

발간등록번호

11-1543000-000191-01

T000038954

MONO1201414436

**녹용의 발효를 통한 조혈증진 입증 및  
기능성 제품 개발에 관한 연구**

**The development of functional food  
and the clinical study to evaluate the efficacy and safety  
on hematopoietic function of fermented velvet antler extract**

광 동 제 약 (주)

농 립 축 산 식 품 부

## 제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “녹용의 발효를 통한 조혈증진 입증 및 기능성 제품 개발에 관한 연구” 과제의 보고서로 제출합니다.

2013 년 6월 31일

주관연구기관명 : 광동제약(주)

주관연구책임자 : 우 문 제

연 구 원 : 박 칠 수

연 구 원 : 이 상 훈

연 구 원 : 김 진 수

연 구 원 : 이 건 옥

연 구 원 : 이 경 미

연 구 원 : 윤 범 식

연 구 원 : 이 주 은

협동연구기관명 : 고려대학교

협동연구책임자 : 서 형 주

협동연구기관명 : 전북대학교병원

기능성식품임상시험지원센터

협동연구책임자 : 김 달 식

협동연구기관명 : 한국건설생활환경

시험연구원

협동연구책임자 : 이 진 규

## 요 약 문

### 연구개발의 목적 및 필요성

녹용은 전 세계 생산량의 80%를 한국에서 소비한다고 알려져 있다. 국내 사슴은 꽃사슴, 엘크, 래드디어가 99%를 차지하며, 이중 엘크종이 가장 사업성이 우수하여 사육두수가 매년 증가하고 있어(한국사슴협회 자료) 엘크종의 녹용을 선택하게 되었다. 또한 고령화된 사슴에서 얻은 녹용은 각질화가 심화 되었거나 회분함량이 높아 녹용의 원료 기준규격에 적합하지 못하고, 지나치게 어린 사슴의 뿔은 그 형상이 고르지 못하기 때문에 사슴연령을 6~12연령산 사슴의 뿔(녹용)을 사용하였다.

녹용은 인삼과 더불어 오래 전부터 가장 대표적인 강장 생약재로 한국, 중국, 일본을 중심으로 애용되어 왔다. 현대 과학적으로도 녹용은 혈압강하, 조혈기능, 고콜레스테롤 혈증 개선, 항스트레스 효과가 있다고 밝혀지고 있다. 인삼, 녹용과 같이 강장효과를 가진 생약재의 약성은 특정 장기에만 선택적으로 작용하여 강한 효과를 나타내는 것이 아니라 비록 그 효과는 단일 성분의 의약품에 비해 약하나 신체 전반에 걸쳐 복합적으로 효능을 나타내는 것이 특징이다.

따라서 본 연구에서는 녹용의 효율을 높이고 새로운 약리효과를 기대하기 위해 녹용을 분해하는 미생물을 탐색하였으며, 선정된 미생물을 이용하여 발효시킨 녹용에 대하여 생리활성 연구, 독성시험 및 인체적용시험을 토대로 개별인정형 원료를 개발 하고자 하였으며, 이는 학문적, 기술적 측면 뿐 아니라 경제적면에서도 그 의미가 매우 클 것이다.

식품에 사용되는 대상물질의 가장 중요한 것은 소재의 안전성이다. 본 과제의 대상이 되는 녹용은 안전성이 기 확보되어 있으며 이를 다른 협동과제를 통해 재확인할 것이며, 또한 소재를 발효 전환하여 구조와 생리활성의 관계가 과학적으로 규명된 소재의 개발은 새로운 패러다임의 시장 needs 접근 용이하게 할 수 있다.

녹용에서 유용물질을 추출 또는 분리하는 단계를 넘어 발효 기법을 통해 기능성이 배가된 소재를 획득하는 기술은 다른 유용물질 또는 의약품 생산 및 분리에도 적용될 것이다.

본 과제에서 연구될 발효녹용의 조혈기능, 피로회복 등 다양한 기능성 연구가 국내에서 거의 진행되어 있지 않은 취약 분야이고 특히 발효 녹용의 활성 물질과 활성간의 상관관계 규명은 동 연구 분야 또는 생물학전 전환 분야에 중요한 공헌이 된다고 판단된다. 발효녹용 제조에 사용한 균주에 대한 원천기술을 확보함에 따라 특히 획득이 용이하고 이를 통한 응용제품 개발

을 유도할 수 있다.

본 연구과제를 통하여 녹용의 우수한 기능성을 과학적으로 밝히고, 기능적 효능을 강화 할 수 있는 발효 기술을 접목한 새로운 기능성 식품 개발과 더불어 기능성 신소재 개발을 통하여 우수식품자원의 효과적인 활용 및 고부가가치화기술 기반을 확립하고자 한다.

## 연구개발의 결과

### 1. 녹용원료의 표준화 및 제조공정 표준화

녹용의 기능성 증진 및 이를 바탕으로 한 소재를 개발하기 위하여 녹용원재료의 표준화를 진행하였다. 녹용은 수입산 원료가 아닌 국산 원료를 사용하였으며, 국내 사슴은 꽃사슴, 엘크, 레드디어가 99%를 차지하며, 이중 엘크종이 가장 사업성이 우수하여 엘크종의 사슴을 선택하였고(학명 : *Cervus canadensis*, elk), 생산성 있는 녹용은 사슴연령 6세 이상은 되어야 우량의 녹용을 얻을 수 있고 고령화된 사슴에서 얻은 녹용은 각질화가 심화 되었거나 회분함량이 높아 녹용의 원료 기준규격에 적합하지 못하기 때문에 사슴연령을 6~12년령으로 제한하였다.

발효 제조공정은 121℃에서 60분간 멸균 후 배주로부터 Screening한 *Bacillus sp* 균주를 이용하여 24~48시간동안 발효 후 필터프레스 여과와 동결건조를 통하여 발효녹용추출물분말 제조공정 확립하였다. 표준화된 물질의 영양성분 분석 결과 탄수화물 27.3%, 열량 371.5 kcal/100g, 조지방 0.4%, 조단백질 64.7% 으로 발효녹용의 주요 구성성분은 조단백질과 탄수화물인 것으로 판단 확인 되었으며, 지표물질인 hydroxyproline 은 1.3mg/g 이상을 얻었다.

또한 원료의 중금속 및 잔류농약(BHC, DDT, 알드린, 디엘드린, 엔드린 등)을 분석한 결과 모두 기준치 이하인 것으로 확인 하였으며, 잔류농약의 경우 불검출 되었다.

### 2. 발효녹용추출물의 기능성 연구

Sprague-Dawley(SD)계열 4주령 암컷 흰쥐 20마리를 대상으로 하여 2일간 Phenylhydrazine(PHZ)을 복강내(40 mg/kg)로 투여하여 용혈성 빈혈을 유도하고 비발효와 발효 녹용을 14일간 섭취시킨 결과 빈혈을 유도하지 않은 Control군에 비해 빈혈유도 대조군인 PHZ-con군의 적혈구(RBC), 헤마토크릿(Hct), 헬모그로빈(Hgb)은 모두 감소되는 경향을 나타내었으며 녹용섭취에 의해 빈혈로 감소된 이들 혈액학적 지표가 증가되었고 특히 비발효녹용군인 Non-200군(비발효 녹용 200 mg/kg 섭취군)에 비해 발효녹용군인 B-100군(발효 녹용 100 mg/kg 섭취군)과 B-200군(발효 녹용 200 mg/kg 섭취군)은 용량의존적으로 증가가 보다 뚜렷하게 나타났다.

신장에서서의 EPO(erythropoietin)의 발현량은 녹용과 발효녹용을 경구투여한 군에서 용혈성 빈

혈이 유도되지 않은 정상군과 유사한 활성을 보였다.  $\delta$ -Aminolevulinic acid dehydrates의 경우 정상군이 가장 높은 수치를 보였으며, 녹용과 발효녹용 경구투여군에서 비슷한 효과를 보였다. 또한 골수 세포에서의 적혈구 분화가 가능한 BFU-E colony의 경우 control군과 비교하였을 때와 비교하였을 때에는 적혈구로 분화가 가능한 BFU-E가 더 많이 관찰되었다.

뿐만 아니라, 5주령 음성 Balb/C 마우스를 대상으로 강제 수영 후 피로회복에 대한 실험결과 피로 물질인 젖산, lactate dehydrogenase(LDH) 축적을 저하시켰으며, 지질과산화물, SOD, GSH-Px 물질 저하를 통해서 피로로 야기되는 체내 산화적 손상을 억제하는 효과를 확인으며, creatine phosphokinase(CPK), 무기인산, ATP분해산물을 실험 결과 발효녹용이 근육의 피로도 경감시킴을 확인하였다.

### 3. 발효녹용 추출물의 안전성평가(독성평가)

시험물질(발효녹용추출분말)의 13 주 반복 경구투여에 의한 독성을 조사하기 위하여 Sprague-Dawley(SD) 계통 암수 랫드를 이용하여 시험물질 250(저용량군), 500(중용량군) 및 1,000(고용량군) mg/kg 용량으로 투여군을 설정하여 부형제 대조군과 비교하였다. 각 군별 동물 수는 암수 각 10 마리를 사용하였고, 13 주 반복투여에 의한 사망률, 임상증상, 체중변화, 사료 및 음수 섭취량, 안검사, 요검사, 혈액학적 검사, 혈액응고시간 검사, 혈액생화학적 검사, 부검 소견 및 병리조직학적 소견을 관찰하였다. 본 시험 조건 하에서 발효녹용추출분말의 랫드에 대한 13 주 반복 경구투여 결과, 무독성량(NOAEL, No observed adverse effect level)은 1,000 mg/kg b.w. 이상이며, 표적장기(target organ)는 관찰되지 않았다.

### 4. 녹용추출물의 유효성 및 안전성을 평가하기 위한 인체적용시험(임상연구)

발효녹용의 조혈효과, 운동 후 피로회복에 대한 유효성 및 안전성을 평가하기 위한 12주간의 무작위배정, 이중누가림, 프라세보 대조 임상시험을 실시하였다. 피험자 선정 기준은 만 19 ~ 60세의 성인 남녀로서, 남성은 헤모글로빈 농도가 13~14g/dL, 여성은 12~13g/dL인 자로 정하였으며, 피험자는 12주 동안 1일 2회, 매일 식전 섭취하기로 하였다.

1차 유효성 평가는 피로도 관련 혈액검사(안정 시, 운동부하 검사 직후, 회복 30분 후): 젖산, 암모니아, 무기인산염, creatine kinase, LDH, 글루코스, 유리지방산을 확인하고, 2차 유효성 평가는 호흡계변인 (상대 최대산소섭취량( $VO_{2max}$ ; ml/min/kg), 절대 최대산소섭취량( $VO_{2max}$ ; l/min), 최대환기량 ( $VE_{max}$ ; l/min), 호흡상 (RQ $_{max}$ ; RER), 호흡수 (RR; breaths/min)) 심장기능 (산소맥( $O_2$ pulse; ml/beat), 최대심박수 (HR $_{max}$ ; beats/min)), 자각적 피로도 조사 (주관적 운동강도(RPE; Rating of perceived exertion)), CBC (헤모글로빈, MCV, MCH, MCHC, RDW(red cell distribution width), reticulocyte, Differential count(Lymphocyte,

Monocyte, Eosinophil, Basophil, Neutrophil)), 혈청철 포화도 (transferrin saturation), serum iron, ferritin, TIBC, UIBC, ESR (erythrocyte sedimentation rate), 면역지표 (Cytokine(IL-6, IFN-r, TNF-a), Lymphocyte Subset (CD45/4/8/3, CD45/56/19/3)), 설문지 (다차원 피로척도 (MFS; Multidimensional Fatigue Scale), 삶의 질 설문지 (SF-36; 36-Item Short-Form Health Survey), 피험자 만족도 설문지, 체질 설문지) 등을 통하여 발효농양의 효능을 성인 남녀 60명을 대상으로 평가하고자 한다.

본 연구를 통해, 특허출원 및 등록 총 4건과 학술지 논문을 2건 출판하였으며, 4건의 논문이 현재 심사 중이다.

### 추가연구

현재 인체적용시험 진행 중이며 시험의 유효성평가 지표를 조절작용 뿐만 아니라 면역, 피로 회복 등 다양하게 설정하였다. 다양한 지표에서 우수한 결과를 나타내면 추가적인 연구를 통하여 기능성 확대를 진행하고자 한다.

## SUMMARY

### **Objectives and Necessity**

For more than 2000 years, deer and deer parts have been sources of medicine in Asian countries such as China, Japan and Korea. Antler has been used as a popular medicine in these countries. There are many medical and pharmaceutical uses of antler, which is believed to possess restorative, lowers hypotensive-vascular effect, hematopoietic effect, reduce high-cholesterol, anti-stress effect, and many others.

To increase the beneficial activity of antler we tried fermentation, which may have merits for standardizing efficacy. Fermentation by microorganisms is used to make products useful to humans, including various foods.

Development of a safe and effective fermented velvet antler extract could be applied to various products and materials such as functional foods and medicine. We contribute to the development of functional food industries through the evaluation of biological activity of fermented velvet antler. We promote nation's capacity to develop the high value added technology.

### **Results**

#### **1. Standardization of fermented velvet antler and manufacturing process**

We invested the standaization of fermented velvet antler for functional food material development. We used domestic antler, not imported antler. We made a choice Elk species (scientific name : *Cervus canadensis, elk*), because it have business value. The age limit for deer is 6 to 12 years old.

After sterilization of antler at 121℃ for 60min, we fermented the antler about 24~48 hours using *Bacillus* species from fermented soybean lump. We developed the fermented velvet antler extract powder through filter press equipment and freeze-drying.

We analyzed the nutrition of fermented velvet antler extract powder. Fermented velvet

antler extract powder contains on average, 64.7% protein, 27.3% carbohydrates, 0.4% fat, and supplies 371.5 kcal of energy per 100grams. Protein and carbohydrates are main of nutrition facts of fermented velvet antler.

We also checked remaining of agricultural chemical and researched heavy metal content of fermented velvet antler. Heavy metal content of fermented velvet antler was under reference value and agricultural chemical was not detected.

## **2. Evaluation of fermented velvet antler bioactivity**

We examined the effect of fermentation on the ability of antler to act as a stimulator of hematopoietic activity. Hemolytic anemia was induced by phenylhydrazine (PHZ) in female Sprague - Dawley rats. The vehicle or antler extract (nonfermented or fermented) mixed in drinking water was administered from Days 2 to 15 after PHZ injection. On Day 15, red blood cell counts in the fermented velvet antler group were significantly higher than those in the nonfermented velvet antler group, and rats treated with fermented velvet antler extract tended to have higher hemoglobin compared with rats treated with nonfermented velvet antler extract, but not significantly. We evaluated serum erythropoietin(EPO) levels and renal EPO gene expression.

Antler extract suppressed the increase in serum EPO(erythropoietin) induced by PHZ exposure. Decreases in hepatic  $\delta$ -aminolevulinic acid dehydratase(ALAD) activities in anemic rats were improved significantly by treatment with antler extract. However, significant differences in hepatic ALAD activities were not observed between fermented velvet antler extract treatment and nonfermented velvet antler extract treatment. Our results show that the number of burst forming unit erythron (BFU-E) colonies, earlier RBC precursors, is increased by fermented velvet antler.

We investigated to analyze the effect of fermented velvet antler supplementation on fatigue recovery following exhaustive exercise stress using BALB/c mice. Our results showed that fermented velvet antler decreased lactic acid, lactate dehydrogenase(LDH). Fermented velvet antler prevents the increase in lipid peroxidation, superoxidized dismutase(SOD), glutathione peroxidase(GSH-Px) level in serum. Also, it reduced creatine phosphokinase(CPK), inorganic phosphate. We conclude that the hematopoietic and fatigue recovery activity of antler might be increased by the fermentation process.



### **3. The toxicity test in SD rat in accordance with GLP**

The toxicity of fermented velvet antler extract, was examined in male and female Spargue-Dawley rats. Rats were treated with the test substance at a dose 250 mg/kg, 500 mg/kg and 1000 mg/kg intragastrically for 13 weeks. No death and abnormal clinical signs were observed throughout the administration period. There were not significantly different from control group in net body weight gain, food and water consumption, organ weight, gross pathological findings, and urine analysis among the groups rats treated with different doses of the fermented velvet antler. Hematological findings and biochemical examination revealed no evidence of specific toxicity related to fermented velvet antler. From these results, no observation effect level (NOEL) of fermented velvet antler is 1,000 mg/kg/day under the condition employed in this study.

### **4. A 12week double-blind randomized clinical trial of fermented velvet antler extract supplementation on fatigue recovery and hematopoietic activity for safety and effectiveness**

Fatigue is a common symptom in modern society. We examined the effect of fermented velvet antler extract on fatigue and hematopoietic activity in humans. In a double-blind, randomized, placebo-controlled, parallel-group trial 60 participants (age 19~60 years, hemoglobin concentration for man : 13~14g/dL, hemoglobin concentration for women : 13~14g/dL) were randomly allocated into two groups: fermented velvet antler and placebo for 12 weeks.

Man and woman subjects performed exercise test on the treadmill before and after 12weeks' fermented velvet antler (2 times a day, before meals). Blood samples are collected before and after the exercise, and after 30min of recovery.

We check the blood test about fatigability indicator : lactic acid, ammonia, inorganic-phosphate, creatine kinase, LDH, glucose, free fatty acid. Also, we analyze the breathing indicator : maximum oxygen consumption, maximal breathing capacity, breathing rate, heart function (oxygen pulse , maximal heart rate), subjective fatigue symptom (Rating of perceived exertion, CBC, reticulocyte, differential count, transferrin saturation, serum iron, ferritin, TIBC, UIBC, ESR, Cytokin, Lymphocyte subset). We evaluate on the effect of fermented velvet antler using questionnaires(multidimensional fatigue scale, quality of life, subjects satisfaction, physical constitution).

## CONTENTS

**Part 1. R&D Project Introduction**

**Part 2. Domestic and Foreign Technical Development**

**Part 3. R&D Project Result**

**Part 4. Project Achievement and Contribution Correlated Fields**

**Part 5. R&D Product and Application Plan**

**Part 6. Overseas Scientific Technology Information by R&D Process**

**Part 7. Research Facility & Equipment**

**Part 8. Reference**

## 목 차

- 제 1 장 연구개발과제의 개요
- 제 2 장 국내외 기술개발 현황
- 제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과
- 제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도
- 제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획
- 제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보
- 제 7 장 연구시설·장비 현황
- 제 8 장 참고문헌

## 제 1장 연구개발과제의 개요

### 1절. 연구개발의 목적 및 필요성

#### 1. 연구개발의 목적

녹용(鹿茸, CERVI PARVUM CORNU)은 매화록(梅花鹿) *Cervus nippon* Termminck, 마록(馬鹿) *Cervus elaphus* Linne 또는 대록(大鹿) *Cervus canadensis* Erxleben(사슴과 Cervidae)의 숫사슴의 털이 밀생되고 아직 골질화되지 않았거나 약간 골질화된 어린 뿔을 자른 것을 말하며, 동양의학의 중요 약재로 중국 및 일본 등의 동양권 국가에서 오래 전부터 활용되고 있는 양록산업의 주 생산물이다. 녹용은 전 세계 생산량의 80%를 한국에서 소비한다고 알려져 있다.

국내 사슴은 꽃사슴, 엘크, 레드디어가 99%를 차지하며, 이중 엘크종이 가장 사업성이 우수하여 사육두수가 매년 증가하고 있어(한국양록협회 자료) 엘크종의 녹용을 선택하게 되었다. 또한 녹용은 고령화된 사슴에서 얻은 녹용은 각질화가 심화되었거나 회분함량이 높아 녹용의 원료 기준규격에 적합하지 못하기 때문에 사슴연령을 6~12 연령산 녹용을 사용하였다.

녹용의 약리활성 성분으로는 ganglioside, pantocrin(70% 에탄올 추출물), 아미노산, 인산칼슘, 탄산칼슘, 콜라겐, 인지질, chondroitin, glucosamine, hyaluronic acid 등이 알려져 있다(2-4). 그러나 이들 대부분은 녹용에만 특이적으로 함유되어 있는 성분이 아니며 pantocrin 역시 구성 화합물이 구명되지 않아 이들 성분이 녹용 특유의 성분인지 확인할 수 없다. 또한 대부분 다른 식품에도 다량 함유되어 있는 무기물과 단백질 및 지질 성분에 불과하므로 녹용의 다양한 약리효능을 대변하기는 어렵다.

녹용은 인삼과 더불어 오래 전부터 가장 대표적인 강장 생약재로 한국, 중국, 일본을 중심으로 애용되어 왔다. 현대 과학적으로도 녹용은 혈압강하, 조혈기능, 고콜레스테롤 혈증 개선, 항스트레스 효과가 있다고 밝혀지고 있다. 인삼, 녹용과 같이 강장효과를 가진 생약재의 약성은 특정 장기에만 선택적으로 작용하여 강한 효과를 나타내는 것이 아니라 비록 그 효과는 단일 성분 의약품에 비해 약하나 신체 전반에 걸쳐 복합적으로 효능을 나타남이 특징이다.

그러나, 녹용은 설사 등의 부작용이 있어, 한방에서 수렴작용이 있는 한약과 병용하여 사용하게 되는데, 이 경우 기대했던 효과가 상실되거나 감소될 수 있다. 또한, 한방의 유용한 자원인 녹용은 한약에 이용하기 위해 알코올에 담근 후, 이를 세절하여 사용하게 되는데, 이 과정에서 녹용의 많은 유효성분이 소실되고 있다. 이러한 문제를 해결하고자 발효과정을 거치게 되면 유용성분의 증가, 새로운 생리활성 부여, 흡수율 증가 등 다양한 이점을 지니고 있어 최근 들어 발효를 이용한 생물학적인 전환 방법이 산업체에 널리 사용되고 있다.

따라서 본 연구에서는 녹용의 효율을 높이고 새로운 약리효과를 기대하기 위해 녹용을 분해하는 미생물을 탐색하였으며, 선정된 미생물을 이용하여 발효시킨 녹용에 대하여 생리활성 연구, 독성시험 및 인체적용시험을 토대로 개별인정형 원료를 개발하고자 하였으며, 이는 학문적, 기술적 측면 뿐 아니라 경제적면에서도 그 의미가 매우 클 것이다.

#### 가. 기술적인 측면

식품에 사용되는 대상물질의 가장 중요한 것은 소재의 안전성이다. 본 과제에의 대상이 되는 녹용은 안전성이 기 확보되어 있으며 이를 다른 협동과제를 통해 재확인할 것이며, 또한 소재를 발효 전환하여 구조와 생리활성의 관계가 과학적으로 규명된 소재의 개발은 새로운 패러다임의 시장 needs 접근 용이하게 한다.

녹용에서 유용물질을 추출 또는 분리하는 단계를 넘어 발효 기법을 통해 기능성이 배가된 소재를 획득하는 기술은 다른 유용물질 또는 의약품 생산 및 분리에도 적용될 것이다.

본 과제에서 연구될 발효녹용의 조절기능은 국내 연구가 거의 진행되어 있지 않은 취약 분야이고 특히 발효 녹용의 활성 물질과 활성간의 상관관계 규명은 동 연구 분야 또는 생물학전 전환 분야에 중요한 공헌이 된다고 판단된다.

발효녹용 제조에 사용한 균주에 대한 원천기술을 확보함에 따라 특히 획득이 용이하고 이를 통한 응용제품 개발을 유도할 수 있다.

따라서 본 연구과제를 통하여 녹용의 우수한 기능성을 과학적으로 밝히고, 기능적 효능을 강화 할 수 있는 발효 기술을 접목한 새로운 기능성 식품 개발과 더불어 기능성 신소재 개발을 통하여 우수식품자원의 효과적인 활용 및 고부가가치화기술 기반을 확립하고자 한다.

#### 나. 경제·산업적 측면

최근들어 뉴질랜드 양육산업회(DINZ)는 더욱 강하게 국내 양육산업을 억압하고 있다. 이러한 DINZ는 깨끗한 청정 환경과 체계적인 녹용 생산 이력제 관리로 국내산 녹용시장을 크게 위협하고 있다. 뉴질랜드산 녹용은 거모기계, 원적외선 살균, 저온진공건조 설비, 향온항습설 등 첨단장비와 위생적인 시설을 이용하여 차별화된 판매 전략으로 국내 녹용시장을 잠식하고 있으며, 이러한 청정 공략은 한의원 부터, 소비자에 까지 강하게 어필되고 있는 실정이다. 반면 국내산 녹용은 사육시설과 국가 투자면에서 비교열세를 극복하기 어려운 실정이며, 얼마 지나지 않아 양육산업 자체의 존폐위기 까지 직면할 예정이다.

위기에 처해 있는 국내양육산업은 자체 경쟁력과 기능성 원료로서 경쟁력을 갖추지 않으면 끝없는 하락으로 벗어나지 못할 처지에 직면하고 있다. 따라서 본 연구에서는 국내산 양육산업의 경쟁력을 강화 하고 기능성이 부여된 원료개발을 통하여 다양한 생리활성을 지닌 식품 소재, 더 나아가서는 cosmeceutical 소재 개발이 가능하므로 국내 녹용의 우수성이라는 새로운 홍보 수단을 제공할 수 있고, 이들의 적극적 섭취를 유도시켜 성인병 예방과 국민건강 증진이라는 궁극적 목표도 달성 함과 동시에 국내 농가의 경쟁력을 포함하여 외국산과의 차별화 정책으로 국내 양육산업을 강화하면 지역 경제활성화에 기여함은 물론 해외수출증대에도 기여할 수 있을 것으로 기대된다.

## 2절. 연구개발 내용 및 범위

### 1. 녹용원료의 표준화 및 제품 개발

- 가. 문헌 및 데이터베이스를 이용한 기초자료 수집 : 개별인정형 건강기능식품의 신청에 필요한 섭취 근거자료, 안전성 정보자료, 섭취량 평가자료, 영양평가자료, 생물학적 유용성 자료 등을 아래의 문헌 및 데이터베이스를 통하여 확보.
- 나. 녹용원재료 및 기능물질 함유 추출물의 scale-up 표준화
- 다. 발효녹용 추출물 소재화시 기술과 공정들에 따른 추출물의 안정성 검증 (추출, 농축, 분말 공정에 따른 안정성 실험)
- 라. 액상/타블렛/캡슐 등의 제형 및 공정에 따른 최적화
- 마. 시제품 및 제품 개발
- 바. 건강기능식품의 기준/규격 인정에 관한 허가 자료 제출

### 2. 발효녹용의 기능성 연구 및 지표물질 선정(비임상연구)

- 가. 녹용의 발효 공정 표준화
- 나. 발효에 따른 전·후 기능성물질 변화 및 지표물질 표준화
- 다. 발효녹용추출물의 In vitro/vivo 생리활성 평가
- 라. 발효녹용추출물의 피로회복 작용기전에 대한 표능 평가 및 메카니즘 연구
- 마. 조혈 작용기전에 대한 효능 평가 및 메카니즘 연구

### 3. 발효녹용 추출물의 안전성평가(독성평가)

- 가. 녹용의 발효추출물을 이용한 건강기능성식품의 안전성 평가
- 나. “비임상시험관리기준(GLP)”에 따른 녹용의 발효추출물을 이용한 건강기능성식품의 안전성 평가
- 다. 단회투여독성시험 및 유전독성시험
- 라. 반복투여독성시험

### 4. 녹용추출물의 유효성 및 안전성을 평가하기 위한 인체적용시험(임상연구)

- 가. 발효녹용추출물의 유효성 및 안전성 규명
  - (1) 임상시험을 위한 IRB 승인
  - (2) 대상 피험자 선정
  - (3) 일차유효성 평가

- (4) 이차유효성 평가
- (5) 임상시험 진행



## 제 2 장 국내외 기술개발 현황

### 1절. 국내 기능성 식품 생산 및 시장현황

#### 1. 2011년 건강기능식품 생산실적 분석

2011년 건강기능식품 생산실적을 분석한 결과 총 생산액은 1조3천682억원으로 2010년 대비 (1조671억원) 대비 28.2% 증가하였으며, 이는 건강기능식품 연평균 성장률(27.4%)과 비슷한 수준인 것으로 나타났다. 건강기능식품 생산액은 건강기능식품 제도가 시행된 '04년 2천506억 원에서 지난해에는 1조3천682억원으로 4.5배가량 증가한 것으로 분석되었다. 이 중 건강기능식품 수출액은 '10년도 460억원에서 '11년 556억원으로 21.0% 증가한 것으로 나타났다.

또한, 건강기능식품 생산액 기준 연평균 성장률은 27.4%로 국내 총생산(GDP) 5.9%, 제조업(GDP) 7.8% 보다 높은 성장률을 보이고 있다. 이러한 건강기능식품 산업 성장 추세는 우리나라가 고령화 사회로 진입하고 자기 건강관리(Self-Health Care)에 대한 관심 증가 등의 이유로 풀이된다.

#### 2. 2011년 건강기능식품 품목별 생산실적 분석

홍삼제품 생산액이 전체 건강기능식품 시장의 52.6%(7천190억원)을 차지하며 1위를 달성한 것으로 나타났다. 홍삼제품은 '04년 전체 건강기능식품 시장의 30%(1천920억원), '10년 54.5%(5천817억원)을 기록하며 현재까지 1위를 유지하고 있다. 그 뒤를 이어 비타민 및 무기질 제품(1천561억원), 개별인정형 제품(1천434억원), 알로에 제품(691억원), 오메가-3 지방산 함유 제품(508억원) 순으로 나타났다.

2010년 대비 가장 많이 증가한 품목은 감마리놀렌산 139.8% (93억→223억), 비타민 및 무기질 57.5%(991억→1,561억), 오메가-3 지방산 함유유지 46.2%(348억→509억)순으로 나타났다. 이러한 증가 추세의 원인은 감마리놀렌산과 오메가-3 지방산 함유유지 제품의 경우 육류 및 고지방식 섭취 증가로 인한 소비 수요가 증가한 것으로 풀이된다. 비타민 및 무기질 제품은 바쁜 일상 속에서 직장인들의 식이보충용 소비가 늘고 있는 것으로 분석된다.

### 3. 개별인정형 건강기능식품의 성장세

소비자 요구에 따른 새로운 기능성 원료를 사용한 ‘개별인정형’ 건강기능식품도 꾸준한 성장세를 나타내고 있다. 2011년도 개별인정형 건강기능식품 중 간 건강 제품이 531억원 생산액을 기록하며 1위를 차지하였으며, 그 다음으로 면역기능에 도움을 주는 제품(178억원), 관절/뼈건강 제품(153억원), 피부건강제품(100억원), 체지방감소 관련 제품(78억원) 순이었다.

특히, 체지방감소 제품은 ‘11년 개별인정제품 전체 생산액 중 5.5% (78억원)에 불과하나, 기존 개별인정제품으로 분류되던 고시형 제품으로 전환된 가르시니아카보비아추출물(207억원), 공액리놀렌산(67억원) 생산액까지 합산하면 그 시장규모는 훨씬 큰 것을 알 수 있다.

이러한 개별인정형 건강기능식품의 성장 요인은 우리 사회의 음주문화 등으로 간 건강 제품에 대한 소비 수요 증대, 일본 방사능 유출·환경오염·자외선 등으로 인한 면역기능이나 피부 건강에 대한 소비자 관심 증가 등의 이유로 풀이된다.

### 4. 2011년도 업체별 건강기능식품 생산실적 분석

(주)한국인삼공사가 지난해에도 생산액 5천331억원원을 달성하며 ‘04년부터 계속 1위를 유지하고 있는 것으로 나타났다. 그 뒤를 이어 (주)마임(549억원), (주)서흥캡셀(468억원), 일진 제약주식회사(403억원), (주)태평양제약(378억원)순으로 분석되었다.

2011년 상위 10개 업체의 매출액(8천559억원)이 전체 시장의 62.6%를 차지하여 일부 기업에 편중된 양상을 보이고 있으나, 건강기능식품을 생산하거나 판매한 실적이 있는 업체 수가 2007년 262개에서 2011년 320개소로 증가하고 있어 전체 시장은 활성화되고 있는 것으로 풀이된다. 또한, 틈새 시장개척과 일부 계층에 대한 맞춤형 제품개발 등이 활발해짐에 따라, 이와 같은 쏠림현상은 중장기적으로 완화될 것으로 전망된다.

○ 건강기능식품 생산 현황 ('04~'11)

구 분	총 생산액 (억원)	총 생산량 (톤)	내수용		수출용	
			생산액(억원)	생산량(톤)	생산액(억원)	생산량(톤)
2004	2,506	4,764	2,263	4,250	242	514
2007	7,235	10,578	6,888	10,239	346	339
2008	8,031	13,687	7,516	12,990	514	697
2009	9,598	19,885	9,184	19,293	415	592
2010	10,671	25,361	10,211	24,994	460	367
2011	13,682	40,258	13,126	39,611	556 <sup>1)</sup>	647
비율(% ( '11/'10))	28.2	58.7	28.5	58.5	21.0	76.3

1) 1\$ = 1,108원(2011)

○ 건강기능식품 연평균 증가율 현황 ('04~'11)

구 분	총 생산액 (억원)	총 생산량 (억원)	내수용		수출용	
			생산액(억원)	생산량(톤)	생산액(억원)	생산량(톤)
연평균 증가율(%)	27.4	35.6	28.5	37.6	12.6	3.3

○ 국내 총생산(GDP) 연평균 증가율 현황('04~'11)

구 분	건강기능식품 증가율(%)	국내총생산 (GDP)%	국내제조업 (GDP)%	비고
연평균 증가율(%)	27.4	5.9	7.8	

○ 품목별 총 생산액 현황(상위 10품목)

(단위 : 억원)

구 분		총 생산액					증가율 ('11/'10%)
		2007	2008	2009	2010	2011	
총 액		7,235	8,031	9,598	10,671	13,682	28.2
1	홍삼	3,284	4,184	4,995	5,817	7,191	23.6
2	비타민 및 무기질	604	531	761	991	1,561	57.5
3	개별인정형(밀크씨슬 등)	249	416	800	1,129	1,435	27.1
4	알로에	797	639	648	584	691	18.4
5	오메가-3 지방산 함유 유지	142	266	334	348	509	46.2
누계(5품목)		5,076	6,036	7,538	8,869	11,387	28.4
6	프로바이오틱스	174	190	254	317	405	27.8
7	인삼	348	413	364	341	381	11.7
8	감마리놀렌산	187	145	108	93	223	139.8
9	가르시니아캄보지아 추출물 <sup>1)</sup>	-	-	-	208	207	△0.5
10	식이섬유	3	1	99	117	116	△0.9
누계(10품목)		5,788	6,785	8,363	9,945	12,719	27.9
11	기타품목	1,447	1,246	1,235	726	963	32.6

1) '10.1.1일부터 개별인정형 품목에서 고시형 품목으로 재분류

○ 품목별 국내 판매 생산액 현황(상위 10품목)

(단위 : 억원)

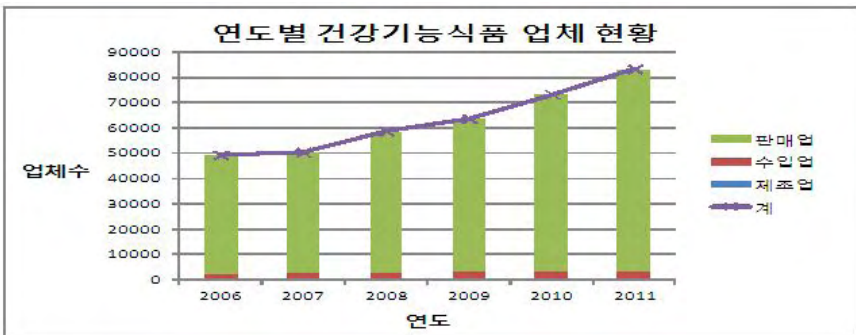
구 분		총 생산액					증가율 (11/10, %)
		2007	2008	2009	2010	2011	
총 액		6,888	7,516	4,869	10,211	13,125	28.5
1	홍삼	3,189	4,040	4,869	5,644	6,980	23.7
2	비타민 및 무기질	602	525	755	987	1,555	57.5
3	개별인정형(밀크씨슬 등)*	249	415	788	1,123	1,419	26.4
4	알로에	796	638	648	584	690	18.2
5	오메가-3 지방산 함유 유지	138	266	331	343	507	47.8
<b>누계(5품목)</b>		<b>4,974</b>	<b>5,884</b>	<b>7,391</b>	<b>8,681</b>	<b>11,151</b>	<b>28.5</b>
6	프로바이오틱스	119	108	150	207	278	34.3
7	인삼	171	183	211	206	231	12.1
8	감마리놀렌산	187	145	109	93	224	140.9
9	가르시니아캄보지아 추출물	-	-	-	207	206	△0.5
10	식이섬유	3	1	99	117	115	△1.7
<b>누계(10품목)</b>		<b>5,454</b>	<b>6,321</b>	<b>7,960</b>	<b>9,511</b>	<b>12,205</b>	<b>28.3</b>
11	기타품목	1,275	1,193	1,224	699	920	31.6

※ 개별인정형 : 고시된 품목이외에 안전성·기능성을 개별로 인정받은 기능성 원료로 제조한 건강기능식품

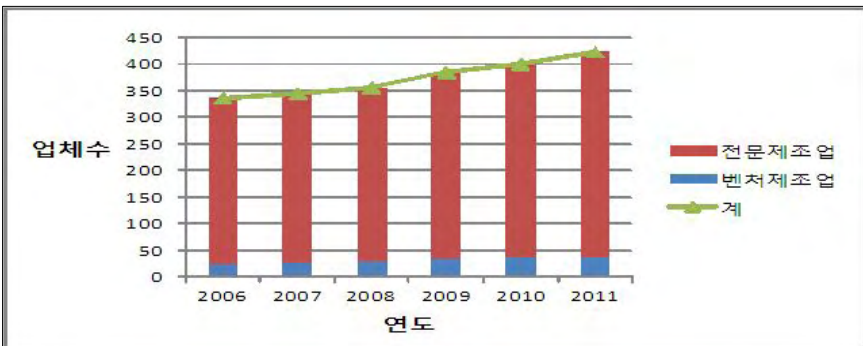
○ 건강기능식품 업체 현황

(단위 : 개소)

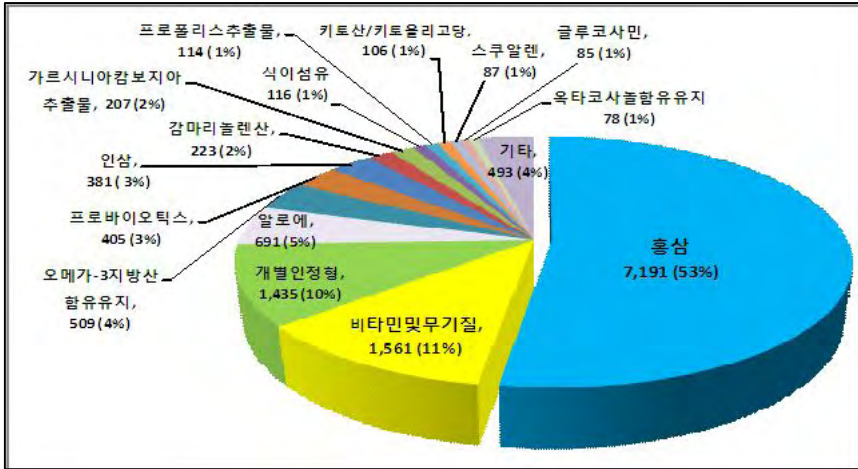
년도	계	건강기능식품 제조업			수입업	건강기능식품 판매업		
		소계	전문	벤처		소계	일반	유통전문
2006	49,203	337	313	24	1,955	46,911	45,833	1,078
2007	50,255	345	319	26	2,201	47,709	46,649	1,060
2008	58,570	356	328	28	2,395	55,819	54,538	1,281
2009	63,458	385	349	36	2,528	60,545	59,234	1,311
2010	73,177	401	364	37	2,764	70,012	68,554	1,458
2011	83,234	424	386	38	2,767	80,043	78,456	1,587
'11/'10 (%)	13.7	5.7	6.0	2.7	0.1	14.3	14.4	8.8



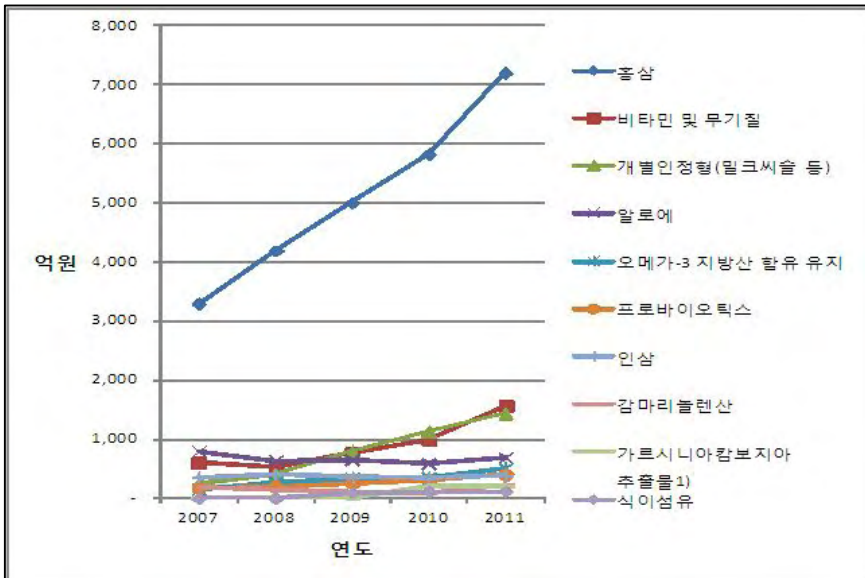
○ 건강기능식품 제조업체 현황



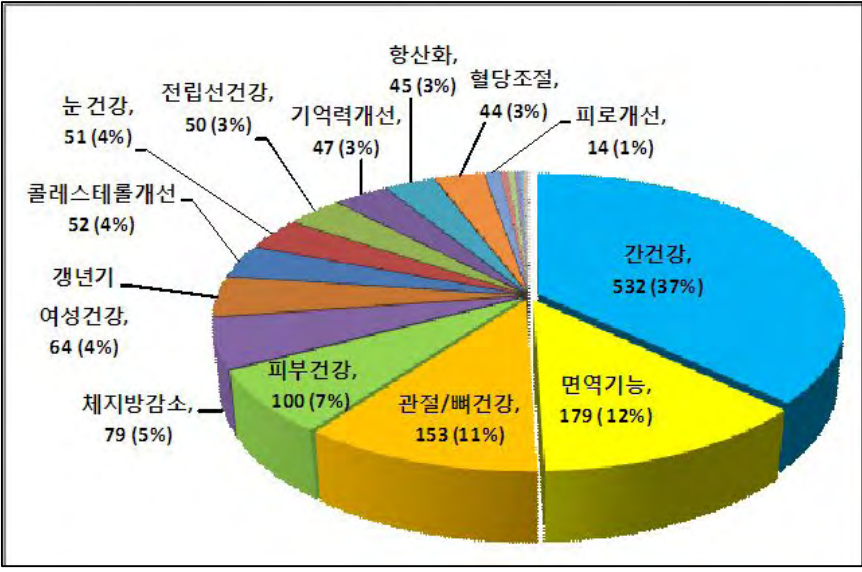
○ 건강기능식품 품목별 시장 현황 ('11년/억원)



○ 연도별 품목별 추이('11년)



○ 개별인정형 제품 기능성 내용별 현황('11년/억원)





## 2절. 국외 기능성 식품 생산 및 시장현황

### 1. 세계 건강기능 식품 시장

세계 건강식품 시장은 매년 8% 이상의 고성장이 되고 있다. 특히, 개발도상국의 소득증대, 건강식품투자 증가, 소비량 증가로 인한 고성장이 예상된다.

### 2. 미국의 건강기능 식품 시장

미국의 건강식품(영양) 산업은 세계건강식품 산업의 37.7% 차지하며 (2009년 기준), 건강식품(영양)산업 중 식이보충제군은 전년도 대비 6.2% 성장하였다. 정부관심은 Baby boomer의 silver세대 전환으로 관심 고조되고 있으며, 소비자의 관심도 Well-being (건강유지/미용), 자연식품 및 체질에 따른 식이요법에 따라 증가되고 있다.

### 3. 일본의 건강기능식품 시장

일본의 경우, 경기침체로 인해 건강기능식품의 시장 축소 경향을 보이고 있다. 특정보건용 식품의 허가 업무가 소비자청으로 이관되면서 심사업무의 일시 지연, 허가 품목 수 감소하고 있다.

