

생물전환기법을 이용한 버섯, 노니 등을 발효시킨
항당뇨 및 항아토피 식품 개발

(Development of functional food for anti-diabetic and
anti-atopic diseases using bio-conversion technology
with mushroom, noni, and etc.)

한국식품연구원

농림수산식품부

제 출 문

농림수산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “생물전환기법을 이용한 버섯, 노니 등을 발효시킨 항당뇨 및 항아토피 식품 개발에 관한 연구” 과제의 보고서로 제출합니다.

2009년 5월 29일

주관연구기관명 : 한국식품연구원

주관연구책임자 : 임 성 일

세부연구책임자 : 성 기 승

세부연구책임자 : 차 성 관

연 구 원 : 최 신 양

연 구 원 : 이 성 훈

위 축 연 구 원 : 송 선 미

참 여 기 업 : (주) 건 농

대 표 : 양 승 창

요 약 문

I. 제 목

생물전환기법을 이용한 버섯, 노니 등을 발효시킨 항당뇨 및 항아토피 식품 개발

II. 연구개발의 목적 및 필요성

국내외 발병률이 기하급수적으로 증가하고 있는 당뇨, 간질환 및 아토피 피부염을 예방하는 기능성 식품소재 제조 기술에 대한 산업계의 요구가 높음.

치료를 위한 의약품 오남용에 따른 부작용이 알려지면서 당뇨, 간질환 및 아토피를 예방할 수 있는 기능성 식품이 절실히 요구되고 있음.

상황버섯, 노니, 미강 등에 복합미생물을 이용한 생물전환기술을 적용하여 당뇨, 간질환 및 아토피 피부염 예방 또는 치료 효능을 가진 소재를 개발하고 기능성 표시의 과학적 근거 제시 및 소재화 기술을 확립코자 함

III. 연구개발 내용 및 범위

1. 고체발효 최적 조건 설정

- 미생물 분리 동정 : 고체발효를 위한 미생물 선발
- 미강, 노니, 버섯 등의 고체발효 조건 설정
- 생물전환 효율 : 인삼의 발효에 의한 진세노사이드 chromatography pattern 변화

2. 고체발효물의 특성

- 발효성분 분석 : 아미노산 및 특수성분
- 독성시험 : 간암세포주인 Hepa1c1c7과 대장의 정상세포주인 CHO-K1을 사용한 MTT assay 및 ICR계인 암수 마우스를 이용급성경구독성 시험

3. 항당뇨 효능 검증

- 동물모델 평가 : 제 2형 당뇨모델인 KK-A^y/Ta Jcl(유전적 비만 2형 당뇨모델) mouse의 항당뇨 효능 평가
- 세포모델 평가 : C2C12 세포를 근육세포로 전환 후 혈당 흡수능 평가 및 GLUT4 신호전달경로 조사.
- 인체모델 평가 : 경계역에 있는 사람을 대상으로 한 모세혈 및 정맥혈의 혈당 검사.

4. 간질환 개선 효능 검증

- 동물모델 평가 : CCl₄의 복강투여로 SD rats의 간질환유발 및 고지방 식이로 지방간 유도

5. 항아토피 효능 검증

- 동물모델 평가 : NC/Nga mouse에 아토피성 피부염유발 시약인 Biostir AD cream으로

아토피성 피부염 유발 시험

6. 항산화활성

DPPH, ABTS(2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid), Hydroxyl radical 소거능 및 SOD 유사활성

7. 항염증 효능 검증

LPS를 처리한 대식세포 RAW 264.7에 있어서 NO (Nitric Oxide), IL-1 α 및 TNF- α 의 생성 억제능

IV. 연구개발결과

1. 고체발효 미생물 선발 및 최적고체발효조건 설정

청국장과 된장으로부터 5종의 *Bacillus* 균주를 분리하였으며 *Bacillus sp.*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus sonorensis*, *Bacillus circulans*로 동정함.

선발된 5종의 균주를 이용하여 종균의 배양조건 및 원료농산물의 3단계 발효와 건조과정으로 이루어진 고체발효조건을 확립함.

2. 독성시험

-동물 : 5주령의 ICR계인 암수 마우스를 이용한 고체발효물의 급성경구독성시험 결과, LD₅₀은 5,000 mg/kg 이상임.

-세포 : 고체발효물로부터 70% EtOH 추출물을 제조한 후, MTT assay에 의한 cell viability를 측정한 결과, 100 ug/mL 이하에서는 세포독성을 나타내지 않음

3. 항당뇨 효능

-동물모델 : 제 2형 당뇨병모델인 KK-A^y/Ta Jc 마우스를 대상으로 동물실험 하였다. 고체발효물이 0.4% 혼합된 사료를 섭취 시켰을 때, 혈청 glucose 및 당화혈색소의 급격한 감소와 triglyceride 농도의 감소가 확인되었다. 따라서 고체발효물의 혈당 상승을 효과적으로 억제시키는 기능이 확인됨.

-세포모델 효능 평가 : C2C12 세포의 근육세포로 전환 후 EtOH 고체발효 추출물의 근육세포로의 혈당 흡수능을 측정한 결과 50 ug/mL 처리 시 control에 비해 당 흡수능이 60% 증가하였다.

-인체모델 효능 평가 : 임상적으로 혈당치의 감소경향이 확인됨.

4. 간질환 개선 효능

SD계 rat에 CCl₄를 복강투여하고 고체발효물이 0.4% 혼합된 사료를 섭취 시켰을 때, 일반사료를 섭취시킨 rat에 비해 ALT 값이 16%, AST 값이 24%, ALP 값이 16% 감소되었으며 CCl₄를 복강투여하지 않은 control군과 유사하였다. 따라서 고체발효물의 CCl₄로 유도된 간 손상을 효과적으로 회복시키는 기능이 확인됨. 한편, 지방간 유도 실험에서는 고체발효물이 0.4% 혼합된 사료를 섭취 시, 간 조직의 총지질 함량은 control에 비해

55% 저하는 것으로 나타나 지방간 억제 효능이 검증됨.

5. 항아토피 효능

Biostir AD cream로 아토피를 유발시킨 rat에 고체발효물이 0.4% 혼합된 사료를 섭취 시, 아토피의 감소는 나타나지 않았다.

6. 항산화 효능

고체발효물의 DPPH, ABTS(2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid), Hydroxyl radical 소거능 및 SOD 유사활성 등 항산화 효능은 항산화제인 **Trolox (positive control)와 유사한 강한 항산화효능**이 있음이 확인됨.

7. 항염증 효능

고체발효물 70% EtOH 추출물이 LPS(lipopolysaccharide)로 activated된 Raw 264.7 cell에 서 나타나는 염증관련 지표[NO production, interleukin-1 α (IL-1 α), tumor necrosis factor- α (TNF- α)] 들에 미치는 영향을 조사한 결과, 50 또는 100 μ g/mL 이상의 농도에서 강한 억제효능이 있음이 확인됨. 따라서 고체발효물은 항염증효과를 가지고 있을 것으로 판단됨.

V. 연구성과 및 성과활용 계획

1. 기술이전 실적

- 항당뇨, 간질환개선 등 효능을 가진 발효식품 제조기술 [(주) 건농, 40,000천원, 2009. 5.27.]

2. 특허출원 실적

- 혈당상승 억제효과와 간 기능 개선효과를 갖는 미생물 및 상기 미생물을 포함하는 식품, 10-2008-0094668, 2008. 9. 26, 임성일, 성기승, 차성관, 최신양, 이성훈, 송선미, 양승창

3. 학회발표 실적

- The Effects of Antioxidant on Extracts of White Ginseng (*Panax ginseng*, C. A. Meyer) and Fermented Ginseng, 김영찬, 임성일, 임주혁, 이영철, 김경탁, 노정해, 최상윤, 조장원, 이영경, 홍희도, 2008. 10. 16. 제주 라마다호텔
- The Antioxidant Activities of Mixed Fermented Materials of Various Mixed *Bacillus* sp. 김영찬, 임성일, 임주혁, 김경탁, 노정해, 최상윤, 조장원, 이영경, 홍희도, 2008. 10. 16. 제주 라마다호텔
- *Bacillus* 복합균주로 발효시킨 농산발효물의 항당뇨 효능, 임성일, 성기승, 송선미, 양승창

[(주)건농], 2008. 10. 16. 제주 라마다호텔

- *Bacillus* 복합균주로 발효시킨 농산발효물의 간 손상 회복 기능, 임성일, 성기승, 송선미, 양승창[(주)건농], 한국식품과학회 심포지움, 2009. 5.28, 대전

4. 논문게재 계획

- 미강 등 발효물의 제2형 당뇨 억제 효능 (2010), 임성일, 성기승, 양승창
- 미강 등 발효물의 CCl₄ 유도 간 손상 rat의 회복 효능 (2010), 임성일, 성기승, 양승창
- 미강 등 발효물의 지방간 유도 rat의 회복 효능 (2010), 임성일, 성기승, 양승창
- 미강 등 발효물의 면역활성 증진 효능 (2010), 임성일, 성기승, 양승창

5. 신규 기능성 소재 개발 활용계획

- 개발 미생물을 이용한 고기능성 발효한방소재의 개발
- 개발 발효물을 활용한 채소발효식품의 저장성 연장
- 개발 발효물을 활용한 스낵류의 개발
- 개발 미생물을 이용한 고품질 소금의 제조

SUMMARY

I. Title

Development of functional food for anti-diabetic and anti-atopic diseases using bio-conversion technology with mushroom, noni, and etc.

II. Objective and Importance of Research

In these days, diseases such as diabetes, hepatic disorder and atopic dermatitis are dramatically increasing.

These diseases will create a crisis not only for the individual concerned but also for his family moreover which cause serious economic losses for the individual and the country.

Functional foods are required strongly to individual and industry as any side effects of medicine concerned with diabetes, hepatic disorder and atopic dermatitis.

In this research, we will develop ingredient with effectiveness in preventing diabetes, hepatic disorder and atopic dermatitis using bio-conversion technology with mushroom, noni, rice bran, and etc and provide scientific proof in respect of the functions of newly-developed ingredient to consumer and industry.

III. Scope and Content of Research

1. Construction of Ideal solid fermentation condition

- Isolation and identification of strains : Selection of strains for solid fermentation
- Set-up of solid fermentation condition with mushroom, noni, rice bran, and etc.
- Bio-conversion rate : Change of ginsenosides chromatographic pattern and antioxidant activities of ginseng by fermentation.

2. Characteristics of solid fermented product

- Analysis of ingredients
- Toxicity test : Toxic test using Hep1c1c7 and CHO-K1 cell and acute toxicity

test in mouse

3. Evaluation of effect on anti-diabetes

- Evaluation in animal model : anti-dibetic effect in KK-A^y/Ta Jcl mice, an animal model of type 2 diabetes
- Evaluation in cell model : absorption ability of blood glucose in C2C12 cell
- Evaluation in human model : the evaluation was conducted for people between diabetic and non-diabetic.

4. Evaluation of effect on improvement of hepatic disorder

- Evaluation in animal model : inducement of liver disease by injecting CCl₄ and fatty liver by feeding a high fat diet

5. Evaluation of effect on preventing atopic dermatitis

- Evaluation in animal model : inducement of atopic dermatitis using Biostir AD cream in NC/Nga mice

6. Evaluation of antioxidant activities

Radical scaenging activities of DPPH, ABTS(2,2'-aziono-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid), and Hydroxyl radical and SOD-liked activities

7. Evaluation of anti-inflammatory activities

Inhibitory effect of fermented product on NO (Nitric Oxide), IL-1 α and TNF- α in Raw 264.7 cell

IV. Results of Research

1. Ideal condition of solid fermentation

Bacillus sp., *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus sonorensis*, and *Bacillus circulans* were isolated and identified from Chunggukjang and used for the manufacturing solid fermented product.

Optima fermentation process using 5 strains were established. The process was composed of starter culture process, 3 steps-fermentation process, and dry process.

2. Toxicity test

- Animal : LD₅₀ value of solid fermented product in acute toxicity test in mouse was

above 5,000 mg/kg.

-Cell : After the treatment of solid fermented product 70% EtOH extract, cell viability was measured by MTT assay. Cell toxicity did not show below the concentration of 100 ug/mL.

3. Anti-diabetic effect

-Animal model : 0.4% solid fermented product significantly reduced glucose levels and glycosylated hemoglobin (HbA1c) in blood of the KK-A^y mice, and also lowered triglyceride levels. These results suggest that solid fermented product has a reductive function on high blood sugar in type 2 diabetes.

-Cell model : 70% EtOH extract of solid fermented product catalyze absorption of blood sugar in into the cell as C2C12.

-Human model : the decrease of blood glucose was confirmed in human model(n=2).

4. Hepatoprotective effect

Feeding 0.4% solid fermented product significantly decreased CCl₄-elevated serum alanine aminotransferase (16%), aspartate aminotransferase (24%), and alkaline phosphatase (16%). These results demonstrate that solid fermented product has the hepatoprotective effect on CCl₄-induced liver damage. Furthermore, triglyceride contents of liver and feces in CF group were significantly lower(40%) than those in control group.

5. Effect on preventing atopic dermatitis

Effect on preventing atopic dermatitis was investigated SD rats inducing the dermatitis with Biostir AD cream. However, Feeding 0.4% solid fermented product had no effect on reducing atopic dermatitis.

6. Antioxidant effect

Solid fermented product showed strong anti-oxidant activities like radical scavenging activities of DPPH, ABTS(2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid), and Hydroxyl radical and SOD-like activities. Furthermore,

anti-oxidant activities of the product were a similar to that of Trolox as positive control.

7. Anti-inflammatory effect

Ethanol extract from the solid fermented product using 70% EtOH showed inhibition effect significantly in Raw 264.7 cells activated with lipopolysaccharide (LPS) on production of nitric oxide(NO), TNF- α and IL-1 α . These findings suggest that solid fermented product can produce anti-inflammatory effect.

V. Contribution and Application of Results

1. Technology transfer : 1 case

- Strains with physiological activity that can control rising of blood glucose level and can improve liver function as well as fermentation technology using the strains and results of the evaluations on health function of the fermented product [GEONNONG Inc. 40,000,000W]

2. Patent application : 1 case

- Microorganism with physiological activity that can control rising of blood glucose and can improve liver function and Food containing thereof (10-2008-0094668, 2008. 9. 26)

3. Presentation at conferences : 4 cases

- Effect on anti-diabetes of solid fermented product fermented with mixed *Bacillus* strains, J. Food Science. Nutrition, 2008. 10. 6., Jeju.
- Effect on hepatic disorder of solid fermented product fermented with mixed *Bacillus* strains, Korean j. Food Science Technology. 2009. 5.29., Daejeun.
- The Effects of Antioxidant on Extracts of White Ginseng (*Panax ginseng*, C. A.

Meyer) and Fermented Ginseng, J. Food Science. Nutrition, 2008. 10. 6., Jeju.

- The Antioxidant Activities of Mixed Fermented Materials of Various Mixed *Bacillus* sp. J. Food Science. Nutrition, 2008. 10. 6., Jeju.

4. Plan of submission

- Effect on anti-diabetes in type 2 diabetes mice of solid fermented product fermented with mixed *Bacillus* strains.
- Hepatoprotective effect of solid fermented product fermented with mix *Bacillus* strains on the liver damage induced by carbon tetrachloride in rats.
- Biochemical and histological effects of solid fermented product on liver lipid metabolism of rats feed high fat.
- Immune effects of solid fermented product

5. Application of results

- Development and industrialization of functional oriental medicinal fermentation materials using fermentation technology for anti-diabetes and liver function improvement

CONTENTS

Chapter 1. SUMMARY OF RESEARCH	14
1) Objectives of research	14
2) Necessity of the research	14
3) Scope of research	17
Chapter 2. STATES OF ARTS	18
Chapter 3. METHODS AND RESULTS OF RESEARCH	30
1) Materials and methods	30
1. Isolation and identification of strains	30
2. Solid fermentation	30
3. Bio-conversion rate of strains	32
4. Toxicity test	34
5. Evaluation of effect on anti-diabetes	34
6. Evaluation of effect on improvement of hepatic disorder	42
7. Evaluation of effect on preventing atopic dermatitis	44
8. Evaluation of effect on in-vitro activities	45
9. Evaluation of anti-inflammatory effect	48
2) Results and discussion	50
1. Ideal condition of solid fermentation	50
2. Characteristics of solid fermented product	56
3. In-vitro effect	62
4. Effect on anti-diabetes	66
5. Effect on improvement of hepatic disorder	77
6. Effect on preventing atopic dermatitis	89
8. Effect on anti-inflammable activities	90
Chapter 4. ACHIEVEMENT AND CONTRIBUTION TO RELATED TECHNOLOGIES	94
Chapter 5. CONTRIBUTION AND APPLICATION OF RESULTS	96
Chapter 6. INFORMATION COLLECTED OF FOREIGN TECHNOLOGY	98
Chapter 7. REFERENCES	99

목 차

제 1 장 연구과제의 개요	14
제 1 절 연구개발의 목적	14
제 2 절 연구개발의 필요성	14
1. 경제적 · 산업적 중요성	14
2. 연구개발의 필요성	16
제 3 절 연구개발의 범위	17
제 2 장 국내외 기술개발 현황	18
제 3 장 연구개발 수행내용 및 결과	30
제 1 절 연구 수행방법	30
1. 미생물 분리 및 동정	30
2. 고체발효	30
3. 균주의 생물전환효율	32
4. 고체발효물의 독성시험	34
5. 항당뇨 효능 평가	34
6. 간질환 개선효능 평가	42
7. 아토피 피부염 개선효능 평가	44
8. In vitro 효능 평가	45
9. 항염증 효능 평가	48
제 2 절 연구결과 및 고찰	50
1. 생물전환을 위한 최적 고체발효조건 설정	50
가. 미생물 분리동정	50
나. 인삼을 이용한 생물전환 효율	50
2. 고체발효물의 특성	56
가. 성분분석	56
나. 미생물 균수	57
다. 독성시험	58
3. In vitro 효능	62
4. 항당뇨 효능	66
가. 동물모델 효능 평가	66
나. 세포모델 효능 평가	74
다. 임상 효능 평가	74
5. 간질환 개선효능	77
가. 동물모델 효능 평가	77

6. 아토피 피부염 개선효능	89
7. 항염증효능	90
제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도	94
제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획	96
제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보	98
제 7 장 참고문헌	99

제 1 장 연구과제의 개요

제 1 절 연구개발의 목적

상황버섯, 노니, 미강 등에 미생물을 이용한 생물전환기술을 적용하여 고체발효물을 제조하고 항당뇨 효능, 간질환 개선효능, 항산화 효능을 밝혀 기능성 표시의 과학적 근거 제시 및 소재화 기술 확립을 통해 고체발효물 생산 기술을 산업계에 기술이전하여 고도 산업화하는 것으로 목적으로 연구를 수행함

제 2 절 연구개발의 필요성

1. 경제적 · 산업적 중요성

- 당뇨병 등의 성인병은 지속적인 관리를 통해 개선 가능한 질환이나 이로 인한 국가차원의 경제적인 손실 또한 매년 의료비, 생산액 손실비를 포함해 약 5조 2,416억원(GNP의 0.96%)에 이르는 것으로 추산됨.
- 개발기술은 직접적인 가치보다도 국민 삶의 질 향상, 건강한 삶의 유지, 의료비 절감 등 간접적인 가치가 크기 때문에 국가적 차원에서 지원이 꼭 필요한 프로젝트임.
- 현재 기술 성숙단계에 있는 생물전환 (bioconversion) 기술 분야는 첨단발효기술에 근거를 둔 원천기술이므로 국가적 차원에서 지원할 때만 가능함.
- 현재 전 세계 당뇨병환자는 모두 2억4천600만명으로, 지난 20년 동안 이 질환 감염자가 7배나 증가한 것으로 나타났다.
- 국제당뇨연맹(IDF)의 발표에 의하면 현존 환자 규모는 세계적으로 20-79세 성인 연령 중 5.9%를 차지하지만 2025년에는 7.1%로 상승될 전망. 또한 매년 380만명이 당뇨병과 관련된 질환으로 사망하고 있으며 이런 가운데 노동연령층인 40-59세 환자가 전체의 46%인 1억1천 300만명으로 추정되고 있어 경제적 손실과 부담을 가중시키는 것으로 나타남.
- 최근 보고 된 대한당뇨병학회 역학소위원회와 건강보험심사평가원의 공동조사 결과에 따르면 2003년 현재 우리나라 당뇨병 환자 수는 전인구의 8.29%인 401만 여명이며, 현재의 발생률을 감안하면 2010년에는 490만 명, 2020년 620만 명, 2030년 720만 명으로 추산하고 있어 그때는 우리나라 전체 인구 7명당 1명이 당뇨병 환자가 되는 심각한 현상이 초래될 것으로

우려됨.

- 당뇨병은 우리나라에서도 급격히 증가하고 있는 중요한 사망 원인 중 하나인 만성 질환이며 당뇨병에 의한 사망률도 1983년 인구 10만명당 4.3명에서 1995년 13.1명으로 빠른 속도로 증가하고 있으며, 2005년에는 15.9명으로 추정되고 있어 당뇨병의 예방과 관리 및 합병증 예방이 매우 중요한 실정임.
- 아토피-알레르기 질환의 경우, 최근 30여년 사이에 크게 증가하고 있으며 주요인은 환경 변화 때문이라고 생각되고 있음.
- 알레르기 질환은 현재 선진국이 저개발국 및 개발 도상국에 비해 그 유병률이 현저히 높기 때문에 우리나라도 선진국으로 진입할수록 발병률이 증가할 것이라 생각된다.
- 우리나라는 과거 30년 동안 급격한 경제 성장으로 식생활·주거환경·대기환경·자연환경 및 생활방법 등 모든 생활환경이 과거와는 달라졌으며 확연하게 서구화 되어가고 있는 상황임. 이런 상태로 진행된다면 오래지 않아 구미 선진국 수준의 유병률로 증가할 것으로 예측됨.
- 최근에 폭발적으로 발병이 증가하고 있는 아토피 피부염 환자가 있는 가정의 가계부담은 매우 심각하며 또 피부 상태가 심한 환자는 병으로 인한 정신적 스트레스를 이기지 못해 자살하는 등의 보고로 사회적 충격을 주고 있음.
- 아토피 질환은 매우 흔한 질환으로 개인, 가정 및 사회에 많은 부담을 주고 있으며 이 병은 치료가 간단치 않는 경우가 많고 악화와 회복이 반복되어 경과가 오래 지속되므로, 사회적으로 발병 예방에 집중하는 것이 바람직 함.
- 한편, 간질환의 경우, '01년 국내 사망원인 5위인 간 질환(간암 제외)의 사회·경제적 비용이 연간 2조6201억원, 조기사망으로 인한 소득손실액이 2조3130억원으로 각각 집계돼 사망원인 1위인 암 다음으로 많음(한국보건사회연구원, 2007년)
- 국가가 관리하고 있는 만성 질환 및 손상질환군은 총 19개 군이며 만성 질환 및 손상에 대하여는 암 환자 지원제도와 희귀난치성 질환 지원제도를 통해 지원을 하고 있음.
- 그러나 만성 간염과 간경변증 등 간질환은 '암 환자 지원제도', '희귀난치성 질환 지원제도'에 모두 제외되어 있음은 물론 이 질환을 가진 환자들을 위한 별도의 지원제도 없음(대한간학회, 2008)
- 이와 같이 막대한 사회적·경제적 손실을 초래하는 당뇨, 아토피, 간질환과 같은 질병을 예방의학적 차원에서 부작용이 전혀없는 식품으로 해결할 수 있다면 국민건강과 건강한 삶의 유지에 엄청난 파급효과가 있을 것임.

2. 연구개발의 필요성

- 현재 국내에 출시된 혈당강하용 건강기능식품은 탄수화물 소화 효소 저해 등 식후 혈당의 일시적 저하만을 목표로 하기 때문에 그 제품의 섭취에 의한 혈당강하효과는 일시적이며 근본적인 당뇨병의 조절과는 거리가 있음.
- 아토피 피부염의 급속도로 확산되고 있어 사회적으로 큰 문제점을 안고 있으나 그 대책은 현재 식이요법 이외에는 별다른 방법이 제시되지 않고 있음.
- 간암을 제외한 간질환의 경우 역시 엄청난 사회 경제적 비용 지출(약 5조원)를 초래하는 큰 요인 중의 하나로서 예방의학적 차원에서의 해결책 마련이 시급한 실정임.
- 기업은 현행 건강기능식품의 법률에 맞는 소재 개발의 연구에 대한 비용 부담 때문에 체계적인 연구는 수행하지 못하고 있음.
- 건강기능식품의 제조 및 가공업체들은 식약청에 허가를, 판매업체는 기초단체장에게 신고가 의무화됨에 따라 제품에 대한 과학적 효능을 제시하고 품질력을 갖춘 검증된 회사만이 성장할 수 있을 것이며 중소기업들은 큰 어려움을 겪을 것으로 예측됨.
- 본 과제의 신청기업에서는 다양한 복합미생물제를 보유하고 있으며 이를 이용하여 각종 발효식품을 대상으로 냄새를 제어할 수 있는 연구를 수행한 바 있으며 지역 주민들은 이들 식품을 섭취한 후 혈당치가 떨어져 효과를 보았다는 사례가 알려짐.
- 본 연구에서는 이들 미생물을 이용하여 기능이 입증되는 상황버섯, 노니, 인진숙, 쌀 배아 등의 천연소재를 대상으로 생물전환기법으로 발효시켜 혈당강하 효과, 항아토피 효과 및 간질환 개선 효능이 기대되는 소재 및 식품을 제조하여 건강기능성을 체계적, 과학적으로 구명함으로써 제품의 실용화를 앞당겨 기업의 이익을 극대화시킴은 물론 국민 건강에도 기여코자 함.

제 3 절 연구개발의 범위

1. 발효 시스템 구축>

- 상황버섯, 노니, 미강 등에서의 미생물 고체발효의 최적조건 확립
 - 균주 측정 · 위해균수 측정 · 최적원료배합비 선정
- 독성 검사 : MTT assay 및 급성경구독성 시험
- 선발 복합균주의 생물전환능 평가
- 미생물 발효를 이용한 생물전환의 단계별 규모 scale up
- 생물전환물의 소재화 기술 확립
- 시작품 제시

2. 미생물 동정 및 균주특성 분석

- 발효종균의 선발 및 동정
- 상황버섯, 노니, 미강 등을 발효 시 이화학적·미생물학적 특성 분석

3. 고체발효물의 효능 평가

- In vitro 효능 평가
 - 고체발효물의 항산화 및 항염증 등 효능 평가
- 동물시험을 통한 효능 평가
 - 제2형 유전성 당뇨 실험쥐 대상 혈액, 당화혈색소 등 분석
 - CCl4 간독성 유도 실험쥐 대상 혈액분석
 - 지방간 유도 실험쥐의 혈액, 간조직, 분변 분석
 - 아토피성 피부염 유발 실험쥐에서의 아토피 유발억제효능 및 IgE 분석
- 당뇨 예방 효능 인체시험

제 2 장 국내외 기술개발 현황

제 1절 기술개발 현황 및 시장현황

1. 국내의 기술개발 현황

○ 국내외 수행기관

연구수행 기관	연구개발의 내용	연구개발성과의 활용현황
Genessance 사	맞춤형 환자 영양보충식이 개발	시장성 확보
파나톤사	진세나라는 이름으로 세계시장에 1.5억불 수출	시장성 확보
신생사이언스	물리적으로 전환시키는 기술로 선삼 개발	년간 100억원 판매
(주)일화	유산균을 활용한 비삼 개발	년간 500만불 수출
(주)장생도라지	도라지 생산기술 확보	년간 100억원 매출

- 최근 국내·외에서는 기능성 소재개발이 활발히 진행되고 있으며 많은 연구성과가 보고되고 있음.
- 미생물에 의한 발효·숙성에 의해 생리 기능적 활성물질 생산성 향상과 관련된 연구를 보면 GABA 물질과 쿠르쿠민, Nattokinase, Monakolin K 등의 연구예가 많이 보고되고 있음.
- GABA물질은 당뇨와 관련하여 인슐린 효과를 증대 시키는 등의 기능성이 입증되어 GABA 생산성을 향상시키기 위한 연구가 진행되어 왔으며 유방, 대장암 예방효과, 위점막 보호효능, 알츠하이머 예방효과 등에 효과가 있는 쿠르쿠민의 울금에서의 생산성 향상, 혈전용해 효능이 높은 nattokinase의 콩에서의 대량생산 기술, 콜레스테롤 합성억제와 관련된 Monakolin K의 대량생산을 위한 홍국균을 이용한 연구 등과 같은 연구가 진행되어 왔으며 생리 기능성 효능이 확인되어 산업화에 성공하여 생산되고 있음.
- 혈당저하 효능에 대한 연구를 보면 동아를 이용한 항당뇨 효능 제품의 개발을 포함하여 일부 연구가 진행되고 있으나 소비자 구매력을 증대시킬 만큼 큰 효능이 있는가에 대해서는 미지수임.

