

# 최 종 보 고 서

발간등록번호

11-1543000-000084-01

국  
산  
농  
산  
물  
을  
이  
용  
한  
기  
능  
성  
식  
품  
산  
업  
화  
연  
구  
사  
업  
단

농  
림  
축  
산  
식  
품  
부

국산 농산물을 이용한  
기능성식품산업화 연구사업단

Center for Business Development of  
Functional Food using domestic  
agricultural resources (CBF)

서울대학교

농림축산식품부

# 제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “국산 농산물을 이용한 기능성식품산업화 연구사업단에 관한 연구”과제의  
보고서로 제출합니다.

2013 년 08 월 09 일

주관연구기관명 : 서울대학교  
주관연구책임자 : 이 형 주  
핵심연구책임자 : 이 상 준  
핵심연구기관명 : 아모레퍼시픽  
핵심연구책임자 : 손 미 원  
핵심연구기관명 : (주) 동아ST  
핵심연구책임자 : 허 철 성  
핵심연구기관명 : (주) 한국야쿠르트

# 요 약 문

## I. 제 목

국산 농산물을 이용한 기능성식품산업화 연구사업단

## II. 연구개발의 목적 및 필요성

### 1. 연구개발의 목적

본 연구사업단의 최종 목적은 국내 농산물을 이용한 고부가가치 기능성식품의 제품화임. 국내 식품관련 대기업, 대학 및 농민단체와 공동으로 국내 농산자원을 활용한 고부가가치의 기능성 식품 및 건강기능식품 개발을 목표로 하고 있음. 강화약썩, 녹차, 마, 국내산 야채 등의 여러 국산 농산물을 이용하여 체중 조절, 혈당 조절, 피부 미용 등의 기능성을 가진 제품을 개발하려 함.

### 2. 연구개발의 필요성

현재 기능성식품 시장 규모는 전세계적으로 해마다 성장하는 추세임. 국내 기능성식품 시장 규모도 해마다 급증하고 있지만, 국산 기능성 원료들은 많은 경우 자체적인 원료 공급과 생산이 활발하지 못해 대부분 외국으로부터 수입된 원료로 대체되고 있음. 현재 우리나라는 외국에서 대부분의 기능성 식품 소재를 수입하여 식이보조제를 단순조합한 후 판매하는 수준에 머물고 있으며 이 같은 상황에서는 국내에서 기능성 식품산업이 확대되어도 결과적으로는 관련 소재의 해외 의존도만 심화시키는 결과를 가져올 것임 (현재 기능성 식품원료의 약 80-90%를 외국에 의존하는 것으로 생각됨). 이는 기능성 식품산업이 장기적으로 국가적인 핵심 산업으로 육성되는데 큰 장애 요인이 될 것임. 또한 FTA 협정 등과 같은 세계 산업환경 변화 속에서 국내 농업이 위기를 맞고 있으며, 이러한 환경 하에서 농산자원을 이용하여 국제 경쟁력을 갖는 건강지향의 기능성식품 개발 및 산업화는 국내농업 기반을 안정적으로 유지하는 주요한 돌파구로 판단됨. 이에 국산 농산자원을 이용한 기능성 식품 개발이 요구되는 상황임.

기능성 식품연구는 새로운 기능성 식품소재 개발 및 상용화하기 위하여 기능성 소재의 탐색을 위한 물질 분리와 이화학적 분석 연구, 공정 개발을 통한 생산성 확립 연구, 소재의 생리활성 및 효능 연구, 상품화를 위한 안전성 및 효능평가 연구 등 학제간, 산학간 통합적인 협력연구가 절실하게 요구되기에 이를 통합할 수 있는 연구단이 발족된다면 효율적으로 기능성 식품을 개발할 수 있는 환경이 갖춰질 것으로 생각됨.

### Ⅲ. 연구개발 내용 및 범위

농산물유래 식품연구는 새로운 기능성 식품소재를 개발 및 상용화하기 위하여 기능성 소재의 탐색을 위한 물질 분리와 이화학적 분석 연구, 공정 개발을 통한 생산성 확립 연구, 소재의 생리활성 및 효능 연구, 상품화를 위한 안전성 및 효능평가 연구 등 학제 간 통합적인 협력연구를 철실하게 요구함. 본 연구사업단은 대학의 주도하에 대기업과 공동으로 설치되는 사업단으로서 대학은 기능성 성분의 작용 기작을 밝히고, 생산 공정을 개발하는 역할을 하고, 기업은 소비자 선호도가 높은 소재 및 제형을 개발하는 역할을 맡아 상호협력 하에 효율적으로 국산 농산자원을 이용한 기능성 식품을 개발하는 연구를 수행함.

본 연구사업단은 다음의 총 4개 핵심과제로 구성되며, 각 핵심과제는 연구기능별이 아닌 농산소재를 중심으로 기능성 제품 개발에 관련된 연구를 수행함.

핵심과제	원료	핵심기능	제품형태	연구책임자
제 1 핵심과제	강화약쑥 등 국내 천연식물	항심혈관 면역조절 피부미용개선 뇌기억력 개선	기능성식품	이형주 교수 (서울대학교) 참여기업 CJ제일제당
제 2 핵심과제	녹차 등 국내 농산물	체중조절 피부건강	개별인증형 기능성식품	이상준 소장 (아모레퍼시픽)
제 3 핵심과제	마 등 국내 농산물	항당뇨	개별인증형 기능성식품	손미원 박사 (동아제약)
제 4 핵심과제	국내산 야채	발효음료	기능성음료	허철성 부문장 (한국야쿠르트,RNA)

### Ⅳ. 연구개발결과

본 연구사업단은 산학연 협업을 통하여 6개의 기능성 제품을 개발하였고, 그 중 아모레퍼시픽의 더블핏S, 한국야쿠르트의 하루야채 퍼플, 한국야쿠르트 흑마늘즙, 한국야쿠르트 도라지즙의 4개 제품을 시장에 출시하였음. 위와 같은 기능성 제품 원료의 지표물질을 밝혔으며, 각 지표물질이 기능성을 나타내는 작용기작을 밝혔고, 이를 국제 우수 저널에 보고하고, 특허를 출원 및 등록함으로써 국산 농산자원을 원료로 하여 개발된 기능성식품의 수출 가능성을 제시하였음. 또한 과제에 관련된 연구를 수행하면서 관련 산업의 발전에 필요한 인재를 양성하여 산업 발전에 기여하였음.

### Ⅴ. 연구성과 및 성과활용 계획

본 연구사업을 통해 개발된 기능성 제품은 현재 시장에서 판매되고 있으며, 앞으로 노인 인구가 증가하고 건강에 대한 관심이 높아짐에 따라 제품 판매 규모는 더욱 확대될 것으로 생각됨. 본 과제를 통하여 기능성 제품을 개발하면서 축적된 노하우는 추후 개발될 기능성 소재 및 제품의 개발기간을 획기적으로 단축시킬 것으로 생각되고, 본 과제에서 학교와 기업이 협력하여 기능성 식품을 개발한 것은 훌륭한 모범사례가 될 것으로 생각됨. 또한 제품 개발 중에 출판된 국제 SCI 논문 및 특허를 통해 글로벌 시장으로의 진출이 가능하여 국내 농업 경쟁력을 제고하고, 기능성 식품 산업을 글로벌화 할 수 있을 것으로 생각됨.

## SUMMARY

### I. The title

Center for Business Development of Functional Food using domestic agricultural resources (CBF)

### II. Objectives and necessity of research

#### 1. Research Objectives

The primary research objective is to produce high-value functional food products by using domestic agricultural resources in cooperation with industry, academia and [farmer's organizations](#). These products are derived from research involving domestic produce including wormwood from Ganghwa province, green tea, Korean yam and other domestic farm vegetables. Potential applications include for weight and [blood glucose control](#) and skincare.

#### 2. Necessity of Research

Demand for functional food products is increasing, especially in the developed world. In many cases, raw materials must be imported from foreign manufacturers due to inadequate production and supply of domestic raw materials. This results in a rising [dependence on imports](#) (the [dependence on imports](#) currently ranges from 80% to 90%), which will be an impeding factor for growth of the industry in Korea. Market conditions are constantly changing, with issues like the FTA adding further obstacles. In this conditions, research on functional food products using [domestic](#) agricultural resources require breakthroughs to maintain financial stability in the Korean agricultural industry.

### III. Scope of the Research Project

The field of functional food research involves integrated and collaborative studies across interdisciplinary fields in order to develop and commercialize new materials and protocols. These include material separation and physico-chemical analysis studies to investigate the properties of functional materials, productivity establishment studies for development processes, bioactivity and effectiveness studies, as well as stability and efficacy studies for commercialization.

As a research group established in cooperation with a conglomerate under the supervision of the university, the consortium's objective is to undertake research for the development of functional foods using domestic agricultural resources. The university's role is to identify the mode of action of the compounds, and to develop production processes, while the conglomerate's role is to develop materials and marketable products in accordance with customer preferences.

The consortium has the following four major objectives, which are based on agricultural resources rather than research capabilities.

Key Objectives	Raw Materials	Key Functions	Product Type	Research Director
Key Objective 1	Native plants, e.g. Wormwood from Ganghwa Province	Anti-cardiovascular immunomodulatory effects; Skin care improvement; Brain-memory improvement	Functional food	Professor Lee, Hyong-Joo (SNU) Participating corporation: CJ (Cheil Jedang Corp.)
Key Objective 2	Domestic agricultural produce, e.g. green tea	Weight control; Skin health	Individually certified functional food	Chief Lee, Sang-Jun (Amore Pacific)
Key Objective 3	Domestic agricultural produce, e.g. Korean yam	Anti-diabetic effect	Individually certified functional food	Dr. Sohn, Mi-Won (Dong A Pharmaceutical Co., Ltd.)
Key Objective 4	Domestic farm vegetables	Fermented drinks	Functional beverage	Section Chief, Heo, Cheol-Sung (Korea Yakult Co., Ltd.,RNA)

#### IV. Research Project Results

The interdisciplinary research consortium has developed 6 functional food products through collaboration. Products including Double-fit S from Amore Pacific, Haroo Yachae (1 day Vege) Purple, Black garlic extract, and Platycodon extract from Yakult Korea have been successfully launched. The research consortium has also identified novel bio-marker compounds and mechanisms of functional materials. These findings have been published in prominent international journals and formed the basis for several patent applications, which has promoted the export possibilities of functional foods made in Korea to an international audience. The research consortium has also contributed to industrial development by nurturing human resources for future growth.

## **V. Research Project Achievements and Plans for Application**

Several functional food products that have been developed through this research have been successfully launched on the Korean market. The demand for such products is expected to rise, as the ageing population continues to increase. Through the development of these functional food products our research team has acquired unique and valuable experience which will aid in the development of future products. In addition, the publications from this research are also likely to promote awareness and demand for functional food products. These factors are expected to promote domestic agricultural competitiveness and the globalization of our functional food industry.

## CONTENTS

Chapter 1	Introduction.....	10
Chapter 2	The status of domestic and foreign technical development.....	49
Chapter 3	Contents and results of study.....	57
Chapter 4	Purpose achievement and contribution degree on field of the study.....	380
Chapter 5	Achievement of the study and application plan of the results.....	391
Chapter 6	Collected Foreign scientific technology information for studying.....	411
Chapter 7	Current status of research installation.....	412
Chapter 8	References.....	413



# 목 차

제 1 장	연구개발과제의 개요.....	10
제 2 장	국내외 기술개발 현황.....	49
제 3 장	연구개발수행 내용 및 결과.....	57
제 4 장	목표달성도 및 관련분야에의 기여도.....	380
제 5 장	연구개발 성과 및 성과활용 계획.....	391
제 6 장	연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보.....	411
제 7 장	연구시설·장비 현황.....	412
제 8 장	참고문헌.....	413

# 제 1 장 연구개발과제의 개요

## 제 1 절 연구개발의 목적

### 1. 총괄 연구목표

가. 최종목표 : 국내 농산물을 이용한 고부가가치 기능성식품 제품화

(1) 강화약썩 등 국내 자생 천연식물을 이용한 건강기능식품 및 기능성 식품 제품화 (1건)

(2) 녹차 등 국내 농산물을 이용한 체중감량 및 피부개선 건강기능식품 제품화 (1건)

(3) 마 등 국내 농산물을 이용한 인슐린저항성 및 당뇨합병증 개선용 건강기능식품 제품화 (1건)

(4) 국내 야채를 이용한 기능성 발효음료 제품화 (1건)

(5) 연구기간내(2010년-2013년)에 연매출 30억 이상 우수상품 2건 이상 달성

### 2. 세부연구과제별 연구목표

가. 제1핵심과제

(가) 최종 연구목표 : 강화약썩 등 국내 자생 천연식물을 이용한 기능성 소재 및 기능성 식품 개발

(나) 연차별 목표

① 1차년도

㉠ 약썩 등 기능성 소재의 생리활성 기능 물질에 대한 가공적성 연구

㉡ 약썩 등의 기능성 소재 원료의 안정성 연구 및 가공 공정 개발

㉢ 세포주 모델을 이용한 약썩 등의 항동맥경화, 항고혈압 예방 또는 면역조절 효능 검색 및 작용기작 규명

㉣ 세포주 모델을 이용한 약썩 등의 피부미용 또는 뇌기억력 개선 효능 검색 및 작용기작 규명

② 2차년도

㉠ 건강기능성 식품 6개 제형 및 확대 제형에서의 가공적성 연구 및 관능 품질 향상 기술 연구

㉡ 강화약썩 등 국내 자생식물의 원료 가공 공정 최적화 및 건강기능성 식품 6개 제형 및 확대 제형에서의 안정성(유통기한) 연구

㉢ 동물 모델을 이용한 약썩 등의 항동맥경화, 항고혈압 예방 또는 면역조절 효능 검색 및 작용기작 규명

㉣ 동물 모델을 이용한 약썩 등의 피부미용 또는 뇌기억력 개선 효능 검색 및 작용기작 규명

③ 3차년도

㉠ 상품화를 위한 약썩 등의 유효 성분의 안정성 검증 및 임상시험을 통한 인체 효능 검증

㉡ 규명된 과학적 근거를 통한 개별인정 취득 및 상품화

㉢ 강화약썩 등 국내 자생식물의 원료 기준 확립 및 원료 가공 공정 표준화

(1) 제1-1세부연구과제

(가) 최종 연구목표 : 강화 약쭉 등 국내 자생천연식물의 심혈관질환 예방 또는 면역조절 효능 규명

(나) 연차별 목표

① 1차년도

㉠ 세포주 모델을 이용한 약쭉 등 국내 자생천연식물의 항동맥경화 및 항고혈압 효능 검색

㉡ 세포주 모델을 이용한 약쭉 등 국내 자생천연식물의 면역조절 효능 규명

② 2차년도

㉠ 동물모델을 이용한 약쭉 등 국내 자생천연식물의 항동맥경화 및 항고혈압 작용기작 규명

㉡ 동물모델을 이용한 약쭉 등 국내 자생천연식물의 면역조절 작용기작 규명

③ 3차년도

㉠ 개발된 제품의 항동맥경화 및 항고혈압 효능 물질 검색 및 작용기작 규명

㉡ 개발된 제품의 면역조절 물질 검색 및 작용기작 규명

(2) 제1-2세부연구과제

(가) 최종 연구목표 : 강화 약쭉 등 국내 자생천연식물의 피부미용 또는 뇌 기억력 개선 효능 규명

(나) 연차별 목표

① 1차년도

㉠ 세포주 모델을 이용한 약쭉 등 국내 자생천연식물의 피부 미용 개선 효능 검색

㉡ 세포주 모델을 이용한 약쭉 등 국내 자생천연식물의 뇌 기억력 개선 효능 검색

② 2차년도

㉠ 동물모델을 이용한 약쭉 등 국내 자생천연식물의 피부 미용 개선 작용기작 규명

㉡ 동물모델을 이용한 약쭉 등 국내 자생천연식물의 뇌 기억력 개선 작용기작 규명

③ 3차년도

㉠ 개발된 제품의 약쭉 등 국내 자생천연식물의 피부 미용 개선 효능 검색

㉡ 개발된 제품의 약쭉 등 국내 자생천연식물의 뇌 기억력 개선 효능 검색

(3) 제1-3세부연구과제

(가) 최종 연구목표

: 강화약쭉 등 국내 자생식물 유래 기능성 물질의 제조공정 확립 및 표준화

(나) 연차별 목표

① 1차년도

㉠ 강화약쭉 등 국내 자생식물의 원료 처리 공정 개발

㉡ 열, 빛, 산소 등 외부 환경 변화에서의 안정성에 대한 kinetic 연구

② 2차년도

㉠ 강화약쭉 등 국내 자생식물의 원료 가공 공정 최적화

㉡ 건강기능성 식품 6개 제형 및 확대 제형에서의 안정성 (유통기한) 연구

③ 3차년도

㉠ 강화약쭉 등 국내 자생식물의 원료 기준 확립

㉔ 강화약썩 등 국내 자생식물의 원료 가공 공정 표준화

(4) 제1-4세부연구과제

(가) 최종 연구목표 : 강화약썩 등 국내 자생 천연식물을 이용한 기능성 소재 및 건강기능성 제품 개발

(나) 연차별 목표

① 1차년도

㉔ 약썩 등 기능성 소재의 생리활성 기능 물질에 대한 가공적성 연구

② 2차년도

㉔ 건강기능성 식품 6개 제형 및 확대 제형에서의 가공적성 연구

㉔ 일반식품에 활용 가능한 관능 품질 향상 기술 연구

㉔ 상품화 가능한 제형의 screening 및 prototype 개발

③ 3차년도

㉔ 상품화를 위한 약썩 유효 성분의 안정성 검증 및 임상시험을 통한 인체 효능 검증

㉔ 규명된 과학적 근거를 통한 개별인정 취득 및 상품화

(5) 제1-5세부연구과제

(가) 최종 연구목표 : 4개의 핵심과제의 조기 제품화

(나) 연차별 목표

① 1차년도

㉔ 4개의 핵심과제의 조기 제품화

② 2차년도

㉔ 4개의 핵심과제의 조기 제품화

③ 3차년도

㉔ 핵심과제의 조기 제품화

나. 제2핵심과제

(가) 최종 연구목표 : 녹차 등 국내 천연농산물을 이용한 피부개선 효능을 갖는 미용기능식품 제품화 (1건) 완료

(나) 연차별 목표

① 1차년도

㉔ 피부미용개선에 이로운 성분이 증가된 국내산 녹차 원료의 개발

㉔ 국내산 녹차 원료의 피부유용성 효능 평가 및 지적재산 확보 (*in vitro* / *in vivo*)

㉔ 원료 안전성 평가 및 대량 생산화

㉔ 원료 표준화

㉔ 국내산 식용 및 약용 농산물자원 확보 및 라이브러리 구축

㉔ 피부건강 기능 식이소재 1차 스크리닝 및 대상자원 확정

㉔ 녹차의 대사체 프로파일링을 위한 기기분석법 확립

㉔ 일반적인 국산 녹차의 대사체와 효능이 검증된 유효성분이 함유된 녹차 대사체의 비교 분석

- ㉔ 녹차의 데이터베이스 구축
- ② 2차년도
  - ㉔ 국내산 녹차 원료의 피부유용성 효능 평가 및 지적자산 확보 (*in vivo/clinical*)
  - ㉕ 플러스 소재에 대한 시너지 검증
  - ㉖ 원료 안전성 평가, 유효성분 pharmacokinetics 검증, dosage response 검증
  - ㉗ 기능성 제품을 위한 제형화
  - ㉘ 피부건강 기능성 신소재 분리정제 및 구조 규명
  - ㉙ 피부건강 기능성 신소재 *in vitro* 및 *in vivo* 효능검증
  - ㉚ 다변량 통계 분석법을 이용한 기능성과의 상관관계 규명
  - ㉛ 피부미용개선에 효과적인 검증된 녹차 대사체에 관한 library 구축
- ③ 3차년도
  - ㉔ 개별인정제품 심의
  - ㉕ 제품세부요소 설계를 통한 제품화
  - ㉖ BA 증진연구
  - ㉗ 미용건강 기능성 신소재 산업화 생산기술 개발
  - ㉘ 미용건강 기능성 신소재 기준규격설정 및 표준화

(1) 제2-1세부연구과제

(가) 최종 연구목표 : 국산 녹차 등 국내 농산물 활용한 피부미용 기능성 식품 제품화 연구

(나) 연차별 목표

- ① 1차년도
  - ㉔ 피부미용개선에 이로운 성분이 증가된 국내산 녹차 원료의 개발
  - ㉕ 국내산 녹차 원료의 피부유용성 효능 평가 및 지적자산 확보 (*in vitro / in vivo*)
  - ㉖ 원료 안전성 평가 및 대량 생산화
  - ㉗ 원료 표준화
- ② 2차년도
  - ㉔ 국내산 녹차 원료의 피부유용성 효능 평가 및 지적자산 확보 (*in vivo / clinical*)
  - ㉕ 플러스 소재에 대한 시너지 검증
  - ㉖ 원료 안전성 평가, 유효성분 pharmacokinetics 검증, dosage response 검증
  - ㉗ 기능성 제품을 위한 제형화
- ③ 3차년도
  - ㉔ 개별인정제품 심의
  - ㉕ 제품세부요소 설계를 통한 제품화
  - ㉖ BA 증진연구

(2) 제2-2세부연구과제

(가) 최종 연구목표 : 국내산 농산물을 이용한 피부건강 기능성소재 발굴

(나) 연차별 목표

- ① 1차년도
  - ㉔ 국내산 식용 및 약용 농산물자원 확보 및 라이브러리 구축

- ㉔ 피부건강 기능 식이소재 1차 스크리닝 및 대상자원 확정
- ② 2차년도
- ㉔ 피부건강 기능성 신소재 분리정제 및 구조 규명
- ㉔ 피부건강 기능성 신소재 *in vitro* 및 *in vivo* 효능검증
- ③ 3차년도
- ㉔ 미용건강 기능성 신소재 산업화 생산기술 개발
- ㉔ 미용건강 기능성 신소재 기준규격설정 및 표준화

(3) 제2-3세부연구과제

(가) 최종 연구목표 : 유용성분을 함유한 국산 녹차의 등 국내 농산물의 대사체 비교 분석 및 생체 내 대사 변화 연구

(나) 연차별 목표

- ① 1차년도
- ㉔ 녹차의 대사체 프로파일링을 위한 기기분석법 확립
- ㉔ 일반적인 국산 녹차의 대사체와 효능이 검증된 유효성분이 함유된 녹차 대사체의 비교 분석
- ㉔ 녹차의 데이터베이스 구축
- ② 2차년도
- ㉔ 다변량 통계 분석법을 이용한 기능성과의 상관관계 규명
- ㉔ 피부미용개선에 효과적인 검증된 녹차 대사체에 관한 library 구축
- ③ 3차년도
- ㉔ 녹차 식이 생체시료의 대사체 프로파일링
- ㉔ 생체 내 대사과정 추정 및 물질 분석
- ㉔ 다변량 통계 분석법을 통한 생체 내 녹차 대사의 상관관계 규명

다. 제3핵심과제

(가) 최종 연구목표 : 인슐린저항성, 당뇨합병증 및 뇌인지기능 개선용 건강기능식품 제품화(2건) 완료

(나) 연차별 목표

- ① 1차년도
- ㉔ 혈당개선 건강기능식품원료의 기준규격심의를 위한 자료 확보
  - 원료 및 제품의 규격화 달성
  - 제품 안정성 연구
- ㉔ 식약청 신청 및 허가
- ㉔ 건강기능식품 제품화 완료
- ② 2차년도
- ㉔ 뇌 인지기능개선용 건기식소재 도출
- ㉔ 효능평가 진행
- ㉔ 추출 및 공정의 최적화 달성
- ㉔ 유효성분(또는 지표성분) 분석기술 확보

㉞ ‘개별인정형 건강기능식품원료’ 인정을 위한 독성/안전성 자료 확보

③ 3차년도

㉞ 건강기능식품원료의 기준규격심의를 위한 자료 확보

- 원료 및 제품의 규격화 달성

- 제품 안정성 연구

㉞ 제형연구 및 대량생산기술 확보

㉞ 건강기능식품 제품화 완료 및 출시

(1) 제3-1세부연구과제

(가) 최종 연구목표 : 인슐린저항성, 당뇨합병증 및 뇌인지기능 개선용 건강기능식품 제품화 (2건) 완료

(나) 연차별 목표

① 1차년도

㉞ 기능성인정(‘개별인정형 건강기능식품’)을 취득하기 위한 효능평가자료 확보

㉞ 추출 및 공정의 최적화 달성

㉞ 유효성분(또는 지표성분) 분석기술 확보

② 2차년도

㉞ ‘개별인정형 건강기능식품원료’ 인정을 위한 독성/안전성 자료 확보

㉞ ‘개별인정형 건강기능식품원료’ 인정을 위한 민원신청 완료 :

- 당뇨성신경병증 개선 기능

- 체중조절 및 인슐린저항성 개선 기능

③ 3차년도

㉞ 건강기능식품원료의 기준규격심의를 위한 자료 확보 :

- 원료 및 제품의 규격화 달성

- 제품 안정성 연구

㉞ 제형연구 및 대량생산기술 확보

㉞ 건강기능식품 제품화 완료 및 출시

(2) 제3-1-1위탁연구과제

(가) 최종 연구목표 : 본 시험은 기능성 식품이 뇌질환 전단계에 해당하는 피험자를 대상으로 인지기능 장애 증상개선에 대한 평가를 혈액검사, 증상 및 삶의 질의 변화를 평가하기 위하여 위약 대조군를 시행한 경우와 유효성을 비교 평가하고자 함.

(3) 제3-2세부연구과제

(가) 최종 연구목표

건강기능식품 원료의 인슐린저항성 개선효능, 그 작용기작을 식이성비만 및 인슐린저항성 동물 모델에서 평가하며, 인지기능개선 모델을 이용한 뇌인지기능개선 효능 평가.

(나) 연차별 목표

① 1차년도

㉞ 식이성비만 및 인슐린저항성 마우스모델을 대상으로 마 등 국내 농산물추출물의 체중조절,

인슐린저항성 및 대사질환 개선효능을 평가

② 2차년도

㉠ 식이성비만 및 인슐린저항성 마우스모델을 대상으로 마 등 국내농산물의 유효분획물 또는 유효성분의 체중조절, 인슐린저항성 및 대사질환 개선효능을 평가하고, 유효용량의 범위를 설정함. 뇌인지기능 후보물질에 대한 효능평가

③ 3차년도

㉠ 유효분획물 또는 유효성분의 인슐린저항성, 인지기능 개선 작용기작을 규명

라. 제4핵심과제

(가) 최종 연구목표 : 국내 야채를 이용한 기능성 발효음료 개발

(나) 연차별 목표

① 1차년도

㉠ 한국야쿠르트에서 시판하고 있는 야채주스 ‘하루야채’의 성분을 발효하는데 적합한 유산균주를 1차로 선발

㉡ *In vitro* test를 통한 발효산물의 생리활성 파악

㉢ 하루야채의 유효성분 분석

② 2차년도

㉠ 동물시험의 효능을 통한 유산균주 2차 선발 및 Biomarker 분석

㉡ 발효산물의 유효성분 분석

③ 3차년도

㉠ 유산균 발효공정 최적화

㉡ 동물시험을 통한 개발제품의 효능 검증

㉢ 제품 상품화

(1) 제4-1세부연구과제

(가) 최종 연구목표 : 국내 야채를 이용한 기능성 발효음료 개발

(나) 연차별 목표

① 1차년도

㉠ 한국야쿠르트에서 시판하고 있는 야채주스 ‘하루야채’의 성분을 발효하는데 적합한 유산균주를 1차로 선발 : 한국야쿠르트 R&BD 및 (주)RNA 보유 유산균주

㉡ 유산균주의 증식

㉢ 야채 발효 후 관능 우수 균주 선발

② 2차년도

㉠ 동물시험의 효능을 통한 유산균주 2차 선발 및 Biomarker 분석

③ 3차년도

㉠ 유산균 발효공정 최적화

㉡ 동물시험을 통한 개발제품의 효능 검증

㉢ 제품 상품화



(2) 제4-2세부연구과제

(가) 최종 연구목표 : 한국 야쿠르트 시판 야채주스 '하루야채'의 생리활성 유효성분 최적화를 위한 유산균주 선발 및 기작 연구

(나) 연차별 목표

① 1차년도

㉠ 한국 야쿠르트 시판 야채주스 '하루야채'의 생리활성 유효성분 최적화를 위한 유산균주 선발

㉡ 선발된 유산균주 동정

② 2차년도

㉠ 선발된 유산균주의 특성 규명 및 기능성 연구

③ 3차년도

㉠ 선발된 유산균의 기능성 기작 규명 및 기능성 물질 탐색

(3) 제4-3세부연구과제

(가) 최종 연구목표 : 원료의 생물전환을 통한 발효 후 유효성분들의 비교 분석

(나) 연차별 목표

① 1차년도

㉠ 한국야쿠르트에서 시판하고 있는 야채주스 '하루야채'의 기능성 성분에 대한 분석

㉡ 원료 채소들에 대한 기능성 물질의 정량 분석

② 2차년도

㉠ 발효음료의 유효 성분 분석

㉡ 발효 전/후 기능성 성분 변화에 대한 비교 분석

③ 3차년도

㉠ 생리활성 발효 제품의 기능성을 부여하는 활성물질의 분리 및 정제

## 제 2 절 연구개발의 배경 및 필요성

### 1. 기술개발의 중요성과 필요성

가. 현재 우리나라는 외국에서 대부분의 기능성 식품 소재를 수입하여 식이보조제를 단순조합한 후 판매하는 수준에 머물고 있으며 이 같은 상황에서는 국내에서 기능성 식품산업이 확대되어도 결과적으로는 관련 소재의 해외 의존도만 심화시키는 결과를 가져올 것임 (현재 기능성 식품원료의 약 80-90%를 외국에 의존하는 것으로 예상됨). 이는 기능성 식품산업이 장기적으로 국가적인 핵심 산업으로 육성되는데 큰 장애 요인이 될 것임.

나. 중국과 인도의 기능성원료가 가격경쟁과 유통량증가 등으로 건강기능식품 세계시장에 큰 영향을 미치고 있음. 미국의 허브원료시장에서도 중국, 인도원료가 50%이상 사용되는 것으로 추정되며, 중국을 비롯한 아시아 각국의 시장규모는 작년에 비해 11% 증가한 90억 달러로 아시아에서는 직접 판매 기업을 타겟으로 지속적인 시장 확대가 예상됨. 따라서 국내 유용 기능성 식품소재의 활용에 대한 국가적인 지원확대와 국제 경쟁력이 있는 신규 기능성식품의 상용화가 시급한 실정임.

다. 기능성 식품연구는 새로운 기능성 식품소재를 개발 및 상용화하기 위하여 기능성 소재의 탐색을 위한 물질 분리와 이화학적 분석 연구, 공정 개발을 통한 생산성 확립 연구, 소재의 생리활성 및 효능 연구, 상품화를 위한 안전성 및 효능평가 연구 등 학제간, 산학간 통합적인 협력연구가 절실하게 요구됨.

라. 우리나라는 전통적으로 식용자원을 사용하여 식품에 적용한 역사적 배경을 갖고 있음. 따라서 국내 기능성 식품소재와 순수 기술로 상용화가 가능한 제품의 개발은 관련 산업에 미치는 파급 효과가 즉각적이고 광범위하며, 기능성 식품 신소재 및 기능성 식품 시장의 확대에 의한 관련 산업의 고용 창출을 증가시키고, 고부가가치의 기능성 식품 시장에서 경쟁력을 확보할 수 있음.

마. 기능성 식품 신소재의 80% 이상이 수입에 의존하는 상황을 개선하여 기능성 식품 소재의 생산 단가절감에 기여하고, 신소재 개발로 인한 기능성 식품 종류가 다양해질 것으로 기대되며, 기능성 식품 소재의 수입을 억제하여 수입 대체 효과를 기대할 수 있음. 또한 수출 증대 효과 및 로열티 지불 없는 제품개발로 무역수지 개선에 효과를 나타냄으로써 기능성 식품 시장의 확대에 이어질 수 있을 것임.

바. 이러한 기능성 식품의 개발과 관련하여 국내외 시장규모의 확대와 소재의 활용이 증가된다는 것은 관련 산업의 지속적인 성장을 기대할 수 있고, 이로 인한 국내외 특허 출원을 통해 지적재산권을 확보하고 기술이전을 통한 이익을 창출할 수 있음.

사. 따라서 본 연구단은 강화약쑥, 녹차, 마, 야채류 등 국내 자생 기능성 원료와 기타 국내산 농산물을 이용하여, 고부가가치의 기능성 식품을 개발 제품화함으로써 국내 기능성 식품산업을

활성화하며, 국제 시장에서도 경쟁력을 확보하고자 함.

## 2. 세부연구과제별 연구의 필요성

### 가. 제1핵심과제

(가) 기능성 식품 시장 규모는 세계적으로 2000년도 1,500억 불로 추정(중국 제외)되며, 2010년에는 10배정도 증대되어 20,000억 불 정도 될 것으로 예측됨. 우리나라 기능성 식품 시장은 2조 5천억원정도(2007년)이며 향후 10%-50% 이상 성장할 것으로 예측됨. 하지만, 동맥경화 및 고혈압 예방 기능성 식품 소재로 허가된 국내 농산 자원의 개발은 미미한 실정이며, 미용식품으로 허가된 기능성 식품도 2007년 현재 프랑스의 해안송껍질추출물(피크노제놀)을 활용한 LG 생활건강의 'L-스킨케어' 제품이 유일함(식품음료신문, 보건산업진흥원, 산업자원부).

(나) 심혈관질환은 심장질환과 인체 내 모든 혈관의 질환을 총칭하는 것으로서, 동맥경화에 의해 관상동맥이 막히는 허혈성 심장질환과 고혈압성 심장질환이 주를 이룸. 심혈관질환은 사망원인 별 통계에서 미국의 경우 1위, 우리나라의 경우 3위에 해당하는 질병임. 우리나라에서 지난 30년 동안 심혈관질환이 급속히 증가했으며, 동맥경화성 심장질환의 경우 지난 10년 동안 사망률이 77.9% 증가. 심혈관질환의 주된 위험요인으로 고콜레스테롤증, 고혈압, 당뇨가 꼽힐 정도로 심혈관질환은 식습관과 밀접한 관련이 있으며 따라서 식품성분을 활용한 예방이 필수적임. (통계청)

(다) 최근 건강 뿐 아니라 아름다움에 대한 욕구가 증가하면서 미용식품 및 기능성 화장품에 대한 관심이 증대되고 있음. 특히 기능성화장품은 기존의 미용 개념에서 벗어나 피부 노화 및 질병을 예방할 수 있는 기능성을 포함하고 있으며, 따라서 피부의 주름개선, 피부 알레르기를 비롯한 면역 관련 질병 개선을 위한 천연 소재 발굴에 대한 요구가 증대되고 있음. 2005년의 세계 화장품 시장은 약 1,400억 불 규모이며, 국내시장도 약 5조 8천억 원으로 거대한 규모를 형성하고 있으며, 화장품산업은 고부가가치 산업으로 더욱 성장할 수 있는 잠재성을 지니고 있음.

(라) 국내 천연자원 중 그 기능성이 이미 민간에 널리 알려져 있으나 체계적인 연구가 부족하여 산업화되지 못하고 있는 대표적 자원으로 쑥을 꼽을 수 있음. 강한 생리활성과 독특한 허브향을 지닌 강화약쑥은 국화과(compositae)에 속하는 다년초(本草)로 동의보감 등의 고문서에서 예로부터 향산화, 항염, 항균, 정장작용, 소화개선 등의 효험이 있는 것으로 알려져 궁중에 진상하던 강화명품임. 강화약쑥의 한 종류인 사자발쑥은 소염, 진통, 강심, 진해제, 흡입제, 항암, 간기능 개선, 알콜 분해 등의 효과가 있다고 알려져 있으나, 이러한 약쑥의 생리활성에도 불구하고 약쑥 성분을 활용한 기능성 식품 및 미용식품의 개발은 전무함. 약쑥을 활용한 제약품으로 시판되는 유일한 제품인 '스티렌' (동아제약, 위염치료제)은 약쑥 성분인 'eupatilin'을 주성분으로 한 신약으로 연매출이 약 600억 원에 달함.

(마) 본 연구는 국내 농산 자원인 약쑥을 활용해 심혈관질환 및 피부미용기능 개선 (피부 항노화 및 면역 조절을 통한 항균, 항염 기능)에 대한 체계적인 기능성 규명을 통해, 고부가가치 기능성 식품소재를 개발하고 산업화를 도모하고자 함. 궁극적으로 현행 법규에서 허가하는 개별인정형 건강기능 소재로서의 유용성 표시 허가를 획득하고 이를 통한 건강기능식품을 개발함으로써, 국산 작물의 고부가 가치 창출 및 약쑥 재배 농가의 수익 증대, 글로벌 식품 시장에서의 국가 경쟁력 향상을 연구의 목적으로 함.

(바) 본연구팀의 관련 선행보유기술 : 본 공동연구기관들은 수년간의 연구를 통하여, 생리활성

을 지닌 약썩 성분에 대한 국내특허 2건을 등록했음 [테트라메톡시하이드록시플라본을 포함하는 유방암 억제용 조성물 (특허등록번호: 2007-0700358, 특허등록일자: 2007.03.21), 유과틸린을 유효성분으로 함유함을 특징으로 하는 세포 간 갭 결합 장애 매개 질환의 예방용 조성물 (특허등록번호: 2007-0742737, 특허등록일자: 2007.07.08)]. 또한, 약썩 성분들의 건강기능성을 입증하는 다음의 2건의 특허를 출원했음 [유과틸린을 포함하는 유방암 억제용 조성물 (출원번호 2005-43891, 특허 출원일 2005.05.24), 자시오시딘을 포함하는 유방암 억제용 조성물. (출원번호 2005-43889, 특허 출원일 2005.05.24)].

(1) 제1-1세부연구과제

(가) 기능성 식품 시장 규모는 세계적으로 2000년도 1,500억 불로 추정(중국 제외)되며, 2010년에는 10배정도 증대되어 20,000억 불 정도 될 것으로 예측됨. 우리나라 기능성 식품 시장은 2조 5천억원정도(2007년)이며 향후 10%-50% 이상 성장할 것으로 예측됨. 하지만, 동맥경화 및 고혈압 예방 기능성 식품 소재로 허가된 국내 농산 자원의 개발은 미미한 실정이며, 미용식품으로 허가된 기능성 식품도 2007년 현재 프랑스의 해안송껍질추출물(피크노제놀)을 활용한 LG 생활건강의 'L-스킨케어' 제품이 유일함. (식품음료신문, 보건산업진흥원, 산업자원부)

(나) 심혈관질환은 심장질환과 인체 내 모든 혈관의 질환을 총칭하는 것으로서, 동맥경화에 의해 관상동맥이 막히는 허혈성 심장질환과 고혈압성 심장질환이 주를 이룸. 심혈관질환은 사망원인 별 통계에서 미국의 경우 1위, 우리나라의 경우 3위에 해당하는 질병임. 우리나라에서 지난 30년 동안 심혈관질환이 급속히 증가했으며, 동맥경화성 심장질환의 경우 지난 10년 동안 사망률이 77.9% 증가. 심혈관질환의 주된 위험요인으로 고콜레스테롤증, 고혈압, 당뇨가 꼽힐 정도로 심혈관질환은 식습관과 밀접한 관련이 있으며 따라서 식품성분을 활용한 예방이 필수적임. (통계청)

(다) 약썩을 이용하여 심혈관질환에 대한 효능과 그 작용기작을 규명한다면 약썩에 대한 활용도가 넓어져 농가 소득 증대에 기여할 수 있을 것으로 사료됨.

(2) 제1-2세부연구과제

(가) 기능성 식품 시장 규모는 세계적으로 2000년도 1,500억 불로 추정(중국 제외)되며, 2010년에는 10배정도 증대되어 20,000억 불 정도 될 것으로 예측됨. 우리나라 기능성 식품 시장은 2조 5천억원정도(2007년)이며 향후 10%-50% 이상 성장할 것으로 예측됨. 미용식품으로 허가된 기능성 식품은 2007년 현재 프랑스의 해안송껍질추출물(피크노제놀)을 활용한 LG 생활건강의 'L-스킨케어' 제품이 유일함. (식품음료신문, 보건산업진흥원, 산업자원부)

(나) 최근 건강 뿐 아니라 아름다움에 대한 욕구가 증가하면서 미용식품 및 기능성 화장품에 대한 관심이 증대되고 있음. 특히 기능성화장품은 기존의 미용 개념에서 벗어나 피부 노화 및 질병을 예방할 수 있는 기능성을 포함하고 있으며, 따라서 피부의 주름개선, 피부 알레르기를 비롯한 면역 관련 질병 개선을 위한 천연 소재 발굴에 대한 요구가 증대되고 있음. 2005년의 세계 화장품 시장은 약 1,400억 불 규모이며, 국내시장도 약 5조 8천억 원으로 거대한 규모를 형성하고 있으며, 화장품산업은 고부가가치 산업으로 더욱 성장할 수 있는 잠재성을 지니고 있음.

(다) 본 연구는 국내 농산 자원인 약썩을 활용해 피부미용기능 개선 (피부 항노화 및 면역 조절을 통한 항균, 항염 기능)에 대한 체계적인 기능성 규명을 통해, 고부가가치 기능성 식품소

재를 개발하고 산업화를 도모하고자 함. 궁극적으로 현행 법규에서 허가하는 개별인정형 건강기능 소재로서의 유용성 표시 허가를 획득하고 이를 통한 건강기능식품을 개발함으로써, 국산작물의 고부가 가치 창출 및 약쑥 재배 농가의 수익 증대, 글로벌 식품 시장에서의 국가 경쟁력 향상을 연구의 목적으로 함.

### (3) 제1-3세부연구과제

(가) 최근 건강기능성식품 시장이 빠르게 확대되고 있고 향후 고성장이 예측됨. 다양한 생리활성을 가진 것으로 알려진 강화약쑥, 헛개나무 등 국내 자생식물을 이용한 기능성 식품의 성공 가능성이 매우 높음. 이들을 이용한 제품 개발에는 기본적으로 약쑥 등의 원료를 적절하게 가공 및 처리하는 것이 중요함.

(나) 강화약쑥 등 국내 자생식물을 이용한 제품 개발에 있어서 원료에 대한 기준과 표준화된 생산 공정이 필요하나 현재는 각종 법령에 준하는 강화약쑥, 헛개나무 등 많은 국내 자생식물의 원료 기준, 기능성 성분 분석법, 표준 공정 기준 등이 마련되어있지 않음.

(다) 본 연구를 통하여 기능성식품소재로서 강화약쑥, 헛개나무 등 국내 자생식물의 가공처리에 관한 차별적인 표준화 공정을 확립하여 제품 개발의 수월성 증대에 기여할 것임.

### (4) 제1-4세부연구과제

(가) 건강기능성 식품의 성공 여부는 소비자에게 주는 health benefit의 구현 여부에 의존하고 있으며, 이는 과학적으로 규명된 건강기능성 소재에 근간을 두고 있음. 대부분의 건강기능성 소재들은 식물체 추출물들이며, 글로벌 시장에서 거대 수익을 내고 있는 대규모 소재전문 기업들은 특정 지역 혹은 특수한 환경에서만 자랄 수 있는 차별적인 자생식물의 추출물 개발을 통해 시장에서 경쟁력을 확보하고 있는 실정임. 한국의 소재 전문 혹은 건강기능성 식품 전문 기업들이 이러한 글로벌 시장에서 어려움을 겪고 있는 이유는 한국만이 할 수 있는 소재 개발을 못했기 때문이며 사업화를 염두에 둔 전략적 소재 개발이 미흡했기 때문임.

(나) 무한한 가능성을 갖고 있는 한국의 자생 혹은 배양식물 자원의 산업적 이용은 국내 자생 식물체로부터 시작함이 타당할 것이며, 현재 농림부 주관으로 시행 중인 지리적표시제 등록 소재들 및 민간 요법이나 구전으로 그 효능이 알려져 있는 소재들을 우선적 대상으로 하여 건강기능성 규명과 원료 표준화 연구를 통해 기능성 소재로 개발하는 전략적 접근이 필요함.

(다) 지리적표시제 16호인 약쑥은 우리나라에 널리 분포되어있는 다년생 식물로서 국화과(Compositae)에 속하는 식물임. 약쑥의 다양한 생리활성에 대해서는 많은 연구가 이루어져 왔는데, 흰쥐의 간과 혈청 중의 지질억제작용 (남상명, 1998), 항 미생물효과 (정병선 등, 1989; 안병용, 1992; 김영숙 등, 1994; 이선화 등, 1995), 혈압강하작용 (임상선과 이종호, 1997), 항암작용 (황윤경 등, 1998), 항산화작용 (강윤한 등, 1995; 임대관 등, 1996; 강정욱, 2000) 등 약쑥의 생리적 효과가 많이 보고되고 있음.

(라) 약쑥의 효능을 상품화하기 위한 응용연구들도 이루어지고 있는데, 약쑥 추출물을 첨가하여 요구르트의 특성을 조사한 김지인과 박상인 (1999)은 약쑥 추출물의 첨가가 젖산균의 증식을 가져왔으며, 색도, 향기, 맛, 조직감 및 전체적인 기호도와 같은 관능성이 더 우수한 것으로 보고하였음. 또한, 약쑥 추출물이 첨가된 yoghurt의 발효특성을 연구한 배인휴 등 (2000)도 약쑥의 첨가가 유산균수를 증가시켰다고 보고하였으나, 약쑥 첨가가 요구르트의 외관, 조직감을 떨어뜨리나 첨가량 1%까지는 맛을 크게 손실시키지 않고 풍미를 다소 증진 시킨 것으로 보고

하였음. 강종욱 (2000)은 약썩 추출물이 LDL (Low density lipoprotein)에 대한 항산화능을 연구하였으며, 아세톤추출액이 가장 강한 항산화능이 있음을 보여주었음. 박찬성 등 (2002)은 솔잎과 약썩을 이용하여 기능성 발효음료를 제조하고자 약썩의 항산화능과 아질산염 소거능을 조사하였고 아질산염 소거능은 pH 1.2에서 가장 높았으며 pH증가에 따라서 감소하였으며 솔잎추출물이 약썩 추출물보다 더 좋은 결과를 보여주었음. 최병범 등 (2004)도 약썩추출물에 대한 항산화효과를 측정하였으며 약썩이 다른 약썩에 비해 총 페놀함량과 플라보노이드함량 및 총 아미노산 함량이 가장 많았으며 항산화능력도 다소 더 높은 것으로 보고하였으며, 모든 약썩의 당 함량에서는 glucose가 가장 많았다고 보고하였음. 상품화 관련된 특허로서는 각종 효소제를 첨가하여 페이스트상의 약썩 제조를 만든 경우 (이신용 등, 1988), 인스턴트 약썩 수프를 제조한 경우 (구자연 등, 1988)와, 식품첨가제로서 생 약썩 제조 (지문환, 2001)가 있음. 또한, 최근에는 약썩 추출액을 이용하여 저장성을 연장한 약썩강정 (김행란 등, 2005)의 경우가 있으며, 약썩 분말을 주성분으로 하는 가공 치즈제조 (임상동 등, 2006)가 있음.

(마) 시장 측면에서 본다면, 2002년부터 국내에 시행되고 있는 건강기능성식품법에 따라 식품의 생리적 효과를 강조한 건강기능성식품 시장이 빠른 속도로 성장하고 있으며, 강화약썩은 그 생리적 효과가 지속적으로 규명되고 있기 때문에 그 개발 가능성은 매우 높아지고 있음. 그러나, 강화약썩의 기능성 연구는 건강기능성식품법에 준하여 상업화를 고려한 맞춤형 연구가 진행되어야만 함에도 불구하고, 다소 기초연구 쪽으로 치중된 경향을 보이거나 기능성을 인증 받기 위해서는 연구 설계가 수정되어야 하는 아쉬운 상황을 보이고 있음.

(바) 강화약썩의 식품으로서의 응용 확대를 저해하는 또 다른 요소로는, 강화약썩이 주로 약재로만 사용됨에 따라 식품으로서의 원료 기준 마련이 미흡하고, 수확 후 건조 과정 등 표준화가 이루어져 있지 않은 점임. 식품 제조사들이 원료로 활용하기 위해서는 재배부터 수확 후 가공까지의 과정이 위생적으로 이루어지고, 원료 차원에서 관리 기준이 마련되어야 함. 그리고, 생리활성 물질에 대한 분석법 표준화 및 validation 작업이 이루어져서 안정적인 원료 생산 및 수급이 선행되어야 상업화가 가속화 될 수 있음.

(사) 본 연구는 강화약썩을 우선적 대상으로 하여 소비 확대를 저해하는 요소를 해결하고 농가 소득 향상시키기 위하여 표준화된 차별적 공정으로 생산된 약썩 원료 산학연 협동으로 개발하고, 이를 건강기능성식품법 상의 개별인정원료로서 허가를 취득하며 이를 이용한 상품을 개발함으로써 소비자 기호성을 충족시키는 건강기능성 식품을 개발하고자 함.

#### (5) 제1-5세부연구과제

(가) 본 연구사업단은 4개의 핵심과제에서 최신 기술을 바탕으로 히트상품이 될 수 있는 제품을 개발하는 것을 목적으로 함. 이를 위해 정보 수집과 행정적인 도움이 필요로 하며 자문위원회와 운영위원회를 두어 연구센터의 원활한 운영을 도모해야 함.

#### 나. 제2핵심과제

(가) 미용식품(Beauty Foods)은 식품, 화장품, 생활건강, 제약 등 다양한 산업체에서 공통적으로 추진하는 신산업 분야로 주목받고 있음. 미용식품은 기존의 화장품과는 달리 먹어서 아름다움을 이루고자 하는 inner & outer의 새로운 미용개념을 제공함으로써 최근 사회적으로 확고하게 인식되어 있는 well-being의 가장 중요한 개념인 아름다움을 추구하는 소비자들의 인식에 가장 근접한 산업영역으로 외국에서 현재 활발한 연구 개발과 산업화가 진행되고 있음.

(나) 전 세계적으로 가장 대표적인 식품 및 화장품 업체인 스위스 Nestle사와 프랑스 L'Oreal사는 공동으로 Laboratoires Inneov사를 설립하여 미용식품을 개발하고 있으며, 일본에서는 콜라겐, 알로에, 녹차, CoQ-10 등을 활용한 미용식품의 개발이 활발하게 진행되고 있음. 미국에서도 soy isoflavone, CLA,  $\alpha$ -lipoic acid 등의 생리활성 물질을 이용한 미용식품이 판매되고 있으며, 앞으로도 미용식품은 전 세계적으로 크게 확대되고 있는 기능성 식품의 가장 중요한 영역으로 자리매김할 것으로 예상됨.

(다) 미용식품은 건강기능성식품이나 의약품으로 분류돼 엄밀한 관점에서는 화장품이 아니지만 최근 이너뷰티(Inner Beauty) 신드롬의 영향으로 넓은 범주의 화장품으로 인식되기도 함. 특히 건강과 아름다움이 직결된다는 평범한 진리가 일반인들 사이에 재인식되면서 건강미용 시장에서 이너뷰티의 개념이 더욱 주목받고 있음.

(라) 피부 기능과 피부상태는 영양에 크게 의존하며 영양결핍에 반응하여 피부에 병소가 발생한다는 사실을 근거로 하여, 현재의 미용식품개발 및 연구는 피부건강을 개선하고 피부 손상이나 노화의 위험을 감소시키는데 있어서 식사, 특정식품성분, 영양보충이 가지는 역할의 중요성에 대한 관심을 높이고 있음. 핵심 연구 분야로는 최근 과잉 활성 산소종에 의한 산화적 스트레스가 노화, 특히 피부노화의 주요한 원인으로 밝혀짐에 따라 유리기 소거활성을 갖는 항산화제의 발견과 이들 성분들이 효과적으로 체내에 흡수될 수 있도록 하는 것이 중요한 연구 과제가 되고 있음.

(마) 이들 효능성분들의 신뢰할 수 있는 biokinetic, biochemical, epidemiological data를 확보하는 것이 미용식품 시장의 지속적 성장을 보장하는 것임. 미용기능식품 소재로서의 최근의 관심사항은 위에서 언급한 영양학적 관점에서의 피부건강 및 미용 소재가 아니라, 보다 구체적인 피부미용, 즉 주름개선, 보습증진, 탄력 증가 등에 영향을 미치는 생물학적 타겟에 보다 특이적으로 작용해서 적은 양으로도 높은 효능을 구현하는 생리활성 천연물에 대한 관심이 높아지고 있음. 따라서 최근에 이러한 피부과학을 바탕으로 다양한 세포실험 및 동물실험, 임상실험을 근거로 천연소재로부터 특정 피부효능을 갖는 소재개발에 많은 관심을 가지고 있음. 미용식품의 산업적 발전을 위해 가장 필요한 것은 미용식품의 기능에 대한 과학적 근거를 제공함으로써 소비자의 신뢰를 얻어야 한다는 것임. 그러나 아직 미용식품의 정확한 정의나 효능평가에 대한 방법이 명확하게 제시되어 있지 않아 관련 산학연 전문가의 컨소시엄을 통한 과학적인 근거구축이 필요하다고 판단됨.

(바) (주)아모레퍼시픽은 천연물을 미용제품이나 식품에 적용한 경험을 갖고 있으며, 다양한 실험 및 연구 등으로 피부과학에 대해서 많은 노하우를 가지고 있음. 또한 (주)아모레퍼시픽은 설록차로 대표되는 제주도 직영다원에서 재배한 녹차를 제품화하여 국내 녹차 시장을 약 30년간 이끌어온 장본인으로 녹차의 재배부터 제품까지 다양한 기술과 노하우를 가지고 있음. 미용식품의 개발은 국내 식용자원 및 자생식물 등의 천연소재를 활용하는 것이 가장 핵심이기에 오랜 기간 녹차 및 천연물에 대한 연구결과를 토대로 한 특허 및 기술로 본 연구를 진행할 수 있음.

#### (1) 제2-1세부연구과제

(가) 미용식품은 건강기능성식품이나 의약품으로 분류돼 엄격한 면에서 화장품은 아니지만 최근 이너뷰티(Inner Beauty) 신드롬의 영향으로 넓은 범주의 화장품으로 인식되기도 함. 특히 건강과 아름다움이 직결된다는 평범한 진리가 일반인들 사이에 재인식되면서 건강미용시장에

서 이너뷰티의 개념이 더욱 주목받고 있음.

(나) 기존의 미용식품개발 및 연구는 피부 기능과 피부상태는 영양에 크게 의존하며, 영양결핍에 반응하여 피부에 병소가 발생한다는 사실을 근거로 하여 피부건강을 개선하고 피부 손상이나 노화의 위험을 감소시키는데 있어서 식사, 특정식품성분, 영양보충이 가지는 역할에 대해 관심이 증대하고 있음. 그리고 핵심연구분야로는 최근 과잉 활성 산소종에 의한 산화적 스트레스가 노화, 특히 피부노화의 주요한 원인으로 밝혀짐에 따라 유리기 소거활성을 갖는 항산화제의 발견과 이들 성분들이 효과적으로 체내에 흡수될 수 있도록 하는 것이 중요한 연구 과제가 되고 있음.

(다) 이들 효능성분들의 신뢰할 수 있는 biokinetic, biochemical, epidemiological data를 확보하는 것이 미용식품 시장의 지속적 성장을 보장하는 것임. 미용기능식품 소재로서의 최근의 관심 사항은 위에서 언급한 영양학적 관점에서의 피부건강/미용 소재가 아니라, 보다 구체적인 피부미용, 즉 주름개선, 보습증진, 탄력 증가 등에 영향을 미치는 생물학적 타겟에 보다 특이적으로 작용해서 적은 양으로도 높은 효능을 구현하는 생리활성 천연물에 대한 관심이 높아지고 있음. 따라서 최근에 이러한 피부과학을 바탕으로 다양한 세포실험 및 동물실험, 임상실험을 근거로 천연소재로부터 특정 피부효능을 갖는 소재개발에 많은 관심을 가지고 있음. 미용식품의 산업적 발전을 위해 가장 필요한 것은 미용식품의 기능에 대한 과학적 근거를 제공함으로써 소비자의 신뢰를 얻어야 한다는 것임. 그러나 아직 미용식품의 정확한 정의나 효능평가에 대한 방법이 정확하게 제시되어 있지 않아 관련 산학연 전문가의 컨소시엄을 통한 과학적인 근거구축이 필요하다고 판단됨.

(라) 미용식품의 개발은 국내 식용자원 및 자생식물 등의 천연소재를 활용하는 것이 가장 핵심이기에 오랜 기간 녹차 및 천연물에 대한 연구결과를 토대로 한 특허 및 기술로 본 연구를 진행 할 수 있을 것으로 생각됨.

(마) 본 연구팀은 미용 건강기능식품 소재 개발을 위해 국산 녹차를 포함한 국내 농산물을 이용하여 미용 기능이 입증된 건강기능식품 개발을 위하여, 효능 성분이 강화된 녹차 원료를 개발 및 표준화 하고, *in vitro* / *in vivo* / clinical test를 수행하여 최종적으로 개별인정형 피부미용식품 개발을 위해 본 연구를 수행하고자 함.

## (2) 제2-2세부연구과제

(가) 과학의 발달과 함께 여러 가지 피부 개선 물질들이 개발됨에 따라 미용기능 시장이 크게 성장하고 있으며, 미용기능시장은 의약품 개발에 비해 상대적으로 적은 시간과 비용으로도 경쟁력 있는 제품 개발이 가능하여 저 자본으로 고부가가치 창출이 가능한 첨단 미래형 산업으로 떠오르고 있음. 우리나라는 전통적으로 천연물을 사용하여 식품이나 미용제품에 적용한 역사적 배경을 갖고 있으므로 국내외 식용자원 및 자생식물을 이용한 미용식품의 개발은 우리나라의 기능성 관련 산업의 선진화 및 국제 경쟁력 확보에 크게 기여할 것으로 예상됨.

(나) 국내에서 가장 역점을 두는 분야는 피부노화방지와 피부미백기능관련 영역이라고 할 수 있음. 최근 국내에서는 미용식품의 주요 원료를 수입에 의존하던 것에서 탈피하여 국내 자체적인 원료나 식품원료, 생약성분의 신소재를 개발하여 제품화하는 움직임이 활발히 일어나고 있음. 최근 학계 및 산업계의 기술개발 동향은 단순 보습이나 피막형성제, 피부보호제 등의 개발에서 MMP-1(matrix metalloproteinase-1) 활성 억제, 엘라스티네이즈(elastinase)의 활성 억제,



히알루론산(hyaluronic acid) 합성 촉진, 섬유아세포의 증식 촉진, 멜라닌 생성 억제 등의 구체적인 효능 중심의 소재들을 연구하고 제품에 활용하고 있음.

(다) 2006년 KFDA의 조사발표에서는 2005년도의 대표적인 42개 건강기능식품의 총 판매액이 6,400억원에 이르며, 이 가운데 미용기능과 관련된 5종의 총 국내 판매액은 약 1,000억원에 이르고 있음. 전 세계의 미용기능식품 시장규모는 연 18% 이상 고성장하여 2008년에는 약 56억 달러(한화 약 6조원) 규모로 크게 성장할 것이라 전망하며, Kline & Company 조사에 의하면 2005년부터 2011년까지도 연평균 두 자리 수 이상 성장할 것으로 전망됨. 현재 전 세계적으로 미용기능식품 분야를 선점하기 위한 치열한 연구개발 경쟁에 돌입하고 있으나 우리나라의 경우 미용기능신소재 및 제품개발에 대한 연구가 체계적으로 이루어져 있지 않아 산학 기획과제로 진행하는 것이 관련 산업의 경쟁력 확보에 필수적인 것으로 판단됨.

(라) 본 연구에서는 국내농산물을 이용한 피부미용 신소재를 탐색하여 피부의 주름개선 및 보습 증진의 효능 검증을 통한 새로운 항노화 미용 기능성 물질을 screening 하려고 함.

### (3) 제2-3세부연구과제

(가) 인간의 수명이 연장됨에 따라 건강에 대한 관심은 전세계적으로 증가하고 있으며 웰빙시대가 대두되면서 단순한 식품이 아닌, 미용식품과 관련한 기능성효능이 주목받고 있음. 오늘날 미용식품의 소재로 다양한 천연물이 소재가 보고되고 상업적으로 시판되고 있으나, 구체적으로 생체 내의 대사변화에 대한 보고는 없음. 최근 Metabolomics 개념이 태동되면서 식품에서의 적용은 식물 대사체학을 기반으로 발전하여, 그에 따른 대사체 프로파일링 및 대사체 분석 프로토콜을 따르고 있음. 일반적으로 metabolite fingerprinting은 NMR, GC-MS, LC-MS 등의 전체적인 spectrum 분석을 말함. Metabolomics 기법은 식품소재의 다양한 metabolite들의 차이 규명 및 생체 지표 발굴에 이용될 수 있는 획기적 기술로 우수한 생리활성을 갖는 식품 소재의 발굴을 위해서는 식물체 및 식품소재의 종류별, 원산지별, 부위별 metabolite의 차이 규명이 매우 중요함. Metabolomics 기법은 이와 관련하여 관련된 지표물질 발굴에 이용될 수 있는 핵심 기술임.

(나) 식품 대사체학을 이용한 대표적인 예로 외국의 경우, 독일의 Max-Planck연구소에서는 감자 구근의 대사체인 주요 당류 및 아미노산, 유기산을 GC/MS로 분석하였으며(Roessner, Wagner et al. 2000), 영국에서는GC Quadorupole/MS가 가진 제한된 요인들에 대한 기기적인 차이를 GC-TOF/MS를 사용하여 분석한 결과를 보고한 사례가 있음(Shepherd, Dobson et al. 2007). 그리고 토마토의 휘발성 성분의 프로파일링을 통해 토마토 종류 구별 및 시료내의 숙성 정도를 구분하는 보고가 있음(Tikunov, Lommen et al. 2005).

(다) Metabolomics 분야의 연구를 위해서는 NMR, GC-MS, LC-MS 등의 기기분석법이 사용되고 있으며, 방대한 데이터를 정리하고, 도식하기 위한 통계기법으로 principal component analysis (PCA), Partial Least Squares Regression (PLSR), Partial Least Squares Discriminant analysis (PLS-DA) 등의 다변량 통계 분석법이 사용되고 있음.

(라) 본 연구팀은 미용 건강기능식품 소재 개발을 위해 국산 녹차를 포함한 국내 농산물을 이용하여 미용 기능이 입증된 건강기능식품의 대사체들을 단편적 성분에 대한 연구가 아니라 종합적이고 전체적인 분석 연구를 수행하고자 함.

### 다. 제3핵심과제

(가) 한국인의 비만유병률 급증 : 2005년 국민건강·영양조사결과에 의하면 20세 이상 한국성인의 32%가 비만으로 나타났음(남자 35.2%; 여자 28.3%). 한국인의 소아비만 발병률도 최근 급증하고 있으며, 2005년에는 초등학생의 11.3%, 중학생 10.7%, 고등학생 16%가 비만으로 분류되었으며 ( $BMI \geq 25\text{kg/m}^2$ ), 과체중( $BMI \geq 25\text{kg/m}^2$ ) 또는 비만청소년의 17%가 대사증후군으로 나타났음. 이와 같은 한국인의 고혈압(남자 30.2%; 여자 25.6%), 당뇨병(남자 9.0%; 여자 7.2%), 그리고 고콜레스테롤혈증 유병률(남자 7.5%; 여자 8.8%)이 모두 다른나라에 비해 매우 높게 나타나고 있음. 비만으로 인한 사회경제적 손실은 2001년 현재 연간 1조 17억원으로 추정되고, 이에 따라 정부는 성인 비만율을 20% 이하, 그리고 청소년 비만율을 15% 이하로 낮추는 것을 2010년 국민건강증진의 주요 목표로 설정한 바 있음.

(나) 아시아국가의 당뇨대란 예고 : 대한당뇨병학회의 조사에 따르면 한국인의 당뇨환자수는 2010년에는 290만명, 2020년 620만명, 그리고 2030년 720만명에 이를 것으로 예상됨. 가톨릭대 강남성모병원 내분비내과 윤건호, 손호영 교수팀은 의학잡지 Lancet(IF: 11) 2006년 11월호에서 우리나라를 비롯한 아시아 각국에서 제2형 당뇨인구가 단기간에 급격히 증가하였음을 보고하였음: 즉, 미국에서 지난 30년 동안 1.5배 증가한 것에 비해 한국은 30년간 5.1배, 중국은 15년 동안 3.4배 당뇨유병률이 증가했으며, 서양인이 대부분 65세 이상에서 당뇨가 많이 발생하는데 반해, 아시아에서는 젊은 연령층 당뇨유병률이 급증하였음.

(다) 당뇨환자 절반이상이 혈당관리를 안함 : 만성 퇴행성 질병인 당뇨는 다양한 합병증을 초래하고 사망위험이 높은 질병임. 만성고혈당은 신체내부기관(눈, 신경, 신장, 심장, 혈관)의 손상 및 기능부전과 같이 장기간의 후유증을 동반하고, 평균수명을 7~8년 단축시킴(Archives of Internal Medicine. Franco OH, et al. 2007). 미국당뇨병학회에 따르면 치료를 받고 있는 당뇨환자의 경우 하루 1~4회 혈당측정을 하도록 권하고 있음. 가톨릭의대 강남성모병원 내분비내과 윤건호 교수팀과 바이엘 헬스케어가 대학병원에서 치료를 받고 있는 당뇨환자를 대상으로 혈당관리 실태를 조사한 결과 (2006년도), 하루 한번이상 스스로 혈당을 측정하는 환자는 47%에 불과하고 나머지 53%는 2~3일에 한번 이하이며, 2주일에 한번 이하로 혈당을 측정한다고 답한 비율도 전체의 20%가 됨. 또한, 대학병원 당뇨환자의 45%가 치료제 복용시간이 서로 달라 복용시간을 지키는데 어려움을 겪고 있는 것으로 나타났으며, 79%는 복용시간 등이 단순해진다면 지키기 쉬울 것으로 답하여 당뇨예방 및 합병증 관리를 위하여 접근이 용이한 우수 건강기능식품의 개발이 절실히 요구되고 있음.

(라) 본연구팀의 관련 선행보유기술 : 본 공동연구기관들은 수년동안의 연구를 통하여 혈당강하효과, 신경세포재생 및 보호효과를 지닌 천연물소재를 확보하였으며, 국내 특허[출원번호 2006-0104935 (2006.10.27), 우선권: 2005-0102450 (2005.10.28)] 및 PCT(출원번호: PCT/KR06/04408, 2006.10.27)를 출원한 바 있음.

(마) 고령화와 치매 질환 및 인지기능 개선 필요성의 증가 : 알츠하이머병으로 대표되는 노인성 치매는 인간 평균수명의 연장과 의료복지시설의 현대화와 맞물려 비례적으로 증가하는 특성을 가지고 있음. 보건사회연구원 통계조사에 따르면 우리나라의 노인인구가 2000년에 7%를 넘어 고령사회에 진입한 이래 2003년 397만 명으로 노인인구의 비율이 8.3%에 이르렀고 2019년에는 14.4%에 이르러 완전 고령사회에 진입할 것으로 예견됨. 65세 이상 노인의 치매 유병률은 8.2%로 추정되고, 서구 사회에서는 65세 이상 인구의 약 10%, 80세 이상 인구의 약 40~50%에서 알츠하이머 병이 발생하고 있으며, 이미 미국에서는 이 질환 환자가 500만 명이

상으로 이로 인한 의료비 지출이 연간 1000억 달러로 추정되고 있음. 또한 우리나라에서는 약 20만 명 이상이 치매 환자인 것으로 나타났음. 미국의 경우 2030년까지 현재의 2배 규모로 증가하고, 2050년까지는 350% 이상 늘어난 1,600만 명에 달할 것으로 추정되고 있음. 치매질환의 원인은 매우 다양하며 이러한 치매질환 중 노인성 치매에 해당되는 알츠하이머 치매증 및 뇌혈관성 치매증은 전체 치매질환의 약 90%를 차지하고 있음. 심각한 수준의 알츠하이머병(Alzheimer's disease)으로 진행되기 전단계인 가벼운 인지기능 장애(mild cognitive impairment, MCI)는 최근 기억의 상실 및 학습능력, 집중력, 사고력의 저하 및 언어능력 저하 등의 증상을 포함하는데, MCI 환자의 80% 이상이 10년 이내에 알츠하이머병으로 발전하며 이것은 65세 이상의 건강한 인구의 1%만이 알츠하이머 병에 걸리는 것에 비해 훨씬 높은 수치임. 인지기능 장애는 노화에 따른 퇴행성 기억저하(age-associated memory impairment, AAMI)와는 구별되며 발병기전 및 경과 특성상 알츠하이머성 치매와 밀접한 연관관계를 갖는 질환임. 뇌의 인지 장애는 임상적으로는 기억력, 인지력, 추리력, 실행 능력(executive functioning), 계획력, 판단력 및 감성적 안정성의 점차적인 손상을 특징으로 하고, 이러한 장애는 점차적으로 깊은 지능의 악화로 이어지게 됨.

(1) 제3-1세부연구과제

(가) 한국인의 비만유병률 급증 : 2005년 국민건강·영양조사결과에 의하면 20세 이상 한국성인의 32%가 비만으로 나타났음(남자 35.2%; 여자 28.3%). 한국인의 소아비만 발병률도 최근 급증하고 있으며, 2005년에는 초등학생의 11.3%, 중학생 10.7%, 고등학생 16%가 비만으로 분류되었으며 (BMI $\geq$ 25kg/m<sup>2</sup>), 과체중(BMI $\geq$ 25kg/m<sup>2</sup>) 또는 비만청소년의 17%가 대사증후군으로 나타났음. 이와 같은 한국인의 고혈압(남자 30.2%; 여자 25.6%), 당뇨병(남자 9.0%; 여자 7.2%), 그리고 고콜레스테롤혈증 유병률(남자 7.5%; 여자 8.8%)이 모두 다른나라에 비해 매우 높게 나타나고 있음. 비만으로 인한 사회경제적 손실은 2001년 현재 연간 1조 17억원으로 추정되고, 이에 따라 정부는 성인 비만율을 20% 이하, 그리고 청소년 비만율을 15% 이하로 낮추는 것을 2010년 국민건강증진의 주요 목표로 설정한 바 있음.

(나) 아시아국가의 당뇨대란 예고 : 대한당뇨병학회의 조사에 따르면 한국인의 당뇨환자수는 2010년에는 290만명, 2020년 620만명, 그리고 2030년 720만명에 이를 것으로 예상됨. 가톨릭대 강남성모병원 내분비내과 윤건호, 손호영 교수팀은 의학잡지 Lancet(IF: 11) 2006년 11월호에서 우리나라를 비롯한 아시아 각국에서 제2형 당뇨인구가 단기간에 급격히 증가하였음을 보고하였음: 즉, 미국에서 지난 30년 동안 1.5배 증가한 것에 비해 한국은 30년간 5.1배, 중국은 15년 동안 3.4배 당뇨유병률이 증가했으며, 서양인이 대부분 65세 이상에서 당뇨가 많이 발생하는데 반해, 아시아에서는 젊은 연령층 당뇨유병률이 급증하였음.

(다) 당뇨환자 절반이상이 혈당관리를 안함 : 만성 퇴행성 질병인 당뇨는 다양한 합병증을 초래하고 사망위험이 높은 질병임. 만성고혈당은 신체내부기관(눈, 신경, 신장, 심장, 혈관)의 손상 및 기능부전과 같이 장기간의 후유증을 동반하고, 평균수명을 7~8년 단축시킴(Archives of Internal Medicine. Franco OH, et al. 2007). 미국당뇨병학회에 따르면 치료를 받고 있는 당뇨병환자의 경우 하루 1~4회 혈당측정을 하도록 권하고 있음. 가톨릭의대 강남성모병원 내분비내과 윤건호 교수팀과 바이엘 헬스케어가 대학병원에서 치료를 받고 있는 당뇨환자를 대상으로 혈당관리 실태를 조사한 결과 (2006년도), 하루 한번이상 스스로 혈당을 측정하는 환자는 47%에 불과하고 나머지 53%는 2~3일에 한번 이하이며, 2주일에 한번 이하로 혈당을 측정한

다고 답한 비율도 전체의 20%가 됨. 또한, 대학병원 당뇨환자의 45%가 치료제 복용시간이 서로 달라 복용시간을 지키는데 어려움을 겪고 있는 것으로 나타났으며, 79%는 복용시간 등이 단순해진다면 지키기 쉬울 것으로 답하여 당뇨예방 및 합병증 관리를 위하여 접근이 용이한 우수 건강기능식품의 개발이 절실히 요구되고 있음.

(라) 본연구팀의 관련 선행보유기술 : 본 공동연구기관들은 수년동안의 연구를 통하여 혈당강하효과, 신경세포재생 및 보호효과를 지닌 천연물소재를 확보하였으며, 국내 특허[출원번호 2006-0104935 (2006.10.27), 우선권: 2005-0102450 (2005.10.28)] 및 PCT(출원번호: PCT/KR06/04408, 2006.10.27)를 출원한 바 있음.

(마) 고령화와 치매 질환 및 인지기능개선 필요성의 증가

알츠하이머병으로 대표되는 노인성 치매는 인간 평균수명의 연장과 의료복지시설의 현대화와 맞물려 비례적으로 증가하는 특성을 가지고 있음. 보건사회연구원 통계조사에 따르면 우리나라의 노인인구가 2000년에 7%를 넘어 고령사회에 진입한 이래 2003년 397만 명으로 노인인구의 비율이 8.3%에 이르렀고 2019년에는 14.4%에 이르러 완전 고령사회에 진입할 것으로 예견됨. 65세 이상 노인의 치매 유병율은 8.2%로 추정됨. 서구 사회에서는 65세 이상 인구의 약 10%, 80세 이상 인구의 약 40~50%에서 알츠하이머 병이 발생하고 있으며, 이미 미국에서는 이 질환 환자가 500만 명 이상으로 이로 인한 의료비 지출이 연간 1000억 달러로 추정되고 있음. 또한 우리나라에서는 약 20만 명 이상이 치매 환자인 것으로 나타났음. 미국의 경우 2030년까지 현재의 2배 규모로 증가하고, 2050년까지는 350% 이상 늘어난 1,600만 명에 달할 것으로 추정되고 있음. 치매질환의 원인은 매우 다양하며 이러한 치매질환 중 노인성 치매에 해당되는 알츠하이머 치매증 및 뇌혈관성 치매증은 전체 치매질환의 약 90%를 차지하고 있음.

(바) 인지기능과 연관 질환 : 심각한 수준의 알츠하이머병(Alzheimer's disease)으로 진행되기 전단계인 가벼운 인지기능 장애(mild cognitive impairment, MCI)는 최근 기억의 상실 및 학습능력, 집중력, 사고력의 저하 및 언어능력 저하 등의 증상을 포함하는데, MCI 환자의 80% 이상이 10년 이내에 알츠하이머병으로 발전하며 이것은 65세 이상의 건강한 인구의 1%만이 알츠하이머 병에 걸리는 것에 비해 훨씬 높은 수치임. 인지기능 장애는 노화에 따른 퇴행성 기억저하(age-associated memory impairment, AAMI)와는 구별되며 발병기전 및 경과 특성상 알츠하이머성 치매와 밀접한 연관관계를 갖는 질환임. 뇌의 인지 장애는 임상적으로는 기억력, 인지력, 추리력, 실행 능력(executive functioning), 계획력, 판단력 및 감성적 안정성의 점차적인 손상을 특징으로 하고, 이러한 장애는 점차적으로 깊은 지능의 악화로 이어지게 됨.

(사) 인지장애의 예로는 자폐증, 난독증, 주의력 결핍 과잉 행동 장애, 정신 분열증, 강박 반응성 장애, 정신병, 조울증, 우울 장애, 투렛 증후군, 경도 인지 장애, 어린이, 청소년 및 성인의 학습 장애, 연령 관련된 기억력 장애, 연령 관련된 인지력 저하증, 알츠하이머 질환, 파킨슨 병, 다운증후군, 외상성 뇌 손상, 헌팅톤 병, 진행성 핵상 마비, HIV, 뇌졸중, 혈관 질환, 픽병 또는 크로이츠-펠트 야곱병, 다발성 경화증과 같은 질환, 다른 백질 질환 및 약물 유도된 인지력 악화증과 같은 질환과 관련되는 것들임.

(아) 인지기능 관련 건강기능성 식품의 개발 : 인지기능 장애 예방 및 개선을 위한 기능성식품의 개발이 각국에서 진행중임. 피에스맨포스파티딜세린(PS)는 40대 이상의 정상인 뿐 아니라 초기 치매 단계의 환자를 대상으로 기억력 인지력 개선효과에 대해 수십건의 임상 논문이 발표되어있고 미국 FDA는 PS가 인지력 저하를 막는데 도움을 주는 것 뿐 아니라 치매 위험을 막아주는 효능을 건강 기능식품에서 health claim을 할 수 있도록 허용하고 있음. PS는 신경전

달 물질의 합성 방출 및 전달의 촉진 작용에 기인하는 단기 기억력 뿐 아니라 뇌 신경돌기 세포 퇴화의 회복 등 장기 기억력에 특히 도움이 될 수 있는 것으로 보고되어 있음. CJ에서는 대두에서 추출한 PS로 CJ 뉴트라 브레인슈타인PS라는 건강 기능성 식품을 출시한 바 있음. 정관장에서는 기억력 개선에 도움을 줄 수 있다는 홍삼농축액 함유 기능성 식품을 출시하였고 홍삼 농축액 외에도 참당귀 주정 추출물, 피브로인 추출물, 원지 추출 분말 등이 기억력 개선에 도움을 줄 수 있는 기능성 원료로 KFDA 허가를 받은 상태임. 경희의료원 정신과에서 참당귀, 오미자, 삼백초의 혼합추출물로, 인지기능 증진과 뇌신경세포 사멸억제를 활성함으로써 인지기능 장애의 예방 및 개선에 효과를 가지고 있는 기능성식품을 연구하고 있고 한국식품연구원에서는 기능성식품 개발을 담당할 미래전략분부를 발족해 오믹스(Omics) 기술을 활용한 인지기능 저하 등을 예방할 수 있는 개인 맞춤형기능성 식품 개발에 주력하고 있음.

(자) 특허

- ① 콩치류의 가루분해물을 포함하는 인지기능장애 예방 또는 개선용 조성물
- ② 현삼추출물을 유효성분으로 함유하는 인지기능 장애 관련질환의 예방 및 치료용 조성물
- ③ 대황 추출물로부터 분리된 피시온 화합물을 유효성분으로 함유하는 인지 기능 장애의 예방 및 치료용 조성물
- ④ 플라보노이드계 화합물을 함유하는 인지기능 장애의 예방 및 치료용 조성물

(차) 천연물을 이용한 건기식소재 개발 : 오랜 기간동안 사용경험을 통해 안전성이 확보, 건강 기능식품의 신소재 개발의 기간과 비용을 줄일 수 있으며, 새로운 물질을 단리 하였을 때는 물질 특히 획득이 가능함. 또한 기지물질이라도 대량 분리하여 각종 활성 연구를 수행하여 새로운 분야의 활성을 연구할 수 있으며, 이 경우 새로운 약효 특허도 획득할 수 있음. 연구를 통하여 확보된 성분을 이용하여 생약 제제의 품질평가나 분석에 응용할 수 있어 생약의 과학화, 규격화에 기여 할 수 있으며, 연구 과정을 통하여 활성 성분의 기기 분광학적 데이터와 분석법을 축적, 확립하게 됨으로서 다른 연구팀들과의 상호 연구 활동에 기여 할 수 있음. 본 과제를 통해 국내의 천연자원으로부터 새로운 소재를 개발하는데 기여함.

(카) 사회가 고도로 산업화됨으로서 새로운 난치성 질병이 출현하여 인류를 위협하고 있으며, 이와 관련하여 최근의 건강기능성 식품 개발은 자연에서 그 해결방안을 모색하고자 천연자원을 체계적으로 연구하려는 시도는 세계 도처에서 볼 수 있음

## (2) 제3-1-1위탁연구과제

(가) 인지기능 장애 예방 및 개선을 위한 기능성식품의 개발이 각국에서 진행중임. 40대 이상의 정상인 뿐 아니라 초기 치매 단계의 환자를 대상으로 기억력 인지력 개선효과에 대해 수십건의 임상 논문이 발표되어있고 미국 FDA는 인지력 저하를 막는데 도움을 주는 것 뿐 아니라 치매 위험을 막아주는 효능을 건강 기능식품에서 health claim을 할 수 있도록 허용하고 있음. 신경전달 물질의 합성 방출 및 전달의 촉진 작용에 기인하는 단기 기억력뿐 아니라 뇌 신경돌기 세포 퇴화의 회복 등 장기 기억력에 특히 도움이 될 수 있는 것으로 보고되어 있음. 따라서 본 연구과제에서 도출된 후보물질에 대하여 기능성 식품이 뇌질환 전단계에 해당하는 피험자를 대상으로 인지기능 장애 증상개선에 대한 평가를 하고자 함.

## (3) 제3-2세부연구과제

(가) GLUT4 translocation 신호전달체계와 인슐린저항성 : 인슐린이 인슐린수용체에 결합하면

세포내 tyrosine kinase를 활성화하는 신호를 보내 인슐린의 기능을 나타냄(Goldstein 등, 1998). 내장지방의 증가는 인슐린민감성 저하와 직접적인 관련이 있으며(Tremblay 등, 2004; Nagaretani 등, 2001), 후자는 고인슐린혈증, 고지혈증, 그리고 고혈압 등을 동반하는 대사질환의 일차적인 원인임(Reaven, 1998; DeFronzo 등, 1991). 인슐린저항성은 인슐린수용체 kinase의 결함, insulin receptor substrate family (IRS 1/2/3/4) 단백질발현 감소, GLUT4 vesicle trafficking · docking · fusion, PI3-kinase 또는 이와 연관된 signaling molecule들의 변화를 동반하고 있음(Virkkamaki 등, 1999). 노화가 진행되면서 인슐린과 인슐린수용체의 결함, 그리고 그 이후의 신호전달과정에 문제가 생겨서 인슐린저항성이 발생할 수 있음이 보고된 바 있으나, 현재까지 이와 같은 GLUT4 translocation 신호전달체계의 조절이 인슐린저항성을 개선용 건강기능식품의 효능평가에 적용된 예는 없음.

(나) 대사질환으로 인한 사회·경제적 비용 급증 : 2005년, 당뇨병으로 인한 사망률은 한국인의 경우 인구 100,000명당 35.5명으로, 일본 (5.9명), 영국 (7.5명), 또는 독일 (16.6명)에 비해 3-7배 이상 높은 것으로 조사되었음. 한국인의 당뇨병 환자수의 증가추이를 살펴보면, 3,000,000명이고, 2030년에는 5,450,000명으로 증가할 것으로 예측되는데, 이는 곧 한국인의 10%가 당뇨병 환자가 된다는 것을 의미함. 보건사회연구원의 통계에 따르면, 2006년 비만 및 비만합병증으로 인한 사회경제적 손실은 진료비와 치료에 따른 소득손실 등 간접비용까지 합해 총 2조 1천억원으로 추정됨. 이에 따라 정부는 성인비만율을 20% 이하, 그리고 청소년 비만율을 15% 이하로 낮추는 것을 2010년 국민건강증진의 주요 목표로 설정하고, 목표달성을 위한 시행전략으로 비만과 대사질환에 대한 정확한 정의와 측정방법을 모색키로 한 바 있음.

(다) 기업체의 향후 연구 우선순위에서 대사질환분야가 우위를 차지함 : ‘2007년도 바이오푸드 네트워크 사업보고서’에 의하면, 기업체의 향후 우선 연구분야로 비만, 면역기능, 콜레스테롤, 당뇨 등 대사질환분야가 우위를 차지하고 있음. 또한, 전세계적으로 2009년 당뇨환자용 기능성식품은 콜레스테롤 저하용 식품과 함께 기능성식품분야에서 가장 높은 매출분야로 성장할 것으로 예측됨. 따라서 향후 국내시장 뿐만 아니라 해외에서 제품력을 인정을 받기 위해서는 대사질환과 관련된 체중조절, 지질대사개선 및 혈당조절에 대한 과학적인 효능평가 및 작용기작 규명이 필수적으로 이루어져야 함. 2005년, 당뇨병으로 인한 사망률은 한국인의 경우 인구 100,000명당 35.5명으로, 일본 (5.9명), 영국 (7.5명), 또는 독일 (16.6명)에 비해 3-7배 이상 높은 것으로 조사되었음. 한국인의 당뇨병 환자수의 증가추이를 살펴보면, 3,000,000명이고, 2030년에는 5,450,000명으로 증가할 것으로 예측되는데, 이는 곧 한국인의 10%가 당뇨병 환자가 된다는 것을 의미함. 보건사회연구원의 통계에 따르면, 2006년 비만 및 비만합병증으로 인한 사회경제적 손실은 진료비와 치료에 따른 소득손실 등 간접비용까지 합해 총 2조 1천억원으로 추정됨. 이에 따라 정부는 성인비만율을 20% 이하, 그리고 청소년 비만율을 15% 이하로 낮추는 것을 2010년 국민건강증진의 주요 목표로 설정하고, 목표달성을 위한 시행전략으로 비만과 대사질환에 대한 정확한 정의와 측정방법을 모색키로 한 바 있음.

(라) 혈당조절용 건강기능식품 시장현황 : 혈당관리용 기능성식품은 신제품의 38.5%가 북아메리카 지역에서 출시되는 등 강세를 보임. 미국의 저혈당지수식품 및 음료시장 규모는 약 3억 5000만 달러에 달할 것으로 예상되며, 2007년 이후 향후 5년간 연평균 45% 이상의 성장세를 지속해 2011년에는 18억달러 규모에 이를 것으로 전망됨. 일본의 경우 고지혈증, 고혈압, 고혈당 등 대사증후군 관련 시장이 2007년도 전년 대비 14% 증가한 1312억엔으로 추정되고, 이중 특정보건용식품이 1182억엔을 차지하여, 전년대비 12.6%의 성장을 보임. 혈당조절용 특정보건

용식품 현황은 2001년도 승인품목이 33건으로 전체 승인품목 299건 중 11%를 차지하며, 매출은 184억엔으로 전체매출 4120억엔 중 4.5%를 차지함. 소재별로는 폴리페놀이 80%의 매출비율을 보였고, 난소화성덱스트린이 10~15%를 나타냄.

(마) 국내 시장현황을 살펴보면, 현재 식품의약품안전청에서 인정한 혈당유지에 도움을 주는 개별인정형 건강기능식품원료로는 옥수수전분에서 추출한 난소화성말토덱스트린과 아열대지역에서 자라는 바나바주정추출물이 있음. 혈당조절용 개별인정형 제품의 생산량은 126톤, 그리고 매출액은 16억원으로 현재까지 미미한 편이나, 최근 건강기능식품시장이 효능을 과학적으로 입증받은 개별인정형으로 재편성되고, 혈당조절기능이 검토 중인 원료가 현재까지 11개에 달하는 등 점차적으로 혈당관련 제품들이 시장을 형성하는 중임(식품의약품안전청, 기능식품신문).

(바) 한국인에게 적합한 인슐린저항성 개선용 건강기능식품개발의 필요성 : 국내 당뇨병환자는 약400만으로 높은 발병률을 보이고 있으나, 환자의 대부분이 건강기능식품에 대한 인식이 부족한 실정임. 한국인의 경우 서양인과 달리 BMI가 양호함에도 불구하고 인슐린저항성이 쉽게 나타나는 특징을 지니므로 한국인에게 적합한 대사질환개선용 건강기능식품 개발이 이루어져야 함. 현재 국내 17건의 혈당조절 기능성 원료가 개발되었으나, 대부분이 안전성과 기능성에 대한 과학적 증거부족 등의 문제가 제기되고 있는 실정임. 따라서 안전하고 기능성 및 작용기전이 입증된 대사질환 관련 건강기능식품의 개발이 국가적 차원에서 요구됨.

#### 라. 제4핵심과제

(가) 2007년 국내 음료 시장은 전년 대비 약 0.6% 플러스 성장한 약 3조 3천억 원대의 실적을 기록할 것으로 보이며, 지난해 음료업계는 웰빙 트렌드를 반영한 제품들이 붐몰을 이뤘음. 옥수수 수염차를 비롯해 혼합차, 콩음료, 등 차 음료들이 큰 인기를 누리면서 차 음료 시장의 경쟁이 치열했음. 바쁜 현대인의 식생활 습관에서 부족하기 쉬운 야채 및 식이 섬유 섭취를 위한 야채주스 시장은 간편하면서도 맛있게 야채를 음용하려는 소비자들이 늘면서 올해 전년대비 47.1%의 플러스 성장을 기록할 것으로 보임(한국식품의약신문, 1월 27일, 신년특집/2007년 음료시장 결산·전망). 당근, 오이, 피망, 가지, 고구마, 고사리, 고사리, 근대, 도라지, 미나리, 배추, 상추, 쑥, 시금치, 등의 야채와 복분자, 토마토, 키위 등을 갈아 만든 야채 음료제품들이 중소식품업계는 물론 대기업에서도 출시되어 치열한 판매 전쟁을 벌이고 있음. 그 중에서 한국야쿠르트에서 2005년도에 출시한 ‘하루야채’는 이 시장에서 독보적인 위치를 차지하고 있음. 최근에는 야채를 싫어하는 사람도 맛있게 마실 수 있도록 야채즙의 씹쓸한 맛을 없애 맛있게 먹을 수 있으면서도 야채의 신선한 맛이 그대로 살아 있도록 한 야채 발효 음료 제품들이 현재 인터넷 쇼핑 그리고 오프라인을 통해서 판매되고 있음. 이러한 발효야채음료는 야채즙 또는 야채 농축액을 혼합해 만든 기존의 야채음료에서 나타나는 맛과 향이 떨어지는 문제를 유산균으로 발효하는 과정에 나타나는 독특한 향과 풍미를 이용하여 개선하고 있음. 이렇게 유산균을 이용하여 야채를 발효함으로써 유산균의 배양과정을 통하여 원료자체의 소화 흡수율이 증가하며, 유산균의 증식시 분비되는 각종 효소에 의한 소화작용의 보조 및 유산균 균체의 작용을 통한 다양한 건강증진 효과를 기대할 수 있음. 또한 발효를 통해 생성되는 유용물질과의 상승효과를 기대할 수 있음. 야채 발효 음료는 성인병 예방 및 변비에도 효능이 있는 것으로 보고되었음.

(나) 현재 야채 발효 기술은 아직 걸음마 단계임. 야채 발효에 있어 중요한 것은 발효의 주체가 되는 적절한 미생물을 선정하는 것임. 현재 야채의 발효에는 주로 유산균이 많이 사용되고 있지만, 이러한 유산균주들은 다양한 생리활성을 나타내는 Probiotics라기 보다는 단지 야채를 발효시키기 위한 목적으로 사용되어 왔음. 따라서 이러한 Probiotic 유산균주를 사용하여 야채를 발효시킨다면 발효산물 뿐만 아니라 Probiotic 유산균 고유의 건강증진 효과를 얻을 수 있을 것으로 판단됨. 현재 이러한 Probiotic 유산균을 함유한 유제품, 음료, 과자, 그리고 껌에 이르기까지 다양한 식품들이 전세계적으로 출시되어 소비자의 인기를 끌고 있음. 따라서 이 연구에서는 (주)한국야쿠르트에서 보유하고 있는 면역증진, 콜레스테롤 저하, 아토피 억제, 염증완화 등의 다양한 생리활성을 갖는 특히 유산균들을 이용하여 국내에서 재배되고 있는 야채를 발효하여 성인병 예방 효과를 갖는 기능성 발효음료를 개발하고자 함.

(다) 본연구팀의 관련 선행보유기술 : 본 공동연구기관들은 수년 동안의 연구를 통하여 기능성 유산균주를 개발한 경험이 있으며, 국내 특허[알러지 질환 예방 및 치료를 위한 유산균. 특허등록번호 제0007968호 (2007. 7. 26)]를 등록한 바 있음. 또한 수년간의 발효기법 연구를 통해 에탄올과 아세트알데하이드 분해효소 활성과 감소능이 우수한 젖산균(특허등록번호: 제0543115호, 특허등록일자 2006. 1. 6)과 알코올과 아세트알데하이드를 분해하는 젖산균(특허등록번호: 제0609779호, 특허등록일자: 2006. 7. 31)이란 제목의 특허를 등록했음. 그 외에도 천연물의 생리활성 기능 연구를 통해 간장 보호 및 혈중 알코올 분해에 유효한 조성물 (특허등록번호: 제0655593호, 특허등록일자: 2006. 12. 12), 연령초 추출물을 유효성분으로 함유하는 비만억제 및 혈당 강하용 조성물 (특허등록번호: 1007732460000, 특허등록일자: 2007. 10. 29)을 특허 등록한 경험이 있음.



(1) 제4-1세부연구과제

(가) 최근의 소비자들의 웰빙 트렌드로 인하여 음료시장에도 이러한 트렌드를 반영한 제품들이 붐몰을 이뤘음. 옥수수 수염차를 비롯해 혼합차, 콩음료, 등 차 음료들이 큰 인기를 누리면서 차 음료 시장의 경쟁이 치열했음. 특히, 바쁜 현대인의 식생활 습관에서 부족하기 쉬운 야채 및 식이 섬유 섭취를 위한 야채주스 시장은 간편하면서도 맛있게 야채를 음용하려는 소비자들이 늘면서 올해 전년대비 47.1%의 플러스 성장을 기록할 것으로 보임(한국식품의약신문, 1월 27일, 신년특집/2007년 음료시장 결산·전망). 현재 국내 야채주스 시장은 1200억원(2008년 2월 3일 한국경제, 야채음료 시장, 거침없는 성장)으로 당근, 오이, 피망, 가지, 고구마, 고사리, 고사리, 근대, 도라지, 미나리, 배추, 상추, 쑥, 시금치, 등의 야채와 복분자, 토마토, 키위 등을 갈아 만든 야채 음료제품들이 중소식품업체는 물론 대기업에서도 출시되어 치열한 판매 전쟁을 벌이고 있음. 그 중에서 한국야쿠르트에서 2005년도에 출시한 '하루야채'는 이 시장에서 독보적인 위치를 차지하고 있음. 최근에는 야채를 싫어하는 사람도 맛있게 마실 수 있도록 야채즙의 쓴 쓴맛을 없애 맛있게 먹을 수 있으면서도 야채의 신선한 맛이 그대로 살아 있도록 한 야채 발효 음료 제품들이 현재 인터넷 쇼핑 그리고 오프라인을 통해서 판매되고 있음. 이러한 발효 야채음료는 야채즙 또는 야채 농축액을 혼합해 만든 기존의 야채음료에서 나타나는 맛과 향이 떨어지는 문제를 유산균으로 발효하는 과정에 나타나는 독특한 향과 풍미를 이용하여 개선하고 있음. 이렇게 유산균을 이용하여 야채를 발효함으로써 유산균의 배양과정을 통하여 원료 자체의 소화 흡수율이 증가하며, 유산균의 증식시 분비되는 각종 효소에 의한 소화작용의 보조 및 유산균 균체의 작용을 통한 다양한 건강증진 효과를 기대할 수 있음. 또한 발효를 통해 생성되는 유용물질과의 상승효과를 기대할 수 있음. 야채 발효 음료는 성인병 예방 및 변비에도 효능이 있는 것으로 보고되었음.

(나) 현재 야채 발효 기술은 아직 걸음마 단계임. 야채 발효에 있어 중요한 것은 발효의 주체가 되는 적절한 미생물을 선정하는 것임. 현재 야채의 발효에는 주로 유산균이 많이 사용되고 있지만, 이러한 유산균주들은 다양한 생리활성을 나타내는 Probiotics라기 보다는 단지 야채를 발효시키기 위한 목적으로 사용되어 왔음. 따라서 이러한 Probiotic 유산균주를 사용하여 야채를 발효시킨다면 발효산물 뿐만 아니라 Probiotic 유산균 고유의 건강증진 효과를 얻을 수 있을 것으로 판단됨. 현재 이러한 Probiotic 유산균을 함유한 유제품, 음료, 과자, 그리고 껌에 이르기까지 다양한 식품들이 전세계적으로 출시되어 소비자의 인기를 끌고 있음. 따라서 이 연구에서는 (주)한국야쿠르트에서 보유하고 있는 면역증진, 콜레스테롤 저하, 아토피 억제, 염증완화 등의 다양한 생리활성을 갖는 특히 유산균들을 이용하여 국내에서 재배되고 있는 야채를 발효하여 성인병 예방 효과를 갖는 기능성 발효음료를 개발하고자 함.

(2) 제4-2세부연구과제

(가) 한국 야쿠르트 시판 야채주스 '하루야채'의 생리활성 유효성분 최적화를 위한 유산균주를 선발할 필요성이 있음. 현재 낙농유제품에 사용되고 있는 유산종균은 우유라는 생육환경에 적응한 균주로서 하루야채와 같은 식물성 배지에서는 생육이 원활하지 못 함. 따라서 혼합 야채 주스인 하루야채의 발효를 위해서는 새로운 식물성 유산균의 선발이 필요함.

(나) 선발한 유산균주의 동정 및 특성 규명, 기작 연구를 수행하여 성인병 예방 효과를 갖는 기능성 발효음료를 개발하고자 함. 유산균주의 probiotic 기능은 같은 종 내의 균주 간에도 차이가 있고 면역활성능, 장 부착능, 생육속도, 내담즙 및 내산성 등이 다르기 때문에 우수 균주

를 선발하는 것은 제품의 성공을 위한 핵심임.

(3) 제4-3세부연구과제

(가) 발효 음료의 재료로 사용되는 여러 채소들의 유효성분의 대한 분석을 통하여 발효음료에 사용되는 채소들의 개발 음료 내에서 기능적인 역할을 규명할 필요성이 있음.

(나) 발효 음료의 기능성 유효 성분의 분석을 통하여 유효물질의 최적 생산 및 최적 생체 이용율을 확보하기 위한 최적 발효 조건을 확립하는 기초 연구로서 유효성분의 분석이 필요함.

## 제 3 절 연구개발의 범위

1. 연구사업단의 역할 : 본 사업단은 선행연구결과 선별된 농산물과 그 기능성을 바탕으로 대기업이 제품화하여 시장에 진입하도록 함으로써 농민, 식품산업 등에 기여하고자 하며 그 구체적인 역할은 다음과 같음.

가. 산학농 시너지 체제 구축 : 국내농산소재발굴 네트워크 구축 등

나. 기업간 대학간 역할조정에 따른 산업화 연구 효율 극대화

다. 유효성분분석 및 기작규명 등 기초연구기능 공유에 따른 중복 투자 방지

라. 기능성인정 협조체계구축에 따른 기능성식품산업 파급효과 극대화

마. 제품판매 네트워크 공유 : 대규모매장위주(CJ), 방문판매(한국야쿠르트, 아모레퍼시픽), 약국, 병의원(동아제약) 등 본 사업단참여 대기업의 판매네트워크는 서로 다른 특징을 가지고 있어 상호공유에 따른 매출 극대화가 가능

2. 세부연구과제별 연구내용 및 방법

가. 제1핵심과제

(가) 강화약썩 등 국내 자생 천연식물 유래 기능성 소재 개발 : 기능성 분획의 분리 및 지표성분의 선정을 통한 표준화된 원료 추출 조성물의 다량 확보

① 사자발 약썩 추출물 등 분리·정제 (유기용매 추출, TLC, RF, prep HPLC, Column, chromatography 등 이용)

② 분리·정제 물질의 구조 분석 (GC, GC/MS, C13-NMR, H1-NMR 등 이용)

③ 유효물질의 지표물질 선정을 통한 원료의 표준화

(나) 개발 제품의 효능 검증

① 심혈관질환 예방 또는 면역조절 효능

㉠ 세포주 모델을 이용하여 만성염증 및 면역조절 불균형으로 인해 과 발현 되는 생체지표 효소의 발현 및 활성 측정

㉡ Human smooth muscle cell (혈관근육세포)에서 동맥경화 및 고혈압 유발의 생체지표들의 발현 및 활성 확인 및 이에 영향을 미치는 세포내 인산화 효소와 자생천연성분의 상호작용을 규명하여 심혈관질환 (동맥경화 및 고혈압) 개선 효능의 작용기작을 규명함

㉢ 동물모델을 이용하여 면역조절에 관계하는 생체지표 단백질의 발현 및 효소활성 측정

㉣ 동맥경화 동물모델을 이용하여, 동맥경화의 생성과 plaque 내에서의 혈관생성 억제 효능을 측정 (COX-2, MMPs, VEGF 활성 및 발현 조절을 통한 항동맥경화 기작 규명)

㉤ 생쥐에 angiotensin-II 를 투여한 고혈압 동물모델에서 혈압 및 혈관 relaxation 을 측정해 항고혈압 효능 규명

② 피부미용 또는 뇌기억력 개선 효능

㉠ 피부세포주에서 자외선 조사로 유발된 피부 노화 생체지표 (MMPs, collagen) 의 발현 조절 효능 측정

㉡ 생쥐에 자외선을 조사한 동물모델에서 피부노화 억제 효능 검색

㉢ 신경세포에서 베타아밀로이드로 매개되는 스트레스에 의한 세포 사멸 및 염증 억제 효능 측정

㉔ 생쥐에 베타아밀로이드 및 뇌 기억력 손상 물질을 주입한 동물 모델에서 뇌 기억력 개선 효능 검색

(다) 개별인정 신청 및 획득

① 유효성분 분석법 검토 및 확립, 개별인정 서류 작성 및 허가 취득

(라) 약쭈 등 국내자생식물 원료의 식품소재로서의 제품 개발 및 활용성 증대 연구

① 제품의 유통기한 설정 연구, 적절한 제형 검토를 통한 제품 개발

② 심혈관질환 개선, 면역조절, 피부 미용 개선, 및 뇌기억력 개선 효능이 검증된 물질의 효율적 추출방법에 관한 연구

③ 약쭈 등 국내자생식물 원료를 식품에 도입했을 때, 원료의 생리활성을 유지하면서 off-flavor가 최소화될 수 있는 방안 연구

(1) 제1-1세부연구과제

(가) 세포주 모델을 이용하여 만성염증 및 면역조절 불균형으로 인해 과 발현 되는 생체지표 효소의 발현 및 활성 측정

(나) Human smooth muscle cell (혈관근육세포)에서 동맥경화 및 고혈압 유발의 생체지표들의 발현 및 활성 확인 및 이에 영향을 미치는 세포내 인산화 효소와 자생천연성분의 상호작용을 규명하여 심혈관질환 (동맥경화 및 고혈압) 개선 효능의 작용기작을 규명함

(다) 동물모델을 이용하여 면역조절에 관계하는 생체지표 단백질의 발현 및 효소활성 측정

(라) 동맥경화 동물모델을 이용하여, 동맥경화의 생성과 plaque 내에서의 혈관생성 억제 효능을 측정 (COX-2, MMPs, VEGF 활성 및 발현 조절을 통한 항동맥경화 기작 규명)

(마) 생쥐에 angiotensin-II 를 투여한 고혈압 동물모델에서 혈압 및 혈관 relaxation 을 측정해 항고혈압 효능 규명

(2) 제1-2세부연구과제

(가) 피부세포주에서 자외선 조사로 유발된 피부 노화 생체지표 (MMPs, collagen) 의 발현 조절 효능 측정

(나) 생쥐에 자외선을 조사한 동물모델에서 피부노화 억제 효능 검색

(다) 신경세포에서 베타아밀로이드로 매개되는 스트레스에 의한 세포 사멸 및 염증 억제 효능 측정

(라) 생쥐에 베타아밀로이드 및 뇌 기억력 손상 물질을 주입한 동물 모델에서 뇌 기억력 개선 효능 검색

(3) 제1-3세부연구과제

(가) 약쭈 등 국내 자생식물의 원료 소재로서의 안정성 연구

① 생리활성 기능물질의 열안정성, 내광성, 산화안정성 연구

② 건강기능식품의 기존 6개 제형 및 확대제형에서의 안정성 연구

(나) 강화약쭈 등 국내 자생식물의 원료 처리 공정 개발 및 최적화

① 건강기능식품의 기존 6개 제형에 활용될 수 있는 강화약쭈 등 국내 자생식물 원료의 가공 공정 개발

② 기능성성분의 안정적인 수율을 확보할 수 있는 최적 가공 처리 조건의 확립

(다) 강화약썩 등 국내 자생식물 원료의 가공 공정 표준화

- ① 최적화된 공정에 맞는 표준화 작업
- ② 원료의 품질지표 확립을 통한 원료 기준 설정

(4) 제1-4세부연구과제

(가) 약썩 등 기능성 소재의 가공적성 연구

- ① CJ제일제당에서 개발한 가속화 연구 설비를 이용한 생리활성 기능물질의 열안정성, 내광성, 산화안정성 연구
- ② CJ제일제당이 보유한 가공적성 향상 기술 적용을 통한 상품화 기초 연구

(나) 개발 제품의 효능 검증

- ① 제1핵심 연구기관에서 연구한 심혈관질환 (동맥경화 및 고혈압) 개선 효능, 피부 항노화 또는 면역 조절을 통한 피부 미용 개선 효능 결과에 근거한 상품화 target 설정
- ② 개별인정 신청을 위한 임상 연구 설계 및 인체 효능 검증 (임상 연구 기관 연계)

(다) 상품화

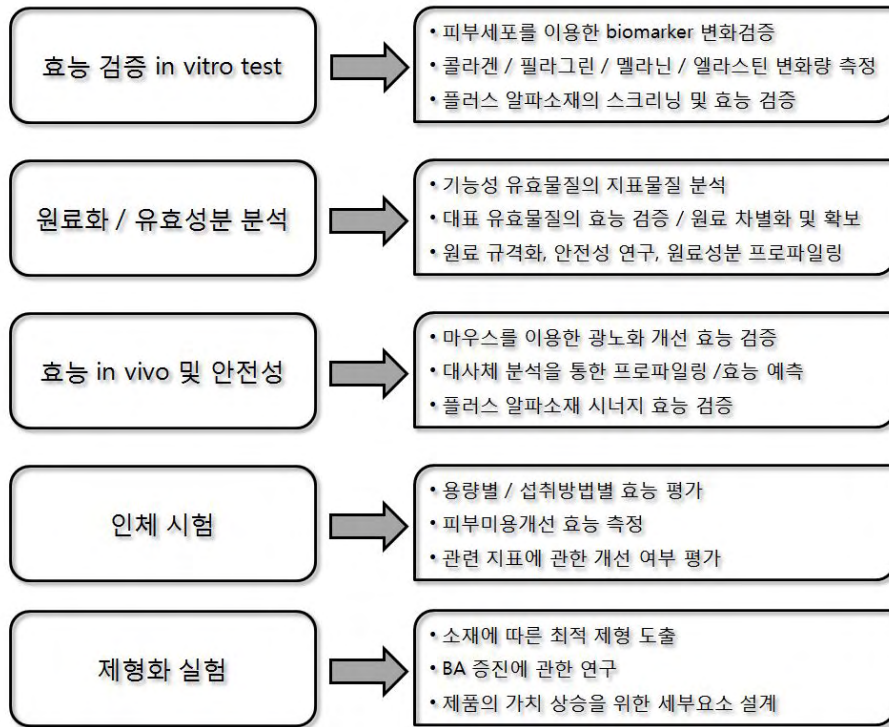
- ① 건강기능식품의 기존 6개 제형 (정제, 캡셀, 분말, 과립, 환, 액상) 및 추가 예정인 제형(편상, 페이스트상, 시럽, 젤, 젤리, 바)에 대한 개발 가능성 검증
- ② flavor masking 기술, bitter taste masking 기술, taste enhancer 활용 등 제품의 관능품질 향상을 위한 연구
- ③ 소비자 조사를 통한 상품화 방향 설정 및 제품 정교화
- ④ 유효성분 분석법 검토 및 확립, 개별인정 서류 작성 및 허가 취득

(5) 제1-5세부연구과제

(가) 본 연구사업단 조직은 4개의 핵심과제의 조기 제품화를 목적으로 한 국내농산물발굴위원회, 기능성인정위원회 그리고 효율적인 연구업무 지원을 위한 행정실로 구성할 것임. 또한 자문위원회와 운영위원회를 두어 연구센터의 원활한 운영을 도모할 것임. 행정실은 기본적인 행정 업무 이외에 자료실과 홍보실을 운영하여 참여연구원에게 연구문헌과 자료를 제공하고, 센터 홍보와 대국민 홍보를 위한 자문 활동을 지원할 것임.

위원회명	역할	구성
운영위원회	사업단의 객관적, 효율적 운영	4개의 참여기업대표, 행정실장, 학계교수
재배농가네트워크위원회	국내 농산자원의 식품산업 제품화에 따른 안정적인 고정수요확보 및 농가 수익 창출을 위해 지표물질 분석전문가에 따른 과학적 원산지 판별, 농산물생산단체와의 네트워크구축, 국내 농산자원의 경쟁력확보를 위해 운영함	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 대사체분석을 통한 국내 농산자원 판별전문가</li> <li>- 기능성물질 분리전문가</li> <li>- 기능성물질 생산공정 전문가</li> <li>- 안동시청, 강화군, 제주도 등 각 지역 지역특화담당자</li> </ul>
건식위원회	건강기능식품개별인정을 통한 획기적 농산자원의 고부가가치창출에 따른 매출증대	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 항비만당뇨</li> <li>- 항산화 및 항암</li> <li>- 면역</li> <li>- 피부미용 등 기능성인정 전문가</li> <li>- 허가부서공무원</li> </ul>

나. 제2핵심과제



(1) 제2-1세부연구과제

(가) 원료화 : 국내 녹차를 이용하여 차별화 공정을 통한 유효성분 증대 연구

(나) 효능 *in vitro* 검증

- ① 피부세포를 이용한 biomarker 변화 검증
- ② 콜라겐/필라그린/엘라스틴/MMP 변화 검증

(다) 유효성분 분석 : 기능성 유효물질 지표성분 변화 분석

(라) 효능 *in vivo* 검증

- ① 마우스를 이용한 광노화 개선 효능 검증
- ② 피부주형분석 / 탄력분석 / 피부두께분석

(마) 안정성 및 대사율 검증 : 원료 안전성 평가, PK 평가

- ① 임상효능 검증 : 피부미용개선 효능 측정, 관련지표 개선성 평가
- ② 제형화 실험 : 소재에 따른 최적제형 도출, BA 증진연구

(2) 제2-2세부연구과제

(가) 미용기능 식이소재 자원 확보

- ① 국내 식품, 약용식물, 미생물 발효물 등 천연 생물자원 확보
- ② 천연 추출물 분양기관의 식이소재 라이브러리 확보

(나) 국내 농산물에 대한 1차 스크리닝

- ① 항노화 활성 : Collagen 생성능, MMP-1 저해활성

(다) 스크리닝을 통해 선별한 후보 농산물의 활성성분 분리정제 및 규명

- ① 분리정제 : silica gel chromatography, Prep-HPLC 등 이용
- ② 분자구조 규명 : <sup>13</sup>C-NMR, <sup>1</sup>H-NMR, IR, EI-MS 등의 정밀기기분석

(라) *In vitro* 활성 연구

① 항노화 효능

㉠ Free radical 제거능 : DCF fluorometer assay, 세포형태학적 관찰

㉡ Keratinocyte 증식 촉진작용 : MTT assay

㉢ MMP-1, MMP-9 : Western blot, zymography

② 피부 보습과 탄력 유지 효능

㉠ 피부구성성분 합성 촉진 : collagen, hyaluronic acid, ceramide 등

㉡ Collagenase 저해능 : Western blot, zymography

㉢ Elastase 저해능 : Western blot, zymography

(마) *In vivo* 활성 연구

① 피부보습, 피부장벽 기능 등 : Tewameter, corneometer

② 주름 주형 및 이미지 분석을 통한 주름 정량 : Replica, skin visiometer

③ Hairless mouse 생체지표 확인 : Western blot, RT-PCR 등

(3) 제2-3세부연구과제

(가) 미용기능성 녹차시료의 metabolome 분석을 위하여, 전처리 방법을 정립하고 표준화함.

(나) 국산 녹차 및 국내 농산물 metabolome 분석을 위하여, 효율적인 대사체 추출법을 확립함.

(다) 피부미용기능성 녹차 유래 대사체 및 유효성분을 섭취시킨 후 얻은 생체 시료의 대사체 성분을 체계적으로 분석하기 위하여 대사체의 효율적인 추출방법 및 NMR, GC/MS, LC-MS/MS 등을 이용한 기기분석법을 확립함.

(라) NMR, GC/MS, LC-MS/MS 등을 이용하여 얻은 생체시료 metabolome의 스펙트럼 data 를 Principal Component Analysis (PCA), Partial Least Squares Regression (PLSR), Partial Least Squares-Discriminant Analysis (PLS-DA) 등의 다변량 통계 기법을 이용하여 대사체 간의 상관관계를 규명하고 생체지표물질을 선정함.

(마) 효능이 입증된 우수한 건강기능성 식품으로써 생체지표물질이 선정되면 인체시험에 적용하기 위한 기반 자료로 활용할 수 있음.



다. 제3핵심과제

농림수산식품부 총연구기간 3년 (2010~2012년)  
당뇨 및 인지기능개선 건강기능식품 제품화

**동아제약(주)연구소 (손미원)**

제1세부: 건강기능식품 제품화 연구

<주요 연구개발 내용>

- 인체시험 실시
- 추출 및 공정연구
- 원료의 기준규격 연구 및 안정성 평가
- 원료의 독성/안정성 평가
- 제형연구 및 대량생산기술 확보
- 상업화 연구(제품컨셉, 표시/광고 심의)

**연세대학교 (박태선)**

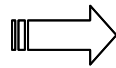
제2세부 : 건강기능식품 원료의 효능평가

<주요 연구개발 내용>

- 효능평가
- 작용기전 연구

**동물실험**

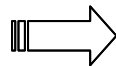
- 2형 당뇨병모델
- 식이성 비만동물모델



- 혈당, glucose tolerance test 효력확인
- 혈당 및 증상개선 확인
- NGF induction(신경재생) 효능 확인
- Nerve conductivity 확인

**인체시험**

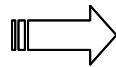
대전대한방병원 외 추진



- 혈당관리 및 유지 측정
- 관련 증상발병 및 개선여부 측정

**추출공정 & 기준규격 연구**

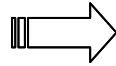
- 추출공정연구
- 기준물질설정 및 규격화



- 각 산지별, 구입처별 원료 확보
- 물, 주정 추출물 공정연구
- 원료의 규격화, 안정성 연구
- 기준규격 설정 및 지표, 유효물질 확보

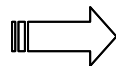
**독성/안전성 실험**

- 단회투여, 간독성
- 약물 상호작용



- 기존 식품원료로 안전성 확보
- 안전성 재확인
- 병용섭취 독성유무 확인 연구

**건강기능식품원료 심의 신청**



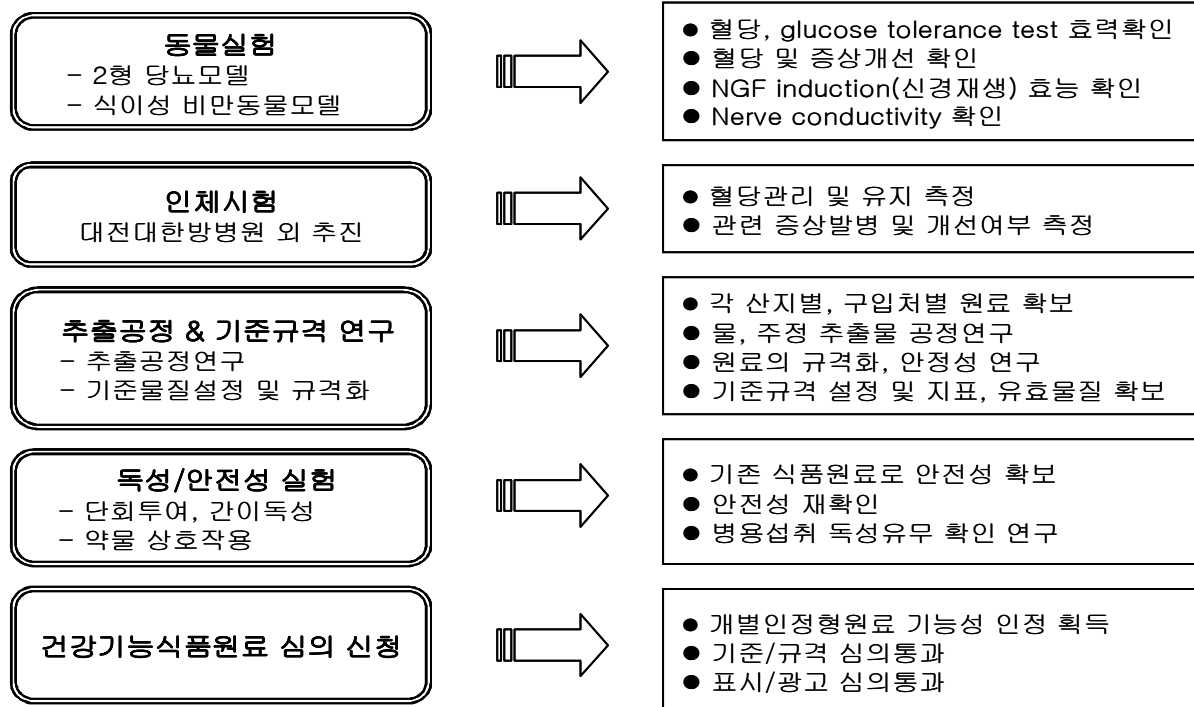
- 개별인정형원료 기능성 인정 획득
- 기준/규격 심의통과
- 표시/광고 심의통과

(1) 제3-1세부연구과제

농림수산식품부 총연구기간 3년 (2010~2012년)  
당뇨 및 인지기능개선 건강기능식품 제품화

**동아제약(주)연구소 (손미원)**  
제1세부: 건강기능식품 제품화 연구  
<주요 연구개발 내용>

- 인체시험 실시
- 추출 및 공정연구
- 원료의 기준규격 연구 및 안정성 평가
- 원료의 독성/안정성 평가
- 제형연구 및 대량생산기술 확보
- 상업화 연구(제품컨셉, 표시/광고 심의)



(2) 제3-1-1위탁연구과제

(가) 임상시험 디자인

① 무작위배정, 이중맹검, 대조군 연구

② 시험군: 건강기능식품

③ 대조군: 플라시보

④ 시험군과 대조군의 인지기능 증상개선에 대한 건강기능식품의 영향을 비교하기 위하여 8주간의 투약 전후로 일차 유효성 평가 및 이차 유효성 평가를 통하여 증상의 변화와 삶의 질을 평가

(나) 선정기준

① 연령이 20세 이상에서 75세 미만의 성인 남녀

② 자세한 프로토콜은 미정-1차년도 종료후 2차년도에 결정

③ 여성의 경우 외과적인 불임술(자궁적출술 또는 양측난관결찰)을 받았거나 폐경기인자 또는 가임 여성의 경우 의학적으로 인정되는 피임방법(즉, IUD, 살정제 barrier방법, 금욕)을 사용하는 자(가임 여성의 경우 스크리닝 방문 시 실시한 뇨임신 검사에서 음성이어야 함)

④ 본 실험에 대한 자세한 설명은 듣고 완전히 이해한 후 자의로 참여를 결정하고 주의를 준수하기로 서면 동의한 자

(다) 제외기준

① 당뇨병 환자(단, 당뇨약을 복용 중인 자로써 당뇨약을 중단했을 경우, 혈당의 변화가 일어나지 않고 유지되는 자를 참여 시킬 수 있음.)

② 급/만성 염증이 있는 피험자

③ 시험 참가 전 4주 이내에 스테로이드제제를 투여 받은 피험자

④ 심부전, 심근경색, 뇌졸중 등의 급성 중증 심혈관계 질환을 가진 피험자

⑤ 시험제품의 흡수에 영향을 줄 수 있는 위장관계 질환(예: 크론씨 병)이나 위장관계 수술 (단, 단순 맹장수술, 탈장수술은 제외)의 과거력이 있는 자

⑥ 첫 투여일 전 3개월 이내에 타 임상시험에 참여한 자

⑦ 급/만성 신부전, 신증후군 등의 신장질환을 앓고 있는 환자

⑧ 간기능이 손상된 피험자

⑨ 최근 2개월 이내에 항정신병 약물치료를 받은 경험이 있는 피험자

⑩ 임상병리검사 결과를 비롯한 기타 사유로 인하여 시험자가 인체시험 참여에 부적합하다고 판단한 자

⑪ 임신 혹은 수유중인 여성

⑫ 임신 가능성이 있는 가임 여성중 적절한 피임법을 시행하지 않은 경우(단, 불임수술을 받은 여성은 제외)

⑬ 시험자에 의해 본 임상시험에 부적합하다고 판단된 자

(라) 목표한 피험자의 수 및 그 근거 : 미정(2차년도에 설정)

	시험군	대조군	총피험자수
유효성평가례수			
Drop-out(15%)고려예수			

① effective size 를 0.65로 가정함

(마) 투약방법

① 시험군 : 미정(2차년도에 설정)

㉠ 약물투여량 :

㉡ 투여방법 :

㉢ 투여기간 :

② Placebo대조군

㉠ 약물투여량 :

㉡ 투여방법 : 1일 3회복용

㉢ 투여기간 : 8주예정

(바) 평가계획표

	검사항목	screening	시험시행
--	------	-----------	------

관찰시기	(Visit1)	치료전 (Visit2)	치료4주 (Visit3)	치료8주 (Visit4)
피험자 동의서 취득	v			
선정/제외기준	v			
인구학적 조사	v			
신체검사	v			v
병력조사	v			v
활력증후	v	v		v
혈액학검사	v	v		v
평가 검사		v	v	
식이검사		v	v	v
순응도 검사		v	v	
부작용기록		v	v	
시험완료				v
기타 자세한 항목 미정 : 2차년도에 결정				

① 통계분석방법

㉞ 주 유효성 평가 변수 : 선형혼합모형을 사용하여 각 측정 시점에서 시험군과 대조군의 변화량 비교 함. 또한 투약 기간에 따른 변화를 분석함. 한편 인구학적 자료 또는 임상병력자료에 군간 차이가 발견되면 유효성 평가에서 이를 보정함.

㉟ 부 유효성 평가 변수 : 시험군과 대조군에서 각 부 평가변수의 섭취전(0주, 방문2)과 비교한 섭취후(8주, 방문4)의 수치 변화는 대응표본 t-검정 (paired t-test)로 분석하고, 시험군과 대조군 간에 이들 변화량의 비교에는 독립 이 표본 t-검정(independent two-sample t-test)을 사용함.

(사) 이상반응을 포함한 안전성의 평가기준 및 평가방법

① 평가대상

㉞ 시험에 참여한 전례(ITT군)에 대하여 평가함.

② 평가기준

㉞ 다량, 장기간 노출 시 접촉성피부염, 기관지 수축, 구토 등을 유발할 수 있음.

㉟ 본 시험에서 이상반응은 임상시험 시작 전에 관찰되지 않은 증상이 발생하는 모든 바람직하지 않은 의학적 소견을 이상반응으로 분류함.

③ 평가방법(통계분석방법)

㉞ 약물치료와 연관성이 있는 이상반응 발현건수의 시험군 별 비교는 독립 이표본 t-검정 또는 윌콕슨 순위합 검정(Wilcoxon rank sum test)을 사용하여 수행하고, 1회 이상의 이상반응을 경험한 피험자 비율의 군 별 비교는 피어슨 카이제곱 검정 또는 피셔의 정확검정(Fisher's exact test)을 이용하여 수행함.

(3) 제3-2세부연구과제

(가) 실험식이의 조제 및 실험동물 사육

① 식이성비만 동물모델 사육 : 6주령의 C57BL/6N mice를 본 연구실에서 개발한 정상식이, 고지방대조식이 (40% fat energy), 그리고 추출물, 부분정제분획물, 또는 유효성분이 첨가된 고지방실험식으로 12주간 사육함.

② 식이섭취량(매일), 체중증가량(주1회) 및 식이효율(FER, 주1회)을 측정함.

③ 시료수집 : 혈액, 간, 부위별 내장지방조직[부고환지방 (epididymal fat); 신장주변지방 (perirenal fat); 장간막지방 (mesenteric fat); 후복강지방 (retroperitoneal fat); 피하지방 (subcutaneous fat); 갈색지방 (brown fat)] 및 근육조직을 각기 채취하고, 무게를 측정함.

(나) 대사질환 관련 생화학 바이오마커 측정

① 혈장 지질농도 측정 : 혈장 총콜레스테롤; HDL콜레스테롤; LDL+VLDL 콜레스테롤; 중성지방; 유리지방산 농도

② 간조직의 지질농도 측정 : 간조직의 지질성분을 추출한 후 중성지방; 콜레스테롤; 유리지방산 농도를 측정함.

③ 간조직의 histology : Hematoxylin (핵 염색)과 eosin (세포질 염색)을 사용하여 세포슬라이드 상의 핵과 세포질을 각기 염색한 후, 광학현미경으로 관찰함.

④ 간손상지표 측정 : 혈장시료에서 glutamate oxaloacetate transferase (GOT); glutamate pyruvate transferase (GPT) 활성을 측정함.

⑤ 혈당, 인슐린 및 렙틴농도 측정

(다) 내장지방 및 근육조직을 대상으로 GLUT4 translocation에 관여하는 인슐린신호전달체계 조절 물질들의 발현 및 활성 평가

① 실험식이를 섭취시킨 마우스의 내장지방조직 및 근육조직으로부터 RNA를 분리하여 인슐린 저항성 관련 유전자를 중심으로 RT-PCR을 시행하여 분석함.

㉠ GLUT4 translocation 신호전달체계 관련 유전자 : PP2A, TC10, GLUT4, AKT, CIP4, Cbl, PI3K

㉡ Metaflammation 관련 유전자: TLR4, TLR2, TRAF6, MyD88, IκBα, NF-κB, IL-6, TNF-α

② 내장지방조직 또는 근육조직에서 Western blot를 실시하여 후보 건강기능식품소재의 인슐린 저항성, 작용기전을 단백질수준에서 규명함.

(라) 내장지방 및 간조직을 대상으로 adipogenesis, 발열반응 및 지방산산화에 관계된 신호전달 물질의 발현과 활성 평가

① 실험식이를 섭취시킨 마우스의 내장지방조직 및 간조직으로부터 RNA를 분리하여 adipogenesis, 발열반응 및 지방산산화 관련 유전자를 중심으로 RT-PCR을 시행하여 분석함.

㉠ Adipogenesis 관련 유전자 : PPARγ, C/EBPα, MAPK, CypD, ERK1, TGFβ, CDK4 & 6

㉡ 에너지대사 관련 유전자: UCPs, AMPK, ACC, aP2

② 내장지방조직 또는 근육조직에서 Western blot를 실시하여 후보 건강기능식품소재의 인슐린 저항성, 작용기전을 단백질수준에서 규명함.

라. 제4핵심과제

(가) 야채 발효를 위한 유산균

- ① 현재 한국야쿠르트에서 보유하고 있는 면역증진, 콜레스테롤 억제 등과 관련된 기술 및 특허 균주를 야채발효 미생물로 이용함.
- ② *In vitro* 및 동물시험을 통하여 발효에 적합하고 다양한 생리활성 물질을 생산하는 균주를 선발함.

(나) 기능성 발효음료 소재

- ① 현재 한국야쿠르트에서 시판하고 있는 야채주스 ‘하루야채’에 사용되는 성분을 기능성 발효음료 소재로 사용함.
- ㉠ 하루야채의 성분 : 당근, 토마토, 시금치, 셀러리, 양상추, 파슬리, 케일, 브로컬리, 미나리, 레드비트, 단호박, 양배추, 적피망, 오이, 콜리플라워, 청피망
- ② 향후 이들 제품을 기능성 측면에서 upgrade한 제품을 출시함.

(다) 개발 제품의 효능

- ① 동물시험을 통하여 개발한 제품의 효능을 검증함.
- ② 아토피 및 관절염 억제와 같은 면역조절 효과, 혈중 콜레스테롤 저하, 체내 항산화 증진을 통한 노화예방 등의 다양한 생리활성 증진에 타겟을 맞추어 제품의 효능을 검증함.

(라) 발효음료의 유효성분 분석

- ① 유산균 발효 후 얻어지는 기능성 유효성분 분석은 이 분야의 전문가인 경희대 김대욱 교수를 세부연구과제 책임자로 하여 실시함.

(마) 발효공정 최적화

- ① 한국야쿠르트의 유산균 배양 기술을 야채 및 한방소재 발효 공정에 적용하여 최적화 함.

(1) 제4-1세부연구과제

(가) 1차년도

- ① 원료 선별 및 혼합액 제조
- ㉠ 즙제조시 이미, 이취를 갖는 야채선별 및 혼합액 제조 : 이미 기능성등은 소비자가 인지하고 있으나 녹즙고객들이 맛에 거부감을 가지고 있는 양상추, 시금치, 파슬리 등을 말하며 이들을 혼합하여 혼합야채즙 제품 하나로 시험할 예정
- ㉡ 하루야채의 성분 : 당근, 토마토, 시금치, 셀러리, 양상추, 파슬리, 케일, 브로컬리, 미나리, 레드비트, 단호박, 양배추, 적피망, 오이, 콜리플라워, 청피망

(나) 야채발효 후 풍미개선 균주선발

- ① 유산균주의 증식
- ② 야채 발효 후 관능 우수 균주 선발

(다) 발효야채 성분 분석

- ① 영양성분(비타민류)
- ② 유기산분석 및 향미 profile 분석

(나) 2차년도

- ① 동물시험을 이용한 효능 평가에서 선발된 균주의 특성 파악
- ㉠ 균주의 생화학적 특성 파악
- ㉡ 균주 동정

② 최종 선발 균주 적용(발효공정 최적화)

㉠ 발효온도

㉡ pH

㉢ 산도 등

(다) 3차년도

① 제품 개발

㉠ 배합비 작성 : 품질설계연구, 배합비 설정, 제조법, 공정연구

㉡ 관능검사 (사내, 사외)

㉢ 최종 배합 완성 : 배합비 완성, 품질규격 확정, 원가분석, 시제품제조, 유통기한 실험

② 생산 준비단계 : 공정적합성 검증, 제품품질 확인, 최종 제조공정 정립

③ 동물시험 : 개발 제품의 효능 시험

(2) 제4-2세부연구과제

(가) 1차년도

① 한국 야쿠르트 시판 야채주스 '하루야채'의 생리활성 유효성분 최적화를 위한 유산균주 선발

㉠ 김치, 과일, 채소 등 유래 식물성 유산균 라이브러리 구축

② 식물성 유산균 라이브러리로부터 생리활성 유효성분 최적화 유산균주 탐색

③ 선발된 유산균주의 동정

(나) 2차년도

① 선발된 유산균주의 특성 규명 및 기능성 연구

㉠ 선발된 유산균주의 특성 규명

㉡ 면역증강, 항 알러지 등 기능성 연구

(다) 3차년도

① 선발된 유산균주의 기능성 물질 탐색

㉠ 선발 유산균주의 세포벽 성분 분석 및 물질 분리

② 선발된 유산균주의 기능성 기작 규명

㉠ 선발 유산균주의 기능성 pathway 조사

(3) 제4-3세부연구과제

(가) 1차년도

① 발효주스에 사용되는 원료 및 혼합액에 대한 유효성분 분석

㉠ 총피놀함량, 총플라보노이드 함량, 총안토시아닌 함량, 총항산화능 등 분석

② 발효야채 분석

㉠ 총피놀함량, 총플라보노이드 함량, 총안토시아닌 함량, 총항산화능 등 분석

(나) 2차년도

① 발효 음료의 유효성분 분석

㉠ RP-DAD-HPLC 분석을 통한 유효 성분 분석

㉡ 총피놀함량, 총플라보노이드 함량, 총안토시아닌 함량, 총항산화능 등 분석

(다) 3차년도

- ① 개발된 제품의 유효성분 분석
- ㉠ RP-DAD-HPLC 분석을 통한 유효 성분 분석
- ㉡ 총피놀함량, 총플라보노이드 함량, 총안토시아닌 함량, 총항산화능 등 분석
- ② 유효 성분의 분리 정제
- ㉠ Column chromatography를 이용한 분리 정제
- ㉡ Solid-phase extraction을 통한 분리 정제



## 제 2 장 국내외 기술개발 현황

### 제 1 절 기술분야의 국내외 현황

#### 1. 국제적인 현황

가. 세계의 기능성식품 시장규모는 2002년 2,023억불 규모에서 2008년 4,394억불 규모로 성장하였으며, 2012년에는 12,549억불 규모로 확대될 것으로 추정됨.

나. 미국의 기능성식품 시장은 '94년도의 약 170억불 규모에서 2000년도의 약 300억불로 성장하였으며 이는 연평균 성장률 11.7%로 타 산업에 비해 이례적으로 높은 성장 추이를 보이고 있음. 기능성식품 시장을 관련 질환으로 나누어보면 과체중, 고지혈증, 소화기질환, 스트레스 등이 주요 질환 군으로 나타나고 총 시장규모는 600억불을 상회할 것으로 추정됨.

다. 유럽의 건강기능식품시장은 독일이 55억불로 가장 큰 규모로 나타났으며, 프랑스가 24억불, 영국이 14억불, 이탈리아가 13억불, 스페인이 8.7억불, 네덜란드가 5.9억불로 나타났음. 일본의 특정보건용식품 시장은 2002년도에 324개 품목에 5,000억엔 정도의 규모를 보이고 있음. 또한 자가 규격기준의 건강식품 시장은 '96년도의 약 6,500억엔 규모에서 2000년도의 약 8,100억엔 정도로 확대되었음.

#### 2. 국내 현황

가. 우리나라의 기능성식품 시장은 1994년도에 7,900억원 규모였으며 '97년의 외환위기 때를 제외하고는 비약적으로 계속 성장하여 2004년도에는 약 2조원 시장을 형성하고 있음. 2005년 2조 4천억원대였던 시장규모가 2007년도에는 약 2조 5천억원, 2010년에는 4조원대 규모로 성장할 것으로 예상되고 있음

나. 국내 건강보조식품 시장은 키토산(351억원), 알로에(685억원), 효소(111억원), 스쿠알렌(142억원) 등의 제품류가 높은 실적을 나타내고 있으나 다른 기능식품 소재들은 자체적인 원료 공급과 생산이 활발하지 못해 대부분 외국으로부터 수입된 원료로 대체되고 있는 실정임.

다. 정부에서는 기능성식품 연구의 중요성을 인식하여 보건복지부의 보건의료기술연구개발사업, 과학기술부의 특정연구개발사업 및 지역협력연구센터, 농림부의 농림기술개발사업 및 바이오그린연구사업, 기타 산업자원부, 특허청 등을 통하여 기능성식품 개발을 지원하고 있음.

라. 2004년 건강기능식품법이 시행됨에 따라 건강기능식품개발이 제도권 하에서 국가적인 관리 하에 산업적으로 진행 되고 있음. 아래의 표는 2004년도 이후 건강기능식품원료 인정 현황으로서 전체 신청건수 228건 가운데 84건이 건강기능식품 원료로 인정되어 약 36.8%의 인정비율을 보이고 있음.

총계		2004년		2005년		2006년		2007년	
인정	보완 (반려)	인정	보완 (불인정)	인정	보완 (불인정)	인정	보완 (반려)	인정	보완 (반려)
84	144	12	34	20	25	26	76	26	9

마. 산업적인 관점에서 가장 큰 문제점은 현재 인정된 원료의 약 80%가 외국에서 개발된 원료로서 거의 대부분 외국산 원료와 기술에 의존하고 있는 상황임. 가장 큰 문제점은 국내산 원료에 대한 충분한 기능성 검증이 임상수준에서 매우 취약할 뿐만 아니라 국내 원료를 사용할 경우 인정과정에서 불인정의 가능성이 높아 대형 식품회사에서 적극적인 투자를 하고 있지 않음.

바. 결과적으로 건강기능식품법을 통한 국내 기능성 식품산업의 육성이라는 큰 시행목적이 충족되고 있지 못함. 따라서 대형 국책과제를 통한 충분한 연구지원과 함께 산업적으로 대표적인 성공 케이스를 많이 발굴하는 것이 대기업이 기능성 식품산업에 적극적으로 참여하는 동기를 제공하고 있음.

사. 이와 같은 산업적인 환경을 고려하여 본 사업단은 기능성식품 및 건강기능식품분야에 연구 인프라와 마케팅 능력을 보유하고 있는 대표적인 4개 식품업체를 중심으로 핵심연구사업단을 구성하였음.

## 제 2 절 전망

가. 미국 인구조사(U.S. Census Bureau)에 따르면 미국의 65세 이상의 인구가 2000년과 2010년 사이 54% 이상 증가할 것으로 전망하고 있음. 따라서 미네랄 및 각종 영양보충제를 포함한 기능성 식품 시장은 온라인 판매 형태의 효율적인 판매 방식에 힘입어 2009년에는 시장 규모가 52억 달러에 이를 것으로 전망되고 있음.

나. 유기농 제품은 전체 시장의 34.2%를 차지해 17.8억 달러로 성장할 것이며 다이어트 제품은 가장 큰 성장률을 보일 품목으로써 39%의 성장률과 7.1억 달러를 기록할 전망이다. 또한 비타민, 미네랄 및 각종 영양보충제 시장은 2009년까지 17.2억 달러 시장으로 성장될 전망이다.

다. 현재 미국 건강보조식품 시장의 약 40%는 비타민, 30%는 허브류가 차지하고 있으며, 최근 변화율을 볼 때, 허브류가 56%로 가장 높은 수치를 보이고 있어 허브류, 식물유래 기능성식품에 대한 관심이 점차 고조될 것으로 전망됨. 또한 영양성분을 드링크, 캡슐, 정제, 파우더 등의 형태로 개발한 novel food의 소비가 기능성 식품과 관련된 새로운 추세로 대두됨.

라. 선진국의 과학기술 예측조사보고에 의하면 기능성 식품시장은 향후 자동차 시장과 대등하게 성장할 것으로 예상되고 있음. 기능성식품 시장의 지속적인 확대에 기여하는 요인으로는 1) 사회적인 고령화 및 건강지향 욕구 확대, 2) 건강과 식품에 관한 지식 증대, 3) 대체의학 및 자가치료에의 관심 증대, 4) 천연물에 대한 과학 연구 확대, 5) 기능성식품의 종류와 공급 확대 등이 제시되고 있음.

