

발 간 등 록 번 호

11-1543000-000194-01

## 기능성식품개발 연구사업단(항당뇨 및 간기능 개선)

Research Group for Development of Functional Food  
-Improvement of Diabetes and Hepatic Functions

연 구 기 관  
한 국 식 품 연 구 원

농 립 축 산 식 품 부



# 제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “기능성식품개발 연구사업단(항당뇨 및 간기능 개선)”에 관한 연구의 보고서로 제출합니다.

2013 년 6 월 30일

주관연구기관명 : 한국식품연구원

주관연구책임자 : 임 성 일

세부연구책임자 : 임 성 일

연 구 원 : 이 소 영, 남 영 도, 최 신 양

연 구 원 : 서 명 지, 노 보 영, 김 현 진

연 구 원 : 이 지 연, 송 은 지, 경 혜 련

세부연구책임자 : 이 성 훈

연 구 원 : 박 소 립, 김 재 호, 박 진 욱

세부연구책임자 : 성 기 승

연 구 원 : 전 기 흥, 서 동 원, 이 경 원

협동연구기관명 : 서울대학교

협동연구책임자 : 오 원 근

연 구 원 : 강 건 욱

참 여 기 업 명 : (주)건농네이처

참여기업책임자 : 조 국 봉



# 요 약 문

## I. 제 목

기능성식품개발 연구사업단(항당뇨 및 간기능 개선)

## II. 연구개발의 목적 및 필요성

### 1. 연구개발 사업단의 목적

본 사업단은 참여업체인 (주)건농네이처와 공동으로 개발한 기능성 고체발효물 제조기술을 이용하여 새로운 당뇨 또는 간질환 개선 개별인정형 건강기능식품을 개발하고 이들 유효성분으로부터 의약품 후보물질을 개발하고자 함. 또한 고체발효시스템을 이용하여 친환경 안전농축산물 생산 및 성장촉진에 의한 사료절감 가능 가축사료 첨가 생균제를 개발하고 산업화하고자 함.

### 2. 연구개발의 필요성

#### 가. 당뇨 및 간기능개선 예방/치료용 건강기능식품 개발

- 당뇨병의 유병율을 2010년을 기준으로 약 10% 정도로 30세 이상 성인 10명 중 1명은 당뇨병 환자로 보고되고 있으며, 2030년에는 722만명까지 증가하여 전체 인구의 14.4%까지 도달할 것으로 추정되고 있음. 더욱이 노령화와 생활습관의 변화로 인해 pre-diabetes의 급격한 증가가 보고되고 있어 이로 인해 당뇨병환자의 증가율이 더욱 가팔라질 전망이다. 당뇨병 환자의 증가로 인해 발생하는 국가 차원의 경제적 손실은 의료비 지출, 노동생산 손실비를 포함하여 약 5조 2,416억원에 이르는 것으로 추산되므로 그 대책 마련이 매우 시급함.
- 이와 더불어 간 질환은 질환발생 초기단계에서는 통증이나 자각증상이 나타나지 않고 말기에 발견되기 때문에, 사망률이 높아 사회적인 문제를 일으키고 있으며, 특히 사회적으로 중요한 위치를 차지하는 중장년층에 발병하여 사회적·경제적으로 막대한 손실을 유발하기 때문에 새로운 간질환 치료제 개발의 필요성과 중요성이 더욱 증대되고 있음
- 이들 질환들은 인슐린저항성 및 이와 관련된 복잡하고 다양한 여러 대사이상과 임상양상을 모두 포괄하고 있어, 단일 기작에 의하여 개발된 의약품으로는 예방 및 치료가 제대로 이루어 질 수 없음. 당뇨병, 고혈압, 복부비만, 이상지혈증이 발병하기까지 수년 내지 십년 이상 장기간이 걸리기 때문에 장기간 복용으로 인한 부작용이 있는 의약품으로는 예방이 어려움. 이러한 사유로 대사증후군의 예방에는 의약품보다 식품이 효율적이지만 다양한 기작에 의하여 발병하는 대사증후군을 제어하는 식품소재는 아직까지 개발되지 않은 실정임. 그러므로 BT와 식품의 융·복합기술 파급효과가 큰 기술을 도입하여 대사증후군 예방에 효과가 있는 유효성분을 강화한 신소재 개발이 필요함. 따라서 본 사업단에서는 당뇨 및 간질환 예방/치료용 건강기능식품을 개발하고자 함

#### 나. 당뇨 및 간기능개선 예방/치료용 의약품 소재 개발

- 평균 수명의 연장과 삶의 질 향상으로 인해 만성 또는 난치성 질환이 증가하여 기존의 치료적 개념의 의료보다 예방적 개념의 의료의 필요성이 높아지고 있으며, 또한, 최근의 치료형 의료

에서 예방형 의료로 전환하고자 하는 사회적 요인은 전통의약의 역할이 증가하여 천연물이 재조명을 받고 있음. 오래 전부터 천연물 의약품의 사용 및 개발이 왕성했던 유럽 뿐 아니라, 천연물을 단순히 식품이나 기능성 식품의 수준으로 취급하던 미국에서도 최근에는 천연물의 의약품으로서의 가치와 가능성을 인정하여 "Botanical drug"라는 천연물 의약품으로의 새로운 개념을 인정하고, 이에 대한 제도적인 장치의 (Guidance for Industry for Botanical Drugs Products, 2004) 마련 뿐 아니라, 국가적 차원에서의 지원이 이루어지고 있어 천연물 의약품은 기존의 합성의약품, 생물학적 의약품과 더불어 새로운 형태의 의약품으로 자리 잡을 가능성이 매우 높음

- 우리나라는 외국에 비해 전통의약과 관련된 전통지식이 풍부하고, 우수한 인력 인프라를 구축하고 있음. 그러나 다국적 제약회사에 비해 열악한 국내 제약회사의 환경과 부족한 연구 개발투자 규모로 인하여 아직 세계적인 성과가 미흡한 실정임. 국가적으로 천연물을 이용한 의약품/건강기능식품의 연구개발이 집중적으로 수행된다면 세계적으로 경쟁력 있는 고부가가치의 천연물 소재의 창출이 가능함
- 따라서 본 사업단에서는 천연고체발효물 및 그 원료식물로부터 당노와 간조직 보호효과를 보일 것으로 기대되는 후보 화합물들의 확인을 통해 당노 및 간질환 예방/치료 효과를 가지는 의약품후보 소재를 개발하고자함

#### 다. 고품질 안전 축산물 생산을 위해 생균제 개발

- 단백질 식품의 수요량이 급격히 늘어나고 있는 현실에서 최근에 문제가 되고 있는 것이 축산물 및 수산물 등에 항생제, 성장촉진제 같은 동물약품의 무분별한 사용과 이들 약품의 축산물 잔류에 대해 관심이 고조되고 있으며, 세계 각국에서는 이미 상당 부분 항생제의 사료 첨가를 엄격히 규제하고 있음. 더욱이 2011년 항생제의 가축사료 첨가가 전면 금지됨에 따라 가축의 질병예방 대책 마련이 시급함.
- '12년 국내 배합사료 생산은 약 1,700만 톤, 이를 생산하기 위한 옥수수 수입은 약 680만 톤으로 곡물수입에 대한 국가적 차원의 대책마련이 시급하고 또한 높은 사료가격으로 인한 축산농가의 경제적 어려움을 해소할 대책 시급. 선행연구(효능평가 : 전남축산기술원)를 통해 육우의 체중을 획기적으로 높일 수 있는 생균제를 개발하여 세계적 상품 가능성을 확인한 바 있음. 사육기간 2개월 단축으로 본 사료절감액은 두당 48만원으로 국내 사료절감액 약 4,600억 원, 사료용 옥수수 수입절감 403,200톤으로 환산됨. 세계적으로 이와 같은 생균제 개발 사례는 전무하므로 사육기간 단축 기술은 향후 초대형 연구 프로젝트로 발전할 수 있는 가능성 매우 높음(참고, 소 사육 상위 10대 국가 6억6850만두, FAO, 2007).

### III. 연구개발 내용 및 범위

본 연구는 2개의 핵심과제로 이루어져 있으며, 1핵심 과제인 당노 및 간기능 개선용 건강기능식품 개발은 3개의 세부과제로 구성되어 있고 2핵심과제인 고품질 안전 축산물 생산용 생균제 개발은 단독으로 구성되어 있음. 각 핵심과제 및 세부과제의 연구개발 내용 및 범위는 다음과 같음

핵심 및 세부과제	연구개발내용	연구범위
제 1핵심 1세부	항당뇨 및 간기능 개선효능 고체발효 기술 확보	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 고체발효물 제조공정 및 발효지표물질 설정</li> <li>○ 노니, 녹차, 울금 및 미강복합물 발효물의 기능성 평가</li> <li>○ 항당뇨 및 간기능 활성 기전 및 전임상 효능 평가</li> <li>○ 산업화 공정확립-원료 및 제품의 표준화 진행</li> <li>○ 설치류를 대상으로 한 독성실험을 통해 안전성 구명</li> <li>○ 예비인체적용실험실시를 통한 안전성 및 인체 유효성 구명</li> </ul>
제 1핵심 2세부	항당뇨 및 간기능 개선효능 소재개발	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 바이오마커 시험 : 혈당의 세포내 uptake 효능, AMPK 인산화, PPAR-<math>\gamma</math> 인산화, <math>\alpha</math>-SMA 및 TGF-<math>\beta</math>1 발현 정도</li> <li>○ 항당뇨, 간기능 개선 관련 의약품과 건기식 제품과의 비교 평가를 통한 고체 발효물의 우수성 제시</li> <li>○ 간 섬유질화 동물모델에서 유효성 평가</li> <li>○ 건강기능식품 등록 추진 : 건강기능식품 등록 추진을 위한 자료 수집 및 신청서 작성</li> </ul>
제 1핵심 3세부	항당뇨 약물목표점 검사, 후보물질 분석, 간섬유화, & 지방간 저해물질의 분석 및 기능연구	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ PTP1B 억제효능 물질 분리, AMP-activated protein kinase (AMPK) 활성화 물질 분리를 통해 당뇨 관련 의약 후보물질 분리 정제</li> <li>○ 정상세포에서 <math>\alpha</math>-SMA 및 TGF-<math>\beta</math>의 발현분석을 통한 지방간 또는 간 섬유화 저해물질을 분리</li> <li>○ 분리된 화합물의 구조해석을 통한 지표물질로서의 가능성 검토 및 지표물질 표준화지원</li> <li>○ 개별인정형 건강기능식품 또는 천연물신약과 관련된 제품개발 지원</li> </ul>
제 2핵심 1세부	개발 생균제의 고품질 축산물 및 증체효율 평가	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 닭, 돼지, 한우용 발효생균제 제작</li> <li>○ 산란계, 육계, 돼지, 한우의 성장촉진효능 구명</li> <li>○ 산란율 및 계란의 품질 분석</li> <li>○ 육계 및 돼지의 육질 분석</li> <li>○ 발효생균제의 미생물학적 특성 구명</li> <li>○ 생균제 급여에 따른 한우의 장내균총 변화연구</li> </ul>

#### IV. 연구개발결과

본 연구사업단의 1핵심과제에서는 노니, 녹차, 울금 및 미강복합물을 발효하여 기능성이 증진된 고체발효물을 제조하였으며, 각 발효에 대한 발효지표설정 및 기능평가를 완료하였음. 그 중에서 항당뇨 활성이 뛰어난 발효노니와 간기능 개선 활성이 뛰어난 발효울금을 제품화하여

기타가공식품으로 등록 완료하였으며, 발효율금의 경우 건강기능식품으로 등록하기 위해 원료 및 제품 표준화, 간 기능성 개선활성 기전연구, 독성실험 및 예비인체적용시험을 실시하여 건강기능식품 등록을 추진하였음. 또한 발효물 및 그 원료물질로부터 37종의 화합물을 분리하였으며, 이중 8종은 신규화합물임을 확인함. 2핵심과제에서는 증체량을 대조군 대비 130 kg이상 증진시켜주는 생균제 개발을 완료하는 등 본 연구 사업을 통해 국내 농축산식품산업의 경쟁력을 제고 할 수 있는 제품을 개발하였음

#### V. 연구성과 및 성과활용 계획

본 연구사업을 통하여 기능성이 뛰어난 고체발효물 5종을 생산하는 기술을 확립하고 2종의 시제품을 제작하는 동안 미국의 대체의학잡지인 eCAM을 포함한 국내외 우수 저널에 7편(SIC 5편, 비SCI 2편)의 논문을 보고하였으며, 특허등록 3건, 특허출원 7건을 통해 당뇨/간기능 개선용 건강기능식품 및 의약품 개발에 활용할 수 있는 원천기술 확보하였음. 이는 향후 기술료 획득과 건강기능식품 및 의약품 수출산업에 활용할 수 있을 것으로 생각됨. 또한 본 연구사업을 통해 개발한 한우성장촉진용 생균제는 한우 사육을 2개월 단축시킬 수 있는 제품으로 이를 통해 획기적인 사료비 절감이 기대되므로 축산농가의 소득증대방안으로 활용 가능하여 국내 축산물의 경쟁력 제고가 기대되고 또한 세계시장(상위 10개국 사육두수, 6억7580만두, 2007, FAO)에도 파급효과가 매우 클 것으로 기대됨. 그 밖에 연구사업을 진행하는 동안 관련사업의 발전에 필요한 인재를 양성하여 산업 발전에 기여하였음.



# SUMMARY

## I. Title

Research Group for Development of Functional Food - improvement of Diabetes and Hepatic Functions

## II. Objective and Necessity of R&D

### 1. Objective of R&D Project Group

The project group aims to develop new health functional foods for diabetes and liver ailments using technologies developed in cooperation with Geon-nong Nature Inc. to manufacture functional solid fermentation products and come up with potential medical substances from valid ingredients. We also plan to use solid fermentation system to manufacture eco-friendly safe agricultural and stockbreeding products and develop fermented probiotics made with economical live stock feeds and finally industrialize the system.

### 2. Necessity of R&D

#### A. Development of Health Functional Foods to Prevent and Cure Diabetes and Liver Ailments

- The prevalence of diabetes was reported to be around 10% as of 2010, which means 1 in 10 people over 30 years has diabetes. It is predicted that the number of diabetic patients will reach 7.22 million, 14.4% of the whole population, by 2030. Due to the aging phenomenon and the change in life pattern, pre-diabetic patients are sharply increasing, so diabetic patients are also predicted to increase at a higher rate. Economical losses caused by increase of diabetic patients at the national scale including medical expenses and labor losses are estimated to reach up to 5.2416 trillion KRW. Therefore, proper measures are urgently needed.
- Besides this, liver ailments cause little pain or subjective symptoms at early stages and can be detected very late, so the high mortality results in social problems. Considering that liver ailments usually attack middle-aged and elderly groups, who occupy important positions in the society, social and economical losses are especially great, so the necessity and importance of development of a new medicine to cure liver ailments are increasing.
- Since both types of diseases possess resistance to insulin and related complex and various metabolic disorders and clinical tendencies, a medicine developed with a single

mechanism is not really helpful in preventing or curing the diseases. It normally takes as long as years or even decades for diabetes, hypertension, abdominal obesity and dyslipidemia to actually occur, so a medicine with side effects in long-term use cannot prevent such diseases. For this reason, a food product is more effective than a medicine to prevent metabolic syndromes, but no food materials controlling metabolic syndromes caused by diverse mechanisms have been developed so far. Hence, BT or technologies that have great ripple effects on convergent food technologies need to be introduced to develop new products made by enhancing valid materials that have effects on preventing metabolic syndromes. Consequently, the project group plans to develop health functional foods for preventing and curing diabetes and liver ailments.

#### B. Development of Medical Products for Preventing and Curing Diabetes and Liver Ailments

- As mean life expectancy has increased and quality of life has improved, prevalence of chronic and intractable diseases has risen as well. So the need of preventing medical treatment rather than curing medical treatment has been going up and accordingly, natural materials widely used for traditional medicine are reilluminated. Not only Europe, the region where people used to actively use and develop natural medical ingredients since long ago, the States, where they treated natural substances merely as food materials or functional food ingredients in the past, has recently approved medical value and potential of natural matters as medical materials. They introduced the new concept of 'Botanical Drug' and established a new systematic device (Guidance for Industry for Botanical Drugs Products, 2004) and the government has taken supportive actions. So it is very probable that natural medicine will be settled as a new form of medicine along with existing synthetic medicine and biological medicine.
- Korea has advantages in the amount of knowledge in traditional medicine and the quality of human infrastructure than many other nations. However, they have not made practical accomplishments at the global scale yet because of poor working environments and shortage of investment in R&D compared with multinational companies. If the government puts emphasis on R&D of medical products and health functional foods using natural materials, manufacture of high value-added natural products with competitiveness in the world will be possible.
- Thus, we suggest to develop potential medical substances that have preventing and curing effects on diabetes and liver ailments by investigating natural solid fermented materials and their original plants to find candidate compounds expected to have effects on lessening diabetes and protecting liver tissue.

#### C. Development of Probiotics for Production of High Quality Safe Agricultural and Stockbreeding Products

- As demand on protein foods has acutely increased, reckless use of animal medicines on livestock and marine products such as antibiotics and growth accelerators has recently caused problems. These medicines has triggered increase of concerns about residual portion in animals and use of antibiotic feeds very strictly controlled in many countries. Moreover, use of antibiotics in feeds for livestock was completely banned in 2011, so a measure for prevention of diseases for livestock is immediately needed. Rapid rise of price of feeds caused huge a financial burden on each stockbreeding farm so a way to help save cost on feeds needs to be found as soon as possible.
- Probiotics co-developed by the project group and the partner have excellent effectiveness of increasing daily growth of cow weight by up to 20%. (Effectiveness Test: National institute of agricultural science and technology). Signing FTA led to opening of world's livestock market and therefore, a distinctive technology to safely produce stockbreeding products and protect domestic products is absolutely needed. If the technology us commercialized, stockbreeding farms can use feeds containing probiotics developed by the project group, so the probiotics can greatly contribute to production of safe stockbreeding products. Needs of consumers wanting safe products will also be met, which is expected to enable growth of consumption of processed stockbreeding products.

### III. Contents and Coverage of R&D

This research consists of 2 core tasks. The first core task is about development of health functional foods for diabetes and live functions and it is divided into 3 subtasks. The other core task is for development of probiotics for production of safe quality stockbreeding products. The details about R&D contents and coverage of the core tasks and subtasks are as follows.

Core Task and Subtask	R&D Contents	Coverage
Subtask 1 of Core 1	Establishment of solid fermentation technology for antidiabetic properties and improvement of liver functions	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ Setup of solid fermentation material manufacturing process and index materials</li> <li>○ Test of noni, green tea, tumreic and rice bran compound for functionality</li> <li>○ Evaluation of solid fermented materials on antidiabetic and liver function activating mechanism and preclinical effectiveness</li> <li>○ Establishment of industrial process of solid fermented materials - standardization of raw materials and products</li> </ul>

Core Task and Subtask	R&D Contents	Coverage
		<ul style="list-style-type: none"> <li>○ Investigation of safety of solid fermented materials through poison test on rodents</li> <li>○ Investigation of safety and validity on human body of solid fermented materials through preliminary application test on human body</li> </ul>
Subtask 2 of Core 1	Development of materials with antidiabetic and liver function betterment effects	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ Biomarker test: uptake effectiveness of blood glucose within cells, phosphorylation of AMPK, phosphorylation of PPAR-<math>\gamma</math> and expression level of <math>\alpha</math>-SMA and TGF-<math>\beta</math>1</li> <li>○ Suggestion of excellence of solid fermented materials through comparison evaluation of antidiabetic and liver function improving medicines with functional food products</li> <li>○ Evaluation of validity for fibrosis of liver using animal models</li> <li>○ Attempt to register as a health functional food: data required for registration of a solid fermented material as a health functional food collected and application form filled</li> </ul>
Subtask 3 of Core 1	Test for antidiabetic drug targeting, analysis of potential material, analysis of materials hindering fiberization of liver and liver fatty and functionality research	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ Refinement of potential medical materials effective on diabetes through separation of materials inhibiting PTP1B and materials activating AMP-activated protein kinase (AMPK)</li> <li>○ Separation of materials hindering fibrosis of liver or fatty liver from stellate cells through expression analysis of <math>\alpha</math>-SMA and TGF-<math>\beta</math></li> <li>○ Investigation of separated compounds for possibilities to be used as index materials and support for standardization of the index materials through structural analysis</li> <li>○ Support for development of products related to individually recognized health functional foods or new natural medicines</li> </ul>
Subtask 1 of Core 2	Test of developed probiotics for quality and effectiveness in increasing weight	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ Manufacture of fermented biotics for chickens, pigs and cows</li> <li>○ Investigation of growth accelerating effects for laying hens, chickens, pigs and cows</li> </ul>

Core Task and Subtask	R&D Contents	Coverage
		<ul style="list-style-type: none"> <li>○ Analysis of quality of eggs</li> <li>○ Analysis of meat quality of chickens and pigs</li> <li>○ Investigation of microbiological properties of fermented probiotics</li> <li>○ Research about change in number of viruses within cow intestine after provision of probiotics</li> </ul>

#### IV. Result of R&D

The research project group, through core task 1, fermented noni, green tea, tumeric and rice bran composite to manufacture solid fermented products with enhanced functionality. For fermentation of each specimen, setup of fermentation index and evaluation of functionality were finished. Among the specimens, fermented noni and fermented tumeric were excellent in activation of antidiabetic properties and improving liver functions respectively, so they were commercialized and registered as processed extra foods. We tested fermented turmeric for standardization of the raw material and processed product, activation of improvement of liver functions, poison and preliminary application to human body, to attempt to register it as a health functional food material. 37 compounds were separated from solid fermented materials and the raw material and 8 of them were new compounds. Through the second core task, we completed to develop probiotics that increase at least extra 100 kg compared with the comparison group. As a result, a product to raise competitiveness of domestic agricultural and stockbreeding industry was developed through this research project.

#### V. Research Outcome and Plan for Future Use

During this research project, a technology to produce 5 solid fermented products with excellent functionality was established and 2 prototype products were manufactured. 7 journals (5 SCI journals and 2 non-SCI journals) were published to well-known domestic and foreign journals and 3 patents were registered. Besides, 7 patent applications were made so original technologies to be used for development of health functional foods and medicines for improvement of diabetes and liver functions were occupied. Hence, they are expected to create extra income from technical fees and exportation of health functional food products medical products in the future. The probiotics for growth acceleration of cows developed through the research project can reduce the time to raise cows by 2 months at average, so it can raise competitiveness of domestic stockbreeding products by

helping the farms greatly save costs for feeds and increase income to a large extent. The research project also contributed to training of talented people who can develop related industries.

# CONTENTS

<b>Chapter 1 Introduction</b> .....	<b>17</b>
Section 1 Objective of R&D .....	17
Section 2 Necessity of R&D .....	20
Section 3 Coverage of R&D .....	30
<b>Chapter 2 The status of domestic and foreign technical development</b> .....	<b>34</b>
Section 1 The status of domestic and international market .....	34
Section 2 The status of technical development .....	44
Section 3 Research to do for development of technology .....	57
Section 4 Expected effectiveness for research outcome .....	58
<b>Chapter 3 Contents and results of study</b> .....	<b>61</b>
Section 1 Establishment of solid fermentation technology for antidiabetics .....	61
Section 2 Evaluation of solid fermented materials on antidiabetic and liver function activating mechanism, preclinical effectiveness and biomarker test .....	82
Section 3 Evaluation of safety and preliminary human research .....	147
Section 4 Isolation of structure determination of compounds with anti-diabetic activity or improvement activity of liver functions .....	175
Section 5 Development of probiotics for production of high quality safe agricultural and stockbreeding products .....	252
<b>Chapter 4 Purpose achievement an contribution degree on field of the study</b> ....	<b>306</b>
Section 1 Achievement of research goal of the study .....	306
Section 2 Contribution degree on field of the study .....	312
<b>Chapter 5 Achievement of the study and application plan of the results</b> .....	<b>314</b>
Section 1 Achievement of the study .....	314
Section 2 Application plan of the results .....	320
<b>Chapter 6 Collected foreign scientific technology information for studying</b> .....	<b>322</b>
Section 1 Status of global dietary supplements .....	322
Section 2 Study on development of anti-diatic material using PTP1B and AMPK .....	326
Section 3 Article trends in liver disease treatment .....	329
Section 4 Patent trends in liver disease treatment .....	329
<b>Chapter 7 Research facilities and equipment</b> .....	<b>330</b>
<b>Chapter 8 Reference</b> .....	<b>331</b>





# 목 차

<b>제 1 장</b>	<b>연구개발과제의 개요</b> .....	<b>17</b>
제 1 절	연구개발의 목적 .....	17
제 2 절	연구개발의 중요성 .....	20
제 3 절	연구개발의 범위 .....	30
<b>제 2 장</b>	<b>국내외 기술개발 현황</b> .....	<b>34</b>
제 1 절	국내외 관련분야 시장현황 .....	34
제 2 절	관련기술분야의 연구현황 .....	44
제 3 절	기술고도화를 위해 연구해야할 내용 .....	57
제 4 절	연구결과의 기대효과 및 위치 .....	58
<b>제 3 장</b>	<b>연구개발수행 내용 및 결과</b> .....	<b>61</b>
제 1 절	고체발효시스템 구축 및 지표성분 표준화 .....	61
제 2 절	고체발효물의 항당뇨 및 간기능 개선 기전, 임상적 효능 .....	82
제 3 절	안전성 평가 및 예비인체 적용시험 .....	147
제 4 절	항당뇨 및 간기능 개선 후보물질의 분리 및 구조결정 .....	175
제 5 절	가축사료첨가 항생제 대체 및 성장촉진용 생균제 산업화 .....	252
<b>제 4 장</b>	<b>목표달성도 및 관련분야에의 기여도</b> .....	<b>306</b>
제 1 절	연구개발목표의 달성도 .....	306
제 2 절	관련분야의 기술발전예의 기여도 .....	312
<b>제 5 장</b>	<b>연구개발 성과 및 성과활용 계획</b> .....	<b>314</b>
제 1 절	연구개발 성과 .....	314
제 2 절	연구성과 활용 계획 .....	320
<b>제 6 장</b>	<b>연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보</b> .....	<b>322</b>
제 1 절	해외 건강기능식품개발 현황4. 조직감 변화 .....	322
제 2 절	PTP1B와 AMPK를 이용한 항당뇨 관련 연구 정보 .....	326
제 3 절	간 질환 치료제 기술 분야 연구 논문의 연도별 동향 .....	329
제 4 절	간 질환 치료제 기술 분야 특허의 연도별 동향 .....	329
<b>제 7 장</b>	<b>연구시설·장비 현황</b> .....	<b>330</b>
<b>제 8 장</b>	<b>참고문헌</b> .....	<b>331</b>



# 제 1 장 연구개발과제의 개요

## 제 1 절 연구개발의 목적

### 1. 사업단의 최종 목표

본 사업단은 참여업체인 (주)건농네이처와 공동으로 개발한 기능성 고체발효물 제조기술을 이용하여 새로운 당뇨 또는 간질환 치료제 후보물질을 지표물질로 하는 대사증후군 예방/치료용 개별인정형 건강기능식품을 개발하고 친환경 안전농축산물 생산 및 사료를 절감할 수 있는 가축사료 첨가 발효 생균제 개발 및 산업화를 통해 FTA를 대처할 수 있는 제품을 개발하고자 함.

### 2. 핵심과제별 및 세부과제의 연구목표

가. 제1핵심과제 : 당뇨 등 대사증후군 예방/치료용 건강기능식품의 산업화

고체발효시스템을 이용하여 기능성 발효물 시작품을 제시하고 각 소재의 발효지표물 제시를 위한 LC-mass 분석, 항당뇨 및 간기능 개선 관련 효능평가(in vitro 및 전임상 평가), 실험동물 간으로부터 분자생물학적 기전 제시 및 metabolites 분석, 타사제품 대비 우수성 제시, 설치류 독성실험 및 인체적용시험을 통한 발효소재의 안전성 제시, 효능물질 분리·정제를 통해 후보물질을 제시함으로써 항당뇨 및 간기능개선 개별인정형 건강기능식품 등록을 추진하고 고체발효물의 산업화를 촉진하고자 함

(1) 제1핵심 1세부과제 : 항당뇨 및 간기능 개선 관련 건강기능식품의 산업화

(가) 최종목표

항당뇨 및 간기능개선 효능 발효물 제조기술을 확립하고 발효물의 지표물질 도출, 영양 및 유해물질 평가, 안전성을 평가하고 생체 간조직의 항당뇨 및 간 기능개선과 관련된 분자생물학적 기전 및 대사체 구명, 항당뇨 관련 질환모델 평가 등을 통해 개발 제품의 우수성을 규명하고 개별인정형 건강기능식품 등록을 추진하여 제품의 산업화를 목표로 함

(나) 연차별 목표

① 1단계(1년차-2년차) : 고체발효물 제조공정 확립 및 고체발효물의 기능성 구명

㉠ 고체발효물 제조공정 확립 - 발효지표물질 설정 및 영양성분 분석

㉡ 제2형당뇨모델인 KKAY 마우스를 대상으로 한 고체발효물의 항당뇨활성 구명

㉢ 간섬유화 유발 동물모델을 활용한 간기능개선활성 구명

㉣ 고지방 식이로 유도한 지방간동물모델을 이용한 지방간 개선 활성 구명

② 2단계(3년차) : 고체발효물의 산업화 공정 확립 및 발효대사체의 안전성 평가

㉠ 고체발효물의 산업화 공정확립 - 원료 및 제품의 표준화 진행

㉡ 설치류를 대상으로 한 독성실험을 통해 발효율금의 안전성 구명

㉢ 예비인체적용실험실시를 통해 발효율금의 안전성 및 인체유효성 구명

(2) 제1핵심 2세부과제 : 항당뇨 및 간기능 개선 관련 바이오마커 분석

(가) 최종목표

고체발효물의 항당뇨, 간기능개선, 고지혈증 억제 효능을 구명하기 위한 바이오마커 분석 및 개별인정형 건강기능성식품 등록 추진

(나) 연차별 목표

① 1단계 (1년차-2년차) : 고체발효물의 바이오마커 분석

㉠ 바이오마커 시험 : 혈당의 세포내 uptake 효능, AMPK 인산화, PPAR- $\gamma$  인산화

㉡  $\alpha$ -SMA 및 TGF- $\beta$ 1 발현 정도 및 간 섬유질화 동물모델에서 유효성 평가(3세부과제에서 간기능 개선관련 유효물질 분리정제 시 필요한 assay)

㉢ 항당뇨, 간기능 개선 관련 의약품과 건기식 제품과의 비교 평가를 통한 고체 발효물의 우수성 제시

② 2단계 (3년차) : 간기능 개선 활성의 바이오마커 분석 및 건강기능식품 등록 추진

㉠ 바이오마커 시험 : 발효율금의 간기능 개선 분석

㉡ 건강기능식품 등록 추진 : 발효율금의 건강기능식품 등록 추진을 위한 자료 수집 및 신청서 작성

(3) 제1핵심 3세부과제 : 항당뇨 및 간기능 개선 후보물질의 분리 및 구조결정

(가) 최종목표

항당뇨 및 간 기능 개선 후보물질의 분리정제 및 구조결정을 사업단에서 제공하는 고체발효물을 사용하여 연구를 진행함. 이를 통하여 확보된 후보물질의 구조를 NMR, Mass 등의 기기 분석을 통하여 화합물의 구조를 확인하여 발효대사물의 건강기능식품 또는 의약품소재로의 개발을 지원함.

(나) 연차별 목표

① 1단계 (1년차-2년차) : 당뇨 관련 의약 후보물질 분리 정제

㉠ protein tyrosine phosphatase 1B (PTP1B) 억제효능 물질 분리

㉡ AMP-activated protein kinase (AMPK) 활성화 물질 분리

㉢ Mouse embryonic fibroblast (MEF)에서 활성화 지표인  $\alpha$ -smooth muscle actin ( $\alpha$ -SMA) 및 TGF- $\beta$ 의 발현정도를 분석을 통한(2세부결과 바탕) 지방간 또는 간 섬유화 저해물질을 분리하고 이들 분리된 화합물의 구조해석을 통하여 지표물질을 제공

② 2단계 (3년차) : 항당뇨 및 간 보호효능 관련 지표물질의 구조결정

㉠ 1, 2차년도에서 얻어진 지표물질을 이용하여 이들과 관련된 기전연구를 통하여 사업단의 개별인정형 건강기능식품 또는 천연물신약과 관련된 제품개발을 지원

㉡ 분리된 화합물의 구조를 분석하여 지표물질로서의 가능성을 검토

㉢ 특히 이 과정에서 얻어진 지표물질을 통하여 개발하려는 제품의 표준화를 HPLC 등의 분석방법을 통하여 지원함.

나. 제2핵심과제 : 가축사료첨가 항생제 대체 및 성장촉진용 생균제 산업화

(가) 최종목표

안전축산물 생산 및 사료절감을 위해 발효생균제를 첨가한 무항생제 사료의 가축 성장촉진 및 육질 등 품질개선 효능 평가로 생균제의 우수성을 규명하고 산업화

(나) 연차별 목표

- ① 1단계 (1년차) : 닭 사료 첨가제 및 고품질 안전계란 사육 효능 구명
  - ㉠ 산란계 및 육계 사육
  - ㉡ 산란율 및 계란의 품질평가, 육계의 성장촉진을 평가
- ② 2단계 (2년차) : 돼지 사료 첨가제 및 고품질 안전 돈육 사육 효능 구명
  - ㉠ 무항생제 돼지 및 한우 사료 제조
  - ㉡ 돼지, 육우의 사육 및 성장촉진을 평가
  - ㉢ 계육 및 돈육의 육질 평가
- ③ 3단계 (3년차) : 한우 사료첨가제 및 고품질 안전 한우 사육 효능 구명
  - ㉠ 무항생제 한우 사료 제조
  - ㉡ 한우 사육 및 성장촉진을 평가

## 제 2절 연구개발의 필요성

### 1. 당뇨 및 간질환 예방/치료용 건강기능식품 산업화 연구의 필요성

대사증후군이란 병태생리적으로 가장 중요한 인슐린저항성 및 이와 관련된 복잡하고 다양한 여러 대사이상과 임상양상을 모두 포괄하고 있어, 단일 기작에 의하여 개발된 의약품으로는 예방 및 치료가 제대로 이루어 질 수 없음. 당뇨병, 고혈압, 복부비만, 이상지혈증이 발병하기까지 수년 내지 십년이상 장기간이 걸리기 때문에 장기간 복용으로 인한 부작용이 있는 의약품으로는 예방이 어려움. 이러한 사유로 대사증후군의 예방에는 의약품 보다 식품이 효율적이지만 다양한 기작에 의하여 발병하는 대사증후군을 제어하는 식품소재는 아직까지 개발되지 않은 실정임. 그러므로 BT와 식품의 융·복합기술은 새로운 기능과 시장을 창조할 수 있는, 파급효과가 큰 기술인 생물전환 기법을 이용하여 대사증후군 예방에 효과가 있는 유용성분을 강화한 신소재 개발이 필요함. 따라서 본 사업단에서는 당뇨 및 간질환 예방/치료용 건강기능식품을 개발하고자 함.

### 가. 당뇨 예방/치료용 건강기능식품 연구개발의 필요성

○ 현대인은 운동부족 및 식생활의 서구화로 인하여 비만, 당뇨, 고지혈증 및 간 질환 등과 같은 대사증후군 (metabolic disease, syndrome X)의 발병률이 급속히 증가하고 있음. 특히 한국인의 경우 서양인에 비해 상대적으로 췌장의 베타세포 부족이 심하고 인슐린 분비능 또한 떨어져 있어 당뇨병에 대한 심각성이 높음.

○ 당뇨병은 1형 당뇨병 (type I diabetes mellitus, T1DM), 2형 당뇨병 (type I diabetes mellitus, T2DM) 및 특별한 경우에 발생하는 임신성 당뇨 (gestational diabetes)가 있으나 보통 임신성 당뇨는 출산 후 증상이 없어지는 경우가 있으므로 크게 1형 당뇨병과 2형 당뇨병으로 구분됨. 1형 당뇨병은 인슐린 의존형 (insuline dependent)으로서 면역학적 기전에 의해 췌장 베타세포가 파괴되거나 유전자 발현이상으로 인한 인슐린 생성장애에서 기인하며 소아기에 발병하는 형태이다. 2형 당뇨병은 인슐린 저항성이 주된 역할을 하는 형태로 인슐린 비의존성 (non insulin dependent diabetes mellitus, NIDDM)으로 초기에는 인슐린의 생성이 정상이나 인슐린 저항성(insulin resistance)으로 인한 인슐린의 대사조절능력의 저하로 시작되어 궁극적으로는 췌장세포의 인슐린 분비장애에 이르게 되며 40세 이상의 성인이 된 후에 발병하며 과체중과 비만과 밀접한 관계가 있는 당뇨병의 형태로 성인형 당뇨병으로 칭함.

○ 그림 1-2-1에 나타난 바와 같이 1985년 전 세계 당뇨병 환자수가 3,000만명이었음에 반해 2010년에는 2억 8천만명에 도달하였고, 2030년에는 약 4억 3천 8백만명으로 증가할 것이라 추정됨. 당뇨병의 증가추세는 매우 가파르며 특히 아시아 지역에서의 증가속도가 큼을 알 수 있는데, 지역별 당뇨병 환자 증가추세를 보면, 2010년 2천만명의 당뇨병 환자수를 갖고 있는 중국은 104% 증가하여 2030년에는 4천 2백만명, 인도는 3천 백만명에서 250% 증가하여 7천 9백만명, 중동은 2천만명에서 164% 증가하여 5천 2백만명 및 동남아 5천 8백만명 등 아시아 지역을 합하여 2030년에는 2억 3천 2백만명에 도달할 것으로 추정되고 있음. 이러한 증가추세가 보여주듯이 당뇨병은 현재도 세계 10대 사망원인 중에 하나이기 때문에 보다

효과적인 치료법의 개발이 절실한 실정임.

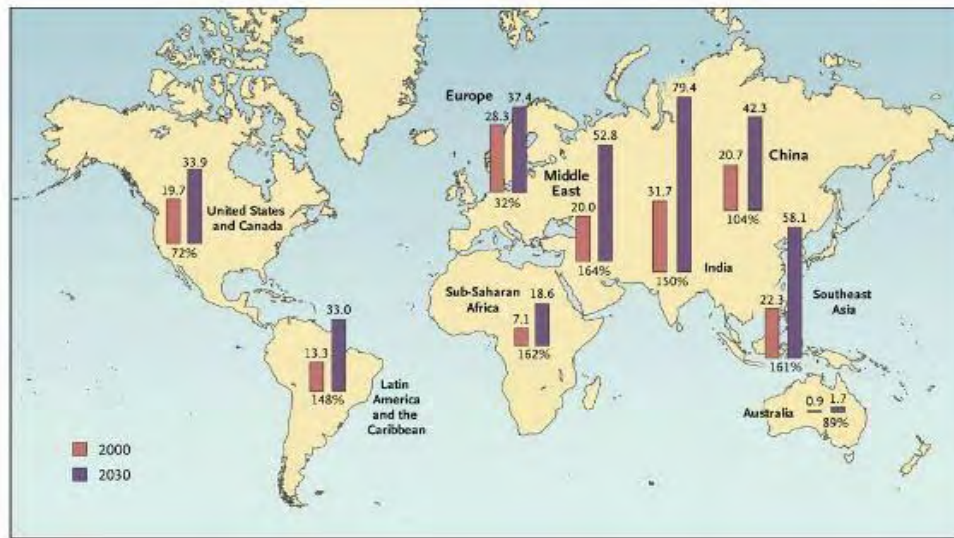


그림 1-2-1. Worldwide prevalence of diabetes 2000-2030.

○ 국내 사망원인 순위 5인 당뇨병의 유병율은 2010년 기준 약 10% 정도임. 이는 30세 이상 성인 10명 중 1명은 당뇨병 환자임을 의미하는데, 2010년 국내의 당뇨병 환자는 전체 인구 5,000만명 중 490만 명 정도로 추산되며 2030년에는 722만명까지 증가하여 전체 인구의 14.4%까지 도달할 것으로 추정되고 있음. 최근에는 아직 자신이 당뇨병환자임을 모르고 있으나 조만간 당뇨병으로 진단될 예비환자인 pre-diabetes의 증가가 보고되고 있어 이로 인해 당뇨병환자의 증가율이 더욱 가팔라질 전망이다. 특히 노령화와 생활습관의 변화로 인해 2형 당뇨병 환자수의 증가가 전체당뇨병 환자 증가의 대부분을 차지할 추세임.

표 1-2-1. 주요 만성질환 유병율(%), 한국 통계청 2008년

	고혈압	당뇨병	고콜레스테롤혈증	영구치우식증	골관절염	천식	알레르기성비염	중이염
2005	28.0	9.1	8.1	-	13.2	-	7.8	2.9
2007	25.6	9.7	10.9	34.8	10.5	6.2	10.3	4.1
2008	27.8	10.0	11.2	32.7	11.4	7.9	10.9	3.8
남자	29.4	10.8	9.6	34.7	5.6	8.4	9.9	3.3
여자	26.4	9.3	12.7	30.9	16.9	7.5	11.7	4.4
30~39	10.7	2.1	5.9	38.4	1.3	5.6	18.3	4.9
40~49	19.9	7.6	8.5	33.1	5.6	5.9	11.2	3.0
50~59	34.7	12.5	15.0	27.4	15.1	7.6	7.9	4.7
60~69	47.7	21.2	18.6	31.3	24.3	11.8	5.2	3.5
70세이상	56.2	19.3	16.1	29.0	29.8	15.0	3.1	2.1

- 이러한 당뇨병의 증가는 당뇨병으로 인해 발생하는 의료비 발생도 증가시키고 있는데, 2009년 대한병원협회에서 보고한 우리나라 당뇨병의 역학적 특성에 따르면 성인 당뇨병 환자의 건강보험 진료비는 전체 성인총 진료비의 19.2%에 해당하는 1조6천억원에 달하는 것으로 보고되고 있음. 이는 순수한 의료비만 고려한 것으로 생산액 손실비를 포함하면 약 5조2,416억원(GNP의 0.96%)에 이르는 국가차원의 경제적 손실이 발생하는 것으로 추산됨. 또한 의료비를 충당하기 위해 전세를 줄이거나 재산을 처분한 가구를 의미하는 재난적 의료비 발생가구의 17%가 당뇨병이 원인임 밝혀져 당뇨병으로 인한 사회적 손실이 막대함을 시사함으로 그 대책 마련이 매우 시급함.
- 따라서 본 사업단은 당뇨병의 90% 이상을 차지하고 있으며, 향후 유병율이 더욱 증가할 것으로 예상되는 제2형 당뇨병을 타겟으로 하는 건강기능식품 및 의약품 후보 물질을 개발하기 위해 천연물소재 및 이들을 발효한 고체발효물의 항당뇨활성을 인슐린저항성의 발병기전을 근거로 평가하고 제2형 당뇨모델인 KKAY를 이용하여 구명하고자 함. 또한 활성을 보인 후보소재로 부터 단일화합물의 분리정제 및 구조결정을 통해 지표물질을 확립함으로써 건강기능식품 및 의약품을 개발하고자 함.

#### 나. 간 질환 예방/치료용 건강기능식품 연구개발의 필요성

- 간 질환은 질환발생 초기단계에서는 통증이나 자각증상이 나타나지 않고 말기에 발견되기 때문에, 사망률이 높아 사회적인 문제를 일으키고 있음. 우리나라의 경우 간 질환 환자는 70년대 후반부터 꾸준히 늘어나는 추세로 1999년에는 당뇨병 환자보다 높은 23.4% (인구 10만명당)로 사망원인 5위였으나, 2009년에는 13.8%로 사망률 8위로 감소하는 등 꾸준한 사회적 관심에 의하여 많이 줄어들고 있는 추세임. 그러나 간질환은 여전히 사회적으로 가장 생산력이 왕성한 40대 남성들의 사망원인 1위로 꼽히며, 40-50대 남성 사망자중 압 다음으로 사망률이 높은 질환으로 40대 남성은 20대 남성에 비해 4배 이상, 50대에는 8배 이상, 60대에는 4배 이상 사망률이 높은 것으로 집계됨(통계청, 2005). 따라서 간 질환은 사회적으로 중요한 위치를 차지하는 중장년층에 발병하여 사회적·경제적으로 막대한 손실을 유발하기 때문에 새로운 간질환 치료제 개발의 필요성과 중요성이 더욱 증대되고 있음.
- 간 질환은 바이러스, 지속적인 다량의 알코올 섭취, 약물의 오남용 등 다양한 원인에 의하여 간세포가 손상을 받으면서 발병하며, 초기에 완치시키지 못하면 만성적으로 진행되어 결국에는 간섬유화 (fibrosis) 과정을 거쳐 간경변 (cirrhosis)이나 간암으로 이행됨. 그리고 초기 간독성에서 나타나는 염증반응이나 세포독성을 매개하는 것들은 바이러스나 간독성 물질의 대사에 의하여 생성되는 free radicals이나 cytokines 등이 간 손상의 주요 원인물질로 작용함.
- 간 손상이 지속적으로 진행되면 간섬유화가 나타나게 되며, 이는 간경변의 전단계로서 지속적인 간세포의 손상에 대한 수복현상에 따른 조직의 remodeling과 연관되어 나타나는 것으로 간조직에서 collagen 합성과 분해의 불균형에 의한 collagen의 과도한 축적이 원인이 됨. 이러한 간섬유화에 이르는 과정은 간세포가 손상을 받으면 손상된 간세포와 쿠퍼세포 (Kupffer cell), 동모양혈관 내피세포 (sinusoidal endothelial cell) 및 간성상세포 (hepatic



stellate cell, HSC) 등의 여러 세포들의 상호작용에 의하여 각종 cytokines 및 free radicals 등이 분비되면서 이에 의해 HSC가 활성화됨. 이렇게 활성화된 HSC에 의하여 collagen type I을 비롯한 세포외기질 (extracellular matrix, ECM) protein들이 합성, 분비되며, 이로 인해서 간섬유화가 진행되게 됨. 간섬유화를 억제시키기 위한 연구는 섬유화 과정에서 가장 핵심적인 역할을 하는 HSC의 활성화 및 증식을 억제하고 collagen의 생성을 저하시켜 간경변으로의 진행을 막는 데 초점이 맞추어지고 있음.

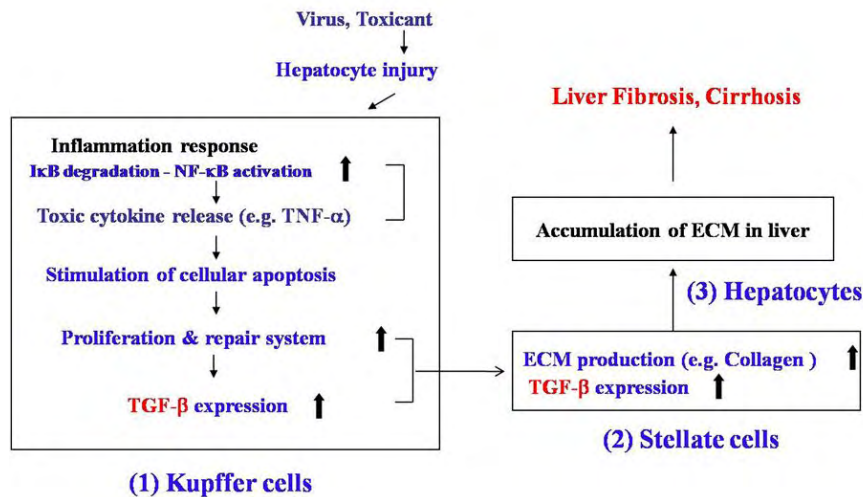


그림 1-2-2. 간손상 및 간섬유화/간경변의 진행 과정

○ 따라서 본 연구에서는 성인형의 2형 당뇨병을 대상으로 하는 식품의약의 개발과 함께 40대 성인의 사망원인 중에 중요한 원인으로 작용하는 간경화를 치료 및 예방할 수 있는 소재를 개발하고자함. 이를 위해 고체발효물의 및 원료물질을 연구 대상으로 전임상실험, 정상세포에서의 TGF-beta, alpha-SMA 활성 측정을 통하여 기능성을 구명하였음.

## 2. 당뇨 및 간질환 예방/치료용 천연물 의약품 소재 개발 연구의 필요성

### 가. 천연물 의약품 소재 개발 연구의 필요성

○ 평균 수명의 연장과 삶의 질 향상으로 인해 만성 또는 난치성 질환이 증가하여 기존의 치료적 개념의 의료보다 예방적 개념의 의료의 필요성이 높아지고 있으며, 또한, 최근의 치료형 의료에서 예방형 의료로의 전환하고자 하는 사회적 요인은 전통의약의 역할이 증가하여 천연물이 재조명을 받고 있음.

〈표 1〉 주요 국가별 인구 고령화 진전 현황

국 가	도달년도			증가 소요연수	
	고령화(7%)	고령(14%)	초고령(20%)	7%→14%	14%→20%
한 국	2000	2018	2026	18	8
일 본	1970	1994	2006	24	12
프랑스	1864	1979	2018	115	39
이태리	1927	1988	2006	61	18
미 국	1942	2015	2036	73	21
스웨덴	1887	1972	2014	85	42

자료 : 통계청, 「장래인구추계」 2006

그림 1-2-3. 고령화 시대의 이슈와 정책과제, 14-16호,  
한국직업능력개발원

- 기존 합성신약개발의 생산성 저하로 인한 대안으로 천연물 자원을 이용한 의약품 개발이 활발히 이루어지고 있으며, 천연물 의약품 시장 규모도 세계적으로 2008년에 195억불을 달성하였고, 2013년에는 329억불에 이를 것으로 추정됨. 국내시장 또한 스티렌 (애엽 추출물), 은행잎 제제 등을 포함한 천연물 의약품의 매출이 2008년 기준 3,000억에 이르고 있는 등, 천연물 관련 의약품 시장의 확대로 천연물 의약품 연구 개발의 중요성이 증가하고 있음. 또한 천연물은 합성의약품에 비해 오랜 기간 동안 사용되어 왔기 때문에 많은 경험적 임상 지식을 가지고 있어 비교적 안전하며, 의약품으로의 개발 과정과 개발 비용이 상대적으로 적게 들어 많은 국내외 기업이 천연물 의약품 개발에 참여하고 있음.
- 오래 전부터 천연물 의약품의 사용 및 개발이 왕성했던 유럽 뿐 아니라, 천연물을 단순히 식품이나 기능성 식품의 수준으로 취급하던 미국에서도 최근에는 천연물의 의약품으로서의 가치와 가능성을 인정하여 "Botanical drug"라는 천연물 의약품으로의 새로운 개념을 인정하고, 이에 대한 제도적인 장치의 (Guidance for Industry for Botanical Drugs Products, 2004) 마련 뿐 아니라, 국가적 차원에서의 지원이 이루어지고 있어 천연물 의약품은 기존의 합성의약품, 생물학적 의약품과 더불어 새로운 형태의 의약품으로 자리 잡을 가능성이 매우 높음.
- 전 세계적인 proteomics, genomics를 기반으로 한 생명공학 연구의 활성화는 약물을 개발할 수 있는 다양한 신규 약물목표점을 제공하고 있음. 우리나라도 생명공학 분야의 발전에서 기전과 목표점의 발굴은 이미 세계 선진국 권에 도달하여 있음. 예를 들어 매년 세계의 우수저널인 Cell, Nature, Science등에 20 - 30여편의 논문이 발표되고 있으므로 우리 스스로 발견한 신규 약물 목표점은 증가하고 있으나 약물 목표점의 유효성을 평가할 화합물의 개발과 연구는 부족한 실정임.
- 정부의 바이오 분야 연구개발투자는 지속적으로 확대되고 있으며, 다양한 기초연구 분야에서 세계적인 주목을 받는 각종 연구 성과들이 배출되고 있으나 이를 산업과 연결할 제약분야 경쟁력은 매우 빈약한 것으로 보고되고 있음. 2005년 한국의 제약 제조업체 허가를 받

은 750개 사 중에서 의약품을 생산할 수 있는 KGMP 적격업체는 270개에 불과하고 이 중 85%가 총자산 100억 미만의 영세 업체임. 따라서 우리나라 주요 제약사의 이익률과 연구개발 투자 비중은 세계적인 다국적 제약사에 비하여 매우 낮음.

- 세계적 자문회사인 McKINSEY 사의 보고에 의하면 선진 다국적 제약사가 신약 1종을 개발하기 위하여 사용하는 연구개발비는 5억불 (5,000억원)이며 이 중 임상관련 비용이 3.75억불로 연구 개발비의 75%를 차지하고 있음. 세계적 제약사가 일반적으로 추구하는 연구개발방법은 화합물을 디스커버리 후 합성을 진행하는 방식으로 이상적이긴 성공가능성이 희박하며, 활성이 좋은 화합물을 창출하였다 하더라도 임상과정에서 독성이 발견된다면 약물 개발은 실패할 가능성이 큼.

Stage	Research	Pre-clinical	Clinical	Review
Action	Candidate Discovery	Laboratory & Animal Testing	Phase I ~ III Safety / Efficacy / Side Effect	By Authority
Time (Years)	2 ~ 10	3	5	1
Cost (\$M)	50	125	250	75
Success Rates	10000 screened	250 enterpreclinical	5 enter clinical	1 approved

그림 1-2-4. 의약품 개발과정 및 각 단계의 연구 개발비용

- 우리나라는 외국에 비해 전통의약과 관련된 전통지식이 풍부하고, 우수한 인력 인프라를 구축하고 있음. 그러나 다국적 제약회사에 비해 열악한 국내 제약회사의 환경과 부족한 연구 개발투자 규모로 인하여 아직 세계적인 성과가 미흡한 실정임. 국가적으로 천연물을 이용한 의약품/건강기능식품의 연구개발이 집중적으로 수행된다면 세계적으로 경쟁력 있는 고부가가치의 천연물 소재의 창출이 가능함.

나. 당뇨 예방/치료용 천연물 의약품 소재 개발 연구의 필요성

- 현재 우리나라 건강보험에서 약 20%인 3조원의 규모가 당뇨병 치료에 사용되고 있음. 국내의 경우, 경구용 당뇨 의약품의 시장은 2002년 1,183억 원에서 2003년 1,470억 원으로 시장규모가 증가한데 이어, 2004년에는 약 1,950억 원대까지 급증한 것으로 보고됨 (2006년 한국기술은행 보고서). 향후 국내 경구 당뇨병 치료제 시장은 매년 20%씩 이상 성장할 것으로 예상됨. 전 세계 당뇨병 치료제 시장도 2005년 170억 달러에서 2012년에는 350억달러로 2배 이상 성장할 것으로 예상됨. 이러한 환자수와 시장 규모의 성장은 ‘당뇨대란’이라고 까지 일컬어지고 있음.

표 1-2-2. 당뇨 치료제의 세계시장 규모 (단위: 억달러)

년 도	시장규모	증가율	비 고
1999. 9. - 2000. 8.	68	-	
2000. 9. - 2001. 8.	81	19%	
2012년	350		2030년에는 세계당뇨병 환자수는 4억6천명으로 추산

- 미국 당뇨병학회의 보고에 따르면 미국의 당뇨 발병률은 2003년 기준 7.1%로 1,820만 명에 달하고 있음. 이러한 수치는 1998년 기준으로 5.4%에 불과했던 발병률이 불과 5년 사이에 약 31% 증가한 것으로 해마다 약 80만 명이 당뇨병에 걸리는 것임. 중국의 경우는 경제발전의 증가와 더불어 당뇨병이 급격하게 증가하고 있으며, 2004년 기준으로 당뇨병 환자는 5,000만 명을 넘어섰으며, 매년 150-200만 명씩 증가할 만큼 당뇨병 치료제 시장이 큼.
- 현재 임상적으로 사용되고 있는 제2형 당뇨병 치료제를 살펴보면 biguanides 계열의 metformin이 세계적으로 가장 많이 사용되고 있음. Metformin의 치료효과는 많은 임상시험을 통하여 보고되고 있으며 약간의 체중감소효과를 보여주고 있음. 최근의 보고에 의하면 metformin은 본 과제의 연구목표 중 하나인 AMP-activated protein kinase(AMPK)를 활성화 시키는 것으로 보고됨. 또한 최근 thiazolidinediones 계열의 약물이 경구용 혈당치료제로서 개발되었으며, α-glucosidase 저해제, sulfonylurea 계열의 화합물, meglitinide 계열의 화합물 등이 있으나 여러 부작용을 갖고 있어 새로운 약물의 개발이 시급한 실정임 (표 1-3).

표 1-2-3. 경구 혈당강하제의 분류

경구 혈당강하제	주요약물	단점
Sulfonylurea계	Glibenclamide, Glipizide	저혈당증 유발, 인슐린분비능 상실
Bisguanide계	metformine	위장장애, 신장독성
α-Glucosidase저해제	Miglitol, Voglibose	설사와 배탈
Glitazone계	Troglitazone, Pioglitazone, Rosiglitazone	신부전, 빈혈등 부작용, 간부전으로 판매금지(Troglitazone)
Meglitinide계	Repaglinide, Nateglinide	저혈당, 두통, 설사, 관절통, 요통

[자료: 보건산업기술동향, 당뇨병 치료제의 최근 연구동향“, 2003]

- 당뇨병 치료제의 개발을 위하여 많은 약물학적 표적이 전임상 단계에서 연구되고 있음. 현재 시도되고 있는 약물학적 표적으로 인슐린모방제, protein tyrosine phosphatase 1B (PTP1B), adiponectin 분비량 증가제, glucagone-like peptide 1 (GLP-1) 및 dipetidylpeptase IV (DPP-IV), AMP kinase activator (AMPK) 등이 연구되고 있음. 따라서 본 사업단에서는 고체발효물 및 그 원료물 이용하여 AMPK activators나 PTP1B 저해물질

활성을 측정하고 이의 후보물질을 발굴하고자 함.

다. 간질환 예방/치료용 천연물 의약품 소재 개발 연구의 필요성

- 간은 체외에서 들어온 물질 및 체내의 물질대사에서 중추적인 역할을 담당하며 지속적으로 효소반응 및 에너지대사가 일어나는 생체기관임. 현재 국내의 만성적 질병 중에서도 간염, 간경화 및 간암이 차지하는 비중은 순환기계 질환과 함께 가장 높은 것으로 나타나고 있으며, 질병으로 인한 사망원인의 큰 비중을 차지하는 실정임. 특히 선진국에 비하여 음주인구가 상대적으로 높고 폭음에 의한 간 손상 발생 원인이 높은 만큼 이에 대한 관심도 지대한 편임.
- 2010년도에 발표된 통계청의 사망원인 통계조사를 보면, 10대 사인은 악성신생물(암), 뇌혈관 질환, 심장 질환, 고의적 자해(자살), 당뇨병, 운수사고, 만성하기도 질환, 간 질환, 폐렴, 고혈압성 질환으로 총사망자의 70.9%를 차지함. 3대 사인으로는 암, 뇌혈관 질환, 심장 질환이 전체사망자의 47.8%를 차지하고 있으며 간질환은 2.8%로 2009년 사망률 8위를 차지하고 있음.

표 1-2-4. 사망원인 순위 추이, 1999-2009

(단위: 인구 10만명당, 명, %)

순위	1999		2009			
	사망원인	사망률	사망원인	사망자수	구성비	사망률
1	악성신생물(암)	114.2	악성신생물(암)	69,780	28.3	140.5
2	뇌혈관 질환	72.9	뇌혈관 질환	25,838	10.5	52.0
3	심장 질환 <sup>1)</sup>	38.9	심장 질환 <sup>1)</sup>	22,347	9.0	45.0
4	운수사고	26.2	고의적 자해(자살)	15,413	6.2	31.0
5	간 질환	23.4	당뇨병	9,757	4.0	19.6
6	당뇨병	21.8	운수사고	7,147	2.9	14.4
7	고의적 자해(자살)	15.0	만성하기도 질환	6,914	2.8	13.9
8	만성하기도 질환	13.7	간 질환	6,868	2.8	13.8
9	고혈압성 질환	7.5	폐렴	6,324	2.6	12.7
10	폐렴	6.7	고혈압성 질환	4,749	1.9	9.6

1) 심장 질환에는 허혈성 심장 질환 및 기타 심장 질환이 포함

- 바이러스 감염이나 음주에 의한 지속적인 간조직의 손상은 간 경화나 간암으로 발전되는 질환의 특징을 갖음. 간조직의 생리적특성 및 중요성을 고려할 때 간 질환의 치료 및 예방은 대단히 중요하며 간 조직손상을 줄이고 궁극적으로 치료에 응용할 수 있는 치료 및 예방용 의약조성물의 개발이 요구되고 있음.
- 간 섬유화는 간염등 만성 간질환에 수반되는 생체 적응반응의 일부로서 손상된 간 조직이 정상적인 간세포로 복구되는 것이 아니라 콜라겐과 같은 섬유조직으로 변형되는 상태를 칭함. 간 섬유화는 조직손상의 복구과정에서 발생하는 생체적응 반응이지만 생체내 물질의 대

사 및 담즙분비 등 간의 고유기능을 전혀 수행할 수 없는 섬유조직으로 간이 대체된다는 점에서 간 기능의 저하가 필연적으로 나타남. 간섬유화 현상이 지속적으로 반복될 때에는 간경화로 발전되어 사망에까지 이르게 한다는 점에서 적절한 치료제의 개발은 의약품 개발의 중요한 과제로 수행되어 왔음. 그러나 현재까지는 간 섬유화의 기전 자체가 명확하게 밝혀져 있지 않으므로 적당한 치료약물이 개발되지 않은 실정임.

- 최근 간조직 내의 대식세포와 이토세포에서 유리되는 Transforming growth factor-beta (TGF-beta)가 간 섬유화의 중요 매개물로 밝혀지고 있음. 또한, TGF-beta의 항체, antisense RNA, 세포 TGF-beta 수용체 변형을 통하여 TGF-beta의 작용을 차단하였을 때에는 간 섬유화과정이 현저하게 억제한다고 보고된 바 있음. 그러나 이러한 연구는 실험적 차원에서 수행된 것일 뿐이며 현재까지 실제로 임상적으로 활용되는 약물은 없는 실정임.
- 바이러스성 간질환의 원인중 하나인 B형 간염은 예방백신의 개발로 보균자 및 발병자의 수는 줄고 있는 추세이나 아직까지도 제1종 전염병으로 분류되어 있을 만큼 감염이 빈번하게 발생하고 있음. 더욱이, A형 및 C형 간염의 경우 적당한 치료제나 백신의 개발이 이루어지지 않아 상대적으로 발병이 증가하는 추세임. 간염의 위험성은 간염 자체보다는 적절한 휴식과 치료가 병행되지 않을 경우, 간암으로 발전할 가능성이 크다는 점에 있음. 수많은 연구나 역학조사의 결과에 따르면 간암의 원인은 간염의 발병과 밀접하게 관련된다는 점에서 우리에게 간염의 치료 및 예방의 중요성을 시사하나 이런 위험성에도 불구하고 적절한 간염치료제는 현재까지 거의 없는 상태임.

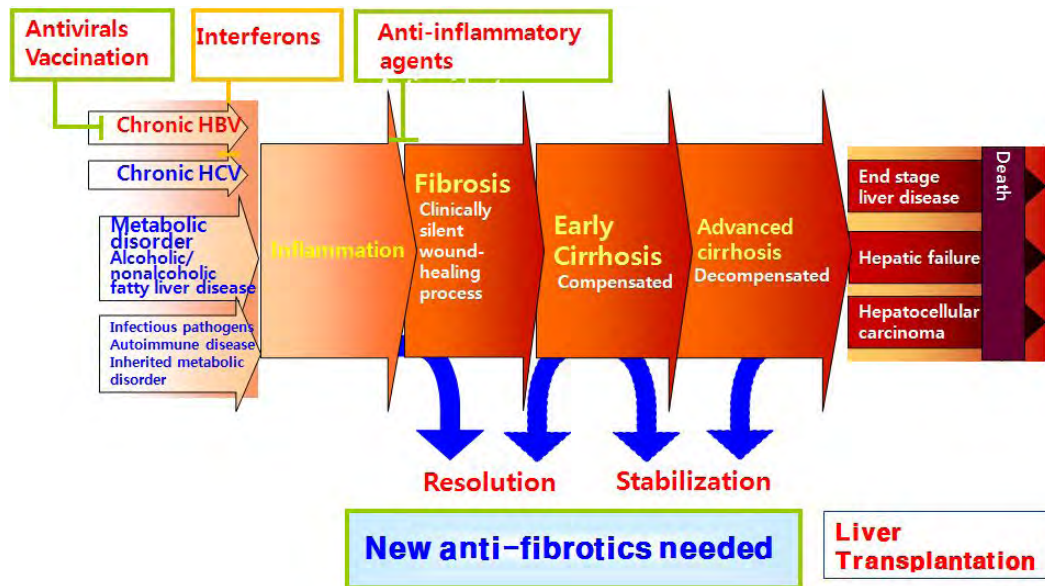


그림1-2-5. 간질환의 원인과 치료제 필요성

- 일반적으로 새로운 성분의 약제를 개발하기 위해 기존 약제를 실험적으로 변형시키는 것보다는 전통 의학에서 사용되고 있는 천연물 약제들로부터 새로운 활성 성분을 찾는 것이 여러 가지 면에서 장점이 많음. 특히 이러한 활성 성분들은 오랫동안 사용되어 왔기 때문에 약물들에 의한 독성 염려가 적음.

○ 따라서 본 사업단에서 현재 사회적으로 간섭유화 및 급·만성간염의 중요성 및 시급성을 감안하여 효과가 확인되면 바로 적용이 가능한 식품 및 약용식물을 대상으로 하여 간섭유화 및 급·만성간염에 대한 TGF-beta와 염증반응에 의하여 증가하는 콜라겐의 지표인  $\alpha$ -SMA를 저해하는 물질을 발굴하고자 함. 고체발효물 및 원료식물로부터 간섭유화 억제 및 간조직 보호효과를 보일 것으로 기대되는 후보 화합물들을 확인할 수 있다면 간섭유화 및 간경화의 진행 억제, 급·만성 간염에 의한 손상에 치료 효과를 제공 할 수 있는 소재를 의약품으로 개발 가능하리라 생각됨.

### 3. 가축사료첨가 항생제 대체 및 성장촉진용 발효생균제 산업화

- 국내의 가축용 항생제는 약 1,200톤이 판매되고 있으며 이중 약 54%가 사료첨가용으로 쓰이며 치료용이 아닌 예방용으로 사용되고 있으며, 이는 축산물에 항생제가 잔류할 가능성이 높음을 시사함. 미국이나 다른 나라에서도 축산물에 항생물질 잔류문제로 대체방안을 모색 중에 있으며, 유럽 각국에서는 항생제를 가축에게 투여하지 못하게 규제를 하고 축산물 검사를 더욱 강화하고 있음.
- 현재 가축사료에 첨가되는 항생제는 20종 이상이며 생산되는 축산물을 섭취 시 잔류하고 있는 항생제에 의해 인체에 2차 오염에 대한 위험이 있음. 단백질 식품의 수요량이 급격히 늘어나고 있는 현실에서 최근에 문제가 되고 있는 것이 축산물 및 수산물 등에 항생제, 성장촉진제 같은 동물약품의 무분별한 사용이며 이들 약품은 축산물에 잔류에 대해 관심이 고조되고 있으며, 세계 각 국에서는 이미 상당 부분 항생제의 사료 첨가를 엄격히 규제하고 있음. 국내에서도 2004년 농림부는 배합사료 제조 시 혼합 가능한 동물약품 종류를 53종에서 30종 이하로 감축하기로 하였으며 앞으로 규제가 더욱 강화될 것으로 예측됨.
- 따라서 안전축산물에 대한 소비자의 요구가 높아지면서 항생제를 대체할 수 있는 사료첨가제 개발 연구가 활발히 진행될 것으로 전망되는 한편, 축산물의 가격변동이 심하고 사료가격의 급격한 증가인해 축산농가의 어려움이 가중됨에 따라 가축의 성장촉진과 질병예방과 관련된 연구가 집중되고 있음. 또한 FTA 체결로 축산물의 세계시장이 개방됨에 따라 국내산 보호를 위한 차별화된 고품질 안전축산물 생산 기술이 절대적으로 필요 실정임.
- '12년 국내 배합사료 생산은 약 1,700만 톤, 이를 생산하기 위한 옥수수 수입은 약 680만 톤으로 곡물수입에 대한 국가적 차원의 대책마련이 시급하고 또한 높은 사료가격으로 인한 축산농가의 경제적 어려움을 해소할 대책 시급.
- 본 사업단과 참여업체에서 공동으로 개발한 대체 사료첨가물은 미생물을 접종한 발효제로서 90℃ 이상의 온도에서 장시간(4시간 이상) 노출하여도 미생물은 살아있는 상태로 존재하는 것을 특징으로 선행연구(효능평가 : 전남축산기술원)로서을 통해 육우의 체중을 높일 수 있는 생균제를 개발한 바 있음. 사육기간을 2개월 단축할 경우 사료절감액은 두당 48만원으로 국내 사료절감액 약 4,600억 원, 사료용 옥수수 수입절감 403,200톤으로 환산됨. 세계적으로 이와 같은 생균제 개발 사례는 전무하므로 본 기술의 상용화 연구를 통해 국내 축산농가를 대상으로 개발 생균제를 사용한다면 안전축산물 생산에 크게 기여할 수 있을 뿐만 아니라 안전축산물을 요구하는 소비욕구를 충족시킬 수 있으며 이를 통한 축산가공식품의 소비도 증가로 기대할 수 있을 것임.

### 제 3절 연구개발의 범위

#### 1. 연구사업단의 구성

본 사업단은 연구 중심의 사업이 아닌 상용화 기술개발사업으로서 제품 생산업체와 축산농가에 직접 기술을 지원함. 건농네이처에서 확보하고 있는 고체발효시스템을 기반으로 제조한 고체발효물의 건강기능적 효능을 한국식품연구원에서 평가하여 개별인정형 건강기능식품을 추진하고 이들 고체발효물로부터 유효성분을 서울대학교에서 분리정제하여 의약품후보 소재로 활용하고자 함. 또한 축산용 발효생균제를 이용하여 축산농가에서 가축사양실험을 추진하고 이를 통하여 얻은 결과물들을 업체에 제공하여 조기에 산업화가 촉진될 수 있도록 함. 이를 위해 아래와 같은 시스템으로 사업단을 구성하여 연구를 진행하였음.





2. 연차별 연구개발 범위

가. 1차년도 연구개발 범위

연구 범위	연구수행방법 (이론적·실험적 접근방법)	구체적인 내용
고체발효물 제조공정 구축 (1, 2차 계속수행)	<ul style="list-style-type: none"> <li>o고체발효시스템 구축                             <ul style="list-style-type: none"> <li>-노니, 녹차, 울금, 미강복합물 각각을 solid state fermentation 적용</li> <li>-이화학적 특성 및 물질분석을 통한 발효지표 설정</li> <li>-발효물의 일반영양과 중금속 분석</li> <li>-발효물의 대사산물 분석을 통한 발효지표물질 추적</li> </ul> </li> <li>o간조직에서의 metabolites 분석</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>o노니 및 미강복합물 발효기간별 분석                             <ul style="list-style-type: none"> <li>-이화학적특성 분석</li> <li>·기간별 온도, 습도, 효소활성</li> <li>-발효물질 분석</li> <li>·β-glucan 함량평가</li> <li>·GABA 함량평가</li> </ul> </li> <li>-영양 및 유해물질 평가</li> <li>·일반성분 및 중금속 함량 평가</li> <li>-발효물의 발효대사체 분석 (LC-MS 분석)</li> <li>o당뇨 및 간섬유화 질환모델 동물에서의 고체발효물 섭취에 의한 간 조직 내 metabolite 변화 분석</li> </ul>
고체발효물의 항당뇨 및 간기능 개선기전 및 임상적 효능 구명 (1, 2차 계속수행)	<ul style="list-style-type: none"> <li>o노니, 울금, 녹차 및 미강복합물 각각의 고체발효물과 대조군에 대한 질환모델 동물 효능평가 및 시판 개별인정형 건강식품과의 상대 평가</li> <li>o당뇨 및 간기능 관련 분자학적 기전 구명</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>o당뇨: 제2형당뇨모델 KKAY 실험쥐 실험                             <ul style="list-style-type: none"> <li>-혈당, 당화혈색소, 인슐린 함량 등</li> <li>-혈청 lipid profile, 인슐린민감도 분석</li> </ul> </li> <li>o간섬유화: 간섬유화 유발 동물모델 실험쥐 실험                             <ul style="list-style-type: none"> <li>-간지표 효소활성 분석</li> <li>-지질 profile 분석</li> <li>-간조직의 조직병리학적 평가</li> </ul> </li> <li>o고지혈증: 고지방식이 동물모델 실험쥐 실험</li> <li>oKKAY 당뇨실험동물 및 CCl<sub>4</sub> 투여 간섬유 유발 실험동물 간조직의 DNA microarrays 분석</li> </ul>
항당뇨 및 간기능 개선 바이오마커효능 구명 (1, 2차 계속수행)	<ul style="list-style-type: none"> <li>oIn vitro 효능 평가</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>o각종 활성: amylase, glucosidase, ACE 등</li> <li>o당뇨관련 활성                             <ul style="list-style-type: none"> <li>-PPAR-gamma 전사활성 평가</li> <li>-Glucose uptake 평가</li> <li>-AMPK 활성화 평가</li> </ul> </li> <li>o간섬유화                             <ul style="list-style-type: none"> <li>-간조직 내 콜라겐 함량 분석</li> <li>-간조직 내 glutathione 함량 분석</li> <li>-간조직 내 지질과산화 정도 분석</li> </ul> </li> </ul>

<p>항당뇨 및 간기능 개선 관련 후보물질 분리/정제 (1, 2차 계속수행)</p>	<p>o항당뇨 후보물질의 분리 및 정제 -발효물의 용매 분획 -분획물의 PTP1B 평가 -구조/활성의 추적을 통한 활성물질의 분리정제 oNMR, MS 등을 통한 후보물질의 구조분석</p>	<p>o인슐린 내성억제에 관련된 protein tyrosine phosphatase 1B (PTP1B) 억제능 물질 분리 o지방전구세포를 지방 세포주로 분화시킨 뒤 glucose uptake를 측정하는 방법을 이용한 후보물질의 분리 o발효대사체로부터 PTP1B를 저해하는 분획을 확보하고 3종의 화합물을 분리함 o2차년도 연구목표로 주관연구기관으로부터 발효노니의 연구를 제시하여 분획 및 활성검증, 후보물질의 분리 정제</p>
--	--	--

다. 3차년도 연구범위 및 연구수행 방법

연구범위	연구수행방법 (이론적·실험적 접근방법)	구체적인 내용
항당뇨 및 간기능 개선 관련 건강기능식품의 산업화	o산업화를 위한 시제품의 지표성분 표준화 및 품질 관리기준 확립	o시제품의 지표성분 표준화 -생산 lot별 지표성분 분석을 통한 표준화 o시제품의 품질관리기준 확립 - 유해물질규격설정 - 제품의 안정성 평가 o홍보 및 디자인 설계
	o안전성 평가	o 세포독성 평가 o 단회투여독성시험 o 반복투여독성시험
	o인체적용시험	oIRB 승인기관(한방산업지원센터)에서의 인체적용시험 o발효노니의 항당뇨활성 또는 발효울금의 간기능 개선 인체적용시험
항당뇨 및 간기능 개선 관련 바이오마커 분석	o개별인정신청을 위한 자료준비(CRO 의뢰)	o소개의 기원, 개발 경위, 사용현황 원료특성 분석 o섭취근거자료 및 섭취량 평가자료 조사 및 확보 o영양평가자료 및 생물학적 유용성 자료 조사 및 확보
항당뇨 및 간기능 개선 후보물질의 분리 및 구조결정	o발효노니의 지표 또는 활성물질 구조 분석 o지표물질의 최적분석 조건 확립	o2차년도에서 노니로부터 분리한 화합물의 구조 결정 o노니, 울금 및 갈근의 발효전후의 활성 및 지표물질 선정을 통한 최적 분석 조건 제공
	o후보물질의 항당뇨, 간기능 개선기능의 기전연구	o갈근의 지표 또는 활성물질을 이용한 간경화 및 간섬유화 저해기전 연구 o울금의 지표 또는 활성물질을 이용한 간경화 및 간섬유화 저해기전 연구 o노니의 지표 또는 활성물질을 이용한 항당뇨 및 당노기전 연구 o울금, 갈근 및 노니의 물질을 이용한 기전 연구 후 논문 및 특허작성 지원
	o후보물질의 유효성 평가	o울금의 지표물질이나 후보물질을 이용하여 동물실험 및 효과 간이 검증 o갈근의 지표물질이나 후보물질을 이용하여 동물실험 및 효과 간이 검증
가축사료첨가 항생제 대체 및 성장촉진용 생균제 산업화	o한우 사양실험 및 육질 분석	o한우 비육사료 주문생산 및 생균제 3% 혼합 및 한우 5개월령 대상 실험사육 o1개월 단위로 증체율 측정

## 제 2 장 국내외 기술개발 현황

### 제 1 절 국내외 관련분야 시장현황

#### 1. 건강기능식품분야의 제품 및 시장 현황

##### 가. 국내 관련(유사)제품의 생산 및 시장 현황

- 건강식품이란 ‘일반적인 식품보다 건강에 유익함(Health Benefit)을 주는 식품으로 International Food Information Council, inc.에서 정의되고 있는데, 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 규정하고 있음. 건강기능식품의 세계시장 성장이 지속되면서 우리나라에도 점차 하나의 산업군으로 자리 잡고 있는 추세임.
- 대다수의 국민이 건강에 대한 인식이 질병 치료보다는 예방의 중요성이 크게 인지되어가고 있고, 여기에 자가 치료(self medication)에 대한 인지도가 점차 증가되어 건강기능식품 시장도 성장을 지속할 것으로 예상됨.
- 현재 건강기능식품은 ‘질병발생위험감소기능’, ‘생리활성기능’ 및 ‘영양소기능’으로 구분할 수 있으며, 생리활성기능은 과학적 근거 정도에 따라 3가지 등급으로 구분되는데, 국내 건강기능식품 시장의 2011년 생산액은 13,682억원, 수출액은 556(4.1%)억원으로 내수시장을 중심으로 빠르게 성장하고 있음.

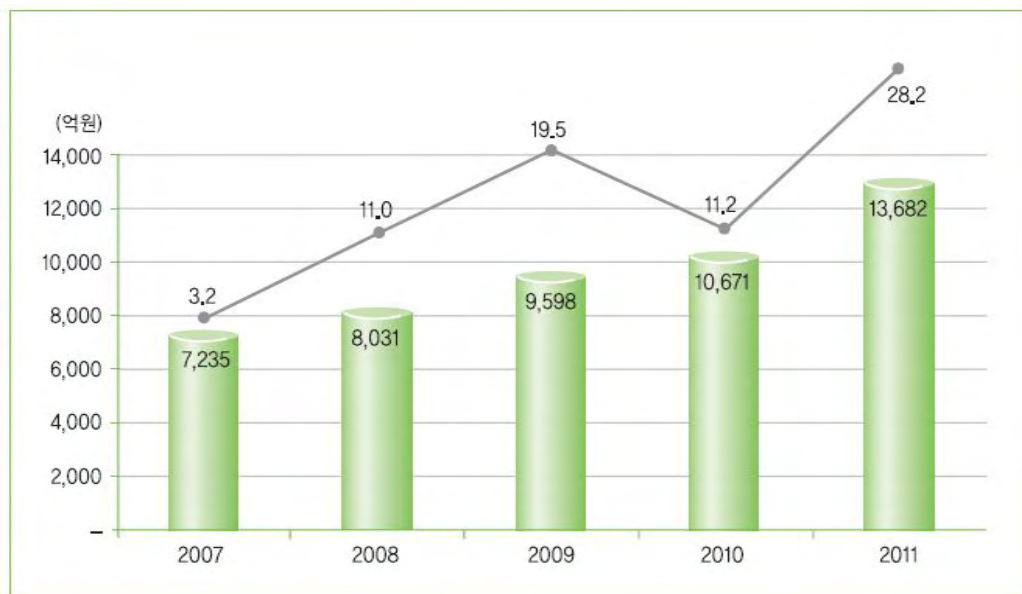


그림 2-1-1. 국내 건강기능식품 생산액 및 성장률 현황

(11년 건강기능식품 생산실적 분석결과 발표,식품의약품안전청-2012.5)

- 제품 중에서는 건강기능식품 중 홍삼이 가장 큰 시장을 형성하고 있으며, 2011년 전체 건강기능식품 생산액의 52.6%(7천억원)를 차지하고 있음. 특히 최근에는 홍삼제품의 면역효과 이외에 피부미용 및 주름개선 등의 미용기능이 각광받기 시작하면서 전년대비 성장률이 23.6%를 기록하는 등 국내 건강기능식품시장의 성장을 주도하고 있음. 이러한 홍삼제품에

대한 주요 소비 계층이 기존에 4-50대 중장년 위주에서 미용에 관심이 많은 2-30대 젊은 층으로 확장되면서 연령에 구분 없이 홍삼의 수요는 지속적으로 증가하는 것으로 전망됨.

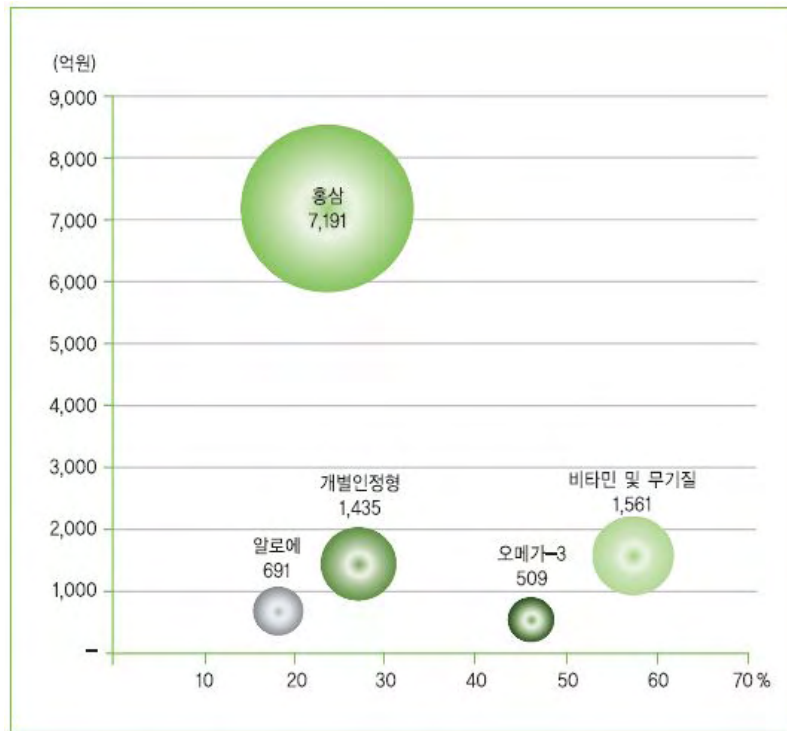


그림 2-1-2. 주요 품목별 생산액 및 성장률 현황  
(11년 건강기능식품 생산실적 분석결과  
발표,식품의약품안전청-2012.5)

- 세계 건강기능식품 중 점유율이 가장 큰 품목인 비타민과 무기질은 국내 시장에서도 급속히 증가하여 2011년 비타민 및 무기질의 생산액은 전년(991억원) 대비 57.5% 상승한 1,561 억원으로 나타났는데, 이는 인지도와 구매경험이 높은 비타민에 친숙도가 높으며, 비타민과 무기질은 일반의약품으로 출시되고 있어 소비자들이 쉽게 구매할 수 있기 때문임.
- 본 과제와 가장 연관성이 깊은 개별인정형 건강기능식품의 성장세도 두드러지게 나타나고 있는데, 2011년도 개별인정형 제품은 전년 대비 27.1% 성장한 1,435억원으로 이중 생산액 1 위는 간 건강 제품(532억원)이었으며, 그 다음으로는 면역기능에 도움을 주는 제품(179억 원), 관절/뼈건강 제품(153억원) 순으로 나타남.
- 이러한 개별인정형 건강기능식품의 성장 요인은 우리 사회의 음주문화 등으로 간 건강 제품에 대한 소비 수요 증대, 일본 방사능 유출, 환경오염, 자외선 등으로 인한 면역기능이나 피부건강에 대한 소비자 관심 증가 등의 이유로 풀이됨.
- 또한 기존에 존재 하는 원료에서 벗어나 치료 효능을 가진 개별인정형 원료가 발견되면 신규 시장을 창출할 수 있는 잠재적 가능성이 내재되어 있어 대기업들이 개별인정형 원료를 찾는데 주력하고 있는 점도 개별인정형 건강기능식품의 성장세에 영향을 주고 있음.



그림 2-1-3. 건강기능식품 분류별 생산현황 (11년 건강기능식품 생산실적 분석결과 발표, 식품의약품안전청-2012.5)

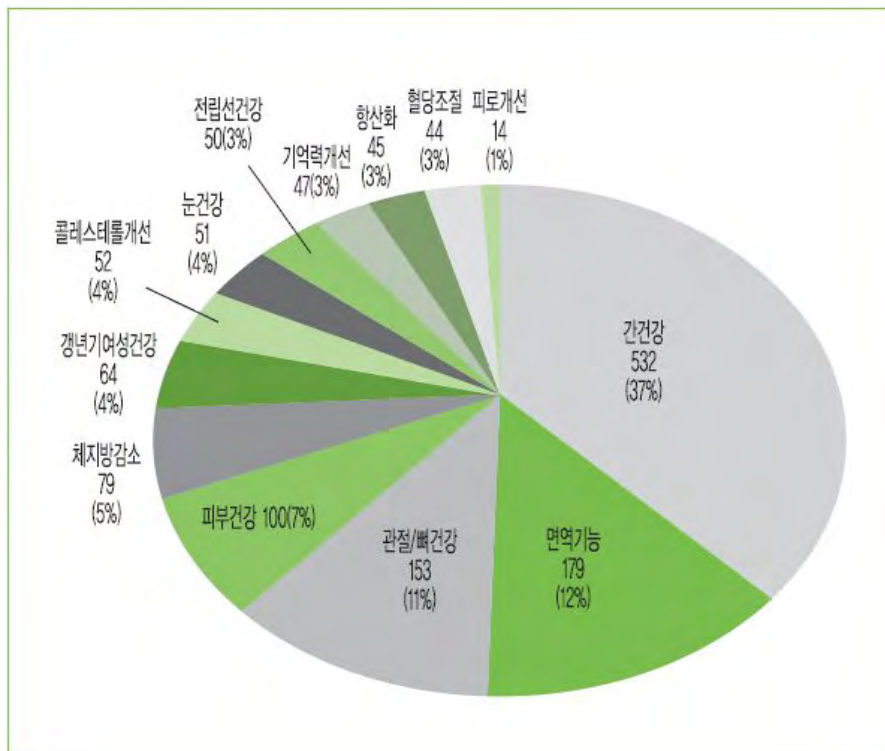


그림 2-1-4. 개별인정형 세부품목별 생산현황 (11년도 건강기능식품 생산실적 분석결과 발표, 식품의약품안전청-2012.5)

- 혈당조절과 관련한 개별인정형 건강기능식품원료는 구아바잎추출물을 비롯하여 17건이 있으며 간건강 관련 원료는 7건이 있는데, 본 연구사업단에서 개발하고자 하는 제품은 당뇨 및 간질환 예방 및 치료효능과 관련한 고체발효물 형태의 제품으로서 현재까지 이러한 형태의 건강기능성 제품은 없으나 유사한 형태의 제품으로는 알콜성 손상으로부터 간을 보호하는데 도움을 주는 유산균발효다시마추출물과 콩발효추출물이 있음.

표 2-1-1. 개별인정형 건강기능식품원료 및 성분 (2011.10.31.)

번호	기능성	기능성원료	건수	
1	간건강	간 건강에 도움	밀크씨슬추출물, 브로콜리스프라우트분말, 표고버섯균사체, 표고버섯균사체추출물, 복분자추출분말	5
		알콜성 손상으로부터 간을 보호하는데 도움	헛개나무 과병 추출물, 유산균발효다시마추출물	2
2	갱년기 여성건강	갱년기 여성의 건강에 도움	석류추출/농축물, 백수오등복합추출물, 회화나무열매추출물	3
3	관절/뼈 건강	관절 건강에 도움	가시오갈피등복합추출물, 글루코사민, 로즈힙 분말, 지방산 복합물, 전칠삼추출물등복합물, 차조기등복합추출물, 초록잎 혼합추출오일, 호프추출물, 황금추출물등복합물, N-아세틸글루코사민, Dimethylsulfone(MSM)	11
		뼈 건강에 도움	흑효모배양액분말, 대두이소플라본	2
4	기억력 개선	기억력 개선에 도움	녹차추출물/테아닌복합물, 인삼가시오갈피등 혼합추출물, 원지추출분말, 은행잎추출물, 테아닌등복합추출물, 피브로인 효소가수분해물, 홍삼농축액, 당귀등추출복합물	8
5	긴장완화	스트레스로 인한 긴장 완화에 도움	유단백가수분해물, L-테아닌	2
6	눈 건강	눈의 피로도 개선에 도움	빌베리추출물, 헤마토코쿠스추출물	2
		눈 건강에 도움	지아잔틴추출물, 루테인복합물	2
7	면역건강	면역력 증진에 도움	게르마늄효모, 구아바잎추출물등복합물, 금사상황버섯, 당귀혼합추출물, 스피루리나, 클로렐라, 표고버섯균사체, Enterococcus faecalis 가열처리건조분말, L-글루타민	9
		과민면역반응 완화에 도움	다래추출물, 소엽추출물, 피카오프레토분말등복합물	3
8	위건강/소화건강	소화기능 개선에 도움	아티초크추출물	1
9	배뇨기능	방광에 의한 배뇨기능 개선에 도움	호박씨추출물등복합물	1

나. 국외 관련(유사)제품의 생산 및 시장 현황

- 2011년 세계 건강기능식품 시장규모는 89십억달러이며, 향후 2016년에는 120십억달러를 상회할 것으로 예상되는데, 연평균 7%의 성장을 지속할 것으로 예측됨. 이는 일반식품이나 제약시장의 성장률 4%의 두 배에 가까운 성장임. 지속적인 성장은 노령화 인구의 증가와 의료비 지출 상승, 그리고 기능식품의 효능 입증과 관련된 학술적 진보, 해양기업들의 혁신노력의 결과로 판단됨.
- 특히, 개발도상국에서의 성장률이 향후 2016년까지 약 12%의 수준을 유지할 것으로 예상된 반면 선진국들은 약 3%의 낮은 성장률을 유지할 것으로 예상되어, 향후 세계 건강기능식품 시장은 이들 개발도상국에 의해 주도될 것으로 판단됨.
- 이러한 개발도상국과 선진국간의 성장률 차이는 건강기능식품의 수요가 인구 구조나 소득의 요인에 많은 영향을 받는 특성에 기인한 것이며, GDP의 성장률이 상대적으로 높고 고

평화가 진행되고 있는 개발도상국의 추세가 반영된 것임.

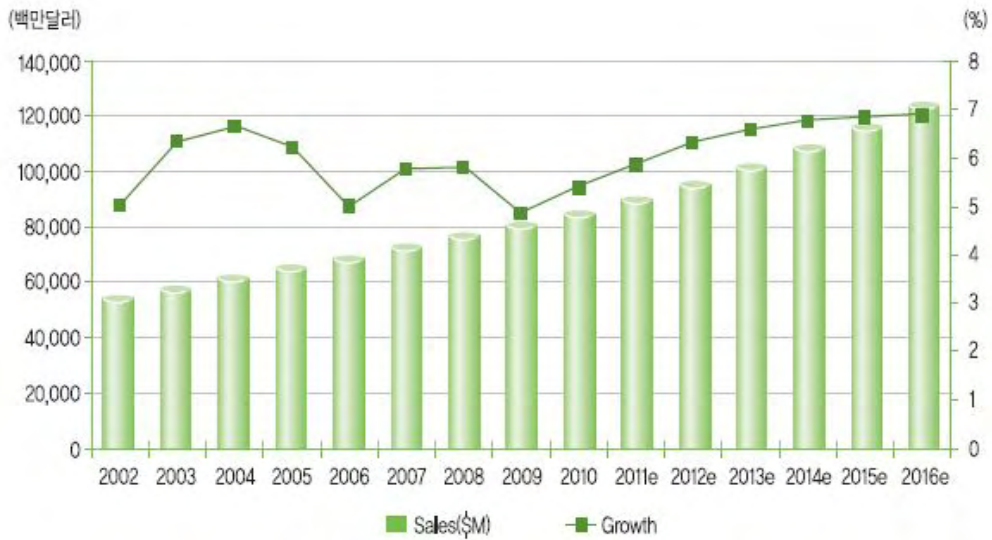


그림 2-1-5. 건강기능식품 세계시장 규모 및 성장률 (Nutrition Business journal estimates)

- 국가/지역별 2011년 매출액을 살펴보면 미국이 29,242 백만 달러로 전년대비 4.2% 성장하며 세계시장에서 가장 큰 건강기능식품 시장을 차지하고 있으며, 2위는 서유럽이 15,657백만달러로 나타남.
- 아시아 시장을 살펴보면 중국이 10,639백만달러로 가장 큰 시장을 나타내고 있으며, 전년 대비(2010년, 9,540백만달러) 성장률은 11.5%로 급속한 성장세를 나타내고 있음. 한국시장은 세계시장에서 1.4%의 비중을 차지하였지만, 전년 대비 성장률은 28.2%로 매우 높게 나타남.

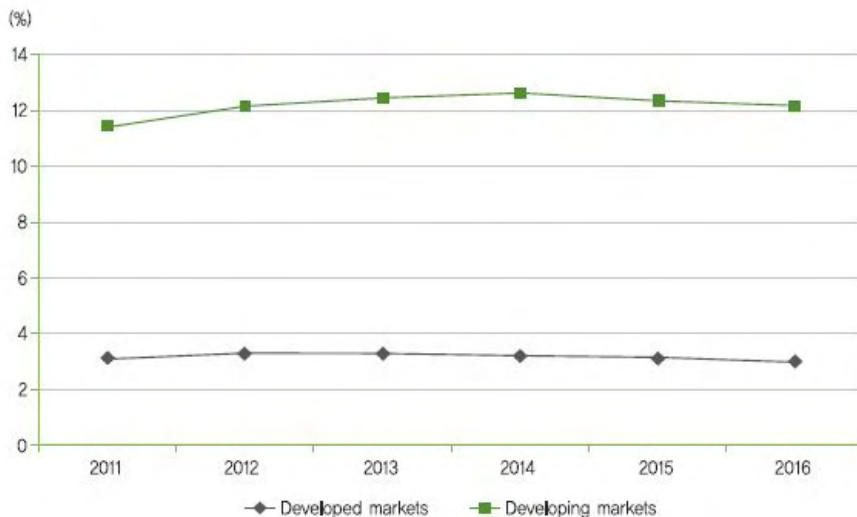


그림 2-1-6. 건강기능식품 시장규모 성장률 추세(NBJ'S Global supplement & Nutrition Industry report', Nutrition Business journal(2012))



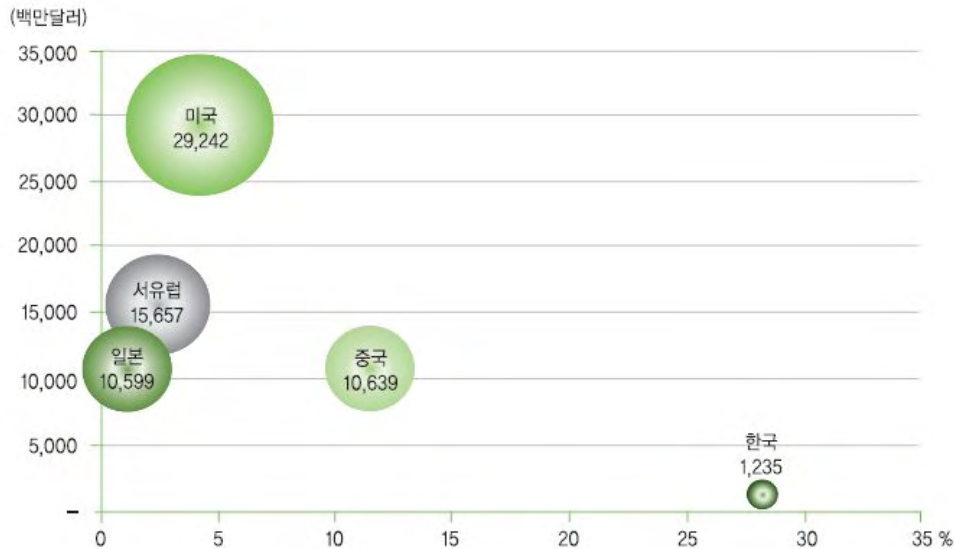


그림 2-1-7. 국가/지역별 건강기능식품 시장규모 및 성장률(2011)

### (1) 미국시장

2006년 미국 건강기능식품은 식이보충용 제품군이 22,460백만불, 자연 유기식품이 23,600백만불 그리고 기능식품이 31,400백만불 규모임. 미국의 소비자 조사결과에 의하면 건강기능 음료를 구매한다가 가장 높고, 비타민과 씨프리먼트, 특수식품, 에너지 증진식품과 드링크, 허브 씨프리먼트의 구매가 비타민과 미네랄보다 낮은 이유는 허브가 효능이 낮다고 알려져 있거나 많지 않은 소비자만이 허브의 효능을 인지하고 있기 때문인 것으로 예상됨. 건강기능식품 구매 이유에 대해서는 1위가 장기적 웰빙이었으며, 2위는 에너지 증진, 3위는 스트레스 감소, 그리고 4위, 5위는 각각 수면개선과 안티 에이징을 위해 구입한다고 조사됨.

### (2) 일본시장

- 일본의 건강기능식품 시장규모는 1조1,284억엔으로 2007년 대비 0.4% 감소, 점포채널과 무점포 채널 모두 역성장하였으며, 이는 히트 상품이 부재하였고, 선진물 규제 등의 다양한 규제가 시장 감소의 원인으로 평가됨. 다이어트나 면역증가 제품은 침체하였으나 우콘드링크 등 간기능 개선이나 뼈 관절 건강제품이 크게 성장하였으며, 눈건강이나 빈혈예방 개선 기능을 가진 영양밸런스 제품은 10% 이상 성장하였음. 소재별로 보면, 콜라겐과 글루코사민이 1, 2위를 차지하고 있으며 히알루론산이 3위를 차지함. 톱 3 소재 중 콜라겐과 히알루론산은 미용소재로 일본의 40대 중 24%, 20대의 7.3%가 이용하고 있으며, 구입경험도 40대는 5.2%가 구입경험이 있는 것으로 조사됨.
- 일본 건강영양식품협회에서 발표한 특정보건용식품의 시장규모 추정치에 의하면 2007년 시장 규모는 6,780억엔으로 2005년 대비 8% 성장함. 용도별로 보면 중성지방, 체지방 관련 제품이 1,606억엔으로 82%의 대폭 신장하여 시장을 견인하였는데, 중성지방 · 체지방관련 시장의 구성비는 전체의 24%로 2005년 대비 10% 상승함.
- 일본의 의약품 · 건강기능식품 인터넷판매 1위 업체인 겐코컴이 2008년 1월부터 11월까지 판매개수, 대금, 신장률 등을 집계하여 발표한 판매랭킹은 아래와 같은데, 전체 시장규모와 유사하게 메이지 제과의 아미노콜라겐 제품이 1위, 2위는 DNS 프로테인 호에이 100, 그리

고 10위 안에는 아지노모토의 아미노 바이탈 프로, 엽산 플러스, 흑 우롱차, 톱야자, 당뇨병 식 등이 포함되어 있음.

표 2-1-2. 켄코콤 선정 2008년 판매랭킹 10위제품

순위	제 품 명	제 조 사
1	아미노콜라겐	메이지제과
2	DNS 프로테인호에이 100	뚝
3	아미노 바이탈프로	아지모노코
4	콜라겐 1000파우더	롯데건강산업
5	피죤서플리먼트 엽산플러스	피죤
6	하나마이의 먹는 콜라겐	하나마이
7	산토리 흑 우롱차	산토리푸즈
8	SOLARY 톱야자	오내추럴재팬
9	인터벨런스 L-92 알레르케어	칼피스
10	당뇨병식 21식 세트	니치레이푸스

(3) 중국시장

- 중국의 건강보조식품시장은 2003년 사스를 기점으로 급성장했으며, 국민소득 증가 및 노령화에 따른 건강에 대한 관심 고조와 맞물려 새로운 시장으로 부상하고 있음. 중국 보건식품산업망에 따르면 2005년 500억위엔에 달한 건강보조식품 시장규모는 2010년 1,300억위엔, 2020년에는 4,500억위엔에 이를 것으로 전망.
- 중국 식품감독검역소 조사에 의하면 건강보조식품 시장에서 다이어트 관련 제품이 전체의 12.68%를 차지하고 있으며, 면역강화제, 피로회복제, 노화방지제 등이 그 뒤를 잇고 있는 것으로 나타남. 2002년 조사에서는 전체시장의 2%에 불과했던 다이어트 제품의 점유율은 2005년 9월 6배 이상 성장하였으며 매년 16-25% 성장하고 있음
- 면역강화 제품은 2003년 사스위기 이후 꾸준히 높은 점유율을 보이고 있음. 인삼류, 영지류, 동충하초, 해조류 등을 원료로 한 제품들이 주를 이루고 있는 가운데 소비자들은 면역강화 제품 구입시, 제품의 효과(92%)와 가격(69.70%) 주로 고려하는 것으로 나타남. 2006년 중국 보건식품전산업망의 통계에 의하면 건강보조식품은 갈슘, 비타민C, 대두추출물 등으로 만들어진 제품이 대부분을 차지함

표 2-1-3. 중국 건강보조식품 종류별 비중 - 자료: 중국식품산업망 (단위 : %)

기능	2002 년	2003 년	2005년 9월
면역강화	34	22.29	12.47
콜레스테롤 조절	15	14.20	7.84
피로회복	18	13.21	9.51
노화방지	8	12.62	
위장개선	4	7.89	8.67
미용	4	5.52	7.39
다이어트	2	3.55	12.68
기타	15	20.72	41.44

## 2. 고품질 안전축산물 생산분야 현황

친환경 안전축산물에 대한 정확한 통계는 없으나 향후 안전축산물에 대한 소비 욕구가 고조되면서 축산물은 물론 축산가공식품의 소비도 크게 늘어날 것으로 예측됨.

### 가. 국내 고품질 안전축산물 생산분야 현황

- 국내에서 생산되는 배합사료 총량이 2012년 기준으로 1,700만톤으로 그 중 54%에 항생제를 첨가하고 있으며, 돼지사료와 닭 사료, 소 사료가 차지하는 비율이 약 85%에 이르고 있음. 총 배합사료 생산량의 85%인 13,153,750톤에 항생제 대신 대체 발효제를 2%만 사용하여도 263,075톤으로 부가가치는 엄청날 것으로 기대됨. 소비자의 안전축산물의 요구로 친환경 안전축산물의 생산증가 속도도 더욱 빨라질 것으로 예상
- 또한 배합사료를 생산하기 위한 옥수수의 수입은 약 680만톤으로 곡물수입에 대한 국가적 차원의 대책마련이 시급하고 또한 높은 사료가격으로 인한 축산 농가의 경제적 어려움을 해소할 대책이 시급.

표 2-1-4. 양축용 배합사료 생산

(단위:톤)

구분	2011년	2012년	대비(증감)
계	15,262,021	16,986,798	11.3%
한육우	4,792,196	5,142,859	7.3%
젖소용	1,298,754	1,336,115	7.8%
양돈용	4,481,696	5,685,466	26.9%
양계용	4,748,375	4,822,358	1.6%

(출처:농식품부, 2013.01.21)

- 친환경 축산물은 농산물과 달리 유기축산과 무항생제 축산물로 나뉘며, 축우를 비롯해 산란업에 종사하는 많은 분들이 친환경 축산물 인증에 관심을 가지고 있음. 또한 친환경 인증기관은 2002년 1월31일 (사)흙살림을 시작으로 하여 현재 38개의 인증기관이 있음.
- 유기축산과 무항생제 인증을 받은 농가들을 보면 2008년 1월 15일자 전체 유기축산 55곳, 무항생제 665곳이 인증을 받았는데, 한우와 산란계(알)의 인증이 가장 많아 쇠고기와 닭고기의 비율이 전체의 89%를 차지함 .이에 비해 돼지고기의 친환경 인증은 5%밖에 되지 않음

표 2-1-5. 유기축산물인증(국립농산물품질관리원, 2008.1.15)

구분	한우	돼지	육계	산란계(알)	육우	오리	산양	젖소	사슴	전체
인증건수	264	34	122	207	3	11	11	8	5	665

표 2-1-6. 무항생제 축산물인증(국립농산물품질관리원, 2008.1.15)

구분	한우	돼지	육계	산란계 (알)	육우	오리	산양	젓소	사슴	전체
인증건수	16	2	6	17	6	0	3	5	0	55

나. 국외 관련(유사)제품의 생산 및 시장 현황

(1) 중국시장

- 사료 생산은 2006년 소비감소, 생산량 감소로 원가가 상승하여 사료생산업체의 수익이 감소하게 되었고, 이에 더하여 인민폐 평가절상, 수출감소, 수입증가 등의 외부환경적 요인의 발생으로 업종이 장기간 쇠퇴하게 됨
- 2006년 상반기, 돼지 사료, 알 가금의 사료, 육류, 가금의 사료의 생산량은 각각 전년 동기 대비 15.1%, 7.3%, 12.9% 감소함. 수산물 사료, 반추동물 및 특수동물의 생산량은 각각 전년 동기 대비 7.2%, 10.3%, 15.0% 증가함
- 2006년 상반기 사료 생산량은 약 4,300만 톤으로 전년 동기 대비 9.2% 감소함. 그 중 배합 사료 생산량은 3,072만 톤으로 9.2% 감소하였고 농축사료는 1,000만 톤으로 11.7% 감소하였으며, 첨가제 사전혼합 사료 생산량은 228만 톤으로 4.6% 증가함

표 2-1-7. 전체 생산량 및 종별 생산현황(중국사료공업협회)

(단위: 만 톤)

	전체 생산량	배합사료	농축사료	첨가제 사전 혼합 사료
2006 상반기	4,300	3,072	1,000	228
2005 상반기	4,735	3,384	1,133	218
성장률(%)	-9.2	-9.2	-11.7	4.6

(2) 미국시장

- 친환경유기사료는 일반사료에 비해 가격이 비싸고 미국 내에서 주 별로도 1.47배에서 2.18배까지 큰 차이를 보여, 지속적으로 안정적인 공급이 힘든 것으로 보고되고 있음. 또한 해외에서도 안전축산물에 대한 소비자 욕구가 높아지고 모든 관심이 가축에게 급여하는 사료에게로, 또 다른 변수로 옥수수뿐만 아니라 곡물들이 바이오연료로 공급되어지고 있어 친환경 유기사료 원료공급이 제한받고 있는 상황에 직면해 있음
- 유기축산물 생산에 이용되는 사료에 함유되어서는 안 되는 물질은 유전자조작 곡물과 그 부산물, 항생제, 호르몬, 동물성부산물, 무농약으로 생산 재배된 곡물부산물, 화학추출사료(용매추출 대두박), 합성아미노산 등이라고 규정하고 있음. 친환경유기사료에 허용되는 성분은 유기적 가축영양을 위해서 인증된 유기사료가 기본사료로 이용되고, 약간의 합성물질도 사용이 가능함. 허용된 합성물질은 첨가제와 보조사료인 비타민과 광물질이 FDA에서 허용되고 있음

표 2-1-8. 일반사료와 유기사료의 가격 비교(현대양돈)

유기농장 지역	일반사료, \$/ton	친환경유기사료, \$/ton	일반사료 대 비율
워싱턴주	130	197	1.51
캘리포니아주	194	361	1.86
위스콘신주	225	333	1.48
오레곤주	338	499	1.47
미네소타	110	202	1.84
미시간	114	218	1.91
미조리	111	227	2.04
펜실베이니아	121	264	2.18

(3) 유럽시장

○ 친환경 축산물을 생산하기 위해서는 친환경농장에서 유기사료를 급여하여 친환경으로 인증 받고 지속적으로 유지할 수 있도록 되어 있음. 현재 유럽의 규정에 의하면 친환경유기축산은 첫 번째로 유기적으로 자가 생산한 사료를 급여하도록 하고 있으나(EC 2092/91, Annex I4.2-4.3), 유기사료가 양적·질적으로 충분하지가 않아서 비-유기사료 혼입비율이 가변적임. 친환경유기축산물을 생산하기 위한 100%유기사료 사양시스템은 사료원료의 이용제한으로 도전을 받고 있음. 또한 가축에 필요한 영양소 특히 필수아미노산 공급 불균형이 생길 가능성이 높음. 또한 유럽 25개국과 영국에서의 친환경유기사료를 이용하여 친환경축산을 하려는 숫자가 많아 사료공급량과 수요량의 균형이 맞지 않으나 소비자의 요구에 의해서 증가되어지고 있음

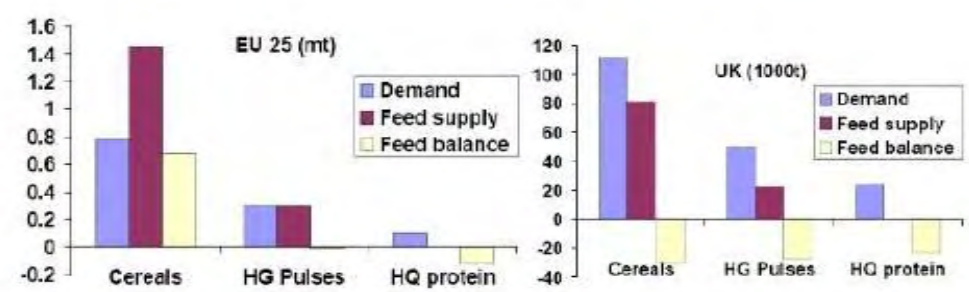


Figure 1: Supply and Demand for organic feed materials in Europe and the UK (Source Padel, 2005)

그림 2-2-1. 유럽의 유기질 사료의 수요와 공급 (Source Padel, 2005)

(4) 일본시장

○ 친환경인증시스템기준에서 성장을 촉진하기 위한 호르몬이나 치료예방 접종이외의 동물용 의약품 사용하지 않고, 유기사료와 적절한 조건에서 건강한 가축사양이 요구되고 있음. 사료는 안전하고 100% 유기재배사료여야 하며, 수입 유기사료는 해외에서의 사료생산·유통상태를 고려하고 있는데, 친환경사료의 재배방법은 인접하고 있는 포장과의 완충지대를 설정하고 있음. 다른 작물재배지와 사이에 적당한 완충지대를 설정하지 않으면, 유기사료의 인증을 받을 수 없는 것으로 되어있음. 유기인증을 받는 옥수수, 대두박으로 자가 배합 사료를 조제하고 있음. 사료는 컨테이너로 수입되어 고가이며, 분리 관리되어 유통되고 있어 유통비용도 일반 수입사료에 비교해 가격이 비쌈

## 제 2 절 관련기술분야의 연구현황

### 1. 건강기능식품 개발 분야

#### 가. 국내외 특허 분석

- 대사증후군과 관련된 특허는 2003년까지 전무하였으며 그 후 급격히 증가하여 2008년을 고점으로 총 39건의 등록되었으며 우선권 주장국가로 살펴본 대사성증후군 관련 특허의 주요 국가는 미국이 압도적으로 높아 약 70%의 특허를 보유하고 있는 것으로 나타남

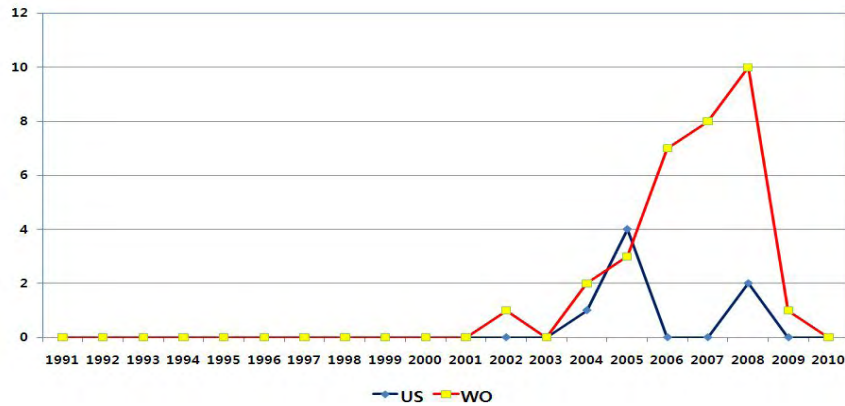


그림 2-2-2. <연도별/도매인별 특허출원 현황>

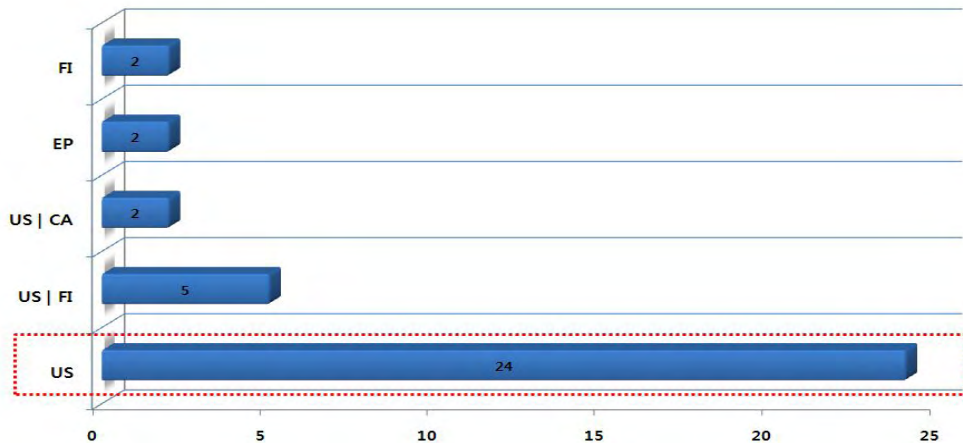


그림 2-2-3. <우선권 주장국가로 살펴본 대사성증후군 특허의 주요 국가>

- 주요 피인용 해외특허는 ① Formulations and methods for treatment or amelioration of inflammatory conditions, ② Modulation of fiaf and gastrointestinal microbiota as a means to control energy storage in a subject ③ Novel genes and markers in type 2 diabetes and obesity로서 각각 5, 5, 4번 인용된 것으로 나타남

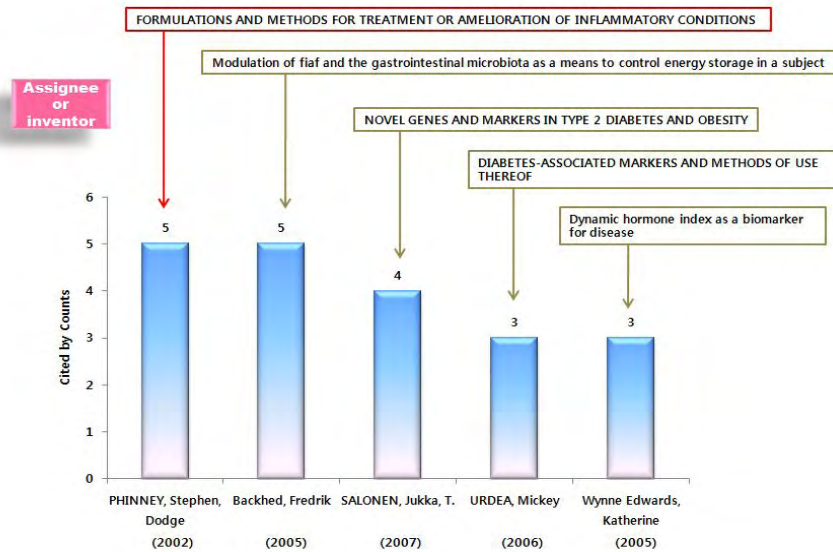


그림 2-2-3. <주요 피인용 해외특허 현황>

- 피인용도가 높은 이들 특허를 분석한 결과, 복합소재를 이용하여 질병을 완화하는 제품제조 기술, 비만을 억제할 수 있는 특정소재 중 펩타이드를 이용하는 기술은 특정 복합소재를 이용한 질병정상완화를 위한 원료조성과 관련해서는 유사성이 인정되나 본 연구에서는 미생물 대사산물을 활용한 소재 개발 분야로서 한 단계 업그레이드된 제품을 개발하고자 하고 또는 효능의 후보물질을 구명하는데 까지 연구를 추진하고자 함. 비만과 관련해서 연구 수행을 위한 기술 관련 특허는 하나의 tool로서 활용이 가능한 기술로서 본 연구에서도 활용할 수 있을 것으로 판단됨
- 특허와 관련된 전체 등고선 지도를 분석해보면 최근 질병예측분야와 관련된 특허와 동맥경화, 당뇨, 심근경색과 관련된 연구가 많이 진행되고 있음을 알 수 있음
- 따라서 본 연구에서도 발효기술을 이용해서 동맥경화, 심근경색과 관련성이 높은 고지혈증 즉 중성지방의 상승을 강하게 억제할 수 있는 발효대사체를 개발하고 또한 빈도가 높은 당뇨와 관련된 억제 소재를 개발하고 효능을 나타내는 선도물질도 분리정제하고 구조를 결정하고 함. 이와 같은 연구를 통해 대사증후군 관련 물질의 기능성을 발효과정을 통해 더욱 높이고 미생물에 의한 대량생산 방법을 확립하며 각종 질병에 대한 맞춤형 식품 및 의약품 원료를 생산하는 방법으로 연구를 추진하여 생산방법, 안정화, 유효성 검증과 관련된 특허 등을 국내 및 국외에 특허출원할 계획임

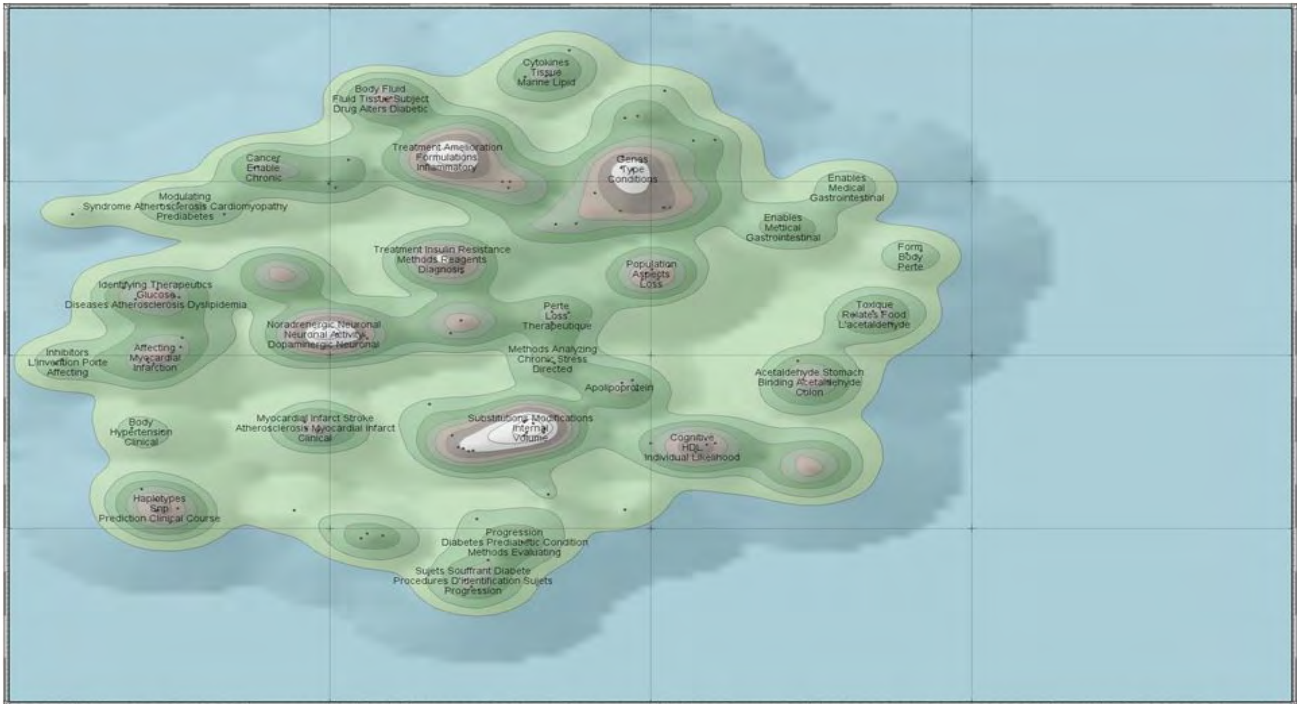


그림 2-2-4. <대사성증후군 특히登高선 지도(최근 5년간 연구)>

나. 국내의 논문분석

- 대사증후군과 관련된 논문은 2003년까지 전무하였으며 그 후 급격히 증가하여 2009년을 고점으로 총 101건의 논문이 발표되었으며 국가별 발표현황을 보면 미국이 압도적으로 높아 약 44%의 논문을 발표한 것으로 나타남

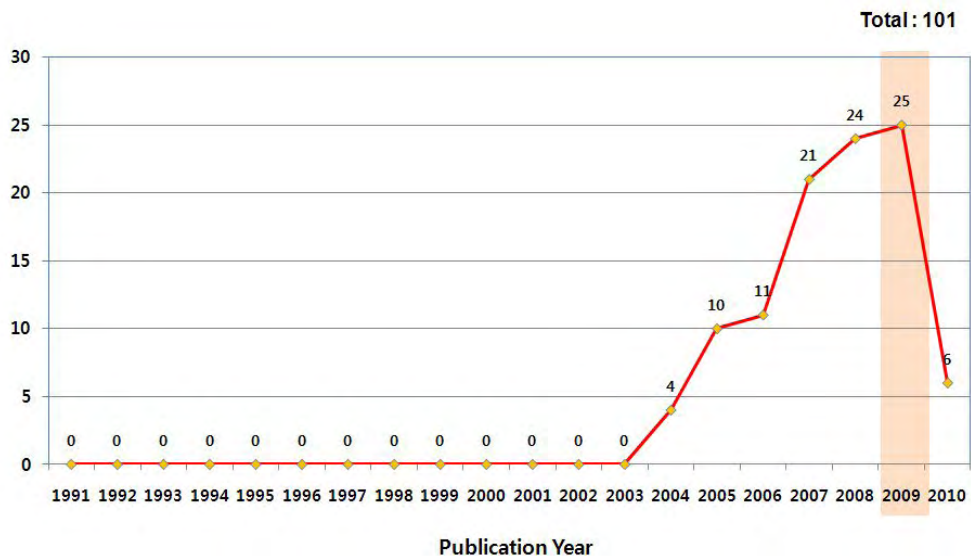


그림 2-2-5. <연도별 논문 발표 현황>



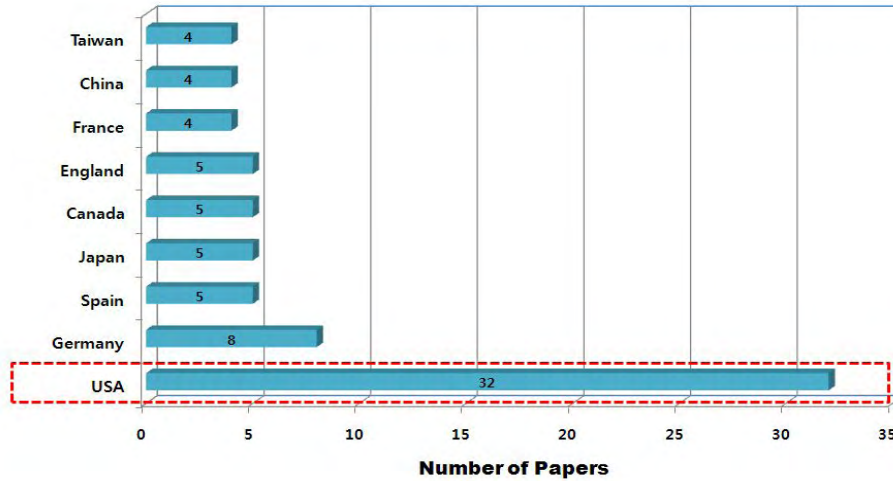


그림 2-2-6. <국가별 발표 현황>

- 주요 피인용도가 높은 논문은 ① Gamma glutamyl transferase and metabolic syndrome, cardiovascular disease, and mortality risk - The Framingham Heart Study, ② Association of physical activity and body mass index with novel and traditional cardiovascular biomarkers in women, ③ Adipocyte fatty acid-binding protein is a plasma biomarker closely associated with obesity and metabolic syndrome로서 각각 81, 80, 54번 인용된 것으로 나타남
- 피인용도가 높은 이들 논문을 분석한 결과, 이들 논문은 대사성증후군을 확인할 수 있는 바이오마커의 개발과 같은 학술적 연구를 위한 기초연구분야에 치중되어 있으며 본 연구와의 유사성에서는 질병을 검출하는 목적에 있어서 유사성은 인정됨. 그러나 실제 제품생산을 위한 산업화 연구는 거의 되어 있지 않으므로, 본 연구과제에서는 제품의 고기능화, 산업화 그리고 제품의 우수성 및 안정성을 진단하기 위한 방향으로 연구를 추진하여 대사증후군 관련 논문 등을 Bioorganic & Medicinal Chemistry 및 Chem. Pharm. Bull. 등에 게재할 계획임

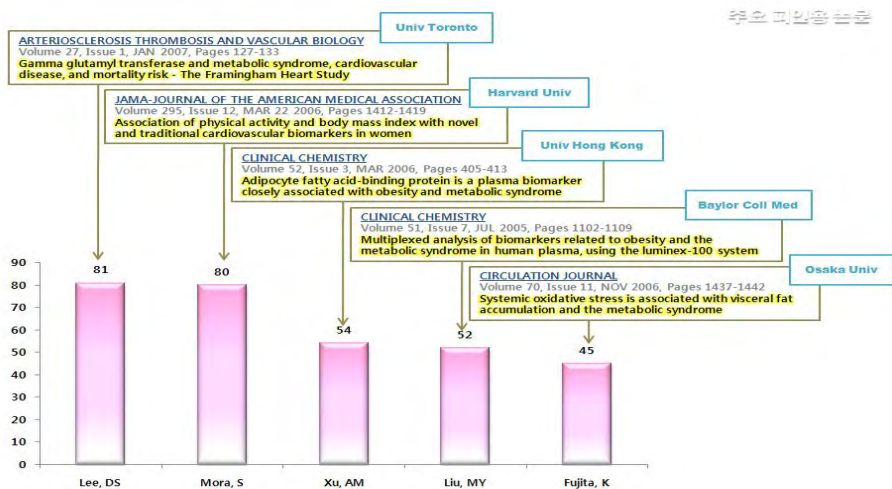


그림 2-2-7. <주요 피인용 논문현황>

## 2. 당뇨 및 간질환 관련 의약품분야의 국내외 연구분야 현황

### 가. 당뇨관련 의약품 분야의 국내외 연구분야 현황

#### (1) 세계적 수준

- 선진제약회사의 경우 genomics 와 proteomics의 기술을 이용하여 확인된 중요 작용기전에 대한 기전별 연구를 진행하고 있는데, PTP-1B knock out mouse의 실험결과로부터 PTP-1B 저해제는 2형 당뇨병 치료제 개발을 위한 좋은 타겟임이 제시되고 있음. 현재까지의 연구결과를 살펴볼 때 PTP1B 효소는 인슐린 신호조절과정에서 음성조절자로 판단되며, 렙틴 신호조절과정에서도 동일하게 관여하는 것으로 알려져 있음. 이러한 결과는 PTP1B knock-out mice와 PTP1B 효소가 부족한 leptin-deficient (*Lep<sup>ob/ob</sup>*) mice 연구를 통하여 확인되었는데, PTP1B 효소 knock-out mice는 혈중의 인슐린, 포도당 및 중성지방 (triglyceride)이 낮았으며, 인슐린 주입후 간과 근육에서 증가된 인슐린 수용체 (IR)의 인산화를 보여 주었으며, 궁극적으로 증가된 인슐린 감수성을 보여줌. PTP1B 효소 knock-out mice와 leptin-deficient mice의 교배는 체중감소, 감소된 지방조직 및 증가된 대사속도의 특징을 보여, PTP1B 효소의 저해가 인슐린과 렙틴 내성을 치료하는 획기적인 약물 목표점으로의 관심이 증대됨. 이러한 연구결과는 PTP1B 저해제가 당뇨병 및 비만의 치료제로 사용될 수 있음을 보여주었음. 최초의 PTP1B 저해제는 vanadate 화합물이며, 그 밖에 PTP1B 저해제로 phosphotyrosine (pTyr) mimetics, dianionic 2-(oxalyamino)-benzoic acid 유도체, VMNS2e, 2-carbamoylbenzoic acid 유도체등 다양한 후보물질이 개발 중에 있음.

