25	20	4.4	3.7	33	22
비수용성 ara (mg)/ 건조중량 (g)	30.9	26.9	0	0	95.6	77.3	0	0

㉞ 심근경색에 대한 효능조사

- 실험에서 사용된 CU-1과 CU-2 (금강밀)에 대한 결과를 설명하기 전에 이에 관련된 선행연구 (HY6228)에 대한 결과를 먼저 제시하고자 함.
- 추출물에 대한 효능조사는 순수성분에 대한 것과 마찬가지로 3일 동안 밀추출물을 사료와 섞어서 먹이고 허혈 30분, 재관류 3시간을 시행하여 심근경색의 면적을 측정하였음.

㉟ HY6228을 이용한 선행연구

- HY6228은 미국에서 수입되어 시중에서 판매하는 것으로 이에 대한 당함량분석은 이루어지지 않았음.
- HY6228의 통밀상등액 100, 200, 400, 800 및 1600 mg/kg/day 등의 용량으로 실험한 결과 200 mg/kg/day 용량부터 대조군에 대비하여 약 27.2% 정도의 심근경색을 최대로 줄이는 효능이 관찰되었고 400, 800, 1600 mg/kg/day의 농도에서도 각각 18.3%, 21.6%, 22%으로 그 효능이 관찰되었음 (그림 38). 이로부터 HY6228의 통밀상등액은 200 mg/kg/day의 용량에서 심근경색을 최대로 줄이는 효능이 관찰되었고 이러한 효능은 1600 mg/kg/day까지의 고용량에서도 유지되었음.

㊱ 수입백맥에 대한 효능조사

- 제2협동참여기업인 (주)동아원에서 미국 등에서 수입하는 백맥 (흰밀)을 혼합한 통밀을 추출한 추출물 (통밀상등액, ara의 함량은 1.7였음)의 심근경색에 대한 효능을 조사한 결과 200 (ara의 함량은 3.4) mg/kg/day 이상의 용량에서 대조군에 비해 경색면적을 최대로 줄이는 효능 (200과 400에서 각각 약 23.9 및 26.8%)이 관찰되었음 (그림 39). 200 mg/kg/day에 포함된 ara의 함량인 3.4 mg/kg/day은 구매한 순수성분인 AX와 AG에서 최대 효능을 나타내는 각각 ara의 함량인 1.7과 13 mg/kg/day의 중간 값에 해당하여 백맥에 대해서도 ara가 기능성분임을 나타냄.

㊲ 국내육종품종인 CU-2 (금강밀)에 대한 효능조사

- 우리나라에서 현재 재배되고 있는 우리밀의 한 종류인 금강밀에 대해서는 CU-1과 비교하여 조사하였음. CU-2의 통밀상등액 (ara의 함량이 2.0%)의 심근경색에 대한 효능을 조사한 결과 400 (ara의 함량은 8 mg/kg/day)의 용량에서 대조군에 비해 경색면적을 최대로 줄이는 효능 (약 23.9%)이 관찰되었음 (그림 40). 400 mg/kg/day에 포함된 ara의 함량인 8 mg/kg/day은 구매한 순수성분인 AX와 AG에서 최대 효능을 나타내는 각각 ara의 함량인 1.7과 13 mg/kg/day의 중간 값에 해당하여 금강밀에 대해서도 ara가 기능성분임을 나타냄.

㊳ 국내토종품종인 CU-1에 대한 효능조사

- 기능성분이 높은 것으로 선별된 CU-1이 다른 품종들과 마찬가지로 심근경색에 대해 효능을 나타내는지를 다양한 추출물 (통밀상등액, 밀기울상등액, 통밀전체 및 밀기울전체)을 조사하였음.
- 밀기울상등액 (ara의 함량이 3.3%): 통밀상등액은 선행연구의 HY6228 이나 백맥 및 금강밀 (CU-1)의 통밀상등액과 같이 200-400 mg/kg/day의 용량에서 비슷한 효능이 관찰될 것을 예상하여 CU-1에 대해서는 밀기울상등액부터 먼저 실시하였음. 우선 400 mg/kg/day로부터 시작한 결과 효능이 관찰되어 점차적으로 낮춘 결과 놀랍게도 25 (ara의 함량은 0.82) mg/kg/day에서도 최대의 효능이 관찰되었음 (25, 50, 100, 200, 및 400 mg/kg/day에서 경색면적 감소는 각각 약 25.4, 21.9, 25, 22.8, 22.8 및 22.3%였음) (그림 41).

- 통밀상등액 (ara의 함량이 2.5%): 이러한 밀기울상등액에 대한 결과를 근거로 통밀상등액에 대해서도 실시한 결과 밀기울상등액에 대해서와 마찬가지로 25 (ara의 함량은 0.63) mg/kg/day에서도 그 효능이 관찰되었음 (그림 42). 이러한 결과는 다른 품종들 (HY6228, 백맥 및 금강밀)에 비해 추출물 및 ara의 함량으로서 10배 정도 낮은 용량에서 효능을 나타내었음.
- 전체 (통밀 및 밀기울): 한편, CU-1의 통밀전체와 밀기울전체는 각각 1 및 2 g/kg/day에서 경색면적을 감소시키는 효능이 관찰되었음 (다만, 통밀전체 1 g/kg/day의 용량에서는 유의성은 확보하지 못하였음). (그림 43).

㊤ CU-1의 심근경색에 대한 효능종합

- 심근경색에 대한 밀품종들이 심근경색을 줄이는 효능에 대해 종합하면 표 20과 같음. CU-1은 CU-2 (금강밀)에 비해 상등액에 있어서 효능을 나타내는데 필요한 상등액의 용량이 1/16만 필요하였으며, 이 상등액에 들어있는 ara의 양도 1/13이었음. 그런데 CU-2가 효능을 나타내는 것은 ara에 의한 것이었으므로 CU-1이 효능을 나타내는 것은 ara 이외에 또 다른 성분에 의한 것으로 판단됨.

(d) CU-1 (A11밀)의 효능에 대한 효능에 대한 종합 (표 30)

- 건강증모델에 대해서는 상등액 (통밀, 밀기울)이 건강기능식품개발 후보로 하는 것이 타당하였으며, 이때 ara를 기능 및 지표성분으로 하는 것이 타당하였음. 한편, 심근경색모델에 대해서는 동일한 상등액이 훨씬 낮은 용량에서 효능을 나타내어 (비록 ara 이외의 성분에 의해 그 효능이 결정된다 하더라도) 그 상등액을 기억력개선용 건강기능식품으로 개발하면 동시에 심근경색도 예방할 수 있는 부가적인 효능을 기대할 수 있는 것으로 판단됨.
- 쥐를 이용한 실험에서 CU-1의 통밀상등액과 밀기울상등액은 기억력개선효과가 최대로 나타나는 100과 200 mg/kg/day 이상에서 그 효능이 오히려 감소하는 양상으로 나타나며, 이것은 특히 통밀상등액에서 심하게 나타남. 하지만 심근경색모델에서는 일반밀품종 (HY6228)의 통밀상등액에 대해서는 200-1,600 mg/kg/day에서, CU-1의 통밀상등액에 대해서는 25-400 mg/kg/day에서 용량에 관계없이 동일한 효능이 관찰되는 것으로부터 CU-1 상등액의 일반적인 독성에는 기인하지는 않을 것으로 사료됨. 뿐만 아니라 HY6228 통밀상등액을 이용한 뇌경색모델에서도 100-400 mg/kg/day에서 효능이 관찰되고 200과 400 mg/kg/day에서는 동일한 효능이 관찰되었음 (Current Topics in Nutraceutical Research 2008, **6(1)**, 47-54). 이는 독성에 기인하지 않는 것이 심장뿐만 아니라 뇌에도 적용될 수 있다는 것을 나타냄. 이에 대한 다른 원인을 생각하면 본 실험에서 사용된 수동회피실험은 전기자극을 기억하는 정도로 판단하는 것이므로 습도 등 날씨의 영향을 많이 받고, 한 번으로 한 실험에 의해 결과가 도출되므로 오차가 도입될 확률이 높아 일어난 현상일 수도 있음 (본 실험은 일부는 여름에 시행). 따라서 수동회피실험은 이렇게 오차가 도입될 확률을 극복하고도 효능을 나타낼 수 있는 강한 후보시료를 탐색하는데 유리하므로, 인체시험에 사용될 원료에 대해서는 수동회피실험뿐만 아니라 다양한 기억력을 측정할 수 있는 실험기법 [물미로실험 (Phytother Res 2010, **24(1)**, 76-84; J Med Food 2010, **13(3)**, 572-578), Y-maze 실험 등]을 사용하고 이에 대한 기전연구도 시행하여 효능이 나타나는 범위에 대해서 보다 정확한 값을 정의하고자 함.

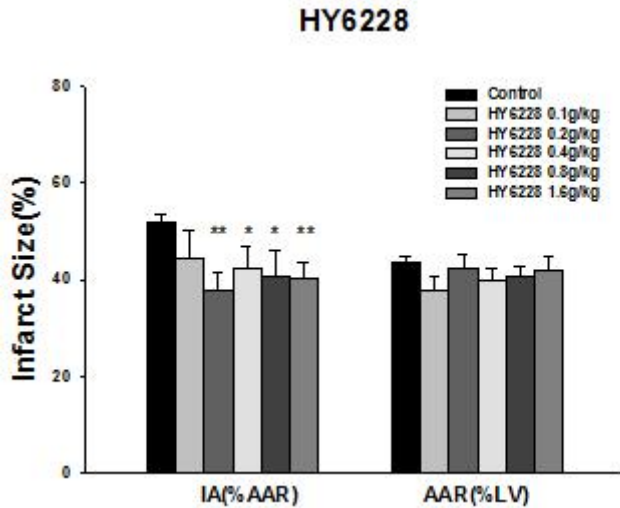


그림 38. HY6228이 심근경색에 미치는 효능 조사

HY6228을 폐색 3일 전부터 여러 농도로 사료와 섞어 자유롭게 먹게 한 후 허혈-재관류 (30분/3시간) 방법을 이용하였을 때 HY6228이 심근경색에 미치는 영향을 조사하였음. 대조군 (control)은 5마리 이상, 실험군은 모두 10마리 내외에 대해 실험한 것임.

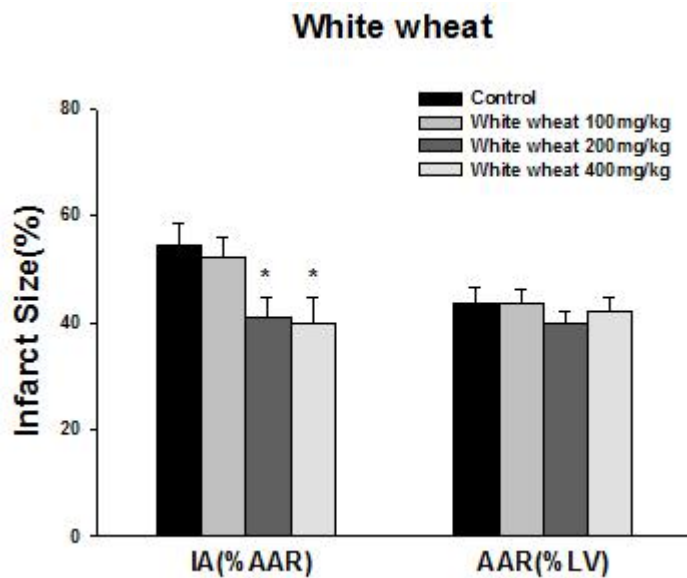


그림 39. 백맥이 심근경색에 미치는 효능 조사

백맥 (혼합밀)을 폐색 3일 전부터 여러 농도로 사료와 섞어 자유롭게 먹게 한 후 허혈-재관류 (30분/3시간) 방법을 이용하였을 때 백맥의 통밀 상등액이 심근경색에 미치는 영향을 조사하였음. 대조군 (control)은 5마리 이상, 실험군은 모두 10마리 내외에 대해 실험한 것임.

KeumKangmil

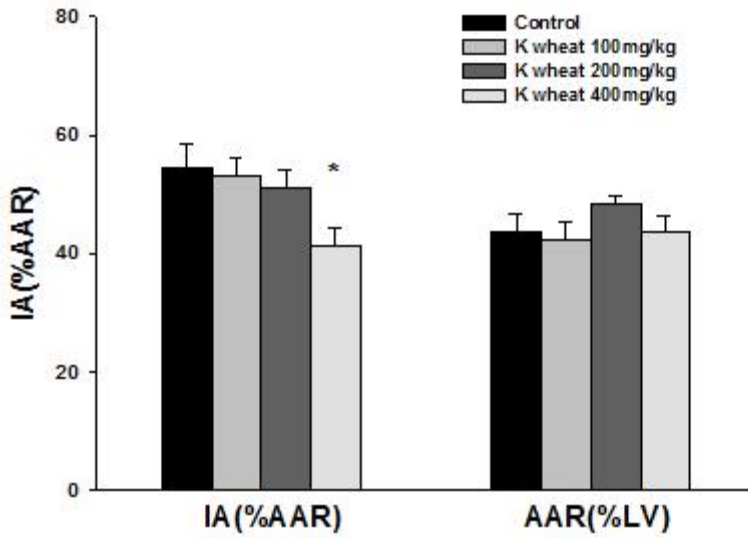


그림 40. 금강밀 통밀 상등액이 심근경색에 미치는 효능 조사

금강밀의 통밀 상등액을 폐색 3일 전부터 여러 농도로 사료와 섞어 자유롭게 먹게 한 후 허혈-재관류 (30분/3시간) 방법을 이용하였을 때 금강밀 통밀 상등액이 심근경색에 미치는 영향을 조사하였음. 대조군 (control)은 5마리 이상, 실험군은 모두 10마리 내외에 대해 실험한 것임.

CU-1 Wheat Bran Supernatant

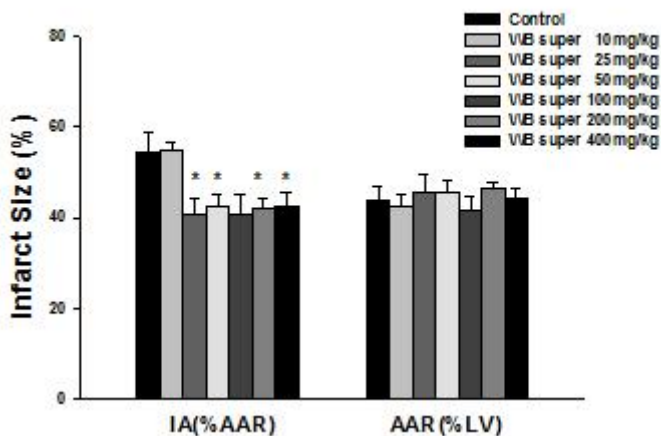


그림 41. CU-1 밀기울 상등액이 심근경색에 미치는 효능 조사

CU-1 밀기울 상등액을 폐색 3일 전부터 여러 농도로 사료와 섞어 자유롭게 먹게 한 후 허혈-재관류 (30분/3시간) 방법을 이용하였을 때 CU-1의 밀기울 상등액이 심근경색에 미치는 영향을 조사하였음. 대조군 (control)은 5마리 이상, 실험군은 모두 10마리 내외에 대해 실험한 것임.

CU-1 Whole Supernatant

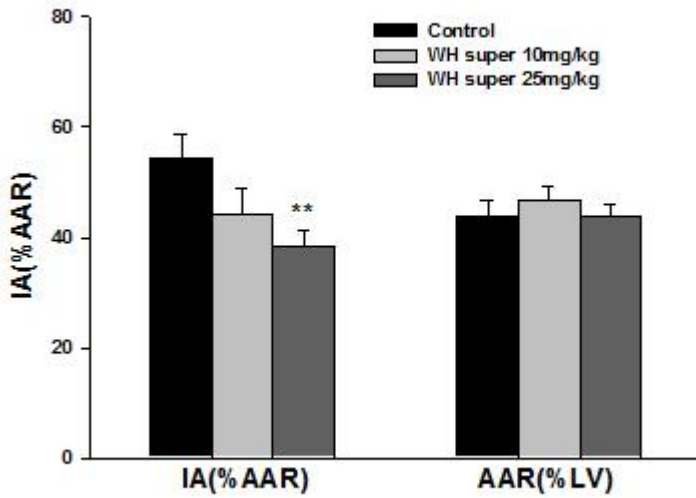


그림 42. CU-1 통밀 상등액이 심근경색에 미치는 효능 조사

CU-1 통밀 상등액을 폐색 3일 전부터 여러 농도로 사료와 섞어 자유롭게 먹게 한 후 허혈-재관류 (30분/3시간) 방법을 이용하였을 때 CU-1의 통밀 상등액이 심근경색에 미치는 영향을 조사하였음. 대조군 (control)은 5마리 이상, 실험군은 모두 10마리 내외에 대해 실험한 것임.

CU-1 Whole (Whole, Bran)

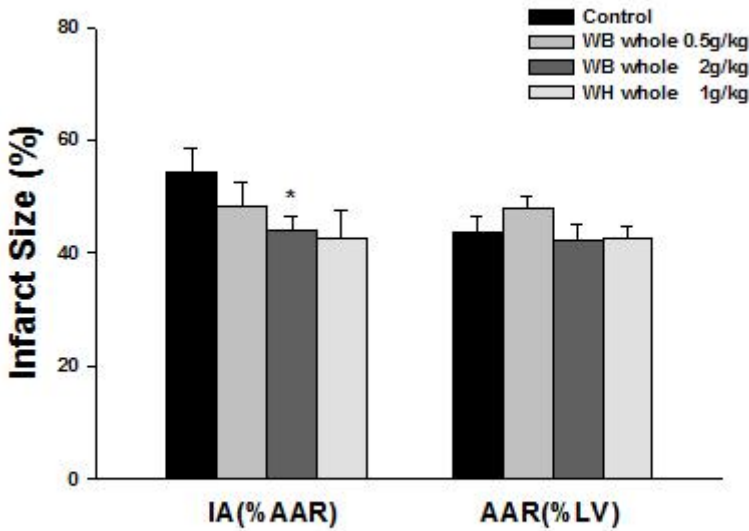


그림 43. CU-1 통밀 및 밀기울 전체의 심근경색에 미치는 효능 조사

CU-1 통밀 전체 및 밀기울 전체를 폐색 3일 전부터 여러 농도로 사료와 섞어 자유롭게 먹게 한 후 허혈-재관류 (30분/3시간) 방법을 이용하였을 때 CU-1의 통밀 및 밀기울 전체가 심근경색에 미치는 영향을 조사하였음. 대조군 (control)은 5마리 이상, 실험군은 모두 10마리 내외에 대해 실험한 것임.

표 30. CU-1과 CU-2 (금강밀) 추출물의 심근경색에 대한 효능의 비교

IS (%) 농도 (mg/kg)	통밀				밀기울			
	전체		상등액		전체		상등액	
	CU-1	CU-2 (금강밀)	CU-1	CU-2 (금강밀)	CU-1	CU-2 (금강밀)	CU-1	CU-2 (금강밀)
10			44.2				54.7	
25			<u>38.4</u>				<u>40.6</u>	
50							42.5	
100				53.1			40.8	
200				51.0			42.0	
400				<u>41.4</u>			42.3	47.9
500					48.5			
1000	<u>42.8</u>							
2000					<u>43.9</u>	52.3		

* 미국에서 수입한 시중판매 밀 품종 (HY6228)에 대한 선행실험 (당분석 이루어지지 않았음) 결과 본 실험과 동일한 동물실험 조건에서 통밀상등액을 200 mg/kg/day 이상으로 쥐에게 투여한 경우 경색면적을 유의하게 감소시키는 효능이 관찰되었음.

② 중규모 생산 (1 kg)

- 선정된 밀품종인 CU-1의 실험실 규모 (약탕기, 2 L)에서의 결과를 이용하여 대용량 (산업용, 톤규모) 추출기에서 최적 생산조건을 확립하는 과정은 실험실규모 (온도조절기능이 있는 추출기, 20 L)에서의 실험을 거쳐 이루어졌음. 또한 생산에 필요한 CU-1은 새롭게 수확된 2012년산을 이용하였음.
- 이를 통해 중규모 생산에서 최적조건을 확립하였음.

㉑ 재배연도별 추출특징

- 실험실 규모 추출기 (전체부피 20 L, 추출부피 10 L)에서의 추출은 CU-1 품종의 2012년도 산 [CU-1(2012)]으로 실시되었음. 이 때 연도별로 수확된 CU-1 품종에서의 건조량, ara의 함량 등을 비교 하기 위해 우선 소규모로 약탕기 (전체부피 2 L)로 추출하여 통밀상등액에 대한 특성을 조사하였음.
- 실험에 사용된 시료는 표 15 (103쪽)에서와 동일한 조건으로 추출되었음. 또한 이러한 4가지 추출물에 대한 당함량분석도 실시하였음.

○ 통밀전체에 들어있는 ara의 함량과 총량은 재배연도에 따라 큰 차이가 나타나지 않았음 (표 31). 하지만 통밀상등액에 들어있는 ara의 총량 (전체 ara 수율)은 변화가 없었지만 수용성 ara의 함량 [Ara (%)]= 거의 3배 가까이 차이가 났음. 2012년도 산에서 수용성 ara의 함량은 감소하였지만 그 수율 (건조량)이 상대적으로 증가함에 따라 전체 수용성 ara의 총량은 유지되었음. 이러한 결과가 나온 이유는 2012년도 산에서 물에 녹는 전분의 양이 증가하여 발생한 것으로 추정되었으며, 이는 추출물을 원심분리한 후 그 상등액이 2011년도 산은 맑은데 반해 2012년도 산은 전분으로 흐린 것에 근거를 두고 있음. 이러한 결과는 수용성 AX의 총량은 재배연도에 따라 큰 영향을 받지 않는데 반해 (Cereal Chem 2006, **83**(6), 617-623; Cereal Chem 1989, **66**(5), 369-373), 밀에 들어있는 전분의 총량은 환경의 영향을 받고 (Starch 2007, **59**, 234-238), 그 중에서도 특히 호화화 노화에 영향을 미치는 amylopectin의 side chain의 길이가 재배연도에 따라 영향을 받는다는 문헌 (Starch 2005, **57**, 521-530; Carbohydrate Polymers 2004, **58**, 71-77)의 보고와 일치하였음.

- 이러한 결과는 재배연도별 전분의 함량변화는 건강기능식품의 개발 측면에서는 규격관리에서 어려움이 예상될 수 있음. 하지만 수용성 AX의 함량은 일정할 것으로 예상되므로, 변화의 원인이 되는 전분이 많이 제거된 밀기울상등액에서는 변화가 적을 것으로 예상됨.

㉒ 실험실규모 추출기에서의 최적조건 확립

- 최적 추출조건을 찾기 위해 대량생산 추출기와 유사한 기능을 가진 것으로 온도조절 (그러나 교반은 수동)이 가능한 추출기 (전체부피 20 L, 추출부피 10 L)를 이용하여 95-97 °C에서 1시간 동안 추출하였음 (95 °C는 밀에 들어있는 전분이 호화되기에 충분한 온도이었으며, 추출시간은 선행연구에서 최적조건으로 찾아진 1시간으로 하였음) (표 32). 본 실험에서는 용매로 사용하는 물과 원재료 (분쇄통밀, 밀기울)의 비율을 5:1 (밀기울에만 적용), 10:1, 15:1 및 20:1 (물은 10 L로 고정하고 위의 비율을 만족시키는 원재료를 첨가하였음)로 하여 실험을 실시하여 이 중에서 최적조건을 찾았음. 또한 대량생산에서 사용할 연속원심분리기 (부산 해양생물산업육성센터 소재, Clara 200)의 최대 g force가 약 12,000이고 실제로는 이 보다 낮은 g force에서 사용될 수 있으므로 실험실용 원심분리기를 이용하는 본 실험에도 이에 상응하게 최대 g force (14,000)과 이의 1/4 (3,500)에서의 생산특성에 대해서도 조사하였음. 이로 부터 얻어진 상등액 (통밀 및 밀기울)과 전체 (통밀 및 밀기울)의 건조량, ara의 함량 및 전체 ara의 수

율을 얻었음.

표 31. CU-1의 재배연도에 따른 추출물의 소규모제조 특성

	CU-1 [A (2011)]		CU-1 [A (2012)]	
	통밀 전체	통밀 상등액	통밀 전체	통밀 상등액
원재료 중량 (g)	100		100	
건조량 (g)	89	10	94	27
Ara (%)	3.2	2.1	2.7	0.81
전체 ara 수율 (건조량 x ara 함량) (mg)	2,780	210	2,540	220

표 32. 실험실규모 추출기를 활용한 추출물의 제조조건

	원재료	원재료 재배 연도	원재료 가공	비율 (물:가 공원재 료)	추출 장비	추출 온도	추출 시간	원료	건조 방법
일반 사항	통밀	2012	분쇄 통밀, 밀기울	5, 10, 15, 20	실험실 용 추출장 비	95 °C 내외	1 시간	상등액, 전체	열풍 건조
비고	CU-1 (국내토 종)		- 통밀 분쇄는 실험실 용 채분기 이용 - 밀기울 은 영농조 합을 통해 구매	- 용매 (물)의 양을 10 L (10 kg)로 후 비율에 따라가 공원재 료 (중 량) 투여	- 온 도 가 조절 가 교반 수동 추출 물보 - 온 - 시 충		- 예열 후 추출 시간	- 실험실 용 원심 분리기 - 원심분 리속도를 2가지로 시 (14,000, 3,500 g)	60 °C

(a) 분쇄통밀에 대한 최적조건 조사

o 분쇄통밀에 대한 결과가 표 33에 제시되어 있으며 이를 항목의 순서별로 분석하면 아래와 같음.

㉠ 통밀상등액

o 첨가된 물과 원재료의 양: 물과 분쇄된 통밀의 비율을 8:1, 10:1, 15:1 및 20:1로 하되 물의 양을 10 L (10 kg)로 고정하고 분쇄통밀을 비율에 맞게 투입하였음.

o 원심분리속도: 실험실용 원심분리기의 최대 속도인 14,000 g와 이의 1/4인 3,500 g에서 원심분리를 실시하여 상등액을 얻었음. 전체적으로 원심분리속도에 따른 실험값의 차이는 크지 않음. 따라서 14,000 g나 3,500 g나 원심분리속도는 편리한 것을 선택하면 됨.

o 상등액의 양 (상등액중량/전체중량): 원심분리 얻어지는 상등액은 궁극적으로 건조시켜 증발시켜야 하므로 이의 양은 적을수록 좋음. 이러한 관점에서 보면 8:1과 10:1이 후보군임.

o 건조중량: ara의 함량이 일정하다고 가정하였을 때 회수되는 건조중량은 많을수록 좋음. 본 연구과제의 경우 원재료 (밀)의 가격이 생산공정에 들어가는 비용에 비해 싸므로 건조중량 (%) (건조중량/원재료 중량) 보다는 회수되는 절대중량 (g)이 높은 것이 유리함. 이러한 관점에서 보면 10:1이 좋음.

o 회수되는 ara의 양: 건조된 원료 내에 들어있는 ara의 함량 [ara (%)]이 높을수록 섭취하여야 할 원료의 양이 줄어들므로 ara의 함량은 높은 조건일수록 유리함. 이러한 관점에서는 추출조건에 따라 큰 차이가 나타나지 않으나, 함량 자체는 약 0.8% 내외로 2011년 산 (2.1%)에 비해 낮게 나타났음. 뿐만 아니라 회수되는 전체 ara의 양은 높을수록 (전체 ara 수율) 생산 batch 당 시험자에게 공급할 분량이 늘어나므로 전체 ara 수율도 높을수록 유리함. 이러한 관점에서 보면 8:1은 제외되어야 하고, 전체적으로 보면 10:1이 최고임.

o 종합적인 판단: 전체적으로 평가하면 전체적으로 수율 (건조중량, 전체 ara 수율)의 측면에서 뿐만 아니라 건조의 측면에서도 물:통밀의 비율이 10:1일 때 가장 최적의 생산조건임을 알 수 있음.

㉡ 통밀전체

o 전체인 경우에는 이론상 회수율 100%여야 하며 실제 회수되는 것도 100%가 되었으며 (공정상에 손실이 없음), 전체의 ara의 함량도 동일하게 측정되었음 (ara의 함량측정에 재현성이 있음).

표 33. 추출조건에 따른 CU-1 통밀의 중규모제조 특성

	추출비율 (물:원재료)	8:1		10:1		15:1		20:1	
	원재료 중량 (g)	1,250		1,000		667		500	
통밀 상등액	원심분리 속도 (g force)	14,000	3,500	14,000	3,500	14,000	3,500	14,000	3,500
	상등액(%) (상등액중량/ 전체중량)	54	45	52	52	65	57	66	64
	건조중량 (g)	97 (전분 많음)	79 (전분 많음)	420	440	330	330	270	300
	건조중량 (%) [건조중량/ 원재료중량]	48	40	42	44	49	49	54	59
	Ara (%)	0.85	1.0	0.7	1.0	0.8	0.8	0.8	0.8
	전체 ara 수율 (건조중량 x ara 함량) (g)	0.82	0.79	2.9	4.4	2.6	2.6	2.2	2.4
통밀 전체	건조중량 (g)	1,250		1,000		667		500	
	건조중량 (%) [건조중량/ 원재료중량]	100		100		100		100	
	Ara (%)	3.0		3.1		3.2		3.3	

(b) 밀기울에 대한 최적조건 조사

o 밀기울에 대한 결과가 표 24에 제시되어 있으며 이를 항목의 순서별로 분석하면 아래와 같음.

㉠ 밀기울상등액

- o 첨가된 물과 원재료의 양: 물과 분쇄된 통밀의 비율을 8:1, 10:1, 15:1 및 20:1로 하되 물의 양을 10 L (10 kg)로 고정하고 분쇄통밀을 비율에 맞게 투여하였음. 다만, 5:1에서는 상등액이 얻어지지 않았음.
- o 원심분리속도: 실험실용 원심분리기의 최대 속도인 14,000 g와 이의 1/4인 3,500 g에서 원심분리를 실시하여 상등액을 얻었음. 전체적으로 원심분리속도에 따른 실험값의 차이는 크지 않음. 따라서 14,000 g나 3,500 g나 원심분리속도는 편리한 것을 선택하면 됨.
- o 상등액의 양 (상등액중량/전체중량): 원심분리 얻어지는 상등액은 궁극적으로 건조시켜 증발시켜야 하므로 이의 양은 적을수록 좋음. 이러한 관점에서 보면 8:1과 10:1이 후보군임.
- o 건조중량: ara의 함량이 일정하다고 가정하였을 때 회수되는 건조중량은 많을수록 좋음. 본 연구과제의 경우 원재료 (밀)의 가격이 생산공정에 들어가는 비용에 비해 싸므로 건조중량 (%) (건조중량/원재료 중량) 보다는 회수되는 절대중량 (g)이 높은 것이 유리함. 이러한 관점에서 보면 8:1과 10:1이 좋음.
- o 회수되는 ara의 양: 건조된 원료 내에 들어있는 ara의 함량 [ara (%)]이 높을수록 섭취하여야 할 원료의 양이 줄어들므로 ara의 함량은 높은 조건일수록 유리함. 이러한 관점에서는 추출조건에 따라 큰 차이가 나타나지 않으나 10:1이 비교적 나아보임. 한편, ara의 함량은 10:1에서 3.4%로 나타나 2011년 산

에서의 밀기울상등액에서의 ara 함량과 동일하게 나타나, 밀기울상등액에 대해서는 재배연도별 차이가 관찰되지 않았음. 따라서 **밀기울상등액을 이용하는 것이 지표성분 규격설정 측면에서 유리할 것임**. 뿐만 아니라 회수되는 전체 ara의 양은 높을수록 (전체 ara 수율) 생산 batch 당 시험자에게 공급할 분량이 늘어나므로 전체 ara 수율도 높을수록 유리함. 이러한 관점에서 보면 전체적으로 보면 8:1과 10:1이 최고임.

○ **종합적인 판단: 전체적으로 평가하면 전체적으로 수율 (건조중량, 전체 ara 수율)의 측면에서 뿐만 아니라 생산조건의 안정성 측면에서 물:통밀의 비율이 10:1일 때 가장 최적의 생산조건 (5:1인 경우에는 상등액이 얻어지지 않았으므로 8:1에서는 생산조건이 불안정할 수 있음)임을 알 수 있음.**

② 밀기울전체

○ 전체인 경우에는 이론상 회수율 100%여야 하며 실제 회수되는 것도 100%가 되었으며 (공정상 손실이 없음), 전체의 ara의 함량도 동일하게 측정되었음 (ara의 함량측정에 재현성이 있음).

(c) 실험실규모에서의 실험결과 종합평가

○ **최적추출 조건: 온도조절이 가능한 실험실 규모 추출기 (20 L)를 이용한 실험에서 최적조건은 95 °C에서 물:원재료 (분쇄통밀 및 밀기울)를 10:1로 하여 1시간 동안 추출한 후 원심분리하여 얻은 상등액 (통밀, 밀기울)을 건조하는 것임.** 한편, 상등액 (통밀, 밀기울) 중에서 지표성분인 ara의 규격설정의 측면에서는 밀기울상등액이 유리함.

표 24. 추출조건에 따른 CU-1 밀기울의 중규모제조 특성

추출비율 (물:원재료)		8:1		10:1		15:1		20:1	
원재료 중량 (g)		1,250		1,000		667		500	
밀기울 상등액	원심분리 속도 (g force)	14,000	3,500	14,000	3,500	14,000	3,500	14,000	3,500
	상등액 (%) (상등액중량/전체중량)	37	37	45	42	64	62	73	70
건조중량 (g)		113	125	100	100	93	93	75	75
건조중량 (%) [건조중량/원재료중량]		9.0	10	10	10	14	14	15	15
Ara (%)		3.2	3.3	3.4	3.5	3.3	3.1	3.1	2.8
전체 ara 수율 (건조중량 x ara 함량) (g)		3.6	4.1	3.4	3.5	3.1	2.9	2.3	2.1
밀기울 전체	건조중량 (g)			667		500			
	건조중량 (%) [건조중량/원재료중량]			100		100			
	Ara (%)			8.1		7.7			

(나) 산업용 규모 생산 [원료 (통밀 vs 밀기울), 추출조건 (상등액 vs 전체)]

- o 산업용 규모 생산은 대규모 생산 (500 kg)으로 대용량 추출기를 이용하여 이루어졌음.
- o 이 장에서는 밀기울로부터 효능을 나타내는 신청원료 (밀기울추출물)를 생산하는 최적의 공정을 찾아 나갔음.

① 산업용규모 생산방법의 개발에 대한 요약

- o ②의 ㉠에서는 열수추출을 먼저하고 원심분리로 전분을 제거하는 방법을 시도하였음 (실패).
- o ②의 ㉡에서는 앞서서의 문제점을 해결하기 위해 전분을 제거하기 위한 방법을 도입하고자 하였음. 전분을 제거하기 위한 방법으로 (a)에서는 열수추출 후 노화를 촉진시키기 위해 냉침시키는 방법을 시도하여 실험실규모에서 최적조건을 확립하였으나 (성공), 대용량 생산에서는 원심분리기 (disk stack type)가 되지 않았음 (실패). 이를 극복하기 위해 (b)에서는 전분을 열수추출 전에 미리 제거하는 방법을 실험실에서 시도하여 최적조건을 확립한 후 (성공), 이를 대용량 생산에서 원심분리기를 disk stack 형으로 시도하였을 때는 (실패)하였으나, 원심분리기를 **데칸터 형으로 시도하여 비로소 (성공)하였음.**

② 최적의 산업용규모 생산방법의 개발

㉠ 대용량 생산 (실패한 실험)

- o 실험실 규모에서의 연구결과를 근거로 하여 인체시험에 사용할 시료를 생산하기 위해 부산 해양생물육성센터에 있는 대규모용량 추출기 (500 L)를 이용하여 대량생산을 실시하였음.

(a) 생산조건 (표 35)

- o 대규모 생산에서의 실험조건은 표 15에서와 같음. 우선, 원재료로서의 통밀은 2012년도산 CU-1 (국산 토종)을 사용하였으며, 시험생산할 재료로는 밀기울뿐만 아니라 대조군으로 통밀을 분쇄한 분쇄통밀도 조사하였음.
- o 추출조건은 실험실 규모에서와 마찬가지로 물:가공원료의 비율을 10:1로 하고 95 °C에서 1시간하기로 하고, 최종원료로는 원심분리 후 얻은 상등액의 건조물로 하기로 하였음.

(b) 시험생산 공정 (그림 44)

- o 시험생산을 그림 44와 같이 실시하였음.

㉠ 생산조건

㉡ 원재료

- o 원재료로는 지표성분의 함량이 높은 밀기울뿐만 아니라 대조군으로 분쇄통밀에 대해서도 실시하였음.

㉢ 추출조건

- o 500 L 추출기에 원재료 40 kg에 물 400 L를 넣고 추출은 95 °C에서 1시간 동안 진행하였음 (추출온도가 95 °C에 도달한 후 1시간). 이 때 교반속도는 각각 100 rpm을 유지하였음.

㉣ 원심분리

- o 원심분리는 분리능이 좋고 연속공정이 가능한 disk stack type (Clara 200)으로 하였으며, feeding은 약 70 °C을 유지하여 호화된 상태에서 300 L/hr로 하고 회전속도는 7,500 rpm에서 시행하였음.

㉤ 건조

- o 상등액 소량에 대해 동결건조와 함께 분무건조가 가능한지 확인하였음.

⑥ 생산결과

㉠ 추출 및 원심분리

○ 추출 후 밀기울과 분쇄통밀은 모두 회수하였음 (450 L).

○ 이 것으로부터 상등액을 얻기 위해 원심분리를 실시하였음. 이 때 원심분리시 온도가 낮으면 호화된 전분이 노화되어 원심분리에 문제를 유발할 수 있으므로 이를 방지하기 위해 전분이 노화되기 전인 뜨거운 상태 (70 °C 이상)에서 실시한 결과 밀기울과 분쇄통밀에서 그 상등액으로 각각 360 L씩 얻어졌음.

㉡ 건조수율 (표 36)

○ 상등액에 들어 있는 전분을 충분하게 제거할 수 있는지 조사하기 위해 상등액의 일부 (4 L)를 센터에 있는 동결건조기를 이용하여 동결건조시켰으며, 일부의 상등액은 대구가톨릭대로 가지고 와 실험실용 열풍건조기로 열풍건조를 실시하였음.

○ 아울러 연속원심분리기로 얻어진 상등액으로부터 전분을 더 제거할 수 있는지를 확인하기 위해 분리능이 더 좋은 실험실용으로 원심분리를 실시하였음.

○ 그 결과를 보면 (표 36), 밀기울에 대해 disk type으로 연속원심분리한 것을 동결건조하거나 열풍건조하거나 상관없이 그 수율은 30% 이상이 얻어졌으나, 이 연속원심분리한 것을 실험실에서 다시 원심분리하면 그 수율이 실험실에서 모든 과정이 이루어졌을 때와 비슷한 약 10%로 떨어졌음. 이러한 결과는 밀기울에 존재하는 전분은 disk type 연속원심분리기로는 충분하게 제거할 수 없다는 것을 나타내었음.

○ 한편, 분쇄통밀에 대해 disk type으로 연속원심분리한 것을 동결건조하거나 열풍건조하거나 그 수율은 45% 이상이 얻어져 밀기울보다 많이 얻어졌을 뿐만 아니라, 이 연속원심분리한 것을 실험실에서 다시 원심분리하여도 그 수율은 여전히 35%가 넘었음. 이러한 결과는 밀가루에 존재하는 전분은 원심분리기의 유형에 상관없이 제거하는 것이 어렵다는 것을 나타냄.

(c) 결론

○ 원심분리로 전분을 제거하는 것을 고려하였을 때 밀기울을 사용하는 것이 바람직하였으며, 연속원심분리로 전분을 제거하기 위해서는 보다 정교한 전분제거방법이 강구되어야 했음.

표 35. 대규모 추출기 (500 L)를 활용한 추출물의 제조조건

	원재료	원재료 재배 연도	원재료 가공	비율 (물:가 공원재 료)	추출 장비	추출 온도	추출 시간	원료	건조 방법
일반 사항	통밀	2012	분쇄 통밀, 밀기울	10:1	산업용 추출기 (500 L)	95 oC 내외	1 시간	상등액, 전체	진공, 동결, 분무
비고	CU-1 (국내토 종)		-통밀분 쇄는 실험 실용 제분기 이용 - 밀기 울은 영 농 조 합을 통해 구매	- 투여 전 물에 미리 개 입.	- 온 도 조 절 자 동 교 가 반 능		- 예열 추출 시간	- 산 업 용 연 속 원 심 분 리 기 (디 스 크 타 입) - 원 심 분 리 속 도??	

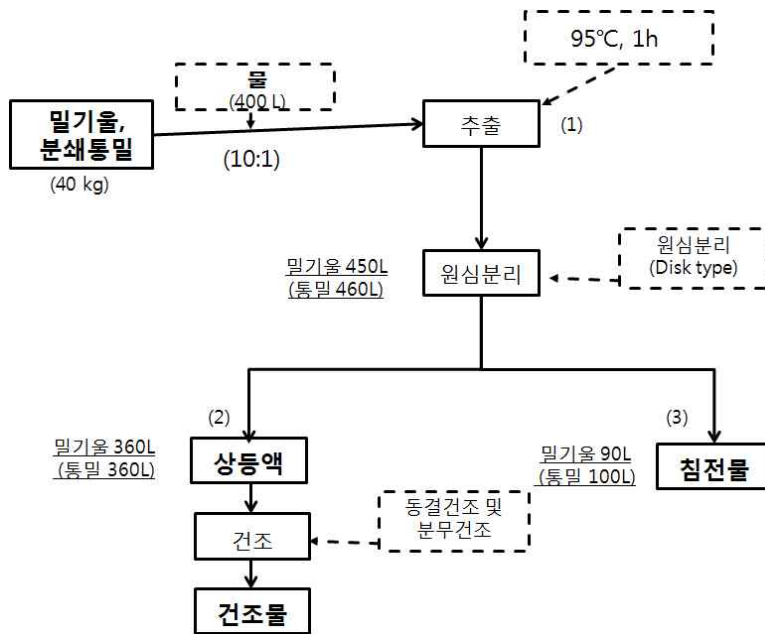


그림 44. 대량생산 공정도 (열수추출, 원심분리 후 얻은 상등액 건조)

표 36. 원심분리 종류에 따른 수율의 변화

원심분리	연속원심분리만	연속원심분리만	연속원심분리후 실험실용 원심분리
건조	동결 (부산)	열풍 (대가대)	열풍 (대가대)
수율 (%) (건조물/원재료)			
밀기울	40	33	10
분쇄통밀	54	46	37

㉔ 전분제거 방법의 개발

- 대규모 용량으로 시생산을 실시한 결과 열수추출물을 단순히 연속원심분리를 하는 것으로는 전분을 모두 제거할 수 없어 전분을 보다 효율적으로 제거하는 방법을 개발하기로 하였음.
- 전분제거방법으로는 열수추출후와 열수추출전의 방법으로 나누어서 실시하였음; 열수추출후 방법은 열수추출후 원심분리하기 전에 밤새도록 냉침을 하여 전분의 노화를 촉진 (Zhou et al., 2010a)시켜 원심분리에서 침전을 증가시키고자 하는 방법이며, 열수추출전 방법은 열수추출하기 전에 냉수에서 교반하여 전분입자를 미리 제거 (Zhou et al., 2010b)하고 나머지로 열수추출하는 방법임.

(a) 열수추출후 방법 (실험실 규모에서는 성공, 대량생산에서는 실패한 실험)

- 실험실에서의 찾은 최적조건을 이용하여 대량생산조건에서 실시하였으나, 결과적으로 전분분리가 원활하지 않을 뿐만 아니라 disk type 연속원심분리기의 disk에 노화된 전분이 달라붙어 원심분리자체가 끝까지 되지 않았음.

㉕ 실험실 규모에서의 생산 (성공한 실험)

㉕ 실험실에서의 최적조건 (그림 45)

- 추출은 중규모추출기로 밀기울 1 kg에 물을 10 L 추가한 후 95 °C에서 1시간 추출하였음.
- 실험실에서는 여러 번에 걸친 실험을 통해 전분의 노화를 촉진하는 조건으로 추출 후 1) 원심분리를 실시할 통 (300 mL)에 옮기는 온도 [추출기의 온도가 95 °C일 때 바로 옮겨 담거나 (그림의 2) 또는 추출기의 온도를 65 °C로 떨어뜨린 후 (그림의 8) 옮김], 원심분리할 추출물의 방치온도 [원심분리통에 옮겨 담은 즉시 원심분리하거나 (그림의 3) 또는 4 °C (그림 6)이나 25 °C (상온) (그림의 7)에서 밤새도록 (O/N) 방치한 후 원심분리를 실시] 및 원심분리할 온도 [4 °C (그림의 4) 또는 25 °C (그림의 5)] 등의 변수에 대해 실험을 실시하였음.

㉖ 실험결과 (그림 45)

- 여러 가지 조건 중에서 전분이 가장 많이 제거되는 공정은 그림 26에서 두껍게 그린 화살표의 방향이었음; 즉, 원심분리를 실시할 통 (300 mL)에 옮기는 온도를 65 °C로 한 후, 4 °C에서 밤새도록 추출물을 방치하고, 마지막으로 4 °C에서 원심분리를 실시하는 공정이었음.
- 이러한 공정을 거치고 나면 3개의 층 (상등액층, 전분층 및 밀겉질이 주를 이루는 침전층)으로 구분이 되었으며, 이 중 상등액층을 건조한 결과 추출물 300 mL 당 약 2.4 g이 얻어져 그 수율이 약 8%였으며, 지표성분인 ara의 함량은 약 2.6%였음.

㉗ 결론

- 얻어진 수율이 이제까지 얻어진 것 중에 가장 낮은 반면에 지표성분의 함량은 적절하여 대량생산을 시도할 만한 가치가 있음.

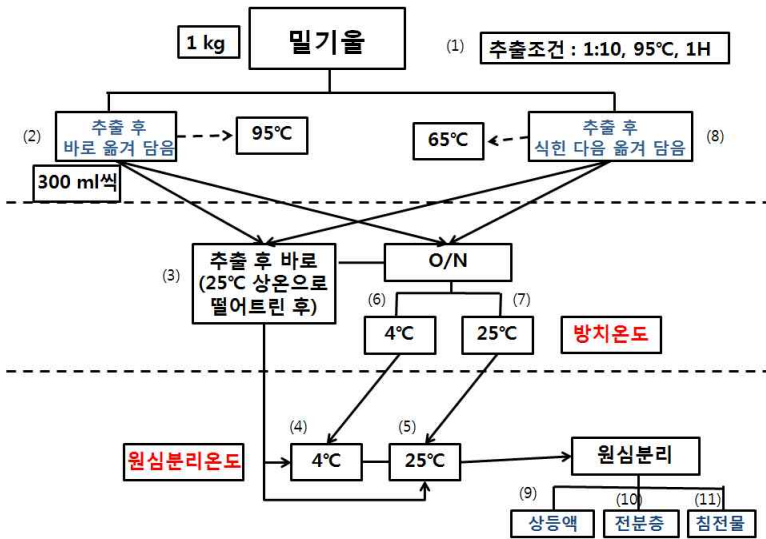


그림 45. 열수추출 후 전분제거 공정의 개략도 (실험실 규모)

㉑ 실험실에서의 최적조건을 활용한 대량생산 시도 (실패한 실험)

㉒ 대량생산 조건

○ 실험실에서의 최적조건을 이용하여 500 L 대량추출기에서 밀기울로부터 추출을 시도하였음. 이를 위해 추출 후 상온으로 식히거나 또는 밤새도록 냉실에 방치한 후 disk type 연속원심분리기로 원심분리를 실시하였음.

㉓ 실험결과

○ 원심분리가 끝나기 전에 호화된 전분 등으로 인해 연속원심분리기가 작동하지 않아 실패하였음.

㉔ 결론

○ 열수추출후 전분을 제거하는 방법 (냉장여부와 상관없이)은 대량생산에서는 적절하지 못하였음.

(b) 열수추출전 방법 (실험실 규모 및 대규모 생산 모두에서 성공한 실험)

o 열수추출후 연속원심분리에 의해 전분을 제거하는 것은 어려우므로 열수추출전에 전분입자를 미리 제거하는 방법을 도입하기로 하였음. 이것이 가능한 이유는 밀에서의 전분은 입자형태로 저장되어 있어 연속원심분리기로도 그 분리가 가능하기 때문임 (Van Der Borgh et al., 2005).

㉠ 개략적인 추출공정

o 실험실 규모나 대규모에서의 냉수추출에 의해 전분을 밀껍질로부터 분리하고 (Zhou et al., 2010b), 이 전분을 원심분리에 의해 미리 제거하고 난 후 열수추출하는 과정의 전체적인 개략도는 그림 46과 같음. 이를 크게 나누면 냉수추출에 의해 전분을 제거하는 과정 (1-11)과 열수추출하는 과정 (12-18)으로 나눌 수 있지만, 세부적인 공정은 실제 생산을 시도하면서 일부 변경될 수 있음.

㉡ 냉수추출에 의한 전분제거과정

o 먼저 구매한 밀기울 (그림의 1)에서 체 (250 μm)를 이용하여 (그림의 2) 전분을 포함한 가는 입자를 제거하였음 (그림의 3).

o 가는 밀가루가 제거된 밀기울 (그림의 4)을 냉수로 교반하면서 추출하고 (그림의 5) 나온 추출물을 체로 걸러 (그림 6) 밀껍질을 포함하는 잔유물 (그림의 7)과 전분을 포함하는 여과액 (그림의 8)을 얻었음.

o 이 여과액을 다시 원심분리하여 (그림의 9) 전분을 포함한 침전물을 제거하고 (그림 10) 남은 상등액 (그림의 11)을 얻었음.

㉢ 열수추출에 의한 건조물 생산

o 그림 7과 11에서 얻어진 잔유물과 상등액을 추출기에 넣고 열수추출 (95 °C, 1시간)을 실시하였음.

o 추출물 전체를 체 (250 μm)로 걸러 (그림의 13) 밀껍질인 잔유물 (그림의 14)을 제거한 후 여과액 (열수추출물) (그림의 15)을 얻음.

o 이 여과액을 다시 원심분리하고 농축한 후 (그림의 16) 건조하여 (그림의 17) 건조물 (그림의 18)을 얻음.

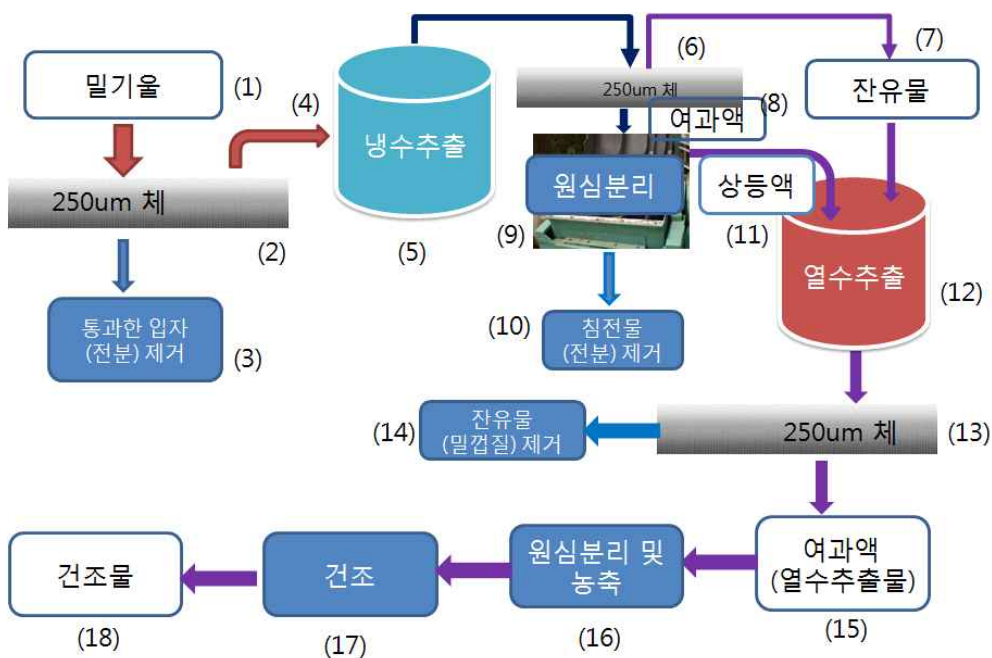


그림 46. 열수추출 전 전분제거 공정의 개략도 (대규모)

㉞ 실험실에서의 최적조건 선정

- o 실험실에서 열수추출전 전분을 가장 많이 제거하는 최적공정을 찾기 위해 그림 46에서 사용한 체 (sieve)는 실험실용, 냉수추출은 비이커를 이용하여 100 g의 밀기울에 적절한 양의 냉수 (4 °C)를 추가한 후 magnetic bar로 교반하면서 추출하였으며, 원심분리는 실험실용 원심분리기 (batch type)로 수행되었음.
- o 열수추출은 잔유물 (7)과 상등액 (11)을 넣고 95 °C에서 1시간 끓인 후 체로 거르고 원심분리하였으며, 이 때 얻어진 상등액을 농축하지 않고 그대로 열풍건조하였음.
- o 최적조건을 찾기 위해 다음과 같은 실험들이 이루어졌음.

㉟ 전분제거 가능성 확인 및 재추출이 필요한지의 여부 조사 (그림 47)

- o 냉수로 추출하는 경우 전분을 제거하는 것이 가능한지와 일단 추출을 한 후 얻은 잔유물을 재추출하여 전분을 제거하는 것이 필요한지 여부를 조사하였음.

i) 실험방법

a. 밀기울을 체로 거른 후 잔유물을 얻었음 (그림의 1)

- A밀의 밀기울 (2012년도산)을 250 µm 체로 걸러 100 g을 확보하였음.

b. 밀기울 잔유물의 교반하여 추출물 얻었음 (그림의 2)

- 밀기울 100 g씩을 1 L 비이커에 1,000 ml의 냉수를 넣고 magnetic stirring bar로 2시간 동안 교반하였음.

- 냉수의 온도는 4도로 유지하였음.

c. 추출물을 체로 걸러 여과액과 잔유물을 얻었음

- 추출물을 250 µm 체로 걸러 내었음 (그림의 3)

- 이 때 체로 걸러 여과액 (그림의 4)과 잔유물 (그림의 5)을 얻었음.

- 이 중 여과액 (4)을 원심분리한 후 얻은 침전물을 열풍건조한 건조물 (그림의 6) (침전물 자체의 무게는 23.6 g; 건조 후 무게는 12.6 g)과 상등액 (그림의 7)을 얻었음.

- 한편 잔유물 (그림의 5)는 1,000 ml의 물로 3번 반복하여 씻어 내어 (그림의 8) 여과액 (그림의 9)과 잔유물 (그림의 10)을 얻었음. 이 여과액을 원심분리 (4도, 20분) (그림의 11)하여 침전물 (그림의 12) (건조 전의 무게 8.7 g; 건조 후 무게 3.4 g)과 상등액 (그림의 13)을 얻었음.

d. 재추출 (2차 추출)

- 잔유물 (그림의 10)을 다시 새로운 물 1 L로 추출을 시도하였음 (그림의 14; 파란색 화살표).

- 재추출의 여과액 (그림의 4): 재추출한 경우에 침전물은 건조 전 6.9 g; 건조 후 2.7 g이 얻어졌음.

- 재추출의 잔유물 여과 침전물 (그림의 12): 침전물은 건조 전 4.4 g, 건조 후 0.8 g이 얻어졌음.

