

발 간 등 록 번 호

11-1543000-000844-01

새싹땅콩의 전립선염증 개선효과를  
이용한 고농축추출물제형 기능성식품 개발

(Development of functional food for anti-prostatitis from  
high-concentrated peanut sprout extract using its  
prostatitis improvement effect)

농업회사법인(주)장수채

농림축산식품부

# 제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “새싹땅콩의 전립선염증 개선효과를 이용한 고농축추출물제형 기능성식품 개발” 과제(동물모델을 이용한 새싹땅콩의 전립선염예방 기능성 연구에 관한 연구)의 보고서로 제출합니다.

2015 년 3 월 10일

주관연구기관명 : (주)장수채

주관연구책임자 : 김 형 모

연 구 원 : 신 영 택

연 구 원 : 김 광 기

연 구 원 : 류 원 석

연 구 원 : 이 은 혁

위탁연구기관명 : 세 종 대

위탁연구책임자 : 김 용 휘

연 구 원 : 민 지 영

연 구 원 : 유 아 영

연 구 원 : 정 현 주

연 구 원 : 이 윤 경

연 구 원 : 김 희 연

협동연구기관명 : 서 울 대

협동연구책임자 : 신 은 희

연 구 원 : 표 경 호

연 구 원 : 신 춘 봉

연 구 원 : 이 유 원

연 구 원 : 정 진 응

# 요 약 문

## I. 제 목

새싹땅콩의 전립선염증 개선효과를 이용한 고농축추출물제형 기능성식품 개발

## II. 연구개발의 목적 및 필요성

- 주관기관인 (주)장수채에서는 레스베라트롤을 다량 함유한 국내 원천 새싹땅콩으로부터 고농축 추출기술을 확립하였고, 레스베라트롤의 기능성을 가장 안정적으로 유지할 수 있는 이중미세캡슐(W/O/W ; water in oil in water) 제조의 분말화 기술을 이미 확보함으로써, 본 연구에서는 새싹땅콩으로부터 전립선염 예방을 위한 제형제제 기능성식품을 개발하여 상업화하는 것을 최종목표로 하였다.
- 이를 위하여 우선 새싹땅콩 고농축 추출물을 이용하여 새싹땅콩차를 개발하고, 새싹 땅콩추출물을 개발한 이중미세캡슐분말을 이용하여 타블렛, 파우치, 땅콩나물 발효 액상음료를 개발함. 이렇게 개발한 제품의 저장 중 품질을 연구하고, 또한 동물 실험을 통한 전립선염 예방을 위한 기능성을 확립하는데 목적을 둬. 제품의 품질과 전립선염 예방의 기능을 정립한 후에 산업화가능한 제형제제 기능성식품을 개발함으로써, 국내산 새싹땅콩 제조산업의 발전과 국내농산물 기능성식품의 고부가가치 산업화의 활성화에 기틀을 마련하고자 하였다.
- 최근 식품산업의 개념은 식품소재·가공기술을 기반으로 다양한 최신 BT기술이 융합되면서 빠르게 변화하고 있으며, 기존의 웰빙(well-being)개념보다 한걸음 더 나아가 지속적으로 건강을 유지할 수 있는 미래지향적이며 환경친화적인 LOHAS 트렌드로 가고 있다. 또한 삶의 질 향상과 의료기술의 발전으로 인하여 수명이 연장됨에 따라 암, 심장질환, 당뇨, 관절염 등과 같은 만성 또는 난치성 질병이 증가하고 있어, 식품산업에서도 다양한 질병에 대한 예방과 개선을 위한 새로운 고부가가치 식품소재와 기능성식품이 많은 관심을 받고 있어 연구의 필요성이 더욱 고조되고 있는 실정이다.
- 특히 농산물 유래 천연물 소재의 경우, 전 세계적으로 안전성 및 신물질 확보 등을 이유로 합성물에 비해 선호도가 지속적으로 증가하고 있고, 현재 의약품의 60%가

천연물 유래인 점을 감안하면, 향후에도 천연물 유래 기능성 소재의 개발이 더욱 활발히 이루어져 제약·바이오 등 타 산업과의 융복합을 통하여 식품산업의 영역이 확장될 것으로 예상된다.

- 전립선염예방 소재의 경우, 전립선염의 발생과 재발이 염증, 노화 및 산화적 스트레스를 주요한 원인으로 한다는 연구결과가 계속적으로 제시되고 있으며, 이와 관련한 수많은 효능물질들이 보고되고 있다. 하지만 대부분 효능에 대한 결과만 있거나, 이를 산업화하기 위한 지표성분 및 대량생산에 대한 기술개발이 수행되지 않아 기능성식품에 적용하기 어려운 실정이다. 그러므로 국내·외적으로 경쟁력을 갖출 수 있는 차별화된 천연소재를 이용하여 기능성이 증대되는 이중캡슐과 분말제조기술을 확립함으로써 세계적인 전립선염 예방 기능성식품개발이 필요한 상황이다.

### III. 연구개발 내용 및 범위

- 새싹땅콩 고농축 추출을 이용한 새싹땅콩차를 개발하고, 새싹땅콩 이중 미세캡슐분말을 이용하여 타블렛, 파우치, 땅콩나물 발효액상 음료를 개발하였다.
- 개발된 제품의 저장중 품질 연구, 레스베라트롤 함량 측정, 생체이용률 측정, 조직과 관능적 특성, 그리고 전립선염 예방을 위한 동물실험 등을 수행하였다.
- 개발된 제품의 지표 성분을 확립하고, 항전립선 고부가가치 식품의 제형화, 대량생산공정확립 및 제품개발에 관한 연구를 수행하였다.
- 개발된 제품의 상업화 및 산업화에 관한 연구를 수행하였다.

### IV. 연구개발 결과

- 레스베라트롤 함량이 가장 높은 새싹땅콩 고농축추출물과 레스베라트롤의 안정성을 확보한 이중미세캡슐의 분말기술을 이용하여 전립선염을 예방하는 제형제제 기능성 식품의 개발로 저장성이 양호하고 복용이 간편하여 산업화에 효과가 있으며,

소비자의 기호에 충족할 수 있을 것으로 기대된다.

- 본 연구를 수행한 새싹땅콩 제형체제의 연구결과로 다수의 SCI논문투고가 가능하고, 특허출원을 통하여 산업재산권을 확보하고자 하였다.
- 전립선염을 예방하는 효과적인 제형체제 기능성 식품의 개발로 현재 증가하는 전립선염환자를 예방치유 함으로써 의료비의 증가를 막고 국민건강과 국가경제에 효과가 기대되며, 또한 농가의 소득증대로 농업의 발전이 기대된다.
- 항전립선염 효능이 양호한 새싹땅콩기능성 식품개발기술을 종료 후 주관기관인 농업회사법인 (주)장수채가 제형체제 기능성식품의 산업화를 추진하고자 하였다.
- 국내 농산물 자원으로부터 새로운 기능성식품을 개발함으로써 2020년 연간 100조 원으로 증가할 것으로 예상되는 세계기능성식품시장에서 경쟁력확보 및 인력양성에 기여하였다.

#### IV. 연구성과 및 성과활용계획

본 연구의 주요 연구개발 성과로는 땅콩새싹의 기능성을 확인한 것이다. 이를 이용하여 레스베라트롤을 다량 함유한 새싹땅콩을 이용한 티백, 타블렛, 파우치, 액상 음료 등 다양한 기능성 식품 개발, 만성박테리아성 전립선염의 억제 효과, 만성전립선비대증의 억제 효과, 세균막의 억제효과, 선천성면역세포의 활성화 효과 등의 성과를 도출해 낸 것이 예상외의 기대치 성과물로 등장하게 되었으며, 이를 신장 및 간에서의 독성시험을 한 결과 생체독성이 없음을 확인하기에 이르렀다.

# SUMMARY

## I. Title

Development of functional food for anti-prostatitis from high-concentrated peanut sprout extract using its prostatitis improvement effect

## II. Purpose and Necessity of Research and Development

The major objective of the present research is to investigate the effect of peanut sprout extract (EPS) on the extensive prostate diseases. EPS was developed by 'JANGSUCHAE CO., Ltd', and recently provided as functional foods. For this purpose, our research team developed animal model with Chronic bacterial prostatitis (CBP) and Benign prostate hyperplasia (BPH) as prostate disease models, and compared the mitigation of inflammation and tissue degeneration in the prostate disease model mice before and after EPS treatment.

## III. Contents and Ranges of Research and Development

### 1. The first years (2012)

#### A. Quality study of peanut sprout tea during storage

- Quantification of resveratrol contents in peanut sprout tea during storage
- Color change of peanut sprout tea during storage
- pH change of peanut sprout tea during storage
- Sensory evaluation of peanut sprout tea during storage

#### B. Quality study of peanut sprout tablet during storage

- Making of peanut sprouts extracts microcapsulation
- Quantification of resveratrol contents in peanut sprout tablet during storage
- Color change of peanut sprout tablet during storage
- pH change of peanut sprout tablet during storage
- Dynamic vapor sorption of peanut sprout tablet

### 2. The Second years (2013)

- A. Quality study of peanut sprout extracts pouch during storage
- Quantification of resveratrol contents in peanut sprout extracts pouch during storage
  - Color change of peanut sprout extracts pouch during storage
  - Sensory evaluation of peanut sprout extracts pouch during storage
- B. Quality study of peanut sprout beverage during storage
- Quantification of resveratrol contents in peanut sprout beverage during storage
  - Color change of peanut sprout beverage during storage
  - Sensory evaluation of peanut sprout beverage during storage
- C. The major concept of the research is to identify the effect of EPS on prostate disease such as CBP and BPH. Prostatitis-inducing bacteria isolated from patients was used for the development of bacteria infection model in mice. Anti-prostatitis effect of EPS was investigated by three kinds of experiment; CBP, BPH, and bacterial biofilm assay. We treated EPS for 4 weeks by oral administration, and measured on the prostatitis related tissue inflammation.

#### IV. Results of Research and Development

##### 1. The first years (2012)

- A. Quality study of peanut sprout tea during storage
- The peanut sprout tea was analyzed about resveratrol content, pH, color, and sensory evaluation for quality study during 10 weeks for various temperature (4°C, 35°C, 45°C, and 55°C).
  - The resveratrol contents was decreased higher temperature and longer storage time than control.
  - In pH, value was reduced higher temperature and longer storage time than control.
  - In color, L value and a value were decreased and b value was increased during storage.
  - In sensory evaluation, results showed a positive change during storage.
  - The quality of peanut sprout tea was considered that almost no change at the recommended storage temperature during storage.
- B. Quality study of peanut sprout tablet during storage

- The peanut sprout tablet was analyzed about resveratrol content, pH, color, and dynamic vapor sorption for quality study during 10 weeks for various temperature (4°C, 35°C, 45°C, and 55°C).
- The resveratrol contents was decreased higher temperature and longer storage time than control.
- In pH, value was reduced higher temperature and longer storage time than control.
- When consumers hold the tablet outdoors, we believe quality is no problem.
- Quality factors of peanut sprouts tablets were not changed at storage temperature during storage.

## 2. The Second years (2013)

### A. Quality study of peanut sprout extracts retort pouch during storage

- The peanut sprout extracts retort pouch was analyzed about resveratrol contents, color, and sensory evaluation for quality study during 8 weeks for various temperature (4, 30, 40, and 50°C).
- The resveratrol contents was decreased during storage in all storage temperature.
- In color, L value and a value were decreased and b value was increased during storage.
- In sensory evaluation, results showed that storage the samples at 4°C showed a positive change during storage.
- The overall quality of peanut sprout retort pouch was considered that almost no change at the recommended storage temperature during storage.

### B. Quality study of peanut sprout beverage during storage

- The peanut sprout beverage was analyzed about resveratrol contents, color, and sensory evaluation for quality study during 8 weeks for various temperature (4, 30, 40, and 50°C).
- The resveratrol contents was decreased during storage in all storage temperature.
- In color, L value and a value were decreased and b value was increased during storage.
- In sensory evaluation, results showed that storage the samples at 4°C showed a positive change during storage.
- The overall quality of peanut sprout beverage was considered that almost no change at the recommended storage temperature during storage.

### C. We used *E. coli* 299 bacteria for the development of prostatitis animal model. After the treatment of EPS for 4 weeks by oral administration, the prostate of mice was examined for the bacterial growth (CFU/g),



pathological analysis, and immune responses. In the present study, the bacterial growth in the prostate tissue was decreased by the administration of EPS, and tissue inflammation was also reduced. In this case, we suggest that the increase of macrophage activation may be related with the reduction of bacterial proliferation.

- D. BPH model mice were established by the treatment of E2 and DTH. BPH-model mice were administered by EPS for 4 weeks. The prostate tissues were collected, and investigated on the inflammation with H&E staining. Our results showed the reduction in the inflammatory region in the prostate tissue after EPS treatment.
- E. The prostatitis can be mediated by the reflux of urine. The progress of inflammation is caused by biofilm-forming capacity of bacteria to help the propagations of uropathogenic bacteria to upstream of urinary tract. Accordingly, we examined whether or not the adhesion of uropathogenic bacteria on prostate cell (PC-3) can be reduced by EPS, and the anti-adhesion of *E. coli* can be mediated by the inhibition of biofilm formation. As the result, we found that EPS was able to reduce biofilm formation and the adhesion of bacteria on prostate cells.

## V. Achievement of Research and Development and Design of Achievement Application

- A. The present study was carried out and various commercialization of new functional materials of peanut sprouts, it is considered that there will be able to widen the choice of functional food consumers through the actual future commercialization.
- B. In the present study, it was revealed that EPS plays a role on the prevention of prostatitis. Moreover, it made clear that EPS had not a toxicity during the administration for four weeks. Accordingly, our results can be helpful on the functional food development for the mitigation of CBP and BPH using EPS.

# CONTENTS

<b>Chapter 1. Summary of Research and Development Subject</b>	<b>-----12</b>
Part 1. Purpose and Necessity of Research and Development	
Part 2. Objective and Range of Research and Development	
<b>Chapter 2. Domestic and Foreign Technology Development</b>	<b>-----22</b>
Part 1. Domestic and Foreign Technology Development on object of study	
<b>Chapter 3. Contents and Results of Research and Development</b>	<b>-----25</b>
Part1. Sample analysis and Empirical Approach Methods on the Extracts of Peanut Sprouts	
Part2. Analysis Method Establishment on Resveratrol out of High-Enriched Peanut Sprouts	
Part3. Research on Prevention of prostate of Peanut Sprouts Using Animal Models	
1. Prostatitis-inducing bacteria and inflammation-inducing effect	
2. Development of animal model with prostatitis by bacteria injection	
3. Effect of EPS on the anti-inflammation in mice suffering from prostatitis	
4. Toxicology test in mice suffering from prostatitis	
5. Effect of EPS in mice suffering from chronic bacterial prostatitis (CBP)	
6. Effect of EPS in mice suffering from benign prostate hyperplasia (BPH)	
7. Anti-adhesion assay of prostate cell line and the inhibition of biofilm formation by EPS	
8. Research and Development Contents in the 1st year	
9. Research and Development Contents in the 2nd year	
Part4. Study on Product Quality Prevention of Prostate using Double Microcapsule and Nano-powder of Peanut Sprouts	
<b>Chapter4. Accomplishment of Objectives and Contribution to Correlated Fields</b>	<b>---97</b>
<b>Chapter5. Achievement of Research and Development and Design of             Achievement Application</b>	<b>-----99</b>

Chapter 6. Information of foreign science and technology-----	102
Chapter 7. Research facilities and equipments-----	103
Chapter 8. References -----	104

# 목 차

제 1 장 연구개발 과제의 개요-----	12
제1절 연구개발의 목표	
제2절 연구개발의 목적 및 범위	
제 2 장 국내·외 기술개발 현황-----	22
제1절 국내·외 기술개발에 관한 연구	
제 3 장 연구개발 수행 내용과 결과-----	25
제1절 새싹땅콩 추출물의 시료분석 및 실험적 접근방법	
제2절 고농축 새싹땅콩 추출물속 레스베라트롤의 분석법 확립	
제3절 동물모델을 이용한 새싹땅콩의 전립선염 예방기능성 연구	
제4절 새싹땅콩 나노분말 및 이중미세캡슐을 이용한 전립선 예방 제품의 품질연구	
제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도-----	97
제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획-----	99
제 6 장 연구개발 과정에서 수집한 해외과학기술 정보-----	102
제 7 장 연구시설·장비 현황-----	103
제 8 장 참고 문헌-----	104

# 제 1 장 연구개발과제의 개요

## 제1절 연구개발의 목적

주관기관인 (주)장수채에서는 레스베라트롤을 다량 함유한 국내 원천 새싹땅콩으로부터 고농축 추출기술을 확립하였고, 레스베라트롤의 기능성을 가장 안정적으로 유지할 수 있는 이중미세캡슐(W/O/W ; water in oil in water) 제조의 분말화 기술을 이미 확보함으로써, 본 연구에서는 새싹땅콩으로부터 전립선염 예방을 위한 제형제제 기능성식품을 개발하여 상업화하는 것을 연구의 목적으로 함. 이를 위하여 우선 새싹땅콩 고농축 추출물을 이용하여 새싹땅콩차를 개발하고, 새싹땅콩 추출물을 개발한 이중미세캡슐분말을 이용하여 타블렛, 파우치, 연질캡슐을 개발하고, 개발한 제품의 저장 중 품질을 연구하고, 또한 동물실험을 통한 전립선염 예방을 위한 기능성을 확립하고자 함. 제품의 품질과 전립선염 예방의 기능을 정립한 후에 산업화 가능한 제형제제 기능성식품을 개발함으로써, 국내산 새싹땅콩 제조산업의 발전과 국내농산물 기능성식품의 고부가가치 산업화의 활성화에 기여함을 연구의 목적으로 하고 있다.

## 제2절 연구개발의 필요성 및 범위

### 1. 연구개발의 필요성

- 최근 식품산업의 개념은 식품소재·가공기술을 기반으로 다양한 최신 BT기술이 융합되면서 빠르게 변화하고 있으며, 기존의 웰빙(well-being)개념보다 한걸음 더 나아가 지속적으로 건강을 유지할 수 있는 미래지향적이며 환경 친화적인 LOHAS 트렌드로 가고 있다. 또한 삶의 질 향상과 의료기술의 발전으로 인하여 수명이 연장됨에 따라 암, 심장질환, 당뇨, 관절염 등과 같은 만성 또는 난치성 질병이 증가하고 있어, 식품산업에서도 다양한 질병에 대한 예방과 개선을 위한 새로운 고부가가치 식품소재와 기능성식품이 많은 관심을 받고 있다.

특히 농산물 유래 천연물 소재의 경우, 전 세계적으로 안전성 및 신물질 확보 등을 이유로 합성물에 비해 선호도가 지속적으로 증가하고 있고, 현재 의약품의 60%가 천연물 유래인 점을 감안하면, 향후에도 천연물 유래 기능성 소재의 개발이 더욱 활발히 이루어져 제약·바이오 등 타 산업과의 융복합을 통하여 식품산업의 영역이 확장될 것으로 예상된다.

- 전립선염예방 소재의 경우, 전립선염의 발생과 재발이 염증, 노화 및 산화적 스트레스를 주요한 원인으로 한다는 연구결과가 계속적으로 제시되고 있으며, 이와 관련한 수많은 효능물질들이 보고되고 있다. 하지만 대부분 효능에 대한 결과만 있거나, 이를 산업화하기 위한 지표성분 및 대량생산에 대한 기술개발이 수행되지 않아 기능성식품에 적용하기 어려운 실정이다. 그러므로 국내·외적으로 경쟁력을 갖출 수 있는 차별화된 천연소재를 이용하여 기능이 증대되는 이중캡슐과 분말제조기술을 확립함으로써 세계적인 전립선염 예방 기능성식품개발이 필요한 상황이다.

## 2. 연구개발대상 기술의 중요성 및 필요성

### 가. 경제적·산업적 중요성

(1) NBJ (Nutrition Business Journal, 2010)의 보고에 따르면, 세계 기능성 식품분야의 경우 2000년 1,435억 달러 규모였던 시장규모가 2008년 2,697억달러로 증가하였고, 향후 지속적 성장으로 2014년에는 3,973억 달러로 증가할 것으로 전망되고 있음. 특히 안전성이 높은 천연물 유래 의약품 대체 식품소재로 개발한 기능성 식품이 가장 높은 성장률을 보일 것으로 기대된다.

(2) 우리나라의 경우 2008년 기능성 식품시장규모가 2조 3600억원 규모로 홍삼, 비타민 및 무기질, 알로에, 글루코사민 등과 같은 제품이 주를 이루고 있는데, 특이하게 홍삼이 전체의 54.5%로 매우 높은 비중을 나타내고 있어, 향후 미래 식품산업 환경변화에 대처하기 위해서는 국내 농산물자원을 활용한 새로운 기능성 소재개발이 매우 절실한 실정이다.

그러나 국내 천연물유래 기능성 식품소재 개발은 관련 분야의 연구력, 제품화 능력, 시장 주도력 등이 선진국에 비해 뒤쳐져, 2020년 연간 100조원에 이를 것으로 예상되는 기능성식품 시장에서 경쟁력을 확보하기 위해서는 차별화된 국내 농산물 소재로부터 고부가가치의 기능성 식품소재와 기능성식품의 개발이 매우 필요한 실정이다.

(3) 본 연구과제에서는 다양한 효능을 가지는 레스베라트롤(resveratrol)을 다량 함유하고 있는 새싹땅콩(peanut sprouts) 기능성 식품소재를 이용하여 항전립선 기능성 식품을 개발하고자 한다. 국내 새싹땅콩의 생리활성 및 우수성 입증을 통하여 현재 수입산에 비해 가격경쟁력이 떨어져 연간 6,000여 톤 정도밖에 생산되지 않는 국내 땅콩생산량을 1987년도의 수준인 연간 32,000톤 수준으로 회복시키고 농가소득도 현재 250억원 수준에서 1,250억 원으로 증가시키고자 한다.

### 나. 기술적 중요성

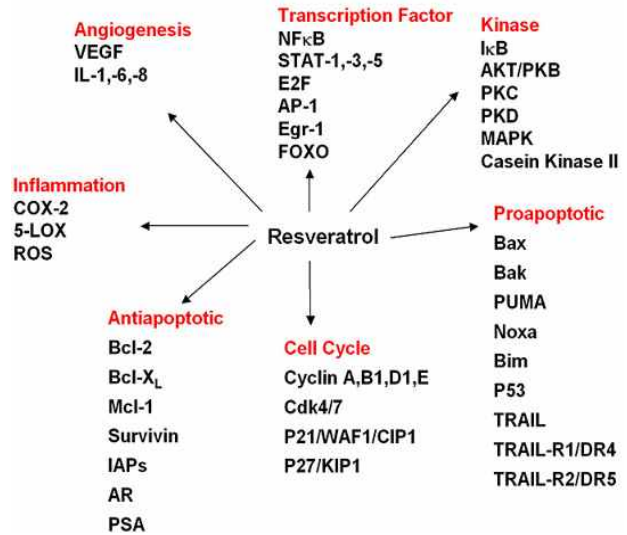
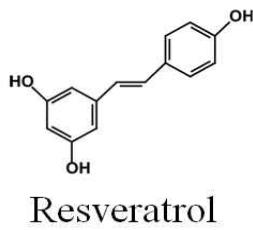
- (1) 주관기관인 (주)장수채에서 이미 개발한 기술, 즉 새싹땅콩의 고농축 추출기술과 이중 미세캡슐 제조기술과 이의 분말화 기술을 이용하여 산업화를 위한 항전립선 기능성 식품을 개발하기 위하여, 우선 다양한 제형제제개발과 제품의 저장 중 품질연구, 그리고 항전립선 효과를 규명하는 동물성실험을 함으로써 기능성 식품개발을 위한 전체적인 기술개발이 중요하다.
- (2) 본 연구에서 전립선염 예방을 위한 제형제제 기능성식품을 개발하기위한 기술로서, 우선 제형제제의 생산을 위한 기술이 필요하고 그 후 이들 제제의 저장 중 품질을 유지하기위하여 레스베라트롤의 방출과 변화를 측정하는 기술, 생체이용률을 측정하는 기술, 제품의 조직과 관능적 특성을 분석하는 기술, 그리고 전립선예방을 과학적으로 규명하는 동물실험을 통한 기술이 매우 중요하다.
- (3) 국내에서도 다양한 농산물 자원으로부터 전립선염예방 효능이 있는 소재가 많이 보고되고 있지만, 국내 기능성식품 법규상 전립선염과 같은 질병에 대한 기능성 표시가 사실상 어려워 전립선염예방 기능성 식품개발에 많은 제약이 따르고 있는 실정이다.
- (4) 하지만 미국과 캐나다와 같은 여러 선진국의 경우 기능성 식품에 전립선염예방 문구를 인정하고 있고 다양한 전립선염 예방관련 기능성식품이 출시되고 있어 향후 국내 기능성 식품법규도 전립선염 예방 기능성식품에 대한 과학적 합의가 도출되어 제품화될 것으로 예상된다.  
따라서 본 연구과제에서는 항산화 및 아토피에 효능이 뚜렷한 레스베라트롤을 다량함유하고 있는 새싹땅콩의 전립선염의 개선 효능 및 기작을 규명하여, 전립선염 예방 기능성 식품 개발을 함으로서 농가 소득 증대 및 주관기업 이익을 창출하고자 한다.

#### 다. 연구의 필요성

- (1) 레스베라트롤은 항암, 항바이러스, 신정보호, 항노화, 항염증, 항전립선염, 수명연장 등의 의학적 효과와 피부세포 재생 및 노화억제, 피부주름방지, 미백 등 미용효과가 보고되고 있는 등 대단히 광범위한 효과가 있는 것으로 보고되고 있음. 또한 인체에 미치는 독성이나 부작용에 대한 것은 아직까지 발표된 바가 없어 천연물 식의약소재 개발가능성이 매우 큰 물질이다.
- (2) 천연 레스베라트롤은 포도, 땅콩, 호장나무, 오디 등 식물에서 추출하여 활용하고 있음. 미국, 유럽 등 선진국은 주로 포도나무에서 추출해 활용하고 있으나 4-8  $\mu\text{g/g}$  정도로 극미량으로 추출될 뿐만 아니라 1년에 1회밖에 추출할 수 없어 재료확보 및 대

량생산이 어려움

- (3) 땅콩새싹채소에는 땅콩종자의 0.018 ~1.25 µg/g 에 비해 대폭 증가된 110.3 µg/g의 레스베라트롤 함유하고 있으며 이것은 포도의 23배에 해당한다. 또한 파종 후 수확까지 1주일이면 충분히 해외 포도추출물 보다 높은 생산성을 보유하고 있어 고농도 땅콩추출물을 이용한 부가가치가 기능성 식품을 개발할 것으로 판단된다.



(Frontiers in Bioscience 12, 4839-4854, 2007)

### 레스베라트롤의 효능 및 메커니즘

- (4) “농공상용합형기업”으로 선정된 주관연구기관인 농업법인 (주)장수채는 새싹땅콩 제조 원천특허를 보유하고 있어 차별화된 원료확보가 가능하고, 여주땅콩작목반과 연계하여 땅콩새싹에 함유된 레스베라트롤과 각종 유용물질의 고부가가치 제품화를 추진하고 있으며, 또한 새싹땅콩의 고농도 추출물 생산기술과 추출물을 이용한 이중미세캡슐화 기술과 이의 분말화 기술을 개발하였으므로 향후 연구사업 종료후에 수익성 있는 산업화가 원활하게 이루어질 것으로 예상된다.
- (5) 따라서 본 연구사업 수행을 통하여 국내 원천기술 및 새싹땅콩 관련기술로 생산된 새싹땅콩으로부터 시장수요가 큰 전립선염 예방 천연물소재로 개발한 기능성식품의 미래 식품시장에서 국내 농생물자원 유래 기능성 식품의 경쟁력 제고 및 고부가가치화를 통해 이익창출을 이루고자 한다.



### 3. 주관, 위탁, 협동기관별 연구 범위

#### 가. 연구개발의 최종목표 및 주요내용

(1) 연구개발 목표 : 국내산 새싹땅콩으로부터 개발한 고농도 추출물과 이중미세캡슐의 항진립선염예방 식품개발

- 본 연구에서는 국내원천 기술로 재배되는 새싹땅콩으로부터 새싹땅콩차, 이중미세캡슐 분말 100%를 타블렛 및 파우치음료와 연질캡슐 제품을 개발하여 진립선염예방 고부가가치 기능성식품개발을 목표로 함.

(가) 이를 달성하기 위하여, 새싹땅콩으로부터 추출한 고농도 추출공정을 개발, 기존의 추출에서 보였던 레스베라트롤 함유량(56.67 ug/ml)보다 270%가 증가한 레스베라트롤이 고농도 (153.36 ug/ml) 함유된 추출물 공정을 개발하였음. 레스베라트롤 함량이 증가된 새싹땅콩의 제조방법 (국내특허출원 : 10-2012-0094906) 새싹땅콩의 미세캡슐과 분말화 기술을 가지고 항진립선염예방 효능식품을 개발하여 산업화하고자함.

(나) 세포실험 및 동물실험을 통한 새싹땅콩 고농도 추출물 및 이중캡슐기술을 이용한 제형 제제 가능성식품들의 진립선염예방 효능확인 및 생리활성 기작규명

(다) 새싹땅콩 고농도추출물과 이중미세캡슐의 대량생산공정 확립 및 제품 개발

- ① 새싹땅콩차 및 새싹땅콩 고농축추출물100% 타블렛, 개발(1차년도목표)
- ② 새싹땅콩 이중캡슐 파우치음료 및 레스베라트롤 고함유(153.36 ug/ml) 새싹땅콩 고농도(고형분 70%이상, brix 60)함유한 연질캡슐 제품(2차년도목표)
- ③ 레스베라트롤 1일 권장량 21mg의 기준 함량을 충족하는 제품개발

#### 나. 1세부과제 (주관): (주)장수채

##### (1)연구목표

진립선염 예방 효능을 갖는 고기능성 소재 새싹땅콩 고농도 추출물과 및 이중캡슐을 이용한 제형제제 기능성식품개발

##### (2)연구내용

## 새싹땅콩 제품화 및 고부가가치 산업화

### 전립선에 방호능 확인

새싹땅콩차  
“장수차”

새싹땅콩  
미세분말 100%  
타블렛

새싹땅콩  
이중캡슐 함유  
파우치음료

새싹땅콩  
고농도추출액  
함유  
연질캡슐

- ① 새싹땅콩 고농도추출물 및 이중캡슐의 분말로 제형제제 기능성식품 개발 및 지표성분 확립을 통한 제품화
- ② 국내산 땅콩을 원료로 양평의 청정수로 새싹땅콩 재배한 제품을 원료로 사용
- ③ 전립선염에 효능이 있는 새싹땅콩차 “장수차” 제조

#### (가) 새싹땅콩 차 제조공정개요

새싹땅콩원료-알코올추출-농축-검사-배합(원료+부원료)-과립제조-건조-검사-사별-검사  
- 알코올 농축액제조+부원료= 배합-과립제조-사별-병입(혹은 티백)-포장

☞ 원료: 새싹땅콩건채소( 원료용), 알코올: 주정 70%,

농축액의 성분: 레스베라트롤+17종아미노산+아르긴산+유용물질(?)

건조: 70~80℃, 7~10시간 건조( 용량에 따라 시간 조정)

-새싹땅콩 고농축추출물 타블렛 제조: 담암갈색의 고농축추출물의 정제

- ① 새싹땅콩 고농축추출물전처리: 적절한 온·습도를 유지하여 원료의 보관조건에 맞추고 항상 청결하게 유지함.
- ② 제성 및 혼합: 제성 및 혼합공정에서 발생 가능한 위해요소를 분석하고 상황에 맞는 예방조치(안) 을 마련한 후 실시함
- ③ 살균: 온도가 낮을 경우 미생물 등에 의한 재오염될 수 있고 청결이 부적절한 경우 이물질이 압착관에 고착되어 제품 변질의 원인이 되므로 수시로 점검·보수
- ④ 세병: 공병은 방충·방서시설이 갖춰진 보관 장소에 보관하고 세병기 등으로 세척하여 이물질을 제거함
- ⑤ 병입: 주입실은 밀폐 또는 양압 상태가 유지되도록 하여 곤충의 침입을 방지하고 전실을 설치하여 이물의 혼입을 최소화함

- ⑥ 제품 보관 및 출하: 완제품은 냉암소 보관하며 유통기간에 맞추어 순차적 출하
- ⑦ 아남정밀사의 타블렛정제 제조기에서 타블렛으로 압착한 제형(제형크기: 두께 2.3mm, 직경 4.55mm) 새싹땅콩 미세분말 100kg에 꿀600g을 넣고 물리적으로 압착하여 2-3시간 동안 자연 건조하는 공정

제품A. 새싹땅콩 타블렛제품(새싹땅콩 미세분말 100%)

제품B. 홍삼플러스 새싹땅콩 타블렛제품(홍삼분말 30%와 새싹땅콩 미세분말 70%)

인삼을 가지고 찌고 건조를 8회 반복하여 홍삼을 제조하여 이 공정으로 제조된 홍삼을 분쇄하여 분말화한 홍삼분말을 재료로 홍삼타블렛 제품과 같은 방법으로 제조

-새싹땅콩 고농축추출물 및 이중캡슐 파우치음료 제품개발

- ① 새싹땅콩건채소70kg, 정제수 1차 - 1,000L, 2차 - 600L, 추출온도 80℃±2, 추출시간 13시간~14시간(brix 2.0이상), 여과 0.5µm 사용, 살균 95~100℃에서 5분, 최종제품(brix - 2.0±0.2; 흡광도 - ??, 일반세균 - 기준치 이하; 대장균 - 음성, 이물질 검출 - 없음

- ② 제조번호: 장수채 JSC0000-00

제조단위: 1000 L

제조일자: 2013년 03월--일

포장단위: 20 ml

보관 및 출하

- 지표성분 도출 및 최적 생산조건 확립을 통한 기능성 인증자료 확보

- QC를 위한 지표성분 분석조건 확립

-제품의 품질 및 안전성에 관해서는 GMP관리하에서 최상의 제품을 생산 상업화

- ③새싹땅콩 고농축추출물 및 이중캡슐을 이용한 연질캡슐 제품개발

- 현재 국내 제품들의 경우, 재래식의 엑기스 형태로 시판되고 있는 경우가 대부분이며, 복용시 매우 불편한 단점을 지니고 있음. 이러한 단점을 개선하고자 캡슐제제 등의 형태로 개발, 레스베라트롤의 흡수개선 등의 기능성 제제로 개발가능성

- 제제기술의 개선으로 충분히 경구 흡수가 증대될 가능성이 있어 **환자의 복용 편의성 뿐만 아니라 약효의 증대 차원에서도 고기능성 제형 개발로 산업화를 통하여 고수의 창출가능하다.**

- 레스베라트롤 고함유(153.36 ug/ml) 새싹땅콩 고농도(고형분 70%이상, brix 60) 및 상용화된 홍삼정을 함유한 연질캡슐제품도 고려하여 홍삼정의 고농축추출물 및 이중캡슐화 연구를 위탁기관인 세종대학 곽해수 교수팀에서 적극적으로 연구하고 있음

- 새싹땅콩과 홍삼의 고농축추출물이 함유된 제품은 시장성을 확보하는데 유리하다고 생각됨

다. 2세부과제 (협동): 서울대

## (1) 연구목표

동물모델을 이용한 새싹땅콩의 전립선염예방 기능성 연구

## (2) 연구내용

### (가) 랫트를 이용한 감염성 전립선염 동물모델 구축

- ① 실험동물 실시 전에 실험동물윤리위원회의 검증을 받아 IACUC 허가 번호 획득.
- ② SPF 랫트는 체중 250 g에서 300 g의 수컷 Lewis rat으로, 전임상 실험부에서 실험 수행.
- ③ 동물실험을 통하여, 레스베라트롤의 투여방법과 전립선염 모델의 완성.
- ④ 새싹땅콩의 미세분말 및 엑기스(EPS)를 이용하여 전립선염의 완화 반응 확인.

### (나) 세균성 전립선염 동물모델의 확인 검증

- ① 소변내의 세균 수 측정.- McConkey agar 배양법을 이용
- ② 조직/병리학적 전립선 조직 확인
- ③ MRI를 이용한 전립선에서의 염증변화 양상 확인

### (다) 새싹땅콩 추출물의 전립선염 예방에 대한 in-vitro, in-vivo 효능 및 기전 연구

- ① 대식세포에서 염증관련인자 (nitric oxide, PGE<sub>2</sub>, cytokine)의 억제효능 평가
- ② iNOS와 COX-2등의 염증 관련 단백질 발현 측정
- ③ 전립선암 등의 세포주 이용 항전립선염증 효능 스크리닝
- ④ cytokine array법을 이용하여 새싹땅콩 기능성 소재를 투여한 마우스에서 염증 관련 cytokine의 증감 확인  
: Cox-1 & 2, PGE<sub>2</sub> NF-κB, NO, iNOS TNFα IL-1b IL-6
- ⑤ 혈액세포내의 CBC counting
- ⑥ Macrophage에서 항전립선염효능과 연관된 염증매개인자 및 NO 등의 증가 여부 확인  
: pro-inflammatory cytokine (IL-1b, IL-6, TNFα), Th1 cytokines (IFNγ, IL-12, IL-23), Th2 cytokines (IL-4, IL-13), suppressor cytokine (IL-10, TGFβ)

## 라. 위탁과제 : 세종대

### (1) 연구목표

전립선염 예방효능을 갖는 새싹땅콩의 고농도 추출물과 이중미세캡슐분말을 이용하여 개발한 제형 기능성 식품들의 저장 중 품질 연구

## (2) 연구내용

(가) 새싹땅콩 추출물과 이중캡슐을 이용한 제형 기능성 식품의 저장 중 이화학적 및 관능적 특성 실험

- ① 타블렛의 용해성 측정 주요 성분의 변화
- ② 캡슐코팅물질의 품질 변화
- ③ 제품의 조직 (texture) 검사
- ④ 제품의 관능적 특성 연

(나) 새싹땅콩 추출물과 이중캡슐을 이용한 제형 기능성 식품의 저장 중 기능성 연구

- ① 레스베라트롤의 방출 측정
- ② 생체 이용률 극대화의 규명

### <새싹땅콩차 제조>

#### ① 새싹땅콩 차 제조공정개요

-새싹땅콩원료-알코올추출-농축-검사-배합(원료+부원료)-과립제조-건조-검사-사별-검사

○ 알코올 농축액제조+부원료= 배합-과립제조-사별-병입(혹은 티백)-포장

☞ 원료: 새싹땅콩건채소( 원료용), 알코올: 주정 70%,

농축액의 성분: 레스베라트롤+17종아미노산+아르기닌(+?)