마. 우리나라는 질병예방을 위한 다양한 기능성식품의 수요가 크게 증가하게 될 것이며, 기능성식품에 대한 객관적 평가나 안전성 확보에 대한 사회적 요구도 높아질 것으로 예상됨. 따라서 국내 자원과 기술을 활용한 기능성제품의 상품화를 통해 기능성 식품의 수출로 발전되어 관련 산업의 발전에도 기여해야 할 것임.

### 제 3 절 기술고도화를 위해 연구해야 할 내용

가. 동물모델과 인체를 대상으로 한 기능성식품의 효능평가는 의약품에 적용되는 효능평가와는 달리, 식사를 통한 에너지 섭취 및 모든 영양소의 섭취량이 엄격히 통제되는 실험조건을 갖추어야 하며, 이를 위해 식품영양학적 전문지식이 필요함.

나. 아울러 건강기능식품의 섭취량 제안을 위해서는 유효성을 보장하기 위한 과학적 근거자료가 제시되어야 하고, 안전한 섭취범위에 속함을 증명할 수 있는 자료 첨부가 필수적임. 동물실험을 실시하는 경우에는 animal-to-human extrapolation이 적합하게 이루어졌는가를 판단할 수 있는 근거자료가 필요함.

다. 의약품과 달리 효능이 완만하게 나타나는 기능성식품의 효능 및 작용기전을 규명하기 위해서는 보다 민감한 바이오마커의 개발이 필수적이며, 최근의 microarray 기술의 발전에 힘입어 민감한 유전자 바이오마커를 개발하고, 응용하는 기술을 개발하는 것이 가능해졌음.

라. 기능성식품의 제품화 기술은 소재의 안정성 향상과 물질의 체내 전달을 위한 나노입자화 기술, multifunctional 제품의 설계 및 고기능화 기술, 소비자층별 특성화 및 소비자 요구에 따른 맞춤형 제품 개발, 의약품, 화장품, 기타 정밀화학제품으로의 소재 다용도화 기술, 최종 제품의 유효성, 안전성 확보를 위한 전임상, 임상 평가 기술개발에 대한 활발한 연구가 기대됨.

마. 본 연구단은 위와 같은 다양한 연구영역의 학계전문가 7명이 핵심연구에 참여하며, 산학협력 연구로서 개발하는 기능성식품의 과학적 근거와 작용기전을 규명함으로써 개발 기능성식품의 상품성 제고와 함께 파워 상품 브랜드 구축에 기여하고자 함.

바. 특히 외국시장에서 세계 일류 상품으로서의 가치를 확보하기 위해서는 기능성의 과학적인 근거에 대한 확실한 데이터의 발굴이 요구되며, 이를 근거로 국내외 지적 재산권의 확보도 가능함.

## 제 4 절 연구결과의 기대효과 및 위상

### 1. 제1핵심과제

- (1) 강화 사자발 약쑥 및 국내자생식물의 기능성식품 소재화로 지역 특용작물 발굴을 통한 영농증진 및 농가 소득 증대, 기능성 식품소재의 수입 대체 및 국산 소재 수출 산업화에 기여
- (2) 전통 기능성 소재의 유효성 입증 및 제품화를 통한 노하우를 축적하고 국내 자생 천연식물 자원을 이용한 성공적인 산업화 연구 사례 창출
- (3) 천연물의 심혈관질환 예방, 면역조절 제품 및 미용 기능성 제품, 뇌기억력 개선 제품 시장 개척을 통한 고부가가치 산업 창출
- (4) 환경적, 시대적 상황에 맞는 건강기능식품 개발을 통해 국민에게 보다 안전하고 효과적인 건강기능식품 제공

### 가. 제1-1세부연구과제

- (1) 전통 기능성 소재의 유효성 입증 및 제품화를 통한 노하우를 축적하고 국내 자생 천연식물 자원을 이용한 성공적인 산업화 연구 사례 창출
- (2) 천연물의 심혈관질환 예방 또는 면역조절 제품 개발
- (3) 환경적, 시대적 상황에 맞는 건강기능식품 개발을 통해 국민에게 보다 안전하고 효과적인 건강기능식품 제공

### 나. 제1-2세부연구과제

- (1) 전통 기능성 소재의 유효성 입증 및 제품화를 통한 노하우를 축적하고 국내 자생 천연식물 자원을 이용한 성공적인 산업화 연구 사례 창출
- (2) 천연물의 미용 기능성 제품 시장 개척 및 세계적인 관심을 받고 있는 피부미용개선 소재 개발을 통한 고부가가치 산업 창출
- (3) 환경적, 시대적 상황에 맞는 건강기능식품 개발을 통해 국민에게 보다 안전하고 효과적인 건강기능식품 제공

### 다. 제1-3세부연구과제

- (1) 강화약쑥 등 국내 자생식물 원료의 표준화를 통한 품질관리에 관한 제도적 장치 마련
- (2) 강화약쑥 등 국내 자생식물의 기능성식품 소재화로 지역 특용작물 활용을 통한 영농 증진 및 농가 소득 향상
- (3) 글로벌 경쟁력 있는 건강기능성식품 소재로서 수입대체 효과, 수출 향상 및 새로운 고부가가치 산업 창출

### 라. 제1-4세부연구과제

- (1) 강화 사자발 약쑥 등 국내 자생 천연식물의 기능성식품 소재화로 지역 특용작물 발굴을 통한 영농증진 및 농가 소득 증대, 기능성 식품 소재의 수입 대체 및 국산 소재 수출 산업화에 기여
- (2) 전통 기능성 소재의 유효성 입증 및 제품화를 통한 노하우를 축적하고 국내 자생 천연식물

자원을 이용한 성공적인 산업화 연구 사례 창출

- (3) 천연물의 심혈관질환 예방 제품 및 미용 기능성 제품 시장 개척, 전 세계적인 문제점으로 대두되고 있는 알레르기 예방 소재 개발을 통한 고부가가치 산업 창출
- (4) 환경적, 시대적 상황에 맞는 건강기능식품 개발을 통해 국민에게 보다 안전하고 효과적인 건강기능식품 제공

마. 제1-5세부연구과제

- (1) 각 핵심과제의 유기적인 협조
- (2) 사업단의 객관적 효율적 운영

2. 제2핵심과제

- (1) 국내에서 재배되는 녹차 및 농산물을 활용한 국내 농산물의 우수성 입증
- (2) 인체시험을 통한 효능이 입증된 우수한 건강기능성 식품 개발
- (3) 글로벌 경쟁력이 있는 소재 도출
- (4) 학계와 산업체의 co-work을 통한 시장지향성 네트워킹 구축

가. 제2-1세부연구과제

- (1) 국내에서 재배되는 녹차 및 농산물을 활용한 국내 농산물의 우수성 입증
- (2) 인체시험을 통한 효능이 입증된 우수한 건강기능성 식품 개발
- (3) Slimming과 피부미용개선 관련 대표 제품 개발
- (4) 글로벌 경쟁력이 있는 소재 도출
- (5) 학계와 산업체의 co-work을 통한 시장지향성 네트워킹 구축

나. 제2-2세부연구과제

- (1) 미용기능식품 신소재의 국내 생산기반기술 확보
- (2) 고기능성의 신규 미용기능 신소재 개발 및 응용기술 확보
- (3) 신규 미용기능 식품 신소재 개발에 대한 국내외 지적 재산권 확보
- (4) 식품과 화장품 기능이 융합된 미용기능식품의 신산업 창출

다. 제2-3세부연구과제

- (1) 녹차 내에 존재하는 천연성분들의 기능성 작용에 관한 대사체학 연구는 소비자들의 욕구에 맞는 식품 및 미용기능성 소재 개발 연구에 기여할 수 있으며, 생산과 가공에 따른 개발의 잠재적 가치를 가지고 있다. 대사체 분석을 위한 통계기법의 적용 및 데이터 분석 방법 역시 방대한 양의 데이터를 정리해주고, 분류해주는 역할을 할 것임.

3. 제3핵심과제

- (1) 식품영양학과 의학과 연계 네트워킹 구축
- (2) 글로벌 경쟁력 있는 건강기능식품 원료 소재도출 및 기능인정 획득
- (3) 시장지향형 건강기능식품 개발
- (4) 기능이 차별화된 우수 건강기능식품 개발에 의한 의원급 병원 판매용 건강기능식품 제품화

가. 제3-1세부연구과제

- (1) 식품영양학과와 의학과 연계 네트워킹 구축
- (2) 글로벌 경쟁력 있는 건강기능식품 원료 소재도출 및 기능인정 획득
- (3) 시장지향형 건강기능식품 개발
- (4) 기능이 차별화된 우수 건강기능식품 개발에 의한 의원급 병원 판매용 건강기능식품 제품화
- (5) 의료비절감 및 삶의 질을 높임으로서 국민보건에 이바지함.

나. 제3-1-1위탁연구과제

- (1) 의료비절감 및 삶의 질을 높임으로서 국민보건에 이바지 함.

안전하며 쉽게 접근할 수 있는 우수한 효력의 건강기능식품 개발을 통하여 가장 효과적으로 건강한 몸상태를 지속적으로 유지시켜 삶의 질을 향상시켜주는 동시에, 궁극적으로는 생명연장의 꿈을 현실화시키는 수단으로서의 역할을 수행한다. 건강기능식품은 세계적으로 급격한 성장이 계속되고 있으며, 2010년도에 한국의 경우 10조원 이상, 세계적으로 수백조원 이상으로 예상되고 있는 분야로서 경제 산업적 측면에서도 우수한 성과를 도출해 낼 수 있다. 또한 의약품으로서 응용성 연구를 통하여 가능성을 타진해 본다면 국내 경구용 당뇨 관련 2000억원대 시장으로의 진출도 타진해 볼 수 있다.

- (2) 글로벌 경쟁력 있는 건강기능식품 원료 소재도출 및 기능인정 획득
- (3) 시장지향형 건강기능식품 개발

다. 제3-2세부연구과제

- (1) 항비만 기능성식품 또는 천연물신약 개발로 기하급수적으로 증가하고 있는 비만합병증에 의한 사회 경제적 손실을 줄일 수 있을 것으로 기대됨.
- (2) 신규 인슐린저항성, 인지기능 개선용 건강기능식품원료가 개발되어 산업화될 경우, 향후 5년간 2000억원 이상 직·간접적 부가가치를 창출할 수 있을 것으로 사료됨.
- (3) 작용기작이 규명된 대사질환개선용 기능성식품원료를 개발함으로써 소비자의 신뢰와 만족도를 향상시킬 수 있음.
- (4) 식이성비만 및 대사질환 발생과 관련된 다양한 신호전달체계(인슐린저항성; 만성염증; 지방세포분화)에 관련된 분자들은 대사질환 예방 및 치료제 개발에 중요한 타겟으로 적용 가능함.

4. 제4핵심과제

- (1) 현재 시판되고 있는 야채주스의 upgrade version으로 연매출 약 1000 억대의 제품 출시
- (2) 면역증진 및 성인병 예방을 위한 건강기능성 식품으로 확대
- (3) 유산균을 이용한 야채 발효에 관한 기술 축적
- (4) 국내 재배 야채의 수요 증진으로 인한 농가 소득의 증대

가. 제4-1세부연구과제

- (1) 현재 시판되고 있는 야채주스의 upgrade version으로 연매출 약 1000 억대의 제품 출시
- (2) 면역증진 및 성인병 예방을 위한 건강기능성 식품으로 확대
- (3) 유산균을 이용한 야채 발효에 관한 기술 축적

(4) 국내 재배 야채의 수요 증진으로 인한 농가 소득의 증대

나. 제4-2세부연구과제

- (1) 한국 야쿠르트 시판 야채주스 '하루야채'의 생리활성 유효성분 최적화를 위한 유산균주를 선발로 야채주스의 신제품 출시
- (2) 생리활성이 우수한 식물성 유산균 라이브러리 구축
- (3) 선발된 식물성 유산균의 기능성 메카니즘 규명

다. 제4-3세부연구과제

- (1) 생물전환에 의한 기능성 물질의 최대 생체 이용율 기술 확보
- (2) 건강기능성 발효 식품에 대한 기능성 유효물질의 분석을 통한 과학적 이해 확보
- (3) 원재료 및 발효 후 제품에 대한 기능성 물질 비교 분석 기술 축적



### 제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

#### 제 1 절 제1핵심과제(강화약쑥등 국내 자생식물을 이용한 기능성 식품 개발)

1. 제1-1세부연구과제(강화약쑥 등 국내 자생식물의 심혈관질환 예방 또는 면역조절 효능 검증)

가. 강화약쑥의 지표물질 Eupatilin의 심혈관 질환 예방 건강기능성 검증

(1) PDGF-BB로 유도되는 인간대동맥평활근 세포의 증식에 대한 강화약쑥 성분(Eupatilin)의 억제 효능 여부 확인

- PDGF-BB는 동맥경화 유도 물질로 인간대동맥평활근 세포에 처리시 세포의 이동 및 침윤을 증가시킬 뿐 아니라 세포 증식을 유도한다. 강화약쑥 성분(Eupatilin)의 PDGF-BB로 유도되는 인간대동맥평활근 세포의 증식을 억제하는 효과를 확인하기 위해서 무처리 대조군에 비해 PDGF-BB를 10 ng/ml의 농도로 24시간 동안 처리한 그룹에서 세포 증식이 증가함을 MTT assay를 통해 확인하였다. 비교군은 강화약쑥 성분(Eupatilin)을 각각 10, 20, 40  $\mu$ M 처리하였고 그 결과 인간대동맥평활근 세포 증식을 농도의존적으로 억제함을 확인하였다(그림 1-1).

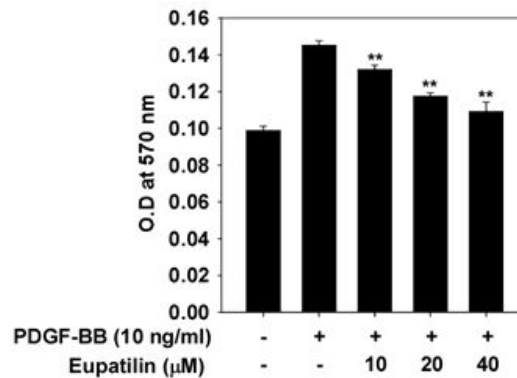


그림 1-1. 강화약쑥 성분(Eupatilin)의 인간대동맥평활근 세포 증식 억제 효과

(2) PDGF-BB로 유도되는 Aortic sprouting에 대한 강화약쭈 성분(Eupatilin)의 억제 효능 여부 확인

- 강화약쭈 성분(Eupatilin)의 PDGF-BB로 유도되는 aortic sprouting에 미치는 영향을 알아보기 위해서 aortic ring assay를 수행하였다. 무처리 대조군에 비해서 PDGF-BB가 10 ng/ml의 농도로 처리된 그룹은 methylene blue staining후 현미경 관찰을 통해 aortic sprouting이 증가하는 것을 확인하였다. 이러한 aortic sprouting은 강화약쭈 성분(Eupatilin)의 처리에 의해 농도 의존적으로 억제되었다(그림 1-2A). 강화약쭈 성분(Eupatilin)의 처리는 인간대동맥평활근 세포에 처리된 농도와 동일하게 처리되었다. 현미경 사진을 통해 얻은 결과를 정량화하면 PDGF-BB처리 대조군에 비해 강화약쭈 성분(Eupatilin) 처리군은 10, 20, 40  $\mu$ M에서 각각 81, 38, 20 % 수준으로 억제되는 것을 확인하였다(그림 1-2B).

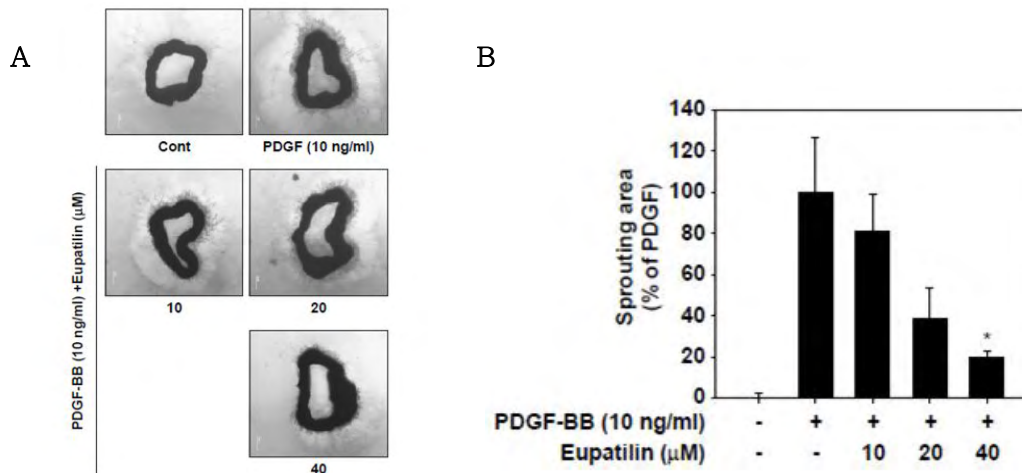


그림 1-2. 강화약쭈 성분(Eupatilin)의 aortic sprouting 억제 효과

(3) PDGF-BB로 유도되는 인간대동맥평활근 세포의 신호전달 기작변화 대한 강화약쑥 성분 (Eupatilin)의 효능 여부 확인

- 강화약쑥 성분(Eupatilin)의 PDGF-BB로 유도되는 인간대동맥평활근 세포의 신호전달 기작 변화에 미치는 영향을 알아보기 위해서 Western blotting을 수행하였다. 인간대동맥평활근 세포 증식 및 aortic sprouting에 관여한다고 알려져 있는 세가지 mitogen activated protein kinases(MAPKs)인 ERK, JNK, p38MAPK의 인산화에 대한 강화약쑥 성분(Eupatilin)의 효과를 살펴보았다. 그 결과 PDGF-BB로 인해 유도된 ERK, JNK, p38 MAPK의 인산화 중 강화약쑥 성분(Eupatilin) 처리에 의해 JNK, p38 MAPK의 인산화가 감소됨을 확인하였다(그림 1-3A). 이에 JNK, p38 MAPK의 인산화를 조절하는 상위 인자인 MKK3/6, MKK4의 인산화를 살펴보았다. 그 결과 PDGF-BB로 인해 유도된 MKK3/6, MKK4의 인산화가 감소됨을 확인하였다(그림 1-3B). 또한 인간대동맥평활근 세포 증식 및 aortic sprouting에 관여한다고 알려져 있는 다른 기작인 Akt 단백질과 그 하위 단백질인 p70S6K의 인산화를 살펴보아 그 인산화의 감소를 확인하였다(그림 1-3C). 이에 Akt 단백질의 인산화를 조절할 수 있는 상위 단백질인 PI3K의 효소 활성을 평가하기위해 Kinase assay를 수행하였다. 그 결과 강화약쑥 성분 (Eupatilin) 처리에 의해 PI3K의 활성이 감소됨을 확인하였다(그림 1-3D).

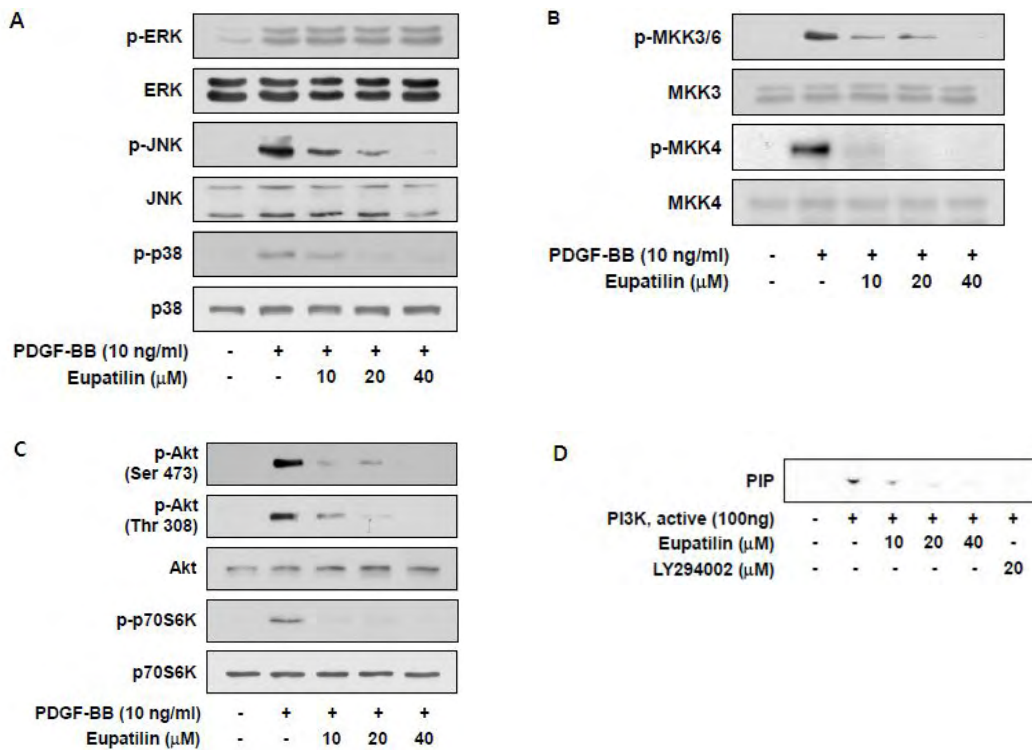


그림 1-3. 강화약쑥 성분(Eupatilin)의 세포신호전달 기작 변화 효능

나. 강화약속의 면역조절 관련 질환 예방 건강기능성 검증 확인을 위한 문헌 탐색

(1) 아토피성 피부염에 대한 예방 건강기능성 검증을 위한 문헌

- 아토피성 피부염의 모델로써 NC/Nga 마우스 및 BALB/c 마우스와 IL-4 나 IL-13 등이 형질전환된 마우스 등이 사용된다. 유도 방법으로는 conventional 한 환경에 노출시키거나, 집먼지진드기 추출물이나 ovalbumin 또는 TNCB, DNCB 등의 hapten 물질을 복부 및 등, 귀에 감작시킴으로써 유도할 수 있고, 식이를 조절함으로써도 가능하나 상기 물질들의 감작으로 인한 결과가 가장 재현성 있고 신뢰할만하여 아토피성 피부염 유도에 주로 사용되고 있다. 이를 통해 후보물질의 피부 소양감, 피부임상증상, 건조함 및 비후정도, IgE, IL-4, IL-12 등의 억제 및 변화양상을 확인할 수 있으며 나아가 후보물질의 작용기작을 밝힐 수 있다.

Adv Immunol. 2009;102:135-226.

**Cellular and molecular mechanisms in atopic dermatitis.**

Oyoshi MK, He R, Kumar L, Yoon J, Geha RS.

Division of Immunology, Children's Hospital and Department of Pediatrics, Harvard Medical School, Boston, Massachusetts, USA.

그림 1-4. 아토피 피부염의 발생 기작에 관한 논문

(2) 천식 모델에 대한 예방 건강기능성 검증을 위한 문헌

- 만성 천식 모델로써 ovalbumin의 반복적인 비강점막노출을 통해 기도 평활근 비후를 유도하고, 후보물질의 기도 과반응정도, 호산구 침윤, IL-4, IL-5, IL-13등의 염증성 사이토카인 및 TGF- $\beta$ 1 등의 growth factor의 억제 및 예방효과를 확인할 수 있으며 후보물질의 작용기작에 대한 연구를 진행할 수 있다.

Int Arch Allergy Immunol. 2011 Feb 2;155(3):243-251. [Epub ahead of print]

**Effect of Imatinib on Airway Smooth Muscle Thickening in a Murine Model of Chronic Asthma.**

Rhee CK, Kim JW, Park CK, Kim JS, Kang JY, Kim SJ, Kim SC, Kwon SS, Kim YK, Park SH, Lee SY.

Division of Pulmonary and Critical Care Medicine, Department of Internal Medicine, College of Medicine, Catholic University of Korea, Seoul, Korea.

그림 1-5. Imatinib의 천식 예방 기작에 관한 논문

(3) 알러지성 비염모델에 대한 예방 건강기능성 검증을 위한 문헌

- 알러지성 비염모델로써 ovalbumin과 알루미늄을 이용한 비강점막 감작을 통해 기도내 호산구 등 침윤을 유도하고, 후보물질의 국소적, 전신적인 Th2 사이토카인 생산 및 Ova-specific IgE 레벨, E-selectin과 같은 adhesion molecule 들의 억제 및 예방효과를 확인할 수 있으며 작용기작을 밝힐 수 있다.

**Anti-tumor necrosis factor-alpha treatment reduces allergic responses in an allergic rhinitis mouse model**

J.-H. Mo<sup>1</sup>, E.-K. Kang<sup>2</sup>, S.-H. Quan<sup>2</sup>, C.-S. Rhee<sup>2</sup>, C. H. Lee<sup>2</sup> & D.-Y. Kim<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Departments of Otorhinolaryngology, Dankook University, Cheonan, Chungcheongnam-do, Korea; <sup>2</sup>Department of Otorhinolaryngology, Seoul National University College of Medicine, Chongno-gu, Seoul, Korea

**To cite this article:** Mo JH, Kang EK, Quan SH, Rhee CS, Lee CH, Kim D-Y. Anti-tumor necrosis factor-alpha treatment reduces allergic responses in an allergic rhinitis mouse model. *Allergy* 2011; **66**: 279-286.

그림 1-6. 알러지성 비염 발생에 있어 TNF- $\alpha$ 의 역할을 규명한 논문

다. 국내 자생식물인 인삼의 지표성분 GPD를 강화한 인삼추출물의 아토피성피부염 예방 건강기능성 검증

- 집먼지진드기는 인간에게 아토피성피부염을 일으키는 주요 allergen으로 작용한다. 따라서 이의 추출물(Dermatophagoides farinae extract)을 마우스에 감작, 도포하여 아토피성피부염을 유발하는 것은 아토피성피부염에 대한 효능 검색에 유용한 모델이라는 것이 잘 알려져 있다.

- 본 실험에 사용된 마우스는 장기간 일반 환경(conventional)에 노출시키면 별도의 인위적인 처리없이도 아토피성피부염이 발생하는 것으로 알려진 NC/Nga 마우스로써, 해당 마우스에 집먼지진드기 추출물을 도포하여 아토피성피부염을 유발하면 개체간 차이를 줄이고, 빠른 기간내에 아토피성피부염이 인간과 유사하게 일어나 본 질환에 대한 효능 검색에 매우 유용한 모델이다.

- 본 유도물질을 이용하여 아토피성피부염을 일으켰을 때, 발적/출혈, 부종, 미란/찰과, 각질/건조함, 소양감 등 인간 아토피성피부염에서 보이는 임상증상을 나타내며, IgE의 발현이나 아토피성피부염에 중요한 병인인 Th2 cytokine의 발현을 크게 늘리는 것으로 밝혀져 있다. 또한 아토피성피부염의 만성화에 따라 Th1 cytokine도 크게 늘리는 것으로 알려져 있다.

(1) 집먼지진드기 추출물(Dermatophagoides farinae extract)로 유도된 NC/Nga 마우스의 아토피성피부염에 대한 인삼 성분(GPD) 강화물의 예방적 완화 효능 확인

(가) 집먼지진드기 추출물(Dermatophagoides farinae extract)로 유도된 NC/Nga 마우스의 아토피성피부염에 대한 인삼 성분(GPD) 강화물의 임상증상 완화 효능 확인

- 아토피성피부염을 유발한 시점부터 모든 그룹의 마우스에 대하여 발적/출혈, 부종, 미란/찰과, 각질/건조함의 요소를 각각 none(0점), mild(1점), moderate(2점), severe(3점)으로 배점하여 점수를 부과하였다.

- 예방적 완화효능에 있어 인삼 성분(GPD) 강화물(GFGE)을 각각 100 mg/kg, 200 mg/kg, 400 mg/kg을 처리한 그룹에서 아토피성피부염을 유발한 대조그룹에 비하여 임상증상이 완화되었음을 확인하였다. 하지만 이러한 현상은 농도의존적인 결과를 나타내지는 않았으며 가장 효과가 좋은 100 mg/kg에 대해서만 결과를 제시하겠다(그림 1-7).

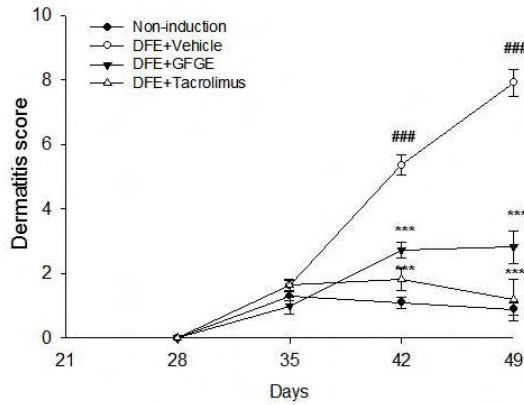
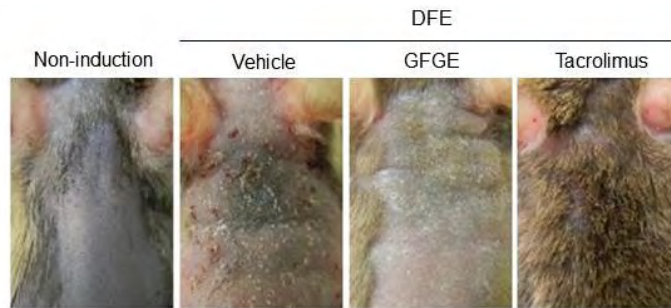


그림 1-7. 인삼성분(GPD)강화 물질의 아토피성피부염 임상증상 억제 효과

(나) 집먼지진드기 추출물(Dermatophagoides farinae extract)로 유도된 NC/Nga 마우스의 아토피성피부염에 대한 인삼 성분(GPD) 강화물의 소양감 완화 효능 확인

- 아토피성피부염을 유발한 시점부터 모든 그룹의 마우스에 대하여 매회 20분 동안 긁는 행동을 보이는 시간을 측정하였다. 인삼 성분(GPD) 강화물을 각각 100 mg/kg, 200 mg/kg, 400 mg/kg을 처리한 그룹에서 아토피성피부염을 유발한 대조그룹에 비하여 긁는 행동을 보이는 시간이 감소하였음을 확인하였다. 이러한 완화 효과는 400 mg/kg에서 가장 크게 나타났다(그림 1-8).

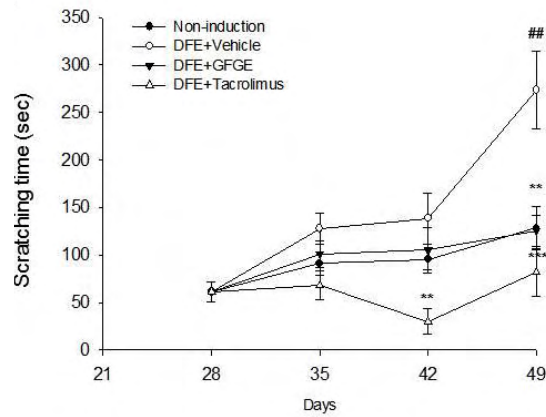


그림 1-8. 인삼성분(GPD)강화 물질의 아토피성피부염 소양감 억제 효과

(다) 집먼지진드기 추출물(Dermatophagoides farinae extract)로 유도된 NC/Nga 마우스의 아토피성피부염에 대한 인삼 성분(GPD) 강화물의 Th1/Th2 cytokine 조절

- 좋은 효과를 보이는 농도인 GPD강화물의 100mg/kg 투여군을 중심으로 아토피성피부염을 유발한 마지막 측정 시점에서 면역반응 불균형을 확인할 수 있는 Th1/Th2 cytokine을 분석하였다. 이 결과 아토피성피부염 유발군은 Th1/Th2 cytokine 모두 유의적으로 증가하였고, 이에 대해 인삼 성분(GPD) 강화물을 처리한 그룹에서 약물치료군과 유사하게 Th1/Th2 cytokine을 유의하게 감소시켰다(그림 1-9).

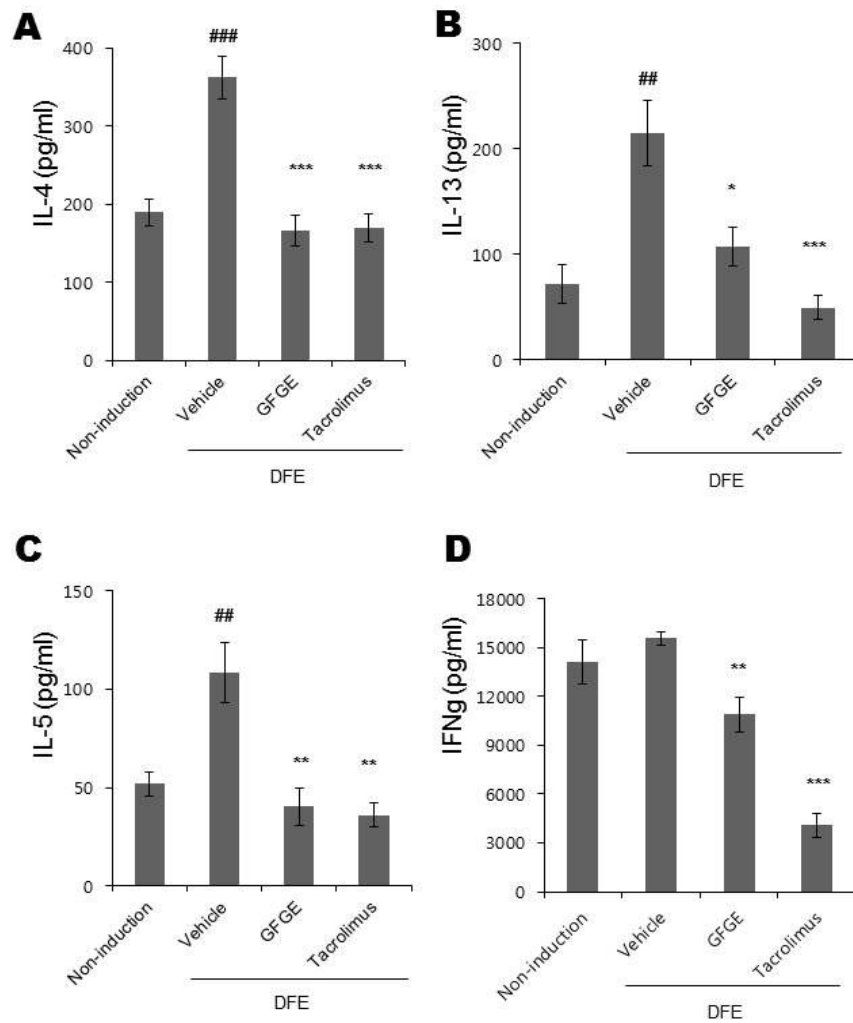


그림 1-9. 인삼성분(GPD)강화 물질의 Th2/Th1 cytokine 조절 효능



(2) 집먼지진드기 추출물(Dermatophagoides farinae extract)로 유도된 NC/Nga 마우스의 아토피성피부염에 대한 인삼 성분(GPD) 강화물의 치료적 완화 효능 확인

(가) 집먼지진드기 추출물(Dermatophagoides farinae extract)로 유도된 NC/Nga 마우스의 아토피성피부염에 대한 인삼 성분(GPD) 강화물의 임상증상 완화 효능 확인

- 상기된 방법으로 피부염 상태를 배점하여 평가하였다.
- 아토피성피부염이 선 유발된 모델에서 치료적 완화효능에 있어 인삼 성분(GPD) 강화물(GFGE)을 각각 50 mg/kg, 100 mg/kg 및 비교군으로 홍삼 추출물 50mg/kg 와 약물대조군 0.1 mg을 처리한 그룹에서 아토피성피부염을 유발한 대조그룹에 비하여 임상증상이 완화되었음을 확인하였다. 하지만 이러한 현상은 농도의존적인 결과를 나타내지는 않았다(그림 1-10).

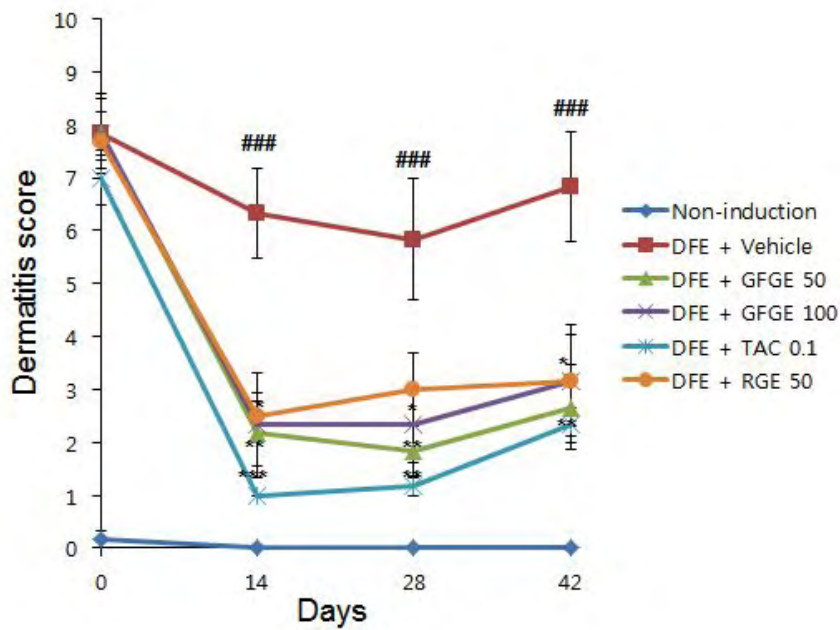


그림 1-10. 인삼성분(GPD)강화 물질의 아토피성피부염 임상증상 억제 효과

(나) 집먼지진드기 추출물(Dermatophagoides farinae extract)로 유도된 NC/Nga 마우스의 아토피성피부염에 대한 인삼 성분(GPD) 강화물의 소양감 완화 효능 확인

- 실험 종료 시점 전 날, 모든 마우스에 대하여 매회 20분 동안 긁는 행동을 보이는 시간을 측정하였다. 시험 결과 GFGE, TAC, RGE 처리에 의해 마우스의 긁는 시간이 감소함을 알 수 있었다(그림 1-11).

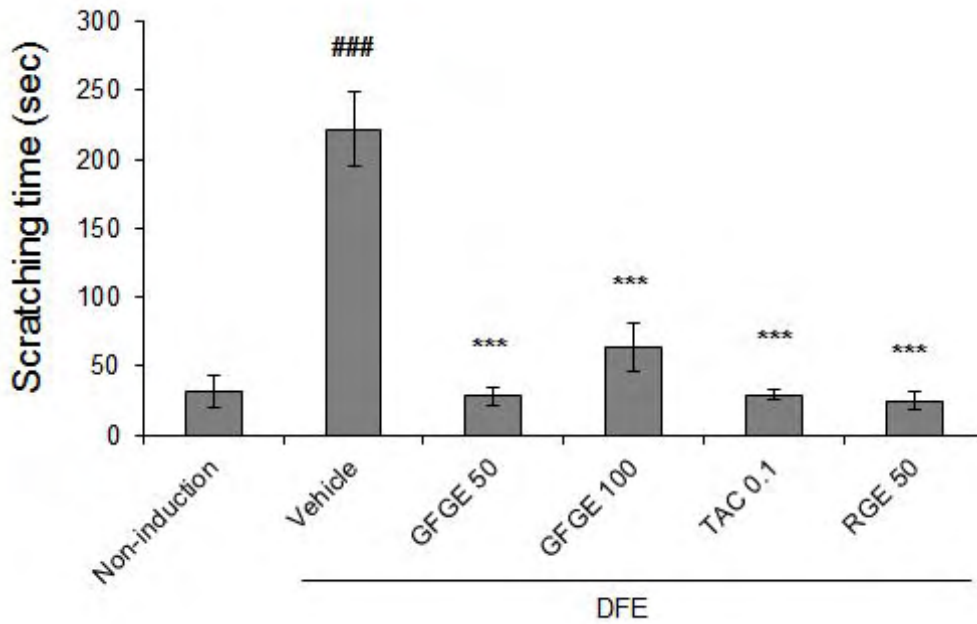


그림 1-11. 인삼성분(GPD)강화 물질의 아토피성피부염 소양감 억제 효과

(다) 집먼지진드기 추출물(Dermatophagoides farinae extract)로 유도된 NC/Nga 마우스의 아토피성피부염에 대한 인삼 성분(GPD) 강화물의 Th1/Th2 cytokine 조절

- 좋은 효과를 보이는 농도인 GPD강화물의 100mg/kg 투여군을 중심으로 아토피성피부염을 유발한 마지막 측정 시점에서 면역반응 불균형을 확인할 수 있는 Th1/Th2 cytokine을 분석하였다. 이 결과 아토피성피부염 유발군은 Th1/Th2 cytokine 모두 유의적으로 증가하였고, 이에 대해 인삼 성분(GPD) 강화물을 처리한 그룹에서 약물치료군과 유사하게 Th1/Th2 cytokine을 유의하게 감소시켰다(표 1-1).

	IL-5	IL-13	IFNg
Non-induction	1.12±4.22 (100)	100.15±20.00 (100)	717.01±524.57 (100)
Vehicle	42.81±37.40 (3807) <sup>#</sup>	421.26±288.68 (421) <sup>#</sup>	1919.48±1217.11 (268) <sup>#</sup>
GFGE 50	2.53±5.11 (225) <sup>*</sup>	113.89±5.64 (114) <sup>*</sup>	948.53±210.28 (132) <sup>p=0.056</sup>
DFE GFGE 100	6.56±4.83 (584) <sup>p=0.066</sup>	124.19±18.14 (124)	769.74±323.19 (107) <sup>*</sup>
TAC 0.1	10.06±4.38 (943) <sup>p=0.090</sup>	141.36±14.09 (141)	705.70±333.47 (98) <sup>*</sup>
RGE 50	7.10±6.37 (632) <sup>p=0.058</sup>	117.32±17.75 (117)	553.98±343.06 (77) <sup>*</sup>

표 1-1. 인삼성분(GPD)강화 물질의 Th2/Th1 cytokine 조절 효능

2. 제1-2세부연구과제(강화약쑥 등 국내 자생식물의 피부미용 또는 뇌기억력 개선 효능 검증)

가. 강화약쑥의 지표물질 Eupatilin의 피부 주름 보호 효능 검증

(1) 사람 피부 섬유아세포(human dermal fibroblast)에 처리할 강화약쑥 성분 Eupatilin과 Jaceosidin의 농도 설정

- 피부세포주에서 약쑥성분의 효능을 평가하기 앞서 세포의 생존률을 측정하는 MTT assay를 통해 성분이 세포에 독성을 갖지 않는 한계농도를 설정하였다. 사람 피부 섬유아세포(human dermal fibroblast)에 강화약쑥 성분 (Eupatilin, Jaceosidin)을 5, 10, 20, 40, 80  $\mu\text{M}$  로 각각 처리하여 48시간 동안 배양한 뒤 MTT assay로 세포의 생존률을 측정하였다. 처리결과 Eupatilin은 고농도인 80  $\mu\text{M}$ 까지 피부세포주에 독성을 보이지 않았으나 Jaceosidin은 세포에 처리하였을 때 Eupatilin에 비해 농도 의존적으로 세포의 생존률을 감소시켰다 (그림 1-12).

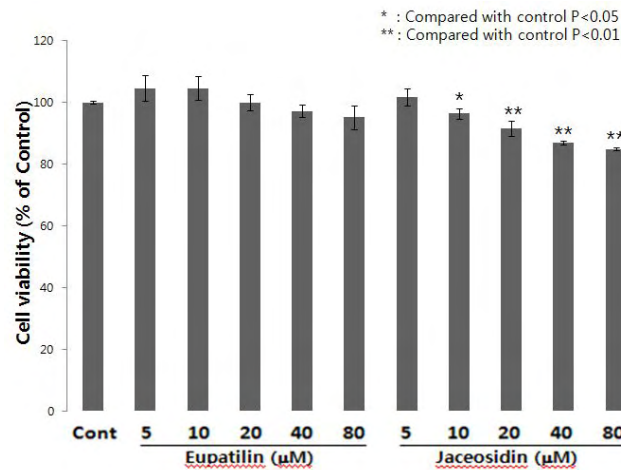


그림 1-12. 강화약쑥 성분 Eupatilin과 Jaceosidin의 사람 피부 섬유아세포에 대한 독성평가

(2) 인간섬유아세포 (human dermal fibroblast)에서 UVB에 의해 증가되는 MMP-1에 대한 약썩성분의 억제효능 평가

- MMP (Matrix Metalloproteinase)는 단백질을 분해효소로서 스트로멜리신, 콜라겐분해효소, 젤라틴분해효소, 엘라스틴분해효소 등을 포함한다. MMP는 세포의 기저막과 콜라겐, 엘라스틴 등의 섬유성 단백질과 세포접착성 단백질로 구성된 세포외 기질을 파괴하여 피부의 노화를 가져오고 심할 경우 암을 유발한다. 위의 MTT assay를 통하여 설정한 농도로 사람섬유아세포에 Eupatilin과 Jaceosidin을 처리한 결과 무처리 대조군과 비교하여 20  $\mu$ M에서 MMP-1(콜라겐분해효소)의 생성이 억제됨을 western blotting을 통해 확인하였다. 그러나 MMP-2 (젤라틴분해효소)의 생성을 억제하지 못하였다 (그림 1-13).

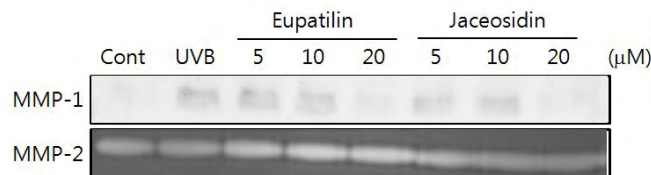


그림 1-13. UVB에 의해 발현되는 MMP-1,2에 대한 약썩성분 (Eupatilin, Jaceosidin)의 억제효능 평가

나. 강화약썩의 지표물질 Eupatilin의 뇌질환 예방 효능 건강기능성 검증

(1) 소신경교세포(microglia)를 이용한 약썩성분(Eupatilin, Jaceosidin)의 신경세포 보호효능 평가

- 소신경교세포 (microglia)는 뇌에서 면역기능을 담당하는 신경원세포의 일종으로 평상시에는 외부로부터 침투한 물질이나 죽은 신경세포를 대식작용을 통해 제거하여 뇌를 보호하는 역할을 하지만 과도하게 활성화되면 지나친 염증반응을 유도하여 TNF-alpha, IL-1beta 등의 물질을 분비하게 되어 뇌를 손상시키게 되며 알츠하이머질환, 파킨슨병 등의 퇴행성 뇌질환을 유발하게 된다. 본 실험에선 이런 염증반응을 Lipopolysaccharide (LPS)를 처리하여 인위적으로 유도했을 때 약썩성분(Eupatilin, Jaceosidin)의 보호효능을 측정하였다. 소신경교세포를 Eupatilin, Jaceosidin 2.5, 5, 10  $\mu$ M과 함께 배양한 뒤 LPS를 100 ng/mL 처리하여 12시간 뒤에 세포를 배양하던 배지에서 TNF- $\alpha$ 의 생성정도를 ELISA를 사용하여 측정하였다. 무처리 대조군과 비교하였을 때 Eupatilin, Jaceosidin 처리는 TNF- $\alpha$ 의 생성을 억제하지 못하였다 (그림 1-14).

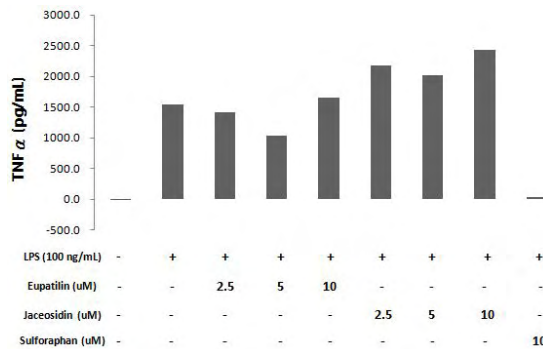


그림 1-14. 신경교세포에서 LPS에 의해 유도되는 TNF- $\alpha$ 의 생성에 대한 약썩성분 (Eupatilin, Jaceosidin)의 억제효능 평가

다. 자외선(UVB)에 의하여 유도되는 피부염증인자의 증가에 대한 강화약썩의 주요성분인 Eupatilin, Jaceocidin의 보호효능 검증

(1) 강화약썩의 주요성분인 Eupatilin과 Jaceocidin의 구조

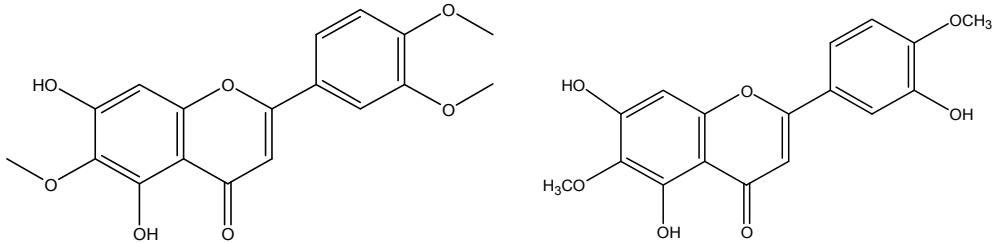


그림 1-15. 강화약썩의 주요성분 Eupatilin(왼쪽)과 Jaceocidin(오른쪽)의 구조

(2) 자외선(UVB)조사에 의한 피부염증 억제평가 모델 설계

- 자외선(UVB)는 태양광이 지표면에 도달하는 광선 중 하나로 다양한 연구결과에 의하여 피부염증을 비롯한 다양한 생물학적인 피부조직의 변화를 유도한다고 알려져 있다. 특히 Cyclooxygenase-2 (COX-2)는 염증반응을 유도하는 대표적인 단백질로 Prostaglandin E2 (PGE2)를 생합성시켜 염증반응을 나타내므로 COX-2의 발현을 억제하는 것이 피부염증을 억제하는 대표적인 전략으로 생각되고 있다.
- COX-2의 발현은 세포내의 다양한 전사인자에 의하여 조절이 되는데 특히 Activator protein-1 (AP-1)과 Nuclear factor-kappa B (NF-kB)가 COX-2의 발현을 조절하는 대표적인 전사인자이다.
- 따라서 강화약썩의 대표적인 성분인 Eupatilin, Jaceosidin의 피부염증 억제효능을 확인하기 위하여 자외선(UVB)에 의한 COX-2의 전사활성과 COX-2 단백질 발현의 대표적 전사인자인 AP-1, NF-kB의 전사인자활성을 측정하였다.

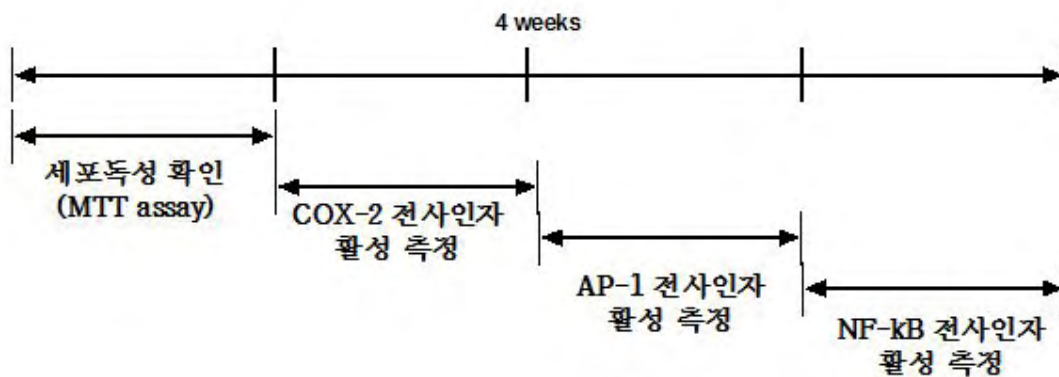


그림 1-16. Eupatilin, Jaceosidin의 피부염증억제 효능측정 실험 모델

(3) 강화약썩의 주요성분인 Eupatilin, Jaceosidin의 세포독성 확인

- 실험에 앞서 유효한 Eupatilin과 Jaceosidin의 농도를 확인하기 위하여 MTT assay를 통하여 JB6 P+ 세포주에서 독성농도를 확인하였다.
- JB6 P+ 세포주는 쥐의 상피세포주로서 천연물을 포함한 다양한 화합물의 피부염증에 대한 효능을 측정할 때 많이 쓰이는 세포주 모델이며 Eupatilin과 Jaceosidin을 세포주에 처리 24시간 후 세포주에 대한 독성을 측정하였다.
- 실험결과 Eupatilin, Jaceosidin모두 실험 최저농도인 25 mM에서 두 성분 모두 세포독성이 나타나 25  $\mu$ M 이하의 농도인 1, 5, 10, 20  $\mu$ M에서 2차실험을 수행하였다(그림 1-17, 1-18).

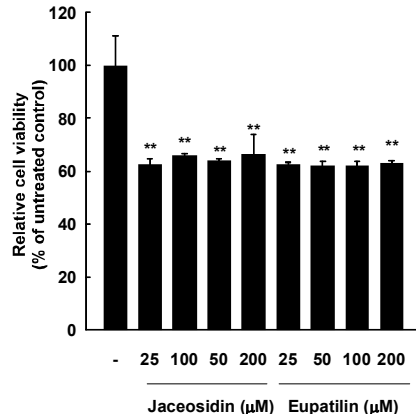


그림 1-17. JB6 P+ 세포주 모델에서의 Jaceosidin, Eupatilin의 독성

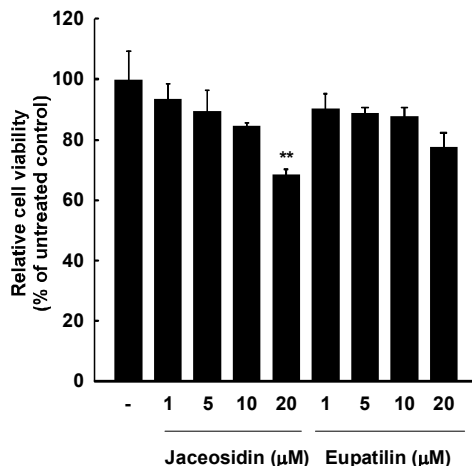


그림 1-18. JB6 P+ 세포주 모델에서의 Jaceosidin, Eupatilin의 독성



- (4) 자외선에 의하여 유도된 COX-2의 전사활성에 대한 Eupatilin과 Jaceosidin의 효능검증
- Eupatilin과 Jaceosidin의 피부염증에 대한 효능을 확인하기 위하여 Eupatilin과 Jaceosidin 각각 1, 5, 10, 20  $\mu\text{M}$ 의 농도로 전처리하고 자외선을 조사하였다.
  - 자외선 조사 후 증가한 COX-2의 전사활성에 대한 Eupatilin과 Jaceosidin의 효능을 비교하였다.
  - 자외선에 의하여 유효하게 증가한 COX-2의 전사활성에 대하여 Eupatilin, Jaceosidin 모두 실험 농도조건에서 (1, 5, 10, 20  $\mu\text{M}$ )에서 억제효능을 보이지 않았다(그림 1-19).

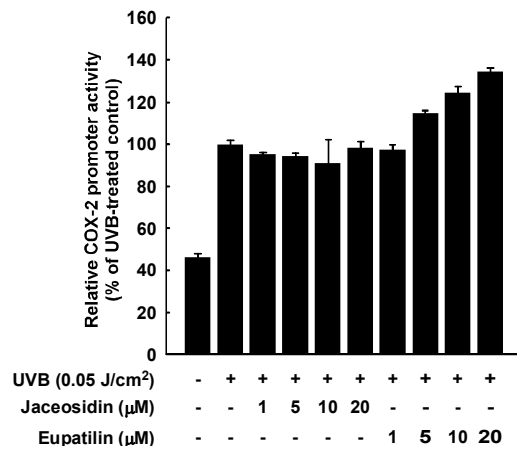


그림 1-19. 자외선으로 인해 증가한 COX-2 전사활성에 대한 Eupatilin, Jaceosidin의 효능

- (5) 자외선에 의하여 유도된 AP-1의 전사인자 활성화에 대한 Eupatilin과 Jaceosidin의 효능검증
- COX-2의 주요한 전사인자 중 하나인 AP-1의 전사인자 활성화에 대한 Eupatilin과 Jaceosidin의 효능을 검증하기 위하여 Eupatilin, Jaceosidin을 1시간 전처리 하고 자외선을 조사한 후 그 효능을 측정하였다.
  - 자외선에 의하여 유효적으로 증가한 AP-1의 전사인지 활성화에 대하여 강화약속의 주요성분인 Eupatilin, Jaceosidin이 억제하지 못하였다(그림 1-20).

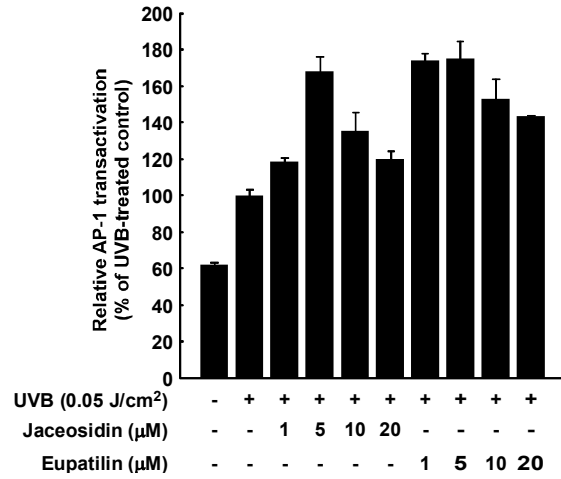


그림 1-20. 자외선으로 인해 증가한 AP-1 전사인자 활성화에 대한 Eupatilin, Jaceosidin의 효능

(6) 자외선에 의하여 유도된 NF- $\kappa$ B의 전사인자 활성화에 대한 Eupatilin과 Jaceosidin의 효능 검증

- COX-2의 주요한 전사인자 중 하나인 NF- $\kappa$ B의 전사인자 활성화에 대한 Eupatilin과 Jaceosidin의 효능을 검증하기 위하여 Eupatilin, Jaceosidin을 1시간 전처리 하고 자외선을 조사한 후 그 효능을 측정하였다.

- 자외선에 의하여 유효적으로 증가한 NF- $\kappa$ B의 전사인지 활성화에 대하여 강화약속의 주요성분인 Eupatilin, Jaceosidin이 억제하지 못하였다(그림 1-21).

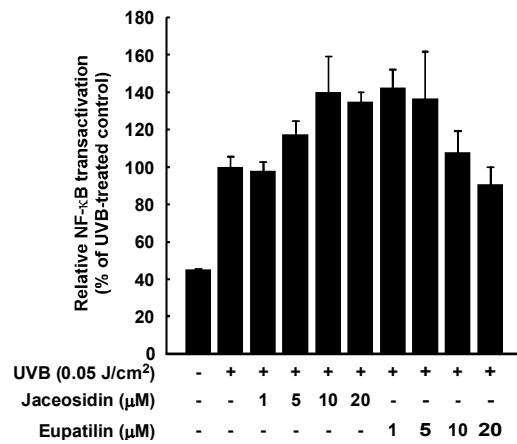


그림 1-21. 자외선으로 인해 증가한 NF- $\kappa$ B 전사인자 활성화에 대한 Eupatilin, Jaceosidin의 효능

라. 인삼의 지표물질 Rg3를 이용한 뇌질환 예방 효능 건강기능성 검증 (Scopolamine으로 유도되는 기억력 장애에 대한 인삼의 지표물질 Rg3의 뇌질환 예방 효능 검증)

(1) 인삼의 지표물질 Rg3에 대한 기본 구조

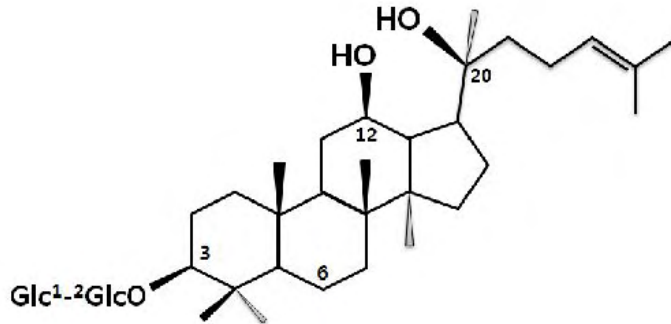


그림 1-22. 인삼의 지표물질 Rg3의 기본 구조

(2) Scopolamine을 투여한 C57BL/6 mouse에서의 기억력 장애 모델 설계

- Scopolamine은 부교감신경전달경로를 억제하는 물질로써, 단기간에 동물모델에서 acetylcholine의 전을 억제하여 기억력의 장애를 일으킨다고 알려진 물질이다. 따라서 scopolamine을 C57BL/6 mouse에 복강투여(1 mg/kg)를 함으로써 기억력 장애를 일으켜, 이에 대한 인삼 지표물질 Rg3의 효능을 확인하기 적합하다고 판단하였다.
- 본 연구에서는 아래 그림(그림 1-23)과 같이 수중미로실험을 통하여 기억력 저하가 개선되는지 확인하고자 계획하였다. 이 실험은 쥐를 물에서 수영하게 하고 부표의 위치를 학습시킨 뒤, 부표가 있는 위치를 기억해서 얼마나 빠르게 찾는지 측정하는 실험이다.

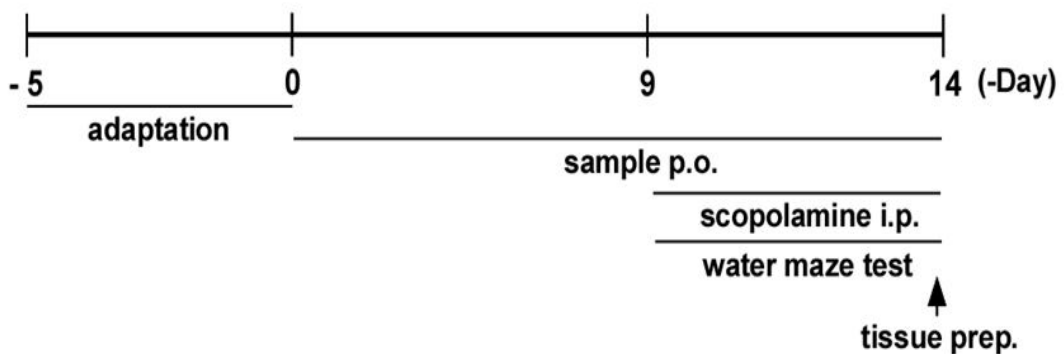


그림 1-23. Scopolamine 투여 동물모델 실험 계획

(3) Scopolamine 및 인삼 유효성분을 투여한 C57BL/6 mouse에서의 무게 및 수영속도 측정  
 - scopolamine을 투여한 군 및 인삼 유효성분을 투여한 군에서 무게차이가 유의적으로 나타나지 않았으며, 수중미로실험 시 수영속도 또한 유의적으로 나타나지 않았다. 따라서 scopolamine 및 인삼 유효성분이 무게나 운동능력의 변화에 영향을 주지 않는 것을 확인할 수 있었다(그림 1-24, 1-25).

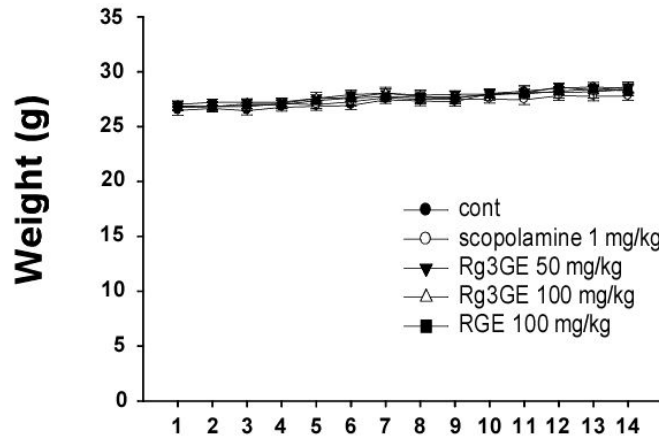


그림 1-24. Scopolamine 및 인삼 유효성분을 투여한 C57BL/6 mouse에서의 무게 측정

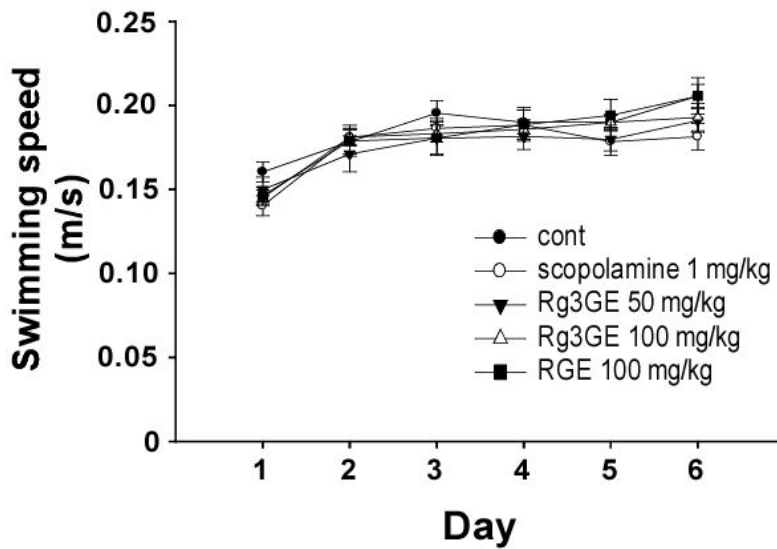


그림 1-25. Scopolamine 및 인삼 유효성분을 투여한 C57BL/6 mouse에서의 수영속도 측정

(4) Scopolamine을 투여한 C57BL/6 mouse에서의 기억력 관련 동물행동실험 및 인삼 기능성 성분에 대한 효능 측정

- Scopolamine을 이용하여 기억력 장애를 일으켰을 때, 수중미로실험(morris water maze)에서 부표의 위치를 제대로 파악하지 못하는 것이 확인되었다. 또한 인삼의 지표성분 Rg3와 RGE(red ginseng extract)가 Scopolamine을 투여한 군에 비하여 부표의 위치를 잘 기억하는 것을 확인하여, 기억력이 개선되었음을 확인하였다(그림 1-26, 1-27).

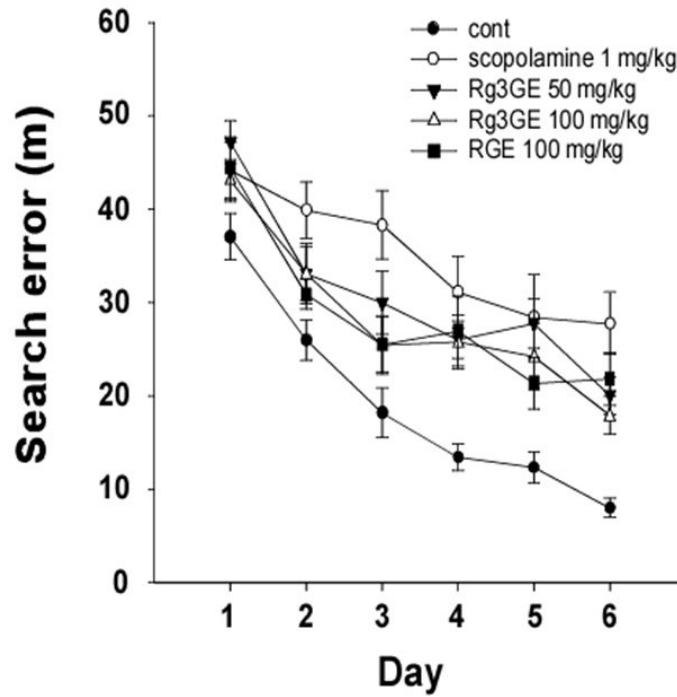


그림 1-26. Scopolamine으로 유도되는 기억력 장애에 대한 인삼 기능성 소재의 효능 확인 수중미로실험

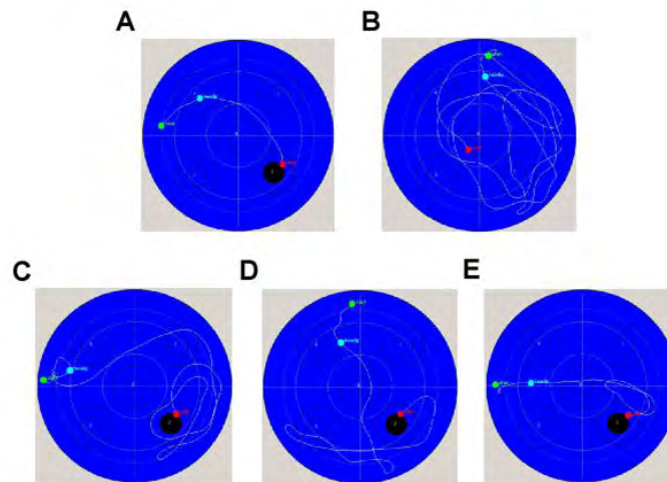


그림 1-27. Scopolamine으로 유도되는 기억력 장애에 대한 인삼 기능성 소재의 효능 확인 수중미로실험 (A. control B. Scopolamine C. Scopolamine + Rg3(50 mg/kg) D. Scopolamine + Rg3(100 mg/kg) E. Scopolamine + RGE(100 mg/kg)

(5) Scopolamine을 투여한 C57BL/6 mouse에서의 acetylcholinesterase 활성 측정

- Scopolamine은 acetylcholinesterase의 활성을 증가시켜 acetylcholine을 억제하는 것으로 알려져 있기 때문에, C57BL/6 mouse에서 기억에 관장하는 뇌 조직인 해마(hippocampus)에서의 acetylcholinesterase의 활성을 측정하여 기억력 저해관련 분자지표를 증명하고자 하였다.

- Scopolamine을 투여한 mouse에서는 acetylcholinesterase의 활성이 증가함을 확인할 수 있었고, 인삼 지표물질 Rg3을 투여한 군(50 mg/kg, 100 mg/kg)에서는 scopolamine 군에 비하여 acetylcholinesterase의 활성이 유의적으로 감소했음을 확인할 수 있었다. 하지만, RGE를 투여한 군은 scopolamine을 투여한 군에 비하여 유의적인 차이를 보이지 않았다(그림 1-28).

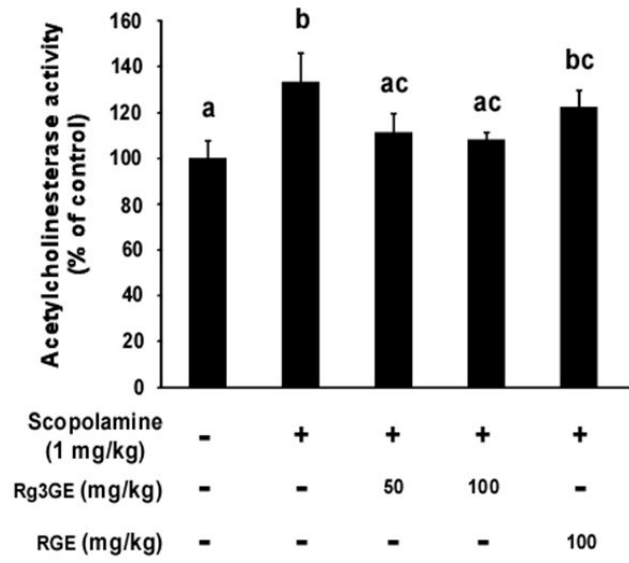


그림 1-28. Scopolamine투여 및 인삼 성분 투여군에서의 acetylcholinesterase 활성 측정

(6) Scopolamine을 투여한 C57BL/6 mouse에서의 p65 인산화 억제 효능 측정

- Scopolamine은 NF-kB의 활성을 증가, 즉 p65의 인산화를 증가시키는 것으로 알려져 있기 때문에, C57BL/6 mouse에서 기억에 관장하는 뇌 조직인 해마(hippocampus)에서의 p65의 인산화의 정도를 측정하여 기억력 저해관련 분자지표를 증명하고자 하였다.

- Scopolamine을 투여한 mouse에서는 p-p65의 인산화가 유의적으로 증가함을 확인할 수 있었다. 또한 인삼 지표물질 Rg3을 투여한 군(50 mg/kg, 100 mg/kg)과 RGE를 투여한 군에서 scopolamine 군에 비하여 p65의 인산화가 유의적으로 감소했음을 확인할 수 있었고, Rg3에 의한 효과는 농도에 의존적으로 나타남을 확인하였다(그림 1-29, 1-30).

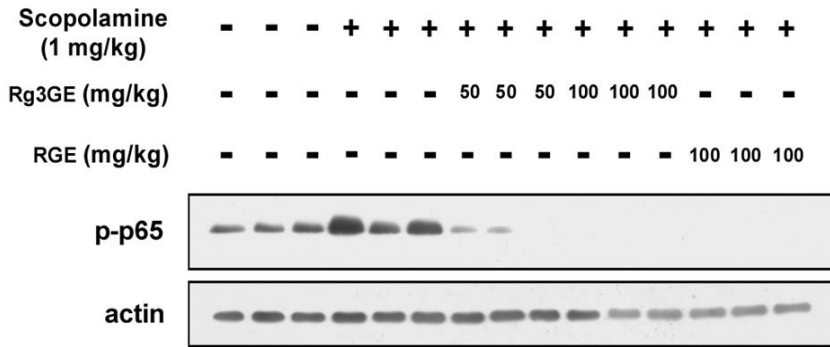


그림 1-29. Scopolamine투여 및 인삼 성분 투여군에서의 p65 인산화 정도 측정

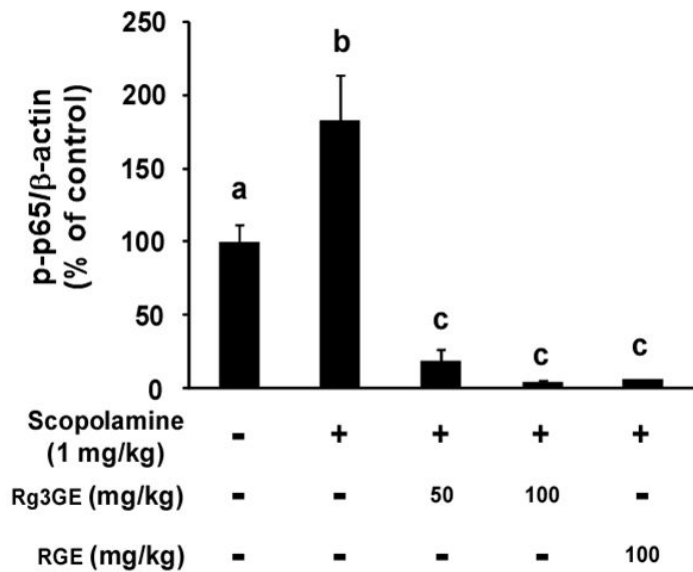


그림 1-30. Scopolamine투여 및 인삼 성분 투여군에서의 p65 인산화정도 측정



3. 제1-3세부연구과제(강화약쭈 등 국내 자생식물 유래 기능성 소재 제조공정 연구)

가. 강화약쭈 원료 제조공정 연구

(1) 강화약쭈 원료 특성 검토

(가) 국내 인정·허가 현황

① 식용근거

- 약쭈은 사제발쭈, 싸주아리쭈, 침애, 의초, 황초, 사제발쭈, 뚝쭈, 참쭈, 빙대 등 다양한 이름으로 불리고 있으며 식품공전상 식품원재료의 식물성원료(야생식물류)로 분류되어 있으며, 식용이 가능한 원료로 등재되어 있다(표 1-2).

원재료명(영문명)	약 쭈
이명	강화쭈, 사제발쭈, 獅子足艾, 싸주아리쭈, Artemisia Herb, 의초(醫草), 황초(黃草), 침애(晷艾), 애(艾), 사제발쭈, 약쭈, 뚝쭈, 참쭈, 빙대
학명	<i>Artemisia argyi</i> (황해쭈) <i>Artemisia princeps</i> Pomp. Hara(쭈) <i>Artemisia montana</i> (산쭈)
생약명	애엽(艾葉, <i>Artemisiae Asiatiae</i> Herba)
기원	애엽: 황해쭈 <i>Artemisia argyi</i> Lev. Et Vant., 쭈 <i>Artemisia princeps</i> Pamp. 또는 산쭈 <i>Artemisia montana</i> Pampani (국화과 Compositae)의 잎 및 어린줄기
식용가능여부	가능
공전등재여부	사용가능원료
용도(이용부위)	식용(어린 잎), 약용(잎, 줄기엽병)
동+식물 분류	식물

(출처: 한국식품의약품안전청 홈페이지, www.kfda.go.kr)

표 1-2. 약쭈의 특성

② 분포 및 특성

㉠ 흔히 바닷바람을 쐬며 자라는데 유기질이 많고 물 빠짐이 좋은 토양에 햇별이 잘 드는 해발 100m 내외의 산자락에 자생하는 강화도의 것을 최고로 치는 인식이 있다. 그래서 약재시장에 출하되는 양은 전체의 10%가 되지 못하나 시장 점유율은 90%를 상회한다. 하는 이해하지 못할 상황이 연출되는 실정이다. 쭈은 엉거시과에 속하는 다년초인데 창쭈·물쭈·약쭈·쭈 등의

종류가 많다. 쑥잎 표면은 푸르며 뒷면은 젖빛의 솜털이 있고 독특한 향기가 있다(그림 1-31). 줄기엽병은 약용, 어린잎은 식용, 잎은 뜯숙을 만드는데 흰 털은 인주 만드는데 써왔다. 쑥은 마늘과 더불어 단군 신화에 나올 만큼 역사가 아주 오래된 약초이자 인체에 매우 이로운 식품이다. 국내에서 쑥은 흔히 인진쑥, 사자발쑥, 싸주아리쑥 등이 대표적으로 거래되고 있으며, 그 중 강화군에서 생산되는 사자발쑥은 농산물품질관리법 시행령 제18조제3항 및 동법 시행규칙 제18조제1항의 규정에 의거 “지리적표시제” 농산물로서 국립농산물품질관리원 공고 제2006-10호로 2006년 7월 4일, 표 2와 같은 내용으로 등재되었다. 그 세부 자료에 보면, 품질의 특성과 지리적 요인과의 관계를 규명하여, 강화군 지역의 지리적 재배 특성을 상세히 규정하고 있다. 강화군의 지질이 약쑥의 생육에 좋은 토양인 화강암계, 현무암계, 화강편마암계, 편상편마암계, 편상퇴적암계로 구성되어 있으며, 특히 대부분의 토양이 결정편마암으로 주로 이루어져 있고 토성이 물 빠짐이 좋은 사양토 및 양토로 주로 구성되어 물 빠짐이 좋아 약쑥의 품질을 좋게 하는 천혜의 특징을 갖고 있다고 보고하고 있다(표 1-3).



그림 1-31. 약쑥의 형태

<p>가. 지리적표시 등록신청인의 성명·주소 및 전화번호</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>○ 성명 : 강화군산림조합</li> <li>○ 주소 : 경기도 강화군 강화읍 용정리 641-1</li> <li>○ 전화 : 032 - 934 - 0789</li> </ul> <p>나. 지리적표시의 등록대상품목 및 등록명칭</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>○ 등록대상품목 : 쑥</li> <li>○ 등록명칭 - 한글 : 강화약쑥(긴쑥) / 영문 : Ganghwa Mugwort</li> </ul> <p>다. 지리적표시 대상지역의 범위</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>○ 지리적표시 대상지역의 범위는 행정구역상의 경기도 강화군으로 한다.</li> </ul> <p>라. 품질의 특성과 지리적 요인과의 관계 (생략)</p> <p>마. 신청인의 자체품질기준 (생략)</p>
--

표 1-3. 약쑥의 지리적표시 등록 신청 주요 내용

(단위 : ha, %)

구분	세사양토	사양토	양토	미사질양토	미사질식양토	합계
강화	48 (0.5)	3,513 (40.7)	4,238 (49.1)	0 (0)	837 (9.7)	8,636
서산	86 (0.5)	323 (1.9)	13,542 (79.0)	94 (0.5)	2,851 (16.6)	17,131
영월	500 (6.3)	1,298 (16.5)	4,473 (57.1)	464 (5.9)	9 (0.1)	7,825

(출처: 『농업토양정보시스템(ASIS)』, 농촌진흥청)

표 1-4. 강화군 밭 토양의 물리적 특성

㉔ 약쑥의 생육기간인 4월에서 9월까지의 평균일조시간은 표 1-5에서 볼 수 있듯이 같은 위도상의 영월과 같은 서해안 지방인 서산보다 상대적으로 많은 225.7시간으로 나타났다. 약쑥은 거의 대부분이 광합성 산물로 이루어진 식물이고, 그늘진 것보다는 햇볕을 좋아하므로 약쑥의 품질에는 광합성 산물의 축적이 큰 영향을 미친다고 할 수 있다. 그렇기 때문에 광합성 작용에 필요한 일조량이 풍부한 강화 지역에서 고품질의 약쑥을 생산할 수 있다.

(단위 : 시간)

월 지역	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	4 - 9월 평균일조량
강화	179.2	190.2	226.4	237.9	256.7	231.2	190.7	212.2	225.2	220.6	170.6	162.6	225.7
인제, 영월, 평창	178.6	182.5	213.7	237.2	254.2	232.3	197.5	206.8	203.9	206.5	164.6	165.4	222.0
당진, 서산	153.7	164.7	207.7	220.9	240.3	198.7	154.7	187.6	198.6	204.9	148.6	142.9	200.0

(출처: 기상청, 기후 평균값)

표 1-5. 주요 쑥 생산지의 지역별 일조시간 분포

(나) 국외 인정·허가 현황

- 썩 추출물은 미국 FDA 식품첨가물 데이터베이스에서 EAFUS(Everything added to food in the United States)로 등재되어 있다(Doc No. 1718). EAFUS는 식품에 직접적으로 첨가될 수 있는 원료로서, 미국 FDA에서 식품 첨가물 혹은 GRAS로 인정된 것을 의미한다.

(다) 강화약썩 원물의 품질 관리 기준

- 원물의 품질 관리 기준을 확인하기 위하여 강화군 농업기술센터의 협조를 얻어서, 기획립 되어 있는 강화약썩의 관리 기준을 확인하고 다음(그림 1-32)과 같이 원물 관리 프로세스로 조절하였다.

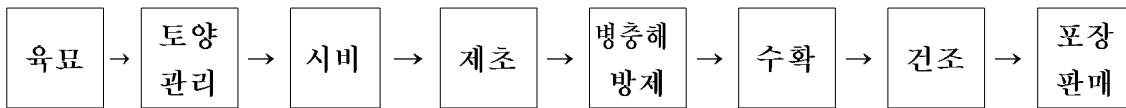


그림 1-32. 강화약썩의 생산과정 중 품질관리 8단계

① 강화군약쑥품질보증위원회 관리 품질 기준

㉔ 강화약쑥 생산자는 자체품질기준(표 1-6, 1-7)에 적합한 강화약쑥을 생산하기 위하여 인천광역시 강화군 농업기술센터의 지도를 받아 재배한 후 강화군약쑥품질보증위원회의 인증을 통과한 약쑥을 대상으로 약쑥의 품질 등급을 받는다.

항 목	심 사 기 준	평 점
1. 잡쑥의 혼입여부	○ 잡쑥의 혼입이 5% 미만	30
	○ 잡쑥의 혼입이 5%이상 ~ 10%미만	25
	○ 잡쑥의 혼입이 10%이상	20
2. 약쑥의 색택과 향	○ 표준규격 특품에 해당	20
	○ 표준규격 상품에 해당	15
	○ 표준규격 중품에 해당	10
3. 약쑥의 건조 및 보관상태	○ 표준규격 특품에 해당	30
	○ 표준규격 상품에 해당	25
	○ 표준규격 중품에 해당	20
4. 약쑥의 형상 및 길이	○ 표준규격 특품에 해당	20
	○ 표준규격 상품에 해당	15
	○ 표준규격 중품에 해당	10
계		100

표 1-6. 강화약쑥 품질보증 심사기준

등 급	특 품	상 품	중 품
평 점	90점 이상	89점 이하 ~ 80 이상	79점 이하 ~ 70점 이상

\* 등급기준 : '특품'에 대해서만 지리적표시등록표지를 표시한다.

\* 표준등급 '특품', '상품', '중품'에 해당하는 표준규격품은 산립조합에 보관하며, 수매 이전에 한번 매년 갱신을 한다.

\* 약쑥의 잔류농약기준은 식약청 고시에 의해 약쑥에 대한 사용 규정이 마련되는 즉시 기준에 따른다.

표 1-7. 약쑥의 품질등급

(2) 강화약쑥의 원료처리 공정 개발

- 강화약쑥에 대한 생리적 효과가 지속적으로 규명되고 있으나 식품으로서의 응용확대를 저해하는 요인으로는 강화약쑥이 주로 약재로만 사용됨에 따라 식품으로서의 원료 기준 마련이 미흡하고, 수확 후 건조 등 표준화가 이루어져 있지 않다는 점을 들 수 있다. 따라서 확보한 강화약쑥 원물을 이용하여 표준화된 원료를 제조하기 위한 최적 공정연구를 수행하였다.

(가) 강화약쑥 추출물 제조 공정 최적화를 위한 연구

① 최적 추출 조건 설정

- 강화약쑥 추출물 제조 공정에서 최적의 추출 조건을 찾기 위해서 강화약쑥을 구입하여 여러 공정 변수를 달리하여 추출한 후 지표물질인 eupatilin 함량을 HPLC(600S controller, Waters, Milford, MA, USA)로 분석하였다.

㉠ 강화약쑥 부위별 지표물질의 함량

- 강화약쑥을 잎과 줄기로 분리하여 잎, 줄기 및 잎+줄기(잎:줄기=4:6)의 세 가지 시료를 만들었다. 이 세 가지 시료 10 g에 각각 95% EtOH 100 mL씩을 가하여 상온(25°C)에서 36시간 동안 침지하여 추출한 후 추출액에 있는 지표물질의 함량을 분석하였다(그림 1-33).

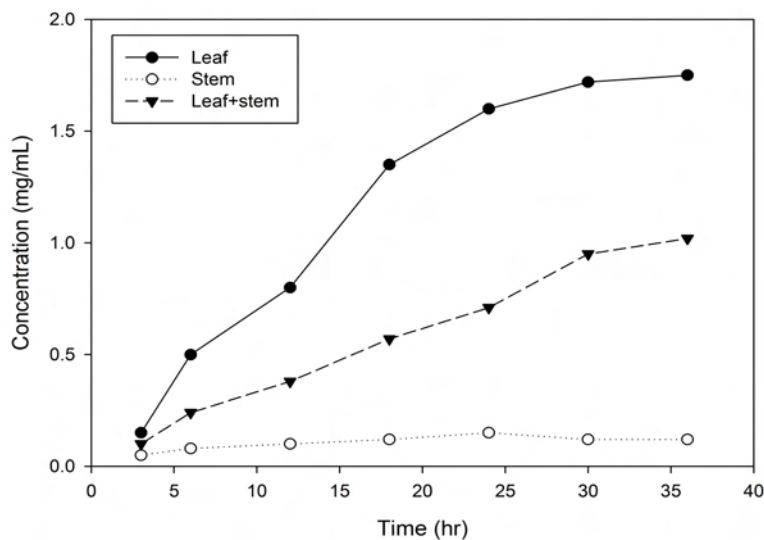


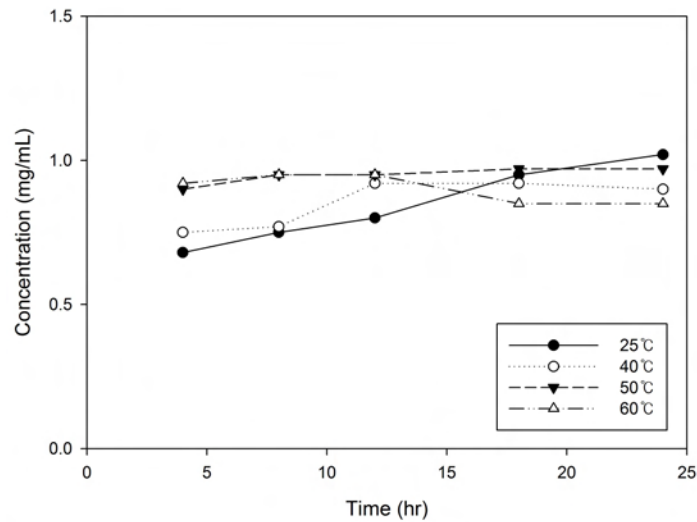
그림 1-33. 강화약쑥 부위별 eupatilin 함량

- 그림 1-33에서 볼 수 있듯이 강화약쑥의 지표물질인 eupatilin은 줄기보다 잎에 10배 이상 많은 양이 포함되어 있음을 알 수 있다. 그러므로 강화약쑥 추출물을 제조하는 데에는 강화약쑥 잎만 분리하여 사용하는 것이 더 효과적이라고 할 수 있다. 하지만 대부분의 강화약쑥이 잎과 줄기가 함께 있는 형태로 유통되고 있는 실정으로 이를 분리하여 사용하는 것은 추가적인 공정을 필요로 하여 대량 생산 시에는 잎과 줄기가 함께 있는 원물 그대로 사용하는 것이 더 효율적이라고 판단된다.

㉔ 추출온도에 따른 지표물질의 함량

- 강화약쑥 10 g에 70% EtOH 100 mL씩을 가하여 25, 40, 50 및 60°C에서 24 시간동안 추출한 후 여과하여 1차 추출물을 얻고 여과박에 다시 100 mL의 70% EtOH을 가해 25, 50, 70 및 80°C에서 8 시간동안 추출하여 2차 추출물을 얻었다. 1차 및 2차 추출물에 있는 지표물질의 함량은 그림 1-34에 나타내었다.

(a)



(b)

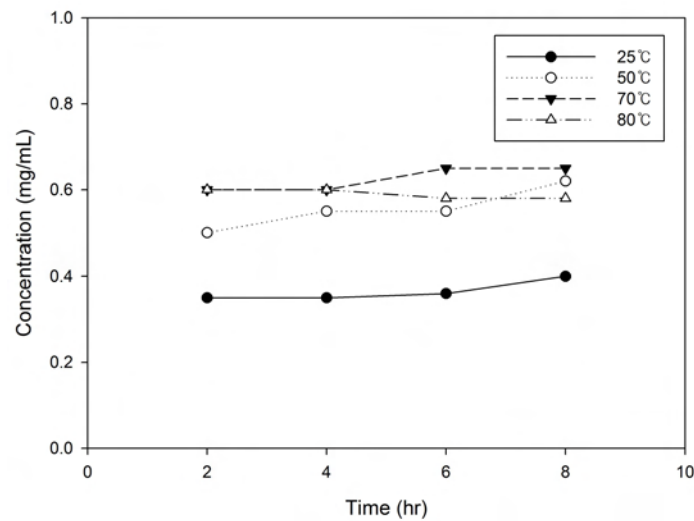


그림 1-34. 추출온도에 따른 eupatilin 함량: (a) 1차 추출물, (b) 2차 추출물

- 그림 1-34 (a)에서 볼 수 있듯이 1차 추출 시 초기에는 50, 60°C와 같이 상대적으로 고온에서 eupatilin의 함량이 더 높게 나타났다. 그러나 시간이 지남에 따라 25°C에서는 꾸준히 eupatilin 함량이 증가하는 반면에 40°C와 50°C에서는 각각 12 및 6시간 이후에는 함량에 큰 변화가 없었으며 60°C에서는 12시간 이후에는 감소하였다. 또한 25°C에서 24시간 추출하였을 때에 비해 40°C 이상의 온도에서 같은 시간 추출하였을 때의 eupatilin 함량이 낮은 것을 통해 고온에서 장시간 추출하였을 때 열에 의해 eupatilin이 파괴된다는 것을 확인할 수 있었다.

- 2차 추출한 경우 25°C에서보다 70과 80°C에서의 추출이 더 효율적이라는 것을 확인할 수 있

었다. 그러나 80°C에서는 6시간 이후에 열 변성에 의한 eupatilin 감소가 나타났으며 이를 통해 70°C에서 추출하는 것이 가장 적합하다고 할 수 있다. 전체적으로 2차 추출 시 1차 추출보다는 낮은 eupatilin 함량을 보였으나 1차의 40 - 60%의 수율을 보여 2차 추출이 필요함을 확인할 수 있었다. 이와 같은 결과를 통해 추출공정은 총 2회에 걸쳐 실시하고 1차에서는 25°C에서, 2차에서는 70°C에서 추출하는 것이 적합함을 알 수 있다.

㉔ 시료 대 추출 용매 비에 따른 지표물질의 함량

- 추출 용매량에 따른 지표물질의 함량을 확인하기 위해 강화약썩 10 g에 70% EtOH을 80, 100, 120 및 150 mL씩을 각각 가한 후 20시간 동안 25°C에서 침지하여 추출하였다. 이를 통해 얻은 추출물의 eupatilin 함량을 분석한 결과를 그림 1-35에 나타내었다.

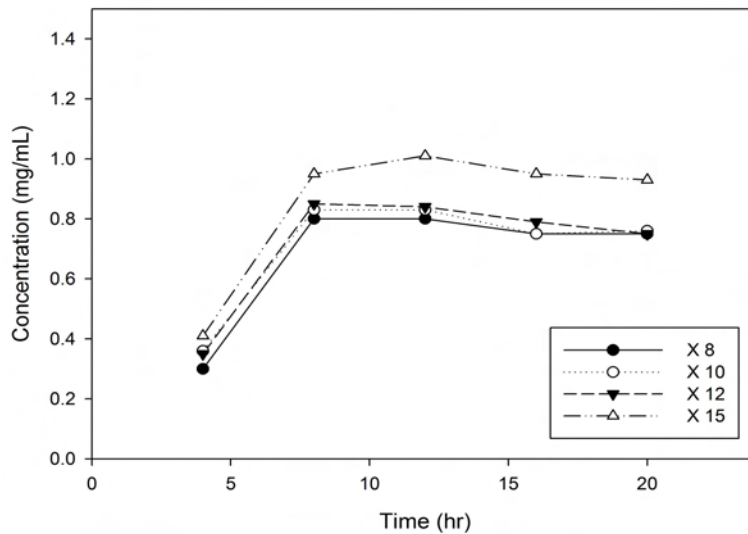


그림 1-35. 추출 용매량에 따른 eupatilin 함량

- 그림 1-35에서 볼 수 있듯이 시료 대비 15배의 용매를 이용하여 추출하였을 때 eupatilin의 함량이 가장 높게 나타나는 것을 확인할 수 있었다.



㉔ 추출 용매의 농도에 따른 지표물질 함량

- 10 g의 강화약썩에 0~95%의 농도를 달리한 EtOH 100 mL씩을 넣고 25°C에서 6시간 침지 추출하였을 때의 eupatilin 함량을 그림 1-36에 나타내었다.

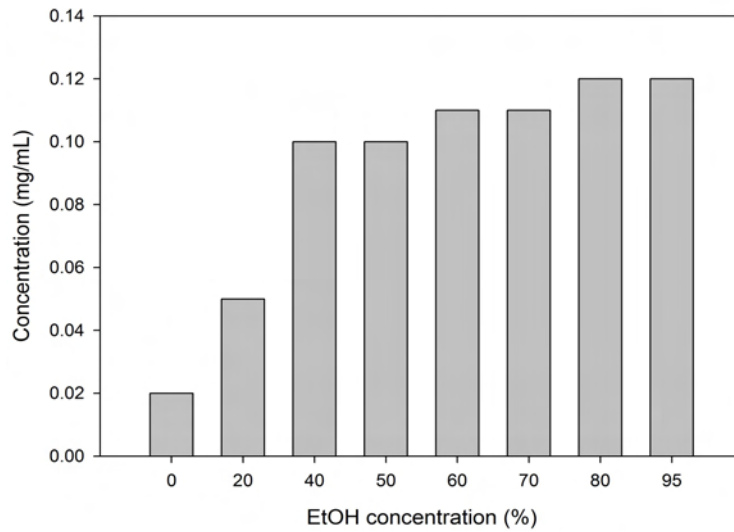


그림 1-36. 추출 용매의 EtOH 농도에 따른 eupatilin 함량

- 물(EtOH 0%)로 추출한 경우에 비해 40% 이상의 EtOH로 추출한 경우가 5배 이상 높은 eupatilin 함량을 보였으며 EtOH 농도가 증가함에 따라 eupatilin 함량도 함께 증가하는 것을 확인하였다. 이를 통해 80% 이상의 EtOH를 사용하는 것이 가장 적합하다는 것을 확인할 수 있었다.

② 강화약썩 추출물의 제조공정 조건 설정

- 상기의 최적 추출 조건을 설정을 토대로 제조공정을 그림 1-37과 같이 설계하였다.

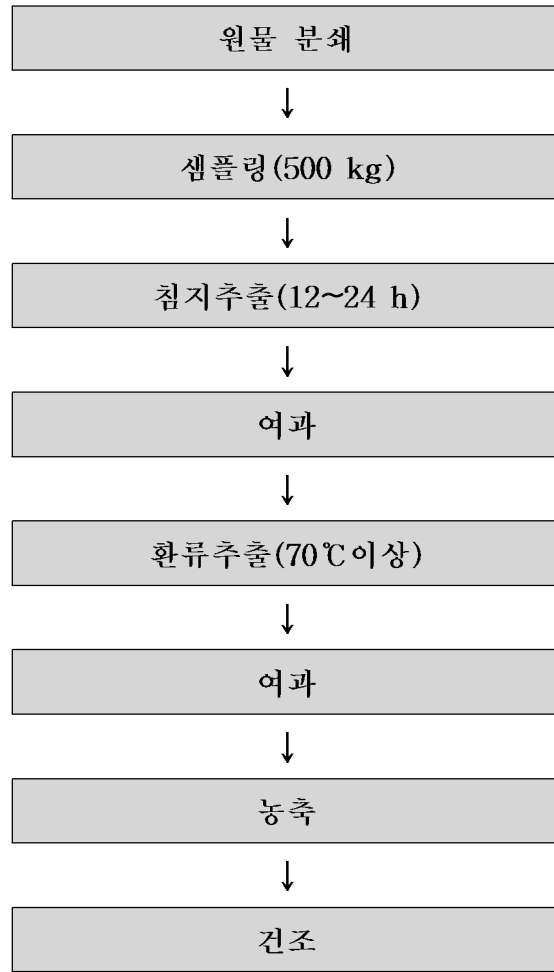


그림 1-37. 강화약썩 추출분말 제조공정도

### (3) 강화약썩 추출물 표준화 원료 scale-up 제조 연구

- Pilot-scale의 강화약썩 추출물을 제조하기 위하여 2절에서 설정한 최적 추출 조건 및 제조 공정을 바탕으로 GMP인증을 받은 기관에서 scale-up 테스트를 진행하였다.

#### (가) 강화약썩추출물 제조공정의 산업화 적용

##### ① GMP 인증 생산기관 검토

- 건강기능식품 및 원료의 제조를 위해서는 식품의약품안전청으로부터 인증을 받은 GMP (Good Manufacturing Practice; 우수건강기능식품제조기준) 생산설비에서 진행하도록 규정되어 있다. 는 소비자에게 신뢰받는 안전하고 우수한 품질의 건강기능식품을 제조하도록 하기 위한 기준으로서 작업장의 구조, 설비를 비롯하여 원료의 구입으로부터 생산·포장·출하에 이르기까지의 전 공정에 걸쳐 생산과 품질의 관리에 관한 체계적인 기준이다.

- 따라서 앞서 설계한 제조 공정을 구현할 수 있는 제조업체의 설비 등을 검토한 뒤 전라남도 나주에 위치한 제조시설을 이용하여(그림 1-38 참조) 강화약썩 표준화 원료 scale-up 테스트를 진행하였다.



그림 1-38. 원료 제조생산 설비(GMP인증업체)

② Scale-up 테스트 결과

- 앞서 설정한 제조공정에 맞추어 원물 강화약썩 500kg을 분쇄기로 갈아 생산공정에서의 표준화 원료를 제조하였다.

	Lab 설계 공정	Scale-up 공정
용매의 양	원물 15배	원물 15배
주정함량	95%	95%
추출방식	침출추출 - 환류추출	침출추출 - 환류추출
추출온도	상온 - 70도	상온 - 70도
비고		2차 추출의 추출 횟수를 조절하여 수율을 높이고자 하였음.

나. 고려인삼 원료 표준화 제조 공정 연구

(1) 특정 성분을 강화한 고려인삼 표준화 원료 제조 공정 연구

(가) 서론

- 고려인삼 (ginseng, 학명 : *panax ginseng* C.A. Meyer)은 국내 자생식물의 하나로 전통적으로 많은 질병의 치료에 쓰인 식물이다. 고려 인삼의 생리학적, 생화학적, 약리학적 가치 있으며, 항상성 유지, 학습기능 증진과 기억력감퇴 개선 및 항암작용, 항당뇨 효능 등에 대한 임상실험 결과가 보고되고 있다. 인삼의 특이적 활성 성분은 진세노사이드(ginsenosides) 또는 사포닌(saponin)으로 불리며 인삼 속 식물에만 존재한다. 이는 독성이 없는 중성 배당체로서 약리작용을 나타낸다. 고려 인삼의 뿌리에는 30여 가지가 넘는 ginsenosides가 존재하고 있으며 aglycone의 차이에 따라서 protopanaxadiol과 protopanaxatriol group으로 나뉘게 된다. protopanaxadiol group에는 ginsenoside Ra, Rb, Rc, Rd, Rg3, Rh, Rs가 포함되며, protopanaxatriol group에는 ginsenoside Re, Rf, Rg1, Rg2, Rh1이 포함된다. 인삼에서 자연적으로 발생하는 major ginsenosides는 총 ginsenosides의 80% 이상을 차지하며, Rb1, Rb2, Rc, Rd, Rd, Rg1이 포함된다. 하지만 이는 섭취 후에 장내에서 흡수가 낮다고 보고되어 있다. 최근의 연구 결과에 따르면, 섭취된 major ginsenosides는 장내 미생물에 의해서 대사 작용이 일어나게 되고 deglycosylation된 ginsenoside는 보다 쉽게 혈액내로 흡수된다고 밝혔다. 이를 minor ginsenosides로 분류하며 F2, Rg3, Rh1, Rh2, GPD 등이 포함된다. GPD(20-O-β-(D-glucopyranosyl)-20(S)-protopanaxadiol)는 최근에 생물학적으로 항종양성, 항면역성, 항알러지성이 밝혀지며 minor ginsenoside로의 분해과정을 거쳐 흡수율도 높다고 알려졌다. 따라서 본 연구에서는 GPD 성분이 강화된 인삼 원료 제조공정을 최적화하기 위하여 건삼으로부터 ginsenosides의 추출 공정을 최적화하고 Rb1, Rb2, Rc, Rd가 강화된 인삼 추출물을 산, 열처리 및 효소처리를 통하여 GPD 성분이 강화된 인삼 원료를 제조하는 가공 공정을 최적화 연구를 수행하였다.

(나) 연구방법

① 실험 재료 및 사용

본 실험에서 사용한 인삼은 충북 인삼농협에서 건삼 형태의 4년근 인삼을 구입하였다. Ginsenoside Rb1, Rb2, Rc, Rd, F2, GPD의 표준품은 ChromaDex(Irvine, CA, USA)에서 구입하여 분석하였다.

② 국내 자생식물의 원료 가공 공정 최적화

㉞ 인삼으로부터 유용물질 탐색 및 분석방법 확립

- Ginsenoside Rb1, Rb2, Rc, Rd로부터 GPD가 형성되는 경로는 Rb1, Rb2, Rc → Rd → F2 → GPD로 알려져 있다(그림 1-39). 이를 지표물질로 삼아 분석방법을 확립하였다.

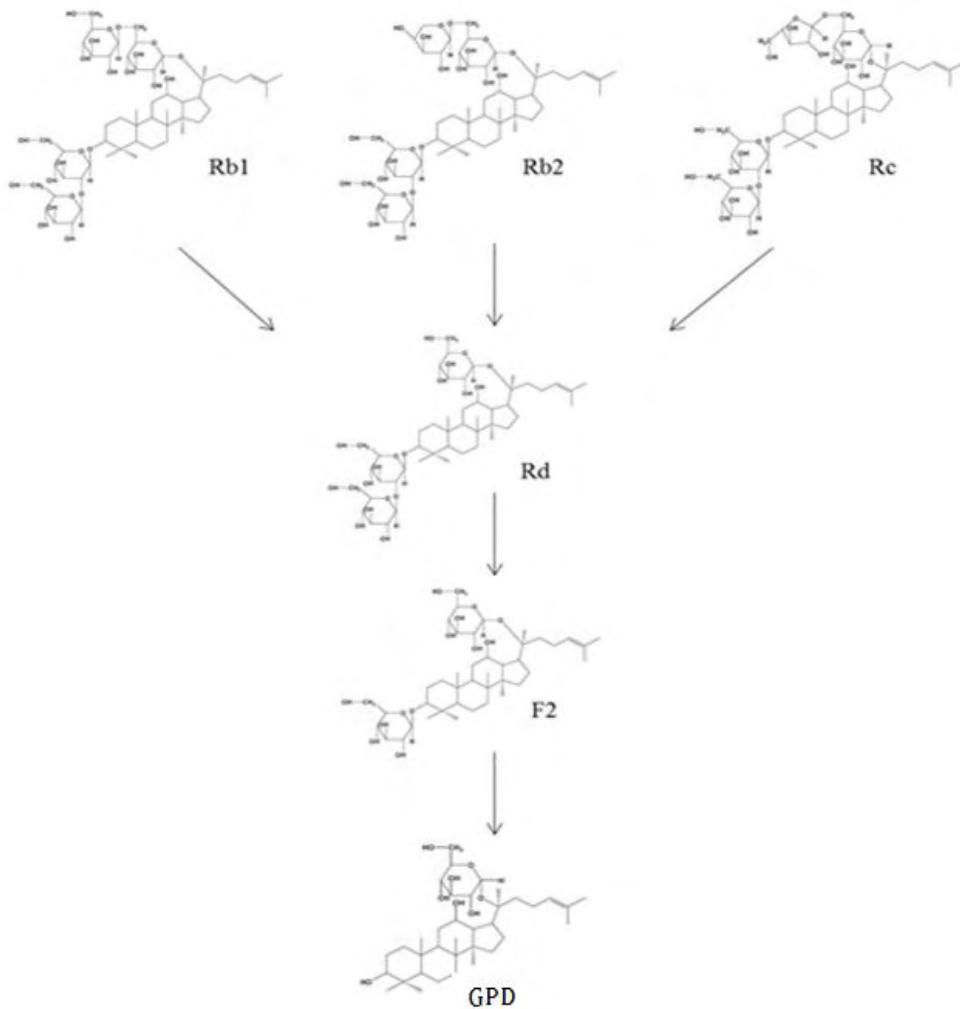


그림 1-39. Rb1, Rb2, Rc, Rd에서 GPD의 생성 경로

㉔ 인삼으로부터 유용물질 추출 조건 최적화

- 분말 상태의 인삼으로부터 Rb1, Rb2, Rc, Rd의 함량이 높은 인삼 추출액을 얻기 위해서 인삼 분말의 입자 크기, 용매와 시료의 비, ethanol 농도, 추출온도와 추출시간에 따른 추출 효율을 비교하였다. 추출과정이 모두 끝난 후의 샘플은 모두 10°C에서 12,000xg로 원심분리를 한 후에 상층액을 HPLC(600S controller, Waters, Milford, MA, USA)를 이용하여 ginsenoside 함량을 분석하였다.

1) 입자 크기에 따른 추출 효율

- 인삼 분말가루를 pore size가 다른 sieve(>500, 250-500, ≤250 μm)를 이용하여 크기별로 선별된 시료를 70% ethanol 30 mL에 넣어 60°C에서 8시간동안 추출하고 ginsenoside Rb1, Rb2, Rc, Rd의 함량을 분석하였다.

2) 용매 대 시료비에 따른 추출 효율

- 용매 대 시료비의 효과를 알아보기 위하여 3 mg의 건조된 인삼 분말에 70% ethanol을 각각 15, 30, 60, 90, 150 mL 첨가하고 60°C에서 8시간 동안 추출하여 ginsenoside Rb1, Rb2, Rc, Rd의 함량을 분석하였다. 즉, 시료와 용매의 비를 각각 1:5, 1:10, 1:15, 1:20, 1:30, 1:50의 비율로 하여 용매비에 따른 추출의 조건을 HPLC로 분석하였다.

3) 에탄올 농도에 따른 추출 효율

- 추출용매인 에탄올의 농도를 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100%로 달리 하여 60°C에서 8시간동안 추출하고 ginsenoside Rb1, Rb2, Rc, Rd의 함량을 분석하였다.

4) 온도에 따른 추출 효율

- 3 g의 분말화된 인삼(particle size ≤250 μm)을 30 mL의 70% 에탄올에 넣고 다른 온도를 달리 하여 추출하였다. 에탄올의 끓는점이 70°C이기 때문에 1기압에서 추출 온도를 30, 40, 50, 60, 70°C로 달리 설정하여 8시간 동안 추출하였다.

5) 추출 시간에 따른 추출 효율

- 추출시간의 영향을 알아보기 위해서 48시간까지 모니터링하면서 ginsenoside Rb1, Rb2, Rc, Rd의 함량을 확인하였다. 샘플링의 간격은 0.5, 1, 4, 12, 24, 48시간 간격으로 수행하였다. 3 g의 분말화된 인삼(particle size ≤250 μm)을 30 mL의 70% 에탄올에 넣고 60°C에서 추출하였다.

㉔ 추출물에 대한 산/열처리 및 효소처리 등 2차 가공에 의한 효과 탐색

- GPD가 강화된 인삼 음료를 만들기 위해서 Rb1, Rb2, Rc, Rd가 다량 함유된 인삼 추출액에 산 처리를 하거나 효소를 처리하여 당 분해 반응을 일으켰다. 산 처리의 경우에는 acetic acid를 각각 0.5, 1, 2, 4%(v/v)으로 처리하였다. 인삼 추출액 1 mL에 10 mL의 탈이온화된 물을 첨가한 후에 95°C에서 100 rpm으로 water bath 안에서 열처리 후에 acetic acid를 첨가하였다. 효소 처리의 경우, 문헌 조사를 통해서 major ginsenoside를 minor ginsenoside로 전환하는 효소를 검색하였다. 그 결과  $\beta$ -glucosidase 활성을 가진 *Aspergillus niger* 유래의 효소가 가장 전환률이 높다고 알려져 있다. 향후 산업적 적용을 고려하여 상업용 효소 중  $\beta$ -glucosidase를 탐색하였으나 단일 성분으로는 존재하지 않아서  $\beta$ -glucosidase 활성을 가진 펙틴분해효소를 이용하였다. 상업적 펙틴분해효소로는 Pectinesterase (PE), Polygalacturonase (PG), Endopectin lyase (PL) 등이 있고 주로 hemicellulase,  $\beta$ -glucosidase의 혼합물로 구성되어있다.

㉕ 추출물에 대한 2차 가공 공정 최적화

- 일반적으로  $\beta$ -glucosidase가 ginsenoside Rb1, Rb2, Rc, Rd로부터 당 가수분해 과정을 거쳐서 GPD로 전환된다. 다양한 상업용 펙틴분해효소를 대상으로  $\beta$ -glucosidase activity 실험을 수행하여 활성이 높은 효소를 선정하였다.

1) 효소 선정

-  $\beta$ -glucosidase activity가 높다고 알려진 상업용 효소의 GPD의 생산능 실험을 실시하였다. 각각 효소의 활성 범주 안에 포함되는 조건(그림 1-40)에서 pre-screening 실험을 실시하였다.

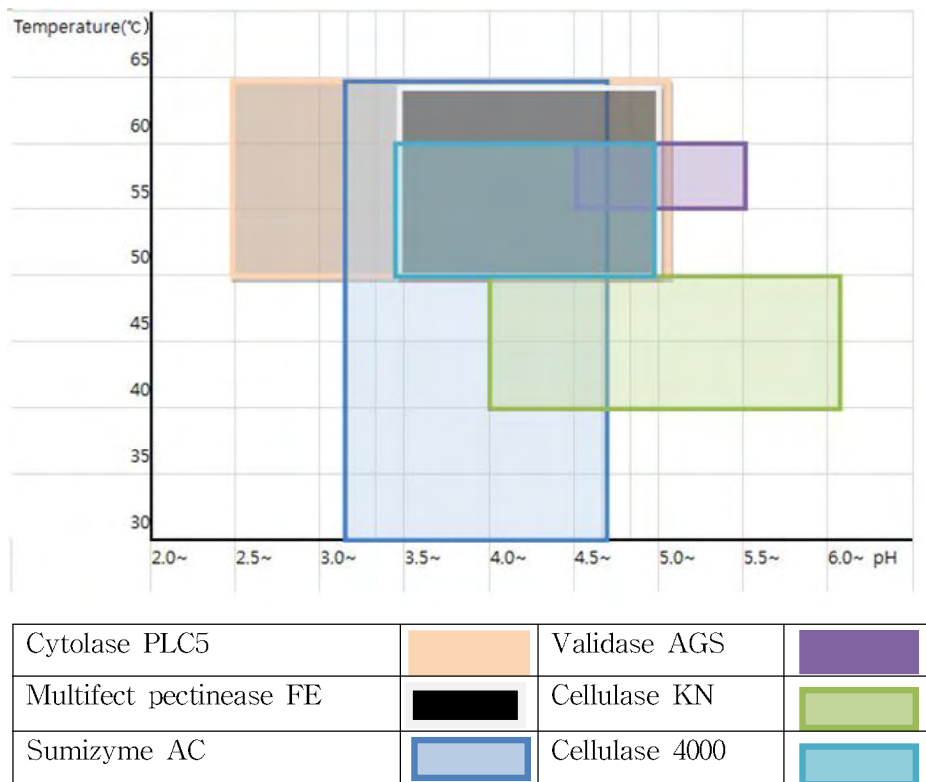


그림 1-40.  $\beta$ -glucosidase 활성을 지닌 효소의 pre-screening

- 활성범위에 해당하는 온도와 pH의 중간범위에서 pre-screening test를 실시하였다. 각각 50, 55, 60°C에서 pH 3.6, 4.3, 5.0에서 효소반응을 시켰다. 효소 반응 실험은 인삼 추출액을 7°brix로 맞춘 후에 citric acid buffer를 이용하여 pH를 조정하였다. 각각의 효소를 2%(v/v) 첨가한 후에 50-60°C, 120 rpm의 water bath(BS-11, Jeotech, Seoul, Korea)에서 96시간까지 반응시켰다.

2) 반응표면분석 (Response Surface Methodology, RSM)

- 인삼 추출물에 대해 효소 처리의 최적화 조건을 결정하기 위해서 반응표면분석법을 사용하였다. 독립변수는 온도, pH, 시간으로 설정하고 종속변수는 GPD의 농도로 하였고 변수 수준은 예비 실험을 통하여 표 1-8과 같은 조건으로 나누었다. Box-Behnken법을 사용하여 RSM을 설계하였다(표 1-9).

Level	Time (hour)	Temperature (°C)	pH	$x_1$	$x_2$	$x_3$
High	84	60	5.0	(+1)	(+1)	(+1)
Center	78	55	4.3	(0)	(0)	(0)
Low	72	50	3.6	(-1)	(-1)	(-1)

표 1-8. 독립 변수와 변수 수준

Standard Order	Time (hour) $x_2$	Temperature (°C) $x_2$	pH $x_3$
1	72(-1)	50(-1)	4.3(0)
2	84(+1)	50(-1)	4.3(0)
3	72(-1)	60(+1)	4.3(0)
4	84(+1)	60(+1)	4.3(0)
5	72(-1)	55(0)	3.6(-1)
6	84(+1)	55(0)	3.6(-1)
7	72(-1)	55(0)	5.0(+1)
8	84(+1)	55(0)	5.0(+1)
9	78(0)	50(-1)	3.6(-1)
10	78(0)	60(+1)	3.6(-1)
11	78(0)	50(-1)	5.0(+1)
12	78(0)	60(+1)	5.0(+1)
13	78(0)	55(0)	4.3(0)
14	78(0)	55(0)	4.3(0)
15	78(0)	55(0)	4.3(0)

표 1-9. 효소 처리 조건의 최적화를 위한 Box-Behnken design

- 독립변수가 3개의 인자이므로 multiple regression procedure에 의해서 2차 함수 방정식 (second-order polynomial equation)을 적용하였다.

$$Y = \alpha_0 + \alpha_1 X_1 + \alpha_2 X_2 + \alpha_3 X_3 + \alpha_{11}^2 X_1^2 + \alpha_{22} X_2^2 + \alpha_{33} X_3^2 + \alpha_{12} X_1 X_2 + \alpha_{13} X_1 X_3 + \alpha_{23} X_2 X_3$$

- Y는 예측되는 값이며  $\alpha_0$ 는 절편(intercept),  $\alpha_1, \alpha_2, \alpha_3$ 은 linear coefficients,  $\alpha_{11}, \alpha_{22}, \alpha_{33}$ 은 squared coefficients를  $\alpha_{12}, \alpha_{13}, \alpha_{23}$ 은 interaction coefficients를 나타낸다.



(다) 연구결과

① 인삼으로부터 유용물질 탐색 및 분석방법 확립

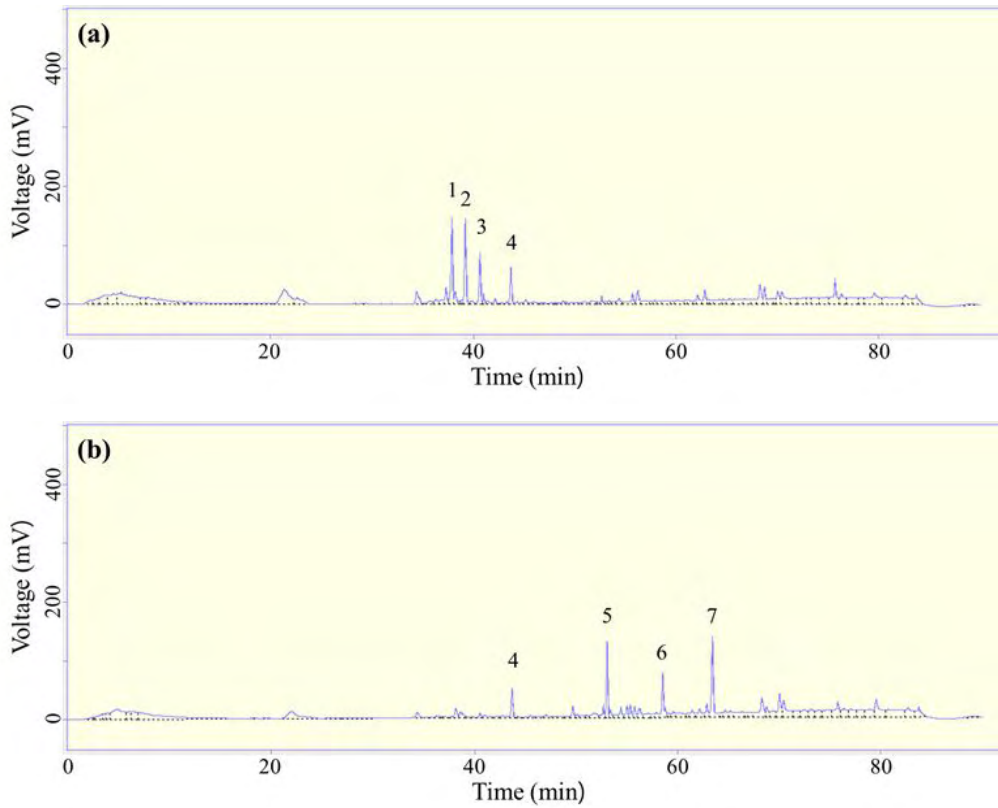
- 다양한 ginsenosides중에서 보다 유용한 물질인 major ginsenosides의 Rb1, Rb2, Rc, Rd의 함량과 이것들이 당 가수분해하여 만들어지는 GPD의 함량, GPD의 전 단계 분해 산물인 F2의 함량과 홍삼에 주요 ginsenoside로 밝혀진 Rg3의 함량을 HPLC로 분석하였다. 모든 시료는 동일용량의 수포화 부탄올(water saturated butanol)을 넣어 분획 후에 0.45  $\mu$ m 크기의 필터로 필터링을 한 후 injection 하였다. HPLC의 분석 조건은 acetonitrile이 많을수록 ginsenoside가 더 많이 용출되는 특성을 이용하여 물과 acetonitrile의 농도를 달리하여 분석 조건을 확립하였다. 인삼추출액을 제조할 때 GPD의 주요 기질로 작용하는 유용물질인 Rb1, Rb2, Rc, Rd의 함량을 신속히 분석하기 위해서 50분 이내의 짧은 시간동안 분석하는 분석 방법을 확립하였다. 산 및 열처리 과정을 통해서는 60분 이내에 Rg3와 GPD의 peak를 나타낼 수 있는 조건을 확립하였고 Rb1, Rb2, Rc, Rd, Rg3, F2, GPD의 함량을 동시에 분석할 수 있는 조건 또한 확립하였다.

- 표 1-10과 같은 조건으로 90분 동안 분석 처리한 결과 각각의 retention time은 다음과 같았다. 샘플과 표준품을 섞어 최종 테스트(스파이크 테스트)를 한 결과 Rb1은 38.02분, Rb2는 40.86분, Rc는 39.43분, Rd는 44.04분, Rg3은 S form과 R form이 각각 56.27분, 56.79분, GPD는 63.90분으로 나타났다.

<b>Column</b>	C18 column (4.6 x 250 mm, 5 $\mu$ m, 100Å)		
<b>Temperature</b>	30°C		
<b>Detector</b>	UV 203nm		
<b>Flow</b>	1.6 mL/min		
<b>Mobile phase</b>	Targets: Rb1, Rb2, Rc, Rd		
	<b>Time(min)</b>	<b>Water(%)</b>	<b>Acetonitrile(%)</b>
	0.00	80	20
	10.00	80	20
	20.00	76	24
	23.00	73	27
	45.00	60	40
	46.00	80	20
	55.00	80	20
<b>Mobile phase</b>	Targets: Rg3, GPD		
	<b>Time(min)</b>	<b>Water(%)</b>	<b>Acetonitrile(%)</b>
	0.00	65	35
	10.00	65	35
	40.00	35	65
	45.00	0	100
	55.00	0	100
	56.00	65	35
	70.00	65	35
<b>Mobile phase</b>	Targets: Rb1, Rb2, Rc, Rd, Rg3, GPD		
	<b>Time(min)</b>	<b>Water(%)</b>	<b>Acetonitrile(%)</b>
	0.00	80	20
	10.00	80	20
	20.00	76	24
	23.00	73	27
	45.00	60	40
	65.00	30	70
	80.00	0	100
	80.01	80	20
90.00	80	20	

표 1-10. HPLC 조건

- 2차 처리하지 않은 인삼을 분석한 결과 그림 1-41 (a)와 같이 나타났다. 4개의 major ginsenosides (Rb1, Rb2, Rc, Rd)의 retention time은 각각 38.0, 39.4, 40.9, 44.0분으로 나타났다.



\*1: ginsenoside Rb1, 2: Rc, 3: Rb2, 4: Rd, 5: F2, 6: unknown, 7: GPD

그림 1-41. 인삼 추출액의 HPLC 분석 결과 (a) raw white ginseng extract, (b) enzymatic treatment in raw white ginseng extract

② 인삼으로부터 유용물질 추출 조건 최적화

㉠ 입자 크기에 따른 추출 효율

- 그림 1-42에서 볼 수 있듯이 입자의 크기가 작아질수록 ginsenoside의 추출 수율이 높은 것을 확인할 수 있었다. 인삼분말의 입자 크기가 250  $\mu\text{m}$  이하인 경우에 추출수율이 가장 높았으며 이 때 Rb1 함량은  $11.668 \pm 0.013$  (mg/g ginseng), Rb2는  $4.124 \pm 0.092$  (mg/g ginseng), Rc는  $8.206 \pm 0.240$  (mg/g ginseng) Rd는  $2.028 \pm 0.121$  (mg/g ginseng)으로 총 Rb1, Rb2, Rc, Rd는  $26.025 \pm 0.440$  (mg/g ginseng)이었다. 따라서 250  $\mu\text{m}$  이하의 입자 크기를 지니고 있는 분말상태의 인삼을 이후의 실험에서 사용하였다.

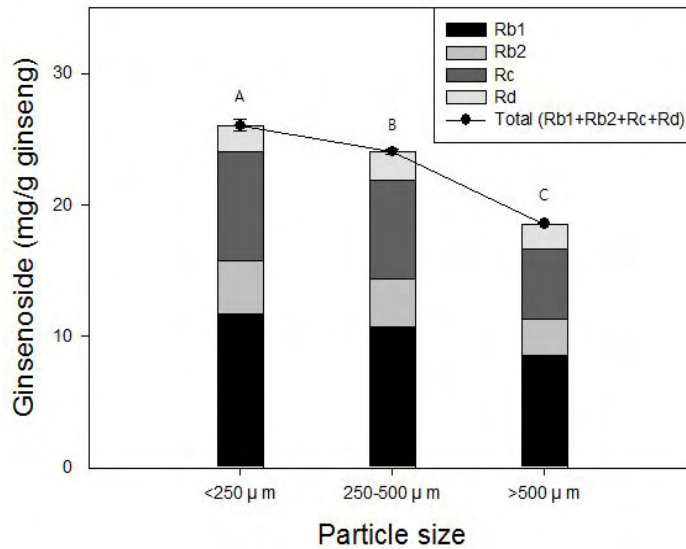


그림 1-42. 인삼 뿌리의 입자 크기에 따른 기질(Rb1, Rb2, Rc, and Rd)의 추출 수율

㉔ 용매와 시료비에 따른 추출 효율

- 인삼분말 대 에탄올 용매의 비율을 달리한 실험 결과(그림 1-43)를 보면 1:5일 때 ginsenosides의 함량이 가장 낮았다. 시료 대비 에탄올의 비율이 높을수록 총 ginsenosides의 함이 소폭으로 증가하였다. 1:10의 비율일 때와 1:50의 비율일 때를 비교하여 보면 총 ginsenosides의 함은 각각 29.164 (mg/g ginseng)과 30.334±0.200 (mg/g ginseng)으로 큰 차이를 나타내지 않았다. 따라서 경제성을 고려하여 시료와 용매비는 1:10으로 결정하였다.

그림 1-43. 시료 대 용매 비에 따른 기질(Rb1, Rb2, Rc, and Rd)의 추출 수율

㉔ 에탄올 농도에 따른 추출 효율

- 에탄올 농도에 따른 추출 효율의 결과는 그림 1-44와 같다. 순수한 물로 추출했을 경우에 Rb1은  $10.821 \pm 0.105$  (mg/g ginseng), Rb2는  $3.569 \pm 0.071$  (mg/g ginseng), Rc는  $7.393 \pm 0.075$  (mg/g ginseng), Rd는  $1.715 \pm 0.001$  (mg/g ginseng)로 총 ginsenosides의 함량은  $23.498 \pm 0.252$  (mg/g ginseng)이었다. 에탄올의 농도가 증가할수록 총 ginsenosides의 함량도 증가하는 결과를 나타냈으며, 에탄올의 농도가 100%일 때에는 추출 수율이 급격하게 떨어지는 것을 확인할 수 있었다. 에탄올의 농도가 90%일 때의 수율이 가장 높은 것을 나타내었으며 이때 Rb1은 13.834 (mg/g ginseng), Rb2는 4.846 (mg/g ginseng), Rc는 9.608 (mg/g ginseng), Rd는 2.590 (mg/g ginseng)으로 총 ginsenosides의 함량은 30.878 (mg/g ginseng)으로 나타났다. 따라서 본 결과에 의하면 추출 시 90%의 에탄올 농도가 바람직하다고 볼 수 있다.

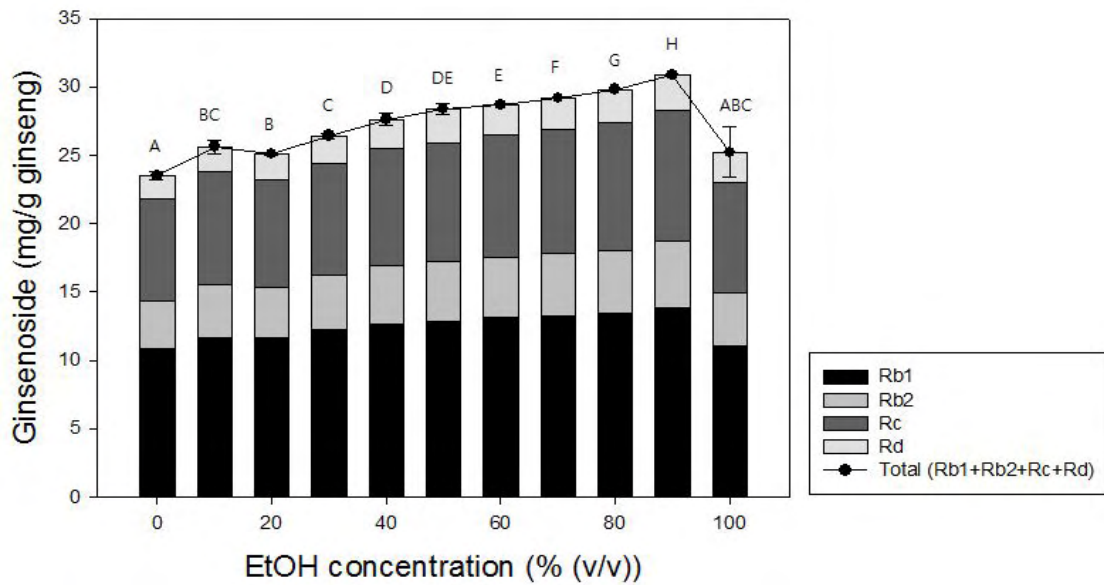


그림 1-44. 에탄올 농도에 따른 기질(Rb1, Rb2, Rc, and Rd)의 추출 수율

㉔ 온도에 따른 추출 효율

- 그림 1-45에서 살펴보면 온도가 높을수록 4개의 ginsenosides 모두의 추출 수율이 높았다. 추출 온도가 30°C일 때 Rb1은 10.438 (mg/g ginseng), Rb2는 3.103 (mg/g ginseng), Rc는 6.729 (mg/g ginseng), Rd는 1.417 (mg/g ginseng)으로 총 ginsenosides의 합은 21.686 (mg/g ginseng)인 반면에 추출온도가 70°C일 때에는 Rb1이 13.252 (mg/g ginseng), Rb2는 4.570 (mg/g ginseng), Rc는 9.069 (mg/g ginseng), Rd는 2.273 (mg/g ginseng)으로 각각의 기질 모두 추출 함량이 증가하여 총 ginsenoside의 함량은 29.164 (mg/g ginseng)로 가장 높은 값을 나타내었다.

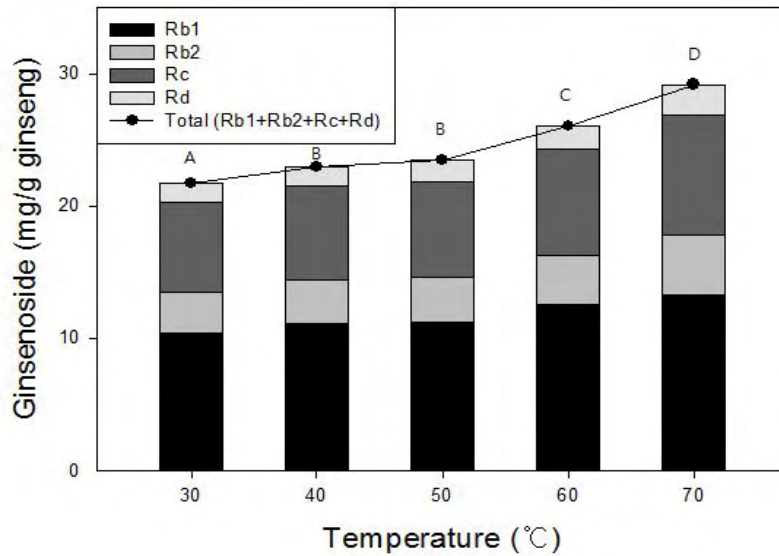


그림 1-45. 온도에 따른 기질(Rb1, Rb2, Rc, and Rd)의 추출 수율

㉔ 추출 시간에 따른 추출 효율

- 그림 1-46에서 볼 수 있듯이 추출 시간이 증가할수록 총 ginsenoside의 함량이 높아졌다. 총 추출 시간이 48시간일 때 총 ginsenosides의 함량이  $49.645 \pm 0.952$  (mg/g ginseng)으로 가장 높은 양을 나타냈다. 그러나 추출 시간이 24시간일 때는 총 ginsenosides의 함량이  $45.890 \pm 2.616$  (mg/g ginseng)으로 48시간의 최대 수율일 때의 값과 비교하면 90%의 추출 수율을 나타내었다. 따라서 산업적 관점으로 살펴보면 추출시간 증가에 들어가는 에너지 소모량이 크므로 24시간 동안만 추출하는 것이 더 효율적이다.

그림 1-46. 추출 수율에 따른 기질(Rb1, Rb2, Rc, and Rd)의 추출 수율

- 따라서 위의 결과를 종합하여 보면, 분말 상태의 인삼으로부터 Rb1, Rb2, Rc, Rd의 함량이 높은 인삼추출액을 만들기 위한 최적의 추출 조건은 입자 크기는  $250 \mu\text{m}$ 이하, 시료와 용매의 비가 1:10일 때, 에탄올의 농도는 90%, 추출 온도는  $70^\circ\text{C}$ , 반응 시간은 24시간 일 때이다.



③ 추출물에 대한 산/열처리 및 효소처리 등 2차 가공에 의한 효과 탐색

- 인삼 추출물에 대해서 산과 열처리를 한 결과 그림 1-47과 같이 나타났다. 시료와 표준품을 섞어 스파이크 테스트를 한 결과 Rb1, Rb2, Rc의 기질들이 Rd에서 Rg3로 생성되었으나 GDP는 형성되지 않았다. GDP와 유사한 구조의 다른 화합물이라 생각된다. Ginsenoside의 구조를 살펴보면 Rg3와 GDP의 경우 생성 pathway가 다르기 때문에 이와 같은 결과가 나온 것이라 생각된다. Rb1, Rb2, Rc에 의해서 화합물들이 생성되는 경로를 보면 그림 1-47과 같다. 아래의 경로를 살펴보면 Rb1, Rb2, Rc에서 Rd가 생성된 후에 Rg3가 형성되거나 F2가 형성되는데 산·열처리를 할 경우 Rg3의 화합물이 분해되는 경로가 더 우세한 것으로 판단된다.

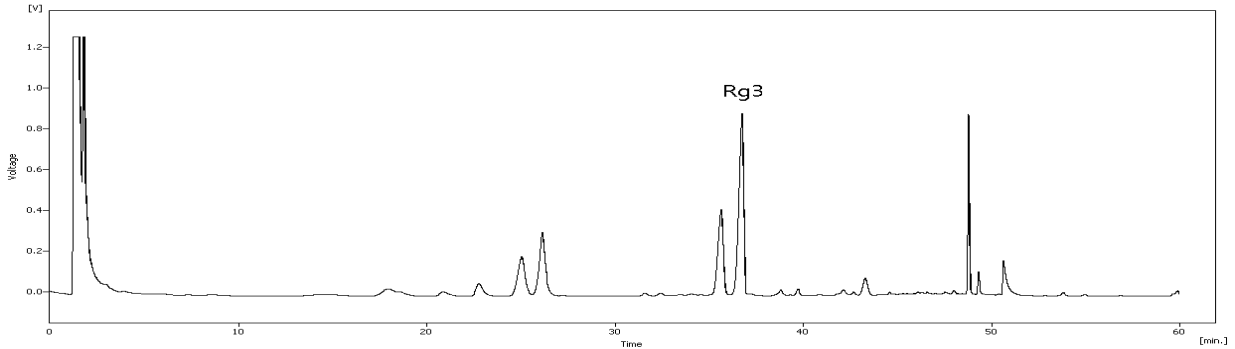


그림 1-47. 산 및 열처리한 인삼 추출물의 HPLC 분석 결과

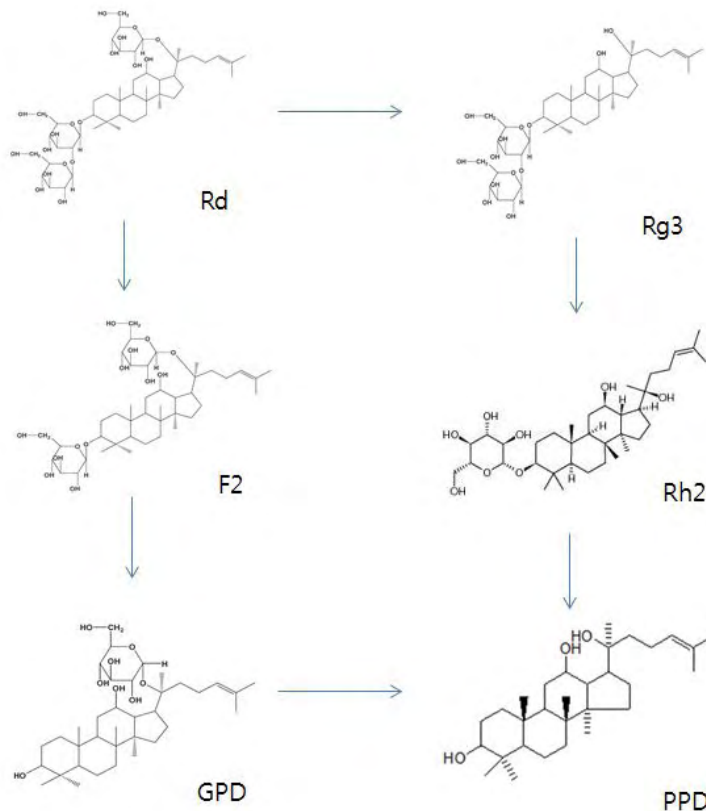


그림 1-48. 효소처리에 의하여 Rd에서 PPD까지 ginsenoside 전환 경로

- 인삼 추출액에 산처리 한 결과 그림 1-49와 같이 acetic acid의 함량이 증가할수록 Rg3의 생성이 촉진되었다. 그러나 반응시간이 증가할수록 PPD로 분해되어 그 함량이 감소한 것으로 보인다.

그림 1-49. 초산의 처리 농도에 따른 Rg3 함량

④ 추출물에 대한 2차 가공 공정 최적화

㉞ 효소 선정

-  $\beta$ -glucosidase activity가 높은 효소들 중에서 pre-screening을 통해서 GPD의 함량을 구한 결과, Cytolase PCL 5, Sumizyme AC, Validase AGS가 각각 1.174 GPD (mg/mL), 1.269 GPD (mg/mL), 0.407 GPD (mg/mL)로 다른 효소와 비교하여 높은 전환률을 나타냈다.