표 2-2-1. 현재 개발중인 PTP1B 저해제

화학구조	시험법	화합물중 PTP1B 저해활성	활성
Benzylidene-2,4-thiazolidinedione derivatives substituted at ortho position of the phenyl group	C57BL/6J Jms Slc, mice fed high fat diet	3e (IC <sub>50</sub> = 5 μM)	Suppresses weight gain Hypoglycemic Reduces circulating triglycerides, total cholesterol, and NEFA Activates PPARs
Benzylidene-2,4-thiazolidinedione derivatives substituted at ortho and para-positions of the phenyl group	C57BL/6J Jms Slc, mice fed high fat diet	18l (IC <sub>50</sub> = 1.3 μM)	Suppresses weight gain Hypoglycemic Reduces circulating triglycerides, total cholesterol, and NEFA No overtoxic effects
5-(3-((Z)-((Z)-2-(4-chlorophenyl imio)-4-oxothiazolidin-5-ylidene) methyl)-2,5-dimethyl-1H-pyrrol-1-yl) isophthalic acid	Selection from a library of compounds by HTS	LGH00081 (IC <sub>50</sub> = 1.6 μM; Ki = 309 nmol/L)	Competitive PTP1B inhibitor
Methylenedisalicylic acid derivatives	C57BL/6J Jms Slc, mice fed high fat diet	SA18 (IC <sub>50</sub> = 20 ± 1 μM)	Improves glucose tolerance
Isothiazolidinone inhibitors (imidazole and imidazoline analogs)	X-ray crystal structures of inhibitors - PTP1B complexes	(IC <sub>50</sub> = 22 nM)	X-ray crystal structure analysis
4-[(5-Arylidene-4-oxo-2-phenyl iminothiazolidin-3-yl)methyl]-benzoic acids	In vitro	4a (IC <sub>50</sub> = 1.9 ± 1.0 μM)	Lipophilic Improved cellular permeability
Monosodium([5-(1,1-dimethylethyl)thiazol-2-yl)methyl]([4-(4-[4-(1-propylbutyl)phenoxy]methyl)phenyl]thiazol-2-yl)methyl)amino)acetate	In vitro: L6 rat skeletal myoblasts	JTT-551 (Ki = 0.22 μM)	Increases insulin-stimulate
1-Biphenyl-4-yl-2-(4-nitro-phenoxy)-ethanone	In vivo: ob/ob mouse	VMNS2e	Acute and chronic hypoglycemic activity
Bidentate α-ketoacid - based inhibitors	Library of inhibitors	2a (IC <sub>50</sub> = 220 nM)	Potential as therapeutics for diabetes, obesity, and Yersinia pestis infection
Triazole-linked glycosylated α-ketocarboxylic acid derivatives	Chemical synthesis	15 (IC <sub>50</sub> = 3.2 μM)	Competitive inhibitor
Aryl diketoacid derivatives	Chemical synthesis	Dimeric LZP25 (Ki = 12 ± 0.6 μM)	Noncompetitive inhibitors
Difluoro-methylenephosphonate bioisosteres on a sulfonamide scaffold	Chemical synthesis	8a (IC <sub>50</sub> = 4.1 μM)	PTP1B activity inhibitors
β-C-glycosiduronic acids quinones and β-C-glycosyl compounds	Chemical synthesis	23 (Ki = 0.77 μM)	PTP1B activity inhibitor
Substituted phenoxy-3-piperazin-1-yl-propyl-2-ols	In vivo: sugar loaded model (SLM), Streptozotocin-injected rats	4a and 5b	Hypoglycemic
Thiophene derivatives	In vitro: CHO-K1 cells	P28 (IC <sub>50</sub> = 2.1 μM)	Permeable to cell membranes
Mixed-ligand oxovanadium(IV) complexes	Chemical synthesis	IC <sub>50</sub> = 41 -75 nM	Competitive inhibitors

(2) 국내수준

- 국내의 경우는 성인형 당뇨의 인슐린 저항성 기작에 근거한 약물이나 천연물 유래의 소재 개발에 대한 결과는 전무한 실정임. 현재 한국화학연구원, 크리스탈제노믹스의 연구진들이 PTP1B를 타겟으로 virtual screening과 합성 chemical library에서 개발을 진행하고 있으나 아직은 괄목할 만한 화합물을 제시하지 않고 있음. 또한 크리스탈제노믹스사가 GSK3에 대한 저해제를 합성하여 발굴하는 전략을 유류산업에 기술 이전하여 진행하고 있는 정도임

(3) 국내·외의 연구현황

- 현재 개발, 판매되고 있는 항당뇨 비만 치료약물의 경우 정도의 차이는 있으나 대부분 부작용을 갖고 있기 때문에 최근 구미 선진국들을 중심으로 치료약물에서 사용되는 의약품으로서가 아니라 식이요법, 운동 및 대체요법을 활용한 치료기술이 늘고 있는 형편임. 동양 삼국인 한국, 중국, 일본은 역사적으로 한약재 기반 전통 치료기법이 서양보다 앞서 있으므로 최근 이러한 기술을 이용하여 천연물기반 약품개발에 장점을 갖고 있음

표 2-2-2. 항당뇨 비만 치료약물의 국내·외의 연구현황

연구수행 기관	연구개발의 내용	연구개발성과의 활용현황
Reliv International, Inc. (미국)	비만억제 효과가 있는 은행나무 추출물	건강보조식품으로 활용
로슈사 (스위스)	효소 리파아제의 기능을 억제하여 지방성분의 흡수를 막는 ‘올리스타트’ 개발	건강보조식품으로 활용
대웅제약/ 싸이클로젠	췌장의 면역기능을 되살려 인슐린 분비기능을 활성화시키는 작용을 하는 당뇨 개선 의약품	산약, 구기자, 오미자 등의 한방복합물로부터 공동 개발·출시
에멀린 파마슈티컬스, 일라이릴리사	도바벵 타액에서 유래한 제 2형 당뇨병 치료약물인 엑센타이드 (exentide)는 형당강화 효과뿐만 아니라 지속적인 체중감소 효과가 있음을 밝힘. 장내에서 포도당의 농도를 제어하는 일을 돕는 호르몬과 유사한 작용을 나타내는 내분비 유사신약으로 분류되어 연구 진행중임	현재 Exedndin-4라는 상표로 미국 FDA허가 신청중
일본 오키나와	오키나와산 식물 ( <i>Momordica charantia</i> Linn)에서 인슐린의 베타세포를 활성화하며 식물자체의 다수 인슐린 유사 활성성분의 존재를 밝혀냄	현재 시장에서 식품으로 판매 중
(주)알앤엘 생명과학	당뇨치료효과를 가진 기능성 쌀을 개발	미 FDA로부터 승인
한국 생명공학연구원	본 연구과제 제안팀들이 식품 원료로 사용 가능한 구아바 ( <i>Psidium guajava</i> )로부터 PTP1B 저해활성을 검색하고 이를 db/db 쥐에 항 당뇨 효능연구 효과를 평가하고 이를 특허 출원하여 특허 등록함	향후 이를 이용한 제품이 개발되어 농가 소득향상에 기여할 것으로 추정됨
아주대 의대 이기업 교수팀	건강식품의 원료로 사용되고 있는 α-lipoic acid가 뇌에서 AMPK를 저해하여 식욕섭취 조절작용이 있음을 밝히고 이를 Nature medicine 7월호 (2004년)에 투고함	현재 미국등에서 시판되고 있는 α-lipoic acid의 효능을 규명하여 이 제품의 매출에 큰 기여를 함

나. 간질환 관련 국내외 연구현황

○ 간 질환은 간염 바이러스, 지속적인 다량의 알코올 섭취, 약물의 오남용 등 다양한 원인에 의하여 발병되는데, 초기에 완치시키지 못하면 만성적으로 진행되어 결국에는 간섬유화 (fibrosis) 과정을 거쳐 간경변 (cirrhosis)이나 간암으로 이행됨. 간 질환은 초기단계에서는 통증이나 자각증상이 나타나지 않고 말기에 발견되기 때문에, 사망률이 높아 사회적인 문제를 일으키고 있음. 현재 간질환 치료제의 개발을 위해 우리나라는 물론 전세계적으로 많은 노력을 기울이고 있으나 인터페론이나 항바이러스제 (lamivudine, adefovir dipivoxil)를 제외하고는 아직까지도 뚜렷한 치료제가 부재한 실정임. 실제, 하단 그림 2-2-8은 BCC report에 게재된 간 질환 치료제 시장의 market share를 보여주고 있으며, 담석용해제, 인터페론제제, 백신을 제외하고, 섬유화 억제제는 현재 존재하지 않음

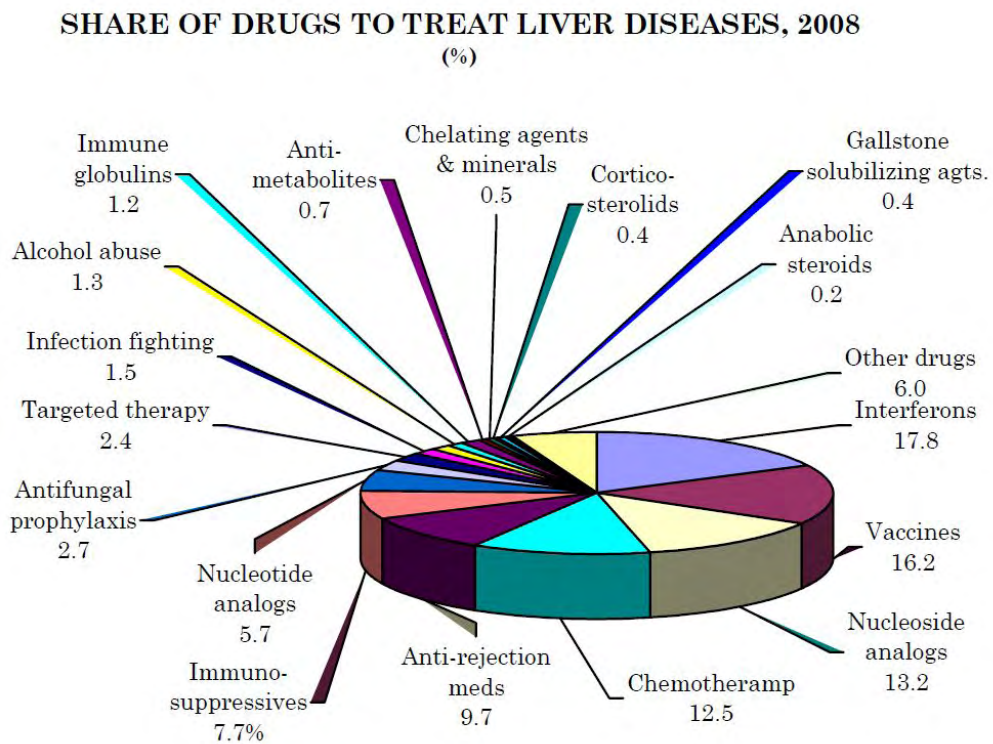


그림 2-2-8. 간 질환 치료제 현황

○ 지금까지 간경변은 불치의 병으로 인식되어 왔으나 최근의 연구결과들은 간에서 섬유생성을 억제시키거나 또는 용해를 촉진시킴으로써 섬유화의 정도를 호전시키거나 소실시킬 수 있다는 결과를 보여주고 있음. 간에서 섬유화 과정은 내피하 디세장 (space of Disse)에서 시작되고 이러한 섬유화의 근원이 되는 세포는 간 정상세포임이 밝혀진 이후 간섬유화를 억제시키기 위한 연구는 섬유화 과정에서 가장 핵심적인 역할을 하는 간 정상세포의 활성화 및 증식을 억제하고 ECM의 생성을 저하시켜 간경변으로의 진행을 막는데 초점이 맞추어지고 있음. 그러나, 아직 간섬유화를 치료할 수 있는 대표적인 방법들은 제시되어 있지 않으며, 많은 동물실험 연구를 통하여 섬유화의 진행을 차단할 수 있는 각 목표점들은 일부 규명되어 있으나 실제 제시된 대부분의 치료법이 사람에서도 치료 효과를 갖는

다는 것이 증명되어 있지 않음. 사람에서의 치료 효과가 증명되어 있지 않는 이유는 섬유화의 변화를 정확히 측정하기 위해서는 연속적인 침습적인 검사법인 간 조직 검사가 필요하고 장기간의 관찰결과가 필요하며 또 한 가지 중요한 사실은 동물(설치류)보다 사람에서 일반적으로 항 섬유화 치료에 대한 민감도가 떨어지기 때문임

- 최근 들어 섬유화의 기전에 대한 연구가 활발해지고 이해가 높아짐에 따라 특이적이고 효과적인 항섬유화 치료에 대한 여러 방법들이 시도되고 있음. 간섬유화의 이상적인 치료는 간에 대해 특이적으로 작용하고 쉽게 간에 전달되어야 하고 부작용이 없어야 하는데, 지금까지의 항섬유화 치료는 엄격히 따져보면 섬유화보다는 염증반응을 차단하는데 초점이 맞추어져 진행되었음. 따라서, 본 연구에서는 염증반응 보다는 정상세포의 활성화를 억제하는 후보물질 발굴에 초점을 맞추어 특정표적을 제어하는 targeted therapy 시장으로 급속히 편될 미래의 간 질환 치료제 시장에 대응하고자 함

**GLOBAL SALES OF DRUGS USED TO TREAT LIVER DISEASES,  
2007-2014  
(\$ MILLIONS)**

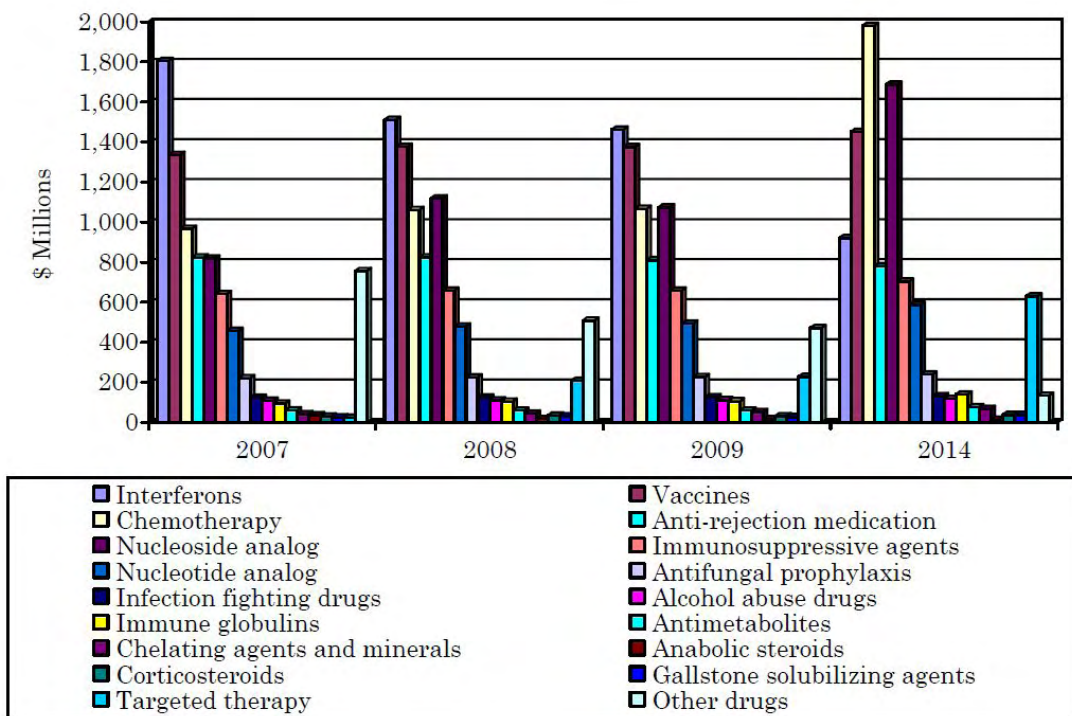


그림 2-2-9. 간 질환 치료제 시장 동향 예측 (길은 하늘색이 표적)

### 3. 고품질 안전축산물 개발 분야

#### 가. 국내외 특허분석

- 안전축산물과 관련된 특허는 2005년 급격히 증가하였으나 2009년에는 급격히 감소하여 2006년부터 2008년 사이에 총 특허 131건 중 75건이 출원되었다. 우선권 주장국가로 살펴본 특허의 주요 국가는 중국이 압도적으로 높아 약 54%의 특허를 보유하고 있는 것으로 나타남

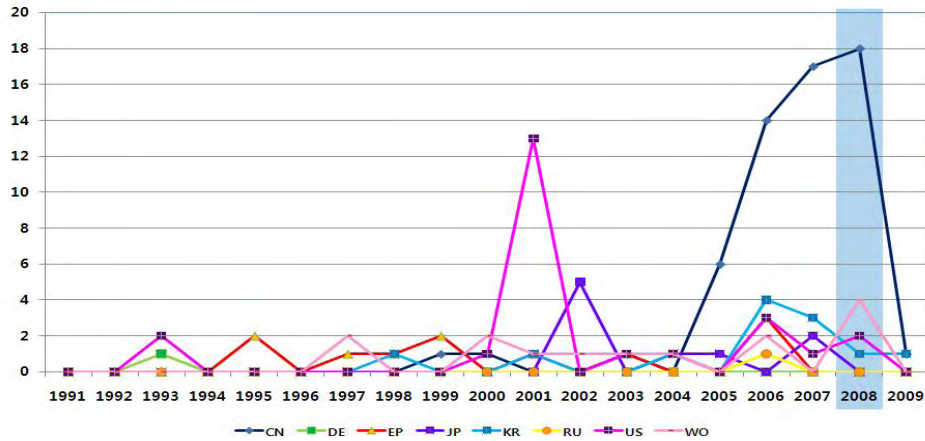


그림 2-2-10. <연도별/도메인별 특허출원 현황>

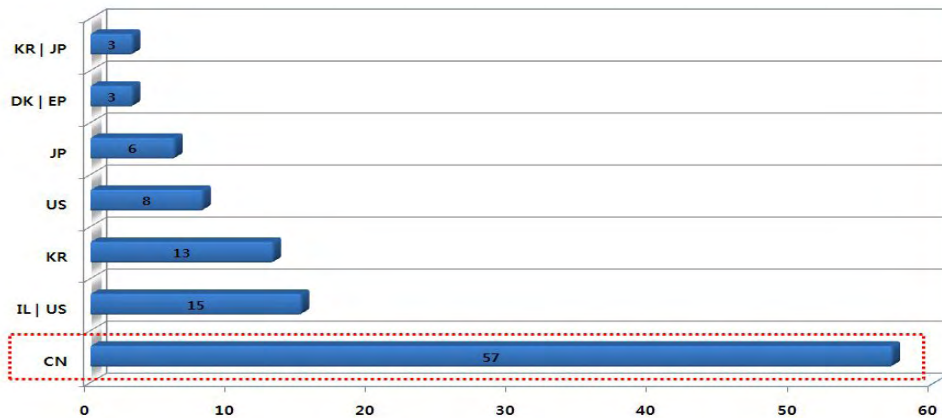


그림 2-2-11. <우선권 주장국가로 살펴본 대사성증후군 특허의 주요 국가>

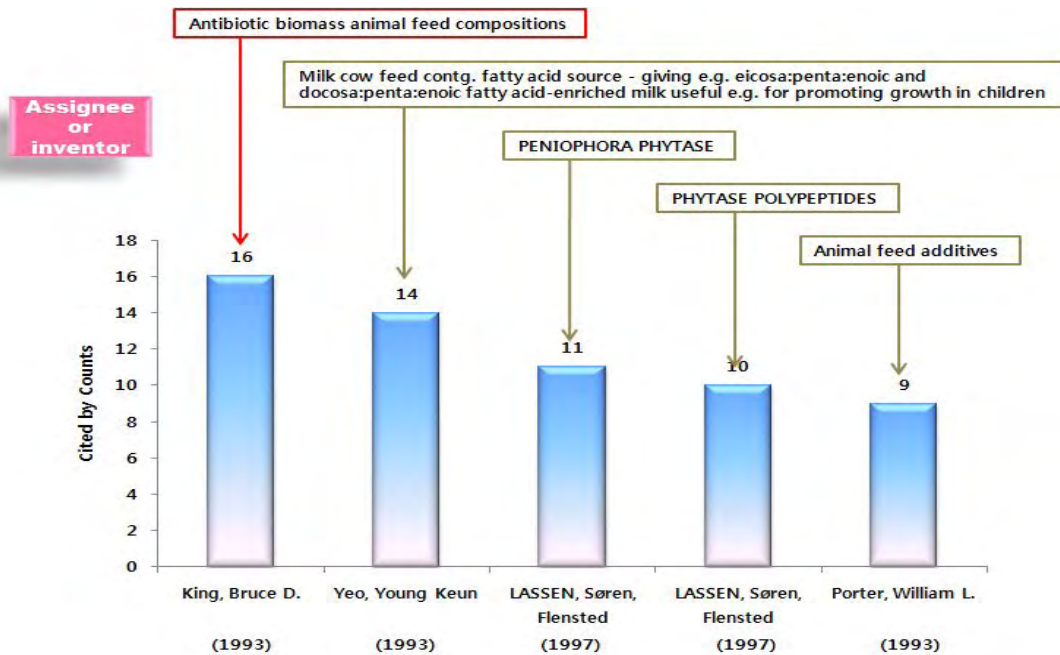


그림 2-2-12 <주요 피인용 해외특허 현황>

- 주요 피인용 해외특허는 ① Antibiotic biomass animal feed compositions, ② Feed additive composition for milk cow (Mit n-3-Fettsäuren angereicherte Milch und Futtermittelzusammensetzung fuer Milchkuehe), ③ Peniophora phytase로서 각각 16, 14, 11번 인용된 것으로 나타남
- 피인용도가 높은 이들 특허를 분석한 결과, 첨가물을 이용한 동물사료의 품질개선, 사료성분 조절을 통한 우유의 품질개선, 사료 첨가물을 이용한 소화율 개선 및 육우의 성장촉진과 관련된 내용이 유사하나(유사성 55% 이하), 항생물질을 함유하는 바이오매스의 이용, 일반사료를 조성을 변화시켜 우유의 품질 변화 유도, phytase를 사료에 첨가하여 사료의 소화율을 개선하는 것으로서 목표는 동일하나 제품화 방법론에서 완전한 차이가 있음
- 특허와 관련된 전체 등고선 지도를 분석해보면 1990년대에는 phytase에 의한 소화흡수율 증대, biomass 항생제 개발이 주도적이었으며 2000년대에는 비병원성 probiotic 제조기술과 유기성 폐기물의 제어와 관련된 특허가 많음. 그러나 최근 5년간에는 가축의 성장촉진제 개발과 유기성 폐기물 처리 기술이 많이 진행되는 것으로 분석됨
- 본 연구과제에서는 농산부산물(미강)을 *Bacillus*를 포함한 복합 균주로 고체발효시킨 사료를 가금류 및 돼지, 한우에 직접 급여하여 사료 효율 증대를 통한 축산농가의 사료원가 저감 효과를 이루고, 항생물질 대체 효과로 무항생제 육류의 생산과 이를 가공한 고품질 친환경 안전육가공품의 생산을 이루는 방향으로 연구를 추진할 계획으로 있어 등고선 지도에서의 최근 개발방향과 일치하는 것으로 판단되며 본 연구에서는 개발할 우수 발효사료 첨가제에 대해 특허출원할 계획임



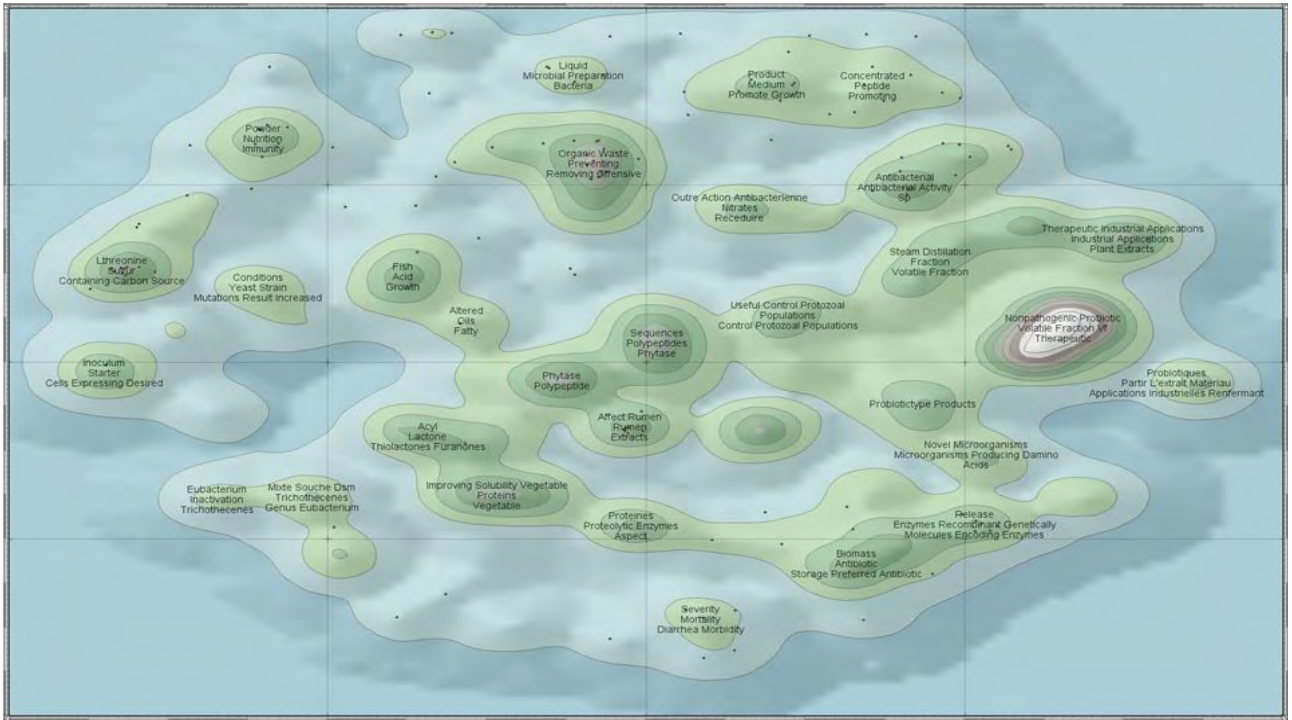


그림 2-2-13. <안전축산물 분야 특히 등고선 지도(최근 5년간 연구)>

나. 국내외 논문분석

- 고품질안전축산물과 관련된 논문은 2000년 이후 꾸준히 증가하는 것으로 분석되어 2009년 총 98편의 논문 중 14편의 논문이 발표되었으며 미국이 가장 많은 논문을 발표하여 32%를 점유한 것으로 분석됨

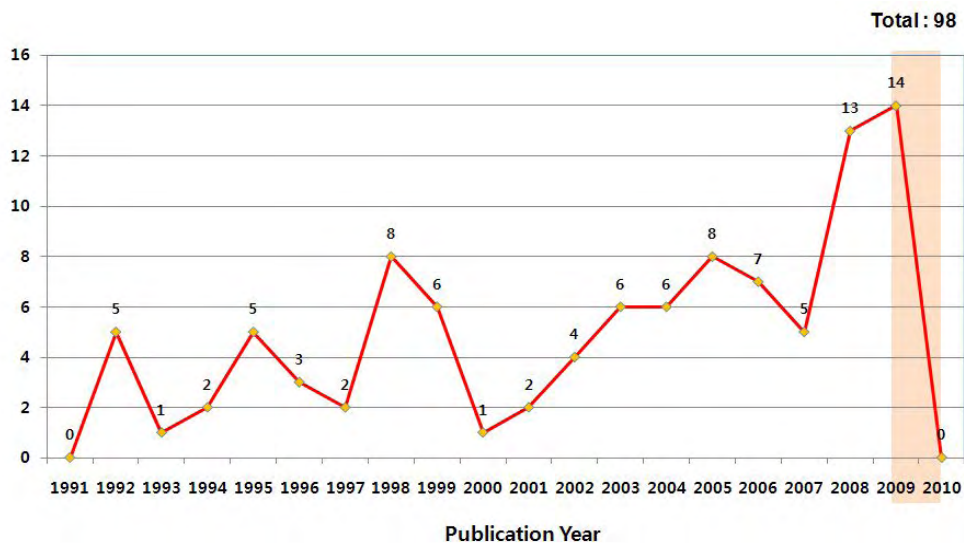


그림 2-2-14. <연도별 논문 발표 현황>

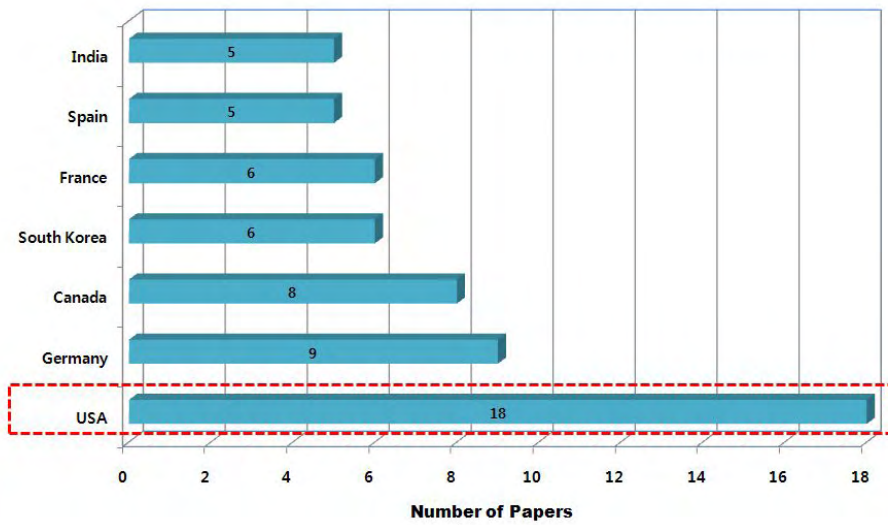


그림 2-2-15. <국가별 발표 현황>

- 주요 피인용도가 높은 3편의 논문은 ① Factors that alter rumen microbial ecology, ② The impact of feed additives on the microbial ecology of the gut in young pigs, ③ Mode of action of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* as a feed additive for ruminants 로서 각각 77, 74, 64번 인용된 것으로 나타남

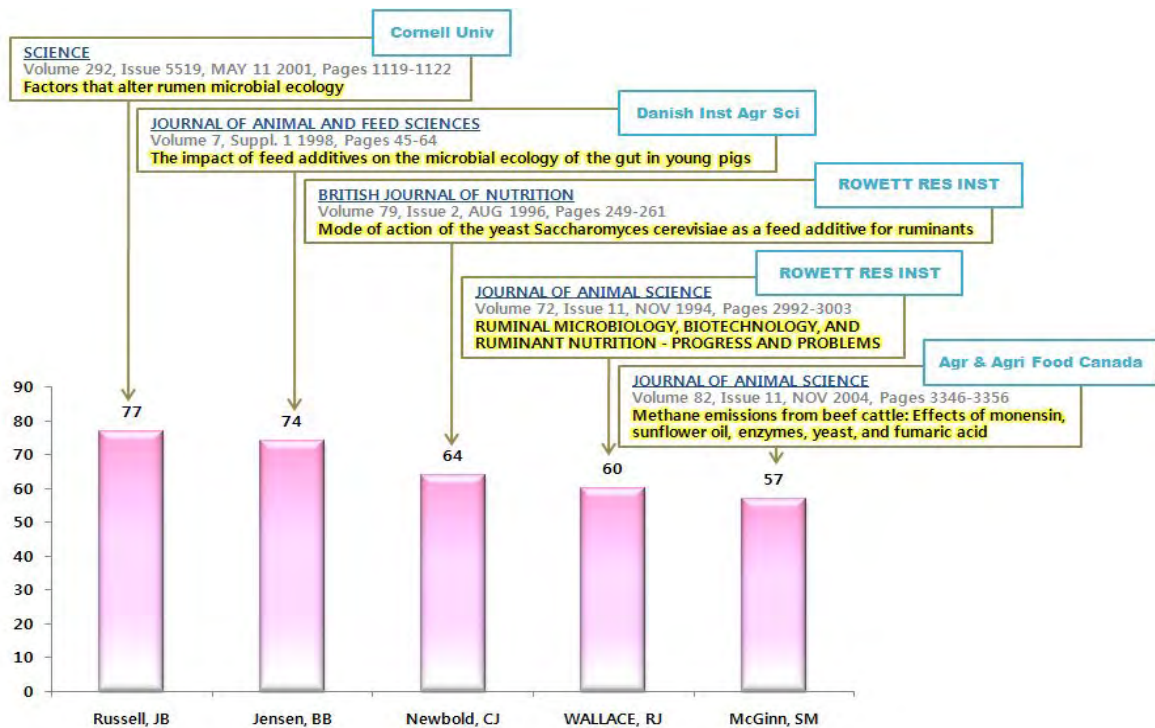


그림 2-2-16. <주요 피인용 논문현황>

## 제 3절 기술고도화를 위해 연구해야할 내용

### 1. 건강기능식품 개발 및 사업화 분야

- 국내 건강기능식품시장은 외국 특히 일본에서 유행하던 제품 및 소재가 국내로 유입되어 제조 판매 되는 경우가 대부분이고 농식품 및 가공 식품 차원에서 만들어지는 것 보다 특정 소재 자체를 이용하거나 식품의 첨가물로 이용하는 경우가 대부분이었고 특히 그 효능이 입증되어 판매가 꾸준히 지속되는 것은 인삼 및 가공 인삼류, 글루코사민, 알로에, 크로켈라 정도임. 특히 대사증후군과 같이 의약품 원료 및 의료용 소재로 이용할 수 있는 물질에 대한 검증을 하기 위해서는 막대한 자본이 필요하기 때문에 고부가가치를 낼 수 있는 의약 대체 식품의 개발은 전무한 실정이나, 최근 들어 개별인정형 건강기능식품 시장의 잠재성을 평가한 대기업의 진출이 이어지면서 다양한 질병을 대상으로 하는 제품들이 출시되기 시작함.
- 개별인정형 건강기능식품군의 경우 기존에 존재 하는 원료에서 벗어나 치료 효능을 가진 원료가 발견되면 신규 시장을 창출할 수 있는 잠재적 가능성이 내재되어 있어 천연물질의 탐색, 기능성 물질의 개발과 fermented bio-technology를 이용한 생명공학적 신소재 개발연구가 중요시 되고 있음.
- 따라서 본 사업단에서는 기 개발한 고체발효시스템을 이용하여 제조한 고체발효물의 항당뇨와 간 기능개선효능에 대해 기전과 원인물질 구명, 안전성확보를 통하여 부가가치를 높인 다양한 제품 (대사증후군 예방/치료 기능식품) 및 원료물질을 개발하는 방향으로 연구를 추진하고 연구진의 축적된 기술을 응용해 고부가가치 수출용 제품을 개발하여 관련 시장을 국내에서 해외로 확대하고자 함.
- 이를 위해서는 고체발효시스템과 같은 생물전환기술의 도입이 필수적이며 고체발효물에 존재하는 생물전환체의 분리/정제 및 효능검증 연구가 연계되어야 함. 또한 고체발효물 자체는 기전이 밝혀져 있는 의약품이 아니므로 고체발효물의 효능 및 작용기전을 구명하기 위해서는 다양한 전임상 실험 및 in vitro 시험이 필요하며 고체발효물의 미생물학적 특성을 구명하기 위해 NGS관련 기술의 도입이 필요함.

### 2. 고품질 안전축산물 생산기술

- 축산물의 시장 트렌드도 무항생제 안전축산물 및 축산가공식품으로 흐름에 따라 항생제를 대체할 수 있는 기술을 반드시 확보하여야하며 가축별 발효대사체의 적기·적량 공급체계가 구명되어야 함
- 이를 위해서 발효생균제의 가축사료(소, 돼지, 닭 사료)에 대한 적정수준 배합비율 작성이 필요하며, 우수 축산물 생산을 위해 고기 및 계란, 우유 등의 축산물에 대한 문제점(항생제 잔류 문제)이 없는가를 조사하고 가축의 성장과정에 문제점이 없는지 그리고 증체율이 대조구에 비하여 향상되는가를 조사하고자 함

## 제 4 절 연구결과의 기대효과 및 위치

### 1. 건강기능식품/의약품후보 소재 분야

- 국내에서 간 질환 유병률의 지속적 증가와 대사증후군 치료제 시장의 지속적인 성장에도 불구하고, 직접적인 작용점을 가진 약물의 부재로 치료를 목적으로하는 신약 개발의 필요성이 어느 때보다 절실히 요구되고 있음. 이에 많은 국내외 제약사와 건기식 업체들이 만성 간 질환 치료제를 비롯한 대사 증후군 치료제 개발에 박차를 가하고 있음. 본 연구사업을 통한 효능이 뛰어나 간질환 예방 및 치료 제품 개발은 고령사회에 대비한 건강하며 풍요로운 삶을 위한 원천기술 개발에 기여할 것이며, 이를 통한 국민의 삶의 질을 향상시키고, 값 비싼 해외신약을 대체하는 국내신약 및 기능성식품 개발로 급증하는 의료 비용을 절감시킬 수 있음
- 대한당뇨병학회는 현 추세를 방치할 경우 향후 10년 이내에 전 국민의 4분의 1이 당뇨병으로 직간접적인 피해를 입을 것으로 경고한 바 있음. 당뇨병의 예방·치료를 위한 식품소재의 경제적 파급효과는 약 5조원으로 추산됨. 따라서 당뇨 등의 대사증후군 예방/치료효과가 기대되는 제품의 개발은 시장성이 매우 높을 뿐만 아니라 국민 보건향상에 크게 이바지할 수 있음은 물론 농업작물의 소비증대로 농가경제에도 긍정적인 영향을 미칠 수 있음.
- 생물전환기술을 이용하여 생산된 기능성물질은 그 자체로 가공식품으로 사용가능할 뿐만 아니라 기능성첨가물이나 건강기능식품으로 이용이 가능하므로 그 적용 범위가 매우 광범위함. 본 연구를 통해 농산물 고체발효기술이 확립된다면 우수한 원료 농산물을 발효 또는 미생물 전환기술을 이용하여 기능성이 더욱 보강된 제품 개발을 기대할 수 있음
- 또한 제조한 고체발효물 및 각 원료에서 분리한 유효성분들은 새로운 기작을 갖는 비만 혹은 성인형 당뇨병 치료제로 개발을 위한 소재로 활용 가능하며, 이러한 후속연구가 성공적으로 수행된다면 신의약품 개발을 위한 제형화 연구, 약물전달체계 개발연구, 부작용이나 독성의 경감을 위한 약리 대사연구 그리고 임상연구를 체계적으로 수행하는 일련의 신의약 개발을 위한 관련연구와 산업분야의 연구 활성화를 기대할 수 있으며, 비만, 당뇨병 치료제의 개발 이외에도 이들 효소와 관련된 여러 질환 개발의 선도물질로의 개발도 가능함
- 본 사업단에서는 validated target에 대한 차별화 된 접근으로 최소화된 개발 비용과 연구 기간으로 보다 효율적으로 비임상 후보물질을 도출하는 전략을 활용하였음. 본 연구의 결과로 나온 화합물의 용도 특허 획득 후, 기초독성 시험 수행이 가능할 것이며, 이를 바탕으로 식품회사나 제약사와의 연계 개발이 가능함. 비교적 초기 단계에서의 대사 증후군 치료제나 기능성식품의 개발 경험이 활발한 기업에 기술 이전할 경우 공동 연구 체계를 구축하여 건강기능식품 및 신약 개발의 성공률을 높일 수 있는 효과가 기대됨
- 본 연구를 수행하면 구축한 실험계 (PTP1B 저해활성, AMPK 활성화, 2NBDG uptake 촉진 활성,  $\alpha$ -SMA와 TGF- $\beta$ 1 발현량 특정, KKAY 동물모델, 간섬유화동물모델)는 대사성 증후군 및 간 섬유화 치료용 신약 개발을 위한 국내 농산물 활용 연구의 가이드라인으로 활용 가능하며, 국내 대사성 증후군 연구 인프라의 다양화 및 확대에 기여할 것으로 기대됨
- 또한 대사성 증후군 연계 질병들의 생리/병리적 기작 및 신약 타겟의 다각적 분석 및 물질 연계 보고서로도 활용이 가능하며 특히, 영양소 대사 이상이 원인이 되는 대사성 증후군

의 특성상 본 연구에서 제시하는 기술 및 소재들은 식품 및 농수산과학과 관련된 제반 분야로 파급되고 확대되어 상승효과를 제공할 것으로 기대됨

표 2-4-1. 본 사업단을 통해 개발한 고체발효물의 건강기능식품화를 통해 예상되는 경제적 효과

(단위 : 백만원)

항 목 \ 산업화 기준	1차년도	2차년도	3차년도	4차년도	5차년도	계
직접 경제효과				2,000	5,000	7,000
경제적 파급효과				20,000	20,000	40,000
부가가치 창출액				2,000	2,000	4,000
합계	0	0	0	24,000	27,000	51,000

- 본 연구과제에 참여하는 과정에서 대학원생을 포함한 다기관 참여 연구 인력의 연구능력 향상을 통해 관련 분야의 제품개발을 위한 우수 연구인력의 확보와 국가연구수준 향상에 기여할 것으로 기대됨

## 2. 축산용 생균제 분야

- 농산부산물을 발효한 항생제 대체 발효사료를 개발하여 안전축산물을 생산하고 무항생제 육류 및 육가공품 제조 기술을 기업에 전수하여 안전식품을 생산할 수 있도록 함
- 국내에서 생산되는 배합사료 총량이 2012년 기준으로 16,986,798톤으로 그 중 54%에 항생제를 첨가하고 있으며, 돼지사료와 닭 사료, 소 사료가 차지하는 비율이 약 85%에 이르고 있음. 총 배합사료 생산량의 85%인 14,438,778톤에 항생제 대신 대체 생균제를 2%만 사용하여도 288,775톤으로 부가가치는 엄청날 것으로 기대되며, 이는 관련 업체의 소득과 직결되므로 발효생균제 생산분야 시장 성장에 기여 할 수 있음

표 2-4-2. 본 연구사업을 통해 개발한 발효생균제의 산업화를 통해 예상되는 경제적 효과

(단위 : 백만원)

항 목 \ 산업화 기준	1차년도	2차년도	3차년도	4차년도	5차년도	계
직접 경제효과			2,000	4,000	10,000	16,000
경제적 파급효과			200	400	1,000	1,600
부가가치 창출액			200	400	1,000	1,600
합계	0	0	2,400	4,800	12,000	19,200

- 또한 사료가격의 높은 상승에 따른 축산농가의 경제적 어려움이 고조되고 사료곡물을 수입에 의존하고 있는 현실에서 국가적 차원의 대책마련이 시급한 시점임. 이에 성장촉진관련 발효생균제의 개발은 매우 중요한 과제임. 육우의 사육기간이 2개월 단축될 경우, 농가는

년간 4,600억원의 획기적인 사료비 절감이 가능하고 이를 위해 수입되는 옥수수의 양을 약 40만톤 절감할 수 있어 축산농가의 소득증대는 물론 국가적 손실도 줄일 수 있을 것으로 기대됨. 또한 2007년 FAO 발표에 의하면 세계 소 사육 두수는 상위 10개국 6억7580만두로 생육촉진용 생균제의 세계시장을 향한 과급효과는 막대할 것으로 기대됨.



그림 2-4-1. 한우 사육 2개월 단축시 예상되는 경제적 효과

# 제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

## 제 1 절 고체발효시스템 구축 및 지표성분 표준화

### 1. 실험방법

#### 가. 고체발효물 제조 및 실험방법

##### (1) 원료 배합 및 제조과정

미강복합물, 노니, 울금, 녹차 및 갈근 분말에 청국장분말(발효균주: *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus coagulans*)을 1% 비율로 첨가하고 총 중량의 40%에 해당하는 수분을 공급한 후 82.5±2.5℃에서 4시간 동안 1차 열처리하였다. 시료를 발효통에 충전시킨 후 온도 25℃, 습도 60% 조건에서 30일 동안 본 발효를 진행하였다. 82.5±2.5℃에서 2시간 1차 건조한 후, 87.5±2.5℃에서 2시간 열풍 건조하여 수분 3% 이하의 시제품을 제조하였다.

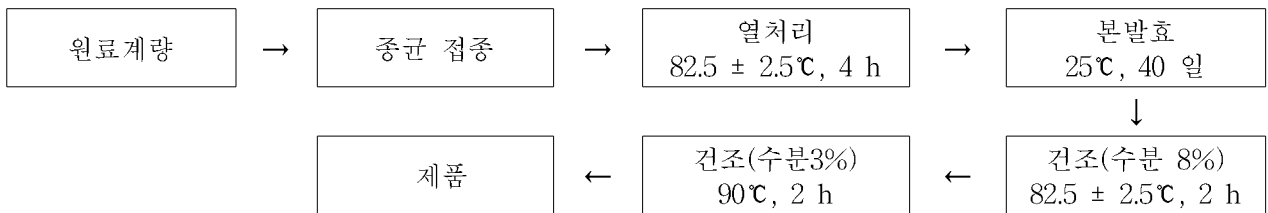


그림 3-1-1. 고체발효 공정

##### (2) 고체발효물 품질지표 설정

###### (가) β-Glucan 함량변화

시료 5 g에 *n*-hexane 10배량을 가하여 탈지한 후 85% 에탄올을 시료 1 g당 10 mL를 가하여 세척하고 물 100 mL을 가했다. 이 검체의 pH를 0.1 N NaOH로 pH 6.9로 조정하고 아밀라제 20 unit를 가하여 20℃에서 2시간 동안 효소분해 시켰다. 이를 0.1 N HCl로 pH 5.0으로 조정하고 셀룰라아제 50 unit를 넣고 37℃에서 2시간 동안 진탕하여 효소분해 한 후, 0.1 N NaOH로 pH를 7.5로 조정하고 프로테아제 10 unit를 가하여 37℃에서 2시간 동안 효소분해 하였다. 이를 다시 0.1 N HCl로 pH 4.8 까지 조정하고 아밀로글루코시다제 70 unit를 가하여 60℃에서 2시간 동안 진탕하여 효소분해 시켰다. 이 효소분해물에 95% 에탄올 400 mL를 가하여 4℃에서 12시간 동안 침전시킨 후, 10,000 rpm에서 10 분간 원심분리하여 시료의 침전 물을 취하고, 다시 80% 에탄올 500 mL을 침전물에 가하여 4℃에서 12시간 동안 침전시킨 후, 동일한 조건으로 원심분리하였다. 원심분리 된 침전물에 물 20 mL를 가한 후 침전물을 호모 게나이저를 이용하여 균질화 하고 물로 100 mL이 되도록 mess up 하였다. 이를 적정농도로 희석하여 시험용액으로 사용하였다. 각각의 시험관에 5% 페놀용액 1 mL을 넣고 시험용액 0.1 mL과 증류수 0.9 mL을 가한 후 10 초간 잘 흔들어 섞어 황산 5 mL씩을 가하여 혼합하고 20 분 동안 실온 반응시켜 470 nm에서 흡광도를 측정하였다.

###### (나) GABA 함량변화

마쇄된 시료 0.2 g에 70 mM LaCl<sub>3</sub> 10 mL을 첨가하여 homogenizer로 균질화시킨 뒤 원심분리하였다. 상등액 2.1 mL에 0.1M KOH 0.48 mL을 첨가하여 원심분리시켰다. 상등액을 분리한

뒤 활성탄을 10% 농도가 되도록 첨가하여 상온에서 1시간 동안 반응시켜 색소를 제거하고 다시 원심분리 한 뒤 상등액만을 0.45  $\mu\text{m}$  syringe filter로 여과하여 활성탄을 완전히 제거하였다. 여과된 상등액을 GABA 함량측정에 이용하였다. GABA 함량은 Gabase를 이용하는 효소 시스템을 이용하여 생성되는 NADPH의 양을 spectrophotometer를 이용하여 340 nm에서 흡광도를 측정하였다.

#### (다) 효소활성변화

효소활성도는  $\alpha$ -amylase의 경우 Fuwa의 blue value 법을 일부 변형하여 측정하였다. 0.5% 전분용액 5 mL에 0.04 M potassium phosphate buffer(pH 5.9) 4 mL과 조효소액 1 mL를 가한 후 37°C에서 10 분간 반응시켰다. 반응액 1 mL을 1/3,000 N 요오드 용액이 10 mL 들어 있는 시험관에 넣어 발색시킨 다음 660 nm에서 흡광도를 측정하였다.  $\beta$ -amylase 활성측정은 dinitrosalicylic acid 법으로 측정하였다. 1% soluble starch를 기질로 사용하여 조효소액과 1:1(v:v)비율로 섞어 20°C에서 10분간 반응 시킨 뒤 DNS 시약 동량을 첨가하여 15분간 끓는 물에서 가열한다. 가열 반응 후 차가운 물에서 식힌 후 증류수를 첨가하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였으며 표준물질로 maltose를 사용하였다. Protease 활성측정은 Anson의 방법을 일부 변형하여 측정하였다. 0.1 M potassium phosphate buffer (pH6.8) 1 mL에 0.6% casein 1.5 mL과 조효소액 0.5 mL을 넣고 37°C에서 30분간 반응시켰다. 반응 후 0.4 M TCA를 3 mL 첨가하여 상온에서 10분간 방치시켜 효소반응을 정지시켰다. 반응액은 원심분리(10,000 rpm, 10분)한 뒤 상층액 1 mL에 0.4 M  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  5 mL과 1 N phenol 1 mL을 첨가하여 40°C에서 30분간 발색시켜 660 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준물질로는 tyrosine을 사용하였으며 효소활성 단위는 1분간 tyrosine 1  $\mu\text{g}$ 을 유리하는 효소량을 1 unit로 정의하였다.

#### (라) 미생물학적 품질변화

발효물 25 g을 멸균된 stomacher bag에 담고, 멸균 증류수 225 mL을 가하여 stomacher로 30초간 균질화 시키고 이를 단계별로 희석한 후, spreading 방법으로 진균류는 10% tartaric acid를 첨가한 potato dextrose agar (PDA) (Difco, MM, USA), 일반세균은 plate count agar(PCA) (Difco), 젖산균은 지시약으로 Bromphenol Blue 0.002%를 첨가한 MRS (Difco)를 이용하여 평판 배양하였다. 총균, 젖산균은 37°C에서 24시간, 효모는 30°C에서 48시간동안 배양한 후 colony를 계측하였다.

#### (마) pH, 산도 및 수분 측정

pH는 pH meter기를 이용하여 측정하였다. 적정산도는 발효물에 10배량의 증류수를 가하고 5분간 교반한 후 여과지(Watman No. 2)로 여과한 다음 0.1 N NaOH로 pH 8.1까지 적정하고 이때 소요된 0.1 N NaOH의 mL 수로 측정하였다. 수분함량은 상압가열건조법에 의해 측정하였다.

#### (바) 온도 및 습도 변화

온습도계를 이용하여 발효기간 동안 발효물의 온도와 습도를 측정하였다.



### (3) 고체발효물의 영양분석 및 유해물질 평가

#### (가) 영양성분 분석

발효미강복합물 및 발효노니의 열량 및 탄수화물은 식품공전(2009)상의 계산법에 준하여 측정 한 후 kcal/100g로 표기하였으며, 수분은 상압가열건조법, 회분은 회분시험법, 지방은 에테르 추출법, 단백질은 kjeldahl법, 식이섬유는 총식이섬유시험법에 준하여 측정 한 후 g/100g으로 표기하였다.

#### (나) 유해물질 평가

유해 중금속 함량(Pb, Cd, As) 분석은 식품공전상(2009)의 유해성금속시험법에 준하여 측정하였다.

## 2. 실험결과

### 가. 고체발효물의 제조

상기 실험방법에 준하여 발효미강복합물, 발효노니, 발효울금, 발효녹차 및 발효갈근을 제조하였다.



그림 3-1-2. 고체발효에 사용된 용기

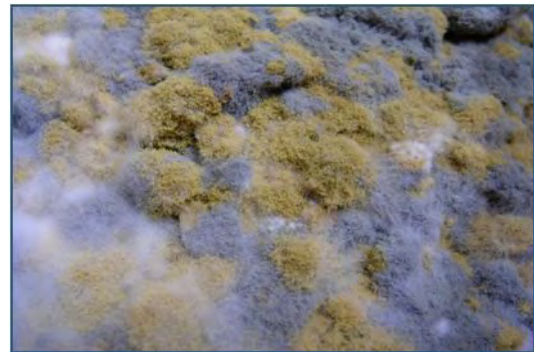


그림 3-1-3. 발효가 완료된 고체발효물

### 나. 고체발효물의 품질지표 설정

#### (1) 발효미강복합물의 품질지표 설정

##### (가) $\beta$ -Glucan 함량변화

미강 복합물의 발효과정 중  $\beta$ -glucan 함량은 발효 10일 16.18 %로 급격히 증가한 후 발효 50일까지 완만하게 증가하는 경향을 보이는데, 특히 발효 30일 이후는 함량변화가 거의 없었다. 30일간의 발효 후 90℃에서 2시간 열처리한 후에도  $\beta$ -glucan 함량(건강기능식품협회 분석의뢰)이 23.3 % 함유된 것으로 확인되었으며 이는 건조 처리에 따른 수분함량 차이를 고려할 때 내부분석법에 의한 산출값과 동일하였으며, 다만 이를 외부 분석처에 의뢰하여 실험방법의 객관성을 다시한번 확인한 것이다. 따라서 발효미강 복합물의 고체발효 최적 조건 설정을 위하여  $\beta$ -glucan을 지표물질로 선정하였다.

표 3-1-1. 미강복합물 발효 중  $\beta$ -glucan 함량 변화

	발효기간(일)						30일 발효물 건조 처리 후 분석*(90℃,2hr)
	0	10	20	30	40	50	
$\beta$ -glucan (%)	13.82 ± 0.98	16.18 ± 1.22	16.76 ± 0.40	17.87 ± 1.10	18.00 ± 0.68	18.02 ± 0.56	23.3 ± 0.50

(나) GABA 함량 변화

GABA(Gamma amino glutamic acid)의 함량은 초기 미강복합물에는 대량 존재하는 것으로 확인되었으나 발효가 진행될수록 감소하는 양상을 보였다. 특히 발효 10일 이후에 급격히 감소하여 초기 함량의 93%가 감소했고 그 이후에도 소량 감소하는 양상을 보였다. 이러한 결과는 GABA가 발효가 진행됨에 따라 미생물 발육과 성장에 소모되는 기질로 사용되었기 때문으로 판단된다. 따라서 GABA는 발효 조건 설정을 위한 지표물질로 사용하기 어려울 것으로 사료된다.

표 3-1-2. 미강복합물 발효 중 GABA 함량변화

	발효기간(일)				
	0	10	20	30	40
GABA ( $\mu$ g/g)	488.0±0.00	371.6±0.00	30.1±1.85	30.0±0.79	25.0±0.34

(다) 효소활성변화

발효미강복합물의  $\alpha$ -amylase 활성은 발효 30일까지 꾸준히 증가한 후 발효 40일 및 50일차에는 감소하는 것으로 나타났다. 50일간 발효 후 90℃에서 2시간 열처리 한 경우 열처리하지 않았을 때에 비해 활성이 다소 감소하기는 하였으나 감소폭이 크지는 않았다.  $\beta$ -amylase 효소 활성은 발효 40일까지 감소하다 발효 50일에는 다시 증가하여 발효 10일째 나타난 효소활성과 유사한 값을 보였다. Protease 효소활성은 발효시기에 따라 계속 증가하였으며 50일째 가장 높은 값을 보였다. Protease는 총 균의 수치가 증가하는 양상과 일치하며  $\beta$ -amylase 효소활성은 총 균수와 젖산균, 진균류의 증가와는 반대로 효소활성이 감소하는 양상을 보인다.

표 3-1-3. 미강복합물 발효 중 효소활성 변화

(Unit/g)	발효기간(일)						50 일 발효물 건조처리 (90℃,2hr)
	0	10	20	30	40	50	
$\alpha$ -amylase	10.29 ±0.81	15.36 ±0.64	20.51 ±0.96	24.17 ±1.32	18.32 ±0.75	19.70 ±0.79	17.95 ±0.85
$\beta$ -amylase	5.8 ±0.1	4.6 ±0.1	4.8 ±0.0	4.1 ±0.1	1.2 ±0.0	4.3 ±0.1	3.8 ±0.1
Protease	17.2 ±0.2	23.2 ±0.5	24.4 ±0.2	25.1 ±0.9	29.8 ±0.3	37.4 ±0.9	32.4 ±0.3

(라) 미생물학적 품질변화

발효기간에 따른 균수의 경우 총 균은 0일째에  $1.4 \times 10^6$ , 10일째에  $2.9 \times 10^7$ , 30일째에  $1.9 \times 10^8$ 로 발효기간이 경과함에 따라 조금씩 증가하는 경향을 보였다. 젖산균의 경우 0일째에  $3.6 \times 10^6$ , 10일째에  $6.3 \times 10^7$ , 20일째에  $3.9 \times 10^8$ 로 증가하다 40일째에  $3.0 \times 10^7$ 로 약간 감소하는 경향을 보였다. 진균류의 경우 발효 30일까지  $2.5 \times 10^8$ 로 증가하였으며, 이후 50일째에는  $4.3 \times 10^7$ 로서 전체적으로는 감소하는 경향이였다. 발효가 끝난 50일째의 발효물을 90℃에서 2시간 건조처리 후의 총균수는  $1.8 \times 10^7$ 으로 발효 마지막 50일째의 균수와 차이가 없었으며 젖산균은  $8.7 \times 10^5$ 으로 발효기간 동안의 값에 비해 감소하였다. 진균류 역시  $4.3 \times 10^6$ 로 발효 마지막 50일째의 값에 비해 약간의 감소를 나타내었다.

표 3-1-4. 미강복합물 발효 중 균수변화

(CFU/g)	발효기간(일)						50 일 발효물 건조처리 (90℃, 2hr)
	0	10	20	30	40	50	
총 균	$1.4 \times 10^6$	$2.9 \times 10^7$	$2.8 \times 10^7$	$1.9 \times 10^8$	$1.5 \times 10^8$	$7.0 \times 10^7$	$1.8 \times 10^7$
젖산균	$3.6 \times 10^6$	$6.3 \times 10^7$	$3.9 \times 10^8$	$1.4 \times 10^8$	$3.0 \times 10^7$	$1.4 \times 10^7$	$8.7 \times 10^5$
진균류	$1.7 \times 10^3$	$2.6 \times 10^7$	$2.2 \times 10^8$	$2.5 \times 10^8$	$7.1 \times 10^7$	$4.3 \times 10^7$	$4.3 \times 10^6$

(마) pH, 산도 및 수분 측정

발효기간에 따른 발효물의 수분함량은 0일째에 31.58%에서 50일째에 15.67%로 발효기간이 증가함에 따라 감소하는 경향을 보이고 있다. pH의 경우 발효기간 동안 pH 6.20~6.58로 유지되었다. 산도 역시 발효기간 동안 0.011~0.27%를 유지하였다. 발효가 끝난 50일째의 발효물을 90℃에서 2시간 건조처리 후 실험한 이화학 결과 수분함량은 2.57%로 감소하였으며, pH는 6.21로 발효기간 동안의 pH값과 큰 차이를 보이지 않았다. 산도 역시 0.0256으로 발효기간 동안의 값과 비교해 큰 차이를 보이지 않았다.

표 3-1-5. 미강복합물 발효 중 수분, pH 및 산도 변화

	발효기간(일)						50 일 발효물 건조처리 (90℃, 2hr)
	0	10	20	30	40	50	
수분(%)	31.58	25.17	22.92	19.69	17.33	15.67	2.57
pH	6.58	6.21	6.41	6.20	6.24	6.34	6.21
산도(%)	0.011	0.017	0.016	0.027	0.022	0.019	0.0256

(바) 온도 및 습도 변화

발효기간에 따른 온도의 변화는 0일째  $25.73 \pm 0.40^\circ\text{C}$ 에서 10일째에  $45.07 \pm 0.51^\circ\text{C}$ 로 큰 폭으로 증가했다가 20일째는  $32.58 \pm 0.61^\circ\text{C}$ 로 감소하여 발효 50일째 까지  $26^\circ\text{C} \sim 30^\circ\text{C}$  사이를 유지하였다. 습도의 경우 0일째에  $92.81 \pm 0.94\%$ 에서 발효 10일째에  $78.09 \pm 0.29\%$ 로 감소하여 발효 50일째까지 75~78%를 유지하였다.

표 3-1-6. 미강복합물 발효 중 수분, pH 및 산도 변화

발효기간(일)	습도(%)	온도(℃)
0	92.81±0.94	25.73±0.40
10	78.09±0.29	45.07±0.51
20	78.26±0.45	32.58±0.61
30	76.54±0.51	29.25±0.63
40	75.00±0.00	28.59±0.08
50	76.00±0.00	26.90±0.00

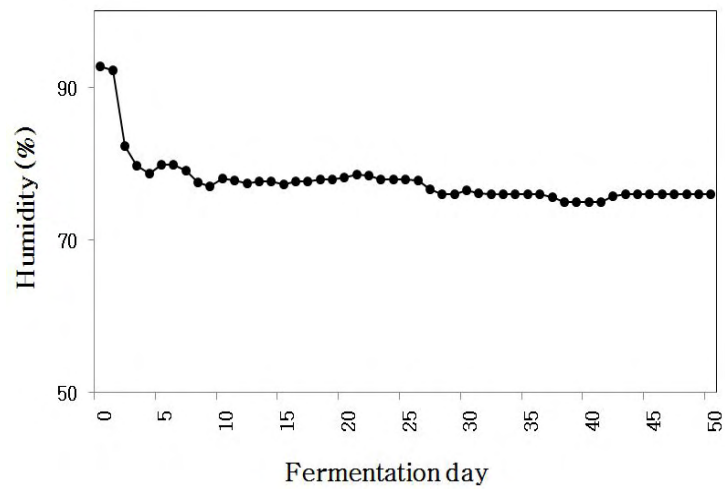


그림 3-1-4. 미강복합물 발효기간에 따른 습도 변화

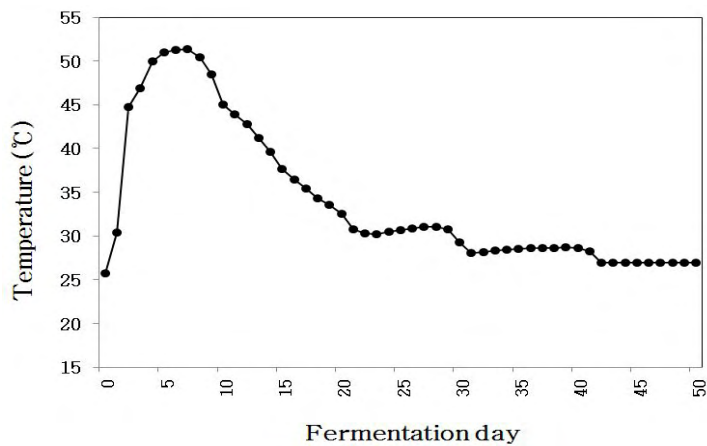


그림 3-1-5. 미강복합물 발효기간에 따른 온도 변화

(2) 발효미강복합물의 영양성분분석 및 유해물질 평가

(가) 영양성분 분석

발효지표물질 분석을 통해 확립한 발효제조공정을 거쳐 제조한 발효미강복합물의 영양성분을 분석하였다. 발효미강복합물의 영양성분을 분석하고 1일 섭취량 및 영양소 기준치에 대한 비율을 계산한 결과, 발효미강 복합물의 1회 섭취량(4g)의 열량은 14.96 kcal 였으며, 지방, 단백질, 탄수화물은 권장 영양소 기준치의 1.15% 이하이었으나, 식이섬유가 1.64 g으로 권장 영양소 기준치의 6.56%에 이르는 양이 함유되어 있었다.

표 3-1-7. 발효미강복합물의 영양성분 분석

항목		1회 섭취량(4g) 당 함량 (영양소 기준치에 대한 비율)	영양소 기준치
영양성분	지방	0.20 g (0.4%)	50 g
	단백질	0.69 g (1.15%)	60 g
	탄수화물	2.55 g (0.78%)	328 g
	식이섬유	1.64 g (6.56%)	25 g
	열량	14.96 kcal	-

(나) 유해물질 분석

적정일일섭취량인 4 g을 기준으로 하여 발효미강복합물 복용 시 섭취하게 되는 납, 비소, 카드뮴 및 총수은에 대한 일일섭취량을 도출하였다. 그 결과 납, 비소, 카드뮴 및 수은 모두 건강기능식품 유해물질기준규격인 10.8, 150, 3.0 및 2.1 µg/일에 미치지 못하는 소량만 검출되었으며, 대장균군도 불검출되어 발효미강복합물은 유해물질규격을 만족시키는 안전한 소재임을 확인하였다. 미생물 시험항목 중 일반세균은 액상제품의 경우에만 해당하므로 고체 상태인 발효미강복합물의 일반세균 결과는 제품제조 정도관리를 위한 지표로 활용하고자 한다.

표 3-1-8. 발효미강복합물의 유해물질분석

항목		1회 섭취량(4g) 당 함량	식약청 기준
중금속	납	1.88 µg/일 (기준충족)	10.8 µg/일
	비소	3.52 µg/일 (기준충족)	150 µg/일
	카드뮴	0.4 µg/일 (기준충족)	3.0 µg/일
	총수은	0.024 µg/일 (기준충족)	2.1 µg/일
미생물	대장균군	음성	음성
	일반세균	-	≤100 (액상제품에 한해)

(3) 발효노니 품질지표 설정

(가) 효소활성변화

발효노니의 α-amylase 활성은 발효기간 30일까지는 큰 변화가 없었으나 40일차에 다소 증가하였으나 활성이 높지는 않았다. β-amylase 효소활성은 발효 40일까지 증가하는 양상을 보이지만 활성자체는 약하다. Protease 효소활성은 10일 이후 약간 감소하였으나 전체적으로 40일째까지 증가하는 양상을 보인다. Protease는 총 균의 수치가 증가하는 양상과 일치한다.

표 3-1-9. 노니 발효 중 효소활성 변화

(Unit/g)	발효기간(일)				
	0	10	20	30	40
α-amylase	2.20 ± 0.20	1.69 ± 0.63	1.41 ± 0.63	1.37 ± 0.45	6.80 ± 1.75
β-amylase	2.7±0.2	2.8±0.1	4.3±0.1	5.5±0.2	5.9±0.0
Protease	20.3±0.3	17.3±1.3	18.8±0.6	21.5±0.4	32.1±0.4

(나) 미생물학적 품질변화

발효기간에 따른 균수의 경우 총 균은 0일째에  $5.4 \times 10^4$ , 40일째에  $1.4 \times 10^8$ 로 발효기간에 지남에 따라 증가하는 경향을 보였다. 젖산균도 0일째에  $1.1 \times 10^5$ , 40일째에  $1.6 \times 10^8$ 로 증가하는 경향을 보였다. 진균류의 경우 발효기간에 따라 20일째부터 증가하기 시작하여 40일째에는  $6.5 \times 10^6$ 로서 전체적으로는 증가하는 경향을 보였다.

표 3-1-10. 노니 발효 중 균수변화

(CFU/g)	발효기간(일)					
	0	10	20	30	40	50
총 균	$5.4 \times 10^4$	$4.5 \times 10^5$	$2.0 \times 10^7$	$4.4 \times 10^7$	$1.4 \times 10^8$	$7.0 \times 10^7$
젖산균	$1.1 \times 10^5$	$8.1 \times 10^5$	$1.1 \times 10^7$	$1.6 \times 10^6$	$1.6 \times 10^8$	$1.4 \times 10^7$
진균류	0	0	$2.5 \times 10^7$	$8.0 \times 10^7$	$6.5 \times 10^6$	$4.3 \times 10^7$

(다) pH, 산도 및 수분 측정

발효기간에 따른 발효물의 수분함량은 0일째에 39.46%에서 40일째에 25.89%로 발효기간이 증가함에 따라 감소하는 경향을 보이고 있다. pH의 경우 발효기간 동안 pH 4.39에서 발효 40일째 pH 6.31로 약 산성에서 알칼리로 증가하였는데 이에 따라 산도 역시 발효기간 동안 0.22%에서 0.05%로 감소하였다.

표 3-1-11. 노니발효 중 수분, pH 및 산도 변화

	발효기간(일)					
	0	10	20	30	40	50
수분(%)	39.46	34.62	30.06	25.57	25.89	15.67
pH	4.39	4.28	4.97	6.24	6.31	6.34
산도(%)	0.22	0.23	0.11	0.04	0.05	0.019

(라) 온도 및 습도 변화

발효기간에 따른 온도의 변화는 0일째 26℃에서 20일째 45.9℃로 증가한 후 발효 40일째까지 28.5℃로 꾸준히 감소하였다. 습도의 경우 0일째에 82.0%에서 발효 10일째에 90.8%로 증가하여 발효 40일째 74.2%까지 감소하였다.

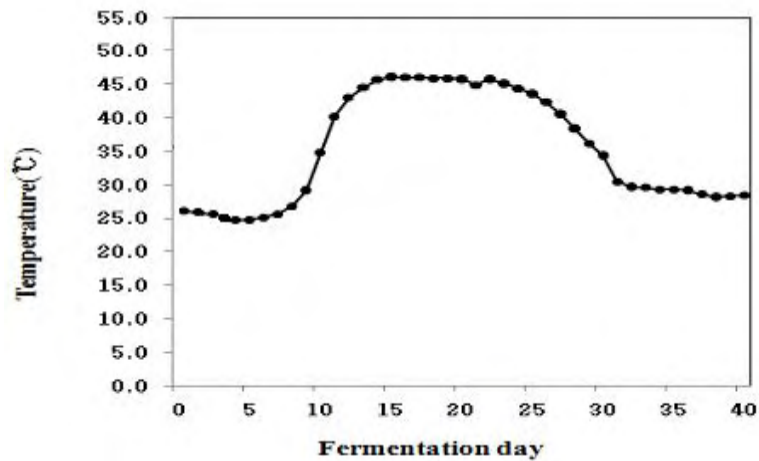


그림 3-1-6. 발효기간에 따른 노니 발효물의 온도 변화

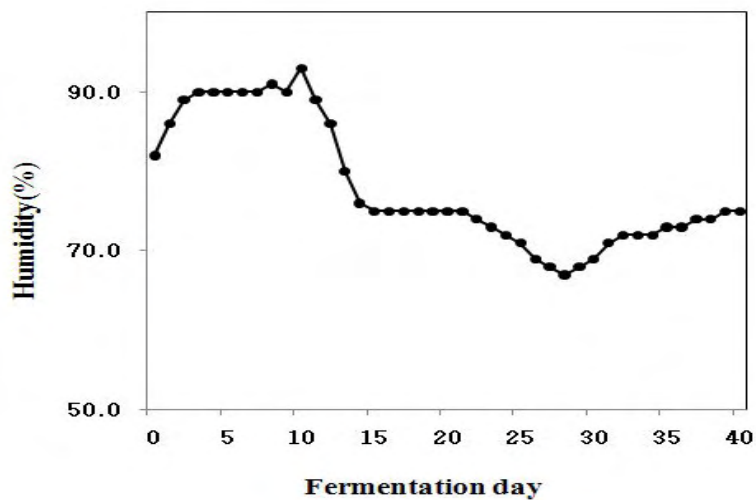


그림 3-1-7. 발효기간에 따른 노니 발효물의 습도 변화

(4) 발효노니의 영양성분분석 및 유해물질 평가

(가) 영양성분 분석

혈당조절을 위한 발효노니의 적정일일섭취량인 4 g을 기준으로 하여 발효노니 복용 시 섭취하게 되는 영양성분을 분석하고 1일 섭취량 및 영양소 기준치에 대한 비율을 계산하여 표기하였다.

표 3-1-12. 발효노니의 영양성분분석

항목		1회 섭취량(4g) 당 함량 (영양소 기준치에 대한 비율)	영양소 기준치
영양성분	지방	0.21 g (0.4%)	50 g
	단백질	0.43 g (0.71%)	60 g
	탄수화물	2.87 g (0.88%)	328 g
	식이섬유	2.42 g (9.69%)	25 g
	열량	14.12 kcal	-

(나) 유해물질분석

발효노니의 유해중금속 함량을 분석한 후, 혈당조절을 위한 발효노니의 적정일일섭취량인 4 g을 기준으로 하여 발효노니 복용 시 섭취하게 되는 납, 비소, 카드뮴 및 총수은에 대한 일일섭취량을 도출하였다. 그 결과 모든 중금속이 건강기능식품 유해물질기준규격을 충족시키는 것으로 나타났으며, 대장균군도 불검출되어 발효노니는 유해물질규격을 만족시키는 안전한 소재임을 확인하였다. 미생물 시험항목 중 일반세균은 액상제품의 경우에만 기준이 제시되어 있으므로 ( $\leq 100$ ), 고체 상태인 발효노니의 일반세균 결과는 제품제조 정도관리를 위한 지표로 활용하고자 한다.

표 3-1-13. 발효노니의 유해물질분석

항목		1회 섭취량(4g) 당 함량	식약청 기준
중금속	납	1.24 $\mu\text{g}/\text{일}$ (기준충족)	10.8 $\mu\text{g}/\text{일}$
	비소	7.88 $\mu\text{g}/\text{일}$ (기준충족)	150 $\mu\text{g}/\text{일}$
	카드뮴	0.20 $\mu\text{g}/\text{일}$ (기준충족)	3.0 $\mu\text{g}/\text{일}$
	총수은	0.184 $\mu\text{g}/\text{일}$ (기준충족)	2.1 $\mu\text{g}/\text{일}$
미생물	대장균군	음성	음성
	일반세균	-	$\leq 100$ (액상제품에 한해)



(5) 발효율금의 품질지표 설정

(가) 발효율금의 영양성분분석

간섭유화 억제 및 지방간 개선 활성을 위한 발효율금의 적정일일섭취량인 4 및 6 g을 기준으로 하여 발효율금 복용 시 섭취하게 되는 영양성분을 분석하고 1일 섭취량 및 영양소 기준치에 대한 비율을 계산하여 표기하였다.

표 3-1-14. 발효율금의 영양성분분석

항목		1회 섭취량당 함량 (영양소 기준치에 대한 비율)		영양소 기준치
		1회 섭취량(4g)	1회 섭취량(6g)	
영양성분	지방	0.12 g(0.24%)	0.19 g (0.38%)	50 g
	단백질	0.38 g(0.63%)	0.58 g (0.96%)	60 g
	탄수화물	2.98 g(0.90%)	4.47 g (1.36%)	328 g
	식이섬유	0.82 g(3.28%)	1.24 g (4.96%)	25 g
	열량	14.64 kcal	21.96 kcal	-

(나) 발효율금의 유해물질분석

간섭유화 억제 및 지방간 개선 활성을 위한 발효율금의 적정일일섭취량인 4 및 6 g을 기준으로 하여 발효율금 복용 시 섭취하게 되는 납, 비소, 카드뮴 및 총수은에 대한 일일섭취량을 도출하였다. 그 결과 모든 중금속이 건강기능식품 유해물질기준규격을 충족시키는 것으로 나타나 발효율금은 유해물질규격을 만족시키는 안전한 소재임을 확인하였다.

표 3-1-15. 발효율금의 유해물질분석

항목		1회 섭취량당 함량		식약청 기준
		4g 섭취량당 함량	6g 섭취량당 함량	
중금속	납	1.50 µg/일 (기준충족)	2.25 µg/일 (기준충족)	10.8 µg/일
	비소	5.12 µg/일 (기준충족)	7.68 µg/일 (기준충족)	150 µg/일
	카드뮴	0.3 µg/일 (기준충족)	0.45 µg/일 (기준충족)	3.0 µg/일
	총수은	0.016 µg/일 (기준충족)	0.024 µg/일 (기준충족)	2.1 µg/일

다. 고체발효 시작품 제작

발효미강복합물과 발효노니, 발효녹차, 발효울금, 발효갈근에 대한 생리활성 측정과 동물실험 사용을 위한 제품을 제조하였으며 특히, 그 중 건강기능식품 후보로 사용될 항당뇨 효능이 강력한 발효노니와 간섬유화 억제 효능이 뛰어난 발효미강복합물과 발효울금의 시작품을 별도의 패키지 형태로 제조하였다.



그림 3-1-8. 발효미강복합물 시작품

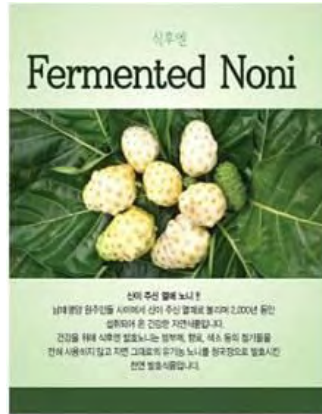


그림 3-1-9. 발효노니 시작품

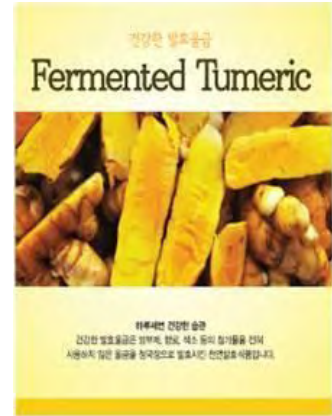


그림 3-1-10. 발효울금 시작품

라. 발효울금의 제품 표준화

발효울금의 건강기능식품 기능성원료 인정 신청을 위하여 원료(발효울금)의 표준화 과정이 필요하며 이에 따른 여러 안정성 실험과 성분분석, 유해물질 분석들을 실시하였다.

1) 지표성분에 대한 규격 및 시험방법

가) 발효울금의 지표성분 설정 근거

울금을 40 일간 고체발효시킨 뒤 메탄올로 추출하여 TLC(Thin Layer Chromatography)로 분석한 결과 발효일수에 따라 주요성분인 커큐민(curcumin)이 수용성 형태의 diarylheptanoid로 전환되어 전체 커큐민 함량이 감소하는 것을 확인하였다. 그리고 발효울금 추출물을 MEF(Mouse embryonic fibroblast)세포를 이용한 간섬유화의 지표인  $\alpha$ -SMA 단백질 발현량을 western blot으로 확인해본 결과 농도의존적으로  $\alpha$ -SMA 발현을 억제시키는 것을 확인하여 기능성 물질의 전구체로 예상되는 커큐민의 함량변화를 지표성분으로 설정하게 되었다.

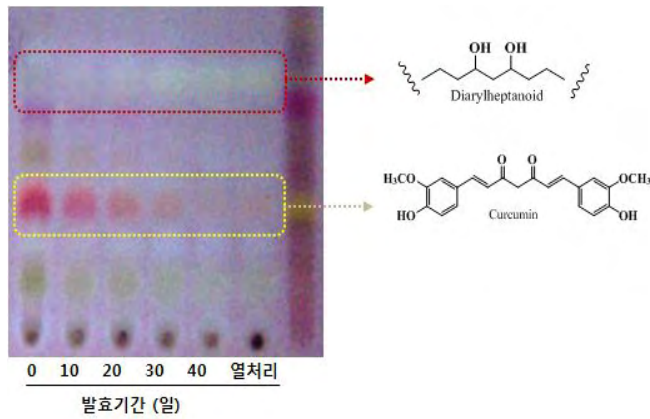


그림 3-1-11. TLC 분석을 이용한 발효율금의 발효기간별 성분 변화

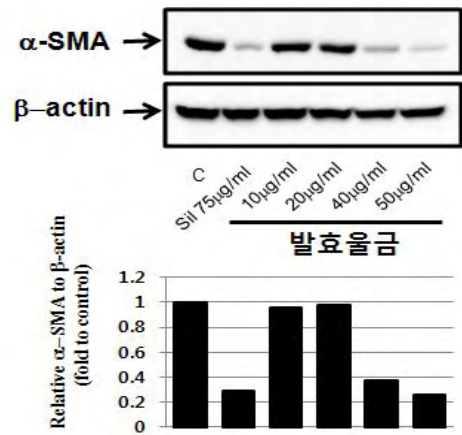


그림 3-1-12. Western blot 분석을 이용한 발효율금의 a-SMA 발현억제 효과

### 나) 발효율금의 지표성분 설정

발효율금의 지표성분 범위 설정을 위해 생산 Lot, No.에 따른 커큐민 함량측정을 실시한 결과 평균 1.1 mg/g으로 나타났다. 이에 따라 지표성분인 커큐민의 범위 설정은 측정함량의 80~110%에 해당하는 범위로 설정되어 다음과 같이 결정되었다.

커큐민(Curcumin) 880 ~ 1,320 µg/g (80~120%)

분자식(C<sub>21</sub>H<sub>20</sub>O<sub>6</sub>), 분자량 368.38, CAS No.458-37-7

표 3-1-16. 생산 Lot별 발효율금의 커큐민 분석

Lot No.	커큐민 (mg/g)		
	발효율금 1	발효율금 2	발효율금 3
1 반복	0.91	1.50	0.90
2 반복	0.90	1.48	0.89
3 반복	0.89	1.52	0.91
평균	0.9 ± 0.01	1.5 ± 0.02	0.9 ± 0.01

## 다) 지표성분 시험방법

### 1. 장비와 재료

#### 1.1 실험실 장비 및 소모품

- 1.1.1 부피플라스크(50, 100 mL)
- 1.1.2 부피 파이펫(1ml)
- 1.1.3 HPLC용 갈색유리병
- 1.1.4 용매용 일회용 실린지
- 1.1.5 여과용 멤브레인필터(PTFE, 0.2  $\mu$ m)
- 1.1.6 초음파진탕기
- 1.1.7 진탕기(Vortex)
- 1.1.8 삼각플라스크(100ml)
- 1.1.9 갈색 시료병(Amber Vial)(2ml) / PreSlit PTFE/Silcon Septa Bonded Screw Cap
- 1.1.10 원심분리관(50ml)

#### 1.2 분석장비

- 1.2.1 고속액체크로마토그래피
- 1.2.2 광다이오드어레이 검출기(Photodiode Array Detector)
- 1.2.3 Shiseido CAPCELL PAK C18 UG120(4.6mm X 150mm, Cat. No. 61503) 또는 이와 동등한 것

### 2. 표준물질 및 일반시약

#### 2.1 표준물질

##### 2.1.1 커큐민(Curcumin)

분자식 :  $C_{21}H_{20}O_6$ , 분자량 : 368.38, CAS No. : 458-37-7

#### 2.2 내부 표준물질

##### 2.2.1 퀘세틴(querceetin)

분자식 :  $C_{15}H_{10}O_7 \cdot 2H_2O$ , 분자량 : 338.2, CAS No. : 6151-25-3

#### 2.3 일반시약

- 2.3.1 아세트산(Acetic acid HPLC grade or ACS grade)
- 2.3.2 아세토니트릴(Acetonitrile, HPLC grade)
- 2.3.3 증류수(Distilled water)

### 3. 시험과정

#### 3.1 표준용액 및 내부표준용액 제조

- 3.1.1 표준물질(커큐민) 10mg을 정밀하게 달아 25ml의 메탄올에 완전히 녹인 후 50ml 부피플라스크에 옮겨 부피를 50ml로 맞추어 최종 농도를 200ug/ml로 표준용액을 만든다.
- 3.1.2 상기 용액을 메탄올로 희석하여 표준용액으로 한다.(예: 10, 25, 50, 75, 100, 200ug/ml)
- 3.1.3 내부표준물질(퀘세틴) 250mg을 정밀하게 달아 25ml의 메탄올에 완전히 녹인 후 50ml 부피플라스크에 옮겨 부피를 50ml로 맞추어 내부표준용액을 만든다.

3.1.4 상기 용액을 메탄올로 희석하여 표준용액으로 한다.(예: 10, 25, 50, 75, 100ug/ml)

### 3.2 시험용액 제조

3.1.1 검체 1g을 취한 후 100mL 플라스크에 넣는다.

3.1.2 검체가 들어있는 100ml 플라스크에 30ml 메탄올과 내부표준물질 1ml (5mg/ml)을 가하여 초음파 진탕기에서 30분간 추출한다.

3.1.3 추출한 시료를 원심분리관에 옮기고 6,580g에서 10분간 원심분리후 상등액을 새로운 플라스크에 옮긴다.

3.1.4 원심분리관에 남아있는 검체에 30ml 메탄올을 다시 가하여 초음파 진탕기에서 30분간 2차 추출한다.

3.1.5 2차 추출한 시료를 다시 원심분리관에 옮기고 6,580g에서 10분간 원심분리후 상등액을 추출액이 보관된 플라스크에 옮긴다.

3.1.6 2차 추출후 원심분리관에 남아있는 검체에 30ml 메탄올을 다시 가하여 초음파 진탕기에서 30분간 3차 추출한다.

3.1.7 3차 추출 검체를 100ml 부피플라스크에 옮기고 1, 2차 추출액을 이용하여 잔류물이 남지 않도록 3차 추출용기를 헹구어 100ml 부피플라스크로 모두 옮긴다.

3.1.7 100mL 부피플라스크에 넣고 메탄올을 표선까지 맞춘 후 멤브레인 필터로 여과하여 시험용액으로 한다.

## 4. 분석 및 계산

### 4.1 기기분석

다음 표 1의 조건으로 사용하되 적용되는 기기에 따라 조정이 필요할 수 있다.

표 3-1-17. 고속액체크로마토그래피 조건

항목	조건
주입량	10 $\mu$ l
칼럼온도	25 $^{\circ}$ C
이동상	아세트니트릴 · 0.2% 아세트산 혼합액(50 : 50)
유속	1 mL/분
분석시간	19분
검출기 파장	420 nm

### 4.2 계산

4.2.1 희석된 커큐민 표준용액(10, 25, 50, 75, 100, 200ug/ml)을 고속액체크로마토그래피에 10ul 씩 주입하여 해당하는 표준물질의 피크 면적을 구한다.

4.2.2 위 과정을 3회 반복하여 각 농도에 해당하는 피크 면적의 평균값을 구하고 이를 이용하여 커큐민 표준물질의 검량선을 만든다.

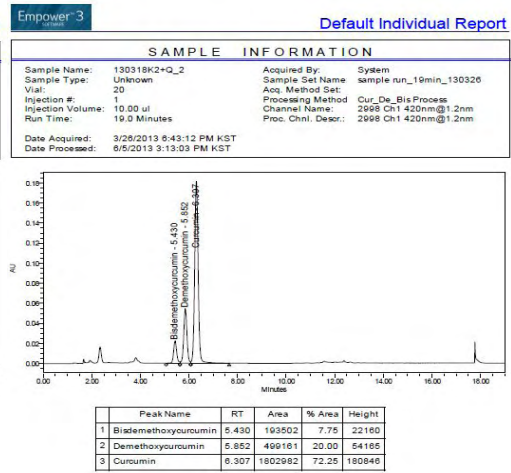
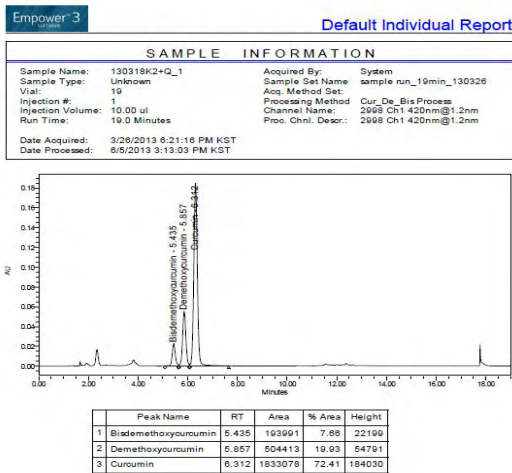
4.2.3. 각 시료에서 분석된 피크면적을 검량선에 대입하여 농도를 계산하고 시료의 수분함량과 내부표준물질의 추출수율을 보정하여 시료에 포함된 커큐민의 최종 농도를 구한다.

라) 시험방법 밸리데이션

앞서 설정된 커큐민 시험방법에 대한 밸리데이션 테스트를 실시하여 시험방법의 유효성을 확인하였다.

표 3-1-18. 지표성분 시험방법 밸리데이션 결과

Curcumin (Peak Area, uV*Sec)						
Lot. #	1 <sup>st</sup> Injection	2 <sup>nd</sup> Injection	3 <sup>rd</sup> Injection	Avr	STDev.	Curcumin (µg/ml)
1	1833078	1802982	1852580	1829546.67	24986.86	18.62



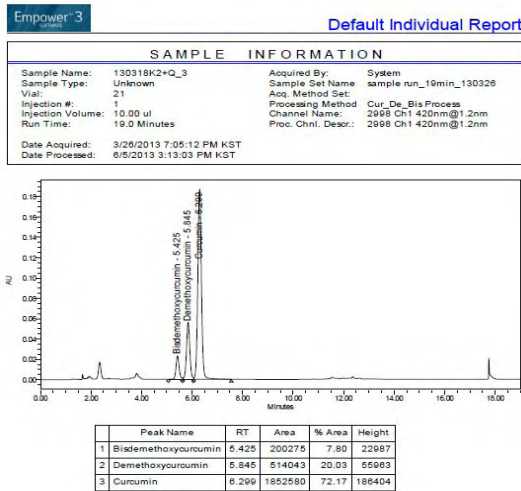
Reported by User: System  
Report Method: Default Individual Report  
Report Method ID: I1008  
Page: 1 of 1

Project Name: KangHoang\_ShiSeido  
Date Printed: 6/5/2013  
3:10:15 PM Asa/Seoul

Reported by User: System  
Report Method: Default Individual Report  
Report Method ID: I1008  
Page: 1 of 1

Project Name: KangHoang\_ShiSeido  
Date Printed: 6/5/2013  
3:18:45 PM Asa/Seoul

그림 3-1-13. 1<sup>st</sup> injection data report    그림 3-1-14. 2<sup>nd</sup> injection data report



Reported by User: System  
Report Method: Default Individual Report  
Report Method ID: I1008  
Page: 1 of 1

Project Name: KangHoang\_ShiSeido  
Date Printed: 6/5/2013  
3:17:36 PM Asa/Seoul

그림 3-1-15. 3<sup>rd</sup> injection data report

2) 영양성분분석

울금과 발효울금의 영양성분을 분석하여 일일 섭취량 6g을 기준으로 환산한 결과, 표 3-1-9와 같다. 울금과 발효울금 모두 단백질, 탄수화물 및 지방 성분은 기준치보다 현저하게 낮아 평균 열량 21 kcal 정도밖에 되지 않는 것으로 측정되었다.

표 3-1-19. 원료 및 발효울금의 영양성분분석결과 (분석처: 한국건강기능식품협회)

성분		단위	분석결과			
			원료울금	발효울금1	발효울금2	발효울금3
영양 성분	열량	kcal/100g	364	366	341	368
	수분	g/100g	10.3	4.7	6.3	3.4
	지방	g/100g	5.9	3.2	0.7	2
	단백질	g/100g	7.3	9.7	9.8	9
	회분	g/100g	6	7.9	9.3	7.1
	탄수화물	g/100g	70.5	74.5	73.9	78.5
	식이섬유	g/100g	13.5	20.6	30.1	18.9

항목		기준치	일일섭취량 6g기준			
			원료울금	발효울금1	발효울금2	발효울금3
영양 성분	열량		21.84 kcal	21.96	20.46	22.08
	수분		0.62 g	0.28	0.38	0.20
	지방	50 g	0.35 g	0.19	0.04	0.12
	단백질	60 g	0.44 g	0.58	0.59	0.54
	회분		0.36 g	0.47	0.56	0.43
	탄수화물	328 g	4.23 g	4.47	4.43	4.71
	식이섬유	25 g	0.81 g	1.24	1.81	1.13

3) 유해물질에 대한 규격 및 시험방법

유해물질 대부분의 항목에서 제안기준 및 규격 이하의 수치가 측정되었으며 대장균군은 음성이며, 카드뮴과 곰팡이독소, 잔류농약 5종은 불검출되었다.

표 3-1-20. 유해물질 규격항목(중금속, 잔류농약, 미생물 등) 분석

제안기준 및 규격	시험항목	제안기준 및 규격	실측치 (시험성적서)			
규격항목	성상	분말	특이한 냄새가 있는 미황색의 결정성 분말			
	지표성분 (mg/g)	Curcumin	0.9	1.5	0.9	
	중금속 (mg/kg)	납	1 이하	0.7	0.3	0.3
		총비소	1 이하	0.4	불검출	0.3
		카드뮴	0.9 이하	불검출	불검출	불검출
		총수은	0.6 이하	0.0019	0.007	0.0023
	미생물	대장균군	음성	음성	음성	음성
		세균수(cfu/g)	-	-	-	-
	곰팡이 독소	독소명 기재	-	-	-	-
	잔류용매	용매명 :	-	-	-	-
규격 미설정 항목	동물용의약품	검사수 :	-	-	-	
	잔류농약	49종	-			
		5종	불검출			

표 3-1-21. 발효율금의 제품 Lot. 별 유해물질 규격항목 분석(일일섭취량 기준)

항목	기준치	일일섭취량 6 g기준			
		원료율금	발효율금1	발효율금2	발효율금3
이산화황		109.20 ug	93.00	34.20	120.00
As	150 ug/일	1.20 ug	2.40	불검출	1.80
Hg	2.1 ug/일	0.02 ug	0.01	0.04	0.01
Cd	3.0 ug/일	불검출	불검출	불검출	불검출
Pb	10.8 ug/일	5.40 ug	4.20	1.80	1.80
세균수	액상제품만	$1.3 \times 10^5$	$2.8 \times 10^4$	$5.0 \times 10^7$	$3.6 \times 10^4$
대장균군	음성	양성	음성	음성	음성
총아플라톡신	불검출	불검출	불검출	불검출	불검출
비에치씨	불검출	불검출	불검출	불검출	불검출
디디티	불검출	불검출	불검출	불검출	불검출
알드린	불검출	불검출	불검출	불검출	불검출
디엘드린	불검출	불검출	불검출	불검출	불검출
엔드린	불검출	불검출	불검출	불검출	불검출



4) 지표성분의 안정성 시험

일정 저장조건에서 저장기간에 따른 지표성분의 안정성을 시험하기위한 것으로 60일 이상 저장기간을 설정하였으며 강산(pH3.0)과 강알칼리(pH 9.0)와 같은 가혹조건에서의 안정성을 실험하였다. 42℃에서 60일 이상 보관시에 발효율금의 지표성분인 커큐민 함량에는 큰 변화가 나타나지 않았으며 pH 3.0~9.0의 가혹조건에서 7일 이상 보관시에도 미량의 감소를 제외하고는 거의 일정함량을 유지하는 것으로 나타났다. 이는 제품 표준화에서 커큐민이 지표성분으로서 적합함은 물론, 저장이나 유통과정에 따른 감소나 변화가 없어 제품화시에도 유리한 점으로 작용할 수 있을 것으로 사료된다.

가) 지표성분의 가속시험

표 3-1-22. 가속시험결과

온도 42±2℃ 습도 75±5%	시험항목	저장일	발효율금1	발효율금2	발효율금3
	커큐민 함량 (mg/g)	0	1.5 ± 0.1	0.9 ± 0.1	0.9 ± 0.2
		30	1.8 ± 0.2	1.0 ± 0.1	1.1 ± 0.1
		60	1.5 ± 0.1	0.8 ± 0.2	1.0 ± 0.1
	수분함량 (%)	0	7.23 ± 0.1	5.77 ± 0.1	4.77 ± 0.3
		30	14.48 ± 0.1	14.04 ± 0.9	14.25 ± 0.9
60		14.57 ± 0.1	14.04 ± 0.1	14.35 ± 0.7	

나) 지표성분의 가혹시험

표 3-1-23. 가혹조건 시험결과

시험항목	가혹조건	저장일	발효율금1	발효율금2	발효율금3
커큐민 함량 (mg/g)	정상 (상온)	0	1.8 ± 0.1	1.0 ± 0.1	1.1 ± 0.1
		3	1.8 ± 0.2	1.0 ± 0.1	1.1 ± 0.2
		7	1.8 ± 0.2	1.0 ± 0.1	1.1 ± 0.1
	광선 (백열등)	0	1.8 ± 0.1	1.0 ± 0.1	1.1 ± 0.1
		3	1.6 ± 0.1	0.9 ± 0.1	1.0 ± 0.1
		7	1.6 ± 0.1	0.8 ± 0.1	0.9 ± 0.1
	pH 3.0	0	1.8 ± 0.1	1.0 ± 0.1	1.1 ± 0.0
		3	1.8 ± 0.0	1.0 ± 0.1	1.1 ± 0.1
		7	1.7 ± 0.1	1.0 ± 0.1	1.1 ± 0.1
	pH 5.0	0	2.0 ± 0.1	1.0 ± 0.1	1.2 ± 0.1
		3	2.0 ± 0.2	1.0 ± 0.1	1.2 ± 0.1
		7	1.9 ± 0.1	1.0 ± 0.1	1.1 ± 0.1
	pH 7.0	0	1.9 ± 0.1	1.0 ± 0.1	1.1 ± 0.0
		3	1.9 ± 0.0	1.0 ± 0.0	1.1 ± 0.0
		7	2.0 ± 0.1	1.0 ± 0.1	1.0 ± 0.1
	pH 9.0	0	1.9 ± 0.1	1.0 ± 0.1	1.1 ± 0.1
		3	1.9 ± 0.1	1.0 ± 0.0	1.0 ± 0.0
		7	1.8 ± 0.1	0.9 ± 0.1	1.1 ± 0.1

마. 건강기능식품 기능성원료 개별인증 신청서 작성

발효율금의 기능성원료 개별인증 획득을 위하여 실험 데이터 및 수집 자료들로 구성된 신청서를 작성하였으며 작성된 신청서상의 내용구성을 간략하게 리스트로 요약하였다.

표 3-1-24. 기능성원료 인증신청서 제출자료 체크리스트

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

연번	제출자료	제출여부	
6. 유해물질에 대한 규격 및 시험방법에 관한 자료			
6.1	유해물질 규격 항목(납, 카드뮴, 총비소, 총수은)의 규격 및 근거	■예 □ 아니오	
	※ 유해물질 규격 항목의 시험성적서 및 분석자료 포함	■예 □ 아니오	
6.2	유해물질 규격 미설정 항목(잔류농약)의 시험성적서 및 분석자료	■예 □ 아니오	
6.3	필요시 추가 항목의 규격 및 근거 (예: 곰팡이독소, 미생물 등)	■예 □ 아니오	
	※ 추가 항목의 시험성적서 및 분석자료 포함	■예 □ 아니오	
6.4	유해물질(중금속, 잔류농약, 미생물 등)의 시험방법	■예 □ 아니오	
7. 안전성에 관한 자료 (의사결정도 : )			
7.1	섭취근거 정보	■예 □ 아니오	
7.2	기능성분 또는 관련 물질에 대한 안전성 검색 정보	■예 □ 아니오	
7.3	섭취량 평가 정보	■예 □ 아니오	
7.4	영양평가, 생물학적유효성, 인체적용시험 정보	■예 □ 아니오	
7.5	독성시험 * GLP기관 확인 여부	단회투여독성시험	□예 ■ 아니오
		3개월 반복투여독성시험	□예 ■ 아니오
		유전독성시험	해당사항 없음
		특수독성 (생식, 항원성, 면역, 발암성 )	해당사항 없음
8. 기능성 내용 및 그에 관한 자료			
8.1	시험관시험	■ 신청원료 (논문 3 편)	
		□ 유사원료 (논문 0 편)	
8.2	동물시험	■ 신청원료 (논문 3 편)	
		□ 유사원료 (논문 0 편)	
8.3	인체적용시험	■ 신청원료 (IRB 승인 보고서 1 편) * 인체적용시험기관 : 대구한의대학교 한방병원	
		□ 유사원료 (IRB 승인 보고서 0 편)	
9. 섭취량, 섭취방법, 섭취 시 주의사항 및 그 설정에 관한 자료			
9.1	섭취량 및 근거	■예 □ 아니오	
9.2	섭취방법 및 근거	■예 □ 아니오	
9.3	섭취 시 주의사항 및 근거	■예 □ 아니오	
10. 의약품과 같거나 유사하지 않음을 확인하는 자료			
10.1	1. 건강기능식품에 사용할 수 없는 원료 여부	■예 □ 아니오	
10.2	2. 의약품과 같거나 유사한 건강기능식품 여부	■예 □ 아니오	

## 제 2 절 고체발효물의 항당뇨 및 간기능 개선 기전, 임상적 효능 및 바이오마커 효능 구명

### 1. 실험방법

#### 가. 항당뇨 활성 평가 측정

##### (1) 고체발효물의 항당뇨활성 Screening - In vitro

##### (가) 노니, 미강 복합, 녹차 및 발효율금 추출물 제조

제 1-1세부 과제에서 개발한 고체발효기술을 이용하여 제조한 각 발효물 10 g에 물 또는 70% ethanol을 100 mL 가하여 25°C에서 24 시간 동안 교반하며 추출하였다. 3000 rpm에서 10분간 원심분리한 후 상층액을 취하여 filter paper(whatman No.2)로 여과하였다. 이 여액을 감압 하에 농축하고 동결건조한 후 -20°C에 보관하며 실험에 사용하였다.

##### (나) Propagation of muscle cell and 2-NBDG uptake assay

C2C12 myoblast cell line을 DMEM supplement 10% FBS 배지에서 48시간 배양한 후, 1% horse serum 배지에서 functional myotube가 될 때까지 6-8일간 분화시킨다. 이를 low glucose 배지로 옮긴 후 4시간 starving 시킨다. 여기에 샘플을 농도별(50, 100, 200, 400 ug/mL)로 처리 후 24시간 동안 배양하였다.

50 uM 2-(N-(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)amino) -2-deoxyglucose 를 첨가하여 1 시간동안 배양한 후 배지를 제거하고 PBS로 세척하였다. Lysis buffer로 cell을 lysis 한 후, lysate를 fluorescence micro reader를 사용하여 EX/EM=485/535 조건으로 측정하였다.

##### (다) PPAR-gamma 전사활성

HEK 293 cell 전사인자 활성 연구를 위하여 PPAR-gamma와 그 cofactor인 RXR, 그리고 결합 DNA 염기서열인 PPRE를 세포내 발현시켜 luciferase assay를 수행하여 활성 여부를 검증하였다.

##### (라) AMPK 인산화

세포를 PBS로 세척하고 lysis buffer (50 mM HEPES, pH 7.4, 150 mM NaCl, 1% deoxy-cholate, 1 mM EDTA, 1 mM PMSF, 1 ug/mL aprotinin, 2 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 100 mM phenylarsine oxide)를 넣고 약 5분간 방치한 후 14000 rpm에서 5분 동안 원심분리하고, 상층액을 취하여 SDS 샘플완충액을 넣은 후 100°C에서 5분간 끓여서 단백질의 변성을 유도하였다. 그 후 10% SDS-PAGE를 이용하여 단백질을 분리 한 후 nitrocellulose membrane에 옮긴 후 specific antibodies (AMPK and  $\beta$ -actin; cell signaling technology, Beverly, MA)를 이용하여 western blot를 실시하였다.

## (2) 고체 발효물의 항당뇨 활성 평가 - 전임상 실험

### (가) 실험동물 및 식이

제2형 당뇨병 모델인 KKA<sup>y</sup>(5주령, 수컷)를 G-BIO에서 구입하여 1주일간 순화시킨 후, 체중에 따라 난피법에 의해 7 마리씩 4 군으로 분류하였다. Control 군은 AIN-93G FORMULA 일반 사료를 공급하였으며, positive control(시판 항당뇨관련 건강기능식품), 노니원료, 발효노니, 녹차원료, 발효녹차, 미강 복합원료, 발효미강복합물 각각의 첨가군은 일반사료에 각 시료를 0.4% 첨가한 사료를 제조하여 식이로 공급하였다. Positive control은 시판되고 있는 항당뇨 관련 건강기능식품인 바나바주정추출물을 상기와 같은 방법으로 식이하였다. 사육실 온도는 23±2℃, 습도는 50±5%, 명암주기는 12시간 간격으로 설정하고 물과 사료를 자율 급식시켰다.

### (나) 체중 및 식이섭취량

10일간 일정한 시간에 체중을 측정하였으며, 식이섭취량 및 수분 섭취량을 급여량과 잔여량의 차이로 측정하였으며 식이효율(feed efficiency ratio:FER)은 체중 증가량을 식이 섭취량으로 나누어 계산하였다.

### (다) 혈당

혈당은 공복시간 없이 매 10일 마다 90일 동안 일정한 시간에 꼬리정맥으로부터 전혈을 채취하여 혈당스트립(ACCU-CHEK Sensor, Roche, Basel, Switzerland)을 이용하여 측정하였다.

### (라) 당화혈색소

실험식이 종료 후 16시간 절식 시킨 후 안와 정맥을 통해 채혈하였다. 이를 3000 rpm에서 15분간 원심분리하여 혈장을 따로 분리한 후 4℃에 보관하며 이를 당화혈색소 측정기(eazy A1c, 아산제약) 이용하여 당화혈색소(HbA1c)를 측정하였다.

### (마) 혈중 glucose 및 Insulin 함량 측정

16시간 절식 시킨 후 마우스의 안와 정맥을 통해 채혈한 혈액을 3000 rpm에서 10분간 원심분리하여 혈청을 분리하였다. Glucose 측정을 위해 상등액 5 uL를 취하였다. 여기에 tinder 시약 1 mL을 첨가하고 상온에서 18분 방치한 후 505 nm에서 흡광도를 측정하였으며, glucose 표준곡선을 이용하여 혈중 포도당 농도를 산출하였다. Insulin은 SHIBAYAGI 사의 mouse insulin ELISA kit (TMB type)를 이용하여 측정하였다. 측정된 glucose 및 insulin 함량을 바탕으로 HOMA-IR을 다음의 수식에 대입하여 산출하였다.

$$\text{HOMA-IR} = \frac{[\text{Fasting insulin level}(\mu\text{U/mL}) \times \text{Fasting glucose level}(\text{mg/dL})]}{405}$$

### (바) 혈청 Triglyceride, Total Cholesterol, HDL-cholesterol, LDL-cholesterol

16시간 절식 시킨 후 마우스의 안와 정맥을 통해 채혈한 혈액을 3000 rpm에서 10분간 원심분리하여 혈청을 분리하여 지질함량을 측정 하였다. 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 측정하였다.

(3) 발효노니의 식이량에 따른 항당뇨 활성 평가 - 전임상 실험

고체발효물 중 항당뇨활성이 높게 나타났던 발효노니는 식이량에 따른 항당뇨활성 평가를 아래와 같이 진행하여, 식이량에 따른 항당뇨활성 및 재현성을 검증하였다.

(가) 실험동물 및 식이

제2형 당뇨병모델인 KKA<sup>y</sup>(5주령, 수컷)를 G-BIO에서 구입하여 1주일간 순화시킨 후, 체중에 따라 난괴법에 의해 7 마리씩 8군으로 분류하였다. Control 군은 AIN-93G FORMULA 일반 사료를 공급하였으며, positive control(시판 항당뇨관련 건강기능식품 및 의약품), 노니원료, 발효노니 첨가군은 일반사료에 각 시료를 일정 비율로 첨가한 사료를 제조하여 식이로 공급하였다. Positive control은 시판되고 있는 항당뇨 관련 건강기능식품인 바나바주정추출물과 시판 의약품인 metformin 사용하였으며, 사육실 온도는 23±2℃, 습도는 50±5%, 명암주기는 12시간 간격으로 설정하고 물과 사료를 자율 급식시켰다. 총 식이 기간은 10주로 진행하였다.

(나) 체중 및 식이섭취량, 혈당, 당화혈색소, 혈중 Glucose 및 insulin, 혈청 Triglyceride, Total Cholesterol, HDL-cholesterol, LDL-cholesterol 측정

상기 항목에 대한 평가는 나.(2)-(6) section과 동일한 방법으로 특정하였다.

(4) 발효노니의 당뇨 치료 효능 평가

(가) 실험동물 및 식이

제2형 당뇨병모델인 KKA<sup>y</sup>(5주령, 수컷)를 G-BIO에서 구입하여 1주일간 순화시킨 후, 체중에 따라 난괴법에 의해 5 마리씩 6군(정상대조군, 당뇨대조군, metformin 투여 지속군, metformin 투여 중지군, 발효노니 투여 지속군, 발효노니 투여 중지군)으로 분류하였다. 발효노니 70% 에탄올추출물은 0.5% CMC에 현탁한 후 150 mg/kg/bw 농도로 1일 1회 경구투여하였으며, metformin은 0.5% CMC에 녹인 후 300 mg/kg/bw 농도로 1일 1회 경구투여하였고, 정상 대조군과 당뇨 대조군은 0.5% CMC만 투여하였다. 발효노니 및 metformin은 8주간 경구투여하였는데, 6주차 부터 일부 실험군은 발효노니와 metformin 투여를 중지하고 3주동안 매주 일정 시간에 공복혈당을 변화를 측정하였다. 실험기간 동안 사육실 온도는 23±2℃, 습도는 50±5%, 명암주기는 12시간 간격으로 설정하고 물과 사료를 자율 급식시켰다.

(나) 공복혈당

공복혈당 특정을 위해 마우스를 15 시간 절식시킨 후 꼬리 정맥으로부터 전혈을 채취하고, 이를 혈당스트립(ACCU-CHEK Sensor, Roche, Basel, Switzerland)에 loadign 한 후 혈당 측정기로 측정하였다.

(다) 당화혈색소, 혈중 glucose, insulin, triglyceride, total cholesterol, HDL-cholesterol 및 LDL-cholesterol

발효노니 투여 중지 3주차에 16시간 절식시킨 마우스를 희생시켰다. 나.(2)-(6) section와 동일한 방법으로 당화혈색소, 혈중 glucose, insulin, triglyceride, total cholesterol, HDL-cholesterol 및 LDL-cholesterol을 분석하였다.

## 나. 간기능 개선 활성 평가 측정

### (1) 고체 발효물의 간 기능 개선 - 전임상 실험

#### (가) 물, 사료 섭취량, 체중

5주령 ICR 마우스 수컷을 사용하여 각 실험군당 7마리, 총 11개 실험군을 설정하였다. 사염화탄소를 8주간 경구투여한 뒤 마지막 날 하루 절식하여 희생시켰다. 간 손상 유발을 위하여 20% 사염화탄소(corn oil)를 1 mL/kg 2회/주 경구투여하며 실험군중 대조군은 corn oil만을 경구투여하고 음성대조군은 20% 사염화탄소를 투여하여 일반사료를 공급하였다. 나머지 실험군은 20% 사염화탄소 투여 후 미강복합물과 노니, 녹차, 울금의발효진과 발효후 샘플을 0.4%(W/W) 포함한 사료를 제조하여 공급하며 양성대조군은 사염화탄소 투여 후 건강기능식품으로 시판되고 있는 헤파셀리아(한국마그나스(주), 한국)를 0.4%(W/W) 포함한 사료를 제조하여 공급하였다. 음용수 공급은 3 회/주, 사료 공급은 1 회/주로 하였으며 체중은 주단위로 측정하였다.

#### (나) 간지표 효소 분석(ALT, AST, ALP, LDH)

혈청을 분리하여 실험에 사용하였으며 ALT와 AST는 IFCC 검사법을 이용한 ALT reagent와 AST reagent(Bayer, USA) kit를 사용하였으며 ALP는 alkaline phosphate reagent(Bayer, USA) kit를 사용하여 ADIVA 1650 자동분석기(Bayer, Japan)를 이용하여 분석하였다. LDH는 LD P-L 검사법을 이용한 lactate dehydrogenase(P→L)(SIEMENS, USA) kit를 사용하여 ADIVA1650/2400(SIEMENS, USA) 자동분석기로 분석하였다.

#### (다) 총 콜레스테롤(TC), 중성지방(TG) 측정

총 콜레스테롤은 효소 발색법을 이용한 cholesterol reagent(Bayer, USA) kit를 사용하였으며, 중성지방은 triglycerid reagent(Bayer, USA) kit를 이용하여 ADIVA 1650 자동분석기(Bayer, Japan)로 분석하였다.

#### (라) TBARS

간 조직을 차가운 PBS(Phosphate buffered saline)에 세척한 뒤 조직을 분쇄하여 10% TCA(Trichloroacetic acid)와 반응시킨 뒤 원심분리하여 상등액을 분리하였다. TBARS의 측정에는 분리된 상등액과 TBA(Thiobarbituric acid)시약을 반응시켜 530nm에서 흡광도를 측정하는 QuantiChrom DTBA Assay Kit(Bioassaysys, USA)를 사용하였다.

#### (마) GSH 함량

간 조직을 차가운 PBS(Phosphate buffered saline)에 세척하여 조직을 분쇄한 뒤 원심분리하여 상등액을 분리하였다. 분리된 상등액을 MPA(Metaphosphoric acid)와 반응시킨 뒤 다시 원심분리하여 상등액을 분리하였다. GSH 함량 측정은 분리된 상등액에 TEAM(Triethanolamine)용액을 첨가한 뒤 glutathione reductase, glucose-6-phosphate dehydrogenase의 효소액과 DTNB(Ellman's reagent)를 반응시켜 405-414 nm에서 흡광도를 측정하는 Glutathione assay kit(Caymanchem, USA)를 사용하였다.

#### (바) Collagen 함량

간 조직을 차가운 PBS(Phosphate buffered saline)로 2 차례 세척 하여 잘게 조각낸 뒤 0.5M acetic acid와 pepsin(0.1mg/ml)을 첨가하여 4℃에서 12시간 반응시켰다. 샘플을 acid neutralising reagent로 중화시킨 후 sirius red dye reagent와 상온에서 30분 이상 반응시킨 후 원심분리하여 침전물을 분리하였다. 침전물에 alkali reagent를 첨가하여 dye를 분리시킨 뒤 555nm에서 흡광도를 측정하는 Sircol soluble collagen assay(Biocolour, UK)를 사용하여 측정하였다.

#### (사) 간 조직 염색

간 조직을 절삭한 뒤 10% formaline 용액을 이용하여 조직을 고정한 후 수세와 탈수, 투명화 과정을 거쳐 파라핀으로 포매시킨 뒤 microtome으로 절삭하여 슬라이드를 제조하였다. 이를 Hematoxylin & Eosin 염색, Masson's trichrome 염색한 뒤 광학현미경으로 간 조직을 관찰하였다.

#### (2) 발효미강복합물 및 발효울금의 간기능 개선 활성

동물실험을 통해 고체발효물의 1차 Screening 진행 후 활성이 높은 발효미강복합물 및 발효울금에 대한 간기능 개선 활성에 대한 재현성 평가를 진행하였다. 주령 ICR 마우스 수컷을 사용하여 각 실험군당 7마리, 총 11개 실험군을 설정하였다. 사염화탄소를 8주간 경구투여한 뒤 마지막 날 하루 절식하여 희생시켰다. 간 손상 유발을 위하여 20% 사염화탄소(corn oil)를 1 mL/kg 2회/주 경구투여하며 실험군중 대조군은 corn oil만을 경구투여하고 음성대조군은 20% 사염화탄소를 투여하여 일반사료를 공급하였다. 나머지 실험군은 20% 사염화탄소 투여 후 미강복합물과 노니, 녹차, 울금의 각각 발효전과 발효후 샘플을 0.4%(W/W) 포함한 사료를 제조하여 공급하며 양성대조군은 사염화탄소 투여 후 건강기능식품으로 시판되고 있는 hepatocellia(한국마그나스(주), 한국)를 0.4%(W/W) 포함한 사료를 제조하여 공급하였다. 음용수 공급은 3회/주, 사료 공급은 1회/주로 하였으며 체중은 주단위로 측정하였다. 간지표 효소 분석(ALT, AST, ALP, LDH), 총 콜레스테롤(TC), 중성지방(TG) 측정, TBARS, GSH 함량, Collagen 함량, 간 조직 염색은 나.(1)②-⑦과 동일한 방법으로 실시하였다.

#### 다. 고체 발효물의 지방간 개선 활성 평가

##### (1) 실험동물 및 식이

생후 4주된 평균체중  $100 \pm 10$ g인 Sprague Dawley계 수컷 흰쥐 92마리를 중앙실험동물에서 구입하여 일반 배합사료로 일주일간 적응기간을 거친 후, 체중이 평균 177 g 내외인 쥐들을 체중에 따라 난괴법(randomized complete block design)에 의해 각 군당 9마리씩 분류하였다. 일반사료(AIN-93G FORMULA)를 공급한 normal 군, 고지방사료(콜레스테롤 1% 및 Lard 12%)를 공급한 control 군, 시판 간기능개선 건강기능식품인 hepatocellia를 0.4% 혼합한 고지방 사료를 공급한 positive control 군, 고지방사료에 노니, 미강 복합물, 녹차, 울금 원료 및 발효물을 각각 0.4% 혼합하여 제조한 사료를 공급한 8개의 실험군까지 총 11개 실험군으로 구성하였다. 온도는  $23 \pm 2$ ℃, 습도는  $50 \pm 5$ %, 조명주기는 12시간 간격으로 조절된 사육실에서 5주간 사육하였고, 식이와 음용수는 자율급식 하였으며, 매주 마다 음용수 및 사료 섭취량을 기록하였다.



## (2) 체중 및 장기 무게 측정

매주 일정한 시간에 체중을 측정하였으며, 실험식이 종료 후 실험동물의 혈액을 안와정맥에서 채혈한 후 해부하여 간, 신장, 부고환지방을 적출하여 무게를 측정하고, 간은 이화학 실험을 위하여  $-70^{\circ}\text{C}$ 에 보관하였다.

## (3) 간 지표 효소 분석

실험식이 종료 후 안와정맥을 통해 채혈한 혈액을 3000 rpm에서 15분간 원심분리하여 혈청을 분리하였다. 혈청의 ALT(Alanine aminotransferase)는 ALT reagents(Bayer, USA) Kit, AST(Aspartate aminotransferase)는 AST reagents(Bayer, USA), ALP(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.

## (4) 간 조직의 지질 profile 분석

간 조직 0.5g에 saline 1.5 mL을 넣고 homogenate 한 후 chloroform : methanol(1: 2) 혼합액을 7.5 mL 넣고 1분간 vortexing 한 후 30분간 정치시켰다. chloroform 2.5 mL과 D.W. 2.5 mL을 첨가 한 후 1분간 vortexing 후 300 rpm에서 20분간 원심분리 하였다. 상층액과 중간의 liver 조직층을 제거하고 sodium sulfate 10 g을 넣어 tube안의 수분을 흡습시켰다. 거름종이로 여과해 chloroform을 증발 시킨 후 지질의 무게를 측정하였다. 추출한 지질 10 mg을 weighting 하여 2 mL의 chloroform : methanol(1: 2)에 녹인 후 BCS Triglyceride kit, BCS Total Cholesterol kit(Bio Clinical System Corporation, Korea)을 이용하여 Triglyceride와 Cholesterol을 측정 하였다.

## 라. 고체발효물의 당뇨 및 간기능 개선 관련 분자학적 기전 구명

### (1) UPLC-Q-TOF MS를 이용한 간섬유화유발 mice 대사체 분석

#### (가) 시료전처리

동물실험 종료 후 간조직 및 혈청을 분리하여 액체질소를 이용하여 급속 동결 시켰다. 동결 건조된 간조직 (50 mg) 및 혈청 시료를 acetonitrile (1.5 mL)로 추출한 후 원심분리하였다. 상등액을 완전히 건조시킨 후 40% 메탄올로 녹인 후 UPLC-Q-TOF MS로 분석하였다. 혈청단백질은 external standard를 함유하고 있는 acetonitrile 로 침전시킨 후 원심분리하여 제거하고 상등액은 동결건조한 후 20% 메탄올로 녹여 대사체 분석 시료로 사용하였다.

#### (나) UPLC-Q-TOF MS를 이용한 대사체 분석

대사체를 분석하기 위하여 ultra performance liquid chromatography (UPLC)-quadrupole-time of flight (Q-TOF)를 사용하였다. UPLC에 장착된 ACQUITY UPLC BHE C18 column (1.7  $\mu\text{m}$ , 2.1 $\times$ 100 mm)을 0.1% formic acid를 함유한 LC/MS용 distilled water로 equilibration시킨 후 시료 3  $\mu\text{L}$ 를 주입하였다. 시료의 elution은 0.1% formic acid를 함유한 acetonitrile를 flow rate 0.3 mL/min으로 초기 15%에서 40%까지 5분간 점차적으로 증가시켜 주면서 진행하였다. 분리된 eluent는 Q-TOF를 이용하여 mass spectrum을 측정하였다. Q-TOF는 ES-positive 조건에서 분석하였으며 capillary와 sample cone voltage는 각각 2.78과

26 kV이고 source 온도와 desolvation 온도는 각각 110°C, 300°C이며, desolvation과 cone 속도는 각각 700 L/h와 50 L/h 조건에서 수행하였다. precursor 분석을 위한 collision cell energy는 4 V를 사용하였으며 물질 동정 시에는 collision cell energy를 10 V에서 30 V로 올리면서 사용하였으며 200 pmole leucine을 lack mass로 사용하였다. 물질의 동정은 elemental composition으로 물질을 1차 screening 한 후 online database (www. chemsider.com)와 Waters사의 mass fragmentation software를 이용하여 2차 screening 하였으며 최종 표준물질을 이용하여 동정하였다.

#### (다) Data analysis

대사체 profiles은 MarkerLynx (Waters, Milford, MA, USA)에 의하여 alignment하였고 external standard를 이용하여 normalization하였다. 보정이 끝난 data는 시료간의 차이와 그 차이에 관여하는 물질들을 동정하기 위하여 SIMCA-P+software version 12.0.1 (Umetrics,Umeå,Sweden)를 이용하여 다변량통계분석을 실시하였다. 대사체들의 mass intensities는 SPSS (2003; SPSS Inc., Shicago, IL)의 analysis of variance (ANOVA)와 the least significant difference (LSD)를 이용하여 분석되었다.

#### (라) DNA microarray 분석

Microarray를 이용한 유전자 발현분석을 위해 시료로부터 추출한 RNA를 두 가닥의 cDNA로 만든 후 Cy3/ Cy5 염료로 표지 하였다. 표지된 DNA를 정량 및 정성적으로 분석하여 assembled Agilent's Mouse Oligo Microarray (44K)와 반응시켜 유전자의 발현 정도를 확인 하였다. Microarray 상에서 발현되는 유전자의 이미지는 Agilent's DNA microarray scanner로 분석하였으며, Feature Extraction Software(Agilent Technology, Palo Alto, CA)를 이용하여 각 유전자의 발현 정도를 정량적으로 측정하고 발현된 유전자는 Gene Ontology<sup>TM</sup> Consortium (<http://www.geneontology.org/index.shtml>)을 이용하였다.

#### 마. 통계처리

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

## 2. 실험결과

### 가. 항당뇨 효능 평가

#### (1) KKAY 마우스를 이용한 고체발효물의 항당뇨 효능 검증 - 전임상

제 2 형 당뇨모델인 KKAY 마우스를 이용하여 발효미강발효물, 발효울금, 발효녹차 및 발효노니의 항당뇨활성을 평가하였다. 90일간의 실험결과 발효미강발효물과 발효울금에서는 항당뇨활성이 검출되지 않았으나, 발효노니와 발효녹차에서는 항당뇨활성이 있는 것으로 나타났다. 본 보고서에는 항당뇨활성을 보인 발효녹차와 발효노니에 대한 결과만을 기재하였으며, 가장 뛰어난 활성을 보인 발효노니에 대해서는 식이량별 효능 및 치료효능에 대한 동물실험도 실시하였다.

#### (가) 발효녹차의 항당뇨활성

##### ① 체중, 식이섭취량 및 식이효율

체중변화 및 식이효율(FER)은 모든 실험구에서 유의적인 차이는 없는 것으로 나타났다. 그러나 음용수 섭취량의 경우 모든 실험구가 control 군에 비해 낮은 음용수 섭취량을 보였는데, 특히 발효녹차 섭취군의 경우 음용수 섭취량이 시판 항당뇨 관련 건강기능식품을 섭취한 positive control 군과 유의적인 차이가 나지 않을 정도로 감소하여 당뇨의 기본 증상 중 하나인 다음 증상 완화에 도움이 됨을 알 수 있었다.

표 3-2-1. KKAY 마우스의 체중변화, 음용수 및 사료 섭취량 변화와 식이 효율

Treatment	Initial body Weight(g)	Final body Weight(g)	Change of body weight(g)	Food intake (g/day)	FER(%)	Water intake (mL/day)
Control	27.29±1.32	45.58±2.35	0.20±0.02	7.11±0.26b	2.53±0.24	22.28±2.61a
Positive control1)	26.61±1.51	42.49±9.16	0.20±0.01	6.57±0.27c	2.94±0.25	16.54±3.50b
GT2)	26.19±0.79	44.97±2.46	0.21±0.02	7.56±0.26a	2.78±0.33	20.22±2.90ab
FGT3)	26.31±0.61	44.35±2.51	0.20±0.02	7.17±0.17b	2.72±0.25	19.59±1.15b

1)Positive control : 시판 건강기능식품을 0.4% 첨가한 사료 식이군. 2)GT : 녹차 원료물을 0.4% 첨가한 사료 식이군.3)FGT : 발효녹차를 0.4% 첨가한 사료 식이군

##### ② 혈당변화측정

녹차 및 발효녹차를 0.4% 첨가한 사료를 90일간 먹이던 KKAY 마우스의 혈당변화를 아래에 나타내었다. 식이 공급 첫날 혈당은 모든 실험구에서 250-270 mg/dL 수준으로 각 군간의 차이가 없었으나 실험 20일 이후 혈당 변화가 나타나기 시작하였다. Control 군의 경우 20일차부터 혈당이 급격히 증가하기 시작하여 30일 이후에는 400 mg/dL 이상의 고혈당이 유지되었으나, positive control의 경우 90일간의 실험기간 동안 260-300 mg/dL 수준으로 혈당 변화가 거의 없는 것으로 나타났다. 발효녹차 섭취군은 30일 까지 혈당이 380 mg/dL 정도로 증가한 후 50일까지 이 수준을 유지하다 60일부터는 시판 건강기능식품인 positive control과 유사한 수준으로 혈당이 감소되어 항당뇨 관련 건강기능식품으로의 개발 가능성을 보였다. 녹차 섭취군도 50일차까지는 대조군과 유사한 수준으로 혈당이 증가하다 60일부터 혈당이 감소하는 때

턴을 보였으나 발효녹차 섭취군 보다는 혈당조절 능력이 떨어지는 것으로 미루어 보아 고체발효를 통해 녹차의 항당뇨 활성이 증진된 것으로 생각된다.

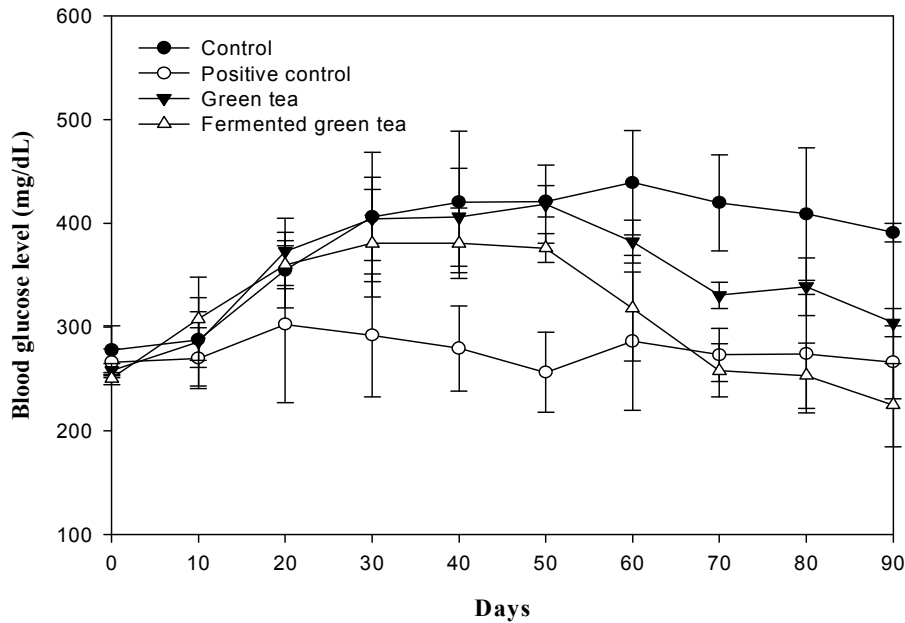


그림 3-2-1. 발효녹차 섭취에 따른 KKAy의 혈당 변화

\*Positive control : 시판 건강기능식품을 0.4% 첨가한 사료 먹이군

### ③ 당화혈 색소

HbA1c는 적혈구 생존기간인 약 3개월 동안에 일어나는 당화 반응의 변화에 따른 것이므로 약 3개월간의 혈당조절 상태를 나타내며 정상인 내지 비당뇨인은 7% 이하 당뇨병 환자의 경우 10% 이상으로 나타나는 경우가 많다. 뿐만 아니라 당뇨병 진행을 나타내는 의미있는 지표로 HbA1c가 2% 증가할 때 마다 당뇨 합병증의 하나인 망막병증의 발병 위험이 2배 정도 증가하며  $\beta$  세포의 기능이 약화된다고 알려져 있다. 본 실험결과, 녹차 섭취군은 control과 유사한 수준의 당화혈 색소값을 보여 혈당 조절 능력이 거의 없는 것으로 나타났으나 발효녹차 섭취군의 당화혈 색소 값은  $8.08 \pm 0.95\%$ 로  $9.72 \pm 0.95\%$ 인 control 보다 유의적으로 낮게 측정되었으며,  $8.96 \pm 0.83\%$ 인 positive control 보다도 낮은 수치를 보여 발효녹차 섭취를 통해 장기간 혈당조절이 가능함을 알 수 있었다.

### ④ 혈청 glucose 및 insulin 함량

실험결과 혈중 glucose 농도는 positive control, 녹차, 발효녹차 섭취군 모두 control군에 비해 유의적으로 낮게 측정된 반면, 혈청 인슐린 함량은 control이 236.33 uU/mL로 가장 높게 검출되었으며, 녹차섭취군, positive control, 발효녹차 섭취군은 control군 보다 유의적으로 낮은 함량을 보였다. 일반적으로 혈당은 인슐린에 의해 조절되기 때문에 인슐린 분비가 많으면 혈당이 떨어지게 된다. 그러나 인슐린 저항성이 생기게 되면 인슐린 분비량이 많아져도 혈당은 잘 떨어지지 않아 정상보다 높은 농도의 인슐린이 분비되게 되는데 이를 고인슐린혈증 상태라고 한다. Control 군의 경우 insulin 함량이 높음에도 불구하고 혈중 glucose 농도가 높은 고인슐

린혈증 상태였는데, 나머지 실험군들은 control 군에 비해 고인슐린혈증이 개선되었음을 알 수 있었다. 특히 발효녹차 섭취군의 경우 insulin 농도는 146.67 uU/mL로 control군에 비해 약 48% 낮게 나타났음에도 불구하고 glucose 농도는 154 mg/dL로 control 군보다 약 20% 감소하여 고인슐린혈증 개선 효과가 큰 것으로 나타났다.

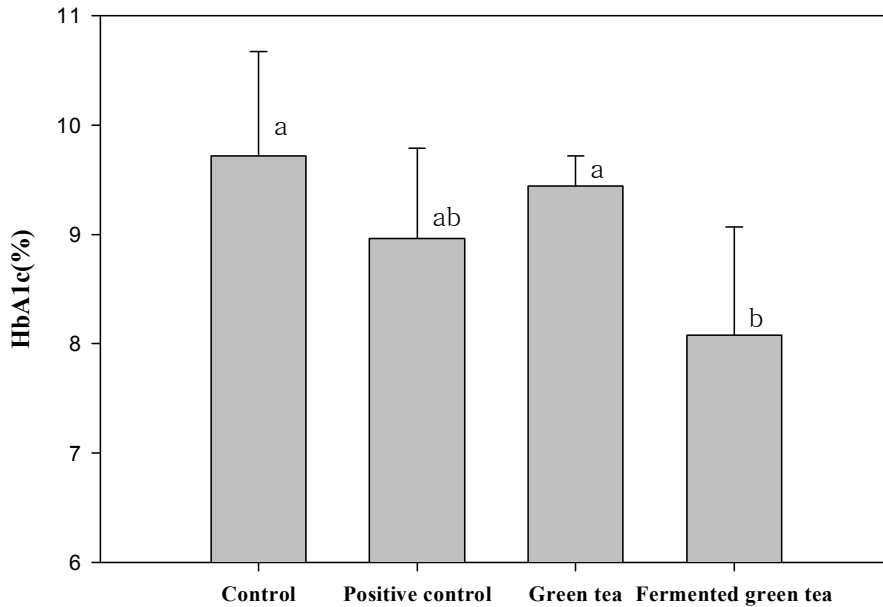


그림 3-2-2. 발효녹차 섭취 90일 후 KKAy의 HbA1c(%)

\*Positive control : 시판 건강기능식품을 0.4% 첨가한 사료 식이군

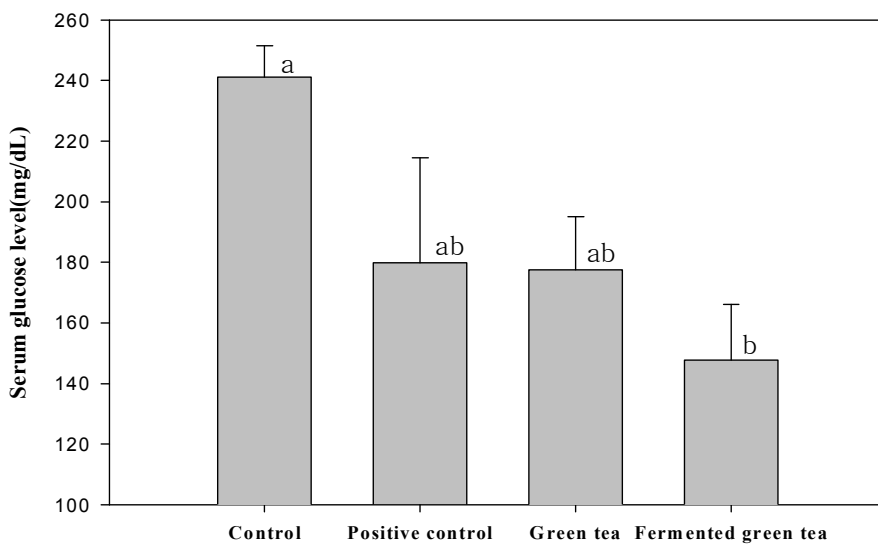


그림 3-2-3. 발효녹차 섭취 90일 후 KKAy의 serum glucose 함량

\*Positive control : 시판 건강기능식품을 0.4% 첨가한 사료 식이군

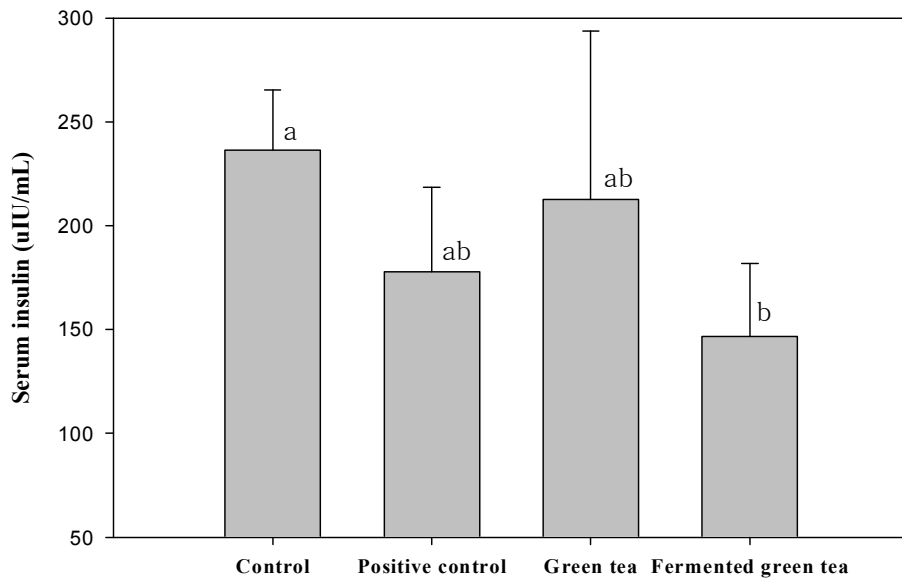


그림 3-2-4. 발효녹차 섭취 90일 후 KKAY의 serum insulin 함량

\*Positive control : 시판 건강기능식품을 0.4% 첨가한 사료 식이군

#### ⑤ HOMA-IR 및 QUICKI index

공복 혈당과 인슐린 농도를 통해 인슐린 저항성 및 민감성 지표인 HOMA(Homeostasis assessment-IR)와 Quicki를 계측하였다. HOMA-IR은 인슐린 저항성을 나타내는 지표로 그 값이 클수록 인슐린 저항성이 높음을 의미하며, Quicki는 인슐린 민감성을 나타내는 지표로 그 수치가 클수록 인슐린 민감성이 높음을 의미한다. Positive control, 녹차섭취군, 발효녹차 섭취군 모두 control군 보다 HOMA-IR은 낮고 Quicki는 높아 인슐린 저항성은 감소하고 민감성은 증가하였는데, 특히 발효녹차 섭취군에서 이러한 현상이 두드러지게 나타났다. 이로 미루어 보아 발효녹차는 인슐린 민감성을 향상시켜 인슐린 저항성을 낮춤으로써 혈당강하효과를 나타낸 것으로 생각된다.

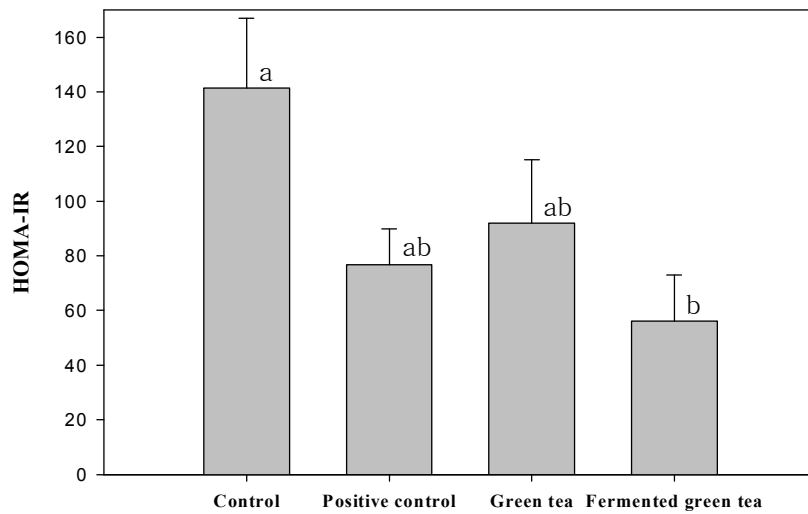


그림 3-2-5. 발효녹차 섭취 90일 후 HOMA score

\*Positive control : 시판 건강기능식품을 0.4% 첨가한 사료 식이군  
 Homeostasis model assessment of insulin resistance = fasting glucose (mg/dL) × fasting insulin (uU/mL)/405

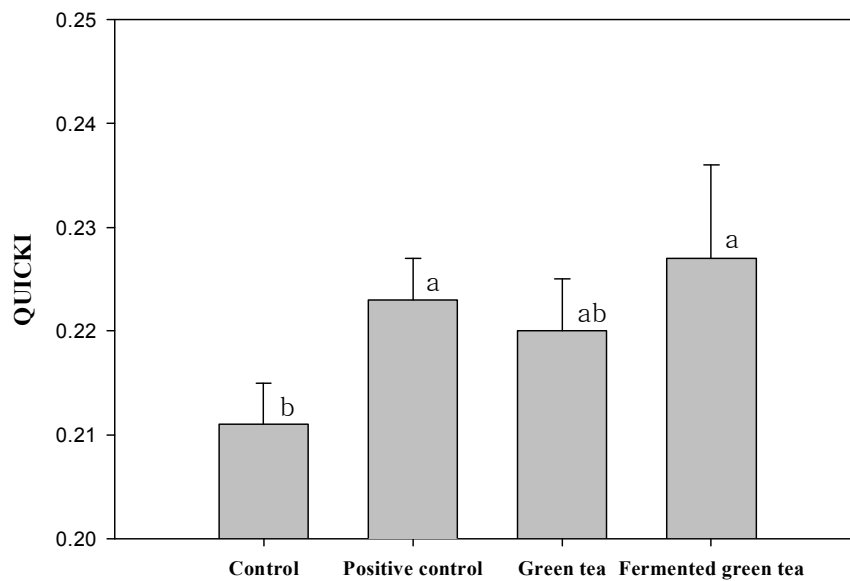


그림 3-2-6. 발효녹차 섭취 90일 후 KKAy의 quantitative insulin sensitivity check index(QUICKI)

\*Positive control : 시판 건강기능식품을 0.4% 첨가한 사료 식이군  
 Quantitative insulin sensitivity check index = 1/(log fasting insulin [uIU/mL] + log fasting glucose [mg/dL])

⑥ 혈중 지질 농도

당뇨병에서 가장 빈번하게 관찰되는 지질대사이상은 혈중 triglyceride와 cholesterol의 증가 그리고 HDL-cholesterol의 감소를 들 수 있는데, 이러한 지질대사이상은 당뇨병 환자의 주된 사망요인이 되는 죽상경화성 질환 발생에 중요한 영향을 미친다. 실험결과 control 군의 중성지방은 235.60±46.73 mg/dL 으로 높은 수치를 보였으며 positive control도 221.5±31.05 mg/dL로 control군과 유사한 수준의 중성지방 수치를 보였으나, 녹차 및 발효녹차 섭취군은 각각 166.60±12.69 mg/dL 및 184.67±16.82 mg/dL로 control 군에 비해 중성지방이 22-30% 가량 감소한 것으로 나타났다. Total cholesterol과 LDL-cholesterol은 실험구간의 유의적인 차이가 없었으나, HDL-cholesterol은 녹차와 발효녹차 섭취군이 control 군에 비해 높게 검출되어 녹차 및 발효녹차 섭취가 당뇨로 인해 발생하는 이상지질대사 개선에도 효과가 있는 것으로 생각된다.

표 3-2-2. 발효녹차 섭취 90일 후 KKAy의 total cholesterol, HDL-cholesterol, LDL-cholesterol, triglyceride 함량 (unit : mg/dL)

Treatment	Total cholesterol	HDL-cholesterol	LDL-Cholesterol	Triglyceride
Control	141.25±16.69	116.00±6.12 <sup>b</sup>	9.60±2.06	235.60±46.73 <sup>a</sup>
Positive control1)	144.80±12.54	119.33±9.48 <sup>b</sup>	9.75±3.90	221.50±31.05 <sup>a</sup>
GT2)	144.40±8.52	120.00±5.82 <sup>ab</sup>	9.67±1.70	166.60±12.69 <sup>b</sup>
FGT3)	145.33±3.86	136.33±5.25 <sup>a</sup>	9.00±1.00	184.67±16.82 <sup>ab</sup>

1)Positive control : 시판 건강기능식품을 0.4% 첨가한 사료 식이군. 2)GT : 녹차 분말을 0.4% 첨가한 사료 식이군.3)FGT : 발효녹차를 0.4% 첨가한 사료 식이군.

⑦ 녹차원료 및 발효녹차 식이 제2형 당뇨 마우스의 간 대사체 분석

제2형당뇨 마우스에 녹차와 발효녹차를 0.4% 혼합한 사료를 각각 식이한 후 UPLC-Q-TOF MS를 이용하여 간 대사체를 분석한 결과 R<sup>2</sup>X, R<sup>2</sup>Y, Q<sup>2</sup>값이 각각 0.252, 0.762, 0.01로 미지의 시료를 예측할 수 있는 Q<sup>2</sup>값이 다소 낮기는 하지만 분석 모델 시스템은 잘 형성되는지를 확인하는 R<sup>2</sup> 값이 높게 나와 분석 모델은 잘 형성된 것으로 확인되었으며 7-fold cross validation을 통해 구축된 모델 시스템을 확인한 결과 R과 Q의 Y 축 값이 0.396와 -0.213로 낮게 나와 overloading도 되지 않은 것으로 확인되었다. 분석된 결과를 PLS-DA score 상에서 visualization 시킨 결과 각 시료 그룹의 군집 형성이 잘 되었으며 그룹 서로 간에 차이도 확연히 구별되는 것으로 관찰되었다. 그룹의 차이에 관여하는 물질을 확인하기 위하여 UPLC-Q-TOF MS에 의해 분석된 723개의 대사체들을 PLS-DA loading plot으로 나타냈으며 이 중 유의적으로 차이 (P<0.05)를 보이는 293개의 대사체를 분석하였다. 5개의 대사물질들 (hypoxanthine, xanthine, valine, leucine, LysoPC 20:4)이 그룹간의 차이에 관여하는 주요물질들로 동정되었다. Hypoxanthine, xanthine, leucine의 경우 control에 비해 일반 녹차 처리구에서 증가하였으며 발효녹차와는 별 차이가 없었다. LysoPE 20:4인 경우 녹차에서는 감소한 반면 발효녹차 식이군에서는 증가하는 것으로 확인되었다.



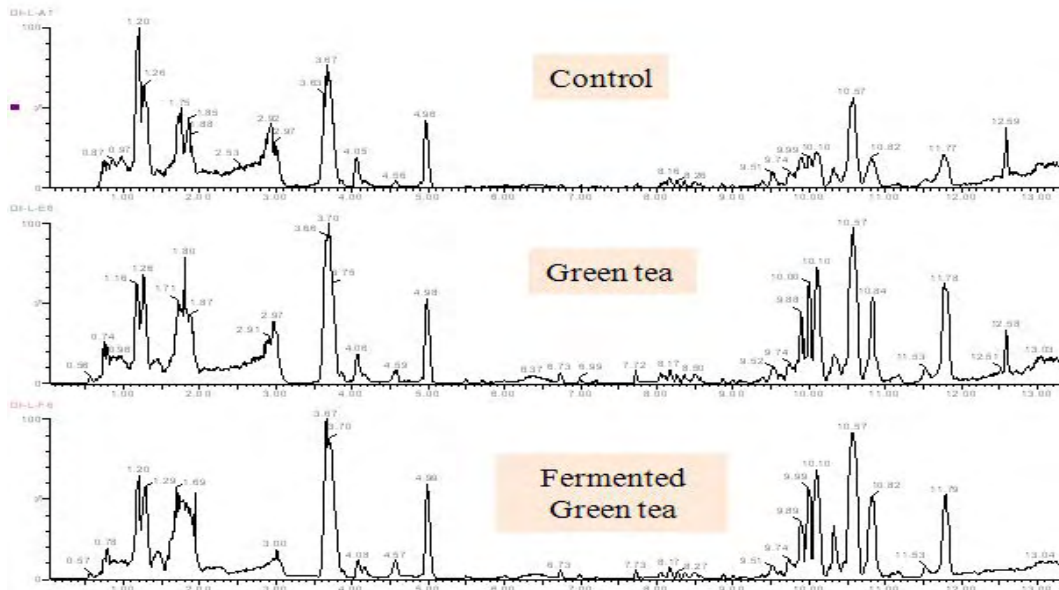


그림 3-2-7. 녹차와 발효녹차를 처리한 당뇨유발 마우스의 간 대사체 mass spectra

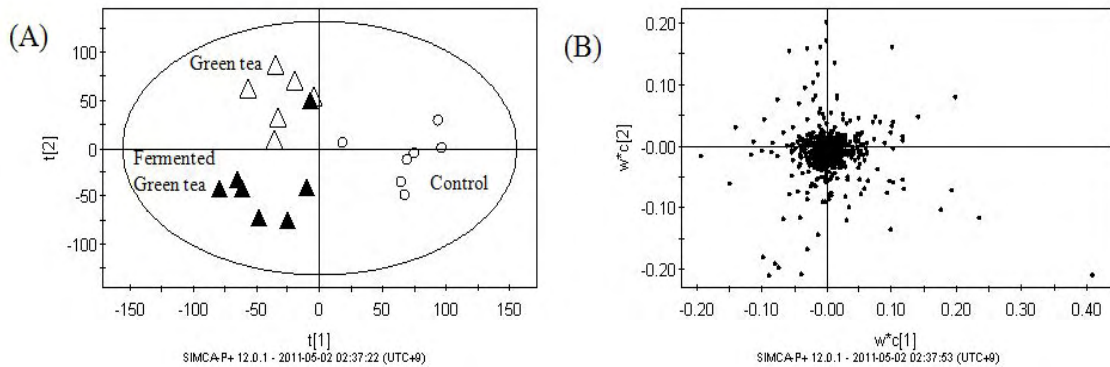


그림 3-2-8. 녹차와 발효녹차를 처리한 당뇨유발 마우스의 간 대사체 mass spectra의 PLS-DA score와 loading plots

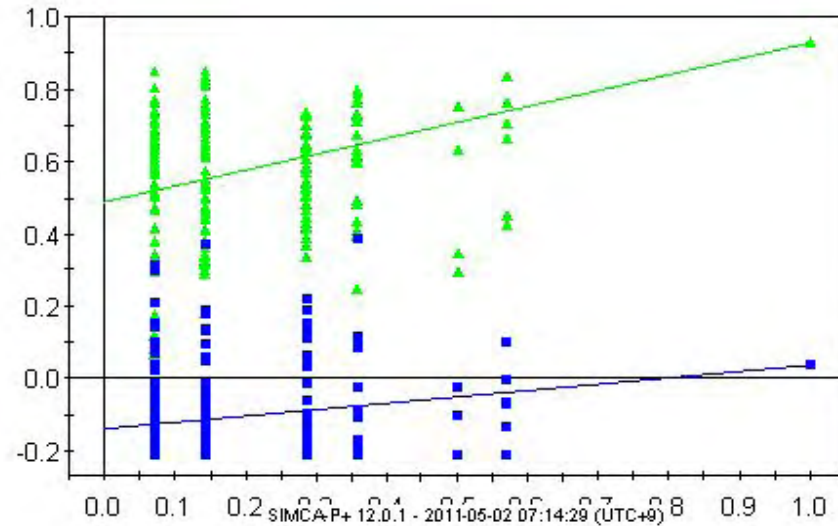


그림 3-2-9. 7-fold cross validation에 의해 분석된 R과 Q 값

표 3-2-3. 녹차와 발효녹차를 처리한 마우스 간의 주요 대사물질들의 동정 및 fold change

Identity	Fold Change (vs. control)	
	Green tea	Fermented Green tea
Hypoxanthine	1.41	1.39
LysoPE (20:4)	0.86	1.46
Xanthine	1.32	1.30
Valine	0.99	1.02
Leucine	1.39	1.25

⑧ 녹차 및 발효녹차 식이 제2형당뇨 마우스의 microarray 분석

발효녹차와 비발효녹차를 급여한 마우스의 간 조직에서의 유전자 발현 변화를 분석하기 위해 간 조직에서 총 36,910개의 유전자를 분석하였다. 이들 유전자가 up/down regulation되는 pattern을 이용하여 Hierarchical clustering (HCL)을 수행하였다. HCL은 전체 유전자의 발현 양상을 분석하여 그 패턴이 비슷한 유전자 또는 투여군으로 묶어가는 방법으로 발현이 증가된 것은 붉은색, 발현이 감소한 것은 녹색으로 나타내었는데, 분석 결과, 녹차 및 발효녹차 급여 시 유전자의 발현량에 차이가 있음을 확인할 수 있다. 유전자 데이터베이스는 NCBI gene과 KEGG pathway database의 (PPAR signaling pathway, insulin signaling pathway, type I diabetes mellitus, tupy II diabetes mellitus와 관련한 유전자)를 이용하였으며, 총 924개 유전자를 대상으로 조사하였다. 발효녹차 식이 마우스에서 발현량이 증가한 유전자는 161개였으며, 반대로 발현량이 감소한 유전자는 91개로 나타났다. 이 중에서 제2형 당뇨와 연관성이 있고

control군에 비해 1.8 fold 이상 up-regulation된 유전자는 12개와 제2 형 당뇨와 연관성이 있으면서 0.5 fold 이하 down-regulation된 유전자 9개를 선별하였다. 발효녹차 식이에 의해 up-regulation된 유전자 중 hexokinase 2(HK2) gene은 glucose와 insulin에 의해 조절되는 gene으로 glucose의 glucose-6-phosphate(G-6-P)로의 전환에 작용하여 glycolysis에 관여하는 주요 효소이며, diabetic rat, mice 그리고 인슐린 비의존성 당뇨병 환자에서 그 발현이 감소되었다고 보고된바 있는데, 본 연구에서 glycolysis 관련 gene인 HK2는 발현이 34.70배 증가하였다. 또한 발효녹차 식이에 의해 베타 Cell의 성숙에 관여하는 pdx의 발현이 2.08배 증가하였으며, beta cell function과 관련된 gene으로 이 유전자가 결손된 mouse에서 고혈당 및 내당능 장애가 보고된바 있는 CACNA1e gene이 1.89배 증가하는 것으로 나타났다. 이로 미루어 보아 발효녹차의 항당뇨 효과에는 glycolysis 활성화를 통한 glucose 이용율 증가 및 beta cell function 증진이 관여하였음을 추론할 수 있다.