건조: 70~80℃, 7~10시간 건조( 용량에 따라 시간 조정)

#### ② 품질검사

□ 품질조건

- 입도: 12-40mesh 90% 이상 (12~25mesh)    ○ 용해성: 냉수 용해( 투명)
- 불용성부유물: 없음    ○ 생균수: 3,000/g 이하    ○ 대장균: 음성    ○ 수분: 1.2% 이하
- pH: 4.3±0.2    ○ 투과율: 75±2%(과장: 600nm)

♣ 참고: 원료 배합(예)

- 알코올 엑스: 20%    ○ 포도당 : 70%(?)    ○ 전분당( DE:9.5): 10% 이하    ○ Vit.C ( 적의)
- 글리시리진(적의)    ○ 주정: 약간

☞ Vit.C(0.6%)+ 글리시리진(0.08%)를 약간의 주정에 녹여 배합

#### ③ 새싹땅콩차 시제품 제조(국내시판 및 수출용)

- A제품: 새싹땅콩농축액 20%+ 포도당 75%(무수)+대추엑스 5%
- B 제품: 새싹땅콩농축액 20%+ 포도당80%
- C 제품: 새싹땅콩농축액 20%+ 포도당 70%(무수)+ 유당(10%)
- D 제품: 새싹땅콩농축액 20%+포도당 79.4%+VitC 0.55%+글리시리진 0.05%

♣ 새싹땅콩추출액 100% 국내산으로 우수건강기능식품 제조 기준

품질이 보증된 우수 건강기능식품을 제조하기 위한 기준으로서 제조함

## ▣ 새싹땅콩차 제조공정

### 생산공법

새싹땅콩-알코올추출-농축-검사-배합(원료+부원료)-  
과립제조-건조-검사-사별-검사  
알코올 농축액제조+부원료= 배합-과립제조-사별-병입(혹은 티백)-포장  
☞ 원료: 새싹땅콩( 원료용), 알코올: 주정 70%,  
농축액의 성분:레스베라트롤+17종아미노산+아르긴산(?)  
건조: 70~80℃, 7~10시간 건조( 용량에 따라 시간 조정)

### 주요공법



## 제 2 장 국내외 기술개발 현황

### 제1절 연구개발대상 기술의 국내·외 현황

#### 1. 국내현황

- 가. 2010년3월 농촌진흥청은 땅콩 종자상태에서는 거의 없던 레스베라트롤 성분이 종자가 발아해 싹나물로 자라나면서 많게는 600배 이상까지 증가하는 사실을 밝혔다고 발표하였고, 특히, 2008년 12월, 농촌진흥청에서 땅콩새싹의 기능성에 관하여 정부 정책보도 자료로 발표한 바 있다. 추가로 농촌진흥청은 국내산 조광땅콩이 기능성 물질인 레스베라트롤이 건물 1g당 63.3 $\mu$ g(포도주 100ml에 해당)이나 함유하고 있다고 언론에 발표한 바 있다.
- 나. 레스베라트롤을 함유하는 “항암토마토”와 레스베라트롤을 고함유하는 포도생산기술 등이 개발되었으나 이를 이용한 기능성 식품이나 소재의 산업화는 진행되지 못하였음. 2009년 3월 농림수산식품부는 땅콩새싹의 기능성을 인지하고 이를 이용한 기능성식품 개발을 위해 농림기술개발사업으로 선정하여 산학 연구활동을 지원하는 등 레스베라트롤의 생리활성과 더불어 새싹땅콩에 대한 관심이 높아지고 있는 실정이다.
- 다. 따라서 정부는 땅콩새싹의 기능성 규명을 위해 별도로 다년간의 기초 연구사업을 지원, 그 결과 다음과 같은 연구성과가 있으나 기능성 소재개발을 통한 실용화 연구사업은 진행되지 못하고 있는 실정이다.
- 땅콩나물의 레스베라트롤 함량 및 영양성분 분석 (2010년)
  - 땅콩나물 추출물의 항산화 효과 (2010년)
  - 땅콩나물 추출물의 신경보호 효과(2010년)
  - 땅콩나물 추출물의 미세캡슐화 (2011년)
  - 땅콩나물의 입자화 (2011년)
  - 나노입자화된 땅콩나물의 관절염 예방효과 (2012년)

#### 2. 국외현황

- 가. 레스베라트롤이 뿌리 한약재에 포함되어 있다는 것을 알게 되면서 분리 및 구조 확인 연구가 밝혀진 것은 1940년대이다. 이후 국제적으로 레스베라트롤을 이용한 각종 식의약 분야에서의 연구결과는 꾸준히 증가하여 최근에는 관련 논문만 매년 1,000여 편 이상이 발표되고 있다.
- 나. 90년도에는 French Paradox와 연계되어, 포도주에 대한 연구가 급격하게 진행되면서, Mattivi 등은 포도에서 레스베라트롤의 단량체, 올리고중합체 및 이성질체와 glucoside형

을 분리하였고, Goldberg 등은 레스베라트롤을 GC-MS법을 이용하여 더욱 세밀한 분석을 수행하였다.

- 다. 특히, Goldberg 등은 위의 연구에서 레스베라트롤의 trans-형뿐만 아니라 cis-형 레스베라트롤도 존재하는 것을 보고하였고, Nonomura 등은 레스베라트롤이 글루코사이드 형태로 추출될 수 있음을 발표하였다. 오늘날 레스베라트롤의 성분분석에는 cis-형 및 trans-형 레스베라트롤 글루코사이드 (glucoside)와 cis-형 레스베라트롤의 함량을 목적물인 trans-형 레스베라트롤과 함께 나타내는 것이 일반적이다.
- 라. 레스베라트롤에 관한 최근 연구동향은 레스베라트롤의 효능이 널리 알려진 이후 생체흡수성 및 관련 대사체 연구와 특정질병에 대한 효능 메커니즘 연구가 주를 이루고 있다. 항진립선염효능의 경우 cDNA microarray를 통하여 레스베라트롤 섭취에 따른 인간의 gene expression 변화에 대한 연구뿐만 아니라 다양한 케리어를 통하여 레스베라트롤의 체내 흡수율을 높이는 연구도 진행되고 있다.
- 마. 기능성 식품개발의 경우 대부분 레스베라트롤을 함유하는 식품소재와 그 외 다양한 생리활성 식품소재와의 조성물 개발을 통하여 고혈압, 비만, 항산화, 염증 등의 효능을 표시할 수 있는 캡슐제품이 주를 이루고 있다. 최근 와인에 비하여 레스베라트롤을 1,000배 이상 함유하는 anti-ageing 음료가 출시되기도 하였다. 하지만 레스베라트롤을 다량 함유하는 천연물관련 소재개발 연구는 포도와 와인 추출물에 국한되어 효능 검증 없이 단순 추출물 형태로 개발되고 있는 실정이다.
- 바. 다국적 제약기업인 글락소(GlaxoSmithKline)社에 의해 2008년 인수된 서트리스(Sirtris)社는 레스베라트롤을 원료로 하여 합성 유도체를 개발하였는데, 이 유도체는 그동안 레스베라트롤이 갖는 활성을 1000배정도 증가시키는 특성이 있었고, 차세대 신약으로서 기대를 받았다. 그러나 독성/부작용이 있음이 밝혀져 2010년 5월 이후로 더 이상의 임상연구는 진행되지 않고 있는 상태로서, 그동안 부작용이 거의 없는 것으로 알려진 천연 레스베라트롤의 식의약품 소재로서의 가치를 더욱 높이게 되는 결과가 되고 있으며, 더욱이 천연소재인 새싹땅콩으로 개발된 기능성식품은 아직 전무한 상태이다.

### 3. 관련기술에 대한 선행연구결과

새싹땅콩이란 땅콩을 콩나물이나 숙주나물처럼 시설 내 암실에서 수시로 종자를 과중하여 수경재배를 통해 과중후 6-7일차에 수확하는 나물채소로, 본 연구사업의 주관기업인 농업회사법인(주)장수채는 국내와 해외(중국, 베트남, 우즈베키스탄, 태국)에 특허를 등록 보유하고 있다. (국내 특허 “땅콩나물 재배방법”, 제10-698489 호, 2007. 3. 15)



(새싹땅콩, 7일차)



또한 레스베라트롤 함량이 증가된 땅콩나물의 제조방법 (국내특허출원 : 10-2012-0094906), 나노 땅콩나물분말 제조관련 특허출원 (10-2012-92386), 그리고 땅콩나물 추출물의 이중미세 캡슐 분말제조 (10-2011-0120885)도 보유하고 있다.

본 연구사업팀의 주관기관인 농업회사법인 (주)장수채는 새싹땅콩 추출물을 이용한 건강기능성식품 개발을 위한 연구수행을 통하여 아래와 같이 추출물의 제조방법 및 항관절염, 항산화, 항비만, 아토피피부염에 대한 효능을 확인하였다. 또한 새싹땅콩추출분말, 새싹땅콩나물추출물의 미세캡슐화 및 분말의 특성 등의 개발연구를 수행한 결과를 기반으로 전립선염증의 예방효과를 확인하고 제품화할 과제가 요구되고 있다.

# 제 3 장 연구개발 수행 내용 및 결과

## 제1절 새싹땅콩 추출물의 시료분석 및 실험적 접근방법

### 1. 새싹땅콩 생산지별 레스베라트롤 함량 조사

새싹땅콩의 생산지별 레스베라트롤 함량을 조사한 결과 베트남, 중국산에 비하여 국내산(조광)이 4.22 µg/g으로 가장 우수한 것으로 나타났다.

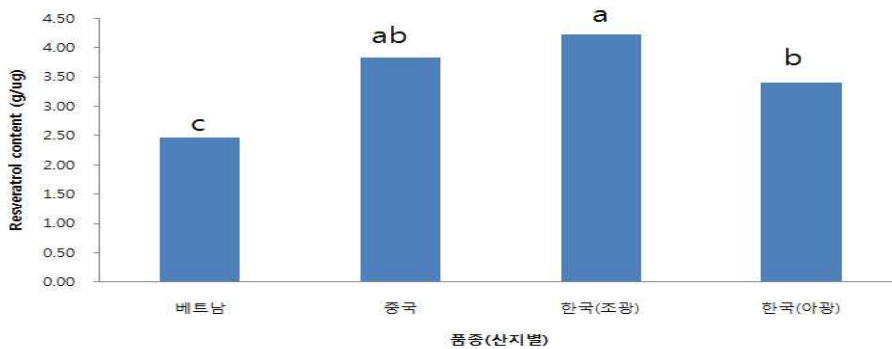


Fig. 1 새싹땅콩 생산지별 레스베라트롤 함량 비교

### 2. 에탄올 농도별 레스베라트롤의 추출효율 측정

새싹땅콩으로부터 생리활성성분인 레스베라트롤을 효율적으로 추출하기 위하여 60°C에서 90분간 에탄올의 농도별 레스베라트롤 함량을 측정한 결과 80% 에탄올에서 가장 높은 추출효율을 가지는 것으로 확인하였다.

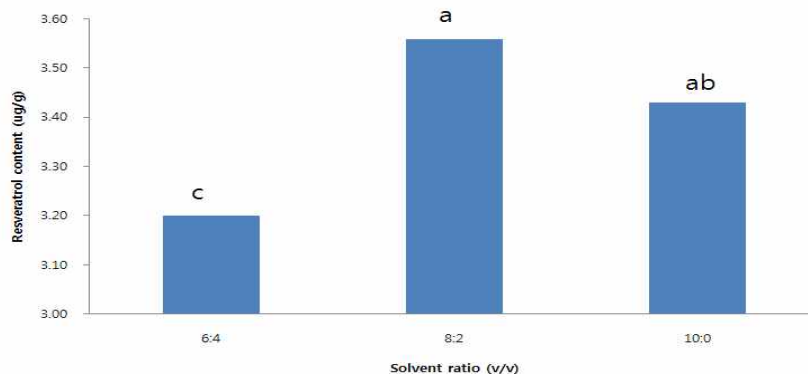


Fig. 2 에탄올 추출농도별 레스베라트롤 함량

### 3. 새싹땅콩 추출분말의 항산화 활성

새싹땅콩추출물의 동결건조 및 온도별 열풍건조를 통해 분말화하여 DPPH 라디칼의 환원력을 측정한 결과, 동결건조의 경우 100 µg/ml의 농도에서 90%이상으로 DPPH에 대해 매우

높은 환원력을 보였으며 열풍건조의 경우에도 50℃로 열풍건조할 경우 거의 유사한 활성을 나타냈다.

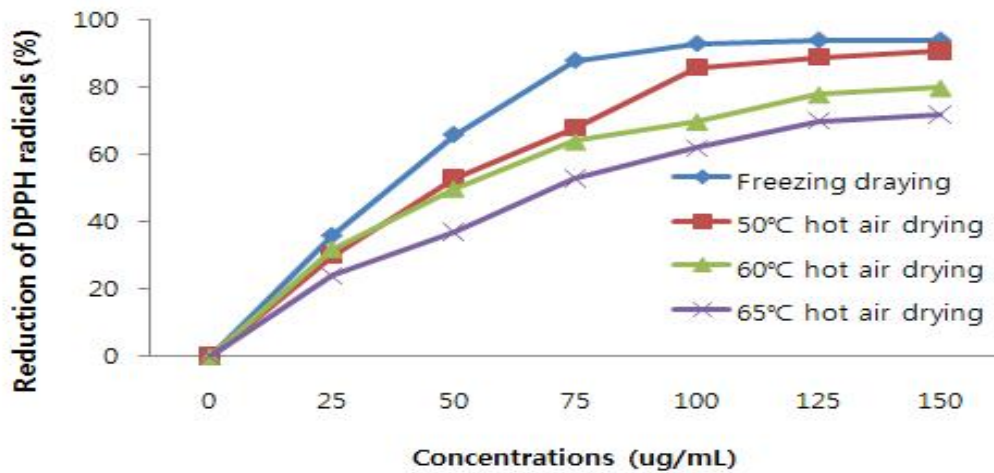


Fig. 3 새싹땅콩 추출물의 DPPH 라디칼 소거능

#### 4. 새싹 땅콩 추출물 섭취가 실험동물의 혈액지방 함량에 미치는 영향

5주간 고지방식이 섭취하면서 식염수를 섭취한 control군과 새싹땅콩 추출물을 매일 15 mg/kg 섭취한 군(RS15) 및 30 mg/kg 섭취한 군(RS30)의 혈장내 지방함량을 측정 한 결과, RS30군이 대조군과 RS15에 비하여 낮아지는 것을 확인할 수 있었다.

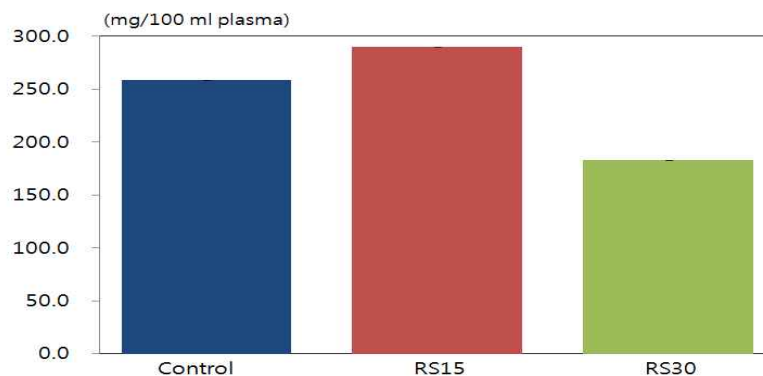


Fig. 4 새싹땅콩 섭취에 따른 고지방식이 마우스의 혈장내 총 지방량의 변화

#### 5. 아토피 피부염 유도 마우스에서의 새싹땅콩 추출물의 영향

Hairless 마우스에 1% DPCP (Diphenylcyclopropanone) 100  $\mu$ l를 도포하고 일주일 후부터 0.5%로 농도를 낮추어 5주간 이들에 한번씩 도포한 결과 1 % DPCP 사용 4일째부터 등 피부가 벗겨지기 시작하고 2주차부터 심한 피부염이 유발되었음. 그러나 DPCP와 REPS (새싹땅콩추출물 함유 연고)를 함께 도포한 마우스에서는 피부가 건조하기는 하였으나 아토피 피부염유도가 현저히 줄어드는 것을 확인할 수 있었다.

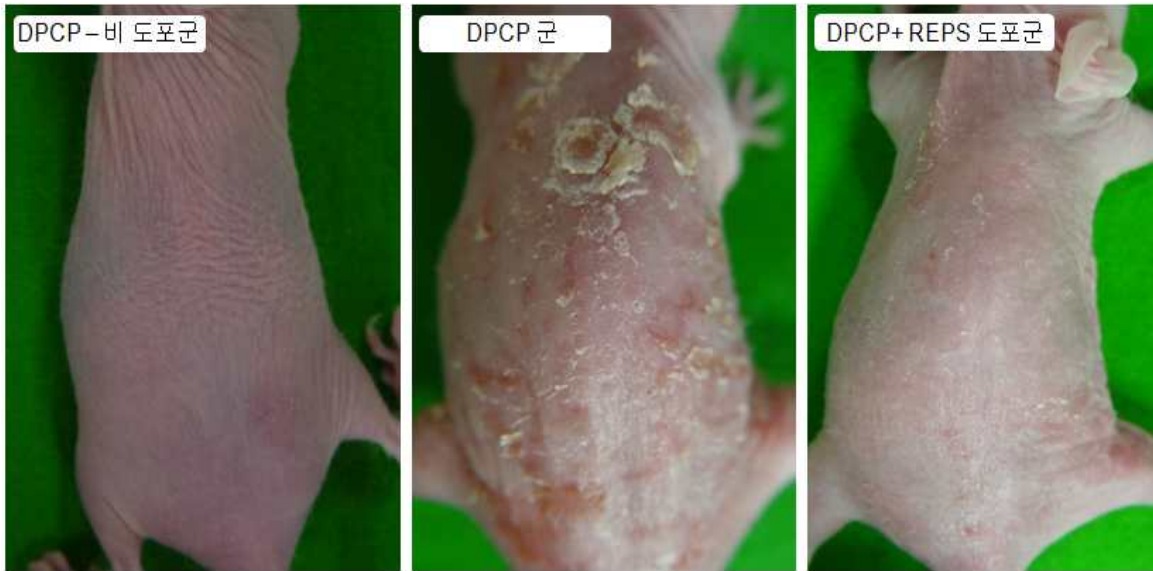


Fig. 5 DPCP에 의해 유도된 아토피 피부염에 대한 새싹땅콩 추출물(REPS)의 영향

- ① 레스베라트롤은 항암, 항염증, 항바이러스, 신경보호, 항노화 등 다양한 생리활성이 알려져 있으며 특히 항전립선염 및 관절염에 대한 효능이 좋은 것으로 보고되고 있음. 상기의 선행연구결과로 포도보다 23배 이상 레스베라트롤을 함유하는 새싹땅콩의 항산화 및 항염증 효능이 뛰어난 것을 확인할 수 있었다.
- ② 이러한 새싹땅콩의 효능은 전립선염유발 억제 및 염증예방과 매우 밀접한 관련을 가지고 있으므로, 새싹땅콩의 in-vitro, in-vivo 생리활성연구 및 소재의 표준화를 통한 전립선염예방 기능성 제품개발 가능성은 매우 높을 것으로 기대된다.

## 6. 새싹땅콩 추출물의 미세캡슐화

### 가. 사진 관찰

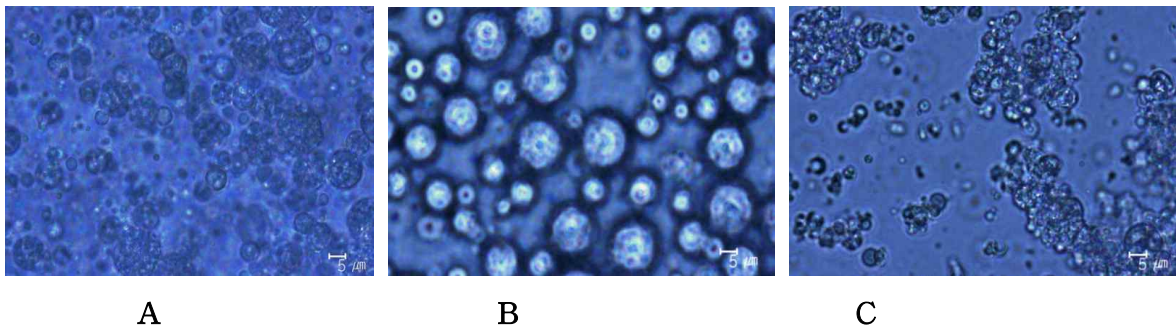


Fig. 6 Microphotographs of W/O/W double emulsion for peanut sprout extracts

Core material: Extract of peanut sprout 1mg/mL

Coating materials: A. 30% Whey protein concentrate (WPC)

B. 30% Maltodextrin (MD, DE 18)

C. 30% Arabic gum (AG)

새싹땅콩 추출물을 미세캡슐의 모양은 구형으로 작은 입자와 큰 입자가 모여 분포된 상태로 존재하는 현상으로 관찰되었으며, 크기는 3~10 $\mu$ m범위로 관찰되었다.

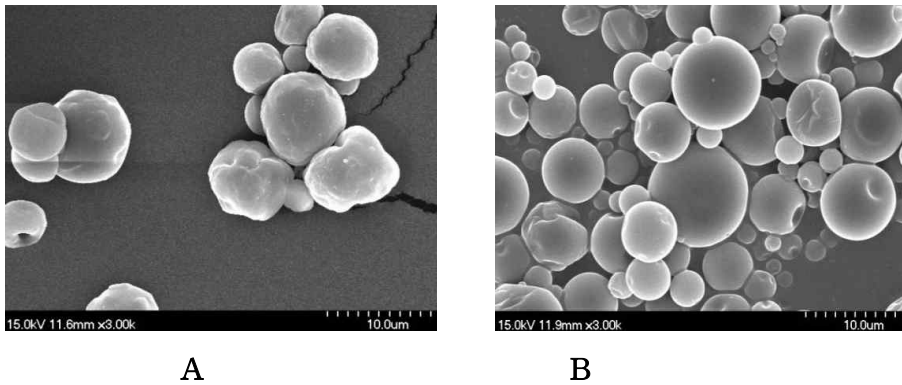


Fig. 7 Scanning electron microphotographs of spray-dried microcapsules for peanut sprout extracts

Core material: Extract of peanut sprout 1mg/mL

Coating materials: A. 30% Maltodextrin (MD, DE 18)

B. 30% Whey protein concentrates (WPC)

#### 나. 새싹땅콩 추출물의 미세캡슐 입자 크기 분포

WPC로 피복한 분말은 1.275-2.86 $\mu$ m는 30%이상, 8.590  $\mu$ m이상 80%이상으로 가장 많이 분포가 되어 비교적 작은 캡슐생산이 가능하다..

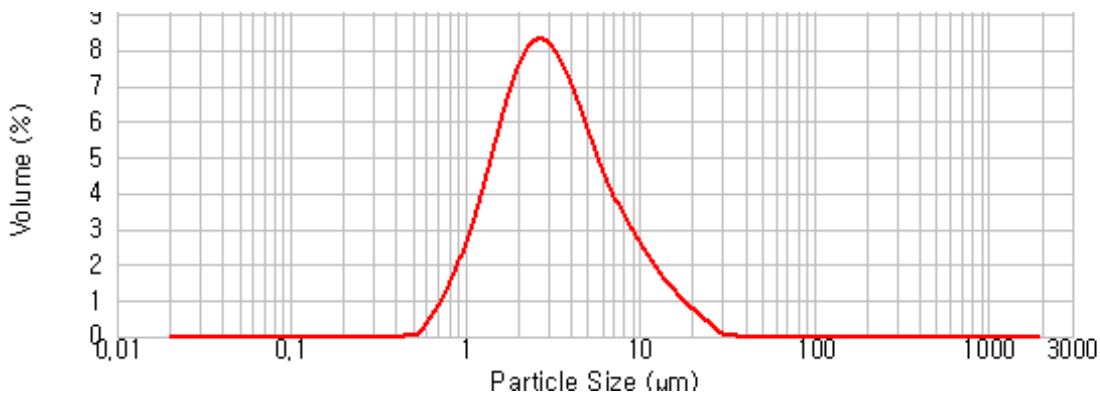


Fig. 8 Particle size of spray-dried microcapsules for peanut sprout extracts

**다. 새싹땅콩추출물의 미세캡슐 분말의 이화학적 특성**

- (가) WPC로 피복한 새싹땅콩추출물의 미세캡슐화 분말의 수분함량은 1.33%으로 소량이며 안정적이었다.
- (나) WPC로 피복한 새싹땅콩추출물의 미세캡슐화 분말은 89.01%의 높은 수율이 나타났다.

**라. 새싹땅콩추출물 미세캡슐 분말의 안정성**

- (가) 에멀전 상태인 미세캡슐의 제타 전위 값이 -41mV이고, 분말 상태인 미세캡슐의 제타 전위의 값은 -35mV으로 안정한 경향을 보였다.
- (나) 새싹땅콩추출물 미세캡슐분말은 4, 20°C에서 저장 후 10일까지는 안정성이 85% 범위의 높은 안정성을 보였다.

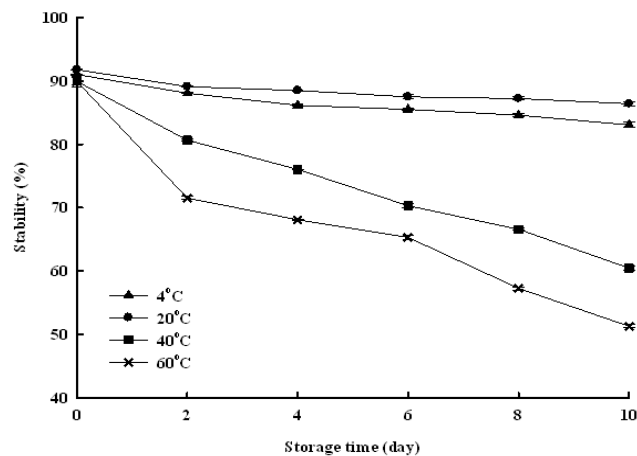
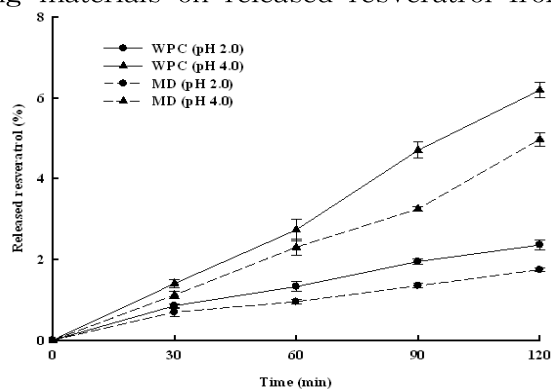


Fig. 9 Effect of temperature on the stability of microcapsules for peanut sprout extracts

**마. 새싹땅콩추출물 미세캡슐분말의 *in vitro* 방출량**

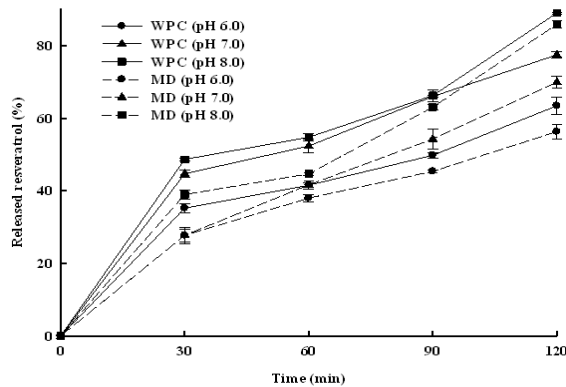
- (1) 새싹땅콩추출물 미세캡슐 분말의 인공위장에서 방출량은 pH 2.0에서 반응 30분 후 새싹땅콩추출물 미세캡슐 분말은 0.89%, 120분 반응 시간 후 2.48%로 극소량의 새싹땅콩추출물 이 유리되었으며, pH 4.0에서는 새싹땅콩추출물 미세캡슐 분말은 30분 후 1.3%가 유리 되었고, 120분 후 7.01%가 유리된다.

Fig. 10 Effect of coating materials on released resveratrol from powdered microcapsuled of



peanut sprout in vitro in simulated gastric condition (pH 2.0, 4.0)

(2) 새싹땅콩추출물 미세캡슐 분말의 인공소장에서 방출량은 pH 6.0에서 30분 일 때 36.05%가 유리되었고, 120분 후에는 61.07%가 유리되었으며, pH 7.0일 때 43.77%가 방출 되고, 120분 후에는 78.36%가 유리되었으며, pH 8.0에서는 30분 일 때 49.07%가 유리되었고 120분 후에는 89.24%가 유리되었다. 캡슐화 된 새싹땅콩추출물 을 섭취할 경우, 80% 이상의 새싹땅콩추출물 이 유리되어 소장의 상피세포에서 효과적으로 흡수가 일어날 것이



다.

Fig. 11 Effect of coating materials on released resveratrol from powdered microcapsuled of peanut sprout in vitro insimulated small intestinal condition (pH 6.0, 7.0, 8.0)

(국내특허출원 “땅콩나물추출물을 포함하는 이중미세캡슐분말, 이의 제조방법 및 용도”  
 , 번호: 10-2011-0120885)

## 제2절 고농축 새싹땅콩 추출물속 레스베라트롤의 분석법 확립

### 1. 새싹땅콩 추출물의 농축 방법

다음은 고농축 땅콩나물 추출물의 농축 방법을 나타내었다.

건조 새싹땅콩 20 Kg → 증숙 (95℃, 4 hrs) → 냉각 (40℃, 4 hrs) → 증숙 (95℃, 4 hrs) → 냉각 (40℃, 4 hrs) → 물 추출 (100℃, 6~8hrs) → 감압 증류 (95℃, 48~60hrs) → Storage

(국내특허출원 “레스베라트롤의 함량이 증가된 땅콩나물의 추출방법”, 번호:  
 10-2012-0094906)

### 2. HPLC를 이용한 새싹땅콩 농축액의 레스베라트롤 분석

- 레스베라트롤을 표준물질로 한 정량분석

레스베라트롤의 chromatogram은 Figure 12이며, 표준물질의 머무름 시간은 12.985분으로 측정되었다.

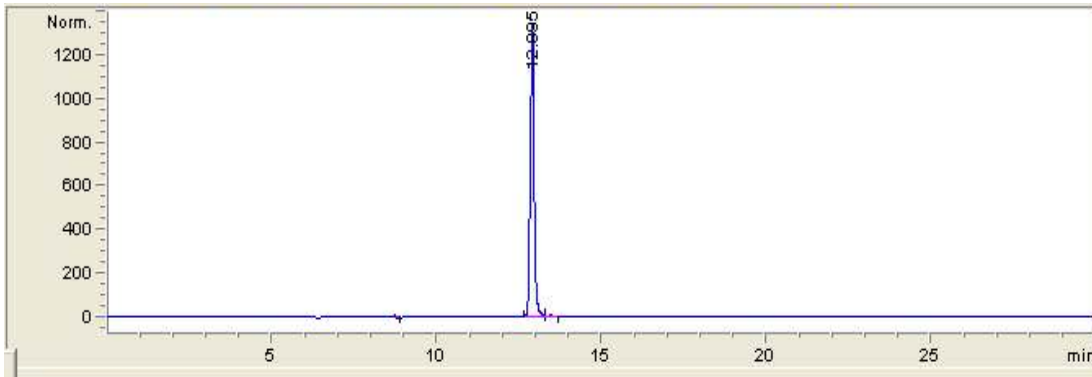


Fig. 12 Chromatogram of trans-resveratrol from standard

- 새싹땅콩 농축액의 레스베라트롤 정량 분석

(가) 용매

분석결과 처리용매로 water가 가장 낮은 레스베라트롤 함량이 나타났으며, 에탄올 용매 추출에서는  $153.36 \pm 0.94$  ug/ml로 가장 높은 함량을 나타내었다 (Table 1).

Table 1. Effect of resveratrol concentration on different extraction solvents for peanut sprout extracts<sup>1)</sup>

Brix	Extraction solvents		
	Water	80% methanol	Ethanol
60	$82.79 \pm 2.61$	$119.3 \pm 2.22$	$153.36 \pm 0.94$

<sup>1)</sup> Mean $\pm$ SD (n=3)

(나) 처리 방법

Table 1의 결과로 가장 높은 레스베라트롤 함량을 나타낸 ethanol을 사용하여 각 처리 방법(vortexing, sonication, ultrasonication)별로 정량 분석을 실시하였음. 분석결과, 처리 방법으로써 농축액을 voltexing만 했을 때 레스베라트롤 함량이 가장 낮았으며, ultra-sonication 처리를 했을 때 가장 높은 함량을 나타내었다.(Table 2)

Table 2. Effect of resveratrol concentration on different extraction methods for peanut sprout extracts<sup>1)</sup>

Brix	Extraction methods		
	Voltexing	Sonication	Ultra-sonication
60	$82.96 \pm 3.95$	$150.44 \pm 1.57$	$153.36 \pm 0.94$



<sup>D)</sup> Mean±SD (n=3)

본 실험의 결과를 요약하면, 고농도 레스베라트롤 함유 새싹땅콩 농축액은 새싹땅콩에 증숙 (95°C, 4 hrs) 과정 2회를 반복하고, 물 추출(100°C, 6~8 hrs)하여 제조하였음. 위 조건으로 제조된 농축물로 HPLC를 이용한 레스베라트롤 정량 분석을 하였을 때 ethanol을 1:10 (w/v) 비율로 ultra-sonication추출한 처리구가 가장 높은 레스베라트롤 함량을 나타낸다.

### 3. 동물실험을 통한 새싹땅콩 나노분말의 효과

가. 샘플을 급여하면서 일주일에 한번 씩 육안을 통하여 관절염 정도를 각 발에 0~4점 부여하였음. 그 결과는 Figure 13과 같다. 5주째에 관절염 정도가 가장 심하였으며, 관절염 치료제 MTX군의 경우 가장 증상의 호전도가 컸으며, 새싹땅콩분말과 새싹땅콩 나노분말에서도 CIA군에 비해 0.5점 정도 더 호전된 것으로 나타났다.

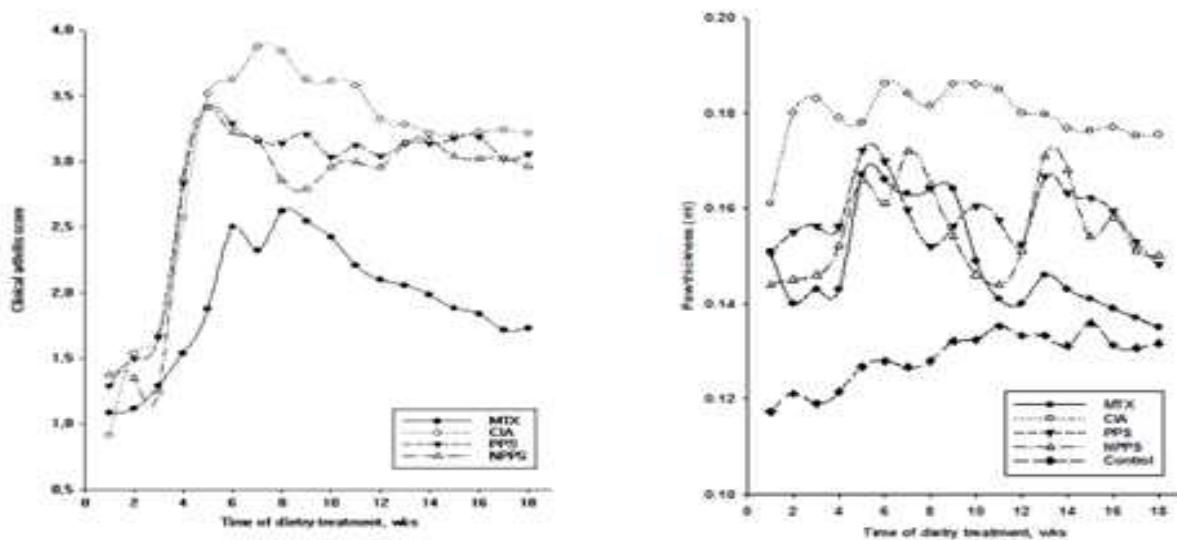


Fig. 13 Absolute clinical arthritic score and paw thickness of all groups.

MTX; methotrexate, CIA; collagen-induced arthritis, PPS; powdered peanut sprout,

NPPS; nanopowdered peanut sprout

나. 샘플을 급여 하면서 일주일에 한번 씩 부종 측정기를 통하여 오른쪽 뒷발의 부피정도를 측정하여 나타냈고, 그 결과는 Figure 13과 같음. 새싹땅콩 나노분말군이 CIA군에 비해 약 0.01ml 정도 낮은 것으로 나타났다.

다. 실험 종료 후 비장을 취하여 무게를 측정한 뒤 비장인덱스 값을 구하였음. 그 결과 CIA 그룹이 1.8정도로 가장 높았고 관절염 치료제인 MTX그룹의 비장지수는 1.27로 가장 낮았음. 또한 NPPS투여 그룹의 비장지수는 1.4로 MTX그룹보다는 높았지만 PPS 그룹보다 낮은 수치를 보인 것을 알 수 있었음. 비장인덱스 값으로 염증질환의 정도를 알 수 있는데 CIA군에 비해서 새싹땅콩 나노분말을 투여한 그룹에서 비장인덱스 값이 낮은 것을 알 수 있었다(Fig. 14).

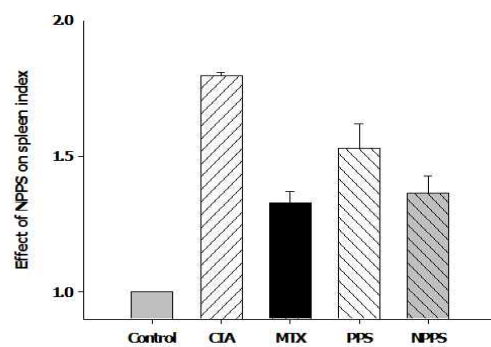


Fig. 14 Effect of Nanopowdered peanut sprout on the spleen indexes in CIA mice.

라. 병리학적 분석 결과는 대조군에서는 정상적인 관절연골조직이 관찰되었으며, CIA군에서는 관절연골조직의 변형이 관찰되었음. 새싹땅콩 나노분말군에서는 관절연골조직의 변형정도가 CIA군에 비해 심하지 않은 것으로 관찰되었다. (Fig. 15).