Enzymes	Origin of microorganism	$\beta$ -glucosidase activity	GPD yield (mg/mL)
Cytolase PCL 5	<i>Aspergillus niger</i>	38.7	1.174
Sumizyme AC	<i>Aspergillus niger</i>	22.2	1.269
Validase AGS	<i>Aspergillus niger</i>	600.6	0.407
Multifect pectinase FE	<i>Aspergillus niger</i>	52.3	-
Cellulase KN	<i>Aspergillus niger</i>	-	-
Cellulase 4000	<i>Aspergillus niger</i>	-	0.156

표 1-11. 각 효소별, 55°C, pH 4.3, 반응시간 65 시간일 때 GPD의 수율

- 따라서 이들 3가지 효소를 대상으로 각각의 활성범위로 알려진 온도(50, 55, 60°C)와 pH (3.6, 4.3, 5.0)에서 반응시킨 결과 전반적으로 Cytolase PCL5가 가장 전환률이 높았고 50°C, pH 4.3일 때 1.627 GPD (mg/mL)(그림 1-50). 따라서 최종적으로 Cytolase PCL5를 선정하였다.

그림 1-50. Cytolase PCL5, Sumizyme AC, Validase AGS 처리에 따른 GPD 수율

㉔ 반응표면분석(Response Surface Methodology. RSM)

- 반응표면분석을 실시한 결과를 표 1-12~1-15에 나타내었다.
- 실험된 결과 값 이외에 실험하지 않은 연속 변수들에서의 요인을 줄이기 위해서 각 13개의 지점에서 3회 반복하여 실험을 수행하였고 중심점은 총 9번의 실험을 실시하였다.

Standard Order	$x_1$	$x_2$	$x_3$	Y (GPD yield mg/mL)
1	(-1)	(-1)	(0)	0.957
2	(+1)	(-1)	(0)	1.038
3	(-1)	(+1)	(0)	1.368
4	(+1)	(+1)	(0)	1.343
5	(-1)	(0)	(-1)	1.040
6	(+1)	(0)	(-1)	1.107
7	(-1)	(0)	(+1)	1.417
8	(+1)	(0)	(+1)	1.344
9	(0)	(-1)	(-1)	1.214
10	(0)	(+1)	(-1)	1.081
11	(0)	(-1)	(+1)	0.795
12	(0)	(+1)	(+1)	0.870
13	(0)	(0)	(0)	1.938
14	(0)	(0)	(0)	1.946
15	(0)	(0)	(0)	2.312

표 1-12. Box-behnken 설계법과 결과

- RSM으로 얻어진 회귀방정식은 다음과 같다.

$$Y = (-144.486309) + 1.497497x_1 + 2.498052x_2 + 8.821538x_3 + (-0.009050)x_1^2 + (-0.000887)x_2x_1 + (-0.022513)x_2^2 + (-0.008333)x_3x_1 + 0.014894x_3x_2 + (-0.045750)x_3^2$$

- Y은 예상되는 GPD의 수율이며  $x_1, x_2, x_3$  각각은 효소 반응 시간, 온도, pH의 전체 반응에 대한 총 영향 정도를 나타낸다. 계수의 확인을 나타내는 모델의 R2는 0.8643으로 계산되었다. 본 실험에서의 F-value는 10.28이고, p-value는 0.0140으로 95% 이상의 신뢰 값을 나타낸다.  
 - 시간, 온도, pH의 F-value는 각각 1.39, 4.30, 3.42로 종속변수의 영향정도는 온도가 가장 큰 것으로 나타났다(표 1-13).

Factor	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Value	Pr > F
$x_1$ (Time)	4	0.399994	0.099998	1.39	0.3573
$x_2$ (Temp)	4	1.237487	0.309372	4.30	0.0707
$x_3$ (pH)	4	0.985295	0.246324	3.42	0.1047

표 1-13. 시간, 온도, pH의 F-value

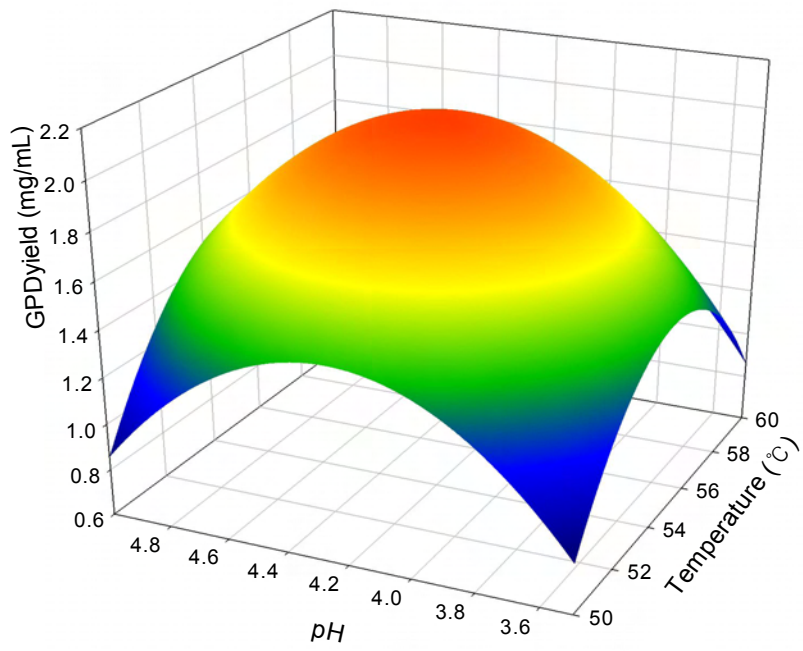
- 모델에 대한 각 변수의 영향정도를 표 1-14에 나타내었다. 온도는 p-value가 0.002 이하로 다른 요소들보다 가장 중요한 인자임을 확인하였다.

Parameter	Parameter Estimate	Standard Error	t Value	Pr >  t
Intercept	2.065233	39.026411	-3.70	0.0140
$x_1$	0.006150	0.667345	2.24	0.0748
$x_2$	0.082248	0.725407	3.44	0.0184
$x_3$	-0.001924	4.081902	2.16	0.0831
$x_1^2$	-0.325816	0.003877	-2.33	0.0668
$x_2x_1$	-0.026602	0.004470	-0.20	0.8506
$x_2^2$	-0.562837	0.005583	-4.03	0.0100
$x_3x_1$	-0.035000	0.031928	-0.26	0.8045
$x_3x_2$	0.052129	0.038314	0.39	0.7135
$x_3^2$	-0.512418	0.284846	-3.67	0.0144

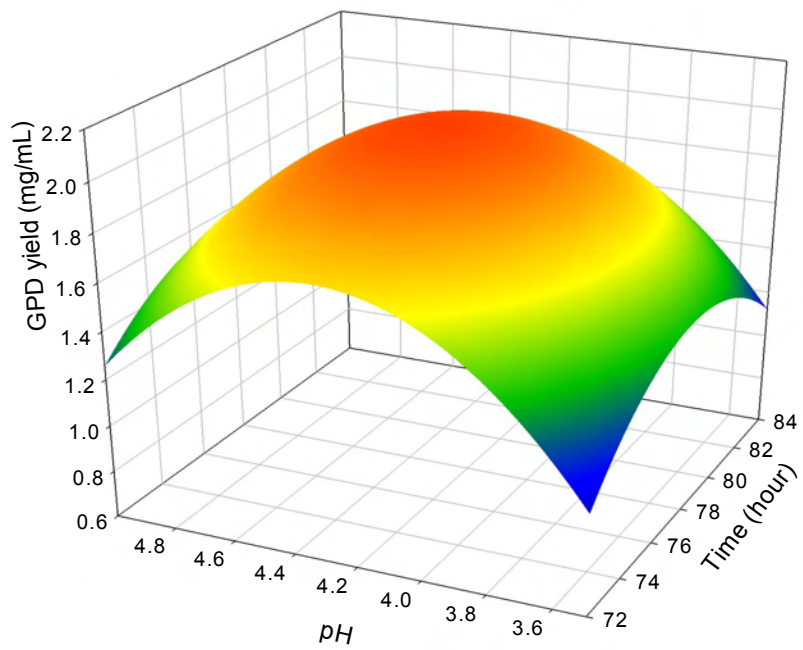
표 1-14. 최소자승법과 The least-squares fit and 변수 추정

- 3개 변수의 반응표면곡선은 그림 1-51과 같았다. 한 인자를 zero level로 고정시키고 다른 2개의 인자에 따른 GPD의 수율을 그래프로 나타내었다.

(a)



(b)



(c)

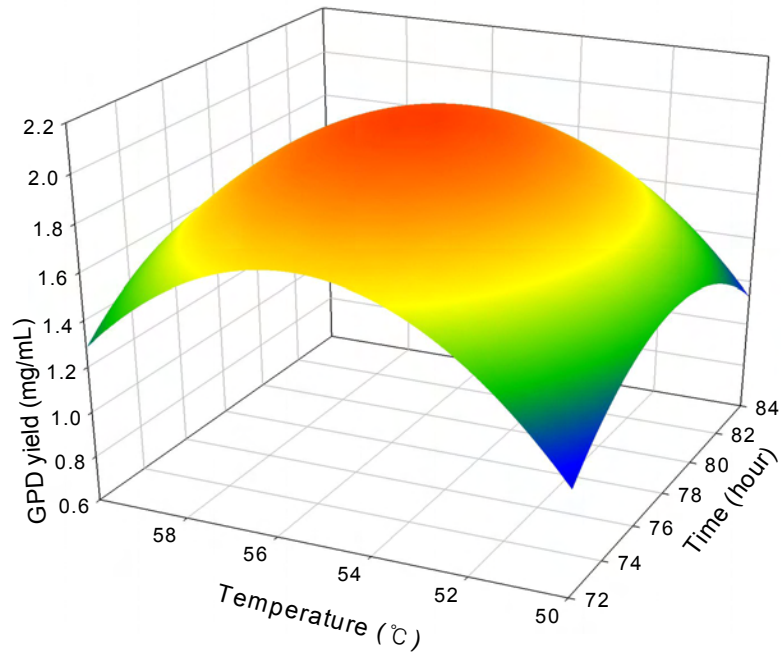


그림 1-51. 반응표면곡선 (a) pH와 온도, (b) pH와 시간, (c) 온도와 시간

- 실험변수의 최적값은 온도 55.36°C, 78시간, pH 4.30으로 나타났다. 이때의 Y = 2.068 mg/mL(GPD yield)이었다(표 1-15).

Factor	Optimum condition
$x_1$ (temperature)	55.36
$x_2$ (time)	78.05
$x_3$ (pH)	4.30
Predicted value at stationary point: 2.068 mg/mL(GPD yield)	
Stationary point is a maximum	

표 1-15. 최적값과 GPD의 예측값

- 최적조건에서 검증 실험한 결과 GDP 수율은 2.065±0.175 mg/mL(GPD yield)로 나타났다. p-value는 0.001로 유의적 차이가 없었다.



⑤ 수율 개선을 위한 가공공정 최적화 연구

- 앞선 결과를 통해 특정 진세노사이드 성분이 강화된 인삼 원료 제조공정을 최적화 하였으며, 수율을 증대시키기 위하여 특정 성분을 더욱 강화할 수 있는지 확인하기 위한 연구를 수행하였다.

㉔ 효소처리에 의한 인삼 GPD 강화 소재

1) 연구 목적

- 인삼 추출물 속에는 다양한 major 또는 minor ginsenoside가 존재하지만 이 중 생물학적인 기능적 측면에서 GPD의 가치가 크다고 생각되므로, 이전 연구에 의해 추출된 인삼 추출물로부터 GPD의 성분이 더욱더 강화된 소재를 얻기 위해 효소에 의한 전환 조건을 찾으려 하였다. Cytolase PCL5라는 β-glucosidase 기능을 가진 상업 효소를 선택하여 GPD의 함량을 최대화 할 수 있는 최적화된 조건을 연구하여 확인하였고, 추가적으로 Cytolase PCL5 이외의 다른 효소를 사용하여 인삼추출물로부터 GPD 함량을 높인 소재를 높일 수 있는지 확인하기 위한 추가실험을 실시하였다.

2) 연구 방법

가) Sumilact L

- 이 효소는 Aspergillus oryzae에서 기원한 β-galactosidase가 주성분이며, 유당(lactose)을 분해하여 포도당(glucose)과 갈락토오스(galactose)를 유리시켜 lactose free 유제품을 제조하는데 사용된다. 알려진 최적조건은 50-55°C, pH 4.0-7.0이다.

- 효소 처리방법

- 온도: 50°C
- pH: 4.0, 5.0, 6.0, 7.0
- 반응시간: 0, 2, 4, 8, 12, 18, 24, 30, 36, 48, 54, 60, 72시간

- HPLC 조건

- HPLC 조건은 표 1-16과 같다.

<b>Column</b>	Venusil XBP C18 (4.6 mm x 250 mm, 5 μm, 100 Å)		
<b>Temperature</b>	30°C		
<b>Detector</b>	UV 203 nm		
<b>Flow</b>	1.6 mL/min		
<b>Mobile phase</b>	Targets: Rb1, Rb2, Rc, Rd		
	<b>Time(min)</b>	<b>Water(%)</b>	<b>Acetonitrile(%)</b>
	0.00	80	20
	10.00	80	20
	20.00	76	24
	23.00	73	27
	45.00	60	40
	46.00	80	20
	55.00	80	20

표 1-16. HPLC 조건

- Ginsenoside 함량 (7° brix)

● 7° brix 추출물 내의 ginsenoside의 함량은 표 1-17과 같다.

	농도(mg/mL)				합계 (Rb1+Rb2+Rc+Rd)
	Rb1	Rc	Rb2	Rd	
평균	1.608	1.276	0.788	0.538	4.210
표준편차	0.065	0.030	0.014	0.025	0.108

표 1-17. 7° brix 추출물 내 ginsenoside 함량

3) 연구 결과

- Sumilact L

● pH에 따른 ginsenosides(Rb1, Rc, Rb2, Rd)의 전환

○ 그림 1-52는 pH 변화(4.0, 5.0, 6.0, 7.0)에 따라 ginsenoside(Rb1, Rc, Rb2, Rd)가 전환되는 경향을 나타낸다. 먼저 pH가 낮을수록 해당 효소반응 시간이 길어짐에 따라 네 가지 ginsenoside들의 총량이 더 줄어드는 양상을 확인할 수 있었다. 특히, 효소반응 후 72시간에서의 총량을 비교하면 0.9156 mg/mL(pH 4.0) > 1.8039 mg/mL (pH 5.0) > 2.5066 mg/mL (pH 6.0) > 2.9225 mg/mL (pH 7.0) 인 것을 확인할 수 있다. 이는 앞서 언급한 바와 같은 맥락으로, pH 4.0에서 네 가지의 major ginsenoside가 가장 많이 전환된 것이라 할 수 있다. 다른 인자와 동시에 고려하여 최적화된 pH는 아니지만, Sumilact L의 최적 pH 범위라 알려진 pH 4.0-7.0 내에서는 pH 4.0이 major ginsenoside를 전환시키기 위해 가장 유리한 조건임을 알 수 있다.

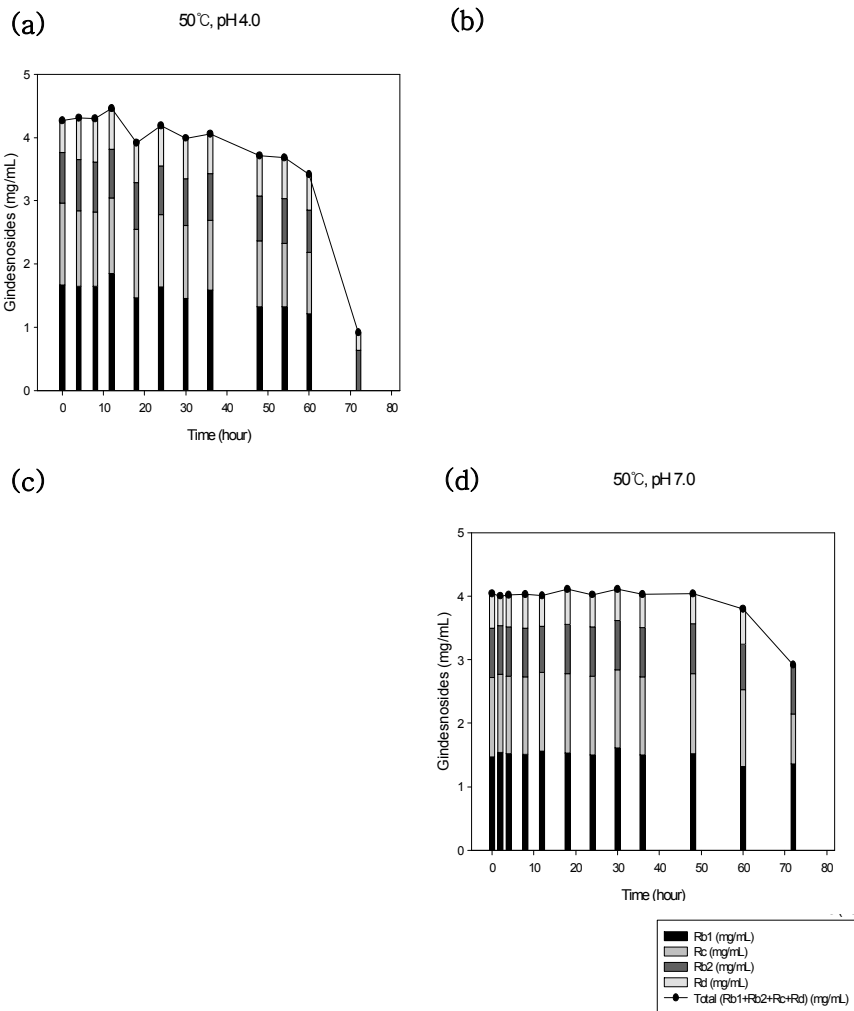
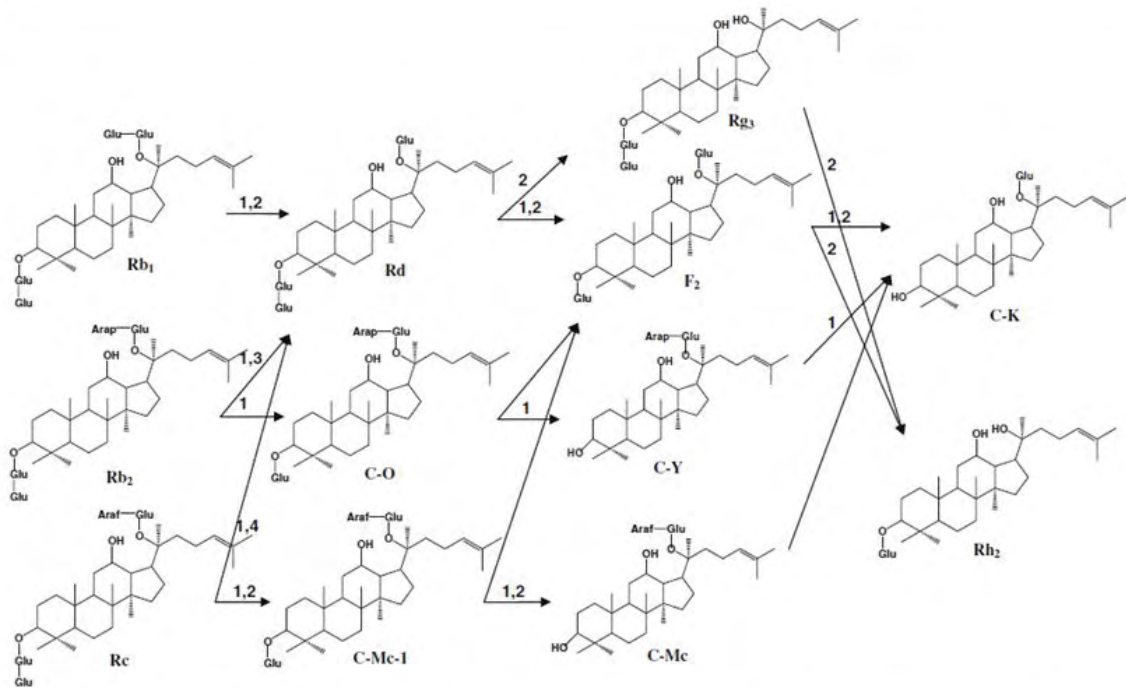


그림 1-52. pH 변화에 따른 Sumilact L에 의한 ginsenoside(Rb1, Rc, Rb2, Rd)의 전환.

○ pH 4.0 조건에서 Sumilact L가 가장 잘 작동함을 확인하였으나, 선정된 네 가지 ginsenoside(Rb1, Rc, Rb2, Rd)만을 잘 전환 한다고 하여 최종적으로 강화하고자하는 GPD의 함량이 증가한다는 말과 동일하다고 볼 순 없다. 그림 2에서 보는 것과 같이 다양한 glycoside에 의해 major ginsenoside들이 minor ginsenoside로 전환 될 수 있다. 이 과정 중 compound K로 전환되기 위한 경로가 매우 다양하고, 특히 Rg3로 전환될 경우 원하는 compound K는 생성되지 않는다. 따라서 전환된 Rb1, Rc, Rb2, Rd 등의 ginsenoside가 최종 GPD로 전환되어 추출물의 GPD 함량을 최대한 증가시키기 위해서는, 가수분해 각 단계별로 최적의 조건에서 적절한 효소를 이용하여야 한다. 하지만 이는 공정의 복잡성을 불러와 경제성이 떨어지기 때문에 적합한 방법이 아니며, 한가지의 효소를 이용하여 추출물의 GPD를 강화시키려는 우리의 목적에 부합되지 않는다.



\*출처: CS Park et al., Applied Microbiol. Biotechnol. 87(1): 9 - 19 (2010)

그림 1-53. 효소에 의한 ginsenoside의 가수분해 경로(1,  $\beta$ -D-glycosidase; 2,  $\beta$ -D-glucosidase; 3, C-MC-1 compound Mc-1, C-Y compound Y, C-Mc compound Mc, C-K GPD).

○ 앞서 언급한 것과 같이 효소에 의한 인삼 추출물의 추가적 GPD 강화는 이론적으로는 가능할 수 있으나, 연구의 복잡성과 경제성을 생각했을 때 적합한 방법이 아니라 판단된다. 따라서 추가적 GPD 강화는 현실적으로 어렵다고 판단하여 공정에서의 개선점을 도출하여 추가연구를 진행하였다.

㉔ 인삼 GPD 강화 분획소재의 공정연구

1) 기존 인삼 GPD 강화 분획소재 제조과정별 GPD 함량확인

가) 최적 조건을 바탕으로 설계한 인삼 GPD 강화 분획소재를 제조하는 공정방법이 요약된 공정도가 바로 그림 1-54이다. 이를 간단히 설명하면, 먼저 백미 삼으로부터 GPD 함량을 최대화할 수 있는 최적 조건에서 추출액을 얻어 농축한다. 그리고 GPD 강화의 최적화된 조건에서 효소반응을 하여 GPD를 강화시킨 후 효소를 불활성화 시켜 강화 추출물을 농축시킨다. 그 후에 흡착수지에 의한 필터링 과정을 거쳐 각각 물과 주정에 씻긴 물질을 분리하고, 주정에 의해 씻긴 물질을 농축하여 동결건조 함으로써 GPD 강화 분획 소재의 분말을 얻을 수 있다.

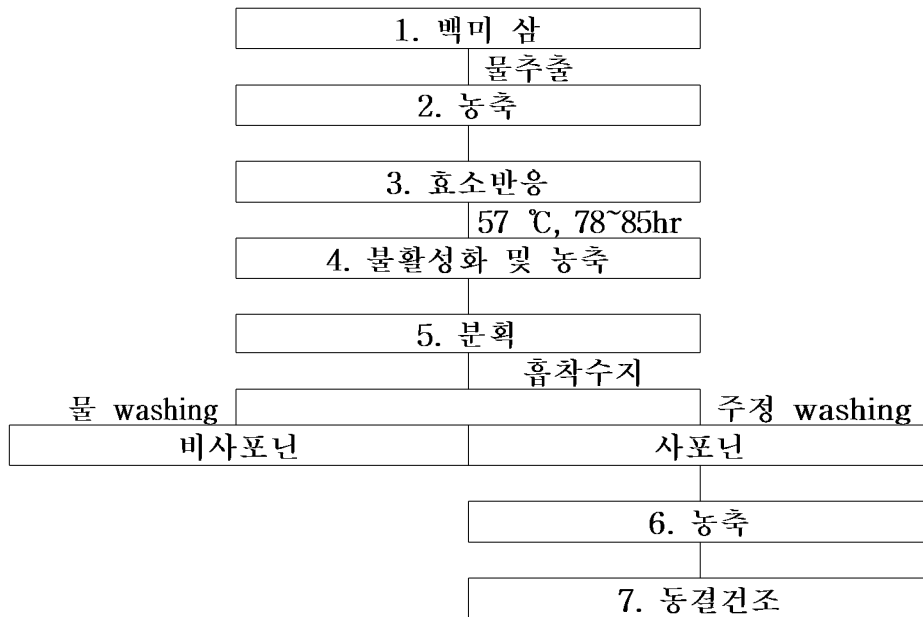


그림 1-54. 2차년도 공정 표준화에 따른  
기존 인삼 GPD 강화 분획 소재의 제조 공정도

나) 그림 1-54와 같은 기존의 인삼 GPD 강화 분획 소재의 제조 공정에 따른 단계별 GPD 함량은 표 4와 같다. 백미 삼을 물로 추출한 농축액에는 우리가 원하는 GPD가 없음을 확인하였고, 농축액을 효소반응을 시킨 상등액과 침전물에는 각각 0.045 mg/mL과 20.17-37.29 mg/g라는 GPD 함량이 존재함을 확인할 수 있었다. 이는 백미 삼 추출물에는 GPD가 존재하지 않고, 효소반응을 통해서만 major ginsenoside로부터 전환된 GPD를 얻을 수 있음을 의미한다. 또한 상등 액 보다는 침전물에 GPD 함량이 높다는 것을 확인할 수 있었다. 분획공정 후 물로 씻어낸 물질에는 거의 없거나 0.02 mg/mL라는 미량의 GPD만 존재하는 반면에, 주정으로 씻어낸 물질을 농축한 후 동결 건조한 공정의 최종 산물에는 82.1 mg/g이라는 비교적 많은 양의 GPD를 얻을 수 있음을 확인하였다.

제조단계	GPD 함량 (mg/g)
2. 백미 삼 농축액	N.D.
3. 효소 반응 후	
(1) 상등 액	0.045 mg/mL
(2) 침전물	20.17-37.29 mg/g
5. 분획공정 후	N.D.-0.02 mg/mL
7. 동결건조(분말)	82.1 mg/g

\*N.D.: not detected

표 1-18. 기존 인삼 GPD 강화 분획 소재 제조 단계별 GPD 함량확인

다) 기존 공정의 최종산물로서 82.1 mg/g이라는 GPD를 얻을 수 있지만 분획공정 중 미량의 GPD가 존재가 확인됨에 따라 이를 최소화시키기 위해(공정 중의 GPD 손실을 최소화시키기 위해), 최종 GPD함량을 좀 더 증가시키기 위해 공정을 개선이 필요했다.

2) 인삼 GPD 강화 분획소재 제조 공정 개선

가) 좀 더 높은 수율의 GPD 강화 분획소재를 제조하기 위한 방법으로 그림 4와 같이 공정을 구상 및 개선하여 인삼 GPD 강화 분획소재를 제조하였다. 제안된 공정은 효소반응 후 효소가 불 활성화된 농축 원료를 흡착수지에 의한 분획이 아닌 원심분리를 통해 상등액과 침전물을 분리하는 방법으로 교체되었다.

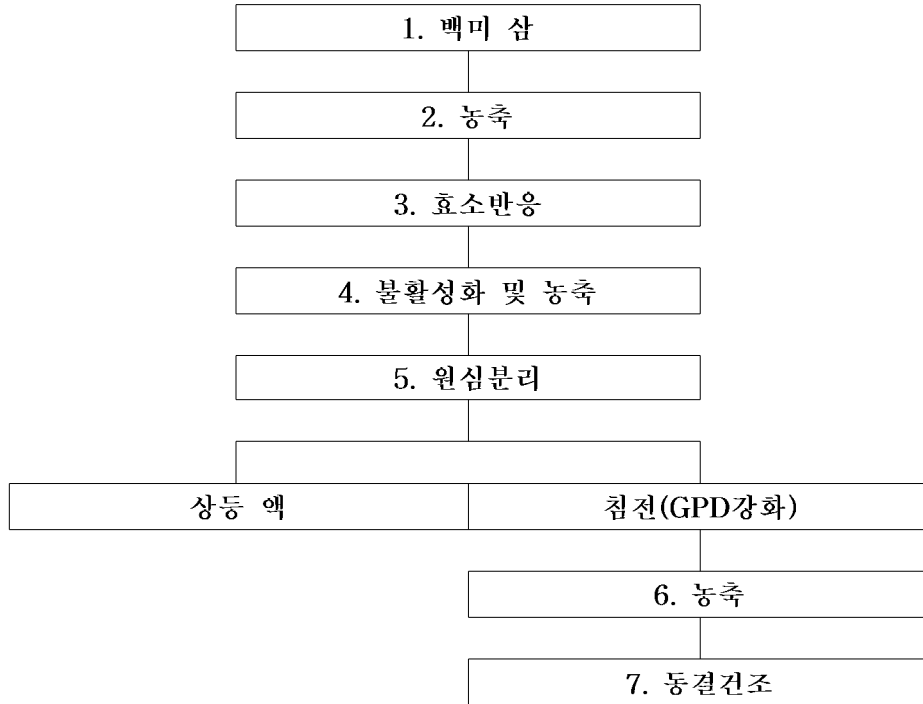


그림 1-55. 개선된 인삼 GPD 강화 분획 소재의 제조 공정도

나) 개선된 인삼 GPD 강화 분획 소재의 제조 공정 단계별 GPD 함량은 표 5와 같다. 효소 반응 후까지 원료의 GPD 함량은 유의적이지 않은 범위 내에서 유사하였으나, 침전물 농축액의 동결건조 최종산물로 얻어진 GPD의 함량이 배 이상(231.25 mg/g)으로 증가하였다. 이는 GPD 함량 측면에서만 평가했을 때, 기존의 공정보다 새로이 제안된 공정이 더 우수하다는 것을 확인할 수 있었다. 따라서 차 후 인삼 GPD 강화 분획 소재를 제조할 시에는 해당 공정을 선택하여 제조하는 것이 합당하다고 판단이 된다.

제조단계	GPD 함량 (mg/g)
2. 백미 삼 농축액	N.D.
3. 효소 반응 후	
(1) 상등 액	N.D.
(2) 침전물	20.44-40.70 mg/g
7. 동결건조(침전물 분말)	231.25 mg/g
동결건조(상등 액 분말)	N.D.

\*N.D.: not detected

표 1-19. 개선된 인삼 GPD 강화 분획 소재 제조 단계별 GPD 함량확인

다) 표 1-19에서 확인할 수 있듯이 새로 제안된 공정에서 효소 반응 후 침전에 의한 GPD 함량을 정량하는 실험에서, 상등액과 침전물에서의 GPD 전환함량이 많이 차이난다는 것을 확인했다. 특히 침전물이 상등액에 비해 월등히 GPD 함량이 높았다. 즉, 상등액에는 GPD의 함량이 거의 제로에 가까웠다. 따라서 새로운 공정에서 상등액의 GPD함량을 강화시키기 위한 추가적 분획방법을 도입하기 전에 제조원가 및 공정상에 소모 비용측면에서의 경제성과 상등액으로부터 얻을 수 있는 GPD의 생산성을 고려하면, 상등액으로부터 GPD강화 원료를 획득하는 추가적인 공정이 불필요 할 수 있을 것이라 예상된다.

라) 개선된 공정을 통해 GPD 강화 소재를 획득하고, 필요에 따라 GPD를 제외한 ginsenoside가 다량 포함되어있는 상등액과 혼합하여 소재의 다양성을 가져올 수 있을 것으로 기대할 수 있다. 본 연구에서의 인삼 GPD 강화 분획 소재는 실험실 수준에서 제조되고 연구된 것이므로, 차후 scale-up 테스트를 통하여 재현성 및 수율 확인을 통한 최종확인이 필요할 것으로 예상된다.



(2) 고려인삼 표준화 원료 기준 규격의 설정

(가) 원료 지표성분에 대한 규격 설정

① 인삼GPD강화 소재의 지표성분 규격 및 시험법

- 인삼GPD강화물의 규격을 식약청 [건강기능식품 기능성 원료 및 기준.규격 인정에 관한 규정 고시]에 따라 설정함.

㉞ 시험법

1) HPLC 분석법

가) Column: Venusil XBP C18(4.6 mm x 250 mm, 5  $\mu$ m, 100 Å)

나) 온도: 35°C, 검출기: DAD. 203 nm

다) 이동상: 물 & acetonitrile

라) Gradient: 20% acetonitrile(0 분) - 95% acetonitrile(60 분)

㉞ 지표성분 규격

1) 정상 : 인삼 고유의 향이 있고 쓴맛이 매우 강한 밝고~어두운 갈색의 분말

2) 지표성분 규격 : GPD로서 64 ~ 96 mg/g

	1회	2회	3회
분석결과(mg/g)	89.32	74.70	97.45
평균	87.16± 11.52 mg/g		

표1-20. 지표성분 분석결과

② 원료 유해물질에 대한 규격 설정

- 건강기능식품 기능성 원료 및 기준규격 인정에 관한 규정 (식품의약품안전청 고시 제 2010-76호 별표2, 2010.10.29)에 따라 중금속, 미생물 등을 검토하여 다음과 같은 규격을 설정하였다.

㉠ 유해물질 규격 및 시험법

1) 미생물

가) 규격 : 대장균군 음성

나) 시험법 : 식품공전 제10. 일반시험법 > 3. 미생물 시험법 > 3.7. 대장균 군 > 3.7.1. 정성시험 > 가. 유당배지 법에 준하여 실험

2) 중금속 및 농약

가) 규격 : 중금속 4종, 1ppm 이하 / 농약 별도 규격 설정하지 않음

나) 분석결과

항목	분석치(mg/kg)	제안규격
비소	0.0189	1.0 mg/kg 이하
납	0.0349	
카드뮴	0.0026	
수은	0.001	
농약	29종 불검출	별도 설정 없음

표 1-20. 식품공전 시험방법에 의한  
인삼 GPD 강화 분획 물 내 중금속 및 농약 분석결과

- 식품공전 시험방법에 의해 인삼 GPD 강화 분획 물 내 중금속 및 농약을 분석한 결과는 표 1-20과 같이 나타났다. 비소, 납, 카드뮴, 수은 등의 분석치는 각 제안된 규격 1.0 mg/kg 이하인 0.0189, 0.0349, 0.0026, 0.001 mg/kg으로 측정되어 제안된 규격의 양보다 훨씬 밑도는 양이 존재함을 확인하였다. 또한 29종의 다양한 농약의 유무를 분석한 결과 모두 불검출되었다. 이에 따라 인삼 GPD 강화 분획 소재 공정에 의한 원료는 식약청에서 제시하는 기준에 적합하게 기준을 설정하였다.

- 그러나 앞선 제조방법으로 제조한 원료의 경우, 쓴맛이 매우 강하고 수용화되지 않아 식품 제형에 적용하기 어려운 것으로 판단되어 추가적으로 원료 단계에서의 마스킹 연구를 하여 원료 품질을 강화시키는 연구를 수행하였다.

다) 시험법

항목	시험방법
총비소	식품공전 제10. 일반시험법 > 7. 식품 중 유해물질 시험법 > 7.1. 중금속 시험법 > 7.1.2. 금속별 시험 > 7.1.2.1. 납(Pb) > 1) 시험용액의 조제 > 가) 습식분해법 > (2)마이크로웨이브 법에 준하여 시험용액 조제 후 ICP-MS로 측정
납	식품공전 제10. 일반시험법 > 7. 식품 중 유해물질 시험법 > 7.1. 중금속 시험법 > 7.1.2. 금속별 시험 > 7.1.2.1. 납(Pb) > 1) 시험용액의 조제 > 가) 습식분해법 > (2)마이크로웨이브 법에 준하여 시험용액 조제 후 ICP-MS로 측정
카드뮴	식품공전 제10. 일반시험법 > 7. 식품 중 유해물질 시험법 > 7.1. 중금속 시험법 > 7.1.2. 금속별 시험 > 7.1.2.1. 납(Pb) > 1) 시험용액의 조제 > 가) 습식분해법 > (2)마이크로웨이브 법에 준하여 시험용액 조제 후 ICP-MS로 측정
총수은	식품공전 제10. 일반시험법 > 7. 식품 중 유해물질 시험법 > 7.1. 중금속 시험법 > 7.1.2. 금속별 시험 > 7.1.2.1. 수은(Hg)에 근거하여 측정
농약	디디티, 메타락실, 비에치씨, 알드린 및 디엘드린, 엔드린, 카벤다짐, 퀴토젠, 디네토펜카브, 디페노코나졸, 싸이퍼메쓰린, 아족시스트로빈, 토릴플루아니드, 톨크로포스-메칠, 이민옥타딘, 피리메타닐, 펜헥사미드, 시아조파미드, 싸이프로디닐, 크레속심-메칠, 카두사포스, 카보설펜, 후루디옥소닐, 플루토라닐, 트리프록시스트로빈, 티프루자마이드, 테플루스린, 플루퀸코나졸, 싸이플루쓰린

표 1-21. 인삼 GPD 강화 분획소재 내 중금속 및 농약 시험방법

### (3) 표준화 소재의 맛품질 개선연구

- 특정 성분이 강화된 표준화 소재를 제조하기 위하여 건삼으로부터 ginsenoside의 추출 공정을 최적화하고 Rb1, Rb2, Rc, Rd가 강화된 인삼 추출물을 효소처리(Cytolase PLC 5)를 통하여 GPD 성분이 강화된 인삼원료를 제조하는 2차 가공 공정을 최적화하였으며, 이 밖의 효소를 사용하여 더욱 강화할 수 있는지 확인하기 위해 추가실험을 수행하였다. 또한 GPD가 강화된 인삼 추출물로부터 분획물을 얻기 위한 공정연구를 진행하였고, 이로부터 얻어진 분획 물을 바탕으로 원료에 대한 기준규격을 설정하였다. 그러나 제조된 원료의 특성으로 다양한 제품에의 적용이 어려우 추가적으로 표준화된 소재의 맛 품질을 개선하기 위해 encapsulation 기술을 도입하여 그 가능성을 검증하였다.

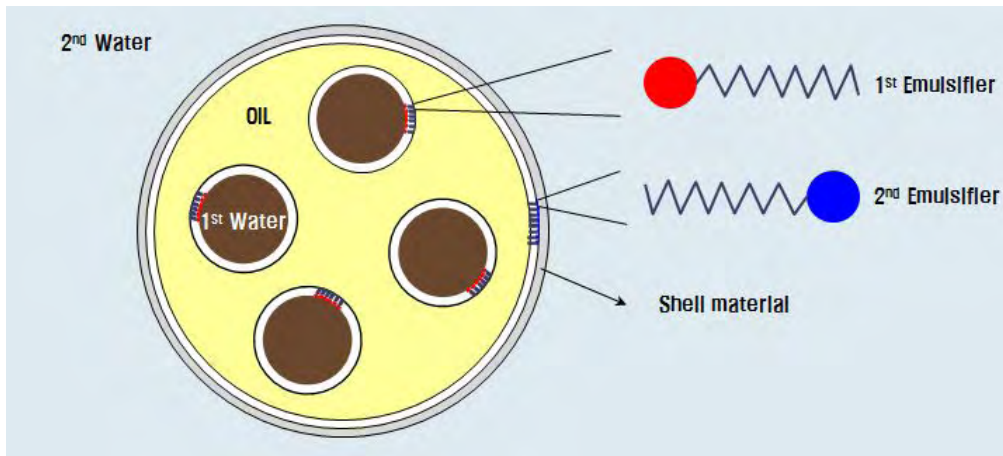
#### ① 연구 목적

- 백미 삼으로부터 추출, 효소반응과 분획 공정의 최적화에 대한 연구들을 통해 획득한 조건에서 인삼 GPD 강화 분획 소재 내 GPD 함량을 최대화 시킬 수 있었다. 이에 따라, 건강기능성이 더욱 증진되었다는 면에서 다른 인삼제품 및 원료와 차별화 될 수 있을 것이다. 하지만 앞선 표준화 연구 내 제품의 성상에서 언급하였듯이 강화 소재는 특유의 인삼 향과 매우 쓴맛을 가지고 있기 때문에 관능적 기호도 측면에서 기존에 상품화된 인삼제품과 원료와 차별화 되지 않는다. 따라서 다양한 소비자와 다양한 형태와 종류의 식품에 적용하기 위해서는 인삼 향과 쓴맛을 제거하기위한 노력이 필요할 것이라 판단되었다. 이러한 노력의 일환으로 다양한 고미마스킹 기술을 접목하여 인삼 GPD 강화 분획 소재의 다양한 활용과 소비자 기호 만족을 가져올 수 있을 것이라는데 그 연구 목적이 있다. 특히 본 연구에서는 해당 소재가 기름에 녹지 않는 친수성을 가진 물질이기 때문에 다중 에멀션(water in oil in water emulsion)이라는 캡슐화 기술을 적용하였다.

## ② 연구 방법

### ㉞ 인삼 GPD 강화 분획소재의 캡슐화 전략

1) 인삼 내에 존재하는 GPD를 포함하는 ginsenoside는 수용성이고 인삼 GPD 강화소재 또한 기름에 녹지 않는다는 것을 확인했기 때문에, O/W(oil in water) 에멀션을 적용할 수 없다. 따라서 수용성인 인삼 GPD 강화 분획소재를 캡슐화하기 위해서는 W/O/W(water in oil in water) 에멀션을 적용해야한다. 에멀션 기술을 이용한 캡슐화 전략에는 캡슐 제조에 사용되는 기름과 유화제의 종류가 중요하다. 인삼 GPD 강화소재를 캡슐화하기 위한 목적은 쓴맛 및 인삼향의 마스킹이기 때문에 그림 1-56과 같이 캡슐화 전략을 세웠다.



\*1st Water: 인삼 GPD 강화 분획소재 수용액, OIL: fully hydrogenated canola oil(FHCO), 1st Emulsifier: polyglycerol polyricinoeate(PGPR), 2nd Emulsifier: Tween 60, Shell material: sweet potato starch(SPS)

그림 1-56. 인삼 GPD 강화 분획소재 W/O/W 캡슐의 모식도

2) FHCO는 상온에서 고체로 존재하기 때문에 oil phase로 사용되었다. 즉, 상온에서 고체상이기 때문에 1<sup>st</sup> water phase(GPD 강화소재 용액)를 잘 감싸서 물리적인 충격을 흡수해 주는 동시에 외부 물 층과의 물질 상호 교환의 물리적 차단을 함으로써 캡슐 내부의 GPD 강화소재 용액의 쓴맛과 인삼 향을 못 느끼게 막아줄 수 있기 때문에 선정되었다.

3) 첫 번째 유화제에 PGPR을 선택한 이유는 PGPR의 HLB(hydrophile lipophile balance) 값이 낮기 때문이다. 즉, PGPR 분자에서 소수성 부분이 차지하는 비율이 높기 때문에 기름 층 내에서 물 층(이 경우는 GPD 강화소재 용액)의 안정성을 높일 수 있기 때문이다.

4) 두 번째 유화제를 Tween 60로 선택한 이유는 Tween 60의 HLB 값이 높기때문에 친수도가 높아서, 물 환경 내에서 GPD 강화소재 용액이 포함된 고체기름(FHCO) 입자의 안정성을 높여 줄 수 있기 때문이다. 또한 FHCO는 대부분 tristearin(glycerol+stearic acid 3개)으로 이루어져 있기 때문에, 분자 내 소수성 부분이 stearic acid로 이루어져 있는 Tween 60을 유화제로 사용 함으로써 안정성을 더 높여 줄 수 있을 것이라 판단했다.

5) 고체기름으로써 형성된 물질 상호교환의 물리적 장벽을 더욱 강화하기 위해 캡슐을 구성하는 최외각을 전분으로 코팅하기 위해 겔화된 SPS를 사용하였다.

㉠ 인삼 GPD 강화 분획소재 캡슐 제조 공정

- 각 공정에서 사용된 물질들의 양적 비율, 농도, 처리공정들은 우리가 원하는 형태와 비슷한 형태의 캡슐을 제조하기 위한 이전 연구를 참고로 하여 결정 되었으며, 공정처리 시간 등은 예비실험의 결과 선택되었다. 특히 spray-chilling(10°C)을 제외한 모든 공정은 FHCO의 녹는점이 대략 70°C이기 때문에 이보다 10°C 높은 80°C에서 이루어졌으며, SPS의 겔화를 위해 해당 용액을 80°C분 동안 shaking 항온수조에 두었다.

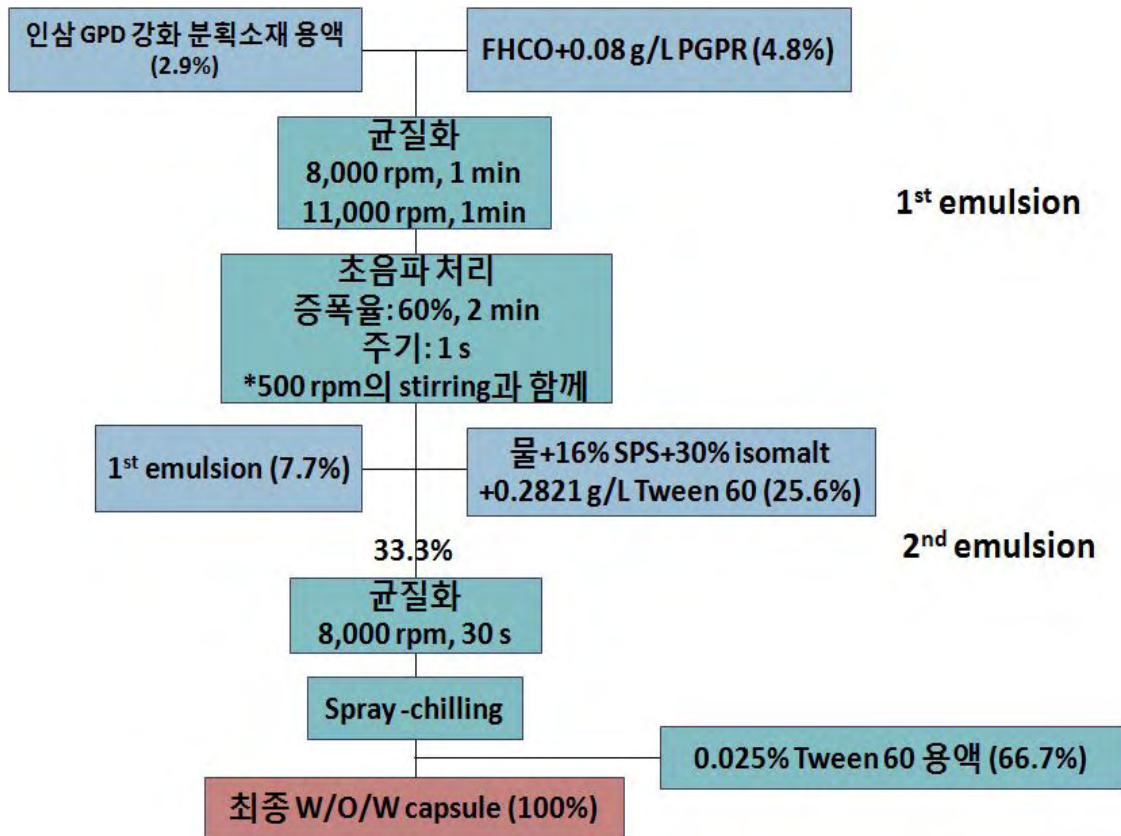


그림 1-57. 인삼 GPD 강화 분획소재 캡슐의 제조공정도

㉡ 인삼 GPD 강화 분획소재 캡슐화 확인

- 인삼 GPD 강화 분획소재가 확실히 캡슐화 되었는지 확인하기 위해, 1<sup>st</sup> water phase에 인삼 GPD 강화 분획소재와 더불어 수용액 환경에서 543 nm의 파장을 흡수하는 rhodamine B(빨간 색)를 첨가하여 캡슐을 제조하고, 이를 광학현미경으로 관찰하여 캡슐화의 유무를 파악할 수 있었다.

㉔ 포집효율(drug entrapment efficiency) 및 함유효율(loading efficiency)

1) 포집효율

가) 공정에 소모된 총 인삼 GPD 강화 분획소재의 양에 대해 캡슐화된 소재의 상대적인 비율로, 계산식은 다음과 같다.

$$\text{Drug entrapment efficiency}(\%) = \left( \frac{\text{캡슐화된 인삼 GPD 강화소재 질량}}{\text{제조에 사용된 인삼 GPD 강화소재 질량}} \right) \times 100$$

나) 캡슐화된 인삼 GPD 강화 분획소재의 양을 확인하기 위해 캡슐화되지 못하고 외부 물 층에 녹아있는 인삼 GPD 강화 분획소재의 양을 측정하여 캡슐화된 소재의 질량을 알아내는 방법을 선택했다. 제조된 캡슐 용액의 일정량 희석 후 원심 분리한 투명한 액으로부터 분광 광도법을 이용하여 203 nm의 파장의 빛을 흡수하는 정도(absorbance)를 확인했다. 미리 획득한 인삼 GPD 강화 분획소재 용액의 회기곡선을 이용, 역 계산 과정을 통해 캡슐화 되지 못한 인삼 GPD 강화 분획소재의 질량을 획득하여 결론적으로 drug entrapment efficiency를 획득 할 수 있었다.

2) 함유효율

가) 인삼 GPD 강화 분획소재 용액을 포함하는 캡슐에서 인삼 GPD 강화 분획소재 용액이 차지하는 상대적인 양적 비율을 나타내는 값으로, 계산식은 다음과 같다.

$$\text{Drug loading efficiency} = \left( \frac{\text{캡슐화된 인삼 GPD 강화소재 질량}}{\text{인삼 GPD 강화소재 캡슐의 총 질량}} \right) \times 100$$

나) 위의 식에서 분자는 drug entrapment efficiency에서의 값과 동일하다. 그리고 인삼 GPD 강화 분획소재 캡슐의 총 질량은 캡슐의 분획 및 동결건조 후 얻어진 캡슐의 총 질량과 동일하다 간주 했다.

㉕ 인삼 GPD 강화 분획소재 캡슐 분획 및 동결건조

- 공정의 최종 단계가 끝나면 액상형태의 인삼 GPD 강화 분획소재 캡슐 용액을 얻을 수 있다. 이 상태의 용액을 여과지에 의해 캡슐 입자와 외부 수용액을 분류하고, 여과지에 남은 입자를 washing한 후 동결 건조하여 최종 분말을 얻을 수 있었다.

③ 연구 결과

㉔ 인삼 GPD 강화 분획소재 캡슐화 확인

1) 인삼 GPD 강화 분획소재 캡슐 제조 공정에 따라 W/O/W 에멀션 캡슐을 제조한 후 광학현미경을 통해 관찰한 결과, 캡슐 입자 내에 물 층으로 추측되는 공간들의 존재를 확인하였다. 하지만 이 물 층이라고 추측되는 공간들이 정말 물 층인지, 아니면 단지 FHCO 기름들이 만들

어떤 단순한 구조물인지 확신할 수 없었기에 이 공간들이 물 층이라고 확신할 만한 방법이 필요했다. 이를 해결하기 위해 물에 녹으면 붉게 발광을 하는 수용성 염색시료인 rhodamine B를 첫 번째 공정 시 1st water phase에 인삼 GPD 강화 분획소재와 함께 섞어서 최종적으로 캡슐을 제조하였다. 그 결과, 그림 7의 오른쪽 그림과 같이 캡슐 입자 내부에 눈으로 구분할 수 있을 정도로 붉은 색을 띠는 부분이 존재하는 것을 확인할 수 있었다. 이 결과는 그림 5(인삼 GPD 강화 분획소재 캡슐의 모식도)에서 예상한 것과 같이 기름(FHCO) 내부에 GPD 강화소재를 포함한 물 층이 존재한다는 것을 증명하는 확실한 증거이다. 고체 기름이 GPD 강화소재가 포함된 물 층을 둘러싸고 있다는 것을 확인했으므로, 더 확인 과정이 필요하지만 그 소재 특유의 인삼 향과 쓴맛을 마스킹할 수 있을 것이라 예상할 수 있었다.

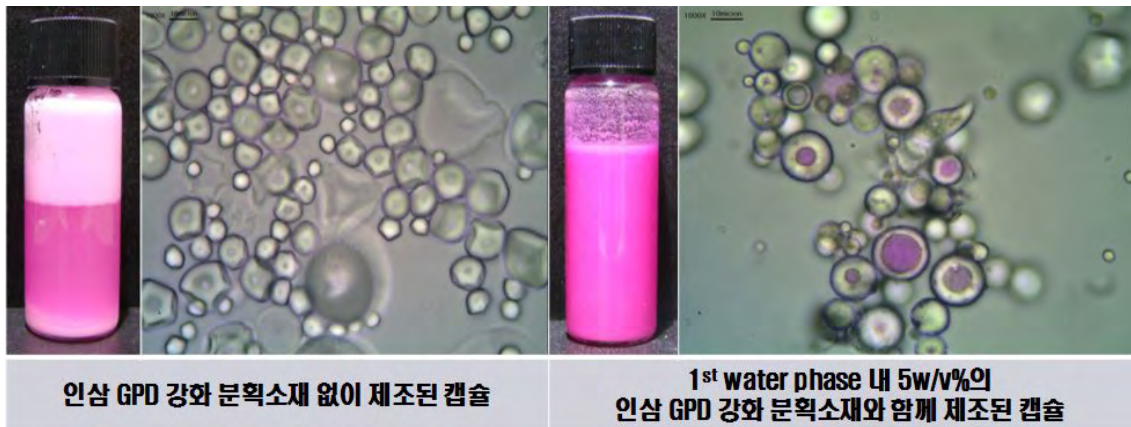


그림 1-58. 인삼 GPD 강화 분획소재의 유무에 따른 미세캡슐화의 차이

2) 그림 1-58의 왼쪽 그림은 1<sup>st</sup> water phase내 인삼 GPD 강화소재를 포함하지 않은 채로 제조법에 따라 제조한 캡슐이다. 오른쪽 그림에서의 캡슐 시스템과 동일한 조건에서 인삼 GPD 강화소재를 제외하고 rhodamine B까지 첨가하여 제조 했음에도 불구하고, 입자 내에 붉은 물 층이 관찰되지 않았다. 이 현상은 공정 디자인에서 1<sup>st</sup> 유화제의 양이 적당하지 않아 인삼 GPD 강화 분획소재 없이는 제대로 된 캡슐이 만들어 지지 않는 것이라 추론할 수 있다. 이의 다른 의미는 1<sup>st</sup> water phase내 단 5 w/v%의 인삼 GPD 강화 분획소재가 W/O/W 에멀션 캡슐 생성의 주요 인자라는 것이다. 따라서 인삼 GPD 강화 분획소재는 물과 기름 층의 계면에서 일종의 ‘co-surfactant’로 작용하여 W/O/W 에멀션 캡슐의 안정화를 가져온다고 생각할 수 있다. 결론적으로 인삼 GPD 강화 분획소재는 캡슐화 적용에 적합한 소재이며, 캡슐화의 긍정적 가능성이 크다고 판단된다.



㉔ 인삼 GPD 강화 분획소재 캡슐의 성상

1) 첫 번째 물층에서의 5 w/v%(인삼 GPD 강화 분획소재)는 캡슐 전체 환경을 기준으로 상당히 미량이므로 이를 더 높이 높일 필요가 있다. 따라서 그 농도를 35 w/v%로 높여 현미경 사진을 통해 관찰한 결과 그림 1-59와 같은 사진을 얻을 수 있었다. 두 캡슐 시스템의 성상을 대표하는 이 사진에서 관찰되듯이 평균적인 캡슐 입자의 크기감소, 캡슐 입자간의 크기 분포 균질화, 그리고 캡슐 입자 내부에 존재하는 물층의 균질화를 확인할 수 있다. 이는 첫 번째 물층에 포함되어 있는 인삼 GPD 강화 분획소재의 농도가 높을수록 W/O/W 에멀션 캡슐 시스템의 안정도가 높아진다는 것을 의미하고, 이 특성 또한 해당 소재의 캡슐화의 우수성을 증명할 수 있다고 판단된다.

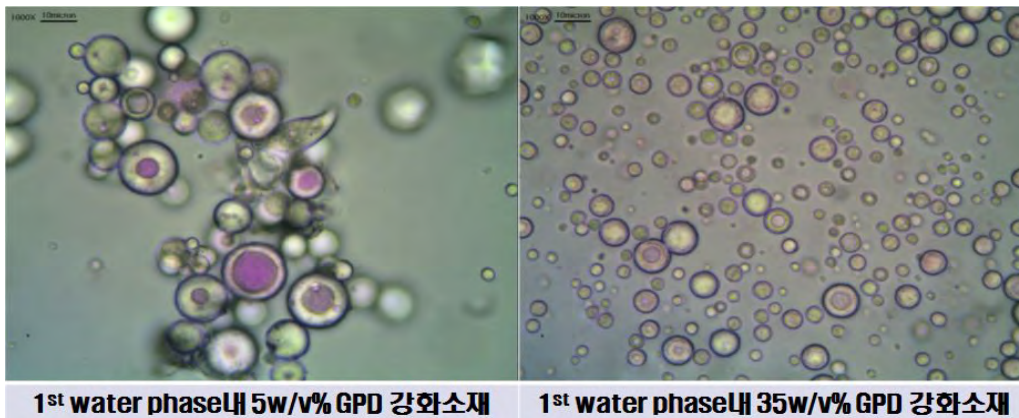


그림 1-59. 1<sup>st</sup> water phase 내  
인삼 GPD 강화 분획소재농도 증가에 따른 캡슐의 현미경

2) 첫 번째 물 층 내 인삼 GPD 강화 분획소재의 농도를 제외한 나머지 인자를 고정하여 입자 크기를 측정된 결과는 그림 9와 같이 나타났다. 그림 9에서 볼 수 있듯이 15w/v% 이상의 농도에서 부터는 약 32~38  $\mu\text{m}$  사이에서 입자 크기가 거의 일정한 것을 확인했다. 이러한 결과는 일정한 농도 이상의 GPD 강화소재는 1<sup>st</sup> water phase와 기름의 계면에 충분히 존재하여 에멀션 시스템의 안정화를 야기하는 것으로부터 기인하는 것으로 예측된다.

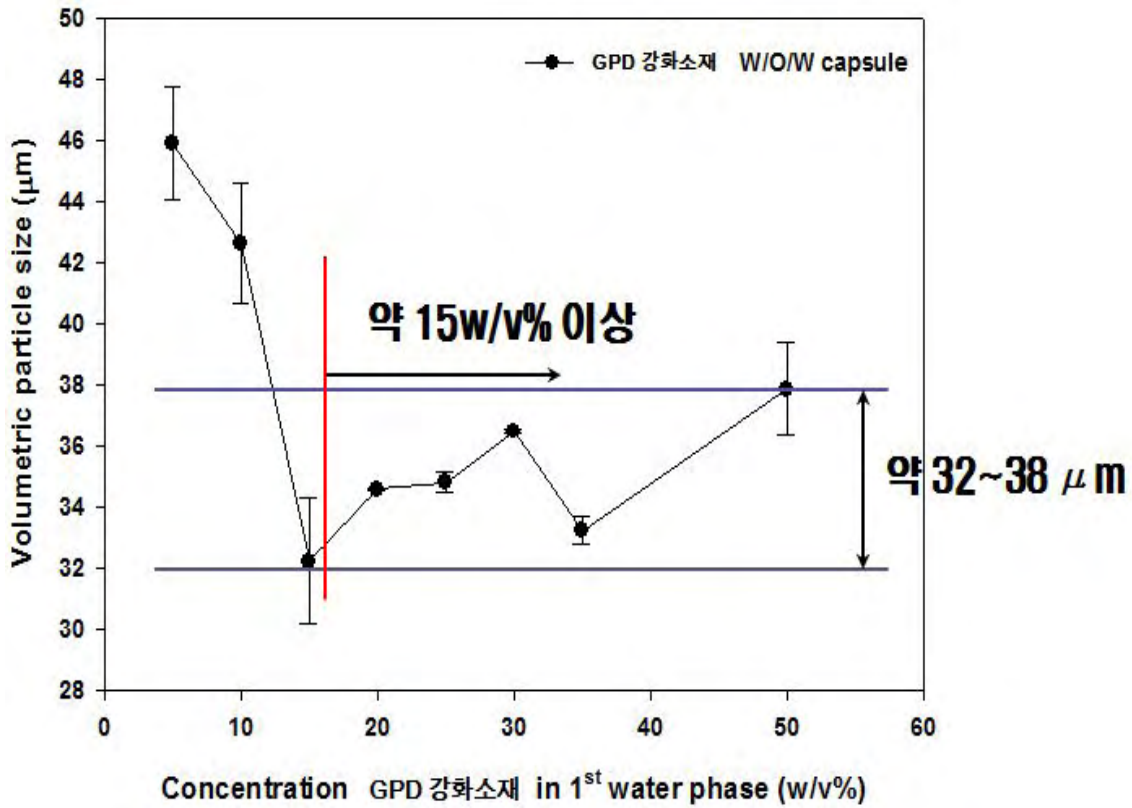


그림 1-60. 인삼 GPD 강화 분획소재 농도에 따른 W/O/W 캡슐의 입자크기 변화

3) 인삼 GPD 강화 분획소재 농도가 증가함에 따라 제조된 W/O/W 에멀션 시스템의 겉보기 특성은 그림 10과 같이 변화된다. 사진에서 확인할 수 있듯이 농도 증가에 따라 강화소재 특유의 갈색이 점점 진해지는 것을 확인할 수 있다. 또한 관능적인 특성(인삼 향, 쓴맛) 역시 강해지는 것을 확인할 수 있었다. FHCO 에멀션의 색은 흰색을 띄고 있기 때문에, 색이 진해진다는 것은 에멀션 화 되지 못한 인삼 GPD 강화 분획소재가 바깥 물 층에 점점 많이 녹아들어 있다는 것을 의미한다는 의미이다. 하지만 이러한 현상이 GPD 강화소재의 농도가 증가되면 에멀션화 되지 못한 강화소재의 ‘비율’이 증가한다는 의미가 아니다. 실질적으로 5w/v%와 30w/v%의 강화소재 용액 내의 GPD 강화소재 양은 6배가 차이가 나므로 색만 진해질 뿐이지, 색도가 진해진다는 것이 전체 사용된 GPD 강화소재에 대해 캡슐 화 되지 못한 강화소재 비율의 증가를 의미하지는 않는다는 것이다.

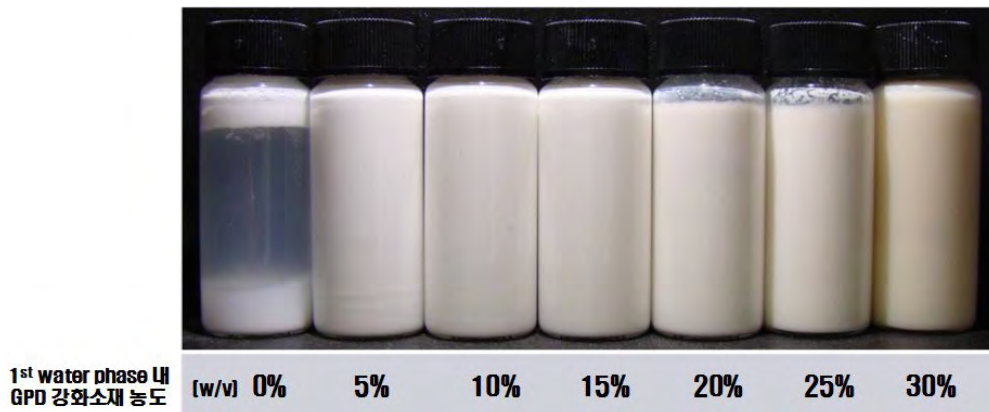


그림 1-61. 1<sup>st</sup> water phase 내인삼 GPD 강화 분획소재의 농도 증가에 따른 에멀션 시스템의 색 변화

㉔ 포집효율 및 함유효율

1) 포집효율(Drug entrapment efficiency)

가) 포집효율(Drug entrapment efficiency)은 전체 공정에 사용된 인삼 GPD 강화 분획소재 대비 캡슐화 된 인삼 GPD 강화 분획소재의 비율을 의미한다. 이는 얼마나 에멀션화가 잘되는지 판단할 수 있는 기준으로 사용된다. 그리고 경제적 측면에서의 의미는 캡슐화 되지 못한 소재의 회수와 연관되어있다.

나) 1<sup>st</sup> water phase 내 인삼 GPD 강화 분획소재의 농도가 증가함에 따라 포집효율의 변화는 그림 1-62와 같다. 그림 1-62에서 보는바와 같이 포집효율은 20 w/v까지는 감소하다가 이후부터 다시 점차 증가하였다. 이는 그림 1-60에서 관찰되는 결과와 동일하게, 일정 농도 이상의 GPD 강화소재가 인삼 GPD 강화 분획소재 캡슐 시스템의 안정성을 증가시켜주기 때문에 나타나는 결과라고 생각된다.

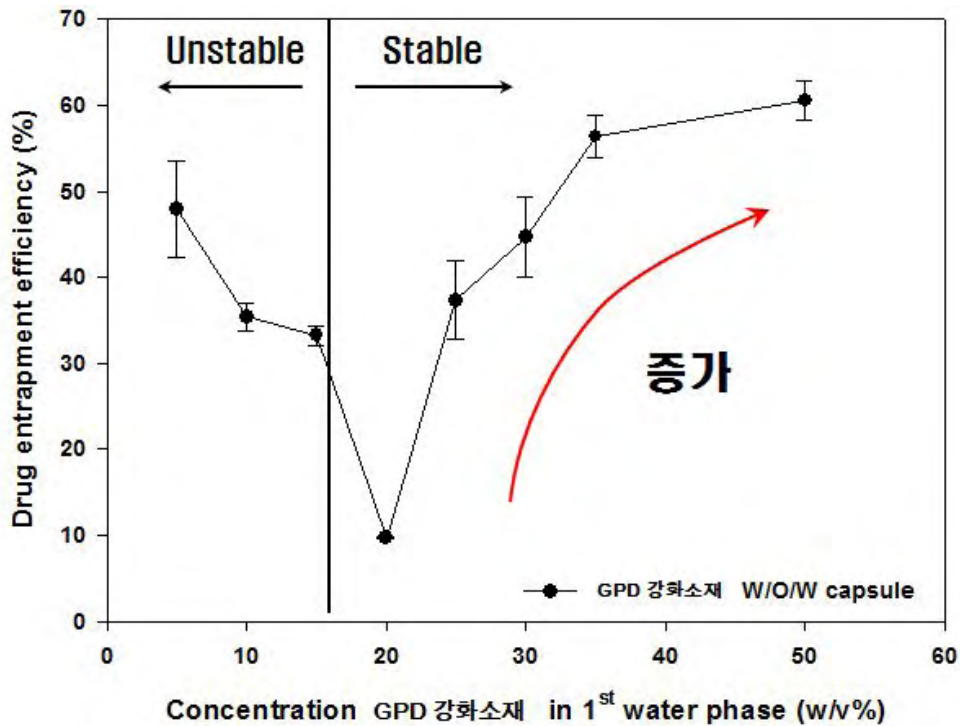


그림 1-62. 1<sup>st</sup> water phase 내 인삼 GPD 강화 분획소재 농도의 증가에 따른 drug entrapment efficiency

## 2) 함유효율(Drug loading efficiency)

가) 함유효율(Drug loading efficiency)은 제조된 캡슐 내에서 인삼 GPD 강화 분획소재가 차지하는 양의 비율을 나타내는 값으로써, 해당 캡슐을 원료로 제품을 생산했을 때 함량 결정과 관련된 수치이다.

나) 첫 번째 물층 내 일정농도 이상의 GPD 강화소재 농도에서 drug loading efficiency가 점차 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 그 결과를 확인할 수 있는 것이 그림 1-63이다. 이는 인삼 GPD 강화 분획소재는 에멀션 시스템의 안정성을 가져온 다는 점에서 그림 9와 11에서 관찰되는 결과와 동일하게 해석된다.

그림 1-63. 1st water phase 내 인삼 GPD 강화 분획소재  
농도의 증가에 따른 drug loading efficiency

㉔ 인삼 GPD 강화 분획소재 캡슐화 가능성

1) 앞서 본 결과들은 인삼 GPD 강화 분획소재가 W/O/W 에멀션 시스템의 안정성을 높이는 co-surfactant로써 작용하기 때문에 해당 방법을 이용한 캡슐화의 이점을 증명해주고 있다. 하지만 인삼 GPD 강화 분획소재의 농도가 높아질수록 뉴튼 유체의 성질을 띠고 있다가 마치 홍삼 진액과 같은 고점도의 액체가 된다. 따라서 실험실 수준에서의 공정 경험으로는 피펫으로 용액을 취할 수 없을 정도의 점도 이상이 되면 캡슐을 제조할 수 없었다. 이 경험적 농도는 140w/v%이고, 이 농도는 캡슐화에 적용할 수 있는 인삼 GPD 강화 분획소재의 농도이자 본 에멀션 시스템 적용의 한계 농도다. 140w/v% 농도에서의 drug entrapment efficiency 값은 약 63%로 그림 11에서 50w/v%에서의 값과 거의 유사하다. 따라서 현재 적용하고 있는 FHCO와 물 및 유화제들의 농도에서는 drug entrapment efficiency를 증가 시킬 수 없을 것이라 예상된다.

2) 해당 공정 환경에서 제조할 수 있는 최대 농도인 140w/v%의 인삼 GPD 강화 분획소재로 캡슐 에멀션 시스템을 제조한 후에, 다양한 식품 형태의 기능성 원료로 사용하기 위해 동결건조 후 가루형 캡슐을 얻었다(그림 1-64(b)). 이 가루는 인삼 GPD 강화 분획소재와 달리 갈색이 아닌 하얀색을 띠고 있고, 인삼 특유의 향이 나지 않는 동시에 거의 쓴맛을 느낄 수가 없었다. 이러한 결과는 우리가 최초 목표로 했던 인삼 GPD 강화 분획소재의 마스킹이 가능하다는 것을 입증한다. 또한 이 캡슐 가루의 morphology를 확인한 결과 그림 1-64(c)와 같이 동결 건조 전(그림 1-64(a))과 동일한 morphology적 특성을 가지고 있으며, isomalt 또는 glycerol 등과 같은 anti-freezer 없이도 W/O/W 구조가 깨지지 않는 캡슐의 견고성을 확인할 수 있다.

(a)

(b)

(c)



그림 1-64. (a) 140w/v%(제조 가능한 최대 농도) GPD 강화소재 W/O/W 캡슐의 morphology, (b) 동결건조 후 가루제형의 인삼 GPD 강화 분획소재 캡슐 (c) 동결건조 후 W/O/W 캡슐 가루의 morphology

3) 앞서 설명하였듯이 공정에 이용할 수 있는 인삼 GPD 강화 분획소재의 농도는 일정하기 때문에, drug loading efficiency를 충분히 높이면서 효과적으로 캡슐화하기 위해서는 유화제들의 양적 비율, 1st water phase와 기름의 양을 변화시켜 캡슐을 제조해야 한다. 결론적으로 본 연구를 통해 캡슐화의 유리함과 가능성을 증명했기 때문에, drug loading efficiency와 entrapment efficiency 값을 최대화하기 위한 양적조건(물, 기름, 유화제)의 최적화에 대한 추가적인 연구를 통해 좀 더 경제성과 가능성이 향상된 인삼 GPD 강화 분획소재 캡슐을 제조한다면 실제 기능성 원료로서 충분히 적용 가능하다고 판단된다.

4. 제1-4세부연구과제(강화약썩 등 국내 자생식물을 이용한 기능성식품 제품화 연구)

가. 강화약썩 소재 표준화 연구

- 썩은 역사가 아주 오래된 약초로서 인체에 매우 이로운 식품으로 그 효능의 우수성이 보고된 바 있으며 인체에 여러 가지 좋은 효과가 있다는 체험담으로 인해 수요가 점차 증가하고 있다. 이런 추세에 따라 강화약썩의 유효성분으로 알려진 것 중에 coumarin, flavonoid, eupatilin, jaceosidin 등이 있으며, 그 중 강화약썩이 가지는 특이적인 성분으로는 "eupatilin"인 것으로 조사되었다. Eupatilin 은 돌연변이 억제, 혈당상승 저하 등과 같은 다양한 약리적 활성에 관여한다고 보고되고 있다. 따라서, 본 연구팀에서는 강화약썩의 지표성분을 eupatilin으로 설정하고 이에 대한 분석조건 확립 및 정량분석 시험을 진행하였다.

<p>분자식 : C<sub>18</sub>H<sub>16</sub>O<sub>7</sub>                  분자량 : 344.3                  융점 : 232 ~ 233 °C                  이명 : 5,7-dihydroxy-3,4,6-trimethoxyflavone                  구조식 : 오른쪽 그림 참조</p>	 <p>Fig. 1. Chemical structure of eupatilin.</p>
---	---

그림 1-65. 지표물질인 Eupatilin 의 구조 및 특성

(1) Eupatilin 분석을 위한 전처리 및 분석조건 확립

(가) 표준물질의 제조

- 표준물질인 eupatilin 6 mg을 10 mL의 용량플라스크에 넣고, 희석용매 (pyridine:MeOH=25:75)로 충분히 녹인 후 10 mL로 mass up 한 후, 희석하여 사용하였다.

(나) 시험용액의 제조

- 강화약썩 시료를 약 1g 정도 취해 100 mL의 용량플라스크에 넣고, 희석용매 (pyridine:MeOH =25:75)로 충분히 녹인 후, 100 mL로 mass up 한 다음, 0.45 μm 필터로 여과하여 측정하였다.

(다) HPLC 측정 조건

- Column : C18 column (4.6 x 250 mm)
- Temp. : 30 °C
- Detector : UV 330 nm
- Flow : 1 mL/min.
- Mobile phase : 0.1% TFA in Water : MeOH = 35 : 65

(라) 계산식

- Eupatilin의 농도와 HPLC의 피크면적 관계를 조사하여 그래프를 그린다. 가로축은 각 농도의 eupatilin을 나타내며, 세로축은 HPLC 피크면적비를 나타내었다.

$\text{Eupatilin의 함량(mg/g)} = \text{시험용액의 농도}(\mu\text{g/g}) * (\text{시험용액의 전량(mL)}/\text{시료량(g)})$
---



(2) Eupatilin 분석 결과

(가) Eupatilin 의 회귀곡선

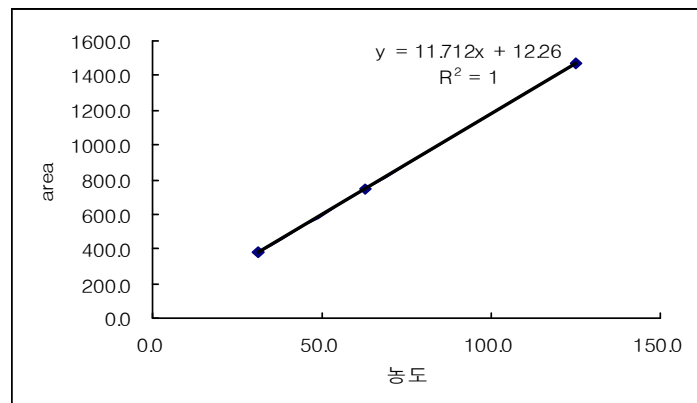


그림 1-66. Eupatilin의 회귀곡선

(나) Eupatilin 분석 chromatogram

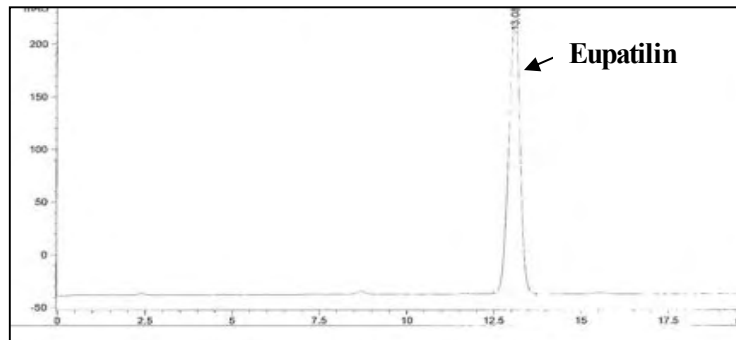


그림 1-67. 지표물질 eupatilin 분석 Chromatogram

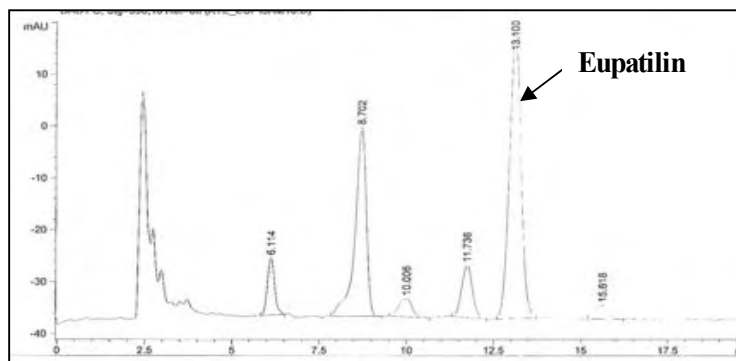


그림 1-68. 강화약썩 추출물에 함유된 eupatilin chromatogram

(3) Eupatilin 분석방법 타당성 검증

- 강화약썩추출물의 지표성분인 Eupatilin의 규격과 시험방법의 타당성 검토를 위하여 공인검사기관인 재단법인 전라남도 생물산업진흥재단 식품산업연구센터에 분석을 의뢰하여 시험방법 타당성 검토를 진행하였다.

항목	결과 및 고찰
① 특이성(Specificity)	강화약썩 추출물의 Eupatilin 피크는 eupatilin 표준품과 동일한 시간대에 검출되었고, 추출분말내의 다른 물질과 분리됨을 quercetin 표준품과유지시간(retention time)의 차이와 eupatilin과 인접 peak의 분리도 및 eupatilin 피크의 peak purity를 eupatilin peak 높이(H)와 전후 1/2 peak 높이(H1/2)의 UV spectrum으로 확인하여, eupatilin이 특이적으로 분석됨을 검증하였다.
② 직선성(Linearity)	분석조건에서 제조하는 Eupatilin 표준용액의 농도구간인 48~112 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 eupatilin 농도(x data)와 eupatilin peak 면적(y data)의 결정계수가 0.999 이상으로 농도와 peak 면적간에 선형 상관관계가 있음을 검증하였다.
③ 정밀성(Precision)	동일 제조번호의 검체에 대해 분석일자 내 함량균일성(inter-day precision)은 상대표준편차 (평균/표준편차 x100, %RSD) 1.8이하, 분석일자간(intra-day precision)의 경우 1.2이하를 확인하였고, 제조번호별 추출물의 지표 성분 함량이 분석조건에서 유의미하게 확인되었고, eupatilin 농도를 재현성 있게 얻어짐을 확인하였다.
④ 정확성(Accuracy)	분석용액에 일정량의 eupatilin을 첨가한 후 회수율(실험 농도/이론농도 x 100)을 평가하였을 때, 회수율이 100~102%로 확인되어 정확성이 있는 분석방법임을 검증하였다.
⑤ 범위(Range)	직선성, 정밀성, 정확성이 만족되는 구간은 eupatilin 농도 64 ~ 96 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 임을 확인하여 범위로 설정하였다.
결론	타당성 검증항목에 있어 평가기준을 충족하고 있는 것으로 확인되어 강화약썩 추출물내의 Eupatilin 분석방법은 타당하다고 판단된다.

표 1-22. Eupatilin 분석 방법의 타당성

(4) 원료에 따른 Eupatilin 분석

- 강화약썩은 채취시기, 보관상태, 잎과 줄기 비율, 건조기간 등 원료의 조건에 따라 지표성분의 함량차이가 크기 때문에 조건에 따른 원료에서의 지표성분 분석을 실시하였으며, 분석결과를 토대로 보았을 때, 농가와의 체계적인 관리를 통해 원물 확보를 하는 것이 원료 표준화를 위해 중요하다는 것을 판단할 수 있었다.

(가) 농가별 원료에 따른 지표성분 함량 분석

- 강화도 지역의 농가 추가 3곳 정도에서 강화약썩 원물을 받아 기존의 원물과의 지표물질 함량을 비교하였다.

- 실험방법 : 강화약썩 원물에 25% Pyridin in MeOH을 첨가하여 30분간 sonication 한 후 Eupatilin의 함량을 측정하였다.

- Eupatilin 분석결과

강화약썩 농가	기준약썩	농가A	농가B	농가C
함량(mg/g)	1.206 ± 0.094	0.968 ± 0.040	0.782 ± 0.025	0.541 ± 0.008

표 1-23. Eupatilin 분석결과

(나) 채취시기에 따른 지표성분 함량 분석

- 채취시기 : 일반적으로 강화약썩의 채취는 년 2-3회 정도 이루어지며, 단오 전후와 9월경, 총 3 시점에서 강화약썩을 채취하여 동일 조건의 추출물을 제조하여 지표물질 함량을 비교하였다.

- 실험방법 : 추출물을 제조 후에 위의 (가)의 방법에 따라 Eupatilin 함량을 분석하였다.

- Eupatilin 분석결과

강화약썩 채취시기	5월	6월	9월
함량(mg/g)	9.18 ± 0.51	6.98 ± 1.72	4.195 ± 0.155

표 1-24. Eupatilin 분석결과

(다) 강화약쑥 추출물내의 지표성분 함량비교

- 원료 조건에 따른 강화약쑥을 동일 조건에서 추출물로 제조하여 지표성분인 Eupatilin 함량을 비교 분석하였다.

농가	채취시기	CJ제조 강화약쑥추출물	비고
		Eupatilin (mg/g)	
농가 A	단오 전	6.67	대부분 잎
농가 B		4.24	줄기 많음
농가 C		5.62	대부분 줄기
농가 D		6.26	

표 1-25. Eupatilin 분석결과

(5) 강화약쑥 추출물의 원료 기준 규격설정

(가) 원료의 지표성분에 대한 규격 설정

① 원료의 조건에 따라 지표성분인 Eupatilin 함량이 원물에서부터 차이가 크기 때문에 이는 궁극적으로 원료 생산 수율에 큰 영향을 줄 수 있어 강화약쑥 원물에서의 지표성분 관리를 통한 추출물의 제조가 필요하다. 따라서 강화약쑥 추출물 제조시 다음의 원물 규격 조건을 설정하여 원료를 제조하고자 한다.

② 강화약쑥 원물 규격

- 원물 지표물질(Eupatilin) 함량 : 1.2mg/g (건조쑥 기준) 이상, 메탄올:피리딘(3:1) 용매에 분쇄한 원물을 넣고 30분간 방치 후 HPLC 분석
- 채취시기 : 초벌쑥을 이용(일반적으로 초벌쑥의 지표 성분 함량이 높음)
- 잎의 비율 : 총 강화약쑥 무게의 40% 이상
- 수분 함량 : 10% 이하
- 절단 크기 : 약 2cm 이하

③ 강화약쑥추출물 지표성분 규격

- 성상 : 쑥 특유의 향이 있고 쓴맛이 강한 회갈색~녹갈색 분말
- 지표성분 규격 : Eupatilin으로서 5.0 - 9.5 mg/g

(나) 원료의 유해성분에 대한 규격 설정

① 건강기능식품 기능성 원료 및 기준규격 인정에 관한 규정 (식품의약품안전청 고시 제 2010-76호 별표2, 2010.10.29)에 따라 중금속, 미생물 등을 검토하여 다음과 같은 규격을 설정하였다.

② 강화약썩추출물의 유해물질 규격과 시험방법의 타당성 검토를 위해 공인검사기관인 한국기능식품연구원에 분석을 의뢰하였으며, 그 결과는 다음의 표와 같이 확인이 되어 원료에 대한 유해물질 규격을 설정하였다.

항목		시험방법	결과값	식약청 규격	유해물질 제안규격
미생물	대장균 군	식품공전] 제10. 일반 시험법 3. 미생물 시험법 3.7. 대장균 군 3.7.1. 정성 시험 가. 유당 배지 법에 준하여 실험	음성	음성	음성
중금속	납	식품공전] 제10. 일반 시험법 7. 식품중 유해물질 시험법 7.1.2. 금속 별 시험	0.09 ppm	<10.8 µg/일	1.0 ppm
	총비소	7.1.2.1. 납(Pb) 1) 시험용액의 조제 가) 습식 분해 법	0.05 ppm	<150 µg/일	1.0 ppm
	카드뮴	(2) 마이크로웨이브 법에 준하여 시험용액 조제 후 ICP-MS로 측정	0.01 ppm	<3.0 µg/일	1.0 ppm
	총수은	식품공전] 제10. 일반 시험법 7. 식품중 유해물질 시험법 7.1.중금속 시험 7.1.2.4. 수은(Hg)에 근거하여 측정함.	0.03 ppm	<2.1 µg/일	1.0 ppm

표 1-26. 강화약썩추출물의 유해물질 제안규격

나. 강화약쑥 표준화 소재를 위한 제조공정 연구

- 제1-3 세부과제에서 연구한 결과를 토대로 설정한 추출 조건 등에 따라 강화약쑥추출물 시제품을 제조하였다. 이에 표준화된 제조 공정을 수립하였으며, 추가적인 테스트를 통해 수율 개선을 통한 제조공정연구를 실시하였다.

(1) 강화약쑥추출물 제조공정

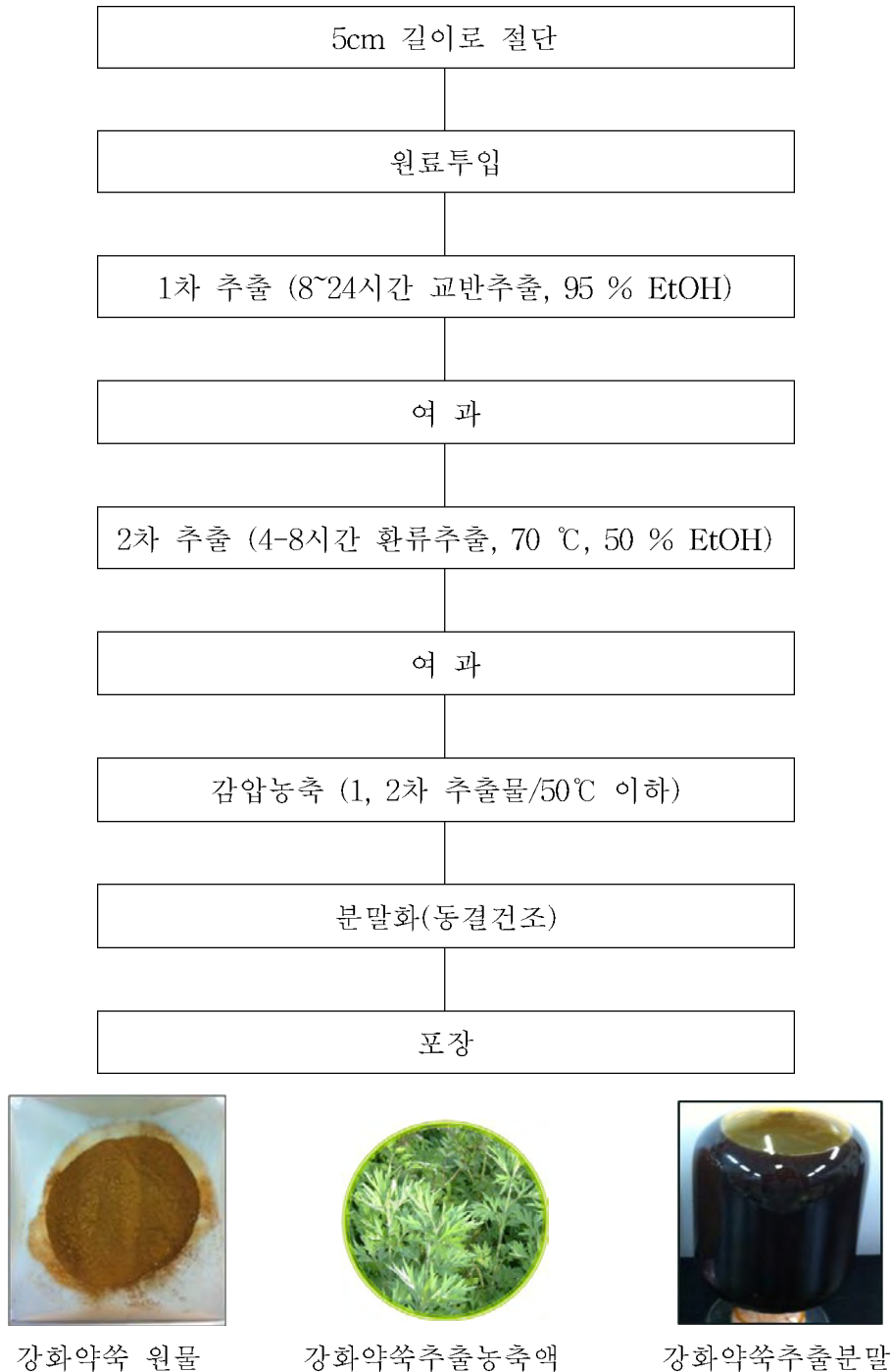


그림 1-69. 강화약쑥추출물 제조공정

(2) 수율 향상을 위한 제조 조건 변경 테스트

(가) 추출 조건 변경을 통한 수율 개선 테스트

- 추출 용매량, 추출방식, 추출온도 및 횟수 등에 의해 원료의 지표성분 함량과 수율에 영향을 줄 수 있기 때문에 해당 조건을 변경하며 최적 제조 조건을 확립하고자 하였다. 아래 표의 3가지 조건에 대한 테스트를 진행하였으며, 테스트(3)의 결과가 수율 및 원료 기준규격에 가장 적합한 조건임을 확인할 수 있었다.

	테스트(1)	테스트(2)	테스트(3)
용매사용량 (주정추출)	원물대비 10배수	원물대비 15배수	원물대비 15배수
추출방식	환류추출	침출추출	침출추출
추출온도	실온	실온	가온 50℃
지표함량(mg/g)	7.5 mg/g	7.2 mg/g	6.8 mg/g
수율	8.0 %	9.8 %	12 %

표 1-27. 수율 개선 테스트 결과

(나) 추출 횟수 증대를 통한 수율 개선 테스트

① 위의 (가)의 테스트 결과 선정된 테스트(3)의 조건에 최종적으로 물 세척을 통한 공정을 추가할 경우, 수율이 더 개선되는 결과를 얻을 수 있었다.

② 테스트 결과 : 1, 2차 주정 추출 → 3차 물 세척(Loss 최소화) → 수율 13.5%, 지표성분함량 6.2 mg/g 확인

(다) 수율 향상을 위한 원료 제조공정 개선점 도출 및 적용

항목	최적 조건
추출용매 사용량(주정추출)	원물대비 15배수 (원물이 충분히 잠길 수 있어야 함)
추출방식	침출추출 1, 2차 주정추출 후, 물세척
추출온도	50 ℃
지표함량(mg/g)	6.2 mg/g
수율	13.5 %

표 1-28. 수율 향상을 위한 최적 조건

다. 강화약쭈 표준화 소재 적용 상품화 연구

(1) 강화약쭈의 산업화 현황 탐색

(가) 국내 강화약쭈 시판제품 검토

- 쭈은 쭈국, 쭈부침개, 쭈떡, 쭈밥 등 쭈을 이용한 요리로 오랜기간 동안 섭취되어 온 식경험이 많은 재료이다. 쭈 요리뿐만 아니라 강화약쭈은 약쭈 액기스, 약쭈차, 약쭈 캔디, 약쭈 환, 약쭈 분말, 약쭈 된장, 약쭈 고추장, 약쭈 청국장, 약쭈 칼국수 등도 현재 시판되고 있다.

제품명	제품사진	원료 및 함량	예상되는 강화약쭈 섭취량
약쭈 액기스		쭈(강화군)8.9%, 정제수, 맥아(국산), 대추(국산), 생강(국산), 감초(수입산)	14.2g/일
약쭈 환		쭈(강화군) 90%, 쭈 액기스, 찹쌀, 과당	4g/일
약쭈 분말		쭈(강화군) 100%	5~10g/일
약쭈 캔디		사자발쭈분말(강화군)2%. 사자발쭈농축고형분(강화군)	1~2g/일
약쭈 차		쭈(강화군) 100%	6~8g/일

표 1-29. 국내에서 시판 중인 약쭈 관련 제품



(나) 국외 강화약썩 시판제품

- 현재 썩 (Artemisia 속)은 미국, 이탈리아, 중국, 멕시코 등에서 음료, 디저트, 차 등으로 판매되고 있는 것으로 조사되었다.

제품사진	제품명	종류	회사명	국가
	Digestive Tea	Non alcoholic beverages (tea)	La Paz Pharma	Mexico
	Liver Protecting Tea	Non alcoholic beverages (tea)	Fujian Provincial Medicines & Health Products	Philippines
	Dark Chocolate with Whole Nuts	Chocolate	Venchi	Italy
	Tea Range	Non alcoholic beverages (tea)	Sonnentor	Portugal
	Absinthe Essence Anise Flavoured Vodka	Alcoholic beverages (Vodka)	EMB	USA
	Blood Fat Reducing Tea	Non alcoholic beverages (tea)	Fujian Provincial Medicines & Health Products	Philippines
	Soup Top Range	Seasonings	Unilever	Taiwan
	Jin Yin Hua Instant Tea Powder	Non alcoholic beverages (tea)	Jue Wei Foods Co.	China
	Chinese Prayer Beads Drink	Non alcoholic beverages	Tong Zhi Tang	Hong Kong
	Gan He Tea	Non alcoholic beverages (tea)	Haoshuang Foods	China
	Venchi Barretta di Cioccolato	Consumer Packaged Goods	Venchi S.p.A.	Italy
	Shangou	Consumer Packaged Goods	Huamei Food Processing Co., Ltd	China

표 1-30. 국외에서 시판 중인 약썩 관련 제품

(2) 강화약썩 상품화 적용 탐색을 위한 가공적성 연구

(가) 강화약썩 원료 기초물성 테스트

① 현장에서 scale-up 생산한 표준화된 원료는 하나의 소재로서 상품 가치가 있다. 생산공정 중 동결건조한 분말 원료 및 건조 전의 농축액이 경우, 제품에 적용할 수 있는 소재의 하나로써 검토될 수 있다. 일반적으로 취급하기 쉬운 측면에서 분말 원료를 선호하기 때문에 생산된 강화약썩 분말원료에 대한 기초 물성테스트를 수행하였다.

② 성상 및 관능평가

- 짙은 갈색의 약썩 고유의 향미가 있는 분말로, 관능시 썩향이 강하게 느껴지며, 쓴맛이 매우 강하다.

③ 용해도 테스트

㉠ 육안평가 : 액상 제형에의 적용 검토를 위한 물에 대한 solubility를 검토하였다. 강화약썩 원료의 1일 섭취량을 고려하여 0.5%-2% 수용액으로 확인하였을 때, 0.5%-2% 수용액 모두 용해되지 않았다. 0.5% 수용액의 경우, 물에 일부 용해 및 혼합되어 육안상으로는 일부 녹지 않는 물질이 가라앉고 전체적으로 혼탁된 상태로 확인이 되었다. 1% 수용액의 경우, 0.5%와 비교하여 좀더 진한 갈색의 용액이 형성되었고, 가라앉지 않는 부분이 더 많았다. 2%는 한약과 같은 짙은 갈색 불투명 용액이 형태로 되었으며, 입자의 침전 또한 형성되었다. 본 원료는 완전히 용해되지 않아 액상 제형에의 검토시 유화 또는 분산 등의 제형연구가 추가적으로 필요할 것으로 판단되었다.

㉡ 투과도 평가 : 각 용액의 투과도(%T)를 Spectrophotometer를 이용하여 440nm 파장에서 측정하였다. 0.5-2% 수용액 모두 1% 미만으로 원료가 용해되지 않고 혼탁된 상태로 존재함을 확인할 수 있었다. 0.5%용액을 1/2로 희석하여 0.25%로 제조하였을 때, 투과도는 5% 정도로 측정되었으며, 육안으로는 역시 혼탁한 상태였다.

수용액	0.50%	1%	2%
투과도T% (440nm)	0.5	0.3	0.3

표 1-31. 투과도 평가 결과

④ 색도 평가

- 수용액 상태의 강화약썩 액의 색도를 측정하였다. 일반적으로 색도색차계의 색도는 식품의 품질지표로서 이용을 하며, 색의 변화나 차이 등을 확인하는 목적으로 사용을 한다. 또한 직접 보지 않고 두 제품의 수치의 정도 차이를 통해 색의 차이를 추정하고 재현하는 것이 가능하다.
- L값의 의미는 명도를 의미하며 0-100의 값으로 나타나는데, 흰색에 가까울수록 100으로 표시되고 육안으로 인식하기에 “밝음”이며 검정에 가까울수록 수치가 작아지고 육안으로 인식하기에 “어둠”에 가까워진다. a값의 의미는 redness 라고 표현하며, (+)수치이면 redness가 증가함을, (-)수치로 가면 greenness가 증가함을 의미하는 값이다. b값의 의미는 yellowness 라고 표현하며, (+)수치이면 yellowness가 증가함을, (-)수치로 가면 blueness가 증가함을 의미한다.
- 수용액 상태의 강화약썩의 색을 색도색차계로 평가하였으며, 농도에 따라 색에 어떠한 변화가 나타나는지 확인하였다. 용액의 농도가 증가할수록 명도는 어두워졌으며, redness의 정도와 yellowness의 정도가 감소하였다. 이는 농도가 증가함에 따라 옅은 갈색에서 짙은 갈색으로 변화하며 육안으로 보기에 검정에 가까운 쪽으로 색이 변하기 때문이다.

수용액	0.50%	1%	2%
L	35.61	11.61	2.25
a	9.88	9.35	2.89
b	22.09	7.74	1.28

표 1-32. 색도 평가 결과

- 표 1-32의 결과와 같이 강화약썩의 원료 물성테스트 결과, 약썩 원료의 용해도가 낮아 액상 제형에의 적용을 위해서는 유화 및 분산등의 연구 및 음료 외의 제형에의 적용가능성을 추가로 검토해보아야 할 것으로 판단되어 제품화를 위한 추가 연구를 진행하였다.

(나) 상품화 가능한 제형의 스크리닝

① 국내·외에서 썩을 이용한 제품들을 탐색한 결과 엑기스, 차, 캔디, 환 및 분말 등의 다양한 제형의 제품들이 판매되고 있는 것을 확인하였다. 효능에 대한 연구 및 검증은 증가하는 반면 일반식품 및 건강기능식품으로의 제품 개발이 미비하고 품질이 열약한 이유는 약썩 본연적으로 갖고 있는 강한 향의 영향 때문이라고 추정하였다.

② 약썩 본연의 강한 향과 맛에 적합한 제형 Ideation을 통해 “환” “건강드링크” “분말차” “액상파우치” 타입을 선정하였고, 이에 대한 소비자 반응을 토대로 가능성 높은 제형을 탐색하여 제품화 연구를 수행하였다.

(3) 강화약쑥 제형연구 및 상품 개발

- 앞에서 선정한 약쑥 적용 적절한 식품제형에 대한 소비자 수용도를 확인하기 위하여 prototype을 제조하여 소비자 조사를 실시하였다.

(가) 소비자 수용도 반응 조사

① 조사목적 : 강화약쑥 적용 prototype 제품의 컨셉 및 소비자 수용도를 평가하여 적절한 제형 선택 및 시장 가능성을 탐색해보고자 함.

② 조사방법

㉠ 대상 : 서울에 거주하는 59세 이하 주부

㉡ 표본 : N = 150

㉢ 조사형태 : C&U (Concept & Usage test)

Sequential Monadic test (한사람이 순서대로 여러 품목을 평가)

㉣ 조사품목 : 강화약쑥 드링크, 강화약쑥 파우더티, 강화약쑥 환, 강화약쑥 액상파우치





그림 1-71. 강화약쑥 적용 제품 Prototype 예시

(나) 소비자 수용도 조사 결과

- ① 강화약쑥의 건강기능식품 소재 및 제품화를 위해서는 소비자의 니즈(needs)인 약쑥의 은은한 맛과 향, 그리고 강화약쑥의 효능이라는 두가지 필수 요소를 동시에 만족 시켜야 할 것으로 판단되었다.
- ② “강화약쑥 환”의 경우 강화약쑥의 우수한 효능이 잘 반영될 수 있는 전통적인 컨셉 제형으로 기호도가 높게 평가되었으며, 소재 고유의 쓴맛에 대한 영향을 덜 받기 때문에 제품에 대한 선호도 또한 높게 평가되었다.
- ③ “강화약쑥 드링크”의 경우, 컨셉에 비해 전반맛에 대한 만족도는 낮아지나 수용할 만한 수준으로 판단되어 품질 개선 연구를 진행하였다. 쑥 본연의 짹짹한 맛은 보완하되 쓴맛의 개선은 필요할 것으로 판단되어 개선점으로 설정하였다.
- ④ “강화약쑥 파우더 티”와 “강화약쑥 액상파우치”의 경우, 쓴맛 등의 영향으로 전반적인 만족도가 매우 낮았으며, 컨셉 또한 수정 및 보완이 필요할 것으로 판단되었다. 소비자가 수용할 만한 맛과 향을 위해서는 하루 섭취해야 하는 제품의 수가 늘어나는 문제점 등이 있어 상품화 제형에서 제외하였다.
- ⑤ “강화약쑥 환” 및 “강화약쑥 드링크” 제형을 선택하여 추가 연구 진행

⑥ 소비자 수용도 조사 결과 요약

		강화약썩 드링크		강화약썩 파우더 티		강화약썩 환		강화약썩 엑상파우치	
		컨셉	제품	컨셉	제품	컨셉	제품	컨셉	제품
구입의사	Top2%	68.0	52.0	71.3	39.3	82.0	80.0	71.3	59.3
	5점평균	3.65	3.41	3.57	2.92	3.75	3.67	3.54	3.33
전반선호도	Top2%	73.3	65.3	68.7	46.0	88.7	86.0	69.3	52.7
	5점평균	3.78	3.67	3.65	3.07	4.03	3.98	3.73	3.23
컨셉만족도	Top2%	80.7		66.0		92.7		73.3	
	5점평균	3.88		3.62		4.14		3.75	
제품전반맛 만족도	Top2%		62.7		34.0				43.3
	5점평균		3.54		2.81				2.97

\* 구입의사 : 컨셉 및 제품 전반맛에 대한 종합적 평가 후 제시한 금액을 보고 구입의사 평가

\* 전반선호도 : 컨셉 및 제품 전반맛에 대한 종합적인 기호도 평가

\* 컨셉만족도 : 컨셉보드만을 인지한 후, 제품에 대한 선호도 평가

\* 제품전반맛 만족도 : Prototype 섭취 후, 제품 맛품질 등에 대한 평가

표 1-33. 소비자 수용도 조사 결과

(다) 제품 제조연구 진행

① 강화약썩 환 : 공복혈당 및 콜레스테롤 수치저하 기능성을 타겟으로 하였으며, 1일 섭취량에 적합하게 강화약썩추출물을 섭취할 수 있도록 3g/포, 1일 2포 물과 함께 섭취할 수 있도록 제품 설계를 진행하여 배합비를 설정하였다. 또한 표준화 된 원료에서는 강화약썩 고유의 향보다는 열처리 등에 의한 당약 향이 강하게 나타나 약썩 flavor를 이용하여 좀더 은은한 썩향이 느껴지도록 하였다. 다음과 같은 제조방법에 의하여 강화약썩 환을 제조하였으며, 제조된 환에서 실제로 지표물질인 Eupatilin이 정량되는지 확인하였으며, 기준에 적합한 결과를 얻을 수 있었다.

Eupatilin함량	기준규격 이론치	기준규격 실측치	결과
		11.25 mg/포	11.76 mg/포

표 1-34. 환 제품에서의 지표물질 함량확인



그림 1-72. 강화약썩 환 제조과정

② 강화약쑥 드링크 : 강화약쑥에 대한 전반적인 건강기능성 제공을 목적으로 마시기 쉽게 드링크 타입 제품개발을 진행하였다. 1병 120mL으로 마와 식물성크림 등을 혼합하여 특유의 쓴맛은 감소시키고 쑥향은 부드럽게 느껴지도록 하였다.

Eupatilin함량	기준규격 이론치	기준규격 실측치	결과
	9.5 mg/병	9.8 mg/병 10.76 mg/병	적합

표 1-35. 드링크 제품에서의 지표물질 함량확인

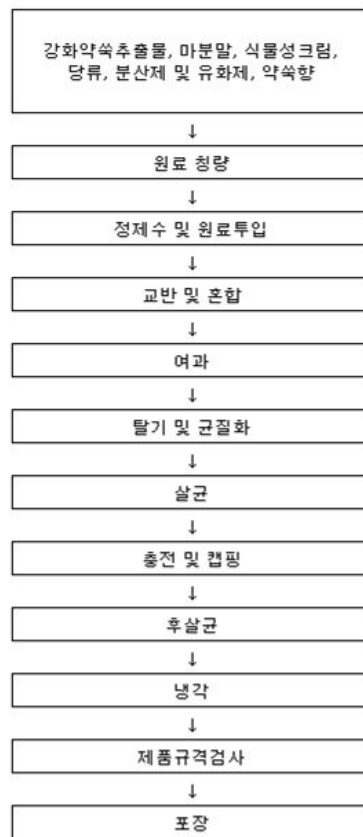


그림 1-73. 강화약쑥 드링크 제조공정

③ 강화약쑥 소재에서 지표성분인 Eupatilin을 기준으로 표준화된 소재 제조조건을 설정하여 이에 따라 표준화된 소재를 생산하였으며 이를 통한 제품에의 적용연구를 수행하였다. 여러 가지 제형 중 소비자의 선호도가 가장 높은 제형인 “환”과 “건강 드링크”를 선정하였으며 이에 대한 제품 제조연구를 수행하여 prototype을 개발하였다. 강화약쑥 소재의 수용가능한 원료가 및 안정적인 원물 확보 등을 위해 제품의 출시는 보류중에 있으나 시장 상황 등에 따라 출시할 수 있도록 제품의 개발은 완료되었다.



라. 추가 국내 자생소재를 이용한 소재 표준화 연구

(1) 추가 국내 자생소재의 검토

(가) 인삼산업법 상의 인삼의 정의

- “인삼”이란 오갈피나무과(科) 인삼속(인삼속) 식물을 말한다.
- “수삼”(수삼)이란 말리지 아니한 인삼을 말한다.
- “홍삼”(홍삼)이란 수삼을 증기나 그 밖의 방법으로 찌서 익혀 말린 것으로서 농림수산식품부령으로 정하는 색상을 띠는 것을 말한다.
- “태극삼”(태극삼)이란 수삼을 물로 익히거나 그 밖의 방법으로 익혀서 말린 것으로서 농림수산식품부령으로 정하는 색상을 띠는 것을 말한다.
- “백삼”(백삼)이란 수삼을 햇볕·열풍 또는 그 밖의 방법으로 익히지 아니하고 말린 것을 말한다.
- “그 밖의 인삼”이란 수삼을 원료로 하여 제조한 것(제3호부터 제5호까지에 해당하는 것은 제외한다)으로서 농림수산식품부령으로 정하는 것을 말한다.
- “인삼류”란 제2호부터 제6호까지에 규정된 것 모두를 말한다.
- “연근”(년근이란 인삼이 출아하여 자란 햇수를 말한다.)
- “원산지”란 인삼이 생산된 국가나 지역을 말한다.
- “인삼류제조”란 수삼을 원료로 하여 홍삼, 태극삼, 백삼 또는 그 밖의 인삼을 제조하는 것을 말한다.
- “인삼제품류”란 에 따른 식품등의 공전(公典) 또는 에 따른 건강기능식품의 공전에 수록된 식품 중 인삼류를 원료로 하여 제조·가공된 식품을 말한다.
- “생산자단체”란 에 따른 인삼 관련 품목조합(이하 “조합”이라 한다), 농업협동조합중앙회 및 농림수산식품부령으로 정하는 인삼 관련 법인을 말한다.

(나) 건기식 공전 상 인삼의 기준규격

① 제조기준

㉠ 원재료 : 인삼

- 말리지 아니한 수삼, 수삼을 햇볕/열풍 또는 기타 방법으로 익히지 아니하고 말린 백삼, 수삼을 물로 익혀 말린 태극삼

㉡ 제조방법

- 상기 ㉠의 원재료를 그대로 분말화 하거나 수분을 제거한 후 분말화하여 식용에 적합하도록 함. 또는 상기 ㉠의 원료재료를 물이나 주정(물/주정 혼합물 포함)으로 추출하여 여과하거나, 여과한 후 농축 또는 발효하여 식용에 적합하도록 함.

㉢ 기능성분 (또는 지표성분)의 함량 : 진세노사이드 Rg1 과 Rb1을 합하여 0.8 ~34 mg/g 함유하고 있어야 함.

㉣ 제조 시 유의사항 : 원재료인 인삼근은 “인삼산업법”에 적합하여야 하며, 4년근 이상의 것으로 춘미삼, 묘삼, 삼피, 인삼박은 사용할 수 없으며, 병삼인 경우에는 병든 부분을 제거하고 사용할 수 있음.

- ② 규격
- ㉠ 성상 : 고유의 색택과 향미를 가지며, 이미/이취가 없어야 함
- ㉡ 진세노사이드 Rg1과 Rb1의 합
  - 원료성 제품 : 표시량 이상
  - 최종제품 : 표시량의 80% 이상
- ㉢ 세균수 : 1 ml 당 3,000이하 (농축액에 한함)
- ㉣ 대장균군 : 음성

(다) 국내 인정 / 허가 현황

- ① 식용근거
- ㉠ 식품공전상 식품원재료 분류에 근채류로 분류
- ㉡ 식품공전상 식품에 사용할 수 있는 원료의 목록에 등재(있)
- ㉢ 식품공전상 식품에 사용할 수 있는 원료의 목록에 등재 (조직배양삼- 단, 조직배양 방법은 사전검토를 요함)
- ㉣ 식규65421-196 민원회신 2002.02.01. 인삼열매(Ginseng berry)는 식품원료로 사용이 가능
- ㉤ 식품공전 제2. 식품일반에 대한 공통기준 및 규격 2 - 1)(17)에 따라 인삼 또는 홍삼 함유 제품류의 경우 인삼박을 사용할 수 없도록 규정

원재료명(영문명)	인삼
이명	Ginseng, 백삼(白蔘), 홍삼(紅蔘), 야산삼(野山蔘), 별직삼(別直蔘), 귀개, 토정, 신초, 혈삼
학명	<i>Panax ginseng</i> C.A.Meyer. <i>Panax schinseng</i> Nees (이명)
생약명	인삼(人蔘, Ginseng Radix Alba)
기원	인삼: 인삼 <i>Panax ginseng</i> C. A. Meyer (오가과 Araliaceae)의 뿌리로서 가는 뿌리와 코르크층을 제거한 것
식용가능여부	가능
공전등재여부	사용가능원료
용도(이용부위)	식용[열매, 잎, 뿌리, (조직배양삼)-사전검토], 약용(뿌리, 잎)
동*식물 분류	식물

(출처: 한국 식품의약품안전청 홈페이지, [www.kfda.go.kr](http://www.kfda.go.kr))

표1-36. 인삼의 특성

② 주요성분 (부위별)

- ㉠ 배당체(配糖體) : 인삼에는 주요성분으로 알려진 배당체가 있으며 이들 혼합물을 산(酸)으로 가수분해하면 유리당으로서 포도당·람노오스·수크로오스·프룩토오스 등과 아글리콘이 생성되며, 인삼사포닌의 배당체로서는 파낙사디올과 파낙사트리올·β-시스토스테롤 및 올레아놀산의 성분이 나온다.
- ㉡ 파나센(panacen) : 인삼 고유의 향기성분으로 끓는점이 낮은 부분(60~110℃)에서 분리되는 것으로 세스퀴테르페노이드계의 화합물이다.

㉔ 폴리아세틸렌계 화합물 : 일본에서는 인삼에서 폴리아세틸렌계 화합물을 분리하여 파낙시놀이라 명명하고 그 화학구조식을 밝힌 바 있으며, 미국에서는 인삼이 어떤 종의 항세포 배양물에 대하여 세포독성을 발휘함을 발견하였으며 그 밖에  $\beta$ -시스토스테롤·스티구마스테롤 등이 함유되어 있음을 확인하였다.

㉕ 함질소 성분 : 인삼 중의 염기성 물질(알칼로이드)에 대한 연구는 오래 전부터 있었고 이 물질은 Hela-cell(乳癌細胞)이나 KS-cell의 생육이 억제된다고 하였으며 그 밖에 펩티드는 인슐린과 같은 작용을 하여 당뇨병에 유효하다고 한다.

㉖ 플라보노이드(flavonoid) : 인삼의 줄기와 잎에는 캠페롤·트리폴람·파나세노이드 등이 함유되어 있다.

㉗ 비타민 : 인삼 중 비타민류로는 B복합체와 니코틴산·판토텐산·폴산·비오틴 등이 함유되어 있다.

㉘ 미량원소(粘液質) : 인삼에는 미량원소로서 망간·구리·바나듐·코발트·비소·게르마늄·인·알루미늄·니켈 등 있으며 게르마늄 세포독성을 통하여 노화된 세포가 신생세포로 바뀌는 것을 촉진함으로써 가장 효과가 있다고 한다. 또한 항암작용도 있다고 한다.

㉙ 효소(酵素) : 인삼에는 아밀라아제와 펄라아제가 있음이 밝혀졌다.

(라) 인삼 (진세노사이드)의 효능

Ginsenoside		효능
Diol계 (중추신경 흥분억제)	Rb1	정신안정, 항불안작용, 진통작용, 콜레스테롤-중성지방 억제 및 분해, 지질과산화 작용, 간상해 보호작용, 혈관확장, 기억력개선, 신경세포생존 촉진작용, 인슐린유사작용, 최면작용, 해열작용, 중추신경 억제작용
	Rb2	당 및 지방대사 촉진, 항당뇨, Epinephrine 유도 지방 분해 억제작용, 콜레스테롤저하, 면역조절작용, 진통작용, 중추신경 억제작용
	Rc	진통작용, 코티코스테론 분비촉진, 간세포의 지질과산화 억제, 중추신경 억제작용
	Rd	부신피질 자극호르몬, 코티코스테론 분비촉진, 신장사구체 비대억제
Triol계 (중추신경 흥분촉진)	Re	부신피질 자극호르몬, 코티코스테론 분비촉진, 혈관확장, 항스트레스 작용, 간장해 (사염화탄소유도) 보호
	Rg1	중추신경계 흥분작용, 면역 기능 증강, 혈소판 응집억제, 기억학습기능 향상, 항피로 (피로회복), 항 스트레스, 혈관확장, 스트레스성 성행동 장애 개선작용, 간세포증식 및 DNA합성 촉진
홍삼 성분	Compound K	항알러지, 주름개선
	Rg3	암세포전이 억제, 뇌세포 보호, 항암제 내성억제, 면역기능(아토피), 기억력개선

표1-37. 인삼의 효능

- 강화약속 외의 부가가치가 높은 국내 자생소재를 추가적으로 탐색하여 “고려인삼”소재를 선정하였으며 이에 대한 특정성분을 강화시킨 표준화된 인삼소재를 제조하기 위한 연구를 수행하였다.

(2) 원료 생산 공정 개발

(가) 지표 (기능)물질의 분석법 확립

HPLC Condition

- Column : C18, 5um (4.6 \* 250 mm)
- Temp. : 35 °C
- Detector : DAD, 203 nm
- Mobile : Water / Acetonitrile
- Gradient : 20 % Acetonitrile(0 min) ~ 95 % Acetonitrile (60 min)
- Peak : 47 ~ 48 분대

(나) 추출물 제조 공정 최적화를 위한 연구

① Compound K 의 기질화합물 및 전환경로 확인

② Ginsenoside Rb1, ginsenoside Rb2, ginsenoside Rc는 ginsenoside Rd, ginsenoside F2를 거쳐 최종적으로 compound K로 변환됨. 따라서 효소 발효 기술을 이용하여 compound K 생산 시, 기질은 ginsenoside Rb1, ginsenoside Rb2, ginsenoside Rc, ginsenoside Rd, ginsenoside F2가 될 수 있음.

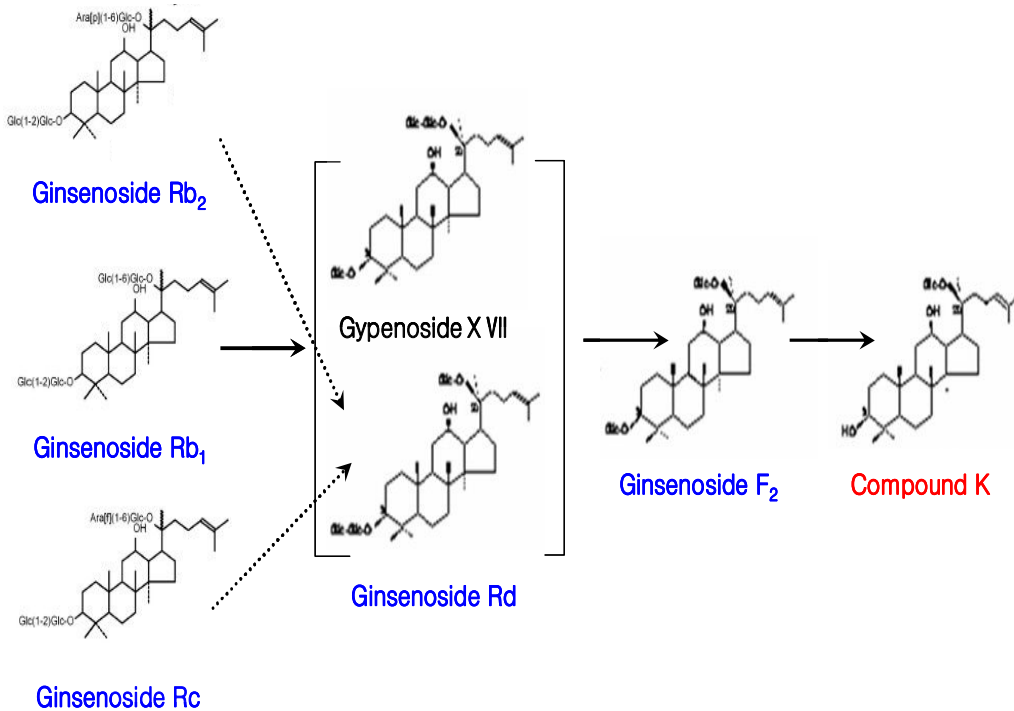


그림 1-74. 인삼 화합물의 대사과정

- ② 기질화합물 (Gisenoside Rb1, Rc, Rb2, Rd)의 추출조건 설정
- ㉠ 물과 주정을 이용하여 사포닌 추출조건을 설정하려 하였으나, 추출물 제조 시 주정의 사용은 이후 농축액과 효소의 반응을 더디게 하므로, 추출물의 제조는 100 % 물을 이용하여 test 함.
- ㉡ 온도 설정 및 추출시간에 따른 기질화합물 (Rb1)의 추출결과 확인
- ㉢ 추출물의 온도는 타온도에서 동일시간 추출하는 것과 비교해 볼 때 80 ℃ 가 가장 적당하며, 추출시간은 반복회수 및 생산공정 scale up 시 효율을 고려하여 재설정하는 것이 바람직할 것으로 판단됨(표 1-36).

온도/시간	Rb1	온도/시간	Rb1
40℃-03	7.247	70℃-03	8.101
40℃-06	7.432	70℃-06	9.490
40℃-10	7.883	70℃-10	10.830
40℃-24	8.447	70℃-24	14.719
50℃-03	7.809	80℃-03	8.701
50℃-06	7.942	80℃-06	9.890
50℃-10	8.324	80℃-10	11.290
50℃-24	9.932	80℃-24	16.257
60℃-03	7.921	90℃-03	5.231
60℃-06	8.553	90℃-06	7.540
60℃-10	9.302	90℃-10	6.330
60℃-24	12.108	90℃-24	5.179

표 1-36. 온도 및 시간에 따른 Rb1의 추출 결과

- ㉣ 생산현장에서의 생산성을 고려하여 추출을 반복할 경우, 4시간씩 3회 반복 추출하는 것이 가장 바람직할 것으로 판단됨.

추출조건	Rb1 함량 (mg/g)	추출물량 (g)	총 Rb1 함량 (mg/g)	Rb1 총량 (mg/g)
4hr-1	15.911	20.09	319.6561	454.5885
4hr-2	17.511	5.74	100.5113	
4hr-3	15.505	2.22	34.42118	
6hr-1	17.616	18.53	326.4245	450.3329
6hr-2	20.335	5.66	115.0964	
6hr-3	16.022	0.55	8.812031	

표 1-37. 반복회수에 따른 사포닌 용출

- ③ 3세부에서 Lab 실험을 통해 설계한 효소반응 공정을 토대로 scale up
- ㉠ pH 4.3
- ㉡ 반응온도 :  $57 \pm 1$  °C
- ㉢ 희석배수 : 농축액 7 bx.
- ㉣ 효소 농도 : 전체 Volumn 2%
- ㉤ 반응시간 : 80시간 이상

④ 효소 반응 진행 전 농축액을 분석결과 CK는 존재하지 않으나, 아주 소량의 F2는 확인 할 수 있었음(그림 1-75).

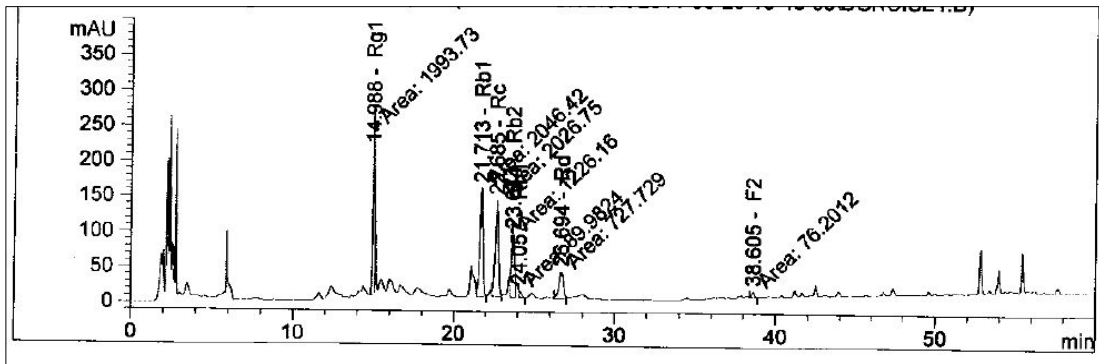


그림 1-75. 농축액 (인삼 추출물) 분석 Chromatogram

⑤ 6시간 간격으로 샘플링을 진행하여 CK의 함량을 분석해 본 결과 84시간 이후부터 큰 변화가 없는 것을 확인할 수 있었음(그림 1-76).

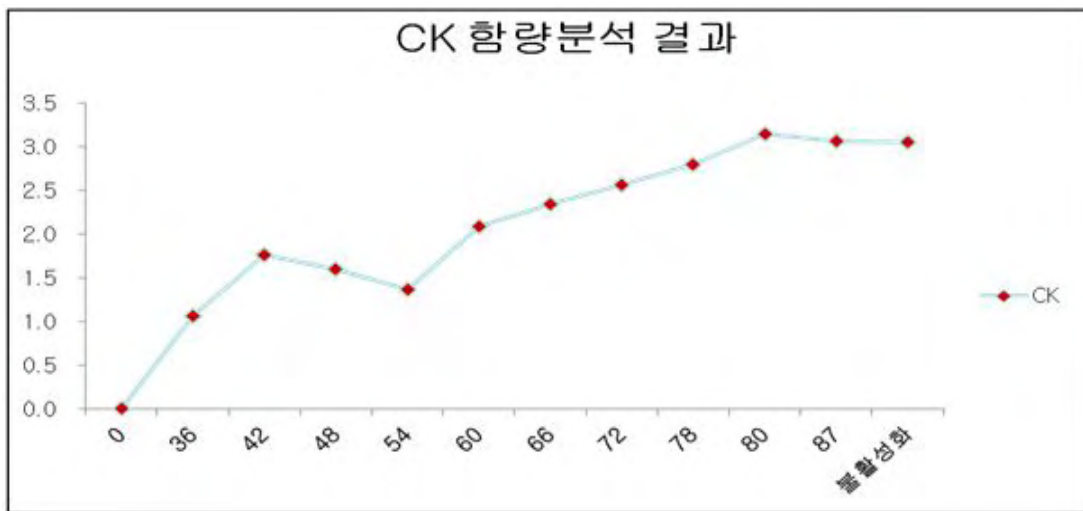


그림 1-76. 시간당 샘플링을 통한 CK의 함량분석 결과

- 개선사항 : 효소가 기질과 반응하는 과정에서 침전물이 발생함을 확인할 수 있었음. 침전물의 양이 많고, 침전물에 다량의 CK가 함유되어 있는 것을 분석을 통해 확인하였기에, 침전물을 제거하는 것은 불가능 하다고 판단되며, 이후 개선을 위한 연구가 진행되어야 할 것으로 판단됨.

⑥ 95 ℃의 고온조건에서 이루어지는 살균작업이므로, 소량의 진세노사이드의 소실을 가져오는 하나, 전체적인 결과에 큰 영향을 미치지 않으며, 효소의 불활성화 공정은 꼭 필요하므로, 고온 살균작업을 진행함.

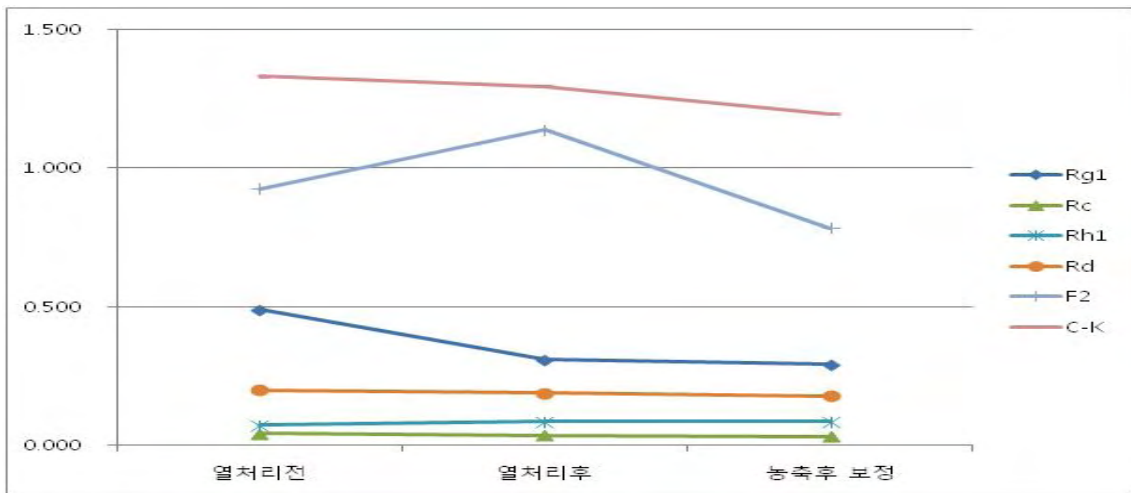


그림 1-77. 반응 종료 후 효소의 불활성화를 위한 test

⑦ 분획 : 추출물을 레진을 이용하여 비사포닌을 일부 제거하기 위한 공정설계

㉞ 레진 (Resin)의 선택

- 식품용도로 사용 가능하여야 하며, 물과 주정을 이용하여 분획이 이루어져야 함.
- 기존 CJ의 기술력으로 인삼 분획 소재 개발을 위한 공정개발에서 선택 되어진 흡착수지 (Diaion HP20)의 경우, CK 강화분획물의 개발에도 적절하다고 판단되어, 흡착수지를 이용한 분획 공정을 개발함.

㉞ 물과 주정의 비율 조절을 이용한 CK 강화분획물의 개발

- 물과 주정의 비율을 이용하여 비사포닌을 일부 제거하기로 함.
- 비사포닌의 제거 시, 용출되는 사포닌의 여부를 확인하여 주정의 농도를 조절함.

1) 흡착방법

- CK가 강화 되어진 농축액을 3 bx. 수준으로 희석하여 흡착수지에 Rotation 방식으로 흡착시킴.
- 흡착시간은 최소 8시간이상 이 되도록 함.

2) Unbound 샘플의 분석을 통해 사포닌의 용출 확인

- HPLC 분석을 통하여 사포닌이 레진에 흡착되어 용출이 이루어지지 않았음을 확인할 수 있었기에 이후 분획연구를 진행함(그림 1-78).

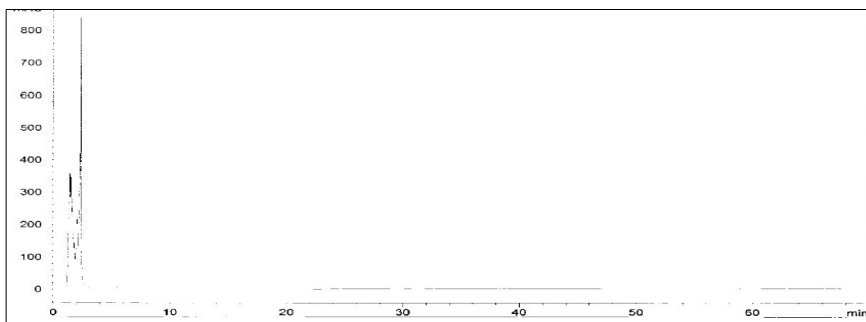


그림 1-78. 흡착 후 unbound 된 물질 분석 Chromatogram



3) 95% 이상의 주정을 이용하여 사포닌 용출

- 일부 비사포닌의 제거를 통해 g당 CK의 함량이 증대되었으며, 이후 건조 작업을 통해 원료를 표준화 함.

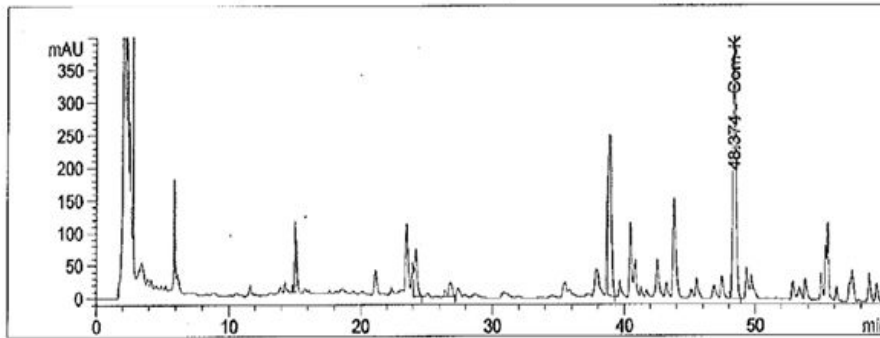


그림 1-79. 주정을 이용하여 용출한 CK강화분획물의 Chromatogram

⑧ CK강화분획물 제조공정

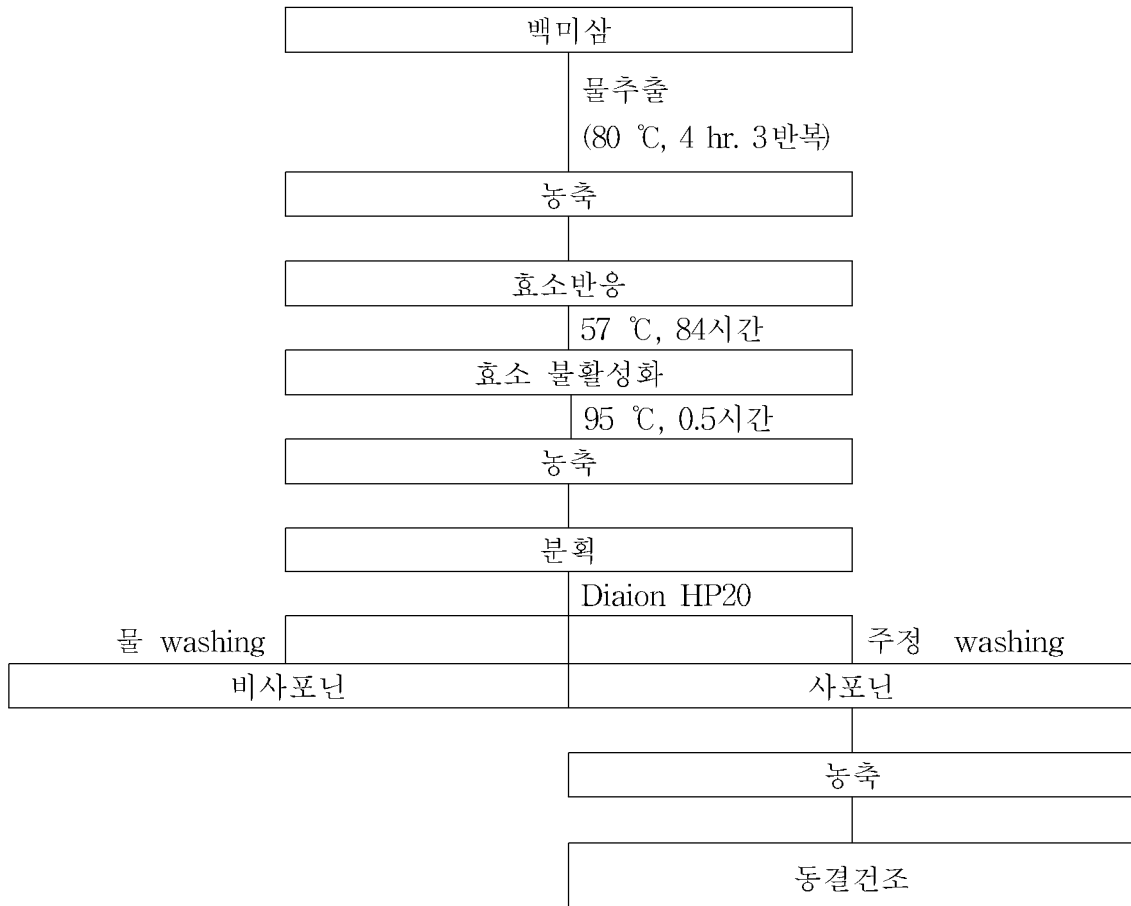


그림 1-80. CK강화분획물 제조공정

⑨ 정량분석 결과

	수율 (%)	CK 함량 (mg/g)
CK강화분획물	12.8	80

표1-40. 정량분석 결과

⑩ 미생물 시험 결과

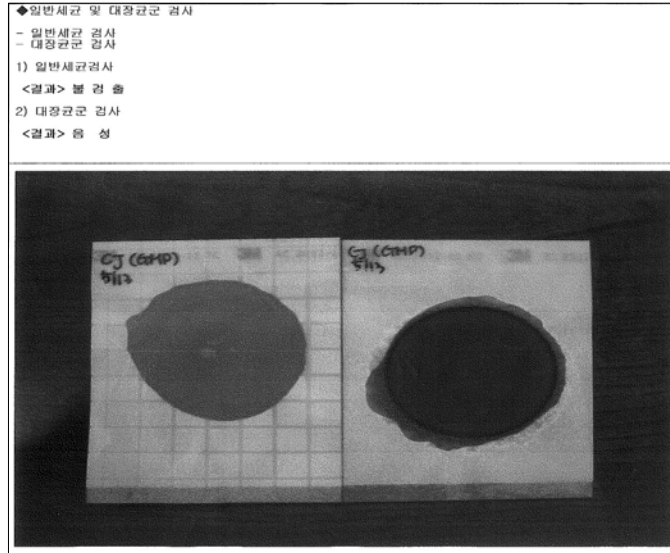


그림 1-81. 미생물 시험 결과

(3) 특정성분 강화소재 제조를 위한 표준 공정 수립

- 앞의 제조방법에 따라 특정성분이 강화된 표준화된 인삼소재를 제조하였으며, 향후 이를 안정적으로 제조하기 위해서는 공정에서의 관리 지점을 설정하고 이에 대한 표준 공정을 수립하는 것이 중요하다고 판단되었다. 제조공정 중 일반적이지 않은 과정이 효소를 사용하는 공정이었고 순도가 높은 효소가 아닌 복합 효소이기에 이 중에서 주요 효소라고 생각되는  $\beta$ -glucosidase에 역가 및 전환량을 확인하고 이에 대한 품질 규격을 설정하여 제조시 이를 참고하고자 하였다.

(가) 사용효소의 품질 규격

효소역가		GPD 전환량 (mg/mL)
생산batch	$\beta$ -glucosidase (U/mg)	
Lot no. 1	76	1.681
Lot no. 2	57.4	2.044
Lot no. 3	60.8	2.105

표1-41. 사용효소의 품질 규격

(나) 효소의 반응성 확인

효소반응 전환(mg/mL)		총 전환량 (mg/mL)
GPD 전환	F2 전환	
1.68	1.97	3.65
2.04	1.83	3.84
2.11	1.42	3.52

표1-42. 효소의 반응성

(다) 효소의 품질규격 설정

- 위의 결과를 보았을 때, 사용 효소의 역가에 따른 GPD 전환량이나 GPD+F2 총 전환량에 큰 차이가 나타나지 않았다. GPD 전환량이 작은 경우, F2로의 전환량이 높아 총 전환량에 있어서는 큰 차이가 없는 것으로 확인이 되었다. 즉, 사용효소의  $\beta$ -glucosidase의 역가의 일부 차이가 진세노사이드 전환에 key factor는 아니라고 판단되었으며, 그러나 전환에 영향을 미치는 효소임을 감안할 때, 향후 제조시에는 55U/mg이상의 효소를 사용하는 것으로 품질 규격을 설정하였다.

#### (4) 원료 기초물성 및 적용 가능제형 screening

##### (가) 원료 기초물성 테스트

① 현장에서 scale-up 생산한 표준화된 원료가 하나의 소재로서 상품 가치가 있다. 생산공정 중 동결건조한 분말 원료 및 건조 전의 농축액이 경우, 제품에 적용할 수 있는 소재의 하나로써 검토될 수 있다. 일반적으로 취급하기 쉬운 측면에서 분말 원료를 선호하기 때문에 생산된 분말원료에 대한 기초 물성테스트를 수행하였다.