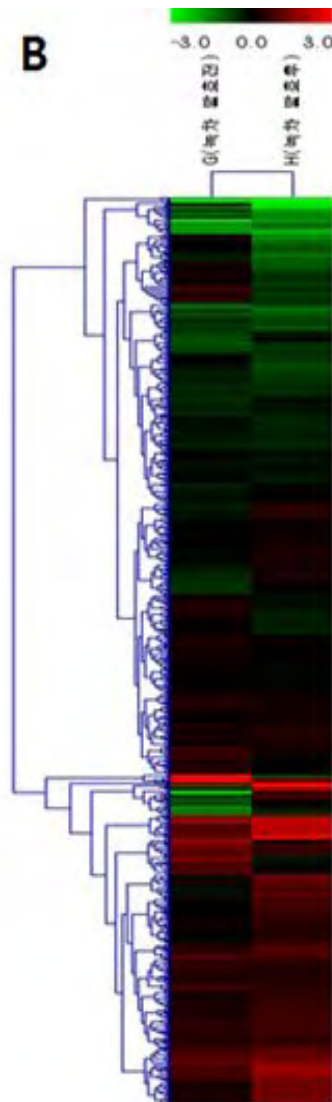


그림 3-2-10. 유전자의 발현량 유사도를 이용한 HCL(Hierarchical clustering)

표 3-2-4. 발효농차 식이에 의해 up-regulation 되는 유전자

Accession No	Gene name	Gene symbol	Fold	Function
NM-013820	Hexokinase 2	Hk2	34.70	Glycolysis Glucose metabolic process
NM-013474	Apolipoprotein A-II	Apoa2	3.68	PPAR signaling
NM-133360	Acetyl-Coenzyme A carboxylase alpha	Acaca	2.56	Insulin signaling
NM-013963	Tumor necrosis factor	Tnf	2.40	Insulin signaling Glucose metabolic process
NM-080464	Protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 3A	Ppp1r3a	2.36	Insulin signaling Glycogen metabolic process
NM-008814	Pancreatic and duodenal homeobox 1	Pdx1	2.08	Insulin signaling Protein amino acid phosphorylation
NM-016979	Protein kinase, X-linked	Prkx	1.93	Insulin signaling
NM-009782	Calcium channel, voltage-dependent, R type, alpha 1E subunit	Cacna1e	1.89	Insulin signaling Glucose homeostasis Calcium ion transport
NM-207692	Mitogen-activated protein kinase 9	Mapk9	1.87	Insulin signaling
NM-009512	Solute carrier family 27(fatty acid transporter), member5	Slc27a5	1.86	PPAR signaling
NM-028259	Ribosomal protein S6 kinase, polypeptide 1	Rps6kb1	1.86	PPAR signaling
NM-010011	Cytochrom P450, Family 4, subfamily a, polypeptide 10	Cyp4a10	1.84	PPAR signaling

표 3-2-5. 발효녹차 식이에 의해 down-regulation 되는 유전자

Accession No	Gene name	Gene symbol	Fold	Function
NM-001033599	acyl-CoA synthetase long-chain family member 6	Acs16	0.48	PPAR signaling
NM-010554	interleukin 1 alpha	Il1a	0.48	Type 1 diabetes mellitus
NM-008839	phosphatidylinositol 3-kinase, catalytic, alpha polypeptide	Pik3ca	0.45	Insulin signaling
NM-009231	son of sevenless homolog 1 (Drosophila)	Sos1	0.45	Insulin signaling
NM-153679	carnitine palmitoyltransferase 1c	Cpt1c	0.42	PPAR signaling
AK-052374	phosphodiesterase 3A, cGMP inhibited	Pde3a	0.39	Insulin signaling
NM-133656	v-crk sarcoma virus CT10 oncogene homolog (avian)	Crk	0.38	Insulin signaling
NM-019388	CD86 antigen	Cd86	0.34	Type 1 diabetes mellitus
NM-028817	acyl-CoA synthetase long-chain family member 3	Acs13	0.34	PPAR signaling Fatty acid metabolic process

PPAR signaling pathway에서 발효녹차 식이에 의해 up-regulation 되는 유전자는 FATP (Fatty acid transporter), FABP(Fatty acid binding protein), Apo-AII(Apolipoprotein)인 것으로 나타났으며(그림 3-2-12. red box) FABP는 인슐린 생성에 필요한 유전자로 발효녹차에 의해 1.7 fold 유전자 발현량이 증가하였고 FATP는 1.5 fold 증가하였다. 그리고 PPAR와 RXR 복합체의 활성화로 fatty acid oxidation에 관여하는 유전자 CYP4A1과 CPT-1이 각각 1.6 fold up-regulation 되었다. Fatty acid transport에 관여하는 FABP 유전자가 1.7 fold up-regulation 되었으며 lipid transport를 일으키는 Apo-AII 유전자 발현량도 3.7 fold 증가하였으나 이들과 동일한 기능을 가진 다른 유전자의 발현량 감소가 동시에 일어나 결과적으로 발현 산물의 효과가 상쇄될 가능성이 존재하므로 결과적으로 발효녹차는 lipogenesis와 fatty acid oxidation을 통한 lipid 대사에 영향을 미치는 것으로 사료된다.



(나) 발효노니의 항당뇨 활성

① 발효노니의 항당뇨 활성

㉔ 체중, 식이섭취량 및 식이효율

체중변화를 살펴보면 발효 노니가 체중 변화율이 가장 높았으며, control과 positive control에서는 비슷한 수준이며, 노니 섭취군이 체중변화율이 가장 낮게 나타났다. 식이섭취량은 positive control, 발효 노니섭취군이 control 군 보다 유의적으로 낮게 나타났고, 음용수 섭취량의 경우도 발효노니 섭취군과 positive control 군이 control 군에 비해 월등히 낮게 나타나 당뇨의 기본 증상인 다식, 다음 증상이 완화 된 것을 알 수 있었다. 이러한 증상 완화는 특히 발효노니 섭취군에서 두드러지게 나타났다. 식이섭취량과 체중변화량을 바탕으로 계산한 식이효율(FER)의 경우 발효노니, positive control, control, 노니 섭취군 순으로 높게 나타났다. 당뇨가 발생하게 되면 체내 대사의 퇴행적인 변화로 인해 식이 효율이 떨어지는 것으로 알려져 있는데, 노니발효물 섭취군의 경우 식이효율이 control 군에 비해 유의적으로 높게 나타나 식이 및 음용수 섭취량 결과와 마찬가지로 당뇨 증상이 완화되고 있음을 보였다.

표 3-2-6. KKAY 마우스의 체중변화, 음용수 및 사료 섭취량 변화와 식이 효율.

Treatment	Intial body Weight(g)	Final body Weight(g)	Change of body weight(g)	Food intake (g/day)	FER(%)	Water intake (g/day)
Control	27.29±1.32	45.58±2.35	0.20±0.02 <sup>ab</sup>	7.11±0.26 <sup>ab</sup>	2.53±0.24 <sup>ab</sup>	22.28±2.61 <sup>a</sup>
Positive control*	26.61±1.51	42.49±9.16	0.20±0.01 <sup>ab</sup>	6.57±0.27 <sup>b</sup>	2.94±0.25 <sup>ab</sup>	16.54±3.50 <sup>bc</sup>
Noni	27.23±1.17	43.76±4.15	0.19±0.02 <sup>b</sup>	7.53±0.60 <sup>a</sup>	2.46±0.26 <sup>b</sup>	20.67±3.94 <sup>ab</sup>
Fermented noni	26.48±0.77	45.71±2.64	0.22±0.01 <sup>a</sup>	6.85±0.81 <sup>b</sup>	3.08±0.28 <sup>a</sup>	13.36±3.61 <sup>c</sup>

Each value represent the mean ± SD (n=7).

\*Positive control : diet with supplementation of commercial health functional food 0.4% group.

㉕ 혈당변화측정

KKay는 비만, 고혈당, 체모색등과 관련 있는 Ay 유전자를 도입한 제 2형 당뇨 질환 모델로서 KK 마우스보다 조기(7-8주령)에 더 심한 비만과 고혈당치를 보이는 것으로 알려져 있는데, 30-40 g 경부터 혈당치 상승이 나타나기 시작한다. Control 군의 경우 체중이 40 g 이상으로 증가한 20일차부터 혈당이 급격히 증가하기 시작하여 30일 이후에는 400 mg/dL 이상의 고혈당을 유지하였다. 그러나 발효노니 섭취군의 경우 체중이 30-40 g으로 증가한 10일차 이후부터 실험 종료기간인 90일차 까지 혈당의 상승 없이 211.60-252.20 mg/dL 수준의 혈당이 유지 되는 것으로 나타나 혈당 조절 능력이 높은 것으로 나타났다. 특히 시판 항당뇨 관련 건강기능식품을 섭취한 positive control 군 보다 낮은 혈당치가 유지되어 상업적으로 이용할 수 있는 가능성이 매우 높음을 알 수 있었다. 한편 노니 섭취군 역시 식이 50일 이후부터 혈당이 control군에 비해 유의적으로 감소하였으나, 발효노니 섭취군 보다는 혈당조절 능력이 떨어지는 것으로 미루어 보아 고체발효를 통해 노니의 항당뇨 활성이 증진된 것으로 생각된다.

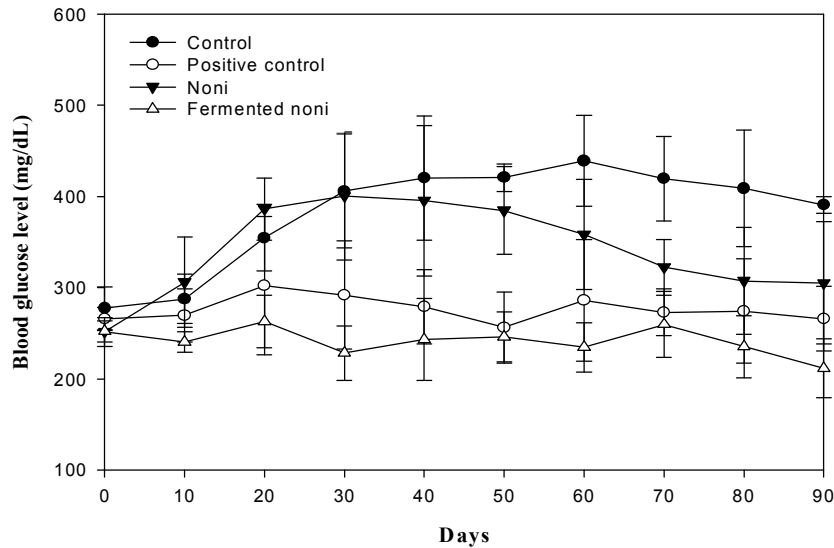


그림 3-2-13. 노니 발효물 섭취에 따른 KKAY의 혈당 변화.

\*Positive control : 시판 건강기능식품을 0.4% 첨가한 사료 식이군

#### ㉔ 당화혈 색소

적혈구에 있는 hemoglobin의 일부인 HbA1c는 혈구의 생존기간 동안 서서히 포도당과 비효소적으로 결합하여 당화혈색소의 형태로 변화하게 된다. 혈구의 생존기간이 약 90-120일 동안이므로 당화혈색소의 측정은 장기간에 걸친 혈당의 변화를 통합하여 나타내는 기본적인 지표로 이용되고 있다. 실험결과, positive control 및 노니 섭취군의 당화혈 색소 값은 각각  $8.96 \pm 0.83$ ,  $9.45 \pm 0.32$  %로  $9.72 \pm 0.95$ % 인 control군과 유의적인 차이를 보이지 않았으나, 발효노니를 섭취한 실험군의 당화혈색소값은  $7.62 \pm 0.81$ %로 control에 비해 유의적으로 낮은 수치를 보여 90일간의 실험기간동안 혈당 조절이 잘 되었고 있음을 알 수 있었다. 이는 90일간의 혈당 변화 측정결과 혈당이 실험기간동안 큰 변화 없이 일정한 수준으로 유지되었던 결과와 일치한다.

#### ㉕ 혈청 glucose 및 insulin 함량

Positive control, 노니, 발효노니 섭취군 모두 control군에 비해 혈중 glucose 농도가 유의적으로 낮게 측정되었는데, 특히 발효노니 섭취군의 경우 glucose 농도가 154 mg/dL로 control 군보다 약 64% 감소하였다. 혈청 인슐린 함량은 control이 236.33 uU/mL로 가장 높게 검출되었으며, 노니섭취군, positive control, 발효노니 섭취군은 control군 보다 유의적으로 낮은 함량을 보였다. 특히, 발효노니섭취군의 insulin 농도는 130.70 uU/mL으로 control군 보다 약 45% 가량 낮게 검출되었다. control군의 경우 insulin 함량이 높음에도 불구하고 고혈당을 보인 것으로 미루어보아 고인슐린혈증 상태임을 알 수 있는데, 발효노니 섭취군의 경우 control 군 보다 인슐린 함량이 낮게 검출되었음에도 불구하고 실험기간동안 혈당이 일정하게 유지되어 발효노니 섭취가 고인슐린혈증 개선에 효과가 있음을 알 수 있었다.



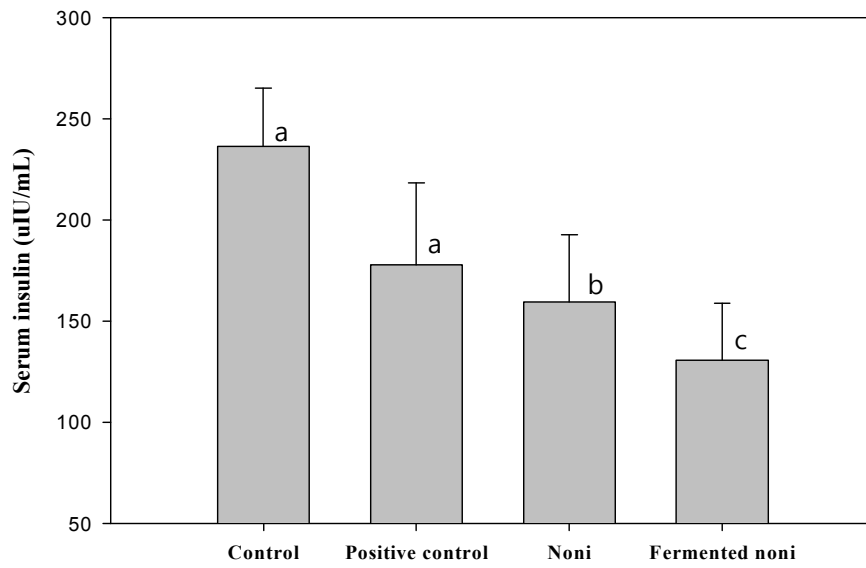


그림 3-2-14. 노니 발효물 섭취 90 일 후 KKAy 의 serum insulin 함량

\*Positive control : 시판 건강기능식품을 0.4% 첨가한 사료 식이군

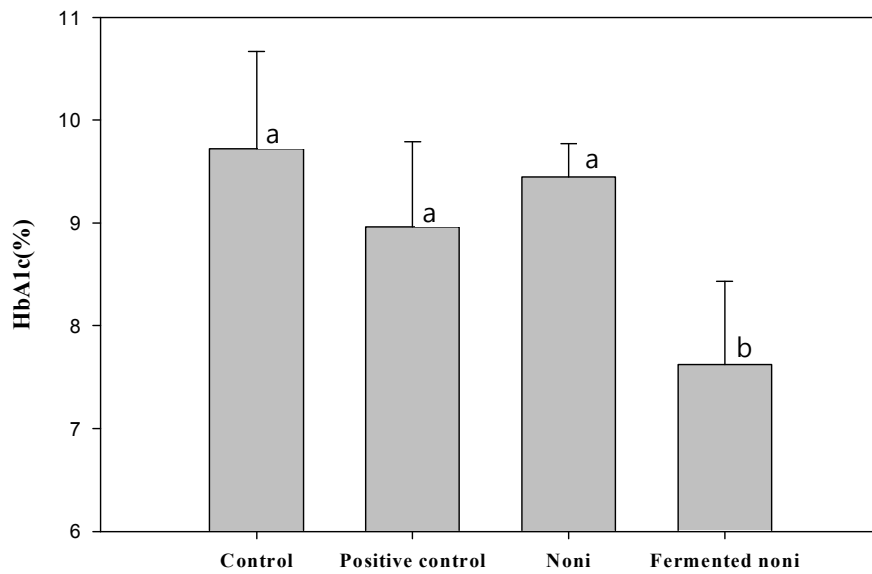


그림 3-2-15. 노니 발효물 섭취 90일 후 KKAy의 HbA1c(%) 변화

\*Positive control : 시판 건강기능식품을 0.4% 첨가한 사료 식이군

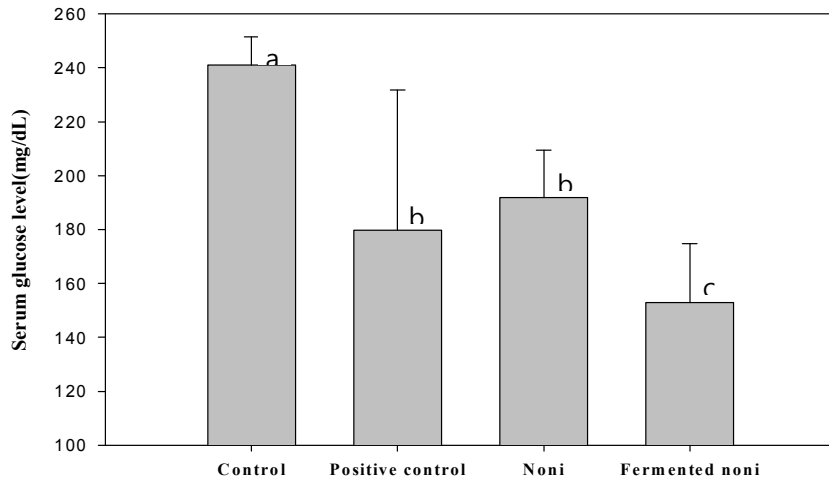


그림 3-2-16. 노니 발효물 섭취 90 일 후 KKAy 의 serum glucose 함량 \*Positive control : 시판 건강기능식품을 0.4% 첨가한 사료 식이군

㉔ HOMA-IR 및 QUICKI index

공복 혈당과 인슐린 농도를 통해 인슐린 저항성 및 민감성 지표인 HOMA(Homeostasis assessment-IR), Quicki를 계측하였다. HOMA-IR은 인슐린 저항성을 나타내는 지표로 그 값이 클수록 인슐린 저항성이 높음을 의미하며, Quicki는 인슐린 민감성을 나타내는 지표로 그 수치가 클수록 인슐린 민감성이 높음을 의미한다. Positive control, 노니섭취군, 발효노니 섭취군 모두 control군 보다 HOMA-IR은 낮고 Quicki는 높아 인슐린 저항성은 감소하고 민감성은 증가하였는데, 특히 발효노니 섭취군에서 이러한 현상이 두드러지게 나타났다. 이로 미루어 보아 발효노니는 인슐린 민감성을 향상시켜 인슐린 저항성을 낮춤으로써 혈당 강하효과를 나타낸 것으로 생각된다.

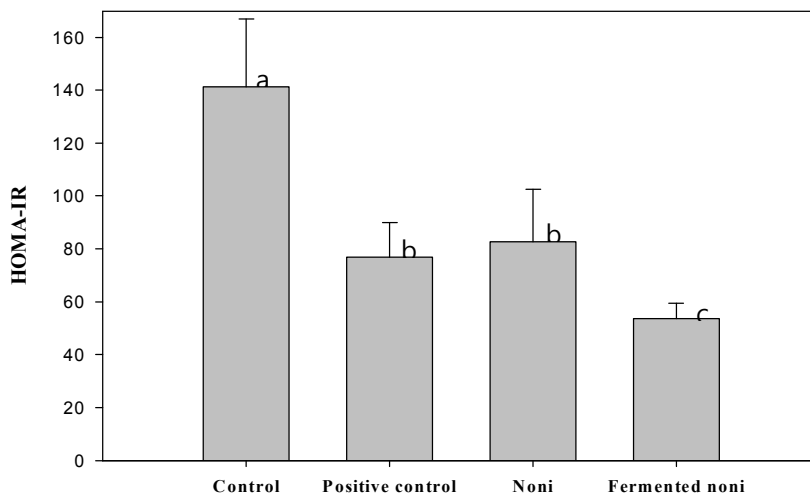


그림 3-2-17. 노니 발효물 섭취 90일 후 HOMA score.

\*Positive control : 시판 건강기능식품을 0.4% 첨가한 사료 식이군.

Homeostasis model assessment of insulin resistance = fasting glucose (mg/dL) × fasting insulin (uU/mL)/405

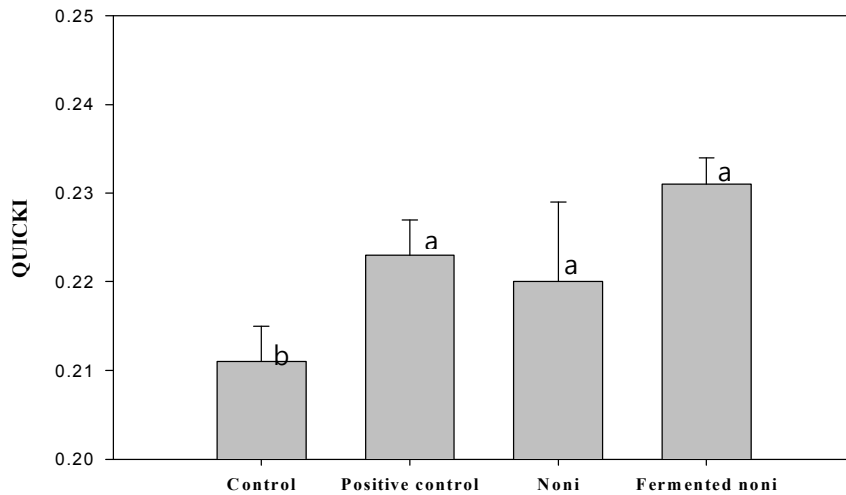


그림 3-2-18. 노니 발효물 섭취 90일 후 KKAy의 quantitative insulin sensitivity check index(QUICKI).

\*Positive control : 시판 건강기능식품을 0.4% 첨가한 사료 식이군 .  
 Quantitative insulin sensitivity check index =  $1/(\log \text{fasting insulin [uU/mL]} + \log \text{fasting glucose [mg/dL]})$

#### ㉞ 혈중 지질 농도

제 2형 당뇨병 환자에서 가장 흔히 나타나는 지질대사 이상은 고지혈증으로 특히 고중성지방혈증이 20-60%의 빈도로 나타나는데, 이는 당뇨병 환자의 주된 사망요인이 되는 죽상경화성 질환 발생에 중요한 영향을 미친다. 본 실험 결과, control 군의 중성지방은  $235.60 \pm 46.73$  mg/dL 으로 높은 수치를 보였으나, 다른 실험군들은 유의적으로 낮은 수치를 보였는데, 특히 발효노니 섭취군은  $148.40 \pm 17.07$  mg/dL로 control 군에 비해 약 37% 가량 중성지방이 감소한 것으로 나타났다. 한편, 고혈당으로 인한 또 다른 혈청지질 대사 이상으로 혈청 내 VLDL과 LDL의 함량이 증가하여 동맥경화성 관상동맥질환 또는 뇌혈관질환의 발생율이 높아질 수 있는데, 혈청지질 중 HDL은 LDL의 생성을 억제하거나 혈관에 축적된 cholesterol을 감소시킴으로서 동맥경화의 발생을 억제하는 작용을 한다. 본 실험결과 total cholesterol은 실험구간의 유의적인 차이가 없었으나, HDL-cholesterol은 노니와 발효노니 섭취군이 control 군에 비해 높게 검출되었으며, 발효노니 섭취군의 경우는 LDL-cholesterol도 control군에 비해 유의적으로 낮게 검출되었다. 이로 미루어 보아 발효노니 섭취군은 당뇨병으로 인해 발생하는 이상지질대사 개선에도 효과가 있는 것으로 생각된다.

표 3-2-7. 노니 발효물 섭취 90일 후 KKAY의 total cholesterol, HDL-cholesterol, LDL-cholesterol, triglyceride 함량 (unit : mg/dL)

Treatment	Total cholesterol	HDL-cholesterol	LDL-Cholesterol	Triglyceride
Control	141.25±16.69	116.00±6.12 <sup>b</sup>	9.60±2.06 <sup>a</sup>	235.60±46.73 <sup>a</sup>
Positive control*	144.80±12.54	119.33±9.48 <sup>b</sup>	9.75±3.90 <sup>a</sup>	221.50±31.05 <sup>ab</sup>
Noni	137.80±13.53	133.40±11.20 <sup>a</sup>	9.40±2.15 <sup>a</sup>	169.00±17.02 <sup>ab</sup>
Fermented noni	137.00±12.47	130.40±10.13 <sup>a</sup>	7.80±1.17 <sup>b</sup>	148.40±17.07 <sup>b</sup>

\*Positive control : 시판 건강기능식품을 0.4% 첨가한 사료 식이군.

㉔ 노니원료 및 발효노니 식이 제2형당뇨 마우스의 간 대사체 분석

제2형당뇨 마우스에 노니와 발효노니를 0.4% 혼합한 사료를 각각 식이한 후 UPLC-Q-TOF MS를 이용하여 간 대사체를 분석한 결과 R<sup>2</sup>X, R<sup>2</sup>Y, Q<sup>2</sup>값이 각각 0.275, 0.842, 0.264로 미지의 시료를 예측할 수 있는 Q<sup>2</sup>값, 분석 모델 시스템은 잘 형성되는지를 확인하는 R<sup>2</sup> 값이 높게 나와 분석 모델은 잘 형성된 것으로 확인되었으며 7-fold cross validation을 통해 구축된 모델 시스템을 확인한 결과 R과 Q의 Y 축 값이 0.489와 -0.138로 낮게 나와 overloading도 되지 않은 것으로 확인되었다. 분석된 결과를 PLS-DA score 상에서 visualization 시킨 결과 각 시료 그룹의 군집 형성이 잘 되었으며 그룹 서로 간에 차이도 확연히 구별되는 것으로 관찰되었다. 그룹의 차이에 관여하는 물질을 확인하기 위하여 UPLC-Q-TOF MS에 의해 분석된 723 개의 대사체들을 PLS-DA loading plot으로 나타냈으며 이 중 유의적으로 차이 (P<0.05)를 보이는 264개의 대사체를 분석하였다. 7개의 대사물질들 (hypoxanthine, xanthine, leucine, phenylalanine, panthothenic acid, lysophosphatidylcholine (LysoPC) 18:4, LysoPC 22:6)이 그룹간의 차이에 관여하는 주요물질들로 동정되었다. Hypoxanthine, xanthine, leucine, phenylalanine, panthothenic acid의 경우 일반 노니와 control간에 거의 차이가 없는 반면 두 LysoPCs의 함량은 노니 처리에 의해 감소하였다. 이와는 대조적으로 발효노니를 처리한 경우 7개의 모든 대사물질의 함량이 증가하는 결과를 관찰 할 수 있었다. 증가한 7개의 대사 물질은 대부분 혈당 조절과 관련 있는 물질로서, phenylalanine은 streptozotocin 으로 유도한 제 1형 당뇨 rats의 혈당을 떨어드리고 간의 lipid profile을 개선하는 효과가 있는 물질이며, Leucine은 insulin signaling pathway와 상호 작용하여 insuline signaling 조절을 통해 혈당을 일정하게 유지하는 효과가 있는 물질이다. 또한 lysophosphatidylcholine(LysoPCs)는 plasmic membrane에서의 GluT 4 수준을 증가시켜 glucose uptake를 촉진시킨다고 알려진 물질로서 발효노니 식이군에서 특히 다량으로 분포되어 있는 것으로 분석되었다. 이러한 대사체 분석 결과는 본 연구의 발효노니를 식이한 KKAY mouse에서 혈당강하 효과가 월등히 뛰어났다는 결과와 부합되는 것이며, 발효노니가 GluT4 signal을 유도하는 CrKII 유전자의 발현 증가에 관여하여 결과적으로 glucose uptake를 촉진시킨다는 본 연구에서 수행한 DNA microarray 분석 결과와도 일치하는 것이다.

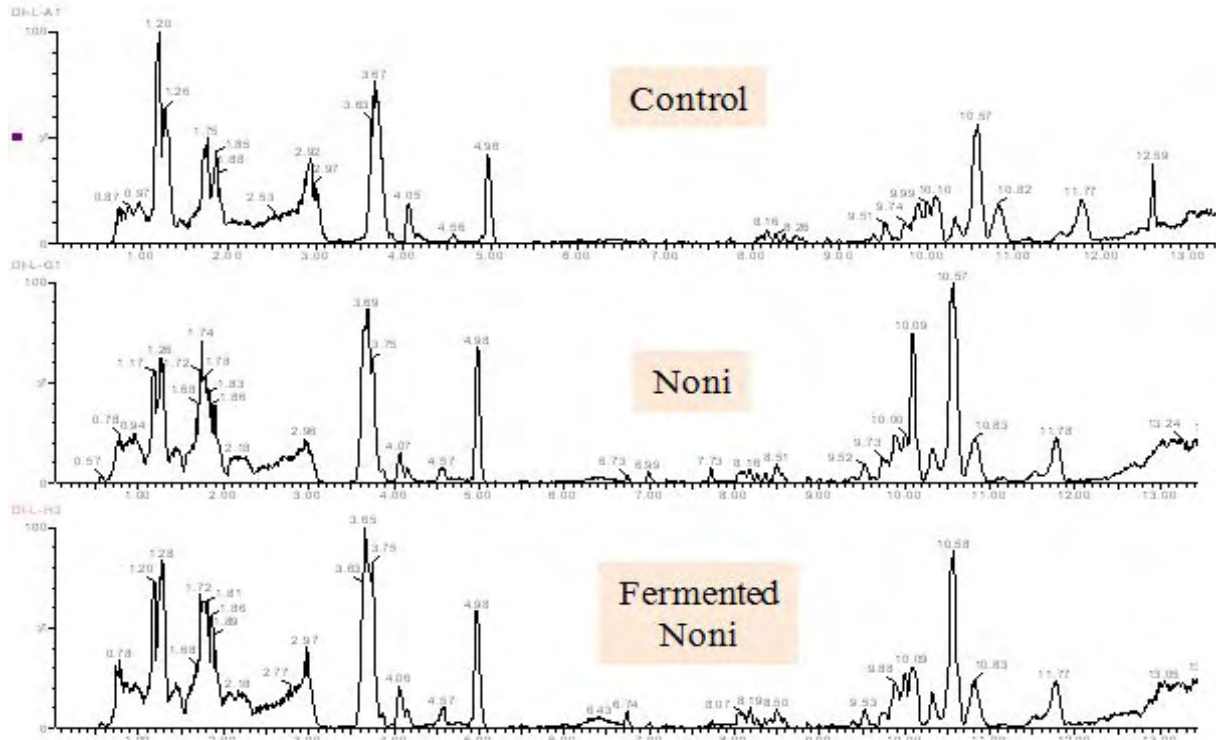


그림 3-2-19. 노니와 발효노니를 처리한 당뇨유발 마우스의 간 대사체 mass spectra

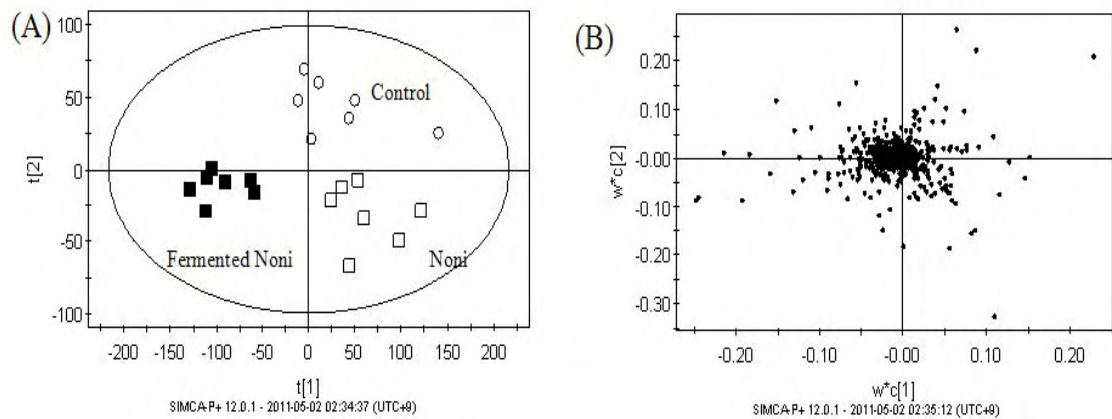


그림 3-2-20. 노니와 발효노니를 처리한 당뇨유발 마우스의 간 대사체 mass spectra의 PLS-DA score와 loading plots

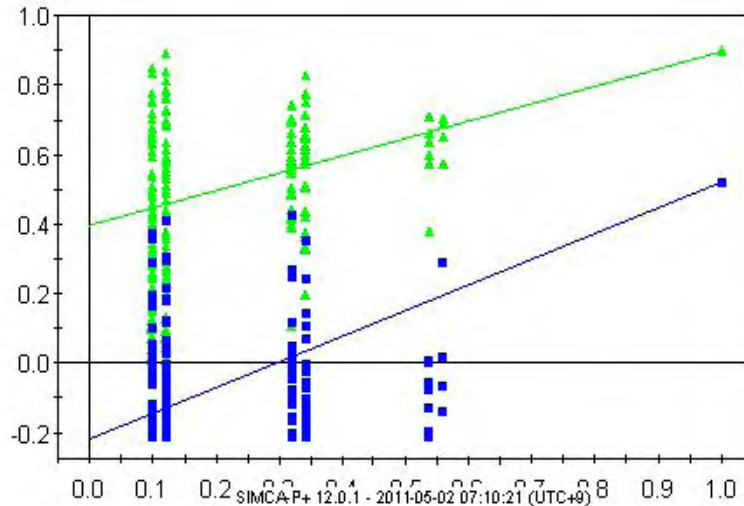


그림 3-2-21. 7-fold cross validation에 의해 분석된 R과 Q값

표 3-2-8. 노니와 발효노니를 처리한 마우스 간의 주요 대사물질들의 동정 및 fold change

Identity	Fold Change(vs. control)	
	Noni	Fermented Noni
Hypoxanthine	0.98	1.24
Xanthine	1.02	1.25
Leucine	1.03	1.29
Phenylalanine	0.99	1.22
Pantothenic acid	1.05	1.57
LysoPC(18:4)	0.75	2.07
LysoPC(22:6)	0.75	1.68

㉔ 노니 및 발효노니 식이 제2형당뇨 마우스의 microarray 분석

노니와 발효노니를 제2형 당뇨 유발 마우스에 90일 동안 급여하고 이들 마우스의 간 조직으로부터 추출한 mRNA의 발현량을 Agilent's Mouse Oligo Microarray를 이용하여 분석하였다. 처리 샘플에 대한 유전자의 발현 특성을 분석하기 위해 각 샘플의 전사체 발현량을 조사한 후 이들 유전자가 up or down regulation되는 pattern을 이용하여 HCL(Hierarchical clustering)을 수행하였다. 분석 결과, 발효 전후의 노니 급여 시 유전자의 발현량에 차이가 있음을 확인할 수 있다. 유전자 데이터베이스는 NCBI gene과 KEGG pathway database의 (PPAR signaling pathway, insulin signaling pathway, type I diabetes mellitus, tupy II diabetes mellitus와 관련한 유전자) 총 924개 유전자를 대상으로 하였다. 노니원료를 식이 시킨 마우스와 비교할 때 발효노니를 식이 시킨 마우스에서 발현이 증가한 유전자는 51개이고 반대로 감소한 유전자는 67개로 나타났다. 그 중에서 당뇨와 연관성이 있고 1.5 fold 이상 up-regulation된 유전자 5개를 선별하여 표기하였으며 당뇨와 연관성이 있으면서 0.7 fold 이하 down-regulation된 유전자 12개를 선별하여 표기하였다.

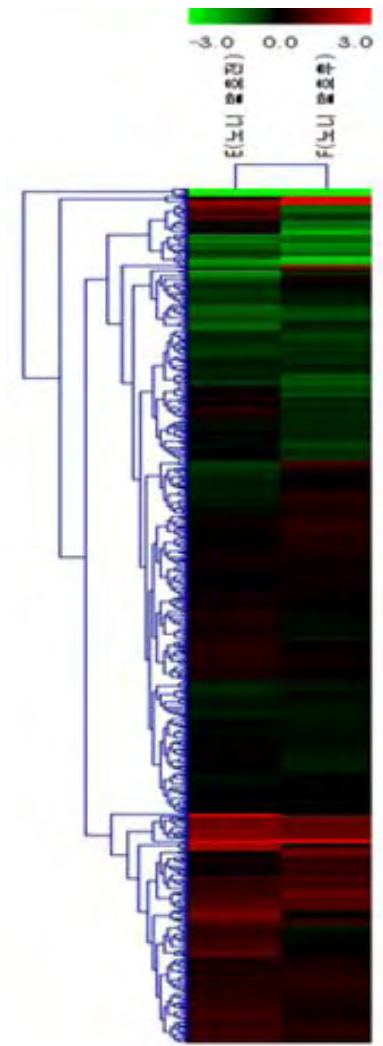


그림 3-2-22. 유전자의 발현량 유사도를 이용한 HCL(Hierarchical clustering)

표 3-2-9. 발효노니 식이에 의해 up-regulation 되는 유전자

Gene Symbol	Fold change	Gene Name
Insulin signaling pathway		
Crkl	1.56	v-crk sarcoma virus CT10 oncogene homolog (avian)-like
Insulin signaling pathway / Type II diabetes mellitus		
Hkdc1	4.22	hexokinase domain containing 1
PPAR signaling pathway		
Fabp3	1.57	fatty acid binding protein 3, muscle and heart
Cyp4a10	1.52	cytochrome P450, family 4, subfamily a, polypeptide 10
Type I diabetes mellitus		
H2-M11	3.47	histocompatibility 2, M region locus 11

표 3-2-10. 발효노니 식이에 의해 down-regulation 되는 유전자

Gene Symbol	Fold change	Gene Name
Insulin signaling pathway		
Rps6	0.66	ribosomal protein S6
Prkaca	0.69	protein kinase, cAMP dependent, catalytic, alpha
Insulin signaling pathway / Type II diabetes mellitus		
Mapk8	0.54	mitogen-activated protein kinase 8
Cacna1a	0.51	calcium channel, voltage-dependent, P/Q type, alpha 1A subunit
PPAR signaling pathway		
Aqp7	0.70	aquaporin 7
Pparg	0.71	peroxisome proliferator activated receptor gamma
Ucp1	0.81	uncoupling protein 1 (mitochondrial, proton carrier)
Fads2	0.86	fatty acid desaturase 2
Acox3	0.99	acyl-Coenzyme A oxidase 3, pristanoyl
Type I diabetes mellitus		
Ica1	0.29	islet cell autoantigen 1
Ptprn2	0.49	protein tyrosine phosphatase, receptor type, N polypeptide 2
H2-Ob	0.57	histocompatibility 2, O region beta locus
Cpe	0.65	carboxypeptidase E
H2-M9	0.66	histocompatibility 2, M region locus 9
Cpe	0.66	carboxypeptidase E
Ifng	0.67	interferon gamma



발효노니 식이에 의해 1.5 fold 이상 up-regulation 되는 유전자는 GK, CrkII 등 2 종류인 것으로 나타났으며 0.5 fold 이하 down-regulation 되는 유전자는 Mapk8, Cacnala, IcaI, Ptpn 등 4 종류인 것으로 나타났다. Insulin signaling pathway에서 노니 발효에 의해 4-fold 이상 발현량이 증가한 GK(Glucokinase)는 glucose로부터 glucose-6-phosphate 생성을 촉매하여 해당경로(Glycolysis)로 도입시키는 최초의 효소로 알려져 있다. 따라서, GK의 유전자의 up-regulation으로 glucose의 분해와 에너지화가 활성화되어 혈액내 glucose의 항상성 유지에 도움을 주는 것으로 사료된다. 그리고 proto oncogene의 일종인 CrkII 유전자는 1.5-fold 이상 발현량이 증가하였으며 이는 세포막에 존재하는 glucose transporter로 알려진 GluT4를 통한 glucose 흡수능에 영향을 미쳐 혈액 내 혈당 유지에 기여하는 것으로 예상된다.

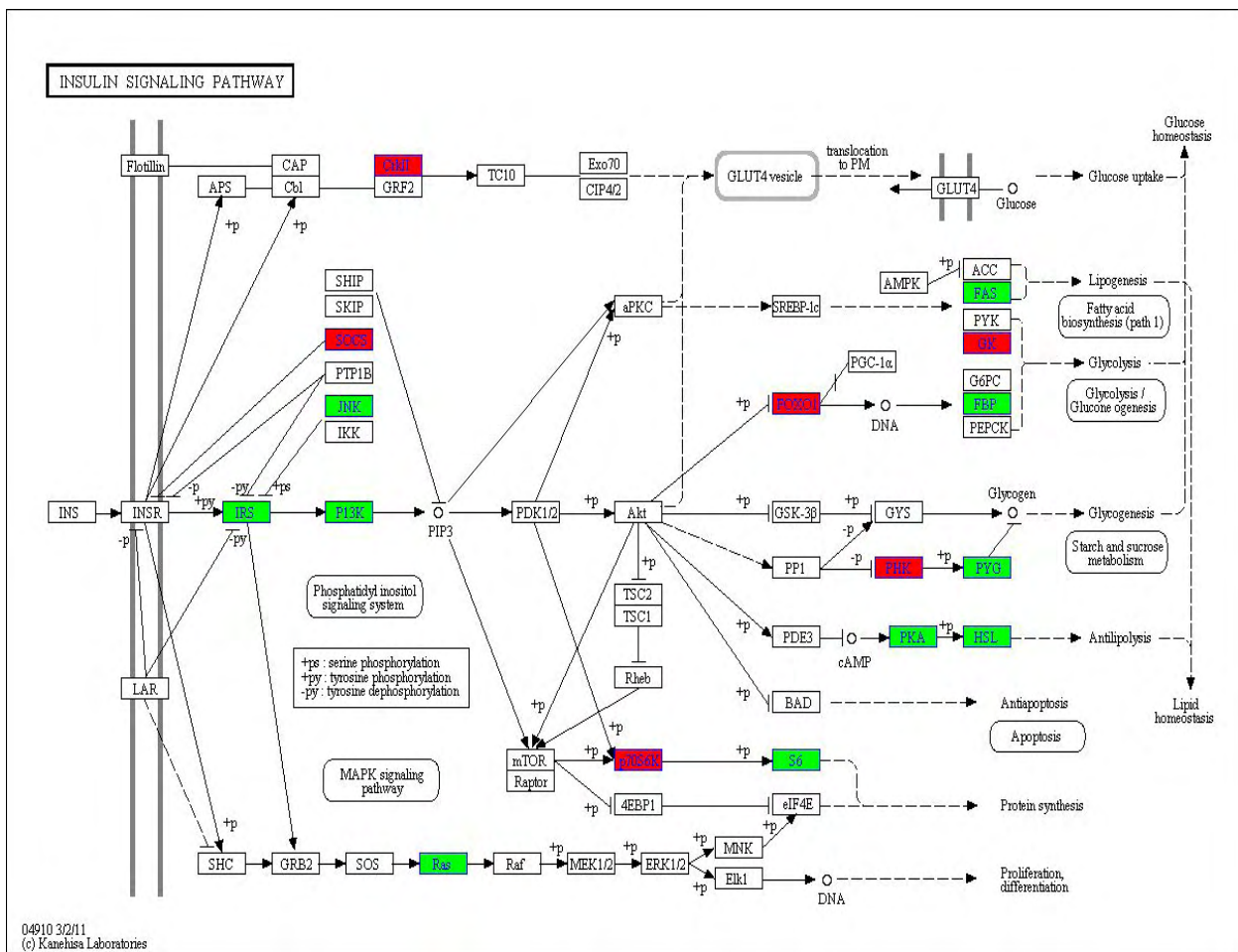


그림 3-2-23 . Insulin signaling pathway에서 발효노니 식이에 의해 효과를 보이는 유전자

PPAR signaling pathway에서 발효노니 식이에 의해 1.5 fold 이상 up-regulation 되는 유전자는 FABP, CYP4A1인 것으로 나타났다(그림 3-2-24. red box). FABP(fatty acid binding protein)은 인슐린 생성에 필요한 유전자로 발효노니 식이에 의해 1.5 fold 유전자 발현량이 증가하였으며 Cholesterol metabolism에 관여하는 유전자 CYP4A1도 1.5 fold 정도 up-regulation 되었다. 특히적으로 RXR(Retinoid x receptor alpha)유전자는 발효노니 식이에 의해 약 1.5 fold 발현량이 증가하였는데 이 유전자는 당대사에 관여하는 유전자 발현을 증가시키는 수용체

인 PPAR (Peroxisome proliferation activated receptor)의 3가지 타입( $\alpha$ ,  $\beta/\delta$ ,  $\gamma$ ) 모두와 결합하는 수용체로 PPAR와 RXR 복합체를 구성하여 fatty acid oxidation에 관여하는 유전자 CYP7A1과 CPT-1, 그리고 fatty acid transport에 관여하는 FABP 유전자를 up-regulation 시키는데 영향을 주는 것으로 예상된다. 이외에도 특이적으로 발효노니 식이에 의해 down-regulation 된 유전자 중 AQP7(Aquaporin 7)은 수분통로 단백질로 고혈당 환자의 경우 장기간 고혈당에 노출되면 모세혈관벽의 AQP에 이상이 발생하여 나타나는 당뇨 증상의 원인으로 알려져 있다. 전체적으로 PPAR signaling pathway에서는 RXR 유전자의 up-regulation 구성된 PPAR-RXR복합체의 영향으로 cholesterol 대사와 fatty acid oxidation, fatty acid transport 기능을 가진 유전자들을 활성화시키는 반면 지질합성은 억제하는 것으로 예상되며 이는 전반적 lipid 대사에 영향을 행사하여 당뇨 예방에 효과를 나타내는 것으로 사료된다.

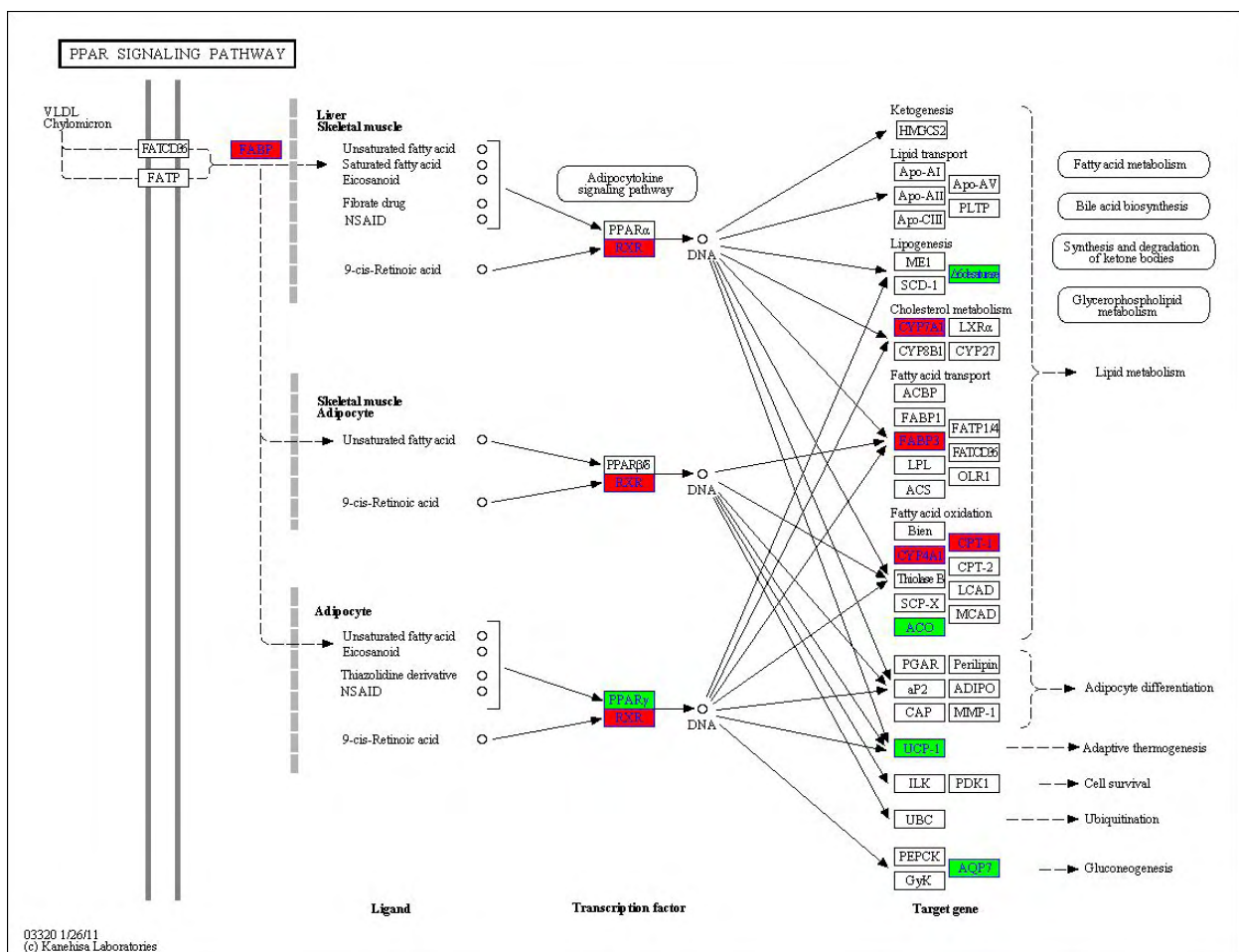


그림 3-2-24. PPAR signaling pathway에서 발효노니 식이에 의해 효과를 보이는 유전자

② 발효노니 식이량에 따른 항당뇨 활성

㉠ 체중, 식이섭취량 및 식이효율

발효노니의 식이량에 따른 체중변화, 식이섭취량 및 식이효율(FER)은 전 실험군에서 유의적인 차이가 없었다. 그러나 음용수 섭취량의 경우, 발효노니를 식이량이 증가할 수록 감소하는 것으로 나타났는데, 발효노니 0.1 및 0.2% 식이 시 음용수 섭취량은 당뇨 대조군 대비 13% 감소하였으며, 0.4% 식이 시 23% 가량 감소하는 것으로 나타나 당뇨의 기본 증상인 다음 증상이 완화된 것을 알 수 있었다.

표 3-2-11. 발효노니의 식이량에 따른 KKAY 마우스의 체중변화, 식이섭취량, 음용수섭취량 및 FER(%)

Treatment	Change of body weight (g/day)	Food intake (g/day)	Water intake (mL/day)	FER <sup>1)</sup>
Control	0.25±0.02	7.88±0.23	26.54±2.58 <sup>AB</sup>	0.032±0.004
Banaba	0.25±0.02	7.91±0.73	26.03±3.44 <sup>AB</sup>	0.031±0.003
Metformin	0.28±0.04	7.29±0.61	24.72±3.06 <sup>AB</sup>	0.037±0.005
MC	0.27±0.04	7.91±0.51	27.71±2.39 <sup>A</sup>	0.033±0.005
FMC 0.1%	0.22±0.03	7.70±0.34	23.31±3.44 <sup>BC</sup>	0.029±0.004
FMC 0.2%	0.23±0.03	7.74±0.34	23.36±1.62 <sup>BC</sup>	0.030±0.003
FMC 0.4%	0.21±0.04	8.16±0.55	20.85±1.63 <sup>C</sup>	0.026±0.005

<sup>1)</sup>FER(food efficiency ratio): weigh gain (g/day)/food intake (g/day)

Each value represents the mean ± SD (n=8).

<sup>A-C</sup> Means with different superscripts in the same column are significantly different from each other (p<0.05, Duncan's multiple range test).

㉡ 혈당변화측정

KKAY는 비만, 고혈당, 체모색등과 관련 있는 Ay 유전자를 도입한 제2형당뇨질환모델로서 KK 마우스보다 조기(7-8주령)에 더 심한 비만과 고혈당치를 보이는 것으로 알려져 있는데, 30-40 g 경부터 혈당치 상승이 나타나기 시작한다. Control 군의 경우 실험 1 주차부터 혈당이 478 mg/dL으로 급격히 증가하기 시작하여 3 주차 이후에는 500 mg/dL 이상의 고혈당을 유지하였다. 시판 항당뇨 치료제인 metformin 식이 군의 경우 2주차까지는 당뇨대조군에 비해 혈당이 떨어지는 것으로 나타났지만, 3 주차 부터는 혈당이 당뇨대조군과 유사한 수준으로 상승하여 항당뇨 활성이 높지 않은 것으로 관찰되었다. 그러나 발효노니 섭취군은 당뇨 대조군에 비해 혈당이 감소되는 것으로 나타났다. 실험 2주차 까지는 노니 원료 및 발효노니 식이량에 따른 혈당 변화가 거의 관찰되지 않았으나, 3주차부터는 발효노니 식이량에 의존적으로 혈당이 감소하였다. 노니원료 식이군과 발효노니 0.1% 식이군은 실험기간이 진행됨에 따라 혈당이 당뇨대조군과 유사한 수준으로 상승하였으나, 발효노니 0.2 및 0.4% 식이군은 시판 항당뇨 관련 건강기능식품인 바나바를 0.4% 섭취한 군 보다 혈당조절능력이 높은 것으로 나타났다. 특히

발효노니를 0.4% 섭취한 KKAy의 혈당은 실험 전 기간에 걸쳐 대조군에 비해 100-150 mg/dL 정도 낮은 수치로 유지되어 상업적으로 이용할 수 있는 가능성이 매우 높음을 알 수 있었다.

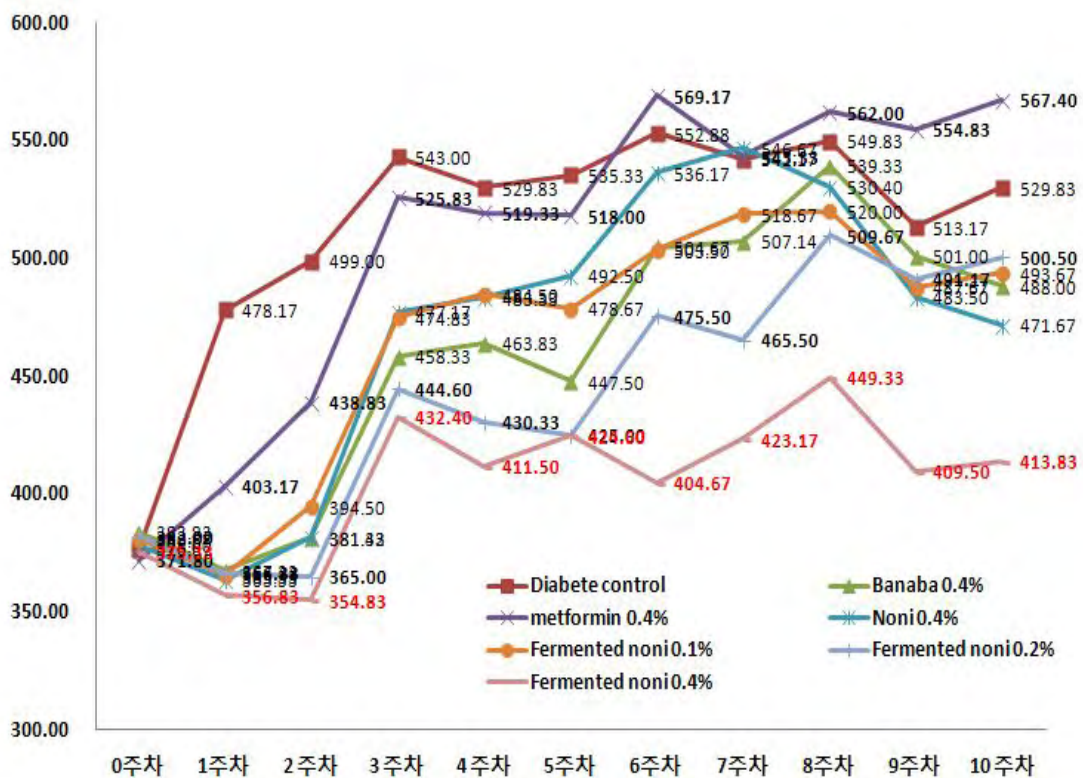


그림 3-2-25. 발효노니 식이량에 따른 KKAy의 혈당변화

㉔ 당화혈 색소

적혈구에 있는 hemoglobin의 일부인 HbA1c는 혈구의 생존기간 동안 서서히 포도당과 비효소적으로 결합하여 당화혈색소의 형태로 변화하게 된다. 혈구의 생존기간이 약 90-120일 동안이므로 당화혈색소의 측정은 장기간에 걸친 혈당의 변화를 통합하여 나타내는 기본적인 지표로 이용되고 있다. 실험결과, 시판 건강기능식품인 바나바, 노니섭취군 및 발효노니 0.1% 섭취군의 당화혈 색소 값은 각각 10.77, 11.75 및 11.33%로 11.63%인 control군과 큰 차이를 보이지 않았으나, 발효노니 0.2% 및 0.4%로 섭취한실험군의 당화혈색소값은 9.91 및 8.87 %로 당뇨대조군에 비해 유의적으로 낮은 수치를 보여 10주간의 실험기간동안 혈당 조절이 잘 되었을 수 있음을 알 수 있었다. 실험기간동안의 혈당변화 및 당화혈 색소 결과를 바탕으로 볼 때, 마우스에 대한 발효노니의 적정식이량은 0.4%(사료첨가농도)이었으므로, 이를 기준으로 인체적정섭취량을 도출(성인남성기준)하면 하루 3-4 g의 발효노니 섭취 시 혈당을 효율적으로 조절할 수 있을 것으로 생각된다.

㉕ 혈청 adiponectin 함량

Adiponectin은 지방세포에서 분비되는 cytokine의 일종으로 혈중에 고농도로 존재하는데, 혈중 유리 지방산 감소, 간의 지방산 산화 작용을 도와주며 인슐린 민감도를 높여 세포내 포도당 흡수를 증가시키는 등 지질 및 혈당 조절에 도움을 주어 체중감량 및 에너지 대사 조절에 영향을 주는 호르몬이다. 지방조직에서 혈액 중으로 분비되며, 다른 호르몬에 비해 그 양이 많은

편인데, 일반적으로 당뇨병 환자에서 낮은 농도로 검출된다. 발효노니 식이량에 따른 KKAY의 adiponectin 함량 변화를 살펴본 결과, 바나바주정추출물, metformin, 0.4% 노니 식이군 및 0.1% 발효노니 식이군은 당뇨대조군의 adiponectin 농도와 유사한 수준으로 검출되었으나, 0.2 및 0.4% 발효노니 식이군은 당뇨대조군에 비해 adiponectin의 농도 증가 하였으며, 특히 발효노니를 0.4% 식이한 군에서 가장 높은 농도로 검출되었다. 이로 미루어 볼때, 발효노니를 0.2% 이상 식이 시 혈중 adiponectin 함량이 증가하여 혈당 조절에 도움을 줄 수 있을 것으로 생각 된다.

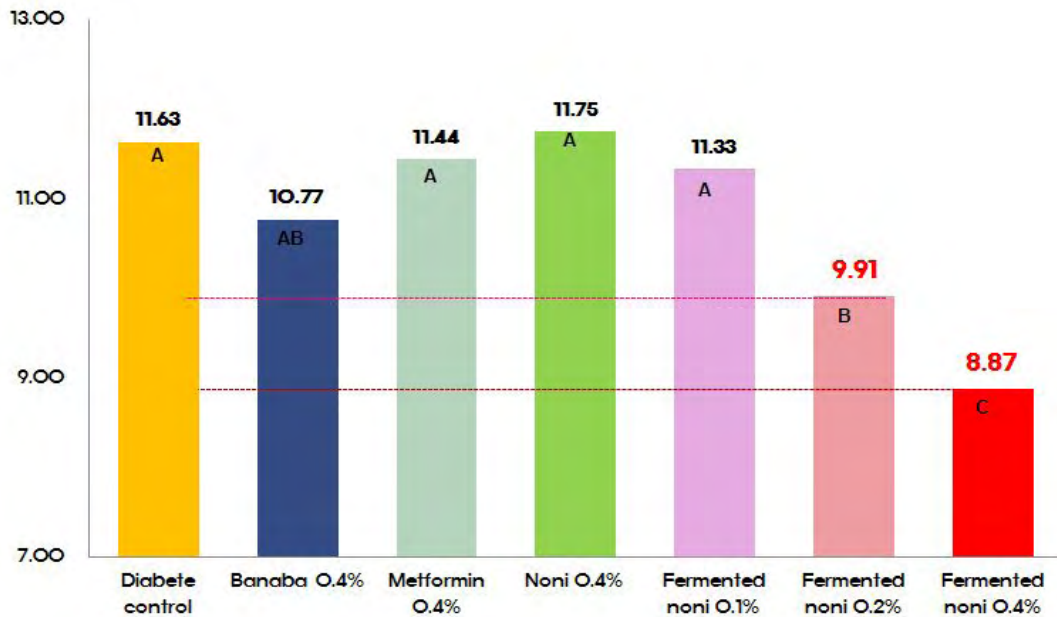


그림 3-2-26. 발효노니 식이량에 따른 KKAY 마우스의 당화혈 색소 변화.

㉓ 혈청 glucose 및 insulin 함량

혈청 insulin 함량은 전체 실험구에서 당뇨대조군과 유의적인 차이가 관찰되지 않았으나, glucose 농도는 발효노니를 0.2 및 0.4% 식이한 군에서 유의적으로 낮게 나타났다. 당뇨대조군의 경우 혈청 insulin 농도가 236.33 uU/mL 일때, glucose 농도가 209 mg/dL로 고인슐린혈증을 보였으며, 바나바주정추출물, metformin, 0.4% 노니 식이군 및 0.1% 발효노니 식이군에서도 이와 유사한 수준의 insulin 및 glucose 가 검출되어 당뇨대조군의 고인슐린혈증 개선에 효과가 없는 것으로 나타났다. 그러나 0.2% 발효노니 식이군 및 0.4% 발효노니 식이군은 혈청 glucose가 각각 28 및 33% 낮게 검출되어 당뇨대조군 비해 고인슐린혈증이 개선되었음을 알 수 있었다. 측정된 공복혈당과 인슐린 함량을 통해 인슐린저항성 지표인 HOMA(Homeostasis assessment-IR)을 계측하였다. HOMA-IR은 인슐린 저항성을 나타내는 지표로 그 값이 클수록 인슐린 저항성이 높음을 의미하는데, 0.2 및 0.4% 발효노니 섭취군의 HOMA-IR이 당뇨대조군에 비해 월등히 낮게 난 것으로 미루어 보아 발효노니는 인슐린 저항성을 낮춤으로써 혈당강하효과를 나타내는 것으로 생각된다.

그림 3-2-27. 발효노니 식이량에 따른 KKAy 마우스의 혈청 adiponectin 함량 변화

표 3-2-12. 발효노니 식이량에 따른 KKAy의 insulin, glucose 함량 및 HOMA-IR 분석

Treatment	Insulin ( $\mu$ U/mL)	Glucose (mg/dL)	HOMA-IR
Control	129.42 $\pm$ 11.82	209.00 $\pm$ 42.53 <sup>AB</sup>	65.60 $\pm$ 17.75 <sup>A</sup>
Banaba	106.66 $\pm$ 18.58	211.20 $\pm$ 92.49 <sup>AB</sup>	58.17 $\pm$ 35.35 <sup>AB</sup>
Metformin	149.46 $\pm$ 18.70	258.80 $\pm$ 95.44 <sup>AB</sup>	76.04 $\pm$ 59.01 <sup>A</sup>
MC	128.72 $\pm$ 27.35	232.00 $\pm$ 49.85 <sup>AB</sup>	75.30 $\pm$ 29.29 <sup>A</sup>
FMC 0.1%	132.89 $\pm$ 41.27	222.20 $\pm$ 81.02 <sup>AB</sup>	80.79 $\pm$ 58.30 <sup>A</sup>
FMC 0.2%	130.83 $\pm$ 54.89	163.20 $\pm$ 8.52 <sup>AB</sup>	53.33 $\pm$ 24.09 <sup>AB</sup>
FMC 0.4%	110.73 $\pm$ 16.90	142.00 $\pm$ 34.64 <sup>B</sup>	39.59 $\pm$ 13.53 <sup>B</sup>

Each value represents the mean  $\pm$  SD (n=8).

A-B Means with different superscripts in the same column are significantly different from each other (p<0.05, Duncan's multiple range test).

#### ㉞ 혈중 지질 농도

제2형 당뇨병 환자에서 가장 흔히 나타나는 지질대사 이상은 고지혈증으로 특히 고중성지방혈증이 20-60%의 빈도로 나타나는데, 이는 당뇨병 환자의 주된 사망요인이 되는 죽상경화성 질환 발생에 중요한 영향을 미친다. 본 실험 결과, 전반적으로 발효노니 식이량이 증가할 수록

지질대사 이상이 개선되는 경향이 관찰되었는데, 0.1 및 0.2% 발효노니 식이군에 비해 0.4% 발효노니 식이군에서 이러한 경향이 두드러지게 나타났다. 중성지방의 경우, 0.4% 발효노니 식이군은 163.43 mg/dL로 227.60 mg/dL의 높은 수치를 보인 control 군에 비해 약 29% 가량 감소하여 발효노니가 고중성지방혈증 개선에 효과가 있음을 알 수 있었다. 고중성지방혈증외에 고혈당으로 인한 또 다른 혈청지질 대사 이상으로 혈청 내 VLDL과 LDL의 함량이 증가하여 동맥경화성 관상동맥질환 또는 뇌혈관질환의 발생율이 높아질 수 있는데, 혈청지질 중 HDL-cholesterol은 LDL-cholesterol의 생성을 억제하거나 혈관에 축적된 cholestrol을 감소시킴으로서 동맥경화의 발생을 억제하는 작용을 한다. 본 실험결과, 0.4% 발효노니 식이군의 경우 total cholesterol 및 LDL-cholesterol은 각각 15 및 33% 감소하였고, HDL-cholesterol은 13% 증가하는 등 시판건강기능식품은 바나바주정추출물 보다도 유의적으로 뛰어난 이상지질 대사 개선 활성을 보여 당뇨합병증 예방에도 효과가 높을 것으로 생각된다.

표 3-2-13. 발효노니 식이량에 따른 KKAy의 혈청 내 triglyceride, total cholesterol, HDL-cholesterol 및 LDL-cholesterol 함량 측정 (mg/dL)

Treatment	Triglyceride	Total cholesterol	LDL-Cholesterol	HDL-Cholesterol
Control	227.60±41.78 <sup>AB</sup>	180.80±12.06 <sup>A</sup>	23.80±5.08 <sup>A</sup>	125.60±30.91 <sup>B</sup>
Banaba	205.83±48.57 <sup>AB</sup>	163.33±20.73 <sup>BC</sup>	17.83±2.85 <sup>AB</sup>	131.83±30.67 <sup>AB</sup>
Metformin	266.80±94.95 <sup>A</sup>	187.40±12.88 <sup>A</sup>	19.80±2.48 <sup>AB</sup>	157.80±16.24 <sup>A</sup>
MC	203.50±28.89 <sup>AB</sup>	172.67±18.39 <sup>BC</sup>	18.33±4.23 <sup>AB</sup>	151.50±12.24 <sup>AB</sup>
FMC 0.1%	243.00±91.79 <sup>AB</sup>	181.17±15.61 <sup>A</sup>	19.00±4.47 <sup>AB</sup>	156.83±18.55 <sup>A</sup>
FMC 0.2%	182.57±47.01 <sup>AB</sup>	171.00±12.58 <sup>BC</sup>	16.86±4.12 <sup>AB</sup>	139.86±7.86 <sup>AB</sup>
FMC 0.4%	163.43±53.84 <sup>B</sup>	155.14±17.79 <sup>C</sup>	15.57±3.81 <sup>B</sup>	142.43±12.86 <sup>AB</sup>

Each value represents the mean ± SD (n=8).

A-C Means with different superscripts in the same column are significantly different from each other (p<0.05, Duncan's multiple range test).

### ③ 발효노니의 항당뇨 치료활성 평가

뛰어난 혈당조절활성을 보인 발효노니의 항당뇨 치료 효능을 구명하기 위하여 당뇨에 유도된 7 주령의 KKAy 마우스에 발효노니추출물을 100 mg/kg·bw 농도로 5주간 매일 경우 투여하여 혈당을 조절한 후, 6주차부터 일부 실험쥐에 발효노니추출물 투여를 중지하였다. 메트포민과 발효노니추출물을 각각 300 mg/kg·bw 및 100 mg/kg·bw 농도로 투여 시 시험기간 동안 혈당이 180 mg/dL까지 증가한 당뇨대조군과는 달리 공복혈당이 113-130 mg/dL 수준으로 유지되어 항당뇨활성이 있음을 확인하였다. 그러나 6주차 부터 투여를 중지하자 투여중지 2주차까지는 혈당이 조절되었으나, 3주차부터 당뇨대조군처럼 증가하는 경향을 보여 발효노니는 메트포민과 마찬가지로 치료활성이 없는 것으로 확인되었다.

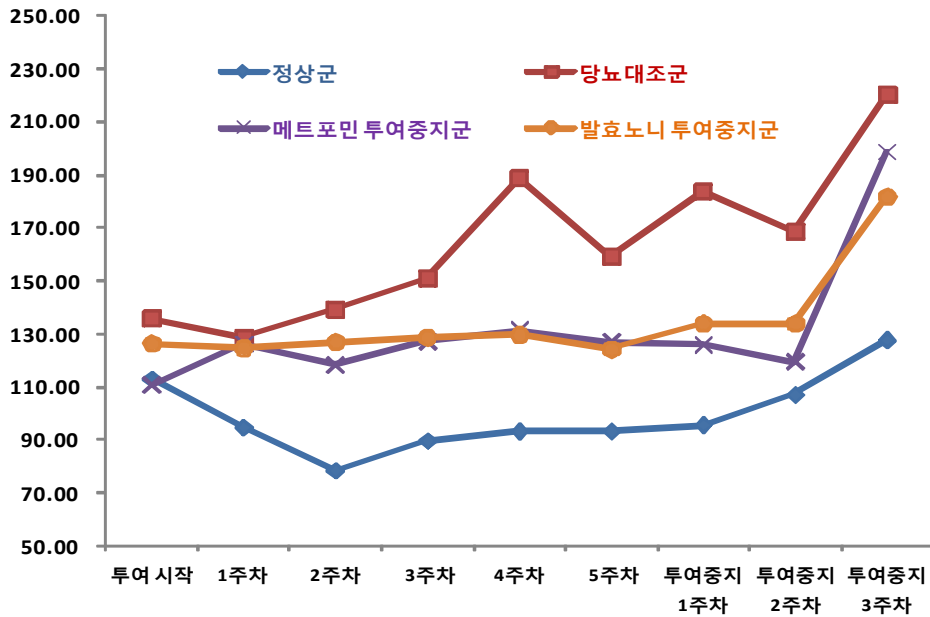


그림 3-2-28. 발효노니 투여 중지에 따른 KKAy 마우스의 혈당변화

## (2) 세포모형을 활용한 발효노니의 항당뇨 효능 검증

### (가) 발효노니의 glucose uptake 촉진 활성

Screening 실험에서 높은 활성을 보였던 발효노니는 발효기간에 따른 glucose uptake 촉진 활성을 평가하였으며, 시판의약품과의 항당뇨 효능 비교하였다. 인슐린 비의존형 당뇨병에서 나타나는 인슐린 저항성의 주된 요인은 골격근에서의 비산화적 포도당 이용률의 감소로 알려져 있다. 이에 발효기간에 따른 발효노니의 의한 포도당 이용률 증가 정도를 측정하기 위해 C2C12세포를 근육세포로 분화시키고 발효노니 70% 메탄올 추출물을 200 및 400  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도로 처리 후 2-NBDG (2-[N-(7-Nitrobenz-2-Oxa-1,3-Diazol-4-yl) Amino]-2-Deoxy-D-Glucose) uptake assay를 측정하였다. 발효기간이 증가함에 따라 glucose uptake가 농도 의존적으로 증가하는 양상을 보였으며, 발효 30-40일차에 최대 활성을 보였다. 특히 발효 20일 이후에는 발효노니를 400  $\mu\text{g}/\text{mL}$  농도로 투여할 경우 시판의약품인 metformin을 근사한 농도 (414  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )로 처리하였을 때 보다 근육내 glucose 흡수율을 증가시켰다. 한편, 높은 glucose uptake 활성을 보인 발효노니 70% 메탄올 추출물의 C2C12 cell에 대한 세포독성을 평가한 결과, 노니원료와 발효노니 모두 5 mg/mL(5000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )이하의 농도에서는 세포 생존률에 영향이 없는 것으로 나타나, 발효노니는 항당뇨 활성을 있는 농도에서도 C2C12 cell에 대한 독성이 없음을 확인하였다.



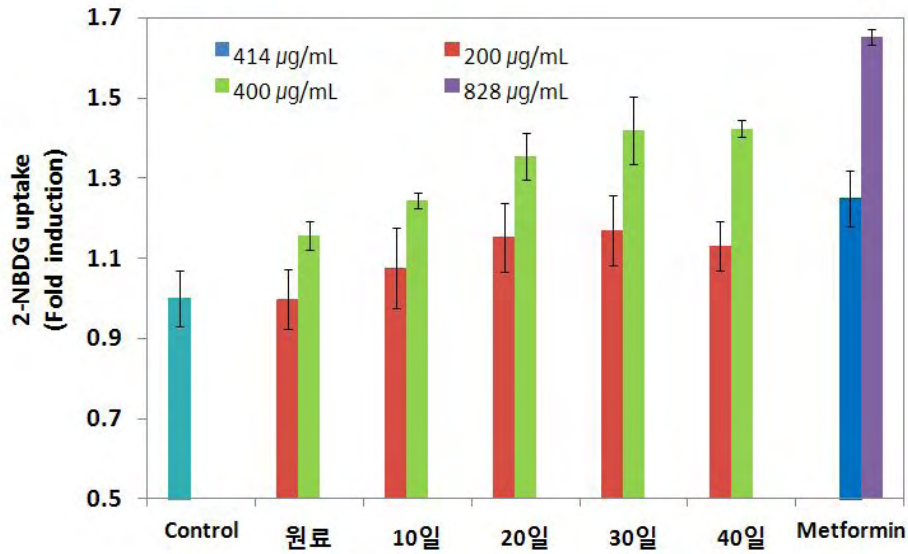


그림 3-2-29. 발효기간에 따른 발효노니 70% 메탄올 추출물의 glucose 이용률 및 시판의약품과의 효능 비교.

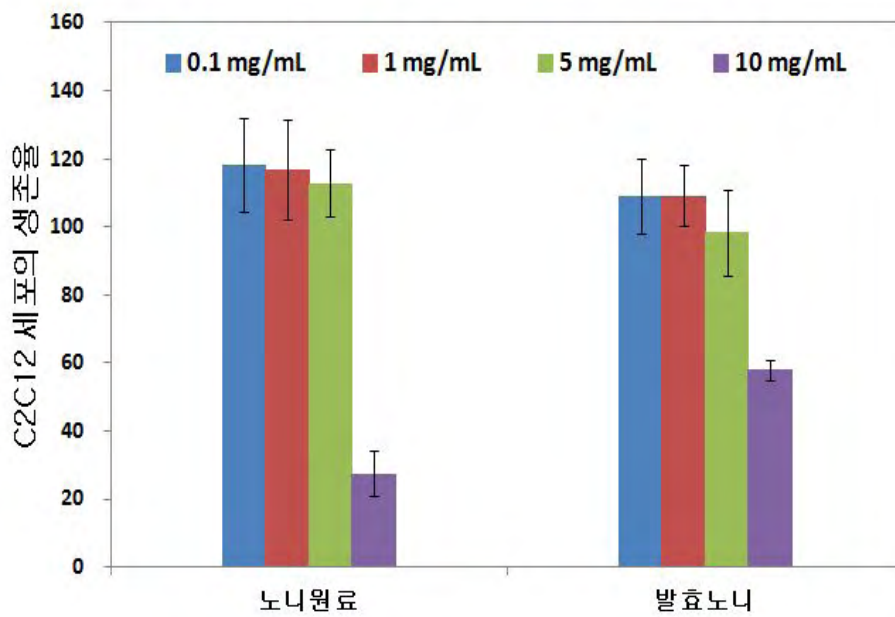


그림 3-2-30. 노니원료 및 발효노니 70%메탄올 추출물의 C2C1에 대한 독성평가.

(나) Peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR- $\gamma$ ) 전사활성 측정

PPAR-gamma는 여러 조직의 세포 핵 안에 있는 수용체이며 이 수용체가 자극을 받으면 지질 및 당대사 단백질을 조절하는 효소가 만들어지고 필요한 세포의 증식을 유발한다. 이 수용체가 중요한 이유는 현재 임상에서 쓰이는 대표적인 당뇨병약인 로지글리타존이 PPAR-gamma를 target으로 개발되었기 때문이며, PPAR-gamma antagonist는 당뇨병환자에 있어서 혈당을 효과적으로 감소시키는 역할을 한다. 노니 원료물 및 발효물의 물 및 70% 에탄올 추출물에 대한 PPAR-gamma 활성 측정결과, 노니 원료물 유래 추출물과 발효노니 물 추출물은 PPAR-gamma 전사활성을 높이지 못하였다. 그러나 발효노니 에탄올 추출물은 농도 의존적으로 PPAR-gamma의 전사활성을 높이는 것으로 확인되었다. 이로 미루어 보아 발효노니는 PPAR-gamma antagonist로 작용하여 인슐린 민감성을 높이고 인슐린 저항성을 낮춤으로써 항당뇨 활성을 나타내는 것으로 사료된다. 또한 본 실험에 사용한 샘플이 발효노니 에탄올 추출물임에도 당뇨병치료약인 로지글리타존과 유사한 수준으로 PPAR-gamma 전사활성을 높인 것을 고려하면 항당뇨 관련 건강기능식품으로 개발하기에 충분한 효능을 가진다고 할 수 있다.

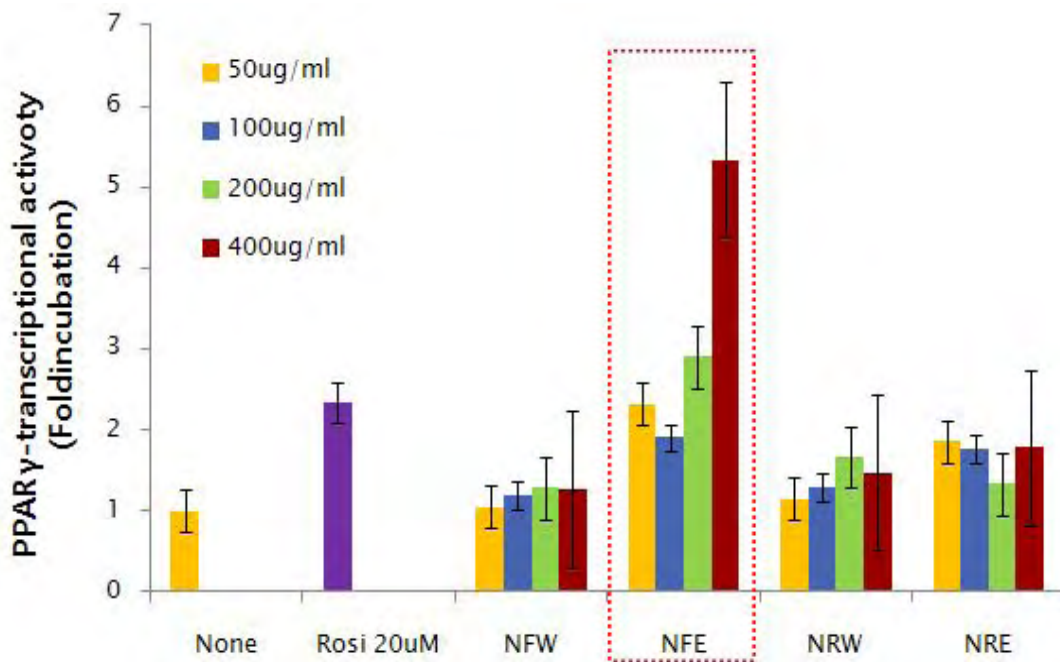


그림 3-2-31. PPAR $\gamma$  전사활성에 대한 발효노니 70% 에탄올 추출물의 효과.  
 NFW : 발효노니 물추출물, NFE : 발효노니 70% 에탄올 추출물, NRW : 노니 원료 물추출물, NRE : 노니 원료 70% 에탄올 추출물, Rosi : 글리타존계열의 항당뇨 약물.

(다) AMP-activated protein kinase (AMPK) 인산화

발효노니 에탄올추출물(NFE)의 항 당뇨 효능을 dual targeting하여 검증하기 위해 PPAR-gamma와 더불어 인슐린 감수성 개선의 바이오 마커로 잘 알려진 AMP-activated protein kinase의 활성을 다시 측정하였다. AMPK는 세포내 에너지 수준을 감지하여 세포의 항상성 유지에 중요한 역할을 하는데, 운동 또는 외부의 스트레스등의 자극이 오면 AMPK는 활성화되어 에너지를 소모하는 지방산합성, 콜레스테롤 합성, 단백질 합성등의 경로는 차단하고 반대로 에너지를 만들어내는 지방산 산화, 혈당흡수등의 경로는 활성화 한다고 알려져 있다. 그림 3-2-32에서 보는 바와 같이 발효노니 에탄올추출물(NFE)를 3시간 동안 처리한 후 웨스턴 블롯을 시행하였을 때 AMPK의 인산화가 농도 의존적으로 증가하는 것을 확인 할 수 있었으며, 특히 400 ug/mL 농도에서는 AMPK의 specific activator인 AICAR 보다 인산화 증가 정도가 큰 것을 확인 할 수 있었다. 이상의 결과로 미루어 볼 때, 발효노니는 혈당 흡수능이 뛰어나며 이는 PPAR-gamma 전사활성 또는 AMPK의 활성을 증가시킴으로서 일어나는 것임을 확인할 수 있었다

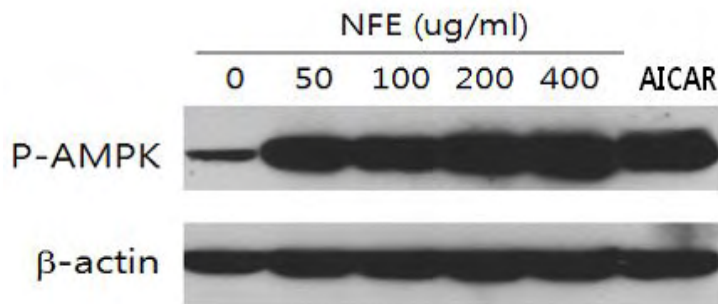


그림 3-2-32. AMPK의 인산화에 대한 발효노니 70% 에탄올 추출물의 효과  
NFE : 발효노니 70% 에탄올 추출물

## 나. 간 기능 개선 활성 평가

### (1) 간 기능 개선 활성 평가를 위한 동물실험

CCl<sub>4</sub>로 투여를 통한 간섬유화 ICR 마우스를 이용하여 발효미강복합물, 발효울금, 발효녹차 및 발효갈근의 간기능 개선 활성을 평가하였다. 실험결과 발효미강발효물과 발효울금에서는 간기능 개선활성을 확인하였으나, 발효녹차와 발효갈근에서는 간기능 개선 활성이 나타나지 않았다. 본 보고서에는 간기능 개선 활성을 보인 발효미강복합물과 발효울금에 대한 결과만을 기재하였다.

### (가) 발효미강복합물의 간기능 개선 활성 평가

#### ① 간 조직의 단백질 함량

사염화탄소(CCl<sub>4</sub>)는 phase I 대사를 통해 trichloromethyl radicals과 trichloromethyl peroxy radicals을 생성하여 세포막의 인지질을 공격해 지질과산화물 야기하여 간세포 괴사를 일으킨다. 이러한 radicals은 세포소기관의 막 지질에 분포하는 불포화 지방산 측쇄의 methylene 결합을 공격하여 약물대사 효소 활성과 단백질 합성을 저하시키고 간에서 급성 지방 변성을 일으켜 지방의 생성과 유리를 차단하여 급속한 지방축적을 야기한다. 사염화탄소는 간질환 관련 실험에 간독성 물질로 주로 사용되며 동물에서는 인간의 간섬유화와 유사한 병증을 유도하는 것으로 알려져 있어 이번 연구에서 독성물질로 사용하였다. 미강복합물(RBM: Rice Bran Mixture)과 발효미강복합물(RBMF: Rice Bran Mixture Fermented)을 각각 첨가한 사료를 자유 식이시키며 사염화탄소를 주 2회, 8주간 경구투여 한 마우스의 체중 증가량과 간 무게, 그리고 간 단백질의 함량을 분석한 결과는 표 3-2-14와 같다. 정상군(Normal control)과 발효미강복합물(RBMF) 실험군에서 체중 증가량이 가장 높은 동시에 간의 무게는 유의적으로 가장 낮게 나타났으며 사염화탄소 투여군(CCl<sub>4</sub> control)은 가장 낮은 체중과 높은 간 무게를 나타냈다. 이는 사염화탄소의 투여로 인한 간 손상과 스트레스가 체중감소에 영향을 미쳤으며, 간 손상으로 인해 비대해진 간의 중량이 증가하였기 때문이다. 체중 대비 간 중량을 보면 사염화탄소 투여군이 정상군보다 약 43% 높은 값을 나타내는 반면 발효미강복합물(RBMF)은 정상군과 유사한 값을 나타냈다. 그리고 사염화탄소 투여군(CCl<sub>4</sub> control)에 비해 발효미강복합물(RBMF) 실험군의 간 단백질 함량이 약 4% 정도 증가하였는데 간에서 생성되는 단백질 함량의 감소는 간 기능의 정도를 시사하는 지표로도 사용이 가능하다. 이와 같이 사염화탄소 투여 시 발효미강복합물(RBMF)의 섭취만으로 물리적 신체 특성과 간 단백질 함량이 정상에 가깝게 회복되는 것을 알 수 있다.

표 3-2-14. 사염화탄소 유도 간 독성 모델에서 발효미강복합물 (RBMF)의 체중, 간 중량 및 간 단백질 함량 측정

Treatment	Liver weight (g)	Body Weight (g)	Liver/body weight (%)	Hepatic protein (mg/mg liver)
Normal control	1.85±0.25 <sup>a</sup>	50.71±8.80 <sup>a</sup>	3.42±0.17 <sup>b,c</sup>	0.62±0.02 <sup>a</sup>
Vehicle control	1.63±0.15 <sup>a</sup>	49.60±3.83 <sup>a</sup>	3.29±0.09 <sup>c</sup>	0.56±0.02 <sup>b</sup>
CCl <sub>4</sub> control	1.54±0.13 <sup>a</sup>	43.17±3.13 <sup>a</sup>	3.56±0.11 <sup>b,c</sup>	0.48±0.04 <sup>c</sup>
Positive control	1.68±0.13 <sup>a</sup>	44.87±1.28 <sup>a</sup>	3.74±0.25 <sup>b,c</sup>	0.53±0.05 <sup>b,c</sup>
RBM(0.4%) +CCl <sub>4</sub>	1.90±0.28 <sup>a</sup>	43.34±3.71 <sup>a</sup>	4.38±0.34 <sup>a</sup>	0.39±0.02 <sup>d</sup>
RBMF(0.4%) +CCl <sub>4</sub>	1.78±0.39 <sup>a</sup>	46.33±4.73 <sup>a</sup>	3.82±0.55 <sup>b</sup>	0.42±0.05 <sup>d</sup>

Values are mean ± S.D. (n=5), RBM : 미강복합물, RBMF : 발효미강복합물

## ② 간 손상 혈액 지표 분석

아미노산 전이효인 alanine aminotransferase(ALT)와 aspartate aminotransferase(AST)는 간세포에 정상적으로 존재하는 효소로 간 손상 연구에 있어 가장 유용한 지표 중의 하나이며 특히 ALT와 AST는 간세포의 피사와 간조직의 파괴가 진행됨에 따라 혈중으로 유리되기 때문에 간 손상 시 혈액에서 높은 수준으로 검출된다고 알려져 있는데, ALT는 간에 많이 존재하며 AST는 심장 간, 골격근에 많아 그 특이성이 인정된다. 사염화탄소 투여군은 정상군에 비해 유의적으로 높은 효소활성을 보임으로써 사염화탄소에 의한 간 손상이 일어난 것으로 나타났다. 발효미강복합물(RBMF) 실험군은 사염화탄소 실험군(CCl<sub>4</sub> control)보다 ALT 효소수치가 31%가 감소되었는데 이는 양성 대조군(Positive control)보다 8%가 더 감소한 것이고 미강복합물(RBM) 실험군은 양성대조군 보다 오히려 증가한 것으로 나타났다. AST 효소수치 역시 발효미강복합물 실험군에서 28% 감소되었는데 이는 양성대조군보다 9% 더 감소한 것은 물론 정상군에 유사한 값으로 나타났다. LDH(Lactate dehydrogenase) 효소 역시 간 조직이 파괴될 때 혈액 중으로 방출되어 수치가 상승하는 것으로 알려져 있는데 발효미강복합물 실험군은 사염화탄소 실험군보다 효소활성이 17% 감소하였으며 양성대조군 보다 7%가 더 감소한 수치를 나타내었다. 정상적인 간 세포내에서 total cholesterol(TC)과 triglyceride(TG) 함량은 합성과 이용의 균형을 이루지만 CCl<sub>4</sub>에 의해 간 손상을 받으면 반응성이 높은 ·CCl<sub>3</sub>기가 생성되어 간세포 기능이 저하됨으로 cholesterol과 glyceride의 함량이 증가되는 것으로 알려져 있다. TC(Total cholesterol)는 사염화탄소 실험군에서 증가하였으나 양성대조군과 발효미강복합물 실험군 모두 정상군과 유사한 값을 보였으며 미강복합물 원료에서도 TC가 감소하는 것으로 나타났다. 효소학적 변화로 볼 때 발효미강복합물(RBMF)의 섭취는 사염화탄소로 유도된 간 손상에 보호효과를 가지는 것으로 사료된다.

표 3-2-15. 사염화탄소 유도 간 독성 모델에서 발효미강복합물(RBMF)이 ALT, AST, ALP, LDH 및 총 콜레스테롤, 중성지방에 미치는 영향

Treatment	ALT (U/L)	AST (U/L)	ALP (U/L)	LDH (U/L)	TC (mg/dL)	TG (mg/dL)
Normal control	69±16 <sup>c</sup>	151±16 <sup>b,c</sup>	53±3 <sup>b</sup>	658±65 <sup>b</sup>	143±5 <sup>b</sup>	120±12 <sup>a</sup>
Vehicle control	85±20 <sup>c</sup>	127±9 <sup>c</sup>	58±7 <sup>b</sup>	638±111 <sup>b</sup>	194±18 <sup>a</sup>	130±29 <sup>a</sup>
CCl <sub>4</sub> control	285±67 <sup>a</sup>	210±11 <sup>a</sup>	92±20 <sup>a</sup>	976±128 <sup>a</sup>	208±18 <sup>a</sup>	131±27 <sup>a</sup>
Positive control	219±76 <sup>a,b</sup>	171±43 <sup>a,b,c</sup>	88±35 <sup>a</sup>	877±316 <sup>a,b</sup>	131±14 <sup>b</sup>	109±18 <sup>a</sup>
RBM(0.4%)+CCl <sub>4</sub>	249±52 <sup>a,b</sup>	184±40 <sup>a,b</sup>	82±17 <sup>a,b</sup>	1070±217 <sup>a</sup>	139±24 <sup>b</sup>	141±21 <sup>a</sup>
RBMF(0.4%)+CCl <sub>4</sub>	196±43 <sup>b</sup>	150±40 <sup>b,c</sup>	74±13 <sup>a,b</sup>	808±177 <sup>a,b</sup>	139±22 <sup>b</sup>	137±29 <sup>a</sup>

③ Glutathione 및 MDA-TBA의 함량

Glutathione(GSH)은 세포내 단백질 또는 peptide의 생리적 화학적 조절뿐만 아니라 활성산소의 무독화에도 관여하는 수용성 항산화제로 알려져 있다. 정상군에 비해 사염화탄소 실험군은 글루타치온의 함량이 간 손상으로 인해 약 50% 정도 감소하였으나 발효미강복합물 실험군에서는 사염화탄소 실험군 보다 68% 정도 글루타치온 함량이 유의적으로 증가하였다. 이는 양성대조군과 유사한 정도의 값이다. MDA는 활성산소가 세포막의 구성성분인 불포화지방산을 공격하여 발생하는 반응산물로 이를 측정 시 세포의 산화적 스트레스 및 과산화 정도를 파악할 수 있다. 사염화탄소 실험군이 정상군에 비해 MDA-TBA의 함량이 약 2배 정도 증가한 것으로 나타났으며 발효미강복합물 실험군은 사염화탄소 실험군에 비해 24% 감소한 수치를 나타내었다. 이는 양성대조군과 유사한 값으로 사염화탄소 실험군이나 미강복합물 실험군과는 유의적인 차이를 나타냈다. 이와 같은 결과로 볼 때 발효미강복합물은 산화적인 간 손상에 대한 보호효과가 있는 것으로 사료된다.

표 3-2-16. 사염화탄소 유도 간독성 모델에서 발효미강복합물(RBMF)이 GSH, MDA-TBA에 미치는 영향

Treatment	GSH(μmol/g liver)	MDA-TBA(nmol/mg protein)
Normal control	4.55±0.98 <sup>a</sup>	0.62±0.10 <sup>d</sup>
Vehicle control	2.26±0.55 <sup>c</sup>	0.87±0.08 <sup>c</sup>
CCl <sub>4</sub> control	2.15±0.31 <sup>c</sup>	1.17±0.08 <sup>a</sup>
Positive control	3.71±0.39 <sup>a,b</sup>	0.87±0.09 <sup>c</sup>
RBM(0.4%)+CCl <sub>4</sub>	3.00±0.72 <sup>b,c</sup>	1.02±0.08 <sup>b</sup>
RBMF(0.4%)+CCl <sub>4</sub>	3.61±0.67 <sup>a,b</sup>	0.89±0.09 <sup>c</sup>

④ 간조직의 H&E 염색

그림 3-2-33은 사염화탄소를 투여한 마우스에서 발효미강복합물(RBMF)의 효과를 조직병리학적으로 관찰하기 위해 간 조직을 H&E stain한 결과이다. 세포의 핵은 파란색으로, 나머지 조직들은 붉은 색으로 염색되는 방법으로 정상군의 간 조직은 간 손상이 나타나지 않은 반면 사염화탄소 실험군(CCl<sub>4</sub> control)은 간세포의 핵포화와 괴사가 어느 정도 나타났다. 그리고 세포 손상으로 인한 체세포분열(cellular mitosis)시 일어나는 핵 응집현상도 관측되었다. 하지만 발효미강복합물(RBMF) 실험군은 이러한 체세포 분열 현상이 거의 나타나지 않으며 핵포화와 괴사 현상도 거의 나타나지 않는다(F). 특히 표고버섯균사체로 제조된 시판 건강기능식품(혜파셀리아)을 사용한 양성대조군(positive control)은 조직의 응집과 세포 파괴, 핵포화가 나타나며 사염화탄소 실험군보다 더 심한 간세포 손상을 받은 것으로 보인다(D).

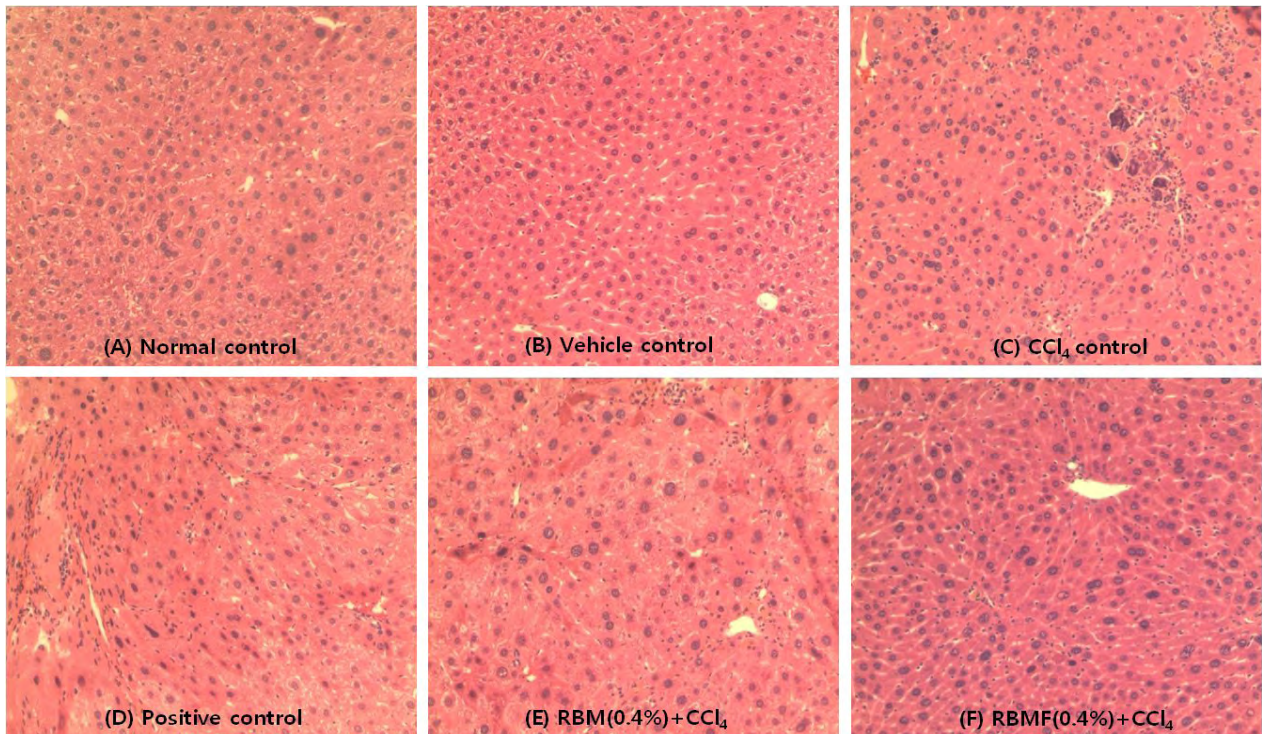


그림 3-2-33. 사염화탄소 유도 간 독성 모델에서 발효미강복합물 (RBMF)이 간에 미치는 영향을 조직병리학적으로 분석하기 위한 간조직의 H&E 염색 결과(100X) (A) Normal control, (B) Vehicle control, (C) CCl<sub>4</sub> control, (D) Positive control, (E) RBM(0.4%)+CCl<sub>4</sub>, (F) RBM(0.4%)+CCl<sub>4</sub>

⑤ 간조직의 M&T 염색

그림 3-2-34는 사염화탄소 투여로 일어난 간 섬유화의(fibrosis)의 정도와 이에 대한 발효미강복합물(RBMF)의 보호효과를 관찰하기 위해 간 조직을 M&T stain한 결과이다. M&T stain에서 정상적인 간 조직은 모두 붉은 색으로, 콜라겐은 푸른색으로 염색된다. 정상군(normal control)(A)은 별다른 이상이 없었지만 사염화탄소로 손상된 간을 재생하는 반복적인 수복과정에서 생성되는 콜라겐의 정도를 관찰해 볼 때, 사염화탄소 실험군은 많은 간 손상을 입은 것으로 나타난다(C). 사염화탄소 실험군의 경우, 간 소엽(hepatic lobules) 가장자리로 섬유화된(fibrotic cellular) 세포들이 자리하며 푸른색 띠를 이룬다. 이는 양성대조군과 미강복합물(RBM)의 경우에도 유사한 현상을 보인다(D, E). 그러나 발효미강복합물 실험군(RBMF)은 섬유화된 세포가 현저히 줄어들었으며 콜라겐의 생성 정도 역시 현저히 감소하였음을 관찰 할 수 있다(F)

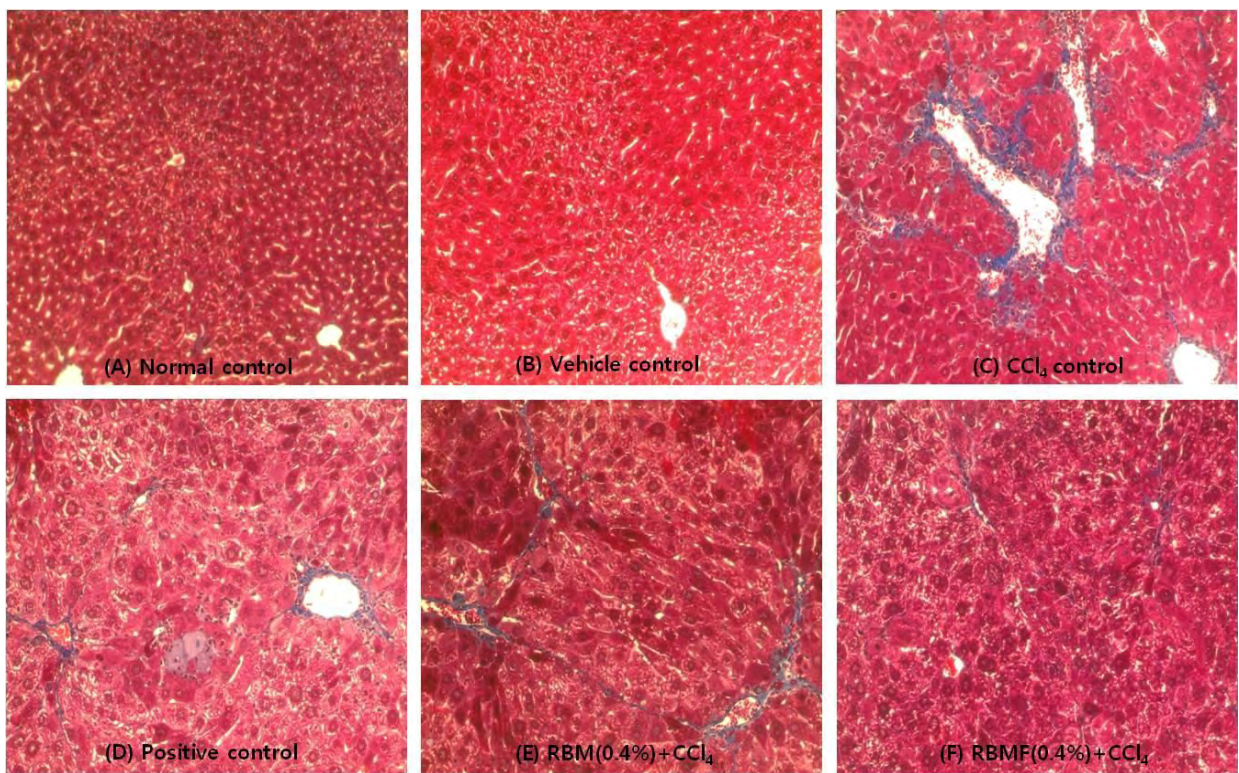


그림 3-2-34. 사염화탄소 유도 간 독성 모델에서 일어나는 간 섬유화의 조직병리학적 변화와 발효미강복합물(RBMF)에 의한 간 보호 효과를 관찰하기 위한 간 조직의 Masson Trichrome 염색 결과(X100). (A) Normal control, (B) Vehicle control, (C) CCl<sub>4</sub> control, (D) Positive control, (E) RBM(0.4%)+CCl<sub>4</sub>, (F) RBMF(0.4%)+CCl<sub>4</sub>



### ⑥ Collagen 함량 측정

조직염색에 나타난 간 섬유화의 지표인 콜라겐의 함량을 정량적으로 나타내기 위해 간 조직내의 콜라겐 함량을 측정하였다. 정상군과 사염화탄소 실험군의 간 조직내 콜라겐 함량의 유의적인 차이로 간 섬유화가 유도된 것을 알 수 있었다. 미강복합물 실험군은 사염화탄소 실험군과 거의 유사한 콜라겐 함량을 나타냈으나 발효미강복합물 실험군은 사염화탄소 실험군보다 콜라겐 함량이 8% 정도 유의적으로 감소한 것으로 나타났다. 그리고 발효미강복합물 실험군은 양성대조군과 유사한 콜라겐 함량을 나타내었다. 간 조직의 염색 결과와 콜라겐 함량의 결과로 볼 때 발효미강복합물은 사염화탄소 유도 간 섬유화에 의한 간 손상을 예방하고 완화시키는 기능을 가지고 있는 것으로 예상된다.

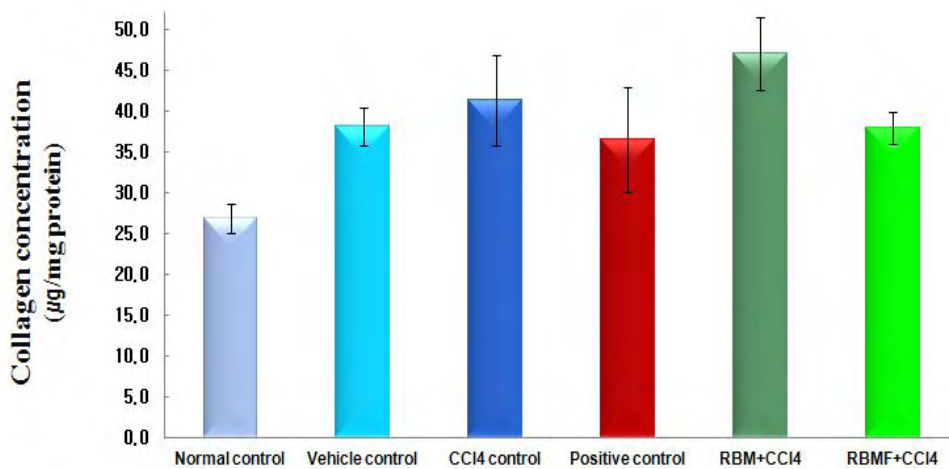


그림 3-2-35. 발효미강복합물에 의한 간 조직의 콜라겐 함량 변화

### ⑦ 발효미강복합물 식이 간 섬유화 유발 마우스의 간 대사체 분석

CCl<sub>4</sub>를 통해 간섬유화를 유발한 마우스에 미강복합물과 발효미강복합물을 각각 식이한 후 UPLC-Q-TOF MS를 이용하여 간 대사체를 분석한 결과 R<sup>2</sup>X, R<sup>2</sup>Y, Q<sup>2</sup>값이 각각 0.252, 0.497, 0.044로 미지의 시료를 예측할 수 있는 Q<sup>2</sup>값이 다소 낮기는 하지만 분석 모델 시스템은 잘 형성되는지를 확인하는 R<sup>2</sup> 값이 높게 나와 분석 모델은 잘 형성된 것으로 확인되었으며 7-fold cross validation을 통해 구축된 모델 시스템을 확인한 결과 R과 Q의 Y 축 값이 0.091와 -0.207로 낮게 나와 overloading도 되지 않은 것으로 확인되었다. 분석된 결과를 PLS-DA score 상에서 visualization 시킨 결과 각 시료 그룹의 군집 형성이 잘 되었으며 그룹 서로 간에 차이도 확연히 구별되는 것으로 관찰되었다. 그룹의 차이에 관여하는 물질을 확인하기 위하여 UPLC-Q-TOF MS에 의해 분석된 1259개의 대사체들을 PLS-DA loading plot으로 나타냈으며 이 중 유의적으로 차이 (P<0.05)를 보이는 326개의 대사체를 분석하였다. 5개의 대사물질들 (LysoPC 18:1, LysoPC 18:2, LysoPC 18:3, LysoPC 20:2, PC)이 그룹간의 차이에 관여하는 주요 물질들로 동정되었다. LysoPC 18:1, LysoPC 18:2, LysoPC 18:3의 경우 CCl<sub>4</sub>를 처리함으로써 감소한 반면 LysoPC 20:2와 PC의 함량은 증가하였다. 반면 미강복합물과 발효미강복합물 식이군에서는 LysoPC 20:2와 PC의 함량이 감소하는 경향을 보였는데, 미강 복합 발효물

식이군에서 감소 정도가 두드러지게 나타났다. 특히, phosphatidylcholine(PC)의 차이가 큰 것으로 나타났으나 본 table에 나타난 PC는 모든 phosphatidylcholine류를 합한 양이기 때문에 PC의 변화를 특정 질병 유발 혹은 완화 현상과 연관지어 설명하기는 무리라고 판단된다. 그러나 두 번째로 실험구간의 차이가 컸던 LysoPC 20:2의 경우 그 함량이 높을수록 지방축적 비율이 높아지는 것으로 알려져 있는데, 비만 쥐나 비만인에서 함량이 높게 나타나는 것으로 알려져 있다. 본 연구에서 미강 복합 발효물 식이군의 LysoPC 20:2의 함량이 CCl<sub>4</sub> 투여군이나 미강 복합물 식이군에 비해 낮게 나타난 것은 TG와 TC 함량이 미강 복합 발효물 식이군에서 가장 낮게 나타난 전임상 결과와 일치한다.

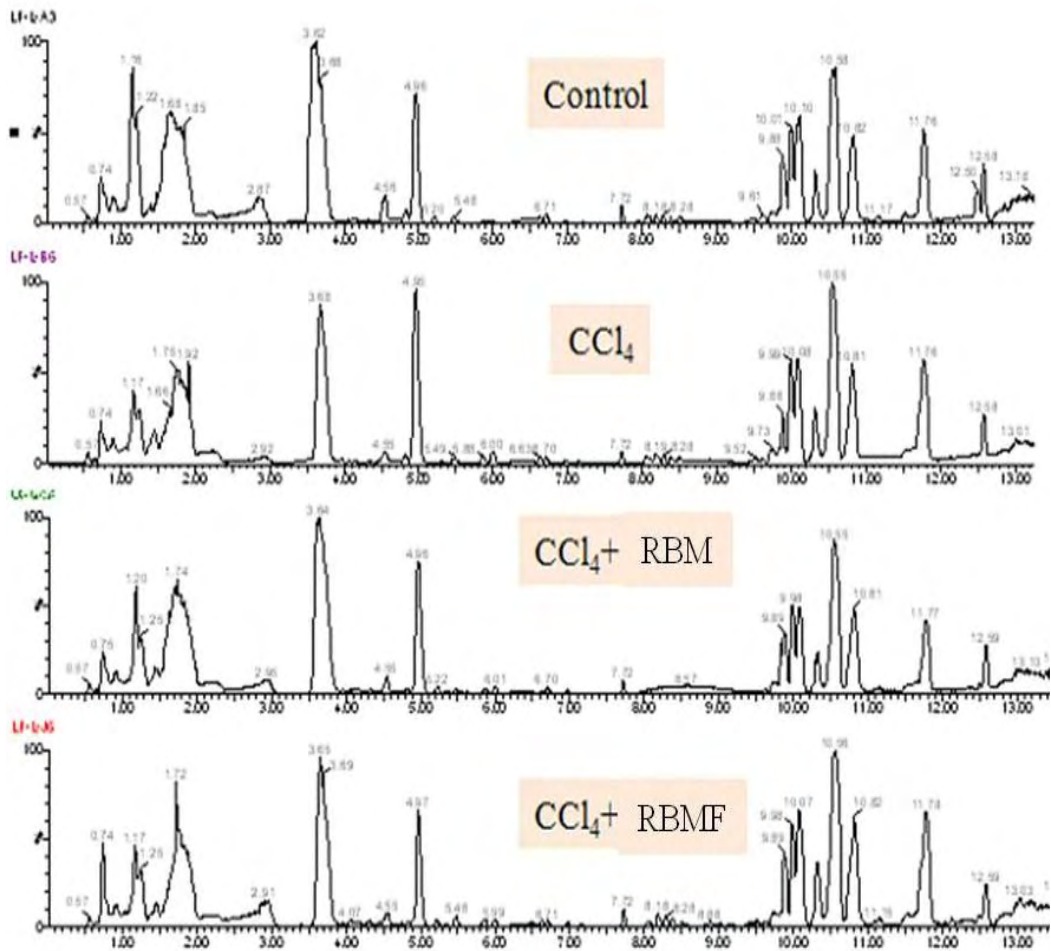


그림 3-2-36. CCl<sub>4</sub>로 간섬유화를 유도한 후 미강복합물과 발효미강복합물을 처리한 마우스의 간 대사체 mass spectra

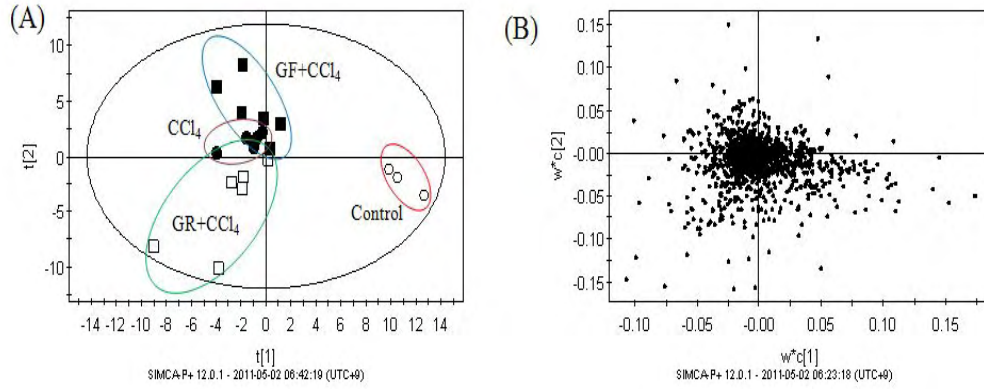


그림 3-2-37. 미강복합물과 발효미강복합물을 처리한 간섬유화 유발 마우스의 간 대사체 mass spectra의 PLS-DA score와 loading plots

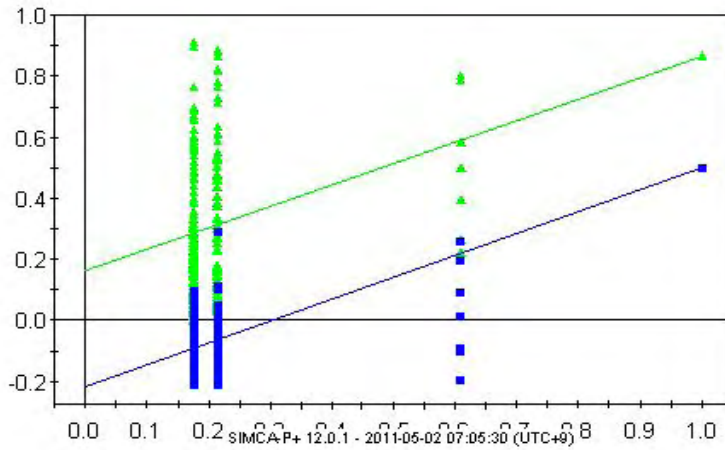


그림 3-2-38. 7-fold cross validation에 의해 분석된 R과 Q 값

표 3-2-17. 미강복합물과 미강복합발효물을 처리한 마우스 간의 주요 대사물질들의 동정 및 fold change

Identity	Fold Change(vs. control)		
	CCl <sub>4</sub>	미강복합물+CCl <sub>4</sub>	발효미강복합물+CCl <sub>4</sub>
LysoPC(18:1)	0.68	0.59	0.71
LysoPC(18:2)	0.68	0.59	0.71
LysoPC(18:3)	0.48	0.37	0.35
LysoPC(20:2)	1.70	1.54	0.35
PC	72.54	82.43	13.29

⑧ 미강복합물 및 발효미강복합물 식이 간 섬유화 유도 마우스의 microarrays 분석

미강복합물 및 발효미강복합물을 사염화탄소로 간 섬유화를 유발시킨 마우스에 8주 동안 급여한 뒤 간 조직으로부터 추출한 mRNA 발현량을 Agilent's Mouse Oligo Microarray를 이용하여 분석하였다. 각 샘플의 전사체 발현량을 조사한 후 이들 유전자가 up 또는 down regulation되는 pattern을 이용하여 HCL(Hierarchical clustering)을 수행하였다. 분석결과, 발효 전후의 미강복합물을 급여시 유전자의 발현량에 차이가 있음을 확인할 수 있다. 유전자 데이터베이스는 NCBI gene, GeneOntology의 mouse DB를 이용하였고 Agilent's mouse whole genome 44K를 사용하여 약 4만개 이상의 유전자를 대상으로 분석하였다.

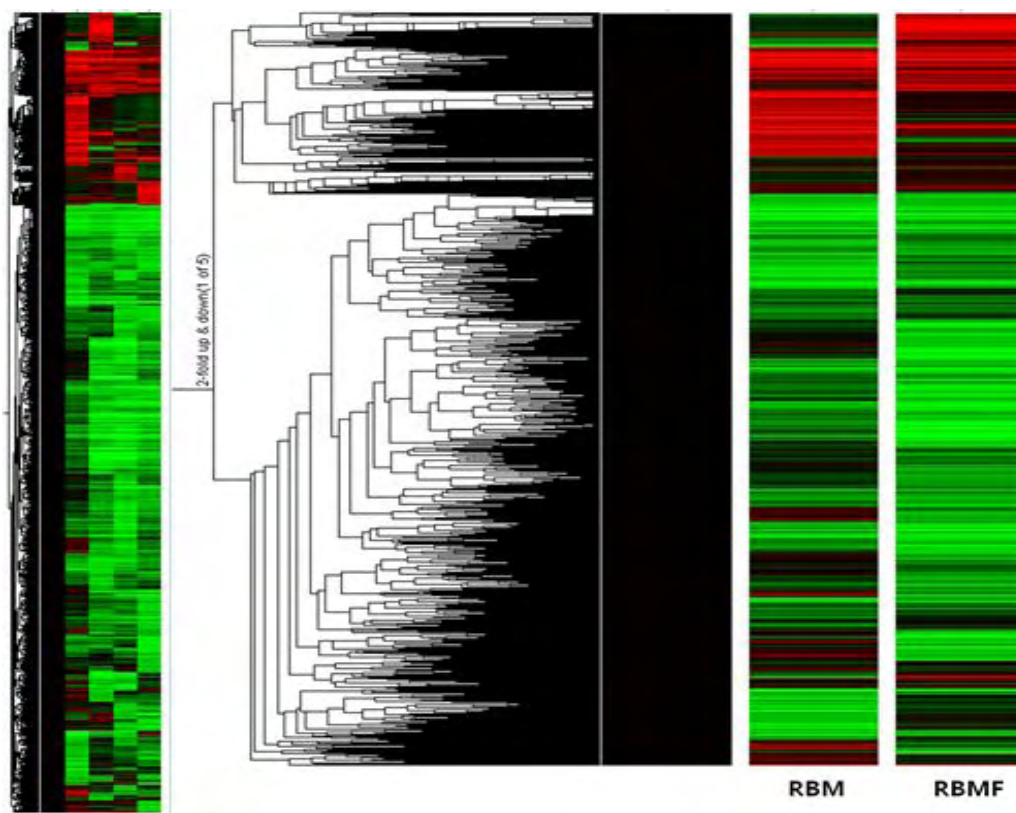


그림 3-2-39. 발효 전후의 미강복합물 식이시 유전자의 발현량 유사도를 이용한 HCL(Hierarchical clustering)

발효미강복합물을 섭취 시 미강복합물 실험군 대비 유전자 발현이 약 1.5배 이상 up-regulation(E/C normalized 1.0 이하, G/C normalized 1.4 이상, G/E normalized 1.4 이상, Flag P 선별)되는 유전자는 총 160개, down regulation(E/C normalized 1.4 이상, G/C normalized 1.0 이하, G/E normalized 0.6 이하, Flag P 선별)되는 유전자는 801개로 나타났다. 그 중에서 간 섬유화나 간 기능 개선과 관련되면서 1.5 fold 이상 up-regulation 된 유전자 5개와 0.6 fold 이하 down-regulation 된 유전자 7개를 선별하여 표기하였다.

표 3-2-18. 발효미강복합물 식이에 의해 up-regulation 되는 유전자

GeneS ymbol	Normalized	GeneName
Hamp2	26.65	hepatocyte growth factor activator(Hgfac)
Gm3798	4.52	microsomal glutathione S-transferase 2(Mgst2)
LOC100047392	4.10	similar to cytochrome P450, family 2, subfamily c, polypeptide 38
Cftr	2.42	cystic fibrosis transmembrane conductance regulator homolog
Ppnr	1.52	matrix metalloproteinase 1b, interstitial collagenase

발효미강복합물 식이에 의해 hepatocyte growth factor activator가 26 fold 증가한 것으로 나타났다. hepatocyte growth factor는 정상 간 정상세포에서 분비하는 다양한 polypeptide 중의 하나로 간 정상세포를 포함한 주위 다른 세포의 성장과 분열에 영향을 주는 기능을 가진 것으로 알려져 있다. Glutathione S-transferase 2와 cytochrome P450 유전자는 모두 4 fold 이상 발현이 증가하였는데 cytochrome P450은 간 조직에서 약물대사 Phase I 대사의 전자 운반 과정에서 전자 수용체를 담당하며 간을 통과하는 독성물질의 무독화(detoxification)에 관여하는 것으로 알려져 있다. 그리고 glutathione S-transferase는 Phase II 대사에서 극성화 된 대사산물을 불활성화 시키는 기능을 하는 효소로 알려져 있는데 연계된 약물대사계의 관여하는 두 개의 유전자 발현이 동시에 증가하는 결과로 볼 때 발효미강복합물이 간 독성물질 분해에 긍정적인 영향을 미치는 것으로 사료된다. 발효미강복합물 식이에 의해 유전자 발현이 1.5 fold 증가한 interstitial collagenase는 collagen을 분해시켜 간 조직의 섬유화를 저해하는데 중요한 효소이며 이외에도 유전자 발현이 2.4 fold 증가한 cystic fibrosis transmembrane conductance regulator homolog(Cftr)은 기능 부전시 점성이 높은 담도점액을 분비하여 담석을 형성하고, 이는 낭성 섬유증(cystic fibrosis)로 발전할 수 있는데 이러한 담도질환도 간 섬유화 과정에 영향을 줄 수 있는 것으로 알려져 있다.

표 3-2-19. 발효미강복합물 식이에 의해 down-regulation 되는 유전자

Gene Symbol	Normalized	Gene Name
Dusp2	0.26	tumor necrosis factor(tnf), superfamily
Osgin2	0.35	oxidative stress induced growth inhibitor family member 2
Col4a5	0.42	collagen, type IV, alpha 5
Fndc3b	0.44	fibronectin type III domain containing 3B
Pdcl	0.48	integrin beta 3 (Itgb3)
Lman1	0.51	collagen, type IV
Gadd45a	0.52	growth arrest and DNA-damage-inducible 45 alpha

발효미강복합물 식이에 의해 down-regulation된 유전자 중 TNF(tumor necrosis factor)는 사이토카인의 일종으로 간 정상세포를 활성화시키고 활성화된 간 정상세포는 손상 후에 ECM(Extracellular matrix : 정상외세포기질)을 생성하는 기능을 한다. 이는 간 조직이 collagen으로 대체되는 주원인으로 발효미강복합물 식이에 의해 TNF 유전자 발현이 0.26 fold로 감소하는 것으로 나타났다. 간 조직 내에서의 collagen 유전자(Col4a5, Lman1) 발현이 0.4~0.5 fold 감소하였으며 ECM 구성성분의 일종인 fibronectin과 ECM과 세포들을 연결하는 막 단백질의 일종인 integrin의 유전자 발현 또한 0.4 fold 감소하였다. 이는 섬유화가 진행된 간 조직의 collagen의 합성을 저해하고 collagen과 교차결합을 일으키는 ECM의 구성성분과 교원질 침착(collagen matrix deposition)에 관여하는 fibronectin의 발현을 저해하는 기능을 나타내는 것으로 해석된다. 발효미강복합물 식이시 간섬유화를 일으키는 주요 관련 인자(TNF, collagen, fibronectin)들의 유전자 발현이 저해되어 간 기능 개선에 긍정적인 영향을 미치는 것으로 사료된다.

(나) 발효율금의 간기능 개선 활성 평가

① 실험기간 동안의 체중변화 및 간 조직의 단백질 함량

울금과 발효율금을 각각 첨가한 사료를 자유 섭식시키며 사염화탄소를 주 2회, 8주간 경구투여한 mouse의 체중 증가량과 간 무게, 그리고 간 단백질의 함량을 아래에 나타냈다. 정상군(Normal control)과 양성대조군의 단백질 함량이 가장 높았으며 발효율금(CF)과 울금(CR)과의 차이는 유의적으로 나타나지 않았으며 간 무게 역시 정상군을 제외한 나머지 실험군에서 거의 유사한 값이 측정되어 큰 영향을 주지 못하는 것으로 나타났다. 사염화탄소 투여군(CCl<sub>4</sub> control)은 가장 낮은 체중과 높은 간 무게, 그리고 낮은 간 단백질 함량을 나타냈다. 이는 사염화탄소의 투여로 인한 간 손상과 스트레스가 체중감소에 영향을 미치게 되며 간 손상으로 인해 비대해진 간의 중량이 증가하였기 때문이다. 체중 대비 간 중량을 보면 사염화탄소 투여군이 정상군보다 높으며 나머지 군들도 유사한 값을 보였다.

표 3-2-20. 사염화탄소 유도 간 독성 모델에서 발효 울금 (CF)의 체중, 간 중량 및 간 단백질 함량 측정

Treatment	Liver weight (g)	Body Weight (g)	Liver/body weight (%)	Hepatic protein (mg/mg liver)
Normal control	1.85±0.25 <sup>b</sup>	50.71±8.80 <sup>a</sup>	3.42±0.17 <sup>c</sup>	0.62±0.02 <sup>a</sup>
Vehicle control	1.63±0.15 <sup>b</sup>	49.60±3.83 <sup>a</sup>	3.29±0.09 <sup>c</sup>	0.56±0.02 <sup>a,b</sup>
CCl <sub>4</sub> control	1.54±0.13 <sup>b</sup>	43.17±3.13 <sup>a</sup>	3.56±0.11 <sup>c</sup>	0.48±0.04 <sup>b</sup>
Positive control	1.68±0.13 <sup>b</sup>	44.87±1.28 <sup>a</sup>	3.74±0.25 <sup>b,c</sup>	0.53±0.05 <sup>b</sup>
CR(0.4%) +CCl <sub>4</sub>	2.04±0.21 <sup>a</sup>	44.55±3.91 <sup>a</sup>	4.73±0.38 <sup>c</sup>	0.49±0.08 <sup>b</sup>
CF(0.4%) +CCl <sub>4</sub>	1.84±0.35 <sup>a,b</sup>	44.78±3.01 <sup>a</sup>	4.09±0.49 <sup>b</sup>	0.62±0.07 <sup>a</sup>

Values are mean ± S.D. (n=5), CR : 비발효율금, CF : 발효율금

② 간 손상 혈액 지표 분석

아미노산 전이효인 alanine aminotransferase(ALT)와 aspartate aminotransferase(AST)의 측정 결과 사염화탄소 실험군은 정상군에 비해 유의적으로 높은 효소활성을 보임으로써 사염화탄소에 의한 간 손상이 일어난 것으로 나타났다. 발효율금(CF)군은 사염화탄소 실험군보다 ALT의 효소수치가 22%가 감소되었는데 이는 양성 대조군보다 27% 감소하였다. AST는 사염화탄소 실험군 대비 25% 감소하였으며 이는 양성대조군보다 6% 더 낮은 수치이다. Lactate dehydrogenase(LDH) 비발효율금 실험군에서는 사염화탄소 실험군 대비 6% 정도 감소하였으나, 발효율금 실험군에서는 2배인 12%가 감소하였다. TC(Total cholesterol)는 사염화탄소 실험군에서 증가하였으나 양성대조군과 발효율금 실험군 모두 정상군과 유사한 값을 보였으며 월금 원료에서도 TC가 감소하는 것으로 나타났다. 효소학적 변화로 볼 때 발효율금(CF)의 섭취는 사염화탄소로 유도된 간 손상에 보호효과를 가지는 것으로 사료된다.

표 3-2-21. 사염화탄소 유도 간 독성 모델에서 발효율금 (CF)이 ALT, AST, ALP, LDH 및 총 콜레스테롤, 중성지방에 미치는 영향

Treatment	ALT (U/L)	AST (U/L)	ALP (U/L)	LDH (U/L)	TC (mg/dL)	TG (mg/dL)
Normal control	69±16 <sup>c</sup>	151±16 <sup>b,c</sup>	53±3 <sup>b</sup>	658±65 <sup>b</sup>	143±5 <sup>b</sup>	120±12 <sup>a,b</sup>
Vehicle control	85±20 <sup>c</sup>	127±9 <sup>c</sup>	58±7 <sup>a,b</sup>	638±111 <sup>b</sup>	194±18 <sup>a</sup>	130±29 <sup>a,b</sup>
CCl <sub>4</sub> control	285±67 <sup>a</sup>	210±11 <sup>a</sup>	92±20 <sup>a</sup>	976±128 <sup>a</sup>	208±18 <sup>a</sup>	131±27 <sup>a,b</sup>
Positive control	219±76 <sup>a,b</sup>	171±43 <sup>b</sup>	88±35 <sup>a,b</sup>	877±316 <sup>a,b</sup>	131±14 <sup>b</sup>	109±18 <sup>b</sup>
CR(0.4%) +CCl <sub>4</sub>	223±16 <sup>a,b</sup>	180±12 <sup>a,b</sup>	68±30 <sup>a,b</sup>	920±138 <sup>a</sup>	142±26 <sup>b</sup>	145±26 <sup>a,b</sup>
CF(0.4%) +CCl <sub>4</sub>	201±45 <sup>b</sup>	158±19 <sup>b,c</sup>	71±16 <sup>a,b</sup>	860±93 <sup>a,b</sup>	134±8 <sup>b</sup>	130±22 <sup>a,b</sup>

③ Glutathione 및 MDA-TBA의 함량

사염화탄소 실험군의 GSH의 함량은 사염화탄소에 의해 정상군 대비 50% 감소하였다. 발효율금 식이에 의해 사염화탄소 실험군 대비 2.5배(155% 증가) 이상 함량이 증가하였고 이는 정상군 보다 17% 정도 높은 수치를 나타낸다. GSH 함량은 비발효율금 실험군이 양성대조군보다 더 높은 수치를 나타내어 월금 원료도 어느 정도 기능을 나타내었다. 세포의 산화적 스트레스 정도를 측정하는 MDA-TBA의 함량 측정결과, 사염화탄소 실험군 대비 약 29% 감소하여 유의적인 차이를 나타내었으며 이는 양성대조군과 유사한 것으로 나타났다. 이와 같은 결과로 볼 때 간 조직내 GSH 생성에 발효율금이 긍정적인 영향을 줄 수 있는 것으로 예상되며 산화적인 간 손상에 대한 보호효과도 예상된다.

표 3-2-22. 사염화탄소 유도 간 독성 모델에서 발효율금 (CF)이 GSH, MDA-TBA에 미치는 영향

Treatment	GSH( $\mu\text{mol/g liver}$ )	MDA-TBA( $\text{nmol/mg protein}$ )
Normal control	4.55 $\pm$ 0.98 <sup>a</sup>	0.62 $\pm$ 0.10 <sup>d</sup>
Vehicle control	2.26 $\pm$ 0.55 <sup>c</sup>	0.87 $\pm$ 0.08 <sup>c</sup>
CCl <sub>4</sub> control	2.15 $\pm$ 0.31 <sup>c</sup>	1.17 $\pm$ 0.08 <sup>a</sup>
Positive control	3.71 $\pm$ 0.39 <sup>a,b</sup>	0.87 $\pm$ 0.09 <sup>c</sup>
CR(0.4%) +CCl <sub>4</sub>	4.38 $\pm$ 0.27 <sup>a,b</sup>	1.03 $\pm$ 0.07 <sup>b</sup>
CF(0.4%) +CCl <sub>4</sub>	5.50 $\pm$ 1.11 <sup>a</sup>	0.83 $\pm$ 0.09 <sup>c</sup>

#### ④ 간조직의 H&E stain

H&E stain은 세포의 핵은 파란색으로, 나머지 조직들은 붉은 색으로 염색되는 방법인데, stain 결과 정상군의 간 조직은 간 손상이 나타나지 않은 반면 사염화탄소 실험군(CCl<sub>4</sub> control)은 간세포의 핵포화화 피사가 어느 정도 관찰되었으며(A), 세포 손상으로 인한 체세포분열 (cellular mitosis)이 일어나는 핵 응집현상도 관찰되었다. 하지만 발효율금(CF) 식이군은 이러한 체세포 분열 현상이 거의 나타나지 않으며 피사와 핵포화 현상도 완화되는 현상을 보였다 (F). 한편, 양성대조군인 표고버섯균사체로 제조된 시판 건강기능식품(해파셀리아)을 사용한 (D)는 심한 세포 파괴가 나타나며 사염화탄소 실험군보다 더 심한 간세포 손상을 받은 것으로 나타나 발효율금이 시판 건강기능식품보다 간 보호 효과가 높음을 알 수 있었다.

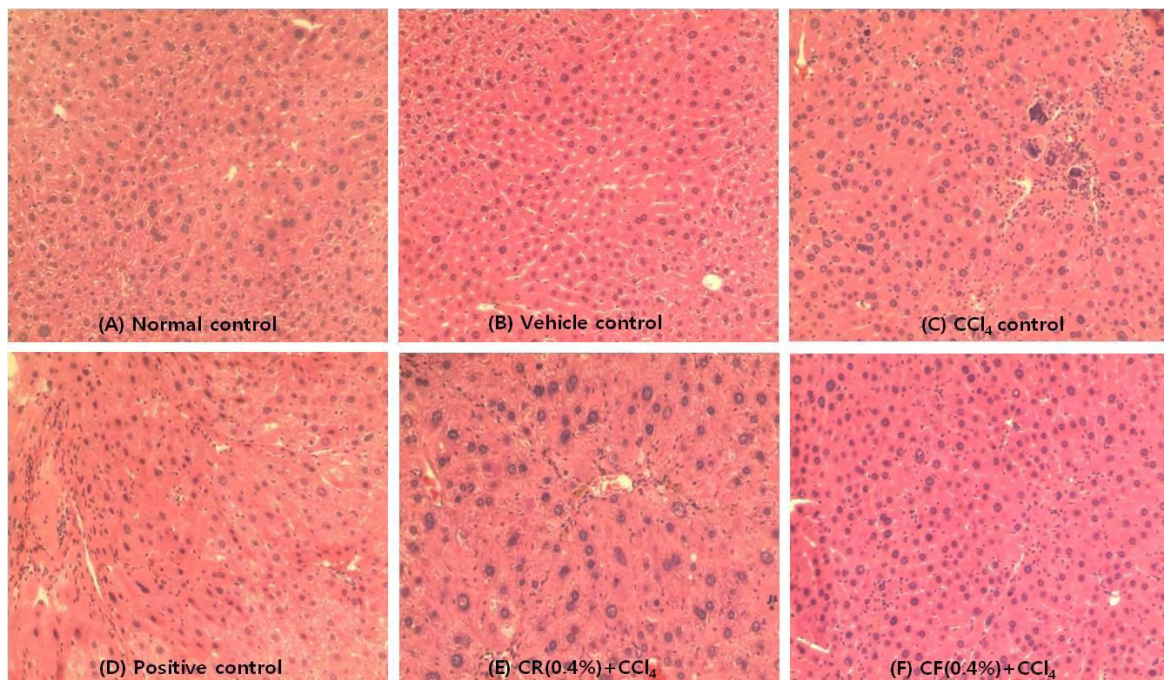


그림 3-2-40. 사염화탄소 유도 간 독성 모델에서 발효율금 (CF)이 간에 미치는 영향을 조직병리학적으로 분석하기 위한 간조직의 H&E 염색 결과(100X) (A) Normal control, (B) Vehicle control, (C) CCl<sub>4</sub> control, (D) Positive control, (E) CR(0.4%)+CCl<sub>4</sub>, (F) CF(0.4%)+CCl<sub>4</sub>



⑤ 간조직의 M&T stain

사염화탄소 투여로 일어난 간 섬유화의(fibrosis)의 정도와 이에 대한 발효 울금의 보호효과를 관찰하기 위해 간 조직을 M&T stain한 결과이다. M&T stain에서 정상적인 간 조직은 모두 붉은 색으로, 콜라겐은 푸른색으로 염색된다. 정상군은 별다른 이상이 없었지만 손상된 간을 재생하는 수복과정에서 생성되는 콜라겐의 정도를 관찰해 볼 때, 사염화탄소실험군(CCl<sub>4</sub> control)은 많은 간 손상을 입은 것으로 나타난다(C). 사염화탄소군은 간 소엽(hepatic lobules) 가장자리로 섬유화된(fibrotic cellular) 세포들이 자리하며 푸른색 띠를 이룬다. 이는 울금(CR) 과 양성 대조군의 경우에도 유사한 현상을 보인다(D, E). 그러나 발효울금(CF)은 섬유화된 세포가 현저히 줄어들었으며 콜라겐의 생성 정도가 다른 실험군에 비해 현저히 낮음을 알 수 있다(F).