- 본 과제의 기술과 관련된 선행연구 결과(본 연구팀의 선행연구)
 - HMG-CoA (3-Hydroxy-3-Methyl Glutaryl CoA) reductase의 활성을 저해하는 특성이 있는 강력한 콜레스테롤 합성 억제 물질인 Monacolin K (일명 : lovastatin, mevinolin)을 대량 생산하는 균주인 *Monascus purpureus* 선발 (ARPC 과제, 2001. 8-2003.8.)
 - 상기 균주의 대량 액체 및 고체발효 방법 확립 및 이를 활용한 식품제조 (특허등록 제0548505호 2006.1)
 - 발효식품유래의 미생물 및 M29 균주를 이용한 액체배양 방법의 확립 및 가축의 설사 및 혈변의 억제 효능평가 (중기청 과제, 기술이전 완료 및 특허등록 제0553377호 2006.2)
 - 쌀을 이용한 면역기능 강화 비피더스 발효제품 개발 (ARPC 과제, 2002. 3.-2003. 3., 특허등록 제 0527419호 2005.11., 무상 기술이전, 농협중앙회 식품연구소)
 - 석류, 은행, 동아, 산사자 등을 장류와 함께 발효시켜 비만억제, 혈당상승억제, 혈압상승억제 효과가 있는 장류의 개발 (기관고유사업과제, 특허등록 제05-462331호, 제05-462330호, 제05-462332호)

2. 시장규모

- 세계 기능성식품 시장 규모는 2006년 1450억달러로 전체 세계 식품시장의 약 4% 차지
- 유럽과 미국은 각각 31% 및 16%의 시장규모를 점유하고 있어 세계 기능성식품 시장을 견인하고 있으며 우리나라는 약 1% 비중임
- 우리나라의 건식시장은 2005년 기준 1조2,800억원 규모(국내 생산액이 6,850억, 수입액이 5,950억)로 성장하였고, 일부 품목군의 성장, 수입 제품의 증가 및 신규로 시장에 진입하는 업체의 증가에 따라 전체 시장 규모는 꾸준한 증가 예상
- Nutrition Business Journal(NBJ, <http://www.nbi.com>)에 따르면 미국의 nutrition industry 시장은 꾸준히 증가하고 있고 2005년 기준 74,150백만달러의 규모로 2005~2008년의 추정성장률을 5~7%로 전망. 특히, 천연치유제품, 기능성식품 및 친환경 유기식품의 성장률은 6~12% 정도로 큰 폭의 성장이 예상
- 건강기능식품 시장은 최근의 LOHAS의 추구로 향후 크게 증가할 것으로 예상되며 건강기능식품의 수입액 또한 크게 증가할 것임
- 특히, 당뇨병 등의 성인병으로 인한 국가차원의 경제적 손실은 의료비, 생산액 손실비를 포함해 약 5조 2,416억원(GNP의 0.96%)에 이르는 것으로 추산되어 그 대책 마련이 매우 시급
- 또한 수입을 대체할 수 있는 제품의 개발이 시급(그림 1)

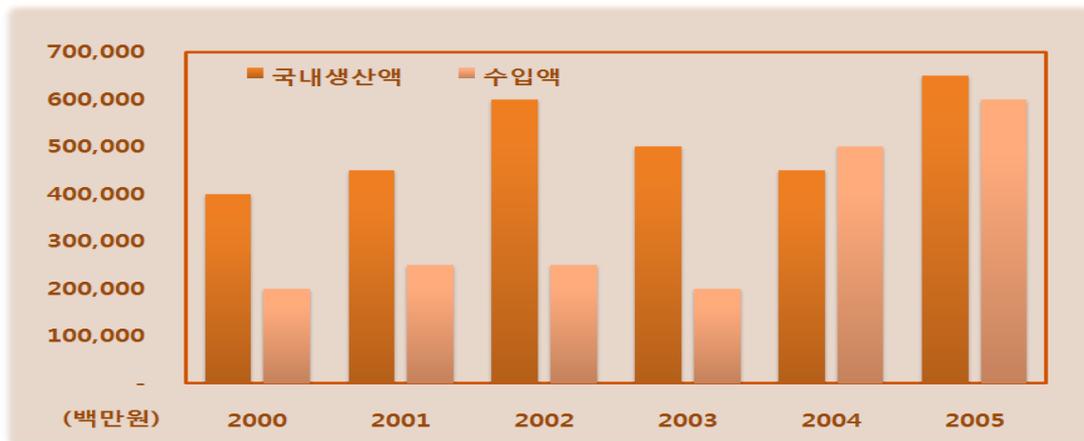


그림 1. 국내 건강기능식품 생산액 및 수입액의 변화(식품의약품안전청, 2007)

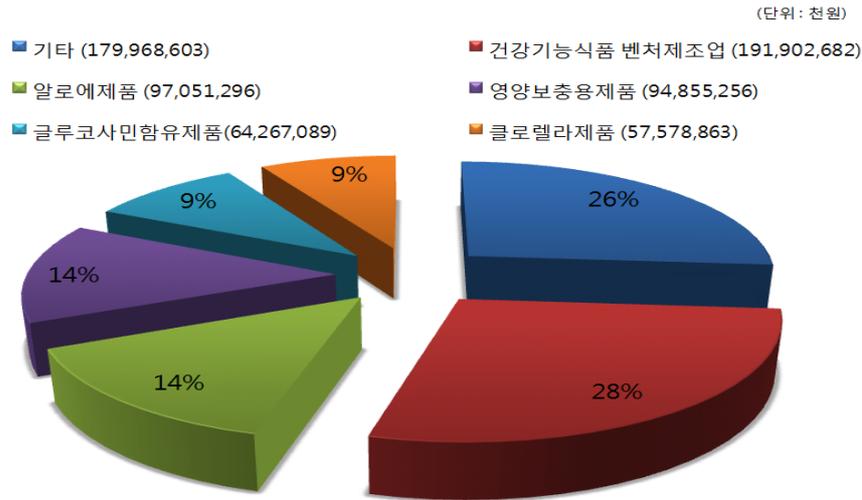
3. 국내 관련(유사)제품의 생산 및 시장현황

- 건강식품이란 ‘일반적인 식품보다 건강에 유익함(Health Benefit)을 주는 식품으로 International Food Information Council, inc.에서 정의
- 1994년에 제정된 DSHEA(Dietary Supplement Health and education Act)에 의해 Dietary Supplement를 ‘특정성분(비타민, 미네랄, Herb or Botanicals, 아미노산과 효소 등)이 포함되어 건강, 미용 등을 위한 보조식품으로 입으로 섭취하는 제품’으로 규정
- 건강기능식품의 세계시장 성장이 지속되면서 우리나라에도 점차 하나의 산업군으로 자리 잡고 있는 추세
- 대다수의 국민이 건강에 대한 인식이 질병 치료보다는 예방의 중요성이 크게 인지되어가고 있고, 여기에 자가 치료(self medication)에 대한 인지도가 점차 증가되어 건강기능식품 시장도 지속적인 성장을 지속할 것으로 예상
- 제품측면에서는 2005년 글루코사민과 같은 소재에 의한 시장 성장을 기대하였으나 성장이 크게 기대 되던 스피루리나와 감마리놀렌산등의 소재가 시장의 견인차 역할을 하지 못해 시장에 출시된 개별인정형 소재들의 매출이 저조
- 2006년 이후에는 다양한 기업들의 시장 참여로 시장이 일부 성장
- 2005년 까지는 건강식품 시장은 세계시장 성장률과 비슷한 매년 10%정도의 성장률을 보이다 2006년에 진행된 기준 규격형 건강식품의 기능성에 대한 재검토로 2006년도 건강기능식품 시장은 2005년도 2조 1,000억원 대비 약 8%성장한 2조 3,000억원으로 예측되고 있어 과

거에 비해 성장률이 비교적 낮은 수준을 기록(식품유통연감 2007)

- 제품군별로 매출액을 보면 홍삼제품이 1,919억원으로 전체시장의 28%를 차지하고 있으며 알로에 제품 970억원, 영양보충요제품군 948억원, 글루코사민 제품이 642억원, 클로렐라 제품군이 575억원으로 전체 시장의 70%이상을 상기 5개 제품군이 차지

건강기능식품 매출현황 (2005)



- 건강식품제조 업체의 수는 2004년 271개 업소에서 2005년 310개 업소로 증가되었고 2006년은 336개 업소로 26개가 증가하여 2005년 39개업소보다 증가의 폭이 완화
- 이중 전문 제조업이 2004년 266개 업소에서 2005년 298개 업소로 32개 증가하였으나 2006년에는 312개 업소로 14개 업소의 증가에 그쳤지만 벤처제조업은 2004년 5개 업소에서 2005년 12개 업소 그리고 2006년 24개 업소로 매년 2배이상 증가
- 일반 판매업은 2004년 3만 6,817개 업소에서 2005년 4만 1,614개 업소로 4,797개 업소가 증가하였고 유통전문 판매업도 2004년 569개에서 2005년 748개 업소로 179개 증가
- 건강기능식품 수입업은 2004년 1,061개에서 2005년 1,635개로 574개 업소가 증가하였으나 2006년에는 1,991개 업소로 증가되어 356개 업소가 증가
- 이는 2006년에는 벤처 제조업이 100% 증가하여 매년 두배의 증가를 보이고 있으며 2005년 50% 이상 증가 하였던 수입 판매업은 356개 업소(전년대비 22%)의 증가를 보여 미약하나마 증가가 둔화

건강식품 업소현황

(단위: 개소)

구분 Classification		2004	2005	2006
총계 Total		38,718	44,307	-
건강기능식품제조업 Health Functional Food Manufacturing Business	건강기능식품 전문제조업 Health Functional Food Specializing Manufacturing Business	266	298	312
	건강기능식품 벤처제조업 Health Functional Food Venture Manufacturing Business	5	12	24
	소계 Subtotal	271	310	336
건강기능식품 수입업 Health Functional Food Import Business		1,061	1,635	1,991
건강기능식품 판매업 Health Functional Food Sales Business	건강기능식품 Health Functional Food General Sales Business	36,817	41,614	-
	건강기능식품 Health Functional Food Distribution-Specializing Sales Business	569	748	-
	소계 Subtotal	37,386	42,362	-

4. 국외 관련(유사)제품의 생산 및 시장현황

- 세계건강식품시장은 약 2,900억 달러로 추정하고 있으며 매년 성장을 거듭하고 있고 1997년 650억 달러이던 시장이 98년 1,000억 달러를 넘어서고 2001년 1,500억 달러, 그리고 2000년 2,000억 달러를 돌파하고 2005년에 2,900억 달러를 기록
- 이를 국가별로 살펴보면 전세계 시장의 70%이상을 미국과 일본이 점유하고 있으며 중국이 9%를 그리고 독일, 이태리가 각각 4%시장을 점유
- 북미와 유럽 기능식품 업계에서 두뇌건강 개선과 인지능 향상용 기능식품 트렌드가 형성되고 있으며, 기능별 관련 제품 및 소재는 표 1과 같다.

표 1. 북미와 유럽의 기능식품 업계의 기능별 관련 제품 및 소재

기능	관련 제품/소재
두뇌기능 증진	도코사헥사엔산(DHA), 아이코사펜타엔산(EPA), 알파리놀렌산(ALA) 등을 함유한 오메가-3 지방산
기억력 향상	은행잎 추출물 제제 / 인삼제제
파킨슨병 예방	레시틴(Lecitin), 코엔자임 Q10 함유제품
우울증억제	제절초 (St. John's wort)제제

(미국)

- 2005년 유기, 자연 건강식품 시장 규모는 전년보다 9.1% 늘어난 513억 9,000만 달러에 달하였으며 이 중에서 비타민, 미네랄 제품군을 함유한 Supplement는 208억 달러로 전년대비 2.5%가 증가했고 기능성제품은 266억 달러로 전년대비 9.0%증가, 자연 유기식품은 207억 달러로 전년대비 12.6%증가 (표 2)

표 2. 제품군 매출 현황 (식품유통연감 2007)

(단위 : 백만달러)

구분	1997	1998	1999	2000	2001	2002	2003	2004	2005
Supplements	13,870	15,350	16,470	17,270	18,082	18,760	19,831	20,325	20,842
Natural & Organic Foods	8,820	9,850	10,900	11,980	13,158	14,362	16,240	18,377	20,700
Functional Foods	13,680	14,780	16,080	17,370	18,820	20,480	21,890	24,460	26,660
Personal Care, etc	3,050	3,290	3,590	3,820	4,113	4,523	4,917	5,475	5,940
Total	39,420	43,270	47,040	50,440	54,173	58,125	62,878	68,637	74,142

- Functional Food 제품군이 전체 시장의 35% 내외를 점유하고 있으며 매년 8~10%의 성장률을 보이고 있고 Supplement군은 2003년까지는 30% 이상의 시장 점유율에서 매년 성장률이 전체시장 성장률을 밑도는 2~5% 수준의 성장을 지속하면서 2005년에는 28%대의 시장을 점유(표 3)

표 3. 제품군 매출 현황(식품유통연감 2007)

구분	1998	1999	2000	2001	2002	2003	2004	2005
Supplements	10.7%	7.3%	4.9%	4.7%	3.7%	5.7%	2.5%	2.5%
Natural & Organic Foods	11.7%	10.7%	9.9%	9.8%	9.2%	13.1%	13.2%	12.6%
Functional Foods	8.0%	8.8%	8.0%	8.3%	8.8%	6.9%	11.7%	9.0%
Personal Care, etc	7.9%	9.1%	6.4%	7.7%	10.0%	8.7%	11.3%	8.5%
Total	9.8%	8.7%	7.2%	7.4%	7.3%	8.2%	9.2%	8.0%

- Natural & Organic Food는 2003년 이후 13% 대의 지속적인 성장을 보이면서 전체 시장 점유율도 20%초반에서 2006년 30%대에 육박할 것으로 예측되며 기타 Personal care제품군은 8~10%대의 성장률과 약 8% 대의 시장 점유율을 지속적으로 유지 (표 4)

표 4. 제품군 매출 현황(식품유통연감 2007)

구분	1997	1998	1999	2000	2001	2002	2003	2004	2005
Supplements	35.2%	35.5%	35.0%	34.2%	33.4%	32.3%	31.5%	29.6%	28.1%
Natural & Organic Foods	22.4%	22.8%	23.2%	23.8%	24.3%	24.7%	25.8%	26.8%	27.9%
Functional Foods	34.7%	34.2%	34.2%	34.4%	34.7%	35.2%	34.8%	35.6%	36.0%
Personal Care, etc	7.7%	7.6%	7.6%	7.6%	7.6%	7.8%	7.8%	8.0%	8.0%

- NIH에서 조사한 미국인들의 건강보조식품을 섭취하는 이유(Factor)는 비만과 높은 콜레스테롤 수치를 조절하기 위해 건강식품을 애용한다고 밝혀짐



(일본)

- 2006년도 일본의 건강식품시장규모는 1조 3,000억엔 정도로 추정되며 ‘건강일본 21’ ‘건강증진법’ 등 국가 연구와 더불어 국민자신이 건강지향에 대한 관심이 높아지면서 앞으로 성장이 예측
- 일본은 1984년부터 ‘식품 기능의 계통적 해석과 전개’ 라는 사업에서 식품의 3차 기능을 주기능으로 하는 ‘기능성 식품’ 용어를 탄생시키고, 1991년 생체방어, 신체리듬 조절 기능을 가지고 일상적으로 섭취가 가능한 식품을 ‘특정보건용식품 (FoSHU : Food for specified Health Use)’ 이라 칭하였고, 2001년 4월 ‘보건기능식품(Health Function Foods)’ 으로 제형 확대(표 5).

표 5. 특정보건용 식품의 기능별 시장변화(식품유통연감 2007)

효능분야	2005년	2006년	전년대비
정장효과	1,872억엔	1,830억엔	-2%
콜레스테롤개선	121억엔	134억엔	11%
고혈압예방	99억엔	110억엔	11%
미네랄흡수	89억엔	82억엔	-8%
충치예방	568억엔	585억엔	3%
혈당치개선	124억엔	146억엔	18%
중성지방치개선	554억엔	612억엔	10%
합계	3,427억엔	3,497억엔	2%

- 2005년 상위 판매소재의 동향으로는 식계, 약계에서 CoQ10, 청즙, 알파리포익산, 유산균 등이 상위를 차지하였고 2005년도 히트소재로는 CoQ10, 알파리포익산, L-카르니틴등 이었고 2006년도 에는 아스타키산틴(천연카로티노이드), 올니친(Ornithine), 블루베리, 대두이소플라본, 키토산, 콜라겐, 글루코사민, 마늘, 알파리포익산, 코엔자임 Q10임
- 일본의 건강기능식품시장에서 유행했던 소재를 시기별로 보면 1990년대 이전에는 비타민, 칼슘, 로얄젤리, 식물섬유, 클로렐라, 비타민 E, 멀티비타민, 케일, 콜라겐, 고려인삼, 건강초, 알로에, 푸룬, 비피더스균 이었으며, 2000년 이후에는 발아현미, 맥주효모, 아미노산, 메시마코푸, 콜라겐, 알파리포익산, 코엔자임 Q10, 향초, 흑초, 한천, 푸코이단, 코다라임, 사라시아 레티큐라타 등으로 변화 (표 6)

표 6. 연도별 유행 소재(식품유통연감 2007)

1990년 이전	1990년	1995년	2000년	2005년
비타민	프로폴리스	아가리쿠스	발아현미	알파리포익산
칼슘	스피루리나	브루베리	맥주효모	L-카르니틴
로얄젤리	DHA	울금	아미노산	코엔자임 Q10
식물섬유	핵산	글루코사민	메시마코부	한천
클로렐라	레시틴	은행잎	콜라겐	꽃송이버섯
비타민 E	철	포도종자	알파리포익산	
멀티비타민	표고버섯	프라센타	코엔자임 Q10	
케일	닭 키토산	가루시니아	향초	
콜라겐	잎새버섯	감마리놀렌산	흑초	
고려인삼	양파	캡사이신	한천	
건강초	마늘		푸코이단	
알로에	참차		코다라임	
푸룬	삼백초		사라시아레티큐라타	
비피더스균	질경이			

○ 2006년에 일본 내에서 주목받았던 주요 기능소재들은 아래의 표와 같음

소재	효능
알파리포익산	항산화, 항당뇨, 간기능 개선 작용
L-카르니틴	다이어트 및 대사증후군 대응소재
아스타키산틴	혈압저하, 당뇨병, 눈의 피로
피크노제놀	항산화작용
글리스린 (잎새버섯추출물)	인슐린 저항성 완화

○ 일본의 한 연구기관은 건강기능식품산업의 성장 당위성을 '고령화의 진행', '생활습관병의 증가', '의료비 자기부담의 증가로 인한 Self care의식의 증대', '약학, 농학, 의학의 발전에

따른 기능성 소재개발의 활성화’, ‘근대 의학 및 약의 한계에 따른 대체의학의 대두’, ‘건강 기능식품에 대한 규제 완화와 글로벌화’, ‘기존 식품시장의 성숙에 따른 대체시장 개발’ 로 예측

- 세계 건강기능식품 시장에서 주로 판매되는 제품 1위는 오메가-3 지방산이며, 다음으로는 프로바이오틱스 보조식품, 그리고 녹차 추출물과 열대과일주스 등의 순이며 향후 기능성식품시장에서 전망이 있을 것으로 예상되는 제품 및 소재 카테고리는 (1) 다이어트 식품시장 (2) Superfruits 시장 (3) 두뇌건강 개선과 인지기능향상용 기능식품 (4) 오메가-3 지방산 (5) 섬유질 식품으로 예측됨

판매순위	제품 / 소재
1위	Omega-3 fish oil
2위	Probiotics and lactic Bacteria supplements
3위	녹차추출물
4위	열대지방 과일 주스 – noni, mangotenn, acai berry, goji
5위	다크 초콜릿 추출물
6위	알로에 베라 주스 / 추출물
7위	후디아
8위	비타민 D
9위	CoQ10

5. 관련 산업의 기술수준

- 일본의 2006년도 자료에 의하면 알파리포익산(항산화, 항당뇨, 간기능 개선작용), L-카르니틴 (다이어트 및 대사증후군 대응 소재), 아스타키산틴(혈압저하, 당뇨병, 눈의 피로), 그리스린 (잎새버섯추출물, 인슐린 저항성 완화)와 같은 제품이 개발되어 이와 같은 개인 맞춤형 건강기능 소재의 개발이 활발할 것이며 현재 상당한 수준에 도달한 것으로 판단됨.
- 국내의 경우 2005년 글루코사민과 같은 소재에 의한 시장 성장을 기대하였으나 성장이 크게 기대 되던 스피루리나와 감마리놀렌산등의 소재가 시장의 견인차 역할을 하지 못해 시장에 출시된 개별인정형 소재들의 매출이 저조하며 아직 대사증후군과 관련된 개발기술 수준은 세계수준에 상당히 미치지 못하는 것으로 판단됨.

6. 미래시장 예측

- LOHAS를 추구하는 소비자들은 일반 소비자에 비해 친환경제품에 대한 구매비중이 매우 높으며 향후 LOHAS의 추세의 확산과 함께 이러한 경향은 크게 증가할 것으로 예상
- ACNielsen사가 2005년도에 59개국 89개 품목을 대상으로 한 세계 주요 성장제품 조사결과, 가장 큰 성장률을 보인 21개 제품 중 17개가 기능성을 강조한 제품임(자료 : ACNielsen, 2005)
- 또한 편의성을 강조한 RTE(Ready-to-Eat) 및 RTD(Ready-to-Drink) 제품 및 친환경 및 신선 편이식품의 경우 높은 성장률을 기록
- 식품 시장 분석 및 컨설팅회사인 Sloan Trends & Solutions사가 2006년 세계 400대 식품기업을 대상으로 향후 3-5년간 기능성식품 분야의 개발동향을 분석한 자료에 따르면, 항고혈압 예방제품, 항비만제품, 혈당조절제품, 정신건강제품 및 미용기능성 제품에 대한 기업체의 연구가 향후 활발하게 진행됨에 따라 맞춤형 건강식품의 성장이 예측됨(그림 2).
- 2006년 기준으로 등록된 국내 건강기능식품제조업체는 337개소로 45개 품목(고시형 37개, 개별인정형 8개)을 생산하였으며, 생산량은 12,269톤, 매출액은 7,008억원(국내판매액: 6,637억원, 수출액: 371억 원)을 기록
- 2006년도 국내 전체 건강기능식품의 총 생산량(12,268,626kg) 중 농산물 유래 건강기능식품의 총 생산량(10,459,308kg)이 85%의 비중 차지하였으며, 총 판매액(700,859억 원)에 대한 농산물 유래 건강기능식품의 총 판매액(579,870억 원)의 비중은 83%
- 식품의약품안전청에 인정을 받는 기능성 원료는 2006년 12월 기준 79개 제품으로 체지방조절이 14종으로 가장 많았고 다음으로 혈당조절(11개), 항산화(9개), 관절건강(8개) 부분(그림 3).



그림 2. 세계 400대 식품기업의 기능성식품 개발 동향

Trends in the Food Industry 2007 & BeyondTrends Beyond, SLOAN TRENDS & SOLUTIONS, INC., 2007



그림 3. 식품의약품안전청 기능성원료 인정건수(식품의약품안전청, 2007)

제 3 장 연구개발 수행 내용 및 결과

제 1 절 연구 수행 방법

1. 미생물 분리 및 동정

본 연구의 향당노 개선, 간질환개선 및 아토피 피부염 억제를 위한 고체발효 시스템을 구축하기 위해 전통발효식품인 청국장과 된장으로부터 고열에서 생존가능한 5종의 미생물을 분리하여 동정하였다. 전통발효식품인 청국장과 된장을 1대 1의 비율로 혼합하여 60°C에서 30분 동안 열처리한 후, 1g을 취하여 0.85% NaCl 9ml에 현탁한 후, 10^0 내지 10^{-7} 로 희석한다. 각각의 희석 현탁액 100 μ l를 PCA 배지(DIFCO 사)에 도말하여 28°C에서 배양하고, 배양된 균주는 콜로니 형태가 다른 것들을 선발하여 TSA 배지에서 적어도 3회 이상 계대배양하여 단일콜로니로 분리한 후, 순수분리한 균주의 집락 및 세포의 형태학적 성질 조사와 gram staining, catalase test를 실시하여 개략적인 미생물 분류 및 동정을 할 수 있는 1차 동정을 실시하였다. 또한 API kit (Biomeriux, France)를 이용하여 미생물을 동정하였다.

분리된 균주는 액체 배양하고 게노믹 DNA(genomic DNA)를 순화하여 16S RNA의 프라이머를 이용하여 증폭한 뒤, 증폭된 부분을 주형(template)으로 하고 ITS1 프라이머(CTTGGTCATTAGAGGAAGTAA)와 ITS4 프라이머(TCCTCCGCTTATTGATATGC)를 사용하여 서열을 시퀀싱(sequencing)하는 과정을 거쳐 동정하였다. 이때 프라이머 세트는 "Nucleic acid techniques in bacterial systematics (John Wiley and Sons, England)"와 "nucleic acid research (2000) 28(1):173-174를 참고하였다.

분리한 미생물은 한천배지로 배양한 균주를 멸균된 10% skim milk 10 mL과 혼합하여 멸균된 vial에 분주한 후, 동결건조 후 4°C에서 보관하였다.

2. 고체발효

가. 미생물 종균 제조

고체발효물을 제조하기 위해 먼저 종균을 제조하였다. 선발한 *Bacillus* sp., *B. subtilis*, *B. licheniformis*, *B. sonorensis*, *B. circulans*로 구성된 복합미생물 0.01 kg, 쌀겨 4 kg, 당밀 2 kg, 황

설탕 4 kg을 음용수에 혼합하여 총 중량이 100 kg이 되도록 혼합한 후 혼합물을 22.5±2.5℃를 유지하며 4시간 간격으로 10m³/hr의 공기를 2시간 동안 폭기하는 과정을 1일 4회 반복하며 21일간 배양하여 복합 미생물 종균을 제조하였다.

나. 고체발효물 제조

본 연구에 사용한 고체발효물의 제조과정은 그림 4에서와 같다. 먼저 미강 61 kg, 청국장분말 28 kg, 다시마분말 0.26 kg, 울금분말 0.52 kg, 김네마실베스타분말 0.26 kg, 녹차분말 0.26 kg, 상황버섯균사체 0.26 kg, 표고버섯균사체 0.26 kg, 노니분말 8.7 kg, 브로콜리분말 0.52 kg, 클로렐라분말 0.52 kg 등 100 kg의 200 mesh 분말을 핫 니드(Hot Kneader, 300-500 L, 대한기계)에 넣고 종균액 20 L를 혼합하고 최종수분 농도를 65%가 되도록 음용수를 첨가하여 80℃로 온도를 올리면서 발효시킨다. 80℃에 도달한 후 4시간 발효시킨 후 숙성용기 [삼나무통, 10 L(40×35 cm), 일본]에 넣고, 봉으로 통기성을 높이기 위해 구멍을 9개 정도 뚫은 다음 28℃에서 45일간 숙성시켰다.

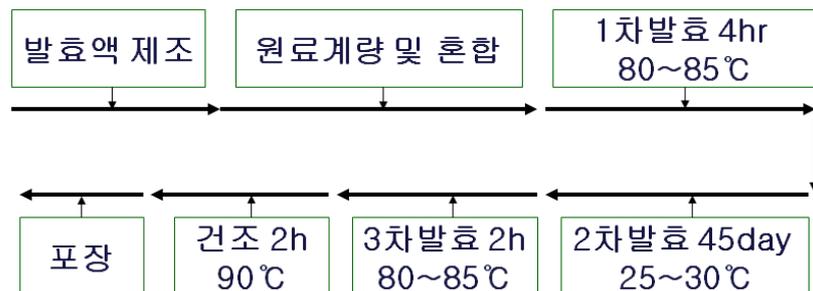


그림 4. 고체발효물 제조 공정

2차 발효단계에서의 숙성물의 성상은 그림 5와 같다.

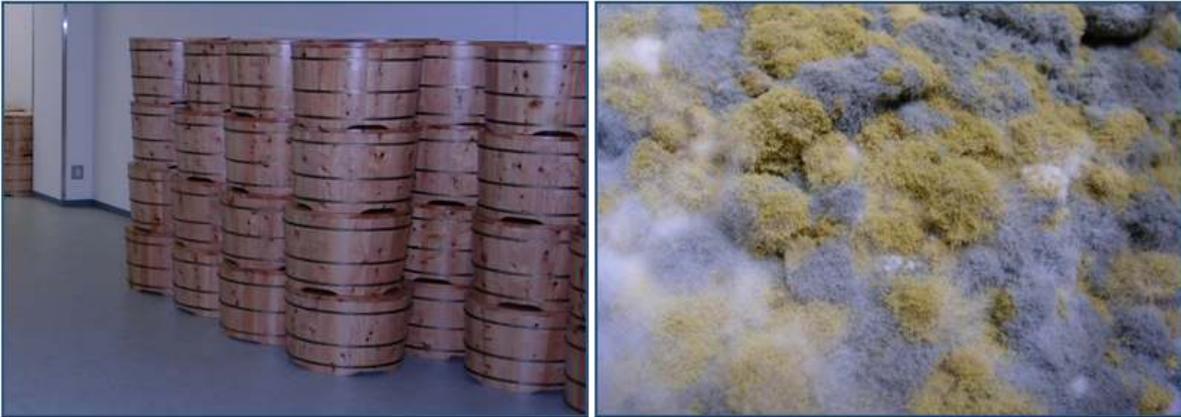


그림 5. 백송발효통 및 숙성물 사진

숙성이 완료된 반제품을 리본 발효기에 넣고 80℃에서 2시간 이상 가열하여 수분함량이 8%가 되면 가열을 완료한다.

제품화를 위해서 90℃에서 2시간 건조하여 최종수분이 3%가 되도록 한 후 포장한다.

3. 균주의 생물전환 효율

선발 복합미생물의 생물전환효율은 인삼을 발효시켜 진세노사이드의 변화와 항산화활성의 변화를 조사하여 간접적으로 추정하였다.

복합미생물을 평균으로 6년근 인삼분말 115 g을 80℃에서 2시간 건조 전 단계까지 처리하여 인삼 발효물을 제조하고 인삼 발효물과 인삼 비발효물 간의 진세노사이드의 함량을 분석하였다. 인삼발효물은 그림 6과 같다.



그림 6. 인삼발효물 사진

가. 사포닌 시료 제조

시료 5 g을 정확하게 칭량하여 추출수기에 옮긴 다음 50 mL 수포화부탄올을 첨가하고 80°C에서 3시간 동안 3회 반복추출한 후 여과지(Whatman No. 2)로 여과하였다. 여액은 250 mL 분액여두에 옮기고 50 mL 증류수를 가한 후 세척하였다. 이후 부탄올 층을 농축수기에 옮겨 감압농축한 후 50 mL 에테르를 가하고 36°C에서 30분간 추출하여 지질 성분 등을 제거하고 남은 잔사를 105°C에서 30분간 건조한 후, 이를 25 ml 메탄올에 녹이고 0.45 μm 막 필터로 여과하여 사포닌 조성 분석을 위한 시료로 사용하였다.

나. 사포닌 조성

상기에서 얻어진 사포닌 시료중의 사포닌조성을 알아보기 위하여 HPLC를 이용하여 분석하였다. 이때 컬럼은 μ -BondapakTM C₁₈ Column (10 μm , 3.9×300 mm, Waters)을, 검출기는 Jasco UV detector (203 nm)를 사용하였다. 이동상으로는 물(A)과 acetonitrile(B)의 gradient system을 사용하였으며 A를 기준으로 80%(0분), 80%(5분), 67%(38분), 20%(63분), 20%(75분), 80%(77분), 80%(90분)이었다. 이동상의 유속은 분당 1.0 mL이었으며 시료주입량은 20 μL , 분석 온도는 35°C이었다.

4. 고체발효물의 독성시험

가. 세포독성

시료의 독성시험은 MTT assay를 이용하여 조사하였다. 이때 cell viability를 측정하기 위한 세포는 간암세포주인 Hepa1c1c7과 대장의 정상세포주인 CHO-K1을 사용하였다. 먼저, 96-well plate를 이용해서 $3 - 5 \times 10^3$ cells/well의 세포를 분주한 후, 4시간 preincubation 한다. 4시간 후 시료를 농도별로 처리한 후, 72시간 배양시키고 MTT assay를 실시한다. 배양이 끝난 후 50 uL의 MTT (3-[4,5 -dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide)용액을 넣은 후 4시간 배양하여 formazan이 형성되면 상등액을 제거하고 150 uL의 DMSO를 넣는다. ELISA reader (Multiskan EX, Thermo, USA)를 이용해서 540 nm에서 흡광도를 측정한다.