② 성상 및 원료 관능 : 갈색의 인삼 고유의 향미가 있는 분말로, 관능시 인삼향이 강하고 쓴맛이 매우 강하다.

③ 용해도 : 액상 제형에의 적용 검토를 위한 물에 대한 solubility를 검토하였다. 0.05%-1% 수용액으로 확인하였을 때, 0.05%는 대부분 물에 용해되는 듯이 육안상으로는 보이나, 일부 녹지 않는 물질이 가라앉았다. 0.25% 농도부터는 눈에 띄게 탁도가 심했으며, 본 원료는 완전히 용해되지 않아 액상 제형에의 검토시 유화 또는 분산 등의 제형연구가 필요할 것으로 판단되었다. 온도에 따라서는 80% 이상의 고온에서 녹였을 때에 용해되는 양은 많아졌으나, 뿌연 형태로 녹아 탁도는 더욱 떨어졌다.

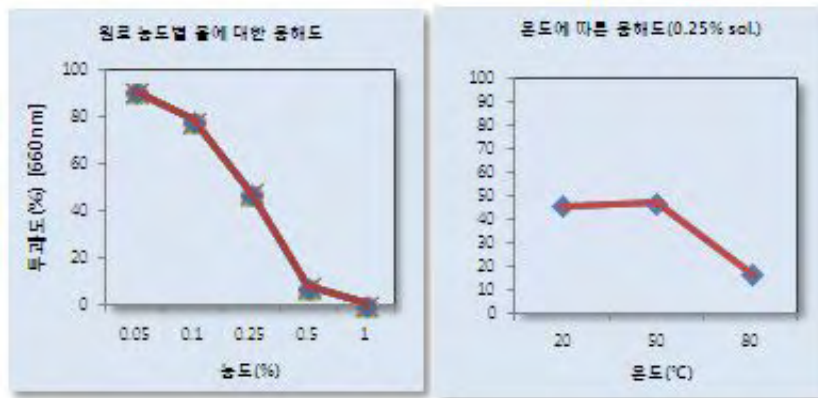


그림 1-82. 원료의 농도 및 온도에 따른 용해도 평가

④ 위의 결과에 따라 원료의 맛개선, 수용화 및 제품에의 안정성을 높이기 위하여 1-3세부 과제에서 encapsulation 연구를 통한 원료 자체에서의 품질개선연구를 수행하여 향후 제품에의 적용 가능성을 높이고자 하였다.

5. 제1-5세부연구과제(연구사업단관리)

가. 1차년도

- 1차년도에는 2011년 2월에 1차년도 성과를 정리하기 위해 1차 진도보고회를 개최하였으며, 같은 해 3월에 해외의 유명한 과학자인 Raymond L. Erickson, Zigang Dong, Robert Huber 교수를 초청하여 자문을 받고 세미나를 개최하였음. 또한 같은 달에 기능성식품산업화 심포지엄을 개최하였음.

날짜	행사내용
2011.02.22.(목)	기능성식품산업화 연구사업단 제1차 진도보고회
2011.03.04.(금)	기능성식품산업화 연구사업단 전문가초청 자문 (Raymond L. Erikson, Zigang Dong)
2011.03.21.(월)	세미나강연 (Robert Huber)
2011.03.24.(목)	2011년기능성식품산업화심포지엄 (강현중, 오동찬, 이광범, 김재범, 이호영, 강경선, 장구)
2011.04.07.(목)	2011년 기능성식품산업화 중간평가

나. 2차년도

- 2차년도에는 1핵심과제의 성과를 정리하기 위한 회의를 세 차례 가졌으며, 2011년 10월에는 James E Troski 교수를 초청하여 세미나를 개최하였음. 또한 같은 해 11월에 식품 분야에서 유명한 Cornell 대학의 Jean B. Hunter 교수와 Harvard Medical School에 있는 이삼환 교수를 특별연사로 초청하여 세미나를 가졌으며, 2012년 2월에는 국내외의 저명한 과학자들을 초청하여 Convergence Science and Technology for Personalized Food-Medicine System이라는 제목의 심포지엄을 개최하였음.

날짜	행사내용
2011.06.02.(목)	기능성식품산업화연구사업단 2차년도 1핵심과제 1차회의
2011.09.19.(월)	기술사업화지원사업 2차년도 1핵심과제 2차회의
2011.10.29.(토)	세미나강연 (James E Troski)
2011.11.04.(금)	기능성식품산업화특별연사초청세미나 (Jean B. Hunter-Cornell University)
2011.11.04.(금)	기능성식품산업화특별연사초청세미나 (Sam W. Lee-Harvard Medical School)
2012.01.30.(월)	기능성식품산업화연구사업단 2차년도 1핵심과제 3차회의
2012.02.01.(수)	심포지엄 (소재목: Convergence Science and Technology for Personalized Food - Medicine System)

다. 3차년도

- 3차년도에는 두 번의 1핵심과제 회의를 비롯하여 최종보고서 작성에 대비하여 2012년 11월에 전체 중간보고회를 가졌으며, Rober Huber를 비롯하여 9분의 연사를 초청하여 6번 세미나를 개최하였음. 또한 2013년 4월에는 기능성식품 산업에 대한 대학과 기업의 상호 이해를 증진하고자 각계에서 활발히 활동을 하고 있는 분들을 초청하여 기능성식품산업화 연구 심포지엄을 개최하였음.

날짜	행사내용
2012.06.04.(월)	기능성 식품산업화 연구사업단 3차년도 1핵심과제 1차회의
2012.06.13.(수)	연사초청세미나 (Rui Hai Liu, Akira Murakami, Robert Huber)
2012.11.13.(화)	기능성 식품산업화 연구사업단 3차년도 최종평가를 위한 전체 중간보고회
2012.11.06.(화)	세미나강연 (Jasom K. Kim)
2013.01.16.(수)	세미나강연 (김영준)
2013.01.25.(금)	세미나강연 (김정현, 박시형)
2013.03.12.(화)	기능성 식품산업화 연구사업단 3차년도 1핵심과제 2차회의
2013.03.11.(월)	세미나강연 (Chang Yong Lee)
2013.03.20.(수)	세미나강연 (Zigang Dong)
2013.04.02.(화)	2013기능성식품산업화연구심포지움 (이정은, 이부용, 홍성주, 최지현)

## 제 2 절 제2핵심과제(녹차 등 국내농산물을 이용한 미용건강기능식품 개발)

### 1. 제2-1세부연구과제(녹차 등 국내농산물을 이용한 미용기능성식품 제품화 연구)

#### 가. 피부 기능성 미용식품 시제품 제작

- 국내산 녹차 자원의 기능성식품 원료화를 위하여, 인체적용시험을 통한 피부 미용 기능성식품의 근거를 확인하고, 차별화 시너지 소재 활용을 위한 다양한 녹차 유래 성분들에 대한 지적 자산 확보가 가능하였다. 이를 통하여 기능성 식품 개발의 단초를 마련하였으며, 제품화를 위해 고객 수용도를 조사하였다. 그 결과, 클로로필 고함량 녹차 추출물은 분말 스틱형 제형이 우수함을 확인하였으며 시장성 부분에서도 월등함을 확인하였다. 이를 토대로 제품 출시를 추진하였으나 회사 내부적인 사정으로 제품출시에는 도달하지 못하였으며, 시장 상황의 변동에 따라 언제라도 출시 가능한 상태로 협의되었다.



그림 2-1. 실험과정

#### 나. 사업화: 개별인정형 녹차활용 기능식품 출시

(1) 내용: 리리코스 더블핏S 제품 출시 (2011.05)

(2) 성과: 출시후 제품 매출 성과 (공급가 기준)

2011.05~12	951,000,000원
2012.01~12	470,000,000원
2013.01~04	67,000,000원
누적매출 (24개월)	1,488,000,000원
환산 연간 매출 (12개월)	620,000,000원 (6억2천만원)

--> 소비자가 환산 연간 매출 약 10억원 (2개년 평균) 달성

(3) 제품특징

- (가) 녹차 추출물 함유하여 체지방감소에 도움을 주는 제품 (개별인정형 기능성식품)
- (나) 더블핏 T와 프로그래밍화 하여 고객 만족도 및 유인 증가 (장건강 개선)
- (다) 소구효능: 녹차추출물 통한 체지방 감소, 체중감량, 체내 지방 축적 방지, 지방 합성 억제, 판토텐산, 비타민B군 처방에 의한 활력 증강, 생체 리듬 활성화



그림 2-2. 녹차관련 출시 제품(더블핏 T)

(4) 소재특징: 아모레퍼시픽 설록다원에서 철저히 관리하는 녹차

- (가) 원료 관리 단계에서부터 고객 안심감 증대로 제품성 제고
- (나) 농가 및 제품개발 기업까지 윈윈 전략 추구

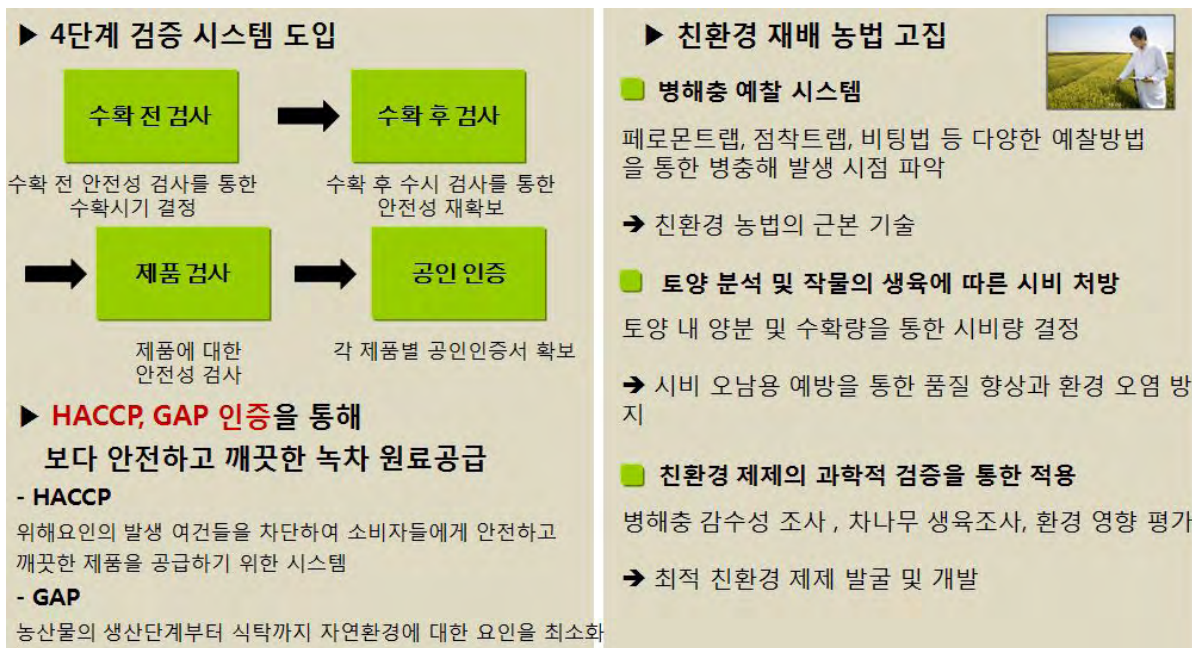


그림 2-3. 소재 특징



다. 사업화 전망: 녹차활용 기능식품 출시

- (1) 2013년 지속된 경기 침체로 건강식품 시장 매출 감소 및 관련된 AP 전략 수정으로 신제품 건수 감소 (제품 SKU 축소 전략) --> 출시전망 현재까지 불투명
- (2) 녹차 추출물의 체지방감소 개별인정형 소재가 기준규격으로 변경 --> Benefit 저하
- (3) 관련 세부과제를 통한 피부 기능성 미용식품 출시 지연 --> 소재화 지연
- (4) 기능식품 활용 소재 pool 확보 차원에서는 의의가 있으나 연계 제품 출시는 지연 / 실패 --> 기술료 및 반환금 산정 시 참고 요망

## 2. 제2-2세부연구과제(국내농산물을 이용한 피부미용 신소재 탐색 및 효능검증)

### 가. 연구수행방법(이론적·실험적 접근방법)

#### (1) 1차년도

- (가) 85종의 식용 및 약용 식물 자원 선정 및 에탄올 추출
- (나) DPPH test, MMP-1 저해활성, Collagen 생성능 스크리닝

#### (2) 2차년도

- (가) 스크리닝을 통해 선별한 후보 농산물의 활성성분 분리정제 및 규명
- (나) 피부세포주를 이용한 *in vitro* 활성 연구 및 동물 모델을 이용한 *in vivo* 활성 연구

#### (3) 3차년도

- (가) Scale-up 및 공정 표준화 연구를 통해 최적 분리 및 정제공정 개발
- (나) 최적 초고압 처리 기술 개발을 통한 추출 수율 증대

### 나. 연구내용

#### (1) 1차년도

- (가) 85종의 식용 및 약용 식물 자원 선정 및 에탄올 추출을 통한 라이브러리 구축
- (나) Free radical 소거능, MMP-1 저해활성, Collagen 생성능이 우수한 대상자원 5종 확정

#### (2) 2차년도

##### (가) 제주진득찰 추출물의 *in vitro* 활성 연구

- ① Free radical 제거능 실험 및 MMP 실험을 통한 항노화 효능 측정
- ② Collagen 합성 촉진 및 collagenase 저해능 실험을 통한 탄력 유지 효능 측정

##### (나) 제주진득찰 추출물의 *in vivo* 활성 연구

- ① 자외선을 조사한 무모쥐에 12주간 경구 투여하여 피부보습 및 피부장벽기능, 주름, 생체지표를 확인

##### (다) 활성성분의 분리정제 및 분자구조 규명

#### (3) 3차년도

##### (가) 활성성분의 *in vitro* 활성 연구

- ① Free radical 제거능 및 collagen 합성 촉진 실험을 통한 항산화 효능 및 탄력 유지 효능 측정

##### ② MAPK/AP-1 pathway에 의한 MMP 억제를 통한 항노화 효능 측정

##### (나) 추출용매 및 공정조건별 추출수율의 최적화

- ① 초고압 추출을 통한 지표성분 추출수율의 최적화
- ② 공정조건 변화에 따른 지표성분 추출수율의 확인을 통한 최적조건 확립

다. 연구결과

(1) 국내농산물 추가 소재 발굴 및 효능평가

(가) 국내산 식용 및 약용 농산물 자원 확보 및 라이브러리 구축

- 국내산 식물자원의 약용 및 식용 가능 여부를 검토하여 최종 85종의 식용 및 약용 식물 자원을 선별하였다. 이후, 에탄올 추출을 통한 국내산 식용 및 약용식물 라이브러리 구축을 완료하였다(표 2-1).

No.	Korean name	Botanical name	식용가능여부	No.	Korean name	Botanical name	식용가능여부
2	꿀풀	<i>Prunella vulgaris</i>	가능	27	쑤(갈취)	<i>Pueraria lobata</i>	가능
3	띠	<i>Imperata cylindrica</i>	가능	28	인동	<i>Lonicera japonica</i>	가능
4	소나무(송취)	<i>Pinus densiflora</i>	가능	30	쑤(갈근)	<i>Pueraria lobata</i>	가능
5	속단	<i>Phlomis umbrosa</i>	가능	31	속백나무(속백엽)	<i>Thuja orientalis/ Biota orientalis</i>	가능
6	식비름	<i>Portulaca oleraceae</i>	가능	32	동굴레	<i>Polygonatum odoratum</i>	가능
7	영경귀	<i>Cirsium japonicum</i>	가능	33	석창포	<i>Acorus gramineus</i>	가능
8	금불초	<i>Inula japonica</i>	가능	34	지자나무(지자)	<i>Gardenia jasminoides</i>	가능
10	만삼	<i>Codonopsis pilosula</i>	가능	35	연(연자)	<i>Nelumbo nucifera</i>	가능
11	재비름	<i>Lablab purpureus</i>	가능	38	결명자	<i>Senna tora</i>	가능
12	뽕의장풀	<i>Commelina communis</i>	가능	39	억모말	<i>Houttuynia cordata</i>	가능
13	저름	<i>Dendropolyporus umbellatus</i>	가능	42	강황	<i>Curcuma longa</i>	가능
15	소나무(송잎)	<i>Pinus densiflora</i>	가능	43	산국	<i>Chrysanthemum boreale</i>	가능
16	황유	<i>Elythria ciliata</i>	가능	44	맥문동	<i>Liriope platyphylla</i>	가능
17	뽕나무(지구자)	<i>Hovenia dulcis</i>	가능	45	황기	<i>Astragalus membranaceus</i>	가능
18	사상자	<i>Tortilis japonica</i>	가능	46	도라지	<i>Platycodon grandiflorum</i>	가능
20	백초향	<i>Agastache rugosa</i>	가능	47	황금	<i>Scutellaria baicalensis</i>	가능
21	단삼	<i>Salvia miltiorrhiza</i>	가능	48	작약	<i>Paeonia lactiflora</i>	가능
22	진득할	<i>Siegesbeckia glabrescens</i>	가능	51	산수유	<i>Cornus officinalis</i>	가능
23	감나무(시엽)	<i>Diospyros kaki</i>	가능	53	민들레	<i>Taraxacum mongolicum</i>	가능
24	뽕대추(산조인)	<i>Zizyphus jujuba</i>	가능	54	오미자	<i>Schizandra chinensis</i>	가능
25	갯나무(해송자)	<i>Pinus koraensis</i>	가능	56	삼주	<i>Atractylodes ovata</i>	가능
26	오리나무	<i>Alnus japonica</i>	가능	57	지자	<i>Gardenia jasminoides</i>	가능

No.	Korean name	Botanical name	식용가능여부	No.	Korean name	Botanical name	식용가능여부
58	택란엽	<i>Lycopus lucidus</i>	가능	103	연전초	<i>Glechoma hederacea</i>	가능
59	속지황	<i>Rehmannia glutinosa</i>	가능	105	지초	<i>Lithospermum erythrorhizon</i>	가능
60	쪽두서니	<i>Rubia akane</i>	가능	106	냉북자	<i>Raphanus sativus</i>	가능
63	뽕나무(상엽)	<i>Morus alba</i>	가능	107	귀전우	<i>Euonymus alatus</i>	가능
70	뽕나무(상상자)	<i>Morus alba</i>	가능	110	매엽	<i>Artemisia princeps</i>	가능
72	막지인(중국산)	<i>Alpinia oxyphylla</i>	가능	113	유근피	<i>Ulmus pumila</i>	가능
73	구기자	<i>Lycium chinense</i>	가능	115	상백피	<i>Morus alba</i>	가능
74	해바라기씨	<i>Helianthus annuus</i>	가능	117	천궁	<i>Cnidium officinale</i>	가능
76	고향강	<i>Alpinia officinarum</i>	가능	119	해동피	<i>Kalopanax septemlobus</i>	가능
79	산마늘(줄기)	<i>Allium victorialis</i>	가능	122	황정	<i>Polygonatum sibiricum</i>	가능
80	산마늘(뿌리)	<i>Allium victorialis</i>	가능	123	의미인	<i>Coix lacryma-jobi</i>	가능
81	산마늘(잎)	<i>Allium victorialis</i>	가능	125	사삼	<i>Adenophora triphylla</i>	가능
85	독활	<i>Aralia cordata</i>	가능	126	두충	<i>Eucommia ulmoides</i>	가능
86	장충	<i>Atractylodes lancea</i>	가능	128	당귀	<i>Angelica gigas</i>	가능
87	천우슬(쇠무릎)	<i>Achyranthes japonica</i>	가능	129	간지황	<i>Rehmannia glutinosa</i>	가능
88	원지	<i>Polygala tenuifolia</i>	가능	131	간강	<i>Zingiber officinale</i>	가능
90	천마	<i>Gastrodia elata</i>	가능	132	모과(목과)	<i>Chaenomeles sinensis</i>	가능
91	함초	<i>Salicornia herbacea</i>	가능	137	산약	<i>Dioscorea japonica</i>	가능
93	사인	<i>Anomum villosum Loureiro</i>	가능	141	인진쑈	<i>Artemisia capillaris</i>	가능
96	감인	<i>Euryale ferox</i>	가능	142	소백리(가죽나무)	<i>Ailanthus altissima</i>	가능
97	갈대뿌리	<i>Phragmites australis</i>	가능				

표 2-1. 국내산 식용 및 약용식물 라이브러리

(나) 피부건강 기능 식이소재 1차 스크리닝 및 대상자원 확정

① 항산화능 평가를 통한 1차 후보자원 선별

- 산화적인 스트레스는 세포의 free radical을 증가시켜 피부노화의 주요한 원인이 된다. 피부 건강 기능 식이소재 스크리닝 및 대상자원 확정을 위해 DPPH assay와 ROS (reactive oxygen species) assay를 통해 free radical 소거능이 우수한 식물자원인 닭의장풀(*Commelina communis* L.), 저령(*Dendropolyporus umbellatus* Jülich), 진득찰(*Siegesbeckia glabrescens* Makino), 오리나무(*Alnus japonica* Steudel), 꼭두서니(*Rubia akane* Nakai)를 1차적으로 선별 하였다(그림 2-4, 2-5).(\*p<0.05, \*\*p<0.01).

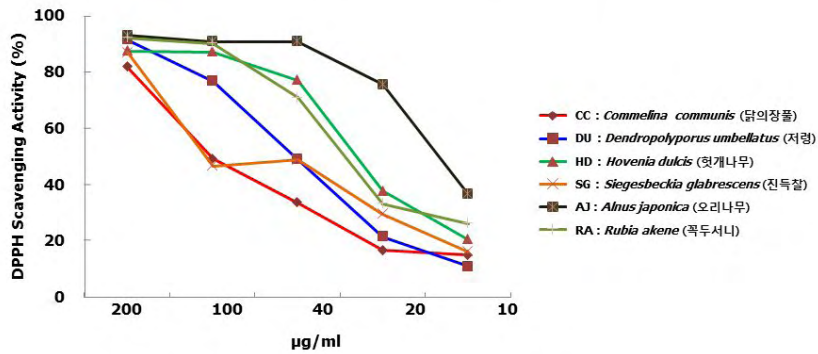


그림 2-4. 국내농산물의 항산화능 평가

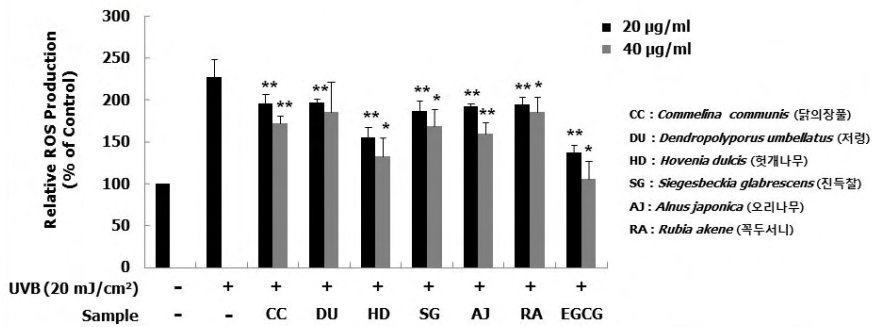


그림 2-5. 국내농산물의 ROS 생성 억제효능 평가

② 항노화능 평가를 통한 최종 후보물질 선별

- MMPs는 단백질 분해효소로서 피부 구성성분인 콜라겐과 엘라스틴 등을 파괴하여 피부 노화의 주요 원인이 된다. MMP의 종류 중에서 특히 MMP-1은 콜라겐 분해효소로 피부 노화의 중요한 효소이며, UVB에 의해서 발현 및 생성이 증가한다. MMP-1에 의해 분해되는 콜라겐은 피부 구성 성분 중 70% 이상을 차지하고 있는 단백질로 피부 노화가 진행됨에 따라서 콜라겐 생성이 줄어들게 되고 피부 탄력이 저하된다. 특히 콜라겐은 외부환경 요인 중 하나인 UVB에 의해 합성이 저해되며, 또한 콜라겐 전구체인 procollagen의 합성이 저해된다.

- 1차적으로 선별된 자원에 대한 항노화 활성을 확인하기 위해 collagen 생성능, MMP-1 저해 활성을 RT-PCR (reverse-transcription polymerase chain reaction)을 통해 확인하여 이 중 우수한 활성을 갖는 제주진득찰을 최종적으로 확정하였다 (그림 2-6, 2-7). (\*p<0.05, \*\*p<0.01)

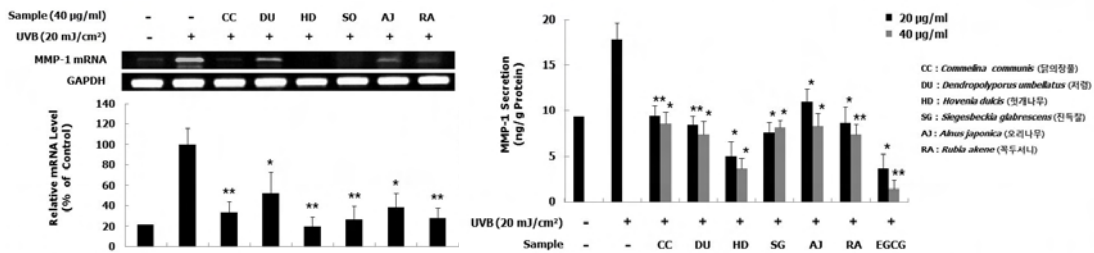


그림 2-6. 국내농산물의 MMP-1 억제효능 평가

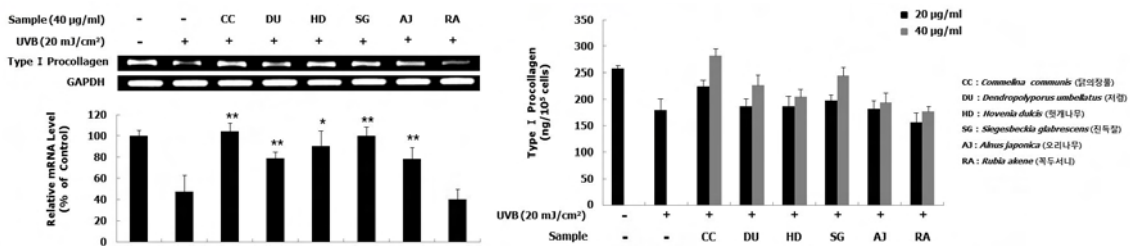


그림 2-7. 국내농산물의 콜라겐합성 촉진효능 평가

(2) 피부건강 기능성 신소재 *in vitro* 및 *in vivo* 효능검증

(가) 제주진득찰 추출물의 항노화 효능 및 탄력 유지 효능 검증

① 제주진득찰 추출물의 처리 농도 설정

- 사람 피부 섬유아세포(human dermal fibroblast, Hs68)에서 제주진득찰 추출물(SOE)의 효능을 평가하기 위하여 MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) assay를 통해 제주진득찰 추출물의 한계농도를 설정하였다.
- 사람 피부 섬유아세포에 UVB 25 mJ/cm<sup>2</sup>를 조사하여 제주진득찰 추출물을 0, 1, 5, 10, 20, 40 µg/ml로 각각 처리하고 24시간 동안 배양하여 세포 생존율을 측정하였다. 그 결과 제주진득찰 추출물은 10 µg/ml까지 세포 독성을 보이지 않았다(그림 2-8). (\*\*p<0.01)

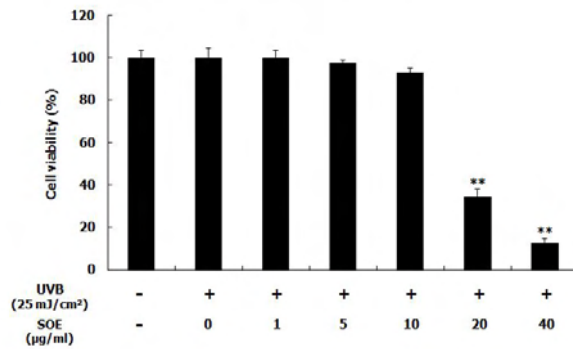


그림 2-8. 제주진득찰 추출물의 사람 피부 섬유아세포에 대한 독성평가

② 제주진득찰 추출물의 free radical 제거능 평가

- UVB에 의해 피부 내에서는 free radical의 종류인 ROS가 많이 발생하며, 이는 피부 노화를 유도한다. 특히 catalase는 이러한 ROS를 억제하는 효소이다. 제주진득찰 추출물의 ROS 제거 효능을 평가하기 위해 catalase 유전자 발현 증가 양상을 RT-PCR을 통해 확인하였다. 그 결과 UVB를 조사한 대조군에서 catalase의 유전자 발현이 현저하게 감소하였으나, 제주진득찰 추출물 처리 시 catalase의 유전자 발현이 현저하게 증가하였다(그림 2-9).

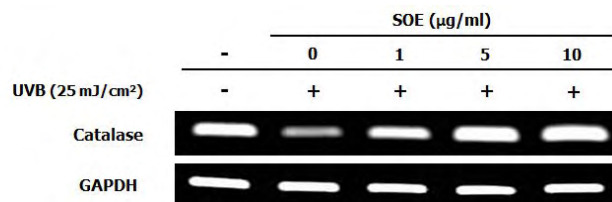
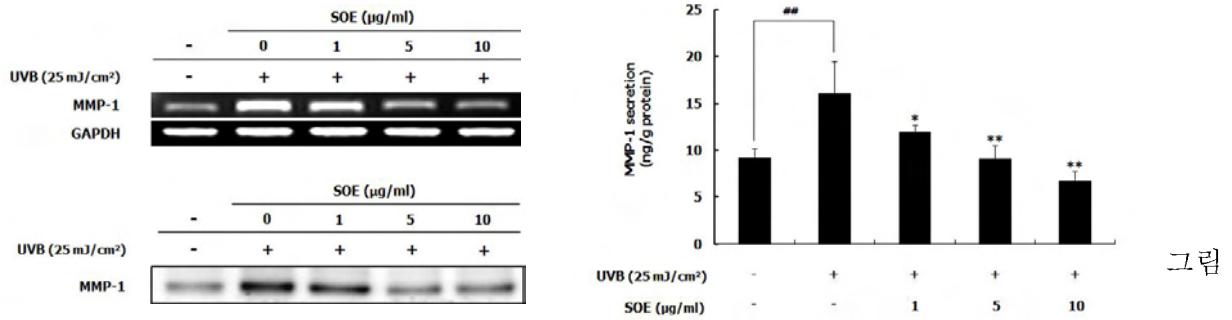


그림 2-9. 제주진득찰 추출물의 catalase 발현 증가 효과

③ 제주진득찰 추출물의 MMPs (matrix metalloproteinases) 억제 효능 평가

- MMP-1에 대한 제주진득찰의 억제 효능을 RT-PCR 및 Western blotting, MMP-1 kit를 통해 평가하였다. 그 결과, UVB에 의해서 증가된 MMP-1 유전자 발현 및 단백질 양이 제주진득찰 추출물에 의해 현저하게 억제되었으며, MMP-1 분비량을 정량적으로 측정된 결과 UVB를 조사한 대조군에 비하여 약 58% 감소하였다(그림 2-10). ( $^{\#}p<0.01$ ,  $^*p<0.05$ ,  $^{**}p<0.01$ )



2-10. 제주진득찰 추출물의 MMP-1 억제 효능 평가

- 또한, 젤라틴 분해효소인 MMP-2와 MMP-9에 대한 제주진득찰 추출물의 억제 효능을 RT-PCR을 통하여 평가하였다. 그 결과, UVB에 의해서 증가되는 MMP-2와 MMP-9의 유전자 발현이 제주진득찰 추출물에 의해 현저하게 억제되었다(그림 2-11).

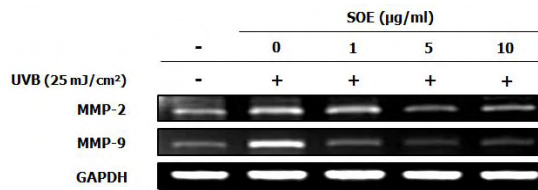


그림 2-11. 제주진득찰 추출물의 MMP-2, MMP-9 억제 효능 평가

④ 제주진득찰 추출물의 콜라겐 합성 촉진 효능 평가

- 콜라겐은 외부환경 요인 중 하나인 UVB에 의해 합성이 저해되며, 또한 콜라겐 전구체인 procollagen의 합성이 저해된다. 저해된 콜라겐 합성에 대하여 제주진득찰의 콜라겐 합성 촉진 효능을 평가하기 위해 콜라겐 전구체인 procollagen의 합성 촉진 능력을 RT-PCR을 통해서 평가하였다. 그 결과, UVB를 처리한 대조군에 비해 제주진득찰 추출물 처리 시 type I procollagen 유전자 발현이 증가하였다(그림 2-12).

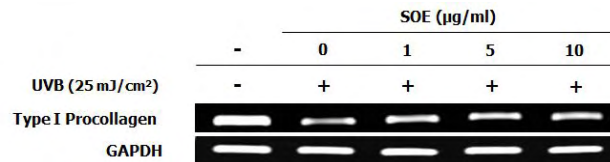


그림 2-12. 제주진득찰의 콜라겐 합성 촉진 효능 평가

(나) 녹차추출물의 플러스 소재로서의 제주진득찰 추출물 효과 확인(*in vitro*)

① 녹차추출물과 제주진득찰 추출물의 독성 여부 평가

- 녹차추출물(GTE)과 제주진득찰 추출물(SOE) 각각의 독성 여부를 평가하고, 혼합물의 독성 여부를 평가하고자 사람 피부 섬유아세포를 이용하여 MTT assay를 수행하였다. 측정된 결과 단일 물질 및 복합물의 대상 농도 처리 시 세포 생존률의 유의적 차이가 없었다(그림 2-13).

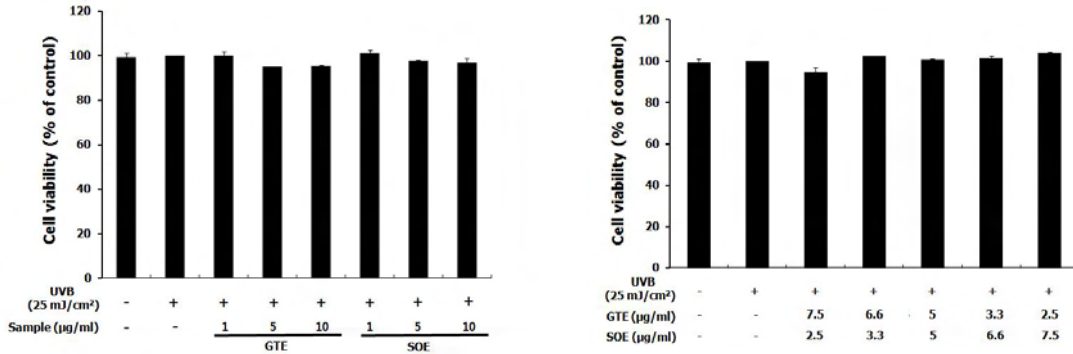


그림 2-13. 녹차추출물과 제주진득찰 추출물, 혼합물에 대한 세포 생존률 평가

② 녹차추출물과 제주진득찰 추출물의 MMP-1 억제 효능 비교 평가

- 녹차추출물과 제주진득찰 추출물의 MMP-1 억제 효능을 MMP-1 kit를 이용하여 정량적으로 비교 평가하였다. 그 결과, UVB를 조사한 무처리 대조군에 비하여 녹차추출물과 제주진득찰 추출물은 각각 MMP-1 분비량을 현저하게 억제시켰다(그림 2-14). (##p<0.01, \*p<0.05, \*\*p<0.01)

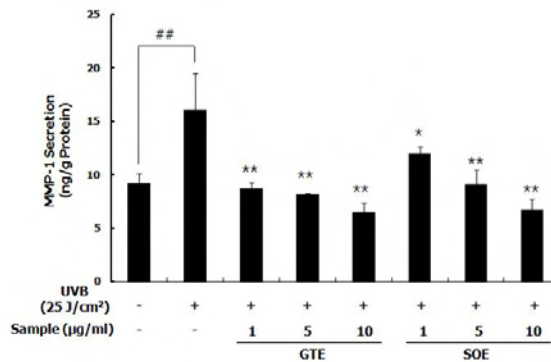


그림 2-14. 녹차추출물과 제주진득찰의 MMP-1 억제 효능 비교 평가



③ 녹차추출물과 제주진득찰 추출물의 콜라겐 합성 촉진 효능 비교 평가

- 녹차추출물과 제주진득찰 추출물의 콜라겐 합성 촉진 효능을 type I procollagen kit를 이용하여 정량적으로 비교 평가하였다. 그 결과, 녹차추출물은 무처리 대조군에 비하여 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 을 제외한 다른 농도에서는 type I procollagen 양의 변화가 없었으나, 녹차추출물에 비하여 제주진득찰 추출물은 1, 5, 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 유의적으로 type I procollagen 양이 증가하였다(그림 2-15). ( $^{##}P<0.01$ ,  $^*P<0.05$ )

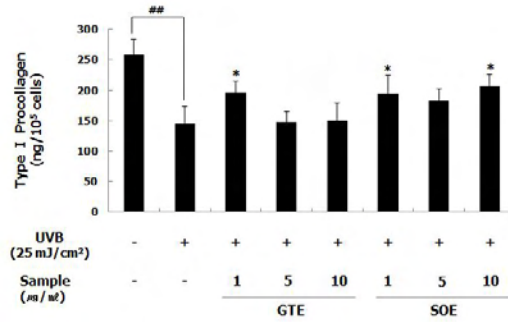


그림 2-15. 녹차추출물과 제주진득찰 추출물의 콜라겐 합성 촉진 효능 비교 평가

④ 플러스 소재로서 제주진득찰 추출물의 효능 평가

- 플러스 소재로서 제주진득찰 추출물의 효능을 평가하기 위하여 사람 피부 섬유아세포에 혼합물의 총 농도를 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 처리하였다. MMP-1 kit를 이용하여 정량적으로 MMP-1 분비 억제능을 평가하였고, type I procollagen kit를 이용하여 type I procollagen 생성량을 평가하였다. 그 결과, 녹차추출물과 제주진득찰 추출물의 단일 물질 보다 복합물이 모든 비율에서 MMP-1 저해능이 좋았으며, 제주진득찰 추출물의 비율이 증가할수록 type I procollagen의 양이 증가하였다(그림 2-16). ( $^{##}P<0.01$ ,  $^*P<0.05$ ,  $^{**}P<0.01$ )

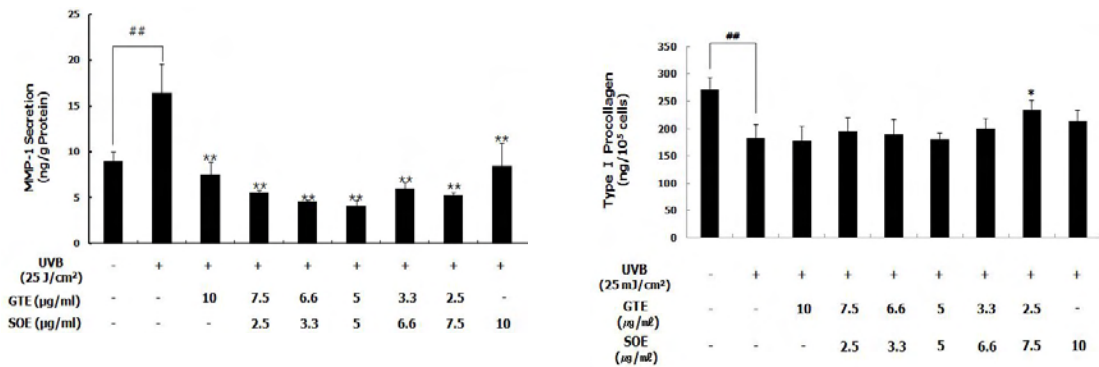


그림 2-16. 혼합물의 MMP-1 억제능과 콜라겐 합성 촉진능 평가

(다) 녹차추출물의 플러스 소재로서의 제주진득찰 추출물 효과 확인(*in vivo*)

① 자외선(UVB) 조사를 통한 주름 형성과 실험물질의 경구투여

- 본 연구에서는 자외선 조사에 의해 광노화가 유도된 무모 생쥐에 녹차추출물과 녹차·제주진득찰 혼합물을 경구 투여하여 플러스 소재로서 제주진득찰 추출물의 항노화 효과를 확인하였다. 1주의 적응기간 후, 제주진득찰 추출물(62.5 mg/kg/day)과 녹차 추출물(187.5 mg/kg/day)을 섞어 제조한 혼합물과 녹차추출물(250 mg/kg/day)을 각 군의 무모 생쥐들에게 12주 동안 매일 경구 투여하였다. 경구투여와 동시에 일주일에 3회 자외선을 조사하였고, 몸무게와 피부두께를 일주일에 1회씩 측정하면서 주름 유도 및 변화 양상을 관찰하였다. 경구 투여한 실험군을 포함한 모든 군에서 실험기간 동안 특이한 임상증상은 관찰되지 않았고, 몸무게도 각 군 간의 유의적 차이는 보이지 않았다. 13주 후의 피부두께 측정결과, 자외선을 조사한 대조군의 피부두께가 자외선을 조사하지 않은 대조군에 비해 현저하게 증가하였다. 이에 비해 혼합물과 녹차추출물을 경구 투여한 실험군의 피부두께는 유의적으로 감소하였다(그림 2-17). (#P<0.01, \*\*P<0.01)

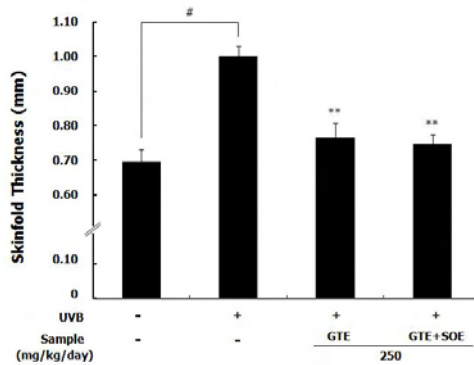


그림 2-17. 대조군과 실험군의 피부두께 변화 측정

② 녹차추출물과 제주진득찰 추출물의 혼합물 섭취에 따른 *in vivo* 피부광노화 개선 효과  
 - 자외선으로 인해 유도된 주름과 이의 개선 효과를 판정하고자 실험 종료 후 피부를 육안으로 관찰하고 피부 주형(replica)을 실리콘 폴리머(Silflo impression material)를 이용하여 제작한 후, 객관적인 주름 정도를 비교하기 위해 Visioline VL650 (Courage Khazaka)으로 분석하였다. 주형은 입사각 20°의 광원을 조사하여 생기는 그림자의 길이를 이용하여 No. of wrinkles, mean length (mm), mean depth ( $\mu\text{m}$ ), mean form factor (between 0 (perfect circle) and 1 (perfect line))를 분석하였다. UV 조사 기간 중 육안으로 관찰 시, 자외선을 조사하지 않은 대조군에 비해 자외선을 조사한 대조군의 피부 주름 형성이 뚜렷하게 증가되었다. 이에 비해 녹차 추출물과 혼합물 투여군의 피부 주름 형성이 적었으며, 특히 혼합물 투여군의 피부 주름이 눈에 띄게 감소되었다(그림 2-18).

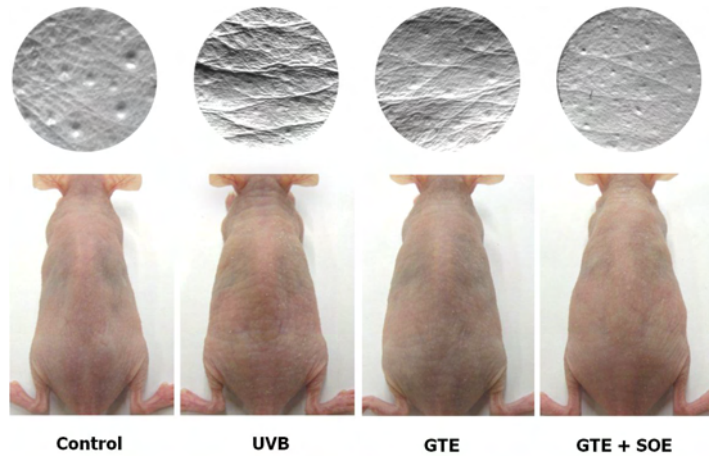


그림 2-18. 주름의 피부주형과 피부의 외관 관찰

- 자외선 조사 대조군은 자외선을 조사하지 않은 대조군에 비해 전체적으로 주름 지표가 유의적으로 증가하였다. Mean length (mm), mean depth ( $\mu\text{m}$ )는 두 실험 시료 투여군 모두 유의적으로 감소하였으나, No. of wrinkles 와 mean form factor 지표의 경우 혼합물 투여 군에서만 유의적 차이를 나타내었다(그림 2-19). (# $P<0.05$ , ## $P<0.01$ , \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$ )

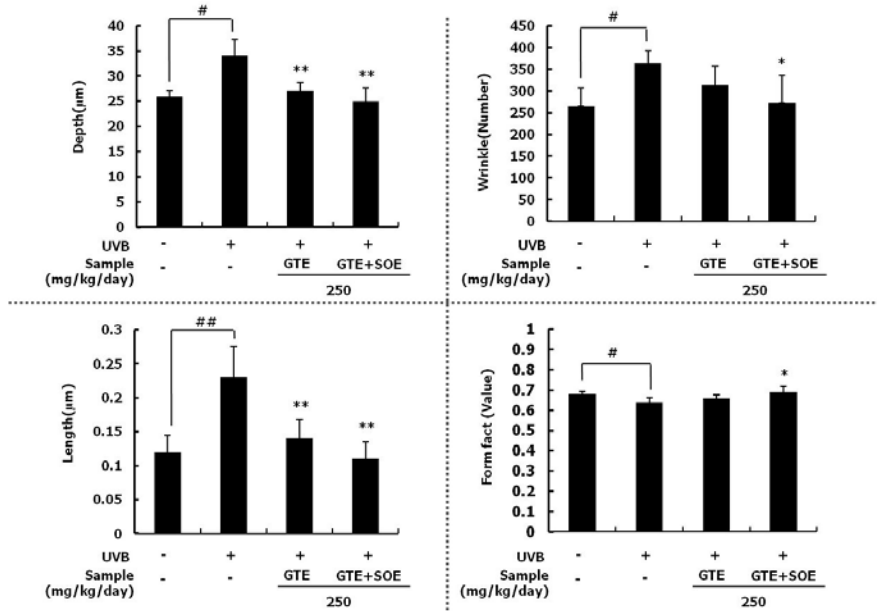


그림 2-19. 피부주형을 이용한 주름 분석

- 피부의 보습효과를 확인하기 위해, 수분손실도(TEWL) 및 수분 함량(skin hydration)을 Tewameter와 Corneometer로 측정하였다. 측정결과 자외선을 조사한 대조군에 비해 녹차 추출물과 혼합물 투여군 각각의 수분 손실도가 유의적으로 감소하였고( $59.79 \pm 11.5\%$ ,  $51.32 \pm 15.21\%$ ), 반대로 수분 함량은 유의적으로 증가함을 확인하였다( $147.0 \pm 17.64\%$ ,  $162.1 \pm 6.29\%$ ) (그림 2-20). (# $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$ )

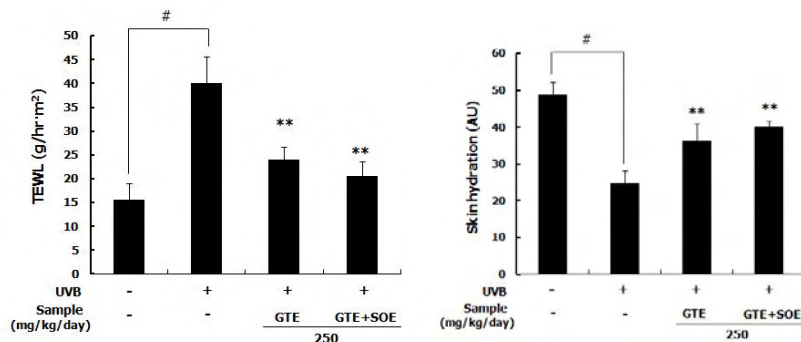


그림 2-20. 수분손실도(TEWL)와 수분함량(skin hydration) 측정

- 또한 피부의 탄력성(elasticity)과 홍반지수(erythema)는 Cutometer와 Mexameter를 이용하여 측정하였다. 그 결과 자외선을 조사한 대조군에 비해 녹차추출물과 혼합물을 투여한 실험 군 각각에서 유의적인 차이를 보였고( $58.2 \pm 12.8\%$ ,  $79.0 \pm 17.9\%$ ), 특히 혼합물을 경구투여한 군에서 눈에 띄게 탄력도가 증가하였다. 홍반지수 또한 자외선 조사된 대조군에 비해 실험물질을 투여한 군이 유의적으로 감소하였다(그림 2-21). ( $\#P<0.05$ ,  $\#\#P<0.01$ ,  $*P<0.05$ ,  $**P<0.01$ )

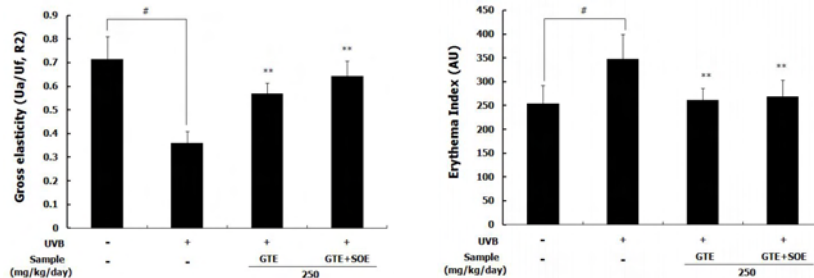


그림 2-21. 탄력도(elasticity)와 홍반지수(erythema index)측정

### (3) 피부건강 기능성 신소재 분리정제 및 구조규명

(가) 제주진득찰 추출물의 기능성 지표 성분 분리 및 효능 확인(*in vitro*)

#### ① 제주진득찰 추출물의 지표 성분 확인

- 제주진득찰 에탄올 추출물로부터 새로운 기능성 지표 성분을 분리하였고, HPLC (high performance liquid chromatography)를 통해서 gradient flow (0~100% acetonitrile)와 wavelength 200 nm의 조건으로 지표 성분을 확인하였다(그림 2-22).

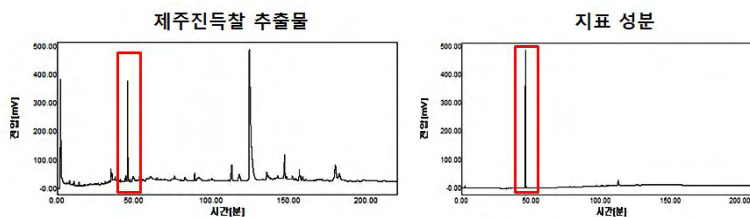


그림 2-22. 제주진득찰 추출물과 지표 성분 확인

#### ② 제주진득찰 추출물로부터 분리한 지표 성분의 구조 확인

- 제주진득찰 추출물로부터 분리한 지표 성분을 확인한 결과, 분리한 지표 성분은 kirenol임을 알 수 있었다. Kirenol은 분자식  $C_{20}H_{34}O_4$ , 분자량 338.48이며, 구조는 그림 2-23과 같다.

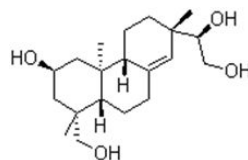


그림 2-23. Kirenol 구조

③ 제주진득찰 추출물로부터 분리한 지표 성분 kirenol의 세포 독성 평가

- 제주진득찰 추출물로부터 분리한 지표 성분인 kirenol의 세포 독성 평가를 평가하기 위하여 사람 피부 섬유아세포를 사용하여 MTT assay를 시행하였다. 그 결과 kirenol을 0부터 200  $\mu$ M까지 처리 하였을 때 100  $\mu$ M부터 유의적인 차이가 나타난 것으로 보아 kirenol의 100  $\mu$ M 이하 농도에서는 세포 생존률에 영향을 미치지 않고 안정한 것으로 나타났다(그림 2-24). (\*P<0.05, \*\*P<0.01)

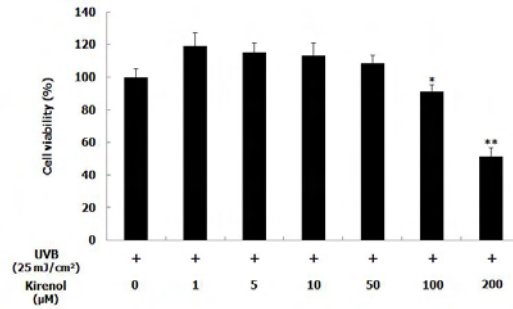


그림 2-24. Kirenol의 세포 생존률 평가

④ 제주진득찰 추출물로부터 분리한 지표 성분 kirenol의 free radical 제거능 평가

- Kirenol의 ROS 제거능을 평가하기 위해 ROS scavenging 활성을 fluorescence assay를 통해 확인하였다. 그 결과 UVB에 의해 월등히 증가한 ROS의 생성이 kirenol 처리 시 20% 이상 감소하였다(그림 2-25). (## $p < 0.01$ , \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ )

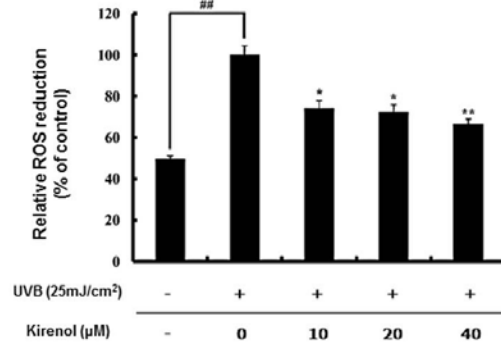


그림 2-25. Kirenol의 ROS 제거능 평가

- 또한, kirenol의 ROS 제거 효능을 평가하기 위해 ROS 억제 효소인 catalase의 유전자 발현 증가 양상을 RT-PCR 및 Western blotting을 통해 확인하였다. 그 결과 UVB를 조사한 대조군에서 catalase의 발현이 현저하게 감소하였으나, kirenol 처리 시 catalase의 유전자 발현이 현저하게 증가하였다 (그림 2-26).

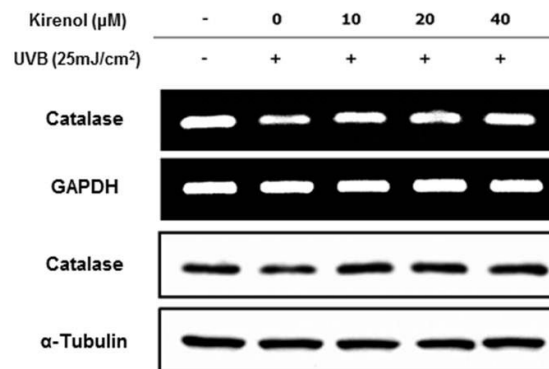


그림 2-26. Kirenol의 catalase 발현 증가 효능 평가

⑤ Kirenol의 MMPs 억제 효능 평가

- 콜라겐 분해효소인 MMP-1과 젤라틴 분해효소인 MMP-2와 MMP-9에 대한 kirenol의 억제 효능을 RT-PCR을 통해 평가하였다. 그 결과, UVB에 의해서 증가된 MMP의 유전자 발현이 kirenol에 의해 현저하게 억제되었다 (그림 2-27).

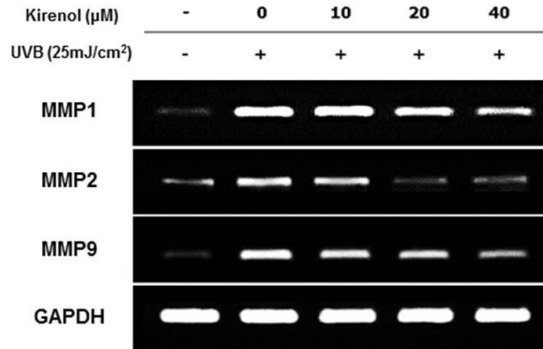


그림 2-27. Kirenol의 MMP-1, -2, -9 발현 억제 효능 평가

MMP의 종류 중에서 피부 노화에 특히 중요한 MMP-1에 대한 kirenol의 억제 효능은 western blotting, MMP-1 kit를 통해 추가적으로 분석하였다. 그 결과 UVB에 의해서 증가된 MMP-1의 단백질 방출량은 kirenol에 의해 정상수준에 가깝게 회복되었다(그림 2-28). (## p<0.01, \* p<0.05, \*\* p<0.01)

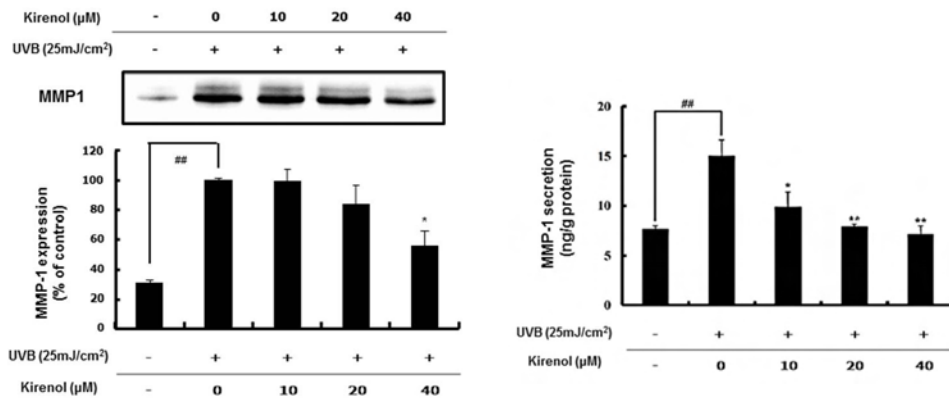


그림 2-28. Kirenol의 MMP-1 억제 효능 평가



⑥ Kirenol의 MAPK/AP-1 메커니즘 억제 효능 평가

- UVB에 의해 발현되는 MAPK 단백질의 종류인 ERK, JNK, p38과 이들에 의해 활성화되는 c-Jun, c-Fos에 대한 kirenol의 억제 효능을 western blotting을 통해 평가하였다. 그 결과 UVB를 처리한 대조군에 비해 kirenol 처리군에서 MAPKs의 인산화 정도와 c-Jun, c-Fos의 활성화 정도가 현저하게 감소하였다(그림 2-29).

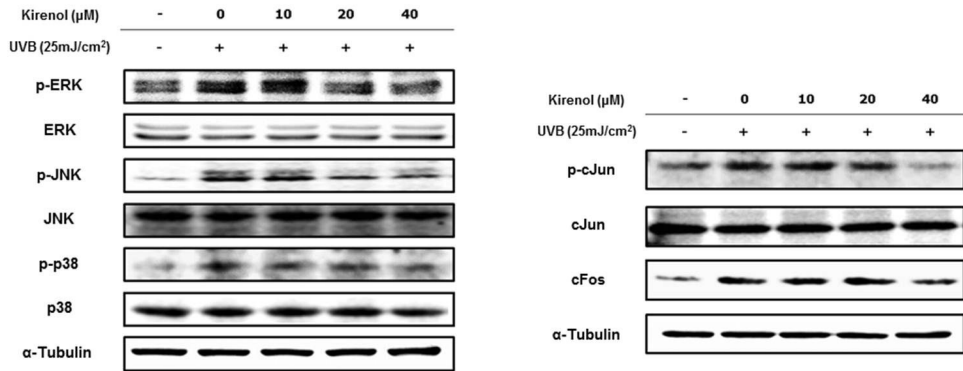


그림 2-29. Kirenol의 MAPK/AP-1 경로 억제 효능 평가

⑦ 제주진득찰 추출물로부터 분리한 지표 성분 kirenol의 콜라겐 합성 효능 평가

- 제주진득찰 추출물로부터 분리한 지표 성분인 kirenol의 콜라겐 합성 효능을 평가하기 위하여 RT-PCR 및 type I procollagen kit를 이용하였다. 그 결과 UVB를 조사한 대조군에 비하여 kirenol을 처리한 경우에서 type I procollagen 유전자 발현과 단백질 생성이 현저하게 증가하였다(그림 2-30). (##p<0.01, \*p<0.05)

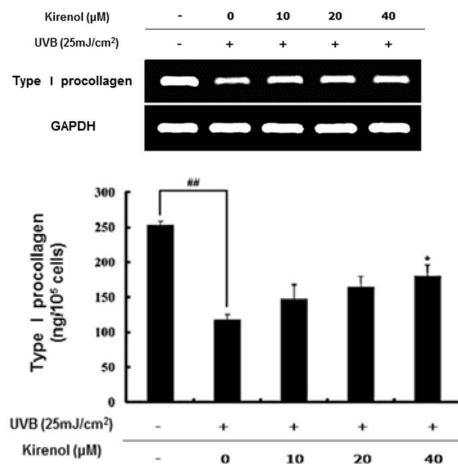


그림 2-30. Kirenol의 콜라겐 합성 효능 평가

(4) 미용건강 기능성 신소재 산업화 생산기술 개발

(가) 제주진득찰의 kirenol 초고압추출 최적화

① 반응표면분석법을 이용한 제주진득찰의 kirenol 초고압추출조건 확립

- 제주진득찰로부터 kirenol 초고압추출조건을 최적화하기 위하여 반응표면분석법(RSM, response surface methodology)을 사용하였다. 추출조건은 추출압력(X1), 에탄올의 농도(X2), 시료의 용매비율(X3) 세가지를 독립변수로 설정하여 BBD (Box-Behnken design) 방법을 이용하였다. BBD 실험계획에 따라 15개의 추출조건을 설정하여 추출을 진행하였고 각각의 추출물에 대한 kirenol의 농도와 추출수율을 표 2-2에 나타내었다.

Run no.	Coded			Extraction pressure (MPa)	Uncoded Solvent conc. (%)	Feed-to-solvent ratio	Kirenol	
	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>				Concentration (ppm)	Extraction of yield (%)
1	-1	-1	0	100	0	1:50	11.6	68.4
2	-1	+1	0	100	80	1:50	9.8	37.4
3	+1	-1	0	500	0	1:50	11.4	42.8
4	+1	+1	0	500	80	1:50	12.9	72.3
5	-1	0	-1	100	40	1:10	11.7	45.8
6	-1	0	+1	100	40	1:90	12.6	78.8
7	+1	0	-1	500	40	1:10	10.2	30.0
8	+1	0	+1	500	40	1:90	11.0	47.6
9	0	-1	-1	300	0	1:10	11.9	70.0
10	0	-1	+1	300	0	1:90	10.3	40.9
11	0	+1	-1	300	80	1:10	12.7	41.8
12	0	+1	+1	300	80	1:90	13.2	73.7
13	0	0	0	300	40	1:50	15.8	76.4
14	0	0	0	300	40	1:50	16.1	80.8
15	0	0	0	300	40	1:50	14.3	76.6

표 2-2. Box-Behnken design 및 초고압추출에 의한 kirenol 추출수율 평가

- 다음으로 BBD 실험계획에 따른 반응표면 방정식을 계산하였다. Kirenol의 추출수율에 대한 회귀방정식의 R<sup>2</sup> 값은 0.9910이었으며, 유의확률 p값은 0.0001으로 회귀 모델에 대한 신뢰도를 입증하였다(표 2-3).

Response	Second order polynomials	R <sup>2</sup>	Regression (p value)
Extraction yield of kirenol (%)	$Y = 17.71231 + 0.12401 X_1 + 0.49497 X_2 + 1.15882 X_3 - 0.00021 X_1^2 - 0.00915 X_2^2 - 0.00775 X_3^3 + 0.00009 X_1 X_2 + 0.00019 X_1 X_3 - 0.00258 X_2 X_3$	0.9910	0.0001

X<sub>1</sub> = Extraction pressure (MPa), X<sub>2</sub> = solvent concentration (%), X<sub>3</sub> = feed-to-solvent ration

표 2-3. 제주진득찰로부터 kirenol의 초고압추출을 위한 반응표면 방정식

② 초고압추출을 이용한 kirenol의 추출수율에 대한 반응표면 방정식 분석

- 추출압력, 에탄올 농도, 시료의 용매비율 3가지 변수에 대해 3차원 반응표면 방정식을 수행하였다. 그 결과 시료의 용매비율이 고정된 상태에서 (1:50) 추출압력과 에탄올 농도 변화에 따른 kirenol의 추출수율은 추출압력은 변화 없이 에탄올 농도가 감소함에 따라 증가하는 경향을 보였다(그림 2-31).

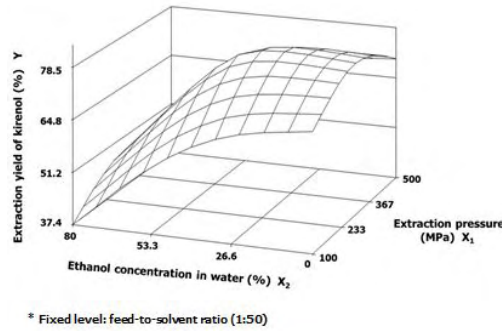


그림 2-31. 추출압력(X1)과 에탄올 농도(X2)의 변화에 따른 kirenol 추출수율 변화

- 에탄올 농도(40%)가 고정된 상태에서 추출압력과 시료의 용매비율 변화에 따른 kirenol의 추출수율은 추출압력이 감소하고 용매비율이 증가함에 따라 증가하는 경향을 보였다(그림 2-32).

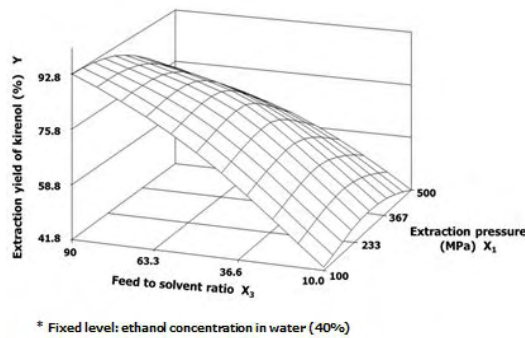


그림 2-32. 추출압력(X1)과 추출물대 용매비율(X3)의 변화에 따른 kirenol 추출수율 변화

- 추출압력(300 MPa)이 고정된 상황에서 시료의 용매비율과 에탄올 농도의 변화에 따른 kirenol의 추출수율은 에탄올 농도가 감소하고 시료의 용매비율이 증가함에 따라 증가하는 경향을 보였다(그림 2-33).

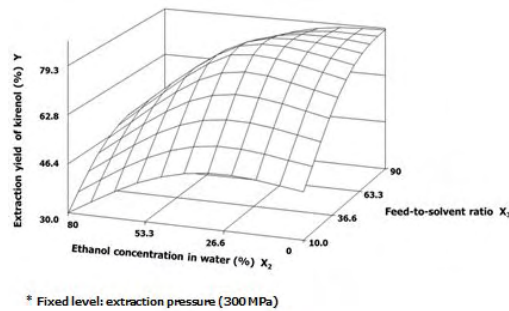


그림 2-33. 시료의 용매비율(X3)과 에탄올농도(X2)의 변화에 따른 kirenol 추출수율 변화

③ 반응표면분석법에 의한 kirenol 초고압추출조건의 최적화

- 반응표면분석 결과, 제주진득찰로부터 kirenol의 최적초고압추출조건은 추출압력 320 MPa, 에탄올 농도 18%, 시료의 용매비율 1:76 (w/v)이며, 이때 예측되는 kirenol 추출수율은 85.9%였다. 위의 반응표면분석에 의한 예측을 확인하기 위해 독립 변수가 적용된 최적추출조건에서 제주진득찰로부터 kirenol 추출실험을 반복하여 실험하였다. 그 결과 kirenol의 추출수율은 90.5%로 반응표면분석모델식이 예측한 추출수율이 실제 추출수율과 큰 차이가 없음을 나타내었다(표 2-4).

Optimum condition			Extraction of yield kirenol (%)	
Extraction pressure (MPa)	Ethanol concentration (%)	Feed-to-solvent ratio	Experimental result	Predicted value
320	18	1:76	90.5±2.2	85.9

표 2-4. 최적 조건에서의 kirenol 추출수율 결과 검증

- 결론적으로, 초고압 추출은 제주진득찰로부터 kirenol을 분리하는데 있어 기존의 추출방법을 대신할 수 있는 방법으로, 낮은 용매사용량과 짧은 공정시간을 통해 상온에서 높은 수율을 얻을 수 있다는 장점을 가진다.

### 3. 제2-3세부연구과제(유용성분 함유 녹차 대사체 비교분석 및 생체내 대사 연구)

가. 일반녹차와 발효녹차의 항산화 능력 비교 및 변화된 대사체 확인 · 동정

- 일반녹차와 *Aspergillus oryzae*를 접종한 발효녹차의 항산화 효과를 확인하기 위하여 일반적으로 쓰이는 DPPH, FRAP 및 ABTS assay를 시험하였다.

- 그림 2-34와 같이, 일반녹차에 비하여 *Aspergillus oryzae*를 접종한 발효녹차의 항산화 효과가 더 뛰어남을 확인할 수 있었다. 이는, 녹차의 발효에 의한 대사체 변화 혹은 함량 차이의 변화가 있음이 추측된다. 그러므로, 두 녹차간의 대사체의 차이를 LC-MS를 이용하여 분석하고자 하였다.

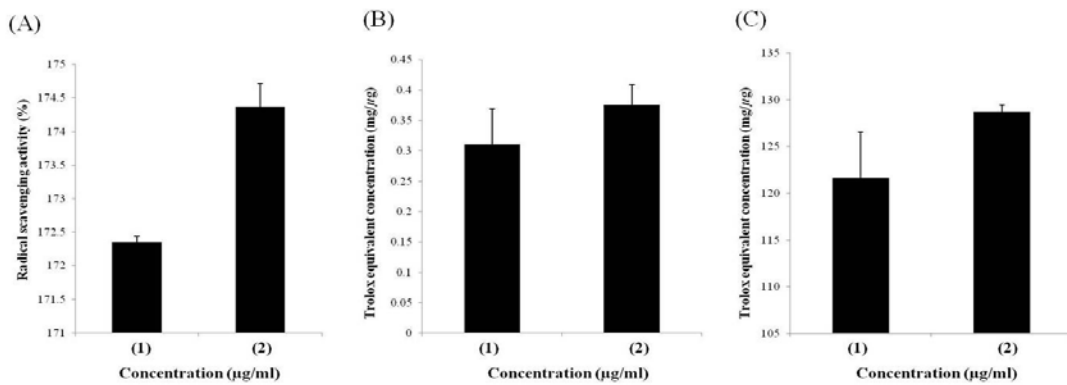


그림 2-34. 일반녹차(1)와 발효녹차(2)의 항산화 능 비교분석  
(A) DPPH (B) FRAP (C) ABTS

- LC-MS/MS에서 얻어진 데이터를 이용하여 다변량 통계분석인 PCA로 분석한 결과, 각각 일반녹차와 발효녹차로 뚜렷하게 2개의 clustering으로 구분되어졌다. 그 결과, LC-MS 주성분 분석의 score plot에서는 주성분 1에 의하여 80.1%의 설명력으로 일반녹차와 발효 녹차 시료가 구분 되었고, 주성분 2에 의해 11.1%의 설명력으로 일반녹차와 발효녹차가 구분되어졌다 (그림 2-35A)

- 따라서, 일반녹차와 발효녹차의 대사체 차이가 뚜렷한 것으로 보여지며, 이들을 나타내는 지표 성분을 분석하기 위하여 OPLS-DA 모델 분석을 수행하였다 (그림 2-35C). 그 결과, PCA score plot 결과와 동일하게 일반녹차와 발효녹차는 뚜렷하게 2개의 clustering으로 구분되어졌다. 그러므로, 일반녹차와 발효녹차를 구분짓는 대사체를 chemical dictionaries (CCD) 와 참고 문헌을 이용하여 동정하였다. 또한, box-and-whisker plot을 이용하여 변화된 대사체의 양적 차이를 확인하였다.

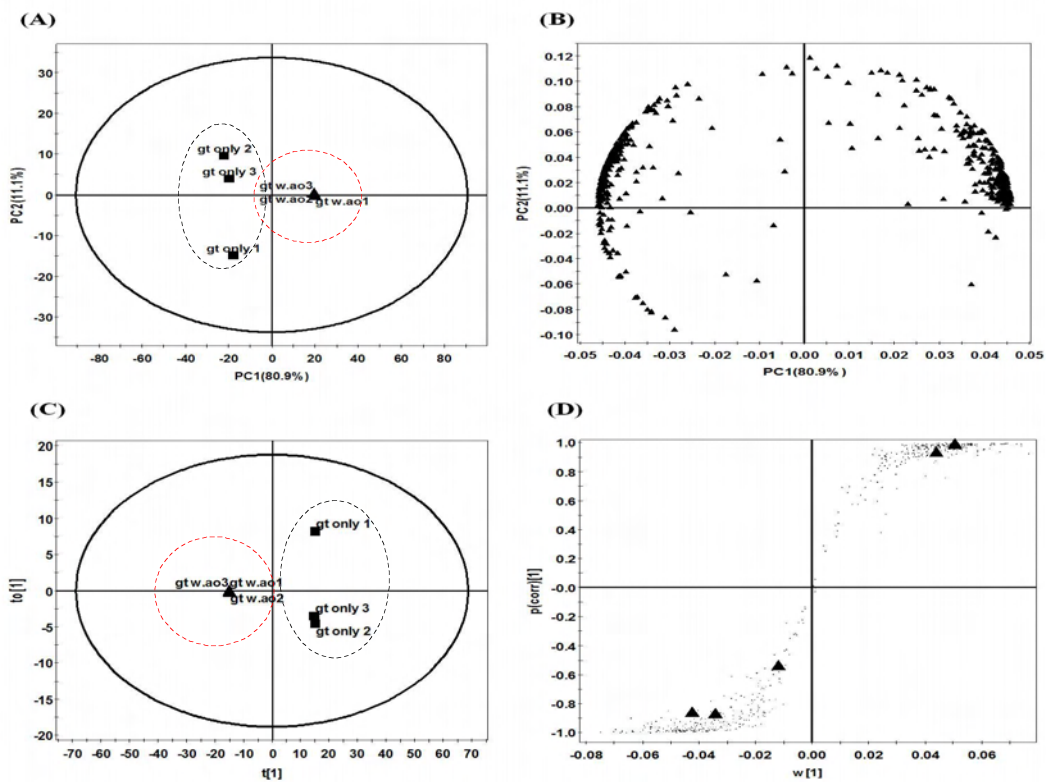


그림 2-35. LC-MS/MS로 분석한 일반녹차(검정)와 발효녹차(빨강)의 PCA score plot (A) 과 loading plot (B) 및 OPLS-DA의 score plot (C)과 loading plot (D)

- LC-MS/MS로 분석한 일반녹차와 발효녹차에서의 양적 변화를 나타낸 이차대사산물은 gallic acid, 3-*p*-coumaroyl quinic acid, catechin, caffeoylquinic acid, caffeine, (epi)catechin, epigallocatechin-3-gallate (EGCG), theaflavin으로 총 8개가 확인되었다 (표 2-5). 발효녹차에서의 gallic acid, theaflavin의 함량은 일반녹차에 비하여 증가하였고, 그 외의 물질들은 감소하는 경향을 보였다. Theaflavin은 발효녹차에서 EGCG와 catechin의 함량이 감소함에 따라 생성되는 성분으로 알려져 있고, 이는 본 실험 역시 그 함량의 변화양상이 유의하게 나타나는 것을 확인할 수 있었다.

Peak NO.	t <sub>r</sub> (min)	[M-H] <sup>-</sup> (m/z)	[M+H] <sup>+</sup> (m/z)	MS Fragment(+/-)	UV λ <sub>max</sub> (nm)	M. W	p-value (t-test)	I.D.
1	3.60	169	171	169 > 125, 97, 81, 79, 69 (-)	222, 273, 374	170	< 0.005	Gallic acid
2	11.58	337	339	337 > 173 (-)	221, 373	338	< 0.005	3- <i>p</i> -Coumaroyl quinic acid
3	12.50	289	291	289 > 245, 205 (-)	233, 275	290	0.09	Catechin
4	12.64	353	355	ND	232	354	< 0.005	Caffeoylquinic acid
5	12.91	-	195	195 > 138 > 111, 110, 83 (+)	222, 273	194	0.3	Caffeine
6	13.68	289	291	289 > 245, 227, 205, 203, 188, 137 (-)	221, 373	290	0.09	(Epi)catechin
7	14.15	457	459	457 > 331, 305, 169, 193 (-)	276, 275, 223, 222	458	0.054	Epigallocatechin-3-gallate
8	20.20	563	565	563 > 504, 503, 473, 443, 383, 353 (-)	221, 326, 373	564	< 0.005	Theaflavin

표 2-5. LC-MS/MS로 분석한 일반녹차와 발효녹차에서 양적 변화를 나타낸 이차대사산물

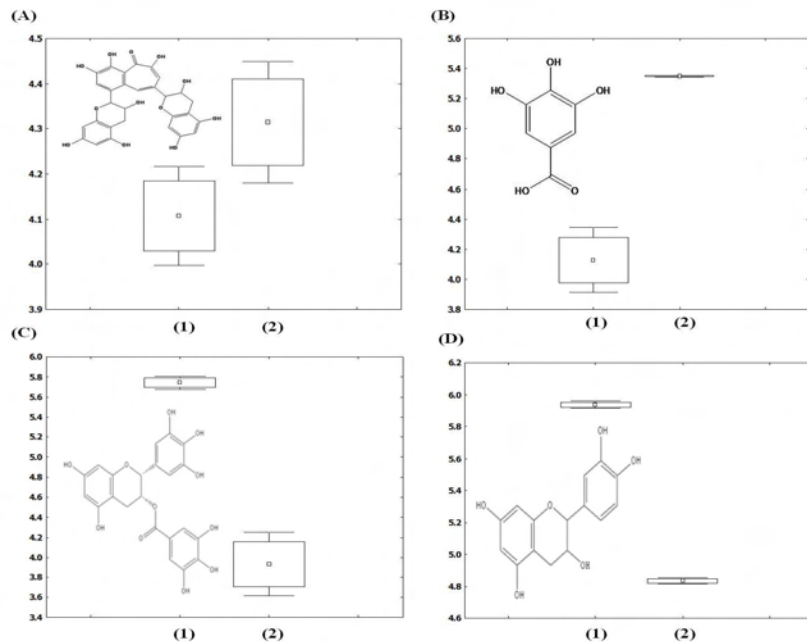


그림 2-36. Box and whisker plot으로 일반녹차(1)와 발효녹차(2)의 theaflavin (A), gallic acid (B), epigallocatechin-3-gallate (EGCG) (C), catechin (D)의 함량 비교.

나. 녹차 식이섭취에 따른 무모생쥐의 피부에서의 대사체 변화 분석

- 본 연구에서는 자외선 B 조사에 의해 광노화가 유도된 무모생쥐 동물모델에서의 녹차 식이섭취 후 얻어진 피부조직에 대하여 피부 대사체 변화를 확인하고자 실험을 진행하였다. 1주의 적응기간 후, 자외선 조사와 병행하여 녹차 (0.33% w/w)가 함유된 고형배합사료를 무모 생쥐들에게 12주 간 공급하였다. 자외선 조사는 UVB를 사용하여 1주일에 3회 동물의 등 부위에 조사하였다. 첫 번째 주는 1 MED(55 mJ/cm<sup>2</sup>)씩, 두 번째 주는 2 MED씩, 3번째 주는 3 MED씩, 4번째 주는 4 MED씩 조사하였다. 5주째부터는 4 MED씩 12주째까지 조사하여 주름살을 유도하였다. 동안 식이섭취 시킴과 동시에 일주일에 3회 자외선을 조사하였고, 몸무게와 피부 두께를 일주일에 1회씩 측정하면서 주름 유도 및 변화 양상을 관찰하였다. 식이급여한 실험군을 포함한 모든 군에서 실험기간 동안 특이한 임상증상은 관찰되지 않았고, 몸무게도 각 군 간의 유의적 차이는 보이지 않았다. 녹차가 함유되어 있지 않는 식이를 12주간 공급받는 군 (정상대조군: NC)을 양성대조군으로, 녹차가 함유되어 있지 않는 식이와 함께 자외선 조사를 12주간 병행하는 군(자외선 조사 대조군: UC)은 음성대조군으로 두었다. 녹차의 식이 공급이 자외선 조사에 의해 노화가 유도된 무모생쥐의 피부 대사체 변화를 살피기 위해 식이 급여 6주 및 12주 후 각각 10마리씩 희생시키고 피부 조직을 채취하였다. 얻어진 피부 시료에 대하여 분석에 있어 최적의 용매 및 추출법을 확립하고, GC-TOF-MS 및 UPLC-Q-TOF-MS와 같은 MS 기반의 분석기기의 올바른 분석법을 확립하였다. 또한, 얻어진 데이터를 이용하여 다변량 통계분석인 PCA, PLS-DA를 통하여 대사체 간의 상관관계 확인 및 변화된 대사체를 동정하고자 하였다.



(1) 피부조직의 추출법 확립

- 자외선이 조사된 무모생쥐의 등 피부 조직의 일부 (2 x 3 cm)를 추출에 용이하도록 잘게 절단한 후 차가운 메탄올 600ul를 넣고 Mixer mill (frequency 1/30)을 이용하여 5분간 3번씩 작동시켜 추출한 시료를 12,000 rpm, 4도, 10분의 조건에서 원심분리한다. 원심분리된 시료의 메탄올 상층액을 취하고, 이 과정을 2번 반복한다. 얻어진 메탄올 상층액을 합하여, speed vac으로 용매를 제거하고, 얻어진 피부조직 추출물은 1차 및 2차 대사체 분석을 위한 GC-TOF-MS 와 UPLC-Q-TOF-MS 분석 전까지 -80도의 냉동상태에서 보관한다.

(2) UPLC-Q-TOF-MS 및 GC-TOF-MS 분석법 확립

<b>GC-TOF-MS</b>	
Run method parameters	Mass configuration
Agilent 7890 GC system coupled with Agilent 7693 autosampler (Agilent, Atlanta, GA)	Pegasus <sup>®</sup> HT TOF-MS (Leco Corp., St. Joseph, MI USA)
Rtx-5MS column (Restek Corp., Bellefonte, PA, USA) 29.8 m x 0.25 mm i.d., a particle size of 0.25 µm	Mass range : 50 - 800 m/z
Injection volume - 1 µL split ratio - 10:1	Trap damping helium gas flow rate - 1.5 mL/min Ionization type - 70 eV electron impact (EI) Ion source temperature - 230°C
Run time - 20 min	
Maintained at 75°C for 2 min Raised to 300°C at a rate of 15°C/min Maintained at 300°C for 3 min	
Front inlet temperature - 250°C Transfer line temperature - 240°C	
<b>UPLC-Q-TOF-MS</b>	
Run method parameters	Mass configuration
Waters Acquity UPLC System (Waters Corp., Milford, MA, USA)	Waters Q-TOF Premier (Micromass MS Technologies, Manchester, UK)
Waters Acquity HPLC BEH C18 column 100 x 2.1 mm, i.d., a particle size of 1.7 µm	Mass range - 100 - 1,000 m/z
Injection volume - 5 µL Flow rate - 0.3 mL/min	Ion mode type - negative mode Scan time - 0.2 s Interscan time - 0.02 s
Water (A) with 0.1% v/v formic acid and Acetonitrile (B) with 0.1% v/v formic acid	Capillary and cone voltages - 3.0 kV and 40 V Desolvation gas flow and temperature - 600 L/h, 200°C Cone gas flow - 50 L/h Ion source temperature - 200°C
Run time - 15 min	
Maintained 5% B for 1 min Raised to 55% B for 4 min Raised to 100% B for 8 min Maintained to 100% B for 1 min Decreased to 5% B for 1 min.	

표 2-6. UPLC-Q-TOF-MS 및 GC-TOF-MS 분석조건

(3) GC-TOF-MS를 이용하여 자외선 조사 및 녹차 식이섭취에 따른 1차 대사체 변화 분석  
 - 6주간 식이공급 후 얻어진 피부 시료를 GC-TOF-MS 분석하여 얻어진 데이터를 이용하여 다변량 통계분석인 PCA로 분석한 결과, 주성분 1과 2에 의해 각각 17.3%과 14.4%의 설명력으로 구분되어졌으나, 자외선 조사 대조군과 녹차식이섭취군의 대사체가 뚜렷하게 구분되지는 않았다 (그림 2-37A). 이를 PLS-DA 판별분석을 통해 자외선 조사 및 녹차 추출물 식이섭취에 따른 대사체 변화를 확인한 결과, PCA분석보다 더 확실하게 자외선을 조사하지 않은 정상대조군, 자외선을 조사한 대조군 및 자외선 조사와 더불어 녹차 식이섭취군이 구분되어짐을 확인하였다 (그림 2-37B). 그리고 각 실험군을 구분짓는 대사체를 NIST, wiley와 같은 mass spectral library 및 standard compound를 이용하여 동정하였다. 또한, Heat map을 이용하여 변화된 대사체의 양적 차이를 비교하였다 (그림 2-38).

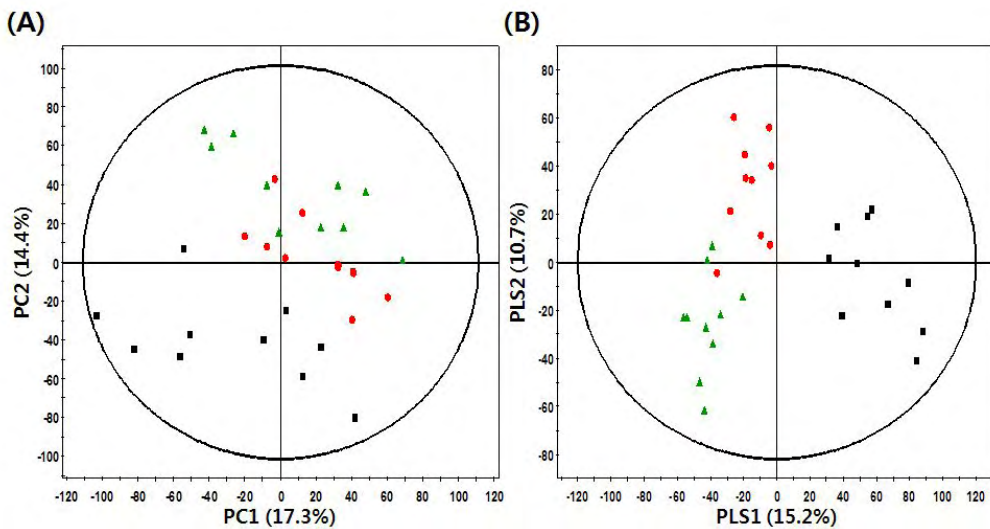


그림 2-37. 6주간 식이공급 후 얻어진 피부 시료에 대하여 GC-TOF-MS로 분석한 자외선을 조사하지 않은 정상대조군 (■), 자외선 조사 대조군 (●) 및 자외선 조사와 녹차 식이섭취군(▲)의 PCA score plot (A) 과 PLS-DA score plot (B)

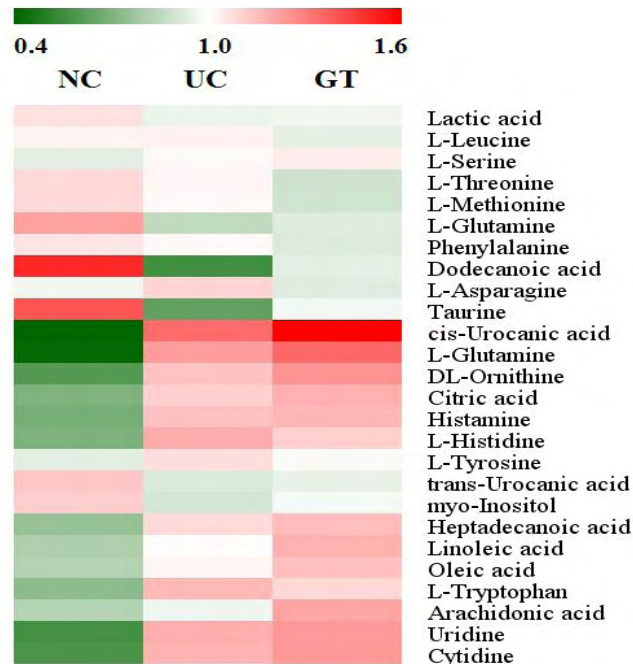


그림 2-38. Heap map을 이용한 6주간 식이공급 후 얻어진 피부 시료에서의 자외선을 조사하지 않은 정상대조군 (NC), 자외선 조사 대조군 (UC) 및 자외선 조사와 녹차 식이섭취군 (GT)의 일차 대사체 함량 비교

- 6주간의 식이 섭취 후 GC-TOF-MS로 분석한 각 실험군간의 양적 변화를 나타낸 일차대사체는 11종의 amino acid와 taurine, citric acid, histamine과 같은 organic compound, 5종의 fatty acid, nucleic acid 관련 대사체, 및 urocanic acid 등으로 총 25개가 확인되었다 (표2-7). 특히, cis-urocanic acid는 자외선 조사에 의하여 급격히 늘어나는 대사체로 확인되었다. 이러한 대사체들은 자외선에 의한 피부의 보호장벽 기능 저하 및 염증 반응, 활성산소 증가와 같은 물리적, 생리적 작용과도 밀접한 관계가 있다는 사실은 이미 많은 논문에서 보고되어져 있으며, 6주간의 녹차 식이섭취에 의한 대사체의 변화보다는 자외선 조사에 의한 대사체의 변화가 더 큰 것으로 확인되었다.

tr (min)	Identified mass (m/z)	Name	Derivatized	p-value
4.80	191	Lactic acid	TMS (X 2)	0.028
7.02	158	L-Leucine	TMS (X 2)	0.047
7.88	100	L-Serine	TMS (X 3)	6.0E-04
8.13	218	L-Threonine	TMS (X 3)	5.0E-04
9.26	176	L-Methionine	TMS (X 2)	0.001
9.89	227	L-Glutamine	TMS (X 2)	0.046
10.14	218	Phenylalanine	TMS (X 2)	0.003
10.23	117	Dodecanoic acid	TMS (X 1)	0.005
10.46	116	L-Asparagine	TMS (X 3)	0.038
10.48	326	Taurine	TMS (X 3)	0.028
11.19	267	cis-Urocanicacid	TMS (X 3)	0.0E+00
11.21	156	L-Glutamine	TMS (X 3)	2.0E-04
11.53	142	DL-Ornithine	TMS (X 4)	9.0E-07
11.57	273	Citric acid	TMS (X 4)	0.002
11.92	174	Histamine	TMS (X 3)	0.001
12.26	254	L-Histidine	TMS (X 3)	3.0E-07
12.36	218	L-Tyrosine	TMS (X 3)	0.003
12.74	267	trans-Urocanicacid	TMS (X 3)	2.0E-04
13.42	217	myo-Inositol	TMS (X 6)	0.001
13.54	327	Heptadecanoic acid	TMS (X 1)	0.001
13.96	337	Linoleic acid	TMS (X 1)	0.003
13.99	339	Oleic acid	TMS (X 1)	0.023
14.15	202	L-Tryptophan	TMS (X 3)	2.0E-04
14.87	91	Arachidonic acid	TMS (X 1)	1.0E-04
15.41	258	Uridine	TMS (X 4)	1.0E-07
16.67	223	Cytidine	TMS (X 4)	4.0E-05

표 2-7. GC-TOF-MS 분석을 통한 6주간의 자외선 조사 및 녹차 식이섭취에 따른 유의적인 차이를 보이는 일차 대사체

- 12주간 식이공급 후 얻어진 피부 시료를 GC-TOF-MS 분석하여 얻어진 데이터를 이용하여 다변량 통계분석인 PCA로 분석한 결과, 주성분 1과 2에 의해 각각 23.6%과 9.9%의 설명력으로 구분되어졌으나, 6주간의 식이공급 결과와 마찬가지로 자외선 조사 대조군과 녹차식이섭취군의 대사체가 뚜렷하게 구분되지는 않았다 (그림 39A). 이를 PLS-DA 판별분석을 통해 자외선 조사 및 녹차 추출물 식이섭취에 따른 대사체 변화를 확인한 결과, PCA분석보다 더 확실하게 자외선을 조사하지 않은 정상대조군, 자외선을 조사한 대조군 및 자외선 조사와 더불어 녹차 식이섭취군이 구분되어짐을 확인하였다 (그림 2-39B). 그리고 각 실험군을 구분짓는 대사체를 NIST, wiley와 같은 mass spectral library 및 standard compound를 이용하여 동정하였다. 또한, Heat map을 이용하여 변화된 대사체의 양적 차이를 비교하였다 (그림 2-40).

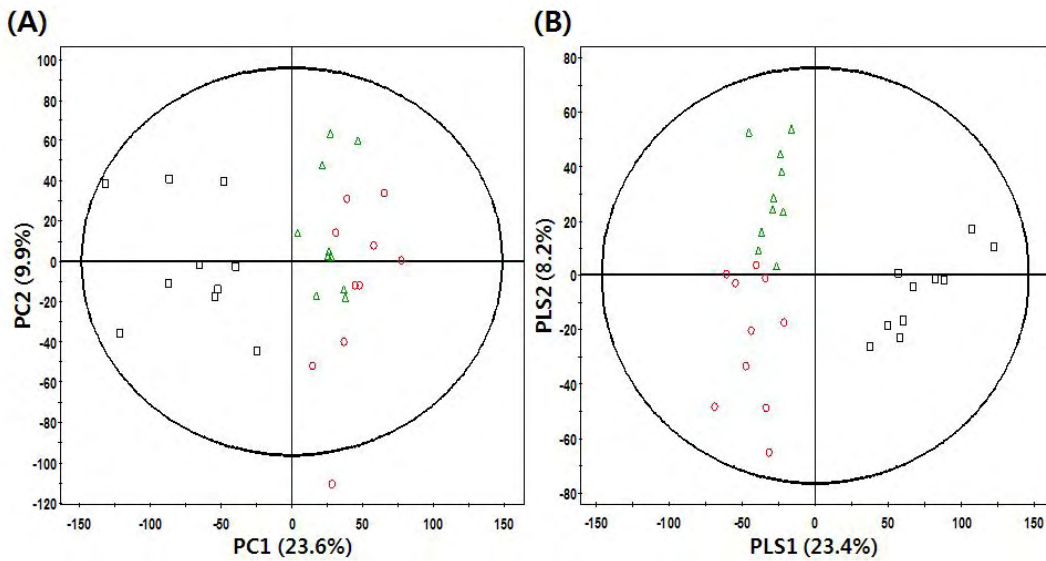


그림 2-39. 12주간 식이공급 후 얻어진 피부 시료에 대하여 GC-TOF-MS로 분석한 자외선을 조사하지 않은 정상대조군(□), 자외선 조사 대조군(○) 및 자외선 조사와 녹차식이섭취군(△)의 PCA score plot(A)과 PLS-DA score plot (B)

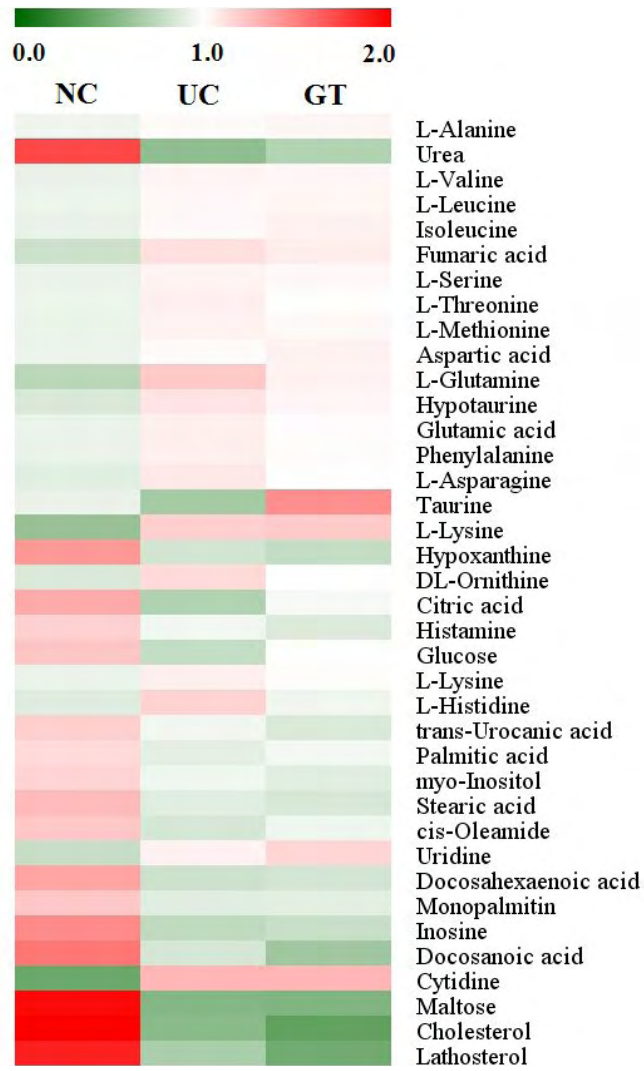


그림 2-40. Heap map을 이용한 12주간 식이공급 후 얻어진 피부 시료에서의 자외선을 조사하지 않은 정상대조군 (NC), 자외선 조사 대조군 (UC) 및 자외선 조사와 녹차 식이섭취군 (GT)의 일차 대사체 함량 비교

- 12주간의 식이 섭취는 6주간의 식이섭취 시보다 더 많은 수의 일차 대사체의 양적 변화를 나타내었다. 15종의 amino acid와 urea, hypotaurin, taurine, citric acid, histamine과 같은 organic compound, 6종의 fatty acid 계열, nucleic acid 관련 대사체, 당류, sterols 및 urocanic acid 등으로 총 37개가 확인되었다 (표 2-8). 특히, cholesterol 과 lathosterol과 같은 sterol 계열이 자외선 조사에 의하여 급격히 줄어드는 것이 확인되었다. 6주간의 식이섭취시와 마찬가지로 이러한 대사체들은 자외선에 의한 피부의 보호장벽 기능 저하 및 염증 반응, 활성산소 증가와 같은 물리적, 생리적 작용과도 밀접한 관계가 있다는 사실은 이미 많은 논문에서 보고되어져 있으며, 자외선 조사에 의하여 양적 변화를 보인 대사체 가운데 일부 대사체 특히, taurine, histidine과 같은 대사체는 12주간의 녹차 식이섭취에 의하여 자외선을 조사하지 않은 정상대조군의 수준으로 회복되는 것이 확인되었다. 이러한 결과를 토대로, GC-TOF-MS 분석을 통한 자외선 조사 및 녹차식이섭취에 따른 일차대사체의 변화는 6주간의 녹차식이섭취보다 12주간의 녹차식이섭취가 피부 일차 대사체에 더 많은 영향을 미치는 것으로 추측되어진다.

$t_R$ (min)	Identified mass (m/z)	Name	Derivatized	p-value
5.26	116	L-Alanine	TMS (X 2)	6.0E-04
6.14	261	Urea	TMS (X 3)	0.028
6.47	144	L-Valine	TMS (X 2)	1.0E-05
7.03	158	L-Leucine	TMS (X 2)	0.003
7.25	158	Isoleucine	TMS (X 2)	0.001
7.69	245	Fumaric acid	TMS (X 2)	2.0E-09
7.88	100	L-Serine	TMS (X 3)	0.001
8.13	218	L-Threonine	TMS (X 3)	0.003
9.26	176	L-Methionine	TMS (X 2)	0.003
9.27	232	Aspartic acid	TMS (X 3)	0.010
9.89	227	L-Glutamine	TMS (X 2)	1.0E-06
9.93	188	Hypotaurine	TMS (X 3)	0.001
10.05	246	Glutamic acid	TMS (X 3)	1.0E-05
10.14	218	Phenylalanine	TMS (X 2)	2.0E-04
10.46	116	L-Asparagine	TMS (X 3)	0.002
10.48	326	Taurine	TMS (X 3)	0.002
10.70	84	L-Lysine	TMS (X 3)	0.005
11.46	265	Hypoxanthine	TMS (X 2)	5.0E-06
11.53	142	DL-Ornithine	TMS (X 4)	0.022
11.57	273	Citric acid	TMS (X 4)	5.0E-05
11.92	174	Histamine	TMS (X 3)	3.0E-05
12.18	205	Glucose	TMS (X 5)	0.001
12.23	156	L-Lysine	TMS (X 4)	1.0E-04
12.26	254	L-Histidine	TMS (X 3)	2.0E-04
12.74	267	<i>trans</i> -Urocanicacid	TMS (X 3)	7.0E-05
12.93	75	Palmitic acid	TMS (X 1)	0.050
13.42	217	<i>myo</i> -Inositol	TMS (X 6)	4.0E-05
14.12	341	Stearic acid	TMS (X 1)	2.0E-06
15.10	144	<i>cis</i> -Oleamide	TMS (X 1)	0.002
15.41	258	Uridine	TMS (X 4)	2.0E-04
15.89	117	Docosahexaenoic acid	TMS (X 1)	2.0E-07
16.01	371	Monopalmitin	TMS (X 2)	5.0E-04
16.06	217	Inosine	TMS (X 4)	2.0E-05
16.22	117	Docosanoic acid	TMS (X 1)	5.0E-06
16.67	223	Cytidine	TMS (X 4)	6.0E-09
17.02	204	Maltose	TMS (X 8)	3.0E-04
19.34	129	Cholesterol	TMS (X 1)	1.0E-09
19.82	255	Lathosterol	TMS (X 1)	1.0E-06

표 2-8. GC-TOF-MS 분석을 통한 12주간의 자외선 조사 및 녹차 식이섭취에 따른 유의적인 차이를 보이는 일차 대사체



(4) UPLC-Q-TOF-MS를 이용하여 자외선 조사 및 녹차 식이섭취에 따른 2차 대사체 변화 분석

- 6주간 식이공급 후 얻어진 피부 시료를 UPLC-Q-TOF-MS 분석하여 얻어진 데이터를 이용하여 다변량 통계분석인 PCA로 분석한 결과, 주성분 1과 2에 의해 각각 15.7%과 10.4%의 설명력으로 구분되어졌으나, 자외선 조사 대조군과 녹차식이섭취군의 대사체가 뚜렷하게 구분되지 않았다 (그림 2-41A). 이를 PLS-DA 판별분석을 통해 자외선 조사 및 녹차 추출물 식이섭취에 따른 대사체 변화를 확인한 결과, PCA분석보다 더 확실하게 자외선을 조사하지 않은 정상대조군, 자외선을 조사한 대조군 및 자외선 조사와 더불어 녹차 식이섭취군이 구분되어짐을 확인하였다 (그림 2-41B). 그리고 각 실험군을 구분짓는 대사체를 HMDB (Human Metabolome Database, <http://www.hmdb.ca>), Lipid maps Databases (<http://www.lipidmaps.org>) 와 같은 online library를 이용하여 잠정적으로 동정하였다. 또한, box-and-whisker plot을 이용하여 변화된 대사체의 양적 차이를 비교하였다 (그림 2-42).

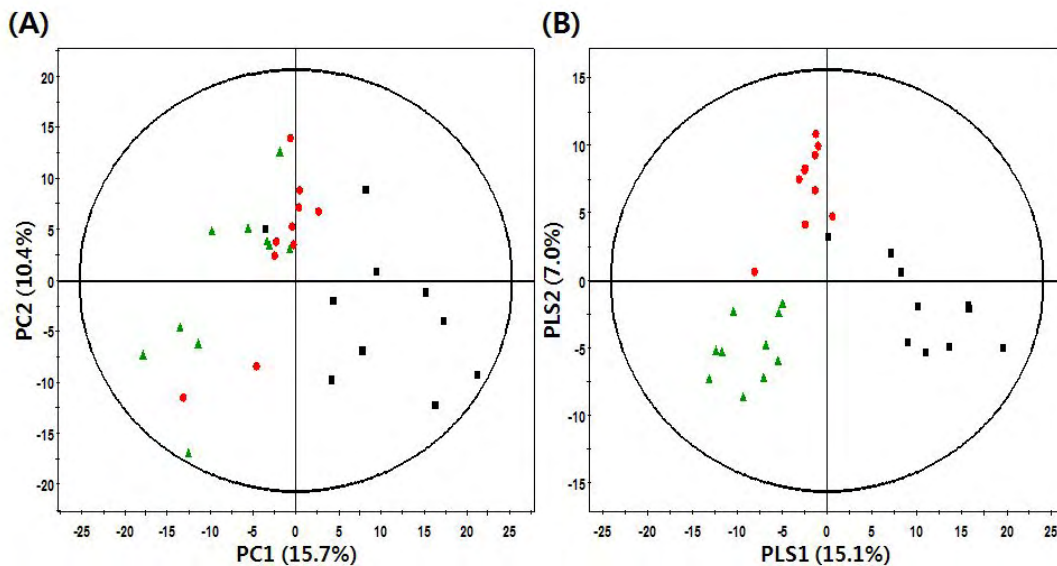


그림 2-41. 6주간 식이공급 후 얻어진 피부 시료에 대하여 UPLC-Q-TOF-MS로 분석한 자외선을 조사하지 않은 정상대조군(■), 자외선 조사 대조군(●) 및 자외선 조사와 녹차 식이섭취군(▲)의 PCA score plot (A) 과 PLS-DA score plot (B)

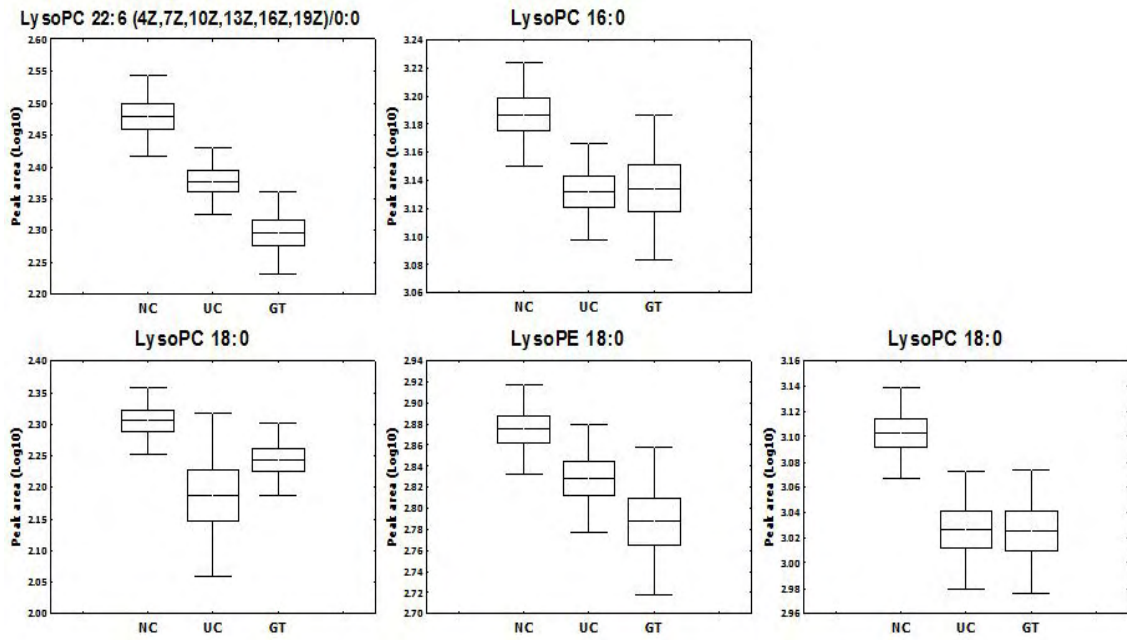


그림 2-42. Box-and-Whisker plot을 이용한 6주간 식이공급 후 얻어진 피부 시료에서의 자외선을 조사하지 않은 정상대조군 (NC), 자외선 조사 대조군 (UC) 및 자외선 조사와 녹차 식이섭취군 (GT)의 이차 대사체 함량 비교

- 6주간의 식이 섭취 후 UPLC-Q-TOF-MS로 분석한 각 실험군간의 양적 변화를 나타낸 이차대사체는 3종의 lysoPC 계열과 1종의 lysoPE가 확인되었다 (표 2-9). lysoPC 및 lysoPE와 같은 대사체들은 glycerophospholipid의 일종으로 피부에서 염증반응과 관련된 것으로 알려져 있다. 6주간의 자외선 조사에 의하여 유의적으로 변화를 보인 이차대사체는 모두 감소하는 경향을 보이며, 녹차 식이섭취로 인하여 더 감소되거나 혹은 변화를 보이지 않는 것으로 확인되었다.

tr (min)	Tentativemetabolites	Measur ed MS (m/z)	HMDB Formula	ppm	iFit (nor m)	error (mDa)	Adduct	p-val ue
7.90	LysoPC22:6(4Z,7Z,10Z,13Z,16Z,19Z)/0:0	612.3279	C <sub>30</sub> H <sub>50</sub> NO <sub>7</sub> P	-3.6	0.9	-2.2	M+FA-H [1-]	1.0E-06
8.65	LysoPC 16:0	540.3267	C <sub>24</sub> H <sub>50</sub> NO <sub>7</sub> P	-6.3	0.6	-3.4	M+FA-H [1-]	0.010
10.02	LysoPC18:0*	568.3625	C <sub>26</sub> H <sub>54</sub> NO <sub>7</sub> P	1.9	4.1	1.1	M+FA-H [1-]	0.020
10.31	LysoPE 18:0	480.3079	C <sub>23</sub> H <sub>48</sub> NO <sub>7</sub> P	-2.3	0.4	-1.1	M-H [1-]	0.006
10.37	LysoPC18:0*	568.3597	C <sub>26</sub> H <sub>54</sub> NO <sub>7</sub> P	-3.0	0.3	-1.7	M+FA-H [1-]	5.0E-04

\*Asterisk means the two forms of LysoPC, with the fatty acyl groups at positions 1 (sn-1) or 2 (sn-2) on the glycerol backbone.

표 2-9. UPLC-Q-TOF-MS 분석을 통한 6주간의 자외선 조사 및 녹차 식이섭취에 따른 유의적인 차이를 보이는 이차 대사체

- 12주간 식이공급 후 얻어진 피부 시료를 UPLC-Q-TOF-MS 분석하여 얻어진 데이터를 이용하여 다변량 통계분석인 PCA로 분석한 결과, 주성분 1과 2에 의해 각각 20.5%와 9.5%의 설명력으로 구분되어졌으나, 6주간의 식이공급 결과와 마찬가지로 자외선 조사 대조군과 녹차식이섭취군의 대사체가 뚜렷하게 구분되지는 않았다 (그림 2-43A). 이를 PLS-DA 판별분석을 통해 자외선 조사 및 녹차 추출물식이섭취에 따른 대사체 변화를 확인한 결과, PCA분석보다 더 확실하게 자외선을 조사하지 않은 정상대조군, 자외선을 조사한 대조군 및 자외선 조사와 더불어 녹차식이섭취군이 구분되어짐을 확인하였다 (그림 2-43B). 그리고 각 실험군을 구분짓는 대사체를 HMDB (Human Metabolome Database, <http://www.hmdb.ca>), Lipid maps Databases (<http://www.lipidmaps.org>) 와 같은 online library를 이용하여 잠정적으로 동정하였다. 또한, box-and-whisker plot을 이용하여 변화된 대사체의 양적 차이를 비교하였다 (그림 2-44).

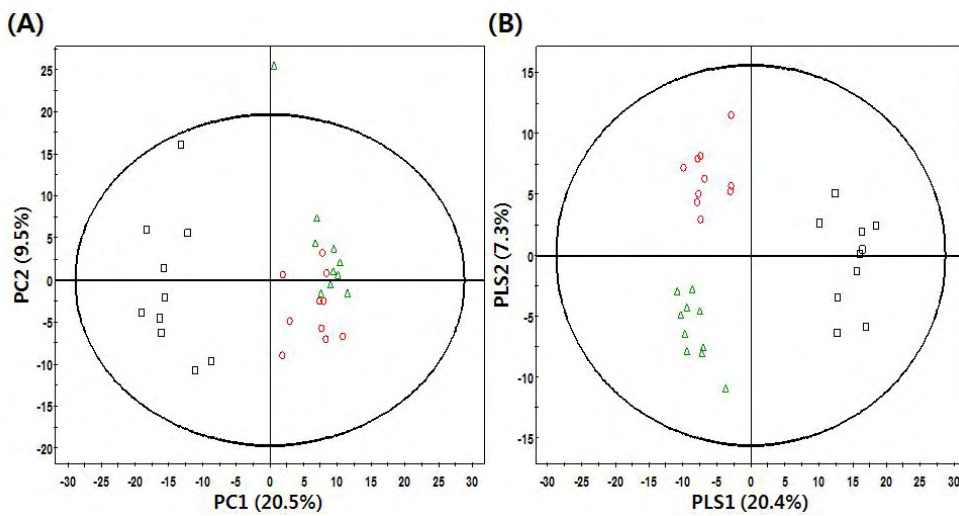


그림 2-43. 12주간 식이공급 후 얻어진 피부 시료에 대하여 UPLC-Q-TOF-MS로 분석한 자외선을 조사하지 않은 정상대조군(□), 자외선 조사 대조군(○) 및 자외선 조사와 녹차식이섭취군(△)의 PCA score plot (A) 과 PLS-DA score plot (B)

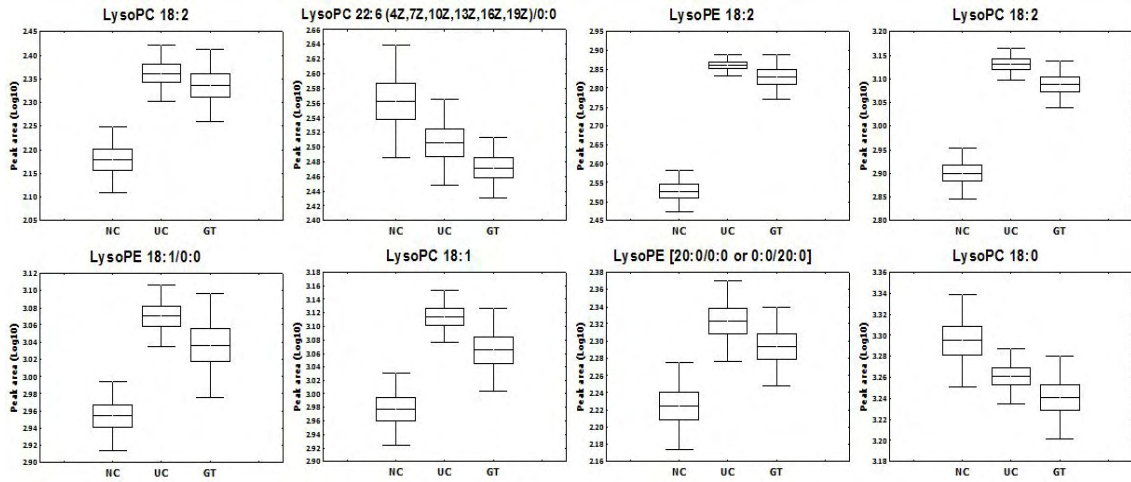


그림 2-44. Box-and-Whisker plot을 이용한 12주간 식이공급 후 얻어진 피부 시료에서의 자외선을 조사하지 않은 정상대조군 (NC), 자외선 조사 대조군 (UC) 및 자외선 조사와 녹차 식이섭취군 (GT)의 이차 대사체 함량 비교

- 12주간의 식이 섭취 후 UPLC-Q-TOF-MS로 분석한 각 실험군간의 양적 변화를 나타낸 이차대사체는 4종의 lysoPC 계열과 3종의 lysoPE가 확인되었다 (표 2-10). lysoPC 22:6 (4Z,7Z,10Z,13Z,16Z,19Z)/0:0 및 lysoPC 18:0과 같은 2종의 lysoPC는 6주에서의 결과와 동일하게 유의적으로 감소하는 경향을 보였으며, 그 외 5종의 lysoPC 및 lysoPE의 경우 자외선 조사에 의하여 증가하였으나, 녹차 식이섭취로 인하여 감소하는 경향을 보였다. 이는 GC-TOF-MS 분석을 통한 일차 대사체의 결과와 유사하게 6주간의 녹차식이섭취보다 12주간의 녹차식이섭취가 피부 이차 대사체에 더 많은 영향을 미치는 것으로 추측되어진다.

tr (min)	Tentativemetabolites	Measured MS (m/z)	HMDB Formula	ppm	iFit (no rm)	error (mDa)	Adduct	p-value
7.74	LysoPC18:2*	564.3302	C <sub>26</sub> H <sub>50</sub> NO <sub>7</sub> P	0.7	1.4	0.4	M+FA-H [1-]	4.0E-06
7.90	LysoPC 22:6 (4Z,7Z,10Z,13Z,16Z,19Z)/0:0	612.3279	C <sub>30</sub> H <sub>50</sub> NO <sub>7</sub> P	0.7	0.9	0.4	M+FA-H [1-]	0.009
7.94	LysoPE18:2	476.2756	C <sub>28</sub> H <sub>44</sub> NO <sub>7</sub> P	-1.7	0.7	-0.8	M-H [1-]	0.0E+00
7.98	LysoPC18:2*	564.3302	C <sub>26</sub> H <sub>50</sub> NO <sub>7</sub> P	-2.1	0.3	-1.2	M+FA-H [1-]	0.0E+00
8.94	LysoPE 18:1/0:0	478.2939	C <sub>28</sub> H <sub>46</sub> NO <sub>7</sub> P	1.7	0.7	0.8	M-H[1-]	2.0E-05
9.00	LysoPC 18:1	566.3458	C <sub>26</sub> H <sub>52</sub> NO <sub>7</sub> P	1.8	0.3	1.0	M+FA-H [1-]	1.0E-05
9.48	LysoPE [20:0/0:0 or 0:0/20:0]	554.3455	C <sub>28</sub> H <sub>52</sub> NO <sub>7</sub> P	2.2	1.7	1.2	M+FA-H [1-]	3.0E-04
10.37	LysoPC 18:0	568.3597	C <sub>26</sub> H <sub>54</sub> NO <sub>7</sub> P	-1.1	0.4	-0.6	M+FA-H [1-]	0.011

\*Asterisk means the two forms of LysoPC, with the fatty acyl groups at positions 1 (sn-1) or 2 (sn-2) on the glycerol backbone.

표6. UPLC-Q-TOF-MS 분석을 통한 12주간의 자외선 조사 및 녹차 식이섭취에 따른 유의적인 차이를 보이는 이차 대사체

### 제 3 절 제3핵심과제(인슐린저항성, 당뇨합병증 및 뇌인지기능 개선용 건강기능식품 제품화 연구)

#### 1. 제3-1세부연구과제(인슐린저항성, 당뇨합병증 및 인지 기능 개선용 건강기능식품 제품화 연구)

##### 가. 마로부터 인슐린 저항성 및 당뇨합병증 개선 건기식 소재 개발

###### (1) 국내·외 인정 및 사용현황

###### (가) 기원 및 개발경위

- Wu 등의 연구에 의하면 *Dioscoreaceae* 과(科) *Dioscorea* 속(屬)에는 전세계적으로 약 600여 개의 종(種)이 존재하며 서양에서는 ‘wild yam’이라는 명칭이 보편적으로 사용된다. 대한약전에 따르면 산약(山藥)은 ‘마 科(*Dioscoreaceae*)’에 속하는 마(*Dioscorea batatas* Decaisne) 또는 참마(*Dioscorea japonica* Thunberg)의 뿌리줄기를 그대로 썬서 말린 것을 일컫는다. 중국에서는 *Dioscorea opposita* Thunberg와 *Dioscorea batatas*는 같은 것으로 혼용되어 사용되고 있다. 또한 산약의 종(種)을 구분한 연구들에 의하면 산약에 해당되는 종(種)은 한국, 일본 및 중국에서 자생하며 사용되어 온 *Dioscorea batatas* Decaisne, *Dioscorea japonica* Thunberg 및 *Dioscorea opposita* Thunberg의 세 가지로 한정된다. 따라서 *Dioscorea batatas* Decaisne, *Dioscorea japonica* Thunberg 및 *Dioscorea opposita* Thunberg의 세 가지 종의 뿌리줄기를 그대로 썬서 말린 것을 산약이라 한다.

- 산약의 세 가지 종(種)은 전통적으로 한방에서 모두 동일한 병증 치료에 사용되어 왔으며 특히 소갈(消渴) 및 소변빈삭(小便頻數)과 같은 당뇨병 치료의 목적으로 사용되어 왔다. 동의보감의 육미지황원(六味地黃元)과 육미지황환(六味地黃丸), 의학정전의 육미지황탕(六味地黃湯), 경약전서의 좌귀음(左歸飲) 등이 모두 산약을 이용한 당뇨병 처방전이다.

- “산약에탄올엑스 DA-9802”는 산약의 전통적인 사용에 근거하여 혈당조절용 기능성원료로 하여 국민 건강을 증진하고 고부가가치 건강기능식품을 개발하고자 한다. 이를 위해 비만 유발 2형 당뇨 생쥐 모델(ob/ob 마우스)에서 7주 동안 경구 투여하는 실험을 진행하였다.

(나) 국내 인정현황

- 대한약전에서는 산약을 마 (*Dioscorea batatas* Decaisne) 또는 참마(*Dioscorea japonica* Thunberg)의 뿌리줄기를 그대로 썬서 말린 것으로 명시하고 있다.

식품공전 제1총칙. 3.식품원재료분류에서 ‘마’는 근채류로 분류되어 있으므로 식품원재료로 제한없이 사용할 수 있도록 허용되고 있다.

또한 식품공전 제2식품일반에대한공통기준및규격. 3. 제조·가공 기준에서 물, 주정 또는 물과 주정의 혼합액, 이산화탄소만을 사용하여 추출한 것을 식품으로 정의하고 있다.

- 따라서, 마의 뿌리줄기를 썬서 말린 산약을 50% 주정으로 추출한 "산약에탄올엑스 DA-9802"는 식품으로 간주할 수 있다.

No	출 처	내 용
		산약( <i>Dioscorea Rhizoma</i> )
1	대한약전	이 약은 마 <i>Dioscorea batatas</i> Decaisne 또는 참마 <i>Dioscorea japonica</i> Thunberg(마 과 Dioscoreaceae)의 뿌리줄기를 그대로 썬서 말린 것이다. 제1. 총칙 3. 식품원재료 분류
2	식품공전	1) 식물성 원료 (4) 채소류 ② 근채류 - 무, 순무, 당근, 양파, 연근, 우엉, 토란, 마 등 제 2. 식품일반에 대한 공통기준 및 규격 3. 제조, 가공기준
3	식품공전	5) 식품은 물, 주정 또는 물과 주정의 혼합액, 이산화탄소만을 사용하여 추출할 수 있다. 다만, 식품첨가물공전에서 개별기준이 정해진 경우는 그 사용기준을 따른다.

표 3-1. 산약의 국내 인정 현황

(다) 국내 사용현황

- 산약이 식품으로 사용되는 경우 주로 마즙 또는 마분말 형태의 일반식품으로 섭취되고 있으며 많은 관련 제품들이 유통되고 있다.
- 육미지황환(동의보감), 자음지황탕 (동의보감), 팔미환 (동의보감) 및 좌귀음(경약전서) 등에 사용되고 있고, 기성한약서 외 한약서에서도 육미지황탕 (의학정전) 등에 사용되고 있다.

No.	형태	제품명	제조사	원재료
1	분말	참마 분말	안동마	참마(100%)
2		자연산자생마분말	안동마	마
3		진주참마(마분말스틱)	진주우영, 마영농조합 법인	마(100%)
4		청정진주참마분말	정도식품, 진주마넛	마가루
5	즙	참마즙	안동마	마(95%이상)
6		안동 전통마즙	안동F&C, 코아뉴트리션	마추출액(91.75%)
7		음료 통째로 마	우일음료(판매원:CJ제 일제당)	마분말(국산)1.5%
8	환	지리산 마(산약)환	지리산 홍화인	마(산약)가루100%
9	과립	천마천연과립100	강원천마	천마과립 100%

표 3-2. 산약의 국내 사용현황

(라) 국외 인정 및 사용현황

① 일본

- 후생노동성식품안전부(厚生労働省食品安全部)의 농수산물등의 식품분류표 (農産物等の食品分類表)에 ながいも(ながいものをいう) 및 やまのいも (じねんじょ) 으로 등재되어 있으며 이것은 각각 *Dioscorea opposita*와 *Dioscorea japonica*에 해당된다. 일본약국방에는 마 (*Dioscorea batatas* Decaisne)와 참마(*Dioscorea japonica* Thunberg)가 기재되어 당뇨 등의 치료 목적으로 사용하도록 하고 있다. 일본에서 ‘마’는 ‘Japanese yam’으로도 불리우며 우동면 및 소바면과 같은 여러가지 가공식품 제조에 사용되고 있다.

② 중국

- 마(*Dioscorea opposita*)가 淮山(huái shān), 山藥(shān yào) 또는 淮山藥(huái shān yào)라는 명칭으로 사용되고 있고, 근경은 약재로 많이 사용되고 있다. *Dioscorea opposita* Thunberg는 중국에서 *Dioscorea polystachya*로도 불리우며 *Dioscorea polystachya*는 *Dioscorea batatas*를 칭하는 예전 이름이다.



③ 기타 국가

- *Dioscoreaceae* 과(科) *Dioscorea* 속(屬)에는 약 600여 개의 종(種)이 존재하며 서양에서는 ‘wild yam’이라는 명칭이 보편적으로 사용된다. 그러나 산약에 해당되는 세 가지 종에 대한 섭취기록은 좀처럼 찾아보기 어렵다. 즉, 한국, 일본 및 중국에서 많이 사용되어온 산약은 기타 국가들에서의 사용은 거의 없었던 것으로 보인다.

(2) 기능성 원료

(가) 원재료

- ① 산지 : 국내 또는 중국
- ② 식물 종(種) : 마 과(科)인 *Dioscoreaceae*에 속하는 3가지 종(種)
- ㉠ *Dioscorea batatas* Decaisne
- ㉡ *Dioscorea japonica* Thunberg
- ㉢ *Dioscorea opposita* Thunberg
- ③ 부위 : 뿌리줄기

(나) 기타 원료

기타 원료	함 량	용 도	사용근거
주정	50% 주정 600 L (산약 100kg 당)	추출용매	식품공전 <sup>1)</sup>
말토덱스트린	총 고형분 기준, 50% 중량비	희석제	식품공전 <sup>2)</sup>

1) 식품공전 - 제5, 27.주류 中 소주  
 2) 식품공전 - 제5, 8.엿류 中 덱스트린

표 3-3. 기타원료의 사용근거

(다) 첨가물

- ① 규조토
- ㉠ 용도 : 여과보조제
- ㉡ 사용근거 : 식품첨가물공전

(3) 제조공정



그림 3-1. 산약에 탄올엑스 DA-9802"의 제조공정도

(4) 원료의 특성연구

(가) 기능성 원료의 특성

- 정상 : 미황색의 건조분말
- 영양학적 특성

항 목	함 량
열량 (Kcal/100g)	338.08Kcal/100g
탄수화물 (%)	65.66%
조단백질 (%)	18.77%
조지방 (%)	0.04%
수분 (%)	5.45%
회분 (%)	10.08%
나트륨 (mg/100g)	311.74mg/100g
과당(mg/100g)	5804.62mg/100g
자당 (mg/100g)	19129.43mg/100g
유당(mg/100g)	불검출
맥아당 (mg/100g)	불검출
포도당 (mg/100g)	1332.28mg/100g
포화지방산 (g/100g)	0.02g/100g
트랜스지방산 (g/100g)	불검출
콜레스테롤 (g/100g)	불검출

표 3-4. 산약주정추출물의 영양학적 특성

(나) 지표성분의 특성

- 명칭 : Allantoin
- 특성 : Allantoin의 물리화학적 특성은 아래와 같다.

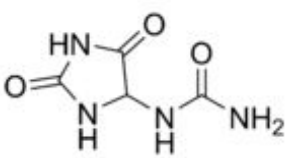
분자식	C <sub>4</sub> H <sub>6</sub> N <sub>4</sub> O <sub>3</sub>
구조식	
IUPAC name	(2,5-Dioxo-4-imidazolidinyl) urea
분자량	158.12 g mol <sup>-1</sup>

표 3-5. 지표성분 allantoin의 물리화학적 특성

- 지표성분 설정 : Allantoin은 동식물계에 널리 존재하는 purine의 대사산물로서 다른 식물과 비교하여 특히 *Dioscorea* 속(屬)에 많이 함유되어 있어 산약의 지표성분으로 알려져 있다. 원재료에 0.21%정도 함유되어 있던 allantoin이 추출 및 여과 단계를 거치면서 4.1~8.0%로 농축되어, 최종 기능성 원료에는 2.7~5.3%로 존재하므로 allantoin은 "산약에탄올엑스 DA-9802"의 지표성분으로 적합한 것으로 사료된다. 원재료의 여과, 농축, 건조에 따른 원료 수율 및 지표성분 함량 변화는 아래와 같다.

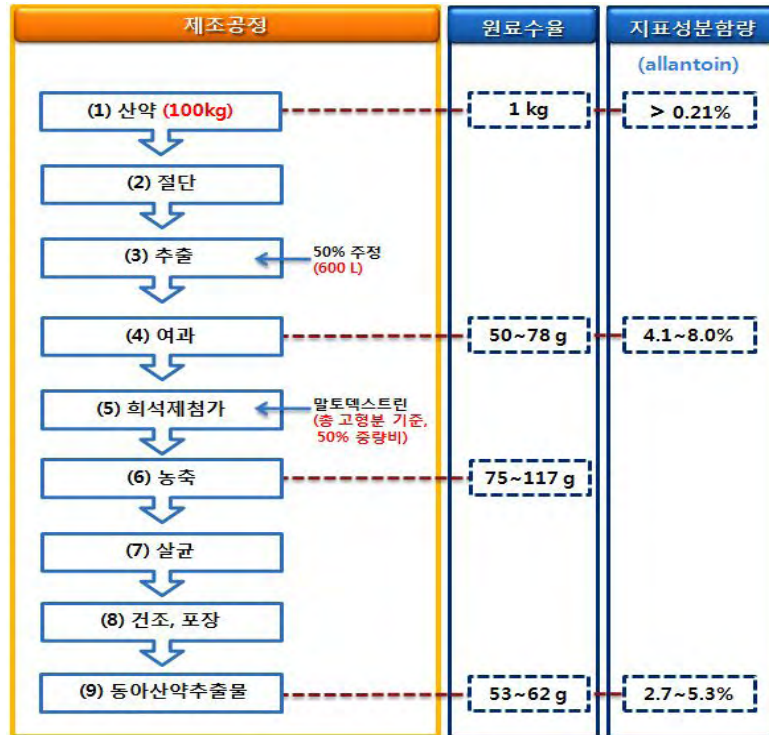


그림 3-2. 제조공정별 원료 수율과 지표성분 함량 변화

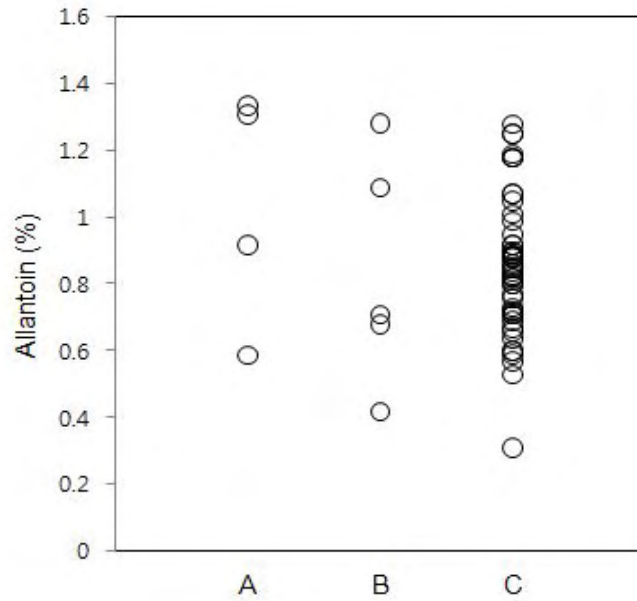
- 원료의 품질인증 자료 : 현재 시중에서 유통되고 있는 “산약”은 “장마” 또는 “참마”를 찌서 말린 것임. *Dioscorea batatas*와 *Dioscorea opposita*는 동일한 품종으로 알려져 있음. [www.nature.go.kr](http://www.nature.go.kr) (국가생물종지식정보시스템)]

학명	식물명	비고
<i>Dioscorea batatas</i> Decaisne (이명: <i>Dioscorea opposita</i> Thunberg)	마 (또는 장마)	<i>Dioscorea batatas</i> 와 <i>Dioscorea opposita</i> 는 동일한 품종으로 알려져 있음
<i>Dioscorea japonica</i> Thunberg	참마 (또는 마, 단마)	

표 3-6.

산약의 식물 품종

- 대전대학교 서영배교수 등에 따르면 산약의 기원에 대하여 한국과 중국에서 각각 기원식물을 달리 하고 있으나 모두 산약으로 사용하는데 문제가 없을 것으로 생각됨.



	기원식물	함량분석처	알란토인 함량 (평균)
A <sup>1)</sup>	<i>Dioscorea japonica</i>	동아제약(주)연구본부	0.59-1.34% (1.04%)
B <sup>1)</sup>	<i>Dioscorea batatas</i>	동아제약(주)연구본부	0.42-1.28% (0.88%)
C <sup>1)</sup>	<i>Dioscorea batatas</i>	경상북도농업기술원 생물자원연구소	0.31-1.28% (0.86%)

그림 3-3. 산약의 알란토인 함량 분석

(5) 지표성분 연구

(가) 지표성분의 규격

- Allantoin 함량 규격을 2.8%~4.2%로 설정한다.

(나) 지표성분의 규격 설정 근거

① 지표성분 함량

- 지표성분의 규격은 「건강기능식품 기능성 원료 인정에 관한 규정」(식품의약품안전청 고시 제2009-39호)의 제13조 제6호에 근거하여, 표시하고자 하는 값에 분석 오차를 고려한 하한치와 상한치를 백분율로 정하여야한다.

- 따라서 지표성분에 대한 공인검사기관 및 자사 분석 결과를 근거로 표시량을 3.5%로 설정하고, 분석 오차 20%를 고려하여 "산약에탄올엑스 DA-9802"의 지표성분 규격을 2.8%~4.2%로 설정하였다.

		공인검사기관 분석결과						
LOT#		#1 D8902- 14	#2 D9101- 36	#3 D8201- 33	#4 D8202- 34	#5 D8203- 35	#6 R09003	#7 R09002
분석결과 (%)		2.9121	2.0318	4.0494	4.0457	3.9732	3.6829	3.2180
		2.9173	1.8026	4.0215	4.0252	3.9287	3.6811	3.6329
		2.9333	1.9833	3.9818	4.0048	3.9806	3.9004	3.8445
평균 ± 표준 편차	Lot 당	2.9209 ± 0.0110	1.9392 ± 0.1208	4.0176 ± 0.0340	4.0252 ± 0.0205	3.9608 ± 0.0281	3.7548 ± 0.1261	3.5651 ±0.3187
	전체	3.4548 ± 0.7422						

표 3-7. Allantoin 함량 분석결과 - 공인검사기관 분석자료

(다) 제조공정별 원료 수율 및 지표성분 함량 변화

- "산약에탄올엑스 DA-9802"는 원재료인 산약을 50% 주정으로 추출하여 여과한 후 희석제를 첨가, 농축, 살균, 건조 과정을 통하여 제조된다.
- 원재료의 여과, 건조에 따른 원료 수율 및 지표성분 함량 변화는 아래와 같다.

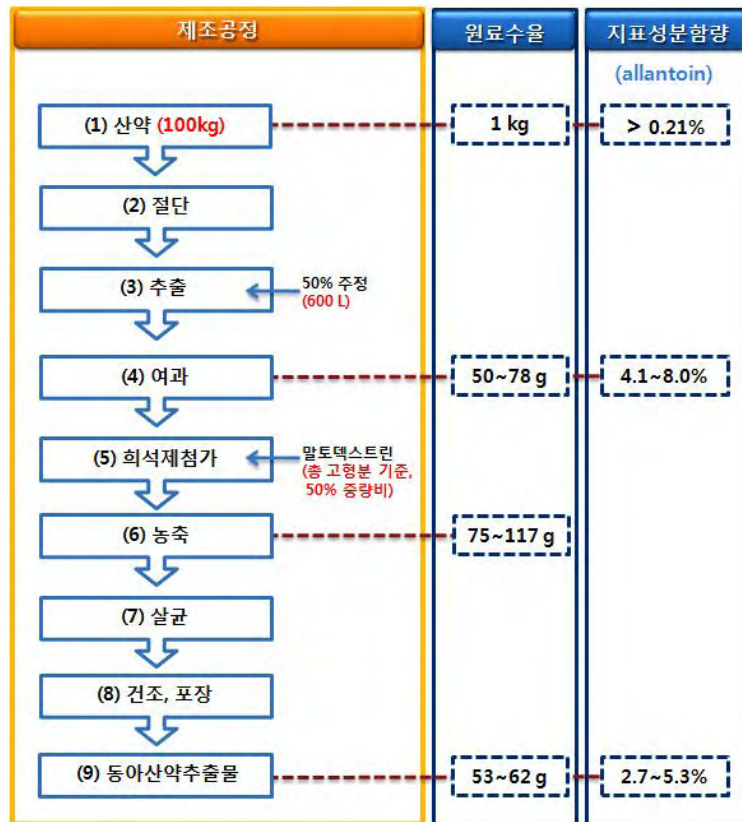


그림 3-4. 제조공정별 원료 수율과 지표성분 함량 변화

(라) 지표성분 함량 측정을 위한 시험방법

① 시험방법 개요

- 지표성분인 allantoin의 분석방법으로 AOAC 공인 방법이 제시되어 있지 않으므로, 자사에서 확립한 방법을 사용하였다.

② 시험방법 요약

㉞ 분석기기: HPLC

㉞ 분석조건

1) Column : Inertsil NH<sub>2</sub>(4.6 x 250mm, 5 $\mu$ m, GL Science Inc.)

2) Mobile phase

- 0~15분 Acetonitrile 90%, 증류수 10%

- 20~50분 Acetonitrile 70%, 증류수 30%

- 50.1~55분 Acetonitrile 90%, 증류수 10%

3) Detector : UV 220nm

4) Column temp. : 30°C

5) Flow rate : 1mL/min

6) Injection volume : 10 $\mu$ l

③ 시료 전처리

㉞ 표준용액의 조제

1) Stock standard solution의 제조

- Allantoin 표준품 약 10mg을 정밀히 달아 50% 에탄올 용액을 가하여 용해시킨 후 50mL로 정용한다.

2) Working standard solution의 제조

- Stock standard solution을 차례로 희석하여 0.05~0.2mg/mL의 농도범위에서 검량용 표준 용액을 조제한다.