- 재추출 후 잔유물 (그림의 10): 잔유물의 건조 전 무게는 294 g, 건조 후 무게는 45 g이었음.

ii) 실험결과

a. 1차 추출

- 여과로 제거되는 전분의 양: 12.6 g (여과액 4의 침전물) + 3.4 g (여과액 9의 침전물) = 16 g

b. 2차 추출

- 잔유물 (그림의 10): 건조 후 약 45 g이 얻어졌음.

- 여과로 제거되는 전분의 양: 2.7 g (여과액 4의 침전물) + 0.8 g (여과액 9의 침전물) = 3.3 g

iii) 결론

- 전분의 제거효율: 전체 전분 중 1차에서 16 g 제거되었음 (초기 밀기울의 16%).
- 재추출의 필요성: 재추출시 제거되는 침전물이 3.3 g으로 1차 추출에 비해 20% 정도 밖에 되지 않아 재추출이 필요하지 않음.

㉔ 실제 열수추출에 적용 (그림 48)

o 냉수추출로 전분이 제거되는 가능성을 확인한 후 실제 열수추출에 까지 적용하여 수율을 확인하고자 하였음. 이를 위해 초기 투입되거나 씻을 때 사용하는 물의 양 (10:1)이 너무 많으면 건조비용이 증가하므로 이를 줄이기 위해 물의 양의 5:1로 실시하였음.

㉕ 실험방법

a. 밀기울을 체로 거른 후 잔유물을 얻었음 (그림의 1)

- A밀의 밀기울 (2012년도산)을 250 μm 체로 걸러 100 g을 확보하였음.

b. 밀기울 잔유물의 교반하여 추출물 얻었음 (그림의 2)

- 밀기울 100 g씩을 1 L 비이커에 500 ml의 냉수를 넣고 magnetic stirring bar로 2시간 동안 교반하였음.

- 냉수의 온도는 4도로 유지하였음.

c. 추출물을 체로 걸러 여과액과 잔유물을 얻었음

- 추출물을 250 μm 체로 걸러 내었음 (그림의 3)

- 이 때 체로 걸러 여과액 (그림의 4)과 잔유물 (그림의 5)을 얻었음.

- 이 중 여과액 (4)을 원심분리 (그림의 6)한 후 얻은 침전물을 열풍건조한 건조물 (그림의 7) (침전물 자체의 무게는 29.0 g; 건조 후 무게는 16.5 g)과 상등액 (그림의 8)을 얻었음.

- 한편 잔유물 (그림의 5)을 500 ml의 물로 3번 반복하여 씻어 내어 (그림의 9) 여과액 (그림의 10)과 잔유물 (그림의 11)을 얻었음. 이 여과액을 원심분리 (4도, 20분) (그림의 6)하여 침전물 (그림의 12) (건조 전의 무게 7.5 g; 건조 후 무게 3.7 g)과 상등액 (그림의 13)을 얻었음.

d. 열수추출 (그림의 14)

- 상등액을 합쳐 (그림의 8+13) 잔유물 (그림의 11)과 함께 열수추출 (그림의 14)하였음.

- 열수추출 후 체로 걸러 (그림의 15) 여과액 (그림의 16)과 잔유물 (그림의 17)을 얻었음.

- 이 여과액 (16)을 원심분리하여 상등액 (그림의 18) (건조 전 무게 453 g; 건조 후 무게 10 g)과 침전물 (그림의 19) (건조 전 무게 33.1 g; 건조 후 무게 3.1 g)를 얻었음.

- 한편, 잔유물 (17)을 500 ml의 끓인 물로 3번 씻은 후 (그림의 20) 체로 거른 후 남은 잔유물은 건조 전 무게가 295 g; 건조 후 무게가 49 g이었음. 그리고, 여과액 (그림의 21)을 원심분리하여 상등액 (그림의 22) (건조 전 무게 487 g; 건조 후 무게 3 g)과 침전물 (그림의 23) (건조 전 무게 9.4 g; 건조 후 무게 0.7 g)을 얻었음.

㉖ 실험결과

a. 냉수추출의 침전물 (7과 12)

- 여과로 제거되는 전분의 양: 16.5 g (여과액 4의 침전물) + 3.7 g (여과액 7의 침전물) = 20.2 g

b. 열수추출의 잔유물 및 상등액

- 잔유물 (그림의 17): 건조 후 약 49 g이 얻어졌음.
- 여과액: 추출물을 체로 거른 1차 상등액 (그림 16)과 2차 상등액 (그림의 22)으로부터 얻어진 양은 각각 10 g과 3 g이었음. 이로부터 **상등액은 여전히 약 10 g 정도가 확보**되었으며 (실험실에서의 원심분리는 분리능이 좋아 전분을 최대한 제거할 수 있고 이 양이 대략 10 g 정도이나, 연속원심분리에서는 이것이 제거되지 않아 호화된 양만큼 늘어나게 됨), 2차로 씻어내지 않았을 때의 손실이 약 30%였음.

㉔ 결론

- 전분의 제거효율: 전체 전분 중 1차에서 20 g 제거되어 (초기 투여량의 20%), 목적이 달성되었음. 따라서 추출에 사용되는 물의 양과 냉수추출후 잔유물을 씻을 때 사용하는 물의 양도 5:1이면 충분함.
- 열수추출 후 끓는 물로 씻을 필요성: 30%의 손실을 감안할 때 필요없음.
- 확보되는 상등액: 1차로만 확보할 경우 약 10 g로 약 10%가 얻어져 전분이 최대로 제거되었을 때와 동일한 양임. 따라서 본 추출방법이 적절하다는 것을 보여 줌.

㉕ 공정의 최적화 (교반시간) (그림 49)

- o 최적화가 필요한 부분은 냉수추출시 조사할 조건은 교반 (교반의 필요유무, 교반시간)과 씻는 물의 양 등이며, 우선 교반조건을 조사하였음.
- o 교반을 하지 않고 추출을 하는 경우에 제거되는 전분의 양은 현저히 감소하였음 (Data not shown). 따라서 교반은 필요하였음.
- o 교반시간을 알아보기 위해 교반시간 1, 2 및 3시간으로 하여 조사하였음.

㉖ 실험방법

- a. 밀기울을 체로 거른 후 잔유물을 얻었음 (그림의 1)
 - A밀의 밀기울 (2012년도산)을 250 μm 체로 걸러 100 g을 확보하였음.
- b. 밀기울 잔유물에 대해 시간대별 (1, 2, 3시간)로 교반하여 추출물 얻었음 (그림의 2, 3, 4)
 - 밀기울 100 g씩을 1 L 비이커에 500 ml의 냉수를 넣고 magnetic stirring bar로 1 (그림의 2), 2 (그림의 3), 3 (그림의 4)시간 동안 교반하였음.
 - 냉수의 온도는 4도로 유지하였음.
- c. 추출물을 체로 걸러 여과액과 잔유물을 얻었음
 - 추출물을 250 μm 체로 걸러 내었음 (그림의 5).
 - 이 때 체로 걸러 여과액 (그림의 6)과 잔유물 (그림의 7)을 얻었음.
 - 이 중 여과액 (6)을 원심분리한 후 얻은 침전물을 열풍건조한 건조물 (그림의 8)과 상등액건조물 (그림의 9)을 얻었음.
 - 한편 잔유물 (그림의 7)은 500 ml의 물로 2번 반복하여 씻어 내어 (그림의 10) 여과액 (그림의 11)과 잔유물 (그림의 12)을 얻었음. 이 여과액을 원심분리 (4도, 20분) (그림의 12)하여 침전물 건조물 (그림의 13)과 상등액 건조물 (그림의 14)을 얻었음.

㉗ 실험결과

- a. 침전물 (그림의 8과 13)
 - 제거되는 전분의 양 (그림의 8+13): 1시간 (18.8 g), 2시간 (19.6 g), 3시간 (21.2 g)
- b. 상등액 (그림의 9와 14)

- 얻어지는 상등액의 양 (그림의 9+14): 1시간 (9.6 g), 2시간 (10 g), 3시간 (11.1 g)

c. 잔유물 (그림의 12)

- 얻어지는 잔유물의 양 (그림의 12): 1시간 (61.8 g), 2시간 (61.5 g), 3시간 (59.3 g)

㉔ 결론

- 교반시간에 따른 전분의 제거효율: 시간대별로 제거되는 전분의 양, 얻어지는 상등액의 양 및 잔유물의 양에 큰 차이를 보이지 않음. 따라서 교반 1시간으로도 충분하였음.

- 교반시간을 1시간으로 하였을 때 제거되는 전분의 양은 약 19 g으로 약 19%가 제거되었음.

- 교반시간을 1시간으로 하였을 때 전분의 양 (약 19 g), 상등액의 양 (약 10 g) 및 잔유물의 양 (약 62 g)을 모두 합치면 91 g으로 처음 투입한 100 g의 90% 이상이 회수되는 것을 알 수 있었음.

㉕ 공정의 최적화 (씻는 물의 양) (그림 50)

o 최적화가 필요한 마지막 부분으로 냉수추출후 잔유물을 씻는 물의 양에 대한 정보를 확보하기 위해 250과 500 mL 물로 각각 2번 씻는 실험을 실시하였음 (교반시간은 1시간).

o 공정은 열수추출까지 실시하되 밀기울 (그림의 11)을 넣지 않고 실시하였음.

o 이에 덧붙여 열수추출후 제거되는 전분의 양이 증가하는지를 조사하기 위해 열수추출물을 4 °C에서 밤새 방치하였음.

㉖ 실험방법

a. 밀기울을 체로 거른 후 잔유물을 얻었음 (그림의 1)

- A밀의 밀기울 (2012년도산)을 250 μm 체로 걸러 200 g을 확보하였음.

b. 밀기울 잔유물의 교반하여 추출물 얻었음 (최적조건) (그림의 2)

- 밀기울 100 g씩을 1 L 비이커에 500 ml의 냉수를 넣고 magnetic stirring bar로 1시간 동안 교반하였음.

- 냉수의 온도는 4 °C도로 유지하였음.

c. 추출물을 체로 걸러 여과액과 잔유물을 얻었음.

- 추출물을 250 μm 체로 걸러 내었음 (그림의 3)

- 이 때 체로 걸러 여과액 (그림의 4)과 잔유물 (그림의 5)을 얻었음.

- 이 중 여과액 (4)을 원심분리 (그림의 6)한 후 얻은 침전물을 열풍건조한 건조물 (그림의 7)과 상등액 (그림의 8)을 얻었음 (250 ml와 500 ml로 잔유물을 씻는 경우에 각각).

- 한편 잔유물 (그림의 5)는 250 ml 또는 500 ml의 물로 2번 반복하여 씻어 내어 (그림의 9) 여과액 (그림의 10)과 잔유물건조물 (그림의 11)을 각각 얻었음. 이 여과액을 원심분리 (4도, 20분) (그림의 6)하여 침전물건조물 (그림의 12)과 상등액 (그림의 13)을 각각 얻었음.

d. 열수추출 (그림의 14)

- 상등액을 합쳐 (그림의 8+13) 열수추출 (그림의 14)한 후 4도에서 O/N하였음 (그림의 15).

- 이 추출물 (15)을 원심분리하여 상등액건조물 (그림의 16)과 침전물건조물 (그림의 17)을 얻었음.

㉗ 실험결과

a. 냉수추출의 침전물 (7과 12)

- 1차로 여과된 후 침전물 (그림의 7)은 250 ml와 500 ml로 씻을 때 모두 동일 (각각 13.7 및 13.8 g)하였음.

- 아울러 잔유물 (5)을 250 ml과 500 ml로 2번 씻는 경우의 침전물 (12)은 모두 5.9 g으로 동일하였음.

b. 냉수추출후 열수추출 상등액 (그림의 16)

- 열수추출 후 최종 상등액은 250 ml로 씻거나 500 ml로 씻는 경우를 막론하고 상등액도 동일하였음 (8.7 & 9.0 g).

c. 냉수추출후 열수추출 침전물 (그림의 17)

- 열수추출 후 최종 침전물도 씻는 물의 양에 상관이 없었음.

㉔ 결론

- 잔유물을 250 ml나 500 ml로 씻는 경우 모두 동일하여 씻는 물의 양의 영향이 없었음.

- 이를 근거로 500 ml로 1회 씻어도 무방할 것으로 사료됨 (2회 씻으면 공정시간을 길어져 생산단가가 높아짐).

(c) 실험실에서 확립된 최적조건 (성공한 실험) (그림 51)

o 이제까지 실험실에서 찾아진 최적을 조건을 요약하면 그림 51과 같음.

o 실험실 규모나 대량규모에서의 냉수추출에 의해 전분을 미리 제거하고 난 후 열수추출하는 과정의 전체적인 개략도는 그림 51과 같음. 크게 나누면 냉수추출에 의해 전분을 제거하는 과정 (1-13)과 열수추출하는 과정 (14-18)으로 나눌 수 있음. 하지만 세부적인 공정은 실제 생산을 시도하면서 일부 변경될 수 있음.

㉑ 냉수추출에 의한 전분제거과정

o 먼저 구매한 밀기울 (그림의 1)에서 체 (250 μ m)를 이용하여 전분을 포함한 가는 입자를 제거함.

o 가는 밀가루가 제거된 밀기울 (잔유물) (그림의 2)을 냉수로 교반하면서 추출하고 (물:밀기울 = 5:1, 4도 1시간) 나온 추출물을 체로 걸러 (그림 3) 전분을 포함하는 여과액 (그림의 4)과 밀껍질을 포함하는 잔유물 (그림의 5)을 얻음.

o 이 여과액 (그림의 4)을 다시 원심분리하여 전분을 포함한 침전물을 제거하고 (그림 7) 남은 상등액 (그림의 8)을 얻음.

o 한편, 잔유물 (그림의 5)를 물 (4도)로 (5:1)로 1번 씻어 얻은 여과액을 다시 원심분리하여 (그림의 6) 전분을 포함한 침전물을 제거하고 (그림 12) 남은 상등액 (그림의 13)을 얻음.

㉒ 열수추출에 의한 건조물 생산

o 그림 8과 13에서 얻어진 상등액과 잔유물 (그림의 11)을 추출기에 넣고 열수추출 (95 $^{\circ}$ C, 1시간)을 실시함 (그림의 14).

o 추출물 전체를 체 (250 μ m)로 걸러 (그림의 15) 밀껍질인 잔유물 (그림의 15)을 제거한 후 여과액 (열수추출물) (그림의 16)을 얻음.

o 이 여과액을 다시 원심분리하여 침전물을 제거하고 (그림의 17) 얻은 상등액 농축한 후 (그림의 18) 건조하여 건조물 (그림의 19)을 얻음.

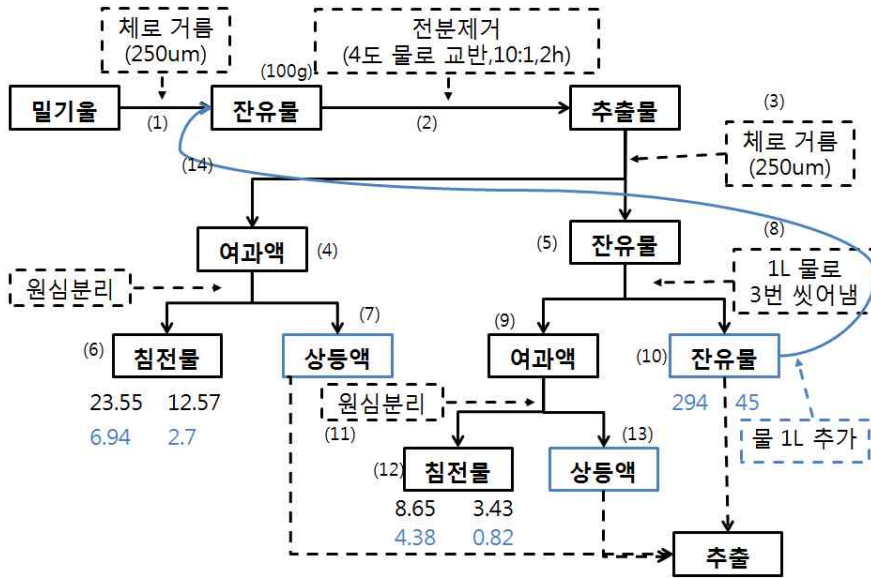


그림 47. 열수추출전 전분제거 가능성 확인 및 재추출이 필요한지의 여부 조사 (실험실 규모)

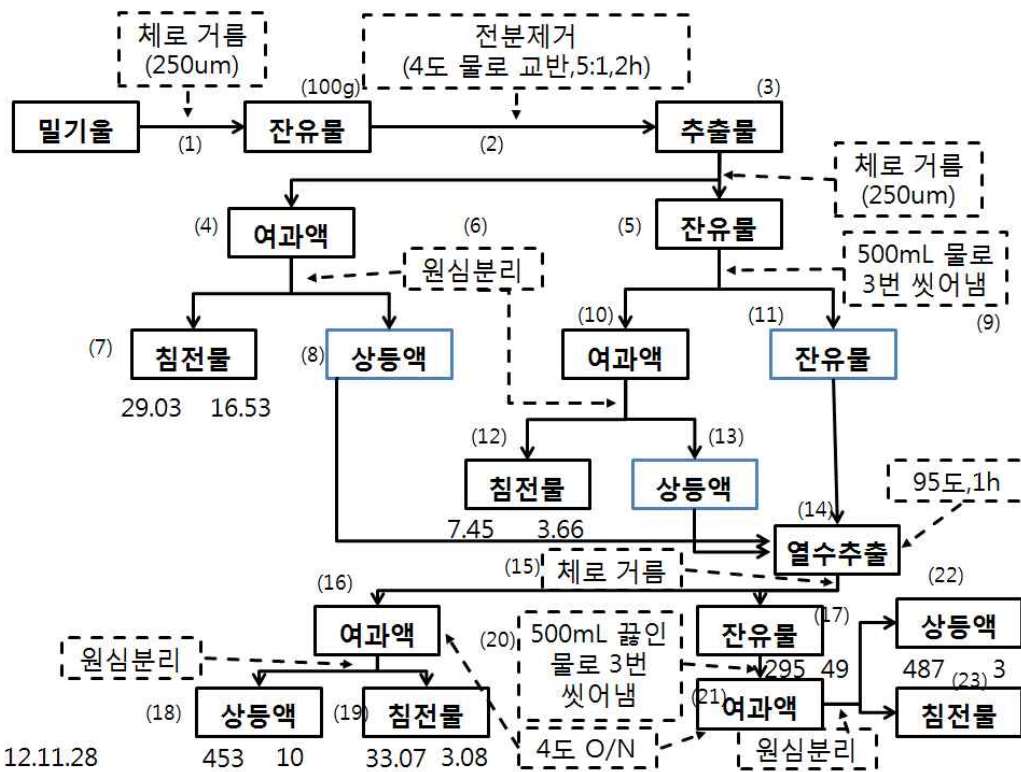


그림 48. 열수추출전 전분제거 가능성 확인 (실험실 규모에서 실제 열수추출 적용)

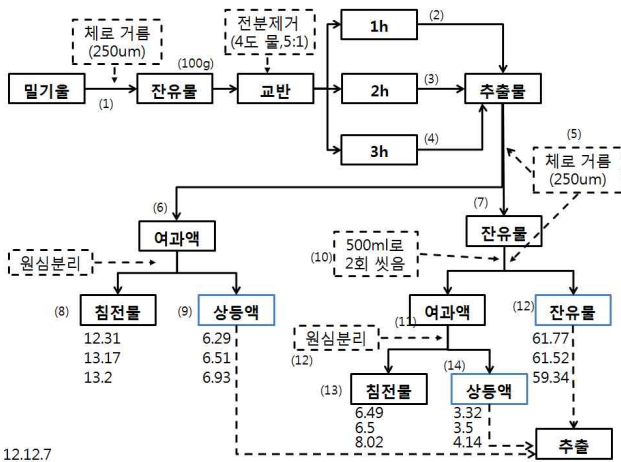


그림 49. 열수추출전 전분제거 공정의 최적화 (실험실 규모에서 교반시간 영향 조사)

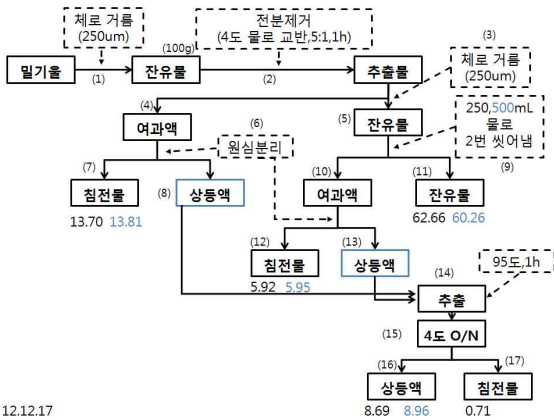


그림 50. 열수추출전 전분제거 공정의 최적화 (실험실 규모에서 씻는 물의 양 영향 조사)

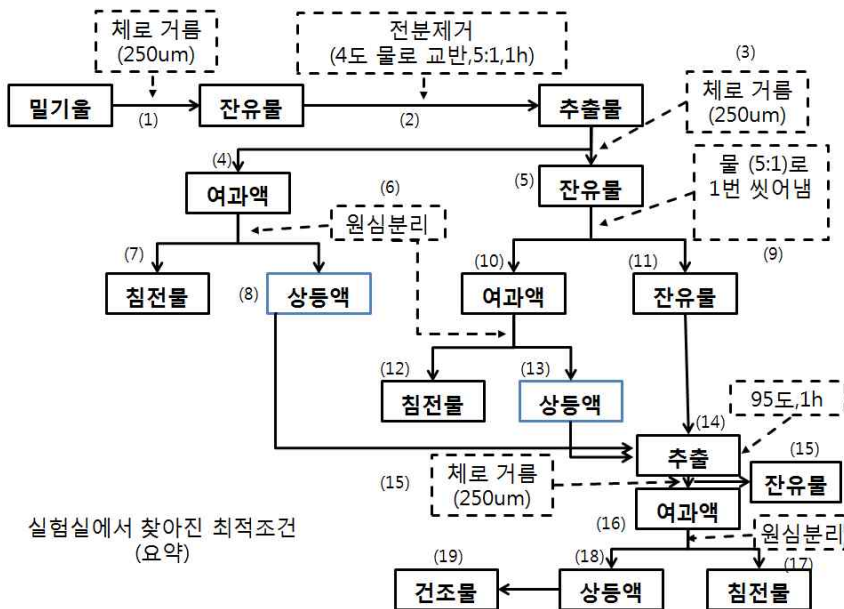


그림 51. 열수추출전 전분제거 공정의 최적조건 (실험실 규모)

- ㉔ 대량생산 공정의 개발 (원심분리시 disk type으로는 실패하였으나, 데칸터로는 성공하였음)
 - o 실험실에서 얻어진 최적공정 (그림 51)을 이용하여 대량생산공정을 시도하였음.
 - o 냉수추출후 전분을 제거하기 위한 연속원심분리기를 최초에는 disk type으로 시도하였으나 실패하여 최종적으로는 decanter type으로 성공하였음.

㉕ Disk type으로 대량생산 시도 (실패한 실험)

- o Disk type 연속원심분리기가 전분의 생산에서 이용될 수 있어 이를 사용하여 생산을 시도하였음.

i) 실험방법

- a. 밀기울을 체로 거른 후 잔유물을 얻었음 (그림 46의 1)
 - 밀기울 (약 50 kg)을 체 (250 μm)로 걸러 잔유물 40kg과 체에 빠져 나간 것 (4.1 kg)을 얻었음 (제거된 것은 $4.1/44.1 \times 100\%$) (체는 주문제작한 것)
- b. 밀기울 잔유물의 교반하여 추출물 얻었음 (그림 46의 5)
 - 밀기울 40 kg을 500 L 발효기에 200 L의 냉수를 넣고 200 rpm에서 1시간 동안 교반하였음.
 - 냉수의 온도는 7.2도로 시작하여 끝날 때에 7.8도까지 올라갔음.
- c. 추출물을 체로 걸러 여과액과 잔유물을 얻었음 (그림 46의 6, 7, 8)
 - 추출물을 250 μm 체로 걸러 내었음 (그림 46의 6).
 - 이 때 체로 걸러진 잔유물을 다시 1:5의 물로 씻어 내어 여과액을 얻고 이를 다시 합쳤음 (일단 체로 걸러 낸 것에 대해 밀기울의 무게를 어렵짐작을 한 후 1:5 정도로 씻어 냈음) (그림 46의 6).
 - 여과액으로부터 전분을 제거하기 위해 disk type 연속원심분리기 (Westfalia 제품)로 전분의 분리를 시도하였음 (그림 46의 8). 그런데, 약 200 L 정도 원심분리된 후 원심분리에 공급되지 않고 원심분리기가 멈춰버렸음 (전분입자들이 disk 사이에 응집이 일어나 분리가 되지 않았음).

ii) 실험결과

- a. 냉수추출에 의해 전분이 들어있는 여과액을 체로 걸러 확보하였으나, 이 여과액을 disk type으로 원심분리하여 전분을 제거하는 것은 실패하였음.

iii) 결론

- 여과액으로부터 원심분리에 의해 전분을 제거하는 방법으로 disk type 대신에 다른 방법을 고려하여야 함.
- 이를 위해 분리를 전문으로 하는 업체 (알파테크)를 방문하여 이 업체에서 보유하고 있는 소규모 disk type 연속원심분리기를 이용하여 시험생산을 실시한 결과 글루텐과 전분이 벽면에 붙어있어 disk type 연속원심분리기로 분리하는 것은 어려울 것으로 제안하였음.
- 이에 대한 대안으로 데칸터 연속원심분리기를 이용할 것을 제안하였음 (데칸터는 g 값이 적어 완전하게 분리되는 것은 어려울 것이므로 tubular type의 연속원심분리기를 추가하여 사용할 것을 제안하였음).

㉖ Decanter type으로 대량생산 시도 (성공한 실험)

- o 밀가루로부터 아라비노자일란의 생산에서 전분을 제거하기 위한 방법으로 데칸터 연속원심분리기와 tubular type 연속원심분리기가 이용된 문헌 (Faurot et al., 1995; Sayaslan, 2004)에 의거하여 이를 사용하여 생산을 시도하여 전분을 성공적으로 제거하고 인체시험에 필요한 시료를 확보하는데 성공하였

음.

o 이를 위해 시험생산용 데칸터의 이용 및 공정과정의 미세조정을 통해 대량생산을 위한 최적공정을 확립하였음.

i) 시험생산용 데칸터를 이용한 가능성의 조사 (그림 52)

o 최종적으로는 실험실에서 찾아진 조건을 대량생산공정에 도입하는 것이나 이 과정에서 생성되는 다른 추출물도 효능을 나타낼 수 있으므로 이의 생산까지도 고려하여 시험생산을 실시하였음 (그림 52).

- 냉수추출 후 전분제거 방법: 냉수추출 후 (그림 52의 3) 얻은 여과액 (그림 52의 5와 6)에서 전분을 제거하는 방법은 밤새도록 냉침하는 방법 (그림 52의 8)과 데칸터 (원심분리기)를 이용하여 강제로 분리하는 방법 (그림 52의 9)이 있으며 생산과정에서 이 두 방법도 비교하였음.

- 열수추출할 물질: 열수추출하는 물질은 전분을 제거하는 상등액 (그림 52의 5와 6) 자체를 열수추출하는 방법 (그림 52의 11과 15)과 이 상등액을 잔유물 (그림 52의 7)과 섞은 후 열수추출 (그림 52의 16)하는 방법이 있으며 생산과정에서 이 두 방법도 비교하였음.

(i) 실험방법

A. 실험방법의 요약

o 전분이 제거된 밀기울 (잔유물) 40 kg에 물을 5배를 넣은 후 (5:1), 500 L 교반기에서 약 10도 물에서 1시간 교반하였음 (그림 52의 2).

o 여과액 (그림 52의 5와 6)의 일부분을 냉침한 후 상등액을 열수추출하여 건조물을 얻었음 (그림 52의 8-10-11-12) (Procedure 2).

o 여과액 (그림 52의 5와 6)의 100 L를 시험용 데칸터로 처리한 후 얻어지는 상등액 (그림 52의 13)을 그 자체로 열수추출하여 건조물을 얻거나 (그림 52의 15) (Procedure 3) 또는 이 상등액을 잔유물 (그림 52의 7)과 섞은 후 열수추출 (그림 52의 16)한 후 상등액 (그림 52의 20)을 얻었음 (Procedure 4).

B. 구체적인 실험방법

a. 밀기울을 체로 거른 후 잔유물을 얻었음 (그림의 1)

o 동아원에서 A밀의 밀기울을 250 μm 체로 걸러서 가지고 옴.

b. 밀기울 잔유물의 교반하여 추출물 얻었음 (그림의 2, 3)

o 밀기울 40 kg을 500 L 발효기에 200 L의 냉수를 넣고 200 rpm에서 1시간 동안 교반하였음 (그림의 2).

o 냉수의 온도는 9.7도로 시작하여 끝날 때에 11.6도까지 올라갔음.

c. 추출물을 체로 걸러 여과액 (그림의 6)과 잔유물 (그림의 4)을 얻었음

o 추출물을 250 μm 체로 걸러 냈음 (그림의 3)

o 이 때 체로 걸러 여과액 (그림의 6)을 얻고 남은 잔유물 (그림의 4)을 다시 1:5의 물로 씻어 내어 여과액 (그림의 5)을 얻었음 (일단 체로 걸러 낸 것에 대해 밀기울의 무게를 어림잡작을 한 후 1:5 정도로 씻어 냈음).

o 발효기에 추출물을 남겨 놓은 채 잔유물을 씻은 관계로 중간에 발효기로부터 나오는 것이 파이프관을 막아 멈추어 버렸음 (다음에는 발효기로부터 모두 한 번에 빼 낸 후 씻어야 할 것임).

o 막히기 전까지 얻은 여과액 (5와6)이 160 L였으며, 잔유물 (그림의 7)은 35kg이었음.

d. 냉침 및 열수추출물

o 여과액의 일부분을 냉침을 시키고 (그림 8) 난 다음 날 상등액을 취하여 열수추출하고 (그림의 11) 원심분리 후 동결건조하였음 (3 L 건조하여 25 g 얻었음) ([Procedure 2](#)).

e. 데칸터와 원심분리이용 방법 (그림의 9이하)

o 데칸터를 이용 (그림의 9)하여 전분의 일부분을 제거하였음 [데칸터 제작업체인 부산의 부성 엔지니어링에서 이 업체가 보유한 시험용데칸터를 이용하였음]. (약 100L를 투여하여 약 85L의 상등액 (그림의 13)을 회수하였음).

- 이 상등액의 일부를 열수추출한 후 동결건조하였음 (그림의 15) (3 L 건조하여 32 g 얻었음) ([Procedure 3](#))

- 또한 이 상등액의 일부 (30L)를 잔유물 (그림의 7) (6.5kg)과 섞은 후 열수추출을 시행하였음 (그림의 16). 이 후 열수추출물을 70 도로 식힌 후 체 (250 um)로 걸러 여과액 (그림의 17)을 얻었음. 그리고 원심분리 (tubular)하여 상등액 (그림의 20)을 얻었음 ([Procedure 4](#)).

(ii) 실험결과

a. 건조물의 기억력개선 효능

o 이렇게 생산된 건조물이 기억력 개선에 영향을 미치는지를 수동회피실험을 통해 확인하였음 (그림 53) (구체적인 실험방법은 “2. 연구범위 및 연구수행 방법” 부분 참조). 그 결과 본 공정을 거쳐 생산된 것 ([Procedure 4](#))은 다른 공정 ([Procedure 2](#)와 [3](#)을 포함하는 공정방법들에 대한 설명은 figure legend 참조)에 비해 효능이 더 좋게 나타났음.

- Step-through latency time에서 먼저 정상군(SHAM)의 경우에 164.93 ± 54.86 초를 기록하였고, 스코폴라민 대조군(SCO)은 28.85 ± 30.50 초를 기록하여 136.11초의 차이를 보여 줌. 이로부터 스코폴라민 대조군에서 기억력 손상을 확실히 유발한 것으로 판단됨. 한편, 실험군 (SCO + 공정 1-5)의 경우 step-through latency time에서 각각 17.06 ± 12.03 , 31.74 ± 47.07 , 91.63 ± 34.83 , 138.18 ± 34.97 ([Procedure 4](#)), 57.98 ± 64.25 초를 기록하여 본 공정에 의해 생산된 건조물 ([Procedure 4](#))로 얻어진 추출물의 투여가 스코폴라민으로 인해 손상된 기억력의 회복에 가장 유의한 효과가 있음을 확인하였음.

b. 건조물의 조성

- 열수추출후 동결건조하여 얻은 건조물 (procedure 4)의 조성을 분석한 결과 다음과 같은 결과를 얻었음.

* ara: 2.8%, xyl: 4.3%, gal: 2.3%, rib: 0.36%, glc: 40.0% (alditol acetate법) (셀룰로스의 포도당은 분석되지 않음).

* β -glucan: 3.4% (효소법에 의한 분석)

(iii) 결론

a. 냉수추출 후 데칸터에 의해 전분을 제거하고 난 후 밀집질과 함께 열수추출하는 공정 (procedure 4)는, 효능 (기억력개선)과 지표성분인 ara의 함량 (2.8%) 측면에서 가능성이 있었음. 따라서 대량생산공정을 시도해 볼만한 가치가 있음.

㉔ 인체시험용 시료의 대량생산 (대량생산용 데칸터 이용) (최적화된 공정)

- o 선행연구결과를 근거로 대량생산용 데칸터 (춘천바이오산업진흥원)를 이용하여 생산을 시도하여 최적 조건을 확립하였음 (그림 54) (102쪽). 이 방법은 기본적으로 그림 54와 동일하나 몇 가지 점에서 차이 점을 나타냄.
 - 여과액의 확보: 냉수추출물을 얻고 체로 걸러 (그림 54의 5) 1차로 여과액을 얻은 후 이 잔유물 (그림 54의 4)을 바로 다시 냉수로 씻어 여과액 전체 (그림 54의 5)를 확보하였음.
 - 데칸터 원심분리후 tubular 원심분리: 데칸터로 원심분리후 (그림 54의 7) 얻은 상등액 (그림 54의 8)을 분리능이 좋은 tubular type 연속원심분리기로 다시 전분을 분리하였으나 그 양이 적어 (약 150 g) 생략하였음.
 - 열수추출후 밀껍질 제거: 원래는 열수추출 후 여과액 (그림 54의 11)을 그대로 사용하였으나 체로 거르는 과정에서 밀껍질의 일부가 들어올 수 있어 이를 방지하기 위해 건조하기 전 구멍이 작은 체 (125 μm)로 이를 걸러 내었음 (그림 54의 13). 하지만 이 과정에서 걸러지는 양은 많지 않았음 (약 40 g).
 - 감압농축: 건조를 하기 전 감압농축 단계를 도입하여 건조시킬 부피를 줄였음 (그림 54의 15).
 - 분무건조: 동결건조는 건조비용이 높으므로 이를 줄이기 위해 생산단가가 보다 싼 분무건조를 시도하여 가능성을 확인하여 이를 이용하여 생산하였음 (그림 54의 17).

㉕ 실험방법

- a. 밀기울을 체로 거른 후 잔유물을 얻었음 (그림 54의 1)
 - 동아원에서 A밀의 밀기울을 250 μm 체로 걸러서 가지고 옴.
- b. 밀기울 잔유물을 교반하여 추출물 얻었음 (그림 54의 2)
 - 밀기울 50 kg을 500 L 발효기에 250 L의 냉수를 넣고 70 rpm에서 1시간 동안 교반하였음.
 - 냉수의 온도는 생산시기에 따라 8-28 $^{\circ}\text{C}$ 에서 실시되었음.
- c. 추출물을 체로 걸러 여과액과 잔유물을 얻었음
 - 추출물을 250 μm 체로 걸러 냈음 (그림 54의 3)
 - 교반된 추출물을 체 (250 μm)로 밀껍질을 걸러내 여과액을 1차로 얻고, 이 밀껍질에 250 L의 냉수로 1회 씻어 합쳐진 전체 여과액을 얻었음 (용액 1) (그림 54의 5). 그리고 체에 남은 잔유물 (밀껍질 1)를 얻었음 (그림 54의 6).
- d. 데칸터를 이용하여 전분을 제거하였음 (그림 54의 7, 8, 9)
 - 용액 1을 데칸터 (Tomoe Eng Co LTD, 약 4000 rpm)를 이용하여 시간당 얻어지는 상등액의 양이 약 200 L/hr가 되는 조건에서 원심분리를 실시하여 상등액 (상등액 1)을 얻었음 (그림 54의 8).
 - 그리고, 나머지 침전물 (잔사 1)을 얻었음.
- e. 열수추출 및 농축을 실시하였음 (그림 54의 10-15)
 - 밀껍질 1과 상등액 1을 추출기 (500 L)에 함께 넣고 95 $^{\circ}\text{C}$, 1h동안 70 rpm에서 교반하면서 추출하였음 (그림 54의 10).
 - 95 $^{\circ}\text{C}$ 의 추출물을 체로 거르고 여과액 (용액 2) (그림 54의 11)과 잔유물 (밀껍질 2) (그림 54의 12)을 얻고, 이 용액 2를 다시 체 (125 μm)로 걸러 여과액 (그림 54의 13)과 잔유물 (잔사 2) (그림 14)를 얻었음.
 - 얻은 여과액 (그림 54의 13)을 감압농축 (연속) (그림 54의 15)을 실시하여 농축액 (상등액 2)을 얻었음.

f. 분무건조를 실시하였음 (그림 54의 17)

- 농축액 (상등액 2)을 분무건조하여 건조물을 얻었음 (그림 54의 18).
- 이 건조물은 분무건조기 아래에 떨어지는 분말 (정상)과 분무되지 않고 분무건조기의 벽면에 붙은 분말 (air)로 나누어 확보하였음.

㉠ 실험결과

a. 생산공정 과정상에서 얻어진 결과

- o 최적공정이 확립될 때까지를 포함하여 데칸터를 이용한 생산에서는 총 6번의 대량생산 (500 L 추출기 이용)이 이루어졌으며, 이 중에서 최적공정이 확립된 후 이루어진 4번의 값을 평균한 결과를 요약하면 표 37과 같음.

b. 데칸터의 효율

- o 데칸터에 의해 평균 5.5 kg의 전분을 포함한 침전물이 제거되었으며 (잔사 1, 건조물), 이를 제거하고 남은 상등액 1과 밀겉질 1을 열수추출하여 얻은 용액 2의 건조물의 양이 8.3 kg인 것을 감안하면 전체 추출가능한 양 (5.5+8.3)의 약 40%가 데칸터에 의해 제거되었음. 이렇게 데칸터에 의해 전분이 제거된 덕분에 지표성분인 ara의 함량이 냉수추출 한 용액 (용액 1)에서의 1.1%인데 반해 전분을 제거하고 남은 데칸터의 상등액 (상등액 1)에서의 ara의 함량이 2.0%로 약 2배 정도 증가하였음. 이를 종합하면 데칸터를 이용함으로써 전분이 충분하게 제거되었음을 알 수 있음.

c. 지표성분의 변화 (표 37 참조)

- 지표성분인 ara의 함량은 b에서도 언급한 바와 같이 데칸터로 전분이 제거될 때 2배 증가하며, 열수추출 때 밀기울에서 추출되어 나온 ara에 의해 약 20% (2.0에서 2.38%로) 증가하였음. 그 이후로는 단순 농축 및 건조단계이므로 큰 변화가 관찰되지 않았음.
- 분무건조물의 ara의 지표성분은 정상이나 air가 모두 동일하였으며, 그 값은 약 2.5였음. 이러한 결과는 밀기울을 실험실에서 얻은 값인 3.5%보다는 낮지만 전분이 제거되지 않았을 때 얻을 수 있는 1.1%보다는 높았음.

d. 최종수율 (표 37 참조)

- 분무건조에 의해 얻어지는 전체 양 (정상 + air)은 평균 6.6 kg으로 그 수율은 약 13%였으며, 이 중에서 정상으로 얻은 것이 평균 3.9 kg, 벽면에 붙은 air로 얻은 것이 평균 2.7 kg이었음.
- 하지만 개별적으로 보면 그 양이 생산시기별로 전체 양은 5.4, 6, 7.4, 7.4 kg이고, 이 중에서 정상은 4.5, 5, 2.8, 3.2 kg인 반면에 air는 0.85, 1.0, 4.6 및 4.2 kg이었음 (표 38). 이러한 결과는 전체의 양은 후반부로 갈수록 그 양이 약간씩 증가하는 반면에 정상은 반대로 감소하였음. 이는 냉수추출시 온도가 15도, 15도 (연이어 이틀시행), 25도 및 28도 (연이어 이틀시행) 이어서 냉수추출온도가 높아 이 과정에서 전분이 많이 용해되어 일어나 전체 양은 증가하고, 아울러 전분의 양이 많아지면 분무시 점도로 인해 분무가 되지 않고 원심력에 의해 벽면에 달라붙게 되어 발생한 것으로 사료됨. 향후 생산에서는 냉수의 온도를 낮게 유지하는 것이 중요할 것임.

e. 건조물의 효능

- 이 건조물의 효능 조사하기 위해 분무건조를 한 정상과 air 및 감압농축한 후 동결건조한 것에 대해 그 효능을 조사하였음 (3가지 시료 모두에 대해 지표성분인 ara의 함량은 동일하였

음) (그림 55).

- 실험결과 그림 55에 나타내는 바와 같이 step-through latency time에서 정상군(SHAM)의 경우에 190.11 ± 31.38 초를 기록하였고, 스코폴라민 대조군(SCO)은 42.51 ± 8.25 초를 기록하여 147.6초의 차이를 보여 주었음. 한편, 실험군(SCO + 공정4A-4C) 800 mg/kg 투여의 경우 step-through latency time에서 각각 137.34 ± 36.74 , 60.42 ± 19.05 , 128.68 ± 21.98 초를 기록하여 공정4A로 얻어진 추출물 (정상)이 스코폴라민으로 인해 손상된 기억력의 회복에 가장 유의한 효과가 있음을 확인하였음. 또한 분무건조 중 정상 (4A)은 800 mg/kg/day뿐만 아니라 400 mg/kg/day에서도 효능을 수동회피실험뿐만 아니라 물미로 실험서도 관찰되었음. 이는 동일한 분무건조물이더라도 정상과 air는 지표성분의 함량은 동일하였으나 그 효능에서는 차이를 나타내었으며 이는 air인 것이 벽면에 묻어서 오래 방치됨으로써 열변성이 일어나 효능이 줄어들었을 것으로 사료됨. 이를 근거로 분무건조물 중에서도 “정상”에 해당하는 것만 “신청원료”로 사용함.
- “정상”인 분무건조물이 생쥐에게 있어서 효능을 나타내는 400 mg/kg/day의 용량은 사람에게 있어서는 0.08을 곱한 값 즉 3.2 mg/kg/day에 해당하고 60 kg 사람에게 대해서는 약 2 g/day에 해당함. 즉, 60 kg 사람이 분무건조 (정상)를 하루에 2 g을 섭취하면 기억력을 개선시키는 효능이 나타나게 됨.

㉔ 결론

o 인체시험용 신청원료의 확보

- 인체시험용 신청원료는 지표성분인 ara의 함량이 2.5%인 밀기울추출물 중 “정상”에 해당하는 것이고 이는 4회에 걸쳐 1회당 3.9 kg으로 총 약 15.5 kg이 생산되었으며, 동물실험용과 분석용 및 손실 등으로 인해 현재 확보하고 있는 것은 약 13 kg임.
- 인체시험은 35명의 신청원료를 섭취할 피시험자가 12주에 걸쳐 1일 3 g을 섭취하는 것으로 결정되었음. 이를 위해 필요한 신청원료의 양은 약 9 kg이며, 여분으로 2주 분을 추가하면 약 10.5 kg임. 따라서 현재 확보된 신청원료 (약 13 kg)가 인체시험을 완료할 때까지 필요한 양 (10.5 kg)을 넘어서 충분하게 확보되었음.

o 생산단가의 관점에서의 최적화의 필요성

- 현시점에서 비록 인체시험을 시행할 원료를 생산하기 위한 최적화가 이루어졌다 할지라도 실제 판매가 이루어지기 위해서는 생산원가가 유통마진 등을 고려할 때 기능성식품으로서의 최종판매가의 10% 이내로 유지하는 것이 바람직함. 따라서 대량생산 (500L가 아닌 5,000L)을 통한 원가절감방안과 기술을 이전받아 가는 기업에서 직접 생산설비를 갖추어서 원가절감을 할 수 있는 방안에 대해 참여기업인 동아원과 협의를 계속할 예정임.

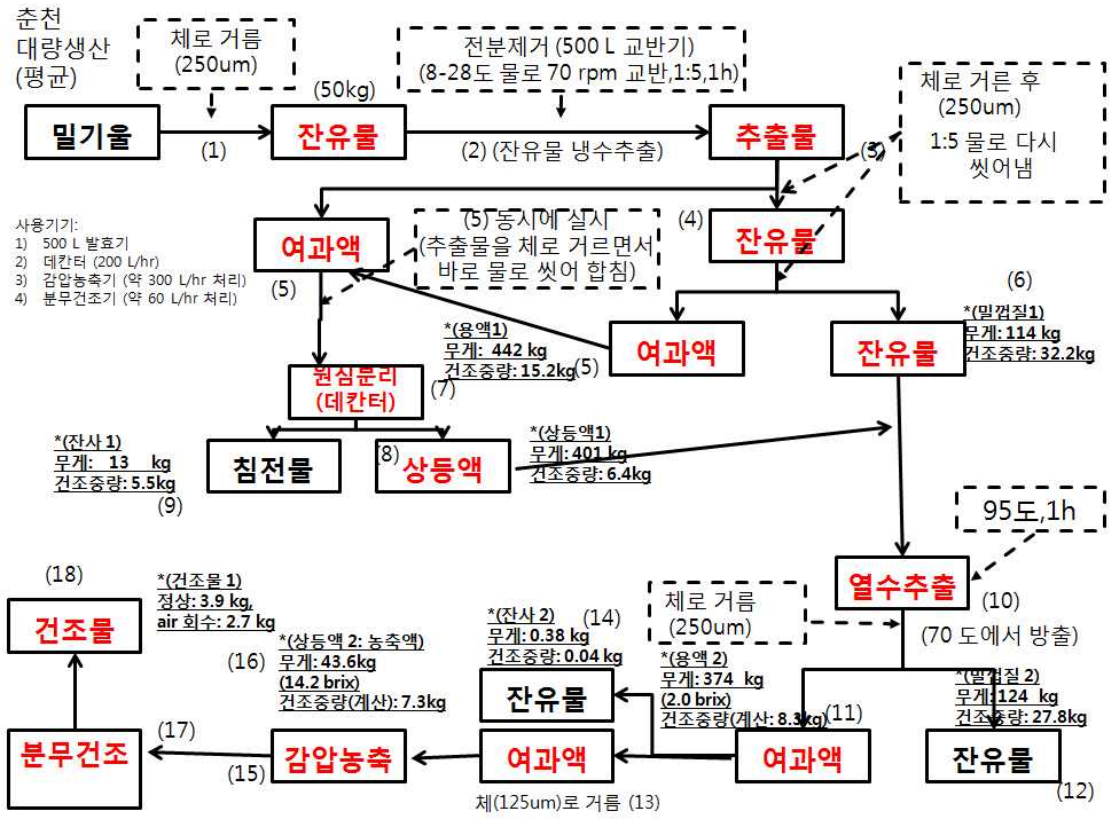


그림 54. 확립된 신청원료 (밀기울추출물)의 생산공정 개략도

표 37. 신청원료 생산공정의 요약표

공정 (2013. 06.03, 4, 07.03, 04) (평균값)	Weight or Vol	Brix	지표성분 농도 (mg/mL)	회수액 (kg)	고형분 (kg)	출지표 성분 (g)	지표성분 수율 (%)	지표 성분 함량 (mg/g)
냉수추출 (추출물 체로 거름2 (250 um)	용액 1 (그림 5) (원액에서 여과액을 얻 고 이 후에 200 L 냉수로 씻어 랑꺼번에 얻음)	L (샘플 4) (액체 약 50 ml)	0.379	442	15.2	167		11.0
	밀겉질 1 (제잔사) (그림 9)	Kg (샘플 5)	-	114	32.2	-		
데칸터 (그림 7)	상등액 1 (그림 8)	L (샘플 6)(액체 약 50 ml)	0.323	401	6.4	130		20.1
	잔사 1 (잔사) (그림 9)	Kg (샘플 7)		13.0	5.5			
열수추출 (추출물 체로 거름3 (250 um)	용액 2 (원액) (그림 11)	L (샘플 8) (액 체 약 50 ml)	2.0 brix	0.532	374	8.3	199	23.8
	밀겉질 2 (제잔사) (그림 12)	Kg (샘플 9)	-	124	27.8	-		
용액 2를 체로 거름 (125um) (그림 13)	용액 (용액 2와 동일)							
	잔사 2 (잔사) (그림 14)	(샘플 10)	-	0.38	0.04	-		
감압농축 (연속) (그림 15)	상등액 2 (그림 16) (농축액)	L (샘플 11)	14.2 brix	4.11	43.6	7.3	177	24.5
건조(분무) (상등액 2) (그림 17)	건조물 1 (그림 18) (분무건조)	kg (샘플 12)	-	-	-	정상: 3.9 Air: 2.7	97.4 (정상)	24.9 (정상)
최종 (건조물 1)(인체시험용)			-	-	-	정상: 3.9	97.4 (정상)	24.9 (정상)

표 38. 신청원료 개별공정 결과

	6월3일	6월4일	7월3일	7월4일
사용한 원료량 (kg)	50	50	50	50
생산량 (kg)				
분무	4.5	5.0	2.8	3.2
Air	0.85	1.0	4.6	4.2
분무+air	5.4	6.0	7.4	7.4
수율 (%) (분무)	9.0	10.0	5.6	6.4
수율 (%) (분무+air)	10.8	12.0	14.8	14.8
지표성분 (분무내 ara %)	2.6	2.6	2.3	2.5
추출온도 (°C)	18	18	25	28

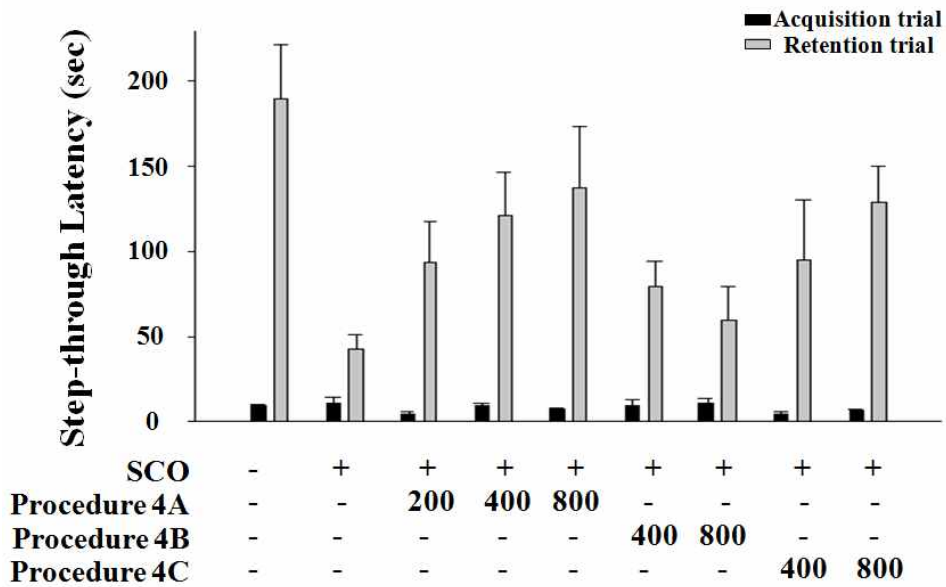


그림 55. 대량 생산 공정4의 건조 방법에 따른 추출물의 기억력 향상 효능 비교(수동회피 실험)

C57BL/6 마우스에 스킵올라민을 주사하여 발생하는 건망증에 대한 대량 생산 공정4의 다양한 건조과정에 의해 획득된 추출물들(Procedure 4A-4C)의 효과를 비교 조사하기 위해 수동회피 실험을 실시하여 전기적 충격을 기억하는 평균시간 step-through latency를 측정함. SHAM은 정상적인 쥐, SCO는 스킵올라민(1 mg/kg)만 주사한 쥐, SCO + Procedure 4A-4C는 대량생산공정 추출물을 1일 표기된 용량으로 투여한 쥐를 각각 나타냄.

- Procedure 4A: 분무건조로 생산된 것 중 “정상”에 해당
- Procedure 4B: 분무건조로 생산된 것 중 “air”에 해당
- Procedure 4C: 동결건조한 시료

(4) 원료의 특성에 관한 자료 (제2협동)

o 식약처가 요구하는 순서대로 원료를 특징 지을 수 있는 성상, 물성 등, 기능성분(또는 지표성분) 및 근거, 영양성분정보자료를 제시하였음.

(가) 원료를 특징지을 수 있는 성상, 물성 등 (표 39)

o 성상: 약간 어둡고 누런빛을 띠는 회황색의 고운 분말로 이취가 없고 약간의 쓴맛이 있음.
o 물성: 공기 노출 시 흡습하는 성질을 가지고 있음.

표 39. 신청원료의 성상

시료 특성	신청원료	
	6/3 생산	6/4 생산
외관 (사진)		
외관 (색)	- 약간 어둡고 누런빛을 띠는 회황색	
외관 (성상)	- 고운 분말 형태	
맛	- 끝에 쓴맛이 느껴짐.	
향	- 미세한 구수한 향과 밀기울 특유의 이취가 미세하게 느껴지나 대체적으로 두드러지는 향이 없음.	

(나) 기능성분(또는 지표성분) 및 근거

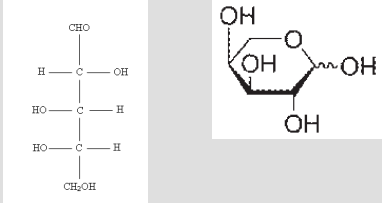
○ 지표성분으로 L-아라비노스 (L-arabinose)로 선정하였음.

① 지표성분으로서의 근거

- 대량생산한 밀기울추출물에는 전분, 단백질 이외에 식이섬유인 비전분 다당류로 아라비노자 일란 (AX), 아라비노갈락탄-펩타이드 (AGP) 및 베타글루칸 (BGlu)이 포함되어 있음. 그런데 선행연구에 의하면 AX, AG 및 BGlu가 기억력감소모델 (혈관성치매, 스코폴라민에 의한 건망증)에서 효능을 나타내는 기능성분인 것이 확인되었으며, 이 뿐만 아니라 AX와 AGP를 구성하는 다당류들인 아라비노스 (ara)와 자일로스 (xyl)도 효능을 나타내었음.
- 그런데 원료 (추출건조물) 내에 들어있는 AX와 AGP의 함량을 측정하기 위해서는 다당류 자체로 분석하는 것은 불가능하고 이 다당류들을 산으로 분해하여 다당류의 함량을 측정한 후 계산식에 의해 AX와 AGP의 함량을 구함. 따라서 지표성분으로 기능성분의 함량을 간접적으로 나타내는 다당류로 선택하였으며 이 중에서 기능성분인 AX와 AGP에 모두 포함되어 있는 ara로 선정하였음.

② 지표성분에 대한 자료

- Ara는 L형과 D형을 가지나 자연상태에서는 L형이 발견됨.
- 이 Ara는 설탕과 같이 흰색의 결정체로서 물에 잘 녹고 단맛 (설탕의 60% 정도) 가짐.
- 녹는점이 약 160 °C로 열안정성을 가짐.