#### ○ 세계 건강기능식품 분류별 매출액 현황

(단위 : 백만 불)

구분	2004	2005	2006	2007	2008
식이보조식품 (Dietary Supplements)	61,104	64,957	68,275	72,231	76,545
유기농 식품 (Natural & Organic Foods)	44,865	50,058	56,064	63,235	70,799
유기농 제품 (Natural & Organic Products)	17,006	18,841	21,043	24,309	27,099
기능성식품 (Functional Foods)	73,705	79,505	85,196	90,112	95,354
계	196,679	213,361	230,578	249,886	269,797

○ 세계 건강기능식품 규모 (2005~2008)

(단위 : 백만 불)

제품유형	2005	2006	2007	2008	연평균 성장률
비타민&무기질	26,983	28,290	29,815	31,978	5.8
허브/식물류	18,710	19,435	20,255	20,901	3.8
상기 유형 이외의 식이보충제	19,264	20,550	22,161	23,666	7.1
자연&유기농식품	50,058	56,064	63,235	70,799	12.3
자연&유기 퍼스널 케어/가정식	18,841	21,043	24,309	27,099	12.9
기능성식품	79,505	85,196	90,112	95,354	6.3
총 판매액	213,361	230,578	249,886	269,797	8.2

### 3절. 국내·외 녹용 기술개발 현황

#### 1. 국내현황

사슴뿔은 매년 성장과 낙각을 반복하며, 뿔 내부의 모세혈관이 분포되어 있어 성장하면서 지속적인 혈액순환이 이루어진다는 점에서 다른 동물의 뿔과는 전혀 다른 성장과정을 하는 부분이다 또한 사슴의 뿔은 봄에 자라기 시작하여 약 4개월 동안 성장하여 부드러운 털로 둘러 쌓인 녹용을 만들며, 표면의 털이 거칠어지면서 서서히 벗겨지기 시작하여 녹각으로 변화된다. 사슴의 뿔은 이렇게 녹용과 녹각 두 가지로 부러진다. 하지만 녹용과 녹각은 그 효능과 성상 면에서 많은 차이가 있어 과거부터 녹용을 주요 효능물질로 다루었다. 이러한 사슴뿔인 녹용은 그 효용가치가 매우 고귀하여 옛날부터 귀한 약재로 활용되었으며, 국내에서도 관련 효능을 입증하기 위한 연구가 다양하게 이루어 졌으나, 대부분 뉴질랜드산, 중국산을 원료를 사용하였으며, 그 효능에 대한 실험이 세포주 실험이나, 동물실험에서 그쳐 실제적인 사람에 대한 효능을 밝히는 데는 한계가 있었다.

구 분	산 지	요 약
국내	뉴질랜드	Modifying Effect of Fermented Pilose Antler on Immunological Function and Hepatocarcinogenesis(국립보건안전연구원보, 1994)
국내	뉴질랜드	복수암 생쥐에 대한 발효녹용의 항암작용(약학회지, 김동현, 1994)
국내	뉴질랜드	대장암모델 생쥐에 발효녹용의 발암억효과(경희대약대논문집, 김동현, 1995)
국내	중국	Studies of the Chemical Structure of Gangliosides in Deer Antler, <i>Cervusnippon</i> (Che.Pharm, 전길자, 1999)
국내	국산, 뉴질랜드, 중국	녹용의 품종에 따른 조혈작용 비교 연구(생약학회지, 김성훈, 2004)
국내	중국	녹용과 녹각의 성장기 흰쥐 장골 길이 성장에 대한 효과(대한본초학회지, 전길자, 2006)
국내		녹용추출물이 성장기 흰쥐의 혈중 IGF- I 농도, 골격성장 및 비장 세포 증식능에 미치는 영향(한국영양학회지, 장수정, 2006)

현재 국내 녹용시장은 1~9두 정도 사용하는 영세한 수준의 능가가 대부분을 차지하고 있으며, 2002년부터 지금까지 사육두수가 급속히 감소하면서 국내 양록산업이 위기를 맞고 있다. 이는 1991년 3월 29일 상공부 수입자유화계획수립과 1994년 우루과이라운드(UR) 농업 협상 이후 절편녹용 등의 녹용시장 개방과 국내 경기침체에 따른 판매 저하, 불안정한 유통구조,

사료가격 급등에 따른 경영여건 악화로 인해 사슴 사육 의욕이 저하되었기 때문인 것으로 보고 있다.

또한 우리나라는 세계 녹용 생산량의 약 80%를 소비하는 녹용 산업의 최대의 시장임에도 2010년 기준 국내 녹용 생산량은 119톤으로 자급률이 21% 미만으로 나타났다고 보고되었다. 게다가 국내에서 유통되는 국산녹용의 대부분은 건강원을 통하여 판매되고 있기 때문에 위생적 관리뿐만 아니라 녹용의 유통 현황조차 정확히 파악하기 어려운 실정이며, 녹용의 효능은 과학화를 통한 효능과 기능성에 대해 정확히 보고된바가 적어 소비자들이 점점 녹용을 의면하고 있다.

따라서 본 연구에서는 녹용의 효능을 과학적으로 밝히고 개별인정형원료 개발을 통하여 일반식품뿐만 아니라 기능성식품군으로 녹용시장을 전문화와 다양화 시켜 국내·외 양록산업을 육성하고자 한다.

## 2. 국외현황

국외에서 녹용을 이용한 소재를 꾸준히 증가하고 있다. 특히 국내에 녹용 수출 1,2위를 차지하는 중국, 러시아, 뉴질랜드는 보다 체계적이고 위생적인 녹용공급을 위해 끊임 없는 투자를 유치하고 있다.

뉴질랜드의 경우 청정 자연환경을 배경으로 생육한 사슴으로부터 얻은 녹용의 효능을 강조하며 캡슐, 정제 등 다양한 제품군을 개발하고 있다. 또한 첨단장비와 위생적인 시설을 이용하여 차별화된 판매 전략으로 국내 녹용시장을 잠식하고 있으며, 이러한 청정 공략은 한의원부터, 소비자에 까지 강하게 어필되고 있는 실정이다.

하지만, 대부분의 국외 제품은 단순 가공제품으로 생산되고 있기 때문에 외국 녹용과의 기능적 차별화를 도출한 연구가 이루어진다면 경쟁력있는 고부가가치의 제품을 개발 할 수 있을 것으로 기대된다.

## 제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

### 1절. 재료 및 방법

#### 1. 녹용의 원료 표준화를 위한 연구

##### 가. 녹용

사슴은 크게 일본사슴(Japanese sika deer), 대만사슴(Formosna sikd deer), 만주사슴, 엘크 사슴(Elk or Wapiti), 레드디어(적록, Red deer), 삼바사슴(수룩, Sambar deer), 펠로우사슴(Fallow deer), 사불상사슴(Pere david deer), 순록(rain deer) 등의 종류가 있으며(한국사슴 협회), 녹용에 대한 한국, 중국, 일본의 일반적인 정의는 나라마다 약간의 차이가 있지만, 그 기원은 유사하다.

##### (1) 녹용에 대한 정의

○ 대한약전외한약(생약)규격집 『녹용(鹿茸)』

이 약은 매화록(梅花鹿) *Cervus nippon* Temminck, 마록(馬鹿) *Cervus elaphus* Lin 또는 대록(大鹿) *Cervus canadensis* Erxleben (사슴과 Cervidae)의 숫사슴의 털이 밀생되고 아직 골질화되지 않았거나 약간 골질화된 어린 뿔을 자른 다음 말린 것.

○ 중화인민공화국약전[2005년판] 『녹용(鹿茸)』

이 약은 녹과(鹿科) 동물인 꽃사슴(梅花鹿) *Cervus nippon* Temminck 혹은 마록(馬鹿) *Cervus elaphus* Linnaeus 의 수컷의 골화되지 않은 솜털이 촘촘한 어린뿔. 전자는 속칭 “화녹용(花鹿茸)”, 후자는 “마녹용(馬鹿茸)”이라고 부른다. 여름과 가을에 톱으로 잘라서 채취하여 가공한 다음 그늘진 곳에서 말리거나 불에 쪄어 말림

○ 일본의 원색일본화한약도감 등 『녹용(鹿茸)』

만주사슴(梅花鹿) *Cervus (Sika) nippon mantchurcus* Swinhoe 또는 만주붉은사슴(馬鹿) *Cervus elaphus xzanthopygus* Minlne-Edwards 등의 각화되지 않은 어린 뿔 만주붉은사슴(馬鹿) *Cervus elaphus xzanthopygus* Minlne-Edwards, 시베리아사슴 *Cervus canadensis* Severtzow 또는 만주사슴 *Cervus (Sika) nippon mantchurcus* Swinhoe의 각질화되지 않은 어린 뿔

(2) 사슴과의 분류

The Encyclopedia of Animals의 분류에 따르면 최추동물문/포유동물강/유태반아강/유제목/반추아목/사슴과/아슴아과/사슴속

사슴 아과 (Cervinae)	4속	Dama sp.	1종	2아종
	14종	Axis sp.	4종	4아종
	71아종	Cervus sp.	8종	65아종
		Elaphus sp.	1종	
고라니 아과 (Hydropotinae)	1속	Hydropotes sp	1종	2아종
	1종			
	2아종			
흰꼬리사슴 아과 (Odocoilinae)	9속 15종 96아종	Odocoileus sp.	2종	49아종
		Capreolus sp.	1종	3아종
		Alces sp.	1종	6아종
		Rangifer sp.	1종	9아종
		Blastocerus sp.	1종	
		Ozotoceros sp.	1종	3아종
		Hippicamelus sp.	2종	
		Mazama sp.	4종	24아종
문작 아종 (Muntiacinae)	2속	Pudu sp.	2종	2아종
	6종	Muntiacus sp.	5종	17아종
	20아종	Elaphodus sp.	1종	3아종

\*

녹용의 기원동물 및 원산지에 대한 설명(식약처, 2012)

(3) Cervus sp 일람표

일반명칭	학명	체구	분포	서식지
붉은사슴, 적록, 마록, red deer, maral	<i>Cervus elaphus</i> (12아종)	H: 70~150 cm W: 73~340 kg	산림 숲	유럽, 소아시아, 소련, 중국
엘크, 와피티, 대록, wapiti, elk	<i>Cervus canadensis</i> (13아종)	H:130~152 cm W:240~454 kg	초원 숲	북미, 중국, 몽고
일본사슴 sika(Japanese) deer	<i>Cervus nippon</i> (13아종)	H: 65~109 cm W: 28~ 81 kg	산림	한국, 일본, 대만 중국동북부, 북구, 남서부
물사슴, 수록 sambar	<i>Cervus unicolor</i> (16아종)	H: 61~142 cm W:227~272 kg	산림	필리핀, 인도네시아, 중국남부, 버마, 인도
흰입사슴, 白麂鹿, Ehroid's deer	<i>Cervus albirostris</i>	H:122cm W: 불명		티베트
늪사슴, 바라싱가 Swamp deer, barasingha	<i>Cervus duvauceli</i> (2아종)	H:119~124 cm W:172~182 kg	습지대 초원	인도북부, 중앙부, 네팔
타민사슴, 엘드사슴 Eld's deer, thamin	<i>Cervus eldi</i> (3아종)	H:114 cm W: 불명	습지대	인도, 태국, 버마, 베트남, 해남도습지대
루사사슴 Rusa(Timor)deer	<i>Cervus timorensis</i> (6아종)	H: 86~110 cm W: 86~ 98 kg	초원 산림	인도네시아

\* 녹용의 기원동물 및 원산지에 대한 설명(식약처, 2012)

일반적으로 유통되는 명칭은 러시아산(원용 : 마록), 중국산(깔깔이 : 마록, 매화용 : 매화록), 뉴질랜드산(적록계 사슴), 한국산(대록, 엘크)이 주를 이룬다.

실험에 사용한 녹용(학명 : *Cervus canadensis* Erxleben, 일반명칭 : elk or wapiti)은 엘크사슴으로부터 절각한 뿔을 원료로 하였으며, 원료의 표준화를 위하여 한국사슴협회의 M.O.U를 체결하고, 한국사슴농민연합회로부터 6~12년령된 사슴으로부터 털이 밀생하고 뿔 성상이 끝은 골질화되지 않은 사슴뿔을 선정하였다.

사슴의 주 먹이는 건조, 옥수수를 주식으로 사육되고, 대한약전외한약(생약)규격집 (2007) 기준에 의거하여 건조감량 12% 이하(6시간), 회분 : 33% 이하(절편 기준)인 국산 녹용을 두꺼서 1~3mm가 되게 세절하여 건조 후 사용하였다.

또한 산지별 녹용 성분을 비교하기 위하여 국산(엘크), 러시아산(엘크), 중국산(엘크), 뉴질랜드산(레드 디어) 녹용의 일반성을 비교 분석하였다.

## 나. 녹용의 산지별 일반성분

### (1) 수분 함량

수분함량은 AOAC법에 따라 105℃ 상압가열건조법으로 분석하였다. 항량된 칭량 접시에 검체 2g을 정밀히 달아 뚜껑을 약간 열어 놓고 105℃ dry oven에서 3~5시간 건조 후 데시케이터에서 약 30분간 방냉 후 무게를 달았다. 다시 칭량접시를 1~2시간 건조하여 항량이 될 때까지 같은 조건으로 반복하였다.

### (2) 회분 함량

회분측정은 식품공전에 등재된 방법에 따라 실시하였다. 항량 된 회화용기에 시료 약 2g을 정밀히 취한 후 550~600℃ 회화로에서 여러 시간 가열하여 백색 ~ 회백색의 회분이 얻어질 때까지 회화하였다. 회화가 끝난 후, 가열을 그치고 그대로 식혀 온도가 약 200℃로 되었을 때 데시케이터에 옮겨 방냉 후 회분무게를 칭량하였다.

### (3) 조단백질 함량

조단백질 분석은 AOAC법에 따라 행하였다. 질소(N) 함량이 2~3mg에 해당하는 양의 시료를 정밀히 취하여 킬달플라스트에 넣고 여기에 분해촉진제 약 0.5g을 넣은 후 10ml의 황산을 넣고 분해하였다. 검체의 탄화물이 보이지 않을 때까지 온도를 높여 끓이고 분해액이 투명한 담청색이 되면 다시 1~2시간 가열을 계속하였다. 분해가 끝난 분해액은 냉각시킨 후 증류장치에 연결하여 조단백질 함량을 측정하였다.





낮은 함량을 보였다. 특히 상대의 조단백 함량이 분골에 비해 다소 높게 나타난 이유는 분골과 상대의 구분이 명확하게 되어지지 않은 듯 하다. 조회분의 양은 녹용의 밑부분으로 내려갈수록 증가하는 경향을 보였다. 이는 이미 알려져 있듯이 사슴의 불이 성장하면서 중대 밑 부분은 골질화되는 현상을 보이기 때문이다. 조지방의 함량은 한국산과 뉴질랜드산이 다소 높게 나타났으며, 이는 러시아나 중국산의 녹용 건조시 열풍 건조를 활용하는 반면 한국산이나 뉴질랜드산은 동결 건조한 것으로 건조에 다른 영향으로 추정된다.

일반성분 중 상대적으로 함량이 적은 탄수화물은 다른 성분에 비해 낮은 함량을 보였다. 특히 한국산 녹용의 탄수화물 함량이 다른 산지 녹용에 비해 높게 나타났으나, 그 함량은 단백질이나 회분에 비해 낮은 수준이다. 녹용의 일반성분은 산지별 큰 차이가 없는 듯 하나 부위별 차이는 많은 함량 차이를 보였다.

## 2. 발효녹용추출물의 표준화를 위한 연구

### 가. 발효녹용추출물 실험 재료

발효녹용추출물은 Q.C 합격한 건조 녹용을 30~50mesh 분쇄 후 녹용기준 배합량을 10~20배수의 정제수를 투입한 후 121℃에서 60분간 멸균하다. 멸균 후 탱크 온도를 30℃로 냉각 시킨 후 *Bacillus subtilis* KCTC 11454BP를 접종하여 24~48시간 동안 교반속도 300rpm, 통기량 0.3vvm, 내압 0.5kg/cm<sup>2</sup>의 조건으로 발효한다. 발효가 완료된 후 균 사멸을 위하여 100℃에서 4시간 살균 후 50℃로 냉각하여 1차 mesh 망 여과를 진행한다. 여과된 발효물은 펄라이트 약 5% 조건에서 필터프레스 여과를 진행하고, 진공농축기를 이용하여 농축 후 영하 50~70℃에서 냉동한 후 48시간 이상 동결건조기를 이용하여 건조하여, 성상, 미생물, 수분 등의 적합여부를 확인한 후 시험 원료로서 사용한다.

### 나. 발효녹용추출물의 일반성분

#### (1) 수분 함량

수분함량은 AOAC법에 따라 105℃ 상압가열건조법으로 분석하였다. 항량된 칭량 접시에 검체 2g을 정밀히 달아 뚜껑을 약간 열어 넣고 105℃ dry oven에서 3~5시간 건조 후 데시케이터에서 약 30분간 방냉 후 무게를 달았다. 다시 칭량접시를 1~2시간 건조하여 항량이 될 때까지 같은 조건으로 반복하였다.

#### (2) 회분 함량

회분측정은 식품공전에 등재된 방법에 따라 실시하였다. 항량된 회화용기에 시료 약 2g

을 정밀히 취한 후 550~600℃ 회화로에서 여러 시간 가열하여 백색 ~ 회백색의 회분이 얻어질 때까지 회화하였다. 회화가 끝난 후, 가열을 그치고 그대로 식혀 온도가 약 200℃로 되었을 때 데시케이터에 옮겨 방냉 후 회분무게를 칭량하였다.

### (3) 조단백질 함량

조단백질 분석은 AOAC법에 따라 행하였다. 질소(N) 함량이 2~3mg에 해당하는 양의 시료를 정밀히 취하여 킬달플라스크에 넣고 여기에 분해촉진제 약 0.5g을 넣은 후 10ml의 황산을 넣고 분해하였다. 검체의 탄화물이 보이지 않을 때까지 온도를 높여 끓이고 분해액이 투명한 담청색이 되면 다시 1~2시간 가열을 계속하였다. 분해가 끝난 분해액은 냉각시킨 후 증류장치에 연결하여 조단백질 함량을 측정하였다.

### (4) 조지방 정량

녹용의 조지방 함량은 식품공전 방법에 따라 분석하였다. 미세분말로 한 검체 2~10g을 달아 원통여과지에 넣고 검체 위에 탈지면을 가볍게 충전하여 이를 적당한 용기에 담아 100~105℃의 건조기에서 2~3시간 건조한 후, 데시케이터에서 식히고 속시레추출기의 추출관에 넣는다. 받는 그릇에 무수에테르 약 1/2용량을 넣어 장치하고 8시간 추출한다. 추출이 끝난 후 에테르를 완전히 증발시키고 98~100℃의 건조기에 넣어 약 1시간 항량이 될 때까지 건조한 다음 데시케이터에서 식히고 칭량한다.

### (5) 탄수화물

탄수화물 함량은 100에서 수분, 회분, 조단백, 조지방 함량을 뺀 값으로 구한다.

### (6) 철 함량

식품공전 소페난트로린 비색법으로 실험하였다. 발색된 샘플을 분광광도계(Spectrophotometer) 510nm의 파장에서 흡광도를 측정하여 비흡광계수를 구한 후 검량선을 기준으로 철의 함량을 구한다.

## 다. 발효농축추출물의 지표물질 분석

### (1) 지표물질 선정

농축 발효물의 기능성 물질 및 지표물질인 S-GAG와 salic acid, 산성당, 아미노산 등을 비교하여, 발효 후 일정하게 함량 증가를 보인 hydroxyproline을 지표물질로 선정하였다.

### (2) 지표물질(hydroxyproline) 함량 분석

지표물질인 hydroxyproline은 비필수 아미노산으로써 발효전·후를 지표 할 수 있는 물질이다. 일반명칭은 히드록시프롤린((2S,4R)-4-hydroxypyrrolidine-2-carboxylic acid)이며, 분자식은  $C_5H_9O_3N$ , 분자량은 131.13이다. 분석장비는 아미노산 분석기(Biochrom 30 Amino acid Analyser), 자외부흡광검출기(UV Detector-570nm,440nm), Cation separation Column Sodium 4.6X150mm(Biochrom 30)을 사용하였다.

검체 약 1g을 취한 후 50ml 플라스크에 넣은 후 0.2M sodium citrate(ph 2.2)용액으로 표선까지 맞춘 후 초음파 진탕기에서 충분히 녹인 후 상온에서 식힌다. 상기 용액을 멤브레인 필터(0.2μm)로 여과하여 시험용액으로 한다. 분석 장비는 아미노산 분석기(biochrom 30, or Hitachi Amino acid analyser), 검출 파장 440, 570nm에서 분석여 검출값은 다음과 같이 한다.

### ○ 아미노산분석기 검출 조건

항목	조건
주입량	20 μl
칼럼온도	46~95℃
이동상	Sodium citrate buffer(0.2M, 1.2M)
유속	35 mL/h
검출기 파장	440, 570 nm

유리히드록시프롤린(Hydroxyproline) 함량(mg/g) =  $C \times V / W$

C : 시험용액중의 Hydroxyproline 농도 (mg/mL)

V : 시험용액의 전량 (mL)

W : 시료채취량 (g)

라. 중금속 및 잔류농약 분석

- (1) 납, 비소, 카드뮴, 총수은 분석은 식품공전 유해성중금속시험법을 따르며, 한국기능식품 연구원에 의뢰하여 확인하였다.
- (2) BHC, DDT, 알드린, 디엘드린, 엔드린 분석은 식품공전 식품 중 농약잔류시험법에 따라 실험하며, 한국기능식품연구원에 의뢰하여 확인하였다.

**3. 발효녹용추출물의 안전성 연구**

식품의약품안전청고시 제2009-116호 “의약품등의 독성시험기준”과 식품의약품안전청고시 제2009-183호 “비임상시험관리기준(GLP)”에 따른 녹용의 발효추출물을 이용한 건강기능성식품의 안전성 평가 하였다.

**가. 랫드를 이용한 발효녹용추출분말의 단회투여독성시험 (경구)**

(1) 재료 및 방법

- (가) 명칭 : 발효녹용추출분말
- (나) 제조(로트)번호 : 기재되지 않음
- (다) 입수일 : 2011년 04월 25일
- (라) 입수량 : 125.03 g, 127.38 g, 127.54 g, 125.27 g, 126.93 g, 126.14 g, 124.32 g, 125.67 g, 126.72 g, 125.65 g, 126.55 g, 124.81 g, 126.13 g, 125.59 g, 124.62 g (용기포함)
- (5) 외관 및 색상 : 연한 갈색분말
- (6) 보관조건 : 냉동
- (7) 안정성 : 상온상압에서 안정
- (8) 취급시 주의사항 : 시원하고 건조한 곳에 완벽히 밀봉하여 보관하고, 통상 화학품과 같이 보호구를 착용하여 취급

(2) 부형제

- (가) 명칭 : 멸균증류수
- (나) 외관 및 색상 : 투명 액체
- (다) 선정이유 : 용해성 확인시험 결과, 용해가 잘되는 것이 확인되어 멸균증류수를 부형제로 선택하였다.

(3) 투여할 시험물질 조제

투여당일 시험물질 12 g을 멸균증류수 60 ml에 용해시켜 해당 시험물질의 농도 2,000 mg/kg의 용량을 조제한 후, 이 시험용액을 단계별 희석하는 방법으로 나머지 용량(1,000, 500 mg/kg)의 시험용액을 조제하였다. 투여 당일 오전에 조제 후 바로 투여 하였으므로 안정성 및 균질성시험은 수행하지 않았다.

(4) 보관 및 취급

시험 중 시험물질은 시험물질보관실 실온보관고에 보관하였다. 시험 종료 후 시험에 사용하고 난 여분의 양은 실온보관고에 보관하였다.

(5) 시험계

(가) 종 및 계통 : SD(Sprague-Dawley) 계통의 특정병원균 부재(SPF) 랫드

(나) 공급원 : 오리엔트바이오 (경기도 성남시 중원구 상대원동 143-1번지)

(다) 시험계의 선택이유

본 시험에 사용하는 랫드는 일반독성시험에 널리 사용되고 있으며, 풍부한 시험기초자료가 축적되어 있어 실험결과의 해석 및 평가가 용이 하기 때문에 본 시험계를 선택하였다.

(라) 입수일 : 2011 년 05 월 17 일

(마) 입수동물 성별 및 수 : 수컷 22 마리, 암컷 22 마리

(바) 입수시 주령 및 체중범위

수컷 : 7 주령, 196.99 ~ 210.55 g

암컷 : 7 주령, 151.37 ~ 165.82 g

(사) 검역 및 순화기간

시험은 입수 후 7일 순화기간을 두었으며 순화기간 중 일반증상을 매일 관찰하여 건강한 동물만 시험에 사용하였다. 시험계에 대한 검역은 동물공급업체에서 분석한 시험계 미생물검사 성적서를 참조하였다.

(아) 투여개시시 주령 및 체중 범위

수컷 : 8 주령, 234.02 ~ 253.64 g

암컷 : 8 주령, 169.90 ~ 184.73 g

(자) 사용 동물수 : 군별 암수 각 5 마리 씩 총 40 마리를 사용하였다.

(타) 군분리법 : 투여개시 전일에 체중을 측정하고 순위화한 체중을 이용한 무작위법에 의해 군 분리를 하였다.

(카) 식별법

개체식별은 미부표시법 및 사육상자별 개체식별카드 표시법을 이용하고 사용동물실의 입구에는 시험번호, 의뢰기관명, 동물실 사용기간, 시험책임자명, 시험자명을 기재한 동물실 사용기록지를 부착하였다.

(타) 잔여동물의 처치 : 잔여동물은 안락사 처리 하였다.

(6) 사육환경

(가) 동물실 : SPF 사육구역 1 호실

(나) 온습도 범위 : 온도 20.6~22.8 °C, 상대습도 45.8~57.2 %RH

(다) 환기횟수 : 10~15 회/hr.

(라) 명암 cycle : 형광등조명 12 hr. (08:00 점등~20:00 소등)

(마) 조도 : 288 Lux.

(바) 소음 : 51.6 dB

(사) 암모니아 농도 : 5 ppm 이하

(아) 사육상자의 종류(크기) : 순화, 검역, 투여 및 관찰기간 중 스테인레스제 망사육상자 (250W x 350L x 180H mm)에 수용하였다.

(자) 사육상자 당 동물수 : 순화기간, 투여 및 투여 후 관찰기간 중 3 마리 이하

(차) 사육상자 교체주기 : 군 분리시 교체

(카) 사 료

① 종류 : 실험동물용 고품사료

② 공급원 : 두얼바이오텍

③ 생산자 : Harlan

④ 급여법 : 급이기를 이용하여 자유섭취 시켰다.

⑤ 오염물질 확인 : 사료생산자로부터 공급된 자료를 이용하였다.

(타) 물

① 종류 : 정수과정을 거친 인천광역시 음용 상수도수

② 급수방법 : 물병을 이용한 자유섭취

③ 오염물질의 분석 : 국가공인 검사기관에서 검사한 자료를 참조하였다.

(7) 시험방법

(가) 투여경로 : 경구

(나) 선택이유 : 경구투여시의 독성을 알아보기 위하여 실시하였다.

(다) 투여부위 및 투여법

투여 전 하루 밤 동안 절식시켜 위 내용물을 비운 후 경구투여용 존데를 이용하여 강제 경구투여 하였으며, 약 4 시간 후 사료를 재 급여 하였다.

(라) 투여액량 : 투여 당일 측정된 체중을 기준으로 10 ml/kg으로 투여액량을 계산하였다.

(마) 투여횟수 및 투여기간 : 1 회/일

(8) 시험군의 구성

군	성별	동물수 (마리)	동물번호	투여액량 (ml/kg)	투여량 (mg/kg)
G1	Male	5	01~05	10	0
	Female	5	21~25	10	
G2	Male	5	06~10	10	500
	Female	5	26~30	10	
G3	Male	5	11~15	10	1,000
	Female	5	31~35	10	
G4	Male	5	16~20	10	2,000
	Female	5	36~40	10	

(9) 투여량 설정이유

단회투여독성에서 일반적으로 사용되는 상한값인 2,000 mg/kg의 용량을 고용량으로 설정하여 2 배수 간격으로 시험군을 설정하였다.

(10) 시험방법 및 시험항목

(가) 일반증상관찰

생존한 모든 시험동물에 대하여 매일 1 회 일반증상관찰을 실시하였으며, 투여 당일에는 투여 직후 및 이후 6 시간까지 매시간 마다 관찰하였다. 일반증상관찰은 투여 후 14 일까지 실시하였다.



(나) 체중측정

생존한 모든 시험동물에 대하여 투여 전, 투여 후 1, 3, 7 및 14 일에 측정하였다.

(다) 부검

시험물질을 노출시킨 모든 시험동물은 투여 후 14 일째에 부검을 실시하였다. CO<sub>2</sub> 가스를 이용하여 마취시킨 후 개복하여 복대동맥을 절단하여 방혈 치사 시킨 후 육안으로 모든 장기를 검사하였다.

(11) 자료의 통계처리

체중변화는 일원배치 분산분석을 이용하여 군간 비교 하였다. 반수치사량 산출은 사망동물이 관찰되지 않아 실시하지 않았다.

**나. 랫드를 이용한 발효녹용추출분말의 2 주 반복경구투여 용량결정시험 (경구)**

(1) 재료 및 방법

(가) 명칭 : 발효녹용추출분말

(나) 제조(로트)번호 : 기재되지 않음

(다) 입수일 : 2011 년 04 월 25 일

(라) 입수량 : 125.03 g, 127.38 g, 127.54 g, 125.27 g, 126.93 g, 126.14 g, 124.32 g, 125.67 g, 126.72 g, 125.65 g, 126.55 g, 124.81 g, 126.13 g, 125.59 g, 124.62 g (용기포함)

(마) 외관 및 색상 : 연한 갈색분말

(바) 보관조건 : 냉동

(사) 안정성 : 상온상압에서 안정

(아) 취급시 주의사항 : 시원하고 건조한 곳에 완벽히 밀봉하여 보관하고, 통상 화학품과 같이 보호구를 착용하여 취급

(2) 부형제

(가) 명칭 : 멸균증류수

(나) 외관 및 색상 : 투명 액체

(다) 선정이유 : 용해성 확인시험 결과, 용해가 잘되는 것이 확인되어 멸균증류수를 부형제로 선택하였다.

### (3) 시험물질 조제

투여당일 시험물질을 칭량하고, 부형제인 멸균증류수에 용해시켜 고용량군(2,000 mg/kg)을 조제한 후, 이 시험용액을 단계별 희석하는 방법으로 나머지 용량군 (1,000 및 500 mg/kg)의 시험용액을 조제하였다. 투여 당일 오전에 조제 후 바로 투여하기 때문에 안정성 시험은 수행하지 않았다.

### (4) 보관 및 취급

시험 중 시험물질은 시험물질보관실 108-3 냉동고에 보관하였다. 시험 종료 후 시험에 사용하고 난 여분의 양은 시험물질보관실 108-4 냉동고에 보관하였다. 조제된 시험용액은 조제 후 바로 투여하기 때문에 보관조건은 기술하지 않았다.

### (5) 시험계

(가) 종 및 계통 : SD(Sprague-Dawley) 계통의 특정병원균 부재(SPF) 랫드

(나) 공급원 : 오리엔트바이오(경기도 성남시 중원구 상대원동 143-1번지)

(다) 시험계의 선택이유

본 시험에 사용되는 랫드는 일반독성시험에 널리 사용되고 있으며, 풍부한 시험기초자료가 축적되어 있어 실험결과의 해석 및 평가가 용이 하기 때문에 본 시험계를 선택하였다.

(라) 입수일 : 2011 년 06 월 09 일

(마) 입수시 동물수 : 암수 각 25 마리

(바) 입수시 주령 : 암수 각 5 주령

(사) 입수시 체중 범위

수컷 : 130.98 ~ 145.47 g

암컷 : 104.36 ~ 117.10 g

(아) 검역 및 순화기간

입수 후 7 일간 순화기간을 두었으며, 순화기간 중 일반증상을 매일 관찰하여 건강한 동물만 시험에 사용하였다. 검역은 동물공급처에서 분석한 시험계의 병원체 검사 성적서를 참조하여 검역을 실시하였다.

(자) 투여개시시 주령 : 암수 각 6 주령

(차) 투여개시시 체중 범위

수컷 : 206.07 ~ 229.58 g

암컷 : 151.44 ~ 169.10 g

(카) 사용 동물수 : 암수 각 20 마리

(타) 군분리법 : 투여개시 1 일전에 순위화한 체중을 이용하여 군 분리를 하였다.

(파) 식별법

개체식별은 미부표시법 및 사육상자별 개체식별카드 표시법을 이용하고 사용동물실의 입구에는 시험번호, 의뢰기관명, 동물실 사용기간, 시험책임자명, 시험자명을 기재한 동물실 사용기록지를 부착하였다.

(하) 잔여동물의 처치 : 최종부검일에 안락사 처리하였다.

## (6) 사육환경

(가) 동물실 : SPF 사육구역 3 호실

(나) 온습도 범위 : 온도  $21.4 \pm 0.5$  °C, 상대습도  $53.9 \pm 1.5$  %RH

(다) 환기횟수 : 10~15 회/hr.

(라) 명암 cycle : 형광등조명 12 hr.(08:00 점등~20:00 소등)

(마) 조도 : 283 Lux.

(바) 소음 : 52.3 db

(사) 암모니아 농도 : 5 ppm 이하

(아) 사육상자의 종류(크기)

순화, 검역, 투여 및 관찰기간 중 폴리카보네이트 사육상자(360L x 215W x 200H mm)에 수용하였다.

(자) 사육상자 당 동물수

순화기간, 투여기간 및 투여 후의 관찰기간 모두 3 마리 이하

(차) 사육상자 교체주기 : 주 1~2 회

(카) 사료

① 종 류 : 실험동물용 고형사료

② 공급원 : 두얼마이오텍

③ 생산자 : Harlan

④ 급여법 : 급이기를 이용하여 자유섭취 시켰다.

⑤ 오염물질 확인 : 사료생산자로부터 공급된 자료를 이용하였다.

(타) 물

① 종 류 : 정수과정을 거친 인천광역시 음용 상수도수

② 급수방법 : 물병을 이용한 자유섭취

③ 오염물질의 분석 : 국가공인 검사기관에서 검사한 자료를 참조하였다.

(7) 투여방법

(가) 투여경로 : 경구

(나) 선택이유 : 경구투여시의 독성을 알아보기 위하여 실시하였다.

(다) 투여부위 및 투여법

동물의 경배부 피부를 잡아 고정한 후 경구투여용 존데를 이용하여 강제 경구투여 하였다.

(라) 투여액량

최근 주 1 회 측정된 체중을 기준으로 10 ml/kg의 투여액량을 계산하였다.

(마) 투여횟수 및 투여기간 : 1 회/일, 2 주간 매일

(8) 시험군의 구성

군	성별	동물수	동물번호	투여액량 (ml/kg/day)	투여량 (mg/kg/day)
G1	Male	10	1~5	10	0
	Female	10	21~25	10	
G2	Male	10	6~10	10	500
	Female	10	26~30	10	
G3	Male	10	11~15	10	1,000
	Female	10	31~35	10	
G4	Male	10	16~20	10	2,000
	Female	10	36~40	10	

(G1: 대조군, G2 ~ G4: 시험군)

(9) 투여량 설정이유

단회경구투여독성시험결과, 모든 시험물질 투여군에서 시험물질에 의한 특이적 이상소견이 관찰되지 않았다. 이에 2,000 mg/kg을 고용량으로 설정하며, 공비 2 를 주어 증용량 및 저용량을 각각 1,000 및 500 mg/kg으로 설정하였다.

(10) 시험방법 및 시험항목

(가) 일반증상관찰

투여 전 기간에 걸쳐 1 일 1 회 투여 직후의 일반증상을 관찰하였다. 일반 증상의 관찰은 사망여부, 증상의 종류 및 정도, 발현일을 개체별로 기록하였다.

(나) 체중측정

모든 동물에 대하여 입수시, 군분리시, 투여개시시, 투여 후 주 1 회, 절식 후 부검일에 측정하였다.

(다) 사료섭취량 측정

투여 개시일 및 투여 개시 후 주 1 회 사료섭취량을 측정하였다. 측정방법은 체중측정일로부터 1 일간의 사료 급여량 및 잔량을 측정하여, 마리 당 평균섭취량(g/rat/day)으로 산출하였다.

(라) 음수 섭취량 측정

사료섭취량 측정일에 측정하였다. 측정방법은 1 일간의 물 급여량 및 잔량을 측정하여 마리 당 평균섭취량(g/rat/day)으로 산출하였다.

(마) 안검사

군 분리시에 모든 동물에 대하여 눈의 외관을 관찰하였고, 투여 마지막 주에 부형제 대조군 및 고용량군의 모든 동물에 대하여 눈의 외관을 관찰하였다.

(바) 요검사

투여 마지막 주에 시험군별 각 5 마리의 동물을 대사케이지에 수용하여 신선요를 채집한 뒤 요검사용 시험지(SIEMENS)와 요자동분석장치(CliniTek 50, SIEMENS)를 이용하여 측정하였다. 정성검사는 요당(glucose), 빌리루빈(bilirubin), 케톤체(ketone body), 요비중(specific gravity), 잠혈(Occult blood), pH, 단백질(protein), 유로빌리노겐(urobilinogen), 아질산염(nitrite) 및 백혈구(leukocyte)를 측정하였고, 색조는 육안으로 관찰하였다.

(사) 혈액학적 검사

부검일에 모든 생존동물에서 채혈한 혈액에 대하여 혈액분석기(ADVIA 2120)를 이용하여 혈액학적 검사를 실시하였다. 부검 전 모든 동물을 하룻밤 절식시킨 후 부검 시 CO<sub>2</sub> 마취하에 개복하여 복대동맥에서 채혈한 혈액을 측정하였다. 항응고제로는 EDTA-2K를 사용하였다. 검사항목과 방법은 다음 표와 같다.

혈액학적 검사항목		
항 목*	단 위	방 법
㉠ WBC(White blood cell count)	$10^3/\mu\ell$	Flow cytometry
㉡ RBC(Red blood cell count)	$10^6/\mu\ell$	Flow cytometry
㉢ HGB(Hemoglobin conc.)	g/dℓ	Cyanmethemoglobin
㉣ HCT(Hematocrit)	%	Flow cytometry (연산항목)
㉤ MCV(Mean corpuscular volume)	fL	Flow cytometry
㉥ MCH(Mean corpuscular hemoglobin)	pg	Flow cytometry (연산항목)
㉦ MCHC(Mean corpuscular hemoglobin conc.)	g/dℓ	Flow cytometry (연산항목)
㉧ RDW(Red cell Distribution Width)	%	Flow cytometry (연산항목)
㉨ PLT(Platelet)	$10^3/\mu\ell$	Flow cytometry
㉩ MPV(Mean Platelet Volume)	fL	Flow cytometry (연산항목)
㉪ 백혈구감별계산	%	Flow cytometry
㉫ Retic(Reticulocyte)	$10^9/L$	Flow cytometry (연산항목)
혈구자동계측장치 (ADVIA 2120, MAI-105-01) 에 의하여 검사.		

(아) 혈액생화학학적 검사

부검일에 모든 생존동물에서 채혈한 혈액에 대하여 혈액생화학검사기(Hitachi7180, HITACHI)를 이용하여 혈액생화학적 검사를 실시하였다. 복대동맥에서 채혈한 혈액을 3,000 rpm, 10 분간 원심 분리하여 얻은 혈청을 이용하였다.

혈액생화학적 검사항목		
항 목	단 위	방 법
AST(Aspartate aminotransferase)*	IU/L	JSCC법
ALT(Alanine aminotransferase)*	IU/L	JSCC법
ALP(alkaline phosphatase)*	IU/L	P-NPP 기질법
BUN(Blood urea nitrogen)*	mg/dl	Enzyme법
CRE(Creatinine)*	mg/dl	Jaffe법
GLU(Glucose)*	mg/dl	Hexokinase법
CHO(Total cholesterol)*	mg/dl	Enzyme법
PRO(Total protein)*	g/dl	Biuret법
CPK(Creatine phosphokinase) *	U/L	JSCC 법
ALB(Albumin)*	g/dl	BCG 법
BIL(Total bilirubin)*	mg/dl	Vana data법
A/G ratio		PRO, ALB로 산출
TG(Triglyceride) *	mg/dl	Glycerol 소거효소법
Ca(Calcium) *	mg/dl	O-CPC 법
IP(Inorganic phosphorus)	mg/dl	Fiske Subbarow법
Cl(Chloride)*	mmol/L	전극법
Na(Sodium)*	mmol/L	전극법
K(Potassium)*	mmol/L	전극법
* 자동분석장치(Hitachi7180, HITACHI, 일본)를 이용하여 측정.		

(자) 부검

투여 종료 후 모든 투여군의 생존동물에 대하여 부검을 실시하여, 모든 장기에 대하여 육안 부검소견을 관찰하였다.

(차) 장기중량측정

투여 종료 후 모든 생존동물에 대한 부검 시 고환, 전립선, 난소, 자궁, 비장, 간장, 흉선, 부신, 신장, 심장, 폐, 뇌에 대한 중량을 전자저울을 이용하여 측정하였다.

(카) 기관 및 조직의 보존

모든 동물에 대하여 장기중량을 측정된 장기들을 10 % 중성포르말린 액으로 고정하였으며, 고환은 Bouin's 액에 고정하였다. 그러나 부검 시 이상소견이 관찰되지 않았고, 시험물질에 의한 독성이 의심되지 않아 조직병리학적 검사는 실시하지 않았다.

(11) 통계학적 방법

얻은 자료에 대한 부형제 대조군과 시험물질 투여군간의 비교는 일반적으로 모 수적인 다중비교(parametric multiple comparison procedures) 혹은 비모수적인 다중비교(non parametric multiple comparison procedures)를 사용하였다. 발생율의 표기는 일반적으로 백분율로 나타내었다. 통계방법은 상용으로 널리 사용되는 통계 패키지인 SPSS 12.0K 프로그램을 이용하였다.

체중의 경우 각 주별 체중을 대조군과 시험물질 투여군간에 비교하였다. 사료 및 음수섭취량의 경우 각 주별 데이터를 대조군과 비교하였다.

요검사의 데이터는 증상의 정도로 표시되어 있는 데이터에 대해 다음과 같이 척도변환을 실시하였다.

Specific Gravity		Protein, Leukocyte, Occult blood, Nitrite, Glucose, Ketone, Bilirubin		pH		Urobilinogen	
데이터	척도변환	데이터	척도변환	데이터	척도변환	데이터	척도변환
≤1.005	1	-	0	7.0	1	0.2	1
1.010	2	± (trace)	1	7.5	2	1.0	2
1.015	3	1+	2	8.0	3		
1.020	4	2+	3	8.5	4		
1.025	5	3+	4	≥9.0	5		
≥1.030	6						

(12) 통계분석 절차

연속자료의 분석(체중, 사료 및 음수 섭취량, 혈액학적 검사, 혈액생화학적검사, 장기중량)은 일반적인 정규성을 가정하고 통계처리를 실시하였다. 일원배치분산분석을 통하여 구간 유의성을 확인하고 등분산을 검증하였다. 일원배치 분산분석에서 유의성이 인정되고 등분산이 인정되면 Duncan test를, 등분산이 인정되지 않으면 Dunnett's T test를 사용하였다. 비연속적인 자료의 분석은 척도변환을 통하여 데이터를 재입력하여 카이제곱검정을 사용하였다.



## 다. 펠트를 이용한 발효녹용추출분말의 13 주 반복경구투여 독성시험 (경구)

### (1) 재료 및 방법

(가) 명칭 : 발효녹용추출분말

(나) 제조(로트)번호 : 기재되지 않음

(다) 입수일 : 2011 년 04 월 25 일 / 2011 년 11 월 01 일

(라) 입수량 : 125.03 g, 127.38 g, 127.54 g, 125.27 g, 126.93 g, 126.14 g, 124.32 g, 125.67 g, 126.72 g, 125.65 g, 126.55 g, 124.81 g, 126.13 g, 125.59 g, 124.62 g, 126.45 g, 126.27 g (용기포함)

(마) 외관 및 색상 : 연한 갈색분말

(바) 보관조건 : 냉동

(사) 안정성 : 상온상압에서 안정

(아) 취급시 주의사항

시원하고 건조한 곳에 완벽히 밀봉하여 보관하고, 통상 화약품과 같이 보호구를 착용하여 취급

### (2) 부형제

(가) 명칭 : 멸균증류수

(나) 외관 및 색상 : 투명 액체

(다) 선정이유 : 용해성 확인시험 결과, 용해가 잘되는 것이 확인되어 멸균증류수를 부형제로 선택하였다.