㉞ 시험용액 제조

- 시료 약 150mg을 정밀히 달아 50mL 용량플라스크에 넣고 50% 에탄올 용액을 적당량 넣어 20분간 초음파 진탕한다. 이 액을 식힌 후 50% 에탄올 용액으로 표선을 맞춘 후 잘 흔들어 섞은 다음, 약 1mL을 취하여 1.5mL PP tube에 옮겨 담고 13,000rpm에서 5분간 원심분리하여 상등액을 검액으로 한다.

④ 정량시험

- 앞서 기술한 분석 조건에 따라 표준용액 및 시험용액의 allantoin 함량을 측정한다.



(마) 시험법 검증

- Allantoin 분석 방법은 자사확립법이므로 「건강기능식품 기능성 원료 인정에 관한 규정」(식품의약품안전청 고시 제2009-39호)의 제3장 제13조 제6호에 근거하여 시험방법의 타당성 검증을 실시한 결과, 모든 항목에서 타당성이 입증되었다.

항 목	평 가 결 과
특이성 (Specificity)	- Blank 및 혼합 시료에서 allantoin이 선택적으로 분석되었음.
정확성 (Accuracy)	- 회수율 : 98.1%~102.3%
정밀성 (Precision)	- Intra day % RSD : 0.3~0.7%
직선성 (Linearity)	- Inter day % RSD : 0.4~1.4%
범위 (Range)	- 50~500 µg/mL 농도에서 R2=1.0000 - 기능성 원료 내 지표성분 함량의 50~500% 인 50~500 µg/mL

• Allantoin 특이성 보완

- Sample에 allantoin을 spiking하여 조제한 QC sample의 분석결과, allantoin이 하나의 peak로 관찰됨.
- QC sample 결과로부터 표준품첨가법에 따라 검량선 작성시 R2 =0.9999 이상의 양호한 직선성을 나타내었음.

표 3-8. Allantoin 함량 분석 시험방법 타당성 검증 결과

(6) 유해물질에 대한 규격

(가) 유해물질규격 설정

납 : 1 ppm 이하  
 비소 : 1 ppm 이하  
 카드뮴 : 1 ppm 이하  
 수은 : 1 ppm 이하

표 3-9. 유해물질 규격 설정

(나) 유해물질규격설정 근거

- 유해물질에 대한 규격 설정은 「건강기능식품 기능성 원료 인정에 관한 규정」 (식품의약품 안전청 고시 제2009-39호)의 유해물질 규격 설정 항목에 근거하였으며, 해당 항목에 대하여 건강기능식품 검사 기관 (한국기능식품연구원)에서 분석한 결과는 다음 표와 같다.

항 목	규 격 <sup>1)</sup>	원료 내 함량 (mg/kg) <sup>2)</sup>			원료 1일 섭취량당 함량 (µg/일) <sup>3)</sup>		
		Lot No			Lot No		
		D8201-33	D8202-34	D8202-35	D8201-33	D8202-34	D8202-35
납	<10.8µg/일	0.0144	0.0283	0.0216	0.0130	0.0255	0.0194
총비소	<150µg/일	0.3067	0.3527	0.3510	0.2760	0.3174	0.3159
카드뮴	<3.0µg/일	0.0162	0.0125	0.0092	0.0146	0.0113	0.0083
총수은	<2.1µg/일	0.0030	0.0030	0.0030	0.0027	0.0027	0.0027

1) 「건강기능식품 기능성 원료 인정에 관한 규정 (식약청고시 제2009-39호, 2009.06.29)」의 [별표 2] 유해물질규격설정항목

2) 권장규격(µg/일) ÷ 섭취량 (900mg/일) X 1,000

3) 한국기능식품연구원 검사성적서

표 3-10. 유해물질규격설정 근거

(다) 중금속

- 권장규격에 DA-9802의 섭취량(900mg/일)을 적용할 경우 납은 12 mg/kg 미만, 총비소는 166.7 mg/kg 미만, 카드뮴은 3.3 mg/kg 미만, 총수은은 2.3 mg/kg미만으로 관리되어야 함.
- 중금속은 가능한 최소한의 함량으로 관리되는 것이 바람직하므로 분석결과를 고려하여 권장규격보다 낮은 함량인 납1ppm 이하, 총비소 1ppm 이하, 카드뮴 1ppm 이하, 총수은 1ppm 이하로 규격을 설정함
- 한국기능식품연구원에서 DA-9802의 중금속 함량을 분석한 결과, 설정한 규격에 적합함을 확인하였음.

(라) 잔류농약

- 「건강기능식품 기능성 원료 인정에 관한 규정」 (식품의약품안전청 고시 제2009-39호)에 따라 잔류농약 정밀검사항목 (49종)에 대하여 건강기능식품 검사기관 (한국기능식품연구원)에서 분석한 결과는 다음 표와 같다.

시험항목	분석결과
비에치씨 (BHC)	불검출
비펜스린 (Bifenthrin)	불검출
카보후란 (Carbofuran)	불검출
클로르헨나피르 (Chlorfenapyr)	불검출
클로로타로닐 (Chlorothalonil)	불검출
클로르피리포스 (Chlorpyrifos)	불검출
클로르피리포스-메틸 (Chlorpyrifos-methyl)	불검출
싸이할로쓰린 (Cyhalothrin)	불검출
싸이퍼메쓰린 (Cypermethrin)	불검출
싸이프로디닐 (Cyprodinil)	불검출
디디티 (DDT)	불검출
다이아지논 (Diazinon)	불검출
디크로보스 (Dichlorvos)	불검출
디코폴 (Dicofol)	불검출
디메토이이트 (Dimethoate)	불검출
엔도설판 (Endosulfan)	불검출
이피엔 (EPN)	불검출
에토프로포스 (Ethoprophos)	불검출
페나리몰 (Fenarimol)	불검출
페니트로치온 (Fenitrothion)	불검출
펜프로파스린 (Fenpropathrin)	불검출
펜치온 (Fenthion)	불검출
펜발러레이트 (Fenvalerate)	불검출
플루디옥소닐 (Fludioxonil)	불검출
플루퀸코나졸 (Fluquinconazole)	불검출
이마자릴 (Imazalil)	불검출
이프로디온 (Iprodione)	불검출
이소프로치오란 (Isoprothiolane)	불검출
말라치온 (Malathion)	불검출
메티다치온 (Methidathion)	불검출
메소밀 (Methomyl)	불검출
파클로부트라졸 (Paclobutrazole)	불검출
파라치온 (Parathion)	불검출
파라치온-메틸 (Parathion-methyl)	불검출
펜디메타린 (Pendimethalin)	불검출
퍼메쓰린 (Permethrin)	불검출
펜토이이트 (Phenthoate)	불검출
포스메트 (Phosmet)	불검출
포스파미돈 (Phosphamidone)	불검출
피리미카브 (Pirimicarb)	불검출

프로시미돈 (Procymidone)	불검출
피라조포스 (Pyrazophos)	불검출
퀸토젠 (Quintozene)	불검출
터브포스 (Terbufos)	불검출
테트라디폰 (Tetradifon)	불검출
트리아디메폰 (Triadimefon)	불검출
트리아조포스 (Triazophos)	불검출
트리프루미졸 (Triflumizole)	불검출
빈클로졸린 (Vinclozolin)	불검출

표 3-11. 원료의 잔류농약 시험 결과

(7) 안전성 연구

(가) 수컷 랫드 경구 투여 단회독성시험

- ① 시험동물 : SD rat 수컷 8주령
- ② 시험물질 : DA-9801 산약 50% 주정추출물
- ③ 투여빈도 및 경로 : 단회, 경구투여
- ④ 시험구성 :

시험군	투여용량 (mg/kg)	투여액량 (ml/kg)	동물수
			수컷
C	0	10	5
T1	500	10	5
T2	1000	10	5
T3	2000	10	5

표 3-12. 시험구성

⑤ 관찰항목

- 폐사 및 임상증상 (daily), 체중, 부검소견

⑥ 결과 및 결론

- 폐사, 임상증상, 체중 및 부검소견 관찰에서 약물의 영향으로 판단될만한 특이사항 없음. 따라서 수컷 랫드에서 최소치사용량 (MLD)은 2000mg/kg 이상임을 확인 할 수 있었음.

(나) 암컷 랫드 경구 투여 단회독성시험

- ① 시험동물 : SD rat 암컷 8주령
- ② 시험물질 : DA-9801 산약 50% 주정추출물
- ③ 투여빈도 및 경로 : 단회, 경구투여
- ④ 시험구성 :

시험군	투여용량 (mg/kg)	투여액량 (ml/kg)	동물수
			암컷
C	0	10	5
T1	500	10	5
T2	1000	10	5
T3	2000	10	5

표 3-13. 시험구성

⑤ 관찰항목

- 폐사 및 임상증상 (daily), 체중, 부검소견

⑥ 결과 및 결론

- 폐사, 임상증상, 체중 및 부검소견 관찰에서 약물의 영향으로 판단될만한 특이사항 없음. 따라서 암컷 랫드에서 최소치사용량 (MLD)은 2000mg/kg 이상임을 확인 할 수 있었음.

(8) 안정성 시험

(가) 개요

- ① 이름 : DA-9802 기능성 원료
- ② 성분 : 건조된 산약의 50% 에탄올 추출액을 20배 농축하여 말토덱스트린과 2:1 비율로 혼합/건조하여 분말로 한 것
- ③ Lot No. : D8201-33, D8202-34, D8203-35

(나) 시험일정

- ① 보존개시 예정일 : 2009년 4월 15일
- ② 시료분주 : 시험물질을 알루미늄 pack에 넣고 밀봉.
- ③ 시험일정

Type	Condition	Testing interval (Months)						
		0*	3	6	9	12	18	24
가속I	402°C, 755%RH	O	O	O	-	-	-	-
가속II	602°C	O	O	O	-	-	-	-
장기보존	252°C, 605%RH	O	O	O	O	O	O	O

\* 0개월 중 성장 및 대장균군 항목은 검사성적서 발행 결과 사용예정.

표 3-14. 시험일정

(다) 시험방법

- ① Appearance, Taste and Odor
  - 투명한 유리 vial에 담긴 시료를 흰색 및 검정색을 배경으로 하여 육안으로 관찰하였고, 특이한 맛이나 향이 없는지 검토하였다.
- ② Marker compound (지표성분) : allantoin
- ㉠ 검액의 조제
  - 시료 약 150mg을 정밀히 달아 50mL 용량플라스크에 넣고 50% 에탄올 용액을 적당량 넣어 20분간 초음파 진탕하였다. 이 액을 식힌 후 50% 에탄올 용액으로 표선을 맞춘 후 잘 흔들어 섞은 다음, 약 1mL을 취하여 1.5mL PP tube에 옮겨 담고 13,000rpm에서 5분간 원심분리하여 상등액을 검액으로 하였다.
- ㉡ 검량용 표준용액의 조제
  - 알란토인 표준품 약 10mg을 정밀히 달아 50% 에탄올 용액을 가하여 용해시킨 후 50mL로 정용하였다. 이 용액을 차례로 희석하여 0.05, 0.1, 0.2mg/mL의 농도의 검량용 표준용액을 조제하였다.

㉔ 조작

\*\*\*\* 액체크로마토그래프법 조건 \*\*\*\*

- 검출기 : 자외가시부흡광도계 (측정파장 220nm)
- 칼럼 : Inertsil NH2 (5μm, ID 4.6mm, L 250mm)
- 칼럼온도 : 30℃
- 유속 : 1.0 mL/분
- Gradient 조건

시간 (분)	아세토니트릴 (%)	DW (%)
0	90	10
15	90	10
20	70	30
50	70	30
50.1	90	10
55	90	10

검액 및

표준액 10μL를 가지고 다음 조건에서 액체크로마토그래프법에 따라 시험하였다.

- 검량용 표준용액의 농도 및 피크면적으로부터 검량선을 구하고, 여기에 검액 중 알란토인의 피크면적을 대입하여 농도(Cs)를 구하였다(기준 : 아래 식에 따라 계산한 알란토인의 함량은 2.33% 이상이다).

$$\text{알란토인(C}_4\text{H}_6\text{N}_4\text{O}_3\text{) 함량(\%)} = \frac{C_s}{W_s} * f * P$$

- Cs : DA-9802 기능성 원료 중 알란토인의 농도 (mg/mL)
- Ws : 칭량한 DA-9802 원료의 양 (mg)
- f : 회석배수, 50
- P : 알란토인 표준품의 함량(%)

③ Coliform bacteria (대장균군)

- 식품공전 제10.일반시험법 8.미생물시험법 5)대장균군 (1)정성시험 ②BGLB 배지법에 따라 계산실험하였다 (한국기능식품연구원 의뢰 실시).

(라) 시험결과

① 장기보존

Test item	Specification	Time Points	Lot No.		
			D8201-33	D8202-34	D8203-35
Appearance, Taste and Odor	Beige powder, No abnormal taste or odor	Initial	Conform	Conform	Conform
		LT3M	Conform	Conform	Conform
		LT6M	Conform	Conform	Conform
		LT9M	Conform	Conform	Conform
		LT12M	Conform	Conform	Conform
		LT18M	Conform	Conform	Conform
Marker compound	Allantoin, NLT 2.33%	Initial	4.05%	4.13%	4.07%
		LT3M	4.08%	4.05%	4.08%
		LT6M	4.06%	4.00%	3.91%
		LT9M	3.93%	4.03%	3.99%
		LT12M	3.93%	3.92%	3.91%
		LT18M	3.80%	3.85%	3.88%
Coliform bacteria	Negative	Initial	Negative	-	-
		LT3M	Negative	-	-
		LT6M	Negative	-	-
		LT9M	Negative	-	-
		LT12M	Negative	-	-
		LT18M	Negative	-	-

표 3-15. 장기보존 시험결과

② 가속

Test item	Specification	Time Points	Lot No.		
			D8201-33	D8202-34	D8203-35
Appearance, Taste and Odor	Beige powder, No abnormal taste or odor	Initial	Conform	Conform	Conform
		Accel. I 3M	Conform	Conform	Conform
		Accel. II 3M	<i>Out of Spec.</i>	<i>Out of Spec.</i>	<i>Out of Spec.</i>
		Accel. I 6M	Conform	Conform	Conform
		Accel. II 6M	<i>Out of Spec.</i>	<i>Out of Spec.</i>	<i>Out of Spec.</i>
		Initial	4.05%	4.13%	4.07%
Marker compound	Allantoin, NLT 2.33%	Accel. I 3M	4.16%	4.00%	4.03%
		Accel. I 6M	3.98%	3.99%	3.94%
		Initial	Negative	-	-
Coliform bacteria	Negative	Accel. I 3M	Negative	-	-
		Accel. I 6M	Negative	-	-

표 3-16. 가속 시험결과



③ 원료의 가속시험 (40℃, 상대습도 75%, 기밀용기)

DA-9801		시험항목	
		성상	함량 (%)
		황갈색 추출물	알란토인 (2.8-4.2%)
0개월	D8102-2	확인	3.2617
		확인	4.0253
		확인	3.6686
	D8103-2	확인	2.8057
		확인	2.9250
		확인	3.4892
	D8104-2	확인	3.4279
		확인	3.4878
		확인	3.5267
1개월	D8102-2	확인	3.4403
		확인	3.7731
		확인	3.1739
	D8103-2	확인	2.8958
		확인	2.8177
		확인	3.1279
	D8104-2	확인	2.8424
		확인	2.9900
		확인	4.0325
2개월	D8102-2	확인	4.1596
		확인	3.5390
		확인	3.7816
	D8103-2	확인	2.9630
		확인	3.1504
		확인	3.6391
	D8104-2	확인	3.5888
		확인	3.6796
		확인	2.9902
3개월	D8102-2	확인	3.1205
		확인	3.1323
		확인	3.0756
	D8103-2	확인	3.2653
		확인	3.4260
		확인	3.3355
	D8104-2	확인	3.2220
		확인	3.0449
		확인	3.3449

표 3-17. 원료의 가속 시험결과

(9) 인체적용시험

(가) 인체적용시험 개요

명칭	DA-9802이 당뇨병 전단계의 피험자를 대상으로 혈당조절 효과 및 손발저림 증상개선에 미치는 효과에 관한 안전성 및 유효성 평가를 위한 무작위배정, 이중맹검, 대조군 비교 임상시험
시험책임자	대전대학교 한의과대학 홍권의 교수
실시기관	대전대학교 한방병원
의뢰자	동아제약(주)
목적	DA-9802의 당뇨병 전단계의 피험자에 대한 혈당조절 효과 및 손발저림 증상개선에 미치는 효과 확인
시험설계	무작위배정, 이중맹검, 대조군 비교
피험자 수	2008년 5월 1일부터 2008년 12월 31일 사이에 임상시험 모집에 응모한 45명(남: 29, 여: 16)을 대상으로 하였다.
선정기준	<p>다음 사항에 모두 해당하는 경우 시험에 적합한 자로 선정하였다.</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>① 연령이 20세 이상에서 75세 미만의 성인 남녀</li> <li>② 공복시 혈당이 100mg/dl이상, 135mg/dl이하인 피험자 (단, 당뇨약을 복용 중인 자로써 당뇨약을 중단했을 경우, 혈당의 변화가 일어나지 않고 유지되는 자를 참여 시킬 수 있다.)</li> <li>③ 식후 2시간 혈당이 140mg/dl이상, 199mg/dl이하인 자(단, ②번과 ③번 중 그 중 1개에 해당)</li> <li>④ 여성의 경우 외과적인 불임술(자궁적출술 또는 양측난관결찰)을 받았거나 폐경기인자 또는 가임 여성의 경우 의학적으로 인정되는 피임방법(즉, IUD, 살정제 barrier방법, 금욕)을 사용하는 자(가임 여성의 경우 스크리닝 방문 시 실시한 뇨임신 검사에서 음성이어야 함)</li> <li>⑤ 본 실험에 대한 자세한 설명은 듣고 완전히 이해한 후 자의로 참여를 결정하고 주의를 준수하기로 서면 동의한 자.</li> </ol> <p>제외 기준</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>① 당뇨병 환자(단, 당뇨약을 복용 중인 자로써 당뇨약을 중단했을 경우, 혈당의 변화가 일어나지 않고 유지되는 자를 참여 시킬 수 있다)</li> <li>② 급/만성 염증이 있는 피험자</li> <li>③ 시험 참가 전 4주 이내에 스테로이드제제를 투여 받은 피험자</li> <li>④ 심부전, 심근경색, 뇌졸중 등의 급성 중증 심혈관계 질환을 가진 피험자</li> <li>⑤ 시험제품의 흡수에 영향을 줄 수 있는 위장관계 질환(예: 크론씨 병)이나 위장관계 수술 (단, 단순 맹장수술, 탈장수술은 제외)의 과거력이 있는 자</li> <li>⑥ 첫 투여일 전 3개월 이내에 타 임상시험에 참여한 자</li> </ol>

	<p>⑦ 급/만성 신부전, 신증후군 등의 신장질환을 앓고 있는 환자</p> <p>⑧ 간기능이 손상된 피험자</p> <p>⑨ 최근 2개월 이내에 항정신병 약물치료를 받은 경험이 있는 피험자</p> <p>⑩ 임상병리검사 결과를 비롯한 기타 사유로 인하여 시험자가 인체 시험 참여에 부적합하다고 판단한 자</p> <p>⑪ 임신 혹은 수유중인 여성</p> <p>⑫ 임신 가능성이 있는 가임 여성중 적절한 피임법을 시행하지 않은 경우(단, 불임수술을 받은 여성은 제외)</p> <p>⑬ 시험자에 의해 본 임상시험에 부적합하다고 판단된 자</p>
시험물질	DA-9802 150mg 캡슐
대조물질	위약 캡슐
섭취방법 및 기간	<p>한약 복합제(DA-9802)는 1캡슐 중 산약 50% 주정추출물 150mg 결정셀룰로오스, 유당, 규산칼슘 480mg으로 구성되었고 위약(placebo)은 1캡슐 중 유당, 결정셀룰로스, 규산칼슘 630mg으로 구성되었다. 위약을 포함한 모든 시험약은 KGMP 시설을 갖춘 동아제약에서 제조하였다.</p> <p>한약 복합제의 안전성 검사는 상온, 상대습도 75±5%의 환경에서 기밀용기 상태로 이루어졌는데 정상, 구성약물, 함량 면에서 모두 3개월간 적합 판정을 받았다.</p> <p>한약 복합제과 위약 모두 1일 3회, 1회 2캡슐을 8주간 경구 투여하였다. 한번 내원했을 때 1주간의 약물을 피험자에게 주었고, 다음 내원 시 남은 약물을 반납하도록 교육시켜 순응도 및 약물의 오용을 예방하였다.</p>
평가기준 및 분석	<p>① 주 평가변수</p> <p>㉠ 혈당변화량 : - 시험전(0주)과 비교한 시험 중간(4주)과 시험 종료직후(8주)의 혈당치 변화로 아래와 같이 계산된다. 식전 혈당치 변화량 = 투약 후 식전 혈당치 - baseline 투약 전 식전 혈당치 식후 혈당치 변화량 = 투약 후 각 시점(1시간 후 2시간 후)의 식후 혈당치 - baseline 투약 전 각 시점(1시간 후 2시간 후)의 식 후 혈당치</p> <p>② 부 평가변수</p> <p>㉠ 혈액검사(TG, Total cholesterol, HDL, LDL, AST, ALT, <math>\gamma</math>-GTP): 섭취전(0주, 방문2)와 섭취후(8주, 방문4) 혈청 지질 및 지단백 등(TG, total cholesterol, HDL, LDL, AST, ALT, gamma-GTP) 수치를 비교하여 개선정도를 분석하고, 시험군과 대조군의 개선정도를 비교하여 통계적으로 유의한 차이가 있는지 평가한</p>

	<p>다.</p> <p>㉔ 인슐린(insulin), C-peptide: 섭취전(0주, 방문2)와 섭취후(4,8주, 방문3,4) 인슐린(insulin), C-peptide를 비교하여 개선정도를 분석하고 시험군과 대조군의 개선정도를 비교하여 통계적으로 유의한 차이가 있는지 평가한다.</p> <p>㉕ HbA1c변화량 : 섭취전(0주, 방문2)와 섭취후(8주, 방문4) HbA1c를 비교하여 개선정도를 분석하고, 시험군과 대조군의 개선정도를 비교하여 통계적으로 유의한 차이가 있는지 평가한다.</p> <p>㉖ TSS 변화량 : 섭취전(0주, 방문2)와 섭취후(8주, 방문4) TSS(total symptom score)비교하여 개선정도를 분석하고, 시험군과 대조군의 개선정도를 비교하여 통계적으로 유의한 차이가 있는지 평가한다.</p> <p>㉗ Human beta NGF ELISA 검사 : 섭취전(0주, 방문2)와 섭취후(8주, 방문4) NGF ELISA 검사비교하여 개선정도를 분석하고, 시험군과 대조군의 개선정도를 비교하여 통계적으로 유의한 차이가 있는지 평가한다.</p> <p>③ 주 유효성 평가 변수: - 선형혼합모형을 사용하여 각 혈당치 측정 시점에서 시험군과 대조군의 혈당치 변화량 비교 한다. 또한 투약 기간에 따른 혈당치 변화를 분석한다. 한편 인구학적 자료 또는 임상병력자료에 군간 차이가 발견되면 유효성 평가에서 이를 보정한다.</p> <p>④ 부 유효성 평가 변수: - 시험군과 대조군에서 각 부 평가변수의 섭취전(0주, 방문2)과 비교한 섭취후(8주, 방문4) re)의 수치 변화는 대응표본 t-검정 (paired t-test)로 분석하고, 시험군과 대조군 간에 이들 변화량의 비교에는 독립 이 표본 t-검정(independent two-sample t-test)을 사용한다.</p>
결 과	<p>대상환자 45명은 무작위배정 결과 DA-9802군과 placebo군에 각각 23, 22명씩 배정되었다. 방사선검사, 심전도검사 및 남녀비, 평균연령, 키, 몸무게 등 인구학적 요소들에서도 군 간 유의한 차이가 없었으며 치료 전 증상의 정도 역시 유의한 차이가 없었다. 따라서 본 연구는 비교성과 객관성의 확보에서 적절하였다고 생각된다.</p> <p>복용 전의 혈액학적 검사, 혈액화학적 검사 및 소변검사의 군간비교에서는 콜레스테롤 수치에서 통계적으로 유의성이 있는 군간 차이가 보였으며 기타 항목에서는 군간 유의한 차이가 없었다.</p> <p>또한 복용 전의 기본 대사관련 수치, 혈당 관련 수치 및 TSS Score의 복용전 군 간 비교에서는 TEE 주중 1일, TEE 주중 2일, TEE 주중 3일에서 통계적으로 유의성이 있는 군 간 차이가 보였으며 기타 항목에서는 군간 유의한 차이가 없었다.</p>

	<p>당뇨환자의 혈당 조절 및 당뇨로 인한 불편감을 주 증상으로 보아 본 평가에서는 주 평가변수로 혈당변화량(공복시, 식후 1시간, 식후 2시간)을 확인하였으며 부 평가변수로 혈액검사, 인슐린(insulin), C-peptide, HbA1c 변화량, TSS 변화량, Human beta NGF ELISA 검사를 비교하여 통계적으로 유의한 차이가 있는지 평가하였다.</p> <p>본 연구에서 주평가변수로 혈당변화량(공복시, 식후 1시간, 식후 2시간)을 확인 하였다. 두 군간의 복용 전의 군 간에는 유의성이 있는 차이가 없었다. 처음과 복용 후 8주 후의 군내 유의성을 비교 해 보았을 때 placebo군에서는 유의성이 있는 차이가 보이지 않았지만 DA-9802군에서는 PP 분석 상 FBS 수치가 유의성 있게 감소함을 볼 수 있었다. FBS에 있어서 두 군간 유의성은 보이지 않았으나 선형혼합모델로 평가한 PP 분석 상에는 DA-9802군에서 유의성 있는 차이가 있었으며 군 간 비교에서도 DA-9802가 더 현저한 감소가 있음이 보였다.</p> <p>부평가변수에서 볼 수 있는 TSS score는 군 간 및 군 내 유의성이 없었다.</p> <p>C-peptide 및 HbA1c의 복용 전 군 간 유의성 있는 차이는 없었다. 복용 후 8주가 지났을 때 두 군간의 유의성 있는 차이는 없었으나 DA-9802군의 PP분석 상 C-peptide에서 통계적으로 유의성이 있는 수치 감소 소견이 보였다.</p> <p>복용 8주 후의 전체적인 혈액화학적 이차유의성 평가 결과 ITT 분석 상 Placebo군에서 PDW와 콜레스테롤에서 통계적으로 유의성이 있는 감소 소견이 보였으며 PP 분석 상 헤모글로빈과 콜레스테롤에서 유의성 있는 감소 소견이 보였다. 기타 항목에서는 군간 유의한 차이가 없었다.</p> <p>이를 분석해 보면 DA-9802의 복용이 공복 혈당 및 C-peptide 등의 몇몇 혈당 관련 인자의 감소에 있어 placebo군에 비해 유의성 있는 효과를 보임을 알 수 있다. Placebo 군이 콜레스테롤 및 헤모글로빈 수치에 있어 유의성 있는 효과를 보였으나 헤모글로빈 수치는 본 연구의 주목적인 혈당의 조절과 관계가 크지 않으며 콜레스테롤은 복용 전 수치상 이미 placevb군의 수치가 유의성이 보일 정도로 더 높은 상태여서 실험상의 신뢰도가 크지 않을 것으로 보이며 이에 대한 자세한 연구는 추후 이루어져야 될 것으로 보인다.</p>
<p>결 론</p>	<p>당뇨병 진단계의 피험자 45명을 대상으로 한약 복합제 (DA-9802)와 위약(placebo)을 투여한 후 혈당변화량, 혈액검사, 인슐린(insulin), C-peptide, HbA1c 변화량, TSS 변화량, Human beta NGF ELISA 검사 등을 시행하여 평가한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.</p> <p>① 복용 8주동안 PP 분석 상 FBS의 군 간 유의성은 보이지 않았으나 DA-9802군에서 군 내 복용 8주동안 유의성 있는 감소가 있었다.</p>

	<p>② 선형혼합모델로 평가한 PP 분석 상에는 DA-9802군에서 유의성 있는 차이가 있었으며 군 간 비교에서도 DA-9802가 더 현저한 감소가 있음이 보였다.</p> <p>③ 복용 8주동안 지났을 때 PP분석 상 C-peptid의 두 군간의 유의성 있는 차이는 없었으나 DA-9802군내 복용 8주동안 통계적으로 유의성이 있는 수치 감소 소견이 보였다.</p> <p>이상에서 DA-9802는 당뇨병 전단계의 피험자의 혈당 조절과 삶의 질을 개선시키는데 유효한 효과가 있는 것으로 생각된다 .</p>
--	---

(10) 기능성원료 개발일정

(가) 2009. 10. 28. 건강기능식품 기능성원료 인정 신청

- 원료명 : 산약에탄올엑스
- 제안기능성 : 혈당조절에 도움

(나) 2010. 8. 11. 기능성원료 인정신청 반려

- 사유 : 자진취하 (대사기전 보완 등)

(다) 2011. 3. 건강기능식품 기능성원료 인정 재신청 계획

- Glut4 translocation 유도 등 대사기전 확인 (제3-2세부)

## 나. 인지기능 개선 소재 발굴 및 체중조절 건기식 소재 도출

### (1) 뇌인지기능 개선 후보물질 검토연구

#### (가) 연구 배경

① 뇌질환 중 알츠하이머는 고령화 사회가 되면서 대두되는 대표적인 신경퇴행성 질환임.

- 뇌질환은 크게 허혈성 또는 출혈성 뇌질환, 신경독성, 외상에 의한 뇌손상, 알츠하이머병이나 간질 등 신경학적 장애로 나눌 수 있으며, 이 중 임상적으로 중요하거나 사회적 이슈화가 되고 있는 대표적인 질환으로는 뇌졸중, 간질, 알츠하이머병이 있다. 이중 고령화 사회가 되면서 노화와 연관성을 가지는 알츠하이머병이나 파킨스병의 경우가 대표적인 신경퇴행성질환이며, 이런 질환들은 뇌에 영향을 주어 신체조절이나 인지능력을 저하시킨다. 이에 따라 기억력 및 인지능력감소 등의 증상이 나타나며, 신경의 손상이나 학습과 기억형성에 중요한 역할을 하는 cholinergic system의 기능저하 등이 나타난다. 특히 알츠하이머병은 노화와 관련하여 대표적인 신경퇴행성질환의 하나로 임상적으로 점진적인 기억력손상과 치매와 같은 증상을 동반하는 질병이며, 65세 이상의 인구 중 치매환자의 50-60%에 해당하는 인구가 이에 속한다. 또한 높은 발현율과 심각성을 가지고 있으나 현재 사용되고 있는 약물에 의한 치료로는 만족할만한 치료효과를 나타내지 못하고 있는 현실이다.

② 알츠하이머의 주 병리학적인 증거는 Amyloid beta 펩타이드이며, transgenic animal model의 한계로 nontransgenic model에서 평가하고자 하였음.

- 알츠하이머병의 주 병리학적인 증거는 세포간질의 amyloid plaques와 신경세포내의 tangles이며, Plaque의 주성분은 뭉쳐져 있는 작은 A $\beta$  peptides이다. A $\beta$  peptides는 amyloid precursor protein(APP)로부터 두 protease( $\beta$ , $\gamma$ -secretase)에 의해 생성되고 결과로 주로 A $\beta$ 40와 A $\beta$ 42가 생성된다. 21번 염색체의  $\beta$ -APP gene, 14번염색체의 PS1, 1번 염색체의 PS2; 이 세 가지의 유전자의 돌연변이가 생기면 A $\beta$ 42 과발현과 관계가 있는 상염색체 우성형의 조기 발병 알츠하이머로 진행한다. A $\beta$  lowering therapy가 알츠하이머를 치료할 수 있을 것이라고 널리 받아들여지고 있으나, 알츠하이머 환자에게 사용하기 전 아밀로이드 가설에 대해 평가해보아야 한다. 그러므로 soluble and aggregated A $\beta$ 를 낮추기 위한 다양한 전략으로 많은 조사가 이루어지고 있으며, 이러한 전략으로 A $\beta$  immunization, passive A $\beta$  immunotherapy, disruption of plaque stability, cholesterol modulation, A $\beta$  production억제 등이 있다. 이러한 전략들이 A $\beta$  level을 감소시킬 수도 있으나 가장 직접적인 접근방법은 APP로부터 A $\beta$  peptide를 유리시키는  $\beta$ , $\gamma$ -secretase를 억제시켜 생성자체를 조절하는 것이다.  $\gamma$ -secretase inhibitor의 A $\beta$  lowering efficacy는 human APP 과발현되는 transgenic mouse모델에서 cortex, plasma, CSF의 A $\beta$  level을 분석하여 in vivo efficacy를 평가하였다. 이 연구 결과들로  $\beta$ -APP가 과발현되고 amyloid plaque가 축적되는 transgenic mice가 완전한 모델은 아니지만 secretase inhibitor의 약효와 선택성 안전성을 평가하는데 유용하다는 것이 증명되었다. 그러나 이 동물 실험모델을 생산하고 분류하는 것이 가격적인 측면과 시간이 많이 소모되는 breeding계획을 필요로 하는 colony 유지의 필요성 때문에 제한적이며, 게다가 genetic background의 차이는 transgenic expression의 동물간 편차를 야기할 수 있고 만족스런 결과를 위해서 군당 N수가

상대적으로 커질 수도 있다. 따라서 후보물질의 A $\beta$  lowering effect를  $\gamma$ -secretase inhibitor의 A $\beta$  lowering effect를 평가한바 있는 nontransgenic animal model에서 평가하고자 하였다.

- 또한 후보물질의 인지장애 개선효과에 대한 성공적인 스크리닝에는 평가시료, 병태를 유발하는 물질의 type과 다른 관련된 변수들에 달려있다. 초기 인지장애 모델은 노인병과 알츠하이머의 기억장애에 대한 cholinergic hypothesis를 근간으로 해서 설계되었다. Antimuscarinic drug은 알츠하이머와 치매에서 보이는 인지장애를 동물모델에서 만들어내는데 집중적으로 사용되어져 왔으며, 대다수의 이런 연구들은 인지장애에 대한 임상 후보물질을 도출하기 위해 초기 스크리닝 방법으로 사용되었고 scopolamine-reversal에 초점을 맞추었다. Scopolamine은 muscarinic acetylcholine receptors(mAChR)에 competitive antagonism에 있는 tropane alkaloid drug으로서 일반적으로 이러한 치료제들은 일시적인 증상개선효과를 보이며 질환 자체를 치료하지는 못한다. 본 연구에서는 amyloid beta 유도 알츠하이머 치매모델 뿐만 아니라 scopolamine 유도 기억상실모델 등을 이용하여 인지기능 개선 후보물질을 도출하고자 하였다.

#### (나) 유효성 연구

##### ① Scopolamine induced amnesia model에서 후보물질 스크리닝

##### ㉠ 시험물질

- 1) Scopolamine hydrobromide, (Tocris Bioscience, Bristol,UK), IP
- 2) Donepezil hydrochloride, SC

##### ㉡ 실험동물

- 1) ICR mice, 8주령

##### ㉢ 실험장비

- 1) Passive avoidance test apparatus(DJ-369)

##### ㉣ 실험군

- 1) Control(Vehicle), 3% HPMC
- 2) Negative control: Scopolamine 1mg/kg, IP
- 3) Positive control: Scopolamine 1mg/kg IP + donepezil hydrochloride 3mg/kg, SC.
- 4) Screening: Scopolamine 1mg/kg IP + candidate drug



㉔ 실험방법

1) Acute model

- 일주일간 순화사육을 마친 mouse를 learning session전 passive avoidance 장비의 적응을 위해 training을 실시하여 흰 상자에서 검은 상자로 가는 데 걸리는 시간을 평가하고 이 시간을 토대로 군 분리 한다. 약물 투여 50분 후 Scopolamine을 1mg/kg으로 투여하여 Amnesia를 유발한 다음 40분 후 learning trial을 한다[1]. learning trial후 24시간 후 Step through latency를 측정한다.

2) Chronic model

- Acute model과 모두 동일하며 약물투여 기간만 길게 설정한다. 이번 연구에서는 Acute model만 수행하였다.

3) Behaviour test

가) Passive avoidance test: 실험 장비는 500×250×330mm의 크기의 상자로 이루어졌다. 두 공간으로 나누어져 있는데 한 곳에는 등이 켜져 있고 어두운 공간과 서로 연결되어 있다. step through methods를 이용하여 어두운 공간으로 이동하는데 걸리는 시간을 측정한다.

나) Learning session: Learning session을 시작하기 40분전에 Scopolamine 1mg/kg을 투여하며 1시간 30분 전에 약물투여를 한다. 밝은 방에 넣고 난 다음 어두운 방으로 이동한 직후 0.8mA의 전기자극을 주고 이동하는데 걸린 시간을 측정한다. 이 과정을 3회 반복한다.

다) Memory retrieval session: Learning session후 24시간 후 시작한다. 흰 상자에서 검은상자로 들어가는데 걸리는 시간을 측정한다.

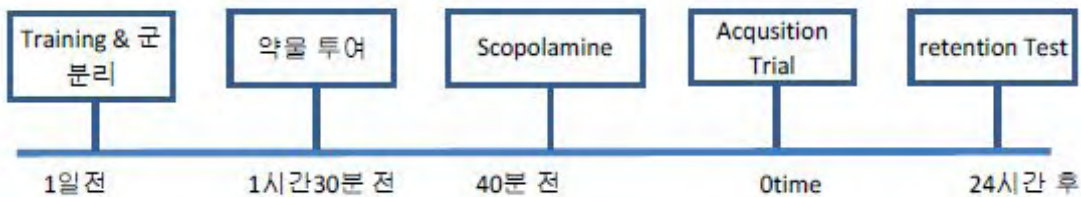


그림 3-5. 실험의 개요

㉞ 실험결과

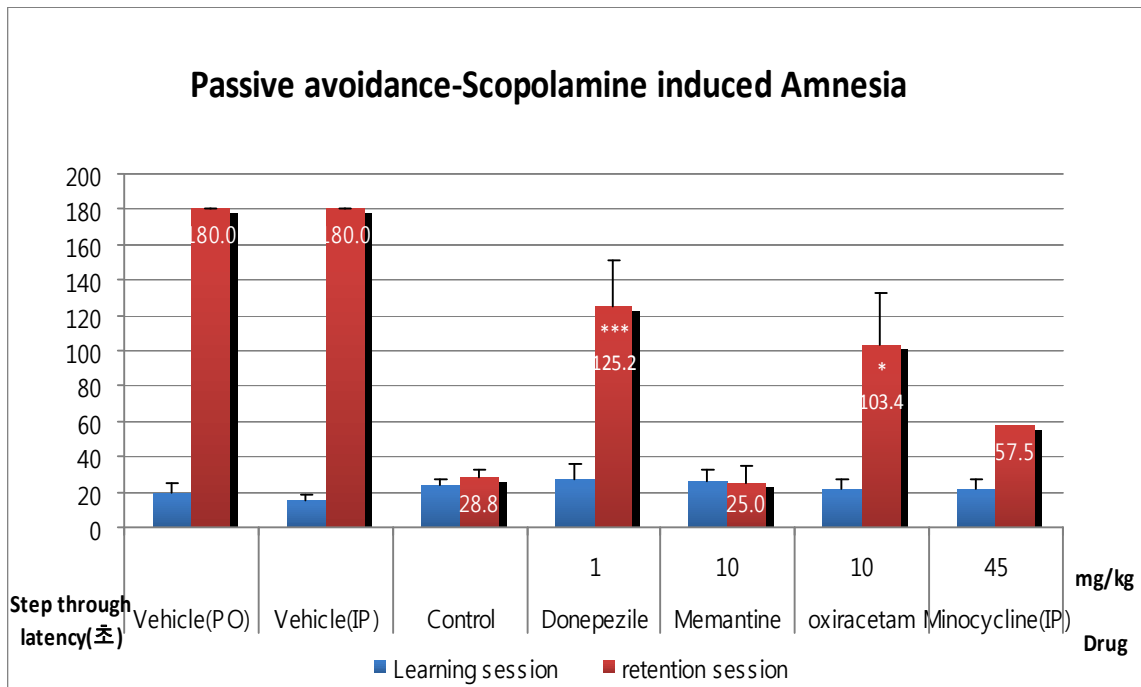


그림 3-6. 1차 스크리닝

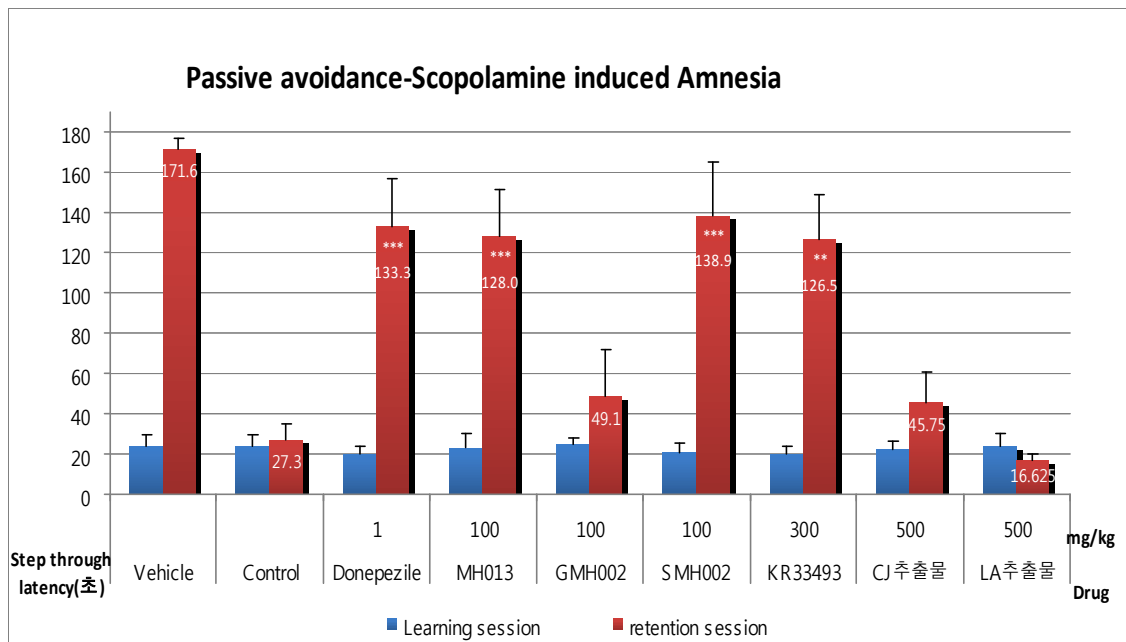


그림 3-7. 2차 스크리닝

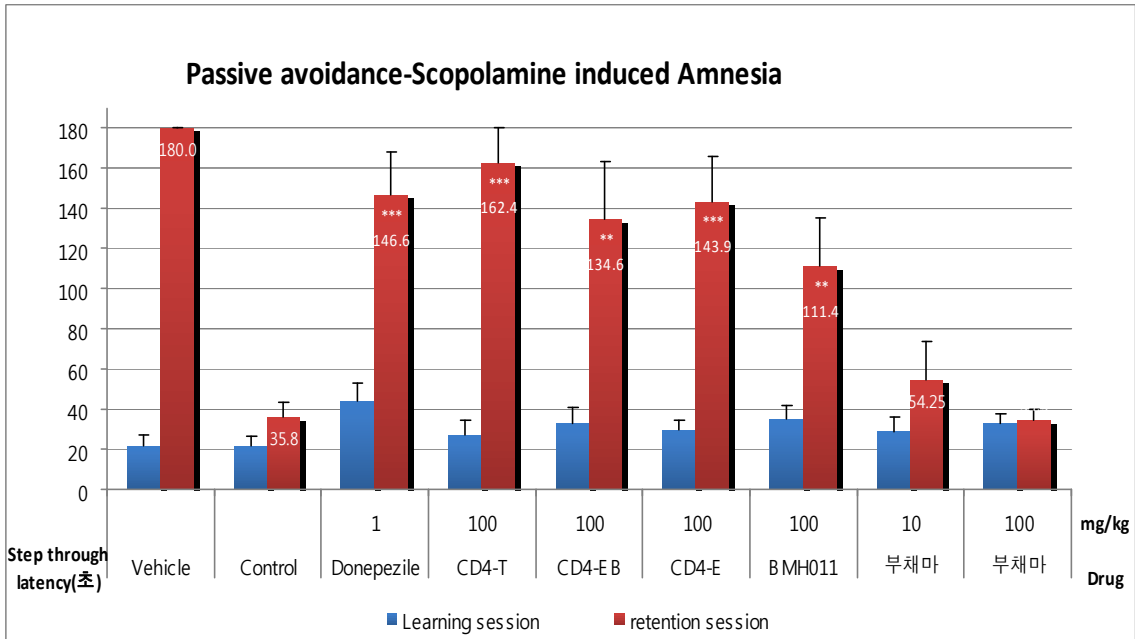


그림 3-8. 3차 스크리닝

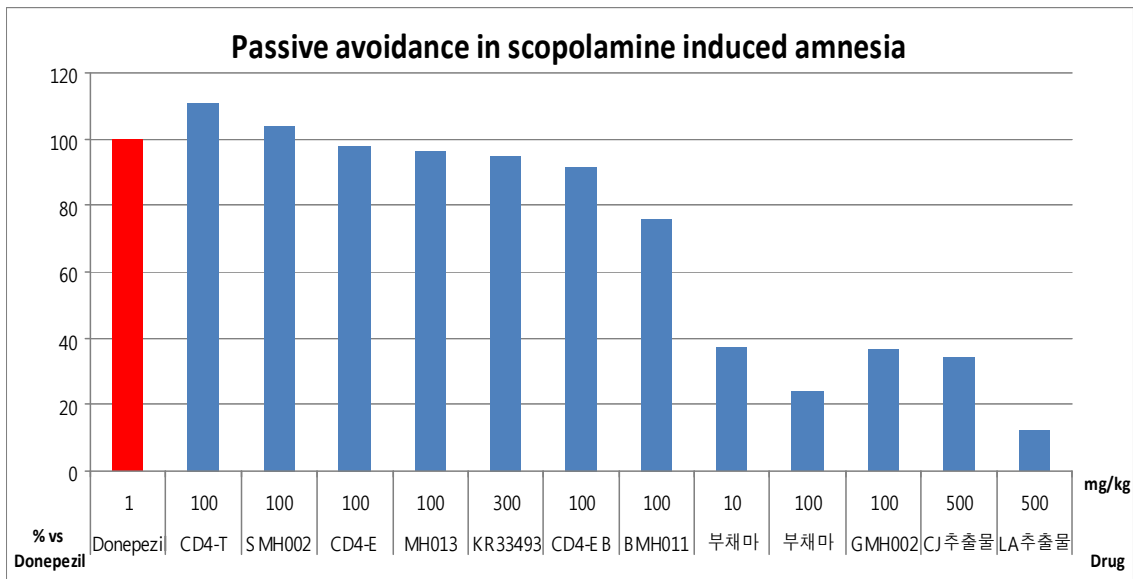


그림 3-9. 스크리닝 결과 정리

② Passive avoidance test in scopolamine induced amnesia model

㉠ 시험물질

- 1) Scopolamine hydrobromide, (Tocris Bioscience, Bristol,UK), IP
- 2) Donepezil hydrochloride, SC
- 3) 말뚝진흙버섯추출물 (HR)

㉡ 실험동물

- 1) ICR mice, 6주령

㉢ 실험환경

- 1) 온도범위:  $23 \pm 3^{\circ}\text{C}$
- 2) 상대습도범위:  $50 \pm 10\%$
- 3) 조명시간 및 조도: 12시간 점등 (조명시간: 08:00 ~ 20:00, 조도: 150~300 Lux)
- 4) 사육상자: 마우스용 폴리카보네이트 사육상자 (W180xD240xH130mm)
- 5) 물의 수용: 사육상자 당 7~10마리

㉣ 실험군 (n=7, 7groups)

- 1) Normal (Vehicle): 3% HPMC
- 2) Negative control: Scopolamine 1mg/kg, IP
- 3) Positive control: Scopolamine 1mg/kg IP + donepezil hydrochloride 1mg/kg, SC.
- 4) 말뚝진흙버섯추출물 (HR): Scopolamine 1mg/kg IP + HR 10mg/kg, PO.
- 5) 말뚝진흙버섯추출물 (HR): Scopolamine 1mg/kg IP + HR 30mg/kg, PO.
- 6) 말뚝진흙버섯추출물 (HR): Scopolamine 1mg/kg IP + HR 100mg/kg, PO.
- 7) 말뚝진흙버섯추출물 (HR): Scopolamine 1mg/kg IP + HR 300mg/kg, PO.

㉤ 실험방법

1) 시험원리

- 마우스의 기억능을 측정하기 위하여 shuttle box (50×15×40 cm, electric grid floor)를 사용하였다. 한쪽은 밝고 한쪽은 어두운 부분으로 연결된 상자(4×13×10 cm)로 바닥은 7 mm 간격으로 grid가 설치되어 있으며 어두운 상자 부분에는 전류가 흐르게 되어있다. 마우스를 밝은 부분에 놓으면 마우스의 어두운 부분으로 가려는 성질로 인하여 어두운 곳으로 옮겨가는데 이때 전류를 3초간 0.3 mA로 흐르게 하여 마우스가 다시 밝은 곳으로 옮겨가게 고안되었다. 24 시간 후에 마우스를 위와 같은 상자 중 밝은 곳에 놓으면 전날의 전기쇼크로 인하여 상자의 검은 부분으로 들어가지 않게 되는데, 이때 밝은 부분에 체류하는 시간(최대 180초, cut off time)을 측정하여 기억의 지표(marker)로 삼는다.

2) 시험방법

가) 본 실험에서는 각 군당 7마리씩 총 49마리의 마우스를 사용하였으며, 1주일 동안 순화사육한 후 passive avoidance test 장비에서 training trial을 통해 밝은 공간에서 어두운 공간으로 이동하는 시간이 각 군당 균등하게 균분리를 한 후 실험을 진행하였다.

나) 각 시험물질의 투여용량은 후보물질(버섯추출물)의 경우 10, 30, 100, 300mg/kg로 용량반응성을 살펴보고자 하였고, positive control 약물인 donepezil은 1mg/kg로 설정하였다. 두 시험물질 모두 3% HPMC를 이용하여 현탁하여 사용하여 각각 300ul씩 경구투여 하고 50분 후에 normal군을 제외한 실험군에 scopolamine 1mg/kg를 복강투여하여 기억력형성을 저해하였다.

다) 40분 후 밝은 공간에 쥐를 넣고 적응시간(10초)을 준 후 어두운 공간으로 이동하는 시간을 측정(Acquisition trial)하고 이동한 쥐에게는 0.8mA의 전기자극을 3초간 주어서 학습을 시켰다.

라) 24시간 후에 Retention trial을 통하여 기억력을 평가하였는데, 최대 180초까지 측정하였으며 180초 이상의 경우 기억하고 있는 것으로 판단하였다.

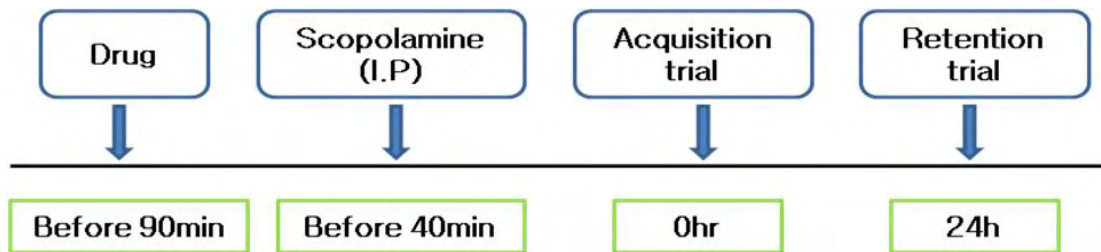
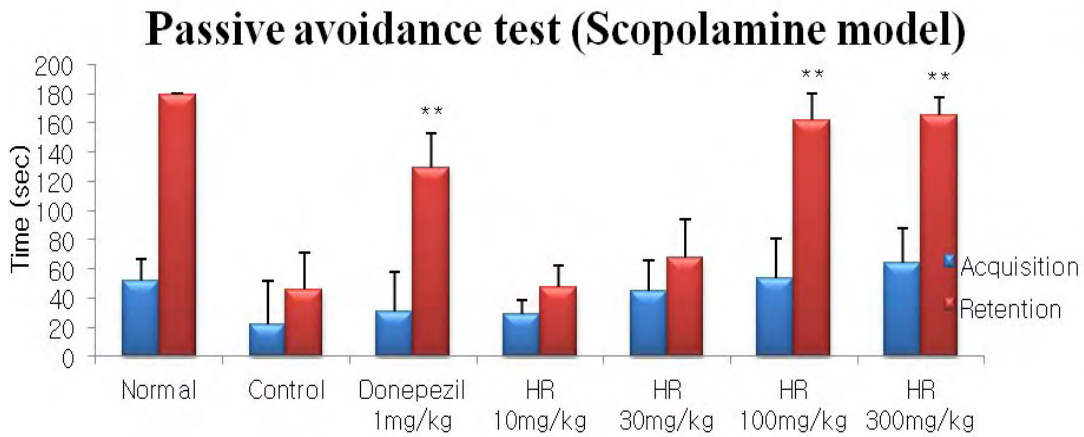


그림 3-10. 실험의 개요

㉞ 실험결과

- Scopolamine (1mg/kg)의 투여에 의해 대조군의 latency time은 정상군 대비 유의하게 74.2% 감소하여 기억력 감소가 잘 유발되었음을 확인하였다. HR은 용량의존적인 결과를 보였으며, 특히 HR 100, 300mg/kg 용량군에서 대조군에 비해 유의하게 latency time이 증가되어 각각 대조군 대비 355, 362% 개선되었으며, 이는 정상군 대비 각각 10%, 7.2%정도 감소한 수치로서 치매치료제인 Donepezil대비 동등이상의 효과를 보였다. Donepezil 1mg/kg의 경우 대조군 대비 유의하게 283% 증가하여 정상군 대비 약 25%정도 감소한 수치임을 확인하였다. HR 10, 30mg/kg의 latency time은 정상군 대비 각각 74%, 63%의 감소를 보여 대조군과 거의 차이가 없었다.



Each value is the mean±S.E.M. of 7 animals.

\*\*, p<0.01 vs. normal group by t-test.

그림 3-11. Passive avoidance test 실험 결과 (Scopolamine 모델)

③ Passive avoidance test in amyloid beta induced Alzheimer's model

㉠ 시험물질

- 1) A $\beta$ 1-42 peptide (Sigma)
- 2) BF-7, BT-11, 홍삼, PS
- 3) 말뚝진흙버섯추출물 (HR)

㉡ 실험동물

- 1) ICR mice, 6주령

㉢ 실험환경

- 1) 온도범위:  $23 \pm 3^{\circ}\text{C}$
- 2) 상대습도범위:  $50 \pm 10\%$
- 3) 조명시간 및 조도: 12시간 점등 (조명시간: 08:00 ~ 20:00, 조도: 150~300 Lux)
- 4) 사육상자: 마우스용 폴리카보네이트 사육상자 (W180xD240xH130mm)
- 5) 물의 수용: 사육상자 당 7~10마리

㉣ 실험군 (n=10, 7groups)

- 1) Normal (Vehicle)
- 2) Negative control
- 3) BF-7 100mg/kg
- 4) BT-11 100mg/kg
- 5) 홍삼 100mg/kg
- 6) HR 100mg/kg
- 7) PS 100mg/kg

㉤ 실험방법

1) 시험원리

마우스의 기억능을 측정하기 위하여 shuttle box (50×15×40 cm, electric grid floor)를 사용하였다. 한쪽은 밝고 한쪽은 어두운 부분으로 연결된 상자(4×13×10 cm)로 바닥은 7 mm 간격으로 grid가 설치되어 있으며 어두운 상자 부분에는 전류가 흐르게 되어있다. 마우스를 밝은 부분에 놓으면 마우스의 어두운 부분으로 가려는 성질로 인하여 어두운 곳으로 옮겨가는데 이때 전류를 3초간 0.3 mA로 흐르게 하여 마우스가 다시 밝은 곳으로 옮겨가게 고안되었다. 24시간 후에 마우스를 위와 같은 상자 중 밝은 곳에 놓으면 전날의 전기쇼크로 인하여 상자의 검은 부분으로 들어가지 않게 되는데, 이때 밝은 부분에 체류하는 시간(최대 180초, cut off time)을 측정하여 기억의 지표(marker)로 삼는다.

2) 시험방법

가) 사람 아밀로이드 베타에 해당하는 Aβ1-42 펩티드는 Sigma에서 구입하여, 이들의 섬유형성을 위해 멸균된 dH2O (최종 농도, 9 mg/mL)로 용해하고, 사용하기 전에 37°C에서 72시간 동안 배양하였다.

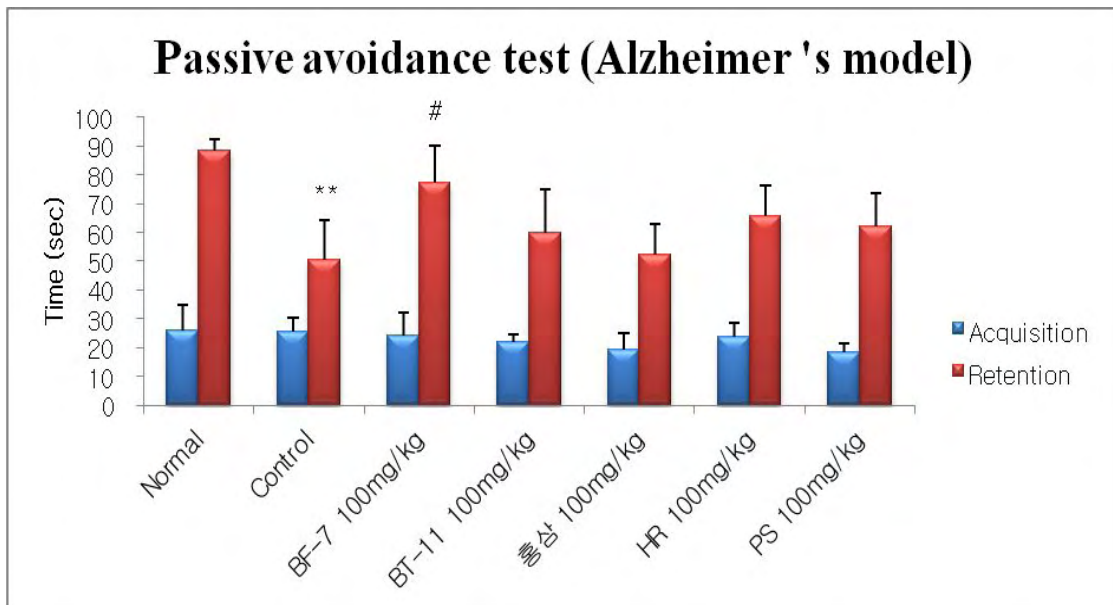
나) 말뚝진흙버섯추출물은 Aβ1-42 주입하기 1시간 전에 주사하고, 그 뒤로 같은 농도로 시험 종료일 동안 계속 투여하였다.

다) 본 실험에서는 각 군당 10마리씩 총 70마리의 마우스를 사용하였다. 훈련이 마친 동물은 졸레틸로 마취시킨 다음 뇌정위수술틀 (Stereotaxic frame, Narishige, Japan)을 통해 Aβ1-42를 주입하였다. 각 마우스는 26-gauge needle이 달려있는 50 μL Hamilton microsyringe로 정수리에서 오른쪽으로 2 mm 떨어진 부위에 3mm 깊이로 주입하였고, 주입한 용량은 5 μL이었다.

라) 측정 방법은 상기 scopolamine model의 passive avoidance 방법과 동일하다.

㉞ 실험결과

- Aβ-42 투여 후 대조군의 latency time이 정상군 대비 유의하게 42.7% 감소하여 알츠하이머가 잘 유발되었음을 확인하였고, 시험물질 처리군의 경우 BF-7군은 정상군 대비 latency time이 유의하게 7.4% 감소해 치매가 개선되었음을 확인하였다. 그 외 BT-11, 홍삼, HR, PS군은 순서대로 latency time을 정상군 대비 31.9%, 38.1%, 25.7%, 24.4% 감소시켜 대조군 대비 개선시키는 경향을 보였지만 유의성은 없었다.



Each value is the mean±S.E.M. of 10 animals.

\*\* , p<0.01 vs. normal group; #, p<0.05 vs. control group by t-test.

그림 3-12. Passive avoidance test 실험 결과 (Alzheimer's 모델)



④ Morris water maze test in scopolamine induced amnesia model

㉠ 시험물질

- 1) Scopolamine hydrobromide, (Tocris Bioscience, Bristol,UK), IP
- 2) BF-7, PS, BT-11, 홍삼엑기스
- 3) 버섯추출물

㉡ 실험동물

- 1) ICR mice, 6주령

㉢ 실험환경

- 1) 온도범위:  $23 \pm 3^{\circ}\text{C}$
- 2) 상대습도범위:  $50 \pm 10\%$
- 3) 조명시간 및 조도: 12시간 점등 (조명시간: 08:00 ~ 20:00, 조도: 150~300 Lux)
- 4) 사육상자: 마우스용 폴리카보네이트 사육상자 (W180xD240xH130mm)
- 5) 물의 수용: 사육상자 당 7~10마리

㉣ 실험군 (n=8, 7groups)

- 1) Normal (Vehicle)
- 2) Negative control
- 3) BF-7 100mg/kg
- 4) PS 100mg/kg
- 5) BT-11 100mg/kg
- 6) 홍삼엑기스 100mg/kg
- 7) 버섯추출물 100mg/kg

## ㉔ 실험방법

### 1) 시험원리

수중미로측정장치는 설치류를 이용하여 공간학습 및 기억력을 측정하는 장비로서 실험방법은 다음과 같다. 지름이 140 cm, 높이가 45 cm인 원형수조 안에 물을 약 70% 채우고 우유를 넣어 안이 들여다 보이지 않도록 한다. 지름이 15 cm, 높이가 35 cm인 원형 플랫폼을 수면 아래 1.5 cm가 되도록 물 높이를 조절한다. 물의 온도는 21~32℃가 되도록 한다.

가) 훈련: 흰쥐를 수조에 넣어서 플랫폼에 도달하는 시간을 90초 동안 측정한다. 만약 흰쥐가 90초 내에 플랫폼을 찾지 못하면 꺼내어 플랫폼에 올려놓고 15초 동안 방치한다. 다시 30초 후에 흰쥐를 수조에 넣고 플랫폼에 도달하는 시간을 기록한다. 1일 2회씩 (오전 오후로 나누어 실시) 실시하며 흰쥐가 30초 내에 플랫폼에 도달하게 되면 훈련이 완료된 것으로 간주한다.

나) 본시험: 훈련이 완료된 흰쥐를 군분리하여 escape time(수조에 플랫폼이 있는 상태)을 측정하는데, 1일 2회씩 4일 동안 측정하였으며, 5일째에는 수조에 플랫폼을 제거하여 흰쥐가 남아있는 기억력으로 플랫폼이 있었던 장소에 머무는 시간(swimming time)을 5일에 측정한다. 측정방법은 훈련 방법과 동일하며 최대 측정시간은 90초로 하였다.

### 2) 시험방법

가) 본 실험에서는 각 군당 8마리씩 총 56마리의 마우스를 사용하였으며, 버섯추출물과 기억력 개선제품들은 3% HPMC로 현탁하여 사용하였다.

나) 시험방법은 상기에 제시된 수동회피 시험방법을 사용하였고, 이를 통해 수중미로시험을 실시하였다.

다) 시험물질의 용량은 모두 100mg/kg로 설정하여 투여하였다.

㉞ 실험결과

- Scopolamine 투여 후 (시험 1일) 대조군의 경우 Escape time (platform을 찾아가는 시간 =short or long-term memory)이 정상군에 비해 유의하게 지연되었고, 시험 2일부터 4일까지 같은 수준을 유지하였다. 시험물질 처리군의 경우 시험 1일에 BF-7군과 말뚝진흙버섯추출물군이 대조군과 비슷한 양상을 나타내었으나 시험 2일부터 모두 회복하였고, 시험 3-4일에는 다른 시험물질 투여군과 비슷한 수준으로 회복하였다 (그림 3-13). Platform을 제거한 상태에서의 대조군 swimming time (platform 주변에 머무르는 시간=Reference memory)은 정상군을 포함한 다른 시험물질 투여군보다 짧았지만, 통계학적인 유의성은 없었다. 시험물질 투여군에서는 홍삼엑기스 투여군이 대조군과 유의성을 나타냈으며(137%), 버섯추출물의 경우 114%의 개선을 나타내었다(그림 3-14).

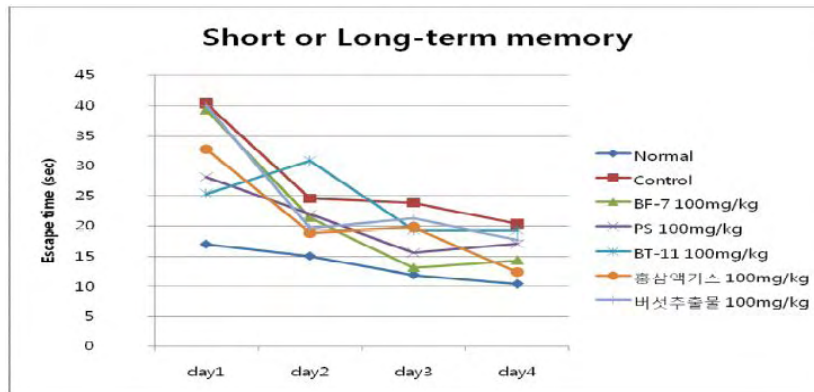
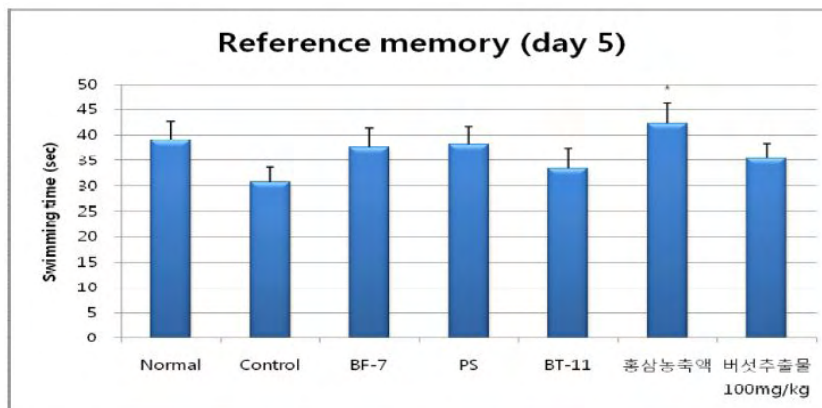


그림 3-13. Morris water maze test 실험 결과



The training trials were carried out on days 10 (two times per day) and the partial memory trials (five times per day) were carried out after the i.p injection of scopolamine. Each value is the mean±S.E.M. of 8 animals.

\*,  $p < 0.05$  vs. control group by t-test.

그림 3-14. Morris water maze test 실험 결과

⑤ Morris water maze test in amyloid beta induced Alzheimer's model

㉠ 시험물질

- 1) A $\beta$ 1-42 peptide (Sigma)
- 2) BF-7, PS, BT-11, 홍삼엑기스
- 3) 버섯추출물

㉡ 실험동물

- 1) ICR mice, 6주령

㉢ 실험환경

- 1) 온도범위:  $23 \pm 3^{\circ}\text{C}$
- 2) 상대습도범위:  $50 \pm 10\%$
- 3) 조명시간 및 조도: 12시간 점등 (조명시간: 08:00 ~ 20:00, 조도: 150~300 Lux)
- 4) 사육상자: 마우스용 폴리카보네이트 사육상자 (W180xD240xH130mm)
- 5) 물의 수용: 사육상자 당 7~10마리

㉣ 실험군 (n=11, 7groups)

- 1) Normal (Vehicle)
- 2) Negative control
- 3) BF-7 100mg/kg
- 4) PS 100mg/kg
- 5) BT-11 100mg/kg
- 6) 홍삼엑기스 100mg/kg
- 7) 버섯추출물 100mg/kg

㉤ 실험방법

1) 시험원리

가) 수중미로측정장치는 설치류를 이용하여 공간학습 및 기억력을 측정하는 장비로서 실험방법은 다음과 같다. 지름이 140 cm, 높이가 45 cm인 원형수조 안에 물을 약 70% 채우고 우유를 넣어 안이 들여다 보이지 않도록 한다. 지름이 15 cm, 높이가 35 cm인 원형 플랫폼을 수면 아래 1.5 cm가 되도록 물 높이를 조절한다. 물의 온도는  $21\sim 32^{\circ}\text{C}$ 가 되도록 한다.

나) 훈련: 흰쥐를 수조에 넣어서 플랫폼에 도달하는 시간을 90초 동안 측정한다. 만약 흰쥐가 90초 내에 플랫폼을 찾지 못하면 꺼내어 플랫폼에 올려놓고 15초 동안 방치한다. 다시 30초 후에 흰쥐를 수조에 넣고 플랫폼에 도달하는 시간을 기록한다. 1일 2회씩 (오전 오후로 나누어 실시) 실시하며 흰쥐가 30초 내에 플랫폼에 도달하게 되면 훈련이 완료된 것으로 간주한다.

다) 분시험: 훈련이 완료된 흰쥐를 군분리하여 escape time(수조에 플랫폼이 있는 상태)을 측정하는데, 1일 2회씩 4일 동안 측정하였으며, 5일째에는 수조에 플랫폼을 제거하여 흰쥐가 남아있는 기억력으로 플랫폼이 있었던 장소에 머무는 시간(swimming time)을 5일에 측정한다. 측정방법은 훈련 방법과 동일하며 최대 측정시간은 90초로 하였다.

2) 시험방법

가) 본 실험에서는 각 군당 11마리씩 총 77마리의 마우스를 사용하였으며, 버섯추출물과 기존 기억력개선제품은 3% HPMC로 현탁하여 사용하였다.

나) 시험방법은 Aβ1-42으로 유도된 알츠하이머 마우스를 가지고 수중미로시험을 실시하였다.

다) 시험물질의 용량은 모두 100mg/kg로 설정하여 투여하였다.

라) 시험종료 후, 동물을 sacrifice한 후 뇌를 분리하여 급냉시킨 후 추후에 Aβ1-42 detection ELISA kit으로 정량하였다.

㉞ 실험결과

- Aβ-42 투여 후 대조군의 latency time 및 reference memory가 정상군에 비해 유의하게 38% 감소함을 확인하였다. 시험물질 처리군의 경우 BF-7군과 버섯추출물군에서 시험 3, 4일에 통계학적으로 유의하게 latency time 이 약 130% 단축되었다. Platform을 제거한 상태에서 reference memory를 측정된 결과 대조군이 정상군을 포함한 다른 시험물질 투여군보다 유의하게 35% 낮았다(그림 3-16). 그러나 시험물질 투여군에서는 대조군에 비해 7% 인지력이 높았고, 시험종료 후, 동물을 sacrifice한 후 분리한 뇌에서 Aβ 정량한 결과 대조군에 비해 24% Aβ 발현감소를 관찰할 수 있었다(그림 3-17).

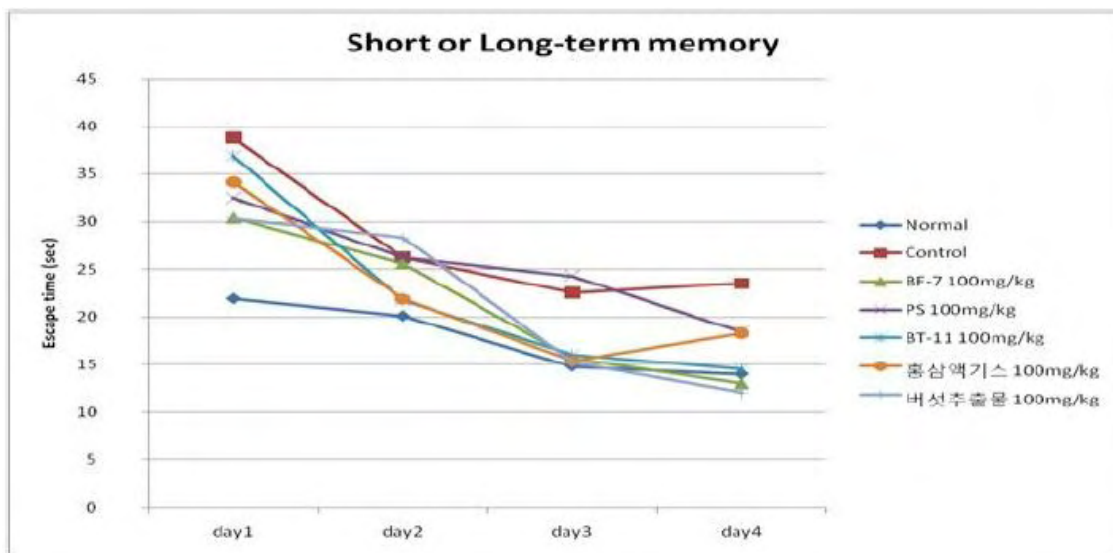
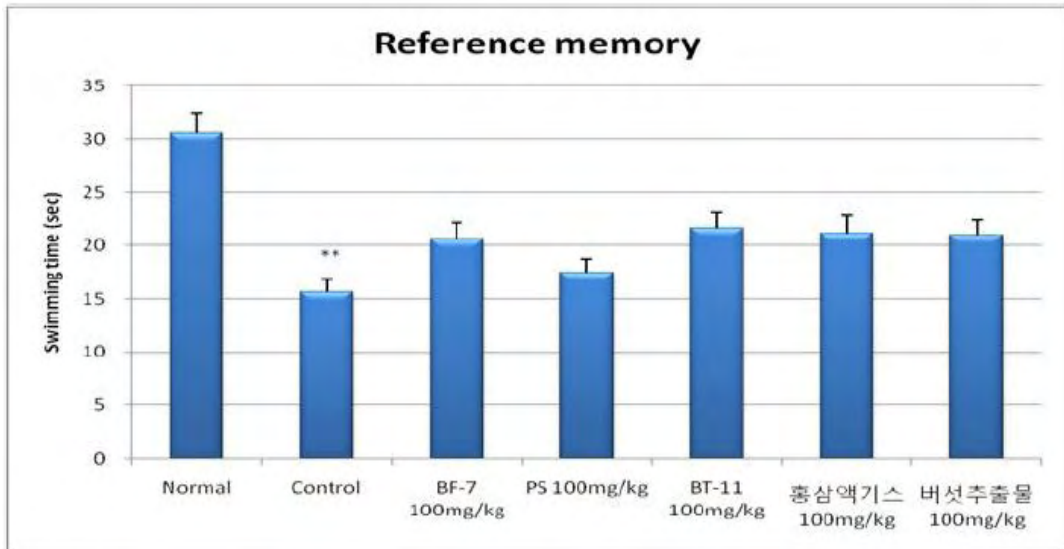


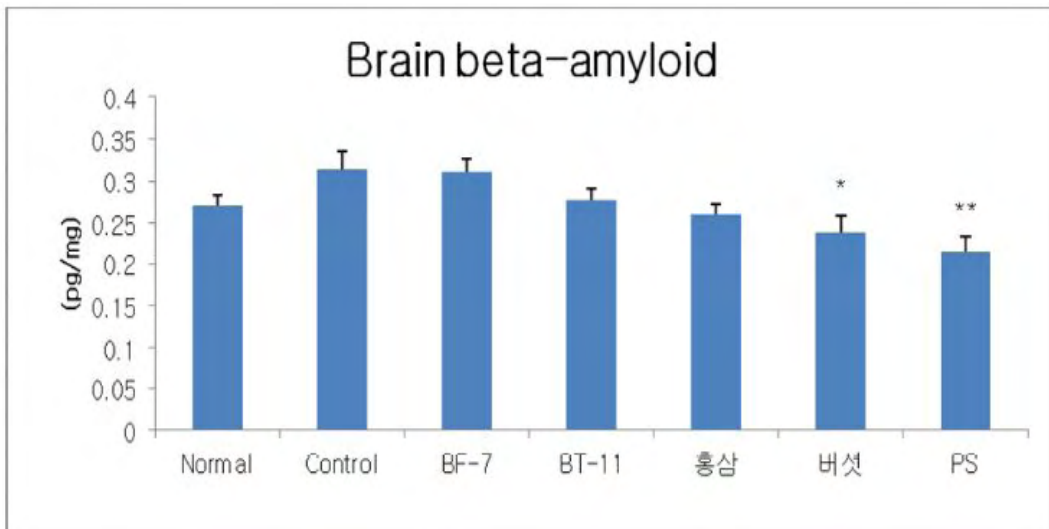
그림 3-15. Morris water maze test 결과 (HR의 효능)



The training trails were carried out on days 10 (two times per day) and the partial memory trials (five times per day) were carried out after the i.c.v injection of  $A\beta$ . Each value is the mean $\pm$ S.E.M. of 11 animals.

\*\* $p < 0.01$  vs. normal group.

그림 3-16. Morris water maze test 결과 (HR의 효능)



Each value is the mean $\pm$ S.E.M..

\*,  $p < 0.05$  vs. control group; \*\*,  $p < 0.01$  vs. control group.

그림 3-17. Alzheimer' 쥐의 뇌에서의  $A\beta$ -42 함량

## (2) 인슐린저항성, 비만 등 대사 증후군에 유효한 건강기능식품 개발 연구

### (가) 연구 배경

① 인슐린 저항성이 원인으로 알려져 있는 대사 증후군의 근본적인 치료를 위해서는 비만 개선이 직접적인 해결책임.

- 대사 증후군은 심혈관 질환의 주된 위험인자인 고혈압, 고혈당, 이상지질혈증, 복부비만 등이 동시에 군집해서 발생 및 진행되어 만성질환의 발생위험을 높이는 대사 장애를 말한다. 우리나라는 급속한 경제발전과 더불어 식생활이 서구화되면서 영양섭취 과잉, 운동 부족 등으로 비만, 고혈압, 이상지질혈증, 심혈관질환 등 만성질환이 매년 증가하고 있다. 대사 증후군은 진단명 자체에서 증후군이라는 용어가 포함된 것처럼 아직 정확한 병태생리 기전이 밝혀져 있지 않다. 일반적으로 인슐린 저항성(insulin resistance)이 근본적인 원인으로 작용한다고 추정하고 있지만 이 역시 대사 증후군의 발병을 만족스럽게 설명하지는 못한다. 인슐린 저항성이란 혈당을 낮추는 인슐린에 대한 몸의 반응이 감소하여 근육 및 지방세포가 포도당을 잘 섭취하지 못하게 되고 이를 극복하고자 더욱 많은 인슐린이 분비되어 여러 가지 문제를 일으키는 것을 말한다. 인슐린 저항성은 환경 및 유전적인 요인이 모두 관여하여 발생하는데, 인슐린 저항성을 일으키는 환경적 요인으로는 비만이나 운동 부족과 같이 생활 습관에 관련된 것이 잘 알려져 있고, 유전적인 요인은 아직 밝혀지지 않았다. 따라서 근본적인 치료를 위해서는 비만 개선이 우선시 되어야 할 것이다.

② 비만의 정의

- 비만은 유전적, 대사적, 환경적 그리고 행동학적인 복잡한 요인의 상호작용에 의해 발생하는 생물학적 현상으로 일반적으로 체중과다로 인식되고 있으나 의학적으로는 BMI(body mass index)가 30이상(=표준체중의 30% 이상)인 경우이거나 BMI가 27이상이며 기타 순환기계 질환인 당뇨병(diabetes), 고혈압(hypertension), 고지혈증(hyperlipidemia) 등이 연관되어 있는 경우를 비만으로 분류하고 있다. 특히 비만은 인슐린 저항성(insulin resistance), 당뇨병, 고혈압, 암, 담낭질환(gallbladder disease), 고지혈증, 동맥경화 등과 연관되어 각종 성인병을 일으키는 중요한 원인이 되고 있을 뿐만 아니라 비만에 걸린 환자나 동물의 경우 면역계에 악화를 초래하는 것이 최근에 보고 되고 있다.

- 과거엔 비만의 원인으로 유전적인 소인이 70% 이상으로 알려져 있고 그 외 환경요인으로 고지방식의 섭취나 운동부족 등이 알려져 있지만 최근 들어서는 섭취한 에너지량과 소비하는 에너지의 불균형에 관심이 모아지고 있다. 즉, 지난 수십년간 유전적 소인이 많이 변화하지 않았음에도 발생율은 급속히 증가한 것으로 미루어 유전적 원인으로만 보기는 어렵고 따라서 에너지 균형을 파괴하는 유전적, 환경적 복합 요인이 체중결정(비만발생)의 중요 인자로 인식되고 있다. 따라서 비만의 정확한 원인에 대한 규명이 절실히 요구되고 있다.

### ③ 비만 현황 조사

- 현재 WHO의 보고에 따르면 세계 약 4억명의 성인이 비만이며 16억명의 성인이 과체중인 상태이다. 미국 성인 인구의 31%, 유럽 성인 인구의 18%, 중국 성인 인구의 25%, 우리나라 성인 인구의 32%가 비만인 실정이다. 하지만, 2006년 아콕플리아의 유럽 승인 이후 신규 승인된 비만 치료제가 전혀 없는 상황이며, 더욱이 아콕플리아의 경우 우울증 및 자살충동 등의 부작용으로 2007년 미국 FDA 승인이 거절되었으며, 2009년에는 유럽연합에서 판매가 중지 되었고, 이 여파로 동일 기전을 가지는 CB1 수용체 길항제인 아벤티스사의 drinabant나 머크사의 taranabant의 개발이 중지되었다. 또한 리덕틸의 경우 미약한 체중감량효과와 심장마비, 뇌졸중 등의 부작용을 이유로 2010년 판매가 중지되어, FDA에 승인된 장기간 처방약은 제니칼이 유일한 상황이 되었다. 하지만, 제니칼 역시 미약한 체중감소 효과와 설사 및 지용성 비타민 흡수 감소 등의 부작용으로 시장 점유율이 낮아지고 있는 상황이다.

### ④ 비만 개선을 위한 차의 다양한 효능

- 비만은 중추신경 및 말초신경계가 관련된 복합적 원인의 만성 대사질환이다. 하지만, 기존의 치료제는 대체로 단일 기전을 타겟으로 하여 다른 기전에서의 보상효과로 인해 약효가 미약하거나, 또는 부작용을 배제한 채 중추신경계에 작용하여 장기 투여 시 심각한 부작용을 일으킬 가능성이 있다는 문제점을 가지고 있다. 따라서 이를 해결하기 위해서는 장기간의 투여에도 부작용이 없는 안전성이 검증된 소재가 필요하다.

- 차(Tea)는 커피, 카카오와 함께 세계 3대 기호음료로서 세계 각국에서 음용되어 왔고, 특히 국내에서 재배되고 있는 녹차의 음용인구가 매년 증가하는 추세이다. 차가 중요한 기호음료로서 발전해 온 가장 큰 이유는 여러 민족의 구미에 맞는 대중적인 기호성을 가지고 있을 뿐만 아니라 생체의 복잡한 생명활동을 조절하는 식품의 3차 기능으로서 생체리듬의 조절, 면역력의 증진, 질병의 예방이나 회복, 노화 억제 등의 신체조절 기능을 갖는 기능성 식품으로서 중요성이 새삼 강조되고 있기 때문이다. 차에는 비타민과 무기질의 영양소를 공급하는 기능과 맛과 향 등의 기호를 충족시키는 기능이 있는 것으로 알려져 있으며, 떫은 맛의 주성분인 catechin 류 등은 그 유도체에 따라 epicatechin, epigallocatechin, epicatechin gallate 및 epigallocatechin gallate 등으로 분류할 수 있다. 그리고 쓴맛은 주로 각성작용, 이뇨작용, 피로회복작용 등이 있는 것으로 알려진 caffeine에 의한 것이며, 특유의 독특한 맛을 내는 성분은 theanine 성분으로서 이 중 glutamic acid의 ethylamide가 약 절반을 차지하고 이 외에 20여 종류의 아미노산이 함유되어 있다. 이들은 항암, 항산화, 항비만, 항돌연변이, 항균, 항 동맥경화 등의 효과가 있다고 알려져 있다. 차는 발효정도에 따라 녹차(green tea; unfermented tea), 우롱차(oolong tea; half fermented tea), 흑차 (black tea; full fermented tea), 발효흑차(post-fermented tea)로 나뉜다.

- 본 연구에서는 발효흑차의 체지방 감소에 대한 기능성을 평가하였다.



(나) 유효성 연구

① High-fat diet induced obesity model에서 발효흑차의 약효평가

㉠ 시험물질

- 1) 일반사료: Chaw diet (퓨리나)
- 2) 고지방사료: 60% kcal high-fat diet (D12492), Research diet
- 3) 발효흑차

㉡ 실험동물

- 1) C57BL/6 mouse, 6주령

㉢ 실험장비

- 1) Minispec LF-2 (Bruker)

㉣ 실험환경

- 1) 온도범위:  $23 \pm 3^{\circ}\text{C}$
- 2) 상대습도범위:  $50 \pm 10\%$
- 3) 조명시간 및 조도: 12시간 점등 (조명시간: 08:00 ~ 20:00, 조도: 150~300 Lux)
- 4) 사육상자: 마우스용 폴리카보네이트 사육상자 (W180xD240xH130mm)
- 5) 물의 수용: 사육상자 당 1마리

㉤ 실험군

- 1) Control(Vehicle), 3% HPMC, Chaw diet
- 2) Negative control: 3% HPMC, High fat diet
- 3) Positive control: Rimonabant 10mg/kg, High fat diet
- 4) 발효흑차 300mg/kg, High fat diet
- 5) 발효흑차 1000mg/kg, High fat diet

㉞ 실험방법

1) 군분리 및 비만유발

- 입수된 동물 70마리 중 20마리는 일반사료를 나머지 50마리는 고지방식이를 4주간 공급하여 비만을 유발하였고 일반사료군 중 8마리와 비만 유발군 중 32마리만 선별, 체중과 체지방 함량을 기준으로 군분리하여 사용하였다. 군 내 개체간의 영향을 배제하기 위해 1cage당 1마리씩 사육하였다.

2) 약물투여 및 체중, 체지방 함량

- 4주 유발 후 약물투여를 시작하여 실험 종료일까지 1일 1회 경구 투여 하였다. 매주 1회 체지방 함량 및 체중 측정을 하였다. 체지방 함량은 체지방 측정 장비 (minispec LF-2)를 이용하여 측정하였다.

3) 부검 및 혈액생화학

- 6주 약물 투여 후 sacrifice 시켜 부위별 체지방 및 혈액생화학 지표를 분석하였다. 부위별 지방은 epididymal fat, subcutaneous fat, retroperitoneal fat으로 나누었고 Liver를 적출하였다. 혈액 생화학 지표는 지질관련 지표를 포함하여 일반적인 지표들을 분석하였다.

㉔ 실험결과

1) 체중

- 체중 분석 결과 6주 투여 후 발효흑차의 체중감소 효과는 control대비 약 30% ( $29.19 \pm 0.91\text{g}$  vs  $41.45 \pm 1.31\text{g}$ ) 감소하여 rimonabat의 15% ( $35.18 \pm 1.71\text{g}$  vs  $41.45 \pm 1.31\text{g}$ )보다 약 두 배 더 큰 것으로 나타났다. 체지방 함량의 경우 Control대비 Rimonabant, 발효흑차가 각각 22.4% ( $29.12 \pm 2.36$  vs  $37.56 \pm 0.99$ ), 28.8% ( $26.71 \pm 0.74$  vs  $37.56 \pm 0.99$ )의 체지방을 감소효과를 나타내었다.

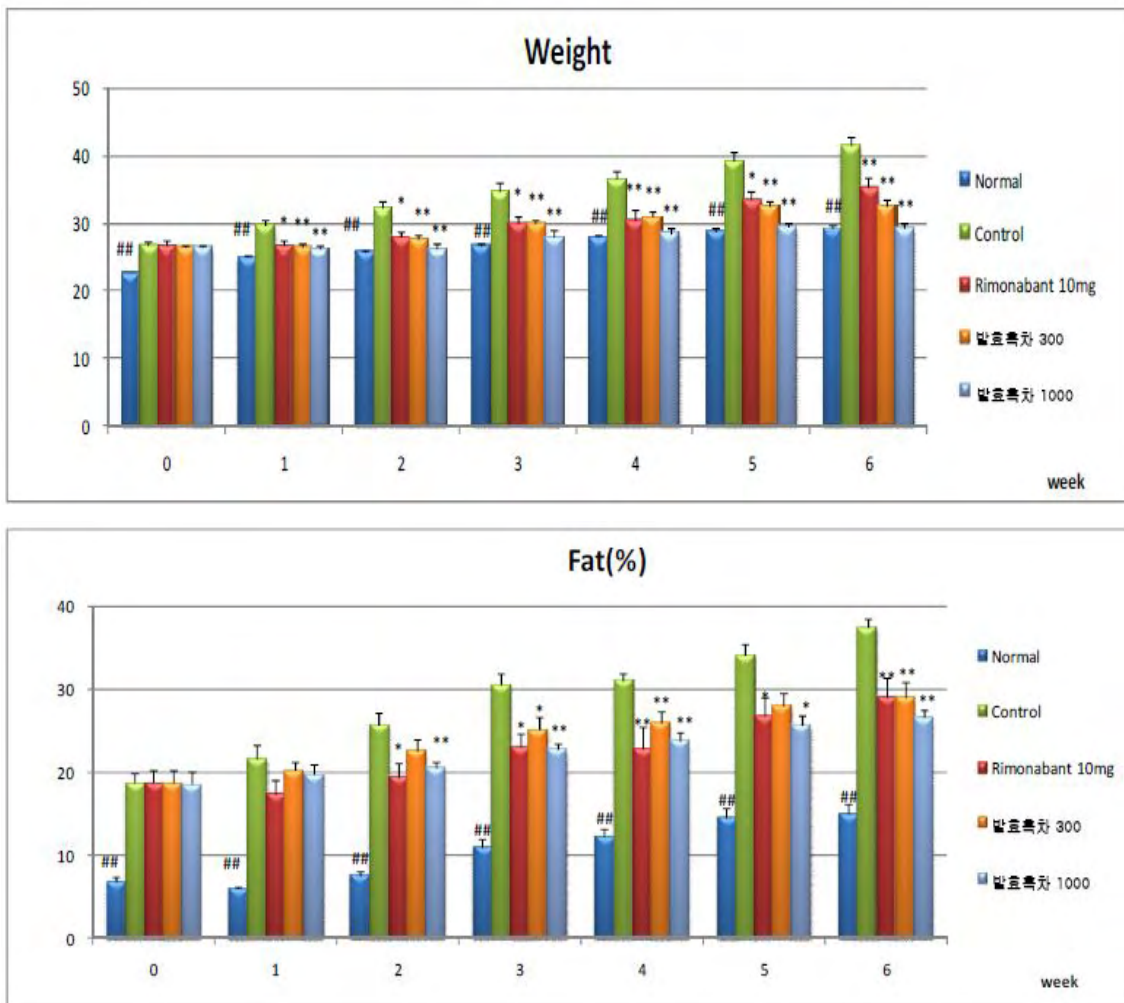


그림 3-18. 발효흑차의 체중 감소 및 지방조직 무게 감소 효과

2) Fat mass and lean mass

- Fat mass는 control대비 rimonabant가 33%, 발효흑차가 300, 1000mg/kg에서 각각 38%, 50%감소하는 결과를 나타냈다. Lean mass 분석 결과 Control이 0-time에 비해 약 19%가 증가한 반면 rimonabant, 발효흑차 (1000mg/kg)는 각각 14.3, -0.8% 증가하였다. Rimonabant가 control대비 약 5%의 lean mass 감소효과가 있는 반면 발효흑차는 19%의 lean mass감소 효과가 있는 것으로 나타났다.

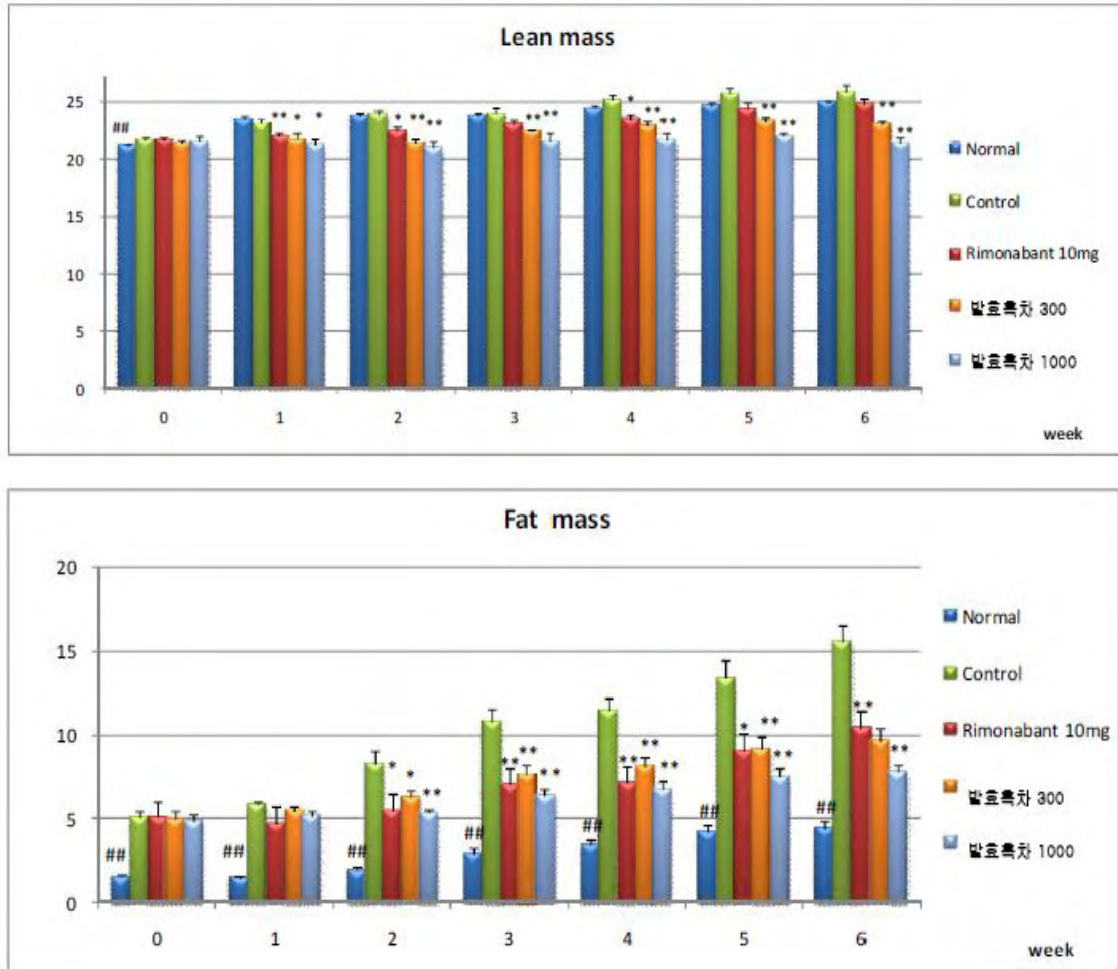


그림 3-19. 발효흑차의 체중 감소 및 지방량 감소 효과

### 3) Adipose tissue weight

- Rimonabant의 경우 control에 비해 liver 18%, retroperitoneal fat 28%, epididymal fat 39%, subcutaneous fat 40%의 무게감소효과가 있었다. 발효흑차는 control에 비해 1000mg/kg의 경우 각각 30%, 43%, 41%, 51%의 무게감소효과가 나타나 전체적으로 rimonabant에 비해 우수한 지방감소효과가 나타났다. 발효흑차 300mg/kg의 경우 각각 30, 27, 25, 38%로 rimonabant와 비슷한 정도의 효력을 나타내었으나 간 무게에 대한 효과는 더 뛰어난 것으로 판단된다. 간 무게는 300mg/kg과 1000mg/kg에서 동일한 30%의 무게 감소효과가 나타나 지방간 예방효과는 300mg/kg에서 이미 최고 유효 농도에 도달한 것으로 판단된다.

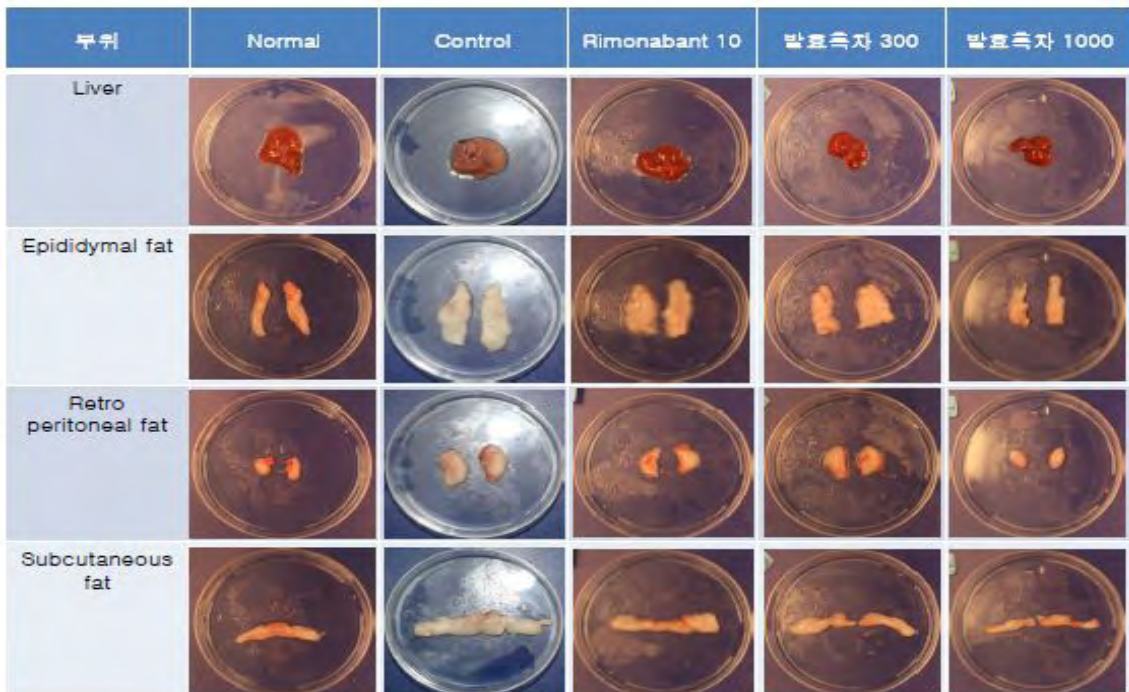
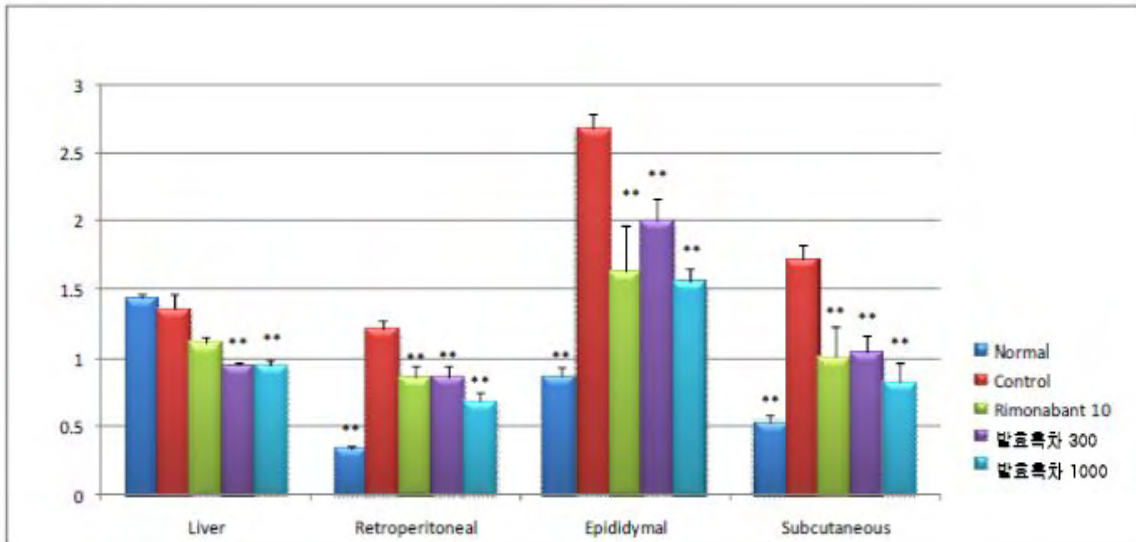


그림 3-20. 발효흑차가 각종 장기의 무게에 미치는 영향

4) Blood biochemistry

- 혈액생화학 분석결과 지질관련 지표에서는 발효흑차 투여군의 경우 Triglyceride (중성지방) 이 control에 비해 유의적으로 감소하였다. HDL-cholesterol의 경우 비만유발군이 유의적으로 증가하였고 발효흑차 투여시 약 9% 감소하였으나 유의적이지는 않았다. 간 손상 지표에서는 GPT와 GGT가 비만 유발군에서 증가하였고 발효흑차 투여군에서 유의적으로 감소하였다. 신장기능지표에서는 BUN (혈중요소질소), IP (무기인) 지표가 비만 유발군에서 증가하였고 발효 흑차 투여군에서는 유의적으로 감소한 것으로 나타났다.

지질관련 지표	결과	비고
T-Cho	Control: 유의적 증가, 발효흑차: 감소, N/S	고지혈증에서 증가
TG	Control: 영향 없음, 발효흑차, Rimonabant: 유의적 감소	고지혈증에서 증가
HDL-cholesterol	Control: 유의적인 증가, Control에 비해 약 9%감소, N/S	고지혈증에서 증가
LDL-cholesterol	불검출	고지혈증에서 감소

T-Cho; total cholesterol, TG; Triglyceride, HDL-cholesterol; High density lipid cholesterol, LDL-cholesterol : Low density lipid cholesterol

간 손상 지표	결과	비고
GOT (ALT)	Control: 영향 없음, 발효흑차: 영향 없음	간 및 여러 장기에 분포하는 효소
GPT (AST)	Control: 유의적 증가, 발효흑차 유의적 감소	간세포에 주로 존재하는 효소
GGT	Control: 증가(N/S), 발효흑차, Rimonabant: 유의적 감소	과영양성 지방간시 상승

GOT; Glutamic-Oxaloacetic Transaminase, GPT; Glutamic-Pyruvic Transaminase, Gamma Glutamyl Transpeptidase

신장기능 지표	결과	비고
BUN	Control: 유의적 증가, 발효흑차: 유의적감소	신장기능 감소시 증가
IP	Control: 증가(N/S), 발효흑차, Rimonabant: 유의적감소	신장기능 감소시 증가

BUN: Blood urea Nitrogen, IP; inorganic phosphate (무기인)

표 3-18. 혈액 분석 결과 (N/S: not significant)

② High-fat diet induced obesity model에서 발효흑차의 용량의존성 평가

㉠ 시험물질

- 1) 일반사료: Chaw diet (퓨리나)
- 2) 고지방사료: 60% kcal high-fat diet (D12492), Research diet
- 3) 발효흑차

㉡ 실험동물

- 1) C57BL/6 mouse, 6주령

㉢ 실험장비

- 1) Minispec LF-2 (Bruker)

㉣ 실험환경

- 1) 온도범위:  $23 \pm 3^{\circ}\text{C}$
- 2) 상대습도범위:  $50 \pm 10\%$
- 3) 조명시간 및 조도: 12시간 점등 (조명시간: 08:00 ~ 20:00, 조도: 150~300 Lux)
- 4) 사육상자: 마우스용 폴리카보네이트 사육상자 (W180xD240xH130mm)
- 5) 물의 수용: 사육상자 당 1마리

㉤ 실험군

- 1) Control(Vehicle), 3% HPMC, Chaw diet
- 2) Negative control: 3% HPMC, High fat diet
- 3) Positive control: Rimonabant 10mg/kg, High fat diet
- 4) 발효흑차 10mg/kg, High fat diet
- 5) 발효흑차 30mg/kg, High fat diet
- 6) 발효흑차 100mg/kg, High fat diet
- 7) 발효흑차 300mg/kg, High fat diet

㉞ 실험방법

1) 군분리 및 비만유발

- 입수된 동물 100마리 중 20마리는 일반사료를 나머지 80마리는 고지방식을 4주간 공급하여 비만을 유발하였고 일반사료군 중 8마리와 비만 유발군 중 48마리만 선별, 체중과 체지방 함량을 기준으로 군분리하여 사용하였다. 군 내 개체간의 영향을 배제하기 위해 1cage당 1마리씩 사육하였다.

2) 약물투여 및 체중, 체지방 함량

- 4주 유발 후 약물투여를 시작하여 실험 종료일까지 1일 1회 경구 투여 하였다. 매주 1회 체지방 함량 및 체중 측정을 하였다. 체지방 함량은 체지방 측정 장비 (minispec LF-2)를 이용하여 측정하였다.

3) 부검 및 혈액생화학

- 6주 약물 투여 후 sacrifice 시켜 부위별 체지방 및 혈액생화학 지표를 분석하였다. 부위별 지방은 epididymal fat, subcutaneous fat, retroperitoneal fat으로 나누었고 Liver를 적출하였다. 혈액 생화학 지표는 지질관련 지표를 포함하여 일반적인 지표들을 분석하였다.

㉟ 실험결과

1) 체중

- 체중 분석 결과 6주 투여 후 발효흑차 300mg/kg에서 체중감소 효과는 control대비 약 12% ( $42.00 \pm 1.49g$  vs  $47.17 \pm 1.37g$ ) 감소하여 rimonabant의 10% ( $42.87 \pm 1.11g$  vs  $47.17 \pm 1.37g$ )와 유사한 정도로 나타났다. 체중은 10mg/kg농도에서 감소하기 시작하여 용량의존적으로 감소하였고 300mg/kg에서는 유의적인 체중감소효과를 나타내었다.

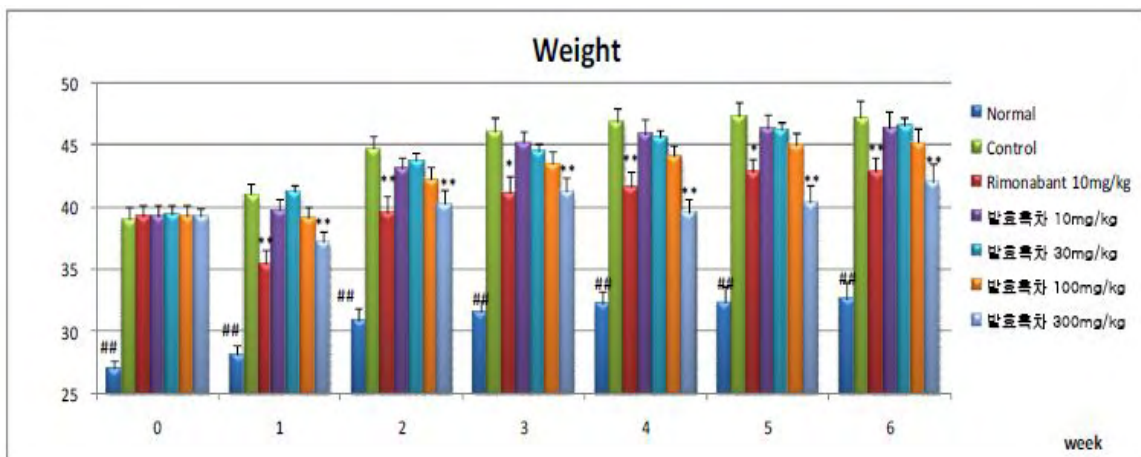
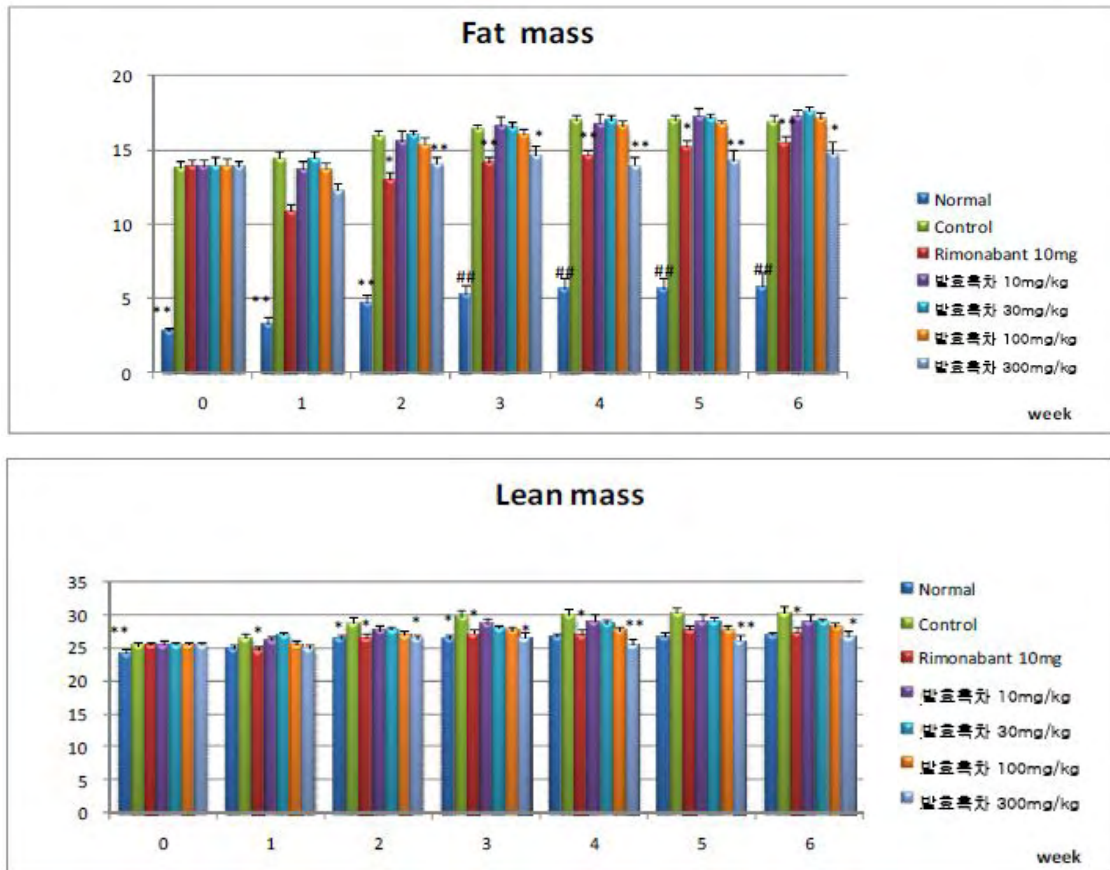


그림 3-21. 발효흑차가 체중에 미치는 영향



2) Fat mass and lean mass

- Fat mass는 control대비 rimonabant가 8.3%감소를 보였다. 발효흑차는 저용량 10, 30, 100mg/kg에서 fat mass 감소효과를 보이지 않았으나 300mg/kg에서 control대비 fat mass가 12.9% 감소하였다. Lean mass 분석 결과 Control이 0-time에 비해 약 19%가 증가한 반면 rimonabant, 발효흑차 300mg/kg은 각각 7.67, 5.33%로 control에 비해 유의적으로 감소하였고 이때, 일반사료를 섭취한 마우스의 경우 10.9% 증가하였다. 발효흑차의 Lean mass 증가율은 10, 30, 100mg/kg용량에서 각각 14.6, 13.7, 11.09%로 용량의존적으로 감소하였다.



(\*; P<0.05, \*\*; P< 0.01 vs control)

그림 3-22. 발효흑차가 체중과 지방조직 무게에 미치는 영향

### 3) Fat tissue and liver weight

- Liver weight는 control에 비해 rimonabant는 17.23% 감소하였고 발효흑차 투여군의 경우 10, 30, 100, 300mg/kg에서 각각 3.3, 16, 19.8, 37.4%로 용량의존적으로 감소하였다. Retroperitoneal fat weight는 control대비 rimonabant 투여군이 24.5% 감소하였고 발효흑차 투여군의 경우 10, 30, 100, 300mg/kg의 용량에서 각각 8%, 6.1%, 11.8%, 26.3%로 용량의존적인 무게 감소효과가 나타났다. Epididymal fat weight는 control대비 rimonabant 투여군이 10.3% 감소하였고 발효흑차 10, 30, 100, 300mg/kg 투여군이 각각 1.6, 1.8, 7.1, 17.2%로 용량의존적으로 감소하였다. Subcutaneous fat weight는 control대비 rimonabant가 17.7% 감소하였고, 발효흑차 투여군의 경우 10, 30, 100, 300mg/kg의 용량에서 각각 12.1, 12, 20, 23.1%로 용량의존적으로 감소하였다. 모든 조직에서 용량의존적인 무게 감소효과가 나타났으며 300mg/kg에서는 모두 유의적으로 감소하였고 100mg/kg에서는 Liver와 피하지방에서만 유의적이었다.

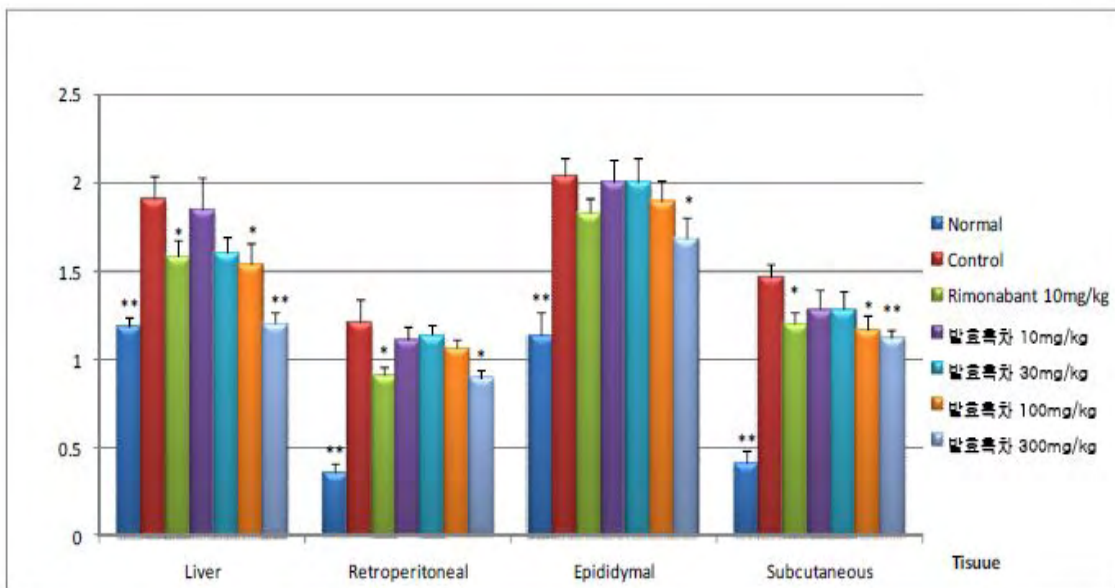


그림 3-23. 발효흑차가 각종 장기에 미치는 영향

4) Blood biochemistry

- 혈액생화학 분석결과 간 손상지표인 GOT, GPT는 control군에서 증가한 반면 발효흑차 투여군에서는 용량의존적으로 감소하였고 300mg/kg에서 유의적이었다. 혈중 glucose의 경우 rimonabant와 발효흑차 투여군 모두 control대비 차이가 없었다. 지질관련 지표의 경우 발효흑차 투여군의 total cholesterol과 Triglyceride (중성지방)이 용량의존적으로 감소하였으나 유의적이지는 않았다. LDL cholesterol은 control에 비해 용량의존적으로 감소하였고 300mg/kg에서 유의적이었다. HDL-cholesterol의 경우 비만유발군이 유의적으로 증가하였고 발효흑차 및 리모나반트 투여군은 control과 차이가 없었다.

Drug (mg/kg)	Normal	Control	리모나 반트10	발효흑차 10	발효흑차 30	발효흑차 100	발효흑차 300
LDL-Chol	**6.11 ± 0.61	37.26 ± 6.36	21.57 ± 4.669	38.8 ± 5.21	43.03 ± 7.28	32.73 ± 5.98	23.41 ± 4.56
GLU	*105.44 ± 11.99	145.44 ± 11.17	144.78 ± 10.68	136.88 ± 9.19	153.67 ± 7.02	156.44 ± 17.16	141.13 ± 4.03
GOT	*205.73 ± 20.32	251.07 ± 9.01	**194.22 ± 11.84	223.62 ± 12.25	239.34 ± 24.32	233.88 ± 16.49	**187.83 ± 11.30
GPT	**34.37 ± 2.92	150.34 ± 19.68	**79.95 ± 7.54	135.24 ± 14.43	153.70 ± 23.03	102.60 ± 11.27	**60.83 ± 7.35
HDL-C hol	*86.66 ± 3.67	159.74 ± 21.66	175.62 ± 10.19	179.76 ± 6.78	167.38 ± 18.33	171.61 ± 10.77	154.73 ± 15.09
T-CHO	**94.45 ± 3.89	204.00 ± 13.29	184.37 ± 13.76	208.42 ± 9.23	197.01 ± 22.26	198.08 ± 13.74	160.55 ± 21.29
TG	81.24 ± 8.79	80.41 ± 5.37	72.23 ± 4.72	78.64 ± 3.33	81.27 ± 7.65	77.95 ± 6.34	73.16 ± 6.51

\*; p<0.01 vs control, \*\*; p<0.01 vs control

T-Cho; total cholesterol, TG; Triglyceride, HDL-cholesterol; High density lipid cholesterol, LDL-cholesterol : Low density lipid cholesterol, GOT; Glutamic-Oxaloacetic Transaminase, GPT; Glutamic-Pyruvic Transaminase, Gamma Glutamyl Transpeptidase

표 3-19. 혈액 분석 결과

5) Food intake

- 6주에 사료섭취량 분석결과 발효흑차 투여군 10, 30, 100mg/kg에서는 식이섭취량 감소가 나타나지 않았고 300mg/kg 투여군에서 control대비 유의적으로 18.5% 감소한 것으로 나타났다.

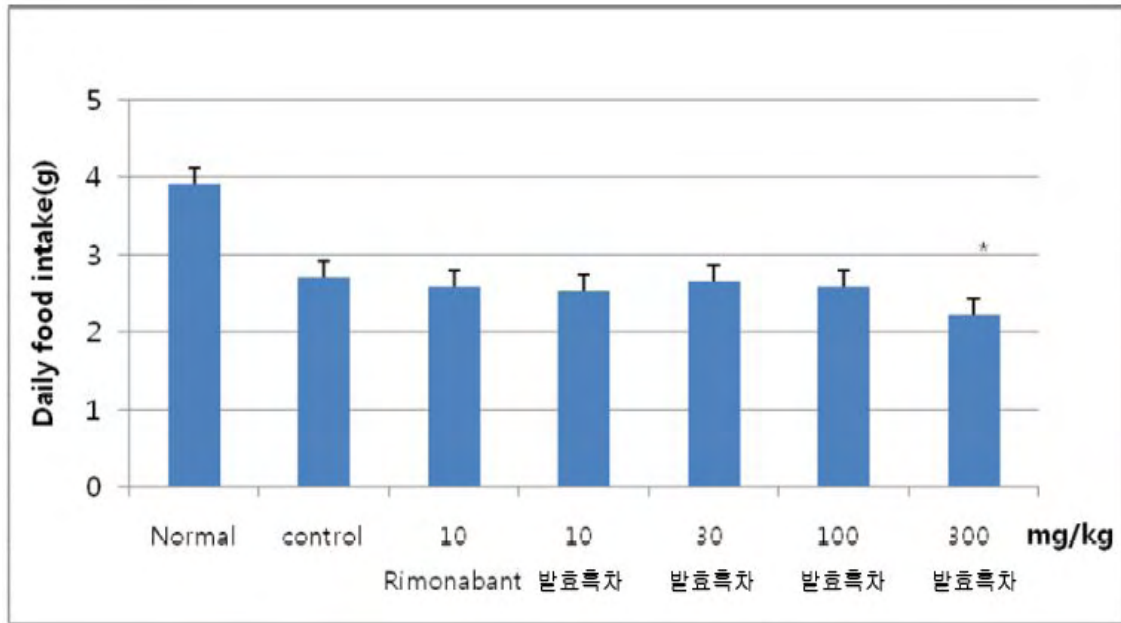


그림 3-24. 발효흑차가 식이섭취에 미치는 영향

6) Blood leptin level

- 6주 후 혈중 leptin 분석결과 control군이 normal 군에 비해 현저히 증가하였다. rimonabant의 경우 약 15%가 감소하였고 유의적이지는 않았던 반면 발효흑차 300mg/kg투여군은 유의적으로 약 25% 감소하였다.

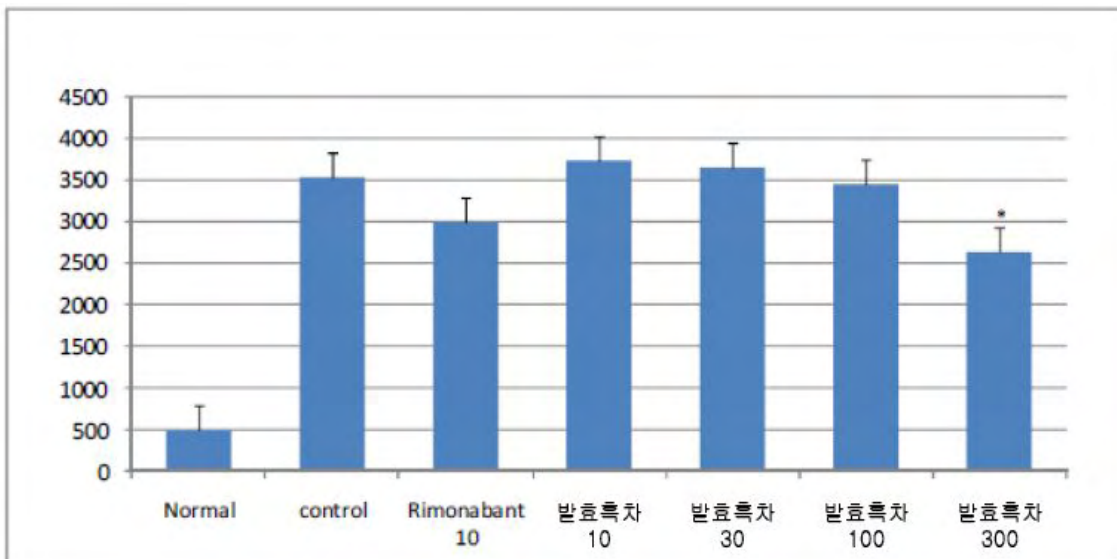


그림 3-25. 발효흑차가 혈중 렙틴 농도에 미치는 영향

## 다. 체지방 감소 건강기능식품 인체시험 개시. 체지방 감소 건기식 식약청 개별인정

### (1) 연구배경

#### (가) 비만의 정의 및 현황

- 비만은 유전적, 대사적, 환경적, 그리고 행동학적인 복잡한 요인의 상호작용에 의해 발생하는 생물학적 현상으로 일반적으로 체중 과다로 인식되고 있으나, 의학적으로는 BMI(body mass index)가 30 이상(≒표준체중의 30% 이상)인 경우이거나 BMI가 27 이상이며 기타 순환기계 질환인 당뇨병(diabetes), 고혈압(hypertension), 고지혈증(hyperlipidemia) 등이 연관되어 있는 경우를 비만으로 분류하고 있다. 특히 비만은 인슐린 저항성(insulin resistance), 당뇨병, 고혈압, 암, 담낭질환(gallbladder disease), 고지혈증, 동맥경화 등과 연관되어 각종 성인병을 일으키는 중요한 원인이 되고 있을 뿐 아니라 비만에 걸린 환자나 동물의 경우 면역계에 악화를 초래하는 것이 최근에 알려져 있어 사회적으로 중요한 관심의 대상이 되고 있다. 현재까지 알려진 비만의 원인은 유전적인 소인이 70% 이상으로 알려져 있고, 그 외 환경요인으로 고지방 식의 섭취나 운동부족 등이 알려져 있지만, 최근 들어서는 섭취한 에너지량과 소비하는 에너지량의 불균형에 관심이 모아지고 있다. 즉, 지난 수십년간 유전적 소인이 많이 변화하지 않았음에도 발생율은 급속히 증가한 것으로 미루어 유전적 원인으로만 보기는 어렵고, 따라서 에너지 균형을 파괴하는 유전적, 환경적 복합 요인이 체중결정(비만발생)의 중요 인자로 인식되고 있다. 따라서 비만의 정확한 원인에 대한 규명이 절실히 요구되고 있다.

- 현재까지 알려진 비만치료제로는 제니칼(Xenical, 로슈제약회사, 스위스), 리덕틸(Reductil, 에보트사, 미국), 엑소리제(Exolise, 아토파마, 프랑스) 등으로 크게 식욕억제제, 에너지소비 촉진제, 지방흡수억제제로 분류되며, 대부분의 비만치료제는 시상하부와 관련된 신경전달물질을 조절함으로써 식욕을 억제하는 식욕억제제이다. 그러나 현행 치료제들은 심장질환, 호흡기질환, 신경계질환 등의 부작용과 함께 그 효능의 지속성도 낮아, 더욱 개선된 비만치료제의 개발이 필요하고, 또한 현재 개발되고 있는 제품도 부작용없이 만족할 만한 치료효과를 가지는 치료제는 없어 새로운 비만치료제의 개발이 요구되고 있다.

- 지질 관련 대사성 질환은 생체 내 물질대사 장애에 의해 발생하는 질환 중 혈중 지질과 관련된 것을 의미하며, 구체적으로 지방간, 제2형 당뇨, 고지혈증, 심혈관 질환, 동맥경화증 및 지질 관련 대사증후군을 포함한다. 상기 대사증후군은 당뇨, 비만 등 여러가지 대사성 질환이 한 사람에게 동시에 나타나는 질환을 의미한다. 상기 지질 관련 대사성 질환 역시 비만과 동일하게 효과적인 치료제의 개발이 필요하다.

(나) 원재료의 기원

- 흑차(black tea)는 다과(Theaceae)에 속하는 차나무(Camelia sinensis L.)에서 미생물에 의해 발효가 진행되는 후발효차이며, 흑차의 성분으로는 갈산(Gallic acid)과 카페인(Caffeine), 카테킨류(Catechins)를 함유하고 있다. 중국의 흑차는 생산지에 따라 여러 종류가 있다. 보이차, 칠자병차, 타차 등은 운남성에서 생산되는 차이며, 강전차, 금첨차 등은 사천성에서 복전차, 흑전차, 화전차 등은 호남성에서 노청병차는 호북성에서 육보차는 광서성에서 생산되는 차이다. 대표적인 흑차인 보이차는 오래 전부터 중국 변방의 소수민족들이 마시기 시작한 것으로서 운남 대엽종 차잎을 이용하여 햇볕에 건조시켜 만든 모차를 이용하여 만든 차를 말한다. 소수민족들이 주로 마시다가 중국본토로 알려졌으며 1726년에 이르러서는 공차(貢茶)로 지정되었다. 형태에 따라 잎차인 산차(散茶), 찌서 덩어리로 만든 긴압차가 있으며, 긴압차의 종류는 병차, 전차, 긴차, 방차, 타차 등 시중에 다양하게 유통되고 있다. 자연건조법인 건창법으로 만들어진 차(茶)는 문화대혁명때 대부분 사라졌다. 현재 유통되는 것은 악퇴(渥堆)라는 제조공정을 이용하여 미생물을 생성시켜 숙성발효시킨 모차를 건조 후 긴압해서 출하하는 숙병이 대부분이며, 전통적인 방식으로 만든 청병보이차는 그 생산량이 적다. 지방과 콜레스테롤을 분해하는 효과가 있다는 사실이 알려지면서 애용하는 사람들이 증가 추세에 있다.

(2) 제조공정



그림 3-26. 흑차주정추출물의 제조공정도

(3) 원료의 특성연구

(가) 기능성 원료의 특성

- 정상 : 주정50% 추출물의 미황갈색의 건조분말

(나) 지표성분의 특성

- 명칭 : Gallic acid

- 특성 : Gallic acid의 물리화학적 특성은 아래와 같다.

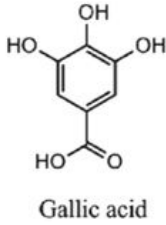
분자식	C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>5</sub>
구조식	 Gallic acid
IUPAC name	3,4,5-trihydroxybenzoic acid
분자량	170.12 g mol <sup>-1</sup>

표 3-20. 지표성분 gallic acid의 물리화학적 특성

#### (4) 유효성 연구

(가) DA-9307(흑차 50% 에탄올 수용액 냉침 추출물)과 발효흑차 (100% 열수 추출물)의 High fat diet-induced obese mouse model에서의 항비만 효능평가

##### ① 시험물질

- 1) 일반사료: Chaw diet (퓨리나)
- 2) 고지방사료: 60% kcal high-fat diet (D12492), Research diet
- 3) 발효흑차 (흑차 100% 열수 추출물)
- 4) DA-9307 (흑차 50% 에탄올 수용액 냉침 추출물)

##### ② 실험동물

- 1) C57BL/6 mouse, 3주령

##### ③ 실험장비

- 1) Minispec LF-2 (Bruker)

##### ④ 실험환경

- 1) 온도범위: 22~24℃
- 2) 상대습도범위: 60~80%
- 3) 조명시간 및 조도: 12시간 점등 (조명시간: 08:00 ~ 20:00, 조도: 150~300 Lux)
- 4) 사육상자: 마우스용 폴리카보네이트 사육상자 (W180xD240xH130mm)
- 5) 물의 수용: 사육상자 당 1마리

##### ⑤ 실험군

- 1) Normal(Vehicle), 3% HPMC, Chaw diet
- 2) Control: 3% HPMC, High fat diet
- 3) Positive control: 발효흑차 300mg/kg
- 4) DA-9307 100mg/kg, High fat diet
- 5) DA-9307 300mg/kg, High fat diet



## ⑥ 실험방법

### 1) 군분리 및 비만유발

- 흑차의 50% 에탄올 수용액 냉침 추출물과 흑차의 100% 열수 추출물을 이용하여 고지방식이 비만모델에서 항비만 효력을 비교 측정하였다. 실험에 사용된 고지방식이 비만 마우스 모델의 제조는 다음과 같다. 3주령 수컷 C57/BL6 웅성 마우스(대한바이오링크, 한국)를 22~24℃, 습도 60~80% 상태에서 표준 식이와 물을 공급하며 1주간 순화사육한 후 고지방식이사료(Research diet, 미국)를 7주간 섭취시켰다. 각 개체의 무게를 측정하여 상위 70%를 실험동물로 선정하고 하위 30%는 탈락시켰다. 상기 선정된 상위 70%의 마우스를 각 군당 8마리씩으로 하여 체중 및 체지방을 기준으로 각 군으로 분리한 후 8주간 매일 오전 9:00~ 11:00 사이에 각 약물을 경구 투여하였다.

### 2) 약물투여 및 체중, 체지방 함량

- 8주 유발 후 약물투여를 시작하여 실험 종료일까지 1일 1회 경구 투여 하였다. 매주 1회 체지방 함량 및 체중 측정을 하였다. 체지방 함량은 체지방 측정 장비 (minispec LF-2)를 이용하여 측정하였다. Minispec LF90 live animal analyzer(Bruker, 독일)는 핵자기 공명원리를 이용한 NMR장비로 해부하거나 죽이지 않고 체내의 구성성분인 지방량 및 비지방류, 체액 등의 양을 신속, 정확하게 분석할 수 있다. 저울을 이용하여 마우스의 체중을 측정 후 마취제 및 진정제를 투입할 필요없이 운동성이 있는 그대로 마우스를 Minispec LF90 기기에 넣고 지방 및 체체질(lean body mass)의 비율을 측정하였다.

### 3) 미세단층촬영

- Ketamine(Huons, 1.5 ml/kg)과 xylazine(Bayer, 0.5 ml/kg)를 마우스에 복강 투여하여 마취시킨 후, 마우스의 복부 지방 조직의 평가를 위해 in-vivo Micro CT(Skyscan 1076, Bruker AXS, 독일)를 이용하여 몸체 부분을 촬영하였다. 3차원적으로 재구성하여 계산하는 SkyScan CT 분석기 version 1.11(Bruker ASX, 독일)를 이용하여 요추(腰椎)의 제 2요추골부터 제5요추골까지를 기준으로 하여 복부 피하지방 및 내장지방의 부피를 측정하였다.

### 4) 부검 및 혈액생화학

- 8주 약물 투여 후 sacrifice 시켜 부위별 체지방 및 혈액생화학 지표를 분석하였다. 혈액학 검사를 위하여 부검일에 마우스의 복대정맥에서 1 ml을 채혈하여 혈액 항응고제 EDTA-2K를 사용하여 혈액의 응고를 방지하였다. 혈액을 원심분리기를 이용하여 혈장을 분리한 후 혈장 내의 생화학적 성상을 혈액생화학자동분석장치 (20i, KoneLab)를 사용하여 측정하였다.

- 부위별 지방은 epididymal fat, subcutaneous fat, retroperitoneal fat으로 나누었고 Liver를 적출하였다. 혈액 생화학 지표는 지질관련 지표를 포함하여 일반적인 지표들을 분석하였다.

5) 간의 병리조직 검사

- 상기 마우스의 간을 적출하여 10% 중성완충포르말린(10% neutral buffered formalin, Sigma, HT50-1-640)에 24시간 이상 고정하였다. 고정된 조직은 자동조직처리기(Vacuum tissue processor ASP300, Leica)로 처리한 후, 포매기 (Embedding center EG1150H, Leica)로 파라핀 블럭을 만들었다. 파라핀 블럭은 절편기(Microtome RM2145, Leica)로 4um 두께로 절편한 후, 자동염색기(Autostainer XL, Leica)로 H&E 염색을 실시하였다. 염색된 조직표본은 광학현미경 (Axioskop 2, Zeiss)로 검경하였다.

⑦ 실험결과

1) 체중 변화

- 고지방식이 양성대조군 대비 흑차 DA-9307 300 mg/kg은 23.5%의 체중감소가 나타나 효능이 가장 컸으며, 발효흑차 300 mg/kg은 18.1% 감소, DA-9307 100 mg/kg은 13.2% 감소, 발효흑차 100 mg/kg은 3.9% 감소하였다.

- 또한, 투여 전후 비교 시 8주후 고지방사료식이 양성대조군의 체중은 약 10.24g 증가하였으나, DA-9307 300 mg/kg의 체중은 약 0.22 g 감소하여 대조군 대비 월등한 체중 감소 효과(23.5% 감소)를 보였다. 발효흑차 300 mg/kg의 체중은 약 1.94 g 증가하여 대조군 대비 체중 18.1%의 감소효과를 확인하였다.

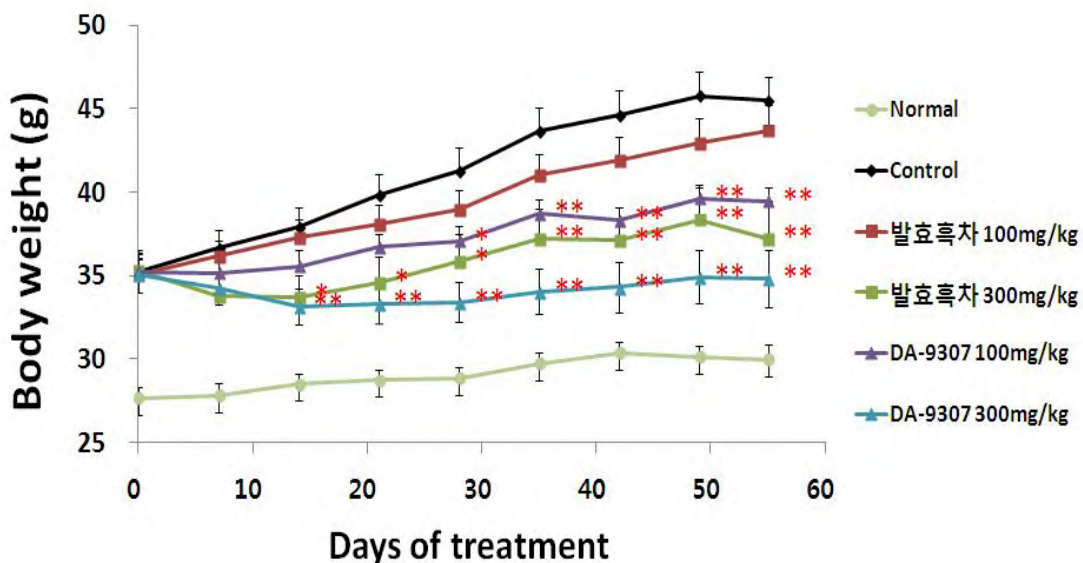


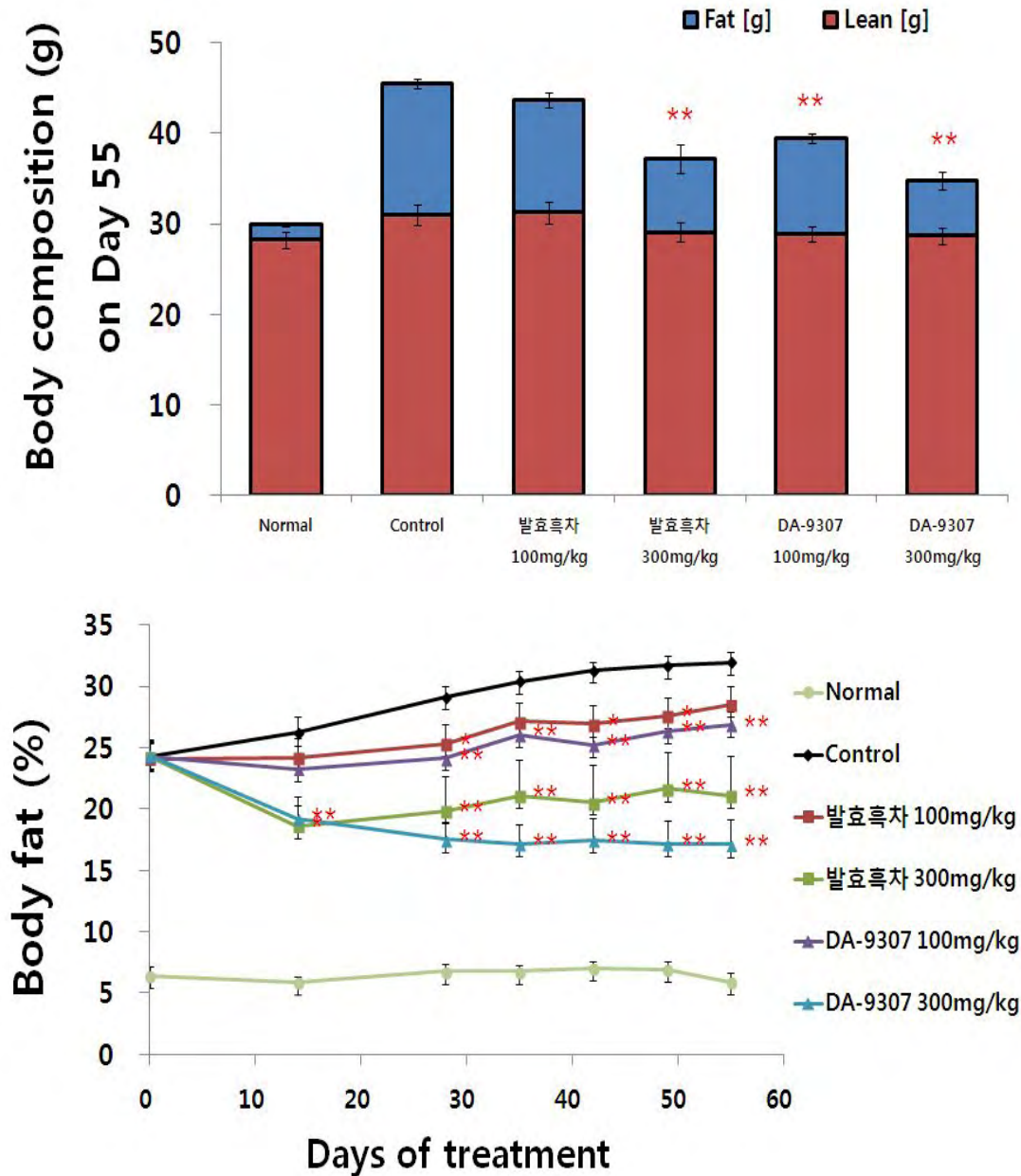
그림 3-27. 체중감소효과

실험군	초기 체중(g)	8주 후 체중(g)	초기 대비변화율(%)	대조군 대비변화율(%)
정상식이군	27.68±0.66	29.99±0.86	+8.3%	-
고지방사료식이 양성대조군	35.26±1.02	45.49±1.43	+29.1%	-
발효흑차 100 mg/kg	35.07±0.91	43.70±1.55	+24.4%	-3.9%
발효흑차 300 mg/kg	35.31±1.21	37.25±2.12	+4.1%	-18.1%
DA-9307 100 mg/kg	35.23±1.18	39.47±0.83	+12.3%	-13.2%
DA-9307 300 mg/kg	35.04±1.03	34.81±1.73	-1.0%	-23.5%

표 3-21. 체중감소 효과

2) 체지방 변화

- 체중의 변화는 제체질량(lean body mass)의 변화보다는 대부분 체지방의 변화에 의한 것을 확인하였다. 8주 후 고지방사료식이 양성대조군의 체지방은 약 7.73 % 증가하였으나, DA-9307 300 mg/kg의 체지방은 약 7.25%의 감소되어 대조군 대비 월등한 체지방감소 효과를 확인하였다. 발효흑차 300 mg/kg의 체지방은 약 3.18% 감소하여 대조군 대비 체지방 감소 효과를 확인하였다.