○ 지표성분 : L-(+)-아라비노스[L-(+)-Arabinose] 2.0-3.0 mg/g	
구조	
일반명	L-아라비노스 (L-arabinose) (CAS 번호: 5328-37-0)
분자식	C ₅ H ₁₀ O ₅
분자량	150.13

(다) 영양성분자료

- 신청원료 (밀기울추출물)의 영양성분 한국기능식품연구원에 의뢰하여 분석한 결과, 100 g 당 열량 (Kcal)은 311.20 Kcal/100 g이고, 탄수화물 6.44%, 조단백질 15.15%, 조지방 0.94%, 수분 3.33%, 회분 14.14%, 나트륨 224.57 mg/100 g이며, 탄수화물 중 식이섬유는 수용성 식이섬유는 11.81%이고 불용성 식이섬유는 검출되지 않았음 (표 40, 41).
- 이로부터 신청원료는 주로 전분 등 소화가 가능한 탄수화물이 약 54%, 단백질이 약 15%, 수용성 식이섬유가 12%, 회분이 14%로 구성되어 있었음. 특히, AX 등 식이섬유는 모두 수용성으로 밀기울에 비록 불용성 식이섬유가 대부분을 차지하더라도 물로 추출하는 과정에서 수용성만 녹아 나온 것을 알 수 있음.

표 40. 신청원료의 영양성분 분석 결과

항목	결과
열량 (Kcal/100g)	311.20
탄수화물 (%)	66.44% (수용성 식이섬유 11.81, 불용성 식이섬유 0.00 함유)
조단백질 (%)	15.15
조지방 (%)	0.94
수분 (%)	3.33
회분 (%)	14.14
나트륨 (mg/100 g)	224.57

표 41. 신청원료의 영양성분 분석 결과 (검사성적서)

제 D2013060897 호			
검 사 성 적 서			
발주명	밀기울주출물	제조일자 (유통기한)	2013-06-03
이피인	업체명 주소	상 명	
제조번호	Lot #A	입수년월일	2013-06-26
검사뢰뢰처	참고문	감제입수번호	D2013060897
귀하가 우리 연구원에 검사뢰뢰한 결과는 다음과 같습니다. 검사뢰뢰 후 책임자(김 원 희)			
시험항목	결과	검사담당자	
열량(Kcal/100g)	311.20Kcal/100g	정은숙	
탄수화물(%)	66.44%(수용성 식이섬유 11.81%, 불용성 식이섬유 0.00% 함유)	정은숙	
조단백질(%)	15.15%	양지선	
조지방(%)	0.94%	이진영	
수분(%)	3.33%	장은희	
회분(%)	14.14%	장은희	
나트륨(mg/100g)	224.57mg/100g	조미주	
불용성식이섬유(%)	0.00%	이주영	
수용성식이섬유(%)	11.81%	양지선	
2013년 7월 5일			
한국기능식품연구원 			
<small>(주)한국건강기능식품협회 우정, 한국기능식품연구원 http://www.khcf.co.kr 전화번호 110013900-040071</small>			

(5) 기능성분[또는 지표성분] 규격 및 시험방법에 관한 자 (제1세부, 제2협동)

o 식약처가 요구하는 순서대로 기능성분(또는 지표성분)의 규격 및 근거, 기능성분(또는 지표성분) 표준품 정보, 기능성분(또는 지표성분) 시험방법 (시험방법 밸리데이션 포함)을 제시하였음.

(가) 기능성분(또는 지표성분)의 규격 및 근거

o 기능성분 (또는 지표성분)의 규격 및 설정 근거에 대해 요약하였음.

① 기능성분 (또는 지표성분)의 규격

o 신청원료 (밀기울추출물)에 평균적으로 ara가 25 mg/g (2.5 %) 함유되어 있으며, 허용범위를 80-120%로 하였을 때 그 범위는 20-30 mg/g (2.0-3.0 %)에 해당하였음.

② 설정근거

㉠ 자체분석

o 자체적으로 실시한 지표성분의 분석을 통해 (표 42) 신청원료 (밀기울추출물)에 평균적으로 ara가 25 mg/g (2.5 %) 함유되어 있으며, 허용범위를 80-120%로 하였을 때 그 범위는 20-30 mg/g (2.0-3.0 %)에 해당하였음.

표 42. 기능(지표) 성분 설정 근거

(검사기관명: 자체)

Lot No.	1	2	3	4	평균 (%)
	(Lot 06/03)	(Lot 06/04)	(Lot 07/03)	(Lot 07/04)	
1반복	2.684	2.470	2.455	2.552	
2반복	2.502	2.732	2.058	2.464	
평균(%)	2.59	2.60	2.26	2.51	2.5

㉡ 인정기관에서의 분석

o 한국기능식품연구원에 본 연구에서 확립한 실험방법을 이용하여 확인한 결과 본 연구에서 측정된 값과 동일하다는 결과를 얻었음 (그림 56). 3개 이상의 LOT에 대해 실시하여 허용범위 내에 위치하는 것을 확인하였음.

㉢ 지표성분의 분석결과 (자체 분석)

(a) 단당류들에 대한 alditol acetate법 적용

o 일반적으로 식물의 세포벽에서 관찰되는 단당류 (rhamnose, fucose, ribose, arabinose, xylose, mannose, galactose, glucose)와 내부표준 (internal standard)으로 고려한 allose와 myo-inositol을 구매하여 동일한 양에 대해 alditol acetate법을 적용한 결과 참고문헌 (Rumpel & Dignac, 2006)에서 제시된 바와 같이 완전하게 분리된 피크들을 얻었음 (그림 57).

제 D2014050059 호				검 사 성 적 서							
입재명	Lot#	제조일자 (공통기원)	2013-08-08								
의뢰인	입재명 주소	성명	[REDACTED]								
제조번호	제출물	입수년월일	2014-05-07								
검사희의목적	제출물	검체검수번호	D2014050059								
<p>이하가 우리 연구원에 검사희의한 결과는 다음과 같습니다. 검사관련 총 책임자: 김 권 희</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>시험항목</th> <th>결과</th> <th>검사담당자</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Arabinose(㎍/g)</td> <td>24.31㎍/g</td> <td>유재영</td> </tr> </tbody> </table> <p>분석방법-컬러계량</p>						시험항목	결과	검사담당자	Arabinose(㎍/g)	24.31㎍/g	유재영
시험항목	결과	검사담당자									
Arabinose(㎍/g)	24.31㎍/g	유재영									
											
2014년 5월 15일 한국기능식품연구원											
<small>(사)한국건강기능식품협회 부설 한국기능식품연구원 Tel: 02-777-3831, Fax: 02-777-3832 E-mail: khsi@khsi.or.kr www.khsi.or.kr KHSI0011028-0800-1</small>											

그림 56. 신청원료 (밀기울추출물) 지표성분에 대한 시험성적서

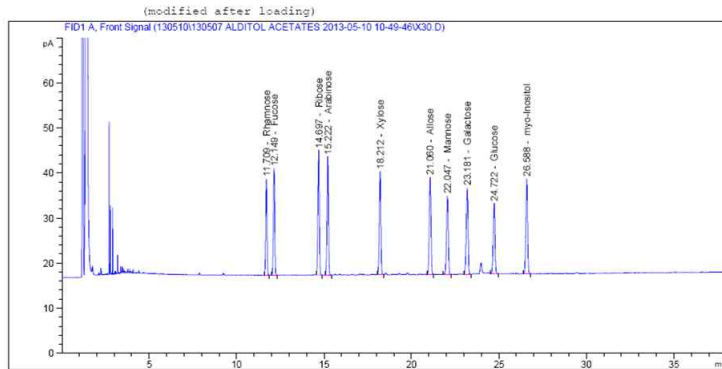


그림 57. Alditol acetate법에 의해 얻어진 단당류들의 크로마토그램

(b) 신청원료의 분석

- 신청원료로 사용된 밀기울추출물 (정상)에 대해 alditol acetate법을 이용하여 분석한 결과 그림 58과 같은 결과를 얻었음.
- 원료 내에서 관찰되는 단당류로는 ara, xyl, gal 및 glc가 주를 이루었으며, 이는 추출건조물을 이루는 단당류로는 AX, AGP 및 전분이 주를 이루고 있음을 알 수 있음.
- 면적의 계산을 통해 함량 (질량 %)을 조사한 결과 ara 2.51, xyl 3.81, gal 3.01 및 glc 39.6%이었음.
- 인체시험에서 사용할 신청원료는 4번의 대량생산에서 얻은 것을 사용하며, 각 lot에서 ara의 함량이 2.51%와 더불어 2.59%, 2.60% 및 2.26%였음. 이 시료들을 단순 평균을 취하면 약 2.5%임. 이를 근거로 지표성분의 범위를 2.5%를 기준으로 하여 80%-120% 사이인 2.0%-3.0%로 설정하였음.
- 한편, 참고로 ara (2.5%) 이외에 xyl의 평균값은 3.5%, gal의 평균값은 2.7%, man는 0.5%, glc는 40.6%였음. 그런데, ara는 AX와 AGP, xyl는 AX, gal은 AGP, man는 glucomann 등 식이섬유의 구성성분이므로 이러한 단당류들로 구성된 식이섬유는 전체의 9.2%를 차지함. 아울러 이 식이섬유에는 포도당으로 구성된 BGlu도 포함되어야 하며 별도로 측정된 BGlu의 함량은 약 3.0%였음. 이로부터 신청원료에 포함된 식이섬유는 전체의 약 12%를 차지하는 것으로 계산됨. 그런데, 표 40 (163쪽)에서 제시된 바와 같이 신청원료에 대해 별도로 측정된 수용성 식이섬유가 11.8%로 당분석에 의해 계산된 식이섬유인 12%와 일치하였음. 이러한 결과를 서로 비교하면 당분석에 의해 얻어지는 단당류의 함량이 정확하게 측정된다는 것을 알 수 있음.

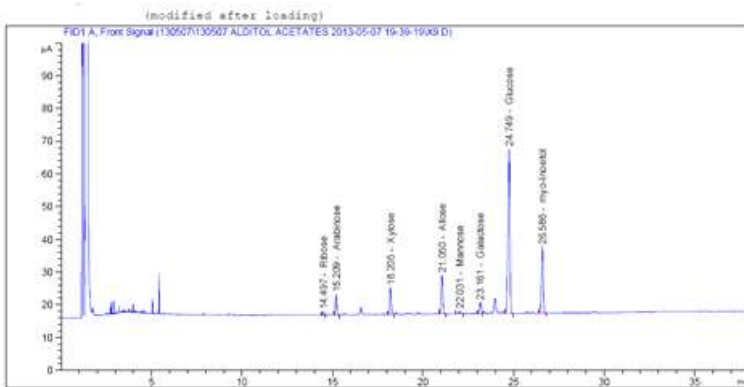
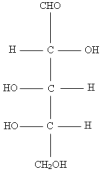


그림 58. Alditol acetate법에 의한 신청원료 (밀기울추출물)의 크로마토그램

(나) 기능성분 (또는 지표성분) 표준품 정보

- 표 43에서와 같은 양식으로 작성하였음.
- 시그마-알드리치 회사로부터 구매하였으므로 “시판되는 표준품”에 해당하게 작성하였음.

표 43. 표준품에 대한 정보

□ 시판되는 표준품	표준품명	L-(+)-아라비노스 [L-(+)-Arabinose]
	제조·판매회사명	시그마-알드리치 (Sigma-Aldrich)
	구조식	
	CAS No.	5328-37-0

(다) 기능성분(또는 지표성분) 시험방법

- 추출건조물에 포함된 ara의 함량은 식이섭유 내에 존재하는 중성단당류의 함량을 측정하는 공인된 방법 (AOAC Official method 994.13)을 변형한 방법 (Melton & Smith, 2001)으로 측정하였으며, 구체적인 시험방법은 2-5-3에서 제시하였음. 이를 활용하여 아래와 같이 시험법 검증 (method validation)을 실시하였음..

① 시험방법 밸리데이션

- 시험방법 밸리데이션에서 식약처에서 요구하는 자료는 특이성, 정확성, 직선성 및 정밀성에 대한 밸리데이션임이며, 이에 대한 자료는 아래와 같음.

㉠ 특이성

- 특이성은 분석하고자 하는 성분에 대해 특이적으로 반응하는 시험법이고, 주변 간섭물질로부터 선택적으로 분석이 가능한지 확인하는 것임.
- 확립된 GC 조건에서 arabinose, 신청원료 (밀기울추출물), arabinose를 spike처리한 밀기울추출물 그리고 arabinose를 포함한 9개의 sugar standard에 대해 alditol acetate법으로 실시하여 얻어진 네 개의 크로마토그램을 동일한 스케일로 비교한 결과 기능 성분인 arabinose는 순수하거나 다당류 형태로 있거나 막론하고 동일한 위치에 나타났으며, 다른 단당류와 구분이 가능하였음. 위에서 얻어진 네 개의 크로마토그램을 동일한 스케일로 비교한 결과 기능 성분인 arabinose의 특이성을 확인하였음 (특이성 1) (표 44 및 그림 59).
- 특이성의 또 다른 수행 방법으로 GC의 분석 조건을 바꾸어서 retention time은 같이 변화하나 arabinose의 면적에는 변함이 없음을 증명하여 다른 어떤 성분과도 겹쳐있지 않음을 증명하였음 (특이성 2) (표 45 및 그림 60).

㉡ 직선성

- 분석하고자 하는 물질 양에 대한 기기적인 신호값이 직선적으로 관찰되었는지 확인하는 것으로 통상적으로 상관계수(Correlation coefficients)는 0.995 이상인 경우 인정함.

- 분석하고자 하는 arabinose의 유도체인 arabinitol acetate에 대한 peak의 면적이 분석농도 구간에서 직선적으로 관찰되는지를 확인하기 위해서 arabinose를 6개의 다른 농도로 분석한 결과 지표성분인 arabinose의 r^2 는 0.999로 요구하는 0.995를 넘었음. 이상으로부터 arabinose에 대해 직선성이 확인되었음. 이 때 분석하고자 하는 신청원료 (밀기울추출물)내의 arabinose 양이 표준물질의 직선성 범위 내에 들어있도록 범위를 잡아 직선성을 입증하였음 (그림 61, 62 및 표 46).

㉔ 정밀성

- 시료속의 분석대상물질이 여러 회의 반복시험을 통하여 통계적으로 유의한 차이가 없는 범위에 속하는지 [단순반복성(repeatability), 측정날짜간, 사람간, 기기간, 실험실간]를 조사하는 것임. 이 때 RSD가 5% 이하인 경우 인정함.

(a) 일내 반복 정밀성

- 균일한 밀기울추출물로부터 여러 번 채취하여 분석했을 때 밀기울추출물속의 분석대상인 arabinose의 양이 통계적으로 유의한 차이가 없는 범위에 속하는지를 보기위한 일환으로 repeatability를 시험한 결과 일내 반복 정밀성은 RSD (relative standard deviation)가 3.09% (허용치 5% 이하)로 정밀성이 확인되었음 (표 47).

(b) 일간 반복 정밀성

- 균일한 밀기울추출물로부터 여러 번 채취하여 분석했을 때 밀기울추출물속의 분석대상인 arabinose의 양이 통계적으로 유의한 차이가 없는 범위에 속하는지를 보기위한 일환으로 repeatability를 측정날짜를 달리하여 세 번 시험한 결과 일간 반복 정밀성은 RSD (relative standard deviation)가 4.92% (허용치 5% 이하)로 정밀성이 확인되었음 (표 48).

㉕ 정확성

- 분석하고자 하는 성분이 원료(매트릭스)에서 분리할 수 있는가를 확인하는 항목 (traceability)으로, 알고 있는 참값을 원료에 가하여 참값을 정확히 회수할 수 있는가를 회수율 (recovery)로서 실험한 것인지 확인하는 것임.
- 정확성 평가 방법으로 CRM, RM, Spiking & Recovery을 사용함.
- Spiking & Recovery 방법을 사용하여 밀기울추출물에 arabinose를 첨가 한 후 회수율을 구한 결과 98.7%의 평균회수율을 r^2 이 0.999의 (RSD는 4.5%) 정확성으로 입증하였음 (표 49 및 그림 62).

㉖ 범위

- arabinose 50 μ g ~ 1.2 mg 까지의 범위에서 직선성을 확보하였음.

표 44. 특이성 1

Chromatograms	arabinose (mg)	밀기울추출물 (mg)	allose (mg)
CC-7	0.806		0.514
CC-8		5.1	0.514
CC-34	0.806	5.1	0.514

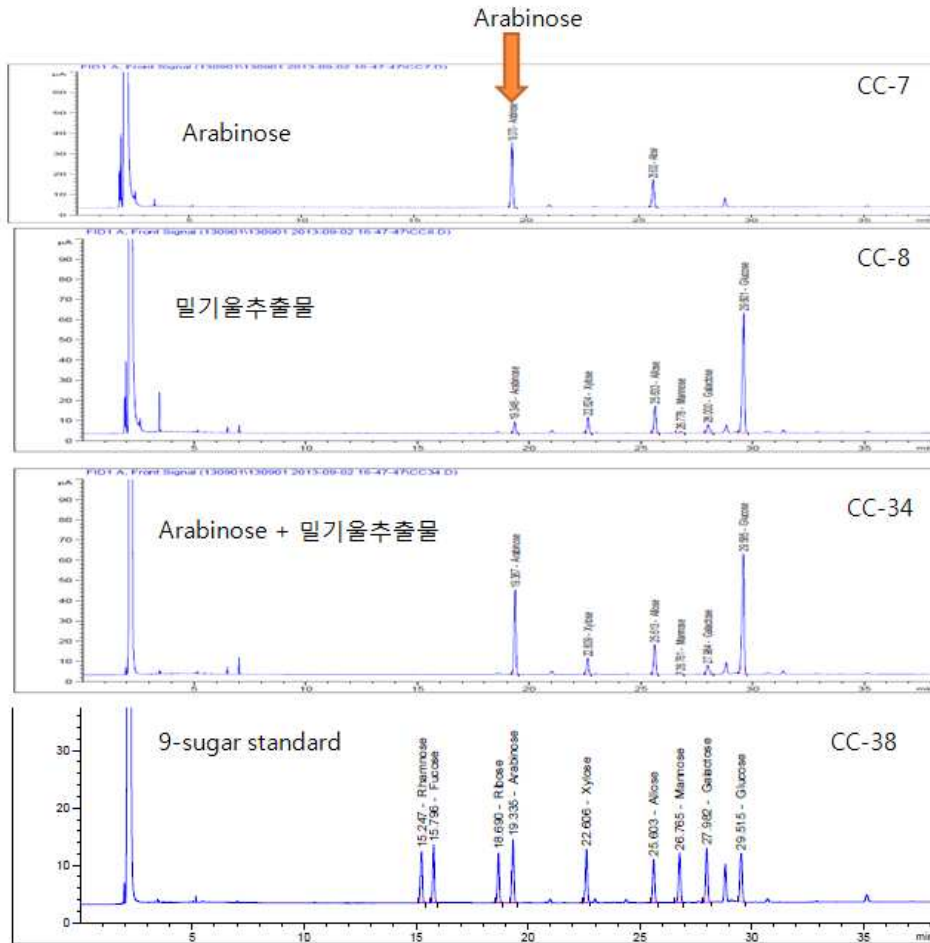


그림 59. 특이성 1

표 45. 특이성 2

Chromatograms	arabinose		밀기울추출물	allose
	added	detected		
CC-7	0.806	0.799	0	0.514
CC-7'		0.804		
CC-8	0	0.144	5.1	0.514
CC-8'		0.147		
CC-34	0.806	0.975	5.1	0.514
CC-34'		0.983		
unit (mg)				
CC-38	GC of 9-standard sugar alditols			
CC-38'				

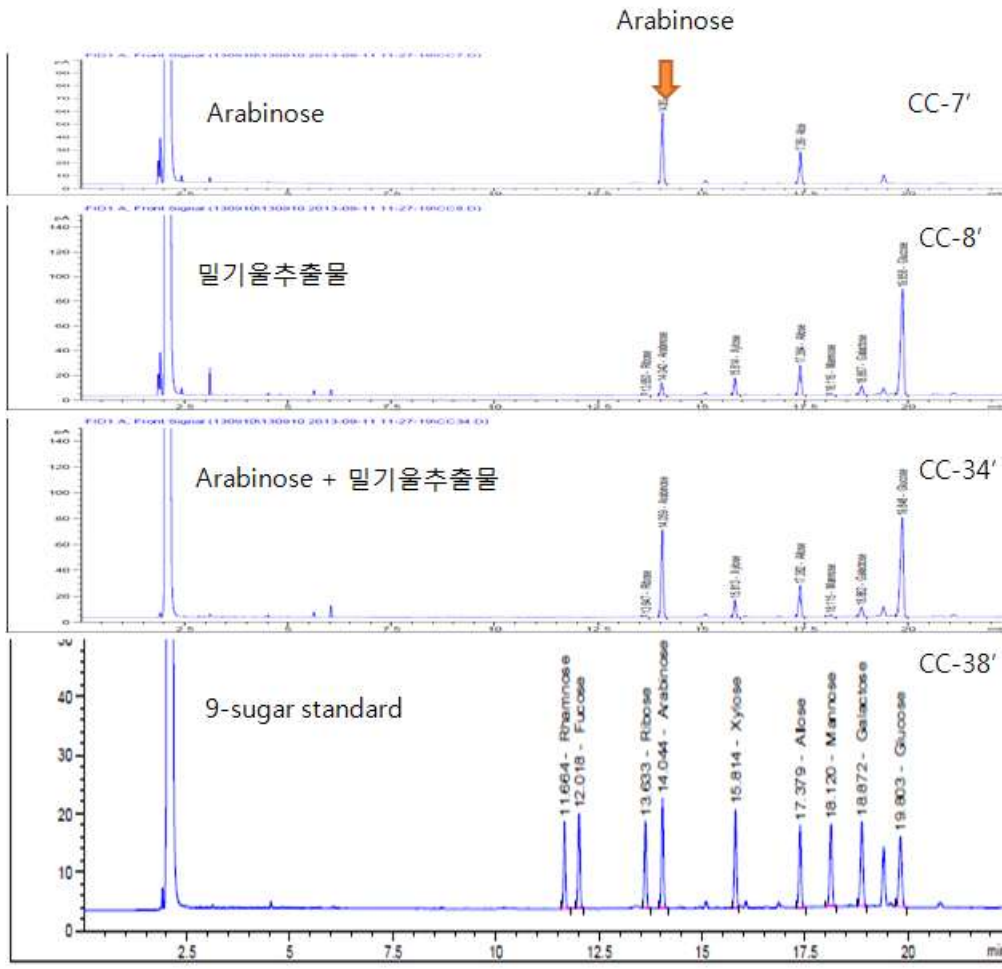


그림 60. 특이성 2

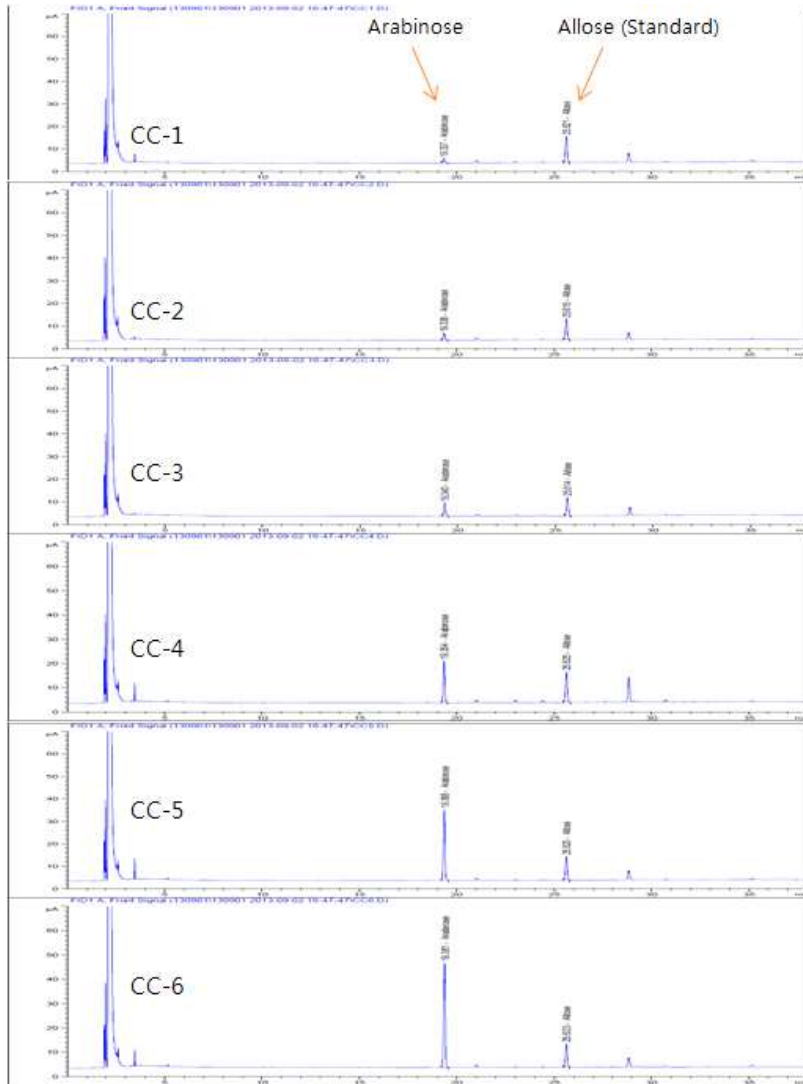


그림 61. 직선성

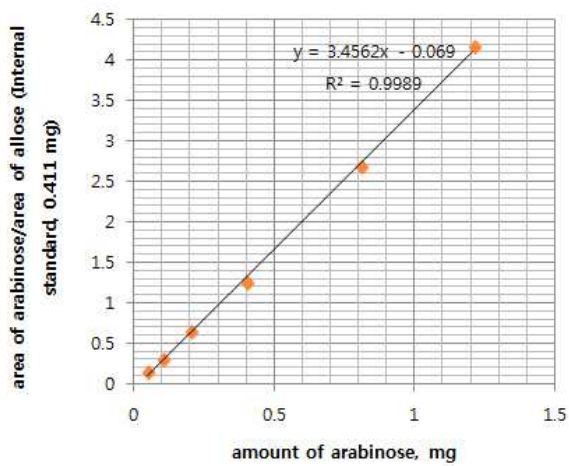


그림 62. 직선성

표 46. 직선성

x		y		
amount of Arabinose (mg)	GC #	area of arabinose	area of internal allose (internal standard, 0.411mg)	area of arabinose/ area of allose (internal standard, 0.411 mg)
0.05038	CC-1	11.58240	78.09450	0.1483
0.10075	CC-2	18.18962	60.90694	0.2986
0.2015	CC-3	33.92253	52.95609	0.6406
0.403	CC-4	103.3205	83.19377	1.2419
0.806	CC-5	186.8222	69.97702	2.6698
1.209	CC-6	262.8979	63.15997	4.1624
y = 3.4562x - 0.069 (R² = 0.9989)				

표 47. 일내 반복 정밀성

GC #	밀기울 추출물 (mg)	area of arabinose	normalized area of arabinose/ area of internal standard	% arabinose in 밀기울추출물	amount of Arabinose In 밀기울추출물 (mg/g)	Average (mg/g)	SD	RSD%
A14	5.9	30.99026	0.286	2.511	25.11	25.28	0.78	3.09
A15	6.0	26.78430	0.291	2.506	25.06			
A16	5.6	26.52238	0.270	2.497	24.97			
A17	6.4	25.08961	0.332	2.684	26.84			
A18	5.8	22.43479	0.280	2.502	25.02			
A19	5.4	17.83746	0.258	2.470	24.70			

표 48. 일간 반복 정밀성

GC # (분석일자)	Amount of arabinose in sample (mg/g)	Average (mg/g)	SD	RSD%	Average (mg/g)	SD	RSD%
A14-A19 (2013/07/03)	25.11	25.28	0.78	3.09	26.81	1.32	4.92
	25.06						
	24.97						
	26.84						
	25.02						
	24.70						
CC8-CC12 (2013/09/02)	28.31	27.51	0.56	2.04			
	27.47						
	27.49						
	27.55						
	26.72						
DD1-DD5 (2013/10/21)	27.14	27.64	1.50	5.43			
	28.53						
	25.99						
	26.78						
	29.75						

GC # (분석일자)	Amount of arabinose in sample (mg/g)	Average (mg/g)	SD	RSD%	Average (mg/g)	SD	RSD%
A14-A19 (2013/07/03)	25.11	25.28	0.78	3.09	26.81	1.32	4.92
	25.06						
	24.97						
	26.84						
	25.02						
	24.70						
CC8-CC12 (2013/09/02)	28.31	27.51	0.56	2.04			
	27.47						
	27.49						
	27.55						
	26.72						
DD1-DD5 (2013/10/21)	27.14	27.64	1.50	5.43			
	28.53						
	25.99						
	26.78						
	29.75						

표 49. 정확성

GC #	밀기울 추출물 (mg)	첨가한 arabinose (mg)	검출된 arabinose (%)	검출된 total arabinose in sample (mg)	회수량 (mg)	회수율 (%)	평균 회수율 (%)	SD	RSD (%)	평균 회수율 (%)	SD	RSD (%)
CC8	5.1	0	2.831	0.1444								
CC9	5.2	0	2.747	0.1428								
CC10	5.3	0	2.749	0.1457								
CC11	5.1	0	2.755	0.1405								
CC12	5.3	0	2.672	0.1416								
CC18	5.2	0.050375	3.621	0.1883	0.0453	89.9097	101.68	11.72	11.53	98.70	4.45	4.50
CC20	5.2	0.050375	3.736	0.1943	0.0513	101.7806						
CC21	5.0	0.050375	3.892	0.1946	0.0571	113.3499						
CC14	5.1	0.10075	4.539	0.2315	0.0912	90.5598	90.83	0.38	0.42			
CC15	5.1	0.10075	4.541	0.2316	0.0913	90.6610						
CC16	5.1	0.10075	4.553	0.2322	0.0920	91.2685						
CC24	5.1	0.2015	6.842	0.3489	0.2087	103.5692	99.98	3.83	3.83			
CC25	5.1	0.2015	6.717	0.3426	0.2023	100.4055						
CC26	5.1	0.2015	6.541	0.3336	0.1933	95.9509						
CC30	5.0	0.403	11.016	0.5508	0.4133	102.5558	100.51	1.86	1.85			
CC31	5.2	0.403	10.504	0.5462	0.4032	100.0516						
CC32	5.0	0.403	10.723	0.5362	0.3987	98.9206						
CC33	5.2	0.806	18.073	0.9398	0.7968	98.8581	100.53	1.54	1.53			
CC36	5.1	0.806	18.685	0.9529	0.8127	100.8294						
CC37	5.0	0.806	19.175	0.9588	0.8213	101.8921						

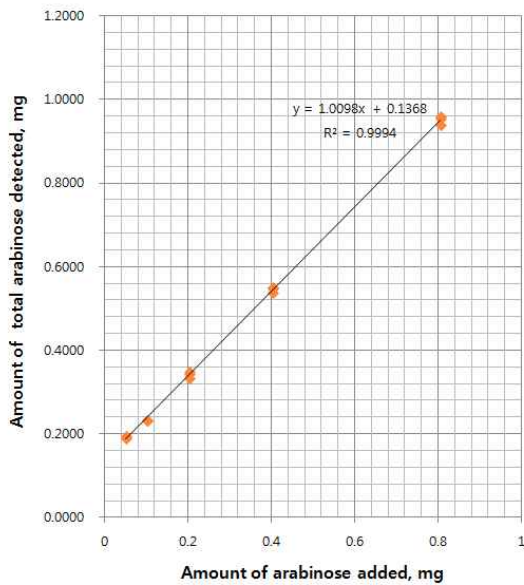


그림 62. 정확성

(6) 유해물질에 대한 규격 및 시험방법에 관한 자료 (제2협동)

(가) 유해물질 규격항목(납, 카드뮴, 총비소, 총수은)의 규격 및 근거

o 식약처에서 고시한 건강기능식품 기능성 원료 및 기준·규격 인정에 관한 규정 중 유해물질규격설정항목 (제14조 제6호 가목 관련)에 준하여 신청원료의 납, 카드뮴, 총비소, 총수은, 대장균군의 규격을 건강기능식품연구원에 의뢰하여 확인한 결과, 납 0.0437 mg/kg, 카드뮴 0.110 mg/kg, 총비소 0.1222 mg/kg, 총수은은 불검출 및 대장균군은 음성으로 분석되어 모두 유해물질규격에 적합한 것으로 확인되었음 (표 50).

표 50. 신청원료의 유해물질 규격항목 분석 결과

항목	결과
대장균군	음성
납(mg/kg)	0.0437
카드뮴(mg/kg)	0.0110
총수은(mg/kg)	불검출
총비소(mg/kg)	0.1222

* 적합성 예시: 유해물질규격설정에 의하면 납인 경우 1일 허용섭취량이 10.8 µg/일임. 그런데 신청원료는 그 섭취량이 3 g/일이고 이 신청원료 내에는 0.044 mg/kg이므로 1일 납 섭취량은 0.01 µg/일이므로 1일 허용섭취량인 10.8 µg/일보다 매우 낮은 것을 알 수 있음.

(나) 유해물질 규격 미설정항목(잔류농약)의 시험성적서 및 분석자료

o 신청원료 (밀기울추출물)의 원재료인 밀에 해당하는 59종의 잔류농약 항목의 함량을 건강기능식품연구원에 의뢰하여 분석한 결과, 전 항목이 불검출되어 건강기능식품원료로써 안전함을 확인하였음.

(다) 필요시 추가항목의 규격 및 근거

① 곰팡이독소

o 신청원료 (밀기울추출물)의 원재료인 밀에 적용되는 곰팡이독소 항목(총아플라톡신, 오크라톡신A, 데옥시니발레놀, 제랄레논)을 건강기능식품연구원에 의뢰하여 분석한 결과, 전 항목이 불검출되어 건강기능식품원료로써 안전함을 확인하였음 (표 51).

표 51. 신청원료의 곰팡이독소 분석 결과

항목	결과
총아플라톡신(µg/kg)	불검출
오크라톡신A(µg/kg)	불검출
데옥시니발레놀(µg/kg)	불검출
제랄레논(µg/kg)	불검출

(7) 안전성에 관한 자료 (제1세부)

○ 식약처에서 요구하는 순서대로 의사결정도, 섭취근거 정보, 기능성분 및 관련물질의 안전성(부작용.독성 등) DB 검색 정보, 섭취량 평가 정보, 영양평가.생물학적 유용성.인체적용시험 정보 및 독성시험에 대한 자료를 제시하였음.

(가) 건강기능식품 기능성원료의 안전성평가를 위한 의사결정도

○ 식품의약품안전처 (식약처) 고시 “건강기능식품 기능성 원료 및 기준 · 규격 인정에 관한 규정”의 별표 3 (건강기능식품 기능성 원료의 안전성 평가를 위한 의사결정도”에 의거하여 본 원료를 판단하면 그림 63과 같음.

① 판단근거

○ “밀기울로부터 전분의 일부를 제거하고 열수추출한 후 그 상등액을 분무 건조하여 얻은 원료인 밀기울추출물”에 대해 각 단계별 판단 근거는 아래와 같음.

㉠ 건강기능식품 제조로 사용할 수 없는 원료로 규정되어 있는가? 아니오

- 아님.

㉡ 섭취경험이 있는 동 · 식물, 조류, 미생물 등의 원료 자체인가? 아니오

- 밀기울을 냉수 및 열수로 추출한 것이므로 섭취경험은 있으나 원료자체는 아님.

㉢ 섭취경험이 있는 동·식물, 조류, 미생물 등을 제조 또는 가공한 것인가? 예

- 냉수 및 열수로 추출한 것임.

㉣ 물리적인 추출 또는 물이나 주정을 이용한 단순 추출물인가? 예

- 냉수 및 열수로 추출한 것임.

㉤ 알려진 부작용이 있는가? 아니오

- 밀은 주식으로 사용되고 있어 일반적으로는 부작용이 없음. 하지만 소수의 사람들은 밀의 글루텐에 대해 부작용을 나타내는 사람들도 있음 (아래의 부작용의 내용에 대한 설명 참조).

㉥ 섭취량이 일상 섭취량보다 증가하였는가? 아니오

- 구체적인 근거자료는 아래의 설명 참조

② 판단결정

- 이상의 근거로 판단하면 의사결정도의 “나”에 해당하며, 이를 근거로 “제출되어야 하는 안전성 자료의 범위”는 섭취근거자료, 해당 기능성분 또는 관련물질에 대한 안전성 정보 자료, 섭취량평가자료임 (표 52). 만약 소수의 글루텐에 대해 부작용을 나타내는 사람들로 포함하는 경우에는 “다”에 해당하여 위의 자료에 추가하여 영양평가자료, 생물학적유용성자료 및 인체시험자료가 포함되어 본 기술에서는 “다”에 해당하는 것으로 간주하고 기술하였음.

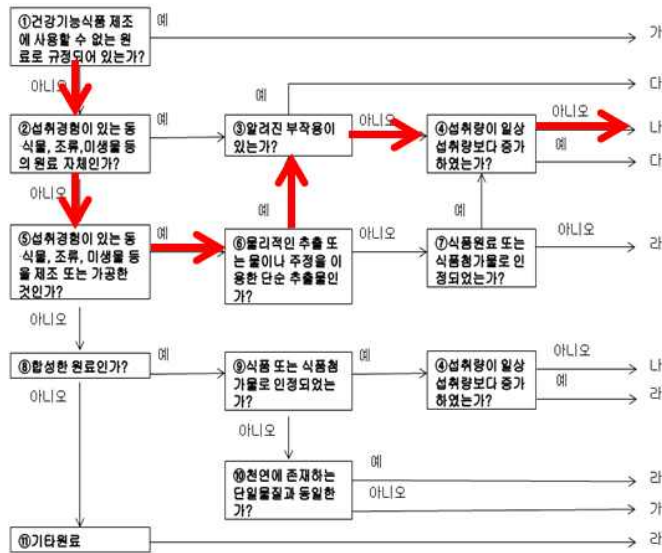


그림 63. 건강기능식품 기능성 원료의 안전성 평가를 위한 의사결정도

표 52. 제출되어야 하는 안전성 자료의 범위

제출되어야 하는 안전성 자료	가	나	다	라
건강기능식품으로 신청할 수 없음	√			
섭취 근거 자료 ¹⁾	√	√	√	√
해당 기능성분 또는 관련물질에 대한 안전성 정보 자료 ¹⁾	√	√	√	√
섭취량평가자료 ¹⁾	√	√	√	√
영양평가자료, 생물학적유효성자료, 인체시험자료 ¹⁾			√	√
독성시험자료 ¹⁾				√

(나) 섭취근거정보

o 97쪽 참조.

① 국내.외 인정.허가 현황

o 98쪽 참조.

② 국내.외 사용현황

o 98쪽 참조.

③ 국내.외에서 시행된 인체시험

㉔ 밀기울에 대해 시행된 인체시험

o 밀기울에 대해서는 제품화된 All-Bran을 이용한 인체시험과 밀기울을 그 자체 또는 시리얼, 빵 등에 첨가한 형태의 시험용으로 자체 제조하여 적용한 인체시험이 이루어졌음.

(a) All-Bran을 이용한 인체시험

o All-Bran을 이용한 인체시험은 암예방, 이소플라본 및 대장에서의 기체발생에 대한 영향 등에 대해 조사되었음.

㉕ 암예방에 대한 영향

o 하루 All-Bran 45g (식이섬유 양은 약 13.5 g, 밀기울 약 27 g에 해당)을 adenoma 제거된 720명이 최대 3개월 동안 섭취 (Alberts et al., 2000; Jacobs et al., 2002) 또는 All-Bran 2 온스 (56 g, 밀기울 37 g에 해당)를 노인 45명이 3개월간 섭취하였을 때 대장암의 발생이 억제되는지 조사하였음 (Ho et al., 1991).

o 하루 All-Bran 38 g (밀기울 25 g에 해당)을 adenoma가 관찰된 사람 20명이 18주 (4개월)동안 섭취하였을 때 대장의 상피세포의 증식에 영향을 미치는지를 조사하였음 (Macrae et al., 1997).

㉖ 이소플라본에 대한 영향

o 하루 All-Bran 50 g (밀기울 약 33 g에 해당)을 폐경 전 여성 13명에게 2개월 동안 섭취하도록 하였을 때 isoflavan인 equol의 방출에 영향을 미치는지를 조사하였음 (Lampe et al., 2001).

㉗ 대장에서의 기체발생에 대한 영향

o 건강한 남성에서 All-Bran 150 g (생밀기울 약 100 g)을 단회 섭취하였을 때 장에서 발생하는 수소기체의 양을 조사하였음 (Hickey et al., 1972).

(b) 자체 제조한 밀기울 첨가식품을 이용한 인체시험

o 밀기울은 그 자체 또는 시리얼, 빵 등에 첨가한 형태로 다양한 종류의 인체시험이 이루어졌음. 예를 들면, 장의 기능 및 장내 대사에 미치는 영향 (Parisi et al., 2002; Smith et al., 1981; Heller et al., 1980; Wyman et al., 1976; Fuchs et al., 1976; Tomlin & Read, 1988; Anson et al., 2011), 혈중지질대사에 미치는 영향 (Pomare et al., 1976; Kestin et al., 1990; Anderson et al., 1991; Jenkins et al., 1999; Huijbregts et al., 1980; Stasse-Wolthuis et al., 1979; Moore et al., 1985; Sanders & Reddy, 1992), 대장암을 예방하는 효과 (Alberts et al., 2000; Jacobs et al., 2002a; Alberts et al., 1996; Earnest et al., 1999; Martinez et al., 1998; Ho et al., 1991; Macrae et al., 1997; Lampe et al., 2001; Hickey et al., 1972; Jacobs et al., 2002b; MacLennan et al., 1995) 및 페놀화합물 등의 흡수에 미치는 영향 (Price et al., 2008;

Hamill et al., 2009; Keagy et al., 1988) 등에 대해서 인체시험이 이루어졌음.

㉠ 장기능에 대한 영향 조사

- 하루 밀기울 자체 30 g을 과민성 장염이 있는 어른 188명이 12주 동안 섭취하였음 (Parisi et al., 2002).
- 하루 밀기울 자체 20 g을 diverticular disease 환자 24명이 4주 동안 섭취하였을 때 장운동에 미치는 영향을 조사하였음 (Smith et al., 1981).
- 하루 밀기울 30 g을 섞어 만든 빵을 건강한 청년 9명이 4주 동안 섭취하였을 때 대변양이 증가하는 기전에 대해 조사하였음 (Chen et al., 1998).
- 하루 밀기울 32 g/day을 섞어 만든 빵을 건강한 청년 24명이 4주 동안 섭취하였을 때 대장의 기능에 미치는 영향에 대해 조사하였음 (Heller et al., 1980).

㉡ 지질대사에 대한 영향 조사

- 하루 밀기울 자체 57 g을 담석증환자 6명이 4-6주 동안 섭취하였을 때 담즙염 대사에 미치는 영향에 대해 조사하였음 (Pomare et al., 1976).
- 하루 밀기울 35 g을 섞어 만든 빵을 약한 고지혈증이 있는 남자 28명이 4주 동안 섭취하였을 때 혈중지질 등에 미치는 영향에 대해 조사하였음 (Kestin et al., 1990).
- 하루 밀기울 40 g을 섞어 만든 시리얼이나 머핀을 고지혈증이 있는 남자 10명이 3주 동안 섭취하였을 때 혈중지질 등에 미치는 영향에 대해 조사하였음 (Anderson et al., 1991).

㉢ 통밀에 대해 시행된 인체시험

- 밀을 제분하여 얻은 밀가루보다는 밀기울이 포함된 밀전체 (wholegrain)를 섭취하면 심혈관 질환 (Fardet, 2010; Gil et al., 2011; Seal, 2006; Kelly et al., 2007; Flight & Clifton, 2006), 제2형 당뇨병 (Fardet, 2010; Gil et al., 2011; Belobrajdic & Bird, 2013), 대장암 (Fardet, 2010; Gil et al., 2011) 등의 예방에 효능이 있는 것으로 알려져 국내 및 국외에서 통밀을 빵 등의 재료용 또는 이를 이용하여 만든 제품으로 판매하고 있음.

㉣ 아라비노자일란 고함유 식이섬유 (혼합물)

- 밀가루와 쌀겨 (rice bran)로부터 얻어진 AX 고함유 식이섬유에 대해 인체시험이 실시되고 일부는 판매도 되고 있음.

(a) 밀식이섬유

- 밀가루로부터 전분과 활성글루텐을 얻고 난 후의 부산물로 얻은 AX를 주성분으로 하는 식이섬유 (혼합물)가 혈당이나 장기능에 미치는 영향에 대해 인체시험이 실시되었음.

㉠ 혈당조절

- Lu 등 (Lu et al., 2000; Lu et al., 2002)은 질량비로 AX 63%, 전분 15%, 단백질 10% 등으로 이루어진 밀식이섬유가 정상인과 제2형 당뇨병환자의 식후 혈당에 미치는 영향을 조사하였음. 예를 들면, 하루 밀식이섬유 12 g을 빵으로 만들어 정상인 14명이 3일 동안 섭취하였을 때 식후혈당을 낮추는 효능에 대해 조사하였음 (식약처에서 밀식이섬유를 건강기능식품으로 인정할 때 인용된 문헌) (Lu et al., 2000). 또한, 하루 밀식이섬유 14-17 g을 빵으로 만들어 제2형 당뇨병환자 7명이 5주 동안 섭취하였을 때 식후혈당을 낮추는 효능에 대해 조사하였음 (Lu et al., 2002).
- Garcia 등 (Garcia et al., 2007; Garcia et al., 2006)은 질량비로 AX 57%, 단백질 17% 및

AGP와 BGlu 등으로 이루어진 밀식이섬유가 내당능 장애가 있는 사람들의 식후 혈당에 미치는 영향을 조사하였음. 예를 들면, 하루 밀식이섬유 15 g을 내당능 장애가 있는 사람 11명이 6주 동안 빵과 분말형태로 섭취하였을 때 식후혈당을 낮추는 효능에 대해 조사하였음.

㉑ 장기능조절

○ Grasten 등 (Grasten et al., 2003)은 질량비로 AX 50%, AGP 15%, 단백질 30% 등으로 이루어진 밀식이섬유 (Courtin & Delcour, 1998)가 정상인의 장기능에 미치는 영향에 대해 조사하였음. 예를 들면, 하루 밀식이섬유 13 g을 정상인 14명이 3주 동안 빵의 형태로 섭취하였을 때 장기능에 미치는 영향에 대해 조사하였음.

(b) 쌀겨식이섬유

○ 쌀겨로부터 유래한 AX 고함유 식이섬유인 MGM-3은 암환자나 만성피로를 느끼는 환자들에 대해 시행되었음.

㉒ 암치료 보조작용

○ Bang 등은 간암환자 (Bang et al., 2010)와 다발성골수성환자 (Cholujova et al., 2013)에 대해 조사되었음.

- 하루 Biobran 1 g을 간암환자 38명이 12개월 동안 섭취하였을 때 항암제의 치료 효과를 높이는 지에 대해 조사하였음 (Bang et al., 2010).

- 하루 Biobran 2 g을 다발성골수성환자 48명이 3개월 동안 섭취하였을 때 면역 증강 작용에 영향을 미치는지에 대해 조사하였음 (Bang et al., 2013).

㉓ 만성피로증후군에 대한 영향

- 하루 Biobran 6 g을 만성피로증후군환자 37명이 8주 동안 섭취하였을 때 피로 정도를 완화시키는지에 대해 조사하였음 (McDermott et al., 2006).

㉔ 밀구성 식이섬유와 식이섬유 구성 다당류 및 단당류

○ 밀을 구성하는 다당류 식이섬유로 효능을 나타내는데 기여하는 것으로는 아라비노스 (ara)와 자일로스 (xyl)로 구성된 아라비노자일란 (AX), ara와 갈락토오스 (gal)로 구성된 아라비노갈락탄-펩타이드 (AGP) 등이 있음.

(a) 다당류

㉕ AX

○ AX로부터 얻어진 AXOS (AXOS를 최소한 70%이상 포함하며, 나머지는 BGlu 7%, 단백질 2% 이하, 재 2%이하 포함; GRAS Notice No. GRN 000343에 기재된 내용)를 이용하여 장내 세균변화 등의 프리바이오틱 효능에 대한 인체시험이 다양하게 이루어졌음.

- 하루 AXOS (AXOS 71%, ara/xyl 0.26, 당의 수 6개) 10 g을 정상인 20명이 3주 동안 섭취하였을 때 프리바이오틱 효능에 대해 조사하였음 (Cloetens et al., 2010).

- 하루 AXOS 4.8 g을 정상인 55명이 3주 동안 시리얼 형태로 섭취하였을 때 비피더스균의 증식에 대해 조사하였음 (Maki et al., 2012).

- 하루 AXOS 2.2 g을 정상인 40명이 3주 동안 빵 형태로 섭취하였을 때 부티르산의 생성에 미치는 영향에 대해 조사하였음 (Walton et al., 2012).

- 하루 AXOS 2.1 g을 정상인 27명이 3주 동안 빵 형태로 섭취하였을 때 장내 발효에 미치는 영향에 대해 조사하였음 (Damen et al., 2012).

㉞ AG

○ 잎갈나무 유래 AG는 면역증강, 위장관 건강 및 혈당조절 등에 대한 인체시험이 다양하게 이루어졌음.

㉟ 면역증강 효능

○ Lonza사의 Resistaid (Riede et al., 2013; Udani et al., 2010)와 미국에서 GRAS를 얻은 Larix Inc. (Kim et al., 2002)에서 면역증강에 대한 인체시험을 각각 실시하였음.

- 하루 Resistaid 4.5 g을 정상인 101명이 12주 동안 섭취하였을 때 감기에 걸리는 정도에 대해 조사하였음 (Riede et al., 2013);

- 하루 Resistaid 4.5 g을 정상인 21명이 6주 동안 섭취하였을 때 폐렴백신을 투여 시 항체 생성에 도움을 주는지 조사하였음 (Udani et al., 2010).

- 하루 Larix사 AG 1.5 g을 정상인 여성 8명이 4주 동안 섭취하였을 때 면역증가 효능에 미치는 영향에 대해 조사하였음 (Kim et al., 2002).

㊱ 위장관에 대한 효능

- 하루 Larix사 AG 30 g을 정상인 20명이 3주 동안 섭취하였을 때 젖산균 증가에 미치는 영향에 대해 조사하였음 (Robinson et al., 2001).

㊲ 혈당에 대한 효능

- 하루 Larix사 AG 8.4 g을 정상인 36명이 6개월 동안 섭취하였을 때 혈중지질과 혈당에 미치는 영향에 대해 조사하였음 (Marett & Slavin, 2004).

㉟ 단당류

(a) L-아라비노스

○ Ara는 설탕을 분해하는 sucrase의 활성을 억제하는 효능이 관찰되어 비만을 억제할 수 있는 가능성에 대해 인체시험을 실시하였음.

- 하루 ara 2 g을 정상인 21명이 1번 음료로 설탕과 함께 섭취하였을 때 혈당의 상승을 억제하는 영향에 대해 조사하였음 (Shibanuma et al., 2011).

- 하루 ara 3 g을 정상인 15명이 1번 음료로 설탕과 함께 섭취하였을 때 장내 sucrase의 활성에 미치는 영향에 대해 조사하였음 (Krog-Mikkelsen et al., 2011).

(다) 기능성분 및 관련물질의 안전성(부작용·독성 등) DB 검색정보

① Toxline, Pubmed, PDRhealth 및 Natural Medicines로부터 각각 아래의 검색어로 조사하였을 때 표 53과 같은 결과를 얻었음.

○ 이 결과를 요약하면 밀로부터 발생하는 부작용으로는 밀알레르기 (wheat allergy)와 밀못견딤증 (wheat intolerance)이 있으며 (PDRhealth), 밀알레르기에는 제빵사천식 (baker's athma)이 대표적이며, 밀못견딤증에는 만성소화장애증 (celiac disease)이 있음.

○ Toxline, Pubmed 등에서 주어진 검색어에 대해 밀 또는 밀기울의 부작용 내용들도 모두 밀알레르기와 밀못견딤증에 관한 것이었음.

표 53. 기능성분 및 관련물질의 안전성(부작용·독성 등) DB 검색정보 결과

검색데이터베이스	검색어	검색결과	안전성 관련 정보 여부	첨부번호
Toxline	(wheat) And (safety or adverse or toxic)	8개	3개	
	(wheat) And (bran) And (safety or adverse or toxic)	2개	0개	
Pubmed	(wheat) And (safety or adverse or toxic)	2649개	18개/400개 (최신)	
	(wheat) And (bran) And (safety or adverse or toxic)	124개	0개	
PDRhealth	'wheat'	약 1000개	2개 (wheat allergy 및 wheat intolerance)	
Natural Medicines	'wheat'	0개	0개	

② 밀알레르기 및 밀못견딤증

○ 밀알레르기는 면역반응으로 IgE가 밀에 있는 gluten과 결합하여 생긴 복합물이 히스타민 등을 분비하도록 하여 발생하며, 밀못견딤증 중 만성소화장애증은 자가면역질환으로 유전적으로 소질을 가진 사람이 transglutaminase 등에 대한 항체를 생성하고 이것이 transglutaminase의 작용을 억제하여 발생함 (Sapone et al., 2012; Guandalini & Newland, 2011; Pietzak, 2012).

㉠ 밀알레르기

○ 밀알레르기 중 흔히 관찰되는 제빵사전식은 밀가루가 호흡기를 통해 흡입하였을 때 글루텐에 노출되고 이로 인해 수분 또는 수시간 후 급성으로 나타남 (Sapone et al., 2012; Page et al., 2010). 따라서, 밀알레르기는 본 연구개발에서 개발하고자 하는 신청원료 (밀기울추출물)를 섭취하고자 하는 사람과의 관련성이 적음.

㉡ 만성소화장애증 (밀못견딤증)

○ 만성소화장애증은 밀뿐만 아니라 호밀, 보리 등에 있는 단백질 중 gluten의 구성단백질인 prolamin (밀에 있는 것은 gliadin이라 불림)을 섭취하였을 때 이에 대해 감수성을 나타내는 사람 (사람백혈구항원인 HLA type 중 HLA-DQ2과 HLA-DQ8 유형을 가진 사람)에게서 발병하는 것으로 밀 섭취 후 수주 또는 수년간에 걸쳐 발병하는 것임 (Sapone et al., 2012). 이의 질환은 서구인에서는 약 1%가 이러한 증상을 나타내는 반면, 한국인과 일본인에서는 발병의 한 원인이 되는 HLA-DQ2의 빈도도 낮고 이에 따라 발병률도 매우 낮아 크게 문제가 되지 않음 (Sapone et al., 2012; Cummins & Roberts-Thomson, 2009; Rallabhandi, 2012).