### (3) 시험물질의 조제

투여당일 시험물질을 칭량하고, 부형제인 멸균증류수에 용해시켜 고용량군(1,000 mg/kg)을 조제한 후, 이 시험용액을 단계별 희석하는 방법으로 나머지 용량군 (500 및 250 mg/kg)의 시험용액을 조제하였다. 투여 당일 오전에 조제 후 바로 투여하기 때문에 안정성 시험은 수행하지 않았다.

### (4) 보관 및 취급

시험 중 시험물질은 시험물질보관실 108-3 냉동고에 보관하였다. 시험 종료 후 시험에 사용하고 난 여분의 양은 시험물질보관실 108-4 냉동고에 보관하였다. 조제된 시험용액은 조제 후 바로 투여하기 때문에 보관조건은 기술하지 않았다.

(5) 시험계

(가) 종 및 계통 : SD(Sprague-Dawley) 계통의 특정병원균 부재(SPF) 랫드

(나) 공급 및 생산처 : 오리엔트바이오(경기도 성남시 중원구 상대원동 143-1번지)

(다) 시험계의 선택이유

본 시험에 사용되는 랫드는 일반독성시험에 널리 사용되고 있으며, 풍부한 시험기초자료가 축적되어 있어 실험결과의 해석 및 평가가 용이 하기 때문에 본 시험계를 선택하였다.

(라) 입수일 : 2011 년 08 월 16 일

(마) 입수시 동물수 : 암수 각 50 마리

(바) 입수시 주령 : 암수 각 5 주령

(사) 입수시 체중 범위

수컷 : 123.22 ~ 141.28 g

암컷 : 101.13 ~ 118.85 g

(아) 검역 및 순화기간

입수 후 수컷은 7 일, 암컷은 9 일간 순화기간을 두었으며, 순화기간 중 일반증상을 매일 관찰하여 건강한 동물만 시험에 사용하였다. 검역은 동물공급처에서 분석한 시험계의 병원체 검사 성적서를 참조하였다.

(자) 투여개시 주령 : 암수 각 6 주령

(차) 투여개시체중 범위

수컷 : 198.88 ~ 218.53 g

암컷 : 154.72 ~ 186.80 g

(카) 사용 동물수: 암수 각 40 마리

(타) 군분리법 : 투여개시 1 일전에 순위화한 체중을 이용하여 군 분리를 하였다.

(파) 식별법

개체식별은 미부표시법 및 사육상자별 개체식별카드 표시법을 이용하고 사용동물실의 입구에는 시험번호, 의뢰기관명, 동물실 사용기간, 시험책임자명, 시험자명을 기재한 동물실 사용기록지를 부착하였다.

(하) 잔여동물의 처치 : 최종부검일에 안락사 처리하였다.

(6) 사육환경

(가) 동물실 : SPF 사육구역 3 호실

(나) 온습도 범위 : 온도  $22.1 \pm 1.0$  °C, 상대습도  $53.1 \pm 4.1$  %RH

(다) 환기횟수 : 10 ~ 15 회/hr.

(라) 명암 cycle : 형광등조명 12 hr.(08:00 점등 ~ 20:00 소등)

(마) 조도 : 284 Lux.

(바) 소음 : 52.8 db

(사) 암모니아 농도 : 5 ppm 이하

(아) 사육상자의 종류(크기)

순화, 검역, 투여 및 관찰기간 중 폴리카보네이트 사육상자(360W x 215L x 200H mm)에 수용하였다.

(자) 사육상자 당 동물수

순화기간, 투여기간 및 투여 후의 관찰기간 모두 3 마리 이하

(차) 사육상자 교체주기 : 주 1 ~ 2 회

(카) 사료

① 종 류 : 실험동물용 고품사료

② 공급원 : 두얼바이오텍

③ 생산자 : Harlan

④ 급여법 : 급이기를 이용하여 자유섭취 시켰다.

⑤ 오염물질 확인 : 사료생산자로부터 공급된 자료를 이용하였다.

(타) 물

① 종 류 : 정수과정을 거친 인천광역시 음용 상수도수

② 급수방법 : 물병을 이용한 자유섭취

③ 오염물질의 분석 : 국가공인 검사기관에서 검사한 자료를 참조하였다.

## (7) 시험방법

(가) 투여경로 : 경구

(나) 선택이유 : 경구투여시의 독성을 알아보기 위하여 실시하였다.

(다) 투여부위 및 투여법

동물의 경배부 피부를 잡아 고정한 후 경구투여용 존데를 이용하여 강제 경구투여 하였다.

(라) 투여액량

최근 주 1 회 측정된 체중을 기준으로 10 ml/kg으로 투여액량을 계산하였다.

(마) 투여횟수 및 투여기간 : 1 회/ 일/ 13 주

## (8) 시험군의 구성

군	성별	동물수	동물번호	투여액량 (mL/kg/day)	투여량 (mg/kg/day)
G1	Male	10	1~10	10	0
	Female	10	41~50	10	
G2	Male	10	11~20	10	250
	Female	10	51~60	10	
G3	Male	10	21~30	10	500
	Female	10	61~70	10	
G4	Male	10	31~40	10	1,000
	Female	10	71~80	10	

(G1: 대조군, G2 ~ G4: 시험군)

(9) 투여량 설정이유

본 시험물질의 랫드 단회투여독성시험 결과(GT11-00202), 반수치사량(Lethal dose 50, LD<sub>50</sub>)이 > 2,000 mg/kg 이고 어떠한 이상증상도 관찰되지 않아, 2 주 반복경구투여용량결정 시험(GT11-00203)을 0, 500, 1,000 및 2,000 mg/kg/day으로 설정하여 반복투여하였다. 그 결과 또한 모든 시험물질 투여군에서 시험물질에 의한 이상증상 및 독성변화가 관찰되지 않아, 본시험에서는 반복투여독성시험에서의 한계용량인 1,000 mg/kg/day를 고려하여 최고 용량을 1,000 mg/kg/day로 설정하였고, 그 아래로 공비를 2 로 하여 중간용량 및 저용량군으로 설정하였다. 추가로 부형제만을 투여하는 부형제 대조군을 두었다.

(10) 시험방법 및 시험항목

(가) 일반증상관찰

투여 전 기간에 걸쳐 1 일 1 회 투여 직후의 일반증상을 관찰하였다. 일반 증상의 관찰은 사망여부, 증상의 종류 및 정도, 발현일을 개체별로 기록하였다.

(나) 체중측정

모든 동물에 대하여 입수시, 군분리시, 투여개시시, 투여 후 주 1 회, 절식 후 부검일에 측정하였다.

(다) 사료섭취량 측정

투여 개시일 및 투여 개시 후 주 1 회 사료섭취량을 측정하였다. 측정방법은 체중측정일로부터 1 일간의 사료 급여량 및 잔량을 측정하여, 마리 당 평균섭취량(g/rat/day)으로 산출하였다.

(라) 음수섭취량 측정

사료섭취량 측정일에 측정하였다. 측정방법은 1 일간의 물 급여량 및 잔량을 측정하여 마리 당 평균섭취량(g/rat/day)으로 산출하였다.

(마) 안검사

군 분리시에 모든 동물에 대하여 눈의 외관을 관찰하였고, 투여 후 대조군 및 고용량군의 전례에 대하여 투여 마지막 주에 눈의 외관을 육안적으로 관찰하였다. 그리고 대조군 및 고용량군에 대하여는 안저사진기(Genesis, Kowa Co. Ltd., Japan)를 이용하여 눈의 안저부위를 관찰하였다.

(바) 요검사

투여 마지막 주에 시험군별 각 5 마리의 동물을 대사케이지에 수용하여 신선요를 채집한 뒤 요검사용 시험지(SIEMENS)와 요자동분석장치(CliniTek 50, SIEMENS)를 이용하여 측정하였다. 정성검사는 요당(glucose), 빌리루빈(bilirubin), 케톤체(ketone body), 요비중(specific gravity), 잠혈(Occult blood), pH, 단백질(protein), 유로빌리노겐(urobilinogen), 아질산염(nitrite) 및 백혈구(leukocyte)를 측정하였고, 요침사검사는 적혈구, 백혈구, 상피세포, 원주를 관찰하였다. 색조는 육안적으로 관찰하였으며, 요량은 대사케이지 수용 후 24 시간동안 채집한 요량을 측정하였다.

(사) 혈액학적 검사

부검일에 모든 생존동물에서 채혈한 혈액에 대하여 혈액분석기(ADVIA 2120, SIEMENS)를 이용하여 혈액학적 검사를 실시하였다. 부검 전 모든 동물을 하룻밤 절식시킨 후 부검 시 CO<sub>2</sub> 마취하에 개복하여 복대동맥에서 채혈한 혈액을 측정하였다. 항응고제로는 EDTA-2K를 사용하였다. 검사항목과 방법은 다음 표와 같다.

혈액학적 검사항목		
항 목*	단 위	방 법
㉑ WBC(White blood cell count)	10e3/ $\mu$ l	Flow cytometry
㉒ RBC(Red blood cell count)	10e6/ $\mu$ l	Flow cytometry
㉓ HGB(Hemoglobin conc.)	g/dl	CyaNSLethemoglobin
㉔ HCT(Hematocrit)	%	Flow cytometry (연산항목)
㉕ MCV(Mean corpuscular volume)	fL	Flow cytometry
㉖ MCH(Mean corpuscular hemoglobin)	pg	Flow cytometry (연산항목)
㉗ MCH (Mean corpuscular hemoglobin conc.)	g/dl	Flow cytometry (연산항목)
㉘ RD (Red cell Distribution Width)	%	Flow cytometry (연산항목)
㉙ PLT(Platelet)	10e3/ $\mu$ l	Flow cytometry
㉚ MPV(Mean Platelet Volume)	fL	Flow cytometry (연산항목)
㉛ 백혈구감별계산	%	Flow cytometry
㉜ Retic(Reticulocyte)	10e9/L	Flow cytometry (연산항목)
혈구자동계측장치 (ADVIA 2120, MAI-105-01) 에 의하여 검사.		

(아) 혈액응고시간 검사

부검일에 PT(prothrombin time) 및 APTT(active partial thromboplastin time)을 혈액응고시간 검사장치(ACL7000, Instrumentation Laboratory)를 이용하여 측정하였다. 혈액응고시간 검사용 항응고제는 3.2 % sodium citrate 용액을 사용하였다.

(자) 혈액생화학적 검사

부검일에 모든 생존동물에서 채혈한 혈액에 대하여 혈액생화학검사(Hitachi7180, HITACHI)를 이용하여 혈액생화학적 검사를 실시하였다. 복대동맥에서 채혈한 혈액을 3,000 rpm, 10 분간 원심분리하여 얻은 혈청을 이용하였다.

혈액생화학적 검사항목		
항 목	단 위	방 법
AST(Aspartate aminotransferase)*	IU/L	JSCC법
ALT(Alanine aminotransferase)*	IU/L	JSCC법
ALP(Alkaline phosphatase)*	IU/L	P-NPP 기질법
BUN(Blood urea nitrogen)*	mg/dℓ	Enzyme법
CRE(Creatinine)*	mg/dℓ	Jaffe법
GLU(Glucose)*	mg/dℓ	Hexokinase법
CHO(Total cholesterol)*	mg/dℓ	Enzyme법
PRO(Total protein)*	g/dℓ	Biuret법
CPK(Creatine phosphokinase) *	U/L	JSCC 법
ALB(Albumin)*	g/dℓ	BCG 법
BIL(Total bilirubin)*	mg/dℓ	Vana data법
A/G ratio		PRO, ALB로 산출
TG(Triglyceride) *	mg/dℓ	Glycerol 소거효소법
Ca(Calcium) *	mg/dℓ	O-CPC 법
IP(Inorganic phosphorus)	mg/dℓ	Fiske Subbarow법
Cl(Chloride)*	mmol/L	전극법
Na(Sodium)*	mmol/L	전극법
K(Potassium)*	mmol/L	전극법

\* 자동분석장치(Hitachi7180, HITACHI, 일본)를 이용하여 측정.

(차) 부검

투여 종료 후 모든 투여군군의 생존동물에 대하여 부검을 실시하여, 모든 장기에 대하여 부검조건을 관찰하였다.

(카) 장기중량측정

투여 종료 후 모든 생존동물에 대한 부검 시 교환, 전립선, 난소, 자궁, 비장, 간장, 흉선, 부신, 신장, 심장, 췌, 뇌, 뇌하수체에 대한 중량을 전자저울을 이용하여 측정하였다.

(타) 기관 및 조직의 보존

모든 동물에 대하여 장기중량을 측정한 장기 및 이상장기들을 10 % 중성포르말린 액으로 고정하였으며, 교환은 Bouin's 액에, 안구는 Davidson's 액에 고정하였다.

(파) 조직병리학적 검사

부검 시 관찰된 이상장기는 파라핀 포매하여 H&E 염색표본을 만들어 검경하였고, 병리 책임자의 1 차 검경 후 2 차로 peer review를 실시하였다.

병리조직검사 장기적출 명세			
1. 유 선	12.하악림프절	23. 부 신	34.좌골신경
2. 비 장	13. 난 소	24. 간	35. 골격근
3. 췌 장	14. 자 궁	25. 흉 골	36. 대퇴골
4. 공 장	15. 질	26. 흉 선	37. 흉척수
5. 위	16. 방 광	27. 심 장	38. 피 부
6.십이지장	17. 고 환	28. 폐	39. 안 구
7. 회 장	18. 부고환	29. 기 관	40.하더리안선
8. 맹 장	19. 전립선	30. 식 도	41. 뇌
9. 결 장	20. 정 낭	31. 갑상선(부갑상선)	42.뇌하수체
10.장림프절	21. 직 장	32. 혀	
11. 타액선	22. 신 장	33. 대동맥	

(11) 통계학적 방법

얻은 자료에 대한 부형제 대조군과 시험물질 투여군간의 비교는 일반적으로 모 수적인 다중비교(parametric multiple comparison procedures) 혹은 비모수적인 다중비교(non parametric multiple comparison procedures)를 사용하였다. 발생율의 표기는 일반적으로 백분율로 나타내었다. 통계방법은 상용으로 널리 사용되는 통계 패키지인 SPSS 12.0K 프로그램을 이용하였다.

(12) 데이터 처리

체중의 경우 각 주별 체중을 대조군과 시험물질 투여군간에 비교하였다. 사료 및 음수섭취량의 경우 각 주별 데이터를 대조군과 비교하였다.

요검사의 데이터는 증상의 정도로 표시되어 있는 데이터에 대해 다음과 같이 척도변환을 실시하였다.



Specific Gravity		Protein, Leukocyte, Occult blood, Nitrite, Glucose, Ketone, Bilirubin		pH		Urobilinogen	
데이터	척도변환	데이터	척도변환	데이터	척도변환	데이터	척도변환
≤1.005	1	-	0	6.0	1	0.2	1
1.010	2	± (trace)	1	6.5	2	1.0	2
1.015	3	1+	2	7.0	3		
1.020	4	2+	3	7.5	4		
1.025	5	3+	4	8.0	5		
≥1.030	6			8.5	6		
				≥9.0	7		

(13) 통계분석 절차

연속자료의 분석(체중, 사료 및 음수섭취량, 혈액학적 검사, 혈액응고시, 간, 혈액생화학적 검사, 장기중량)은 일반적인 정규성을 가정하고 통계처리를 실시하였다. 일원배치분산분석을 통하여 군간 유의성을 확인하고 등분산을 검정하였다. 일원배치 분산분석에서 유의성이 인정되고 등분산이 인정되면 Duncan test를, 등분산이 인정되지 않으면 Dunnett's T test를 사용하였다.

비연속적인 자료의 분석은 척도변환을 통하여 데이터를 재입력하여 카이제곱검정을 사용하였다.

라. 미생물복귀돌연변이시험

(1) 시험균주

*Salmonella typhimurium* TA98, TA100, TA1535, TA1537 및 *E. coli* WP2uvrA

(2) 용량단계

용량설정을 위한 예비시험을 통해 결정된 최고용량을 기준으로 5단계 이상을 설정하며 매 용량마다 3매 이상의 플레이트를 사용한다.

(3) 대사활성화법 : S9 mix를 첨가한 대사활성화법을 병행하여 수행

(4) 결과의 판정

대사활성계 존재 유, 무에 관계없이 최소 1개 균주에서 평판 당 복귀된 집락수에 있어서 1개 이상의 농도에서 재현성 있는 증가를 나타낼 때 양성으로 판정한다. 또한, 음성 결과에 대해서는 필요에 따라 재현성을 확인한다.

마. *In vitro* 염색체이상시험

(1) 시험세포주

CHO-k1(Chinese Hamster Ovary fibroblast) 유래의 배양세포

(2) 농도결정시험

대사활성효소계(S9) 적용(S9+) 및 미적용(S9-)하에 시험물질 처리한다. 시험물질 처리 후 6hr과 24hr 후에 세포사멸정도를 RCC(Relative Cell Count)를 통해 관찰한다. 50% 세포증식 억제농도를 본시험의 최고농도로 한다.

(3) 본시험

농도결정시험 결과를 토대로 최고 농도로 부터 공비 2~3으로 하여 3단계 이상의 농도와 음성 및 양성대조군으로 구성한다.

대사활성효소계 적용(S9+) 및 미적용(S9-)하에 시험물질 처리한다.

염색체표본의 제작은 시험물질 처리 22시간 후 콜세미드 처리 및 giemsa 염색한다.

(4) 관찰기준

염색체이상의 검색은 농도당 200개의 분열중기상에 대하여 염색체의 구조이상 및 수적이상을 가진 세포의 출현빈도를 구한다.

(5) 결과의 판정

대사활성계 존재 유, 무에 관계없이 최소 1개 군주에서 평판 당 복귀된 집락수에 있어서 1개 이상의 농도에서 재현성 있는 증가를 나타낼 때 양성으로 판정한다. 또한, 음성 결과에 대해서는 필요에 따라 재현성을 확인한다.

마. *In vivo* 소핵시험

(1) 시험동물 : ICR 계통의 특정병원균 부재(SPF) 수컷 마우스

(2) 투여용량 설정시험

최대투여용량을 2,000 mg/kg B.W으로 설정 후 공비를 2~3으로 하여 최소 3단계 용량 이상의 시험물질 투여군과 용매대조군을 설정하고 각 군당 3마리 이상씩 구성한다.

투여경로는 경구로 투여 후 동물의 임상증상 관찰한다.

본시험 최고 투여용량 설정한다.

(3) 본시험

투여용량 설정시험을 통해 최고용량 설정 후 공비를 2~3으로 하여 최소 3단계 용량 이상의 시험물질 투여군과 용매대조군 및 양성대조군을 설정하고 각 군당 5마리 이상씩 구성한다.

투여경로는 경구 투여하며, 일반 임상증상관찰 및 체중 측정한다.

(4) 골수세포 수거 및 검체의 제작

최종 시험물질 투여 후 24시간 후 부검하여 검체를 제작

(5) 소핵의 계수

개체 당 2,000개의 다염성적혈구(PCE)를 관찰하고 이중 소핵다염성적혈구의 출현빈도를 구한다. 동시에 전적혈구(PCE+NCE)에 대한 다염성적혈구(PCE)의 출현빈도를 구한다.

(6) 결과의 판정

모든 동물에 있어서  $PCE / (PCE+NCE)$  비율(Mean±SD)이 0.1 이상인 경우 시험이 타당 한 것으로 하고, 소핵 유발빈도(MNPCE/2000PCEs, Mean±SD, %)가 통계학적으로 유의하며, 용량 의존적으로 증가하거나 하나 이상의 용량에서 재현성 있는 양성반응을 나타낼 경우 양성으로 판정한다.

#### 4. 발효녹용추출물의 생리활성 연구

가. 조혈작용 생리활성 연구를 위한 재료 및 방법

##### (1) 발효 녹용 추출물

발효녹용추출물은 Q.C 합격한 건조 녹용을 30~50mesh 분쇄 후 녹용기준 배합량을 10~20배수의 정제수를 투입한 후 121℃에서 60분간 멸균한다. 멸균 후 탱크 온도를 30℃로 냉각시킨 후 *Bacillus subtilis* KCTC 11454BP를 접종하여 24~48시간 동안 교반속도 300rpm, 통기량 0.3vvm, 내압 0.5kg/cm<sup>2</sup>의 조건으로 발효한다. 이 때 seed배양은 50ml의 potato dextrin 액체 배지를 포함한 30L 배양탱크에서 300rpm조건으로 2일간 전 배양 되어졌다. 발효가 완료된 후 균 사멸을 위하여 100℃에서 4시간 살균 후 50℃로 냉각하여 1차 mesh 망 여과를 진행한다. 여과된 발효물은 퍼라이트 약 5% 조건에서 필터프레스 여과를 진행하고, 진공농축기를 이용하여 농축 후 영하 50~70℃에서 냉동한 후 48시간 이상 동결건조기를 이용하여 건조하여, 성상, 미생물, 수분 등의 적합여부를 확인한 후 시험 원료로서 사용한다.

##### (2) 조혈 작용 측정을 위한 실험 프로토콜

실험 프로토콜은 고려대학교 동물 관리 위원회에 의해 검토되고 승인되어졌다. 4주령의 암컷 Sprague - Dawley 쥐는 대한 바이오링크(Chungchungbuk-do, Korea)로 부터 구입하였다. 용혈성 빈혈은 남자보다는 여자에게 더 흔하다. 여자가 남자에 비해 거의 두 배 가량 빈혈 발병이 높다.

동물실은 온도 24±1℃, 습도 60%로 유지되며 12시간 낮과 12시간 밤의 주기로 조절되었다. 8마리의 쥐는 정상대조군(control)으로 분류되었으며 32마리는 2일 동안 매일 phenylhydrazine(40 mg/kg 체중)을 복강 내로 주입하여 빈혈을 유도시켰다. 혈액소수가 14 g/dL이하인 쥐를 빈혈 유도쥐로 이용하였다.

빈혈 유도쥐는 무작위로 4개의 그룹으로 분류되었다(각 군당 8마리씩): PHZ-con, 일반 식염수(0.9% NaCl)를 동량 투여; Non-200, 비발효 녹용 추출물 투여(200mg/kg 체중); B-100, 발효 녹용 추출물 투여(100 mg/kg 체중); B-200, 발효 녹용 추출물 투여 (200 mg/kg 체중). 식염수 또는 녹용 추출물은 phenylhydrazine를 투여한 후 실험 2일째 부터 15일까지 14일간 경구로 투여되었다.

### (3) 조혈 인자 분석

혈액 바이오마커들의 측정을 위해 0일(빈혈 유도 전), 2일(빈혈 유도 후, 시료 처치 전), 15일(시료 처치 후)째에 혈액 샘플이 미정맥에서부터 채취하였다. 헤파린이 첨가된 전혈 샘플은 채취 즉시 혈액 작용 인자들의 분석을 위해 사용되었다. 혈청은 4℃, 2,800 g에서 15분간 원심분리한 후 분리되어졌고 분석 전까지 70℃에서 보관되어졌다.

혈액 작용 인자 분석은 자동 혈구 분석기 KN-21N(Sysmex, Seoul, Korea)을 이용해 이루어졌다. 분석 인자는 적혈구수(red blood cell, RBC), 백혈구수(white blood cell, WBC), 적혈구용적비(hematocrit, Hct), 혈색소수(hemoglobin, Hb), 평균적혈구용적(mean corpuscular volume, MCV), 평균적혈구혈색소량(mean corpuscular hemoglobin, MCH), 평균적혈구혈색소농도(mean corpuscular hemoglobin concentration, MCHC), 혈소판수(platelet) 및 망상적혈구수(reticulocyte)이었다.

### (4) Erythropoietin(EPO) 분석

혈청 EPO는 EPO enzyme-linked immunosorbent assay kit(catalog number E0028r; Uscn Life Science & Technology, Beijing, China)을 이용해 분석되었다. 신장 EPO 발현은 신장의 수질 부위를 제거하고 피질 조직만을 이용해 분석하였다. RNA 동정과 역전사 증합 효소연쇄반응은 Gazzaniga 등(21)의 방법을 이용해 이루어졌다. cDNA 증폭을 위해 사용된 EPO 프라이머 시퀀스는 다음과 같다: 5' -CACGAAGCCATGAAGACAGA-3', 5' -GGCTGTTGCCAGTGGTATTT-3'.

### (5) ALAD 활성

간 조직의 ALAD 활성은 Berlin과 Schaller(22)의 방법으로 측정하였다. 간은 제거 후 컷은 상태에서의 무게를 측정하였다. 그런 다음 0.15 M NaCl 용액으로 세척하고 필터용지를 이용해 걸러내고 다시 무게를 측정한 후 potassium phosphate buffer(pH 7.0) 4.5 mL 안에 넣고 균질화시켰다.

간 균질액은 4℃, 18,928 g에서 4분간 원심분리한 후 상정액을 간 조직 용액으로 사용하였다. ALAD 활성 측정 방법을 간단하게 설명하면 간 조직 용액 0.2 mL을 증류수 1.3 mL와 혼합하고 완전한 용혈을 유도하기 위해 37℃에서 10분간 반응시켰다. 1 mL의 standard aminolevulinic acid를 첨가한 후에 37℃에서 60분간 반응시켰다. 효소 작용은 한시간 후 10% trichloroacetic acid(TCA) 1 mL를 첨가하여 정지시켰다. 반응물은 1,008 g에서 10분간 원심분리한 후 상정액에 동량의 Ehrlich's reagent를 넣고 555 nm에서 5분간 흡광도를 관찰하였다. 간의 ALAD 활성은 다음과 같은 식에 의해 계산되어졌다.

ALAD activity (%) = (1 - Abs<sub>sample</sub> / Abs<sub>control</sub>) × 100

Abs<sub>sample</sub> 시료 포함 흡광도, Abs<sub>control</sub> 시료 비포함 흡광도

#### (6) 삼투압저항성

적혈구의 삼투압 저항성은 Diallo 등(23)의 방법을 응용하여 측정하였다. 0%에서 9%까지의 다양한 농도의 식염수(NaCl 용액)를 준비하고 혈액 50 µL을 각 농도의 식염수와 혼합하였다. 혼합물은 60분동안 반응시켰다. 반응시킨 후 혼합물은 448g에서 10분간 원심분리하고 상정액을 취해 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

### 나. 피로개선도 측정을 위한 실험방법

#### (1) 항피로 평가를 위한 동물 실험 연구

##### (가) 실험동물 및 녹용추출물 투여

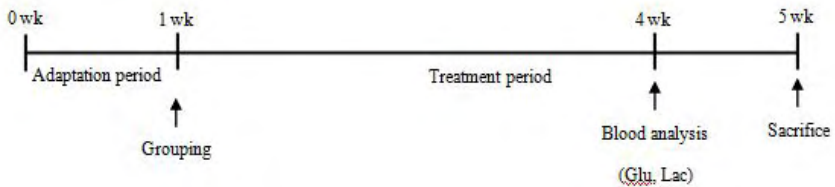
본 실험에 사용한 동물은 생후 5 주된 수컷 BALB/C 마우스를 (주)대한바이오링크(Dae han biolik Co., Ltd, Eumsung, Korea)에서 구입하여 일반 고형사료(Samyang oil & feed Co., Ltd, Wonju, Korea)와 물을 충분히 공급하면서 실험실 환경을 최적의 상태로 (온도 22±2℃, 습도 55±10%) 유지하면서 자동으로 12 시간씩 밤과 낮을 자동으로 조절하여 실험실 환경에 적응시켰다.

일주일간 실험실 환경에 적응시키면서 수영 연습을 시켰으며 일주일 중 마지막 날 최고 수영시간을 측정하였다. 최고수영시간을 기준으로 각 군에 순서대로 배치하여 평균 수영시간이 같도록 처치군을 나누었다. 처치군은 시료를 투여하지 않은 군 (대조군), NFA를 200 mg/kg body weight/day 로 투여한 군 (NFA200), NFA를 500 mg/kg body weight/day 로 투여한 군 (NFA500), FA를 200 mg/kg body weight/day 로 투여한 군 (FA200), FA를 500 mg/kg body weight/day로 투여한 군 (FA500)으로 나누어 실험을 진행하였다. 처치군은 각각의 시료와 농도에 맞춰서 100 µL씩, 대조군은 동일 부피로 증류수를 매일 1 회 4주 간 존대를 사용해 경구투여 하였다.

○ Experimental groups in the study

Experimental groups	Sample	Concentration	n	
Control	Distilled water	-	8	
Treatment group	NFA200	Non-fermented anthler	200 mg/kg B.W.	8
	NFA500	Non-fermented anthler	500 mg/kg B.W.	8
	FA200	Fermented anthler	200 mg/kg B.W.	8
	FA500	Fermented anthler	500 mg/kg B.W.	8

○ Experimental design in the study



(2) 체중 변화 및 장기무게

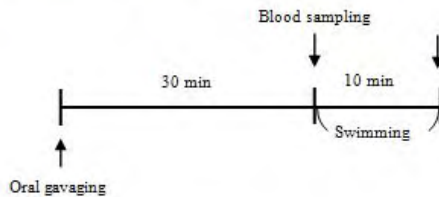
5 주째에는 10 분간 강제수영을 시키고 희생시킨 뒤 장기의 무게를 측정하였다. 장기는 신장, 비장, 심장, 간의 무게를 측정하였다.

(3) 수영 지구력

90 × 45 × 45 cm의 투명한 아크릴 플라스틱에 증류수를 35 cm까지 채우고 온도는 34℃, 유량은 8 L/min로 유지한다. 시료를 경구투여하고 30 분이 경과한 시점에서 수영을 시켰으며 최고수영시간은 수영을 시작부터 실험동물이 수면 아래로 가라앉아 7 초 동안 떠오르지 못하는 시점까지의 시간을 측정하였다. 수영은 일주일에 두 번씩 오후 2시에서 5 시 사이에 실행하였다.

#### (4) 피로도 관련 혈액 지표

4 주째에는 실험동물을 4 시간 절식시키고 수영을 하기 30 분 전에 경구투여를 한다. 그 후 실험동물의 미정맥에서 두 번의 시점(수영 전, 10 분간의 수영을 한 직후)에서 대략 20  $\mu$ L씩 혈액을 채취하여 Glucose, Lactate의 시간별 혈중 농도를 측정하여 변화를 살펴보았다. Glucose는 Gluco-card (Super Glucocard II, Arkcray, Kyoto, Japan), Lactate는 Lactate analyzer (Lactate Scout, SensLab GmbH, Leipzig, Germany)로 각 시간대에 측정을 하였다.



○ Scheme of blood sampling

5 주째에는 10 분간 강제수영을 시키고 희생시킨 뒤 얻은 혈액은 원심분리(3,000  $\times$ g, 15 min)를 거쳐서 혈청으로 만들고 aliquot하여 사용하기 전까지  $-70^{\circ}\text{C}$ 에서 보관한다. 혈청에서는 Creatine phosphokinase (CPK)와 Lactate dehydrogenase (LDH)의 농도를 측정하였고 이는 자동 혈청 화학 분석기(Fujifilm Co., Tokyo, Japan)를 이용하였다.

#### (5) 간에서의 항산화 효소 활성

10 분간 강제수영 후 희생시킨 실험동물의 간에서 항산화 효소 활성을 측정하였다. 일정량 간을 취해 0.2 g/mL의 농도에 맞춰서 10 mM의 Tris-HCl buffer (pH 7.4)를 넣는다. 그런 다음 Tissue lyser (Qiagen, Hilden, Germany)를 이용하여 균질화한 후 원심분리(10000 g, 15 min)하여 얻은 상등액을 aliquot하여 사용하기 전까지  $-70^{\circ}\text{C}$ 에서 보관한다.

항산화 효소 지표로는 Glutathione peroxidase (GSH-Px)와 Superoxide dismutase (SOD)를 측정하였다. 간 조직의 Glutathione peroxidase 활성은 Paglia와 Valentine의 방법(Paglia & Valentine, 1967), superoxide dismutase 활성은 Marklund와 Marklund의 방법으로 측정하였다(MARKLUND & MARKLUND, 2005).



(6) 근육에서의 산화적 대사 관련 지표

10 분간 강제수영 후 희생시킨 실험동물의 비복근(gastrocnemius) 부위를 사용하기 전까지  $-70^{\circ}\text{C}$ 에서 보관한다. 근육에서의 산화적 대사 지표로서 지방산의  $\beta$ -oxidation과 관련이 있는 muscle carnitine palmitoyl transferase I (mCPT I, CPT 1b), pyruvate dehydrogenase kinase 4 (PDK4), uncoupling protein 3 (UCP3)과 근육에서 산소를 저장하는 Myoglobin을 지표로 선정하여 Western blot 실험을 하였다.

비복근 부위를 일정량 취해서 Protein lysis buffer (0.01 M PBS, 1% Triton X-100, 0.1 mM PMSF) 1 mL을 첨가하고 Tissue lyser (Qiagen, Hilden, Germany)를 이용하여 균질화한 후 원심분리(14000 rpm, 25 min)하여 상등액만 취한다. 단백질 농도는 BCA 방법을 이용해 정량분석 하였다. 정량분석 후 단백질을 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 맞추고 Concentrated (5 $\times$ ) Laemmli sample buffer를 첨가하여 5분간 가열한 뒤 급속냉각 시킨다.

준비된 시료는 SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)을 이용하여 전기영동한 후 PVDF로 transfer한다 (100 V, 1 hour). 그 후 다시 3% 탈지분유로 상온에서 1 시간 동안 blocking하고 Tris-buffered saline with tween (TBST; 0.05 M Tris base, 0.1% Tween-20, 0.15 M NaCl, pH 7.4)로 10 분씩 3 번 씻어낸 다음 일차항체의 함께  $4^{\circ}\text{C}$  조건에서 16 시간 배양하였다. 일차항체는 UCP3 (Santa Cruz Biotechnology, Inc., California, USA), mCPT I (Santa Cruz Biotechnology, Inc., California, USA), PDK4 (Santa Cruz Biotechnology, Inc., California, USA), Myoglobin (Santa Cruz Biotechnology, Inc., California, USA)를 사용하였고 배양 후 TBST로 수세를 시키고 이차항체인 Goat IgG Horseradish peroxidase conjugated antibody (R&D system, Minneapolis, MN, USA)를 2 시간 동안 반응시키고 TBST로 수세하였다.

수세된 PVDF 용지 band의 시각화는 Enhanced Chemiluminescent (ECL, Thermo Fisher Scientific Inc., Rockford, IL, USA)를 이용하였고 FluorChem FC2 (Alpha Innotech, San Leandro, CA, USA)를 이용하여 band를 촬영하였다. Band의 강도를 측정하기 위해 Alpha view software (Alpha Innotech, San Leandro, CA, USA)를 이용하여 정량하였다.

#### (7) 근섬유 유형

근육에서의 근섬유타입을 알아보기 위해 Acid pre-incubation Myofibrillar ATPase (mATPase) method를 통해 염색하여 구분하였다. 실험동물의 gastrocnemius muscle을 20°C 조건에서 10 μm의 두께로 동결절편하여 산성예비배양액 조건 (pH 4.7)에서 10 분간 예비 배양한다. 예비 배양 후 증류수와 washing buffer로 차례대로 세척한 뒤 pH 9.4에서 20 분간 배양한다. 1% Calcium chloride (CaCl<sub>2</sub>)와 2% Cobalt chloride (CoCl<sub>2</sub>)를 처리하고 마지막으로 1% Ammonium sulfide solution으로 처리한다. 염색이 완료되면 Glycerin jelly로 코팅하여 보관한다.

염색을 하게 되면 Type I (Oxidative slow-twitch), Type II A (Oxidative-glycolytic fast-twitch), Type II B (Glycolytic fast-twitch)로 구분할 수 있고, Type I은 Dark, Type II A는 Pale, Type II B는 Dark와 Pale의 중간상태인 Intermediate를 나타낸다. 이를 Fluorescence Stereomicroscope (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany)로 촬영한 뒤 이미지 분석 프로그램 (Image J Ver. 1.46r, USA)을 통해 각 근섬유의 면적(% of area)을 측정하였다.

#### (8) 통계 분석

실험 결과는 SPSS 12.0 (SPSS Inc., IL, USA)을 이용하여 통계 처리하였으며 모든 측정 항목에 대한 평균(mean)과 표준오차(standard error of measurement, SEM)를 산출하였다. 실험군 간의 유의성 차이는 ANOVA test 후 구체적인 사후 검증은 p<0.05 수준에서 Tukey's multiple test를 실시하였다.

## 5. 발효농축추출물의 인체적용시험 연구

### 가. 인체적용시험용 샘플 제작

인체적용시험용제품은 '0'호의 적갈색 캡셀에 충전 후 PTP포장하였으며, 외형 및 성상이 동일하여 육안으로는 차이가 관찰되지 않아야 한다. 인체적용시험용제품은 기본적으로 42일분씩 제공될 수 있도록 용기에 넣어 피검자에게 제공하지만, 분실을 고려한 7일분의 여유분을 합하여 49일 분을 포장하여 총 12주 분량을 1차 제공분과 2차제공분으로 나누어 별도 포장한다. 제품에 대한 모든 정보는 식별되지 않도록 코드명(KD-R1~60)으로 관리하였다.

### 나. 인체적용시험 시험 계획

#### (1) 피험자 선정

##### (가) 선정기준

모든 피험자는 다음 기준을 만족하여 인체적용시험에 참여하였다.

- ① 만 19 ~ 60세의 성인 남녀로서, 남성은 헤모글로빈 농도가 13~14g/dL, 여성은 12~13g/dL인 자
- ② 이전에 철분제제를 복용한 적이 없거나 기존에 철분제제를 복용한 경우 4주간의 휴약기간을 가진 피험자만 참여가능
- ③ 본 인체적용시험에 대한 자세한 설명을 듣고 완전히 이해한 후, 자의로 참여를 결정하고 주의사항을 준수하기로 서면 동의한 자

#### (2) 제외기준

피험자들이 다음 기준 중 하나라도 해당될 경우 인체적용시험의 참여에서 배제되었다.

- (가) 운동부하 심전도 결과 이상이 있는 자(단, 결과에 이상이 없어도 연구자의 판단에 따라 연구 진행이 어려울 것으로 판단되는 자는 제외됨)
- (나) 약물 및 임상적으로 유의한 과민반응의 병력이 있는 자
- (다) 신부전, 심부전, 심근경색, 뇌졸중이 있거나 과거력이 있는 자
- (라) 시험제품의 흡수에 영향을 줄 수 있는 위장관계 질환(예: 크론병)이나 위장관계 수술(단, 단순맹장수술이나 탈장수술은 제외)의 과거력이 있는 자
- (마) 첫 섭취일 전 2주 이내에 피로회복 및 빈혈증상 개선에 영향을 미칠 수 있는 의약품이나 건강기능식품을 섭취한 경험이 있는 자 (철분제제의 경우 첫 섭취일 전 4주간의 휴약기간을 거쳐 참가가능)
- (바) 스크리닝 검사 전 2개월 이내에 항정신병 약물치료를 받은 경험이 있는 피험자

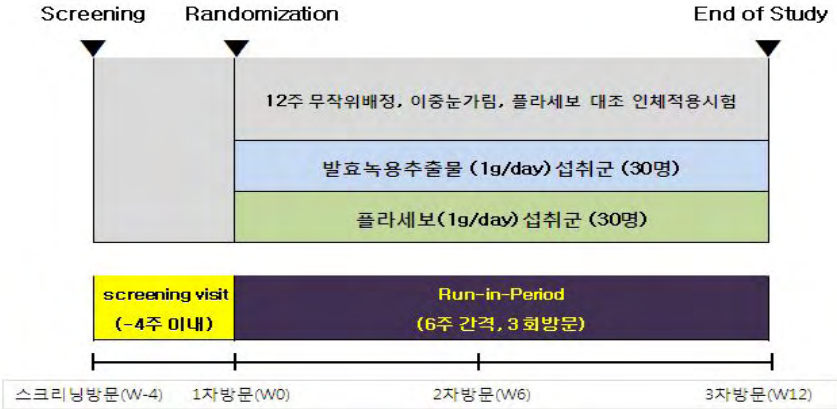
- (사) 알코올 중독 또는 약물 남용으로 인한 치료력이 있는 자
- (아) 스크리닝 검사 전 2개월 이내에 타 인체적용시험에 참여한 자
- (자) 검사실검사에서 다음에 해당하는 결과를 보이는 자
  - ☞ AST, ALT > 참고범위 상한치의 2배
  - ☞ Serum Creatinine > 2.0 mg/dL
  - ☞ Creatine Kinase (CK) > 참고범위 상한치의 2배
- (차) 임신 혹은 수유 중인 여성
- (카) 임신 가능성이 있는 가임 여성 중 적절한 피임법의 시행을 수용하지 않은 경우
  - (단, 불임수술을 받은 여성은 제외)
- (타) 진단검사의학 검사결과를 비롯한 기타 사유로 인하여 시험책임자가 연구 참여에 부적합하다고 판단한 자

#### 나. 인체적용시험 방법

본 인체적용시험은 총 60명의 피험자를 대상으로 하는 단일기관, 무작위배정, 이중눈가림, 플라세보 대조 인체적용시험이다.

시험자는 자원자에 한하여 1차 방문으로부터 전 4주 이내에 스크리닝 검사를 시행하여 본 인체적용시험에 피험자로서 적합하다고 판단되는 자를 선정하였으며, 스크리닝 방문에 이어 1차 방문 시에 피험자 선정/제외기준 적합성 재평가 및 무작위배정을 실시하였다.

피험자는 해당 시험제품 또는 플라세보를 12주간 1일 2회씩 매일 섭취하며, 전북대학교병원 기능성식품임상시험지원센터에 6주 간격으로 방문하였다. 매 방문 시 활력징후, 약물투여력 및 의학적 상태 변화 확인, 이상반응 등을 확인하였다.



다. 인체적용시험용 제품 섭취량, 섭취방법

- (1) 발효녹용추출물군 : 1일 2회, 1회2캡슐, 아침/저녁 식전 경구섭취 (1g/일)
- (2) 플라세보군 : 1일 2회, 1회2캡슐, 아침/저녁 식전 경구섭취 (1g/일)

라. 평가 항목

(1) 1차 유효성 평가

(가) 혈액검사(안정 시, 운동부하 검사 직후, 회복 30분 후): 젖산, 암모니아, 무기인산염, creatine kinase, LDH, 글루코스, 유리지방산

(2) 2차 유효성 평가

(나) 호흡계변인: 상대 최대산소섭취량( $VO_{2max}$ ; ml/min/kg), 절대 최대산소섭취량 ( $VO_{2max}$ ; l/min), 최대환기량( $VE_{max}$ ; l/min), 호흡상( $RQ_{max}$ ; RER), 호흡수(RR; breaths/min)

(다) 심장기능: 산소맥( $O_2$ pulse; ml/beat), 최대심박수(HRmax; beats/min)

(라) 자각적 피로도 조사: 주관적 운동강도(RPE; Rating of perceived exertion)

(마) CBC: 헤모글로빈, MCV, MCH, MCHC, RDW(red cell distribution width), reticulocyte, Differential count(Lymphocyte, Monocyte, Eosinophil, Basophil, Neutrophil)

(바) 혈청철 포화도(transferrin saturation), serum iron, ferritin, TIBC, UIBC, ESR(erythrocyte sedimentation rate)

(사) 면역지표: Cytokine(IL-6, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ ), Lymphocyte Subset(CD45/4/8/3, CD45/56/19/3)

(아) 설문지: 다차원 피로척도(MFS: Multidimensional Fatigue Scale), 삶의 질 설문지 (SF-36; 36-Item Short-Form Health Survey), 피험자 만족도 설문지, 체질 설문지

## 6. 발효녹용추출물의 제제연구 및 제품개발 연구

### 가. 발효녹용추출물 원료 안정성 시험

발효녹용추출물의 유통기한을 결정하기 위한 실험을 진행하였다. 식약처에서 고시한 ‘식품의 유통기한설정기준’에 근거하고 식품의 유통기한 설정 실험 가이드라인을 바탕으로 실험방법을 설계하였으며, 성상, 미생물, 함량 등의 결과를 토대로 소재의 유통기한을 설정하다.