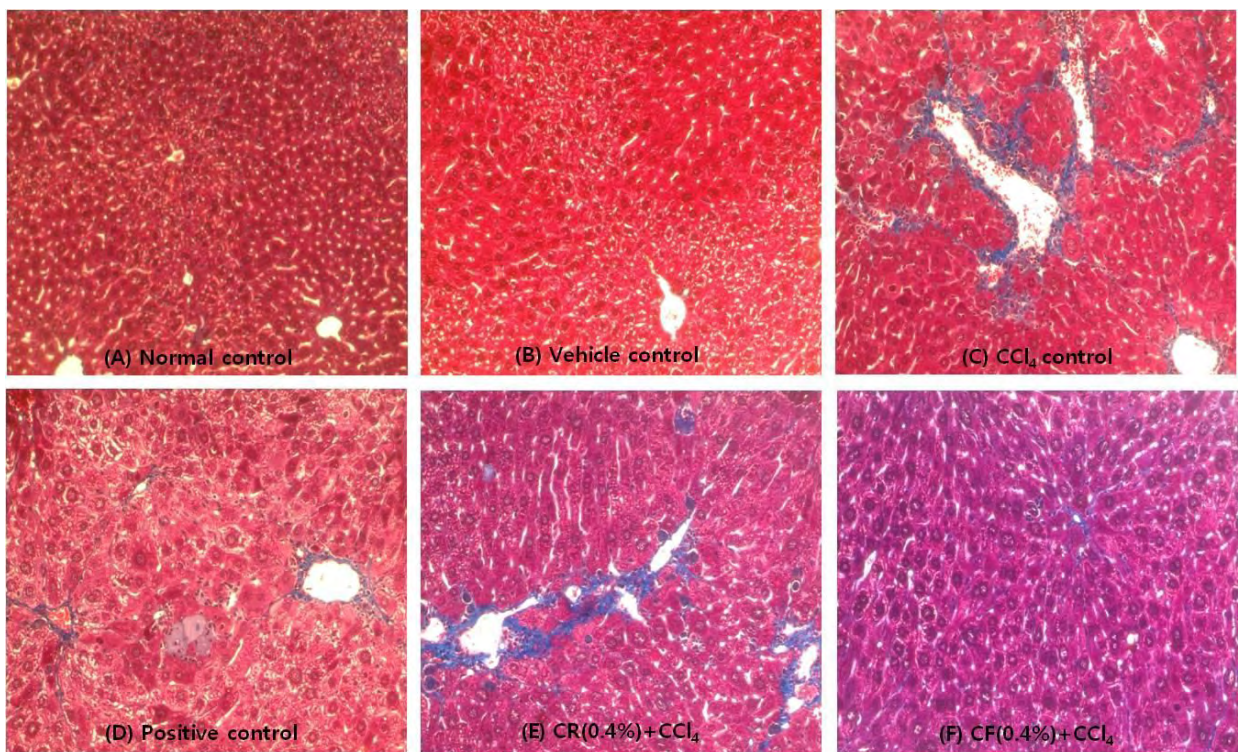


그림 3-2-41. 사염화탄소 유도 간 독성 모델에서 일어나는 간 섬유화의 조직병리학적 변화와 발효울금에 의한 간 보호 효과를 관찰하기 위한 간 조직의 Masson Trichrome 염색 결과(X100)(A) Normal control, (B) Vehicle control, (C) CCl<sub>4</sub> control, (D) Positive control, (E) CR(0.4%)+CCl<sub>4</sub>, (F) CF(0.4%)+CCl<sub>4</sub>

⑥ 간 조직의 콜라겐 함량

조직염색에 나타난 간 섬유화의 지표를 정량적으로 나타내기 위해 간 조직내의 콜라겐 함량을 측정된 결과, 사염화탄소 실험군이 간 손상 수복 현상으로 인해 가장 높은 콜라겐 함량을 나타내었다. 사염화탄소 실험군은 정상군 대비 약 15% 정도 콜라겐 함량이 증가하였으며 비발효울금 실험군에서도 콜라겐 함량이 유의적으로 감소하는 것으로 나타났다. 발효울금 실험군에서 사염화탄소 투여군 대비 약 40%에 해당하는 콜라겐 함량이 유의적으로 감소하였으며 이는 양성대조군보다 약 28% 더 감소한 값으로 나타났다. 조직병리학적인 검사결과와 간 조직의 콜라겐 함량으로 볼 때 발효울금 실험군은 사염화탄소로 유도한 간 섬유화에 대한 손상 예방에 효과가 있을 것으로 예상된다.

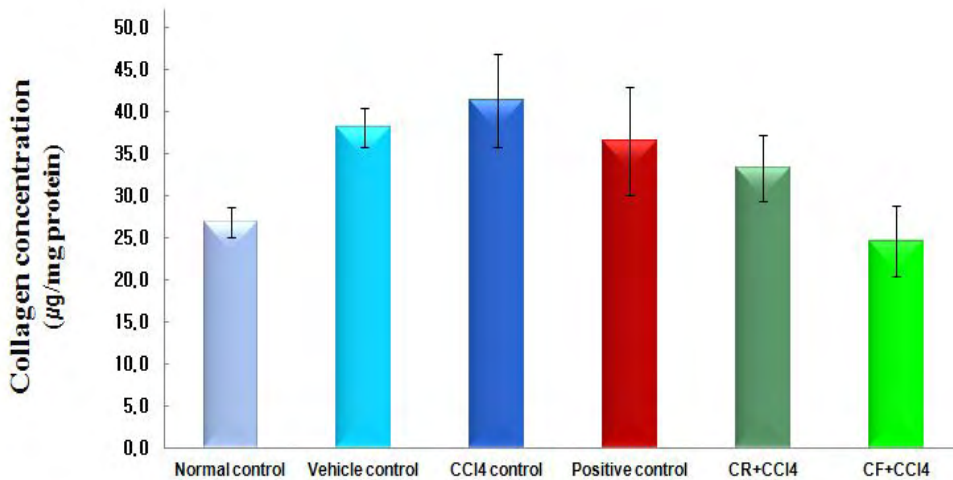


그림 3-2-42. 발효울금에 의한 간 조직의 콜라겐 함량 변화

⑤ 발효울금 식이 간 섬유화 유발 마우스의 대사체 분석

CCl<sub>4</sub>를 통해 간섬유화를 유발한 마우스에 울금과 발효울금을 각각 식이한 후 UPLC-Q-TOF MS를 이용하여 간 대사체를 분석한 결과 R<sup>2</sup>X, R<sup>2</sup>Y, Q<sup>2</sup>값이 각각 0.330, 0.499, 0.151로 미지의 시료를 예측할 수 있는 Q<sup>2</sup>값이 다소 낮기는 하지만 분석 모델 시스템은 잘 형성되는지를 확인하는 R<sup>2</sup> 값이 높게 나와 분석 모델은 잘 형성된 것으로 확인되었으며 7-fold cross validation을 통해 구축된 모델 시스템을 확인한 결과 R과 Q의 Y 축 값이 0.258와 -0.285로 낮게 나와 overloading도 되지 않은 것으로 확인되었다. 분석된 결과를 PLS-DA score 상에서 visualization 시킨 결과 각 시료 그룹의 군집 형성이 잘 되었으며 그룹 서로 간에 차이도 확연히 구별되는 것으로 관찰되었다. 그룹의 차이에 관여하는 물질을 확인하기 위하여 UPLC-Q-TOF MS에 의해 분석된 1259개의 대사체들을 PLS-DA loading plot으로 나타냈으며 이 중 유의적으로 차이 (P<0.05)를 보이는 636개의 대사체를 분석하였다. 5개의 대사물질들 (hypoxanthine, stearoylcarnitine, LysoPC 18:2, LysoPC 18:3, PC)이 그룹간의 차이에 관여하는 주요 물질들로 동정되었다. Hypoxanthine, LysoPC 18:2, LysoPC 18:3의 경우 실험군 간의 함량 차이가 크지 않았으나, stearoylcarnitine은 CCl<sub>4</sub> 투여군에서 감소하였고 울금과 발효울금 식이군에서 증가하였는데, 발효울금 식이군에서 가장 높은 함량을 보였다. 지방산의 대사는 미토콘드리아 내의 β-oxidation에 의해 이루어지는데, stearic acid(C18:0) 같은 장쇄 지방산이 세

포질에서 미토콘드리아 내부로 이동하기 위해서는 carnitine과 결합하여 stearyl carnitine과 같은 acyl-carnitine으로 전환되어야 한다. 따라서 stearyl carnitine의 함량이 높다는 것은 지질 대사가 활발히 일어나고 있음을 시사한다. 본 연구에서 발효율금 식이균의 stearyl carnitine의 함량이 CCl<sub>4</sub> 투여군이나 율금 원료 식이균에 비해 높게 나타난 것은 TG와 TC 함량이 발효율금 식이균에서 가장 낮게 나타난 전임상 결과와 일치하는 경향을 보인다.

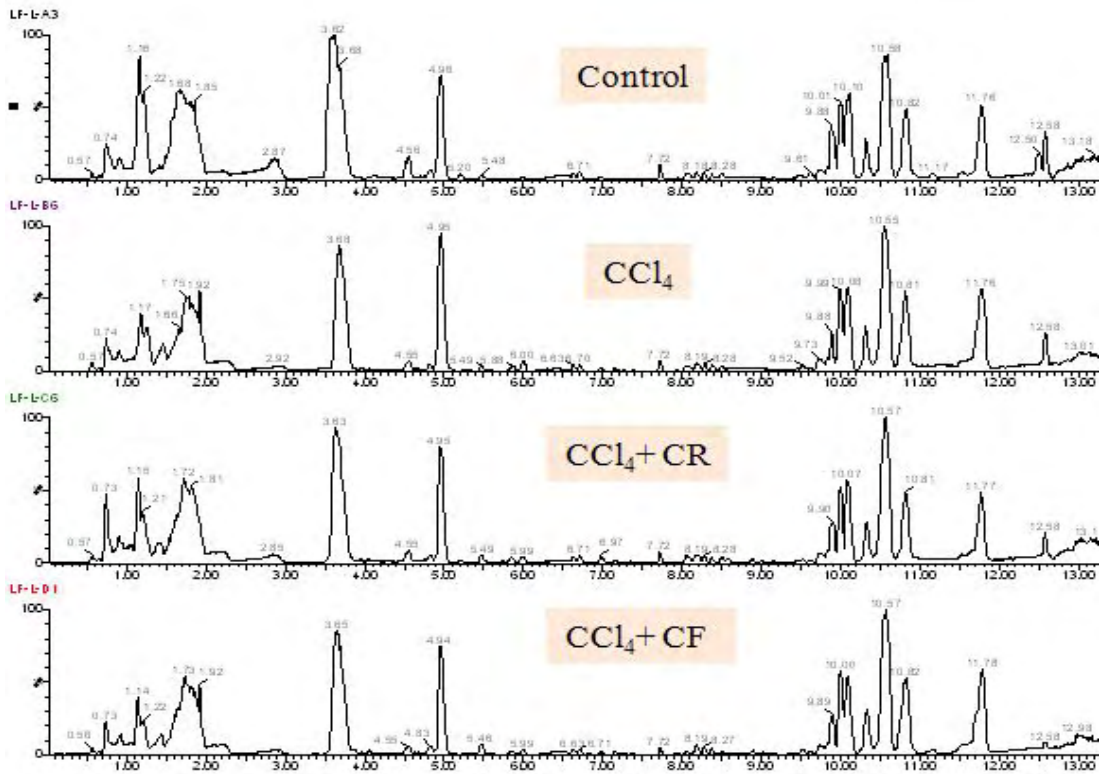


그림 3-2-43. CCl<sub>4</sub>로 간섬유화를 유도한 후 율금과 발효율금을 처리한 마우스의 간 대사체 mass spectra

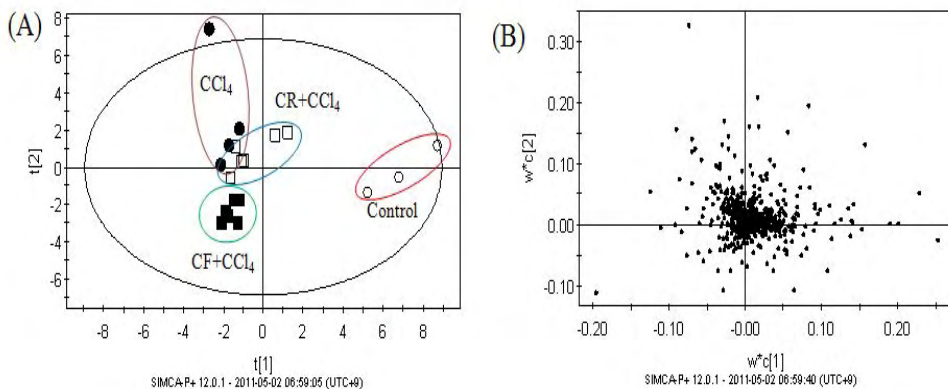


그림 3-2-44. 율금과 발효율금을 처리한 간섬유화 유발 마우스의 간 대사체 mass spectra의 PLS-DA score와 loading plots

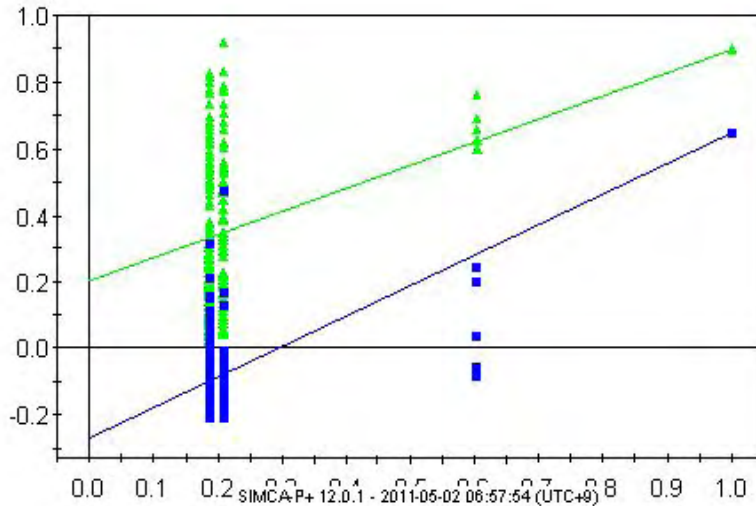


그림 3-2-45. 7-fold cross validation에 의해 분석된 R과 Q 값

표 3-2-23. 울금과 발효울금을 처리한 마우스 간의 주요 대사물질들의 동정 및 fold change

Identity	Fold Change(vs. control)		
	CCl <sub>4</sub>	울금+CCl <sub>4</sub>	발효울금+CCl <sub>4</sub>
Hypoxanthine	0.16	0.20	0.15
Stearoylcarnitine	1.35	3.85	4.85
LysoPC(18:2)	0.67	0.77	0.73
LysoPC(18:3)	0.43	0.54	0.54
PC	78.44	48.35	129.24

⑥ 울금 및 발효울금 식이 간 섬유화 유도 마우스의 microarrays 분석

발효울금을 사염화탄소로 간 섬유화를 유발시킨 마우스에 8주 동안 급여한 뒤 간 조직으로부터 추출한 mRNA 발현량을 Agilent's Mouse Oligo Microarray를 이용하여 분석하였다. 각 샘플의 전사체 발현량을 조사한 후 이들 유전자가 up 또는 down regulation되는 pattern을 이용하여 HCL(Hierarchical clustering)을 수행하였다. 분석결과, 발효 전후의 울금 급여시 유전자의 발현량에 차이가 있음을 확인할 수 있다. 유전자 데이터베이스는 NCBI gene, GeneOntology의 mouse DB를 이용하였고 Agilent's mouse whole genome 44K를 사용하여 약 4만개 이상의 유전자를 대상으로 분석하였다.

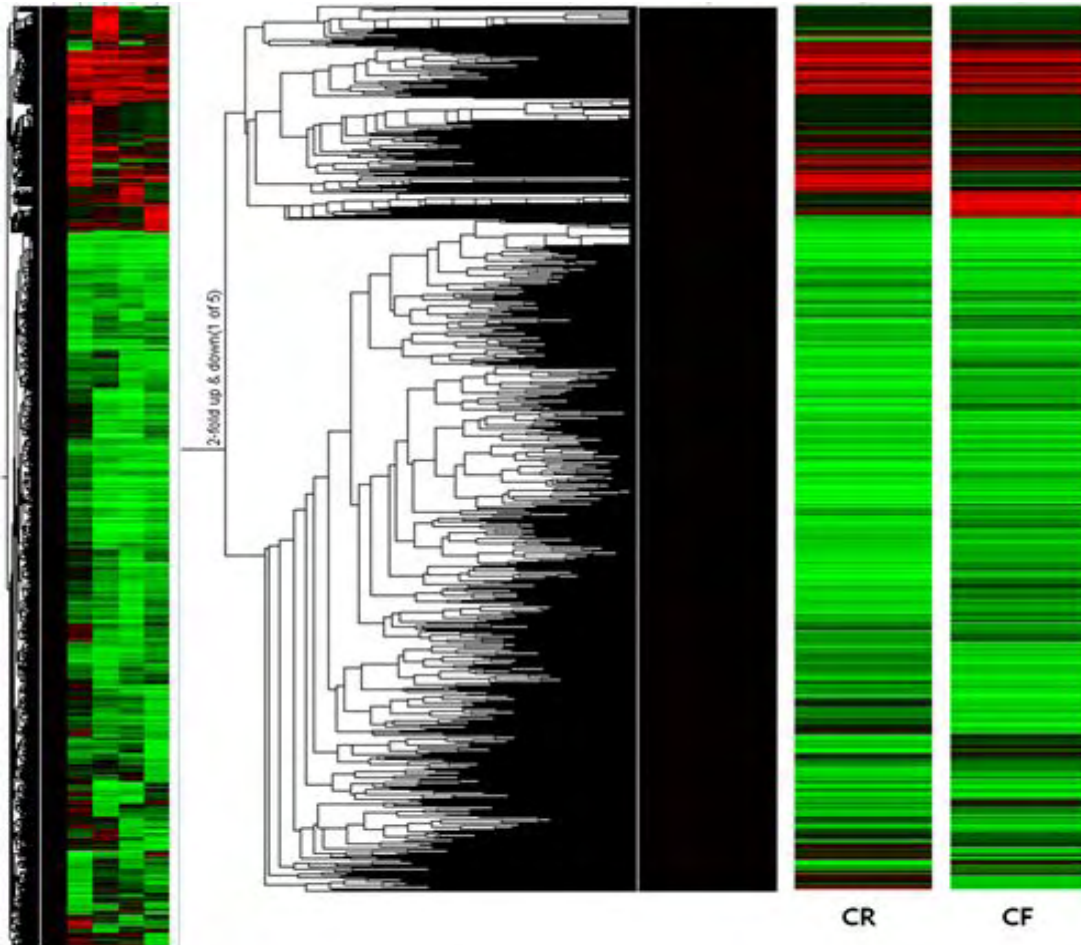


그림 3-2-46. 발효 전후의 울금 식이시 유전자의 발현량 유사도를 이용한 HCL(Hierarchical clustering)

발효울금을 섭취 시 울금 실험군 대비 유전자 발현이 약 1.5배 이상 up-regulation(I/C normalized 1.0 이하, K/C normalized 1.4 이상, K/I normalized 1.5 이상, Flag P 선별)되는 유전자는 총 45개, down regulation(I/C normalized 1.5 이상, K/C normalized 1.0 이하, K/I normalized 0.6 이하, Flag P 선별)되는 유전자는 127개로 나타났다. 그 중에서 간 섬유화나 간 기능 개선과 관련되면서 1.5 fold 이상 up-regulation 된 유전자 5개와 0.6 fold 이하 down-regulation 된 유전자 4개를 선별하여 표기하였다.

표 3-2-24. 발효울금 식이에 의해 up-regulation 되는 유전자

GeneSymbol	Normalized	GeneName
Cyp2c38	6.89	cytochrome P450, family 2, subfamily c, polypeptide 38
Cyp2c37	2.61	cytochrome P450, family 2. subfamily c, polypeptide 37
Maff	2.05	DnaJ (Hsp40) homolog
Hc	1.73	hemolytic complement
Hspa8	1.62	heat shock protein 8

발효율금 식이에 의해 cytochrome P450 유전자 2 종류가 2~6 fold 이상 발현이 증가하였다. cytochrome P450은 앞에서 언급한 것처럼 간 내 약물대사에서 독성물질을 무독화(detoxification) 시키는 물질로 알려져 있어 사염화탄소로 인한 간 조직의 과산화 현상을 완화시키는데 긍정적인 영향을 미칠것으로 예상된다. 그리고 유전자 발현이 1.7 fold 증가한 hemolytic complement(보체)는 항원·항체복합물과 결합하는 단백질로, 감염 및 염증반응 같은 면역반응에서 생물학적 활성을 발현하는 것으로 알려져 있어 발효율금에 의해 간 조직내에서 일어나는 여러 면역 반응에 대한 간접적인 증거로 해석될 수 있다. 발효율금 식이시 cytochrome P450과 같은 항산화 기능을 가진 유전자의 발현 증가로 간 기능 개선에 긍정적인 영향을 미칠것으로 사료된다.

표 3-2-25. 발효율금 식이에 의해 down-regulation 되는 유전자

Gene Symbol	Normalized	Gene Name
<b>Pkhd1</b>	0.14	polycystic kidney and hepatic disease 1
LOC675328	0.24	dimerization cofactor of hepatocyte nuclear factor 1 alpha 1(TCF1)
Gjc3	0.45	Glutathione peroxidase 2 (Gpx2)
<b>Fgfr2</b>	0.70	<b>fibroblast growth factor receptor 2</b>

발효율금 식이에 의해 0.7 fold down-regulation된 유전자 fibroblast growth factor receptor 2는 활성화된 간 정상세포의 증식을 증가시키는 성장인자 중의 하나인 fibroblast growth factor 표면에 존재하는 수용체로 알려져 있다. 이 수용체의 발현을 감소시켜 다른 세포가 분비하는 사이토카인에 대한 감수성을 감소시키고 이와 연계된 간 정상세포의 활성화에 필요한 신호전달을 감소시켜 간 기능 개선에 긍정적인 영향을 줄 수 있을 것으로 예상된다. Glutathione peroxidase 2는 간에서 GSH(Glutathione)가 독성물질과 반응하여 산화형 GSSG로 전환되는 반응에 참여하는 효소로 체내 GSSG/GSH ratio가 높을수록 산화스트레스가 높음을 의미한다. Glutathione peroxidase 유전자 발현의 감소는 발효율금 식이시 cytochrome P450같은 항산화 작용 기능을 가진 다른 물질의 증가로 독성물질이 제거됨에 따른 필요성 감소가 유전자 발현 저하로 나타났을 것으로 예상된다. 그리고 가장 큰 발현 감소를 나타낸 Pkhd1(polycystic kidney and hepatic disease 1) 유전자는 선천성 간섬유증 환자 30%에게서 나타나는 돌연변이 부위로 정확한 기작은 밝혀져 있지 않다.

다. 비알콜성 지방간 개선 활성 평가

고지방 식이(콜레스테롤 1%, lard 10%)를 통해 지방간을 유도한 SD rat을 이용하여 발효미강 복합물, 발효울금, 발효녹차 및 발효갈근의 간기능 개선 활성을 평가하였다. 실험결과 발효미강 발효물과 발효울금에서 지방간 개선활성을 확인하였으나, 발효녹차, 발효노니 및 발효갈근에서는 지방간 개선 활성이 나타나지 않았다. 본 보고서에는 간기능 개선 활성을 보인 발효미강복합물과 발효울금에 대한 결과만을 기재하였다.

(1) 발효미강복합물의 지방간 개선 활성

① 발효미강복합물 식이에 따른 장기 및 부고환 지방 함량

고지방-고콜레스테롤 식이로 비알콜성 지방간이 유도된 쥐는 정상군에 비해 간조직이 비대해졌으며, 부고환 지방함량이 증가한 것으로 나타났다. hepatocellular 발효미강복합물을 식이한 군에서 간조직의 무게는 고지방 식이군과 유의적인 차이가 없었으나, 간조직의 외관 관찰 시 고지방만 식이한 군에 보다는 발효미강복합물 1.0% 식이 군의 간조직에서 붉은 빛이 진하게 관찰되어 간조직내 지방함량이 감소하였음을 예측할 수 있었으며, 이는 간조직 내 총지질함량결과와 일치하였다. 부고환지방함량은 고지방식이군에 비해 hepatocellular 1.0% 식이군과 발효미강복합물 1.0% 식이군에서 유의적으로 감소하는 것으로 나타났다. 부고환지방조직과 같은 복부지방의 증가는 건강상이 위해 요인으로 체지방 함량이 동일하더라도 복부지방 함량이 증가할수록 대사성 합병율이 높은 것으로 알려져 있다. 따라서 발효미강복합물식은 고지방-고콜레스테롤로 인한 복부비만을 억제하고 더불어 대사성 합병률을 낮추는데 효과가 있을 것으로 생각된다.

표 3-2-26. 발효미강복합물 식이에 따른 비알콜성 지방간 유도 랫드의 장기 및 부고환 지방 함량 변화

(g/100g body weight)

처리군	Liver	Kidney	Epididymal fat pad
정상군	2.73±0.10	0.66±0.04	1.44±0.22 <sup>B</sup>
고지방 식이군	3.66±0.10	0.66±0.02	1.81±0.22 <sup>A</sup>
hepatocellular <sup>1)</sup> 1.0%	3.75±0.19	0.74±0.04	1.42±0.24 <sup>B</sup>
미강복합물 1.0%	3.62±0.19	0.82±0.06	1.72±0.16 <sup>A</sup>
발효미강복합물 1.0%	3.68±0.34	0.66±0.04	1.44±0.34 <sup>B</sup>

<sup>1)</sup>hepatocellular: 시판건강기능식품. Each value represents the Mean±S.D.

\*0.5% 식이군은 효과가 미약하여 data 표기에서 제외

② 발효미강복합물 식이에 따른 간조직 내 지질 함량 변화

고지방-고콜레스테롤 식이로 지방간이 유도된 군의 간조직 내 총 지질, 중성지방 및 총 콜레스테롤 함량은 정상군에 비해 월등히 높게 나타났다. 그러나 시판 간기능 개선 건강기능식품인 hepatocellular 및 발효미강복합물을 각각 1%씩 첨가한 고지방-고콜레스테롤 사료 식이군은 총 지질, 중성지방 및 총 콜레스테롤 함량이 감소하는 것으로 나타났다. 특히 발효미강복합물의

경우 고지방-고콜레스테롤 식이군에 비해 총 지질 함량은 45%, 중성지방은 33%, 총 콜레스테롤은 33% 가량 감소하는 것으로 나타나 현재 간기능 개선 건강기능식품으로 시판되고 있는 hepatella 보다 뛰어난 효과를 보였다. 반면, 발효하지 않은 미강복합물은 총 지질, 중성지방 및 총 콜레스테롤 함량이 고지방-고콜레스테롤 사료만을 식이한 군과 유사한 수준으로 검출되었다. 따라서 발효를 통해 미강복합물의 비알콜지방간개선 활성을 증진시킬 수 있을 것으로 생각되며, 발효미강복합물은 고지방-고콜레스테롤 식이로 유도되는 간의 지질대사를 개선함으로써, 간의 손상을 방지하고 간 기능을 유지하는데 효과가 있을 것으로 사료된다.



그림 3-2-47. 발효미강복합물 식이에 따른 비알콜성 지방간 유도 랫드의 간조직 외관

표 3-2-27. 고지방-고콜레스테롤을 식이한 랫드의 간조직내 총지질, 중성지방 및 총 콜레스테롤에 미치는 발효미강복합물의 효과

(mg/g)

처리군	Total Lipid	Triglyceride	Total cholesterol
정상군	17.25±2.86 <sup>C</sup>	2.10±0.65 <sup>C</sup>	0.69±0.09 <sup>B</sup>
고지방 식이군	165.32±31.92 <sup>A</sup>	20.94±4.31 <sup>AB</sup>	1.99±0.50 <sup>A</sup>
hepatella <sup>1)</sup> 1.0%	134.8±26.04 <sup>AB</sup>	13.51±2.72 <sup>B</sup>	1.40±0.30 <sup>AB</sup>
미강복합물 1.0%	173.2±28.66 <sup>A</sup>	22.43±5.07 <sup>A</sup>	2.03±1.17 <sup>A</sup>
발효미강복합물 1.0%	92.40±22.51 <sup>B</sup>	14.05±5.01 <sup>B</sup>	1.33±0.17 <sup>AB</sup>

<sup>1)</sup>hepatella: 시판건강기능식품. Each value represents the Mean±S.D.

\*0.5% 식이군은 효과가 미약하여 data 표기에서 제외

### ③ 발효미강복합물 식이에 따른 혈중 간 손상지표 효소 분석

간기능 지표 효소인 혈청 중 AST 및 ALT는 고지방 식이, 고콜레스테롤 식이 및 알콜 등으로 지방간이 유도되거나 간독성 물질에 의하여 간조직이 손상될 경우 혈중으로 유출되어 활성도가 높아진다고 알려져 있다. 본 실험 결과에서도 정상食이를 공급한 군에 비해 고지방-고콜레스테롤 식이를 급여한 군의 AST 및 ALT 활성이 높은 것으로 나타났다. 그러나 hepatella, 미강복합물 및 발효미강복합물을 혼합한 고지방 사료 식이군에서는 AST의 수치가 고지방-고콜레스테롤 식이군에 비해 떨어지는 것으로 나타났는데, 특히 발효미강복합물은 고지방-고콜레스테롤 식이군에 비해 AST가 약 12% 감소하는 것으로 나타났다. 또한 발효미강복합물 식이



군의 경우 고지방-고콜레스테롤 식이군에 비해 담도계 폐색 또는 간 질환에 의해 활성이 증가하는 ALP가 수치가 약 18% 감소하는 것으로 나타나 고지방-고콜레스테롤 식이로 인해 유도된 간 손상을 억제하는 효과가 있음을 확인할 수 있었다.

표 3-2-28. 고지방-고콜레스테롤을 식이한 랫드의 혈액 중 AST, ALT, ALP 및 LDH 에 미치는 발효미강복합물의 효과

(U/L)

처리군	AST	ALT	ALP	LDH
정상군	84.20±5.64 <sup>BC</sup>	57.00±10.04	198.80±6.58 <sup>C</sup>	211.80±19.11 <sup>B</sup>
고지방 식이군	101.60±7.31 <sup>A</sup>	64.40±8.45	318.00±25.78 <sup>A</sup>	224.00±45.00 <sup>B</sup>
헤파셀리아 <sup>1)</sup> 1.0%	75.40±5.95 <sup>C</sup>	61.60±10.31	273.40±17.10 <sup>B</sup>	222.20±35.68 <sup>B</sup>
미강복합물 1.0%	97.40±10.09 <sup>AB</sup>	60.60±5.50	271.00±21.26 <sup>B</sup>	304.80±79.16 <sup>A</sup>
발효미강복합물 1.0%	89.60±17.10 <sup>BC</sup>	68.00±10.49	262.80±15.41 <sup>B</sup>	248.00±15.44 <sup>AB</sup>

<sup>1)</sup>헤파셀리아: 시판건강기능식품. Each value represents the Mean±S.D.

\*0.5% 식이군은 효과가 미약하여 data 표기에서 제외

#### ④ 발효미강복합물 식이에 따른 혈중 지질농도 분석

정상군에 비해 고지방-고콜레스테롤 식이군의 경우 중성지방, 총 콜레스테롤, LDL-콜레스테롤은 높게 나타났으며, HDL-콜레스테롤은 낮게 나타났다. 그러나 헤파셀리아, 미강복합물 및 발효미강복합물을 1.0% 식이한 실험군들은 고지방-고콜레스테롤 식이군에 비해 중성지방, 총 콜레스테롤, LDL-콜레스테롤은 낮게 나타났으며, HDL-콜레스테롤은 높게 나타나 혈중지질농도 상승 억제효과를 보였다. 특히 발효미강복합물의 경우 중성지방, 콜레스테롤, LDL-콜레스테롤이 고지방-고콜레스테롤 식이군에 비해 27%, 19% 및 33% 가량 감소하였으며, HDL-콜레스테롤은 23% 가량 증가하여 시판 건강기능개선 건강기능식품이 헤파셀리아보다 효과가 높은 것으로 나타났다. 미강복합물도 혈중지질을 고지방-고콜레스테롤 식이군에 비해 개선시키기는 하였으나, 그 효과가 발효미강복합물보다는 떨어지는 것으로 나타났다.

표 3-2-29. 고지방-고콜레스테롤을 식이한 랫드의 혈액 중 중성지방, 총 콜레스테롤, LDL-콜레스테롤 및 HDL-콜레스테롤에 미치는 발효미강복합물의 효과

(mg/dL)

처리군	Triglyceride	Total Cholesterol	LDL-Cholesterol	HDL-Cholesterol
정상군	56.60±10.42 <sup>C</sup>	66.24±4.44 <sup>B</sup>	12.60±3.38 <sup>C</sup>	64.00±6.16 <sup>A</sup>
고지방 식이군	98.20±19.19 <sup>A</sup>	82.40±14.80 <sup>A</sup>	28.00±8.92 <sup>A</sup>	42.60±1.62 <sup>C</sup>
헤파셀리아 <sup>1)</sup> 1.0%	79.40±5.50 <sup>AB</sup>	73.80±7.44 <sup>AB</sup>	22.40±4.72 <sup>AB</sup>	49.80±3.54 <sup>B</sup>
미강복합물 1.0%	82.80±13.66 <sup>AB</sup>	66.40±6.02 <sup>B</sup>	18.20±4.07 <sup>BC</sup>	46.20±5.91 <sup>BC</sup>
발효미강복합물 1.0%	72.20±9.83 <sup>BC</sup>	67.20±5.84 <sup>AB</sup>	19.00±2.28 <sup>BC</sup>	52.80±6.88 <sup>B</sup>

<sup>1)</sup>헤파셀리아: 시판건강기능식품. Each value represents the Mean±S.D.

\*0.5% 식이군은 효과가 미약하여 data 표기에서 제외

(2) 발효울금의 비알콜성 지방간 개선 활성 평가

고지방-고콜레스테롤 식이로 지방간이 유도된 랫드에 발효울금을 0.5 및 1.0% 식이 시, 0.5%에서는 비알콜성 지방간 개선 활성이 관찰되지 않았으나, 1.0% 식이 시 부고환지방량 감소, 간 손상의 지표인 ALT, AST, ALP 및 LDH 감소(10-31%), 간 조직내 TG 및 TC 감소(15-48%) 효과가 확인 되었다. 효능을 보인 1.0% 식이량으로 부터 인체적정섭취량을 도출한 결과, 발효울금은 하루 6-7 g섭취 시 비알콜성 지방간 개선 활성을 기대할 수 있을 것으로 생각된다.

① 발효울금 식이에 따른 장기 및 부고환 지방 함량

고지방-고콜레스테롤 식이로 비알콜성 지방간이 유도된 쥐는 정상군에 비해 간조직이 비대해졌으며, 부고환 지방함량이 증가한 것으로 나타났다. hepatocellular 발효울금을 식이한 군에서 간조직의 무게는 고지방 식이군과 유의적인 차이가 없었으나, 간조직의 외관 관찰 시 고지방-고콜레스테롤 식이군에 보다는 발효울금 1.0% 식이 군의 간조직에서 붉은 빛이 진하게 관찰되어 간조직 내 지방함량이 감소하였음을 예측할 수 있었으며, 이는 간조직 내 총지질 함량이 고지방식이군에 비해 48% 감소한 결과와 일치하였다. 또한 발효울금 1.0% 식이시 부고환지방함량이 고지방식이군에 비해 10% 가량 감소하는 것으로 나타나 발효울금 섭취가 랫드의 장기 내 지방축적을 다소 억제할 것으로 기대된다.

표 3-2-30. 발효울금 식이에 따른 비알콜성 지방간 유도 랫드의 장기 및 부고환 지방 함량 변화 (g/100g body weight)

처리군	Liver	Kidney	Epididymal fat pad
정상군	2.73±0.10	0.66±0.04	1.44±0.22 <sup>C</sup>
고지방-고콜레스테롤 식이군	3.66±0.10	0.66±0.02	1.81±0.22 <sup>V</sup>
hepatocellular <sup>1)</sup> 1.0%	3.75±0.19	0.74±0.04	1.42±0.24 <sup>C</sup>
울금 1.0%	3.62±0.19	0.82±0.06	1.74±0.40 <sup>A</sup>
발효울금 1.0%	3.68±0.34	0.66±0.04	1.64±0.56 <sup>B</sup>

<sup>1)</sup>hepatocellular: 시판건강기능식품. Each value represents the Mean±S.D.

\*0.5% 식이군은 효과가 미약하여 data 표기에서 제외

② 발효울금 식이에 따른 간조직 내 지질 함량 변화

고지방-고콜레스테롤 식이로 지방간이 유도된 고지방 식이군의 간조직 내 총 지질, 중성지방 및 총 콜레스테롤 함량은 정상군에 비해 월등히 높게 나타났다. 그러나 시판 간기능 개선 건강기능식품인 hepatocellular, 울금 및 발효울금을 각각 1%씩 첨가한 고지방-고콜레스테롤 사료 식이군은 총 지질, 중성지방 및 총 콜레스테롤 함량이 감소하는 것으로 나타났다. 발효울금의 경우 고지방-고콜레스테롤 식이군에 비해 총 지질 함량은 48%, 중성지방은 42%, 총 콜레스테롤은 15% 가량 감소하는 것으로 나타나 현재 간기능개선 건강기능식품으로 시판되고 있는 hepatocellular보다 뛰어난 효과를 보였다. 울금 역시 control군에 비해 총 지질, 중성지방이 감소하는 하였으나, 발효울금 보다 효과가 미약하여, 발효를 통해 울금의 비알콜성 지방간질환 개선 활성이 증가한 것을 알 수 있었다.



그림 3-2-48. 발효울금 식이에 따른 비알콜성 지방간 유도 랫드의 간조직 외관

표 3-2-31. 고지방-고콜레스테롤을 식이한 랫드의 간조직내 총지질, 중성지방 및 총 콜레스테롤에 미치는 발효미강복합물의 효과

(mg/g)

처리군	Total Lipid	Triglyceride	Total cholesterol
정상군	17.25±2.86 <sup>D</sup>	2.10±0.65 <sup>C</sup>	0.69±0.09 <sup>C</sup>
고지방-고콜레스테롤 식이군	165.32±31.92 <sup>A</sup>	20.94±4.31 <sup>A</sup>	1.99±0.50 <sup>AB</sup>
헤파셀리아 <sup>1)</sup> 1.0%	134.8±26.04 <sup>AB</sup>	13.51±2.72 <sup>B</sup>	1.40±0.30 <sup>BC</sup>
울금 1.0%	108.60±19.49 <sup>BC</sup>	17.67±4.39 <sup>AB</sup>	2.57±0.28 <sup>A</sup>
발효울금 1.0%	86.20±15.04 <sup>C</sup>	12.28±2.82 <sup>B</sup>	1.71±0.52 <sup>B</sup>

<sup>1)</sup>헤파셀리아: 시판건강기능식품. Each value represents the Mean±S.D.

\*0.5% 식이군은 효과가 미약하여 data 표기에서 제외

### ③ 발효울금 식이에 따른 혈중 간 손상지표 효소

ALT 및 AST는 간세포에 정상적으로 존재하는 효소로 간 손상 연구에 있어 가장 유용한 지표 중 하나로 간세포의 피사와 간조직의 파괴가 진행됨에 따라 혈중으로 유리되기 때문에 간 손상 시 혈액에서 높은 수준으로 검출된다. ALP은 담즙이 간세포에서 배출이 잘 안되거나 담도가 막혔을 경우, LDH는 효소를 내포한 조직이 파괴될 때 혈액 중으로 유출되는 효소로 급성 간염, 초기 간암 등에서 수치가 현저하게 상승 상승하는 것으로 알려져 있는데, 본 실험 결과 정상군에 비해 고지방-고콜레스테롤 식이군의 AST, ALT, ALP 및 LDH 수치가 높은 것으로 나타났다. 그러나 헤파셀리아, 울금 및 발효울금을 식이한 실험군에서는 AST와 ALP 수치가 고지방-고콜레스테롤 식이군에 비해 떨어지는 것으로 나타났는데, 특히 발효 울금의 경우 고지방-고콜레스테롤 식이군에 비해 AST와 ALP가 각각 31 및 25 % 감소하는 것으로 나타나, 비알콜성 지방간질환으로 인해 간 손상을 억제하는 효과가 있는 것을 확인할 수 있었으며, 헤파셀리아나 울금 식이군에 비해서도 효과가 높은 것으로 나타나 발효를 통해 울금의 간손상 억제 활성이 증가하였음을 확인하였다.

표 3-2-32. 고지방-고콜레스테롤을 식이한 랫드의 혈액 중 AST, ALT, ALP 및 LDH 에 미치는 발효미강복합물의 효과

(U/L)

처리군	AST	ALT	ALP	LDH
정상군	84.20±5.64 <sup>B</sup>	57.00±10.04	198.80±6.58 <sup>C</sup>	211.80±19.11
고지방-고콜레스테롤 식이군	101.60±7.31 <sup>A</sup>	64.40±8.45	318.00±25.78 <sup>A</sup>	224.00±45.00
헤파셀리아 <sup>1)</sup> 1.0%	75.40±5.95 <sup>BC</sup>	61.60±10.31	273.40±17.10 <sup>AB</sup>	222.20±35.68
울금 1.0%	85.00±10.86 <sup>B</sup>	50.80±4.96	242.20±32.44 <sup>BC</sup>	238.00±19.09
발효울금 1.0%	70.60±5.54 <sup>C</sup>	58.60±5.46	239.60±20.92 <sup>BC</sup>	205.40±17.62

<sup>1)</sup>헤파셀리아: 시판건강기능식품. Each value represents the Mean±S.D.

\*0.5% 식이군은 효과가 미약하여 data 표기에서 제외

④ 발효울금 식이에 따른 혈중 지질농도 분석

혈중 지질농도 측정결과, 정상식이군에 비해 고지방-고콜레스테롤 식이군의 경우 중성지방, 총 콜레스테롤, LDL-콜레스테롤은 높게 나타났으며, HDL-콜레스테롤은 낮게 나타났다. 그러나 헤파셀리아, 울금 및 발효울금을 함께 식이한 실험군들은 고지방-고콜레스테롤 식이군에 비해 중성지방, 총 콜레스테롤, LDL-콜레스테롤은 낮게 나타났으며, HDL-콜레스테롤은 높게 나타나 혈중지질농도 상승 억제효과를 보였다. 특히 발효울금의 경우 중성지방과 LDL-콜레스테롤이 고지방-고콜레스테롤 식이군에 비해 25% 및 33%가량 감소하였으며, HDL-콜레스테롤은 20% 가량 증가하여 시판 건강기능개선 건강기능식품이 헤파셀리아보다 효과가 높은 것으로 나타났다.

표 3-2-33. 고지방-고콜레스테롤을 식이한 랫드의 혈액 중 중성지방, 총 콜레스테롤, LDL 콜레스테롤 및 HDL-콜레스테롤에 미치는 발효울금의 효과 (mg/dL)

처리군	Triglyceride	Total Cholesterol	LDL-Cholesterol	HDL-Cholesterol
정상군	56.60±10.42 <sup>C</sup>	66.25±4.44 <sup>C</sup>	12.60±3.38 <sup>C</sup>	64.00±6.16 <sup>A</sup>
고지방-고콜레스테롤 식이군	98.20±19.19 <sup>A</sup>	82.40±14.80 <sup>A</sup>	28.00±8.92 <sup>A</sup>	42.60±1.62 <sup>C</sup>
헤파셀리아 <sup>1)</sup> 1.0%	79.40±5.50 <sup>AB</sup>	73.80±7.44 <sup>AB</sup>	22.40±4.72 <sup>AB</sup>	49.80±3.54 <sup>B</sup>
울금 1.0%	82.00±16.16 <sup>AB</sup>	69.00±6.93 <sup>BC</sup>	18.60±4.36 <sup>BC</sup>	48.60±3.01 <sup>B</sup>
발효울금 1.0%	74.40±15.96 <sup>BC</sup>	70.80±4.12 <sup>BC</sup>	18.80±4.26 <sup>BC</sup>	51.20±2.56 <sup>B</sup>

<sup>1)</sup>헤파셀리아: 시판건강기능식품. Each value represents the Mean±S.D.

\*0.5% 식이군은 효과가 미약하여 data 표기에서 제외

### 제 3 절 안전성 평가 및 예비인체적용시험

유효성평가를 기능성을 입증한 고체발효물 중 개별인정형 건강기능식품으로의 등록가능성을 고려하여 간기능개선용 소재인 발효울금의 개별인정등록을 추진하기 위해 안전성 및 예비인체 적용시험을 진행하였다.

#### 1. 발효울금의 안전성 평가

##### 가. 실험방법

##### (1) 단회투여독성시험

##### (가) 시험동물 및 시료투여

시험동물은 orientbio INC에서 6주령의 ICR계 마우스를 구입하여 2주간 순화시킨 뒤 암수 각 5마리씩 Group당 10마리의 실험동물을 배정하였다. OECD 및 식품의약품안전청에서 제시한 독성평가 가이드라인 참고하여 0, 50, 300, 2000 및 5000 mg/kgbw의 투여용량군을 설정하였고, 물로 현탁시킨 발효울금을 4-6시간 절식시킨 마우스에 존데를 이용하여 투여하였다.

##### (나) 일반증상관찰 및 체중 측정

발효울금 투여 후 마우스의 행동, 호흡, 경련, 피부, 체모, 배설물 상태, 음용수 및 사료섭취량, 체중변화를 관찰하였다. 투여 후 6 시간동안은 매 시간 관찰하였으며, 이 후에는 1일 2회 총 14일간 관찰하였다. 14일 후 혈액을 채취하였으며, 부검하여 각 장기의 무게 측정, 육안관찰을 통해 변화가 인정되는 기관에 대해서는 병리학적 조직 검사를 실시하였다.

##### (다) 혈액학적 검사

18시간이상 절식 시킨 동물의 안와정맥에서 혈액을 채취하였으며, 혈액학적 검사는 채취한 혈액을 EDTA가 함유된 tube에 넣은 후 혈구 분석기로 적혈구수(RBC), 혈색소량(HGB), 헤마토크리트치(HCT), 평균적 혈구용적(MCV), 평균적 혈구 헤모글로빈량(MCH), 평균적 헤모글로빈 농도(MCHC), 혈소판수(PLT), 백혈구수(WBC)를 측정하였다.

##### (라) 혈액생화학적 검사

18시간이상 절식 시킨 동물의 안와정맥에서 혈액을 채취하였으며, 혈장을 분리하여 혈액생화학 분석기로 알라니(ALT), 아스파테이트(AST), 알카라인포스파타제(ALP), 혈액요소질소(BUN), 크레아티닌(Crea), 총 빌리루빈(T-Bili), 총단백(TP), 알부민(Alb), 콜레스테롤(T-chol), 트리글리세라이드(TG)를 측정하였다.

##### (마) 장기중량 측정 및 병리검사

모든 동물에 대하여 심장, 간, 폐, 비장, 신장, 부신, 흉선을 적출하여 각 장기에 대한 무게를 측정하고 육안관찰을 통해 변화가 인정되는 기관에 대해서는 병리학적 조직 검사를 실시하였다.

(2) 2주 반복투여독성시험

(가) 시험동물 및 시료투여

시험동물은 (주)코아텍에서 6주령의 SD 랫드를 구입하여 2주간 순화시킨 뒤 암수 각 5마리씩 Group당 10마리의 실험동물을 배정하였다. OECD 및 식품의약품안전청에서 제시한 독성평가 가이드라인 및 단회투여독성시험 결과를 참고하여 0, 500, 1000 및 2000 mg/kgbw의 투여용량군을 설정하였고, 물로 현탁시킨 발효울금을 SD 랫드에 존데를 이용하여 2주간 반복 투여하였다.

(나) 일반증상관찰 및 체중 측정

발효울금 투여 후 마우스의 행동, 호흡, 경련, 피부, 체모, 배설물 상태, 음용수 및 사료섭취량, 체중변화를 관찰하였다. 14일간 반복투여 종료 시 하룻밤동안 절식시킨 후 혈액을 채취하였으며, 부검하여 각 장기의 무게 측정, 육안관찰을 통해 변화가 인정되는 기관에 대해서는 병리학 적 조직 검사를 실시하였다.

(다) 혈액학적 검사, 혈액생화학적 검사, 장기중량 측정 및 병리검사

혈액학적 검사, 혈액생화학적 검사, 장기중량 측정 및 병리검사는 단회투여독성시험방법에 준하여 실시하였다.

(3) 13주 반복투여독성시험

(가) 시험동물 및 시료투여

시험동물은 (주)코아텍에서 6주령의 SD 랫드를 구입하여 2주간 순화시킨 뒤 암수 각 5마리씩 Group당 10마리의 실험동물을 배정하였다. OECD 및 식품의약품안전청에서 제시한 독성평가 가이드라인 및 2주반복투여독성시험 결과를 참고하여 0, 500, 1000 및 2000 mg/kgbw의 투여용량군을 설정하였고, 물로 현탁시킨 발효울금을 SD 랫드에 존데를 이용하여 13주간 반복 투여하였다.

(나) 일반증상관찰 및 체중 측정

발효울금 투여기간동안 랫드의 행동, 호흡, 경련, 피부, 체모, 배설물 상태, 음용수 및 사료섭취량, 체중변화를 관찰하였다. 13주간의 반복투여 종료 시, 하룻밤동안 절식시킨 후 혈액을 채취하였다.

(다) 혈액학적 검사 및 혈액생화학적 검사

혈액학적 검사, 혈액생화학적 검사는 단회투여독성시험방법에 준하여 실시하였다.

(라) 장기중량 측정 및 병리검사

모든 동물에 대하여 부검을 실시하여 기관 및 조직의 위치 형태, 색조, 크기, 경도 등을 관찰하고 단면에 대해서도 검사하였다. 심장, 간, 폐, 비장, 신장, 위, 비장, 부고환, 난소, 자궁, 췌장 및 뇌는 적출하여 각 장기에 대한 무게를 측정하였으며, 육안관찰을 통해 변화가 인정되는 기관과 간,폐, 신장, 췌장, 위 조직은 10% 포르말린으로 고정한 후 병리학 적 조직 검사를 실시하였다.

#### (마) 회복군 시험

발효울금 반복투여에 의해 발현된 변화가 가역성인지 비가역성인지를 평가하기 위해 고용량군인 2,000 mg/kgbw 투여군에 대해서는 2주간의 회복기간을 두었다. 13주간의 발효울금 투여가 종료된 후 2주간은 정상식이와 음용수만 공급하였다. 2주후 부검하여 상기와 동일할 방법으로 독성발현 유무를 검사하였다.

### 나. 실험결과

#### (1) 발효울금의 안전성평가

##### (가) 단회투여독성시험

본 시험은 마우스를 이용하여 발효울금을 경구로 단회 투여 시 나타나는 독성을 평가하고 개략의 치사량을 구하기 위해 시험물질을 0(대조군), 50, 300, 2,000 및 5,000 mg/kg의 용량으로 암.수 각각 5마리씩 경구투여 하였고, 투여 후 14일 동안 일반증상, 체중변화 및 부검시의 육안적 소견을 관찰하였다. 관찰기간 동안 대조군과 시험물질 투여군에서 투여에 기인한 사망례는 관찰되지 않았다. 사망률 뿐만 아니라 행동이상에서도 발효울금 투여 직후부터 6시간 이내는 물론 관찰이 진행된 14일 동안 대조군과 구별되는 시험물질 투여와 관련된 어떠한 이상소견(보행장애, 행동이상, 옹크림, 설사, 부종, 호흡축박, 몸단장, 뛰어오름, 유루, 무기력증, 구토, 비루, 마비, 유연 등)도 관찰되지 않았으며, 체중변화, 사료 및 음용수 섭취량도 대조군과 유의적인 차이가 나타나지 않았다. 또한 부검 후 적출한 장기에서 중량 변화나 특기할 만한 육안적 이상소견은 관찰되지 않았다. 부검일 안와정맥을 통해 혈액을 채취한 후 백혈구수(WBC), 적혈구수(RBC), 헤마토크리트치(HCT), 평균적 혈구용적량(MCV), 평균 혈구 헤모글로빈량(MCH), 평균 헤모글로빈농도(MCHC), 혈소판수(PLT)를 측정하였다. 대조군과 발효울금투여군의 평균값과 표준편차로 결과를 비교한 결과, 음성 쥐에서는 발효울금 투여에 따른 변화가 관찰되지 않았으나, 자성 쥐의 경우, 적혈구수, 헤모글로빈, 헤마토크리트치가 발효울금투여에 따라 증가하는 것으로 관찰되었지만, 정상범위 내의 증가로 판단된다. 또한 동일한 방법으로 채취한 혈액의 생화학적 분석결과 발효울금을 투여한 모든 실험군과 대조군에서 정상범위를 나타내었으며, 실험 군 간의 통계학적으로 유의성은 없는 것으로 판단된다.

이상으로 발효울금을 마우스에 경구 단회 투여한 결과 개략의 치사량은 암.수 5,000mg/kg 이상으로 판단된다. US Environmental protection agency OPPTS 870.100에 따르면, 일반적으로 반수 치사량이 5000-15000 mg/kg인 물질을 무독성 물질로 규정하고 있어 발효울금은 무독성 카테고리에 해당하는 물질로 판단된다.

표 3-3-1. 발효율금 투여한 ICR계 마우스의 치사율 및 LD<sub>50</sub>

Sex	Group (mg/kg-bw)	Day after treatment															LD50 (mg/kg)	
		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14		
female	0	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	>5,000 mg/kg
	50	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	
	300	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	
	2,000	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	
	5,000	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	
male	0	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	>5,000 mg/kg
	50	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	
	300	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	
	2,000	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	
	5,000	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	

Each value represents the mean ± SD (n=5).

<sup>A-C</sup> Means with different superscripts in the same column are significantly different from each other

(p<0.05, Duncan's multiple range test).

표 3-3-2. 발효율금 투여한 ICR계 마우스의 체중변화, 사료와 음용수 섭취량 및 사료효율

Sex	Group (mg/kg-bw)	No of animal	Initial body weight(g)	Final body weight(g)	Change of body weight(g/day)	Food intake (g/day)	FER(%)*	Water intake (g/day)
female	0	5	26.80±0.70	28.33±1.33	0.14±0.05	4.70±0.11	2.98±0.07	4.32±0.24
	50	5	27.47±1.52	28.02±1.88	0.14±0.07	4.38±0.73	3.24±0.54	4.38±0.30
	300	5	27.50±0.71	29.29±1.50	0.17±0.10	4.87±0.61	3.52±0.45	5.69±1.04
	2,000	5	27.01±0.38	29.32±1.00	0.17±0.05	4.77±0.48	3.58±0.36	5.18±0.07
	5,000	5	27.40±0.85	27.88±1.74	0.06±0.01	4.50±0.22	1.33±0.06	5.06±0.10
male	0	5	34.67±1.03	36.72±0.55	0.15±0.06	6.22±0.34	2.42±0.13	6.33±0.57
	50	5	34.15±1.26	36.94±0.95	0.20±0.11	5.75±0.31	3.48±0.19	5.91±0.80
	300	5	33.63±1.38	36.37±2.19	0.20±0.9	6.56±0.46	3.05±0.21	6.29±0.16
	2,000	5	33.50±2.71	37.37±2.42	0.16±0.10	7.64±1.28	2.12±0.36	5.65±0.86
	5,000	5	34.00±0.89	35.86±0.67	0.13±0.05	6.01±0.55	2.17±0.20	5.91±0.56

Each value represents the mean ± SD (n=5).

<sup>A-C</sup> Means with different superscripts in the same column are significantly different from each other (p<0.05, Duncan's multiple range test).

Feed efficiency ratio(FER) = (Change of body weight /Food intake)\*100



표 3-3-3. 발효올금을 투여한 ICR계 마우스의 장기무게

Sex	Group (mg/kg·bw)	No of animal	Weight of Organs(g/100g·bw)				
			Liver	Kidney	Spleen	Heart	Lung
female	0	5	4.31±0.38	1.21±0.09	0.42±0.10 <sup>AB</sup>	0.51±0.7	0.67±0.04
	50	5	3.88±0.29	1.21±0.08	0.37±0.06 <sup>AB</sup>	0.45±0.02	0.67±0.07
	300	5	4.51±0.11	1.14±0.04	0.45±0.05 <sup>A</sup>	0.44±0.04	0.63±0.09
	2,000	5	4.03±0.25	1.10±0.08	0.38±0.05 <sup>AB</sup>	0.41±0.04	0.58±0.02
	5,000	5	3.66±0.12	1.11±0.09	0.33±0.04 <sup>B</sup>	0.43±0.03	0.61±0.03
male	0	5	4.08± 0.15	1.60±0.18	0.33±0.28	0.46±0.05	0.57±0.02
	50	5	3.74±0.25	1.48±0.16	0.28±0.03	0.42±0.02	0.58±0.05
	300	5	4.23±0.15	1.54±0.12	0.31±0.05	0.45±0.04	0.57±0.06
	2,000	5	4.30±0.32	1.55±0.17	0.29±0.03	0.43±0.04	0.55±0.06
	5,000	5	3.83±0.16	1.69±0.25	0.29±0.03	0.41±0.03	0.59±0.01

Each value represents the mean ± SD (n=5).

<sup>A-B</sup> Means with different superscripts in the same column are significantly different from each other

(p<0.05, Duncan's multiple range test).

표 3-3-4. 발효올금을 투여한 ICR계 마우스의 혈액학적 분석

Sex	Group (mg/kg·bw)	n	WBC (10 <sup>3</sup> /uL)	RBC (10 <sup>6</sup> /uL)	Hb (g/uL)	Hct (%)	MCV (fL)	MCH (pg)	MCHC (g/dL)	Platelet (10 <sup>3</sup> /uL)
female	0	5	5.33±1.03	7.87±0.36	12.72±0.66	42.90±2.00	55.20±0.86	16.46±0.48	29.82±0.49	900.75±184.86
	50	5	4.97±1.49	7.88±0.37	12.12±1.66	42.66±4.27	57.60±6.02	16.28±0.66	28.44±0.49	873.00±143.53
	300	5	6.21±2.09	8.45±0.21	14.05±0.60	46.56±1.66	54.58±1.19	16.74±0.52	30.68±0.41	1092.75±113.16
	2,000	5	5.20±1.72	8.62±0.47	14.64±0.75	46.80±2.64	53.52±1.17	16.84±0.29	31.48±0.91	1152.75±82.06
	5,000	5	5.23±1.42	9.08±0.38	15.06±0.33	51.06±2.67	55.76±4.04	16.46±0.67	29.62±1.56	1141.50±101.4
male	0	5	6.30±2.12	9.25±0.19	14.64±0.25	49.68±0.34	53.74±1.10	15.90±0.32	29.58±0.26	1156.80±118.14
	50	5	5.39±1.50	9.28±0.72	15.12±0.96	49.5±3.65	53.34±0.91	16.30±0.32	30.54±0.31	1136.40±94.40
	300	5	5.94±1.32	8.95±0.72	14.16±1.30	45.66±3.32	51.10±1.20	15.78±0.38	30.92±0.45	1292.25±387.01
	2,000	5	5.69±2.50	8.70±0.32	14.04±0.54	45.72±1.60	52.64±1.98	16.20±0.56	30.82±1.62	1131.00±219.44
	5,000	5	4.49±1.82	8.61±1.36	13.56±2.10	43.92±5.86	52.20±1.72	16.10±0.29	30.84±0.72	1132.80±185.49

Each value represents the mean ± SD (n=5).

<sup>A</sup> Means with different superscripts in the same column are significantly different from each other (p<0.05, Duncan's multiple range test).

표 3-3-5. 발효율금을 투여한 ICR계 마우스의 혈액생화학적 분석

Sex	Group (mg/kg · bw)	N	Protein (g/dL)	Albumin (g/dL)	A/G ratio	Bilirubin (mg/dL)	ALP (U/L)	AST (U/L)	ALT (U/L)	Creatinine (mg/dL)	BUN (mg/dL)	Cholesterol (mg/dL)	Triglyceride (mg/dL)	Glucose (mg/dL)
female	0	5	5.8±0.2	3.4±0.1	1.4±0.1	0.1±0.0	127.2±20.4	125.8±19.8	45.4±26.2	0.4±0.1	20.6±3.0	135.2±21.1	140.8±31.5	133.00±21.2
	50	5	5.9±0.2	3.4±0.1	1.3±0.1	0.1±0.0	132.0±45.2	159.0±40.6	41.2±9.4	0.4±0.2	19.3±2.0	133.4±18.6	105.0±20.5	116.80±20.8
	300	5	6.0±0.3	3.4±0.2	1.4±0.2	0.1±0.1	118.4±20.2	120.6±43.7	52.8±28.7	0.5±0.1	22.9±3.6	148.2±18.2	136.3±39.2	149.50±20.1
	2,000	5	6.0±0.3	3.3±0.3	1.2±0.2	0.1±0.0	123.0±34.5	145.0±52.2	65.5±21.0	0.3±0.2	21.1±3.2	145.8±27.8	113.0±49.3	126.80±20.1
	5,000	5	6.1±0.2	3.5±0.2	1.4±0.1	0.1±0.0	126.4±43.4	135.6±32.3	49.8±16.2	0.4±0.1	18.0±2.2	134.4±14.7	119.8±29.6	103.00±19.7
male	0	5	5.9±0.4	3.1±0.3	1.1±0.2	0.2±0.1	81.4±9.4	130.4±31.0	55.3±16.6	0.4±0.1	24.7±1.4	180.6±26.3	96.4±17.2	142.00±37.0
	50	5	5.9±0.2	3.2±0.1	1.2±0.0	0.2±0.0	89.0±19.2	141.8±29.7	67.3±15.9	0.4±0.0	23.0±2.4	175.8±13.6	97.4±24.3	158.20±36.8
	300	5	5.9±0.3	3.2±0.1	1.2±0.1	0.2±0.0	69.4±13.0	118.0±48.7	49.8±15.6	0.4±0.0	27.1±9.4	152.4±13.3	80.0±23.3	170.00±18.7
	2,000	5	6.0±0.4	3.2±0.1	1.1±0.1	0.2±0.1	78.0±25.8	157.0±39.4	68.3±24.2	0.5±0.0	25.4±4.8	181.8±21.7	94.0±36.1	143.80±32.6
	5,000	5	5.9±0.2	3.2±0.1	1.2±0.1	0.2±0.0	76.8±22.3	115.6±25.4	67.5±25.2	0.3±0.1	22.5±5.9	192.6±29.3	81.0±13.1	140.40±14.2

Each value represents the mean ± SD (n=5).

<sup>A-C</sup> Means with different superscripts in the same column are significantly different from each other (p<0.05, Duncan's multiple range test).

(나) 2주반복 독성시험

본 시험은 발효율금의 반복투여 독성시험시 용량설정 근거로 사용하고자, 6주령 SD 암.수 랫드에 0(대조군), 500, 1,000, 2,000mg/kg의 용량으로 2주간 경구 반복 투여 하였다. 일반증상 관찰, 체중 및 사료섭취량 측정, 혈액 및 혈액생화학적 검사, 부검 시 장기의 중량 측정과 육안적 검사 및 조직병리학적 검사를 수행하였다.

관찰기간 동안 대조군과 시험물질 투여군에서 투여에 기인한 사망례는 관찰되지 않았다. 사망례 뿐만 아니라 일반증상 관찰에서도 시험물질 투여 직후부터 6시간 이내는 물론 투여 및 관찰이 진행된 14일 동안 대조군과 구별되는 시험물질 투여와 관련된 어떠한 이상소견(보행장애, 행동이상, 웅크림, 설사, 부종, 호흡축박, 몸단장, 뛰어오름, 유루, 무기력증, 구토, 비루, 마비, 유연 등)도 관찰되지 않았다. 암컷에서는 체중변화, 사료 및 음용수 섭취량, 사료효율이 대조군과 유의적인 차이가 나타나지 않았다. 수컷의 경우 2,000mg/kg 용량 군에서 체중이 대조군에 비해 감소하는 경향을 보였으나, 사료효율을 계산한 결과 대조군과 차이가 없는 것으로 판단된다. 시험물질 투여군에서의 변 색깔은 대조군의 변 색깔과 비교해 노란빛을 더 띄는 것으로 나타났으나, 이는 발효율금이 가지는 특유의 성상에 의한 것으로 독성과는 무관한 것으로 판단된다. 부검 후 적출한 장기에서 장기중량 변화나 특기할만한 육안적 부검소견은 없었으며, 14일간의 반복투여 후 부검일 안와정맥을 통해 혈액을 취하여 백혈구수(WBC), 적혈구수(RBC), 헤마토크리트치(HCT), 평균적 혈구용적량(MCV), 평균 혈구 헤모글로빈량(MCH), 평균 헤모글로빈농도(MCHC), 혈소판수(PLT)를 측정하였다. 대조군과 시험물질 투여군의 평균치와 비교한 결과, 암.수 모든 투여군에서 시험물질 투여에 따른 변화는 관찰되지 않았다. 또한 동일한 방법으로 채취한 혈액의 생화학적 분석결과 시험물질을 투여한 모든 시험군과 대조군 모두 정상범위를 나타냈다. 이상으로 발효율금에 대한 2주 경구 반복투여 용량결정 시험결과 암.수 모든 시험물질 투여군에서 시험물질로 인한 사망례가 발견되지 않았고, 투여물질에 의한 체중감소, 혈액 및 혈액생화학적 검사, 장기중량 및 부검소견에서 시험물질에 대한 영향이 없는 것으로 인정되어 반복투여독성시험의 고용량은 2,000 mg/kg으로 설정해야할 것으로 판단된다.

표 3-3-6. 발효율금 2주간 반복 투여한 S/D rat의 치사율 및 LD<sub>50</sub>

Sex	Group (mg/kg-bw)	Day after treatment															LD50 (mg/kg)	
		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14		
female	0	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	>2,000 mg/kg
	500	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5		
	1,000	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5		
	2,000	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5		
male	0	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	>2,000 mg/kg
	500	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5		
	1,000	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5		
	2,000	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5		

Each value represents the mean ± SD (n=5).

표 3-3-7. 발효율금을 2주간 반복 투여한 SD rat의 체중변화, 사료와 음용수 섭취량 및 사료효율

Sex	Group (mg/kg·bw)	No of animal	Initial body weight(g)	Final body weight(g)	Change of body weight(g/day)	Food intake (g/day)	FER*	Water intake (g/day)
female	0	5	130.11±2.72	178.28±7.87	3.40±0.21	14.23±0.25	23.87±1.63	25.76±2.64
	500	5	130.69±2.13	175.29±8.34	3.16±0.12	14.34±1.12	22.07±0.57	25.64±3.60
	1,000	5	131.50±2.65	176.46±6.23	3.18±0.17	13.92±1.03	22.83±0.03	24.89±1.27
	2,000	5	131.95±2.51	184.19±9.04	3.80±0.34	14.96±0.26	25.36±2.77	27.32±3.73
male	0	5	171.59±5.95	259.57±11.52	6.46±0.02 <sup>A</sup>	20.03±0.26	32.27±0.63 <sup>B</sup>	30.43±0.07
	500	5	168.39±4.91	257.57±6.41	6.34±0.04 <sup>A</sup>	18.65±0.14	34.19±0.30 <sup>A</sup>	31.49±0.96
	1,000	5	169.23±169.23	257.57±7.41	6.33±0.03 <sup>A</sup>	18.47±0.70	34.24±1.58 <sup>A</sup>	31.56±1.49
	2,000	5	170.55±3.92	249.05±15.87	5.86±0.25 <sup>B</sup>	16.29±0.55	36.01±1.40 <sup>A</sup>	28.04±2.57

Each value represents the mean ± SD (n=5).

<sup>A-B</sup> Means with different superscripts in the same column are significantly different from each other (p<0.05, Duncan's multiple range test).

Feed efficiency ratio(FER) = (Change of body weight /Food intake)\*100

표 3-3-8. 발효율금을 2주간 반복 투여한 S/D rat의 장기무게

Sex	Group (mg/kg·bw)	No of animal	Weight of Organs(g/100g·bw)					
			Liver	Kidney	Spleen	Heart	Lung	Ovary/ Testicle
female	0	5	4.21±0.31	0.81±0.05	0.33±0.02	0.40±0.03	0.66±0.05	0.06±0.01
	500	5	3.74±0.15	0.75±0.03	0.33±0.03	0.42±0.03	0.61±0.05	0.06±0.01
	1,000	5	4.11±0.37	0.77±0.02	0.33±0.04	0.41±0.2	0.63±0.02	0.05±0.01
	2,000	5	3.89±0.24	0.79±0.01	0.32±0.02	0.40±0.1	0.57±0.02	0.05±0.01
male	0	5	4.32±0.02	0.73±0.02	0.28±0.02	0.37±0.03	0.54±0.02	1.23±0.03
	500	5	4.32±0.11	0.76±0.05	0.28±0.02	0.32±0.08	0.53±0.02	1.28±0.03
	1,000	5	4.38±0.33	0.76±0.03	0.29±0.01	0.36±0.02	0.54±0.02	1.24±0.15
	2,000	5	4.39±0.10	0.77±0.03	0.27±0.02	0.37±0.02	0.51±0.03	1.31±0.09

Each value represents the mean ± SD (n=5).

<sup>A</sup>Means with different superscripts in the same column are significantly different from each other

(p<0.05, Duncan's multiple range test).

표 3-3-9. 발효올금을 2주간 반복 투여한 S/D rat의 혈액학적 분석

Sex	Group (mg/k g·bw)	n	WBC (10 <sup>3</sup> /uL)	RBC (10 <sup>6</sup> /uL)	Hb (g/uL)	Hct (%)	MCV (fL)	MCH (pg)	MCHC (g/dL)	Platelet (10 <sup>3</sup> /uL)
female	0	5	6.46±1.00	7.59±0.23	15.22±0.34	49.28±1.03	64.98±1.48	20.02±0.36	30.86±0.43	905.2±84.43
	500	5	7.61±1.77	7.69±0.23	15.36±0.75	49.68±2.38	64.54±1.45	19.96±0.40	30.92±0.40	875.6±78.22
	1,000	5	6.35±1.34	7.59±0.34	15.34±0.38	49.46±1.17	65.22±1.88	20.22±0.53	31±0.16	1016±138.57
	2,000	5	7.34±2.15	7.65±0.28	15.3±0.81	49.3±2.16	64.44±1.24	19.98±0.55	31.06±0.39	943±58.28
male	0	5	6.83±1.30 <sup>B</sup>	7.61±0.31	15.04±0.40	48.4±1.14	63.7±2.22	19.82±0.63	31.08±0.25	809.8±118.75
	500	5	7.56±0.97 <sup>B</sup>	7.78±0.30	15.18±0.53	49±1.97	62.98±0.67	19.52±0.16	30.98±0.13	883.6±53.66
	1,000	5	8.48±1.63 <sup>B</sup>	7.78±0.22	15.46±0.18	49.26±0.68	63.38±1.58	19.86±0.74	31.38±0.60	920.2±35.23
	2,000	5	10.95±1.44 <sup>A</sup>	7.74±0.19	15.12±0.22	48.38±0.83	62.52±1.37	19.54±0.58	31.28±0.49	908.4±98.20

Each value represents the mean ± SD (n=5).

<sup>A-B</sup> Means with different superscripts in the same column are significantly different from each other

(p<0.05, Duncan's multiple range test).

표 3-3-10. 발효올금을 2주간 반복 투여한 S/D rat의 혈액생화학적 분석

Sex	Group (mg/kg · bw)	N	Protein (g/dL)	Albumin (g/dL)	A/G ratio	Bilirubin (mg/dL)	ALP (U/L)	AST (U/L)	ALT (U/L)	Creatinine (mg/dL)	BUN (mg/dL)	Cholesterol (mg/dL)	Triglyceride (mg/dL)	Glucose (mg/dL)
female	0	5	6.32±0.36	3.66±0.18	1.38±0.08	<0.1	272.8±34.94	122±24.62	62.8±6.76	0.50±0.07	18.62±4.06	125.8±16.35	58.4±12.18	112.8±7.85
	500	5	6.58±0.16	3.76±0.15	1.32±0.08	<0.1	259.8±15.88	143.8±36.55	66.4±11.41	0.56±0.08	17.08±3.01	128±7.65	54.4±8.53	102.2±16.45
	1,000	5	6.3±0.16	3.74±0.05	1.46±0.05	<0.1	265±51.60	124.2±12.93	62.2±10.28	0.50±0.03	17.40±0.91	125.2±9.26	61.2±7.98	113.2±8.35
	2,000	5	6.36±.15	3.76±0.11	1.48±0.08	<0.1	265.2±46.09	137.4±9.21	65.2±4.15	0.50±0.04	15.74±2.57	116±6.04	55.2±7.92	109.8±4.27
male	0	5	6.34±0.15	3.58±0.11	1.30±0.00	<0.1	347.2±21.75	109.6±4.83	70.8±6.91	0.48±0.03	18.04±1.49	118.6±136.65	146.2±28.37 <sup>A</sup>	111.6±18.66
	500	5	6.10±0.14	3.52±0.08	1.36±0.05	<0.1	322.0±33.02	125.0±16.64	70.8±2.77	0.45±0.03	16.68±2.12	109.0±10.37	123.6±28.23 <sup>AB</sup>	109.2±5.22
	1,000	5	6.12±0.13	3.56±0.11	1.42±0.08	<0.1	323.2±44.57	111.2±13.99	66.4±3.13	0.46±0.3	18.1±2.18	103.8±4.76	99.6±10.62 <sup>A</sup>	110.2±6.46
	2,000	5	6.06±0.23	3.50±0.14	1.38±0.08	<0.1	354.4±18.46	112.6±11.97	76.4±13.20	0.45±0.03	16.24±1.55	103.8±16.90	103.8±25.55 <sup>AB</sup>	115.2±10.33

Each value represents the mean ± SD (n=5).

<sup>A-B</sup> Means with different superscripts in the same column are significantly different from each other (p<0.05, Duncan's multiple range test).

(다) 13주 반복투여독성 시험

2주 반복독성시험 결과를 토대로 13주 반복투여독성 용량을 0(대조군), 500, 1,000, 2,000 mg/kg으로 설정하고 6주령 SD 암수 랫드에 13주간 경구 반복 투여 하였다. 일반증상관찰, 체중 및 사료섭취량 측정, 혈액 및 혈액생화학적 검사, 부검 시 장기의 중량 측정과 육안적 검사 및 조직병리학적 검사를 수행하였다.

13주간의 반복투여기간동안 대조군과 시험물질 투여군에서 투여에 기인한 사망례는 관찰되지 않았다. 사망례 뿐만 아니라 일반증상 관찰에서도 시험물질 투여 직후부터 6시간 이내는 물론 투여 및 관찰이 진행된 시험 전기간 동안 대조군과 구별되는 시험물질 투여와 관련된 어떠한 이상소견(보행장애, 행동이상, 웅크림, 설사, 부종, 호흡축박, 몸단장, 뛰어오름, 유루, 무기력증, 구토, 비루, 마비, 유연 등)도 관찰되지 않았다. 2주 반복투여독성 시험때와 마찬가지로 시험물질 투여군에서의 변 색깔은 대조군의 변 색깔과 비교해 노란빛을 더 띄는 것으로 나타났으나, 이는 발효율금이 가지는 특유의 성상에 의한 것으로 독성과는 무관한 것으로 판단된다.

암수 모두에서 체중변화, 사료 섭취량, 사료효율이 대조군과 유의적인 차이가 나타나지 않았으나 암컷의 경우 2,000 mg/kg 용량 군에서 음용수 섭취량이 대조군에 비해 증가하는 것으로 나타났다. 암수모두 투여기간 에는 부검 후 적출한 장기에서 장기중량 변화나 특기할만한 육안적 부검소견은 없었으며, 조직병리학적검사에서도 특이할 만한 독성징후는 나타나지 않았다. 또한 13주간 반복투여 종료 후 실시한 백혈구수(WBC), 적혈구수(RBC), 헤마토크리트치(HCT), 평균 적 혈구용적량(MCV), 평균 혈구 헤모글로빈량(MCH), 평균 헤모글로빈농도(MCHC), 혈소판수(PLT) 측정에서 대조군과 시험물질 투여군 평균치와 비교한 결과, 암수 모든 투여군 에서 시험물질 투여에 따른 변화는 관찰되지 않았으며, 동일한 방법으로 채취한 혈액의 생화학적 분석 결과 시험물질을 투여한 모든 시험군과 대조군 모두 정상범위를 나타냈다. 그러나 발효율금 13주 투여 종료 후 2주간 투여를 중지한 회복군에서는 정상범위의 변화이기는 하나 체중대비간 중량, ALP, AST, ALT 및 triglyceride 등이 유의적으로 증가하는 경향 보여, 발효율금섭취로 인해 간 기능 개선 활성이 투여 중지후에는 오히려 간기능 개선활성이 떨어지는 양상을 보였다.

이상으로 발효율금에 대한 13주 반복투여 시험결과 암수 모든 시험물질 투여군에서 시험물질로 인한 사망례가 발견되지 않았고, 투여물질에 의한 체중감소, 혈액 및 혈액생화학적 검사, 장기중량 및 부검소견에서 시험물질에 대한 영향이 없는 것으로 인정되었으므로 설취류에 대한 발효율금의 안전성을 확인할 수 있었다.

표 3-3-11. 발효율금 13주간 반복 투여한 S/D rat의 치사율 및 LD<sub>50</sub>

Sex	Group (mg/kg· bw)	weeks															LD <sub>50</sub>	
		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14		15
female	0	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	실험종료		>2,000 mg/kg
	500	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5			
	1,000	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5			
	2,000	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5			
	2,000 (회복군)	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	
male	0	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	실험종료		>2,000 mg/kg
	500	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5			
	1,000	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5			
	2,000	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5			
	2,000 (회복군)	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	

표 3-3-12. 발효율금을 13주간 반복 투여한 SD rat의 사료 및 음용수 섭취량, 사료효율

Sex	Group (mg/kg·bw)	No of animal	Initial body weight(g)	Final body weight(g)	Change of body weight(g/day)	Food intake (g/day)	FER*	Water intake (g/day)
female	0	5	159.20±8.60	275.12±12.13	1.31±0.10	16.49±0.37	7.97±0.21	25.95±1.75 <sup>B</sup>
	500	5	159.89±5.68	269.99±15.29	1.21±0.08	16.53±0.65	7.30±0.29	26.58±2.45 <sup>B</sup>
	1,000	5	159.52±5.68	267.95±13.81	1.18±0.04	16.11±0.10	7.35±0.32	24.61±3.05 <sup>B</sup>
	2,000	5	159.35±4.66	276.28±17.33	1.25±0.13	16.88±0.49	7.23±0.30	32.03±3.04 <sup>A</sup>
male	0	5	176.32±8.28	463.30±21.33	3.20±0.12	24.24±1.58	13.21±0.37	30.59±3.02
	500	5	174.72±5.18	455.46±46.27	3.17±0.40	25.11±1.34	12.59±0.93	36.33±4.16
	1,000	5	174.78±8.28	469.52±10.38	3.14±0.12	26.44±2.80	12.49±0.64	35.95±4.22
	2,000	5	174.40±6.73	446.23±25.50	3.02±0.21	24.15±0.98	13.05±0.48	36.07±5.93

Each value represents the mean ± SD (n=5).

<sup>A-B</sup> Means with different superscripts in the same column are significantly different from each other (p<0.05, Duncan's multiple range test).

Feed efficiency ratio(FER) = (Change of body weight /Food intake)\*100



표 3-3-13. 발효울금을 13주간 반복 투여한 S/D rat의 체중변화

(g)

Sex	Group (mg/kg·bw)	No of animal	weeks					
			0	3	6	9	13	15
female	0	5	159.20±8.60	177.03±8.82	245.47±9.02	265.54±11.62	275.12±12.13	실험종료
	500	5	159.80±5.68	181.62±8.23	243.21±10.55	258.58±13.13	269.99±15.29	
	1,000	5	159.52±6.42	179.53±7.22	237.39±16.14	251.15±13.18	267.95±13.81	
	2,000	5	159.35±4.66	172.25±11.88	242.70±14.79	261.23±15.36	276.28±17.33	
	2,000 (회복군)	5	159.35±4.66	213.15±5.35	241.07±8.47	256.11±5.99	264.05±9.88	276.18±10.88
male	0	5	176.32±8.28	309.34±18.82	383.91±22.32	428.61±21.31	463.30±21.33	실험종료
	500	5	174.72±5.18	309.77±23.22	379.10±36.82	418.39±36.21	455.46±46.27	
	1,000	5	174.78±8.28	317.24±6.47	392.68±7.86	439.10±6.84	469.52±10.38	
	2,000	5	174.40±6.73	295.4±22.09	377.01±23.21	414.48±23.72	446.23±25.50	
	2,000 (회복군)	5	176.36±0.18	293.97±4.669	390.08±1.13	433.09±3.77	463.27±11.72	498.45±14.67

Each value represents the mean ± SD (n=5).

<sup>A</sup>Means with different superscripts in the same column are significantly different from each other(p<0.05, Duncan's multiple range test).

표 3-3-14. 발효올금을 13주간 반복 투여한 S/D rat의 장기무게

Sex	Group (mg/kg-bw)	No of animal	Weight of Organs(g/100g-bw)								
			Liver	Kidney	Spleen	Heart	Lung	Pancreas	Stomach	Brain	Ovary/ Testicle
female	0	5	2.19±0.14 <sup>B</sup>	0.59±0.04	0.21±0.02	0.35±0.02	0.56±0.03	0.36±0.07	0.66±0.05	0.59±0.02	0.22±0.06
	500	5	2.40±0.27 <sup>B</sup>	0.62±0.04	0.24±0.01	0.35±0.02	0.62±0.04	0.51±0.02	0.64±0.03	0.58±0.04	0.19±0.03
	1,000	5	2.34±0.30 <sup>B</sup>	0.60±0.04	0.23±0.02	0.38±0.15	0.60±0.02	0.52±0.06	0.68±0.13	0.61±0.03	0.20±0.03
	2,000	5	2.50±0.16 <sup>B</sup>	0.63±0.05	0.23±0.02	0.35±0.03	0.52±0.07	0.52±0.07	0.73±0.10	0.60±0.50	0.23±0.05
	2,000 (회복군)	5	3.03±0.27 <sup>A</sup>	0.64±0.04	0.25±0.06	0.32±0.02	0.53±0.03	0.53±0.03	0.80±0.20	0.63±0.04	0.21±0.03
male	0	5	2.50±0.04 <sup>B</sup>	0.58±0.05	0.16±0.01	0.31±0.02	0.42±0.02	0.35±0.03	0.64±0.02	0.37±0.04	0.91±0.07
	500	5	2.61±0.17 <sup>AB</sup>	0.63±0.05	0.17±0.00	0.32±0.02	0.45±0.03	0.40±0.03	0.67±0.18	0.37±0.03	0.96±0.11
	1,000	5	2.74±0.12 <sup>AB</sup>	0.62±0.04	0.19±0.02	0.35±0.03	0.44±0.03	0.42±0.01	0.78±0.12	0.36±0.03	0.94±0.02
	2,000	5	2.81±0.27 <sup>A</sup>	0.65±0.03	0.19±0.02	0.35±0.03	0.48±0.03	0.35±0.05	0.77±0.07	0.42±0.03	0.91±0.06
	2,000 (회복군)	5	2.96±0.18 <sup>A</sup>	0.57±0.03	0.17±0.02	0.30±0.02	0.45±0.02	0.37±0.01	0.73±0.10	0.41±0.02	0.89±0.06

Each value represents the mean ± SD (n=5).

<sup>A-B</sup> Means with different superscripts in the same column are significantly different from each other (p<0.05, Duncan's multiple range test).

표 3-3-15. 발효올금을 13주간 반복 투여한 S/D rat의 혈액학적 분석

Sex	Group (mg/kg-bw)	n	WBC (10 <sup>3</sup> /uL)	RBC (10 <sup>6</sup> /uL)	Hb (g/uL)	Hct (%)	MCV (fL)	MCH (pg)	MCHC (g/dL)	Platelet (10 <sup>3</sup> /uL)
female	0	5	5.46±0.99	8.93±0.23	15.90±0.82	62.98±3.09	70.58±4.83	17.84±1.23	25.26±0.48	817.40±77.18
	500	5	5.25±0.63	8.36±0.33	15.54±0.35	62.3±2.36	74.48±1.47	18.60±0.35	25.00±0.48	828.40±36.14
	1,000	5	5.61±0.63	8.60±0.25	15.98±0.18	64.28±0.56	74.80±2.35	18.58±0.52	24.82±0.17	947.80±36.14
	2,000	5	4.86±0.50	8.44±0.30	14.92±0.79	61.98±5.28	73.36±4.96	17.68±1.28	24.22±2.16	802.60±72.50
	2,000 (회복군)	5	5.89±0.73	8.45±0.24	16.22±0.37	50.50±1.90	59.74±1.15	19.18±0.39	32.14±0.58	831.80±77.11
male	0	5	6.97±1.10 <sup>AB</sup>	9.64±0.35	16.84±0.41	62.70±3.01	65.04±2.41	17.48±0.56	26.94±0.76	844.20±69.28
	500	5	6.72±1.91 <sup>AB</sup>	9.63±0.21	17.20±0.38	64.00±1.78	66.42±1.20	17.86±0.39	26.90±0.59	871.60±117.03
	1,000	5	8.35±1.15 <sup>AB</sup>	9.45±0.22	16.94±0.27	63.42±1.43	67.16±2.14	17.94±0.34	26.74±0.49	879.00±59.03
	2,000	5	9.89±2.00 <sup>A</sup>	9.33±0.25	16.80±0.36	63.74±1.86	68.34±2.44	18.00±0.34	26.38±0.71	854.75±114.15
	2,000 (회복군)	5	6.54±0.70 <sup>B</sup>	9.12±0.26	16.88±0.26	52.38±1.59	57.45±1.96	18.45±0.34	32.18±0.51	901.75±28.21

Each value represents the mean ± SD (n=5).

<sup>A-B</sup> Means with different superscripts in the same column are significantly different from each other (p<0.05, Duncan's multiple range test).

표 3-3-16. 발효올금을 13주간 반복 투여한 S/D rat의 혈액생화학적 분석

Sex	Group (mg/kg ·bw)	N	Protein (g/dL)	Albumin (g/dL)	A/G ratio	Bilirubin (mg/dL)	ALP (U/L)	AST (U/L)	ALT (U/L)	Creatinine (mg/dL)	BUN (mg/dL)	Cholesterol (mg/dL)	Triglyceride (mg/dL)	Glucose (mg/dL)
female	0	5	6.90±0.22 <sup>B</sup>	3.92±0.12	1.32±0.07	0.20±0.05	83.80±10.87 <sup>B</sup>	126.80±11.39	59.40±9.85 <sup>B</sup>	0.85±0.06	21.62±4.22	141.80±13.23	102.80±36.30 <sup>A</sup>	98.80±5.56
	500	5	7.20±0.52 <sup>B</sup>	4.18±0.27	1.40±0.06	0.20±0.05	91.40±14.18 <sup>B</sup>	123.20±14.44	58.80±5.84 <sup>B</sup>	0.87±0.04	22.34±2.50	147.20±21.98	103.40±28.49 <sup>A</sup>	98.00±5.10
	1,000	5	7.28±0.35 <sup>B</sup>	4.16±0.21	1.36±0.08	0.20±0.05	93.20±23.11 <sup>B</sup>	127.80±22.10	57.20±8.63 <sup>B</sup>	0.91±0.03	23.14±1.24	144.20±16.92	86.40±22.18 <sup>B</sup>	96.80±10.35
	2,000	5	7.22±0.44 <sup>B</sup>	4.20±0.17	1.38±0.12	0.15±0.05	101.20±16.08 <sup>B</sup>	119.40±18.77	59.80±4.02 <sup>B</sup>	0.90±0.08	22.00±1.62	140.80±16.36	75.20±34 <sup>B</sup>	102.2±12.60
	2,000 (회복군)	5	8.40±0.46 <sup>A</sup>	4.48±0.20	1.14±0.10	0.11±0.01	217.80±30.02 <sup>A</sup>	155.60±28.22	83.60±17.28 <sup>A</sup>	0.87±0.07	22.24±1.38	146.00±40.98	139.8±33.97 <sup>A</sup>	103.00±9.90
male	0	5	6.90±0.32	3.86±0.12	1.28±0.07	0.11±0.01	121.00±16.50 <sup>B</sup>	118.80±15.71 <sup>B</sup>	58.00±5.10 <sup>B</sup>	0.80±0.05	23.08±2.36	132.20±14.80	84.40±16.55 <sup>B</sup>	105.80±9.66
	500	5	7.30±0.20	4.10±0.06	1.32±0.04	0.13±0.04	139.80±17.23 <sup>B</sup>	113.20±12.51 <sup>B</sup>	64.40±12.88 <sup>AB</sup>	0.89±0.05	25.12±3.88	137.20±20.25	95.80±33.00 <sup>B</sup>	106.6±13.85
	1,000	5	7.24±0.48	4.00±0.23	1.24±0.10	0.11±0.01	149.40±32.88 <sup>B</sup>	121.00±4.34 <sup>B</sup>	66.40±12.29 <sup>AB</sup>	0.83±0.09	26.32±3.55	131.00±10.12	70.60±10.97 <sup>B</sup>	103.8±10.61
	2,000	5	7.20±0.13	3.98±0.15	1.26±0.05	0.15±0.06	160.80±27.83 <sup>B</sup>	115.00±13.02 <sup>B</sup>	54.75±5.36 <sup>B</sup>	0.83±0.5	24.22±2.17	124.20±5.60	80.60±15.73 <sup>B</sup>	100.40±5.99
	2,000 (회복군)	5	7.55±0.15	4.03±0.08	1.13±0.04	0.12±0.01	277.25±32.36 <sup>A</sup>	148.25±9.65 <sup>A</sup>	73.25±7.82 <sup>A</sup>	0.74±0.05	19.80±	127.00±9.57	124.00±16.93 <sup>A</sup>	99.75±6.72

Each value represents the mean ± SD (n=5).

<sup>A-B</sup> Means with different superscripts in the same column are significantly different from each other (p<0.05, Duncan's multiple range test).

2. 발효울금의 예비인체적용시험

가. 실험방법

(1) 인체시험용 발효 울금의 제품정보

인체적용시험용 식품의 기본 정보는 표 3-2-50과 같다.

표 3-3-17. 인체적용시험용 식품 정보

항목	시험식품
일반명	발효울금 과립
성분 및 함량 (1포당)	발효울금 과립 100%, 2,000 mg/포
1일 복용량	6,000 mg (3포)
제형	과립
성상	연한 갈색의 과립
복용방법	1일 3회, 1회당 1포씩 식후 30분경에 충분한 물과 함께 복용
포장단위	1상자 99포 (28+5일분)
저장방법	실온, 차광보관
유효기간	제조일로부터 2년

(2) 발효울금의 복용량 설정

시험식품 복용량은 ICR 마우스 및 SD 랫드를 사용한 비임상시험 자료에 근거하였으며, 실험동물의 투여용량으로부터 Reagan-Show가 제시한 체표면적 표준화법(body surface area normalization method)에 따라 표준 체형군의 성인 및 간질환 발병율과 사망률이 높은 40~60세 성인 남성의 복용량(Human Equivalent Dose(HED))을 추정, 결정하였다.

표준체형군 성인의 BSA 및 Km factor는 미국 식약청 가이드라인 및 참고문헌에 제시된 수치를 사용하였고, 40~60세 성인 남성의 BSA 및 Km factor는 한국인 평균 체중 및 신장에 관한 통계자료<sup>(21)</sup>를 사용하여 구하였다. 마우스와 랫드의 BSA 및 Km factor는 의뢰자가 제공한 시험동물 희생 시점에서 측정된 평균 체중과 신장에 관한 자료를 BSA calculator (<http://www.globalrph.com/bsa2.htm>)에 적용하여 구하였다.

표 3-3-18. Human Equivalent Dose(HED) 산출식

$$Human\ Equivalent\ Doses\ (mg/kg) = Animal\ Dose\ (mg/kg) \times \frac{Animal\ Km}{Human\ Km}$$

$$Km\ factor\ (kg/m^2) = \frac{Body\ Weight\ (kg)}{BSA\ (m^2)}$$

$$BSA\ (Body\ Surface\ Area, m^2) = 0.007184 \times (Height, cm)^{0.725} \times (Weight, kg)^{0.425}$$

표 3-3-19. ICR 마우스 및 SD 랫드 동물시험 Animal Dose

	함량(%)*	Animal Dose(mg/kg-BW)
마우스 시험	0.4	622.22
랫드 시험	1.0	571.43

※ 비임상시험에서 간기능 개선 활성이 인정된 시험군의 사료 중 발효율금 함량

표 3-3-20. 비임상시험 결과를 근거로 한 인체적용용량 산출 결과

		표준체형 성인		40~60세 성인 남성	
		BSA	Km	BSA	Km
		1.62	37.00	1.82	38.97
마우스 시험	BSA 0.01 Km 4.50	4,540.80		5,097.76	
랫드 시험	BSA 0.05 Km 7.00	6,486.60		7,283.02	

1. BSA : Body Surface Area, m<sup>2</sup>  
 2. Km : kg/m<sup>2</sup>  
 3. Human Equivalent Dose : mg/day

ICR 계 마우스와 SD rat을 이용한 동물시험 결과로부터 사람에게 대한 발효율금의 간기능 개선 활성이 인정되는 유효농도는 4540.80~7283.02 mg/day 인 것으로 추정되었다. 시험식품의 포장단위(2,000 mg/포)를 고려하여 복용량이 유효농도에 도달하기 위한 복용회수를 1일 3회로 하였을 때, 1일 복용량은 6000 mg으로 산출되었다.

(3) 시험용 식품의 복용방법

시험식품은 1일 3회, 1회당 1포씩을 매 식후 30분경 적당량의 물과 함께 경구로 복용시켰다. 시험식품은 1포당 발효율금 과립 2,000 mg을 함유하고 있으며, 1일 복용량은 발효율금으로서 6,000 mg에 해당하였고 식품복용기간은 8주간으로 하였다.

(4) 시험용 식품의 포장 및 라벨링

시험용 식품은 피험자 1인이 다음 방문일까지 복용할 분량인 99포(28+5일분)를 1주일분씩 4개의 지퍼팩 포장과 여분의 5일분을 1개의 지퍼팩에 포장되어 있었으며, 이를 1개의 종이상자에 포장된 상태로 피험자에게 제공되었다. 제공된 시험용 식품의 포장 상자에는 다음 사항을 기재한 라벨을 부착하였다.

- (가) '인체적용시험용'이라는 표시
- (나) 식품명, 시험번호, 피험자 배정번호 및 방문차수
- (다) 제조연월일 및 사용기간
- (라) 저장방법
- (마) 제조사의 상호

(바) ‘인체적용시험 외의 목적으로 사용할 수 없음’이라는 표시

(5) 시험용 식품의 관리 및 보관

시험용 식품의 입출고는 시험담당자와 시험용 식품 관리자가 식품 수령과 불출사실 및 수량을 서면으로 기록하고 서명하여 관리하였다. 시험담당자는 시험용 식품 관리자로부터 라벨된 시험용 식품을 수령하여 실온에서 차광하여 보관하였고, 보관용 제품으로서 1인분을 시험 종료 후 6개월까지 보관하기로 하였다. 시험담당자는 각 피험자의 식품 복용 후 4주 및 8주째의 방문일에 미복용 식품과 제품용기를 회수하였고, 잔여수량 확인 후 실온에서 보관하였다. 피험자에게 배정되지 않은 잔여 시험식품과 피험자로부터 회수한 미복용 시험식품은 시험종료 후 의뢰자에게 반송하기로 하였다. 각 피험자별 시험용 식품은 제공 일시와 수량, 잔여식품 회수 일시와 수량을 서면으로 기록하고 시험담당자와 시험용 식품 관리자가 서명하여 확인, 관리하였다. 시험용 식품은 수령 이후 의뢰자의 요청에 따라 피험자에게 제공하는 시점까지 실온에서 차광상태로 보관하였다. 시험 종료 후 피험자로부터 회수한 잔여제품 또한 밀봉 후 피험자번호가 기록된 라벨을 부착하여 실온에서 차광 보관하였다.

(6) 피험자 선정

발효율금의 간기능 개선을 평가하기 위한 피험 대상자는 경미한 간건강 이상자로 선정기준 및 제외기준은 다음과 같다.

(가) 선정기준

- ① 만 20~65세인 성인
- ② GPT가 36~105 IU/L 범위에 속하는 자 (검사기관 정상범위 : 5~35 IU/L)\
- ③ 연구의 목적, 내용 등에 관하여 충분히 설명을 듣고 자발적으로 참여동의서에 서명한 자

(나) 제외기준

- ① B형간염 항원 양성자
- ② C형간염 항체 양성자
- ③ 급성 간염환자 및 간경화의 징후가 인정되는 자
- ④ 황달 징후가 인정되는 자
- ⑤ 담도계 폐색증이 있는 환자
- ⑥ 기타 간장 질환으로 투약이 필요하다고 판단되는 자
- ⑦ GOT가 검사기관 정상범위의 3배를 초과하는 자(검사기관 정상범위 8~40)
- ⑧ 체질량지수(BMI)가 30 kg/m<sup>2</sup>을 초과하는 자
- ⑨ 일주일 평균 음주량이 알코올로서 남성 490 g, 여성 392 g을 초과하는 자
- ⑩ 3년 이내에 위장관 절제술을 받은 병력이 있는 자(맹장제외)
- ⑪ 시험중 결과에 영향을 미칠수 있다고 판단되는 다음 약물을 계속 복용해야 하는 환자
- ㉠ 간기능에 영향을 미칠 수 있는 Isoniazid, rifampin 등의 항결핵제나 비스테로이드성 소염진통제, 항생제 등
- ㉡ Cytochrome P450에 영향을 줄 수 있는 제품
- ㉢ 고지혈증으로 진단받고 투약하고 있는 자
- ㉣ 현재 간기능 개선제를 투약하고 있는 자

- ⑫ 현재 간기능개선 기능성식품을 복용하고 있는 자
- ⑬ 최근 4주 이내에 간기능에 영향을 미칠 수 있는 약물을 복용한 자
- ⑭ 임신, 수유 중인 여성 및 시험기간 중 피임에 동의하지 않는 가임기 여성
- ⑮ 위의 사항들 외에 연구자의 판단으로 시험의 수행이 곤란하다고 판단되는

(다) 중도탈락기준

방문 3의 검사 결과 선정기준 부적합 또는 제외기준 해당

- ① 투여 전 검사에서 발견하지 못한 전신질환이 발견된 피험자
- ② 피험자 또는 법정대리인이 시험 참가동의를 철회하는 경우
- ③ 피험자에게 중대한 이상반응(SAE)이 발생한 경우 또는 이상반응(AE)으로 인해 시험참여가 불가능하거나 시험용 식품 사용 및 관찰이 적절하지 않다고 연구자가 판단하는 경우
- ④ 시험용 식품에 대하여 급성반응(알러지, 과민반응 등)을 보이는 경우
- ⑤ 피험자가 방문하지 않거나 피험자와 연락이 두절되는 경우(피험자의 추적이 안되는 경우)
- ⑥ 방문 4 또는 방문 5에서 사용일지로 평가한 시험용 식품 사용 순응도가 80% 미만인 경우
- ⑦ 시험용 식품을 복용하는 기간 중 연구자의 지시 없이 연구결과 또는 관정에 영향을 미칠 수 있는 약물 또는 제품을 사용한 경우
- ⑧ 방문 4 또는 방문 5에서 일주일 평균 음주량이 남성 490 g/week, 여성 392 g/week를 초과하는 경우
- ⑨ 기타 연구진행이 적합하지 않거나 피험자의 안전과 시험결과에 중대한 영향을 미칠 수 있는 것으로 책임연구자가 판단하는 경우

(라) 병용요법 및 병용투여약물

시험 참가 당시 이미 받고 있던 치료나 약물은 피험자의 복지를 위해 필요하고, 시험용 식품에 영향을 주지 않는다고 시험책임자가 판단하는 경우에는 투여를 허용하였으며, 그 내용을 증례 기록서에 기록하였다. 시험기간 동안 병용요법 및 병용투여 약물은 변경되지 않았다. 아래 제품에 대해서는 시험기간 중 병용을 금지하였다.

- ① 간기능에 영향을 미칠 수 있는 Isoniazid, rifampin 등의 항결핵제나 비스테로이드성 소염진통제, 항생제 등
- ② Cytochrome P450에 영향을 줄 수 있는 제품
- ③ 고지혈증 치료제
- ④ 기타 간질환 치료제 및 간기능개선 기능성 식품 복용

(마) 피험자의 음주, 식이 및 운동

시험기간 중 피험자의 음주, 식이 및 운동에 관한 생활을 시험에 참여하기 전 평소의 생활과 유사한 형태로 유지하도록 피험자에게 교육하였고, 이를 확인하기 위하여 방문 1 및 방문 3에 각 방문일 이전의 연속된 3일의 음주, 식이 및 운동내용을 조사하였다.

시험기간 동안의 식이 내용은 매주 토요일 또는 일요일을 포함하는 연속된 3일의 내용을 기록하도록 하였고, 운동과 음주에 관한 내용은 시험용 식품 사용 여부와 함께 시험기관에서 제공하는 기록지에 매일 작성하도록 하고, 시험참여 전과 비교하여 시험결과에 중대한 영향을 미칠 수 있는 변화가 있는지 여부를 관찰하였다.

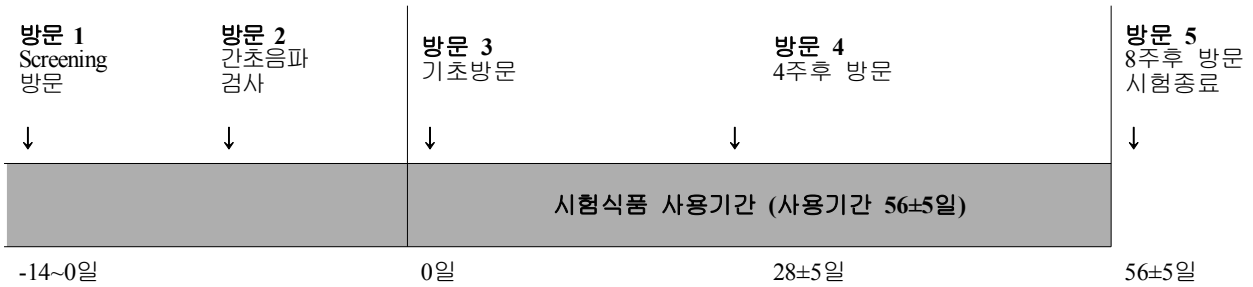


(7) 시험디자인 및 관찰일정

(가) 시험디자인

본 시험은 발효율금 과립이 간기능 개선에 미치는 영향을 평가하기 위하여 동일한 용량이 발효율금을 복용하는 단일 시험군에서 시험식품 복용 전후의 혈액 검사 결과를 반복하여 비교하는 예비 인체적용시험으로 open label, single group assignment, 단일기관 인체적용시험으로 실시하였다.

표 3-2-54. 시험일정



(나) 관찰일정

표 3-3-21. 방문 및 관찰일정

확인/평가항목	방문일	방문 1	방문 2	방문 3	방문 4	방문 5
		Screening (-14일~0일)	초음파검사 (-14일~0일)	0주 (0일)	4주 (28일±5일)	8주 (56일±5일)
피험자 동의서		○				
인구학적 조사		○				
병력/약물투여력 조사		○				
생체활력징후		○		○	○	○
체성분분석		○		○	○	○
선정/제외기준 검토		○		○		
임상병리 검사		○		○	○	○
간초음파검사			○			
임신반응검사		○				
시험용 식품 제공				○	○	
이상반응 모니터링				○	○	○
병용약물 체크		○	○	○	○	○
순응도 조사					○	○

※ 피험자가 동의서에 서명한 후에 본 시험의 모든 과정이 이루어져야 한다.

(다) 시험용 식품의 배정

인체시험에 사용되는 식품은 Screening 방문(방문 1)시 피험자 선정·제외기준을 확인하여 선정 기준에 적합하고 제외기준에 해당되는 사항이 없는 참여자를 대상으로 방문 2에서 간초음파 검사를 진행하여 치료가 필요한 특별한 간질환이 없는 것으로 연구자가 판단한 참여자를 피험자로 선정하였다. 선정된 피험자는 방문 3에서 방문 순서대로 시험용 식품을 배정받았다. 방문 3에서의 검사결과로 피험자 선정·제외기준을 재검토하여 각 피험자의 시험참여 여부를 최종 결정하였고, 선정기준에 부적합하거나 제외기준에 해당하는 피험자는 시험을 중지하고 배정한 시험용 제품은 회수하였다. 방문 3에서의 검사 결과 인체시험에 사용되는 식품의 투여가 결정된 피험자는 인체시험에 사용되는 식품을 배정받아 8주간 복용하였다.

(8) 검사 및 평가

(가) 피험자 기초정보 및 생체징후

방문 1에서 피험자의 연령, 성별, 생년월일 등 인구통계적 자료와 과거의 병력, 투약력, 병용치료, 병용약물, 흡연, 음주정도 등 피험자 기초정보를 조사하였다. 생체징후로는 체중, 신장, 혈압, 체온, 맥박을 측정하였고, 체성분 분석항목은 BMI, 체지방률, 복부지방률을 기록하였다.

(나) 검사항목

① 임상실험실 검사

임상실험실적 검사를 실시하여 피험자의 전신적 건강상태를 평가하였다. 검체 채취는 정확한 검진결과를 위하여 공복상태에서 진행하였으며, 혈액학 검사, 혈액화학 검사, 면역혈청검사, 뇨 검사를 실시하였다. 임상실험실 검사 항목 중 면역혈청검사는 방문 1에만 실시하였으며 다른 항목은 모든 방문에서 실시하였다. 세부 검사항목은 다음표와 같다.

표 3-3-22. 임상실험실 검사 항목

구분	세부 검사항목
혈액학적 검사	RBC, WBC, hemoglobin, hematocrit, platelet, differential count
혈액생화학 검사	GPT, GOT, g-GT, protein, albumin, bilirubin, ALP, total cholesterol, HDL-cholesterol, LDL-cholesterol, BUN, creatinine, TG, glucose, LDH
면역혈청검사	HBs-Ag, Anti-HBs, Anti-HCV
뇨검사	protein, glucose, occult blood, ketone, bilirubin, urobilinogen

② 간 초음파검사

간 초음파검사는 서주미르영상의학과의원에서 실시하였으며 검사결과의 영상자료와 판정결과지를 연구기관에서 수령 후 연구자가 재검토하여, 특별한 치료가 필요한 간질환 유무를 확인하였다.

(다) 순응도 평가

시험용 식품의 복용 순응도는 사용일지의 기록에 따라 평가함을 원칙으로 하였으며, 방문 4와 방문 5에 시험용 제품의 용기와 잔여 제품을 회수하여 사용일지의 기록과 잔여제품의 수를 비교하여 복용 순응도를 확인하였다.

(라) 유효성 평가 기준 및 방법

1차 유효성 평가 변수 : 시험식품 사용 전(방문 3)과 사용 후(방문 4, 5)의 혈청 GPT

2차 유효성 평가 변수 : 시험식품 사용 전(방문 3)과 사용 후(방문 4, 5)의 혈청 GOT, g-GT

평가방법 : 방문 3(0주)과 방문 4(4주), 방문 5(8주)의 유효성 평가변수의 변화를 비교한다.

(9) 안전성 평가방법

(가) 평가대상군

인체시험에 사용되는 식품을 한번이라도 복용하고, 이후 적어도 한번 이상 방문하여 이상반응이나 생체 징후값 또는 임상검사치의 변화 등의 안전성 자료를 확보한 피험자를 안전성 평가 대상으로 하였다.

(나) 평가항목

- ① 이상반응
- ② 임상 검사치의 비정상적인 변화
- ③ 생체징후

(10) 통계분석방법

시험식품의 유효성 평가를 위한 통계분석은 「임상시험 통계지침(KFDA, 2000)<sup>(17)</sup>」에 근거하였으며, 통계패키지 SPSS version 21을 이용하였다. 통계적 유의성을 위한 유의수준은 5%로 설정하였다.

(가) 분석대상군

본 인체시험의 피험자로부터 얻어지는 자료분석 대상군은 시험 이후 최소한 1회 이상 주 평가 변수에 대한 측정이 이루어진 피험자 중 인체시험계획서에 따라 시험을 완료한 피험자를 대상으로 분석하였다.

(나) 결측자료의 분석

유효성평가 변수의 분석을 위하여, 중도 탈락된 피험자에서 발생하는 결측자료(missing data)는 대응하는 환자 바로 직전의 관측값으로 대체하는 LOCF(last observation carried forward)방법을 주 분석법으로 사용하였다. 이 방법은 결측 자료를 상수(constant)로 취급하는 제한된 가정에도 불구하고 사용하기 쉽고 보수적인 결과를 준다는 이유로 현재까지 흔히 사용되는 방법이다<sup>1)</sup>. 하지만 결측치를 처리하는 데 현재까지 공통적으로 권장되는 방법은 없다(임상시험 통계지침, 2000, pp.38).

(다) 분석방법

평가값은 시험용 식품 복용 전의 기초평가값(방문 3에서 구한 평가값)과 시험용 식품 복용 후의 중간평가값(방문 4에서 구한 평가값)과 최종평가값(방문 5에서 구한 평가값)을 사용하였다. 각종 평가 자료는 연속형 변수는 평균과 표준편차로, 범주형 변수는 빈도와 백분율로 요약하였다. 주 분석방법은 정규성에 근거한 모수적 방법인 일원배치 분산분석(One Way ANOVA)을 사용하며, 그 검정 결과를 정규성에 의존하지 않는 비모수적 방법인 Kruskal-Wallis test와도

비교하였다. 각 방문 간의 차이가 있는 경우에는 등분산성 만족 여부에 따라 사후검정을 실시하여 어느 방문이 차이가 있는지를 확인하였다.

나. 시험결과

(1) 피험자 정보

자발적으로 본 인체적용시험에 참여하기로 동의한 대상자 40명을 스크리닝하여 선정기준에 적합하고 제외기준에 해당되지 않는 13명을 피험자로 선정하였다. 선정된 피험자는 남성 11명, 여성 2명으로 남성 성비가 높았으며, 선정된 피험자의 평균 연령은 41.85±7.87세였다.

표 3-3-23. 피험자 성별의 분포(빈도수, %)

성별	인원수(명)	비율(%)
남성	11	84.6
여성	2	15.4
계	13	100

표 3-3-24. 피험자 연령의 분포(빈도수, %)

연령대	인원수(명)	비율(%)
20~29	1	7.7
30~39	5	38.5
40~49	5	38.5
50~59	2	15.4
계	13	100

(가) 시험용 식품 복용 전·후의 음주량 조사

시험용 제품 복용 전·후의 음주에 관한 조사는 각 방문일에 피험자 상담으로 진행하였다. 시험용 제품 복용 전의 조사는 방문일 이전 일주일간의 음주일지를 작성하도록 하였고, 제품 복용 후의 조사는 제품 복용기간 동안의 음주여부를 매일 기록하도록 하였다. 각 피험자가 작성한 음주일지로부터 음용한 주류의 종류 및 용량을 조사하고, 섭취한 일주일 평균 음주량을 계산하였다. 각 방문 간 음주량의 차이를 모수적 방법인 ANOVA와 비모수적 방법인 크루스칼-왈리스 검정으로 분석한 결과, 각 방문 간 음주량은 두 가지 방법 모두에서 통계적으로 유의한 차이가 없었다.

표 3-3-25. 일주일 평균 음주량의 기초통계량 및 통계분석결과

기초통계량	Variable	평균	표준편차	최소값	최대값
	방문 1	91.2	111.7	0.0	329.0
	방문 3	84.9	114.6	0.0	356.8
	방문 4	109.1	151.7	0.0	515.3
	방문 5	104.6	144.3	0.0	515.3

분산의 동질성	Levene 통계량	df1	df2	유의확률
	.248	3	48	.862

ANONVA	Variable	제공합	df	평균 제공	F	유의확률
	집단간	5002.2	3	1667.4	.096	.962
	집단내	833227.7	48	17358.9		
	합계	838229.9	51			

크루스칼-왈리스검정	합계 N	검정통계량	자유도	근사유의수준 (양쪽검정)
	52	0.429	3	0.934

(나) 간초음파 소견

간초음파 검사 결과 13명의 피험자 중 경도의 지방간이 있는 피험자가 5명, 중등도의 지방간이 있는 피험자가 4명, cyst가 확인된 피험자가 3명, 특별한 소견이 없는 피험자가 2명이었다.

표 3-3-26. 시험군별 간초음파 검사 소견의 분포(빈도수, %)

Finding	인원수(명)	비율(%)
Fatty liver, mild	5	38.5
Fatty liver, moderate	4	30.8
Renal cyst	3	23.1
Unremarkable finding	2	15.4

(2) 시험용 식품 복용의 순응도 및 중도탈락자 현황

시험에 참여한 13명의 피험자 중 동의 철회 1명, 중대한 이상반응 1명, 이상반응 2명으로 총 4명이 시험을 중지하였고, 9명이 시험을 종료하였다. 각 방문별 시험제품 복용의 순응도는 ITT 군은 복용 4주 후 83.8±23.3%, 복용 8주 후 94.4±4.3%, PP군은 복용 4주 후 93.4±6.8%, 복용 8주 후 94.3±4.5%였다.

표 3-3-27. 중도탈락자 현황

배정번호	이니셜	성별	연령	탈락사유
E07	ㄱㅈㅇ	여	28	시험참여 동의철회
E09	ㄹㅈㅇ	남	56	중대한 이상반응
E11	ㅈㅈㅈ	남	44	이상반응
E13	ㄱㅈㅈ	남	57	이상반응

표 3-3-28. 식품 복용 순응도

Group	ITT		PP	
	평균	표준편차	평균	표준편차
방문 4	83.8	23.3	93.4	6.8
방문 5	94.4	4.3	94.3	4.5

(3) 유효성평가 변수 분석 결과

시험용 제품 복용 전·후의 유효성 평가 변수인 GPT, GOT 및  $\gamma$ -GT는 세 항목 모두 복용 8주 후에는 모두 감소하는 경향을 나타내었다. 이러한 유효성 평가 변수의 감소 경향이 세 항목 모두 일치하였으므로 임상적으로 의미 있는 변화인 것으로 사료되었으나, 통계적으로는 유의하지 않았다. 전임상연구 결과 GOT와 GPT는 사염화탄소 간섭유화 모델과 지방간 모델에서 모두 유의하게 감소하는 경향을 보였으나 본 임상 연구에서는 GOT는 통계적으로 유의하게 감소한 반면 GPT는 최종 평가에서 통계적 유의성은 없으나 감소하는 것으로 나타났다. 또한  $\gamma$ -GT는 비임상 연구에서는 관찰되지 않았으나 본 임상연구에서는 통계적 유의성은 없으나 감소하는 경향을 보였으며, LDH는 전임상 연구에서와 같이 통계적으로 유의한 감소를 보였다. GPT, GOT,  $\gamma$ -GT 및 LDH는 모두 간기능과 관련하여 주로 사용되고 있는 평가항목으로 본 연구에서 GPT,  $\gamma$ -GT가 통계적 유의성은 없으나 최종 평가에서 모두 감소하는 경향을 보였고, GOT와 LDH는 제품 복용 8주 후의 평가에서 모두 통계적으로 유의한 감소를 보였다. 이러한 결과로부터 발효율금은 임상적으로 간기능 개선에 영향을 미칠 가능성이 높은 것으로 사료되나, 본 임상시험은 예비시험으로서 제한된 피험자로부터 시험제품의 영향을 평가하였고, 또한 대조군과의 비교 결과가 없었으므로 발효율금의 간기능에 대한 명확한 평가를 위한 추가적인 연구가 필요할 것으로 사료된다.

(가) 1차 유효성 평가 변수 결과

1차 유효성 평가변수인 GPT 수치변화를 검사한 결과 시험 대상자의 78%에 해당하는 피험자에서 GPT의 수치가 감소하는 것이 관찰되었는데, 식품 복용 전(방문 3) 57.11±18.62에서 복용 8주 후(방문 5)50.89±20.05로 10.9% 감소하였으나. 결측치를 LOCF법으로 처리하고 모수적 방법인 ANOVA와 비모수적 방법인 크루스칼-왈리스 검정으로 분석한 결과, 각 방문의 GPT 수치는 두 가지 방법 모두에서 통계적으로 유의한 차이가 없었다.

(나) 2차 유효성평가 변수 분석 결과

① GOT

2차 유효성 평가변수인 GOT 수치변화를 검사한 결과 시험을 완료한 피험자 모두에게서 GOT의 수치가 감소하는 것이 관찰되었는데, 발효율금 복용 전(방문 3) 34.33±7.62에서 복용 8주 후(방문 5) 24.67±6.00으로, 최종적으로는 28.2% 감소하였다. 시험제품 복용 전·후 GOT 수치의 차이를 검토하기 위하여 결측치를 LOCF법으로 처리하고 모수적 방법인 ANOVA와 비모수적 방법인 크루스칼-왈리스 검정으로 분석한 결과, 각 방문의 GOT 수치는 두가지 방법 모두에서 통계적으로 유의한 차이가 없었으나, t-test 로 통계처리 시 P<0.05 수준에서 유의적으로 감소하는 것으로 나타났다.

② γ-GT

2차 유효성 평가변수로 선정하였던 γ-GT 수치 변화를 분석한 결과, 피험자의 67%에서 γ-GT의 감소가 관찰되었는데, 식품 복용 전(방문 3) 93.22±116.68에서 복용 8주 후(방문 5) 75.33±64.34로 최종적으로는 19.2% 감소하였다. 결측치를 LOCF법으로 처리하고 모수적 방법인 ANOVA와 비모수적 방법인 크루스칼-왈리스 검정으로 분석한 결과, 각 방문의 γ-GT 수치는 두가지 방법 모두에서 통계적으로 유의한 차이는 없었다.

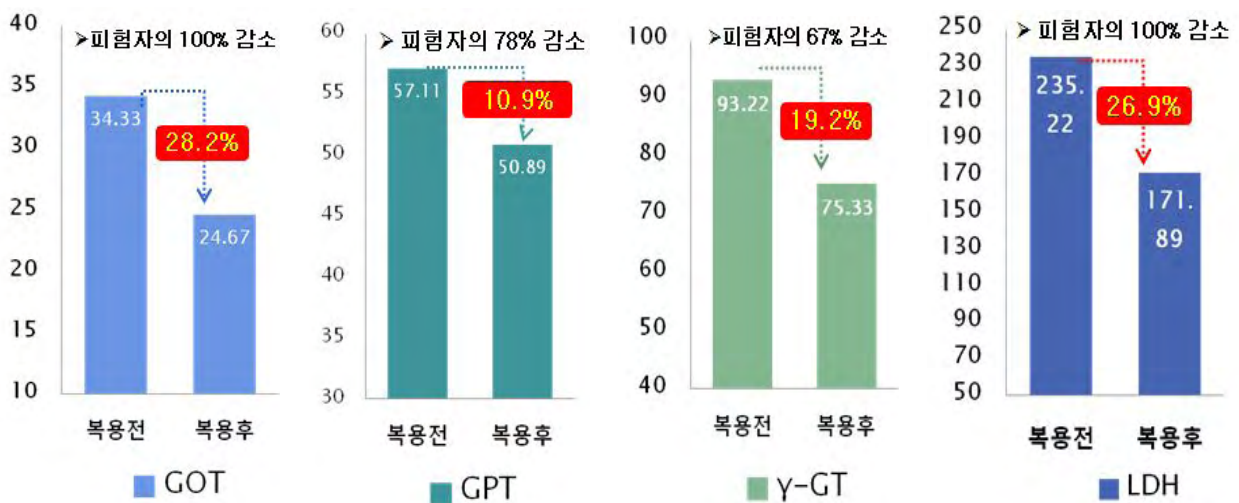


그림 3-3-1. 유효성 평가 변수 분석

#### (다) 기타 유효성평가 변수 분석 결과 - LDH 변화

기타 유효성평가 변수로 혈중 LDH 수치를 분석한 결과, 모든 피험자의 LDH수치가 감소하는 것이 관찰되었다. 발효율금 복용전(방문 3)  $235.22 \pm 29.86$ 에서 복용 8주 후(방문 5)  $171.89 \pm 36.12$  으로 감소하여 26.9%의 감소율을 보였다. 시험제품 복용 전·후 LDH 수치의 차이를 검토하기 위하여 결측치를 LOCF법으로 처리하고 모수적 방법인 ANOVA와 비모수적 방법인 크루스칼-왈리스 검정으로 분석한 결과, 각 방문의 LDH 수치는 두가지 방법 모두에서 통계적으로 유의한 차이가 있었다. 각 방문별 LDH 수치의 분산이 동질하였으므로 방문간 차이의 사후검정은 Tukey HSD, Duncan, Scheffe 검정법에 따랐다. 그 결과 발효율금 복용 후의 LDH 수치가 통계적으로 유의하게 감소한 것을 확인할 수 있었다.

#### (4) 안전성 평가 결과

시험기간 동안 확인된 이상반응은 2명의 피험자에서 속쓰림과 발진이 각각 1건씩 있었고, 중대한 이상반응으로는 1명의 피험자에서 추간판 탈출증으로 인한 입원, 수술이 1건 있었다. E09(남) 피험자의 추간판 탈출증으로 인한 입원 및 수술은 물리적 손상에 의한 외과적 처치를 위한 것이므로 시험용 식품 사용과의 관련성은 '없음'으로 판정되었다. E11(남) 피험자에서 발생한 발진과 E13(남) 피험자에서 발생한 속쓰림, 증상정도는 2건 모두 경증이었다. 상기 이상반응은 제품 복용개시일로부터 속쓰림은 10일, 발진은 18일 후 발생하여 제품 복용 중지 3~4일 후 의학적 개입 없이 회복된 것으로 보아 시험용 식품 사용과의 관련성은 '의심됨'으로 판정되나, 본 연구에서 예상된 이상반응에 해당하며 시험용 식품 복용 후 실시된 모든 검사에서 생체징후 또는 임상검사 결과의 비정상적인 변화는 관찰되지 않았기 때문에 시험제품의 복용시 주의 사항으로 표기할 예정이다. 그러나 시험용 식품 사용과의 관련성이 의심되었으므로, 시험제품의 안전성을 명확히 하기 위하여 추가적인 관찰이 필요한 것으로 사료된다.



## 제 4 절 항당뇨 및 간기능 개선 후보물질의 분리 및 구조결정

### 1. 실험방법

#### 가. 항당뇨 활성 측정실험

##### (1) PTP1B 저해활성측정

본 과제에서 목표로 하는 DSPase로는 인간유래의 VHR과 CDC25를 PTPase로는 PTP1B를 선정하고 이들 효소의 catalytic 부위의 유전자가 cloning된 대장균 벡터를 사용하여 대장균에서 발현하여 정제하여 효소원으로 사용한다. 이 효소는 대장균에서 발현시켜도 활성형의 효소로 발현되고 또한 tagging 단백질로 GST을 융합 발현시켜서 대장균으로부터 분리 정제시에도 손쉽게 얻을 수 있다. 그리고 효소반응의 기질로는 <sup>32</sup>P 방사능동위원소로 표지된 단백질이나 펩타이드 대신에 PTPase의 특성인 tyrosine기 탈인산화 반응을 이용하여 tyrosine에 발색 감광화합물 유도체인 pNPP나 OMFP를 사용하여 발색반응이나 형광광도 분석 등의 간편하게 측정하는 방법을 사용한다.

##### (2) AMPK 효소활성 측정

AMPK 활성화 효능을 측정하기 위하여 C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> myoblast cell line을 사용하여 측정하였다. C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> 세포를 6 wells 플레이트에 접종한 후 10% FBS + DMEM 배지를 사용하여 배양시킨 후 분화를 유도하기 위하여 1% FBS를 포함한 DMEM 배지로 치환하였다. 세포의 분화를 확인한 후 16시간동안 serum free DMEM 배지로 starvation 후에 정해진 농도의 시료를 처리한 후 2시간 동안 배양한 후에 2×SDS sample buffer로 수확 후 sonification을 통하여 protein lysate를 얻었다. 그리고 10% SDS-PAGE 전기영동을 실시하고 semi-dry transfer 기기를 이용하여 PVDF transfer membrane에 단백질을 transfer하였다. Transfer된 단백질을 5% skim milk로 1시간 동안 상온에서 blocking 후 total AMPK와 phospho-AMPK(Thr172) 항체를 이용하여 4°C에서 overnight incubation 한 후 0.1% tween-20이 첨가된 TBS buffer로 3번 washing 후 anti-mouse HRP secondary antibody를 이용하여 immunoblot을 수행하였다. 에너지 대사과정에서 AMPK 활성의 증가는 ACCs(acetyl-CoA carboxylase1 과 2)의 인산화를 증가시키는 것으로 알려져 있으므로 AMPK 활성화를 확인하기 위하여 동일한 방법으로 수득한 단백질을 이용하여 phospho-ACCs를 확인하였다.

#### 나. 간섬유화 치료효능 후보 물질발굴

##### (1) 시약 및 재료

Aanti-alpha-smooth muscle actin (alpha-SMA) 항체는 Neomarker (Fremont, CA, 미국)에서 구입함. HRP-conjugated donkey anti-rabbit IgG, HRP-conjugated rabbit anti-mouse IgG 및 AP-conjugated donkey anti-rabbit IgG는 Jackson Immunochemical에서 구입하였다. Mouse TGF-beta primer는 Bioneer (충북, 음성)에서 합성하였다.

##### (2) 실험세포주 배양

Mouse embryonic fibroblast (MEF) 세포는 영남대학교 광미경교수 연구팀으로부터 분양받았으며, 10% fetal bovine serum (MCF-7) 또는 5% horse serum, 10 ng/ml EGF (MCF-10A)

과 50 U/ml penicillin, 50µg/ml streptomycin을 함유하는 Dulbeccos modified Eagles medium (DMEM)을 배지로 하여  $1-2 \times 10^6$ /ml이 되도록 37°C로 유지되는 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 배양하였다. 실험 전 serum이 없는 배지에 최소 12시간 배양하였다.

### (3) Nuclear extrats의 분리

Dish를 ice-cold phosphate-buffered saline으로 세척하여 scrapping하여 microtube에 옮긴 후 100 µl의 lysis buffer [10 mM HEPES (pH 7.9), 10 mM KCl, 0.1 mM EDTA, 1 mM DTT, 0.5 mM phenylmethylsulfonylfluoride]를 넣고 vortex하여 세포를 완전히 용해하였다. 10분간 얼음에서 incubation 시킨 후 4°C에서 5분간 원심분리하고 nuclei pellet에 50 µl의 extraction buffer (20 mM HEPES (pH 7.9), 400 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 1 mM phenylmethylsulfonylfluoride)를 가하여 ice에서 30분간 추출한 후 15,800g로 4°C에서 20분간 원심분리하여 70°C에 보관하였다.

### (4) Immunoblot analysis

세포를 sterile phosphate-buffered saline으로 두 번 세척한 후 EBC lysis buffer로 lysis 시켰다. 이를 원심분리하며 얻은 상등액을 사용할 때까지 -80°C에 보관하며, sodium dodecyl sulfate (SDS) - polyacrylamide gel electrophoresis과 immunoblot analysis은 본 연구실에서 확립된 방법으로 수행하였다. Protein들은 10% gel electrophoresis로 분리하여 nitrocellulose paper에 전이하고 skim milk 또는 bovine serum albumin으로 blocking 시킨 후 각 항체와 반응시켜서 수행하며 ECL system (Amersham, Buckinghamshire, England)으로 발색하였다.

### 다. 활성물질의 분리와 구조동정

주관기관으로부터 제공된 후보식물에 대하여 PTP1B, AMPK 및 성장세포를 사용한 TGF-beta 및 alpha-SMA 저해활성을 측정하여, 저해활성이 우수하고 용매이행성이 확인된 후보식물의 시료를 대량으로 확보하여 용매분획법, Sephadex LH-20, MCI gel, silica gel, amide, cellulose, amino, cyano, 역상 silica gel 등을 이용한 open column chromatography, 또는 HPLC를 이용하여 순수한 단일물질로 분리 정제한다.

### 라. 활성물질의 구조분석

후보식물로부터 순수하게 단일물질로 분리된 활성물질을 UV, IR, EI-MS, HRFAB-MS, <sup>1</sup>H-, <sup>13</sup>C-, 2D-NMR 등의 기기 분석을 이용하여 그 구조를 동정하여 총 30종의 새로운 PTP1B, AMPK 및 간질환 저해인자를 저해하는 화합물을 분리정제하여 주관기관의 표준화 사업을 지원하였다.

## 2. 실험결과

### 가. 당뇨 치료효능 후보물질의 분리

#### (1) 발효 혼합물로부터 항당뇨 치료 효능 후보 물질의 분리

미강복합발효물로부터 항당뇨 효능물질을 분리하기 위하여 발효전 혼합물 1 kg과 발효후 혼합물 1kg을 각각 메탄올로 추출한 뒤 용매분획하여 PTP1B, alpha-glucosidase inhibitory activity, MAO 저해활성을 측정하였다. 대조군으로 ursolic acid를 사용하여 PTP1B 저해활성을 측정한 결과 발효전 혼합물 (Mix)과 발효후 혼합물 (F.Mix)의 유기 용매층으로 활성이 넘어간 것을 확인하였다. 따라서 발효 후 혼합물을 대량 분획하여 항 당뇨후보물질을 분리하였다 (그림 3-4-1).

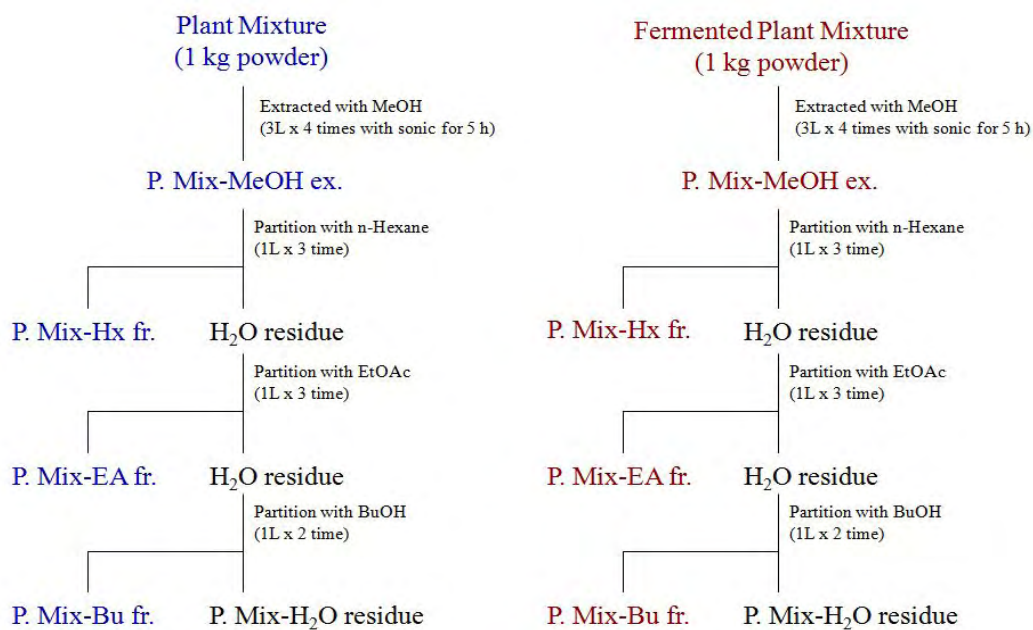


그림 3-4-1. 발효전 혼합물과 발효 후 혼합물의 용매 분획방법

Final Con	30 ug/mL											
	Mix-MeOH	Mix-Hx	Mix-EA	Mix-Bu	Mix-Water	F,mix-Me	F,Mix-Hx	F,Mix-EA	F,Mix-Bu	F,Mix-W	DMSO	Ursolic
Temperature	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
26.3	0.0658	0.0683	0.0768	0.069	0.1711	0.063	0.069	0.0691	0.0713	0.1305	0.3058	0.0609
	0.0656	0.0697	0.0738	0.0746	0.1257	0.0599	0.0695	0.0691	0.0801	0.1665	0.1268	0.0537
aver	0.0657	0.069	0.0753	0.0718	0.1484	0.06145	0.06925	0.0691	0.0757	0.1485	0.2163	0.0573
% Inh	91.6616	89.6531	85.8186	87.9489	41.3268	94.2483	89.5009	89.5922	85.5752	41.266		96.7742

그림 3-4-2. 발효전 혼합물과 발효 후 혼합물의 PTP1B 저해 활성 측정

PTP1B 저해활성을 측정한 결과 에틸아세테이트 추출물에서 활성이 검출되었기에 발효 후 대사체로부터 활성물질을 확인하고자 분리를 시도 하였다. 활성을 나타내는 에틸아세테이트와 부탄올 분획을 합하여 역상 칼럼을 사용하여 12개의 분획으로 나눈 뒤 각각 분획의 TLC pattern을 비교하여 5개의 소분획으로 나누었다. PM-1과 PM-5에서 강한 PTP1B 저해활성을 나타내어 HPLC를 통하여 화합물의 소분획을 나누는 과정을 추가적으로 실시하여 3개의 화합물을 분리하여 얻었다 (그림 3-4-3).

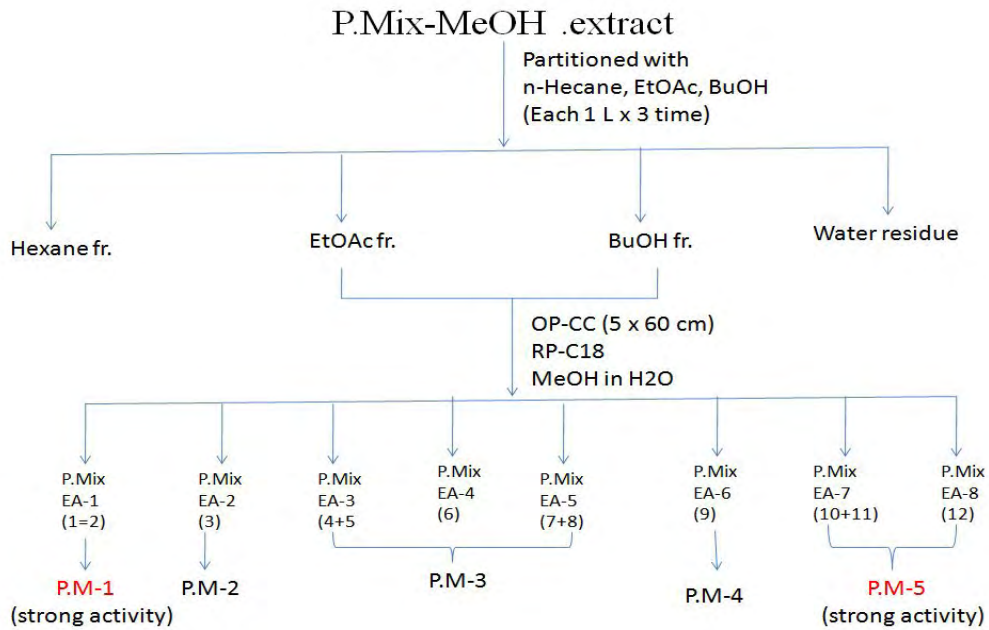
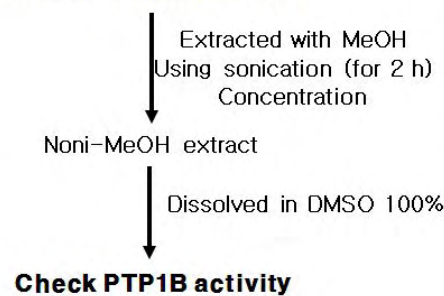


그림 3-4-3. 발효 후 혼합물의 PTP1B 저해 활성 측정을 통한 분리 및 분획 방법

그러나 주관기관의 미강복합발효물의 동물실험을 통한 해당노 효능평가 결과 발효물의 해당노 효능은 미약한 것으로 평가되었다. 오히려, 발효물의 구성 성분중 하나인 노니의 발효물이 강한 해당노 효능이 있는 것으로 주관기관에서 제시하였다. 따라서 주관기관과의 회의를 통하여 노니 발효물의 해당노 효능화합물을 분리하기 위하여 노니의 PTP1B, Sirtuins 및 alpha-glucosidase inhibitory activity를 평가를 실시하였다 (그림 3-4-4, 3-4-5).

**Dried powder of Noni**



Sample	Noni	OA	AI	Usolic acid	DMSO
Temperature	1	2	3	11	12
24.9	0.4466	0.328	0.1817	0.1163	0.8059
	0.4935	0.3353	0.3755	0.0917	0.1273
	0.1084	0.1834	0.3441	0.0985	0.6784
	1.0485	0.8467	0.9013	0.3045	1.6116
<b>% Inh</b>	<b>34.94043</b>	<b>47.4621</b>	<b>44.0742</b>	<b>81.1057334</b>	
Sample	1mg/mL		Final concentration		30ug/mL
PTP1B	20ug/mL		0.06ug		0.6ug/mL
pNPP	10 mM				1 mM
NaOH	10 N				

그림 3-4-4. 노니 발효물의 분획화 및 PTP1B 저해 활성 측정을 측정

Temperature	1	2	3	4	5	6	8
26.2							
	0.1624	0.1628	0.1647	0.1575	0.1595	0.1808	0.2353
	0.1686	0.1693	0.1608	0.1602	0.1719	0.1693	0.2309
	0.1648	0.1595	0.1578	0.1576	0.1712	0.1808	0.2265
	0.165267	0.163867	0.1611	0.158433	0.167533	0.176967	0.2309
Temperature	1	2	3	4	5	6	8
26.5							
	0.1982	0.2003	0.2055	0.2026	0.2175	0.2581	0.3154
	0.1948	0.2031	0.2004	0.2032	0.2238	0.241	0.3068
	0.195	0.1976	0.1978	0.201	0.2151	0.2661	0.3056
	0.196	0.200333	0.201233	0.202267	0.2188	0.255067	0.309267
	0.030733	0.036467	0.040133	0.043833	0.051267	0.0781	0.078367
<b>% Inhibitio</b>	<b>60.6487</b>	<b>53.3077</b>	<b>48.6129</b>	<b>43.8754</b>	<b>34.3577</b>		<b>-0.3414</b>
	2.5	1.25	1	0.625	0.3125	DMSO	WS-MeOH

그림 3-4-5. 노니 발효물의 분획화 및 alpha-glucosidase 활성 측정

그러나 노니발효물의 PTP1B 및 alpha-glucosidase 저해활성에는 상대적으로 강한 저해활성을 나타내지 않아 2-NBDG 및 6-NBDG를 이용한 glucose uptake 활성을 측정하는 방법을 사용하여 노니발효물의 활성을 측정하는 방법을 실험실 내에 구축하였다 (그림 3-4-6).

- **Cells cultured in Petri-dish is removed the culture media**
- **Add 1-2 mL 1X-trypsin (lysis buffer in 1X-PBS) then incubate for 2-3 min in cell culture incubator (37 °C, 5% CO<sub>2</sub>)**
- **Pipetting well for lysis the cells then transfer to 15 mL Falcon tube and centrifuge for 3 min, 1000 rpm, r. Temp.**
- **Remove lysis buffer, then add 1 mL 10%-CS media, mix well**
- **Take 10 μL for counting the cells (The cell number = totally cells in 4 squares × 104/4), Calculate for adding appropriate CS-media**
- **Seeding to 96 well plate (c = 3\*10<sup>3</sup> cells/well, v = 200 μL/well), then incubate for 1 day in incubator (37 °C, 5% CO<sub>2</sub>) before treating compounds**

그림 3-4-6. 노니 발효물의 2-NBDG 및 6-NBDG를 이용한 glucose uptake 측정방법

주관기관에서 미강복합발효물보다 해당노 효능이 강력한 것으로 평가된 노니발효물로부터 해당노 치료효능 후보물질을 glucose uptake 평가방법을 도입하여 실험을 실시하였다. 그 결과 노니발효물이 상대적으로 미강복합발효물보다 강한 2-NBDG uptake를 증가시켰다. 노니발효물을 용매 분획하여 2-NBDG uptake의 활성을 측정한 결과 활성이 증가하였으므로 노니를 해당노 후보로 선정하고 활성물질을 분리하였다.