○ 아울러 이러한 환자의 치료는 이 환자들이 글루텐의 섭취를 제한하는 것이고, 이의 한 방법으로 글루텐을 함유한 음식의 섭취를 제한하거나 또는 글루텐이 제거된 음식을 섭취하는 방법이 있음 (Rashtak & Murray, 2012; Fasano, 2012). 따라서 혹시라도 밀에 대해 만성소화장애증을 나타내는 사람은 본 연구개발에서 개발된 신청원료를 사용하기 이전에 이미 이러한 증상을 나타내고 있을 것이므로 본 원료의 사용에서 제외하면 문제가 되지 않을 것임. 아울러 gliadin은 물에 잘 녹지 않으므로 (Lagrain et al., 2010), 물로 추출한 후 상등액을 이용하는 경우 대부분이 제거될 것이므로 문제를 일으킬 소지가 낮음 (원료에 남아 있는 gliadin 함량은 측정 kit로 측정이 가능하여 기능성 원료로 개발된 후 섭취량 내에 존재하는

gliadin의 함량을 측정할 예정임).

(라) 섭취량 평가정보

- 독성시험면제에 대한 평가자료로 섭취량평가자료를 제시함.
- 이 모두에 의해 평가한 한 결과 신청원료의 섭취량은 안전한 것으로 판단되었음.

① 섭취량 평가자료

㉠ 신청원료 (밀기울추출물)에 대한 자료

(a) 신청원료의 제안 섭취량 (요약)

- 추출건조물: 3 g/일 [지표성분 (ara): 75 mg]
- 밀기울 (원재료): 30 g/일 (수율 약 10%)

(b) 신청원료의 제안 섭취량 (근거자료)

- 신청원료는 원재료 (밀기울)로부터 약 10% 수율 (중량비)로 얻었으며, 이 원료에는 지표성분인 ara가 약 2.5% 함유되어 있음.
- 생쥐를 이용한 동물실험에서 400 mg/kg/day에서 효능을 나타내고, 이러한 결과를 사람에게 적용할 경우 필요한 용량을 계산하기 위해 미국 FDA 산하기관인 CDER (Center for Drug Evaluation and Research)에서 제시한 지침을 활용하였음 (Guidance for industry: Estimating the maximum safe starting dose in initial clinical trials for therapeutics in adult healthy volunteers. July 2005). 이 지침에 의하면 생쥐를 실험동물로 사용할 때 60 kg 사람에게 대해서는 단위 무게 당 0.08을 제안하고 있음. 이를 고려하면 신청원료인 경우 60 kg 사람인 경우 1일 약 2 g의 원료를 섭취하게 됨 (400 mg/kg x 0.08 x 60 kg). 60 kg 보다 큰 사람까지 고려하여 그 여유분 (margin)을 1.5배로 하면 신청원료의 1일 섭취량은 3 g이 되고, 이를 섭취하는 ara의 총량으로 계산하면 약 75 mg임.

㉡ 원재료 섭취량에 의거한 안전성 평가

- 섭취량은 원재료인 밀기울의 섭취량과 지표성분인 ara의 섭취량의 관점에서 비교설명함.

(a) 밀기울

㉠ 일상적인 섭취량에 의한 평가

- 밀기울에 대한 일상적인 섭취량에 대한 자료를 확보하기 어려워 켈로그회사에서 밀기울을 이용하여 만들어 시리얼 형태로 판매하는 All-Bran 한끼 식사량을 근거로 판단하였음. 이 시리얼 중 “Original”에는 한끼에 해당하는 1/2컵 (serving size)에는 시리얼이 31 g이고 여기에는 밀식이섬유가 10 g이 포함되어 있음. 한편, 켈로그회사의 호주지사에서 판매하는 All-Bran 38 g에는 식이섬유가 11 g 포함되어 있으며 이 식이섬유에 해당하는 가공되지 않은 밀기울 (밀기울)은 25 g에 해당하였음 (Macrae et al., 1997). 이상으로부터 All-Bran 30 g에는 밀식이섬유가 약 10 g 포함되어 있고, 이는 약 20 g의 생밀기울에 해당하고, 1일 매 끼마다 All-Bran을 섭취하는 경우에는 60 g에 해당함.
- 1일 섭취량의 신청원료 (밀기울추출물)를 제조하는데 사용한 밀기울 30 g이므로, All-Bran을 회사에서 추천하는 한끼로 섭취할 경우 섭취하는 밀기울 20 g의 1.5배에 해당하고, 3끼를 All-Bran으로 섭취하는 밀기울 60 g의 0.5배에 해당함. 따라서 최악의

경우에도 원재료 평균섭취량의 1.5배에 해당하여 극단적인 양을 평가하는 기준인 3배를 넘지 않음.

⑥ 인체시험 섭취량에 의한 평가

- 인체시험에서 사용한 밀기울의 양을 가장 장기적으로 시행한 인체시험, 중장기적으로 가장 많은 양을 복용한 인체시험 및 가장 많은 양을 섭취한 단기적인 인체시험으로 나누어서 설명함.
 - 최장 인체시험: 하루 All-Bran의 식이섬유의 양 13.5 g (시리얼의 양은 약 45 g, 밀기울 양 약 27 g에 해당)을 adenoma가 제거된 사람 720명이 최대로 평균 34개월 (Alberts et al., 2000; Jacobs et al., 2002) 시행한 인체시험임.
 - 가장 많이 복용한 중장기 인체시험: 하루 밀기울 자체 57 g을 담석증환자 6명이 4-6주 동안 섭취하였을 때 담즙염의 대사에 미치는 영향에 대해 조사 (Pomare et al., 1976)한 인체시험임.
 - 가장 많이 복용한 단기 인체시험: 건강한 남성에게 All-Bran 150 g (생밀기울 약 100 g)을 단회 섭취하였을 때 장에서 발생하는 수소기체의 양을 조사 (Hickey et al., 1972)한 인체시험임.
- 이상으로부터 예로 들은 인체시험에서 사용한 밀기울의 양은 모두 1일 섭취량의 신청원료를 제조하는데 사용한 밀기울 30 g과 같거나 많은 양을 섭취하고 있어 신청원료의 섭취량이 안전한 것을 알 수 있음.

(b) Ara

- Ara의 섭취량에 의한 평가는 ara의 섭취량이 표시되는 밀식이섬유, AX 및 밀의 구성단당류의 관점에서 설명함.

① 밀식이섬유에서의 ara의 섭취량

- 식약처에서 밀식이섬유를 건강기능식품으로 인정할 때 인용된 문헌 (Lu et al., 2000)에서는 하루 밀식이섬유 12 g을 빵으로 만들어 정상인 14명이 3일 동안 섭취하였을 때 식후혈당을 낮추는 효능에 대해 조사하였음.
- 이 시험에서 사용한 밀식이섬유는 ara + xyl의 합으로 계산한 AX가 63%였으며, AX에서의 ara:xyl = 0.66이었음. 이로부터 밀식이섬유 1 g에 포함된 ara의 함량은 250 mg [630 mg x (0.66/1.66)]으로 계산되며, 따라서 밀식이섬유 12 g에는 ara의 함량이 3 g임. 이는 신청원료에 포함된 ara의 함량인 75 mg의 약 40배에 이르는 것으로 신청원료로부터 섭취하는 ara의 함량은 안전한 범위인 것을 알 수 있음.

② 밀기울 유래 AX에서의 ara의 섭취량

- 벨기에 소재 기업인 Fugeia NV가 개발한 밀기울추출물을 미국 FDA로부터 GRAS (generally recognized as safe)로 허가를 받았음 (GRAS Notice No. GRN 000343, 2010년 11월 22일). GRAS로 승인받을 당시 AXOS는 한끼 (serving) 당 2.4-3.2 g 섭취하는 것으로 제안되었으며, 이 AXOS에는 실제 AXOS가 70% 이상이고 ara:xyl = 0.26이었음 (Cloetens et al., 2010). 이로부터 AXOS 1 g에 포함된 ara의 함량은 150 mg [700 mg x (0.26/1.266)]으로 계산되며, 따라서 섭취하는 AXOS 3.2g에는 ara의 함량이 약 500 mg임. 이는 신청원료에 포함된 ara의 함량인 75 mg의 약 6.7배에 이르는 것으로 신청원료로부터 섭취하는 ara의 함량은 안전한 범위인 것을 알 수 있음.

o 인체시험에서는 AXOS가 10 g까지 사용되었으며 (Cloetens et al., 2010), 이 경우에는 신청 원료로부터 섭취하는 ara의 함량의 약 21배에 이릅니다.

㉓ 순수성분 ara의 섭취량

o 순수한 ara가 sucrase를 억제하는 것을 조사하는 인체시험에서는 하루 3 g이 섭취되었음 (Krog-Mikkelsen et al., 2011). 이는 신청원료에 포함된 ara의 함량인 75 mg의 약 40배에 이르는 것으로 신청원료로부터 섭취하는 ara의 함량은 안전한 범위인 것을 알 수 있음.

(마) 영양평가, 생물학적 유용성, 인체적용시험 정보

① 영양평가 정보

o 영양평가 정보는 건강기능식품 기능성 원료가 기타 영양성분의 흡수·분포·대사·배설 등에 미치는 영향을 연구한 자료를 요약 또는 영양소, 식품, 의약품과의 상호작용 등에 관한 자료를 요약하는 것임.

o 신청원료의 원재료인 밀기울은 금속이온과 미세영양성분의 흡수에 영향을 미쳤음.

㉔ 밀기울이 기타 영양성분의 흡수에 미치는 영향

(a) 금속이온의 흡수에 미치는 영향

- 요약하면 밀기울은 아연과 칼슘의 흡수는 방해하였으나, 철분과 크롬의 흡수에는 크게 영향을 미치지 않았음.

o Sandverg et al. (1982): 밀기울이 ileostomy 환자 8명에게 밀기울을 16 g/일로 7일 동안 공급하였을 때 소장으로부터 아연의 흡수를 방해하였음. 하지만 인, 칼슘, 마그네슘 및 철의 흡수는 방해하지 않았음.

o Farah et al. (1985): 젊은 사람 (21-26세) 32 명에게 밀기울을 20 g/일로 7일 동안 공급하였을 때 아연의 흡수를 유의하게 감소시켰음.

o Fairweather-Tait et al. (1989): 정상성인을 대상으로 보통 밀기울과 extruded 밀기울이 철과 아연의 흡수에 미치는 영향을 조사한 결과 밀기울의 가공여부는 흡수에 영향을 미치지 않았음.

o Bagheri & Gueguen (1985): 돼지 (35-40 kg)을 대상으로 밀기울을 20% 포함하는 사료를 3주 동안 제공한 결과 아연과 칼슘의 흡수에 나쁜 영향을 미쳤음.

o Bagheri SM, Gueguen L. (1982): 쥐 20마리에 대해 밀기울을 사료에 15%까지 첨가하여 10일간 공급한 결과 아연과 칼슘의 흡수에 영향을 미치지 않았음.

o Weaver et al. (1996): 건강한 여성에게 밀기울을 16 g/일 공급한 결과 밀기울이 칼슘과 결합함으로써 칼슘의 흡수가 방해되었음.

o Donangelo & Eggum (1986): 쥐에게 밀기울이 포함된 사료를 9일간 먹었을 때 아연과 칼슘의 흡수를 방해하였음.

o Fairweather-Tait (1982): 쥐를 이용하여 밀기울이 철의 흡수에 미치는 영향을 조사한 결과 영향을 미치지 않았음.

o Frolich W, Lyso A. (1983): 돼지에게 20%의 밀기울이 첨가된 사료를 공급하여도 철의 흡수를 방해하지 않았음.

o Keim et al. (1987): 쥐 (10 마리)에게 밀기울을 35%가 포함된 사료를 공급한 결과 크롬의 흡수를 방해하지 않았음.

(b) 미세 영양성분의 흡수에 미치는 영향

- 요약하면 밀기울은 folic acid의 흡수는 촉진한 반면에 비타민 B-6의 흡수는 방해하지 않았음.

o Keagy et al. (1988): 젊은 남자 7 명에게 밀기울을 60 g/일로 9일 동안 공급하였을 때 monoglutamyl folic acid의 흡수를 촉진하였음.

o Hudson et al. (1988): 쥐에게 밀기울이 20% 포함된 사료를 28일간 먹었을 때 비타민 B-6의 흡수를 방해하지 않았음.

o Fernandez et al. (1998): 토끼에게 전체식이섭유 (4 g/일) 중 밀기울로부터 온 식이섭유가 75% 포함된 사료를 섭취하게 한 결과 피임약으로 사용되는 ethinylestradiol의 흡수를 약 30% 감소시켰음.

② 생물학적 유용성

o 생물학적 유용성은 건강기능식품 기능성 원료 또는 성분이 체내 흡수 후 생체작용에 반영되는 정도를 연구한 자료를 요약하는 것으로 이에 시간대별로 측정된 기능성분의 AUC(Area under the Curve), 혈중최고농도 도달시간(T_{max}), 혈중최고농도(C_{max}) 등을 포함함.

o 밀기울에 대해서는 문헌조사를 시행하였으나, 생물학적 유용성을 나타내는 자료가 많지 않았으며, 현재는 구성성분 (AX 등)에 대한 생물학적 유용성에 관련된 문헌을 조사 중에 있음.

③ 인체적용시험 정보

o 인체적용시험 정보는 기능성 시험을 위해 인체적용시험을 수행할 때, 안전성지표와 이상반응의 확인 항목이 있으면 이를 기술하는 것임. 이상반응사례, 기초 건강지표(체중, 혈압, 심전도 등), 혈액학적·혈액생화학적 검사(헤마토크리트, 혈색소, 백혈구수, 적혈구수, 혈소판수, 혈당, AST, ALT, ALP, 총단백질, 알부민, 총빌리루빈, γ -GTP, 콜레스테롤(total, LDL, HDL), 중성지방, 요소질소, 크레아티닌, 요산, calcium, potassium 등) 및 뇨 검사(산도, 아질산염, 케톤체 등)

o 현재까지 조사된 바로는 밀기울이나 밀식이섭유가 건강지표에 이상반응을 일으키는 예는 발견되지 않았으며, 오히려 혈당이나 콜레스테롤을 낮추는 등 건강지표에 도움을 주는 효능들이 관찰되었음.

㉠ 밀기울

- 밀기울은 장을 통과시간을 단축시켜 변비에 효능을 나타내는 것으로 관찰되었으며, 장염을 개선시키는 효능도 관찰되었음. 반면에 혈중 콜레스테롤의 농도를 낮추는 효능에 대해서는 그 증거가 약하였음.

(a) 장기능에 대한 영향 조사

o 하루 밀기울 자체 36 g을 건강한 사람 8명이 1회 섭취하도록 한 결과 장을 통과하는 시간이 단축되었음 (Hamberg et al., 1989).

o 하루 밀기울 자체 20 g을 diverticular disease 환자 24명이 4주 동안 섭취하였을 때 장운동에 미치는 영향을 조사한 결과 대변의 양이 증가하고 장을 통과하는 시간이 단축되었음 (Smith et al., 1981).

o 하루 밀기울 32 g/day을 섞어 만든 빵을 건강한 청년 24명이 4주 동안 섭취하였을 때 대장의 기능에 미치는 영향에 대해 조사한 결과 장을 통과하는 시간을 단축시켰음 (Heller et al., 1980).

- 하루 밀기울 30 g을 섞어 만든 빵을 건강한 청년 9명이 4주 동안 섭취하였을 때 대변양이 증가하는 기전에 대해 조사한 결과 대변의 양이 증가하였음 (Chen et al., 1998).
- 하루 밀기울 자체 30 g을 과민성 장염이 있는 어른 188명이 12주 동안 섭취하게 한 결과 장염이 개선되었음 (Parisi et al., 2002).

(b) 지질에 대한 영향 조사

- 하루 밀기울 자체 57 g을 담석증환자 6명이 4-6주 동안 섭취하였을 때 담즙염 대사에 미치는 영향에 대해 조사한 결과 혈중 콜레스테롤 농도를 감소시켰음 (Pomare et al., 1976)
- 하루 밀기울 35 g을 섞어 만든 빵을 약한 고지혈증이 있는 남자 28명이 4주 동안 섭취하였을 때 혈중지질 등에 미치는 영향에 대해 조사한 결과 혈중콜레스테롤 농도와 LDL을 낮추는 효능이 관찰되지 않았음 (Kestin et al., 1990).
- 하루 밀기울 40 g을 섞어 만든 시리얼이나 머핀을 고지혈증이 있는 남자 10명이 3주 동안 섭취하였을 때 혈중지질 등에 미치는 영향에 대해 조사한 결과 혈중콜레스테롤 농도와 LDL을 낮추는 효능이 관찰되지 않았음 (Anderson et al., 1991).

(c) 대장에서 기체발생에 대한 영향 조사

- 건강한 남성에서 All-Bran 150 g (생밀기울 약 100 g)을 단회 섭취하였을 때 장에서 발생하는 수소기체의 양을 조사한 결과 장에서의 기체발생이 증가하였음 (Hickey et al., 1972).

㉔ 밀식이섭유

- 밀가루로부터 전분과 활성글루텐을 얻고 난 후의 부산물로 얻은 AX를 주성분으로 하는 식이섭유 (혼합물)가 혈당이나 장기능에 미치는 영향에 대해 인체시험이 실시되었음.
- 밀식이섭유는 혈당이나 인슐린을 개선시키는 효능이 관찰되었으며, 장기능도 발효특성을 좋게 하여 개선시켰음.

(a) 혈당조절에 대한 영향 조사

- Lu 등 (Lu et al., 2000; Lu et al., 2002)은 질량비로 AX 63%, 전분 15%, 단백질 10% 등으로 이루어진 밀식이섭유가 정상인과 제2형 당뇨병환자의 식후 혈당에 미치는 영향을 조사하였음.
 - 하루 밀식이섭유 12 g을 빵으로 만들어 정상인 14명이 3일 동안 섭취하였을 때 식후혈당을 낮추는 효능에 대해 조사한 결과 혈당과 혈중 인슐린농도가 감소하였음 (Lu et al., 2000).
 - 하루 밀식이섭유 14-17 g을 빵으로 만들어 제2형 당뇨병환자 7명이 5주 동안 섭취하였을 때 식후혈당을 낮추는 효능에 대해 조사한 결과 혈당과 혈중 인슐린농도가 감소하였음 (Lu et al., 2002).

(b) 장기능조절에 대한 영향 조사

- Grasten 등 (Grasten et al., 2003)은 질량비로 AX 50%, AGP 15%, 단백질 30% 등으로 이루어진 밀식이섭유 (Courtin & Delcour, 1998)가 정상인의 장기능에 미치는 영향에 대해 조사하였음.
 - 하루 밀식이섭유 13 g을 정상인 14명이 3주 동안 빵의 형태로 섭취하였을 때 장기능에 미치는 영향에 대해 조사한 결과 대장에서 발효가 잘 되고 부티르산의 생성이 증가하였음.

(바) 독성시험

- 의사결정도에 의해 동물을 이용한 독성시험은 면제됨.
- 하지만 통밀을 분쇄하여 얻은 추출물을 열수추출한 후 원심분리에 의해 밀껍질을 제거하고 얻은 상등액을 동결건조한 건조물에 대해 쥐를 이용한 단회투여 독성시험을 2006년도에 식약처로부터 공인된 GLP시설을 갖춘 대구가톨릭대 바이오안전성센터 (현재 GLP 센터로 개명: <http://www.glpcenter.co.kr/zbxe/>)에 의뢰하여 실시하였음. 그 결과 열수추출물을 먹이는데 한계인 2 g/kg에서 독성이 관찰되지 않았음 (Data not shown).

(8) 기능성 내용 및 그에 관한 자료

○ 기능성 시험은 세포 및 동물시험을 포함하는 비인체시험과 사람을 대상으로 하는 인체시험으로 나누어짐.

(가) 비인체시험 (제1세부, 제1협동, 제2협동, 제3협동)

○ 비인체시험은 사용한 시료로 분류하면 실제 신청원료 (밀기울추출물), 인체시험용 플라시보 후보 (플라시보), 신청원료를 섞은 프리믹스, 유사원료 (통밀추출물) 및 기능성분 고함유 통밀추출물로 나눌 수 있음. 이 외에도 활성을 나타내는 순수성분으로는 AX (구매된 것 및 본 과제에서 분리정제된 것), AG (구매된 AG 및 본 과제에서 분리정제된 AGP)이 있음.

○ 이러한 시료들에 대해 사용한 실험은 크게 시험관 시험과 동물시험으로 나누어짐.

① 신청원료 (밀기울추출물)

○ 이러한 시료들에 대해 사용한 실험은 크게 시험관 시험과 동물시험으로 나누어짐.

㉠ 시험관시험 (세포실험)

(a) 알츠하이머병모델 (제1협동)

㉠ 신경세포 독성 보호효과

㉠ 우선 베타아밀로이드로 유도된 신경세포 독성에 대한 밀기울추출물(wheat bran extract, WBE)의 일련의 보호효과를 검토하기 위하여, 다양한 신경세포주(SH-SY5Y neuroblastoma 세포, BV-2 micriglia 세포, C6 glioma 세포)들을 사용하여 세포생존율을 MTT dye reduction assay로 측정하였음(그림 64). 밀기울추출물을 30분간 전처리 한 다음 15 μ M의 베타아밀로이드(A β_{25-35})를 가하여 세포독성에 미치는 보호효과를 검토한 결과, 베타아밀로이드를 첨가한 경우에는 감소된 세포생존율이 추출물 농도의존적(0.1, 0.3, 1 mg/ml)으로 증가됨을 확인 할 수 있었으며 1 mg/ml에서 최대의 보호효능을 나타냄.

㉠ 신경세포 사멸 보호효과

㉠ 밀기울추출물이 베타아밀로이드로 유도된 신경세포 사멸 과정에서 어떠한 역할을 하는지 규명하기 위하여, 아포토시스(apoptosis)를 측정하는 대표적인 지표중의 하나인 DNA fragmentation을 *in situ* nick-end labeling (TUNEL staining)을 통하여 측정하였음. TUNEL staining은 apoptosis 과정에서 활성화된 endonuclease에 의해 180-200 bp 단위로 fragmentation 된 DNA를 3-OH위치에 표식된 dUTP를 결합시켜 기질을 공급하여 발색시키는 방법임. 베타아밀로이드를 15 μ M의 농도로 24시간 처리한 결과 DNA fragmentation이 일어나 TUNEL staining에 positive한 세포의 수가 현저히 증가되었으며, 이는 밀기울추출물을 전처리 함으로써 감소되었음(그림 65).

㉠ 일반적으로 apoptosis가 진행되는 과정에서 다양한 사멸 지표들이 나타나는데, 특히 미토콘드리아는 손상을 받아 막전압(mitochondrial membrane potential, MMP)이 감소되며 이는 TMRE 형광염색시약을 사용하여 측정 가능함. 베타아밀로이드(15 μ M)만 처리한 경우 MMP가 감소된 것에 비하여, 밀기울추출물을 처리한 세포에서는 대조군과 유사한 수준으로 MMP가 회복되었음(그림 66A).

㉔ 이러한 apoptosis 조절과정에는 다양한 단백질들이 관여하며, 여러 가지 유전자중에서 제일 먼저 발견된 것이 Bcl-2임. Bcl-2 gene family는 크게 기능적인 면에서 두 가지로 대별어, 그 상대적인 비가 세포의 생존과 사멸을 결정짓는데 중요한 역할을 함. 즉, Bcl-2와 Bcl-X_L은 anti-apoptotic한 기능을 가지며, Bax를 비롯한 Bad, Bak, Bik, Bcl-X_S등은 오히려 pro-apoptotic한 기능을 가져, 상대적으로 Bcl-2 또는 Bcl-X_L의 비가 증가되는 경우 세포는 생존으로 진행을 하게 됨. 이러한 Bcl-2 단백질의 발현 변화는 이후 미토콘드리아로부터 cytochrome c 유출, caspase 활성화, PARP 절단 등을 통하여 DNA fragmentation을 매개하게 됨. SH-SY5Y 세포에 베타아밀로이드(15 μM)를 처리함으로써 proapoptotic Bax/antiapoptotic Bcl-2의 비율이 증가되며 PARP 절단이 일어난 것을 관찰 할 수 있었으며, 이는 밀기울추출물을 전처리 함으로써 현저히 감소되었음(그림 66B).

㉕ 신경영양인자 강화 효과

㉕ 또 다른 신경보호 기전으로 신경영양인자 BDNF의 발현을 측정함. BDNF는 neurotrophin family의 일종으로 neurotrophins은 polypeptide growth factor로 신경세포 및 비신경세포의 분열, 분화, 생존을 조절하며, BDNF 이외에도 nerve growth factor (NGF), NT-3 (neurotrophin-3), NT-4 (neurotrophin-4) 등을 포함함. 최근 이러한 인자들의 발현 변화, 수용체에 대한 친화도 변화가 치매, 헌팅톤병, 신경정신과 질환, 우울증, 중독 등과 밀접히 관련성이 있는 것으로 보고되고 있음. 특히, BDNF는 신경세포 생존, 장기 기억력 강화(long-term potentiation), 시냅스 가소성(synaptic plasticity), 신경발생(neurogenesis), 신경극 발아(neurite outgrowth) 등과 관련되어 기억력 형성에 중요한 역할을 하는 것으로 알려짐.

㉕ 실험결과 베타아밀로이드(15 μM)만 처리한 경우 BDNF의 발현이 감소됨을 확인할 수 있었으며 이는 밀기울추출물 처리에 의해 다시 증가됨(그림 67A). 한편, 이러한 BDNF의 증가는 상위 조절인자인 c-AMP-response element-binding protein (CREB)의 활성화를 통해 매개됨. 베타아밀로이드(15 μM)만 처리한 경우 인산화를 통한 CREB의 활성은 감소되었으며, 이는 밀기울추출물을 처리함으로써 다시 회복됨(그림 67B).

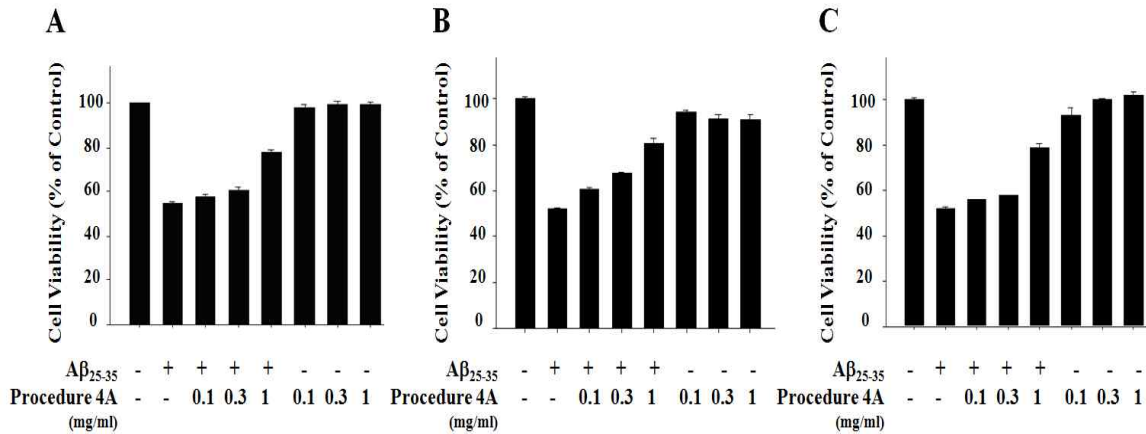


그림 64. 베타아밀로이드로 인한 세포독성에 대한 추출혼합물의 보호효과

SH-SY5Y neuroblastoma 세포(A), BV-2 micriglia 세포(B), C6 glioma 세포(C)에 추출혼합물을 농도별 (0.1, 0.3, 1 mg/ml)로 30분간 전처리 한 다음 베타아밀로이드로 세포독성을 유발하여 세포생존율에 미치는 영향을 MTT dye reduction assay로 측정함.

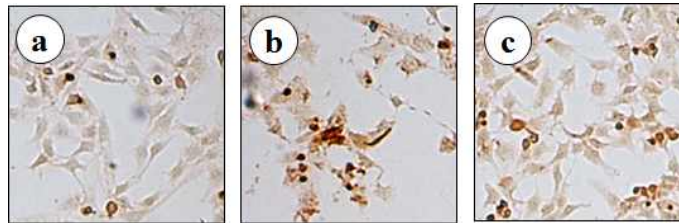


그림 65. 베타아밀로이드로 인한 신경세포에 대한 밀기울추출물의 보호효과

SH-SY5Y neuroblastoma 세포에 추출혼합물을 30분간 전처리 한 다음 베타아밀로이드로 세포 사멸을 유발하여 DNA fragmentation을 TUNEL 염색법으로 측정함. a : Control, b : Aβ₂₅₋₃₅, c : Aβ₂₅₋₃₅ + WBE (1 mg/ml)

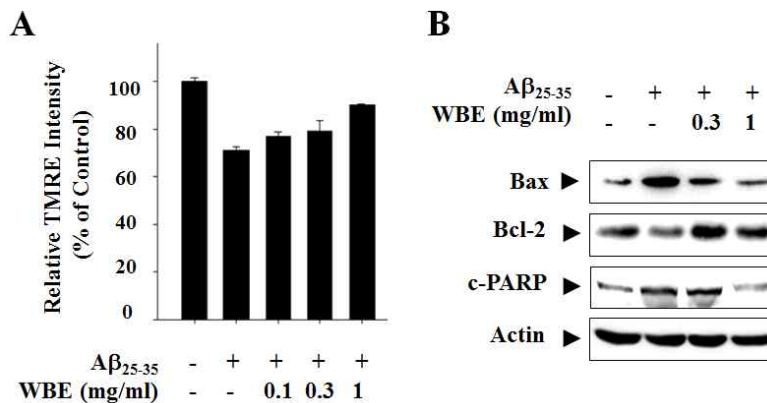


그림 66. 베타아밀로이드로 인한 신경세포 사멸 매개 지표에 대한 밀기울추출물의 보호효과

SH-SY5Y neuroblastoma 세포에 추출혼합물을 30분간 전처리 한 다음 베타아밀로이드로 세포 사멸을 유발하여 미토콘드리아 막전압(A), Bcl-2 family 단백질 발현 및 PARP 단백질 절단 (B)에 미치는 영향을 MMP 형광발색법과 Western blot으로 각각 측정함.

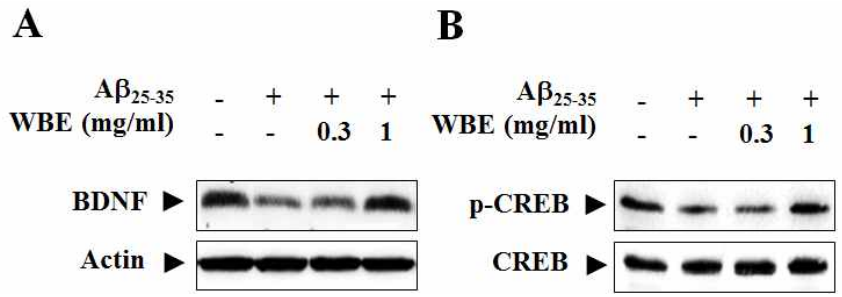


그림 67. 밀기울추출물이 신경영양인자의 발현 및 상위 조절인자 활성화에 미치는 영향
 SH-SY5Y neuroblastoma 세포에 추출혼합물을 30분간 전처리 한 다음 베타아밀로이드로 세포 사멸을 유발하여 BDNF 단백질의 발현(A) 및 상위 조절인자 CREB의 활성화(B)에 미치는 영향을 Western blot analysis를 통하여 비교 측정함.

㉔ 동물시험

(a) 건망증 모델 (제1협동)

㉑ 기억력 개선 효과

㉒ 수동회피실험

○ 밀기울추출물(WBE)에 대해 수동회피실험을 실시한 결과 step-through latency time에서 정상군 (SHAM)의 경우에 190.11 ± 31.38 초를 기록하였고, 스코폴라민 대조군(SCO)은 42.51 ± 8.25 초를 기록하여 147.6초의 차이를 보여 주었음. 한편, 실험군(SCO + WBE) 특히 밀기울추출물을 800 mg/kg로 투여한 경우 step-through latency time에서 137.34 ± 36.74 초를 기록하였음(그림 68).

㉓ 물미로실험

○ 물미로 실험에서는 실험동물이 주변의 단서를 파악하여 숨겨진 도피대를 찾는데 걸리는 평균탈출시간 mean escape time을 비교함. 결과, 그림 69에서 나타내는 바와 같이 정상군 (SHAM)의 경우 훈련 시간이 길어질수록 도피대를 찾아가는 시간이 현저히 감소되었으며, 스코폴라민(SCO)만 복강으로 투여한 경우 훈련 시간과 관계없이 거의 도피대를 찾아가지 못하는 것을 확인 할 수 있었음. 한편, 밀기울추출물을 투여한 실험군(SCO + WBE)은 스코폴라민만 단독으로 투여한 군(SCO)에 비하여 평균탈출시간이 감소되는 경향을 나타내었으며, 특히 훈련 3일째 이후 800 mg/kg의 경구투여 용량에서 통계적으로 유의한 효능을 나타내었음.

(b) 아세틸콜린 대사에 미치는 영향

㉑ 밀기울추출물의 인지 및 기억력 향상 기전을 규명하기 위하여 기억과 학습에 중요한 역할을 하는 신경전달물질인 아세틸콜린의 양을 측정하였음. 아세틸콜린은 기억과 학습이라는 뇌 작용에 중심적인 역할을 담당하는 신경전달물질로, 이가 부족하면 기억력 손상을 비롯한 인지 기능장애가 유발 됨. 실제, 알츠하이머병 질환자의 중추신경계 내에 아세틸콜린의 수치는 정상인과 비교하여 현저히 낮으며, 반대로 아세틸콜린을 분해하는 효소인 acetylcholine esterase (AChE)의 발현은 높은 것으로 보고됨. 또한, 아세틸콜린을 합성하는 효소 choline acetyltransferase (ChAT)의 활성도가 급격히 떨어지고 이는 해마에서 최대이며, 뇌에서 니코틴성 및 무스카린성 아세틸콜린 수용체(nicotinic and/or muscarinic acetylcholine receptor : nAChR and/or mAChR) 수가 감소된 것이 확인됨.

㉒ 스코폴라민을 복강으로 투여하여 기억력은 손상시킨 경우 대뇌피질(cortex, CX)과 해마(hippocampus, HP) 부위에서 아세틸콜린의 양이 정상군에 비해 감소하였으며, 이는 추출혼합물 400 mg/kg 및 800 mg/kg을 경구투여 함으로써 용량의존적으로 회복되었음(그림 70A).

㉓ 대뇌피질과 해마 부위에서 아세틸콜린을 합성하는 효소인 ChAT의 단백질 발현에 대한 밀기울추출물의 효능을 Western blot으로 측정한 결과, 특히 800 mg/kg 용량에서 효과적으로 증가시킴을 확인할 수 있었음(그림 70B). 한편, 추출혼합물은 아세틸콜린을 분해하는 효소인 AChE의 발현에는 직접적인 영향을 주지 않았음(그림 70B).

(c) 신경영양인자 발현 증가 효과

㉑ 또 다른 신경보호 기전으로 신경영양인자 BDNF의 발현을 측정함. 스코폴라민을 복강으로

투여하여 기억력을 손상시킨 경우 대뇌피질과 해마 부위에서 BDNF의 발현이 감소됨을 확인할 수 있었으며 이는 밀기울추출물 처리에 의해 특히 800 mg/kg 용량에서 현저히 증가됨 (그림 71A).

㉔ 한편, 이러한 ChAT 및 BDNF의 유전자 발현 조절에는 다양한 상위 전사인자가 관여하는 것으로 알려져 있으며, 특히 최근 CREB가 주목을 받고 있음. CREB은 기억이나 시냅스 가소성과 관련된 다양한 유전자의 프로모터 부위에 결합하는 전사인자로, CREB의 활성화는 기억 형성 및 강화와 관련된 유전자의 전사를 유도하게 됨. 밀기울추출물을 경구투여 한 경우 CREB 및 상위 인산화 효소인 Akt가 인산화를 통하여 활성화 되어 p-CREB(그림 71B) 및 p-Akt(그림 8C)의 양이 현저히 증가됨을 확인할 수 있었으며, 이는 ChAT 및 BDNF의 발현 증가를 통해 기억력 향상 효과를 매개할 것으로 추정됨.

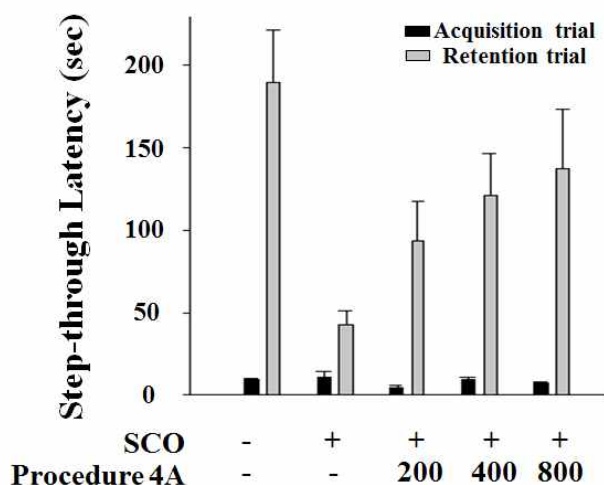


그림 68. 밀기울추출물의 기억력 개선 효능 (스코폴라민 건망증 모델-수동회피 실험)

C57BL/6 마우스에 스코폴라민을 주사하여 발생하는 건망증에 대한 밀기울추출물의 효능을 조사하기 위해 수동회피 실험을 실시하여 전기적 충격을 기억하는 평균시간 step-through latency를 측정함. SHAM은 정상적인 쥐, SCO는 스코폴라민(1 mg/kg)만 주사한 쥐, SCO + WBE는 밀기울추출물을 1일 표기된 용량으로 투여한 쥐를 각각 나타냄.

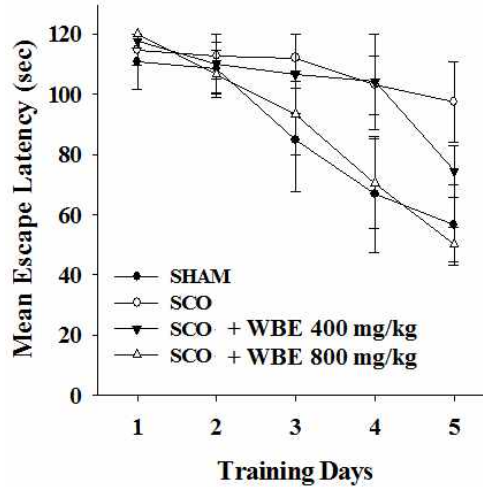


그림 69. 밀기울추출물의 기억력 개선 효능 (스코폴라민 건망증 모델-물미로 실험)

C57BL/6 마우스에 스코폴라민을 주사하여 발생하는 건망증에 대한 밀기울추출물의 효과를 검증하기 위해 물미로 실험을 추가적으로 실시하여 도피대를 찾아가는데 걸리는 시간, 즉 평균탈출시간(mean escape latency)을 측정함. SHAM은 정상적인 쥐, SCO는 스코폴라민(1 mg/kg)만 주사한 쥐, SCO + WBE는 밀기울추출물을 1일 표기된 용량으로 투여한 쥐를 각각 나타냄.

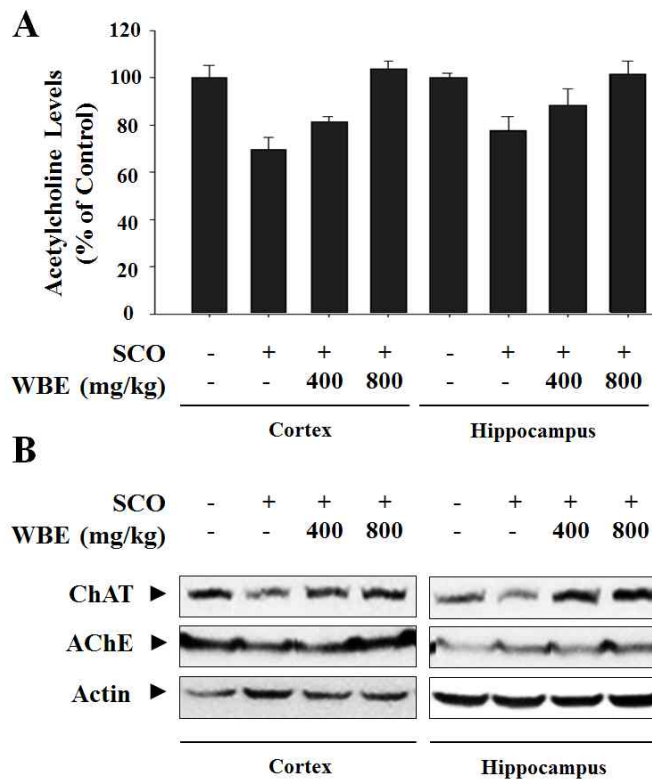


그림 70. 밀기울추출물이 아세틸콜린 양 및 아세틸콜린 합성효소의 발현에 미치는 영향

밀기울추출물을 용량별(400 mg/kg 및 800 mg/kg)로 일주일간 경구 투여한 다음 스코폴라민으로 기억력 손상을 유발하여 대뇌피질(cortex)와 해마(hippocampus) 부위에서 아세틸콜린 양(A)과 아세틸콜린 합성효소(ChAT)의 단백질 발현(B)에 미치는 영향을 Amplex[®] Red Acetylcholine Assay Kit와 Western blot analysis으로 비교 측정함.

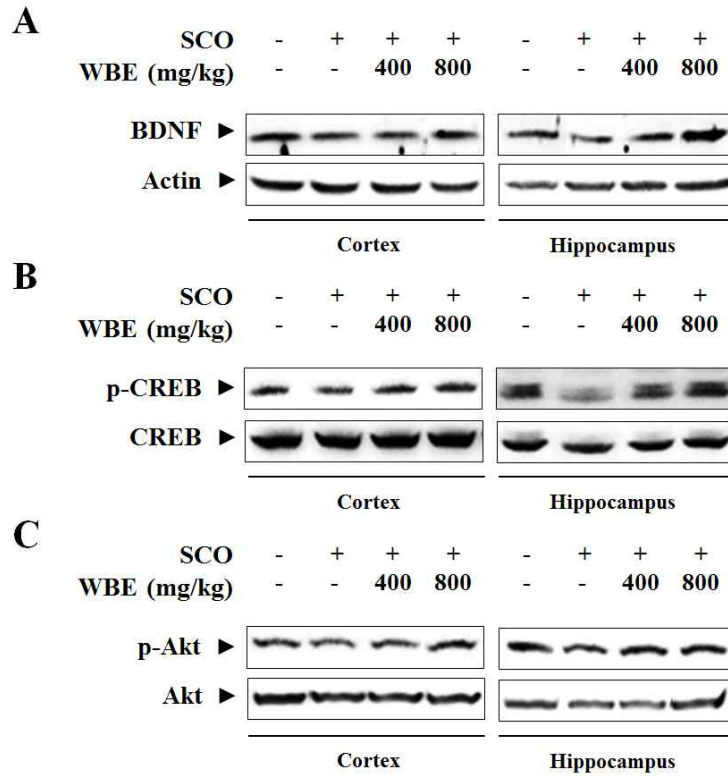


그림 71. 밀기울추출물이 신경영양인자의 발현 및 상위 조절인자 활성화에 미치는 영향

밀기울추출물을 용량별(400 mg/kg 및 800 mg/kg)로 일주일간 경구 투여한 다음 스킵폴라민으로 기억력 손상을 유발하여 대뇌피질과 해마 부위에서 신경영양인자 BDNF의 단백질 발현(A) 및 상위 조절인자 CREB(B)와 Akt(C)의 활성화에 미치는 영향을 Western blot analysis를 통하여 비교 측정함.

(b) 알츠하이머병 모델(제1협동)

㉠ 기억력 개선 효과

㉠ 이후 베타아밀로이드로 유도된 기억력 및 인지능 저하에 대한 밀기울추출물의 보호효과를 검토하기 위하여, C57BL/6 마우스의 뇌척수내(intracerebroventricle : i.c.v)로 베타아미로이드($A\beta_{1-42}$)를 주입하여 알츠하이머형 치매동물 모델을 확립함. 이후, 밀기울 추출물을 400 mg/kg 및 800 mg/kg의 용량으로 1주간 경구 투여하였으며, 기억력 손상에 대한 보호효과를 물미로 실험으로 측정함.

㉡ 공간지각능력을 측정하기 위하여 물미로 실험을 수행한 결과, $A\beta_{1-42}$ 를 단독으로 i.c.v.로 주입한 그룹에서는 기억력이 손상이 되어 숨겨진 플랫폼을 찾아가는 학습 능력이 떨어져 플랫폼을 찾아가는 시간이 오래 걸렸지만, 밀기울추출물을 투여한 그룹에서는 정상군(SHAM)과 거의 비슷한 시간에 플랫폼을 찾아가는 것을 관찰할 수 있었음(그림 72). 특히, 밀기울추출물을 800 mg/kg의 용량으로 투여한 실험군($A\beta_{1-42}$ + WBE)에서 베타아미로이드($A\beta_{1-42}$)만 단독으로 투여한 대조군에 비하여 평균 탈출 잠복기가 둘째 날부터 다섯째 날까지 유의하게 짧아져 정상군(SHAM)과 유사한 수준으로 감소됨.

㉢ 아세틸콜린 합성효소 및 신경영양인자의 발현에 미치는 영향

㉠ 밀기울추출물의 인지 및 기억력 향상 기전을 규명하기 위하여 기억과 학습에 중요한 역할을 하는 신경전달물질인 아세틸콜린의 양을 측정하였음. 베타아미로이드를 뇌실로 주입하여 기억력은 손상시킨 경우 대뇌피질 부위에서 아세틸콜린을 합성하는 효소 ChAT의 단백질 발현이 현저히 감소되었고, 이는 밀기울추출물을 경구투여 함으로써 다시 회복되었음. 한편, 동일한 조건에서 아세틸콜린을 분해하는 효소인 AChE의 발현에는 큰 변화가 없었음(그림 73A).

㉡ 또 다른 신경보호 기전으로 신경영양인자 BDNF의 발현을 측정함. 베타아미로이드를 뇌실로 주입하여 기억력은 손상시킨 경우 대뇌피질 부위에서 BDNF의 발현이 감소됨을 확인할 수 있었으며 이는 밀기울추출물 처리에 의해 증가됨(그림 73B). 한편, 이러한 BDNF의 증가는 상위 조절인자인 CREB의 활성화를 통해 매개됨(그림 73C).

㉣ 신경세포 사멸 및 손상 억제 효과

㉠ 다음으로 신경세포 사멸에 대한 보호효과를 검토하기 위하여 Bcl-2 family 단백질들의 발현을 측정함. 베타아미로이드에 유도되는 apoptosis 진행 과정에 일반적으로 proapoptotic한 단백질인 Bax에 대한 anti-apoptotic한 단백질인 Bcl-2의 비율이 증가하며, 이와 함께 cytochrome c 유출 증가, caspase-3의 활성화, PARP 단백질 전단 등을 통하여 DNA fragmentation이 유도되는 것으로 알려져 있음. 실험결과 베타아미로이드를 단독으로 i.c.v.로 주입한 치매 유발 그룹에서는 세포 생존매개 단백질인 Bcl-2의 발현이 감소되고, 세포 사멸유도 단백질인 Bax의 발현이 증가됨(그림 74A). 한편, 이는 밀기울추출물을 투여한 그룹에서 회복되어 Bcl-2/Bax의 비율이 증가됨.

㉡ 과도하게 생성된 베타아미로이드가 독성을 유발하는 작용기전은 다양하지만 크게 다음 두 가지의 이론으로 질병의 진행을 설명할 수 있음. 첫 번째 이론은, 활성산소종의 작용에 근거를 둬. 뇌의 95% 이상은 지방으로 구성되어 있으며, 자유라디칼(free radical)의 공격을 받

아 쉽게 산화가 되며, 이러한 손상으로 유발된 순차적인 신호전달에 의하여 세포는 결국 사멸에 이르게 된다는 것임. 두 번째 이론은, 아밀로이드 플라크가 발생되면 소교세포 (microglia cell)에 염증이 생겨, 결국 신경을 손상시키고 공격하는 사이토카인의 생성을 자극하는 등 일련의 염증반응을 유발하게 된다는 것임.

- ㉔ 실제 베타아밀로이드에 의해 활성산소종이 생성되어 지질과산화가 일어난 것을 4-hydroxynonenal (4-HNE)을 지표로 측정할 수 있었으며, 이는 밀기울추출물의 경구투여로 감소됨(그림 74B). 불포화지질은 다수의 이중결합채를 가지고 있으며, 이는 산화적 손상을 받기 쉬운 형태를 띄고 있음. 여러 가지 지질 과산화물들은 높은 활성을 가져 돌연변이 원인으로 작용하거나 효소들의 활성을 억제할 수 있으며, 단백질이나 핵산과 작용하여 cross-link를 이루기도 함. 더욱이 지질과산화에 의하여 세포막의 유동성이 감소되고 막단백질의 손상이 초래되기도 함.
- ㉕ 밀기울추출물은 특히 대표적인 항산화/무독화 전사인자인 NF-E2-related factor 2 (Nrf2)의 발현을 높게 유지함(그림 74B). Nrf2는 redox-sensitive한 전사인자로 산화적 스트레스, 염증반응, 능동적 세포사멸 대하여 보호 작용을 갖는 세포내 무독화 효소 및 항산화 단백질의 발현을 조절하는데 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있음. 불활성화 상태에서 Nrf2는 세포질 내 Keap1과 결합하여 존재하고 있으나, 산화적 손상이 주어지는 경우 활성화 되어 핵내로 이동하여 ARE에 결합함으로써 표적 유전자인 γ -glutamylcysteine ligase (GCL), glutathione-S-transferase (GST), NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 (NQO1), and heme oxygenase-1 (HO-1)의 발현을 증가시킴. 본 연구에서 밀기울추출물의 경구투여로 Nrf2 하위 유전자인 HO-1의 발현 또한 증가됨을 확인함.
- ㉖ 한편, 알츠하이머병 환자의 뇌를 사후 검사한 경우, 보체단백질(complement), 사이토카인 (cytokine), 소교세포 등 면역활성 상태에서 나타나는 세포나 단백질이 증가되어 있었으며, 따라서 면역활성화가 알츠하이머병 유발에 중요한 역할을 하고 있으리라 생각되고 있음. 따라서, 베타아밀로이드로 인한 염증적 손상에 대한 밀기울추출물의 보호효능을 검토하기 위하여 대표적인 염증매개 물질인 사이토카인 TNF- α 의 발현을 측정함. 결과 베타아밀로이드로 인한 기억력 손상군에서 증가된 TNF- α 의 발현이 밀기울추출물 투여에 의해 효과적으로 감소됨을 확인함(그림 74D).

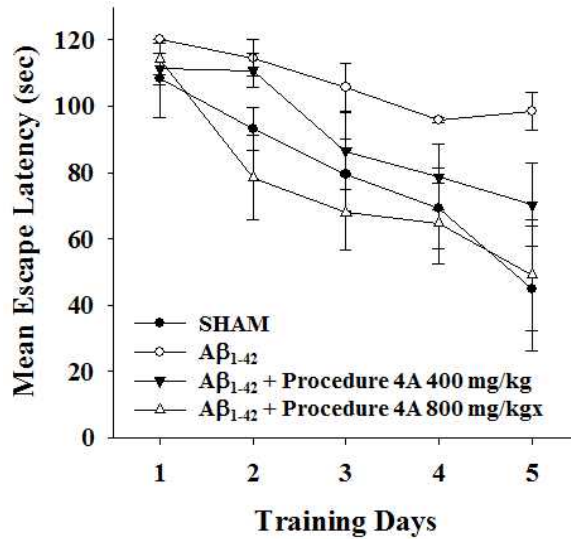


그림 72. 밀기울추출물의 기억력 개선 효능 (베타아밀로이드 치매 모델-물미로 실험)

C57BL/6 마우스에 베타아밀로이드를 뇌실내로 주입하여 유발된 알츠하이머 치매에 대한 밀기울추출물의 효과를 검증하기 위해 물미로 실험을 실시하여 도피대를 찾아가는데 걸리는 시간, 즉 평균탈출시간(mean escape latency)을 측정함. SHAM은 정상적인 쥐, Aβ₁₋₄₂는 베타아밀로이드만 주사한 쥐, Aβ₁₋₄₂ + WBE는 밀기울추출물을 1일 표기된 용량으로 투여한 쥐를 각각 나타냄.

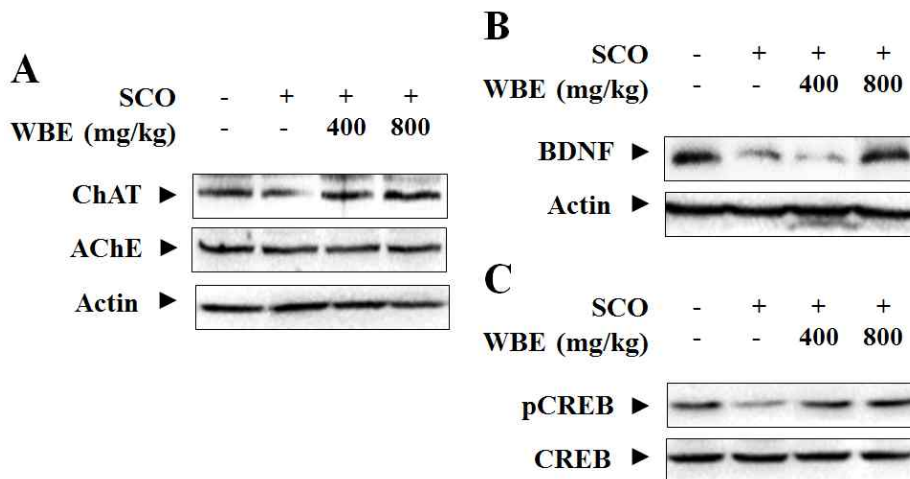


그림 73. 밀기울추출물이 아세틸콜린 합성효소 및 신경영양인자 BDNF 발현에 미치는 영향

베타아밀로이드로 기억력 손상을 유발한 뒤 일주일동안 밀기울추출물을 용량별(400 mg/kg 및 800 mg/kg)로 경구 투여한 다음 대뇌피질 부위에서 아세틸콜린 합성효소(A)와 신경영양인자(B)의 발현, 상위 조절인자(C)의 활성화에 미치는 영향을 Western blot analysis으로 비교 측정함.

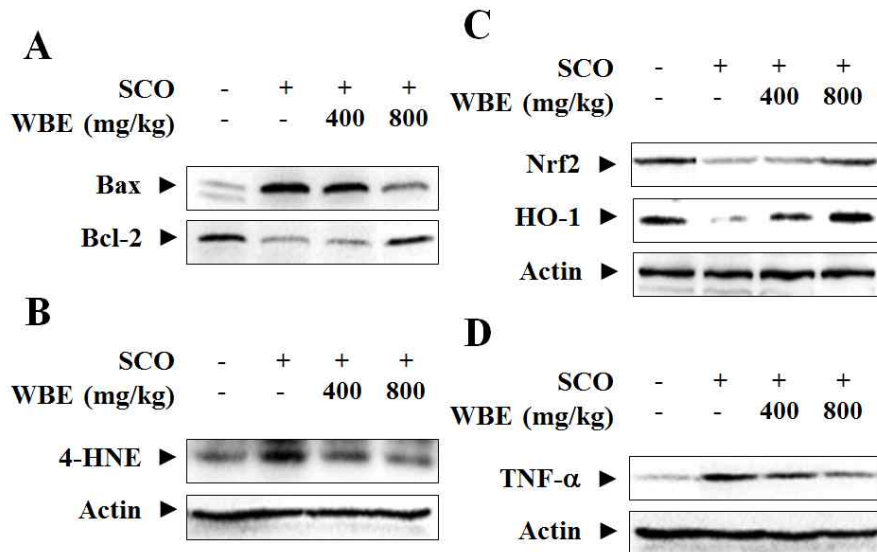


그림 74. 밀기울추출물이 베타아밀로이드로 인한 신경세포 사멸 및 산화적/염증적 손상에 미치는 영향

베타아밀로이드로 기억력 손상을 유발한 뒤 일주일동안 밀기울추출물을 용량별(400 mg/kg 및 800 mg/kg)로 경구 투여한 다음 대뇌피질 부위에서 신경세포 생존 및 사멸 매개 단백질(A), 지질과산화(B), 항산화 단백질(C), 염증매개 인자(D)의 발현에 미치는 영향을 Western blot analysis으로 비교 측정함.