- (1) 발효녹용추출분말 원료 성상 : 연한 갈색 분말
- (2) 품질관리 기준

기준 및 규격	시험항목		기준 및 규격
규격항목	성 상		연한 갈색 분말
	지표성분 (Hydroxyproline, Proline(mg/g))		1.0 이상
	수 분(%)		8.0% 이하
	미생물	대장균군	음성
		세균수(cfu/g)	3,000 이하
	중금속 (mg/kg)	납	2.0 이하
		총비소	2.0 이하
		카드뮴	1.0 이하
총수은		1.0 이하	

- (3) 포장재질, 포장방법, 포장단위

알루미늄 방습 외포장, 비닐 내포장

- (4) 유통기한 설정 실험을 위한 저장조건

직사광선을 피한 서늘한 곳에 보관, 실온보관(1~35℃)

보관조건	온도	습도	시험항목
1	25℃	75%	성상 수분 지표물질 미생물 중금속
2	30℃	75%	
3	40℃	75%	

○ 발효녹용추출물분말 정상 및 포장 형태

	
<p>분말정상</p>	<p>외포장(일루미늄 방습포장)</p>

(5) 통계처리방법

실험으로부터 3회반복 측정하여 획득한 데이터를 시간과 반응속도 상수로 표현되는 화학반응식(아레니우스 방정식)을 사용하여 정상 저장 조건으로 외삽하여 유통기한을 예측 하였다.

나. 제품 홍보 및 개발 전략 개발

(1) Life style

- (가) 고령화 사회 대응
- (나) 식사대용 시장 공략
- (다) 연령별 니즈 충족

(2) 미래성장동력구축

- (가) 경영전략 정립
- (나) 차별화 시장 탐색
- (다) 기능성 소재 개발
- (라) 제형의 다변화

(3) 수익성 강화

- (가) 사업성 : 고객대응 R&D, 고객창조 R&BD
- (나) 신성장동력
- (다) 차별화



다. 제제연구 및 제품화

본 연구는 발효농용추출물을 이용한 제형의 다변화에 접근하고 했다. 액상, 타블렛, 캡셀, 과립제로의 적용 가능성을 검토한다.

구 분	연구개발 내용 및 범위	비교
음료의 개발	- Formulation 개발 - 포장방법 (병, PET, CAN 등) - 관능평가	식품공전, 건강기능식품공전, 식품첨가물공전 기준
캡슐제의 개발	- Formulation 개발 - 캡슐제에 적합한 포장기술 제안	대한약전 및 대한약전외 한약(생약)규격집 기준
타블렛의 개발	- Formulation 개발 - 정제에 적합한 포장기술 제안	대한약전 및 대한약전외 한약(생약)규격집 기준

## 2절. 연구과제의 결과

### 1. 녹용 원료의 표준화를 위한 연구

#### 가. 녹용의 산지별 일반성분 비교

개별인정형 소재개발에 사용될 원료의 표준화를 위하여 원재료의 표준화에서부터 발효녹용 추출물의 표준화까지 완료하였다.

녹용원재료의 표준화를 위하여 녹용의 주 산지인 국산(엘크), 러시아산(엘크), 중국산(엘크), 뉴질랜드산(레드디어) 녹용의 일반성분 분석을 실시하였다. 다만, 뉴질랜드의 경우 사육 사슴 품종이 레드디어가 대부분이기 때문에 레드디어의 뼈를 비교군으로 사용하였다.

#### (1) 수분 함량

수분함량은 AOAC법에 따라 105℃ 상압가열건조법으로 분석한 결과 Russia 9.52%, China 8.05%, Korea 10.21%, Newzealand 8.52%로 모두 대한약전의환약(생약)규격집에 근거한 기준에 적합하였다.

#### (2) 회분 함량

조회분의 양은 녹용의 밑부분으로 내려갈수록 아래 표와 같이 증가하는 경향을 보였다. 이는 이미 알려져 있듯이 사슴의 뼈가 성장하면서 중대 밑 부분은 골질화되는 현상을 보이기 때문이다. 조지방의 함량은 한국산과 뉴질랜드 산이 다소 높게 나타났으며, 이는 러시아나 중국산의 녹용 건조시 열풍 건조를 활용하는 반면 한국산이나 뉴질랜드산은 동결건조한 것으로 건조에 다른 영향으로 추정된다.

○ Crude ash content of deer antler according to growing area.

Ash(%)	Upper	Middle	Base
Russia	26.77±0.21	29.2±0.11	35.1±0.1
China	31.37±0.24	31.07±0.09	38.98±0.05
Korea	17.13±0.66	22.58±0.32	37.73±0.24
Newzealand	28.53±0.15	30.88±0.19	32.53±0.09

(3) 조단백질 함량

조단백질 함량은 42.5-72.7%의 함량을 보였으며, 부위별 함량은 분골이 대체적으로 높은 함량을 보였으며, 상대와 중하대가 다소 낮은 함량을 보였다. 아래 표의 결과에서 녹용의 50~60%는 조단백질이 차지하고 있는 것을 알 수 있었으며, 하대보다는 상대, 분골 부분의 조단백질 함량이 높은 것을 알 수 있다. 산지간 차이는 크지 않은 것으로 파악된다.

○ Crude protein content of deer antler according to growing area.

Protein(%)	Upper	Middle	Base
Russia	67.21±1.8	63.71±2.5	53.81±2.5
China	60.4±1.7	62.96±1.2	55.03±0.3
Korea	61.18±2.4	71.68±1.2	42.55±0.4
Newzealand	55.01±3.5	64.42±4.8	49.03±5.3

(4) 조지방 함량

조지방의 함량은 한국산과 뉴질랜드 산이 다소 높게 나타났으며, 이는 러시아나 중국산의 녹용 건조시 열풍 건조를 활용하는 반면 한국산이나 뉴질랜드산은 동결건조한 것으로 건조에 다른 영향으로 추정된다.

○ Crude fat content of deer antler according to growing area.

Fat(%)	Upper	Middle	Base
Russia	1.39±0.27	2.86±0.43	6.59±0.84
China	2.99±0.29	1.39±0.28	1.49±0.16
Korea	16.8±0.3	15.5±0.16	1.4±0.28
Newzealand	15.61±0.13	8.24±0.49	3.37±0.31

(5) 우론산(Uronic acid) 측정

산성당인 uronic acid 함량은 하대, 상대보다 분골에서는 큰 함량 차이를 보였으나, 상대나 중하대에서의 산지별 차이는 거의 없었다. 아래 표와 같이 중국산의 약  $2.67 \pm 0.13 \mu\text{g/g}$ 으로 가장 낮은 uronic acid 함량을 보였으며, 국산의 함량이  $4.69 \pm 0.03 \mu\text{g/g}$ 으로 가장 높게 나타났다. 하지만, 하대부분에서는 산지간 큰 차이를 보이지 않았다.

○ Uronic acid contents of deer antler according to growing area.

Uronic acid( $\mu\text{g/g}$ )	Upper	Middle	Base
Russia	$4.05 \pm 0.11$	$1.87 \pm 0.03$	$1.92 \pm 0.02$
China	$2.67 \pm 0.13$	$2.26 \pm 0.11$	$1.96 \pm 0.04$
Korea	$4.69 \pm 0.03$	$2.04 \pm 0.02$	$1.68 \pm 0.02$
Newzealand	$4.57 \pm 0.13$	$1.87 \pm 0.02$	$1.88 \pm 0.03$

(6) 황산화(Sulfated)-GAGs 측정

S-GAG(Sulfated-glycoseaminoglycan)함량은 산지별로 큰 차이가 없었으나, 부위별로는 분골이 가장 높은 함량을 보였고, 상대와 중하대로 밑으로 갈수록 그 함량이 감소하는 경향을 보였다. 상대에서 한국산이  $1.21 \pm 0.17 \text{mg/g}$ 으로 다른 산지의 상대에서 보다 비교적 높은 함량을 보였으며, 러시아, 뉴질랜드 및 중국산간에 차이는 크지 않았다.

○ S-GAG contents of deer antler according to growing area.

S-GAG( $\text{mg/g}$ )	Upper	Middle	Base
Russia	$1.08 \pm 0.02$	$0.72 \pm 0.01$	$0.58 \pm 0.01$
China	$1.06 \pm 0.02$	$0.9 \pm 0.06$	$0.9 \pm 0.01$
Korea	$1.21 \pm 0.17$	$0.97 \pm 0.02$	$0.74 \pm 0.15$
Newzealand	$1.11 \pm 0.01$	$1.08 \pm 0$	$0.91 \pm 0.01$

(7) 시알산 (Sialic acid) 측정

Sialic acid함량은 산지별 큰 차이를 보였다. 한국산 1.81±0.01µg/g 과 뉴질랜드산 1.03±0.02 µg/g으로 그 함량이 중국산 0.25±0.01µg/g, 러시아산 0.21±0.03µg/g에 비해 비교적 높은 함량을 보였으며, 분골이나 상대 부위별 sialic acid함량이 차이는 적었다. 그러나 중하대 부위에서는 sialic acid함량이 현저하게 낮았다.

○ Sialic acid contents of deer antler according to growing area.

Sialic acid(µg/g)	Upper	Middle	Base
Russia	0.21±0.03	0.23±0.01	0.1±0.03
China	0.25±0.01	0.21±0.01	0.08±0.02
Korea	1.81±0.01	1.96±0.05	0.96±0.02
Newzealand	1.03±0.02	1.08±0.18	0.97±0.01

(8) 탄수화물 함량

탄수화물은 다른 성분에 비해 낮은 함량을 보였다. 특히 한국산 녹용의 탄수화물 함량이 다른 산지 녹용에 비해 높게 나타났으나, 그 함량은 단백질이나 회분에 비해 낮은 수준이다.


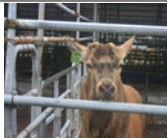

○ Carbohydrate content of deer antler according to growing area.

Carbohydrate(%)	Upper	Middle	Base
Russia	0.21±0.02	0.11±0.01	0.1±0.01
China	0.24±0.03	0.09±0.01	0.05±0
Korea	0.66±0.0	0.32±0	0.24±0.01
Newzealand	0.19±0.01	0.15±0	0.09±0

나. 녹용 원료 표준화

녹용의 산지별 일반성분 비료를 통하여 국산의 우수성 및 차이점을 확인 하였다. 이를 근거로 국산 녹용 원료의 표준화를 위하여 Table 8에서와 같이 사슴의 생육 환경 및 녹용의 보관관리까지 표준화를 진행하였으며, 녹용원 지나치게 어리 사슴이나 고령화된 사슴의 뿔은 녹용화가 빨리 진행 되기 때문에 양질의 녹용을 얻기 위하여 절각하고자 하는 사슴을 연령을 6 ~ 12년령으로 제한하였으며, 대한약전외한약(생약)규격집에 근거하여 아래와 같이 녹용의 건조감량을 12%이하, 회분 함량을 33% 이하로 관리하였다.

○ 녹용원재료의 표준화

구 분	내 용		기 타
사슴 종	학 명	<i>Cervus canadensis</i>	자체 교배 번식을 통한 국산화
	이 명	<i>elk or wapiti</i>	
	원산지	한 국	
공 급 처	한국사슴농민연합회		
사슴 연령 (녹용 절각 연령)	5년령 이상 녹용 각관길이 7cm미만		사슴 인식표 근거
사슴 먹이	친환경 농산물 (건초/옥수수/콩대 등)		
사육 환경	축 사		
녹용 외형 조건	털이 밀생하고 뿔 성상이 끝은 녹용		

원료 전처리	털 제거 및 소독	
	녹용 절각 및 건조	
녹용 보관 조건	냉장 보관 (0~10℃)	
원료 규격 시험	건조 감량/회분 함량 [규격] ○ 건조감량 12% 이하(6시간) ○ 회분 : 33% 이하(절편 기준)	대한약전의한약(생약) 규격집 (2007)기준

## 2. 발효녹용추출물의 표준화를 위한 연구

### 가. 발효녹용추출물의 일반성분

#### (1) 발효녹용추출물의 표준화

발효녹용추출물은 Q.C 합격한 건조 녹용을 30~50mesh 분쇄 후 녹용기준 배합량을 10~20배수의 정제수를 투입한 후 121℃에서 60분간 멸균한다. 멸균 후 탱크 온도를 30℃로 냉각시킨 후 *Bacillus subtilis* KCTC 11454BP를 접종하여 24~48시간 동안 교반속도 300rpm, 통기량 0.3vvm, 내압 0.5kg/cm<sup>2</sup>의 조건으로 발효한다. 발효가 완료된 후 균 사멸을 위하여 100℃에서 4시간 살균 후 50℃로 냉각하여 1차 mesh 망 여과를 진행한다. 여과된 발효물은 펄라이트 약 5% 조건에서 필터프레스 여과를 진행하고, 진공농축기를 이용하여 농축 후 영하 50~70℃에서 냉동한 후 48시간 이상 동결건조기를 이용하여 건조하여, 성상, 미생물, 수분 등의 적합여부를 확인한 후 시험 원료로서 사용한다.

표준화된 발효녹용추출물의 일반성분을 아래 표와 같이 나타내었다. 그 결과 조단백질 64.7%로 가장 많은 함량을 차지하고 있으며, 탄수화물 27.3%, 수분 4.3%, 회분 3.4%, 나트륨 8.82mg/g, 조지방 0.4%의 함량을 나타내었다. 또한 녹용 자체적으로 0.027mg/g의 철을 포함하고 있었다.

#### ○ 발효녹용의 일반성분

성분	함량	성분	함량
열량(Kcal/100g)	371.5	수분(%)	4.3
탄수화물(%)	27.3	회분(%)	3.4
조지방(%)	0.4	나트륨(mg/100g)	882.5
조단백질(%)	64.7	철(mg/100g)	2.7

### 나. 발효녹용추출물의 지표물질 분석

지표물질인 hydroxyproline은 비필수 아미노산으로써 발효전·후를 지표 할 수 있는 물질이다. 일반명칭은 히드록시피롤린(2S,4R)-4-hydroxypyrrolidine-2-carboxylic acid이며, 분자식은 C<sub>5</sub>H<sub>9</sub>O<sub>3</sub>N, 분자량은 131.13이다. 분석장비는 아미노산 분석기(Biochrom 30 Amino acid Analyser), 자외부흡광광도검출기(UV Detector-570nm,440nm), Cation separation Column



Sodium 4.6X150mm(Biochrom 30)을 사용하였다.

그 결과 발효 전 히드록시프롤린 함량 약  $0.3 \pm 0.09 \text{mg/g}$ 에서 발효가 진행 되면서 지표물질 함량은 발효 시  $1.3 \text{mg/g}$  이상으로 그 함량의 변화됨을 확인 하였다.

다. 중금속 및 잔류농약 분석

발효농용추출물의 중금속 함량을 확인하고, 그 물질에 대한 잔류농약분석을 한국기능성식품 연구원, 수원여자대학 식품분석센터, 광동제약(주)에서 그 함량을 분석하였다. 그 결과는 아래 표와 같이 5대 잔류농약인 BHC, DDT, 엔드린, 디엘드린, 알드린 모두 불검출 되었으며, 납  $0.1 \text{mg/kg}$ , 총비소  $0.4 \text{mg/kg}$ , 카드뮴  $0.02 \text{mg/g}$ , 총수은 불검출 되었으며 이 함량을 근거로 기준 및 규격을 설정하였다.

○ 중금속 및 잔류농약 분석 결과

시험항목		시험 결과	시험항목		시험 결과
중금속 (mg/kg)	납	0.1	잔류농약 (mg/kg)	BHC	불검출
	총비소	0.4		DDT	
	카드뮴	0.02		알드린	
	총수은	불검출		디엘드린	
			엔드린		

### 3. 발효녹용추출물의 안전성 연구

시험기준은 식품의약품안전청 고시 제 2009-183호(2009년 12월 22일) '비임상시험관리기준' 및 식품의약품안전청 고시 제 2009-116호(2009년 08월 24일) '의약품등의독성시험기준'에 따라 수행하였다.

가. 랫드를 이용한 발효녹용추출분말의 단회투여독성시험 (경구) GT11-00202

#### (1) 시험결과

##### (가) 사망동물

시험기간 동안 사망동물은 관찰되지 않았다.

##### (나) 일반증상

모든 시험동물에서 특이한 일반증상은 관찰되지 않았다.

##### (다) 체중변화

체중측정결과, 암컷 대조군에서 시험물질 투여 후 3일째의 평균체중이 시험물질 투여 후 1일째의 평균체중에 비하여 감소하였고, 500 mg/kg 암컷 투여군 1 마리(No.28) 또한 시험물질 투여 후 3일째의 체중이 시험물질 투여 후 1일째의 체중에 비하여 감소하였다. 이를 제외한 모든 시험동물에서는 정상적인 체중증가가 관찰되었으며, 모든 암수 시험물질투여군의 체중변화를 부형제 대조군과 비교하였을 경우 통계적으로 유의한 차이를 보이지 않았다.

##### (라) 부검조건

실험종료 시 모든 생존동물의 부검 결과 특이한 육안소견은 관찰되지 않았다.

#### (2) 고찰 및 결론

시험물질 발효녹용추출분말의 단회투여독성 및 개략적인 치사량을 조사하기 위하여, Sprague-Dawley (SD) 계통 암·수 랫드를 이용하여 시험물질을 단회 경구투여 하였다. 대조군과 3개의 시험군 (500, 1,000 및 2,000 mg/kg)으로 시험을 수행하였으며, 시험기간 동안 일반증상, 체중변화, 시험 중 동물의 사망 유무와 사망동물 및 실험종료 시 생존동물의 부검소견을 관찰하였다.

모든 시험군에서 사망동물 및 이상증상은 관찰되지 않았다.

체중측정 결과, 암컷 대조군 및 암컷 500mg/kg 시험물질 투여군에서 보인 체중감소는 부형제 대조군이거나 그 정도가 경미하고 일시적이므로 시험물질에 의한 영향이 아닌 우발적 감소로 판단된다.

실험종료 시 모든 생존동물의 부검결과, 특이한 육안소견은 관찰되지 않았다.

이상의 결과로 보아 시험물질 발효독용추출분말의 반수치사량 (LD<sub>50</sub>, Lethal Dose 50)은 > 2,000 mg/kg b.w. 으로 사료된다.

○ Body weight changes of male rats in single dose toxicity study

SUMMARY OF BODY WEIGHTS (Grams)						
STUDY : GT11-00202		SEX : MALE				
GROUP	Animal No.	0-day	1-day	3-day	7-day	14-day
DOSE						
G1 (0 mg/kg)	1	249.07	287.01	299.73	336.30	378.82
	2	239.85	268.03	282.74	311.64	338.96
	3	241.20	244.96	287.77	318.70	349.29
	4	253.25	279.16	301.91	338.41	391.37
	5	249.88	279.53	298.55	331.32	372.61
	Mean	246.65	271.74	294.14	327.27	366.21
	S.D.	5.83	16.43	8.39	11.62	21.57
	N	5	5	5	5	5
.....						
G2 (500 mg/kg)	6	253.64	280.37	300.65	339.39	363.69
	7	241.17	268.00	284.48	311.69	318.12
	8	243.62	272.77	293.07	322.02	340.14
	9	248.89	284.31	299.88	332.20	382.75
	10	249.36	279.83	295.86	328.58	377.65
	Mean	247.34	277.06	294.79	326.78	356.47
	S.D.	4.95	6.55	6.53	10.51	27.06
	N	5	5	5	5	5
.....						
G3 (1,000 mg/kg)	11	239.02	265.10	272.84	294.83	333.66
	12	234.02	269.27	283.04	308.77	345.20
	13	249.54	280.83	291.65	320.29	366.70
	14	249.38	276.22	299.60	338.18	382.89
	15	248.39	270.55	286.56	317.88	358.71
	Mean	244.07	272.39	286.74	315.99	357.43
	S.D.	7.13	6.17	9.96	15.92	19.04
	N	5	5	5	5	5

---

G4 (2,000 mg/kg)	16	240.81	265.66	288.97	313.92	362.77
	17	239.12	266.79	280.37	304.00	344.56
	18	250.61	277.42	299.20	328.39	381.15
	19	250.26	280.78	302.08	337.63	389.26
	20	252.84	281.90	300.15	334.74	380.13
	Mean	246.73	274.51	294.15	323.74	371.57
	S.D.	6.28	7.75	9.23	14.33	17.92
	N	5	5	5	5	5

---

○ Body weight changes of female rats in single dose toxicity

---

SUMMARY OF BODY WEIGHTS (Grams)						
STUDY : GT11-00202			SEX : FEMALE			
GROUP	Animal No.	0-day	1-day	3-day	7-day	14-day
DOSE						
G1 (0 mg/kg)	21	171.52	192.11	189.61	201.86	219.41
	22	181.10	198.96	193.13	207.72	229.29
	23	181.34	202.10	201.42	226.18	259.66
	24	178.85	201.40	205.44	216.85	226.17
	25	180.28	206.23	208.52	220.56	226.40
	Mean	178.62	200.16	199.62	214.63	232.19
	S.D.	4.09	5.21	8.04	9.80	15.78
	N	5	5	5	5	5
G2 (500 mg/kg)	26	171.61	186.66	189.72	203.06	218.40
	27	169.90	190.25	200.20	214.55	231.49
	28	175.94	196.10	195.89	218.08	243.01
	29	179.40	197.85	206.71	220.53	241.83
	30	181.17	203.24	206.41	226.44	231.11
	Mean	175.60	194.82	199.79	216.53	233.17
	S.D.	4.85	6.50	7.22	8.69	9.96
	N	5	5	5	5	5

---

---

G3 (1,000 mg/kg)	31	174.16	191.72	191.92	206.65	232.59
	32	174.44	195.46	197.17	205.69	228.81
	33	174.63	194.50	206.76	228.17	251.09
	34	177.39	201.12	204.00	226.24	260.00
	35	181.01	201.14	213.71	232.30	253.48
	Mean	176.33	196.79	202.71	219.81	245.19
	S.D.	2.92	4.19	8.46	12.65	13.69
N	5	5	5	5	5	

---

G4 (2,000 mg/kg)	36	170.05	183.01	194.86	207.15	221.86
	37	175.00	196.86	198.64	209.15	231.07
	38	178.62	197.38	208.63	227.83	239.23
	39	176.33	187.49	203.13	216.16	234.70
	40	184.73	202.30	216.09	232.62	260.12
	Mean	176.95	193.41	204.27	218.58	237.40
	S.D.	5.36	7.90	8.37	11.27	14.22
N	5	5	5	5	5	

---

\* Body weight changes of female rats in single dose toxicity study

나. 랫드를 이용한 발효녹용추출분말의 2 주 반복경구투여 용량결정시험 (경구)

(1) 시험결과

(가) 일반증상 및 사망률

실험기간 동안 사망동물 및 특이한 일반증상은 관찰되지 않았다.

○ Body weight changes of male rats in single dose toxicity study

SUMMARY OF BODY WEIGHTS (Grams)						
STUDY : GT11-00202						SEX : MALE
GROUP	Animal No.	0-day	1-day	3-day	7-day	14-day
<b>DOSE</b>						
G1 (0 mg/kg)	1	249.07	287.01	299.73	336.30	378.82
	2	239.85	268.03	282.74	311.64	338.96
	3	241.20	244.96	287.77	318.70	349.29
	4	253.25	279.16	301.91	338.41	391.37
	5	249.88	279.53	298.55	331.32	372.61
	Mean	246.65	271.74	294.14	327.27	366.21
	S.D.	5.83	16.43	8.39	11.62	21.57
	N	5	5	5	5	5
.....						
G2 (500 mg/kg)	6	253.64	280.37	300.65	339.39	363.69
	7	241.17	268.00	284.48	311.69	318.12
	8	243.62	272.77	293.07	322.02	340.14
	9	248.89	284.31	299.88	332.20	382.75
	10	249.36	279.83	295.86	328.58	377.65
	Mean	247.34	277.06	294.79	326.78	356.47
	S.D.	4.95	6.55	6.53	10.51	27.06
	N	5	5	5	5	5
.....						
G3 (1,000 mg/kg)	11	239.02	265.10	272.84	294.83	333.66
	12	234.02	269.27	283.04	308.77	345.20
	13	249.54	280.83	291.65	320.29	368.70
	14	249.38	276.22	299.60	338.18	382.89
	15	248.39	270.55	286.56	317.88	358.71
	Mean	244.07	272.39	286.74	315.99	357.43
	S.D.	7.13	6.17	9.96	15.92	19.04
	N	5	5	5	5	5
.....						
G4	16	240.81	265.66	288.97	313.92	362.77

	17	239.12	266.79	280.37	304.00	344.56
	18	250.61	277.42	299.20	328.39	381.15
	19	250.26	280.78	302.08	337.63	389.26
(2,000 mg/kg)	20	252.84	281.90	300.15	334.74	380.13
	Mean	246.73	274.51	294.15	323.74	371.57
	S.D.	6.28	7.75	9.23	14.33	17.92
	N	5	5	5	5	5

○ Body weight changes of female rats in single dose toxicity study

SUMMARY OF BODY WEIGHTS (Grams)						
STUDY : GT11-00202	Animal No.	0-day	1-day	3-day	7-day	SEX : FEMALE 14-day
GROUP DOSE						
G1 (0 mg/kg)	21	171.52	192.11	189.61	201.86	219.41
	22	181.10	198.96	193.13	207.72	229.29
	23	181.34	202.10	201.42	226.18	259.66
	24	178.85	201.40	205.44	216.85	226.17
	25	180.28	206.23	208.52	220.56	226.40
	Mean	178.62	200.16	199.62	214.63	232.19
	S.D.	4.09	5.21	8.04	9.80	15.78
	N	5	5	5	5	5
.....						
G2 (500 mg/kg)	26	171.61	186.66	189.72	203.06	218.40
	27	169.90	190.25	200.20	214.55	231.49
	28	175.94	196.10	195.89	218.08	243.01
	29	179.40	197.85	206.71	220.53	241.83
	30	181.17	203.24	206.41	226.44	231.11
	Mean	175.60	194.82	199.79	216.53	233.17
	S.D.	4.85	6.50	7.22	8.69	9.96
	N	5	5	5	5	5
.....						
G3 (1,000 mg/kg)	31	174.16	191.72	191.92	206.65	232.59
	32	174.44	195.46	197.17	205.69	228.81
	33	174.63	194.50	206.76	228.17	251.09
	34	177.39	201.12	204.00	226.24	260.00
	35	181.01	201.14	213.71	232.30	253.48
	Mean	176.33	196.79	202.71	219.81	245.19
	S.D.	2.92	4.19	8.46	12.65	13.69
	N	5	5	5	5	5
.....						
G4 (2,000 mg/kg)	36	170.05	183.01	194.86	207.15	221.86
	37	175.00	196.86	198.64	209.15	231.07
	38	178.62	197.38	208.63	227.83	239.23
	39	176.33	187.49	203.13	216.16	234.70
	40	184.73	202.30	216.09	232.62	260.12
	Mean	176.95	193.41	204.27	218.58	237.40
	S.D.	5.36	7.90	8.37	11.27	14.22
	N	5	5	5	5	5

(나) 체중변화

실험기간 동안 암수 모든 시험군에서 통계학적으로 유의한 체중변화는 관찰되지 않았다.

(다) 사료섭취량

실험기간 동안 암수 모든 시험군에서 통계학적으로 유의한 사료섭취량의 변화는 관찰되지 않았다.

(라) 음수섭취량

실험기간 동안 암수 모든 시험군에서 통계학적으로 유의한 음수섭취량의 변화는 관찰되지 않았다.

(마) 안검사

군 분리시 및 투여 마지막 주에 실시한 안검사 결과, 안검사를 실시한 모든 암수 시험동물에서 이상소견은 관찰되지 않았다.

○ Ophthalmic examination of rats in the 2 weeks oral repeated dose finding study

INCIDENCE OF OPHTHALMOSCOPIC									
STUDY No. : GT11-00203					SEX : MALE				
	GROUP DOSE: (mg/kg)	G1		G2		G3		G4	
		0	500	1,000	2,000				
		5		5		5		5	
		N	%	N	%	N	%	N	%
RIGHT EYE	NORMAL	5	100	5	100	5	100	5	100
LEFT EYE	NORMAL	5	100	5	100	5	100	5	100

INCIDENCE OF OPHTHALMOSCOPIC									
STUDY No. : GT11-00203					SEX : FEMALE				
	GROUP DOSE: (mg/kg)	G1		G2		G3		G4	
		0	500	1,000	2,000				
		5		5		5		5	
		N	%	N	%	N	%	N	%
RIGHT EYE	NORMAL	5	100	5	100	5	100	5	100
LEFT EYE	NORMAL	5	100	5	100	5	100	5	100



(바) 요검사

요검사 및 요색소 관찰결과, 암수 모든 시험군에서 통계학적으로 유의한 변화는 관찰되지 않았다.

○ Urinalysis of rats in the 2 weeks oral repeated dose finding study

URINALYSIS									
STUDY : GT11-00203									
SEX :	MALE				FEMALE				
GROUP :	G1	G2	G3	G4	G1	G2	G3	G4	
No. OF ANIMALS EXAMINED	5	5	5	5	5	5	5	5	5
1) GLUCOSE	-	5	5	5	5	5	5	5	5
2) BILIRUBIN	-	5	5	5	5	5	5	5	5
3) KETONE	-	4	5	5	5	5	5	5	4
	+/-	1	0	0	0	0	0	0	1
4) SPECIFIC GRAVITY	≤ 1.005	1	0	1	0	4	2	3	3
	1.010	2	4	3	3	1	3	2	1
	1.015	1	1	0	1	0	0	0	0
	1.020	0	0	1	1	0	0	0	1
	≥ 1.030	1	0	0	0	0	0	0	0
5) OCCULT BLOOD	-	4	5	5	5	5	5	5	5
	+/-	1	0	0	0	0	0	0	0
6) pH	7.0	0	0	0	0	0	0	0	2
	7.5	0	1	0	0	1	0	0	2
	8.0	2	2	1	4	3	1	2	1
	8.5	3	2	4	1	1	4	3	0
7) PROTEIN	-	1	2	1	0	4	5	5	4
	+/-	3	1	2	3	1	0	0	0
	1+	1	2	2	2	0	0	0	1
8) UROBILINOGEN	0.2	5	5	5	5	5	5	5	4
	1.0	0	0	0	0	0	0	0	1
9) NITRITE	-	5	5	5	5	5	5	5	4
	+	0	0	0	0	0	0	0	1
10) LEUKOCYTE	-	0	1	2	0	5	4	5	4
	+/-	5	4	3	5	0	1	0	1

○ Urine color of rats in the 2 weeks oral repeated dose finding study

URINE COLOR								
STUDY : GT11-00203								
SEX :	MALE				FEMALE			
GROUP :	G1	G2	G3	G4	G1	G2	G3	G4
DOSE (mg/kg)	0	500	1,000	2,000	0	500	1,000	2,000
No. OF ANIMAL	5	5	5	5	5	5	5	5
Straw	4	4	5	5	5	5	3	5
Coloress	1	1	0	0	0	0	2	0

(사) 혈액학적 검사

혈액학적 검사결과, 암수 모든 시험군에서 통계학적으로 유의한 변화는 관찰되지 않았다.

(아) 혈액생화학학적 검사

혈액생화학학적 검사결과, 수컷의 경우 모든 시험물질투여군의 ALP 수치가 부형제 대조군 (0 mg/kg)에 비해 용량의존성을 보이며 통계학적으로 유의하게 감소하였다( $p < 0.05$ ). 또한 2,000 mg/kg 시험물질투여군의 CRE 수치가 500 및 1,000 mg/kg 시험물질투여군에 비해 통계학적으로 유의하게 증가하였고( $p < 0.05$ ), TG 수치가 부형제 대조군, 500 및 1,000 mg/kg 시험물질투여군에 비해 통계학적으로 유의하게 증가하였다( $p < 0.01$ ).

암컷의 경우 모든 시험물질투여군의 CRE 수치가 부형제 대조군에 비해 용량의존성을 보이며 통계학적으로 유의하게 감소하였다( $p < 0.05$ ). 또한 암컷 2,000 mg/kg 시험물질투여군의 T-BIL 수치가 대조군에 비해 통계학적으로 유의하게 증가하였다( $p < 0.01$ ). 그 외 암수 모든 시험군에 대한 혈액생화학학적 검사결과, 통계학적으로 유의한 변화는 관찰되지 않았다.

○ Serum biochemical values of male rats in the 2 weeks oral repeated dose finding study

SUMMARY OF BIOCHEMICAL TESTS									
PERIOD : 2 WEEKS									
STUDY ID : GT11-00203								SEX : MALE	
TESTS :	AST <sup>1</sup>	ALT <sup>2</sup>	ALP <sup>3</sup>	BUN <sup>4</sup>	CRE <sup>5</sup>	GLU <sup>6</sup>	CHO <sup>7</sup>	TP <sup>8</sup>	CPK <sup>9</sup>
UNITS :	IU/L	IU/L	IU/L	mg/dℓ	mg/dℓ	mg/dℓ	mg/dℓ	g/dℓ	U/L
GROUP	G1 : 0 (mg/kg)								
MEAN	139	47	1127	17.8	0.34	176	85	5.5	450
S.D	29.1	2.2	230.3	2.0	0.09	28.0	15.0	0.2	226.3
N	5	5	5	5	5	5	5	5	5
GROUP	G2 : 500 (mg/kg)								
MEAN	127	45	892 <sup>a</sup>	17.0	0.16 <sup>b</sup>	184	96	5.5	469
S.D	44.6	2.4	110.4	3.0	0.10	12.7	12.1	0.1	291.7
N	5	5	5	5	5	5	5	5	5
GROUP	G3 : 1,000 (mg/kg)								
MEAN	159	53	890 <sup>a</sup>	18.8	0.13 <sup>b</sup>	174	77	5.8	630
S.D	68.7	10.0	141.0	2.0	0.13	35.2	18.0	0.2	597.2
N	5	5	5	5	5	5	5	5	5
GROUP	G4 : 2,000 (mg/kg)								
MEAN	141	45	822 <sup>a</sup>	15.6	0.46	169	88	5.6	632
S.D	39.4	10.4	156.4	3.8	0.28	15.5	22.4	0.1	264.1
N	5	5	5	5	5	5	5	5	5
TESTS :	ALB <sup>10</sup>	T-BIL <sup>11</sup>	A/G ratio	TG <sup>12</sup>	Ca <sup>13</sup>	IP <sup>14</sup>	Cl <sup>15</sup>	Na <sup>16</sup>	K <sup>17</sup>
UNITS :	g/dℓ	mg/dℓ		mg/dℓ	mg/dℓ	mg/dℓ	mmol/L	mmol/L	mmol/L
GROUP	G1 : 0 (mg/kg)								
MEAN	2.3	0.06	0.72	28	11.8	11.6	104	146	6.1
S.D	0.1	0.06	0.04	9.3	1.0	0.5	1.1	1.8	0.8
N	5	5	5	5	5	5	5	5	5
GROUP	G2 : 500 (mg/kg)								
MEAN	2.4	0.07	0.76	34	11.8	11.0	105	148	5.7
S.D	0.1	0.05	0.04	7.6	1.5	1.1	1.9	1.7	0.7
N	5	5	5	5	5	5	5	5	5
GROUP	G3 : 1,000 (mg/kg)								
MEAN	2.4	0.18	0.73	27	12.8	11.9	104	148	5.8
S.D	0.1	0.06	0.06	8.8	1.3	0.6	1.1	1.8	0.4
N	5	5	5	5	5	5	5	5	5
GROUP	G4 : 2,000 (mg/kg)								
MEAN	2.4	0.08	0.74	59 <sup>c</sup>	14.5	12.4	103	147	6.0
S.D	0.1	0.12	0.04	19.9	2.6	1.3	3.0	1.9	0.9
N	5	5	5	5	5	5	5	5	5

1, Aspartate aminotransferase; 2, Alanine aminotransferase; 3, alkaline phosphatase; 4, Blood urea nitrogen; 5, Creatinine; 6, Glucose; 7, Total cholesterol; 8, Total protein; 9, Creatine phosphokinase; 10, Albumin; 11, Total bilirubin; 12, Triglyceride; 13, Calcium; 14, Inorganic phosphorus; 15, Chloride; 16, Sodium; 17, Potassium

a : Significant difference from control value,  $p < 0.05$

b : Significant difference from 2,000 mg/kg value,  $p < 0.05$

c : Significant difference from control value,  $p < 0.01$

○ Serum biochemical values of female rats in the 2 weeks oral repeated dose finding study

SUMMARY OF BIOCHEMICAL TESTS									
PERIOD : 2 WEEKS									
STUDY ID : GT11-00203								SEX : FEMALE	
TESTS :	AST <sup>1</sup>	ALT <sup>2</sup>	ALP <sup>3</sup>	BUN <sup>4</sup>	CRE <sup>5</sup>	GLU <sup>6</sup>	CHO <sup>7</sup>	TP <sup>8</sup>	CPR <sup>9</sup>
UNITS :	IU/L	IU/L	IU/L	mg/dℓ	mg/dℓ	mg/dℓ	mg/dℓ	g/dℓ	U/L
GROUP	G1 : 0 (mg/kg)								
MEAN	182	36	654	24.3	0.78	163	83	5.6	972
S.D	53.9	8.8	114.2	6.6	0.25	34.1	15.3	0.3	567.2
N	5	5	5	5	5	5	5	5	5
GROUP	G2 : 500 (mg/kg)								
MEAN	154	31	515	18.5	0.60 <sup>a</sup>	150	87	5.4	705
S.D	44.1	8.7	113.0	2.1	0.05	24.0	20.5	0.3	304.0
N	4	4	4	4	4	4	4	4	4
GROUP	G3 : 1,000 (mg/kg)								
MEAN	155	36	796	22.0	0.52 <sup>a</sup>	183	101	5.6	814
S.D	34.8	10.8	273.9	6.9	0.04	42.0	14.9	0.4	225.6
N	5	5	5	5	5	5	5	5	5
GROUP	G4 : 2,000 (mg/kg)								
MEAN	147	37	691	22.2	0.45 <sup>a</sup>	177	82	5.2	617
S.D	31.3	4.1	113.8	6.7	0.06	17.9	21.4	0.2	315.6
N	5	5	5	5	5	5	5	5	5
TESTS :	ALB <sup>10</sup>	T-BIL <sup>11</sup>	A/G ratio	TG <sup>12</sup>	Ca <sup>13</sup>	IP <sup>14</sup>	Cl <sup>15</sup>	Na <sup>16</sup>	K <sup>17</sup>
UNITS :	g/dℓ	mg/dℓ		mg/dℓ	mg/dℓ	mg/dℓ	mmol/L	mmol/L	mmol/L
GROUP	G1 : 0 (mg/kg)								
MEAN	2.4	0.00	0.74	20	11.1	9.4	105	146	5.3
S.D	0.2	0.00	0.04	12.9	1.3	1.3	2.2	1.1	0.9
N	5	5	5	5	5	5	5	5	5
GROUP	G2 : 500 (mg/kg)								
MEAN	2.3	0.02	0.76	23	10.7	8.8	107	147	4.9
S.D	0.1	0.02	0.02	5.6	0.1	0.4	2.1	0.5	0.4
N	4	4	4	4	4	4	4	4	4
GROUP	G3 : 1,000 (mg/kg)								
MEAN	2.5	0.02	0.80	32	11.9	10.3	106	146	5.3
S.D	0.3	0.02	0.06	15.4	2.7	1.5	2.9	1.8	0.5
N	5	5	5	5	5	5	5	5	5
GROUP	G4 : 2,000 (mg/kg)								
MEAN	2.3	0.04 <sup>b</sup>	0.79	20	11.1	9.9	106	145	5.1
S.D	0.1	0.02	0.05	5.2	0.6	0.9	2.9	1.7	0.6
N	5	5	5	5	5	5	5	5	5

1, Aspartate aminotransferase; 2, Alanine aminotransferase; 3, alkaline phosphatase; 4, Blood urea nitrogen; 5, Creatinine; 6, Glucose; 7, Total cholesterol; 8, Total protein; 9, Creatine phosphokinase; 10, Albumin; 11, Total bilirubin; 12, Triglyceride; 13, Calcium; 14, Inorganic phosphorus; 15, Chloride; 16, Sodium; 17, Potassium

a : Significant difference from control value,  $p < 0.05$

b : Significant difference from control value,  $p < 0.01$

(가) 부검소견

암수 모든 시험동물에 대한 부검결과, 이상소견은 관찰되지 않았다.

(차) 장기중량

절대장기중량 측정결과, 수컷 1,000 mg/kg 시험물질투여군 흥선의 절대장기중량이 부형제 대조군 및 500 mg/kg 시험물질투여군에 비해 통계학적으로 유의하게 증가하였다( $p < 0.05$ ). 그 외 모든 시험군에서 통계학적으로 유의한 변화는 관찰되지 않았다.

상대장기중량 측정결과, 암수 모든 시험군에서 통계학적으로 유의한 변화는 관찰되지 않았다.