나. 급성경구독성시험

경구투여용 시료는 고체발효물을 음용수로 현탁시켜 250 mg/mL로 조제하였다. 실험동물은 5주령의 ICR계인 암수 마우스를 이용하였으며 약 1주간의 예비사육을 실시하고 일반상태에서 이상이 없는 것을 확인한 후 시험에 사용하였다. 시험동물은 polycarbonate cage에 각 5마리씩 넣어, 실온 $23^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$, 조명시간 12시간/일로 사육하였다. 사료(마우스, rat용 고품사료 : Lab MR Stock, 일본농산공업주식회사) 및 음용수는 자유로 섭취시켰다.

실험은 검체 투여용량으로 5,000mg/kg을 투여하는 시험군 및 용매 대조로서 음용수를 투여하는 대조군을 설정하여, 각 군에 암수 각 5마리를 사용하였다.

시료투여 전 4시간 동안 시험동물을 단식시켰고 체중을 측정한 후 시험군에는 시험액, 대조군에는 음용수를 각각 20mL/kg의 투여용량으로 stomach sonde(탐침)를 사용하여 강제 단회 경구투여하였다. 투여 후 7일째 및 14일째에 체중을 측정하여 t-검정에 있어서 유의수준 5%로 각 군을 비교하였다. 관찰기간 종료 시에 동물 모두를 부검하였다.

5. 항당뇨 효능 평가

가. 동물실험

(1) 실험동물 및 식이

제 2형 당뇨병모델인 KK-A^y/Ta Jcl(유전적 비만 2형 당뇨병모델) 마우스 30마리를 Clea(Tokyo, Tapan)사에서 구입하여 1주간 AIN-93G 사료로 자유급식하면서 사육환경에 적응시킨 뒤 실험에 사용하였다. 1주 후 난괴법(randomized complete block design)에 의해 10마리씩 분류하여 기본사료를 먹인 당뇨병대조 군(이하D군), 기본사료에 발효물을 0.08% 첨가하여 먹인 군(이하 DF1), 기본사료에 발효물을 0.4% 첨가하여 먹인 군(이하 DF2)으로 구성 하였다. 사육실 온도는 23±2℃, 습도는 50±5%, 조명주기는 12시간 간격으로 조절하였다.

(2) 식이제조 및 실험군

실험에 사용된 식이는 AIN-93G diet를 기본으로 하여 제조하였다. 실험 식이는 표 7과 같다. 실험군은 모두 3군으로 AIN-93G 식이만 급여한 D군과 70kg 성인이 하루에 발효물 10 g을 먹을 때 마우스의 체중 대비로, 하루에 먹는 양의 0.08%(DF1 식이군), 0.4%(DF2 식이군)의 양을 AIN-93G 식이에 첨가한 군으로 구성하여 실험을 10주간 진행 하였다. 식이와 음용수는 각군의 개체들이 자유롭게 섭취하도록 하였다.

(3) 체중, 식이 섭취량 및 수분 섭취량

매주 일정한 시간에 체중을 측정 하였고, 식이섭취량 및 수분 섭취량을 급여량과 잔여량의 차이로 측정 하였다. 식이효율(Food Efficiency Ratio: FER)은 실험기간 동안의 체중증가량을 총 식이섭취량으로 나누어 계산하였다.

(4) 혈액 지표 분석

(가) 혈당 : 혈당은 공복시간 없이 매주 일정한 시간에 꼬리정맥으로부터 전혈을 채취하여 Glucose-oxidase 법을 이용한 혈당스트립(ACCU-CHEK Sensor, Roche, Basel, Switzerland)을 이용하여 측정 하였다.

(나) 당화혈색소 : 실험식이 종료 후 2시간 절식 시킨 후에 안와 정맥을 통해 채혈하였고(그림 7), 전혈을 따로 분리하여 4℃에 보관 후 일주일 내에 affinity chromatography를 이용한 측정 kit (Biosystems S. A., Barcelona, Spain)를 이용해 당화혈색소(HbA1c) 측정에 사용하였다.

표 7. 당뇨 실험쥐 사료 조성비

Ingredients	Dietary group ¹⁾		
	D	DF1	DF2
Casein	20	20	20
Cornstarch	39.7	39.7	39.7
Dyetrose	13.2	13.2	13.2
Sucrose	10	10	10
Cellulose	5	5	5
Soybean Oil	7	7	7
T-Butylhydroquinone	0.0014	0.0014	0.0014
Salt mix	3.5	3.5	3.5
Vitamin mix	1	1	1
L-Cystine	0.3	0.3	0.3
Choline Bitartrate	0.3	0.3	0.3
Fermented Product	-	0.08	0.4
Total	100.0	100.08	100.4

Journal of Nutrition v123, 1941 (1993)

¹⁾D ; Diabetic control group, DF1 ; Diabetic group with the supplementation of Fermented product 0.08%, DF2 ; Diabetic group with the supplementation of Fermented product 0.4%



그림 7. 안와정맥을 통한 채혈

(다) 혈청 Glucose, 혈청 insulin, Triglyceride, Total Cholesterol, HDL-Cholesterol : 실험식

이 종료 후 2시간 절식 시킨 후 채혈한 혈액을 3000rpm에서 15분간 원심분리 후 얻어진 혈청을 사용하여 녹십자(Green Cross, Korea)에 의뢰 하여 측정하였다.

(5) 장기 무게 측정

최종 실험동물을 해부 후 간, 신장, 비장을 적출하여 각 각의 무게를 측정하였다.

(6) 통계처리

실험결과는 SAS 9.1(ver.)을 이용해 평균값(mean)±표준편차(standard deviation)로 표시하였고, 분산분석법(ANOVA)으로 분석하였다. 각 실험군 사이의 평균값들에 대한 통계적 유의성 검증은 $p < 0.05$ 수준에서 Duncan's multiple range test에 의해 검정 하였다.

나. 당뇨관련 세포실험

(1) 근육세포 분화 및 NBDG uptake assay

먼저 C2C12 cell 분화는 48시간 culture 후, 1% horse serum 배지로 분화를 유도하였다. 분화유도 4 ~ 6일 후 cell starvation을 low glucose DMEM으로 배지교환을 4시간 시행한다. 각각의 시료 처리를 농도별(25, 50, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$)로 하여 24시간 incubation하고 50 μM NBDG를 첨가하여 1시간 반응시킨 후, medium을 제거하고 PBS washing 한 다음 lysis buffer를 이용하여 cell lysis를 하고 fluorescence micro reader로 EX/EM=485/535 값을 측정한다.

다. 당뇨 관련 임상평가

(1) 피험자 선정기준 및 제외기준

선정기준은 다음과 같다.

1. 만20세 이상 75세 이하인 성인 남녀
2. 정상인과 당뇨병 진단범위 사이의 금식혈당조절장애(IFG, impaired fasting glucose) : 8~12 시간 공복 후 혈당치가 다음에 해당하는 자 => $90\text{mg} < \text{FBS (공복혈당)} < 126\text{mg}/\text{dl}$
3. 최근 3개월 이내에 당뇨병으로 인한 약물 요법을 받지 않은 자
4. 자발적으로 인체시험에 참여를 결정하고 서면동의서에 서명한 자

제외기준은 다음과 같다.

1. 임신 또는 수유 중이거나 임신 가능성이 있는 여성
2. HbA1c(당화혈색소) > 7.0 인자
3. BMI(체질량지수) 수치가 28 이상인 자
4. 과다 음주자(소주기준: 200ml/일 이상, 1,440ml/주)
5. 임상병리 검사 상 임상적으로 유의한 신장, 간 기능 관련 혈액학적 검사소견을 보이는 자
 - 간기능(SGOT, SGPT 수치 > 정상 상한치의 2배)
 - 신기능(혈중 Creatinine 수치 < 정상 상한치의 1.5배)
6. 전신성 스테로이드 체제를 지속적으로 복용해야 하는 경우
7. 최근 3개월 이내 다른 임상연구에 참여한 자
8. 기타 당대사에 영향을 줄 수 있는 질환을 가진 자나 약제를 복용 중인 자
9. 상기 외에 시험책임자 또는 시험담당자가 시험에 부적절하다고 생각되는 임상소견이 있는 자

(2) 피험자 수

표본 수는 최종 유효성 평가 가능 대상자 수 10명으로 한다.

(3) 그 밖의 사전조사 사항

피험자와 관련된 병력검사, 신체검사, 활력징후, 체성분분석, 병용 약물, 임상병리검사는 한 방산업지원센터의 검사 기준에 준하였다.

(4) 임상병리검사 항목

임상병리 검사 항목은 정맥 혈액화학 검사에서는 glucose, HbA1c, AST(SGOT), ALT(SGTP), creatinine(신장 특히 사구체의 여과기능을 알아보는 검사이며, 신기능의 정도를 아는 일반적인 지표)을 모세혈관 혈당측정기 검사에서는 glucose를 측정하였다.

(5) 관찰 항목 및 관찰 검사 방법

(가) 피험자배경 및 병력

시험담당자는 방문 1에 피험자의 성명(이니셜), 성별, 나이, 생년월일, 신장, 체중, 직업, 이 병기간 병력 및 기초질환, 가족력 및 과거력, 병용약제, 주량을 관찰하고 기록한다.

(나) 임상병리검사

시험담당자는 측정치의 정상, 비정상 여부를 평가하여 시험 제품 복용 후 비정상적 변화가 나타난 경우에는 시험 제품과의 관련성을 평가하고 추적조사를 실시하고 기록한다(최소 8시간의 공복상태를 유지한 후 채혈).

- 검사항목: Glucose (모세혈관 및 정맥채혈), HbA1c, SGOT, SGPT, Creatinine

(다) 체 성분 분석 : 체중, 골격근량, 체지방량, 체질량지수(BMI), 체지방율 등

(라) 총괄적 유효성 평가

유효성 평가 변수는 다음과 같다.

1차 유효성 평가변수	Glucose의 변화
2차 유효성 평가변수	혈중 HbA1c의 변화

(마) 순응도 평가

피험자 방문 3, 4, 5, 6에 복용하지 않고 남아있는 시험 제품의 양과 복용률을 시험담당자가 조사한다. 피험자는 전체 복용률 80% 이면서 연속 6회 이상 복용 중지를 금지 하는 원칙을 지키지 않았을 경우 탈락자로 처리한다.

그리고 시험 제품 복용 전후의 피험자의 병용 약품(한약 또는 양약 등)의 변동을 조사하여 시험담당자가 자세히 기록한다. 또한 시험담당자는 피험자에게 복용 원칙을 알리고, 복용 순응도 조사지를 배부하여 매일의 복용 결과를 기록하도록 지시한다. 한편 시험담당자는 미복용한 시험 제품을 수거하여 순응도를 높이도록 한다.

(바) 이상반응 평가

임상병리검사 및 기타 이상반응 발생여부로서 피험자 방문 2, 3, 4, 5, 6시 책임연구자 또는 시험담당자가 평가한다. 단, 피험자 방문시가 아니더라도 이상 반응이 나타날 시 피험자는 책임연구자나 시험담당자에게 즉시 보고하는 것을 원칙으로 한다.

부작용의 정도	대응책
Mild	복용지속, 무처치 혹은 간단한 대증요법
Moderate	복용 중단 및 일반적인 치료
Severe	복용 중단 및 집중치료 혹은 입원치료

(사) 안전성 평가

피험자 방문 3, 4, 5, 6시 시험담당자가 피험자의 상태를 평가하여 안전성을 평가한다.

(6) 시험 분석 방법

본 통계분석은 「인체 시험 통계지침(KFDA, 2000)」에 근거하며, 이용되는 통계 패키지는 SAS version 9.1이다. 통계적 유의성을 위해 유의수준은 5%로 설정하였다.

(가) 유효성 평가 분석

1차 유효성 평가변수(혈중 혈당수치)에 대한 분석은 방문 전·후의 평균변화량(0주-12주)이 시험제품 복용 전·후 간에 비교됨으로써 수행된다. 이를 위해 대응-표본 t-검정을 사용한다. 또한, 1차 유효성 평가변수의 평균변화량에 대한 추정치와 95%신뢰구간이 제시된다. 이러한 결과로부터 시험제품 복용 전·후의 차이(즉, 혈당의 저하)를 우선적으로 평가한다. 2차 유효성 평가에 대해서도 1차 유효성평가와 유사한 통계적 분석절차를 따른다.

(나) 안전성 평가에 대한 분석

피험자 방문시점 및 중도탈락시점에 평가한 이상반응과 관련된 점수결과(예: 부작용 발현율)를 통해 시험 전·후를 비교한다.

※ 결과적으로, 1차 및 2차 유효성 평가와 안전성 평가에 대한 통계분석 결과를 비교 검토한 후, 종합적으로 본 임상을 수행하기 위한 기초자료로 사용하고자 함

(7) 시험제품 복용방법

시험제품을 1일 3회(1회 당 1포, 2g)씩 아침, 점심, 저녁 식후 30분에 적당량의 물과 함께 복용한다.

(8) 피험자의 시험 중지 혹은 탈락

(가) 중지자

다음에 해당하는 경우는 '중지자'로 분류한다.

A. 시험책임자 또는 시험담당자가 인체시험용 제품과 '관련 없음'으로 판정한 이상반응으로 인하여 조기에 연구를 중지한 경우

- B. 인체시험용 제품과의 관련성이 명백하지 않은 기타의 이유로 조기에 시험을 중지한 경우
- C. 인체시험계획서를 심하게 벗어난 경우(예를 들면, 검사를 받지 않거나 계획된 일정을 따르지 않는 경우, 더 이상의 투약을 거부하는 경우, 병용금지약물을 사용하였을 경우 등)
- D. 당뇨병 치료를 받아야 하는 경우
- E. 임신 한 경우

‘중지자’에 해당하는 피험자는 시험책임자, 시험담당자와 상담 후 인체시험계획서에 따라 인체 시험 실시 또는 탈락 여부를 시험책임자 또는 시험담당자가 결정한다.

(탈락자)

다음에 해당하는 경우는 ‘탈락자’로 분류하고 최종 분석 평가 시에 ‘악화’로 판정한다.

- A. 시험담당자가 인체시험용 제품과 ‘관련이 있을 수 있음’ 또는 ‘명백한 관련 있음’으로 판정한 이상 반응으로 인하여 조기에 연구를 중지한 경우
 - B. 효과가 없어(증상이 중증이거나 악화되어) 조기에 시험을 중지한 경우
 - C. 시험책임자 혹은 시험담당자의 판단으로 인체시험 수행이 곤란하다고 판단되는 경우
- ※ ‘중지자’ 및 ‘탈락자’는 중단된 이유를 막론하고 분석을 위해 추적 조사될 것이다.

(8) 시험 디자인 및 분석 방법

(가) 시험 디자인

단일기관 일체 시험, pilot study, 전·후 비교시험

(나) Initial 작성법

피험자의 Initial은 피험자 이름의 각 음절의 첫 자음을 기준으로 3개의 대문자로 표시한다. 단, 이름이 4자인 경우 마지막 자리의 자음은 탈락시키며 2자리인 경우는 중간 자리를 ‘-’처리하여 작성한다. 만약에 이름이 같을 경우에는 ‘-1,-2.....’처럼 번호로 작성한다.

예) 홍길동 : 홍기디, 홍길 : 홍-기, 홍길동전 : 홍기디, 홍길동-1: 홍기디-1 로 작성한다.

(다) 시험분석 방법

본 통계분석은 「인체 시험 통계지침(KFDA, 2000)」⁽⁷⁾에 근거하며, 이용되는 통계 패키지는 SAS version 9.1이다. 통계적 유의성을 위해 유의수준은 5%로 설정하였다.

1) 유효성 평가 분석

1차 유효성 평가변수(혈중 혈당수치)에 대한 분석은 방문 전·후의 평균변화량(0주-12주)이 시험제품 복용 전·후 간에 비교됨으로써 수행된다. 이를 위해 대응-표본 t-검정을 사용한다. 또한, 1차 유효성 평가변수의 평균변화량에 대한 추정치와 95%신뢰구간이 제시된다. 이러한 결과로 부터 시험제품 복용 전·후의 차이(즉, 혈당의 저하)를 우선적으로 평가한다. 2차 유효성 평가에 대해서도 1차 유효성평가와 유사한 통계적 분석절차를 따른다.

2) 안전성 평가에 대한 분석

피험자 방문시점 및 중도탈락시점에 평가한 이상반응과 관련된 점수결과(예: 부작용 발현율)를 통해 시험 전·후를 비교한다.

※ 결과적으로, 1차 및 2차 유효성 평가와 안전성 평가에 대한 통계분석 결과를 비교 검토한 후, 종합적으로 본임상을 수행하기 위한 기초자료로 사용하고자 함

6. 간질환 개선효능 평가

가. 동물실험

(1) 실험동물 및 식이

생후 4주된 평균체중 80~90 g인 Sprague Dawley계 수컷 흰쥐를 두얼 바이오텍(DoolYeal Biotech, Korea)에서 분양받아 일반 배합사료로 일주일간 적응기간을 거친 후, 체중이 평균 180 g 내외인 쥐들을 체중에 따라 난괴법(randomized complete block design)에 의해 6마리씩 분류하여, 기본사료를 먹이고 올리브유를 복강투여한 군(이하 Normal), CCl₄를 0.15 mL/100g 복강투여하고 기본사료를 먹인 군(이하 control), CCl₄를 0.15 mL/100g 복강투여하고 발효물이 0.4% 혼합된 사료를 먹인 군(이하 CF) 으로 구성하였다. CCl₄와 Olive oil의 혼합비율은 1 : 1이었으며 체중 100 g 당 0.15 mL을 3일 간격으로 2회 복강투여하고 5주간 사육하였다.

본 실험에 사용한 실험 식이는 AIN-93G FORMULA 어린 쥐 사료[(주)e-조은사료, 한 삼 피드 렐]를 기본으로 하여 제조하였다. 실험 식이의 구성성분은 표 8과 같다. 식이와 음용수는 각 군의 개체들이 자유롭게 섭취 하도록 하였다. 사육실의 온도는 23±2℃, 습도는 50±5%, 조명주기는 12시간 간격으로 조절하였다.

한편 고체발효물이 고지방을 투여한 실험쥐의 간지질 대사에 미치는 영향을 분석하기 위해

lard 12%와 콜레스테롤 1%를 지방이 7% 함유된 기본사료에 혼합하여 사료를 제조하고 상기와 같은 방법으로 사육하였다.

표 8. 간질환 시험 동물사료 조성비

Ingredients	(g/100g diet)		
	Normal	Control	CF
Crude Protein(min.)	20	20	20
Crude Fat(min.)	7	7	7
Crude Fiber(max.)	7	7	7
Moist.(max.)	10	10	10
Crude Ash(max.)	6	6	6
Calcium(min.)	0.5	0.5	0.5
Phosphorus(min.)	0.4	0.4	0.4
Fermented Product	—	—	0.4

Journal of Nutrition v123, 1941 (1993)

(2) 체중 및 간 무게 측정

매주 일정한 시간에 체중을 측정하였으며, 실험식이 종료 후 실험동물의 혈액 채혈 후 해부하여 간, 신장 및 부고환지방을 적출하여 무게를 측정하였다.

(3) 혈액 지표 분석

(가) AST, ALT, ATP, LDH : 실험식이 종료 후 채혈은 안와정맥을 통해하였고, 채혈한 혈액을 3000 rpm에서 15분간 원심분리한 후 얻어진 혈청을 녹십자(Green Cross, Korea)에 의뢰하여 측정하였다. ALT(Alanine aminotransferase)는 ALT reagents(Bayer, USA) Kit, AST(Aspartate aminotransferase)는 AST reagents(Bayer, USA) ,ATP(Alkaline phosphatase)는 Alkaline Phosphate Reagents(Bayer, USA), LDH(Lactate dehydrogenase)는 Lactate Dehydrogenase(P→L)(Bayer, USA) Kit를 사용하여 ADVIA 1650(Bayer, USA) 기기를 이용하여 측정하였다.

(나) Total Cholesterol, Triglyceride, HDL-cholesterol, LDL-cholesterol : 혈장을 녹십자 (Green Cross, Korea)에 의뢰하여 측정하였다. Triglyceride는 Triglycerides reagents(Bayer, USA), Total Cholesterol은 Cholesterol reagent(Bayer, USA), HDL-cholesterol은 Direct HDL-Cholesterol (Bayer, USA), LDL-cholesterol은 LDL-Cholesterol(Bayer, USA) Kit를 사용하여 ADVIA 1650(Bayer, USA) 기기를 이용하여 측정되었다.

(4) 간 조직 및 분변의 지질함량

지질 함량은 Folch 법에 준하여 측정하였다. 간 또는 분변 0.5 g에 0.9% saline 1.5 mL를 첨가한 후 20초간 homogenate하고 chloroform과 methanol 혼합액(1 : 2) 7.5 mL로 넣고 1분간 혼합 후 30분간 정체시킨다. 여기에 chloroform 2.5 mL과 증류수 2.5 mL을 첨가하여 1분간 혼합한 후, 3,000 rpm에서 20분간 원심분리하여 최하층을 분리하여 여기에 sodium sulfate를 10 g 가하고 여과하고 chloroform을 완전히 증발시킨다. 추출된 지질(잔존물)을 BCS triglyceride kit 및 BCS cholesterol kit(Bio Clinical System Co.)를 이용하여 측정하였다.

7. 아토피 피부염 개선효능 평가

가. 동물실험

(1) 아토피 유발

8주령의 아토피성 피부염 동물모델인 NC/Nga mouse (SLC Co., Shizuoka, Japan)를 중앙 실험동물에서 분양받아 기본사료로 2주간 적응기간을 거친 후 마우스의 등 쪽, 귓바퀴 윗부분 까지 최대한 제모한 다음, 일반시판용 제모크림을 이용하여 털을 완벽히 제거하고 크림을 제거한다. 도포부위에 4% SDS 수용액을 분무하여 피부의 지방성분 제거하고 1시간 건조 후, 아토피성 피부염유발 시약인 Biostir AD cream (Biostir Co., Kobe, Japan) 100 mg을 등쪽, 귓바퀴 부분에 균일하게 도포한다. 주 2회 제모와 Biostir AD cream를 반복하여 5주간 실시하였다.

(2) 아토피 증상 및 진단

5주간 아토피를 유발시키면서 매주 소양행동(가려워 긁는 행동)을 동반한 홍반, 구진(살갓에

돋는 발진), 린설(비듬), 가피(딱지)의 생성정도를 확인하고 실험식이 종료 후 안와정맥을 통해 채혈하였으며 채혈한 혈액을 3,000 rpm에서 15분간 원심분리한 후 얻어진 혈장의 IgE 값은 IgE ELISA kit (Shibayagi Co., Ltd, Ishihara Japan)를 이용하여 protocol에 준하여 측정하였다.

8. In vitro 효능 평가

가. 기능성 효소활성 관련 시험

(1) Fibrinolytic activity

혈전용해활성은 본 활성은 Fayek 등과 김 등의 방법에 따라 0.6% fibrinogen 용액 10 mL을 완전용해 한 다음 thrombin (10U/100 μ L)을 페트리 디쉬에 분주하고 완전용해 된 fibrinogen 용액을 부어서 응고시킨 후 paper disk를 이용하여 sample을 적정한 후 37°C에서 6시간 반응시킨 후 clearzone을 확인하였다.

(2) ACE inhibitory activity

고혈압억제 활성은 Cushman 등의 방법에 따라 시료액에 동일 용량의 ethyl acetate를 처리하여 얻은 추출액 50 μ L를 rabbit lung powder에서 추출한 ACE용액 150 μ L(약 2.8~3 Unit)와 기질 용액(pH 8.3의 100 mM sodium borate 완충용액 2.5 mL에 300 mM NaCl과 25 mg Hip-His-Leu을 용해) 50 μ L와 섞은 후 37°C에서 30분간 반응시킨 다음 1 N HCl로 반응을 정지시켰다. 이 반응액에 유리되어 나오는 hippuric acid의 양을 228 nm에서 흡광도를 측정하여 산출¹³⁾하였고 시료 무첨가구를 대조구로 하여 저해율을 구하였다.

(3) Tyrosinase inhibitory activity

미백 활성은 성 등의 방법에 따라 시료액 0.5 mL에 5 mM L-DOPA 0.2 mL, 0.1 M sodium phosphate buffer(pH 6.0) 0.2 mL를 혼합한 후 tyrosinase 11 U을 첨가하여 35°C에서 2분간 반응시킨 후 475 nm에서 흡광도를 측정하여 시료액 무첨가구와 비교하였다.

(4) GST activity

간 기능 개선 활성은 William H의 방법을 일부 변형하여 측정하였다. 0.1 mM potassium phosphate buffer(pH 6.5) 100 μ L에 시료 10 μ L과 GST 효소액 15 μ L(1.5 unit) 그리고 Glutathione(GSH) 10 μ L의 조효소액을 가한 후, 25°C에서 5분간 pre-incubation시켰다. 여기에 기질 1-chloro 2,4-dinitrobenzene 10 μ L 가하여 다시 25°C에서 5분간 반응시킨 후 20% TCA 350 μ L를 가하여 반응을 정지시켰다. 반응물을 vortexing한 다음 8000 rpm으로 5분간 원심분리 후 상등액을 취하여 314 nm에서 흡광도를 측정하여 GST activation activity를 아래와 같이 계산하였다.

$$\text{GST activation activity (\%)} = (B-S / C) \times 100$$

C: A₃₁₄ of Control (without sample)

S: A₃₁₄ of Sample

B: A₃₁₄ of reactants (products)

(5) HMG-CoA reductase inhibitory activity

콜레스테롤 합성억제 효능은 Kleinsek 등의 방법을 사용하여 다음과 같이 측정하였다. D.W에 10 μ g/ μ L로 녹인 각 시료 추출물 10 μ L(control은 시료 대신 D.W 10 μ L)에 0.5 μ M 인산완충용액(pH 7.0) 100 μ L, 2 mM DTT 100 μ L, 0.5 mM β -NADPH 100 μ L, HMG-CoA reductase (Syrian hamster liver, 10 mg-protein/mL) 10 μ L 를 넣고 37°C에서 5분간 예열시킨 후 HMG-CoA를 넣고 3분간 반응시키면서 340 nm에서 흡광도의 변화를 측정하였다. 이 값을 이용하여 다음과 같이 억제활성을 계산하였다. 또한 HMG -CoA 대신 증류수를 가한 blank 실험도 동시에 수행하였다.

$$\text{HMG-CoA reductase inhibition(\%)} = (1 - \frac{A_{340} \text{ of sample} - A_{340} \text{ of sample blank}}{A_{340} \text{ of control} - A_{340} \text{ of control blank}}) \times 100$$

(6) Acetylcholinesterase inhibitory activity

치매 개선 활성은 Ellman 방법을 응용하여 측정하였다. Acetylcholinesterase(AChE)는 인산완충액(0.1M, pH 7.3)으로 균질화 시켜 0.8 units/mL가 되게 하였다. 발색시약은 DTNB(2 mM)을 인산 완충액(0.1M, pH 7.3)으로 균질화시켜 조제하였다. Eppendorff tube에 인산 완충액(0.1M, pH 7.3), 발색시약 및 시료를 넣고 AChE를 가해 최종 부피가 170 μ L가 되게 한 후 3

7°C에서 5분간 preincubation을 하였다. AChE의 기질인 acetylthiocholine iodide를 최종 농도가 0.2 mM이 되도록 가한 다음 37°C에서 1시간 incubation을 하고, 415 nm에서 UV 흡광도를 측정하였다. 위의 실험에서 대조군으로는 시료만 넣지 않고 시료 양만큼 인산 완충액을 넣은 것을 사용하였고 각 시험군은 AChE를 가한 것과 가하지 않은 것의 흡광도를 측정하여 시료 자체에 의한 흡광도 값을 제외하였다.

나. 항산화 효능

(1) 시료제조

분말 시료 10 g에 50% EtOH, 100% EtOH, DW 100 mL를 각각 가하여 6시간 동안 2회 환류 추출한 후 여액을 감압 농축하여 사용하였다.

(2) DPPH radical 소거능 시험

DPPH (α, α -diphenyl- β -picrylhydrazyl) 라디칼에 대한 소거활성은 Blois 등의 방법에 따라 시험하였다. 에탄올 적정량에 시험액 0.2 mL와 4×10^{-4} M DPPH 용액 0.8 mL를 가하여 10초간 혼합한 후 10분간 실온에서 방치 후 525 nm에서 흡광도를 측정하였다. DPPH 라디칼 소거활성은 대조구에 대한 시료 첨가구의 흡광도를 비교하여 다음과 같이 계산하였다.

$$\text{Inhibition (\%)} = (\text{Control O.D.} - \text{Sample O.D.}) / \text{Control O.D.} \times 100$$

(3) ABTS(2,2'-aziono-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid) radical 소거능

ABTS radical 소거능은 Van den Berg 등의 방법을 일부 변형하여 측정하였다. 2.0 mM AAPH (2,2'-azobis(2-amidinopropane dihydrochloride)를 radical 유도제로 사용하고, 150 μ M ABTS와 혼합하였다. 혼합액은 55°C에서 1시간 동안 반응시키고, 냉각 후 시료액과 반응시켜 734 nm에서 흡광도를 측정하였다.

(4) SOD 유사활성

SOD 유사활성 측정은 Marklund 등의 방법에 의해 측정하였다. 시료액에 Tris-HCl

buffer(pH 8.5)와 24 mM pyrogallol을 첨가하여, 420 nm에서 2분 동안 흡광도의 변화를 측정하였다. 시료액의 활성은 대조구에 대한 pyrogallol의 자동산화 억제율 (%)로 나타냈다.

(5) Hydroxyl radical 소거활성 시험

Hydroxyl radical($\cdot\text{OH}$)소거능은 2-deoxyribose oxidation법에 따라 0.1 mM FeSO_4 /0.1 mM EDTA·2Na 0.2 mL, 10 mM 2-deoxyribose 0.2 mL, 시료액 0.2 mL, 0.1 M phosphate buffer(pH 7.4) 1.2 mL를 혼합한 후 10 mM H_2O_2 0.2 mL를 가하고 37°C에서 4시간 반응시킨 후 2.8% trichloroacetic acid (TCA)용액 1 mL를 가하여 반응을 중지시키고, 1% thiobarbituric acid (TBA)/50 mM NaOH 1 mL를 가하여 100°C에서 10분간 가열시킨 후 급속히 냉각하고 532 nm에서 흡광도를 측정하여 대조구와 비교하였다.

9. 항염증효능 평가

가. 고체발효물의 70% 에탄올 추출물 제조

고체발효물 10 g에 70% EtOH 100 mL을 가해 실온에서 3시간 진탕한 후 거어즈로 1차 여과하고 3,000×g에서 30분간 원심분리하고, 상층액을 취하여 0.2µg filter(Nalgene, New York, NY, USA)로 여과하였다. 이를 rotary evaporator(EYELA, Tokyo, Japan)로 45°C에서 건조한 후 -20°C에서 보관하였다. 추출물의 지로 여과하고 감압여과(45°C)하여 농축하여 추출물을 제조하였다. 이때, 고체발효물 70% EtOH 추출물의 수율은 14%였다.