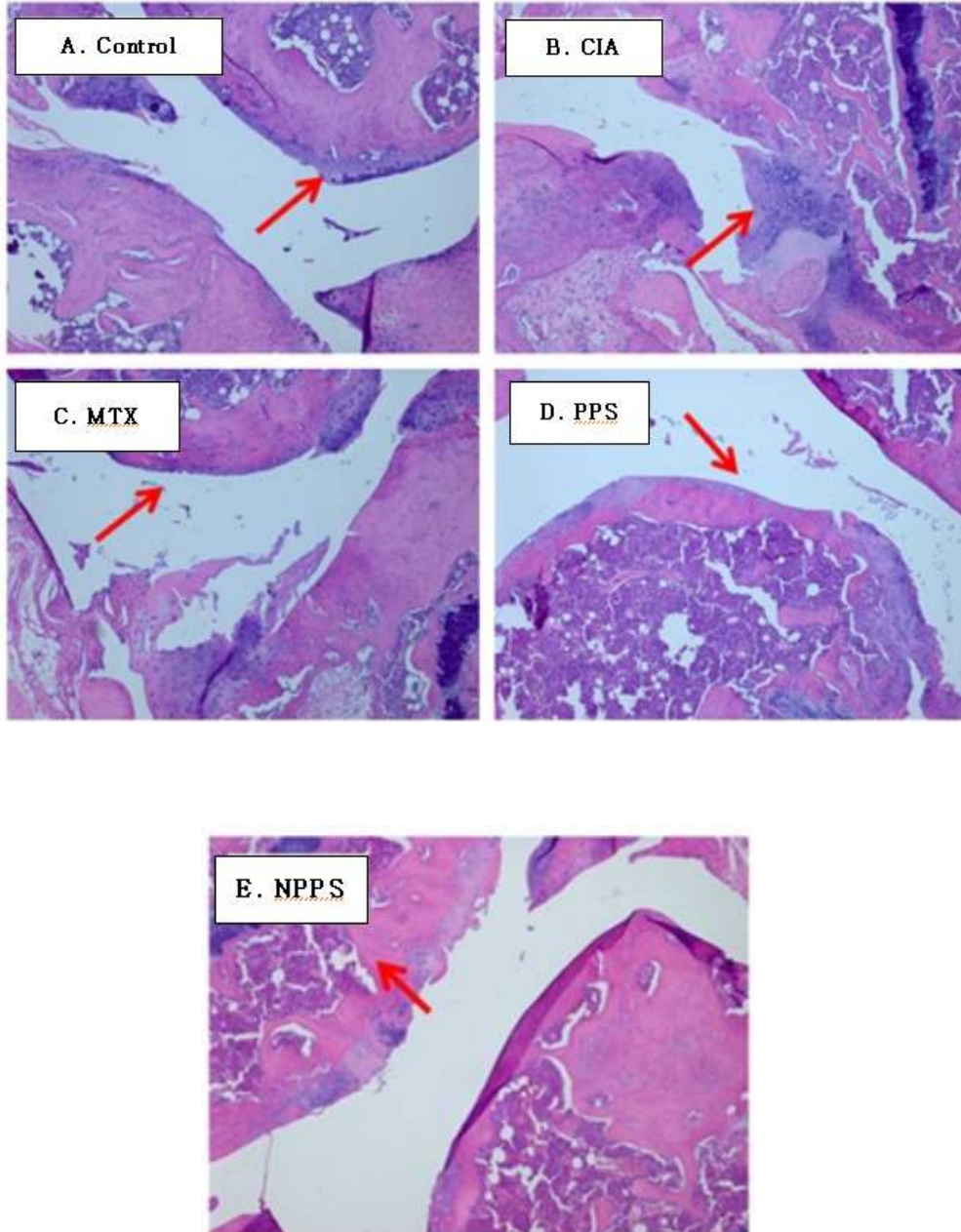


Fig. 15 Histologic changes in knee joint of all groups.

(A); control group, (B); collagen-induced arthritis group, (C); methotrexate group, (D); powdered peanut sprout; (E); nanopowdered peanut sprout

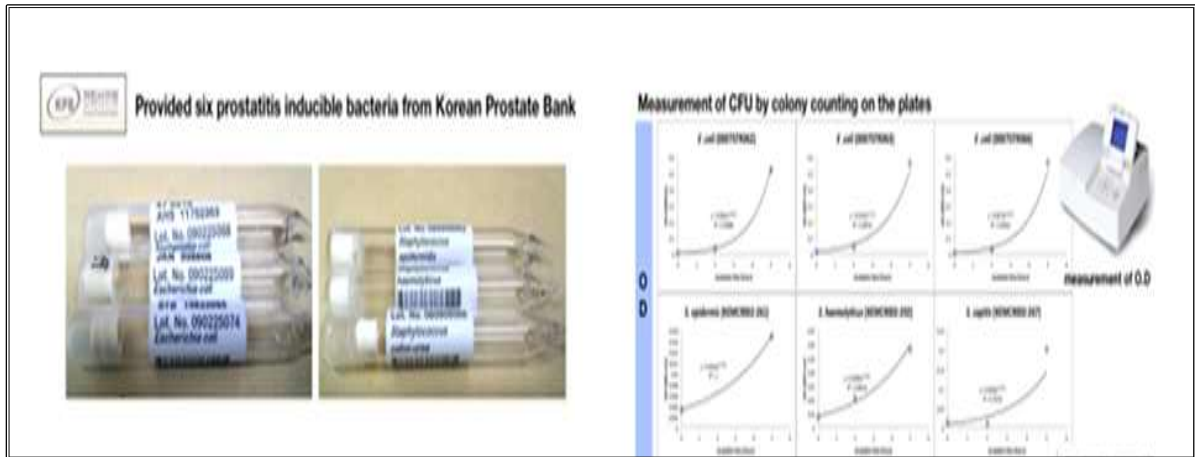
### 제3절 동물모델을 이용한 새싹땅콩의 전립선염 예방 기능연구

#### 1. 인체 전립선염증 유발 세균 확보 및 염증유발 정도 확인

##### 가. 인체 전립선염증 유발 세균 확보

본 연구진은 세균성 전립선염에서 절반 이상의 감염을 유발시킬 수 있는 *E. coli* 3종과,

그람 음성균 3종 총 6종을 구할 수 있었으며, 이들 박테리아는 실제로 박테리아성 전립선염을 앓은 환자로 부터 확보된 균주이다.



**나. 모델마우스 개발 전의 세균유래 LPS 주입에 따른 전립선 염증 유발 정도 확인.**

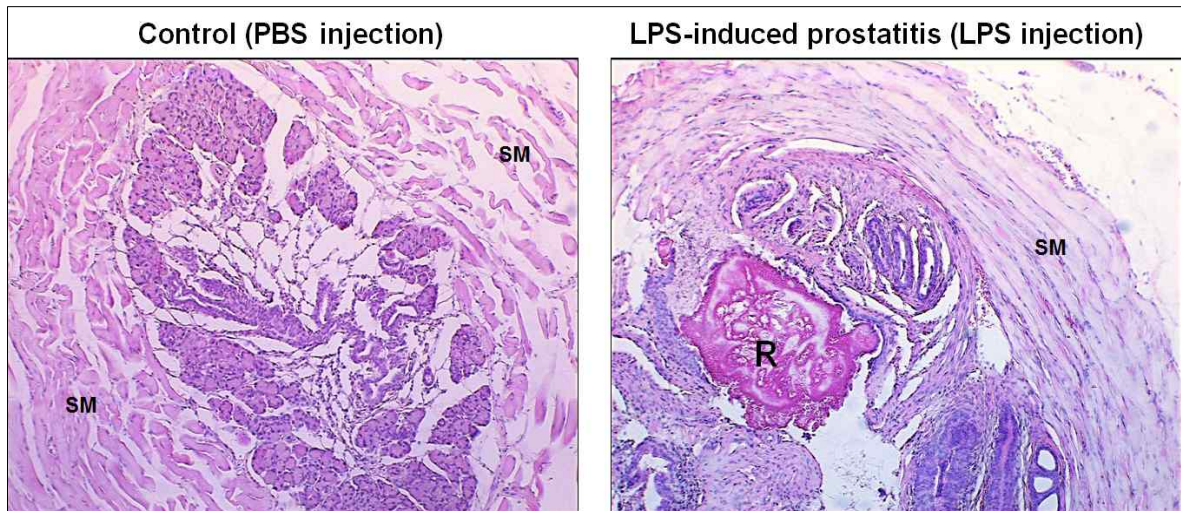
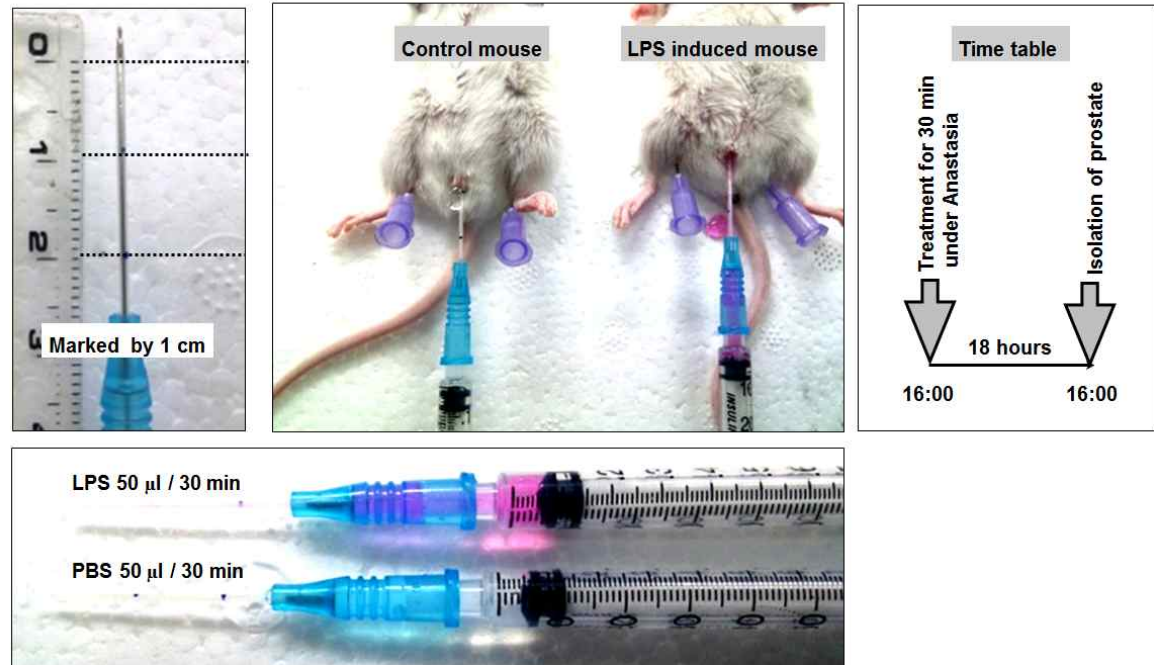
**(1) 연구배경 및 필요성**

인체유래 전립선염 세균을 확보하였으나 동물에서 전립선 염증 유발 시에 조직학적 변화의 양상과 전립선 세균 주입 방법에 대한 사전 연구가 필요하였다. 이는 동물을 대상으로 하기에 본 실험을 진행하기 전에 사전 스크리닝 실험을 진행한 것으로 많은 동물의 희생을 미리 막고 안정된 실험 조건을 확립하기 위함이다.

**(2) 연구내용 및 결과**

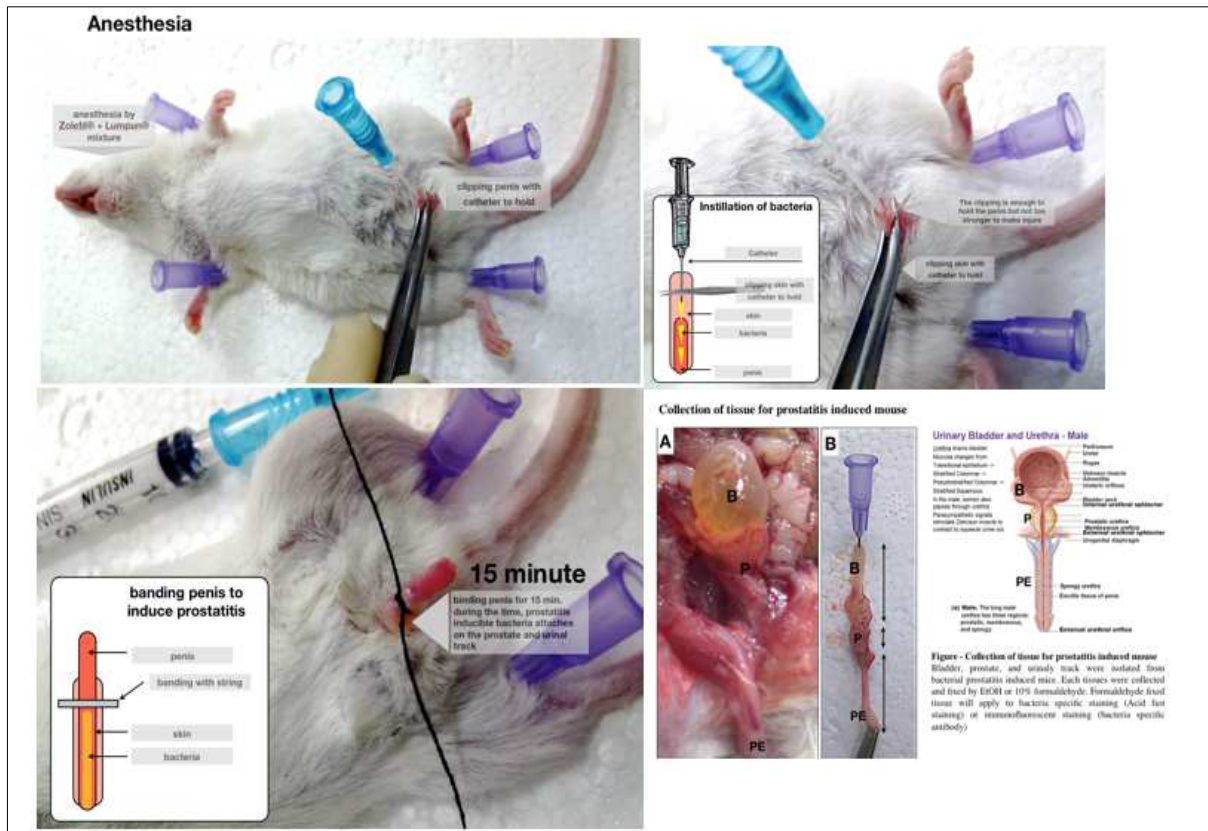
- (가) 세균 유래 LPS에 처치된 마우스의 전립선 염증 유발 결과를 확인하였다. 병리학적 조직소견을 확인하였으며, 그 결과, 우리 연구진의 실험 조건에서 전립선조직에 염증세포가 침윤됨을 확인할 수 있었다. (동물에서의 전립선염 유발 확인)
- (나) LPS를 통해서 전립선염을 유발하는데 까지 18시간이 걸리는 단기 염증 유발 방법이다.
- (다) 위의 결과를 통해서 볼 수 있는 것은 PBS처리 그룹에서는 염증세포가 침윤되지 않았으나, LPS를 처리한 뒤 18시간 뒤에는 염증세포가 전립선주변에 침윤됨을 확인하였다. 즉, 우리의 실험 방법에 의하여 전립선 염증이 유발됨을 확인하였다.

**Prostatitis induced by LPS in mouse**



**2. 세균주입에 의한 전립선염 유발 모델마우스 확보.**

가. ICR마우스를 이용한 전립선염 유발 모델 마우스 확보



(1) 실험 배경

- ICR마우스에 *E. coli* 066 (= *E. coli* 292)와 *S. haemolyticus*를 이용하여 감염을 시켰다.
- 감염의 정도를 확인하기 위하여 7일차, 9일차에 각각 urine을 확보하여 colony를 확인하였다.

(2) 실험내용 및 결과

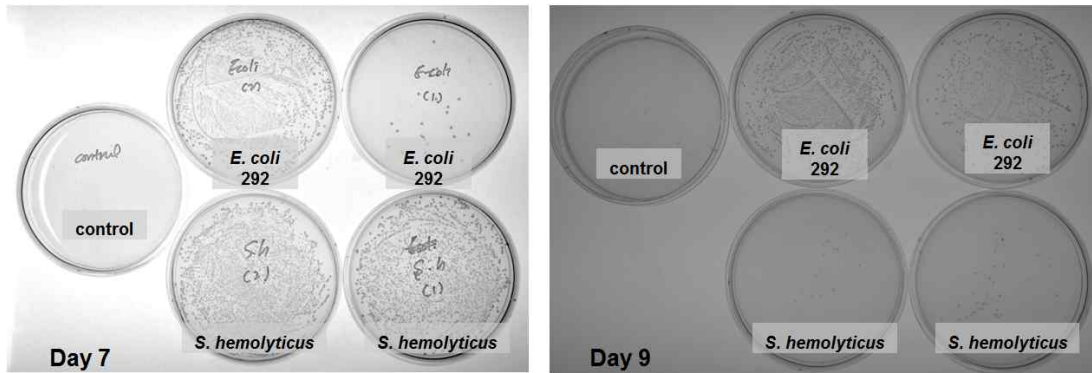
- 환자에서 분리한 전립선염 유발 세균들 중 *E. coli* 066 (= *E. coli* 292)과 *S. hemolyticus*에 대하여 콜로니 형성 능력을 조사하였다.
- 아래의 결과에서 보듯이, *E. coli*는 지속적으로 균의 증식이 확인되었는데 비하여, *S. hemolyticus*는 7일 이후로 점점 균의 증식능이 사라지는 것을 확인하였다. 따라서 만성 전립선염증 유발 실험에서는 *E. coli*에 의한 염증 유발 모델 확보가 좋은 것으로 확인되었다.

(가) *E. coli*는 지속적으로 9일까지도 urine에서 확인되었다.

(나) *S. haemolyticus* 는 7일까지 확인이 되었지만, 9일차에서 상당수 감소됨이 나타났다.

(다) 따라서 본 연구를 통해서 *E.coli*가 좀 더 적합함을 확인하였다.

Urine bacteria after infection of two strains: *E. coli* 292 and *S. hemolyticus*

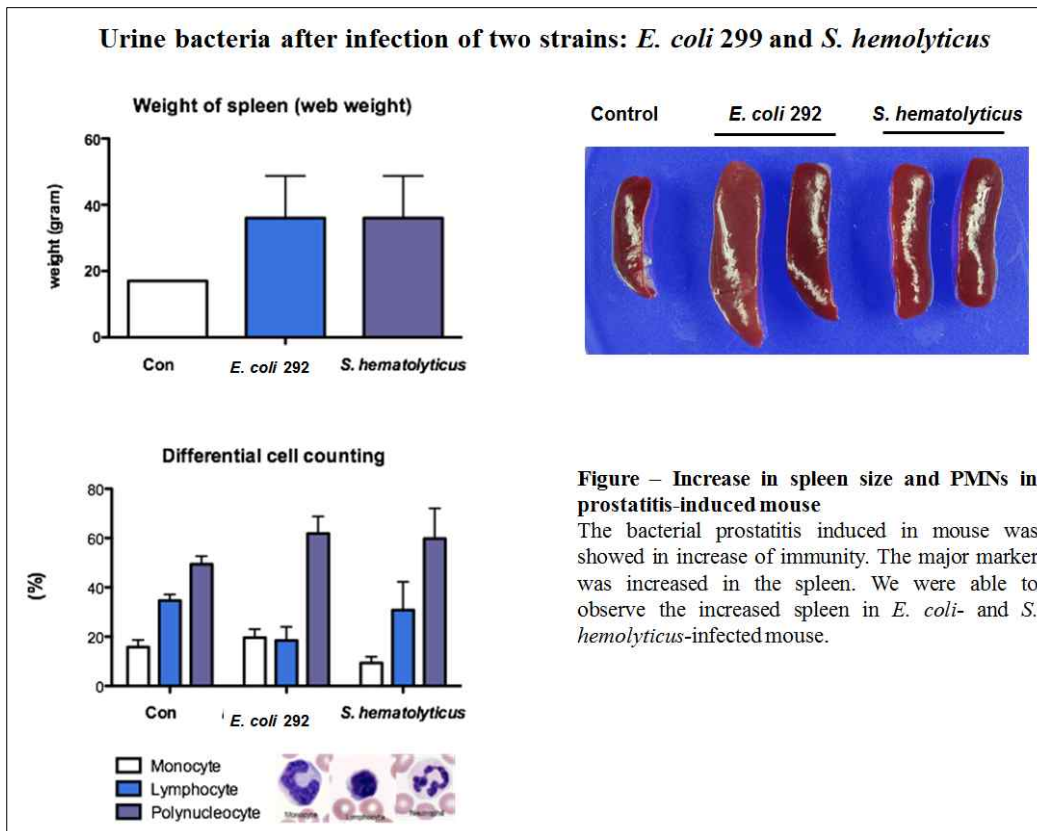


	Con	<i>E.coli</i> (1)	<i>E.coli</i> (2)	<i>S. hemolyticus</i> (1)	<i>S. hemolyticus</i> (2)
Day 7	-	++	+	++	++
Day 9	-	++	++	+	+

- 세균 감염 후의 비장에서 면역반응 확인

(가) 감염된 그룹에서 면역반응을 확인하기 위하여 spleen의 크기를 측정하여 보았다.

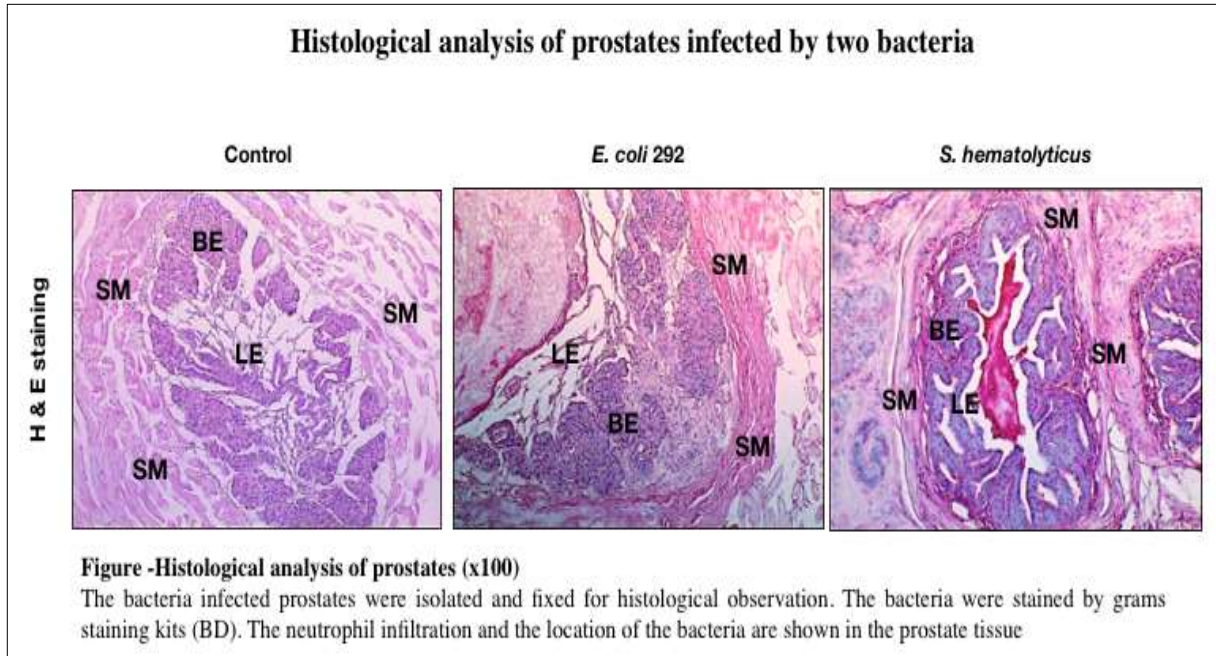
(나) 그 결과, 감염된 그룹에서 모두 spleen의 크기가 증가함을 확인하였으며, 혈액에서도 염증세포의 수가 증가하였음을 확인하였다. 이는 감염 시 나타나는 생체 반응의 시작으로 동물에서 전립선염세균에 의한 감염이 있었음을 나타낸다.



- 세균 감염 후의 전립선 조직에서의 염증 소견 확인

(가) 병리학적인 조직 검사 결과, LPS에 의한 전립선유발 마우스 모델과 마찬가지로 면역세포가 동일하게 침윤됨을 확인하였다.

(나) 두 종의 박테리아 가운데 *E coli*가 좀 더 적합함을 확인하였다.



나. BALB/c 마우스를 이용한 전립선염 유발 모델 마우스 확보.



## Bacteria-induced acute prostatitis

Acute infection model BALB/c mice with bacterial prostatitis

Positive  
N = 3

EPS treatment (1%) group  
N=3

EPS treatment (5%) group  
N=4



Figure. Bacteria-induced acute prostatitis model (BALB/c) mice : Acute prostatitis animal model was prepared by 3 groups.

### (1) 연구 배경

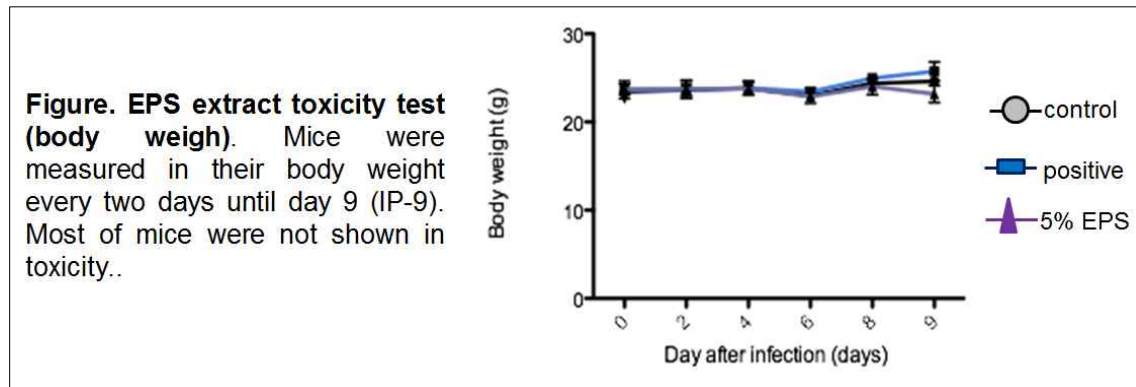
(가) ICR마우스가 아닌 BALB/c 마우스를 이용하여 실험을 진행하였다. 이는 유전형이 동일한 상태로 기타의 요인을 밝히는데 inbred strain 인 BALB/c가 더 적합하므로 마우스를 교체하여 실험을 실시하였다.

(나) BALB/c 는 H2 type이 C 형인 inbred mice이다.

### (2) 연구 내용 및 결과

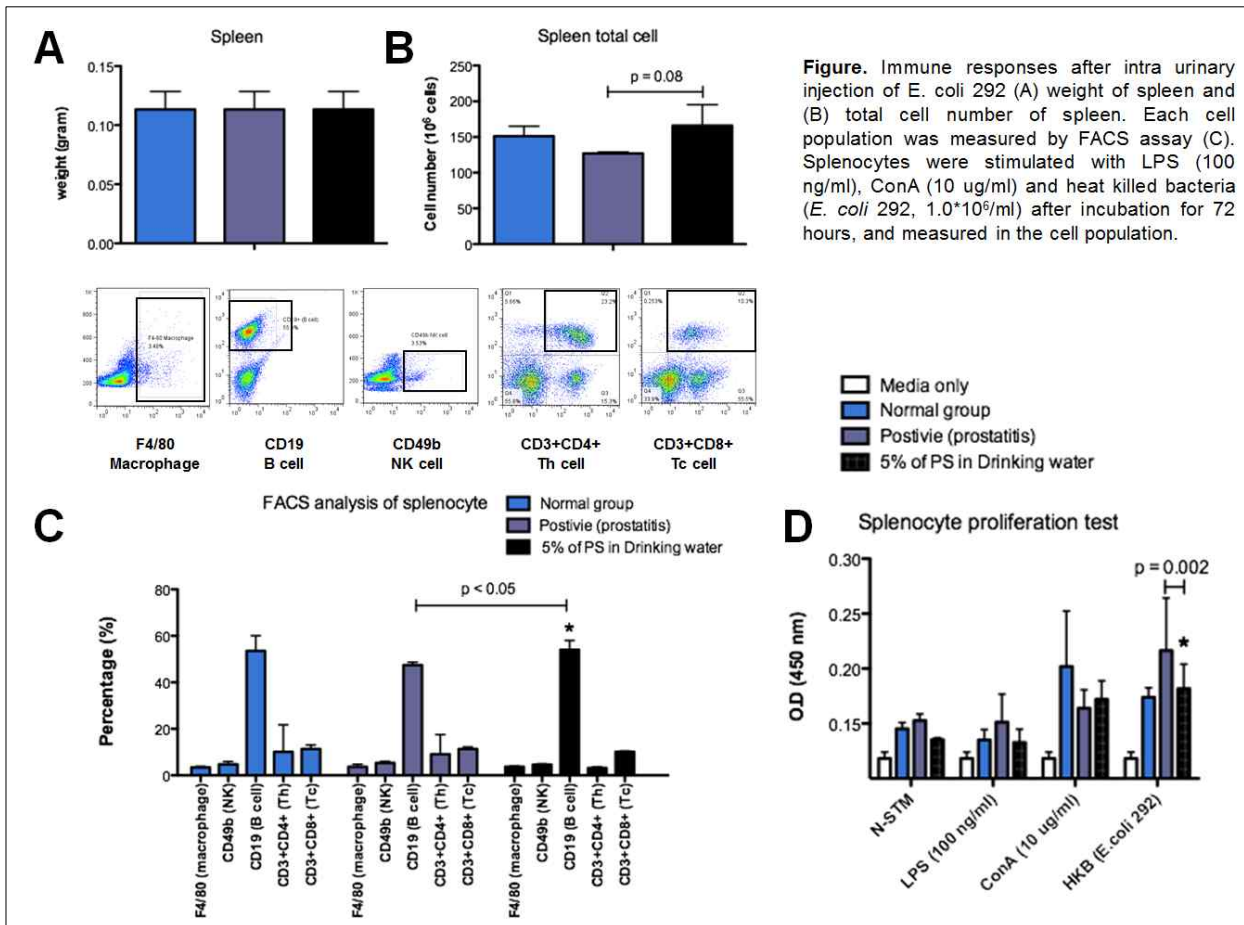
(가) 그룹은 normal group, positive group, EPS treated groups으로 구분하여 실험하였다.

(나) 우선 9일간 treatment 하였을 때, 5%의 EPS를 처리한 그룹에서의 체중변화가 보이지 않았으며, 이는 EPS에 대한 생리학적 독성효과가 5%의 EPS에서는 나타나지 않음을 보여준다.



### (3) 면역학적 변화 연구

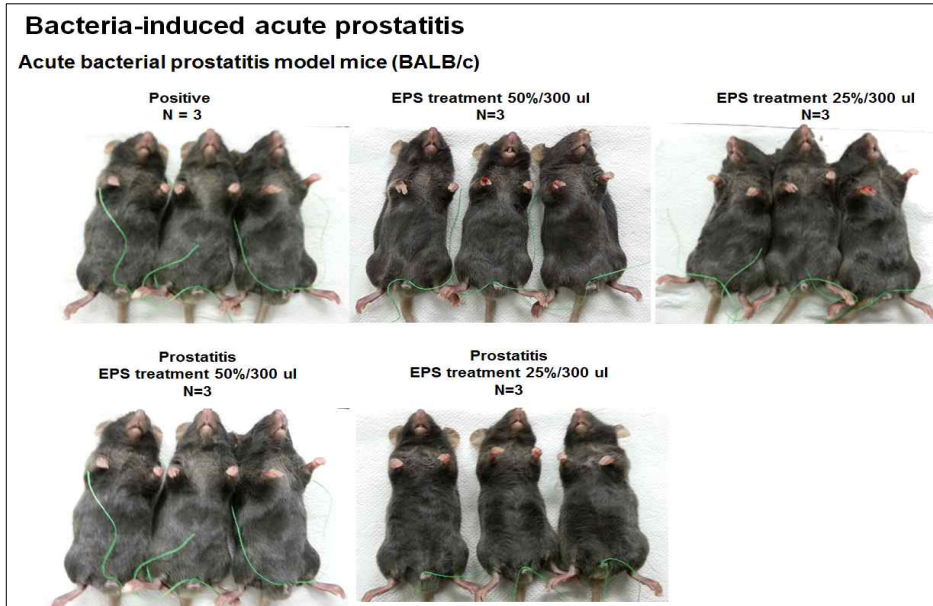
- (가) BALB/c 7주령 수컷 마우스를 실험 대상으로 하였다.
- (나) Spleen의 크기는 ICR 마우스에 비하여 차이가 없었으며, 오줌을 통한 세균의 배출은 감염 후 9일까지 지속적이지 않았다.
- (다) 면역반응을 살펴본 결과, CD19<sup>+</sup> B cell이 유의적으로 증가함을 확인하였으며, splenocyte에 대한 mitogenic effect가 유의적으로 감소하였음을 72시간동안 배양 실험을 통해 확인하였다. 이는 BALB/c 마우스 종의 특성상 체액성 면역반응이 강화되는 유전자형의 동물이기에 이에 따른 결과로 해석된다.
- (라) 기존에 사용한 박테리아의 양과 동일하게 10<sup>8</sup> 세균을 넣어주었지만 위의 결과는 마우스의 종간의 유전적 차이에 의한 면역특성에 의한 영향이 미친 것으로 생각되어 다음으로는 세포성 면역반응이 잘 나타나는 C57BL/6 마우스로 변경하여 실험을 진행하였다.
- (마) 본 연구에서 전립선염증에 대한 면역반응의 관여가 또한 중요할 것으로 생각되어 최적의 전립선염 동물모델을 만들기 위하여 본 연구에서는 ICR, BALB/c, 그리고 C57BL/6 마우스를 이용하여 연구를 수행하였고, 그 결과를 비교하였다.



다. C57BL/6 마우스를 이용한 세균성 전립선염 유발 모델 마우스 확보.

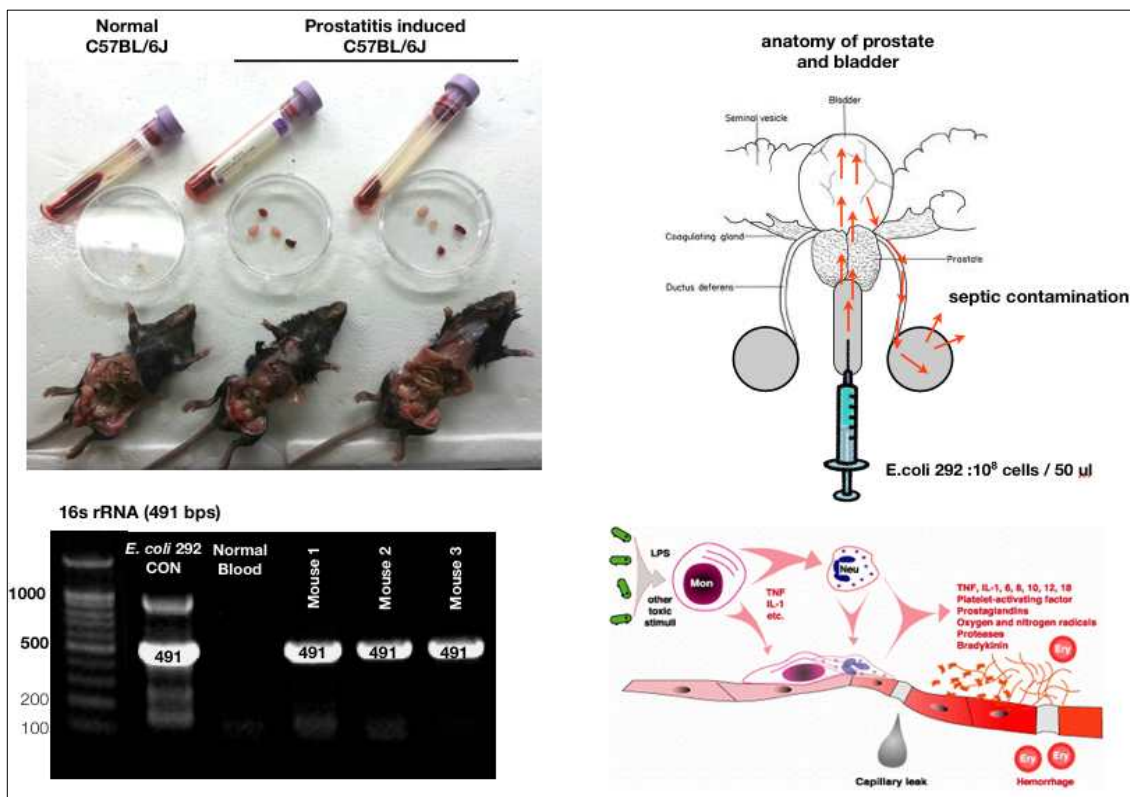
(1) 연구 내용 및 결과

(가) C57BL/6 마우스에  $2 \times 10^8$  세균을 전립선에 주입한 후 결과를 확인하였다.

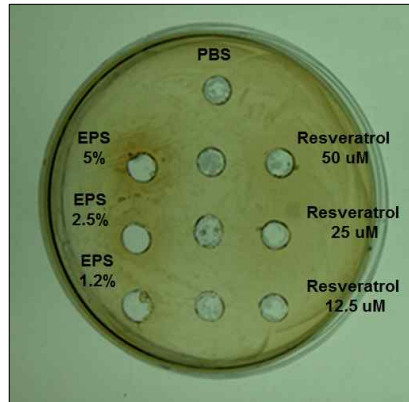


(나) 마우스는 24-36 시간 내에 septic shock로 죽었다.

(다) septic shock의 여부를 확인할 수 있는 방법으로, 비장, 고환, 방광, 혈액 등을 채취하였으며, 특히 혈액 내에 전립선세균이 증식함을 통하여, septic shock 이라는 것을 확인하였다.



(라) 다음 실험은 새싹땅콩추출물(EPS)과 레스베라트롤이 항세균 효과가 있는 지를 조사하였다. 연구 결과, 레스베라트롤 자체보다도 새싹땅콩추출물이 5%의 농도에서 세균을 죽일 수 있음을 확인하였다. 아래의 데이터는 세균이 포함된 배지에 구멍을 뚫어 EPS를 넣은 결과이며, 5% EPS에서 주위 껍데에 세균이 죽어 있음이 확인되었다. 이 결과는 EPS농도 의존적이며, 순수한 레스베라트롤보다도 효과가 있음이 확인되었다.