○ Absolute organ weight of female rats in the 2 weeks oral repeated dose finding study

ABSOLUTE ORGAN WEIGHTS					
STUDY : GT11-00203			SEX : FEMALE		
GROUP		G1	G2	G3	G4
DOSE : (mg/kg)		0	500	1,000	2,000
Body weight	MEAN	200.79	195.83	195.28	204.63
	S.D.	7.79	7.07	12.12	9.74
	N	5	5	5	5
Ovary (Lt.)	MEAN	0.0544	0.0375	0.0407	0.0436
	S.D.	0.0143	0.0043	0.0119	0.0071
	N	5	5	5	5
Ovary (Rt.)	MEAN	0.0456	0.0416	0.0400	0.0362
	S.D.	0.0175	0.0055	0.0041	0.0074
	N	5	5	5	5
Uterus	MEAN	0.4961	0.4652	0.6340	0.5102
	S.D.	0.1912	0.1361	0.3416	0.1642
	N	5	5	5	5
Spleen	MEAN	0.4898	0.6331	0.4675	0.4951
	S.D.	0.0676	0.3310	0.0876	0.0616
	N	5	5	5	5
Liver	MEAN	7.2581	7.0680	7.1682	7.1010
	S.D.	0.6291	0.6422	1.0619	0.4202
	N	5	5	5	5
Adrenal gl. (Lt.)	MEAN	0.0297	0.0298	0.1888	0.1273
	S.D.	0.0014	0.0071	0.3675	0.2179
	N	5	5	5	5
Adrenal gl. (Rt.)	MEAN	0.0294	0.0281	0.3907	0.0289
	S.D.	0.0031	0.0064	0.8141	0.0058
	N	5	5	5	5

○ Absolute organ weight of female rats in the 2 weeks oral repeated dose finding study(Continued)

ABSOLUTE ORGAN WEIGHTS					
STUDY : GT11-00203					SEX : FEMALE
					Unit : g
GROUP		G1	G2	G3	G4
DOSE : (mg/kg)		0	500	1,000	2,000
Kidney (Lt.)	MEAN	0.7664	0.7923	0.8094	0.7995
	S.D.	0.0397	0.0627	0.0866	0.0837
	N	5	5	5	5
Kidney (Rt.)	MEAN	0.7882	0.8030	0.8268	0.8081
	S.D.	0.0234	0.1036	0.0915	0.1008
	N	5	5	5	5
Heart	MEAN	0.8243	0.8320	1.0802	0.8310
	S.D.	0.1148	0.0353	0.3804	0.0788
	N	5	5	5	5
Lung	MEAN	1.4205	1.2340	1.5246	1.3887
	S.D.	0.3626	0.1226	0.3970	0.3481
	N	5	5	5	5
Brain	MEAN	1.8555	1.7994	1.8327	1.8481
	S.D.	0.0707	0.0704	0.0614	0.0823
	N	5	5	5	5
Thymus	MEAN	0.5858	0.5827	0.6033	0.5102
	S.D.	0.1478	0.1223	0.1044	0.0240
	N	5	5	5	5

○ Relative organ weight of male rats in the 2 weeks oral repeated dose finding study

RELATIVE ORGAN WEIGHTS					
STUDY : GT11-00203			SEX : MALE		
			Unit : % Body weight		
GROUP		G1	G2	G3	G4
DOSE : (mg/kg)		0	500	1,000	2,000
Testis (Lt.)	MEAN	0.4661	0.4506	0.4692	0.4584
	S.D.	0.0200	0.0128	0.0279	0.0374
	N	5	5	5	5
Testis (Rt.)	MEAN	0.4611	0.4530	0.4756	0.4579
	S.D.	0.0276	0.0214	0.0147	0.0392
	N	5	5	5	5
Prostate	MEAN	0.1261	0.1278	0.1427	0.1128
	S.D.	0.0152	0.0242	0.0199	0.0134
	N	5	5	5	5
Spleen	MEAN	0.2463	0.2432	0.2371	0.2241
	S.D.	0.0340	0.0302	0.0122	0.0271
	N	5	5	5	5
Liver	MEAN	3.4889	3.4102	3.0091	3.5039
	S.D.	0.1382	0.1303	1.3394	0.0786
	N	5	5	5	5
Adrenal gl. (Lt.)	MEAN	0.0091	0.0092	0.0087	0.0093
	S.D.	0.0014	0.0026	0.0018	0.0018
	N	5	5	5	5
Adrenal gl. (Rt.)	MEAN	0.0083	0.0092	0.0087	0.0086
	S.D.	0.0011	0.0010	0.0009	0.0020
	N	5	5	5	5



○ Relative organ weight of male rats in the 2 weeks oral repeated dose finding study(Continued)

RELATIVE ORGAN WEIGHTS					
STUDY : GT11-00203		SEX : MALE			
GROUP		G1	G2	G3	G4
DOSE : (mg/kg)		0	500	1,000	2,000
		Unit : % Body weight			
Kidney (Lt.)	MEAN	0.4071	0.3735	0.4129	0.3898
	S.D.	0.0324	0.0184	0.0264	0.0186
	N	5	5	5	5
Kidney (Rt.)	MEAN	0.4103	0.3782	0.4132	0.4048
	S.D.	0.0297	0.0131	0.0322	0.0211
	N	5	5	5	5
Heart	MEAN	0.3974	0.3723	0.3716	0.3855
	S.D.	0.0367	0.0395	0.0231	0.0195
	N	5	5	5	5
Lung	MEAN	0.5422	0.4956	0.5481	0.5416
	S.D.	0.0834	0.0532	0.0311	0.0633
	N	5	5	5	5
Brain	MEAN	0.6057	0.6467	0.6354	0.6123
	S.D.	0.0114	0.0501	0.0325	0.0271
	N	5	5	5	5
Thymus	MEAN	0.1650	0.1770	0.2105	0.1819
	S.D.	0.0110	0.0268	0.0338	0.0183
	N	5	5	5	5

○ Relative organ weight of female rats in the 2 weeks oral repeated dose finding study

RELATIVE ORGAN WEIGHTS					
STUDY : GT11-00203		SEX : FEMALE			
GROUP		G1	G2	G3	G4
DOSE : (mg/kg)		0	500	1,000	2,000
		Unit : % Body weight			
Ovary (Lt.)	MEAN	0.0273	0.0191	0.0209	0.0214
	S.D.	0.0082	0.0020	0.0055	0.0041
	N	5	5	5	5
Ovary (Rt.)	MEAN	0.0228	0.0213	0.0207	0.0177
	S.D.	0.0094	0.0033	0.0024	0.0037
	N	5	5	5	5
Uterus	MEAN	0.2477	0.2369	0.3276	0.2516
	S.D.	0.0955	0.0652	0.1801	0.0879
	N	5	5	5	5
Spleen	MEAN	0.2444	0.3211	0.2399	0.2418
	S.D.	0.0363	0.1590	0.0356	0.0269
	N	5	5	5	5
Liver	MEAN	3.6186	3.6055	3.6772	3.4694
	S.D.	0.3309	0.2409	0.3192	0.0923
	N	5	5	5	5
Adrenal gl. (Lt.)	MEAN	0.0148	0.0153	0.1014	0.0594
	S.D.	0.0009	0.0040	0.1991	0.0997
	N	5	5	5	5
Adrenal gl. (Rt.)	MEAN	0.0147	0.0144	0.2106	0.0141
	S.D.	0.0019	0.0037	0.4407	0.0025
	N	5	5	5	5

○ Relative organ weight of female rats in the 2 weeks oral repeated dose finding study(Continued)

RELATIVE ORGAN WEIGHTS					
STUDY : GT11-00203		SEX : FEMALE			
GROUP		G1	G2	G3	G4
DOSE : (mg/kg)		0	500	1,000	2,000
		Unit : % Body weight			
Kidney (Lt.)	MEAN	0.3819	0.4045	0.4166	0.3905
	S.D.	0.0199	0.0259	0.0319	0.0329
	N	5	5	5	5
Kidney (Rt.)	MEAN	0.3927	0.4099	0.4253	0.3943
	S.D.	0.0097	0.0488	0.0300	0.0381
	N	5	5	5	5
Heart	MEAN	0.4119	0.4257	0.5606	0.4064
	S.D.	0.0651	0.0308	0.2158	0.0381
	N	5	5	5	5
Lung	MEAN	0.7128	0.6294	0.7813	0.6773
	S.D.	0.2103	0.0486	0.1803	0.1574
	N	5	5	5	5
Brain	MEAN	0.9259	0.9195	0.9456	0.9040
	S.D.	0.0640	0.0399	0.0398	0.0399
	N	5	5	5	5
Thymus	MEAN	0.2922	0.2966	0.3106	0.2495
	S.D.	0.0742	0.0560	0.0468	0.0098
	N	5	5	5	5

## (2) 고찰 및 결론

발효농축추출분말의 2주 반복 경구투여에 의한 독성을 조사하고 13 주 반복경구투여독성 시험의 용량을 설정하기 위하여 Sprague -Dawley(SD) 계통 암수 랫드에 시험물질 500(저용량군), 1,000(중용량군) 및 2,000(고용량군) mg/kg 용량으로 투여군을 설정하여 부형제 대조군과 비교하였다. 2 주 반복투여에 의한 사망률, 임상증상, 체중변화, 사료 및 음수섭취량, 안검사, 요검사, 혈액학적 검사, 혈액생화학적 검사 및 부검소견을 관찰하였다.

실험기간동안 암수 모든 시험군에서 사망동물 및 특이한 일반증상은 관찰되지 않았다.

실험기간동안 암수 모든 시험군에서 체중변화, 사료섭취량 및 음수섭취량 측정 결과, 시험물질과 관련된 통계학적으로 유의한 변화는 관찰되지 않았다.

안검사 결과, 안검사를 실시한 모든 암수 시험동물에서 이상소견은 관찰되지 않았다.

요검사 및 요색조 관찰결과, 암수 모든 시험군에서 시험물질과 관련된 통계학적으로 유의한 변화는 관찰되지 않았다.

혈액학적 검사결과, 암수 모든 시험군에서 시험물질과 관련된 통계학적으로 유의한 변화는 관찰되지 않았다.

혈액생화학적 검사결과, 수컷 모든 시험물질투여군의 ALP 수치( $p<0.05$ )와 암컷 모든 시험물질투여군의 CRE 수치( $p<0.05$ )가 부형제 대조군에 비해 용량의존성을 보이며 통계학적으로 유의하게 감소하였으나, 생물학적 정상범위에 속하므로 시험물질에 의한 영향은 아닌 것으로 사료된다. 또한 수컷 2,000 mg/kg 시험물질투여군의 TG 수치( $p<0.05$ )와 암컷 2,000 mg/kg 시험물질투여군의 T-BIL 수치( $p<0.01$ )가 부형제 대조군에 비해 통계학적으로 유의하게 증가하였으나, 용량의존성을 보이지 않고 생물학적 정상범위에 속하므로 시험물질에 의한 영향은 아닌 것으로 판단된다. 따라서 모든 시험군에 대한 혈액생화학적 검사결과, 시험물질과 관련된 통계학적으로 유의한 변화는 관찰되지 않았다.

암수 모든 시험동물에 대한 부검결과, 이상소견은 관찰되지 않았다.

장기증량 측정결과, 수컷 1,000 mg/kg 시험물질투여군 흥선의 절대장기증량이 부형제 대조군에 비해 통계학적으로 유의하게 증가하였으나( $p<0.05$ ), 용량의존성을 보이지 않고 증가한 흥선의 무게가 생물학적 정상범위에 속하므로 시험물질에 의한 영향은 아닌 것으로 사료된다. 그 외 모든 시험군에서 절대 및 상대장기증량 비교결과, 시험물질과 관련된 통계학적으로 유의한 변화는 관찰되지 않았다.

이상의 결과로 보아 본 시험 조건 하에서 발효농용추출분말의 랫드에 대한 2 주 반복 경구투여 결과, 시험물질에 의한 영향은 관찰되지 않았다.

#### 다. 랫드를 이용한 발효농용추출분말의 13 주 반복경구투여 독성시험 (경구)

##### (1) 시험결과

###### (가) 일반증상 및 사망률

실험기간동안 사망동물은 없었으나, 수컷 250 mg/kg 시험물질투여군의 1 레(시험동물 20 번)에서 시험물질 투여 후 74 일째부터 부검 전까지 쇠약(weakening)이 관찰되었다. 그 외 모든 시험동물에서는 특이한 일반증상이 관찰되지 않았다.

###### (나) 체중변화

실험기간동안 암수 모든 시험군에서 통계학적으로 유의한 체중변화는 관찰되지 않았다.

###### (다) 사료섭취량

실험기간동안 암컷 500 mg/kg 시험물질투여군의 11 주차 사료섭취량이 부형제 대조군 및 1,000 mg/kg 시험물질투여군에 비하여 통계학적으로 유의하게 감소하였다( $p<0.05$ ). 그 외 모든 기간 및 시험군에서 통계학적으로 유의한 변화는 관찰되지 않았다.

###### (라) 음수섭취량

실험기간동안 암수 모든 시험군에서 통계학적으로 유의한 음수섭취량의 변화는 관찰되지 않았다.

###### (마) 안검사

군 분리시 및 투여 마지막 주에 실시한 안검사 결과, 안검사를 실시한 모든 시험동물에서 이상소견은 관찰되지 않았다.

###### (바) 요검사

수컷에서 백혈구(leukocyte)의 검출빈도가 군간 통계학적으로 유의한 차이를 보였다

( $p < 0.05$ ). 그 외 암수 모든 시험군에 대한 요검사, 요침사, 요색조 및 요량 검사에서는 통계학적으로 유의한 변화가 관찰되지 않았다.

(사) 혈액학적 검사

혈액학적 검사결과, 암컷 1,000 mg/kg 시험물질투여군의 MCH 수치가 250 및 500 mg/kg 시험물질투여군에 비하여 통계학적으로 유의하게 감소하였다( $p < 0.01$ ). 그 외 모든 시험군에서 통계학적으로 유의한 변화는 관찰되지 않았다.

(아) 혈액응고시간 검사

혈액응고시간 측정결과, 암컷 250 mg/kg 시험물질투여군의 APTT 수치가 1,000 mg/kg 시험물질투여군에 비해 통계학적으로 유의하게 감소하였다( $p < 0.05$ ). 그 외 모든 시험군에서 통계학적으로 유의한 변화는 관찰되지 않았다.

(자) 혈액생화학적 검사

혈액생화학적 검사결과, 암컷의 Cl 수치에서 500 mg/kg 시험물질투여군은 부형제 대조군 및 250 mg/kg 시험물질투여군에 비하여( $p < 0.05$ ), 그리고 1,000 mg/kg 시험물질투여군은 250 mg/kg 시험물질투여군에 비하여 통계학적으로 유의하게 감소하였다( $p < 0.05$ ). 그 외 모든 시험군에서 통계학적으로 유의한 변화는 관찰되지 않았다.

(차) 부검소견

암수 모든 시험동물에 대한 부검결과, 다음과 같은 소견이 관찰되었다.

수컷의 경우, 250 mg/kg 시험물질투여군의 1 레(시험동물 20 번)의 외관에서는 전신적 황달(icterus, systemic)이 관찰되었고, 내부장기에서는 대뇌 표면과 뇌막의 적화(red), 간, 폐, 비장, 췌장림프절의 비대(enlargement), 액와림프절과 신장림프절의 양측성 비대(enlargement, bilateral), 그리고 선위에서 다발성 적색 반점(red spot, multifocal, glandular stomach)이 관찰되었다.

암컷의 경우, 250 mg/kg 시험물질투여군의 1 레(시험동물 52 번)에서 회음부 피하 종괴(mass, subcutaneous, perineal region)가 관찰되었다. 그 외 모든 시험동물에서는 이상소견이 관찰되지 않았다.

○ Gross findings of rats in the 13 weeks oral repeated toxicity study

INCIDENCE OF GROSS FINDINGS

ORGANS		GROUP, DOSE: (mg/kg)			SEX : MALE	
		G1 0	G2 250	G3 500	G4 1,000	
External findings	Normal	10/10	9/10	10/10	10/10	
	Icterus, systemic	0/10	1/10	0/10	0/10	
Axillary lymph node	Normal	10/10	9/10	10/10	10//10	
	Enlargement, bilateral	0/10	1/10	0/10	0/10	
Brain	Normal	10/10	9/10	10/10	10//10	
	Red, cerebral surface	0/10	1/10	0/10	0/10	
Cerebral meninges	Normal	10/10	9/10	10/10	10//10	
	Red	0/10	1/10	0/10	0/10	
Liver	Normal	10/10	9/10	10/10	10//10	
	Enlargement	0/10	1/10	0/10	0/10	
Lung	Normal	10/10	9/10	10/10	10//10	
	Enlargement	0/10	1/10	0/10	0/10	
Pancreatic lymph node	Normal	10/10	9/10	10/10	10//10	
	Enlargement	0/10	1/10	0/10	0/10	
Renal lymph node	Normal	10/10	9/10	10/10	10//10	
	Enlargement, bilateral	0/10	1/10	0/10	0/10	
Spleen	Normal	10/10	9/10	10/10	10//10	
	Enlargement	0/10	1/10	0/10	0/10	
Stomach	Normal	10/10	9/10	10/10	10//10	
	Red spot, multifocal, glandular stomach	0/10	1/10	0/10	0/10	
Other organs	Normal	10/10	10/10	10/10	10/10	

Number of animals with the sign / Number of animals examined

○ Gross findings of rats in the 13 weeks oral repeated toxicity study(Continued)

INCIDENCE OF GROSS FINDINGS					
STUDY No. : GT11-00204			SEX : FEMALE		
ORGANS		G1	GROUP, DOSE: (mg/kg)		
			G2	G3	G4
		0	250	500	1,000
Skin	Normal	10/10	9/10	10/10	10/10
	Mass, subcutaneous, perineal region	0/10	1/10	0/10	0/10
Other organs	Normal	10/10	10/10	10/10	10/10

Number of animals with the sign / Number of animals examined

(카) 장기중량

절대 및 상대장기중량 측정결과, 암수 모든 시험군에서 통계학적으로 유의한 변화는 관찰되지 않았다.

(타) 조직병리학적 검사

① 수컷

㉞ 부형제 대조군

염증세포 소수 침윤(inflammatory cell infiltration)이 간의 간질에서 4 레(시험동물 3, 6, 8, 9 번), 신장의 간질에서 2 레(시험동물 7, 9 번), 기관지 상피하층에서 1 레(시험동물 6 번), 폐의 간질에서 3 레(시험동물 8, 9, 10 번), 심외막에서 2 레(시험동물 4, 9 번), 전립선의 간질에서 2 레(시험동물 6, 9 번) 관찰되었다. 그리고 간에서 지방과립 침착(lipid droplet)이 1 레(시험동물 3 번) 관찰되었다.

㉟ 1,000 mg/kg 시험물질투여군

염증세포의 소수 침윤이 간의 간질에서 2 레(시험동물 38, 40 번), 신장의 간질에서 2 레(시험동물 31, 36 번), 췌장 담관 주위에서 1 레(시험동물 40 번), 심외막에서 1 레(시험동물 37 번) 관찰되었으며 전립선의 간질에서 약한 정도로 1 레(시험동물 37 번) 관찰되었다.

② 암컷

㉞ 부형제 대조군

염증세포 소수 침윤이 간의 간질에서 4 레(시험동물 44, 46, 47, 48 번) 관찰되었다.

㉟ 1,000 mg/kg 시험물질투여군

염증세포 소수 침윤이 간의 간질에서 4 레(시험동물 71, 75, 79, 80 번), 신장의 간질에



서 2 레(시험동물 71, 74 번), 혀의 근층(시험동물 73 번)에서 1 레 관찰되었다. 그리고 간에서 지방과립 침착이 1 레(시험동물 72 번), 위담관 증생(pseudo bile duct hyperplasia)이 1 레(시험동물 71 번) 관찰되었다.

### ③ 부검소견을 보인 시험동물

#### ㉠ 수컷 250 mg/kg 시험물질투여군(시험동물 20 번)

간에 단핵구 침윤(monocyte infiltration)이 강하게 관찰되었으며 간세포와 실질이 줄어들어 침윤된 단핵구가 대다수를 이루었다. 침윤된 단핵구는 핵의 크기가 다양했으며 Mitosis가 다수 관찰되었다. 종대된 비장과 림프절, 뇌막하에 간에서 관찰된 동종의 세포가 관찰되었으며 염증세포가 심장 외막, 선위, 흉선 등에 침윤되어 있었다. 그리고 폐의 간질에 거품성 대식세포(foamy macrophage)와 물질 탐식(phagocytosis)이 관찰되었다. 따라서 이 병변은 대과립성 림프구 림프종(large granular lymphocyte lymphoma)으로 사료된다.

#### ㉡ 암컷 250 mg/kg 시험물질투여군(시험동물 52 번)

유선을 대체하는 증식성세포의 침윤(proliferated cell infiltration)이 유선 구조를 이루고 있었다. 증식세포는 크기가 다양했고 Mitosis가 다수 관찰되었으며 유선 구조 외부에는 유선 구조를 잘 이루고 있었지만(well-differenciated) 내부에는 유선 구조를 잃어버려 미분화된 양상(poorly-differenciated)을 보이고 있었다. 따라서 이 병변은 유선 조직 선암(adenocarcinoma)으로 사료된다.

그 외 모든 시험동물에서는 이상소견이 관찰되지 않았다.

## (2) 고찰 및 결론

발효농축출분말의 13 주 반복 경구투여에 의한 독성을 조사하기 위하여 Sprague-Dawley(SD) 계통 암수 랫드에 시험물질 250(저용량군), 500(중용량군) 및 1,000(고용량군) mg/kg 용량으로 투여군을 설정하여 부형제 대조군과 비교하였다. 13 주 반복투여에 의한 사망률, 일반증상, 체중변화, 사료 및 음수 섭취량, 안검사, 요검사, 혈액학적 검사, 혈액응고시간 검사, 혈액생화학적 검사, 부검소견 및 병리조직학적 소견을 관찰하였다.

실험기간동안 암수 모든 시험군에서 사망동물은 관찰되지 않았고 수컷 250 mg/kg 시험물질 투여군의 1 레에서 최악이 관찰되었으나, 용량의존성을 보이지 않고 개체 특이적으로 관찰된 소견으로써 시험물질과 관련된 영향은 아닌 것으로 사료된다. 그 외 모든 시험동물에서 특이한 육안소견은 관찰되지 않았다.

체중변화 및 음수섭취량 측정결과, 모든 암수 시험군에서 시험물질과 관련된 통계학적으로 유의한 변화는 관찰되지 않았다.

사료섭취량 측정결과, 암컷 500 mg/kg 시험물질투여군의 11 주차 사료섭취량이 부형제 대조군 및 1,000 mg/kg 시험물질투여군에 비하여 통계학적으로 유의하게 감소하였으나 ( $p < 0.05$ ), 용량의존성을 보이지 않고 단발성으로 발생하여 시험물질에 의한 영향은 아닌 것으로 판단된다. 그 외 모든 기간 및 시험군에서 시험물질과 관련된 통계학적으로 유의한 변화는 관찰되지 않았다.

안검사 결과, 안검사를 실시한 모든 시험동물에서 이상소견은 관찰되지 않았다.

요검사 결과, 수컷 백혈구의 검출빈도가 군간 통계학적으로 유의한 차이를 나타내었으나 ( $p < 0.05$ ), 그 정도가 trace 수준으로 일반적으로 흔히 관찰될 수 있으며 다른 시험항목에서 이와 관련된 변화가 관찰되지 않았으므로 시험물질에 의한 영향은 아닌 것으로 사료된다. 그 외 암수 모든 시험군에 대한 요검사, 요침사, 요색조 및 요량 검사에서는 시험물질과 관련된 통계학적으로 유의한 변화가 관찰되지 않았다.

혈액학적 검사 및 혈액응고시간 검사결과, 시험물질투여군간 통계학적으로 유의한 차이를 보이는 항목(MCH,  $p < 0.01$  및 APTT,  $p < 0.05$ )이 존재하였으나, 부형제 대조군과는 차이가 없고 용량의존성도 보이지 않아 시험물질에 의한 영향은 아닌 것으로 판단된다. 그 외 모든 시험군에서 시험물질과 관련된 통계학적으로 유의한 변화는 관찰되지 않았다.

혈액생화학적 검사결과, 암컷에서 관찰된 Cl의 수치변화는 용량의존성을 보이지 않고 감소한 수치가 생화학적 정상범위에 속하였다. 따라서 이러한 변화는 모두 시험물질에 의한 영향이 아닌 것으로 판단된다. 그 외 모든 시험군에서 시험물질과 관련된 통계학적으로 유의한 변화는 관찰되지 않았다.

암수 모든 시험동물에 대한 부검결과, 수컷 250 mg/kg 시험물질투여군 1 레의 외관에서는 전신적 황달이 관찰되었고, 내부장기에서는 대뇌 표면과 뇌막의 적화, 간, 폐, 비장, 췌장립프질의 비대, 액와립프질과 신장립프질의 양측성 비대, 그리고 선위에서 다발성 적색 반점이 관찰되었다. 또한 암컷 250 mg/kg 시험물질투여군의 1 레에서 회음부 피하 종괴가 관찰되었다. 그러나 이러한 소견들은 용량의존적이지 않고 개체 특이적(idiopathic)으로 발생한 소견

혹은 우발적으로 발생한 소견으로써 시험물질에 의한 영향은 아닌 것으로 판단된다. 그 외 모든 시험동물에 대한 부검결과, 이상소견은 관찰되지 않았다.

절대 및 상대장기증량 측정결과, 암수 모든 시험군에서 시험물질과 관련된 통계학적으로 유의한 변화는 관찰되지 않았다.

조직병리학적 검사에서 검경한 내용을 요약 정리하면 다음과 같다.

관찰결과 발견된 병변 중 일부 장기의 염증세포 침윤은 사육환경과 관련하여 분진 발생, 혹은 털의 흡입 등에 의하여 발생 가능한 병변이며 일반적으로 시험동물에서 관찰할 수 있는 병변이었다. 그리고 간의 지방과립 침착과 위담관 증생 등은 사료의 영향으로 인한 발생 가능한 병변으로 사료된다.

수컷 250 mg/kg 시험물질투여군에서 발생한 1 레의 대과립성 림프구 림프종과 암컷 250 mg/kg 시험물질투여군에서 발생한 1 레의 유선 조직 선암은 대조군 및 기타 시험물질 투여군 동물에서는 관찰되지 않아 시험동물의 개체차에 의한 특이적 소견으로 판단되며, 시험물질 투여와는 관계없는 병변으로 사료된다.

따라서 모든 시험동물에 대한 조직병리학적 검사결과, 시험물질과 관련된 이상소견은 관찰되지 않았다.

이상의 결과로 보아 본 시험 조건 하에서 발효녹용추출분말의 랫드에 대한 13 주 반복 경구투여 결과, 무독성량(NOEL, No observed adverse effect level)은 1,000 mg/kg b.w. 이상이며, 표적장기(target organ)는 관찰되지 않았다.

라. 미생물복귀돌연변이시험

시험물질 발효농축출분말에 대한 발암성 유발 유·무 판단을 위한 기초 자료를 얻기 위하여 유전독성시험 중 미생물복귀돌연변이 시험을 실시하였다. 시험에는 *Salmonella typhimurium*의 히스티딘 요구성 균주인 TA98, TA100, TA1535, TA1537 및 *Escherichia coli*의 트립토판 요구성 균주인 WP2uvrA를 이용하였다. 시험물질은 멸균증류수에 용해하여 사용하였으며, 대사활성에 의한 경우와 대사활성에 의하지 않은 경우를 적용하였다.

본시험에서의 적용농도의 결정을 위하여 5000 µg/plate를 최고농도로 하여 공비2의 5단계 농도군으로 농도결정시험을 실시하였다. 그 결과, 대사활성계의 적용에 관계없이 모든 균주에서 생육저해는 관찰되지 않았다. 시험 결과를 바탕으로 본 시험에서 대사활성화에 의하지 않은 경우와 대사활성화에 의한 경우 5000 µg/plate 농도를 최고농도로 하고 공비를 2로 하여 5 단계 농도군으로 본시험을 실시하였다.

본시험 결과, 대사활성계의 적용에 관계없이 모든 균주에서 생육저해는 관찰되지 않았으며 양성으로 판단할 만한 복귀집락 수의 증가는 관찰되지 않았다.

○ 시험결과(본시험)

Metabolic activation	Dose ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )	Number of colony / plate					
		Base-pair substitution type			Frameshift type		
		TA100	TA1535	WP2uvrA	TA98	TA1537	
S9Mix(-)	0	123 113 127	10 9 11	47 45 45	39 25 29	6 9 5	
	Mean $\pm$ SD	121 $\pm$ 7.2	10 $\pm$ 1.0	46 $\pm$ 1.2	31 $\pm$ 7.2	7 $\pm$ 2.1	
	313	101 87 109	9 9 6	47 39 43	29 41 44	6 4 5	
	Mean $\pm$ SD	99 $\pm$ 11.1	8 $\pm$ 1.7	43 $\pm$ 4.0	38 $\pm$ 7.9	5 $\pm$ 1.0	
	625	100 99 80	12 15 10	46 52 40	40 38 31	7 3 6	
	Mean $\pm$ SD	93 $\pm$ 11.3	12 $\pm$ 2.5	46 $\pm$ 6.0	36 $\pm$ 4.7	5 $\pm$ 2.1	
	1250	116 87 92	11 8 7	49 37 36	32 46 32	6 7 9	
	Mean $\pm$ SD	98 $\pm$ 15.5	9 $\pm$ 2.1	41 $\pm$ 7.2	37 $\pm$ 8.1	7 $\pm$ 1.5	
	2500	114 127 91	14 7 16	30 47 36	37 29 28	8 10 4	
	Mean $\pm$ SD	111 $\pm$ 18.2	12 $\pm$ 4.7	38 $\pm$ 8.6	31 $\pm$ 4.9	7 $\pm$ 3.1	
	5000	137 124 141	8 13 9	31 50 45	25 28 38	6 6 6	
	Mean $\pm$ SD	134 $\pm$ 8.9	10 $\pm$ 2.6	42 $\pm$ 9.8	30 $\pm$ 6.8	6 $\pm$ 0.0	
S9Mix(+)	0	108 98 107	16 7 14	35 37 55	38 39 44	6 5 11	
	Mean $\pm$ SD	104 $\pm$ 5.5	12 $\pm$ 4.7	42 $\pm$ 11.0	40 $\pm$ 3.2	7 $\pm$ 3.2	
	313	102 129 129	11 18 17	42 52 50	47 37 33	4 9 9	
	Mean $\pm$ SD	120 $\pm$ 15.6	15 $\pm$ 3.8	48 $\pm$ 5.3	39 $\pm$ 7.2	7 $\pm$ 2.9	
	625	125 113 102	11 19 11	46 35 56	37 37 45	9 7 10	
	Mean $\pm$ SD	113 $\pm$ 11.5	14 $\pm$ 4.6	46 $\pm$ 10.5	40 $\pm$ 4.6	9 $\pm$ 1.5	
	1250	124 126 118	11 11 25	56 41 62	52 45 45	8 8 4	
	Mean $\pm$ SD	123 $\pm$ 4.2	16 $\pm$ 8.1	53 $\pm$ 10.8	47 $\pm$ 4.0	7 $\pm$ 2.3	
	2500	140 123 134	14 20 15	56 52 50	41 43 49	9 5 7	
	Mean $\pm$ SD	132 $\pm$ 8.6	16 $\pm$ 3.2	53 $\pm$ 3.1	44 $\pm$ 4.2	7 $\pm$ 2.0	
	5000	172 146 146	16 11 18	60 57 73	50 42 60	5 3 5	
	Mean $\pm$ SD	155 $\pm$ 15.0	15 $\pm$ 3.6	63 $\pm$ 8.5	51 $\pm$ 9.0	4 $\pm$ 1.2	
Positive controls	S9Mix(-)	Positive controls	AF-2	NaN <sub>3</sub>	AF-2	AF-2	9-AA
		Dose ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )	0.01	0.5	0.01	0.1	80
		Number of colony	451 465 521	268 224 236	260 316 308	428 481 504	2222 2128 2046
		Mean $\pm$ SD	479 $\pm$ 37.0	243 $\pm$ 22.7	295 $\pm$ 30.3	471 $\pm$ 39.0	2132 $\pm$ 88.1
		Positive controls	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA	2-AA
	S9Mix(+)	Dose ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )	1	2	10	1	2
		Number of colony	1068 1220 1226	279 300 259	269 264 274	371 356 366	180 196 275
		Mean $\pm$ SD	1171 $\pm$ 89.5	279 $\pm$ 20.5	269 $\pm$ 5.0	364 $\pm$ 7.6	217 $\pm$ 50.9

시험물질 및 S9 mix의 무균성을 확인하기 위한 무균시험 결과 미생물에 의한 오염은 없었다. 한편, 양성대조군 및 음성대조군에서는 각각의 균주에서 양성 및 음성으로 판단한 수치범위에서 복귀집락수가 유발되었으므로 본 시험은 적절히 실시되었다고 할 수 있다.

이상의 결과를 종합하여 판단하였을 때, 시험물질 발효농용추출분말은 본 시험조건 하에서 복귀돌연변이를 유발하지 않는 것으로 판단되었다.

#### 마. *In vitro* 염색제이상시험

##### (1) 세포증식억제시험

본 시험의 투여농도를 결정하기 위해 5000  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 를 최고농도로 하여 8개의 농도단계(39.06, 78.13, 156.25, 312.5, 625, 1250, 2500, 5000  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )를 적용하였으며 각각의 농도에서 생존세포수를 측정한 다음 음성대조군의 세포수를 100%로 하여 세포증식률(RCC)을 산출하였다.

직접법의 경우 24시간 처리군에서는 처리농도 5000  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 과 2500  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 70.45% 및 98.86%의 세포생존율을 나타내었으며, 6시간 처리군에서는 5000  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 과 2500  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 각각 77.84% 및 94.32%의 세포생존율을 나타내었다. 시험물질의 세포증식률을 고려해 직접법의 24시간 연속처리군 및 6시간처리 18시간 회복군은 5000  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 를 본시험의 최고농도로 선정하였다.

대사활성법을 이용하여 6시간 시험물질을 처리한 경우, 처리농도 5000  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 과 2500  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 각각 72.48% 및 75.17%의 세포생존율을 나타내었다. 시험물질의 세포증식률을 고려해 5000  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 를 본시험의 최고농도로 선정하였다.

세포증식억제시험 결과를 고려해 최고농도를 결정하여 공비2의 3단계로 본시험의 농도를 다음과 같이 설정하였다

직접법 (-S9 mix, 24시간 연속처리군) : 1250, 2500, 5000  $\mu\text{g}/\text{ml}$

직접법 (-S9 mix, 6시간 처리 18시간 회복군) : 1250, 2500, 5000  $\mu\text{g}/\text{ml}$

대사활성법 (+S9 mix, 6시간 처리 18시간 회복군) : 1250, 2500, 5000  $\mu\text{g}/\text{ml}$

##### (2) 염색제이상시험 (본시험)

본시험 결과, 직접법에서의 이상중기상(aberrant metaphase, gap-)의 빈도는 24시간 처리군의 음성대조군, 1250, 2500, 5000  $\mu\text{g}/\text{ml}$  농도단계에서 각각 0.0, 0.0, 0.5, 0.5의 빈도를 나타내었으며, 6시간 처리 18시간 회복군에서는 음성대조군, 1250, 2500, 5000  $\mu\text{g}/\text{ml}$  농도단계에서 각각 0.0, 0.5, 0.5, 0.0의 빈도를 나타내었다

대사활성화법에서의 이상중기상(aberrant metaphases, gap-)의 빈도는 음성대조군, 1250, 2500, 5000  $\mu\text{g}/\text{ml}$  농도단계에서 각각 0.5, 1.0, 1.0, 1.5의 빈도를 나타내었다. 배수성(PP) 및 핵내배화(ER)는 통계학적으로 유의한 증가를 보이지 않았다.

이상의 결과를 종합해 본 결과, 모든 처리군에서 이상중기상의 빈도는 음성대조군과 비교하였을 때 통계적으로 유의한 차이가 관찰되지 않았다.

○ Test results of relative cell count (preliminary range-finding study).

Exposure <sup>a)</sup>	S9 mix	Dose (mM)	Cell counts ( $\times 10^6$ )				RCC(% <sup>b)</sup>	
			Plate A		Plate B	Mean		
24-0	-	N.C.	1.80	1.73	1.81	1.70	1.76	100.00
	-	39.06	1.91	1.83	1.74	1.90	1.85	105.11
	-	78.13	1.82	1.90	1.80	1.85	1.84	104.55
	-	156.25	1.96	1.84	1.82	1.73	1.84	104.55
	-	312.5	1.85	1.92	1.91	1.84	1.88	106.82
	-	625	1.81	1.85	1.76	1.84	1.82	103.41
	-	1250	1.82	1.72	1.75	1.70	1.75	99.43
	-	2500	1.72	1.74	1.70	1.79	1.74	98.86
	-	5000	1.29	1.30	1.23	1.15	1.24	70.45
6-18	-	N.C.	1.72	1.82	1.70	1.80	1.76	100.00
	-	39.06	1.87	1.83	1.89	1.92	1.88	106.82
	-	78.13	1.92	1.94	1.81	1.83	1.88	106.82
	-	156.25	1.81	1.94	1.83	1.89	1.87	106.25
	-	312.5	1.69	1.69	1.78	1.70	1.72	97.73
	-	625	1.72	1.70	1.65	1.72	1.70	96.59
	-	1250	1.60	1.54	1.76	1.82	1.68	95.45
	-	2500	1.71	1.65	1.60	1.68	1.66	94.32
	-	5000	1.31	1.39	1.40	1.36	1.37	77.84
6-18	+	N.C.	1.49	1.52	1.49	1.47	1.49	100.00
	+	39.06	1.38	1.53	1.42	1.38	1.43	95.97
	+	78.13	1.22	1.22	1.32	1.37	1.28	85.91

+	156.25	1.30	1.25	1.38	1.25	1.30	87.25
+	312.5	1.27	1.20	1.25	1.23	1.24	83.22
+	625	1.22	1.33	1.28	1.22	1.26	84.56
+	1250	1.20	1.35	1.18	1.22	1.24	83.22
+	2500	1.12	1.07	1.20	1.10	1.12	75.17
+	5000	1.05	1.07	1.12	1.07	1.08	72.48

N.C. : Negative control

Test substance : 발효녹용추출분말

a) Treatment time-recovery time

b) RCC (Relative cell count) = (No. of treated cells / No. of control cells) × 100 (%)

○ The number of cells with chromosome aberrations in the absence of S9 mix.

Exposure <sup>a)</sup>	Dose ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	Cell No.	Aberration						No. of total chromosome aberrations		No. of cells with chromosome aberrations			
			Chromatid type		Chromosome type		PP/ER	Gap						
			ctb	cte	csb	cse			(-)Gap	(+)Gap	(-)Gap	(+)Gap		
24-0	Negative control	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
		100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	1250	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
		100	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1	
	2500	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
		100	0	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	
	5000	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
		100	0	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	
	MMC	100	3	29	0	0	0	2	32	34	31	33		
		100	7	25	0	0	0	0	32	32	28	28		
	6-18	Negative control	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
			100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1250		100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
		100	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1		
2500		100	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1		
		100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
5000		100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
		100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
MMC		100	2	21	0	0	0	0	23	23	23	23		
		100	8	19	0	0	0	1	27	28	24	25		



Test substance : 발효녹용추출분말

a) Treatment time-recovery time

MMC : Mitomycin C (0.04 µg/ml)

PP : Polyploidy

ER : Endoreduplication

○ The number of cells with chromosome aberrations in the presence of S9 mix.

Exposure <sup>a)</sup>	Dose (µg/ml)	Cell No.	Aberration						No. of total chromosome aberrations		No. of cells with chromosome aberrations	
			Chromatid type		Chromosome type		PP/ER	Gap	(-)Gap	(+)Gap	(-)Gap	(+)Gap
			ctb	cte	csb	cse						
6-18	Negative control	100	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1
		100	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1
	1250	100	0	1	0	0	0	0	1	1	1	1
		100	0	1	0	0	0	0	1	1	1	1
	2500	100	1	0	0	0	0	1	1	2	1	2
		100	1	0	0	0	0	1	1	2	1	2
	5000	100	1	1	0	0	0	0	2	2	2	2
		100	1	0	0	0	0	1	1	2	1	2
	CPA	100	3	23	0	0	0	1	26	27	25	26
		100	4	25	1	0	0	1	30	31	28	29

Test substance : 발효녹용추출분말

a) Treatment time-recovery time

CPA : Cyclophosphamide · H<sub>2</sub>O (10 µg/ml)

PP : Polyploidy

ER : Endoreduplication

## 바. In vivo 소핵시험

시험물질 발효녹용추출분말의 유전독성을 평가하기 위하여 수컷 마우스 (ICR mouse) 골수세포를 이용한 소핵시험을 실시하였다.

본 소핵시험은 예비시험과 본시험에서 7주령의 수컷마우스를 각각 8일과 7일간 순화시킨 후 농도별로 시험물질을 복강 투여하였다. 시험물질은 멸균증류수에 용해하여 조제하였으며 예비시험과 본시험의 단계별 처리농도는 다음과 같았다.

예비시험 : 500, 1000, 2000 mg/kg

본시험 : 500, 1000, 2000 mg/kg

예비시험 결과, 모든 시험물질 투여군에서 용매대조군과 비교하여 특이한 일반증상은 관찰되지 않았다. 투여농도 (500 mg/kg, 1000 mg/kg, 2000 mg/kg) 및 투여 후 도살시기 (24시간, 48시간)에 따라 관찰시, 전체 적혈구 중 다염성 적혈구의 수는 용매대조군과 비교해 뚜렷한 골수세포의 증식억제는 나타나지 않았다. 예비시험의 결과를 기초로 2000 mg/kg를 최고 투여농도로 하고 부검 및 검체제작시기를 투여 후 24시간으로 본시험을 실시하였다.

그 결과 시험물질 투여군(500 mg/kg, 1000 mg/kg, 2000 mg/kg)에서 전체 적혈구 중 다염성 적혈구의 수는 용매대조군과 비교하여 뚜렷한 골수세포의 증식억제는 나타나지 않았다. 개체당 약 2,000개의 다염성 적혈구에서 관찰한 소핵유발빈도는 모든 시험물질투여군(500 mg/kg, 1000 mg/kg, 2000 mg/kg)에서 용매대조군과 비교하여 통계적으로 유의한 결과를 보이지 않았다. 한편 양성대조군은 소핵유발빈도에서 용매대조군에 비해 통계적으로 유의하며 현저한 증가를 보였다( $P < 0.01$ ).

시험물질 투여 후 모든 투여군에서 용매대조군과 비교하여 통계적으로 유의한 체중변화는 관찰되지 않았다.

이상의 결과를 종합하여 볼 때 시험물질 발효녹용추출분말은 본 시험의 조건하에서 마우스의 골수세포의 소핵형성에 영향을 주지 않는 것으로 사료된다.

○ Test results (main study)

Sampling time(hrs)	Groups	Dose (mg/kg)	Animal No.	MNPCE/2000 PCEs (Mean±SD, %)	PCE/(PCE+NCE) (Mean±SD)
24	Vehicle control	0	1	0.10	0.46
			2	0.05	0.43
			3	0.10	0.45
			4	0.10	0.44
			5	0.30	0.57
			6	0.15 (0.13± 0.09)	0.50 (0.47± 0.05)
		500	7	0.20	0.45
			8	0.20	0.44
			9	0.15	0.49
			10	0.20	0.46
			11	0.35	0.56
			12	0.25 (0.23± 0.07)	0.48 (0.48± 0.04)
	발효농용 추출분말	1000	13	0.20	0.47
			14	0.15	0.38
			15	0.25	0.45
			16	0.20	0.48
			17	0.25	0.54
			18	0.25 (0.22± 0.04)	0.49 (0.47± 0.05)
		2000	19	0.30	0.50
			20	0.20	0.45
			21	0.35	0.47
			22	0.05	0.52
			23	0.25	0.42
			24	0.20 (0.23± 0.10)	0.49 (0.47± 0.03)
	MMC	2.0	25	8.60	0.22
			26	13.50	0.31
			27	11.75	0.30
			28	8.00	0.42
			29	13.30	0.25
			30	6.40 (10.26± 2.99)**	0.31 (0.30± 0.07)**

Vehicle : Distilled water

\*\* Significantly different from the control at  $P < 0.01$  (One-way ANOVA)

Abbreviations

MNPCE : PCE with one or more micronuclei

PCE : Polychromatic erythrocyte

NCE : Normochromatic erythrocyte

MMC : Mitomycin C

사. 최종결과

아래 표에서와 같이 발효농용추출분말의 랫드에 대한 13 주 반복 경구투여 결과, 무독성량 (NOAEL, No observed adverse effect level)은 1,000mg/kg b.w. 이상이며, 표적장기(target organ)는 관찰되지 않았다.

○ 발효농용추출물 안전성시험 결과

시험 종류	종 및 계통	투여 방법	투여 기간	시험 결과
단회 투여	설치류  SD Rat (M 20, F 20)	경구	1회	· 시험결과 기재 : 특이한 일반증상, 사망례, 유의한 체중변화 및 육안적 병변 소견 없음 · LD <sub>50</sub> > 2,000 mg/kg
	비설치류  Beagle dog (M 4, F 4)	경구	1회	· 시험결과 기재 : 특이한 일반증상, 사망례, 유의한 체중변화 및 육안적 병변 소견 없음 · ALD > 2,000 mg/kg
13주 반복 투여	설치류  SD Rat (M 80, F 80)	경구	13주	· 시험결과 현재까지 시험물질과 관련된 임상증상, 행동이상, 체중변화, 폐사개체가 관찰되지 않음
유전 독성	복귀 돌연변이 (Ames test)	· <i>S. typhimurium</i> TA98, TA100, TA1535, TA1537 · <i>E.coli</i> WP2 uvrA	1회	· 본 시험조건 하에서 복귀돌연변이를 유발하지 않음(음성)
	염색체 이상시험	CHO cells	1회	· 음성(염색체 이상을 나타내지 않음.)
	소핵시험	ICR 마우스	경구	1회 · 본 시험 조건하에서 마우스 골수세포에 대한 소핵을 유발하지 않음(음성)

#### 4. 발효녹용추출물의 생리활성 연구

가. Phenylhydrazine(PHZ)에 의한 용혈성 빈혈 모델에서의 조혈기능 연구

##### (1) 동물실험 결과

Sprague-Dawley(SD)계열 4주령 암컷 흰쥐 20마리를 대상으로 하여 2일간 Phenylhydrazine(PHZ)을 복강내(40 mg/kg)로 투여하여 용혈성 빈혈을 유도하고 비발효와 발효 녹용을 14일간 섭취시켰다.

그 결과 빈혈을 유도하지 않은 Control군에 비해 빈혈유도 대조군인 PHZ-con군의 적혈구(RBC), 헤마토크릿(Hct), 헤모글로빈(Hgb)은 모두 감소되는 경향을 나타내었다. 녹용섭취에 의해 빈혈로 감소된 이들 혈액학적 지표가 증가되었고 특히 비발효녹용군인 Non-200군(비발효 녹용 200 mg/kg 섭취군)에 비해 발효녹용군인 B-100군(발효 녹용 100 mg/kg 섭취군)과 B-200군(발효 녹용 200 mg/kg 섭취군)은 용량의존적으로 증가가 보다 뚜렷하게 나타났다. 따라서 녹용은 빈혈로 인한 혈구 이상을 개선함으로써 조혈 작용을 통한 빈혈에 효과가 있는 것으로 나타났으며 특히 이러한 경향은 녹용의 발효를 통해 보다 증가됨을 알 수 있었다.

신장에서의 EPO(erythropoietin)의 발현량은 녹용과 발효녹용을 경구투여한 군에서 용혈성 빈혈이 유도되지 않은 정상군과 유사한 활성을 보였다.