(\*; P<0.05, \*\*; P< 0.01 vs control)

그림 3-28. 체지방 감소효과

실험군	초기 체지방(%)	8주 후 체지방(%)	초기 대비 변화율(%P)
정상식이군	6.38±0.76	5.91±0.76	-0.47%P
고지방사료식이 양성대조군	24.24±1.39	31.97±0.80	+7.73%P
발효흑차 100mg/kg	24.12±1.23	28.50±1.56	+4.38%P
발효흑차 300mg/kg	24.27±1.26	21.08±3.25	-3.18%P
DA-9307 100mg/kg	24.31±1.13	26.85±1.13	+2.54%P
DA-9307 300mg/kg	24.34±1.11	17.10±2.09	-7.25%P

표 3-22. 체지방 감소 효과

3) 미세단층촬영(microtomography or computed tomography;Micro-CT) 분석

- Micro-CT 사진에서 8주간 고지방사료식을 섭취한 양성대조군의 복부지방 및 피하지방은 정상군 대비 많이 증가하였다. 하지만 DA-9307 300 mg/kg가 투여된 마우스의 복부지방 및 피하지방은 고지방사료를 섭취하였음에도 불구하고 정상군과 거의 비슷한 복부지방 및 피하지방을 유지하였음을 확인하였다.

- DA-9307 300 mg/kg의 복부지방 및 피하지방은 각각  $512.4 \pm 77.3 \text{ mm}^3$ ,  $125.9 \pm 86.8 \text{ mm}^3$ 로서, 고지방사료식이 양성대조군의 복부지방  $3383.4 \pm 249.8 \text{ mm}^3$ , 피하지방  $973.0 \pm 191.6 \text{ mm}^3$  대비 월등한 체지방감소 효과를 보였으며, 정상군(복부지방:  $442.2 \pm 81.9 \text{ mm}^3$ , 피하지방:  $77.9 \pm 62.3 \text{ mm}^3$ )과 거의 비슷한 체지방을 유지하였음을 확인하였다.

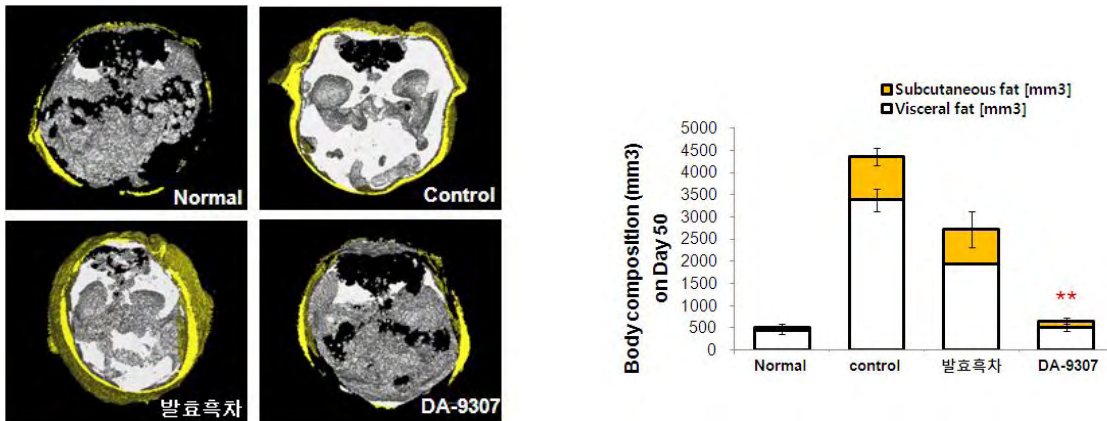


그림 3-29. Micro CT

실험군	복부지방( $\text{mm}^3$ )	피하지방( $\text{mm}^3$ )
정상식이군	$442.2 \pm 81.9$	$77.9 \pm 62.3$
고지방사료식이 양성대조군	$3383.4 \pm 249.8$	$973.0 \pm 191.6$
발효흑차 300mg/kg	$1945.3 \pm 6.7$	$780.9 \pm 403.6$
DA-9307 300mg/kg	$512.4 \pm 77.3$	$125.9 \pm 86.8$

표 3-23. Micro CT

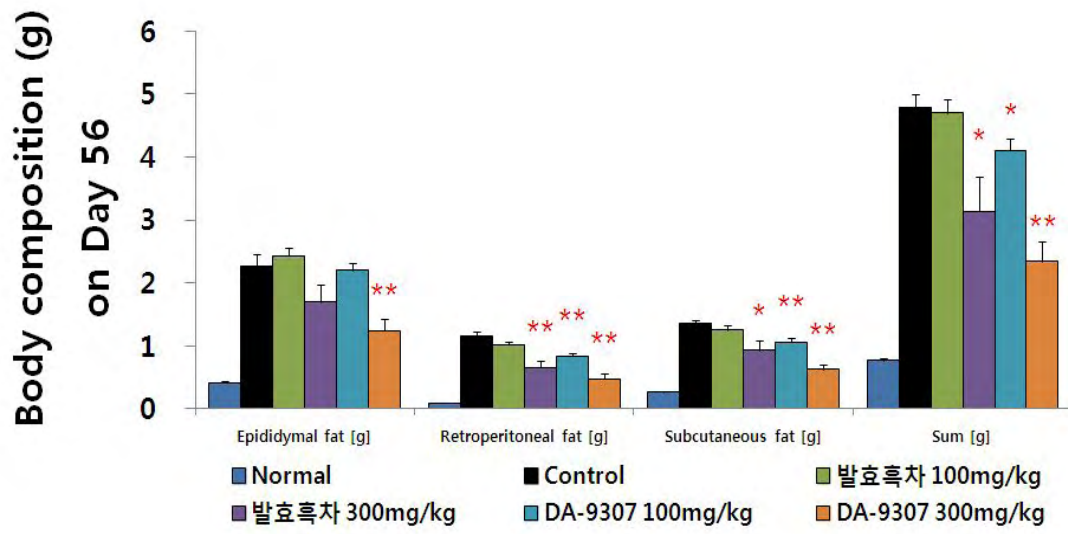
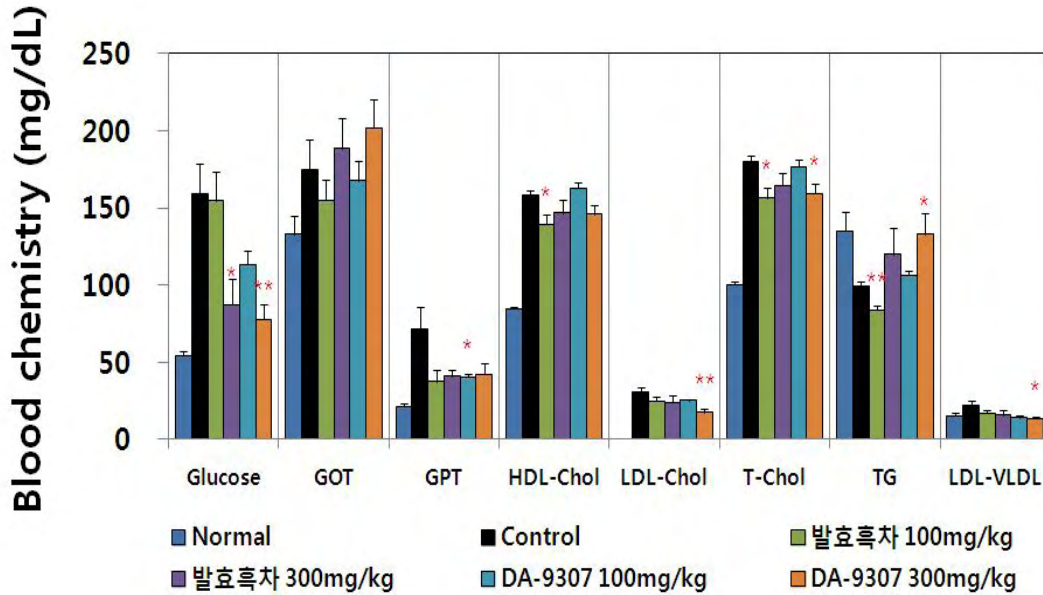


그림 3-30. 내장지방 감소 효과

4) 혈당 변화

- 8주 후 흑차 50% 에탄올 수용액 냉침 추출물 300 mg/kg의 혈당은 77.97±9.65 mg/dL로서 고지방식이에 의한 혈당을 대조군 대비 거의 반(고지방사료식이 양성대조군의 혈당: 158.96±20.06 mg/dL)으로 낮추었음을 확인하였다.



\*; p<0.01 vs control, \*\*; p<0.01 vs control

T-Chol; total cholesterol, TG; Triglyceride, HDL-cholesterol; High density lipid cholesterol, LDL-cholesterol : Low density lipid cholesterol, GOT; Glutamic-Oxaloacetic Transaminase, GPT; Glutamic-Pyruvic Transaminase, Gamma Glutamyl Transpeptidase

그림 3-31. 혈액 생화학 지표 변화

실험군	혈당 (mg/dL)
정상식이군	54.18±3.17
고지방사료식이 양성대조군	158.96±20.06
발효흑차 100mg/kg	154.56±19.33
발효흑차 300mg/kg	87.23±16.74
DA-9307 100mg/kg	113.29±8.61
DA-9307 300mg/kg	77.97±9.65

표 3-24. 혈당 변화



5) 간의 병리조직검사

- 8주 후 적출한 마우스 간의 병리조직검사 결과, DA-9307 300 mg/kg의 지방구는 고지방식이 양성대조군 대비 현저히 감소되어 지방간 개선 효과를 확인하였다.

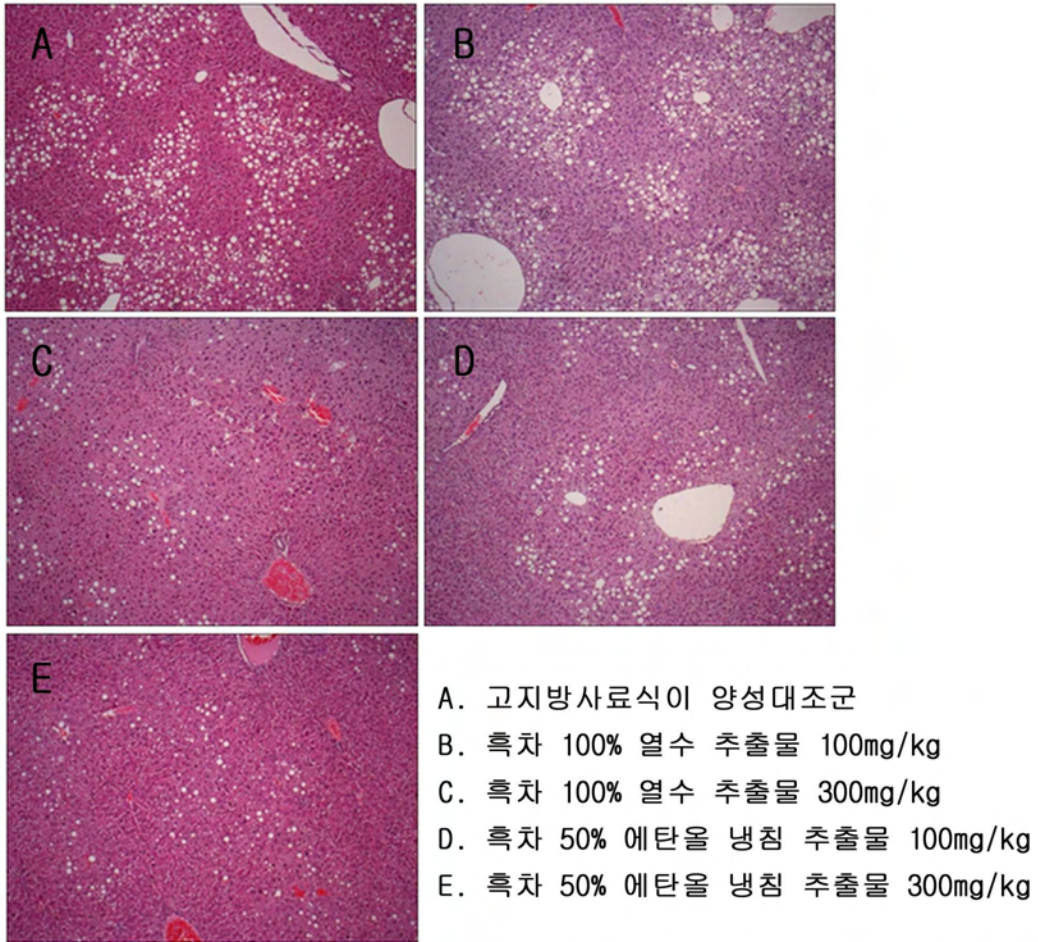


그림 3-32. 간의 지방구 변화

5) Food intake

- 8주의 식이 섭취량 분석결과 발효흑차 및 DA-9307은 섭취량의 차이가 없었다. 즉, 섭취량의 조절 없이 체중 및 체지방의 감소가 확인되었다.

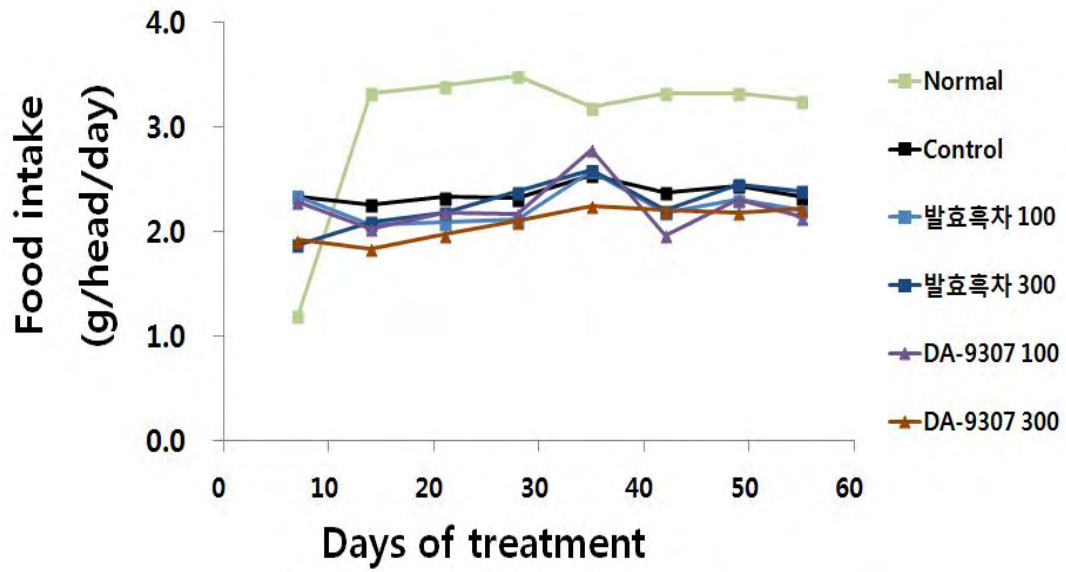


그림 3-33. 식이 섭취량

(나) DA-9307(흑차 50% 에탄올 수용액 냉침 추출물)과 흑차가열(흑차 50% 에탄올 수용액 가열 추출물)의 High fat diet-induced obese mouse model에서의 항비만 효능평가

① 시험물질

- 1) 일반사료: Chaw diet (퓨리나)
- 2) 고지방사료: 60% kcal high-fat diet (D12492), Research diet
- 3) 흑차가열 (흑차 50% 에탄올 수용액 가열 추출물)
- 4) DA-9307 (흑차 50% 에탄올 수용액 냉침 추출물)

② 실험동물

- 1) C57BL/6 mouse, 3주령

③ 실험장비

- 1) Minispec LF-2 (Bruker)

④ 실험환경

- 1) 온도범위: 22~24℃
- 2) 상대습도범위: 60~80%
- 3) 조명시간 및 조도: 12시간 점등 (조명시간: 08:00 ~ 20:00, 조도: 150~300 Lux)
- 4) 사육상자: 마우스용 폴리카보네이트 사육상자 (W180xD240xH130mm)
- 5) 물의 수용: 사육상자 당 1마리

⑤ 실험군

- 1) Normal(Vehicle), 3% HPMC, Chaw diet
- 2) Control: 3% HPMC, High fat diet
- 3) 흑차가열 300mg/kg, High fat diet
- 5) DA-9307 300mg/kg, High fat diet

## ⑥ 실험방법

### 1) 군분리 및 비만유발

- 흑차의 50% 에탄올 수용액 냉침 추출물과 흑차의 50% 에탄올 수용액 가열 추출물을 이용하여 고지방식이 비만모델에서 항비만 효력을 비교 측정하였다. 실험에 사용된 고지방식이 비만 마우스 모델의 제조는 다음과 같다. 3주령 수컷 C57/BL6 웅성 마우스(대한바이오링크, 한국)를 22~24℃, 습도 60~80% 상태에서 표준 식이와 물을 공급하며 1주간 순화사육한 후 고지방식이사료(Research diet, 미국)를 24주간 섭취시켰다. 각 개체의 무게를 측정하여 상위 70%를 실험동물로 선정하고 하위 30%는 탈락시켰다. 상기 선정된 상위 70%의 마우스를 각 군당 8마리씩으로 하여 체중 및 체지방을 기준으로 각 군으로 분리한 후 8주간 매일 오전 9:00~11:00 사이에 각 약물을 경구 투여하였다.

### 2) 약물투여 및 체중, 체지방 함량

- 8주 유발 후 약물투여를 시작하여 실험 종료일까지 1일 1회 경구 투여 하였다. 매주 1회 체지방 함량 및 체중 측정을 하였다. 체지방 함량은 체지방 측정 장비 (minispec LF-2)를 이용하여 측정하였다. Minispec LF90 live animal analyzer(Bruker, 독일)는 핵자기 공명원리를 이용한 NMR장비로 해부하거나 죽이지 않고 체내의 구성성분인 지방량 및 비지방류, 체액 등의 양을 신속, 정확하게 분석할 수 있다. 저울을 이용하여 마우스의 체중을 측정 후 마취제 및 진정제를 투입할 필요없이 운동성이 있는 그대로 마우스를 Minispec LF90 기기에 넣고 지방 및 체체질(lean body mass)의 비율을 측정하였다.

### 3) 미세단층촬영

- Ketamine(Huons, 1.5 ml/kg)과 xylazine(Bayer, 0.5 ml/kg)를 마우스에 복강 투여하여 마취시킨 후, 마우스의 복부 지방 조직의 평가를 위해 in-vivo Micro CT(Skyscan 1076, Bruker AXS, 독일)를 이용하여 몸체 부분을 촬영하였다. 3차원적으로 재구성하여 계산하는 SkyScan CT 분석기 version 1.11(Bruker ASX, 독일)를 이용하여 요추(腰椎)의 제 2요추골부터 제5요추골까지를 기준으로 하여 복부 피하지방 및 내장지방의 부피를 측정하였다.

### 4) 부검 및 혈액생화학

- 8주 약물 투여 후 sacrifice 시켜 부위별 체지방 및 혈액생화학 지표를 분석하였다. 혈액학 검사를 위하여 부검일에 마우스의 복대정맥에서 1 ml을 채혈하여 혈액 항응고제 EDTA-2K를 사용하여 혈액의 응고를 방지하였다. 혈액을 원심분리기를 이용하여 혈장을 분리한 후 혈장 내의 생화학적 성상을 혈액생화학자동분석장치 (20i, KoneLab)를 사용하여 측정하였다.

- 부위별 지방은 epididymal fat, subcutaneous fat, retroperitoneal fat으로 나누었고 Liver를 적출하였다. 혈액 생화학 지표는 지질관련 지표를 포함하여 일반적인 지표들을 분석하였다.

### 5) 간의 병리조직 검사

- 상기 마우스의 간을 적출하여 10% 중성완충포르말린(10% neutral buffered formalin, Sigma, HT50-1-640)에 24시간 이상 고정하였다. 고정된 조직은 자동조직처리기(Vacuum tissue processor ASP300, Leica)로 처리한 후, 포매기 (Embedding center EG1150H, Leica)로 파라핀 블럭을 만들었다. 파라핀 블럭은 절편기(Microtome RM2145, Leica)로 4um 두께로 절편한 후,

자동염색기(Autostainer XL, Leica)로 H&E 염색을 실시하였다. 염색된 조직표본은 광학현미경 (Axioskop 2, Zeiss)로 검경하였다.

⑦ 실험결과

㉔ 체중 변화

- 투여 4주 후 고지방식이 양성대조군 대비 DA-9307 300 mg/kg는 22.1%의 체중감소가 나타났으며, 흑차가열 300 mg/kg는 16.5%의 체중감소를 확인하였다. 또한, 투여 8주 후에는 DA-9307 300 mg/kg는 23.9%의 체중감소가 나타났으며, 흑차가열 300 mg/kg는 19.5%의 체중감소를 확인하였다. 즉, DA-9307이 흑차가열 보다 체중감소 효과가 크게 나타났다.
- 투여 전후 비교 시 8주후 고지방사료식이 양성대조군의 체중은 약 1.68 g 증가하였으나, DA-9307 300 mg/kg의 체중은 약 11.47 g 감소하여 대조군 대비 월등한 체중 감소 효과를 확인하였다. 흑차가열 300 mg/kg의 체중은 9.01 g 감소하여 대조군 대비 체중감소 효과를 확인하였다.

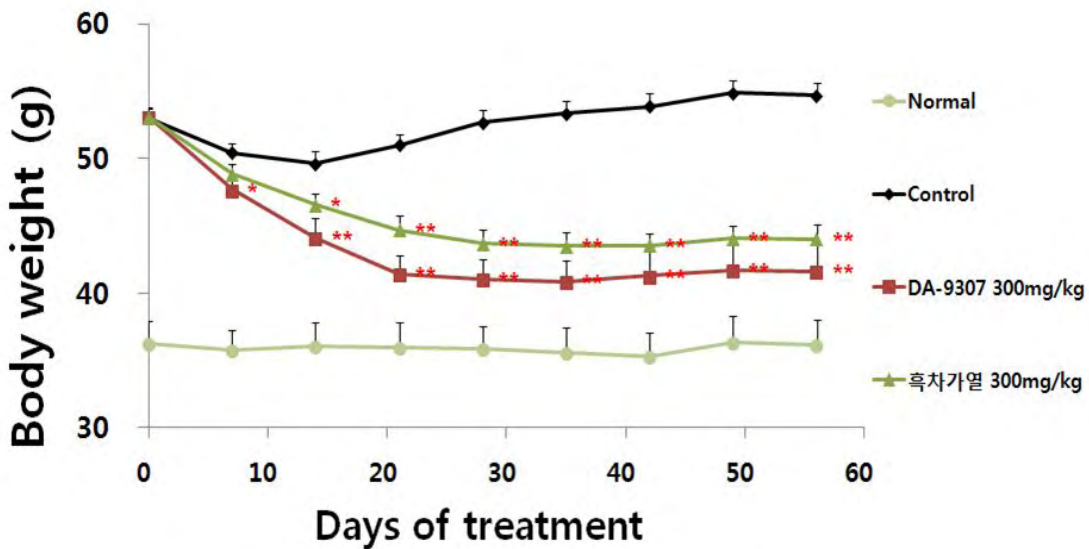


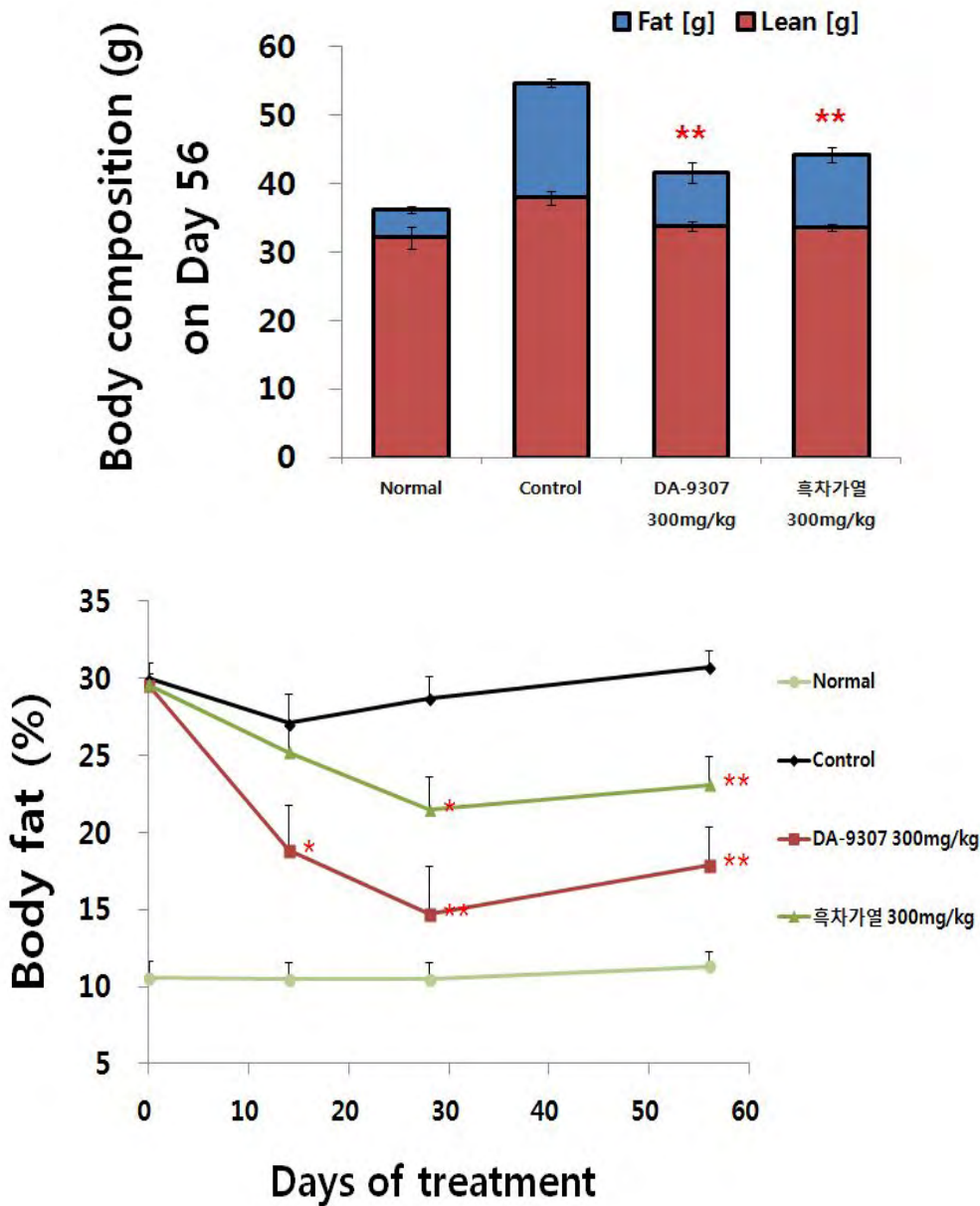
그림 3-34. 체중감소효과

실험군	초기 체중(g)	8주 후 체중(g)	초기 대비 변화율(%)	대조군 대비 변화율(%)
정상식이군	36.23±1.71	36.18±1.85	-0.23%	-
고지방사료식이 양성대조군	53.01±0.73	54.68±0.90	+2.33%	-
DA-9307 300 mg/kg	53.09±0.71	41.63±1.99	-21.84%	-23.87%
흑차가열 300 mg/kg	53.04±0.71	44.03±1.06	-17.06%	-19.48%

표 3-25. 체중감소 효과

㉔ 체지방 변화

- 8주 후 고지방사료식이 양성대조군의 체지방은 투여 전 대비 약 0.73% 증가하였으나, 흑차 50% 에탄올 수용액 냉침 추출물 300 mg/kg의 체지방은 약 11.63%의 감소되어 대조군 대비 월등한 체지방감소 효과가 확인하였다. 흑차 50% 에탄올 수용액 가열 추출물 300 mg/kg의 체지방은 약 6.48% 감소하여 대조군 대비 체지방 감소 효과를 확인하였다.



(\*; P<0.05, \*\*; P< 0.01 vs control)

그림 3-35. 체지방 감소효과

실험군	투여 전 체지방(%)	8주 후 체지방(%)	초기 대비 변화율(%P)
정상식이군	10.60±1.07	11.32±0.94	+0.72%P
고지방사료식이 양성대조군	29.98±1.08	30.71±1.14	+0.73%P
DA-9307 300 mg/kg	29.53±0.83	17.91±2.49	-11.63%P
흑차가열 300 mg/kg	29.57±0.79	23.09±1.83	-6.48%P

표 3-26. 체지방 감소 효과

㉔ 내장지방 변화

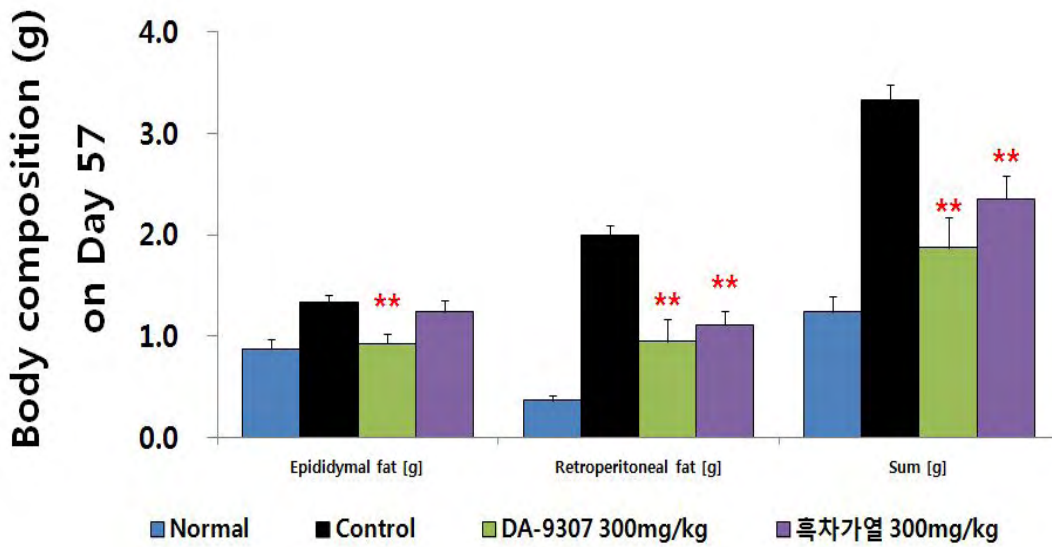
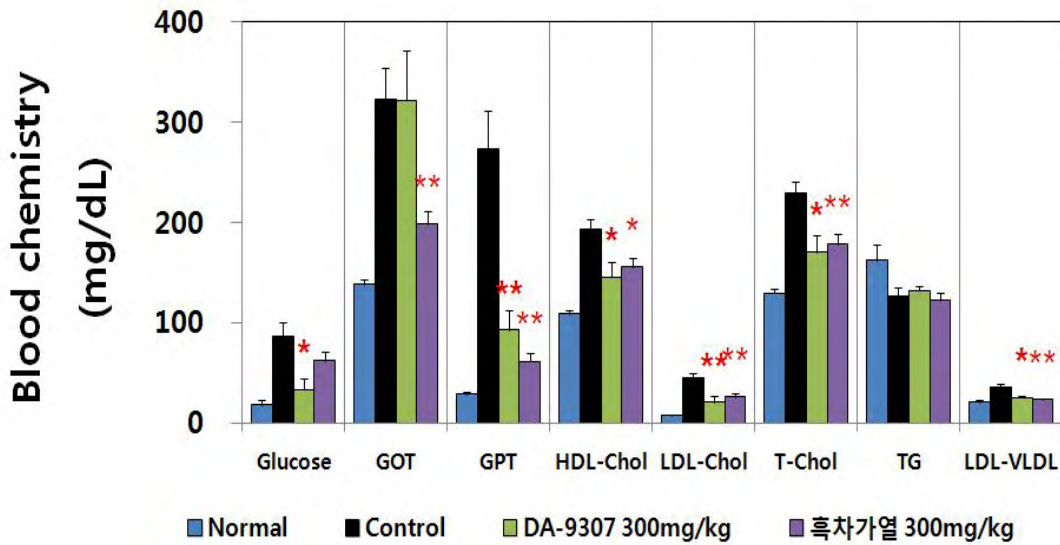


그림 3-36. 내장지방 감소 효과

㉔ 혈당 변화

- 8주 후 DA-9307 300 mg/kg의 혈당은 32.94±11.23 mg/dL로서 대조군 대비 혈당을 현저히 낮추는 것을 확인하였다(고지방사료식이 양성대조군의 혈당: 86.03±14.02 mg/dL). 흑차가열 300 mg/kg의 혈당은 61.94±8.98 mg/dL로서 대조군 대비 혈당을 낮추었으나, DA-9307의 혈당 감소 효과가 더 컸음을 확인하였다.

- 또한, DA-9307 300 mg/kg의 콜레스테롤은 170.29±16.67 mg/dL로서 대조군 대비 콜레스테롤을 현저히 낮추는 것을 확인하였다(고지방사료식이 양성대조군의 콜레스테롤: 229.16±11.44 mg/dL). 흑차가열 300 mg/kg의 콜레스테롤은 177.95±10.39 mg/dL로서 흑차 50% 에탄올 수용액 냉침 추출물과 동등한 정도로 콜레스테롤을 감소시키는 것을 확인하였다.



\*; p<0.01 vs control, \*\*; p<0.01 vs control

T-Cho; total cholesterol, TG; Triglyceride, HDL-cholesterol; High density lipid cholesterol, LDL-cholesterol : Low density lipid cholesterol, GOT; Glutamic-Oxaloacetic Transaminase, GPT; Glutamic-Pyruvic Transaminase, Gamma Glutamyl Transpeptidase

그림 3-37. 혈액 생화학 지표 변화

실험군	혈당 (mg/dL)	총 콜레스테롤 (mg/dL)
정상식이군	17.73±5.62	129.08±4.07
고지방사료식이 양성대조군	86.03±14.02	229.16±11.44
DA-9307 300 mg/kg	32.94±11.23	170.29±16.67
흑차가열 300 mg/kg	61.94±8.98	177.95±10.39

표 3-27. 혈당 및 콜레스테롤 변화



㉔ 간의 병리조직검사

- 8주 후 적출한 마우스 간의 병리조직검사 결과, DA-9307 300 mg/kg의 지방구는 고지방식이 양성대조군 대비 현저히 감소되어 지방간 개선 효과를 확인하였다.

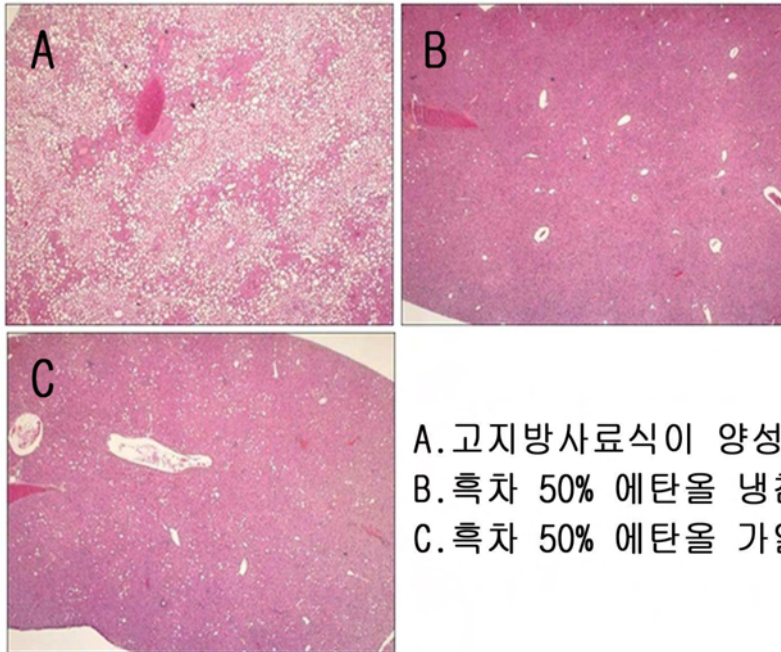


그림 3-38. 간의 지방구 변화

(5) 체지방 감소 건강기능식품 인체시험

(가) 인체적용시험 개요

**인체적용시험 계획서 요약**

<p><b>인체적용시험 제목</b></p>	<p>과체중 혹은 비만인 성인을 대상으로 흑차 추출물(DA-9307) 섭취에 따른 체중과 체지방 감소에 관한 효과와 안전성을 평가하기 위한 이중 맹검, 무작위 배정, 위약 대조, 인체적용시험</p> <p>A Randomized, Double-Blind, Placebo-controlled Study to evaluate the efficacy and safety of DA-9307 on weight or body fat reduction in overweight or obese subjects</p>
<p><b>인체적용시험 책임 연구자</b></p>	<p>가톨릭대학교 서울성모병원 가정의학과 교수 김 경수</p>
<p><b>인체적용시험 실시기관</b></p>	<p>가톨릭대학교 서울성모병원</p>
<p><b>시험기간</b></p>	<p>IRB 승인일로부터 12개월</p>
<p><b>대상 질환</b></p>	<p>과체중 혹은 비만인 성인 남녀</p>
<p><b>시험단계 및 디자인</b></p>	<p>단일기관, 무작위배정, 비공개, 위약대조 인체적용시험</p>
<p><b>인체적용시험 목적</b></p>	<p><u>일차 목적</u></p> <p>과체중 또는 비만인 성인 피험자를 대상으로 8주간의 흑차 추출물 섭취를 통한 체지방률의 감소 효과를 평가한다.</p> <p><u>이차 목적</u></p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1) 8주간의 흑차 추출물 섭취를 통한 BMI 변화를 평가한다.</li> <li>2) 8주간의 흑차 추출물 섭취를 통한 체지방량의 변화를 평가한다.</li> <li>3) 8주간의 흑차 추출물 섭취를 통한 체중의 변화를 평가한다.</li> <li>4) 8주간의 흑차 추출물 섭취를 통한 복부 및 간의 지방 변화를 평가한다.</li> <li>5) 8주간의 흑차 추출물 섭취를 통한 Waist-Hip-Ratio(WHR)를 평가한다.</li> </ol>
<p><b>인체적용시험용 제품</b></p>	<p>시험제품: 흑차 추출물(DA-9307)</p> <p>대조제품: 위약(Placebo)</p>

<p style="text-align: center;"><b>시험방법</b></p>	<p>본 연구의 목적과 연구방법 등에 대한 상세한 설명을 듣고 서면 동의한 자를 대상으로 스크리닝 검사를 실시한 후 선정/제외 기준에 적합한 자를 선정한다. 스크리닝을 통해 피험자로 선정된 자를 시험군 또는 대조군으로 무작위 배정하여 인체적용시험용제품을 8주 동안 1일 2회, 1회 2정 복용하며, 시험용 제품은 무작위배정일(1Day)부터 복용하도록 한다.</p> <p>무작위배정일(1Day)에 인체적용시험용 제품을 복용하기 전에 체성분 검사, 활력징후 및 24시간 회상법을 이용한 식이섭취량 조사를 실시한다. 또한 신체활동량 평가를 위한 신체활동측정기 사용 교육을 실시하며, 신체활동측정기를 지급한다. 신체활동측정기는 대상자의 손목, 허리 또는 발목에 벨트로 기기를 고정하도록 하며, 기기 착용 후 1주에 외래방문을 통한 신체활동측정기 반납이 이루어지며, 연구 종료 시점을 기준으로 1주 전 신체활동측정기 착용을 위한 외래방문이 이루어진다.</p> <p>인체적용시험용 제품 복용 시작 시점을 기준으로 8주에 외래방문을 통하여 활력징후, 이상반응과 병용약물 등의 안정성을 위한 검사와 체성분 검사 등의 유효성 평가 항목들을 실시한다.</p> <div style="text-align: center;"> <p style="text-align: center;"> <b>무작위배정</b> (Red text above V2)  <b>연구종료</b> (Red text above V5)        시험제품 : 흑차 추출물(DA-9307)        대조제품 : 위약(Placebo)     </p> <p style="text-align: center;">       V1                      V2                      V3                      V4                      V5        스크리닝 방문(-14D-)    1Day                      1W                      7W                      8W        동의서 취득     </p> </div>
<p><b>피험자 수</b></p>	<p>50명(시험군 25명, 대조군 25명)</p>
<p><b>선정기준</b></p>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1) 만 20 세 이상 65 세 이하의 성인 남녀</li> <li>2) BMI 가 23kg/m<sup>2</sup> 이상 30kg/m<sup>2</sup>미만의 과체중 혹은 비만인 성인 남녀</li> <li>3) 본 인체적용시험에 대하여 자세한 설명을 들은 후, 자의로 참여를 결정하고 주의사항을 준수하기로 서면 동의한 자</li> </ol>

<p><b>제외기준</b></p>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1) 활동성 급성 또는 만성 중증 질환(심장, 신장, 간, 뇌혈관, 결핵, 류마티스 질환)을 앓고 있는 자</li> <li>2) 갑상선 질환, 쿠싱증후군 등의 2차성 비만으로 진단받은 자</li> <li>3) 당뇨 또는 고혈압으로 진단받은 자</li> <li>4) 최근 5년 이내 암의 진단 및 항암 치료를 받은 자</li> <li>5) 최근 3개월 이내에 체중에 영향을 미치는 비만치료제(흡수저해제 및 항우울제, 식욕억제제 등), 이노제, 피임약, 스테로이드제제, 여성호르몬제, 한약, 비만관련 건강기능식품을 복용하였거나 복용하고 있는 경우</li> <li>6) 연구개시(인체적용시험용 제품 복용) 전 30일 이내에 타 연구에 피험자로 참여한 자</li> <li>7) 임신부 및 수유부</li> <li>8) 기타 사유로 연구책임자의 판단 시 인체적용시험 참여가 부적합하다고 판단한 자</li> </ol>
<p><b>중지 및 탈락 기준</b></p>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1) 피험자가 인체적용시험 제품의 안전성 및 효능을 평가하는데 영향을 줄 것으로 예상되는 약물을 투여한 경우</li> <li>2) 피험자가 인체적용 시험 중 인체적용시험용 제품의 복용 중단을 요구하거나, 인체적용시험에 참여 동의를 철회하는 경우</li> <li>3) 중대한 이상반응/이상약물반응이 발생한 경우</li> <li>4) 인체적용시험 중 피험자 선정/제외 기준 등 중대한 연구계획서 위반 사항이 새롭게 발견되는 경우</li> <li>5) 기타 연구책임자/담당자가 인체적용시험을 중지하여야 한다고 판단한 경우</li> </ol>
<p><b>유효성 평가변수</b></p>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1) 일차 변수: 체성분 측정기로 측정한 체지방률(Body fat ratio)</li> <li>2) 이차 변수 <ol style="list-style-type: none"> <li>① BMI(Body mass index)</li> <li>② 체성분 측정기로 측정한 체지방량(Body fat)</li> <li>③ 체중</li> <li>④ CT를 통한 복부지방 면적</li> <li>⑤ CT를 통한 지방간 평가: HU</li> <li>⑥ Waist-Hip-Ratio(WHR)</li> </ol> </li> </ol>

안전성 평가변수	이상반응, 실험실적 검사, 활력징후, 이학적 검사
통계분석방법	<p>1. 1차 유효성 평가</p> <p>기저시점 대비 8주 후의 체지방률의 변화량을 산출한 후 기술통계량(평균, 표준편차, 중앙값, 최솟값, 최댓값)을 정리하고, 자료의 정규분포 여부를 검정하여 Independent t-test 또는 Wilcoxon's rank sum test를 이용하여 두 군간 비교 검정한다. 또한 기저시점과 비교시점에서의 군 내 차이를 분석하기 위해서 paired t-test 또는 Wilcoxon's signed rank test를 이용하여 비교 분석한다.</p> <p>2. 2차 유효성 평가</p> <p>1) BMI(Body mass index), 체지방량, 체중, Waist-Hip-Ratio(WHR)</p> <p>기저시점 대비 8주 후의 BMI, 체지방량, 체중 및 WHR의 변화량을 산출한 후 기술통계량(평균, 표준편차, 중앙값, 최솟값, 최댓값)을 정리하고, 자료의 정규분포 여부를 검정하여 Independent t-test 또는 Wilcoxon's rank sum test를 이용하여 두 군간 비교 검정한다. 또한 기저시점과 비교시점에서의 군 내 차이를 분석하기 위해서 paired t-test 또는 Wilcoxon's signed rank test를 이용하여 비교 분석한다.</p> <p>2) 복부 CT를 통한 복부 지방 면적</p> <p>기저시점 대비 8주 후의 복부 지방 면적에 대하여 내장지방 면적, 피하지방 면적, 총 복부지방 면적, 내장지방/피하지방 면적비에 대해 기저시점 대비 평균 변화량에 대하여 기술통계량(평균, 표준편차, 중앙값, 최솟값, 최댓값)을 제시하고, 자료의 정규분포 여부를 검정하여 Independent t-test 또는 Wilcoxon's rank sum test를 이용하여 두 군간 비교 검정한다. 군 내 비교를 위해서는 Paired t-test 또는 Wilcoxon's signed rank test를 이용하여 분석한다.</p> <p>3) 간 CT를 통한 지방간 평가</p> <p>기저시점 대비 8주 후의 간의 HU, 비장의 HU, 간과 비장의 HU 차이(Liver minus Spleen), 간과 비장의 HU비(Ratio Between Liver and Spleen)에 대하여 기저시점 대비 평균 변화량에 대하여 기술통계량(평균, 표준편차, 중앙값, 최솟값, 최댓값)을 제시하고, 자료의 정규분포 여부를 검정하여 Independent t-test 또는 Wilcoxon's rank sum test를 이용하여 두 군간 비교 검정한다. 군 내 비교를 위해서는 Paired t-test 또는 Wilcoxon's signed rank test를 이용하여 분석한다.</p> <p>3. 안전성 평가변수에 대한 분석</p>

	<p>1) 이상반응</p> <p>시험기간 중 발생한 모든 이상반응에 대하여 시행한다. 이상반응의 발현율, 중도탈락의 원인이 된 이상반응의 발현율, 중대한 이상반응의 발현율을 처리군별로 요약하며, Chi-square test 또는 Fisher's exact test를 이용하여 검정한다. 이상반응의 발현율은 모든 이상반응에 대한 발현율 및 시험제품과 관련이 있는 이상반응의 발현율을 제시한다.</p> <p>2) 활력징후, 이학적 검사 및 실험실적 검사</p> <p>연속형 자료의 경우 기저시점 대비 평균 변화량에 대하여 기술통계량(평균, 표준편차, 중앙값, 최솟값, 최댓값)을 제시하고, 자료의 정규분포 여부를 검정하여 Independent t-test 또는 Wilcoxon's rank sum test를 이용하여 두 군간 비교 검정한다. 또한, 군 내 비교를 위해서는 Paired t-test 또는 Wilcoxon's signed rank test를 이용하여 분석한다. 범주형 자료의 경우 기술통계량(빈도, 백분율)을 제시하고, Chi-square test 또는 Fisher's exact test를 이용하여 두 군간 비교 검정한다.</p> <p>4. 식이섭취량 및 신체활동량에 대한 분석</p> <p>1) 식이섭취량 분석</p> <p>방문2(Visit2)와 종료방문(Visit5)에서 24시간 회상법을 이용하여 조사된 식이섭취량 자료를 토대로 칼로리를 계산하고 두 군간 비교 검정한다.</p> <p>2) 신체활동량 분석</p> <p>인체적용시험 기간 중 측정된 신체활동량 자료를 토대로 두 군간 비교 검정한다.</p>
--	--

## 용어정의

ADR	Adverse Drug Reaction
AE	Adverse Event
CRF	Case Report Form
ICH- GCP	International Conference On Harmonization - Good Clinical Practice
ITT	Intent-To-Treat
IRB	Institutional Review Board
PP	Per Protocol
BMI	Body mass index
WHR	Waist-Hip-Ratio

NFS	NAFLD fibrosis score
TG	Triglyceride
WBC	White Blood Cell
RBC	Red Blood Cell
ALT	Alanine Aminotransferase
AST	Aspartate Aminotransferase
HU	Hounsfield units

(6) 만성질환자용 건기식 개발계획

(가) 시장현황 및 개발전략

- 고령화로 인한 안티에이징 니즈와 active senior가 부상되고 고령화 사회가 될수록 만성질환의 유병률이 증가됨. 이에 따라 만성질환의 예방관리 및 건강유지를 위한 전문화된 제품이 필요함. 개발전략으로는 만성질환 예방효과가 있는 기능성분과 영양성분을 과학적으로 설계하여 자체개발원료로 제품의 독점성 확보하고자 함.

(나) 당뇨병환자용 건기식



그림 3-39. 당뇨병환자용 건기식

(다) 비만환자용 건기식

## 만성질환자용 건기식 (2)

“Body-fat Care”: 다이어트 건기식

**체지방 감소**  
: 흑차추출물 (DA-9307)  
체내 지방 연소  
지방 흡수 억제



↔

**Nutritional Ingredients**  
: soy protein, folate, fiber, Ca 등 21종  
영양소의 효과적인 배합

- ✓ Promotes the loss of fat
- ✓ Supplies good source of fiber
- ✓ Folates: Healthy homocystein level

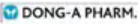


그림 3-40. 비만환자용 건기식

(라) 개발일정



그림 3-41. 건기식 개발 일정



2. 제3-2세부연구과제(건강기능식품원료의 식이성비만, 인슐린저항성 및 인지기능 개선효능 평가)

가. 식이성 비만 마우스모델을 대상으로 마 추출물의 혈당조절 효능 확인

(1) *Ob/Ob* 비만마우스 모델에서 혈당강하 효력시험

(가) 시험방법

- 비만 유발 2형 당뇨 생쥐 모델(*ob/ob* 마우스)에서 7주 동안 경구 투여함.

(나) 시험결과

- 식후 혈당의 경우 투여 2주 후부터 혈당이 감소되기 시작하였으며 100, 300mg/kg 투여 용량에서 투여 4주후부터 통계적으로 유의한 수준으로 혈당을 감소시켰음( $p < 0.05$ ). 또한 공복 혈당의 경우, 100mg/kg 투여 용량에서 투여 5주 후부터 유의한 혈당 강하 효과를 나타내었음( $p < 0.05$ ). 이러한 결과는 제 2형 *db/db* 마우스 동물모델에서의 혈당강하효과 및 Type 1 당뇨 유발 흰쥐 동물 모델에서의 혈당 강하 효과와 매우 유사한 결과임. 한편 7주간 장기 투여 후 혈중 인슐린은 100, 300mg/kg 투여군에서 각각 14, 10% 감소하였으나 유의적이지 않았음. 인슐린 민감도 지표로는 HOMA-IR(homeostasis model of insulin resistance) 지수와 Revised QUICKI(quantitative insulin sensitivity check index)를 사용하였음. HOMA-IR의 경우 100, 300mg/kg 투여군에서 각각 통계적으로 유의하거나( $p < 0.05$ ) 경계수준으로 유의하였음( $p < 0.1$ ). Revised QUICKI의 경우는 100, 300mg/kg 투여군에서 통계적으로 유의하게 증가하였음( $p < 0.05$ ). 결론적으로 비만 유발 2형 당뇨 마우스 모델에서(*ob/ob* 마우스) DA-9802은 식후 및 공복 혈당 강하 효능을 나타내었으며, 비만으로 증가하는 혈중 인슐린 수치를 낮추고 인슐린 민감도를 개선시켰음.

Groups	Dose (mg/kg)	Initial body weight (g)	Final body weight (g)
Normal	-	20.8±0.4	28.0±0.4
Control	-	35.7±1.1†	48.1±2.2†
DA-9802	100	36.0±1.3	46.6±2.2
DA-9802	300	35.2±0.8	44.2±2.1

Each values are mean±SEM, \* $p < 0.05$  vs. control, †  $p < 0.05$  vs. normal

표 3-28. *ob/ob* 쥐에서의 DA-9802의 체중 조절 효과 (7 weeks)

Groups	Dose (mg/kg)	Non-fasting blood glucose (mg/dL)			
		Week 0	Week 2	Week 4	Week 6
Normal	-	153.4±6.1	157.4±4.4	135.6±3.0	151.6±4.2
Control	-	336.2±18.4	342.2±26.6	392.8±17.0	383.8±6.5
DA-9802	100	319.5±8.4	307.7±5.7	344.7±13.5	343.0±10.5
DA-9802	300	336.7±18.9	340.3±25.6	357.0±4.3	376.4±28.2

Each values are mean±SEM, \*p<0.05 vs. control, † p<0.05 vs. normal.

표 3-29. *ob/ob* 쥐에서의 DA-9802의 혈당 조절 효과 (7 weeks)

Groups	Dose (mg/kg)	Fasting blood glucose (mg/dL)				
		Week 0	Week 1	Week 3	Week 5	Week 7
Normal	-	82.8±2.5	68.9±2.5	99.4±5.1	89.5±3.3	89.0±3.6
Control	-	83.3±8.2	152.7±23.0	237.3±8.2	251.2±6.6	278.2±14.7
DA-9802	100	84.5±11.2	154.3±32.9	235.7±21.7	227.7±7.2	231.0±7.7
	300	108.9±12.8	147.3±15.4	219.6±18.3	256.0±11.1	276.1±21.6

Each values are mean±SEM, \*p<0.05 vs. control, † p<0.05 vs. normal

표 3-30. *ob/ob* 쥐에서의 DA-9802의 공복혈당 조절 효과 (7 weeks)

Groups	D o s e (mg/kg)	F a s t i n g G l u c o s e (mg/dL)	I n s u l i n (mU/L)	HOMA-IR	R e v i s e d Q U I C K I
Normal	-		89.9±0.7	21.8±0.8	0.262±0.004
Control	-		259.5±53.8	152.5±22.2	0.212±0.004
DA-9802	100		228.1±40.5	97.2±11.9	0.222±0.008
DA-9802	300		236.0±36.1	100.5±16.4	0.221±0.008

Each values are mean±SEM, \*p<0.05 vs. control, † p<0.05 vs. normal.

표 3-31. *ob/ob* 쥐에서의 DA-9802의 인슐린 민감성 조절 효과 (7 weeks)

(2) Type 2 db/db 마우스 동물모델에서의 혈당강하 효과

(가) 시험방법

- Type 2 당뇨병 모델에서 혈당 강하 효과를 평가하기 위해 db/db 마우스 25마리를 각각 5마리씩 5개군으로 나누었음. DA-9802 45, 150, 450 mg/kg을 3% hydroxypropyl methylcellulose(HPMC)에 현탁하여 1일 1회 경구 투여한 그룹, rosiglitazone(Avandia®, GSK) 10 mg/kg 비교물질 투여군, 매체(vehicle) 대조군의 혈당을 1주일에 1회, 7주간 측정하였음. 혈당은 하룻밤 절식한 db/db 마우스 미정맥에서 채혈하여 (9~11 AM) 채혈하여 혈당 측정용 strip-operated blood glucose sensor(ONETOUCH Ultra, Inverness Medical Ltd. Stockport, UK) 기기를 이용하여 측정하였음.

(나) 시험결과

- Type 2 db/db mouse에 산약추출물(DA-9802) 45 mg/kg, 150 mg/kg 및 450 mg/kg를 1일 1회 경구투여 하여 1주일에 1회 공복상태에서 7주간 혈당을 측정하였음. 대조화합물로는 rosiglitazone 10 mg/kg을 경구 투여하였음. 그 결과 산약투여군에서는 체중변화 및 식이 섭취량의 변화가 없었고 대조약물 처리군에서만 통계적으로 유의한 수준으로 체중증가를 나타냈음 (표 5). 혈당강하에 미치는 영향은 산약을 투여한 그룹, 산약을 투약하지 않은 control 그룹 및 대조약물을 처리한 그룹 각각으로부터 혈액을 1주일부터 7주차까지 매주 한번씩 채취하여 공복 혈당을 측정하였음. 그 결과 45 mg/kg을 경구로 투여한 그룹에서는 시료처리 첫째 주부터 마지막 7주차까지 정상군과 대조하여 큰 변화를 나타내지 않았음. 그러나 150 mg/kg 용량으로 처리한 군은 6주차부터 통계적으로 유의한 수준으로 정상과 비교하여 50 mg/dl차만큼 감소하였고 7주차에 69 mg/dl만큼 감소하였음. 특히 DA-9802 고용량 450 mg/kg처리군에서는 투여 1주차부터 정상군과 비교할 때 감소하기 시작하였고, 5주차부터는 통계적으로 유의한 수준으로 감소되었고 7주차에서 정상군은 340 mg/dl인데 비하여 DA-9802 고용량처리군은 242 mg/dl로 혈당이 감소되었음. 물론 이러한 산약추출물의 혈당강하 효력은 대조화합물 rosiglitazone 10 mg/kg을 처리한 그룹만큼 혈당을 저하시키지는 않는 수준이었음. Type 2 db/db mouse에 산약을 투여한 후 혈당을 측정한 결과 투여 저용량은 6주차에, 중간용량에서는 5주차에 고용량에서는 3주차부터 통계적으로 유의한 수준으로 혈당을 감소시킴으로써, 산약추출물의 투여 용량에 따른 혈당강하 효과가 비례적으로 나타났음(표 3-33).

Group	Dose (mg/kg)	Initial Body Weight (g)	Final Body Weight (g)	Food Intake (g/day/mouse)
Control	0	39.2 ± 0.9	45.4 ± 1.7	6.0 ± 0.2
DA-9802	45	39.0 ± 0.6	42.3 ± 1.2	6.1 ± 0.2
DA-9802	150	36.4 ± 1.2	40.2 ± 2.5	5.8 ± 0.3
DA-9802	450	39.5 ± 0.8	43.5 ± 0.7	6.0 ± 0.3
Rosiglitazone	10	37.9 ± 1.1	51.0 ± 1.0*	6.5 ± 0.4

Each values are mean ± SEM. n=5 for all groups. \*P < 0.05 vs. control.

표 3-32. db/db 쥐에서의 DA-9802의 인슐린 민감성 조절 효과 (7 weeks)

Group	Dose (mg/kg)	Fasting Blood Glucose (mg/dl)					
		wk 0	wk 1	wk 3	wk 5	wk 6	wk 7
Control	0	117±20	136±27	165±21	318±12	371±19	340±15
DA-9802	45	126±23	148±15	123±04	272±29	374±37	333±33
DA-9802	150	115±19	137±17	139±11	272±18	321±10*	271±15*
DA-9802	450	112±17	113±13	124±19	240±28*	309±13*	242±23*
Rosiglitazone	10	106±10	92±14	96±10*	112±19**	179±03**	144±18**

Each values are mean ± SEM. n=5 for all groups. \*P < 0.05, \*\*P < 0.01 vs. control.

표 3-33. db/db 쥐에서의 DA-9802의 혈당 조절 효과 (7 weeks)

(다) 경구 포도당부하검사 (oral glucose tolerance test)

① 시험방법

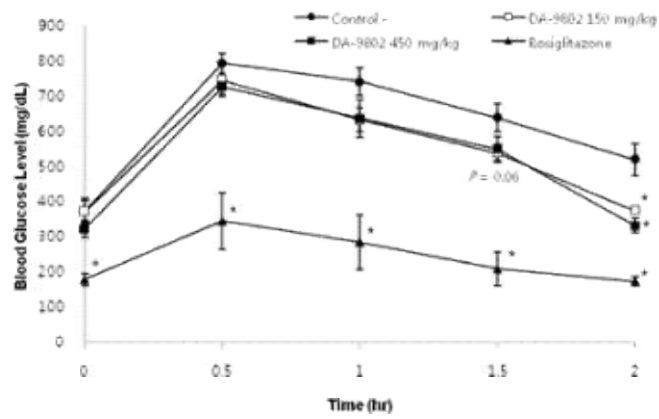
- 경구 포도당부하검사는 투여 7주차에 실시하였음. 하룻밤 절식한 db/db 마우스에 포도당(2 g/kg)과 시험물질을 동시에 경구 투여하고 당부하 전, 당부하 30분, 60분, 90분, 120분 후 미정맥에서 채혈하여 혈당을 측정 하였음. 즉 채혈된 혈당 측정용 strip-operated blood glucose sensor(ONETOUCH Ultra, Inverness Medical Ltd. Stockport, UK) 기기를 이용하여 측정하였음.

② 시험결과

- 경구 포도당 검사는 투여 7주차에 하룻밤 절식한 db/db mice에 포도당과 시험물질을 경구 투여하고 당부하 전, 당부하 30분, 60분, 90 분 및 120 분 후 미정맥에서 채혈하여 혈당을 측정 하였음. 그 결과 대조화합물 rosiglitazone 10 mg/kg, 산약추출물 150 mg/kg와 450 mg/kg를 투여하고 동시에 glucose 2 g/kg를 경구 투여한 두 그룹에서는 모두 투여 30분 후에 혈당이 가장 높았고, 그 이후 120분까지 혈당이 서서히 감소하였다(그림 3-42). 당부하에 따른 혈당값의 변화는 정상군과 비슷한 경향을 나타냈고 단지 1.5시간에 통계적으로 의미 있는 수준에서 급격히 감소되었음. 그러나 대조화합물인 rosiglitazone 은 0.5 시간 후부터 정상군에 비하여 내당능 효능을 나타냈고 시간에 따른 경향이 완만한 형태로 감소하였음. 또한 1.5시간까지는 혈당증가율이 산약 투여 용량과는 차이를 나타냈다. 그 이후 120분에 도달하면서 산약 투여 그룹의 혈당증가율이 낮았으며, 산약 450 mg/kg 투여 그룹보다 150 mg/kg 투여 그룹의 혈당증가율이 더 낮아 산약 투여 용량과 비례적으로 혈당이 낮아짐을 확인할 수 있었음(그림 3-42).

- Glucose tolerance test는 당뇨병 검사법 중의 하나로 당뇨, 임신성 당뇨, 당대사 이상 등을 진단하는데 사용되는 검사방법임. 즉 glucose tolerance test는 당을 섭취한 후 혈액 내 포도당 농도를 정해진 시간에 측정함으로써 간접적으로 인슐린 분비기능을 알아보는 방법임. 본 연구에서 산약과 glucose를 함께 투여한 그룹의 경우 혈당 증가량도 control 그룹에 비해 낮았고, 혈당감소량도 높아 산약이 인슐린 분비를 촉진시키는 작용이 있음을 120분까지의 calculated glucose AUC를 통하여 재확인할 수 있었음(그림 3-42).

A



B

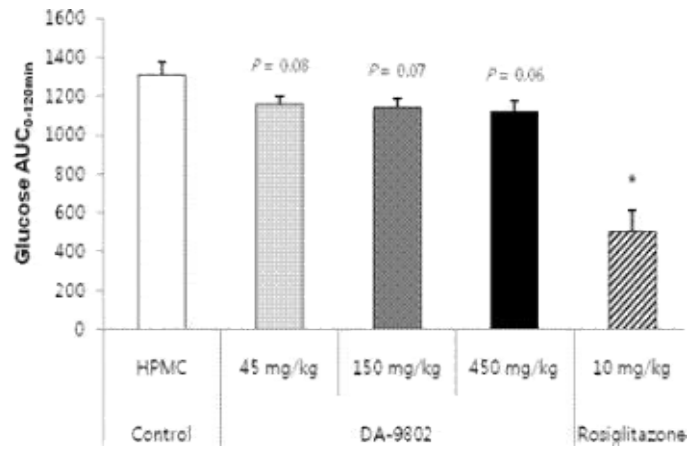


그림 3-42. *db/db* 쥐에서의 혈당 강하 효과

(A) and calculated glucose AUC<sub>0-120 min</sub> (B). The Oral glucose tolerance tests were performed by administering drugs orally (simultaneously administered with 2.0 g/kg glucose) rosiglitazone (10 mg/kg) and DA-9802 (45, 150, 450 mg/kg). Each values are mean  $\pm$  SEM. n=5 for all groups. \*P < 0.05 vs. control.

(3) C2C12세포 에서 마 추출물의 포도당 흡수촉진 효능확인

(가) 인슐린에 의해 매개되는 glucose uptake에 미치는 영향 평가

- 혈중 glucose는 촉진확산과 능동수송 기전을 통해 세포내로 이동함. Glucose의 능동수송은 세포막에 존재하는 GLUT4에 의해 세포내로 uptake되는 것이며, 이 과정은 인슐린에 의해 촉진됨. 본 연구에서는 C2C12 myoblasts cell에서 GLUT4에 의한 glucose uptake값을 측정하기 위해, 촉진확산과 능동수송 기전에 의한 total glucose uptake값에서 촉진확산에 의한 glucose uptake값(GLUT4 억제제, cytochlasin B를 처리하여 측정)을 제하여 계산하였음.

(나) 마우스근아세포주(C2C12) 모델에서 인슐린에 의해 매개되는 glucose uptake의 time course

- C2C12 myoblasts cell에서 GLUT4에 의한 glucose uptake의 time course를 확인하기 위해, GLUT4에 의한 glucose uptake값을 시간대별로(5분, 10분, 30분, 90분) 측정하였음. C2C12 myoblasts cell에 인슐린을 처리했을 때, GLUT4에 의한 glucose uptake값은 인슐린을 처리하지 않았을 때보다 모든 시간대에서 유의적으로 증가하였음(5분, 36% 증가; 10분, 22% 증가; 30분, 28% 증가; 90분, 25% 증가). C2C12 myoblasts cell에서 GLUT4에 의한 glucose uptake의 time course를 살펴보면, 인슐린을 처리하지 않았을 때와 인슐린을 처리했을 때, GLUT4에 의한 glucose uptake가 시작된 후 30분까지는 그 값이 증가하였으나 30분 이후부터는 GLUT4에 의한 glucose uptake값이 더 이상 증가하지 않고 일정하게 유지되었음. 따라서 본 연구에서는 실험물질이 GLUT4에 의한 glucose uptake에 미치는 영향을 평가하기 위해, GLUT4에 의한 glucose uptake값이 증가하고 있는 시점인 10분 후에 그 값을 측정하였음.

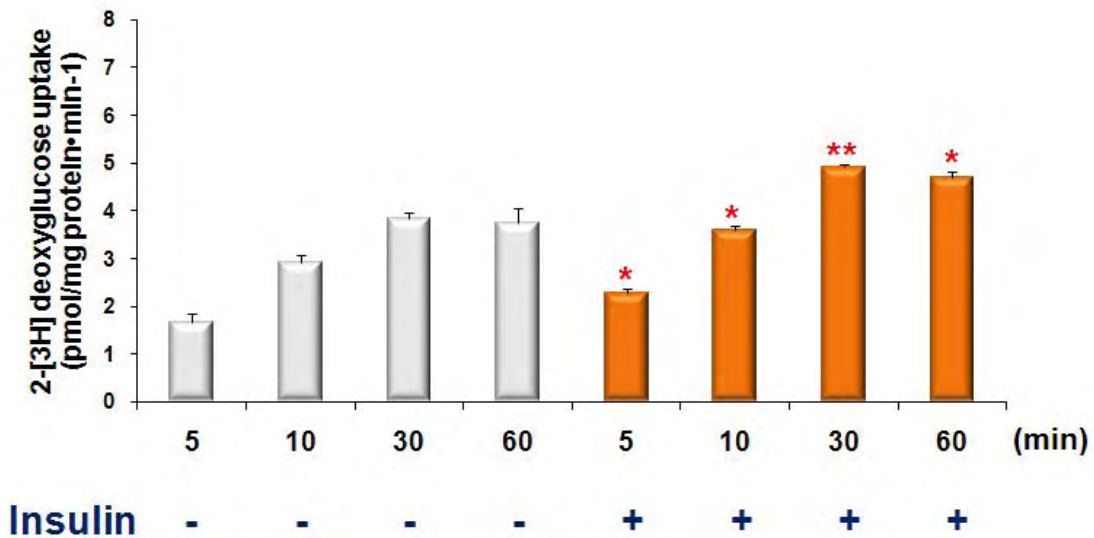


그림 3-43. C2C12 myoblasts로의 인슐린 처리 시간에 따른 2-DG 흡수

(다) 마우스근아세포주(C2C12)모델에서 마추출물(DB)이 인슐린에 의해 매개되는 glucose uptake에 미치는 영향 평가

- C2C12 myoblasts cell에 마추출물(DB)을 200  $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 1시간 동안 처리 한 결과, 대조세포(Cont)에 비해 GLUT4에 의한 insulin-stimulated glucose uptake가 유의적으로 증가하였음(43% 증가,  $p < 0.05$ ). 한편 인슐린을 처리하지 않은 상태에서도, C2C12 myoblasts cell에서 마추출물(DB)에 의한 glucose uptake가 증가하는 경향을 보였으나 통계적으로 유의한 차이는 없었음.

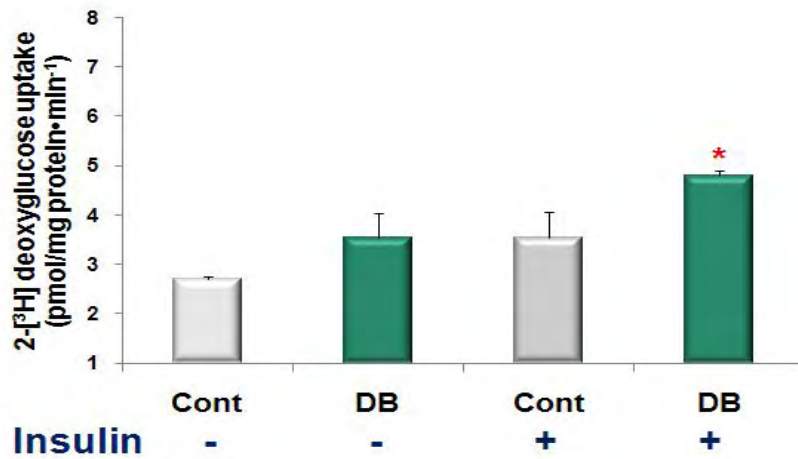


그림 3-44. 2-DG의 C2C12 myoblasts로의 흡수에 미치는 DB의 영향

(4) 추출물의 섭취에 의한 혈당조절과 관련된 생화학적 지표 및 유전자 발현변화 확인

(가) 식이성 비만 마우스의 혈당조절에 미치는 영향 평가

① 체중증가량

- 고지방식이대조군(HFD)의 최종체중은 정상식이대조군(Chow)의 최종체중에 비해 유의적으로 증가하였음(20% 증가,  $p < 0.05$ ). 한편 마추출물을 100 mg/kg BW/day 용량으로 7주동안 경구투여한 실험군(DB)의 최종체중은 고지방식이대조군(HFD)보다 감소하는 경향은 보였으나, 통계적으로 유의하지 않았음.

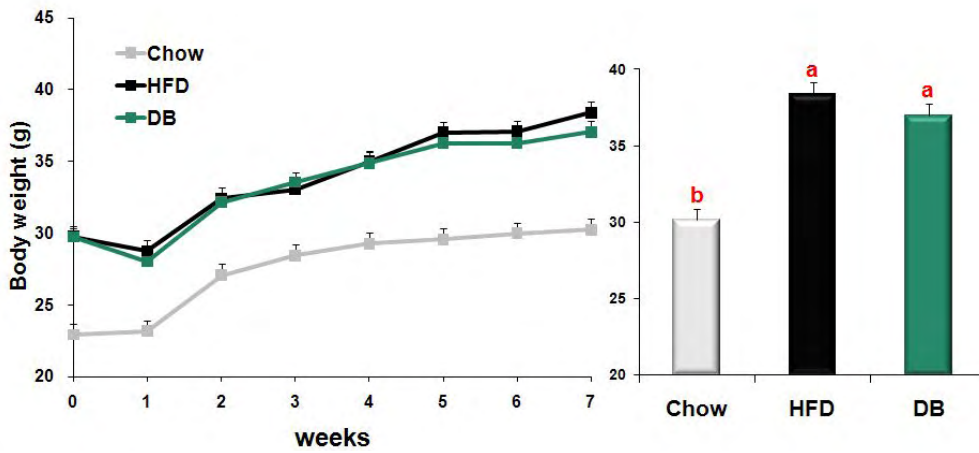


그림 3-45. DB의 체중 조절 효과 (7 weeks)



② 공복혈당 측정

- 고지방식이대조군(HFD)의 공복혈당은 정상식이군(Chow)에 비해 유의적으로 증가하였음 (26% 증가,  $p < 0.05$ ). 한편, 고지방식을 섭취한 마우스에게 마추출물을 100 mg/kg BW/day 용량으로 7주동안 경구투여 한 실험군(DB)의 공복혈당은 고지방식이대조군(HFD)에 비해 유의적으로 감소하였음(19% 감소,  $p < 0.05$ ).

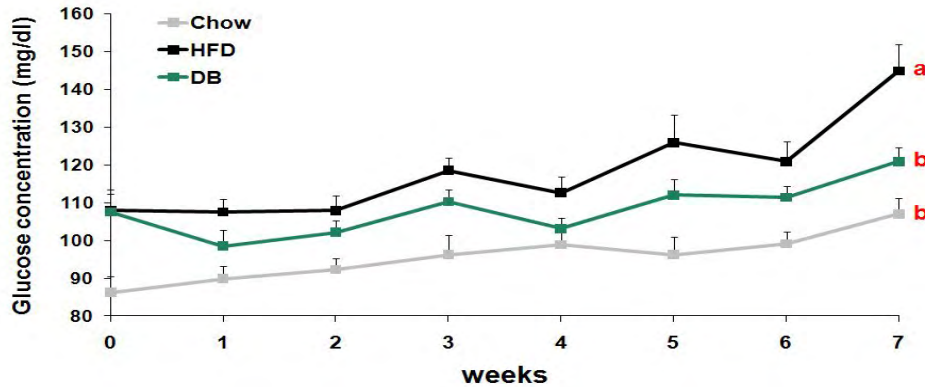


그림 3-46. DB의 공복혈당 조절 효과 (7 weeks)

③ 경구 포도당부하검사(Oral glucose tolerance test, OGTT)

- 고지방식이대조군(HFD)의 증가된 혈당농도는 정상식이대조군(Chow)에 비해 모든 시간대에서 높았음. 반면, 마추출물을 100 mg/kg BW/day 용량으로 7주동안 경구투여한 실험군(DB)의 혈당농도는 모든 시간대에서 고지방식이대조군(HFD)에 비해 낮게 유지되었음. 또한 고지방식이대조군(HFD)의 AUC(area under the curve)값에 비해 마추출물을 경구투여한 실험군(DB)의 값이 유의적으로 감소하였음(11%,  $p < 0.05$ ).

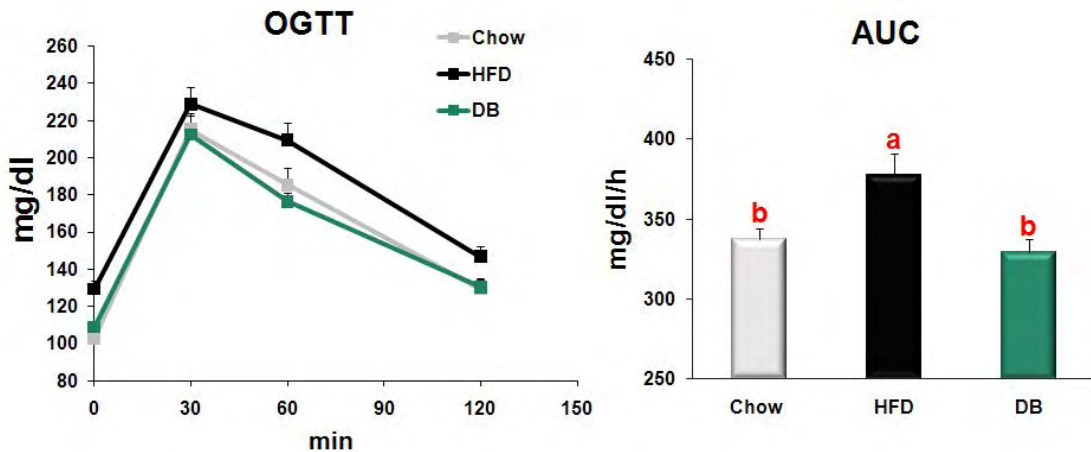


그림 3-47. Oral glucose tolerance test (OGTT) 실험 중 혈당의 변화

④ 인슐린 저항성 평가

- 마추출물을 100 mg/kg BW/day 용량으로 7주동안 경구투여한 실험군(DB)의 plasma glucose(16% 감소,  $p < 0.05$ ) 및 인슐린(50% 감소,  $p < 0.05$ ) 농도는 고지방식이대조군(HFD)에 비해 유의적으로 감소하였음. 또한 plasma glucose와 인슐린 농도를 이용하여 계산한 인슐린저항성 지수(homeostasis model of assessment - Insulin resistance, Homa-IR)에서도 마추출물을 경구투여한 실험군(DB)의 Homa-IR 값은 고지방식이대조군(HFD)에 비해 유의적으로 감소하였음(35% 감소,  $p < 0.05$ ).

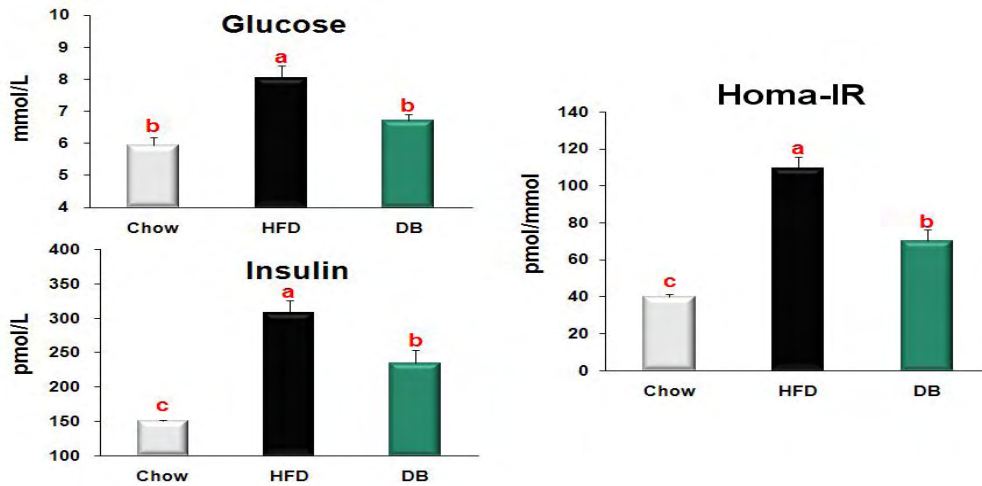


그림 3-48. Homeostasis model of assessment-insulin resistance (Homa-IR)

(나) 마추출물을 섭취한 마우스의 내장지방 및 근육조직을 대상으로 GLUT4 translocation에 관여하는 인슐린 신호전달체계 조절물질들의 발현 및 활성 평가

① 인슐린 신호전달체계 관련 molecule 분석

- 마우스의 비복근에서 RNA를 추출하여 GLUT4 translocation signaling(그림 3-10 참고)과 관련한 유전자 발현변화를 RT-PCR을 통해 분석하였음. HFD군의 비복근에서 SIRT1 mRNA 발현량은 Chow군에 비해 유의적으로 감소하였고 DB군에서는 HFD군에 비해 SIRT1 mRNA 발현량이 유의적으로 다시 증가하였음. 또한 비복근에서 Rheb mRNA 발현량은 HFD군에서 Chow군에 비해 유의적으로 증가하였으며, 이는 DB군에서 HFD군에 비해 유의적으로 감소하였음.

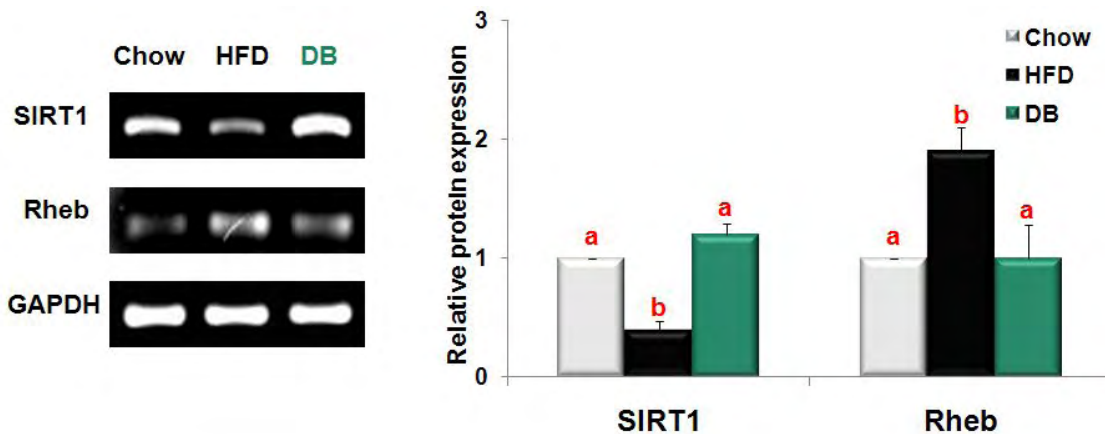


그림 3-49. Gastrocnemius muscle에서의 인슐린 신호전달체계 관련 mRNA 발현

② GLUT4 translocation에 관여하는 분자들을 단백질 수준에서 분석

- 마우스의 비복근에서 추출하여 GLUT4 translocation signaling과 관련한 분자들을 단백질 수준에서 western blot을 이용하여 분석하였음. HFD군의 비복근에서 phosphoERK 단백질량은 Chow군에 비해 유의적으로 감소하였고, DB군에서는 HFD군에 비해 phosphoERK 단백질량이 유의적으로 다시 증가하였음.

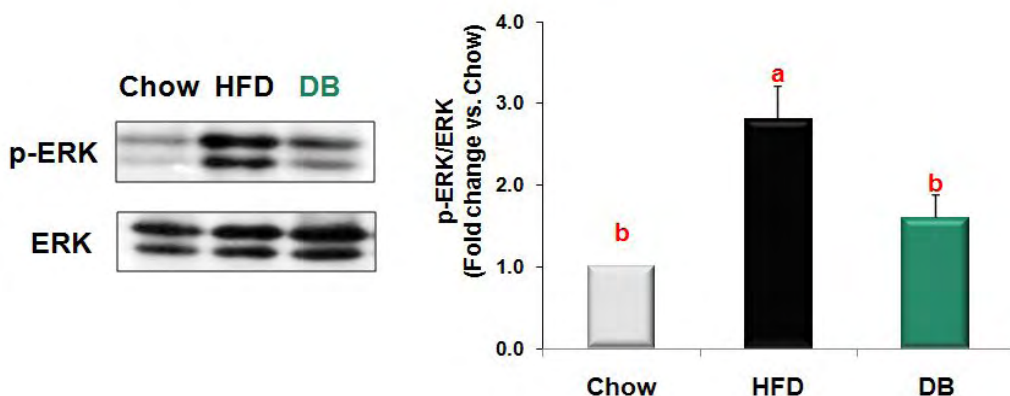


그림 3-50. Gastrocnemius muscle에서의 포도당 수송에 관련된 단백질 발현

③ 마추출물의 작용기작

- Insulin이 insulin receptor(IR)에 결합하여 insulin receptor substrate (IRS)1이 활성화되면 그 하위 molecule인 AKT가 활성화됨. 이는 세포질에 있던 GLUT4가 membrane로 translocation하게 하여 glucose를 조직내로 이동시킴. HFD군에서는 IRS1을 불활성화시켜 GLUT4 translocation을 억제하는 molecule들 (ERK, Rheb 등의)발현 및 활성이 증가함. 반면 DB군에서는 고지방식으로 인해 증가된 molecule들의 발현 및 활성이 감소하고, GLUT4 translocation을 촉진시키는 molecule(AKT, SIRT1 등)의 발현 및 활성이 증가됨.

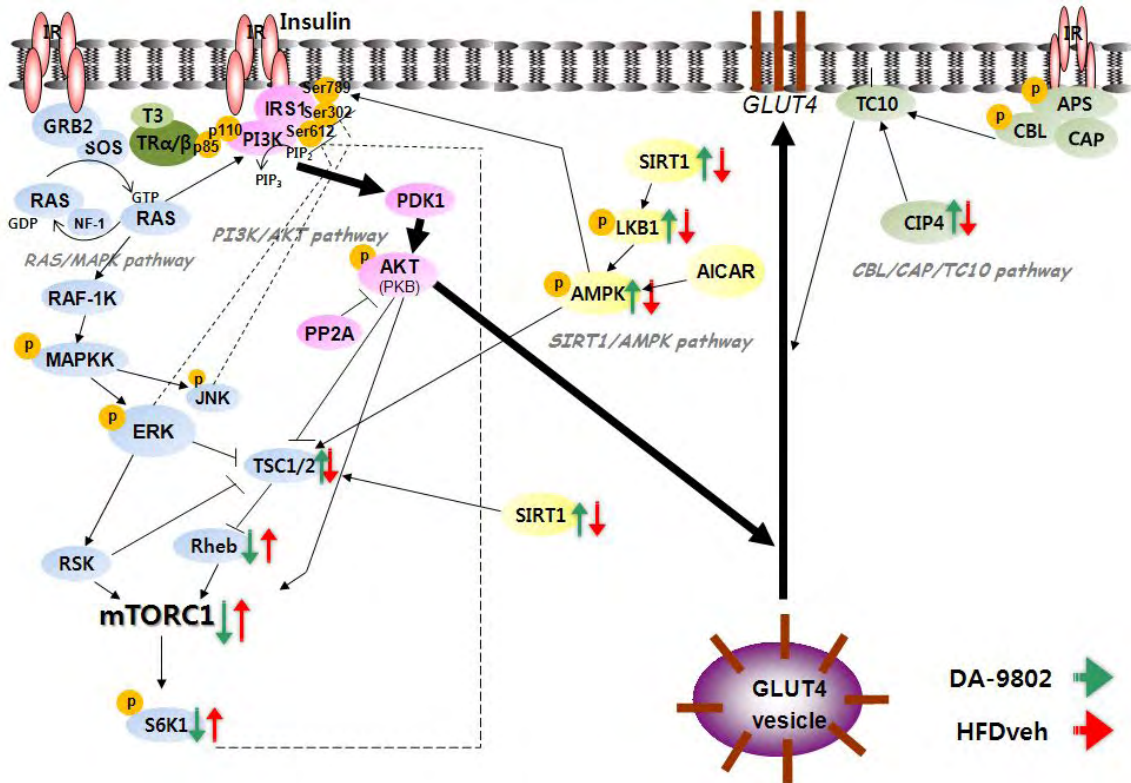


그림 3-51. Insulin에 의해 매개되는 GLUT4 translocation에 관련된 신호 전달 체계

나. 식물S줄기추출물(SSED), 식물S잎추출물(SLED) 및 식물G추출물(GED)의 인슐린저항성 개선 효능 평가

(1) 식물 추출물의 조제

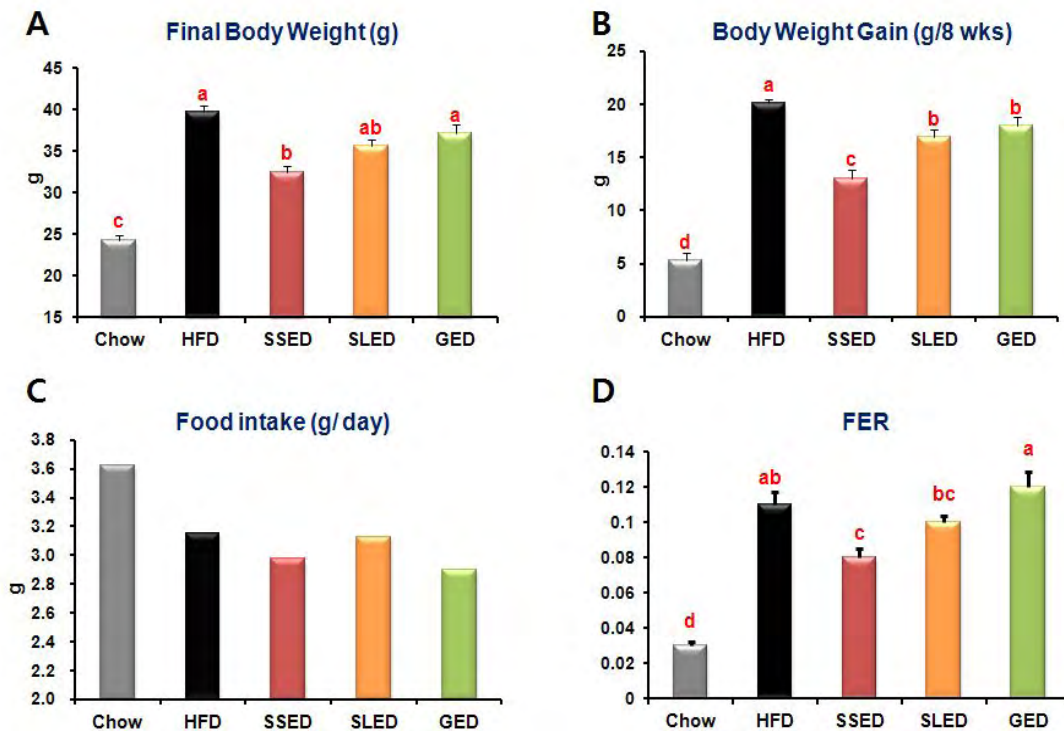
(가) 식물G 100 g을 분쇄기에서 조말로 만든 후 주정(90% 에탄올) 6 L를 넣고 환류추출기에서 3회 열수 추출하였음. 식물G추출물(GED)을 여과지로 여과한 다음 감압농축기에서 저온 농축한 후 냉동건조기를 사용하여 엑스 11.5 g (수율 11.5%)을 얻어 실험에 사용하였음.

(나) 식물S 줄기 1 kg을 분쇄기에서 조말로 만든 후 주정(90% 에탄올) 6 L를 넣고 환류추출기에서 3회 열수 추출하였음. 식물S줄기추출물(SSED)을 여과지로 여과한 다음 감압농축기에서 저온 농축한 후 냉동건조기를 사용하여 엑스 80.8 g (수율 8.08%)을 얻어 실험에 사용하였음.

(다) 식물S 잎 100g 을 분쇄기에서 조말로 만든 후 주정(90% 에탄올) 6 L를 넣고 환류추출기에서 3회 열수 추출하였음. 식물S잎추출물(SLED)을 여과지로 여과한 다음 감압농축기에서 저온 농축한 후 냉동건조기를 사용하여 엑스 18.3 g (수율 18.3%)을 얻어 실험에 사용하였음.

(2) 체중증가량 및 식이효율

- 실험식으로 8주간 마우스를 사육한 결과, 고지방식이대조군(HFD)의 누적체중증가량은 정상식이대조군(Chow)에 비해 유의적으로 증가하였음(74% 증가). 반면에, 고지방식이에 0.4% 식물S줄기추출물(SSED)을 섭취한 군과 0.4% 식물S잎추출물(SLED)을 섭취한 군의 누적체중증가량은 HFD군에 비해 각각 35% 및 16% 유의하게 감소하였음(그림. 3-52B). 또한 고지방식이에 0.4% 식물G추출물(GED)을 섭취한 군의 누적체중증가량은 HFD군보다 감소하는 경향은 보였으나, 통계적인 유의성은 관찰되지 않았음. 실험기간 동안의 총 누적체중증가량을 총 식이섭취량으로 나누어 준 식이효율(FER)은 SSED군 및 SLED군에서 HFD군에 비해 각각 27% 그리고 9% 유의적으로 감소하였으나, GED군의 경우 HFD군과 유의한 차이를 보이지 않았음(그림 3-52D). 따라서, 식물S줄기추출물(SSED)은 고지방식이 섭취에 의한 체중증가를 현저하게 예방하는 효과가 있음을 알 수 있음.

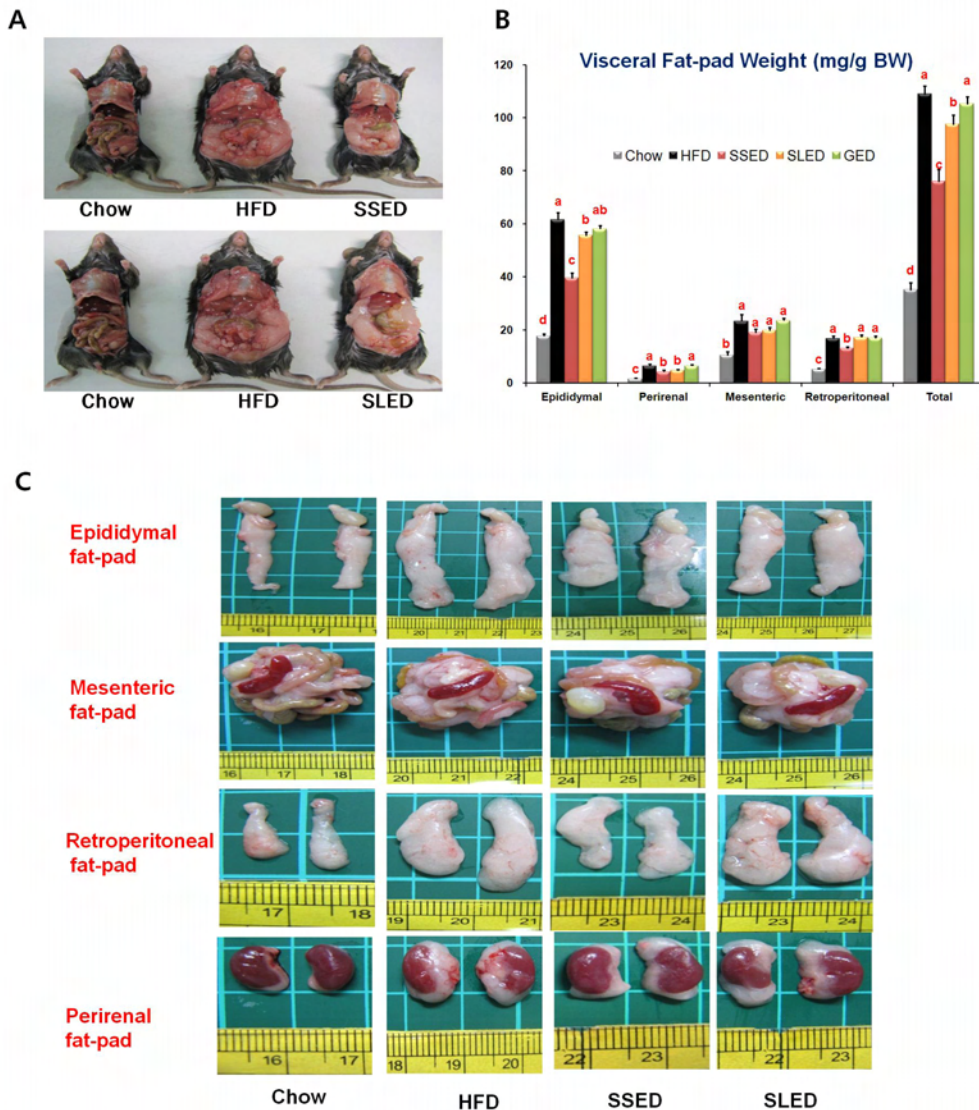


Values with different superscripts are significantly different at  $P < 0.05$ . FER (food efficiency ratio) = body weight gain for experimental period (g)/food intake for experimental period (g).

그림 3-52. HFD, SSED, SLED, GED를 먹인 쥐의 최종 몸무게, 몸무게 증가량, 식이 섭취, 식이효율

(3) 내장지방량 감소효과

- 실험식이를 8주간 섭취시킨 후 단위체중당 부고환지방(epididymal), 신장주변지방(perirenal adipose tissue), 장간막지방(mesenteric adipose tissue) 및 후복강지방(retroperitoneal adipose tissue) 무게를 측정된 결과, SSED 및 SLED군에서 HFD군에 비해 각 부위별 내장지방량이 유의적으로 감소하였음. 네가지 부위의 내장지방량을 합한 총 내장지방량 역시 SSED 및 SLED군에서 HFD군에 비해 각각 30% 및 10% 유의적으로 감소하였음. 한편 GED군의 총 내장지방량은 HFD군보다 감소하는 경향은 보였으나, 통계적인 유의성은 관찰되지 않았음. SSED군의 경우 체중 뿐만 아니라 내장지방량 감소가 가장 현저히 나타난 것으로 미루어 볼 때, 식물S줄기추출물(SSED)의 체중 감소효과는 내장지방량 감소에 기인한 것으로 추측됨.



Value are means  $\pm$  SEM of 8 mice.

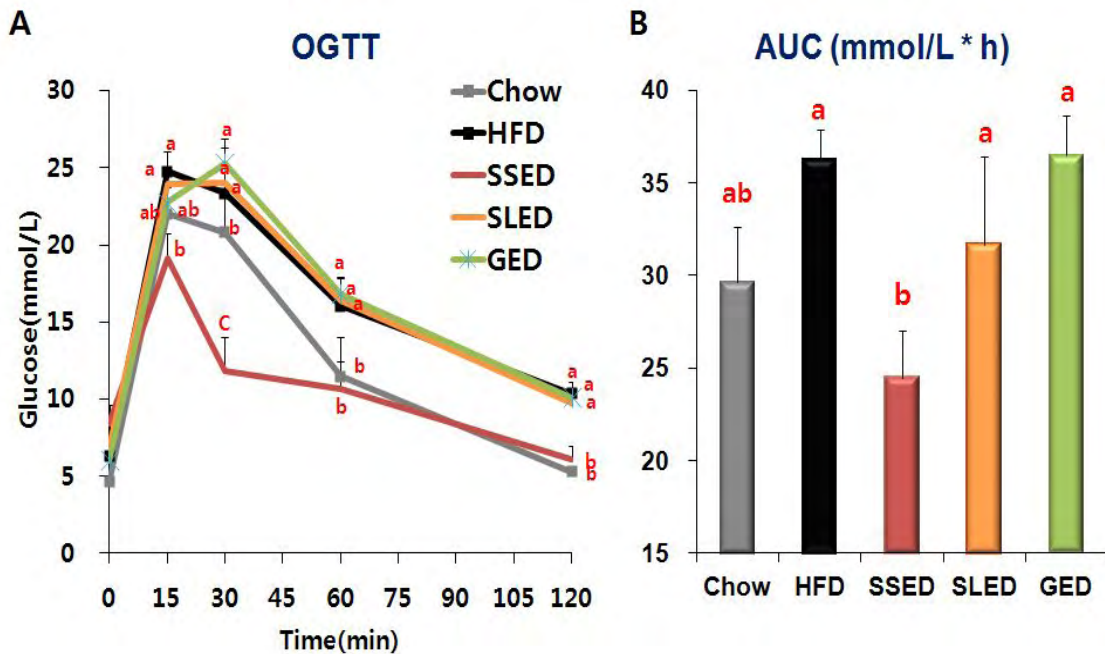
Values with different superscripts are significantly different at  $P < 0.05$ .

그림 3-53. 쥐의 해부학적 사진과 각종 내장 지방의 무게

(4) 인슐린저항성

(가) 경구포도당 부하검사(oral glucose tolerance test, OGTT)

- 실험사육 6주째에 실험동물을 16시간 공복시킨 후 2 g/kg 체중에 해당하는 d-glucose를 경구투여 하였음. 경구투여후 15분, 30분, 60분, 120분이 경과한 시점에 마우스의 꼬리정맥을 통해 혈액을 채취하여 포도당 농도를 측정된 결과, HFD군의 혈당농도는 모든 시간대에서 Chow 군에 비해 유의적으로 높게 유지된 것이 관찰되었음(그림. 3-54A). SSED군의 혈당농도는 모든 시간대에서 HFD군에 비해 유의하게 낮았고, area under the curve (AUC) 값 역시 HFD군에 비해 SSED군에서 유의하게 더 낮았음(-33%, 그림. 3-54B). 한편, SLED군과 GED군의 혈당농도 및 AUC 값은 모든 시간대에서 HFD군과 유의한 차이가 없었음(그림. 3-54A, 3-54B). 이와 같은 결과는, 식물S줄기추출물(SSED)이 고지방식이 섭취로 인한 당대사이상(인슐린저항성)을 개선하는 효과가 있음을 제시하는 것임.



Value are means ± SEM of 8 mice.

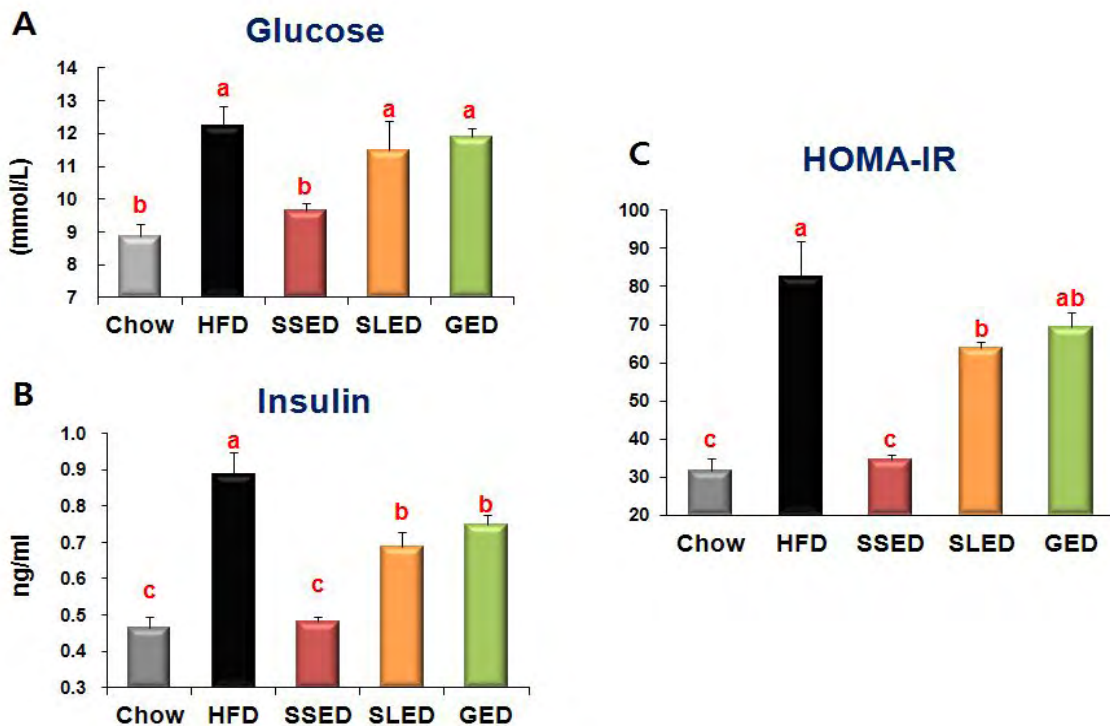
Values with different superscripts are significantly different at P<0.05.

그림 3-54. Oral glucose tolerance test (OGTT) 실험 중 혈당의 변화



(나) 공복시 혈당 및 인슐린농도

- 실험식으로 8주간 사육한 마우스를 16시간 공복시킨 후 에테르 마취하에 채혈하였음. 공복시 혈중 포도당 및 인슐린농도는 HFD군에서 Chow군에 비해 유의적으로 증가한 반면, SSED군에서는 HFD군에 비해 각각 21% 및 41% 유의적으로 감소하였음 (그림. 3-55A, 3-55B). 또한, SLED군과 GED군의 혈중 인슐린농도는 HFD군에 비해 각각 22% 및 15% 유의적으로 감소하였으며 (그림. 3-55B), 혈당농도는 HFD군에 비해 감소하는 경향은 보였으나 통계적인 유의성은 관찰되지 않았음 (그림. 3-55A). 혈중 포도당과 인슐린 농도를 이용하여 계산한 인슐린저항성 지수(homeostasis model of assessment-insulin resistance, Homa-IR)는 SSED 및 SLED군에서 HFD군에 비해 각각 52%, 그리고 22% 유의적으로 감소하였고, GED군에서는 HFD군에 비해 감소하는 경향은 보였으나, 통계적인 유의성은 관찰되지 않았음 (그림. 3-55C). 따라서, 식물S줄기추출물(SSED)은 고지방식이섭취로 인해 유도되는 인슐린저항성을 예방하는 효과가 있음을 알 수 있음.



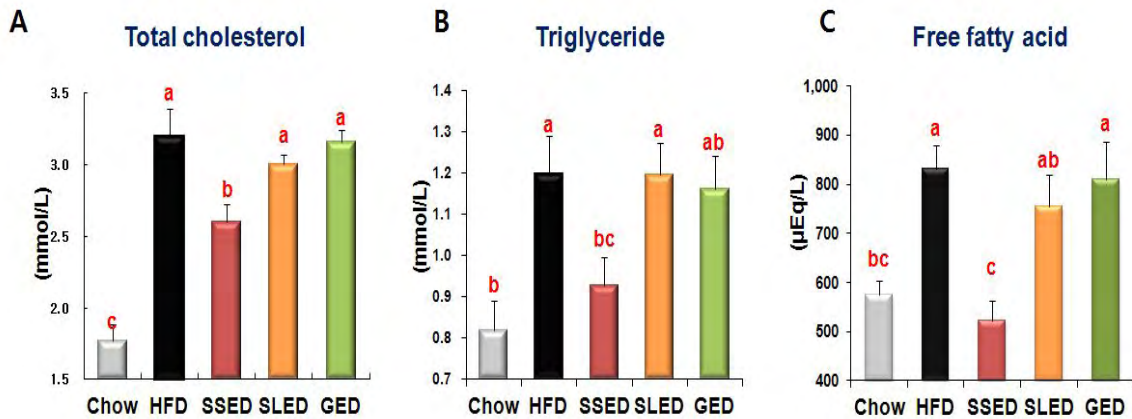
Value are means  $\pm$  SEM of 8 mice.

Values with different superscripts are significantly different at  $P < 0.05$ .

그림 14. 공복 혈당과 혈중 인슐린 농도, 그리고 HOMA-IR (10 weeks)

(5) 혈장 지질농도

- 실험식이로 8주간 사육한 마우스의 혈중 지질농도는 그림. 5-56에 제시된 바와 같음. 혈장 지질농도는 HFD군에서 Chow군에 비해 유의적으로 증가한 반면, SSED군에서는 HFD군에 비해 유의하게 감소하였음. 즉, 혈장 총콜레스테롤, 중성지방, 그리고 유리지방산 농도가 SSED군에서 HFD군에 비해 각각 18%, 22%, 그리고 37% 유의하게 감소하였음 (그림. 5-56A~5-56C). 한편, SLED 및 GED군의 혈장 지질농도는 HFD군에 비해 감소하는 경향은 보였으나, 통계적인 유의성은 관찰되지 않았음. 따라서, 식물S줄기추출물(SSED)은 고지방식이 섭취로 인해 고지혈증이 유발되는 것을 예방하는 효과가 있음을 알 수 있음.



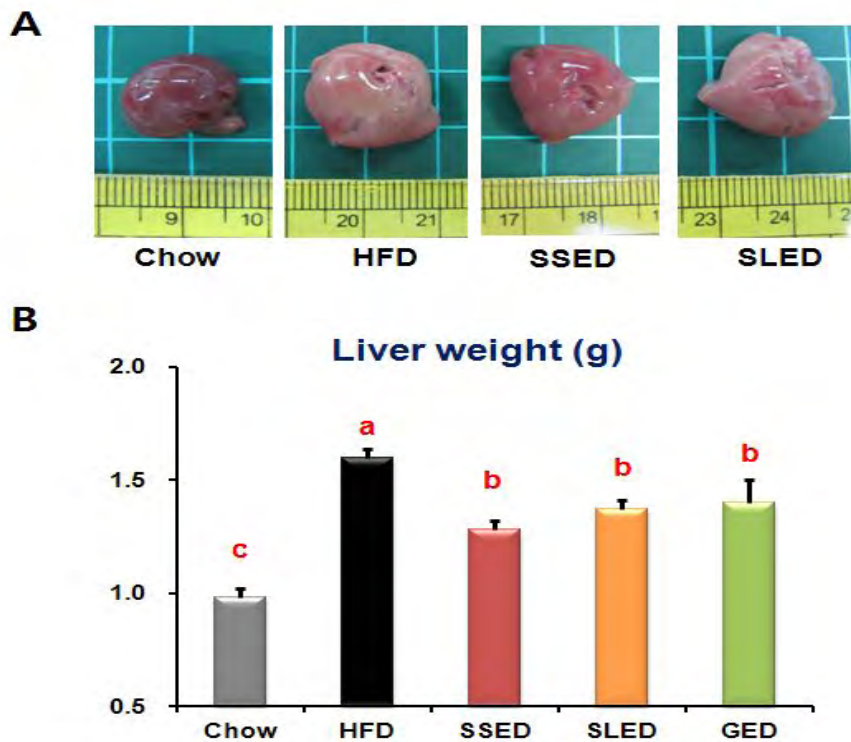
Value are means ± SEM of 8 mice.

Values with different superscripts are significantly different at P<0.05.

그림 5-56. 혈중 지질 농도 (8 weeks)

(6) 간조직 무게 및 형태학적 건강상태

- Chow, HFD, SSED, SLED, 그리고 GED군에서 적출한 간의 사진이 그림 16에 제시되어 있음. HFD군의 경우 Chow군에 비해 간조직의 크기가 더 크고 색이 옅어 육안 상으로도 지방이 많이 축적된 것을 알 수 있음. 반면에, SSED군의 경우 간의 색깔이 HFD군에 비해 붉은 빛을 띠며 크기도 더 적은 것을 확인할 수 있었음 (그림 5-57A). 한편, SLED군과 GED군(사진자료 없음)의 경우 간 크기와 색깔이 HFD군과 육안 상으로 차이가 없었음.
- 간의 절대무게는 HFD군에 비해 SSED군에서 20%, SLED군에서 14%, 그리고 GED군에서 12%로 각기 유의하게 감소하였음 (그림 5-57B). 따라서, 고지방식을 섭취시킨 마우스에게 식물S줄기추출물(SSED)을 보충 섭취시킨 결과, 고지방식으로 인한 간조직 비대 현상이 개선되었음을 알 수 있음.



Value are means  $\pm$  SEM of 8 mice.

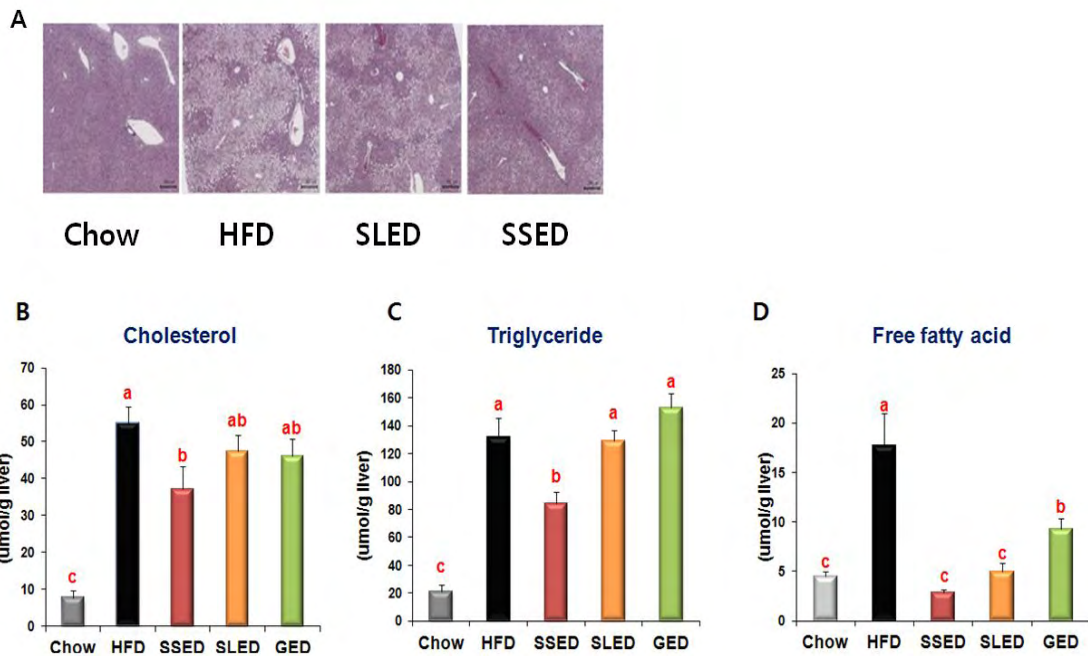
Values with different superscripts are significantly different at  $P < 0.05$ .

그림 5-57. 간의 무게

(7) 간조직의 histology 및 비알콜성지방간 관련지표

- 실험식이로 8주간 사육한 마우스에서 간조직의 histology 및 지질농도를 분석한 결과는 그림. 3-57에 제시되었음. HFD군의 경우 간의 콜레스테롤, 중성지방, 그리고 유리지방산의 농도가 Chow군에 비해 모두 유의적으로 증가하였음. 또한, 간조직을 H&E 염색하여 얻은 histological image를 통해 간세포내 지방 축적량이 HFD군에서 Chow군에 비해 현저하게 증가한 것이 확인되었음(그림. 3-58A).

- SSED군의 경우 HFD군에 비해 간세포내 지방 축적량이 현저히 감소하였고, 간의 콜레스테롤(32% 감소), 중성지방(36% 감소), 그리고 유리지방산(83% 감소) 농도가 유의적으로 감소한 것이 관찰되었음(그림. 3-58B~3-58D). 한편, SLED군 및 GED군의 경우 간조직의 유리지방산 농도가 HFD군에 비해 각각 72% 및 32% 유의적으로 감소하였으나(그림. 3-58D), 콜레스테롤 및 중성지방 농도는 HFD군과 유의한 차이를 보이지 않았음(그림. 3-58A, 3-58B). 따라서, 식물S줄기추출물(SSED)은 고지방식이 섭취로 인한 간조직의 지질축적을 완화시키고 비알콜성지방간을 예방하는 효과가 있음.



Representative liver paraffin sections stained with hematoxylin and eosin from mice fed experimental diets. Images captured at 200X magnification.

Value are means  $\pm$  SEM of 8 mice.

Values with different superscripts are significantly different at  $P < 0.05$

그림 3-58. 간 지질 프로파일과 간 내 지질 농도 (8 weeks)

(8) 결론

- 고지방식이를 섭취한 마우스모델을 대상으로 0.4% 식물S줄기추출물(SSED)을 실험식이에 첨가시켜 8주간 사육한 결과, 누적체중증가량(-35%), 총 내장지방량(-30%)이 HFD군에 비해 유의적으로 감소하였음. 또한 SSED군에서 혈중 포도당(-21%) 및 인슐린농도(-41%) 및 인슐린저항성지수(-52%)가 HFD군에 비해 각기 유의적으로 감소하여 정상군의 수준으로 유지되었음. 이외에도 혈장 총콜레스테롤(-18%), 중성지방(-22%) 및 유리지방산 농도(-37%), 그리고 간조직 콜레스테롤(-32%), 중성지방(-36%) 및 유리지방산(-83%) 농도가 SSED군에서 HFD군에 비해 모두 유의적으로 감소되었음. 따라서, 식물S줄기추출물(SSED)은 인슐린저항성을 및 비알콜성지방간을 예방하는 효과가 있는 것으로 사료됨.

다. 식물S줄기추출물(SSED)의 지방간 및 인슐린저항성 개선 작용기작 규명

- 혈중 adiponectin은 지방세포로부터 분비되는 adipokine이며 간조직의 adiponectin receptor와 결합하여 AMPK 인산화를 증가시키고, 활성화된 AMPK는 mTOR를 거쳐 S6K1의 인산화를 억제시킴. S6K1의 인산화의 감소는 궁극적으로 lipogenesis를 촉진하는 주요 전사인자인 LXR $\alpha$  및 SREBP1-C와 이들의 타겟유전자(CD36 및 aP2)의 mRNA 발현을 감소시킴(그림 3-59). AMPK는 lipogenesis를 조절할 뿐만 아니라 인슐린 신호전달체계에도 영향을 미치는데, 활성화된 AMPK는 S6K1의 인산화를 감소시킴. 이는 결과적으로 IRS-1의 tyrosine잔기의 인산화와 AKT의 인산화를 증가시킴. PI3K/AKT pathway가 촉진되면 세포질에서 세포막으로의 GLUT2 translocation이 증가하고, 결과적으로 인슐린 신호전달이 활성화됨. 한편 활성화된 AKT는 당신생합성을 조절하는 전사인자인 FOXO1의 인산화를 억제하고, 궁극적으로 당신생합성 관련 유전자인 G6Pase와 PEPCK의 mRNA 발현을 감소시킴(그림 3-59).

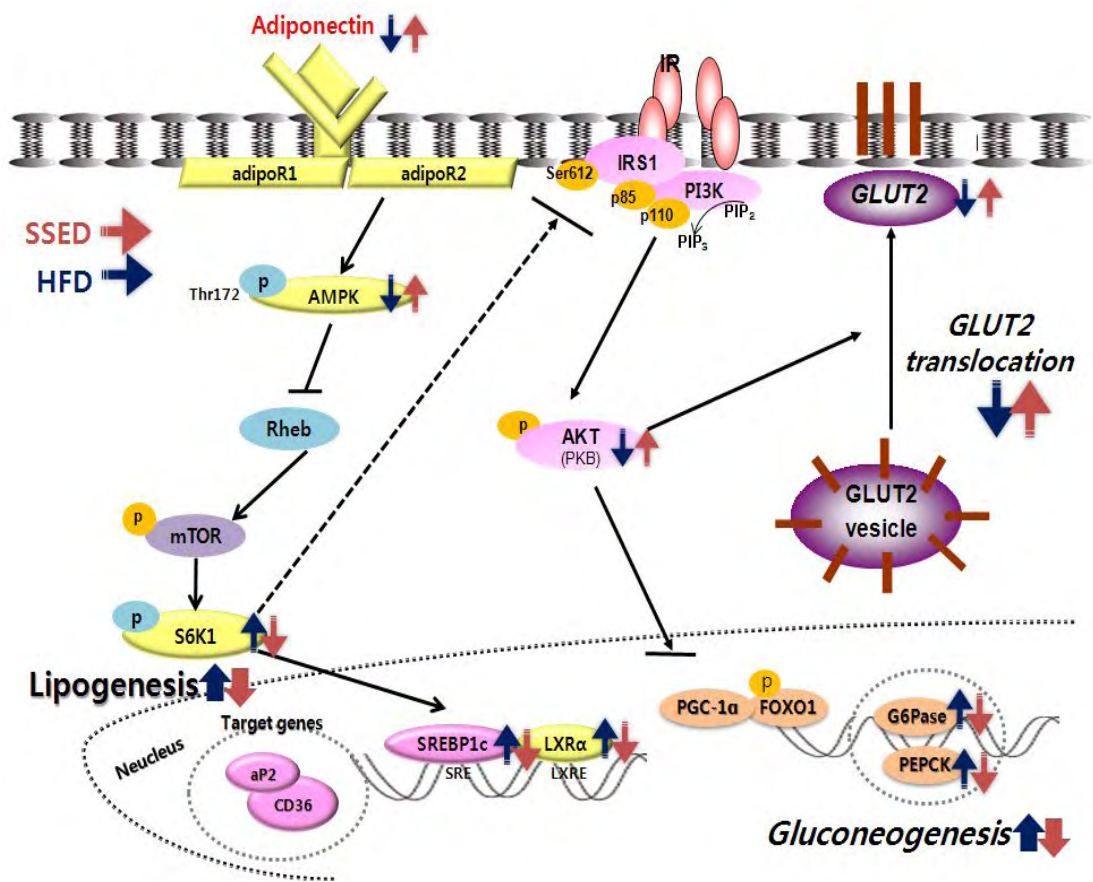
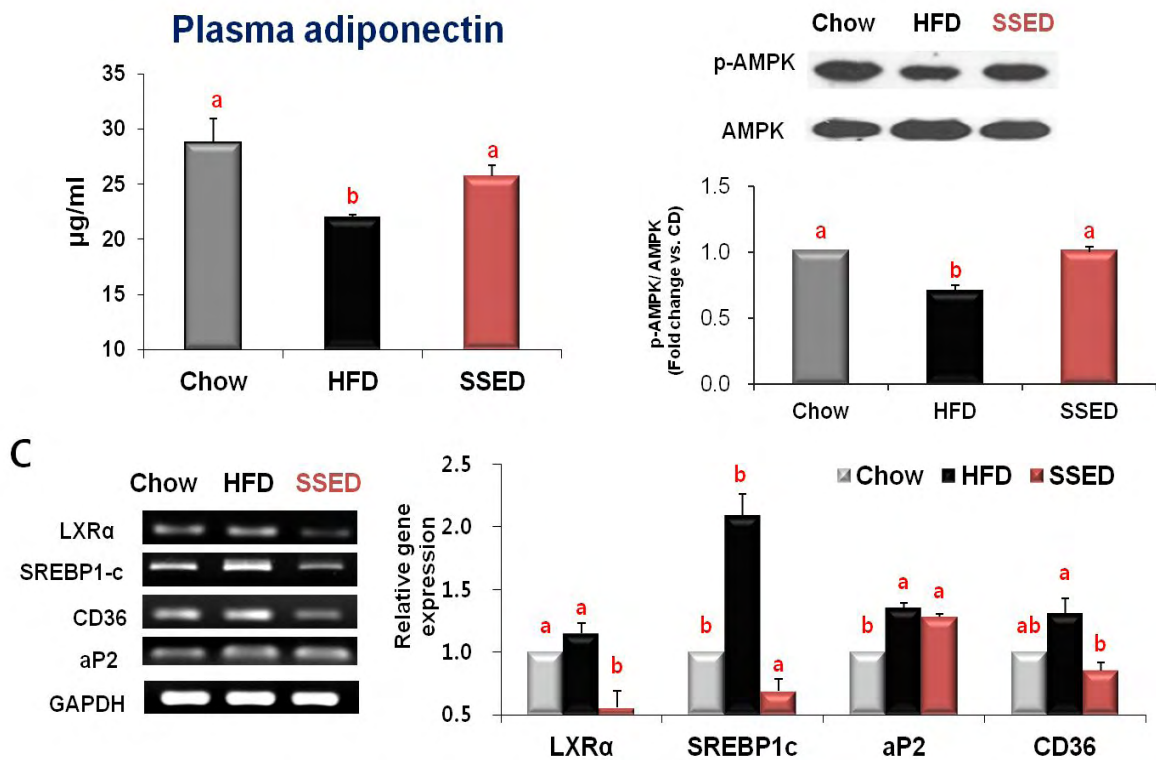


그림 3-59. SSED가 고지방식으로 유도되는 지방간을 억제하는 기작

(1) 간조직에서의 Lipogenesis 관련 유전자 발현변화

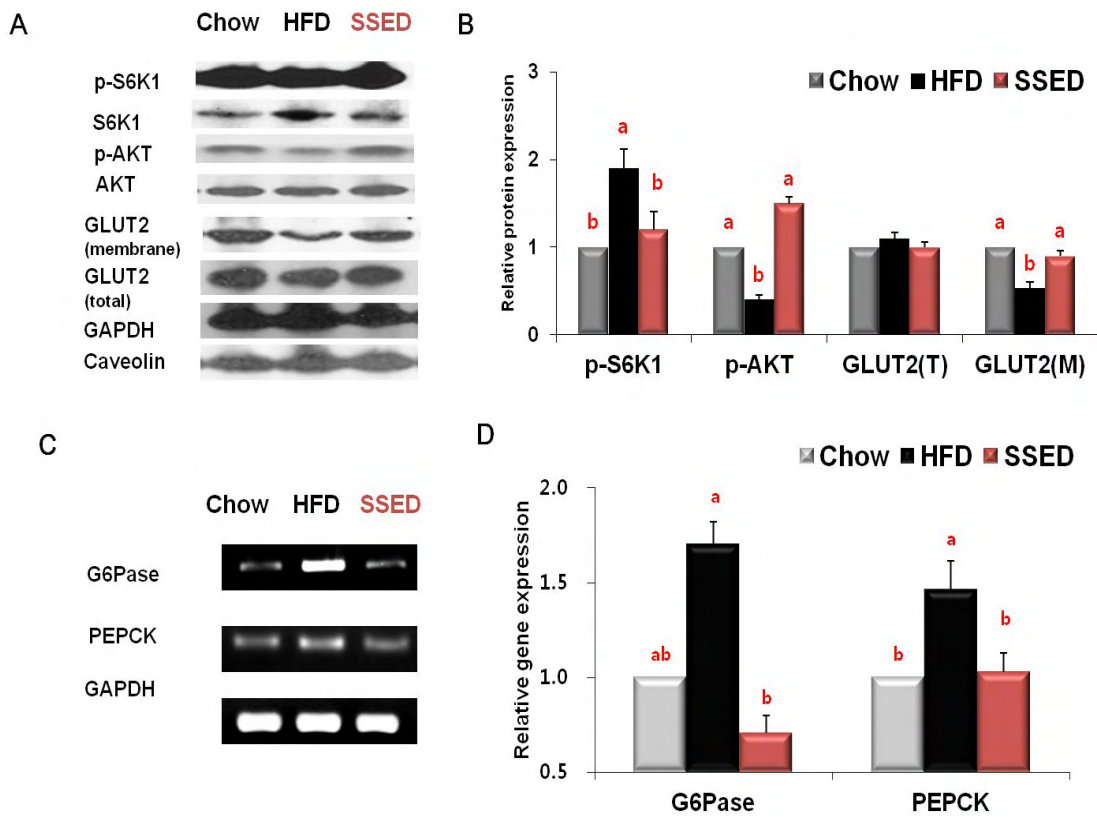
- 8주 동안 정상식이(Chow), 고지방식이(HFD), 고지방식이에 0.4% plant X를 보충한 식이(SSED)를 섭취한 마우스의 혈장을 대상으로 ELISA를 수행한 결과, 혈중 adiponectin의 농도는 HFD군에서 Chow군에 비해 유의적으로 감소한 반면, SSED군에서는 HFD군에 비해 유의적으로 증가한 것이 관찰되었음(그림 3-60A). 또한, 간조직에서 Western blot과 RT-PCR을 수행한 결과, AMPK의 인산화는 HFD군에서 Chow군에 비해 유의적으로 감소한 반면, SSED군에서는 HFD군에 비해 유의적으로 증가하였음(그림 3-60B). AMPK의 하위 신호전달 물질이면서 lipogenesis를 촉진하는 주요 핵 전사인자인 LXR $\alpha$  및 SREBP1-C, 그리고 이들의 타겟 유전자(CD36 및 aP2)의 mRNA 발현량은 HFD군에서 Chow군에 비해 유의적으로 증가한 반면, SSED군에서는 HFD군에 비해 다시 유의적으로 감소하였음(그림 3-60C). 따라서, plant X(SSED)는 고지방식을 섭취한 마우스 간조직에서 adiponectin receptor-AMPK에 의해 매개되는 신호전달체계를 통해 lipogenesis를 억제하였을 것으로 사료됨. plant X(SSED)가 고지방식을 섭취한 마우스에서 지방간 및 인슐린저항성을 개선하는 작용기작에 adiponectin receptor-AMPK signaling이 관여한다는 가설 하에, 본 연구에서는 adiponectin receptor-AMPK signaling에 관여하는 molecule들의 유전자 발현량, 단백질량, 그리고 인산화 정도를 측정하였음.



Values with different superscripts are significantly different at P<0.05.

그림 3-60. SSED가 간에서 지방합성에 관련된 유전자의 발현에 미치는 영향

(2) 간조직에서의 GLUT2 translocation 관련 신호전달물질의 발현 및 인산화 정도  
 - 마우스의 간조직에서 GLUT2 translocation에 관여하는 단백질의 인산화정도를 평가하기 위해 Western blot을 수행한 결과는 그림 3-61에 제시된 바와 같음. 본 연구결과에 따르면, SSED군에서 HFD군에 비해 GLUT2 translocation을 억제시키는 S6K1의 인산화는 유의적으로 감소한 반면, GLUT2 translocation을 촉진하는 AKT의 인산화는 유의하게 증가하였음(그림 3-61A, 3-61B). 한편 간조직에서 GLUT2의 세포내 단백질량은 Chow, HFD, SSED군간에 유의적인 차이가 없었으나, 세포막으로 이동한 GLUT2의 단백질량은 HFD군에 비해 SSED군에서 유의하게 증가하였음(그림 3-61A, 3-61B). 또한 당신생합성에 관여하는 유전자인 G6Pase와 PEPCK의 mRNA 발현은 SSED군에서 HFD군에 비해 유의적으로 감소하였음(그림 3-61C, 3-61D). 따라서, plant X(SSED)는 고지방식을 섭취한 마우스 간조직에서 인슐린신호전달 활성화에도 관여할 것으로 해석됨.



Values with different superscripts are significantly different at  $P < 0.05$ .

그림 3-61. SSED가 간에서 인슐린 신호전달에 관련된 유전자의 발현에 미치는 영향



라. 식물S줄기추출물(SSED)의 비만, 대사성 염증반응 및 인슐린저항성 개선 작용기작 규명  
 - 식이성비만이 유도되면 canonical Wnt (wnt10b)를 LRP와 frizzled receptor로 부터 분리시키고, Wnt10b 신호전달이 감소됨. Wnt10b의 신호전달 감소는 DSH의 인산화를 감소시키고, 그 결과 GSK3의 활성을 증가시키며, 후자는 APC, AXIn, GSK3,  $\beta$ -catenin complex를 분해시킴. 분해된  $\beta$ -catenin 은 핵 내로 translocation되는 양이 줄어들고 발현이 감소된  $\beta$ -catenin은 TCF, LEF와의 결합을 감소시켜 PPAR $\gamma$  및 C/EBP $\alpha$ 의 발현을 증가시키게 됨(그림 3-62).Adipocyte에서 분비된 SFRP5는 canonical Wnt (wnt10b) signaling을 억제함으로써 adipogenesis을 일으킨 반면, noncanonical Wnt (Wnt5a) signaling을 억제함으로써 염증 및 인슐린저항성을 개선함. SFRP5 발현이 증가하면 Wnt5a와 frizzled receptor의 결합이 감소되고, Wnt5a 신호전달이 감소됨. Wnt5a 신호전달 감소는 JNK의 인산화를 감소시키고, inflammatory cytokine인 TNF- $\alpha$  및 IL-6 발현을 감소시킴. 한편 JNK의 인산화 감소는 IRS-1을 활성화시키고, GLUT4 translocation을 증가시킴으로써 인슐린 신호전달체계를 촉진시킴(그림 3-62).

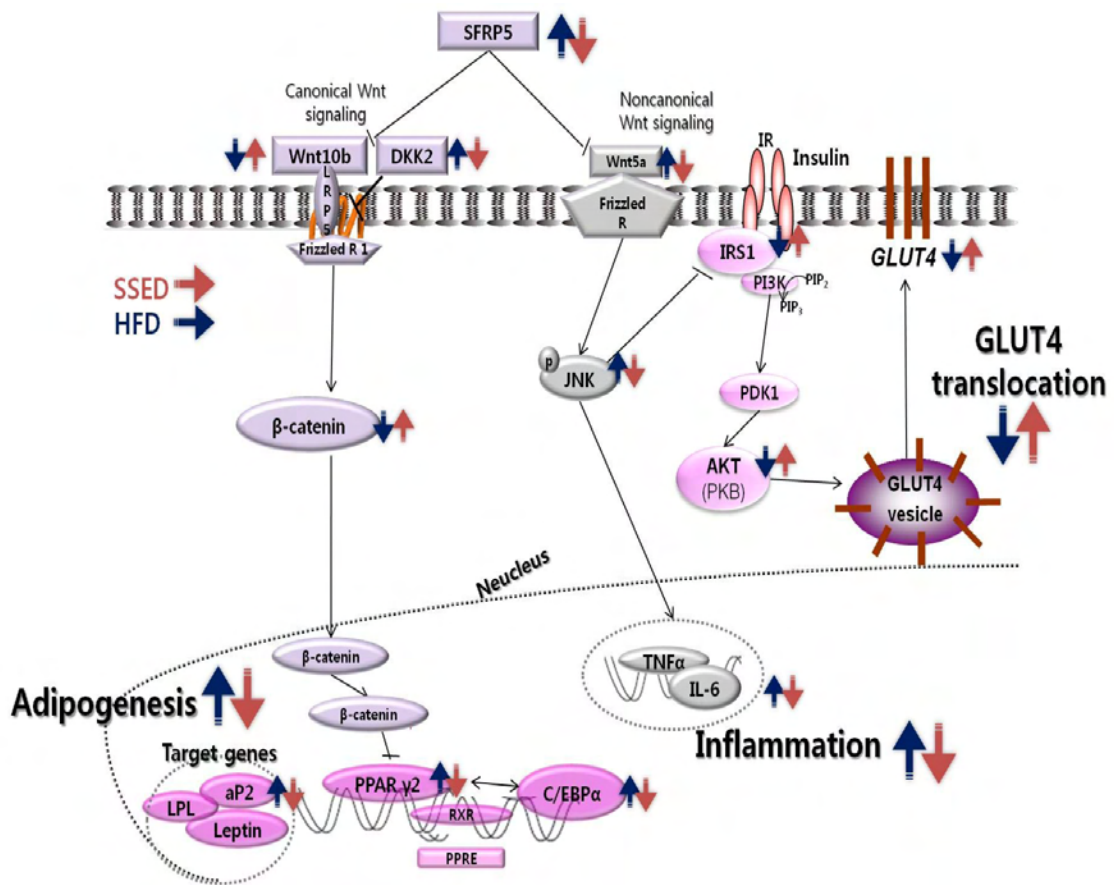
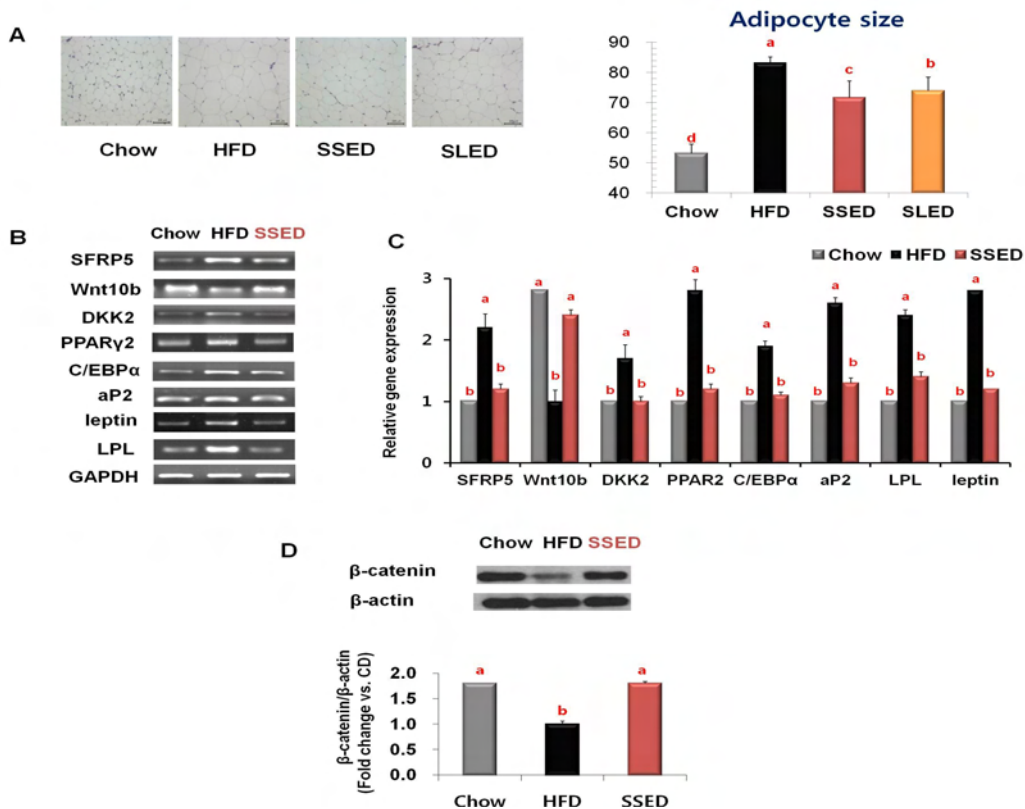


그림 3-62. SSED가 지방세포분화와 염증, 그리고 인슐린 저항성을 개선하는 기작

(1) 지방조직에서의 adipogenesis 관련 유전자 발현변화

- 8주 동안 정상식이(Chow), 고지방식이(HFD), 고지방식이에 0.4% 식물S줄기추출물을 보충한 식이(SSED), 그리고 고지방식이에 0.4% 식물S잎추출물을 보충한 식이(SLED)를 섭취한 마우스의 부고환 지방조직을 대상으로 지방세포크기 분석이 수행되었음. 그 결과, 부고환 주변 지방조직의 지방세포크기는 SSED군과 SLED군에서 HFD군에 비해 각각 유의하게 감소하였고, SSED군의 감소효과는 SLED군에 비해 탁월하였음. 이를 바탕으로 정상식이(Chow), 고지방식이(HFD), 식물S줄기추출물(SSED)군의 부고환 지방조직에서 RT-PCR 및 Western blot을 수행하여 식물S줄기추출물의 adipogenesis 조절 작용기작을 규명하였음(그림 3-63). 지방세포분화를 촉진하는 상위 신호전달물질들의 발현변화를 평가한 결과, SSED군에서 HFD군에 비해 Wnt10b 저해제인 SFRP5와 DKK2의 발현이 유의적으로 감소한 반면, Wnt10b 발현은 증가하였음. 또한 SSED군의 부고환 지방에서 HFD군에 비해  $\beta$ -catenin 단백질양이 유의적으로 증가하였음. 지방축적을 조절하는 주요 전사인자인 PPAR $\gamma$  및 C/EBP $\alpha$  와 그 타겟 유전자인 aP2, leptin, 그리고 LPL 발현이 SSED군에서 HFD군에 비해 모두 유의적으로 감소하였음(그림 3-63). 따라서 식물S줄기추출물(SSED)의 내장지방량 감소효과는 Wnt10b-mediated signaling pathway의 활성화로 인한 adipogenesis 억제현상과 관련이 있을 것으로 사료됨.