### 3. 새싹땅콩추출물(EPS)에 대한 항염증반응 효과 확인

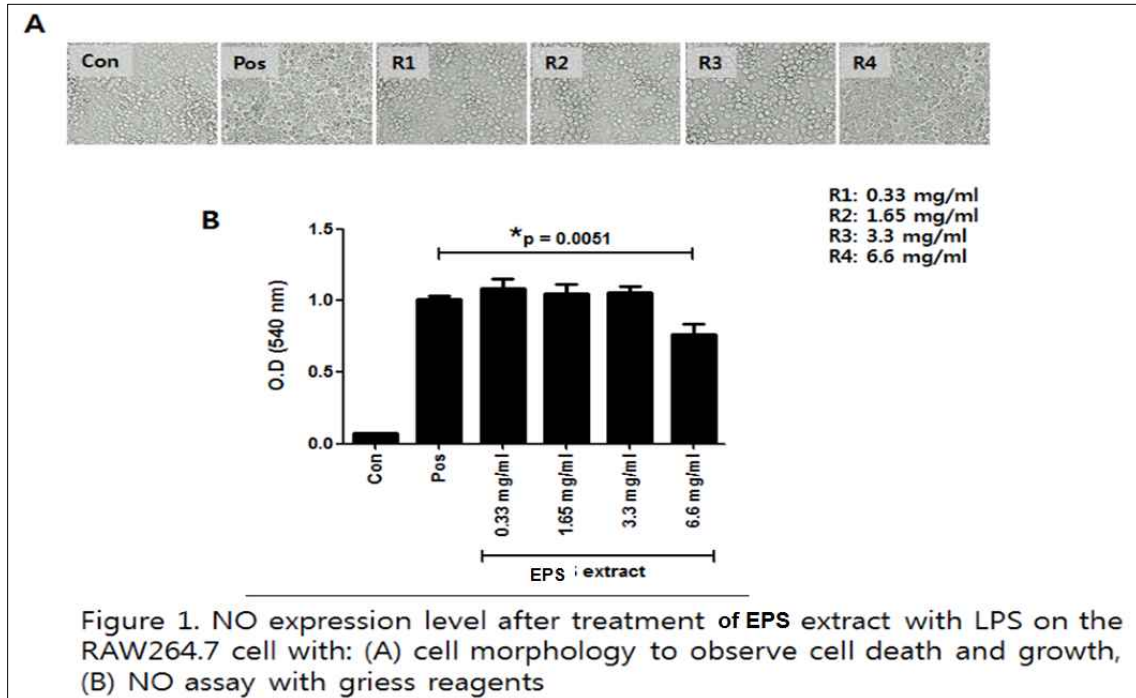
#### 가. 연구 배경

- (1) RAW264.7 cell은 murine (mouse)계열의 monocyte, macrophage로서, innate immunity에 관련하여 다양한 염증성 사이토카인을 발현한다.
- (2) 특히 전립선염을 유도하는 bacteria에서 파생된 LPS는 조직에 상주 혹은 혈액을 통하여 침윤된 macrophage 등의 면역세포의 표면인자인 Toll like receptors 관련 innate immune responses를 자극하게 된다.
- (3) 이렇게 자극받게 된 macrophage는 NO를 생산하게 되는데, 이러한 NO는 염증을 과도하게 유발하여, 전립선 염증을 유발하게 된다.
- (4) RAW264.7 cell을 6 well plate에  $1.0 \times 10^6$  cell을 넣어주고, plate 내 confluence가 90%가 되었을 때, LPS (100 ng/ml)으로 각 well에 처리를 해주고, 동시에 위에서 얻어준 10% 용액을 10, 50, 100, 200  $\mu$ l (농도변환 시 : 0.33 mg/ml, 1.65 mg/ml, 3.3 mg/ml, 6.6 mg/ml) 씩 넣어주어 24시간 뒤에 결과를 확인하였다.

#### 나. 연구 내용 및 결과

- (1) 우선 EPS에 의하여 세포의 괴사가 일어나는 정도를 확인하였다.
- (2) 실험군 가운데 가장 높은 농도인 6.6 mg/ml에서도 괴사나 세포성장에 영향이 있음을 세포형태로 확인할 수 있었으며, 이로서 EPS는 세포에 특별한 독성이 없음을 확인하였다.

- (3) 연구 결과 RAW264.7세포에서 NO의 양이 농도에 따라 감소됨을 확인하였으며, 이는 6.6 mg/ml의 양에서 RAW264.7 cell의 NO량이 significantly하게 감소함을 확인하였다.
- (4) 또한 LPS만 넣어준 대조군과 비교하였을 때, 무려 24%의 NO 감소를 확인할 수 있었다.
- (5) 이 결과는 시험관내 실험에서 EPS가 세균 유래 LPS에 의한 염증소견의 하나인 NO 생산량을 감소시킴으로서 염증을 억제할 수 있음을 나타내는 결과이다.



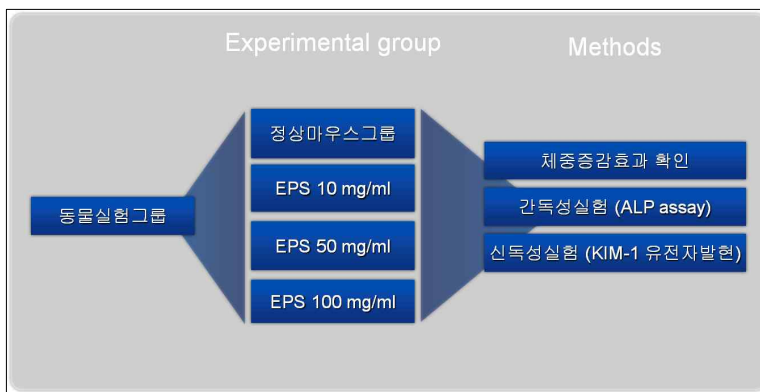
#### 4. 기능성식품 적용을 위한 독성연구

##### 가. 연구배경 및 내용

- (1) 기능성 식품의 반복투여 시, 반복독성에 따른 체중의 변화와, 간독성, 및 신독성을 확인하기 위한 실험을 수행하였다.
- (2) 독성에 따른 동물의 변화로서 체중의 변화와 행동학적인 변화, 그리고 대변의 형태 등을 볼 수 있으며, 지속적인 체중의 감소 혹은, 털세움, 웅크림의 변화를 통하여, 고통의 정도를 확인할 수 있다.
- (3) 반복투여독성실험은 총 11일간 실시하였으며, BALB/c mouse에 1일 1회, 농도는 총 3가지로 10, 50, 100mg/ml 의 EPS를 oral로 처리하였다.

실험군	마리수 (N)	처리
Control group (대조군)	3마리 / BALB/c mouse	
EPS 처리군 (농도 10mg/ml)	3마리 / BALB/c mouse	10mg/ml /200 ul
EPS 처리군 (농도 50mg/ml)	3마리 / BALB/c mouse	50mg/ml /200ul
EPS 처리군 (농도 100mg/ml)	3마리 / BALB/c mouse	100mg/ml /200ul

## 나. 연구 방법 및 결과



### (1) 체중의 변화 확인

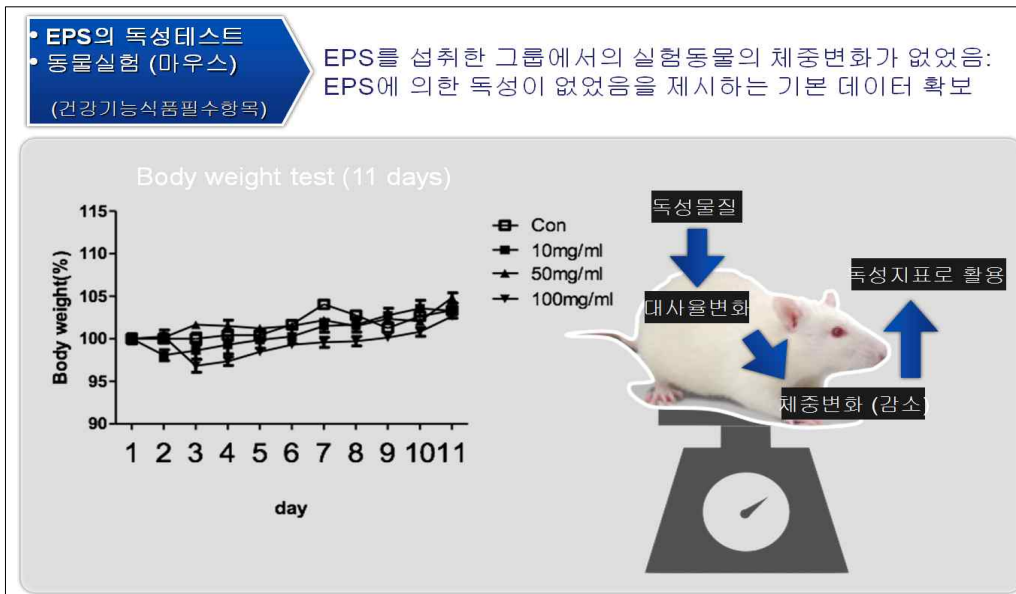
(가) 체중의 변화를 확인함으로써 독성의 전반적 형태를 확인하였다.

(나) 체중의 변화는 1일 / 1회 측정하며, 동일한 시간에 측정하여 오차를 줄였다.

(다) 체중의 변화가 급격하게 되어 체중의 20%이하 감소될 경우, 동물실험을 중단한다.  
(독성이 있는 것으로 간주함)

(라) 실험 결과 EPS를 섭취한 그룹에서 체중변화가 없었음을 알 수 있었다.

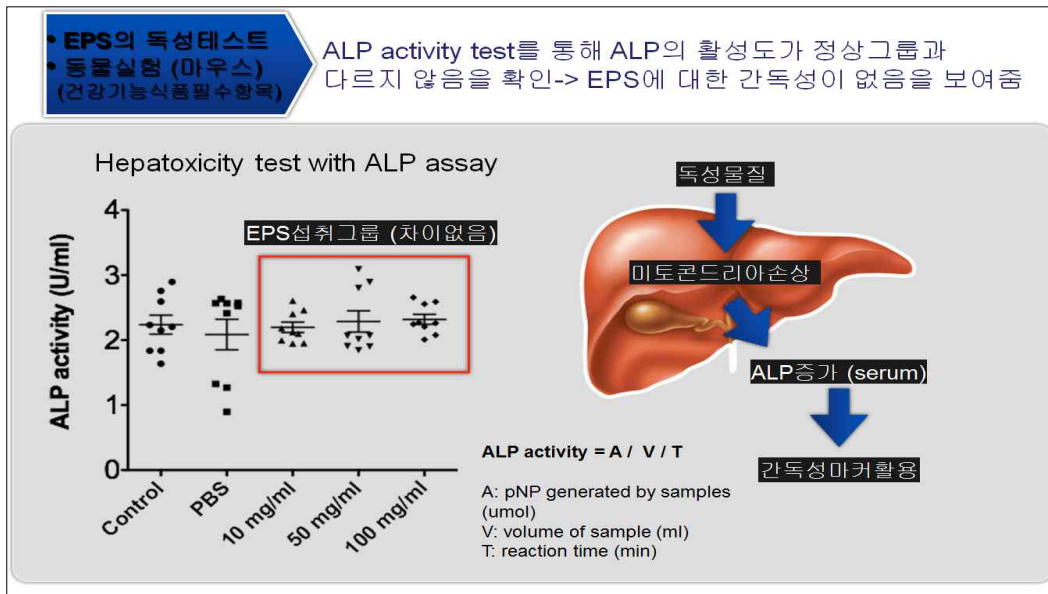
(아래의 그림 결과 참고)



### (1) 간독성 확인을 위한 ALP activity test

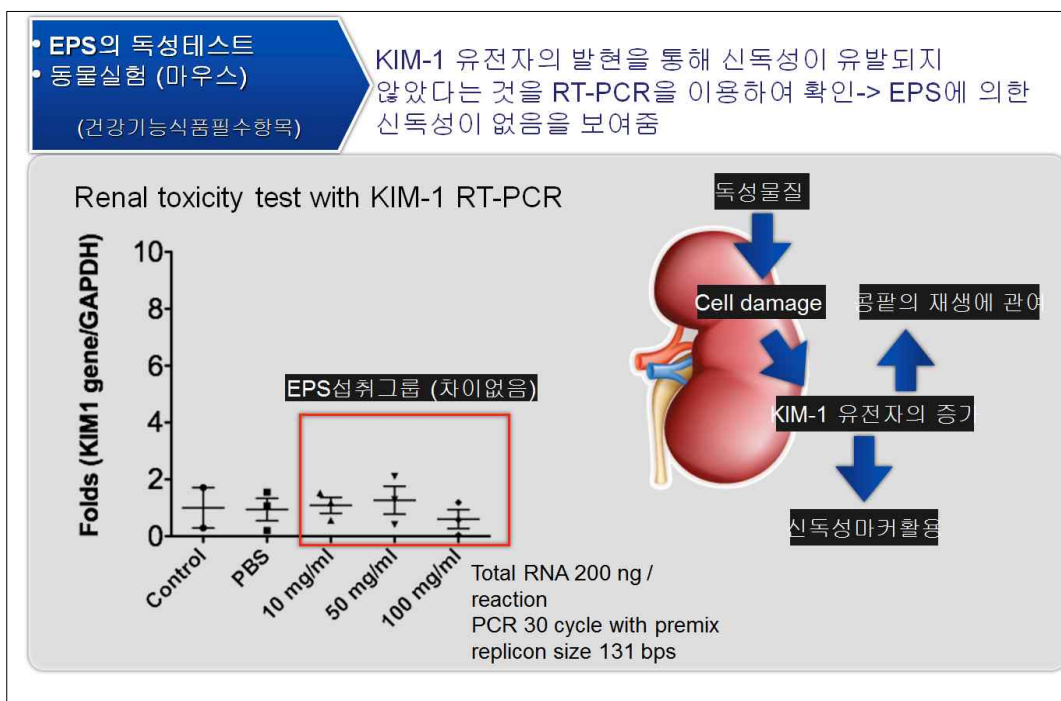
- (가) 혈액샘플을 채취하여, 혈청 내의 ALP 수치를 확인하기 위한 kit (abcam, ab83369)를 사용하고 간독성을 확인하였다.
- (나) Serum 30  $\mu$ l를 HBSS 270  $\mu$ l에 섞어 10배 희석하여 사용하였다.
- (다) pNPP 50  $\mu$ l를 섞고, 25°C에서 1시간 동안 반응 시킨 뒤 stop solution으로 반응을 멈추고 405 nm에서 OD값을 측정하였다.
- (라) 측정된 값은 함께 측정한 standard curve의 OD값을 바탕으로 pNP 값으로 환산하였다.
- (마) 환산된 값은  $ALP\ activity = A/V/T$  (A: pNP generated by sample( $\mu$ mol), V: volume of sample(ml), T: reaction time(min))의 공식에 대입하여 ALP activity를 측정한다.
- (바) 그 결과 모든 샘플에서 간 독성이 없음을 증명하였다. 즉, 결과에서 보듯이 ALP activity는 EPS의 10-100 mg/ml의 조건에서 거의 동일하게 control과 PBS군과 같이 차이가 없어서 간독성은 없는 것으로 확인되었다.





(2) 신독성 확인을 위한 KIM-1의 유전자의 발현 확인

- (가) 독성물질이 들어오면 신장의 세포에 손상을 입게 되고, 이때 신장의 재생을 위해 KIM-1유전자가 발현된다. 따라서 KIM-1유전자 발현은 신독성의 지표로 사용이 된다.
- (나) 신독성을 확인하기 위해 신장조직에서의 RNA를 뽑아 cDNA를 합성하였다.



(다) 신독성을 위한 유전자 검사 실험 조건은 다음과 같다.

cDNA (200 ng/ul)	1 ul
KIM-1 Primer forward	0.5 ul
KIM-1 Primer Reverse	0.5 ul
PCR Premix	15 ul
D.W.	13 ul
Total	30 ul

의 조성으로 95℃에서 2분- (95℃ 20초- 64℃ 40초 - 72℃ 30초)x30 cycle - 72℃ 5분의 조건에서 RT-PCR을 돌린다.

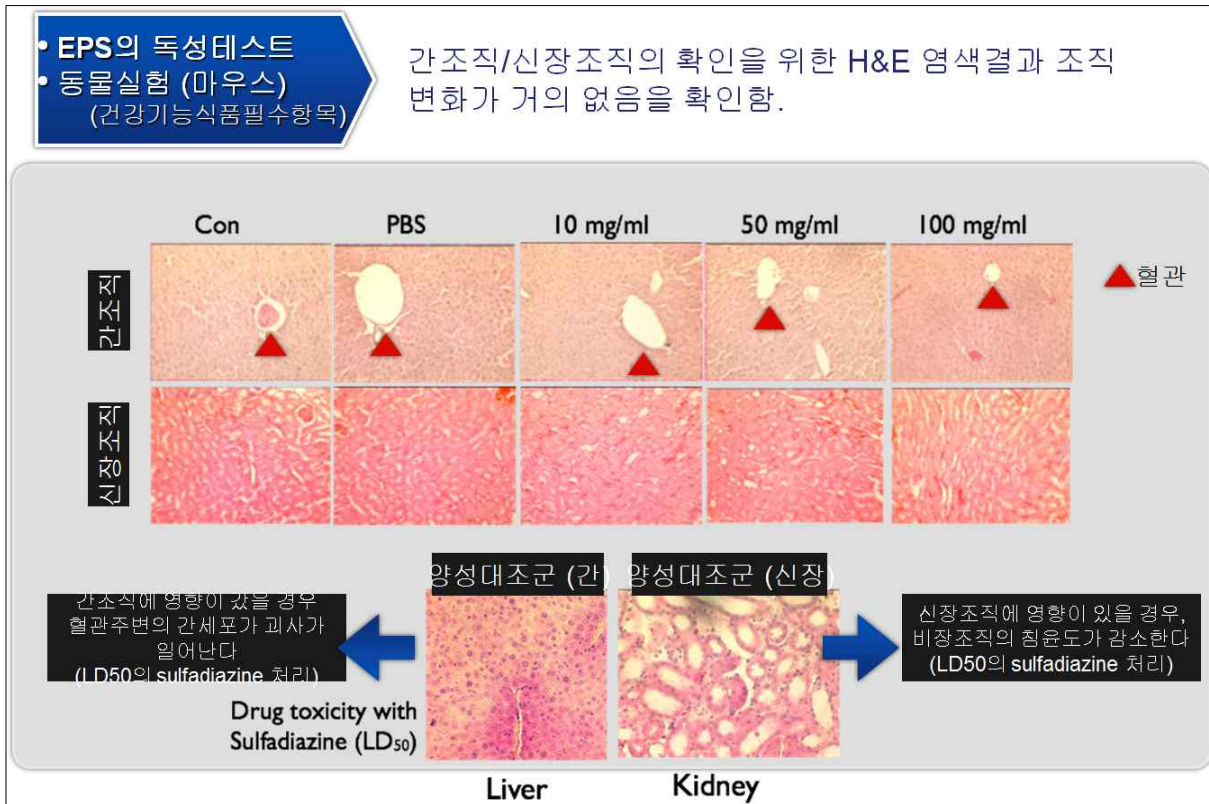
- (라) PCR sample은 2% 아가로스 젤에서 전압 50 V로 내려 밴드의 진하기를 확인하였다.
- (마) GAPDH의 밴드의 진하기를 바탕으로 각 sample의 진하기를 분석하여 결과를 냈다.
- (바) 그 결과 EPS 섭취 그룹에서 KIM-1의 발현이 큰 차이가 없음을 알 수 있었다. 즉, 신장의 독성도 없는 것으로 확인되었다.

### (3) EPS 투여 후의 전립선 조직의 변화

- (가) 간조직과 신장조직의 일부를 10%포르말린으로 고정하였다.
- (나) 흐르는 수돗물에 1시간 동안 둔 뒤 카세트에 넣고 파라핀침투기에 넣고 탈수화 과정 후 파라핀화 된 조직을 파라핀 블록에 넣고 굳힌다.
- (다) 다 굳은 뒤 microtome으로 7um의 두께로 조직을 잘라서 슬라이드 글라스에 붙여 말린다.
- (라) 다 마른 뒤 xylene에 dipping 20번(3번 반복) 한 뒤 100% 에탄올에 dipping 20번, 95% 에탄올에 dipping 20번, 90% 에탄올에 dipping 20번, 85% 에탄올에 dipping 20번, 80% 에탄올에 dipping 20번, 75% 에탄올에 dipping 20번, 70% 에탄올에 dipping 20번을 한 뒤 흐르는 수돗물에서 dipping 20번을 시행한다. 이후 hematoxylin에서 1분 동안 dipping한 후 흐르는 수돗물에서 조직 주변의 염색약을 씻어낸다. 암모니아에서 30초 동안 dipping하여 색깔을 고정한 뒤 다시 흐르는 수돗물에서 조직 주변의 암모니아를 씻어낸다. eosin에서 30초 동안 dipping 한 후 흐르는 수돗물에서 조직 주

변의 염색약을 씻어낸다. 다시 탈수화를 위해 70% 에탄올에 dipping 20번, 75% 에탄올에 dipping 20번, 80% 에탄올에 dipping 20번, 85% 에탄올에 dipping 20번, 90% 에탄올에 dipping 20번, 95% 에탄올에 dipping 20번, 100% 에탄올에 dipping 20번, xylene()에 dipping 20번(3번 반복) 한 뒤 mountain solution 으로 cover glass를 덮는다.

(마) 상온에서 2일 동안 건조 시키고 사진(X200배율)을 찍는다.



(바) 간 조직의 혈관 주변에 간세포의 과사가 일어나지 않은 것으로 보아 간에는 독성이 없음을 확인할 수 있다.

(사) 신장조직에서도 조직의 침윤도가 세밀한 것으로 보아 신장에도 독성이 없음을 알 수 있다. 이는 sulfadiazine 약제로 간 및 신장에 대한 영향을 본 우리 연구진 결과를 대조군으로 하여 결과를 확인하여 보면 EPS 처리는 신장과 간 조직에 조직 변성을 주지 않는 점으로 보아 독성이 없는 것으로 생각된다.

#### (4) 독성연구의 결과 요약

(가) 실험동물에게 EPS를 섭취 시켰을 경우 체중 변화가 없었다. 이것을 통해 체내에 독

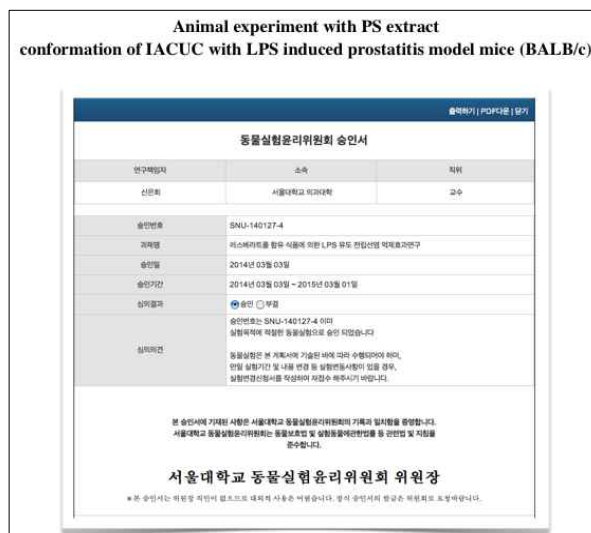
성으로 미치는 영향이 없음을 알 수 있다.

- (나) 간독성 및 신독성 지표 확인 결과 대조군에 비해 차이가 없음을 확인할 수 있었다.
- (다) 간조직 및 신장조직에서의 독성 영향이 없음을 병리학적인 분석에 의하여 확인하였다.
- (라) 건강기능 식품 안정성 평가 규정상 ‘독성시험자료’에서 요구하는 잠재적 위해를 동물시험 연구를 통해 예측하는 연구결과로 활용이 가능하다. 이것은 ‘단회투여 독성시험(설치류)’ 및 ‘반복투여 독성시험’에 준하여 GLP시설(서울대학교 의과대학 실험동물실: IACUC허가)에서 확인한 결과이다.

## 5. 만성 세균성 전립선염 모델 마우스에서 EPS에 의한 염증 완화 연구

### 가. 연구 배경

- (1) 본 연구진은 본격적인 연구를 위하여 실험동물실연구를 위한 IACUC 등급을 인증받기 위한 실험동물계획서를 제출하였고, 승인을 받을 수 있도록 서울대학교 실험동물 윤리위원회의 심사를 받아 승인서를 받아 실험을 진행하였다.
- (2) 실험동물윤리위원회의 승인을 받기 위하여, 본 연구진은 실험동물에 대한 증명, 마리 수, 그룹 수, 실험방법과 마취, 그리고 안락사에 이르기까지 관련된 모든 정보를 입력하였고, 3명의 심사위원의 심사를 통하여, 2번의 수정과정을 거쳐 실험동물 윤리위원회의 승인을 받을 수 있었다.
- (3) 실험동물 윤리위원회의 승인을 받고, 의과대학의 8층 동물실에서 연구를 수행할 수 있으며, 동물실험에 대한 다양한 연구지원등을 받을 수 있도록 등록되었을 뿐만 아니라, 규정된 동물시설에 의한 환경적인 영향을 최소화 하면서 연구를 수행하였다.

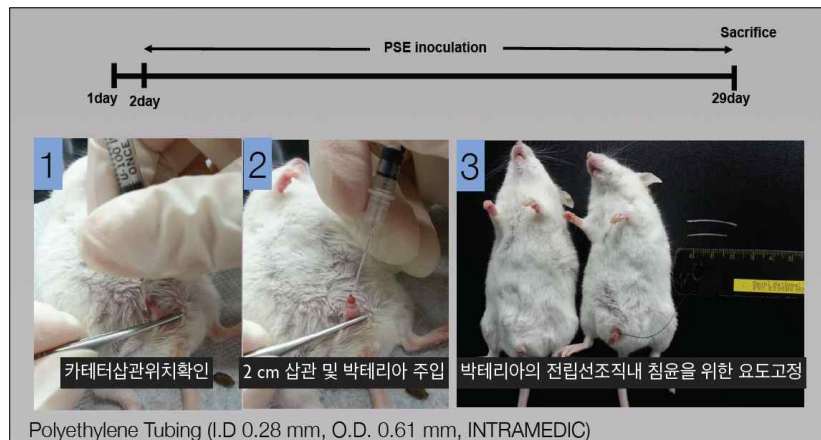


- (4) 만성전립선염 유도를 위하여 BALB/c male 11 주령 마우스를 그룹 당 5마리로, 각 그

roup은 대조군, 양성대조군 (전립선염유도), EPS 섭취군과, 전립선염을 유발시킨 EPS 섭취군으로 총 4개 그룹으로 구성되었다.

실험군	마리수	처리
대조군	5마리/ BALB/c mouse (11주)	
EPS 섭취군	5마리/ BALB/c mouse (11주)	-EPS 100 mg/ml/1day/mouse
전립선염유발군	5마리/ BALB/c mouse (11주)	-E. coli 292; 2x10 <sup>6</sup> CFU/20ul/mouse
전립선염 유발 및 EPS 섭취군	5마리/ BALB/c mouse (11주)	-E. coli 292; 2 x 10 <sup>6</sup> CFU/20ul/mouse -EPS 100 mg/ml; 200 ul/1day/mouse

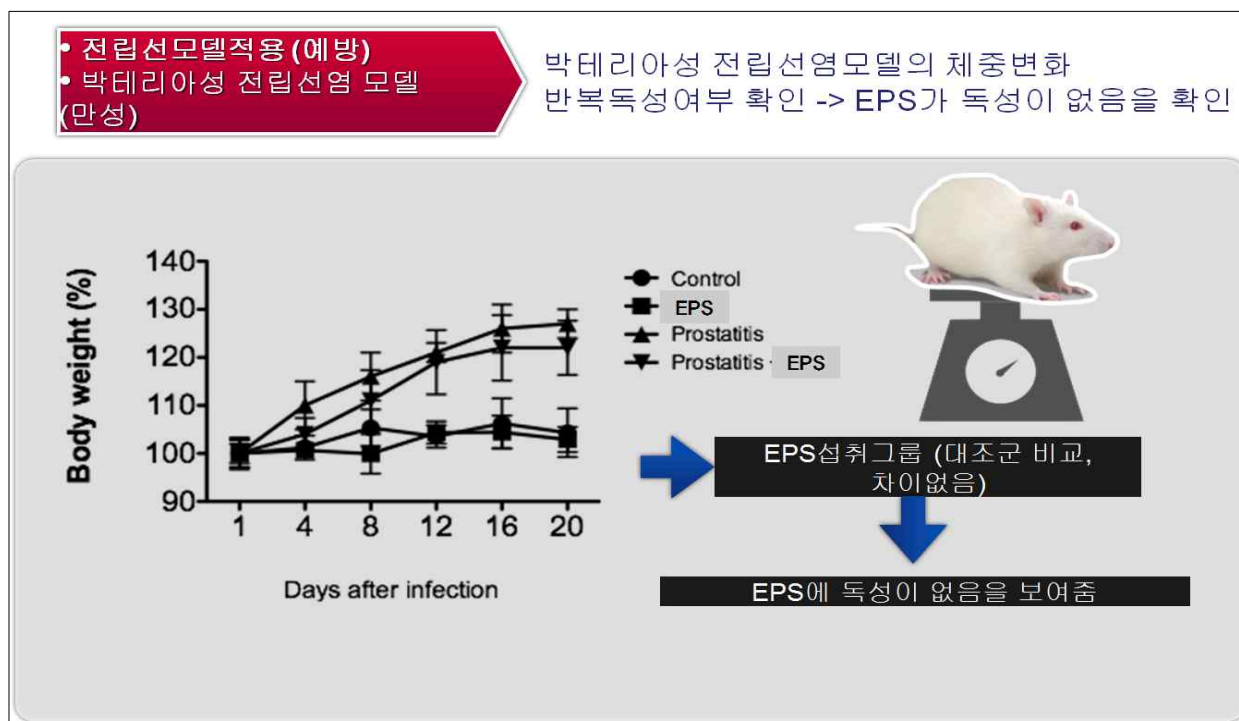
- (5) 실험에 사용하기 전에 EPS는 DPBS에 희석하였으며, 희석된 용액은 0.22 µm pore sized 실린지 필터를 이용하여, 세균의 오염을 억제하여 사용하였다.
- (6) 전립선모델을 만들기 위하여 세균을 삽입 전 마우스는 졸레틸(30 mg/kg)과 럼퐁(10 mg/kg)으로 마취하였다.
- (7) 삽입된 카테터는 직경, 관직경 0.61 mm, 길이 20 mm의 깊이로, 요도에 삽입하였다.
- (8) 주입된 박테리아는 *E. coli* 292 strain으로 LB broth에서 대수기로 증식된 박테리아를 2 시간 이내에 사용하였다.
- (9) 주입에는 10 µl 헤밀턴 실린지로 (Hamilton 80300, Nevada, USA) 이용하였다.
- (10) 주입용량은 2 x 10<sup>6</sup>/20ul/mouse으로 20 ul을 1분 동안 서서히 주입하였다. 주입 이후에 멸균사를 이용하여 요도를 30분간 고정하였다.
- (11) 이후 멸균사를 풀어준 후 마취를 깨웠다.
- (12) 4주간 IACUC 규정에 의거하여, 사육을 하였다.



## 나. 연구내용 및 결과

### (1) 체중의 변화

- (가) 우선 EPS의 독성여부를 판단하기 위해 체중의 변화를 확인하였다. 각 그룹의 마우스 당 총 5마리씩 4일마다 한번 씩 체중을 측정하였다.
- (나) 처음 측정된 무게를 100%으로 환산하여 증감여부를 확인하였다.
- (다) 그 결과, 대조군과, EPS를 섭취한 두 그룹은 체중의 변화가 거의 없음을 확인하였으며, 전립선염을 유발한 그룹에서는 체중의 증가가 유의적으로 증가함을 확인하였다.
- (라) 유의적이지 않지만, 땅콩새싹을 섭취한 전립선염그룹에서는 전립선염만 유발한 그룹보다 체중의 변화가 적었다.



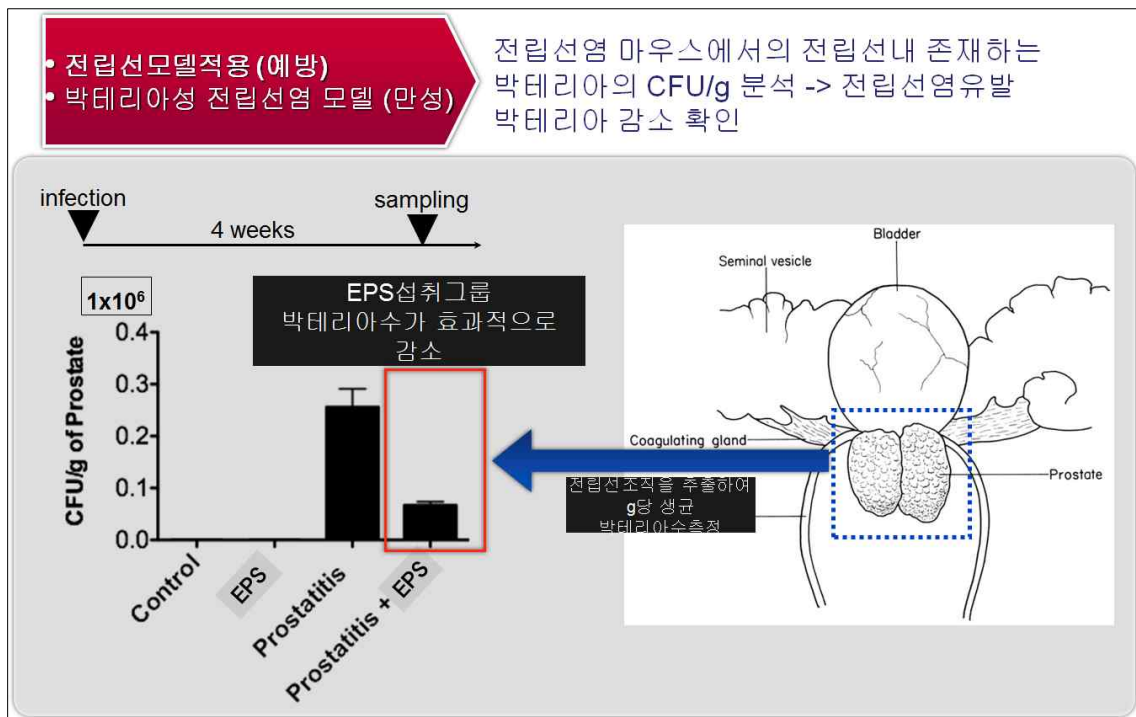
### (2) 전립선 조직 내 세균 번식 정도 (CFU counting)

- (가) 28일 후 전립선조직내의 박테리아 CFU를 측정하기 위하여, dorsal, ventral 부분의 전립선조직을 미세저울로 무게를 측정한 뒤 조직분쇄기와 멸균된 PBS를 이용하여 분쇄를 하였다. 분쇄 시에 열 발생을 최소화하기 위하여 ICE cold 된 상태를 유지하여 실

시하였다.

(나) 분쇄된 조직을 PBS에 희석하여, LB 한천배지에 37°C를 유지한 상태에서 12시간동안 배양하였다. 배양 후 생성된 박테리아의 콜로니를 카운트 한 뒤, 희석배수와 곱하여, 결과를 측정하였다. 측정을 위하여 2반복하여 실험을 수행하였다.

(다) 수행된 결과 전립선염 유도군에서는 그람당  $2.5 \times 10^5$ CFU의 박테리아가 검출되었으며, 4주간 EPS를 섭취한 그룹에서는 이의 1/4 수준인  $0.6 \times 10^5$ CFU가 검출되었다. 이 두 결과는 유의적으로 차이가 있었다 ( $p < 0.05$ ). 따라서 EPS 투여군에서는 전립선세균 증식이 억제되었음을 알 수 있다.



### (3) 전립선조직 분석(조직 형태 변화 및 면역세포 침윤, fibrosis, and hyperplasia)

(가) 정상적인 전립선조직의 형태는 gland와 stroma로 구성되어 있으며, supporting stroma (SS)는 콜라겐 섬유조직 (collagenous fibrous tissue)와 연근육조직 (smooth muscle fibers)로 이루어져 있다.

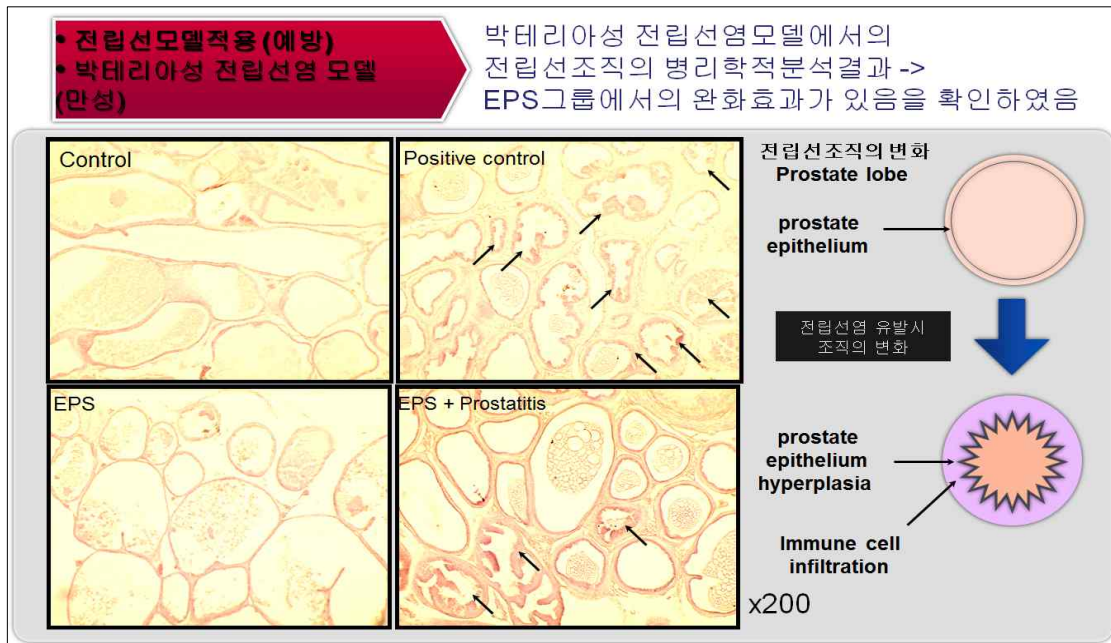
(나) Grand의 lumen 부분에 있는 것은 seminal fluid로서, citric acid, proteolytic enzyme, fibrinolysin이 함유되어 있다. 이는 가임률을 증가시킬 수 있는 중요한 기능을 수행한다. 나이가 들거나 혹은 만성 전립선염에 의하여 이 부분의 섬유화와 석회화가 증가함에 의하여, 전립선의 기능을 제대로 수행하지 못하게 된다. (Wheater's Functional

Histology: A text and colour atlas 5<sup>th</sup> Edition).