$\delta$ -Aminolevulinic acid dehydrates는 혈액색소의 합성초기 과정인  $\delta$ -aminolevulinic acid로부터 porphobilinogen이 합성되는 경로를 촉매하는 효소이다. 적혈구 용혈로 인한 빈혈은 헤모글로빈 합성에 관여하는  $\delta$ -aminolevulinic acid dehydrates(ALAD)의 활성을 저해하여 aminolevulinic acid (ALA)의 요 중 배설을 증가시켜 조혈작용을 저해하는 것으로 알려졌다. 실험결과  $\delta$ -Aminolevulinic acid dehydrates는 정상군이 가장 높은 수치를 보였으며, 녹용과 발효녹용 경구투여군에서 비슷한 효과를 보였다. 각 실험 결과는 다음과 같다

- Effect of fermented antler extract on body weight gain and food intake in PHZ-induced anemic rats

Parameters	Groups				
	Control	PHZ-con	Non-200	B-100	B-200
Body weight gain (g/day)	5.42±0.25 <sup>a</sup>	3.61±1.24 <sup>b</sup>	3.79±1.21 <sup>b</sup>	4.82±0.45 <sup>ab</sup>	4.62±0.40 <sup>ab</sup>
Food intake (g/day)	17.01±0.92	14.43±0.89	15.26±1.63	17.58±1.91	17.92±1.93

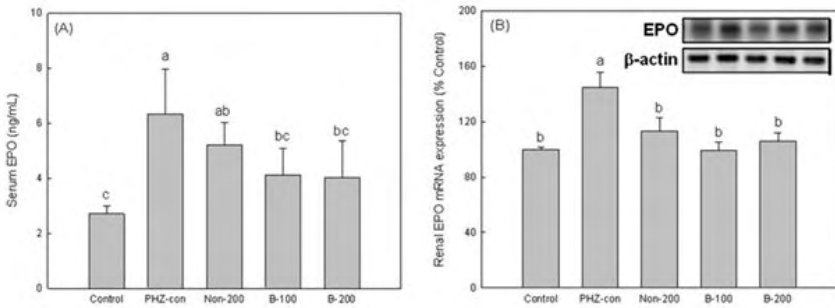
Values are mean±SD for 5 rats/group. Means with different superscript letters are significantly different at  $p < 0.05$  by Turkey's multiple comparison test. Control: normal rats, PHZ-con: anemic rats treated vehicle, Non-200; anemic rats treated non-fermented antler extract 200 mg/kg body weight (BW), B-100; anemic rats treated fermented antler extract 100 mg/kg BW, B-200; anemic rats treated fermented antler extract 200 mg/kg BW

- Effect of fermented antler extract on hematologica parameters in PHZ-induced anemic rats

Hematological values	Groups				
	Control	PHZ-con	Non-200	B-100	B-200
RBC ( $\times 10^6/\mu\text{L}$ )	7.20±0.29 <sup>a</sup>	5.17±0.21 <sup>d</sup>	5.90±0.10 <sup>c</sup>	6.15±0.21 <sup>bc</sup>	6.33±0.15 <sup>b</sup>
WBC ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ )	5.80±1.96	4.20±0.72	3.83±1.79	3.75±2.49	4.10±2.31
Hct (%)	59.05±	50.03±0.87 <sup>b</sup>	51.87±4.67 <sup>b</sup>	53.30±1.70 <sup>b</sup>	53.30±2.08 <sup>b</sup>
Hgb (g/dL)	15.70±0.24 <sup>a</sup>	14.30±0.30 <sup>b</sup>	14.30±1.15 <sup>b</sup>	14.50±0.42 <sup>b</sup>	14.77±0.40 <sup>ab</sup>
MCV (fL)	82.18±2.09 <sup>b</sup>	97.07±5.32 <sup>a</sup>	88.00±9.09 <sup>ab</sup>	87.05±0.07 <sup>ab</sup>	84.03±3.85 <sup>b</sup>
MCH (pg)	21.85±0.59 <sup>c</sup>	27.70±0.52 <sup>a</sup>	24.27±2.24 <sup>b</sup>	23.65±0.07 <sup>bc</sup>	23.27±0.70 <sup>bc</sup>
MCHC (g/dL)	26.58±0.46 <sup>b</sup>	28.57±1.11 <sup>a</sup>	27.60±0.40 <sup>ab</sup>	27.25±0.07 <sup>b</sup>	27.70±0.46 <sup>ab</sup>
Platelet ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ )	1123.75±178.48	1095.20±273.52	1073.67±41.02	994.50±37.48	858.33±6.81
Reticulocyte (%)	4.65±0.13 <sup>c</sup>	6.87±0.95 <sup>a</sup>	6.15±0.21 <sup>ab</sup>	5.60±0.72 <sup>bc</sup>	5.57±0.67 <sup>bc</sup>

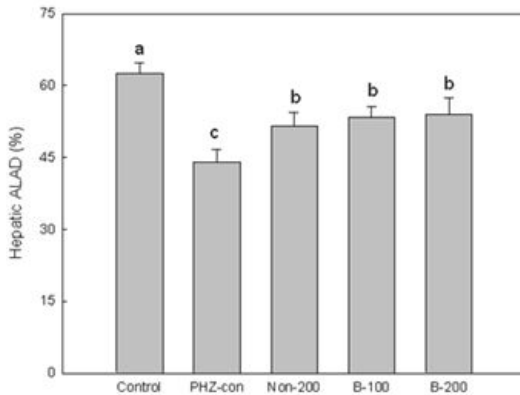
Control: normal rats, PHZ-con: anemic rats treated vehicle, Non-200; anemic rats treated non-fermented antler extract 200 mg/kg body weight (BW), B-100; anemic rats treated fermented antler extract 100 mg/kg BW, B-200; anemic rats treated fermented antler extract 200 mg/kg BW. RBC: red blood cell, WBC: white blood cell, Hct: hematocrit, Hgb: hemoglobin, MCV: mean corpuscular volume, MCH: mean corpuscular hemoglobin, MCHC: mean corpuscular hemoglobin concentration

- Effect of fermented antler extract on the serum level (A) and renal mRNA expression(B) of erythropoietin(EPO) in phenylhydrazine (PHZ)-induced anemic rats



Control: normal rats, PHZ-con: anemic rats treated vehicle, Non-200; anemic rats treated non-fermented antler extract 200 mg/kg body weight (BW), B-100; rats treated fermented antler extract 100 mg/kg BW, B-200; rats treated fermented antler extract 200 mg/kg BW.

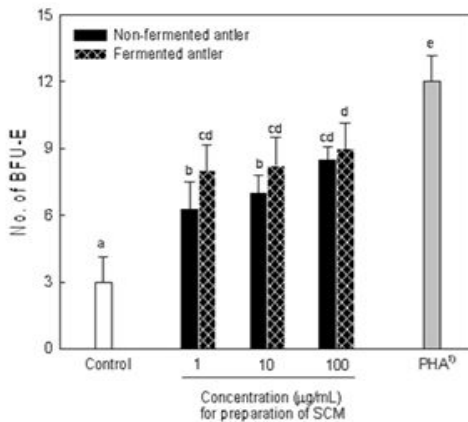
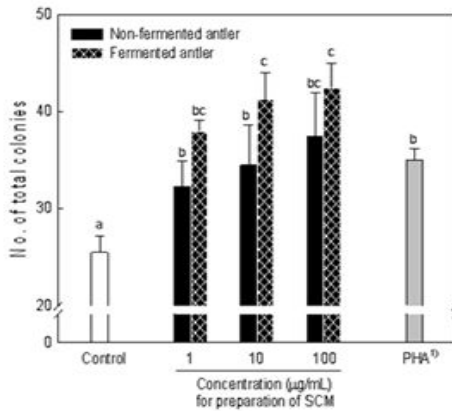
- Effect of fermented antler extract on hepatic  $\delta$ -aminolevulinic acid dehydratase (ALAD) activity in phenylhydrazine(PHZ)-induced anemic rats.



(2) 골수 세포에서의 적혈구 분화

Colony forming assay 를하여 colony를 counting하였다. 그 결과 다양한 혈구 세포로 분화할수 있는 colony들은 녹용을 처리하지 않은 control 군보다 많았으며 혈구 세포의 분화를 촉진한다고 알려져 positive control로 사용한 PHA를 첨가하였을 때에 비해 높은 농도에서는 더 많은 colony가 관찰되었다.

적혈구로 분화가 가능한 BFU-E colony의 경우 PHA를 첨가하였을 때보단 colony가 다소 조금 관찰되었으나 녹용을 처리하지 않은 control군과 비교하였을 때와 비교하였을 때에는 적혈구로 분화가 가능한 BFU-E가 더 많이 관찰되었다.



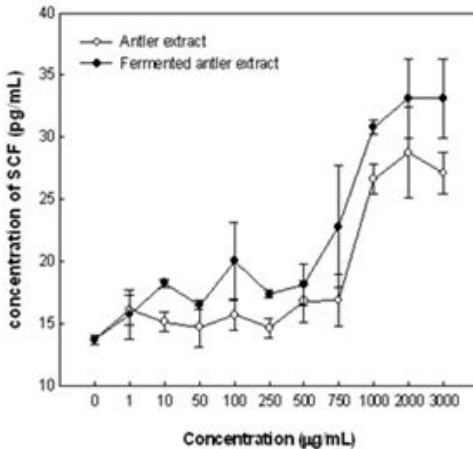


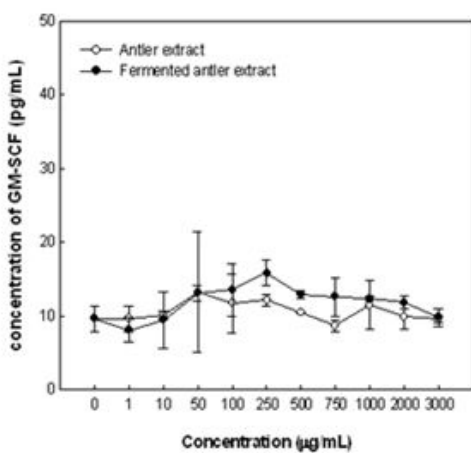
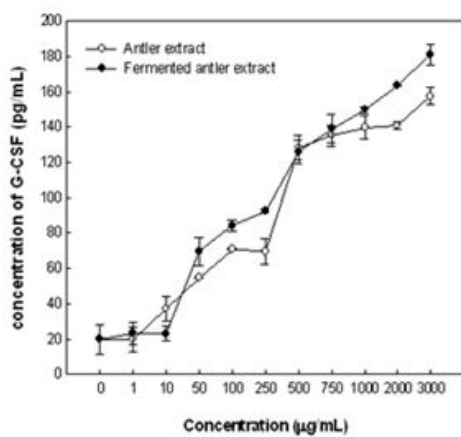
### (3) 골수 세포에서의 적혈구 형성 효과

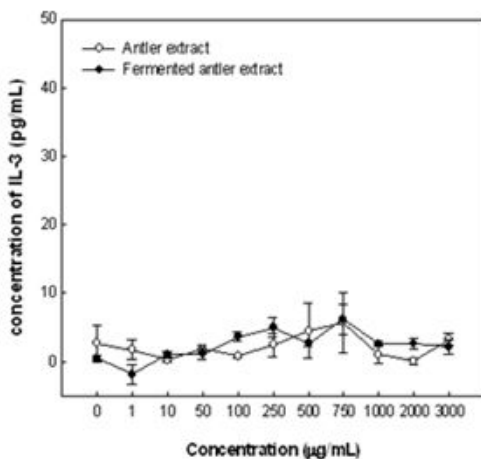
발효와 비발효 녹용 추출물은 비장에서 생성되는 조혈 조절인자에 영향을 주는 것을 알 수 있었다. 그래서 비장세포에서 생성되는 조혈인자를 측정하기 위해 비장에서 분리한 세포를 배양한 배지를 모아 ELISA 측정을 하였다.

골수세포가 혈액을 구성하는 혈소판 및 혈구들로 분화할 때 필요로 할 때 다양한 cytokine들의 영향을 받게 되는데 cytokine으로 호르몬과 비슷한 작용을 하여 골수세포들이 분화할 수 있게 도와준다. 많은 cytokine들 중 적혈구로의 분화에 필요로 하는 stem cell factor(SCF), granulocyte-colony stimulating factor(G-CSF), granulocyte macrophage-colony stimulating factor (GM-CSF), interleukin-3(IL-3)와 적혈구 분화에 필수적인 EPO라는 호르몬이 있는데 EPO는 비장에서는 생산되지 않으므로 앞의 4가지를 정하여 ELISA로 생산된 cytokine을 측정하였다.

그 결과 비장세포와 여러 농도의 녹용 추출물을 72 시간동안 함께 배양한 다음 비장에서 생성된 조혈 인자를 측정한 결과 발효와 비발효 모두 GM-CSF나 IL-3에는 영향을 주지 않았으나 SCF, G-CSF에는 농도 의존적으로 영향을 주었으며 두 조혈인자 모두 발효 추출물이 더 많이 생성시키는 것을 알 수 있었다.







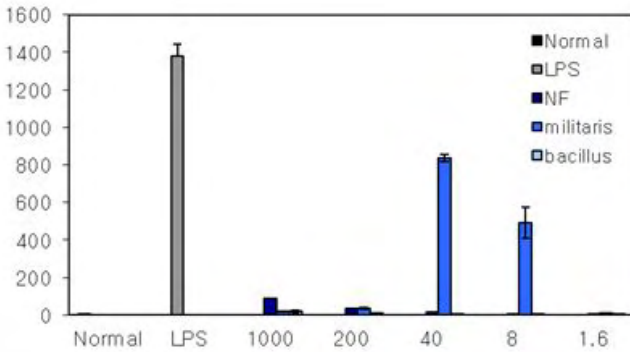
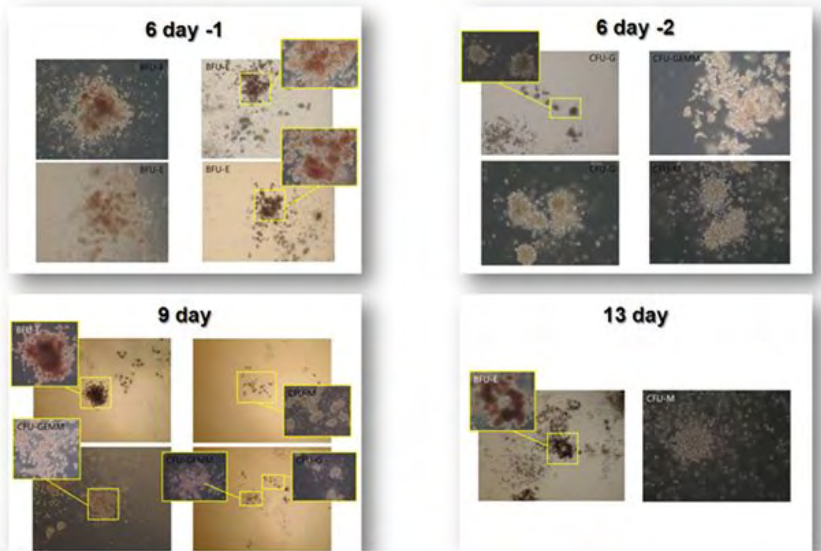
#### 나. 발효녹용추출물의 면역활성 평가

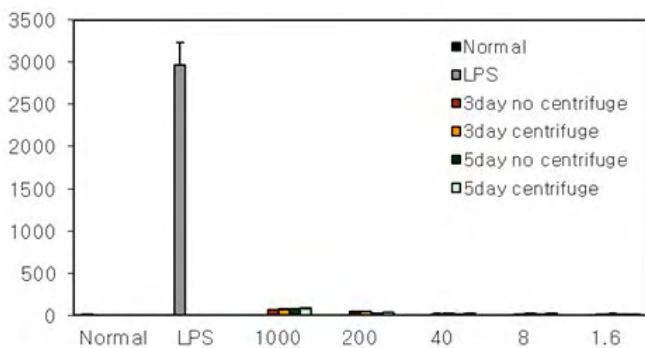
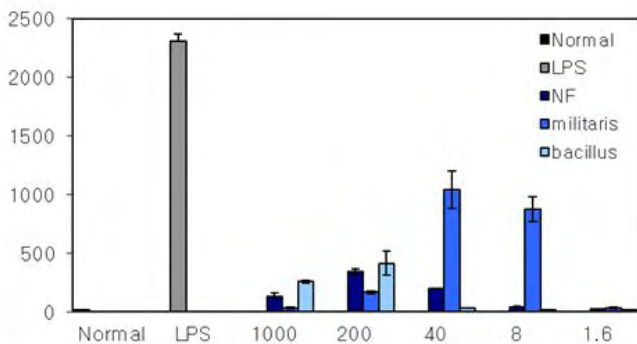
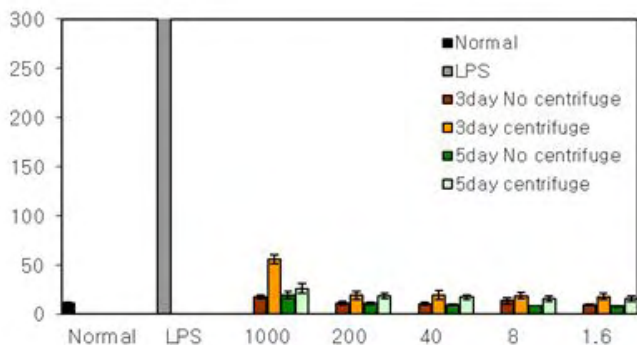
##### (1) 면역활성 평가를 위한 세포주 모델에서의 연구

시료는 NF(발효하지않는 녹용), *militaris*(*C. militaris*로 발효한 녹용), *bacillus*(*B. subtilis*로 발효한 녹용), 3day-no-cent(*C. militaris*로 3일 발효한 녹용 원액), 3 day-cent(*C. militaris*로 3일 발효한 녹용의 가용획분), 5 day-no-cent(*C. militaris*로 5일 발효한 녹용 원액), 5 day-cent(*C. militaris*로 5일 발효한 녹용의 가용획분)를 이용하였다.

Cytokine production of macrophages (IL-6 & 12 분석결과): positive control(LPS)에 비하여 발효녹용, 녹용의 활성이 미약하였으며, 가용획분 역시 낮은 활성을 보였다.

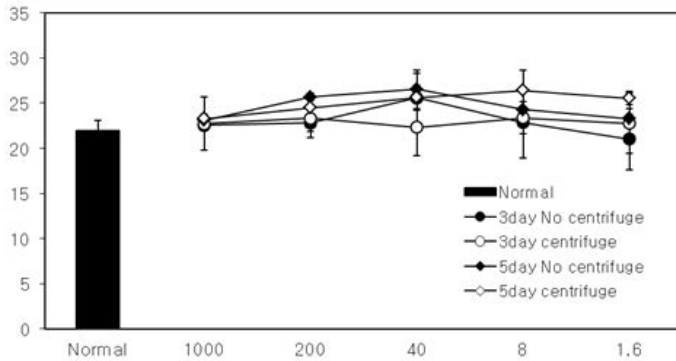
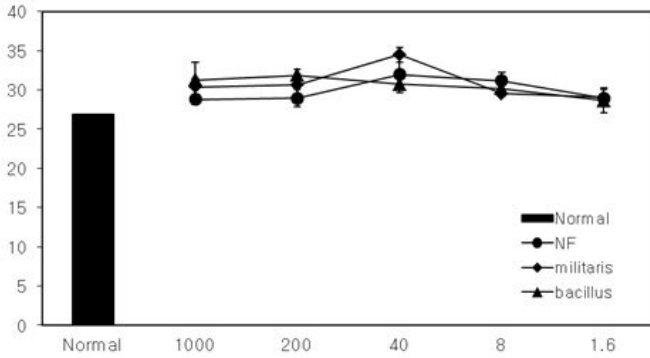
○ colony forming assay의 positive control 결과



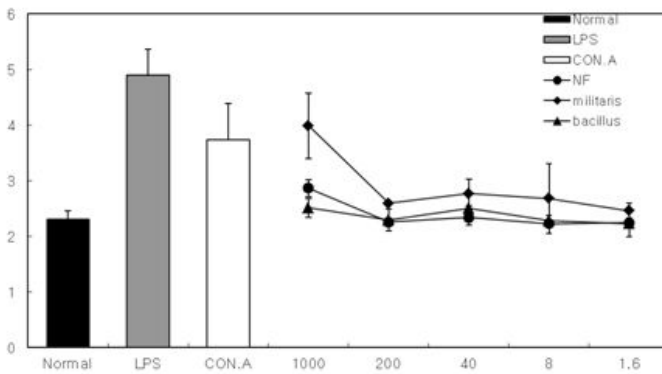
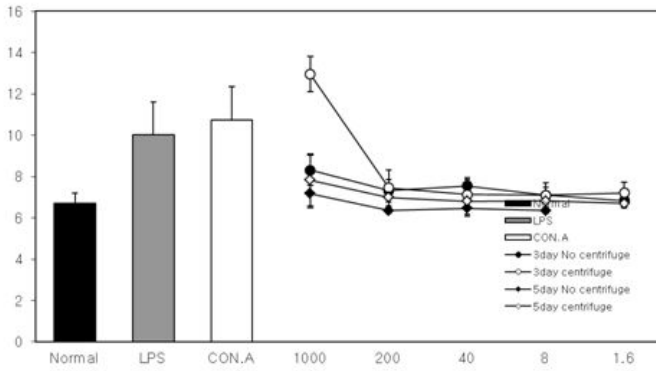


Peyer's patch cells에서의 IgA, IL-6 및 GM-CSF 활성 평가한 결과 녹용, 발효녹용 및 가용획분 역시 낮은 활성을 보였다.

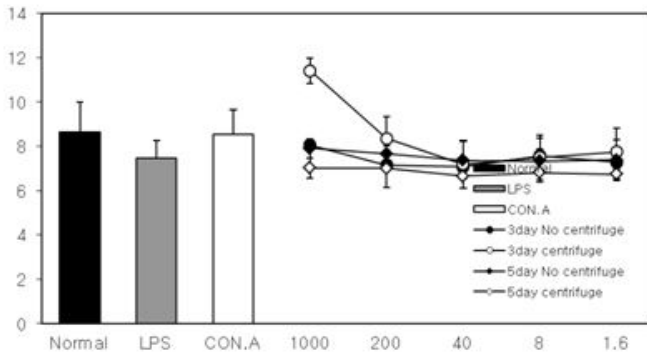
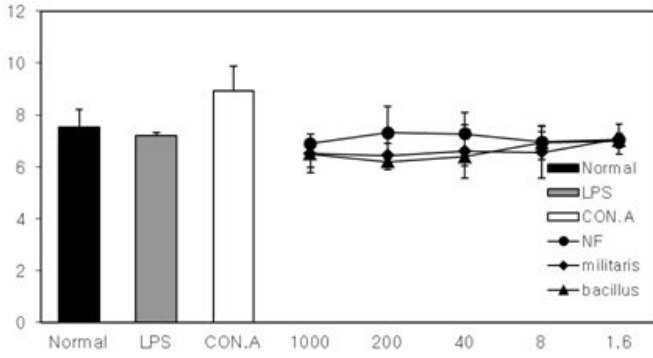
○ Peyer's patch cells에서의 IgA 측정값



○ Peyer's patch cells에서의 IL-6 측정값



○ Peyer's patch cells에서의 GM-CSF 측정값

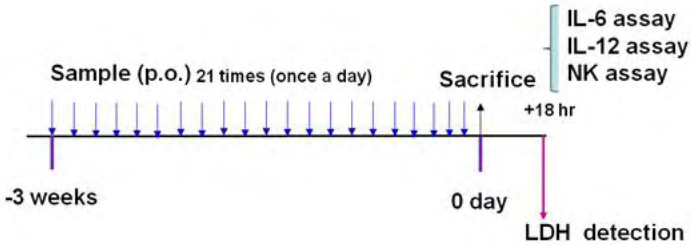




(2) 면역활성 평가를 위한 동물모델에서의 연구

## ❖ Effect of oral administration of fermented deer antler

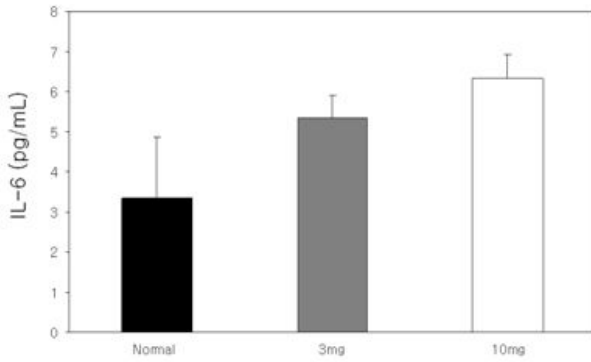
### Oral administration schedule



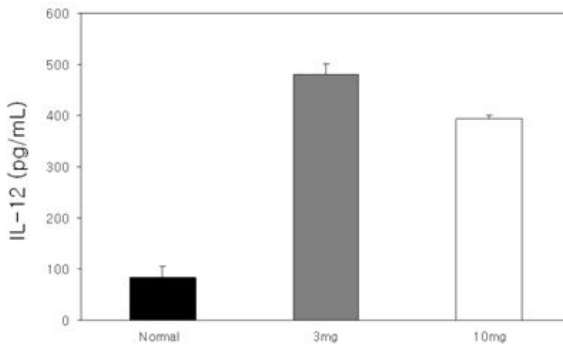
3주간 경구투여 후 IL-6, -12 및 NK cell 활성을 각각 평가한 결과, IL-6는 3 mg과 10 mg을 각각 경구투여 하였을 경우 농도 의존적으로 IL-6의 양이 증가하였으나, 증가량이 면역활성증진 의미하기에는 너무 낮은 수치를 보였다. IL-12는 3 mg 경구투여 시 480 pg/ml의 활성을 보였으나 10 mg에서는 이보다 낮은 390 pg/ml의 활성을 보였다.

그러나 이 수치 역시 면역증진 효과를 설명하기에 낮은 수치이다. NK cell활성에서도 유사한 결과를 보였다. 이상의 결과에 발효농용은 농용에 비하여 나은 면역활성을 보였으나 활성이 미약하였다.

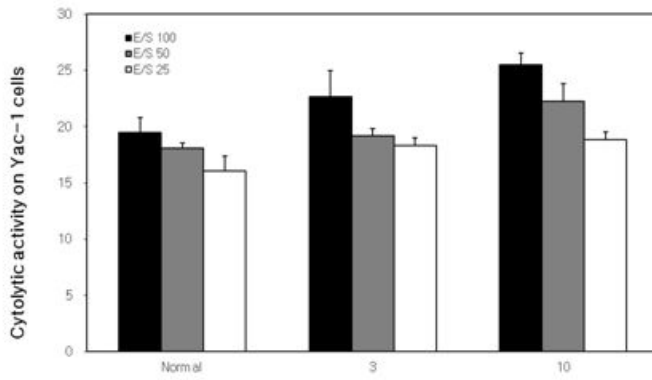
○ Effect of fermented deer antler on IL-6 induction in blood (p.o.)



○ Effect of fermented deer antler on IL-12 induction in blood (p.o.)



○ Effect of oral admin. of fermented deer antler on NK-cell activity



다. 발효녹용추출물의 피로회복에 대한 기능성 연구

(1) 체중 변화 및 장기 무게 측정

실험기간 동안의 체중 변화와 장기무게 측정 결과를 아래 표로 나타내었다. 체중 변화결과를 보면, 처치군(NFA, FA)의 경우는 대조군에 비해서 체중이 덜 감소되는 경향을 보였다. 운동으로 유도된 피로는 체중을 감소시키지만, NFA나 FA를 섭취한 경우는 체중의 감소가 억제되는 것으로 판단된다.

하지만 체중 증가량은 군간의 유의적인 차이가 나타나지 않았다. 장기 무게의 경우도 간, 신장, 심장, 비장의 무게를 측정하여 체중 100 g 당의 상대적인 장기 무게를 비교하였을 때 군간의 유의적인 차이가 없었다. 이러한 결과로 보아 NFA와 FA의 섭취로 인해 상대적인 장기 무게의 유의적인 변화가 없는 것으로 보아 NFA와 FA의 섭취는 간, 신장, 심장, 비장의 무게 변화를 통한 장기독성을 야기하지 않는 것을 알 수 있었다.

○ Body weight and organ weight in BALB/c mice treated with the deer antler extract for 4 weeks.

Group	Body weight (g)			Organ weight (mg/100 g of body weight)			
	Before treatment (0-week)	After treatment (4-week)	△ Difference	Liver	Kidney	Heart	Spleen
Control	19.82	23.75	-11.33	4.72	1.41	0.51	0.38
	±0.54	±0.38	±9.29NS	±0.12NS	±0.02NS	±0.01NS	±0.02NS
NFA-200	18.81	23.56	-4.13	4.68	1.41	0.47	0.37
	±0.25	±0.37	±3.90	±0.09	±0.03	±0.01	±0.01
NFA-500	18.38	22.93	-4.00	4.66	1.42	0.48	0.37
	±0.34	±0.40	±9.72	±0.09	±0.01	±0.02	±0.02
FA-200	20.18	23.96	-4.50	4.66	1.44	0.52	0.42
	±0.80	±0.69	±6.87	±0.13	±0.03	±0.01	±0.02
FA-500	19.57	22.65	-5.00	4.35	1.42	0.53	0.37
	±0.30	±1.35	±5.84	±0.05	±0.04	±0.02	±0.02

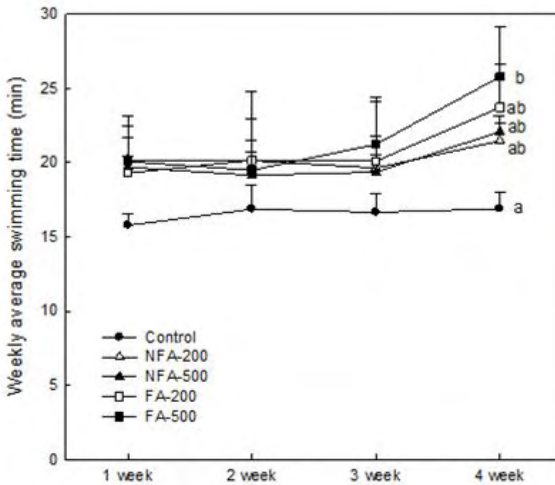
Values are the mean±standard error of the mean (SEM) for 8 mice. Control, vehicle (saline); NFA-200, nonfermented antler extract 200 mg/kg/day; NFA-500, nonfermented antler extract 500 mg/kg/day; FA-200, fermented antler extract 200 mg/kg/day; FA-500, fermented antler extract 500 mg/kg/. ns; not significant.

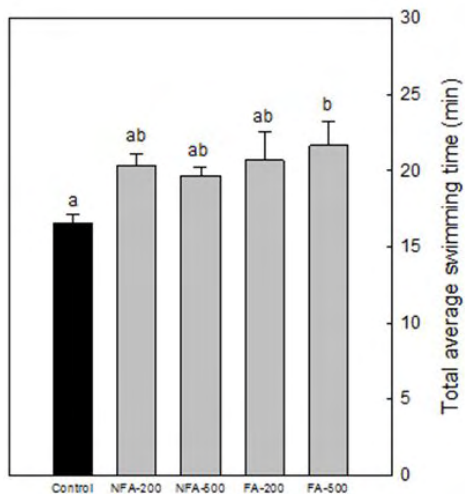
(2) 수영 지구력 측정

운동으로 유도된 피로에 대한 지구력을 측정하기 위해 수영시간을 측정 결과는 아래 그림과 같다. 녹용의 섭취로 인해 수영시간을 증가함을 알 수 있었고 특히, FA-500군의 경우가 대조군에 비해 크게 증가하였다 ( $p < 0.05$ ).

총 수영시간의 평균을 보면, 대조군이 16.55 분, FA-500군은 21.64 분으로서 FA-500군의 경우 대조군에 비해 수영시간이 30.75%가 증가하였다. 또한 FA-500군의 수영시간은 4 주차에 크게 증가하였다. 이 결과로 보아 FA의 섭취가 수영능력을 향상시킴을 알 수 있다. NFA의 섭취로 인해 수영시간이 대조군에 비해 증가하기는 하였지만 유의적인 차이는 나타나지 않았다.

○ Effect of the deer antler extract on endurance capacity for swimming in BALB/c mice.





Values are the mean±standard error of the mean (SEM) for 8 mice. Control, vehicle (saline); NFA-200, nonfermented antler extract 200 mg/kg/day; NFA-500, nonfermented antler extract 500 mg/kg/day; FA-200, fermented antler extract 200 mg/kg/day; FA-500, fermented antler extract 500 mg/kg/day. Means with different letters are significantly different between groups for each parameter at  $P<0.05$  by Tukey's multiple test.

(3) 혈액 생화학적 분석

강제 수영 전과 후의 혈중 glucose와 lactate 농도 변화를 아래 표와 같이 나타내었다. 수영 후 혈중 glucose의 농도는 모든 그룹에서 감소하였고, 혈중 lactate의 농도는 모든 그룹에서 증가하였다. 녹용을 섭취한 그룹은 대조군에 비해 수영 후 혈중 glucose 농도는 높게, 혈중 lactate 농도가 낮게 측정되었다. 이는 녹용을 섭취로 인해 혈중 glucose를 적게 감소시키며 lactate생성은 억제하는 경향을 보였지만 유의적인 차이는 없었다.

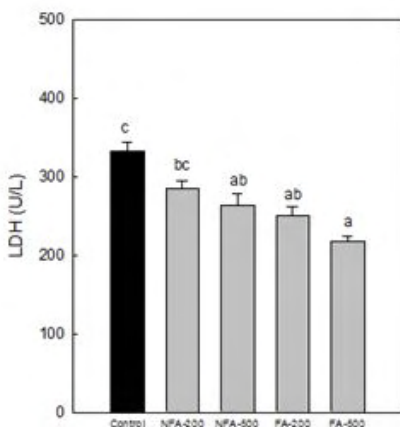
○ Effect of the deer antler extract on serum glucose and lactate in BALB/c mice after 10 min of forced swimming test.

Group	Glucose (μmol/L)			Lactate (μmol/L)		
	Before swimming	After swimming	△ Difference	Before swimming	After swimming	△ Difference
Control	93.60±5.51	77.20±11.27	-16.40±9.54 <sup>ns</sup>	1.87±0.35	3.14±0.47	1.27±0.45 <sup>ns</sup>
NFA-200	98.50±3.31	94.38±5.44	-4.13±3.90	2.01±0.26	2.81±0.32	0.80±0.31
NFA-500	85.83±7.38	81.83±8.82	-4.00±9.72	1.97±0.15	2.80±0.19	0.83±0.21
FA-200	97.38±4.81	93.13±7.32	-4.25±9.66	1.76±0.16	2.67±0.12	0.91±0.21
FA-500	93.33±1.45	86.67±6.16	-6.67±5.05	1.92±0.28	2.75±0.26	0.83±0.42

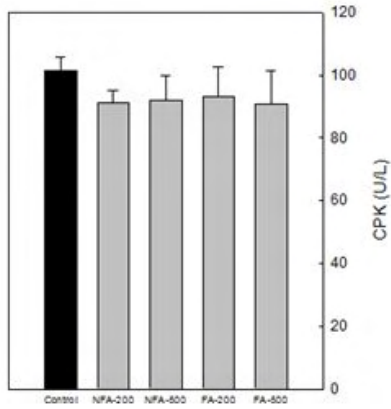
Values are the mean±standard error of the mean (SEM) for 8 mice. Control, vehicle (saline); NFA-200, nonfermented antler extract 200 mg/kg/day; NFA-500, nonfermented antler extract 500 mg/kg/day; FA-200, fermented antler extract 200 mg/kg/day; FA-500, fermented antler extract 500 mg/kg/day. ns; not significant.

강제 수영 후 근육의 손상 지표인 LDH의 혈중 농도를 아래 그림에서 확인해 보면, FA군 (FA-200 group; 249.75 U/L, FA-500 group; 217.67 U/L)이 대조군(332.00 U/L)에 비해 유의적으로 낮게 관찰되었다 ( $p < 0.05$ ). 이는 발효농용이 근육의 손상을 감소시킨다는 것을 나타낸다. 하지만 NFA군은 대조군과 유의적인 차이를 나타내지 않았다. 또 다른 근육의 손상 지표로서 CPK의 혈중 농도를 보면, 처치군(NFA, FA)이 대조군에 비해 다소 낮아졌지만 유의적인 차이는 나타나지 않았다.

○ Serum lactate dehydrogenase (LDH) and creatine phosphokinase (CPK) in BALB/c mice after 10 min of forced swimming test.





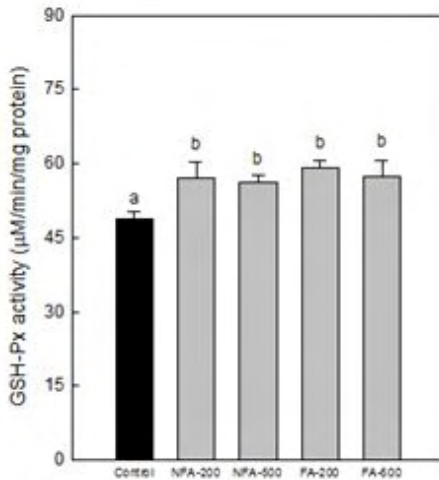


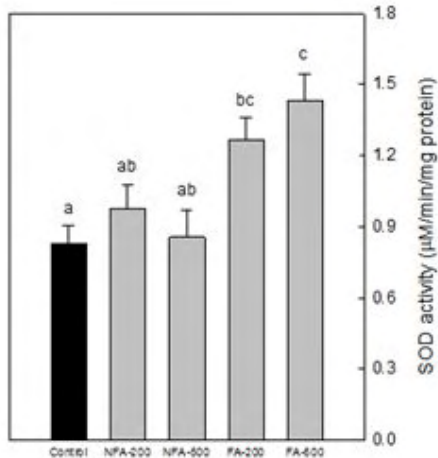
Values are the mean±standard error of the mean (SEM) for 8 mice. Control, vehicle (saline); NFA-200, nonfermented antler extract 200 mg/kg/day; NFA-500, nonfermented antler extract 500 mg/kg/day; FA-200, fermented antler extract 200 mg/kg/day; FA-500, fermented antler extract 500 mg/kg/day. Means with different letters are significantly different between groups for each parameter at  $P<0.05$  by Tukey multiple test.

(4) 간에서의 항산화 효소 분석

강제 수영 후 간의 GSH-Px와 SOD의 활성의 변화를 다음 그림과 같이 나타내었다. 간에서 GSH-Px의 활성은 처치군(NFA, FA)의 경우는 크게 증가하였지만 NFA군과 FA군 사이에서는 유의적 차이가 나타나지 않았다. 또한 간에서 SOD의 활성은 FA군이 대조군에 비해 유의적으로 크게 증가하였지만 ( $p < 0.05$ ), NFA군은 대조군에 비해 유의적인 차이를 나타내지 않았다. 또한 FA-500군( $1.43 \mu\text{M}/\text{min}/\text{mg protein}$ ) 이 NFA군(NFA-200 group;  $0.98 \mu\text{M}/\text{min}/\text{mg protein}$ , NFA-500;  $0.86 \mu\text{M}/\text{min}/\text{mg protein}$ )에 비해 유의적으로 높은 SOD 활성을 보였다 ( $p < 0.05$ ).

- Activities of hepatic glutathione peroxidase (GSH-Px) and superoxide dismutase (SOD) in BALB/c mice after 10 min of forced swimming test.





Values are the mean±standard error of the mean (SEM) for 8 mice. Control, vehicle (saline); NFA-200, nonfermented antler extract 200 mg/kg/day; NFA-500, nonfermented antler extract 500 mg/kg/day; FA-200, fermented antler extract 200 mg/kg/day; FA-500, fermented antler extract 500 mg/kg/day. Means with different letters are significantly different between groups for each parameter at  $P<0.05$  by Tukey's multiple test.

#### (5) 단백질 수준에서의 근육 내 산화적 대사 관련 지표 분석

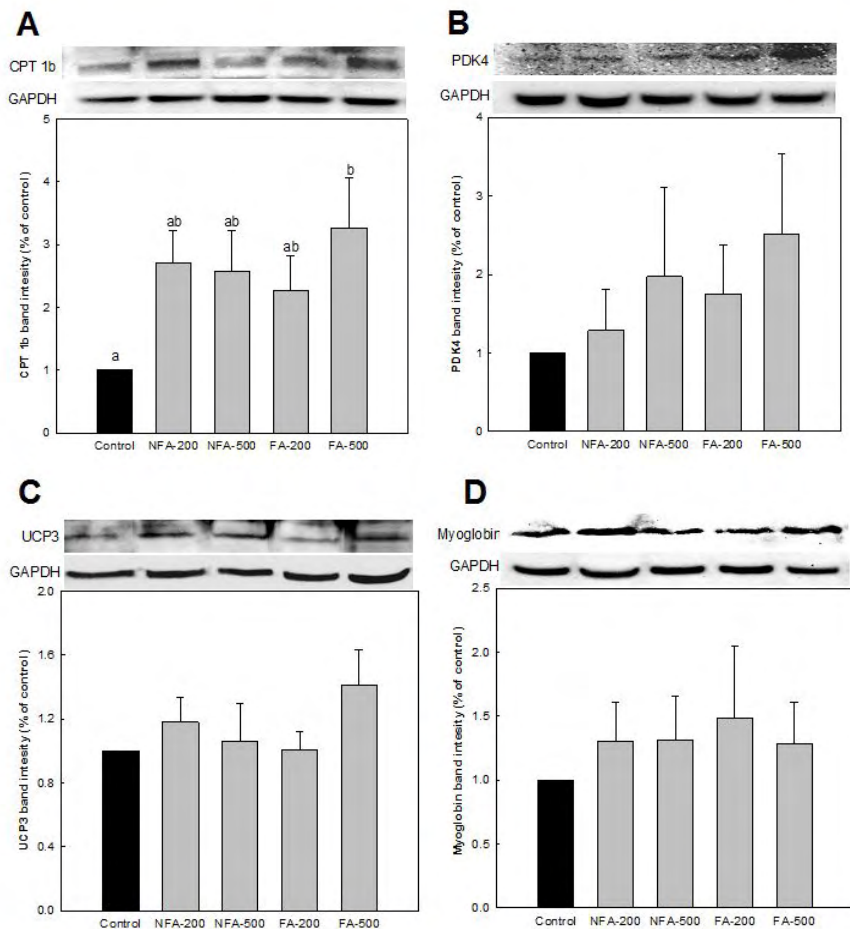
강제 수영 후 근육에서의 산화적인 에너지 대사 조절 관련 지표로서 CPT 1b, PDK4, UCP3, Myoglobin을 단백질 수준에서 발현량을 본 결과를 다음과 같이 나타내었다. 지방산의  $\beta$ -oxidation과 관련이 있는 CPT 1b, PDK4, UCP3의 발현량을 보면, CPT 1b의 경우 FA500군이 대조군에 비해 유의적으로 높은 발현량을 보였고( $p<0.05$ ), NFA군과 FA200군은 대조군에 비해 높은 경향을 보였으나 유의적인 차이는 나타나지 않았다.

PDK4와 UCP3의 단백질 발현량은 대조군에 비해 처치군(NFA, FA)에서 높아지는 경향을 보이기는 했지만, 유의적인 차이를 보이지는 않았다. Myoglobin도 대조군에 비해 처치군에서 높아지는 경향을 보이기는 했지만, 유의적인 차이를 보이지는 않았다.

○ Protein expression levels in BALB/c mice after 10 min of forced swimming test.

A : muscle carnitine palmitoyl transferase I (Cpt 1b)

B : pyruvatedehydrogenasekinase4(Pdk4),C:uncouplingprotein3(Ucp3),D:Myoglobin



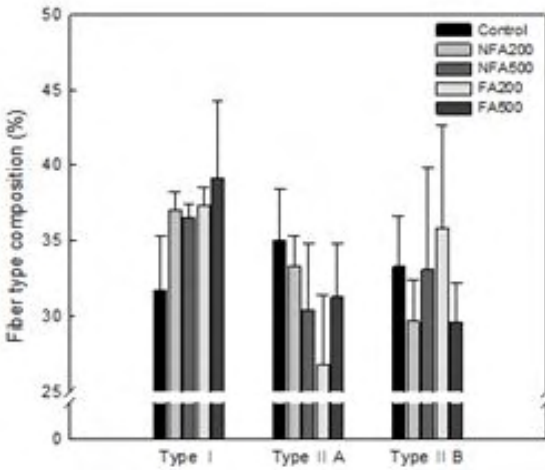
Values are the mean±standard error of the mean (SEM) for 8 mice. Control, vehicle (saline); NFA-200, nonfermented antler extract 200 mg/kg/day; NFA-500, nonfermented antler extract 500 mg/kg/day; FA-200, fermented antler extract 200 mg/kg/day; FA-500, fermented antler extract 500 mg/kg/day. Means with different letters are significantly different between groups for each parameter at  $P < 0.05$  by Tukey's multiple test.