나. 대식세포 RAW 264.7에 있어서 NO (Nitric Oxide) 형성능

쥐의 대식세포인 RAW 264.7 세포주를 이용하여 NO 생성능을 측정하였으며 이때 NO의 농도는 배양 상등액 중의 NO로 Griess 시약을 이용해서 측정하였다. 먼저, 96 well plate에 well 당 1×10^5 개의 세포를 분주한 다음 4시간 동안 세포를 부착시킨 후 시료를 처리하고 16시간 동안 다시 배양하였다. 배양이 끝난 후 50 µL의 상등액을 취해 동일 부피의 Griess 시약 (1% sulfanilamide/0.1% N-(1-naphthyl-ethylenediamine dihydrochloride in 2.5% H_3PO_4)을 첨가하여 실온에서 10분간 반응시킨 후, ELISA reader (Thermo, Multiskan EX, USA)를 이용하여 540 nm의 흡광도를 측정하였다. 이때, 생성된 NO의 함량은 이의 대사물인 nitrite의 생성정

도를 측정하였으며, sodium nitrite를 이용한 검량선으로부터 산출하였다.

다. 시료의 IL-1 α 생성능

RAW 264.7 세포주는 96-well plate에 1×10^5 cells/well의 농도로 2시간 동안 부착시킨 다음 시료 추출물을 농도별로 첨가하여 16시간 배양하여 상등액을 취하였다. 상등액은 -70°C 에 보관하면서 실험에 사용하였다. 실험에 사용된 kit는 Mouse IL-1 α ELISA kit (PIERCE, USA)를 사용하였다. Biotinylated anti-mouse IL-1 α 가 pre-coat 되어 있는 96-well plate에 50 μL 의 biotinylated anti-mouse IL-1 α antibody를 넣고, 상등액 또는 표준 IL-1 α 용액을 넣은 후 실온에서 2시간 동안 반응시킨 다음 plate를 세척용 완충액으로 3회 세척하고 1.5 $\mu\text{L}/\text{mL}$ 농도의 streptavidin-HRP solution 100 μL 를 넣어 실온에서 30분간 배양하였다. 세척용 완충용액으로 3회 세척하고 발색기질용액인 TMB substrate buffer 100 μL 를 넣어 30분간 반응시켰다. 100 μL 의 stop solution을 넣어서 반응을 정지 시킨 다음에 ELISA reader (Thermo, Multiskan EX, USA)를 이용해 파장 450 nm에서 흡광도를 측정하였다. 작성한 표준곡선을 이용해 IL-1 α 의 함량을 계산하였다.

라. 시료의 TNF- α 생성능

RAW 264.7 세포주는 96-well plate에 1×10^5 cells/well의 농도로 2시간 부착시키고 시료를 농도별로 첨가한 후 다시 16시간 동안 배양하여 상등액을 취하였다. 상등액은 -70°C 에 보관하여 실험에 사용하였다. 실험에 사용한 kit는 Mouse TNF- α ELISA kit (PIERCE, USA)를 사용하였다. Biotinylated anti-mouse TNF- α 가 pre-coat 되어 있는 96-well plate에 50 μL 의 biotinylated anti-mouse TNF- α antibody를 넣고, 준비된 상등액 또는 표준 TNF- α 용액을 넣은 후 실온에서 2시간 반응시켰다. plate는 세척용 완충액으로 5회 세척하고 1.5 $\mu\text{L}/\text{mL}$ 농도의 streptavidin-HRP solution 100 μL 를 넣어 실온에서 30분간 배양하였다. 세척용 완충용액으로 5회 세척하고 여기에 발색기질용액인 TMB substrate buffer 100 μL 를 넣어 30분간 반응시켰다. 100 μL 의 stop solution을 넣어서 반응을 정지 시킨 다음, ELISA reader (Thermo, Multiskan EX, USA)를 이용해 파장 450 nm에서 흡광도를 측정하고 작성한 표준곡선을 이용해 TNF- α 의 함량을 계산하였다.

제 2 절 연구결과 및 고찰

1. 생물전환을 위한 최적 고체발효 조건 설정

가. 미생물 분리 및 동정

본 연구의 향당노 개선, 간질환개선 및 아토피 피부염 억제를 위한 고체발효 시스템을 구축하기 위해 전통발효식품인 청국장과 된장으로부터 고열에서 생존가능한 5종의 미생물을 분리하여 동정하였다. 그 결과 표 9에서와 분리한 5종의 균주는 *Bacillus* 균주의 일반적인 형태학적 등의 특징을 가지고 있는 것으로 나타났으며 API kit에 의한 분석과 16S RNA 프라이머를 이용한 DNA sequence 분석에 의해 분리한 5종의 균주는 각각 *Bacillus sp.*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus sonorensis*, *Bacillus circulans* 인 것으로 동정되었다. 이들 균주는 각각 *Bacillus sp.* KS-25, *Bacillus subtilis* KS-29, *Bacillus licheniformis* KS-30, *Bacillus sonorensis* KS-33, *Bacillus circulans* KS-80 균주로 명명하였다.

한편, 상기의 미생물들을 한국유전자은행(대전광역시 유성구 어은동 52번지 소재)을 기탁기관으로 하여, *Bacillus sp.* KS-25는 KCTC 11351BP, *B. subtilis* KS-29는 KCTC 11352BP, *B. licheniformis* KS-30는 KCTC 11353BP, *B. sonorensis* KS-33는 KCTC 11354BP, *B. circulans* KS-80는 KCTC 11355BP로서 2008년 6월 25일자로 각각 기탁하였다.

나. 인삼을 이용한 생물전환 효율

기능성 고체발효물을 제조하기 위해 선발된 미생물의 생물전환능을 조사하고자 하였다. 인삼에 복합미생물을 접종하여 발효시켜 진세노사이드 함량변화를 조사하였다. HPLC로 진세노사이드의 크로마토그래피 패턴을 조사한 결과 그림 8에서와 같이 발효에 의해 크로마토그래피 패턴이 완전히 다르게 나타났으며 그 함량을 분석한 결과는 표 10에서와 같이 백삼의 주요 성분 함량이 $Rb1 > Re > Rg1$ 의 순이었으나 발효에 의해 전환되어 $Rb2+Rb3 > Rd > Rg1$ 으로 생물전환된 것으로 나타났다. 또한 본 연구에서 선발한 복합미생물은 triol 계열의 $Rg1$ 과 Re 에 대해서 보다 diol 계열의 4개의 glucose로 이루어진 $Rb1$ 에 대해 강한 생물전환능을 가지고 있어 glucose가 2개인 $Rg3$ 가 59배, glucose가 1개인 Rd 가 11배 발효에 의해 증가하는 것으로 나타나 개발 미생물은 인삼의 진세노사이드에 대해 강한 생물전환능을 가지고 있는 것으로 사료된다. 총 진세노사이드 함량도 1.6배 증가하였다. 그러나 $Rb1$ 의 경우 발효에 의해

2.47 mg/g이 감소한 반면 Rg3와 Rd가 각각 1.73, 6.55 mg/g이 증가하여 Rb1의 감소된 양보다 많은 양이 생성되어 그 이유에 대해서는 아직 불명확하다. 또한 총 진세노사이드 함량도 1.6배 증가한 결과에 대해서도 아직 그 이유가 밝혀지지 않았다.

표 9. 균주의 생리적 및 생화학적 특성

	KS25	KS29	KS30	KS33	KS80
카탈라제 반응	+	+	+	+	+
그람 반응	+	+	+	+	+
세포 형태	rod	rod	rod	rod	rod
포자 형성	+	+	+	+	+
성장 15°C	+	+	+	+	+
45°C	+	+	+	+	+
당이용 능력					
L-아라비노스	-	-	-	-	+
D-사이로스	-	-	-	-	+
D-갈락토스	-	-	-	-	+
D-글루코스	+	+	+	+	+
D-프락토스	+	+	+	+	+
D-만노스	+	+	+	+	+
D-만니톨	+	+	+	+	+
D-솔비톨	+	+	+	+	+
메칠-αD-글루코피라노사이드	-	-	-	-	+
N-아세틸 글루코스아민	-	-	-	+	+
아미그달린	-	-	-	-	+
아르부틴	-	-	-	-	+
에스쿨린 웨릭시트레이트	+	+	+	+	+
살리신	-	-	-	-	+
D-셀로비오스	+	+	+	+	+
D-말토스	+	+	+	-	+
D-락토스	+	+	-	-	+
D-멜리비오스	-	-	-	-	+
D-수크로스	+	+	+	+	+
D-트레할로스	-	-	-	-	+
이눌린	-	-	-	-	+
D-멜레지토스	-	-	-	-	+
D-라피노스	-	-	+	-	+
스타치	-	-	-	-	+
글리코젠	-	-	-	-	+
실리톨	-	-	-	-	+
젠티오비오스	-	-	-	-	+
D-투라노스	-	-	-	-	+
포타슘 글루코네이트	-	-	-	-	+
포타슘 2-케토글루코네이트	-	-	-	-	+
균주명	<i>Bacillus sp</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>B. licheniformis</i>	<i>B. sonorensis</i>	<i>B. circulans</i>

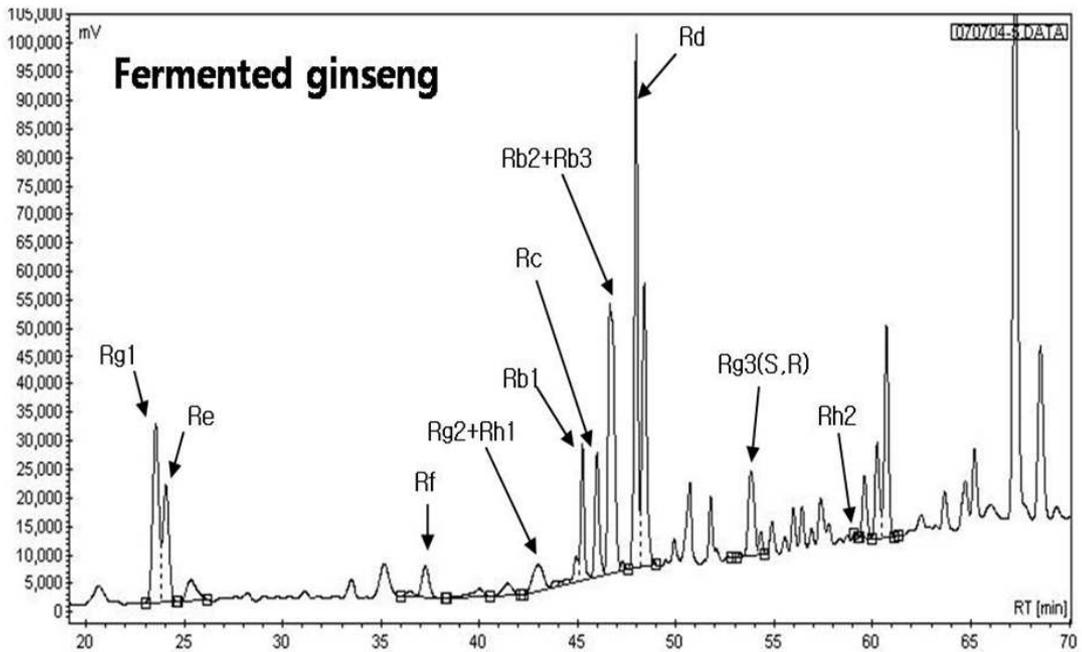
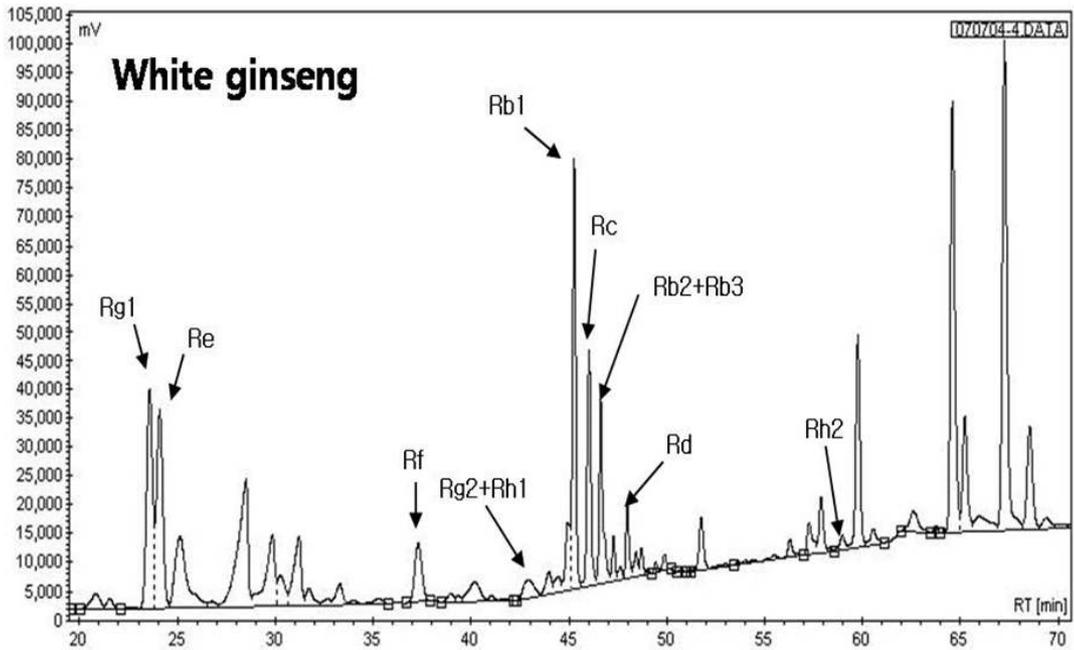


그림 8. 비발효인삼과 발효인삼의 ginsenosides chromatography pattern

표 10. 백삼과 발효인삼의 진세노사이드 함량

Ginsenosides	Contents (mg/g)	
	White ginseng	Fermented ginseng
Rg1	3.21	4.04
Re	3.48	3.14
Rf	0.99	0.80
Rg2 + Rh1	0.38	0.82
Rb1	4.93	2.46
Rc	3.03	2.62
Rb2 + Rb3	2.11	7.65
Rd	0.66	7.21
Rg3	0.03	1.76
Rh2	0.09	0.07
Sum	18.91	30.57

한편 발효에 의해 변화되는 항산화력에 대해 조사하였다. 50% ethanol로 추출 시 비발효인삼의 경우, DPPH와 ABTS 라디칼 소거활성이 가장 높게 나타나 각각 73%, 100%이었다(그림 9 - 12). 발효인삼에서는 50% ethanol로 추출 시 2-deoxyribose의 산화 억제율 가장 높게 나타나 100% 억제되었으며 SOD(superoxide anion dismutase) 유사 활성은 100% ethanol로 추출 시 가장 높은 60%의 활성이 있는 것으로 나타났다.

이와 같은 결과로부터 비발효 인삼에서는 라디칼 소거활성에 강한 영향을 미치는 것으로 나타났으나 인삼의 발효에 의해 산화방어 작용 쪽으로 효능이 전환되는 것으로 나타났다.

따라서 선발된 복합미생물은 인삼의 진세노사이드의 패턴과 항산화활성의 변화에 크게 영향을 미침으로서 강한 생물전환능이 있는 것으로 판단된다.

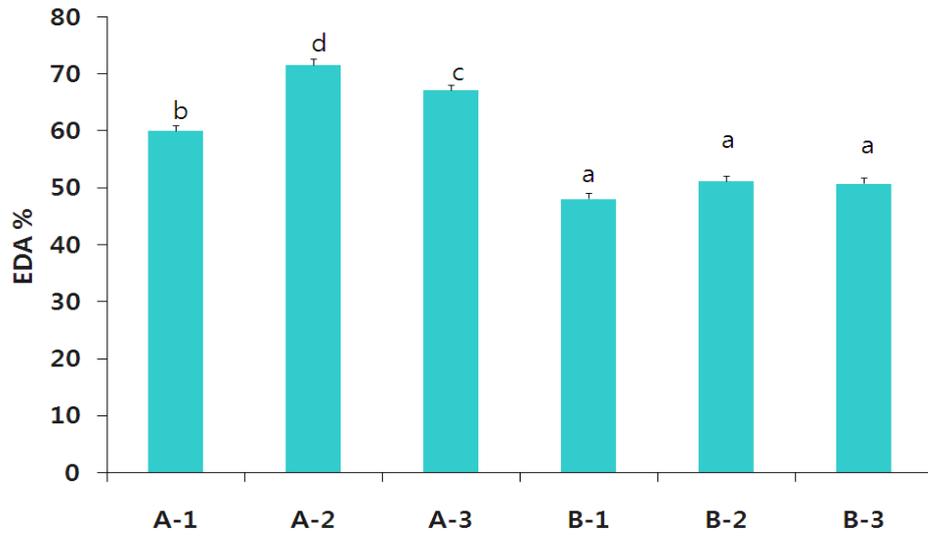


그림 9. 비발효인삼과 발효인삼의 DPPH 라디칼 소거능

- 1) A: white ginseng, B: fermented ginseng, -1: absolute ethanol, -2: 50% ethanol, -3: water
- 2) Mean \pm S.D
- 3) Values within a column with different superscripts are significantly different a $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test. (NS: not significant)

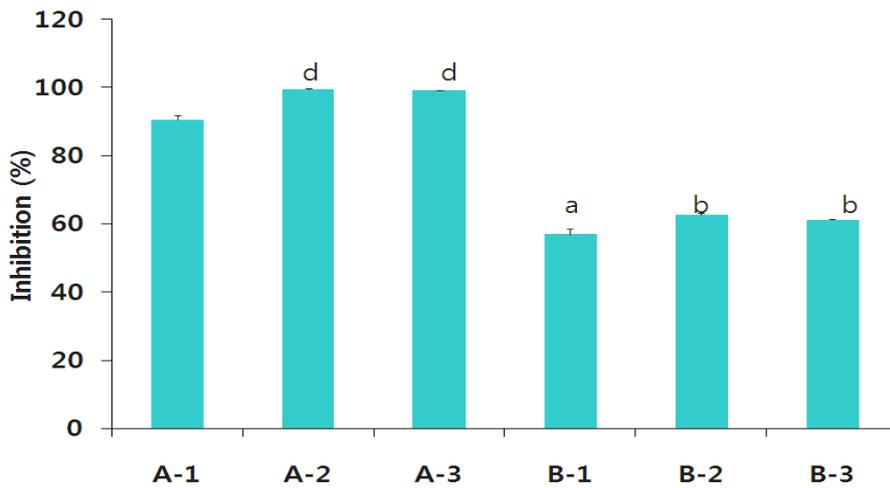


그림 10. 비발효인삼과 발효인삼의 ABTS 라디칼 소거능

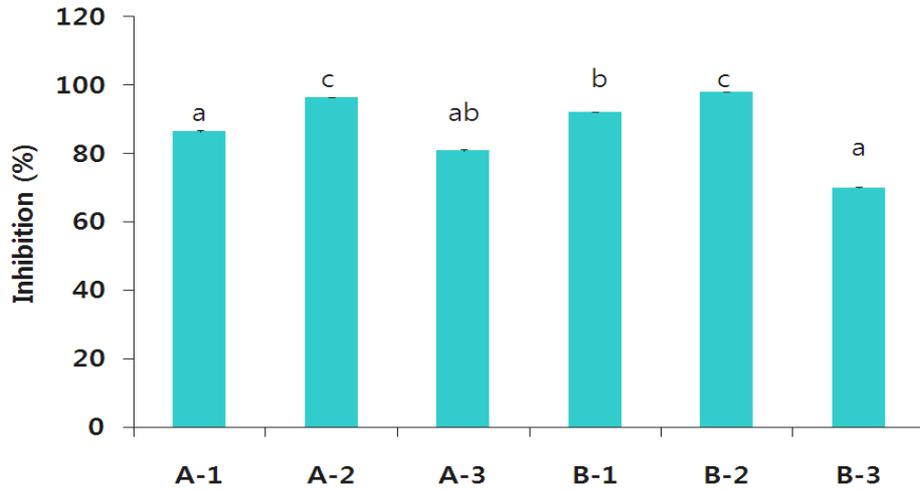


그림 11. 비발효인삼과 발효인삼의 2-deoxyribose의 산화억제능

- 1) A: white ginseng, B: fermented ginseng, -1: absolute ethanol, -2: 50% ethanol, -3: water
- 2) Mean \pm S.D
- 3) Values within a column with different superscripts are significantly different a $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test. (NS: not significant)

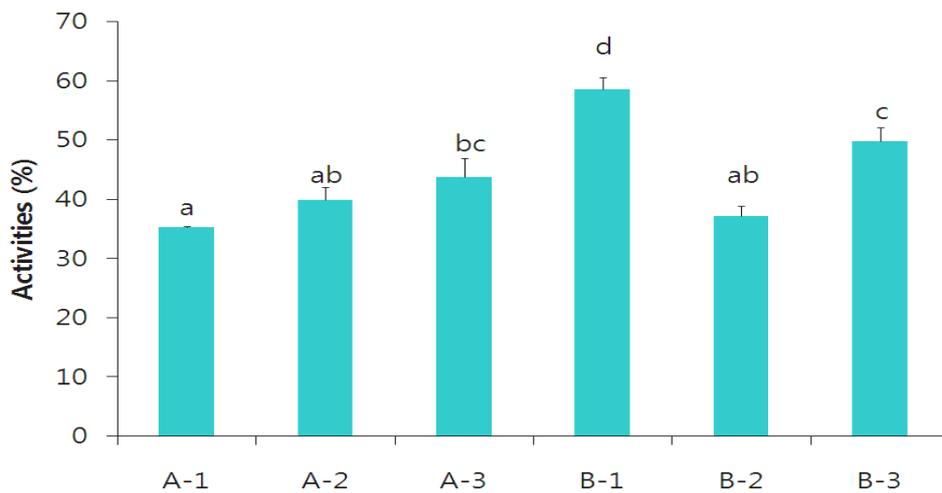


그림 12. 비발효인삼과 발효인삼의 SOD 유사활성

2. 고체발효물의 특성

가. 성분분석

발효물의 성분을 분석한 결과, 표 11에서와 같이 버섯류에 다량 함유되어 있는 β -glucan의 함량이 4.4 g/100 g으로 비교적 높게 나타났고 특이하게도 아미노산 중에서도 glutamic acid가 2.83 g/100 g, aspartic acid가 2.00 g/100 g으로 높게 나타났다.

표 11. 발효물의 이화학적 분석결과

분석시험항목	결과	검출한계	주	방법
ergosterol	1.26mg/100g			HPLC법
β -glucan	4.4g/100g			효소법
아미노산			1	아미노산 자동분석기
arginine	1.13g/100g			
lysine	0.66g/100g			
histidine	0.58g/100g			
phenylalanine	0.89g/100g			
tyrosine	0.54g/100g			
leucine	1.37g/100g			
isoleucine	0.74g/100g			
methionine	0.30g/100g			
valine	0.98g/100g			
alanine	1.07g/100g			
glycine	0.99g/100g			
proline	0.92g/100g			
glutamic acid	2.83g/100g			
serine	0.89g/100g			
threonine	0.76g/100g			
aspartic acid	2.00g/100g			
tryptophan	0.25g/100g			
cystine	0.37g/100g			

주1. formic acid 처리 후, 염산 가수분해하여 측정

나. 미생물 균수

고체발효물의 안전성을 확인하기 위해 일반세균, 대장균, 효모, 황색포도상구균 수를 조사하였다. 그 결과, 표 12에서와 같이 일반세균수는 3.3×10^5 CFU/g이었으며 병원성균인 대장균, 황색포도상구균과 효모는 검출되지 않았다.

표 12. 발효물의 균수 측정

분석시험항목	균수 (CFU/g)
일반세균수	3.3×10^5
대장균군	음성
효모수	음성
황색포도상구균	음성

발효물에 존재하는 미생물의 특성을 조사하기 위해 인공위액, 인공장액 및 열 처리에 따른 균수를 측정하였다. 그 결과, 표 13에서와 같이 인공위액(pH 1.4)과 인공장액(pH 6.8)에 의한 발효균주의 생육저해 현상은 없는 것으로 나타났다. 이러한 결과는 본 발효물에 존재하는 미생물들은 항산성 효과가 매우 뛰어난 미생물로 구성되어 발효미생물에 의한 생리적 기능도 충분히 고려해야 할 대상인 것으로 사료된다.

한편, 95°C에서 10분간 열처리한 결과에서도 열처리 후 24시간 경과한 경우에도 균수가 무처리군과 비슷하며 또한 저장 시간이 72시간 경과한 시점에서 5.45×10^{10} 의 균이 검출되어 본 발효물의 발효미생물들은 열안정성이 매우 뛰어난 것으로 사료된다.

표 13. 처리조건별 생균수의 변화

시험항목	균수	주
무처리	$2.91 \times 10^5/g$	1
인공위액처리	$2.71 \times 10^5/g$	2
인공장액처리	$3.35 \times 10^5/g$	3
가열처리후; 0시간	$1.32 \times 10^5/g$	4
; 24시간	$1.20 \times 10^5/g$	4
; 48시간	$2.31 \times 10^8/g$	4
; 72시간	5.45×10^{10}	4

주1. 식품위생검사지침에 준하여 표준한천평판배양법에 따라 일반생균수를 측정함

주2. 검체를 10배량의 인공위액(pH 1.4)에 현탁하고 37°C에서 2.5시간 처리한 후, 균수측정

주3. 검체를 10배량의 인공장액(pH 6.8)에 현탁하고 37°C에서 2.5시간 처리한 후, 균수측정

주4. 검체를 10배량의 생리식염수에 현탁하고 95°C에서 10분간 가열한 후, 35°C에서 0, 24, 48, 72시간 보온한 후, 균수 측정

※ 인공위액 : 염화나트륨 0.1 g에 1M 염산 1.2 mL를 가하고, 이온교환수로 50 mL로 맞추고 37°C에서 pH가 1.4가 되도록 조제하였다.

※ 인공장액 : 인산이수소칼륨 0.544 g을 소량의 이온교환수로 용해시킨 후, 0.2 M수산화나트륨 수용액 5.9 mL를 가하고 이온교환수로 전량을 50 mL로해서, 37°C에서 pH가 6.8이 되도록 조제하였다.

※ 생리식염수 : 염화나트륨 0.85 g을 이온교환수에 용해하고 전량을 100 mL로 하였다.

다. 독성시험

(1) 세포독성

고체발효물 70% EtOH 추출물의 농도별 (25, 50, 100 ug/mL)로 간암세포주인 Hepa1c1c7과 대장의 정상세포주인 CHO-K1와 16시간 반응시켜 MTT assay를 실시하여 cell viability를 측정하였다. 그 결과, 그림 13과 14에서와 같이 추출물 100 ug/mL 이하의 농도에서 16시간 처리하였으나 cell viability에 대해 control과 동일한 결과로 나타났다. 따라서 개발한 고체발효물은 유의한 세포독성이 없음이 확인되었다.

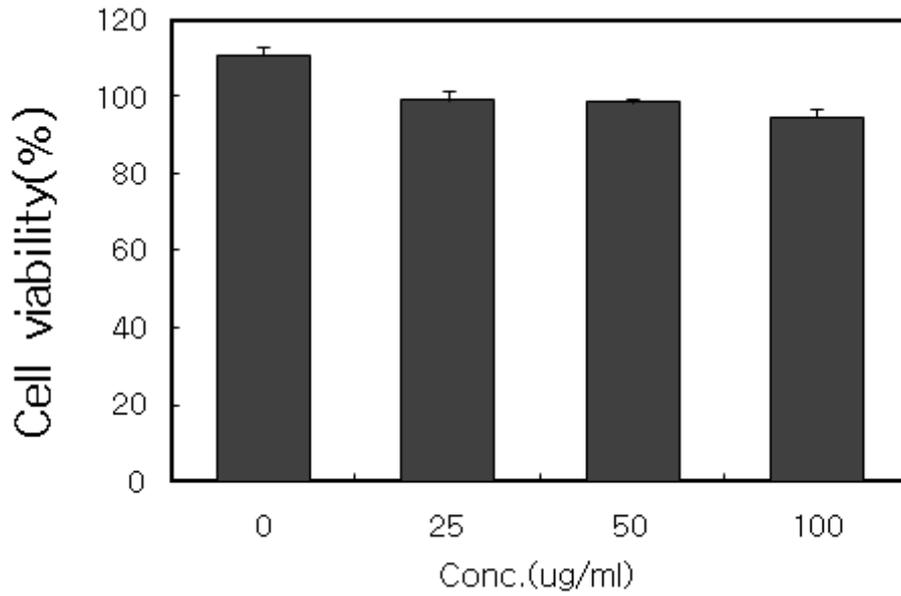


그림 13. 고체발효물 70% EtOH 추출물이 CHO-K1 세포의 cell viability에 미치는 영향

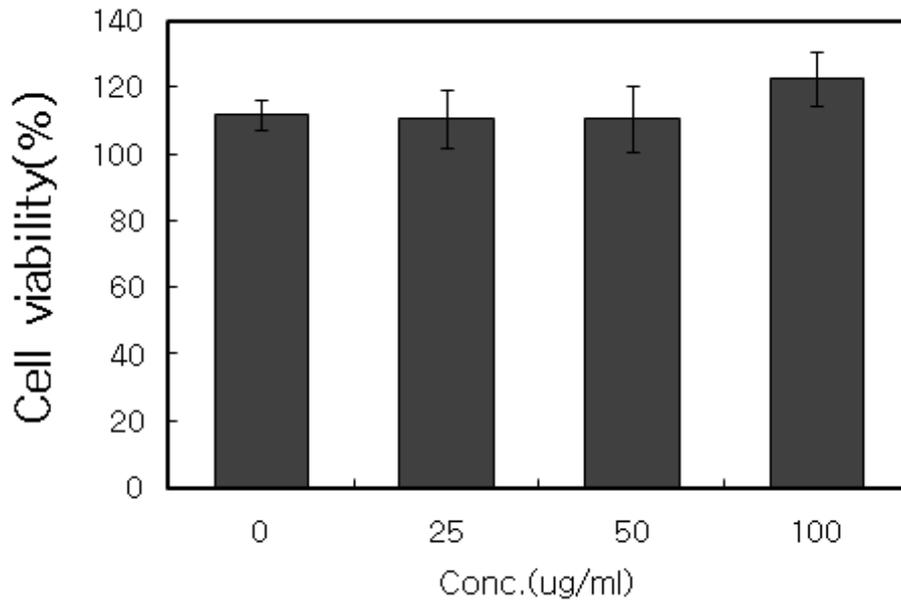


그림 14. 고체발효물 70% EtOH 추출물이 Hepa1c1c7 세포의 cell viability에 미치는 영향

(2) 급성경구독성시험

(가) 사망사례

모든 처리군에 있어서 관찰 기간 중 사망예가 없었다.

(나) 일반상태

모든 처리군에 있어서 관찰 기간 중 이상은 없었다.

(다) 체중변화

투여 후 7일 및 14일의 체중측정에 있어도 암수 모두의 시험군은 대조군과 비교하여 체중에 차이가 없었다(표 14와 15).