(다) 본 연구진은 4주간 전립선염을 유도한 그룹에서의 dorsal prostate gland에 대한 변화를 H&E staining 으로 확인하였다

- ① 28일째 쥐의 전립선을 추출하여 10% neutral formalin에 72시간 보관한다.
- ② 흐르는 수돗물에 1시간 동안 둔 뒤 카세트에 넣고 파라핀침투기계에 넣고 탈수화 과정 후 파라핀화 된 조직을 파라핀 블록에 넣고 굳힌다.
- ③ 다 굳은 뒤 microtome으로 7 um의 두께로 조직을 잘라서 슬라이드 글라스에 붙여 말린다.
- ④ 다 마른 뒤 xylene에 dipping 20번(3번 반복) 한 뒤 100% 에탄올에 dipping 20번, 95% 에탄올에 dipping 20번, 90% 에탄올에 dipping 20번, 85% 에탄올에 dipping 20번, 80% 에탄올에 dipping 20번, 75% 에탄올에 dipping 20번, 70% 에탄올에 dipping 20번을 한 뒤 흐르는 수돗물에서 dipping 20번을 한다.
- ⑤ 이후 hematoxylin에서 1분 동안 dipping한 후 흐르는 수돗물에서 조직 주변의 염색약을 씻어낸다. 암모니아에서 30초 동안 dipping하여 색깔을 고정한 뒤 다시 흐르는 수돗물에서 조직 주변의 암모니아를 씻어낸다. eosin에서 30초 동안 dipping 한 후 흐르는 수돗물에서 조직 주변의 염색약을 씻어낸다.
- ⑥ 다시 탈수화를 위해 70% 에탄올에 dipping 20번, 75% 에탄올에 dipping 20번, 80% 에탄올에 dipping 20번, 85% 에탄올에 dipping 20번, 90% 에탄올에 dipping 20번, 95% 에탄올에 dipping 20번, 100% 에탄올에 dipping 20번, xylene()에 dipping 20번(3번 반복) 한다.
- ⑦ mountain solution 으로 cover glass를 덮는다.
- ⑧ 상온에서 2일동안 건조 시키고 사진을(400배율) 찍는다.





(라) 그 결과, 정상조직 (control)과는 달리 SS부분이 증가하면서, SS부위에서 관찰되는 면역세포의 침윤과, fibrosis가 증가하였음이 관찰되었고, gland lumen에 있는 내피세포 (epithelial cell layer)의 이상 증식 (hyperplasia)의 소견이 관찰되었다.

(마) 전립선염 유도와 함께 4 주간 EPS를 섭취시킨 그룹에서는 상대적으로 조직에서의 epithelium hyperplasia가 적게 일어났을 뿐만 아니라, SS의 fibrosis가 약하게 나타남을 확인하였다. EPS만을 섭취한 그룹에서는 정상 전립선 조직과 같이 나타남을 확인할 수 있었다.

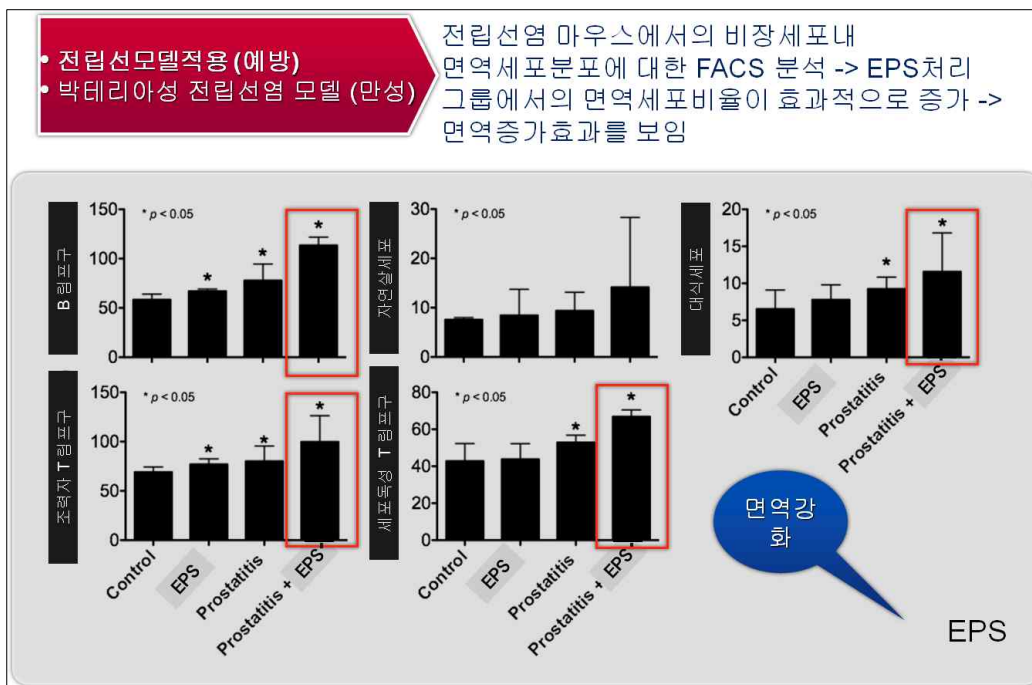
#### (4) 전립선염증 유발 마우스에서 EPS 투여 후의 혈액 내 염증세포의 수 측정

(가) 일반적으로 염증의 여부를 판단하기 위한 영향으로서, 혈액 내에 존재하는 염증세포 구인 Neutrophil의 수치를 확인하게 된다. 이때 DQ staining을 이용하여 확인하였다.

- ① 각 동물그룹에서 혈액 내 염증세포의 측정을 위하여 실험동물의 말초혈액 (peripheral blood)를 facial vein을 통하여 채취하였다.
- ② 20 ul를 EDTA Tube에 넣고 상온에서 EDTA와 섞는다.
- ③ 여기서 2 ul를 따서 슬라이드에 떨어뜨리고 부채꼴 모양으로 박충도말법(thin smear method)한다.

- ④ 상온에서 2일 동안 말린다.
- ⑤ Methanol 30초, DQII 1분, DQI 30초 염색 후 Ethanol로 빠르게 고정한다.
- ⑥ xylene에 잠시 담갔다가 mountain solution 으로 cover glass를 덮는다.
- ⑦ 상온에서 2일동안 건조 시킨다.
- ⑧ 쥐 한마리 당 monocyte와 neutrophil, lymphocyte의 총 개수가 100개를 세어 계산한다.

(나) 면역세포의 형태학적특징을 통하여 Differential cell counting을 수행하였고 결과를 현미경 관찰을 통하여 분석하였다.



(다) 그 결과, 유의적이지 않지만, 염증세포가 상대적으로 감소하는 경향을 보여 주었다. 이는 직접적으로 전립선염에 대한 완화효과를 말해주지는 못하지만, 앞서 전립선 조직에서의 박테리아수의 감소, 그리고, 병리학적인 소견에서의 전립선염 완화에 연관되어 있는 결과라고 볼 수 있다.

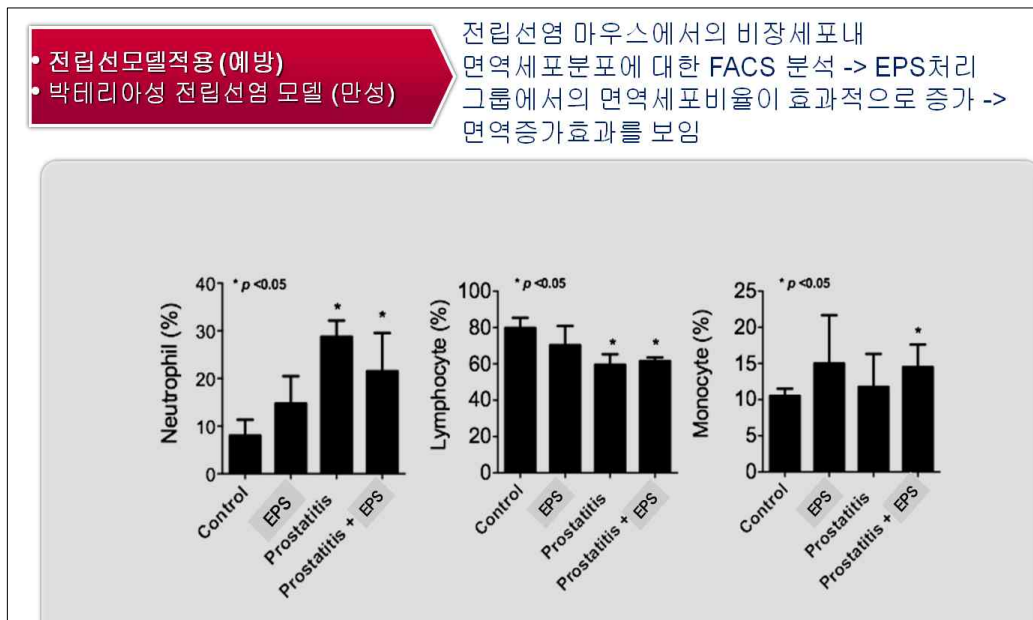
(라) 림프구의 감소는 전립선염 유발그룹 모두에서 확인할 수 있는 결과이며, 대식세포의 경우 EPS를 섭취한 두 그룹에서 모두 증가하는 경향이 있었으며, 전립선염을 유발시킨 EPS 섭취군에서는 유의적으로 대식세포의 비율이 증가함을 확인할 수 있었다.

## (5) 전립선 염증 유발 마우스에서 EPS 투여후의 비장 내 면역세포비율 측정

- (가) 박테리아에 의한 만성 전립선염의 경우에는 호르몬에 의하여 유도되는 전립선비대증이나 전립선염과는 달리, 박테리아의 감염에 의하여 유발되는 염증이다.
- (나) 실제로 염증이라고 하는 것은 외부로부터 침입한 병원체에 대한 방어기전으로서, 특히 박테리아가 요도 내로 침입했을 때에 초기에 나타나는 염증은 균을 없애기 위한 반응이다. 그러나 급성 염증반응에서 균을 죽이는 것을 지나 만성 염증으로 갈 경우에는 오히려 조직에 악영향을 줄 수 있다. 단기간의 염증억제반응은 염증세포의 억제나, 조직의 염증반응을 순간적으로 완화할 수 있겠지만, 박테리아가 조직에 있는 한 만성전립선염에 대하여 근본적인 치료는 되지 않는다.
- (다) 앞선 우리의 연구 결과에서는 EPS를 투여한 마우스의 오줌 내의 세균 수가 줄어 든 것을 확인하였다. 이는 염증 억제와 상관없이 EPS 투여가 균을 직접 죽이거나 혹은 숙주의 면역반응을 세포성 면역반응으로 향진시켜 균에 대해 살멸효과를 보인 것으로 예측할 수 있었다. 따라서 본 연구는 박테리아의 전립선조직내의 감소효과와 병리학적인 결과를 통하여 다음으로 EPS 투여한 마우스에 있어서 면역반응을 조사하여 보았다.
- (라) *E. coli* 292에 감염된 전립선이나, 시스템하게 반응하는 면역반응이 박테리아를 감소시킬 수 있다고 보았을 때, 면역세포의 비율은 매우 중요한 부분을 차지한다.
- (마) 특히 비장세포는 숙주의 시스템한 면역반응을 모니터링할 수 있는 주요한 면역장기로서, 본 연구진은 각 실험그룹별로, 면역세포의 비율이 어떻게 차이가 있는지를 확인하기 위하여 FACS를 수행하였다.
- (바) 아래의 실험 프로토콜은 FACS 연구를 수행하는 방법이다.
- ① 비장세포의 FACS 분석방법으로 4주 동안 사육된 마우스의 비장을 적출한 뒤, 비장세포를 dissociation시키기 위하여 Tissue grinder (sigma)를 사용하였다.
  - ② 적출된 비장세포는 RBC를 제거하기 위하여 LCK lysis buffer (조성)을 이용하였으며, 이후, 1500 rpm에서 5분간 원심분리를 한 뒤, 세포 수를 측정하였다.
  - ③ 세포 수를 측정하여, 전체 비장세포 수를 측정하였고, FACS분석을 하기 위하여  $2 \times 10^6$  cell을 각각의 FACS 형광염색을 수행하였다.
  - ④ FACS 형광염색에 사용된 항체와 희석배수는 다음과 같다: 1:100 of Anti-CD19-PE conjugated (BD bioscience, MA, USA), 1:100 of Anti-F4/80-PE conjugated, 1:100 of anti-DX5a-FITC conjugated, 1:100 of anti-CD3-APC conjugated, 1:100 of

anti-CD4-PE conjugated, 1:100 of anti-CD8-PEcy5 conjugated.

- ⑤ 염색을 수행하기 위하여, 각각의 희석배율을 세포에 10분간 반응시키고, 반응된 세포를 동량의 4% paraformaldehyde를 이용하여, 고정하였다.
  - ⑥ 고정된 세포는 FACS Caliber(주)를 이용하여 측정하였으며, 측정 이후에 데이터는 FlowJo를 이용하여 분석하였다.
- (바) FACS를 통하여 확인하고자 한 결과는, B, T 림프구와 대식세포구의 양이 전립선염 유도그룹보다 전립선염을 유발시킨 EPS섭취그룹에서 높은 수로 면역세포가 증가함을 확인하였다.
- (사) 특히 NK 세포나 Tc세포의 경우에는 Th1 면역반응을 주도적으로 박테리아에 감염된 세포를 죽이는 기능을 수행한다. 전립선염을 유발시킨 EPS그룹에서 Tc는 유의적으로 증가하였고, NK 세포는 유의적이지 않지만, Tc와 비슷한 경향으로 증가한 것을 확인할 수 있었다.
- (아) 특히 비장 내에서의 대식세포의 증가도 보였는데, 이는 대식세포의 전단계인 monocyte가 실제로 EPS를 섭취한 그룹에서 공통적으로 말초혈액 내에서 증가한 결과와 일맥상통하다.



### (6) 골수성 대식세포(bone marrow-derived macrophages)의 활성화 측정

- (가) EPS와 대식세포와의 연구가 전무하며, 박테리아의 감염 시에 대식세포의 단순한 증

가를 가져오는 것인지 혹은 시너지한 효과를 가져올 수 있는지에 대하여, 골수성 대식세포에 대한 *ex vivo* 실험을 수행하였다.

(나) 골수성 대식세포는 APC로서 F4/80에 양성이고, PAMP에 대한 자극에 민감한 세포이다.

(다) 골수성 대식세포를 배양하기 위하여, BALB/c 7주령 마우스의 골수에서 골수구를 분리한 후, M-CSF가 들어있는 L292 세포의 상등액을 추출하여 이를 10% FBS가 들어 있는 RPMI1640 배지에 10배 희석하여 2주간 이산화탄소 배양기에서 배양한다.

(라) 배양한 후 골수성대식세포의 분화여부를 판단하기 위하여,  $10^4$ 개의 cell을 취하여 대식세포 지표인 F4/80으로 95%이상 유지된 것을 확인하고 실험을 수행한다.

(마) 대식세포의 활성을 측정하기 위하여 사용한 방법으로는 대식세포의 활성화 지표인 CD11b와 CD40를 확인하였으며, CD11b<sup>high</sup>CD40<sup>high</sup>세포의 비율을 확인 하였다.

(바) *E. coli* 292에 대한 면역반응을 확인하기 위하여, *E. coli*에서 추출된 LPS를 이용하여 실험을 수행하였다. LPS추출은 LPS extraction kit(INTRON biotechnology #17141)를 이용하였다.

① *E.coli* 292를 LB broth5ml에 OD값이 0.8-1.2 키운다.

② 13000rpm으로 원심분리기에 돌려서 균만 모으고 상층액은 버린다.

③ Lysis buffer 1 ml을 넣고 강하게 섞는다.

④ Chloroform 200 ul 넣고 강하게 섞는다.

⑤ 5분 동안 상온에 둔다.

⑥ 13000rpm으로 10분간 4°C에서 원심분리기에 돌린다.

⑦ 상층액만 400  $\mu$ l따서 새 tube에 옮긴다.

⑧ Purification buffer 800  $\mu$ l를 넣고 섞은 뒤 10분간 -20도에 둔다.

⑨ 13000rpm으로 15분간 4°C에서 원심분리기에 돌린다.

⑩ 상층액을 버리고 70%에탄올 1ml을 넣는다.

⑪ 13000rpm으로 3분간 4°C에서 원심분리기에 돌린다.

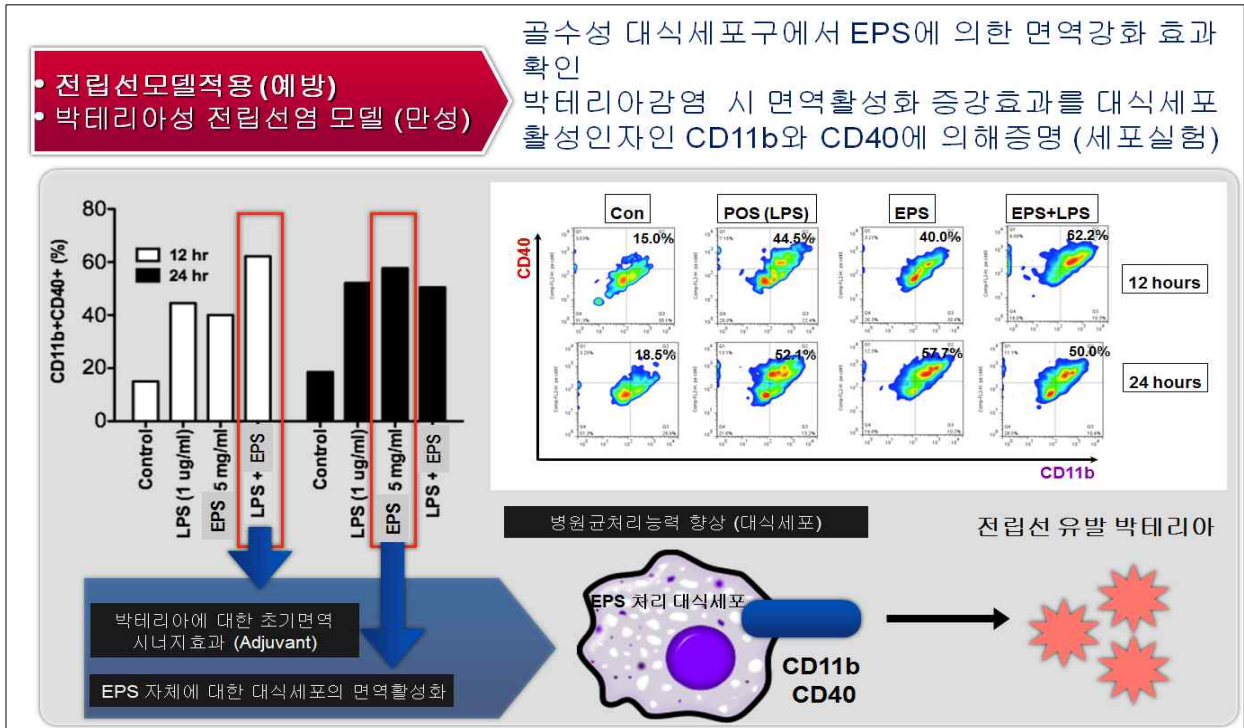
⑫ 상층액을 버리고 상온에 말린다.

⑬ HBSS를 농도 1 mg/ml에 맞추어 넣고 -80°C에 보관한다.

(사) 실험에 사용하기 전에 EPS는 DPBS에 희석하였으며, 희석된 용액은 0.22  $\mu$ m pore

sized 실린지 필터를 이용하여, 박테리아의 오염을 억제하여 사용하였다. 농도는 5 mg/ml로 활용하였다.

(아) 실험은 12시간과 24시간 2그룹으로 나누어 실험을 수행하였으며, LPS만 처리한 그룹과 LPS 와 EPS를 처리한 그룹간의 비교뿐만 아니라, EPS 자체에 대한 대식세포의 활성을 측정하여 보았다.



(자) 그 결과, 12시간째, CD11b와 CD40가 LPS를 처리한 그룹에서뿐만 아니라, EPS를 처리하여준 그룹에서도 증가함을 보았으며, 특히 EPS와 LPS가 동시에 처리된 그룹에서는 LPS만 처리한 그룹보다 면역세포활성이 증가됨을 보였다.

(차) 24시간째에서는 모든 그룹에서 활성화 되어 평형화 되는 경향을 보았다. 이러한 결과를 토대로 EPS는 자체적으로 면역활성화 효과를 가지고 있음을 확인하였다.

(카) LPS와 EPS가 같이 처리되었을 때, 면역활성화를 위한 시간이 더욱 빠르게 진행되어 12시간째 LPS만 처리한 그룹보다 더 활발히 증가됨을 증명하였다.

(7) 만성 세균성전립선염 모델마우스에서의 EPS 효과에 대한 결과 요약

- (가) EPS섭취그룹의 전립선 조직 내에서의 생존 박테리아 수는 감소하였다.
- (나) 박테리아에 의하여 유발된 전립선 조직이 EPS를 섭취한 그룹에서 염증이 완화된 것을 병리학적으로 확인하였다.
- (다) EPS에 의하여 면역세포의 증식과 활성화가 된 것을 *in vivo*와 *in vitro*상에서 증명하였다.
- (라) EPS 자체에 대한 면역 활성화 기능이 감염성 박테리아에 대한 저항성을 증가시켰을 뿐만 아니라 면역세포 활성화의 시너지 효과를 확인하였다. 이는 면역 강화제로서의 가능성을 보여준다.

## 6. 전립선 비대증 모델 마우스에서의 EPS 효과

### 가. 연구 배경

- (1) 만성전립선염 유도를 위하여 BALB/c male 11 주령 마우스를 그룹 당 5마리로, 각 그룹은 대조군, 양성대조군 (전립선비대증 유도), EPS 섭취군과, 전립선비대증을 유발시킨 EPS 섭취군으로 총 4개 그룹으로 구성되었다.

실험군	마리수	처리
대조군	5마리/BALB/c mouse (11주)	
EPS 섭취군	5마리/ BALB/c mouse (11주)	-EPS 100 mg/ml/200 ul/1day/mouse
전립선비대증유도군	5마리/ BALB/c mouse (11주)	- $\beta$ -estradiol (250 ug/kg)+ Androstan-17 $\beta$ -ol-3-one(DHT) (250 ug/kg)/20ul/mouse
전립선비대증 및 EPS섭취군	5마리/ BALB/c mouse (11주)	- $\beta$ -estradiol (250 ug/kg)+ Androstan-17 $\beta$ -ol-3-one(DHT) (250 ug/kg)/20 ul/mouse  -EPS 100 mg/ml/200 ul/1 day/mouse

- (2) 전립선염을 유발시키는 방법으로 2주간 Prostatitis그룹에는  $\beta$ -estradiol(Sigma, #e8875, europe) sesame oil에 녹여 250  $\mu$ g/kg을 피하주사 하였다. 이후 2주간  $\beta$ -estradiol과 5 $\alpha$ -Androstan-17 $\beta$ -ol-3-one(DHT) (Sigma, #a8380, europe)를 참기름에 녹여 250  $\mu$ g/kg 씩 피하주사 하였다.
- (3) 이후 4주간 마우스들은 IACUC 규정에 의거하여, 서울대학교 의과대학 실험동물실에서 사육을 하였다.

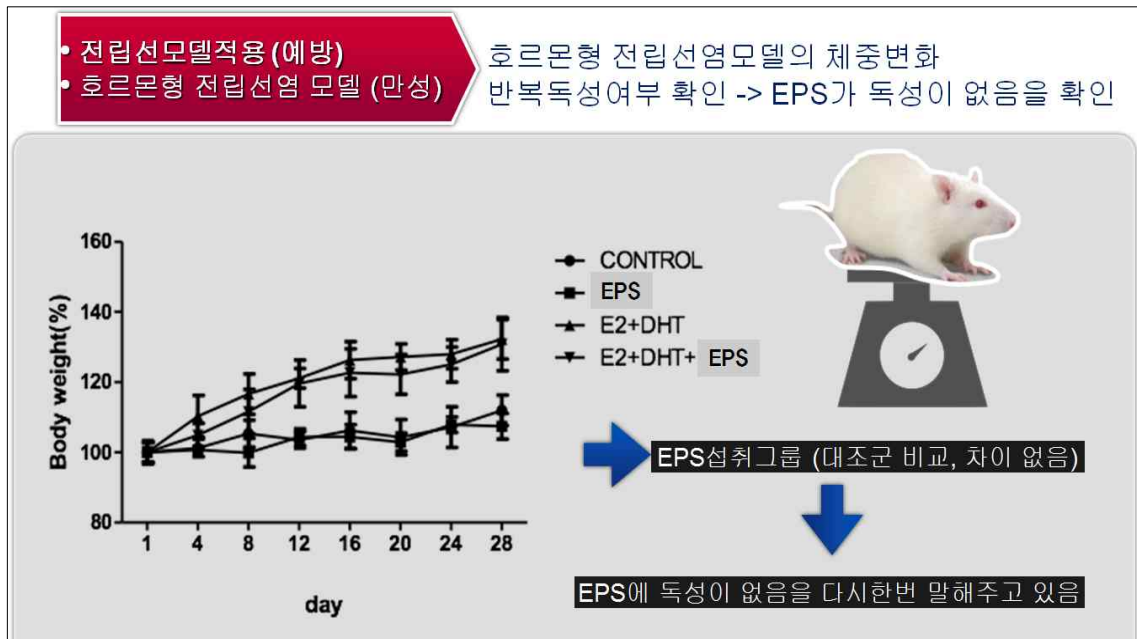


## 나. 연구 내용 및 결과

### (1) 체중의 변화

- (가) EPS의 독성여부를 판단하기 위해 체중의 변화를 확인하였다.
- (나) 대조군, 양성대조군 (전립선비대증유도), EPS섭취군과, 전립선비대증을 유발시킨 EPS 섭취군으로 나누어 4일 간격으로 체중을 측정하였으며 각 그룹 당 마우스는 총 5마리다.
- (다) 처음 측정된 무게를 기준으로 %수치로 환산하여 분석하였다.
- (라) 전립선 비대증을 유발한 그룹에서는 체중의 증가가 유의적임을 확인할 수 있었으며, 전립선 비대증을 유발시킨 EPS섭취군 또한 증가함을 알 수 있었다. 반면, 대조군과 EPS를 섭취한 그룹은 체중의 변화가 거의 없음을 확인하였다



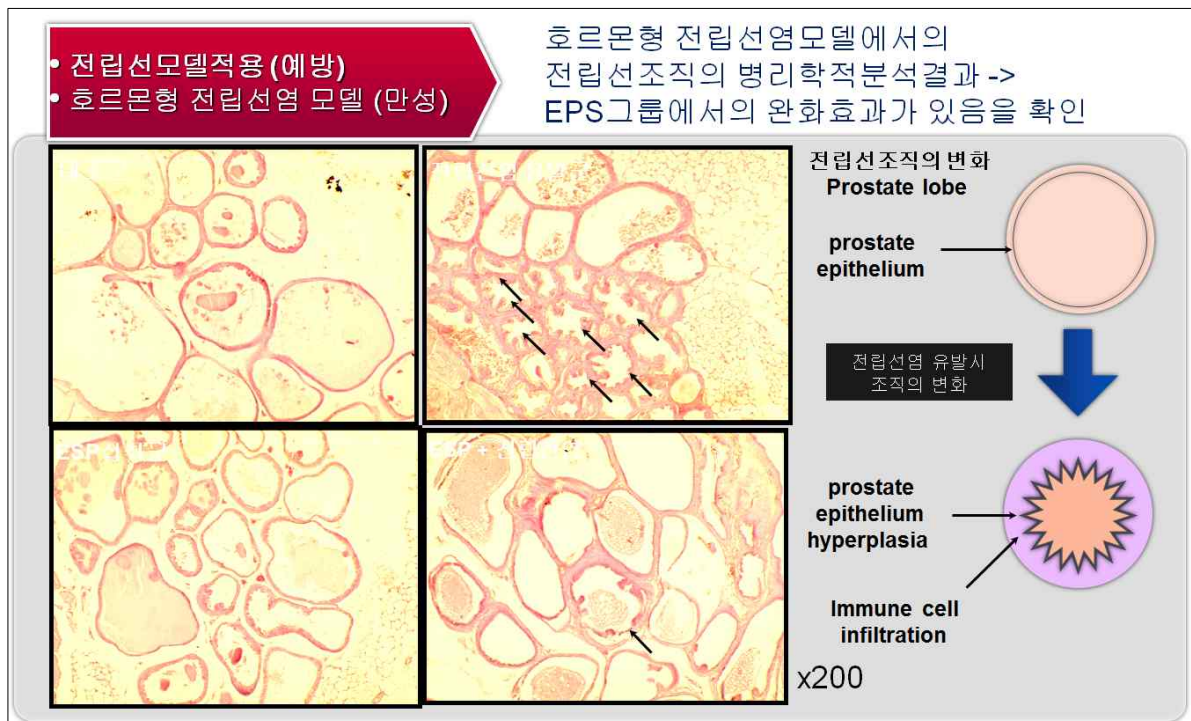


## (2) 전립선 조직의 분석

(가) 4주간 각 그룹에서의 dorsal prostate gland에 대한 변화를 H&E staining 으로 확인 하였다

- ① 28일째 쥐의 전립선을 추출하여 10% neutral formalin에 72시간 보관한다.
- ② 흐르는 수돗물에 한 시간 동안 둔 뒤 카세트에 넣고 파라핀침투기계에 넣고 탈수화 과정 후 파라핀화 된 조직을 파라핀 블록에 넣고 굳힌다.
- ③ 다 굳은 뒤 microtome으로 7 um의 두께로 조직을 잘라서 슬라이드 글라스에 붙여 말린다.
- ④ 다 마른 뒤 xylene에 dipping 20번(3번 반복) 한 뒤 100% 에탄올에 dipping 20번, 95% 에탄올에 dipping 20번, 90% 에탄올에 dipping 20번, 85% 에탄올에 dipping 20번, 80% 에탄올에 dipping 20번, 75% 에탄올에 dipping 20번, 70% 에탄올에 dipping 20번을 한뒤 흐르는 수돗물에서 dipping 20번을 한다.
- ⑤ 이후 hematoxyline에서 1분 동안 dipping한 후 흐르는 수돗물에서 조직 주변의 염색약을 씻어낸다. 암모니아에서 30초 동안 dipping하여 색깔을 고정한 뒤 다시 흐르는 수돗물에서 조직 주변의 암모니아를 씻어낸다. eosin에서 30초 동안 dipping 한 후 흐르는 수돗물에서 조직 주변의 염색약을 씻어낸다.

- ⑥ 다시 탈수화를 위해 70% 에탄올에 dipping 20번, 75% 에탄올에 dipping 20번, 80% 에탄올에 dipping 20번, 85% 에탄올에 dipping 20번, 90% 에탄올에 dipping 20번, 95% 에탄올에 dipping 20번, 100% 에탄올에 dipping 20번, xylene()에 dipping 20번(3번 반복) 한다.
- ⑦ mountain solution 으로 cover glass를 덮는다.
- ⑧ 상온에서 2일동안 건조 시키고 사진을(400배율) 찍는다.



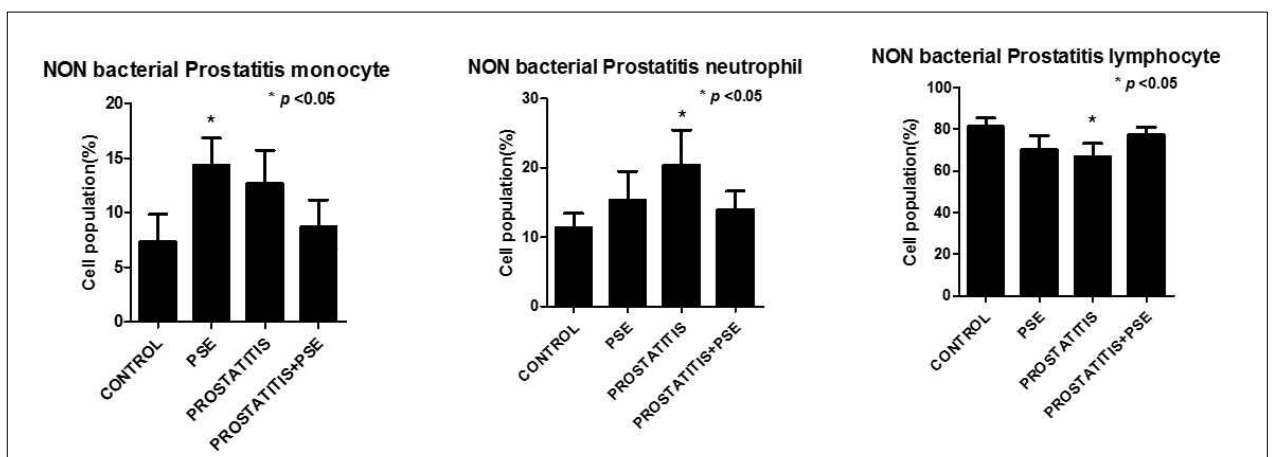
- (나) 그 결과, 전립선 비대증을 유도한 조직에서는 정상조직과 비교하였을 때 내피세포 (epithelial cell)의 이상증식(hyperplasia)을 비롯하여 supporting stroma (SS)가 증가함을 알 수 있었다.
- (다) 또한 정상조직에 비해 SS안의 면역세포의 침윤과 섬유화된 부위가 증가함을 확인할 수 있었다.
- (라) 그에 비해 전립선 비대증 유도와 함께 EPS를 섭취시킨 그룹에서는 전립선 비대증 유도 그룹에 비해 전립선 내피 조직의 이상증식과 섬유화가 적었음을 확인하였다.
- (마) EPS만 섭취한 그룹의 경우 정상조직과 유사하여 EPS 자체는 전립선 조직의 이상을 가져오지 않음을 알 수 있다.

### (3) 혈액 내 염증세포의 수 측정

(가) 각 그룹에서의 염증의 정도를 분석하기 위해 마우스의 혈액 내 neutrophil의 수치를 측정하였다.

- ① 각 동물그룹에서 혈액 내 염증세포의 측정을 위하여 실험동물의 말초혈액 (peripheral blood)를 facial vein을 통하여 채취하였다.
- ② 20 ul를 EDTA Tube에 넣고 상온에서 EDTA와 섞는다.
- ③ 여기서 2  $\mu$ l를 따서 슬라이드에 떨어뜨리고 부채꼴 모양으로 박충도말법(thin smear method)한다.
- ④ 상온에서 2일 동안 말린다.
- ⑤ Methanol 30초, DQII 1분, DQI 30초 염색 후 Ethanol로 빠르게 고정한다.
- ⑥ xylene에 잠시 담갔다가 mountain solution 으로 cover glass를 덮는다.
- ⑦ 상온에서 2일 동안 건조 시킨다.
- ⑧ 쥐 한 마리 당 monocyte와 neutrophil, lymphocyte의 총 개수가 100개를 세어 계산한다.

(나) 면역세포의 형태학적특징을 통하여 Differential cell counting을 수행하였고 결과를 현미경 관찰을 통하여 분석하였다.



(다) 우선 전립선 비대증 유도 그룹에서 염증세포가 증가함에 비해 EPS를 먹인 전립선 비대증 유도그룹에서는 염증세포의 감소를 확인할 수 있었다.

(라) 직접적으로 전립선비대증에 대한 완화효과를 말해주지는 못하지만 병리학적인 소견에

서의 전립선 비대증 완화에 연관되어 있는 결과라고 볼 수 있다.

- (마) 림프구는 전립선 비대증 유도그룹에서 감소되었지만 EPS를 먹인 전립선 비대증의 경우 다시 정상그룹의 수치로 증가하는 경향을 확인 할 수 있다.
- (바) 대식세포를 분석한 결과 전립선 비대증 유도 그룹에서는 정상그룹에 비해 증가하는 경향을 보였지만 EPS섭취한 전립선 비대증 그룹에서 다시 정상그룹의 수치와 유사하게 감소하는 경향을 보였다. 다시 말해, 혈액 세포의 변화를 관찰한 결과는 EPS 투여 군에서 염증세포인 monocyte와 neutrophils이 전립선 비대증을 보인 마우스에 비하여 적었음을 보여준다.

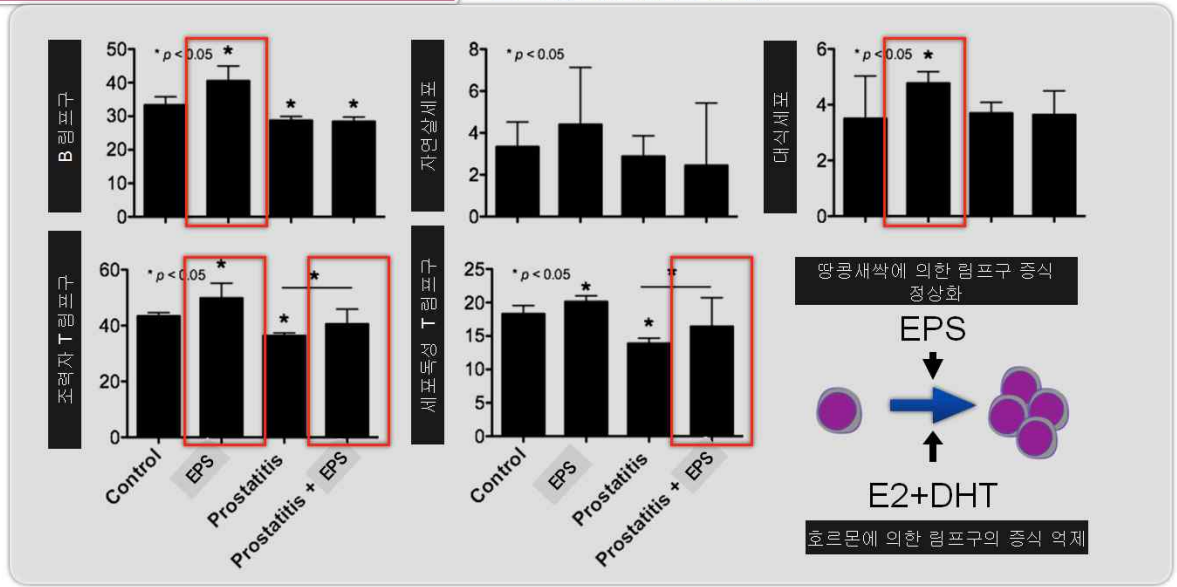
#### (4) 비장 세포 측정

(가) 특히 비장세포는 숙주의 시스템릭한 면역반응을 모니터링할 수 있는 주요한 면역장기로서, 본 연구진은 각 실험그룹별로, 면역세포의 비율이 어떻게 차이가 있는지를 확인하기 위하여 FACS를 수행하였다.

- ① 비장세포의 FACS 분석방법으로 4주 동안 사육된 마우스의 비장을 적출한 뒤, 비장세포를 dissociation시키기 위하여 Tissue grinder (sigma)를 사용하였다.
- ② 적출된 비장세포는 RBC를 제거하기 위하여 LCK lysis buffer (조성) 을 이용하였으며, 이후, 1500 rpm에서 5분간 원심분리를 한 뒤, 세포수를 측정하였다.
- ③ 세포수를 측정하여, 전체 비장세포수를 측정하였고, FACS분석을 하기 위하여  $2 \times 10^6$  cell에 대하여 각각의 FACS 형광염색을 수행하였다.
- ④ FACS 형광염색에 사용된 항체와 희석배수는 다음과 같다: 1:100 of Anti-CD19-PE conjugated (BD bioscience, MA, USA), 1:100 of Anti-F4/80-PE conjugated, 1:100 of anti-DX5a-FITC conjugated, 1:100 of anti-CD3-APC conjugated, 1:100 of anti-CD4-PE conjugated, 1:100 of anti-CD8-PEcy5 conjugated.
- ⑤ 염색을 수행하기 위하여, 각각의 희석배율을 세포에 10분간 반응시키고, 반응된 세포를 동량의 4% paraformaldehyde를 이용하여, 고정하였다.
- ⑥ 고정된 세포는 FACS Caliber를 이용하여 측정하였으며, 측정이후에 데이터는 FlowJo를 이용하여 분석하였다.