(2) 노니로부터 항당뇨 치료 효능 후보 물질의 분리

노니로부터 2-NBDG uptake를 증가시키는 화합물을 확인하기 위하여 용매분획, SiO<sub>2</sub>, RP<sub>18</sub> column chromatography 및 HPLC를 통하여 10종의 화합물 분리를 하였으며, 3종의 화합물 구조를 확립하였다.

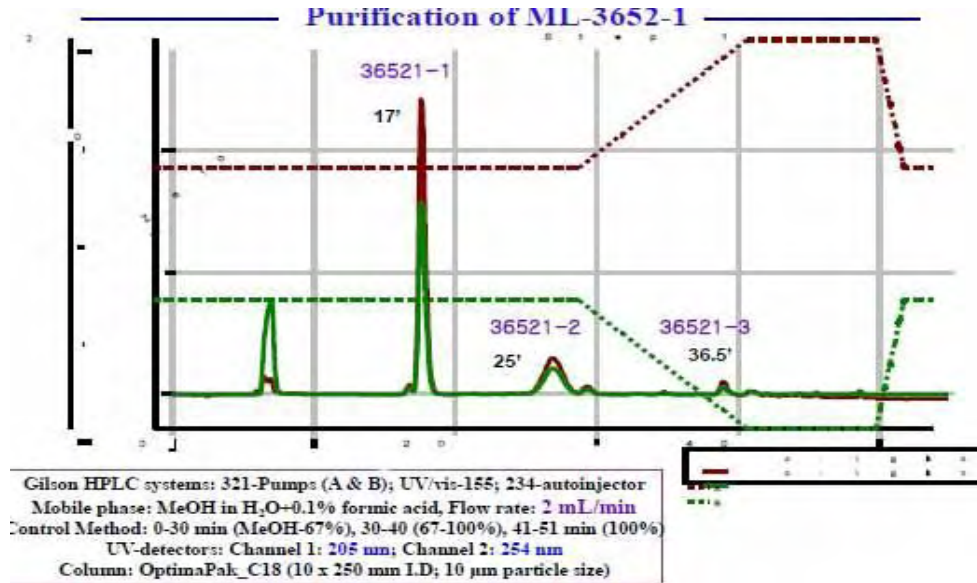


그림 3-4-7. 노니로부터 화합물 ML-3652-1의 HPLC를 통한 화합물의 분리

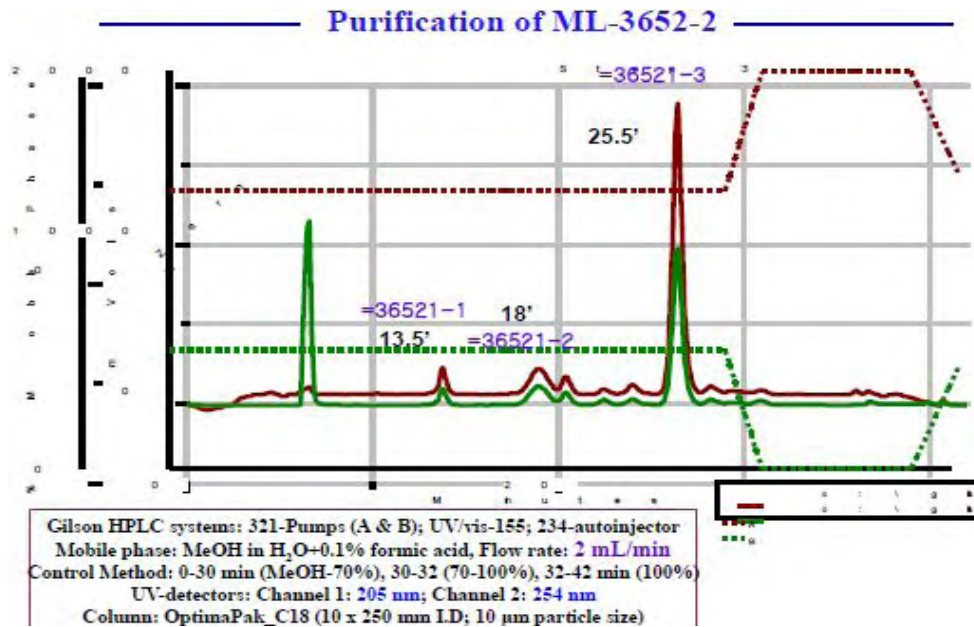


그림 3-4-8. 노니로부터 화합물 ML-3652-2의 HPLC를 통한 화합물의 분리

### (3) 노니로부터 신규 화합물의 분리와 구조결정

#### (가) 활성물질의 분리

후보식물 노니 (*Morinda citrifolia*) 분말 (1.58 kg)을 주관기관인 한국식품연구원으로부터 받아 5L의 메탄올을 용매로 사용하여 3회 추출하였다. 메탄올 추출액을 농축한 뒤 물에 현탁시킨 후 (155 g) 헥산, 에틸아세테이트 및 부탄올로 연속적으로 분액하였다. 활성을 보인 에틸아세테이트 층 (94.6 g)을 농축한후 일부분 (90.0 g)을 hexane-EtOAc (20/1 → 1/20)을 전개용매로 실리카겔 크로마토그래피하여 화합물 1 (1 g)과 6개의 분획으로 나누었다 (MC-1 - MC-6).

소분획 MC-5 (15g)을 RP-18 레진으로 충전한 pastic column (6.0 × 20 cm)에 MeOH-H<sub>2</sub>O (1/10 → 10/1, 각각 2.5L)로하여 MPLC systems (EYELA ceramic pump VSP-1200, Japan)하여 5개의 소분획 (MC-5.1 - MC-5.5)를 얻었다. 소분획 MC-5.2를 Gilson HPLC system [mobile phase: MeOH in H<sub>2</sub>O containing 0.1% HCO<sub>2</sub>H (0 - 35 min: 48% MeOH); flow rate: 2 mL/min; UV detection at 205와 254 nm]에서 화합물 4 (155 mg;  $t_R$  = 20.1 min)과 6 (30 mg;  $t_R$  = 29.2 min).(331 mg)을 분리하였다. 소분획 MC-5.3을 HPLC [mobile phase MeCN in H<sub>2</sub>O containing 0.1% HCO<sub>2</sub>H (0 - 45 min: 24% MeCN); flow rate 2 mL/min; UV detection at 205와 254 nm]하여 화합물 3 (4.0 mg;  $t_R$  = 25.9 min), 8 (1.2 mg;  $t_R$  = 35.5 min), 9 (2.9mg;  $t_R$  = 34.8 min)과 화합물 10 (1.5 mg;  $t_R$  = 37.5 min)를 얻었다. 소분획 MC-5.4을 HPLC [mobile phase MeOH in H<sub>2</sub>O containing 0.1% HCO<sub>2</sub>H (0 - 35 min: 50% MeOH); flow rate 2 mL/min; UV detection at 205와 254 nm] 하여 화합물 5 (3.7 mg;  $t_R$  = 20.1 min)과 화합물 11 (16.0 mg;  $t_R$  = 30.0 min)을 각각 얻었다. 비슷한 과정으로 화합물 7은 (7.8 mg;  $t_R$  = 22.2 min) 소분획 MC-5.5로부터 HPLC [mobile phase MeOH in H<sub>2</sub>O containing 0.1% HCO<sub>2</sub>H (0 - 30 min: 60% MeOH); flow rate 2 mL/min; UV detection at 205와 254 nm]하여 얻을수 있었다.

분획 MC-6 (20g)은 RP-18 레진으로 충전한 pastic column (6.0 × 20 cm)에 MeOH-H<sub>2</sub>O (1/15 → 15/1, 각각 3.0L)로하여 화합물 12 (20 mg)과 5개의 소분획 (MC-6.1 - MC-6.5)를 나누었다. 소분획 MC-6.3은 HPLC [mobile phase: MeCN in H<sub>2</sub>O containing 0.1% HCO<sub>2</sub>H (0 - 50 min: 20% MeOH); flow rate 2 mL/min; UV detection at 205와 254 nm]하여 화합물 1 (2.3 mg;  $t_R$  = 27.4)과 화합물 2 (20.8 mg;  $t_R$  = 37.6 min)를 얻을 수 있었다. 비슷한 과정으로 화합물 13 (14 mg;  $t_R$  = 28.5 min)과 화합물 14 (4.5 mg;  $t_R$  = 22.2 min)은 소분획 MC-6.4를 HPLC [mobile phase: MeCN in H<sub>2</sub>O containing 0.1% HCO<sub>2</sub>H (0 - 40 min: 26% MeOH); flow rate 2 mL/min; UV detection at 205와 254 nm].하여 최종적으로 얻을 수 있었다.

화합물 1: *trans*-(4)*E*-2-(3,4-dihydroxyphenyl)-4-[(3,4-dihydroxyphenyl)-methylene]-4-(hydroxymethyl) dihydrofuran-2(3*H*)-one: yellowish, amorphous powder; [α]: -5.62 (*c* 0.11, MeOH); UV (MeOH) λ<sub>max</sub> (log ε) 233 (4.10), 284 (3.60) nm; IR (KBr, cm<sup>-1</sup>) λ<sub>max</sub> 3394, 2919, 1747, 1646, 1508, 1033, and 677; <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR data (Table 7); HR-EIMS *m/z* 344.0898 (calcd for C<sub>18</sub>H<sub>16</sub>O<sub>7</sub>, 344.0896).

화합물 2: (-)-3,4,3',4'-Tetrahydroxy-9,7'β-epoxyignano-7β,9'-lactone: brown, amorphous powder; [α]: -5.78 (*c* 0.10, MeOH); UV (MeOH) λ<sub>max</sub> (log ε) 231 (4.11) 282 (3.71) nm; IR (KBr, cm<sup>-1</sup>) λ<sub>max</sub> 3274, 2967, 1747, 1648, 1288, 828; <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR data (Table 7); HR-EIMS *m/z* 344.0894 (calcd for C<sub>18</sub>H<sub>16</sub>O<sub>7</sub>, 344.0896).

Episesamin 2,6-dicatechol (3): <sup>1</sup>H NMR (CD<sub>3</sub>OD, 600 MHz) δ 6.80 (1H, d, *J* = 1.8 Hz, H-2), 6.73 (1H, d, *J* = 8.2 Hz, H-5), 6.69 (1H, dd, *J* = 8.2, 1.8 Hz, H-6), 4.32 (1H, d, *J* = 6.2 Hz, H-7), 2.89 (1H, m, H-8), 4.04 (1H, brd, *J* = 9.0 Hz, H-9a), 3.81 (1H, dd, *J* = 9.0, 6.0 Hz, H-9b), 6.81 (1H, d, *J* = 1.2 Hz, H-2'), 6.74 (1H, d, *J* = 8.1 Hz, H-5'), 6.67 (1H, dd, *J* = 8.1, 1.2 Hz, H-6'), 4.79 (1H, d, *J* = 6.0 Hz, H-7'), 3.33 (1H, m, H-8'), 3.76 (1H, t, *J* = 8.4 Hz, H-9'a), 3.63 (1H, dd, *J* = 16.8, 8.4 Hz, H-9'b); <sup>13</sup>C NMR (CD<sub>3</sub>OD, 150MHz) δ 132.2 (C, C-1), 114.6 (CH, C-2), 146.3 (C, C-3), 146.2 (C, C-4), 116.2 (C, C-5), 119.1 (C, C-6), 83.6 (CH, C-7), 55.7 (CH, C-8), 72.0 (CH<sub>2</sub>, C-9), 134.9 (C, C-1'), 114.2 (CH, C-2'), 146.6 (C, C-3'), 145.5 (C, C-4'), 116.3 (CH, C-5'), 118.3 (CH, C-6'), 83.3 (CH, C-7'), 51.4 (CH, C-8'), 70.7 (CH<sub>2</sub>, C-9').

화합물 9: (7*R*,8*R*)-3-methoxy-1'-carboxy-4',7-epoxy-8,3'-oxyneolignan-4,9-diol: brown, amorphous powder; [α]: +4.68 (*c* 0.17, MeOH); UV (MeOH) λ<sub>max</sub> (log ε) 224 (4.30), 253 (4.12), 299 (4.01) nm; CD (MeOH, Δε) λ<sub>max</sub> 222 (-1.24), 229 (-1.55); IR (KBr, cm<sup>-1</sup>) λ<sub>max</sub> 3371, 2935, 1720, 1603, 1280, 687; <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR data (Table 7); HR-EIMS *m/z* 332.0898 (calcd for C<sub>17</sub>H<sub>16</sub>O<sub>7</sub>, 332.0896).

화합물 10: (7*R*,8*R*)-3,4,9-trihydroxy-4',7-epoxy-8,3'-oxyneolignan-1'-al: yellowish, amorphous powder; [α]: +2.53 (*c* 0.21, MeOH); UV (MeOH) λ<sub>max</sub> (log ε) 224 (4.26), 252 (4.11), 300 (4.02) nm; CD (MeOH, Δε) λ<sub>max</sub> 223 (-0.67), 230 (-0.85); IR (KBr, cm<sup>-1</sup>) λ<sub>max</sub> 3361, 2921, 1705, 1604, 1015, 691; <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR data (Table 7); HR-EIMS *m/z* 302.0794 (calcd for C<sub>16</sub>H<sub>14</sub>O<sub>6</sub>, 302.0790).

화합물 14: (7'*E*),(7*R*,8*S*)-3,4,9-trihydroxy-4',7-epoxy-8,3'-oxyneolignan-7'-en-8'-oic acid: yellow, amorphous powder; [α]: -26.80 (*c* 0.05, MeOH); UV (MeOH) λ<sub>max</sub> (log ε) 224 (4.25), 253 (4.13), 310 (4.10) nm; IR (KBr, cm<sup>-1</sup>) λ<sub>max</sub> 3275, 2922, 1688, 1607, 1012, 816; <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR data (Table 7); HR-EIMS *m/z* 344.0896 (calcd for C<sub>18</sub>H<sub>16</sub>O<sub>7</sub>, 344.0896).



(나) 노니의 PTP1B 저해 활성물질의 구조 규명

노니 (*Morinda citifolia*)로부터 분리된 15종의 화합물 중 화합물 3 - 8, 11, - 13 및 15는 지지 물질과의 물리화학적 결과와 분광학적 결과 ( $[\alpha]_D$ , MS,  $^1\text{H}$ 과  $^{13}\text{C}$  NMR)의 비교를 통하여 화합물 episesamin 2,6-dicatechol (3), (-)-3,3-bisdemethylpinoresinol (4), (-)-pinoresinol (5), liriioresinol B (6), liriioresinol B dimethyl ether (7), americanin A (8), arteminorin D (11), *rel*-(7 $\alpha$ ,8 $\beta$ )-3-methoxy-4',7-epoxy-8,3'-oxyneolignan-4,9,9'-triol (12), americanoic acid A (13), ursolic acid (15)임을 확인하였다 (그림 3-4-27).

분리한 화합물 1은 기지의 물질과 구조가 다른 것으로 추정되어 정확한 결과를 해석하였다. 화합물 1은 무정형 분말로 얻어졌으며,  $[\alpha]_D$ 가 -5.62 (*c* 0.11, MeOH)로 측정되었으며, 화합물의 분자량이 HR-EIMS로 측정된 결과  $m/z$  344.0898  $[\text{M}]^+$ (calcd. 344.0896 for  $\text{C}_{18}\text{H}_{16}\text{O}_7$ )에서 molecular ion peak를 관찰하였으므로 분자식을  $\text{C}_{25}\text{H}_{26}\text{O}_6$ 으로 결정하였다. 화합물 1의 IR 흡수밴드인 3394, 1747, 및 1646  $\text{cm}^{-1}$ 에서 관찰은 분자 내에 OH, C=O, 및 C=C 기능기의 존재와 UV 분광기에서의 233과 284의 흡수밴드는 벤젠 기능기의 존재를 예시한다. 화합물 1의  $^1\text{H}$  NMR 결과로부터 ABX aromatic 프로톤 (표 3-3-1):  $\delta_{\text{H}}$  7.08 (1H, d,  $J = 1.8$  Hz, H-2), 6.83 (1H, d,  $J = 8.4$  Hz, H-5) 그리고 7.03 (1H, dd,  $J = 8.4, 1.8$  Hz, H-6)과 또한  $\delta_{\text{H}}$  6.72 (1H, d,  $J = 1.9$  Hz, H-2'), 6.75 (1H, d,  $J = 8.2$  Hz, H-5')와 6.65 (1H, dd,  $J = 8.2, 1.9$  Hz, H-6') 피크를 확인하였다.  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  CO SY 스펙트럼으로부터 H-5/H-6, H-5'/6', 그리고 H-7'/H-8'/H-9' (그림 3-4-29) 관계를 관찰하였고 (그림 3-4-9, 10) 화합물 1의 HMBC 스펙트럼으로부터 H-7' ( $\delta_{\text{H}}$  5.52)로부터 C-1' ( $\delta_{\text{C}}$  133.9), C-2' ( $\delta_{\text{C}}$  113.6), C-6' ( $\delta_{\text{C}}$  118.4)의 연결을 또한 확인 하였다 (그림 3-4-11, 12). 이러한  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY와 HMBC 스펙트럼의 결과는 H-7' ( $\delta_{\text{H}}$  5.52)로부터 H-2' ( $\delta_{\text{H}}$  6.72)와 H-6' ( $\delta_{\text{H}}$  6.65) NOESY 결과로부터 또한 확인되었다 (그림 3-4-11, 21). 또한,  $\delta_{\text{H}}$  7.47 (H-7)의 단일 수소로부터 C-1 ( $\delta_{\text{C}}$  127.0), C-2 ( $\delta_{\text{C}}$  118.0), C-6 ( $\delta_{\text{C}}$  125.1) 및  $\delta_{\text{C}}$  122.5 (C-8) 에 있는 olefinic carbon과  $\delta_{\text{C}}$ 175.3 (C-9)으로의 HMBC 연결은 강하게  $\alpha,\beta$ -unsaturated carbonyl 기능기가 탄소 C-1에 연결됨을 확인한다. 더욱이 HMBC 스펙트럼은 H-7' ( $\delta_{\text{H}}$  5.52)로부터 C-8 ( $\delta_{\text{C}}$  122.5), C-9 ( $\delta_{\text{C}}$  175.3) 연결, H-8' ( $\delta_{\text{H}}$  3.64) 로부터 C-9 ( $\delta_{\text{C}}$  175.3)은 화합물 1에 5각형 7',9'-lactone ring이 존재함을 제시한다. 위의 결과는 화합물 1이 phellinsin A와 유사하나,<sup>21</sup> methylene moiety ( $\delta_{\text{C}}$  62.6;  $\delta_{\text{H}}$  3.89와 3.63)가 다름을 확인하였다. 화합물 1의 상대적 입체배열은 NOESY 실험을 통하여 H-6 ( $\delta_{\text{H}}$  7.03)과 H-8' ( $\delta_{\text{H}}$  3.64)를 통하여 *E*-type  $\Delta^{7,8}$  double bond를 H-7'와 H-8'의 trans 관계를 H-7' ( $\delta_{\text{H}}$  5.52)와 H-9' ( $\delta_{\text{H}}$  3.89, 3.63)의 NOESY 스펙트럼을 통하여 확인하였다. 따라서 화합물 1은 *trans*-(4)*E*-2-(3,4-dihydroxyphenyl)-4-[(3,4-dihydroxyphenyl)-methylene]-4-(hydroxymethyl)dihydrofuran-2(3*H*)-one으로 구조결정 하였다 (그림 3-4-27).

분리한 화합물 2은 갈색의 분말로 얻어졌으며, 화합물의 분자량이 HR-EIMS로 측정된 결과  $m/z$  344.0894  $[\text{M}]^+$  (calcd. 344.0896)에서 molecular ion peak를 관찰하였으므로 분자식을  $\text{C}_{18}\text{H}_{16}\text{O}_7$

으로 결정하였다. 화합물 2의 IR 흡수밴드인 OH ( $3274\text{ cm}^{-1}$ ), C=O ( $1747\text{ cm}^{-1}$ ) 및 C=C ( $1648\text{ cm}^{-1}$ )와  $\lambda_{max}$  231과 282 nm에서 UV 흡수밴드를 보여 주었다. 화합물 2의  $^1\text{H}$ 과  $^{13}\text{C}$  NMR 결과는 1,3,4-trisubstituted benzene systems [ $\delta_{\text{H}}$  6.77 (1H, d,  $J = 1.2\text{ Hz}$ , H-2), 6.78 (1H, d,  $J = 7.8\text{ Hz}$ , H-5), 6.68 (1H, dd,  $J = 7.8, 1.2\text{ Hz}$ , H-6); 6.82 (1H, d,  $J = 1.8\text{ Hz}$ , H-2'), 6.75 (1H, d,  $J = 8.4\text{ Hz}$ , H-5'), 6.70 (1H, dd,  $J = 8.4, 1.8\text{ Hz}$ , H-6');  $\delta_{\text{C}}$  132.7 (C, C-1), 114.0 (CH, C-2), 147.1 (C, C-3), 146.6 (C, C-4), 116.6 (CH, C-5), 118.6 (CH, C-6); 133.4 (C, C-1'), 114.2 (CH, C-2'), 146.9 (C, C-3'), 146.3 (C, C-4'), 116.4 (CH, C-5'), 118.4 (CH, C-6')]과 oxymethylene 프로톤 피크를 [ $\delta_{\text{H}}$  4.25 (1H, dd,  $J = 9.6, 7.2\text{ Hz}$ )과 3.97 (1H, dd,  $J = 9.6, 4.2\text{ Hz}$ );  $\delta_{\text{C}}$  73.9 (CH<sub>2</sub>, C-9)], 2개의 oxymethine signals [ $\delta_{\text{H}}$  5.30 (d,  $J = 3.6\text{ Hz}$ , H-7)과 5.16 (1H, d,  $J = 3.6\text{ Hz}$ , H-7');  $\delta_{\text{C}}$  87.2 (CH, C-7)과 85.2 (CH, C-7')] 또한 carbonyl carbon [ $\delta_{\text{C}}$  179.9 (C, C-9')]을 각각 확인하였다 (그림 3-4-12, 13). 화합물 2의  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY 결과는 H-7으로부터 H-8, H-8과 H-8' 및 H<sub>2</sub>-9, H-8'로부터 H-7'로의 연결을 보여주며, 위의 결과는 HMBC와 (그림 3-4-15, 16, 28) NOESY로부터 (그림 3-4-29) 화합물 2는 기지물질인 (+)-3,4,3',4'-tetrahydroxy-9,7 $\alpha$ -epoxylignano-7 $\alpha$ ,9'-lactone과 비슷함을 확인하였다 (그림 3-4-27). 그러나, 화합물 2는 광학활성도가 음의값으로 [ $\alpha$ ]: -5.78 ( $c$  0.10, MeOH)로 (+)-3,4,3',4'-tetrahydroxy-9,7 $\alpha$ -epoxylignano-7 $\alpha$ ,9'-lactone ([ $\alpha$ ]: +7.5 ( $c$  0.15, MeOH))와 반대값을 갖았다. 따라서, 화합물 2는 신규 화합물인 lignan, (-)-3,4,3',4'-tetrahydroxy-9,7 $\beta$ -epoxylignano-7 $\beta$ ,9'-lactone로 결정하였다 (그림 3-4-27).

화합물 9은 갈색 분말로 얻어졌으며, [ $\alpha_{\text{D}}$ ]가 + 4.68 ( $c$  0.17, MeOH)로 측정되었으며, 화합물의 분자량이 HR-EIMS로 측정된 결과  $m/z$  332.0898 [ $\text{M}]^+$  (calcd. 332.0896)로 측정되었으므로 분자식을 C<sub>17</sub>H<sub>16</sub>O<sub>7</sub>으로 결정하였다. 화합물 9의 IR 흡수밴드인 OH ( $3371\text{ cm}^{-1}$ ), C=O ( $1720\text{ cm}^{-1}$ ), C=C ( $1603\text{ cm}^{-1}$ )와  $\lambda_{max}$  224, 253, 299 nm에서 벤젠환의 UV 흡수밴드를 보여 주었다. 화합물 9의  $^1\text{H}$ 과  $^{13}\text{C}$  NMR 결과는 1,3,4-trisubstituted benzene systems [ $\delta_{\text{H}}$  (1H, d,  $J = 1.8\text{ Hz}$ , H-2), 6.85 (1H, d,  $J = 8.5\text{ Hz}$ , H-5), 6.92 (1H, d,  $J = 8.5, 1.8\text{ Hz}$ , H-6), 7.56 (1H, d,  $J = 1.8\text{ Hz}$ , H-2'), 7.00 (1H, d,  $J = 8.0\text{ Hz}$ , H-5'), 7.57 (1H, d,  $J = 8.0, 1.8\text{ Hz}$ , H-6');  $\delta_{\text{C}}$  129.3 (C, C-1), 112.2 (CH, C-2), 149.4 (C, C-3), 148.6 (C, C-4), 116.4 (CH, C-5), 121.9 (CH, C-6), 124.7 (C, C-1'), 119.8 (CH, C-2'), 145.0 (C, C-3'), 149.0 (C, C-4'), 117.8 (CH, C-5'), 124.7 (CH, C-6')], two oxymethine signals [ $\delta_{\text{H}}$  4.92 (d,  $J = 8.0\text{ Hz}$ , H-7)와 4.15 (m, H-8);  $\delta_{\text{C}}$  77.7 (C-7)과 80.5 (C-8)], an oxymethylene signals [ $\delta_{\text{H}}$  3.72 (d,  $J = 12.6, 2.4\text{ Hz}$ , H-9a)와 3.50 (d,  $J = 12.6, 4.1\text{ Hz}$ , H-9b);  $\delta_{\text{C}}$  62.1 (CH<sub>2</sub>, C-9)], a carboxyl group ( $\delta_{\text{C}}$  169.5, C-7')와 oxymethyl signal [ $\delta_{\text{H}}$  3.89 (s);  $\delta_{\text{C}}$  56.6]을 확인할 수 있었다 (그림 3-4-17, 18). 카보닐 그룹과 oxymethyl 그룹의 위치는 C-1'와 C-3에 각각 붙어있음을 H-2' ( $\delta_{\text{H}}$  7.56)와 H-6' ( $\delta_{\text{H}}$  7.57)로부터 carboxyl carbon으로 연결인  $\delta_{\text{C}}$  169.5로 oxymethyl 프로톤인  $\delta_{\text{H}}$  3.89로부터 C-3 ( $\delta_{\text{C}}$  149.4)의 HMBC 결과로부터 확인하였다 (그림 3-4-19, 20). 이러한 결과는 추가적으로  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY 스펙트럼으로부터 H-7/H-8/H<sub>2</sub>-9, 이러한 연결은 C-1에 부착된 것으로 H-7( $\delta_{\text{H}}$  4.92)로부터 C-1 ( $\delta_{\text{C}}$  129.

3), C-2 ( $\delta_C$  112.2), C-6 ( $\delta_C$  121.9)의 HMBC 연결로부터 확인하였으며 (그림 3-4-19, 28), H<sub>2</sub>-9 ( $\delta_H$  3.72와 3.50)로부터 C-3' ( $\delta_C$  145.0), C-8 ( $\delta_C$  80.5)와 C-3' ( $\delta_C$  145.0)는 C-8-O-C-3' 연결을 제시한다. 위의 결과는 화합물 9가 arteminorin D와 유사하나,<sup>20</sup> carboxyl 그룹에서의 변화가 있음을 제시한다. 화합물 9의 상대적 입체배열은 H-7과 H-8사이의 coupling constant ( $J_{7,8} = 8.0$  Hz)로부터 *trans* 관계를 CD exciton chirality method을 통하여 확인하였다. 화합물 9의 UV 스펙트럼은  $\lambda_{max}$  224에서 강한 벤젠부분의 흡수밴드 ( $\pi \rightarrow \pi^*$ )를 보여주었고 상응한 CD 스펙트럼은 225 nm에서 음의 Cotton 효과를 보여주었다 (그림 3-4-30). 이러한 결과는 2개의 벤젠링 간의 전이 관계를 보여주며 공간상에서 반시계 방향 배열을 보여준다. 따라서 화합물 9은 (7*R*,8*R*)-3-methoxy-1'-carboxy-4',7-epoxy-8,3'-oxyneolignan-4,9-diol로 구조결정 하였다 (그림 3-4-10).

화합물 10은 노란색 분말로 얻어졌으며,  $[\alpha]_D$ 가 + 2.53 ( $c$  0.21, MeOH)로 측정되었으며, 화합물의 분자량이 HR-EIMS로 측정한 결과  $m/z$  302.0794  $[M]^+$  (calcd. 302.0790)로 측정되었으므로 분자식을 C<sub>16</sub>H<sub>14</sub>O<sub>6</sub>으로 결정하였다. 화합물 10의 UV 흡수밴드인  $\lambda_{max}$  224, 252, 300 nm와 IR 흡수밴드는 3361 (OH), 1705 (C=O), 1604 (C=C) cm<sup>-1</sup>는 화합물 9와 비슷한 골격을 제시한다. 화합물 10의 <sup>1</sup>H과 <sup>13</sup>C NMR 결과는 [ $\delta_H$  6.87 (1H, d,  $J = 1.8$  Hz, H-2), 6.79 (1H, d,  $J = 8.2$  Hz, H-5), 6.77 (1H, d,  $J = 8.2, 1.8$  Hz, H-6), 7.45 (1H,  $J = 1.6$  Hz, H-2'), 7.13 (1H, d,  $J = 8.0$  Hz, H-5'), 7.49 (1H, d,  $J = 8.0, 1.6$  Hz, H-6');  $\delta_C$  129.0 (C, C-1), 115.6 (CH, C-2), 146.9 (C, C-3), 147.5 (C, C-4), 116.5 (CH, C-5), 120.5 (CH, C-6), 132.1 (C, C-1'), 119.1 (CH, C-2'), 146.0 (C, C-3'), 151.1 (C, C-4'), 118.7 (CH, C-5'), 125.5 (CH, C-6')], two oxymethine signals [ $\delta_H$  4.89 (d,  $J = 7.8$  Hz, H-7)과 4.14 (m, H-8);  $\delta_C$  77.6 (C-7)와 80.8 (C-8)], oxymethylene signals [ $\delta_H$  3.73 (d,  $J = 12.6, 2.4$  Hz, H-9a)와 3.50 (d,  $J = 12.6, 4.1$  Hz, H-9b);  $\delta_C$  62.0 (C-9)]를 보여 주었다 (그림 3-4-21-24). 그러나, 화합물 9에서의 oxymethyl signal [ $\delta_H$  3.89 (s);  $\delta_C$  56.6]과 carboxyl 기 [ $\delta_C$  169.5]가 화합물 10에서의 aldehyde기 [ $\delta_H$  9.80 (s);  $\delta_C$  192.9] 치환되었음을 확인하였다 (그림 3-4-27). 화합물 10의 상대적 입체배열은 H-7과 H-8사이의 coupling constant ( $J_{7,8} = 7.8$  Hz)로부터 *trans* 관계를 CD exciton chirality method을 통하여 확인하였다 (그림 3-4-30). 화합물 10의 UV 스펙트럼은  $\lambda_{max}$  226에서 강한 벤젠부분의 흡수밴드 ( $\pi \rightarrow \pi^*$ )를 관찰과 상응한 CD 스펙트럼의 음의 Cotton 효과로부터 반시계 방향 배열을 확인하였다. 따라서 화합물 10은 (7*R*,8*R*)-3,4,9-trihydroxy-4',7-epoxy-8,3'-oxyneolignan-1'-al로 결정하였다 (그림 3-4-27).

화합물 14은 노란색 분말로 얻어졌으며,  $[\alpha]_D$ 가 - 26.80 ( $c$  0.05, MeOH)로 측정되었으며, 화합물의 분자량이 HR-EIMS로 측정한 결과  $m/z$  344.0896  $[M]^+$  (calcd. 344.0896)로 측정되었으므로 분자식을 C<sub>18</sub>H<sub>16</sub>O<sub>7</sub>으로 결정하였다. 화합물 14의 UV 흡수밴드인  $\lambda_{max}$  224, 253, 310 nm 및 IR 흡수밴드는 3275 (OH), 1688 (C=O), 1607 (C=C) cm<sup>-1</sup>에서 측정되었으므로 화합물 14은 화

합물 9와 10과 비슷한 골격을 제시한다. 화합물 14의  $^1\text{H}$ 과  $^{13}\text{C}$  NMR 결과는 ABX aromatic 프로톤 존재를 [ $\delta_{\text{H}}$  6.82 (1H, d,  $J = 1.8$  Hz, H-2), 6.76 (1H, d,  $J = 8.4$  Hz, H-5), 6.71 (1H, dd,  $J = 8.4, 1.8$  Hz, H-6), 7.16 (1H, d,  $J = 1.8$  Hz, H-2'), 6.98 (1H, d,  $J = 8.4$  Hz, H-5'), 7.12 (1H, dd,  $J = 8.4, 1.8$  Hz, H-6')];  $\delta_{\text{C}}$  130.5 (C, C-1), 114.6 (CH, C-2), 146.7 (C, C-3), 144.0 (C, C-4), 116.4 (CH, C-5), 119.3 (CH, C-6), 129.2 (C, C-1'), 118.5 (CH, C-2'), 145.4 (C, C-3'), 146.2 (C, C-4'), 119.1 (CH, C-5'), 123.1 (CH, C-6')], 2개의 oxymethine signals [ $\delta_{\text{H}}$  5.18 (d,  $J = 3.3$  Hz, H-7)과 4.45 (ddd,  $J = 8.4, 3.6, 3.3$  Hz, H-8);  $\delta_{\text{C}}$  77.1 (C-7)과 79.5 (C-8)], oxymethylene signal [ $\delta_{\text{H}}$  3.54 (dd,  $J = 12.0, 3.6$  Hz, H-9a)와 3.46 (dd,  $J = 12.6, 8.4$  Hz, H-9b);  $\delta_{\text{C}}$  60.2 (C-9)]를 확인하였다 (그림 3-4-25, 26). 화합물 10과 14사이의 차이는 알데하이드 그룹의 사라짐과 화합물 14에서 새로이 olefinic 결합 [ $\delta_{\text{H}}$  7.48 (d,  $J = 15.9$  Hz)와 6.35 (d,  $J = 15.9$  Hz);  $\delta_{\text{C}}$  146.7 (CH)와 117.4 (CH)] 및 carboxyl 그룹 [ $\delta_{\text{C}}$  170.5 (C)]의 관찰이다. 이러한 결과는 강하게 화합물 14에서의  $\alpha, \beta$ -unsaturated carboxyl group이 C-1'dp 존재함을 예측하였고, H-7' [ $\delta_{\text{H}}$  7.48 (d,  $J = 15.9$  Hz)]로부터 C-1' ( $\delta_{\text{C}}$  129.2), C-2' ( $\delta_{\text{C}}$  118.5), C-6' ( $\delta_{\text{C}}$  123.1)의 HMBC 결과로부터 확인하였다 (그림 3-4-28). 화합물 14의 H-7과 H-8사이의 coupling constant  $J_{7,8} = 3.3$  Hz와  $J_{7,8'} = 15.9$  Hz는 *cis* 관계 및 *E*-type  $\Delta^{7,8}$  double bond의 존재를 보여준다. 화합물 14의 상대적 입체배열은 CD exciton chirality method을 통하여 시도하였으나, UV 스펙트럼은  $\lambda_{\text{max}}$  224 nm에서의 상응하는 CD 흡수 스펙트럼을 확인하지 못하였다 (그림 3-4-28). 그러나, 화합물 14가 *cis*-(2*R*,3*S*)-3-methyl-2-phenyl-1,4-benzodioxane 및 eusiderin C와 유사한 CD 스펙트럼을 보여 주었으므로 7*R*과 8*S*로 입체배열을 결정하였다. 따라서 화합물 14은 (7'*E*),(7*R*,8*S*)-3,4,9-trihydroxy-4',7'-epoxy-8,3'-oxyneolignan-7'-en-8'-oic acid로 결정하였다 (그림 3-4-27).

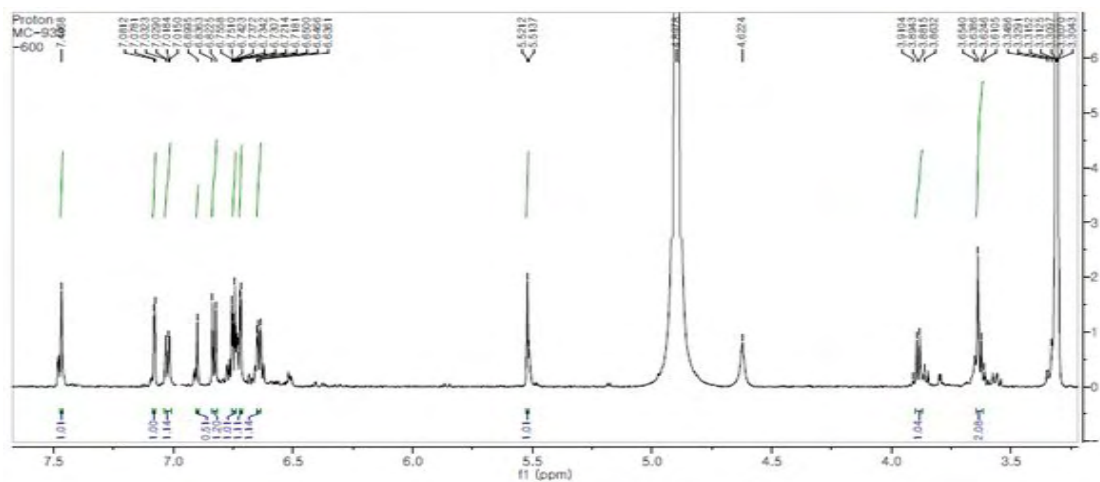


그림 3-4-9.  $^1\text{H}$  NMR spectrum of compound 1 (600 MHz,  $\text{MeOH-}d_4$ )

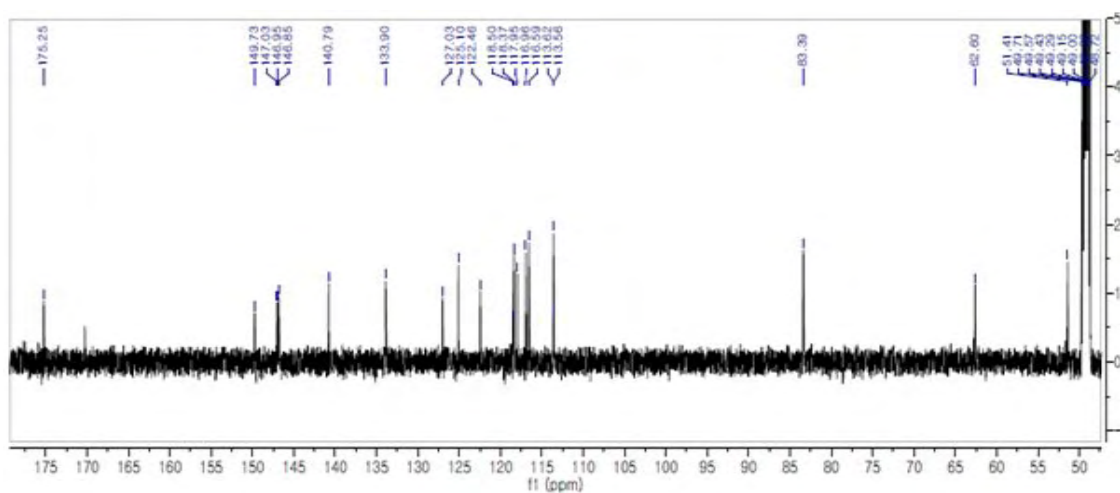


그림 3-4-10.  $^{13}\text{C}$  NMR spectrum of compound 1 (150 MHz,  $\text{MeOH-}d_4$ )

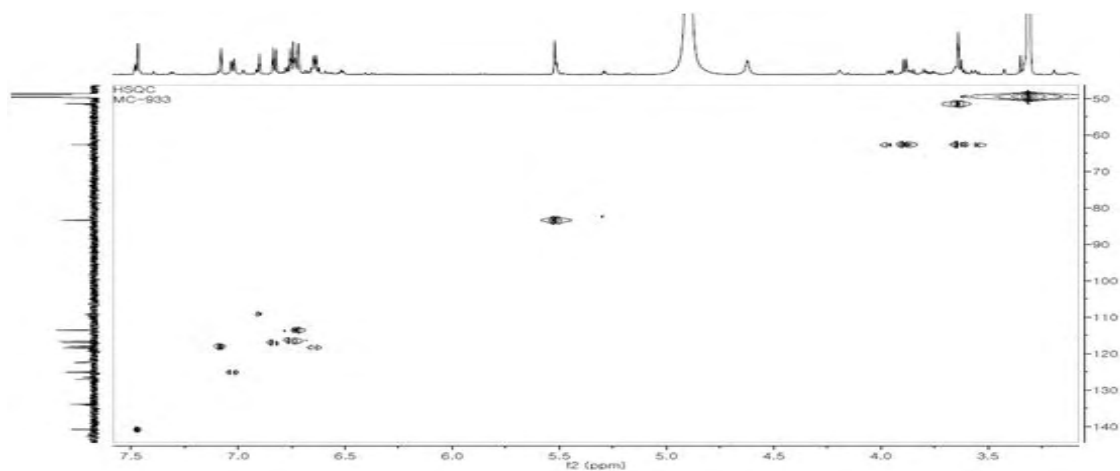


그림 3-4-11. HSQC NMR spectrum of compound 1 (600 MHz,  $\text{MeOH-}d_4$ )

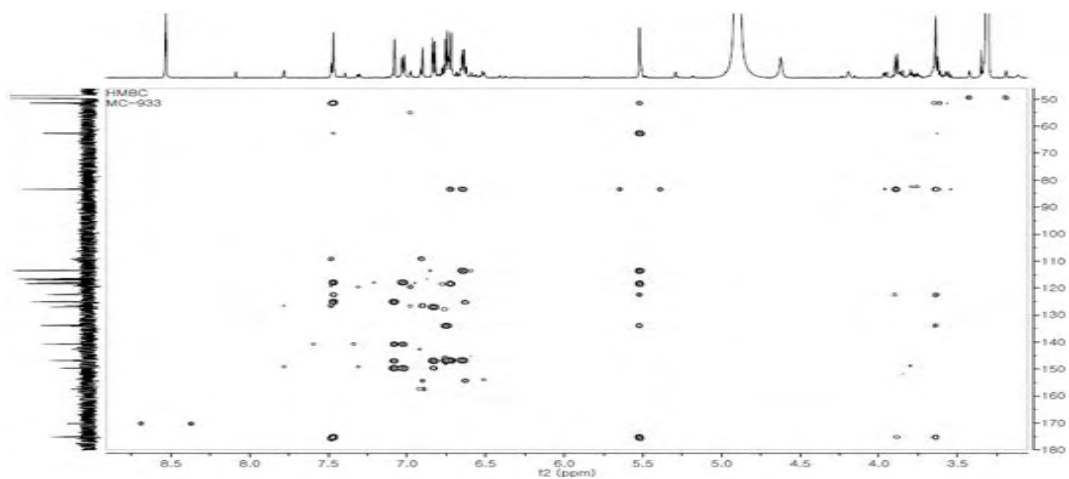


그림 3-4-12. HMBC NMR spectrum of compound 1 (600 MHz, MeOH- $d_4$ )

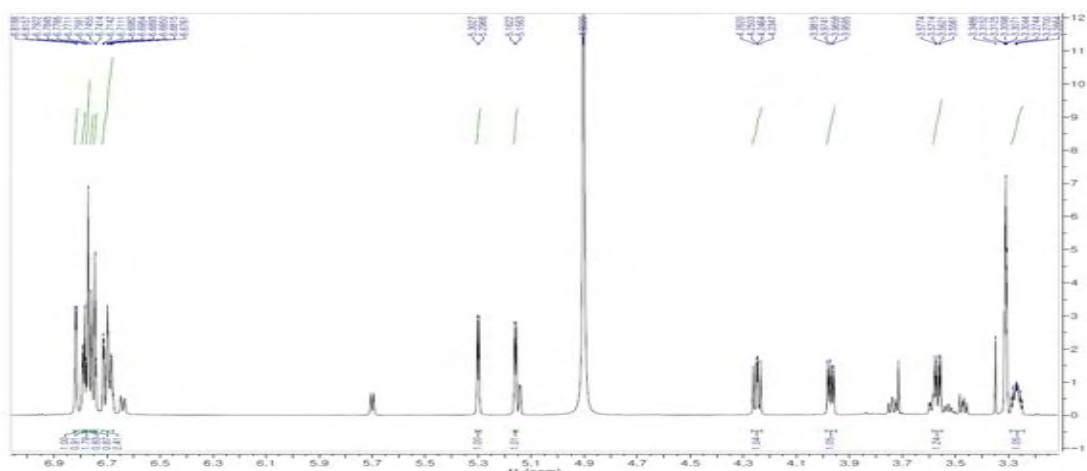


그림 3-4-13.  $^1\text{H}$  NMR spectrum of compound 2 (600 MHz, MeOH- $d_4$ )

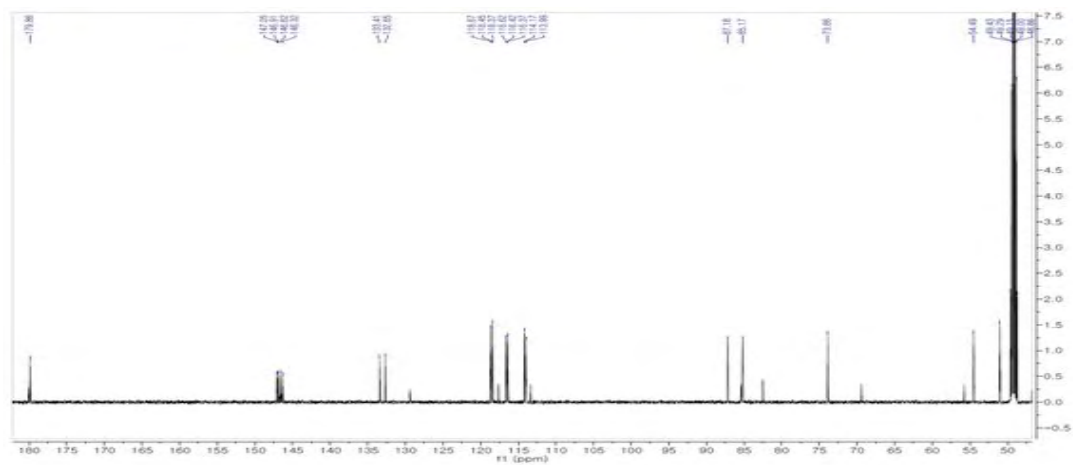


그림 3-4-14.  $^{13}\text{C}$  NMR spectrum of compound 2 (150 MHz, MeOH- $d_4$ )



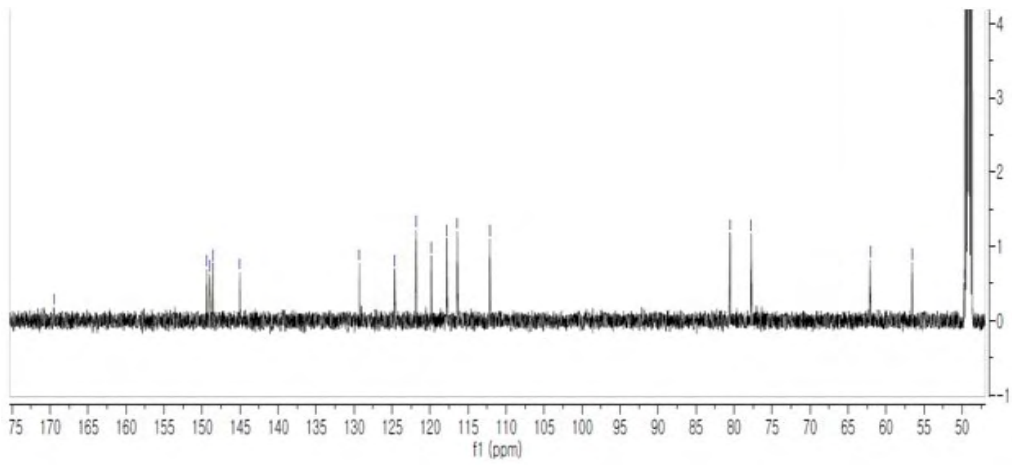


그림 3-4-18.  $^{13}\text{C}$  NMR spectrum of compound 9 (150 MHz,  $\text{MeOH-}d_4$ )

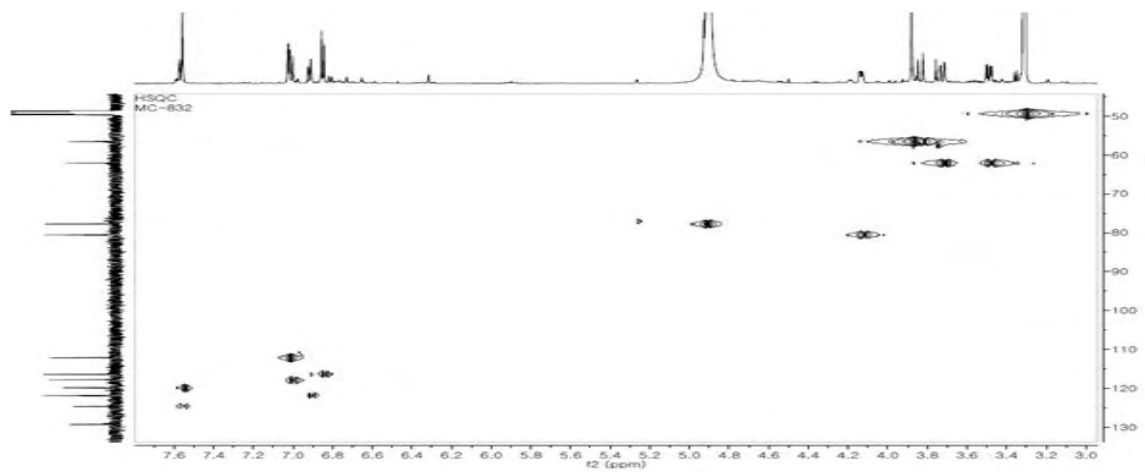


그림 3-4-19. HSQC NMR spectrum of compound 9 (600MHz,  $\text{MeOH-}d_4$ )

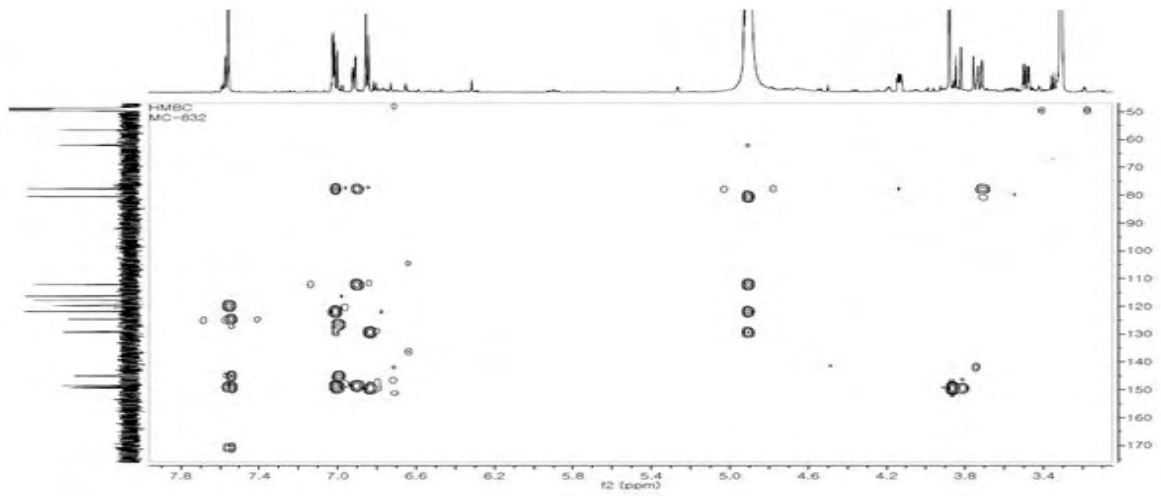


그림 3-4-20. HMBC NMR spectrum of compound 9 (600 MHz,  $\text{MeOH-}d_4$ )



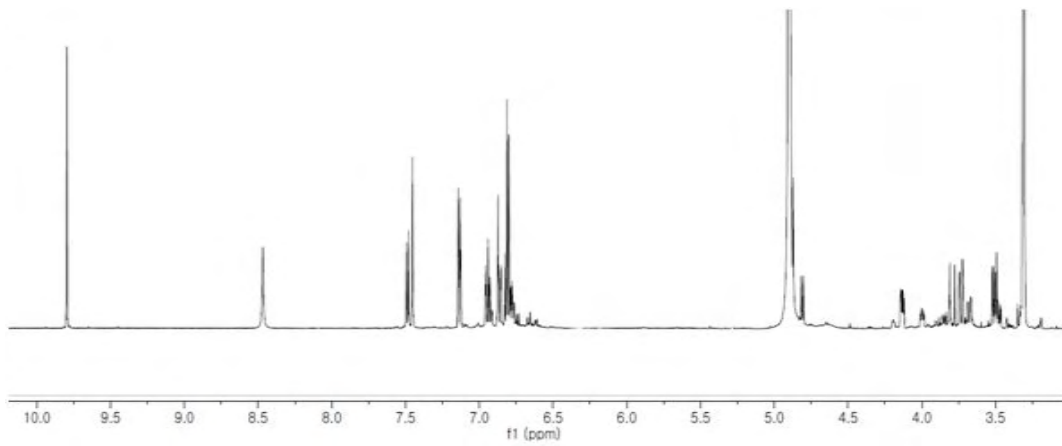


그림 3-4-21.  $^1\text{H}$  NMR spectrum of compound 10 (600 MHz,  $\text{MeOH-}d_4$ )

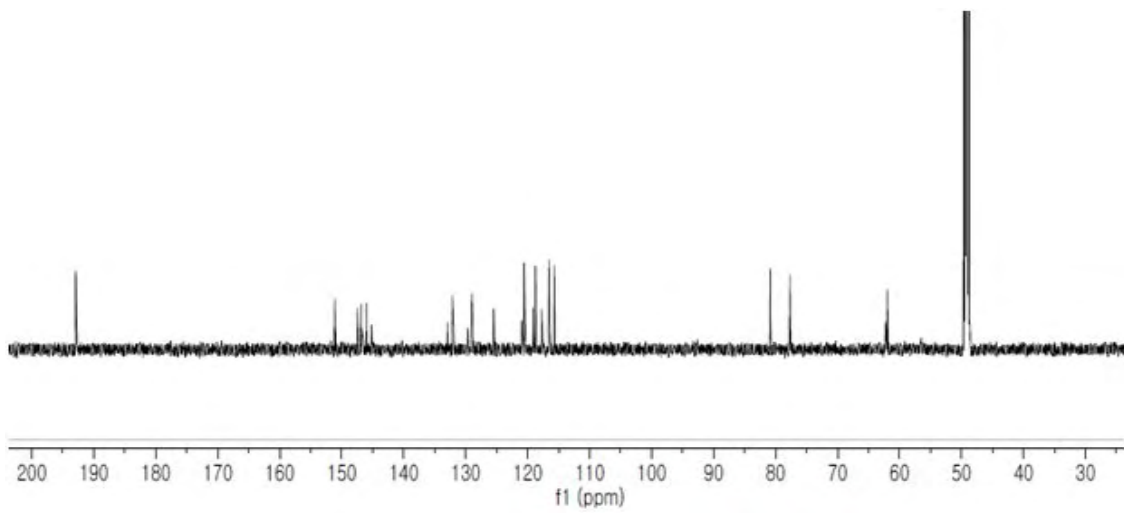


그림 3-4-22.  $^{13}\text{C}$  NMR spectrum of compound 10 (150 MHz,  $\text{MeOH-}d_4$ )

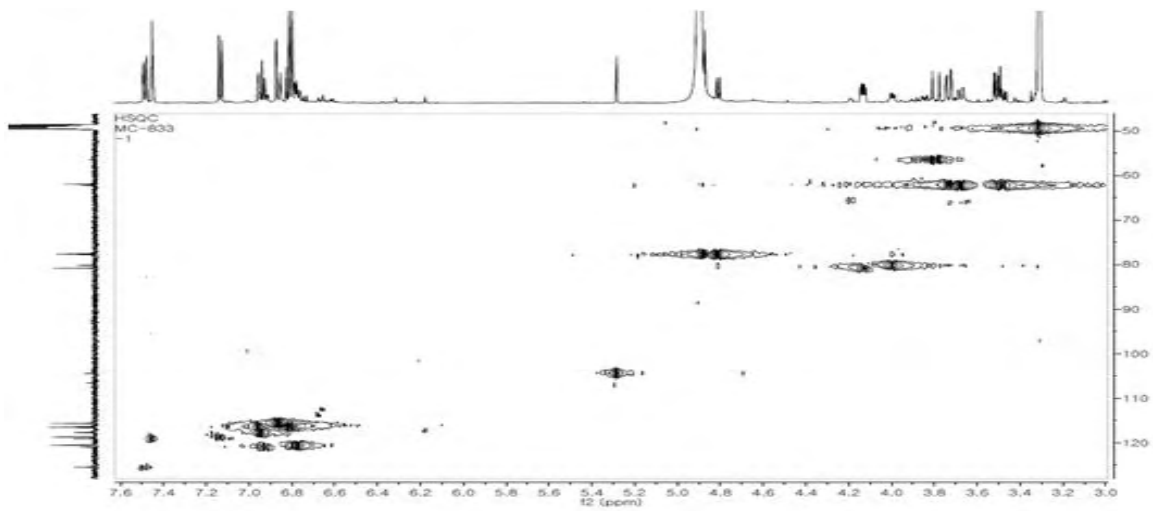


그림 3-4-23. HSQC NMR spectrum of compound 10 (600 MHz,  $\text{MeOH-}d_4$ )

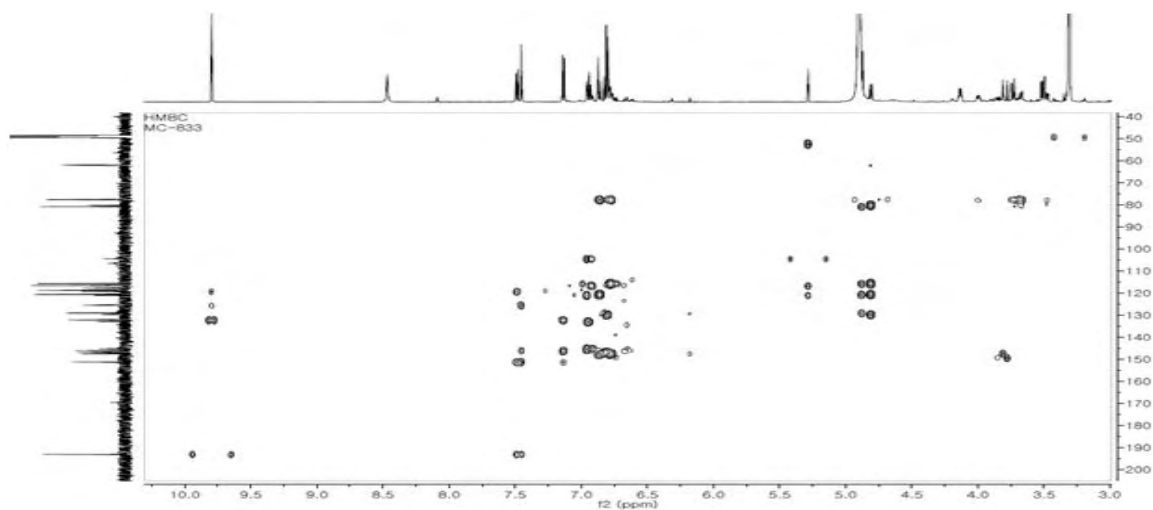


그림 3-4-24. HMBC NMR spectrum of compound 10 (600 MHz, MeOH- $d_4$ )

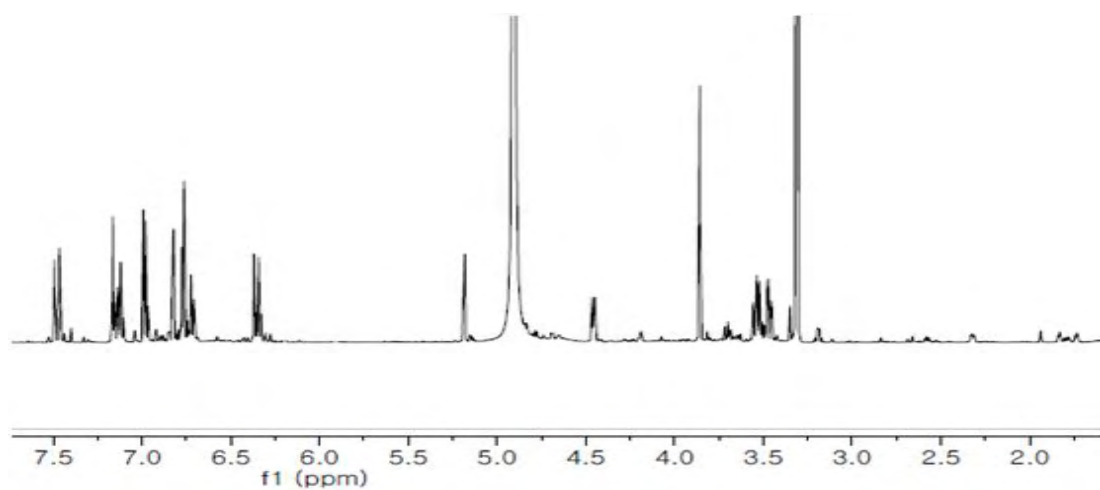


그림 3-4-25.  $^1\text{H}$  NMR spectrum of compound 14 (600 MHz, MeOH- $d_4$ )

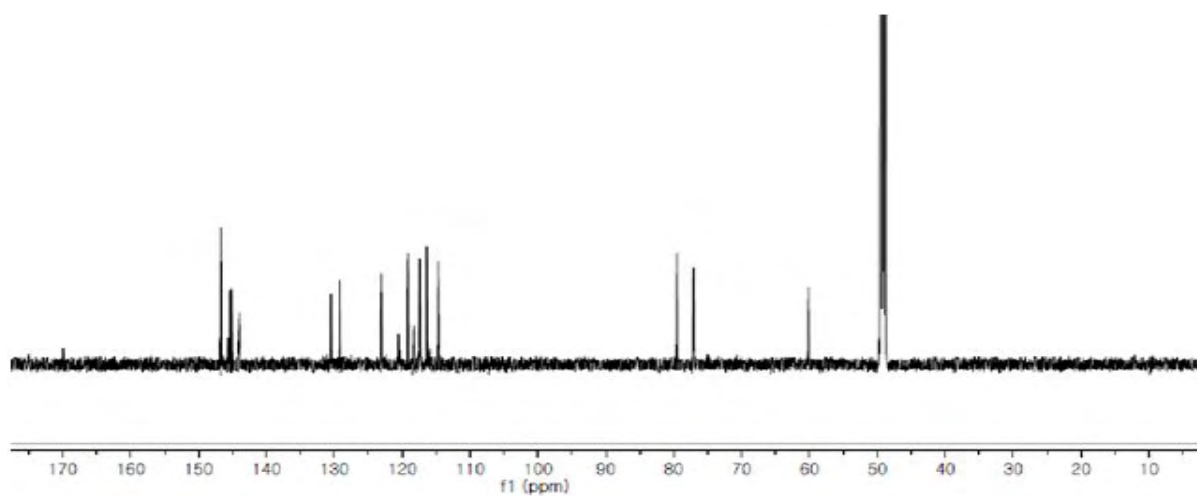
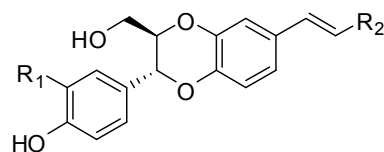
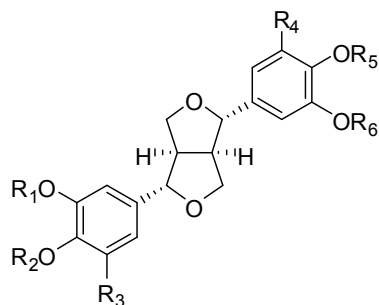
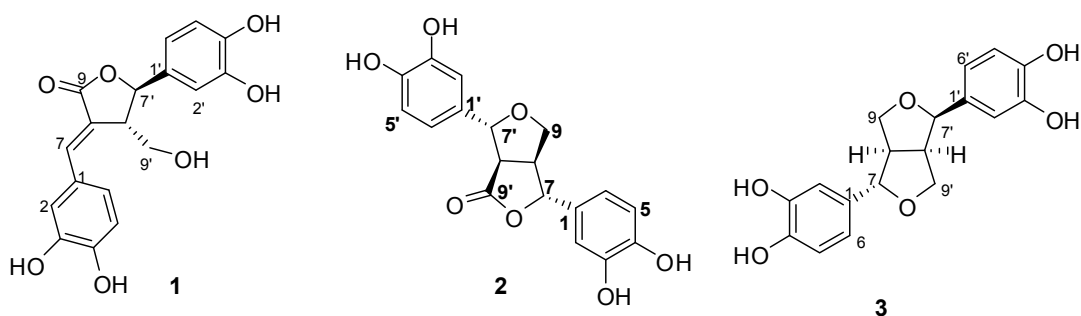
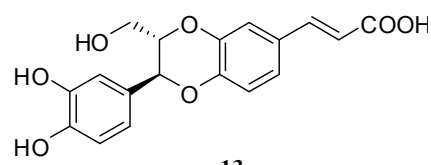
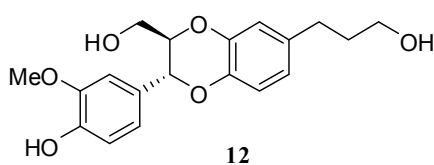
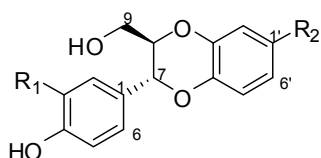


그림 3-4-26.  $^{13}\text{C}$  NMR spectrum of compound 14 (150 MHz, MeOH- $d_4$ )



- 4:  $R_1 = H, R_2 = H, R_3 = H, R_4 = H, R_5 = H, R_6 = H$   
 5:  $R_1 = CH_3, R_2 = H, R_3 = H, R_4 = H, R_5 = H, R_6 = CH_3$   
 6:  $R_1 = CH_3, R_2 = H, R_3 = OCH_3, R_4 = OCH_3, R_5 = H, R_6 = CH_3$   
 7:  $R_1 = CH_3, R_2 = CH_3, R_3 = OCH_3, R_4 = OCH_3, R_5 = CH_3, R_6 = CH_3$

- 8:  $R_1 = OH, R_2 = CHO$   
 11:  $R_1 = OMe, R_2 = COOH$



- 9:  $R_1 = OMe, R_2 = COOH$   
 10:  $R_1 = OH, R_2 = CHO$

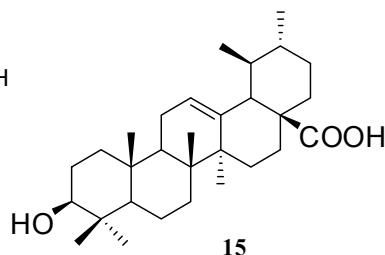
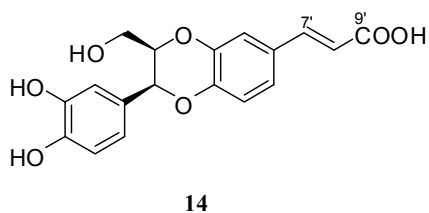


그림 3-4-27. Chemical structure of active constituents isolated from *Morinda citriflora*. Their structures were elucidated by extensive spectroscopic analysis, including UV, IR, NMR, and MS, as well as comparison with literature data.

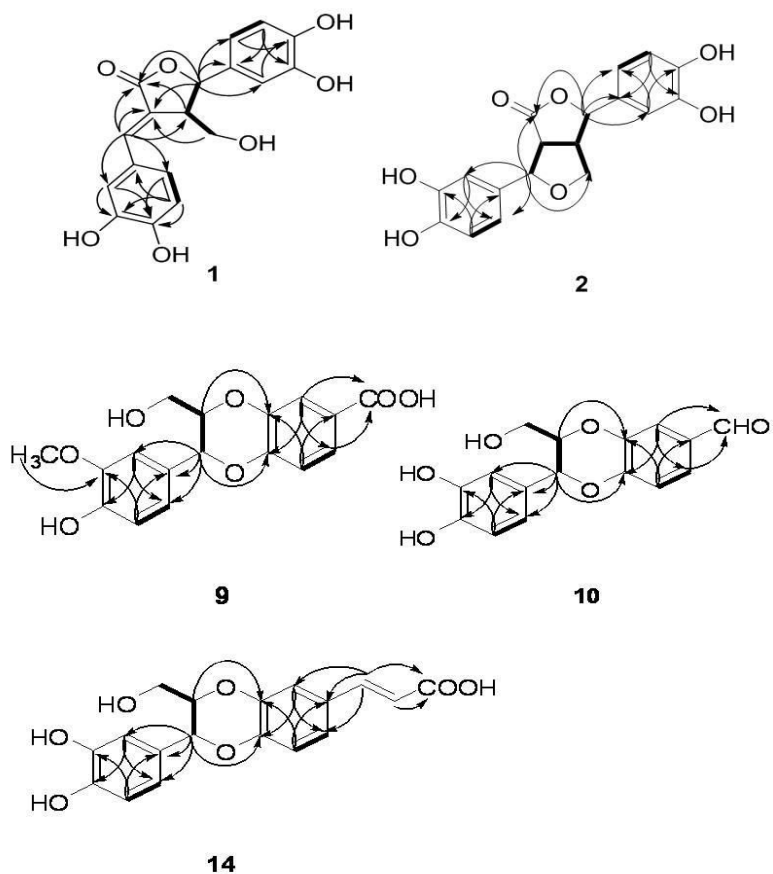


그림 3-4-28.  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSCOSY ( — ) and HMBC (  $\curvearrowright$  ) correlations of compounds 1, 2, 9, 10, and 14

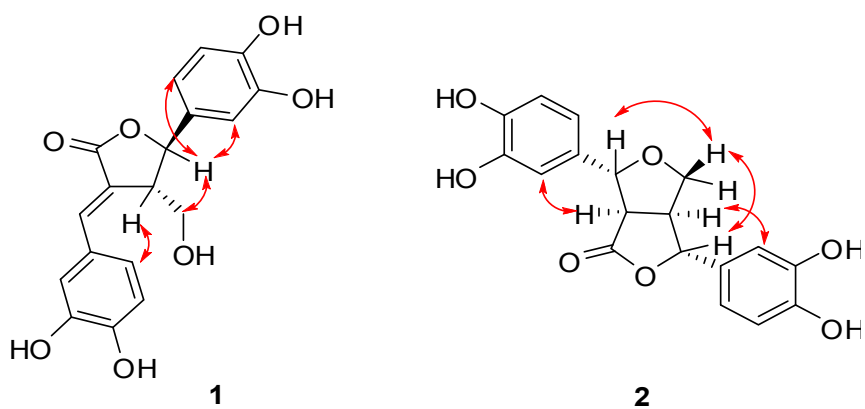
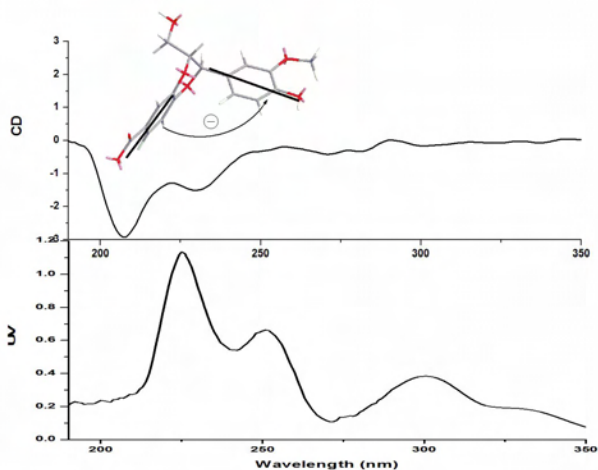
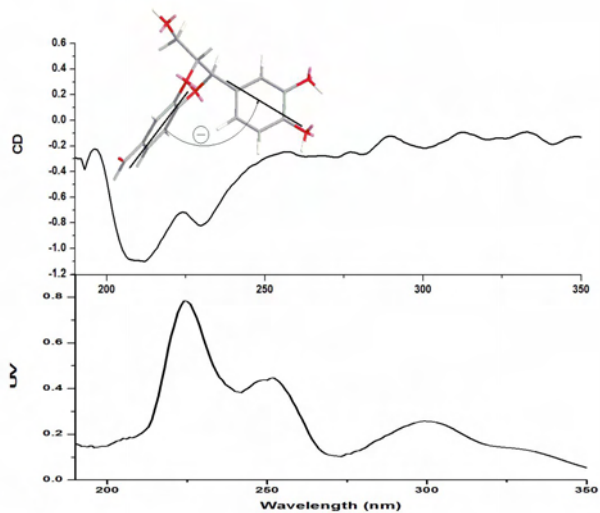


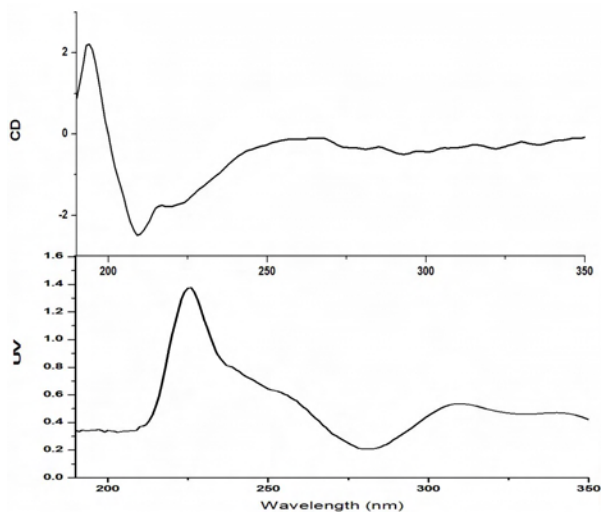
그림 3-4-29. NOESY correlations of compounds 1 and 2



(A)



(B)



(C)

그림 3-4-30. CD and UV spectra of compound 9 (A), 10 (B), and 14 (C). The arrow denotes the electronic transition dipole of the chromophores.

Table 3-4-1. NMR Spectroscopic Data (600 MHz, in CD<sub>3</sub>OD) for Compounds 1, 2, 9, 10, and 14

no.	1		2		9		10		14	
	$\delta_H$ ( <i>J</i> in Hz)	$\delta_C$	$\delta_H$ ( <i>J</i> in Hz)	$\delta_C$	$\delta_H$ ( <i>J</i> in Hz)	$\delta_C$	$\delta_H$ ( <i>J</i> in Hz)	$\delta_C$	$\delta_H$ ( <i>J</i> in Hz)	$\delta_C$
1		127.0, C		132.7, C		129.3, C		129.0, C		130.5, C
2	7.08, d (1.8)	118.0, CH	6.77, d (1.2)	114.0, CH	7.02, d (1.8)	112.2, CH	6.87, d (1.8)	115.6, CH	6.82, d (1.8)	114.6, CH
3		146.9, C		147.1, C		149.4, C		146.9, C		146.7, C
4		149.6, C		146.6, C		148.6, C		147.5, C		144.0, C
5	6.83, d (8.4)	116.9, CH	6.78, d (7.8)	116.6, CH	6.85, d (8.5)	116.4, CH	6.79, d (8.2)	116.5, CH	6.76, d (8.4)	116.4, CH
6	7.03 dd (8.4, 1.8)	125.1, CH	6.68, dd (7.8, 1.2)	118.6, CH	6.92, dd (8.5, 1.8)	121.9, CH	6.77, dd (8.2, 1.8)	120.5	6.71, dd (8.4, 1.8)	119.3, CH
7	7.47, br s	140.8, CH	5.30, d (3.6)	87.2, CH	4.92, d (8.0)	77.7, CH	4.89, d (7.8)	77.6, CH	5.18, d (3.3)	77.1, CH
8		122.5, C	3.27, m	52.0, CH	4.15, m	80.5, CH	4.14, m	80.8, CH	4.45, ddd (8.4, 3.6, 3.3)	79.5, CH
9		175.3, C	4.25, dd (9.6, 7.2)	73.9, CH <sub>2</sub>	3.72, dd (12.6, 2.4)	62.1, CH <sub>2</sub>	3.73, dd (12.6, 2.4)	62.0, CH <sub>2</sub>	3.54, dd (12.0, 3.6)	60.2, CH <sub>2</sub>
			3.97, dd (9.6, 4.2)		3.50, dd (12.6, 4.1)		3.50, dd (12.6, 4.2)		3.46, dd (12.0, 8.4)	
1c		133.9, C		133.4, C		124.7, C		132.1, C		129.2, C
2c	6.72, d (1.9)	113.6, CH	6.82, d (1.8)	114.2, CH	7.56, d (1.8)	119.8, CH	7.45, d (1.6)	119.1, CH	7.16, d (1.8)	118.5, CH
3c		146.9, C		146.9, C		145.0, C		146.0, C		145.4, C
4c		147.0, C		146.3, C		149.0, C		151.1, C		146.2, C
5c	6.75, d (8.2)	116.6, CH	6.75, d (8.4)	116.4, C	7.00, d (8.0)	117.8, CH	7.13, d (8.0)	118.7, CH	6.98, d (8.4)	119.1, CH
6c	6.65, dd (8.2, 1.9)	118.4, CH	6.70, dd (8.4, 1.8)	118.4, C	7.57, dd (8.0, 1.6)	124.7, CH	7.49, dd (8.0, 1.6)	125.5, CH	7.12, dd (8.4, 1.8)	123.1, CH
7c	5.52, d (4.5)	83.4, CH	5.16, d (3.6)	85.2, CH		169.5, C	9.80, s	192.9, CH	7.48, d (15.9)	146.7, CH
8c	3.64, m	51.4, CH	3.57, dd (9.0, 3.6)	54.5, CH					6.35, d (15.9)	117.4, CH
9c	3.89, dd (16.8, 9.0)	62.6, CH <sub>2</sub>		179.9, C						170.5, C
	3.63, dd (16.8, 8.4)									
OMe					3.89, s	56.6, CH <sub>3</sub>				

(다) 노니로부터 분리한 화합물 1-15의 PTP1B 저해활성

분리된 15종의 화합물에 대한 PTP1B 에 대한 저해 활성을 검토한 결과, 화합물 3, 5 - 7와 9 및 15은 농도 의존적으로 PTP1B 효소를 저해하였다. 표 3-3-2에서 보여주는 결과와 같이, 화합물 3, 5 - 7과 9는 PTP1B 효소를 15.01 ± 0.20부터 21.86 ± 0.48 μM 농도범위에서 저해하였으며 화합물 4와 11 - 14는 약한 저해활성을 보여 주었다.

표 3-4-2 Inhibitory Effects of Compounds 1- 15 on PTP1B Enzyme

Compounds	Inhibitory effect (IC <sub>50</sub> , μM) <sup>a</sup>
1	NA <sup>b</sup>
2	NA
3	21.86 ± 0.48
4	> 30
5	18.69 ± 0.28
6	15.01 ± 0.20
7	16.82 ± 0.42
8	NA
9	19.56 ± 0.37
10	NT
11	> 30
12	> 30
13	> 30
14	> 30
15 <sup>c</sup>	4.12 ± 0.09

NA: Not active.

NT: Not tested.

<sup>a</sup>Values are expressed as mean ± SD of three replicates. Seven concentration points were set for establishment of PTP1B inhibition curve to calculate IC<sub>50</sub> value.

<sup>b</sup>Compounds showed no activity at concentration of 50 μM.

<sup>c</sup>Compound 15 (ursoilc acid) was used as positive control.

(라) 노니로부터 분리한 화합물 1 - 15의 2-NBDG uptake 측정

분리된 15종의 화합물에 대한 2-NBDG를 사용하여 uptake 능력을 측정하였다. 2-NBDG uptake 측정을 위하여 지방전구세포인 3T3-L1 pre-adipocytes를 Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), 10% calf serum (CS), pen/strep (50 units/mL penicillin과 50 µg/mL streptomycin)에서 95% 공기와 5% CO<sub>2</sub> 조건에서 2일간 배양하였다. 지방세포로 분화를 촉진하기 위하여 10% fetal bovine serum (FBS), 0.5 mM 3-isobutyl-1-methyl-xanthine, 2 µg/ml dexamethasone, 1 µg/mL insulin, 1 µM rosiglitazone과 pen/strep을 포함한 DMEM 배양액으로 치환하고 48시간 추가 배양하였다. dlg로 매 2일 간격으로 세포가 10% FBS, 1 µM rosiglitazone, 1 µg/mL insulin과 pen/strep을 포함한 DMEM 배양액으로 유지되었고, 분화가 시작된 7일후에 실험을 위하여 사용하였다.

지방세포인 3T3-L1 adipocytes에서 2-NBDG uptake는 다음의 방법을 이용하여 측정되었다. 분화된 3T3-L1 adipocytes ( $3 \times 10^4$  cells/well)가 24-well tissue culture plate (BD Falcon, NJ, USA)에 분주된 후, 10% FBS, pen/strep와 2-NBDG를 실험하려는 화합물과 대조군으로 나누는 뒤 포도당이 들어있지 않는 배양액에서 처리되었다. 그리고 나서 배양액은 저 포도당 농도의 혈청이 첨가되지 않는 배양액으로 3시간동안 유지 되었다. 이러한 배양액은 최종적으로 실험물질을 포함한 DMEM 배양액으로 치환되었으며, 양성대조군으로 로지글리티아존 (400 µg/mL)이 처리되었다. 배양액은 30분 후 50 µM 2-NBDG를 포함한 DMEM으로 치환되었고, 1시간 배양 후 pre-warmed phosphate buffered saline (PBS)으로 두 번 수세한 뒤 70 µL 0.1 M potassium phosphate, 1% triton X-100, pH 10의 PBS buffer에 10분동안 방취한 후 30 µL DMSO를 첨가하여 가볍게 섞어 주었다. NBDG값은 VICTORTM X3 Multilabel fluorescent reader (PerkinElmer; excitation 450 nm and emission 535 nm)에서 측정되었다.

화합물 1 - 15가 지방세포인 3T3-L1 adipocyte 세포주에서 2-NBDG uptake가 측정되었을 때, 화합물 1 - 15 중 화합물 3, 6, 7과 15는 2-NBDG uptake에서 특별한 자극효과를 보여 주었다. 화합물 3, 6, 7의 자극효과는 각각 대조군인 로지글리티아존의 89.61%, 85.84% 및 85.48% 이었다. 사용된 대조군 및 또한 노니로부터 대량 분리된 화합물 15 (ursolic acid)는 대조군 대비 106.96%로 보다 강력한 활성을 보여 주었다. 보기 36의 결과로부터 ursolic acid와 7,9':9,7'-diepoxy lignanes들은 2-NBDG uptake에서 3',8-epoxy-7,4'-oxynolignanes보다 강력한 자극효과가 있음을 알수 있었다. 더욱이, 화합물 3과 4에서 볼 수 있는 7,9':9,7'-diepoxy lignane 기능기는 C-7' 위치의 절대배열에서의 차이에 기인할 수 있는 극적인 차이를 보여 주었다. 화합물 4와 비교되었을 때 화합물 5 - 7 은 그들의 구조에서 더많은 oxymethyl 그룹을 갖고 있으며 이들 그룹은 2-NBDG uptake와의 관련성을 갖을 수도 있다 (그림 3-4-31).



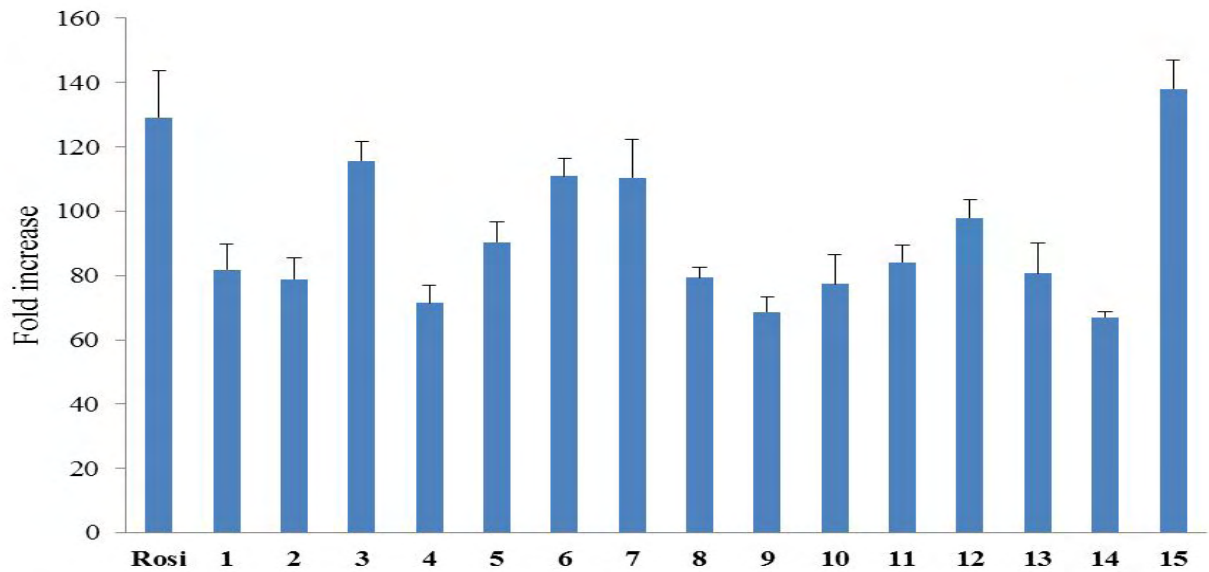


그림 3-4-31. Stimulatory effects of compounds (1 - 15) on 2-NBDG uptake in 3T3-L1 adipocyte cells (Rosi: rosiglitazone). The tested compounds (1 - 15), DMSO (vehicle), and rosiglitazone (positive control, 400  $\mu$ g/ml) were treated to the cells for 90 min. Compounds 1, 3, 6, and 9 were treated at concentration of 20  $\mu$ M, while other compounds were treated at 40  $\mu$ M. Compared with that of Rosi, stimulatory effects of compounds 3, 5 - 7, and 12 were around 89.61%, 69.99%, 85.84%, 85.48%, and 75.80%, respectively.

(4) 발효 전 노니와 발효 후 노니의 비교를 통하여 발효에 따라 증가하는 활성물질의 분석조건 확립

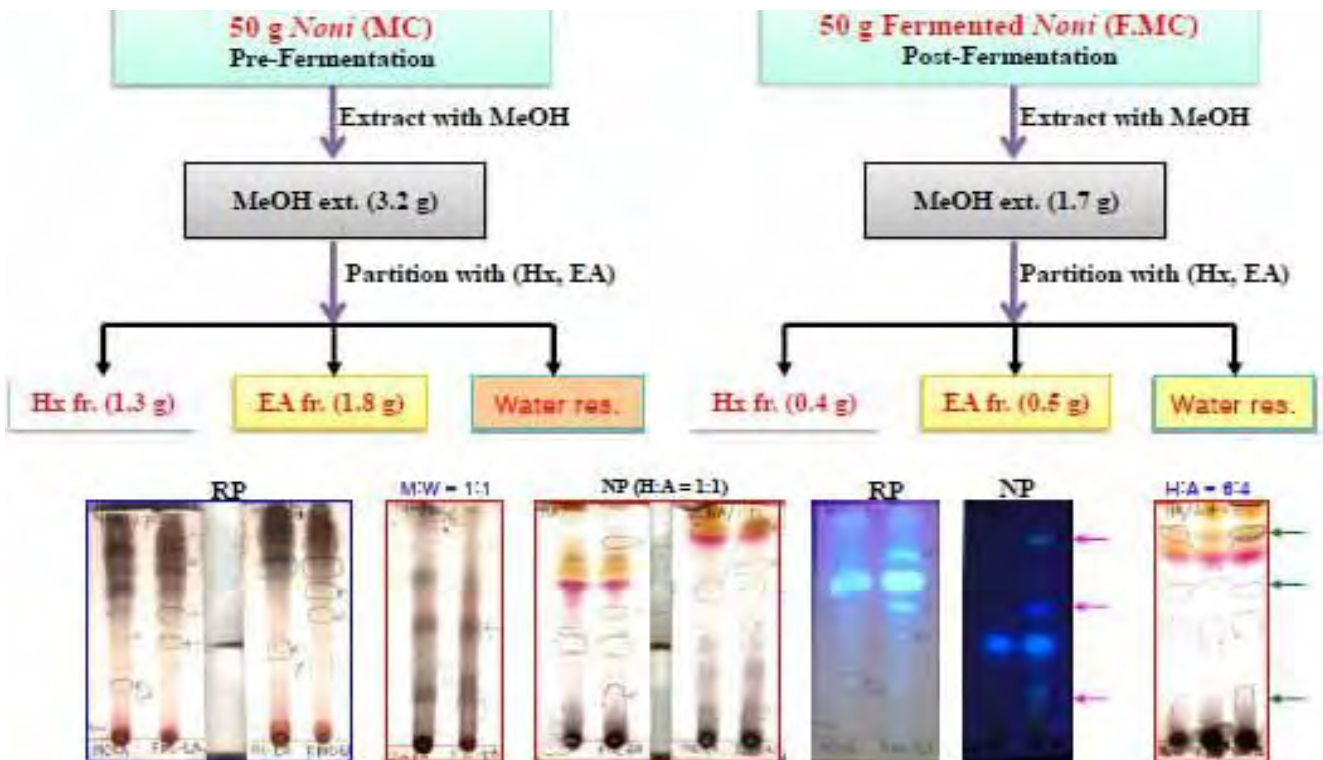
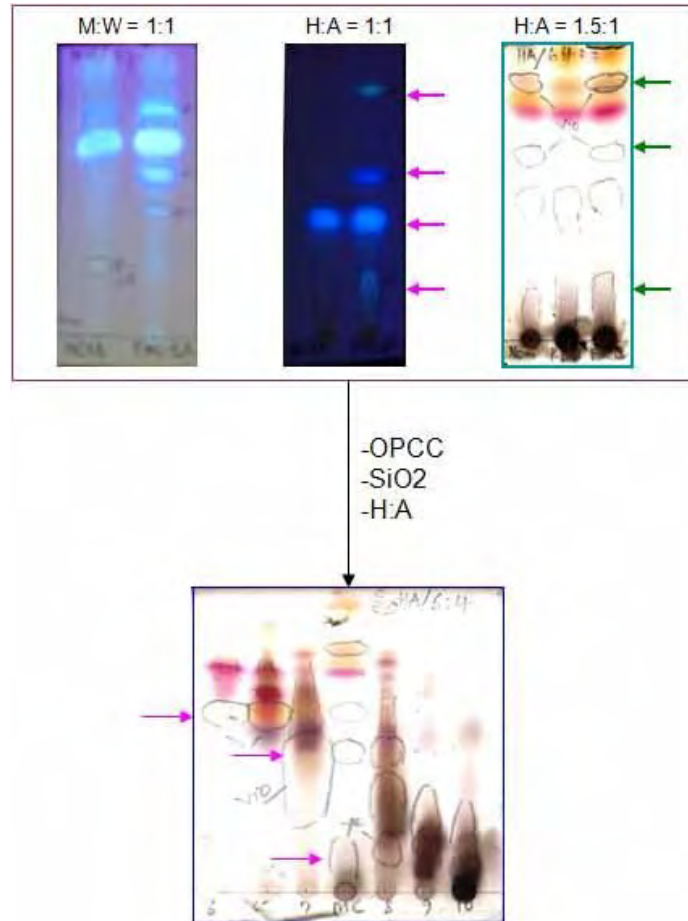


그림 3-4-32. 발효전과 발효후의 노니의 비교를 통하여 발효 표준물질 선정을 위한 활성물질 검출방법 확립



노니의 발효 전과 발효 후를 TLC로 비교하여 본 결과 형광물질이 증가함을 알았다. 이들 화합물을 분리하기 위하여 노니의 발효대사체를 분획한 후 RP-18 column chromatography, 실리카겔 column chromatography 및 HPLC를 통하여 형광물질의 분리를 시도 하였다. 이들로부터 3개의 화합물을 얻었고 2 개의 화합물은 coumarine 계열의 물질이었으며, 다른 한개는 트리테페노이드 계열의 물질임을 확인 하였다.

(5) 발효 후 노니로부터 증가된 화합물의 구조 해석

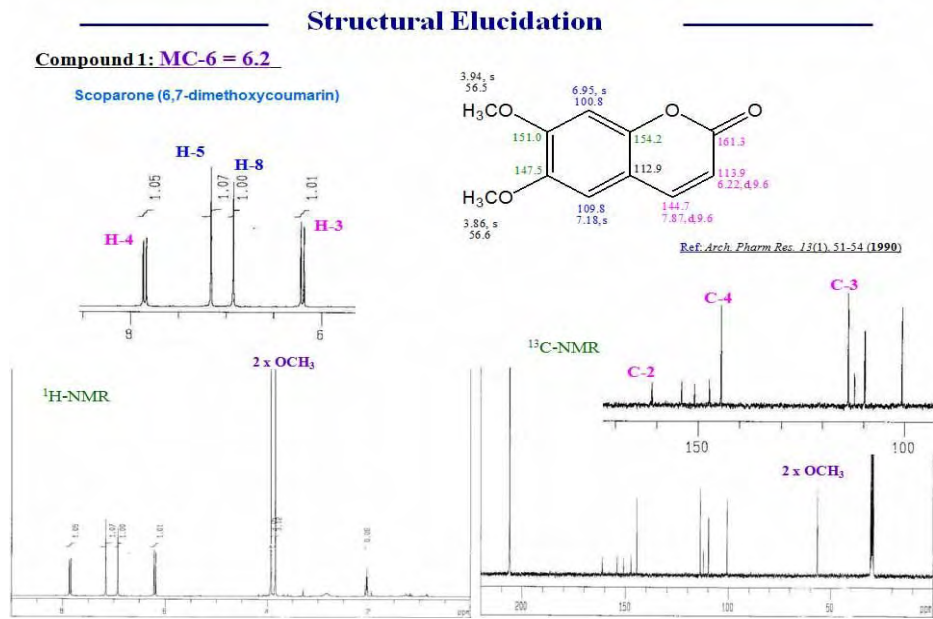


그림 3-4-33. 화합물 MC-6의 화학구조 및 그들의 <sup>1</sup>H-NMR과 <sup>13</sup>C-NMR spectrum (화합물 1)

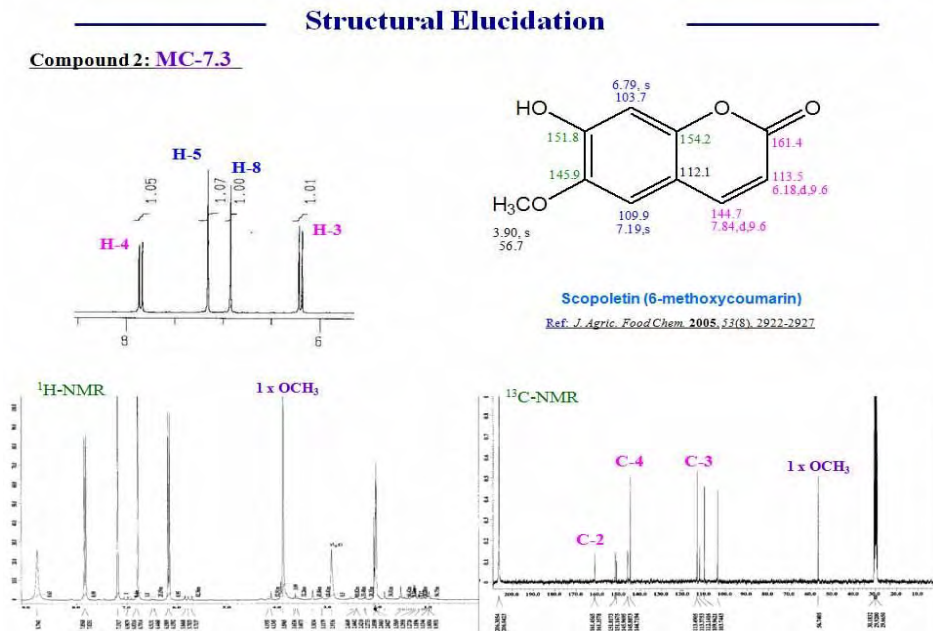


그림 3-4-34. 화합물 MC-7.3의 화학구조 및 그들의 <sup>1</sup>H-NMR과 <sup>13</sup>C-NMR spectrum (화합물 2)

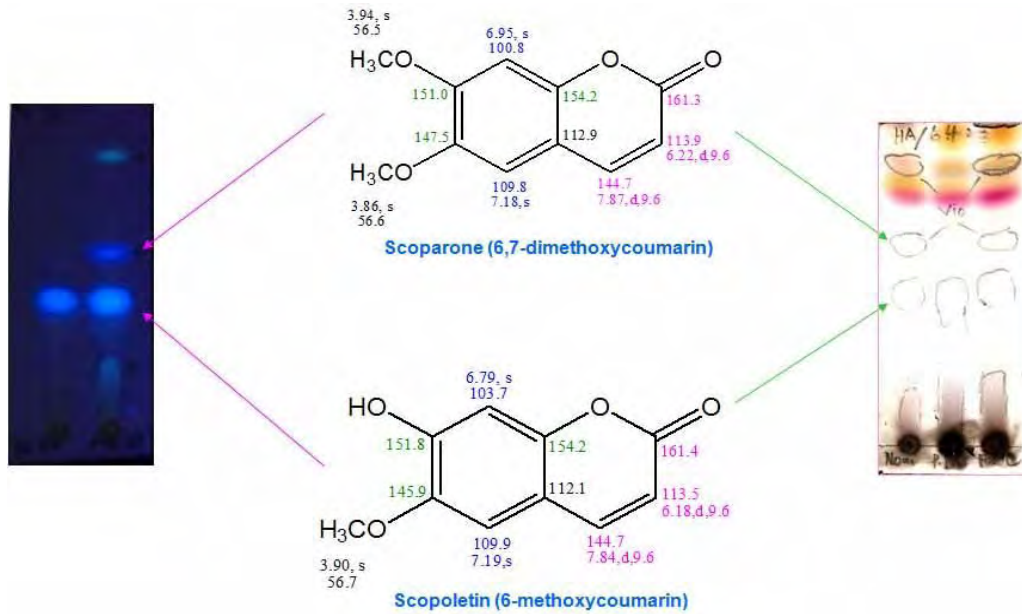
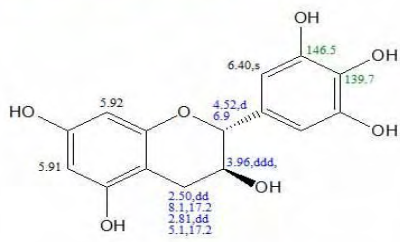


그림 3-4-35. 발효시 증가하는 화합물 1과 화합물 2의 TLC 비교

(6) 녹차로부터 2-NBDG uptake를 증가시키는 화합물의 분리

녹차로부터 모두 8종의 화합물을 분리하여 이들의 화학구조를  $^1\text{H-NMR}$  및  $^{13}\text{C-NMR}$ 을 통하여 구조를 확인하였음. 이들 화합물들은 모두 카테킨 계열의 물질 이었다. 이들 화학구조의 확인으로부터 발효전과 발효후의 화합물을 비교하기 위하여, 동일량의 발효추출물을 용매분획한 뒤 HPLC에 주사하여 변화량을 확인하였음. 또한 이들 얻어진 화합물을 2-NBDG의 양을 측정한 결과 녹차 화합물들도 혼합 발효대사체의 항당뇨 효능에도 기여함을 추정할 수 있었다.

Compound: F.CS-2



(+)-gallocatechin (GC)

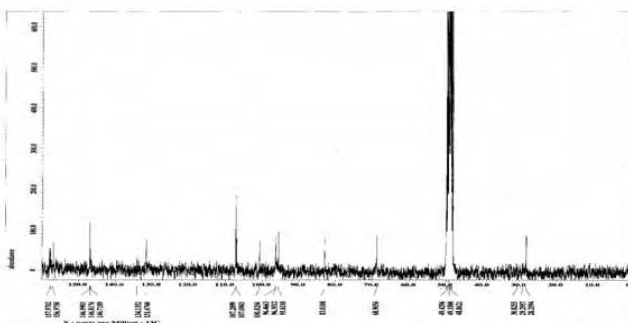
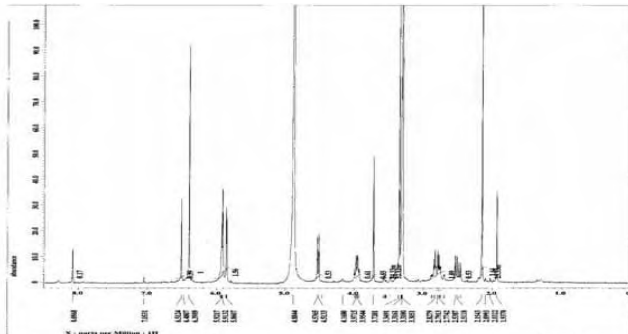
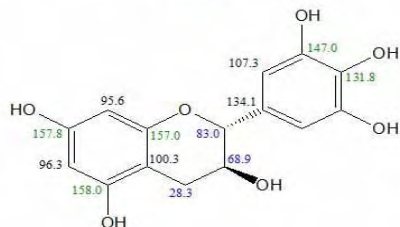


그림 3-4-36. 화합물 F.CS-2의 화학구조 및 그들의  $^1\text{H-NMR}$  spectrum (화합물 2)

**Compound: F.CS-2**

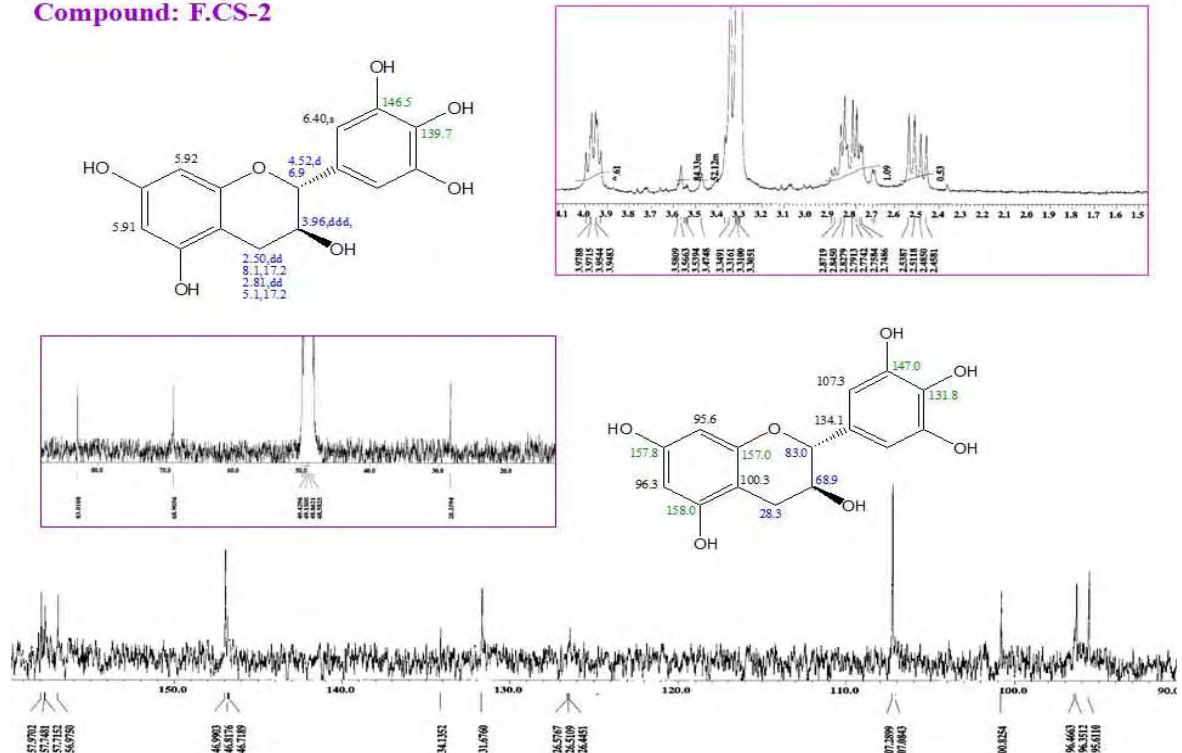


그림 3-4-37. 화합물 F.CS-2의 화학구조 및 그들의 <sup>13</sup>C-NMR spectrum (화합물 2)

**Compound: F.CS-3 = PM-125.1**

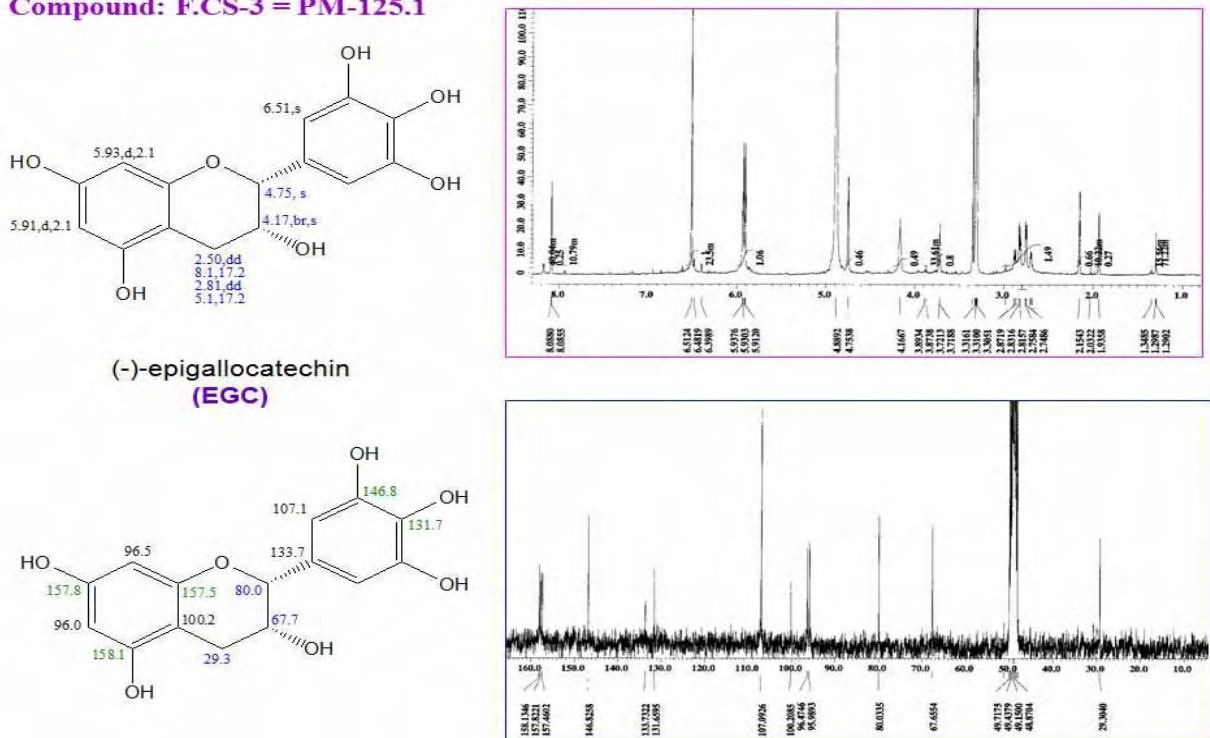
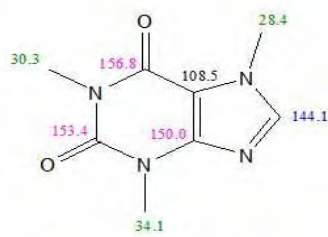
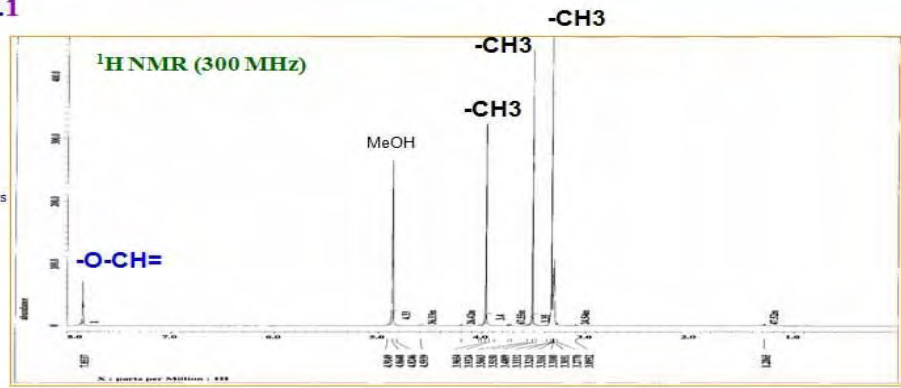
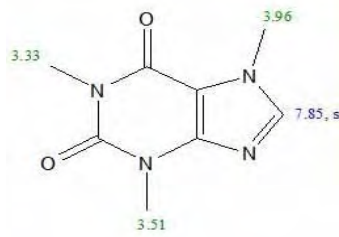


그림 3-4-38. 화합물 F.CS-3의 화학구조 및 그들의 <sup>1</sup>H-NMR과 <sup>13</sup>C-NMR spectrum ( 화합물3)

**Compound 2: PM-132.1**



**1,3,7-trimethylxanthine (Caffeine)**

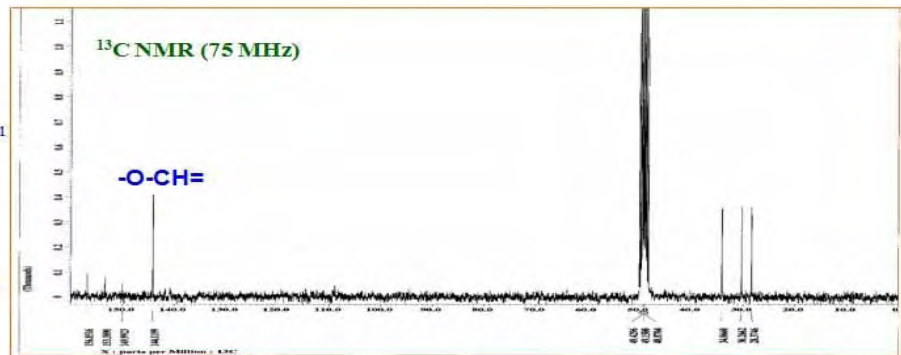
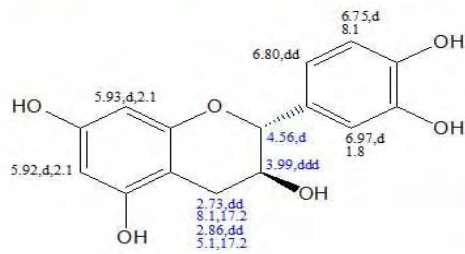


그림 3-4-39. 화합물 F.CS-3의 화학구조 및 그들의  $^1\text{H}$ -NMR과  $^{13}\text{C}$ -NMR spectrum ( 화합물 4)

**Compound:CS-4' = TA.431**



**(+)-catechin**

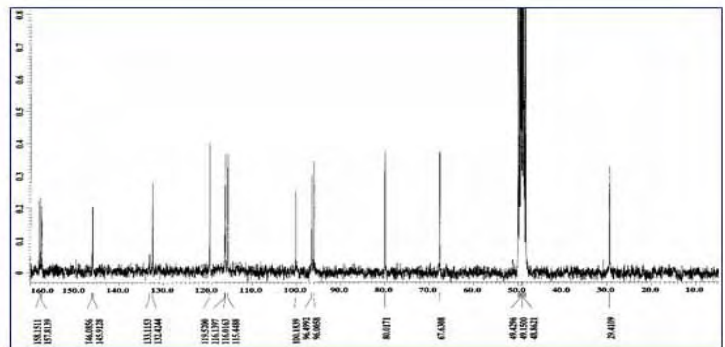
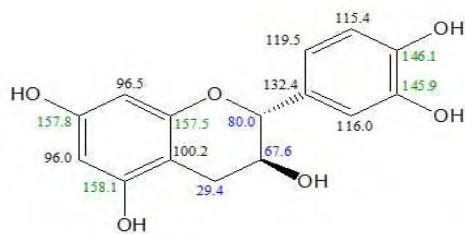
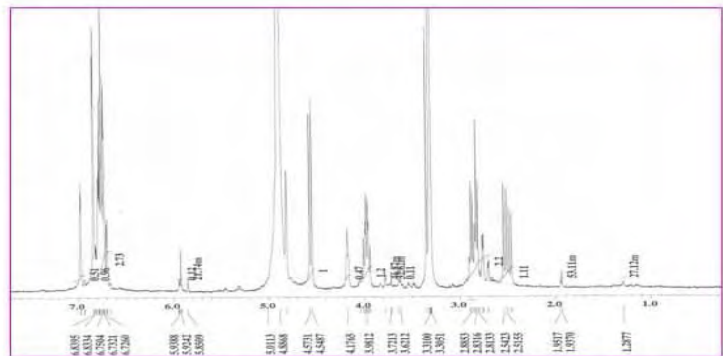
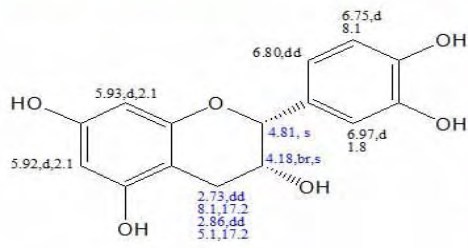


그림 3-4-40. 화합물 F.CS-4의 화학구조 및 그들의  $^1\text{H}$ -NMR과  $^{13}\text{C}$ -NMR spectrum ( 화합물5)

Compound: F.CS-5 = TA.432



(-)-epicatechin

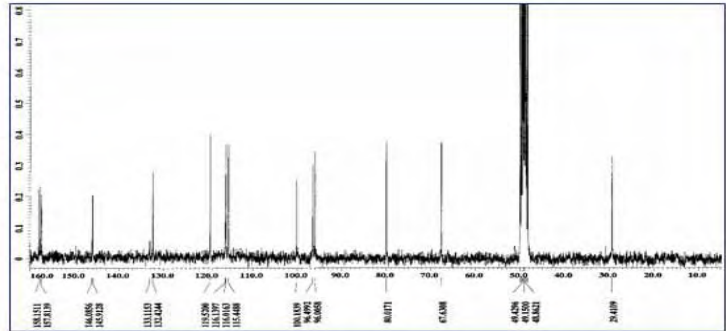
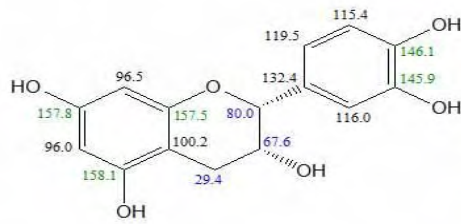
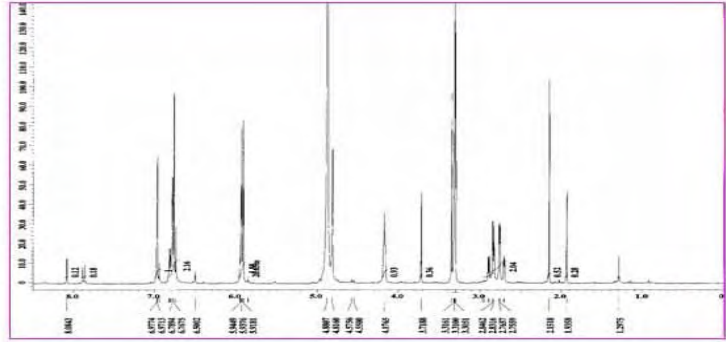
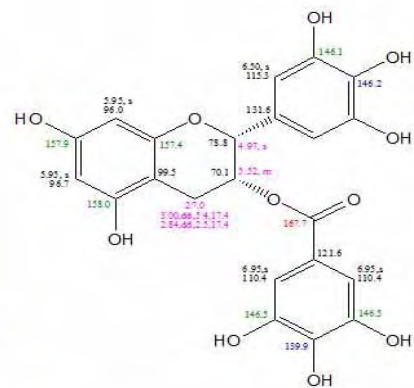
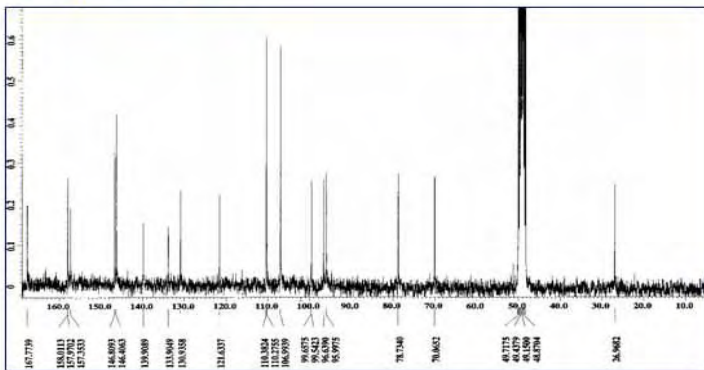


그림 3-4-41. 화합물 F.CS-5의 화학구조 및 그들의  $^1\text{H-NMR}$ 과  $^{13}\text{C-NMR}$  spectrum ( 화합물6)

Compound: F.CS-6



(-)-epigallocatechin-3-O-gallate (EGCG)

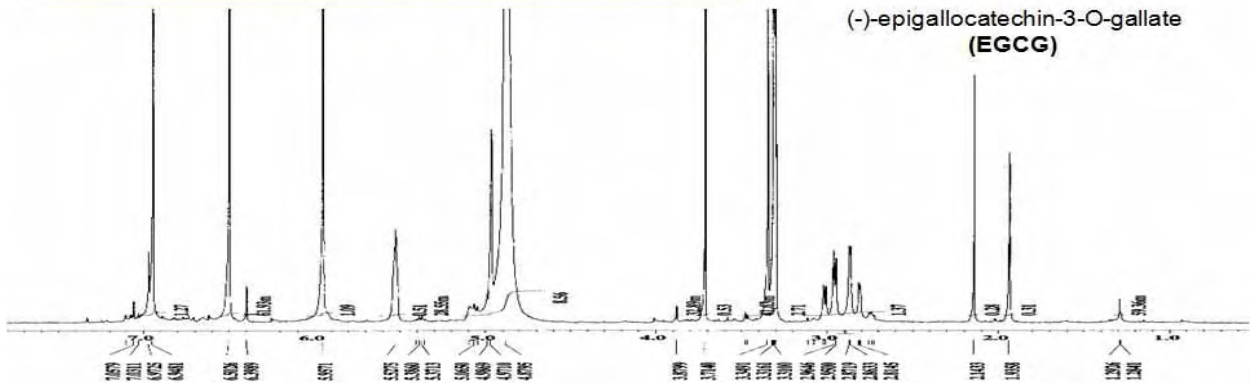


그림 3-4-42. 화합물 F.CS-6의 화학구조 및 그들의  $^1\text{H-NMR}$ 과  $^{13}\text{C-NMR}$  spectrum ( 화합물 7)

Compound: F.CS-7

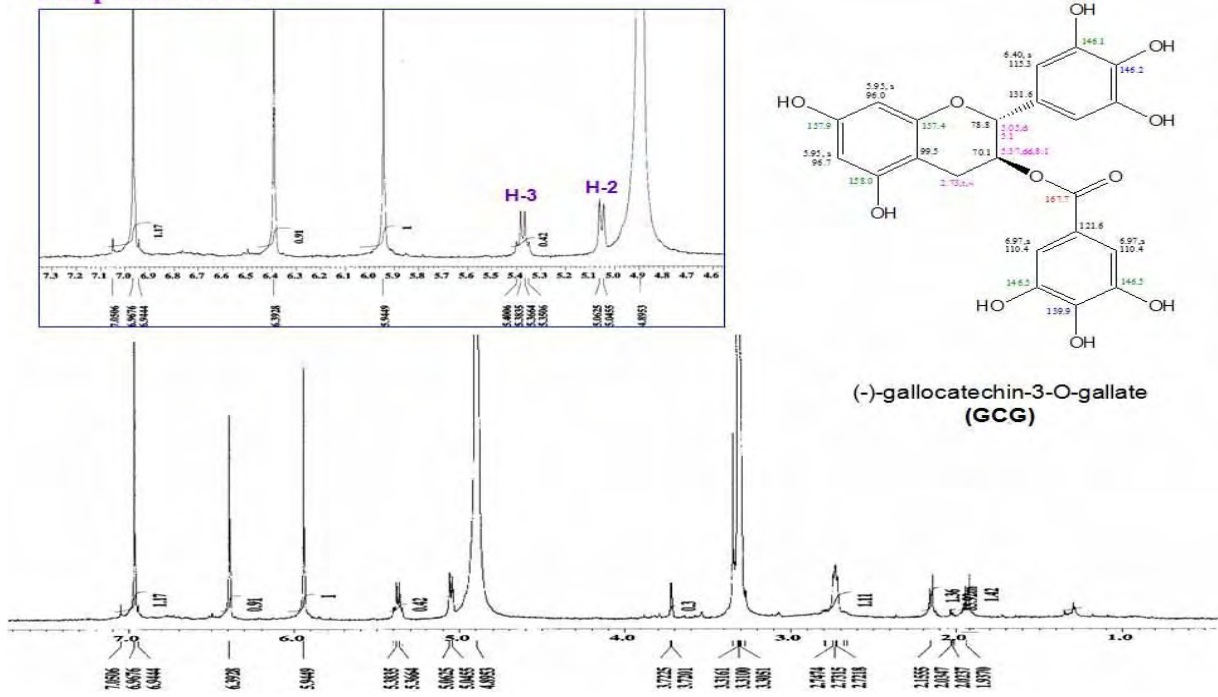


그림 3-4-43. 화합물 F.CS-7의 화학구조 및 그들의  $^1\text{H-NMR}$ 과  $^{13}\text{C-NMR}$  spectrum ( 화합물8)



(7) 녹차로부터 2-NBDG uptake를 증가시키는 화합물 및 발효과정에서의 변화추적  
 녹차로부터 모두 8종의 화합물을 분리하고 이들의 발효 전후의 양상을 비교한 결과, 발효 시 FCS-1과 caffeine의 양이 증가하였으므로 발효 시 녹차는 적합하지 않은 것으로 판단하여 발효침가를 하지 않을 것을 권고함. 주관기관과의 협의를 거쳐 연구진행을 하지 않음.

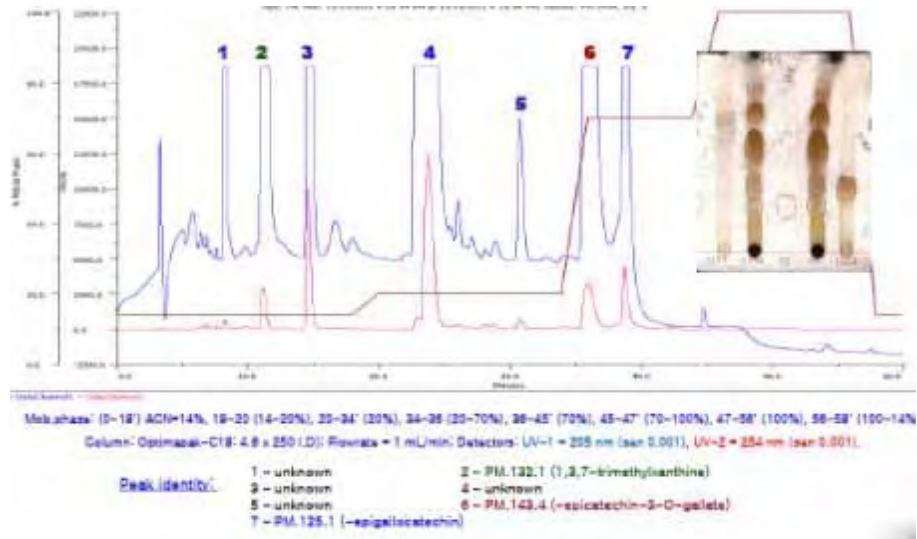


그림 3-4-44. 발효전과 발효후의 지표물질 비교를 위한 분석 조건 확립

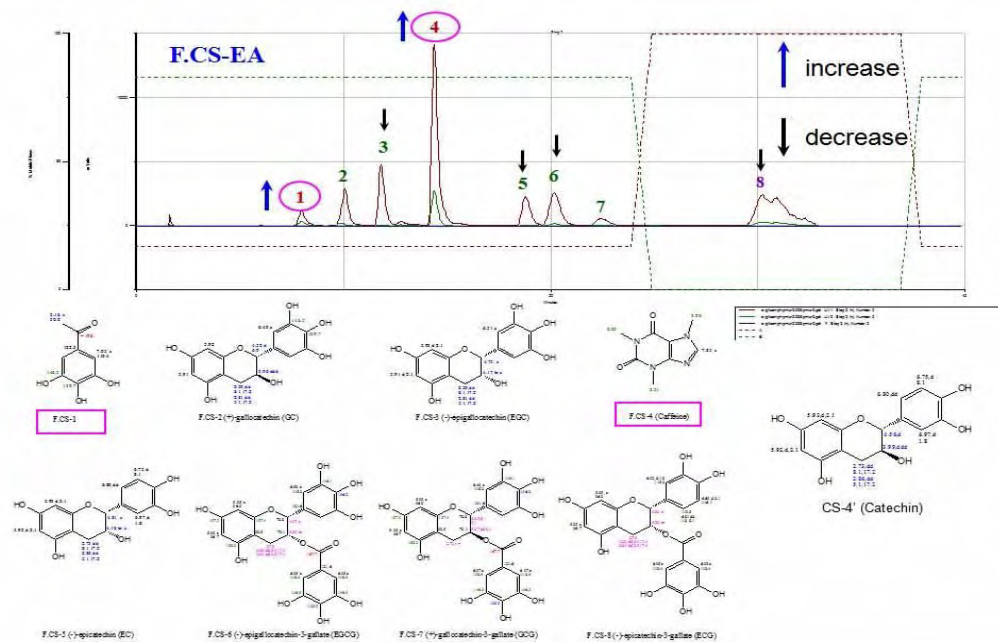


그림 3-4-45. 발효후 증가하는 화합물의 결정 (Caffeine과 FCS-1이 증가)

나. 간섬유화 치료효능 물질의 발굴

(1) 발효 혼합물로부터 간섬유화 치료효능 물질발굴

(가) 미강 복합체 발효물로부터 간섬유화 치료효능 후보 물질 분리 및 활성 평가

간의 섬유화 과정에서 핵심적인 역할을 수행하는 세포는 stellate 세포 (성상세포)로서 정상간이 섬유화 되는 과정에서 지질저장 역할을 수행하는 성상세포는 myofibroblast 세포형으로 전환이 일어난다. 이 성상세포 활성화 과정에서 세포는 특이적으로 alpha-SMA 단백질이 발현되므로 alpha-SMA 단백질을 성상세포 활성화의 특이 marker로 인정된다. 성상세포 활성화는 transforming growth factor-beta (TGF-beta) 분비를 증가시키고, 이는 collagen과 같은 extracellular matrix 단백질 생성을 촉진시켜, 섬유소의 간 내 축적을 일으킨다. 따라서, 간 섬유화 치료를 위한 1차 약리타겟은 성상세포의 활성화 억제가 될 수 있는 것으로 사료된다.

본 연구에서는 미강복합체 발효물에서 추출/분리된 분획들을 대상으로 성상세포 활성화 지표인 alpha-SMA 발현의 억제를 일으킬 수 있는 화합물들을 분획화하고 활성을 측정하는 방법을 매 단계 별로 측정하는 방법을 사용하여 화합물을 분리하고자 하였다. 활성 측정결과, ethyl acetate 분획과 BuOH 분획에서 분명한 억제효과가 발견되었다 (그림 3-4-46).

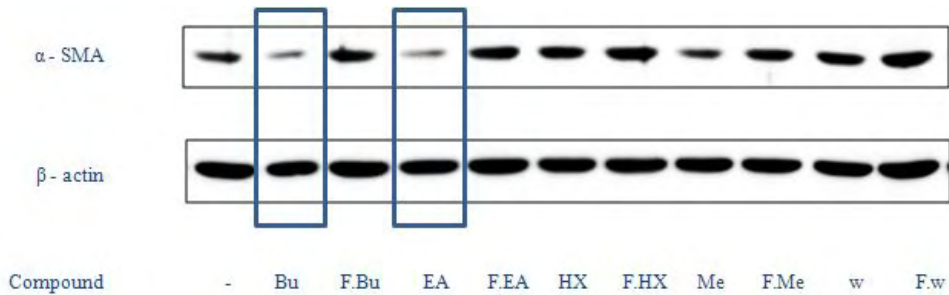


그림 3-4-46. 각 분획의 alpha-SMA 발현억제 효능

활성을 보인 ethyl acetate 분획을 추가적으로 분획화하여 alpha-SMA 발현 억제정도를 평가한 결과, 대부분의 분획에서 억제효능이 관찰되나 Fraction 7, 8번에서 상대적으로 강한 억제활성이 관찰되었다 (그림 3-4-47). 따라서 이들 분획을 이용한 추가 분획화 실험을 수행하였다.

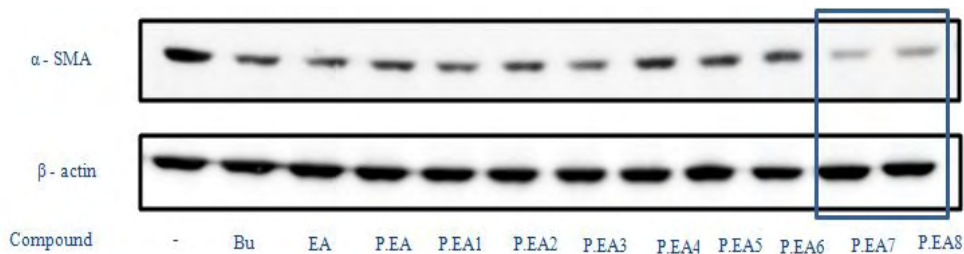


그림 3-4-47. Ethylacetate 분획의 alpha-SMA 발현억제 효능

Alpha-SMA 발현 억제 효능을 평가한 결과, 위의 그림에서 볼 수 있듯이 대부분의 화합물은 극성부 분인 앞부분 분획에서 나왔으므로 분리의 편의를 위하여 분획 F1 (PEA1), F2 (PEA2), F3 (PEA3 - 5), F4 (PEA6), F5 (PEA7 - 8)으로 나누었다. F1부터 F3는 TLC pattern을 비교한 결과 비슷한 TLC pattern을 보였기에 합하여 분리를 시도하였다. 또한 F5분획을 이용하여 7개의 분획으로 나누어 활성 검사를 추가적으로 실시하였다 (그림 3-4-48).

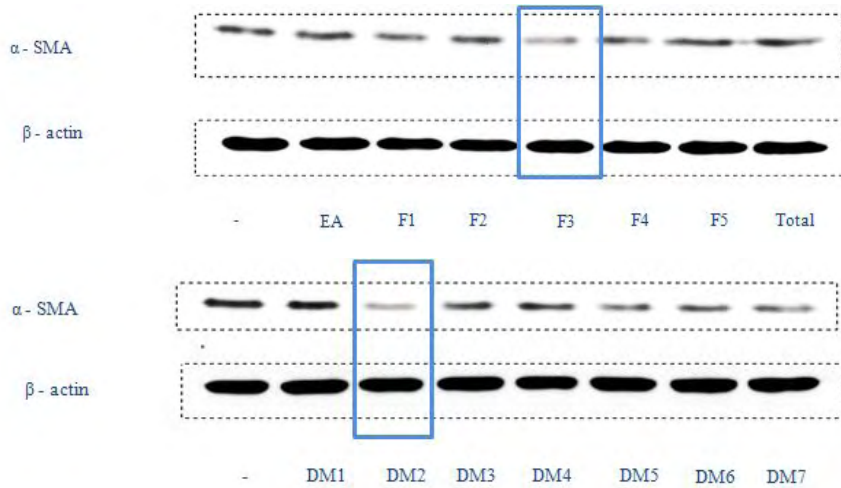


그림 3-4-48. F1분획을 추가 분획한 후 (A)와 F5분획을 추가 분획한 후 (B) alpha-SMA 발현억제 효능 활성 검사

F1 분획을 추가로 분획하여 활성을 측정한 결과 F13 분획이 강한 활성을 보이는 것으로 최종 평가하고 3종의 화합물을 분리하였다. F5분획은 상대적으로 다른 분획에 비하여 발효 부산물의 양이 적었으므로 화합물을 분리하고자 대량 추출 후 상기의 대량 분획화를 시도하였다 (그림 3-4-49).

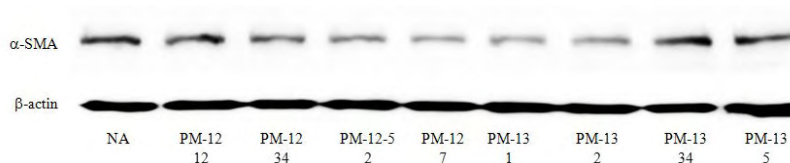


그림 3-4-49. F1 분획에서 분리한 성분들의 alpha-SMA 발현억제 효능

최종분획으로부터 HPLC를 통하여 각각의 피크를 분리하였으며, 몇몇 화합물 들은 단일 화합물로 존재하는 것으로 파악하였다. 최종적으로 얻은 화합물 PM125-2 및 PM132 이었으며 추가적으로 3개의 화합물을 활성물질로 분리하였다 (그림 3-4-50, 51, 52).

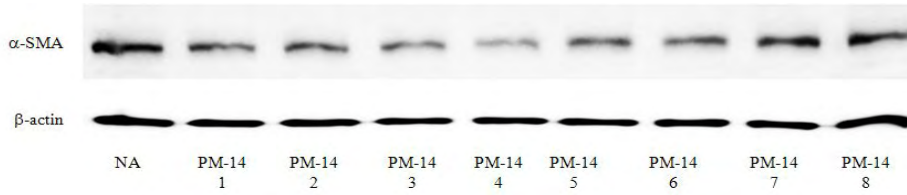


그림 3-4-50. FM3 분획에서 분리한 성분들의 alpha-SMA 발현억제 효과

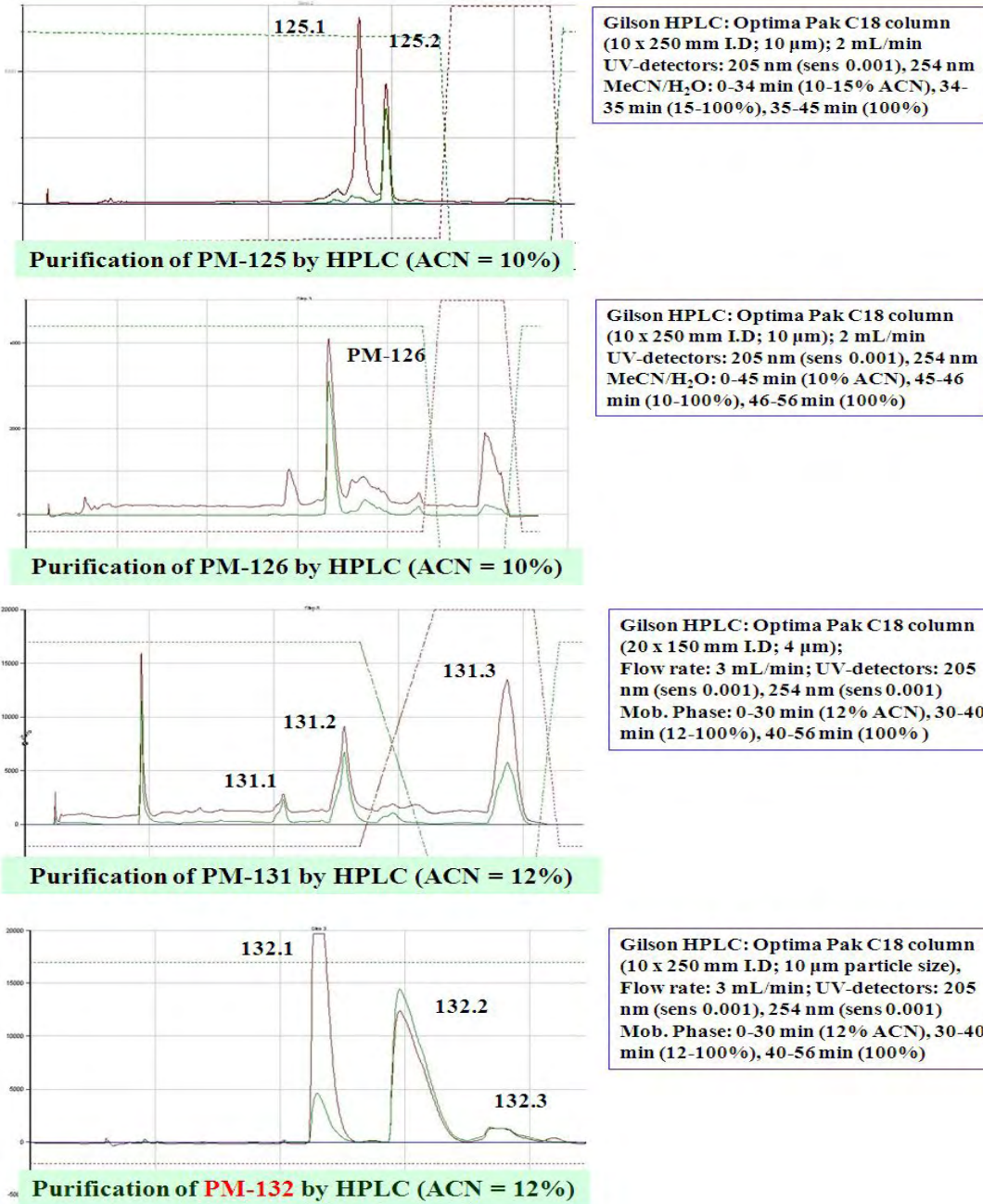
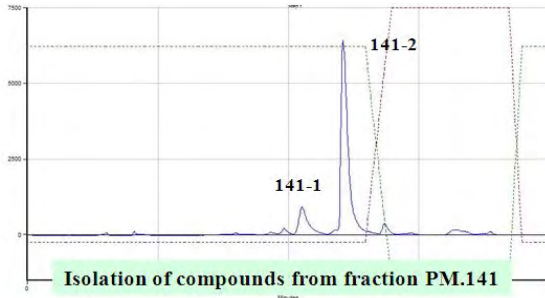
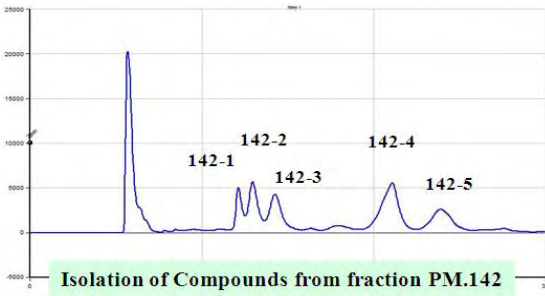


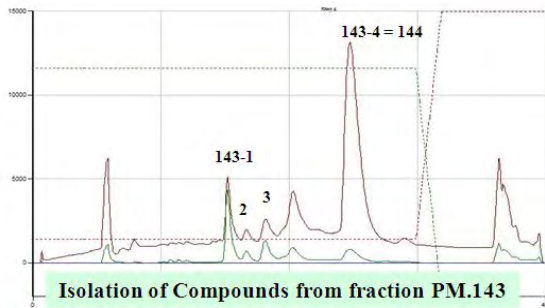
그림 3-4-51. 분획 PM-12분획 PM-13 분획으로부터 HPLC를 통한 화합물의 분리



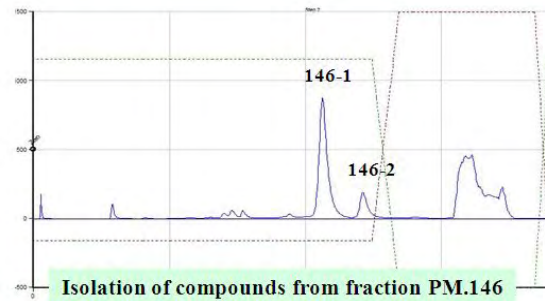
Gilson HPLC: Optima Pak column (10 x 250 mm I.D; 10  $\mu$ m)  
 Flow rate: 2 mL/min; UV-detectors: 205 & 254 nm (sens 0.001)  
 MeOH/H<sub>2</sub>O: 0-26 min (14% ACN), 26-28 min (14-100% ACN), 28-40 min (100%)



Gilson HPLC: Optima Pak column (10 x 250 mm I.D; 10  $\mu$ m)  
 Flow rate: 2 mL/min; UV-detectors: 254 nm (sens 0.001)  
 ACN/H<sub>2</sub>O: 0-26 min (17% ACN), 26-27 min (17-100% ACN), 27-35 min (100%)



Gilson HPLC: Optima Pak column (10 x 250 mm I.D; 10  $\mu$ m)  
 Flow rate: 2 mL/min; UV-detectors: 254 nm (sens 0.001)  
 ACN/H<sub>2</sub>O: 0-30 min (20% ACN), 30-32 min (20-100% ACN), 32-42 min (100%)



Gilson HPLC: Optima Pak column (10 x 250 mm I.D; 10  $\mu$ m)  
 Flow rate: 2 mL/min; UV-detectors: 254 nm (sens 0.001)  
 ACN/H<sub>2</sub>O: 0-26 min (17% ACN), 26-28 min (17-100% ACN), 28-40 min (100%)

그림 3-4-52. 분획 PM-14 분획으로부터 HPLC를 통한 화합물의 분리

FM3로부터 HPLC를 통하여 각각의 피크를 분획하였으며, 몇몇 화합물 들은 단일 화합물로 존재하는 것으로 파악하였다. 최종적으로 얻은 화합물 PM132-3 및 PM141-1을 얻었으며, 추가적으로 2개의 화합물을 분리하여 현재 구조를 확인 하였다.