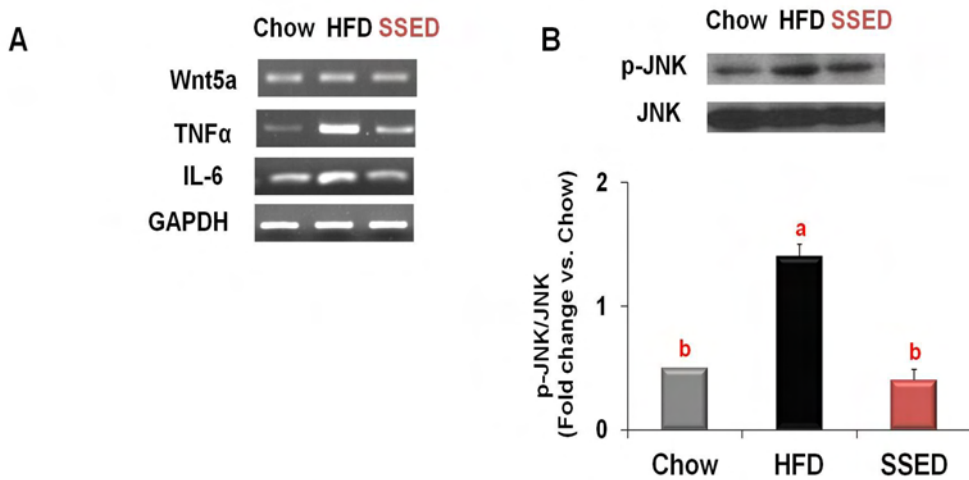


Values with different superscripts are significantly different at P<0.05.

그림 3-63. SSED가 부고환지방조직에서 지방세포분화에 관련된 유전자 발현에 미치는 영향

(2) 지방조직에서의 대사성 염증반응관련 신호전달물질의 발현 및 인산화 정도

- Adipocyte에서 분비된 SFRP5는 canonical Wnt (wnt10b) signaling을 억제함으로써 adipogenesis을 일으킨 반면, noncanonical Wnt (Wnt5a) signaling을 억제함으로써 염증 및 인슐린저항성을 개선함. 식물S줄기추출물이 대사성 염증반응을 개선하는 작용기전을 알아보기 위해 마우스의 지방조직에서 RT-PCR을 수행하여 염증반응 관련 유전자(Wnt5a, TNF $\alpha$ , IL-6, p-JNK) 발현변화를 평가하였음(그림 3-64). 본 연구결과에 따르면, SSED군에서 HFD군에 비해 Wnt5a 발현이 감소하였음. SSED군의 Wnt5a 발현감소는 JNK 인산화를 감소시켰고, proinflammatory cytokine인 TNF $\alpha$  및 IL-6의 발현 또한 감소시켰음(그림 3-64). 따라서 식물 S줄기추출물은 고지방식이를 섭취시킨 마우스의 지방조직에서 Wnt5a에 의해 경유되는 신호전달체계를 억제시켜 proinflammatory cytokines 발현을 감소시킴으로써 대사성 염증반응을 개선시켰을 것으로 사료됨.

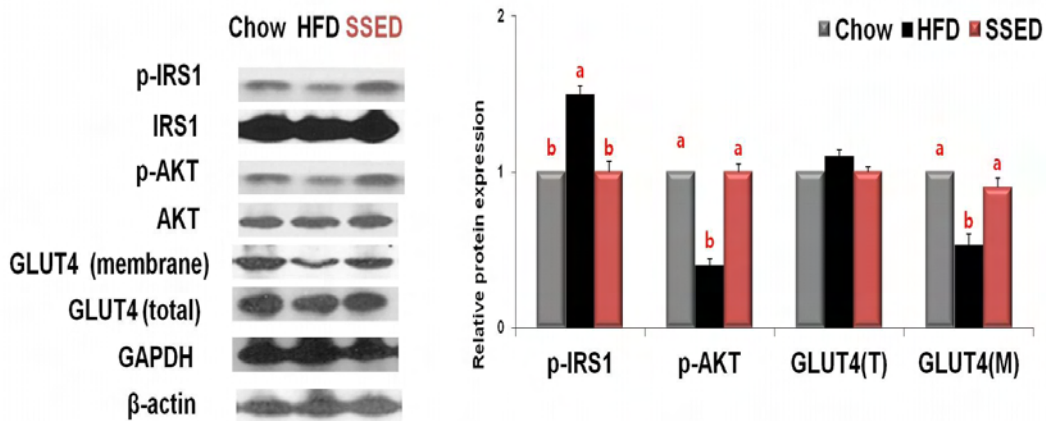


Values with different superscripts are significantly different at  $P < 0.05$

그림 3-64. SSED가 부고환지방조직에서 염증에 관련된 유전자의 발현에 미치는 영향

(3) 지방조직에서의 GLUT4 translocation 관련 신호전달물질의 발현 및 인산화 정도

- 한편 JNK의 인산화 감소는 IRS-1을 활성화시키고, GLUT4 translocation을 증가시킴. 이는 SSED군의 JNK 인산화 감소가 인슐린 신호전달체계를 활성화시킨다고 가정할 수 있음. 식물S 줄기추출물이 인슐린저항성을 개선하는 작용기전을 알아보기 위해 마우스의 지방조직에서 Western blot을 수행하여 인슐린 신호전달 관련 단백질(pJNK, pIRS1, pAKT, GLUT4) 발현변화를 평가하였음(그림 3-65). 본 연구결과에 따르면, 마우스 지방조직에서 SSED군은 HFD군에 비해 JNK 인산화를 감소시켰음. 또한 SSED군은 HFD군에 비해 IRS1 대비 p-IRS1 단백질 비율을 유의하게 감소시킨 한편, AKT 대비 p-AKT 단백질 비율을 유의하게 증가시켰음. 또한 총단백질(세포질+막단백질) fraction 에서 측정된 GLUT4(지방조직)의 발현 변화는 Chow군, HFD군, SSED군간의 차이가 없었으나, 막단백질에서 측정된 GLUT4의 발현은 SSED군에서 HFD군에 비해 유의하게 증가하였음(그림 3-65). 따라서 식물S줄기추출물은 고지방식이를 섭취시킨 마우스의 지방조직에서 GLUT4를 세포질에서 세포막으로 이동시켜 포도당 유입을 증가시키므로써 인슐린저항성을 개선시켰을 것으로 사료됨.



Values with different superscripts are significantly different at  $P < 0.05$

그림 3-65. SSED가 부고환지방조직에서 인슐린 저항성에 관련된 유전자의 발현에 미치는 영향

(4) 마우스 지방전구세포(3T3-L1)에서 인슐린에 의해 매개되는 glucose uptake 분석

- 혈중 glucose는 축진확산과 능동수송 기전을 통해 세포내로 이동함. Glucose의 능동수송은 세포막에 존재하는 GLUT4에 의해 세포내로 uptake되는 것이며, 이 과정은 인슐린에 의해 촉진됨. 본 연구에서는 3T3-L1 세포에서 GLUT4에 의한 glucose uptake 값을 측정하기 위해, 축진확산과 능동수송 기전에 의한 total glucose uptake 값에서 축진확산에 의한 glucose uptake 값(Glut4 억제제, cytochalasin B를 처리하여 측정)을 제하여 계산하였음(그림 3-66). 마우스 지방전구세포(3T3-L1)를 대상으로 식물S줄기추출물(SSED)을 50 µg/ml 의 농도로 1시간 동안 처리한 결과, 인슐린을 처리하지 않은 경우에는 식물S줄기추출물(SSED)에 의한 glucose uptake가 증가하는 경향을 보이지 않았음. 인슐린을 처리한 경우에는 Control(DMSO)에 비해 GLUT4에 의한 insulin-stimulated glucose uptake가 유의적으로 증가하였음(그림 3-66). 따라서 식물S줄기추출물(SSED)은 인슐린 자극에 의한 포도당 유입을 촉진시켜 인슐린저항성을 개선시켰을 것으로 사료됨.

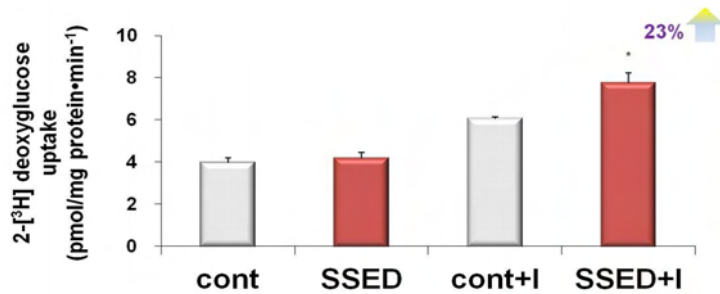


그림 3-66. SSED가 3T3-L1 세포에서 2-DG 흡수에 미치는 영향

3. 제3-1-1위탁연구과제(인지기능 증상개선에 미치는 효과에 관한 안전성 및 유효성 평가를 위한 무작위배정, 이중맹검, 대조군 비교 임상시험) - 2차년도

가. 인지기능 및 기억력 개선 효력평가

(1) Normal rat에서 후보물질이 amyloid beta level에 미치는 약효 평가

(가) 시험물질

① BetaMark™ Beta-Amyloid x-40 Chemiluminescent Elisa kit (SIG-38950, Covance)

② LA (메탄올 추출물, KIST), CJ (메탄올 추출물, KIST), E2 (Single compound), E3 (Single compound, KIST)

③ positive material

DAPT (Sigma, D5942)

(R)-(-)-2-FLUORO-ALPHA-METYL-4-BIPHENYLACETIC ACID, 97% (Flurizan),(Sigma, 545740)

(나) 실험동물

① SD rat 200-250g

(다) 실험군

① Normal-vehicle

② Positive control: DAPT

③ LA (메탄올 추출물, KIST), 500mg/kg

④ CJ(메탄올 추출물, KIST), 500mg/kg

⑤ CD4-T, 100mg/kg

⑥ SMH002, 100mg/kgControl(Vehicle), 3% HPMC

(라) 실험방법

① 약물 투여 및 부검

군 별로 약물 투여 한지 3시간 후 zoletil 50mg/kg, rompun 10mg/kg으로 마취한 다음 EDTA-Coated tube에 Cardiac picture로 채혈한 다음 0.9% saline으로 intracardinal perfusion을 하여 Brain을 채취, 액체질소에 사용하기 전까지 담귀둔다.

② Elisa quatification of soluble A $\beta$

A $\beta$  level은 Amyloid  $\beta$  C-terminal의 40, 42 residue에 특이적인 Monoclonal antibody를 이용한 Elisa system을 사용한다.

(마) 실험결과

① Aβ-40 in blood & Brain

- 분석결과 혈중 Abeta-40은 약물투여군 전체적으로 감소하는 경향을 보였으나 유의적이지는 않았다. Brain에서의 Abeta40은 reference drug인 DAPT가 normal의 약 40%로 감소하였으며 후보물질 투여군은 CJ추출물이 약 50%로 감소하였으며 나머지 후보물질투여군은 결과값이 Minimum detection range를 벗어나 최소 측정값으로 대체하였다. 그 결과 normal값의 30%수준으로 감소한 결과를 도출하였다.

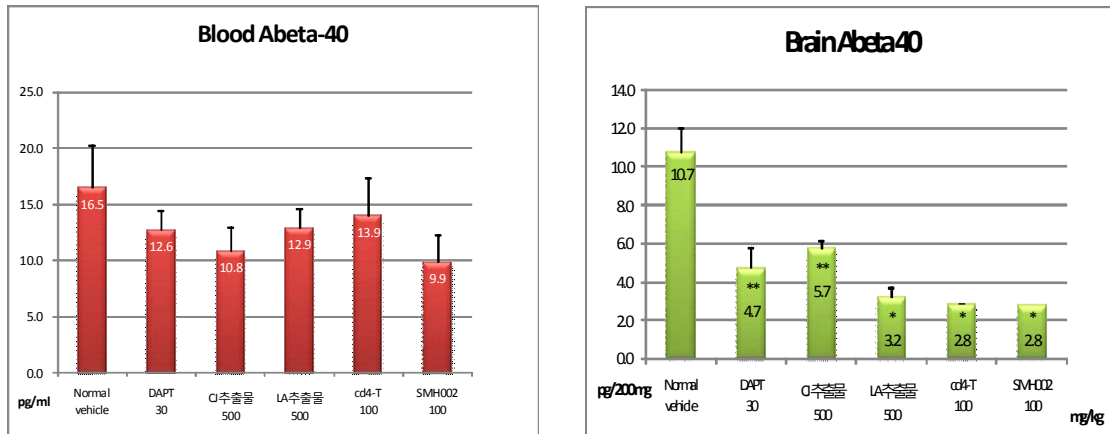
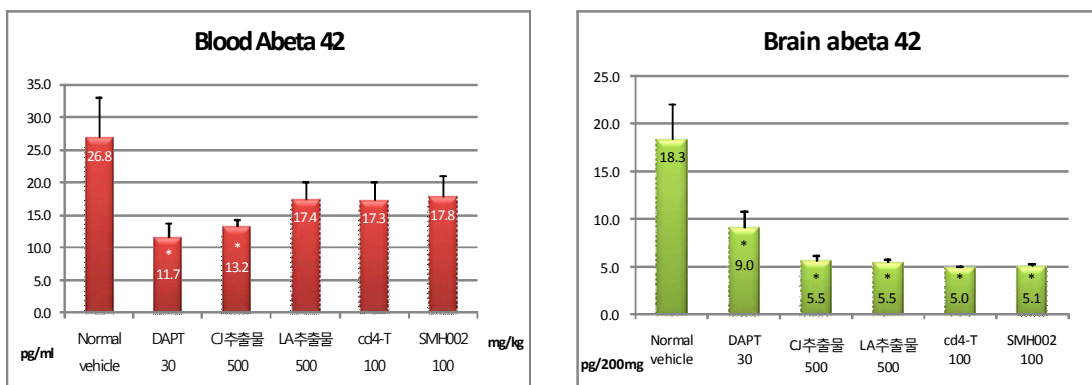


그림 3-67. Aβ-40의 농도

② Aβ-42 in blood & Brain

- 분석결과 혈중 Abeta-42는 reference drug이 normal의 50%수준으로 감소하였고 CJ추출물, LA추출물, cd4-T, SMH-002가 각각 normal의 약 50, 65, 65, 65% 수준으로 감소하였으나 CJ추출물의 결과만 유의적이었다. Brain Abeta-42는 DAPT투여군이 normal의 약 50%로 유의적으로 감소하였다. 후보물질 투여군은 결과값이 최소 측정값을 벗어나 최소 측정값으로 대체하여 결과를 도출하였으며 그 결과 모두 normal의 약 30%수준으로 감소하였다.



그림

3-67. Aβ-40의 농도

#### 4. 제3-1-1위탁연구과제(지방분화에 대한 발효흑차의 영향 조사) - 3차년도

##### 가. 발효흑차에 의한 지방세포분화 및 지방세포에 미치는 영향조사

###### (1) 실험방법

###### (가) 지방세포 분화 및 성숙한 지방세포 배양방법

- 3T3-L1 지방전구세포를  $5 \times 10^3$  cells/cm<sup>2</sup> 로 시딩하고 4일간 confluent하게 배양시킨다. 접축저해로 성장이 완전히 억제된 후 분화호르몬을 아래와 같이 처리하여 6일간 배양한다.

● 0d : 10% FBS, 5ug/ml Insulin, 2uM Dex, 0.5mM IBMX

● 2d : 10% FBS, 5ug/ml Insulin

● 4d : 10% FBS

● 6d : 분화여부 관찰

● 6-10d : 분화가 끝나고 성숙한 지방세포는 10% FBS가 첨가된 배지에서 4일간 배양한다.

- 발효흑차는 배지에 녹여서 20mg/ml의 농도로 만든 후, 0.2uM로 filtration하고 serial dilution을 통해 적정 농도로 희석한다.

###### (나) Oil Red O 염색방법

- 지방세포분화 6일 또는 10일차에 배지를 제거한 후 PBS(phosphate buffered saline)로 2회 세척을 하고 10% 포름알데히드로 1시간 동안 실온에서 세포를 고정시킨다. 형성된 중성지방 염색은 Oil Red O(Sigma #O0625)를 0.5%로 isopropanol에 녹인 후, 증류수에 3:2의 비율로 희석하여 사용한다. 고정된 3T3-L1세포에 충분히 잠길 정도의 Oil Red O용액을 넣고 37°C에서 30분간 세포를 염색시킨다. 염색된 Oil Red O는 isopropanol로 다시 추출하여 510nm 파장에서 흡광도를 측정하여 정량화한다.

###### (다) RNA 분리와 qRT-PCR반응

- 분화가 끝난 후, 전체 RNA를 RNeasy spin column(Qiagen. Chatsworth, CA, Cat. No. 74106)을 사용하여 분리하였다. 분리된 RNA(2ug)는 M-MLV역전사 효소(Promega, Madison WI, Cat. No. M170B), dNTP 그리고 hexamer 랜덤 프라이머를 사용하여 37°C에서 1시간 동안 역전사되고, 합성된 cDNA(20ng)는 Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Cat. No. 4367659)를 사용하여 ABI 7000 Real-Time PCR System(기기)으로 정량화 되었다. 정량적 PCR은 1) 50°C- 2분, 2)95°C- 10분, 3)95°C- 15초, 4)60°C- 1분 5) 3->4번 과정 40회 반복으로 진행되었고, 사용된 Primer 서열은 아래와 같다.

C/EBP $\alpha$  (F) 5'-AGCCAAGAAGTCGGTGGACA -3'

(R)5'-CAGCCTAGAGATCCAGCGACC -3'

PPAR2 (F) 5'- CTGATGCACTGCCTATGAGCA -3' ;

(R) 5'- ATGCGAGTGGTCTTCCATCAC -3'

ACC (F) 5'- TAACAGAATCGACACTGGCTGGCT -3'

(R) 5'- ATGCTGTTTCCTCAGGCTCACATCT -3'

FAS (F) 5'- TGCTCCCAGCTGCAGGC -3'



(R) 5'- GCCCCGTAGCTCTGGGTGTA -3'  
 FABP4 (F) 5'- GATGAAATCACCGCAGACGACA -3'  
 (R) 5'- ATTGTGGTTCGACTTTCCATCCC- 3'  
 18s rRNA (F) 5'- ACCGCAGCTAGGAATAATGGAATA -3'  
 (R) 5'- CTTTCGCTCTGGTCCGTCTT -3'

(라) 세포수와 세포사멸 측정방법

- Adam assay : 세포막을 투과하는 PI (propidium iodide)라는 chemical을 이용하여 세포를 계수하는 방법으로써, detergent와 PI가 함께 포함된 용액과 PI만 포함된 용액을 사용하여 각각 비생존세포와 전체세포수를 계측하여 총 생존세포의 수를 계산하는 방법이다. ADAM-MC 라는 장비를 이용한다.
- Tunnel assay : Trevigen에서 제공하는 'HT TiterTACSTM Assay Kit' 키트를 사용하여 세포사멸 조건의 마커인 DNA fragmentation의 정도를 정량하면 각 조건에서 어느 정도의 세포사멸이 일어나고 있는지 확인할 수 있다. 정량은 450nm 의 파장에서 흡광도 측정을 통해 수치화 한다.

(2) 연구내용 및 결과

(가) 발효흑차에 의한 지방세포분화 억제조사

- 미분화된 지방전구세포인 3T3-L1에 지방세포분화 유도호르몬 (0.5 mM 1-isobutyl-3-methylxanthine, 2uM dexamethasone, 5g/ml insulin ; MDI)을 처리하여 지방세포로 유도하였다 (Kirkland et al., 1990). 이때 발효흑차를 0 ug/ml, 10 ug/ml, 25 ug/ml, 50ug/ml, 100ug/ml 또는 200 ug/ml 으로 함께 처리하여 세포분화를 관찰하였다. 분화유도 6 일 후에 형성된 중성지방을 Oil Red-O로 염색한 결과, 발효흑차 농도에 의존적으로 지방형성이 억제되었다. (그림 3-68A). 이는 염색된 Oil Red-O를 추출하여 정량화한 결과와도 일치하였다 (그림 3-68B). 또한 발효흑차의 농도를 0 ug/ml, 100 ug/ml, 200 ug/ml, 250 ug/ml, 300 ug/ml, 400 ug/ml 로 처리한 결과 200-300 ug/ml의 발효흑차가 지방세포 분화억제에 충분하다는 것을 확인하였다(그림 3-68C). 지방세포분화 과정에서 마스터 전사인자로 알려진 C/EBP $\alpha$ 와 PPAR $\gamma$ 2의 발현은 중요하다. 발효흑차에 의해 지방분화가 억제됨에도 불구하고 C/EBP $\alpha$ 와 PPAR $\gamma$ 2의 mRNA양은 일정하게 유지되었고, 이들의 타겟 유전자인 FABP4, FAS, ACC의 발현에도 영향이 없었다(그림 3-68D). 이는 qRT-PCR로 C/EBP $\alpha$ 와 PPAR $\gamma$ 2의 mRNA양을 정량화한 결과와도 일치하였다. 비록 발효흑차에 의해 PPAR $\gamma$ 2의 발현정도가 변동하였으나, 처리하지 않은 대조군에 비해 감소하지 않고 오히려 증가하는 양상으로 보였으며 양과 효과의 상관성을 보긴 힘들었다. 다만, 10, 25  $\mu$ g/ml 의 농도에서는 증가하는 경향이 관찰되었다(그림 3-68E, 3-68F). PPAR $\gamma$ 2의 발현을 증가시킨다는 C/EBP $\alpha$  전사인자역시 발효흑차에 의해 현저히 감소하지 않고 낮은 농도의 발효흑차 (10, 25  $\mu$ g/ml )에서는 현저히 증가하였으며, 고농도 (200  $\mu$ g/ml)의 발효흑차는 C/EBP $\alpha$  발현을 감소시켰다. 하지만 발효흑차에 의해서 세포의 상태가 건강하지 않은 현상이 관찰되었고, mRNA양의 보정에 사용되는 18S rRNA와 TBP 유전자의 발현이 발효흑차에 의해서 감소하였다. 전체 RNA의 감소가 수반되기 때문에 18S rRNA와 TBP 로 보정하면, 발효흑차가 특별히 C/EBP $\alpha$ 와 PPAR $\gamma$ 2를 감소시킨다고 보기 어렵다.



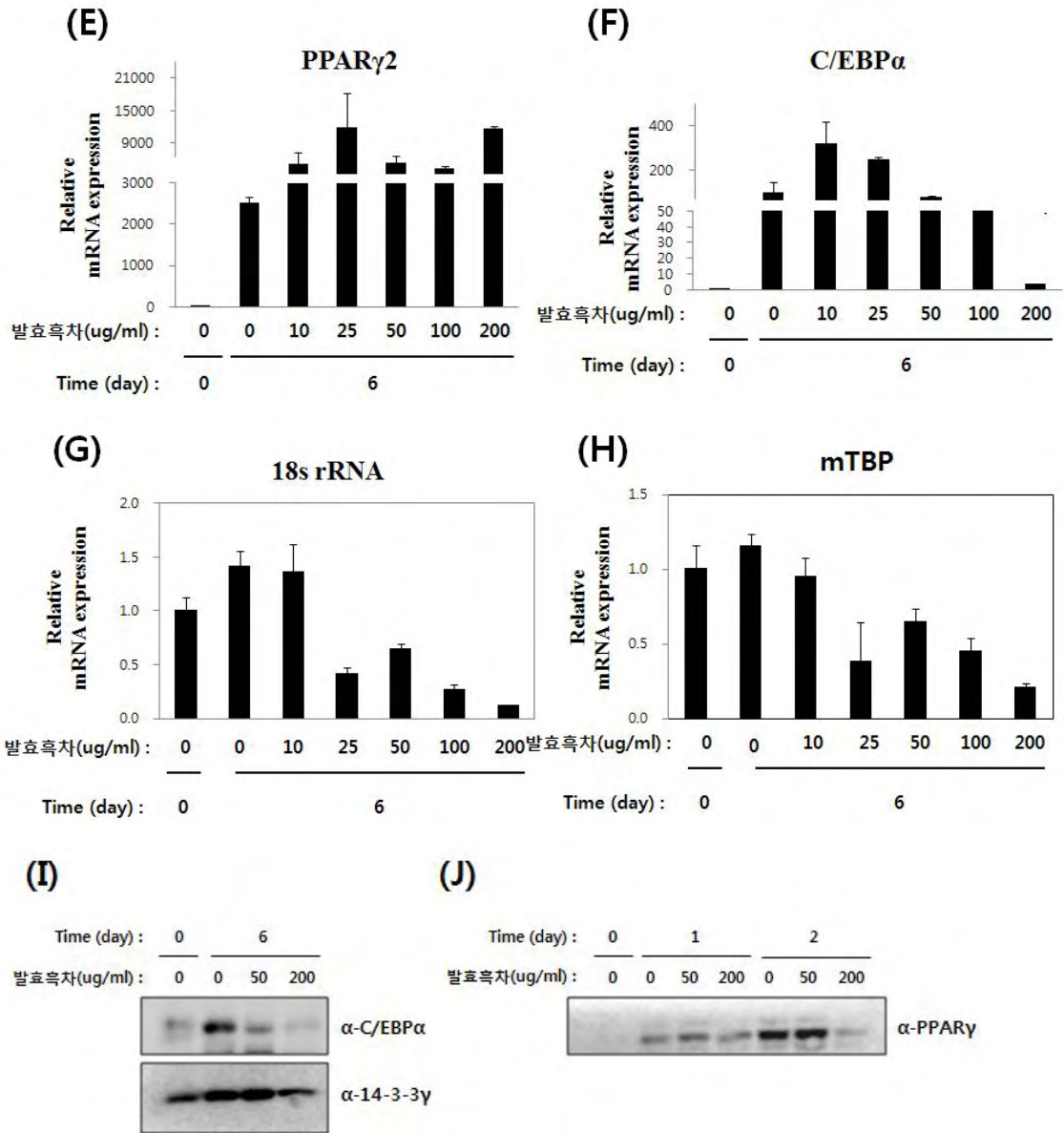


그림 3-68. 3T3-L1에서의 발효흑차의 지방세포분화 억제 효능

(나) 발효흑차가 세포증식 및 생존에 미치는 영향조사

- 3T3-L1세포를 이용한 지방분화시 발효흑차를 0, 50, 200ug/ml의 농도로 처리하여 분화2일차에 ADAM 분석을 통해 살아있는 세포의 수를 확인한 결과, 발효흑차에 의해 지방분화 초기의 세포증식 과정이 온전히 일어나지 않았으며(그림 3-69A), 세포의 생존률 또한 발효흑차 농도에 의존적으로 낮아지는 것을 확인하였다(그림 3-69B, 3-69C). 또한 Tunnell 분석을 통해 이러한 현상은 세포사멸을 통해서 나타나는 것을 확인하였다(그림 3-69D).

- 한편 분화시키지 않은 3T3-L1 지방전구세포에 발효흑차를 0, 50, 200ug/ml의 농도로 처리시에도 세포의 수가 감소하고, 세포사멸이 증가하는 현상이 관찰되었다(그림 3-69E, 3-69F). 발효흑차에 의한 세포사멸 증가는 지방전구세포보다 지방세포 분화과정동안에 민감하게 나타났다.

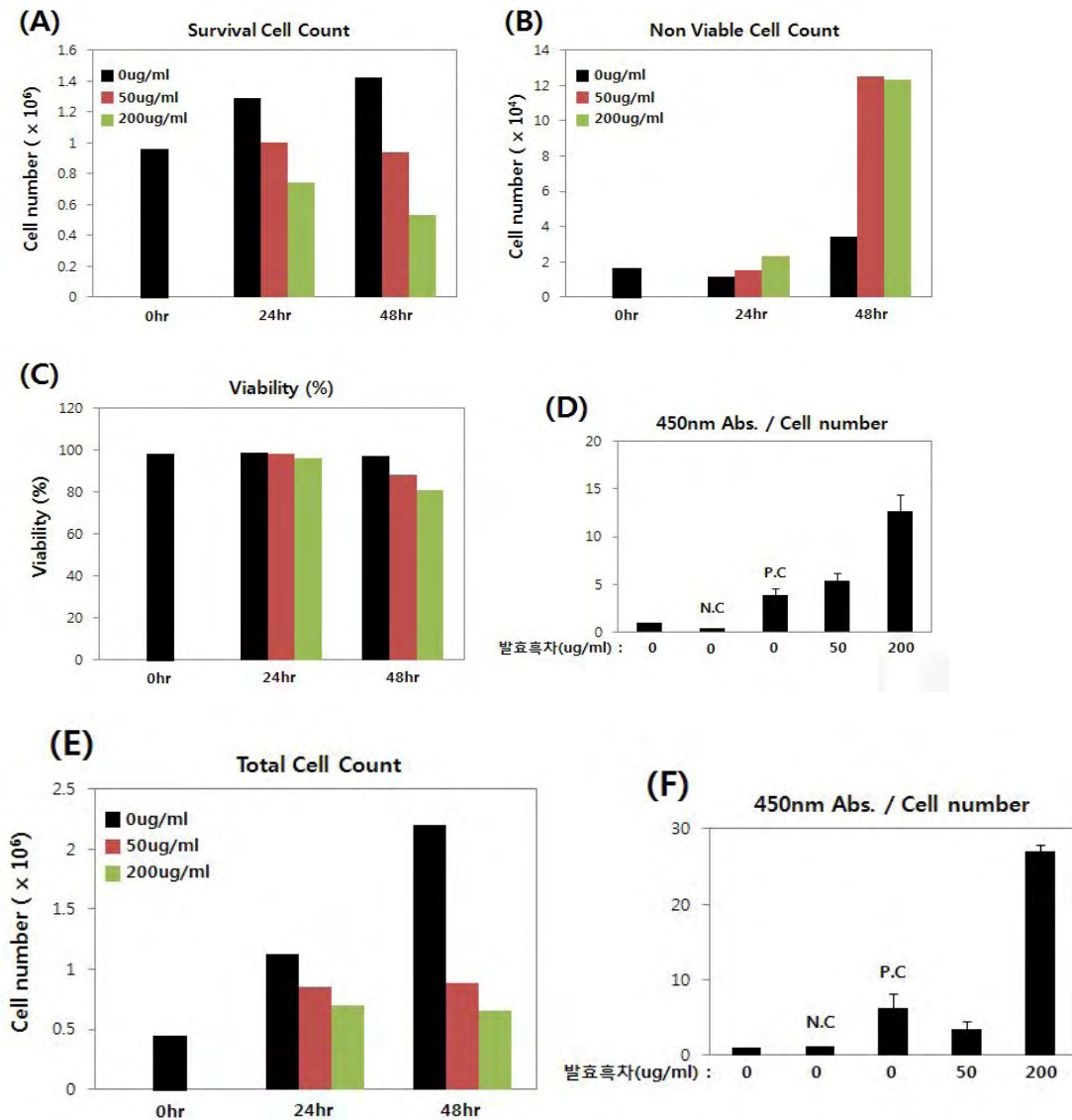
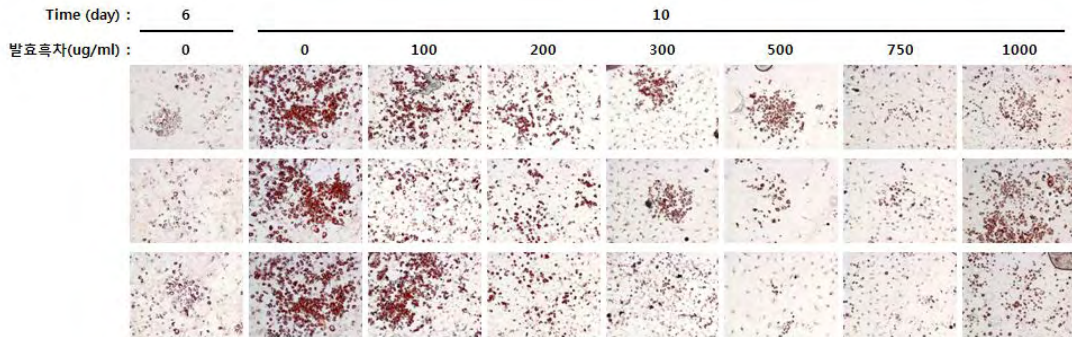


그림 3-69. 발효흑차의 세포 생존 및 증식에 미치는 효과

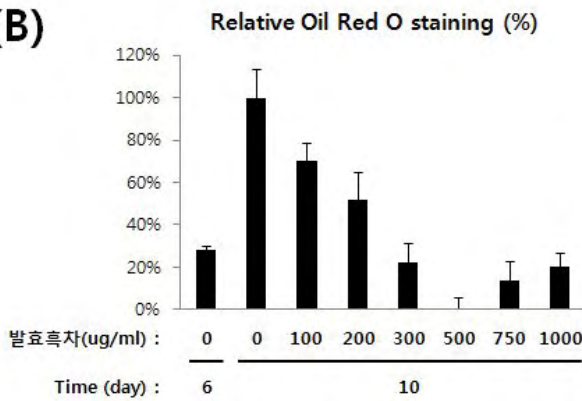
(3) 발효흑차가 성숙한 지방세포에 미치는 영향조사

- 미분화 3T3-L1 을 6일간 분화 시켜 지방이 생성됨을 ORO로 아래와 같이 확인하였다. 성숙한 3T3-L1 지방세포에 발효흑차를 100 ug/ml, 200ug/ml, 300ug/ml, 500ug/ml, 750ug/ml 또는 1000ug/ml 으로 처리하여 4일후 세포의 중성지방을 Oil Red-O로 염색하여 확인한 결과, 300ug/ml 의 발효흑차가 세포의 지방을 감소시키는 것을 확인하였다(그림 3-70A). 이는 염색된 Oil Red-O를 추출하여 정량화한 결과와도 일치하였다 (그림 3-70B). 성숙한 지방세포의 C/EBP $\alpha$ 와 PPAR $\gamma$ 2의 mRNA양은 200ug/ml 농도의 발효흑차에 의해 감소되고, 이들의 타겟 유전자인 FABP4, FAS, ACC의 발현도 억제되는 듯이 보였으나(그림 3-70C), qRT-PCR로 C/EBP $\alpha$ 와 PPAR $\gamma$ 2의 mRNA양을 정량화한 결과 C/EBP $\alpha$ 의 발현만이 감소하였다(그림 3-70D, 3-70E). 한편 웨스턴분석을 통해서도 발효흑차(200ug/ml)가 C/EBP $\alpha$ 와 PPAR $\gamma$ 2의 단백질 양을 감소시키는 사실을 확인하였다(그림 3-70F).

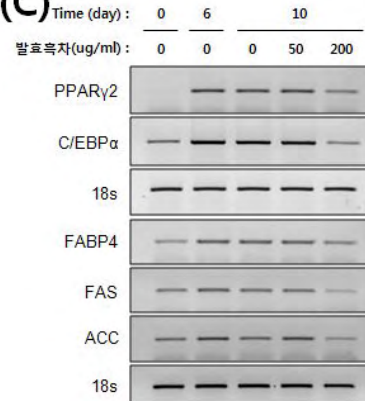
(A)



(B)



(C)



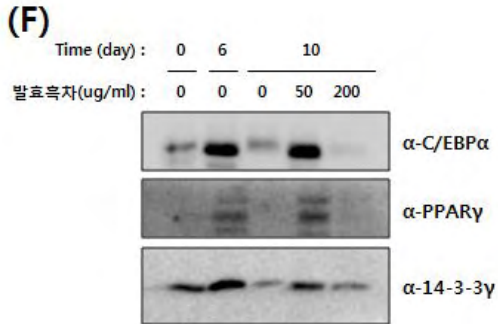
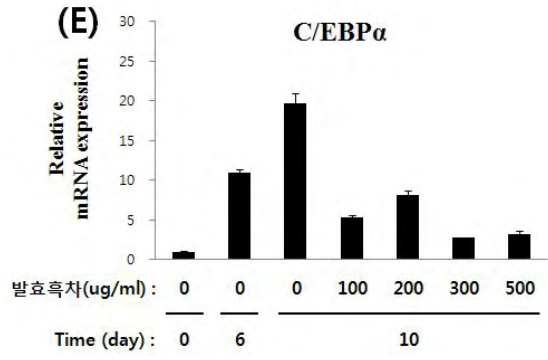
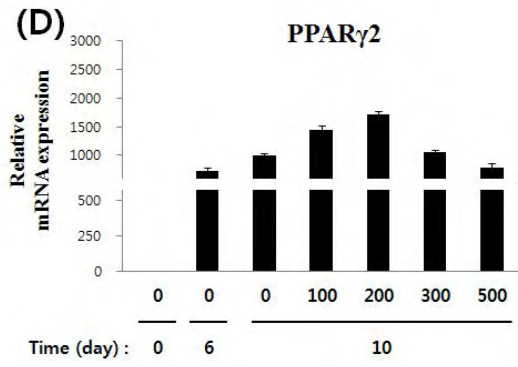


그림 3-70. 발효촉차가 지방세포에 미치는 영향

### (3) 결론

- 50ug/ml 농도의 발효흑차는 3T3-L1세포의 지방형성을 50%로 감소시켰고, 200ug/ml로 처리 시에는 10%정도만이 지방세포로 분화하였다. 이러한 농도 의존적인 지방형성 감소는 지방분화에 중요한 유전자인 C/EBP $\alpha$ 와 PPAR $\gamma$ 2의 발현억제와는 일치되지 않았다. 특히 50ug/ml의 발효흑차는 지방형성을 절반정도 감소시켰지만, 보정 전과 후 모두에서 C/EBP $\alpha$ 와 PPAR $\gamma$ 2의 발현은 줄어들지 않았다. 발효흑차를 처리한 샘플에서 mRNA양의 보정에 사용되는 18S rRNA와 TBP 유전자 또한 감소하였기 때문에 웨스턴 분석으로 단백질의 양적변화를 확인한 결과, 발효흑차 50ug/ml에서는 C/EBP $\alpha$ 가 200ug/ml에서는 PPAR $\gamma$ 의 단백질양이 감소하는 것을 볼 수 있었다. 따라서 발효흑차에 의해 C/EBP $\alpha$ 의 타겟유전자들인 지방세포 관련효소들의 활성감소가 지방형성 억제의 결과로 나타날 가능성이 있으며 추후 관련효소들의 발현이나 활성을 조사할 필요가 있다.

- 지방세포분화 과정에서 발효흑차를 처리하면 세포의 수가 적고, 상태가 건강하지 않은 현상이 나타나서 발효흑차가 세포의 증식을 억제하거나 세포사멸을 유도하여 지방형성이 줄어들 가능성이 있다. 지방분화 동안에는 50ug/ml이상의 발효흑차에 의해 생존세포의 수 및 생존률이 감소하고 세포사멸이 증가하는 것을 확인하였으며, 이러한 현상은 지방전구세포에서도 관찰되었다. 성숙한 지방세포에서는 200ug/ml이상의 발효흑차에 의해서 형성된 지방의 정도가 50%이하로 감소한다. 발효흑차는 18S rRNA와 TBP 유전자의 발현을 감소시켜 mRNA로 C/EBP $\alpha$ 와 PPAR $\gamma$ 2의 발현변화를 보기가 어려웠지만, 웨스턴분석으로 C/EBP $\alpha$ 와 PPAR $\gamma$ 의 단백질양은 발효흑차에 의해 감소하였다.

- 발효흑차는 3T3-L1세포의 분화와 성숙한 지방세포에서 모두 1) 지방형성을 억제하고, 2) 지방세포에 중요한 C/EBP $\alpha$ 와 PPAR $\gamma$ 의 단백질 양을 감소시킨다. 분화과정과 전구세포 증식과정에서는 3) 생존세포의 수가 감소하고 세포사멸현상이 나타난다. 발효흑차에 의해 나타나는 이러한 현상들은 성숙한 지방세포나 전구세포 증식과정보다 4) 지방세포 분화과정에서 더 민감하게 나타난다.

## 제 4 절 제4핵심과제(국내 야채를 이용한 기능성 발효음료 개발)

### 1. 제4-1세부연구과제(국내 농산물을 이용한 기능성 발효음료 개발)

- 본 연구는 국내 야채를 이용한 기능성 발효 음료 개발에 목적이 있다. 기능성 유산균으로 야채주스를 발효시켜, 야채 주스 자체의 항산화 효과와 콜레스테롤 저하 효과 등은 향상시키고 면역력 증가와 같은 추가 기능성을 부여할 수 있으며 풍미를 개선시킬 수 있다. 이에 따라 1차년도에 야채를 발효시키면서 동시에 면역 기능을 강화시킬 수 있는 유산균을 선발하였으며, 당해연도에는 선발된 유산균의 다양한 기능성을 동물실험을 통해 평가하였다. 제 4-1세부 연구에서는 선발된 유산균의 항산화 및 콜레스테롤 저하 효과를 고지방/고콜레스테롤 식이를 투여한 흰쥐(rat)에서 평가하였다. 고지방/고콜레스테롤 식이를 투여한 실험동물은 혈중 콜레스테롤이 정상식이군에 비해 1.9배 증가하는데 비하여, 기능성유산균인 *Lactobacillus plantarum* HY7712 (K55-5)를 동시에 섭취하면 혈중 콜레스테롤 농도가 36.8% 낮아진다. 또한 이 기능성 유산균은 심혈관질환 동물모델의 혈관 내 지방반(fatty plaque) 형성을 억제할 수 있는데 LDLR KO mice에 western diet와 *L. plantarum* HY7712(K55-5)를 8주간 투여하여, western diet만 투여한 control 그룹에 비해 지방반 형성 비율이 낮아지고 지방반의 크기가 작아진 것을 확인하였으며 대동맥 조직에 염증반응 관련 유전자의 발현이 줄어든 것을 확인하였다. 이와 같은 효능을 가지는 기능성유산균 *L. plantarum* HY7712(K55-5)로 발효시킨 야채 발효물을 한국야쿠르트의 야채주스 제품인 하루야채에 첨가하여 <100% 야채와 과일 하루야채 퍼플>을 개발하였다.

- 이번 연구에서 사용한 *L. plantarum* HY7712(K55-5)는 면역 증강 및 면역 조절 효능이 우수한 유산균주로서 혈중 콜레스테롤 개선 효능을 확인하였다. 본 연구에서는 이 유산균주를 활용하여 발효한 야채발효물의 실험동물에서의 혈중 콜레스테롤을 개선하고 혈전의 생성 억제를 통한 혈행 개선 효능을 확인하고 제품소재로 개발하는 것을 최종 목표로 하였다.



가. 고콜레스테롤 투여 동물실험

- 건강기능식품시험법 가이드(2004. 식품의약품안전청)의 산화관련 기능성 시험 및 콜레스테롤 관련 기능성 시험에 따라 선발 유산균의 기능성을 평가하였다.

(1) 실험동물 및 사료

- 5주령의 수컷 SD rat을 일본 SLC사에서 구입하여 1주간 순치 후 6주령부터 실험을 시작하였다. 정상식이로는 AIN76을 이용하고 여기에 lard, 콜레스테롤(2%), cholic acid(0.5%)를 첨가한 고지방/고콜레스테롤 사료를 실험동물에 투여하였다(표 4-1). 정상식을 섭취한 그룹을 ND, 고지방/고콜레스테롤 식이를 섭취한 그룹을 HFD/HCD, 고지방/고콜레스테롤 식이에 기능성 유산균 *L. plantarum* K55-5(HY7712)를 일일 109 CFU 정도 섭취한 그룹을 K55-5로 표시하였다. 실험식은 6주간 투여하였고 주 1회 꼬리정맥에서 채혈하여 혈중 콜레스테롤 농도를 측정하였다.

Ingredients	Diet(g/kg diet)	
	AIN76	HFD/HCD
Casein	200	200
D,L-methionine	3	3
Corn starch	150	111
Sucrose	500	355
Cellulose powder	50	50
Corn oil	50	30
Lard	-	170
Mineral mixture	35	42
Vitamin mixture	10	12
Choline bitartrate	2	2
Cholesterol	-	20
Cholic acid	-	5
Tert-Buthylhydroquinone	0.01	0.04
Total kcal/g	16,439	19,315

표 4-1. 시험 동물의 사료 조성

(2) 혈중 지질 변화

- 6주간의 실험 결과, 시험소재가 실험동물의 체중변화와 사료 섭취량에 미치는 영향은 표 4-2와 같았다. 사료 섭취량 당 체중변화를 의미하는 사료효율(FER)은 정상식이에 비해 고지방/고콜레스테롤 사료에 의해 유의적으로 증가하였으며 *L. plantarum* K55-5에서 유의적으로 감소하는 경향을 나타내었다(표 4-2). 따라서 *L. plantarum* K55-5가 체중감소에도 영향을 미칠 수 있을 것으로 예상되었다.
- 이와 같은 사료효율의 감소가 체지방감소와 연관이 있는지 확인하기 위해 장기를 적출하여 무게를 측정하였다(표 4-3). 그 결과 부고환 지방(epididymal fat pad)은 유의적이지 않아 체지방 감소 효과를 증명하기는 어려웠으며, 신장 무게에도 큰 변화가 없었다. 한편 같은 고지방/고콜레스테롤 사료에 의해 비대해 진 것을 확인할 수 있었으며(2.31배 증가), *L. plantarum* K55-5에 의하여 유의하게 감소하였음을 확인하였다.

Group	Body weight gain(g/day)	Food Intake(g/day)	FER**
ND	5.34±0.88 <sup>b</sup>	17.01±1.52	0.31±0.04 <sup>c</sup>
HFD/HCD	6.91±0.51 <sup>a</sup>	16.34±0.70	0.42±0.02 <sup>a</sup>
K55-5	6.52±0.47 <sup>a</sup>	16.58±0.87	0.39±0.01 <sup>ab</sup>

\* Data are expressed as means ± SD values of 7 mice per group. Data within a same column with different superscripts are significantly different among groups at  $p < 0.05$  by Duncan's test. ND: normal diet group, HFD/HCD: high-fat/high-cholesterol diet group, K55-5: HFD/HCD group supplemented with *L. plantarum* K55-5

\*\* FER: Food efficiency ratio = body weight gain (g)/Food intake (g).

표 4-2. 식이 급여에 따른 체중 변화 및 사료 효율

Group	Liver weight(g)	Epididymal fat pad(g)	Kidney weight(g)
ND	11.57±16.0 <sup>c</sup>	4.90±1.55	2.65±0.32
HFD/HCD	26.79±2.91 <sup>a</sup>	4.87±1.47	2.62±0.26
K55-5	25.29±2.20 <sup>ab</sup>	5.06±0.64	2.63±0.19

\* Data are expressed as means ± SD values of 7 mice per group. Data within a same column with different superscripts are significantly different among groups at  $p < 0.05$  by Duncan's test. ND: normal diet group, HFD/HCD: high-fat/high-cholesterol diet group, K55-5: HFD/HCD group supplemented with *L. plantarum* K55-5

표 4-3. 식이 급여에 따른 장기의 무게 변화

- 6주간의 실험결과, 기능성 유산균의 섭취는 고지방/고콜레스테롤 섭취로 높아진 혈중 총콜레스테롤을 36.8% 감소시켰으며, 이것은 소위, 나쁜 콜레스테롤인 LDL-콜레스테롤의 감소(44% 감소)에서 유래하여 실험동물의 혈중 지질 개선에 큰 도움을 주었다(표 4-4). 또한 이러한 혈중 콜레스테롤의 감소는 간 조직에서도 이어져, 간 조직 내의 콜레스테롤이 45.3% 감소하였으며 중성지방은 42.5% 감소하였다. 한편 간 건강을 반영하는 GOT, GPT 수치 역시 감소하여 기능성 유산균이 콜레스테롤 대사에 영향을 미침을 확인할 수 있었다.

Group	ND	HFD/HCD	K55-5
Plasma			
Total cholesterol(mg/dL)	103.1±36.6 <sup>b</sup>	194.1±74.3 <sup>a</sup>	137.3±22.9 <sup>b</sup>
Triglyceride(mg/dL)	114.5±37.8 <sup>a</sup>	66.8±22.1 <sup>b</sup>	59.64±9.0 <sup>b</sup>
HDL-cholesterol(mg/dL)	61.9±15.8	45.8±9.9	50.0±36.0
LDL-cholesterol(mg/dL)	31.1±26.8 <sup>b</sup>	135.0±72.2 <sup>a</sup>	75.4±23.3 <sup>ab</sup>
AI	0.69±0.48	3.43±1.95	2.75±2.27
Liver			
Total cholesterol(mg/g)	0.83±0.12 <sup>c</sup>	8.14±3.20 <sup>a</sup>	4.45±1.74 <sup>b</sup>
Triglyceride(mg/g)	10.85±2.49 <sup>c</sup>	39.59±13.02 <sup>a</sup>	22.74±3.71 <sup>b</sup>
GOT(IU/L)	120.4±44.5	172.6±53.9	149.5±59.1
GPT(IU/L)	58.7±16.1 <sup>b</sup>	96.6±33.1 <sup>a</sup>	65.6±14.4 <sup>b</sup>

표 4-4. *L. plantarum* K55-5가 고지방/고콜레스테롤 식이를 섭취한 쥐의 혈중 지질 및 간지질에 미치는 영향

- 기능성 유산균의 간 지질 감소는 조직병리학적 관찰로도 확인할 수 있었는데, 그림 4-1에서 보는 바와 같이 고지방/고콜레스테롤 사료에 의해 간세포에 지방이 축적되어 세포의 크기가 커진 것에 비해, 기능성 유산균 *L. plantarum* K55-5를 섭취한 그룹의 간세포는 지방축적량이 적고 크기가 줄어든 것을 알 수 있었다.

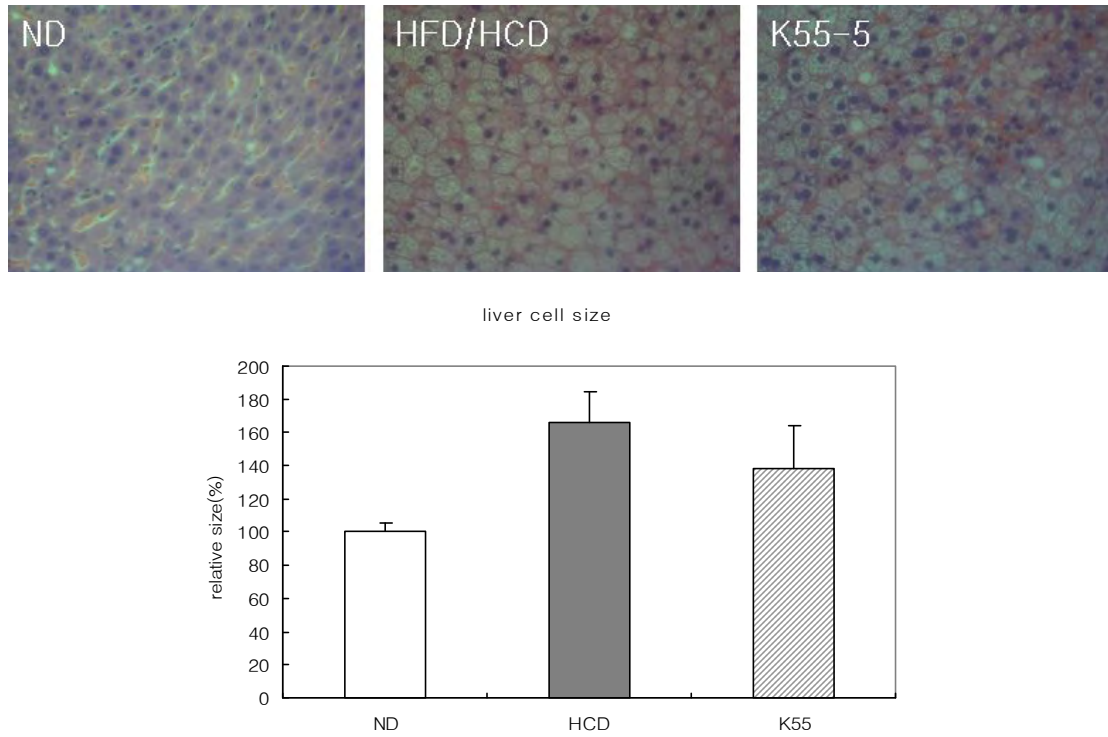


그림 4-1. 간 조직의 조직병리학적 분석 및 세포 크기 비교

(3) 항산화 효과

- 실험동물의 혈장과 간 조직에서 항산화 효소인 SOD(superoxide dismutase), CAT(catalase), GPx(GSH/GSSG ratio로 대체)를 측정하였으나, 고지방/고콜레스테롤 사료의 투여에 의해 항산화 효소 활성의 감소가 나타나지 않아 기능성 유산균의 활성을 평가할 수 없었다. 다만, 간 조직에서 고지방/고콜레스테롤의 과산화지질인 MDA(malondialdehyde)의 농도가 증가한 것이 기능성 유산균의 섭취로 27.2% 감소한 것을 확인하였다(표 4-5).

Group	ND	HFD/HCD	K55-5
erythrocytes			
SOD(U/ml)	0.19±0.12 <sup>b</sup>	0.15±0.09 <sup>b</sup>	0.40±0.03 <sup>a</sup>
CAT(mU/ml)	14.37±0.36	14.67±0.14	14.61±0.34
GSH/GSSG ratio	0.47±0.02	0.51±0.06	0.51±0.06
MDA(nmol/ml)	12.51±4.05	10.65±1.63	9.52±1.52
liver			
SOD(U/ml)	1.59±0.19 <sup>b</sup>	2.92±0.21 <sup>a</sup>	3.00±0.12 <sup>a</sup>
CAT(mU/ml)	53.04±0.07	53.21±0.74	54.64±0.43
MDA(nmol/ml)	141.54±47.41 <sup>b</sup>	246.26±95.72 <sup>a</sup>	179.24±27.31 <sup>ab</sup>

표 4-5. *L. plantarum* K55-5가 항산화 방어 체계 및 지질 과산화에 미치는 영향

나. 동맥경화 유발 모델 동물실험

(1) 실험동물 및 사료

- 실험동물은 11주령의 수컷 C57B/L6 LDLR KO mice으로 (주)중앙실험동물을 통해 미국 Jackson lab사에서 구입하였다. 1주간 순치 후, 12주령 제에 공복 시 콜레스테롤을 기준으로 실험 군을 나누었고, 실험 기간 중 1주일에 1회 체중과 식이량을 측정하고, 4주마다 꼬리채혈을 통해 공복 시, 혈중 콜레스테롤과 중성지방을 측정하였다. 모든 실험동물의 사료는 Atherogenic diet사료를 사용하였다 (Research diet 사 #D12079B). 실험소재는 western 사료에 양성 대조군으로 omega-3 (33/22)을 2% 농도로 섞었으며, 유산균의 경우 MRS 배지에서 배양하고 원심 분리하여 증류수로 균체를 세척한 후 실험동물이 일일  $2 \times 10^9$  CFU를 섭취하게 사료에 첨가하였고, 유산균으로 발효한 야채발효물은 총 사료에 0.5 %씩 첨가하였다 (이때 실험동물의 일일 사료 섭취량은 3 g을 기준으로 하였다). 양성 대조군으로 사용한 omega-3 식이를 먹인 omega-3군 (ND, n=10), 음성 대조군으로는 고지방/고콜레스테롤 식이를 먹은 고지방/고콜레스테롤식이군(HFCD, n=10)을 이용하였다. 실험 소재군은 *L. plantarum* HY7712 (K55-5, n=10)와 본 유산균으로 발효한 야채 발효물을 사료에 첨가한 군으로 구성하였다. 실험 종료 전 12시간 절식시키고 드라이아이스의 이산화탄소를 이용하여 실험동물을 희생시켰다. 소재 투여 기간은 16주간 식이투여를 진행한 후 희생하였다.
- 총 16주 간의 실험 기간이 종료된 후 실험동물은 12시간 절식 시키고, CO<sub>2</sub>를 흡입시켜 마취하여 희생시켰다. 실험동물을 개복하여 간 문맥에서 전혈을 채취하고 혈장을 분리하였으며 비장, 간, 부고환 지방 등을 적출하여 무게를 측정하였다. 혈장 및 조직 샘플은 사용 시까지 -80°C에서 보관하였다.

Ingredients	Diet(g/kg diet)
Casein	195
D,L-methionine	3
Corn starch	50
Maltodextrin 10	100
Sucrose	341
Cellulose powder	50
Milk fat, anhydrous*	200
Corn oil	10
Mineral mixture	35
Calcium carbonate	4
Vitamin mixture	10
Choline bitartrate	2
Cholesterol, USP*	1.5
Ethoxyquin	0.04
Total(g)	1001.54

\* Anhydrous milk fat typically contains approximately 0.3% cholesterol. On this basis western diet contains approximately 0.21% cholesterol.

표 4-6. Western diet의 식이 조성표

(2) 체중 및 식이섭취량

- 16주 동안 소재를 투여 후, 총 식이투여량은 정상대조군 295.16 g, 동맥경화 유도군 273.88 g 으로 비슷하였고 소재투여군인 omega-3, *L. plantarum* HY7712, 야채발효 투여군은 각각 197.22, 228.82, 219.29 g으로 대조군에 비해 적게 섭취되었지만(그림 4-2), 각 사료 효율은 0.05 ~0.06으로 큰 차이는 없었다. 체중 증가율 및 체중 변화는 소재 투여군에서 작게 나타남을 확인할 수 있었다(그림 4-3, 그림 4-4). 특히 모든 군에서 야채발효 투여군은 식이 섭취량에서는 큰 변화가 없었지만, 체중증가율 및 체중 변화량은 가장 작은 것으로 나타나 체중 감소 효과가 있을 것이라 추측할 수 있었다.

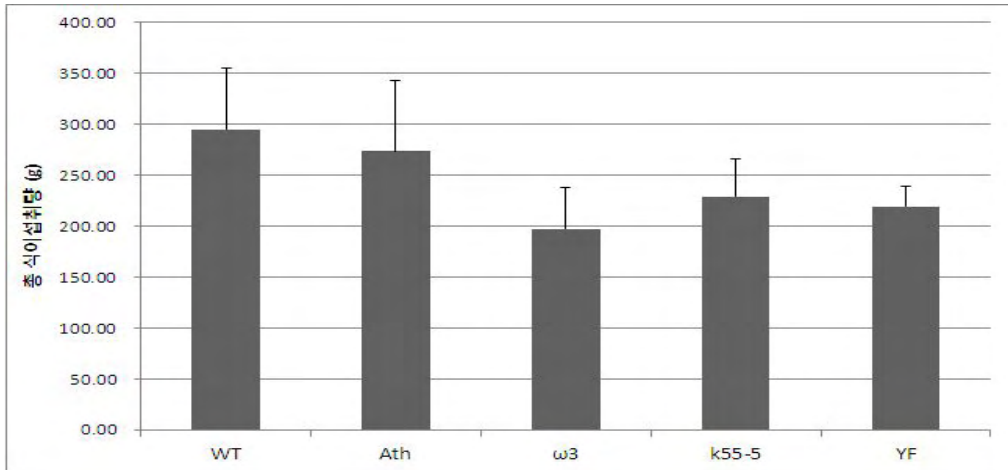


그림 4-2. 16주 간 소재 투여 이후의 총 식이 투여량 (g)

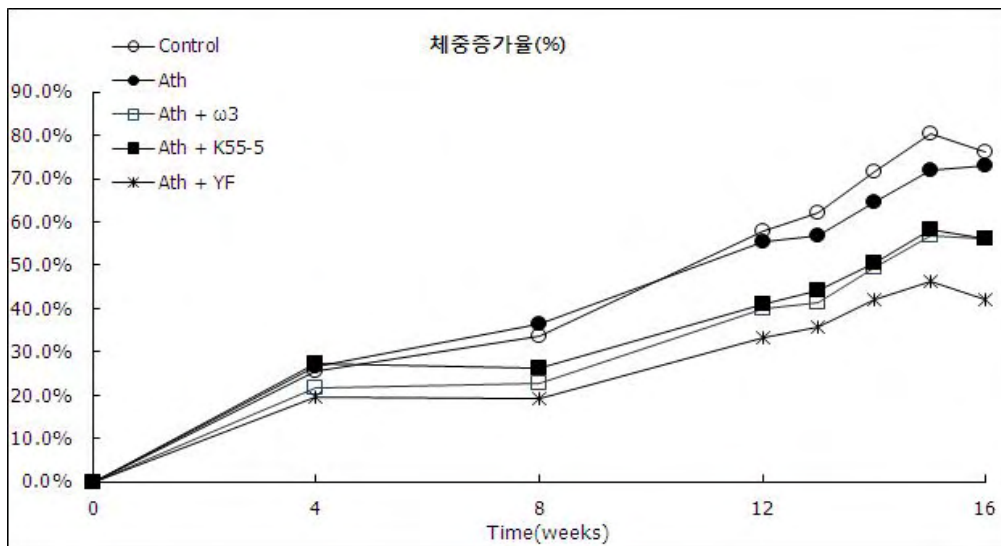


그림 4-3. 각 군의 기간별 체중 증가율 (%)

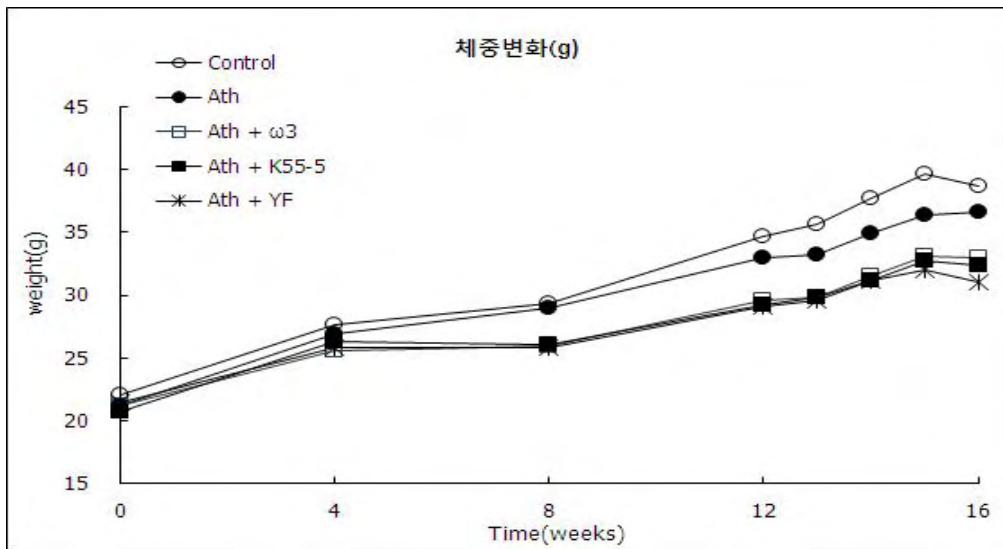


그림 4-4. 각 군의 기간별 체중 변화량 (g)



(3) 각 조직의 무게 변화량

- 16주 동안 소재를 투여 후, 각 장기의 무게를 측정하였다. 각 장기의 무게는 대사 및 면역 활성화 및 독성에 대한 기본적인 지표로 확인할 수 있다. 각 실험군의 장기 중량을 관찰한 결과는 아래와 같다. 즉, 간 중량, 지방 조직 중량, 비장 중량은 대조군에 비해 다소 증가하거나 감소하는 경향을 관찰하였지만, 체중 대비에 대한 비율적 값으로 환산한 결과 큰 차이는 없었다.

(가) 간 무게

- 간 조직 중량은 고지방 식이의 영향으로 지방간으로 진행되어 비대해 졌음을 외향적으로 확인할 수 있었다. 하지만 omega-3, K55-5, 야채발효 소재를 투여한 군에서는 지방간 증상이 완화되어 중량이 유의적으로 감소하는 것을 확인할 수 있었다. 특히 체중의 무게를 반영하여 비율적 계산을 하여도 유의성이 있음을 확인할 수 있었다(그림 4-5).

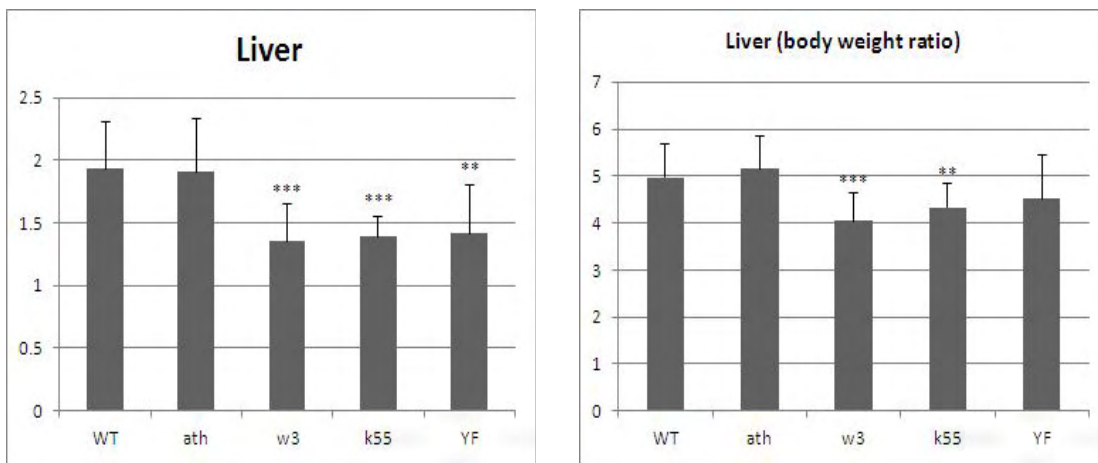


그림 4-5. 간 조직 중량 및 체중 대비 비율  
(\*\*\*, p<0.005; \*\*, p<0.01; \*, p<0.05)

(나) 지방 조직 무게 (부고환 지방)

- 지방 조직의 중량은 소제 투여 군에서 감소하는 것을 확인할 수 있었다. 특히 *L. plantarum* HY7712 소제군과 야채 발효 소제 투여군에서는 비장의 절대적 무게 수치와 체중을 반영한 비율적 환산 값에서 유의적으로 감소하는 것을 확인하였다. 위에서 확인한 바와 같이 개체 별 체중과 유사한 경향으로 감소하는 것으로 나타났다(그림 4-6).

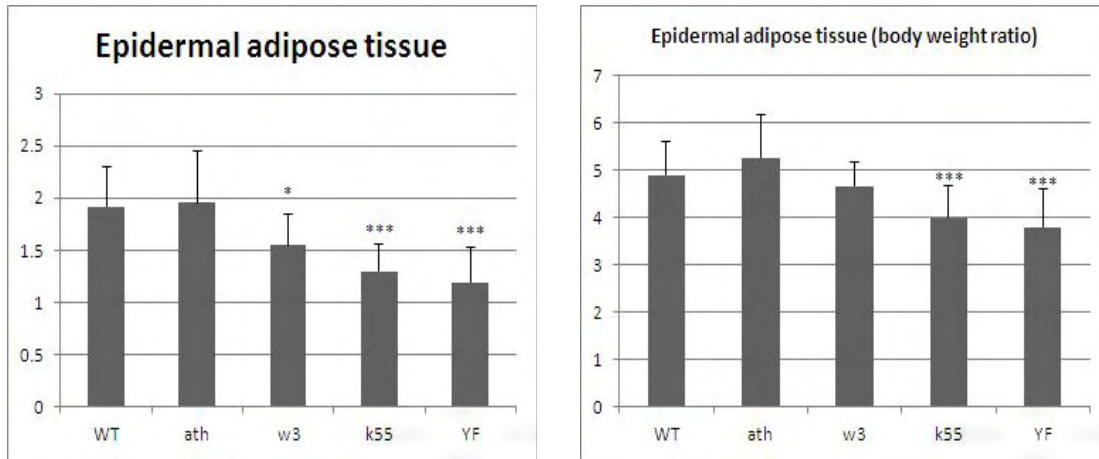


그림 4-6. 지방 조직 중량 및 체중 대비 비율  
 (\*\*\*, p<0.005; \*\*, p<0.01; \*, p<0.05)

(다) 비장 무게

- 비장의 중량은 동맥경화 유발군에서 정상 대조군보다 소폭 증가하는 것이 확인되었지만, 유의적이지는 않았으며, 소재 투여군에서는 소폭 감소하는 것을 확인하였다. 하지만 체중을 고려한 비율적 값에서는 모든 군 간의 유의적인 증감을 확인할 수 없었다. 즉 소재 투여가 비장의 무게에 영향을 미치지 않는다는 것을 확인하였다(그림 4-7).

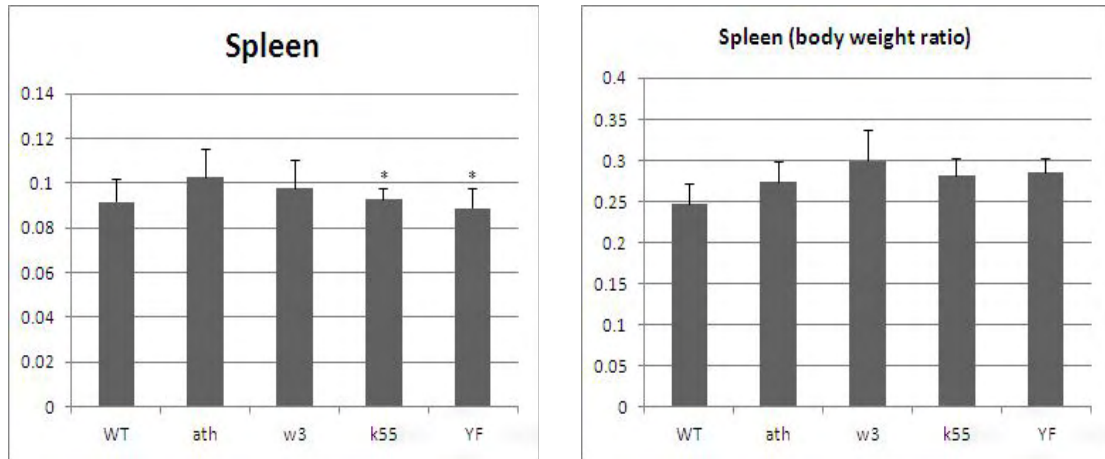


그림 4-7. 비장 조직 중량 및 체중 대비 비율

(\*\*\*,  $p < 0.005$ ; \*\*,  $p < 0.01$ ; \*,  $p < 0.05$ )

(4) 혈중 콜레스테롤 변화

- 16주 동안 소재 투여를 진행하면서 0주, 4주, 8주, 12주에는 꼬리 미정맥 채혈을 통해 공복 시, 혈중 콜레스테롤과 중성지방, 고밀도 지단백 콜레스테롤을 측정하였고, 측정 16주에는 희생 후에 간문맥에서 전혈을 채취하여 혈장에서 혈중 콜레스테롤 변화를 측정하였다.

- 혈청 중성지질(TG) 함량은 Asan pharmaceutical에서 구입한 시약을 활용하여 효소적인 방법으로 측정하였고, 총콜레스테롤(TC) 함량은 V-cholesterol kit(Asan Pharmaceutical, Korea)을 이용하여 측정하였다. 고밀도 지단백-콜레스테롤(HDL)은 HDL-cholesterol kit(Asan Pharmaceutical)로 측정하였다. 저밀도 지단백(LDL)-콜레스테롤은 총콜레스테롤에서 HDL-콜레스테롤과 중성지질(triglyceride)을 5로 나눈 값을 빼준 것으로 결정하였다.

- TG, TC, LDL의 수치는 0~12주까지는 일정하게 나타나고 있지만 16주에서 증가하는 것을 확인할 수 있었다(그림 4-8~4-11). 본 결과는 0~12주에는 꼬리 미정맥 채혈법을 통해 얻은 혈장에서 측정하였고, 16주에는 희생 후에 간문맥에서 채취한 혈장을 사용했기 때문에 채혈 부위에 따른 차이가 있을 것이라 생각된다.

- 동맥경화 유도 식이군은 다른 시험군과 비교하여 높은 혈중 지질 함량을 나타냈으며, *L. plantarum* HY7712, 야채발효물 투여군은 omega-3 투여군에 비해서는 증가하였지만, 동맥경화 식이 유도군에 대해서는 증가 추세가 낮은 것을 확인할 수 있었으며, 특히 *L. plantarum* HY7712 투여군의 중성지방 및 총 콜레스테롤에서 증가율이 낮은 것을 확인할 수 있었다.

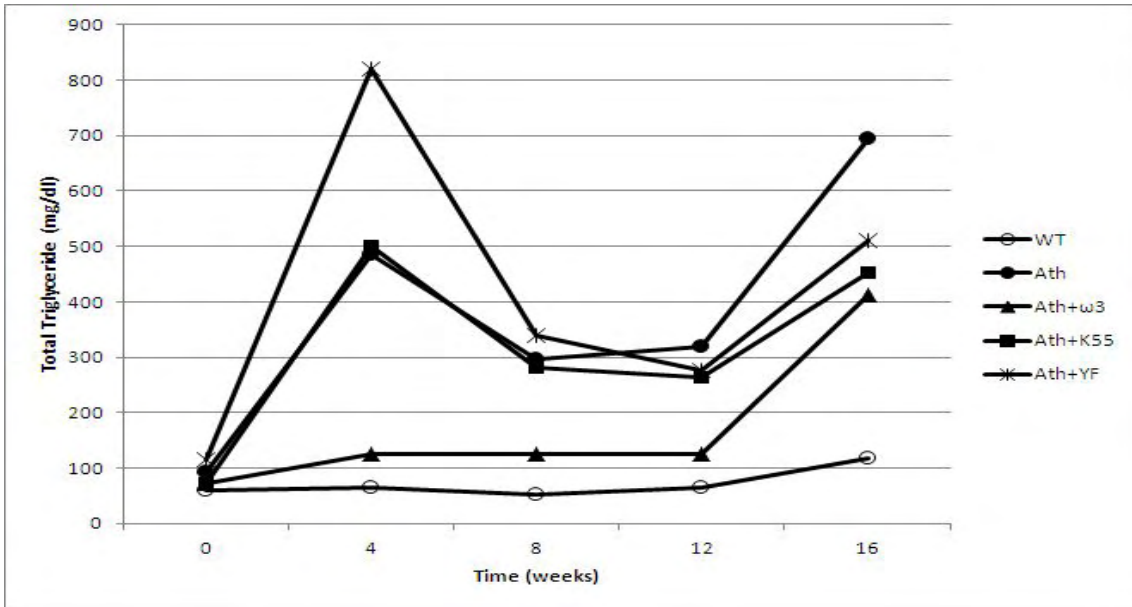


그림 4-8. Total triglyceride(TG)의 시간(주)에 따른 변화

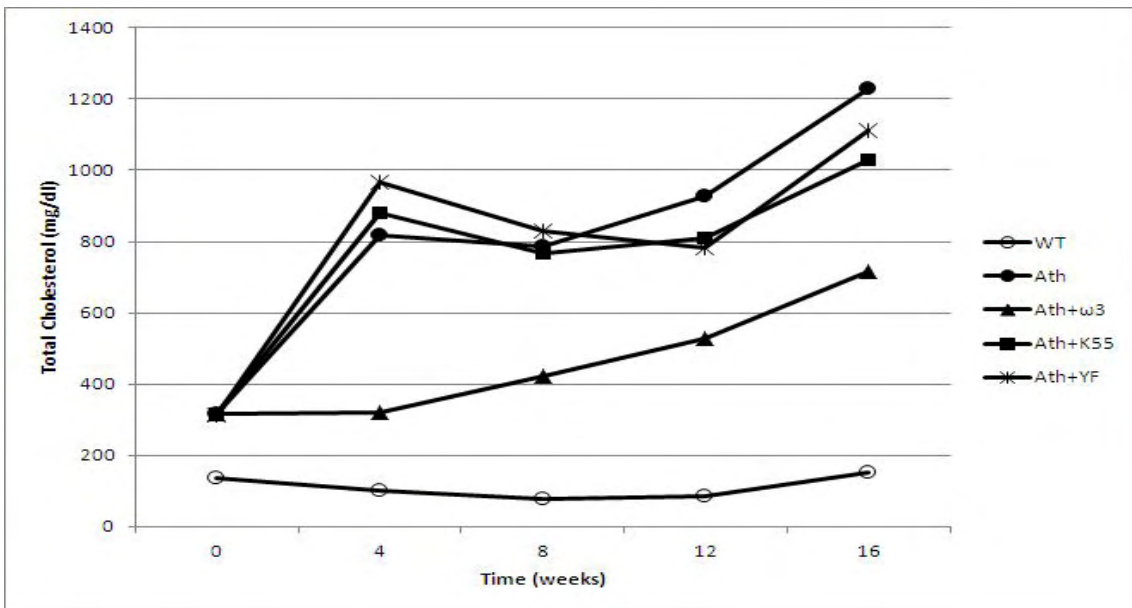


그림 4-9. Total cholesterol(TC)의 시간(주)에 따른 변화

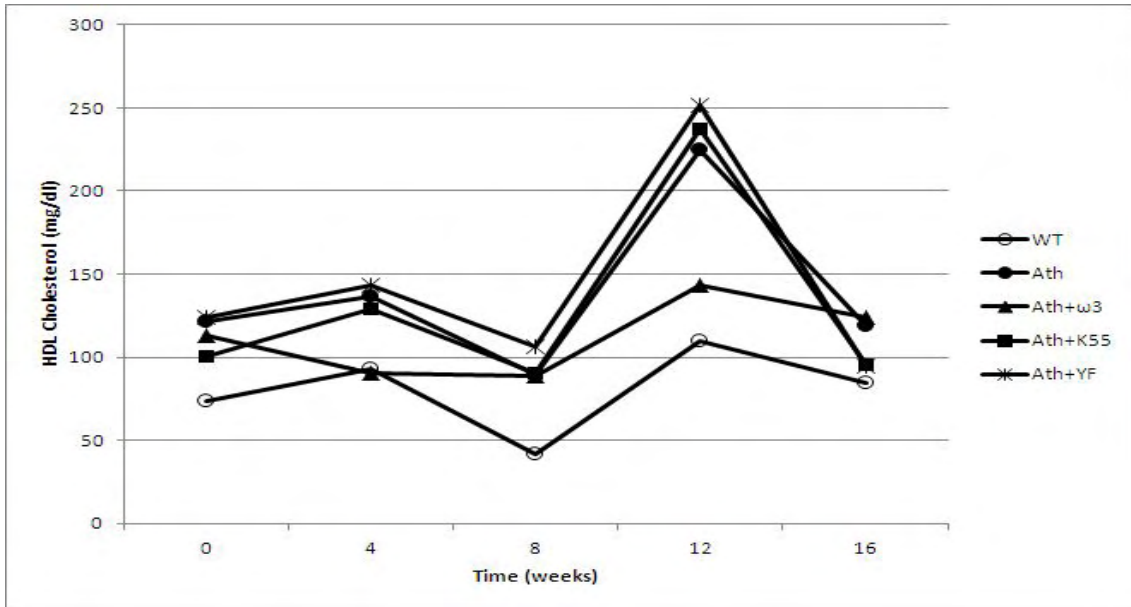


그림 4-10. HDL Cholesterol (HDL)의 시간(주)에 따른 변화

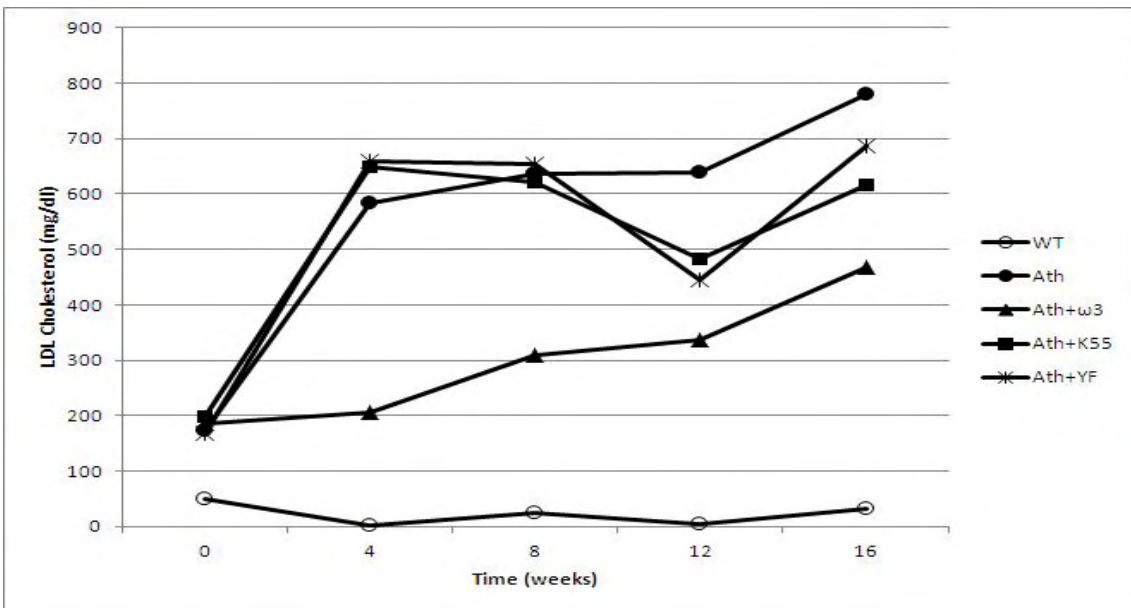


그림 4-11. LDL Cholesterol (LDL)의 시간(주)에 따른 변화

- 16주 소재 섭취 이후 최종 혈중 내 지질 변화는 중성지방, 총 콜레스테롤 함량에서 동맥경화 유도 식이군에 비해 omega-3(Ath+ω3), *L. plantarum* HY7712(Ath+K55-5), 야채발효균 (Ath+YF)에서 유의적으로 감소하는 것으로 확인되었다(그림 4-12). HDL 콜레스테롤 함량은 모든 군 간의 유의성은 없었지만, LDL 콜레스테롤에서는 omega-3(Ath+ω3)와 시험대조군인 *L. plantarum* HY7712(Ath+K55-5)를 섭취한 군에서 유의적으로 감소하는 것으로 확인되었다.

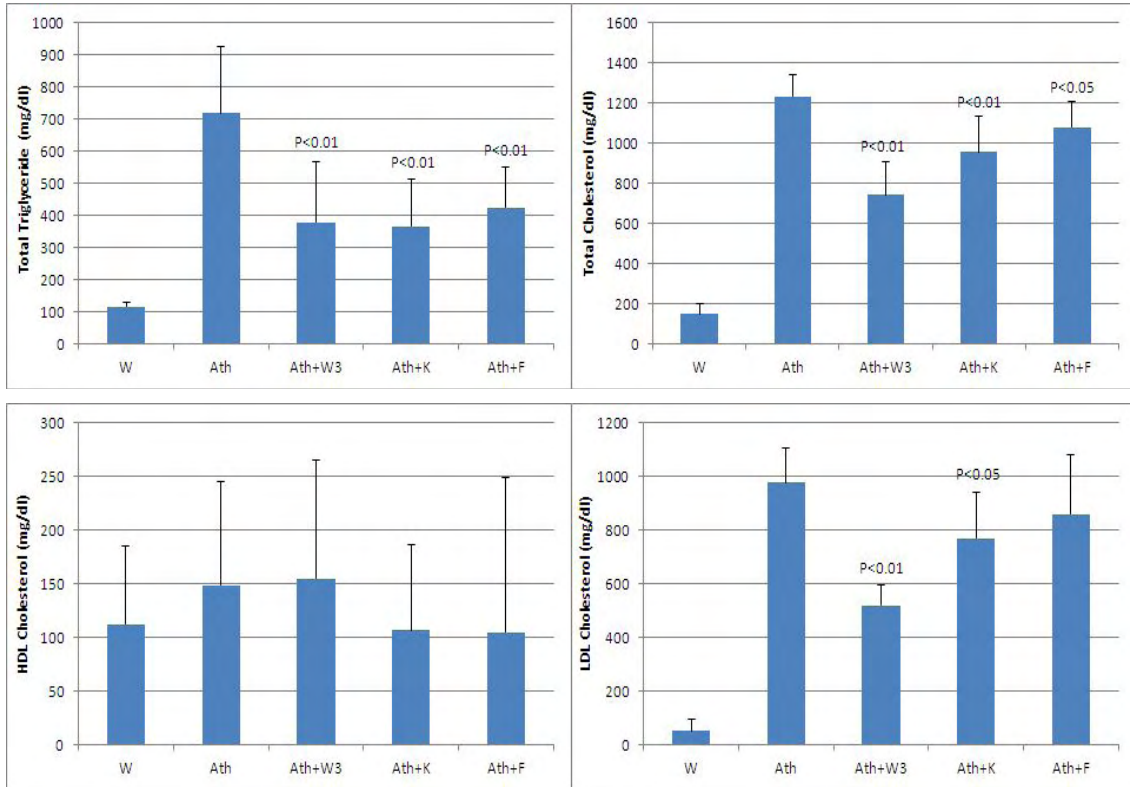


그림 4-12. 16주 식이 섭취 이후의 최종 혈중 지질 분석  
(왼쪽 위로부터 TG, TC, HDL, LDL)

- 서론에서 서술하였다시피 LDL-콜레스테롤의 경우 활성산소와 만나 산화되면 대식세포에 흡수되어 지속적으로 축적되게 된다. 산화된 LDL-콜레스테롤이 축적된 대식세포는 혈관 벽 안쪽에 쌓여서 거품세포(foam cell)를 형성하게 되는데 거품세포는 서로 뭉쳐 지방조직과 같이 커지게 되고 혈관 근육세포인 smooth muscle cell까지 여기에 붙어, 결과적으로는 혈관 내벽이 지방으로 밀려나오는 지방반(fatty plaque)을 형성하게 된다. 또한 초기에 혈관벽에서 일어나는 단백질의 소집과 대식세포의 분화는 혈관에 침입한 세포독성이 있는 산화된 LDL-콜레스테롤을 제거하고자 혈관을 보호하는 측면에서 일어나는 작용이라 볼 수 있지만, 대식세포가 지속적으로 침윤되어 산화된 LDL-콜레스테롤을 계속 섭취하게 되면 동맥경화증의 병변이 점차 심해진다고 보고되어 있다. 이에 따라 산화된 LDL-콜레스테롤은 동맥경화 병변을 유도하는 중요한 인자가 된다. 16주간 소재를 섭취한 군별로 산화된 LDL-콜레스테롤의 양을 정량적으로 확인하였다. 산화된 저밀도 지단백(LDL)-콜레스테롤은 ELISA법(USCN Life science사)으로 측정하였다. 산화된 LDL-콜레스테롤은 동맥경화식이군(Ath)과 비교하였을 때, omega-3(Ath+W3)군, *L. plantarum* HY7712(Ath+K55-5)군, 야채발효물(Ath+YF)군에서 모두 유의적으로 감소하는 것을 확인하였다. 특히 *L. plantarum* HY7712(Ath+K55-5)군, 야채발효물(Ath+YF)군은 모두 양성대조군인 omega-3군보다 더 유의적으로 감소하는 것을 확인하였다(그림 4-13).

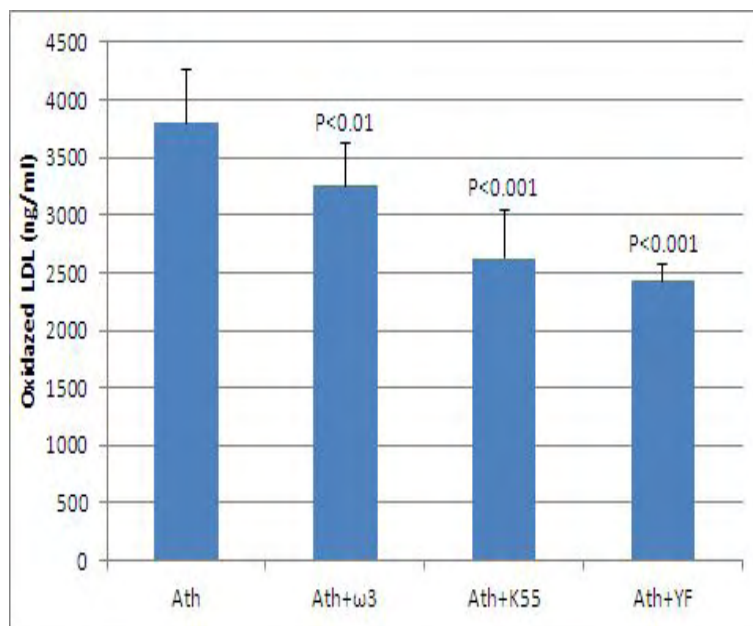


그림 4-13. 혈장 내의 산화된 LDL (Oxidized LDL)

(5) 혈중 대사성 단백질(Metabolic hormone) 발현 변화

- 16주 동안 소제 투여 후 희생하여 간문맥에서 전혈을 채취하고 혈장에서 혈중 대사성 단백질인 Ghrelin, GIP, Leptin, PAI, Resistin을 측정하였다. Ghrelin은 위 기저부의 신경내분비 세포에서 주로 합성되는 펩타이드로서 growth hormone secretagogue receptor(GHS-R)에 대한 내인성 리간드로 작용하는 호르몬이다. Ghrelin은 뇌하수체로부터 성장호르몬의 분비를 촉진하며, 시상하부를 통한 작용을 통해 식욕을 증가시키는 기능을 갖는다. 지방조직에서 생성되어 식욕억제인자로 작용하는 leptin의 자연적인 길항제로 작용한다. 따라서 배고픔 및 굶주림에 반응하여 위장관에서 합성되어 분비되어 음식 섭취를 촉진하도록 중추에 신호를 보내는 말초 신호의 역할을 담당한다. Ghrelin의 증가는 음식섭취를 현저히 증가시키는 것으로 확인되었다. GIP는 Gastric inhibitory polypeptide의 약자로서, glucose-dependent insulinotropic peptide와 같이 작용하여, 호르몬과 같은 기능을 갖는다. GIP는 전통적으로 위산을 중화시켜, 소장세포를 위산으로부터 보호한다고 알려져 있으나, 현재에는 insulin 분비를 유도하는 작용을 갖는 것으로 보고되고 있다. Leptin은 지방세포에서 발현하는 adipokine으로, 음식물 섭취를 억제하고, 체중을 감소하며, 에너지 소비를 촉진시키는 것으로 알려져 있다. Leptin의 발현은 음식물 섭취 후에 증가하고 공복 시에는 감소한다. 한편, leptin의 발현이 감소하게 되면 인슐린의 저항성(resistance)을 일으키는 것으로 알려져 있다. 혈전현상을 특징으로 하는 질환에서는 Plasminogen activator inhibitor-1(PAI-1)이 높은 활성도를 보이는데, PAI-1의 수치는 당뇨병, 심근경색증, 비만 등에서 높다고 밝혀진 바 있다. 또한 당뇨병 환자들의 합병증의 주요한 병인은 죽상경화증으로 혈전현상이 특징인 질환에서 증가하는 PAI-1이 당뇨병 환자에서 높다. Resistin은 지방 조직에서 분비되는 단백질이며 이것이 LDL의 높은 수치를 발생시키는 단백질이라고 알려져 있다. Resistin 단백질은 인간의 간에서 LDL의 생성을 촉진함과 동시에 간에서 LDL과 결합하는 수용체를 분해함으로써, 간이 LDL 제거에 실패하게 되고 그 결과로 신체 내 LDL의 수치를 높인다고 보고되었다. 따라서 Resistin의 감소는 LDL 생성을 억제하는데 크게 기여하게 된다.

- Omega-3, *L. plantarum* HY7712, 그리고 야채발효물을 16주간 투여 후 동맥경화 유발 식이군(Ath)과 비교하였을 때, Leptin과 Resistin이 유의적으로 감소하는 것을 확인하였다(그림 4-15, 4-16). Leptin과 Resistin 이외의 대사질환과 관련이 있는 단백질인 Ghrelin, GIP의 발현은 유의성이 관찰되지 않았지만, GIP는 증가하는 경향을 확인할 수 있었다(그림 4-14~4-16). Leptin과 Resistin은 모두 지방조직에서 분비되는 단백질이므로, 그림 4-6에서 확인한 바와 같이 개체별 지방 조직의 중량은 소제 투여군에서 감소하는 것을 확인할 수 있었기 때문에 Leptin과 Resistin의 발현이 감소할 수 있었던 것으로 생각되어진다.



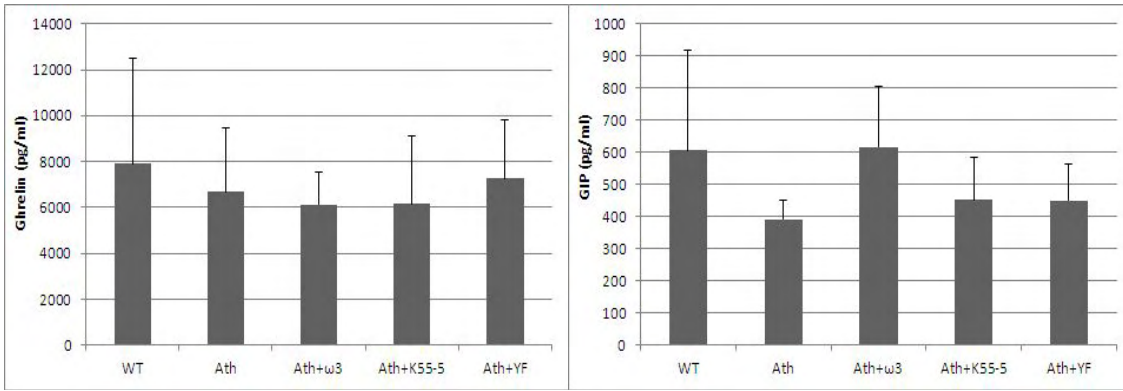


그림 4-14. 혈장 내 Ghrelin, GIP의 발현 변화

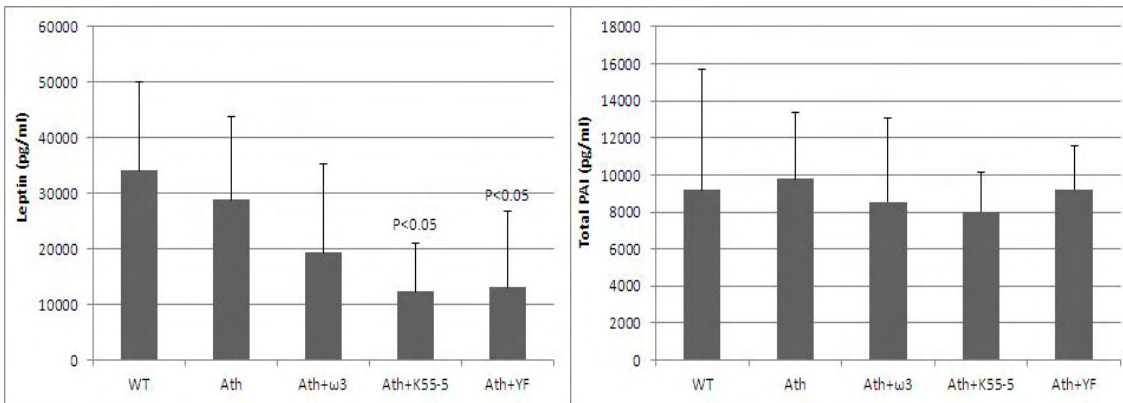


그림 4-15. 혈장 내 Leptin, PAI의 발현 변화

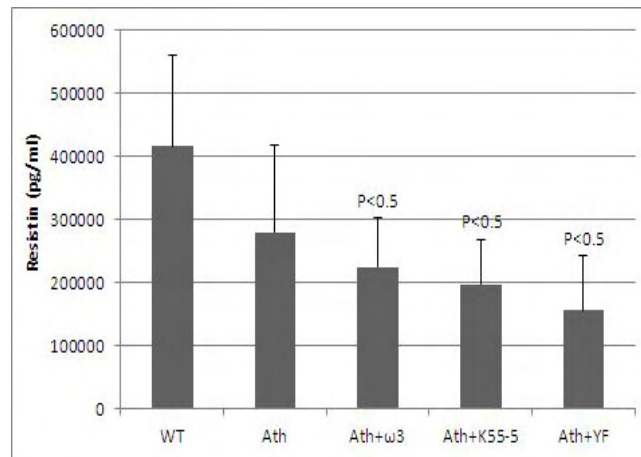


그림 4-16. 혈장 내 Resistin의 발현 변화

(6) 혈중 cytokine의 발현 변화

- 16주간 소재 투여 후 희생하여 간문맥에서 전혈을 채취하고 혈장에서 cytokine인 IL-1 $\beta$ , IL-6, MCP-1, TNF- $\alpha$ , IL-17 그리고 IL-10을 측정하였다. 소재 투여 후 양성대조군인 omega-3군과 비교하였을 때, *L. plantarum* HY7712 및 야채발효물을 투여한 군에서 우수한 염증성 cytokine의 감소효과를 유의적으로 나타내었다(그림 4-17~4-19). 특히, 동맥경화와 밀접한 관련이 있는 IL-1 $\beta$ , IL-6, MCP-1, TNF- $\alpha$ 의 저하효과가 유의적으로 나타남을 확인할 수 있었으며, IL-17의 감소도 두드러지게 나타남을 확인하였다. 내피세포에서 분비되는 MCP-1(monocyte chemotactic protein-1)은 화학주성 단백질 분자로 작용한다. 단핵구에 있는 CCR-2는 MCP-1의 수용체로서 고콜레스테롤혈증에 의해 발현이 증가된다는 보고가 있다. 또한 최근 실험결과에 따르면 IL-17과 함께 TNF- $\alpha$ 의 동반 작용으로 응혈 촉진과 혈전증 촉진이 동반됨을 나타낸 결과가 확인되었기 때문에 TNF- $\alpha$ 와 IL-17의 동반적이고 유의적인 감소는 동맥경화 병변 감소 및 혈전 감소에 의미가 있다고 할 수 있다. 또한 IL-10은 Th1 세포를 조절하고 대식세포의 활성을 억제하며, 동맥경화반의 형성을 억제한다고 알려져 있다. IL-10이 결핍된 생쥐는 혈관 벽에 콜레스테롤 침착이 3배 이상 증가하였고 IL-10을 과발현 시키면 동맥경화증의 발생이 감소하는 것으로 보아 IL-10은 강력한 항동맥경화 cytokine 중에 하나로 알려져 있다. 시험결과에서는 omega-3 투여군에서 IL-10의 발현이 증가하는 경향을 나타냈지만 각 군간 유의한 차이는 없었다.

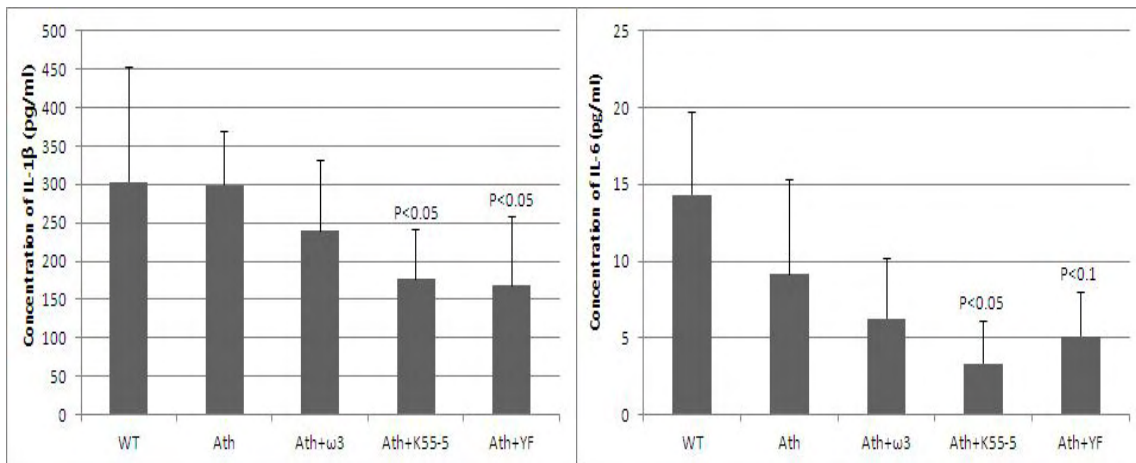


그림 4-17. 혈중 cytokine 발현 변화 확인 (IL-1 $\beta$ , IL-6)

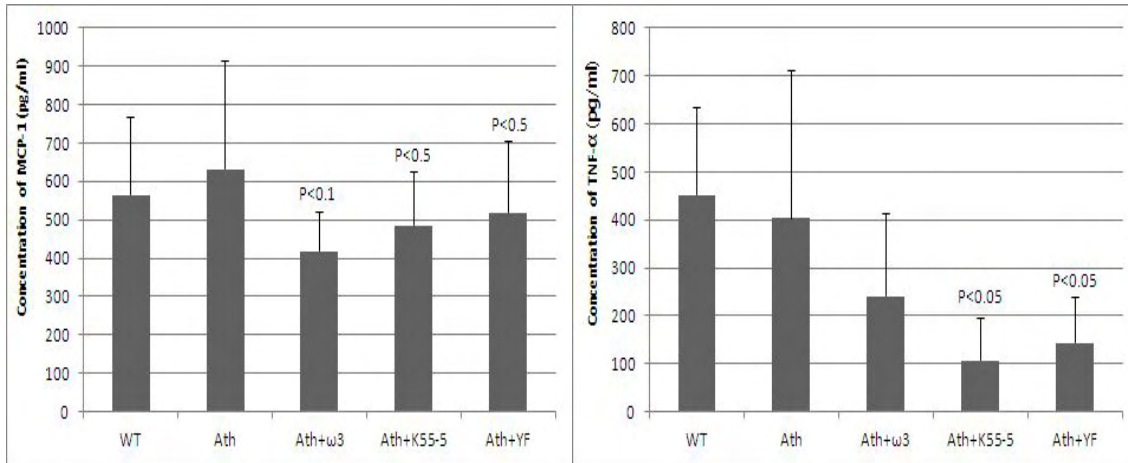


그림 4-18. 혈중 cytokine 발현 변화 확인 (MCP-1, TNF-α)

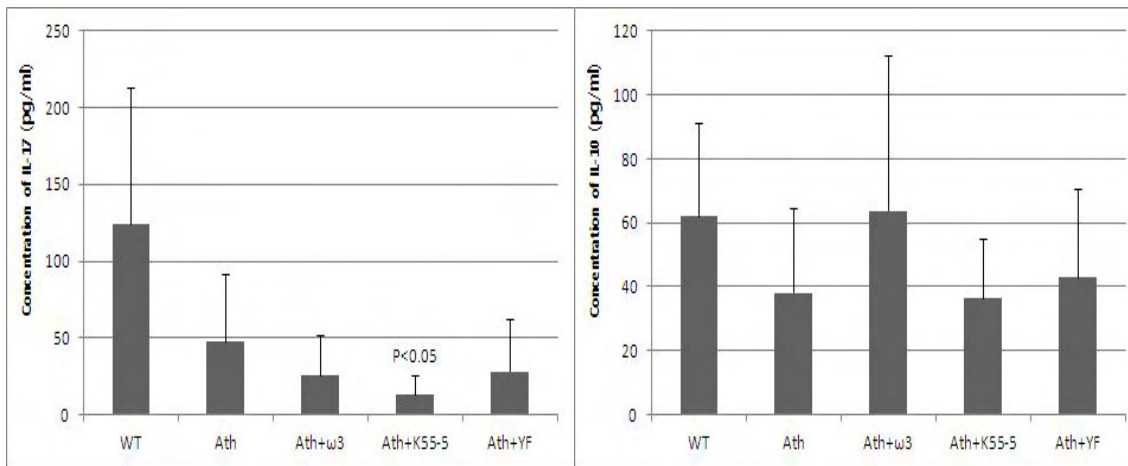


그림 4-19. 혈중 cytokine 발현 변화 확인 (IL-17, IL-10)

(7) 간 조직의 지질 변화

- <(4) 혈중 콜레스테롤 변화>에서 확인했던 바와 같이 16주 소제 섭취 이후 최종 혈중 내 지질 변화는 중성지방, 총 콜레스테롤 함량에서 동맥경화 유도 식이군에 비해 양성대조군인 omega-3(Ath+ω3)를 비롯하여 *L. plantarum* HY7712(Ath+K55-5), 야채발효균(Ath+YF)에서 유의적으로 감소하는 것으로 확인되었다(그림 4-12). 또한 LDL 콜레스테롤은 omega-3(Ath+ω3)와 *L. plantarum* HY7712(Ath+K55-5)를 섭취한 군에서 유의적으로 감소하는 것이 확인되었다.

- 이러한 혈중 콜레스테롤의 감소와 간 조직 내의 콜레스테롤 변화와 관련성이 있는지를 확인하기 위해, 간 조직 내의 지질 변화를 확인하였다. 간 조직 내의 콜레스테롤 함량이 *L. plantarum* HY7712 투여군 및 양성 대조군인 omega-3 투여군에서 전체적으로 유의성 있게 감소하는 것을 확인할 수 있었다(그림 4-20). 특히 *L. plantarum* HY7712를 섭취한 군에서는 중성지방, 총 콜레스테롤은 감소하고 HDL 콜레스테롤은 증가하여, 결론적으로 LDL 콜레스테롤이 감소하는 효과를 보여주었다. 야채발효물 투여군(Ath+YF)에서는 간 조직 내 지질 변화가 가장 뚜렷이 나타나는 것으로 확인되었으며, 양성대조군인 omega-3 투여군보다 총 콜레스테롤, 중성지방, LDL 콜레스테롤이 더욱 감소하는 것을 확인하였다.

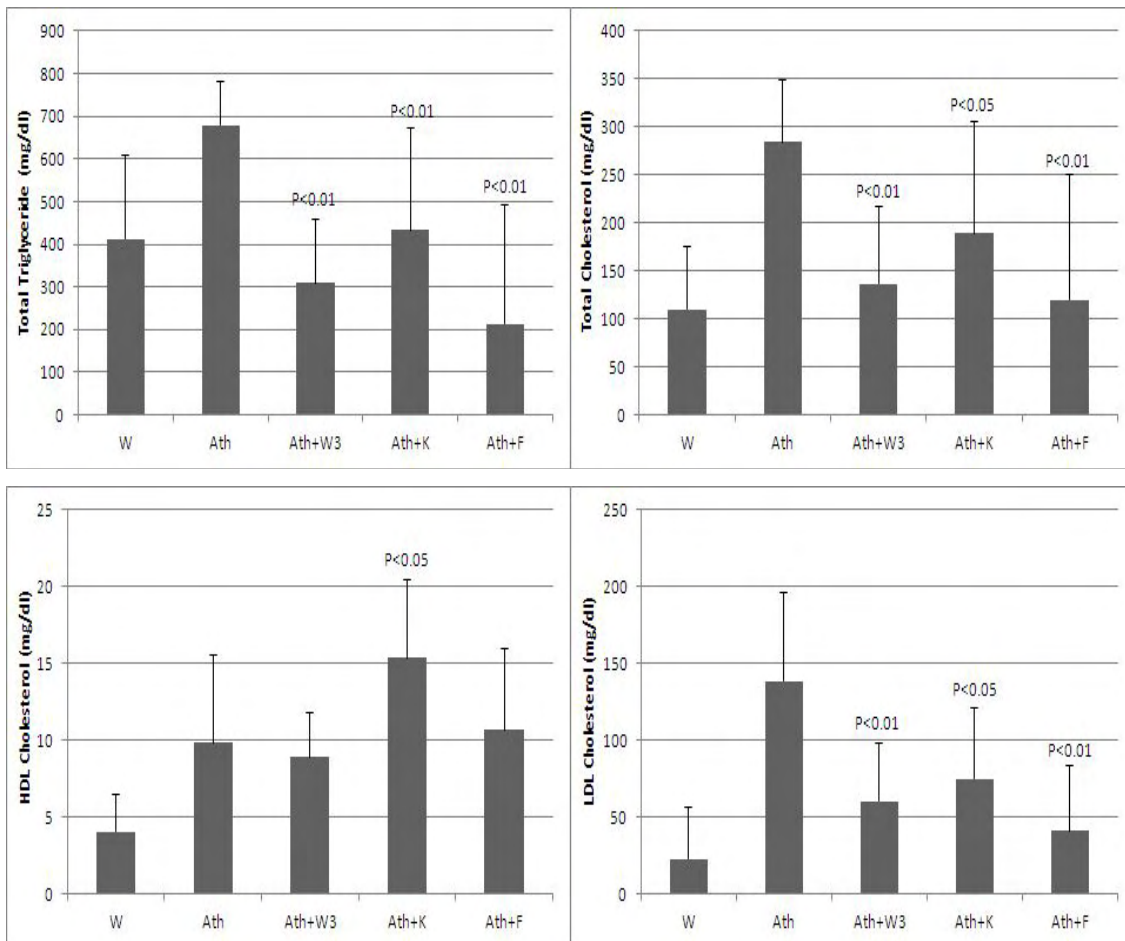


그림 4-20. 16주 식이 섭취 이후의 간지질 분석  
(왼쪽 위로부터 TG, TC, HDL, LDL)

(8) 대동맥의 조직병리학적 분석

16주 소제 섭취 이후 각 소제 섭취 군별 실험동물의 심장 대동맥을 일정하게 분리하여 슬라이드 절편을 만들고 H&E staining과 Masson's trichrome staining을 통해 지방반(fatty plaque)의 형성과 크기 및 동맥경화 병변 정도를 관찰하였다. 지방반 형성율은 고 콜레스테롤 식이를 섭취한 대조군 그룹은 지방반 형성을 모두 하였지만, 소제 식이 섭취군에서는 약 45~65% 정도 지방반을 형성하는 것으로 확인되었다. 또한 동맥경화의 조직병리학적 점수에 따라 그 정도를 확인한 결과, 고 콜레스테롤 식이를 섭취한 대조군은 대부분 포말성 대식세포 및 지질을 함유한 평활근 세포를 관찰하고, 지방 및 콜레스테롤 cleft를 함유하는 죽상을 형성하는 단계에 있음을 확인할 수 있었으며, 본 대조군에 비해 소제 투여군은 보통 지질을 함유한 포말성 대식세포의 침윤 및 혈관 내막층의 경도가 비후함을 확인할 수 있었다. 따라서 그 정도를 점수화하여 대조군 대비한 백분율로 표시한 결과, omega-3 소제를 섭취한 군에서 평균 44%, *L. plantarum* HY7712(K55-5)를 섭취한 군에서는 61.11%, 야채 발효물 소제를 섭취한 군 (Ath+YF)에서는 66.66%의 점수를 확인하여, 대동맥의 조직병리학적 분석결과에서도 동맥경화의 억제 효과를 확인해 볼 수 있었다(표 4-7, 그림 4-21).

	Ath	$\omega$ 3	K55-5	YF
지방반 형성율 (%)	10/10(100%)	6/10(60%)	6/10(60%)	6/10(60%)
동맥경화의 조직병리학적 정도 (%)	100%	44.44%	61.11%	66.66%

표 4-7. LDLR KO mice의 대동맥 지방반 형성율

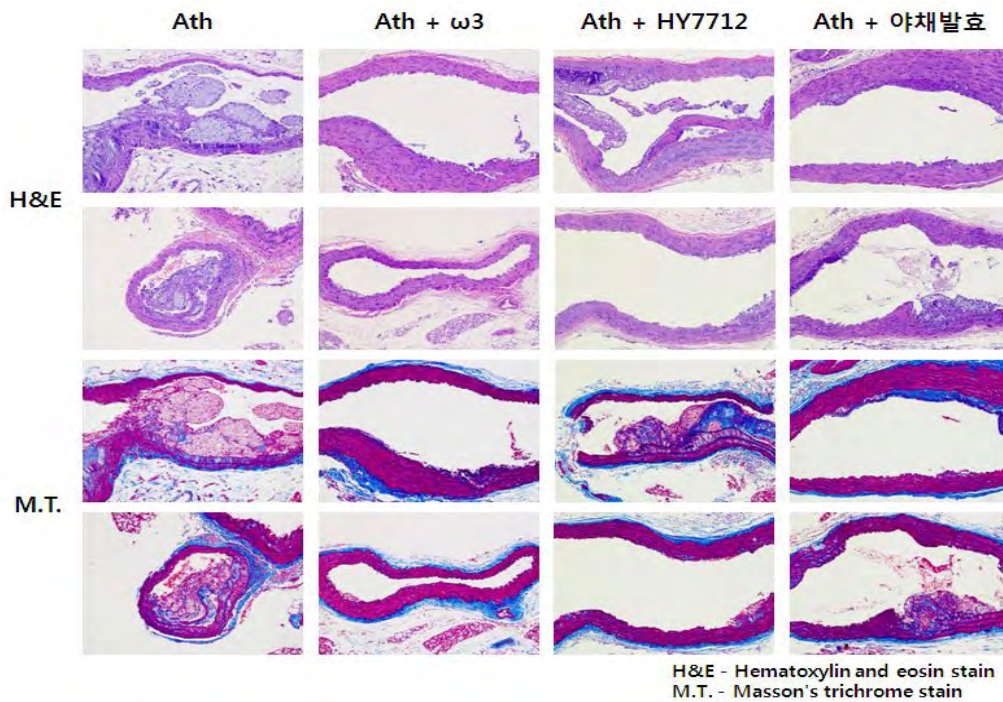


그림 4-21. LDLR KO mice의 대동맥 지방반의 조직 병리학적 관찰 결과

다. 야채 발효물 제품개발

(1) 원재료 생산

- 당사의 제조 공정에 용이하게 야채베이스의 배합비를 조정하고(표 4-8), 야채발효 유산균의 성장 정도를 비교하였다. 변경된 배합비에서도 1차 년도에 선발한 야채발효 우수균주는 모두 24시간 내에 10<sup>9</sup> CFU/mL 수준으로 성장하였다. 기능성 유산균인 *L. plantarum* K55-5는 야채 베이스를 대량으로 발효시키는 pilot 실험에서도 적정 수준으로 성장하였고 발효물의 풍미가 개선되는 효과를 나타내어 ‘식물성유산균발효야채혼합즙’으로 품목제조 신고하여 원재료로 이용하였다.

변경전		변경후	
원재료명	함량(%)	원재료명	함량(%)
보라당근	5.9	보라당근	6
야채농축액	2.2	야채농축액	22
야채혼합즙	0.5	야채혼합즙	71
정제수	91.4		
pH 4.5, Brix 7.03		pH 4.77, Brix 16.94	

표 4-8. 야채베이스 배합비

(2) 제품생산

당사의 <100% 야채와 과일 하루야채 퍼플>에 2011년 8월부터 ‘식물성유산균발효야채혼합즙’을 첨가하여 제품을 생산(그림 4-22), 판매하였으며, 2011년 한 해 2,702,966본을 판매하여 2,935,110,961원의 매출을 기록하였고, 2012년 한 해 5,706,719본을 판매하여 6,823,394,418원의 매출을 기록하였다. 2013년 4월 7일까지 현재 1,440,000,000원의 매출을 달성하고 있다.



그림 4-22. 하루야채 퍼플

- *L. plantarum* HY7712(K55-5)로 국내산 남해 흑마늘을 발효시켜 당사의 <한국야쿠르트 흑마늘즙>(그림 4-23)을 2012년 7월에 출시하여 2012년 출시 이후 12월 31일까지 2,420,000,000원의 매출을 달성하였고, 2013년 4월 7일 현재까지 1,240,000,000원의 매출을 기록하고 있다.



그림 4-23. 한국야쿠르트 건강 흑마늘즙

- 경북 영주 및 의성산 도라지를 *L. plantarum* HY7712(K55-5)로 발효시켜 만든 <한국야쿠르트 도라지즙>(그림 4-24)을 2012년 7월에 출시하여 2012년 출시 이후 12월 31일까지 1,760,000,000원의 매출을 달성하였고, 2013년 4월 7일 현재까지 830,000,000원의 매출을 기록하고 있다.



그림 4-24. 한국야쿠르트 도라지즙

2. 제4-2세부연구과제(발효음료의 효능 검증)

가. 시험내용 - 면역저하 동물모델에서의 유산균의 면역증강 효능평가

- (1) BALB/c mice의 비장세포와 복강대식세포를 분리한 후 유산균(K55-5, K8)을 처리한 in vitro 배양 상등액에서 사이토카인 레벨 분석
- (2) BALB/c mice에 cyclophosphamide를 복강 주사하여 면역 저하를 유발한 후 유산균 (K55-5, K55-5+K8)을 경구투여 실시. 면역증강 활성이 있는지 여부를 사이토카인 ( IL-12 및 IFN- $\gamma$ ) 레벨 분석
- (3) BALB/c mice에 cyclophosphamide를 복강 주사하여 면역 저하를 유발한 후 유산균 (K55-5, K55-5+K8)이 포함된 사료를 섭취하게 함. 장관면역과 밀접한 관계를 갖는 IgA의 양을 측정하여 장관면역 활성을 분석

나. 시험 물질 - 김치에서 분리한 유산균 *Lactobacillus plantarum* K8(미립화 유산균)과 *Lactobacillus plantarum* K55-5 (생균)을 사용하였다.

다. 시험 계획

(1) Study design of *in vitro* experiment

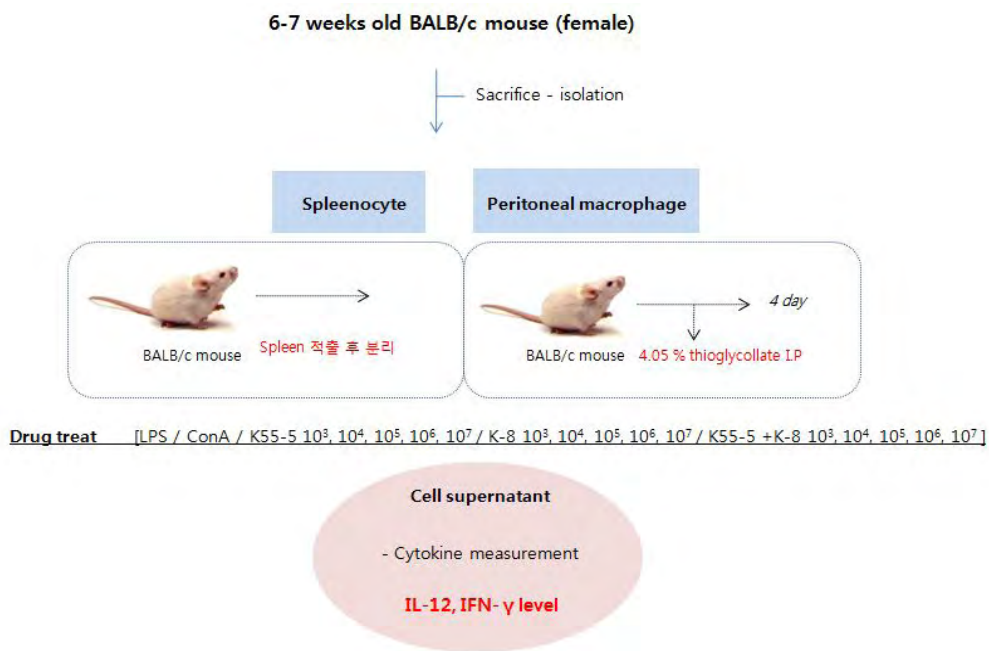


그림 4-25. 유산균 시료의 *In vitro* 시험 계획



### 3.2 Study design of *in vivo*, *ex vivo* experiment

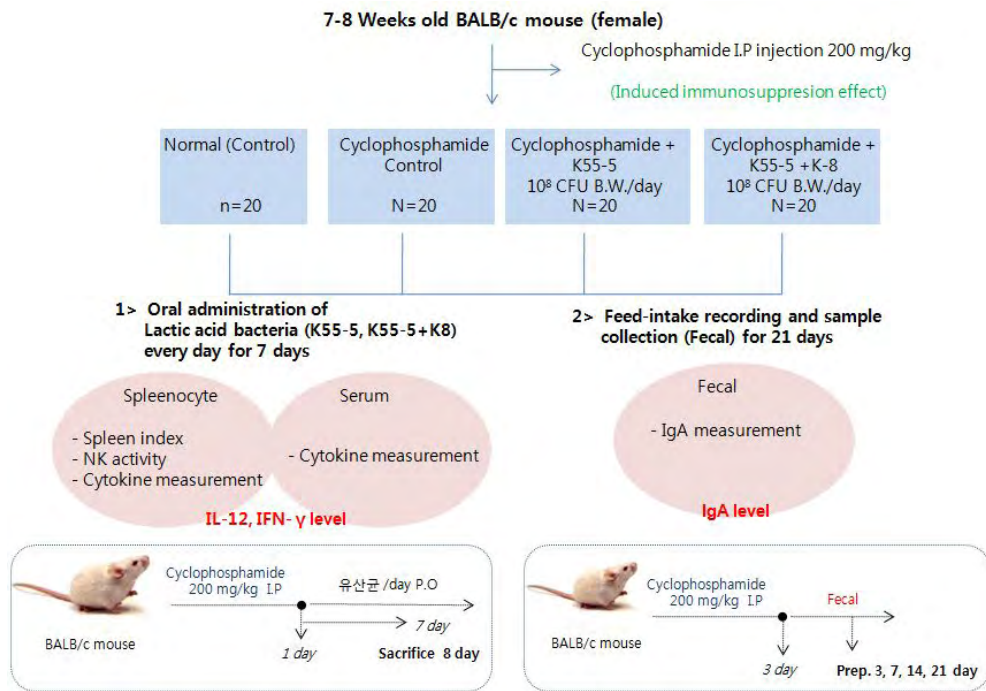


그림 4-26. 유산균 시료의 *In vivo* 시험 계획

#### 라. 재료 및 방법

##### (1) *In vitro*

##### (가) 재료

시약 및 재료 명	제조사	Catalog No.
RPMI1640	Welgene	LM011-01
DMEM	Welgene	LM001-10
IFN- $\gamma$ ELISA kit	ENZO	ADI-900-137
Mouse IL-12 p70 IDELISATM	ID Labs	IDEL-Mu12
ACK lysing buffer	Lonza	10-548E
24 well plate	SPL	30024
96 well plate	SPL	30096
LDH Cytotoxicity Assay Kit	Bioworld	526102
IgA ELISA kit	Bethyl	E99-103

(나) 비장세포의 분리 및 배양

- 경추 탈골 법으로 희생시킨 마우스의 비장을 무균적으로 적출하여 RPMI 1640 용액으로 씻은 다음 cell strainer와 syringe 끝부분을 이용하여 가볍게 분쇄하여 세포를 유리시켰다. 분리된 세포 현탁액을 100  $\mu$ m cell strainer에 통과시킨 후 15 ml tube에 넣고 4°C, 1,500 rpm에서 10분간 원심분리 시킨 후 cell pellet을 ACK Lysing Buffer에 1분간 현탁시켜 적혈구를 제거하였다. 위의 세포는 다시 RPMI 1640으로 2회 원심 세척한 다음, 세포 부유액을  $2 \times 10^6$  cells/ml의 농도로 분주하여 10% FBS를 함유하는 RPMI 1640 배지를 넣고, 37°C를 유지하여 5% 이산화탄소를 포함하는 배양기 내에서 배양하였다.

(다) 복강 대식세포의 분리 및 배양

- 8주령의 BALB/c 마우스에 4.05% brewer thioglycollate medium을 부검하기 4일전에 마리당 3 ml씩 복강 주사한 후, 복강 마사지를 충분히 하여 DMEM 배지를 이용하여 부유액을 수거하였다. 15 ml tube에 넣고 4°C, 1,500 rpm에서 10분간 원심분리 시킨 후 cell pellet을 ACK Lysing Buffer에 1분간 현탁시켜 적혈구를 제거하였다. 위의 세포는 다시 DMEM으로 2회 원심 세척한 다음, 분리된 복강대식 세포를 plate에  $2 \times 10^6$  cells/ml의 농도로 분주하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에 넣어 2시간 배양시킨 후 상층액을 제거하고 warm media로 세척하여 미부착세포를 제거한 후 사용하였다.

(라) NK activity의 측정

- BALB/c 마우스의 비장을 멸균적으로 취하여 비장세포(effector cell; E)를 준비하였다. 96-well plate에 마우스로부터 얻은 비장세포와 NK-sensitive 세포로 알려진 YAC-1 세포(target cell; T)를, E/T 비가 50:1 되도록 조정하여 24시간 동안 공동 배양하였다. 배양종료 후에 원심분리를 통하여 배양 상등액을 취한 후 살해된 암세포가 유리한 LDH의 양을 kit를 이용하여 제조사의 지침에 따라 측정하였다.

(마) 분변 상등액의 분리

- 신선한 분변 2-4알을 tube에 채취하여 중량을 측정하고 10 mg 당 100  $\mu$ l의 0.02% sodium azide 용액을 가하여 30분간 방치 후 vortex mixer에 의해 강하게 교반하여 현탁액을 만들어 7000rpm에서 10분 원심분리한 후 배양 상등액을 취해 ELISA법에 의해 IgA의 양을 측정하였다.

(바) 사이토카인의 측정

- -80°C에 보관되어 있던 배양 상등액 및 혈청 시료를 사용하여 사이토카인 측정에 사용하였다. 측정방법은 IFN- $\gamma$  및 IL-12 ELISA Kit을 이용하여 제조사가 제시한 방법에 준하여 ELISA법으로 정량하였다.

(사) 통계

- *In vitro* 시험에서의 3회 이상 실험의 평균치는 mean ± SD로 표시하였으며, 반복실험 평균치간의 통계처리는 Student's t-test를 사용하였으며 유의확률 P<0.05에서 평균값 간의 유의적 차이를 구하였다.

(2) *In vivo*

(가) 시험계

- 본 평가에 사용된 모든 동물 실험은 경기바이오센터에서 운영하는 동물실험윤리위원회의 승인(승인 번호 2012-10-0010)후 수행하였다.

- 생후 6주의 BALB/c 암컷 마우스는 나라바이오텍(Seoul, Korea)에서 구입하여 사용하였다. 모든 마우스는 온도 24±2°C, 습도 50±10%로 최적 환경 조건을 유지시킨 실험실에서 12hr/day 명암 주기로 사육 하였으며, 사료는 자유롭게 섭취하도록 하였다. 실험 전 최소 1주일의 안정화 기간을 두어 순화 시킨 후 실험에 사용하였다.

(나) 시험 방법

① 투여물질: 면역저하 물질로 알려진 cyclophosphamide를 복강주사한 후, 매일 경구투여로서 마우스에 마리당 200µl를 경구투여(6×10<sup>9</sup> CFU/ml; 2회/일) 후 비장 분리 및 혈액 채취 또는 매일 사료(6×10<sup>9</sup> CFU/ml; 자유 섭취) 섭취 후 날짜별로 분변을 수거 하였다.

	경구투여 (비장 분리 및 혈액 채취)	사료섭취 (분변 수거)
정상 대조군	Saline	AIN93G 사료
면역저하 대조군	Saline	AIN93G 사료
면역저하 + K55-5군	K55-5	AIN93G(K55-5 혼합)
면역저하 + K55-5 + K8군	K55-5 + K8	AIN93G (K55-5 + K8 혼합)

② 면역저하 유도

㉠ 유발방법: cyclophosphamide를 200 mg/kg으로 복강주사 1회 실시하였다.

㉡ 측정방법: 복강주사 실시 7일 후 안와채혈을 통하여 혈청을 분리한 후 ELISA 법에 의하여 IFN-γ의 양을 확인하였다.

③ 분변의 수거

- 수거한 분변에 대한 수거는 다음과 같이 진행되었다. 실험에 사용된 BALB/c 마우스는 40마리를 정상대조군, CY 처리대조군(AIN93G), CY처리 후 유산균을 포함한 고체사료 투여군(AIN93G+K55-5, AIN93G+K55-5+K8) 총 4 군으로 구분하여 21일간 자유섭식을 하게 한 다음 소장의 IgA 항체 생산 응답에 미치는 영향을 알아보기 위하여 매 실험 당일 신선한 분변을 마리당 2~3알 씩 e-tube에 수거하였다.

④ 시험 항목

㉠ 일반증상관찰

- 모든 동물에 대하여 매일 1회 일반증상관찰을 실시하였으며, 일반증상관찰은 시험이 종료되는 시점까지 계속 실시하였다.

㉡ 체중 및 비장의 적출

- 체중 측정과 비장무게를 측정함으로써 마우스에 대한 경구투여와 고체사료의 영향을 확인하였다.

- 무균적으로 비장을 적출하여 비장의 무게를 측정한 뒤, 실험동물 체중의 차이에 따른 변이를 없애고 이를 표준화하기 위하여 적출 비장의 무게와 마우스의 체중을 바탕으로 아래의 공식에 따라 비장 지수를 구하였다.

1) 비장-체중 지수 = 비장무게 (g)/ 체중 (g)×100

2) 비장지수 = 시험군에서 비장-체중 지수의 평균 / 대조군에서의 비장-체중 지수의 평균

⑤ 자료의 통계처리

- 실험동물의 분석은 기간단계와 군별 Figure와 평균 및 표준오차로 정리한 Table을 이용하여 경향을 분석하였으며, 통계프로그램 SPSS를 이용하여 ANOVA와 사후 분석으로는 Tukey test, independent T-test, Dunnett T3, Kruskal-wallis multiple comparison test를 수행하였다.

마. 시험 결과

(1) *In vitro*

(가) 비장세포에서 유산균의 처리 시 사이토카인의 변화 측정

- 본 실험에서 측정된 IL-12 및 IFN- $\gamma$ 는 면역조절 기능을 하는 주요 사이토카인으로 알려져 있다. 각각의 기능을 간략하게 알아보면, IL-12는 다양한 면역 증강 기능과 우수한 항암면역을 가지는 사이토카인, 그리고 IFN- $\gamma$ 는 대식 세포를 활성화하여 대식세포의 미생물 살해능력을 증가시키며, Th-1 cell의 분화를 촉진하는 IL-12를 만들어내는 기능을 가진다.
- 이들 사이토카인의 측정을 위하여, BALB/c 마우스의 비장을 적출하여 단일 세포로 분리한 후, 유산균을 처리하였다. 각각 대조군과 양성 대조군 (LPS 50 ppm, ConA 5 ppm), 유산균 처리군 으로 나누어 ELISA를 수행하였다(K8, K55-5 및 K55-5+K8 군 각각에 대하여 IFN- $\gamma$  측정 실험군은  $10^5$ ,  $10^6$ ,  $10^7$  CFU 처리, IL-12 측정 실험군은  $10^3$ ,  $10^4$ ,  $10^5$ ,  $10^6$  CFU 처리함).
- 그 결과, K8, K55-5 단독 처리군 및 K55-5+K8 혼합처리 군에서 IL-12, IFN- $\gamma$ 의 경우 대조군에 비해 농도 의존적으로 유의하게 증가하였다. IFN- $\gamma$ 의 경우 K8, K55-5 단독 처리군 및 K55-5+K8 혼합처리 군에서  $10^7$  CFU 농도에 가장 높은 활성을 보였다. IL-12의 경우에는 K8 단독처리군이  $10^6$  CFU 농도에서 높은 활성을 보였으며, K55-5 단독처리군K55-5+K8 혼합처리 군은  $10^7$  CFU 농도에서 가장 높은 활성을 보였다(그림 4-27).

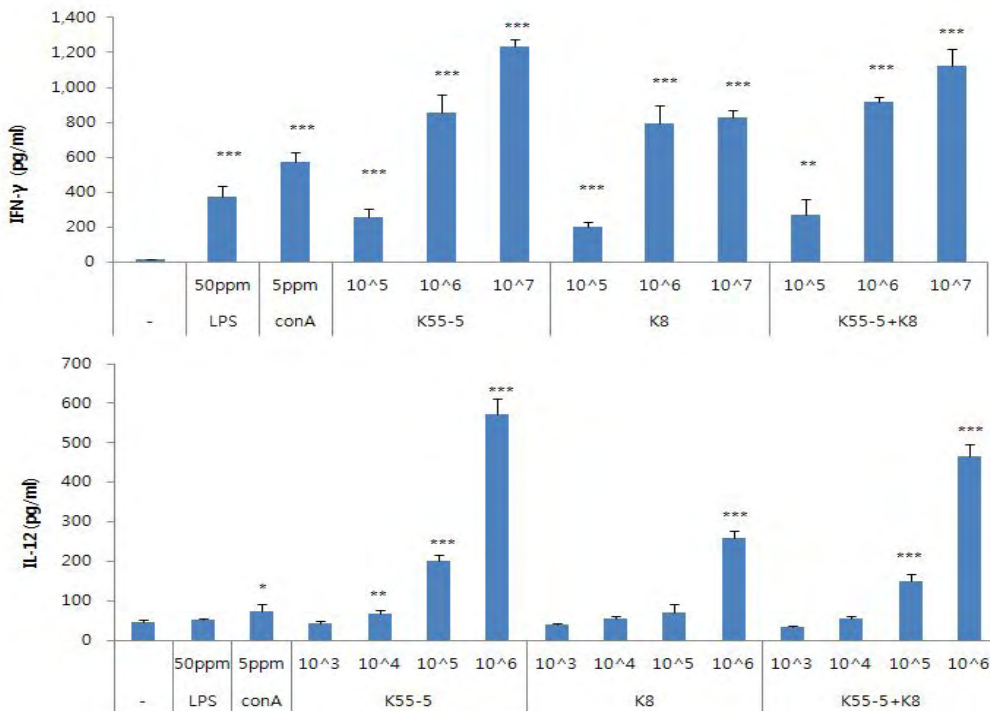


그림 4-27. 비장세포에 대한 사이토카인 변화량  
 $p < 0.05$ : \*;  $p < 0.01$ : \*\*;  $p < 0.001$ : \*\*\* us. control

(나) 복강대식세포에서 유산균의 처리 시 사이토카인의 변화 측정

- BALB/c mouse에 thioglycollate를 4일전에 복강 주사하여 DMEM으로 수거하여 단일 세포로 분리 한 후, 유산균을 처리하였다. 각각 대조군과 양성 대조군 (LPS 1 ppm, ConA 2 ppm), 유산균 처리군 (K8, K55-5 및 K55-5+K8 군 각각  $10^4$ ,  $10^5$ ,  $10^6$  CFU 처리)으로 나누어 ELISA를 수행하였다. K8, K55-5 및 K55-5+K8 군에서 모두 IL-12, IFN- $\gamma$ 의 경우 농도 의존적으로 유의하게 증가하였다(그림 4-28).

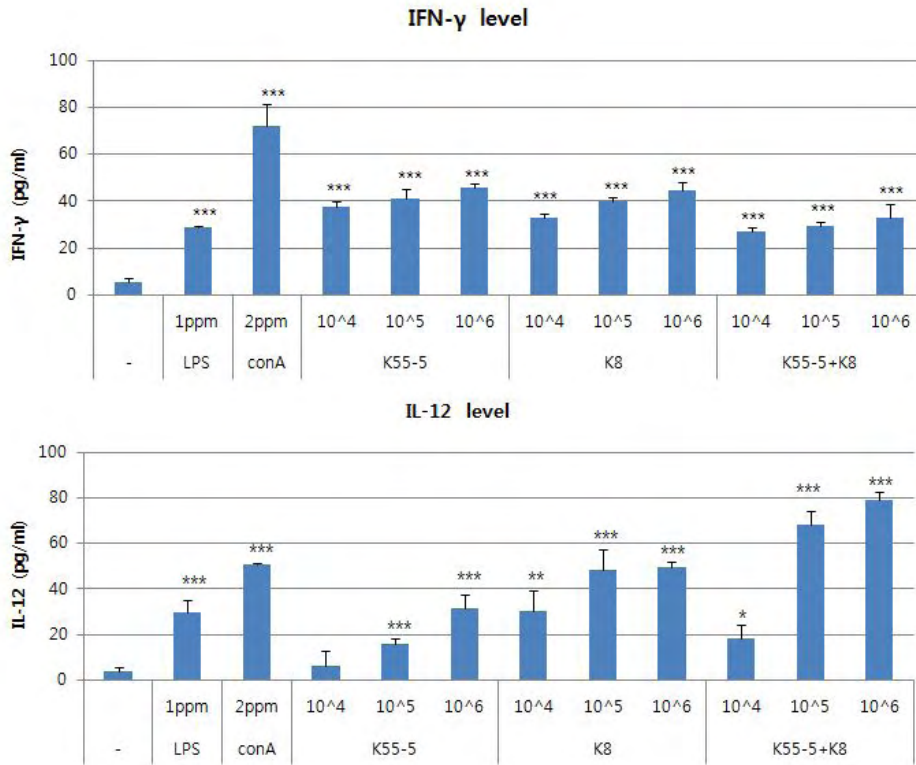


그림 4-28. 복강대식세포에 대한 사이토카인 변화량  
 $p < 0.05$ : \*;  $p < 0.01$ : \*\*;  $p < 0.001$ : \*\*\* us. control

(2) *In vivo* - 유산균의 경구투여를 통한 면역증강 활성 탐색

- BALB/c 마우스에 cyclophosphamide를 복강 주사하여 면역 저하를 유발한 후 유산균 (K55-5, K55-5+K8)을 매일 총 7일간 경구투여 하였다. 면역증강 활성이 있는지 여부를 IL-12, IFN- $\gamma$  및 NK activity를 측정하여 분석하였다.