- 전립선모델 적용 (예방)
- 호르몬형 전립선염 모델 (만성)

호르몬 유도 전립선염 마우스에서의 비장세포내 면역세포분포에 대한 FACS 분석 -> EPS처리 그룹에서의 면역세포비율이 효과적으로 증가 -> 면역증가효과를 보임



(나) 그 결과, EPS를 처리한 그룹에서 B림프구와 조력자 T림프구와 대식세포, 세포독성 T림프구가 증가했음을 알 수 있었다.

(다) 전립선 비대증이 유도된 그룹에서는 T림프구가 대조군에 비해 감소하였지만, EPS를 섭취한 전립선 비대증이 유도된 그룹에서는 다시 T림프구가 정상수치로 돌아오는 것을 확인할 수 있었다. 비장에서의 면역세포의 변화의 특징은 전체적으로 EPS 처리군에서 전체적으로 면역항진이 나타남을 알 수 있다.

(5) 전립선비대증 유발 마우스에서 EPS 투여 후의 효과에 대한 요약

(가) 호르몬에 의하여 유발된 전립선 비대증 조직이 EPS를 섭취한 그룹에서 염증이 완화된 것을 병리학적으로 확인하였다.

(나) EPS에 의하여 면역세포 중 T림프구의 증식을 in vivo 실험에서 증명하였으며, 이는 앞서 박테리아성 전립선염의 결과와 유사함을 알 수 있다.

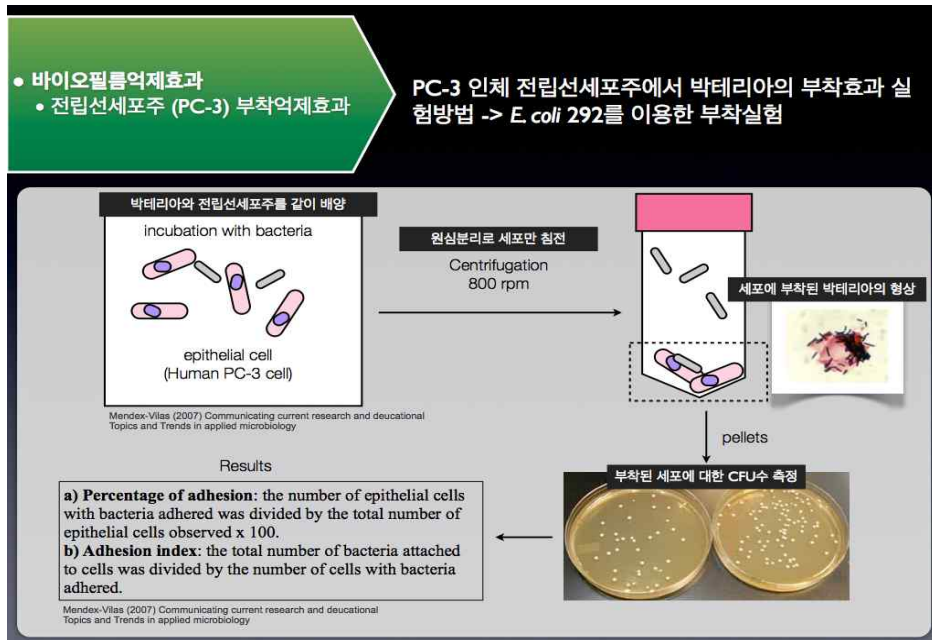
(다) EPS 자체에 의한 면역 활성화기능이 림프구 증식에 영향을 주었고, 호르몬 유도 전립선염을 감소시켜줄 수 있음을 확인하였다. 이는 호르몬에 의한 전립선 비대증에 대

해 제한적이지만 예방 효과로 볼 수 있다.

## 7. 요도 내 세균 부착 및 증식에 관여하는 바이오필름 형성에 대한 EPS 효과

### 가. 연구 배경

생체 내에서의 바이오필름은 치아나, 요도 등에 생기며, 최근 바이오필름 형성이 원인이 되어 박테리아의 항생제 내성이나, 만성염증에 관한 다양한 질환들이 소개되고 있다. 특히 전립선염 가운데, 만성전립선염(CBP)의 경우 바이오필름에 의한 영향이 상당히 높으며, 유일한 치료방법으로는 항생제 요법이 전부이다. 하지만, 본 연구진은 EPS에 대한 직접적인 항생 효과를 보는 것이 아니라, 바이오필름의 억제에 대한 부분에 초점을 맞추었다. 우선 전립선 세포주에 대한 부착력 실험을 통하여, 박테리아가 EPS가 존재하는 상황에서 어떠한 변화가 있는지를 확인할 수 있는 실험과, 바이오필름의 형성자체에 영향을 주는지, 혹은 바이오필름의 부착력에는 어떠한 차이가 있는지를 알아보기 위한 ‘드립플로어실험’을 수행하였다.



### 나. 연구내용 및 결과

#### (1) 전립선 세포주, PC-3에 대한 부착력 실험

##### (가) PC-3 전립선세포주 (인체기원)의 부착력 시험방법

- ① E. coli 292 박테리아를 전날 배양한다. (12 hour in LB)
- ② O.D 값을 측정하여 박테리아수를 측정 한다

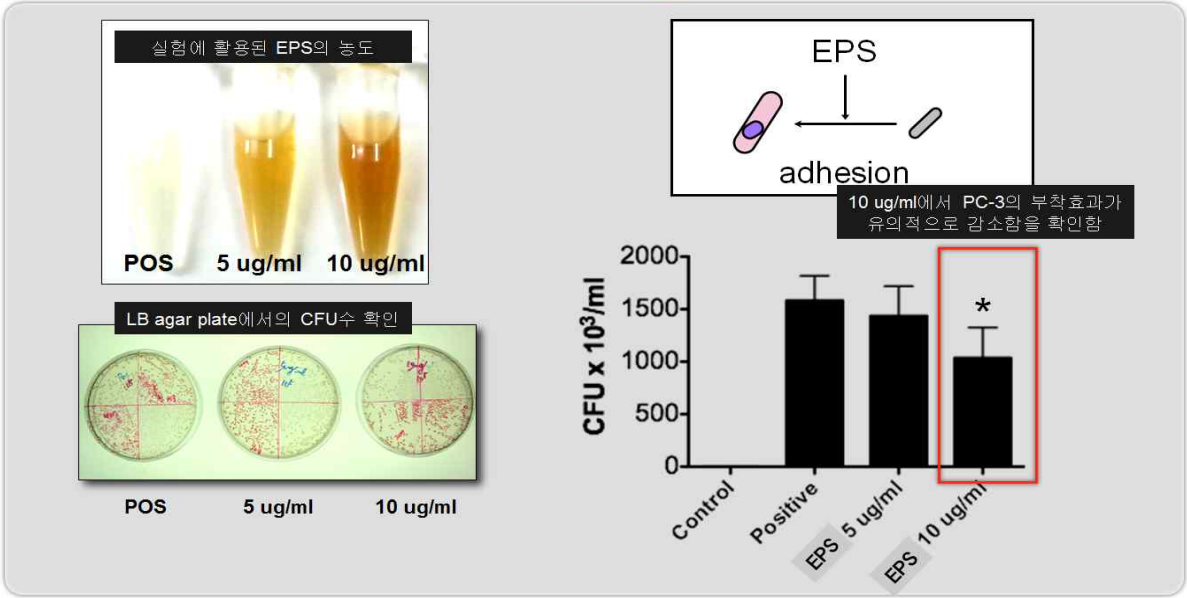
- ③ 1번 RPMI (plain)을 이용하여 washing 한다 10 ml이용
- ④ RPMI로 희석하여 둔다 ( $4 \times 10^7$  cfu/ml RPMI)
- ⑤ RPMI로 희석된 bacteria에 EPS를 섞어준다 (희석) (final  $2 \times 10^7$  cfu/ml RPMI)
- ⑥ 10분간 lower rpm으로 RT에서 incubation 한다
- ⑦ cell을 counting하여  $2 \times 10^5$  cell/ml로 만들어준다
- ⑧ cell 500  $\mu$ l + bacteria 500  $\mu$ l을 섞어준다
- ⑨ 1시간 배양한다. 37도
- ⑩ 800 rpm 5 min RT
- ⑪ 상층액버리고 1ml PBS로 같은 조건에서 washing
- ⑫ 800 rpm 5 min RT
- ⑬ 300  $\mu$ l 0.05% EDTA+Trypsin으로 10분간 incubation
- ⑭ 700 ml LB broth 를 처리하고 RT에서 10분간 incubation, plating을 한다.
- ⑮ 12시간 배양 한다.

#### (나) 실험 결과

전립선세포주의 부착력을 확인하기 위하여, EPS 5  $\mu$ g/ml와 10  $\mu$ g/ml를 각각 사용하여 결과를 얻었다. 그 결과, 10  $\mu$ g/ml에서 통계적으로 유의하게, 전립선세포주에 부착된 박테리아 (292-전립선유발 박테리아)의 수가 감소한 것을 확인할 수 있었다. 이는 5  $\mu$ g/ml에 비하여 높은 수준의 효과를 보였으며, 이 결과를 통해 추정하건데 더 높은 농도에서 부착력 억제가 나올 수 있을 것으로 판단되지만, 세포의 삼투압이나, 다양한 독성을 고려하여 보았을 때, 본 실험에서 사용된 EPS 농도에서도 충분한 효과가 있을 것으로 판단된다.

- 바이오필름억제효과
- 전립선세포주 (PC-3) 부착억제효과

PC-3 인체 전립선세포주에서 박테리아의 부착효과가 EPS에 의하여 감소되는 것을 확인하였음



## (2) 바이오필름 형성 실험

바이오필름은 크리스탈 바이올렛에 염색이 된다는 점을 고려, 크리스탈바이올렛의 정량분석을 위하여 흡광도법을 이용하였다. 504 nm 파장에서 측정이 되며, 염색된 바이오필름의 정량을 위하여, 형성된 바이오필름 부분을 흡광측정을 위해 에탄올을 이용한 추출을 시도하였다. 바이오필름의 폴리 L-lysine은 세포의 표면에서 발현하는 RGD binding 사이트를 제공하여 주는 동일한 효과를 보인다. 따라서 이를 코팅한 플레이트에 박테리아를 12시간 배양하여, 바이오필름이 poly-L-lysine에 부착되도록 incubation한다. 이후 이를 정량화 하였다.

### (가) 실험방법

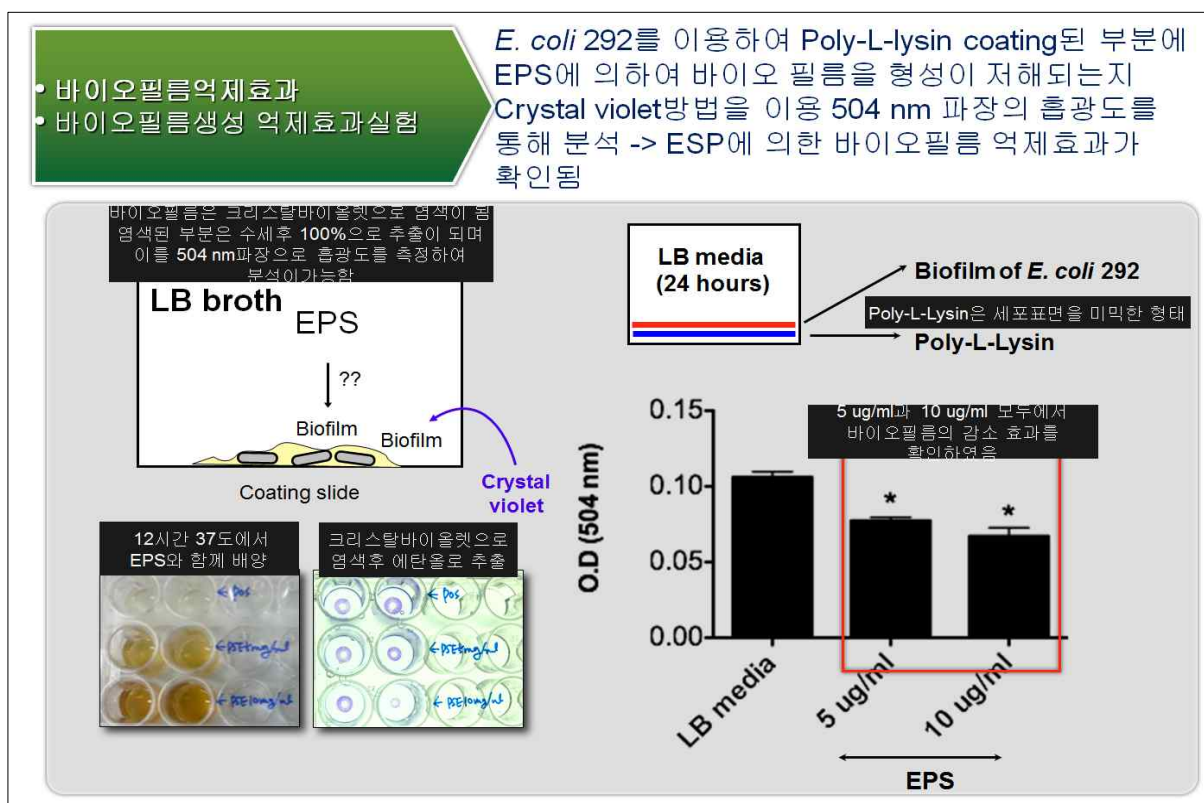
- ① 292 박테리아를 전날 배양한다. (12 hour in LB)
- ② 24 well plate에 Poly-L-Lysin을 200  $\mu$ l 처리 후 말려준다.
- ③ 박테리아를 LB 10 ml에  $1 \times 10^8$  cfu/ml으로 LB broth로 만들어준다.
- ④ EPS를 각각 넣어주어 최종농도를 5 mg/ml, 10 mg/ml, 50 mg/ml으로 만들어준다
- ⑤ RT에 10분간 incubation을 한다.
- ⑥ 24 well plate에 1 ml씩 넣어준다.
- ⑦ 12시간 배양한다.
- ⑧ PBS로 3번 씻어준다.
- ⑨ crystal violet으로 staining 한다.
- ⑩ PBS로 3번 씻어준다.



- ⑪ 사진을 찍는다.
- ⑫ EtOH로 표백한 후 상층액을 96 well plate에 옮긴다.
- ⑬ 504 nm으로 측정한다 / 6층

### (나) 실험 결과

실험결과, 이는 PC-3 부착과 마찬가지로 EPS농도에 따라 바이오필름의 생성이 감소됨을 확인하였다. 이는 항생제와 같은 강력한 제거능력을 보이지는 않지만, 바이오필름이 유의적으로 감소하였다. 아마 EPS에 존재하는 특정 화합물에 의한 작용이거나 혹은 미량원소에 의한 안티-킬레이팅에 의한 효과일 수 있다. 본 결과를 통하여 확인할 수 있는 것은 바이오필름이 EPS에 의하여 유의적으로 감소하였다는 점이다.



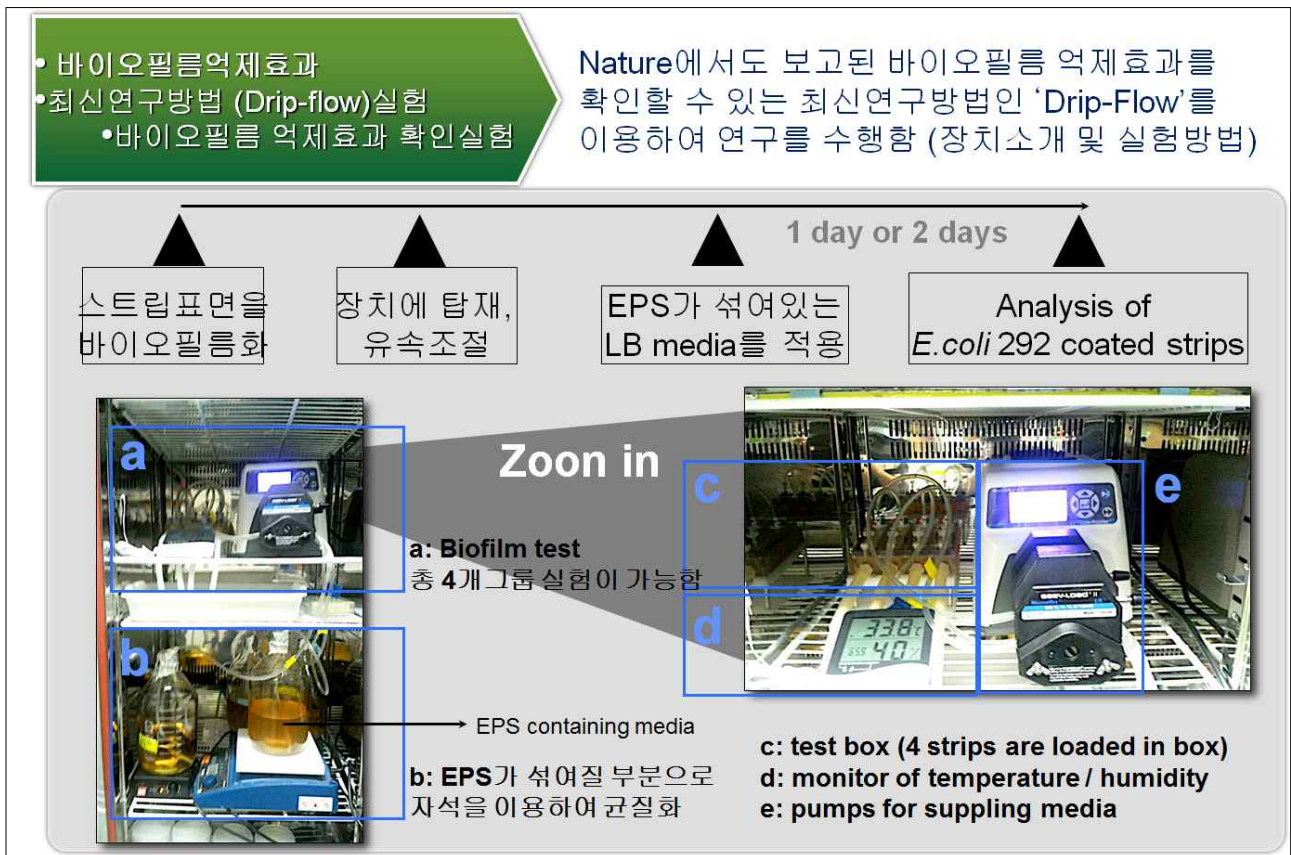
### (3) 드립-플로어를 이용한 바이오필름 형성 연구

#### (가) 실험방법

드립플로어시스템은 DFR110을 이용하여 수행하였다. 이는 박테리아의 바이오필름의 억제효과나 증가효과를 확인할 수 있는 방법으로 '네이처'에 소개된바 있다. 이 방법을 위하여, 미리 292 박테리아를 이용하여 글라스표면에 박테리아를 배양한다. 글라스표면에 박테리아가 배양이 되면, 이를 장치에 넣고, 24시간 동안 37도에서 1% (5 ug/ml), 혹은 5% (10 ug/ml)가 포함되어 있는 LB broth를 흘려주고, 배양 24시간 후, 모든 글라스에 동일하게 원심분리를 하여 원심력을 가하는데, 이는 요도에서의 오줌이 나오는 것과 같은 물

리적인 효과로 생각을 하고 바이오필름의 표면 부착력을 조사하였다. 이후 글라스 표면을 confocal fluorescence microscope를 이용하여 CLSM이미지를 얻어낸다. 장치의 형태는 아래의 그림과 같다.

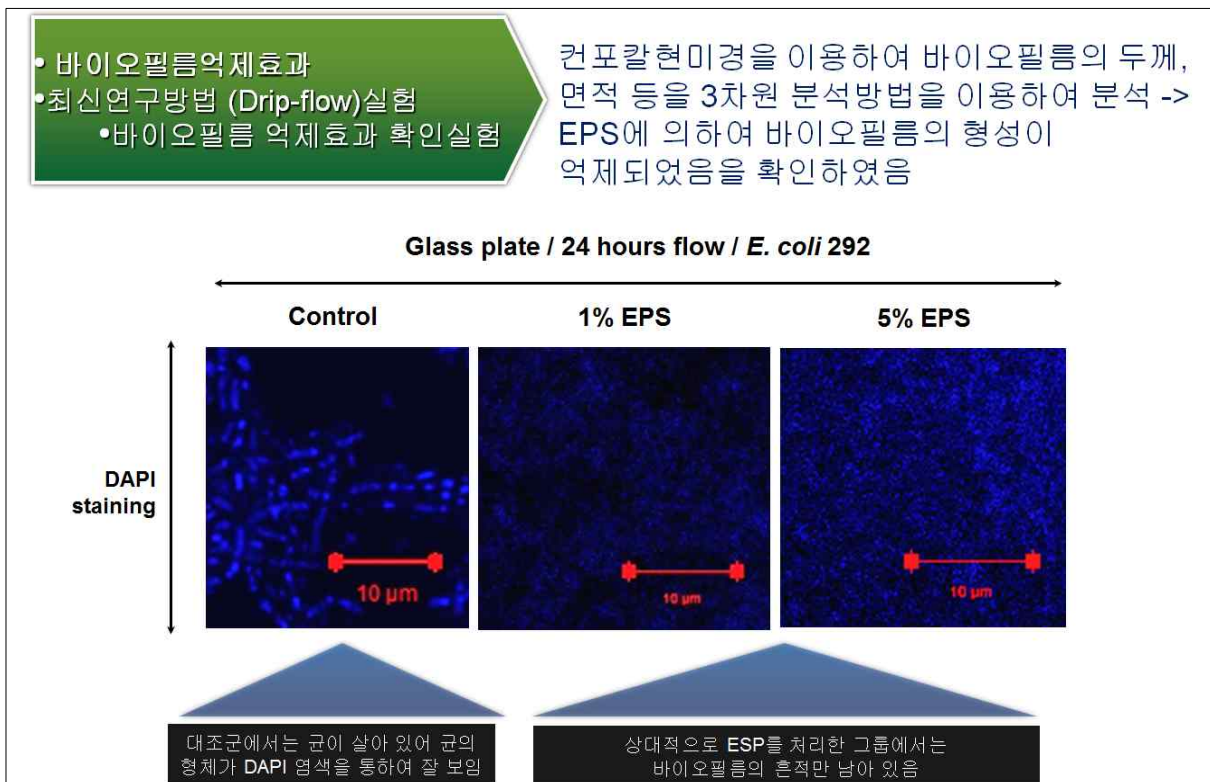
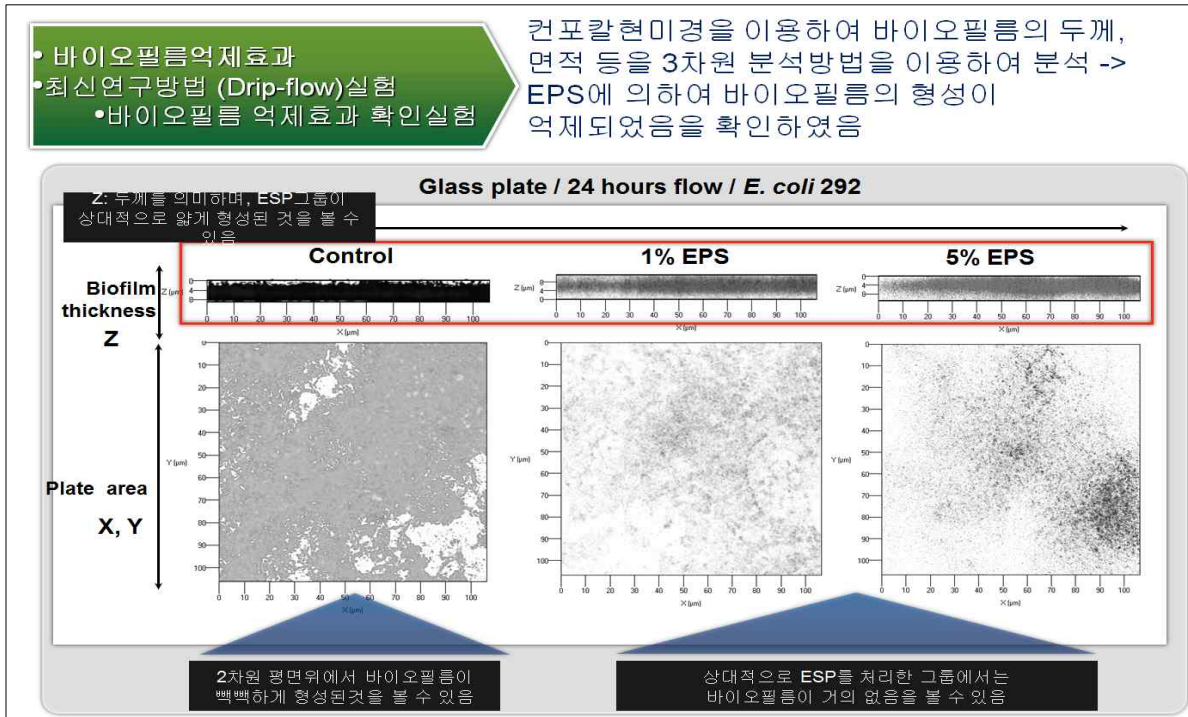
- ① 스트립 (글라스)위에 292박테리아를 12시간 배양한다.
- ② 배양된 글라스를 드립플로어시스템에 탑재한다.
- ③ 탑재 시에 남는 글라스부분은 다이아몬드칼로 제거하여 넣어준다.
- ④ 각각의 솔루션을 미리 준비한다. (LB, LB+1% EPS, LB + 5% EPS)
- ⑤ 배양조건은 37도로, 1초-2초에 1방울씩 표면을 흐르도록 한다.
- ⑥ 각도는 10도를 유지하도록 한다.
- ⑦ 24시간 뒤에 글라스를 슬라이드 글라스 원심분리기에 넣고 500 rpm 회전한다.
- ⑧ 이후 얻어진 슬라이드를 메탄올로 고정한다
- ⑨ 고정된 박테리아는 Triton-x와 DAPI를 이용하여 염색한다.
- ⑩ 컨포칼현미경으로 검경한다.



#### (나) 실험결과

실험결과 일정 표면적에 존재하는 바이오필름의 양이 눈에 두드러질 정도의 양으로 차이가 있음을 확인하였다. 대조군의 경우 박테리아의 생장이 눈에 보일 정도로 두꺼운데 반하여, EPS의 1%와 5%를 처리해준 그룹에서의 바이오필름의 생성율은 감소하였다. 이는 현미경으로 확대한 결과에서도, 대조군에서는 살아있는 박테리아가 눈에 보이지만, 1%와 5%

의 EPS에서는 물리력으로 가볍게 떨어져 나간 박테리아의 흔적만 남아있음을 확인하였다. 따라서 본 결과를 통해 확인할 수 있는 것은 EPS가 바이오필름의 부착력을 억제할 수 있다는 점을 증명하였다.



## 제4절 새싹땅콩 나노분말 및 이중미세캡슐 이용한 전립선 예방 제품의 저장중 품질 연구

### 1. 새싹 땅콩 나노분말 또는 이중 미세캡슐을 이용한 전립선 예방 제품의 저장 중 품질연구

#### 가. 새싹 땅콩차

##### (1) 레스베라트롤 함량 측정

새싹 땅콩 차 속의 레스베라트롤 함량 분석은 고속 액체 크로마토그래피 (HPLC)을 이용하여 시행되었다. HPLC 시료의 전처리 과정은 다음과 같다. 샘플을 80℃물 100mL에 3분간 우려낸 후, 이를 감압농축 후 필터하여 시료로 사용하였다. HPLC는 Agilent Technologies (1200 series Clara, CA, USA)를 사용하였고, 컬럼은 5µm, 4.6 mm X 250mm (Sunfire™C18,WaterLtd.,Ireland)를 사용하였으며 검출기는 UV를 사용하였다. HPLC 분석 조건은 다음과 같다. 이동 용매는 acetonitrile, Distilled water의 이동상을 사용 하였다. 시료는 20 ul 주입하였고, 이동상의 속도는 0.6 ml/min이며, UV 는 306 nm에서 수행하였다. 이동상의 변화는 Table 0 와 같다. 결과는 standard 레스베라트롤의 retention time과 면적을 시료의 것과 비교하여 계산하였다.

Table 0. Condition of HPLC analysis about mobile pahse.

Time	Acetonitrille (%)	Distilled water (%)
0	0	100
10	75	25
20	90	10
25	0	100
30	0	100

##### (2) pH

시료를 4℃, 35℃, 45℃, 55℃에서 10 주 동안 저장하면서 2주 간격 (0, 2, 4, 6, 8, 10 주)으로 pH 변화를 측정하였다. 저장 중 pH 변화는 다양한 온도에서 저장한 새싹 땅콩 티백을 꺼내어 30 분 동안 실온에 방치한 뒤, 80℃물 100mL에 3분간 우려낸 후, pH meter(Orion 900A, Boston, MA, USA)를 이용하여 측정하였다.

##### (3) 색도

색도는 4℃, 35℃, 45℃, 55℃에서 저장된 시료를 Hunter 색차계 (Minolta CT-310, Tokyo, Japan) 를 사용하여 밝은 정도를 나타내는 L-value (lightness), 붉은색 정도를 나타내는 a-value (redness), 노란색 정도를 나타내는 b-value (yellowness) 를 처리군

별로 10 회 반복 측정하였다. 이때 사용한 표준 백색판 (standard plate) 의 L, a, b 값은 각각 98.07, 0.18, 1.57 이었다.

#### (4) 관능평가

시료를 4℃, 35℃, 45℃, 55℃에서 10 주 동안 저장하면서 2주 간격 (0, 2, 4, 6, 8, 10 주) 으로 관능검사를 실시하였다. 관능검사를 위한 패널은 기존에 관능검사를 한 경험이 있는 숙련된 세종대학교 식품공학과 대학원생 10 명으로 이루어졌다. 시료를 세자리 난수 표로 표기하여 다양한 온도에서 저장한 새싹 땅콩 티백을 꺼내어 30 분 동안 실온에 방치한 뒤, 80℃물 100mL에 3분간 우려내고 각각 떨어져 앉게 하여 검사의 방해를 최소한으로 하여 관능평가를 실시하였다. 실험은 7 점법으로 (1=대단히 약하다, 4=보통이다, 7=대단히 강하다) 을 사용하여 평가하였다.

### 나. 새싹 땅콩 타블렛

#### (1) 레스베라트롤 함량 측정

새싹 땅콩 타블렛 속의 레스베라트롤 함량 분석은 고속 액체 크로마토그래피 (HPLC)을 이용하여 수행되었다. HPLC 시료의 전처리 과정은 다음과 같다. 샘플을 증류수에 녹여 액체화 하였다. 그 후 유기용매를 사용하여 레스베라트롤을 추출하였다. 이를 감압농축 후 필터하여 HPLC 시료로 사용하였다. HPLC는 Agilent Technologies (1200 series Clara, CA, USA)를 사용하였고, 컬럼은 5 $\mu$ m, 4.6 mm X 250mm (Sunfire™C18,WaterLtd.,Ireland)를 사용하였으며 검출기는 UV를 사용하였다. HPLC 분석 조건은 다음과 같다. 이동 용매는 acetonitrile, Distilled water의 이동상을 사용 하였다. 시료는 20 ul 주입하였고, 이동상의 속도는 0.6 ml/min이며, UV 는 306 nm에서 수행 하였다. 이동상의 변화는 Table 0 와 같다. 결과는 standard 레스베라트롤의 retention time과 면적을 시료의 것과 비교하여 계산하였다.

#### (2) pH

시료를 4℃, 35℃, 45℃, 55℃에서 10 주 동안 저장하면서 2주 간격 (0, 2, 4, 6, 8, 10 주) 으로 pH 변화를 측정하였다. 저장 중 pH 변화는 다양한 온도에서 저장한 새싹 땅콩 타블렛을 꺼내어 30 분 동안 실온에 방치한 뒤, 증류수를 넣어 sonic 처리한 후, pH meter(Orion 900A, Boston, MA, USA)를 이용하여 측정하였다.

#### (3) 색도

색도는 4℃, 35℃, 45℃, 55℃에서 저장된 시료를 Hunter 색차계 (Minolta CT-310, Tokyo, Japan) 를 사용하여 밝은 정도를 나타내는 L-value (lightness), 붉은색 정도를 나타내는 a-value (redness), 노란색 정도를 나타내는 b-value (yellowness) 를 처리군 별로

10 회 반복 측정하였다. 이때 사용한 표준 백색판 (standard plate) 의 L, a, b 값은 각각 98.07, 0.18, 1.57 이었다.

#### (4) 흡습성평가

흡습성은 DVS 측정기기를 통하여 분석하였다. 시료는 가루화 하여 충분한 시간 동안 상대습도의 변화를 관찰하며 흡습성을 평가하였다.

## 2. 파우치 및 액상 음료의 저장중 품질 연구

가. 새싹 땅콩 나노분말 또는 이중 미세캡슐을 이용한 진립선 예방 제품의 저장 중 품질연구

### (1) 새싹 땅콩 파우치

#### (가) 레스베라트롤 함량 측정

새싹 땅콩 파우치가 함유하고 있는 레스베라트롤 정량 분석은 고속 액체 크로마토그래피 (HPLC)를 이용하여 수행되었다. 각 4, 30, 40, 50℃에서 8 주간 저장하면서, 2주 간격 (0, 2, 4, 6, 8주) 으로 저장된 시료를 이용하였으며, HPLC 시료의 전처리 과정은 다음과 같다. 샘플을 유기용매에 녹여 레스베라트롤을 추출하였다. 이를 원심분리하여 상층액을 취한 후 감압농축하고 필터를 이용하여 거른 후 HPLC에 주입하여 사용하였다. HPLC는 Agilent Technologies (1200 series Clara, CA, USA)를 사용하였고, 컬럼은 5 $\mu$ m, 4.6 mm X 250mm (Sunfire™C18,WaterLtd.,Ireland)를 사용하였으며 검출기는 UV를 사용하였다. HPLC 분석 조건은 다음과 같다. 이동 용매는 acetonitrile, Distilled water의 이동상을 사용 하였다. 시료는 20 ul 주입하였고, 이동상의 속도는 0.6 ml/min이며, UV는 306 nm에서 수행하였다. 이동상의 변화는 Table 0 와 같다. 결과는 standard 레스베라트롤의 retention time과 면적을 시료의 것과 비교하여 계산하였다.

#### (나) 색도

색도는 각 4, 30, 40, 50℃에서 저장된 시료를 Hunter 색차계 (Minolta CT-310, Tokyo, Japan) 를 사용하여 밝은 정도를 나타내는 L-value (lightness), 붉은색 정도를 나타내는 a-value (redness), 노란색 정도를 나타내는 b-value (yellowness) 를 처리군 별로 10 회 반복 측정하였다. 이때 사용한 표준 백색판 (standard plate) 의 L, a, b 값은 각각 98.07, 0.18, 1.57 이었다.

#### (다) 관능평가

시료를 각 4, 30, 40, 50℃에서 8 주간 저장하면서, 2주 간격 (0, 2, 4, 6, 8주) 으로 관능검사를 실시하였다. 관능검사를 위한 패널은 기존에 관능검사를 한 경험이 있는 숙련된 세종대학교 식품공학과 대학원생 10 명으로 이루어졌다. 시료를 세자리 난수표로 표기하여 30 분 동안 실온에 방치한 뒤 제시하였으며, 각각 떨어져 앉게 하여 검사의 방해를 최소한으로 하였다. 실험은 7 점법으로 (1=대단히 약하다, 4=보통이다, 7=대단히 강하다) 을 사용하여 평가하였다.

(2) 새싹 땅콩 음료

(가) 레스베라트롤 함량 측정

새싹 땅콩 음료가 함유하고 있는 레스베라트롤 정량 분석은 고속 액체 크로마토그래피 (HPLC)을 이용하여 수행되었다. 각 4, 30, 40, 50°C에서 8 주간 저장하면서, 2주 간격 (0, 2, 4, 6, 8주) 으로 저장된 시료를 이용하였으며, HPLC 시료의 전처리 과정은 다음과 같다. 샘플을 감압농축하고 필터를 이용하여 거른 후 HPLC에 주입하여 사용하였다. HPLC는 Agilent Technologies (1200 series Clara, CA, USA)를 사용하였고, 컬럼은 5µm, 4.6 mm X 250mm (Sunfire™C18,WaterLtd.,Ireland)를 사용하였으며 검출기는 UV를 사용하였다. HPLC 분석 조건은 다음과 같다. 이동 용매는 acetonitrile, Distilled water의 이동상을 사용 하였다. 시료는 20 ul 주입하였고, 이동상의 속도는 0.6 ml/min이며, UV 는 306 nm에서 수행하였다. 이동상의 변화는 Table 0 와 같다. 결과는 standard 레스베라트롤의 retention time과 면적을 시료의 것과 비교하여 계산하였다.

(나) 색도

색도는 각 4, 30, 40, 50°C에서 저장된 시료를 Hunter 색차계 (Minolta CT-310, Tokyo, Japan) 를 사용하여 밝은 정도를 나타내는 L-value (lightness), 붉은색 정도를 나타내는 a-value (redness), 노란색 정도를 나타내는 b-value (yellowness) 를 처리군 별로 10 회 반복 측정하였다. 이때 사용한 표준 백색판 (standard plate) 의 L, a, b 값은 각각 98.07, 0.18, 1.57 이었다.

(다) 관능평가

시료를 각 4, 30, 40, 50°C에서 8 주간 저장하면서, 2주 간격 (0, 2, 4, 6, 8주) 으로 관능검사를 실시하였다. 관능검사를 위한 패널은 기존에 관능검사를 한 경험이 있는 숙련된 세종대학교 식품공학과 대학원생 10 명으로 이루어졌다. 시료를 세자리 난수표로 표기하여 30 분 동안 실온에 방치한 뒤 제시하였으며, 각각 떨어져 앉게 하여 검사의 방해를 최소한으로 하였다. 실험은 7 점법으로 (1=대단히 약하다, 4=보통이다, 7=대단히 강하다) 을 사용하여 평가하였다.