(나) 미강 복합 발효물로부터 얻어진 화합물의 구조 결정

① <sup>1</sup>H-NMR (125-2)

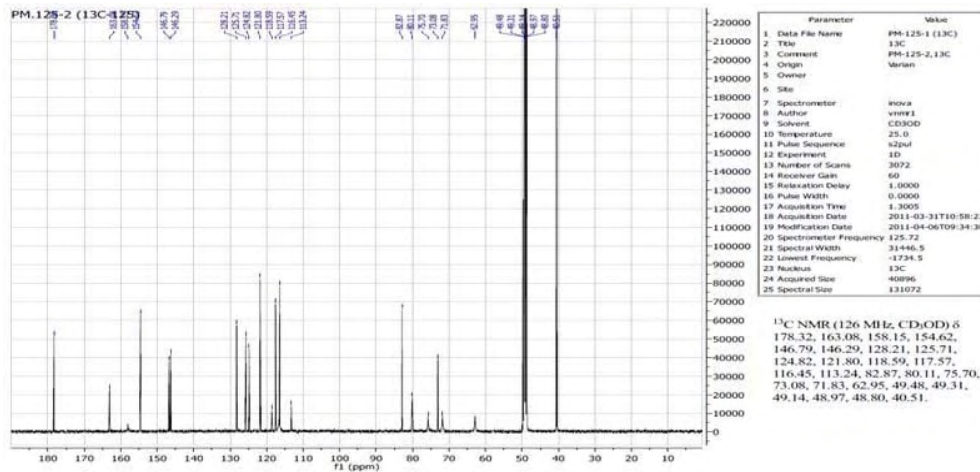


그림 3-4-53. 미강 복합발효물로부터 얻어진 화합물의 <sup>1</sup>H-NMR (125-2)

② <sup>13</sup>C-NMR (125-2)

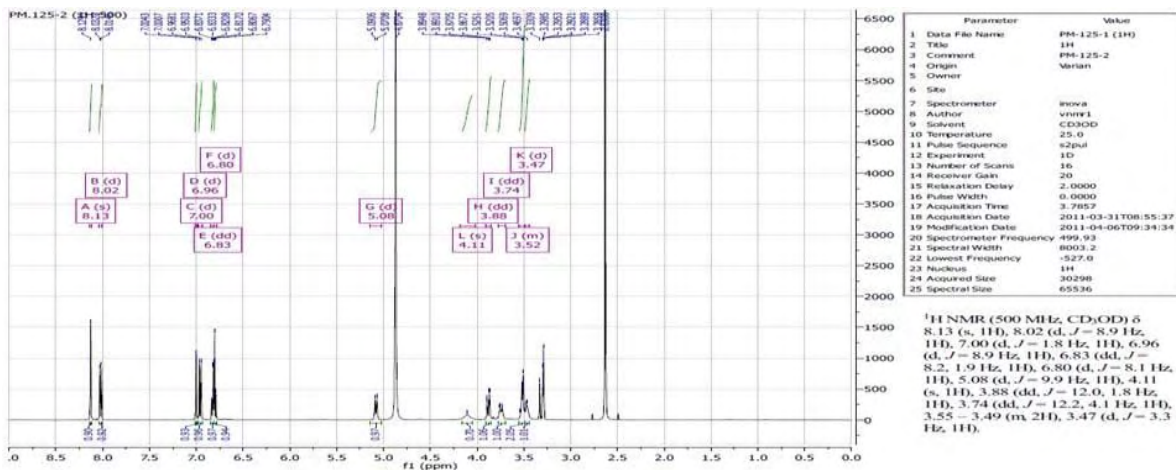


그림 3-4-54. 미강 복합발효물로부터 얻어진 화합물의 <sup>13</sup>C-NMR (125-2)

③ 화합물 (125-2)의 NMR에서의 모핵 확인

화합물 PM 125-2의 <sup>1</sup>H 및 <sup>13</sup>C NMR 스펙트럼의 결과로부터 화합물은 이소플라본 골격을 갖는 화합물로 추정하였다. 이러한 이소플라본 골격은 <sup>1</sup>H NMR spectrum로부터 δ<sub>H</sub> 8.13 (1H, s)의 특징적인 이소플라본의 2번 수소를 확인하였으며 상응하는 탄소를 <sup>13</sup>C NMR spectrum에서 δ<sub>C</sub> 154.6으로부터 관찰함으로써 확인하였다. B-ring과 A-ring의 치환형식을 확인하여 첨부된 구조에 표시하였으며, 관찰결과 8번위치가 치환된 형태의 화합물로 8번 탄소의 화학적 이동값인 δ<sub>C</sub> 113.2로부터 본 위치에 탄소가 연결된 화합물로 추정하였다. 화합물 PM 125-2의 <sup>1</sup>H 및 <sup>13</sup>C NMR 스펙트럼의 결과는 한 개의 당이 존재함을 제시하였다. 특히적으로 8번의 화학적 이동값이 113.2에 관찰되었으므로 이 위치에 당이 연결함으로 추정하였다. 당부분의 정확한 확인을 위하여 HSQC 실험이 행하여졌으며 이를 통하여 각각의 위치를 결정하였다.

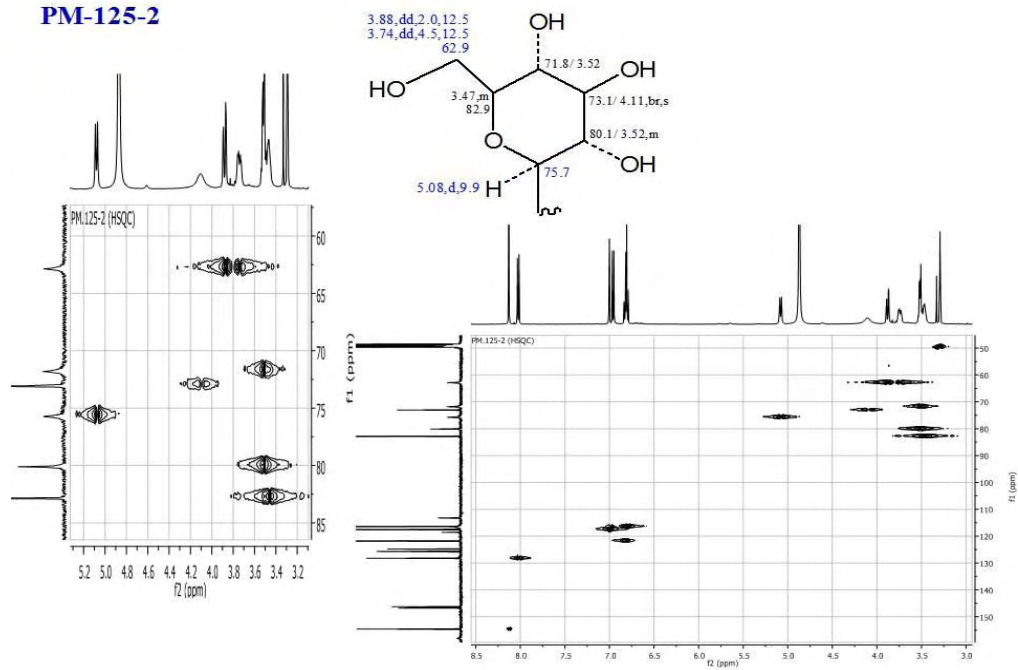


그림 3-4-55. 미강 복합 발효물로부터 얻어진 화합물의 NMR(125-3)

④ 화합물 (125-2)의 HMBC 결과 해석을 통한 최종 구조 확인

화합물 PM 125-2의 정확한 연결을 확인하기 위하여 HMBC 실험이 행하여 졌다. 화합물 PM 125-2의 8번위치에 글루코스가 연결된 형태임을 확인하였으며 특이적으로 C-methylated 연결된 형태의 화합물이 alpha-SMA의 활성을 저해함을 확인하였다.

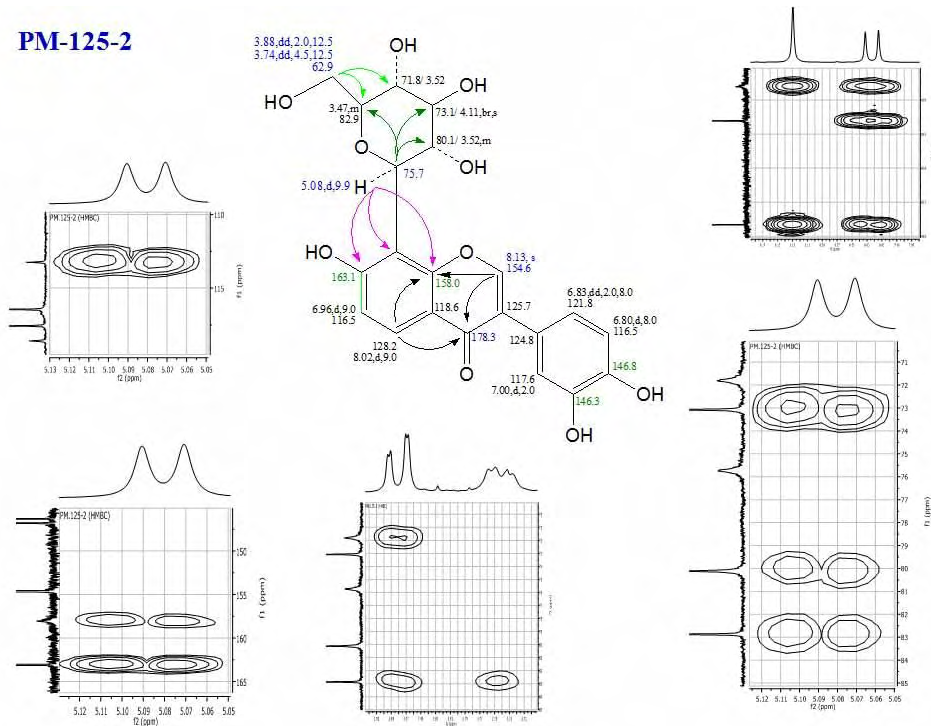


그림 3-4-56. 화합물 125-2의 HMBC

(다) 같은근로부터 분리한 화합물 7종의 구조 확인

분리한 화합물 7종의 화합물의 구조를 아래와 같은 것으로 부분 추정하였다 (그림 3-4-57~62).

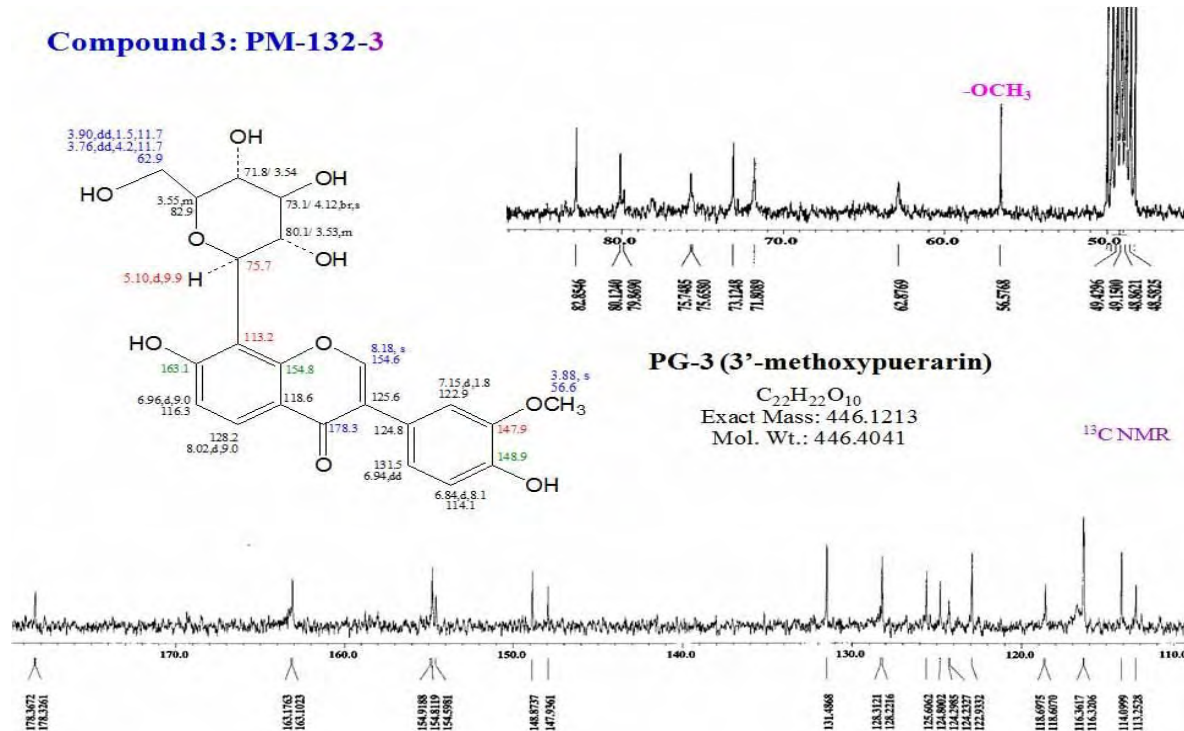
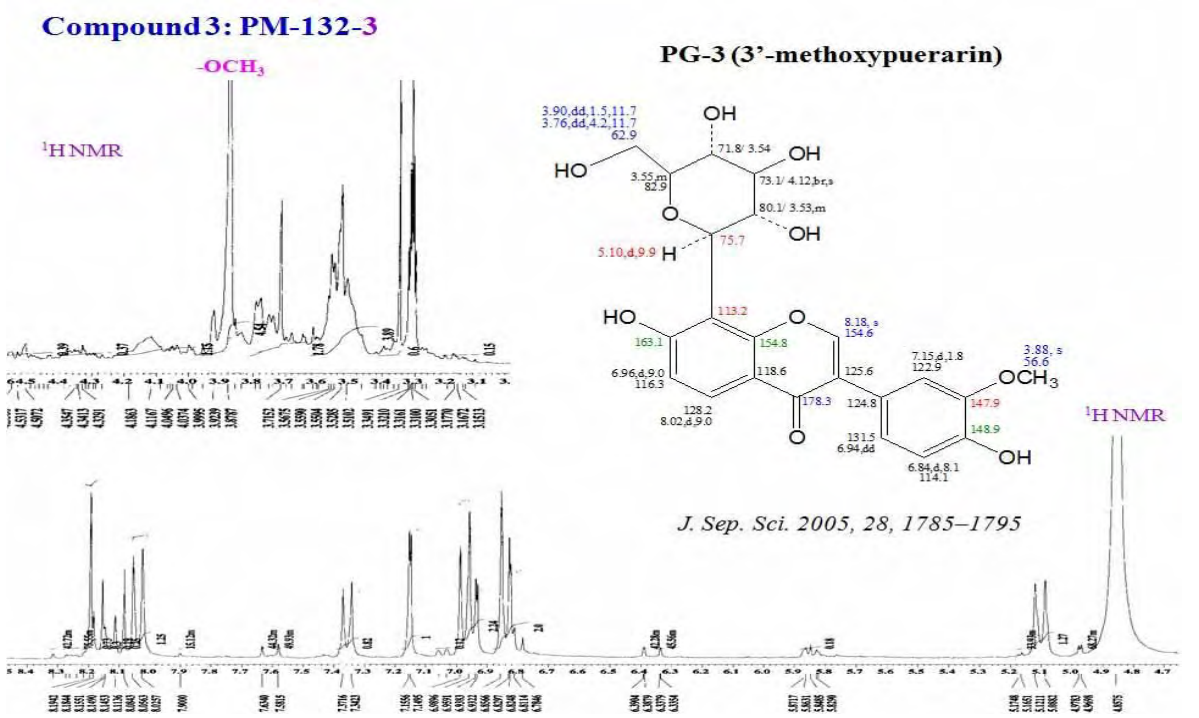
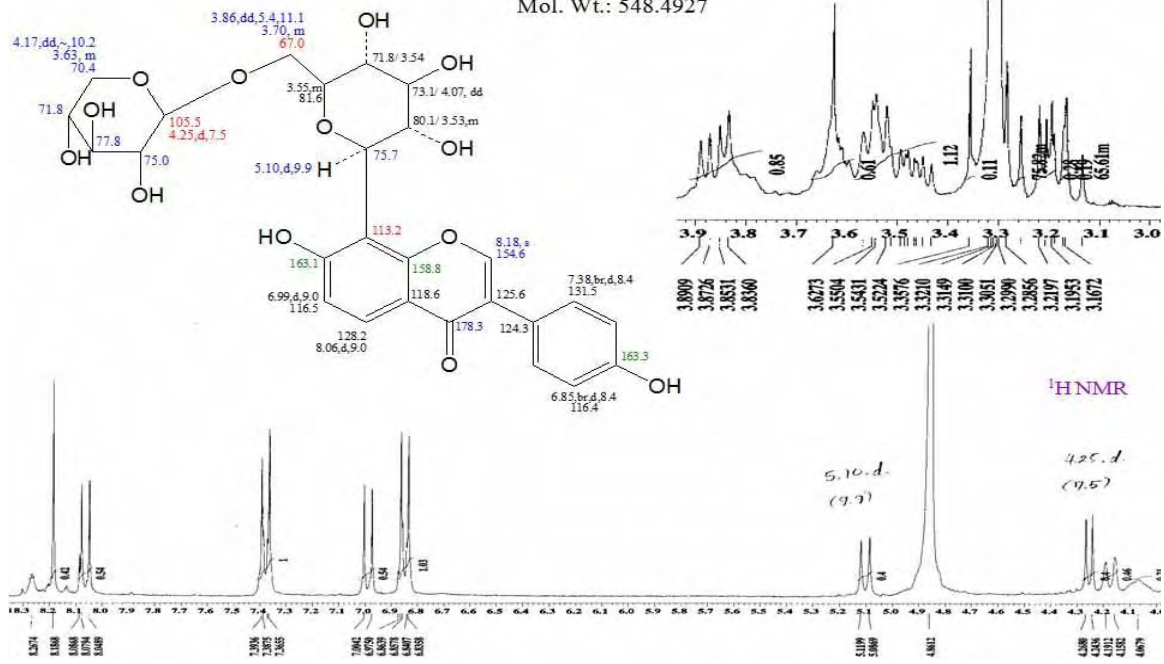


그림 3-4-57. 화합물 PM-132-3의 화학구조 및 그들의 <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C-NMR spectra (화합물 1)



**Compound 4: PM-141-1**

$C_{26}H_{28}O_{13}$   
Exact Mass: 548.153  
Mol. Wt.: 548.4927



**Compound 4: PM-141-1**

**6''-O-D-xylosylpuerarin**

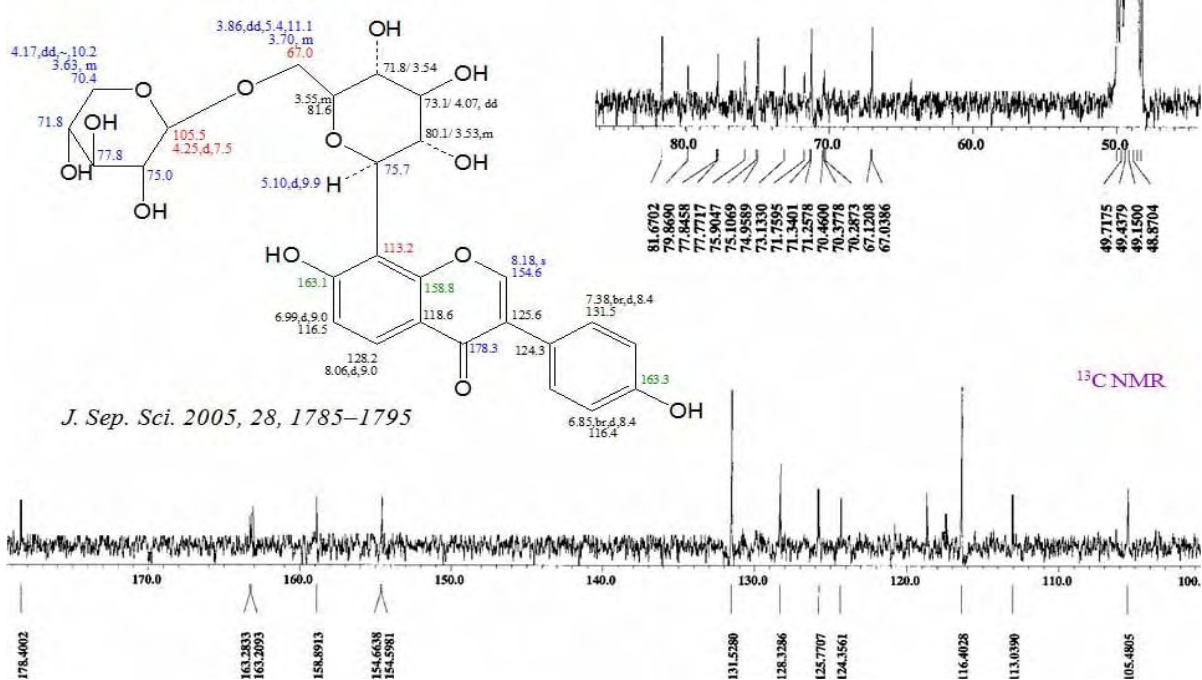
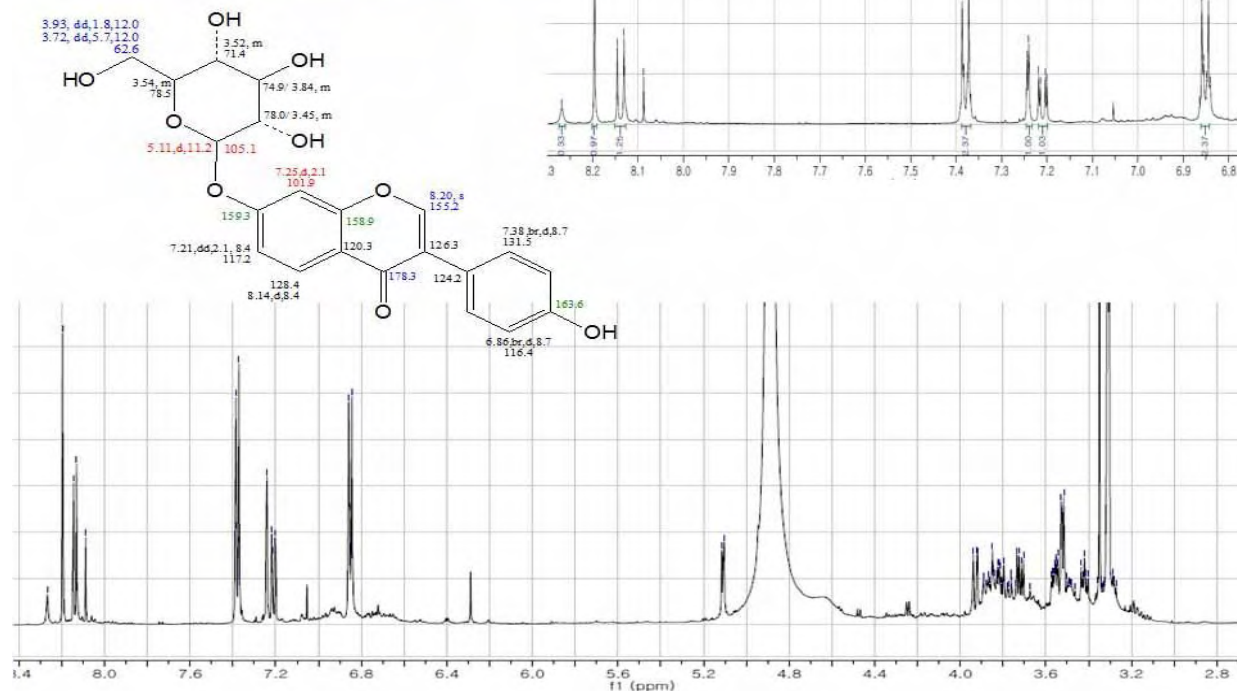


그림 3-4-58. 화합물 PM-141-1의 화학구조 및 그들의  $^1H$  and  $^{13}C$ -NMR spectra ( 화합물2)

**Compound 6: PM-143.1 = 147.1**



**Compound 6: PM-143.1 = 147.1**

**Daidzin**

C<sub>21</sub>H<sub>20</sub>O<sub>9</sub>  
 Exact Mass: 416.1107  
 Mol. Wt.: 416.3781

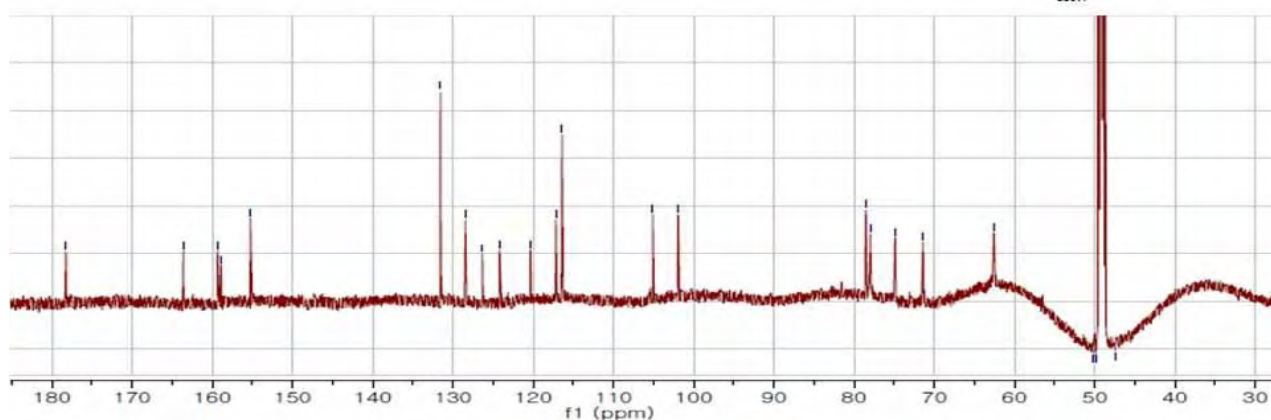
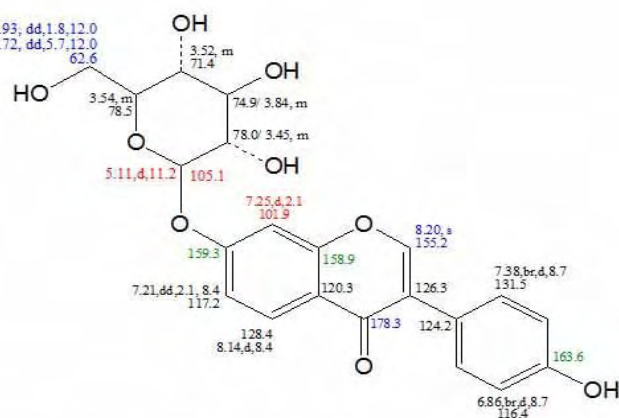


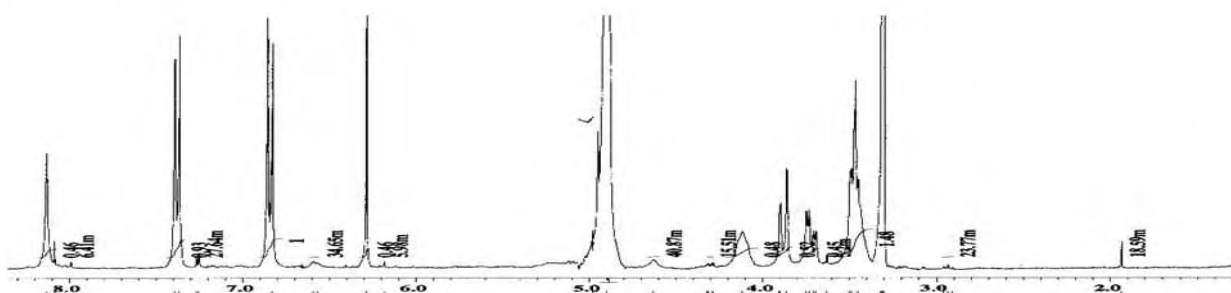
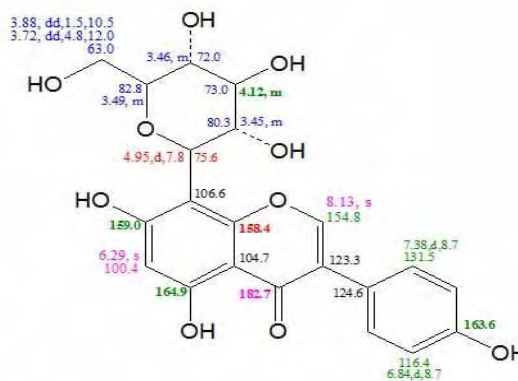
그림 3-4-59. 화합물 PM-143-1=PM147.1의 화학구조 및 그들의 <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C-NMR spectra ( 화합물 3)

**Compound9: PM-147.3**

**Genistein-8-C-glucoside**

C<sub>21</sub>H<sub>20</sub>O<sub>10</sub>  
 Exact Mass: 432.1056  
 Mol. Wt.: 432.3775

Chem. Pharm. Bull. 1992, 40(7), 1978-1980



**Compound9: PM-147.3**

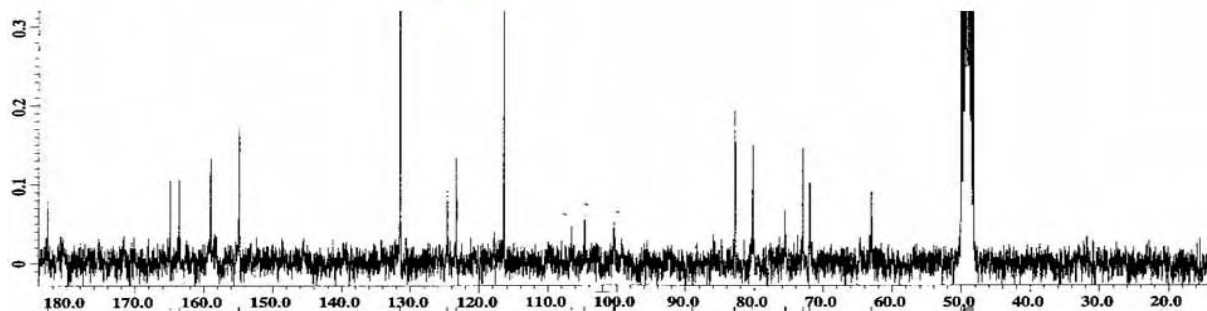
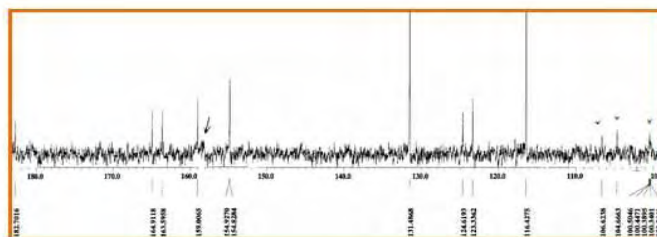
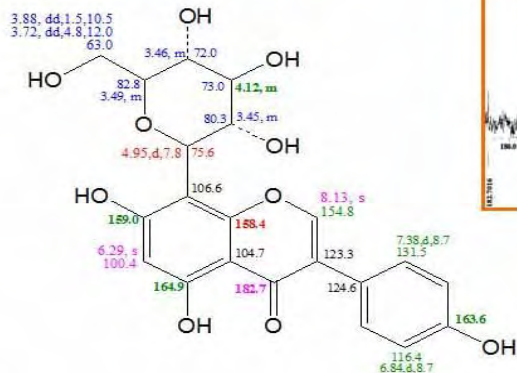
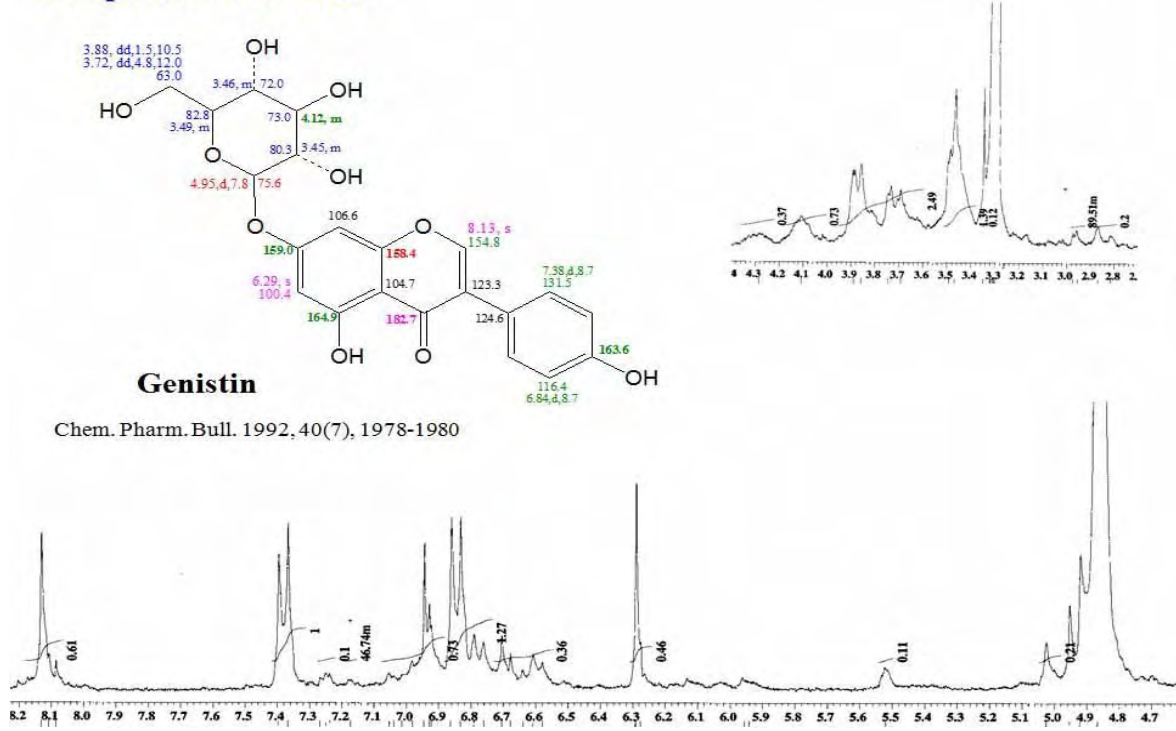


그림 3-4-60. 화합물 PM-147.3의 화학구조 및 그들의 <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C-NMR spectra (화합물 4)



**Compound 8: PM-143.3**



**Compound 7: PM-143.2 = 147.2**

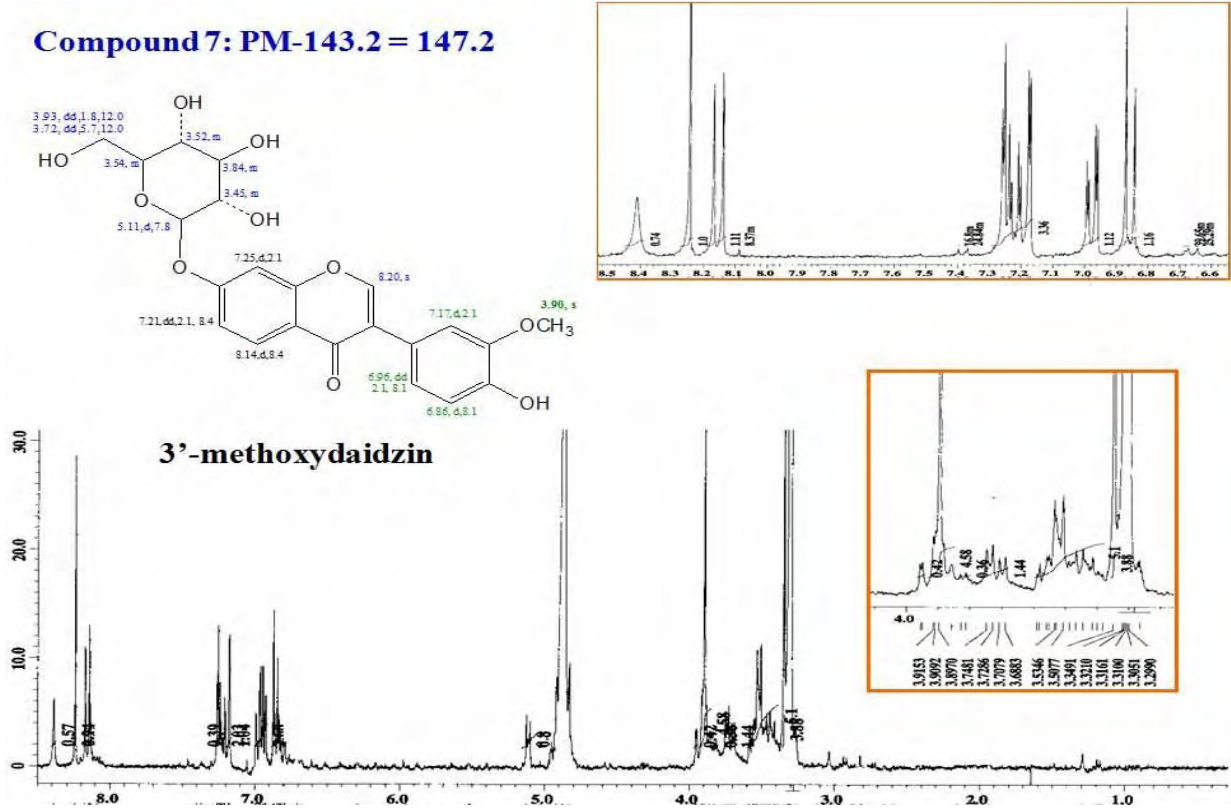


그림 3-4-62. 화합물 PM-143.3의 화학구조 및 그들의 <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C-NMR spectra (화합물 6)

(라) 분리한 화합물들의 물리화학적 특성<sup>27-29</sup>

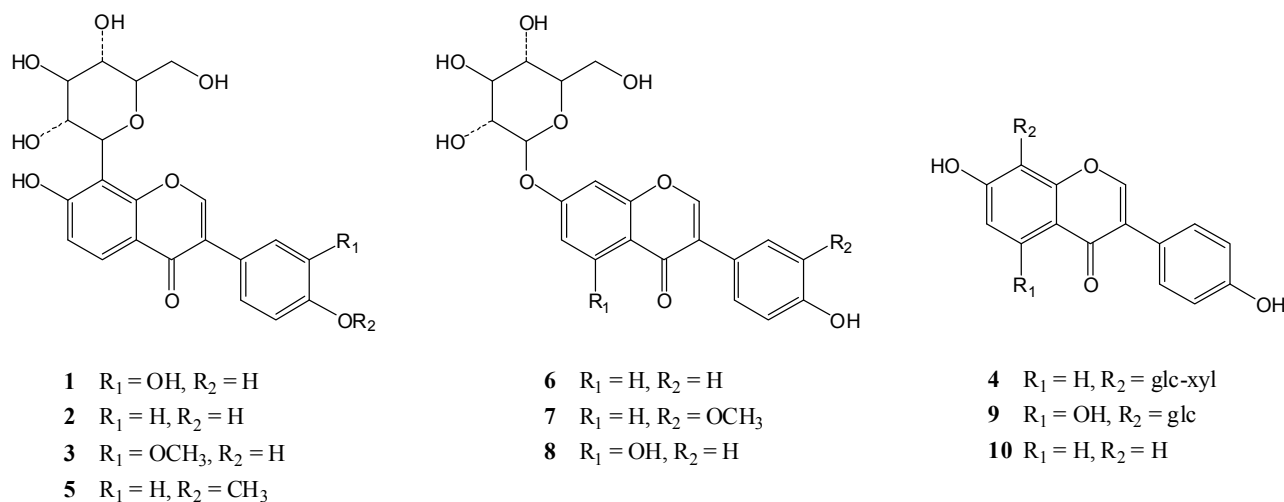


그림 3-4-63. 분리된 화합물의 구조

3'-hydroxypuerarin, PG-1 (1):

Brown amorphous powder, mp 248 - 250 °C.  $[\alpha]_{25D} +15.6^\circ$  (c 0.5, MeOH). UV (c 0.05, MeOH)  $\lambda_{max}$  nm: 310, 295, 272, 238, 224, 210. ESIMS m/z 433 ( $[M+H]^+$ ), 415 (100), 397 (37.5), 379 (18.4), 3.67 (60.8), 337 (15.6), 313 (32.7), 283 (3.7).  $^1H$  NMR (300 MHz) and  $^{13}C$  (75 MHz) NMR Data in CD<sub>3</sub>OD.

Puerarin (2):

White amorphous powder, mp 198 - 200 °C.  $[\alpha]_{25D} +14.8^\circ$  (c 1.38, MeOH). UV (c 0.025, MeOH)  $\lambda_{max}$  nm: 308, 271, 250, 242, 208. ESIMS m/z 417 ( $[M+H]^+$ ), 399 (100), 381 (44.2), 363 (18.1), 351 (59.4), 321 (14.6), 297 (31.7), 267 (2.6).  $^1H$  NMR (300 MHz) and  $^{13}C$  (75 MHz) NMR Data in CD<sub>3</sub>OD.

3'-Methoxypuerarin, PG-3 (3):

White amorphous powder, mp 212 - 213 °C.  $[\alpha]_{25D} +19.5^\circ$  (c 1.1, MeOH). UV (c 0.025, MeOH)  $\lambda_{max}$  nm: 311, 289, 239, 224, 208. ESIMS m/z 447 ( $[M+H]^+$ ), 429 (100), 411 (42.5), 393 (17.6), 381 (53.1), 351 (15.5), 327 (22.5), 297 (2.4).  $^1H$  NMR (300 MHz) and  $^{13}C$  (75 MHz) NMR Data in CD<sub>3</sub>OD.

Puerarin-xyloside (4):

White amorphous powder, mp 198 - 200 °C.  $[\alpha]_{25D} -2^\circ$  (c 0.3, MeOH). UV (c 0.025, MeOH)  $\lambda_{max}$  nm: 325, 232, 210. ESIMS m/z 548 ( $[M+H]^+$ ), 417, 399 (100), 381 (45.2), 363 (21.5), 351 (60.7), 321 (20.0), 297 (34.4), 267 (2.4).  $^1H$  NMR (300 MHz) and  $^{13}C$  (75 MHz) NMR Data in CD<sub>3</sub>OD.

4'-Methoxypuerarin (5):

White amorphous powder, mp 200 - 210 °C.  $[\alpha]_{25D} +14.8^\circ$  (c 1.0, MeOH); EIMS m/z 430.1264 (calcd for  $C_{22}H_{22}O_9$  430.1248)  $^1H$  NMR (300 MHz) and  $^{13}C$  (75 MHz) NMR Data in  $CD_3OD$ .

Daidzin (6):

White amorphous powder, mp 235 - 238 °C.  $[\alpha]_{25D} -38.6^\circ$  (c 1.5, MeOH). UV (c 0.025, MeOH)  $\lambda_{max}$  nm: 306, 270, 248, 210. EI-MS m/z: 416  $[M^+]$ , 255, 137.  $^1H$  NMR (300 MHz) and  $^{13}C$  (75 MHz) NMR Data in  $CD_3OD$ .

3'-Methoxydaidzin (7):

Colorless needles mp 212 - 215 °C.  $[\alpha]_{25D} -18.1^\circ$  (c 1.5, MeOH). UV (c 0.025, MeOH)  $\lambda_{max}$  nm: 312, 290, 240, 210. EIMS m/z 446.1213 (calcd for  $C_{22}H_{22}O_{10}$  446.1311)  $^1H$  NMR (300 MHz) and  $^{13}C$  (75 MHz) NMR Data in  $CD_3OD$ .

Genistin (8):

Colorless needles, mp 258 - 260 °C.  $[\alpha]_{25D} -28.5^\circ$  (c 0.4, MeOH). UV (c 0.025, MeOH)  $\lambda_{max}$  nm: 326, 261, 212. EI-MS m/z: 433  $[M^+]$ , 271, 153.  $^1H$  NMR (300 MHz) and  $^{13}C$  (75 MHz) NMR Data in  $CD_3OD$ .

Genistin-8-C-glucoside (9):

Colorless needles, mp 221-223 °C.  $[\alpha]_{25D} +3.7^\circ$  (c 1.4, MeOH). UV (c 0.025, MeOH)  $\lambda_{max}$  nm: 265, 212. EIMS m/z 432  $[M^+]$   $^1H$  NMR (300 MHz) and  $^{13}C$  (75 MHz) NMR Data in  $CD_3OD$ .

Daidzein (10):

Yellow amorphous powder, mp 300 - 310 °C. UV (c 0.025, MeOH)  $\lambda_{max}$  nm: 303, 259, 249, 238. EI-MS m/z: 254  $[M^+]$ , 137, 118, 105.  $^1H$  NMR (300 MHz) and  $^{13}C$  (75 MHz) NMR Data in  $CD_3OD$ .

(마) 갈근으로부터 얻어진 주 화합물들의 동물실험을 위한 대량분리조건

갈근으로부터 얻어진 PM143-1과 PM147-1, 2, 3의 대량분리 조건을 확립하였다. 본 화합물을 이용하여 서울대학교 연구팀에서의 기전연구 및 동물에서의 활성평가를 위하여 단일물질의 대량분리가 필요하다. 분리된 대량의 화합물을 이용하여 정상세포에서의 기전연구가 진행하였다.

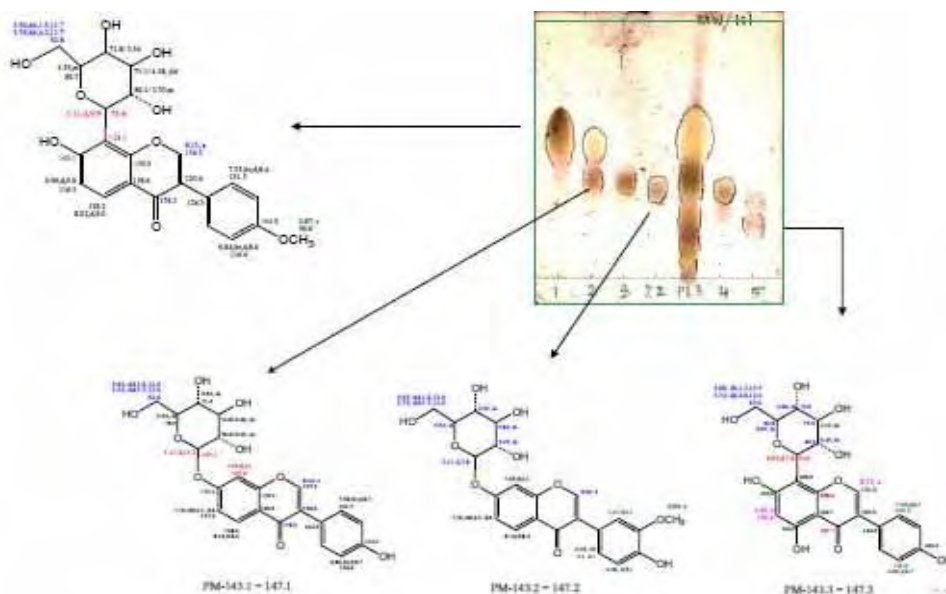


그림 3-4-64. 갈근으로부터 얻어진 화합물 143-1의 동물실험을 위한 대량분리조건 확립

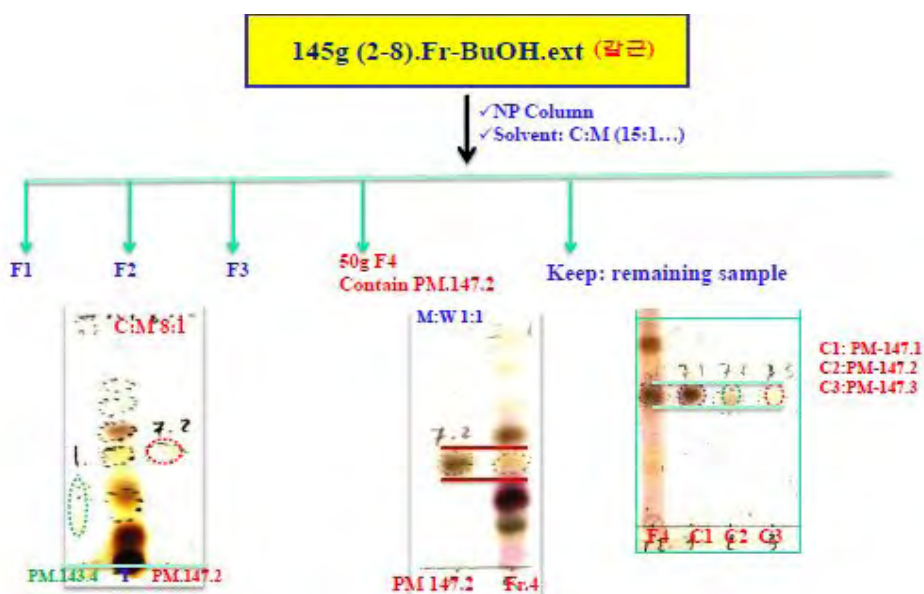


그림 3-4-65. 갈근으로부터 얻어진 화합물 147-1, -2 및 -3의 동물실험을 위한 대량분리조건 확립



(바) 울금으로부터 diarylheptanoids의 분리 및 제공

① 울금(*Curcuma longa*)로부터 화합물의 분리

발효대사체 (미강복합발효물)의 발효산물의 조성으로부터 울금(*Curcuma longa*)가 함유된 것을 확인하였다. 울금의 간보호 효과물질로 알려진 커큐민의 효과를 검증하기 위하여 3종류의 diarylheptanoids 화합물을 분리하고 이들 화합물의 구조를 결정하였다. 울금은 인도원산으로 인도로부터 동남아시아를 중심으로 열대 및 아열대 지방에서 넓게 재배되고 있는 다년생 초본이다. 울금은 강황이라고도 불리우며, 최근 우리나라의 남쪽 지역에서 재배되고 있는 식물로 카레 등의 원료로 사용되고 있다.

울금에는 방향성 정유가 1-5% 포함되어 있으며, 황색색소인 커큐민(curcumine) 등을 0.3% 정도 함유하고 있어 방향성 건위제로 간장염, 담도염, 담석증, 카타르성 황달 등에 사용되고 있다.<sup>30</sup> 울금 3kg을 주정 3ℓ를 사용하여 4시간 동안 3회에 걸쳐 환류 냉각기를 이용하여 가열 추출하였다. 에탄올 추출물 농축액을 90% 메탄올에 녹인 뒤 n-헥산으로 분획하여 탈지한 후 이 농축액을 물에 포화시킨 뒤 에틸아세테이트를 용매로 분획하여 70.0g의 농축액을 얻었다. 에틸 아세테이트 분획(25.8g)을 헥산-에틸 아세테이트(8:1 → 0:1)의 용매구배 조건으로 실리카 겔 컬럼크로마토그래피를 실시하여 12개의 분획을 얻었다(fr. 1-12).

이 분획을 실리카(silica)와 리버스 페이스-18(reverse phase-18, RP-18)를 이용한 TLC(thin layer chromatography)를 실시하여 7개의 분획을 나누었다. 이후 분획 7를 MeCN-H<sub>2</sub>O(0-60min: 59 → 65% MeOH, 60-65min: 65 → 100% MeCN)을 사용하여 HPLC [Optima Pak C<sub>18</sub> column 20×150mm; 10μM 입자 크기 2ml/min; UV detection:205nm]를 실시하여 화학식 1로 표시되는 화합물 1 내지 화합물 3을 순수하게 얻을 수 있었다 (그림 3-4-66).

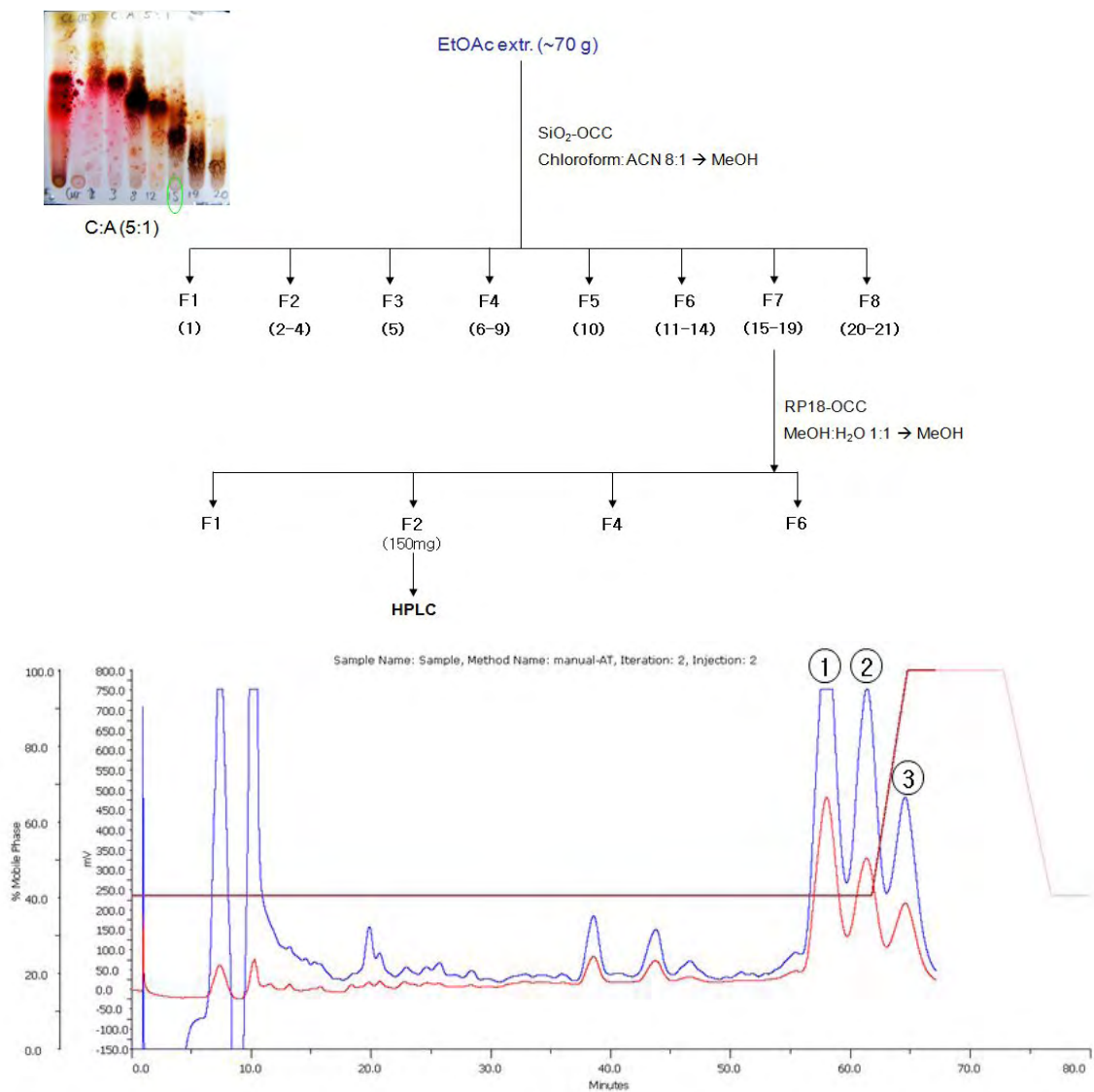


그림 3-4-66. Isolation procedure of *Curcuma longa* on SiO<sub>2</sub> and RP-18 column chromatography and their HPLC profile.

② 디아릴헵타노이드계 화합물의 물리 화학적 특성 및 화학구조 분석

상기 울금으로부터 분리된 화합물은 공통적으로 디아릴헵타노이드계 화합물의 특징을 갖음을  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ -NMR 분석 결과로부터 확인하였다. 디아릴헵타노이드계 화합물은  $^1\text{H}$ -NMR 스펙트럼에서 1,4 치환된 2개의 벤젠환이나, 1,3,4 치환된 벤젠환의 화학적 이동값을 공통적으로 관찰함으로써 커큐모노이드 계열의 화합물임을 확인할 수 있었다.  $^1\text{H}$ -NMR 스펙트럼에서 1,4치환된 벤젠환을 가진 경우 7.0 ppm 과 6.75 ppm 근처에서 더블렛(doublet)으로 갈라지는 수소수 2개, 4개의 차이로부터 이들 화합물의 대칭성 및 골격의 차이를 유추할 수 있었으며, 1,3,4 치환된 벤젠환은 특징적인 치환형식 [7.21 (1H, d,  $J = 2.0$  Hz), 7.03 (1H, dd,  $J = 2.0, 8.0$  Hz), 6.89 (1H, d,  $J = 8.0$  Hz)]로부터 벤젠 부분의 구조를 확인할 수 있었다.

따라서, 울금으로부터 얻은 화합물의  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ -NMR 등의 1D NMR 데이터와 COSY, NOESY, HMQC, HMBC 등의 2D NMR 스펙트럼을 통하여 구조를 확인한 결과 이들 화합물은 울금 중에 다량 존재하는 커큐미노이드계 화합물로 화합물 1은 커큐민 (curcumin), 화합물 2는 데메톡시커큐민 (demethoxycurcumin) 및 화합물 3은 비스데메톡시커큐민 (bisdemethoxycurcumin)으로 확인되었다 (그림 3-4-67).

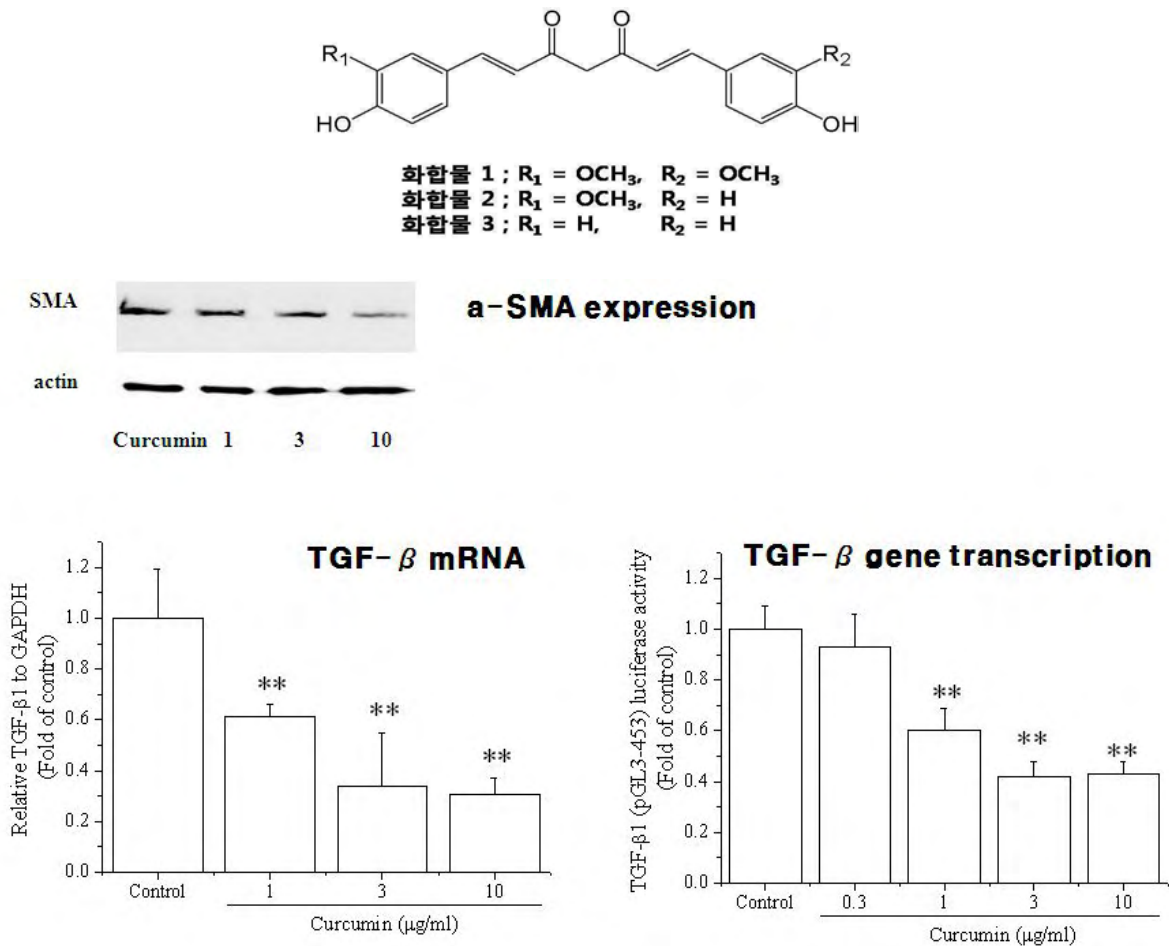


그림 3-4-67. 커큐민의 (curcumin) 항 섬유화 저해 활성의 측정.

### ③ 울금으로부터 신규 화합물의 분리 과정

울금 (*Curcuma longa*)으로부터 간보호 효과물질을 분리하는 과정에서 신규의 화합물을 분리하였다. 분리한 과정을 간략히 기술하면 다음과 같다. 건조된 울금의 뿌리를 메탄올 (15 L)를 사용하여 3번 추출한 뒤 합하여 농축하였다 (380 g). 농축액을 증류수 (2.5 L)에 넣은 뒤 n-hexane (3×2 L), EtOAc (3×2 L)와 BuOH (3×2 L)를 사용하여 각각 추출한 뒤, alpha-SMA 저해활성을 검색한 결과 EtOAc와 BuOH 분획에서 강한 저해활성을 나타내었기에 합하여 농축하였다. 농축액 (130 g)을 silica gel column (10×30 cm; 63 - 200 mm particle size)에서 CHCl<sub>3</sub>/acetone (19:1, 18:2 ... 1:19, each 2.5 L)로 용출하여 6개의 분획 (F1: 17.6 g; F2: 8.5 g; F3: 5.6 g; F4: 9.8 g; F5: 10.5 g; F6: 12.6 g; F7: 22.4 mg)를 각각의 TLC profile에 입각하여 나누었다. 분획 F3로부터 n-hexane/EtOAc를 용매로하여 curcumin, 4.2 g)를 분획 F4로부터 demethoxycurcumin, 1.3 g) bisdemethoxycurcumin, 2.5 g)을 얻을 수 있었다. 분획 F5를 메탄올을 용매로 사용하여 Sephadex LH-20 column (7 × 40 cm)에서 용출시켜 3개의 분획으로 나노었다 (F5.1 - F5.3). 소분획 F5.2 (3.1 g)을 silica gel column (5 × 40 cm; 40 - 63 μm particle size)에서 CHCl<sub>3</sub>/MeCN (9:1,8:2 ... 1:9, 각각 2.5L)로 용출하여 5개의 소분획으로 다시 분획하였다 (F5.2.1 - F5.5.5). 소분획 F5.2.4 (95 mg)을 HPLC (0 - 60 min: 35% MeCN, 65 min: 100% MeCN)을 실시하여 신규 화합물 1 (tR=46.0 min, 4.5mg)을 얻을 수 있었다. Curcupalongin A (1): Yellow amorphous powder; UV (MeOH) λ<sub>max</sub> nm (log ε) 295 (3.53), 398 (4.06); IR (KBr) ν<sub>max</sub> 3415 (OH), 1665 (C=O), 1598, 1547, 1511, 1489, 1273 cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR data, see Table1; HREIMS m/z 352.0949 [M]<sup>+</sup> (Calcd for C<sub>20</sub>H<sub>16</sub>O<sub>6</sub>, 352.0947).

### ④ 울금으로부터 신규 화합물의 구조결정

화합물 1은 노란 분말로 얻어졌다. 화합물 1의 <sup>1</sup>H NMR spectrum (표 3-3-3)은 3,4,5-tetra substituted benzene ring을 [ $\delta_H$  7.23 (1H, d,  $J=1.8$  Hz, H-2')와 7.21 (1H, d,  $J=1.8$  Hz, H-6')]에서, A<sub>2</sub>B<sub>2</sub> 방향족 수소를 [ $\delta_H$  7.63 (2H, d,  $J=8.4$  Hz, H-2'', H-6'')와 6.94 (2H, d,  $J=8.4$  Hz, H-3'', H-5'')], *trans*-olefinic 수소를 [ $\delta_H$  7.67 (1H, d,  $J=15.6$  Hz, H-7'')와 7.08 (1H, d,  $J=15.6$  Hz, H-8'')에서, 메톡시 그룹을 [ $\delta_H$  3.99 (3H, s, 3'-OCH<sub>3</sub>)]에서 다른 olefinic 수소를 [ $\delta_H$  6.52 (1H, s, H-7')]에서 확인하였으며, 또한,  $\delta_H$  5.92 (1H, s, H-4)에서  $\beta$ -diketone 수소를 확인하였다. 이러한 <sup>1</sup>H NMR 결과와 일치하는 결과를 <sup>13</sup>C NMR spectrum으로부터 얻을 수 있었다. 메톡시 그룹을  $\delta_C$  56.5에서, 4개의 olefinic 탄소들을  $\delta_C$  146.7, 139.3, 113.3과 112.2에서, conjugated ketone 탄소를  $\delta_C$  186.6에서, 수산화기가 붙어있는 탄소를  $\delta_C$  176.1에서,  $\beta$ -diketone 형태의 탄소를  $\delta_C$  105.4에서 확인하였으며 12개의 방향족 탄소를 확인할 수 있었다. 탄소의 숫자를 확인하기 위하여 추가적으로 HSQC 실험이 행하여졌으며, 최종적으로 탄소수가 20개로 결정하였다. 2개의 다른 olefinic 탄소보다 벗겨진 (deshielding) 탄소인  $\delta_C$  146.7 (C-2)와 176.1 (C-5)은 수산기가 치환된 탄소로 결정하였다. 이러한 관찰은 특징적인 IR에서의 흡수밴드(1665, 1598cm<sup>-1</sup>)와 UV (398, 295 nm) 스펙트럼에서 확인하였으며, 이러한 결과로부터 화합물 1은 3(2*H*)-furanone 골격을 갖는 (-C=CH-CO-CH=C(OH)-CH=CH-) 형태로 추정하였으며, 이것은 울금으로부터 분리한 화합물과 다른 형태의 화합물인 것으로 추정하였다 (그림 3-4-68).



Table 3-4-3. <sup>1</sup>H (600 MHz) and <sup>13</sup>C (150 MHz) NMR Data for New Compound 1 in CD<sub>3</sub>COCD<sub>3</sub>

Position	1	
	δHmult.(JinHz)	δC
1		
2		146.7
3		186.6
4	5.92 s	105.4
5		176.1
6		
7		
1'		124.4
2'	7.23 d (1.8)	107.9
3'		149.2
4'		137.5
5'		146.5
6'	7.21 d (1.8)	113.6
7'	6.52 s	112.2
1''		127.7
2''	7.63 d (8.4)	131.2
3''	6.94 d (8.4)	117.0
4''		160.8
5''	6.94 d (8.4)	117.0
6''	7.63 d (8.4)	131.2
7''	7.67 d (15.6)	139.3
8''	7.08 d (15.6)	113.3
3'-OCH <sub>3</sub>	3.99 s	56.5
3''-OCH <sub>3</sub>		

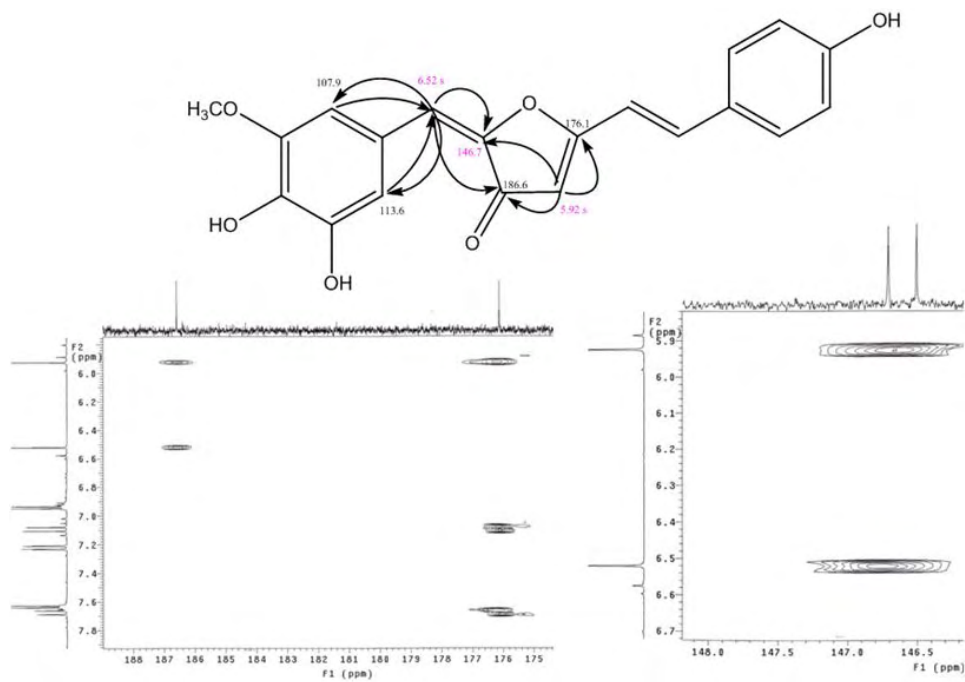
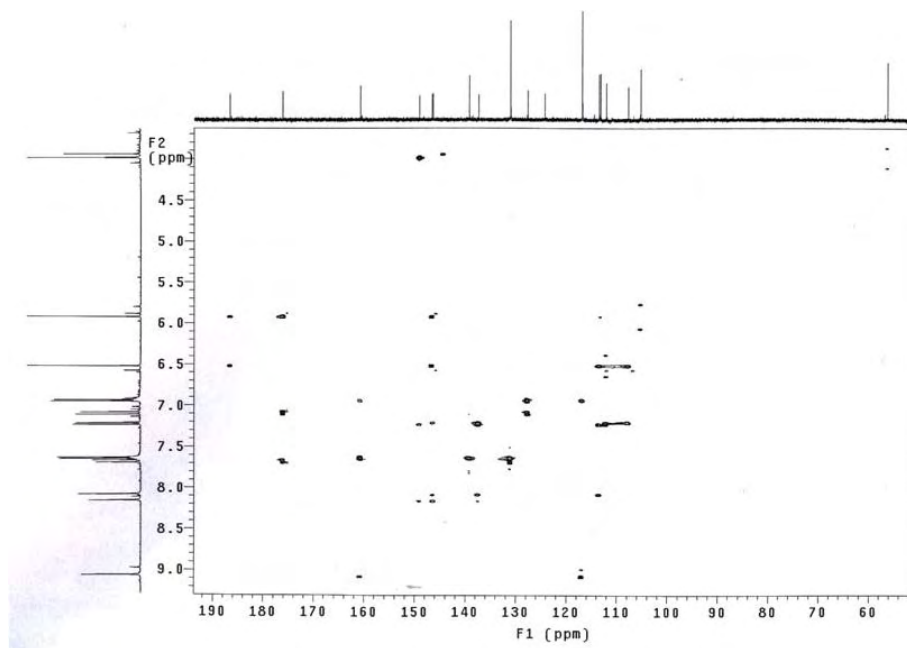


그림 3-4-70. Key HMBC (H → C) correlations for new compound 1.

⑤ 울금으로부터 새로운 diarylheptanoids의 분리 및 구조 해석

울금 (*Curcuma longa*)로부터 2차년도에 9종의 추가 화합물의 분리

울금 (*Curcuma longa*)은 예로부터 간보호 효과작용이 알려져 있으며, 커큐민이 혼합되어 있는 주요화합물로 보고되고 있다. 1차년도에 분리한 신규물질 1종을 포함하여 4종의 화합물을 분리하여 보고하였음. 2차년도에 추가적으로 8종의 후보물질을 분리하였고, NMR 등의 구조분석을 통하여 2종의 화합물이 신규물질임을 알았다. 울금은 원래 인도원산으로 인도로부터 동남아시아를 중심으로 열대 및 아열대 지방에서 넓게 재배되고 있는 다년생 초본이다. 울금은 강황이라고도 불리우며, 최근 우리나라의 남쪽 지역에서 재배되고 있는 식물로 카레 등의 원료로 사용되고 있다. 울금에는 방향성 정유가 1 - 5% 포함되어 있으며, 황색색소인 커큐민 (curcumine) 등을 0.3% 정도 함유하고 있어 방향성 건위제로 간장염, 담도염, 담석증, 카타르성 황달 등에 사용되고 있다.

2차년도의 얻은 8종 화합물의 정제과정을 간략히 기술하여 보면, 완도에서 생산된 국내산 울금 3 kg을 메탄올 15ℓ를 사용하여 4시간 동안 3회에 걸쳐 환류 냉각기를 이용하여 가열 추출하였다. 메탄올 추출물을 환류농축기로 농축시킨 후 (380 g), 농축액을 증류수에 포화시켜, n-헥산 2ℓ를 사용하여 3번 추출하여 분획하고, 각각 에틸아세테이트 (3 × 2ℓ), 부탄올 (3 × 2ℓ)를 용매로 분획하였다. 에틸아세테이트와 부탄올 분획을 (130 g)을 합한 후, CHCl<sub>3</sub>/acetone (19:1, 18:2 ... 1:19, 각각 2.5ℓ)를 용매로 하여 silica gel column (10 × 30 cm; 63 - 200 μm 입자크기) 크로마토그래피를 실시하여 6개의 소분획으로 나누었다 (F1: 17.6 g; F2: 8.5 g; F3: 5.6 g; F4: 9.8 g; F5: 10.5 g; F6: 12.6 g; F7: 22.4 mg).

1차 년도에 분리한 커큐민 (curcumin, 4.2 g)은 소분획 F3로부터 n-hexane/EtOAc을 용매로 하여 재결정하여 얻을 수 있었다. 소분획 F4를 순상 silica gel column (5 × 40 cm; 40 - 63 μm 입자크기) 크로마토그래피를 CHCl<sub>3</sub>/MeCN (9:1, 8:2 ... 1:9, 각각 2ℓ)을 전개용매로 하여 5개의 분획으로 나누었다 (F4.1 - F4.5). F4.2와 F4.3을 CHCl<sub>3</sub> 하에서의 재결정 방법을 사용하면 1차년도에 보고한 화합물인 디메톡시커큐민 (demethoxycurcumin, 1.3 g)과 비스테메톡시커큐민 (bisdemethoxycurcumin, 2.5 g)을 높은 순도로 얻을 수 있음을 확인하였고, 특허 및 기전연구를 위하여 활성연구팀에게 제공하였다.

소분획 F4.4 (90 mg)을 HPLC [Optima Pak C<sub>18</sub> column (10 × 250 mm, 10 μm particle size, RS Tech, Korea); mobile phase MeCN in H<sub>2</sub>O containing 0.1% HCO<sub>2</sub>H (0 - 40 min: 45% MeCN, 40 - 45 min: 100% MeCN, 45 - 55 min: 100% MeCN); flow rate 2mL/min; UV detection at 205 and 254nm]하여 호합물 8 (*t<sub>R</sub>*=30.0 min, 5.5 mg)과 화합물 10 (*t<sub>R</sub>*=34.0 min, 14.0 mg)을 얻을 수 있었다. 소분획 F5를 메탄올을 전개용매로 사용하여, Sephadex LH-20 column (7 × 40 cm) 크로마토그래피를 실시하여 3개의 소분획으로 나누었다 (F5.1 - F5.3). 소분획 F5.2 (3.1 g)를 CHCl<sub>3</sub>/MeCN (9:1, 8:2 ... 1:9, each 2.5 L)를 전개용매로 silica gel column (5 × 40 cm; 40 - 63 μm particle size) 크로마토그래피를 실시하여 5개의 소분획으로 나누었다 (F5.2.1 - F5.5.5). 소분획 F5.2.2 (150 mg)을 HPLC (0 - 45 min: 60% MeCN, 45 - 50 min: 100% MeCN)하여 화합물 9 (*t<sub>R</sub>*=35.0 min, 10.5 mg)과 화합물 11 (*t<sub>R</sub>*=38.5 min, 13.0 mg)을 얻을 수 있었다, 소분획 F5.2.3 (110 mg)을 HPLC하여 (0 - 65 min: 57% MeCN, 65 - 70 min:



100% MeCN) 화합물 6 ( $t_R=42.0$  min, 10.5 mg), 화합물 7 ( $t_R=58.0$  min, 7.5 mg)과 3 ( $t_R=61.0$  min, 6.0 mg)을 수득하였다. 최종적으로 1차년도에 분리하여 보고한 curcumaloganin A ( $t_R=46.0$  min, 4.5 mg), 2 ( $t_R=48.5$  min, 3.5 mg) 그리고 12는 ( $t_R=52.0$  min, 6.5 mg)는 소분획 F5.2.4 (95 mg)으로부터 HPLC하여 (0 - 60 min: 35% MeCN, 65 min:100% MeCN) 얻을 수 있었다.

울금(*Curcuma longa*)로부터 2차년도에 분리한 화합물의 구조 결정

2차년도에 추가적으로 분리한 8종의 화합물은 공통적으로 디아릴헵타노이드계 화합물의 특징을 갖음을  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ -NMR 분석 결과로부터 확인하였다. 디아릴헵타노이드계 화합물은  $^1\text{H}$ -NMR 스펙트럼에서 1,4 치환된 2개의 벤젠환이나, 1,3,4 치환된 벤젠환의 화학적 이동값을 공통적으로 관찰함으로써 커큐모노이드 계열의 화합물임을 확인할 수 있었다.  $^1\text{H}$ -NMR 스펙트럼에서 1,4 치환된 벤젠환을 가진 경우 7.0 ppm 과 6.75 ppm 근처에서 더블렛(doublet)으로 갈라지는 수소 수 2개, 4개의 차이로부터 이들 화합물의 대칭성 및 골격의 차이를 유추할 수 있었으며, 1,3,4 치환된 벤젠환은 특징적인 치환형식 [7.21 (1H, d,  $J = 2.0$  Hz), 7.03 (1H, dd,  $J = 2.0, 8.0$  Hz), 6.89 (1H, d,  $J = 8.0$  Hz)]으로부터 벤젠 부분의 구조를 확인할 수 있었다.

따라서, 울금으로부터 얻은 화합물 8종 중 신규화합물로 밝혀진 화합물 2와 3을 제외한 나머지 화합물은  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ -NMR 등의 1D NMR 데이터와 몇몇 HMQC, HMBC 등의 2D NMR 스펙트럼을 통하여 구조를 확인한 결과 이들 화합물은 울금 중에 존재하는 커큐모노이드계 화합물로 화합물 6은 1,7-bis(3,4-dihydroxyphenyl)-1,6-heptadiene-3,5-dione, 화합물 7은 1-(4-hydroxyphenyl)-7-(3,4-dihydroxyphenyl)-1,6-heptadiene-3,5-dione, 화합물 8은 1-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-7-(3,4-dihydroxyphenyl)-1,6-heptadiene-3,5-dione, 화합물 9은 1,5-bis(4-hydroxyphenyl)-1,4-pentadiene-3-one, 화합물 10은 5-hydroxy-1,7-bis(4-hydroxyphenyl)-4,6-heptadiene-3-one, 화합물 11은 1,5-dihydroxy-1,7-bis(4-hydroxyphenyl)-4,6-heptadiene-3-one, 화합물 12는 1,5-dihydroxy-1,7-bis(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-4,6-hepta-diene-3-one임을 확인 하였다 (그림 3-4-71).

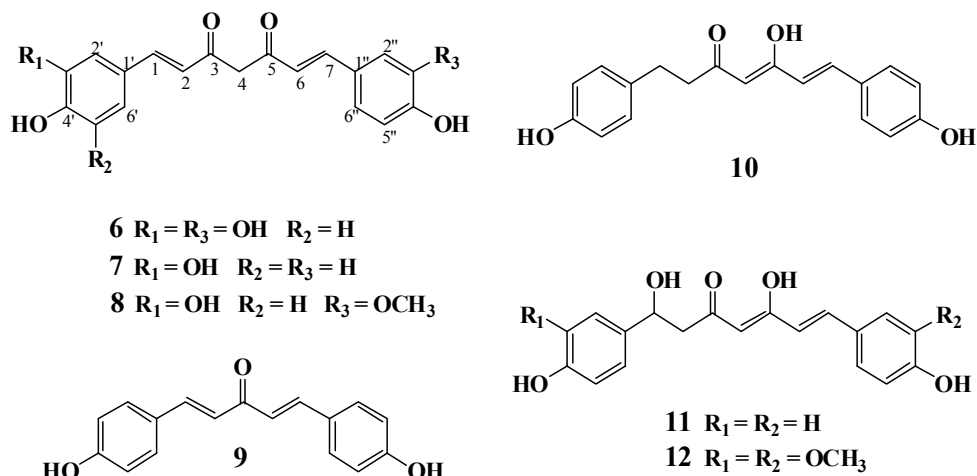


그림 3-4-71. 울금으로부터 추가로 분리한 7종 기지물질의 화학적 구조

울금 (*Curcuma longa*)로부터 2차년도에 분리한 신규 화합물 2와 3의 구조 결정  
 화합물 2는 노란 분말로 얻어졌으며, 화합물 2의 분자식은  $m/z$  382.1051 [M]<sup>+</sup>의 분자이온 피크  
 를 관찰함으로써 C<sub>21</sub>H<sub>18</sub>O<sub>7</sub>로 결정되었다. 화합물 2의 IR spectrum으로부터 수산기를 3416  
 cm<sup>-1</sup>, 공유화된 카보닐기를 1665 cm<sup>-1</sup>에서 방향족 환에 기인한 기능기를 1588, 1547, 1512, 와  
 1490 cm<sup>-1</sup>에서 각각 확인하였다. 화합물 2의 <sup>1</sup>H NMR과 <sup>13</sup>C NMR spectrum (표 3-3-4)은 화  
 합물 1과 비슷하였으나 추가적인 메톡시 피크를 δ<sub>H</sub> 3.99 (3H, s, 3''-OCH<sub>3</sub>)에서 확인하였다. 이  
 러한 결과는 화합물 1에 존재하는 A<sub>2</sub>B<sub>2</sub> 방향족 치환형식에 비하여 ABX spin system [δ<sub>H</sub> 7.43  
 (1H, d,  $J = 1.8$  Hz, H-2''), 7.20 (1H, dd,  $J = 8.4, 1.8$  Hz, H-6'')과 6.91 (1H, d,  $J = 8.4$  Hz,  
 H-5'')]를 확인함으로써 추가적으로 확인할 수 있었다 (그림 3-4-77~81).

1차년도에 확인한 화합물 1에서 메톡시가 추가된 형태의 화합물로 화합물 2를 추정하였으며,  
 이러한 연결점은 HMBC를 통하여 최종적으로 확인하였다. 메톡시 프로톤과 H-2''와 5''에 존재  
 하는 프로톤 피크로부터 C-3'' (δ<sub>C</sub> 149.2)로의 연결은 메톡시 그룹이 C-3''에 존재함을 최종적으  
 로 확인할 수 있었다. 따라서 신규 화합물 2는 2-(4,5-dihydroxy-3  
 -methoxyphenyl)methenyl-5-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)ethenyl-3(2H)-furanone로 결정하  
 였으며 curcumalongin B로 명명하였다 (그림 3-4-76).

화합물 3은 노란 분말로 얻어졌으며, IR spectrum으로부터 수산기를 3415 cm<sup>-1</sup>, 공유화된 카보  
 닐기를 1737과 1626 cm<sup>-1</sup>에서 방향족 환에 기인한 파장을 1599, 1513, 1467 cm<sup>-1</sup>에서 각각 확  
 인하였다. 화합물 3의 <sup>1</sup>H NMR으로부터 1,3,4-trisubstituted benzene ring [δ<sub>H</sub> 7.34 (1H, s,  
 H-2''), 7.18 (1H, d,  $J = 8.4$  Hz, H-6''), 6.88 (1H, d,  $J = 8.4$  Hz, H-5'')]과  
 1,3,4,5-tetrasubstituted benzene ring [δ<sub>H</sub> 6.90' (1H, s, H-2)와 6.87' (1H, s, H-6)] 또한 2쌍의  
*trans*-olefinic protons [δ<sub>H</sub> 7.60 (1H, d,  $J = 15.6$  Hz, H-7), 6.72 (1H, d,  $J = 15.6$  Hz, H-6)와  
 7.53 (1H, d,  $J = 15.6$  Hz, H-1), 6.67 (1H, d,  $J = 15.6$  Hz, H-2)], 2개의 메톡시 기능기 [δ<sub>H</sub>  
 3.90 (3H, s, 3''-OCH<sub>3</sub>)와 3.89 (3H, s, 3'-OCH<sub>3</sub>)]에서 확인하였으며 커큐미노이드 계열에서 공  
 통적으로 나타나는 δ<sub>H</sub> 5.98 (2H, s, H-4)에서 β-diketone의 중심수소를 확인할 수 있었다 (그  
 립 3-4-76, 77, 82~85).

화합물 3의 <sup>1</sup>H NMR과 <sup>13</sup>C NMR spectrum은 커큐민의 그것과 비슷하였으나, 특이적으로 방향  
 족 환의 탄소 5'번에 부착된 추가적인 수산기가 존재하였다. 이러한 결과는 화합물 3의 분자량  
 을 HREIMS의  $m/z$  384.1213 [M]<sup>+</sup>에서 분자이온 피크를 관찰함으로써 C<sub>21</sub>H<sub>20</sub>O<sub>7</sub>로 결정하였다.  
 각 치환기의 위치는 H-2''와 H-6''으로부터 C-4'' 연결, H-2''와 H-5''으로부터 C-3'' 연결, H-2'  
 로부터 C-3', C-4''와 C-6'' 및 3'-OCH<sub>3</sub>로부터 C-3' 그리고 3''-OCH<sub>3</sub>로부터 C-3'' 연결을 또한  
 확인 하였다 (그림 3-4-77).

디아릴헵타노이드에서 관찰되는 7개의 직선 탄소들의 위치는 추가적으로 H-7/C-1'', C-2''와  
 C-6'' 연결, H-2''와 H-6''로부터 C-7''로의 연결 및 H-2''와 H-5''로부터 C-1'' 연결로부터 확인  
 하였다. 따라서 신규 화합물 3은 1-(4,5-dihydroxy-3-methoxyphenyl)  
 -7-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-1,6-heptadien-3,5-dione로 결정하였으며 curcumalongin C  
 로 명명하였다.

Curcumalongin B (2): yellow amorphous powder; UV (MeOH)  $\lambda_{\max}$  nm (log  $\epsilon$ ) 290 (3.76), 410 (4.12) IR (KBr)  $\nu_{\max}$  3416 (OH), 1665 (C=O), 1588, 1547, 1512, 1490, 1284  $\text{cm}^{-1}$   $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR data, see Table 1 EIMS  $m/z$  (rel. int.): 382 ( $[\text{M}]^+$ , 100), 352 (20), 322 (8), 308 (10), 278 (6), 267 (9), 245 (12), 191 (10), 180 (24); HREIMS  $m/z$  382.1054  $[\text{M}]^+$  (calcd for  $\text{C}_{21}\text{H}_{18}\text{O}_7$ , 382.1053).

Curcumalongin C (3): yellow amorphous powder; UV (MeOH)  $\lambda_{\max}$  nm (log  $\epsilon$ ) 264 (3.74), 422 (4.27) IR (KBr)  $\nu_{\max}$  3415 (OH), 2917, 1737 (C=O), 1626, 1599, 1513, 1467, 1272  $\text{cm}^{-1}$   $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR data, see Table 1 EIMS  $m/z$  (rel. int.): 384 ( $[\text{M}]^+$ , 100), 366 (47), 284 (51), 267 (55), 208 (32), 192 (53), 177 (97) HREIMS  $m/z$  384.1213  $[\text{M}]^+$  (calcd for  $\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{O}_7$ , 384.1209).

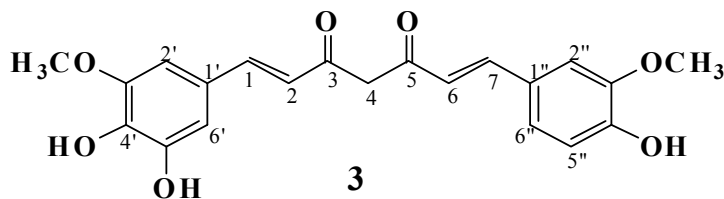
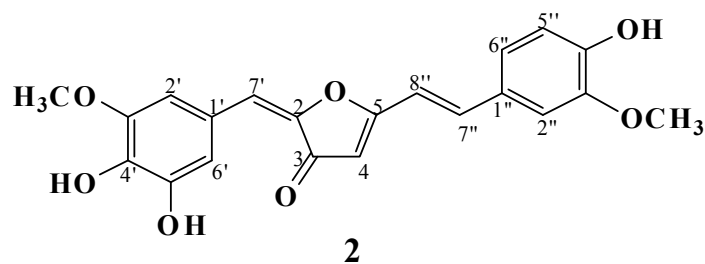


그림 3-4-72. Chemical structure of new compounds 2 and 3.

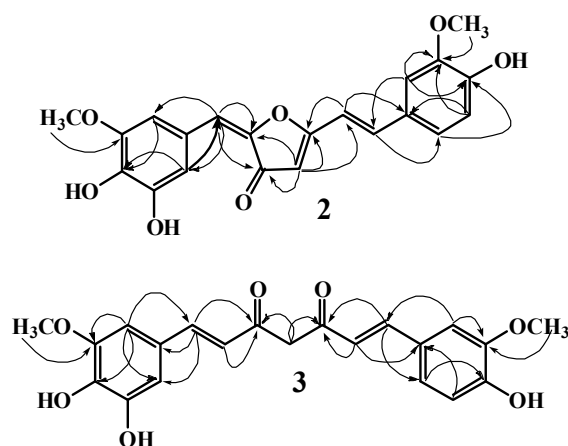


그림 3-4-73. Key HMBC (H  $\rightarrow$  C) correlations for new compounds 2 and 3.

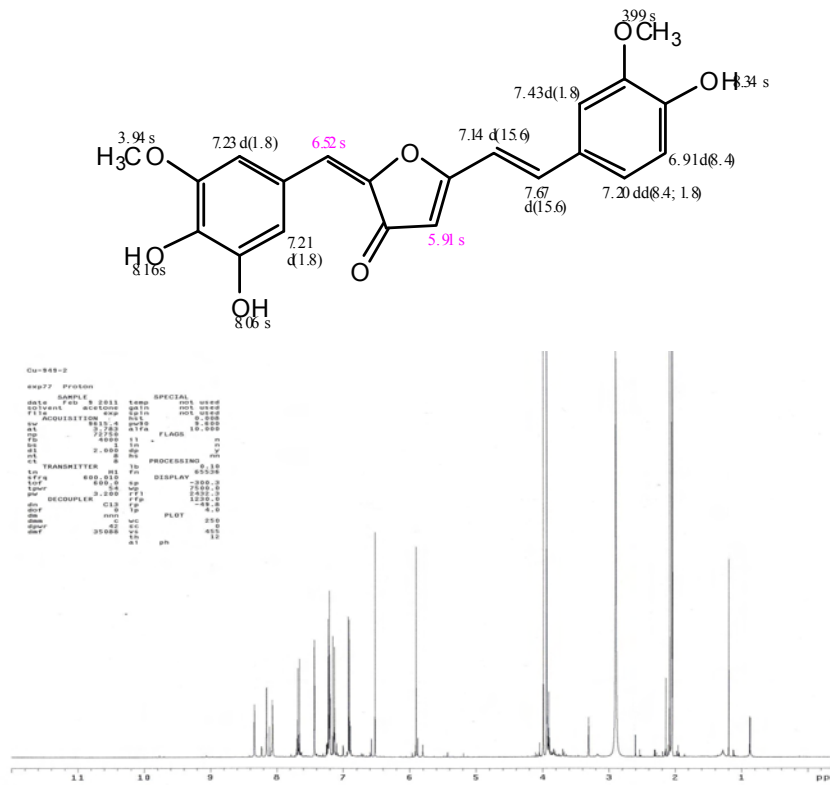


그림 3-4-74. <sup>1</sup>H NMR (600 MHz, CD<sub>3</sub>COCD<sub>3</sub>) of new compound 2.

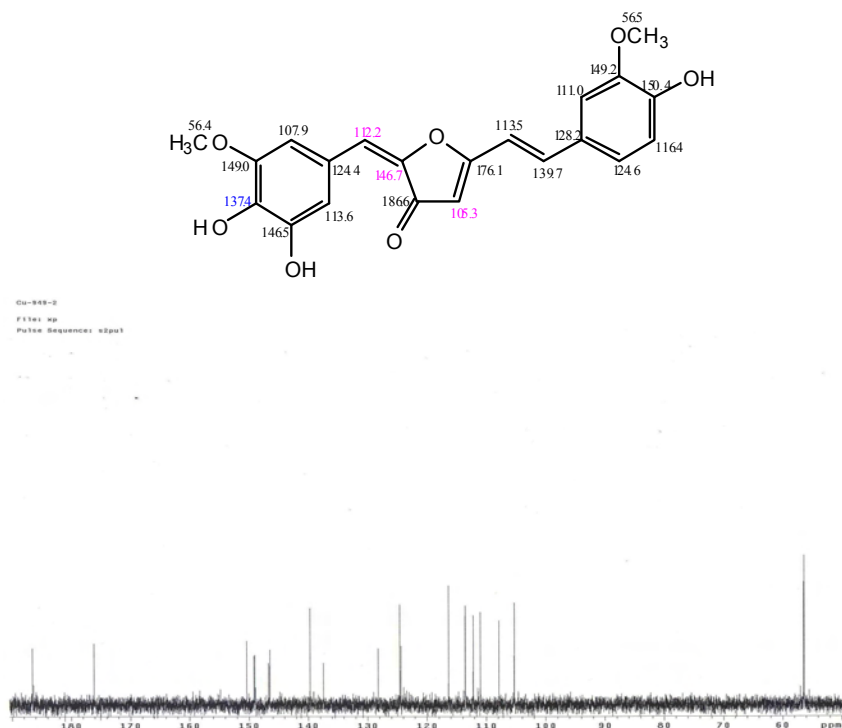


그림 3-4-75. <sup>13</sup>C NMR (150 MHz, CD<sub>3</sub>COCD<sub>3</sub>) of new compound 2.

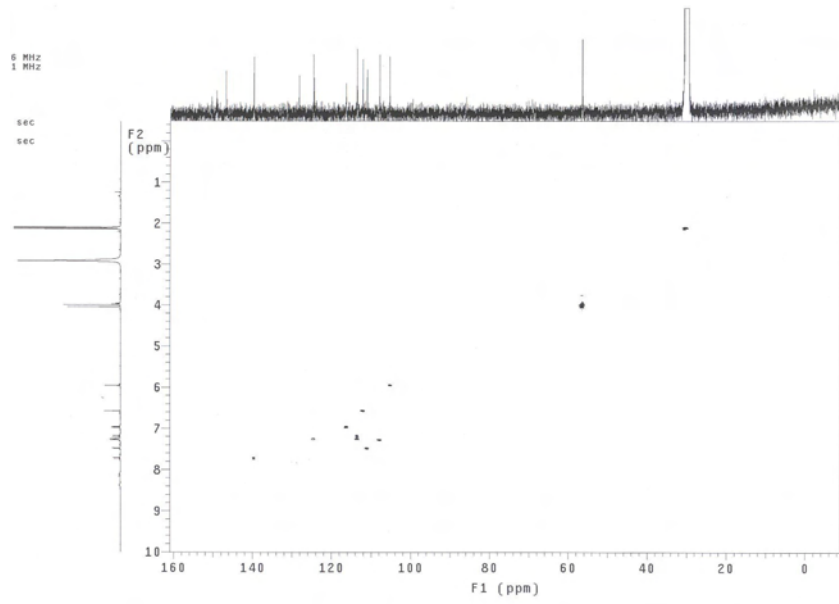
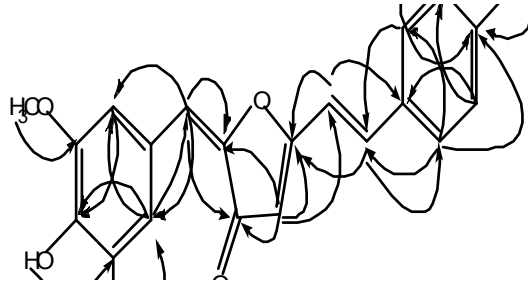


그림 3-4-76. HSQC spectrum of new compound 2.



Cu-949-2  
 File: xp  
 Pulse Sequence: gHMBC  
 Solvent: acetone  
 Ambient temperature  
 Operator: vwnrl  
 VNMSC-650 "Varian-NMR"  
 Relax. delay 1.000 sec  
 Mixing 0.080 sec  
 Acq. time 0.120 sec  
 Width 6476.7 Hz  
 20 Width 3235.5 Hz  
 16 repetitions  
 400 increments  
 OBSERVE F1, 509.0962532 MHz  
 DATA PROCESSING  
 Sine bell 0.044 sec  
 F1 DATA PROCESSING  
 Sine bell 0.022 sec  
 FT size 4096 x 8192  
 Total time 2 hr, 9 min, 31 sec

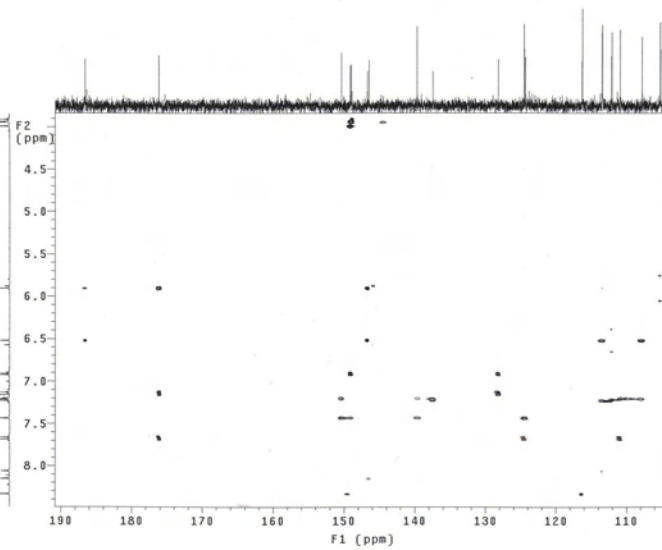


그림 3-4-77. HMBC spectrum of new compound 2.

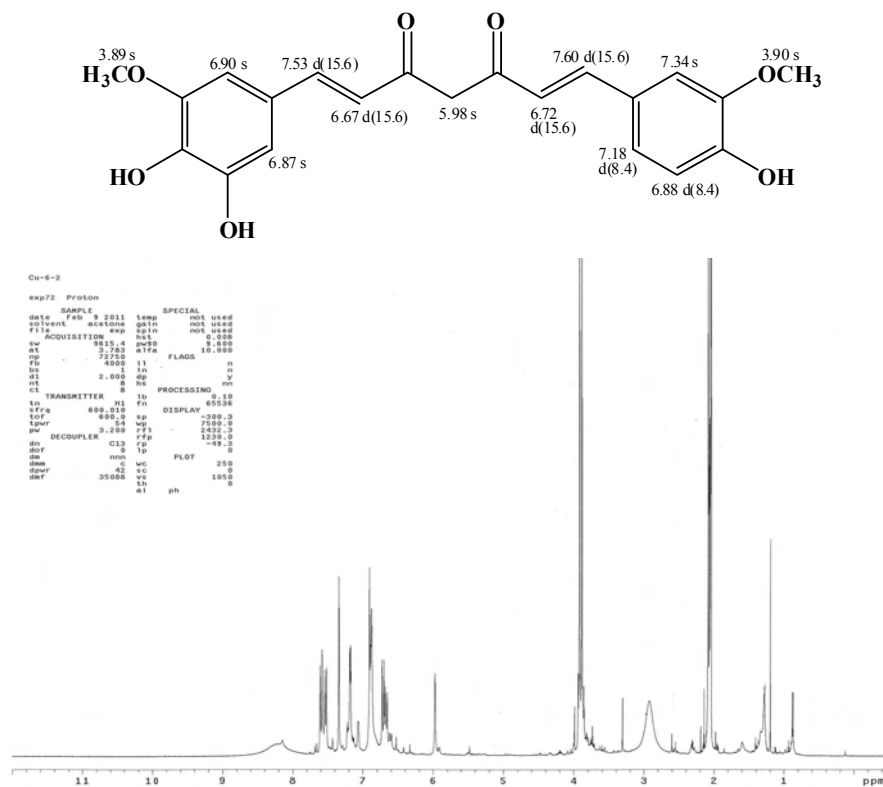


그림 3-4-78.  $^1\text{H}$  NMR (600 MHz,  $\text{CD}_3\text{COCD}_3$ ) of new compound 3.

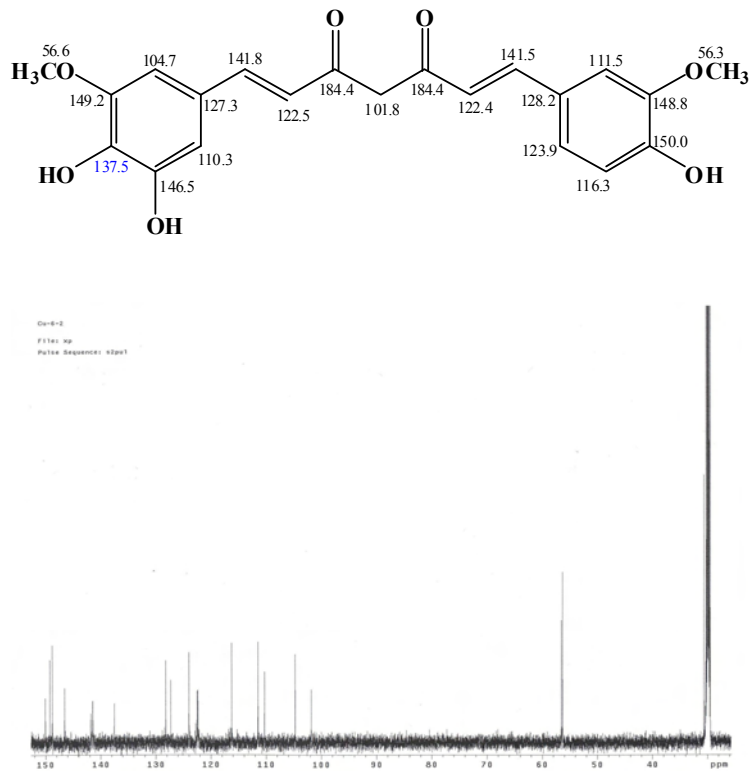


그림 3-4-79.  $^{13}\text{C}$  NMR (150 MHz,  $\text{CD}_3\text{COCD}_3$ ) of new compound 3.

Cu-6-2  
 File: xp  
 Pulse Sequence: gHSQC  
 Solvent: acetone  
 Ambient temperature  
 Operator: vnr1  
 VNMRS-600 "Varian-NMR"  
 Relax. delay 1.000 sec  
 Acq. time 0.199 sec  
 Width 6570.9 Hz  
 2D Width 25649.2 Hz  
 4 repetitions  
 2 x 250 increments  
 OBSERVE H1: 600.886533 MHz  
 DECOUPLE C13: 150.8830950 MHz  
 Power 42 dB  
 on during acquisition  
 off during delay  
 Wdg\_C13: tube modulated  
 DATA PROCESSING  
 Gauss apodization 0.092 sec  
 F1 DATA PROCESSING  
 Gauss apodization 0.014 sec  
 FT size 4096 x 4096  
 Total time 33 min, 24 sec

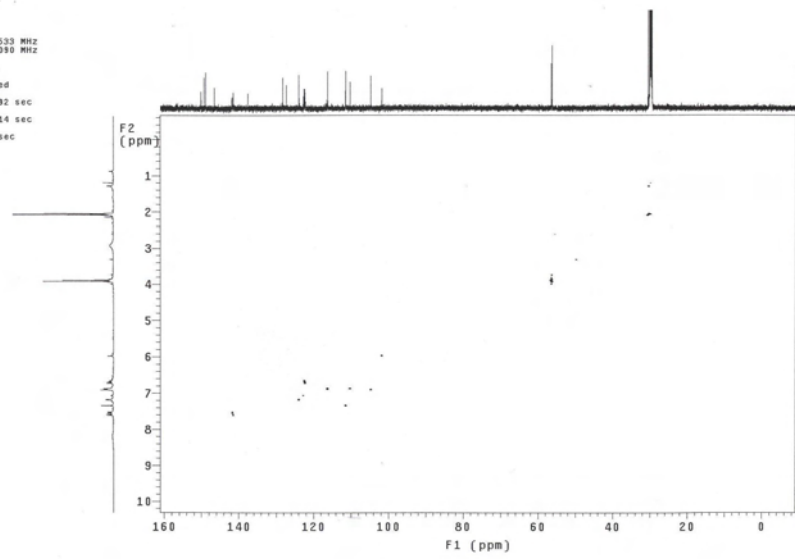


그림 3-4-80. HSQC spectrum of new compound 3.

Cu-6-2  
 File: xp  
 Pulse Sequence: gHMBC  
 Solvent: acetone  
 Ambient temperature  
 Operator: vnr1  
 VNMRS-600 "Varian-NMR"  
 Relax. delay 1.000 sec  
 Mixing 0.080 sec  
 Acq. time 0.128 sec  
 Width 8570.9 Hz  
 2D Width 36215.5 Hz  
 8 repetitions  
 400 increments  
 OBSERVE H1: 600.0062533 MHz  
 DATA PROCESSING  
 Sine bell 0.064 sec  
 F1 DATA PROCESSING  
 Sine bell 0.022 sec  
 FT size 4096 x 8192  
 Total time 1 hr, 5 min, 5 sec

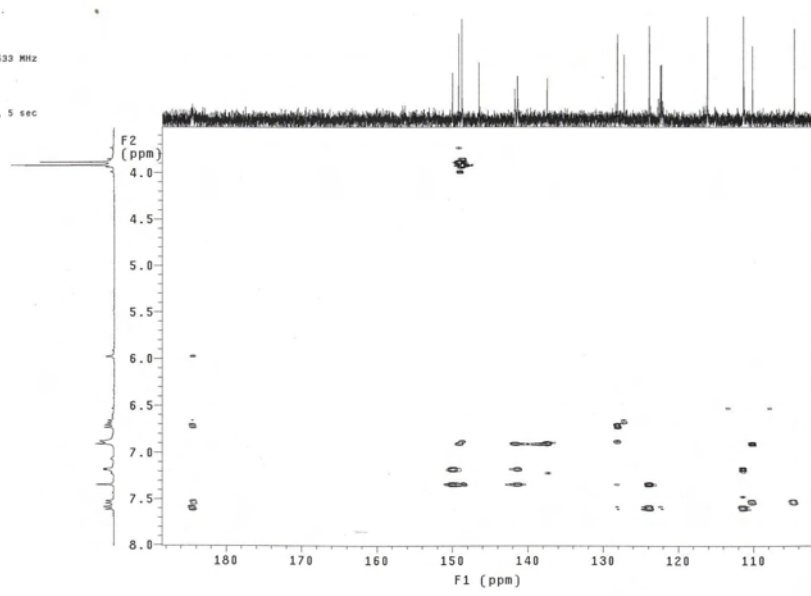


그림 3-4-81. HMBC spectrum of new compound 3.

⌘ 3-4-4. <sup>1</sup>H (600 MHz) and <sup>13</sup>C (150 MHz) NMR data for Compounds 2 and 3

Position	2		3	
	$\delta_H$ mult. (J in Hz)	$\delta_C$	$\delta_H$ mult. (J in Hz)	$\delta_C$
1			7.53 d (15.6)	141.8
2		146.7	6.67 d (15.6)	122.5
3		186.6		184.4
4	5.91 s	105.3	5.98 s	101.8
5		176.1		184.4
6			6.72 d (15.6)	122.4
7			7.60 d(15.6)	141.5
1		124.4		127.3
2	7.23 d (1.8)	107.9	6.90 s	104.7
3		149.0		149.2
4		137.4		137.5
5		146.5		146.5
6	7.21 d (1.8)	113.6	6.87 s	110.3
7	6.52 s	112.2		
1''		128.2		128.2
2''	7.43 d (1.8)	111.0	7.34 s	111.5
3''		149.2		148.8
4''		150.4		150.0
5''	6.91 d (8.4)	116.4	6.88 d (8.4)	116.3
6''	7.20 dd (8.4, 1.8)	124.6	7.18 d (8.4)	123.9
7''	7.67 d (15.6)	139.7		
8''	7.14 d (15.6)	113.5		
3-OCH <sub>3</sub>	3.94 s	56.4	3.89 s	56.6
3''-OCH <sub>3</sub>	3.99 s	56.5	3.90 s	56.3



다. 간섬유화 치료효능 물질의 간보호 효과 검증

(1) 디아릴헵타노이드계 화합물의 간보호 효과 검증

이들 커큐민 계열의 화합물은 간경변 관련하여 최근 보고가 되었기에 이들 화합물의 구조적 차이에 따른 간보호 효과 검사와 새로운 기전 연구를 위하여 먼저 alpha-SMA 발현에 미치는 효과를 평가하였다. 그 결과, 기존에 알려진 curcumin에 비하여 demethoxycurcumin 및 bismethoxycurcumin의 alpha-SMA 억제 효능은 유사하거나 우수한 것으로 나타났다 (그림 3-4-82).

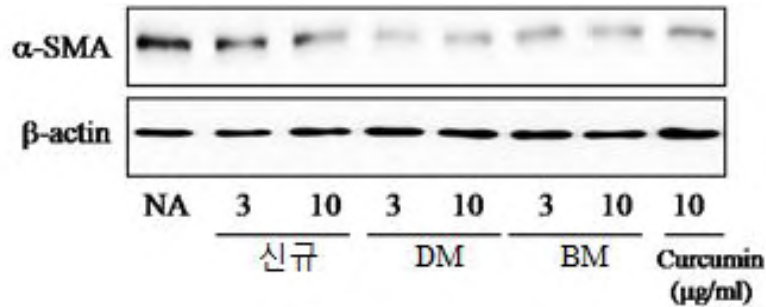


그림 3-4-82. Curcumin, demethoxycurcumin 및 bismethoxycurcumin의 alpha-SMA 발현억제 효능

(2) 신규 디아릴헵타노이드계 화합물의 간보호 효과 검증

본 연구팀은 최근 울금에서 새로운 구조의 신규 curcumin 계 성분을 분리하고 구조를 확인하였다. 이 신규 화합물에서 그림 3-4-83과 같이 농도의존적인 alpha-SMA 발현억제 효능이 관찰되었으며, TGF-beta1 mRNA 발현과 유전자 전사활성 억제가 관찰되었다. 이 화합물의 대량분리 조건과 동물실험 완료 및 curcumin과의 효력 (potency) 비교 실험 수행 시 특허출원이 가능할 것이다 (그림 3-4-83~85).

신규 분리 **curcumin** 계 성분

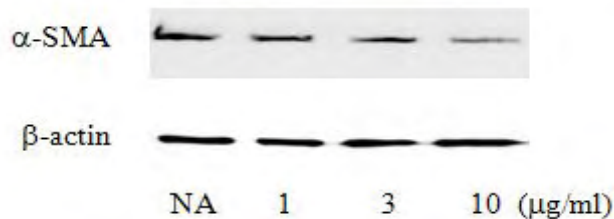


그림 3-4-83. 신규분리 Curcumin계 성분의 alpha-SMA 발현억제 효능

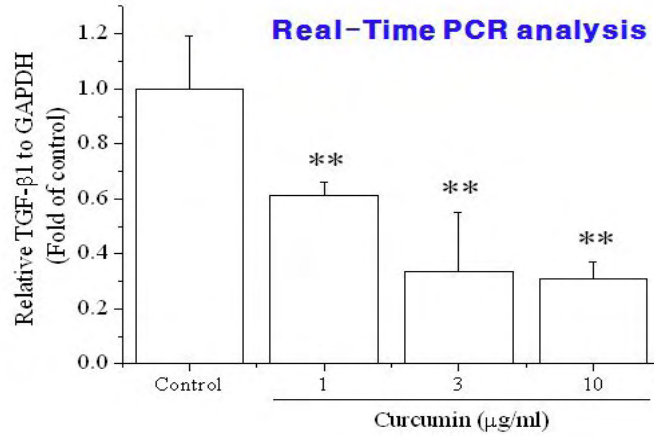


그림 3-4-84. Effect of cyclocurcumin on TGF-β mRNA synthesis

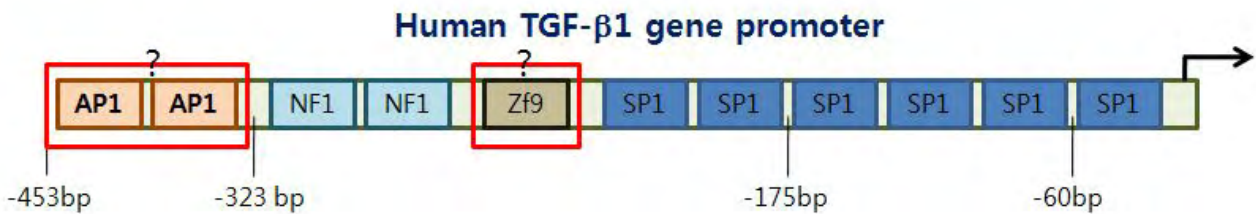
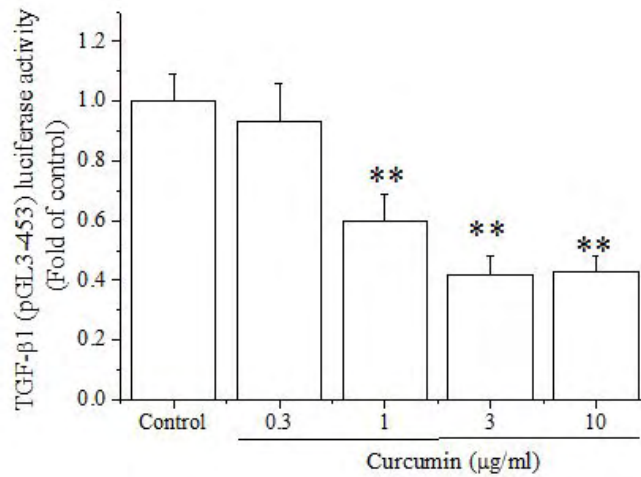


그림 3-4-85. Effect of cyclocurcumin on TGF-β gene transcription (Reporter gene analysis using human TGF-β gene promoter)

(3) 신규로 발굴된 화합물들의 간 섬유화 치료효능 검토

(가) 발굴된 curcumin과 demethoxycurcumin 화합물의 간 섬유화 치료효능 검토

간의 섬유화 과정에서 핵심적인 역할을 수행하는 세포는 stellate 세포 (정상세포)로서 정상간이 섬유화되는 과정에서 지질저장 역할을 수행하는 정상세포는 myofibroblast 세포형으로 전환이 일어난다. 이 정상세포 활성화 과정에서 세포는 특이적으로 alpha-SMA 단백질이 발현되므로 alpha-SMA 단백질을 정상세포 활성화의 특이 marker로 이용한다. 정상세포 활성화는 transforming growth factor-beta (TGF-beta) 분비를 증가시키고, 이는 collagen과 같은 extracellular matrix 단백질 생성을 촉진시켜, 섬유소의 간 내 축적을 일으킨다. 따라서, 간 섬유화 치료를 위한 1차 약리타겟은 정상세포의 활성화 억제가 될 수 있다. 본 연구에서는 신규 디아릴헵타노이드 화합물 이외에 alpha-SMA 발현이 기존 curcumin 보다 강한 것으로 나타난 디아릴헵타노이드 화합물을 찾고자 하였다 (그림 3-4-86).

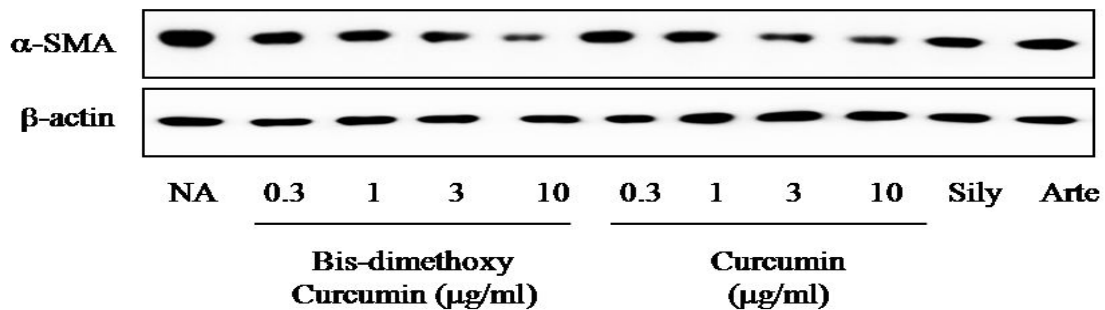


그림 3-4-86. Curcumin과 bis-dimethoxy curcumin의 alpha-SMA 발현 억제효과

그림 3-4-86은 curcumin과 bis-dimethoxycurcumin의 정상세포 활성화 지표인 alpha-SMA 발현에 미치는 영향을 평가한 결과이다. Curcumin과 bis-dimethoxy curcumin 공통적으로 10 µg/ml 농도에서 alpha-SMA 발현을 억제하였으며, 기존 간 보호제로 알려진 silymarin과 artemisinin에 비하여 우수한 효능을 보였다 (그림 3-4-86).

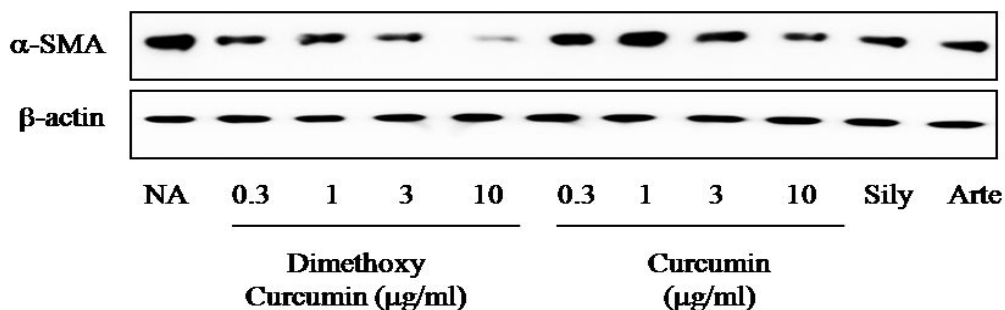


그림 3-4-87. Curcumin과 dimethoxycurcumin의 alpha-SMA 발현 억제효과

상단 그림은 curcumin과 demethoxycurcumin 정상세포 활성화 지표인 alpha-SMA 발현에 미치는 농도의존적인 영향을 평가한 결과이다. Demethoxycurcumin의 경우, 1 - 10 µg/ml 전 농도범위에서 강력한 활성억제효과를 보였으며, 특히, 10 µg/ml에서는 alpha-SMA 발현이 매우 강력하게 억제되었다. Curcumin의 경우, 억제활성이 있으나, demethoxycurcumin에 비해서는 상대적으로 활성이 낮은 것으로 평가되었다.

(나) 미강복합체로부터 간 섬유화 치료효능 검토

미강복합체 발효물에서 추출/분리된 분획들을 대상으로 정상세포 활성화 지표인 alpha-SMA 발현의 억제 효능을 1차 스크리닝하였다. 그 결과, Ethyl acetate 분획과 BuOH 분획에서 분명한 억제 효과가 발견되었으며, 더 나아가, 활성을 보인 상기 분획중 ethylacetate 분획을 추가분리하여 alpha-SMA 발현 억제정도를 평가한 결과, 대부분의 분획에서 억제효능이 관찰되나 Fraction 7, 8번에서 상대적으로 강한 억제활성이 관찰되었다. 따라서, 활성을 보인 물질들을 대상으로 추가 분획 분리 및 유효성분 동정을 진행하였다 (그림 3-4-88~89).

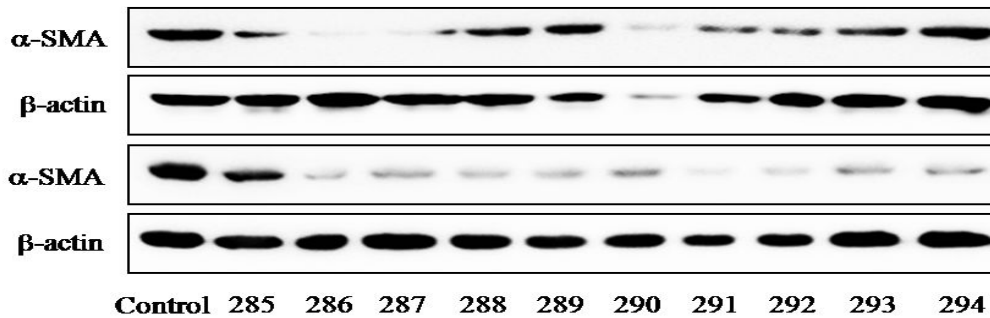


그림 3-4-88. 미강복합체발효물 분획의 alpha-SMA 발현 억제효과

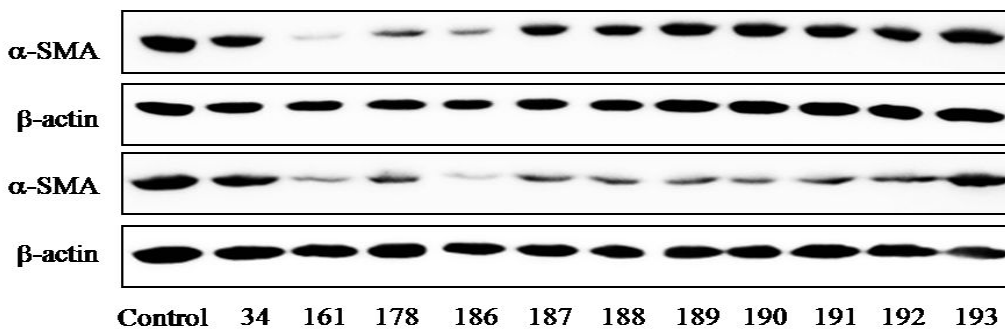


그림 3-4-89. 미강복합체발효물 분획의 alpha-SMA 발현 억제효과

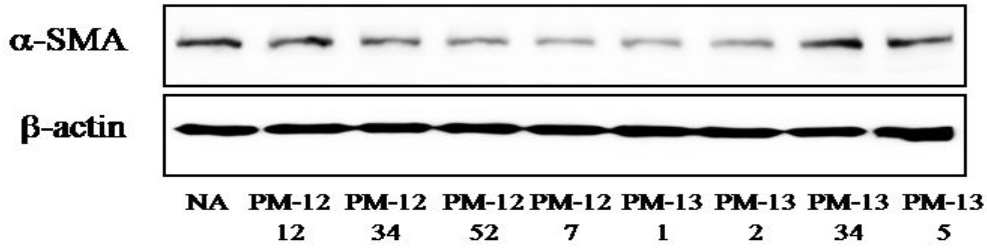


그림 3-4-90. 미강복합체발효물 분획의 alpha-SMA 발현 억제효과

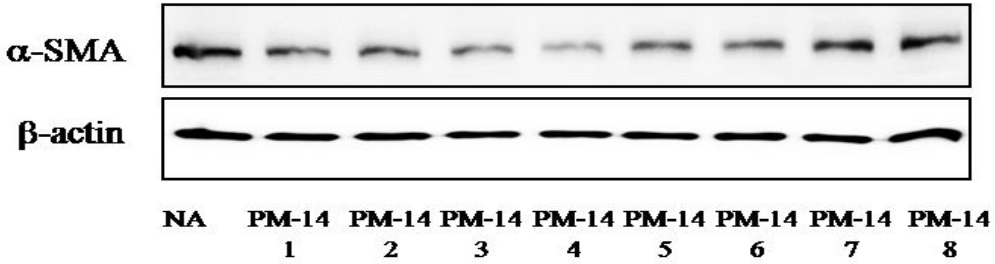


그림 3-4-91. 미강복합체발효물 분획의 alpha-SMA 발현 억제효과

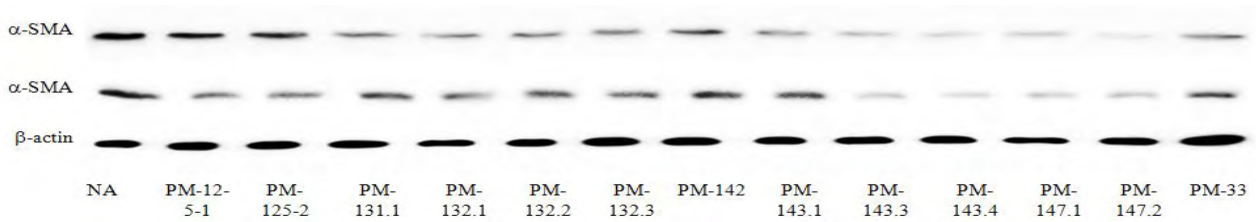


그림 3-4-92. 미강복합체발효물 분획의 alpha-SMA 발현 억제효과

상단 그림들처럼 순수 단일물질 수준의 화합물군에서 alpha-SMA 발현의 강력한 억제효과가 관찰되었다. 특히, PM131.1, 132.1, 132.2, PM143.1, 143.3, 143.4 및 PM147.1, 147.2에서 현저한 억제효과가 관찰되었으며, 이들 물질들의 구조분석 결과, 갈근기원 puerarin 성분으로 규명되어 puerarin의 효능을 정상세포 및 MEF 세포를 이용하여 실험하였다.

#### (다) 신규로 발굴된 puerarin과 demethoxycurcumin의 효능 평가

따라서 alpha-SMA 발현의 강력한 억제효과가 관찰된 demethoxycurcumin 및 puerarin을 선정하고 정상세포 활성화에 따른 transforming growth factor-beta (TGF-beta) 발현 증가 및 활성화 억제와 섬유화 신호 관련 epithelial mesenchymal transition (상피세포의 간질세포화, EMT) 매개 인자에 대한 억제를 평가하였다. 또한 dimethylnitrosamine (DMN)을 이용한 간 섬유화 동물 모델을 이용하여 puerarin, demethoxycurcumin의 alpha-SMA 발현 및 TGFbeta1 발현을 관찰함으로써 간 섬유화 억제 효능을 평가하였다 (그림 3-4-93).

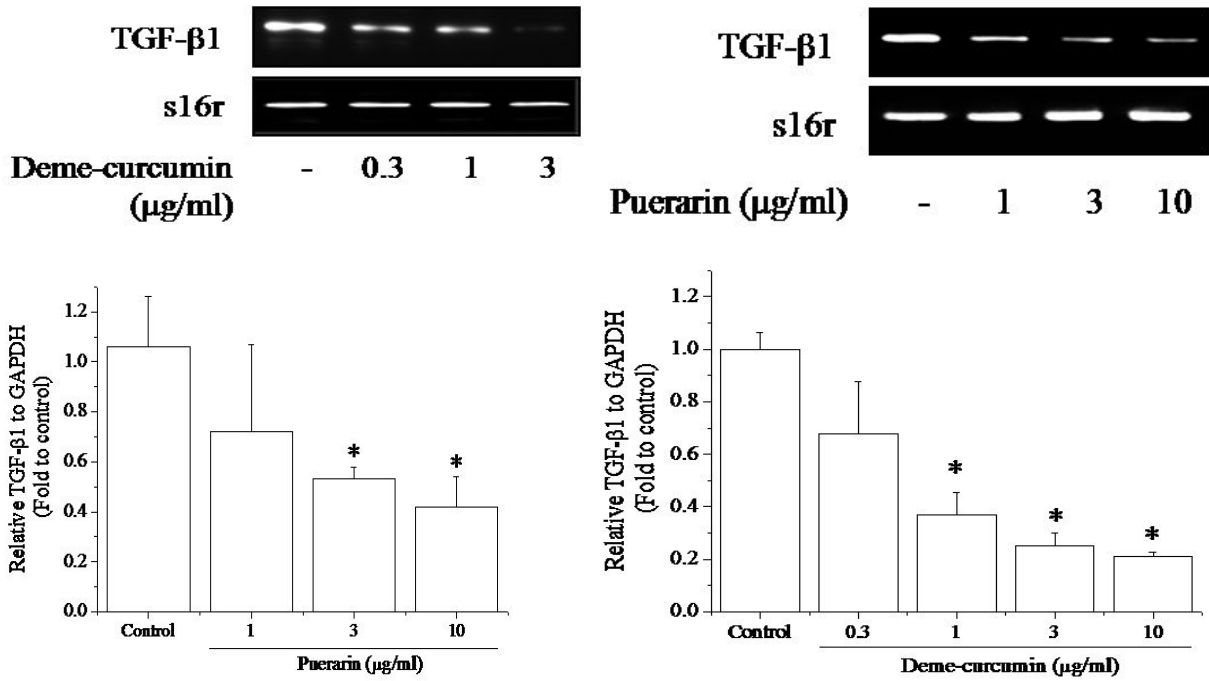


그림 3-4-93. Dimethoxycurcumin 및 puerarin 의 TGF-beta1 mRNA 발현 억제 효과

그림 3-4-93은 demethoxycurcumin 및 Puerarin의 정상세포 활성화에 따른 TGF-beta1 mRNA 발현 억제 효과를 PCR 및 Real time PCR 분석으로 정량한 결과이다. Demethoxycurcumin의 경우, 1 μg/ml 농도부터 강력한 TGF-beta1 mRNA 발현 억제 효과를 보였으며, Puerin의 경우, 3 μg/ml 농도부터 강력한 TGF-beta1 mRNA 발현 억제 효과를 나타내는 것으로 나타났다.

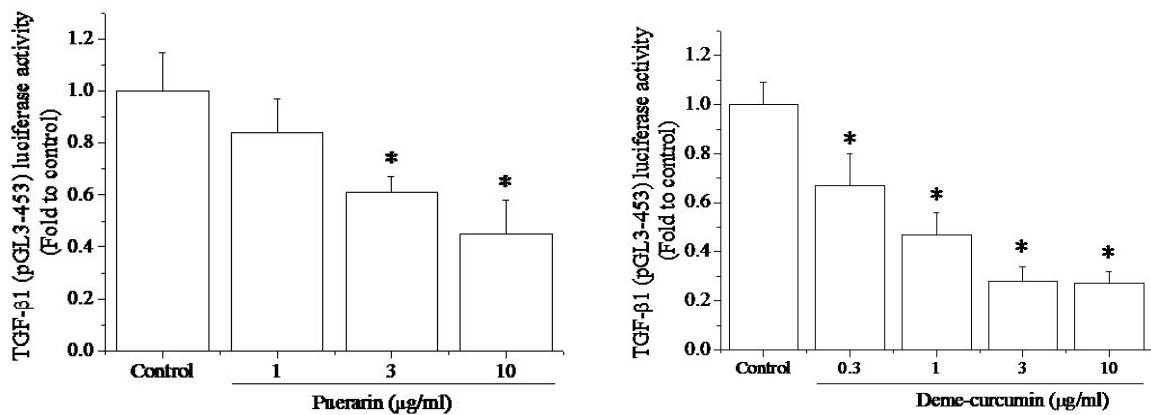


그림 3-4-94. Dimethoxy-curcumin 및 puerarin의 TGF-beta1 promoter 활용 전사 활성 평가

그림 3-4-94은 인간 TGF-beta1 promoter 전사활성을 reporter gene 분석으로 정량한 결과이다. Demethoxycurcumin 및 puerarin의 경우, 정상세포 활성화에 핵심 cytokine인 TGF-beta1의 전사 과정을 억제한다는 사실을 알 수 있다.

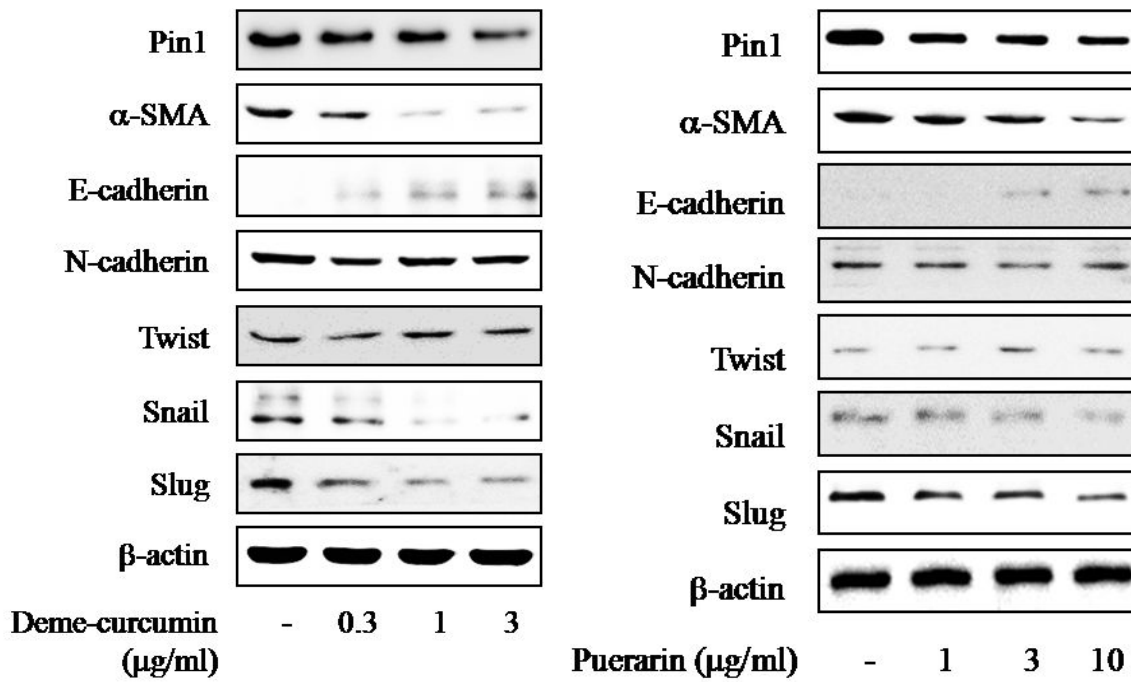


그림 3-4-95. Dimethoxycurcumin 및 puerarin 의 EMT 관련 인자 발현 억제 효과

그림 3-4-95는 demethoxycurcumin 및 Puerarin의 섬유화 신호 관련 EMT 매개 인자에 대한 억제 효과를 결과임. Demethoxycurcumin의 경우, 0.3 - 3 µg/ml 전 농도범위에서 강력한 EMT 관련 인자 발현 억제 효과를 보였으며, 특히, 1 µg/ml부터 EMT 관련 인자 발현이 매우 강력하게 억제되었다. Puerarin의 경우, 3 µg/ml부터 EMT 관련 인자 발현 억제 효과를 나타내었다. 이는 이들 두 화합물들이 지질보존 세포인 stellate 세포의 섬유화과정에서 fibroblast 세포로 전환되는 신호를 억제함을 시사한다.

신규 섬유화인자 Pin1: 본 연구진은 dimethylnitrosamine (DMN) 투여 마우스 간 섬유화 모델에서 Pin1의 발현이 증가함을 규명하였다. 또한, Pin1의 과발현은 정상세포의 활성화지표인 alpha-SMA 발현과 TGF-beta1 발현 증가를 일으키는 mouse embryonic fibroblast (MEF) 세포모델에서 밝혔다 (그림 3-4-96, 97).