(c) 혈관성치매 모델 (제1세부) (논문발표)

㉠ 신청원료의 효능조사 (표 53)

- 동공 반응 조사 결과 - 대조군에서 양쪽 눈 모두 PLR 손실이 온 것은 56 %, 한쪽 눈에만 PLR 손실이 온 것은 22 %, 양쪽 모두 PLR 손실이 없는 정상은 22%였음. 이에 비해 신청원료를 먹인 실험군에서는 양쪽 눈 모두 PLR이 손실이 온 것은 33 %, 한쪽 눈만 PLR 손실이 온 것은 17 %, 양쪽 모두 PLR 손실없이 정상인 것은 50% 였음. 이로부터 원료를 먹인 실험군에서 동공 반응이 대조군에 비해 확실히 많은 쥐들이 정상에 가깝게 유지되고 있는 것을 확인하였음.

- Luxol fast blue 염색법에 의한 뇌조직 손상 결과 (그림 75) - 수초의 형태학적인 변화와 존재유무를 측정할 수 있는 luxol fast blue 염색법을 사용하여 손상정도를 살펴보았을 때 백색질 중 대표적인 cc에 대하여 수초의 상태에 따라 점수를 매겨 환산하였음. 그 결과 신청원료를 먹인 군에서는 대조군에 비해 손상점수가 유의하게 감소하는 것을 확인하였음 (1.13 ± 0.13 vs. 1.79 ± 0.11 , $p < 0.05$). 또한 손상이 잘 일어나는 지역 중 대표적인 opt를 관찰한 결과 역시 원료를 먹인 군이 대조군에 비해 손상점수가 현저하게 낮게 확인되었음 (0.83 ± 0.34 vs. 1.89 ± 0.34 , $p < 0.05$). 즉 opt 지역의 조직상태는 대조군에서는 액포화가 많이 진행되었고 수초의 손상이 심하였으나, 원료를 먹인 군에서는 액포화의 진행이 많이 더디고 수초의 손상이 많이 진행되지 않았음을 알 수 있었음.

㉡ 신청원료의 기전조사

- 미세아교세포의 활성화 결과 (그림 76) - Microglia의 활성화 상태를 확인하기 위하여 Iba1을 이용한 조직염색화법을 실시한 결과 손상 정도가 현저하게 관찰되는 opt 지역을 중심으로 분석을 실시하였음. 대조군에서는 정상군에 비해 미세아교세포가 활성화 되어 크기가 커지고 발을 뺀 형태가 뚜렷하게 관찰되는 수가 증가하였으며 그 염색강도도 강하게 발색이 되었으나, 원료를 먹인 군에서는 대조군에 비해 미세아교세포의 활성이 덜 진행되었으며 발을 뺀 형태가 뚜렷이 관찰되지 않았음. 이를 색의 강도 및 면적으로 반영하여 정량적 분석을 실시한 결과 역시 원료를 먹인 군이 대조군에 비해 미세아교세포의 활성화 정도가 약 50%정도 감소하는 것을 알 수 있었음 ($p < 0.05$).

- 별아교세포의 활성화 결과 (그림 77) - 별아교세포의 활성화를 확인하기 위하여 GFAP 를 이용한 조직화법을 실시하고 백색질 중 cc 부분을 중심으로 관찰하였음. 별아교세포는 활성화 되면 발을 뺀어 그 크기가 커지고 색의 강도도 강해지는데 대조군에서는 정상군에 비해 발 뺀 모양이 뚜렷하게 관찰되고 활성화된 개수도 증가한 것처럼 보였으나, 원료를 먹인 군에서는 정상군에 가깝게 활성화가 된 별아교세포의 수가 적고 그 크기도 작았음. 즉 대조군에 비해 원료를 먹인 군에서 별아교세포의 활성화정도가 상당히 낮았음.

표 53. 원료(밀기울 추출물)가 혈관성치매 모델에서 Pupillary Light Reflex 에 미치는 효능 조사

Experimental group	loss of PLR in both eyes(%)	loss of PLR in one eye(%)	maintained of PLR in both eyes(%)
Sham	0(0%)	0(0%)	8(100%)
Control	5(56%)	2(22%)	2(22%)
CU-1 BN 400mg/kg	2(33%)	1(17%)	3(50%)

* 원료가 총경동맥을 묶어 발생시킨 혈관성 치매 모델에서 동공 반응에 어떠한 영향을 주는지 확인하기 위하여 Pupillary Light Reflex (PLR)를 조사하였음. 정상적인 쥐 (Sham), 혈관성치매가 유발된 쥐(Control), 혈관성치매를 유발하면서 원료를 먹인 쥐(CU-1 BN 400mg/kg) 에 대해 조사하였고 양쪽 눈 모두 PLR 손실이 일어난 쥐, 한쪽눈에서만 손실이 일어난 쥐, 그리고 양쪽눈 모두 PLR이 잘 유지되고 있는 쥐로 나누어 그 마리수와 각 군에서의 분율을 괄호 안의 % 로 나타내었음.

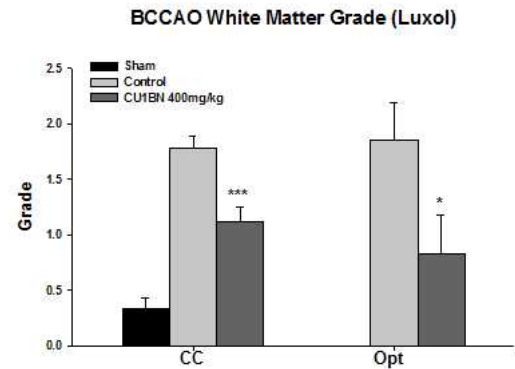
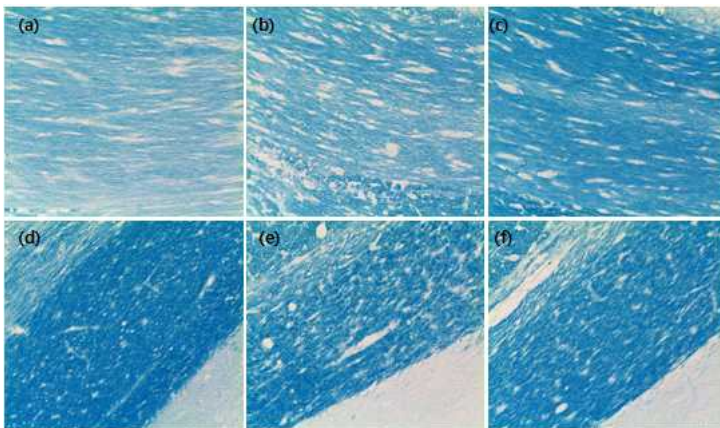


그림 75. 원료(밀기울 추출물)가 뇌신경축삭 손상에 미치는 효능 조사

원료가 총경동맥을 묶어 발생시킨 혈관성 치매에서 뇌의 백색질 (white matter) 중의 뇌량 (corpus callosum, cc) (a~c) 및 시각로 (optic tract, Opt) (d~f)의 손상을 보호하는 효과를 luxol fast blue staining 을 이용하여 확인하였음. 실험 중 (a),(d)는 정상적인 쥐 (sham)이고 (b),(e)는 혈관성치매가 유발된 쥐 (Control) 이며 (c),(f) 는 혈관성치매에 원료를 먹인 쥐 (CU1BN 400mg/kg)의 대표적인 결과를 각각 나타냄(왼쪽 그림). 수초의 손상정도를 점수로 환산하여 비교한 것을 그래프로 나타냄(오른쪽 그림).

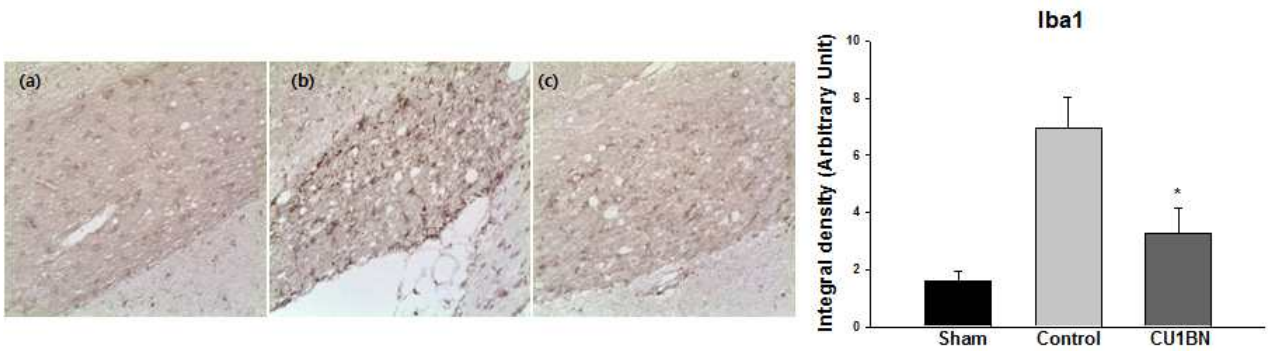


그림 76. 원료(밀기울 추출물)가 염증세포인 미세아교세포의 활성화에 미치는 효능 조사

원료가 총경동맥을 묶어 발생시킨 혈관성 치매에서 뇌의 백색질 (white matter) 중의 시각로 (optic tract, Opt) 의 미세아교세포의 활성화 정도에 미치는 영향을 Iba1을 이용한 면역염색화법으로 확인하였음. 실험 중 (a)는 정상적인 쥐 (Sham)이고 (b)는 혈관성치매가 유발된 쥐 (Control) 이며 (c)는 혈관성치매에 원료를 먹인 쥐 (CU1BN)의 대표적인 결과를 각각 나타냄(왼쪽 그림). Iba1의 발색정도를 정량화하여 그래프로 나타냄(오른쪽 그림).



그림 77. 원료(밀기울 추출물)가 별아교세포의 활성화에 미치는 효능 조사

원료가 총경동맥을 묶어 발생시킨 혈관성 치매에서 뇌의 백색질 (white matter) 중의 뇌량 (corpus callosum, cc) 에서의 별아교세포의 활성화 정도에 미치는 영향을 GFAP를 이용한 면역염색화법으로 확인하였음. 실험 중 (a)는 정상적인 쥐이고 (b)는 혈관성치매가 유발된 쥐이며 (c)는 혈관성치매에 원료를 먹인 쥐의 대표적인 결과를 각각 나타냄.

② 플라시보의 건망증에 대한 효능조사 (제1협동)

- o 인체시험에서 사용할 플라시보를 선정하기 위해 후보들 중에서 효능이 나타나지 않은 후보를 선정하였음.
- o 임상시험시 사용될 플라시보의 면밀한 선정을 위하여 4종의 플라시보 후보물질(플라시보1 : 볏은쌀, 플라시보2 : 쌀 전분, 플라시보3 : 옥수수 전분, 플라시보4 : 옥수수 텍스트린)에 대해 기억력 개선효능이 있는지를 스코폴라민을 주사한 쥐를 수동회피실험을 통해 조사하였음. 그 결과 쌀전분 (플라시보2)가 기억력 개선효능이 전혀 없으며 행동양상에 영향을 주지 않음을 확인하여 (그림 78), 이를 플라시보 캡슐을 제조하는데 사용하였음 (“3-8-2. 인체시험” 부분 참조).

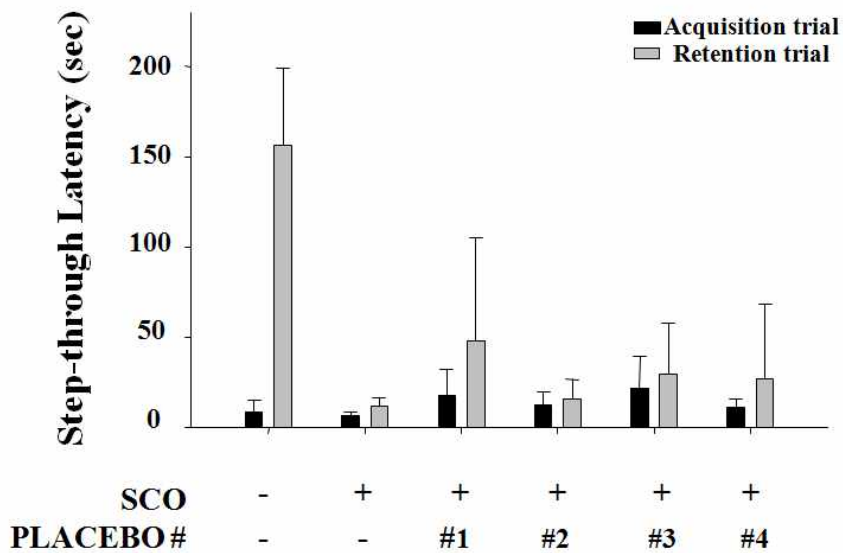


그림 78. 플라시보 후보물질 4종이 스코폴라민으로 인한 기억력 손상에 미치는 영향 검토 (수동회피 실험)

C57BL/6 마우스에 스코폴라민을 주사하여 발생하는 건망증에 대한 플라시보 후보 추출물 4종 (Placebo 1-4)의 효과를 비교 조사하기 위해 수동회피 실험을 실시하여 전기적 충격을 기억하는 평균시간 step-through latency를 측정함. SHAM은 정상적인 쥐, SCO는 스코폴라민(1 mg/kg)만 주사한 쥐, SCO + Placebo 1-4는 플라시보 후보 추출물을 1일 800 mg/kg로 투여한 쥐를 각각 나타냄.

③ 프리믹스의 제조 및 효능조사

- 신청원료인 밀기울추출물을 프리믹스와 섞었을 때 효능이 나타나는지를 건망증모델을 이용하여 조사하였음.

㉓ 프리믹스의 제조 (제2협동과제)

- 프리믹스 (부침가루로 만든 김치전 1인분 175g 기준)의 가공레시피는 프리믹스 50g, 물 65g 및 김치 60g이 포함되는 것으로 이 전체에 밀기울추출물 3g이 들어가도록 하면 됨.
- 이를 기준으로 밀기울추출물을 포함하는 프리믹스는 밀추출물 3g과 기타원료 (밀가루, 전분 등) 47g으로 하였음. 따라서 이 프리믹스에는 밀기울추출물의 함량이 6%임.

㉔ 프리믹스의 효능조사 (제1협동과제)

(a) 기억력 개선효과

- ㉑ 상기 최적공정에 의해 생성된 밀기울추출물(신청원료)를 함유하는 프리믹스 제품(Premix w/ WBE)이 건망증 모델에서 기억력 개선효능이 있는지 그 기능성을 조사하였음. 밀기울추출물을 불포함한 프리믹스 제품(Premix w/o WBE)을 음성 대조군으로 사용하였음.
- ㉒ 건망증 모델은 아세틸콜린 수용체에 길항제로 작용하는 스코폴라민을 복강에 주사하여 유발하였으며, 기억력 개선 정도는 수동회피실험 기법을 활용하여 측정하였음. 실험결과 step-through latency time에서 정상군(SHAM)의 경우에 284.2 ± 10.63 초를 기록하였고, 스코폴라민 대조군(SCO)은 71.19 ± 8.25 초를 기록하여 213.01초의 차이를 보여 주었음(그림 79). 한편, 실험군(SCO + Premix w/ WBE) 밀기울추출물을 포함한 프리믹스 200 mg/kg, 400 mg/kg, 800 mg/kg을 투여한 경우 step-through latency time에서 각각 93.14 ± 23.77 , 120.07 ± 35.62 , 145.23 ± 23.53 초를 기록하여 스코폴라민으로 인해 손상된 기억력의 회복에 가장 유의한 효과가 있음을 확인함(그림 79). 한편, 밀기울추출물을 불포함한 프리믹스 800 mg/kg를 투여한 경우 효과가 없음을 확인함.

④ 유사원료 (통밀추출물)

- “(2) 기원, 개발경위, 국내.외 인정 및 사용현황 등에 관한 자료” 중 “(나) 기능성분 고함유 품종의 선별 (제1세부)” 부분에 설명되었음.

⑤ 기능성분 고함유 밀추출물

- “(2) 기원, 개발경위, 국내.외 인정 및 사용현황 등에 관한 자료” 중 “(나) 기능성분 고함유 품종의 선별 (제1세부)” 부분에 설명되었음.

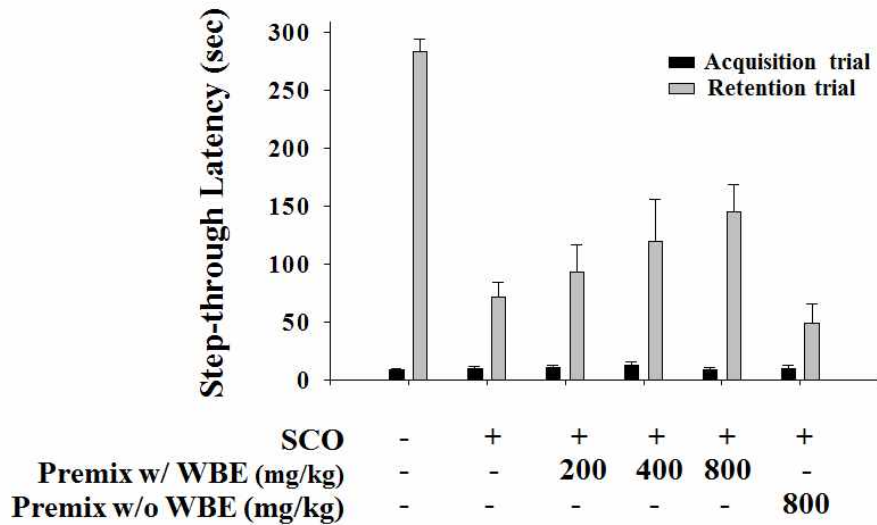


그림 79. 프리믹스 제품이 스코폴라민으로 인한 기억력 손상에 미치는 영향 검토(스코폴라민 건망증 모델-수동회피 실험)

C57BL/6 마우스에 스코폴라민을 주사하여 발생하는 건망증에 대한 프리믹스 제품의 효과를 비교 조사하기 위해 수동회피 실험을 실시하여 전기적 충격을 기억하는 평균시간 step-through latency를 측정함. SHAM은 정상적인 쥐, SCO는 스코폴라민(1 mg/kg)만 주사한 쥐, SCO + Premix w/ WBE는 밀기울추출물을 포함한 프리믹스 제품을 1일 200 mg/kg, 400 mg/kg, 800 mg/kg로 투여, SCO + Premix w/o WBE는 밀기울추출물을 불포함한 프리믹스 제품을 1일 800 mg/kg로 투여한 쥐를 각각 나타냄.

⑥ 순수성분에 대한 효능조사

㉠ 구매된 AX, AG 등에 대한 효능조사

(a) 건망증 모델 (제1협동)

㉡ 다당류 (AX와 AG)에 대한 연구

- 1차 년도에 순수 아라비노자일란 (AX, 밀 유래), 아라비노갈락탄 (AG, 낙엽송 유래) 및 베타-글루칸(BG, 보리 유래)에 대해 기억력 개선효능이 있는지를 조사하였음 (1차년도).
- 당해연도에는 AX와 AG가 기억력 향상 기전을 검증하였음 (*당초 계획서에서는 기술되지 않았으나 추가적으로 실시함)

㉢ 결과요약

- 활성성분인 아라비노자일란(AX)과 아라비노갈락탄(AG)의 기억력 향상 기전을 추가적으로 검증함. 아라비노자일란과 아라비노갈락탄은 해마 부위에서 뇌신경세포의 생존 등에 관련된 BDNF의 발현을 증가시켰으며, 이는 상위 조절 전사인자인 CREB와 인산화 효소인 Akt의 활성화에 의해 매개되는 것으로 사료됨. 특히, 아라비노자일란은 아세틸콜린 합성효소 및 무스카린성 아세틸콜린 수용체(M1 mAChR)의 발현을 증가시킴.

㉣ 결과의 세부설명

- 활성성분인 아라비노자일란과 아라비노갈락탄의 인지 및 기억력 향상 기전을 규명하기 위하여 BDNF의 발현 및 상위 조절 단백질의 활성을 검토하는 일련의 실험을 수행하였음. BDNF의 단백질 발현은 스키폴라민 투여로 인하여 감소되었으며, 이는 아라비노자일란 (그림 80A) 및 아라비노갈락탄 (그림 81A)의 경구투여에 의해 정상군과 유사한 또는 그 이상의 수준으로 회복되었음. 한편, BDNF의 발현을 조절하는 것으로 알려진 상위 전사인자인 CREB의 활성화 또한 아라비노자일란 (그림 80B, 80C) 및 아라비노갈락탄 (그림 81B)을 투여함으로써 증가되었으며, 이는 상위 인산화 효소인 Akt의 활성화에 의해 매개되는 것으로 사료됨 (그림 81C).
- 이후 연구에서는, 아라비노자일란과 아라비노갈락탄이 기억력을 향상시키는 또 다른 기전으로 기억과 학습에 중요한 역할을 하는 신경전달물질인 아세틸콜린 대사에 관여하는 유전자의 발현을 측정하였음. 아라비노자일란 (그림 82A)과 아라비노갈락탄 (그림 81D)은 아세틸콜린을 합성하는 효소인 ChAT의 mRNA 발현을 공통적으로 증가시켰으며, 아라비노자일란은 더 나아가 무스카린성 아세틸콜린 수용체(mAChR)의 발현 또한 증가시키는 것을 확인할 수 있었음(그림 82B).

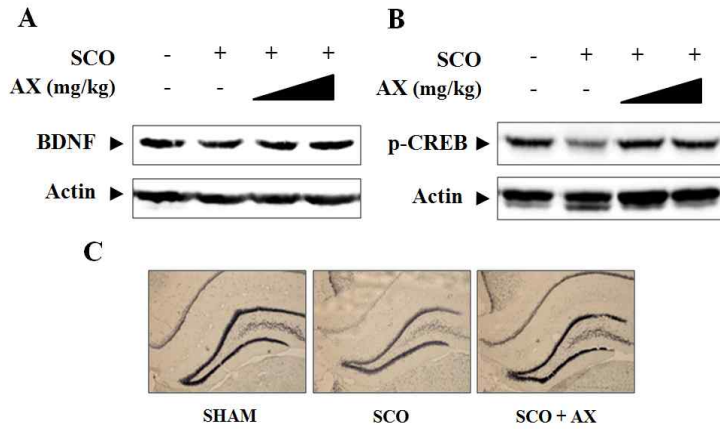


그림 80. 아라비노자일란(AX)이 BDNF 발현에 미치는 영향

스코폴라민을 주사하여 발생하는 건망증에 대한 아라비노자일란의 작용기전을 규명하기 위하여 해마 부위에서 신경영양인자 BDNF의 단백질 발현(A) 및 상위 조절인자 CREB의 활성화(B, C)에 미치는 영향을 Western blot analysis (A, B)과 면역조직화학염색(C)을 통하여 비교 측정함.

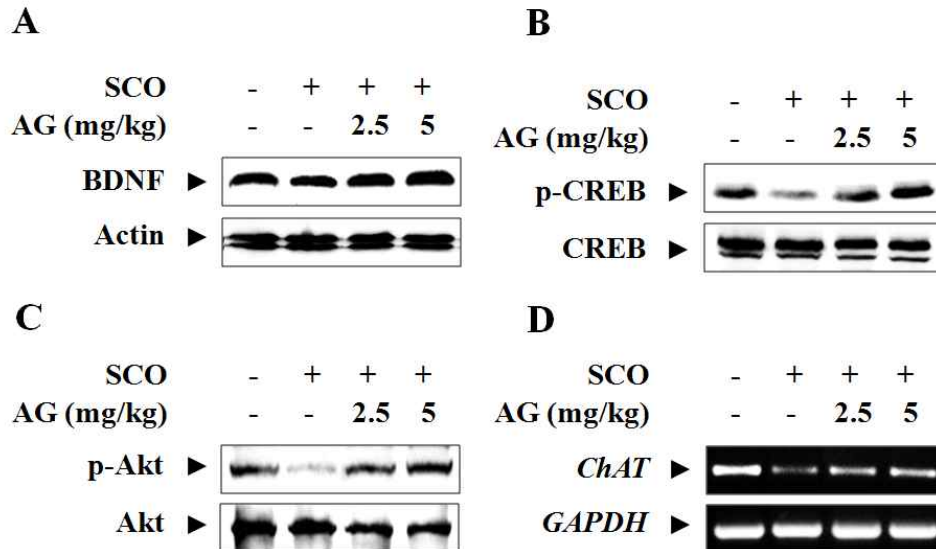


그림 81. 아라비노갈락탄(AG)이 BDNF 발현에 미치는 영향

스코폴라민을 주사하여 발생하는 건망증에 대한 아라비노갈락탄의 작용기전을 규명하기 위하여 해마 부위에서 신경영양인자 BDNF의 단백질 발현(A) 및 상위 조절인자 CREB (B) 및 Akt (C)의 활성화에 미치는 영향을 Western blot analysis (A-C)을 통하여 비교 측정함. 동일한 실험 조건에서 아라비노갈락탄이 아세틸콜린 합성효소(ChAT)의 mRNA 발현에 미치는 영향을 RT-PCR로 추가 검토함(D).

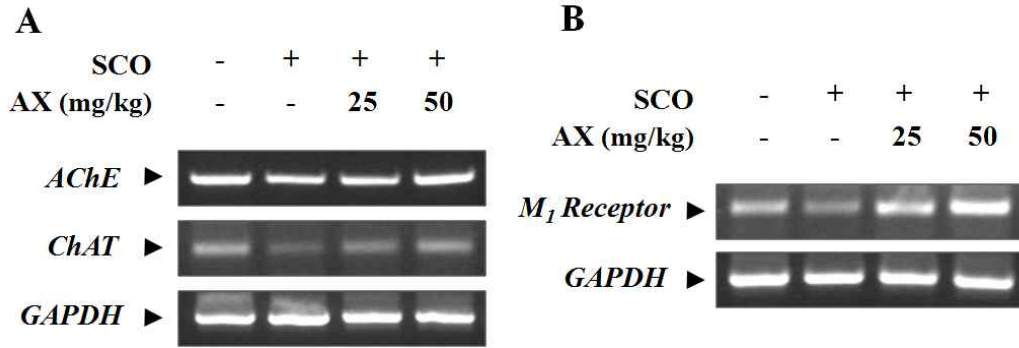


그림 82. 아라비노자일란(AX)이 아세틸콜린 대사에 미치는 영향

C57BL/6 마우스에 스키폴라민을 주사하여 발생하는 건망증에 대한 아라비노자일란의 작용기전을 규명하기 위하여 대뇌피질 부위에서 아세틸콜린 합성 및 분해효소(A), 무스카린성 아세틸콜린 수용체(B) mRNA 발현에 미치는 영향을 RT-PCR로 추가 검토함(D).

(b) 혈관성 치매 모델 (제1세부)

㉠ 구매된 Arabinogalactan (Larch)에 대한 효능조사

o Luxol fast blue 염색법에 의한 뇌조직 손상 결과 (그림 82) - 수초의 형태학적인 변화와 존재유무를 측정할 수 있는 luxol fast blue 염색법을 사용하여 손상정도를 살펴보았을 때 백색질 중 대표적인 cc에 대하여 수초의 상태에 따라 점수를 매겨 환산하였음. 그 결과 구매된 AG를 먹인 군에서는 대조군에 비해 손상점수가 유의하게 감소하는 것을 확인하였음 (1.06 ± 0.22 vs. 1.79 ± 0.11 , $p < 0.05$). 그러나 잘 손상되는 지역 중 대표적인 opt를 관찰한 결과 구매된 AG를 먹인 군이 대조군과 손상점수가 크게 차이가 나지 않았음 (1.45 ± 0.43 vs. 1.89 ± 0.34 , $p > 0.05$). 즉 혈관성치매 발생 시 가장 크게 손상되는 지역인 opt 지역에서는 구매된 AG의 효능이 관찰되지 않았으나 이지역보다 손상정도가 덜 영향 받는 cc 지역에서는 대조군에 비해 구매된 AG를 먹인 군에서 수초의 손상이 줄어든 것을 알 수 있었음.

㉡ 구매된 Arabinogalactan (Larch)의 기전조사

o 미세아교세포의 활성화 결과 (그림 83) - Microglia의 활성화 상태를 확인하기 위하여 Iba1을 이용한 조직염색화법을 실시한 결과 손상 정도가 현저하게 관찰되는 opt 지역을 중심으로 분석을 실시하였음. 대조군에서는 정상군에 비해 미세아교세포가 활성화 되어 크기가 커지고 발을 뺀 형태가 뚜렷하게 관찰되는 수가 증가하였으며 그 염색강도도 강하게 발색이 되었으나, 구매된 AG를 먹인 군에서는 대조군에 비해 미세아교세포가 훨씬 덜 활성화되었으며 발을 뺀 형태가 뚜렷이 관찰되지 않았음. 이를 색의 강도 및 면적으로 반영하여 정량적 분석을 실시한 결과 구매된 AG를 먹인 군이 대조군에 비해 미세아교세포의 활성화 정도가 약 45%정도 감소하였으나 유의성은 없었음 ($p > 0.05$).

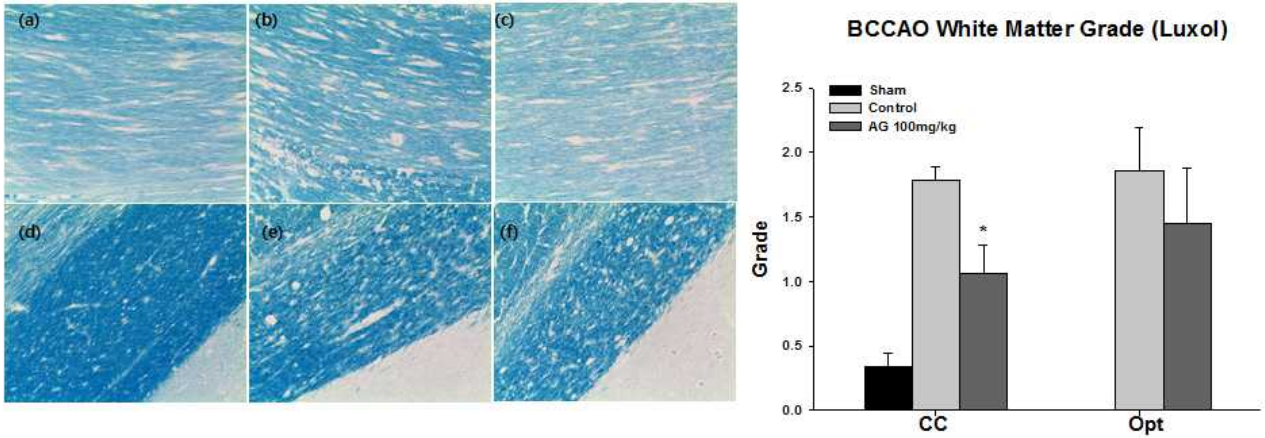


그림 82. 구매된 AG(arabinogalactan, Larch)가 뇌신경축삭 손상에 미치는 효능 조사

구매된 AG가 총경동맥을 묶어 발생시킨 혈관성 치매에서 뇌의 백색질 (white matter) 중의 뇌량 (corpus callosum, cc) (a~c) 및 시각로 (optic tract, Opt) (d~f)의 손상을 보호하는 효과를 luxol fast blue staining을 이용하여 확인하였음. 실험 중 (a),(d)는 정상적인 쥐 (sham)이고 (b),(e)는 혈관성치매가 유발된 쥐 (Control) 이며 (c),(f)는 혈관성치매에 구매된 AG를 먹인 쥐 (AG 100mg/kg)의 대표적인 결과를 각각 나타냄(왼쪽 그림). 수초의 손상정도를 점수로 환산하여 비교한 것을 그래프로 나타냄(오른쪽 그림).

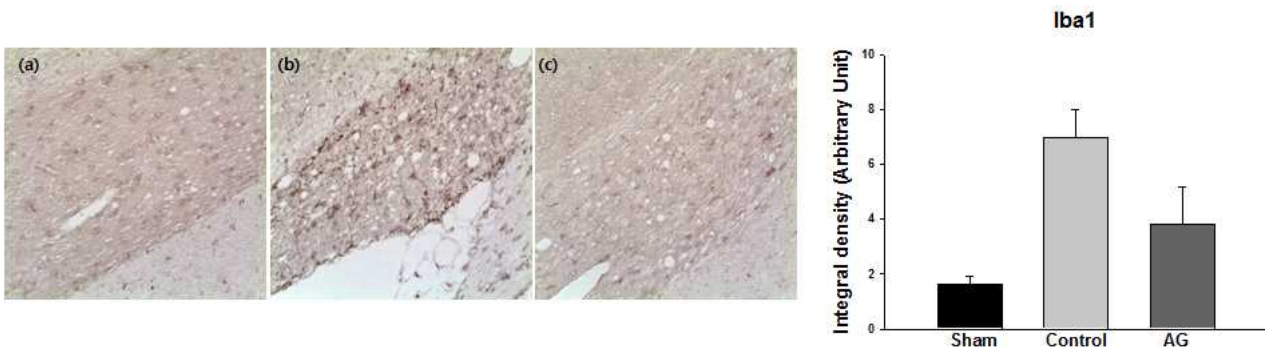


그림 83. 구매된 AG(arabinogalactan, Larch)이 염증세포인 미세아교세포의 활성화에 미치는 효능 조사

구매된 AG가 총경동맥을 묶어 발생시킨 혈관성 치매에서 뇌의 백색질 (white matter) 중의 시각로 (optic tract, Opt) 의 미세아교세포의 활성화 정도에 미치는 영향을 Iba1을 이용한 면역염색화법으로 확인하였음. 실험 중 (a)는 정상적인 쥐 (Sham)이고 (b)는 혈관성치매가 유발된 쥐 (Control) 이며 (c)는 혈관성치매에 원료를 먹인 쥐 (CU1 WH)의 대표적인 결과를 각각 나타냄(왼쪽 그림). Iba1의 발색정도를 정량화하여 그래프로 나타냄(오른쪽 그림).

(c) 심근경색 모델 (제1세부) (논문투고 중)

㉠ 구매된 Arabinogalactan(Larch)에 대한 효능조사

o 구매한 AG를 10, 50 및 100 mg/kg/day 등의 용량으로 조사한 결과 100 mg/kg/day의 용량에서 27.4% 정도의 심근경색을 줄이는 효능이 관찰되었음. 한편, 50 mg/kg/day의 농도에서도 심근경색을 줄이는 경향은 관찰되었으나 통계적으로 유의하지는 않았음 (그림 84). 또한 AG를 이루고 있는 구성성분이 ara와 gal이기 때문에 구매한 ara는 10과 100 mg/kg/day의 용량에서 심근경색에 대한 효능을 관찰한 결과 10 mg/kg/day의 용량에서 대조군에 비해 약 20% 정도의 심근경색을 줄이는 효능이 관찰되었음. 또한 100 mg/kg/day의 용량에서도 약 31.9% 정도의 심근경색을 줄이는 효능이 관찰되었음 (그림 61). 한편, gal (100 mg/kg/day)에 대해서는 그 효능이 관찰되지 않았음 (그림 84).

㉡ 구매된 Arabinogalactan(Larch)의 기전조사

o 구매한 AG 및 그 구성성분인 ara 가 심근경색의 부피를 줄이는 원인을 조사하기 위해 세포 자살 기전 조사의 대표적인 방법인 TUNEL assay 및 면역조직화법을 실시하였음.

o TUNEL 결과 - 경계 지역 (BZ, AAR)인 곳에서 구매한 AG와 ara 가 100 mg/kg/day의 농도에서 대조군에 비해서 현저하게 세포의 자살을 줄이는 효능이 있었음 (7.31 ± 1.71 and 3.65 ± 0.57 , respectively, versus 17.2 ± 3.16 , $p < 0.05$) (그림 85). 그러나 ara 는 10 mg/kg/day의 농도에서는 세포의 자살이 줄어드는 경향이 보였으나 유의하지는 않았음 (7.98 ± 3.98 versus 17.2 ± 3.16 , $p > 0.05$). IA 지역에서는 오직 ara를 100 mg/kg/day 로 먹인 군에서만 세포 자살이 줄어들었음 (9.33 ± 1.58 versus 24.5 ± 11.6 , $p < 0.05$). 구매한 AG를 100 mg/kg/day와 ara를 10 mg/kg/day로 먹인 쥐는 세포 자살이 줄어드는 경향이 보였으나 유의하지는 않았음 (15.3 ± 1.22 and 17.9 ± 1.81 , respectively, versus 24.5 ± 11.6 , $p > 0.05$). 또한 효능의 결과와 마찬가지로 gal을 100 mg/kg/day로 먹인 쥐는 세포의 자살을 줄이는 효과가 관찰되지 않았음.

o 면역조직화법 결과 - 세포자살관련 TUNEL assay 결과를 뒷받침하기 위하여 cleaved caspase-3, Bcl-2/Bax 등의 발현정도를 면역조직화법으로 조사를 실시하였음. 우선 cleaved caspase-3 의 발현 정도의 차이를 비교해보면 구매한 AG를 먹인 군과 ara를 먹인 군에서 대조군에 비해 cleaved caspase-3의 발현이 확실하게 줄어드는 것처럼 보였음 (그림 86). 이를 정량화하여 비교하였을 때 구매한 AG를 100 mg/kg/day로 먹인 군 ($0.284 \pm 0.038\%$), ara를 10, 100 mg/kg/day로 먹인 군 ($0.510 \pm 0.116\%$, $0.290 \pm 0.077\%$)들이 대조군 ($1.00 \pm 0.181\%$)에 비해 발현정도에서 유의성이 관찰되었음. 즉 이러한 결과는 TUNEL assay에서 확인된 DNA nick 형성으로 이어지는 활성화된 caspase-3의 형성을 억제함으로 AG와 ara가 세포 자살을 억제하는 효과가 나타남을 알 수 있었음. 이뿐 아니라 caspase-3의 upstream에 위치하고 있는 Bcl-2 (antiapoptotic effect)와 Bax(apoptotic effect)의 발현비를 비교한 결과 AG (100 mg/kg/day)와 ara (100 mg/kg/day)를 먹인 군에서 Bcl-2 쪽의 발현이 Bax의 발현보다 좀 더 발색이 많이 되었음 (그림 87). 이에 반해 대조군은 Bcl-2에 비해 Bax의 발색이 좀 더 많이 되었음. 이를 Bcl-2/Bax의 비로 정량화하였을 때 AG (100 mg/kg/day)와 ara (10 and 100 mg/kg/day)를 먹인 군에서 대조군에 비해 그 비가 증가하였음 (1.21 ± 0.075 , 1.17 ± 0.096 , and 1.32 ± 0.088 , respectively, versus $0.880 \pm 0.050\%$, $p < 0.01$, $p < 0.05$, and $p < 0.05$, respectively). 즉, apoptotic cascade 안에서 Bcl-2와 Bax가 관련된 단계에 AG 및 ara가 영향을 미치는 것

을 나타냄.

- o AG가 효능을 나타내는 것이 이를 구성하는 ara 때문인 것으로 확인되었음. 이를 보다 더 확실히 확인하기 위하여 ara로만 이루어진 arabinan (Para)과 gal로만 이루어진 galactan (Pgal)을 가지고 심근경색의 모델에서의 효능을 확인하였음 (그림 88). 모두 100 mg/kg/day의 농도로 먹였음. 경색면적을 측정 한 결과 Para만 먹인 군에서 대조군에 비해 약 24% 경색 면적이 줄어드는 것을 확인하였음 (41.5 ± 2.04 versus $54.4 \pm 4.25\%$, $p < 0.05$). 그에 반해 Pgal은 대조군과 비슷한 면적을 나타내었음 (50.7 ± 2.14 versus $54.4 \pm 4.25\%$, $p > 0.05$). 또한 TUNEL assay로 세포자살의 영향을 조사한 결과 경계지역(BZ)과 경색지역(IA) 모두 대조군에 비해 세포자살이 줄어들었음 (3.06 ± 0.400 versus 17.2 ± 3.16 , and 10.7 ± 1.57 versus 24.5 ± 11.6 , respectively, $p < 0.05$). 이에 반해 Pgal은 경계지역과 경색지역 모두 대조군과 큰 차이가 나지 않았음 (15.6 ± 1.48 versus 17.2 ± 3.16 , and 20.2 ± 0.360 versus 24.5 ± 11.6 , respectively, $p > 0.05$).

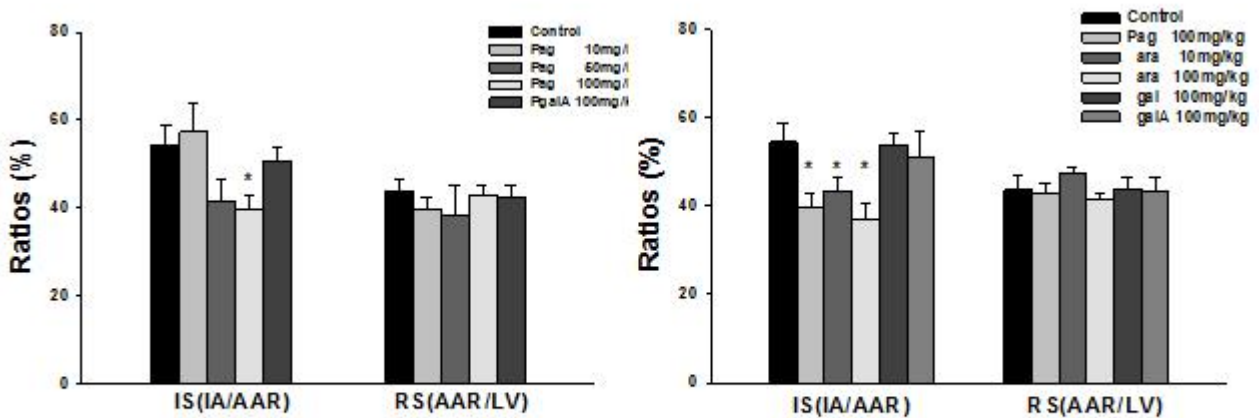


그림 84. 구매한 arabinogalactan (Pag) 및 그 구성성분이 심근경색에 미치는 효능 조사

구매한 Pag 와 arabinose (ara), galactose (gal) 을 폐색 3일 전부터 여러 농도로 사료와 섞어 자유롭게 먹게 한 후 허혈-재관류 (30분/3시간) 방법을 이용하였을 때 심근경색에 미치는 영향을 조사하였음. Pag (10, 50 and 100 mg/kg/day) (A), ara (10 and 100 mg/kg/day), gal (100 mg/kg/day) (B) 에 대해 조사하였음.

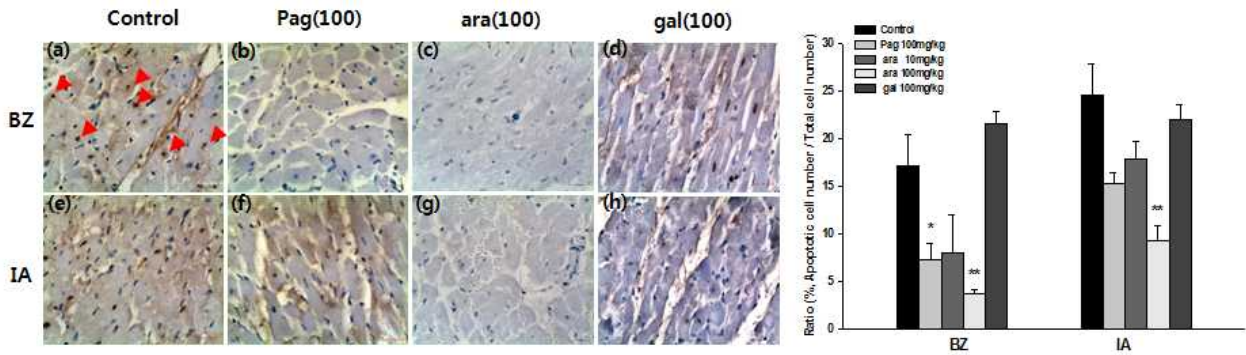


그림 85. Arabinogalactan (Pag) 및 그 구성성분이 심장의 허혈-재관류시 세포자살에 미치는 영향 (TUNEL)

구매한 Pag 와 arabinose (ara), galactose (gal) 을 폐쇄 3일 전부터 여러 농도로 사료와 섞어 자유롭게 먹게 한 후 허혈-재관류 (30분/3시간) 방법을 이용하였을 때 TUNEL assay 방법을 통하여 세포 자살에 미치는 영향을 조사하였음. Pag (100 mg/kg/day), ara (10 and 100 mg/kg/day), gal (100 mg/kg/day) 에 대해 조사하였음. 허혈 및 재관류를 진행한 control 군(a, e) 및 Pag 100mg/kg/day(b, f), ara 100mg/kg/day (c, g) 그리고 gal 100mg/kg/day (d, h)은 허혈은 있었으나 경색은 일어나지 않은 BZ 지역(a, b, c, d)과 허혈과 경색이 일어난 지역인 IA(e, f, g, h) 지역으로 구분하여 TUNEL 을 실시한 후 400X 로 사진을 찍었음 (왼쪽그림). 갈색 반점으로 나타나는 것이 세포자살이 일어난 것을 의미하고 파란 반점은 핵을 염색한 것임. 또한 이를 바탕으로 전체 세포수에 대한 세포자살이 일어난 수를 세어 비율로 정량화 하였음(오른쪽 그림). *p < 0.05 and **p < 0.01 vs. control group.

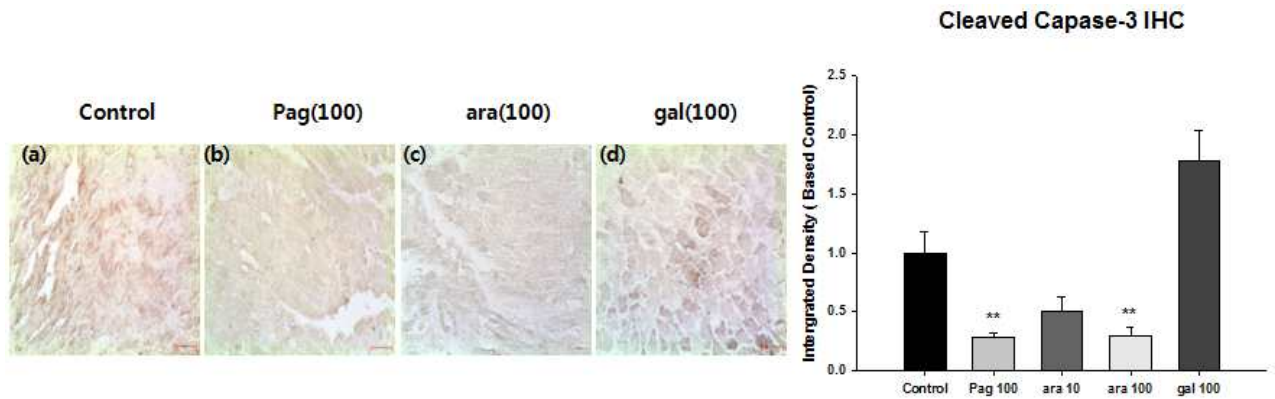


그림 86. Arabinogalactan(Pag) 및 그 구성성분이 심장의 허혈-재관류시 세포자살에 미치는 영향 (Caspase-3)

구매한 Pag 와 arabinose (ara), galactose (gal) 을 폐쇄 3일 전부터 여러 농도로 사료와 섞어 자유롭게 먹게 한 후 허혈-재관류 (30분/3시간) 방법을 이용하였을 때 TUNEL assay 방법을 통하여 세포 자살에 미치는 영향을 조사하였음. Pag (100 mg/kg/day), ara (10 and 100 mg/kg/day), gal (100 mg/kg/day) 에 대해 조사하였음. 허혈 및 재관류를 진행한 control 군(a) 및 Pag 100mg/kg/day(b), ara 100mg/kg/day (c) 그리고 gal 100mg/kg/day (d)은 cleaved caspase-3 로 면역염색화법을 실시한 후 허혈은 있었으나 경색은 일어나지 않은 BZ 지역을 무작위로 200X 로 사진을 찍었음(왼쪽그림). 갈색으로 나타나는 것이 cleaved caspase-3 의 발현정도를 나타내는 것임. 또한 이를 바탕으로 발현 정도를 정량화 하였음(오른쪽 그림). **p < 0.01 vs. control group.

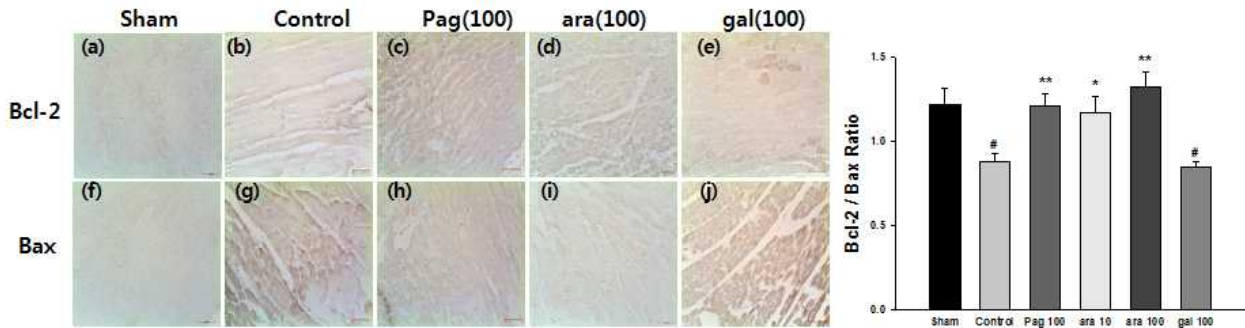


그림 87. Arabinogalactan(Pag) 및 그 구성성분이 심장의 허혈-재관류시 세포자살에 미치는 영향 (Bcl-2 & Bax)

구매한 Pag 와 arabinose (ara), galactose (gal) 을 폐색 3일 전부터 여러 농도로 사료와 섞어 자유롭게 먹게 한 후 허혈-재관류 (30분/3시간) 방법을 이용하였을 때 TUNEL assay 방법을 통하여 세포 자살에 미치는 영향을 조사하였음. Pag (100 mg/kg/day), ara (10 and 100 mg/kg/day), gal (100 mg/kg/day) 에 대해 조사하였음. 수술은 시행하고 허혈을 진행하지 않은 sham 군 (a, f), 허혈 및 재관류를 진행한 control 군(b, g) 및 Pag 100mg/kg/day(c,h), ara 100mg/kg/day (d, i) 그리고 gal 100mg/kg/day (e, j)은 Bcl-2 (a, b, c, d, e)와 Bax (f, g, h, I, j)로 면역염색화법을 실시한 후 허혈은 있었으나 경색은 일어나지 않은 BZ 지역을 무작위로 200X 로 사진을 찍었음(왼쪽그림). 갈색으로 나타나는 것이 Bcl-2 및 Bax 의 발현정도를 나타내는 것임. 또한 이를 바탕으로 발현 정도를 Bcl-2/Bax 의 비율로 정량화 하였음(오른쪽 그림). *p < 0.05 and **p < 0.01 vs. control group.

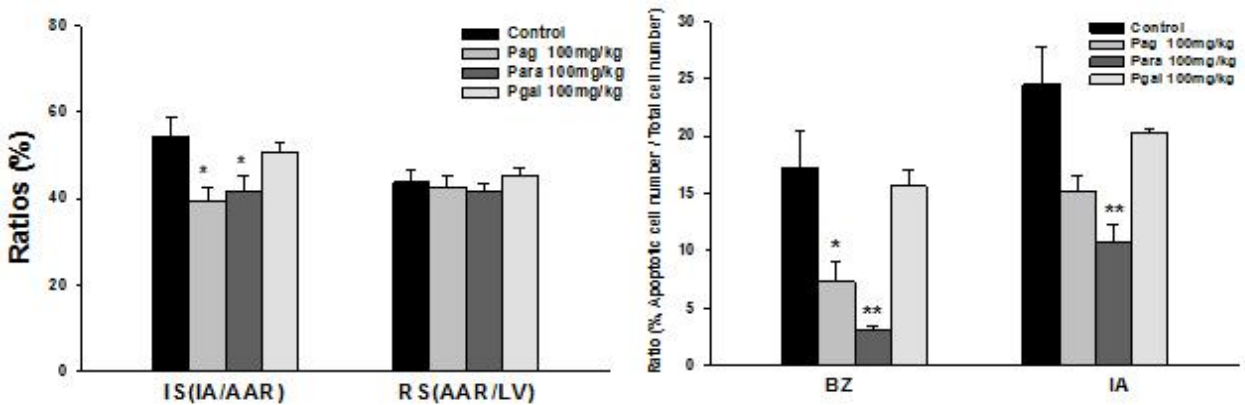


그림 88. Arabinan (Para) 와 galactan (Pgal) 이 심근경색에 미치는 효능 조사 및 세포자살에 미치는 영향 조사

Para 와 Pgal 을 폐색 3일 전부터 각각 100mg/kg/day 의 농도로 사료와 섞어 자유롭게 먹게 한 후 허혈-재관류 (30분/3시간) 방법을 이용하였을 때 심근경색에 미치는 영향을 조사하였음(왼쪽 그림). 그리고 TUNEL assay를 실시한 후 허혈은 있었으나 경색은 일어나지 않은 BZ 지역과 허혈과 경색이 일어난 지역인 IA지역으로 구분하여 전체 세포수에 대한 세포자살이 일어난 수를 세어 비율로 정량화 하였음(오른쪽 그림). *p < 0.05 and **p < 0.01 vs. control group.

㉔ 분리정제된 AX와 AGP에 대한 효능조사

- 밀가루로부터 분리정제된 AGP의 당분석과 GPC (gel permeation chromatography)를 통해 순도와 분자량을 확인하고, 이를 이용하여 효능조사를 실시하였음.
- 본 사업에 사용될 밀 품종인 CU-1 (2011년산)의 밀기울을 열수로 추출한 추출물의 상등액 (밀기울상등액)으로부터 AX와 AGP를 분리정제하였음 (CU-1에 대한 설명은 "5. 기능성분 고함유 품종선별" 부분 참조).
- 각 단계별 또는 최종적으로 분리정제된 AX와 AGP의 순도를 확인하기 위해 3에서 설명할 alditol acetate법을 활용하여 각 시료에 포함된 단당류의 종류와 함량을 분석하였음 (만약 AX와 AGP가 순수하다면 각각 ara와 xyl 및 ara와 gal로만 구성되어야 하는 반면에 순수하지 않다면 다른 단당류들도 포함될 것임). 아울러 분리정제된 AX와 AGP의 크기를 확인하기 위해 GPC (gel permeation chromatography)를 이용하여 분자량이 측정되었음.