3. 연구 내용 및 결과

1. 제 1차년도 (2012)

가. 새싹 땅콩 나노분말 또는 이중 미세캡슐을 이용한 전립선 예방 제품의 저장 중 품질연구

(1) 새싹 땅콩차

(가) 레스베라트롤 함량 측정

새싹땅콩차의 주요한 기능성 성분은 레스베라트롤이라고 할 수 있다. 레스베라트롤 함량 측정은 HPLC를 이용하여 진행하였다. 새싹땅콩 차를 4, 35, 45, 55°C에 저장하면서

10주 동안, 2주 간격으로 레스베라트롤의 함량의 변화를 Figure 1에 나타내었다. 처음 새싹땅콩차의 레스베라트롤 함량은 약 58ug/ml로 측정되었다. 이를 4°C에 저장하였을 경우 레스베라트롤의 함량은 거의 변화가 없었으며 35, 45°C에 저장 시에는 4°C에 비해 감소하는 경향을 보였으나 그 폭은 크지 않았다. 하지만 55°C에 저장 하였을 때에는 4주 경과 후 약 37ug/ml, 10주 경과 후 약 22ug/ml로 레스베라트롤의 함량이 급격하게 감소하였다. 실험의 결과 저장 온도가 높을수록 레스베라트롤 함량의 감소폭이 커졌으나, 저장 권장 온도에서는 크게 변화가 없을 것이라고 생각된다.

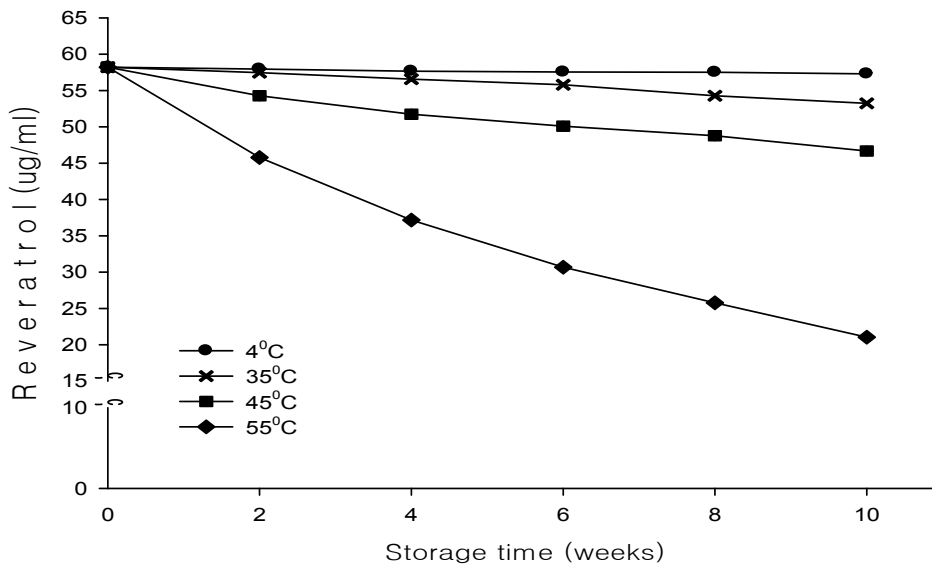


Figure 1. Quantitative analysis in resveratrol of peanut sprout tea during storage at various temperatures for 10weeks.

#### (나) pH

저장 중 이화학적 변화를 평가하기 위하여 pH를 측정하였다. 10주 동안 4, 35, 45, 55°C에 새싹땅콩차를 저장하며 pH를 측정한 결과는 Figure 2와 같다. 새싹땅콩차를 80°C, 100ml의 물에 3분간 우려냈을 때의 pH를 측정하였다. 처음의 pH는 약 6.3이었으며 4°C와 35°C에 저장 하였을 경우 저장 기간 동안 pH가 크게 변화하지 않았다. 하지만 45, 55°C에 저장 하였을 시에는 pH가 각각 5.0, 4.8로 처음보다 현저하게 감소하였다. 하지만 이 결과는 권장 저장 온도인 실온에서는 저장 기간 동안 pH의 변화는 거의 없을 것으로 분석되었다.



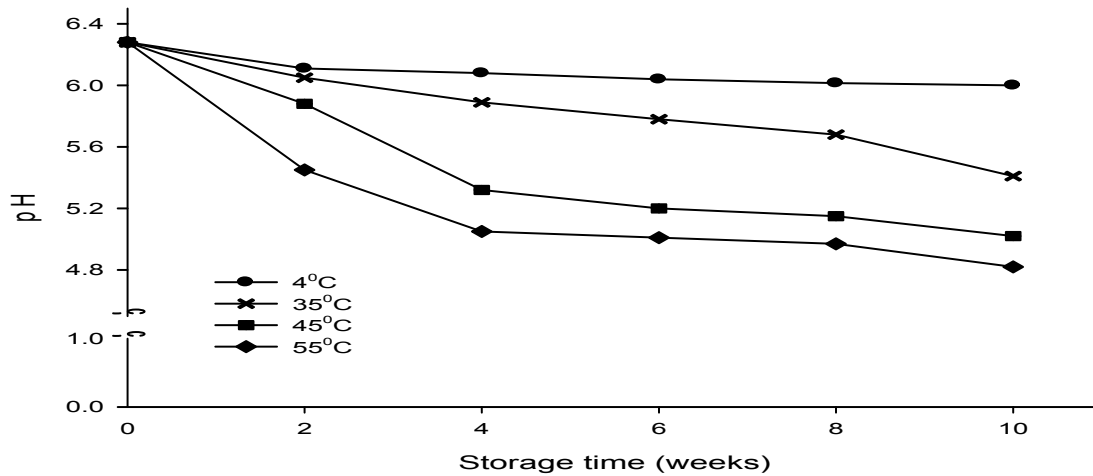


Figure 2. Change in pH of peanut sprout tea during storage at various temperatures for 10weeks.

(다) 색도

저장 중 새싹땅콩 차의 색도는 Table 1과 같다. 색은 관능적 품질에 영향을 미치는 중요한 요인 중 하나라고 할 수 있다. 색도는 새싹땅콩 차를 80°C, 100ml의 물에 3분간 우려냈을 때를 측정하였다. 색차계로 측정된 Hunter Value 결과의 처음 값은 밝기를 나타내는 L값은 68.23, 적색도를 나타내는 a값은 1.07, 황색도를 나타내는 b값은 6.38 이었다.

4°C에 저장한 경우 L값이 10주 경과 후 64.52로 측정되어 약간 감소하는 경향이 있지만 많은 변화를 보이지 않았다. a값과 b값의 경우도 각각 0.92, 6.88로 4°C에 저장 했을 시에는 거의 변화 하지 않았다. 35, 45°C에 저장 하였을 때에는 L값은 각각 41.63, 40.27로 두 온도에서 처음보다 비슷하게 낮아졌다. 냉장 보다 높은 온도에서 저장 한 결과 티백을 우려냈을 시, 색이 더 어두워지는 것으로 분석되었다. a값 역시 35°C는 -0.10, 45°C는 -0.27으로 비슷하게 감소하였다. 이는 처음보다 더 황색을 띄는 것으로 분석되었다. b값의 경우 처음보다 증가하긴 하였지만 45°C에서 저장한 샘플이 17.25로 35°C의 13.45보다 더 높은 값을 나타내었다. 이는 더 높은 온도에서 저장할수록 적색을 띄는 것으로 분석되었다. 가장 높은 온도 군인 55°C에 저장한 새싹땅콩 차는 저장 후 2주차에 측정하였을 때 L값은 47.82로 처음보다 급격하게 감소하였으나, 4주 저장 후 측정하였을 때에는 44.30으로 2주차와 비교하였을 때 큰 차이를 보이지 않으며 감소하였다. 또한 a값은 처음보다 점점 낮아져 10주차에 -0.35의 값을 나타내었고, b값은 점점 높아져서 19.26의 값이 되었다. 4°C에 저장 할 경우 L, a, b 값의 변화가 거의 없고, 35, 45°C에 저장 하였을 때 L값과 a값은 감소하고 b값은 증가하는 비슷한 양상을 보이며 변화하였고, 55°C의 경우 변화하는 경향은 다른 군과 같았으나, 가장 많이 L, a, b 값이 변화하는 것으로 나타났다.

Table 1. Change in color of peanut sprout tea during storage at various temperatures for 10weeks.

Color value	Initial value	Temp. (°C)	Storage time (weeks)				
			2	4	6	8	10
L	68.23±0.36	4	65.42±0.30	64.81±0.06	64.60±0.08	64.54±0.19	64.52±0.21
		35	56.59±0.07	48.31±1.39	46.20±0.16	42.79±0.04	41.63±0.25
		45	53.52±0.19	48.75±2.08	44.62±0.24	41.35±0.37	40.27±0.18
		55	47.82±1.92	44.42±1.20	43.39±0.07	40.21±0.19	39.97±0.36
a	1.07±0.08	4	0.99±0.02	0.94±0.03	0.93±0.02	0.93±0.04	0.92±0.02
		35	0.83±0.05	0.35±0.06	0.28±0.01	0.04±0.18	-0.10±0.07
		45	0.50±0.11	0.20±0.04	0.12±0.12	-0.18±0.12	-0.27±0.05
		55	0.48±0.13	-0.14±0.09	-0.23±0.07	-0.29±0.05	-0.35±0.03
b	6.38±0.24	4	6.77±0.29	6.78±0.22	6.80±0.23	6.84±0.17	6.88±0.10
		35	9.67±0.24	10.27±0.23	11.72±0.27	12.96±0.18	13.45±0.15
		45	11.26±0.09	13.62±0.45	14.56±0.18	16.05±0.23	17.25±0.17
		55	12.31±0.18	14.83±0.21	16.26±0.21	18.93±0.31	19.26±0.23

(라) 관능평가

저장 중 새싹땅콩 차의 관능 평가 결과는 Table 2와 같다. 관능적 품질은 식품에서 가장 중요한 요소 중 하나라고 할 수 있다. 새싹땅콩의 관능적 품질을 평가하기 위하여 차의 갈색 정도를 나타내는 brownness, 부유물이 없고 맑고 깨끗한 정도인 clarity, 새싹땅콩의 향, 차의 진하기의 정도인 Strong, 차의 향이 지속되는 정도를 나타내는 durability와 차의 맛을 평가 할 수 있는 항목으로 평가하였다. 그 항목은 sourness, astringency, bitterness, sweetness 이다. 관능 평가는 숙련된 10명을 상대로 7점법을 통하여 평가하였다.

Brownness는 4°C에 저장한 샘플의 경우 저장 중에 점수의 차이가 거의 나지 않았지만 35, 45, 55°C도에서 저장 한 샘플은 시간이 지날수록 갈색의 정도가 높아지는 것으로 나타났다. 이는 색도의 분석결과와 일치하였고, Brownness의 저장 중 증가는 차의 외

관에 긍정적인 영향을 미칠것으로 사료된다. Clarity는 저장 기간과 저장 온도에 상관 없이 약 4점대의 점수로 저장 중에 영향을 받지 않는 것으로 나타났다. 일정한 투명도를 유지하는 것은 저장이 차에 부정적인 영향을 미치지 않는다는 것으로 분석된다. 새싹땅콩의 향은 4℃에 저장 한 샘플보다는 35, 45, 55℃의 높은 온도에서 저장 하였을 때 1점 정도의 높은 점수를 나타내었다. 실온을 권장 온도라고 생각했을 때, 냉장온도보다 더 긍정적인 향을 낼 것으로 사료된다. Strong의 경우 2주차까지 점수의 차이가 없었으나, 4주가 지났을 4℃를 제외한 온도에서 저장한 차들의 Strong이 증가하였다. 이는 저장 할수록 차의 농도가 짙어진다는 것을 의미한다. Durability는 4, 35℃에 저장한 차는 저장 기간 동안 변화를 보이지 않았으나, 45, 55℃에 저장한 차는 차의 지속되는 정도가 더 길어진 것으로 나타났다. 앞의 결과는 차의 저장기간이 길어질수록 차의 외관과 짙은 정도, 지속력이 더 길어져 긍정적인 결과를 나타냈다. 차의 맛의 경우, Sourness는 4, 35, 45℃에서 저장한 경우 강하지 않았지만 55℃ 저장한 차는 신맛이 점점 증가하는 것으로 나타났다. 이는 pH의 변화와 상관 있을 것으로 생각된다. Astringency, bitterness, sweetness 부분은 전체적으로 강하지 않았고 저장 온도와 저장 시간에 따라 많은 점수 차이를 보이지 않아 저장 중에 영향을 거의 받지 않는 것으로 나타났다. 저장 중 새싹땅콩 차의 관능은 외관과 향에서는 차이가 있었으나 이것이 부정적인 변화는 아니었으며, 맛에 관해서는 신맛을 제외한 짙은 맛, 쓴 맛, 단 맛은 거의 변화하지 않았다.

Table 2. Sensory analysis of peanut sprout tea during storage at various temperatures for 10weeks.

	Initial score	Temp. (℃)	Storage time (weeks)				
			2	4	6	8	10
Brownness	3.62±0.92	4	3.50±0.88	3.25±0.70	3.50±0.75	3.50±0.88	3.50±0.70
		35	3.62±0.70	4.37±0.74	4.50±0.88	4.50±0.74	4.74±0.88
		45	4.12±0.74	4.50±0.92	4.50±0.92	4.50±0.74	4.83±0.70
		55	4.75±0.88	5.87±1.20	5.90±0.70	6.12±0.88	6.35±1.20
Charity	4.12±0.74	4	4.50±0.88	4.75±0.88	4.75±0.88	4.75±0.92	4.62±0.70
		35	4.62±1.55	4.62±0.74	4.62±0.74	4.70±0.70	4.74±0.92
		45	4.50±0.75	4.62±0.74	4.62±1.20	4.62±0.88	4.75±1.06
		55	4.50±0.88	4.75±1.03	4.75±0.75	4.74±0.88	4.62±0.74

P e a n u t sprout	3.50±0.88	4	3.00±0.64	3.50±0.75	3.50±0.88	3.75±0.74	3.75±0.75
		35	4.37±1.06	4.50±0.53	4.50±0.92	4.75±0.70	4.75±0.88
		45	4.62±1.20	4.87±1.55	4.90±1.20	4.50±0.74	5.00±1.20
		55	4.50±0.92	4.12±1.55	4.50±0.88	4.75±0.92	5.15±0.70
Strong	2.21±0.75	4	2.12±0.88	2.12±0.64	2.12±0.88	2.25±0.92	2.50±0.74
		35	2.25±0.74	3.00±0.92	3.00±0.88	3.25±0.70	3.25±0.92
		45	2.75±1.03	3.62±1.06	3.62±0.74	4.00±0.88	4.00±1.06
		55	2.37±0.88	3.00±0.92	3.00±0.70	3.15±1.20	3.50±0.88
Durability	2.00±1.06	4	2.37±0.92	2.21±0.64	2.21±1.06	2.35±0.88	2.50±0.64
		35	2.25±1.35	2.62±1.06	2.75±0.88	2.75±0.75	3.00±0.70
		45	3.25±1.03	3.50±1.06	3.50±0.92	3.50±0.88	3.50±0.74
		55	2.21±0.99	2.60±0.92	2.60±1.20	2.75±0.70	2.75±0.92
Sourness	2.21±0.74	4	2.00±0.53	2.12±0.99	2.12±1.06	2.25±0.88	2.21±0.64
		35	2.60±0.92	2.87±0.99	3.00±0.88	3.30±0.70	3.50±1.20
		45	2.62±1.03	3.50±1.06	3.50±0.64	3.75±0.74	4.00±0.75
		55	3.50±1.03	4.12±1.35	4.50±0.74	4.50±1.06	5.00±0.70
Bitterness	2.25±1.03	4	2.00±0.92	2.00±0.53	2.00±0.64	2.25±0.70	2.21±0.64
		35	2.21±0.64	2.50±0.53	2.50±0.88	2.21±0.74	2.50±0.92
		45	2.75±0.74	3.25±1.03	2.75±0.92	2.50±1.20	2.75±0.88
		55	2.50±0.99	2.75±0.70	2.75±1.06	2.50±0.70	2.50±0.75
Astringency	2.50±0.64	4	2.12±0.88	2.37±0.74	2.45±0.70	2.75±0.88	2.75±0.64
		35	2.37±1.03	2.75±0.70	2.75±0.64	2.50±1.20	2.50±0.74
		45	3.00±0.99	3.62±0.73	3.50±0.88	3.00±0.88	3.00±0.70
		55	2.62±0.74	3.25±1.03	2.50±0.64	2.75±0.75	3.00±1.06

		4	2.37±0.70	2.25±0.88	2.25±0.74	2.00±0.70	2.21±0.64
		35	2.21±1.03	2.37±0.74	2.45±0.88	2.21±0.92	2.00±0.70
Sweetness	2.00±0.92	45	2.00±1.35	1.87±0.64	2.00±1.20	1.87±0.75	1.87±0.88
		55	2.12±0.88	1.87±0.64	1.87±1.06	1.75±0.88	1.75±0.74

## (2) 새싹 땅콩 타블렛

### (가) 레스베라트롤 함량 측정

새싹땅콩 타블렛에서 가장 중요한 성분은 레스베라트롤이라고 할 수 있다. 새싹땅콩 타블렛의 레스베라트롤 함량은 HPLC를 통하여 분석하였다. 샘플을 4, 35, 45, 55°C에 저장하면서 10주 동안 2주 간격으로 레스베라트롤의 함량의 변화를 Figure 2로 나타내었다. 처음 새싹땅콩 타블렛 하나의 레스베라트롤 함량은 약 17ug/개로 측정되었다. 이를 4°C에 저장하였을 경우 10주 동안 레스베라트롤의 함량은 거의 변화가 없었으며 35°C에 저장 시 약 16ug/개로 약간 레스베라트롤의 함량이 감소하였으며, 45°C에 저장 시에는 약 15ug/개로 감소가 일어났다. 45°C까지는 레스베라트롤 감소의 폭이 적었으며, 이는 타블렛 제조시 이중캡슐을 이용하였기 때문인 것으로 사료된다. 55°C에 저장 하였을 때는 약 12ug/개로 레스베라트롤 함량이 분석되었다. 이는 고온에서 새싹땅콩 이중캡슐이 더 많이 파괴되어 비교적 큰 감소를 보인 것으로 추측된다. 다른 저장 온도에 비하여 감소한 양이 많았지만, 전체적으로는 저장 기간 동안 많은 양의 레스베라트롤이 방출 되지는 않는 것으로 나타났다. 새싹 땅콩 타블렛은 이중캡슐 기술을 사용하여 새싹 땅콩 추출물을 바로 적용하는 것보다 레스베라트롤의 보호가 가능할 것으로 사료된다.

### (나) pH

저장 중 이화학적 변화를 평가하기 위하여 pH를 측정하였다. pH는 새싹 땅콩 타블렛을 10ml의 증류수에 녹여 측정하였다. 10주 동안 4, 35, 45, 55°C에 새싹땅콩 타블렛을 저장하며 pH를 측정한 결과는 Figure 4와 같다. 처음의 pH는 약 6.9로 측정되었다. 4°C와 35°C에 저장 하였을 때는 각각 6.7, 6.4로 저장 기간 동안 약간 낮아졌다. 45°C에 저장한 타블렛의 경우 6.2의 pH를 나타내었고, 55°C에 저장한 샘플은 4주차까지 가파른 pH 감소를 보였으나 그 이후의 저장 기간 동안은 5.6의 pH로 일정한 경향을 나타냈다. pH 분석 결과, 저장 온도가 높아질수록 pH가 더 많이 감소하였다. 저장 기간이 길어 질수록 pH가 감소하는 경향을 보았으나 그 폭은 넓지 않아 타블렛의 품질 변화에 큰 영향을 미치지 않을 것으로 사료된다.

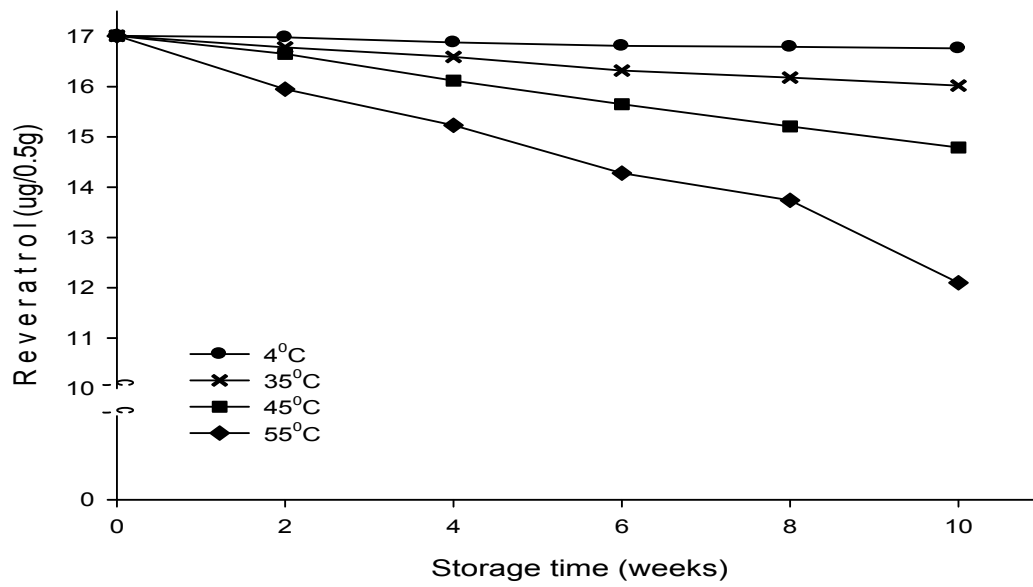


Figure 3. Quantitative analysis of resveratrol in tablet made from peanut sprout during storage at various temperatures for 10weeks.

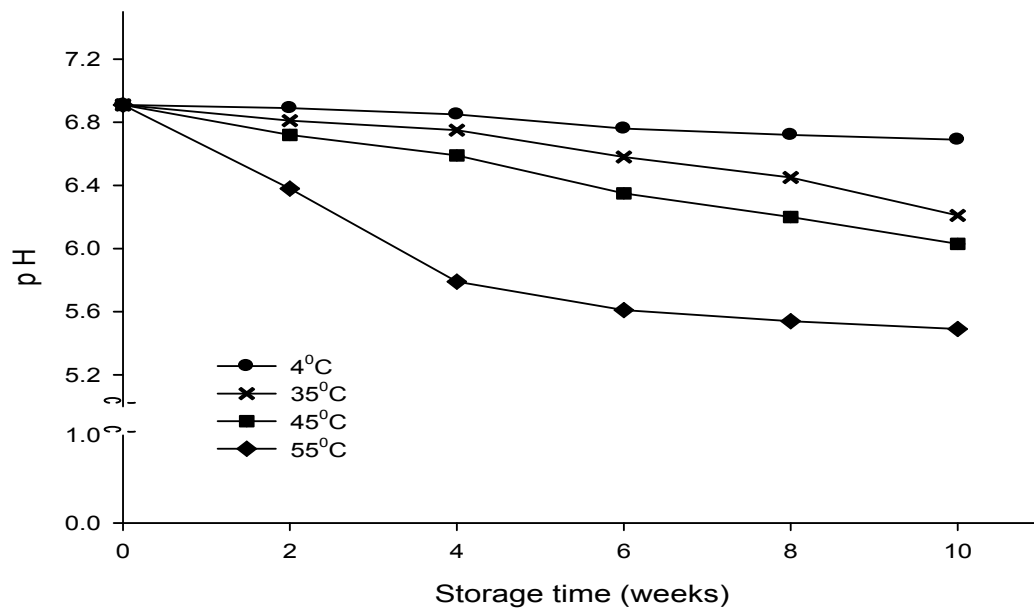


Figure 4. Change in pH of tablet made from peanut sprout during storage at various temperatures for 10weeks.

Table 3. Change in color of tablet made from peanut sprout during storage at various temperatures for 10weeks.

Color value	Initial value	Temp. (°C)	Storage time (weeks)				
			2	4	6	8	10
L	82.04±0.07	4	81.87±0.15	81.05±0.41	81.00±0.02	79.95±0.44	79.87±0.15
		35	84.62±0.44	83.55±0.23	82.34±0.37	82.10±0.19	81.75±0.44
		45	73.42±0.19	72.82±0.76	71.15±0.15	70.78±0.02	69.10±0.19
		55	77.82±0.07	71.23±0.15	70.35±0.02	69.13±0.23	67.75±0.07
a	-1.1±0.08	4	-1.07±0.07	-1.02±0.02	-1.02±0.44	-1.02±0.02	-1.01±0.15
		35	-0.98±0.02	-0.76±0.03	-0.55±0.03	-0.40±0.23	-0.35±0.19
		45	1.02±0.02	1.08±0.08	1.12±0.15	1.15±0.02	1.18±0.07
		55	1.59±0.01	1.64±0.03	1.75±0.07	1.80±0.44	1.95±0.02
b	6.52±0.06	4	6.51±0.37	7.51±0.14	8.15±0.08	8.50±0.02	8.70±0.15
		35	8.95±0.03	9.84±0.11	10.20±0.44	10.35±0.23	10.50±0.19
		45	9.26±0.03	9.95±0.10	10.25±0.02	10.29±0.15	10.32±0.03
		55	9.32±0.03	10.00±0.09	10.30±0.44	10.37±0.02	10.40±0.08

(다) 색도

저장 중 새싹땅콩 타블렛의 색도는 Table 3과 같다. 색상은 관능적 품질에 영향을 미치는 중요한 요인 중 하나이다. 색도는 타블렛의 표면을 색차계로 측정하였다. 색차계로 측정한 Hunter Value 결과의 처음 값은 밝기를 나타내는 L값은 82.04, 적색도를 나타내는 a값은 -1.1, 황색도를 나타내는 b값은 6.52 이었다.

4°C에 저장한 경우 L값이 10주 경과 후 79.87로 측정되어 값이 감소하였으나 큰 변화는 보이지 않았다. a값의 경우, -1.01으로 4°C에 저장 했을 시에는 거의 변화 하지 않았다. 또한 b값의 경우 8.70의 값을 나타내며 처음보다 더 황색을 띄었다. 35°C에 저장 하였을 때에는 L값은 약81.75로 저장 전과 큰 차이가 없었으나 a값이 -0.35, b값이 10.50로 4°C와 비교하여 갈색 빛을 띄는 것으로 나타났다. 45, 55°C에 새싹땅콩 타블렛을 저장 했을 때에는 L값이 각각 69.10, 67.75으로 처음보다 현저하게 낮아졌다. a값은 45°C에 저장했을 때가 1.18, 55°C에 저장했을 때 값이 1.95로 적색의 정도가 더 높아지는 것으로 나타났다. b값 역시 45°C에 저장했을 때가 10.32, 55°C에 저장했을 때 값이 10.40로 처음보다 증가하여 황색을

떨는 것으로 나타났다. 모든 군에서 저장을 할수록 L값은 낮아지고 a값과 b값이 높아지는 경향이 나타났다. 또한 저장 온도가 높을수록 변화의 정도가 큰 것으로 분석되었다.

(라) 흡습성평가

타블렛의 경우 제품의 특성상 파우더를 압축하여 만들었기 때문에 흡습성에 대하여 분석해 볼 필요가 있어 DVS analyzer를 통하여 흡습성을 평가하였다. 이는 주변 환경의 습도를 변화시켜 흡습의 정도를 분석하는 방법이라고 할 수 있다. 새싹땅콩 타블렛의 흡습성 분석의 결과는 Figure 5와 같다. 상대 습도가 70까지는 거의 mass의 변화를 보이지 않았고 그 이후로는 수분을 흡수하여 mass의 변화 정도가 크게 나타났다. 이 결과를 미루어 보아 타블렛을 실외에 보관하였을 때의 보통의 습도에서는 거의 수분을 흡수하지 않아 타블렛의 품질에는 거의 영향을 받지 않을 것으로 사료된다. 또한 제품으로 출시 시에는 수분흡착제와 같은 방법으로 타블렛의 수분 흡수량을 최소화 할 수 있을 것이라 판단된다.

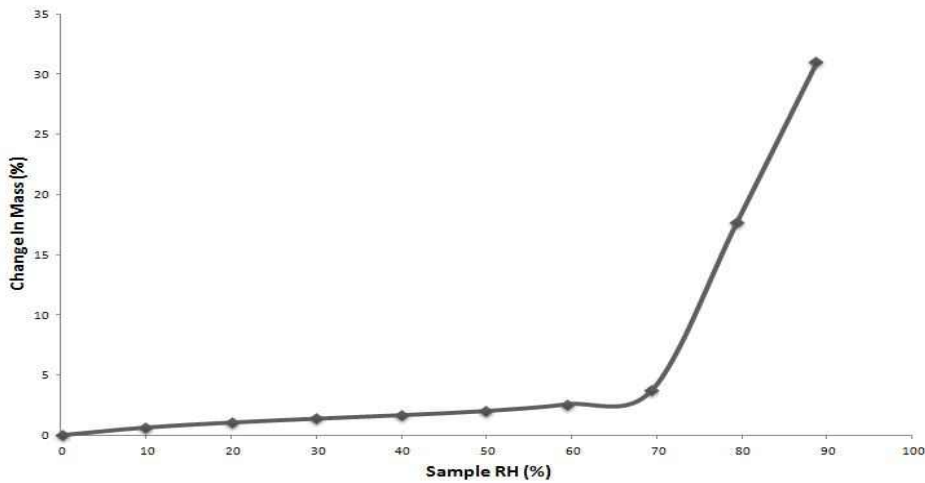


Figure 5. Change in mass of tablet made from peanut sprout under isothermal vapor adsorption.

2. 제 2차년도 (2013)

가. 새싹 땅콩 나노분말 또는 이중 미세캡슐을 이용한 전립선 예방 제품의 저장 중 품질연구

(1) 새싹 땅콩 파우치

(1) 새싹 땅콩 파우치

(가) 레스베라트롤 함량 측정



새싹땅콩 파우치에서 가장 중요한 성분은 레스베라트롤이라고 할 수 있다. 새싹땅콩 파우치의 레스베라트롤 함량은 HPLC를 통하여 분석하였다. 샘플을 4, 30, 40, 50℃에 저장하면서 8주 동안 2주 간격으로 레스베라트롤의 함량의 변화를 Figure 6에 나타내었다. 처음 새싹땅콩 파우치의 레스베라트롤 함량은 약 85.56 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 측정되었다. 이를 4℃에서 저장하였을 경우 6주차에는 79.43 $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 8주차에는 75.26 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 함량이 측정되는 것으로 보아, 8주 간의 저장기간 동안 약 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 레스베라트롤 함량이 약간 감소하는 것을 확인하였다. 30℃에 저장한 새싹땅콩 파우치의 경우 저장기간 동안 레스베라트롤 함량이 지속적으로 감소하다가, 저장이 끝난 8주 차에는 55.65 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 레스베라트롤이 측정되었다. 40℃에 저장한 새싹땅콩 파우치에서는 2주 간의 저장기간 마다 약 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 레스베라트롤이 감소하여 저장 8주차에는 43.39 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 레스베라트롤이 측정되었다. 마지막으로 50℃에서 저장한 새싹땅콩 파우치에서는 저장 2주차부터 69.32 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 레스베라트롤이 측정되며 급격한 감소 경향을 보였다. 저장 8주차에는 35.13 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 레스베라트롤 함량이 측정되었다. 결론적으로, 저장온도가 높고 저장기간이 길수록 낮은 레스베라트롤 함량을 보였다. 특히 40, 50℃에서 저장한 새싹땅콩 파우치의 경우 저장기간 동안 지속적으로 레스베라트롤 함량이 감소하는 경향을 보였다. 하지만 저장 권장온도인 4℃에서는 저장기간 동안 미미한 감소 경향을 보여 제품 생산시 문제가 없을 것으로 사료된다.

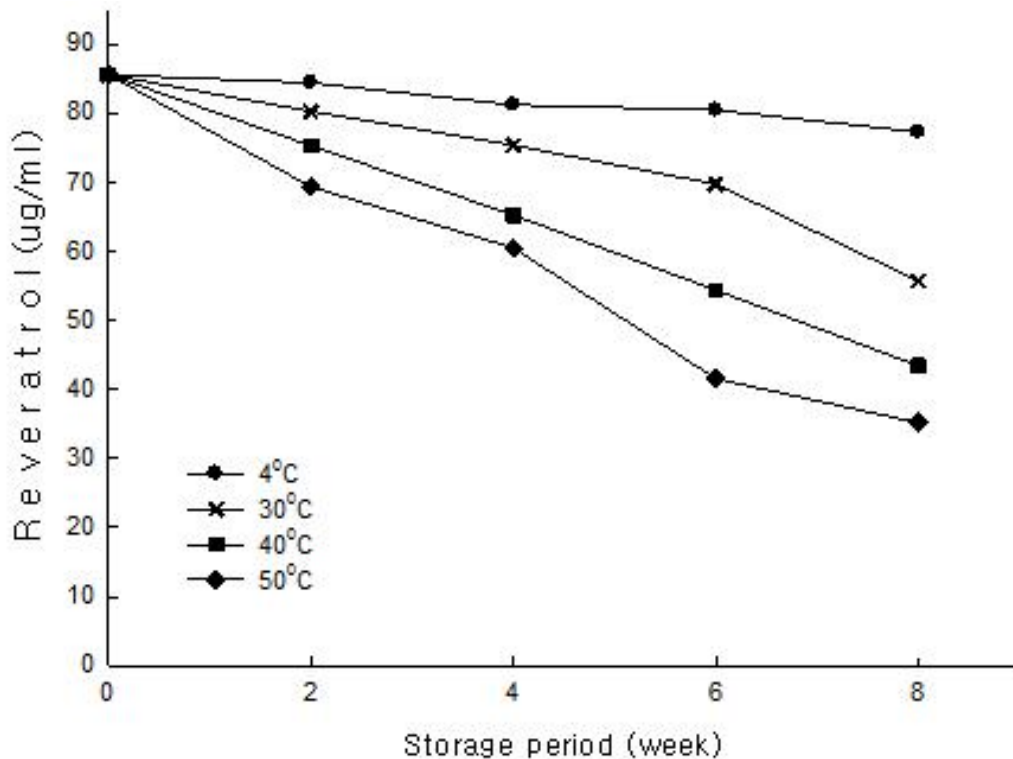


Figure 6. Quantitative analysis in resveratrol of peanut sprout pouch during storage at various temperatures for 8 weeks

(나) 색도

새싹땅콩 파우치의 저장 중 색도는 Table 4과 같다. 색상은 관능적 품질에 영향을 미치는 중요한 요인 중 하나이다. 색도는 파우치 안의 액체를 투명한 용기에 담아 표면을 색차계로 측정하였다. 색차계로 측정한 Hunter Value 결과의 처음 값은 밝기를 나타내는 L값은 16.02, 적색도를 나타내는 a값은 4.20, 황색도를 나타내는 b값은 0.25 이었다.

L값의 경우, 저장 2주 경과 후 4℃에서는 15.97의 값이 측정된 반면에 50℃에서 저장한 파우치의 경우 15.04의 값이 측정되었다. 이는 저장기간 동안 계속해서 감소하여 저장 8주 차에는 4℃에서 저장한 파우치는 14.99의 값을 가진 반면에 30℃에서 저장한 파우치의 경우 14.58, 50℃에서 저장한 파우치의 경우 14.43의 값을 나타냈다. a값의 경우, 저장 2주 차에는 4℃에서 4.18로 큰 변화를 보이지 않았지만, 30, 40, 50℃에서 측정한 결과 각각 3.86, 3.83, 3.74로 감소하였다. 저장 8주 차에도 비슷한 경향을 보였는데, 4℃에서 저장한 파우치의 a값은 3.84, 50℃에서 저장한 파우치의 경우에는 3.19의 값이 측정되었다. 4℃에서 저장한 파우치의 경우에도 저장기간이 길어질수록 a값이 감소하는 경향을 보였으며, 높은 온도에서 저장할수록 낮은 온도에서 보다 더 높은 a값의 감소폭을 보였다. L값과 a값이 저장기간 동안 감소한 반면에 b값의 경우 저장하면서 처음 보다 더 황색을 나타냈다. 4℃에서 저장한 파우치의 b값은 저장 6주 차에는 1.33, 8주 차에는 1.57의 값을 보였다. 30℃에 저장 하였을 때에는 4℃에서 저장했을 때보다 높은 황색도를 보였다. 저장 8주차의 경우 30℃에서 저장한 파우치의 b값은 1.87, 40℃에서 저장한 파우치의 값은 1.98, 50℃에서 저장한 파우치의 황색도는 2.09였다. 모든 군에서 저장을 할수록 L값과 a값은 낮아지고 b값이 높아지는 경향이 나타났으며 저장 온도가 높을수록 변화의 폭이 큰 것으로 사료된다.

Table 4. Change in color of peanut sprout pouch during storage at various temperatures for 8 weeks

Color value	Initial Value	Temp. (°C)	Storage period (week)			
			2	4	6	8
L	16.02±0.40	4	15.97±0.36	15.59±0.18	15.11±0.05	14.99±0.08
		30	15.14±0.10	15.10±0.26	14.66±0.08	14.58±0.39
		40	15.14±0.05	14.84±0.07	14.64±0.12	14.57±0.03
		50	15.04±0.04	14.77±0.35	14.51±0.10	14.43±0.05
		.....				
a	4.20±0.11	4	4.18±0.11	4.04±0.19	3.87±0.14	3.84±0.17
		30	3.86±0.17	3.83±1.03	3.80±0.14	3.42±0.80
		40	3.83±0.13	3.80±0.09	3.75±0.40	3.20±0.12
		50	3.74±0.28	3.73±0.18	3.47±0.84	3.19±0.80
		.....				
b	0.25±0.05	4	0.33±0.58	0.70±0.18	1.33±0.09	1.57±0.10
		30	0.54±0.17	0.73±0.26	1.43±0.07	1.87±0.23
		40	0.64±0.05	1.02±0.07	1.46±0.11	1.98±0.11
		50	0.86±0.14	1.41±0.18	1.60±0.14	2.09±0.14
		.....				

(다) 관능평가

저장 중 새싹땅콩 파우치의 관능 평가 결과는 Table 5와 같다. 관능적 품질은 식품에서 가장 중요한 요소 중 하나라고 할 수 있다. 새싹땅콩 파우치의 관능적 품질을 평가하기 위하여 차의 갈색 정도를 나타내는 brownness, 파우치의 맛을 평가 할 수 있도록 peanut sprout, sourness, bitterness, astringency의 항목을 측정하였다. 관능 평가는 숙련된 10명을 상대로 7점법을 실시하였다.