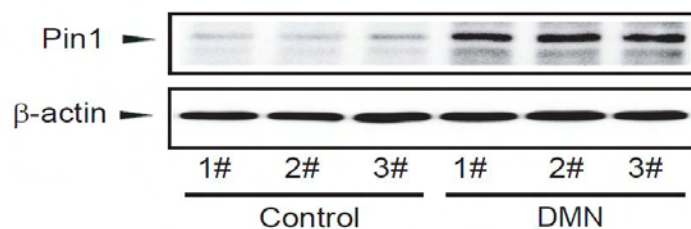


그림 3-4-96. DMN 매개 간 섬유화조직에서 Pin1 발현의 증가

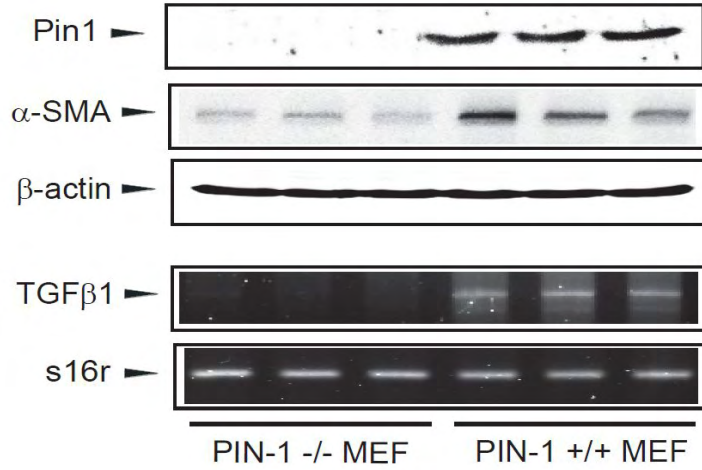


그림 3-4-97. MEF 세포에서 Pin1 발현에 의한  $\alpha$ -SMA 및 TGF-beta1 발현 변화

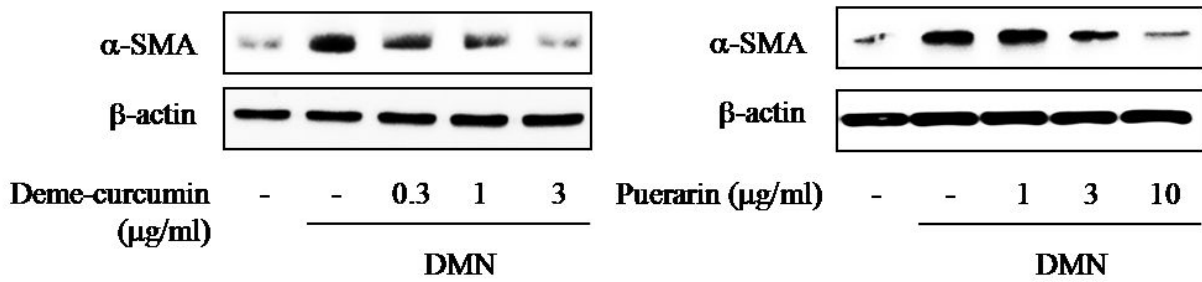


그림 3-4-98. Dimethoxycurcumin 및 puerarin의  $\alpha$ -SMA 발현 억제효과

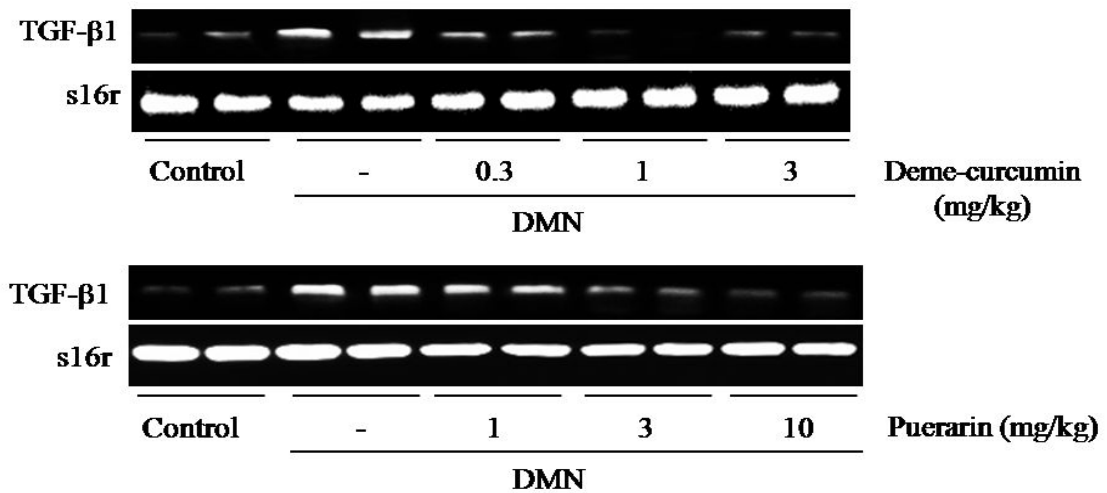


그림 3-4-99. Dimethoxycurcumin 및 puerarin의 TGFbeta1 발현 억제효과



그림 3-4-98, 99은 DMN을 이용한 간 섬유화 동물 모델을 이용하여 demethoxycurcumin, puerarin에 대한 alpha-SMA 및 TGFbeta1 발현을 관찰함으로써 간 섬유화 억제 효능을 관찰한 결과이다. Demethoxycurcumin의 경우, 0.3 - 3  $\mu\text{g}/\text{kg}$  전 범위에서 alpha-SMA 및 TGFbeta1 발현 억제 효과를 보였으며, 특히, 3  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 부터 alpha-SMA 및 TGFbeta1 발현이 매우 강력하게 억제되었다. Puerarin의 경우, 3  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 부터 alpha-SMA 및 TGFbeta1 발현 억제 효과를 나타내었다.

(라) 신규로 발굴된 puerarin과 demethoxycurcumine의 동물 효능 평가

DMN 유도성 마우스 섬유화모델에서의 puerarin 효능 평가: 실제 동물 섬유화모델에서 puerarin (각 용량 주 3회 복강 투약)의 효과를 평가하였다. DMN 10  $\mu\text{l}/\text{kg}$ 을 3주간 투약한 마우스 모델에서 섬유화 정도를 병리학자에 의한 조직병리학적 검정치표 (그림 3-4-100 및 표 3-4-5 및 collagen의 분해산물인 4-hydroxyproline 양 (그림 3-4-101) 정량으로 평가하였다. 그 결과 puerarin 3 및 10  $\text{mg}/\text{kg}$  투약군에서 현저한 개선효과가 관찰되었다.

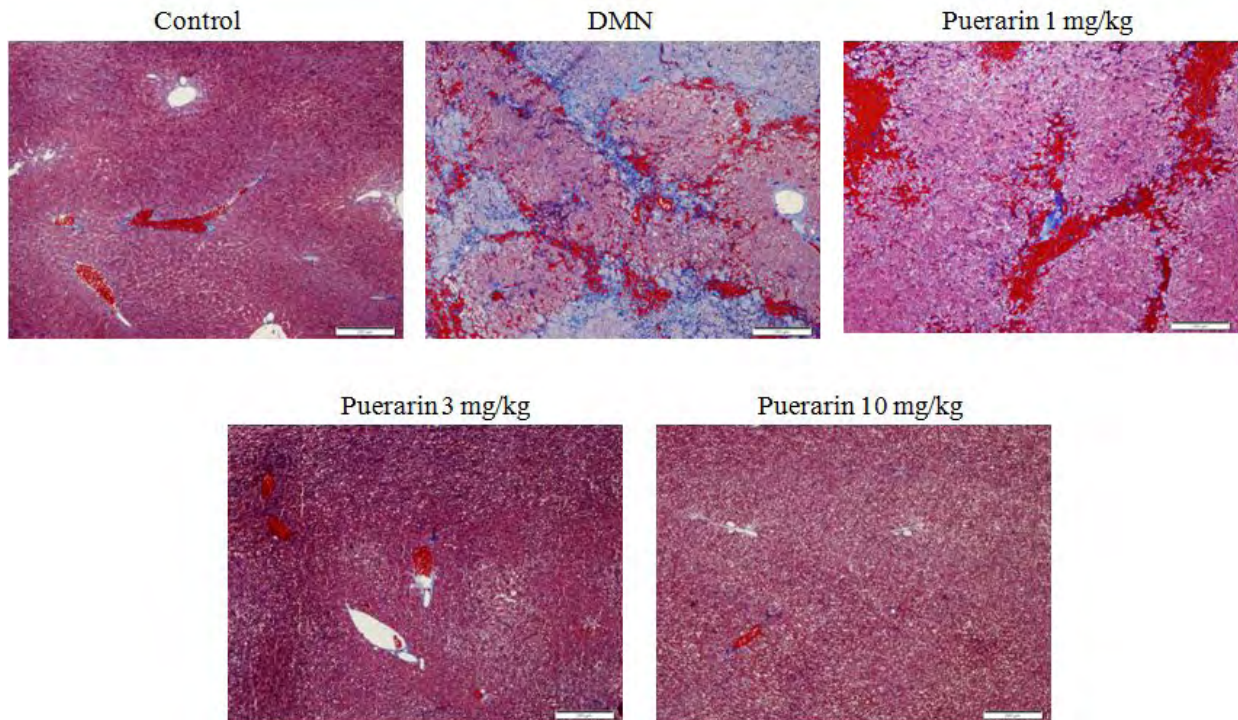


그림 3-4-100. Puerarin 처치에 의한 간 섬유화 개선 (Masson's Trichrome staining)

표 3-4-5. Puerarin 투약에 의한 간 섬유화 개선 효과

Group	Case	Stage	Remarks
Control	1	0	
	2	0	
	3	0	
	4	0	
DMN	1	3	
	2	2	
	3	3	
	4	3	
	5	3	
	6	3	
Puerarin 1mg/kg	1	0	
	2	2	*Ballooning degeneration +++
	3	2	
Puerarin 3mg/kg	1	0	
	2	0	
	3	0	*Ballooning degeneration +
Puerarin 10mg/kg	1	0	*Ballooning degeneration ++
	2	0	
	3	0	

Fibrosis Staging

Stage 0: none

Stage 1: Enlarged, fibrotic portal areas

Stage 2: Periportal or portal-portal septa but intact architecture

Stage 3: Fibrosis with architectural distortion but no obvious cirrhosis

Stage 4: Probable or definite cirrhosis

\*: hepatocytic change

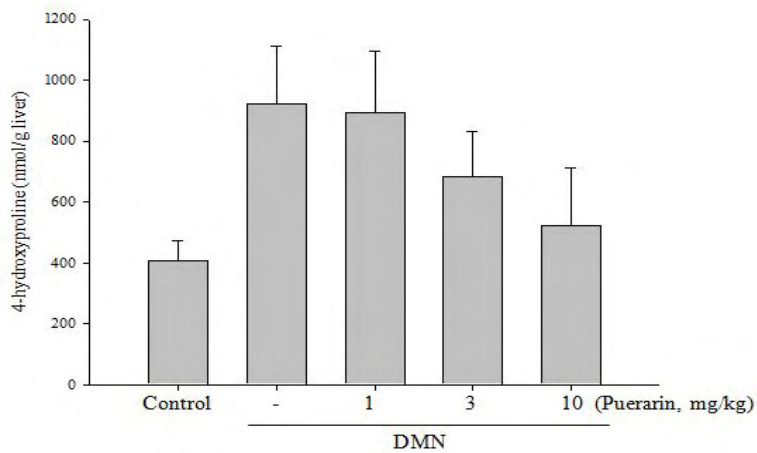


그림 3-4-101. Puerarin의 4-hydroxyproline 억제효과

DMN 유도성 마우스 섬유화모델에서의 demethoxycurcumin 효능 평가: 실제 동물 섬유화모델에서 demethoxycurcumin (각 용량 주 3회 복강 투약)의 효과를 평가하였다. DMN 10 ul/kg을 3주간 투약한 마우스 모델에서 섬유화 정도를 병리학자에 의한 조직병리학적 검정치표 (그림 3-4-102, 표 3-4-6) 및 collagen의 분해산물인 4-hydroxyproline 양 (그림 3-4-103) 정량으로 평가하였다. 그 결과 demethoxycurcumin 1 및 3 mg/kg 투약군에서 현저한 개선효과가 관찰되었다.

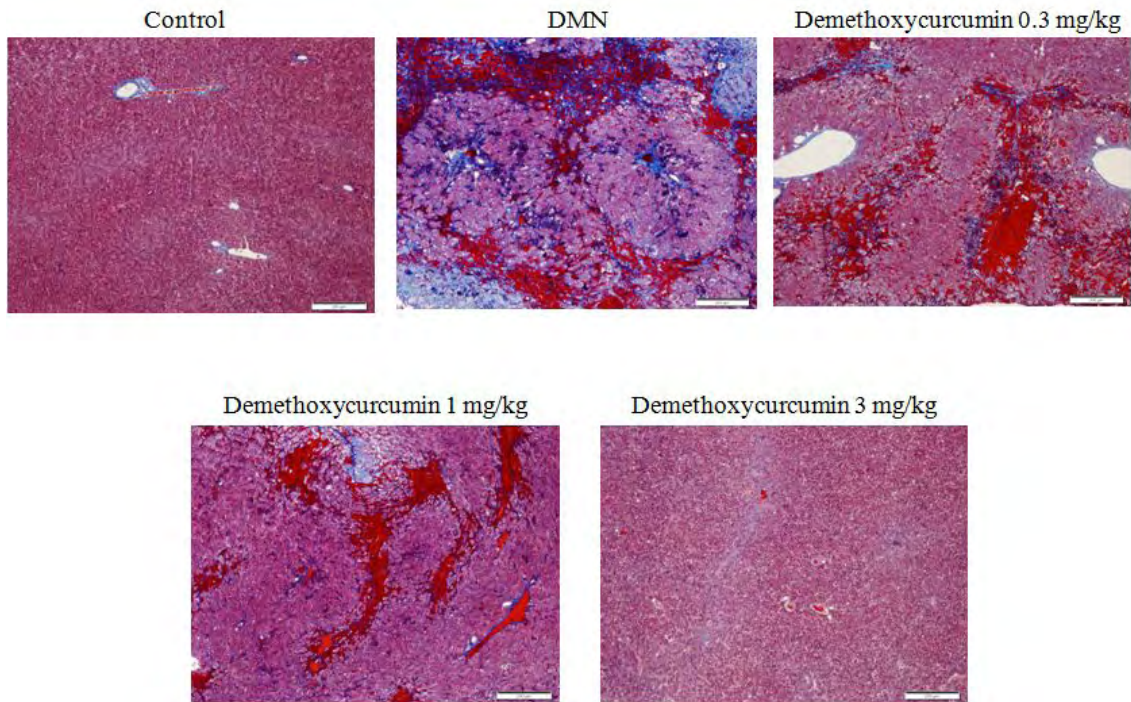


그림 3-4-102. Demethoxycurcumin 처치에 의한 간 섬유화 개선 (Masson's Trichrome staining)

표 3-4-6. Demethoxycurcumin 투약에 의한 간 섬유화 개선 효과

Group	Case	Stage	Remarks
Control	1	0	
	2	0	
	3	0	
	4	0	
DMN	1	3	
	2	2	
	3	3	
	4	3	
	5	3	
	6	3	
Demethoxycurcumin 0.3mg/kg	1	3	
	2	1	
	3	3	*Ballooning degeneration +
Demethoxycurcumin 1mg/kg	1	2	
	2	0	
	3	0	
Demethoxycurcumin 3mg/kg	1	0	
	2	0	
	3	0	

Control과 DMN결과는 puerarin 결과와 동일한 동물 사용

Fibrosis Staging

Stage 0: none

Stage 1: Enlarged, fibrotic portal areas

Stage 2: Periportal or portal-portal septa but intact architecture

Stage 3: Fibrosis with architectural distortion but no obvious cirrhosis

Stage 4: Probable or definite cirrhosis

\*: hepatocytic change

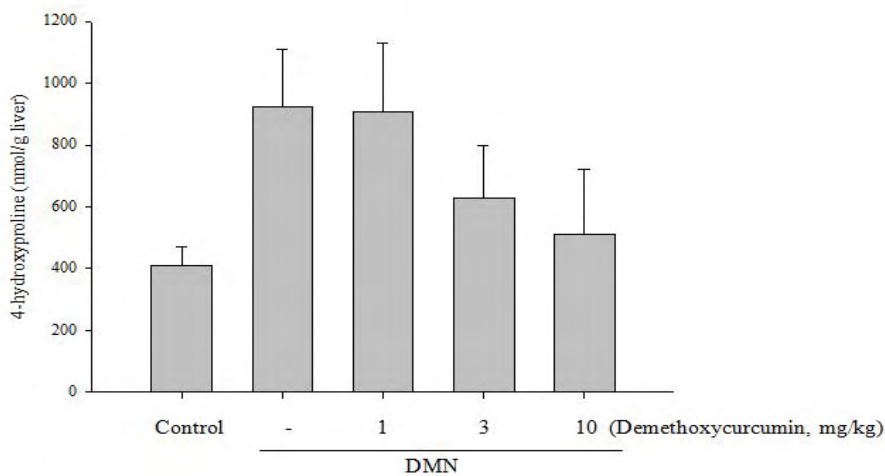


그림 3-4-103. Demethoxycurcumin의 4-hydroxyproline 억제효과  
(Control과 DMN 단독투여군은 puerarin 결과와 동일)

(마) 신규로 발굴된 puerarin과 demethoxycurcumine의 인간 정상세포를 이용한 효능 평가  
 인간 정상세포 LX-2 세포를 활용한 약물 작용기전 연구: 상기 연구결과를 바탕으로 puerarin과 demethoxycurcumin의 작용기전을 Pin1 억제와 연결시키는 후속 실험을 인간 정상세포주인 LX-2 세포를 활용하여 수행하였다. 간 섬유화의 핵심세포인 인간 정상세포의 활성화형인 LX-2 세포에서도 demethoxycurcumin 3 microg/ml, puerarin 10 및 30 microg/ml 농도에서 정상세포 활성화지표인 alpha-SMA와 Pin1의 발현이 억제됨을 확인하였다 (그림 3-4-104. 이 결과로 볼 때, puerarin 및 demethoxycurcumin의 작용은 간 섬유화 과정에 핵심 세포인 정상세포의 활성화를 억제하는 작용임을 알 수 있다.

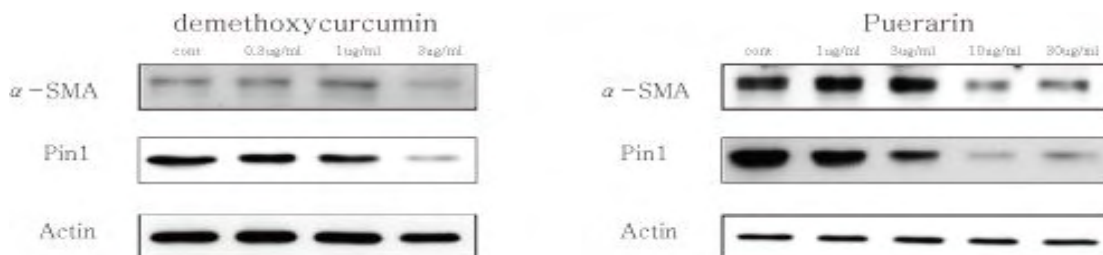


그림 3-4-104. 인간 활성화형 정상세포인 LX-2 세포에서 demethoxycurcumin 및 puerarin의 alpha-SMA 및 Pin1 발현 억제 작용

발효 갈근추출물에서 증가한 성분의 정상세포 활성화 억제작용 평가: 다음으로 실제 갈근추출물을 발효시 증가했던 성분들의 정상세포 활성화 억제작용을 MEF세포에서 평가하였다. 그 결과, CPP825만 alpha-SMA 발현을 농도 비의존적으로 억제하였으나, 그 강도는 갈근의 주요 약리성분으로 알려진 puerarin보다 약하게 나타났다 (그림 3-4-105).

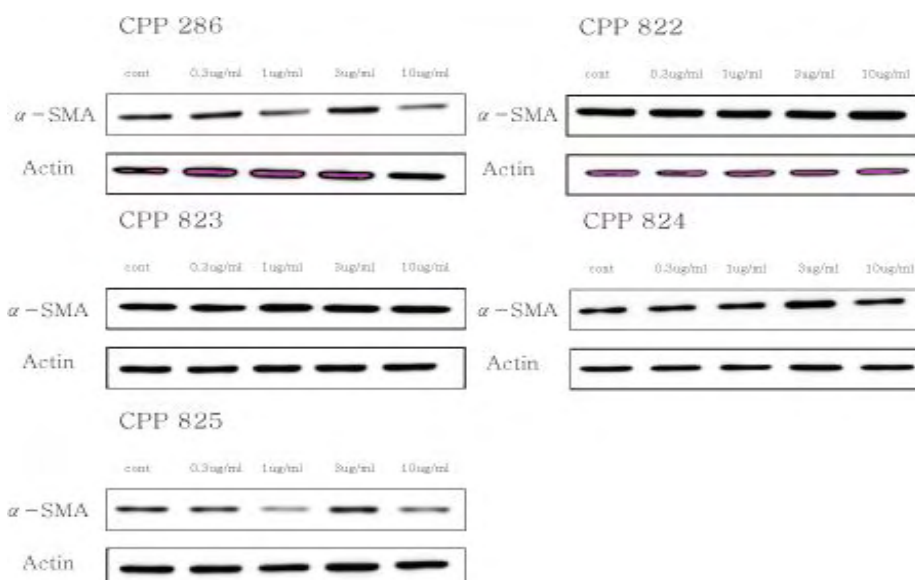


그림 3-4-105. 발효 갈근추출물에서 증가한 성분들을 활용한 alpha-SMA 발현 비교

## 제 5 절 가축사료첨가 항생제 대체 및 성장촉진용 생균제 산업화

### 1. 실험방법

#### 가. 산란계 사양실험

##### (1) 산란계 선정

본 시험에 적용할 시료 생산을 위해 경기도 용인시 원삼면 소재 덕이농원에서 산란계를 사양하면서 계란을 생산하였다. 이 때 사용한 산란계는 생후 30주령 백색 레그혼종이었으며 계란 생산을 위한 산란계는 총 200수 규모 기준이었다.

##### (2) 산란계용 사료

본 시험에 사용한 산란계용 대조구 사료는 (주)천하제일에 본 시험 처리구에 맞게 주문자 의뢰 방식으로 생산한 것을 기본사료로 이용하였다. 또한 처리구에 이용한 사료는 본 연구과제의 참여업체인 (주)건농네이처에서 생산한 생균제를 일반사료에 1% 첨가한 것을 사용하였다. 이 때 (주)천하제일 사료를 급여하는 대조구와 생균제를 첨가한 처리구 규모는 각각 100수였다.

##### (3) 시험항목

급여사료 종류별 대조구와 처리구의 산란율을 조사하고, 생산된 계란의 품질평가를 위하여 매주 동일한 요일을 선정하여 1회/주 계란을 수거하여 계란의 품질을 비교 측정하였다. 이 때 계란 품질 측정항목으로는 난중, 난백계수, 난황계수, Haugh unit 등의 신선도 품질과 콜레스테롤 등 이화학적 품질을 측정하였으며 계란의 저장 중 품질변화를 조사하였다.

#### (가) Haugh unit

Haugh unit은 난중 무게를 잰 후, 평판 위에 할란하여 농후난백의 높이를 측정하였다. 이 후, 다음 공식의 대입하여 haugh unit 값을 구하였다.

$$\text{Haugh unit} = 100 * \log(\text{농후난백의 높이} + 7.57 - 1.7 * \text{난중} * 0.37)$$

#### (나) 난백계수

농후난백의 높이는 Digimatic indicator을 이용하여 측정하였고, 농후난백의 직경은 digimatic caliper을 이용하여 장축과 단축을 서로 90도의 방향으로 측정하고 두 값의 평균을 내었다. 각 측정값은 다음 식에 의하여 난백계수를 얻었다.

$$\text{난백계수} = \text{농후난백의 높이(mm)} / \text{농후난백의 직경(mm)}$$

#### (다) 난황계수

난황의 높이는 Digimatic indicator (Mitutoyo사, Japan)을 이용하여 측정하였고, 난황의 직경은 digimatic caliper (miyutoyo사, Japan)를 이용하여 1회 측정하고 각도를 90도로 돌려 2회 측정 한 다음, 평균값을 내었다. 각 측정값은 다음 식에 의하여 난황계수를 얻었다.

$$\text{난황계수} = \text{난황높이(mm)} / \text{난황직경(mm)}$$

(라) 난각두께

난각두께는 1/150 mm까지 측정할 수 있는 digimatic caliper를 이용하여 계란의 둔단분, 첨단부, 적도부의 난각의 내막을 제거한 후 측정하였다. 이를 각각 3회 측정하여 평균값을 내었다.

(마) 색도

난황과 난백을 분리한 후 색차계(Chroma meter: Model CR-410. Minolta Co., Japan)를 이용하여 동일한 방법으로 6회 반복하여 L값(명도), a값(적색도), b값(황색도)으로 나타내었다. 이 때 사용된 표준백판은 L값 97.10, a값 -0.13, b값 2.15으로 표준화하였다.

나. 육계 사양실험

육계실험은 용인시 원삼면 독성리 덕이농원에서 실시하였으며, 병아리 사료에 생균제 1%를 혼합하여 초생추부터 초생추사료, 비육전기, 비육후기 사료로 닭의 체중이 증가함에 따라 사료를 교체하고 대조군 사료에는 생균제를 혼합하지 않고 실험사료에만 1%의 생균제를 혼합하여 급여하였다.(참여업체 요청에 의해서)부로일러 병아리는 양지부화장으로 부터 200수의 초생추를 구입하여 배터리 cage 사육을 실시하였으며, 처리군은 대조군(생균제 혼합하지 않은 사료 급여) 100수, 실험군(생균제 1%를 첨가하여 급여하는 실험군)100수 총 2 처리군으로 나누어 실험을 실시하였다. 실험기간은 총 7주간 진행하였다.

(1) 사육 및 사료

병아리 사료에 생균제를 1%를 혼합하여 초생추부터 초생추사료, 비육전기, 비육후기 사료로 닭의 체중이 증가함에 따라 사료를 교체하고 대조군 사료에는 생균제를 혼합하지 않고 실험사료에만 1%의 생균제를 혼합하여 급여하였다.(참여업체 요청)

(2) 체중 측정

체중측정은 매주 1회 측정하여 성장율을 조사하였으며 총7회 체중을 측정 하였다.

(3) 육질분석

매주 1회 체중을 측정하여 성장률을 조사하고 총7회 체중을 측정하였으며, 실험이 종료되어 대조군과 실험군으로 나눠 도계를 하고 고기의 성분분석과 관능검사, 이화학적 성분분석, 고기의 항생제 잔류 분석 등을 실시하고 소비자의 기호도를 9점 척도법으로 조사하였다.

(4) 시험항목

(가) pH 측정

사료 5 g을 취하여 증류수 20 mL과 혼합하고 Ultra-turrax(Janken & Kunkel, Model No. T25, Germany)를 사용하여 8,000 rpm에서 1분간 균질한 후 유리전극 pH meter(Mettler, toledo 340, Switzerland)를 사용하여 측정한다.

(나) 가열감량

조리 전 무게에 대한 조리 후 손실된 무게의 백분율(%)로 산출하였다.

각기 다른 조리방법으로 조리를 한 후, rack에서 3분간 방치하여 drip을 제거한 다음 측정하였

다. 가열감량(%)= (가열 전 무게 - 가열 후 무게) / 가열 전 무게 X 100

(다) 보수력

시료 5 g 채취하여 분쇄 후 보수력 측정용 원심관에 기포가 없도록 채우고 70 °C의 항온수조에서 30분간 가열처리 후 실온에서 10분 동안 방냉하고 230xg 로 10분간 원심분리 후 유리된 액즙양을 측정하였다(Wierbick 등, 1975). 총수분량은 동일시료를 20 g을 105 °C에서 항량이 될 때까지 건조하여 측정하였다. 보수력을 구하는 공식은 아래와 같다.

$$\text{보수력}(\%) = 100 - \text{유리수분함량}(\%)$$

(라) TBA(Thiobarbituric acid)

시료를 가로x세로x높이를 2.5x2.5x1.5cm로 절단하여 80 °C water bath에서 30분간 가열하고 실온에서 30분간 냉각시킨 후 근섬유와 평행하게 잘라 p20mm Diaebonicie가 장착된 장착된 Texture analyzer(TA-XT2i, stable micro system. UK)를 이용하여 시료의 TBA를 측정하였으며, 이때의 speed는 3.3mm/s, distance는 75%이다.

(마) 전단력

가열한 시료를 실온에서 30분간 냉각시킨 후 근섬유 방향으로 2.5cm x 2.5cm x 1.5cm (가로x세로 x 두께)로 잘라 Blade set(Warner Bratzler blade)가 장착된 Texture analyzer(TA-XT2i, stable micro system. UK)를 이용하여 전단력을 측정한다. Cross head speed은 2 mm/sec로 하였다.

(바) 색도

시료를 색차계(Chroma meter:Model CR-410.Minolta Co., Japan)를 이용하여 10회 반복하여 L값(명도), a값(적색도), b값(황색도)으로 나타낸다. 이 때 사용된 표준백판은 L값 97.10, a값 -0.13, b값 2.15으로 표준화한다.

(사) 관능검사

관능평가는 훈련된 15명의 패널요원을 구성하여 신선육과 가열육의 관능적 기호도를 조사하였다. 조사항목은 신선육의 경우 외관, 육색, 냄새, 전반적인 기호도이었고 가열육은 외관, 육색, 다즙성, 풍미, 조직감, 전반적인 기호도를 평가하였다(9점 척도법).

다. 양돈실험

(1) 사료섭취량 측정

사료 섭취량은 2주일에 한 번씩 측정하였다. 한 처리구에 5두씩 배치하였으며 섭취량 계산법은 다음과 같다. 사료섭취량=(사료급여량-사료잔량)

(2) 체중측정

체중 측정은 2주일에 1회 측정하였으며 측정은 둔형기를 이용하고 디지털로 표시되는 저울을 사용하였다. 1두씩 측정하였으며 1 처리구에 5두를 측정하고 전체 중량을 5로 나누어 평균 체중을 산출 하였다.



### (3) 지육율측정

돼지고기 지육율은 생체 체중에서 도체를 한 후 부산물(등지방, 체지방, 족발, 혈액, 돈피, 머리)을 뺀 뼈가 있는 상태의 고기의 중량을 말한다.

지육율=(생체중-부산물(등지방, 체지방, 족발, 혈액, 돈피, 머리)

지육율=(도체중량÷생체중량)×100

### (4) 등지방두께측정

등지방은 왼쪽 반도체의 마지막 등뼈와 제1허리뼈 사이와 제11등뼈와 제12등뼈 사이의 두 개 부위의 등지방을 mm 단위로 캘리포스를 이용하여 측정하여 평균치로 산정하였다.

### (5) 부위별 분석

돼지고기의 부위별 분석은 등심, 목살, 삼겹살 등 소비자 들이 가장 선호하는 부위 3가지를 분석하였으며, 고기의 pH, 고기를 가열하였을 때 줄어드는 가열 감량, 고기가 육즙을 보유할 수 있는 보수력, 고기의 색깔, 그리고 입으로 맛을 보고 느낄 수 있는 관능 검사를 실시하였다.

### (6) 시험항목

#### (가) pH 측정

시료 5 g을 취하여 증류수 20 mL과 혼합하고 Ultra-turrax(Janken & Kunkel, Model No. T25, Germany)를 사용하여 8,000 rpm에서 1분간 균질한 후 유리전극 pH meter(Mettler, toledo 340, Switzerland)를 사용하여 측정한다.

#### (나) 가열감량

조리 전 무게에 대한 조리 후 손실된 무게의 백분율(%)로 산출하였다.

각기 다른 조리방법으로 조리를 한 후, rack에서 3분간 방치하여 drip을 제거한 다음 측정하였다. 가열감량(%)= (가열 전 무게 - 가열 후 무게) / 가열 전 무게 X 100

#### (다) 보수력

시료 5 g 채취하여 분쇄 후 보수력 측정용 원심관에 기포가 없도록 채우고 70 °C의 항온수조에서 30분간 가열처리 후 실온에서 10분 동안 방냉하고 230xg 로 10분간 원심분리 후 유리된 액즙양을 측정하였다(Wierbick 등, 1975). 총수분량은 동일시료를 20 g을 105 °C에서 항량이 될 때까지 건조하여 측정하였다. 보수력을 구하는 공식은 아래와 같다.

보수력(%) = 100 - 유리수분함량(%)

#### (라) 색도

시료를 색차계(Chroma meter:Model CR-410.Minolta Co., Japan)를 이용하여 10회 반복하여 L값(명도), a값(적색도), b값(황색도)으로 나타낸다. 이 때 사용된 표준백판은 L값 97.10, a값 -0.13, b값 2.15으로 표준화한다.

#### (마) 관능검사

고기의 맛은 혀에서 느끼는 맛과 코로 느끼는 냄새를 종합적으로 평가하며, 고기의 지방은 가

열시 특유의 풍미를 갖는다. 관능검사는 고기는 지방과 수분을 많이 보유하는 고기일수록 다즙성이 좋으며 육색, 다즙성, 풍미, 조직감등 전반적인 항목으로 9점 척도법으로 최종 평가하였다.

#### (바) 이화학분석(지방산)

25mL의 튜브에 지방질 20 mg을 취한다. 0.5N NaOH/Methanol 2 mL을 넣어 마개를 막고 heating block(100°C)에서 약 5분간 가수분해 시킨다. 냉각 후 14% BF<sub>3</sub>/Methanol 2mL을 넣고 5분간 반응시킨 다음 이소옥탄 2 mL을 넣고 진탕한다. 반응이 끝나면 시료가 든 튜브에 포화 식염수 2 mL을 넣는다. 마개를 막고 5초간 가볍게 흔들어준 후 이소옥탄층을 뽑아 무수황산나트륨을 이용하여 탈수시킨다. 탈수된 지방산 메틸 에스테르 시험액을 받아 GC-FID에 주입하여 분석한다. 분석조건으로 칼럼은 HP-FFAP(30m×0.32um ID, 0.52mm film thickness), 주입부 및 검출기온도는 230°C 및 250°C이고, 오븐온도는 100°C에서 230°C까지 분당 4°C씩 승온하였다.

#### (사) 아미노산분석

시료 약 5.0g를 시험관에 취하고 여기에 6N-HCl 15 mL를 가하여 가수분해 한다. vortex mixer로 1분간 교반시킨다. 시험관에 질소가스를 충전시켜 관내의 산소를 제거한 후 즉시 마개를 막는다. 질소가스가 충전된 상태에서 105°C heating block에 장착시킨 후 24시간 동안 가수분해 한다. 분해가 끝나면 실온까지 방냉시킨 다음 시험관내 여액은 50 mL 정용 flask로 옮기고 3차 증류수로 표선까지 정용한 후 혼합하여 여과지를 이용 여과한다. 여과한 여액 1 mL을 취해서 20 mL 정용 flask에 3차 D.W.로 정용한 후 이를 0.45µm 멤브레인 필터로 여과하여 시험용액으로 하여 아미노산 자동분석기(Hitachi AAA L-8900)로 분석하였다. 분석조건으로 칼럼은 Ion exchange column (4.6×60mm), 검출기는 Visible detector, 이동상은 buffer solution과 D.W를 사용하였다.

#### (아) 일반성분분석(화학분석)

##### ① 수분

미리 가열하여 항량으로 한 칭량접시에 고체 및 분말 검체 약 3~5 g을 정밀히 달아둔다. 뚜껑을 약간 열어 놓고 각 식품마다 규정된 온도의 건조기에 넣어 3~5시간 건조한 후 데시케이터 중에서 약 30분간 식히고 무게를 단다. 다시 칭량접시를 1~2시간 건조하여 항량이 될 때까지 같은 조작을 반복한다.

##### ② 지방

시료 약 5 g을 원통여과지에 넣고 시료위에 탈지한 솜을 가볍게 충전한 다음, 100~105°C의 건조기에서 약 2~3시간 건조시킨다. 건조시킨 원통여과지를 사이폰에 넣고 105°C에서 항량을 구한 지방수기와 연결시킨다. 디에틸에테르가 시료에 충분히 적시도록 사이폰 위에서 100 mL 정도 부은 다음 속시렛장치에 장착시킨다. 디에틸에테르가 약 4-5방울/초의 속도로 8시간 추출한다. 추출이 끝나면 사이폰에 있는 원통여과지를 핀셋을 이용하여 제거한다. 사이폰에 남은 디에틸에테르를 지방수기로 옮긴다. 농축기에서 디에틸에테르를 감압건고 시킨다. 완전하게 건고시킨 후 지방수기를 105°C에서 항량을 구한다.

### ③ 단백질

시료 약 1.0 g를 단백질 분해관에 넣고 촉매제를 넣는다. 95% 황산 20-25 mL를 천천히 분해관에 넣는다. 410°C로 미리 예열한 분해기에 분해관을 넣고 분해기 뚜껑을 덮은 후 1.5~2시간 정도 가열하며 분해한다. 분해가 끝나면 상온에서 냉각시킨다. 분해관을 단백질 증류장치에 장착시킨다. 증류장치에 장착시킨 분해관에 H<sub>2</sub>O 40mL를 넣은 후 32% NaOH 90mL를 넣는다. 증류시 발생된 NH<sub>3</sub> gas를 3% Boric Acid (60mL)에 포집하여 증류액이 100 mL 정도 받을 때까지 증류시킨다. 0.1N HCl로 증류액을 적정한다.

### ④ 회분

시료 5g를 칭량한 도가니를 열판에서 예비 탄화시킨다. 예비 탄화 시 도가니의 뚜껑은 열고 가열하며 처음에는 약하게 가열하여 연기가 나면 단계적으로 서서히 온도를 높여가며 예비 탄화시킨다. 집계를 이용하여 예비 탄화된 시료가 담긴 도가니를 전기로에 옮겨 뚜껑을 덮고 450-600°C에서 3시간 이상 가열한다. 시료의 상태가 백색~회백색으로 되면 desiccator에서 실온으로 방랭, 칭량하고 함량을 구한다.

#### (자) 항생제분석

고기의 항생물질이 없는 안전한 고기를 알아보기 위하여 식품분석실에서 항생제 분석을 실시하였으나 3가지 고기 모두에서 항생제는 일체 검출되지 않았다.

#### 라. 한우실험

##### (1) 한우사양

경기도 용인시 원삼면 두창리 소재 한우 단지 내 농장(소유주: 이상혁)에서 실험을 수행하기로 하고 한우(송아지 5개월령 수소) 15두를 입식시켰으며, 농장소유주가 한우를 직접 구매한 뒤 농장에 입식하였으며 사료와 생균제 첨가제는 한국식품연구원에서 제공하였다.

##### (2) 한우실험 사료제조

한우 사양시험을 위한 기본사료는 항생제를 첨가하지 않은 (주)천하제일사료에 의뢰하여 주문 생산하였으며 그 사료를 대조구로 사용하고(일반대조군), 그 기본사료에 참여업체인 (주)건농네이처의 생균제 3%를 첨가한 그룹(생균제 급여군), 일반농가에서 주로 사용하는 생균제 1% 급여군 상품명(아비락: 주)대성미생물)(시중생균제 급여군 등 총 3그룹으로 나누어 각 처리구에 5두씩 3처리구로 실험을 실시하였다.

##### (3) 한우체중측정

##### (4) 사료효율 및 사료요구량

사료효율은 1일 증가체중/1일 사료섭취량 X 100으로 계산하였으며 사료요구량은 체중을 1kg 증가 시키기 위해 요구되는 사료량으로부터 계산하였다.

##### (5) 한우 장내 미생물 분석

(가) 장내에 존재하는 미생물의 구성을 분석하기 위해 사용하는 amplicon sequencing은 분변샘

플에서 추출한 metagenome상에 존재하는 특정 유전자만을 target으로 분석하는 방법이기 때문에 장내에 존재하는 세균, 고세균, 곰팡이류 또는 원생생물 등의 특정 미생물 군만을 분석하기에 적절한 방법이기 때문에 본 연구에서는 이제까지 알려진 모든 미생물의 유전정보를 바탕으로 생균제에 의한 한우 장내 미생물의 변화를 확인하기 위해 metagenome 분석법을 이용하였다.

(나) 24주령 (생균제 급여 12개월 후) 한우에서 수집한 분변 샘플 1g씩을 LN2를 이용하여 완전 파쇄하고, STES buffer (미생물막 분해 용액)를 첨가하여 60°C에서 over-night incubation으로 cell lysis를 진행하였음. Cell lysis 후에는 phenol extraction (PCI:phenol-chloroform-isoamylalcohol) 방법을 이용하여 crude metagenome을 추출하였으며, Crude metagenome상에 존재하는 RNA를 제거하기 위하여 10ul의 (100mg/ml) RNase를 처리하여 1시간 동안 incubation하고 추가적으로 column을 이용하여 DNA purification 하여 sequencing에 이용 가능한 순도를 가지는 purified metagenome을 획득하였다.

(다) 확보한 purified metagenome을 bioruptor를 이용하여 10min 5 cycle 물리적 fragmentation을 하였으며 purified metagenome과 fragmented metagenome의 quality를 2% agarose gel electrophoresis를 통해 확인한 후, 10X end-repair buffer, low TE, end-repair enzyme 등을 반응시켜 각 fragmented metagenome의 말단을 blunt end로 repair하고, Ion-torrent sequencing adaptor를 이용하여 각 metagenome의 5' 및 3' 말단에 specific 50mer-Oligo adaptor를 연결시킨 후 metagenome sequencing에 이용하였다.

(라) 각 샘플의 metagenome sequence는 MG-RAST server를 이용하여 gene annotation 하였으며 염기서열 분석시에 충분한양의 sequence를 해독하였는지 확인하기 위해 rarefaction analysis를 수행하였다. 세 group (생균제 급여군, 시중생균제 급여군, 일반사료 급여군)의 metagenome과 급여한 생균제 metagenome을 이용하여 전체 미생물 조성이 어떻게 존재하는지를 확인하였으며, Heatmap clustering을 이용하여 전체 미생물 조성이 각 group별로 다르게 존재하는지를 확인하였다. Metagenome annotation 결과를 바탕으로 phylum Bacteroidetes와 phylum Firmicutes의 양이 각 group에서 유의적으로 차이가 있는지 확인하였으며, metagenome상에 존재하는 유전자중 group간에 유의적으로 차이가 있는 유전자를 분석하였다.

## 2. 실험결과

### 가. 산란율, 난황의 콜레스테롤 함량 및 항생제 분석

1% 생균제를 항생제가 첨가되지 않은 사료에 혼합하여 200 수에 대해 14주간 사육하면서 산란율을 측정 한 결과, 생균제 첨가군에서 대조군에 비해 약 2% 이상 산란율이 높은 것으로 분석되었다. 또한 난황의 콜레스테롤 함량을 분석한 결과, 생균제 혼합사료 섭취군에서 약 12% 낮게 검출되어, 1%의 생균제는 계란의 산란율과 난황의 콜레스테롤을 감소시키는데 탁월한 효과가 있는 것으로 나타났다. 한편 13종의 항생제에 대해 분석한 결과 항생제가 검출되지 않았다.

표 3-5-1. 산란율

Week	대조군(%)	실험군(%)
1	85.05 ± 7.64	87.30 ± 7.85
2	89.02 ± 7.18	92.18 ± 7.59
3	86.81 ± 6.93	92.92 ± 11.65
4	87.58 ± 8.91	91.19 ± 11.02
5	89.05 ± 2.27	89.85 ± 4.33
6	88.12 ± 5.93	88.92 ± 8.45
7	87.05 ± 2.78	89.18 ± 2.84
8	87.61 ± 3.57	86.66 ± 5.01
9	85.49 ± 7.46	85.52 ± 5.45
10	79.18 ± 5.20	83.40 ± 2.69
11	84.49 ± 4.49	85.58 ± 3.79
12	86.94 ± 2.79	86.94 ± 5.24
13	87.07 ± 5.36	87.07 ± 3.25
14	87.38 ± 3.33	91.91 ± 2.96

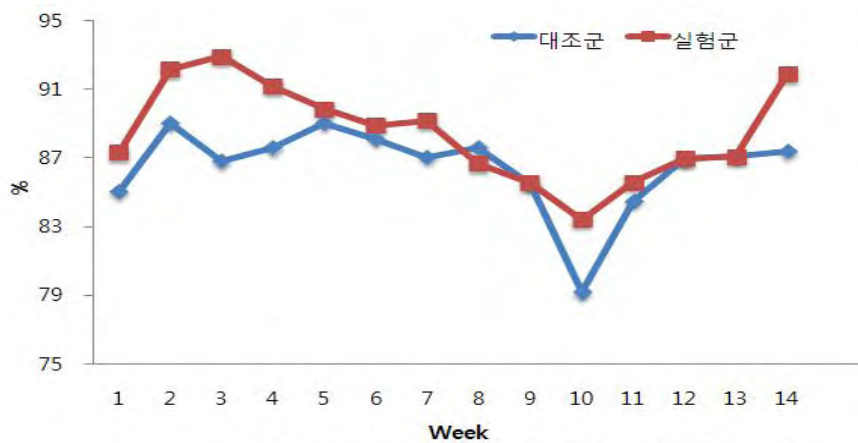


그림 3-5-1. 생균제 첨가사료를 급여한 산란계의 산란율

표 3-5-2. 계란의 콜레스테롤 분석 결과 (mg/dl)

Week	대조군	실험군
4	363.80 ± 0.28	314.73 ± 0.97
8	352.72 ± 1.13	311.34 ± 1.18
12	341.63 ± 1.98	308.26 ± 1.39

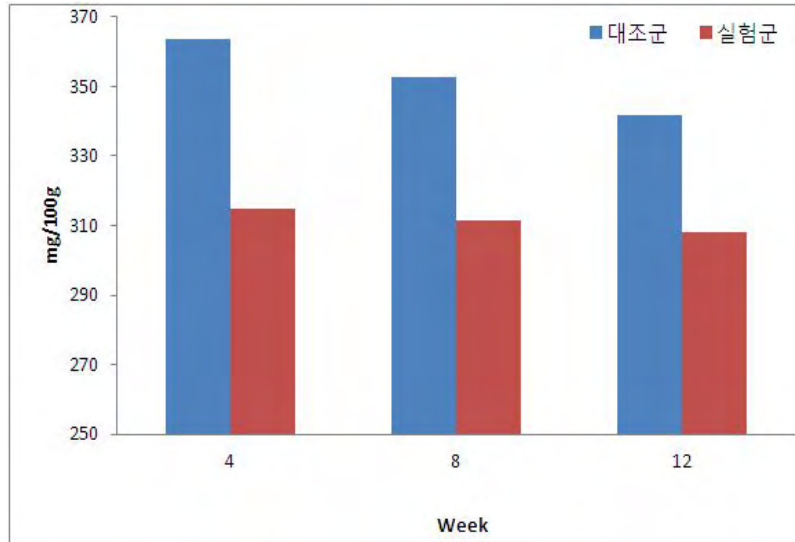


그림 3-5-2. 계란의 콜레스테롤 분석 결과

표 3-5-3. 항생제 분석 결과

항생제	대조군	실험군
Oxytetracycline	불검출	불검출
Tetracycline	불검출	불검출
Chlortetrachcline	불검출	불검출
Doxycycline	불검출	불검출
Marbofloxacin	불검출	불검출
Norfloxacin	불검출	불검출
Ciprofloxacin	불검출	불검출
Danofloxacin	불검출	불검출
Enrofloxacin	불검출	불검출
Sarafloxacin	불검출	불검출
Difloxacin	불검출	불검출
Oxolinic acid	불검출	불검출
Flumequinine	불검출	불검출

## 나. 계란의 품질 평가

### (1) 계란의 신선도 평가

#### (가) Haugh unit

산란 직후부터 계란의 이화학적 성분은 변하기 시작한다. 대부분의 성분 변화는 품질저하를 의미하며 이에 따라 품질 등급도 낮아진다. 품질 변화는 산란 후 저장기간, 온도, 상대 습도, 취급 방법에 따라 달라진다. 난백의 품질을 평가하는 Haugh unit은 Raymond Haugh(Haugh, 1937)가 제안한 이후로 가금 산업에서 내부적 품질의 측정에 폭넓게 적용되고 있다(Williams, 1992; Farran et al., 1995). 이는 저장기간에 따라 변하는 난백의 무게와 높이의 관계를 20~100 범위에서 수치화한 것이다. 저장기간이 길어지면서 계란의 자체 품질선도가 저하되는 현상이 발생하면서 Haugh unit도 낮아지게 된다. 박 등(2010)은 저장기간에 따른 신선도의 변화 연구결과 Haugh unit은 저장기간이 증가함에 따라 급격히 감소함을 보고하였다. 생균제(Probiotic)는 Paker(1974)에 의해 장내 미생물 균형에 도움을 주는 미생물이나 물질들로 정의되었다. 1980년대 후반부터 가축의 생산성을 개선시킬 목적으로 *Saccharomyces cerevisiae*, *Lactobacillus acidophilus*, *Bacillus subtilis* 등이 주로 연구되어 이용되어왔다(Fuller, 1989; Martin et al., 1995). 정 등(2010)은 사료 내 Agariemycetes를 급여한 처리구가 대조구에 비해 2주차와 3주차에서 Haugh unit이 유의적으로 높았으며 윤 등(2008)은 *Bacillus subtilis*, *Lactobacillus plantarum* 및 *Aspergillus oryza*의 급여가 Haugh unit에 유의적인 영향을 미친다고 보고하였다. 각 처리구에서 선택한 특란(60 g 이상)의 저장기간에 따른 Haugh unit의 결과는 표 3-5-4와 같다. 생균제를 급여한 처리구와 대조군은 0일 각각 86.34와 83.57으로 생균제를 급여한 처리구에서 높게 나타났다. 저장기간이 지남에 따라 생균제를 급여한 처리구와 대조구 모두 감소하는 경향을 나타내었는데 생균제를 급여한 처리군은 14일에서 21일간 0.13감소로 2.91 감소한 대조구에 비해 감소율이 낮았다. 또한 28일 생균제 급여 처리구 64.18 였으며 대조군은 56.94로 식란기준(60)에 미치지 못하였다.

표 3-5-4. 사료첨가물을 급여한 닭에서 생산한 계란의 저장 중 Haugh unit

저장일	대조구	실험구
0일	82.03±4.95	86.13±5.55
7일	73.00±4.78	75.35±4.92
14일	67.70±4.88	71.51±4.98
21일	65.91±4.77	71.47±4.40
28일	56.94±5.21	64.41±5.05

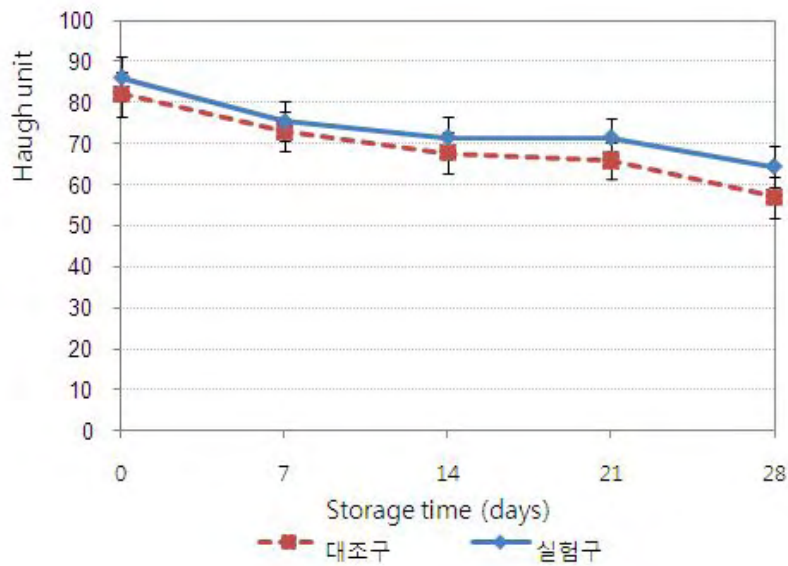


그림 3-5-3. 사료첨가물을 급여한 닭에서 생산한 계란의 저장 중 Haugh unit

#### (나) 난백계수

난백과 난황 그리고 농후난백과 수양난백 사이의 부위별 수분함량이 각각 다르기 때문에 삼투압 현상으로 고농도에서 저농도로 이동현상이 발생하게 된다. 특히 난황성분이 난백으로 이동하여 난각막이 약해지거나 파열되는 경우가 있고, 난백내에서도 농후난백의 수분이 수양난백으로 이동함으로써 액화가 발생하기 때문이다. 신선란의 경우, 농후난백과 수양난백의 비율은 6:4 가량이나 수양화가 진행되면서 농후난백이 감소되고 수양난백의 수분함량이 증가하게 되어 난백이 퍼지게 되는 현상이 발생하게 된다. 계란의 수분증발과 이동으로 Haugh unit과 난백계수는 감소하게 된다. 농후난백의 높이는 품종 또는 계통의 차이와 같은 유전적인 요인에 의해서 크게 영향을 받는 편이지만(Johnson and Merrit, 1955), 닭에게 공급되는 사료의 영양성분에 의해서는 크게 영향을 받지 않는 것으로 보고된 것이 있으며(Monsey et al., 1977; Benabdeljelil and Jensen, 1990), 농후난백의 높이에 영향을 미치는 다른 변이요인으로 계란의 저장기간과 저장온도에 관해서 보고된 바 있다(Baum et al., 1960; Sabrani and Payne, 1987). 일반적으로 신선란의 난백계수는 0.14~0.17의 범위를 갖는다. Tortuero와 Fenandez(1995)는 복합 생균제의 급여가 난백의 품질을 향상시킨다고 보고한 바 있다. 본 실험에서 난백계수는 저장기간 동안 0.05~0.10의 범위로 신선란의 난백계수 수치보다 낮게 나타났다. 생균제를 급여한 처리구와 대조군은 0일 0.10, 0.09으로 저장기간 경과함에 따라 감소하는 경향을 나타내었으며 저장 28일 각각 0.05, 0.04으로 나타났다. 생균제 급여 처리구와 대조구의 차이는 크지 않았으나 저장기간 중 처리구에서 높게 측정되었다.



표 3-5-5. 사료첨가물을 급여한 닭에서 생산한 계란의 저장 중 난백계수

저장일	대조구	실험구
0일	0.09±0.02	0.10±0.02
7일	0.07±0.02	0.08±0.02
14일	0.06±0.01	0.06±0.01
21일	0.05±0.01	0.06±0.02
28일	0.04±0.01	0.05±0.01

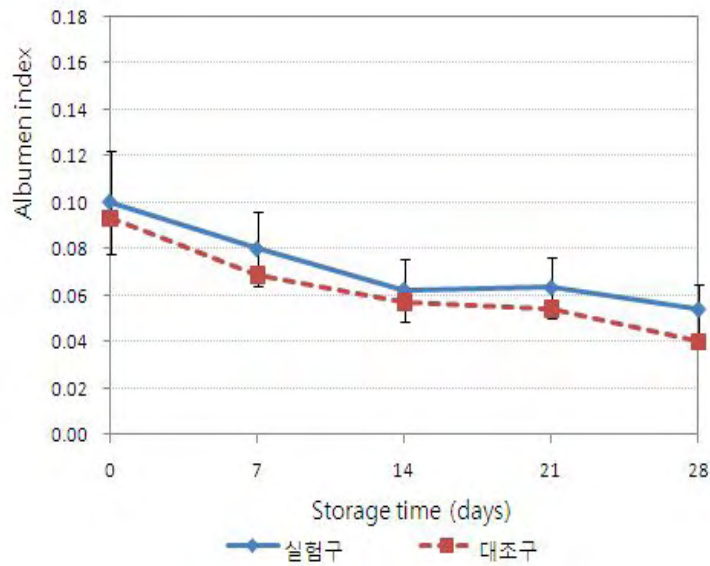


그림 3-5-4. 사료첨가물을 급여한 닭에서 생산한 계란의 저장 중 난백계수

(다) 난황계수

난황의 품질은 일반적으로 색깔, 모양 그리고 난황막의 강도로 평가한다. 난황의 품질 저하가 진행되는 동안 난백으로부터 수분을 흡수하기 때문에 난황막(vitelline membrane)의 팽창과 약화로 인하여 난황의 모양은 저장기간이 지남에 따라 난황의 높이는 낮아지고 폭은 넓어지게 된다(Romanoff and Romanoff, 1949). 따라서 난황계수는 저장기간이 늘어날수록 낮아지게 된다. 실험결과, 생균제 급여 처리구와 대조군은 각각 0.40~0.43, 0.39~0.42의 범위를 나타내었으며 저장기간이 경과함에 따라 난황계수가 감소하는 경향을 보였다. 0일 생균제 급여처리구와 대조군은 각각 0.43, 0.42로 0.01의 차이를 보였으며 저장 7일 0.01씩 감소하였으며, 저장 14일, 21일에는 각각 0.41, 0.40으로 감소하지 않았다. 저장 28일 경과 후 생균제 급여처리구와 대조군은 각각 0.40, 0.39로 나타났다. 일반적으로 신선란의 난황계수는 0.36~0.44 정도를 나타내고 있다. 본 실험결과 생균제 급여 처리구와 대조구 모두 저장기간 동안 신선란 범위 안에 포함되었다.

표 3-5-6. 사료첨가물을 급여한 닭에서 생산한 계란의 저장 중 난황계수

저장일	대조구	실험구
0일	0.42±0.03	0.43±0.04
7일	0.41±0.04	0.42±0.04
14일	0.40±0.08	0.41±0.03
21일	0.40±0.06	0.41±0.11
28일	0.39±0.03	0.40±0.04

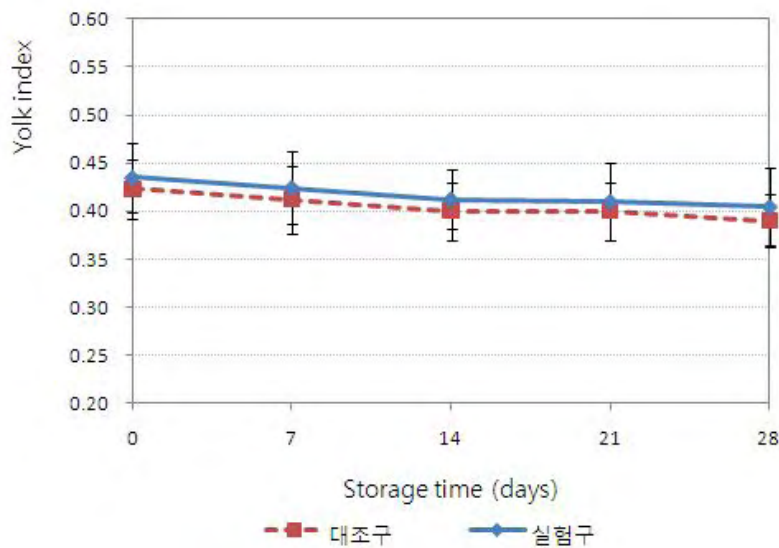


그림 3-5-5. 사료첨가물을 급여한 닭에서 생산한 계란의 저장 중 난황계수

(라) 난각두께

생균제의 급여가 난각질에 미치는 영향을 알아보기 위해 저장기간에 따라 첨단부, 둔단부, 중간부의 난각두께를 측정하였다 (표 3-5-7, 그림 3-5-8)다. 계란을 선택하는 첫 번째 요인은 계란의 외관이며 특히 난각의 성상은 구매 선택에 많은 영향을 미친다. 일반적으로 계란의 외부를 이루는 난형은 타원형이어야 하고, 폭과 길이의 비는 3:4가 좋으며, 또한 첨부와 둔부가 명확해야 한다. 난각질과 두께는 단단하고 매끈하며 균일하고 두꺼울수록 좋다. 두께는 최소 0.33mm 이상이어야 고급 품질로 인정받을 수 있으며 이는 모계의 주령, 건강상태, 사료에 의한 영향 등에 따라 기인하기도 한다. 난각 두께가 기준에 미치지 못 하면 유통 중 깨지기 쉽고 외부환경에 노출되기 쉽기 때문에 계란의 품질을 유지하는데 많은 제한요인을 갖게 된다. Mohan 등 (1996)은 산란계 사료 내 복합 생균제를 100 mg/kg과 150 mg/kg 수준으로 급여하면 질병이나 스트레스가 부여되지 않은 통상적인 조건에서 산란율 증가 및 난각질 개선 효과가 나타난다고 보고하였다. 반면 Mahdavi 등(2005)은 사료내 생균제의 급여가 난각 강도와 난각 두께에 미치는 영향이 없다고 하였다. 본 실험결과, 0일차 생균제 급여 처리군은 둔단부가 0.35 mm로 대조구에 비해 0.1 mm 두껍게 나타났으며 첨단부와 중간부는 모두 0.35 mm로 동일하게 측정되었다. 저장 7일, 14일차에는 생균제 급여 처리군은 첨단, 둔단, 중간부 모두 0.36 mm였고 대조구

에 비해 0.01~0.02 mm 두껍게 나타났다. 또한 저장 28일에는 0.35 mm로 0일차와 동일하게 나타났다. 대조구에 비해 첨단부는 0.01 mm의 차이를 보였으며 둔단부와 중간부는 동일하게 나타났다. 따라서 생균제 급여 처리군은 대조구와 저장기간에 따른 뚜렷한 차이를 보이지 않았으며 저장기간 동안 생균제 급여 처리구와 대조구 모두 0.33 mm 이상으로 생균제 급여가 난각질의 품질에 영향을 준 것으로 판단하기 어렵다고 생각된다.

표 3-5-7. 사료첨가물을 급여한 닭에서 생산한 계란의 저장 중 난각두께 (mm)

	대조구			실험구		
	첨단	둔단	중간	첨단	둔단	중간
0일	0.35±0.02	0.34±0.02	0.35±0.02	0.35±0.03	0.35±0.03	0.35±0.03
7일	0.35±0.03	0.35±0.03	0.35±0.03	0.36±0.03	0.36±0.02	0.36±0.02
14일	0.34±0.03	0.33±0.02	0.34±0.02	0.36±0.02	0.36±0.02	0.36±0.02
21일	0.35±0.03	0.35±0.02	0.35±0.02	0.36±0.03	0.35±0.03	0.36±0.02
28일	0.34±0.04	0.35±0.03	0.35±0.03	0.35±0.03	0.35±0.03	0.35±0.03

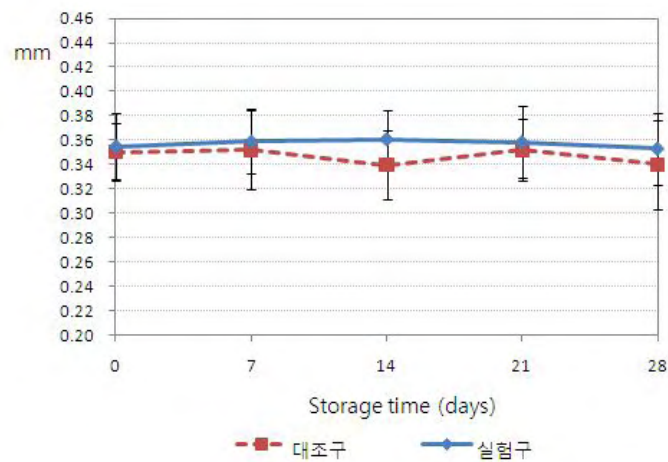


그림 3-5-6. 사료첨가물을 급여한 닭에서 생산한 계란의 저장 중 난각두께(첨단)

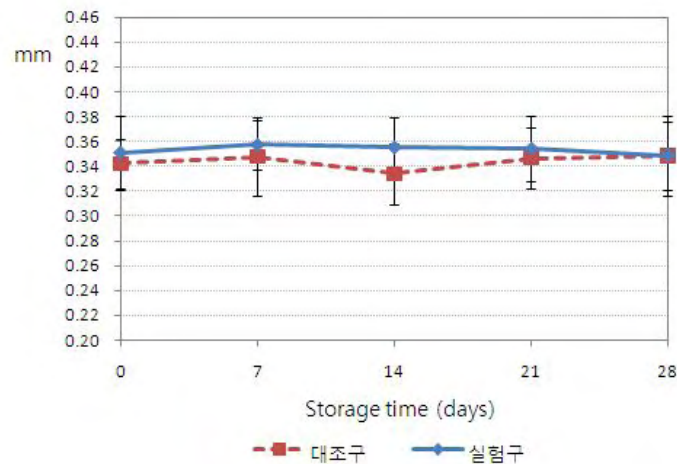


그림 3-5-7. 사료첨가물을 급여한 닭에서 생산한 계란의 저장 중 난각두께(둔단)

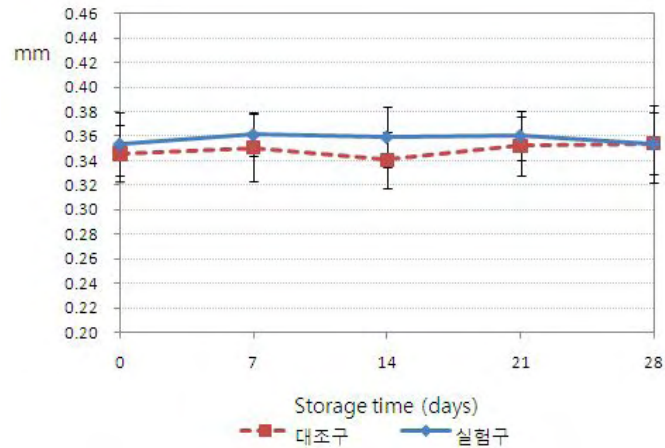


그림 3-5-8. 사료첨가물을 급여한 닭에서 생산한 계란의 저장 중 난각두께(중간)

#### (마) 색도

생균제 급여 처리구의 저장기간에 따른 색도 변화를 측정하여 비교하였다. 난황의 품질은 일반적으로 색깔, 모양, 난황막의 강도로 평가한다. 난황색은 할란 후에만 평가할 수 있고, 소비자에 따라 선호하는 색깔이 다양하기 때문에 등급에서는 고려하지 않는다. 또한 난황 색깔은 사료에 따라 강하게 영향 받기 때문에 여러 가지 화학적 분석방법으로 색소함량을 분석하여 표준과 비교 평가한다. 가장 간편하고 일반적인 방법은 로슈 사가 개발한 색깔 차트(Roshe Color Fan)를 이용하여 난황색깔을 평가하는 것이다. 또한 소화기 장애나 내부 기생충에 감염된 닭은 섭취량 감소 또는 흡수저하가 발생하는 경우가 있으므로 계란 착색도는 닭의 건강상태를 나타내는 것으로 간주되기도 한다(Herrick, 1971). 신선하지 않은 계란 난백은 저장기간이 증가함에 따라 혈반의 생성, 이산화탄소 영향에 의한 혼탁성이 증가하게 되는 경향이 있다. 또한, 난황 품질의 경우, 고유 색깔, 모양 그리고 난황막의 강도로 평가하게 된다. 난황색의 판단은 할란 이후에만 평가할 수 있고 또한 난황의 색은 소비자의 기호도, 섭취하는 사료의 성분배합비 등에 따라 영향을 받기 때문에 일정한 품질지표로 삼기 어려운 점이 있다. 하지만 저장중의 품질 변화와 상관되어 판단되는 색깔의 변화는 온도 및 기간 등 외부환경에도 본래의 색을 유지할 수 있을 정도로 건강한 계란인 것으로 평가될 수 있다.

생균제를 급여한 처리구의 저장기간에 따른 L값은 표 3-5-8과 같다. 그 결과 난황은 생균제 급여 처리구와 대조구가 각각 67.92~69.87, 67.39~69.59의 범위를 나타내었다. 생균제 급여처리구와 대조구 모두 0일에서 7일 사이 증가하였다가 저장 14일 차에 감소하는 경향을 보였고 0, 21일에는 대조구에 비해 낮게 측정되었으며 7, 14, 28일에는 높게 나타났으나 큰 차이를 보이지 않았다. 난백 또한 난황과 같이 저장 7일차에 생균제 급여 처리구와 대조구 각각 78.44, 78.26으로 증가하였으며 이 후 저장기간이 경과함에 따라 감소하는 경향을 나타내었다. 또한 0일과 7일에는 큰 차이를 보이지 않았지만 생균제 급여 처리구가 대조구보다 높았으며 이 후 대조구에서 높게 측정되는 경향이 나타났다. 난황의 a값은 생균제 급여 처리구와 대조구가 각각 3.17~6.13, 3.39~5.99의 범위를 나타내었다. 저장 7일차에는 증가하였으며 이 후 감소하여 L값과 같은 경향을 나타내었다. 난백은 생균제 급여 처리군은 0일 -1.57에서 7일 -1.92로 감소하였고

저장 14일 차 증가하였다가 이 후 감소하여 저장 28일 -2.03으로 나타났다. 또한 대조구와 비교할 때 저장 7일차를 제외하고 모두 생균제 급여 처리구에서 높게 측정되었다. 생균제 급여 처리구 난황의 b값은 저장기간이 지남에 따라 증가하는 경향이 나타났으나 큰 차이를 보이지 않았으며 저장 7일을 제외하고 대조구보다 높았다. 난백은 생균제 급여 처리구와 대조구가 각각 3.15~3.82, 2.35~3.68의 범위였고, 저장 28일 차를 제외하고 생균제 급여 처리구가 높았으나 대조구와의 차이는 0.02로 크지 않았다.

표 3-5-8. 사료첨가물을 급여한 닭에서 생산한 계란의 저장 중 L값

	대조구		실험구	
	난황	난백	난황	난백
0일	68.40±2.21	75.40±3.56	68.00±2.23	75.45±3.91
7일	69.59±2.07	78.26±3.10	69.87±1.97	78.44±2.58
14일	68.85±2.90	77.68±3.19	68.71±3.10	77.60±3.13
21일	68.47±3.46	76.84±2.87	68.42±3.36	76.68±3.07
28일	67.39±2.26	75.63±2.27	67.92±3.06	75.24±2.00

표 3-5-9. 사료첨가물을 급여한 닭에서 생산한 계란의 저장 중 a값

	대조구		실험구	
	난황	난백	난황	난백
0일	3.39±1.03	-1.74±0.81	3.17±1.05	-1.57±0.51
7일	5.99±1.12	-1.65±0.88	5.49±1.32	-1.92±0.66
14일	5.84±1.65	-2.49±0.52	6.13±1.02	-1.87±0.41
21일	4.93±1.58	-2.11±0.43	4.99±1.38	-1.94±0.86
28일	4.05±1.23	-2.23±0.62	4.15±1.44	-2.03±0.61

표 3-5-10. 사료첨가물을 급여한 닭에서 생산한 계란의 저장 중 b값

	대조구		실험구	
	난황	난백	난황	난백
0일	24.33±1.52	3.68±0.95	24.96±1.19	3.82±0.96
7일	25.19±0.54	2.35±0.68	24.98±0.80	3.29±0.78
14일	25.06±0.96	3.05±0.65	25.23±0.84	3.15±0.86
21일	25.23±0.94	3.21±0.67	25.32±0.91	3.43±0.68
28일	25.26±0.47	3.42±0.84	25.32±0.76	3.40±0.89

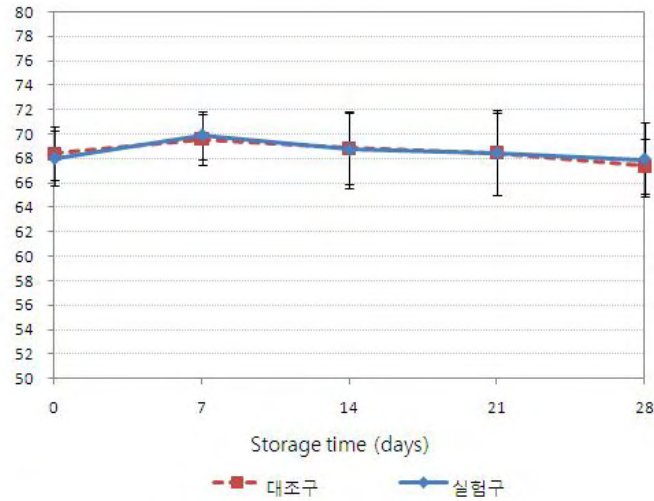


그림 3-5-9. 사료첨가물을 급여한 닭에서 생산한 계란 저장 중 난황의 L값

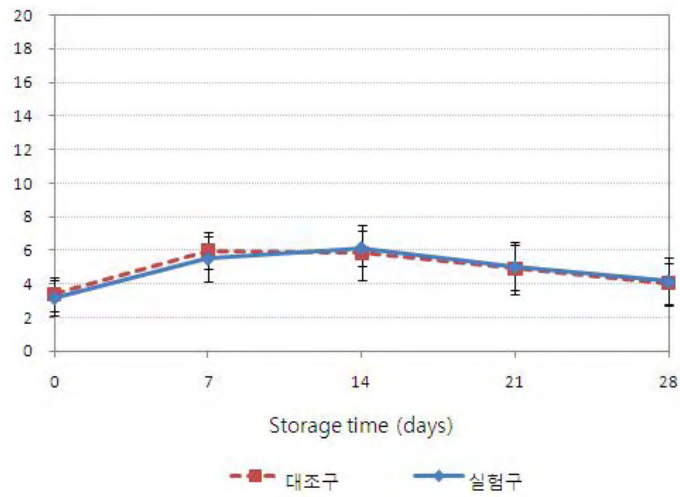


그림 3-5-10. 사료첨가물을 급여한 닭에서 생산한 계란 저장 중 난황의 a값

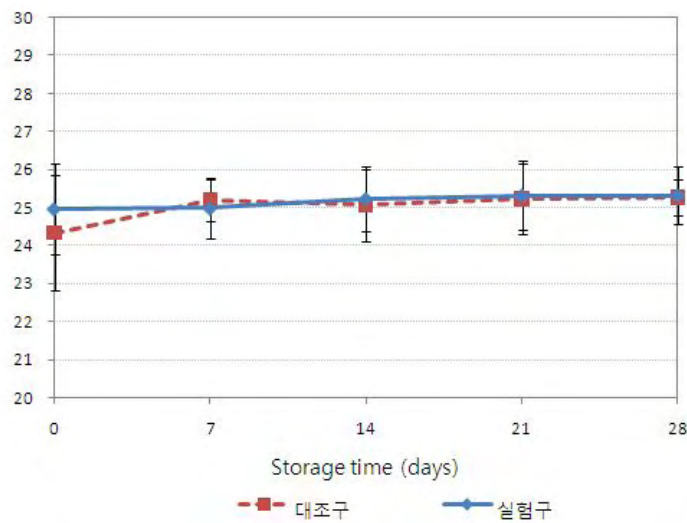


그림 3-5-11. 사료첨가물을 급여한 닭에서 생산한 계란 저장 중 난황의 b값

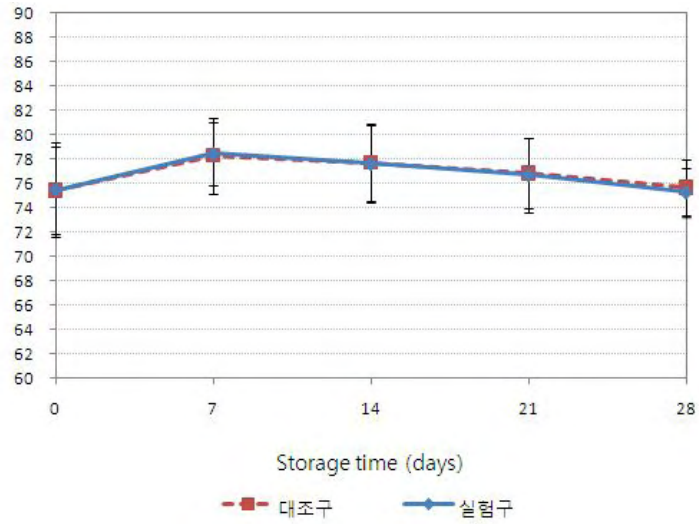


그림 3-5-12. 사료첨가물을 급여한 닭에서 생산한 계란 저장 중 난백의 L값

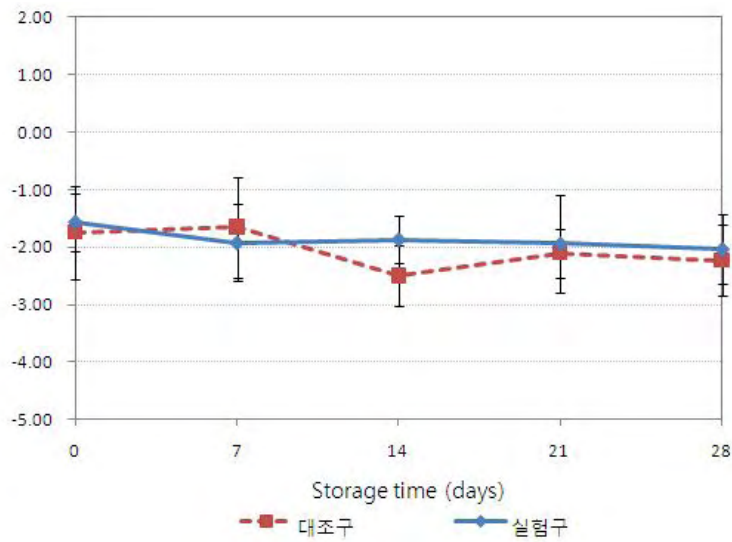


그림 3-5-13. 사료첨가물을 급여한 닭에서 생산한 계란 저장 중 난백의 a값

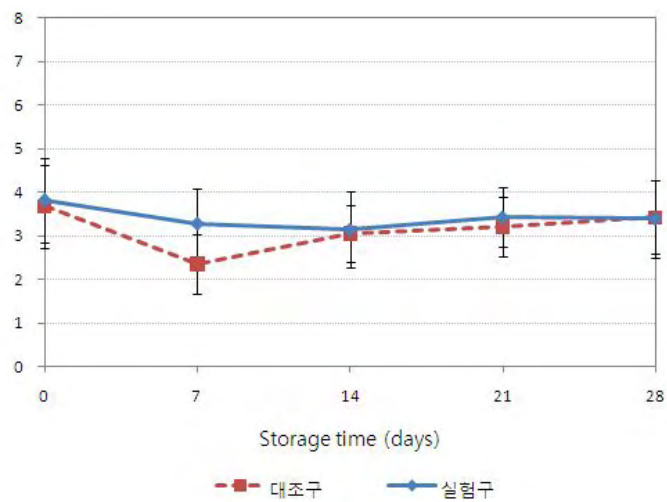


그림 3-5-14. 사료첨가물을 급여한 닭에서 생산한 계란 저장 중 난백의 b값

산란계 실험결과, 생균제를 1% 첨가하여 급여한 처리구에서 일반사료를 급여한 처리구보다 산란율에서 약2.16% 산란율이 높게 나타났으며, 계란 난황의 콜레스테롤은 생균제 첨가 급여구가 실험 4주차에 314.73 mg/dl 이었으나 대조군은 363.80mg/dl으로 일반사료를 급여한 대조구에서 콜레스테롤이 높게 나타났으며 12주차에도 생균제 급여구가 308.26mg/dl일 때 대조군은 341.63으로 생균제 급여구에서 콜레스테롤이 저하되는 효과가 있었다. 계란의 항생제 검출 분석을 실시한 결과, 항생제는 대조구와 생균제 급여구에서 모두 검출되지 않았다. 신선도 평가를 위해서 계란을 저장하면서 Haugh unit를 측정된 결과, 0일자부터 28일 까지 매 주별 측정된 결과 저장 3주일째 생균제 급여구가 71.47±4.41일 때 대조군은 65.91±4.77로 신선도에서도 생균제 급여구가 더 좋은 결과를 보이고 있다. 난백계수와 난황계수는 대조구 및 생균제 급여구 모두 비슷한 경향을 보였다. 색도에서도 L(명도)값, a(황색도)값, b(적색도)값 모두 저장기간이 지남에 따라 약간의 차이는 있으나 비슷한 경향을 보였다. 난각 두께가 두꺼울수록 단단하여 파란이 적는데 난각 두께의 첨다, 중간, 둔단 모두에서 비슷한 경향으로 생균제의 효과는 미미 하였다.



다. 육계실험

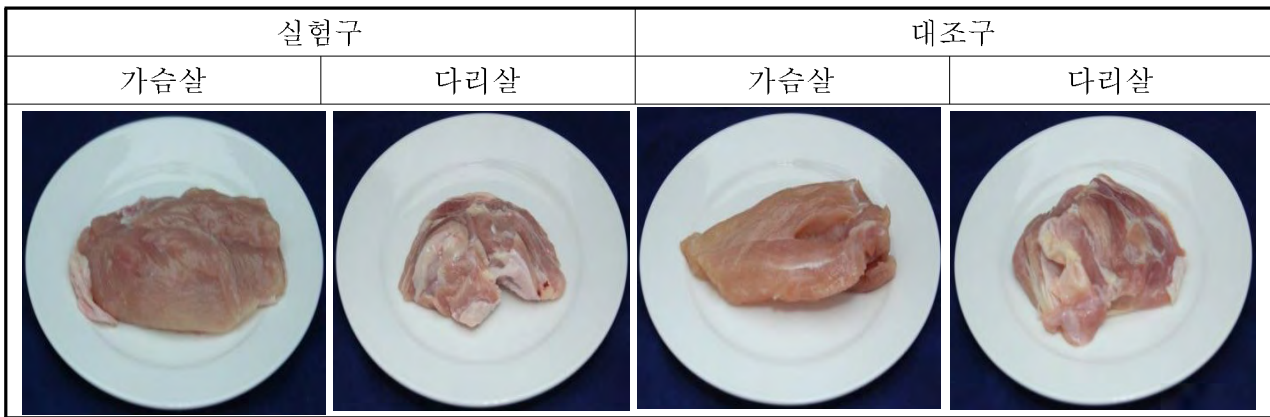
(1) 육계의 체중측정

대조군에 비하여 생균제를 첨가하여 급여한 계육의 체중이 약 40g의 무게가 더 높았으며 매주별 체중 증가 추이는 표 3-5-11에서 보는 바와 같다.

표 3-5-11. 처리구별 육계의 체중

처리군	체중(g/week)						
	1	2	3	4	5	6	7
대조군	41.5	127.9	369.5	748.0	1360.2	2016.6	2446.1
실험군	41.6	123.9	370.3	762.2	1388.9	1951.9	2487.0

표 3-5-12. 사료첨가물을 급여한 계육의 사진



(2) pH 측정

사료첨가물을 급여한 계육의 pH를 측정한 결과는 표 3-5-13과 같다. 사료첨가물을 급여한 계육은 가슴살 5.64, 다리살 6.03으로 대조구에 비해 높게 나타났다. 일반적으로 식육에 있어서 pH의 변화는 신선도, 보수력, 육색 및 조직감 등의 품질변화에 영향을 미치는 것으로 보고되고 있다. 계육의 pH는 도계 후 6-8시간 안에 가슴살은 5.6~5.8, 다리살은 6.1~6.4 정도로 급격히 감소한다(Stewart et al., 1984). Pelicano 등(2003)은 생균제를 육계에 급여시 pH가 증가한다고 보고와 본 실험의 결과와 일치하였다. 일반적으로 식육의 pH는 식육의 품질 특성과 밀접한 관계가 있으며 최종 식육의 pH가 높을 때 높은 보수력을 가진다(Zhang 등, 2005)는 보고로 미루어 볼 때 본 실험의 사료첨가물급여는 육질에 긍정적인 영향을 줄 것으로 판단된다. 또한 Kim(2007)의 육계사료에 복합생균제 0.2%를 급여하여 5주간 사양실험 결과 대조구에 비해 다리육의 pH에는 유의적인 차이가 없다는 보고와는 다른 경향을 나타내었다. Park 등(2010)은 가슴육의 pH가 육계사료에 생균제 0.3%를 첨가한 처리구와 항생제 100%만을 급여한 처리구에서 높게 나타났으나 처리구간의 유의적 차이는 보이지 않았고 다리육의 pH는 가슴육에 비해 높았으며 항생제 100%만을 급여한 처리구에서 대조구보다 유의적으로 높았으나 생균제와의 유의적인 차이는 없는 것으로 보고하였다.

표 3-5-13. 사료첨가물을 급여한 계육의 pH

	실험구		대조구	
	가슴살	다리살	가슴살	다리살
pH	5.64±0.025	6.03±0.03	5.46±0.01	5.23±0.01

### (3) 가열감량

가열감량은 단백질의 변성으로 나타나는데, 근육의 가열온도와 가열시간이 중요한 요인이 되며 가열감량은 보수력에도 영향을 미치는 것으로 알려져 있다(Winger and Fennema, 1976). 사료첨가물을 급여한 계육의 가열감량을 측정된 결과 표 3-5-14와 같다. 사료첨가물을 급여한 계육은 가슴살과 다리살 각각 20.90, 23.76%였으며 가슴살은 대조구에 비해 0.3%높게 나타났으나 다리살은 0.5% 낮았다. 가슴살과 다리살을 비교할 때 다리살은 가슴살보다 지방 함유량이 상대적으로 많아 가열감량이 높은 것으로 사료된다. 생균제를 육계에 급여시 Yu 등(2004)은 생균제 첨가구가 무첨가구에 비해 가열감량을 유의적으로 낮추었고, Pelicano 등(2003)은 생균제의 급여가 가열감량에 큰 영향이 없다고 보고하였다. 가열감량은 식육의 pH와 서로 관련이 있어 pH가 높은 식육일수록 가열감량이 적다는 보고가 있다(Palanska and Nosal, 1991).

표 3-5-14. 사료첨가물을 급여한 계육의 가열감량

	실험구		대조구	
	가슴살	다리살	가슴살	다리살
(%)	20.90±0.72	23.76±0.58	20.68±0.93	24.32±1.01

### (4) 보수력

식육의 보수성이란 식육이 물리적 처리를 받을 때 수분을 잃지 않고 보유할 수 있는 능력을 의미하는데, 여기서 물리적 처리란 절단, 열처리, 세절, 압착, 냉동 및 해동 등을 말한다. 따라서 식육의 보수성은 육색, 가열감량, 조직감, 연도 등과 밀접한 관련이 있으며, 가공육제품의 생산 수율과 견도 등에 상당한 영향을 미친다. 그러므로 식육의 보수성은 식육의 관능적 특성이며 동시에 기능적 특성이라 할 수 있다. 사료첨가물을 급여한 계육의 보수력을 측정된 결과는 표 3-5-15와 같으며 사료 첨가물을 급여한 계육은 가슴살과 다리살 각각 65.97 %, 57.80%로 가슴살은 대조구에 비해 0.1% 높았으며 다리살은 0.9% 낮게 나타났다. 식육의 보수력은 pH와 단백질의 등전점인 pH 5.0에 근접할수록 가장 낮은 것으로 알려져 있으며 식육의 숙성중에는 단백질 구조의 변화와 이온강도의 변화 등에 따라 보수력이 증가하게 된다(Person and Young, 1989).

표 3-5-15. 사료첨가물을 급여한 계육의 보수력

	실험구		대조구	
	가슴살	다리살	가슴살	다리살
(%)	65.97±3.02	57.80±6.48	65.87±5.24	58.76±2.94

(5) TBA(Thiobarbituric acid)

식육은 가열처리함으로써 염용성 단백질은 변형시켜 응고하게 되어 지방구나 수분을 감싸거나 안정화시킨다. 그러므로 열을 가하게 되면 제품의 조직감이 형성되고 안정된 형태를 이룬다. 사료첨가물을 급여한 계육의 TBA를 측정된 결과 표 3-5-16과 같다. 사료첨가물을 급여한 계육의 가슴살과 다리살의 hardness는 각각 5.52 kg, 2.64 kg으로 대조구에 비해 높았다. Springiness는 사료첨가물을 급여한 계육의 가슴살과 다리살 모두 대조구에 비해 높은 것으로 나타났다. Cohesiveness는 다리살의 경우 사료첨가물을 급여한 계육이 0.39로 대조구보다 높았지만 가슴살은 0.38로 대조구보다 낮았다. Gumminess는 사료첨가물을 급여한 계육의 가슴살과 다리살 각각 2131.29, 1285.08로 대조구에 비해 높게 측정되었다. Chewiness는 가슴살은 사료첨가물을 급여한 계육은 1965.38로 대조구보다 낮았으나 다리살은 1210.97로 대조구보다 높았다.

표 3-5-16. 사료첨가물을 급여한 계육의 TBA

	실험구		대조구	
	가슴살	다리살	가슴살	다리살
Hardness(kg)	5.52±0.72	2.64±0.67	5.26±0.80	2.36±0.63
Springiness	0.91±0.05	0.99±0.03	0.83±0.07	0.84±0.11
Cohesiveness	0.38±0.09	0.39±0.05	0.43±0.08	0.38±0.14
Gumminess	2131.29±658.61	1285.08±494.86	1969.10±505.38	1266.29±545.84
Chewiness	1965.38±679.11	1210.97±397.74	2210.17±581.53	1203.79±655.44

(6) 전단력

De Vol등(1988)은 근내지방이 돈육의 연도 및 전단력에 가장 크게 영향을 미친다고 하였고, Moon 등(2001)은 돈육 등심의 조직감은 육의 수분 함량과 성분조성, 원료육의 상태 등 여러 가지 요인에 따라 달라질 수 있으며 가열조리한 고기의 조직감은 가열온도와 시간에 따라 달라진다고 하였다. 고기의 연도를 대표하는 전단력은 가슴살은 사료첨가물을 급여한 계육이 4.28 kg/cm<sup>2</sup>로 대조구 4.15 kg/cm<sup>2</sup>에 비해 높게 나타났다. 또한 다리살의 경우 가슴살과 같이 사료첨가물을 급여한 계육이 3.23 kg/cm<sup>2</sup>으로 대조구에 비해 높게 나타났다. Yu 등(2004)은 복합생균제를 육계에 급여시 전단력이 유의적으로 높았다고 하였으며, 다른 연구결과에서는 생균제 급여가 육계의 육질에 큰 영향을 나타내지 않는다는 보고도 있다. 또한 식육의 보수성이 높으면 연하고 부드러우며(Marsh 등, 1987) 연도는 콜라겐의 함량과 콜라겐의 성질에 따라 차이가 생긴다고 보고한 바 있다(Marsh 등, 1987; Light 등, 1985). 보수력의 결과와 비교할 때 가슴살은 보수력이 높게 측정된 사료첨가물을 첨가한 계육이 전단력이 더 높았으나 다리살은 전단력이 높았던 사료첨가물을 급여한 계육이 보수력이 낮게 나타났다.

표 3-5-17. 사료첨가물을 급여한 계육의 전단력

	실험구		대조구	
	가슴살	다리살	가슴살	다리살
(kg/cm <sup>2</sup> )	4.28±0.53	3.23±0.97	4.15±0.70	3.10±0.89

(7) 색도

식육의 육색은 눈으로 감지되는 것으로 몇몇 요인에 의해 복합적으로 이루어지며, 소비자들에게는 육의 신선도와 육질을 판단하는 구매조건이 되므로 육 본래의 신선한 선홍색을 유지하는 것이 매우 중요하다. 육색의 평가는 색의 농도나 균일성으로 평가되고 색의 농도가 큰 것은 육색소 함량이 많고 육조직이 더 많은 빛을 흡수하기 때문이다(Brith 등, 1978). 육색은 육색소인 myoglobin이 산소와의 반응으로 나타나며 육색변화는 육색소내의 산소유무 및 량, 육조직내의 효소활동, 저장온도, 미생물의 오염도, pH 등에 따라 다르다. 특히 육색소와 산소와의 반응정도는 효소활동이 육색변화에 가장 큰 영향을 미치는 것으로 알려져 있다(Lawrie, 1995). 표 3-5-18은 사료첨가물을 급여한 계육의 색도를 나타낸 것이다. 명도를 나타내는 L값은 가슴살의 경우 사료첨가물을 급여한 계육 48.5, 대조구 46.75로 사료첨가물을 급여한 계육이 높게 나타났으며 다리살 또한 사료첨가물을 급여한 계육이 50.19로 대조구보다 높았다. Pelicano 등(2003)은 생균제를 육계에 급여시 계육의 명도가 감소하였다고 보고하였는데 본 실험의 결과와 일치하였다. 적색도를 나타내는 a값은 사료첨가물을 급여한 계육은 가슴살과 다리살 각각 8.81, 8.49로 사료첨가물을 급여한 계육이 높았다. 반면 다리살은 사료첨가물을 급여한 계육이 9.73으로 대조구 10.73 보다 낮았다. 황색도를 나타내는 b값은 가슴살과 다리살 모두 사료첨가물을 급여한 계육에서 7.88, 8.73으로 높게 측정되었다. Ducan 등(1999)은 육색은 급여되는 사료에 영향을 받는다고 보고하였다.

표 3-5-18. 사료첨가물을 급여한 계육의 색도

	실험구		대조구	
	가슴살	다리살	가슴살	다리살
L	48.50±2.85	50.19±1.43	46.75±1.59	46.95±1.61
a	8.81±6.67	9.73±0.60	8.49±0.50	10.73±0.81
b	7.88±0.66	7.29±1.13	8.73±0.82	7.75±0.68

(8) 관능검사

육류 및 육제품에 대한 가열은 수분 손실로 조직감과 다즙성에 영향을 미치게 되어 다즙성은 가열감량과 상반된 관계를 나타낸다고 한다(Aaslyng et al., 2003; Jeremiah and Gibson, 2003). 사료첨가물을 급여한 계육의 관능평가는 9점을 기준으로하여 신선육과 가열육을 평가하였다. 신선육의 관능평가는 외관, 육색, 냄새, 전반적인 기호도의 4가지 항목을 평가하였으며 표 3-5-19에 나타내었다. 외관은 사료첨가물을 급여한 계육이 가슴살과 다리살 각각 6.14, 6.29점으로 대조구에 비해 높은 기호도를 보였으며 육색은 가슴살의 경우 사료첨가물을 급여한 계육

과 대조구에서 동일하게 5점이었다. 냄새는 사료첨가물을 급여한 계육이 가슴살과 다리살 모두 대조구에 비해 낮은 점수로 전반적인 기호도에서도 대조구에 비해 낮은 기호도를 보였다. 가열육의 관능평가는 외관, 육색, 다즙성, 풍미, 조직감, 전반적인 기호도의 항목으로 평가하였으며 표 3-5-20과 같다. 가열육의 외관과 육색은 사료첨가물을 급여한 계육이 대조구보다 높게 나타났다. 다즙성은 가슴살의 경우 사료첨가물을 급여한 계육이 6.0점으로 대조구보다 높았으며 다리살도 사료첨가물을 급여한 계육이 6.29점으로 대조구에 비해 높은 것으로 나타났다. 풍미와 조직감 항목에서도 다즙성과 같이 가슴살과 다리살 모두 사료첨가물을 급여한 계육이 높은 기호도를 나타내었다. 따라서 전반적인 기호도에서도 사료첨가물을 급여한 계육의 가슴살과 다리살이 각각 6.00, 6.43점으로 대조구에 비해 높은 기호도를 나타내었다.

표 3-5-19. 사료첨가물을 급여한 계육의 신선육 관능평가

	실험구		대조구	
	가슴살	다리살	가슴살	다리살
외관	6.14±1.86	6.29±1.11	5.43±1.72	6.00±1.29
육색	5.00±1.41	6.14±1.21	5.00±1.83	6.00±1.15
냄새	6.43±1.51	6.43±1.51	6.57±1.13	6.86±1.21
전반적인 기호도	5.86±2.04	6.14±1.46	6.00±1.15	6.29±1.38

표 3-5-20. 사료첨가물을 급여한 계육의 가열육 관능평가

	실험구		대조구	
	가슴살	다리살	가슴살	다리살
외관	6.14±1.95	6.57±0.79	5.86±1.57	6.43±1.40
육색	6.00±2.16	6.43±0.79	5.71±1.70	6.29±1.25
다즙성	6.00±2.65	6.29±1.70	4.71±2.06	5.29±1.50
풍미	6.14±1.77	6.14±1.07	5.43±0.79	5.86±0.90
조직감	6.86±2.04	6.57±1.51	5.43±1.51	6.00±1.29
전반적인 기호도	6.00±2.00	6.43±1.27	5.43±1.27	5.86±1.21

양지부화장에서 갈색 육계병아리 200수를 구입하여 1처리구에 100수씩 2처리구로 생균제 첨가구(일반사료에 생균제 1% 첨가)와 일반 대조구로 나누어 실험을 진행하고 총 7주간 실시하였다. 체중은 매주 1회 실시하였으며 7주 후 도계하여 고기를 분석하였다. 체중은 일반 대조구보다 7주 후 체중이 약 40g정도 생균제 첨가구가 무겁게 측정되었으며, 고기는 pH, 고기를 가열할 때 줄어드는 가열감량, 보수력, TBA, 전단력, 색도, 관능검사를 실시하였다. 고기는 가슴살과 다리살 2 종류를 분석 시료로 사용하였으며, pH는 가슴살에서는 생균제 급여구 5.64±0.025, 일반사료 급여구 5.46±0.01이었으며 다리살은 생균제 급여구가 6.03±0.03 이었으나 대조군은 5.23±0.01로 생균 급여구가 약간 높게 나타났다. 가열감량과 보수력, TBA, 색도는 실험구와 대조구 모두 비슷한 경향을 보였으며, 전단력과 생균제 급여구가 약간 높게 나타났다. 관능검사는 신선육의 경우 생균제 급여구가 일반사료 급여구 보다 약간 높은 기호를 보였으며, 가열한 고기를 조사 하였을 때는 외관을 비롯한 육색, 다즙성, 풍미, 조직감 모두에서 대조구보다 높은 경향을 보였다.

라. 양돈 실험

(1) 양돈 사양실험



그림 3-5-15. 돼지 사육 광경

(가) 사료 섭취량

돼지 실험은 총 13주간 실시하였으며, 체중은 2주일에 1회씩 측정하고, 2주일 간격으로 사료잔량을 측정하여 섭취량을 계산하였다. 표 3-5-21에 나와 있는 것은 한 마리의 돼지가 일주일동안 섭취된 량이다. 사료는 대체적으로 대조구의 섭취량이 높았으나 기간이 지날수록 아비락 급여구가 높았다.

표 3-5-21. 처리군별 돼지의 사료섭취량

처리구	사료섭취량(kg/week)						
	2	4	6	8	10	12	13
A실험군(생균제)	10.72	12.07	14.18	15.37	14.69	17.20	17.44
B실험군(아비락)	11.41	14.57	15.09	17.49	16.33	17.89	19.31
C대조군	14.43	13.57	14.29	17.25	15.39	19.03	16.65

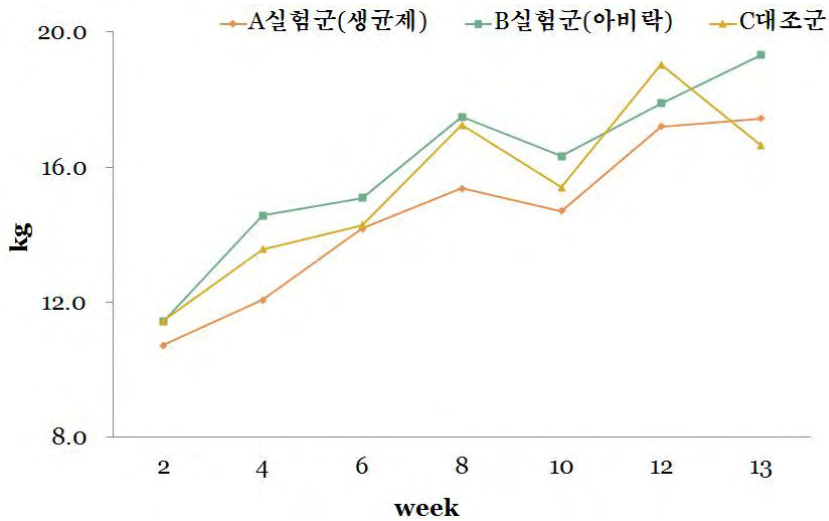


그림 3-5-16. 처리군별 돼지의 사료섭취량 변화

(나) 체중측정

체중측정은 2주일에 1회씩 실시하였으며 총 13주 동안 실시하였다. 표 3-5-22에서 보듯 처음 개시체중이 아미락 급여구가 약 3kg 높았으며 점점 섭취량 및 체중도 함께 증가하는 경향을 보였다. 체중이 높은 것은 구정(설날)이전에 도축을 계획하였으나 도축장의 도축량이 워낙 많아 도축장 사정상 약 2주 이상 더 사육하여 높은 것이다.

표 3-5-22. 처리군별 돼지의 체중

처리구	체중(kg/week)							
	0	2	4	6	8	10	12	13
A 실험군(생균제)	41.2	55.0	67.2	82.2	97.0	110.2	125.0	131.2
B 실험군(아미락)	44.2	59.0	75.2	93.6	107.2	124.0	138.6	151.2
C 대조군	42.0	55.2	65.6	82.0	95.6	111.2	125.2	133.2

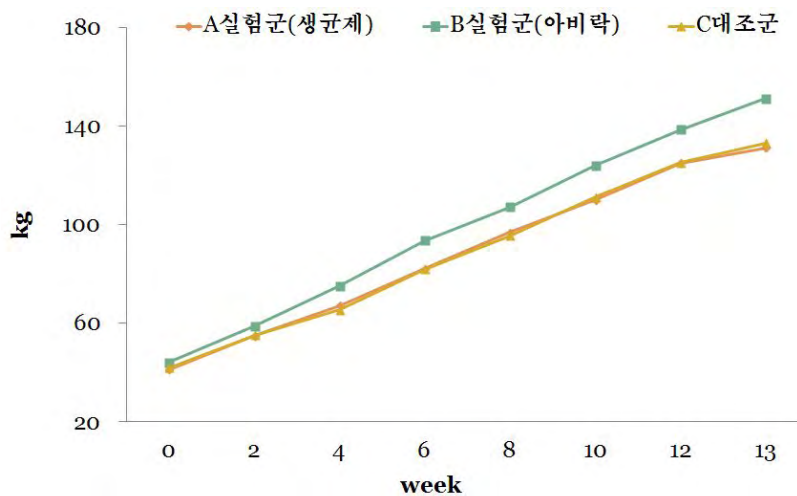


그림 3-5-17. 처리군별 돼지의 체중 변화

(다) 돼지고기 지육율

체중은 아비락 처리구가 높았으나 지육율에서는 일반대조구나 생균제 급여구에 비하여 약 2% 이상 떨어지는 경향을 보였다. 이것은 2% 정도 고기가 적게 생산된다는 것이다.

표 3-5-23. 처리군별 돼지고기의 지육율

처리구	지육율(%)
A실험군(생균제)	79.52
B실험군(아비락)	77.38
C대조군	79.85

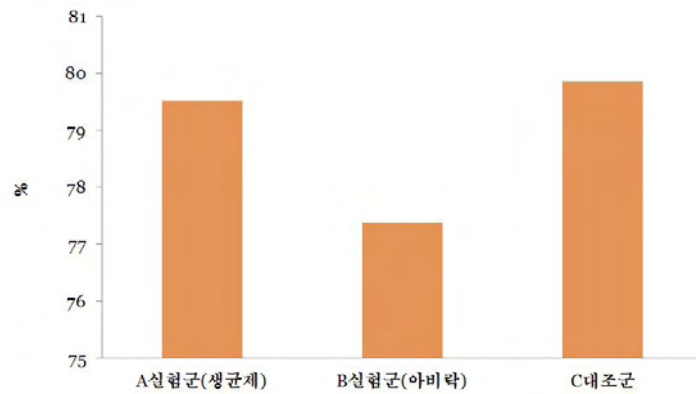


그림 3-5-18. 처리군별 돼지고기의 지육율 변화

(라) 돼지고기 등지방 두께

돼지를 도축하여 도축장에서 전체적인 등급은 2등급 판정을 받았으며 이것은 체중이 높아서 그런 것으로 사료되며 생균제를 급여한 처리구에서 1두가 1등급을 받았다. 1등급을 받은 돼지는 체중이 가장 적게 나가는 것이었으며, 도축장에서 등지방 두께를 측정된 결과 대조구에서 가장 등지방이 두꺼웠으며 생균제 급여구가 가장 얇은 결과를 보였다. 이것은 등지방이 적은 생균제 급여구에서 좋은 결과를 보였으며 자세한 결과는 표 3-5-24에서 보는 바와 같다.

표 3-5-24. 처리군별 돼지고기의 등지방 두께

처리구	등지방 두께(mm)
A실험군(생균제)	31.6
B실험군(아비락)	32.4
C대조군	36.8



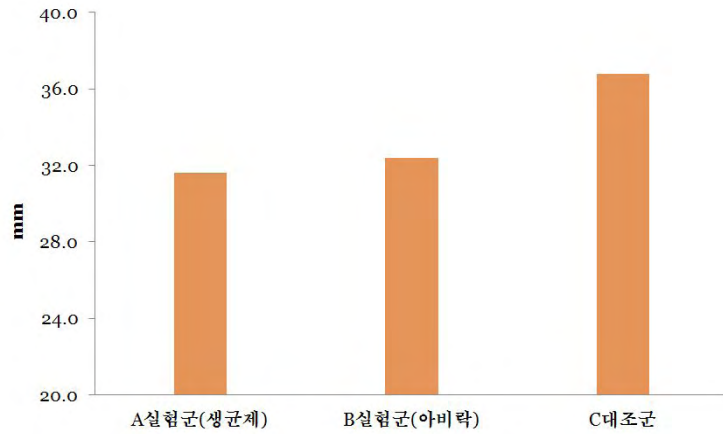
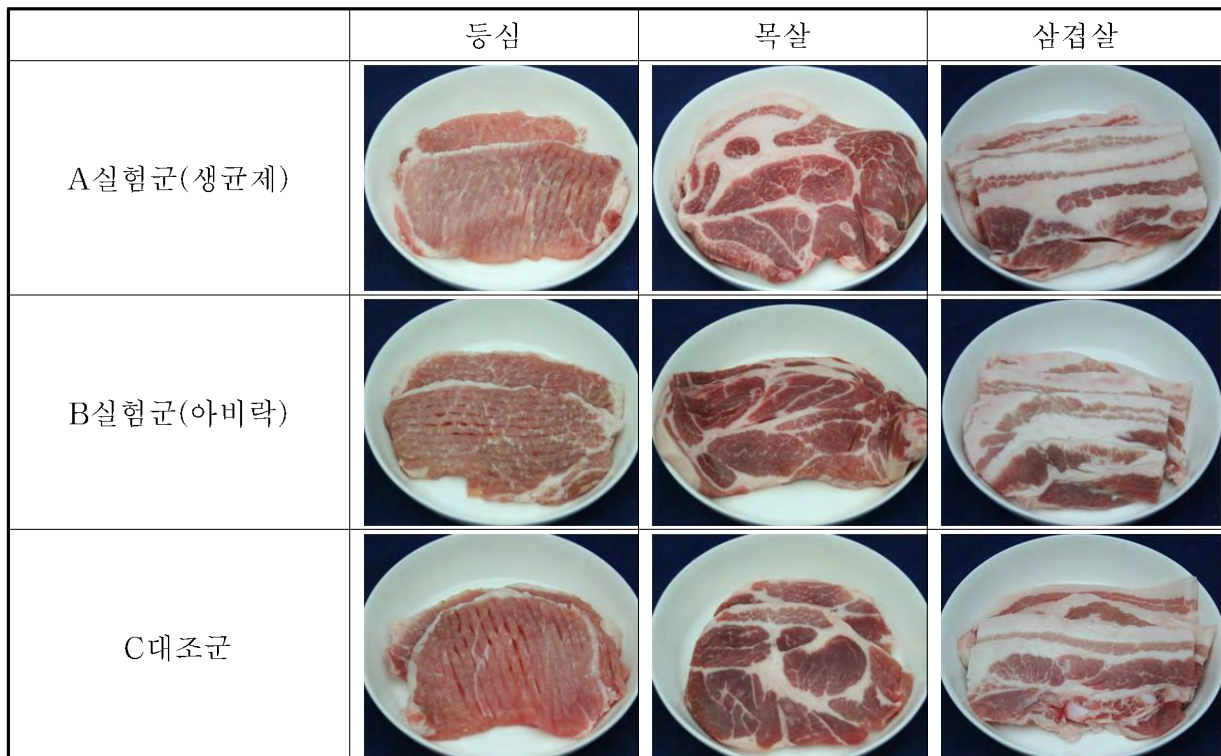


그림 3-5-19. 처리군별 돼지고기의 등지방 두께 변화

(마) 돼지고기의 부위별 분석결과

돼지고기의 소비자가 가장 선호하는 부위를 실험시료로 사용하였다. 특히, 한국인은 구이용으로 삼겹살 중 배삼겹과 목삼겹 그리고 돈가스용으로 등심을 선호하기 때문에 처리군별 3가지씩 분석을 실시하였다.

그림 3-5-20. 처리군별 돼지고기 사진



(2) 돼지고기 부위별, 처리구별 육질 분석

(가) 각 처리구별 돼지고기의 pH

사료첨가물을 급여한 돼지고기의 pH를 측정된 결과는 표 3-5-25와 같다. 등심은 5.5~5.7, 목살은 6.0~6.2, 삼겹살은 5.6~6.4의 범위로 나타났고, 등심과 목살에 비해 삼겹살의 처리구간의 pH 차이가 큰 것으로 나타났다. 일반적으로 식육에 있어서 pH의 변화는 신선도와 보수력 등 품질과 관련된 변화와 관계가 있으며 pH가 높아지면 육즙이 유의적으로 증가하고, 담백하고 유연한 조직을 나타낸다고 보고되었다(Kauffman 등, 1961). 또한 pH가 5.5~5.8이면 신선한 상태이지만 pH 8.0이상부터 부패단계에 접어든다고 하였다(James, 1972). 김경수 등(2008)의 복합생균제의 급여가 돼지의 성장과 육질에 미치는 영향을 보면 생균제를 급여한 처리구의 pH가 대조구에 비해 다소 높은 경향이었고, 본 실험의 결과에서는 목살을 제외한 나머지 등심과 삼겹살에서 다소 높은 것으로 비슷한 결과를 보였다. 최종 식육의 pH가 높을 때 높은 보수력을 가진다(Zhang 등, 2005)는 보고로 미루어 볼 때 본 실험의 사료첨가물급여는 육질에 긍정적인 영향을 줄 것으로 판단된다.

표 3-5-25. 처리구별 돼지고기의 pH

실험구 A			실험구 B			대조구		
등심	목살	삼겹살	등심	목살	삼겹살	등심	목살	삼겹살
5.7±0.0	6.0±0.0	6.4±0.0	5.5±0.0	6.1±0.0	5.9±0.0	5.6±0.0	6.2±0.0	5.6±0.0

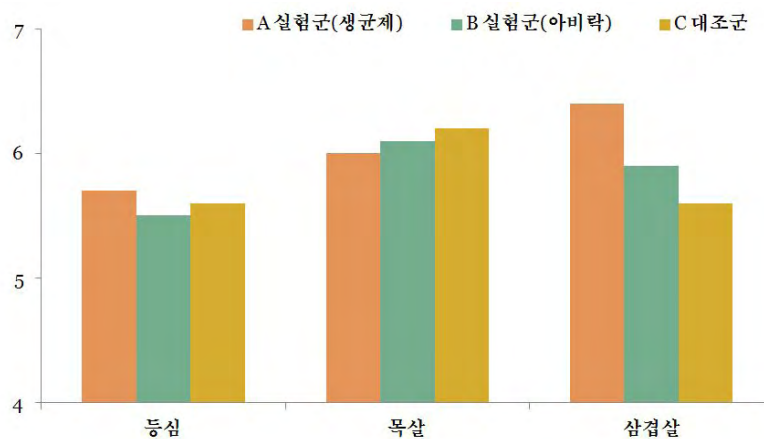


그림 3-5-21. 처리구별 돼지고기의 pH

(나) 돼지고기의 가열 감량

가열감량은 단백질의 변성으로 나타나는데, 근육의 가열온도와 가열시간이 중요한 요인이 되며 가열감량은 관능평가상 조직감이나 다즙성 등에 영향을 미치는 것으로 알려져 있다(Winger 등, 1976). 사료첨가물을 급여한 돼지고기의 가열감량을 측정된 결과 표 3-5-26과 같다. 등심의 가열감량의 범위는 23.4~31.2%, 목살은 27.5~30.44%, 삼겹살은 35.8~40.1%로 나타났고, 실험구 A 등심의 가열감량이 23.4로 가장 낮았고, 실험구 B의 삼겹살의 가열감량이 40.1%로 가장

높게 나타났다. 또한 삼겹살 부위를 제외한 나머지 등심과 목살에서 생균제를 투여한 처리구가 대조구에 비해 가열감량이 낮은 것으로 나타났다.

한 편, 김경수 등(2008)의 연구결과에 따르면 등심의 가열감량은 29.1~30.8%의 범위로 본 연구와 비슷하게 나타났고, 생균제 처리구와 대조구간의 유의적인 차이는 나타나지 않았고, 생균제 처리구에서 다소 낮게 나타난 것과는 비슷한 결과라고 할 수 있겠다.

표 3-5-26. 처리군별 돼지고기의 가열감량

(%)

실험구 A			실험구 B			대조구		
등심	목살	삼겹살	등심	목살	삼겹살	등심	목살	삼겹살
23.4±0.8	27.5±0.0	35.8±0.4	28.4±0.9	28.3±0.2	40.1±5.8	31.2±1.3	30.44±1.1	36.7±4.0

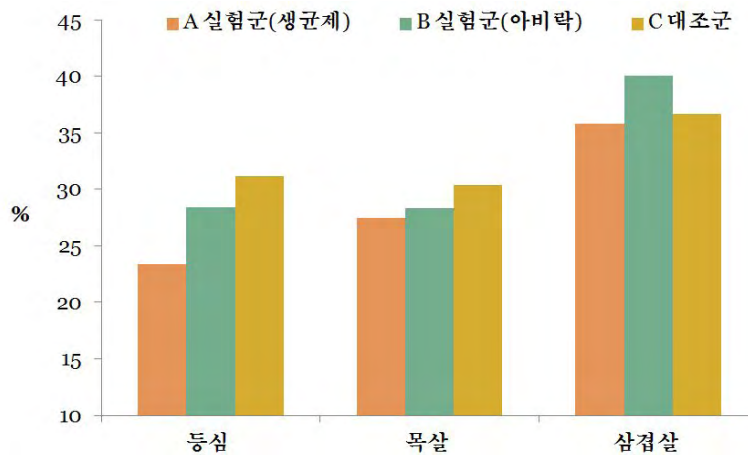


그림 3-5-22. 처리군별 돼지고기의 가열감량 변화

(다) 보수력

식육의 보수력이란 식육이 물리적 처리를 받을 때 수분을 잃지 않고 보유할 수 있는 능력을 의미하며 식육의 보수력은 단백질의 등전점인 pH 5.0에 근접할수록 가장 낮은 것으로 알려져 있으며(Pearson 등, 1970), 식육의 단백질 구조 변화와 이온강도 등에 따라 보수력이 증가한다는 보고가 있다(Wu 등, 1978). 사료첨가물을 급여한 돼지고기의 부위별(등심, 목살 및 삼겹살) 보수력을 측정된 결과는 표 3-5-27과 같다. 그 결과 등심은 51.37~54.62%의 범위로 실험구 A가 가장 높았으며 실험구 B보다 대조구가 높게 나타났지만 큰 차이를 보이지 않았다. 목살과 삼겹살의 경우 각각 53.27~56.16%, 40.76~42.90%의 범위로 실험구 A가 가장 높았고 실험구 B와 대조구 순서로 낮게 나타났다. 돼지고기의 부위별로는 목살이 가장 높았으며 삼겹살이 가장 낮게 측정되었는데 이는 식육의 보수력에 영향을 주는 요인으로 최종 pH, 단백질 변성, 근절의 길이 등이 관여한다는 보고(Warner 등, 1997)와 같이 부위별에 따라 최종 pH, 단백질 변성 및 근절의 길이에서 차이를 보이기 때문으로 사료된다. 김경수 등(2008)의 *Phaffia rhodozyma* 균주를 포함한 복합생균제를 급여한 돼지의 성장과 육질에 미치는 영향에 관한 연구에서 보수력은 암돼지의 경우 대조구에 비해 생균제 처리구에서 유의적으로 높게 나타난 것으로 보고하였는데 본 연구결과와 일치하였다.

표 3-5-27. 처리군별 돼지고기의 보수력

실험구 A			실험구 B			대조구		
등심	목살	삼겹살	등심	목살	삼겹살	등심	목살	삼겹살
54.62±3.29	56.16±0.19	42.90±2.02	51.37±3.50	54.51±2.14	42.19±3.53	52.14±1.94	53.27±1.94	40.76±0.50

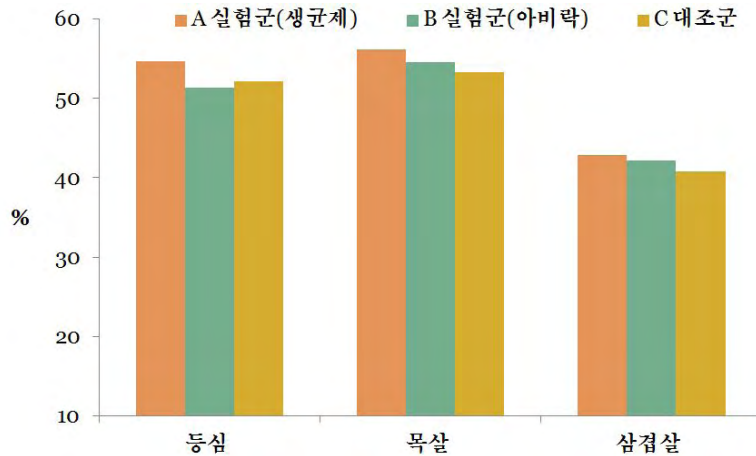


그림 3-5-23. 처리군별 돼지고기의 보수력 변화

(라) 색도

식육의 육색은 눈으로 감지되는 것으로 몇몇 요인에 의해 복합적으로 이루어지며, 소비자들에게는 육의 신선도와 육질을 판단하는 구매조건이 되므로 육 본래의 신선한 선홍색을 유지하는 것이 매우 중요하다. 사료첨가물을 급여한 돼지고기의 색도를 측정된 결과 표 3-5-28.과 같다. 등심의 명도(L값)의 범위는 44.66~48.39였고, 목살은 44.60~50.67, 삼겹살은 53.20~59.56으로 나타났고, 적색도(a값)는 등심이 13.46~16.18, 목살이 11.36~16.31, 삼겹살이 9.83~13.92로 나타났고, 황색도(b값)는 등심이 8.81~9.74, 목살이 7.48~8.04, 삼겹살이 7.36~8.68인 것으로 나타났다. 명도는 목살을 제외한 나머지 부위에서 대조구에 비해 처리구가 높은 것으로 나타났고, 적색도는 등심을 제외한 나머지 부위의 값이 높은 것으로 나타났다. 또한 황색도도 마찬가지로 등심을 제외한 나머지 부위의 값이 대조구에 비해 처리구가 높은 것으로 나타났다. 한편 육색소인 myoglobin은 육색소내의 산소 유무에 크게 영향을 받는데, 육조직내의 효소활동, 저장온도, 미생물의 오염도, pH 등에 따라 다르다. 특히 육색소와 산소와의 반응 정도와 효소 활동이 육색 변화에 가장 큰 영향을 미치는 것으로 알려져 있다(Lawrie, 1985). 또한 육색은 사료에 영향을 받는다는 보고(Dugan 등, 1999)로 볼 때 생균제의 급여가 육색에 다소 영향을 미칠 수 있다고 판단된다.

표 3-5-28. 처리군별 돼지고기의 색도

	실험구 A			실험구 B			대조구		
	등심	목살	삼겹살	등심	목살	삼겹살	등심	목살	삼겹살
L	48.39±0.31	44.60±0.10	53.20±0.11	45.43±0.24	48.28±0.13	56.09±0.30	44.66±0.40	50.67±0.32	59.56±0.08
a	15.28±0.05	16.31±0.13	13.92±0.18	13.46±0.10	14.84±0.09	10.04±0.06	16.18±0.16	11.36±0.09	9.83±0.14
b	9.74±0.04	8.04±0.15	8.68±0.05	8.81±0.05	7.80±0.05	7.73±0.05	8.88±0.08	7.48±0.10	7.36±0.05

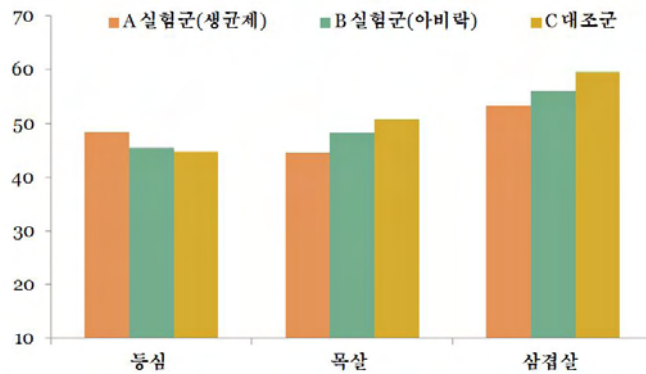


그림 3-5-24. 처리군별 돼지고기의 L값 색도변화

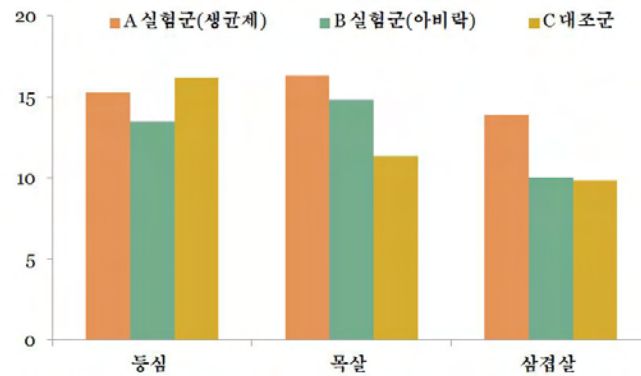


그림 3-5-25. 처리군별 돼지고기의 a값 색도변화

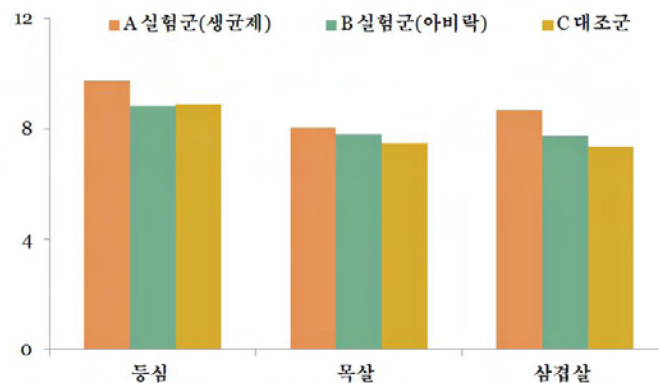


그림 3-5-26. 처리군별 돼지고기의 b값 색도변화

(마) 관능검사

관능검사란 혀에서 느끼는 맛과 코에서 느끼는 냄새를 종합적으로 평가하는 것으로 고기를 가열할 경우에 일어나는 중요한 반응으로 당의 분해, 단백질과 아미노산의 분해 및 지질의 분해 등 단백질과 지질의 상호작용에 의해 발생할 수 있으며, 특히 육내 지방은 가열시 고기 특유의 풍미를 갖게 한다(Mottram 등, 1983). 사료첨가물을 급여한 돼지고기의 관능평가는 9점을 기준으로 하여 신선육과 가열육을 평가하였다. 신선육의 관능평가는 외관, 육색, 냄새, 전반적인 기호도의 4가지 항목을 평가하였으며 표 3-5-29에 나타내었다. 전반적으로 나타난 평가점수의 범위는 6.9~8.1로 실험구에 비해 대조구의 등심과 삼겹살이 기호도가 높은 것으로 나타났고, 목살은 냄새 항목을 제외한 나머지 처리구에서 실험구 B의 기호도가 높은 것으로 나타났다. 가열육의 관능평가는 외관, 육색, 다즙성, 풍미, 조직감, 전반적인 기호도의 항목으로 평가하였으며 표 3-5-30과 같다. 일반적으로 지방과 수분을 많이 보유하는 고기일수록 다즙성이 좋다(Carlin 등, 1978). 때문에 등심이나 목살에 비해 삼겹살의 평가가 높은 것으로 보인다. 가열육의 관능평가 결과의 범위는 4.5~8.2로 처리구에 따라 부위에 따라 차이가 높은 것으로 나타났고, 처리구에 관계없이 평가가 가장 높게 나타난 것은 삼겹살 부위였고, 낮게 평가된 부위는 등심이였다. 등심의 외관 및 육색, 풍미는 실험구 B가 높았으나 다즙성과 조직감은 실험구 A가 높았고, 이에 따라 전반적인 기호도 또한 등심 A가 6.3점으로 가장 높은 것으로 나타났다. 목살의 경우 외관과 육색은 대조구가 각각 7.8점, 7.9점으로 높게 나타났고, 다즙성, 풍미, 조직감 및 전반적인 기호도는 실험구 A가 6.6~7.4점으로 높게 나타났다. 또한 삼겹살의 경우 외관과 육색, 풍미 및 전반적인 기호도가 7.5~8.2점으로 가장 높게 나타났고, 실험구A는 다즙성과 조직감이 각각 7.3점, 7.2점으로 높게 평가받았다.

표 3-5-29. 처리군별 돈육의 신선육 관능평가

	실험구 A			실험구 B			대조구		
	등심	목살	삼겹살	등심	목살	삼겹살	등심	목살	삼겹살
외관	7.1±1.5	7.5±1.3	7.4±1.2	7.6±1.2	7.9±0.8	7.1±1.4	8.1±0.7	7.7±1.3	7.6±1.3
육색	6.9±1.8	7.6±1.1	7.5±1.1	7.1±1.5	7.9±0.8	7.3±1.2	7.9±1.1	7.7±1.2	7.7±1.3
냄새	7.18±1.47	7.2±1.3	7.6±1.2	7.3±1.6	7.4±1.3	7.4±1.3	7.6±1.6	7.6±1.4	7.6±1.4
전반적인 기호도	7.3±1.6	7.5±1.2	7.3±1.1	7.5±1.2	8.0±0.9	7.3±1.2	7.9±1.0	7.7±1.4	7.6±1.3

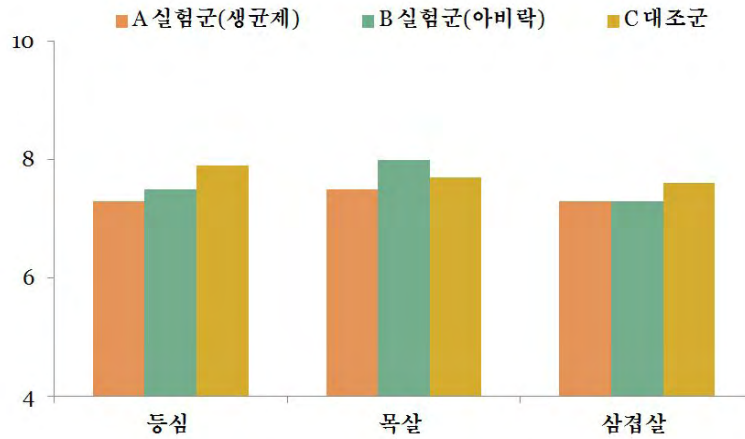


그림 3-5-27. 처리군별 신선육의 전반적인 기호도 변화

표 3-5-30. 처리군별 돈육의 가열육 관능평가

	실험구 A			실험구 B			대조구		
	등심	목살	삼겹살	등심	목살	삼겹살	등심	목살	삼겹살
외관	7.4±1.3	7.7±1.4	8.0±1.4	7.5±1.0	7.1±1.2	7.7±1.3	7.3±1.2	7.8±1.3	8.1±1.3
육색	7.4±1.3	7.6±1.3	8.1±1.3	7.5±1.1	7.2±1.4	7.6±1.3	7.4±1.3	7.9±1.3	8.2±1.2
다즙성	5.5±1.3	6.6±1.0	7.3±1.1	4.7±1.2	6.4±1.29	6.8±1.4	4.5±1.2	6.2±1.4	6.6±1.1
풍미	6.3±1.2	7.4±1.4	7.0±1.1	6.4±1.3	6.6±1.3	7.1±1.2	6.4±1.3	7.2±1.4	7.5±1.1
조직감	5.9±1.6	7.0±1.2	7.2±1.4	5.6±1.3	7.0±1.2	7.0±1.6	5.5±0.8	6.6±1.5	7.0±1.3
전반적인 기호도	6.3±1.2	7.2±1.1	7.2±1.0	6.0±1.2	6.7±1.0	6.9±1.3	5.9±0.9	6.7±1.4	7.6±1.0

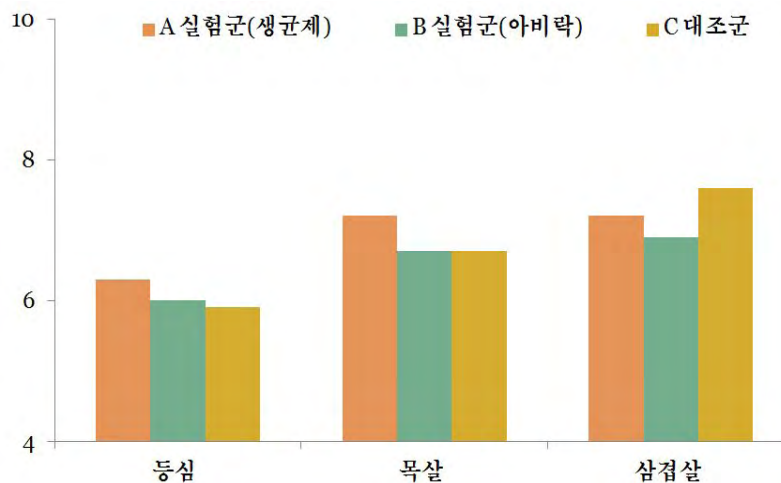


그림 3-5-28. 처리군별 돈육의 가열육의 전반적인 기호도

(3) 돼지고기의 이화학 분석

(가) 배삼겹, 목삼겹, 등심의 지방산 분석

배삼겹의 지방산 분석결과 포화지방산은 아비락 급여구가 높았으나 불포화지방산은 아비락 급여구가 낮은 경향을 보였으며 대조구와 생균제 급여군은 비슷한 경향을 보였다. 목삼겹에서도 같은 경향을 보였다. 그러나 등심에서도 같은 경향을 보였다. 자세한 결과는 표 3-5-31, 32, 33에서 보는바와 같다.

표 3-5-31. 처리군별 돼지고기 배삼겹의 지방산 분석 결과

구분	화학식	지방산(일반명)	지방 100g 당 조성비(%)		
			A 배삼겹	B 배삼겹	C 배삼겹
포 화 지 방 산	C10:0	카프르산(Capric acid)	0.1	0.1	0.1
	C12:0	라우르산(Lauric acid)	0.1	0.1	0.1
	C14:0	미리스트산(Myristic acid)	1.4	1.4	1.4
	C16:0	팔미트산(Palmitic acid)	24.7	25.5	24.3
	C18:0	스테아르산(Stearic acid)	12.6	14.5	12.7
	C20:0	아라키드산(Arachidic acid)	0.2	0.2	0.2
		포화지방산 합계	39.1	41.8	38.8
불 포 화 지 방 산	C16:1	팔미톨레산(Palmitoleic acid)	2.5	2.2	2.3
	C18:1	올레산(Oleic acid)	50.1	47.6	47.3
	C18:2	리놀레산(Linoleic acid)	6.0	5.9	8.5
	C18:3	리놀렌산(Linolenic acid)	0.2	0.2	0.5
	C20:1	가드올레산(Gadoleic acid)	0.9	0.9	1.0
	C20:2	에시코사디에노산(Eicosadienoic acid)	0.3	0.3	0.4
	C20:3	에이코사트리에노산(Eicosatrienoic acid)	0.0	0.0	0.1
	C20:4	아라키돈산(Arachidonic acid)	0.0	0.0	0.2
			불포화지방산 합계	60.0	57.1
		Unknown	0.9	1.1	0.9
	합 계		100.0	100.0	100.0



표 3-5-32. 처리군별 돼지고기 목삼겹의 지방산 분석 결과

구분	화학식	지방산(일반명)	지방 100g 당 조성비(%)		
			A 목삼겹	B 목삼겹	C 목삼겹
포화 지방산	C10:0	카프르산(Capric acid)	0.1	0.1	0.1
	C12:0	라우르산(Lauric acid)	0.1	0.1	0.1
	C14:0	미리스틴산(Myristic acid)	1.4	1.3	1.2
	C16:0	팔미트산(Palmitic acid)	24.5	23.6	23.3
	C18:0	스테아르산(Stearic acid)	13.1	13.0	14.8
	C20:0	아라키드산(Arachidic acid)	0.2	0.2	0.2
		포화지방산 합계	39.4	38.3	39.7
불포화 지방산	C16:1	팔미톨레산(Palmitoleic acid)	2.4	2.4	1.8
	C18:1	올레산(Oleic acid)	48.0	46.9	48.1
	C18:2	리놀레산(Linoleic acid)	7.5	9.5	7.6
	C18:3	리놀렌산(Linolenic acid)	0.3	0.5	0.4
	C20:1	가드올레산(Gadoleic acid)	0.8	0.8	0.9
	C20:2	에시코사디에노산(Eicosadienoic acid)	0.3	0.4	0.4
	C20:3	에이코사트리에노산(Eicosatrienoic acid)	0.1	0.1	0.1
	C20:4	아라키돈산(Arachidonic acid)	0.1	0.2	0.2
		불포화지방산 합계	59.5	60.8	59.5
		Unknown	1.1	0.9	0.8
	합 계		100.0	100.0	100.0

표 3-5-33. 처리군별 돼지고기 등심의 지방산 분석 결과

구분	화학식	지방산(일반명)	지방 100g 당 조성비(%)		
			A 등심	B 등심	C 등심
포화 지방산	C10:0	카프르산(Capric acid)	0.1	0.1	0.1
	C12:0	라우르산(Lauric acid)	0.1	0.1	0.1
	C14:0	미리스틴산(Myristic acid)	1.5	1.4	1.3
	C16:0	팔미트산(Palmitic acid)	24.4	25.0	23.5
	C18:0	스테아르산(Stearic acid)	11.3	13.1	11.9
	C20:0	아라키드산(Arachidic acid)	0.2	0.2	0.2
		포화지방산 합계	37.6	39.9	37.1
불포화 지방산	C16:1	팔미톨레산(Palmitoleic acid)	3.0	2.9	2.7
	C18:1	올레산(Oleic acid)	49.2	48.5	49.3
	C18:2	리놀레산(Linoleic acid)	7.6	6.3	8.1
	C18:3	리놀렌산(Linolenic acid)	0.4	0.4	0.4
	C20:1	가드올레산(Gadoleic acid)	0.9	0.8	0.8
	C20:2	에시코사디에노산(Eicosadienoic acid)	0.4	0.3	0.4
	C20:3	에이코사트리에노산(Eicosatrienoic acid)	0.1	0.1	0.1
	C20:4	아라키돈산(Arachidonic acid)	0.2	0.2	0.3
		불포화지방산 합계	61.8	59.5	62.1
		Unknown	0.6	0.6	0.8
	합 계		100.0	100.0	100.0

(나) 돼지고기 배삼겹 및 목삼겹, 등심의 아미노산 분석

돼지고기 아미노산 분석결과, 배삼겹의 경우 대체적으로 아비락을 급여한 처리구에서 낮게 나타났으며 목삼겹의 경우도 마찬가지로의 결과를 보였으며 등심에서도 같은 결과를 보였다.

표 3-5-34. 처리군별 돼지고기 배삼겹의 아미노산 분석 결과

	A 배삼겹(생균제)	B 배삼겹(아비락)	C 배삼겹(대조군)
Asp	1174.6 ± 23.13	1023.7 ± 6.05	1184.0 ± 11.93
Thr	556.5 ± 11.13	473.5 ± 0.10	568.7 ± 7.55
Ser	495.7 ± 11.85	398.5 ± 5.88	492.3 ± 9.67
Glu	1905.5 ± 34.19	1756.8 ± 13.19	1920.0 ± 24.69
Pro	492.7 ± 6.78	385.4 ± 24.16	455.5 ± 24.16
Gly	695.4 ± 01.29	526.2 ± 27.35	620.8 ± 2.38
Ala	744.1 ± 11.47	612.9 ± 7.40	732.9 ± 0.46
Val	484.0 ± 4.28	505.3 ± 0.13	506.2 ± 1.93
Met	175.2 ± 37.10	162.8 ± 11.64	174.7 ± 0.40
Ile	512.1 ± 7.34	493.8 ± 5.84	526.8 ± 5.55
Leu	1014.3 ± 10.55	880.9 ± 1.82	1030.3 ± 5.69
Tyr	433.5 ± 6.99	377.7 ± 8.32	440.0 ± 3.03
Phe	554.2 ± 4.05	449.9 ± 3.80	566.0 ± 7.80
Lys	1190.5 ± 25.54	936.1 ± 3.14	1220.2 ± 10.87
His	480.6 ± 10.94	371.8 ± 16.00	512.0 ± 1.16
Arg	754.1 ± 0.70	606.5 ± 9.52	751.6 ± 4.37

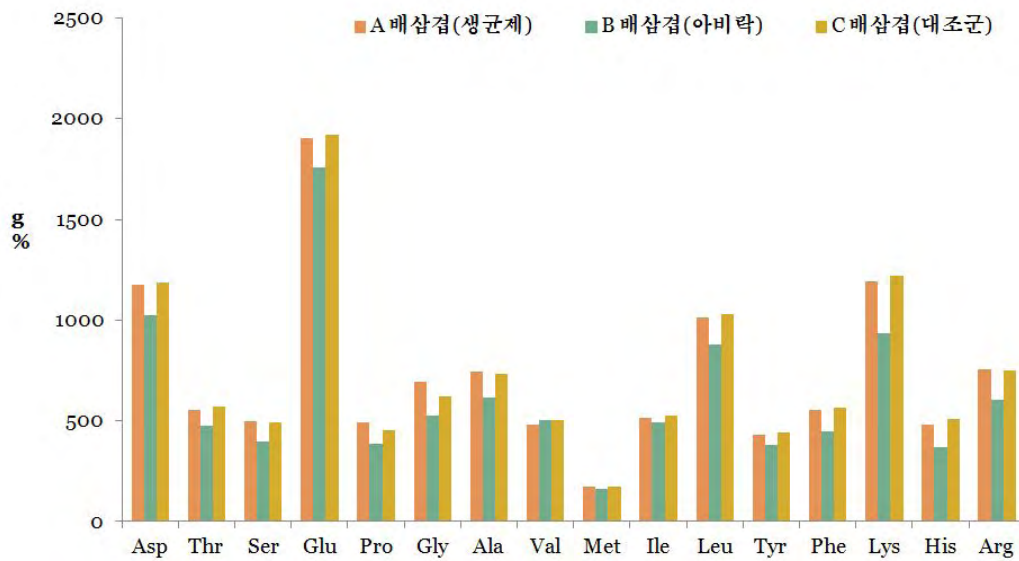


그림 3-5-29. 처리군별 돼지고기 배삼겹의 아미노산 분석 결과.