(가) 일반증상 관찰

- 각각의 시험물질을 투여한 마우스에 있어서 대조군에 비교하여 특별한 증상은 관찰할 수 없었다.

(나) 체중 및 비장무게

- 투여시작 후 7일차에 희생을 한 경구투여군의 체중 및 비장무게를 측정한 결과, 정상군에 비해서 면역저하 유발군, 유산균 투여군과 체중 및 비장무게에서 유의차가 발견되지 않았다(표 4-9).

	Weight $\pm$ SD	Spleen Weight $\pm$ SD	Spleen index	Spleen Weight Index $\pm$ SD
<b>Normal</b>	19.57 $\pm$ 1.22	0.10 $\pm$ 0.02	1	0.50 $\pm$ 0.08
<b>CY + Saline</b>	19.37 $\pm$ 1.35	0.08 $\pm$ 0.02	0.84	0.42 $\pm$ 0.10
<b>CY + K55-5</b>	18.29 $\pm$ 1.67	0.08 $\pm$ 0.02	0.84	0.42 $\pm$ 0.14
<b>CY + K55-5 + K8</b>	18.79 $\pm$ 0.86	0.08 $\pm$ 0.01	0.86	0.43 $\pm$ 0.05

1) Spleen-weight index = Spleen weight (g)/Body weight (g) $\times$ 100  
 2) Spleen index = Mean of (Spleen-weight index) in test group/Mean of (Spleen-weight index) in control group

Normal : 정상대조군

CY + Saline : 면역저하 유발 후 Saline 경구투여군

CY + K55-5 : 면역저하 유발 후 K55-5 경구투여군

CY + K55-5 + K8 : 면역저하 유발 후 K55-5 + K8 경구투여군

표 4-9. 체중 및 비장 무게(mean $\pm$ SD)

(다) 비장 상등액에서의 사이토카인 분석

- BALB/c 마우스에 유산균을 경구투여 한 후, 비장을 적출하여 단일 세포로 분리하여 배양하였다. 앞서 언급한 내용과 같이 면역 조절 기능을 하는 주요 사이토카인으로 알려져 있는 IL-12 및 IFN- $\gamma$ 의 사이토카인은 ELISA를 이용하여 측정되었다. IL-12는 면역저하 유발 군에 비하여 CY+K55-5 처리군과 CY+K55-5+K8 처리군에서 통계적으로 유의(P<0.001)하게 증가되었다. 또한 CY+K55-5 처리군에 비해 CY+K55-5+K8 처리군에서 IL-12 활성이 유의(P<0.05)하게 증가되었다. IFN- $\gamma$ 는 CY+K55-5 처리군과 CY+K55-5+K8 처리군 모두 면역 저하 유발 군에 비하여 통계적으로 유의(CY+K55-5 처리군; P<0.05, CY+K55-5+K8 처리군; P<0.001)하게 증가되었다(표 4-10, 그림 4-29).

	Group (Mean $\pm$ Standard error)				P value
	Normal	CY + Saline	CY + K55-5	CY + K55-5 + K8	
<b>IL-12</b>	34.28 $\pm$ 3.028 <sup>**1)</sup>	25.01 $\pm$ 2.464	43.96 $\pm$ 4.252 <sup>***1)</sup>	59.29 $\pm$ 5.659 <sup>***1)</sup>	0.000 <sup>1)</sup>
<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	2174.4 $\pm$ 454.47	1893.6 $\pm$ 182.05	3130.55 $\pm$ 474.5 <sup>*2)</sup>	3599.10 $\pm$ 232.66 <sup>***3)</sup>	0.001 <sup>4)</sup>

1) Kruskal-Wallis multiple comparison, 2) Independent T-test (vs. CY +saline), 3) Dunnett T3, 4) one-way ANOVA

( $p < 0.05$ : \*;  $p < 0.01$ : \*\*;  $p < 0.001$ : \*\*\*)

표 4-10. 비장 상등액에서의 사이토카인 레벨 분석

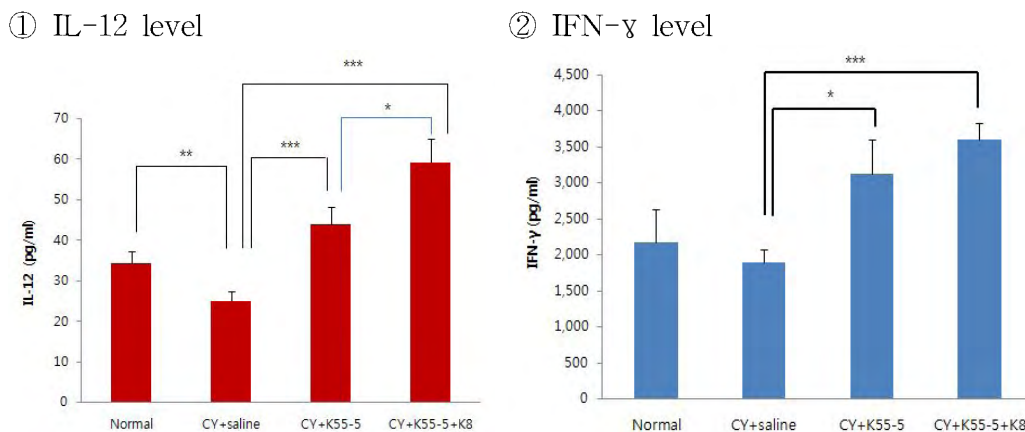


그림 4-29. 비장 상등액에서의 사이토카인 레벨 분석  
( $p < 0.05$ : \*;  $p < 0.01$ : \*\*;  $p < 0.001$ : \*\*\* vs. CY+saline)



(라) 혈청에서의 사이토카인 분석

- BALB/c 마우스에 유산균을 경구투여 한 후, 혈청 사이토카인 레벨을 확인하기 위하여 안와채혈을 실시하여 혈청을 수거하였다. IL-12 및 IFN- $\gamma$ 의 사이토카인은 ELISA를 이용하여 측정되었다. 유산균 경구투여 7일째의 IFN- $\gamma$ 는 면역저하 유발 군 보다 K55-5, K55-5+K8군 모두 통계적으로 유의(CY+K55-5 처리군;  $P < 0.01$ , CY+K55-5+K8 처리군;  $P < 0.001$ )하게 증가되었다. 또한 CY+K55-5 처리 군에 비해 CY+K55-5+K8 처리군이 유의( $P < 0.05$ )하게 IFN- $\gamma$  활성이 증가되었다. IL-12도 면역저하 유발 군 보다 K55-5, K55-5+K8 군 모두 통계적으로 유의(CY+K55-5 처리군;  $P < 0.01$ , CY+K55-5+K8 처리군;  $P < 0.05$ )하게 증가되었다(표 4-11, 그림 4-30).

	Group (Mean $\pm$ Standard error)				P value
	Normal	CY + Saline	CY + K55-5	CY + K55-5 + K8	
<b>IL-12</b>	100.45 $\pm$ 6.959 <sup>***1)</sup>	63.27 $\pm$ 6.195	83.00 $\pm$ 4.613 <sup>**1)</sup>	88.25 $\pm$ 9.616 <sup>*1)</sup>	0.001 <sup>1)</sup>
<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	860.15 $\pm$ 42.03 <sup>***1)</sup>	671.53 $\pm$ 36.84	853.65 $\pm$ 35.26 <sup>**1)</sup>	962.85 $\pm$ 39.45 <sup>***1)</sup>	0.001 <sup>1)</sup>

1) Kruskal-wallis multiple comparison

( $p < 0.05$ : \*;  $p < 0.01$ : \*\*;  $p < 0.001$ : \*\*\* vs. CY+saline)

표 4-11. 혈청에서의 사이토카인 레벨 분석 (IL-12; n=20, IFN- $\gamma$ ; n=20)

① IL-12 level

② IFN- $\gamma$  level

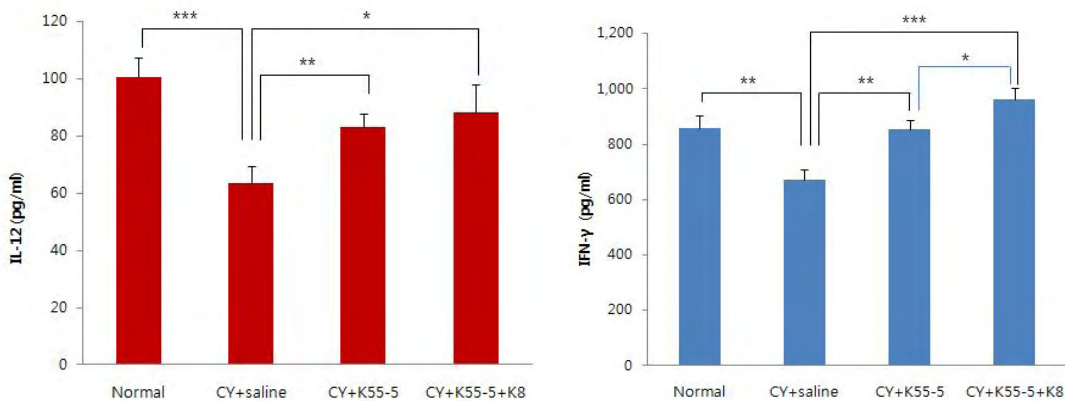


그림 4-30. 혈청에서의 사이토카인 레벨 분석  
( $p < 0.05$ : \*;  $p < 0.01$ : \*\*;  $p < 0.001$ : \*\*\* vs. CY+saline)

(마) NK activity 측정

- NK 세포는 림프구의 극히 일부분이지만 면역 방어기전에 중요한 부분을 차지하는데 T 림프구와 B 림프구와는 달리 특별히 항원에 의한 면역이 만들어져 그에 대한 기억이 되어 있지 않아도 어떤 암세포나 바이러스에 감염된 세포들을 자발적으로 공격하는 세포독성을 나타내 표적세포를 살해함으로써 감염이나 이형성세포의 증식으로부터 우리 몸을 보호한다.

- 이러한 NK 세포의 능력을 확인하기 위하여 경구 투여를 실시한 BALB/c 마우스의 비장을 평균적으로 취하여 비장세포(effector cell; E)를 준비한 후 NK-sensitive 세포로 알려진 YAC-1 세포(target cell; T)를 50:1이 되도록 조정하여 24시간 동안 배양하였다. NK 세포의 세포독성 능력을 보는 방법으로는 NK 세포가 암세포의 일종인 YAC-1 세포를 공격하여 유리된 LDH를 측정하는 방법(modified lactate dehydrogenase [LDH] release assay)을 이용하였다.

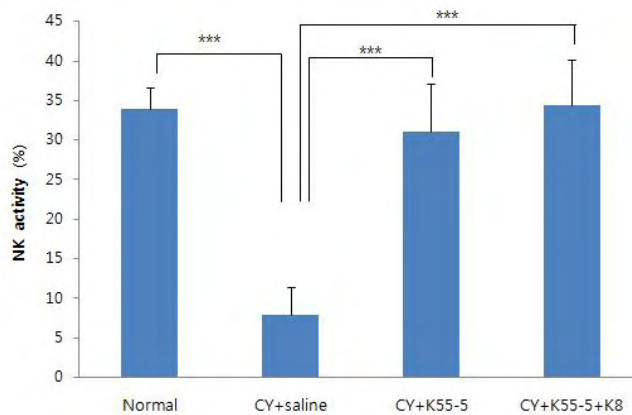
- 유산균을 경구 투여한 마우스의 비장에서 NK 활성을 측정한 결과는 표 4-12에 나타내었다. 즉, NK 세포활성은 50 : 1의 effector/target (E/T) ratio에서, 정상 군의 경우 33.90 ± 2.811%의 NK activity를 나타내었고, 면역저하 유발군은 7.96 ± 3.413%, K55-5군은 31.04 ± 6.141%, K55-5+K8군은 34.48 ± 5.718%의 결과를 나타냈다. 정상 군에 비해서 면역저하 유발 군에서 낮은 NK activity를 확인하였고, 면역저하 유발 군에 비해서 K55-5 군과 K55-5+K8 군에서 NK activity가 통계적 유의(P<0.001)있게 증가되었다. K55-5 단독 처리군과 K55-5+K8 혼합 처리군 간의 유의차는 나타나지 않았다. (표 4-12, 그림 4-31)

	Group (Mean ± Standard error)				P value
	Normal	CY + Saline	CY + K55-5	CY + K55-5 + K8	
<b>NK activity</b>	33.90 ± 2.811 <sup>***1)</sup>	7.96 ± 3.413	31.04 ± 6.141 <sup>***2)</sup>	34.48 ± 5.718 <sup>***2)</sup>	0.000 <sup>2)</sup>

1) Tukey HSD, 2) Kruskal-Wallis multiple comparison

(p<0.05: \*; p<0.01: \*\*; p<0.001: \*\*\* vs. CY+saline)

표 4-12. NK activity 측정



Splenocyte (Effector cell) : Yac-1 (Target cell) = 50 : 1

그림 4-31. NK activity (p<0.05: \*; p<0.01: \*\*; p<0.001: \*\*\* vs. CY+saline)

(3) *In vivo* - 유산균이 함유된 고체사료의 섭취를 통한 장관면역 활성화

- BALB/c 마우스에 cyclophosphamide를 복강 주사하여 면역 저하를 유발한 후 유산균 (K55-5, K55-5+K8)이 포함된 고체사료를 21일간 자유 섭취하였다. 고체사료의 경우 장을 통과하기 때문에 이를 통해 나오는 분변을 수거 후 분리하여 IgA의 양을 측정하였다. IgA의 양이 증가하는 것을 확인하여 유산균의 장관면역 활성을 평가하였다.

(가) 일반증상 관찰

- 각각의 시험물질을 투여한 마우스에 있어서 대조군에 비교하여 특별한 증상은 관찰할 수 없었다.

(나) 체중 변화측정

- 0, 3, 7, 14, 21일차에 체중을 측정한 결과, 정상(Normal)군에 비해서 면역 저하 유발 대조군 및 유산균을 포함한 고체사료 투여군의 3일 차에서는 유의성 있는 감소를 보였으나, 14일 차에는 정상군의 체중 값에 근접하는 결과를 보였다(표 4-13, 그림 4-32).

	Group (Mean ± Standard deviation)				p <sup>1)</sup>
	Normal	CY + AIN93G	CY + AIN93G (K55-5)	CY + AIN93G (K55-5+K8)	
<b>Day0</b>	18.23 ± 0.80	18.44 ± 0.84	18.96 ± 0.63	18.69 ± 0.56	0.142
<b>Day03</b>	18.81 ± 0.79	16.81 ± 1.09 <sup>***2)</sup>	17.37 ± 0.91 <sup>*2)</sup>	16.93 ± 1.10 <sup>***2)</sup>	0.000
<b>Day07</b>	19.63 ± 0.95	17.78 ± 0.88 <sup>**2)</sup>	19.07 ± 0.96	18.62 ± 0.98	0.001
<b>Day14</b>	19.90 ± 0.99	19.59 ± 0.82	19.71 ± 0.92	19.49 ± 0.96	0.779
<b>Day21</b>	20.28 ± 0.67	20.77 ± 0.84	20.27 ± 0.52	20.26 ± 0.51	0.232

1) One-way ANOVA, 2) Tukey multiple comparison

( $p < 0.05$ : \*;  $p < 0.01$ : \*\*;  $p < 0.001$ : \*\*\* vs. control)

Normal + AIN93G : 정상대조군 AIN93G사료 투여군

CY + AIN93G : 면역저하 유발 후 AIN93G사료 투여군

CY + AIN93G(K55-5) : 면역저하 유발 후 K55-5를 포함한 고체사료 투여군

CY + AIN93G(K55-5+K8) : 면역저하 유발 후 K55-5+K8을 포함한 고체사료 투여군

표 4-13. 체중 측정 (mean±standard error)

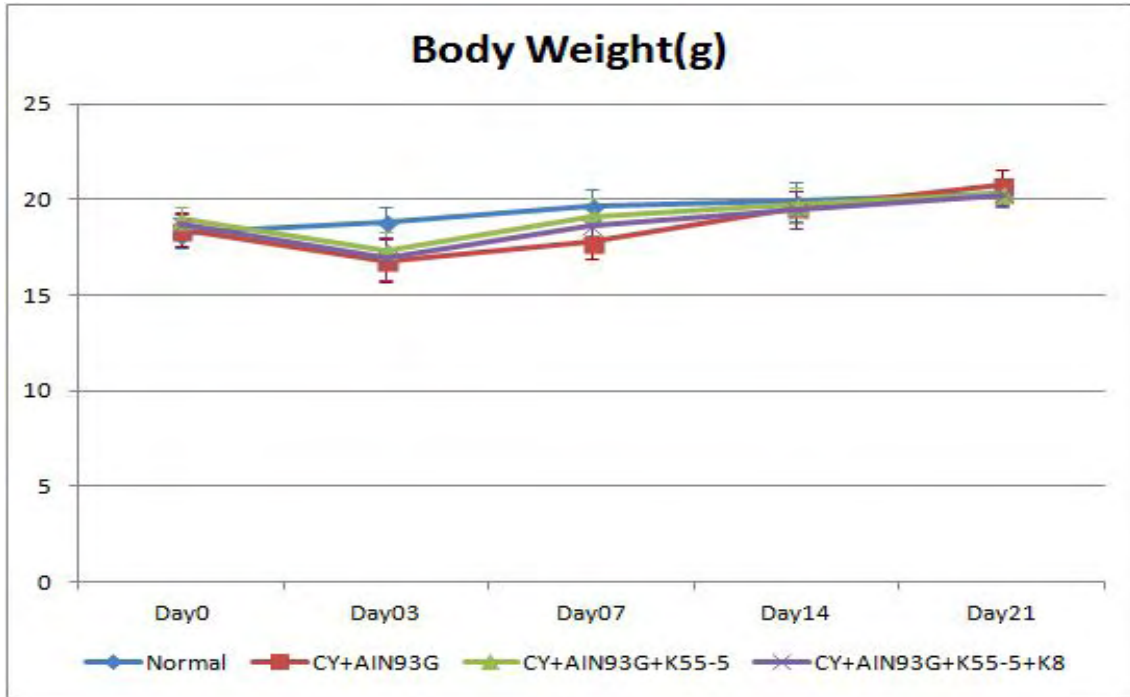


그림 4-32. 유산균을 포함한 사료를 섭취한 마우스의 날짜에 따른 체중변화

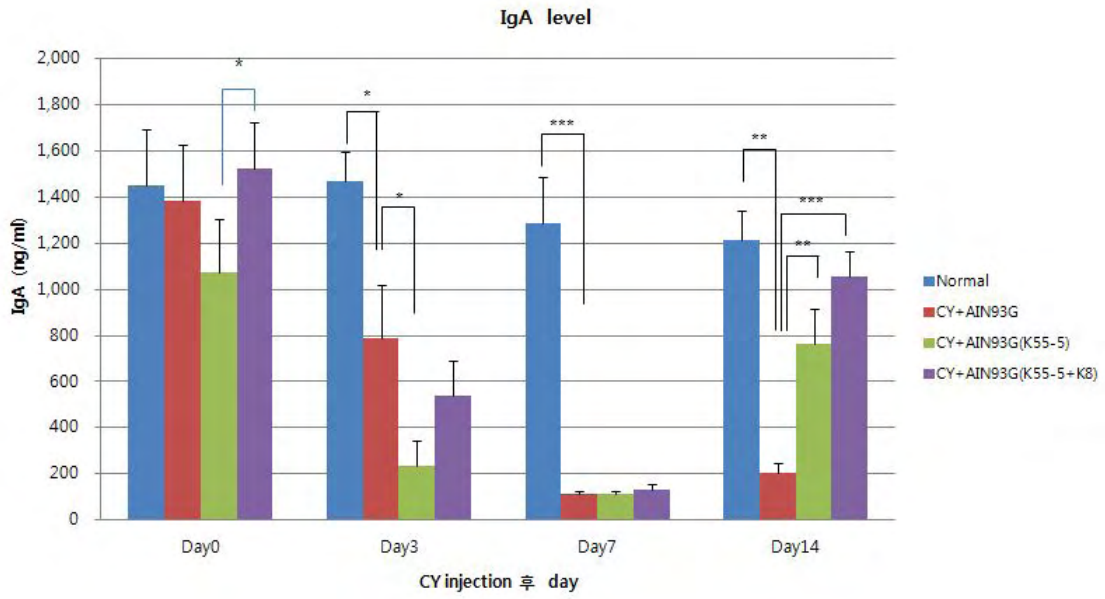
(다) IgA 변화측정

- 유산균을 포함한 고체사료를 섭취 하였을 때 마우스 장관에서의 IgA 항체 생산에 미치는 영향을 알아보기 위하여 분변 중의 IgA 항체량을 ELISA를 이용하여 측정하였다. 14일째에서 면역저하 유발 대조군에 비해 K55-5와 K55-5+K8를 포함한 고체사료 군에서 IgA의 양이 통계적으로 유의하게 증가하였다. 따라서, 유산균을 포함한 고체 사료의 섭취는 마우스의 장관 면역 활성화에 영향을 미치는 것으로 사료된다(표 4-14, 그림 4-33).

	Group (Mean ± Standard error)			
	Normal + AIN93G	CY + AIN93G	CY + AIN93G (K55-5)	CY+AIN93G (K55-5+K8)
<b>3 Day</b>	44.78 ± 5.12	6.92 ± 0.18	14.74 ± 2.73 <sup>*1)</sup>	14.39 ± 1.39 <sup>***1)</sup>
<b>7 Day</b>	55.41 ± 16.41	6.72 ± 0.10	9.73 ± 1.07 <sup>*1)</sup>	14.70 ± 1.16 <sup>***1)</sup>
<b>14 Day</b>	38.91 ± 10.75	4.35 ± 0.62	14.90 ± 4.29 <sup>*1)</sup>	44.07 ± 12.83 <sup>*1)</sup>

1) The independent t-test ( $p < 0.05$ : \*;  $p < 0.01$ : \*\*;  $p < 0.001$ : \*\*\* vs. CY+AIN93G)

표 4-14. 분변에서의 IgA 변화 측정



그림

4-33. 분변 IgA 측정 ( $p < 0.05$ : \*;  $p < 0.01$ : \*\*;  $p < 0.001$ : \*\*\*)

### 3. 제4-3세부연구과제(발효음료의 유효성분 분석)

#### 가. 연구방법 및 전략

- 발효주스에 사용되는 원료 및 혼합액에 대한 유효성분을 총피놀함량, 총플라보노이드 함량, 총안토시아닌 함량, 총항산화능으로 분석
- 발효채소에 대한 유효성분을 총피놀함량, 총플라보노이드 함량, 총안토시아닌 함량, 총항산화능으로 분석
- RP-DAD-HPLC 분석을 통한 발효 음료의 유효 성분 정량 분석
- 발효음료에 사용되는 원료 및 혼합액에 대한 유효성분을 총피놀함량, 총플라보노이드 함량, 총안토시아닌 함량, 총항산화능으로 분석
- 개발된 제품의 유효성분을 RP-DAD-HPLC 분석 및 총피놀함량, 총플라보노이드 함량, 총안토시아닌 함량, 총항산화능 등을 통하여 분석
- Column chromatography 및 solid-phase extraction을 통하여 유효 성분을 분리 정제

#### 나. 한국야쿠르트의 채소주스 성분을 발효하는데 적합한 유산균주를 선발

##### (1) 유산균주 선발

##### (가) 시험재료

BB : 야채주스
B6 : <i>Lb. casei</i> B6의 야채주스 발효물
B8 : <i>Lb. casei</i> B8의 야채주스 발효물
55 : <i>Lb. plantarum</i> K55-5의 야채주스 발효물
<i>Lactococcus lactis ssp. cremoris</i> K601Y의 야채주스 발효물

##### (나) 실험방법

###### ① Total Phenolics

- ㉠ 2.6 mL의 증류수에 샘플 200  $\mu$ L을 첨가한다.
- ㉡ 200  $\mu$ L Folin & Ciocalcu 페놀 시약을 첨가 후 vortex한다.
- ㉢ 6분 후 7%  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ 를 200  $\mu$ L 첨가한다
- ㉣ 90분간 실온에서 반응시킨다.
- ㉤ 750 nm에서 측정한다
- ㉥ Total Phenolics양은 gallic acid equivalent(GAE)/100 mL sample로 나타낸다.

###### ② Total Flavonoids

- ㉦ 500  $\mu$ L의 sample에 2 mL의 ddH<sub>2</sub>O를 첨가한다.
- ㉧ 150  $\mu$ L의 5%  $\text{NaNO}_2$ 를 첨가한다. (0분)

- ㉔ 150  $\mu\text{l}$ 의 10%  $\text{AlCl}_3$ 를 첨가한다. (5분)
  - ㉕ 1M NaOH를 1 ml 첨가한다. (6분)
  - ㉖ 즉시 510 nm에서 흡광도를 측정한다.
  - ㉗ Total Flavonoids 양은 catechin equivalent(CE)/100 mL sample 로 나타낸다.
- ③ Total anthocyanins
- ㉔ 6개의 test tube에 200  $\mu\text{L}$  의 sample을 각각 첨가한다.
  - ㉕ 3개의 test tube에 potassium chloride buffer (pH 1.0; 25 mM)을 3,800  $\mu\text{L}$ 씩 첨가한다.
  - ㉖ 나머지 3개의 test tube에 sodium acetate buffer (pH 4.5; 400 mM) 3,800  $\mu\text{L}$ 씩 첨가한다.
  - ㉗ 15분 후 510 nm와 700 nm 에서 흡광도를 측정한다.
  - ㉘ Total anthocyanins 양은 mg cyanidin 3-glucoside equivalents/100 mL sample로 나타낸다.
- ④ DPPH
- ㉔ 80% methanol을 이용하여 0.1 mM의 DPPH 용액을 만든다.(20분간 stirring)
  - ㉕ DPPH 용액을 517 nm에서  $0.650 \pm 0.020$ 의 흡광을 갖도록 보정한다.  
(80% methanol을 이용하여 dilution)
  - ㉖ 샘플 0.05 ml을 취한 후 2.95 mL의 DPPH 용액을 첨가한다.
  - ㉗ Vortexing 후 30분간 실온에서 저장한다. (in the dark)
  - ㉘ 517 nm에서 흡광도를 측정한다. (at 30min as end point)
  - ㉙ Vitamin C equivalent antioxidant capacity/100 mL sample 로 표현한다.
- ⑤ ABTS
- ㉔ 1.0 mM AAPH와 2.5 mM  $\text{ABTS}^{2-}$  을 amber bottle에 첨가 후 100 mL PBS 용액을 넣는다.
  - ㉕ 30분간 70°C water bath에서 중탕한다.
  - ㉖ ABTS 라디칼 용액을 실온으로 식힌다.
  - ㉗ Acrodisc LC13 PVDF 0.45  $\mu\text{m}$ 을 이용하여 필터링한다.
  - ㉘ 734 nm에서 흡광도를  $0.650 \pm 0.020$ 로 PBS를 이용하여 조정한다.
  - ㉙ 만들어진 라디칼 용액을 실험하는 동안 37°C에 보관한다.
  - ㉚ 20  $\mu\text{L}$ 의 샘플에 980  $\mu\text{l}$ 의 라디칼 용액을 넣고 반응시킨다.
  - ㉛ Vitamin C equivalent antioxidant capacity/100 mL sample 로 표현한다.

(다) 결과

총페놀릭은 5가지 샘플에서 함량의 차이가 나타나지 않았고, 총플라보노이드 함량은 B8 발효물 = 야채주스 > B6 발효물 > K55 > RNA 발효물 순이었다. B8 발효물은 RNA의 발효물에 비해 약 1.6배 높은 총플라보노이드 함량을 보여주었다. 안토시아닌의 함량은 K55 발효물을 제외한 4종의 시료가 안토시아닌의 함량에서 차이가 없으며 다만, K55 발효물만 4종의 비해 다소 낮은 안토시아닌 함량을 나타내었다. 항산화능력 측정에서는 ABTS, DPPH 라디칼을 사용하였다. ABTS 실험법에서는 BB, B6, 55, RNA, 배합비 각각  $369.83 \pm 15.67$ ,  $372.83 \pm 26.92$ ,  $396.17 \pm 32.23$ ,  $379.17 \pm 24.38$ ,  $360.83 \pm 15.31$  mg vitamin C equiv./100 mL을 나타냈고, DPPH 실험법에서는 BB, B6, 55, RNA, 배합비 각각  $141.46 \pm 10.03$ ,  $137.29 \pm 5.56$ ,  $132.79 \pm 8.25$ ,  $141.46 \pm 6.78$ ,  $155.46 \pm 3.63$  mg vitamin C equiv./100 mL을 나타냈다.

ABTS를 이용한 항산화능 에서는 K55가 가장 높게 나타났으며, DPPH를 이용한 항산화능 에서는 K55가 가장 낮게 나타났다. 항산화능 실험법은 저렴한 비용과 간편한 실험 방법으로 가장 널리 이용 되지만 DPPH가 pH, 빛, 온도 등에 민감하게 영향을 받는 것이 단점이며 이에 반해 ABTS 라디칼을 이용한 실험법은 넓은 범위의 pH에 적용될 수 있는 항산화 측정방법으로 두 실험법의 차이로 인하여 생긴 것으로 생각된다<sup>1,2)</sup>.

	Total phenolics (mg GA equiv./100 mL)	Total flavonoids (mg catechin equiv./100 mL)	Antioxidant capacities (mg vitamin C equiv./100 mL)		Total anthocyanins (mg C 3-G equiv./100 mL)
			ABTS	DPPH	
<b>B8</b>	176.00 ± 8.03 <sup>a)</sup>	49.36 ± 1.90 <sup>a)</sup>	369.83 ± 15.67 <sup>b)</sup>	141.46 ± 10.03 <sup>b)</sup>	0.50 ± 0.07 <sup>a)</sup>
<b>B6</b>	178.92 ± 5.91 <sup>a)</sup>	44.73 ± 1.85 <sup>b)</sup>	372.83 ± 26.92 <sup>b)</sup>	137.29 ± 5.56 <sup>b)</sup>	0.49 ± 0.04 <sup>a)</sup>
<b>55</b>	178.00 ± 6.23 <sup>a)</sup>	34.62 ± 2.01 <sup>c)</sup>	396.17 ± 32.23 <sup>a)</sup>	132.79 ± 8.25 <sup>c)</sup>	0.38 ± 0.06 <sup>b)</sup>
<b>RNA</b>	177.00 ± 4.76 <sup>a)</sup>	30.36 ± 2.71 <sup>d)</sup>	379.17 ± 24.28 <sup>a,b)</sup>	141.46 ± 6.78 <sup>b)</sup>	0.43 ± 0.05 <sup>a,b)</sup>
<b>배합비</b>	178.83 ± 6.60 <sup>a)</sup>	48.38 ± 1.65 <sup>a)</sup>	360.83 ± 15.31 <sup>b)</sup>	155.46 ± 3.63 <sup>a)</sup>	0.45 ± 0.05 <sup>a,b)</sup>

표 4-15. Levels of total phenolics, total flavonoids, total anthocyanins, and antioxidant capacities of five samples



다. 원료의 생물전환을 통한 발효 후 유효성분들의 비교 분석

(1) 하루야채 ‘퍼플’의 유효성분 측정

(가) 실험재료

K55 : *Lactobacillus plantarum* K55-5 첨가

Base : 하루야채 야채 Base

(나) 실험방법

- ① Total Phenolics : 자세한 방법은 나. (1) (나) 참조
- ② Total Flavonoids : 자세한 방법은 나. (1) (나) 참조
- ③ Antioxidants capacities (ABTS and DPPH) : 자세한 방법은 나. (1) (나) 참조

(다) 결과

- 하루야채의 야채 Base와 *L. plantarum* K55-5를 첨가한 발효물(K55-5)의 총페놀 함량을 측정하였다. 측정 결과 Base, K55-5 각각 147.6, 161.6mg gallic acid equiv./100 mL의 총페놀 함량을 나타냈다. *L. plantarum* K55-5를 첨가하여 발효시킨 발효물이 대조군에 비하여 총페놀 함량이 높게 나타났다. 총플라보노이드 함량은 Base, K55-5 각각 48.4, 35.7 mg catechin equiv./100 mL을 나타냈다. 대조군이 *L. plantarum* K55-5를 첨가한 발효군에 비하여 높은 총플라보노이드 함량을 나타냈다. 총페놀 함량과는 달리 *L. plantarum* K55-5균이 총플라보노이드 함량 상승효과에 영향을 미치지 못하였다. 항산화능력 측정에서는 DPPH, ABTS라디칼을 사용하였다.

- 항산화능은 DPPH 실험법에서는 Base, K55-5 각각 255.0, 228.0 mg vitamin C equiv./100 mL을 나타냈고, ABTS 실험법에서는 Base, K55-5 각각 197.1, 153.7 mg vitamin C equiv./100 mL을 나타냈다. DPPH와 ABTS 실험법 모두 대조군이 *L. plantarum* K55-5 균주를 처리한 발효군에 비해 높은 항산화능을 나타냈다. *L. plantarum* K55-5 균주는 총페놀 함량의 상승효과에는 영향을 주었으나, 총플라보노이드 함량 및 항산화능 상승효과에는 영향을 미치지 못했다.

	<b>Total phenolics</b> (mg GA equiv./100 mL)	<b>Total flavonoids</b> (mg catechin equiv./100 mL)	<b>Antioxidant capacities</b> (mg vitamin C equiv./100 mL)	
			ABTS	DPPH
<b>Base</b>	147.6±20.3	48.4±4.4	197.1±7.2	255.0±25.4
<b>K55</b>	161.6±32.6	35.7±2.6	153.7±14.1	228.0±44.3

Table 4-16. Levels of total phenolics, total flavonoids, total anthocyanins, and antioxidant capacities both base and K55

- 대조군과 발효군의 야채발효 주스의 시간차에 의한 항산화능의 변화를 측정하였다. 실험에는 ABTS 라디칼을 이용하였다. 시간은 0초에서 600초까지 였으며, 60초 간격으로 변화를 측정하였다. 실험결과 대조군의 항산화능은 *Lactobacillus plantarum* K55-5 균주를 처리한 발효군 보다 지속적으로 높았으며, 측정시간 1분에선 대조군과 발효군의 항산화능은 각각 141.0 , 111.7 mg vitamin C equiv./100 mL이였으며, 10분에선 대조군과 발효군의 항산화능은 각각 197.1, 153.7 mg vitamin C equiv./100 mL으로 나타났다. 1분에서 두 군간의 항산화능의 차이는 29.3 mg vitamin C equiv./100 mL으로 나타났고, 10분에서 두 군간의 차이는 43.4 mg vitamin C equiv./100 mL으로 나타났다. 1분을 기준으로 9분이 지난 후 대조군과 발효군의 항산화능의 차이는 약 1.5배로 증가하게 나타났고, 시간이 지남에 따라 항산화능 변화의 차이는 나타나지 않았다.

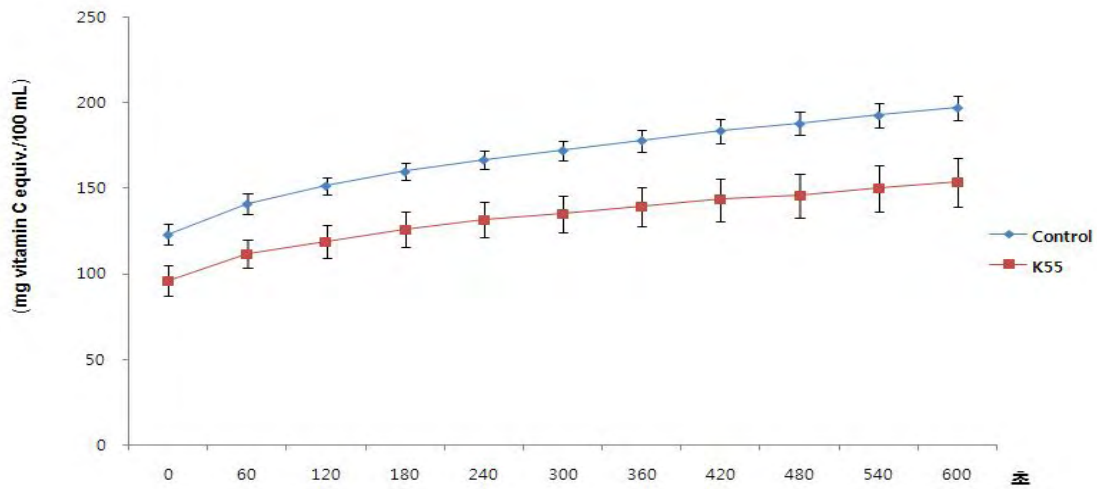


그림 4-34. Kinetics of antioxidant capacity by two juices of Purple

라. 원료의 생물전환을 통한 발효 후 유효성분들의 비교 분석

(1) 하루야채 ‘퍼플’의 유효성분 측정

(가) 실험재료

- ① MRS : 배지
- ② 배양전 : 배지에 *Lactobacillus plantarum* K55-5 접종
- ③ 배양후 : *Lactobacillus plantarum* K55-5 접종 후 하루동안 배양한 배지  
☞ 접종시에는 50mL기준 50 $\mu$ L만 접종 (0.1% 접종)
- ④ 혼합 : 야채혼합액
- ⑤ 열처리 : 살균 처리 한 야채혼합액
- ⑥ 접종 : 야채혼합액 + 배양을 위한 *Lactobacillus plantarum* K55-5 접종 직후
- ⑦ 발효 : 야채혼합액 + 배양을 위한 *Lactobacillus plantarum* K55-5 접종 24시간 후
- ⑧ 실환 : 실제 제품 (하루야채 퍼플) ☞ 실제 제품으로 사용 시 열처리를 통해 배양액을 멸균함

(나) 실험방법

- ① Total Phenolics : 자세한 방법은 나. (1) (나) 참조
- ② Total Flavonoids : 자세한 방법은 나. (1) (나) 참조
- ③ Antioxidnats capacities (ABTS and DPPH) : 자세한 방법은 나. (1) (나) 참조
- ④ Total Anthocyanins : 자세한 방법은 나. (1) (나) 참조
- ⑤ HPLC Analysis

(다) 결과

- 8개의 시료를 배지균(MRS, 배양전, 배양후)과 야채 주스균(혼합, 열처리, 접종, 발효, 실환)으로 나눠 결과를 살펴보겠다. 배지균은 총안토시아닌 함량을 제외한 총페놀 함량, 총플라보노이드 함량 및 항산화능을 측정하였다. 배지에 *Lactobacillus plantarum* K55-5 접종 후 배양을 하지 않은 배양전이 총페놀 함량, 총플라보노이드 함량 및 항산화능에서 가장 높은 함량을 나타냈다. 혼합이 야채 주스균에서 가장 높은 총페놀 함량을 나타냈고 열처리와 접종 마지막으로 발효와 실환 순서였다. 열처리와 접종, 발효와 실환은 각각 총페놀 함량 유의차가 나타나지 않았다. 총플라보노이드 함량도 총페놀 함량과 마찬가지로 혼합이 가장 높은 함량을 나타냈고, 열처리 > 접종 > 실환 > 발효 순서였다. 항산화능은 ABTS와 DPPH법 모두 접종이 가장 높게 나타났고 다음으로 ABTS법은 혼합 > 열처리 > 실환 > 발효 순서였고, DPPH법은 실환 > 열처리 > 발효 > 혼합 순서였다. 총안토시아닌 함량은 혼합, 열처리, 접종이 높은 함량을 나타냈고 그 다음으로 발효, 실환 이었다. DPPH법 항산화능을 제외한 나머지 총페놀, 총플라보노이드, 총안토시아닌 및 ABTS법 항산화능에서 혼합은 열처리에 비하여 높은 함량을 나타냈다. 그러나 큰 함량 차이는 아니었다. 열처리, 접종, 배양 등과 같은 가공 과정은 총페놀, 총플라보노이드, 총안토시아닌 함량 및 항산화능 상승에 큰 영향을 미치지 못했다. 야채 주스의 발효 과정은 항산화능과 같은 기능성 특성의 감소 없이 유효성분을 유지시키는 결과를 나타냈다.

	Total phenolics (mg GAE/100 mL)	Total flavonoids (mg CCE/100 mL)	Antioxidant capacities (mg VCE/100 mL)		Total anthocyanins (mg CGE/100 mL)
			ABTS	DPPH	
혼합	159.4 ± 27.7 <sup>a)</sup>	40.3 ± 3.0 <sup>a)</sup>	157.8 ± 17.3 <sup>b)</sup>	93.5 ± 21.5 <sup>e)</sup>	5.1 ± 0.5 <sup>a)</sup>
열처리	152.8 ± 8.1 <sup>b)</sup>	36.9 ± 2.2 <sup>b)</sup>	154.2 ± 28.1 <sup>c)</sup>	107.0 ± 8.0 <sup>c)</sup>	5.1 ± 1.0 <sup>a)</sup>
접종	150.0 ± 7.21 <sup>b)</sup>	35.5 ± 3.4 <sup>c)</sup>	176.7 ± 18.6 <sup>a)</sup>	117.8 ± 8.0 <sup>a)</sup>	4.9 ± 0.6 <sup>a,b)</sup>
발효	135.3 ± 13.7 <sup>c)</sup>	22.8 ± 4.3 <sup>e)</sup>	122.1 ± 21.9 <sup>e)</sup>	99.2 ± 12.0 <sup>d)</sup>	4.2 ± 0.8 <sup>b)</sup>
실환	141.1 ± 20.6 <sup>c)</sup>	23.7 ± 4.2 <sup>d)</sup>	142.7 ± 36.1 <sup>d)</sup>	110.3 ± 2.8 <sup>b)</sup>	4.2 ± 1.2 <sup>b)</sup>
MRS	84.5 ± 2.3 <sup>e)</sup>	2.2 ± 0.2 <sup>h)</sup>	36.0 ± 3.4 <sup>g)</sup>	17.0 ± 1.5 <sup>h)</sup>	-
배양전	101.0 ± 1.2 <sup>d)</sup>	2.3 ± 0.3 <sup>f)</sup>	43.9 ± 6.2 <sup>f)</sup>	30.3 ± 10.4 <sup>f)</sup>	-
배양후	85.8 ± 2.6 <sup>e)</sup>	2.2 ± 0.5 <sup>g)</sup>	34.1 ± 2.9 <sup>h)</sup>	20.2 ± 2.4 <sup>g)</sup>	-

표 4-17. Levels of total phenolics, total flavonoids, total anthocyanins, and antioxidant capacities of eight samples

(2) 하루야채 '퍼플'의 *in vitro* 평가

(가) 실험재료

- ① 혼합 : 야채혼합액
- ② 열처리 : 살균 처리 한 야채혼합액
- ③ 접종 : 야채혼합액 + 배양을 위한 *Lactobacillus plantarum* K55-5 접종 직후
- ④ 발효 : 야채혼합액 + 배양을 위한 *Lactobacillus plantarum* K55-5 접종 24시간 후
- ⑤ 실환 : 실제 제품

(나) 실험방법

① MTT assay : Cytotoxicity

- ㉠ 96-well plate에 PC12 cell을  $1.5 \times 10^4$  cells/100 $\mu$ L medium 으로 넣고 24시간 동안 incubator에서 배양시킨다.
- ㉡ 기존 배지 제거 후 FBS가 첨가 되지 않은 배지를 이용하여 적정 농도로 희석 시킨 Sample 을 각 well에 100  $\mu$ L 첨가 후 24시간 동안 incubator에서 배양시킨다.
- ㉢ 기존 배지 제거 후 100  $\mu$ L MTT stock solution을 첨가하여 3~4시간 배양한다.
- ㉣ 배양액 제거 후 DMSO를 이용하여 세포에 흡수된 MTT formazan을 녹여낸 후 Spectrophotometer로 540nm에서 흡광도를 측정한다.

② DCFH-DA assay : intracellular antioxidant activity assay

- ㉠ 96-well plate에 PC12 cell을  $3 \times 10^4$  cells/100 $\mu$ L medium 으로 넣고 24시간 동안 incubator에서 배양시킨다.
- ㉡ 기존 배지 제거 후 FBS가 첨가 되지 않은 배지를 이용하여 적정 농도로 희석 시킨 Sample 을 각 well에 100  $\mu$ L 첨가 후 24시간 동안 incubator에서 배양시킨다.
- ㉢ 기존 배지 제거 후 100  $\mu$ L DCFH-DA stock solution을 첨가하여 1시간 동안 배양한다.
- ㉣ Sample이 첨가된 배지를 제거 후 배지에 희석된 hydrogen peroxide(600 $\mu$ M)를 control을 제외한 각 well에 100  $\mu$ L 1시간 동안 incubator에서 배양시킨다.
- ㉤ 배양액 제거 후 즉시 Spectrophotometer로 485nm (excitation wavelength) and 530nm (emission wavelength)에서 흡광도를 측정한다.

(다) 결과

- MTT assay를 이용하여 혼합으로 독성 평가를 한 결과 800( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 까지 독성을 나타내지 않아 최고 농도를 800( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )까지 설정하여 DCFH-DA assay를 진행하였다(Data not shown). 신경세포에 과산화수소로 산화적 스트레스를 가한 후 DCFH-DA를 형광 probe로 이용하여 혼합, 열처리, 접종, 발효, 실환의 산화적 스트레스에 대한 효과를 측정하였다. 실험결과 그래프의 세로축은 형광의 발광정도를 %로 나타낸 것이고, 가로축은 시료의 처리 농도를 나타낸다. 과산화수소 100  $\mu\text{M}$ 의 농도로 산화적 스트레스를 가했을 때 대조구에 비하여 현저하게 형광이 늘어났다. 농도를 달리한 혼합, 열처리, 접종, 발효, 실환 다섯 개의 시료 모두 과산화수소를 처리한 세포군에 비하여 유의적 수준으로 산화적 스트레스를 감소시키는 결과를 나타내지는 못하였다.

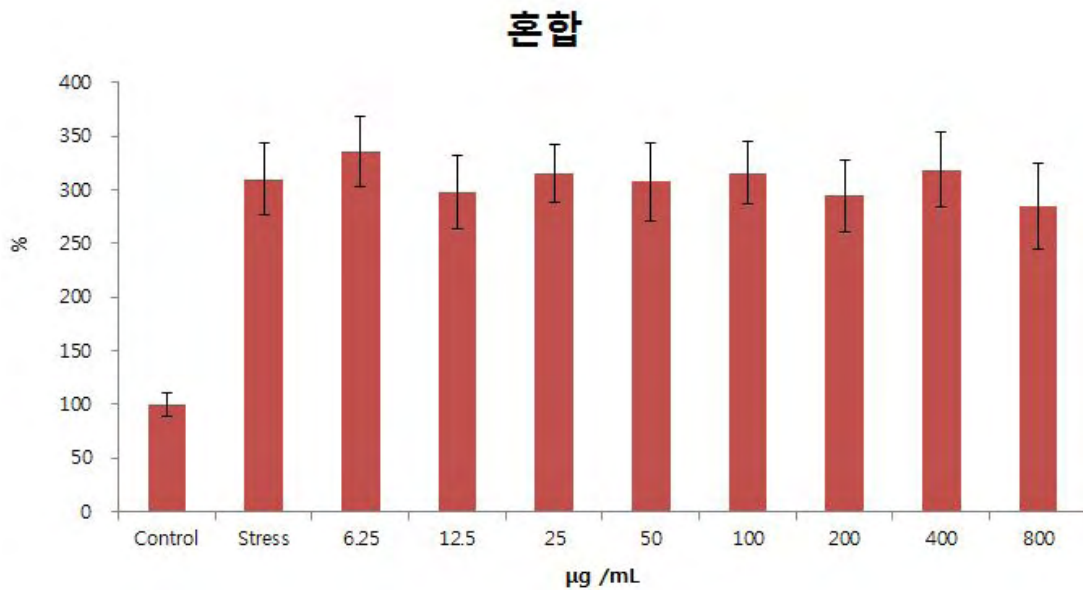


그림 4-35. Determination of intracellular oxidative stress level by pretreatment with mixed vegetable juice in PC12 cells.

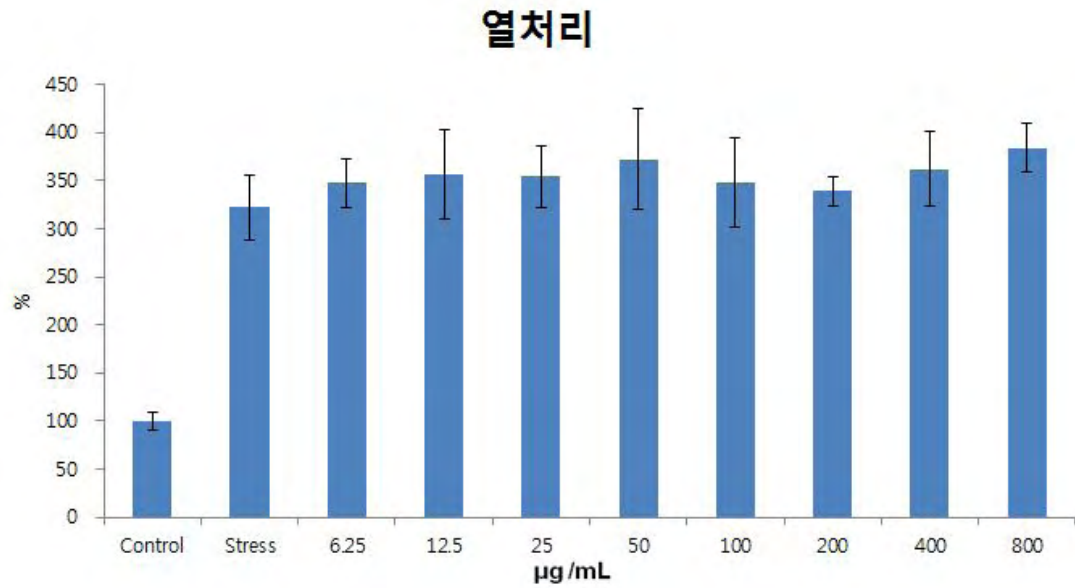


그림 4-36. Determination of intracellular oxidative stress level by pretreatment with vegetable juice with thermal in PC12 cells.

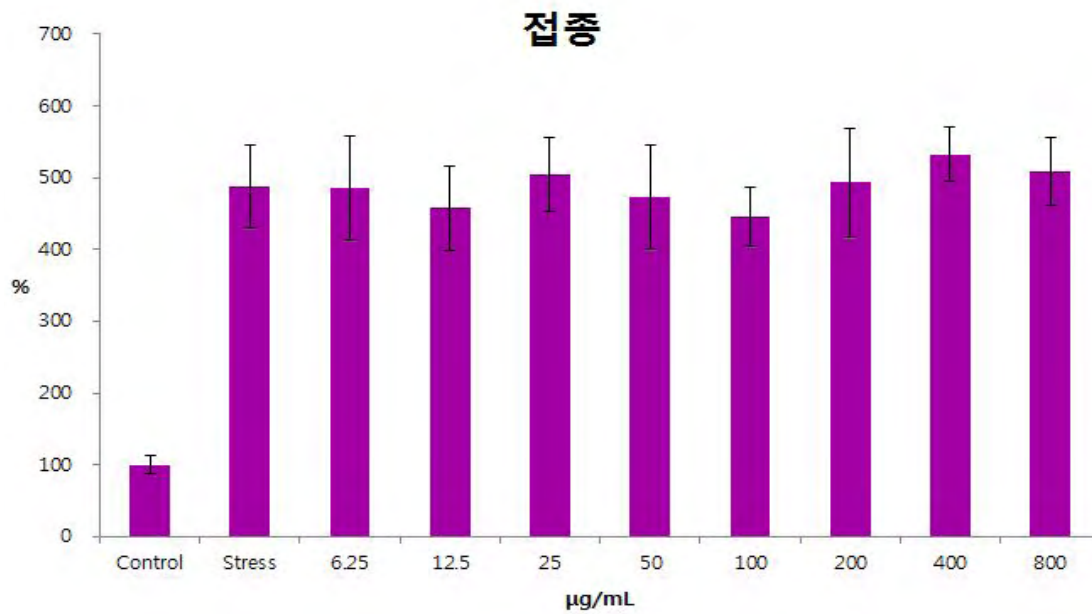
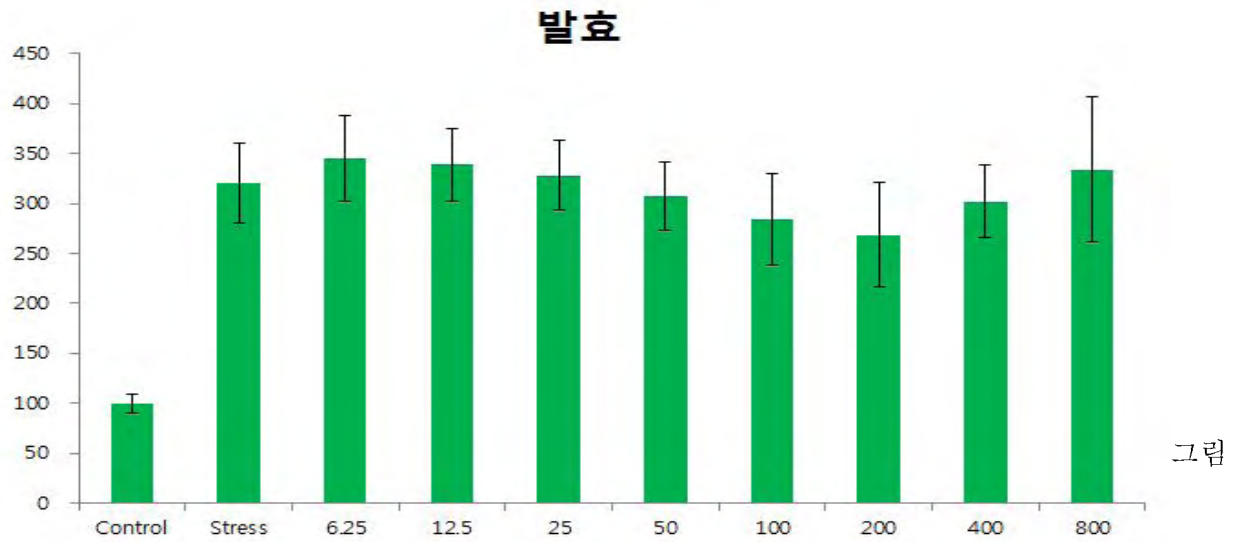


그림 4-37. Determination of intracellular oxidative stress level by pretreatment with vegetable juice with thermal treatment and fermentation in PC12 cells.





4-38. Determination of intracellular oxidative stress level by pretreatment with vegetable juice after fermentation without heat-treatment and fermentation in PC12 cells.

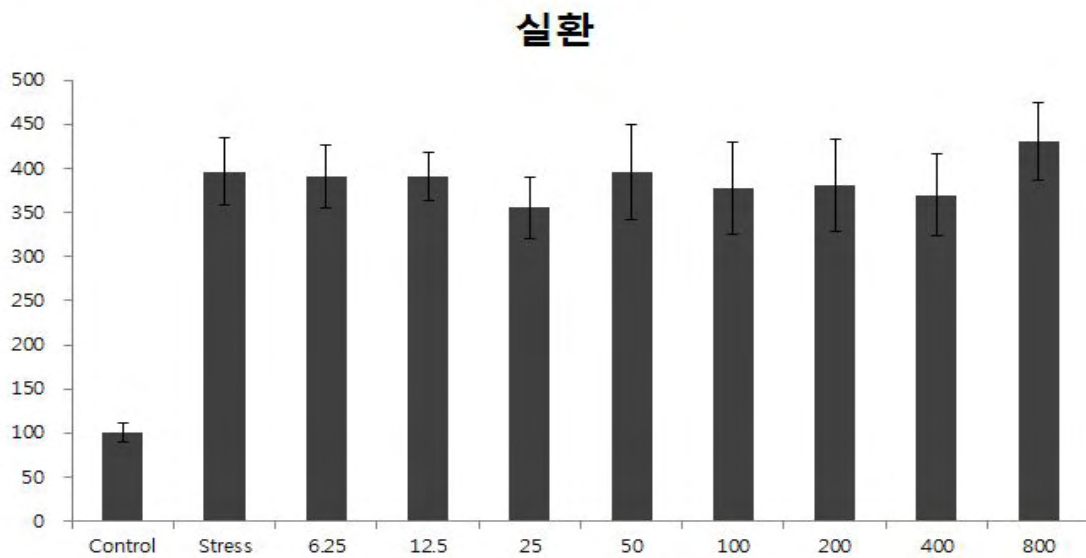


그림 4-39. After fermentation of vegetable juice, thermal processing

(3) HPLC를 통한 생리활성 물질의 정량/정성 분석

- 야채주스 혼합, 열처리, 접종, 발효, 실환의 5가지 시료의 페놀 화합물 분석과 동정은 LC-MS/MS를 사용하였다. 분석칼럼은 Halo C18 column (2.1 mm, 100 mm, 2.7 μm Advanced Materials Technology, Wilmington, DE, USA)를 이용하였다. 이동상으로는 DDW(0.1% phosphoric acid 함유)와 acetonitrile(4% phosphoric acid 함유)를 사용하였고 520nm 파장에서 안토시아닌 위주로 결과를 관찰하였다.

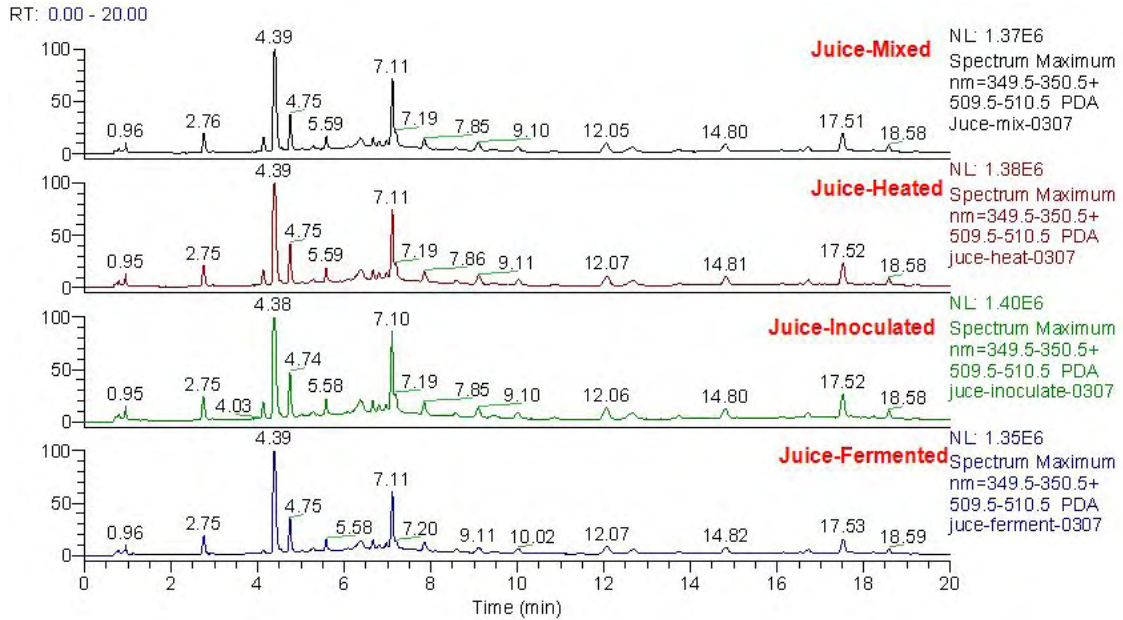


그림 4-40. HPLC chromatograms of different mixed vegetable juice

- 야채주스는 보라당근, 호박, 양상추, 셀러리, 시금치의 혼합이며, 야채주스의 안토시아닌은 보라당근에 의한 것으로 생각한다. 보라당근의 대표적인 안토시아닌으로는 cyanidin 3-(2''-xylose-6''-glucose-galactoside), cyanidin 3-(2''-xylose-galactoside), cyanidin3-(2''-xylose-6''-sinapoyl-glucose-galactoside), cyanidin3-(2''-xylose-6''-feruloyl-glucose-galactoside), and cyanidin3-(2''-xylose-6''-(4-coumaroyl)glucose-galactoside)등이 있다<sup>3,4)</sup>. Cyanidin은 안토시아닌의 색소 성분으로 체내에서 항산화, 항염증 및 항암작용을 하는 것으로 보고 되고 있다<sup>5)</sup>.

- 4종의 시료에서 HPLC 스펙트럼의 차이는 없었으며 이는 MS 분석에서도 동일한 수준으로 나타났다. 발견된 물질로는 안토시아닌과 (cyanidin, pelargonidin + pentose + hexose)과 chlorogenic acid, asperulosidic acid등이 spectrum과 MS/MS fragment pattern 분석 결과 검출되었다.

RT	m/z ([M+H] <sup>+</sup> )	Formula	Δppm	MS/MS	λ <sub>max</sub>	예상구조
2.75	456.2069	C33 H27 O2	3.182	438, 276	322	
4.39	355.1025	C16 H18 O9	0.398	163	324	Chlorogenic acid
4.74	267.1341	C13 H18 O4 N2	0.473	249, 221, 166	324	Thr-Phe
5.58	379.1000	C14 H14 O7 N6	0.862	185, 217	322	
6.38	433.1344	C18 H24 O12	0.825	127, 271, 289, 307	323, 527	Asperulosidic acid
7.11	287.0551	C15 H11 O6	0.158	213, 231, 241, 259	283, 531	Cyanidin
7.85	333.0607	C16 H12 O8	0.739	318(-methyl)	255, 339, 527	Patuletin(?)
8.59	333.0607	C16 H12 O8	0.739	318(-methyl)	255, 339, 527	Patuletin(?)
10.03	671.1821	C29 H34 O18	0.446	509(-162) 347(-162-162)	340, 527	Dihexosides of methylated dihydromyricetin
12.07	565.1553	C26 H28 O14	0.227	433(-132) 271(-132-162)	332, 527	Pelargonidin + pentose + hexose
12.69	671.1823	C29 H34 O18	0.744	509(-162) 347(-162-162)	340, 525	Dihexosides of methylated dihydromyricetin
14.81	523.1085	C23 H22 O14	0.551	347(-176) 332(-methyl)	366, 575	5,6-Dihydroxy-2-(3-hydroxy-4-methoxyphenyl)-7-methoxy-4-oxo-4H-chromen-3-yl β-D-glucopyranosiduronic acid
16.72	537.1241	C24 H24 O14	0.425	361(-176) 346(-methyl)	329	4-[5,7-Dihydroxy-3,6-dimethoxy-4-oxo-4H-chromen-2-yl]-2-methoxyphenyl β-D-glucopyranosiduronic acid
17.52	521.0929	C23 H20 O14	0.669	345(-176) 330(-methyl)	340	2-Hydroxy-4-[9-hydroxy-7-methoxy-8-oxo-8H-[1,3]dioxolo[4,5-g]chromen-6-yl]phenyl β-D-glucopyranosiduronic acid
18.58	535.1087	C24 H22 O14	0.950	359(-176) 344(-methyl)	333	6-[3,4-Dimethoxyphenyl]-9-hydroxy-8-oxo-8H-[1,3]dioxolo[4,5-g]chromen-7-yl β-D-glucopyranosiduronic acid

표 4-18. Identification of phenolics in by reversed-phase HPLC and LC/MS

## 제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

### 제 1 절 연구목표의 달성도

#### 1. 1차년도

세부과제명	세부연구목표	평가의 착안점 및 기준	가중치	달성도	내용
강화약쭈 등 국내 자생식물을 이용한 기능성 식품 개발	- 세포주 모델을 이용한 약쭈 등 국내 자생식물의 효능 검색 (심혈관질환 예방, 면역조절, 피부 미용 개선, 뇌 기억력 개선)	- 기능성 분획물 2종 발굴	15%	100%	- 약쭈의 지표성분인 eupatilin이 심혈관질환에 효능이 있다는 것을 사람 평활근세포 모델을 통해서 밝혔으며, 약쭈의 활성성분인 eupatilin과 jaceocidin이 자외선으로 유도되는 주름을 억제할 가능성이 있음을 사람 섬유아세포에서 확인하였음.
	- 약쭈 등 국내 자생식물의 생리활성 기능 성분 규명 및 원료의 재료화	- 기능성분 또는 지표성분 1종 도출	10%	100%	- 강화약쭈의 생리활성 기능 성분으로서 eupatilin을 규명하였고, 이 성분을 표준화하기 위한 강화약쭈 원료 처리 공정을 개발하였음.
녹차 등 국내농산물을 이용한 미용건강기능 식품 개발	- 녹차 이외에 slimming에 도움을 줄 수 있는 소재에 관한 <i>in vitro</i> 효능 검증	- 기능성분 1종 규명	10%	90%	- 클로로필 고함량 녹차 추출물 원료화를 완료하였음.
	- 효능이 입증된 녹차를 포함한 복합	- 시제품 1종 제작	15%	100%	- 인체적용 시험을 통해 녹차를 포함한 소재를 이용하

	소재에 관한 제형화 및 인체 효능 시험				여 슬리밍 효능을 가지는 제품을 출시하였음.
인슐린저항성, 당뇨합병증 및 뇌인지기능 개선용 건강기능식품 제품화 연구	- 마로부터 인슐린 저항성 및 당뇨합병증 개선 건강기능식품 소재 개발	- 기능성 분획물 1종 발굴 및 원료기능인 증 획득	25%	100%	- 산약으로부터 allantoin을 지표성분으로 하는 분획물을 개발하였으며, 지표성분의 함량을 분석하는 기법을 개발하였고, 현재 혈당조절에 도움을 주는 개별인정형 기능성식품을 출시하였음.
국내 야채를 이용한 기능성 발효음료 개발	- 기능성 probiotic 유산균 <i>in vitro</i> 선발 (면역조절, 항산화, 콜레스테롤 저하)	- 기능성 probiotic 유산균 1종 선발	15%	100%	- 300여종의 유산균으로부터 발효능이 우수한 92종의 유산균을 선발하였고, 이로부터 면역증강능력이 뛰어난 기능성 유산균 <i>L. plantarum</i> HY7712와 <i>Lactobacillus sakei</i> K101을 선발하였음.
	- 기능성 발효음료 개발을 위한 원료 선발	- 원료 1종 선발	10%	100%	- 기능성 발효음료의 원료로는 국산 유기농 야채 혼합물을 사용하기로 함.

2. 2차년도

세부과제명	세부연구목표	평가의 착안점 및 기준	가중치	달성도	내용
강화약썩 등 국내 자생식물을 이용한 기능성 식품 개발	- 동물모델을 이용한 약썩 등 국내 자생식물의 효능 검색 및 작용기작 규명	- 동물모델로부터 기능성이 입증된 기능성 소재 1종 발굴	15%	80%	- 아토피 동물모델을 통하여 CK 강화 인삼의 효능을 탐색하였음. CK 강화 인삼을 투여시 동물에서 아토피성 피부염을 억제하는 효능을 확인하였음. - Rg3강화 인삼의 뇌질환 예방 효능을 연구하였음. Rg3가 뇌질환을 예방하고, 기억력을 개선시키는 효과를 확인하였으나, 일반 인삼과 비교하여 탁월한 효능을 보이지는 않음.
	- 인삼 등 국내 자생식물의 생리활성 기능 물질 규격화 (원료의 표준화)	- 기능성분을 이용한 원료의 표준화 및 공정 최적화 1종	10%	100%	- 사포닌의 최적 분석 조건을 설정하고, 강화약썩 외 두 종의 국내 자생식물의 원료 가공 공정 최적화 및 소재의 scale-up 제조를 수행함. 또한 산 및 효소처리를 통한 소재의 2차 가공 공정 연구를 수행하여 원료 제조 방법에 적용하였음.
녹차 등 국내 농산물을 이용한 미용건강기능 식품 개발	- Slimming 효능 제품 출시	- Slimming 효능 제품 1종 출시	15%	100%	- 인체적용 시험을 통해 녹차를 포함한 소재를 이용하여 슬리밍 효능을 가지는 제품을 출시하였음.

	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 녹차 이외에 피부미용에 도움을 줄 수 있는 소재에 관한 <i>in vitro</i> 효능 검증</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- <i>In vitro</i> 검증을 통해 피부미용 기능성 소재 1종 발굴</li> </ul>	10%	100%	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 85 종의 식용 및 약용 식물 자원 라이브러리를 구축하였고, 이로부터 DPPH test, MMP-1 저해 활성, Collagen 생성능 등의 실험을 통하여 피부미용 효능을 스크리닝을 하였음. 이를 통하여 제주진득찰 추출물을 선정하였으며, 이로부터 활성성분인 kirenol을 분리하였음.</li> </ul>
인슐린저항성, 당뇨합병증 및 뇌인지기능 개선용 건강기능식품 제품화 연구	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 항당뇨 건기식 제품화 연구 및 체중 조절 기능 개선 소재 발굴</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 항당뇨 건기식 제품 1종 출시 및 체중 조절 기능성 분 또는 지표 물질 1종 규명</li> </ul>	25%	100%	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 항당뇨 건기식 제품 개발을 위해 allantoin을 지표성분으로 하는 기능성 원료를 개발하였고, 현재 품목 제조 신고를 한 상태임.</li> <li>- Gallic acid를 지표성분으로 하는 발효흑차 추출물의 체중 조절 효능을 동물 모델에서 확인하였으며, 현재 임상실험승인을 받아 실험을 준비 중임.</li> </ul>
국내 야채를 이용한 기능성 발효음료 개발	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 기능성 발효음료의 개발 및 동물모델 효능시험</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 기능성 발효음료 개발을 위한 마케팅 협의</li> </ul>	25%	100%	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 개발된 유산균 및 기능성 발효음료를 이용하여 고콜레스테롤 투여 동물 모델, 동맥경화 유발 동물 모델에서 동물실험을</li> </ul>

					수행하여 제품의 효능을 입증하였음.
--	--	--	--	--	------------------------



3. 3차년도

세부과제명	세부연구목표	평가의 착안점 및 기준	가중치	달성도	내용
강화약썩 등 국내 자생식물을 이용한 기능성 식품 개발	- 인삼 등 국내 자생식물 유래 유효성분의 안정성 검증 및 임상시험을 통한 인체 효능 검증 및 제품 출시	- 개별인정형 인증 1종 획득 - 제품 1종 출시	25%	80%	- 강화약썩의 eupatilin을 지표 성분으로 표준화 소재개발을 완료하여 기능성원료 신청을 하였음. 표준화 소재를 적용하여 시제품을 개발하였으며 소비자 수용도 조사를 통해 드링크 및 환 제품의 개발을 진행하였음. 원물확보 및 원가 등 시장환경, 상황의 검토중에 있음.
녹차 등 국내농산물을 이용한 미용건강기능 식품 개발	- 피부미용 개선 효능 관련 인체 효능 시험 및 제품 출시	- 제품 1종 출시	15%	90%	- 피부 미용 개선 기능성 제품 출시를 위하여 인체적용시험을 통하여 피부 미용 기능성 식품의 근거를 확인하였고, 고객 수용도를 조사하였음. 이 결과들을 토대로 제품 출시를 추진 중이며, 현재 내부적인 사정으로 인해 제품 출시에는 도달하지 못하였으나, 시장 상황의 변동에 따라 언제든 출시 가능한 상태임.
	피부미용 개선에 효과적인 검증된 소재에 관한	- Library 및 데이터베이스 구축	15%	100%	- 선행연구를 통해 구축된 라이브러리를 통해서 피부미용 효능을 지니는

	library 구축				원료를 확보하였으며, 이를 토대로 소재 라이브러리를 구축함.
인슐린저항성, 당뇨합병증 및 뇌인지기능 개선용 건강기능식품 제품화 연구	- 체지방 감소 건강기능식품 인체시험 개시	- 인체적용시험 개시 1건	15%	90%	- 발효흑차 추출물의 체지방 감소 효능연구 및 작용기작을 규명하였고 특허를 출원하였으며, 인체적용시험을 개시하였음. 개별인정신청을 위해 근거자료를 마련하고 있음.
	- 유효분획물의 또는 유효성분의 인슐린저항성 개선 작용기작 규명	- 인슐린저항성 개선 작용기작 규명	15%	100%	- 지방간, 비만, 대사성 염증반응 및 인슐린저항성 개선 작용기작을 규명하였음.
국내 야채를 이용한 기능성 발효음료 개발	- 기능성 발효음료의 출시	- 기능성 발효음료 1종 출시	15%	100%	- 선행 연구 결과를 바탕으로 기능성 발효 음료를 출시하여 현재 시장에서 판매 중임.

4. 최종평가

세부과제명	세부연구목표	평가의 착안점 및 기준	가중치	달성도	내용
강화약썩 등 국내 자생 식물 을 이용한 기능성 식품 개발	- 강화 약썩 등 국내 자생 식물 을 이용한 건강기능성식품 제품화	- 우수상품개발 1건	25%	90%	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 강화약썩에서 생리활성을 나타내는 eupatilin을 지표성분으로 하여 표준화된 원료제조공정을 확립하고 이에 따라 표준화된 원료제조를 하였음.</li> <li>- 해당 원료를 적용한 시제품의 소비자 수용도 조사를 통해 드링크, 환제형의 제품화 연구를 수행하여 제품개발을 진행하였음.</li> <li>- 강화약썩 외에 특정 성분을 강화한 표준화된 인삼 원료를 제조하기 위한 가공공정 연구를 수행하고 이를 이용한 아토피 및 뇌건강에의 기능성 연구를 수행하여 아토피 치료에 가능성이 있음을 확인하였고, 제품에 적용하기 위한 원료가공 연구를 수행함.</li> </ul>
녹차 등 국내농산물을 이용한 미용건강기능식품 개발	- 녹차 등 국내 천연농산물을 이용한 Slimming, 피부개선 효	- 우수상품개발 1건	25%	100%	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 녹차를 이용하여 슬리밍 효능을 지니는 제품을 출시하였으며, 녹차 이외에 피부개선 효능을 갖는 신소재</li> </ul>

	능을 갖는 미용기능성식품 제품화				로 제주진득찰의 kirenol을 개발하였음. 현재 제품화 직전 단계에 도달해 있음.
인슐린저항성, 당뇨합병증 및 뇌인지기능 개선용 건강기능식품 제품화 연구	- 마 등 국내 농산물을 이용한 인슐린저항성 및 당뇨합병증 개선용 건강기능성 식품 제품화	- 우수상품개발 1건	25%	90%	- Allantoin을 지표성분으로 하여 마 추출물인 DA-9802가 혈당조절기능으로 개별인정을 취득하였으며, 현재 이를 이용한 제품이 신고되어 있음. 또한 gallic acid를 지표성분으로 하는 발효흑차 추출물의 체중 조절 효능을 인정받기 위한 임상 실험을 승인받아 곧 실험이 진행될 예정임.
국내 야채를 이용한 기능성 발효음료 개발	- 국내 야채를 이용한 건강기능성식품 제품화	- 우수상품개발 1건	25%	100%	- 국산 유기농 야채 혼합물을 기본으로 하여 국내산 흑마늘과 도라지 등을 포함하는 원료물질을 <i>in vitro</i> 에서 선발된 유산균으로 발효시켜 기능성이 향상된 제품을 출시하여, 현재 시장에서 판매되고 있음.

## 제 2 절 관련분야에의 기여도

1. 강화약썩 외 두 종의 국내 자생식물의 여러 기능성을 다양한 세포주 및 동물 모델에서 확인함으로써 추후에 다른 소재를 연구할 때 플랫폼으로 사용될 수 있는 프로토콜을 개발하였으며, 국내 자생식물을 기반으로 한 기능성 식품 개발의 가능성을 높였음.
2. 강화약썩 외 두 종의 국내 자생식물의 생리활성성분을 규명하고, 특정 성분을 표준화하여 제조하는 원료 제조방법 연구를 수행하여 가공공정을 확립하였음. 이렇게 제조된 원료의 품질 관리를 위한 기준규격을 설정하여 기능성 원료의 품질 관리에 중요한 지표로서 활용이 가능하도록 하였음.
3. 자생식물의 특정 성분 함량을 강화하기 위하여 추출조건 외에 산처리 또는 효소처리와 같은 2차 가공공정 연구를 통하여 표준화 원료 제조조건을 최적화하고 이것의 Scale-up생산 과정을 확립함으로써 국내 자생식물의 표준화된 원료 그 자체로서의 상품성을 높였음.
4. 원료의 추출, 농축 등의 가공공정을 거쳐 표준화된 기능성 강화 소재를 제조한 경우, 원료에 따라 다양한 제품에의 적용이 어려운 점을 감안하여 원료 자체의 맛품질 및 수용성 등을 높이기 위한 캡슐화 기술의 가능성을 검증하였음.
5. 강화약썩 외 두 종의 국내 자생식물을 이용한 기능성 식품의 시제품을 개발하여 소비자의 수용도 및 상품으로서의 가능성을 탐색하였으며, 국산 자생식물을 주원료로 하는 기능성 식품으로서의 가능성을 높임.
6. 녹차의 체중 조절 효과에 대한 작용 기작을 밝힘으로써 체중 조절 기능성 식품의 개발을 효율적으로 만들었음. 또한 녹차를 이용한 체중 조절 기능성 식품을 개발하여 기능성 식품 시장의 규모를 신장시켰으며, 비만으로 인한 사회적 비용을 경감시키는데 역할을 하였음.
7. 국내의 식용 및 약용 식물 자원 라이브러리를 구축함으로써 국산 자생식물이 기능성 식품의 소재로 이용될 수 있는 가능성을 높였으며, 라이브러리를 이용하여 피부 미용 효능을 지니는 소재를 규명함으로써 라이브러리를 이용한 기능성 원료 개발에 모범적인 사례를 남김. 추후에 기능성 원료 개발을 효율적으로 만들어 줄 수 있다고 생각됨.
8. 기능성 원료를 섭취했을 때 생길 수 있는 대사체를 분석하고, 이를 이용하여 데이터베이스를 구축함으로써 각종 기능성 원료의 생체이용률에 대한 개념을 도입하고, 기능성 원료의 체내에서의 구체적인 작용기작을 밝히는데 일조할 것으로 생각됨.
9. 체지방 감소 및 혈당 조절의 구체적인 기작을 밝힘으로써 현대 사회에 문제가 되고 있는 비만과 대사성 질환에 대한 해결책을 제시하였음.

10. 산약, 흑차와 같은 국내산 농산물의 체중 조절 및 혈당 조절 효능을 국제 우수 저널에 게재함으로써 국제적으로 인정받을 수 있는 국산 체중 조절 및 혈당 조절 기능성 식품의 개발 가능성을 제시함.
11. 산약의 지표성분(allantoin)이나 발효흑차의 지표성분(galic acid)을 규명하고, 분석법을 밝히고, 이들의 함량을 표준화하고 추출 공정을 확립함으로써 지표물질이 강화된 고기능성 제품의 개발 가능성을 높임.
12. 소비자에게 익숙한 유산균을 이용하여 기능성이 개선된 기능성 식품을 개발함으로써 소비자 친화적인 새로운 개념의 기능성 식품을 제시함.
13. 유산균을 이용한 발효 뿐만 아니라 유산균 자체의 면역강화 기능성 소재로서의 이용가치를 제시함으로써 유산균을 이용한 기능성 식품 개발 가능성을 제시하였음.
14. 여러 가지 조건으로 가공된 야채발효 기능성 식품의 기능성 성분을 정성분석함으로써 각종 기능성 식품의 최적 가공 조건을 확립하였고, 이를 토대로 기능성을 최대한 보존하면서 가공할 수 있는 방법을 개발하였음.

## 제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

### 제 1 절 제1핵심과제(강화약썩등 국내 자생식물을 이용한 기능성 식품 개발)

#### 1. 연구개발 성과

구분	특허 출원	특허 등록	제품 등록	상표 등록	신품종등록 (유전자원 등 포함)	논문		기타
						국외 (SCI)	국내	
목표	2	1	1			8		
성과	1		1			5(2)		
달성도	50%	0%	100%			80%		

#### 가. 특허

(1) 당초 목표는 특허 출원 2건, 등록 1건이었으며, 과제 기간 내에 특허를 1건 출원하였음. 현재 진행중인 특허가 출원되면 목표를 달성할 수 있을 것으로 판단됨.

#### (2) 특허 목록

##### (가) 출원

- 효소전환 및 분획기술을 이용한 사포닌 전환체 케이 화합물 강화분획물 및 그 제조방법, 10-2012-0007044 (2012.01.20.)

#### 나. 논문

(1) 논문 8편을 국외 SCI 저널에 게재하기로 목표를 설정하였으며, 현재 국외 SCI 저널에 5편의 논문을 게재하였고, 2편은 논문을 투고하여서 게재 여부를 검토받고 있음. 당초 예상보다 논문 게재 시기가 다소 늦어졌지만, 곧 게재 여부가 정해질 것으로 생각되며, 논문 게재가 완료되면 목표를 달성할 수 있을 것으로 판단됨.

(2) 논문 목록

- Cyanidin-3-glucoside suppresses B[a]PDE-induced cyclooxygenase-2 expression by directly inhibiting Fyn kinase activity. *Biochem Pharmacol.* 2011 Jul 15;82(2):167-74.
- Coffee phenolic phytochemicals suppress colon cancer metastasis by targeting MEK and TOPK. *Carcinogenesis.* 2011 Jun;32(6):921-8.
- Kaempferol attenuates 4-hydroxynonenal-induced apoptosis in PC12 cells by directly inhibiting NADPH oxidase. *J Pharmacol Exp Ther.* 2011 Jun;337(3):747-54.
- Caffeinated coffee, decaffeinated coffee, and the phenolic phytochemical chlorogenic acid up-regulate NQO1 expression and prevent H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced apoptosis in primary cortical neurons, *Neurochem Int.* 2012 Apr;60(5):466-74.
- Optimization of Enzymatic Treatment for Compound K Production from White Ginseng Extract by Response Surface Methodology. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2013 May 7. [Epub ahead of print]
- Eupatilin, a major polyphenol of Artemisia plants, inhibits Aortic Smooth Muscle Cells migration via attenuating PI3K activity and MKK3 and MKK4 phosphorylation *Planta medica.* major revision
- Anthocyanidins, a novel Focal Adhesion Kinase inhibitors, attenuates PDGF-BB-induced vascular smooth muscle cell migration *Cardiovascular research* major revision

다. 제품

(1) 과제기간 내에 제품을 1건 개발하기로 하였고, 약썩을 주성분으로 하는 기능성식품을 개발 하였으며, 현재 시장 상황이 좋지 않다고 판단되어 출시는 보류되어 있음. 시장 상황이 개선되면 출시할 수 있도록 준비 중임.



라. 기타

(1) 과제에 관련하여 수행한 연구결과를 국내외 학회에서 1건 발표하였으며, 과제 수행을 통해 2명의 석사를 양성하였음.

(2) 학회 발표 목록

- 2012 IFT Annual Meeting & Food Expo Program & Exhibit Directory (2012)

● Eun Hey Kim et al. Optimization of Enzymatic Transformation for Bioavailability of White Ginseng Extract Usin Response Surface Methodology

(3) 인력양성 목록

인력양성명	인력양성년도	성과발생년도	인력양성내용	전공	학위	성별
석사 인력양성	2012.08	2010	석사학위 취득 (이영은)	농학 계열	석사	여
석사 인력양성	2013.02	2010	석사학위 취득 (김은혜)	농학 계열	석사	여

2. 성과 활용 계획

가. 약쑥, 인삼 등 국내 자생식물의 지표물질을 규명하고, 지표물질의 기능성에 대한 작용 기작을 규명함으로써 원료를 표준화하고, 국내 자생식물의 기능성원료로서의 가치를 높여서 고부가가치 기능성식품 개발의 가능성을 높임.

나. 국내 자생식물로 기능성식품을 개발함으로써 기업과 농업 종사자 사이에 협업을 확대하고, 국내 농가 소득 창출에 기여할 것으로 생각됨.

다. 인삼, 약쑥 등 국내 자생식물의 지표성분의 기능성을 해외 저널에 게재함으로써 국내 자생식물의 우수성을 해외에 알리고, 이와 자사의 해외 유통망을 결합하여 해외에서 상품성을 가지는 기능성 식품을 개발할 수 있음.

라. 2013년 6월부터 식약청에서는 “국민면역반응으로 인한 피부상태 개선에 도움”이라는 기능성 인정을 허가해 주기 시작하여, 본 과제에서 수행한 소재의 경우에도 기능성 원료인정 신청 및 인정이 가능할 것으로 판단됨에 따라 향후 기능성 원료인정 신청을 하고, 제품을 개발할 예정이다.

마. 기 구축된 CJ제일제당의 브랜드 이미지를 활용하고, 기존 국내 약용 식물 주이용층이 많이 구매하는 유통채널을 활용하여 제품 판매를 확대하고, 기능성 강화 약쑥을 건강기능식품 제형의 일반 식품군 등의 다양한 형태로 개발할 예정이다.

## 제 2 절 제2핵심과제(녹차 등 국내농산물을 이용한 미용건강기능식품 개발)

### 1. 연구개발 성과

구분	특허 출원	특허 등록	제품 등록	상표 등록	신품중등록 (유전자원 등 포함)	논문		기타
						국외 (SCI)	국내	
목표	3		1			2	2	
성과	2	1	1			3		
달성도	100%	100%	100%			100%	0%	

#### 가. 특허

(1) 당초 목표는 특허 출원 3건이었으며, 과제 기간 내에 특허를 2건 출원하고, 1건 등록하여서 목표를 달성했다고 생각됨.

#### (2) 특허 목록

##### (가) 출원

- 온주밀감 추출물, 시스틴 및 비타민 C를 함유하는 피부톤 개선용 또는 미백용 조성물, 10-2010-008738 (2010.09.07.)

- 녹차나무 뿌리에서 추출한 사포닌을 포함하는 구강용 조성물, 10-2011-0099525 (2011.09.30.)

##### (나) 등록

- 보이차의 제조타입과 후발효 기간을 구별하는 방법 및 그 구별용 조성물, 10-1130860호 (2012.03.20.)

## 나. 논문

(1) 논문 2편을 국내 저널에 게재하고, 2편을 국외 SCI 저널에 게재하기로 목표를 설정하였으며, 현재 국외 SCI 저널에 3편의 논문을 게재하였음. 당초 목표보다 논문 편수는 적지만 국외 SCI 저널에 목표를 초과하여 논문을 게재하였고, 이는 추후 해외 시장으로의 제품 수출을 고려할 때 바람직한 결과라 할 수 있음.

### (2) 논문 목록

- Changes in secondary metabolites of green tea during fermentation by *Aspergillus oryzae* and its on antioxidant potential, *Food Research International*, 2013, accepted

- Metabolomics-based optimal Koji fermentation for tyrosinase inhibition supplemented with *Astragalus Radix*, *Biosci Biotechnol Biochem.* 2012;76(5):863-9.

- Metabolomics analysis reveals the compositional differences of shade grown tea (*Camellia sinensis* L.). *J Agric Food Chem.* 2010 Jan 13;58(1):418-26.

## 다. 제품

(1) 과제기간 내에 제품을 1건 개발하기로 하였고, 녹차를 주성분으로 하는 AP 내추럴뷰티푸드 더블핏S를 2011년 5월에 출시하여 현재까지 누적매출 약 15억원을 달성하였음(연간 매출 6억 2천만원).

## (2) 제품 목록

### - 내추럴뷰티푸드 더블핏S



## 라. 기타

(1) 과제에 관련하여 수행한 연구결과를 국내외 학회에서 13건 발표하였으며, 과제 수행을 통해 11명의 석사를 양성하였음.

## (2) 학회 발표 목록

- International Seminar & Expo on JAMU (2010)

● Jaekyung Kim et al. Anti-photoaging activity of korean medicinal plants in human dermal fibroblasts.

- 11th Asian societies of cosmetic scientists conference (2013)

● Ji-Eun Park et al. Preventive effects of kirenol isolated from Jeju jindeukchal (*Siegesbeckia orientalis*) on UVB-induced photoaging in human skin fibroblast.

- 한국식품과학회 제78차 학술대회 및 정기총회 (2011)

● Sukyeong Mun et al. Effects of some korean medicinal plants on procollagen and matrix metalloproteinase (MMP) in UV-irradiated human dermal fibroblasts.

- 영·호남 식품과학회 국제심포지엄 (2011)

● Sukyeong Mun et al. Anti-photoaging effect of *Siegesbeckia orientalis* L. on UV-induced damage in human skin fibroblast.

- 한국식품과학회 제79차 학술대회 및 정기총회 (2012)

● Sukyeong Mun et al. Oral Administration of *Siegesbeckia orientalis* L. Extract Protects against Photoaging in Hairless Mice.

- 한국식품과학회 제79차 학술대회 및 정기총회 (2012)
  - Hee-Bong Pyun et al. Synergic effects of *Siegesbeckia orientalis* L. with green tea extract on UVB-induced skin damage in hairless mice.
  
- 한국식품영양과학회 국제심포지엄및정기학술대회 (2012)
  - Mi-Bo Kim et al. Optimization of high hydrostatic pressure extraction of kirenol from *Siegesbeckia orientalis* L. using response surface methodology.
  
- 101차정기총회 및 국제학술대회 (2012)
  - Young-Mi Kim et al. LC-MS-based Chemotaxonomic Classification of Wild-type *Lespedeza* sp. and Its Correlation with Genotype.
  
- 2012한국대사체학회 하계워크샵 (2012)
  - Sa-Ra Lee et al. Mass Spectrometry-Based Metabolite Profiling and Antioxidant Activity of Different Sizes of Aloe vera (*Aloe barbadensis* Miller)
  
- 2012한국대사체학회 하계워크샵 (2012)
  - Hye-Min Park et al. Mass Spectrometry - Based Chemotaxonomic Classification of *Penicillium* Species (*P.echinulatum*, *P. expansum*, *P. solitum*, and *P. oxalicum*) and its Correlation with Antioxidant Activity.
  
- 2012한국대사체학회 하계워크샵 (2012)
  - Soo-Yeon Lee et al. Mass Spectrometry-Based Metabolite Profiling and Bacterial Diversity Characterization of Korean Traditional Meju during Fermentation.
  
- 2012한국대사체학회 하계워크샵 (2012)
  - Mi-Yeon Lee et al. LC-MS Based Chemotaxonomic Classification of *Aspergillus* spp. and Its Discriminable Metabolite, Neosartorin, with Antibacterial and Anticancer Activities.
  
- 2012한국대사체학회 하계워크샵 (2012)
  - Jung-Nam Choi et al. Influence of Iron Regulation on Metabolome of *Cryptococcus neoformans*.

(3) 인력양성 목록

인력양성명	인력양성년도	성과발생년도	인력양성내용	전공	학위	성별
석사 인력양성	2010.08	2010	석사학위 취득 (보조연구원 최은정)	공계열	석사	여
석사 인력양성	2010.08	2010	석사학위 취득 (보조연구원 김성경)	공계열	석사	남
석사 인력양성	2011.02	2010	석사학위 취득 (보조연구원 김성화)	공계열	석사	남
석사 인력양성	2011.02	2010	석사학위 취득 (보조연구원 강영규)	공계열	석사	남
석사 인력양성	2011.08	2010	석사학위 취득 (보조연구원 김재경)	공계열	석사	남
석사 인력양성	2011.08	2010	석사학위 취득 (보조연구원 조근애)	공계열	석사	여
석사 인력양성	2011.08	2010	석사학위 취득 (보조연구원 최유리)	공계열	석사	여
석사 인력양성	2012.08	2012	석사학위 취득 (보조연구원 문숙영)	공계열	석사	여
석사 인력양성	2012.08	2012	석사학위 취득 (보조연구원 이경은)	공계열	석사	여
석사 인력양성	2013.02	2012	석사학위 취득 (보조연구원 김명석)	공계열	석사	남
석사 인력양성	2013.02	2012	석사학위 취득 (보조연구원 사보경)	공계열	석사	여

2. 성과 활용 계획

가. 아모레퍼시픽 자체기술로 개발한 녹차소재를 활용하여 슬리밍효능의 개별인정형 제품을 출시하였고 녹차 기능성 식품 시장을 창출함.

나. 국내 자생 식물 연구를 통해 녹차와 시너지 있는 소재를 발굴하고 효능을 증명하여 피부미용 식품시장 확대를 준비함. 또한, 이에 대해서 최신 연구기법인 메타볼로믹스 기법을 이용하여 과학적 백데이터를 확보하여 고객 신뢰도를 높임.

다. 녹차 소재와 기능성 국내 소재를 통해 피부 기능성 식품시장 파이를 넓히고 소재 산업을 활성화하여 국내 농가 소득 창출에 기여할것으로 생각됨.

라. 국내산 녹차의 차별성을 찾고, 자사 특화 제품력을 이용하여 중국, 일본등을 포함한 아시아

권의 글로벌 시장을 겨냥하는 특화 제품을 개발할 수 있음.

마. 체지방감소 효능 이외에 다른 녹차의 효능을 밝히고, 이를 이용한 제품을 개발하고, 다양한 제형 및 판매 채널 확보를 통해 제품 경쟁력 및 매출을 강화 할 예정임.

### 제 3 절 제3핵심과제(인슐린저항성, 당뇨병증 및 뇌인지기능 개선용 건강기능식품 제품화 연구)

#### 1. 연구개발 성과

구분	특허 출원	특허 등록	제품 등록	상표 등록	신품중등록 (유전자원 등 포함)	논문		기타
						국외 (SCI)	국내	
목표	2	1	1					
성과	1		1			4	1	
달성도	50%	0%	100%			100%	100%	

#### 가. 특허

(1) 당초 목표는 특허 출원 2건, 등록 1건이었으며, 과제 기간 내에 특허를 1건 출원하였음. 실적에는 포함되어 있지 않지만, 진행 중인 특허가 출원되면 목표를 달성할 수 있을 것으로 생각됨.

#### (2) 특허 목록

##### (가) 출원

- 흑차 에탄올 수용액 냉침 추출물을 함유하는 체중 및 체지방 감소 또는 지질관련 대사성 질환의 예방 또는 개선용 약학적 조성물 및 건강식품, 10-2013-0040280 (2013.4)

#### 나. 논문

(1) 논문 목표는 없었으나, 현재 국외 SCI 저널에 4편의 논문을 게재하였고, 국내 저널에 1편의 논문을 게재하였음. 이외에도 현재 게재 검토중인 논문이 3편 있어 논문 실적이 매우 우수함. 특히 국외 SCI 저널에 발표된 4편의 논문은 비만을 비롯한 대사성질환 분야에서 널리 인정받고 있는 우수한 저널이기 때문에 추후 외국에 체중 조절용 기능성식품을 출시할 때 근거 자료로 이용할 수 있을 것으로 생각됨.



(2) 논문 목록

- Extract from *Dioscorea batatas* ameliorates insulin resistance in mice fed high-fat diet *J Med Food*. 2012 Jun;15(6):527-34.
- *Artemisia iwayomogi* Extract Attenuates High-Fat Diet-Induced Obesity by Decreasing the Expression of Genes Associated with Adipogenesis in Mice. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2013;2013:915953.
- Involvement of SIRT1-AMPK signaling in the protective action of indole-3-carbinol against hepatic steatosis in mice fed a high-fat diet. *J Nutr Biochem*. 2013 Jan 18. pii: S0955-2863(12)00296-3.
- Taurine ameliorates hyperglycemia and dyslipidemia by reducing insulin resistance and leptin level in Otsuka Long-Evans Tokushima fatty (OLETF) rats with long-term diabetes. *Exp Mol Med*. 2012 Nov 30;44(11):665-73.
- The effect of coated liposome from *Dioscorea Rhizoma* Extract (DRE) on hypoglycemic, serum insulin and lipid in streptozotocin-Induced Diabetic Mice 한국식품영양학회지

다. 제품

(1) 과제기간 내에 제품을 1건 개발하기로 하였고, 마주정 추출물의 혈당 조절 기능성으로 개별인정을 취득하였고, 해당 원료로 혈당 기능 조절 기능성식품을 만들어서 품목 제조 신고를 하였으며, 시장성을 높이기 위해 기능성을 향상시키기 위한 추가적인 실험을 진행 중임. 실험이 완료된 후 시장 상황을 살펴 제품을 출시할 예정임. 또한 발효흑차의 체중조절 효능 및 작용 기작을 세포주 및 동물 모델에서 확인하고, 현재 임상 실험 승인을 받아 실험을 준비 중에 있음.

라. 기타

(1) 과제에 관련하여 수행한 연구결과를 국내외 학회에서 4건 발표하였으며, 인체적용시험 승인을 받아 놓았음.

(2) 학회 발표 목록

- 한국식품연구원 2011 심포지움 (2011)

● Taesun Park 초청강연: 체중조절용 건강기능식품원료 후보물질 발굴. 대사증후군의 임상적 이해와 건강기능식품의 개발방향.

- Annual Scientific Meeting of Nutrition Society (2011)

● Taesun Park Resveratrol exerts anti-obesity effects via mechanisms involving down-regulation of aipogenic and inflammatory process in mice.

- International symposium and Annual Meeting 40th Anniversary (2011)

● Taesun Park Carvacrol protects against hepatic steatosis by controlling lipogenesis, fatty acid oxidation, and cholesterol metabolism in mice fed a high-fat diet.

- 대상 R&D metabolism: 기능성식품이 만드는 건강한 삶 (2011)

● Taesun Park 기능성식품이 만드는 건강한 삶.

## 2. 성과 활용 계획

### 가. 만성질환자용 건기식 개발계획

#### (1) 시장현황 및 개발전략

고령화로 인한 안티에이징 니즈와 active senior가 부상되고 고령화 사회가 될수록 만성질환의 유병률이 증가됨. 이에 따라 만성질환의 예방관리 및 건강유지를 위한 전문화된 제품이 필요함. 개발전략으로는 만성질환 예방효과가 있는 기능성분과 영양성분을 과학적으로 설계하여 자체개발원료로 제품의 독점성 확보코자 함

#### (2) 당뇨병환자용 건기식





(3) 비만환자용 건기식

## 만성질환자용 건기식 (2)

“Body-fat Care”: 다이어트 건기식

**체지방 감소**  
: 흑차추출물 (DA-9307)  
체내 지방 연소  
지방 흡수 억제





**Nutritional Ingredients**  
: soy protein, folate, fiber, Ca 등 21종  
영양소의 효과적인 배합

- ✓ Promotes the loss of fat
- ✓ Supplies good source of fiber
- ✓ Folates: Healthy homocystein level

DONG-A PHARM.

(4) 개발일정



- 향후 성인병 환자가 급증할 것으로 예상되는 상황에서 동아ST는 국내 천연물의약품 매출 선두를 달리는 기업으로서 소비자들이 믿고 구입할 수 있는 고기능성의 혈당 및 체중 조절 건

강기능식품을 개발하여 5년 내 연매출 100억원을 달성할 목표를 가지고 있음.

## 제 4 절 제4핵심과제(국내 야채를 이용한 기능성 발효음료 개발)

### 1. 연구개발 성과

구분	특허 출원	특허 등록	제품 등록	상표 등록	신품중등록 (유전자원 등 포함)	논문		기타
						국외 (SCI)	국내	
목표	3	1	1	1		2		
성과	3	1	3	3		(1)	(1)	
달성도	100%	100%	100%	100%		50%		

#### 가. 특허

(1) 당초 목표는 특허 출원 3건, 등록 1건이었으며, 과제 기간 내에 특허를 3건 출원하였고, 1건이 등록되었음. 소기의 목적을 달성하였다고 생각됨.

#### (2) 특허 목록

##### (가) 출원

- 락토바실러스 플란타룸 HY7712의 심장질환 및 뇌졸중을 유발하는 혈관 병변형성 억제효과 및 이를 유효성분으로 함유하는 제품, 10-2012-0089580, (2012)

- 락토바실러스 헬베티쿠스 HY7801로 발효한 기능성 칩즙 발효물 및 이를 유효성분으로 함유하는 제품, 10-2012-0089582, (2012)

- 류코노스톡 락티스 HY6001을 이용한 기능성 칩즙 발효물 및 이를 유효성분으로 함유하는 제품, 10-2012-0022298, (2013)

##### (나) 등록

- 면역증강 활성을 가지는 신규한 락토바실러스 플란타룸 에이취와이 7712, 10-1239806 (2013)

## 나. 논문

(1) 논문 목표는 국외 SCI 저널에 2편의 논문을 게재하는 것이었으며, 현재 2편의 논문을 투고하였고, 게재 여부를 검토 받고 있음. 아직 목표를 달성하지는 못 했지만, 투고된 논문이 게재되면 목표를 달성할 수 있을 것으로 생각됨.

### (2) 논문 목록

- Anti-aging effect of Lithospermum erythrorhizon extract on human skin model of Keratinocyte and fibroblast *Journal of Food Biochemistry* submission

- Total Phenolics, Total Flavonoids and Antioxidant Capacity of Various Commercial Products of Japanese Apricot (*Prunus mume*) in Korea *Journal of Food Science and Biotechnology* submission

다. 제품

(1) 과제기간 내에 제품을 1건 개발하기로 하였고, 유산균 발효 제품인 하루야채 퍼플(2011년 8월 출시, 총 매출액 약 15억원), 한국야쿠르트 흑마늘즙(2012년 출시, 총 매출액 약 12억 5천 만원), 한국야쿠르트 도라지즙(2012년 7월 출시, 총 매출액 약 8천5백만원)을 개발하여 총 3개의 제품을 개발하여 약 30억원의 매출을 올림.

(2) 제품 목록

- 100% 야채와 과일 하루야채 퍼플



- 한국야쿠르트 흑마늘즙



- 한국야쿠르트 도라지즙





라. 기타

(1) 과제에 관련하여 수행한 연구결과를 국내외 학회에서 5건 발표하였음.

(2) 학회 발표 목록

- 한국식품과학회 (2012)

● Bong Han Lee et al. Comparison of Total Phenolics, Total Flavonoids, Total Anthocyanins, and Antioxidant Capacity in Fermented Juices with Various Vegetables by *Lactobacillus plantarum* K55-5

- 한국식품과학회 (2012)

● Myoung-Hee Lee et al. Vegetable juice which was fermented by *Lactobacillus plantarum* HY7712 ameliorates hyperlipidemia in rats fed on a high-fat and high-cholesterol diet

- 생화학분자생물학회 (2012)

● Hongsup Yoon et al. *Lactobacillus plantarum* HY7712 prevent from the atherosclerosis

- APNC (2012)

● Hong-sup Yoon et al. Probiotic *Lactobacillus plantarum* HY7712 prevent from the atherogenic lesion formation

- KoSFoST (2012)

● Hee Geun Yoo et al. Anti-aging Effect of *Lithospermum erythrorhizon* on Skin in in vitro HaCaT and HDF-n Cells

## 2. 성과 활용 계획

가. 김치에서 분리한 유산균 *Lactobacillus plantarum* K8균을 이용한 다양한 제품(미용소재 식품, 다이어트소재 식품등) 들을 출시할 수 있으며, 이를 국내 및 해외 전시회를 통해 홍보함으로써 해외시장을 공략할 수 있음.

나. 유산균을 이용한 논문을 게재하고 특허출원을 할 수 있으며, 이미 개발되어 있는 소재들을 결합시켜서 다양한 제품을 출시해 국내 시장에 맞는 제품군을 개발할 수 있음.

다. 현재 시판되고 있는 발효주스 제품은 다양하지 않고, 이들의 효능에 관한 연구도 많이 부족한 현실이다. 현재 연구 사업에서 진행되어 지는 발효주스 가공 공정을 통하여 생리활성 물질의 감소 없이 발효주스를 섭취 할 수 있는 결과가 뒷받침 될 수 있다.

라. 바쁜 현대인들에게 야채주스의 간단한 섭취를 통하여 생리활성 물질을 쉽게 공급 할 수 있으므로 기능성 제품으로서의 좋은 발전 가능성을 제시할 수 있다.

마. 발효주스의 기능적 생리활성 물질의 분석 및 선정된 후보 물질의 항노화, 항염증 등을 위한 효능을 검증하고 효과적인 항산화 음료로의 개발을 이루고자 한다.

바. 발효 및 가공식품으로서 활용을 통한 식품산업의 성장 및 육성을 기대 할 수 있다.

사. 국내 고유 채소를 이용하여 제품 개발시 새로운 고부가가치를 갖고, 국내 기술력을 통하여 세계 시장으로 판매 가능하며, 이는 우리 제품이 세계 시장에서 우위를 점할 수 있는데 기여할 것으로 사료된다.

아. 기존에 개발되어 있는 제품을 활용하여 한국야쿠르트의 강점인 방문판매 및 온라인 판매를 통해 매출을 더욱 증대시킬 계획에 있음. 또한 본 과제를 통해 확보한 발효 기술을 신규 소재에 적용하여 새로운 제품을 개발하고, B2B 소재 사업화를 통해 매출을 올릴 수 있을 것으로 생각됨.

## 제 5 절 총 괄

### 1. 연구개발 성과

구분	특허 출원	특허 등록	제품 등록	상표 등록	신품중등록 (유전자원 등 포함)	논문		기타
						국외 (SCI)	국내	
목표	10	3	4	1		12	2	
성과	7	2	6	3		12(3)	1(1)	
달성도	70%	70%	100%	100%		100%	80%	

#### 가. 특허

- 특허는 출원 10건, 등록 3건이 목표였으며, 과제 기간 내에 특허를 7건 출원하였고, 2건이 등록되었음. 현재 출원이 진행 중인 특허의 출원 절차가 완료되면 목표를 달성할 수 있을 것으로 생각됨.

#### 나. 논문

- 논문은 국외 SCI 저널에 12편, 국내 저널에 2편을 투고하는 것이 목표였으며, 과제 기간 내에 12편의 논문이 국제 우수 SCI 저널에 등재되었으며, 국내 저널에 1편이 등재되었음. 또한 현재 진행중인 논문의 게재가 확정되면 목표를 초과달성할 수 있을 것으로 판단됨.

#### 다. 제품

- 제품은 과제 기간 내에 4개의 제품을 개발하는 것이 목표였으며, 과제 기간 내에 6개의 제품을 개발하였음. 또한 제품 개발이 진행되고 있는 것을 포함하면 목표를 초과달성할 수 있을 것으로 생각됨.

### 2. 성과 활용 계획

- 본 과제를 통하여 여러 가지 국산 농산물의 기능성을 연구하고 제품을 개발하였으며, 이를 통하여 축적된 기술 및 제품 개발 노하우를 활용하여 앞으로도 다양한 국산 농산물의 기능성을 연구하고 이를 활용하여 제품을 개발 할 것임.

## 제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

1. 일본- YAKURT 중앙연구소 유산균 사균체 자료
2. 일본-SUNTORY 중앙연구소 면역발란스 조절 식물성유산균 자료
3. 일본-OHAYO 주식회사 L-55유산균의 항바이러스 효능
4. 일본-A사의 EF-2001 사균체의 효능

## 제 7 장 연구시설·장비 현황

해당 사항 없음.

## 제 8 장 참고문헌

1. SIRT1 negatively regulates the mammalian target of rapamycin. *PLoS One*. 2010 5(2):e9199.
2. Skeletal muscle pathways of contraction-enhanced glucose uptake. *Int J Sports Med*. 2008 ;29(10):785-94.
3. Effects of AICAR and exercise on insulin-stimulated glucose uptake, signaling, and GLUT-4 content in rat muscles. *J Appl Physiol*. 2003;94(4):1373-9.
4. Angiotensin II inhibits insulin-stimulated GLUT4 translocation and Akt activation through tyrosine nitration-dependent mechanisms. *PLoS One*. 2010;5(4):e10070.
5. Positive and negative regulation of insulin signaling through IRS-1 phosphorylation. *Biochimie*. 2005;87(1):99-109.
6. 5'-AMP-activated protein kinase phosphorylates IRS-1 on Ser-789 in mouse C2C12 myotubes in response to 5-aminoimidazole-4-carboxamide riboside. *J Biol Chem*. 2001 276(50):46912-6.
7. Insulin-regulated hepatic gluconeogenesis through FOXO1-PGC-1alpha interaction. *Nature*. 2003;423(6939):550-5.
8. Hepatocytes: critical for glucose homeostasis *Int J Biochem Cell Biol*. 2004;36(5):753-8.
9. Chronic rapamycin treatment causes glucose intolerance and hyperlipidemia by upregulating hepatic gluconeogenesis and impairing lipid deposition in adipose tissue *Diabetes*. 2010 ;59(6):1338-48.
10. A complex interplay between Akt, TSC2 and the two mTOR complexes. *Biochem. Soc. Trans*. 2009;37, 217-222
11. ER stress negatively regulates AKT/TSC/mTOR pathway to enhance autophagy. 6:2,239-247;2010
12. Tpl2/Cot Signals Activate ERK, JNK, and NF- $\kappa$ B in a Cell-type and Stimulus-specific Manner. *J Biol Chem*. 2005; 280(25):23748-57
13. Adipogenesis and WNT signalling *Trends Endocrinol Metab*. 2009 Jan;20(1):16-24.
14. Changes in gene expression foreshadow diet-induced obesity in genetically identical mice. *PLoS Genet*. 2006; 2(5):e81.
15. Adiponectin and adiponectin receptors. *Endocr Rev*. 2005May;26(3):439-51.
16. Cloning of adiponectin receptors that mediate antidiabetic metabolic effects. *Nature*. 2003; 423(6941):762-9.
17. Cani PD, Amar J, and Iglesias MA. 2007. Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance. *Diabetes*. 56:1761-1772
18. Musso G, Gambino R, and Cassader M. 2011. Interactions between gut microbiota and host metabolism predisposing to obesity and diabetes. *Annu Rev Med*. 62:361-380

19. Hamad EM, Sato M, and Uzu K. 2009. Milk fermented by *Lactobacillus gasseri* SBT2055 influences adipocyte size via inhibition of dietary fat absorption in Zucker rats. *Br J Nutr.* 101:716–724
20. Ley RE, Turnbaugh PJ, and Klein S. 2006. Microbial ecology: human gut microbes associated with obesity. *Nature.* 444:1022–1023
21. Ma X, Hua J, and Li Z. 2008. Probiotics improve high fat diet-induced hepatic steatosis and insulin resistance by increasing hepatic NKT cells. *J Hepatol.* 49:821–30
22. Xu H. 2003. Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. *J Clin Invest.* 112:1821–30
23. Yun SI, Park HO, and Kang JH. 2009. Effect of *Lactobacillus gasseri* BNR17 on blood glucose levels and body weight in a mouse model of type 2 diabetes. *J Appl Microbiol.* 107:1681–6
24. Hofmann, M. A. et al. RAGE mediates a novel proinflammatory axis: a central surface receptor for S100/calgranulin polypeptides. *Cell* 1999, 97, 889 - 901.
25. Marathe, S., Kuriakose, G., Williams, K. J. & Tabas, I. Sphingomyelinase, an enzyme implicated in atherogenesis, is present in atherosclerotic lesions and binds to specific components of the subendothelial extracellular matrix. *Arterioscl. Thromb. Vasc. Biol.* 1999, 19, 2648 - 2658.
26. Verschuren L, de Vries-van der Weij J, Zadelaar S, Kleemann R, Kooistra T. LXR agonist suppresses atherosclerotic lesion growth and promotes lesion regression in apoE\*3Leiden mice: time course and mechanisms. *J Lipid Res.* 2009 Feb;50(2):301–11.
27. Janeway (Jr.), C.A., Medzhitov, R. Innate immune recognition. *Annu. Rev. Immunol.* 2002. 20:197–216.
28. Libby, P., P. M. Ridker, A. Maseri., Inflammation and atherosclerosis. *Circulation.* 2002. 105: 1135 - 1143.
29. Aldons J. Lysis, Atherosclerosis, *Nature.* 2000 Sep 14; 407(6801):233–41. Review.
30. Li Yepeng , Ji Rong , Han Chunhui. Study on cyclophosphamide immunodepressed model in mice. *Chinese Journal of Food Hygiene* ( 2001) ,13 (6) : 7~10
31. H.S. Gill, K.J. Rutherford, J. Prasad and P.K. Gopal. Enhancement of natural and acquired immunity by *Lactobacillus rhamnosu* (HN001), *Lactobacillus acidophilus* (HN017) and *Bifidobacterium lactis* (HN019). *British Journal Nutrition* (2000), 83, 167–176.
32. Hekui J, Fumiko H, Masafumi N, Xingrong Z, Yasuyuki M, Takanori K and Masanori S. Establishment of an in Vitro Peyer' Patch Cell Culture System Correlative to in Vivo Study Using Intestine and Screening of Lactic Acid Bacteria Enhancing Intestinal Immunity. *Biol. Pharm. Bull.* (2010), 33(2) 289–93
33. Schmidt C, Giese T, Ludwig B, Mueller-Molaian I, Marth T, Zeuzem S, et al. Expression of interleukin-12-related cytokine transcripts in inflammatory bowel disease: elevated interleukin-23p19 and interleukin-27p28 in Crohn' disease but not in ulcerative colitis. *Inflamm Bowel Dis* 2005; 11(1): 16–23.
34. Mayumi H , Umesue M, Nomoto K, et al. Cyclophamide-induced immunological

tolerance :an overview[J ] . Immunobiology , 1996 ,195 (2) :129 –139.

35. Lemańska K, Szymusiak H, Tyrakowska B, Zieliński R, Soffers AEMF, Rietjens IMCM. The influence of pH on antioxidant properties and the mechanism of antioxidant action of hydroxyflavones. *Free Radic. Biol. Med.* 31: 869–881 (2001).

36. Yoo KM, Kim D-O, Lee CY. Evaluation of different methods of antioxidant measurement. *Food Sci. Biotechnol.* 16: 177–182 (2007).

37. Charron CS, Kurilich AC, Clevidence BA, Simon PW, Harrison DJ, Britz SJ, Baer DJ, Novotny JA. Bioavailability of anthocyanins from purple carrot juice: effects of acylation and plant matrix. *J Agric Food Chem.* 57: 1226–1230 (2009).

38. Kurilich AC, Clevidence BA, Britz SJ, Simon PW, Novotny JA. Plasma and urine responses are lower for acylated vs nonacylated anthocyanins from raw and cooked purple carrots. *J Agric Food Chem.* 53: 6537–6542 (2005).

39. Kassim A, Poette J, Paterson A, Zait D, McCallum S, Woodhead M, Smith K, Hackett C, Graham J. Environmental and seasonal influences on red raspberry anthocyanin antioxidant contents and identification of quantitative traits loci (QTL). *Mol Nutr Food Res.* 53: 625–634 (2009).



## 연구개발보고서 초록

과 제 명	(국문) 국산 농산물을 이용한 기능성식품산업화 연구사업단				
	(영문) Center for Business Development of Functional Food using domestic agricultural resources (CBF)				
주 관 연구 기관	서울대학교		주 관 연 구 책 임 자	(소속) 서울대학교	
참 여 기 업	CJ 제일제당, 아모레퍼시픽, (주)동아ST, (주)한국야쿠르트			(성명) 이 형 주	
총 연구개발비  (3,437,100 천원)	계	3,437,100천원	총 연 구 기 간	2010.04.15~2013.04.14(3년)	
	정부출연 연구개발비	1,710,000천원	총 연 구 원 수	총 인 원	76명
	기업부담금	1,710,000천원		내부인원	44명
	연구기관부담금	17,100천원		외부인원	32명

○ 연구개발 목표 및 내용

본 연구사업단의 최종 목표는 국내 농산물을 이용한 고부가가치 기능성식품의 제품화임. 국내 식품관련 대기업, 대학 및 농민단체와 공동으로 국내 농산자원을 활용한 고부가가치의 기능성식품 및 건강기능식품 개발을 목표로 하고 있음. 강화약쑥, 녹차, 마, 국내산 야채 등의 여러 국산 농산물을 이용하여 체중 조절, 혈당 조절, 피부 미용 등의 기능성을 가진 제품을 개발하려 함.

농산물유래 식품연구는 새로운 기능성 식품소재 개발 및 상용화하기 위하여 기능성 소재의 탐색을 위한 물질 분리와 이화학적 분석 연구, 공정 개발을 통한 생산성 확립 연구, 소재의 생리활성 및 효능 연구, 상품화를 위한 안전성 및 효능평가 연구 등 학제 간 통합적인 협력연구를 철실하게 요구함. 본 연구사업단은 대학의 주도하에 대기업과 공동으로 설치되는 사업단으로서 대학은 기능성 성분의 작용 기작을 밝히고, 생산 공정을 개발하는 역할을 하고, 기업은 소비자 선호도가 높은 소재 및 제형을 개발하는 역할을 맡아 상호협력 하에 효율적으로 국산 농산자원을 이용한 기능성 식품을 개발하는 연구를 수행하려함.

○ 연구결과

본 연구사업단은 산학연 협업을 통하여 6개의 기능성 제품을 개발하였고, 그 중 아모레퍼시

픽의 더블핏S, 한국야쿠르트의 하루야채 퍼플, 한국야쿠르트 흑마늘즙, 한국야쿠르트 도라지즙 의 4개 제품을 시장에 출시하였음. 위와 같은 기능성 제품 원료의 지표물질을 밝혔으며, 각 지표물질이 기능성을 나타내는 작용기작을 밝혔고, 이를 국제 우수 저널에 보고하고, 특허를 출원 및 등록함으로써 국산 농산자원을 원료로 하여 개발된 기능성식품의 수출 가능성을 제시하였음. 또한 과제에 관련된 연구를 수행하면서 관련 산업의 발전에 필요한 인재를 양성하여 산업 발전에 기여하였음.

○ 연구성과 활용실적 및 계획

본 연구사업을 통해 개발된 기능성 제품은 현재 시장에서 판매되고 있으며, 앞으로 노인 인구가 증가하고 건강에 대한 관심이 높아짐에 따라 제품 판매 규모는 더욱 확대될 것으로 생각됨. 본 과제를 통하여 기능성 제품을 개발하면서 축적된 노하우는 추후 개발될 기능성 소재 및 제품의 개발기간을 획기적으로 단축시킬 것으로 생각되고, 본 과제에서 학교와 기업이 협력하여 기능성 식품을 개발한 것은 훌륭한 모범사례가 될 것으로 생각됨. 또한 제품 개발 중에 출판된 국제 SCI 논문 및 특허를 통해 글로벌 시장으로의 진출이 가능하여 국내 농업 경쟁력을 제고하고, 기능성 식품 산업을 글로벌화 할 수 있을 것으로 생각됨.

## 자체평가 의견서

연구개발분야	기술사업화지원	과제구분	<input checked="" type="checkbox"/> 지정공모과제 <input type="checkbox"/> 자유응모과제	관리번호	810002-3
연구과제명	국산 농산물을 이용한 기능성식품산업화 연구사업단				
주관연구기관	서울대학교				
연구담당자	주관연구책임자	이 형 주			
	협동/위탁/세부 연구책임자	기관(부서)	아모레퍼시픽	성 명	이 상 준
		기관(부서)	(주)동아ST	성 명	손 미 원
		기관(부서)	(주)한국야쿠르트	성 명	허 철 성
		기관(부서)		성 명	
연구기간	총 기 간	2010.04.15 ~ 2013.04.14 (3년)	당해년도기간	2010.04.15 ~ 2013.04.14 (3년)	
연구비(천원)	총 규 모	3,437,100천원	당해년도규모	3,437,100천원	

1. 연구는 당초계획대로 진행되었는가?

당초계획 이상으로 진행     
  계획대로 진행     
  계획대로 진행되지 못함

○ 계획대로 수행되지 않은 원인은?

해당 사항 없음.

2. 당초 예상했던 성과는 얻었는가?

예상외 성과 얻음     
  어느 정도 얻음     
  얻지 못함

3. 연구과정 및 성과가 농림어업기술의 발전·진보에 공헌했다고 보는가?

공헌했음     
  현재로서 불투명함     
  그렇지 않음

4. 경제적인 측면에서 농림어가의 소득증대에 공헌했다고 보는가?



6. 연구개발착수 이후 국내 다른 기관에서 유사한 기술이 개발되거나 또는 기술 도입함으로 연구의 필요성을 감소시킨 경우가 있습니까?

- 없다                       약간 감소되었다                       크게 감소되었다

○ 감소되었을 경우 구체적인 원인을 기술하여 주십시오?

해당 사항 없음.

7. 관련된 기술의 발전속도나 추세를 감안할 때 연구계획을 조정할 필요가 있다고 생각하십니까?

- 없다                       약간 조정필요                       전반적인 조정필요

8. 연구과정에서의 애로 및 건의사항은?

해당 사항 없음.

1-4세부과제 CJ제일제당(주)

1. 연구개발 목표의 달성도는?

- 만족                       보통                       미흡

(근거 : 강화약속 소재의 지표설정, 표준화 완료 및 상품화연구를 통해 제품을 출시할 경우의 시장가능성 확인)

2. 참여기업 입장에서 본 본과제의 기술성, 시장성, 경제성에 대한 의견

가. 연구성과가 참여기업의 기술력 향상에 도움이 되었는가?

- 충분                       보통                       불충분

나. 연구성과가 기업의 시장성 및 경제성에 도움이 되었는가?

- 충분                       보통                       불충분

3. 연구개발 계속참여여부 및 향후 추진계획은?

가. 연구수행과정은 기업의 요청을 충분히 반영하였는가?

- 충분                       보통                       불충분

나. 향후 계속 참여 의사는?

- 충분                       고려 중                       중단

다. 계속 참여 혹은 고려중인 경우 연구개발비의 투자규모(전년도 대비)는?

- 확대                       동일                       축소

4. 연구개발결과의 상품화(기업화) 여부는?

- 즉시 기업화 가능     수년 내 기업화 가능     기업화 불가능

5. 기업화가 불가능한 경우 그 이유는?

해당사항 없음
---------

구 분	소 속 기 관	직 위	성 명
주관연구책임자	CJ제일제당(주)	센터장	박 석 준 (인)
참여기업대표	CJ제일제당(주)	대표이사	김 철 하 (인)

2-1세부과제 아모레퍼시픽

1. 연구개발 목표의 달성도는?

- 만족                       보통                       미흡

(근거 : 1개제품 출시하였으나, 피부미용기능식품의 출시는 시장환경 및 소재완성도 관련 지연됨)

2. 참여기업 입장에서 본 본과제의 기술성, 시장성, 경제성에 대한 의견

가. 연구성고가 참여기업의 기술력 향상에 도움이 되었는가?

- 충분                       보통                       불충분

나. 연구성고가 기업의 시장성 및 경제성에 도움이 되었는가?

- 충분                       보통                       불충분

3. 연구개발 계속참여여부 및 향후 추진계획은?

가. 연구수행과정은 기업의 요청을 충분히 반영하였는가?

- 충분                       보통                       불충분

나. 향후 계속 참여 의사는?

- 충분                       고려 중                       중단

다. 계속 참여 혹은 고려중인 경우 연구개발비의 투자규모(전년도 대비)는?

- 확대                       동일                       축소

4. 연구개발결과의 상품화(기업화) 여부는?

- 즉시 기업화 가능     수년 내 기업화 가능     기업화 불가능

5. 기업화가 불가능한 경우 그 이유는?

해당사항 없음
---------



구 분	소 속 기 관	직 위	성 명
주관연구책임자	아모레퍼시픽	소장	이상준 (인)
참여기업대표	아모레퍼시픽	CEO	심상배 (인)

3-1세부과제 동아에스티(주)

1. 연구개발 목표의 달성도는?

- 만족                       보통                       미흡

(근거 : 개별인정형 건강기능식품 개별인정 및 품목제조신고 1건 완료, 특허 출원 1건 완료, 논문 성과 초과 달성)

2. 참여기업 입장에서 본 본과제의 기술성, 시장성, 경제성에 대한 의견

가. 연구성과가 참여기업의 기술력 향상에 도움이 되었는가?

- 충분                       보통                       불충분

나. 연구성과가 기업의 시장성 및 경제성에 도움이 되었는가?

- 충분                       보통                       불충분

3. 연구개발 계속참여여부 및 향후 추진계획은?

가. 연구수행과정은 기업의 요청을 충분히 반영하였는가?

- 충분                       보통                       불충분

나. 향후 계속 참여 의사는?

- 충분                       고려 중                       중단

다. 계속 참여 혹은 고려중인 경우 연구개발비의 투자규모(전년도 대비)는?

- 확대                       동일                       축소

4. 연구개발결과의 상품화(기업화) 여부는?

- 즉시 기업화 가능     수년 내 기업화 가능     기업화 불가능

5. 기업화가 불가능한 경우 그 이유는?

해당사항 없음
---------

구 분	소 속 기 관	직 위	성 명
주관연구책임자	동아에스티(주)연구소	상무이사, 연구소장	손 미 원 (인)
참여기업대표	동아에스티(주)연구소	대표이사	김 원 배 (인)

4-1세부과제 한국야쿠르트(주)

1. 연구개발 목표의 달성도는?

- 만족                       보통                       미흡

(근거 : 한국야쿠르트 하루야채 퍼플, 한국야쿠르트 흑마늘즙, 한국야쿠르트 도라지즙의 상기 3개 제품에 본 과제의 성과물을 활용하여 시장에 출시하고, 그 지표로 총 매출 하루야채 퍼플 11,198,505,379 원, 흑마늘즙 3,660,000,000 원, 도라지즙 2,590,000,000원의 매출을 달성하였다)

2. 참여기업 입장에서 본 본과제의 기술성, 시장성, 경제성에 대한 의견

가. 연구성고가 참여기업의 기술력 향상에 도움이 되었는가?

- 충분                       보통                       불충분

나. 연구성고가 기업의 시장성 및 경제성에 도움이 되었는가?

- 충분                       보통                       불충분

3. 연구개발 계속참여여부 및 향후 추진계획은?

가. 연구수행과정은 기업의 요청을 충분히 반영하였는가?

- 충분                       보통                       불충분

나. 향후 계속 참여 의사는?

- 충분                       고려 중                       중단

다. 계속 참여 혹은 고려중인 경우 연구개발비의 투자규모(전년도 대비)는?

- 확대                       동일                       축소

4. 연구개발결과의 상품화(기업화) 여부는?

- 즉시 기업화 가능     수년 내 기업화 가능     기업화 불가능

5. 기업화가 불가능한 경우 그 이유는?

해당 사항 없음.

구 분	소 속 기 관	직 위	성 명
주관연구책임자	(주)한국야쿠르트	전무이사, 연구소장	허 철 성 (인)
참여기업 대표	(주)한국야쿠르트	대표이사, 사장	김 혁 수 (인)

## 연구결과 활용계획서

### 1. 연구과제 개요

사업추진형태	<input type="checkbox"/> 자유응모과제 <input checked="" type="checkbox"/> 지정공모과제	분 야	기술사업화지원	
연구과제명	국산 농산물을 이용한 기능성식품산업화 연구사업단			
주관연구기관	서울대학교	주관연구책임자	이 형 주	
연구개발비	정부출연 연구개발비	기업부담금	연구기관부담금	총연구개발비
	1,710,000천원	1,710,000천원	17,100천원	3,437,100천원
연구개발기간	2010.04.15~2013.04.14(3년)			
주요활용유형	<input type="checkbox"/> 산업체이전 <input type="checkbox"/> 교육 및 지도 <input type="checkbox"/> 정책자료 <input checked="" type="checkbox"/> 기타(제품개발)			
	<input type="checkbox"/> 미활용 (사유: _____ )			

### 2. 연구목표 대비 결과

당초목표	당초연구목표 대비 연구결과
① 세포주 모델을 이용한 약쭈 등 국내 자생 식물의 효능 검색 (심혈관질환 예방, 면역조 절, 피부 미용 개선, 뇌 기억력 개선)	- 약쭈의 지표성분인 eupatilirpi 심혈관질환 에 효능이 있다는 것을 사람평활근세포 모델 을 통해서 밝혔으며, 약쭈의 활성성분인 eupatilin과 jaceocidin이 자외선으로 유도되는 주름을 억제할 가능성이 있음을 사람섬유아세 포에서 확인하였음.
② 약쭈 등 국내 자생식물의 생리활성 기능 성분 규명 및 원료의 재료화	- 강화약쭈의 생리활성 기능 성분으로서 eupatilin을 규명하였고, 이 성분을 표준화하기 위한 강화약쭈 원료 처리 공정을 개발하였음.
③ 동물모델을 이용한 약쭈 등 국내 자생식물 의 효능 검색 및 작용기작 규명	- 아토피 동물모델을 통하여 CK강화 인삼의 효능을 탐색하였음. CK강화 인삼을 투여시 동 물에서 아토피성 피부염을 억제하는 효능을 확인하였음. - Rg3강화 인삼의 뇌질환 예방 효능을 연구하 였음.Rg3가 뇌질환을 예방하고, 기억력을 개선 시키는 효과를 확인하였으나, 일반 인홍삼과 비교하여 탁월한 효능을 보이지는 않음.
④ 인삼 등 국내 자생식물의 생리활성 기능 물질 규격화 (원료의 표준화)	- 사포닌의 최적 분석 조건을 설정하고, 강화 약쭈 외 두 종의 국내 자생식물의 원료 가공 공정 최적화 및 소재의 scale-up 제조를 수행 함. 또한 산 및효소처리를 통한소재의 차가

	공공정 연구를 수행하여 원료 제조방법에 적용하였음.
⑤ 인삼 등 국내 자생식물 유래 유효 성분의 안정성 검증 및 임상시험을 통한 인체 효능 검증 및 제품 출시	- 강화약썩의 eupatilin을 지표 성분으로 표준화 소재개발을 완료하여 기능성원료 신청을 하였음. 표준화 소재를 적용하여 시제품을 개발하였으며 소비자 수용도 조사를 통해 드링크 및 환 제품의 개발을 진행하였음. 원물 확보 및 원가 등 시장환경, 상황의 검토중에 있음.
⑥ 강화 약썩 등 국내 자생식물을 이용한 건강 기능성식품 제품화	- 강화약썩에서 생리활성을 나타내는 eupatilin을 지표성분으로 하여 표준화된 원료 제조공정을 확립하고 이에 따라 표준화된 원료제조를 하였음. - 해당 원료를 적용한 시제품의 소비자 수용도 조사를 통해 드링크, 환 제형의 제품화 연구를 수행하여 제품개발을 진행하였음. - 강화약썩 외에 특정 성분을 강화한 표준화된 인삼원료를 제조하기 위한 가공공정 연구를 수행하고 이를 이용한 아토피 및 뇌건강에의 기능성 연구를 수행하여 아토피 치료에 가능성이 있음을 확인하였고, 제품에 적용하기 위한 원료가공 연구를 수행함.
⑦ 녹차 이외에 slimming에 도움을 줄 수 있는 소재에 관한 <i>in vitro</i> 효능 검증	- 클로로필 고함량 녹차 추출물 원료화를 완료하였음.
⑧ 효능이 입증된 녹차를 포함한 복합 소재에 관한 제형화 및 인체 효능 시험	- 인체적용 시험을 통해 녹차를 포함한 소재를 이용하여 슬리밍 효능을 가지는 제품을 출시하였음.
⑨ Slimming 효능 제품 출시	- 인체적용 시험을 통해 녹차를 포함한 소재를 이용하여 슬리밍 효능을 가지는 제품을 출시하였음.
⑩ 녹차 이외에 피부미용에 도움을 줄 수 있는 소재에 관한 <i>in vitro</i> 효능 검증	- 85 종의 식용 및 약용 식물 자원 라이브러리를 구축하였고, 이로부터 DPPH test, MMP-1 저해 활성, Collagen 생성능 등의 실험을 통하여 피부미용 효능을 스크리닝을 하였음. 이를 통하여 제주진득찰 추출물을 선정하였으며, 이로부터 활성성분인 kireno를 분리하였음.
⑪ 피부미용개선 효능 관련 인체 효능시험 및 제품 출시	- 피부 미용 개선 기능성 제품 출시를 위하여 인체적용시험을 통하여 피부 미용 기능성식품의 근거를 확인하였고, 고객 수용도를 조사하

	<p>였음. 이 결과들을 토대로 제품 출시를 추진 중이며, 현재 내부적인 사정과 시너지 소재 미완으로 인해 제품 출시는 못하였음. 향후, 시장 상황에 따라 출시 예정임.</p>
⑫ 피부미용개선에 효과적인 검증된 소재에 관한 library 구축	<p>- 선행연구를 통해 구축된 라이브러리를 통해서 피부미용 효능을 지니는 원료를 확보하였으며, 이를 토대로 소재 라이브러리를 구축함.</p>
⑬ 녹차 등 국내 천연농산물을 이용한 Slimming, 피부개선 효능을 갖는 미용기능성 식품 제품화	<p>- 녹차를 이용하여 슬리밍 효능을 지니는 제품을 출시하였으며, 녹차 이외에 피부개선 효능을 갖는 신소재로 제주진득찰의 kireno를 개발하였음. 현재 제품화 직전 단계에 도달하였음.</p>
⑭ 마로부터 인슐린 저항성 및 당뇨합병증 개선 건기식 소재 개발	<p>- 산약으로부터 allantoin을 지표성분으로 하는 분획물을 개발하였으며, 지표성분의 함량을 분석하는 기법을 개발하였고, 현재 혈당조절에 도움을 주는 개별인정형 기능성식품을 출시하였음.</p>
⑮ 항당뇨 건기식 제품화 연구 및 체중 조절 기능 개선 소재 발굴	<p>- 항당뇨 건기식 제품 개발을 위해 allantoin을 지표성분으로 하는 기능성 원료를 개발하였고, 현재 품목 제조 신고를 한 상태임. - Gallic acid를 지표성분으로 하는 발효흑차 추출물의 체중 조절 효능을 동물 모델에서 확인하였으며, 현재 임상실험승인을 받아 실험을 준비 중임.</p>
⑯ 체지방 감소 건강기능식품 인체시험 개시	<p>- 발효흑차 추출물의 체지방 감소 효능연구 및 작용기작을 규명하였고 특허를 출원하였으며, 인체적용시험을 개시하였음. 개별인정신청을 위해 근거자료를 마련하고 있음.</p>
⑰ 유효분획물의 또는 유효성분의 인슐린저항성 개선 작용기작 규명	<p>- 지방간, 비만, 대사성 염증반응 및 인슐린저항성 개선 작용기작을 규명하였음.</p>
⑱ 마 등 국내농산물을 이용한 인슐린저항성 및 당뇨합병증 개선용 건강기능성식품 제품화	<p>- Allantoin을 지표성분으로 하여 마 추출물인 DA-9802가 혈당조절기능으로 개별인정을 취득하였으며, 현재 이를 이용한 제품이 신고되어 있음. 또한 gallic acid를 지표성분으로 하는 발효흑차 추출물의 체중 조절 효능을 인정받기 위한 임상 실험을 승인받아 곧 실험이 진행될 예정임.</p>
⑲ 기능성 probiotic 유산균 <i>in vitro</i> 선발 (면역조절, 항산화, 콜레스테롤 저하)	<p>- 300여종의 유산균으로부터 발효능이 우수한 92종의 유산균을 선발하였고, 이로부터 면역증</p>



	강능력이 뛰어난 기능성 유산균 <i>L. plantarum</i> HY7712와 <i>Lactobacillus sakei</i> K101을 선발하였음.
㉔ 기능성 발효음료 개발을 위한 원료 선발	- 기능성 발효음료의 원료로는 국산 유기농 야채 혼합물을 사용하기로 함.
㉕ 기능성 발효음료의 개발 및 동물모델 효능 시험	- 개발된 유산균 및 기능성 발효음료를 이용하여 고콜레스테롤 투여 동물 모델, 동맥경화 유발 동물 모델에서 동물실험을 수행하여 제품의 효능을 입증하였음.
㉖ 기능성 발효음료의 출시	- 선행 연구 결과를 바탕으로 기능성 발효 음료를 출시하여 현재 시장에서 판매 중임.
㉗ 국내 야채를 이용한 건강기능성식품 제품화	- 국산 유기농 야채 혼합물을 기본으로 하여 국내산 흑마늘과 도라지 등을 포함하는 원료 물질을 <i>in vitro</i> 에서 선발된 유산균으로 발효시켜 기능성이 향상된 제품을 출시하여, 현재 시장에서 판매되고 있음.

### 3. 핵심기술

구분	핵심기술명
①	국내농산물의 표준화원료 제조기술 및 건강기능성 작용기작 규명
②	녹차 추출물의 체중조절 및 피부미용 효능
③	마추출물 및 식물S추출물의 인슐린저항성 개선효능 기술
④	유산균으로의 야채 발효 기술

### 4. 연구결과별 기술적 수준

구분	핵심기술 수준					기술의 활용유형(복수표기 가능)				
	세계 최초	국내 최초	외국기술 복제	외국기술 소화·흡수	외국기술 개선·개량	특허 출원	산업체이전 (상품화)	현장으로 해결	정책 자료	기타
①의 기술	v					v	v			
②의 기술	v					v	v			
③의 기술	v					v	v			
④의 기술	v					v	v			

\* 각 해당란에 v 표시

### 5. 각 연구결과별 구체적 활용계획

핵심기술명	핵심기술별 연구결과활용계획 및 기대효과
①의 기술	기능성 원료의 지표물질 및 작용기작의 규명을 통한 고부가가치 기능성 식품 개발
②의 기술	녹차 소재와 기능성 국내 소재를 통한 피부 기능성 식품시장 확대 및 소재 산업 활성화를 통한 국내 농가 소득 창출
③의 기술	개별인정형 건강기능식품 원료 인정 및 상용화
④의 기술	새로운 고부가가치를 가지는 제품 개발을 통한 해외 시장으로의 진출

6. 연구결과의 기술이전조건(산업체이전 및 상품화연구결과에 한함)

핵심기술명			
이전형태	<input type="checkbox"/> 무상 <input type="checkbox"/> 유상	기술료 예정액	천원
이전방식	<input type="checkbox"/> 소유권이전 <input type="checkbox"/> 전용실시권 <input type="checkbox"/> 통상실시권 <input type="checkbox"/> 협의결정 <input type="checkbox"/> 기타( )		
이전소요기간		실용화예상시기	
기술이전시 선행조건			

\* 핵심기술이 2개 이상일 경우에는 각 핵심기술별로 위의 표를 별도로 작성

\*\* 기술이전시 선행요건 : 기술실시계약을 체결하기 위한 제반 사전협의사항(기술지도, 설비 및 장비 등 기술이전 전에 실시기업에서 갖추어야 할 조건을 기재)

\*\*\* 실용화예상시기 : 상품화인 경우 상품의 최초 출시 시기, 공정개선인 경우 공정개선 완료시기 등

## 주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 "국산 농산물을 이용한 기능성식품 산업화 연구사업단" 사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림축산식품부에서 시행한 "국산 농산물을 이용한 기능성식품산업화 연구사업단" 사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니 됩니다.