Brownness는 4°C에 저장한 샘플의 경우 저장 중에 점수의 차이가 거의 나지 않았지만 30, 40, 50°C도에서 저장 한 샘플은 시간이 지날수록 갈색의 정도가 높아지는 것으로 나타났다. 저장 8주 차의 Brownness는 4°C에서 저장한 파우치의 경우 4.00인 반면에, 40, 50°C에서 저장한 파우치의 경우 4.30의 값을 나타냈다. 이는 색도의 분석결과와 일치하였고, 저장 중 파우치의 Brownness가 약간 증가하는 것은 파우치의 품질 변화에 큰 영향을 미치지 않을 것으로 사료된다. 파우치에서 느낄 수 있는 Peanut sprout는 4°C에 저장한 파우치의 경우 3.80의 값을 보였으나 저장기간이 길어질수록 높은 값을 보였다. 또한, 저장온도가 높을수록 peanut sprout의 맛이 크게 느껴지는 것을 확인하였다. 저장 2주 차부터 8주 차까지 50°C에서 저장한 파우치는 4.30의 값을 보였고 4°C에서 저장한 샘플은 2주에서 6주까지는 4.00의 값을, 8주 차에는 4.10의 값

을 보였다. Sourness의 경우 4℃에서 저장한 파우치에서는 initial week의 값이 1.90이었다. 4℃에서 저장한 파우치는 8주 간의 저장기간 동안에 큰 변화를 나타내지 않으며 약간 증가하는 경향을 보였다. 반면에 50℃에서 저장한 파우치의 sourness는 2주 차에는 2.40으로 증가하였고, 8주 차에는 2.80으로 증가하며 온도가 높을수록 sourness가 크게 증가하는 경향을 확인하였다. Bitterness의 경우 4℃에서 저장한 파우치에서는 initial week의 값이 3.50이었다. 땅콩나물 농축액 자체의 약간 쓴 맛이 작용한 것으로 보였으나 4℃에서 저장한 파우치는 8주 간의 저장기간 동안에 큰 변화를 나타내지 않으며 약간 증가하는 경향을 보였다. 반면에 저장 온도가 높을수록 bitterness가 증가하는 경향을 보였는데, 8주 차의 값을 보면 4℃에서 저장한 파우치의 경우 4.10이었고 50℃에서 저장한 파우치의 bitterness는 4.30의 값을 보였다. 마지막으로 Astringency의 경우 4℃에서 저장한 initial week의 값은 3.40이었다. 이 역시 마찬가지로 땅콩나물 농축액 자체의 떫은 맛이 영향을 미친 것으로 보인다. 4℃에서 저장했을 때에는 큰 변화를 보이지 않으며 증가하였고, 30℃에서는 4.20, 40℃에서는 4.30, 50℃에서 저장한 파우치의 경우 8주 차에는 4.40의 값을 나타내며 저장 온도가 높을수록 큰 값을 나타냈다. 관능평가 결과, 전체적으로 저장온도가 높고 저장기간이 길수록 값이 증가하는 경향을 나타냈으나 4℃에서 저장한 경우 그 증가 폭이 적어 품질에 영향을 미치지 않을 정도라고 사료된다.

**Table 5. Sensory analysis of peanut sprout pouch during storage at various temperatures for 8 weeks**

	Initial score	Temp. (°C)	Storage period (week)			
			2	4	6	8
Brownness	3.60±0.52	4	3.80±0.63	3.90±0.74	3.90±0.74	4.00±0.67
		30	4.00±0.67	4.00±0.82	4.00±0.67	4.20±0.63
		40	4.10±0.88	4.10±0.74	4.10±0.57	4.30±0.67
		50	4.10±0.74	4.10±0.74	4.10±0.74	4.30±0.48
Peanut sprout	3.80±0.79	4	4.00±0.82	4.00±0.67	4.00±0.82	4.10±0.88
		30	4.20±0.79	4.20±0.92	4.10±0.88	4.20±0.92
		40	4.20±0.79	4.20±0.79	4.20±0.92	4.30±0.82
		50	4.30±0.82	4.30±0.67	4.30±0.82	4.30±0.82
Sourness	1.90±0.53	4	2.10±0.74	2.20±0.63	2.10±0.74	2.20±0.63
		30	2.20±0.79	2.30±0.95	2.30±0.67	2.30±0.67
		40	2.30±0.82	2.50±0.71	2.60±0.52	2.50±0.53
		50	2.40±0.70	2.70±0.67	2.80±0.63	2.80±0.63

Bitterness	3.50±0.52	4	3.90±0.88	4.00±0.82	4.00±0.47	4.10±0.74
		30	4.00±0.82	4.10±0.74	4.10±0.57	4.10±0.92
		40	4.10±0.74	4.30±0.67	4.20±0.63	4.20±0.63
		50	4.10±0.74	4.30±0.67	4.40±0.84	4.30±0.82
Astringency	3.40±0.57	4	3.70±0.82	3.90±0.88	3.90±0.57	4.00±0.82
		30	3.80±0.79	4.00±0.82	4.10±0.57	4.20±0.79
		40	3.90±0.74	4.00±0.82	4.20±0.63	4.30±0.82
		50	3.90±0.74	4.10±0.88	4.20±0.63	4.40±0.97

## (2) 새싹 땅콩 음료

### (가) 레스베라트롤 함량 측정

새싹땅콩 음료에서 가장 중요한 성분은 레스베라트롤이라고 할 수 있다. 새싹땅콩 음료의 레스베라트롤 함량은 HPLC를 통하여 분석하였다. 샘플을 4, 30, 40, 50℃에 저장하면서 8주 동안 2주 간격으로 레스베라트롤의 함량의 변화를 Figure 7에 나타내었다. 처음 새싹땅콩 음료의 레스베라트롤 함량은 약 68.85 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 측정되었다. 이를 4℃에서 저장하였을 경우 2주 차에는 65.50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 4주 차에는 64.29 $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 6주차에는 63.48 $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 8주차에는 62.41 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 저장 기간이 늘어날수록 레스베라트롤 함량이 약간씩 감소하는 것을 확인하였다. 30℃에 저장한 새싹땅콩 음료의 경우 저장기간 동안 레스베라트롤 함량이 감소하는 경향을 보였는데, 저장 2주 차에는 62.25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 비교적 큰 차이를 보이지 않았지만 저장 8주 차에는 50.65 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 레스베라트롤이 측정되었다. 40℃에 저장한 새싹땅콩 음료에서는 저장 2주 차부터 55.03 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 레스베라트롤이 측정되었고, 저장 8주차에는 40.86 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 레스베라트롤이 측정되었다. 마지막으로 50℃에서 저장한 새싹땅콩 음료에서는 저장 2주차부터 52.93 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 레스베라트롤이 측정되며 급격한 감소 경향을 보였다. 저장 4주 차에는 44.86 $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 저장 6주 차에는 40.52 $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 저장 8주차에는 30.29 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 레스베라트롤 함량이 측정되었다. 레스베라트롤의 함량 측정 결과, 저장온도가 높고 저장기간이 길수록 낮은 레스베라트롤 함량을 보였다. 특히 40, 50℃에서 저장한 새싹땅콩 음료의 경우 저장 2주 차부터 급격한 양의 감소를 확인할 수 있었다. 하지만 저장 권장온도인 4℃에서는 저장기간 동안 미미한 감소 경향을 보여 제품 생산 시 문제가 없을 것으로 사료된다.

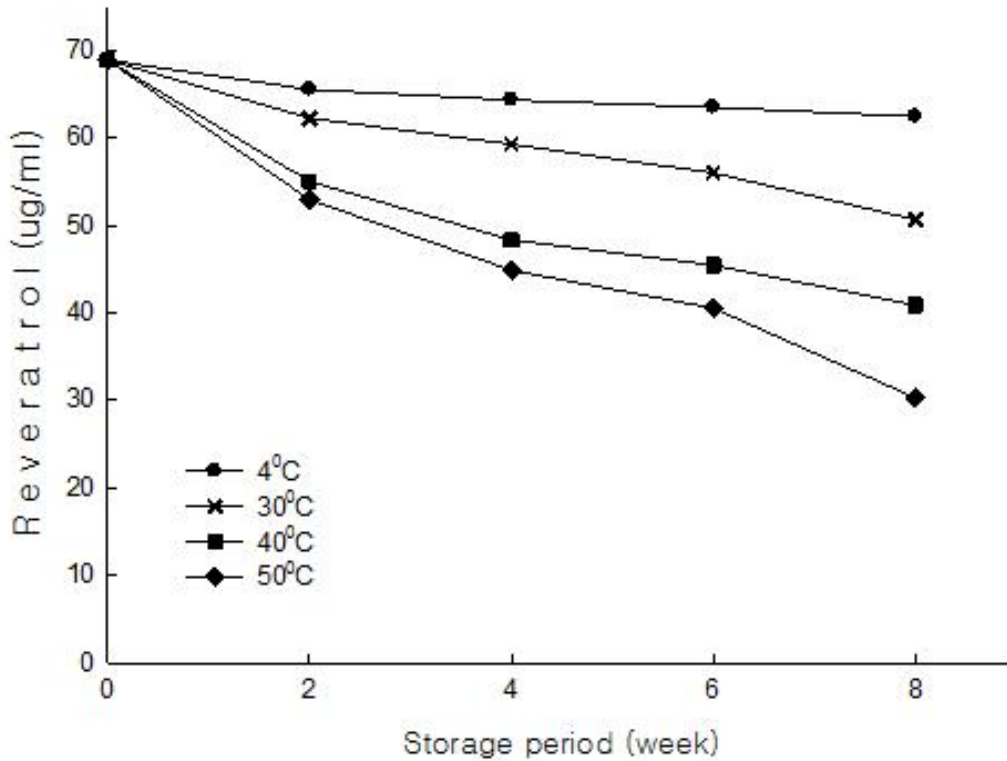


Figure 7. Quantitative analysis in resveratrol of peanut sprout beverage during storage at various temperatures for 8 weeks

(나) 색도

새싹땅콩 음료의 저장 중 색도는 Table 6과 같다. 색상은 관능적 품질에 영향을 미치는 중요한 요인 중 하나이다. 색도는 음료를 투명한 용기에 담아 표면을 색차계로 측정하였다. 색차계로 측정한 Hunter Value 결과의 처음 값은 밝기를 나타내는 L값은 53.21, 적색도를 나타내는 a값은 -10.57, 황색도를 나타내는 b값은 38.78 이었다.

L값의 경우, 저장 2주 경과 후 모든 온도에서 감소하는 경향을 보였다. 4°C에서는 44.39의 값이 측정된 반면에 50°C에서 저장한 음료의 경우 41.28의 값이 측정되었다. 4°C에서 저장한 음료의 경우 8주의 저장기간 동안 큰 변화가 없었던 반면에, 높은 온도에서 저장한 음료에서는 L값이 크게 감소하였다. 저장 8주 차에 4°C에서 저장한 음료는 40.56의 값을 가진 반면에 30°C에서 저장한 음료의 경우 36.16, 50°C에서 저장한 음료의 경우 35.56의 값을 나타냈다. a값의 경우, 저장 2주 차에는 4°C에서 -12.29로 약간 감소하는 경향을 보였다. 저장 2주 차의 30, 40, 50°C에서 저장한 음료의 a값 측정 결과 각각 -14.13, -14.19, -14.59로 감소하였다. 저장 8주 차에도 비슷한 경향을 보였는데, 4°C에서 저장한 음료의 a값은 -13.21, 50°C에서 저장한 음료의 경우에는 -15.59의 값이 측정되었다. 4°C에서 저장한 음료의 경우에도 저장기간이 길어질수록 a값이 감소하는 경향을 보

였으며, 높은 온도에서 저장할수록 낮은 온도

**Table 6. Change in color of peanut sprout beverage during storage at various temperatures for 8 weeks**

Color value	Initial value	Temp. (°C)	Storage period (week)			
			2	4	6	8
L	53.21±1.54	4	44.39±0.17	44.29±0.46	41.55±1.58	40.56±0.31
		30	43.09±1.03	41.38±1.54	37.60±1.25	36.16±1.31
		40	42.76±0.14	39.18±0.87	37.25±0.57	35.90±0.90
		50	41.28±1.06	38.05±0.63	36.60±1.06	35.56±1.32
-a	10.57±0.53	4	12.29±0.23	12.50±0.60	12.92±0.29	13.21±0.21
		30	14.13±0.30	14.40±0.48	14.98±0.25	15.10±0.17
		40	14.19±0.27	14.80±0.14	15.37±0.03	15.45±0.31
		50	14.59±0.52	15.10±0.24	15.49±0.23	15.59±0.13
b	38.78±1.54	4	38.72±0.75	39.67±0.23	41.12±0.83	42.82±0.98
		30	37.45±0.12	39.41±0.39	40.01±0.38	41.00±0.66
		40	36.78±1.14	37.00±0.78	39.73±0.41	40.98±0.67
		50	35.75±1.88	36.61±0.65	39.93±1.08	40.19±0.44

에서 보다 더 큰 감소 폭을 보였다. L값과 a값이 저장기간 동안 감소한 반면에 b값의 경우 저장하면서 값이 증가하는 경향을 나타냈다. 저장 2주 차에 4°C에서 저장한 음료의 b값은 38.72로 initial week와 큰 차이는 나타나지 않았지만, 50°C에서 저장한 음료의 경우 35.75로 감소하였다. 저장 8주차의 경우 4°C에서 저장한 음료의 b값은 42.82로 증가하였고, 30°C에서 저장한 음료의 b값은 41.00, 40°C에서 저장한 음료의 값은 40.98, 50°C에서 저장한 음료에서는 40.19의 값이 측정되었다. 높은 온도에서 저장했을 때 b값이 감소하는 경향을 보였으나 저장기간 동안 모든 군에서 b값이 증가하여 저장 8주 차에는 initial week의 b값보다 큰 값을 나타내었다.

(다) 관능평가

저장 중 새싹땅콩 음료의 관능 평가 결과는 Table 7와 같다. 관능적 품질은 식품에서 가장 중요한 요소 중 하나라고 할 수 있다. 새싹땅콩 음료의 관능적 품질을 평가하기 위하여 차의 갈색 정도를 나타내는 brownness, 음료의 맛을 평가 할 수 있도록

peanut sprout, sourness, bitterness, astringency의 항목을 측정하였다. 관능 평가는 숙련된 10명을 상대로 7점법을 실시하였다.

Browness는 4℃에 저장한 음료의 경우 저장 2, 4, 6주 차에는 3.50으로 변화가 없었으나 저장 8주 차에 3.62로 약간 증가하였다. 30, 40, 50℃도에서 저장한 음료는 저장기간이 길어질수록 brownness가 증가하였다. 30℃에서 저장한 음료는 4℃에서 저장한 음료와 마찬가지로 brownness에 큰 변화를 보이지 않았으며 저장 8주 차에 3.62의 값을 나타냈다. 하지만 40℃에서 저장한 음료의 경우 저장 2주 차에 3.62에서 저장 8주 차에 3.75로 증가하였고, 50℃에서 저장한 경우 3.62에서 4.00으로 증가하는 경향을 보였다. 이는 색도의 분석결과와 일치하였고, 권장 저장온도인 4℃에서는 음료의 Browness에 큰 변화가 없어 음료의 품질 변화에 큰 영향을 미치지 않을 것으로 사료된다. 음료에서 느낄 수 있는 Peanut sprout는 4℃에 저장한 음료의 경우 3.50의 값을 보였으나 저장기간이 길어질수록 값이 증가하는 경향을 보였다. 또한, 저장온도가 높을수록 peanut sprout의 맛이 크게 느껴지는 것을 확인하였다. 저장 2주 차부터 8주 차까지 4℃에서 저장한 음료는 3.50에서 3.62로 약간 증가하였다. 반면에 40℃에서 저장한 음료의 경우 저장기간이 2주에서 8주로 증가하면서 3.62에서 4.00으로, 50℃에서 저장한 음료는 3.75에서 4.12로 증가하였다. Sourness의 경우 4℃에서 저장한 음료에서는 initial week의 값이 2.00이었다. 저장 2주 차에는 4, 30℃에서 저장한 음료는 2.00, 40, 50℃에서 저장한 음료는 2.12로 큰 변화를 보이지 않았으나 저장 6주 차부터 온도가 높을수록 sourness가 증가하는 경향을 보였다. 그 결과, 저장 8주 차에는 4℃에서 저장한 음료는 2.21, 40℃에서 저장했을 때에는 2.50, 40℃에서 저장했을 때에는 2.62, 50℃에서 저장한 경우 3.00의 값을 보였다. Bitterness의 경우 4℃에서 저장한 음료에서는 initial week의 값이 2.00이었다. 4℃에서 저장 2주 차 음료의 bitterness는 2.00이었고, 50℃에서 저장한 경우 2.25의 값을 나타냈다. 저장 8주 차에는 4℃에서 저장한 음료는 2.25, 50℃에서 저장한 음료는 2.50의 bitterness를 나타냈다. 저장기간이 길어지면서 bitterness가 약간 증가하는 경향을 보였으나 증가 폭이 관능적 품질에 큰 영향을 미치지 않을 것으로 사료된다. 마지막으로 Astringency의 경우 4℃에서 저장한 initial week의 값은 2.12이었다. 4℃에서 저장했을 때에는 저장 2주 차에는 2.12, 저장 8주 차에는 2.25로 큰 변화를 보이지 않으며 증가하였다. 50℃에서 저장한 음료의 경우, 저장 2주 차에는 2.50, 저장 6주 차에는 3.00의 astringency를 나타냈다. 관능평가 결과, 전체적으로 저장온도가 높고 저장기간이 길수록 값이 증가하는 경향을 나타냈으나 4℃에서 저장한 경우 그 증가 폭이 적어 품질에 영향을 미치지 않을 정도라고 사료된다.

**Table 7. Sensory analysis of peanut sprout beverage during storage at various temperatures for 8 weeks**



	Initial score	Temp. (°C)	Storage period (week)			
			2	4	6	8
Brownness	3.50±0.92	4	3.50±0.70	3.50±0.70	3.50±0.75	3.62±0.88
		30	3.50±0.75	3.50±0.74	3.62±0.72	3.62±0.88
		40	3.62±0.74	3.62±0.74	3.62±0.80	3.75±0.74
		50	3.62±0.70	3.62±0.88	3.75±0.70	4.00±0.95
Peanut sprout	3.50±0.75	4	3.50±0.74	3.50±0.74	3.62±0.82	3.62±0.74
		30	3.62±0.75	3.62±0.88	3.62±0.80	3.75±0.70
		40	3.62±0.88	3.75±0.70	3.75±0.92	4.00±0.92
		50	3.75±0.92	4.00±0.88	4.00±0.75	4.12±1.02
Sourness	2.00±0.53	4	2.00±0.82	2.12±0.75	2.12±0.88	2.21±0.92
		30	2.00±0.70	2.21±0.82	2.21±0.75	2.50±0.88
		40	2.12±0.75	2.25±0.92	2.60±0.70	2.62±0.92
		50	2.12±0.74	2.25±0.88	2.87±0.74	3.00±1.02
Bitterness	2.00±0.88	4	2.00±0.53	2.12±0.82	2.12±0.74	2.25±0.92
		30	2.00±0.82	2.12±0.92	2.12±0.75	2.25±0.80
		40	2.12±0.75	2.12±0.75	2.25±0.82	2.50±1.02
		50	2.25±0.70	2.25±0.74	2.25±0.92	2.50±0.92
Astringency	2.12±0.92	4	2.12±0.82	2.12±0.25	2.25±0.88	2.25±0.74
		30	2.12±0.70	2.25±0.70	2.50±0.80	2.50±0.74
		40	2.50±0.88	2.62±0.92	2.62±0.80	2.62±0.92
		50	2.50±0.92	2.62±0.80	3.00±0.75	3.00±0.88

### 3. 인체 이용율을 위한 데이터

2007년 미국 FDA, GRAS에서 공인된 레스베라트롤의 인체 섭취기준을 0.067mg/kg/day로 확인하고 있으며 이를 기준으로 하면 성인65kg은 4.3mg을 복용함을 권장하고 있음.

EPS 1g에는 레스베라트롤 함량이 0.1765mg이 함유되어 있어65kg 성인기준으로 1일 24g을 복용해야 FDA기준에 부합된다 할 수 있음. 따라서 전립선 염증환자를 대상으로 한 기능성 식품에 첨가해야할 EPS의 투여량은 24g~ 10g으로 설정하겠으며 향후 임상실험 기간 중에 각각 투여하여 최적의 량을 결정하려함.

Across the dataset, adverse effects of resveratrol on relevant endpoints were noted generally at doses greater than 300 mg/kg/day. The intended use levels of resveratrol, resulting in 90th percentile intake of 0.07 mg/kg/day is over 4000-fold lower than the lowest dose at which no significant adverse effects were noted. The available dataset show that adverse effects of resveratrol are not likely to occur at resveratrol exposure levels of 0.07 mg/kg/day. It is concluded that, under the intended and expected conditions

of use, resveratrol does not pose a health risk to humans. Moderate consumers of red wine (such as muscadine) with high levels of resveratrol are likely to ingest 4 mg resveratrol/day or 0.067 mg/kg/day.

## 제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

### 제 1 절 연구개발 성과 및 활용목표 대비 실적

#### 1. 제 1차년도 (2012)

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	달성도 (%)	연구개발 수행내용
1차 년도 (2012- 2013 )	<b>제1세부과제:</b> 전립선염 예방 효능을 갖는 새싹땅콩 고농축추출물 및 이중캡슐 제품개발	○ 새싹땅콩 원료제조공정 표 준화 -품종, 생산조건 및 레스베라 트롤 함량조사	100	○ 새싹땅콩 고농축추출물 및 이중캡 슐 소재 대량생산 체제구축
		○ 새싹땅콩차 제조를 위한 추 출조건 확립 및 제품개발	100	○ 전립선염에 좋은 새싹땅콩차 시제 품 제조
		○ 새싹땅콩 고농축추출물 타 브릿 시제품개발	100	○ 새싹땅콩 고농축추출물 타브렛 제 조: 담암갈색의 고농축추출물의 시 제품 제조
		○ 새싹 땅콩 차의 저장 중 품질 연구	100	○ 저장 중 새싹땅콩차의 레스베라트 롤의 함량 측정 ○ 저장 중 새싹땅콩 차의 color 변화 ○ 저장 중 새싹땅콩 차의 pH 변화 ○ 저장 중 새싹땅콩차의 관능적 특 성 검사
	<b>위탁과제 :</b> 새싹 땅콩 나노분말 또는 이중 미세캡슐을 이용한 전립선 예방 제품의 저장 중 품질 연구	○ 새싹땅콩 이중캡슐 분말을 이용한 타블렛의 저장 중 품 질 연구	100	○ 새싹땅콩 이중캡슐 분말 제조 ○ 저장 중 새싹땅콩 타블렛으로부터 방출된 레스베라트롤의 분석 ○ 저장 중 새싹 타블렛의 color 변화 ○ 저장 중 새싹땅콩 타블렛의 pH 변화 ○ 새싹땅콩 타블렛의 생체이용을 측 정 → <i>in vitro</i> 실험
		<b>&lt;제1협동&gt;</b> 동물모델을 이용한 새싹땅콩의 전립선염예방 기능성 연구	○ 실험동물을 이용한 감염성 전립선염 동물모델 구축	100
		○ 세균성 전립선염 동물모델 의 확인 검증	100	○ 전립선염모델 마우스에서 인체감 염 박테리아를 이용한 전립선염유 발 후 조직학적 병리, 혈액학적 변 화인자 등 확인
		○ 새싹땅콩 추출물의 전립선 염 예방에 대한 <i>in-vitro</i> , <i>in-vivo</i> 효능 및 기전 연구	100	○ 새싹땅콩 추출물을 처치한 실험에 서 전립선염 유발인자인 여러 사이 토카인의 혈액 내 농도 결정, NO 생성에 대한 억제 효과 확인 및 병 리학적 소견 확인으로 전립선염 예 방에 대한 효능 및 기전연구 실시

2. 제 2차년도 (2013)

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	달성도 (%)	연구개발 수행내용	
2차 년도 (2013- 2014)	<b>제1세부과제 (장수채)</b>  전립선염 예방을 위한 새싹땅콩추출물 및 이중캡슐 제품 개발	○새싹땅콩 고농축추출물 및 이중캡슐을 이용한 파우치 제품 개발	100	○6년근 홍삼에 레스베라트롤성분을 고농축 엑기스화한 EPS를 혼합하여 “레스홍삼”시제품을 제작	
		○새싹땅콩 고농축 추출물 및 이중캡슐을 이용한 땅콩나물 발효액상 음료제품 개발	100	○새싹땅콩차를 개발하고 여기에도 EPS를 첨가하여 기능성 차로 시제품 개발	
		○ 새싹 땅콩 고농축 추출물을 이용한 파우치 음료의 저장 중 품질 연구	100	○ 저장 중 새싹땅콩 파우치의 주요 성분 변화 검사 ○ 저장 중 새싹땅콩 파우치의 이화학적 변화 검사 ○ 저장 중 새싹땅콩 파우치의 관능적 특성 검사	
		○ 새싹 땅콩 이용한 땅콩나물발효액상음료의 저장 중 품질 연구	100	○ 저장 중 새싹땅콩 땅콩나물발효액상음료의 주요 성분 변화 검사 ○ 저장 중 새싹땅콩 땅콩나물발효액상음료의 이화학적 변화 검사 ○ 저장 중 새싹땅콩 땅콩나물발효액상음료의 관능적특성 변화	
	<b>제1협동 (서울대)</b>  동물모델을 이용한 새싹땅콩의 전립선염예방 가능성 연구	○기능성 식품적용을 위한 독성 연구	100	○ 농도별 EPS의 반복 투여 시 체중 변화 및 행동학적, 신체적 변화 확인 ○ 농도별 EPS의 반복 투여에 따른 신독성 확인(KIM1유전자) ○ 농도별 EPS의 반복 투여에 따른 간독성 확인 (ALP activity test)	
		○만성 세균성 전립선염 모델 마우스에서 EPS에 의한 염증 완화 실험	100	○ 세균을 주입하여 전립선염증 유발 후 EPS의 투여 시 체중 변화 ○ 전립선 조직 내 세균 번식 정도 확인(CFU counting) ○ EPS의 투여 후의 전립선 조직의 변화 (조직형태, 면역세포 침윤, fibrosis, hyperplasia) ○ 전립선염증 유발 마우스에서 EPS 투여 후의 혈액 내 염증세포 변화 ○ 전립선염증 유발 마우스에서 EPS 투여 후의 비장 내 면역세포변화 ○ EPS 투여 후의 골수성 대식세포의 활성화 측정	
		○전립선 비대증 모델 유발 마우스에서 EPS의 효과	100	○ 호르몬성 전립선비대증을 유발시킨 마우스에서 EPS 투여에 따른 체중 변화 확인 ○ EPS 투여에 따른 전립선 조직의 변화 분석 ○ EPS 투여에 따른 혈액 내 염증세포의 수 측정 ○ EPS 투여에 따른 전립선비대증 유발 마우스의 비장 내 면역세포 변화	
		○요도 내 세균 부착 및 증식에 관여하는 바이오필름 형성에 대한 EPS 효과	100	○ EPS의 투여에 따른 PC-3 전립선 세포주의 부착력 테스트 ○ EPS 투여에 따른 바이오필름 형성 실험 ○ EPS 투여 후의 드립-플로어를 이용한 바이오필름 형성 연구- 컨포칼현미경실험)	

## 제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

### 제 1 절 연구개발 성과

#### 가. 연구성과 목표

(단위 : 건수)

구분	특허		신품종				유전자원 등록	논문		기타
	출원	등록	품종명 명칭등록	품종생산 수입판매 신고	품종보호			SCI	비SCI	
					출원	등록				
1차 년도	목표	1						2	1	
	달성	1(100%)						2	0	(SCI 2편투고)
2차 년도	목표	1	1					2	1	
	달성									
계	목표	2	1					4	1	
	달성	2						2	1	

○1차년도 목표는 달성되었으며 특히 전립선질환에 효과가 있는 새싹땅콩 엑상차 제조방법에 대한 국내특허 등록과 해외출원(pct)을 완료하였고 2차년도 특허는 “새싹땅콩추출물(eps)을 포함한 만성 전립선염증 개선용 식품조성물” 주제로 특허출원을 의뢰한 상태(장백특허법률사무소)이며 해외출원(pct)도 동시에 실시할 계획임. 2차년도 SCI 및 비SCI급 논문은 2015년 4월 이전에 게재를 목표로 작성 중에 있음.

\* 연차별 연구성과 목표는 향후 연차평가 등의 정량적 평가지표로 활용됨

\*\* 연구성과는 연구계획에 따라 도출된 것으로 예시와 같이 작성

#### 나. 연구성과 활용 목표

구분	기술실시 (이전)	상품화	정책자료	교육지도	언론홍보	기타
활용건수	목표	3			3	
	달성	3			3	

※매일경제, 식품외식경제, 농수산홈쇼핑 등

#### 다. 논문게재 성과

계 재 년 도	논문명	저자			학술지명	Vol.(No.)	국내	SCI
		주저자	교신저자	공동저자				
2014	Influence of Nanopowdered Peanut Sprouts in Collagen-induced Arthritic Mice	Yoon Hyuk Chang	Hae-Soo Kwak	Dong-Hwi Kim	Food Sci. Biotechnol	23(6): 2083-2088	국내	SCI

라. 특허성과

출원된 특허의 경우					등록된 특허의 경우				
출원연도	특허명	출원인	출원국	출원번호	등록연도	특허명	등록인	등록국	등록번호
2013	레스베라트롤함량이 증가된 땅콩나물의 추출방법	곽해수, 유아영, (주)장수채	PCT	PCT/KR2013/003565					

마. 기술료 징수 현황

기 징수액	당해년도 징수액	향후 징수액	합계
해당사항없음			

바. 사업화 현황

사업화명	사업화내용	사업화 업체 개요				기매출액	당해년도 매출액	매출액 합계
		업체명	대표자	종업원수	사업화형태			
해당사항없음								

사. 인력활용/양성 성과

(1) 인력지원 성과

지원 총인원	지원 대상 (학위별, 취득자)				성별		지역별		
	박사	석사	학사	기타	남	여	수도권	대전	기타지역
(주)장수채	-	-	-	2	1	1	2	-	-
세종대		2				2	2		
서울대	1	1			2		2		

(협동, 서울대) 박사 1명과 석사2명도 추가로 과제에 포함되어 있으나 아직 학위 취득 전이라 포함하지 않았음

(2) 장·단기 연수지원 성과

장기 (2월 이상)		단기 (2월 미만)	
국내	국외	국내	국외

(3) 산업기술인력 양성 성과

프로그램명	프로그램 내용	교육기관	교육 개최회수	총 교육시간	총 교육인원

아. 경제사회 파급효과

산업지원 성과 (단위 : 건)				고용창출 성과 (단위 : 0명)		
기술지도	기술이전	기술평가	합계	취업	사업체 확장	합계

## 제 2 절. 활용 계획

1. 실용화 · 산업화 계획

가. 건강기능성 소재의 상업화

- 새싹땅콩에 함유된 “레스베라트롤”이 항암, 항산화, 항전립선염, 항치매, 항노화까지 다양한 효과를 보유하고 있어, 이의 활용도는 향후 고령화 시대에 건강 기능성 식품으로 등재될 경우 그의 수요는 폭발적이라 사료된다.
- 차 종류로 식음을 하여도 효과가 있지만 특히 협동연구기관인 서울대의대연구팀에서 EPS(Extrect Peanut Sprout)가 전립선염증 치료에 효과가 있다는 동물 in-vivo실험에서 구명되어 향후 인체실험 등 추가적인 연구가 진행되면 그의 파급효과는 클 것으로 사료된다.

(1) 상품화 방안

- 레스홍삼(엑기스, 파우치), 증숙차, 통조림 등 다양한 상품화를 고려하고 있다.

2. 교육·지도·홍보 등 기술 확산 계획 등

3. 특허, 품종, 논문 등 지식재산권 확보계획 등

- EPS가 전립선염증 치료에 미치는 영향 구명을 특허출원 중에 있음

#### 4. 추가연구, 타연구에 활용 계획 등

협동과제에서 도출한 성과 중에서 레스베라트롤을 다량 함유한 새싹땅콩추출물(EPS)의 면역증강효과를 제시하였다. 이는 EPS의 효능상 새로운 관점에서 우수성을 제안한 것으로 향후 EPS의 면역증강효과의 기전연구를 통해 성인뿐만 아니라 노약자들에서 EPS 투여에 의한 면역증강 효과를 규명하여 장수시대의 건강한 삶을 영위할 수 있는 기반을 제공하는 건강기능성 식품을 개발할 수 있는 추가 연구를 계획 중에 있다.



## 제6장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

- 새싹땅콩에서 추출된 레스베라트롤에 관한 연구는 미국을 비롯하여 수 많은 논문들이 발표되었으나 이를 생명산업으로 부각시킨 사례는 (주)장수채가 가장 선두주자임을 확인하는 연구결과를 도출 함

## 제7장 연구시설·장비 현황

-없음-

## 제8장 참고문헌

1. Baeza, I., et al., Soybean and green tea polyphenols improve immune function and redox status in very old ovariectomized mice. *Rejuvenation Res*, 2010. 13(6): p. 665-74.
2. Bisson, J.F., et al., Therapeutic effect of ACTICOA powder, a cocoa polyphenolic extract, on experimentally induced prostate hyperplasia in Wistar-Unilever rats. *J Med Food*, 2007. 10(4): p. 628-35.
3. Collins, M.M., et al., How common is prostatitis? A national survey of physician visits. *J Urol*, 1998. 159(4): p. 1224-8.
4. Emilio Celotti, Roberto Ferrarini, Roberto Zironib, Lanfranco S. Conteb, Resveratrol content of some wines obtained from dried Valpolicella grapes: Recioto and Amarone, *Journal of Chromatography A*, 1996, 47-52
5. Gao, W., et al., Brazilian green propolis improves immune function in aged mice. *J Clin Biochem Nutr*, 2014. 55(1): p. 7-10.
6. Hueber, P.A. and K.C. Zorn, Canadian trend in surgical management of benign prostatic hyperplasia and laser therapy from 2007-2008 to 2011-2012. *Can Urol Assoc J*, 2013. 7(9-10): p. E582-6.
7. Jang, H., et al., Seoritae extract reduces prostate weight and suppresses prostate cell proliferation in a rat model of benign prostate hyperplasia. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2014. 2014: p. 475876.
8. Jang, H., et al., Seoritae extract reduces prostate weight and suppresses prostate cell proliferation in a rat model of benign prostate hyperplasia. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2014. 2014: p. 475876.
9. Kim, J.W., et al., An Analytical Comparison of Short-term Effectiveness and Safety Between Thulium:YAG Laser Vaporesection of the Prostate and Bipolar Transurethral Resection of the Prostate in Patients With Benign Prostatic Hyperplasia. *Korean J Urol*, 2014. 55(1): p. 41-6.
10. Kim, S.H., et al., Preventive effect of ginsenoid on chronic bacterial prostatitis. *J Infect Chemother*, 2012. 18(5): p. 709-14.
11. Kim, W.K., et al., Peanut sprout ethanol extract inhibits the adipocyte proliferation, differentiation, and matrix metalloproteinases activities in mouse fibroblast 3T3-L1 preadipocytes. *Nutr Res Pract*, 2013. 7(3): p. 160-5.
12. Kosalec, I., N. Kopjar, and D. Kremer, Antimicrobial activity of Willowherb (*Epilobium angustifolium* L.) leaves and flowers. *Curr Drug Targets*, 2013. 14(9): p. 986-91.
13. Lee, Y.K., P. Ganesan, and H.S. Kwak, Properties of Milk Supplemented with Peanut Sprout Extract Microcapsules during Storage. *Asian-Australas J Anim Sci*, 2013. 26(8): p. 1197-204.

14. Lee, Y.S., et al., Synergistic effect between catechin and ciprofloxacin on chronic bacterial prostatitis rat model. *Int J Urol*, 2005. 12(4): p. 383-9.
15. Liangliang Dong, Junli Zhu, Xuepeng Li, Jianrong Li, Effect of tea polyphenols on the physical and chemical characteristics of dried-seasoned squid (*Dosidicus gigas*) 31G. Szakonyi and R. Zelko, Prediction of oral disintegration time of fast disintegrating tablets using texture analyzer and computational optimization, *International Journal of Pharmaceutics*, 2013, 448, 346-353
16. Liu, J., et al., Anti-androgen effects of extracts and compounds from *Ganoderma lucidum*. *Chem Biodivers*, 2009. 6(2): p. 231-43.
17. Maria Carerl, CLAUDIO CORRADINI, LISA ELVIRI, ISABELLA NICOLETTI, AND INGRID ZAGNONI, Direct HPLC Analysis of Quercetin and trans-Resveratrol in Red Wine, Grape, and Winemaking Byproducts, *J. Agric. Food Chem.* 2003, 51, 5226-5231
18. Martin Obanda, P. Okinda Owuor, Richard Mang'oka, Changes in the chemical and sensory quality parameters of black tea due to variations of fermentation time and temperature, *Food Chemistry*, 2001 75, 395-04
19. Nahata, A. and V.K. Dixit, Ameliorative effects of stinging nettle (*Urtica dioica*) on testosterone-induced prostatic hyperplasia in rats. *Andrologia*, 2012. 44 Suppl 1: p. 396-409.
20. Nickel, J.C. and J.W. Costerton, Bacterial localization in antibiotic-refractory chronic bacterial prostatitis. *Prostate*, 1993. 23(2): p. 107-14.
21. Nickel, J.C., et al., Bacterial biofilms: influence on the pathogenesis, diagnosis and treatment of urinary tract infections. *J Antimicrob Chemother*, 1994. 33 Suppl A: p. 31-41.
22. Okinda Owuor, Martin Obanda, Hastings E. Nyirenda, Nicholas I.K. Mphangwe, Louwrance P. Wright, Zeno Apostolides, The relationship between some chemical parameters and sensory evaluations for plain black tea (*Camellia sinensis*) produced in Kenya and comparison with similar teas from Malawi and South Africa, *Food Chemistry*, 2006 97, 644-53
23. Robert, R., et al., Anatomic basis of chronic perineal pain: role of the pudendal nerve. *Surg Radiol Anat*, 1998. 20(2): p. 93-8.
24. Seo, J.Y., et al., Laxative effect of peanut sprout extract. *Nutr Res Pract*, 2013. 7(4): p. 262-6.
25. Stamatiou, K. and N. Pierris, *Serenoa repens* extract additionally to quinolones in the treatment of chronic bacterial prostatitis. The preliminary results of a long term observational study. *Arch Ital Urol Androl*, 2013. 85(4): p. 190-6.
26. Victor S. Sobolev and Richard J. Cole, trans-Resveratrol Content in Commercial Peanuts and Peanut Products, *J. Agric. Food Chem.*, 1999, 47, 1435-1439
27. Victoria K. Ananingsih, Amber Sharma, Weibiao Zhou, Green tea catechins during food processing and storage: A review on stability and detection, *Food Research*

International, 2013 50, 469–479

28. Xiong, Q., et al., Preliminary separation and purification of resveratrol from extract of peanut (*Arachis hypogaea*) sprouts by macroporous adsorption resins. *Food Chem*, 2014. 145: p. 1-7.
29. Yoon, B.I., et al., Anti-inflammatory and antimicrobial effects of nanocatechin in a chronic bacterial prostatitis rat model. *J Infect Chemother*, 2011. 17(2): p. 189-94.
30. Yuerong Liang, Jianliang Lu, Lingyun Zhang, Shan Wu, Ying Wu, Estimation of black tea quality by analysis of chemical composition and colour difference of tea infusions, *Food Chemistry*, 2003, 80, 283–90

## 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.