표 3-5-35. 처리군별 돼지고기 목삼겹의 아미노산 분석 결과

	A 목삼겹(생균제)	B 목삼겹(아비락)	C 목삼겹(대조군)
Asp	1552.6 ± 14.12	1790.2 ± 76.76	1566.8 ± 4.02
Thr	704.3 ± 3.61	659.7 ± 0.02	736.7 ± 4.35
Ser	584.9 ± 28.30	369.8 ± 0.06	619.8 ± 0.86
Glu	2493.6 ± 25.95	2963.4 ± 117.54	2553.2 ± 6.06
Pro	581.8 ± 39.11	681.0 ± 11.51	600.9 ± 18.94
Gly	806.9 ± 101.48	913.1 ± 36.57	821.0 ± 36.89
Ala	938.8 ± 35.93	1097.5 ± 42.52	955.0 ± 37.48
Val	726.6 ± 11.70	934.5 ± 44.39	736.3 ± 4.02
Met	249.6 ± 100.84	205.0 ± 18.23	270.0 ± 80.22
Ile	733.2 ± 0.69	868.6 ± 29.73	746.4 ± 10.82
Leu	1338.1 ± 7.52	1578.0 ± 68.31	1375.3 ± 14.15
Tyr	519.8 ± 60.88	268.0 ± 37.41	558.2 ± 55.03
Phe	733.9 ± 4.35	921.3 ± 44.44	767.4 ± 8.09
Lys	1587.2 ± 5.61	1826.4 ± 62.35	1631.5 ± 0.01
His	600.4 ± 8.83	711.9 ± 16.89	673.7 ± 2.52
Arg	971.2 ± 57.35	1044.2 ± 23.77	985.6 ± 9.06

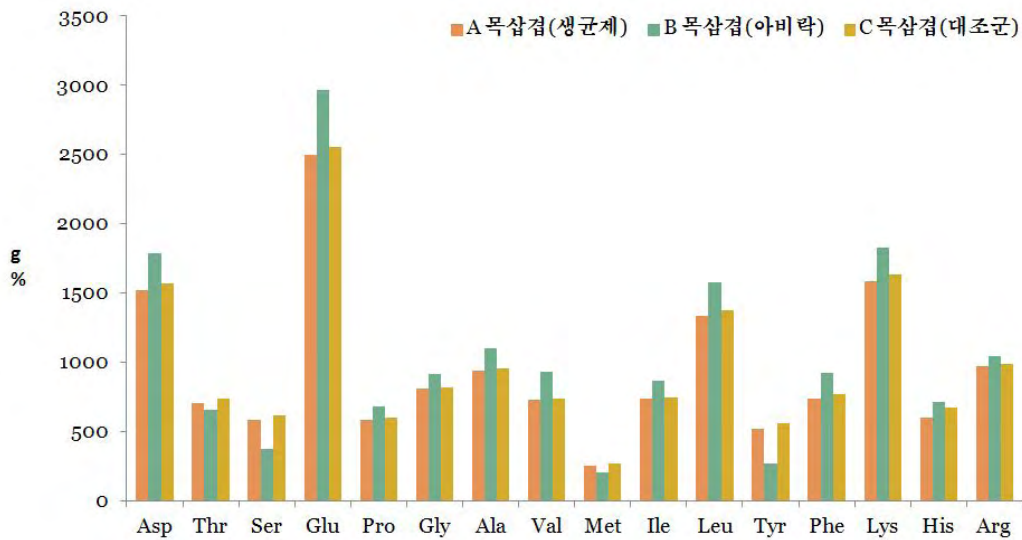


그림 3-5-30. 처리군별 돼지고기 목삼겹의 아미노산 분석 결과

표 3-5-36. 처리군별 돼지고기 등심의 아미노산 분석 결과

	A 등심(생균제)	B 등심(아비락)	C 등심(대조군)
Asp	2084.9 ± 1.61	2033.2 ± 39.38	2148.5 ± 11.20
Thr	912.1 ± 9.49	959.3 ± 22.05	974.5 ± 15.06
Ser	669.0 ± 14.63	850.6 ± 19.38	791.8 ± 11.84
Glu	3321.1 ± 4.56	3208.7 ± 64.57	3496.7 ± 21.31
Pro	686.4 ± 8.86	715.7 ± 26.22	814.1 ± 37.23
Gly	918.7 ± 9.15	953.2 ± 46.76	1199.4 ± 28.21
Ala	1214.5 ± 4.60	1194.9 ± 11.26	1330.0 ± 27.32
Val	1071.0 ± 5.09	766.7 ± 11.58	1053.7 ± 5.52
Met	327.4 ± 17.86	306.5 ± 0.00	315.7 ± 14.05
Ile	1051.5 ± 7.91	804.8 ± 18.38	1048.2 ± 8.83
Leu	1791.7 ± 8.13	1696.6 ± 37.43	1827.9 ± 11.55
Tyr	604.0 ± 28.78	710.9 ± 23.08	648.8 ± 24.63
Phe	1102.1 ± 4.02	986.4 ± 14.41	1092.7 ± 1.07
Lys	2156.0 ± 4.41	2029.6 ± 43.64	2225.3 ± 32.63
His	1070.9 ± 2.99	952.7 ± 14.21	1001.4 ± 9.86
Arg	1243.0 ± 8.52	1242.4 ± 22.64	1366.9 ± 15.94

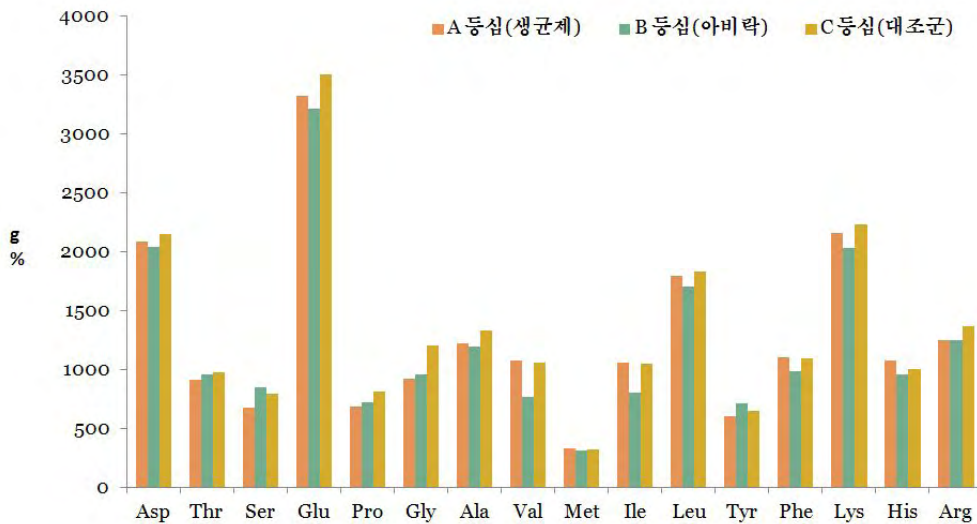


그림 3-5-31. 처리군별 돼지고기 등심의 아미노산 분석 결과

(4) 돼지고기의 처리구별 일반성분 분석

(가) 처리구별 일반성분 분석결과

돼지고기의 일반성분을 분석한 결과, 배삼겹의 경우 칼슘과 마그네슘, 칼륨은 생균제를 급여한 처리구가 높은 함량을 나타냈으며 아비락 처리군은 약간 낮은 경향을 보였다. 목삼겹의 경우 지방함량이 오히려 생균제 급여구가 약간 높았으며 단백질 함량은 아비락 급여구가 높은 경향을 나타냈다. 등심의 경우는 아비락 급여구가 약간 높았으나 전반적으로 3 처리구 모두 비슷한 경향을 보였다. 자세한 결과는 표 3-5-37, 38, 39에서 보는 바와 같다.

표 3-5-37. 처리구별 돼지고기 배삼겹의 화학 분석 결과

	A 배삼겹(생균제)	B 배삼겹(아비락)	C 배삼겹(대조군)
열량(kcal/100g)	499	467	408
수분(g/100g)	41.95 ± 0.91	41.02 ± 0.71	46.49 ± 0.06
지방(g/100g)	43.82 ± 4.67	46.58 ± 1.34	39.38 ± 2.81
단백질(g/100g)	12.78 ± 1.03	11.19 ± 1.31	12.62 ± 0.59
회분(g/100g)	0.68 ± 0.02	0.55 ± 0.01	0.66 ± 0.01
탄수화물(g/100g)	0.78	0.67	0.86
콜레스테롤(mg/100g)	37.52 ± 1.17	37.09 ± 1.18	34.76 ± 0.21
Ca(mg/100g)	10.19 ± 0.09	5.33 ± 0.07	7.14 ± 0.17
Fe(mg/100g)	0.47 ± 0.01	0.47 ± 0.00	0.37 ± 0.01
Na(mg/100g)	67.44 ± 0.20	73.35 ± 0.44	66.08 ± 0.16
K(mg/100g)	14.53 ± 0.18	9.45 ± 0.10	12.35 ± 0.06
Mg(mg/100g)	12.44 ± 0.06	10.15 ± 0.61	13.12 ± 0.01
P(mg/100g)	12.02 ± 0.01	10.05 ± 0.06	12.87 ± 0.12

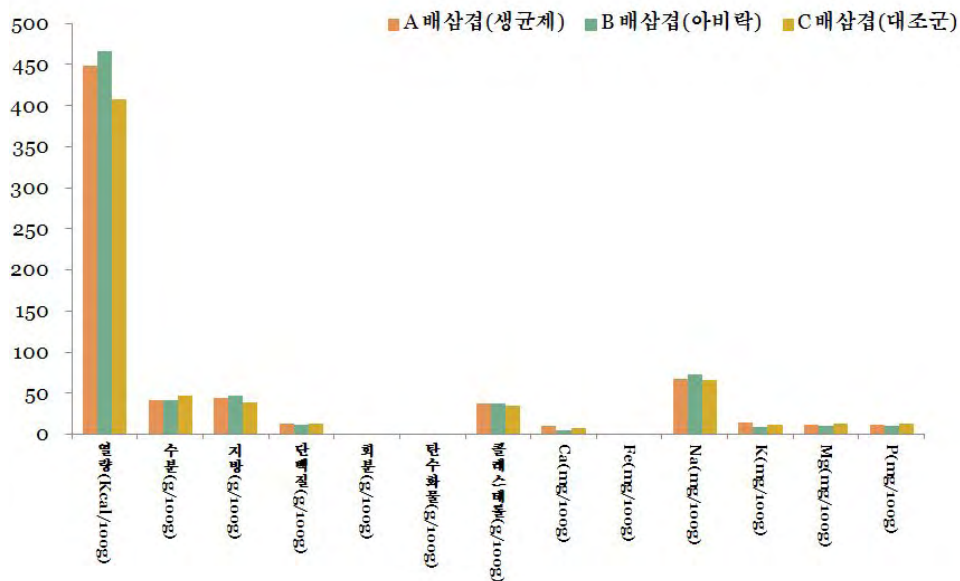


그림 3-5-32. 처리구별 돼지고기 배삼겹의 화학 분석 결과 변화

표 3-5-38. 처리군별 돼지고기 목삼겹의 화학 분석 결과

	A 목삼겹(생균제)	B 목삼겹(아비락)	C 목삼겹(대조군)
열량 (kcal/100g)	305	250	279
수분 (g/100g)	56.17±0.11	60.09 ± 0.79	58.39 ± 0.47
지방 (g/100g)	26.66 ± 0.20	18.77 ± 0.43	23.17 ± 1.92
단백질 (g/100g)	15.19 ± 1.03	19.27 ± 0.15	16.66 ± 0.04
회분 (g/100g)	0.81 ± 0.00	0.91 ± 0.01	0.89 ± 0.01
탄수화물 (g/100g)	1.17	0.97	0.89
콜레스테롤 (mg/100g)	47.39 ± 3.04	44.50 ± 2.38	39.38 ± 2.59
Ca (mg/100g)	5.93 ± 0.14	4.46 ± 0.04	6.92 ± 0.06
Fe (mg/100g)	0.94 ± 0.01	0.88 ± 0.01	0.73 ± 0.01
Na (mg/100g)	79.22 ± 1.16	89.64 ± 0.29	84.26 ± 3.20
K (mg/100g)	24.04 ± 0.11	25.07 ± 0.13	22.72 ± 0.12
Mg (mg/100g)	16.13 ± 0.42	17.34 ± 0.08	17.79 ± 0.08
P (mg/100g)	16.77 ± 0.04	17.74 ± 0.04	16.99 ± 0.01

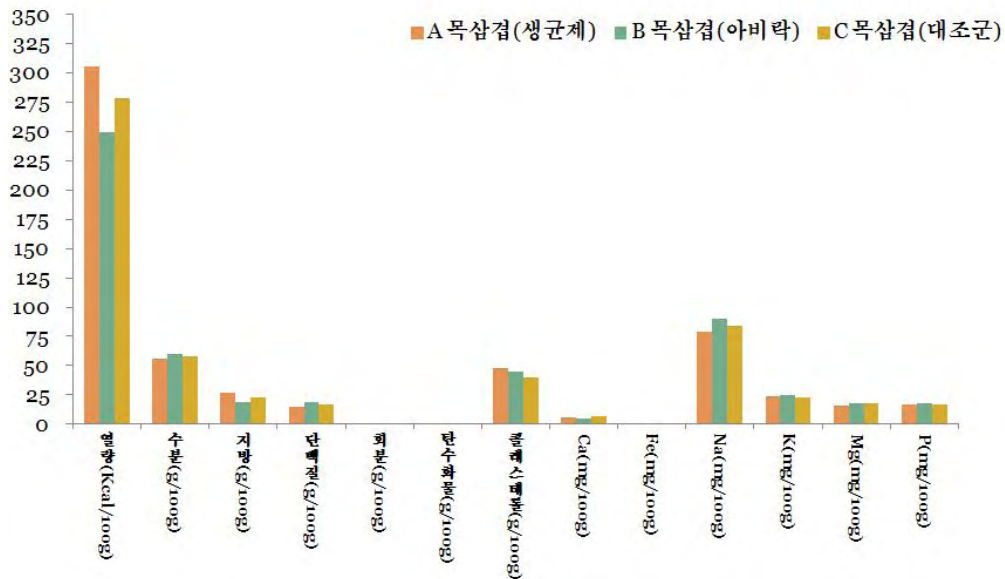


그림 3-5-33. 처리군별 돼지고기 목삼겹의 화학 분석 결과 변화

표 3-5-39. 처리군별 돼지고기 등심의 화학 분석 결과

	A 등심(생균제)	B 등심(아비락)	C 등심(대조군)
열량 (kcal/100g)	176	197	167
수분 (g/100g)	66.53 ± 0.15	64.12 ± 0.48	66.60 ± 0.80
지방 (g/100g)	9.32 ± 0.36	11.58 ± 0.35	7.53 ± 0.24
단백질 (g/100g)	22.28 ± 0.08	22.59 ± 1.15	24.11 ± 0.11
회분 (g/100g)	1.05 ± 0.05	1.03 ± 0.03	1.10 ± 0.01
탄수화물 (g/100g)	0.83	0.68	0.67
콜레스테롤 (mg/100g)	44.47 ± 2.88	40.89 ± 0.42	45.61 ± 1.68
Ca (mg/100g)	4.86 ± 0.01	4.53 ± 0.09	6.41 ± 0.05
Fe (mg/100g)	0.50 ± 0.01	0.53 ± 0.00	0.44 ± 0.01
Na (mg/100g)	75.25 ± 0.42	71.01 ± 0.33	80.01 ± 0.68
K (mg/100g)	30.45 ± 0.23	31.39 ± 0.28	31.97 ± 0.38
Mg (mg/100g)	22.06 ± 0.47	23.84 ± 0.28	24.78 ± 0.33
P (mg/100g)	20.89 ± 0.06	21.37 ± 0.48	21.47 ± 0.09

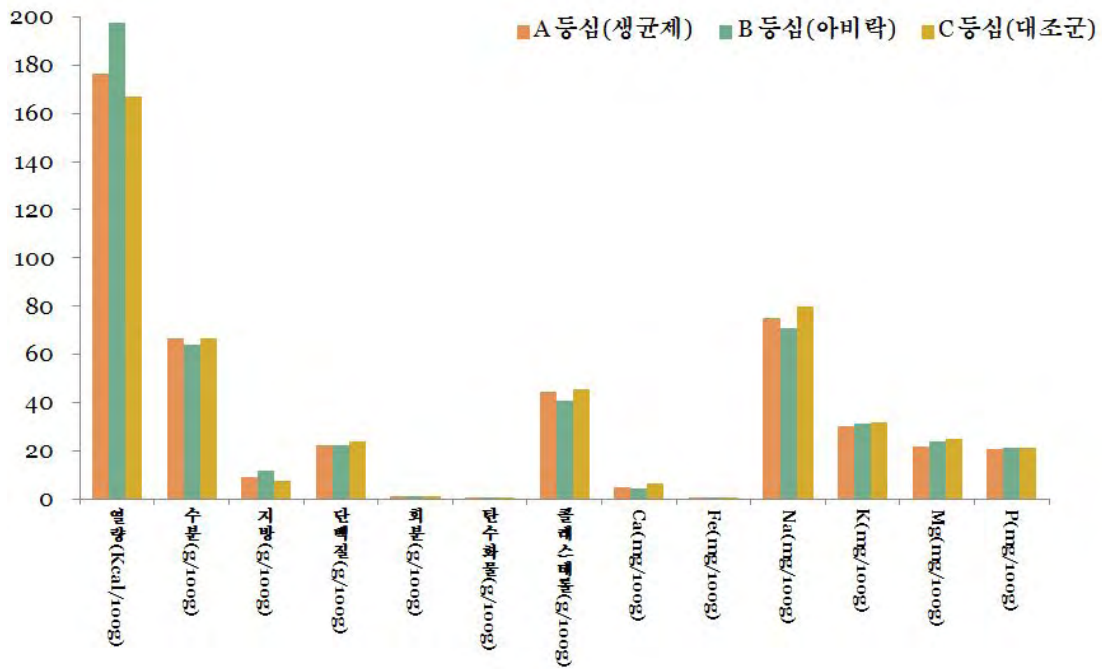


그림 3-5-34. 처리군별 돼지고기 등심의 화학 분석 결과 변화

(5) 돼지고기의 항생제 분석

표 3-5-40. 처리군별 돼지고기의 항생제 분석 결과

항생제	A 목삼겹	B 목삼겹	C 목삼겹	A 배삼겹	B 배삼겹	C 배삼겹	A 등심	B 등심	C 등심
Oxytetracycline	불검출	불검출	불검출	불검출	불검출	불검출	불검출	불검출	불검출
Tetracycline	불검출	불검출	불검출	불검출	불검출	불검출	불검출	불검출	불검출
Chlortetrachline	불검출	불검출	불검출	불검출	불검출	불검출	불검출	불검출	불검출
Doxycycline	불검출	불검출	불검출	불검출	불검출	불검출	불검출	불검출	불검출
Marbofloxacin	불검출	불검출	불검출	불검출	불검출	불검출	불검출	불검출	불검출
Norfloxacin	불검출	불검출	불검출	불검출	불검출	불검출	불검출	불검출	불검출
Ciprofloxacin	불검출	불검출	불검출	불검출	불검출	불검출	불검출	불검출	불검출
Danofloxacin	불검출	불검출	불검출	불검출	불검출	불검출	불검출	불검출	불검출
Enrofloxacin	불검출	불검출	불검출	불검출	불검출	불검출	불검출	불검출	불검출
Sarafloxacin	불검출	불검출	불검출	불검출	불검출	불검출	불검출	불검출	불검출
Difloxacin	불검출	불검출	불검출	불검출	불검출	불검출	불검출	불검출	불검출
Oxolinic acid	불검출	불검출	불검출	불검출	불검출	불검출	불검출	불검출	불검출
Flumequinine	불검출	불검출	불검출	불검출	불검출	불검출	불검출	불검출	불검출

양돈실험은 랜드레이스 15두를 구입하여 1처리구에 5두씩 총 3처리구로 나누어 일반사료 급여군과 시중생균제(상품명:아비락(대성미생물) 급여군, 개발 생균제 급여군 등으로 5두씩 칸막이를 한 돈사에서 총 13주간을 실시하였으며 체중은 2주일에 한 번씩 체중을 측정하였다. 체중에서는 시중생균제 급여군이 가장 높은 151.2kg, 일반사료 급여군 133.2kg, 개발 생균제 급여군이 가장 낮은 131.2kg이었다. 그러나 돼지를 도축한 후 지육율을 보면 약 2% 정도 낮은 것으로 나타났으며 등지방 두께는 생균제 급여구가 31.6mm, 시중생균제 급여군이 32.4mm, 일반사료를 급여한 대조구가 36.8mm로 실험군이 가장 얇았으며 대조구가 가장 두꺼운 지방을 함유하고 있었다. 돼지고기 분석은 등심, 목살, 삼겹살 등 3종류를 선택하여 실시하였다. pH는 3처리구 모두 비슷한 경향을 보였으며 고기를 가열 하였을 때 가열감량은 등심의 경우 생균제 급여구가 가장 적은 23.4±0.0일 때 시중생균제 급여군은 28.4±0.9, 일반사료 급여군은 31.2±1.3으로 생균제 급여구가 가장 좋은 결과를 보였다. 다른 부위인 목살 및 삼겹살도 마찬가지로 생균제 급여구에서 가장 좋은 결과를 보였다. 보수력도 등심, 목살, 삼겹살 모두 생균제 첨가 급여구에서 가장 높게 나타났다. 색도는 거의 비슷한 경향을 보였으며 관능검사 결과 신선육은 모든 처리구에서 비슷하였으나 가열육 결과는 생균제 첨가 급여구에서 가장 높은 점수를 얻었다. 3 종류의 돼지고기의 지방산 분석과 아미노산 분석 결과도 3처리구 모두 비슷한 경향을 나타냈다. 돼지고기의 이하학적 분석 결과 수분은 일반사료를 급여한 대조구에서 가장 높았으며 배삼겹의 경우 Ca(mg/100g)은 생균제 급여구가 10.19±0.09, 시중생균제 급여군 5.33±0.07, 일반사료 급여군 7.14±0.17로 생균제 급여구가 30%이상 높은 함량을 지니고 있었다. 등심과 목삼겹은 3처리구 모두 비슷한 결과를 보였다. 모두 처리구의 고기에서 항생물질은 검출되지 않았다.



#### 마. 한우실험

한우 실험은 용인시 원삼면 두창리 한우단지 내 이상혁씨 농장에서 5개월 령의 수소 15두를 입식시키고 1처리구에 5두씩 총 3처리구로 나누어 실험생균제 첨가 급여구, 시중생균제생균제 첨가 급여구, 일반사료 급여구로 나누어 실시하였다. 2010년 11월 안동에서 발병한 구제역이 전국적으로 확대되면서 1차년도 한우실험에 차질이 발생하였다. 5개월령의 한우를 700kg 이상 까지 성장시키려면 약 28개월 이상이 소요되는데 3차 년도를 사육하더라도 도축 가능한 체중에 미달할 것으로 사료되며 도축 가능한 시기는 연구종료 시점보다 더 길어지게 되어 당초 계획되었던 한우의 육질분석은 어려울 것으로 예상된다.

##### (1) 한우의 체중측정 변화

체중은 매월 1회 측정하였으며 현재 21개월째 사육하고 있다. 실험 개시체중이 생균제 처리가 약간 높긴 하였으나 20개월 실험결과로 볼 때 참여업체인 (주)진농네이처 생균제 급여군이 615.75kg, 아비락(주)대성미생물 첨가군이 526.6kg, 일반사료만 급여한 처리군은 491.6kg으로 성장하고 있으며 성장률을 실험 생균제 급여구에서 약 90kg 더 증가한 것으로 나타났다. 체중 변화는 표 3-5-41과 3-5-42에서 보는 바와 같다. 체중의 변화를 보면 처음 개시체중 후 점차적으로 증가하긴 하였으나 완만하게 성장하는 것을 볼 수 있다. 그림 3-5-35을 보면 20개월 동안 서서히 증가하는 추세에 있으며 현재는 615kg, 526kg, 491kg으로 SPSS program으로 통계 처리한 결과 유의적인( $p < 0.05$ )차이가 나타났다. 처음 3개월간 성장률은 유의성이 없었으나 4개월령 이후는 20개월 현재 일반대조군과 시중생균제 급여군에 비하여 높은 성장률을 보이며 통계적으로도 유의적인 효과가 있다. 생후 24개월령이 된 시점에서 볼 때 전 기간 1일 평균 증체량은 생균제 급여군의 경우, 약 780g, 시중생균제 급여군 660g, 일반사료 급여군 600g 으로서 생균제 급여군은 일반사료 급여군에 비해 1일 180g의 체중이 더 늘어나는 것으로 나타났다.

표 3-5-41. 처리군별 한우의 체중(평균체중/5두/월)

(단위:kg)

개월	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
A(생균제)	172.8 ± 8.66	206.8 ± 11.15	228.8 ± 11.09	245.3 ± 11.00a	263.5 ± 10.63a	287.5 ± 9.57a	309.5 ± 7.72a	337.5 ± 8.66a	367.5 ± 14.18a	393.3 ± 19.72a
B(시중생균제)	153.4 ± 12.64	180.8 ± 13.37	202.8 ± 15.76	210.2 ± 15.72b	227.8 ± 13.42b	246.6 ± 18.35b	265.4 ± 26.31b	287.8 ± 33.78b	318.8 ± 23.07b	348.0 ± 14.84b
C(일반사료)	147.8 ± 17.73	179.4 ± 26.44	194.4 ± 39.03	206.0 ± 32.57b	221.2 ± 33.76b	240.6 ± 37.65b	252.2 ± 41.13b	280.4 ± 37.72b	316.4 ± 36.66b	348.4 ± 39.67b
개월	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
A(생균제)	421.3 ± 18.87a	443.0 ± 18.60a	473.8 ± 25.29a	500.0 ± 26.32a	516.5 ± 27.50a	531.8 ± 24.78a	553.3 ± 26.15a	572.5 ± 23.27a	594.3 ± 41.69a	615.75 ± 51.87a
B(시중생균제)	371.4 ± 15.07b	396.6 ± 20.43b	415.2 ± 22.44b	433.0 ± 22.96b	450.6 ± 23.67b	462.8 ± 23.57b	482.2 ± 23.38b	499.0 ± 22.80b	517.0 ± 25.91b	526.6 ± 19.68b
C(일반사료)	372.2 ± 35.16b	389.0 ± 36.02b	401.8 ± 40.80b	414.6 ± 43.69b	429.6 ± 42.83b	442.8 ± 42.55b	459.8 ± 39.81b	475.8 ± 36.05b	494.6 ± 26.79b	491.6 ± 31.28b

표 3-5-42. 처리군별 한우의 평균 일일증체량(kg, 체중/1두/1일)

개월		6	7	8	9	10	11	12	13	14
A(생균제)		1.13 ± 0.21	0.73 ± 0.17	0.55 ± 0.06	0.61 ± 0.02	0.80 ± 0.09	0.73 ± 0.13	0.93 ± 0.27	1.00 ± 0.32	0.86 ± 0.29
B(시중생균제)		1.05 ± 0.12	0.50 ± 0.11	0.39 ± 0.23	0.51 ± 0.22	0.65 ± 0.21	0.39 ± 0.93	0.94 ± 0.49	1.20 ± 0.38	1.07 ± 0.29
C(일반사료)		0.91 ± 0.29	0.73 ± 0.50	0.25 ± 0.29	0.59 ± 0.14	0.63 ± 0.18	0.63 ± 0.14	0.75 ± 0.17	1.03 ± 0.08	0.97 ± 1.72
개월	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
A(생균제)	0.93 ± 0.16	0.73 ± 0.08	1.03 ± 0.23	0.88 ± 0.20	0.55 ± 0.29	0.51 ± 0.12	0.72 ± 0.10	0.64 ± 0.21	0.73 ± 0.67	0.72 ± 0.35
B(시중생균제)	0.79 ± 0.26	0.56 ± 0.27	0.43 ± 0.19	0.43 ± 0.10	0.50 ± 0.05	0.44 ± 0.04	0.57 ± 0.16	0.53 ± 0.05	0.63 ± 0.38	0.32 ± 0.31
C(일반사료)	0.78 ± 0.27	0.84 ± 0.16	0.62 ± 0.21	0.59 ± 0.11	0.59 ± 0.12	0.41 ± 0.09	0.65 ± 0.10	0.56 ± 0.13	0.60 ± 1.47	0.32 ± 0.32

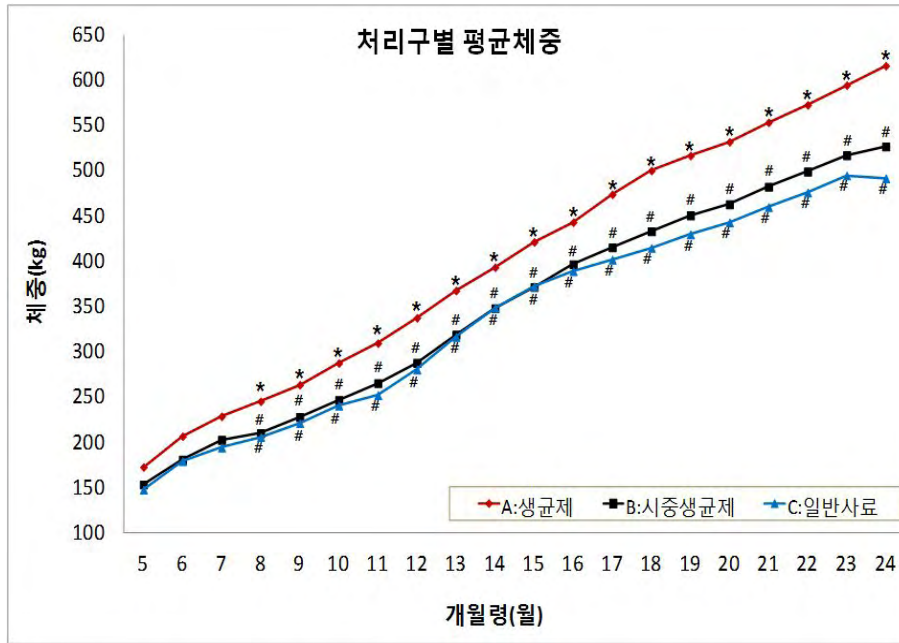


그림 3-5-35. 처리군별 한우의 체중 변화표

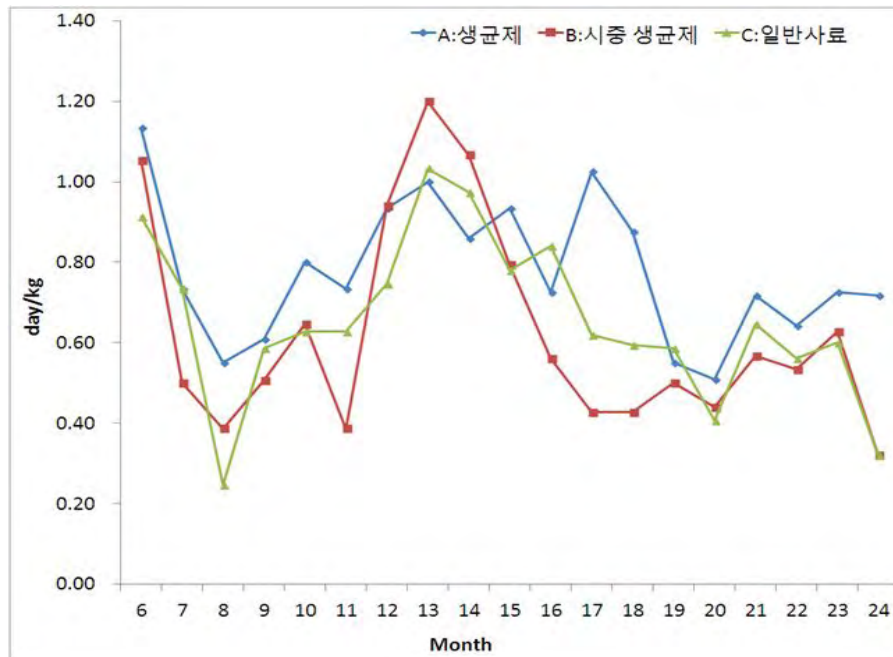


그림 3-5-36. 처리군별 한우의 평균 일일증체량(kg, 체중/1두/1일)

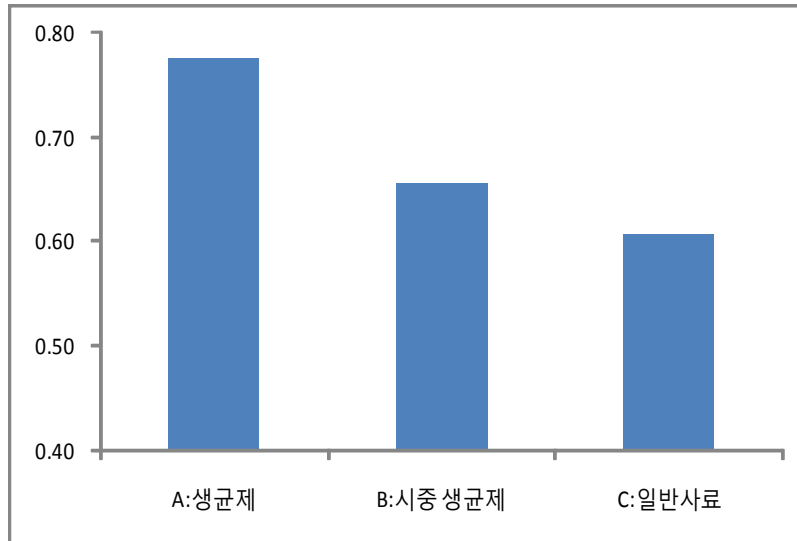


그림 3-5-37. 처리군별 한우의 일일증체량(kg, 체중/1두/1일)

(2) 사료 섭취량

사료섭취량도 소의 성장에 따라 증가하고 있으나 현재는 약 10.3kg 전후로 섭취하고 있다. 20개월간의 사료섭취량의 결과는 표 3-5-43, 그림 3-5-38에서 보는 바와 같다. 한우의 일당 섭취량을 살펴보면 체중이 증가함에 따라 사료 섭취량도 증가하여 생균제 급여군 10.36kg, 시중 생균제 급여군 10.05kg, 일반사료 급여군 9.98kg이었다.

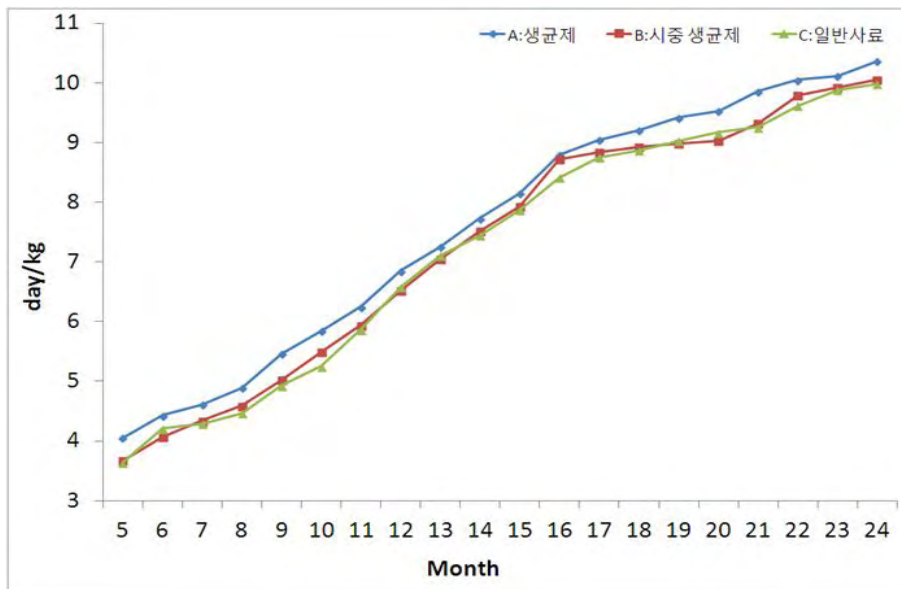


그림 3-5-38. 처리군별 한우의 사료 섭취량(일당섭취량/1두/1일)

표 3-5-43. 처리군별 한우의 일일 사료섭취량(섭취량/1두/1일)

(단위:kg)

개월	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
A(생균제)	4.06	4.43	4.61	4.89	5.46	5.84	6.25	6.85	7.26	7.73
B(시중생균제)	3.67	4.07	4.34	4.59	5.02	5.49	5.94	6.52	7.05	7.52
C(일반사료)	3.64	4.21	4.29	4.47	4.93	5.25	5.87	6.58	7.11	7.45
개월	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
A(생균제)	8.15	8.79	9.05	9.21	9.42	9.53	9.86	10.05	10.12	10.36
B(시중생균제)	7.93	8.72	8.84	8.92	8.99	9.03	9.32	9.79	9.92	10.05
C(일반사료)	7.87	8.41	8.75	8.87	9.03	9.17	9.26	9.62	9.88	9.98

(3) 사료효율

1일 두당 체중과 사료섭취량 결과를 바탕으로 한 전 사육기간의 평균 사료효율을 계산한 결과, 그림 3-5-39와 표 3-5-44에서와 같이 생균제 급여군 10.88%, 시중생균제 급여군 9.67%, 일반사료 급여군 9.14%로 생균제 급여군이 일반사료 급여군보다 1.74%의 사료효율이 높은 것으로 나타났다. 이때 1kg의 체중을 증가시키기 위한 사료요구량은 각각 9.97kg, 11.33kg, 12.37kg이었다.

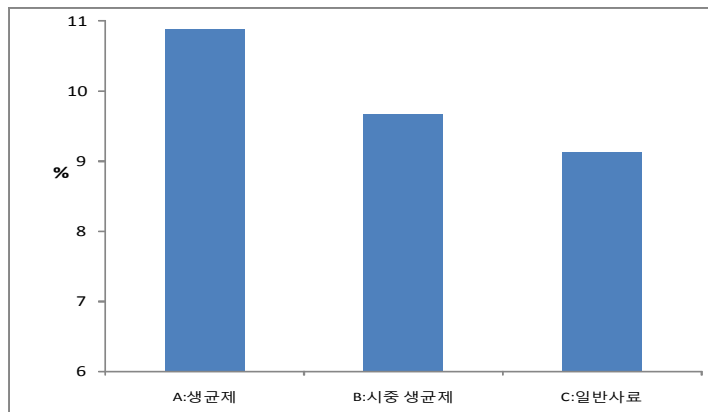


그림 3-5-39. 처리군별 한우의 사료효율

표 3-5-44. 처리군별 한우의 사료효율(월 평균)

(단위:%)

개월	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
A(생균제)	14.90	10.41	11.45	13.19	11.19	13.55	13.33	11.39	10.52	8.10
B(시중생균제)	14.75	8.76	12.78	12.48	11.41	12.57	15.85	13.81	10.37	10.59
C(일반사료)	11.88	9.01	11.33	13.12	7.37	16.01	18.24	15.00	10.65	7.12
개월	16	17	18	19	20	21	22	23	24	
A(생균제)	10.47	8.69	5.99	5.35	6.80	4.83	5.78	8.85	10.00	
B(시중생균제)	7.11	6.71	5.18	6.54	5.78	8.33	8.33	8.33	12.50	
C(일반사료)	5.07	4.88	4.69	6.25	10.00	11.49	10.00	11.49	11.49	

한우 거세우의 경우, 출하체중은 694kg, 평균 도축월령은 31개월인 것으로 보도된 바 있다(축산물품질평가원, 2011.10). 도축시점 체중을 700kg으로 하였을 때 각 처리군별 도축시기를 예상한 결과, 생균제 급여군은 생후 27-28개월령, 일반사료 급여군은 생후 35개월일 때, 시중생균제 급여군은 생후 32개월령인 것으로 추정되었다. 24개월령의 사료섭취량을 기준으로 도축까지의 사료 필요량을 계산한 결과, 생균제 급여군은 1,214kg, 일반사료 섭취군은 3,293kg, 시중생균제 급여군은 2,412kg이 더 소요되는 것으로 계산되었다. 이러한 결과로부터 개발 생균제의 급여는 일반사료만을 급여하였을 때에 비해 7개월의 사육기간을 획기적으로 단축할 수 있을 것으로 판단된다. 일반적으로 대부분의 축산농가는 한우사육 시 생균제 제품을 급여하고 있다. 따라서 시중생균제 급여군과 비교해도 4개월의 사육기간을 단축시킬 수 있을 것으로 판단된다. 한우의 사육기간을 2개월 단축 시의 파급효과는 사료절감액 4,600억원, 옥수수 수입절감 40만톤으로 국내 축산물의 경제력 제고와 해외시장 진출이 크게 기대되는 제품이라 할 수 있다.

#### (4) 한우의 장내 미생물 분석

생체의 장내 미생물은 병원성 세균의 침범 억제, 장 표피세포의 손상 방지, 지방 축적 조절, 생체 스스로가 소화하지 못하는 영양분을 분해하여 흡수 가능한 형태로 전환, 비타민 K의 생산과 철분 흡수, 장 점막의 면역 증강 및 담즙산 대사 등의 전반적 대사 과정 및 생리작용에 직접적인 영향을 인간과 주고받고 있다고 알려져 있다(Turnbaugh et al., 2007. Nature 449:804-810). 워싱턴의대 Jeffrey Gordon 교수 연구팀은 장내 세균의 종류가 달라짐에 따라 비만 여부가 결정된다는 사실을 밝혀냈으며 12명의 비만인을 대상으로 1년간 저지방/저탄수화물 식사를 한 비만 환자의 비만도가 현저히 감소였고 장내 미생물을 분석한 결과 실험을 시작하기 전에 90% 이상이었던 Firmicutes가 73%까지 감소하고, 3% 였던 Bacteroidetes는 15%까지 증가하였다. 생체의 장내에서 Firmicutes는 음식물에서 보다 많은 칼로리를 추출하여 숙주에게 전달하는 역할을 하는 것으로 알려져 있는데 이에 본 연구에서도 생균제를 급여한 한우 실험군과 대조군의 장내 미생물 분석을 통해 생균제의 증체 효과에 대한 장내 미생물학적 검증을 실시하고자 하였다.

각 샘플의 metagenome sequence를 MG-RAST server를 이용하여 gene annotation하였으며 염기서열 분석결과가 충분히 한우의 장내 미생물을 해석하였는지 확인하기 위하여 각 샘플의 미생물 동정결과를 바탕으로 rarefaction analysis를 수행하였다. rarefaction 분석 결과 샘플 당 2,600,000 이상의 read가 분석되었으며 약 2500종 이상의 미생물이 한우의 장내에 존재하는 것으로 확인되었다. 모든 샘플의 rarefaction curve 기울기가 약 1,000,000 read 이상에서 포화되는 (기울기가 “0”에 수렴하는) 경향을 보였으므로 본 실험은 한우에 장내에 존재하는 대부분의 미생물을 확인한 것으로 사료된다.

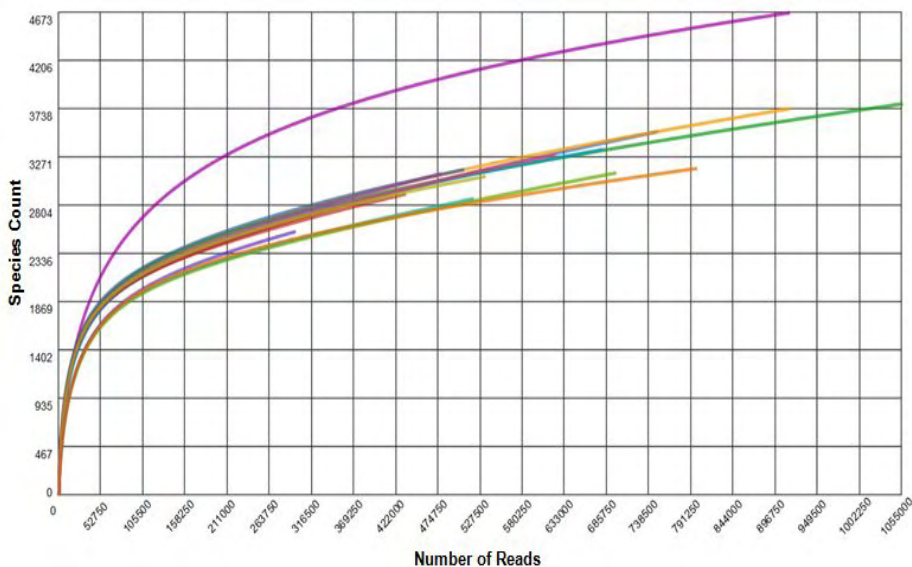


그림 3-5-40. metagenome 분석 샘플의 rarefaction 결과

한우의 장내 미생물 분석 결과 전체 sequence의 약 95.1%는 세균인 것으로 확인되었으며, 약 3.1%는 진핵세포유래, 약 1.5%는 고세균 유래인 것으로 확인되었다. 일반적으로 동물의 장내에는 세균이 대부분을 차지하며 세균 중에서는 동물 종에 따른 차이는 있지만 Firmicutes와 Bacteroidetes가 대부분을 차지하는 것으로 알려져 있다. 본 연구에서도 한우의 장내에는 Firmicutes가 가장 많은 양을 차지하는 것으로 확인되었으며, Bacteroidetes와 actinobacteria, 그리고 proteobacteria가 대표적인 우점종인 것으로 확인되었다. 고세균의 경우에는 methan 생성균을 포함하는 Euryarchaeota가 약 1.2% 정도 존재하는 것으로 확인되었다.

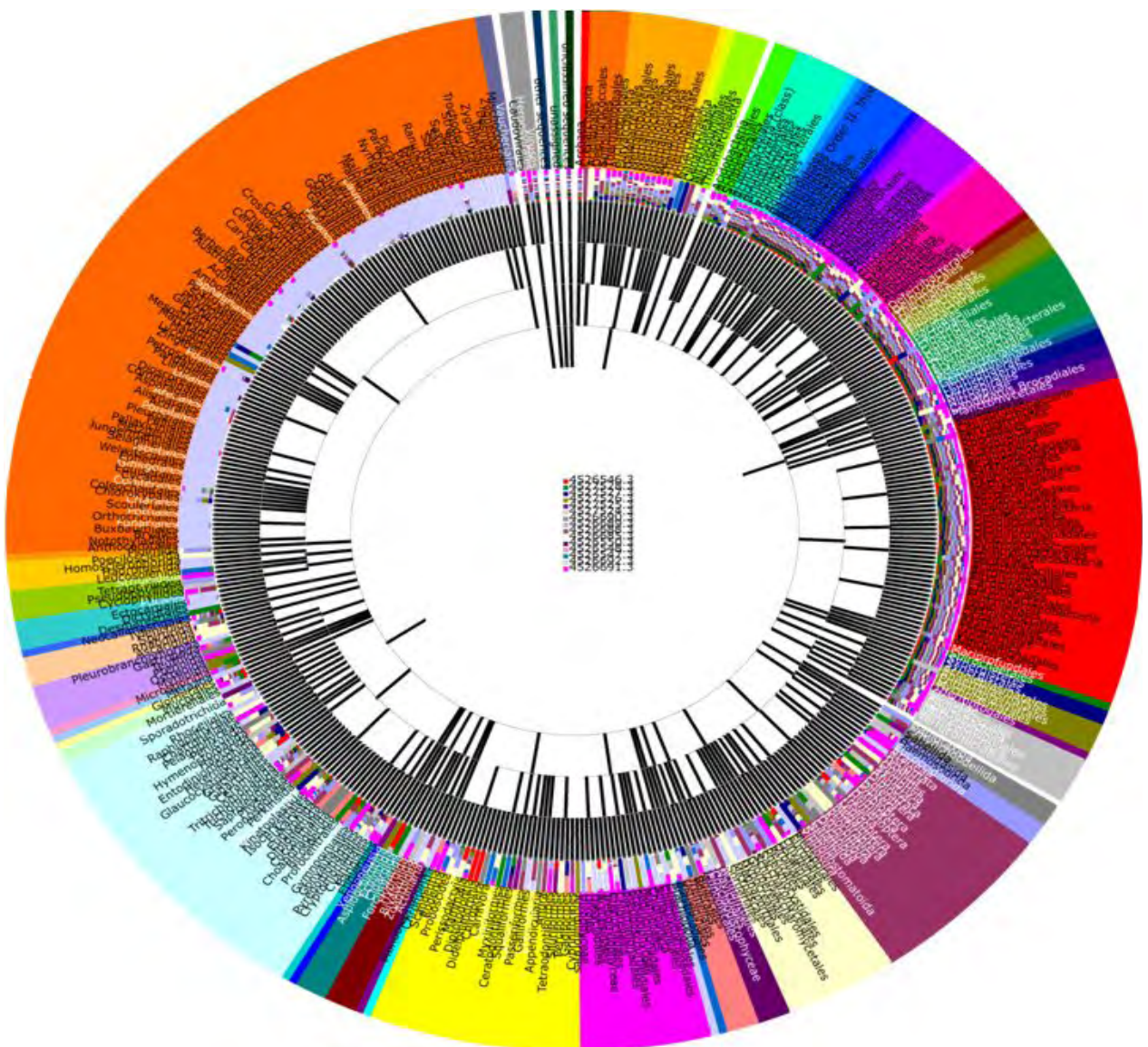


그림 3-5-41. metagenome 분석을 통한 한우의 장내 미생물 분포 결과



생균제 급여군(K), 시중생균제 급여군 그리고 일반사료 급여군(C)의 한우 장내 metagenome 분석 결과를 바탕으로 각 장내 미생물의 구성을 Heatmap clustering을 이용하여 확인한 결과 생균제 급여군과 시중생균제 급여군은 하나의 cluster로 묶이는 결과를 보였고 전체 한우 샘플은 투여한 생균제 조성물과는 현격한 차이를 보이며 하나의 cluster를 이루었음. 이를 통해 생균제 조성물에 들어있는 미생물이 한우의 장내 미생물 조성에 직접적인 영향을 끼친 것을 아니라고 생각되며 생균제 급여군과 시중생균제 급여군이 하나의 cluster를 이루기에 개발 생균제 또는 시중생균제의 급여는 한우의 장내 미생물을 변화시키는 것으로 사료된다.

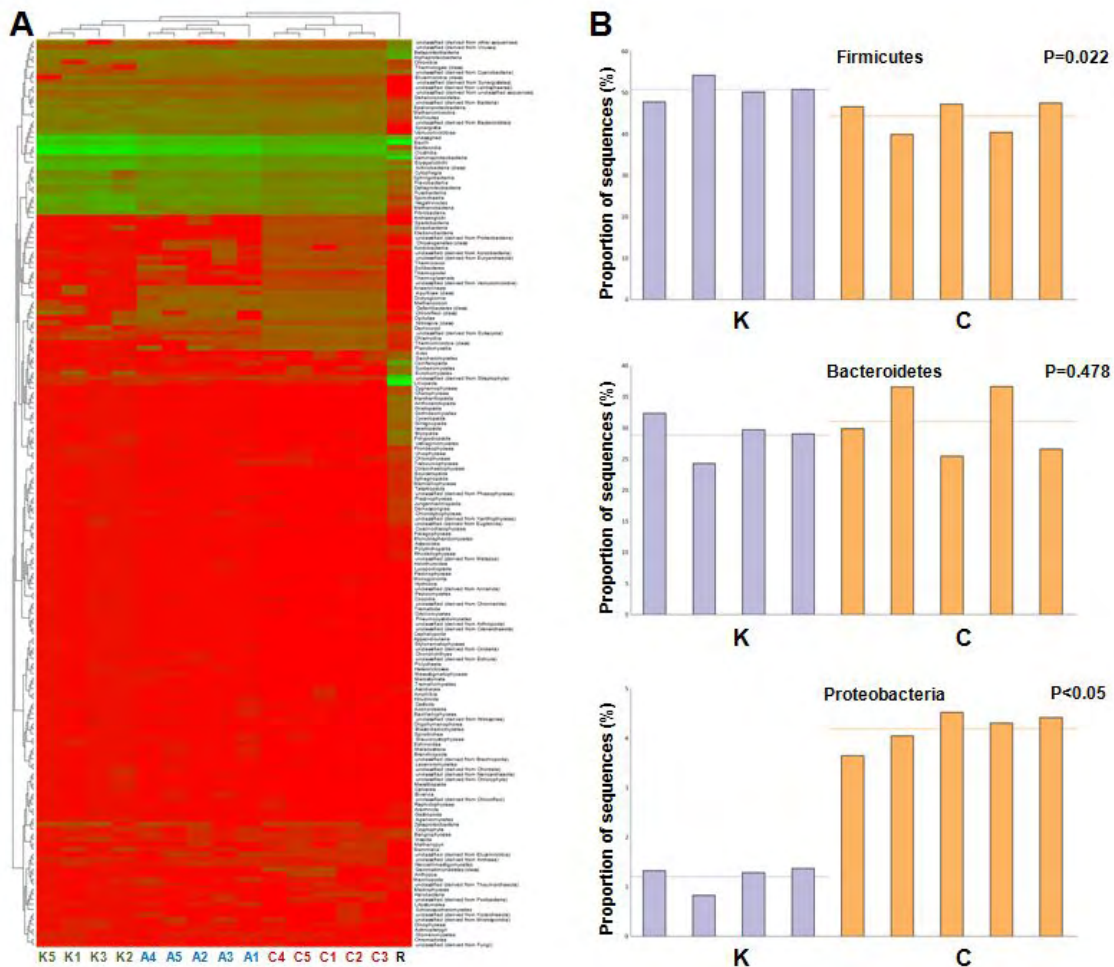


그림 3-5-42. A) metagenome heatmap clustering결과와 B) 주요 미생물 phylum의 통계 유의성 검사 결과

장내 미생물의 구성은 체중 증가와 밀접한 연관이 있는 것으로 밝혀져 있으며 특히 장내에 존재하는 Firmicutes와 Bacteroidetes의 양이 체중증가를 결정짓는 것으로 알려져 있다. 이에 본 연구에서 분석된 metagenome을 이용하여 각 미생물 phylum (계통 분류학 상 “문”)의 양이 통계적으로 유의하게 다른지를 확인하여 본 결과 시중 급여군과 일반대조군 간에는 유의성이 있는 미생물 phylum이 없었지만 생균제 급여군과 일반대조군과의 비교에서는 Firmicutes의 양이 유의적으로 차이를 보였다(생균제 급여군:  $50.73 \pm 2.30\%$ , 일반대조군:  $44.33 \pm 3.42\%$ ). 따라

서 생균제의 급여가 한우의 장내 미생물, 특히 Firmicutes의 특이적 증식을 활성화시켜 체중 증가로 이어졌으리라 예상되어진다.

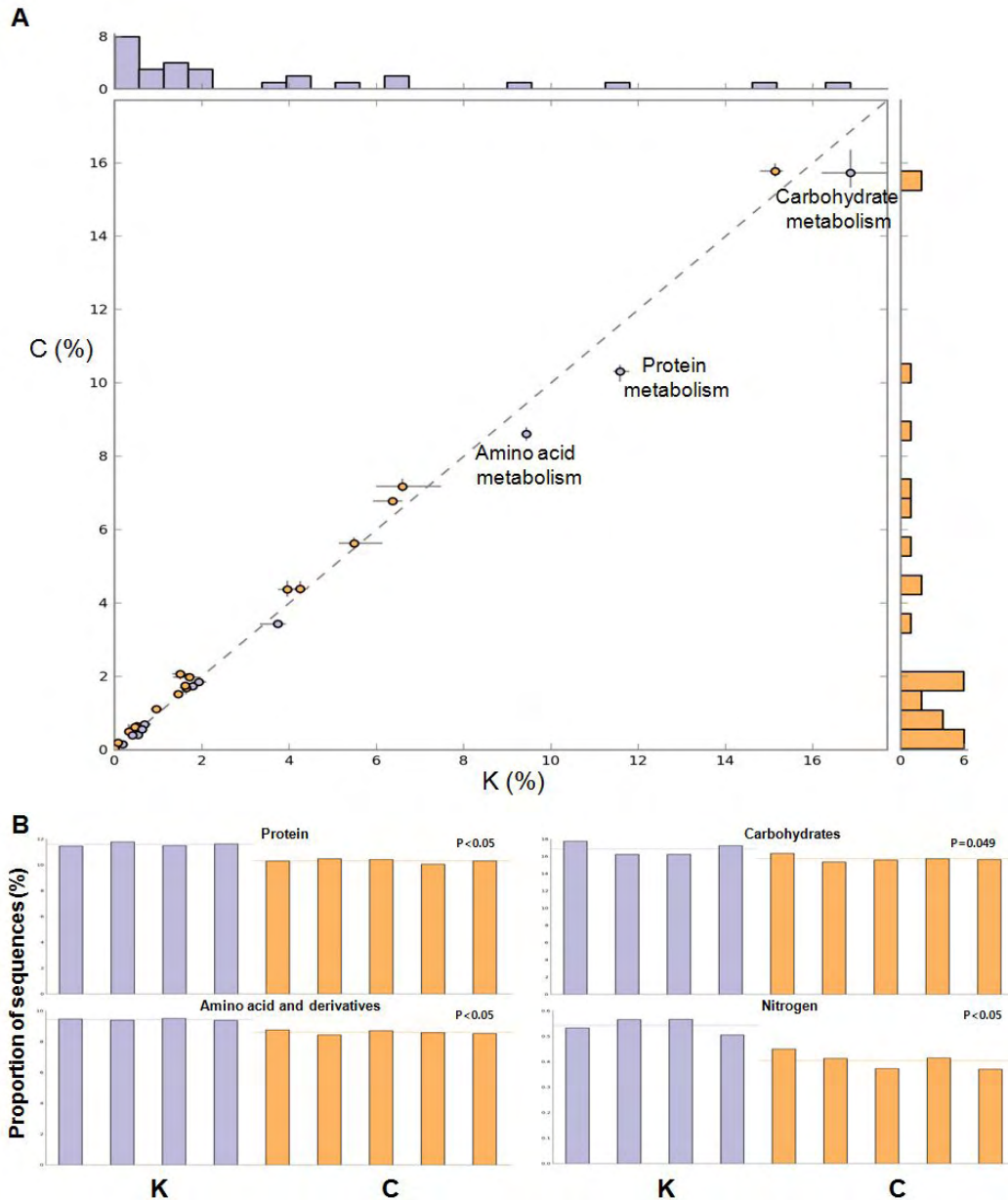


그림 3-5-43. A) 생균제 급여군과 control군의 전체 유전자 비교 결과와 B)유의적으로 차이가 있는 주요 유전자군

또한 metagenome 분석 결과를 바탕으로 생균제 급여군과 일반대조군의 전체 유전자를 비교한 결과 일반대조군(C)과 비교하여 생균제 급여군 (K) 이 carbohydrate, protein 그리고 amino acid and derivatives metabolism에 관련한 유전자가 더 많이 존재하는 것을 확인하였다. 이에 각각의 유전자 유의적으로 차이가 있는지 확인한 결과 생균제 급여군과 일반대조군 사이에 많은 유전자 조성 차이를 확인할 수 있었다. 보다 구체적으로는 Protein (생균제 급여군: 11.63 Vs 일반대조군: 10.30%), Carbohydrates (16.73 Vs 15.72%), Amino acid and derivatives (9.38 Vs 8.60%), 그리고 Nitrogen metabolism (0.54 Vs 0.40%) 이 유의적으로 생균제 급여군

에서 높게 나타났다. 따라서 생균제의 급여는 장내 미생물의 구성에 영향을 주고, 특히 장내에 Firmicutes가 많이 생육하는 방향으로 영향을 주며, 이로 인해 이들 미생물이 가진 단백질 및 탄수화물 대사 유전자의 증가로 한우의 사료 효율이 증가하는 것으로 해석될 수 있다.

## 제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

### 제 1 절 연구개발목표의 달성도

#### 1. 1차년도 연구개발목의 달성도

목 표	연구개발 수행내용	달성도(%)
항당뇨 및 간섬유화 개선효능 고체발효물 제조공정 구축	o노니 및 미강복합물의 발효기간별 분석 -이화학적 분석, $\beta$ -glucan 및 GABA 함량평가 효소활성, 일반성분, 중금속 함량 o항당뇨 및 간섬유화억제 효능 시작품 제조	150
발효물 4종의 항당뇨 효능 평가 시험	oIn vitro 평가: PPAR-gamma 전사활성, glucose uptake율, AMPK 인산화 평가 o제2형당뇨질환모델 마우스(KKAY) 실험 (발효노니, 발효녹차, 발효미강복합물 대상) -혈당, 당화혈색소, 인슐린 함량, 인슐린민감성 lipid profile 분석 oCCl <sub>4</sub> 투여로 간섬유화 유도 모델 마우스실험 (발효미강복합물, 발효울금, 발효노니, 발효녹차 대상) -간지표효소활성, 지질 profile, 간조직의 병리학적 평가 -간조직 내 콜라겐 및 과산화물 함량 평가 o고지방 식이 레트 실험 (발효미강복합물, 발효울금, 발효노니, 발효녹차 대상) -간조직 및 혈액의 지방함량 등 분석	200
항당뇨 관련 발효물의 생체 대사체 평가	o발효노니(항당뇨 효능) 및 발효미강복합물, 발효울금(간섬유화 억제효능) 식이 동물 간조직의 대사물질 분석	200
항당뇨 관련 분자생물학적 기전	o노니 및 발효녹차 식이 동물(KKAY) 간조직 mRNA의 microarrays 분석에 의한 항당뇨효능 기전 구명	100
발효 대사체의 항당뇨 약물목표점에 대한 검사 및 후보물질 분석 -항당뇨 후보물질 2종 제시 -구조구명 1건 이상	o인슐린 내성억제에 관련된 protein tyrosine phosphatase 1B (PTP1B) 억제효능 물질 분리 o지방전구세포를 지방 세포주로 분화시킨 뒤 glucose uptake를 측정하는 방법을 이용한 후보물질의 분리 o발효대사체로부터 PTP1B를 저해하는 분획을 확보하고 3종의 화합물을 분리함. o2차년도 연구목표로 주관연구기관으로부터 발효노니의 연구를 제시하여 분획 및 활성검증, 후보물질의 분리 정제	100

<p>발효 대사체의 지방간 및 간 섬유화 저해 물질의 분석 및 기능연구 -간섬유화 억제 후보 물질 2종 제시 -구조구명 1건 이상</p>	<p>o지방간 또는 간 섬유화 저해물질을 분리 및 세포를 이용한 alpha-SMA 발현 저해물질의 분리. o발효물로부터 7종의 화합물을 분리하고 4종의 화합물에 대한 구조해석을 완료 o울금으로부터 diarylheptanoids 계열 4종 화합물의 분리하고 NMR 분석을 통하여 3종의 기지화합물 및 1종의 신규 화합물을 확인함. o1종의 신규화합물은 alpha-SMA를 저해하는 능력이 관찰되었으며 세포내 확인실험 및 동물실험을 진행할 것임.</p>	<p>200</p>
<p>사료첨가 생균제의 산란계 및 육계 대상 평가</p>	<p>o계란의 콜레스테롤 함량, 산란율 평가 o육계의 증체율 및 육질 평가 o한우 사육 start</p>	<p>80</p>

2. 2차년도 연구개발목의 달성도

목 표	연구개발 수행내용	달성도(%)
<p>항당뇨 및 간섬유화 개선 효능 고체발효물 제조공정 구축</p>	<p>○지표물질설정 및 발효시스템 확립을 위한 노니, 울금의 발효기간별 특성 분석 -발효기간에 따른 품온변화 -발효기간에 따른 주요성분함량변화 -발효기간에 따른 glucose 이용율 측정 -발효물의 영양성분 및 유해물질(중금속,미생물)평가</p>	<p>100</p>
<p>고체발효물의 항당뇨 및 간기능 개선 기전 및 임상적 효능 구명</p>	<p>○제2형당뇨모델 KKAY 실험쥐 에 대한 발효노니 식이량별 혈당조절능 및 당뇨 치료효능 평가 -혈당, 당화혈색소, 인슐린 함량 등 -혈청 adiponectin, lipid profile, 인슐린민감도 분석 -시판 개별인정형 제품(바나바주정추출물), 시판의약품(metformin)과의 효능 비교 및 인체적정섭취량 제시</p> <p>○간섬유화 유발 동물모델 실험쥐에 대한 발효미강복합물, 발효울금 및 발효갈근의 식이량별 효능 평가 -간지표 효소활성 분석, 지질 profile 분석, 간조직의 조직병리학적 평가 -시판 개별인정형 제품(헤파셀리아)과 효능 비교 및 인체적정섭취량 제시</p> <p>○고지방-고콜레스테롤 식이로 비알콜성지방간이 유도된 동물모델에 대한 발효미강복합물, 발효울금 및 발효갈근의 효능 평가 -간 및 부고환지방 함량 분석,간지표 효소활성, 지질 profile 분석 -시판 개별인정형 제품과 효능 비교 및 인체적정섭취량 제시</p>	<p>200</p>
<p>간섬유화 억제 관련 발효물의 생체 대사체 평가</p>	<p>○발효미강복합물 및 발효울금 식이 동물 간조직의 대사물 분석</p>	<p>100</p>
<p>간섬유화 억제 관련 발효물의 분자생물학적 기전</p>	<p>○발효미강복합물 및 발효울금을 식이한 동물(CCl4 투여로 간섬유화 유도) 간조직의 mRNA microarrays 분석에 의한 간섬유화 억제 효능 기전 구명</p>	<p>100</p>
<p>고체발효물로부터 항당뇨 후보물질의 분리 및 구조 분석</p>	<p>○발효녹차로부터 지표물질을 확립하기 위하여 8종의 후보물질을 분리하고 구조 확인. (합계 8종 확보) ○노니의 발효전과 발효후의 비교 연구를 통하여 발효후에 특이적으로 증가하는 화합물 3종과 기타 7종의 물질 등을 포함하여 10종의 화합물을 분리하고 3종의 구조 확인 (10종 분리, 3종 구조 구명)</p>	<p>200</p>

<p>고체발효물로부터 지방간/간 섬유화 저해물질 분리</p>	<p>o간 섬유화 저해물질로 울금으로부터 1차년도에 4종을 분리의 2차년도에 9종을 추가로 분리하여 구조를 규명하였으며, 2종은 신규 화합물이었음 (합계 13종 확보)</p> <p>o간 섬유화 저해물질을 갈근으로부터 1차년도에 7종의 물질을 분리하고 4종을 구조 규명. 2차년도에 추가적으로 3종을 확보하고 6종을 구조규명 (합계 10종 확보)</p> <p>o간보호/간경화 저해관련 단일화합물을 이용한 활성기작 연구 및 동물실험 연구를 위하여 갈근, 울금으로부터 2종의 화합물 대량 분리.</p>	<p>200</p>
<p>유효 화합물의 섬유화 억제 효능 및 신호 평가</p>	<p>o정상세포 활성화 지표인 <math>\alpha</math>-SMA 발현에 대한 puerarin 및 demethoxycurcumin의 억제 효능 관찰</p> <p>o정상세포 활성화에 따른 transforming growth factor-<math>\beta</math> (TGF-<math>\beta</math>) 발현에 대한 puerarin 및 demethoxycurcumin의 억제 효능 관찰</p> <p>o섬유화 신호 관련 EMT 매개 인자에 대한 demethoxycurcumin, puerarin의 억제 효능 관찰</p>	<p>100</p>
<p>간 섬유화 동물모델에서 유효 화합물의 섬유화매개인자의 생성 및 활성화 억제능 평가</p>	<p>oDMN에 의한 간섬유화 동물 모델에서 <math>\alpha</math>-SMA와 TGF<math>\beta</math>1의 발현에 미치는 demethoxycurcumin, puerarin의 효능 평가</p>	<p>100</p>
<p>성장촉진용 생균제 효능평가</p>	<p>o육계의 성장촉진을 및 육질평가</p> <p>o돼지의 성장촉진 및 돈육의 육질평가</p> <p>o한우사양실험</p>	<p>100</p>

3. 3차년도 연구개발목의 달성도

목표	연구개발 수행내용	달성도(%)
산업화를 위한 시제품의 지표성분 표준화 및 품질관리기준 확립	<ul style="list-style-type: none"> <li>o시제품의 지표성분 표준화                             <ul style="list-style-type: none"> <li>-생산 lot별 지표성분 분석을 통한 표준화</li> </ul> </li> <li>o시제품의 품질관리기준 확립                             <ul style="list-style-type: none"> <li>- 유해물질규격설정</li> <li>- 제품의 안정성 평가</li> </ul> </li> <li>o홍보전략 및 디자인 설계</li> </ul>	100%
고체발효물의 안전성 평가	<ul style="list-style-type: none"> <li>o세포독성 평가</li> <li>o단회투여독성시험</li> <li>o반복투여독성시험</li> </ul>	100%
인체적용시험	<ul style="list-style-type: none"> <li>oIRB 승인기관(한방산업지원센터)에서의 인체적용시험</li> <li>o발효노니의 항당뇨활성 또는 발효울금의 간기능 개선 인체적용시험</li> </ul>	100%
개별인정신청을 위한 자료준비(CRO 의뢰)	<ul style="list-style-type: none"> <li>o소재의 기원/개발경위/사용현황/원료특성 분석</li> <li>o섭취권거자료 및 섭취량 평가자료 조사/확보</li> <li>o영양평가자료 및 생물학적 유용성 자료 조사 및 확보</li> </ul>	100%
발효노니의 지표 또는 활성물질 구조 분석 지표물질의 최적분석 조건 확립	<ul style="list-style-type: none"> <li>o2차년도에서 노니로부터 분리한 화합물의 구조 결정</li> <li>o노니, 울금 및 갈근의 발효전후 의 활성 및 지표물질 선정을 통한 최적 분석조건 제공</li> </ul>	100%
후보물질의 항당뇨, 간기능 개선기능의 기전연구	<ul style="list-style-type: none"> <li>o갈근의 지표 또는 활성물질을 이용한 간경화 및 간 섬유화 저해기전 연구</li> <li>o울금의 지표 또는 활성물질을 이용한 간경화 및 간 섬유화 저해기전 연구</li> <li>o노니의 지표 또는 활성물질을 이용한 항당뇨 및 당뇨 기전 연구</li> <li>o울금, 갈근 및 노니의 물질을 이용한 기전 연구 후 논문 및 특허작성 지원</li> </ul>	100%
후보물질의 유효성 평가	<ul style="list-style-type: none"> <li>o울금의 지표물질이나 후보물질을 이용하여 동물실험 및 효과 간이 검증</li> <li>o갈근의 지표물질이나 후보물질을 이용하여 동물실험 및 효과 간이 검증</li> </ul>	100%
한우 사양실험 및 육질 분석	<ul style="list-style-type: none"> <li>o한우 비육사료 주문생산 및 생균제 5% 혼합 및 한우 5개월령 대상 실험사육</li> <li>o1개월 단위로 증체율 측정</li> </ul>	100%



4. 최종목표달성도

구분	연도	세부연구목표	가중치		평가의 착안점 및 기준	달성도(%)
				%		
1차 년도	2010	항당뇨 또는 간기능 개선 기전 구명 및 전임상시험	60	%	○고체발효공정 확립 ○분자생물학적 기전 및 metabolites 분석 ○전임상시험 유무 ○항당뇨, 간기능개선용 시작품 여부	100%
		항당뇨 및 간기능개선 효능물질 분리/정제	20	%	○효능물질 확인 여부	100%
		닭 및 소의 사육 및 닭고기, 계란의 품질평가	20	%	○닭 사료첨가제 평가 여부	100%
2차 년도	2011	항당뇨 또는 간기능 개선 기전구명 및 전임상시험	60	%	○바이오마커 분석 ○발효대사물의 간섬유화 억제기전구명 ○발효노니와 추출물의 식이량별 질환모델동물 평가	100%
		항당뇨 및 간기능개선 효능물질 분리/정제	20	%	○효능물질 정제 여부 ○분리물질의 인간정상세포 및 간 섬유화 마우스에서의 유효성 및 기전 평가 여부	100%
		돼지 사육 및 육질평가	20	%	○생균제의 돼지 증체율 및 육질 관련 평가	100%
3차 년도	2012	산업화 공정 확립	10	%	○항당뇨, 간기능개선 시작품제작	100%
		발효물의 안전성 및 인체적용시험	25	%	○독성평가 및 인체적용시험 수행 여부	100%
		선도물질 구조 분석	25	%	○물질 구조 결정	100%
		개별인정형 건강기능식품 추진	20	%	○등록 추진여부	100%
		한우 사육 및 증체율 평가	20	%	○생균제의 한우 증체율 관련 평가	100%
최종 평가	2013	항당뇨 및 간기능개선 기전구명	60	%	○항당뇨, 간기능개선용 식품 및 건강기능성 소재 등록 추진 여부	100%
		효능물질의 구명	15	%	○의약품 소재 제시 여부	100%
		안전 사료첨가제 및 안전축산물생산기술	15	%	○제품화 여부	100%

## 제 2 절 관련분야의 기술발전예의 기여도

### 1. 당뇨 및 간질환 예방/치료 효능 건강기능식품 및 의약품의 산업화 연구

- 대사성 증후군 유병률의 증가와 이로 인한 관련 질환 치료제 시장의 지속적인 성장에도 불구하고, 직접적인 작용점을 가진 약물의 부재로, 대사성 증후군을 치료할 수 있는 신규 건강기능식품 및 신약 개발의 필요성이 어느 때보다 절실히 요구되고 있으며, 간 섬유화의 경우, 현재 치료제가 없는 시장 상황을 고려 시 개발 제품의 가치는 매우 크다고 할 수 있음. 본 과제에서는 생물전환기술인 고체발효시스템을 이용하여 제조한 고체발효물과 그 원료 식물에 대한 당뇨 및 간질환 개선 활성을 밝혔으며, 그 활성물질을 분리하였음. 특히 발효 진행과정의 조절을 통해 천연소재의 기능성을 증진시켰다는 점에서 향후 관련 분야에 응용성이 매우 큼
- 본 사업단의 대상 원료인 노니, 녹차, 울금, 갈근, 미강과 각 원료의 발효물로부터 항당뇨 및 간기능 개선활성 후보물질을 분리하고 그들의 구조를 규명하는 과정을 통해 37종의 화합물과 8종의 신규화합물을 확인하였음. 이러한 다양한 화합물 정보는 고체발효시스템의 품질관리에 적용할 수 있는데, 발효기간별 화합물의 함량변화를 바탕으로 기능이 최적화되는 시점을 확립함으로써 최종 제품의 균질화를 이룰 수 있음. 또한 각 원료의 기능성 및 안전성을 추정하여 목적에 알맞은 제품개발에 활용할 수 있음. 일례로 본 연구과제 진행 중 발효녹차가 항당뇨 활성은 있으나 심장 등에 부작용을 일으킬 수 있는 카페인 다량 함유되었음을 확인하여 참여업체에 발효녹차의 부작용에 대한 정보를 제시하여 제품 개발 방향을 선회한 바 있음.
- 고체발효물을 대상으로 한 PTP1B, TGF-beta, alpha-SMA 저해물질 및 AMPK 활성화물질 개발은 현재 제약 및 보건의약산업의 신의약 제품 개발 시 필수적으로 이룩해야 하는 새로운 의약활성을 갖는 선도화합물 확보와 관련되어 있음. 건강기능식품 및 제약산업에서 새로운 제품 개발은 질병의 원인과 발병기작에 근거하여 목표기작을 설정한 후 선도물질의 탐색에서 시작되어야 함. 이와 같은 관점에서 질병의 많은 종류에 적용할 수 있는 목표기작으로 PTP1B, TGF-beta, alpha-SMA 및 AMPK를 설정할 수 있는데, 이를 조절할 수 있는 화합물을 자연계로부터 개발하고 발효를 통해 증진시키는 기술은 식품 및 의약품 전 분야에서 신규 제품 개발을 위한 공통 기반적 기술 확립에 기여할 수 있음
- 본 연구를 통해 노니, 녹차로부터 항당뇨 활성이 있는 발효물을 제조하고 활성물질을 분리하는 과정 중, 천연소재로부터 항당뇨활성을 검증할 수 있는 실험계(PTP1B 저해활성, AMPK 활성화, 2NBDG uptake 촉진 활성 측정 시스템, KKAY 마우스를 활용한 제2형 당뇨모델실험)를 구축하였음. 또한 미강, 울금, 갈근으로부터 간기능 개선활성이 있는 발효물을 제조하고 발효물과 원료물질로 부터 활성물질을 분리하는 과정 중에 이들 기능성을 평가할 수 있는 다양한 실험계( $\alpha$ -SMA와 TGF- $\beta$ 1 발현량)를 구축하였음. 이러한 다양한 실험계는 향후 식품을 비롯한 다양한 천연물로부터 항당뇨 활성소재 및 간기능 개선 활성 소재를 개발하는데 활용 가능하며 이는 기능성 소재 및 제품의 개발기간 단축에 기여할 것임
- 현재 다수의 국내외 제약사들이 대사성 증후군 및 간 질환 치료제의 개발에 매진하고 있으나, 타겟의 다양성 및 불명확성, 부작용 등의 문제로 신약개발 초기단계, 혹은 전임상/임상 단계에서 개발을 포기하는 등 많은 어려움을 겪고 있음. 본 과제에서 제안하는 AMPK 및

PTPIB 표적 물질들은 혈당조절과 함께 비만증을 함께 조절하는 약물의 개발로 이어질 수 있으므로 혁신적인 치료제를 개발할 수 있다는 점에서 연관효과가 크다고 할 수 있음.

- 울금의 curcumin은 항암, 대사성질환, 항염, 간 질환 등 다양한 효과가 연구되었으나, 본 연구에서 발굴한 신규 curcumin과 demethoxycurcumin은 현재 간 질환에 대한 연구가 거의 없으므로 신규제품 개발의 기초연구로서 가치가 크다고 할 수 있음. 갈근의 경우 민간의학 및 한방에서 이미 오래전부터 간 질환에 효능이 있다고 알려진 약재로서 본 연구에서 제시한 간 섬유화 억제능 및 발효물질의 유용성은 미래 천연물신약 및 건강 기능성 식품 개발에 유용한 자료로서 활용될 수 있을 것임

## 2. 고품질 안전 축산물 생산용 발효생균제 개발

- 2011년 7월부터 가축사료에 항생제 사용이 전면 금지됨에 따라 현재 대부분의 축산농가에서는 가축의 증체량 및 건강관리를 위해 생균제를 사료에 혼합하여 사용하고 있으나, 기존에 판매되고 있는 생균제의 효과에 대한 결론은 아직까지 미지수 임. 특히 시판중인 생균제는 열에 약하기 때문에 쉽게 변질되고 잡균 오염 가능성이 매우 높은 문제점이 있음. 본 사업단에서 고체발효기술은 활용하여 개발한 생균제는 90℃ 이상의 고온에서 내열성을 가지는 균주로 구성되어 기존 생균제의 문제점을 해결할 수 있으며, 증체량에 있어서 확실한 효과를 보이는 것을 확인하였음. 따라서 본 연구사업단에서 개발한 생균제를 축산농가에 보급한다면 사료비 절감과 가축사육기간 단축을 기대할 수 있으므로 고품질 안전 축산물 생산에 크게 기여 할 것으로 생각됨
- 또한 NGS 기술을 기반으로 개발 생균제의 미생물학적 분포 및 이들 미생물이 가축의 장내에서 어떠한 작용을 하는지, 사료효율 및 증체량과 어떠한 상관관계를 가지는지에 대한 연구를 수행함으로써 한우성장촉진 활성이 있는 생균제의 과학적 근거를 제시하고 원인을 구명함

## 제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

### 제 1절 연구개발 성과

#### 1. 연차별 연구성과 목표 및 달성 현황

- 연구수행기간 중 달성한 연구목표는 아래 표와 같음. 지적재산권의 경우 특허출원과 등록 항목 모두 3차년도까지 달성해 하는 목표를 초과달성하였으나, 논문의 경우 비SCI만 100% 달성하였음. SCI 논문 달성율은 현재까지 56% 수준이나 현재 심사 및 투고 중인 논문까지 고려하면 100% 달성 가능할 것으로 예상됨

표 5-1-1. 연차별 연구성과 목표 및 달성 현황

구분		특허		논문		기타
		출원	등록	SCI	비SCI	
1차 년도	목표	1		2		
	성과	2		3		
2차 년도	목표	3		3	1	
	성과	4	2	0	0	
3차 년도	목표	2	2	4	1	
	성과	1(2)*	1	2(3)**	2	
계	목표	6	2	9	2	
	성과	7(2)	4(4)**	5(4)	2	
	달성도(%)	116%(130%)	200%(400%)	56%(100%)	100%	

\* 명세서 작성중. \*\* 투고1건, 심사1건 \*\*\* 출원 후 등록을 위한 심사 중인 건

#### 가. 논문게재 성과

게재 연도	논문명	저자			학술지명	Vol.	국내 외 구분	SCI 구분
		주저자	교신 저자	공동저자				
2014. 2 게재 예정	Protective effects of fermented rice bran against carbon tetrachloride induced hepatotoxicity in mice	박소림	임성일	이소영 이성훈 남영도	Food Science and Biotechnology	2014.2	국내	SCIE
2013. 08	Anti-diabetic effect of green tea fermented by cheonggukjang in KKAY diabetic mice	이소영	임성일	박소림 이성훈 남영도	한국식품과학회	2013.08	국내	비SCI

2013	AMPK activators from natural products: a patent review	Uddin MN	오원근	Sharma G 최홍석 임성일	Natural Product Sciences	19(1)	국내	비SCI
2012	Antidiabetic effect of <i>M. citrifolia</i> fermented by cheonggukjan in KKAY diabetic mice	이소영	임성일	박소림 이성훈 남영도	Evidence-based complementary & alternative medicine	2012	국외	SCI
2011	Effect of rice bran and soybean fermented by <i>Bacillus</i> spp. on lipid profiles of liver, serum, and feces in rats fed high fat diet	임성일	이부용	성기승 송선미 황진택	J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem	54(2)	국내	SCIE
2011	Chalcones as novel influenza A (H1N1) neuraminidase inhibitors from <i>Glycyrrhiza inflata</i>	Dao TT	오원근	Nguyen PH, 이홍식, 김은희 박준수, 임성일	Bioorganic & Medical Chemistry Letters	21(1)	국외	SCI
2010	Antioxidant activity and ginsenoside pattern of fermented white ginseng	임성일	김영찬	조장원 최웅규	J. Ginseng Res.	34(3)	국내	SCIE
2013	Protein tyrosine phosphatase 1B (PTP1B) inhibitors from <i>Morinda citrifolia</i> (Noni) and their insulin mimetic activity	Nguyen PH	오원근	양준리, Uddin MN, 박소림, 임성일, 정다운 Williams DR	J. Nat. Prods.	심사중	국외	SCI
2013	Curcumin derivatives from the <i>Curcuma longa</i> L. with the inhibitory activity on liver fibrosis	Dao TT	오원근	강건욱 양준리 박소림 임성일	Food Chemistry	투고 예정	국외	SCI
2013	Protective effects of fermented curcuma longa against carbon tetrachloride induced hepatotoxicity in mice	박소림	임성일	이소영 이성훈 남영도	J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem	투고 예정	국내	SCIE

나. 학술발표

발표연도	발표제목	학회명	발표자
2011	Anti-diabetic Effects of Fermented Green Tee	식품과학회	이소영, 박소림 이성훈, 남영도 송선미, 임성일
2011	Protective Effects of Fermented Rice Bran agai-nst Carbon Tetrachloride Induced Hepatotoxicity in Mice	식품과학회	박소리, 이소영 이성훈, 남영도 송선미, 임성일
2011	Anti-diabetic Effects of Fermented <i>Morinda citrifolia</i>	식품과학회	이소영, 박소림 이성훈, 황진택 남영도, 송선미, 임성일
2011	Protective Effects of Fermented Curcuma against Carbon Tetrachloride Induced Hepatotoxicity in Mice	식품과학회	박소림, 이소영 남영도, 이성훈 송선미, 임성일
2011	Functional Property of Solid-state Fermentation by Rice Bran	식품과학회	박소림, 이소영 남영도, 이성훈 송선미, 임성일
2011	Anti-diabetic Effects of Fermented <i>Morinda citrifolia</i> by Microarray and Metabolite Analysis Using KKAY Mouse	식품영양과학회	이소영, 박소림 이성훈, 남영도 임성일
2011	Anti-diabetic Effects of Fermented Green Tea by Microarray and Metabolite Analysis Using KKAY Mouse	식품영양과학회	박소림 이소영 남영도, 이성훈 임성일
2012	Anti-diabetic activity of fermented <i>Morinda citrifolia</i> Ethanol extract	미생물생명공학회	이소영, 박소림 남영도, 이성훈 임성일
2012	Protective effects of Fermented <i>P.lobata</i> Against Carbon Tetrachloride-induced hepatotoxicity in mice	미생물생명공학회	박소림 이소영 남영도, 이성훈 임성일
2012	Effect of Fermented <i>Curcuma longa</i> on Improvement of Lipid Metabolism in Rats Fed a High Fat/High Cholesterol Diet	미생물생명공학회	이소영, 박소림 이성훈, 남영도 임성일

다. 특허출원

출원된 특허의 경우				
출원연도	특허명	출원인	출원국	출원번호
2011	노니 발효물을 유효성분으로 하는 항당뇨 발효식품 및 이의 제조방법	식품연	대한민국	10-2011-0050785
2011	미강발효물을 유효성분으로 하는 간 보호 발효식품 및 이의 제조방법	식품연	대한민국	10-2011-0050779
2011	녹차 발효물을 유효성분으로 하는 항당뇨 발효식품 및 이의 제조방법	식품연	대한민국	10-2011-0102632
2011	울금발효물을 유효성분으로 하는 간 보호 발효식품 및 이의 제조방법	식품연	대한민국	10-2011-0106924
2012	울금발효물을 유효성분으로 하는 비알콜성 지방간 개선 발효식품 및 이의 제조방법	식품연	대한민국	10-2012-0066803
2012	미강 발효물을 유효성분으로 함유하는 비알콜성 지방간 예방 및 치료용 조성물	식품연	대한민국	10-2012-0066800
2012	청국장 발효 울금 추출물 또는 이로부터 분리된 커큐미노이드 유도체를 함유하는 간질환의 예방 또는 치료용 조성물	식품연/ 조선대	대한민국	10-2012-0085262
2012	발효갈근으로부터 간경화 또는 간섬유화의 치료 및 예방용 조성물	식품연/ 서울대	대한민국	명세서 작성중
2012	발효노니로부터 당뇨병의 치료 및 예방용 조성물	식품연/ 서울대	대한민국	명세서 작성중

라. 특허등록

등록된 특허의 경우				
등록연도	특허명	등록인	등록국	등록번호
2013. 06.28	노니 발효물을 유효성분으로 하는 항당뇨 발효식품 및 이의 제조방법	한국식품연구원	대한민국	10-1282055
2013. 08.29	녹차 발효물을 유효성분으로 하는 항당뇨 발효 식품 및 이의 제조방법	한국식품연구원	대한민국	10-130553
2011. 08.01	쿠딩차 추출물로부터 항산화 활성을 갖는 페놀릭 화합물 및 이를 유효성분으로 포함하는 기능성 식품	오원근, 배기환, 텡퐁티엔, 누엔두이 투완	대한민국	10-1054943
2011. 08.30	감잎으로부터 얻은 에이엠피케이를 활성화 시키는 트리터페노이드계 화합물 및 이를 유효성분으로 포함하는 비만 또는 당뇨의 예방과 치료용 조성물	오원근, 텡퐁티엔, 누엔두이 투완, 김정기, 김완기, 이상준	대한민국	10-1062174

## 2. 연구결과 활용목표 및 달성현황

- 연구결과를 바탕으로 기타가공식품 2건의 상품화 하였으며, 이 중에서 1건은 개별인정형 건강기능식품으로 등록하기 위해 신청서작성을 완료하였고 한우성장촉진용 생균제 1건은 상품화를 앞두고 있음. 이들 제품에 대해서 약 20건의 언론홍보를 진행하는 등 상품화와 언론홍보목표를 초과 달성함. 또한 상품화한 제품은 참여업체인 건농네이처에 기술이전 할 계획에 있으며, 연구사업을 진행하는 동안 참여업체에 고체발효시스템과 관련한 교육지도 2건을 실시하는 등 연구결과를 대내외적으로 활용하였음. 기술이전은 건농네이처가 새로운 법인을 설립할 계획에 있어 법인설립이 완료되는 2013년 말에 이전할 계획에 있음.
- 한우 생육촉진 생균제 개발 기술은 '13.08.20 농식품부 기자브리핑이 예정되어 있어 개발기술을 적극 홍보하과 함

표 5-1-2. 연구결과 활용목표 및 달성현황

구분	기술실시(이전)	상품화	정책자료	교육지도	언론홍보
활용건수	1	1	1	2	1
성과	2건 '13년 내 예정	2(1)		2	20
달성도	0%	200%	0%	100%	1000%



그림 5-1-1. 본 사업단과제를 통해 상품화된 제품 2종

## 3. 인력활용/양성 성과

- 본 사업단에 참여하고 있는 연구원들이 지도하고 있는 석, 박사과정 학생들의 논문연구 상당부분이 사업단 연구과제 프로그램과 연계하여 수행되면서 박사과정 1명, 석사과정 2명의 전문인력을 양성하였음.
- 본 사업단의 연구과제는 산업체와 밀접하게 연계되어 수행되었으며, 연구 경험이 풍부하고 활발한 연구를 수행하는 연구자와 현장 산업 경험이 풍부한 인사를 초빙하여 심도 깊은 세미나, 심포지움 및 워크샵 등의 학술교류를 통해 산업체 기술인력이 전문가와 접촉할 수 있



는 기회를 제공하였음.

표 5-1-3. 인력활용/양성 성과

지원 총인원	지원 대상 (학위별, 취득자)				성별		지역별		
	박사	석사	학사	기타	남	여	수도권	대전	기타지역
3	1	2			3				광주

4. 언론홍보

- 본 사업단의 연구를 추진하며 얻은 연구결과물은 학술발표, 논문 혹은 특허발표가 완료되는 대로 언론에 홍보하여 향후 산업적 활용이 용이하도록 하였음. 현재까지 약 20건의 언론 홍보를 진행하였음

표 5-1-4. 사업단 관련 언론 홍보

날짜	제목	언론지명
2013.05	식품연구, 노니·울금이 당뇨·지방간 개선 효과	중앙일보경제
2013.05	"발효노니·울금, 당뇨·지방간 억제에 효과"	연합뉴스
2013.05	발효노니·울금, 당뇨·지방간 억제에 효과	매일경제
2013.05	부작용 없는 노니·울금 발효식품으로 당뇨·지방간 잡는다	한국경제
2013.05	부작용 없는 노니·울금 발효식품으로 당뇨·지방간 잡는다	서울신문
2013.05	부작용 없는 노니, 울금 발효식품으로 당뇨, 지방간 잡는다	뉴스와이어
2013.05	식품연구, 노니·울금이 당뇨·지방간 개선 효과	뉴시스
2013.05	발효식품 으로 당뇨, 지방간 잡는다	동아 사이언스
2013.05	노니 울금 당뇨 예방효과	디지털타임즈
2013.05	식품연구 '노니·울금, 당뇨·지방간 개선 효과	디지털보사
2013.05	노니·울금 발효식품으로 당뇨·지방간 잡는다	식품음료신문
2013.05	발효시킨 노니·울금, 혈당 상승 억제 간기능 개선	식품저널뉴스
2013.05	식품연구, "발효 노니·울금, 당뇨·지방간 억제에 효과"	아시아투데이
2013.05	식품연구, 노니·울금이 당뇨·지방간 개선	파이낸셜뉴스
2013.05	식품연구, 노니·울금이 당뇨·지방간 개선 효과	Daum금융
2013.05	'노니·울금' 당뇨 간기능 개선 효과	YTN
2011.11	"노니" 제2형 당뇨 개선 길 열려	보건뉴스
2011.08	<미래의 농어촌> 식품이 곧 미래	아주경제
2011.07	항당뇨 및 간기능 개선 관련 고체발효기술 관련 연구	한국경제 TV
2011.05	천연 미생물의 놀라운 효능 "체내정화"	보건뉴스

## 제 2 절 연구성과 활용 계획

### 1. 특허, 논문 등 지식재산권 활용 계획

- 본 연구사업을 통하여 기능성이 뛰어난 고체발효물을 생산하는 기술을 확립하고 2종의 시제품을 제작하는 동안 국내외 우수 저널에 7편(SIC 5편, 비SCI 2편)의 논문을 보고하였으며, 특허등록 3건, 특허출원 7건을 통해 당뇨/간기능 개선용 건강기능식품 및 의약품 개발에 활용할 수 있는 원천기술 확보하였음. 이는 향후 기술료 획득과 건강기능식품 및 의약품 수출산업에 활용할 수 있을 것으로 생각되며, 특허의 해외 licensing out 은 제약시장에서의 수입대체 및 수출효과를 가질 수 있을 것으로 기대됨.
- 본 사업단과 참여업체에서 공동개발한 발효노니는 당뇨 예방효과가 충분하며, 발효울금 간기능 개선 활성이 뛰어나. 특히, 이들 제품은 시판건강기능식품에 비해 높거나 유사한 수준의 활성을 보유하고 있으므로 제품화가 가능한 수준임. 현재 개별인정형 건강기능식품시장은 다양한 원료들이 출시되어 있으나 시장을 선도해 가는 눈에 띄는 제품이 없으므로 본 개발제품의 우수성을 뒷받침할 수 있는 자료로 SCI 논문 연구성과와 특허등을 활용하여 홈쇼핑 등의 방송매체에서 공격적 마케팅을 진행한다면 시장에서 빠르게 점유율을 확보할 수 있을 것임.
- 또한 본 사업단에서는 고체발효물과 그 원료로부터 항당뇨 및 간기능 개선활성을 유도하는 원인물질을 37종 분리/정제하였으며, 활성이 높은 노니, 울금 및 갈근 유래 물질들은 용도특허를 출원/등록하였음. 이 결과를 활용하면 다음과 같이 원료농산물의 다양한 분야로의 활용이 가능할 것을 생각됨.

농업분야	식용농업식물의 기능성 작물로의 전환에 따른 고부가가치화
식품분야	항당뇨 예방용 식품첨가물로 활용이 가능함
건강 기능성식품분야	당뇨 등 대사증후군 예방·치료를 위한 건강기능식품 제공
의약분야	당뇨 등 대사증후군 치료를 위한 의약품 개발에 활용 물질특허에 의한 기술료 획득 및 의약품 수출산업에 활용 국내 의약품 제조기술 향상에 활용

- 결과적으로 확보하고 있는 연구성과들을 업체에 제공하여 고체발효시스템을 기반으로 생산한 고체발효물의 개별인정형 건강기능식품 등록을 추진하고, 가축 생육촉진용 생균제의 조기산업화가 촉진될 수 있도록 활용함.

### 2. 교육·지도·홍보 등 기술 확산 계획

- 본 연구의 핵심기술인 고체발효시스템을 통하여 개발한 발효생균제 제조 및 사용 기술은 농업의 미래성장동력인 지속가능하고 친환경적인 농업정책 수립에 활용
- 또한 고체발효물의 기능성을 구명하기 위해 구축한 시스템은 대사성 증후군 및 간 섬유화 치료용 신약 개발을 위한 국내 농산물 활용 연구의 가이드라인으로 활용 가능하며, 국내 대사성 증후군 연구 인프라의 확대에 활용
- 본 사업단은 현장 실증시험 및 기술교육을 통해 농가에 정보제공, 인력교류 등을 적극 지원하고 사업이 종료된 후에도 한국식품연구원의 생명과학 연구인력과 참여업체인 (주)건농네이처 그리고 축산농가 및 대학의 관련기술 인력을 유기적으로 연결하여 산·학·연간의

원활한 연구수행과 산업화를 위한 매개체로서의 역할을 담당하고자 함. 특히 본 연구를 통해 생산된 제품군의 산업화가 조기에 이루어 질 수 있도록 참여업체와 지속적으로 교류하고자 함.

### 3. 추가연구, 타연구에 활용 계획 등

- 갈근 발효 후 원래 성분에 비하여 현저히 양이 증가된 5종 화합물들에 대한 alpha-SMA 발현 억제 실험 결과, 기대와는 달리 효력이 약하게 나온 바 있음. 현재, 이들 중 억제 효과가 일부 관찰된 CPP286 및 CPP825에 대한 보강실험을 수행 중에 있으며, 발효갈근의 우수성 입증 자료가 될 연구결과를 기대하고 있음.
- 항당뇨 활성이 뛰어나지만, 건강기능식품 등록 가능성이 간기능 개선과 관련된 울금보다는 낮다고 판단되어 인체 적용시험을 진행하지 못하였던 발효노니에 대한 인체적용시험이 필요하다고 생각되며 이는 발효노니 제품의 기술이전 대상인 참여업체와 함께 추가로 연구를 수행할 계획에 있음.
- 발효생균제의 가치에 대한 성장촉진활성은 검증되었으므로 수산양식과 농산물의 생육촉진 및 품질에 미치는 영향도 평가하여 발효생균제의 사용범위를 확대함으로써 고품질 친환경 농축수산물 생산 기술 개발에 활용함. 이를 통해 수입 농축수산물과 차별화되고 비교 우위에 설 수 있는 제품을 소비자에게 제공하고자 함.

## 제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

### 제 1 절 해외 건강기능식품개발 현황

- 건강기능식품에 대한 정의는 국가별로 용어와 범위에서 규정에 따른 차이를 보이기는 하나 supplements를 주요 용어로 사용하고 있음.

표 6-1-1. 국가별 건강기능식품에 대한 용어와 범위

국가	용어	범위
한국	건강기능식품	기준고시형, 개별인정형
USA	Dietary supplements	Vitamins, Mineral, Herb/botanicals, amino acid, concentrate, metabolite, constituent, extract
EU	Food supplements	Concentrated sources of nutrients other substances with a nutritional or physiological effect
Canada	Natural Health Products	Vitamins, Mineral, Herbal remedies, Homeopathic medicines
Russia	Biologically active food supplements	Nutriceuticals, para-pharmaceuticals
Australia	Complementary medicines	Herbal medicines, Vitamins and minerals, Nutritional supplements
Japan	Foods for specific health use	Functional foods are foods that can have three functions: Nutrition, sensory satisfaction, physiological improvements

- 세계적인 웰빙 트렌드의 확산과 고령화의 영향으로 건강기능식품이 포함된 Nutrition industry의 시장규모는 최근 5년간 연평균 6% 수준의 고성장세를 지속하고 있음. DataMonitor의 자료에서 글로벌 식품산업의 최근 5년간 연평균 성장률이 3.7%임을 감안할 때, 건강기능식품 시장의 성장세는 상당히 높은 것임. 이러한 건강기능식품의 높은 성장세는 '건강 지향적 소비자'의 증가에 따라 지속될 것으로 예상되는데, DataMonitor의 조사에 따르면 소비자의 약 60%는 평소에 건강에 대한 관심이 매우 높았으며, 미국의 Food marketing institute의 조사에서는 소비자의 65%가 음식 섭취를 통해 건강 상태를 조절하는 특성이 있는 것으로 나타남.

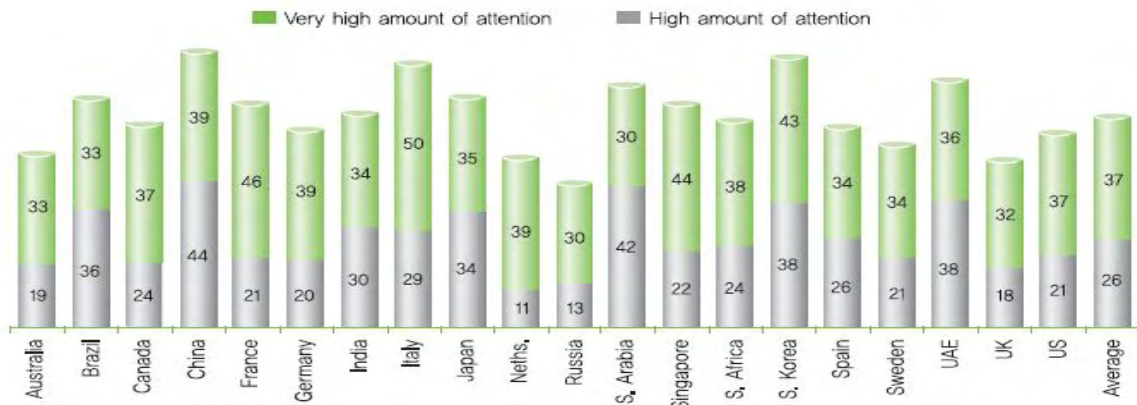


그림 6-1-1. 국가별 건강에 대한 소비자의 관심정도

- 2011년 세계 건강기능식품 시장규모는 89십억달러이며, 향후 2016년에는 120십억달러를 상회할 것으로 예상되는데, 연평균 7%의 성장을 지속할 것으로 예측됨. 이는 일반식품이나 제약시장의 성장률 4%의 두 배에 가까운 성장임. 지속적인 성장은 노령화 인구의 증가와 의료비 지출 상승, 그리고 기능식품의 효능 입증과 관련된 학술적 진보, 해양기업의 혁신적 노력의 결과로 판단됨.

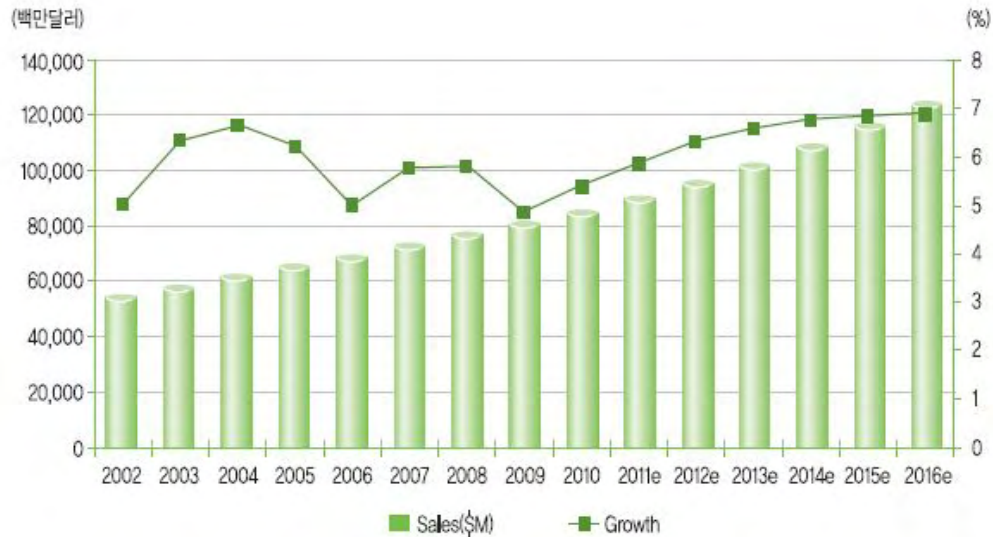


그림6-1-2. 건강기능식품 세계시장 규모 및 성장률 (Nutrition Business journal estimates)

- 특히, 개발도상국에서의 성장률이 향후 2016년까지 약 12%의 수준을 유지할 것으로 예상된 반면 선진국들은 약 3%의 낮은 성장률을 유지할 것으로 예상되어, 향후 세계 건강기능식품 시장은 이들 개발도상국에 의해 주도될 것으로 판단됨.
- 이러한 개발도상국과 선진국간의 성장률 차이는 건강기능식품의 수요가 인구 구조나 소득의 요인에 많은 영향을 받는 특성에 기인한 것이며, GDP의 성장률이 상대적으로 높고 고령화가 진행되고 있는 개발도상국의 추세가 반영된 것임.
- 국가/지역별 2011년 매출액을 살펴보면 미국이 29,242 백만 달러로 전년 대비 4.2% 성장하며 세계시장에서 가장 큰 건강기능식품 시장을 차지하고 있으며, 2위는 서유럽이 15,657백만달러로 나타남.
- 아시아 시장을 살펴보면 중국이 10,639백만달러로 가장 큰 시장을 나타내고 있으며, 전년대비(2010년, 9,540백만달러) 성장률은 11.5%로 급속한 성장세를 나타내고 있음. 한국시장은 세계시장에서 1.4%의 비중을 차지하였지만, 전년 대비 성장률은 28.2%로 매우 높게 나타남.

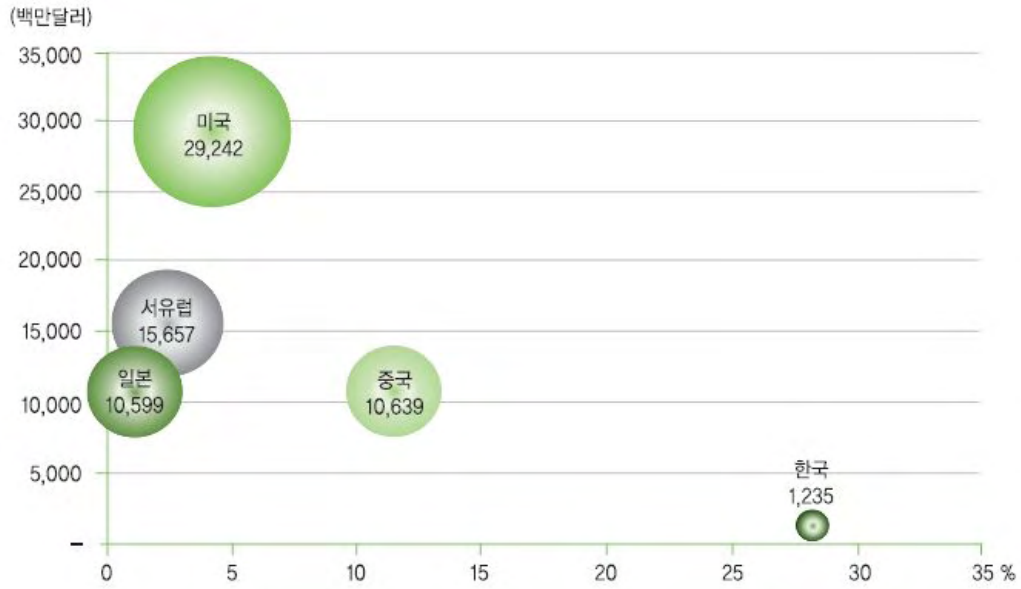


그림6-1-3 국가/지역별 건강기능식품 시장규모 및 성장률(2011)

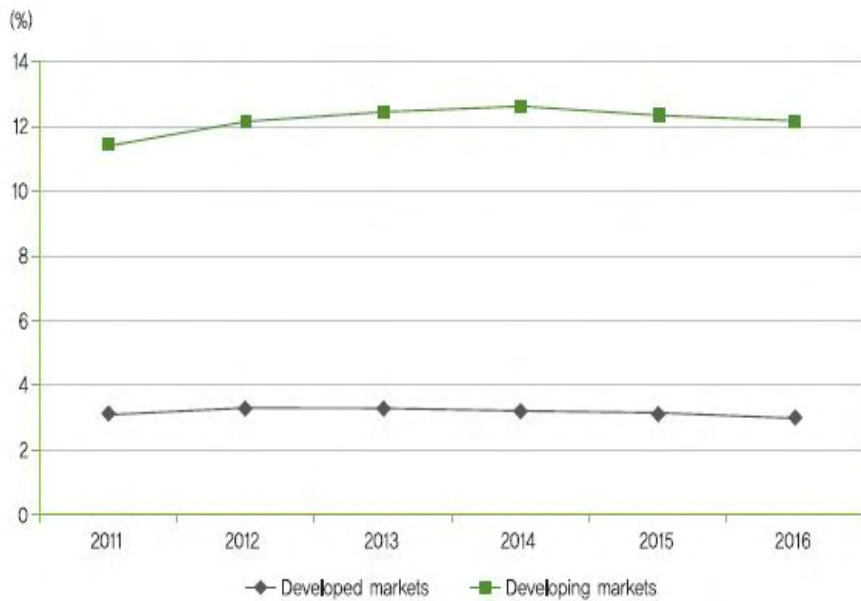


그림6-1-4. 건강기능식품 시장규모 성장률 추세(NBJ'S Global supplement & Nutrition Industry report', Nutrition Business journal(2012))

- 건강기능식품의 대표상품으로는 이미 소비자들에게 깊게 인식된 Vitamins & Mineral의 2011년 시장규모는 36십억달러이며 전년대비 5.3%의 성장률을 기록함

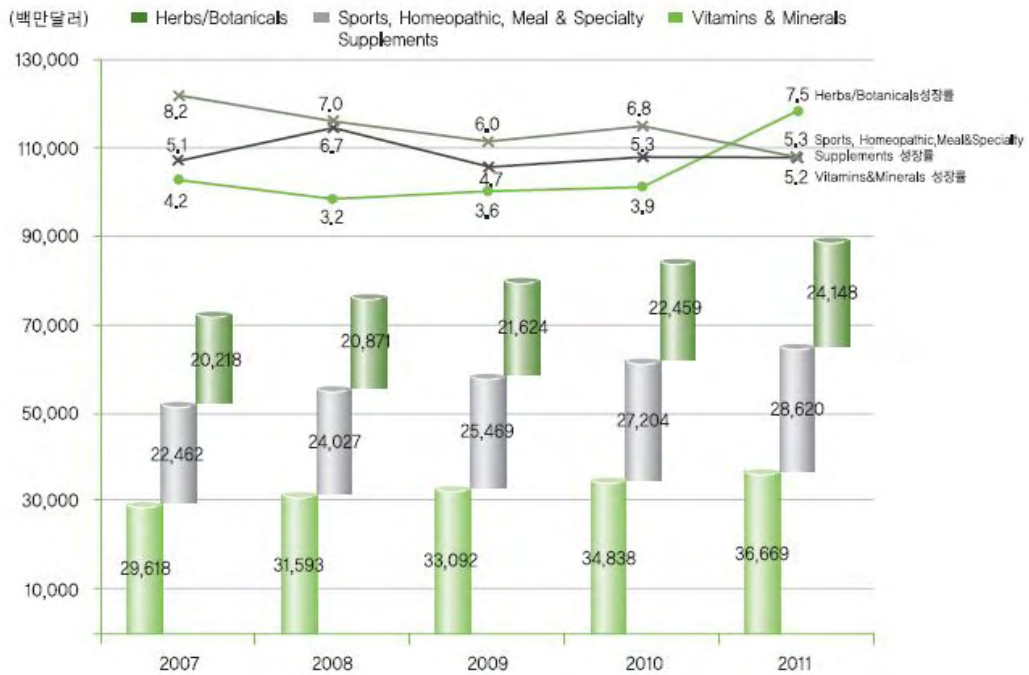


그림6-1-5. 건강기능식품 품목별 시장현황

- 또한 최근 건강에 대한 소비들의 관심이 체중 조절과 체력 향상을 돕는 Performance enhancers, Muscle builders, Weight gainers 등 건강 증진용 제품의 판매확대로 연결되면서 sports nutrition 시장의 최근 5년간 연평균 성장률이 가장 높은 6.2%를 기록함.



그림6-1-6. 해외 sports nutrition 제품 예시

## 제 2 절 PTP1B와 AMPK를 이용한 항당뇨 관련 연구 정보

- 세포의 신호전달조절기작의 관점에서 보면 비정상적인 신호전달이 다양한 질병을 야기하게 되므로 이들 질병의 발현에 관여하는 신호전달과정을 차단하면 각각의 특이적인 질병의 치료가 가능하다고 입증되고 있음. 이 중에서도 신호전달에 관련된 수용체, 효소나 결합 단백질들의 활성화에 관여하는 단백질의 인산화가 중요한 치료약물의 개발 타겟으로 인식되어 이들의 개발이 현재 활발히 진행되고 있음. 세포증식에 관련된 신호전달과정의 효소인 growth factor receptor protein tyrosine kinase (GR-PTK), 발암유전자 유래 PTK, protein kinase C (PKC), c-AMP dependent protein kinase (PKA), MAPK cascade kinase들, cell division cycle dependent protein kinase (CDC kinase)들의 기능을 선택적으로 저해하는 물질들을 개발하고자 하는 노력이 시도되고 있음.
- 선진제약회사의 경우 genomics 와 proteomics의 기술을 이용하여 확인된 중요 작용기전에 대한 기전별 연구를 진행시키고 있으며 특히 PTP-1B knock out mouse의 실험결과는 PTP-1B가 2형 당뇨병 치료제 개발을 위한 좋은 타겟임을 제시하고 있음. 현재까지의 연구 결과를 살펴볼 때 PTP1B 효소는 인슐린 신호조절과정에서 음성조절자로 판단되며, 렙틴 신호조절과정에서도 동일하게 관여하는 것으로 알려져 있음. 이러한 결과는 PTP1B knock-out mice와 PTP1B 효소가 부족한 leptin-deficient (*Lep<sup>ob/ob</sup>*) mice 연구를 통하여 확인되었음. PTP1B 효소 knock-out mice는 혈중의 인슐린, 포도당 및 중성지방 (triglyceride)이 낮았으며, 인슐린 주입후 간과 근육에서 증가된 인슐린 수용체 (IR)의 인산화를 보여 주었으며, 궁극적으로 증가된 인슐린 감수성을 보여주었음. PTP1B 효소 knock-out mice와 leptin-deficient mice의 교배는 체중감소, 감소된 지방조직 및 증가된 대사속도의 특징을 보여 주었음. 이러한 결과는 PTP1B 효소의 저해가 인슐린과 렙틴 내성을 치료하는 획기적인 약물 목표점으로의 관심을 증대시켰음.

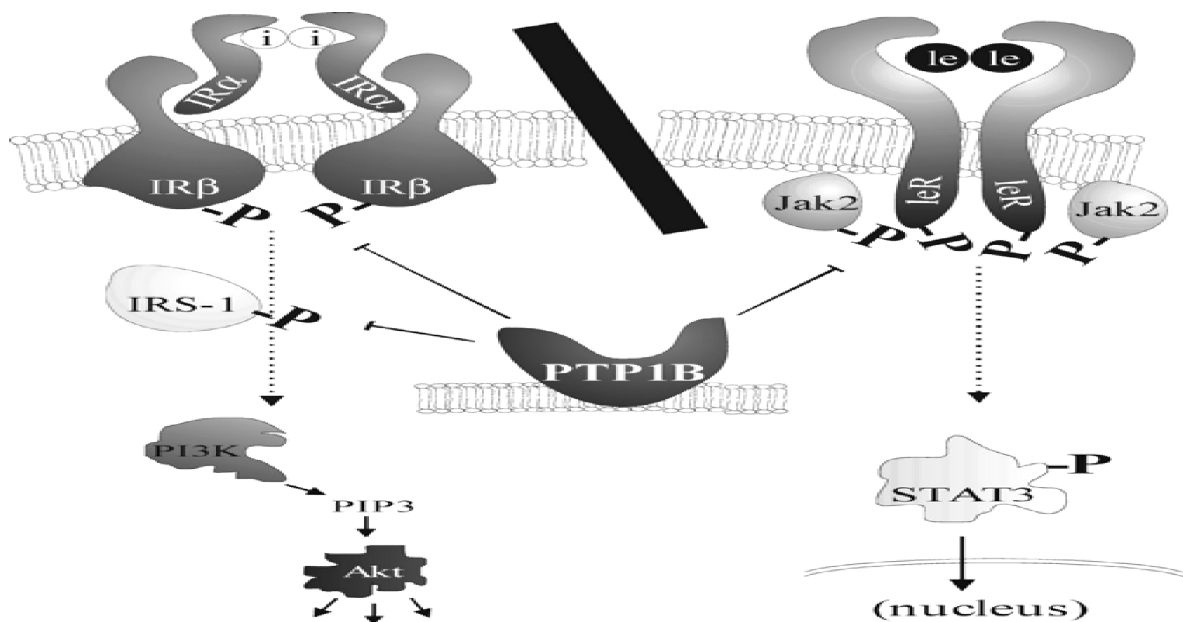


그림6-2-1. Regulation of the insulin and leptin signaling pathways by PTP1B



- 또한, 맥길대학의 연구팀은 PTP1B가 유방암의 40%에서 나타나는 유망 표적이라고 'Nature Genetics'에 발표하였음. 기존 표적 항암제인 허셉틴(Herceptin)에 반응하는 암을 가진 마우스를 대상으로 한 연구결과, PTP1B의 작용을 차단하는 약물이 암의 진행을 억제하는 것으로 나타남. 인체 유방암의 약 40% 가량이 PTP1B가 과도한 것으로 나타난 가운데 연구팀은 유방암을 앓는 여성의 약 25%에서 나타나는 HER-2의 과다발현으로 인해 유방암 발병 위험이 큰 쥐를 대상으로 한 연구에서 HER-2가 과다 발현되는 유방암 여성 환자들은 일반적으로 허셉틴으로 효과를 보고 있음. 연구팀은 이들 마우스에서 PTP1B를 결실시키면 유방암 발생이 현저히 늦추어지고 폐에서의 2차 암 발생이 예방되는 현상을 관찰을 보고하였음.
- 이러한 연구결과는 PTP1B 저해제가 당뇨병 및 비만의 치료제로 사용될 수있을 뿐만 아니라 유방암 등을 비롯한 합암제로서의 사용가능성을 밝혀 세계적인 제약회사들의 주요한 약물 목표점으로 인식되어 오고 있음. PTP1B 효소를 저해하는 중요한 위치로 PTP1B 효소의 단백질 잔기 214 - 221 (the P-loop)를 목표로 다양한 화합물이 합성되고 있음. 최초의 PTP1B 저해제는 vanadate 화합물로 이 화합물은 thiol-vanadyl ester linkage를 통하여 catalytic Cys 215 잔류물과 결합하는 것으로 보고 되었음. 이러한 연구를 통해 새로운 PTP1B 저해제로 anthranilate (anc-), imidazole-4-carboxylate (imc-) 화합물의 개발 등이 보고되고 있음. PTP1B 저해제로 phosphotyrosine (pTyr) mimetics가 또한 개발되고 있으며, dianionic 2-(oxalamino)-benzoic acid 유도체들이 보고되었음. 다른 화합물로 VMNS2e, 2-carbamoylbenzoic acid 유도체등 다양한 후보물질이 개발 중에 있음.
- AMPK는 세포의 영양상태나 운동, stress등에 의해 변화하는 세포의 에너지 상태 (ATP/AMP ratio)에 반응하여 그 활성이 조절되는 인산화 효소로서 glucose transport, fatty acid synthesis, cholesterol synthesis 등의 여러 가지 생리작용에 영향을 미치고 있음. 최근 보고에 의하면 운동에 의하여 촉진되는 근세포에서의 glucose uptake에 AMPK가 관여함.
- AMPK는 일반적으로 세포내에서 에너지 준위를 모니터하는 센서 역할을 하고 있음. 운동을 하거나 허기진 상태에서 근육세포, 간세포 그리고 지방세포는 필요한 에너지를 공급하기 위하여 지방, 글리코겐 등의 합성을 억제하며, 저장물질(지방)로부터 지방분해를 통하여 몸에 필요한 에너지를 생성케 함. 또한, 이 효소는 지방세포로부터 분비되는 렙틴 (leptin) 과 아디포넥틴 (adiponectin)의 세포내 신호전달물질로도 알려져 있음. 특히 아디포넥틴은 비만인 사람의 혈중에서 정상체중의 사람에 비교하여 낮은 농도로 측정되는 것으로 보아, 비만으로 기인한 인슐린저항성과 높은 관계가 있음.
- 운동스위치 역할을 하는 효소인 AMPK의 활성화는 지방 합성을 억제하고 지방의 연소를 촉진하는 효과를 갖고있어 대사성질환의 여러 증상들에 좋은 효과를 나타냄. 따라서 AMPK 활성화 물질을 찾으려는 연구는 세계적으로 대사성 증후군 치료제를 발굴하려는 좋은 목표로 부상하고 있음. 최근, 가르반 의학연구소 팀은 비터멜론(bitter melon)에서 추출한 4가지 성분이 체내 대사를 조절하는데 관여하여하는데, 이들이 AMPK를 활성화하는 것으로 보고하였음. 또한 이들 화합물은 당분 운반체인 glucose transporter4 (GLUT4)의 세포내로 이동과 관련성을 보고하여 천연물 소재가 AMPK 활성화 물질 탐색을 위한 좋은 재료임을 제시함

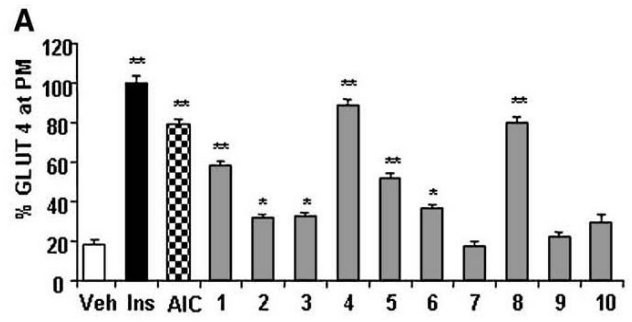
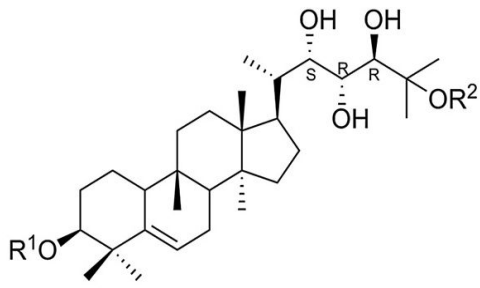


그림6-2-2. 비터멜론으로부터 얻은 AMPK 활성화 물질의 GLUT4의 이동에 미치는 영향

### 제 3 절 간 질환 치료제 기술 분야 연구 논문의 연도별 동향

간 질환 치료제 관련 분야의 논문은 1990년 이후로 꾸준히 증가하고 있는 추세이며, 특히 지난 세기의 과학 3대 혁명으로 손꼽히는 분자생물학 분야의 비약적인 발전과, 서구화된 식습관과 생활방식의 변화로 인해 늘어나는 대사증후군 질환과 관련 치료제 개발 필요성으로 인해, 2000년대 이후 해당 연구가 기하급수적으로 증가하고 있는 추세임. 국가별 동향을 살펴보면 전체 논문 중 20% 이상을 차지할 정도로 중국이 가장 많은 논문을 게재하며, 이들 중 대부분은 중약(한약) 추출물에 대한 연구임. 다음으로 미국에서 연구가 활발히 진행되고 있으며, 이들의 대부분은 2000년 초반 이후 간 질환에 대한 작용점 발굴과 기전연구에 집중되어 있음.

### 제 4 절 간 질환 치료제 기술 분야 특허의 연도별 동향

알코올성 및 비알코올성 지방간염을 포함하는 간 치료제 관련 분야 특허는 미국특허가 가장 많은 비중을 차지하고 있으며, 특히 90년대 후반부터 건강에 대한 관심이 높아지면서 출원건수가 꾸준히 증가하는 추세를 보이고 있음. 간 치료제 관련 분야 특허는 미국특허가 602건 (47%)으로 가장 많으며, 그 다음에 유럽특허 270건 (21%), 한국특허 228건 (18%), 일본특허 181건 (14%) 순으로 나타났다 (BCC report). 종합적으로 간 질환 치료제 관련 특허에 대한 기술주기 변화를 살펴보면, 가장 많은 특허를 보유한 미국의 특허출원 및 출원인의 증가세가 꾸준히 이루어지다가 최근 소폭 하락함에 따라 성숙기 진입 단계에 들어선 것으로 보이며, 일반적인 특허 등록이 아닌 핵심 기술을 보유하고 있는 선도 기업의 개량 기술 특허에 대한 출원이 주도적으로 이루어지고 있어 향후 이들 질환에 대한 치료제에 대한 특허소송 및 기술경쟁이 이루어질 것으로 예측되며, 국내 기업의 기술 개발 및 소송 대비 전략 등이 시급한 것으로 판단됨.

## 제 7 장 연구시설·장비 현황

\* 해당사항없음

## 제 8 장 참고문헌

1. Abdel-Kader MS, Wisse J, Evans R, van der Werff H, Kingston DG. (1997) Bioactive iridoids and a new lignan from *Allamanda cathartica* and *Himatanthus fallax* from the Suriname rainforest. *J Nat Prod.* 60(12): 1294 - 1297.
2. Akanatsu S, Watanabe A, Tamesada M, Nakamura R, Hayashi S, Kodama D, Kawase M, Yagi K. (2004) Hepatoprotective effect of extracts from *Lentinus edodes* mycelia on dimethylnitrosamine-induced liver injury. *Biol. Pharm. B.* 12: 1957-1960.
3. Alberti K. G. and Zimmet P. Z. (1998) Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: Diagnosis and classification of diabetes mellitus. Provisional Report of a WHO consultation. *Diabetic medicine* 15: 539-553.
4. American diabetes association. (2004) Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 27(1): 5-10.
5. Baskaran K, Kizar Ahamath B, Radha Shanmugasundaram K. and Shanmugasundaram E. R. B. (1990) Antidiabetic effect of a leaf extract from *Gymnema sylvestre* in non-insulin-dependent diabetes mellitus patients. *Journal of Ethnopharmacology* 30(3): 295-305.
6. Baum EL, Stadelman WJ, Walkup HG, Darroch JG. (1960) An economic analysis of egg quality changes as influenced by time and temperature. Technical Bulletin 35. Washington State University. Pullman, WA.
7. Benabdeljelil K, Jensen LS. (1990) Effectiveness of ascorbic acid and chromium in counteracting the negative effects of dietary vanadium on interior egg quality. *Poultry Sci.* 69:781-786.
8. Bentires-Alj M, Neel BG. (2007) Protein-tyrosine phosphatase 1B is required for HER2/Neu-induced breast cancer. *Cancer Res.* 67(6): 2420-2424.
9. Benyon R, and Iredale J. (2000) Is liver fibrosis reversible? *Gut.* 46(4): 443 - 446.
10. Chen MF, Chung HH, Lu HL. (2012) Protection of the extracts of *Lentinus edodes* mycelia against carbon-tetrachloride-induced hepatic injury in rats. *Sci. Worl. J.* Article ID 231586.

11. Chattopadhyay R. R. (1999) A comparative evaluation of some blood sugar lowering agents of plant origin. *Journal of Ethnopharmacol*, vol. 67, pp, 367–372.
12. Choi HK, Pokharel YR, Lim SC, Han HK, Ryu CS, Kim SK, Kwak MK, Kang KW. Inhibition of liver fibrosis by solubilized coenzyme Q10: Role of Nrf2 activation in inhibiting transforming growth factor- $\beta$ 1 expression. *Toxicol Appl Pharmacol*. 240(3): 377–384.
13. Classen JB. (2012) Review of evidence that epidemics of type 1 diabetes and type 2 diabetes/metabolic syndrome are polar opposite responses to iatrogenic inflammation. *Curr Diabetes Rev*. 8(6): 413 - 418.
14. Cui L, Lee HS, Ndinteh DT, Mbafor JT, Kim YH, Le TV, Nguyen PH, Oh WK. (2010) New prenylated flavanones from *Erythrina abyssinica* with protein tyrosine phosphatase 1B (PTP1B) inhibitory activity. *Planta Med*. 76(7): 713–718.
15. *Curcuma longa*. (2002) *Alternative Medicine Review Monograph*, 119–125.
16. Dao TT, Nguyen PH, Won HK, Kim EH, Park J, Won BY, Oh WK. (2012) Curcuminoids from *Curcuma longa* and their inhibitory activities on Influenza A neuraminidases. *Food Chemistry*, 134(1): 21–28.
17. Deng S, Palu 'K, West BJ, Su CX, Zhou BN, Jensen JC. (2007) Lipoxygenase inhibitory constituents of the fruits of noni (*Morinda citrifolia*) collected in Tahiti. *J Nat Prod*. 70(5): 859–862.
18. Elchebly, M, Payette, P, Michaliszyn, E, Cromlish, W, Collins, S, Loy, AL, Normandin, D, Cheng, A, Himms-Hagen, J, Chan, CC, Ramachandran, C, Gresser, MJ, Tremblay, ML, Kennedy, BP. (1999) Increased insulin sensitivity and obesity resistance in mice lacking the protein tyrosine phosphatase-1B gene. *Science*, 283: 1544–1548.
19. Fallowfield JA. (2011) Therapeutic targets in liver fibrosis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 300(5): G709–715.
20. Farran, M. T., M. G. Uwayjan, A.M.A. Miski, F.T. Sleiman, F.A. Adada and V.M. Ashikarian. (1995) Effects of the feeding raw and treated common vetch seed on the performance and egg quality parameters of laying hens. *Poult. Sci*. 74: 1630–1635.
21. Friedman SL. (1993) *Seminars in medicine of the Beth Israel Hospital, Boston*. The

cellular basis of hepatic fibrosis. Mechanisms and treatment strategies. *N Engl J Med.* 328(25): 1828–1835.

22. Fujii T, Fuchs BC, Yamada S, Lauwers GY, Kulu Y, Goodwin JM, Lanuti M, Tanabe K. (2010) Mouse model of carbon tetrachloride induced liver fibrosis: Histopathological changes and expression of CD133 and epidermal growth factor. *BMC Gastroenterology.* 10: 79
23. Fuller R. (1989) Probiotics in man and animals. A review. *J Appl Bacteriol.* 66:365–378.
24. Fu Y, Zheng S, Lin J, Ryerse J, Chen A. (2007) Curcumin protects the rat liver from CCl<sub>4</sub>-caused injury and fibrogenesis by attenuating oxidative stress and suppressing inflammation. *Mol Pharmacolog* 73:399–409.
25. Gabriel LP, Willian RH. (1982) *Hayes : Principles and methods of toxicology.* Raben Press, New York, 407–445.
26. Gressner AM. (1991) Liver fibrosis: perspectives in pathobiochemical research and clinical outlook. *Eur J Clin Chem Clin Biochem.* 29(5): 293– 311.
27. Hardie DG, Ross FA, Hawley SA. (2012) AMP-activated protein kinase: a target for drugs both ancient and modern. *Chem Biol.* 19(10): 1222–1236.
28. Haugh, R.R. (1937) The Haugh unit for measuring egg quality. *U.S. Egg Poult. Mag.* 43:522–555, 572–573.
29. He H, Mennone A, Boyer JL, Cai SY. (2010) Combination of retinoic acid and ursodeoxycholic acid attenuates liver injury in bile duct-ligated rats and human hepatic cells. *Hepatology.* 53(2): 548–557.
30. He ZZ, Yan JF, Song ZJ, Ye F, Liao X, Peng SL, Ding LS. (2009) Chemical constituents from the aerial parts of *Artemisia minor*. *J Nat Prod.* 72(6): 1198–1201.
31. Herrick, G. M. (1971) Repletion and depletion of pigmentation in broiler skin and shanks. *Poultry Sci.* 50:1467.
32. Hiraxumi A, Furusawa E, Choum S. C, and Hokama Y. (1996) Immunomoulation contributes to the anticancer activity of *Morinda citrifolia* (noni) fruit juice. *proceedings of the western pharmacology society,* 39: 7–9.

33. Horton JW. (2003) Free radicals and lipid peroxidation mediated injury in burn trauma: the role of antioxidant therapy. *Toxicology*. 189: 75-88.
34. Hsu Y., Tasi CF, Chuang WC, Chen WK, Ho YC, Lu FJ. (2010) Protective effects of silica hydride against carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in mice. *Food Chem. Toxicol.* 48: 1644-1653.
35. Hwang EI, Yun BS, Kim YK, Kwon BM, Kim HG, Lee HB, Jeong WJ, Kim SU. (2000) Phellinsin A, a novel chitin synthases inhibitor produced by *Phellinus* sp. *PL3. J Antibiot (Tokyo)*. 53(9): 903-911.
36. Islam MS. (2011) Effects of the aqueous extract of white tea (*Camellia sinensis*) in a streptozotocin-induced diabetes model of rats. *Phytomedicine*. 19(1): 25- 31.
37. Jang MK, Lee HJ, Kim JS, Ryu JH. (2004) A curcuminoid and two sesquiterpenoids from *Curcuma zedoaria* as inhibitors of nitric oxide synthesis in activated macrophages. *Arch Pharm Res.* 27(12): 1220-1225
38. Jeong CS, Jung KH. (2002) Protective effects of *angelica tenuissima nakai* on hepatotoxicity by carbon tetrachloride in rats. *J. Appl. Pharmacol.*10: 211-217.
39. Jin SE, Son YK, Min BS, Jung HA, Choi JS. (2012) Anti-inflammatory and antioxidant activities of constituents isolated from *Pueraria lobata* roots. *Arch Pharm Res.* 35(5): 823-837.
40. Johnson AS. Merritt ES. (1995) Heritability of albumen height and specific gravity of eggs from White Leghorn and Barred Rocks and the correlations of these traits with egg production. *Poultry Sci* 34:578-587.
41. Johnson, TO, Ermolieff, J, Jirousek, MR. (2002) Protein tyrosine phosphatase 1B inhibitors for diabetes. *Nat. Rev. Drug Discov.* 1: 696-709.
42. Julien SG, Dubé N, Read M, Penney J, Paquet M, Han Y, Kennedy BP, Muller WJ, Tremblay ML. (2007) Protein tyrosine phosphatase 1B deficiency or inhibition delays ErbB2-induced mammary tumorigenesis and protects from lung metastasis. *Nat Genet.* 2007 39(3): 338-346.
43. Kennedy G, Burlingame B. (2003) Analysis of food composition data on rice from a plant genetic resources perspective. *Food Chemistry.* 80: 589-596.



44. Kim JM, Lee YM, Lee GY, Jang DS, Bae KH, Kim JS. (2006) Constituents of the roots of *Pueraria lobata* inhibit formation of advanced glycation end products (AGEs). *Arch Pharm Res.* 29(10): 821-825.
45. Kim KS, Kim SK, Sung KM, Cho YW, Park SW. (2012) Management of type 2 diabetes mellitus in older adults. *Diabetes Metab J.* 36(5): 336-344.
46. Kim WH, Lee J, Jung DW, Williams DR. (2012) Visualizing sweetness: increasingly diverse applications for fluorescent-tagged glucose bioprobes and their recent structural modifications. *Sensors (Basel).* 12(4): 5005- 5027.
47. Korean National Statistical Office. (2010) Annual report on the cause of death statistics.
48. Lee J, Jung DW, Kim WH, Um JI, Yim SH, Oh WK, Williams DR. (2013) Development of a Highly Visual, Simple, and Rapid Test for the Discovery of Novel Insulin Mimetics in Living Vertebrates. *ACS Chem Biol.*
49. Lee SS, Byoun YS, Jeong SH, Kim YM, Gil H, Min BY, Seong MH, Jang ES, Kim JW. (2012) Type and cause of liver disease in Korea: single-center experience, 2005-2010. *Clin Mol Hepatol.* 18(3): 309-315.
50. Lee JK, Lee SY, Cho BM, Kim YJ. (2001) Ideal body mass index and level of body mass index for management of obesity. *The Korean Journal of Obesity* 10(4): 356-365.
51. Lee KS.(2006)Hepatic Fibrogenesis. *Korean J. Gastroenterology.* 48: 297-305.
52. Lim SI, Seong KS, Song SM, Hwang JT, Lee BY. (2010) Effect of rice bran and soybean fermented by *Bacillus* spp. on lipid profiles of liver, serum, and feces in rats fed high fat diet. *Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry.* 54: 2, 237-242.
53. Lin Y, and Sun Z. (2010) Current views on type 2 diabetes. *Journal of Endocrinology,* 204: 1-11.
54. Matin RG. Lyons TP. Jacques KA. (1995) Probiotic feeding effect on performance and intestinal microflora broiler chicks. p371 In *Biotechnology in the Feed Industry Proc 11th Annual Symp, Alltech Publ, KY, USA.*
55. Meister A, Anderson ME. (1983) Glutathione. *Annual Review of Biochemistry* 2: 711-760.

56. Miura T, Ueda N, Yamada K, Fukushima M, Ishida T, Kaneko T, Matsuyama, T. Ishida, T. Kaneko, F. Matsuyama, and Y. Seino. (2006) Antidiabetic effects of Corosolic acid in KK-Ay diabetic mice. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 29(3): 585-587.
57. Monsey JB, Robinson DS, Millier WS, Ellis M. (1977) The effect of feeding magnesium-enriched diets on the quality of albumen of stored eggs. *Br J Nutr.* 37:35-44
58. Mohan B, Kadirvel R. Natarajan A, Bhaskaran M. (1996) Effect of probiotic supplementation on growth, nitrogen utilization and serum cholesterol in broilers. *Br Poult Sci.* 37: 395-401
59. Nayak B. S, sandiford S, and Maxell A. (2009) Evaluation of the wound healing activity of ethanolic extract of *Morinda citrifolia* L. leaf. *Evidence-based complementary and alternative* 6(3): 351-356.
60. Paker RB. (1974) Probiotics: the half of the antibiotic story. *An Nutr & health* 29:4-8
61. Panzhinskiy E, Ren J, Nair S. (2013) Pharmacological Inhibition of Protein Tyrosine Phosphatase 1B: A Promising Strategy for the Treatment of Obesity and Type 2 Diabetes Mellitus. *Curr Med Chem.* 20(21): 2609- 2625.
62. Park SY, Kim DS. (2002) Discovery of natural products from *Curcuma longa* that protect cells from beta-amyloid insult: a drug discovery effort against Alzheimer's disease. *J Nat Prod.* 65(9): 1227-1231.
63. Pinzani M, Rombouts K. (2004) Liver fibrosis: from the bench to clinical targets. *Dig Liver Dis.* 36(4): 231-242.
64. Polasek M, Fuchs BC, Uppal R, Schühle DT, Alford JK, Loving GS, Yamada S, Wei L, Lauwers GY, Guimaraes AR, Tanabe KK, Caravan P. (2012) Molecular MR imaging of liver fibrosis: a feasibility study using rat and mouse models. *J Hepatol.* 57(3): 549-555.
65. Reagan-Shaw S, Nihal M, Ahmad N. (2007) Dose translation from animal to human studies revisited. *FASEB J.* 22: 659 - 661.
66. Romanoff, A.L and A.J. Romanoff. (1949) *The Avian Egg.* John wiley and Sons Co., NY

67. Rong H, Stevens JF, Deinzer ML, Cooman LD, Keukeleire DD. (1998) Identification of isoflavones in the roots of *Pueraria lobata*. *Planta Med.* 64(7): 620–627.
68. Ross GD, Vetvicka V, Xia JY, Vetickova J. (1999) Therapeutic intervention with complement and beta-glucan in cancer. *Immunopharmacology* 42: 61–74.
69. Sabrani M, Payne CG (1978) Effect of oiling on internal quality of eggs stored at 28 and 12 degrees C. *Br Poult Sci* 19: 567–571
70. Sengupta M., Sharma G. D. and Chakraborty B. (2011) Hepatoprotective and immunomodulatory properties of aqueous extract of *Curcuma longa* in carbon tetrachloride intoxicated Swiss albino mice. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine* 1: 193–199.
71. Song EK, Cho H, Kim JS, Kim NY, An NH, Kim JA. (2001) Diarylheptanoids with free radical scavenging and hepatoprotective activity in vitro from *Curcuma longa*. *Planta Med* 67: 876–877.
72. Su BN, Pawlus AD, Jung HA, Keller WJ, McLaughlin JL, Kinghorn AD. (2005) Chemical constituents of the fruits of *Morinda citrifolia* (Noni) and their antioxidant activity. *J Nat Prod.* 68(4): 592–595.
73. Tabák AG, Herder C, Rathmann W, Brunner EJ, Kivimäki M. (2012) Prediabetes: a high-risk state for diabetes development. *Lancet.* 379(9833): 2279–2290.
74. Tang LX, He RH, Yang G, Tan JJ, Zhou L, Meng XM, Huang XR, Lan HY. (2012) Asiatic acid inhibits liver fibrosis by blocking TGF-beta/Smad signaling in vivo and in vitro. *PLoS One.* 7(2): e31350.
75. Tortuero F, Fenandez E. (1995) Effects of inclusion of microbial cultures barley-based diets fed to laying hens. *Anim Feed Sci Technol.* 53: 255–26
76. Tongta A M. (2009) Gamma-linolenic acid production of *Mucor rouxii* by solid-state fermentation using agricultural by-products. *Letters App. Microbiol.* 49: 91–97
77. Wang M. Y. and Su C. (2001) Cancer preventive effect of *Morinda citrifolia* (Noni). *Annals of the New York Academy of Sciences* 952: 161–168.
78. Wild S, Roglic G, Green A, Sicree R, King H. (2004) Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030. *Diabetes Care.* 27(5): 1047–1053.

79. Williams, K.C. (1992) Some factors affecting albumen quality with particular reference to Haugh unit score. *Worlds Poult. Sci. J.* 48:5-16
80. 국민건강통계, 국민건강영양조사 제4기 2차년도. (2008) 질병관리본부.
81. 국민체력실태조사. (2011) 국민체육진흥공단 체육과학연구원, 문화체육관광부.
82. 박선민, 안일성, 홍상미, 김다슬, 권대영, 양혜정. (2010) 천년초 추출물과 식이 유허의 첨가가 계란의 생선성, 품질 및 관능적 특성에 미치는 영향. *한국식품영양과학회지*. 39(2):294-300
83. 손진균, 송혜란, 이광영, 김진하, 김호찬. (2003) 부산지역 근로자들에서 Alcohol Use Disorders.
84. 송계원, 이무하, 한재용, 임정목, 김희발. (2009) 알의 혁명. 서울대학교 출판사 124-126.
85. 윤지연, 김재영, 김지숙, 이보근, 안병기, 황용배, 강성기, 김동건, 강창원. (2008) 생균제 및 Colistin 복합 첨가제의 급여가 산란계의 생산성과 계란의 품질에 미치는 영향. *한국가금학회* 35:153-162.
86. 정병윤, 임희석, 백인기. (2004) 산란계 사료에 *Glutinicus* 첨가가 산란 생산성, 난각 및 난황 색도에 미치는 영향. *동물자원지* 46(6):975-980.
87. 정지홍, 김호진, 왕건평, 김채현, 정정환, 김인호. (2010) 사료내 *Agariemycetes* 첨가 급여가 산란계의 계란 품질 및 분내 유해 가스 농도에 미치는 영향. *한국가금학회지* 37(2):145-150.
88. 한국보건산업진흥원, 건강기능식품산업 글로벌 트렌드. 보건산업통계시스템.(2012) 1-8.
89. Identification Test (AUDIT)와 간기능 검사와의 연관성 조사. *대한산업의학회지*. 15(3): 281-289.
90. Estimating the maximum safe starting dose in initial clinical trials for therapeutics in adult healthy volunteers, Guidance for Industry, U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration Center for Drug Evaluation and Research (CDER) July 2005