(a) 분리정제된 AX에 대한 효능조사

㉕ AX의 분리정제

- 분리정제하는 과정에서 밀기울 열수 추출물의 WEM용액에 에탄올을 첨가 했을 때 에탄올 농도가 20과 60% 사이에서 침전하는 침전물의 당분석을 실시한 결과 불순물로 포도당만 일부 나타나는 조AX이었으며 (그림 89), 이로부터 전분, 단백질 및 베타글루칸을 제거하여 얻은 물질은 AX을 구성하는 arbinose와 xylose 이외에는 불순물이 관찰되지 않는 순수AX이었음 (그림 90). 이 순수AX에서의 함량을 정량적으로 분석한 결과 ara:xyl의 비율 (A/X)이 0.48이었으며, 이는 다른 문헌에서 보고된 A/X 비율 (Wheat Flour) 0.42-0.52 범위 안에 있음 . 또한, ara/xyl가 0.48인 것은 AX에서의 ara의 함량이 0.32이므로 Megazyme에서 구매한 AX가 가지는 ara의 함량인 0.34 ("3-2-1. 순수성분의 당분석" 참조)와 동일하였음.

- AX의 분자량 측정: 밀기울 WEM에서 분리해낸 순수AX를 GPC (gel permeation chromatography)를 이용하여 분석한 결과 peak가 1개만 관찰되는 것으로부터 분리정제한 AX가 순수하다는 것을 확인할 수 있었음 (그림 91). 이 순수AX의 분자량을 측정한 결과 Mw가 68.8 kDa이었으며, 이는 Khan and Shewry (Wheat Chemistry and Technology, 4th Ed., St. Paul, MN., 2009)가 밀의 AX에 대해 기록한 분자량인 65-66 kDa과 비슷한 결과여서 본 과제에서 분리정제한 AX가 진품임을 확인하였음.

㉖ 분리정제된 AX의 기능

㉗ 분리정제된 AX의 심근경색에 대한 효능 (제1세부)

- 시료의 양과 실험시간이 비교적 많이 필요로 하는 기억력개선에 관련된 실험을 시행하기에 앞서 스크리닝의 관점에서 심근경색에서의 효능을 분리정제한 AX (Megazyme)와 구매한 AX의 효능을 서로 비교하였음. 앞에서 언급된 구매한 AX의 효능을 나타내는데 최소용량인 5 mg/kg/day의 농도로 3일 동안 밀에서 분리정제한 AX를 5 mg/kg/day의 농도로 사료와 섞어서 먹이고 허혈 30분, 재관류 3시간을 시행하여 심근경색의 면적을 측정하였음. 분리정제한 순수AX와 구매한 AX는 대조군에 비해 각각 22.8와 21.8%의 경색부피를 줄이는 효능을 보였으며, 순수AX는 p value가 0.05와 근접하는 0.062를 보였음 (그림 92). 이러한 결과는 본 연구에서 분리정제한 순수AX가 심근경색에 대해서는 구매한 것과 동일한 효능을 나타내어 원하는 AX를 확보하였다는 것을 확인하였음.

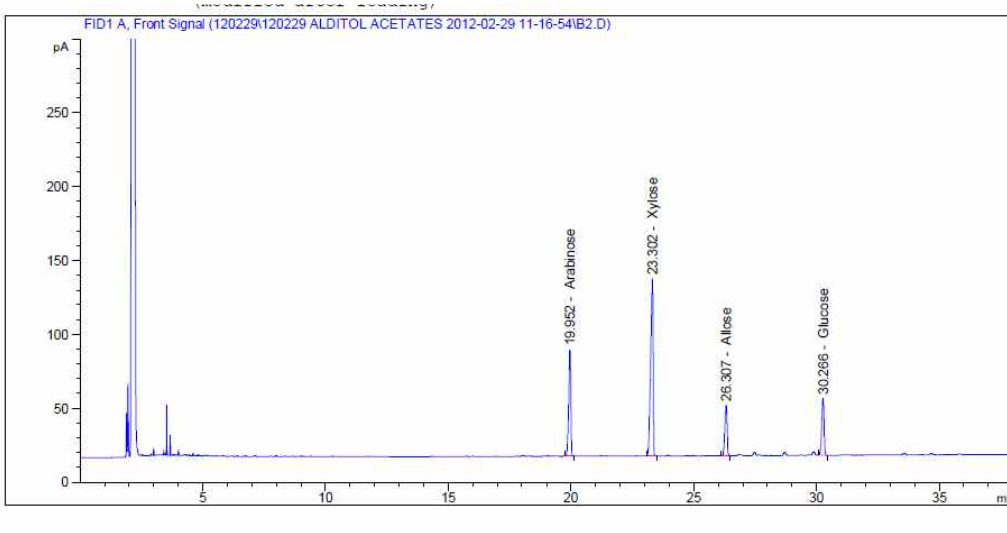


그림 89. 분리정제한 조AX의 alditol acetate 법에 의한 크로마토그램

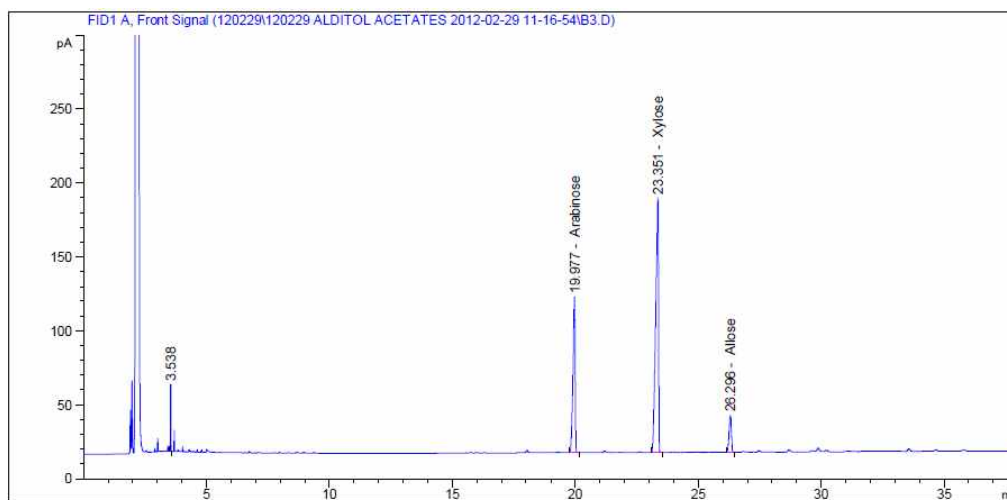
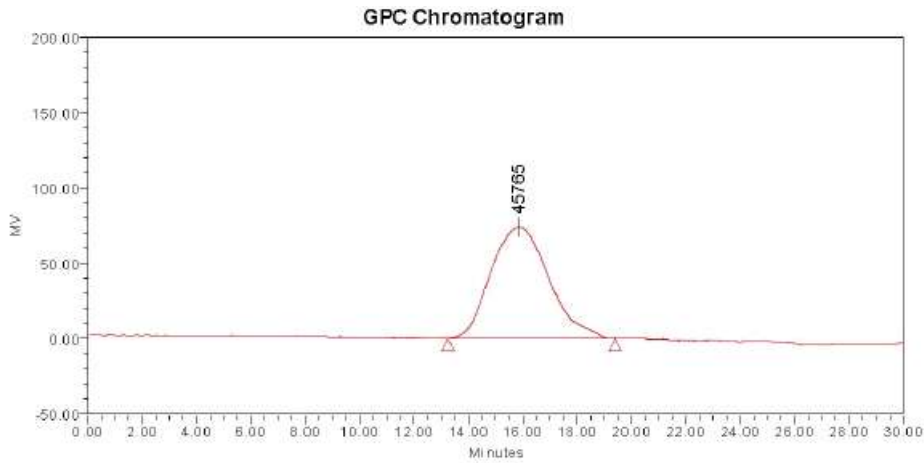


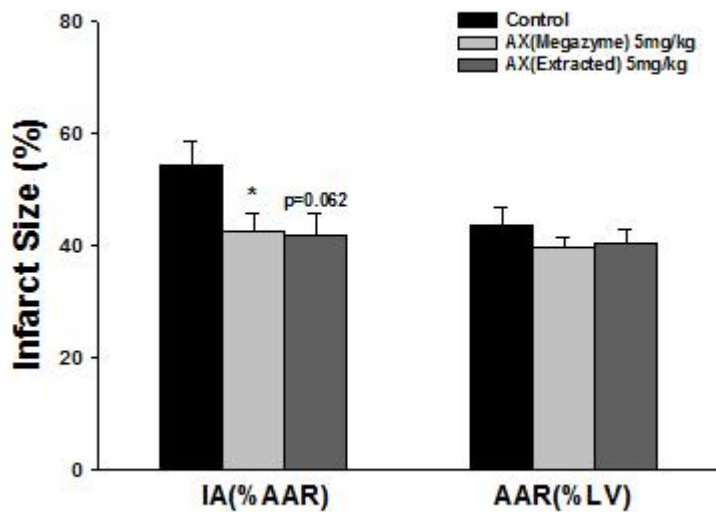
그림 90. 분리정제한 순수AX의 alditol acetate 법에 의한 크로마토그램



Peak Results								
Peakname	Mn	Mw	MP	Polydispersity	Mz	Mz/Mw	% Area	Retention Time
1 Peak1	21169	67822	45765	3.203752	148368	2.187619	100.00	15.864

91. 분리정제된 순수AX의 분자량 분포

Arabinoxylan



92. 밀에서 분리정제한 arabinoxylan (AX)이 심근경색에 미치는 효능 조사

분리정제한 AX를 폐색 3일 전부터 여러 농도로 사료와 섞어 자유롭게 먹게 한 후 허혈-재관류 (30분/3시간) 방법을 이용하였을 때 밀에서 분리정제한 순수AX가 심근경색에 미치는 영향을 조사하였음. 대조군 (control)은 5마리 이상, 실험군은 모두 10마리 내외에 대해 실험한 것임.

(b) 분리정제된 AGP에 대한 기능조사

㉠ AGP의 분리정제

- 200 g의 밀가루로부터 순수한 AGP 약 230 mg (초기에 사용한 밀가루의 약 0.15%)을 얻었음.
- 중성당 분석을 실시한 결과 (그림 93) ara 40.0%, gal 57.7%, xyl 0.8%, 힘 1.2% 및 man 0.3%로 구성되어 있어 arabinogalactan의 특성을 만족시켰음.
- GPC를 실시한 결과 1개만의 peak가 관찰되어 순수하다는 것을 확인하였음 (그림 94).
- 분자량을 측정한 결과 평균분자량이 15,500이었음.

㉡ 분리정제된 AGP의 효능

- 건망증모델과 심근경색모델에 대해 조사되었음.

㉢ 건망증 모델 (제1협동)

i) 기억력 개선 효능

- 밀가루로부터 분리정제된 AGP의 당분석과 GPC (gel permeation chromatography)를 통해 순도와 분자량을 확인하고, 이를 이용하여 기억력 개선 효능이 있는지를 수동회피실험으로 조사하였음. 그림 24에 나타내는 바와 같이 step-through latency time에서 정상군(SHAM)의 경우에 221.13 ± 40.92 초를 기록하였고, 스키폴라민 대조군(SCO)은 33.1 ± 11.52 초를 기록하여 188초의 차이를 보여 주었음(그림 24). 한편, 실험군(SCO + AGP 10 mg/kg) 투여의 경우 step-through latency time에서 185.93 ± 58.92 초를 기록하여 스키폴라민으로 인해 손상된 기억력의 회복에 유의한 효과가 있음을 확인하였음(그림 24).

㉣ 심근경색모델 (제1세부)

i) 분리정제된 AGP에 대한 효능조사

- 분리정제된 AGP를 0.1, 1, 10 및 100 mg/kg/day 등의 용량으로 조사한 결과 1 mg/kg/day 의 용량에서 26.1% 정도의 심근경색을 줄이는 효능이 관찰되었음. 이 이상의 용량에서도 그 효능이 관찰되었음 (그림 96).

ii) 분리정제된 AGP의 기전조사

- 분리정제된 AGP가 심근경색의 부피를 줄이는 원인을 조사하기 위해 세포 자살 기전 조사의 대표적인 방법인 TUNEL assay를 실시하였음. 아울러 TUNEL assay의 상위에 위치하는 Bax/Bcl-2 및 MAPK의 발현정도를 측정하기 위해 Western blotting을 실시하였음.
- TUNEL 결과 - 경계 지역 (BZ, AAR)인 곳에서 AGP가 100 mg/kg/day의 농도에서 대조군에 비해서 현저하게 세포의 자살을 줄이는 효능이 있었음 (7.35 ± 1.40 versus 14.23 ± 7.35 , $p < 0.05$) (그림 97). 반면에 IA 지역에서는 AGP를 100 mg/kg/day로 먹인 쥐는 세포 자살이 줄어드는 경향이 보였으나 유의하지는 않았음 (24.60 ± 5.09 and 18.27 ± 3.18 , $p > 0.05$).
- Western blotting 결과 - 세포자살관련 TUNEL assay 결과를 뒷받침하기 위하여 Bax/Bcl-2와 MAPK 등의 발현정도를 Western blotting으로 조사를 실시하였음. Bax(apoptotic effect)와 Bcl-2 (antiapoptotic effect)의 발현비를 비교한 결과 Bcl-2는 control에 비해 증가하였으며, Bax는 control에 비해 감소하였음. 이를 Bax/Bcl-2 비로 정량화하였을 때 AGP (100 mg/kg/day)를

먹인 군에서 대조군에 비해 그 비가 유의하게 감소하였음 (그림 98). 즉, apoptotic cascade 안에서 Bcl-2와 Bax가 관련된 단계에 AGP가 영향을 미치는 것을 나타냄. 아울러 Bax와 Bcl-2의 upstream에 위치하는 MAPK의 인산화정도를 조사하였음 (그림 99). 그 결과 P38, JNK 및 ERK는 모두 AGP (100 mg/kg/day)를 먹인 군에서 대조군에 비해 인산화정도가 유의하게 감소하였음. 이러한 결과는 AGP가 세포자살을 억제하는 것은 세포자살에 관련된 유전자의 발현 (Bax 및 Bcl-2)이나 인산화정도 (MAPK)에 영향을 미쳐 일어난 것임을 알 수 있었음.

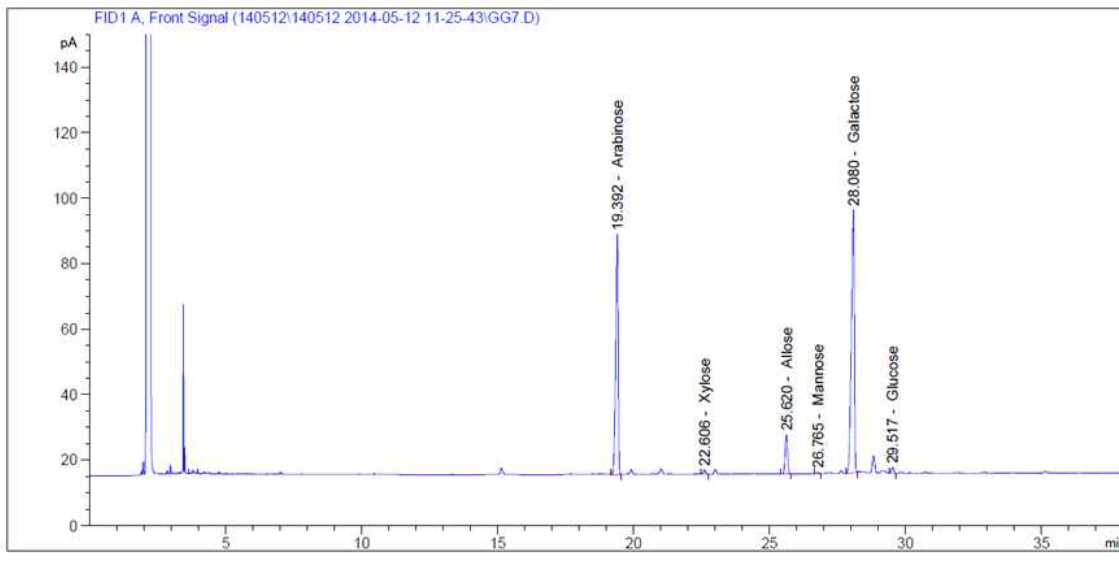
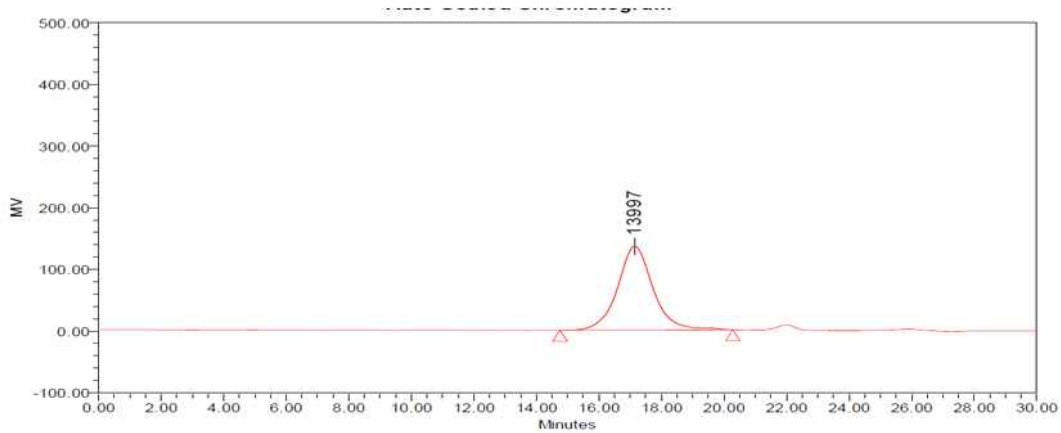


그림 93. 분리정제된 AGP의 당분석 결과



GPC Results

SampleName	Retention Time (min)	Mn (Daltons)	Mw (Daltons)	MP (Daltons)	Mz (Daltons)	Polydispersity	% Area
1 AGP(3)	17.146	10423	15518	13997	21252	1.488798	100.00

Method Remark :

SampleName : AGP(3)
 Column : 2 X TSKgel GMPWxl
 Eluent : 0.1 M NaNO₃ + 0.02 M Na₂HPO₄ pH 7
 Flow rate : 1.0 mL/min
 Sample Conc. : 3 mg/mL
 Temperature : 45 oC
 Sample loading : 100 uL
 Detector : RI
 Calibration : PEG/PEO
 Software : EMPOWER

그림 94. 분리정제된 AGP의 GPC 분석결과

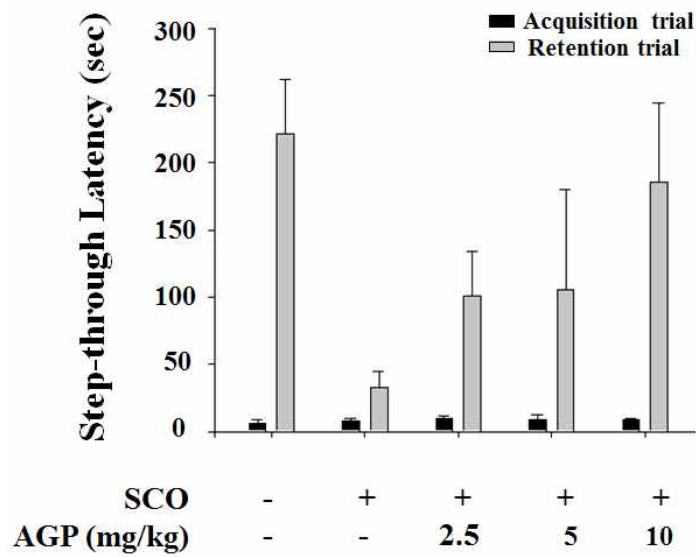


그림 95. 아라비노갈락탄 펩타이드(AGP)의 기억력 향상 효능 비교(수동회피 실험)

C57BL/6 마우스에 스키폴라민을 주사하여 발생하는 건망증에 대한 아라비노갈락탄 펩타이드 (AGP)의 효능을 검토하기 위해 수동회피 실험을 실시하여 전기적 충격을 기억하는 평균시간 step-through latency를 측정함. SHAM은 정상적인 쥐, SCO는 스키폴라민(1 mg/kg)만 주사한 쥐, SCO + AGP는 아라비노갈락탄 펩타이드를 1일 표기된 용량으로 투여한 쥐를 각각 나타냄.

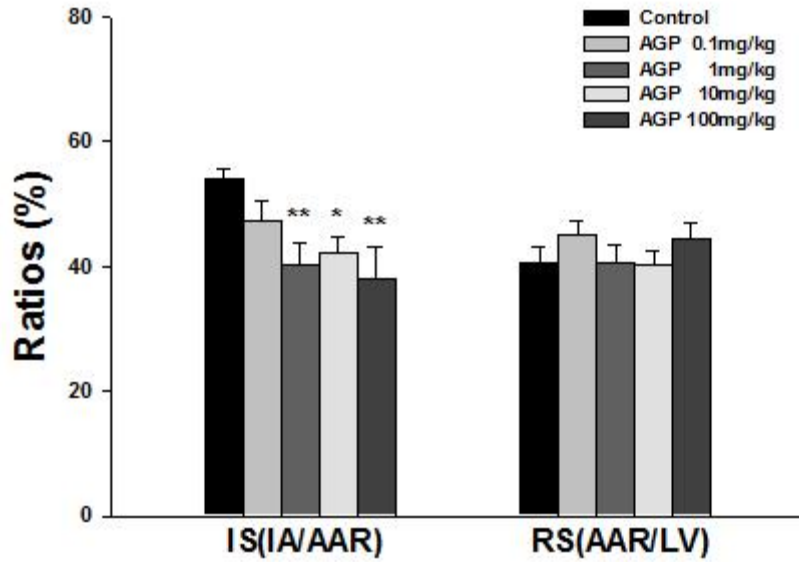


그림 96. 분리정제한 AGP가 심근경색에 미치는 효능 조사

분리정제한 AGP를 폐색 3일 전부터 여러 농도로 사료와 섞어 자유롭게 먹게 한 후 허혈-재관류 (30분/3시간) 방법을 이용하였을 때 심근경색에 미치는 영향을 조사하였음.

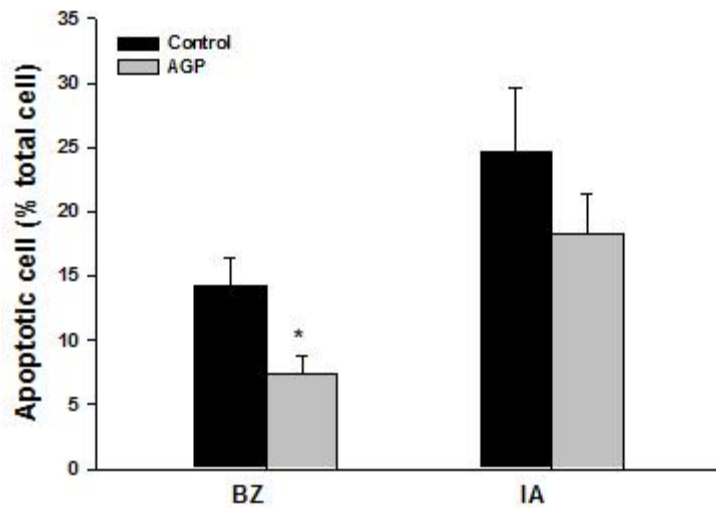


그림 97. AGP가 심장의 허혈-재관류시 세포자살에 미치는 영향 (TUNEL)

분리정제한 AGP를 폐색 3일 전부터 여러 농도로 사료와 섞어 자유롭게 먹게 한 후 허혈-재관류 (30분/3시간) 방법을 이용하였을 때 TUNEL assay 방법을 통하여 세포 자살에 미치는 영향을 조사하였음. AGP 100 mg/kg/day에 대해 조사하였음. *p < 0.05 vs. control group.

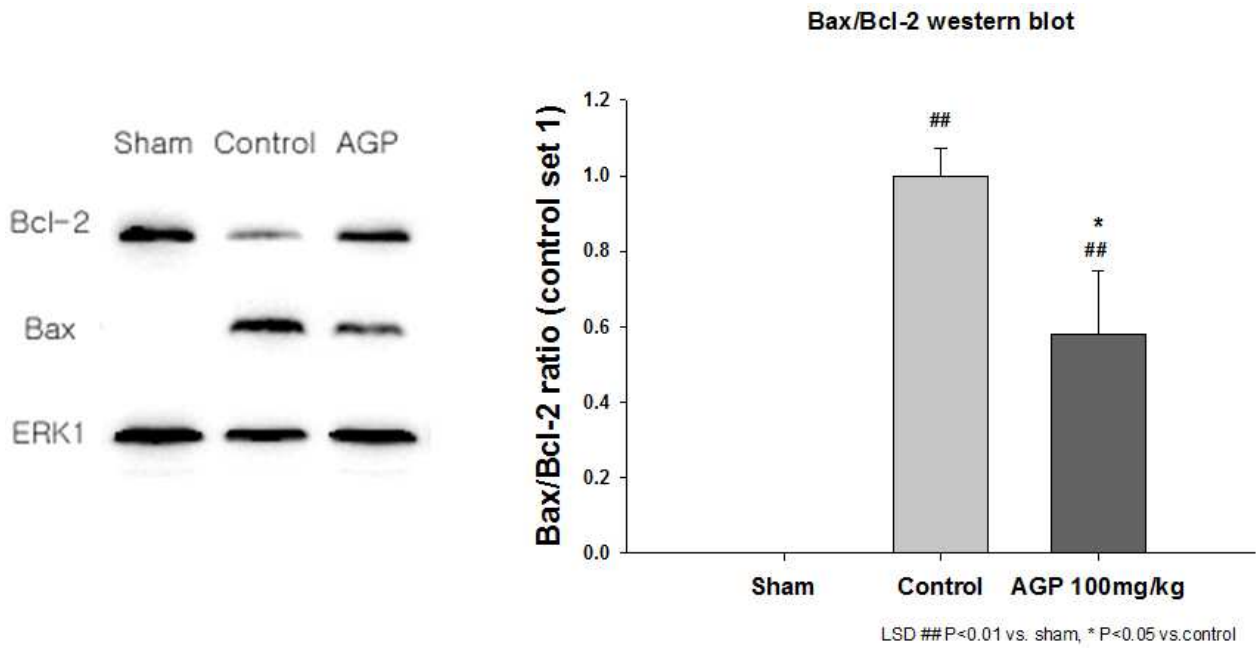


그림 98. AGP가 심장의 허혈-재관류시 Bcl-2와 Bax의 발현에 미치는 영향

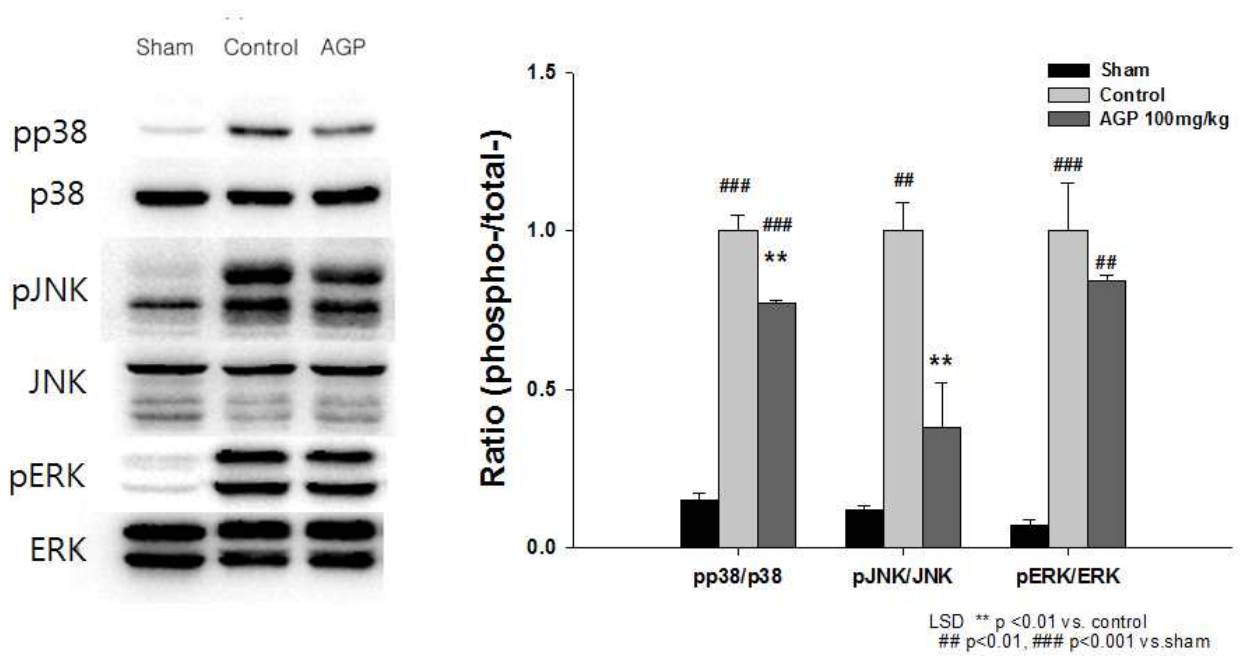


그림 99. AGP가 심장의 허혈-재관류시 MAPK의 인산화에 미치는 영향

(나) 인체시험 (제2협동, 제3협동)

① 신청원료 캡슐 및 플라시보 캡슐의 제조 (제2협동)

- 신청원료와 플라시보의 선정에 대해서는 “3-8-1. 동물시험” 부분 참조.
- 캡슐의 제조는 건강기능식품제조시설에서 이루어졌음.

㉠ 신청원료 캡슐

- 신청원료 캡슐의 제조는 500 mg의 미황색 캡슐 (그림 100)에 신청원료 (밀기울추출물) 95% (약 335 mg)와 부형제 (유당혼합분말, 이산화규소, 스테아린산마그네슘) 5%을 배합 및 충전하여 제조하였음 (표 54).

㉡ 플라시보 캡슐

- 플라시보 원료 제품은 신청원료를 대신하여 기억력 개선 기능이 나타나지 않는 쌀전분 95%에 식용색소 황색4호, 적색40호, 청색1호를 배합하여 신청원료와 색상을 동일하게 조정 (그림 70) 후 인체시험 원료와 동일한 부형제 (유당혼합분말, 이산화규소, 스테아린산마그네슘) 5%을 배합하여 동일한 500 mg의 미황색 캡슐에 충전하여 제조하였음 (표 54).

② 섭취

- 피시험자 1인당 하루 3 g을 섭취하도록 해야 하므로 신청원료 캡슐에는 신청원료가 캡슐 당 335 mg이 있으므로 1일 3회 3캡슐을 섭취하면 1일 3 g을 섭취하게 됨.
- 신청원료는 위에서 위산에 의해 분해된 단당류가 효능을 나타낼 가능성이 높으므로 가능하면 산성이 강한 식전에 섭취하도록 하는 것이 유리함.
- 이를 고려하여 신청원료 캡슐과 플라시보 캡슐을 1회 3캡슐로 하여 하루에 식전 3회 섭취하도록 함.



그림 100. 신청원료 캡슐과 플라시보 캡슐

표 54. 신청원료 캡슐 및 플라시보 캡슐의 성분 및 배합비

신청원료 캡슐		플라시보 캡슐	
성분명	배합비 (%)	성분명	배합비 (%)
신청원료	95.240	쌀전분	95.0220
유당혼합분말	2.760	식용색소황색4호	0.1800
이산화규소	1.000	식용색소적색40호	0.0320
스테아린산마그네슘	1.000	식용색소청색1호	0.0060
		이산화규소	1.0000
		스테아린산마그네슘	1.0000
		유당혼합분말	2.760

③ 인체적용시험 설계

㉠ 연구디자인 설계 및 평가항목 선정

(a) 연구디자인: 12주, 무작위배정, 이중눈가림, 위약 대조 연구

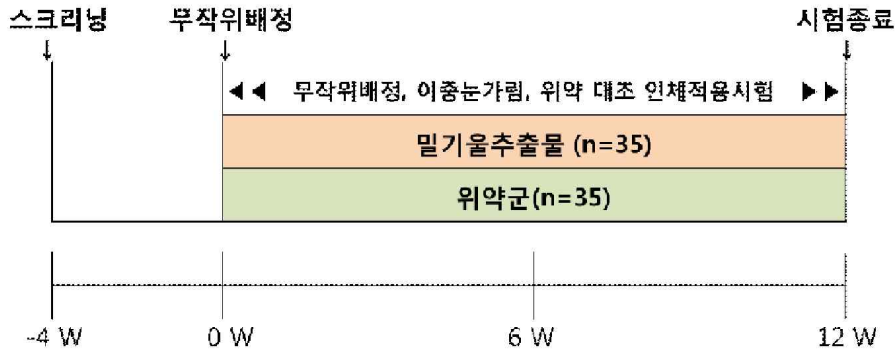


그림. 연구디자인

(b) 평가항목

㉠ 유효성 평가항목

㉡ 1차 유효성 평가항목

- CNT (computerized neurocognitive function test)
: 시각 기억 검사 (visual learning test)
- WMT (working memory test)
: 시각 작업기억 과제 (visual working memory test)

㉢ 2차 유효성 평가항목

- CNT
: 지속검사, 단기 기억 검사(숫자 따라하기, 시각 단기 기억), 언어기억 검사, 기호잇기 검사
- WMT
: 언어성 작업기억 과제 (verbal working memory test)
- K-MMSE (Korean mini-mental status examination; 간이정신상태검사)
- BCRS (brief cognitive rating scale; 단기인지기능평가)
- PRMQ (prospective and retrospective memory questionnaire; 과거회상기억 및 미래예측기억)
- PSS (perceived stress scale; 스트레스 검사)
- SF-36 (36-item short form health survey; 삶의 질 설문지)
- 혈중 BDNF (brain-derived neurotrophic factor; 뇌유래신경영양인자)

㉣ 안전성 평가항목

- 자·타각 증상 등 이상반응 모니터링
- 신체검진, 진단검사의학검사, 심전도 및 활력징후

㉠ 인체적용시험계획서 및 증례기록서 개발

- 인체적용시험계획서, 전자증례기록서 개발을 완료하였음 (그림 101, 102).

대구가톨릭대학교 Protocol No. CTCF2_2013_WBE Version 1.4
인 체 적 용 시 험 계 획 서
 말기암환자들의 인지기능 개선에 대한 유효성 및 안전성을 평가하기 위한
 무작위배정, 이중눈가림, 위약 대조 인체적용시험
 제목명 말기암환자를 위한
 시험계획서번호 CTCF2_2013_WBE (Version 1.4)
 시험단계 인체적용시험
 시험계획서작성일 2014. 01. 21
 시험기관 경북대학교병원 기능성식품융합시험지원센터
 시험책임자 [Redacted]

본 인체적용시험계획서의 유효성이 있는 것은 물론, 올바른 시험책임자 및 시험담당자, 심사위원회, 보건당국에 의해 제공된 경우로서, 인체적용시험윤리위원을 통한 철저한 시험계획서 평가에 대한 서면동의를 받기 위한 경우를 제외하고는 대구가톨릭대학교의 시험서명용과 같이 꼭 지켜야 할 수 없습니다.

개 례 문 서

인체적용시험계획서

Case Report Form
증례기록서
Case Report Form
 말기암환자들의 인지기능 개선에 대한 유효성 및 안전성을 평가하기 위한
 무작위배정, 이중눈가림, 위약 대조 인체적용시험
 Patient No. 12
 연구대상자번호 [Redacted]
 연구구분번호 [Redacted]
 증례번호 [Redacted]

Protocol No. CTCF2_2013_WBE
 연구자(Sponsor) 대구가톨릭대학교 연구부서 2014
 승인기관(Investigating Institution) 경북대학교병원 기능성식품융합시험지원센터
 승인번호(Investigation Number) 2014-01-21
 시험책임자(Principal Investigator) [Redacted]
 공동연구자(Co-Principal Investigator) [Redacted]

증례기록서

㉔ IRB 심의

- 인체적용시험계획서는 연구대상자의 안전을 충분히 고려하여 작성되었으며, 전북대학교병원의 기능성식품인체시험윤리위원회(IRB)가 심의하여 인체적용시험 수행을 결정하였음 (그림 103, 104).
- 최초승인일: 2013. 10. 15

연구과제신청서

연구과제명: [redacted]

연구기간: 2013년 10월 15일 ~ 2013년 11월 15일

연구책임자: [redacted]

연구비: 총 200,000 원

전북대학교병원 기능성식품인체시험윤리위원회 귀하

그림 103. IRB 신청서

심사결과 통지서

연구과제명: [redacted]

Protocol No.: CTCF2_2013_WBE

Version No.: 1.0

연구책임자: [redacted]

연구비: 총 200,000 원

심사결과: 승인

승인일: 2013년 10월 15일

그림 104. IRB 승인서

㉕ 인체적용시험 수행

㉖ 연구자 개시모임

: 2013. 10. 31 연구자 개시모임을 진행하였음.

㉗ 연구대상자 모집 및 인체적용시험 수행

: 본 인체적용시험 등록 목표 연구대상자 수는 70명, 중도탈락 20%를 고려한 종료 목표 연구대상자 수는 56명으로, 총 79명의 자원자가 서면동의서를 자발적으로 작성한 후 스크리닝 검사를 받았고, 연구대상자 적합성 평가를 통해 70명이 적격 연구대상자로 선정되었음. 선정된 연구대상자는 무작위배정, 이중눈가림 방법을 통해 인체적용시험에 참여(밀기울추출물군 35명, 위약군 35명)하였음 (표 55). 인체적용시험 수행 도중 4명(밀기울추출물군 2명, 위약군 2명)이 동의철회에 의해 중도탈락, 2명(밀기울추출물군 1명, 위약군 1명)이 순응도 미달로 계획서를 위반하여 종료 목표 연구대상자 56명을 초과한 총 64명(밀기울추출물군 32명, 위약군 32명)이 인체적용시험계획서에 명시된 모든 절차를 수행 완료하였음.

표 55. 탈락 및 계획서 위반 현황 및 사유

시험군	사유	N (명)
Test group	동의철회	2
	순응도 미달	1
Placebo group	동의철회	2
	순응도 미달	1
Total	동의철회	4
	순응도 미달	2

㉔ 인체적용시험 모니터링

: 26차 모니터링을 완료하였음.

⑤ 인체적용시험 결과 분석

㉕ 순응도 평가

: 인체적용시험용제품의 섭취 상황에 대하여 매 방문마다 연구대상자가 지참하고 온 인체적용시험용제품의 잔여량을 반납받고 아래와 같이 순응도를 확인하였음.

$$\text{순응도}(\%) = \frac{\text{실제 섭취한 제품 수}}{\text{섭취하여야 할 제품 수}} \times 100$$

연구기간 중 2명(밀기울추출물군 1명, 위약군 1명)의 연구대상자가 순응도 미달이었음. 연구대상자 일인 당 섭취해야 할 제품의 수는 760.76±32.34 캡슐, 실제로 섭취한 제품 수는 668.01±125.66 캡슐이며 밀기울추출물군과 위약군 간 유의한 차이가 없었음 ($p=0.489$, $p=0.968$). 제품 순응도는 밀기울추출물군 86.29±23.06 %, 위약군 86.49±22.83 %이며 두 섭취군 간 통계적으로 유의한 차이가 없었음 ($p=0.971$) (표 56).

표 56. 순응도

	Test group (n=35)	Placebo group (n=35)	Total (n=70)	<i>p</i> -value ¹⁾
섭취해야 할 제품 수 (Prescriptions)	758.06±36.96	763.46±27.22	760.76±32.34	0.489
섭취한 제품 수 (Total intakes)	668.63±113.38	667.40±138.52	668.01±125.66	0.968
순응도 (%) (Compliance)	88.37±15.77	87.78±18.44	88.07±17.03	0.886

Compliance was calculated by total intakes by prescriptions.

Values are presented as mean±SD

¹⁾Analyzed by independent *t*-test

㉔ 인구학적 정보 (표 57)

: 인구학적 정보는 인체적용시험에 참여하여 최소 1회 이상 시험용제품을 섭취한 연구대상자 70명(safety군)을 대상으로 분석하였음. 본 연구 스크리닝 당시 전체 연구대상자 70명 중 남성이 29명, 여성이 41명(밀기울추출물군 남성 16명/여성 19명, 위약군 남성 13명/여성 22명), 평균 연령은 65.76±3.90세(밀기울추출물군 65.37±3.40, 위약군 66.14±4.36세)로 두 섭취군 간 성별 분포 및 평균 연령에 유의한 차이가 없었음. 평균 신장은 밀기울추출물군 161.74±8.91 cm, 위약군 158.31±7.76 cm로 두 섭취군 간 유의한 차이가 있었으나($p=0.091$) 유효성 및 안전성 평가에 영향을 미칠만한 영향은 없다고 판단하였음. 평균 체중은 61.90±9.47 kg (밀기울추출물군 63.31±9.42 kg, 위약군 60.50±9.45 kg), BMI는 24.12±2.68 kg/m² (밀기울추출물군 24.16±2.60 kg/m², 위약군 24.08±2.79 kg/m²)으로 두 섭취군 간 유의한 차이가 없었음. 연구대상자 70명 중 음주자는 22명, 비음주자 48명(밀기울추출물군 음주자 10명, 비음주자 25명; 위약군 음주자 12명, 비음주자 23명)으로 섭취군 간 유의한 차이가 없었고, 흡연자 2명, 비흡연자 68명(밀기울추출물군 흡연자 2명/비흡연자 33명, 위약군 비흡연자 35명)으로 섭취군 간 유의한 차이가 없었음. 이상의 결과를 종합할 때 섭취군 간 의미 있는 차이가 없었으므로 대체로 연구대상자의 무작위배정이 잘 이루어졌다고 판단하였음.

표 57. 인구학적 정보

	Test group (n=35)	Placebo group (n=35)	Total (n=70)	p-value ¹⁾
성별 (남/여)	16/19	13/22	29/41	0.467 ²⁾
나이 (세)	65.37±3.40	66.14±4.36	65.76±3.90	0.412
학력 (년)	10.00±3.79	10.46±3.7	10.23±3.72	0.611
키 (cm)	161.74±8.91	158.31±7.76	160.03±8.47	0.091*
체중 (kg)	63.31±9.42	60.50±9.45	61.90±9.47	0.217
BMI (kg/m ²)	24.16±2.60	24.08±2.79	24.12±2.68	0.902
음주력 (음주자/비음주자)	10/25	12/23	22/48	0.607 ²⁾
흡연력 (흡연자/비흡연자)	2/33	0/35	2/68	0.493 ²⁾

Values are presented as mean±SD or number

¹⁾Analyzed by independent *t*-test, ²⁾Analyzed by chi-square test

* $p<0.1$

㉕ 유효성 평가항목

: 유효성 평가는 시험제품 섭취 후, 최소한 1회 이상 주 평가변수에 대한 측정이 이루어진 연구대상자 70명(ITT 분석군)을 대상으로 분석하였음.

(a) 1차 유효성 평가항목

㉑ 시각 기억 검사 (visual learning test)

: CNT 항목 중 시각 기억 검사를 시험제품 섭취 전, 섭취 12주 후에 측정하였음 (표 58).

분석 결과, visual learning test A5(5번째 반복시험) 항목이 밀기울추출물 섭취군에서 섭취 전에 비해 섭취 12주 후 유의하게 증가하여($p=0.029$) 두 섭취군 간 통계적으로 유의한 차이가 있었음 ($p=0.024$).

표 58. 섭취 전 · 섭취 12주 후 시각 기억 검사 결과 변화

	Test group (n=35)			Placebo group (n=35)			p -value ¹⁾	
	0 w	12 w	p -value ¹⁾	0 w	12 w	p -value ¹⁾		
Visual learning test	A1	10.00 ±1.33	10.36 ±1.54	<.001***	9.86 ±1.61	10.22 ±1.93	0.038*	0.976
	A2	10.46 ±1.54	11.03 ±1.79	0.043*	10.66 ±1.91	11.13 ±1.84	0.190	0.744
	A3	10.43 ±1.54	11.21 ±1.36	0.003**	11.11 ±1.75	11.44 ±1.88	0.228	0.272
	A4	11.29 ±1.53	11.76 ±1.62	0.079	11.66 ±1.89	11.69 ±1.82	0.961	0.196
	A5	11.49 ±1.70	11.97 ±1.70	0.029*	11.83 ±1.60	11.72 ±1.85	0.399	0.024*
Recognition	11.34 ±1.51	11.09 ±1.51	0.217	11.34 ±1.92	11.50 ±1.74	0.481	0.155	

Values are presented as mean±SD

¹⁾Analyzed by linear mixed model

* $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$

¶CPT; continuous performance task, CCPT; controlled continuous performance task

㉞ 시지각 작업기억과제 (visual working memory test)

: WMT 항목 중 시지각 작업기억과제를 시험제품 섭취 전, 섭취 12주 후에 측정하였음 (표 59).

분석 결과, 검사 반응시간이 시험군에서 섭취 전에 비해 섭취 12주 후 감소하고, 위약군에서 증가하여 두 섭취군 간 통계적으로 유의한 차이가 있었음 ($p=0.042$).

표 59. 섭취 전 · 섭취 12주 후 시지각 작업기억과제 결과 변화

	Test group (n=35)			Placebo group (n=35)			p -value ¹⁾	
	0 w	12 w	p -value ¹⁾	0 w	12 w	p -value ¹⁾		
시지각 작업기억 과제	정확도 (%)	84.14 ±11.87	89.03 ±13.97	0.031*	85.38 ±13.12	91.63 ±8.49	<.01**	0.590
	보정된 정확도(%)	40.21 ±12.52	43.40 ±16.39	0.198	36.09 ±16.95	43.97 ±15.84	0.013*	0.194
	반응시간 (msec)	615.24 ±98.94	594.38 ±98.29	0.278	566.11 ±108.1	600.93 ±88.76	0.079	0.042*

Values are presented as mean±SD

¹⁾Analyzed by linear mixed model

* $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$

(b) 2차 유효성 평가항목

㉠ 지속검사, 단기기억검사, 언어기억검사, 기호잇기 검사

: CNT 검사 항목 중 지속검사(CPT; continuous performance task), 단기기억검사 [숫자 따라하기(digit span), 시각단기기억(visual span)], 언어기억검사(verbal learning test), 기호잇기 검사(trail making)를 시험제품 섭취 전·섭취 12주 후에 측정하였음 (표 60).

분석 결과, 시험제품 섭취 전·섭취 12주 후, 섭취군 간 통계적으로 유의한 차이가 없었음.

표 60. 섭취 전·섭취 12주 후 지속검사, 단기기억검사, 언어기억검사, 기호잇기검사 결과 변화

		Test group (n=35)			Placebo group (n=35)			<i>p</i> -value ¹⁾
		0 w	12 w	<i>p</i> -value ¹⁾	0 w	12 w	<i>p</i> -value ¹⁾	
	Visual CPT	0.41 ±0.05	0.41 ±0.04	0.827	0.43 ±0.05	0.42 ±0.05	0.192	0.419
	Visual controlled CPT	0.39 ±0.09	0.40 ±0.08	0.808	0.38 ±0.06	0.37 ±0.05	0.954	0.815
	Auditory CPT	0.58 ±0.1	0.60 ±0.08	0.374	0.63 ±0.15	0.60 ±0.06	0.202	0.114
	Auditory controlled CPT	0.57 ±0.08	0.56 ±0.09	0.672	0.59 ±0.09	0.59 ±0.08	0.989	0.763
Digit span	Forward	5.65 ±1.17	5.88 ±1.20	0.115	5.60 ±1.26	5.63 ±1.32	0.899	0.299
	Backward	3.88 ±0.96	4.27 ±1.20	0.006**	3.88 ±0.94	3.98 ±1.18	0.582	0.141
Visual span	Forward	5.39 ±0.85	5.45 ±0.67	0.661	5.55 ±1.17	5.87 ±1.04	0.048*	0.288
	Backward	4.80 ±1.09	4.86 ±1.30	0.787	5.28 ±1.14	5.23 ±1.07	0.876	0.839
	Backward recognition	12.57 ±1.50	13.12 ±1.58	0.072	12.80 ±1.62	13.19 ±1.47	0.204	0.596
Verbal learning test	A1	5.34 ±1.41	6.58 ±1.97	<.001***	5.14 ±1.63	6.56 ±2.58	<.001***	0.697
	A2	8.06 ±1.55	8.97 ±1.78	0.002**	7.54 ±1.98	8.94 ±1.97	0.001**	0.304
	A3	9.14 ±1.77	10.21 ±2.09	0.003**	9.20 ±2.15	10.34 ±2.29	<.001***	0.813
	A4	10.46 ±1.82	11.33 ±2.03	0.037*	10.20 ±2.30	11.34 ±2.43	0.008**	0.567
	A5	10.86	11.36	0.110	10.97	11.59	0.086	0.905

		±1.59	±2.37		±2.20	±2.18		
	B1	4.49	4.91	0.142	4.34	4.94	0.102	0.747
		±1.69	±1.76		±1.80	±1.58		
	Blocking	8.91	10.09	0.002**	8.89	10.47	<.001***	0.512
		±2.34	±2.13		±2.71	±2.55		
	Recall	9.06	10.64	<.001***	8.89	10.00	0.038*	0.250
		±2.21	±2.40		±3.01	±2.41		
Trail making	A	37.94	36.73	0.713	36.40	36.50	0.949	0.750
		±15.96	±13.51		±14.75	±14.43		
	B	108.54	109.88	0.861	99.17	99.34	0.727	0.773
		±69.10	±54.74		±57.86	±40.47		

Values are presented as mean±SD

¹⁾Analyzed by linear mixed model

* $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$

¶CPT; continuous performance task, CCPT; controlled continuous performance task

㉞ 언어성 작업기억과제 (verbal working memory test)

: WMT 검사 항목 중 언어성 작업기억과제를 시험제품 섭취 전·섭취 12주 후에 측정하였음 (표 61).

분석 결과, 시험제품 섭취 전·섭취 12주 후, 섭취군 간 통계적으로 유의한 차이가 없었음.

표 61. 섭취 전·섭취 12주 후 언어성 작업기억과제 결과 변화

		Test group (n=35)			Placebo group (n=35)			p -value ¹⁾
		0 w	12 w	p -value ¹⁾	0 w	12 w	p -value ¹⁾	
언어성 작업기억 과제	정확도 (%)	47.71	50.25	0.279	50.09	53.23	0.108	0.849
		±11.14	±11.06		±12.80	±12.13		
	보정된 정확도(%)	41.09	43.84	0.316	43.76	47.96	0.063	0.651
		±13.12	±12.81		±14.85	±13.40		
	반응시간 (msec)	631.57	571.92	<.0001***	621.51	580.20	0.014*	0.341
		±90.65	±81.06		±76.90	±63.31		

Values are presented as mean±SD

¹⁾Analyzed by linear mixed model

* $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$

㉟ K-MMSE (간이정신상태검사)

: K-MMSE를 시험제품 섭취 전, 섭취 12주 후에 측정하였음 (표 62).

분석 결과, 시험제품 섭취 전·섭취 12주 후, 섭취군 간 통계적으로 유의한 차이가 없었음.

표 62. 섭취 전·섭취 12주 후 K-MMSE 변화

	Test group (n=35)			Placebo group (n=35)			p -value ¹⁾
	0 w	12 w	p -value ¹⁾	0 w	12 w	p -value ¹⁾	

시간지남력	4.94 ±0.24	4.88 ±0.33	0.380	4.86 ±0.36	4.88 ±0.33	0.717	0.385
장소지남력	4.91 ±0.37	4.91 ±0.38	0.979	4.94 ±0.24	4.97 ±0.17	0.608	0.649
기억등록	3.00 ±0.00	3.00 ±0.00	-	3.00 ±0.00	3.00 ±0.00	-	-
주의집중 및 계산	4.14 ±0.81	4.21 ±0.82	0.538	4.03 ±1.10	4.18 ±1.01	0.479	0.755
기억회상	2.06 ±0.84	1.79 ±0.86	0.169	2.00 ±0.77	1.67 ±0.85	0.017	0.768
언어능력	7.34 ±0.64	7.48 ±0.62	0.344	7.40 ±0.60	7.55 ±0.56	0.255	0.976
그리기	0.89 ±0.32	0.85 ±0.36	0.205	0.91 ±0.28	0.91 ±0.29	0.964	0.394
총점	27.29 ±1.34	27.12 ±1.58	0.535	27.14 ±1.52	27.15 ±1.50	0.990	0.687

Values are presented as mean±SD

¹⁾Analyzed by linear mixed model

㉔ 관련 설문항목 변화

: BCRS(단기인지기능평가), PRMQ(과거회상기억 및 미래예측기억), PSS(스트레스검사), SF-36(삶의 질) 설문지를 시험제품 섭취 전, 섭취 12주 후에 측정하였음 (표 63).

분석 결과, SF-36 항목(total)이 밀기울추출물 섭취군에서 섭취 전에 비해 섭취 12주 후 유의하게 증가하여($p=0.032$) 두 섭취군 간 통계적으로 유의한 차이가 있었음($p=0.047$).

표 63. 섭취 전 · 섭취 12주 후 관련 설문항목 변화

	Test group (n=35)			Placebo group (n=35)			p -value ¹⁾	
	0 w	12 w	p -value ¹⁾	0 w	12 w	p -value ¹⁾		
BCRS	16.97 ±12.44	18.09 ±11.83	0.660	17.43 ±11.42	14.67 ±9.91	0.118	0.214	
PRMQ	33.11 ±13.75	31.91 ±12.32	0.543	33.09 ±9.30	29.64 ±5.74	0.063	0.395	
PSS	16.97 ±3.91	15.64 ±5.28	0.126	16.69 ±4.95	15.33 ±4.20	0.079	0.994	
SF-36	PF	75.29 ±18.03	74.39 ±21.53	0.449	79.43 ±13.38	79.85 ±12.65	0.941	0.536
	RP	66.43 ±33.73	69.70 ±31.10	0.612	78.57 ±26.53	69.70 ±31.72	0.082	0.136
	BP	78.57 ±20.47	88.26 ±13.95	0.012*	83.93 ±16.21	84.09 ±19.58	0.975	0.072
	GH	56.71 ±16.22	59.70 ±18.83	0.369	63.57 ±16.07	64.24 ±16.73	0.817	0.655

VT	65.57 ±15.52	65.76 ±20.66	0.963	75.43 ±18.92	70.76 ±16.59	0.157	0.338
SF	84.64 ±19.43	92.42 ±10.80	0.041*	90.00 ±14.79	90.53 ±11.28	0.869	0.137
RD	65.72 ±38.34	77.78 ±31.91	0.089	71.43 ±37.18	73.74 ±34.12	0.567	0.340
MH	69.49 ±20.44	75.39 ±14.53	0.034*	76.57 ±17.39	75.64 ±16.32	0.749	0.124
total	562.42 ±134.09	603.41 ±102.59	0.032*	618.93 ±112.76	608.54 ±108.98	0.553	0.047*

Values are presented as mean±SD

¹⁾Analyzed by linear mixed model

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$

¶PF; physical functioning, RP; role physical, BP; bodily pain, GH; general health, VT; vitality, SF; social functioning, RD; role emotional, MH; mental health

㉔ 혈중 BDNF 변화

: 혈중 BDNF(뇌신경영양인자)를 시험제품 섭취 전, 섭취 12주 후에 측정하였음 (표 64).

분석 결과, 시험제품 섭취 전·섭취 12주 후, 섭취군 간 통계적으로 유의한 차이가 없었음.

표 64. 섭취 전·섭취 12주 후 관련 혈중 BDNF 변화

	Test group (n=35)			Placebo group (n=35)			p -value ¹⁾
	0 w	12 w	p -value ¹⁾	0 w	12 w	p -value ¹⁾	
BDNF (pg/ml)	29217.20 ±7141.53	28907.23 ±10554.58	0.867	29358.17 ±7095.95	27444.16 ±13280.11	0.469	0.599

Values are presented as mean±SD

¹⁾Analyzed by linear mixed model

㉕ 안전성 평가항목

: 안전성 평가는 시험에 참여하여 최소한 1회 이상 인체적용시험용제품을 섭취한 연구대상자 70명(safety 분석군)을 대상으로 분석하였음.