표 14. 체중변화(암)

투여군	투여 전	투여 후(일)	
		7	14
시험군	32.1 ± 0.7 (5)	35.8 ± 1.8 (5)	35.8 ± 1.7 (5)
대조군	31.7 ± 0.6 (5)	35.3 ± 1.8 (5)	37.9 ± 1.2 (5)

체중은 평균치 표준 ± 편차로 나타냄 (단위: g)
괄호 내에 마우스 수를 표시

표 15. 체중변화(수)

투여군	투여 전	투여 후(일)	
		7	14
시험군	26.0 ± 0.9 (5)	28.8 ± 1.0 (5)	31.2 ± 0.9 (5)
대조군	26.3 ± 0.8 (5)	30.1 ± 1.2 (5)	32.0 ± 1.2 (5)

체중은 평균치 표준 ± 편차로 나타냄 (단위: g)
괄호 내에 마우스 수를 표시

(라) 부검소견

관찰기간 종료 시의 부검에서는 암수 모두에 어떠한 이상도 없었다.

(마) 고찰

고체발효물에 있어서 마우스를 사용한 급성경구독성시험을 실시하였다. 고체발효물을 5,000mg/kg 용량으로 단회경구투여를 한 결과, 관찰기간 중에 이상 및 사망예가 없었다. 따라서 검체인 마우스의 단회경구투여에 있어서의 LD50 값이 암수 모두 5,000mg/kg 이상일 것으로 사료된다.

3. In vitro 효능

가. 기능성 효소활성

발효물을 물로 추출하고 동결건조한 시료를 대상으로 활성 및 활성저해효과를 조사한 결과, 표 16에서와 같이, 고혈압저해활성(ACE inhibitory activity), 간 기능개선능(GST activity)에서 높은 활성이 검출되었다. 본 과제는 항당뇨 효능에 포커스를 맞추고 있으나 간 기능개선과 항고혈압과 관련된 연구도 추진할 가치가 있을 것으로 판단되어 간질환 관련 전임상시험인 동물에 의한 효능 평가를 추가하여 연구를 진행하였다.

표 16. 각종 효소활성

	Fibrinolytic activity (mm)	ACE inhibitory activity (%)	Tyrosinase inhibitory activity (%)	GST activity (%)	HMG-CoA reductase inhibitory activity (%)	Acetylcholinesterase inhibitory activity (%)
	¹⁾ n.d	72.1±0.5	15.9±2.3	92.4±2.4	n.d	3.3±0.5
농도	100µg	1mg	1mg	100µg	100µg	10µg

¹⁾ n.d : not detected

나. 항산화 효능

발효물의 항산화활성에 대해 조사하였다(그림 1-4)을 측정하였다. 물, 50% 및 100% ethanol로 발효물을 추출하여 조사하였으며 positive control로 항산화제인 Trolox를 사용하였다. 고체 발효물의 항산화 효능을 측정한 결과, DPPH 라디칼 소거능은 모든 처리조건에서 90%의 소거능이 확인되었으며 50% ethanol로 추출하였을 때 가장 높은 93.5%가 억제되어 Trolox와 유사한 소거능이 있는 것으로 나타났다(그림 15).

ABTS 소거능의 경우는 모든 처리조건에서 95% 이상의 소거능이 확인되었으며 50% ethanol로 추출하였을 때 Trolox와 유사하게 100%에 가까운 소거능이 확인되었다(그림 16).

2-deoxyribose의 산화억제능은 모든 처리조건에서 88% 이상의 산화억제능이 확인되었으며 50% ethanol로 추출하였을 때 Trolox와 유사한 97%의 억제효능이 확인되었다(그림 17).

SOD 유사활성은 50% ethanol로 추출하였을 때 38%의 활성이 있었으며 이때 Trolox의 경

우는 53%였다(그림 18).

이와 같이 본 연구에서 개발한 고체발효물은 항산화제인 Trolox와 유사한 정도의 항산화 효능이 있는 것으로 밝혀져 항산화소재로서의 가능성이 매우 높은 것으로 판단된다.

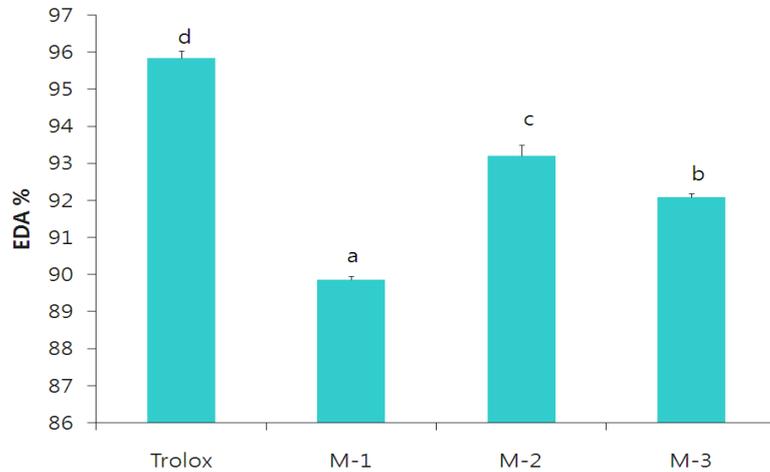


그림 15. 고체발효물의 DPPH 라디칼 소거능

- 1) Trolox: 1 mg/mL, M: fermented materials(100 mg/mL), -1: absolute ethanol, -2: 50% ethanol, -3: water
- 2) Mean \pm S.D
- 3) Values within a column with different superscripts are significantly different a $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test. (NS: not significant)

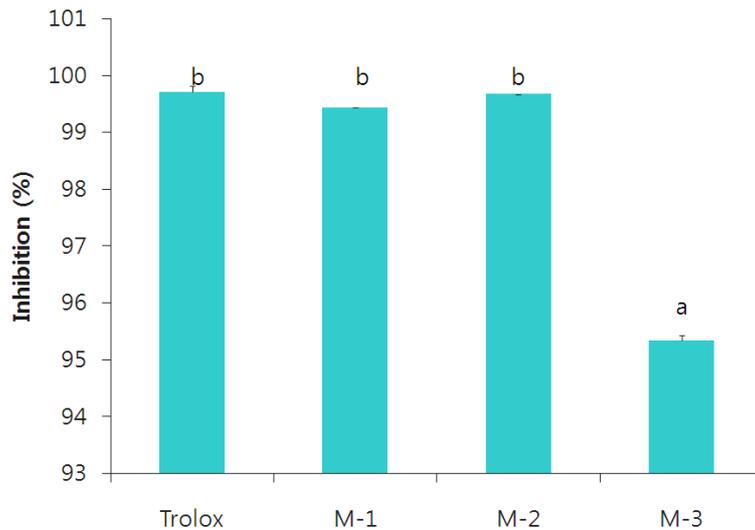


그림 16. 고체발효물의 ABTS 라디칼 생성 억제능

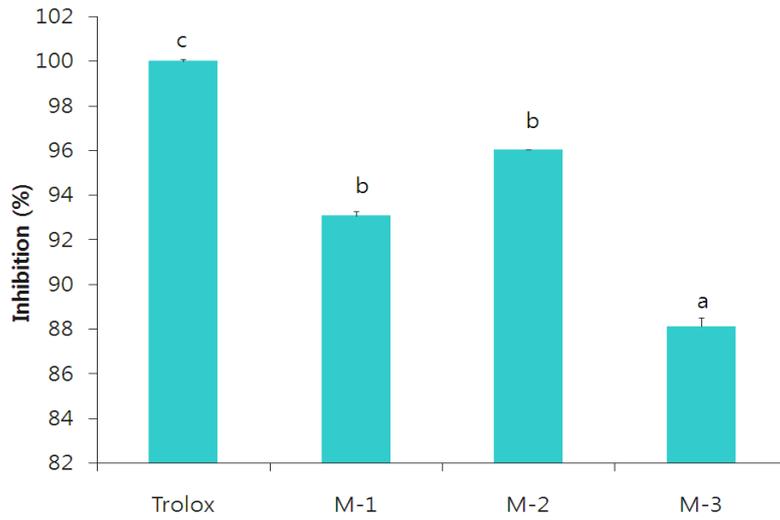


그림 17. 고체발효물의 2-deoxyribose 산화 억제능

- 1) Trolox: 1 mg/mL, M: fermented materials(100 mg/mL), -1: absolute ethanol, -2: 50% ethanol, -3: water
- 2) Mean \pm S.D
- 3) Values within a column with different superscripts are significantly different a $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test. (NS: not significant)

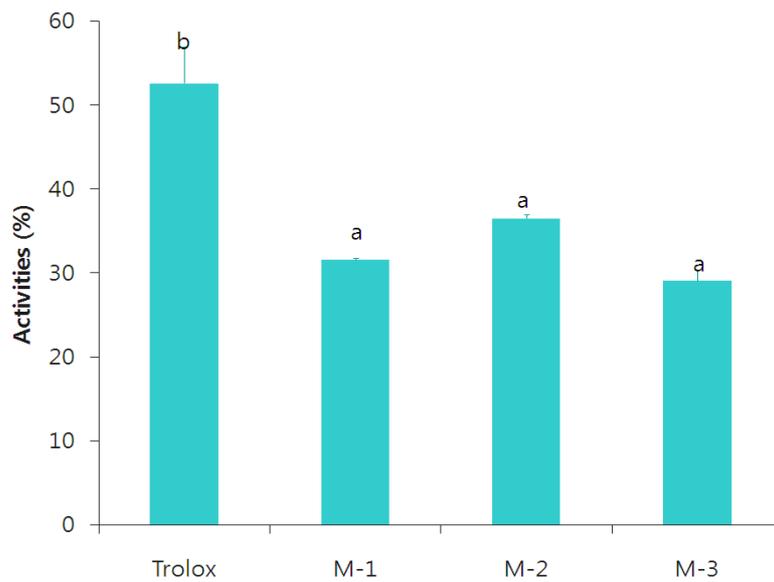


그림 18. 고체발효물의 SOD 유사활성

4. 항당뇨 효능

가. 동물모델 효능 평가

오늘날 사회의 발전은 경제성장과 더불어 국민소득의 증대를 가져왔고, 이로 인해 사람들의 식생활 패턴 또한 서구화되면서 당뇨병의 유병율이 증가 되고 있다. 통계청의 발표에 따르면 2006년도 사망원인통계를 보면 인구 10만 명 당 당뇨병이 23.7명으로 4번째로 차지했으며, 사망원인으로 지난 10년 동안 암 질환 다음으로 많이 증가하였다.

당뇨병은 인슐린의 절대적 및 상대적 결핍으로 인하여 야기되며 여러 조직에서 인슐린 작용저하에 의한 당질, 지방, 단백질 등의 대사 장애를 비롯하여 각종 병리학적 증세를 초래한다. 일반적으로 혈중 중성지방 및 LDL-Cholesterol, 과산화물 증가, HDL-Cholesterol의 감소 등에 의해 지질대사의 이상과 함께 모세혈관의 상피세포막이 두꺼워져 심장순환기계 질환(coronary heart disease, CHD) 등 많은 합병증 유발이 문제시 되고 있는 고혈당이 특징인 질환이다.

이러한 당뇨병의 증세를 개선하기 위한 약물요법 중 현재 경구용 혈당강하제로 설폰닐요소제, 메트포르민, α -glucosidase 저해제 등이 사용되고 있다. 그러나 이러한 약물들은 저혈당, 간독성, 체중증가, 복부팽만감, 젖산증 등의 부작용을 유발하기 때문에 약물요법 이외의 당뇨병 개선에 효과적인 천연식물의 생리활성에 대한 연구들이 국내외에서 활발히 이루어지고 있다. 최근 까지 보고된 동물실험 혹은 인체실험을 통한 혈당강하 및 당뇨개선 효과에 미치는 천연 식물성 소재로는 대두와 그 단백질 및 생리활성 성분, 인삼과 홍삼 및 그 추출 분획물 그리고 약용식물 등 다양한 종류가 있다. 이처럼 천연식물에 대한 연구가 활발히 진행되는 반면 발효물에 대한 연구는 미비하다고 할 수 있다. 따라서 본 실험에서는 제 2형 당뇨모델인 KK-A^y/Ta Jcl (유전적 비만 2형 당뇨모델) 마우스에 발효물을 첨가한 식이를 10주간 공급 하여 혈당, 당화혈색소, 혈청 Glucose, 혈청 insulin, Triglyceride, Total Cholesterol, HDL-cholesterol을 분석하고, 간, 신장, 비장의 장기 무게를 측정하여 발효물의 항 당뇨 효과를 살펴 보고자 하였다.

(1) 발효물질이 체중변화, 식이 및 음용수 섭취량에 미치는 영향

실험기간 동안 체중변화, 식이 및 음용수 섭취량 변화는 표 17과 같다. 평균 식이섭취량은 D군(기본사료섭취군)이 DF1(기본사료에 발효물을 0.08% 혼합한 사료 섭취군)과 DF2(기본사료에 발효물을 0.4% 혼합한 사료 섭취군)에 비해 유의적으로 높게 나타났다.($p < 0.001$) 이는 STZ로 유도된 당뇨쥐의 경우 정상쥐에 비해 유의적으로 식이섭취량이 높다고 보고되었으며 이는

인슐린이 결핍된 쥐에게서 NPY (neuropeptide) mRNA의 증가와 시상하부의 leptin 수용체의 작용저하로 식이 섭취량이 현저히 증가하였고 인슐린이 보충되었을 때는 이러한 식이 섭취량의 증가는 감소되었다는 보고에서의 인슐린 작용에 비추어 볼 때 발효물의 섭취가 인슐린의 식이 섭취와 관련한 작용과 유사한 역할을 한다고 사료된다. 식이효율은 DF2가 95.58%로 D군 87.83%, DF1 89.06%에 비해 가장 우수하였으며, D군이 가장 낮았다. 이처럼 D군의 식이섭취량이 DF1과 DF2에 비해 유의적으로($p<.0001$) 높았음에도 불구하고 식이효율은 가장 낮은 것은, 당뇨의 전형적인 증상 중의 하나로 당뇨에 의한 체내 대사의 퇴행적인 변화 때문인 것으로 생각된다. 이러한 결과를 토대로 발효물의 섭취가 당뇨에 있어서 체내 대사에 어느 정도 영향을 미치는 것으로 사료된다. 또한 음용수 섭취량에서도 실험기간 동안 D군은 28.42 mL/day, DF1은 23.16 mL/day, DF2는 18.70 mL/day로 식이의 발효물 첨가함량이 높을 수록 유의적인 감소 효과를 나타내었다.($p<.0001$) 이 결과로부터 발효물이 당뇨의 대표적인 증상인 다식과 다음 현상에 영향을 미친다고 사료되며, 발효물의 함량이 가장 높은 DF2가 뛰어난 효과를 나타내었다.

표 17. 실험동물 KK-A^y 마우스의 사료 및 음용수 섭취량과 체중 변화

Group	Change of body weight (g/day)	Food intake (g/day)	FER(%) ²⁾	Water intake(ml/day)
D ¹⁾	5.71±0.49	6.70±0.30 ^{a*}	87.83±6.39	28.42±2.48 ^{a*}
DF1	5.69±0.42	6.54±0.41 ^a	89.06±7.10	23.16±2.20 ^b
DF2	5.57±0.50	5.93±0.29 ^b	95.58±8.24	18.70±1.64 ^c

¹⁾D ; Diabetic control group, DF1 ; Diabetic group with the supplementation of Fermented Product 0.08%, DF2 ; Diabetic group with the supplementation of Fermented Product 0.4%

²⁾FER (food efficiency ratio) = [body weight gain (g) / food intake (g)] × 100

Each value represents the mean±S.D.

Significance of the difference among the group(* ; $p<.0001$)

(2) 혈당수준의 변화

실험기간 동안 매주 공복 없이 측정된 혈당 수치는 그림 19와 같다. 실험 식이를 시작 전

D, DF1, DF2의 혈당은 각각 313 mg/dL, 301 mg/dL, 311 mg/dL 이었으며, 첫째 주 D, DF1, DF2의 혈당은 각각 440mg/dL, 394 mg/dL, 392 mg/dL로 셋째 주까지는 혈당의 상승이 보이다가 넷째 주 부터는 감소가 나타나 실험식이 10주 동안 지속적으로 억제 되었다. 또한 DF2의 혈당이 D군과 DF1에 비해 유의적으로($p<.05$, $p<.01$, $p<.001$, $p<.0001$) 낮은 수치를 보였다. 실험식이 종료 시 혈당은 D군이 353 mg/dL, DF1이 235 mg/dL 이었으며, DF2의 경우는 실험식이 넷째주 후부터 혈당이 급격하게 저하되어 실험 다섯째 주 에는 초기혈당 값 311 mg/dL 보다 낮게 측정되었으며, 식이 종료 시점에는 D군이 약 400 mg/dL이었으나 실험군인 DF2군은 186 mg/dL로 급격히 저하되었다. 따라서 발효물질의 함량이 높을 수록 혈당의 감소가 유의적으로($p<.01$) 크게 감소하는 것으로 나타났다.

Lawes 등의 연구 결과 공복 시 혈당이 1 mmol/L 낮아짐에 따라 발작(stroke) 위험률은 21% 감소되었고, 허혈성 심장질환의 위험률은 23% 감소되었다고 하여 당뇨병의 혈당 관리에 대한 중요성을 제시하였다. 본 연구에서의 발효물 섭취는 혈당 수준을 유의적으로 낮추어 당뇨병에서의 혈당 관리에 효과가 있는 것으로 사료된다.

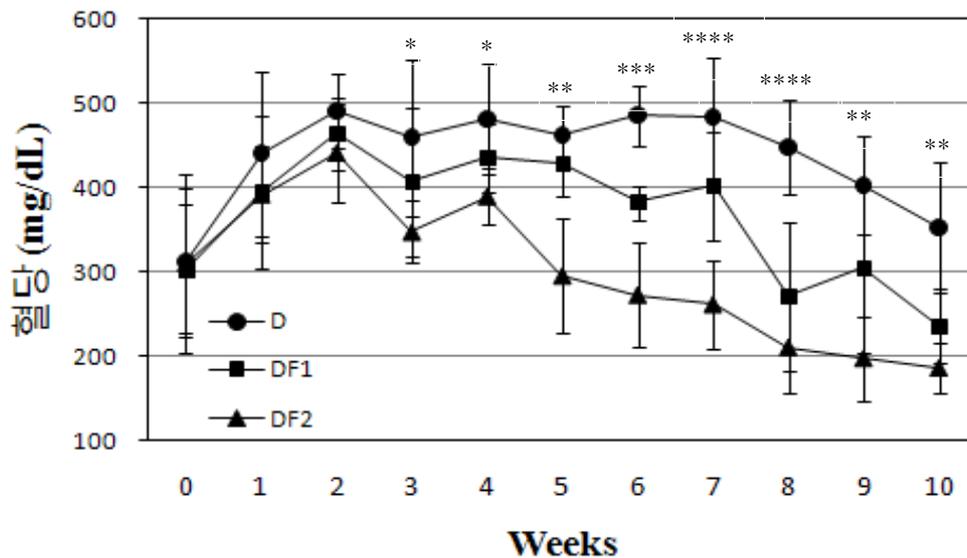


그림 19. 고체발효물 식이에 의한 KK-A^y 제2형 당뇨 마우스의 혈중 glucose 함량 변화

Each plot denotes the mean±S.D.

D ; Diabetic control group, DF1 ; Diabetic group with the supplementation of Fermented Product 0.08%, DF2 ; Diabetic group with the supplementation of Fermented Product 0.4%

Significantly different from respective group KK-A^y mice (* ; $p<.05$, ** ; $p<.01$, *** ; $p<.0001$; **** ; $p<.001$)

(3) 혈청 Glucose 농도

실험식이 종료 후 혈청 Glucose를 분석한 결과는 그림 20과 같다. 혈청 glucose 농도는 D군이 494.60 mg/dL, DF1이 313.20 mg/dL, DF2가 260.60 mg/dL로, D군에 비해 DF1과 DF2에서 유의적인 감소 효과를 나타내었다.($p < .01$) 현재 인슐린, 약제 및 식품 등의 투여에 의한 당뇨병 환자에서의 혈당강하 기작은 명확하게 밝혀지지 않았지만 포도당에 대한 인슐린 감수성 증진, 베타세포 손상완화, 베타세포의 회복 또는 재생 등으로 알려져 있으며, 이외에도 간세포 내 glucokinase, glucose-6-phosphate dehydrogenase, fatty acid synthetase 및 acetyl CoA carboxylase 등의 효소 조절을 통한 혈당강하 기작이 보고되고 있다. 본 연구에서의 혈청 glucose 농도 감소는 D군에 비해 DF1과 DF2에서의 혈청 인슐린 감소 결과와 함께 생각해 볼 때(그림 20) 인슐린의 역할을 일부 대행함으로써 인슐린의 감수성을 증진시켜 혈청 glucose의 농도를 감소시키는 것으로 사료된다.

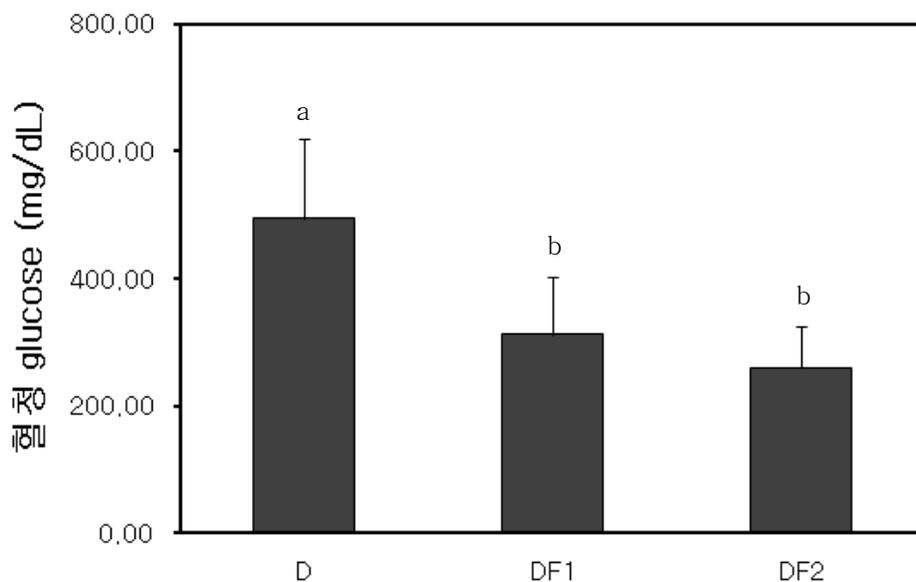


그림 20. 고체발효물을 10주간 식이한 KK-A^y 마우스의 혈청 glucose 함량

The bar represent mean±S.D.

Significantly different from respective group KK-A^y mice, $p < .01$

D ; Diabetic control group, DF1 ; Diabetic group with the supplementation of Fermented Product 0.08%,

DF2 ; Diabetic group with the supplementation of Fermented Product 0.4%

(4) 혈청인슐린 농도

실험식이 종료 후 혈액을 채취하여 혈청인슐린 농도를 분석한 결과는 그림 21과 같다. D군의 혈청 인슐린 농도는 896.72 ng/mL 이었으며, DF1은 766.64 ng/mL, DF2는 837.86 ng/mL로 D군과 비교하여 혈청 인슐린이 감소하였으나 유의적이지는 않았다.

인슐린, 약제 및 식품 등의 투여에 의한 당뇨병 환자 에서의 혈당강하 기작 중 명확하게 밝혀지지 않았지만 포도당에 대한 인슐린 감수성증진, 베타세포 손상완화, 베타세포의 회복 또는 재생 등과 Kubo와 Nanba, 박 등의 제2형 당뇨병모델인 KK-A^y 마우스의 잎새버섯 식이의 혈당 및 인슐린함량 측정결과 대조군에 비해 혈당과 인슐린함량이 실험군에서 유의적으로 감소한 결과에 대해 잎새버섯에 의한 인슐린 민감성 향상에 의한 메커니즘으로 예상 하였는데, 본 실험에서도 D군에 비해 DF1과 DF2 에서의 혈당 감소와 인슐린함량의 감소를 보이는 것으로 보아 발효물이 인슐린의 민감성을 향상시켜 낮은 인슐린 농도에도 불구하고 혈당강하효과를 나타내는 것으로 사료된다.

임상에서 제 2형 당뇨병치료제로 처방 되고 있는 glimepiride는 설폰요소제로 당뇨 모델 동물에서 인슐린 민감성 향상을 통하여 혈당강하작용을 나타내었고 이때 혈청 내 인슐린 농도는 glimepiride를 처방하지 않은 대조군에 비하여 낮았다.

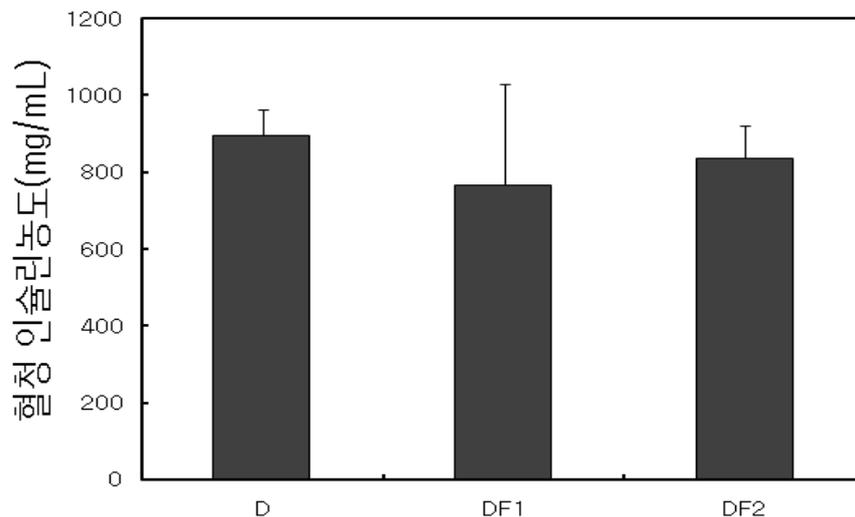


그림 21. 고체발효물을 10주간 식이한 KK-A^y 마우스의 혈청 insulin 함량

The bar represent mean±S.D.

D ; Diabetic control group, DF1 ; Diabetic group with the supplementation of Fermented Product 0.08%, DF2 ; Diabetic group with the supplementation of Fermented Product 0.4%

(5) 당화혈색소 농도

실험식이 종료 후 2시간 절식 후 분석한 당화혈색소는 그림 22와 같다. **D군의 당화혈색소 농도는 7.19%, DF1은 6.17%, DF2는 5.30%**로 D군과 비교하여 발효물의 함량이 높아질 수록 유의적으로 감소하였다.($p < .05$) HbA1c는 혈중 포도당 농도가 높을 때 성숙한 혈색소와 포도당의 결합으로 생성되는 것으로, 혈당이 증가하면 당화혈색소량이 증가한다. 당화혈색소는 장기간에 걸친 혈당변화를 제공 하는 것으로서, 최근 2~3개월 동안의 혈당 조절능력을 가장 정확하게 반영 해준다. 일반적으로 당뇨병 진단에 사용하기 보다는, 당뇨병 환자가 병원을 방문하기 전 혈당 조절을 잘 하고 있는지를 알아보는 지표로서 이용이 되고 있다. 본 실험에서 발효물의 함량이 높을 수록 당화혈색소의 농도 또한 감소하는 결과를 나타내고 있는 것을 볼 때 발효물이 혈당 감소뿐만 아니라, 감소된 혈당을 지속적으로 유지 할 수 있도록 혈당 관리에도 영향을 미치는 것으로 사료된다.

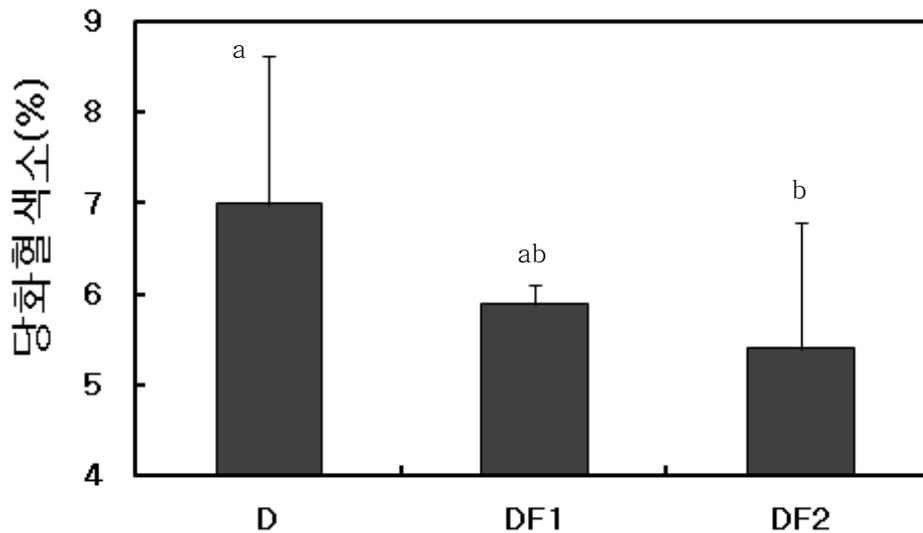


그림 22. 고체발효물을 10주간 식이한 KK-A^y 마우스의 당화혈색소 함량

The bar represent mean±S.D.

Significantly different from respective group KK-A^y mice, $p < .05$

D ; Diabetic control group, DF1 ; Diabetic group with the supplementation of Fermented Product 0.08%,

DF2 ; Diabetic group with the supplementation of Fermented Product 0.4%

(6) 혈청 지질의 농도

실험식이 종료 후 혈청지질을 분석한 결과는 그림 23과 같다. 혈청지질중의 총 콜레스테롤 농도는 D군이 172.25 mg/dL, DF1이 146.00 mg/dL, DF2가 142.25 mg/dL로 D군에 비해 DF1과 DF2가 감소하는 경향을 나타냈다. HDL-cholesterol의 경우도 D군이 92.40 mg/dL, DF1이 86.60 mg/dL, DF2가 79.00 mg/dL로, D군에 비해 DF1과 DF2가 감소하였다. Triglyceride의 경우 D군이 409.50 mg/dL, DF1이 192.75 mg/dL, DF2가 232.50 mg/dL로 D군에 비해 DF1과 DF2에서 유의적인 감소를 나타냈다.($p < .05$) 제2형 당뇨병에서는 혈액 Triglyceride의 증가, Cholesterol의 증가 등 혈액 지질의 변화가 동반되는 경우가 많다. 일반적으로 당뇨가 유발되면 당대사의 이상으로 인하여 acetyl-CoA가 축적되고, 지방합성이 증가되기 때문에 혈액중의 총 지질과 중성지방의 함량이 증가한다. 본 실험에서도 기본사료를 섭취한 당뇨그룹인 D군이 혈중 Triglyceride 농도가 높았으며, 식이에 발효물을 첨가하여 섭취한 당뇨그룹인 DF1과 DF2에서는 감소하였다. 이는 발효물이 혈액 지질의 변화에 영향을 미쳐 증가를 억제하는 것으로 추측할 수 있다. 반면 HDL-cholesterol 농도는 D군에 비해 DF1과 DF2에서 더 감소하였는데, 이는 HDL-cholesterol 상승의 부분적 원인이 very low density lipoprotein(VLDL) 감소로 인한 HDL 내부의 중성지방이 콜레스테롤로 대체되거나 VLDL 대사증가로 ester화 되지 않은 콜레스테롤이 HDL로 전달되고 HDL의 대사가 저하되기 때문이라는 연구와 비교해 볼 때 이러한 HDL 대사 과정에 발효물이 큰 영향을 미치지 못하는 것으로 추측해 볼 수 있다.