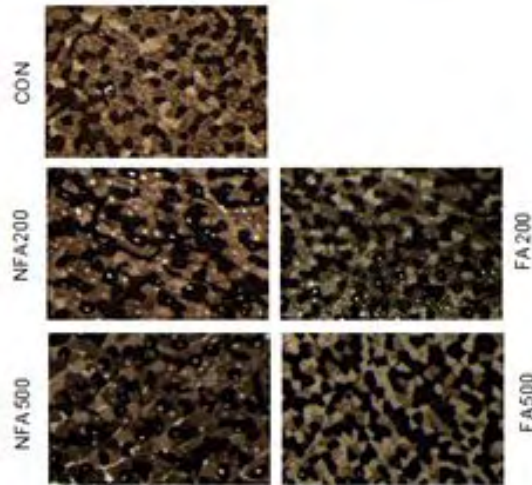
(6) 근섬유 유형 분석

강제 수영 후 treatment에 의해 근섬유의 유형이 변화하였는지 Acid Pre-incubation mATPase method로 염색하여 구분하였다. 근섬유의 유형은 Myosin heavy chain(MHC) ATPase가 pH에 민감한 특성을 이용하여 변색성의 염색(metachromatic staining)을 이용하여 판단할 수 있다 (Brooke & Kaiser, 1970).

염색한 근섬유를 이미지를 분석하여 총 근섬유 면적에서 각각의 근섬유 타입이 차지하는 면적을 백분율(% of area)로 계산한 결과는 다음 그림과 같다. 지구력과 관련이 있는 Dark 한 상태의 Type I (Oxidative slow-twitch)은 대조군에 비해 처치군 (NFA, FA)에서 증가하는 경향을 보이기는 하였으나, 유의적인 차이는 없었다.

- Muscle fiber type composition of gastrocnemius muscle in BALB/c mice after 10 min of forced swimming test





Values are the mean±standard error of the mean (SEM) for 8 mice. Control, vehicle (saline); NFA-200, nonfermented antler extract 200 mg/kg/day; NFA-500, nonfermented antler extract 500 mg/kg/day; FA-200, fermented antler extract 200 mg/kg/day; FA-500, fermented antler extract 500 mg/kg/day. Means with different letters are significantly different between groups for each parameter at  $P<0.05$  by Tukey's multiple test.

## 5. 발효농축추출물의 인체적용시험 연구

### 가. 인체적용시험용 샘플 제작

(1) 발효농축추출물을 '0'호 적갈색 캡셀충진을 후 PTP포장을 Fig와 같이 진행 하였다. Placebo와 True군간 색상, 냄새, 물성 등의 차이가 없도록 제작되었다. 포장된 샘플은 각각의 무작위배정 KD-R1~R60까지 코드넘버를 부여하고, 다음 그림과 같이 제작을 완료하였다.

#### ○ 인체적용시험 샘플 제작

원료 혼합	샘플 PTP포장	알루미늄 호일 포장	완성품

#### ○ 인체적용시험용 라벨 및 멩검 봉투 제작

<p style="text-align: center;"><b>인체적용시험용 제품입니다.</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>● 제품의 코드명</li> <li>● 피험자 코드</li> <li>● 방문</li> <li>● 유효기간</li> <li>● 제조번호</li> <li>● 저장방법</li> <li>● 제품제조업자의 상호</li> </ul> <p style="text-align: center;"><b>"인체적용시험 외의 목적으로는 사용할 수 없습니다"</b></p>	
---	--

## 나. 인체적용시험 진행 결과

### (1) 발효녹용추출물의 인체적용시험 바이오마커 설정

본 연구는 녹용의 발효를 통한 조혈증진 입증 및 기능성 제품 개발을 목적으로 진행하였다. 따라서 발효녹용추출물의 조혈효과에 대한 바이오마커 확인과 함께 다양한 기능성에 대한 인체적용시험 결과물 획득을 통해 연구의 다양성을 확보하기 위하여 조혈증진, 면역활성, 피로회복 등 다양한 바이오마커를 설정하여 실험하였다.

다만, 다양한 기능성 중에 식약처의 정책과 기능성의 사업성을 고려하여 피로회복을 주 타겟으로 인체적용시험을 진행하였으며, 본 연구목표 달성 후에도 지속적인 녹용연구를 진행할 수 있는 기틀을 마련하고자 하였다.

#### ① 조혈기능 바이오마커 설정 완료

헤모글로빈, reticulocyte, MCV, MCH, MCHC, RDW(red cell distribution width), 혈청 철 포화도(transferrin saturation), serum iron, ferritin, TIBC, UIBC, EPO(erythropoietin), ESR(erythrocyte sedimentation rate)

#### ② 피로회복 바이오마커 설정 완료

㉠ 호흡계변인 : 상대 최대산소섭취량 ( $VO_{2max}$ ; ml/min/kg),

절대 최대산소섭취량 ( $VO_{2max}$ ; l/min),

최대환기량( $VE_{max}$ ; l/min),

호흡상 ( $RQ_{max}$ ; RER),

호흡수 (RR; breaths/min)

㉡ 심장기능 : 산소맥( $O_2$ pulse; ml/beat), 최대심박수( $HR_{max}$ ; beats/min)

㉢ 자각적 피로도 조사 : 주관적 운동강도(RPE; Rating of perceived exertion)

#### ③ 면역활성 바이오마커 설정 완료

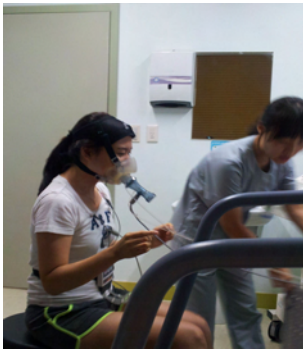
Cytokine(IL-6, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ ), Lymphocyte Subset(CD45/4/8/3, CD45/56/19/3)



(2) 인체적용시험을 위한 실험 시뮬레이션

운동 후 피로회복 정도를 측정하기 위하여 시행되는 운동부하검사 방법에 대한 선행연구 조사 결과 선행연구들의 대부분이 운동선수를 대상으로 이루어진 연구이며 기존의 운동부하검사 protocol은 일반인이 시행하기에 어려울 것이라는 전문가의 자문을 구하였다.

따라서 본 연구의 선정기준에 맞는 피험자에 적합한 운동부하검사 방법을 수립하기 위하여 운동부하검사 시뮬레이션을 시행하였다. 20~30대의 건강한 성인남녀 총 22명을 대상으로 시행하였으며 시뮬레이션은 운동부하검사 방법 중 하나인 bruce protocol에 맞춰 진행하였다. 시뮬레이션 수행 결과를 바탕으로 피험자에 적합한 운동부하검사 방법을 수립하였다.



운동 부하 검사 시뮬레이션

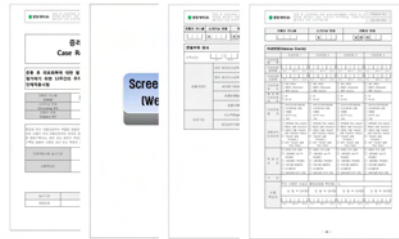
### (3) 인체적용시험 프로토콜 개발

선행연구 조사를 통한 기능성 및 안전성자료 확보한 후 연구자 회의 개최를 통해 인체적용시험 디자인 설계 및 biomarker를 결정하였다. 또한 인체적용시험 유효성평가 분석을 위한 통계적 접근방법을 모색하였다. 이에 따라 목표로 하는 기능성에 관한 연구디자인 및 피험자 선정/제외기준을 확립하여 인체적용시험 계획서(protocol), 증례기록서(CRF)를 개발하였다.

발효농축추출물의 인체적용시험 프로토콜(Protocol) 및 증례기록서(CRF; Case Reports Form)개발: 인체적용시험 계획서(protocol)는 해당 인체적용시험의 배경이나 근거를 제공하기 위해 인체적용시험의 목적·연구방법론·통계학적 측면·관련 조직 등이 기술된 문서를 말하고, 증례기록서(CRF)는 개개 피험자별로 계획서에서 규정한 정보를 기록하여 의뢰자에게 전달될 수 있도록 고안한 인쇄되거나 전자 문서화된 서식을 말한다.



인체적용시험계획서



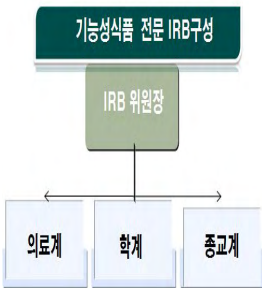
증례기록서

다. 인체적용시험심사위원회 (IRB; Institutional Review Board) 심의 (2012년 05월 08일)

프로토콜 및 인체적용시험용제품을 IRB(기관윤리심의위원회)의 승인을 받음으로써 윤리적 타당성을 확보하였다. 인체적용시험심사위원회는 계획서 또는 변경계획서를 검토하고, 피험자의 서면동의를 얻기 위해 사용하는 방법이나 제공되는 정보를 검토하고 지속적으로 이를 확인함으로써 인체적용시험에 참여하는 피험자의 권리·안전·복지를 보호하기 위해 시험기관 내에 독립적으로 설치한 상설위원회이다.

따라서 인체적용시험의 윤리적·과학적 수행을 위해서 상설위원회에 관련 심의 서류 (인체적용시험자 자료집, 계획서, 증례기록서 등)를 제출하여 승인을 득하였다.

(최종 승인 일자: 2013년 03월 26일)



가능성식품전문IRB구성



IRB 심의 장면

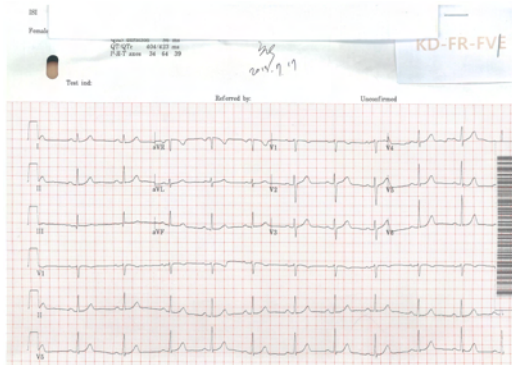


IRB 심사결과 통지서

라. 인체적용시험 수행

(1) 심전도 검사

심전도 검사를 위해 피험자가 충분히 안정을 취했는지 확인 후 수행한다. 기본적인 항목 이외에 automatic analysis & recording에 의하여 별도로 출력되는 PR interval (msec), QRS (msec), QT/QTc (msec) 항목 등도 기록한다. 심전계의 감도 1(10 mm/Mv), 기록지 이동속도 25 mm/sec, 필터 off 등의 표준측정조건으로 기록한다.



○ 심전도 검사 수행 결과

(2) 운동부하 심전도 검사

운동부하 심전도는 스크리닝 시 피험자가 연구 참여에 적합한지 판단하기 위하여 검사하며 경사와 속도를 변경할 수 있는 벨트 위에서 피험자가 뛰면서 흉통과 ST분절변화를 확인하는 검사로 각 단계는 3분씩 구성된다(Bruce 프로토콜).

검사를 위해 12 유도 심전도를 부착한 후 트레드밀 기계에서 Bruce 프로토콜에 따라 운동을 수행한다. 12유도 심전도 부착 중 사지유도는 운동을 수행할 때 흔들림에 따른 잡음을 줄이기 위해 표준 12유도 심전도의 사지유도를 몸통으로 옮긴 메이슨-라이커 12유도(Mason-Likar modification)를 사용하여, 상지유도(arm lead)는 쇄골하방의 가장 측단에 부착하고 하지유도(leg lead)는 전방장골능상방과 늑골하방 사이의 안정된 부위에 부착한다.

검사시작 후 피험자가 증단을 원할 때, ECG상 의미 있는 양성ST change가 있을 때, ECG 변화는 없지만 전형적인 심장흉통이거나 숨차할 때, 심장허혈 부정맥이 나타날 때 등 증단을 한다. 검사 전 연구자는 검사방법에 대해 설명하고 피험자가 검사에 동의하는지 확인한다.

```

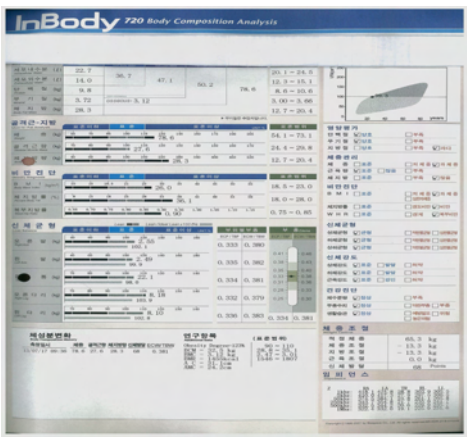
Clinical Information: Chest discomfort ( ) palpitation ( )
abnormal ECG ( ) abnormal ECG ( ) arrhythmia study ( )
P/UL/ECG ( ) Other ( ) Evaluation year: 2013
Risk factor: Metabolism
Reason for Request: On purpose ( ) Don't P/UL/ECG ( )
Proposed stratification ( )
Evaluation of functional capacity ( )
Proposed stratification ( )
Observation:
Heart rate: Blood pressure:
Pre-exercise HR: 75 bpm Pre-exercise BP: 109/64 mmHg
Maximal HR: 173 bpm Peak-exercise BP: 167/95 mmHg
Post-exercise HR: 86 bpm Recovery time: 165/62 mmHg
ECG: RHR:
Arrhythmia: No APC's, No VPC's
ST segment: Abnormal ST depression at 11-V6 during stage 2
Downsloping ST depression at 11 during stage 3
Abnormal ST depression at 11, aVF, V5, V6 during stage 3
Reason for termination: Target HR achieved
Chest pain: none
Maximal HR: 164 bpm ( 90% of MHR)
Maximal Work Load: 10.5 METs (min. 20sec)
Procedure: BRUCE
Duke treadmill score: Estimated lifetime (EST deviation)-
(4-Treadmill steps)- 4.33
Final Exercise ECG Test Conclusion:
1) Negative TMT
2) ST/HR index: 1.02 uV/bpm
- If > 0.5 uV/bpm, 0.5k obstructive pulmonary disease (+)
3) Estimated functional capacity: 8.4 METs
- predicts slight/low risk of all-cause mortality.
4) Duke treadmill score: 4.33
- cardiac mortality of 10 %/year over the next 5 years
intermediate risk
5) Chronotropic response index: 0.803
- predicts decreased risk of death compared with the Duke treadmill score.
- beta-blockers (+) -> 0.803 falls outside
- beta-blockers (+) -> 0.65 is abnormal

```

○ 운동부하심전도 검사 수행 결과

(3) 체성분 검사

체성분 검사는 체지방량, 체지방률, 체지방률, 기초대사량 등을 측정하기 위한 검사이며 Inbody 720(Biospace, Korea)을 이용하여 측정한다.



○ 체성분 검사 수행 결과

#### (4) 운동부하검사

운동부하검사는 운동부하를 단계적으로 높여감으로써 평상시에 나타나지 않는 심장질환을 운동 중에 진단하거나 개인의 생리적 기능능력 등을 평가하는데 이용되는 검사이다. 또한 인체를 대상으로 육체적 피로회복 기능성을 평가하기 위해서 트레드밀을 이용한 운동부하검사가 주로 이용된다. 운동부하검사 중 속도와 경사도를 함께 증가시켜 운동부하를 측정하는 방법인 Bruce 프로토콜을 이용하여 검사한다.

피험자는 편안한 자세로 앉아 호기가스 표집을 위해 마스크와 호스를 설치 후 착용하고 심박수 측정을 위해 12유도 심전도 중 사지유도를 몸통으로 옮긴 쇄골 하방, 전방장골능상방과 늑골하방 사이의 안정된 부위에 부착한다(메이슨-라이커 12 유도(Mason-Likar modification)). 안정시의 상태가 되도록 한 뒤 안정 시 피로도 관련 혈액검사를 위한 채혈을 실시한 후 시험에 들어간다.

Bruce 프로토콜에 준하여 운동을 수행하며, 초기부하로 속도 1.7mph, 경사 10%에서 3분 지속하며 이후 3분마다 속도 0.8~0.9mph, 경사도 2% 씩 높인다. 단계별로 설정된 경사와 속도에 맞춰 3분씩 수행하여 3단계까지, 총 9분간 운동을 수행한다. 검사 전 연구자는 검사방법에 대해 설명하고 피험자가 검사에 동의하는지 확인한다.

### CardioPulmonary Exercise Test Results

Age: 55 Height: 174 Weight(kg): 78.0

Sprometry	Predicted	Measured	% Predicted
FVC (L)	4.47		
FVC (%L)	3.89		
MVV (L)	1.92		

Resting Data	HR (bpm): 78	SpO2: 98	SBP(mmHg): 116	DBP (mmHg): 86
--------------	--------------	----------	----------------	----------------

Peak Cardiovascular Responses	Predicted	Measured	% Predicted
VO2 (ml/min)	39.5	30.3	77
VO2 (l/min)	2.278	2.363	104
VO2 (l/min)	175	182	104
Work (Watts)	> 0.911	82	
Anaerobic Threshold (AT)(l/min)	> 40%		
AT (% Predicted Max VO2)	184	182	99
Heart Rate (bpm)	117	132	113
Systolic Blood Pressure (Max)	171	195	114
Diastolic Blood Pressure (Max)	85-105	75	
Heart Rate Reserve (bpm)	<15	2	

Peak Ventilatory Responses	Predicted	Measured	% Predicted
VE Max (l/min) (STPD)	118.5	80.5	68
Tidal Volume (VT) (L)	2.357	1.663	68
Respiratory Rate (RR)	<50	46	
Breathing Reserve (%)	20-40	36	

Gas-Exchange Responses	Predicted	Measured	% Predicted
End Tidal CO2 (Peak PetCO2)	40.0	110.2	
End Tidal O2 (Peak PetO2)	24	23	
VE/VO2 @ AT	2.9	2.9	
VE/VO2 @ Rest	0.30	0.23	76
VO2/VE (l) @ Peak	0.18	0.13	72
Respiratory Quotient (RQ)(Peak)	1.15,1.3	1.16	

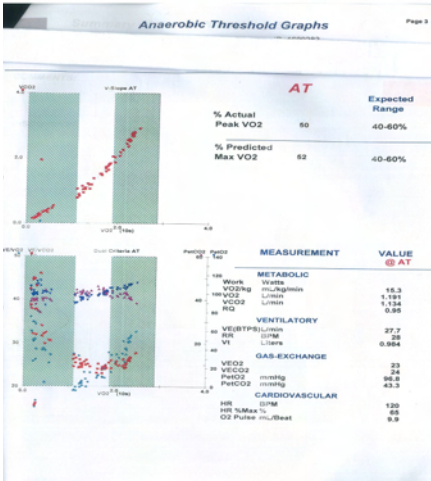
  

Calibration Results	Predicted	Measured	% Predicted
Flow Cal: Pred Volume: 3.00			
Expire Avg: 3.02			
Inspire Avg: 3.00			

Gas Cal:	Cal 1 O2	Cal 2 O2	Cal 3 CO2	Ambient O2	Ambient CO2
Predicted	15.25	4.04	26.00	20.97	0.07
Measured	15.25	4.04	26.00	20.97	0.07
Residual (meas)	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

Version: 10/27/2014 Physician: \_\_\_\_\_



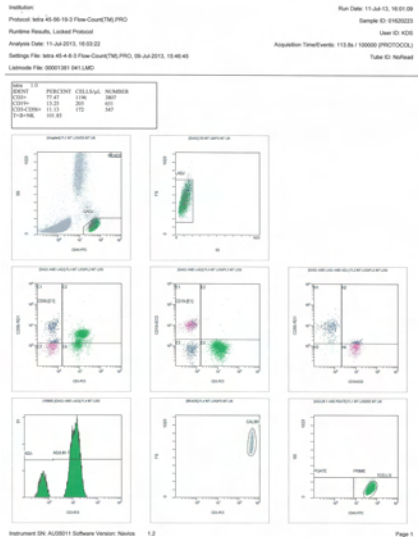
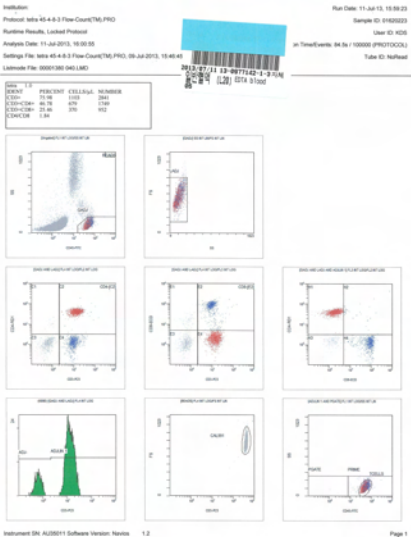
○ 운동부하검사 수행 결과





(6) 면역지표 검사

혈중 Cytokine(IL-6, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ ) 분석을 위해, 혈액채취는 5ml 용 SST tube 1 개에 5ml 채취하고, Clotting 하기 위해 30 분 실온 방치 후 3000rpm(or 1000xg), 15 분 동안 원심분리한다. 분리된 혈청을 Seperator(혈청분리판 or 1.5ml tube) 2개에 1ml씩 옮긴 후 냉동(-70 $^{\circ}$ C) 보관 후 측정한다. 혈중 Lymphocyte Subset(CD45/4/8/3, CD45/56/19/3) 분석을 위해, EDTA tube 1개에 2ml를 채취하여 냉동(-70 $^{\circ}$ C) 보관 후 측정한다.



○ 면역지표검사 수행 결과

(7) 인체적용시험 설문평가

(가) 다차원 피로척도

MFS는 Schwartz등(1993)의 Fatigue Assessment Inventory (FAI)를 토대로 Chang(2000)이 개발한 19문항의 다차원 피로척도설문으로서, 피로로 인한 육체적, 심리적, 사회적 증상 등을 객관적으로 측정할 수 있도록 표준화된 측정도구이다.

MFS는 지난 2주 동안 느꼈던 피로수준에 대해 응답하도록 하며, 19문항의 3개 하부 영역으로, 전반적 피로도(Global fatigue, 8항목-문항 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19), 일상생활 기능장애(Daily dysfunctioning, 6항목-문항 1, 2, 3, 4, 10, 11), 상황적 피로(Situational fatigue, 5항목-문항 5, 6, 7, 8, 9)으로 구성되어 있다. 각 항목에 대해 1점부터 7점까지의 7점 척도로 응답하며, 이들 점수를 합산하여 피로수준을 평가한다.

피로차 이니셜	성명자 번호	3차 방문일	3차 방문					
[I.S.] [J.]	[K] [D] [R] [E] [I]	[L] [M] [N] [O] [P] [Q]						
다차원 피로척도(Multidimensional Fatigue Scale: MFS)								
다음 질문은 귀하의 피로수준을 알아보기 위해 만들어진 것입니다. 자신 '호전' '중립' '노역'의 단계를 가장 거깝다고 생각하는 것에 'v'로 하여 주십시오.								
항	비	1	2	3	4	5	6	7
1	나는 피로해진 나뉠과자고 느끼는 노한다.	1	2	3	4	5	6	7
2	나는 피로한 나뉠과자고 느끼는 노한다.	1	2	3	4	5	6	7
3	나는 피로해진 나뉠과자고 느끼는 노한다.	1	2	3	4	5	6	7
4	나는 피로해진 나뉠과자고 느끼는 노한다.	1	2	3	4	5	6	7
5	나는 피로해진 나뉠과자고 느끼는 노한다.	1	2	3	4	5	6	7
6	나는 피로해진 나뉠과자고 느끼는 노한다.	1	2	3	4	5	6	7
7	나는 피로해진 나뉠과자고 느끼는 노한다.	1	2	3	4	5	6	7
8	나는 피로해진 나뉠과자고 느끼는 노한다.	1	2	3	4	5	6	7
9	나는 피로해진 나뉠과자고 느끼는 노한다.	1	2	3	4	5	6	7
10	나는 피로해진 나뉠과자고 느끼는 노한다.	1	2	3	4	5	6	7
11	나는 피로해진 나뉠과자고 느끼는 노한다.	1	2	3	4	5	6	7
12	나는 피로해진 나뉠과자고 느끼는 노한다.	1	2	3	4	5	6	7
13	나는 피로해진 나뉠과자고 느끼는 노한다.	1	2	3	4	5	6	7
14	나는 피로해진 나뉠과자고 느끼는 노한다.	1	2	3	4	5	6	7
15	나는 피로해진 나뉠과자고 느끼는 노한다.	1	2	3	4	5	6	7
16	나는 피로해진 나뉠과자고 느끼는 노한다.	1	2	3	4	5	6	7
17	나는 피로해진 나뉠과자고 느끼는 노한다.	1	2	3	4	5	6	7
18	나는 피로해진 나뉠과자고 느끼는 노한다.	1	2	3	4	5	6	7
19	나는 피로해진 나뉠과자고 느끼는 노한다.	1	2	3	4	5	6	7
총 점		[ ] 점						
작성일		[ ]년 [ ]월 [ ]일						
2013. 11. 11		[ ]						

○ 다차원 피로척도 설문지 수행 결과

(나) 삶의 질 설문지

삶의 질 설문지는 Ware와 Sherbourne(1992)에 의해 고안되고, Koh 등(1997)이 우리나라에 적용하여 신뢰도와 타당도를 검증한 36-Item Short-Form Health Survey (SF-36) 설문도구를 이용하였다.


SF-36은 총 36문항의 다차원적이면서도 실용적인 간단한 측정도구로 신체적 기능(physical functioning, PF) 10문항(문항 3.1~3.10), 신체적 역할 제한(role-physical, RP) 4문항(문항 4.1~4.4), 통증(bodily pain, BP) 2문항(문항 7, 8), 일반적 건강(general health, GH) 5문항(문항 1, 11.1~11.4), 활력(vitality, VT) 4문항(문항 9.1, 9.5, 9.7, 9.9), 사회적 기능(social functioning, SF) 2문항(문항 6, 10), 감정적 역할제한(Role-emotional, RE) 3문항(문항 5.1~5.3), 정신적 건강(mental health, MH) 5문항(문항 9.2, 9.3, 9.4, 9.6, 9.8) 및 일반 건강상태의 변화량을 확인하는 1문항(문항2)으로 구성되어 있고, 이 중 일반건강상태의 변화량인 문항2를 제외한 8영역(35문항)으로 나누어 평가한다. 각 문항은 Likert 척도로 계산하는데 건강에 가장 나쁜 영향을 미치는 내용을 최저로 하여 0점에서 100점으로 환산하여 계산한다. 하지만 10개 문항(문항 1, 6, 7, 8, 9.1, 9.4, 9.5, 9.8, 11.2, 11.4)에서는 최고점수가 정반대의 의미인 건강에 가장 나쁜 영향을 미치는 것을 의미하기 때문에 이들 문항 점수는 역순으로 산출한다.

각 영역별 점수는 문항에서 얻은 점수의 평균값을 계산하여 이용한다. 그러므로 각 영역별 삶의 질은 0점에서 100점까지의 분포를 가질 수 있으며, 점수가 높을수록 건강관련 삶의 질이 좋은 것을 의미한다.



(다) 피험자 만족도 설문지

피로회복 및 빈혈증상 개선도, 제품에 대한 만족도 설문조사를 실시한다.

 본 설문 조사는 피로회복, 빈혈, 안면색개선, 두뇌기능개선, 면역기능향상, 미용효과, 피부개선, 안면색개선, 두뇌기능향상, 면역기능향상, 미용효과, 피부개선을 목적으로 실시합니다. <span style="float: right;">Protocol No. KD-FR-PVE</span>											
<table border="1"> <tr> <td>피험자 이니셜</td> <td>피험자 번호</td> <td>3차 방문일</td> <td>3차 방문</td> </tr> <tr> <td>[G][S][J]</td> <td>[K][D][R][O][I]</td> <td>[1][3][0].[1][1][1]</td> <td></td> </tr> </table>	피험자 이니셜	피험자 번호	3차 방문일	3차 방문	[G][S][J]	[K][D][R][O][I]	[1][3][0].[1][1][1]		<b>피험자 만족도 설문지</b> 다음 질문은 연구 참여를 통한 만족도를 알아보기 위한 것입니다. 해당하기 어려운 질문이라도 조금이라도 더 자세한 쪽으로 최대한 주십시오. 1. 시용제품 섭취에 의해 피로회복이 어느 정도 개선되었다고 생각하십니까? ① 전혀 없음 <input checked="" type="radio"/> ② 약간 개선 ③ 중간 정도 개선 ④ 상당히 많이 개선 ⑤ 극도로 많이 개선 2. 시용제품 섭취에 의해 빈혈증상이 어느 정도 개선되었다고 생각하십니까? ① 전혀 없음 <input checked="" type="radio"/> ② 약간 개선 ③ 중간 정도 개선 ④ 상당히 많이 개선 ⑤ 극도로 많이 개선 3. 시용제품 섭취 시 맛, 향, 색상 등에 대해 전반적으로 어느 정도 만족하십니까? ① 매우 불만족 <input checked="" type="radio"/> ② 불만족 ③ 보통 <input checked="" type="radio"/> ④ 만족 ⑤ 매우 만족		
피험자 이니셜	피험자 번호	3차 방문일	3차 방문								
[G][S][J]	[K][D][R][O][I]	[1][3][0].[1][1][1]									
작성일	피험자 성명										
2013 / 1 / 11	[REDACTED]										

○ 피험자 만족도 설문지 수행 결과

(라) 체질 설문지

체질에 대한 설문조사를 실시한다. 가장 많이 고른 답에 따라 체질 평가한다(1번 태음인, 2번 소음인, 3번 소양인, 4번 태양인).

(마) 신체 활동 설문지

신체활동 정도를 확인하기 위하여 국제신체활동도 설문(International Physical Activity Questionnaire: IPAQ)에 의한 신체활동조사 설문지를 작성한다.



바. 프로토콜의 국제 인체적용시험 등록 사이트 등재

국제전문학술지 게재 사전작업으로서 작성된 프로토콜의 국제 인체적용시험 등록 사이트인 <http://clinicaltrials.gov> 에 등재 하였다.

ClinicalTrials.gov ID: NCT01689467



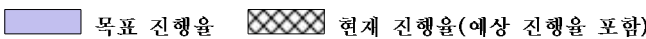
[그림] <http://clinicaltrials.gov>

사. 국제전문학술지(SCI) 게재

발효녹용추출물의 우수성을 규명하기 위한 국제전문학술지(SCI)에 게재함으로써 발효녹용추출물의 기능성 규명 인체적용시험의 과학적 타당성을 확보할 예정이다.

아. 인체적용시험 진행 현황

(1) 진행현황 (2013년 07월 24일 기준)

구 분	월별 진행계획																	비고			
	2012년					2013년							2014년								
수 행 내 용	1	3	5	7	9	11	1	3	5	7	9	10	11	12	1	2	3	4	5		
문헌검색 및 임상시험 준비	■	■	■																		완료
인체적용시험계획서(protocol) 및 증례기록서(Case Report Form; CRF) 개발	■	■	■																		완료
IRB(Institutional Review Board) 제출자료 준비 및 IRB 승인			■	■	■	■	■	■	■												완료
인체적용시험용제품 공급				■	■																완료
개시모임 진행					■	■		■													완료
피험자모집 및 임상시험 수행							■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	진행 중
자료 분석 및 정리 통계분석 및 결과보고서 작성										■	■	■	■								예정
식약처 개별인정															■	■	■				예정
추진 진도 (%)	10				30					40					70				80	100	
																					



\* 피험자 모집 현황

구 분	피험자수 (명)
목표 피험자 수	60
스크리닝 피험자 수	55
등록 피험자 수	18 (등록대기자 2명)
중도탈락 피험자 수	0
종료 피험자 수	3
진행 피험자 수	15

\* 인체적용시험 수행 과정



**피험자 동의**



**전문의 문진**



**스크리닝**



**임상시험참여**



**모니터링**



**자료입력(double check) 통계분석 및 보고서작성**



**자료보관**

바. 향후 개발 목표

인체적용시험 시, 피검자 모집과 같은 어려움으로 인하여 연구기간 내에 완료하기 어려운 현실 때문에 연구의 최종결과는 과제가 종료된 이후 인체적용시험이 완료될 예정이다.

임상시험의 어려운 점을 감안하여 최대한 2013년도 이내에 완료 될 수 있도록 추진할 예정이며, 관련 연구결과 획득 후 세계최초 녹용을 이용한 개별인정형원료 허가를 제출할 예정이다.

최초 허가가 완료되면 국내 양록 능가뿐만 아니라 국산의 우수성을 세계적으로 입증하는 중요한 계기가 될 것으로 판단된다.

## 6. 발효녹용추출물의 제제연구 및 제품개발 연구

가. 발효녹용추출물 원료 안정성 시험

발효녹용추출분말을 Fig 1.과 같이 포장하여 제조직후부터 25, 30, 40℃ 습도 75% 가속조건에서 6개월 동안 안정성시험을 통하여 제품의 안정성 자료를 확보 하였다. 실험 항목은 성상, 제균수, 대장균군, 수분함량 및 지표물질인 hydroxyproline의 함량을 측정하여 결정하였다.

○ 발효녹용추출물분말 포장

	
<p>발효녹용추출분말성상</p>	<p>알루미늄 방습 포장 (비닐 내포장)</p>

(1) 정상 및 미생물 안정성 시험

원료의 미생물 안전성을 확인하기 위하여 황갈색성상, 세균수, 대장균군 확인 시험 결과 아래 표와 같이 모두 적합하였다.

○ 발효녹용추출물분말 정상 및 미생물 안전성 시험결과

시험항목	제조직후	시 험 결 과								
		2개월			4개월			6개월		
		25℃	30℃	40℃	25℃	30℃	40℃	25℃	30℃	40℃
성 상	적합	적합	적합	적합	적합	적합	적합	적합	적합	적합
세균수	100이하 /mL	적합	적합	적합	적합	적합	적합	적합	적합	적합
대장균군	음성	음성	음성	음성	음성	음성	음성	음성	음성	음성

(2) 수분함량 시험

원료의 수분함량 실험 결과를 통하여 유통기한내 안전성을 확인 한 결과 아래 표와 같이 모두 저장 기간 동안 안전하였다.

○ 발효녹용추출물분말의 수분함량 실험결과

보관조건 시험기간	25℃, 습도75%	30℃, 습도75%	40℃, 습도75%
0개월	4.29%		
2개월	4.30%	4.29%	4.29%
4개월	4.24%	4.31%	4.35%
6개월	4.25%	4.30%	4.33%

(3) 지표물질 안전성 시험

지표물질 안전성 자료를 확보하기 위한 실험결과 아래 표와 같이 hydroxyproline 함량 안정성 자료를 확보하였다.

○ hydroxyproline 함량 결과

보관조건 시험기간	25℃, 습도75%	30℃, 습도75%	40℃, 습도75%
0개월	2.16		
2개월	2.16	2.16	2.14
4개월	2.10	2.09	2.07
6개월	2.03	2.00	2.05

위 가속시험에서 기능성분 Hydroxyproline의 함량 결과에 따라 발효녹용추출분말의 유통기한을 다음과 같이 산출하였다.

함량의 경우 자연대수치를 경과 개월수에 대해 아래와 같이 plotting하면 최소자승법으로 각 보관온도에 따른 3개의 직선 방정식을 구할 수 있다.

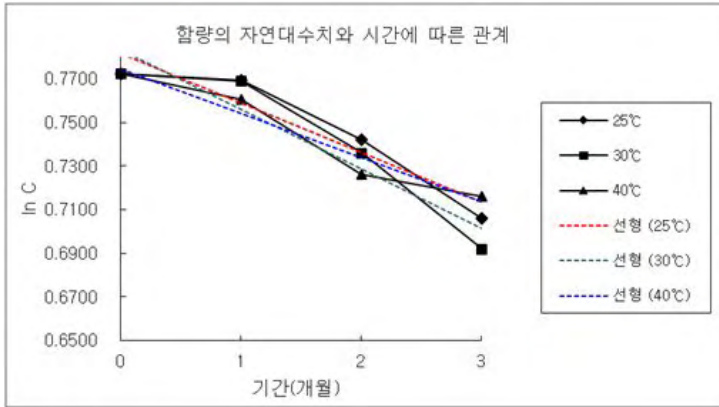
각 보관온도에 따라 직선의 기울기로 소실속도상수(k)를 다음 표와 같이 결정하여 발효녹용추출분말을 제조직후부터 가속조건에서 6개월 동안 안정성시험 한 결과, 일반항목인 성분, 세균수, 대장균군, 수분함량의 결과가 기준규격에 적합하였고 이제품의 기능성분 Hydroxyproline의 시험결과, 상온(25℃)에서 잔존함량이 표시량의 80%가 되는 기간을 산출하면 31.0개월로 나타났다.

○ 소실속도상수(-기울기:k)의 계산

보관 온도	개월	C	lnC	b:y절편	m:기울기	직선의방정식	k
25℃	0	2.1649	0.772386	0.781440	-0.022617	y= -0.022617x +0.781440	0.022617
	1	2.1583	0.769340				
	2	2.1008	0.742332				
	3	2.0259	0.706000				
30℃	0	2.1649	0.772386	0.783466	-0.027409	y= -0.027409x +0.783466	0.027409
	1	2.1575	0.768948				
	2	2.0878	0.736104				
	3	1.9976	0.691970				
40℃	0	2.1649	0.772386	0.774338	-0.020291	y= -0.020291x +0.774338	0.020291
	1	2.1399	0.760761				
	2	2.0672	0.726184				
	3	2.0468	0.716277				

\* C: 지표물질 함량, k:소실속도상수(기울기의 절댓값)

○ 소실속도상수(k) : m, 기율기의 절대값



위에서 계산된 소실속도상수(k)와 보관온도를 사용하여 Arrhenius식으로부터 상온에서의 유통기간을 산출한다.

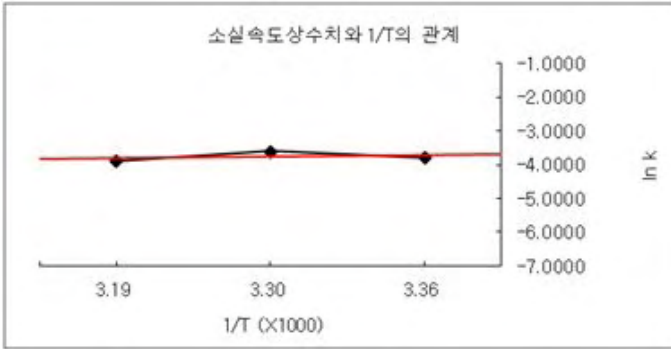
즉, 소실속도상수(k)의 자연대수치(ln k)를 절대온도T(273+보관온도)의 역수에 대하여 아래와 같이 plotting하여 최소자승법으로 계산하면 아래의 방정식을 구할 수 있다.

°C	k	lnk (Y)	T	1/T (X)	x 1000
25	0.02261682	-3.7890614	298	0.003355705	3.36
30	0.02740933	-3.5968717	303	0.00330033	3.30
40	0.02029056	-3.8975995	313	0.003194888	3.19

\* T : 273+보관온도

\* 직선의 방정식 : Y= 961.926148 X -6.919798

○ 소실속도상수치와 1/T의 관계



그리고 잔존함량이 표시함량의 80%가 될 때까지의 시간( $t_{80}$ )을 아래의 Arrhenius식으로부터 구하면, 단,  $C_0$  : 초기농도(%),  $C$  : 허용농도(%) 31개월의 시간이 도출된다.

따라서 발효녹용추출물분말의 보관 기간을 24개월 결정하였다.

$$t_{80} = \frac{1}{k_{25}} \times \ln \left( \frac{C_0}{C} \right)$$

상온 (25℃)에서의 소실상수는

$$\ln k_{25} = 961.9261 \times \left( \frac{1}{273 + 25} \right) - 6.919798$$

$$\ln k_{25} = -3.6918575$$

$$k_{25} = 0.0249257$$

$$t_{\text{실감}80\%} = \frac{1}{0.0249257} \times \ln \left( \frac{2.1649}{1.0} \right)$$



나. 인체적용시험 샘플 제작

(1) 임상시험용 캡슐제품 제작

○ 캡슐 Formulation

용도	원료명	규격	비율%
주성분	KDF101추출분말	별규	69.44%
활택제	스테아르산	KP	1.00%
	마그네슘		
부형제	결정셀룰로오스	KP	28.31%
	(식품용)		
붕해제	이산화규소	KP	1.25%
합 계			100

○ 인습 방지 포장

- 알루미늄 포장, PTP포장, 방습제 포함

				
캡슐 포장	PTP 포장	알루미늄 포장	BOX 포장	코드라벨

○ 캡슐, PTP포장, 케이스포장, 코드라벨

다. 제제연구 및 제품화연구결과

(1) 1차 과립제 연구

(가) 과립제 Formulation 개발

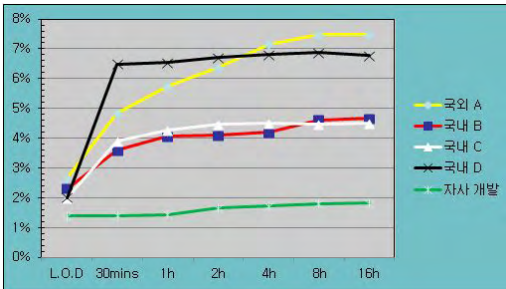
원재료명	함유량(%)	원료명
주성분1	10	발효녹용추출물
주성분2	50	혼합추출물
결합제	0.5	HPC
부형제	39.5	유당
붕해제	6	옥수수전분
합계	100	

○ 유동층 분사약 : 결합제, 활택제, 부형제, 가소제를 이용하여 제조

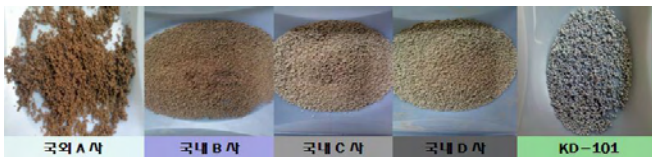
(나) 과립 물성 비교연구

발효녹용추출물의 인습을 줄이기 위해 유동층과립기를 이용하여 과립을 잡고 인습성 비교 시험을 진행하였다. 결합제와 붕해제를 이용한 과립은 타사 천연추출물보다 인습성이 현저하게 줄어들었음을 확인하였다.

○ 발효녹용추출물 과립의 보관(40℃, 75% 조건) 중 인습 비교실험결과



○ 발효녹용추출물 과립 형태



(2) 환제 제제연구

(가) 환제 Formulation 개발

발효녹용추출물과 홍삼, 당귀, 숙지황을 주원료로하는 환제를 개발하여 제형 유지, 인습, 관능에 대한 연구를 진행하였으며, 제조공정을 확립하였다.

원재료명	함유량(%)	기 타
발효녹용추출물	59.8	생약혼합분쇄분말
6년근 홍삼		
당귀		
숙지황		
별꽃	35	아카시아
젤란검	0.2	
글리세린	5	
	100	

○ 환제 제조공정



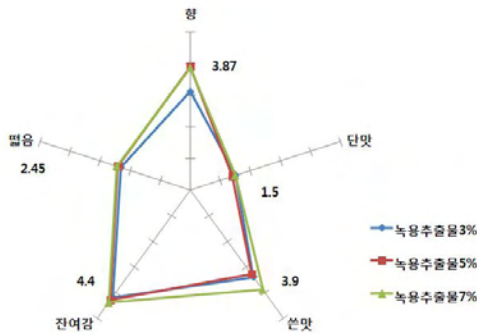
(3) 액상 제제연구

(가) 액상제형 Formulation 개발

발효녹용추출물과 홍삼, 당귀, 황기 등을 주원료로 하는 액상 제형 formulation을 개발하고 시제품을 제작하여 관능 및 안정성 시험을 확인하였다.

원료명	투입량(g)	비 고
발효녹용추출물	5.00	농축액(국산)
홍삼농축액 (홍삼사포닌 70mg/g, 고형분 60%)	0.10	6년근(홍삼미 50%, 홍삼근 50%)
숙지황	1.20	생약으로서,국산
구기자	1.30	생약으로서,국산
당귀	2.00	생약으로서,국산
산약	1.30	생약으로서,국산
두충	1.00	생약으로서,국산
황기	1.00	생약으로서,국산
올리고당	2.50	

(나) 액상제형의 관능평가 연구



○ 5점 척도법을 이용한 관능평가 결과

구분	발효녹용추출물 3%	발효녹용추출물 5%	발효녹용추출물 7%
향	3.1	3.8	3.8
단맛	1.5	1.4	1.5
쓴맛	3.4	3.3	3.9
떫음	2.3	2.4	2.4
잔여감	4.2	4.3	4.4
전반적인 기호도	3.7	4.3	4.1
순위	3	1	2

관능평가 결과 발효녹용추출물의 농도가 5%와 7% 일 경우, 3%에 비해 기호도가 높은 것으로 나타났다.

또한 발효녹용추출물의 풍부한 맛이 잘 구현되고 쓴 맛이 두드러지지 않도록 고려하여 발효녹용추출물로서 5% 투입하기로 결정하였다.