(a) 자·타각 증상 등 이상반응

: 인체적용시험용제품을 섭취한 70명의 연구대상자 중 시험기간 동안 5명의 연구대상자에서 총 5건의 경도 또는 중등도의 이상반응이 발생하였으며 중대한 이상반응은 없었음. 발생한 이상반응은 소화불량 1건, 잇몸통증 1건, 치아발치 1건, 무릎통증 1건, 호흡곤란 1건이었음. 밀기울추출물 섭취군에서 발생한 이상반응 중 호흡곤란은 제품 섭취와 관련이 있을 수 있다고 판단하였고 연구대상자가 동의철회를 요청하여 시험제품 섭취 및 연구 참여를 중단하였음 (표 65).

분석 결과, 두 섭취군 간 이상반응 발생에 유의한 차이가 없고, 시험제품과 관련이 있을 것으로 예상되는 이상반응이 1건(호흡곤란) 있었으나 증상이 경미하고 인과관계가 뚜렷하지는 않아 밀기울추출물의 안전성에는 큰 문제가 없을 것으로 판단하였음.

표 65. 이상반응 발생 여부

	Test group (n=35)	Placebo group (n=35)	Total (n=70)	P-value ¹⁾
이상반응 발생 N (%)	3(8.6%)	2(5.7%)	5(7.1%)	>.999

Values are presented as number (percentage)

¹⁾Analyzed by Fisher's exact test

(b) 진단검사의학검사

: 진단검사의학검사를 시험제품 섭취 전과 섭취 12주 후 측정하였음 (표 66).

분석 결과, 밀기울추출물 섭취군 내에서 RBC, Hb, Hct, albumin, creatinine, total cholesterol이 유의하게 감소했고($p=0.024$, $p=0.004$, $p=0.020$, $p<0.001$, $p=0.002$, $p=0.011$), 위약 섭취군 내에서 Hb이 유의하게 감소했으나($p=0.024$) 두 섭취군 간 유의한 차이가 없었고, 참고치 범위 내에서 일어난 임상적인 의미가 없는 변화라고 판단하였음.

표 66. 섭취 전 · 섭취 12주 후 진단검사의학검사 항목 변화

	Test group (n=35)			Placebo group (n=35)			p-value ¹⁾
	0 w	12 w	p-value ¹⁾	0 w	12 w	p-value ¹⁾	
WBC ($\times 10^3/\mu\text{l}$)	5.45 ± 1.10	5.21 ± 1.33	0.125	5.37 ± 1.18	5.37 ± 1.07	0.940	0.307
RBC ($\times 100^3/\mu\text{l}$)	4.46 ± 0.35	4.39 ± 0.35	0.024*	4.46 ± 0.44	4.44 ± 0.42	0.438	0.182
Hb (g/dl)	14.07 ± 1.22	13.78 ± 1.21	0.004**	14.05 ± 1.36	13.85 ± 1.36	0.024*	0.533
Hct (%)	41.35 ± 3.40	40.59 ± 3.26	0.020*	41.45 ± 3.88	40.95 ± 3.70	0.051	0.450
PLT ($\times 10^3/\mu\text{l}$)	213.34 ± 42.13	207.12 ± 42.25	0.088	225.97 ± 52.45	232.18 ± 42.34	0.329	0.064
ALP (IU/l)	75.49 ± 23.78	72.55 ± 21.36	0.437	75.83 ± 18.51	75.48 ± 18.46	0.629	0.909
GGT (IU/l)	18.63 ± 8.15	18.06 ± 8.26	0.464	22.40 ± 11.61	21.06 ± 12.04	0.288	0.739
AST (IU/l)	23.00 ± 5.16	23.52 ± 6.35	0.721	24.06 ± 5.87	22.79 ± 4.53	0.254	0.314
ALT (IU/l)	20.31 ± 6.56	21.00 ± 10.90	0.752	21.77 ± 9.67	19.97 ± 6.09	0.319	0.374
TB	0.99	0.92	0.120	1.06	0.98	0.083	0.889

(mg/dl)	±0.39	±0.46		±0.38	±0.34		
TP (g/dl)	7.49 ±0.36	7.37 ±0.31	0.012	7.46 ±0.33	7.32 ±0.34	0.001**	0.936
Albumin (g/dl)	4.53 ±0.21	4.37 ±0.17	<.001***	4.42 ±0.19	4.34 ±0.18	0.012*	0.103
BUN (mg/dl)	15.80 ±4.61	14.88 ±3.79	0.343	16.97 ±3.98	16.03 ±3.27	0.197	0.980
Creatinine (mg/dl)	0.81 ±0.19	0.75 ±0.20	0.002**	0.69 ±0.16	0.64 ±0.16	0.003**	0.548
TC (mg/dl)	198.11 ±32.42	187.97 ±30.31	0.011*	209.00 ±33.61	201.15 ±26.66	0.176	0.436
TG (mg/dl)	122.43 ±47.88	112.58 ±51.18	0.271	122.97 ±74.30	122.82 ±51.38	0.894	0.578
Glucose (mg/dl)	100.34 ±14.98	96.94 ±24.52	0.324	98.11 ±9.65	92.06 ±10.49	<.001***	0.529
CK (IU/l)	101.26 ±52.31	111.09 ±59.06	0.318	88.74 ±33.98	96.30 ±37.89	0.230	0.948

Values are presented as mean±SD

¹⁾Analyzed by linear mixed model

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$

‡WBC; white blood cell, RBC; red blood cell, Hb; hemoglobin, Hct; hematocrit, PLT; platelet, ALP; alkaline phosphatase, GGT; gamma glutamyl transferase, AST; L-aspartate aminotransferase, ALT; L-alanine aminotransferase, TB; total bilirubin, TP; total protein, BUN; blood urea nitrogen, TC; total cholesterol, TG; triglyceride, CK; creatine kinase

(c) 활력징후

: 활력징후를 시험제품 섭취 전, 섭취 6주 후, 섭취 12주 후에 측정하였음 (표 67).

분석 결과, 밀기울추출물과 위약 섭취군 내에서 맥박수가 유의하게 감소했으나 두 섭취군 간 통계적으로 유의한 차이는 없었음($p=0.001$, $p=0.006$)

표 67. 섭취 전 · 섭취 12주 후 활력징후 변화

	Test group (n=35)				Placebo group (n=35)				p -value ¹⁾
	0 w	6 w	12 w	p -value ¹⁾	0 w	6 w	12 w	p -value ¹⁾	
SBP (mmHg)	123.49 ±11.44	122.36 ±11.03	125.64 ±11.29	0.172	122.43 ±13.04	122.42 ±14.56	125.52 ±12.40	0.168	0.939
DBP (mmHg)	80.40 ±8.06	78.76 ±7.76	80.76 ±7.65	0.248	76.94 ±8.47	76.27 ±9.95	79.39 ±9.61	0.106	0.627
Pulse (BPM)	73.40 ±8.96	73.58 ±9.36	69.12 ±8.97	0.001**	78.03 ±8.75	77.42 ±9.42	74.18 ±8.23	0.006**	0.763

Values are presented as mean±SD

¹⁾Analyzed by linear mixed model

** $p < 0.01$

‡SBP; systolic blood pressure, DBP; diastolic blood pressure, BPM; beat per minutes

㉠ 결론 및 고찰

본 연구는 주관적 인지기능 저하를 호소하는 자를 대상으로 밀기울추출물 섭취가 인지

기능에 미치는 영향과 안전성을 평가하기 위한 12주, 무작위배정, 이중눈가림, 위약 대조 인체적용시험임. 본 인체적용시험 등록 목표 연구대상자 수는 70명, 중도탈락 20%를 고려한 종료 목표 연구대상자 수는 56명으로, 총 79명의 자원자가 서면동의서를 자발적으로 작성한 후 스크리닝 검사를 받았고, 연구대상자 적합성 평가를 통해 총 70명이 적격 연구대상자로 선정되었음. 선정된 연구대상자는 무작위배정, 이중눈가림 방법을 통해 본 인체적용시험에 참여(밀기울추출물군 35명, 위약군 35명)하였음. 인체적용시험 진행 도중 동의철회를 한 연구대상자가 4명(밀기울추출물군 2명, 위약군 2명), 순응도 미달로 계획서를 위반한 연구대상자가 2명(밀기울추출물군 1명, 위약군 1명)으로 종료 목표 연구대상자 56명을 초과한 총 64명(밀기울추출물군 32명, 위약군 32명)의 연구대상자가 시험 계획서에서 명시한 바에 따라 정상적으로 인체적용시험을 종료하였음. 연구대상자들은 시험계획서에 정해진 바에 따라 CNT, WMT, K-MMSE, BCRS, PRMQ, PSS, GDS, SF-36, 혈중 BDNF 등 유효성 평가 및 이상반응 조사, 활력징후, 심전도 및 혈액검사 등 안전성 평가를 수행하였음.

배정된 대로 분석 대상군(intention to treat; ITT 분석군) 70명을 대상으로 1차 유효성 평가 결과, CNT 중 시각적 기억력 학습능력 항목과 WMT 중 시지각 작업기억 검사 반응시간이 위약군에 비해 밀기울추출물 섭취군에서 유의하게 개선되었음 ($p=0.024$, $p=0.042$). 특히 시지각 작업기억 검사에서 위약군은 반응시간이 늦어지면서 정확도가 증가한 반면, 밀기울추출물군은 반응시간이 빨라지면서 정확도가 증가하였음. 2차 유효성 평가 결과, 삶의 질 총점이 위약군에 비해 밀기울추출물 섭취군에서 유의하게 개선되었음 ($p=0.047$).

안전성 평가를 위해 인체적용시험에 참여하여 최소 1회 이상 시험용제품을 섭취한 연구대상자 70명(safety군)을 대상으로 이상반응, 진단검사의학검사(혈액학적 검사, 혈액생화학적 검사), 활력징후 등의 측정치를 분석한 결과, 총 70명의 연구대상자 중 5명의 연구대상자에서 5건의 경도 또는 중등도의 이상반응이 발생하였음 (밀기울추출물군 3명; 3건, 플라세보군 2명; 2건). 이 중 밀기울추출물 섭취군 연구대상자 한 명이 제품 섭취 후 호흡곤란 증상을 호소하고 동의철회를 요청하여 시험제품 섭취 및 연구 참여를 중단하였음. 그러나 두 섭취군 간 이상반응 발생에 유의한 차이가 없고, 이상반응 중 호흡곤란 증상은 시험제품 섭취와 인과관계가 뚜렷하지 않아 밀기울추출물의 안전성에는 큰 문제가 없을 것으로 판단하였음. 기타 혈액검사, 활력징후 등에서는 통계적·임상적으로 의미 있는 변화가 없었음.

본 인체적용시험에서 인지기능 검사의 여러 항목 중 시각적 인지기능 항목들에서 유의한 개선이 있었는데 동일원료로 수행한 선행 연구(혈관성 치매 동물모델, 건망증모델)에서도 타 항목보다 시각적 인지기능 항목에서 더 높은 효능을 나타내 밀기울추출물의 섭취가 일관적으로 시지각 인지기능 개선에 효과가 있을 것이라고 판단하였음.

요약하면, 본 인체적용시험을 통해 인지기능 저하를 보이는 사람에게서 밀기울추출물의 섭취가 시지각 인지기능 및 삶의 질을 유의하게 개선시키며 인체에 안전함을 확인할 수 있었음.

(9) 섭취량, 섭취방법, 섭취 시 주의사항 및 그 설정에 관한 자료 (제1세부)

- 식약처가 요구하는 자료인 섭취량 및 근거 (원료기준), 섭취방법 및 근거 및 섭취 시 주의사항 및 근거를 제시함.

(가) 섭취량 및 근거 (원료기준)

① 섭취량

- 원료의 섭취량을 3 g-10 g으로 설정하였음.

② 근거

㉠ 기능성 기준 섭취량 계산 (최소)

- 쥐와 생쥐에서의 실험을 기준으로 90 kg 사람에게서 까지 효능이 나타나는 섭취량으로 FDA에서 제안한 계산법에 의해 1일 3 g으로 설정되었음.

㉡ 안전성 기준 섭취량 계산 (최대)

- 밀기울을 이용하여 켈로그에서 제조하여 판매하는 All-Bran을 기준으로 하여 밀기울 섭취량은 일반적으로 밀기울 20 g (하루 한끼)에서 60 g (하루 세끼)임. 이에 대해 극단적인 양 (3배)으로 계산하면 60 g에서 180 g임. 이는 원료의 1일 섭취량 (3 g이며 이는 밀기울 30 g에 해당함)의 2배에서 6배에 해당함.

- 중장기적인 인체시험 (Alberts et al., 2000; jacobs et al., 2002; Pomare et al., 1976)에서 사용한 밀기울의 1일 섭취량은 27 g에서 57 g이었음. 이를 기준으로 극단적인 양 (3배)으로 계산하면 81 g과 171 g이었음. 이는 원료의 1일 섭취량 (밀기울 30 g)의 2.7배에서 5.7배였음.

- 이상으로부터 극단적인 밀기울의 1일 섭취량은 60-180 g에 해당하고 이를 평균하면 120 g에 해당함. 이를 기준으로 원료의 1일 밀기울 섭취량 (30 g)의 4배에 해당하고 이를 원료로 환산하면 12 g에 해당함. 하지만 단기 인체시험에서 건강한 남성에게 실제 실시한 시험에서는 밀기울 약 100 g을 섭취한 시험을 실시 (Hickey et al., 1972)하였으므로 이를 고려하여 신청원료의 수율이 10%인 것을 감안하여 신청원료 10 g으로 설정하였음.

(나) 섭취방법 및 근거

① 섭취방법

- 캡슐형태로 하였음.

② 근거

- 캡슐형태로 설정한 근거: 섭취 후 흡수의 효율성으로는 분말형태가 유리하나 본 원료로는 먹기가 불편하였음. 따라서 섭취 용이성과 섭취 후 흡수성을 고려하여 캡슐형태로 설정하였음.

(다) 섭취 시 주의사항 및 근거

① 섭취시 주의사항

- 밀섭취시 부작용 (밀알레르기 및 만성소화장애증)이 나타나는 사람은 섭취하지 말 것.
- 인체시험 실시 전 피험자를 대상으로 과거 이러한 부작용이 있었는지 확인하고 이러한 피험자는 제외하는 방향으로 진행하면 될 것임.

② 근거

- 일반적인 밀섭취에서 나타나는 흔치 않은 부작용 (동양인에게는 1% 미만)인 밀알레르기와

만성소화장애증이 나타날 수 있음.

(10) 의약품과 같거나 유사하지 않음을 확인하는 자료 (제1세부)

(가) 건강기능식품에 사용할 수 없는 원료 여부

○ 건강기능식품에 사용할 수 없는 원료에 관한 규정 [식품의약품안전청 고시 제2004-13호 (2004.01.31, 제정) 및 제2010-16호(2010. 4.13. 개정)]의 별표 1-4에 명기된 원료에 해당하지 않았음.

(나) 의약품과 같거나 유사한 건강기능식품 여부

○ 건강기능식품에 사용할 수 없는 원료에 관한 규정 [식품의약품안전청 고시 제2004-13호 (2004.01.31, 제정) 및 제2010-16호(2010. 4.13. 개정)]의 제3조의 기존 처방 (기존 한약서에 대한 잠정 규정, 한약처방의 종류 및 조제방법에 관한 규정)에 저촉되지 않을 뿐만 아니라, 본 원료 (추출건조물)는 1가지 식물추출물로 구성되어 제3조 1항의 “3가지 이하의 원료로 구성된 것은 의약품과 같거나 유사한 것으로 간주하지 않는다”에 해당하므로 사용에 문제가 없음.

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

제 1 절 1차년도

1. 요약설명

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	달성도 (%)	관련분야의 기술발전에의 기여도
1차 년도 (2011)	(제 1 세 부 과 제 : 주관) 최적추출방법 확 립, 기능성분의 분 리, 기능성분의 기 능성, 추출혼합물 의 기능성과 안전 성확인 및 아라비 노자일란 고함유 밀품종의 선별	- 원재료확보 (소규모재배): 수 용성 아라비노자일란을 많이 함유하는 원재료를 확보하기 위해 아라비노자일란 고함유 밀품종 선별, 확보 및 재배를 실시함 (3품종 확보 및 재배 후 3,000립 이상 확보)	100	- 기억력개선에 효능을 나타내는 아라비노스(ara)를 지표성분 및 기능성분으로 하여 이를 고함유 하고 있는 품종을 선별하는 방 법을 개발함. * 이 방법을 활용하여 우리나라 고유품종인 A밀 (CU-1)이 기존 에 보고된 ara 최고품종 (Y밀) 과 비슷한 ara 함량과 총량을 나 타낸다는 것을 확인하여 대량생 산 품종으로 선별함.
		- 최적공정 탐색: 생산단가를 낮추기 위해 두 가지 원재료 (통밀, 밀기울)와 두 가지 생 성물 (상등액, 혼합추출물)에 대해 최적생산조건을 확립함 (최대의 효능을 나타내면서 최저의 생산단가로 생산가능)	100	- 선정된 품종인 A밀의 밀기울을 이용하여 소량생산에서부터 대량 생산에 이르는 일련의 과정에 대 해 최적화시켰음. 특히 대량생산 과정에서 연속원심분리에 의해 전분을 제거하는 어려움을 극복 하기 위해 전분을 열수추출하기 전에 미리 제거하는 방법을 새로 게 개발하여 인체시험에 사용할 신청원료를 생산하였음 (1년차와 2년차에 걸쳐 이루어졌음). * 이러한 공정의 개발은 기능성원 료로 인정받는데 필요한 필수자 료를 확보함으로써 기능성원료 로 인정받는데 기여함.
		- 기능성분 규격설정: 기능성분 으로 가능성이 확인된 아라비 노자일란, 아라비노갈락탄, 베 타글루칸을 “최적공정 탐색” 에서 얻은 추출물로부터 분리 정제하고, 제2 협동과제가 주 도하는 기능성분 규격설정 에 참여함	100	- 밀기울과 밀기울로부터 순수한 AX와 AGP를 분리정제하고 이 에 대한 효능을 동물실험을 이 용하여 확인하였음. * AX와 AGP가 기능성분인 것을 확인하였으며, 이로부터 이것의 구성당의 하나인 ara를 지표성분 과 기능성분으로 선정한 것의 타당성을 확인하였음. 이는 건강 기능식품의 인정에 도움을 줌.

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	달성도 (%)	연구개발 수행내용
1차 년도 (2011)	(제 1 세 부 과 제 : 주관) 최적추출방법 확 립, 기능성분의 분 리, 기능성분의 기 능성, 추출혼합물 의 기능성과 안전 성확인 및 아라비 노자일란 고함유 밀품종의 선별	- 기능성 확인 (동물실험을 통 해 치매 중에서 혈관성치매 와 심근경색에 대한 효능 조 사)	100	- 신청원료에 대한 혈관성치매모델 에서의 효능을 조사하였음. 이러 한 결과는 논문으로 발표할 경 우 기능성원료로 인정을 받는데 필요한 비인체시험자료로 활용 될 수 있음. - 뿐만 아니라 유사원료에 대한 동 물시험도 이루어졌음. 이러한 자 료는 기능성원료로 인정을 받는데 참고자료로 활용될 수있음.
		- 안전성 확보: 독성시험이 필 요없다는 자료를 수집함	100	- 건강기능식품의 개발에서 “안전 성평가를 위한 의사결정도“에 의 하면 독성시험 필요없다는 근거 제시하였음. 특히 식약처에서 제 시한 의사결정도에서 상등액은 물추출물. 밀은 그 부작용으로는 만성소화장애증이 있으나 빈도 도 낮고 관리가 가능. 섭취량의 평가에서 통밀상등액과 밀기울 상등액 모두가 일상섭취량의 3 배를 넘지 않았음. * 이러한 결과는 기능성원료로 인 정받기 위해 필수적인 안전성을 제시하고 있으므로 동물을 이용 한 독성시험이 면제되는데 활용 됨.

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	달성도 (%)	관련분야의 기술발전예의 기여도
1차 년도 (2011)	(제1협동과제) 추출혼합물의 기능성확인	<ul style="list-style-type: none"> - 기능성분의 확인: 1년차 전반기에는 구매된 아라비노자일란, 아라비노갈락탄에 대해 기능성분으로서의 자격(건망증 모델에 대한 효능이 용량 의존적이며, 추출혼합물의 50% 이상의 효능을 나타냄.)을 확인하고, 1년차 후반기에는 제1세부에서 분리된 성분으로 확인함. 이 자료는 제2협동의 기능성분 규격 설정에 활용됨. 	100	<ul style="list-style-type: none"> - 신규 기억력 개선 기능성분 발굴 : 건망증 모델을 사용하여 밀기울추출물로부터 기존에 보고되지 않은 신규 기억력 개선 기능성분(다당류)을 발굴하고 그 활성을 입증함. - 신규 기억력 개선 기능성분의 작용기전 규명 : 상기 기억력 향상 기전이 아세틸콜린 합성효소 및 수용체 발현 증가, 신경영양인자 BDNF의 발현 증가를 통해 이루어짐을 규명함.
		<ul style="list-style-type: none"> - 밀기울추출물의 기능성(건망증) 확인: 제1세부에서 제공하는 소량생산 추출혼합물과 제2협동에서 대량생산한 추출혼합물에 대해 다음과 같은 조건들에 대한 실험을 일부 또는 전부를 실시함. 이 결과는 2년차 인체시험에서 근거자료로 활용됨. * 투여용량에 따른 효능의 정도를 확인 * 투여기간에 따른 효능의 정도를 확인 * 인체시험시 투여 용량 및 기간 결정 자료로 활용 * 기억력 측정 행동실험 	100	<ul style="list-style-type: none"> - 신규 기억력 개선 기능소재 발굴 및 효능 최적화 : 건망증 모델을 사용하여 신규 기억력 개선 밀기울추출 소재의 기능성을 검증함. 이후 2차년도에 지속적으로 원료의 형태(분쇄통밀/밀기울), 추출조건(상등액/전체), 다양한 제조 및 건조 방법에 따른 최적 생산 공정을 확립함. - 뇌기능 향진 및 기억력 개선을 위한 천연 약효 식품을 발굴하여 객관적인 효능검증 실험을 수행함. 밀기울추출물은 기존의 연구에서 기억 및 인지능 향상 효능이 보고된 바 없는 신규 소재임. 특히, 독성이 없고 유효 용량 범위가 넓어 안전성이 높고 생산 비용 또한 적절한 한 장점이 있음.

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	달성도 (%)	관련분야의 기술발전에의 기여도
1차 년도 (2011)	(제2협동과제) 추출혼합물의 생산과 성분분석 및 프리믹스의 제조	- 원재료 확보: 아라비노자일란 고풍유 품종이 확보될 때까지 제2협동기관에서 안정적으로 공급할 수 있으면서 수용성 아라비노자일란의 함량이 높은 품종 선별 (수용성 아라비노자일란의 함량은 제2협동에서 측정됨.)	100	- 국산밀, 수입밀의 수용성 아라비노자일란 함량 비교 분석을 통하여 함량이 가장 높은 국산밀 품종(CU-1)을 선별하였으며, 국산밀 품종의 기능성분 연구 자료를 확보하였음.
		- 대량 생산공정 확립: 제1세부에서 선정된 생산공정 (pilot scale)을 대량생산공정에 도입하여 생산함. 이로부터 생산조건 (용매의 비율, 추출온도 및 추출시간)을 확립하고, batch별 기능성분 (아라비노자일란 등)에 대한 규격을 설정함.	100	- 추출혼합물 대량생산 공정을 확립하였으며, 특히 출원하였음.
		- 기능성분 규격설정: 제1협동에서의 연구결과를 바탕으로 기능성분을 설정하고, 대량생산공정에서 생산된 혼합추출물에 대한 분석법 (함량 및 분자량측정) 확립	100	- 추출혼합물의 기능성분 규격을 설정하고 분석법을 확립하였음.
		- 유해물질 분석 (추가): 원료가 유해물질 규격에 합당한지를 확인하기 위해 중금속, 미생물, 잔류농약 및 곰팡이독소 등의 함량분석	100	

2. 구체적인 연구목표, 달성도 및 관련분야의 기술발전예의 기여도 (1차년도)

가. 구체적인 연구목표 및 달성도

o 제1세부

- (1) 원재료 확보 (소규모재배): 수용성 아라비노자일란을 많이 함유하는 원재료를 확보하기 위해 아라비노자일란 고함유 밀품종 선발, 확보 및 재배를 실시함 (3품종 확보 및 재배 후 3,000립 이상 확보)
- (가) 4 품종 (국내 1, 외국 3)을 경북농업기술원에서 50립 이상 재배
* 최소 1 kg 이상씩 확보한 후 통밀 200 g을 분쇄 후 추출하여 그 상등액 (통밀상등액)에 대해 당분석 실시.
- (나) 구매가능한 품종 (14종)의 통밀상등액의 분석을 통해 고함유 품종 선별 (제2협동과 공동)
* 국내토종 (CU-1: A밀)을 선정
- (2) 최적공정 탐색: 생산단가를 낮추기 위해 두 가지 원재료 (통밀, 밀기울)와 두 가지 생성물 (상등액, 혼합추출물)에 대해 최적생산조건을 확립함 (최대의 효능을 나타내면서 최저의 생산단가로 생산가능)
- (가) 최종품종으로 선정된 CU-1으로 최적공정 조사
* 약탕기를 통한 소량 추출 (2 L)을 통해 통밀과 밀기울에 대해 각각 상등액과 전체 (4가지 원료)를 생산 (물과 원재료의 비율은 15:1). 아라비노스의 함량 측정을 측정하고, 각 원료의 용량별 기억력개선 정도를 측정하여 후보원료로 **상등액 (통밀과 밀기울)으로 선정**
* 온도조절 가능 실험실용 추출기를 통한 scale-up (10 L) 실험을 통해 통밀과 밀기울의 상등액을 생산. 이 때 물과 원재료의 비율을 5:1, 8:1, 10:1, 15:1 및 20:1로 변화시키면서 원료 생산. 원료 내 아라비노스의 함량, 생산된 아라비노스의 총량 및 건조시켜야 할 물을 양 등을 고려하여 **10:1을 최적조건으로 선정.**
- (3) 기능성분 규격설정: 기능성분으로 가능성이 확인된 아라비노자일란, 아라비노갈락탄, 베타 글루칸을 “최적공정 탐색”에서 얻은 추출물로부터 분리정제하고, 제2 협동과제가 주도하는 기능성분 규격설정 참여함.
- (가) 주 기능성분으로 확인된 (제1협동) AX와 AGP를 CU-1의 밀기울상등액으로부터 분리정제 시도
* AX: 약 300 mg의 순수한 AX (순수AX) 약 300 mg을 분리정제 한 후 이 것을 분자량을 GPC로 측정한 결과 (제2협동) 분자량이 69 kDa으로 문헌과 일치하였음. 이것을 심근경색모델에 적용한 결과 구매한 순수AX (밀유래)와 동일한 효능을 나타내어 효능측면에서도 진품임이 확인되었음.
* AGP: 90% 이상의 순도를 가진 AGP 500 mg 이상을 분리정제하여 그 분자량을 GPC로 측정한 결과 AGP의 분자량은 약 20 kDa이었음. 현재 다른 정제방법으로 100% 순도의 아라비노갈락탄 분리정제 중.

(4) 기능성 확인 (동물실험을 통해 치매 중에서 혈관성치매와 심근경색에 대한 효능 조사)

(가) 혈관성치매: CU-1의 상등액 (통밀, 밀기울)에 대해 혈관성치매에 대한 효능 조사 중 (효능을 나타내는 biomarker에 대해 효능관찰)

(나) 심근경색: 탐색의 목적으로 시행된 심근경색모델에 대해서는 순수성분과 CU-1 추출물 모두에 대해 시행되었음.

* 순수성분: AX, AGP, B-Glu, ara, xyl, gal 및 glc에 대해 효능을 조사. AX, AGP, B-Glu는 각각 5, 100 및 5 mg/kg/day 이상에서 효능관찰. Ara와 xyl은 5 mg/kg/day 이상에서 효능이 관찰되는 반면에 gal (100) 및 glc (400)에서도 효능이 없었음. 이로부터 ara가 기능성분이라는 결론에 도달.

* 추출물: CU-1뿐만 아니라 국내육종밀품종 CU-2 (금강밀)의 원재료 (통밀, 밀기울)에 대해 추출방법 (상등액, 혼합추출물)에 대해 심근경색에 대한 효능비교. 금강밀과 수입밀의 통밀상등액은 최소한 200-400 mg/kg/day에서 효능을 나타내는 반면에 CU-1의 통밀상등액과 밀기울상등액은 25 mg/kg/day 이상에서 효능을 나타내었음. 이러한 결과는 CU-1을 이용하면 기억력개선뿐만 아니라 심근경색도 예방하는 효능도 가지는 장점이 있음.

(5) 안전성 확보: 독성시험이 필요없다는 자료를 수집함

(가) 건강기능식품의 개발에서 “안전성평가를 위한 의사결정도“에 의하면 독성시험 필요없다는 근거제시

* 식약처에서 제시한 의사결정도에서 상등액은 물추출물. 밀은 그 부작용으로는 만성소화장애증이 있으나 빈도도 낮고 관리가 가능. 섭취량의 평가에서 통밀상등액과 밀기울상등액 모두가 일상섭취량의 3배를 넘지 않았음.

* 특히 밀기울로부터 얻어진 밀식이섬유가 식후 혈당상승 억제 또는 배변활동을 원활하게 하는데 사용하기 위한 고시형 건강기능식품으로 이미 인정되어 있음 (식이섬유 II.2.4.4.7).

* 외국산밀의 통밀상등액에 대해 식약처에서 공인된 기관에서 단회투여독성을 시행한 결과 독성이 없는 것으로 판정되었음.

* 이를 근거로 식약처에 기술상담을 한 결과 독성시험이 필요없는 것으로 확인되었음.

o 제1협동

(1) 밀기울추출물의 기능성 및 기능성분의 확인

(가) 구성 다당류에 대한 기능성분으로서의 자격 확인

① 밀기울추출물 총식이섬유 분획에 다량 함유된 다양한 다당류 및 구성 단당류에 대해 활성 조사를 실시함.

② 구매된 아라비노자일란(arabinoxylan), 아라비노갈락탄(arabinogalactan), 베타글루칸(β -glucan), 밀기울추출물에서 분리정제된 아라비노갈락탄 등에 대해 기능성분으로서의 자격(스코폴라민 유도 건망증 모델에 대한 효능이 용량 의존적이며, 추출혼합물의 50%이상의 효능을 나타냄.)을 확인함.

- ③ 아라비노자일란과 아라비노갈락탄을 구성하는 단당류 아라비노스(arabinose), 자일로즈(xylose), 갈락토스(galactose)에 대해 기능성분으로서의 자격(건망증 모델에 대한 효능이 용량 의존적이며, 추출혼합물의 50%이상의 효능을 나타냄.)을 확인함. 음성 대조군으로 글루코즈(glucose)를 사용함.
- ④ 기능성분의 작용기전을 규명하기 위하여 아세틸콜린량, 아세틸콜린 합성 및 분해에 관여하는 효소의 발현, 아세틸콜린 수용체 발현, 신경영양인자 BDNF의 발현, BDNF의 발현을 조절하는 상위 전사인자 및 인산화 효소의 활성을 측정함.
- ⑤ 상기 자료들은 제2협동의 기능성분 규격설정에 연계 활용됨.

(나) 밀기울추출물의 기능성(건망증) 확인

- ① 제1세부에서 제공하는 소량생산 추출혼합물과 제2협동에서 대량생산한 추출혼합물에 대해 다음과 같은 조건들에 대한 실험을 일부 또는 전부를 실시함. 이 결과는 2년차 인체시험에서 근거자료로 활용됨.
- ② 투여용량(1, 2.5, 5, 10, 25, 50, 100 mg/kg)에 따른 효능의 정도를 확인하여 최대 활성 투여용량 및 유효 용량을 설정함.
- ③ 투여기간(동시투여 및 7일 전투여)에 따른 효능의 정도를 확인하여 최대 활성 투여기간을 설정함.
- ④ 상기 자료들은 인체시험시 투여 용량 및 기간 결정 자료로 활용됨.
- ⑤ 건망증 모델 유발을 위하여 스킵라민을 복강으로 주입하고 기억력 측정 행동실험을 2종 이상 실시함.

o 제2협동

(1) 원재료 확보

(가) 연구 목표 : 아라비노자일란 고함유 품종 확보를 위해 안정적인 공급이 가능하고, 아라비노자일란 고함유 품종 선별

(나) 달성도 : 100%

① 대량으로 구매가 가능한 밀 품종(14종)의 통밀 상등액을 분석하여 기능성분 함량이 높은 품종을 우선 선별하였음.

② 검토한 품종은 미국산 밀 5종, 캐나다산 밀 2종, 호주산 밀 3종, 국산밀 4종을 검토하였으며, 추출 상등액의 당 함량 분석을 실시하여 기능성분으로 선정된 arabinose 함량이 높은 품종을 선정하였음.

③ 후보 품종으로는 호주산 밀 1종과 국산밀 2종(CU-1, CU-4)임.

④ 후보 품종의 추출 상등액 건조 수율과 건조물 내 기능성분(arabinose) 함량을 고려하여 가장 우수한 품종으로 국산 토종밀인 CU-1 품종을 선정하였음.

⑤ 해당 품종은 경남 남해 영농조합을 통하여 재배와 판매가 이루어지고 있음.

(2) 대량생산 공정 확립

(가) 연구 목표 : Pilot scale 공정을 바탕으로 대량생산 공정 확립

(나) 달성도 : 100%

① 제1 세부의 Lab scale 연구를 통해 구한 최적 조건(물:원재료 = 10:1, 95℃, 1시간)을 활용하여 산업용 규모 추출기(500L)로부터 상등액(통밀, 밀기울 원료)을 추출하였음.

② 생산비용 절감을 위해 농축 단계를 추가 도입하였음.

③ 경제성 있는 건조를 위하여 분무건조를 채택하였으며, 원활한 분무 건조를 위하여 원료의 체 분리, 전분 분리 공정을 추가하였음.

④ 춘천바이오산업진흥원에 대량생산공정을 확립하였으며 4회 이상의 실 생산을 통하여 공정을 검증하였음.

(3) 기능성분 규격 설정

(가) 연구 목표 : 제1협동 연구결과를 바탕으로 기능성분을 설정하고, 대량생산 공정에서 생산된 추출혼합물에 대한 분석법 확립

(나) 달성도 : 100%

① 추출혼합물의 기능성분 규격 설정을 위해 혼합물 내 목적 성분을 정제하여 효능 조사를 실시하였음.

② Arabinoxylan, Arabinogalactan peptide가 주 기능성분으로 확인됨.

③ 추출혼합물 내 AX와 AGP의 함량을 직접 측정할 수 없으므로, 기능성분을 대표하는 성분인 Arabinose를 지표성분으로 설정하였음.

④ Ara의 정량법은 alditol acetate법을 이용한 GC로 분석하였으며, 한국기능식품연구원에 분석법을 검증하였음.

(4) 원료 유해물질 분석

(가) 연구 목표 : 원료의 안전성을 확인하기 위하여 중금속, 미생물, 잔류농약 및 곰팡이독소 함량을 분석하였음

(나) 달성도 : 100%

① “식품공전 시험법”에서 제시한 분석법을 통해 중금속과 대장균군, 잔류농약, 곰팡이독소 등의 유해물질을 자체 분석하였음.

② 원료의 분석 결과 유해 성분이 불검출되거나 기준 내 적합한 것으로 확인되었음.

나. 구체적인 관련분야의 기술발전예의 기여도

o 제1협동

(1) 신규 기억력 개선 기능성분 및 천연소재 발굴

(가) 신규 기억력 개선 기능성분 발굴 및 작용기전 규명

- ① 건망증 모델을 사용하여 밀기울추출물로부터 기존에 보고되지 않은 신규 기억력 개선 기능성분(아라비노즈자일란, 아라비노갈락탄, 아라비노즈)을 발굴하고 그 활성을 입증함.
- ② 이는 상기 기능성분의 인지 및 기억력 개선 효능을 최초로 규명한 것으로 건망증 뿐 아니라 향후 치매를 비롯한 퇴행성 뇌질환, 노화에 따른 기억력 손상을 억제하는 천연물 신약으로 응용 개발 가능함.
- ③ 객관적 및 과학적 근거로 기능성분의 기억력 향상 기전이 아세틸콜린 합성효소 및 수용체 발현 증가, 신경영양인자 BDNF의 발현 증가를 통해 이루어짐을 규명함.

(2) 신규 기억력 개선 천연소재 발굴

- ① 뇌기능 향진 및 기억력 개선을 위한 천연 약효 식품을 발굴하여 객관적인 *in vivo* 효능검증 실험을 수행함. 건망증 모델을 사용하여 신규 기억력 개선 밀기울추출 소재의 기능성을 검증함.
- ② 이후 2차년도에 지속적으로 원료의 형태 (분쇄통밀/밀기울), 추출조건(상등액/전체), 다양한 제조 및 건조 방법(각 5종 및 3종)에 따른 최적 생산 공정을 확립함.
- ③ 밀기울추출물은 기존의 연구에서 기억 및 인지능 향상 효능이 보고된 바 없는 신규 소재임. 특히, 독성이 없고 유효 용량 범위가 넓어 안전성이 높으며 생산 비용 또한 적절한 한 장점이 있음.
- ④ 이후 다양한 치매 모델을 사용하여 기능성을 검증하는 실험을 수행하는 경우 신규 치매 치료 및 예방제를 개발하는데 유리한 고지를 점령할 수 있음. 특히, 지금까지 밀기울추출물의 항치매 효능은 국내 및 국외에서 아직 조사되지 않아 고유한 연구 영역을 구축할 수 있음.

o 제2협동

- (1) 국산밀과 수입밀의 아라비노자일란 함량 비교 분석을 통하여 국산밀의 수용성 아라비노자일란 함량이 높음을 확인하였고, 이를 통하여 국산밀의 기능성 연구와 제품 개발 가능성을 높였음.
- (2) 추출혼합물의 기능성분을 설정하고 이를 정량분석하기 위한 분석법을 개발함으로써 분석 기술의 발전에 기여하였음.

제 2 절 2차년도

1. 요약설명

○ 제3세부과제에서의 인체적용시험은 2-3차년도 걸쳐 진행되었으므로 2차년도의 설명에 한꺼번에 묶어서 설명하였음.

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	달성도 (%)	관련분야의 기술발전에의 기여도
2차 년도 (2012)	(제1세부과제 : 주관) 최적추출방법 확 립, 기능성분의 분 리, 기능성분의 기 능성, 추출혼합물 의 기능성과 안전 성확인 및 아라비 노자일란 고함유 밀품종의 선별	○ 기능성확인 (비인체시험), 기 능성분 확보, 원재료확보 실 험을 실시		
		- 비인체시험 (제1세부): 1차년 도에 선정된 원료와 분리정제 된 기능성분의 혈관성치매에 대한 효능 및 작용기전 조사	100	- 신청원료에 대한 혈관성치매모델 에서의 효능을 조사하였음. 이러 한 결과는 논문으로 발표할 경 우 기능성원료로 인정을 받는데 필요한 비인체시험자료로 활용 될 수 있음. - 뿐만 아니라 유사원료에 대한 동 물시험도 이루어졌음. 이러한 자 료는 기능성원료로 인정을 받는 데 참고자료로 활용될 수있음.
		- 기능성분 확보: 1차년도에 확립된 분리정제방법을 이용 하여 기능성확인 (비인체시 험)에 필요한 기능성분 분리 하여 공급함. ○ 1차년도에 확립된 AX와 AGP에 대한 분리정제방법을 이용하여 기능성확인 (비인체 시험)에 필요한 분리정제된 AX와 AGP 공급	100	- 밀기울과 밀기울로부터 순수한 AX와 AGP를 분리정제하고 이 에 대한 효능을 동물실험을 이 용하여 확인하였음. * AX와 AGP가 기능성분인 것을 확인하였으며, 이로부터 이것의 구성당의 하나인 ara를 지표성분 과 기능성분으로 선정한 것의 타당성을 확인하였음. 이는 건강 기능식품의 인정에 도움을 줌.
		- 원재료 확보: 1차년도에 재배 되어 수확된 기능성분 고함유 밀을 가을에 다시 파종하여 그 개체수를 늘림 (50-100배 증식 기대) ○ 1차년도에서 선별된 후보품종 [CU-1 (2011), CU-1 (2012), CU-7 및 CU-8]을 비교품종 (조 경밀, 금강밀 및 우리밀)과 함께 경북농업기술원에서 재배	100	- 동일한 기후 및 토양조건에서 밀품종을 재배함으로써 소량의 밀품종의 양을 늘일 뿐만 아니 라 밀품종의 특성을 직접 비교 하는 가능하게 하였음. - 혼종인 밀품종으로부터 키 등 특성에 의한 분류에 의해 순수 품종을 분리해 내는 것이 가능 하게 하였음. * 이 방법을 적용하여 1차년도에 고함유품종으로 선별된 혼종인 A밀로부터 순품종을 얻는데 적 용함.

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	달성도 (%)	연구개발 수행내용
2차 년도 (2012)	(제1세부과제 : 주관) (계속) 최적추출방법 확 립, 기능성분의 분 리, 기능성분의 기 능성, 추출혼합물 의 기능성과 안전 성확인 및 아라비 노자일란 고함유 밀품종의 선별 (계속)	- 기능성원료로 인정받기 위한 자료준비 (추가) o 식약청에서 제시한 “기능성원 료인정을 위한 제출자료 작성가 이드:제출자료 양식” 부분을 참 조하고 식약청과의 협의를 통해 작성을 시작함 (제2협동과 공동)	100	- 식약처에서 모듬회의를 실시하였으 며 이 과정에서의 자료 작성이 식약 처에서 기능성원료로 인정받는데 필 요한 양식으로 작성하여 자문을 받 았음. * 이러한 양식의 작성은 향후 식약처 에 제출할 자료를 작성하는데 활용 됨.

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	달성도 (%)	관련분야의 기술발전예의 기여도
2차 년도 (2012)	(제1협동과제) 추출혼합물의 기능성확인	- 밀기울추출물(신청원료)의 건 망증에 대한 기전 조사 o 기능성 확인(비인체 시험) :건 망증에 대한 기전 조사 1) 아세틸콜린 양, 아세틸콜린 합성 또는 분해 효소의 발현, 아세틸콜린 수용체 발현 비교 2) 신경영양인자 BDNF의 발현 및 상위 조절인자 활성화 조사	100	- 신규 기억력 개선 밀기울추출물 소재의 작용기전 규명 : 상기 기억 력 향상 기전이 아세틸콜린 합성 효소 및 수용체 발현 증가, 신경영 양인자 BDNF의 발현 증가를 통 해 이루어짐을 규명함. - 다양한 기전 탐색 : 기억 및 인지 능 개선 기능성 소재 개발을 위하 여 현재 가장 많이 사용되고 있는 아세틸콜린 분해효소 억제작용에 국한하지 않고, 치매에서 신경세포 손상을 유발하는 다양한 요인 특 히 신경영양인자 BDNF를 신규 표적으로 기전을 규명하였음.
		- 밀기울추출물(신청원료)의 알츠 하이머병에 대한 효능 조사 o 기능성 확인(비인체 시험) : 알 츠하이머병에 대한 효능 조사 1) 기억력 측정 행동실험 : 물미로, 수동회피실험 2) 신경세포 보호 효능 검토 : 세포생존율 측정, TUNEL 염색법 및 apoptosis 관련 지표 측정	80	- 건망증 모델의 연구결과를 바탕으 로 다양한 <i>in vitro-in vivo</i> 치매 모델에서 효능 및 기전 실험을 수 행하고 전임상 연구를 실시함. 다 각적이고 체계적이며 효율적인 접 근방법에 의해 객관적인 효능 기 반 신규 소재를 발굴하였음. - <i>in vitro</i> 세포 및 <i>in vivo</i> 동물 연 계 치매 모델에서 다양한 표적을 이용한 신경세포 보호 및 기억력 향상 효능 검증 실험을 수행함으 로써 인지 및 기억력 개선 뿐 아 니라 항치매 건강기능성식품 후보 물질을 발굴 가능하였음.

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	달성도 (%)	관련분야의 기술발전예의 기여도
2차 년도 (2012)	(제2협동과제) 추출혼합물의 생산과 성분분석 및 프리믹스의 제조	- 인체시험용 시료생산 o 시료생산: 인체시험에 필요한 원료를 생산하였으며, 이를 원료로 인체적용 시험샘플(캡슐형)과 플리시보를 제조하여 공급함.	100	- 추출혼합물을 활용한 캡슐형 제품 개발(개별인정 후 인지능력 개선 건강기능식품 출시 가능)
		- 기능성분 고함유 밀품종의 기능성분 함량 분석 (4건) o 기능성분 규격설정: 확대재배된 기능성분 (수용성 ara) 고함유 밀품종의 당함량분석	100	- 수용성 아라비노자일란 고함량 국산밀 품종의 년도별 함량 차이 분석 자료 확보
		- 기능성원료로 인정받기 위한 자료준비 (추가) o 식약청에서 제시한 “기능성원료 인정을 위한 제출자료 작성가이드: 제출자료 양식” 부분을 참조하고 식약청과의 협의를 통해 작성을 시작함 (제1세부와 공동)	100	

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	달성도 (%)	관련분야의 기술발전예의 기여도
2차 년도 (2012)	(제3협동과제) 밀추출물의 기억력개선 인체적용시험	- 인체적용시험 설계 o 인체적용시험 디자인 설계 o 평가항목 선정 o 인체적용시험계획서 및 증례 기록서 개발 o IRB 심의 및 승인	100	
		- 인체적용시험 수행 o 연구자 개시모임 o 연구대상자 모집 o 인체적용시험 수행 o 인체적용시험 모니터링(위탁)	100	-
3차 년도 (2013)	(제3협동과제) 밀추출물의 기억력개선 인체적용시험	- 인체적용시험 수행 o 연구대상자 모집 o 인체적용시험 수행 o 인체적용시험 모니터링(위탁)	100	-
		- 인체적용시험 결과분석 o 결과 분석	100	-

2. 구체적인 연구목표, 달성도 및 관련분야의 기술발전예의 기여도 (2차년도)

가. 구체적인 연구목표 및 달성도

o 제1세부

(1) 비인체시험 (제1세부): 1차년도에 선정된 원료와 분리정제된 기능성분의 혈관성치매에 대한 효능 및 작용기전 조사

(가) 신청원료 (밀기울추출물)에 대한 혈관성치매 효능조사: 대량생산된 신청원료에 대해 혈관성치매에 대해 효능이 있는지를 조사하여 그 효능이 관찰되었음.

* 효능조사: 백질의 손상을 측정하는 luxol fast blue와 이러한 손상에 의해 발생한 시신경손상을 측정하는 동공반응조사 결과 손상을 줄여 동공반응이 정상에 가깝게 유지되게 하였음.

* 기전조사: 원료는 별아교세포와 별아교세포의 활성화를 억제하는 것이 관찰되어 이것이 효능에 기여하였음.

(나) 아울러 신청원료와 유사원료인 통밀추출물에 대해서도 신청원료와 동일한 효능과 기전이 관찰되었음.

(다) 분리정제된 AGP가 심근경색모델에 대해 경색부피를 줄이는 효능이 있는 것을 확인하였음.

(라) 이외에 AGP와 유사한 서양잎갈나무 유래 AG 및 이의 구성성분인 ara가 심근경색모델에 대해 경색부피를 줄이고 그 작용기전이 세포자살을 억제하는 것을 확인하였음.

(2)기능성분 확보: 1차년도에 확립된 분리정제방법을 이용하여 기능성확인 (비인체시험)에 필요한 기능성분 분리하여 공급함.

o 1차년도에 확립된 AX와 AGP에 대한 분리정제방법을 이용하여 기능성확인 (비인체시험)에 필요한 분리정제된 AX와 AGP 공급

(가) 2차년도에는 1차년도에 비해 보다 간편한 방법으로 보다 순수한 AGP를 분리정제하는 방법을 개발하여 분리정제하였음.

* 밀기울대신에 밀가루를 사용하였음.

* 효소를 사용하지 않고 물추출과 에탄올분획으로 분리정제.

* 90% 이상의 순도를 확인하였음.

(나) AX는 1차년도에 순수한 것이 분리정제되어 효능을 확인하였음.

(3) 원재료 확보: 1차년도에 재배되어 수확된 기능성분 고품질 밀을 가을에 다시 파종하여 그 개체수를 늘림 (50-100배 증식 기대)

o 1차년도에서 선별된 후보품종 [CU-1 (2011), CU-1 (2012), CU-7 및 CU-8]을 비교품종 (조경밀, 금강밀 및 우리밀)과 함께 경북농업기술원에서 재배

(가) 확대 재배가 가능할 정도로 충분한 양을 확보하였으며, 제2협동에서 당분석 실시 중임.

* CU-1 (2011): CU-1 (A밀) 중 2011년도에 생산된 것을 다시 재배한 것은 7 kg 수확.

* CU-1 (2012): CU-1 (A밀) 중 2012년도에 생산된 것을 다시 재배한 것은 15 kg 수확.

* CU-7 (Y밀): 중국산 품종은 5 kg 수확.

* CU-8 (J밀): 중국산 품종은 5 kg 수확.

* 비교품종 (조경밀, 금강밀 및 우리밀): 각각 10 kg 수확.

(나) 확대 재배가 가능할 정도로 충분한 양을 확보하였으며, 제2협동에서 당분석 실시 중임.

* (추가) 후보품종이 혼종이라서 각 품종별로 순종을 분리하기 위해 키 등 특성별로 개체 14종을 재배하여 증식시켰음.

(4) 기능성원료로 인정받기 위한 자료준비 (추가)

o 식약청에서 제시한 “기능성원료인정을 위한 제출자료 작성가이드:제출자료 양식” 부분을 참조하고 식약청과의 협의를 통해 작성을 시작함 (제2협동과 공동)

(가) 기능성원료를 받기 위해 작성하여야 할 자료 10가지 (6쪽) 중 다음에 해당하는 것을 연구결과 등을 바탕으로 이미 작성하였음.

* 1. 제출자료 총괄요약본 - 작성 (단, 3차 년도에 얻을 결과부분은 제외)

* 2. 기원, 개발경위, 국내·외 인정 및 사용현황 등에 관한 자료 - 작성

* 3. 제조방법에 관한 자료 - 작성

* 5. 기능성분(또는 지표성분)에 대한 규격 및 시험방법에 관한 자료 및 시험성적서 - 작성

* 7. 안전성에 관한 자료 - 작성

* 8. 기능성 내용에 관한 자료 - 비인체시험 부분 작성

* 9. 섭취량, 섭취 시 주의사항 및 그 설정에 관한 자료 - 작성

* 10. 의약품과 같거나 유사하지 않음을 확인하는 자료 - 작성

o 제1협동

(1) 밀기울추출물의 건망증에 대한 기전 및 알츠하이머병에 대한 효능 조사

(가) 밀기울추출물(신청원료)의 건망증에 대한 기전 조사

① 밀기울추출물의 최적 생산 공정 확립을 위해 지속적으로 원료의 형태(분쇄통밀/밀기울), 추출조건(상등액/전체), 제조 및 건조 방법(각 5종 및 3종)에 따른 다양한 추출물들을 개발하고, 건망증에 대한 기능성을 스킵폴라민 모델에서 비교 실험함.

② 최종 신청원료에 대한 기전 규명 실험의 일환으로 아세틸콜린 대사에 미치는 영향을 중심으로 검토함. 즉, 아세틸콜린 양, 아세틸콜린 합성 또는 분해 효소의 발현, 아세틸콜린 수용체 발현 비교함.

③ 더 나아가 뇌신경세포이 생존에 관여하는 신경영양인자 BDNF의 발현 및 이를 조절하는 상위 전사인자/인산화 효소의 활성을 비교함.

(나) 밀기울추출물의 알츠하이머병에 대한 효능 조사

① 알츠하이머병에 대한 효능 조사를 위하여 알츠하이머병의 원인 물질인 베타아밀로이드를 직접 처리한 신경세포 모델과 마우스 뇌실내로 주입한 치매 동물모델을 연계하여 사용하였음.

② 신경세포 보호 효능을 검토하기 위하여 세포생존을 측정, TUNEL 염색법 및 apoptosis 관련 지표(3종)를 측정하였음.

③ 기억력 개선 효능을 검토하기 위하여 행동실험으로 물미로 실험을 실시함.

o 제2협동

가. 구체적인 연구목표 및 달성도 (제2협동)

(1) 인체적용 시험 시료 생산

(가) 연구 목표 : 대량생산 공정을 통하여 인체적용 시험용 시료를 생산하여 시료 제공

(나) 달성도 : 100%

① 인체적용 시험용 시료는 효과 발현과 섭취 용이성을 감안하여 캡슐형으로 선정하였음.

② 추출혼합물은 대량생산 공정을 확립한 춘천바이오산업진흥원에서 생산하였으며, 추출혼합물을 원료로 네추럴F&P에서 시험용 시료와 플라시보를 제조하였음.

③ 제조한 시료와 플라시보는 전북대병원 기능성식품임상시험지원센터에 제공하였음.

(2) 기능성분 고함유 밀품종의 기능성분 함량 분석

(가) 연구 목표 : 기능성분 규격 설정을 위해 확대 재배된 기능성분 고함유 밀품종의 성분 분석

(나) 달성도 : 100%

① 제1 세부과제에서 확보한 각 품종 CU-1(2011), CU-1(2012), CU-7, CU-8 및 비교 국산 밀(조경밀, 금강밀, 우리밀)에 대한 당을 분석하였음.

② 최종적으로 각 품종별로 AX와 AGP의 함량을 분석하여 최적 품종을 선별하였으며, 최적 품종의 년도별 당함량 편차를 확인하였음.

o 제3협동 (2, 3년차 한꺼번에 기술)

(1) 연구목표

(가) 인체적용시험 설계

① 인체적용시험 디자인 및 평가항목 선정

- o 선행연구 검토 및 관련 문헌 수집
- o 자료조사와 통계적 근거를 바탕으로 연구대상자 수 산출
- o 유효성 평가 항목 및 연구디자인 결정

② 인체적용시험계획서 및 증례기록서 개발

- o 계획서: 해당 인체적용시험의 배경이나 근거를 제공하기 위하여 인체적용시험의 목적, 연구방법론, 통계적 고려사항, 관련 조직 등을 기술한 문서
- o 증례기록서: 각각의 연구대상자 별로 인체적용시험 계획서에서 요구한 정보를 기록하여 인체적용시험 의뢰자에게 전달할 목적으로 인쇄하거나 전자 문서화한 문서

③ 인체시험윤리위원회(IRB; institutional review board) 심의 및 승인

- o IRB: 인체적용시험에 참여하는 연구대상자의 권리·안전·복지를 보호하고, 취약한 환경에 있는 연구대상자의 인체적용시험 참여 이유가 타당한지 검토하기 위해 시험기관 내에 독립적으로 설치한 상설위원회
- o 심의자료: 인체적용시험자자료집, 계획서, 증례기록서, 책임연구자 이력사항 등

(나) 인체적용시험 수행

① 연구자 개시모임

- 연구 수행에 관여하는 모든 연구자(연구책임자, 연구담당자, 모니터 요원 등)들이 모여 추후 연구 수행 계획 등에 대해 사전 조율

② 연구대상자 모집 및 인체적용시험 수행

- 선정/제외기준에 적합한 연구대상자 모집
- 선정된 연구대상자를 각 시험군에 무작위배정한 후 정해진 시험일정에 따라 인체적용시험을 수행함.