(7) 장기무게

실험식이 종료 후 측정된 mouse의 장기무게는 표 18과 같다. 발효물의 함량이 가장 높았던 DF2의 간, 신장, 비장의 무게가 D군과 DF1에 비해 감소하였다. 이러한 결과는 인슐린 결핍으로 인해 체지방 분해가 증가되고 증가된 유리 지방산이 간으로 가서 중성지방 합성에 이용되어 간의 지방축적 증가로 인한 간 무게 증가와, 당뇨환쥐에 있어서 신장은 포도당이 UDP-glucose 또는 glycogen으로 대사 되어 사구체내의 혈관사이세포(mesangial cells)에 축적되거나, pentose phosphate 경로에서 포도당의 유출과 RNA 및 DNA의 합성을 증가시킴으로써 신장의 세포분열을 촉진시켜 신장이 비대해 진다는 보고, 당뇨유발 시 배설량의 증가로 신장의 부담이 커짐으로써 비대해진다는 경우 등에 비추어 볼 때 발효물의 섭취가 당뇨로 인한 간, 신장, 비장 등의 장기 비대 현상을 억제하는데 영향을 미치는 것으로 사료 된다.

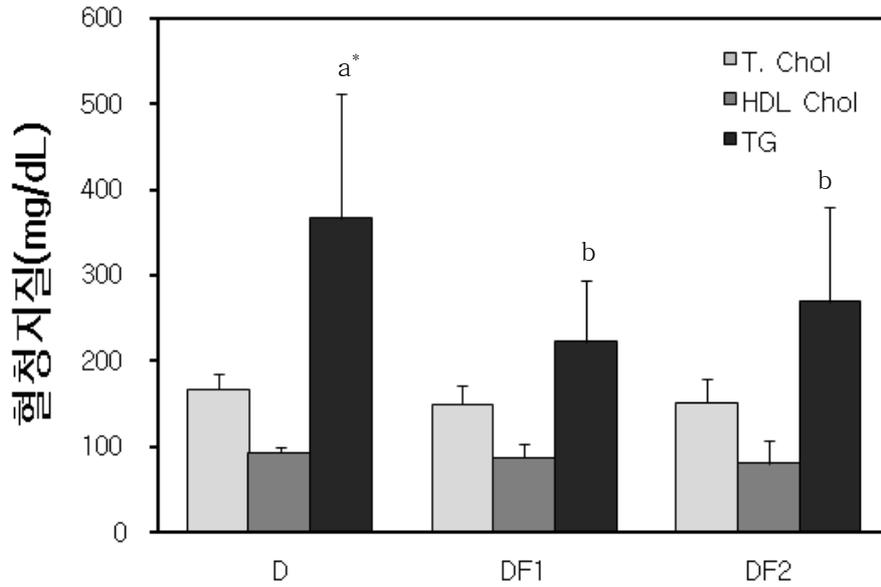


그림 22. 고체발효물을 10주간 식이한 KK-A^y 마우스의 혈청 총콜레스테롤, HDL-콜레스테롤 및 중성지방의 함량

The bar represent mean±S.D.

Significantly different from respective group KK-A^y mice. (* ; p<.05)

D ; Diabetic control group, DF1 ; Diabetic group with the supplementation of Fermented Product 0.08%, DF2 ; Diabetic group with the supplementation of Fermented Product 0.4%

표 18. 고체발효물을 10주간 식이한 KK-A^y 마우스의 간, 신장 및 비자의 무게

Group	Liver (g/10g body weight)	Kidney (g/10g body weight)	Spleen (g/10g body weight)
Control ¹⁾	0.53±0.04	0.14±0.01	0.04±0.01
CF1	0.53±0.09	0.14±0.01	0.03±0.01
CF2	0.45±0.03	0.13±0.01	0.04±0.01

¹⁾D ; Diabetic control group, DF1 ; Diabetic group with the supplementation of Fermented Product 0.08%, DF2 ; Diabetic group with the supplementation of Fermented Product 0.4%

Each value represents the mean±S.D.

나. 세포모델 효능 평가

제 2형 당뇨병모델인 KK-A^y/Ta Jcl(유전적 비만 2형 당뇨병모델) 마우스에서 고체발효물에 의한 혈당상승 억제효능을 확인하였다. 이에 세포레벨에서 실제로 혈중 당의 세포로의 흡수능을 조사하여 고체발효물의 세포레벨에서의 효능을 검증하고자 하였다.

C2C12 세포의 근육세포로 전환 후 EtOH 고체발효 추출물의 근육세포로의 혈당 흡수능을 측정하였다. 그림 23에서 보는 바와 같이 70% EtOH 추출물은 50 및 100uM에서 NBDG, a fluorescent deoxyglucose analog의 세포내 흡수를 유의하게 증가시켰다. 25 ug/mL 추출물 처리 시에는 O.D 값이 9.2로서 control인 NBDG와 유사한 값을 나타내었으나 50 ug/mL 처리 시에는 control에 비해 60% 증가한 14.7로 측정되었다.

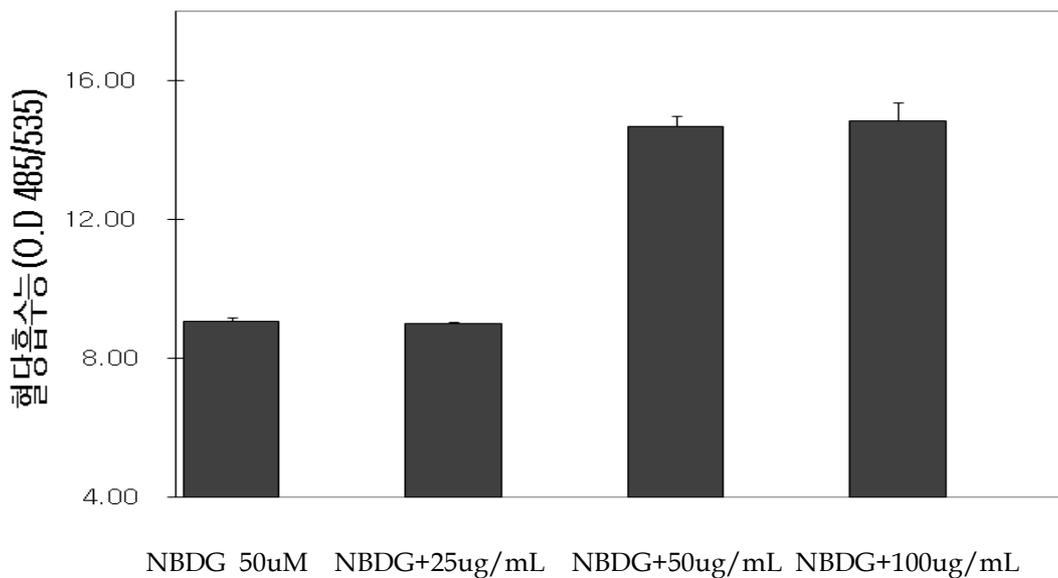


그림 23. 고체발효물 EtOH 추출물의 C2C12 근육세포에 대한 혈당 흡수능

다. 임상 효능 평가

현재 10중 6명이 임상시험에 참여하고 있다. 표 19는 본 시험에 참여한 피험자들의 신체검사 결과이다. H0-01 피험자의 경우를 제외하고 나머지 H0-02와 03 피험자의 혈압은 시험제품 섭취 전에는 약간 높은 편이었으나, 섭취 후 2주 뒤에 혈압이 다소 떨어져 정상범위에 가까워

짐을 보였다.

표 19. 시험에 참여한 피험자들에 대한 기본 신체검사 결과(n=6)

배정 번호	이니셜	생년 월일	성별	나이	키	체중	BMI	혈압		맥박	
								0주	2주	0주	2주
H0-01	ㄱ ㅎ ㅎ	550125	남	54	175.3	79.5	25.9	139/92	142/90	75	74
H0-02	ㅇ ㄷ ㅅ	571114	남	52	177.2	82.4	26.2	139/88	133/77	61	56
H0-03	ㅅ ㅇ ㅎ	620205	남	47	174	83	27.4	131/81	122/81	70	69
H0-04	ㅂ ㅈ ㅅ	660928	남	43	173	75.4	25.2	123/80	.	80	.
H0-06	ㅂ ㅂ ㅅ	430424	여	65	156.1	51.3	21.1	134/88	.	75	.
H0-05	ㅇ ㄷ ㅇ	670117	남	42	171	68.8	23.5	143/92	.	82	.

배정번호 H0-01~03 까지 피험자의 0-2주간 data만이 2주간 진행된 결과이며, H0-04~06 까지 피험자는 현재 2주가 되지 않았으므로 2주째의 data를 제시하지 못하였음

* 신체질량지수(BMI)=체중(kg)/[신장(m)]²

임상병리검사를 실시한 결과는 표 20과 같다. 임상병리검사 중 간기능 검사에서, 다른 피험자들에서는 SGOT와 SGPT의 수치가 감소하였으나, H0-01피험자의 경우, SGOT와 SGPT의 수치가 다소 증가하였음. 이 같은 결과는 과도한 음주나 다른 요인에 의해서도 증가할 수 있기 때문에 약과 관련한 부작용으로 판단하기에는 어려운 점이 있으며, 추후 관찰이 필요하다고 여겨진다. Creatinine검사 결과에서는 큰 변화를 보이지 않았음

표 20. 본 시험에 참여한 피험자들에 대한 임상병리 검사 결과(n=6)

배정 번호	이니셜	Glucose (모세혈)		Glucose (정맥혈)		SGOT		SGPT		Creatinine	
		0주	2주	0주	2주	0주	2주	0주	2주	0주	2주
H0-01	ㄱ ㅎ ㅎ	115	112	87	86	29	39	44	67	1	1.1
H0-02	ㅇ ㄷ ㅅ	236	247	212	264	34	24	50	40	1.2	1.1
H0-03	ㅅ ㅇ ㅎ	116	108	94	89	44	34	46	45	1	0.94
H0-04	ㅂ ㅈ ㅅ	117	.	102
H0-06	ㅂ ㅂ ㅅ	108	.	88
H0-05	ㅇ ㄷ ㅇ	102	.	101

피험자의 혈당을 측정하였다. 2주간 진행된 피험자 수는 총 3명이었으나(이 중 1명은 피험자 선정기준에 포함되지 않았지만 경계역에 있는 사람과의 혈당 감소정도를 비교하기 위해 본 시험에 포함시켰음) 다른 2명의 피험자에 비해 너무 높은 혈당 수치를 보이므로 표 21에서는 HO-03 data를 제외하였다. 2명의 피험자에 대한 2주간 data를 분석한 결과, 모세혈(전혈)을 이용한 혈당측정에서는 0주째 115.5mg%였으나, 2주째에는 110mg%으로서 5.5mg% 낮아졌다. 정맥혈(혈청)을 이용한 분석에서도 0주째에는 90.5mg%였으나, 2주째에는 87.5mg%로서 3mg% 낮아짐으로써, 시험제품의 2주 복용 후에 혈당 수치가 감소하는 경향을 보였으나 통계학적 유의성은 보이지 않았다. 그러나 비록 피험자수가 적지만 평균적으로 혈당수치가 감소하는 경향을 보여 혈당 조절 수치는 임상적으로는 의미가 있을 수 있다고 사료된다. 따라서 충분한 수의 피험자를 확보하고 기존 당뇨관련 치료제 및 식품의 복용기간을 고려하여 시험제품의 복용기간을 늘인다면, 혈당 개선에 영향을 미칠 수도 있을 것으로 사료된다

표 21. 2주간 진행된 피험자들의 혈당 data(n=2)

배정번호	이니셜	Glucose (모세혈)		Glucose (정맥혈)	
		0주	2주	0주	2주
H0-01	ㄱ ㅎ ㅎ	115	112	87	86
H0-03	ㅅ ㅇ ㅎ	116	108	94	89
평균값		115.5	110	90.5	87.5
표준편차		0.71	2.83	4.95	2.12
p value		0.1165		0.5133	

* 현재 임상시험은 계속 진행 중에 있으며 보고서 완성본 제출 시점에는 정확한 임상시험결과를 제시할 수 있음.

5. 간질환 개선 효능

가. 동물모델 효능 평가

간은 인체에서 가장 큰 장기이며, 소화배설 기능, 영양소저장, 새로운 물질합성, 해로운 화학물질을 해독시키는 중요한 역할을 담당하고 있다. 한편 간은 혈액의 흐름이 매우 풍부한 기관으로 혈류를 통한 독성물질의 침투도 용이하게 일어날 수 있다. 만성적인 에탄올 섭취의 경우에도 간세포에 장애를 초래하여 알콜성 간염, 지방간 및 간 경변을 초래할 수 있다. 이러한 간질환은 한국인에 있어서 암, 당뇨병과 함께 가장 발생빈도가 높으며 간암에 의한 사망률은 세계에서 가장 높은 것으로 조사되고 있고 있다. 간 손상으로 인한 간 장애에 대하여 다양한 치료약이 개발되고 사용되고 있으나 결정적으로 유효한 약물은 별로 없으며, 우리나라를 비롯하여 동아시아 지역에서는 천연물을 기원으로 하는 한약재를 조합한 한방제가 경험적으로 널리 이용되고 있다(2). 일반적으로 간 손상 치료 또는 보호약물을 개발할 목적으로 사염화탄소(CCl_4), D-galactosamine 등 화학물질을 처리하여 간 손상을 유도한 실험동물 모델을 활용하고 있다.

사염화탄소(CCl_4)는 유지, 고무, 수지의 용제 등에 이용되어 산업현장에서 쉽게 노출되는 환경공해물질의 하나로서 mixed function oxidase(MFO) 효소계 활성화에 의해 trichloromethyl free radical(CCl_3)로 활성화된다. 생성된 free radical 은 인근 지질막을 공격해 지질의 과산화물을 일으키거나, 세포내의 단백질이나 지질 등의 macromolecules 와 결합하여, 간의 피사, fatty infiltration, microsomal enzyme 활성화저하 등의 간독성을 나타내고, endoplasmic reticulum의 Ca^{2+} pump를 억제해 세포내 Ca^{2+} homeostasis를 저해하여 세포의 죽음을 초래해 간 손상을 유발시키는 것으로 알려져 있다. 한편, 이러한 유리기에 대하여 생체조직은 superoxide dismutase, glutathione S-transferase, catalase, flavonoid계 색소를 포함한 polyphenol류 등의 생리활성 물질들을 활용하여 조직손상을 방어한다. CCl_4 와 같은 독성물질의 투여방법, 경로 및 횟수에 따라 간 손상을 유도한 실험동물을 활용하고 있다.

한편, 지방간은 간 조직 내에서 정상 이상으로 지질이 축적된 상태를 말하며 콜레스테롤 지방간, 인지질 지방간 및 중성지방의 지방간으로 분류된다. 그러나 일반적으로 흔히 볼 수 있는 지방간은 중성지방의 간장 내 지방합성의 증가(지방산합성의 증가와 triglyceride의 증가), 간장 내 지방이화의 감소, 저장지방으로부터 간장으로의 지방 동원의 증가 및 간장으로부터 말초조직으로의 지방이동의 감소(간장 내 lipoprotein 생성의 장애 혹은 생성된 lipoprotein의 분비장애의 경우)로 생각할 수 있다. 지방간은 그 자체가 급속하게 진행되지는 않으나 장시간 방치는 간장기능 및 생체 내 지질대사의 이상을 초래할 수 있다. 또한 지방간을 유도한 여러 병인들은

다른 질환의 원인으로 되기 때문에 초기에 이러한 제 요인들을 차단시켜 주어야 한다. 지방간을 유발하는 주요 요인은 비만, 과음, 당뇨병 및 고지혈증을 들 수 있다. 현대인의 고 에너지 식생활 및 복잡한 사회적 환경은 지방간을 유발할 수 있는 제 요인들을 보다 더 많이 제공해 주며 그 결과로 매년 지방간 환자가 증가하는 추세이다.

지금까지 간 장애에 대한 효과적인 치료제는 개발되고 있으나 아직도 결정적인 약물이 개발되지 않은 단계로 천연물에 대한 많은 연구가 진행되고 있다. 한편, 미생물에 의한 발효물을 이용한 간 질환의 치료 및 예방에 대한 연구 역시 거의 이루어지지 않고 있는 실정이다.

본 연구에서는 제조한 발효물이 사염화탄소(CCl_4)의 투여로 간 손상을 유도한 실험동물 모델에서 간 회복효능이 있는지를 확인하기 위하여 간세포 손상이나 소멸 시에 순환계로 분비되는 간 손상의 주요지표가 되는 혈청 alanine aminotransferase(ALT), aspartate aminotransferase(AST)와 초기 간 손상의 biomarker로 사용하고 있는 alkaline phosphatase (ALP), lactate dehydrogenase(LDH) 측정 하였고, 이외 간접적 지표로 사용하고 있는 total cholesterol, triglyceride, HDL-, LDL-cholesterol의 변화를 측정하였다. 또한 고지방식이 실험쥐의 간 조직 내 지방 및 분변에서의 지방 함량을 측정하고 혈액 중의 total cholesterol, triglyceride, HDL-, LDL-cholesterol의 변화를 측정하였다.

(1) 체중변화 및 간 무게

실험기간 동안 체중변화 및 간 무게는 표 22와 같다. 체중 증가는 CCl_4 를 투여한 control이 5.66 g/day로 가장 적었다. 발효물의 섭취가 간의 무게에 미치는 영향을 조사한 결과, 체중 100 g 당 간의 무게는 CCl_4 를 투여한 control이 4.26 g으로, CCl_4 투여하지 않고 기본사료를 섭취한 normal과 CCl_4 를 투여 하고 발효물을 섭취한 CF에 비해 높았다. Jeon과 Park, Lee 등 및 김 등의 연구에서 사염화탄소에 의해 간독성이 유발된 흰쥐군은 정상군에 비해 간 중량 백분율이 유의적으로 증가한다고 보고하였는데, 이는 본 실험 결과와도 일치하며 CCl_4 를 투여하고 발효물을 첨가한 식이를 섭취한 CF와 Normal 간에 간 중량에 거의 차이를 보이지 않는 것으로 보아 발효물이 간 손상을 회복시키는데 영향을 미칠 수도 있는 것으로 사료된다.

표 22. 고체발효물을 CCl₄ 투여 마우스에 5주간 식이 중 체중 및 간 무게

Groups ¹⁾	Initial body weight(g)	Final body weight(g)	Change of body weight (g/day)	Liver (g/100g body weight)
Normal	180.58±4.73	388.87±15.35	5.79±0.37	4.09±0.14
Control	180.87±7.67	384.69±23.27	5.66±0.55	4.26±0.37
CF	180.80±2.71	401.05±30.67	6.12±0.84	4.02±0.09

¹⁾Noraml; Normal+Olive oil group, Control; CCl₄-treated group, CF; CCl₄-treated with the supplementation of Fermented Product 0.4% group

Each value represents the mean±S.D.

(2) 혈청 중 ALT 및 AST 활성도

발효물의 섭취에 의한 ALT 및 AST 활성도는 표 23과 같다. ALT 활성도는 control이 63 U/L로 normal의 58 U/L에 비해 유의적으로 증가하였으며($p<.001$), CCl₄를 투여한 후 발효물을 첨가한 식이를 먹인 CF는 53 U/L로 control에 비해 약 16%가 유의적으로 감소하였다($p<.001$). AST 활성도의 경우 control이 102 U/L로 normal의 87 U/L에 비해 유의적으로 증가하였다($p<.0001$). CF는 78 U/L로 control에 비해 24%가 유의적으로 감소하였다($p<.0001$). CCl₄와 같은 간 독성물질은 간세포의 괴사와 간 조직의 파괴를 유도해 ALT 및 AST의 혈액 내 유출이 증가되는데 본 연구에서도 CCl₄로 인한 간 기능의 손상을 알 수 있었으며, Kim의 연구에서도 CCl₄ 투여 시 혈중 AST, ALT가 현저하게 증가한다고 보고하여 본 실험 결과와 일치하였다. 또한 간 손상으로 인한 간세포의 괴사와 간 조직의 파괴가 진행됨에 따라 transaminase가 혈중으로 유리되어 AST와 ALT의 높은 활성치를 나타낸다는 보고도 있다. 이와 같이 발효물 섭취로 인한 ALT와 AST 활성도의 15% 이상의 감소 효과는 발효물의 섭취가 CCl₄ 투여로 인한 간 손상 억제에 효과를 보여주는 것으로 사료된다.

표 23. 고체발효물을 CCl₄ 투여 마우스에 5주간 식이 후의 혈청 alanine transaminase 및 aspartate transaminase 활성 (U/L)

Groups ¹⁾	ALT	AST
Normal	58±1.52 ^{b*}	87±6.18 ^{b**}
Control	63±0.84 ^a	102±6.66 ^a
CF	53±4.09 ^c	78±1.87 ^c

¹⁾Noraml; Normal+Olive oil group, Control; CCl₄-treated group, CF; CCl₄-treated with the supplementation of Fermented Product 0.4% group

Each value represents the mean±S.D.

Values with letters are significantly different at * ; p<.001, ** ; p<.0001

(3) 혈청 중 ALP 및 LDH 함량

발효물의 섭취에 의한 ALP 및 LDH 활성도는 표 24와 같다. ALP 활성도는 control이 433 U/L로 normal의 369 U/L과 비교하여 증가를 나타내었으며, CF는 364 U/L로, control에 비해 약 16% 감소하였으나 유의적이지는 않았다. CCl₄ 투여군인 control의 증가는 간세포의 손상 정도를 평가할 수 있는 자료로 이용 되고 있는 혈청 ALP 활성도가 CCl₄ 투여 시 혈청 중 ALP 활성도가 증가한다는 보고와 일치하였다. LDH 활성도의 경우 control이 395 U/L로 normal의 410 U/L 보다 유의적으로 감소하였으나,(p<.05) 수치상 큰 차이를 보이지는 않았다. 그러나 CF는 294 U/L로 control에 비해 약 26%가 유의적으로 감소하였다(p<.05). Normal이 control의 LDH 활성도에 비해 약간 높은 수치를 나타내고 있는데, 이는 당을 에너지로 전환할 때 생성 되는 효소인 LDH가 간세포 손상 시에도 수치가 상승 하지만, 간세포의 손상이 없더라도 다른 조직에서도 존재하기 때문에 실험동물의 대사적인 문제라고 사료된다. 따라서 CCl₄를 투여한 control에 비해 CCl₄를 투여한 후 발효물을 섭취한 CF의 ALP 및 LDH 활성도의 감소는 발효물이 CCl₄ 투여로 인한 간 손상의 억제에 효과를 보이는 것으로 사료된다.

표 24. 고체발효물을 CCl₄ 투여 마우스에 5주간 식이 후의 혈청 alkaline phosphatase 및 lactate dehydrogenase 활성 (U/L)

Groups ¹⁾	ALP	LDH
Normal	369±56.18	410±66.60 ^{a*}
Control	433±89.17	395±85.71 ^a
CF	364±72.80	294±39.76 ^b

¹⁾Noraml; Normal+Olive oil group, Control; CCl₄-treated group, CF; CCl₄-treated with the supplementation of Fermented Product 0.4% group

Each value represents the mean±S.D.

Values with letters are significantly different at * ; p<.05

(4) 혈청 내 지질 함량

발효물의 섭취에 의한 혈청 내 지질함량은 표 25와 같다. 총 콜레스테롤의 경우 CCl₄를 투여한 control에서 64 mg/dL로, 60 mg/dL인 normal(기본사료 섭취군)에 비해 증가를 나타내었다. 0.4%의 고체발효물을 혼합한 사료를 섭취시킨 CF군은 63 mg/dL로 Control에 비해 감소하였으나 큰 차이가 없는 것으로 나타났다. HDL 경우 noraml의 28 mg/dL과 비교하여 control에서 27 mg/dL, CF에서 28 mg/dL로, normal과 CF에 비해 control에서 감소하였으나 큰 차이를 보이지는 않았다. LDL의 경우 normal의 6 mg/dL에 비해 control에서 6 mg/dL, CF는 7 mg/dL로 각 그룹 간의 수치가 유의적(p<.05)이었으나, 큰 차이를 보이지 않았다. 이 결과는 CCl₄의 복강투여와 발효물의 섭취는 실험쥐 혈장의 총 콜레스테롤, HDL-콜레스테롤, LDL-콜레스테롤의 변화에 영향을 미치지 않는 것으로 사료된다. 한편, 중성지방(triglyceride)의 경우 control에서 67 mg/dL 로, 55 mg/dL인 normal에 비해 증가하였으며, CF에서는 48 mg/dL로 control에 비해 약 29% 감소하였다. CCl₄로 인한 간 손상으로 인해 간 조직에 지방이 침착되거나, 정상적인 간 세포내의 지질 함량은 합성과 이용의 균형을 이루지만 CCl₄에 의한 간 장해를 받으면 cytochrome P-450에 의하여 반응성이 높은 ·CCl₃ 기가 생성되어 간 세포기능을 저하시켜 cholesterol과 TG의 함량이 증가된다고 보고된바 있으며 반면, CCl₄ 처리 시 혈중 콜레스테롤 함량이 감소되고, lecithin: cholesterol acyltransferase, HDL apoprotein의 합성이 저하된다는 보고도 있다. 또한 윤 등은 CCl₄ 처리 시 혈청 cholesterol 함량이 감소하며 α-lipoprotein

의 분획비도 저하하였다고 보고하고 있으나, 본 실험에서는 CF에서와 같이 발효물의 섭취가 triglyceride를 큰 폭으로 감소시켰고, 총 콜레스테롤, HDL-cholesterol, LDL-cholesterol에는 크게 영향을 미치지 못하였다. 이는 CCl₄ 투여로 간의 손상을 유발하였으나 콜레스테롤의 지질합성, 분비, 이용에 관한 대사는 전반적으로 유지되는 정도의 급성손상을 일으킨 것으로 사료된다. 즉, 간 손상 정도를 나타내는 지표인 ALT, AST, ALP, LDH의 수치의 감소는 발효물질이 급성손상된 간에 대해 확실한 효과를 보이지만, 전반적으로 그 기능을 유지하고 있는 콜레스테롤 대사에 대해서는 크게 영향을 미치지 못하는 것으로 사료된다. 한편, Borge 등은 중성지방 혈중수치와 뇌졸중 위험사이에 분명한 연관관계가 있으며 혈중수치가 높으면 뇌졸중 위험이 높아진다고 보고한 바 있다. 본 결과에서는 발효물 섭취군인 CF의 체중이 normal과 control보다 높으나, CCl₄의 투여로 현저히 상승된 혈중중성지방을 낮추고 control보다도 혈중중성지방을 낮추는 것으로 보아 발효물은 지방의 에너지 대사를 촉진시키는 것으로 사료된다.

표 25. 고체발효물을 CCl₄ 투여 마우스에 5주간 식이 후의 혈청 total cholesterol, triglyceride, LDL-cholesterol, HDL-cholesterol 함량 (mg/dL)

Group ¹⁾	Total-Cholesterol	HDL-cholesterol	LDL-cholesterol	Triglyceride
Normal	60±6.98	28±2.50	6±0.98 ^{a*}	55±12.44
Control	64±8.99	27±4.61	6±0.90 ^a	67±12.52
CF	63±6.08	28±4.73	7±1.03 ^a	48±11.31

¹⁾Normal; Normal+Olive oil group, Control; CCl₄-treated group, CF; CCl₄-treated with the supplementation of Fermented Product 0.4% group

Each value represents the mean±S.D.

Values with letters are significantly different at * ; p<.05

(5) 고지방식이 실험쥐의 간 조직 내 지방 및 콜레스테롤 함량과 장기 무게

기본사료에 lard 12%와 cholesterol 1% 추가한 고지방사료를 식이시킨 실험쥐의 간 조직에 함유된 총 지질, 중성지방과 총 콜레스테롤 함량을 분석하여 고체발효물 섭취가 간 조직에 미치는 영향을 조사하였다. 그 결과, 그림 24에서와 같이 6주간 사육 시, 간 조직 1 g 당 총 지질 함량은 기본사료 식이군(normal)이 0.06 g이었으나 고지방식이군(control)은 0.22 g으로 지방의 함량이 크게 증가한 반면, 고지방사료에 고체발효물을 0.4% 혼합하여 식이시킨 CF군에서는

0.1 g으로 control에 비해 55%가 유의적으로($p<.0001$) 감소하였다. 또한 간 조직의 중성지방 및 총 콜레스테롤을 측정된 결과 그림 25에서와 같이, normal이 301 mg이었으나 control이 2826 mg으로 중성지방의 함량이 크게 증가한 반면, CF군에서는 1718 mg으로 control에 비해 40%나 중성지방이 유의적으로($p<.0001$) 감소한 결과를 얻었다. 본 결과는 항당뇨 및 CCl₄로 유도된 간독성 실험쥐에서 고체발효물 0.4%를 첨가한 사료 섭취군에서 중성지방이 감소되는 결과와 유사한 결과였다. 한편, 콜레스테롤의 경우는 고지방 식이군인 control군과 CF군에서 크게 증가하였으며 고체발효물 섭취에 따른 함량 변화는 크게 없는 것으로 나타났다.

이와 같은 결과로부터 개발한 고체발효물은 지방간을 유도한 간 조직의 지방함량을 약 40% 저감시키는 매우 강한 효과가 있는 것으로 판단된다.

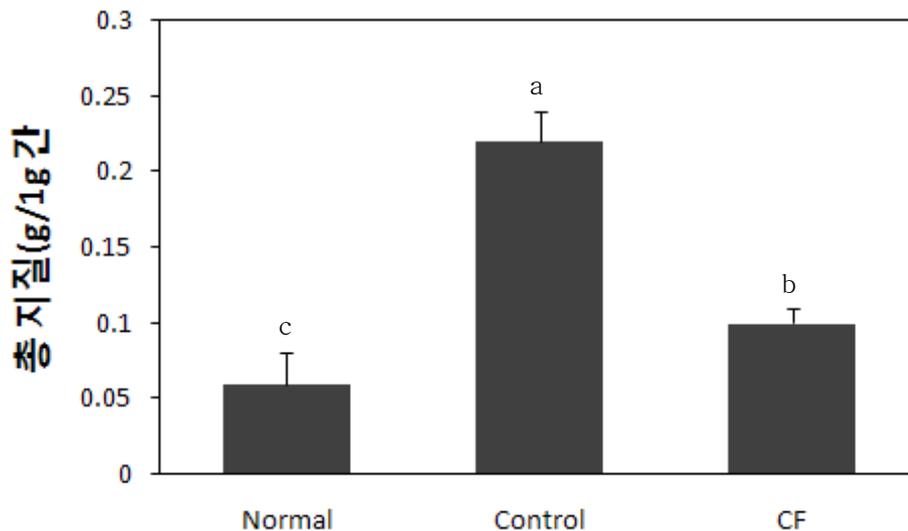


그림 24. 고지방 식이 실험쥐의 간 조직 내 총 지질 함량

The bar represent mean±S.D.

Significantly different from respective group SD rat.($p<.0001$)

Noraml ; Noraml group, Control ; High fat diet group, CF ; High fat diet with the supplementation of Fermented Product 0.4% group

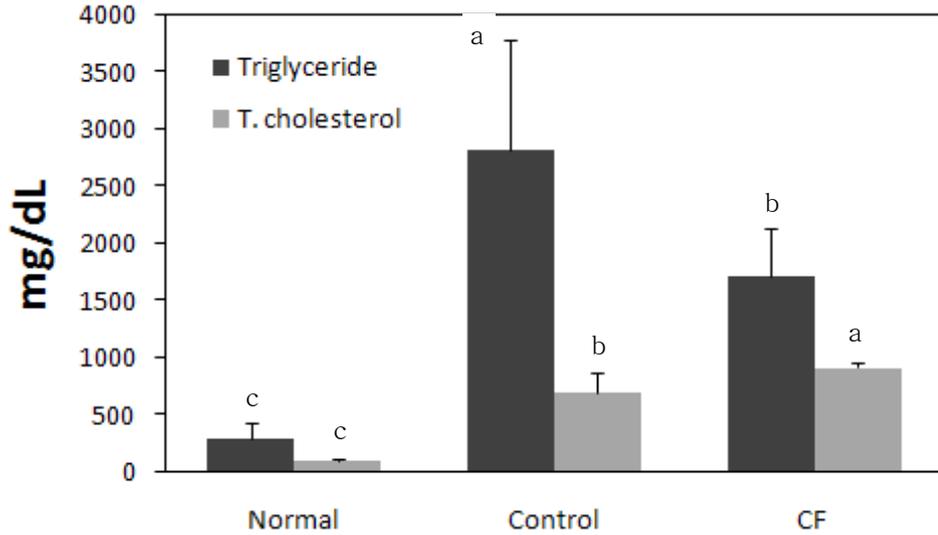


그림 25. 고지방 식이 실험쥐의 간 조직 내의 지질함량

The bar represent mean±S.D.

Significantly different from respective group SD rat.($p < .0001$)

Noraml ; Noraml group, Control ; High fat diet group, CF ; High fat diet with the supplementation of Fermented Product 0.4% group

고체발효물의 고지방 식이군의 장기에 미치는 영향을 조사하였다. 6주간 사육 후 간, 신장, 부고환지방의 무게를 측정한 결과, 그림 26에서와 같이 간과 신장의 무게는 고체발효물의 섭취에 따른 control군과 CF군 간의 차이는 거의 없었으나 고지방사료 섭취 시 지방의 축적이 많은 것으로 알려진 부고환지방에 있어서는 고지방 식이로 인하여 증가된 무게(control군)가 고체발효물의 섭취(CF군)로 인해 감소하는 것으로 나타났다.

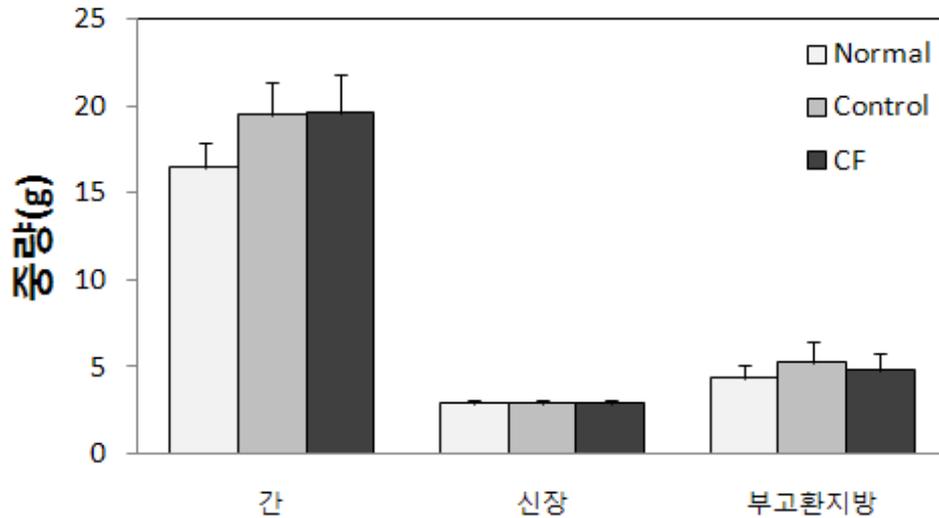


그림 26. 고지방 식이 실험쥐의 장기 무게 변화

The bar represent mean±S.D.

Noraml ; Noraml group, Control ; High fat diet group, CF ; High fat diet with the supplementation of Fermented Product 0.4% group

(6) 고지방식이 실험쥐의 분변 내 지질 함량

고체발효물 섭취 실험쥐 분변에서 지질함량을 측정하여 발효물의 지질 배설에 미치는 영향을 조사하였다. 총 지질함량을 조사한 결과, 분변 내의 총 지질의 함량은 control(0.07 g)과 CF(0.06 g) 군간에 큰 차이가 없어 총 지질의 배설에는 영향을 미치지 않는 것으로 나타났으나 (그림 27), 중성지방 및 총 콜레스테롤 함량을 조사한 결과에서는 그림 28에서와 같이 분변에서의 중성지방 함량은 CF군이 control군(163.83 mg/dL)에 비해 약 18% 많은 199.21 mg/dL로 측정되었다. 한편, 총 콜레스테롤 함량은 고지방 식이군인 control과 CF 간에 유의적인($p<.05$) 차이를 나타냈으나 수치상의 큰 차이는 없었다.. 본 결과로부터 개발한 고체발효물은 섭취한 지방의 배설을 촉진시키는 효과가 있는 것으로 판단된다.

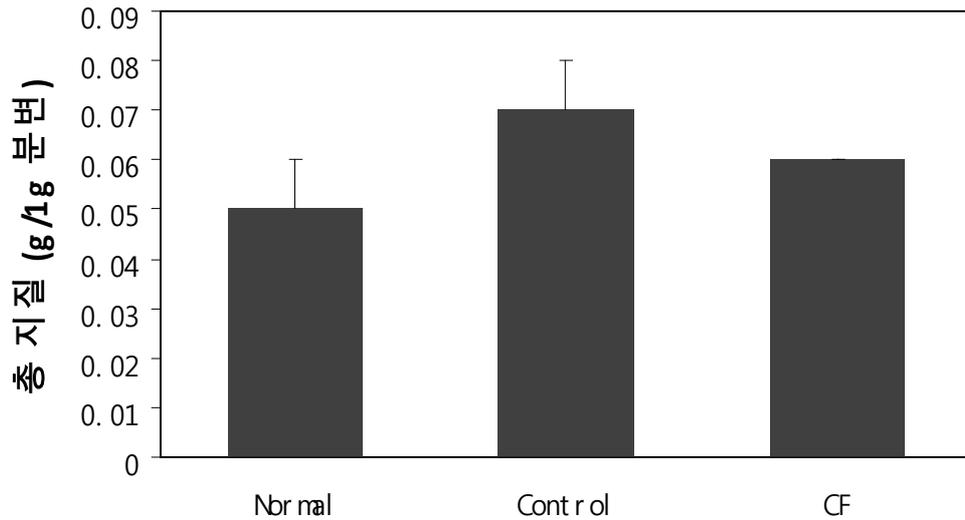


그림 27. 고지방 식이 실험쥐 분변의 총 지질 함량

The bar represent mean±S.D.

Noraml ; Noraml group, Control ; High fat diet group, CF ; High fat diet with the supplementation of Fermented Product 0.4% group

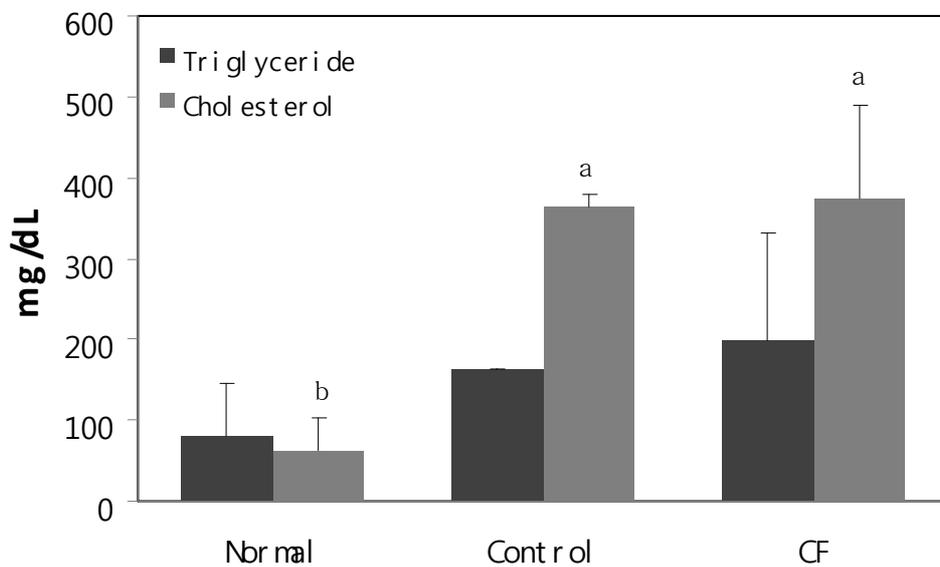


그림 28. 고지방 식이 실험쥐 분변의 지질 함량

The bar represent mean±S.D.

Significantly different from respective group SD rat.(* ; p<.05)

Noraml ; Noraml group, Control ; High fat diet group, CF ; High fat diet with the supplementation of Fermented Product 0.4% group

(7) 고지방식이 실험쥐 혈중 지질 함량

고체발효물의 혈중 지질에 미치는 영향을 조사하기 위하여 실험쥐의 혈중 중성지방, 총 콜레스테롤, LDL-콜레스테롤, 및 HDL-콜레스테롤 함량을 조사하였다. 중성지방과 총 콜레스테롤은 control에서는 고지방 식이에 의해 normal 보다 증가하였으나 고체발효물의 식이로 인하여 감소하여 중성지방은 약 20%, 총 콜레스테롤은 유의적으로(p<.01) 5% 감소하였다(그림 29). 이와 같은 혈중 중성지방의 함량측정결과는 해당노 동물실험과 CCl₄로 유도된 간독성 동물실험에서 고체발효물 0.4%를 첨가한 사료 섭취군에서 중성지방이 감소되는 결과와 유사한 결과였다. 한편, 혈중 LDL-콜레스테롤, 및 HDL-콜레스테롤을 측정된 결과 그림 30에서와 같이 control군에 비해 CF군의 LDL-콜레스테롤 함량은 유의적으로(p<.001) 약간 감소하였고 HDL-콜레스테롤 함량은 약간 증가하는 것을 나타냈으나 큰 변화는 없었다.

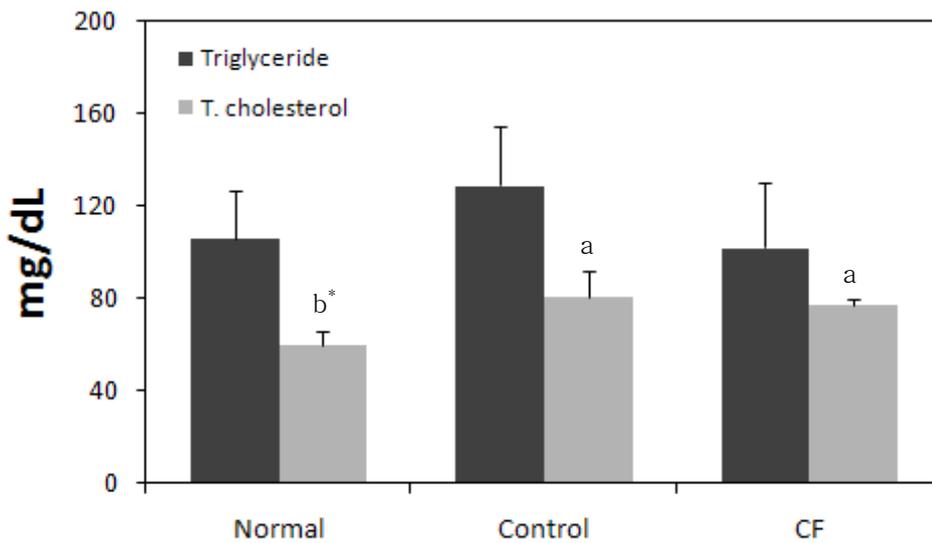


그림 29. 고지방 식이 실험쥐의 혈중 지질 함량

The bar represent mean±S.D.

Significantly different from respective group SD rat.(* ; p<.01)

Noraml ; Noraml group, Control ; High fat diet group, CF ; High fat diet with the supplementation of Fermented Product 0.4% group

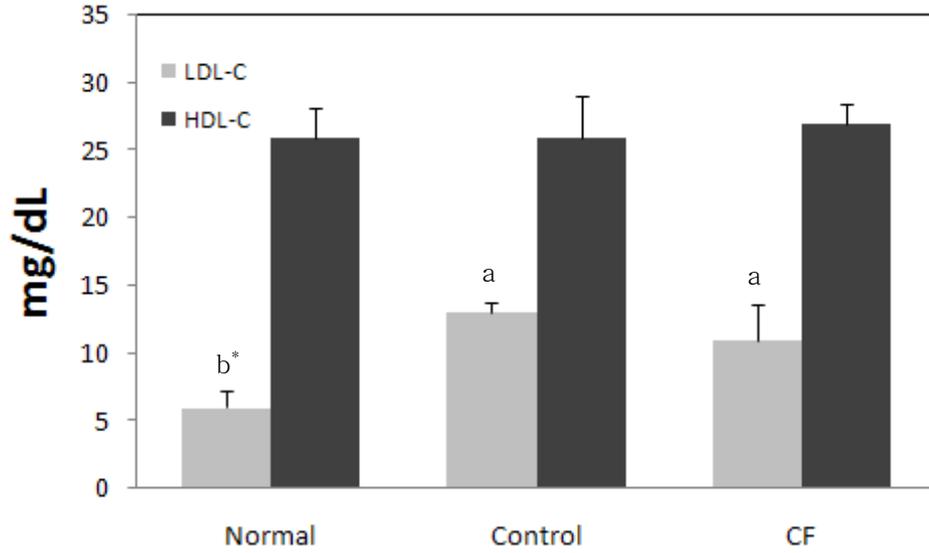


그림 30. 고지방 식이 실험쥐의 혈중 지질 함량

The bar represent mean±S.D.

Significantly different from respective group SD rat.(* ; p<.001)

Noraml ; Noraml group, Control ; High fat diet group, CF ; High fat diet with the supplementation of Fermented Product 0.4% group

6. 아토피 피부염 개선 효능

가. 동물모델 효능 평가

아토피성피부염유발제인 Biostir AD cream으로 5주간 아토피를 유발시킨 다음 홍반, 구진(살갓에 돋는 발진), 린설(비듬), 가피(딱지)의 생성정도를 확인하였다. 그림 31에서와 같이 Normal군(Biostir AD cream 비치리 및 일반사료 식이)에서는 아토피 증상이 없었으며 control군(Biostir AD cream 처리 및 일반사료 식이)과 CF군(Biostir AD cream 처리 및 0.4% 고체발효물 첨가사료 식이)에서는 홍반, 구진(살갓에 돋는 발진), 린설(비듬), 가피(딱지)와 같은 아토피 증상이 나타났다. control군과 CF군간에는 시각적인 큰 차이가 없었다.

또한 식이 6주차에 채혈하여 Mouse IgE ELISA Kit를 이용하여 IgE 값을 조사한 결과 (data not shown), control군과 CF군간에 차이가 없는 것으로 나타나 고체발효물은 아토피성 피부염을 억제하는 효과가 없는 것으로 평가되었다. 따라서 전임상시험에서 항아토피 효능이 없는 관계로 인체시험을 진행할 수 없었다.

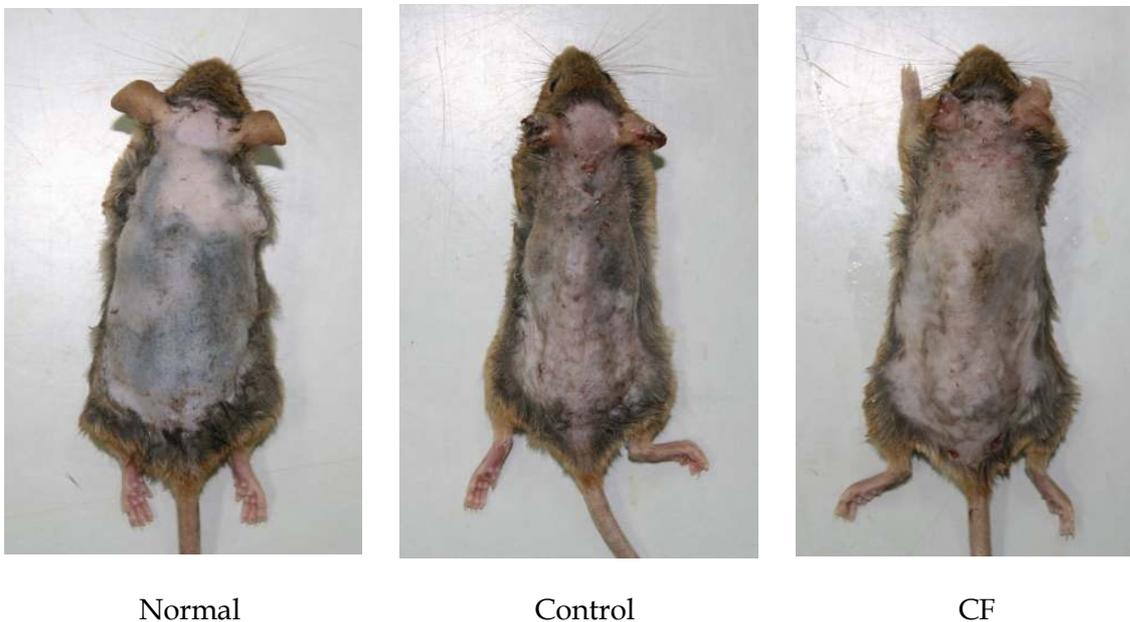


그림 31. 아토피 유발 5주차 실험쥐 사진

Normal; Normal, Control; Biostir AD cream-treated group, CF; Biostir AD cream with the supplementation of Fermented Product 0.4% group

7. 항염증 효능

대식세포는 자연면역 뿐만 아니라 획득면역 등 다양한 숙주 반응에 관여하여 숙주 방어와 항상성 유지에 관여하는 것으로 알려져 있으며, 염증 반응 시에는 reactive oxygen species (ROS)와 TNF- α 및 IL-1 α 와 같은 사이토카인을 생산하여 감염초기에 생체 방어에 중요한 역할을 하는 세포로 알려져 있다. 대식세포가 탐식된 이물질을 분해시킬 때 생성되는 TNF- α , IL-1 α 및 NO는 숙주에 치명적인 결과를 초래 할 수 있는 것으로 보고되고 있다. 따라서 NO 생성 저해제는 septic shock, 만성질환, 동맥경화 및 염증반응조절제로서의 기능성에 관한 연구가 활발하게 이루어지고 있으며, 최근에는 Polygonum tinctorium, Melia azedarach, Cyperus rotundus, Cudrania tricuspidat, 當歸, 香附子 등 한약 및 천연물에서 이러한 조절제를 찾기 위해 많은 연구가 진행되고 있다.

본 연구에서는 고체발효물 70% EtOH 추출물이 LPS(lipopolysaccharide)로 activated된 Raw 264.7 cell에서 나타나는 염증관련 지표[NO production, interleukin-1 α (IL-1 α), tumor necrosis factor- α (TNF- α)] 들에 미치는 영향을 평가하여 고체발효물이 면역체계에 미치는 영향을 평가하고자 하였다.

가. LPS로 유도된 Raw cell의 NO 생성에 미치는 영향

산화질소(nitric oxide; NO)는 ROS의 일종으로 L-arginine으로부터 nitric oxide synthase (NOSs)를 경유하여 생성되는 radical로, 세포내에서 2차 신호전달자로서 중요한 역할을 한다.

NO는 전염증성 또는 항염증성 작용을 가지는 것으로 알려져 있으나, 생체 내 고농도의 NO 생성은 숙주세포의 파괴, shock에 의한 혈관확장, 염증반응 유발에 의한 조직의 상해를 초래할 수 있는 이중적 생물학적 성질을 가지는 것으로 알려져 있다. 따라서 NO 생성 저해제는 septic shock, 만성질환, 동맥경화 및 염증반응조절제로의 가능성 등에 관한 연구가 활발하게 이루어지고 있다. Raw 264.7 cell에서 고체발효물 70% EtOH 추출물을 25-100 μ g/mL의 농도로 세포에 처리하여 생성되는 NO양을 측정하였다. Positive control인 LPS군에서는 control군에 비교하여 NO의 생성이 급격히 증가하였으나, 실험군에서는 16h 반응 시, 추출물 25 μ g/mL의 농도에서부터 추출물 농도 의존적으로 유의하게 NO의 생성을 억제하는 것으로 나타내었다(그림 32). 추출물이 LPS로 유도된 NO의 생성을 감소시킨 것이, 추출물의 세포독성으로 인한 cell population의 저하에서 기인된 것인지는 세포독성 시험을 위한 MTT assay에서의 세포독성이 없는 것으로 나타난 바와 같이 NO의 생성감소는 추출물의 세포독성으로 인한 cell population의 저하에 기인한 것이 아님이 증명되었다.

한편, 상황으로부터 분리한 meshima 등과 같은 다당체는 현재 항암 및 면역요법제 등으로 널리 사용되어지고 있다. 이에 김 등은 상황 물 추출물을 0.1 mg/mL - 3.0 mg/mL의 범위로 처리한 결과, 0.3 mg/mL 이상으로 처리한 실험군에서 유의성 있게 NO의 생성을 억제하였다고 보고하였다. 김 등의 결과와 비교하였을 때 상황 물 추출물의 1 mg/mL에서의 NO 생성억제능과 본 연구에서 개발한 고체발효물의 70% EtOH 추출물을 100 ug/mL로 처리하였을 때의 NO 생성억제능과 유사하여 본 고체발효물은 상황과 비교해 상대적으로 더 높은 NO 생성억제능을 가지고 있는 것으로 사료된다.

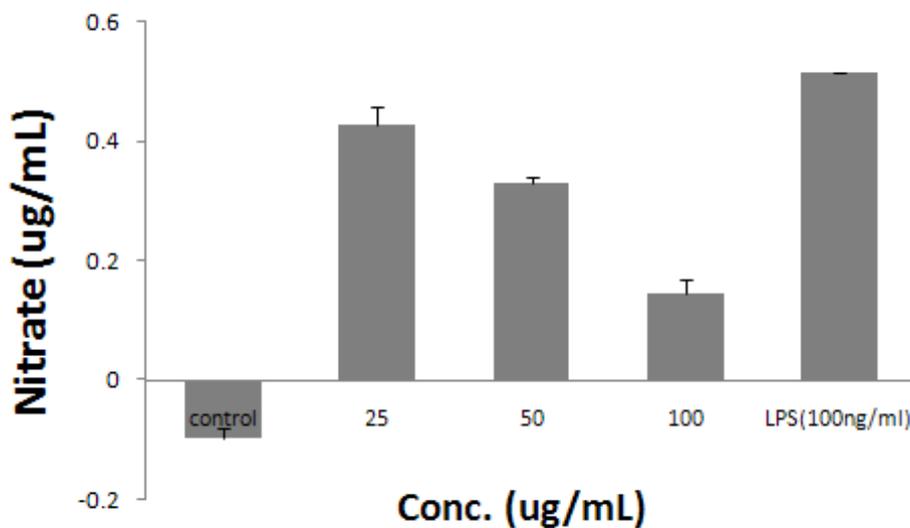


그림 32. 고체발효물 70% EtOH 추출물의 NO 생성에 미치는 영향

나. LPS로 유도된 Raw cell의 TNF- α 에 미치는 영향

TNF- α 는 LPS반응의 주요 매개체로서 innate immune response에 있어서 중요한 역할을 한다. Macrophage와 mast cell에서 분비되는 TNF- α 는 tumor cell에 세포독성을 나타내며, 만성 염증성 반응과 관련되어 있다. 본 실험에서 LPS는 TNF- α 의 분비를 촉진시켰지만, 고체발효물 70% EtOH 추출물 100 ug/mL의 농도에서 TNF- α 의 분비를 강하게 저해하는 것으로 나타났다(그림 33). 한편, TNF- α 와 관련하여 상황 물추출물에 대해 보고된바 있다. 김 등은 상황 물 추출물을 mg/mL의 농도를 처리하였으나 TNF- α 에 대한 유의적인 감소가 없는 것으로 보고한

바 있다. 그러나 본 연구에서는 고체발효물 70% EtOH 추출물을 ug/mL의 농도의 구체적으로는 100 ug/mL의 농도로 처리한 경우에도 TNF- α 를 강하게 억제시키는 것으로 나타났다.

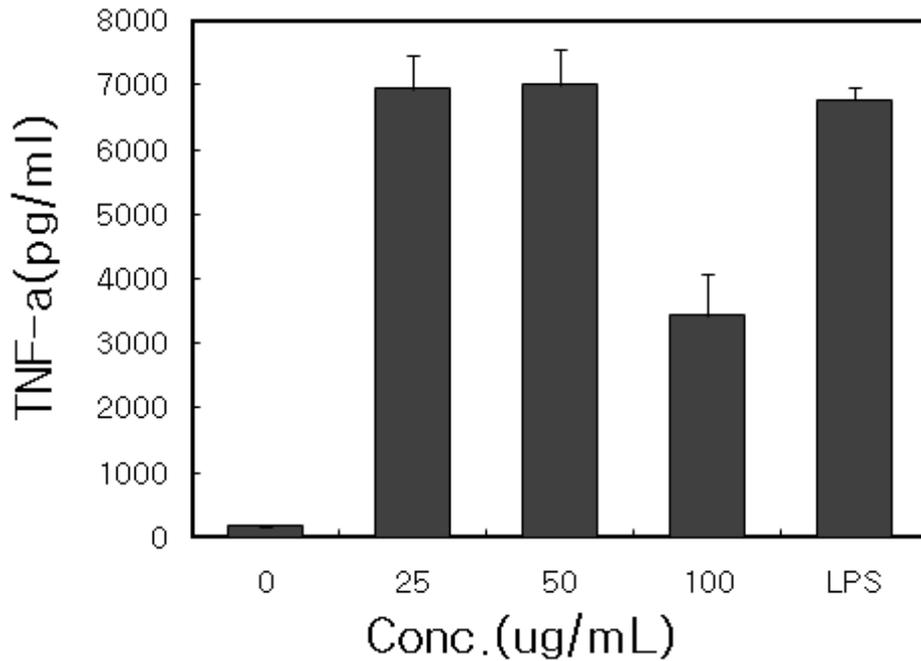


그림 33. 고체발효물 70% EtOH 추출물의 TNF- α 생성에 미치는 영향

다. LPS로 유도된 Raw cell의 IL-1 α 에 미치는 영향

IL-1 α 는 monocyte, macrophage, B-cell, dendritic cell, endothelial cell, neutrophil과 hepatocyte에서 분비되며, TNF- α , IL-6와 함께 proinflammatory cytokine으로서 여러 면역학적 작용들과 연관되어 있다. 특히 IL-1 α 는 T-cell의 activation, B-cell의 maturation, NK cell의 activity를 활성화한다. 또한 IL-1은 septic shock, burn, 간이식 수술 후의 ischemia-reperfusion injury의 경우에 prostaglandins, leukotrienes, platelet-activating factor, nitric oxide 등의 매개 물질 합성을 증가시켜 염증반응을 나타낸다. 본 실험에서 LPS는 IL-1 α 의 분비를 증가시켰으며, 고체발효물 70% EtOH 추출물은 LPS로 유도된 IL-1 α 를 농도 의존적으로 유의성 있게 감소시키는 것으로 나타났다(그림 34).

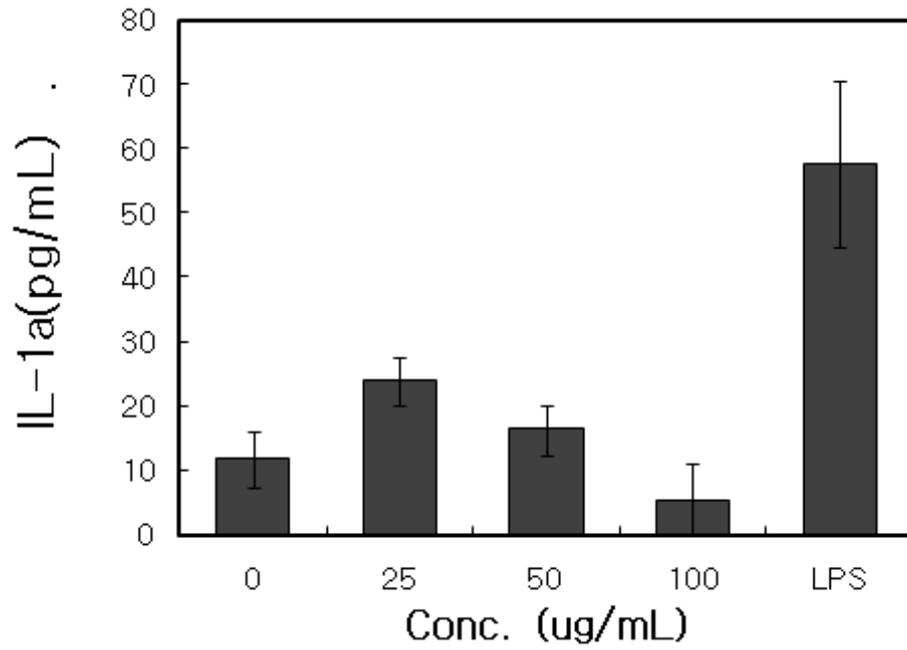


그림 34. 고체발효물 70% EtOH 추출물의 IL-1α 생성에 미치는 영향

이상과 같은 결과로부터 고체발효물은 염증 또는 과량의 NO 및 과량의 proinflammatory cytokine 생성과 관련된 염증치료 및 면역치료에 활용될 수 있음을 시사한다.