③ 인체적용시험 모니터링(위탁)

- 인체적용시험의 질과 신뢰성을 보증하기 위하여 전문기관인 인체적용시험수탁기관(CRO; contact research organization)에서 인체적용시험 전반 과정에 대해 모니터링 실시함.

(다) 인체적용시험 결과분석

- 인체적용시험에서 얻은 결과를 임상적·통계적 측면에서 분석함.

(2) 달성도

(가) 인체적용시험 설계

① 인체적용시험 디자인 및 평가항목 선정

- 인체적용시험 근거 자료 확보하여 연구대상자 수, 유효성 평가항목, 연구디자인 결정 완료
 - 연구대상자 수: 70명(각 시험군 당 35명)
 - 유효성 평가항목: CNT, WMT, K-MMSE, BCRS, PRMQ, PSS, SF-36, BDNF 등
 - 연구디자인: 12주, 무작위배정, 이중눈가림, 위약 대조 인체적용시험

② 인체적용시험계획서 및 증례기록서 개발

- 인체적용시험계획서 1건(v1.3), 증례기록서 1건(v1.2) 개발 완료

③ 인체시험윤리위원회(IRB; institutional review board) 심의 및 승인

- IRB 심의 및 승인 1건

(나) 인체적용시험 수행

① 연구자 개시모임

- 2013. 10. 31 개시모임 진행 완료

② 연구대상자 모집 및 인체적용시험 수행

- 선정/제외기준에 적합한 연구대상자 모집 완료(70명 등록, 4명 중도탈락, 2명 순응도 미달, 64명 시험 완료)
- 유효성 및 안전성 평가 완료

③ 인체적용시험 모니터링(위탁)

- 26차 모니터링 완료

(다) 인체적용시험 결과분석

- 결과분석 및 결과보고서 1건 완료

나. 구체적인 관련분야의 기술발전예의 기여도

o 제1협동

(1) 신규 기억력 개선 기능소재의 건망증에 대한 작용기전 규명 및 항치매 효능 검증

(가) 신규 기억력 개선 기능소재의 건망증에 대한 작용기전 규명

- ① 신규 기억력 개선 기능소재의 건망증에 대한 작용기전이 아세틸콜린 합성효소 및 수용체 발현 증가를 통해 이루어짐을 규명함.
- ② 하지만, 기억 및 인지능 개선 기능성 소재 개발을 위하여 현재 가장 많이 사용되고 있는 아세틸콜린 분해효소 억제작용에 국한하지 않고, 아세틸콜린 대사과정에 관여하는 단백질, 치매에서 신경세포 손상을 유발하는 다양한 요인 특히 신경영양인자 BDNF를 신규 표적으로 기전을 규명하였음.

(나) 신규 기억력 개선 기능소재의 다각적인 항치매 효능 검증

- ① 건망증 모델의 연구결과를 바탕으로 다양한 *in vitro-in vivo* 치매 모델에서 효능 및 기전 실험을 수행하고 전임상 연구를 실시함으로써 다각적이고 체계적이며 효율적인 접근방법에 의해 기존의 소재와는 차별화된 신규 인지 및 기억력 개선 소재를 발굴하고자 하였음.
- ② *in vitro* 세포 및 *in vivo* 동물 치매 모델에서 객관적인 표적 지표들을 이용한 신경세포 보호 및 기억력 향상 효능검증 실험을 수행함으로써 새로운 항치매 건강기능성식품 소재를 발굴하였으며 더 나아가 천연물신약 후보물질로의 활용 가능성을 가짐.
- ③ 기존의 항치매 천연물 연구는 *in vitro*와 *in vivo*가 연계되지 못한 단속적 연구가 다수를 차지하고 있으며, 전통식품 및 제제를 대상으로 순수 정제된 성분들을 사용하기 보다는 용매 추출액이나 복합 성분들을 이용하고 있음. 이에 본 연구에서는 건망증-치매, 세포-동물, 추출물-활성성분, 효능-기전 연구를 연계하여 시스템화 된 접근을 시도함으로써 천연물과 합성화합물 등 다양한 시료를 대상으로 하는 관련 연구에도 활용될 수 있는 가치가 높은 기술임.

제 3 절 3차년도

1. 요약설명

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	달성도 (%)	관련분야의 기술발전예의 기여도
3차 년도 (2013)	(제 1 세 부 과 제 : 주관) 최적추출방법 확 립, 기능성분의 분 리, 기능성분의 기 능성, 추출혼합물 의 기능성과 안전 성확인 및 아라비 노자일란 고함유 밀품종의 선별	- 기능성원료 (밀기울추출물) 인정획득 (기능성 원료 1건) * 기억력개선용 기능성원료 인 정획득: 기능성원료로 인정 을 받기 위해 필요한 자료 작성.	95	- 밀의 제분부산물인 밀기울로부 터 인지기능개선용 건강기능식 품을 세계 최초로 개발하였음. * 기능성원료로 인정받기 위해서 필요한 모든 시험을 완료하였을 뿐만 아니라 식약처에 기술상담 을 받기 위해 자료를 준비하는 과정에서 제출서류 작성도 거의 완료되었음.
		- 원재료확보: 최종후보품종 선 발 * 2차년도에서 얻어진 것을 증 식하여 동물실험과 분석에 필 요한 혼합추출물을 확보함. * 제1협동에서 기능성확인 (건 망증) 및 제2협동에서 수용성 아라비노자일란의 함량분석을 통해 최종후보 선정함. * 농가에 보급하여 대량재배를 준비함. - (추가): 후보품종 내에서 유전 적 특성에 따라 선별된 개체 (21종)를 재배하고 특성파악 (가능하면 당분석 실시)	100	- Ara의 함량측정과 혼종에서 개 체의 재배를 통해 기억력개선예 효능이 좋을 것으로 예상되는 품종 선별이 가능한 방법을 확 립하였음. * 혼종인 A밀에 대해 16 line을 재 배하고 이로부터 ara의 함량을 측정하고 이를 근거로 line을 선 별하여 기억력개선을 조사한 결 과 후보품종 (A11-8)을 확정하 였음. 이 품종에 대한 양을 늘리 기 위한 실험을 준비 중.
		- 추출혼합물의 기능성확인 (비인체시험) * 신청원료의 효능 및 기전에 대해 논문 발표	100	- 신청원료로 혈관성치매에 대한 실험을 완료하여 논문으로 발표 하였음. * 효능이 시각로를 살리는 효능예 의해 동공반응에 반응하는 기능 을 나타내므로 인체적용시험에 확인된 시지각인지기능 개선과 연관되어 있음. * 따라서 이러한 동물시험 결과는 기능성원료의 인정을 받는데 있 어서 도움을 줄 것으로 예상됨.
		o 출원 1건	100	o 출원 1건 (밀기울로부터 대량생 산하는 공정을 출원하였음).

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	달성도 (%)	관련분야의 기술발전예의 기여도
3차 년도 (2013)	(제1협동과제) 추출혼합물의 기능성확인	<ul style="list-style-type: none"> - 기억력개선용 기능성원료 인정 획득 자료 확보: 기능성원료로 인정을 받기 위해 필요한 제출 자료 중 기능성 내용 및 그에 관한 자료 중 비인체시험에 대한 자료를 작성하고, 기능성분에 대한 규격 및 시험방법에 관한 자료의 작성에도 참여함. 		<ul style="list-style-type: none"> - 신규 기억력개선용 기능성원료 인정받는 경우 관련된 기술을 축적 보호하여 선진국과의 기술격차를 줄이고 경쟁력을 높여 현재 세계적으로 관심을 끌고 있는 치매 천연 식품 및 신약 연구 분야에서 독창성 있는 선도적 연구를 추진하는 유리한 고지를 점령 가능함. - 더 나아가 치매 이외의 각종 퇴행성 뇌질환 및 중추신경계 난치성 질환을 예방 및 치료하는 건강기능성식품 및 천연물신약 후보물질 개발에도 응용 가능함.
		<ul style="list-style-type: none"> - 기능성확인 (비인체시험): * 밀기울추출물의 항치매 작용 기전 규명 완료: 아세틸콜린 대사, 신경영양인자 활성화, 신경세포 사멸, 산화적 및 염증적 손상 등 - 기능성분 고탍유 밀 추출혼합물의 건망증에 대한 효능 조사: 기억력 측정 행동실험 * 수동회피 및 물미로 실험 - 프리믹스의 건망증에 대한 효능 조사: 기억력 측정 행동실험 * 수동회피 실험 		<ul style="list-style-type: none"> - 단일 표적에 국한하지 않고 다양한 항치매 기전 탐색 : 기억 및 인지능 개선 기능성 소재 개발을 위하여 현재 가장 많이 사용되고 있는 아세틸콜린 분해효소 억제작용에 뿐 아니라, 치매에서 신경세포 손상을 유발하는 다양한 요인 특히 신경세포사멸, 신경영양인자, 산화적 및 염증적 손상 등을 중심으로 기전을 규명하였음. - 기능 성분이 강화된 신규 밀 품종을 개발하는 경우 기억력 증진 기능성 밀 소재 식품 및 의약품 개발로 소비 및 수출 증가를 기대할 수 있음. - 기능성이 강화된 프리믹스를 개발하는 경우 단시간에 시장 진입이 가능하며 다양한 프리믹스 형태로 개발 할 수 있어 확장성이 좋음.

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	달성도 (%)	관련분야의 기술발전예의 기여도
3차 년도 (2013)	(제2협동과제) 추출혼합물의 생산과 성분분석 및 프리믹스의 제조	<ul style="list-style-type: none"> - 추출혼합물의 기능성원료 인정 획득 o 인체적용시험 결과 보고서 확보 등 기능성 자료 추가확보. o 기능성원료 개별인정을 위한 원료 자료, 기능성분 자료, 유해성분 자료 등 제반 자료 확보 	95	<ul style="list-style-type: none"> - 밀의 제분부산물인 밀기울로부터 인지기능개선용 건강기능식품을 세계 최초로 개발하였음. * 기능성원료로 인정받기 위해서 필요한 모든 시험을 완료하였을 뿐만 아니라 식약처에 기술상담을 받기 위해 자료를 준비하는 과정에서 제출서류 작성도 거의 완료되었음.
		<ul style="list-style-type: none"> o 건강기능제품 (프리믹스) 개발 (기능성원료 첨가한 제품 1건) <ul style="list-style-type: none"> - 건강기능식품으로 정제, 캡슐, 환, 과립, 액상, 분말, 편상, 페이스트상, 시럽, 겔, 젤리, 마 등의 형태 - 일반 식품형태의 제품 개발 	100	<ul style="list-style-type: none"> o 추출혼합물을 사용한 일반 식품 (부침가루, 핫케익믹스, 호떡믹스, 추출혼합물 함유 밀가루 제품) 개발하고 이의 효능을 확인하였음. * 향후 기능성원료로 인정을 받고 난 후 이를 활용하여 건강기능식품으로 개발할 때 프리믹스도 후보로 고려할 때 근거자료로 사용될 수 있음.
		<ul style="list-style-type: none"> - 추출혼합물의 안정성 확인 (1차년도 실시할 예정이었으나 신청원료의 생산이 2차년도에 이루어져 3차년도에 시행하였음.) 	100	<ul style="list-style-type: none"> o 25℃, 35℃, 45℃ 가습 조건에서 6개월의 125%인 231일까지 보관하면서 시료의 변화를 확인한 결과, 지표성분, 미생물 변화는 없는 것으로 확인되었음. * 향후 기능성원료로 개발한 후 기능성식품으로 판매하고자 할 때 필요한 안정성에 대한 자료로 활용될 수 있음.

2. 구체적인 연구목표, 달성도 및 관련분야의 기술발전예의 기여도 (3차년도)

가. 구체적인 연구목표 및 달성도 (제1협동)

o 제1세부

(1) 기능성원료 (밀기울추출물) 인정획득 (기능성 원료 1건)

o 기억력개선용 기능성원료 인정획득: 기능성원료로 인정을 받기 위해 필요한 자료 작성.

(가) 기억력개선용 기능성원료 인정획득: 기능성원료로 인정을 받기 위해 필요한 제출자료 중 기능성 내용 및 그에 관한 자료 중 인체시험분야, 섭취량, 섭취 시 주의사항, 의약품과 같거나 유사하지 않음을 확인하는 자료에 대해 주도적으로 작성함. 나머지 제출자료 전체의 총괄요약본, 기원 및 개발경위 등, 제조방법 및 그에 관한 자료의 작성에도 참여함.

* 기능성원료로 인정을 받는데 필요한 연구는 완료한 상태이며 현재 식약처에 제출한 자료를 준비 중에 있음. 이 자료도 기술상담을 받기 위해 작성한 자료가 있어 문제가 없을 것으로 사료됨.

(2) 원재료확보: 최종후보품종 선발

o 2차년도에서 얻어진 것을 증식하여 동물실험과 분석에 필요한 혼합추출물을 확보함.

o 제1협동에서 기능성확인 (건망증) 및 제2협동에서 수용성 아라비노자일란의 함량분석을 통해 최종후보 선정함.

o 농가에 보급하여 대량재배를 준비함.

o (추가): 후보품종 내에서 유전적 특성에 따라 선별된 개체 (21종)를 재배하고 특성파악 (가능하면 당분석 실시)

(가) 원재료확보: 최종후보품종 선발

* 대량으로 구매가 가능한 A밀 중 11년도산에 추출시 ara의 함량도 높고 동물시험으로 효능도 나타난다는 것을 확인하였음.

* 현재 재배하고 있는 농가와 협력하여 이를 사업화할 준비를 할 예정임.

(나) (추가): 후보품종 내에서 유전적 특성에 따라 선별된 개체 (21종)를 재배하고 특성파악 (가능하면 당분석 실시)

* A밀 중 11년도산과 12년도산으로부터 개체를 각각 8종씩 총 16종을 재배하여 ara의 함량이 높고 효능이 나타나는 개체 1종 (A11-8)을 선별하였음.

(3) 추출혼합물의 기능성확인 (비인체시험)

o 신청원료의 효능 및 기전에 대해 논문 발표

(가) 혈관성치매에 대한 효능

* 논문 1편을 발표하였음.

(4) 출원 1건

* 밀기울로부터 신청원료를 대량생산하는 공정을 국내특허 1편으로 출원하였음.

o 제1협동

(1) 기억개선용 기능성원료 인정획득 자료 확보 및 추가 기능성확인

(가) 기억개선용 기능성원료 인정획득 자료 확보

① 기능성원료로 인정을 받기 위해 필요한 제출자료 중 기능성 내용 및 그에 관한 자료 중 비인체시험에 대한 자료를 작성하고, 기능성분에 대한 규격 및 시험방법에 관한 자료의 작성에도 참여함. 구체적으로 건망증 및 치매에 대한 세포 및 동물실험 자료를 통합적으로 작성함.

(나) 추가 기능성확인 (비인체시험)

- ① 밀기울추출물의 항치매 작용기전 규명 완료: 최종 신청원료에 대한 항치매 기전 규명 실험의 일환으로 아세틸콜린 합성/분해 효소, 신경세포 사멸, 신경영양인자 BDNF, 산화적 및 염증적 손상, 상위 조절 전사인자의 활성을 비교 조사함.
- ② 치매는 단일 원인으로 야기되는 질환이 아니라 여러 가지 요소들이 작용하는 복합적인 질병이므로 치료제 탐색 연구에서도 이러한 다단계 과정을 제대로 반영할 수 있어야 함.
- ③ 제품 활용을 위하여 밀기울추출물을 함유한 프리믹스의 스코폴라민에 의한 기억력 상실 억제효과 조사함. 밀기울추출물이 포함된 프리믹스와 불포함된 프리믹스에 대해 다양한 용량에서 비교 효능 실험이 이루어 졌음.
- ④ 기능성분이 강화된 품종 개발과 효능 검증을 위하여 기능성분 고함유 밀 3종에 대해 기억력 상실 억제효과를 조사함.

o 제2협동

(1) 추출혼합물의 기능성원료 인정 획득

(가) 연구 목표 : 추출혼합물의 연구 자료를 취합하여 기능성원료 개별인정 신청하여 인정을 획득함

(나) 달성도 : 80%

- ① 기능성원료 개별인정 신청을 위한 제반 자료를 확보하였음.
- ② In vitro, In vivo, 인체적용 시험 등 기능성 자료와 원료의 규격, 안전성 자료 등을 확보하였음.
- ③ 기능성원료로 개별인정되지 못하였으나, 추후 개별인정 신청 및 인정 획득 예정임.

(2) 건강기능식품 개발

(가) 연구 목표 : 추출혼합물을 이용한 건강기능식품과 일반식품 개발

(나) 달성도 : 100%

- ① 추출혼합물을 이용한 캡슐형, 분말형, 환형 건강기능식품을 개발하였음. 추출혼합물의 1일 섭취량이 3g을 만족하도록 제품 배합 및 제형을 선정하였음.
- ② 추출혼합물을 사용한 프리믹스(부침가루, 핫케익믹스, 호떡믹스)와 추출혼합물을 함유 밀가루 제품을 개발하였음. 일반 식품은 기능성원료를 첨가하여도 기능성을 광고할 수 없기 때문에 추출혼합물 함량을 0.2~3.0g/100g으로 설정하였음.

(3) 추출혼합물의 안정성 확인

(가) 연구 목표 : 추출혼합물을 시료로 가혹 조건하에서 지표 성분과 식품위생 측면에서의 안정성을 확인하고자 함.

(나) 달성도 : 100%

① 보관 온도(25℃, 35℃, 45℃)에서 가속실험 중요시점 100%기간인 6개월(182일)의 125%인 231일까지 보관하면서 시료를 분석하였음.

② 측정 항목은 지표성분인 Arabinose, 미생물 분석, 정상 확인 등으로 기능성과 식품 안전성의 변화를 파악하였음.

③ 측정 결과 Arabinose 함량과 미생물과 성상의 변화는 없었으며, 최소 1년 이상의 유통기한을 갖는 것으로 확인됨.

나. 구체적인 관련분야의 기술발전예의 기여도

o 제1협동

(1) 신규 기억력개선용 기능성원료 인정획득 및 추가 소재 개발

(가) 신규 기억력개선용 기능성원료 인정획득

- ① 신규 기억력개선용 기능성원료 인정받는 경우 관련된 기술을 축적 보호하여 선진국과의 기술격차를 줄이고 경쟁력을 높여 현재 세계적으로 관심을 끌고 있는 치매 천연 식품 및 신약 연구 분야에서 독창성 있는 선도적 연구를 추진하는 유리한 고지를 점령 가능함.
- ② 더 나아가 치매 이외의 각종 퇴행성 뇌질환 및 중추신경계 난치성 질환을 예방 및 치료하는 건강기능성식품 및 천연물신약 후보물질 개발에도 응용 가능함.
- ③ 천연 기능성식품을 이용한 치매 예방과 치료는 비용이 비교적 적게 들며, 쉽게 적용이 가능하고, 장기투여에 대한 안전성이 높으며, 고부가가치 산업이 될 수 있음.

(나) 다양한 항치매 기전 탐색

- ① 기억 및 인지능 개선 기능성 소재 개발을 위하여 현재 가장 많이 사용되고 있는 아세틸콜린 분해효소 억제작용에 국한하지 않고, 치매에서 신경세포 손상을 유발하는 다양한 요인 특히 신경세포사멸, 신경영양인자, 산화적 및 염증적 손상 등을 중심으로 기전을 규명하였음.
- ② 치매는 여러 가지 요소들이 작용하는 복합적인 질환이므로 예방 및 치료제 개발에서도 이러한 점이 충분히 반영되어야 하며, 따라서 기존에 개발이 집중되었던 아세틸콜린 분해효소 억제제, 아세틸콜린 수용체 효능제 (agonist), 기타 신경전달물질 조절제 이외에도 치매관련 유전자와 단백질을 이용한 치매 예방 및 원인 치료에 이르기까지 광범위한 연구가 진행되어야 함.

(다) 신규 밀품종 및 프리믹스 제품 개발

- ① 다양한 밀 품종을 재배하여 확립된 생산 공정에 따라 밀기울추출물을 획득하였으며, 기능성분을 다량함유하며 활성이 증가된 밀기울추출물로 기능성 확인 실험을 실시함. 기능 성분이 강화된 신규 밀 품종을 개발하는 경우 기억력 증진 밀 소재 식품 및 의약품 개발로 소비/수출 증가를 기대할 수 있음.
- ② 신규 소재의 활용을 위하여 밀기울추출물을 포함하는 프리믹스를 개발하여 건망증에 대한 효능을 검증함. 기능성이 강화된 프리믹스를 개발하는 경우 단시간에 시장 진입이 가능하며 다양한 프리믹스 형태로 개발 할 수 있어 확장성이 좋음.

제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

제 1 절 연구개발 성과

1. 연구성과 부분

가. 연구성과 목표

(단위 : 건수)

구분	특허		신품종				유전자원 등록	논문		기타
	출원	등록	품종 명칭 등록	품종 수입 판매 신고	품종보호			SCI	비SCI	
					출원	등록				
1차 년도	목표	1(신)	1(구)	0	0	0	0	0	0	0
	달성	0	3	0	2	0	0	0	0	1(학술대 회발표)
2차 년도	목표	0	1(구)	0	2	0	0	0	1	1(추가)
	달성	1	1(구)	0	0	0	0	0	0	2 3 (인력 양성2, 학술대 회발표1)
3차 년도	목표	1(신)	1(신,구)	0	0	0	0	0	1	1
	달성	1							1	1
4차 년도	목표	0	0	0	0	0	0	0	1	0
	달성								(2)	(1)
5차 년도	목표	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	달성									
계	목표	2	3	0	2	0	0	0	2	2 (추가1)
	달성	2	4	0	2	0	0	0	2 (1)	5 (2)

[계획서에서 제시된 내용]

- 등록특허의 일부는 선행연구에서 출원되었고, 본 사업에서 등록되면서 본 사업의 특허비로 일부 지원된 것을 포함함. (신)으로 표시된 것은 본 과제에서, (구)로 표시된 것은 선행연구과제로 이루어진 것임.
- 품종생산 수입판매신고는 본 과제에서 기능성분 고품종 품종으로 선별된 품종을 의미함.
- 논문 중에서 () 안은 현재 심사 중인 논문의 수를 나타내며, 2014년도에는 발표될 것임.

나. 성과목표 달성도

(1) 특허

출원된 특허의 경우					등록된 특허의 경우				
출원연도	특허명	출원인	출원국	출원번호	등록연도	특허명	등록인	등록국	등록번호
2013	아래 5	대구 가톨릭대	대한 민국	10-2013- 0129723	2011	아래 1	선목학원, 하이폭시	대한 민국	10-1089957 -0000
2014	아래 6	대구 가톨릭대	대한 민국	10-2014- 0132582	2012	아래 2	선목학원, 하이폭시	대한 민국	10-1121543 -0000
					2012	아래 3	선목학원, 하이폭시	미국	US 8,211, 483 B2
					2013	아래 4	하이 폭시	대한 민국	10- 1280543

특허명

1. 아라비노자일란으로부터 수득되는 아라비노스를 포함하는 허혈성 질환 및 퇴행성 뇌질환의 예방 및 치료를 위한 조성물
2. 벼과식물로부터 수득되는 전분 또는 식이섬유를 포함하는 허혈성 질환 및 퇴행성 뇌질환의 예방 및 치료를 위한 조성물
3. Composition comprising starch or dietary fiber from gramineae plant for prevention and treatment of ischemic diseases and degenerative brain disease.
4. 소맥 냉수 추출물을 이용한 건강 기능성 식품의 제조방법. 등록인: 하이폭시 (참여기업), 발명인: 이종원 (제1세부), 김예실 (제2협동), 장정희 (제1협동).
5. 아라비노갈락탄을 유효성분으로 함유하는 기억력 증진 및 인지기능 장애 질환의 예방 또는 치료용 조성물.
6. 밀기울 추출물의 제조방법.

(2) 신품종

- 신품종은 AX 고품종 선별과정에서 최종적으로 확정된 우리나라 토종인 A밀로부터 얻은 것임.
- 1. 계통품종
 - A11-8: 선별된 품종.
 - A12-8: 선별된 품종.

(3) 논문

(가) 게재논문

게재연도	논문명	저자			학술지명	Vol.(No.)	국내외 구분	SCI구분
		주저자	교신저자	공동저자				
2013	논문 1	백혜숙	이종원	임선하, 안기성	Kor J Herbol (대한본초학회지)	28(3)	국내	KSCI
2013	논문 2	백혜숙	이종원	임선하, 안기성	Kor J Herbol (대한본초학회지)	28(6)	국내	KSCI
2014	논문 3	Kim CY	Jang JH, Lee JW	Lee GY, Park GH	Biomol Ther	22(5)	국내	SCIE
2014	논문 4	임선하	이종원	-	Prev Nutr Food Sci	19(3)	국내	Scopus

논문명:

논문 1: Hot water extract of *Triticum aestivum* L. (common wheat) ameliorates renal injury by inhibiting apoptosis in a rat model of ischemia/reperfusion.

논문 2: Effect of methanol extract from *Cassia mimosoides* var. *nomame* on ischemia/reperfusion-induced renal injury in rats.

논문 3: Protective Effect of Arabinoxylan against Scopolamine-induced Learning and Memory Impairment

논문 4: Hot water extract of wheat bran attenuates white matter injury in a rat model of vascular dementia.

(나) 심사 중인 논문

게재연도	논문명	저자			학술지명	Vol.(No.)	국내외 구분	SCI구분
		주저자	교신저자	공동저자				
2015	논문 1	이찬	장정희	이종원, 박규환	대한본초학회지	심사중	국내	KSCI
2015	논문 2	Lee C	Jang JH	Sah SK, Lee JW, Park GH	Prev Nutr Food Sci	심사중	국내	KSCI
2015	논문3	임선하	이종원	-	Journal of Nutritional Biochemistry	심사중	국외	SCI

논문 1: 베타아밀로이드로 유도된 신경세포 사멸과 기억력 손상에 대한 밀기울추출물의 보호효과

논문 2: Neuroprotective Effect of Wheat Bran Extract against Scopolamine-induced Learning and Memory Impairment in C56BL/6 Mice.

논문 3: Two Dietary Fibers, Arabinogalactan and Arabinan, and Their Constituent

Monosaccharide, Arabinose, Attenuate Myocardial Injury by Inhibiting Apoptosis in a Rat Model of Ischemia-Reperfusion.

(4) 기타

(가) 인력활용/양성 성과

(1) 인력지원 성과

지원 총인원	지원 대상 (학위별, 취득자)				성별		지역별		
	박사	석사	학사	기타	남	여	수도권	대전	기타지역
2	1	1			1	1			2

(2) 인력양성

- ① 김창렬: 2013년도 박사학위 취득
- ② 김미영: 2013년도 석사학위 취득

(나) 학술대회발표

- (1) 임선하, 김미영, 김예실, 이종원. Arabinoglactan이 심근경색에 미치는 영향. 2012 KFN International Symposium and Annual Meeting. 2012년 11월 1일.
- (2) 임선하, 김예실, 이종원. Protective effect of wheat bran on vascular dementia. 제21회 기초의학 학술대회. 2013년 4월 26일.
- (3) Sun Ha Lim, Yae-Sil Kim, Jong-Won Lee. Protective effect of arabinogalactan on vascular dementia. 한국식품영양과학회 추계학술대회. 2013년 11월 13일.
- (4) Sun Ha Lim, Yae-Sil Kim, Jong-Won Lee. Protective effect of arabinogalactan-peptide extracted from wheat on myocardial infarction. 제22회 기초의학 학술대회. 2014년 6월 27일.
- (5) Kim CY, Sah SK, Lee JW, Jang JH. Neuroprotective and memory enhancing effects of Triticum aestivm L. and its active components. 2014년 한국생화학분자생물학회. 2014년 5월 14일-16일.
- (6) Sah SK, Kim CY, Lee JW, Jang JH. Protective effects of Triticum aestivm L. and its active on β -Amyloid-induced neuronal cell death and memory impariments. 2014 대한약학회. 2014년 4월 17일-18일.

2. 연구성과 활용 부분

가. 연구성과 활용 목표

구분		기술실시(이전)	상품화	정책자료	교육지도	언론홍보	기타
활용건수	목표	1	2	0	0	2	1
	달성	0	0	0	0	12 (1차년도 성과)	1

[계획서에서 제시된 내용]

- 기술이전은 본 사업이 완료된 후 2년 이내에 이루어지는 건수를 의미함.
- 상품화는 건강기능성 식품원료로 인정받는 것을 1건, 이것을 이용하여 프리믹스에 첨가하여 제품화가 이루어지는 것을 1건으로 하였음.
- 기타는 본 사업에서의 성과를 잡지 등에 기고하는 것을 포함함.

나. 연구성과 활용 달성도

(1) 언론홍보

- (가) 동아일보 2012. 6. 12. 교육면 C5: 전 사업 (교과부 자생식물이용기술개발사업)에서 수행한 업적이 대표업적으로 소개되었을 뿐만 아니라 후속사업으로 건강기능식품으로 개발되고 있다는 것 소개.
- (나) 매일경제, 서울경제, 한국경제, 아시아경제, MBN, 연합뉴스, 세계일보, 아이뉴스, 이데일리, 이투데이, 머니투데이 2011. 10. 19.: 대구가톨릭대와 동아원이 본 사업 (2011년도 생명산업기술개발사업)“에 선정되어 연구개발사업을 진행하게 되었다는 것 소개.

(2) 기타

- (가) 언론 출연: 2014년 6월 8일 (일) 7시 10분 SBS 일요특선 다큐멘터리인 “밀, 잘 먹고 잘 사는 법”에 연구분야가 소개되었음.

제 2 절 연구성과활용 계획

1. 실용화 산업화 계획

가. 기술실시

- 참여기업인 동아원에 2015년 3월말경 기술이전을 할 예정임.

나. 상품화

- 동아원에서 기능성원료를 받으면 상품화가 1건 이루어지며 (15년 9월경), 이 기능성원료를 이용하여 기능성식품으로 등록이 되면 상품화가 또 1건 이루어지게 됨 (16년 상반기). 기능성식품으로 하기 위한 시제품으로 동아원에서 이미 직접 섭취하기에 적합한 캡슐과 환형태로 제조하였음. 아울러 우유에 타서 마시거나 빵이나 라면 등에 수프형태로 첨가할 수 있는 분말형태로도 제조하였음. 또한 밀기울추출물이 첨가된 프리믹스도 제조하여 그 효능을 확인하였음 (그림 105).
- 동아원에서 기능성원료를 받으면 상품화가 1건 이루어지며 (15년 9월경), 이 기능성원료를

2. 특허, 품종, 논문 등 지식재산권 확보계획

가. 특허

- 현재 일본에서 심사 중인 특허가 등록이 확정되었으며, 아울러 우리나라에 출원 중인 2건도 등록이 되도록 노력함.

나. 품종

- 최종적으로 선정된 A11-8과 A12-8이 품종으로 등록되도록 추진함.

다. 논문

- 현재 심사 중인 3건 (SCI 1건)이 2015년 이내에 출간되도록 하며, 그 이외에도 AGP에 대한 연구결과도 SCI에 2015년도에 투고되도록 함.

3. 교육·지도·홍보 등 기술확산 계획

가. 밀기울 소비촉진 운동

- 밀기울은 이미 배변활동 촉진 등의 기능으로 건강기능식품으로 인정되어 있으므로 여기에 덧붙여 인지기능개선효능도 있다는 것을 홍보함으로써 밀기울의 소비를 촉진시킬 수 있음. 특히 아라비노자일란의 함량이 높은 품종이 국내산이므로 본 연구를 통해 우리밀의 소비도 촉진할 수 있고, 이에 따라 우리밀의 재배도 촉진함으로써 농가소득에 기여할 수 있음.
- 우리밀의 가격이 수입산보다 2-3배 비싸 우리밀의 소비확산에 장애요인이 되고 있는 시점에서 우리밀의 장점을 발굴함으로써 가격경쟁에서의 어려움을 극복하고 소비를 촉진시킬 수 있는 계기를 마련할 수 있을 것으로 사료됨.
- 소비촉진을 위해서는 밀기울을 이용한 다양한 요리법의 개발이 필요할 것으로 사료됨 (예를 들면, 밀기울빵의 요리법 개발 등)

나. 품질관리방법의 개발 및 확산

- 밀품종이 인지기능을 개선시키는 것의 활성화는 수용성 아라비노자일란과 아라비노갈락탄의 함량에 의해 결정되고, 이를 확인하는 방법으로 밀품종에 들어 있는 수용성 아라비노스의 함량을 측정하는 것임.
- 이를 위한 분석장비로는 가스 크로마토그래프가 필요하나 이 정도는 생산지역의 농업기술원에서 갖추어져 있으므로 밀품종의 관리를 생산지역에서 수행할 수 있음.
- 따라서 밀품종의 표준관리법을 설정하여 현장에서 적용하게 함으로써 밀품종의 관리를 원활하게 수행하게 되고 이는 곧 소비자의 신뢰로 이어져 밀기울의 소비를 더욱 촉진하게 될 것임.



그림 105. 동아원에서 제조한 시제품들

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

제 1 절 밀품종에 대한 연구 (Healthgrain)

1. Healthgrain program

- o Healthgrain program은 유럽의 15개국에 참여하여 선별된 밀품종 150종 (겨울밀 130종, 봄밀 20종)을 재배하여 그 특성을 밝히는 프로그램임
(https://www.healthgrain.org/about_the_project).
- o 이 프로그램으로부터 150종의 밀품종의 영양분의 특징뿐만 아니라 아라비노자일란 등 식이섬유의 양에 대한 정보도 확보하였음.
- o 이를 근거로 아라비노자일란의 함량 등이 높은 품종을 육종에 의해 개발하고 있음.

제 7 장 연구시설·장비 현황

* 해당사항 없음.

제 8 장 참고문헌

이한창. (1991) 발효식품. 신광출판사. 189-194.

Alberts Ds, Ritenbaugh C, Story JA, Aickin M, Rees-McGee S, Buller MK, Atwood J, Phelps J, Ramanujam PS, Bellapravalu S, Patel J, Bettinger L, Clark L. (1996) Journal of the National Cancer Institute 88:81-92.

Alberts DS, Martinez ME, Roe DJ, Guillen-Rodriguez JM, Marshall JR, van Leeuwen JB, Reid ME, Ritenbaugh C, Vargas PA, Bhattacharyya AB, Earnest DL, Sampliner RE. (2000) Lack of effect of a high-fiber cereal supplement on the recurrence of colorectal adenomas. The New England Journal of Medicine 342:1156-1162.

Anderson JW, Gilinsky NH, Deakins DA, Smith SF, O'Neal DS, Dillon DW, Oeltgen PR. (1991). Lipid responses of hypercholesterolemic men to oat-bran and wheat-bran intake. Am J Clin Nutr 54:678-683.

Anson NM, Havenaar R, Vaes W, Coulier L, Venema K, Selinheimo E, Bast A, Haenen GRMM. (2011) Effect of bioprocessing of wheat bran in wholemeal wheat breads on the colonic SCFA production *in vitro* and postprandial plasma concentrations in men. Food Chemistry 128:404-409.

AOAC Official Method 994.13. 1999. Total dietary fiber (Determined as neutral sugar residues, uronic acid residues, and Klason lignin) gas chromatographic-colorimetric-gravimetric method (Upsala method).

Bagheri SM, Gueguen L. (1982) Effects of wheat bran on the metabolism of calcium-45 and zinc-65 in rats. J Nutr 112:2047-2051.

Bagheri S, Gueguen L. (1985) Effect of wheat bran and pectin on the absorption and retention of phosphorus, calcium, magnesium and zinc by the growing pig. Reprod Nutr Dev 25:705-716.

Bang MH, van Riep T, Thinh NT, Song LH, Dung TT, Don LV, Ky TD, Pan D, Shaheen M, Ghoneum M. (2010) Arabinoxylan rice bran (MGM-3) enhances the effects of interventional therapies for the treatment of hepatocellular carcinoma: a three-year randomized clinical trial. Anticancer Research 30:5145-5152.

- Belobrajdic DP, Bird AR. (2013) The potential role of phytochemicals in wholegrain cereals for the prevention of type-2 diabetes. *Nutrition Journal* 12:62.
- Chen HL, Haack VS, Janecky CW, Vollendorf NW, Marlet JA. (1998) Mechanisms by which wheat bran and oat bran increase stool weight in humans. *Am J Clin Nutr* 68:711-719.
- Cholujova D, Jakubikova J, Czako B, Martisova M, Humakova L, Duraj J, Mistrik M, Sedlak J. (2013) MGM-3 arabinoxylan rice bran modulates innate immunity in multiple myeloma patients. *Cancer Immunol Immunother* 62:437-445.
- Courtin CM, Delcour JA. (1988) Physicochemical and bread-making properties of low molecular weight wheat-derived arabinoxylans. *J Agric Food Chem* 46:4066-4073.
- Cummins AG, Robers-Thomson IC. (2009) Prevalence of celiac disease in the Asia-Pacific region. *Journal of Gastroenterology and Hepatology* 24:1347-1351.
- Donangelo CM, Eggum BO. (1986) Comparative effects of wheat bran and barley husk on nutrient utilization in rats. *Br J Nutr* 56:269-280.
- Earnest DL, Sampliner RE, Roe DJ, van Leeuwen B, Guillen J, Reid M, Martinez ME, Marshall JR, Alberts DS. (1999) Progress report: the Arizona phase III study of the effect of wheat bran fiber on recurrence of adenomatous colon polyps. *Am J Med* 106:43S-45S.
- Fairweather-Tait SJ, Portwood DE, Symss LL, Eagles J, Minski MJ. (1989) Iron and zinc absorption in human subjects from a mixed meal of extruded and nonextruded wheat bran and flour. *Am J Clin Nutr* 49:151-155.
- Fairweather-Tait SJ. (1982) The effect of different levels of wheat bran on iron absorption in rats from bread containing similar amounts of phytates. *Br J Nutr* 47:243-249.
- Farah DA, Hall MJ, Mills PR, Russel RI. (1984) Effect of wheat bran on zinc absorption. *Hum Nutr Clin Nutr* 38:433-441.
- Fardet A. (2010) New hypotheses for the health-protective mechanisms of whole-grain cereals: what is beyond fibre? *Nutrition Research Reviews* 23:65-134.
- Fasano A. (2012) Novel therapeutic/integrative approaches for celiac disease and dermatitis herpetiformis. *Clinical and Developmental Immunology* 2012:Article ID 95961.

- Faurot AL, Sauliner L, Berot S, Popineau Y, Petit MD, Rouau X, Thibault JF (1995) Large scale isolation of water-soluble and water-insoluble pentosans from wheat flour. *Lebensm.-Wiss. u.-Technol* 28:436-441.
- Fernandez N, Diez MJ, Teran MT, Garcia JJ, Calle AP, Sierra M. (1998) Influence of two commercial fibers in the pharmacokinetics of ethinylestradiol in rabbits. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics (JPET)*. 286:870-874.
- Flight I, Clifton P. (2006) Cereal grains and legumes in the prevention of coronary heart disease and stroke: a review of the literature. *European Journal of Clinical Nutrition* 60:1145-1159.
- Frolich W, Lyso A. (1983) Bioavailability of iron from wheat bran in pigs. *Am J clin Nutr* 37:31-36.
- Fuchs HM, Dorfman S, Floch MH. (1976) the effect of dietary fiber supplementation in man. II. Alteration in fecal physiology and bacterial flora. *The American Journal of Clinical Nutrition* 29:1443-1447.
- Gebruers K, Dornez E, Boros D, Fras A, Dynkowska W, Bedo Z, Rakszegi M, Delcour JA, Courtin CM. (2008) Variation in the content of dietary fiber and components thereof in wheats in the HEALTHGRAIN diversity screen. *J Agric Food Chem* 56:9740-9749.
- Garcia AL, Steiniger J, Reich SC, Weickert MO, Harsh I, Machowetz A, Mohlig M, Spranger J, Rudovich NN, Meuser F, doerfer J, Katz N, Speth M, Zunft HJ, Pfeiffer AH, Koebnick C. (2006) Arabinoxylan fibre consumption improved glucose metabolism, but did not affect serum adipokines in subjects with impaired glucose tolerance. *Horm Metab Res* 38:761-766.
- Garcia AL, Otto B, Reich SC, Weickert MO, Steiniger J, Machowetz A, Rudovich NN, Mohlig M, Katz N, speth M, Meuser F, doerfer J, Zunft HJF, Pfeiffer AHF, Koebnick C. (2007) Arabinoxylan consumption decreases postprandial serum glucose, serum insulin and plasma total ghrelin response in subjects with impaired glucose toerance. *European Journal of Clinical Nutrition* 61:334-341.
- Gil A, Ortega RM, Maldonado J. (2011) Wholegrain cereals and bread: a duet of the Mediterranean diet for the prevention of chronic diseases. *Public Health Nutrition* 14(12A):2316-2322.
- Grasten S, Liukkonen KH, Chrevatidis A, ㅁ-Nezami H, Poutanen K, Mykkanen H. (2003) Effects of wheat pentosan and inulin on the metabolic activity of fecal microbiota and on

- bowel function in healthy humans. *Nutrition Research* 23:1503-1514.
- Grootaert C, den Abbeele PV, Marzorati M, Broekaert WF, Courtin CM, Delcour JA, Verstraete W, de Wiele TV. (2009) Comparison of prebiotic effects of arabinoxylan oligosaccharides and inulin in a simulator of the human intestinal microbial ecosystem. *FEMS Microbiol Ecol* 69:231-242.
- Guandalini S, Newland C. (2011) Differentiating food allergies from food intolerance. *Curr Gastroenterol Rep* 13:426-434.
- Hamberg O, Rumessen J, Gudmand-Hoyer E. (1989) Blood glucose response to pea fiber: comparison with sugar beet fiber and wheat bran. *Am J Clin Nutr* 50:324-328.
- Hamill LL, Keavency EM, Price RK, Wallace JMW, Strain JJ, Welch RW. (2009) Absorption of ferulic acid in human subjects after consumption of wheat-bran and wheataleurone fractions. *Proceedings of the Nutritional society* 67 (OCE7):E255.
- Han HS, Choi JS, Kim YJ, Lim SH, Lee HK, Jang JH, Moon YS, Lee JW. (2008) Protective effect of *Triticum aestivum* L. extract and its components, starch, in rat focal cerebral ischemia. *Current Topics in Nutraceutical Research* 6:47-54.
- Han HS, Jang JH, Jang JH, Choi JS, Kim YJ, Lee C, Lim SH, Lee HK, Lee JW. (2010) Water extract of *Triticum aestivum* L. and its components demonstrate protective effect in a model of vascular dementia. *J Med Food* 13:572-578.
- Heller SN, Hackler LR, Rivers JM, Van Soest PJ, DA Roe, Lewis BA, Robertson J. (1980) Dietary fiber: the effect of particle size of wheat bran on colonic function in young adult men. *The American Journal of Clinical Nutrition* 33:1734-1744.
- Hickey CA, Murphy EL, Calloway DH. (1972) Intestinal-gas production following ingestion of commercial wheat cereals and milling fractions. *Cereal Chemistry* 49:276-282.
- Ho EE, Atwood JR, Benedict J, Ritenbaugh C, Sheehan ET, Arams C, Alberts D, Meyskens Jr. FL. (1991) A community-based feasibility study using wheat bran fiber supplementation to lower colon cancer risk. *Preventive Medicine* 20:213-225.
- Hudson CA, Betschart AA, Oace SM. (1988) Bioavailability of vitamin B-6 from rat diets containing wheat bran or cellulose. *J Nutr* 118:65-71.

- Huijbregts AWM, Berge-Henegouwen GPV, Hectors MPC, Schaik AV, Werf SDJVD. (1980) Effects of a standardized wheat bran preparation on biliary lipid composition and bile acid metabolism in young healthy males. *European Journal of Clinical Investigation* 10:451-458.
- Jacobs ET, Giuliano AR, Roe DJ, Guillen-Rodriguez JM, Alberts DS, Martinez ME. (2002a) Baseline dietary fiber intake and colorectal adenoma recurrence in the wheat bran fiber randomized trial. *Journal of the National Cancer Institute* 94:1620-1625.
- Jang JH, Kim CY, Lim SH, Yang CH, Song KS, Han HS, Lee HK, Lee JW. (2010) Neuroprotective effects of *Triticum aestivum* L. against beta-amyloid-induced cell death and memory impairment. *Phytotherapy Research* 24:76-84.
- Jacobs ET, Giuliano AR, Roe DJ, Guillen-Rodriguez JM, Hess LM, Alberts Ds, Martinez ME. (2002b) Intake of supplemental and total fiber and risk of colorectal adenoma recurrence in the wheat bran fiber trial. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention* 11:906-914.
- Jenkins DJA, Kendall CWC, Vuksan V, Augustin LSA, Mehling C, parker T, Vidgen E, Lee B, Faulkner D, Seyler H, Josse R, Leiter LA, Connelly PW, Fulgoni III V. (1999) Effect of wheat bran on serum lipids: influence of particle size and wheat protein. *Journal of the American College of Nutrition* 18:159-165.
- Keagy PM, Shane B, Oace SM. (1988) Folate bioavailability in humans: effects of wheat bran and beans. *Am J Nutr* 47:80-88.
- Keim K, Holloway CL, Hebsted M. (1987) Absorption of chromium as affected by wheat bran. *Cereal Chem* 64:352-355.
- Kelly GS. (1999) Larch arabinogalactan: clinical relevance of a novel immune-enhancing polysaccharide. *Alternative Medicine Reveiw* 4:96-103.
- Kelly SA, Summerbell CD, Brynes A, Whittaker V, Frost G. (2007) *Cochrane Database Syst Rev* 2:CD005051.
- Kestin Mf, Moss R, Clifton PM, Nestel PJ. (1990) Comparative effects of three cereal brans on plasma lipids, blood pressure, and glucose metabolism in mildly hypercholesterolemic men. *Am J Clin Nutr* 52:661-666.
- Kim LS, Waters RF, Burkholder PM. (2002) Immunological activity of larch arabinogalactan and Echinacea: a preliminary, randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Alternative*

Medicine Review 7:138-149.

Krog-Mikkelsen I, Hels O, Tentens I, Holst JJ, Andersen JR, Bukhave K. (2011) The effects of L-arabinose on intestinal sucrase activity: dose-response studies in vitro and in humans. *Am J Clin Nutr* 94:472-478.

Lagrain B, Goderis B, Brijs K, Delcour JA. (2010) Molecular Basis of processing wheat gluten toward biobased materials. *Biomacromolecules* 11:533-541.

Lampe JW, Skor HE, Li S, Wahala K, Howald WN, Chen C. (2001) Wheat bran and soy protein feeding do not alter urinary excretion of the isoflavan equol in premenopausal women. *J Nutr* 131:740-744.

Loosveld AM, Delcour JA. (2000) The significance of arabinogalactan-peptide for wheat flour bread-making. *Journal of Cereal Science* 32:147-157.

Lu ZX, Walker KZ, Muir JG, Mascara T, O'Dea K. (2000) Arabinoxylan fiber, a byproduct of wheat flour processing, reduces the postprandial glucose response in normoglycemic subject. *Am J Clin Nutr* 71:1123-1128.

Lu ZX, Walker KZ, Muir JG, O'Dea K. (2002) Arabinoxylan fibre improves metabolic control in people with type II diabetes. *European Journal of Clinical Nutrition* 58:621-628.

MacLennan R, Macrae F, bain C, battistutta D, Chapuis P, Gratten H, lambert J, Newland RC, Ngu Mf, russel A, Ward M, Wahlqvist ML, (1995) Randomized trial of intake of fat, fiber, and beta carotene to prevent colorectal adenomas. *Journal of the National Cancer Institute* 87:1760-1766.

Maki KC, gibson GR, Dickmann RS, Kendall CWC, Chen CYO, Costabile A, Comelli EM, McKay DL, Almeida NG, Jenkins D, Zello GA, Blumberg JB. (2012) Digestive and physiologic effects of a wheat bran extract, arabino-xylan-oligosaccharide, in breakfast meal. *Nutrition* 28:1115-1121.

Macrae FA, Kiliass D, Abbott M, Sharpe K, Young GP. (1997) Effect of cereal fibre source and processing on rectal epithelial cell proliferation. *Gut* 41:239-244.

Marett R, Slavin JL. (2004) No long-term benefits of supplementation with arabinogalactan on serum lipids and glucose. *J am Diet Assoc* 104:636-639.

- Martinez ME, Reid ME, Guillen-Rodriguez J, Marshall JR, Sampliner R, Aickin M, Ritenbaugh C, van Leeuwen Bf, Mason-Liddil N, Giuliano A, Vargas PA, Alberts DS. (1998) Design and baseline characteristics of study participants in the wheat bran fiber trial. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 7:813-816.
- McDeromott C, Richards SCM, Thomas PW, Montgomery J, Lewith G. (2006) A placebo-controlled, double-blind, randomized controlled trial of a natural killer cell stimulant (BioBran MGM-3) in chronic fatigue syndrome. *Q J Med* 99:461-468.
- Melton LD, Smith BG. (2001) Determination of neutral sugars by gas chromatography of their alditol acetates. *CurrProtocinFoodAnalChem* E3.2.1-E3.2.13.
- Monograph. (2000) Larch arabinogalactan. *Alternative Medicine Review* 5:463-466.
- Moore DJ, White FJ, Flatt PR, Parke DV. (1985) Beneficial short-term effects of unprocessed wheat bran on lipid and glucose metabolism in man. *Hum Nutr Clin Nutr* 39:63-67.
- O'Sullivan K. (2012) The superior benefits of wheat bran fibre in digestive health. *Eur Gastroenterol Hepatol Rev* 8:3-6.
- Page EH, Dowell CH, Mueller CA, Biagini RE, Heederik D. (2010) Exposure to flour dust and sensitization among bakery employees. *American Journal of Industrial Medicine* 53:1225-1232.
- Parisi GC, Zilli M, Miani MP, Carrara M, Bottona E, Verdianelli G, Battaglia, Desideri S, Faedo A, Marzolino C, Tonon A, Ermani M, Leandro G. (2002) High-fiber diet supplementation in patients with irritable bowel syndrome (IBS). *Digestive Diseases and Sciences* 47:1697-1704.
- Pietzak M. (2012) Celiac disease, wheat allergy, and gluten sensitivity: when gluten free is not a fad. *J Parenter Enteral Nutr (JPEN)* 36:68S-75S.
- Pomare EW, Heaton KW, Low-Beer TS, Espiner HJ. (1976) The effect of wheat bran upon bile salt metabolism and upon the lipid composition of bile in gallstone patients. *Digestive Disease* 21:521-526.
- Pomeranz Y. (1987) *Modern cereal Science and technology*. VCH Publishers, Inc., New York.
- Price RK, Welch RW, Lee-Manion AM, Bradbury I, Strain JJ. (2008) Total phenolics and antioxidant potential in plasma and urine of humans after consumption of wheat bran. *Cereal Chem* 85:152-157.

- Rallabhandi P. (2012) Gluten and celiac disease—an immunological perspective. *Journal of AOAC International* 95:349–355.
- Rashtak S, Murray JA. (2012) Review article: coeliac disease, new approaches to therapy. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics* 35:768–781.
- Riede L, Grube B, Gruenwald J. (2013) Larch arabinogalactan effects on reducing incidence of upper respiratory infections. *Current Medical Research & Opinion* 29:251–258.
- Robinson RR, Feirtag J, Slavin JL. (2001) Effects of dietary arabinogalactan on gastrointestinal and blood parameters in healthy human subjects. *Journal of the American College of Nutrition* 20:279–285.
- Rumpel C, Dignac MF. (2006) Gas chromatographic analysis of monosaccharides in a forest soil profile: analysis by gas chromatography after trifluoroacetic acid hydrolysis and reduction–acetylation. *Soil Biol Biochem* 38:1478–1481.
- Sandberg AS, Hasselblad C, Hasselblad K. (1982) The effect of wheat bran on the absorption of minerals in the small intestine. *Br J Nutr* 48:185–191.
- Sanders TA, Reddy S. (1992) The influence of rice bran on plasma lipids and lipoprotein in human volunteers. *Eur J Clin Nutr* 46:167–172.
- Sapone A, Bai JC, Ciacci C, Dolinsek J, Green PHR, Hadjivassiliou M, Kaukinen K, Rostami K, Sanders DS, Schumann M, Ullrich R, Villalta D, Volta U, Catassi C, Fasano A. (2012) Spectrum of gluten-related disorders: consensus on new nomenclature and classification. *BMC Med* 10:13.
- Saulnier L, Sado PE, Branlard G, Charmet G, Guillon F. (2007) Wheat arabinoxylans: Exploiting variation in amount and composition to develop enhanced varieties. *J Cereal Sci* 46:261–281.
- Sayaslan A (2004) Wet-milling of wheat flour: industrial processes and small-scale test methods. *Lebensm.-Wiss. u.-Technol* 37:499–515.
- Seal CJ (2006) Whole grains and CVD risk. *Proceedings of the Nutrition Society* 65:24–34.
- Shibanuma K, Degawa, Houda K. (2011) Determination of the transient period of the EIS complex and investigation of the suppression of blood glucose levels by L-arabinose in healthy adults. *Eur J Nutr* 50:447–453.

- Smith AN, Drummond E, Eastwood MA. (1981) The effect of coarse and fine Canadian Red Spring Wheat and French Soft Wheat bran on colonic motility in patients with diverticular disease. *The American Journal of Clinical Nutrition* 34:2460-2463.
- Stasse-Wolthuis M, Katan MB, Hermus RJJ, Hautvast JGAJ. (1979) Increase of serum cholesterol in man fed a bran diet. *Atherosclerosis* 34:87-91.
- Swennen K, Courtin CM, Lindemans GCJE, Delcour JA. (2006) Large-scale production and characterization of wheat bran arabinoxylooligosaccharides. *J Sci Food Agric* 86:1722-1731.
- Tomlin JF, Read NW. (1988) Comparison of the effects on colonic function caused by feeding rice bran and wheat bran. *European Journal of Clinical Nutrition* 42:857-861.
- Udani JK, Sinha BB, Barret ML, Singh VJ. (2010) Proprietary arabinogalactan extract increases antibody response to the pneumonia vaccine: a randomized, double-blind, placebo-controlled, pilot study in healthy volunteers. *Nutrition Journal* 9:32.
- Van Der Borgh A, Goesaert H, Veraverbeke WS, Delcour JA. (2005) Fractionation of wheat and wheat flour into starch and gluten: overview of the main processes and the factors involved. *Journal of Cereal Science* 41:221-237.
- Weaver CM, Heaney RP, Teegarden D, Henders SM. (1996) Wheat bran abolishes the inverse relationship between calcium load size and absorption fraction in women. *J Nutr* 126:303-307.
- Wyman JB, Heaton KW, Manning AP, Wicks ACB. (1976) The effect of on intestinal transit and feces of raw and cooked bran in different doses. *The American Journal of Clinical Nutrition* 29:1474-1479.
- Zhou X, Baik BK, Wang R, Lim ST (2010a) Retrogradation of waxy and normal corn starch gels by temperature cycling. *J Cereal Sci* 51:57-65.
- Zhou S, Liu X, Guo Y, Wang Q, Peng D, Cao L. (2010b) Comparison of the immunological activities of arabinoxylans from wheat bran with alkali and xylanase-aided extraction. *Carbohydrate Polymers* 81:784-789.

※ 보고서 겉표지 뒷면 하단에 다음 문구 삽입

주 의

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