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에서의 기여도

1. 연도별 연구목표 및 내용

구분	연도	연구개발의 목표	연구개발의 내용	연구범위
1차년도	2007	◦고체발효 최적 조건 설정	◦상항버섯, 노니, 미강 등의 고체 발효 ◦고체발효 최적조건 설정	당뇨 및 아토피 조절 생물전환 시스템 구축
		◦미생물 특성 분석	◦미생물의 분리 동정 ◦균주 특성 분석	미생물 동정 및 균주 특성 조사
		◦동물모델에서의 당뇨 예방 효능 검증	◦생물전환체 식이 당뇨 유발 흰쥐의 혈액분석	동물 및 인체 시험을 통한 효능평가
2차년도	2008	◦생물전환물 소재화 기술 확립 및 시작품제조	◦생물전환 소재 생산을 위한 최적발효 조건 설정 ◦생물전환 소재의 대량생산 기술 개발	당뇨 및 아토피 조절 생물전환 시스템 구축
		◦생물전환체의 특성분석	◦고체배양물의 이화학적·미생물학적 특성 분석	미생물 동정 및 균주 특성 조사
		◦인체시험에 의한 당뇨 및 아토피 예방효능 검증	◦당뇨 증상이 뚜렷하고 혈당치가 200 이상 또는 공복시 126 이상 인 사람 50명 대상 평가 ◦아토피 피부염이 있는 사람 20명 대상 평가 ◦추가내용 -간질환개선 효능 평가 -항염증 효능 평가 -항산화 효능 평가	동물 및 인체 시험을 통한 효능평가

- 2차년도 연구목표 중 아토피 예방효능 검증을 인체시험을 통해 실시하고자 하였으나 전임 상시험인 동물실험에서 아토피 피부염에 대한 억제 효능이 전무한 것으로 평가됨
- 그러나 간 기능 개선 효능과 관련성이 있는 GST 활성이 높게 검출됨에 따라 간독성을 유발시킨 마우스를 대상으로 한 개선효능과 지방간을 유도한 rat에서의 간 조직과 분변에서의 총 지질, 중성지방, 콜레스테롤, 혈액분석을 실시하였함. 간독성 유발 시험에서 간 지표가 되는 AST 등 다양한 효소활성과 triglyceride(중성지방) 등을 측정한 결과, 손상된 간 기능의 강한 회복능 및 중성지방의 강한 저하능이 매우 높은 것으로 나타났으며 고지방식에 의한 지방간 유도 동물시험에서는 간 조직 내의 총 지질과 중성지방의 축적을 억제시키는

데 매우 강한 효능이 있음을 새롭게 밝힘.

- 또한 항염증 시험에서도 NO, TNF- α 및 IL-1 α 의 생성을 강하게 억제시키는 효능을 밝혀 고체발효물이 염증치료 및 면역치료제로서 가능성 확인한 바 있음
- 그리고 항당뇨 효능평가에서 초기에는 동물과 인체에서의 효능만을 검증하고자 하였으나 본 연구에서 세포 레벨에서의 당흡수능을 추가로 밝힘.

2. 평가착안점 및 달성도

연도	평가의 착안점 및 기준	가중치(%)	달성도(%)
2007	고체발효시스템의 구축여부	37%	발효시스템 구축(100)
	분리균주의 동정여부	25%	균주분리동정(100)
	동물모델에서의 효능평가 여부	38%	당뇨, 간, 아토피 효능평가(100)
2008	대량생산 시스템 구축여부	30%	생산 시스템 구축(100)
	시작품제조 여부		시작품 제조(100)
	균주특성 분석 여부	7%	균주특성 분석(100)
	인체시험 여부	63%	당뇨 개선 임상시험(100)
최종 평가	시작품 제조 여부 효능평가 여부		시작품 제조 (100) 효능평가 여부(100) 기술이전 완료 (100)

제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

제 1 절 연구개발 성과

1. 기술이전

- 향당노, 간질환개선 효능 미생물, 이를 이용한 발효기술 및 기능성 효능 평가결과, (주) G&G, 40,000천원, 2009. 5

2. 특허출원

- 혈당상승 억제효과와 간 기능 개선효과를 갖는 미생물 및 상기 미생물을 포함하는 식품, 10-2008-0094668, 2008. 9. 26, 임성일, 성기승, 차성관, 최신양, 이성훈, 송선미, 양승창

3. 학회발표

- The Effects of Antioxidant on Extracts of White Ginseng (*Panax ginseng*, C. A. Meyer) and Fermented Ginseng, 김영찬, 임성일, 임주혁, 이영철, 김경탁, 노정혜, 최상윤, 조장원, 이영경, 홍희도, 2008. 10. 16. 제주 라마다호텔
- The Antioxidant Activities of Mixed Fermented Materials of Various Mixed *Bacillus* sp. 김영찬, 임성일, 임주혁, 김경탁, 노정혜, 최상윤, 조장원, 이영경, 홍희도, 2008. 10. 16. 제주 라마다호텔
- *Bacillus* 복합균주로 발효시킨 농산발효물의 향당노 효능, 임성일, 성기승, 송선미, 양승창 [(주)건농], 2008. 10. 16. 제주 라마다호텔
- *Bacillus* 복합균주로 발효시킨 농산발효물의 간 손상 회복 기능, 임성일, 성기승, 송선미, 양승창[(주)건농], 한국식품과학회 심포지움, 2009. 5.29, 대전

제 2 절 성과활용 계획

1. 논문게재

- 미강 등 발효물의 제2형 당노 억제 효능 (2010), 임성일, 성기승, 양승창
- 미강 등 발효물의 CCl₄ 유도 간 손상 rat의 회복 효능 (2010), 임성일, 성기승, 양승창
- 미강 등 발효물의 지방간 유도 rat의 회복 효능 (2010), 임성일, 성기승, 양승창
- 미강 등 발효물의 면역활성 증진 효능 (2010), 임성일, 성기승, 양승창

2. 신규 기능성 소재 개발에 활용

- 개발 미생물을 이용한 고기능성 발효한방소재의 개발
- 개발 발효물을 활용한 채소발효식품의 저장성 연장
- 개발 발효물을 활용한 스넥류의 개발
- 개발 미생물을 이용한 고품질 소금의 제조

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

NRC 등 현재 바이오 산업 현황소개 자료 수집

○ NRC의 Bioproducts road map

최근 NRC는 바이오를 중심으로 한 road map을 작성하여 연구에 올인한 상태로 2007년도 부터 bioproducts를 중심으로 한 연구에 집중투자하고 있는 상황임.

Bioproducts와 관련된 개요는 표 1과 같다.

표 1. Overview of the Bioproducts Platforms

Feedstock Traits	Platform	Processing Technology	Primary Products
Starches, lignocellulose	1. Sugars and Lignin	Hydrolysis, Fermentation	Bioethanol, Distillers' Grains and solubles (DGS), CO ₂ , lignin
Dry mixtures	2. Syngas	Gasification	Syngas (CO, H ₂), biochar
Dry mixtures	3. Bio-oil (pyrolysis oil)	Pyrolysis	Bio-oil (pyrolysis oil), biochar
High in lipids (oils, fats)	4. Industrial Oils	Extraction, Refining (chemical or enzymatic) Transesterification	Industrial oils, biodiesel, protein, glycerol
Wet, high BOD/COD mixtures	5. Biogas	Anaerobic Digestion	Biogas (CH ₄ , CO ₂), biofertilizer
Long strand biofibres	6. Biofibres	Physical separation, Refining (mechanical or enzymatic)	Biofibres, Core(shives or hurd)

○ 수집자료

1. Rick Norland, David Brook : Road-Mapping Synthesis for the NRC National Bioproducts Program : Thorington Corporation DBk Consulting August 29, 2007
2. Washington State University : On the Road to a Bioeconomy. Feb. 2008 report.
3. Pew Initiative on Food and Biotechnology : Application of Biotechnology for Functional Foods (미국의 건강식품 현황) 2007. report.
4. Todd Toyoshima, Tekes Tokyo : Functional Food in Japan - Status and Trend

제 7 장 참고문헌

- Cushman D. W. and Cheung. H. S. Spectrophotometric assay and properties of the angiotensin-converting enzyme of rabbit lung. *Biochemical Pharmacology*, 20: 1637-1648 (1971)
- Habig William H, Pabst MJ, Fleischner G, Gatmaitan Z, Arias IM, Jakoby WB. The identity of glutathione S-transferase B with ligandin, a major binding protein of liver. *Proc Natl Acad Sci USA* 71: 3879-3882 (1974)
- Kleinsek, D. A., R. E. Dugan, T. A. Baker, and J. W. Porter. 3-Hydroxy-3- methylglutaryl coenzyme A reductase from rat liver. *Meth. Enzymol.* 71: 462-479 (1981)
- Sung CK. and Cho SH. Studies on the purification and characteristics of tyrosinase from *Diospyros kaki Thunb.* *Kor. Biochem. J.*, 25: 79-87 (1992)
- Fayek KI. and El-Sayed ST. Purification and properties of fibrinolytic enzyme from *Bacillus subtilis.* *Zeit. fur Allgem. Mikrobiol.*, 20: 375-382 (1980)
- Blois, M.S. : Antioxidant determination by the use of a stable free radical. *Nature.* 181, 1199-1200 (1958).
- Van den Berg R, Haenen GR, van den Berg H and Bast A. : Applicability of an improved Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) assay for evaluation of antioxidant capacity measurements of mixtures. *Food Chem.* 66, 511-517 (1999).
- Marlund, S. and Marklund, G. : Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *Eur. J. Biochem.* 47, 469-474 (1974).
- Chung SK, Osawa T and Kawakishi S. : Hydroxyl radical-scavenging effect of spice and scavenger from brown mustard (*Brassica nigra*). *Biosci. Biotech, Biochem.* 61, 118-123 (1997).
- "Nucleic acid techniques in bacterial systematics (John Wiley and Sons, England)"와 "nucleic acid research (2000) 28(1):173-174
- Cho CW, Kim SW, Rho J, Rhee YK and Kim K: Extraction characteristics of saponin and acidic polysaccharide based on the red ginseng particle size. *J. Ginseng Res.* 32(3), 179-186 (2008).
- Korean Statistical Association 2006. Annual report on the cause of death statistics.

Korean Statistical Association. Seoul. Korea.

- Kannel WB, Megee DL. Diabetes and cardiovascular disease. *JAHA* 241: 2035-2038 (1979)
- Abrams JJ, Ginsberg H, Grundy SM. Metabolism of cholesterol and plasma triglycerides in non-ketotic diabetes mellitus. *Diabetes* 31: 903-910 (1982)
- Tol AV. Hypertriglyceride in the diabetic rats effective removal of serum very low density lipoprotein. *Atherosclerosis* 26: 117-128(1977)
- The expert committee on the diagnosis and classification of diabetes mellitus. Report of the expert committee on the diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 20: 1183-1197 (1997)
- Hwang KY, Kim YH, Cho YS, Park YS, Lee JY, Kang KD, Kim K, Joo DK, Ahn DK, and Seong SI. Hypoglycemic effect of fermented soybean culture mixed with mulberry leaves on neonatal streptozotocin-induced diabetic rats. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 37: 452-458 (2008)
- Choi JS, Chung Hy, and Han SY. A preliminary study on hypercholesterolemic and hyperglycemic activities of some medical plants. *Korean J Pharm* 21: 153-157 (1990)
- Kim TH, Yang KS, and Whang SH. Studies on the physiochemical activities of Commelinae herba extract on the normal and streptozotocin-induced hyperglycemic rats. Thesis collection. *SM Pharm Sci* 7: 39-59 (1990)
- Lim SJ, Kim SY, and Lee JW. The effects of Korean wild vegetables on blood glucose level and liver-muscle metabolism of streptozotocin-induced diabetic rats. *Korean J Nutr* 28: 585-594 (1995)
- Ko JB. Effects of raw soy flour (yellow and black) on serum glucose and lipid concentration in streptozotocin-induced diabetic rats. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 27: 313-318 (1996)
- Rho MH, Choi MA, and Koh JB. Effects of raw soy flour (yellow and black) on serum protein concentrations and enzyme activity in streptozotocin-induced diabetic rats. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 27: 724-730 (1998)
- Choi MJ. Comparison of dietary casein or soy protein effect on plasma glucose, lipids and hormone concentrations in the streptozotocin-induced diabetic rats. *J Research Institute for Life Sciences(Keimyung University)* 23: 285-295 (1997)
- Choi MJ and Han YJ. Effects of the soy protein level on plasma glucose, lipids, and

hormone in streptozotocin-diabetic rats. *Korean J Nutrition* 27: 883-891 (1994)

- Kim MH, Kim HY, Kim WK, Kim JY, and Kim SH. Effects of soyoligosaccharide on blood glucose and lipid metabolism in streptozotocin-induced diabetic rats. *Korean J Nutrition* 34: 3-13 (2001)
- Jha HC. Inhibition of in vitro microsomal lipid peroxidation by isoflavonoids. *Biochem Pharmacol* 3: 1367-1369 (1985)
- Bates SH and Jones RB. Bailey CJ. Insulin-like effect of pinitol. *Br J Pharmacol* 130: 1944-1948 (2000)
- Lee IS, Lee SO, and Lee IZ. Effects of tissue cultured ginseng on blood glucose and lipids in streptozotocin-induced diabetic rats. *Korean J Food Sci* 35: 280-285 (2003)
- Park KS, Ko SK, and Chung SH. Comparisons of antidiabetic effect between Ginseng Radix Alba, Ginseng Radix Rubra and Panax Quinquefoli Radix in MLD STZ-induced diabetic rats. *J Ginseng Res* 27: 56-61 (2003)
- Kwak YS, Park JD, and Yang JW. Present and its prospect of red ginseng efficiency research. *Food Industry and Nutrition* 8: 30-37 (2003)
- Shin-Hee Kim, Ju-Seop Kang, Sang Jun Lee, and Young-Jin Chung. Antidiabetic effect of Korean red ginseng by puffing process in streptozotocin-induced diabetic rats. *J Korean Soc Food Sci Nutr.* 37: 701-707 (2008)
- Lim SJ, Han HK, and Ko JH. Effects of edible and medicinal plants intake on blood glucose, glycogen and protein levels in streptozotocin induced diabetic rats. *Korean J Nutr* 36: 981-989 (2003)
- Park CH, Kim DJ, Shin EJ, Lee GD, Kim JO, Kim KS, and Hong JH. Effect of *Bulnesia sarmienti* ethanol extract on plasma levels of glucose and lipid in streptozotocin induced diabetic rats. *Korean J. Food Sci Technol.* 40: 455-459 (2008)
- Kwangju social Research Center. 2000. Statistics and data analysis for non-statisticians: Using windows SAS
- Malabu UH, Dryden S, McCarthy HD, Kilpatrick A, and Williams G. Effects of chronic vanadate administration in the STZ-induced diabetic rats. The antihyperglycemic action of vanadate is attributable entirely to its suppression of feeding. *Diabetes* 43: 9-15 (1994)
- Niall MG, Rosaleen AM, Daphne O, Patrick BC, Alan HJ, and Gerald HT. Cholesterol metabolism in alloxan-induced diabetic rabbits. *Diabetes* 39:626-636 (1990)

- Lawes CM, Parag V, Bennett DA, Suh I, Lam TH, Whitlock G, Barzi F, Woodward M. Blood glucose and risk of cardiovascular disease in the Asia Pacific region. *Asia Pacific Cohort Studies. Diabetes Care* 27: 2836-2842 (2004)
- Kim JS, Na CS, and Eun JB. Effect of *Hovenia dulcis* Thumb extract on the hyperglycemic mice induced with streptozotocin. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 34: 632-637 (2005)
- Kim HS and Choe M. Hypoglycemic effect of *Paecilmyces japonica* in NIDDM patients. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 34: 821-824 (2005)
- Roman-Ropez CR and Allred JB. Acute alloxan diabetes alters the activity but not the total quantity of acetyl CoA carboxylase in rat liver. *J Nutr* 117: 1976-1981 (1987)
- Kube K and Nanba H. Anti-diabetic mechanism of Maitake(*Grifola frondosa*). PP. 215-222, In: *Mushroom Biology and Mushroom Products*. Royse(ed.) Co. Ltd. penn State Uni., PA, USA (1996)
- Kum Ju Park, Young-Joo Oh, Sang-Yun Lee, Hyun-Su Kim, and Hyo-Cheol Ha. Anti-diabetic effect of crude polysaccharides from *Grifola frondosa* in KK-Ay diabetic mouse and 3T3-L1 adipocyte. *Korean J. Food Sci. Technol.*39: 330-335(2007)
- Yoshihiha T, Yasumitsu T, Masaori I, Takeshi T, Tasuku S, Hisao M, Hajime I, Manabu I, Isao U, Rie I, Masaharu U, Yusuke S, Toshifumi I, Shuji T, and Masahi K. Effect of glimepiride (HOE 490) on insulin receptors of skeletal muscles from genetically diabetic KK-A^y mouse. *Eur. J. Pharmacol.* 308: 205-210 (1996)
- 장유경, 변기원, 이보경, 이종현, 이흥미, 조영연 공저. (개정판) *임상영양관리-질병에 따른 식사요법*. 도서출판 효일. pp 287 (2008)
- Brunzell JD and Ayyobi AF. Dyslipidemia in the metabolic syndrome and type 2 diabetes mellitus. *Am J Med* 115: 24S-28S (2003)
- Krauss RM. Lipids and lipoproteins in patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care* 27: 1496-1504 (2004)
- 조영자, 김현아, 방미애, 김은희 (2002). 식이 중 표고버섯의 섭취가 당뇨유발쥐의 혈당과 지질 농도 및 Glutathione 효소계에 미치는 영향. *한국영양학회지*, 35(2), 183-191.
- 김응진, 민현기, 최영길, 이태희, 허갑범, 신순현 (1998). *당뇨병학. 고려의학*
- 국민건강보험공단 (2002). 2001 건강보험통계연보. 서울: 국민건강보험공단.
- 조남한 (2005). 우리나라 당뇨병의 유병률과 관리 상태. *대한내과학회지*, 68(1), 1-3
- 통계청 (2006). *사망원인 통계*

- 최자윤 (2003). 당뇨병자와 일반인의 혈당검사 방법 별 지각된 통증정도에 대한 비교. 대한 간호학회지, 33(7),928-935
- 임상시험 통계지침(2000). 식품의약품안전청. 의약품안전국. 의약65625-13353, 29.
- Cohen, J. (1988). Statistical power analysis for the behavioral sciences. 2nd. edn. Academic Press: New York.
- Friedman, L.M., Furberg, C.D. and DeMets, D.L. (1998). Fundamentals of clinical trials. 3rd Edition, Springer: New York.
- Tritchler, D. (1995). Interpreting the standardized difference. Biometrics, 51, pp.351-353.
- 이재원, 박미라, 유한나 (2007). 생명과학연구를 위한 통계적 방법. 자유아카데미
- Steiner G, Chow A, and Litte JA. Hypertriglyceridemia associated with deficiency of apolipoprotein C-II. New Eng. J. Med. 298: 1256-1273 (1978)
- Eisenberg, S. High density lipoprotein metabolism. J. Lipid Res, 25: 1017-1058 (1984)
- Goldberg RB. Lipid disorders in diabetes. Diabetes Care 4: 561-572 (1981)
- Steer KA, Sochor M, and Mclean P. Renal hypertrophy in experimental diabetes changes in pentose phosphate pathway activity. Diabetes 34: 485-490 (1985)
- Dai S, Thompson KH, and McNeill JH. One-year treatment of streptozotocin-induced diabetic rats with vanadyl sulphate. Pharmacol Toxicol 74: 101-109 (1994)
- Yang YR, Kim HL, and Yang-Kyun Park. Effects of onion kimchi extract supplementation on blood glucose and serum lipid contents in streptozotocin-induced diabetic rats. J Korean Soc Food Sci Nutr. 37: 445-451(2008)
- Jo WS, Nam BH, Oh SJ, Choi YJ, Kang EY, Hong SH, Lee SH, and Jeong MH. Hepatic protective effect and single-dose toxicity study of water extract of cordyceps militaris grown upon protaetia dreujtarsis. Korean J. Food Sci. 40: 106-110 (2008)
- Kim HJ, Lee JW, Ji YJ, Yu MH, Park JH, Lee KD, and Lee IS. Antioxidant Effects of Red Ginseng Powder on Liver of Benzo(α)Pyrene-Treated Mice. J Korean Soc. Food Sci. Nutr. 36: 521-526 (2007)
- Aktay G, Deliorman D, Ergun E, Ergun F, Yesilada E, and Cevik C. Hepatoprotective effects of turkish folk remedies on experimental liver injury. J Ethernopharm. 73: 121-129 (2000)
- Yun HS, Chang IM, Chi HJ, and Lee SY. Plants with liver protective activities(IV). Korean J Pharmacog. 11: 57-60 (1980)
- Muriel P, Garciapina T, Perez-alvarez V, and Mourelle M. Silymarin protects against

paracetamol-induced lipid-per-oxidation and liver damage. *J Appl Toxicol* 12: 439-442 (1992)

- Lee BC, Park JO, and Ryu BH. Antioxidative effects of silymarin and silybin purified from *Silybum marianum* on lipid peroxidation. *Korean J Food & Nutr.* 10: 37-43 (1997)
- Kim BS, Kim HK, Choi JW, and Lee CK. The effects of *Melaleuca toosendan fructus* on liver function. III. *Korean J Pharmacog.* 27: 47-52 (1996)
- Reynolds J. *The extra pharmacopoeia.* 29th ed. The pharmaceutical press, London. 1613-1620 (1989)
- Anita KC and James RT. Interaction of hypoxia and carbon tetrachloride toxicity in hepatocyte monolayers. *Exp Mol Pathol.* 50: 183-192 (1989)
- Recknagel RO. Carbon tetrachloride hepatotoxicity. *Pharmacol Rev.* 19: 145-208 (1967)
- Recknagel RO, Glende EA. Carbon tetrachloride hepatotoxicity: an example of lethal cleavage. *CRC Crit Rev Toxicol.* 2: 263-297 (1973)
- Villarruel MC, Diaz Gomez MI, and Castro JA. The nature of the in vitro irreversible binding of carbon tetrachloride to microsomal lipids. *Toxicol Appl. Pharmacol.* 33: 106-114 (1975)
- Glende EA and Pushpendran CK. Activation of phospholipase A2 by carbon tetrachloride in isolated rat hepatocytes. *Biochem Pharmacol.* 35: 3301-3307 (1986)
- Long RM and Moore L. Inhibition of liver endoplasmic reticulum calcium pump by CCl_4 and release of a sequestered calcium pool. *Biochem Pharmacol.* 35: 4131-4137 (1986)
- Plaa GL, Hewitt WR. Quantitative evaluation of indices of hepatotoxicity. In *Toxicology of the Liver.* Zakim D, Boyer TD, eds. Raven Press, New York. 103-120 (1982)
- Recknagel RO. A new direction in the study of carbon tetrachloride hepatotoxicity. *Life Sci.* 33: 401-408 (1983)
- Lieber CS. Alcohol and the liver. *Gastroenterology.* 106: 1085-1105 (1994)
- Seakins A and Robinson DS. The effect of the administration of carbon tetrachloride on the formation of plasma lipoproteins in the rat. *Biochemistry.* 86: 401-407 (1963)
- Plaa GL. Toxic response of the liver. pp. 334-353. In: Casarett and Doull's *Toxicology.* Amdur MO, Doull J, Klassen CD (eds). Pergamon Press, New York, NY, USA. (1991)
- *Statistics and data analysis for non-statisticians : Using windows SAS* Kwangju social Research Center. (2000)
- Jeon JR and Park JR. Effect of *Eucommia ulmoides* leaf water extract on hepatotoxicity

- of carbon tetrachloride-induced rats. *J Korean Soc Food Sci Nutr.* 31: 124-130 (2002)
- Lee SB, Cho TS, Yoon KW, Lee JC, Lee SM, and Shim SB. A study on hepatoprotective effect of PS-1 from *Artemisia iwayomogi*. *J Appl Pharmacol.* 6: 119-129 (1998)
 - Jin YX, Yoo YS, Han EK, Kang IJ, and Chung CK. *Artemisia capillaris* and *paecilomyces japonica* stimulate lipid metabolism and reduce hepatotoxicity induced by carbon tetrachloride in rats. 37: 548-554 (2008)
 - Kim OK. Protective effects of *Houttuynia cordata* Thunb on carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in rats. *Kor J Pharmaco.* 33: 324-331 (2002)
 - Kim OK. The effects of *Sedum sarmentosum* Bunge extract using super critical carbon dioxide on lipid metabolism, lipid peroxidation and antioxidation in carbon tetrachloride induced hepatotoxicity in rats. *J Korean Oil Chem* 21: 204-213 (2004)
 - Gabriel, LP and Williarn RH.(eds.) Hayes : Principles and methods of toxicology. Raben Press, New York. 407-445 (1982)
 - Perrillo RP, Griffin R, Kecskemeto KD, Launder JJ, and Zuckerman GR. Alcoholic liver disease presenting with marked elevation of serum alkaline phosphatase. *Digest Dis.* 23: 1061-1066 (1978)
 - Farombi EO, Nwankwo JO, and Emerole GO. Possible modulatory effect of browned yam flour diet on chemically-induced toxicity in the rat. *Food Chem Toxicol.* 35: 975-979 (1997)
 - Gole MK, Dasgupta S. Role of plant metabolites in toxic liver injury. *Asia Pac J Clin Nutr.* 11: 48-50 (2002)
 - 김은숙, 주은정, 이경자, 박은숙 공저, 임상영양과 식사요법, 효일 출판사 p135 (2003)
 - Kim KH and Han HK. The effect of mushroom extracts on carbon tetrachloride- induced hepatotoxicity in rats. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 27: 326-332 (1998)
 - Wakasugi JW, Katami K, Ikeda T, and Tomikawa M. Action of malotilate on reduced serum cholesterol level in rats with carbon tetrachloride-induced liver damage. *Japan J. Pharmacol.* 38: 391-398 (1985)
 - Kuller LH, Hully SB, Neaton J, and Dai WS. Environmental determinants, liver function, and high density lipoprotein cholesterol levels. *Am. J. Epidemiol.* 117: 406-412 (1983)
 - Chung TH. Chnages in lipies and apoprotein moieties of serum high density lipoprotein in patients with liver cirrhosis. *Keimyung Univ. Med. J.* 4: 28-36 (1985)
 - Lee HJ, Yoon CK, and Lee SI. Effect of dietary protein on the changes of lipoprotein

- fractions in carbon tetrachloride-treated rats. *J. Korean Soc. Food Nutr.* 22: 127-131 (1993)
- Jacob JF, Anne TH, Jan SJ, and Borge GN. Nonfasting triglycerides and risk of ischemic stroke in the general population *J. American Medical Association*, 300: 2142-2152, (2008)
 - Kim SC, Jung YS, Lee JR, Kim YW, Byun BH, Kwon TK, Suh SI, Byun SH, and Kwon YK. Inhibitory effect of *Phellinus Igniarius* water extract on TNF- α , IL-1 β , IL-6 and Nitric oxide production on lipopolysaccharide-activated Raw 264.7 cells. *Kor J Oriental Physiology & Pathology* 18(3):880-886, 2004
 - Lee YS, Kim HS, Kim SK, and Kim SD. IL-6 mRNA expression in mouse peritoneal macrophages and NIH3T3 fibroblasts in response in response to *Candida albicans*. *J Microbiol Biotechnol.* 10, 8-15, 2000
 - Higuch M, Higashi N, Taki H, and Osawa T. Cytolytic mechanism of activated macrophages. Tumor necrosis factor and L-arginine-dependent mechanism acts as synergistically as the major cytolytic mechanism of activated macrophages. *J Immunol.* 144, 1425-1431, 1990
 - McBaniel ML, Kwon G, Hill JR, Marshall CA, and Corbett JA. Cytokines and nitric oxides in islet inflammation and diabetes. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 211, 24-32, 1996
 - Corbett JA and Mac Daniel ML. Intra-islet release of interleukin-1 inhibits beta cell function by inducing beta cell expression of inducible nitric oxide synthases. *J. Exp. Med.* 181, 559-568, 1995
 - Cetkovic-Cvrlje M, and Eizirik DL. TNF and IFN γ potentiate the deleterious effects of IL-1 β on mouse pancreatic islets mainly via generation of nitric oxide. *Cytokine*, 6, 399-406, 1994
 - 황광진. 산화질소(Nitric Oxide)이로운가? 해로운가?. 산화질소의 화학과 응용. 대한화학회지 39, 52-63, 1999
 - Kawamata H, Ochiai H, Mantani N, and Teasawa K. Enhanced expression of inducible nitric oxide synthase by Juzen-taiho-to in LPS-activated RAW 264-7 cells, a murine macrophage cell line. *Am J Chin Med* 28, 217-226, 2000
 - Lee BG, Kim SH, Zee OP, Lee KR, Lee HY, Han JW, and Lee HW. Suppression of inducible nitric oxide synthase expression in RAW 264-7 cell macrophages by two-carboline alkaloids extracted from *Melia azedarach*. *Eur J Pharmacol* 406, 301-309, 2000
 - Seo WG, Pae HO, OH GS, Chai KY, Kwon TO, Yun YG, Kim NY, and Chung HT.

Inhibitory effects of methanol extract of *Cyperus rotundus* rhizomes on nitric oxide and superoxide production by murine macrophage cell line, RAW 264-7 cells. *J Ethnopharmacol* 76, 59-64, 2001

- 이영선, 한옥경, 신상우, 박종현, 권영규. 향부자 열수추출물의 Nitric oxide 생성 및 iNOS 유전자 발현에 미치는 영향. *동의 생리병리학회지*, 17(3):771-776, 2003
- Lee AK, Sung SH, Kim YC, and Kim SG. Inhibition of lipopolysaccharide-inducible nitric oxide synthase, TNF- α and COX-2 expression by sauchinone effects on I- κ B α phosphorylation, C/EBP and AP-1 activation. *British Journal Pharmacology*. 139, 11-20, 2003
- Chen F, Castranova V, and Shi X. New insights into the role of nuclear factor- κ B in cell growth regulation. *Am J Pathol*. 159(2), 387-397, 2001
- Palmer RM, Ashton DS, and Moncada S. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature*, 333, 664-666, 1988
- Chiou WF, Chou CJ, and Chen CF. Camptothecin suppresses nitric oxide biosynthesis in RAW 264.7 macrophage. *Life Sci* 69:625-635, 2001
- Seo WG, Pae HO, Oh GS, Kim NY, Kwon TO, Shin MK, Chai KY, and Chung HT. The aqueous extract of *Rhodiola sacchalinensis* root enhances the expression of inducible nitric oxide synthase gene in RAW 264.7 macrophage. *J Ethnopharmacol* 76:119-123, 2001
- Casey LC, Balk RA, and Bone RC. Plasma cytokine and endotoxin levels correlate with survival in patients with the sepsis syndrome. *Ann Intern Med*, 119, 771-778, 1993
- Wogensen L, Jensen M, Svensson P, Worsaae H, Welinder B, and Nerup J. Pancreatic beta-cell function and interleukin-1b in plasma during the acute phase response in patients with major burn injuries. *Eur J Clin Invest*. 23, 311-319, 1993
- Shito M, Wakabayashi G, Ueda M, Shimazu M, Shirasugi N, and Endo M, et al. Interleukin 1 receptor blockade reduces tumor necrosis factor production, tissue injury, and mortality after hepatic ischemia-reperfusion in the rat. *Transplantation*, 63, 143-148, 1997
- Takabayashi T, Shimizu S, Clark BD, Beinborn M, Burke JF, and Gelfand JA. Interleukin-1 upregulates anaphylatoxin receptors on mononuclear cells. *Surgery*. 135(5):544-554, 2004