(4) 시제품 개발

액상제형의 실험 결과를 토대로 시제품을 개발하였다.

시제품명은 “귀한삼 홍삼녹용 발효원”이며 제품 특징은 발효녹용과 발효 6년근 홍삼을 주 성분으로 하는 귀한삼 홍삼녹용 발효원은 숙지황, 황기, 두충, 천궁 등 한양재와 대추, 벌꿀 등 14가지 전통 원료로 만든 제품이며, 4無(합성착향료, 합성보존료, 합성착색료, 합성감미료) 첨가물을 넣지 않고 100% 국내산 원료 사용함을 강조 하였다.



### 3절. 연구과제의 결론

#### 1. 녹용원료의 표준화 및 제품 개발

##### 가. 발효녹용추출물의 표준화

발효녹용추출물은 Q.C 합격한 건조 녹용을 30~50mesh 분쇄 후 녹용기준 배합량을 10~20배수의 정제수를 투입한 후 121℃에서 60분간 멸균하다. 멸균 후 탱크 온도를 30℃로 냉각시킨 후 *Bacillus subtilis* KCTC 11454BP를 접종하여 24~48시간 동안 교반속도 300rpm, 통기량 0.3vvm, 내압 0.5kg/cm<sup>2</sup>의 조건으로 발효한다. 발효가 완료된 후 균 사멸을 위하여 100℃에서 4시간 살균 후 50℃로 냉각하여 1차 mesh 망 여과를 진행한다. 여과된 발효물은 펄라이트 약 5% 조건에서 필터프레스 여과를 진행하고, 진공농축기를 이용하여 농축 후 영하 50~70℃에서 냉동한 후 48시간 이상 동결건조기를 이용하여 건조하여, 성상, 미생물, 수분 등의 적합여부를 확인한 후 시험 원료로서 사용한다.

##### 나. 발효녹용추출물을 이용한 시제품 개발

표준화된 원료를 이용하여 과립제, 환제, 캡슐제 및 액상제형의 formulation을 개발하였다. 이중 액상제형 formulation의 실험결과를 근거로 “귀하삼 홍삼녹용 발효원” 시제품을 개발하였다.

#### 2. 발효녹용 추출물의 안전성평가 (독성평가)

발효녹용추출분말의 13 주 반복 경구투여에 의한 독성을 조사하기 위하여 Sprague-Dawley(SD) 계통 암수 랫드에 시험물질 250(저용량군), 500(중용량군) 및 1,000(고용량군) mg/kg 용량으로 투여군을 설정하여 부형제 대조군과 비교하였다. 13 주 반복투여에 의한 사망률, 일반증상, 체중변화, 사료 및 음수 섭취량, 안검사, 요검사, 혈액학적 검사, 혈액응고시간 검사, 혈액생화학적 검사, 부검소견 및 병리조직학적 소견을 관찰하였다.

실험기간동안 암수 모든 시험군에서 사망동물은 관찰되지 않았고 수컷 250 mg/kg 시험물질 투여군의 1 레에서 최약이 관찰되었으나, 용량의존성을 보이지 않고 개체 특이적으로 관찰된 소견으로써 시험물질과 관련된 영향은 아닌 것으로 사료된다. 그 외 모든 시험동물에서 특이한 육안소견은 관찰되지 않았다.

체중변화 및 음수섭취량 측정결과, 모든 암수 시험군에서 시험물질과 관련된 통계학적으로 유의한 변화는 관찰되지 않았다.

사료섭취량 측정결과, 암컷 500 mg/kg 시험물질투여군의 11 주차 사료섭취량이 부형제 대조

군 및 1,000 mg/kg 시험물질투여군에 비하여 통계학적으로 유의하게 감소하였으나( $p < 0.05$ ), 용량의존성을 보이지 않고 단발성으로 발생하여 시험물질에 의한 영향은 아닌 것으로 판단된다. 그 외 모든 기간 및 시험군에서 시험물질과 관련된 통계학적으로 유의한 변화는 관찰되지 않았다.

안검사 결과, 안검사를 실시한 모든 시험동물에서 이상소견은 관찰되지 않았다.

요검사 결과, 수컷 백혈구의 검출빈도가 군간 통계학적으로 유의한 차이를 나타내었으나( $p < 0.05$ ), 그 정도가 trace 수준으로 일반적으로 흔히 관찰될 수 있으며 다른 시험항목에서 이와 관련있는 변화가 관찰되지 않았으므로 시험물질에 의한 영향은 아닌 것으로 사료된다. 그 외 암수 모든 시험군에 대한 요검사, 요침사, 요색조 및 요량 검사에서는 시험물질과 관련된 통계학적으로 유의한 변화가 관찰되지 않았다.

혈액학적 검사 및 혈액응고시간 검사결과, 시험물질투여군간 통계학적으로 유의한 차이를 보이는 항목(MCH,  $p < 0.01$  및 APTT,  $p < 0.05$ )이 존재하였으나, 부형제 대조군과는 차이가 없고 용량의존성도 보이지 않아 시험물질에 의한 영향은 아닌 것으로 판단된다. 그 외 모든 시험군에서 시험물질과 관련된 통계학적으로 유의한 변화는 관찰되지 않았다.

혈액생화학적 검사결과, 암컷에서 관찰된 Cl의 수치변화는 용량의존성을 보이지 않고 감소한 수치가 생화학적 정상범위에 속하였다. 따라서 이러한 변화는 모두 시험물질에 의한 영향이 아닌 것으로 판단된다. 그 외 모든 시험군에서 시험물질과 관련된 통계학적으로 유의한 변화는 관찰되지 않았다.

암수 모든 시험동물에 대한 부검결과, 수컷 250 mg/kg 시험물질투여군 1 레의 외관에서는 전신적 황달이 관찰되었고, 내부장기에서는 대뇌 표면과 뇌막의 적화, 간, 폐, 비장, 췌장림프절의 비대, 액와림프절과 신장림프절의 양측성 비대, 그리고 선위에서 다발성 적색 반점이 관찰되었다. 또한 암컷 250 mg/kg 시험물질투여군의 1 레에서 회음부 피하 종괴가 관찰되었다. 그러나 이러한 소견들은 용량의존적이지 않고 개체 특이적(idiopathic)으로 발생한 소견 혹은 우발적으로 발생한 소견으로써 시험물질에 의한 영향은 아닌 것으로 판단된다. 그 외 모든 시험동물에 대한 부검결과, 이상소견은 관찰되지 않았다.

절대 및 상대장기중량 측정결과, 암수 모든 시험군에서 시험물질과 관련된 통계학적으로 유의한 변화는 관찰되지 않았다.

조직병리학적 검사에서 검경한 내용을 요약 정리하면 다음과 같다.

관찰결과 발견된 병변 중 일부 장기의 염증세포 침윤은 사육환경과 관련하여 분진 발생, 혹은 털의 흡입 등에 의하여 발생 가능한 병변이며 일반적으로 시험동물에서 관찰할 수 있는

병변이었다. 그리고 간의 지방과립 침착과 위담관 증생 등은 사료의 영향으로 인한 발생 가능한 병변으로 사료된다.

수컷 250 mg/kg 시험물질투여군에서 발생한 1 레의 대과립성 림프구 림프종과 암컷 250 mg/kg 시험물질투여군에서 발생한 1 레의 유선 조직 선암은 대조군 및 기타 시험물질 투여군 동물에서는 관찰되지 않아 시험동물의 개체차에 의한 특이적 소견으로 판단되며, 시험물질 투여와는 관계없는 병변으로 사료된다.

따라서 모든 시험동물에 대한 조직병리학적 검사결과, 시험물질과 관련된 이상소견은 관찰되지 않았다.

이상의 결과로 보아 본 시험 조건 하에서 발효농축추출분말의 랫드에 대한 13 주 반복 경구투여 결과, 무독성량(NOAEL, No observed adverse effect level)은 1,000 mg/kg b.w. 이상이며, 표적장기(target organ)는 관찰되지 않았다.

### 3. 발효농축의 기능성 연구

#### 가. 발효농축의 조혈작용

농축은 조혈 손상으로 부터의 회복을 강화시킨다(7,8). 농축의 많은 성분들이 동정되었고 유용성분으로 제기되었다(free amino acids, polypeptides, trace elements, carbohydrates, hexosamines, mucopolysaccharides, uronic acids, sialic acids, prostaglandins, glycolipids, phospholipids, gangliosides, nucleic acids, hypoxanthine, cholesterol, and cholesterol esters). 최근 Yang 등은 농축에서 동정된 monoacyldiglycerides이 조혈 작용의 촉진 인자로서 유의한 치료 효과의 가능성이 있음을 보고하였다.

본 연구에서는 phenylhydrazine에 의해 유도된 EPO나 간의 ALAD와 같은 조혈인자들의 변화가 농축에 의해 정상 수준으로 회복되어짐을 보여주고 있다. 농축의 조혈작용에 대한 이러한 결과들은 이전에 연구들과 일치하고 있다. Yong은 용혈성 빈혈이 유도된 토끼에게 농축 추출물을 투여할 경우 대조군에 비해 적혈구수, 적혈구용적비, 혈색소수는 증가되고 망상적혈구수는 감소되어짐을 관찰하였다. Kim과 Park은 또한 농축 추출물이 빈혈쥐의 적혈구수와 간의 ALAD 활성(최대 36.8%)을 회복시킨다고 보고하였다. 그들은 이런 결과가 농축의 조혈 작용의 촉진 효과를 지지한다는 것으로 결론내렸다. Lee 등의 연구에서 적혈구수, 적혈구용적비, 혈색소수는 또한 대조군에 비해 농축 추출물을 투여할 경우 빈혈쥐에서 증가되었다. 게다가 그들은 농축 투여가 혈청 EPO와 간의 ALAD를 유의하게 향상시킴을 알아내었다. 따라서 우리는 농축이 혈액학적 성장, EPO, 간의 ALAD와 같은 조혈 인자를 향상시킴으로써 용혈성 빈혈을 향상시킬 수 있다고 결론내릴 수 있다.



음식의 발효는 음식의 생물학적 강화를 위해 사용되어져 왔다. 발효는 흡수율을 증가시키고 효력을 표준화시키는 장점을 가지고 있다. 녹용의 sialic acid나 단백질 함량은 발효과정 중에 증가된다. Sialic acid는 gangliosides의 성분인데 녹용의 생물학적 효력은 gangliosides에 기인된다. 세포막에 존재하며 막간의 신호를 조절하는 gangliosides는 특히 세포 연결을 지닌 조혈 기관안의 세포 표면적 표시인자이다. 우리는 녹용 세포막이 발효에 의해 가수분해되어져 단백질이나 gangliosides와 같은 유용 성분의 분비가 수월해졌음을 제안한다. 또한 발효 녹용의 이러한 조혈작용 증가는 증가된 sialic acid와 gangliosides와 관련있다고 사료된다. 우리의 이전 연구에서 osteoblasts와 골수 단백질의 증식을 촉진하며 세포 증식과 alkaline phosphatase 생산에 대한 작용은 발효 녹용이 비발효 녹용에 비해 높음을 증명하였다. 우리의 또 다른 이전 연구에서 발효 녹용의 항보체 활성은 비발효 녹용보다 높으며 발효 녹용의 2,2-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline -6-sulfonic acid) and 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radicals 소거능은 비발효 녹용에 비해 큰 것으로 나타났다. 본 연구에서 녹용 추출물은 용혈성 빈혈을 향상시키고 이들 효과는 비발효 녹용에 비해 발효 녹용에서 다소 증가되었다. 특히 발효 녹용군의 적혈구수는 비발효 녹용군에 비해 유의하게 증가되었고 발효 녹용 추출물은 혈색소수와 혈청 EPO 수준을 비빈혈 대조군 수준으로 향상시켰다. 따라서 우리는 뼈 성장, 면역, 항산화 효과 뿐 아니라 녹용의 조혈 효과 역시 발효에 의해 증가되어질 수 있다고 결론지을 수 있다.

결론적으로 발효 녹용은 용혈성 빈혈을 향상시킬 수 있는 가능성이 있는 것으로 사료되며 따라서 유용한 기능성 식품의 소재가 될 수 있다고 판단된다. 본 연구는 발효 녹용의 약학적 효력을 증명했지만 의학적 사용을 지지하기 위해서는 더 많은 연구가 요구된다고 생각된다.

#### 나. 발효녹용의 항피로작용 연구

본 연구에서 수영시간은 대조군과 NFA군 사이에서 큰 차이를 나타내지 못하였지만, FA-500군은 대조군에 비해 유의적으로 향상된 수영시간을 보여주었다. 또한 LDH의 수준도 FA군이 대조군에 비해 유의적으로 낮았지만 NFA군에서는 대조군과 통계적으로 큰 차이를 보이지는 못하였다. 그리고FA-500군은 대조군과 NFA그룹에 비해 간에서 유의적으로 높은 SOD활성을 보여주었다. 또한 산화적인 대사와 관련된 지표인 CPT 1b의 수준도 FA-500군은 대조군에 비해 유의적으로 증가하였고 PDK4, UCP3, Myoglobin, Muscle type I도 대조군에 비해 처치군에서 높아지는 경향으로 보아 산소를 이용한 대사가 증진시켜 강한 지구력이 요구되는 수영이라는 똑같은 조건에서 근육 내 에너지를 효율적으로 사용하였을 가능성이 높다. 이러한 결과를 통해 발효 녹용이 수영능력을 향상시키고 근육 손상을 감소시키는 데 기인하였음을 알 수 있었다.

녹용의 항피로 물질들은 계속적으로 발견되어왔으며, 첫 번째로는 이러한 생물학적 활성 물질들이 glycosides라고 밝혀졌는데, 이는 첫 활성부위로 뇌하수체에서 일어난다고 알려졌다(Aramwit & Wirotsaengthong). 뇌하수체는 성장호르몬을 생산하고 이는 간에서 IGF-1을 생산하게 만든다. 게다가 녹용은 IGF-1과 -2, transforming growth factors beta-1과 beta-2, bone morphogenic protein 4와 fibroblast growth factor 8 의 우수한 원천이 된다. 이는 녹용의 이용이 항피로 뿐만 아니라 성장 효과와 면역 강화 작용에도 기여할 수 있다는 것을 알려준다(Hemmings & Song, 2004; Suttie & Harris, 2000). 특히 IGF-1은 항피로 처치에 의해 뇌에서 발현이 증가되고 이는 몸 전체의 근육세포에 아미노산의 수송을 증가시켜 운동 후 조직의 재생을 도울 것으로 여겨져 왔다 (Carro, Nuñez, Busiguina, & Torres-Aleman, 2000; Trejo, Carro, & Torres-Alemán, 2001). 또 다른 연구에 의하면 녹용의 항피로 효과는 부신뿐만 아니라 그 기관의 구성분에도 영향을 끼칠 것으로 보여진다(Shin, Lee, Kim, Chung, & Cho, 1989). 이 연구에서 녹용 추출물이 쥐(rat)를 대상으로 연속 4일 동안 1 g/kg 의 양으로 경구투여 하였을 때, 부신의 무게와 부신의 ascorbic acid 함량을 유의적으로 크게 증가시키고 수영능력(73.5 min)을 대조군(54.8 min)에 비해 증가시킴을 밝혀내었다. 이는 녹용이 위의 메커니즘을 통해 운동지구력을 향상시키기는 하지만 대조군에 비해 비발효녹용은 유의적인 차이를 나타내지는 못하였다.

본 연구를 통해 녹용이 강제수영실험에서 나타낸 효과는 운동으로 유도된 피로와 관련된 생리적인 마커들의 감소를 동반하였고 산화적인 대사를 증가시키는 것으로 나타났다. 녹용추출물은 LDH, GSH-Px 그리고 SOD의 활동을 회복시키고 이는 녹용추출물이 다양한 효소의 기능과 회복 속도에 영향을 끼친다고 판단된다. LDH는 근육손상의 정확한 지표로서 알려져 있는데, LDH의 상승은 근육이 손상했거나 손상 중이라는 것을 알려준다. GSH-Px와 SOD는 피로가 유도된 쥐의 산화적 손상에 대해 녹용의 보호효과를 평가하기 위해 측정되었다. 운동으로 유발된 피로는 LDH를 증가시키고 GSH-Px와 SOD를 감소시킨다. 또한 지방산의  $\beta$ -oxidation과 관련이 있는 CPT 1b의 발현량을 증가시키는 것으로 보아 근육에서 미토콘드리아의 산화적 대사를 증진시키는 것으로 판단된다. 이러한 일련의 변화는 녹용 특히, 발효녹용의 처치로 개선되는 경향을 보였다.

이러한 연구결과는 녹용이 피로한 상태를 정상화시키는 효과를 가지며, 발효가 이와 관련된 활성을 증가시킬 것으로 판단된다. 결론적으로 발효녹용은 운동으로 유도된 피로를 향상시킬 가능성을 보였고, 유용한 기능성 식품으로 소재화 가능성을 보여주었다. 이번 실험 연구를 통해 발효녹용의 약리 효과를 입증하였지만, 더 많은 연구가 필요할 것으로 사료된다.

#### 4. 녹용추출물의 유효성 및 안전성을 평가하기 위한 임상연구

선행연구 조사를 통한 기능성 및 안전성자료 확보한 후 연구자 회의 개최를 통해 인체적용 시험 디자인 설계 및 biomarker를 결정하였다. 또한 인체적용시험 유효성평가 분석을 위한 통계적 접근방법을 모색하였다. 이에 따라 목표로 하는 기능성에 관한 연구디자인 및 피험자 선정/제외기준을 확립하여 인체적용시험 계획서(protocol), 증례기록서(CRF)를 개발하였다.

이를 근거로 개발한 프로토콜 및 인체적용시험용제품을 IRB(기관윤리심의위원회)의 승인을 받음으로써 윤리적 타당성을 확보하였다.

인체적용시험을 통해서 진단검사의학 검사 및 조혈기능 혈액검사, 피로회복 검사, 면역지표 검사 등을 통하여 발효녹용추출물 효능 연구를 진행하고 있다.

다만, 피검자 모집에 시일이 많이 필요하기 때문에 3년 연구과제가 종결되었지만, 인체적용 시험은 계속 진행 중이다. 완료 시점은 2014년 3월을 목표로 하고 있다.

인체적용시험을 통하여 얻을 결과로 우선 발효녹용의 피로회복에 대한 개별인정형 원료의 기능성 클레임을 신청하고 2단계 추가 연구를 통하여 조혈과 관련한 혈액생성 및 혈액 건강 관련 기능성으로 계속연구를 추진할 예정이다.

## 제 4 장    목표달성도 및 관련분야에의 기여도

### 1절. 목표 달성도

연구개발 목표	연구개발 내용	목표 달성도
녹용원료의 표준화 및 사업화 전략	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 국내 녹용 시장 및 현황 조사</li> <li>- 녹용 원료 수급을 위한 표준화 설정</li> <li>- 기능성 물질 평가 기준 설정</li> <li>- 원료 산업화를 위한 대량 생산 방법 설계</li> </ul>	100%
발효녹용 추출물의 표준화	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 수급 원료의 특성 평가 및 표준화</li> <li>- 표준화 물질 선정</li> <li>- 최적 발효조건 설정: 배양온도, pH, 시간, 접종량 등에 대한 발효조건 확립</li> <li>- 발효과정중의 성분 변화</li> <li>- 성분변화를 토대로 지표물질 선정, 확인 및 표준화</li> <li>- 발효전후의 활성 측정: 항산화, 조혈, 면역증진활성 등을 위한 연구</li> </ul>	100%
기능성 및 안전성자료 조사를 통해 기능성방향 (임상시험 기능성) 설정	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 녹용의 <i>in vitro</i> 및 <i>in vivo</i> 연구 자료와 기성한약서 등의 자료를 토대로 조혈기능(빈혈)에 대한 기능성자료를 조사하여 임상시험 수행에 따른 근거자료로 활용함</li> </ul>	100%
발효녹용 추출물의 안전성 평가	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 단회투여 독성시험(설치류, 비설치류)</li> <li>- 유전 독성시험(복귀돌연변이시험)</li> <li>- 염색체이상시험</li> <li>- 소핵시험</li> <li>- 14일 설치류 DRF 반복투여독성시험</li> </ul>	100%
제제연구 및 제형 개발	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 원료 규격 및 제조공정 설계</li> <li>- 기능성 소재를 이용한 제형개발 및 그에 따른 안정성 시험</li> <li>- 최적 생산 방법 및 생산 공정 설계</li> </ul>	100%

	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 제품 안정성 시험</li> <li>- 플라세보 실험용 원료 제작</li> <li>- 학술 발표</li> </ul>	
발효공정 표준화 및 전임상시험	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 발효공정의 표준화</li> <li>- 지표물질에 의한 표준화 확립</li> <li>- 활성성분 표준화 검토</li> <li>- 조혈작용 및 면역활성 관련 동물실험을 통해 기능성 확인</li> </ul>	100%
기초자료를 토대로 탐색적 임상시험 2건 수행	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 기초자료 및 비임상 기능성자료를 토대로 녹용추출물의 섭취량 결정을 위한 용량의존적인 탐색적 임상시험을 수행하여 최적의 일일섭취량을 결정함.</li> <li>- 20명의 반건강인들을 모집하여 녹용추출물을 계획되었던 용량투여군에 배정하여 효능이 발현되는 용량을 결정할 수 있음.</li> </ul>	100%
발효녹용 추출물의 안전성 평가	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 90일 설치류 반복투여독성시험</li> </ul>	100%
사업화를 위한 제품 개발 및 시제품 생산	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 제품 시험 생산을 통한 제품개발 확정</li> <li>- 품질 관리 규격 설정</li> <li>- 제품 pilot 테스트</li> <li>- 포장 및 디자인 안정성 검토</li> <li>- 사업화를 위한 마케팅 전략</li> <li>- 제품 안정성 시험</li> <li>- 산업화 응용 및 확대 방안 검토</li> </ul>	100%
발효공정 최적화	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 3 L fermentor를 이용한 발효공정 재확립 및 확인</li> <li>- 100 L fermentor를 이용한 scale-up 및 3회 이상 생산</li> <li>- 지표물질에 의한 표준화 및 활성변화 재확인</li> </ul>	100%
탐색적 임상시험자료를 토대로 본임상시험 수행 및 기능성자료를 활용하여 기능성원료 개별인정 신청	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 반건강인 피험자 확보</li> <li>- 비임상시험 자료 및 탐색적 임상시험결과에서 얻어진 녹용추출물의 일일섭취량 결정</li> <li>- 결정된 일일섭취량을 토대로 60명의 피험자들을 대상으로 임상시험을 수행하여 녹용추출물의 유효성과 안전성을 입증하도록 함</li> <li>- 기능성자료를 정리하여 녹용추출물의 기능성원료 개별인정 신청 진행</li> </ul>	진행중 (달성도 40%)

## 1. 목표달성도에 따른 의견

임상연구시험 시, 피검자 모집과 같은 어려움으로 인하여 연구기간 내에 완료하기 어려운 현실 때문에 연구의 최종결과는 과제가 종료된 이후 인체적용시험이 완료될 예정이다.

## 2. 향후 계획

임상시험의 어려운 점을 감안하여 최대한 2013년도 이내에 완료 될 수 있도록 추진할 예정이며, 관련 연구결과 획득 시 식약처에 세계최초 녹용을 이용한 개별인정형원료 허가를 제출할 예정이다.

최초 허가가 완료되면 국내 양륙 농가뿐만 아니라 국산의 우수성을 세계적으로 입증하는 중요한 계기가 될 것으로 판단된다.

## 2절. 관련분야에의 기여도

### 1. 시장성 : 기술 및 상품경쟁력 제고효과

2002년 건강기능식품법이 발효됨에 따라, 제품의 health benefit을 소비자에게 홍보하고 전달하기 위해서는 법에서 정한 일정 수준의 과학적 근거 자료를 통해 그 효능을 입증하는 연구가 선행되어야 하는 실정이다. 하지만, 이를 위해 소요되는 고비용의 연구비 대비 식품이 갖고 있는 낮은 가격대와 수익 구조적 한계로 인하여, 선행 연구를 위한 투자가 식품업체의 자본으로 이루어지지 못하고 있는 것 또한 피할 수 없는 현실이다.

따라서 현재 개별인정을 획득한 사례들은 대부분 외국의 유명 소재를 수입하여 자료 수집을 통한 허가 취득 사례가 대부분이다. 이러한 현실은 향후 글로벌 식품 시장에서 한국 기업들이 경쟁력을 갖지 못하게 될 위험성을 다분히 내포하고 있다. 본 연구와 같은 산·학 연계 연구로 국가경쟁력 발전에 기여할 수 있다.

동물실험과 임상연구를 진행하여 그 효능을 입증하고 개별인정 획득을 통해 제품개발에 성공하여, 국내의 개별인정형 건강기능식품 시장에서 상품 개발력에 있어 경쟁우위를 확보할 수 있다. 조절 및 피로회복을 위해 건강기능식품을 섭취하고자 하는 소비자들에게 간편하게 제공될 수 있는 식품을 개발하여 국민 건강에 이바지 할 수 있다.

본 연구를 통해 기능성 발효 녹용의 유효성분 분석에 관한 기술이 발전·심화될 것으로 기대된다.

### 2. 농림업 연계 효과

한국은 세계 최대 녹용소비국으로서 전세계 녹용 유통량의 80%를 소비하고 있다. 녹용은 다른 한약재보다 비싼데도 많이 찾는 한약재이며, 부과세율이 43.9%에 이르기 때문에 오래 전부터 밀수가 횡행하고 있다. 이러한 불합리한 유통구조로 인해, 국내 양록농가의 피해가 점차 확대되고 있다.

본 연구는 국산 녹용을 사용함으로써, 짠 수입산 제품으로 심각한 피해가 예상되는 양록 농가 및 관련 산업에 실질적 소득 증가로 이어질 수 있다. 신망 있는 대기업이 보증하는 녹용제품의 판매 확대로 국내 약재 시장에서 불법으로 유통되고 있는 허위 불법 수입녹용의 유통을 근절할 수 있는 효과도 기대할 수 있다.

### 3. 기타 파급효과와 전망

조혈 및 피로회복에 대한 건강기능식품에 대한 관심은 부족하다. 따라서 다양화된 조혈 및 피로회복 관련 효능인정을 통해 건강기능식품에 대한 소비자 인식을 높이고, 빈혈환자 및 만성질환으로 진행되는 경계에 있는 대상자들(반건강인)에게 보다 건강한 삶을 영위케 할 뿐 아니라, 의료비 절감 등 국가적으로 기여할 것으로 예상된다.



## 제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

### 1절. 실용화 · 산업화 계획



광동제약(주)는 한방과학의 대표적인 제조업체로, 천연물 소재개발의 노하우들을 보유하고 있어, 본 과제에서 개발하고자 하는 조혈 및 피로회복 건강기능 식품 개발에 자사 노하우를 접목하여 탁월한 기능을 가진 건강기능 식품 개발을 성공리에 완료하고자 한다.

2013년 12월에, 발효농용의 개별인정형 건강기능식품 원료 인정에 관한 자료를 제출하고 심사를 받아, 2014년에 개별인정형 건기식 원료 인정을 받아 바로 건강기능식품 제품을 발매 예정이다.

광동제약(주)는 건강기능식품 사업부가 독립적으로 운영되어, 본 제품을 병원, 약국, 홈쇼핑, 마트 및 방문판매를 통해 매출을 극대화 할 수 있는 능력을 보유하고 있다.

## 2절. 교육·지도·홍보 등 기술확산 계획

### 1. 교육 및 지도 성과 및 향후 계획

#### 가. 교육 및 지도 성과

교육명	식품의 기능과 영양
교재명	기능성 식품학
참석대상	고려대학교 식품영양학과 학생
교육기간	2013.09 ~ 2013.12.
교육내용	건강기능성식품의 국내외 시장에서의 발효 관련 기능성식품의 위치. 발효, 즉 생물학적 전환에 의한 기능성 증진 및 새로운 기능성 발현의 중요성. 발효 전/후의 기능성의 변화 및 평가방법에 대한 교육 실시
기대효과	건강기능성식품의 개념, 생물학적 전환 방법, 생물학적 전환에 의한 기능성 평가 방법에 대한 개념 정립, 향후 생물학적 제품 개발에 활용

#### 나. 연구 인력 양성 성과

- (1) 2012년 박사학위 수료자 양성 (농림수산계열), 1명
- (2) 2013년 석사학위수료자 (농림수산계열), 1명

#### 다. 교육 및 지도의 향후 계획

본 과제의 성과를 바탕으로 천연물 소재의 생리활성에 대한 지속적인 연구개발을 통해, 전문 연구 인력을 육성시키고자 함.

## 2. 홍보 성과 및 향후 계획




### 가. 홍보성과

- (1) 광동제약(주)과 전북대학교병원 기능성식품임상시험지원센터간 상호 협력을 위한 업무협약

수행중인 발효녹용추출물을 이용한 건강기능성식품 신소재 개발 프로젝트를 완수함과 동시에 급성장하는 시장변화에 공동대응하고 과학적 자문과 인적자원 교류를 비롯해 기능성식품 및 천연물 신소재 개발을 위하여 상호간 적극 협력하기 위한 M.O.U 체결



나. 향후 계획

구 분	내 용
제품의 인지도 상승	다양한 PR 활동을 통해 제품의 인지도를 제고하고, 제품의 효능에 대한 지속적인 매체 마케팅을 통해 홍보효과의 극대화를 유도하고자 한다.
마케팅 효율화	많은 예산이 소요되는 광고, 홍보물 제작 등의 홍보활동 이외에 미디어가 관심을 끌 수 있는 자사 내부의 다양한 홍보 아이템을 발굴하여 홍보 활동을 확대하고자 한다.
온라인 미디어 활용	<p>온라인 이벤트, 공동 프로모션 및 캠페인 등의 진행을 통해 홍보활동을 다양화 하고 홍보 예산의 효율적인 운영이 가능하도록 한다.</p> <p>발효녹용의 제품 효능에 대한 확실한 인지도를 및 입소문 마케팅을 위한 전략으로, 제품의 매출확대를 극대화 한다.</p> <p style="text-align: center;"><b>넛소문 운용 전략 / 흐름도</b></p> <div style="text-align: center;"> <p><b>넛소문 군단 선발</b></p>  <p><b>심실적인 혜택 및 권한 부여</b></p>  <p><b>다양한 활동 전개</b></p>  <p><b>새로운 커뮤니티 걸성</b></p> </div>
개별인정형 원료 허가	<p>인체적용시험 완료 시점(2013. 12) 이후 개별인정형 원료 허가서 제출(2014. 2) 예정이며, 허가를 득하고 액제, 캡슐, 정제 등 다양한 제품을 개발하고자 한다. 또한 마케팅, 온라인 미디어와 같은 다양한 매체를 이용하여 여 국산 녹용의 우수성과 함께 기능성을 적극 홍보함으로써 국내 농가의 이익창출과 함께 녹용 시장의 성장을 이끌 것이다.</p>

### 3절. 특허, 품종, 논문 등 지식재산권 확보계획 등

#### 1. 특허출원 및 등록 : 총 4건

출원 연도	특허명	출원인	출원국	출원번호
2010	코디셉스 밀리타리스 KCTC11455BP로 발효시킨 녹용을 유효성분으로 포함하는 면역기능 증강 및 조혈기능 개선용 조성물 및 그 제조방법	광동 제약	대한 민국	10-2010-0 026002
2010	코디셉스 밀리타리스 KCTC11455BP로 발효시킨 녹용을 유효성분으로 포함하는 항산화 및 성장촉진용 조성물 및 그 제조방법	광동 제약	대한 민국	10-2010-0 026004
2010	바실러스 서브틸리스 KCTC11454BP로 발효시킨 녹용을 유효성분으로 포함하는 면역기능 증강 및 조혈기능 개선용 조성물 및 그 제조방법	광동 제약	대한 민국	10-2010-0 026001
2010	바실러스 서브틸리스 KCTC11454BP로 발효시킨 녹용을 유효성분으로 포함하는 항산화 및 성장촉진용 조성물 및 그 제조방법	광동 제약	대한 민국	10-2010-0 026003

#### 2. 학술지 논문 게재 : 총 2건 게재, 4건 심사중

가. Stimulation of osteoblastic differentiation and mineralization in MC3T3-E1 cells by antler and fermented antler using *Cordyceps militaris*. Journal of Ethnopharmacology. Volume 133, Issue 2, 27 January 2011, Pages 710-717

나. Hematopoietic Effect of *Bacillus subtilis*-fermented Antler Extract on Phenylhydrazine-Induced Hemolytic Anemia in Sprague-Dawley Rats J. Med. Food. 2012 Sep;15(9):774-80.

다. Enhancement of endurance capacity by fermented deer antler in BALB/c mice. Journal of Medicinal Foods (2013, revision 중)

라. Hematopoietic effect of deer antler extract fermented by *Bacillus subtilis* on diet induced anemic rats. Evidence-based Complementary and Alternative Medicine (2013, 심사중)

- 마. Hematopoietic effect of deer antler extract fermented by *Bacillus subtilis* on colony formation of marrow cells. *Journal of Medicinal Foods* (2013, 심사중)
- 바. The effects of fermented deer antler extract on exercise-induced fatigue in healthy subjects: protocol for a randomised controlled trial (2013, 투고중)

#### 4절. 추가연구, 타연구에 활용 계획 등

현재 인체적용시험 진행 중이며 시험의 유효성평가 지표를 조절작용 뿐만 아니라 면역, 피로 회복 등 다양하게 설정하였다. 다양한 지표에서 우수한 결과를 나타내면 추가적인 연구를 통하여 기능성 확대를 진행하고자 한다.

## 제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

구 분	내 용
녹용의 심장질환 효능	<p><a href="#">Evid Based Complement Alternat Med. 2012;2012:825056. doi: 10.1155/2012/825056. Epub 2012 Apr 24.</a></p> <p><b>The Effects of Velvet Antler of Deer on Cardiac Functions of Rats with Heart Failure following Myocardial Infarction.</b></p> <p><a href="#">Shao MJ, Wang SR, Zhao MJ, Lv XL, Xu H, Li L, Gu H, Zhang JL, Li G, Cui XN, Huang L.</a> National Integrated Traditional and Western Medicine Center for Cardiovascular Disease, China-Japan Friendship Hospital, Beijing 100029, China.</p> <p><b>Abstract</b> Velvet antler of deer (VAD) is a commonly-used kidney-Yang supplementing traditional Chinese medication. According to the heart-kidney-related theory, heart Yang originates in kidney Yang and heart failure due to heart Yang deficiency can be treated by tonifying kidney Yang. In this study, we investigated therapeutic effects of VAD on cardiac functions in rats with heart failure following myocardial infarction. Forty-eight male Wistar rats were subjected either to left coronary artery ligation (N = 36) or to sham operation (N = 12). One week after the surgery, rats with heart failure received daily treatment of double-distilled water, captopril or VAD by gavage for consecutively four weeks, while sham-operated animals were given double-distilled water. Ultrasonic echocardiography was adopted to examine cardiac structural and functional parameters and serum brain natriuretic peptide (BNP) concentration was measured using radioimmunoassay. We found that VAD partially reversed changes in cardiac functional parameters and serum BNP levels in rats with heart failure. These results provide further evidence for the heart-kidney-related theory and suggest that VAD might be a potentially alternative and complementary medicine for the treatment of heart failure.</p> <p>PMID: 22611434 [PubMed] PMCID: PMC3348708 <a href="#">Free PMC Article</a></p>
녹용의 골관절염 효능	<p><a href="#">N Z Med J. 2012 Dec 14;125(1367):90-6.</a></p> <p><b>Health benefits of deer and elk velvet antler supplements: a systematic review of randomised controlled studies.</b></p> <p><a href="#">Gilbey A, Paragonzalez JD.</a> College of Business, Massey University, Private Bag 11 222, Palmerston North, New Zealand. a.p.gilbey@massey.ac.nz</p> <p><b>Abstract</b> <b>AIMS:</b> The aim of this systematic review was to evaluate the evidence from RCTs of velvet antler supplements for any condition, using the QUOROM statement as a guiding framework. <b>METHODS:</b> Four electronic databases (PubMed, Medline, Web of Science and Academic search premier, via the bibliographical platform, Endnote) and two review articles were searched for all randomised clinical trials of velvet antler supplements. Retrieved trials were evaluated according to standardised criteria. <b>RESULTS:</b> Seven RCTs were identified as satisfying all inclusion criteria and examined the effectiveness of velvet antler for rheumatoid arthritis (2), osteoarthritis (1), sexual function (1), and sporting performance enhancement (3). Their methodological quality ranged from 3.5, as measured on the Jadad scale. Two RCTs reported some positive effects of velvet antler supplements, but neither were convincing while the remaining five RCTs found no effect of velvet antler supplements. <b>CONCLUSIONS:</b> Claims made for velvet antler supplements do not appear to be based upon rigorous research from human trials, although for osteoarthritis the findings may have some promise.</p> <p>PMID: 23321886 [PubMed - indexed for MEDLINE]</p>
녹용의 면역반응 효능	<p><a href="#">Int Immunopharmacol. 2013 Jun;16(2):210-3. doi: 10.1016/j.intimp.2013.02.027. Epub 2013 Apr 2.</a></p> <p><b>Immunomodulatory effects of a 3.2kDa polypeptide from velvet antler of Cervus nippon Temminck.</b></p> <p><a href="#">Zha E, Li X, Li D, Guo X, Gan S, Yun X.</a> Department of Food Science and Engineering, Liaoning Medical University, No. 5-48 Remmin Street, Jinzhou 121001, China.</p> <p><b>Abstract</b> The objective of this study was to evaluate the immunomodulatory effects of a native 3.2kDa polypeptide of velvet antler from sika deer (nVAP32) on BALB/c mice immunocytes. In vitro tests showed that nVAP32 significantly stimulated splenocyte proliferation and enhanced the NK cytotoxicity and CD4(+)CD8(+) cell subpopulations. Also, nVAP32 demonstrated a significant capacity in up- and down-regulating the expression of Th1- and Th2-related cytokines respectively. These results indicated that nVAP32 might have potential immunomodulatory effects on the immune system of mice and the further investigation on in vivo effects is qualified. Copyright © 2013 Elsevier B.V. All rights reserved.</p> <p>PMID: 23562738 [PubMed - in process]</p>
녹용의 알러지성 기도반응 효능	<p><a href="#">Evid Based Complement Alternat Med. 2012;2012:481318. doi: 10.1155/2012/481318. Epub 2012 Dec 23.</a></p> <p><b>Effect of the Velvet Antler of Formosan Sambar Deer (Cervus unicolor swinhoei) on the Prevention of an Allergic Airway Response in Mice.</b></p> <p><a href="#">Kuo CY, Wang T, Dai TY, Wang CH, Chen KN, Chen YP, Chen MJ.</a> Taiwan Livestock Research Institute, Council of Agriculture, Tainan 71246, Taiwan.</p> <p><b>Abstract</b> Two mouse models were used to assay the anti-allergic effects of the velvet antler (VA) of Formosan sambar deer (Cervus unicolor swinhoei) in this study. The results using the ovalbumin (OVA) sensitized mouse model showed that the levels of total IgE and OVA-specific IgE were reduced after VA powder was administered for 4 weeks. In addition, the ex vivo results indicated that the secretion of Th helper cell 1 (Th1), regulatory T (Treg), and Th17 cytokines by splenocytes was significantly increased (P &lt; 0.05) when VA powder was administered to the mice. Furthermore, OVA-allergic asthma mice that have been orally administered with VA powder showed a strong inhibition of Th2 cytokine and proinflammatory cytokine production in bronchoalveolar fluid compared to control mice. An increase in the regulatory T-cell population of splenocytes in the allergic asthma mice after oral administration of VA was also observed. All the features of the asthmatic phenotype, including airway inflammation and the development of airway hyperresponsiveness, were reduced by treatment with VA. These findings support the hypothesis that oral feeding of VA may be an effective way of alleviating asthmatic symptoms in humans.</p>

위와 같은 녹용의 다양한 생리활성 효능에 대한 연구가 전 세계적으로 꾸준히 이뤄지고 있다. 이를 바탕으로 향후 녹용의 새로운 생리활성에 대한 연구를 지속하고자 한다.

## 제 7 장 연구시설·장비 현황

해당사항 없음



## 제 8 장   참고문헌

1. Ha H, Yoon SH. 1996. Analytical studies of constituents of antler. *J Korean Soc Food Nutr* 25: 279-282.
2. Hong ND, Won DH, Kim NJ, Chang SY, Youn WG, Kim HS. 1991. Studies of analysis of constituent of deer horn ( I ). *Kor J Pharmacogn* 22: 171-182.
3. Invankina NF, Isay SV, Busarova NG, Mischenko TY. 1993. Prostaglandin-like activity, fatty acid and phospholipid composition of sika deer (*Cervus nippon*) antlers at different growth stages. *Comp Biochem Physiol B* 106: 159-162.
4. Tsujibo H, Miyake Y, Maruyama K, Inamori Y. 1987. Hypotensive compounds isolated from an alcohol extract of the unossified horn of *Cervis elaphus* L var xanthopyugus Milne-Edwang (Rokujo). Isolation of lysophosphatidylcholine as a hypotensive principle and structure-activity study of related compounds. *Chem Pharm Bull* 35: 654-659.
5. Kim KW, Park SW. 1982. A study on the hematopoiesis action of deer horn extract. *Korea Biochem J* 15: 151-157.
6. Yong JI. 1976. Studies on deer horn; The effect of deer horn on the liver and other organs of cholesterol administered rabbits. *J Korea Pharm Sci* 6: 26-42.
7. Han SH. 1970. Influence of antler (deer horn) on the enterochromaffin cells in the gastrointestinal mucosa of rats exposed to starvation, heat, cold and electric shock. *J Catholic Medical College* 19: 157-165.
8. Kang CK, Kim SW. 1989. A study on the biochemical and nutritional inquiry of antler. *Korea J Food Nutr* 2: 65-71.
9. Kim DH, Han SB, Park JS, Han MJ. 1994. Fermentation of antler and its biological activity. *Kor J Pharmacogn* 25: 233-237.
10. Chi H, Ji GE. 2005. Transformation of ginsenosides Rb1 and Re from *Panax ginseng* by food microorganisms. *Biotechnol Lett* 27: 765-771.
11. Choi YM, Kim YS, Ra KS, Suh HJ. 2007. Characteristics of fermentation and bioavailability of isoflavones in Korean soybean paste (*doenjang*) with application of *Bacillus* sp. KH-15. *Int J Food Sci Technol* 42: 1497-1503.
12. Cabras P, Angioni A. 2000. Pesticide residues in grapes, wine, and their processing products. *J Agric Food Chem* 48: 967-973.

13. Kosakai M, Yosizawa Z. 1979. A partial modification of the carbazole method of Bitter and Muir for quantification of hexauronic acids. *Anal Biochem* 93: 295-298.
14. Farndale RW, Sayers CA, Barrett AJ. 1982. A direct spectrophotometric microassay for sulfated glycosaminoglycans in cartilage cultures. *Connect Tissue Res* 9: 247-248.
15. Warren L. 1959. The thiobarbituric acid assay of sialic acids. *JBiol Chem* 234: 1971-1975.
16. Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C. 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Technology* 28: 25-30.
17. Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic Biol Med* 26: 1231-1237.
18. Mayer MM. 1971. Complement and complement fixation. In *Experimental Immunology*. 2nd ed. Charles C Thomas Publisher, Illinois. p 133-240.
19. Yoo Y, Kim Y, Jhon GJ, Park J. 1993. Separation of gangliosides using cyclodextrin in capillary zone electrophoresis. *J Chromatogr A* 652: 431-439.
20. Park PJ, Jeon YJ, Moon SH, Jeon BT. 2005. Chemical composition and biological activity of velvet antler. *Food Ind Nutr* 10: 50-59.
21. Min KC, Jo JS, Kim ES. 1984. Studies on the nonstarchy polysaccharides of Korean ginseng, *Panax ginseng* C. A. Meyer: II. Physico-chemical properties of pectic substances. *Korean J Ginseng Sci* 8: 105-113.
22. Gao Q, Kiyohara H, Cyong J, Yamada H. 1989. Chemical properties and anti-complementary activities of polysaccharide fractions from roots and leaves of *Panax ginseng*. *Planta Medica* 55: 9-12.
23. Tsukagoshi S, Hashimoto Y, Fuji G, Kobayashi H, Nomoto K, Orita K. 1984. Krestin(PSK). *Cancer Treat Rev* 11: 131-155.
24. Kwon MH, Sung HJ. 1997. Characteristics of immune response by polysaccharides with complement system activity. *Food Sci Indus* 30: 30-43.
25. Jung YJ, Chun H, Kim KI, An JH, Shin DH, Hong BS, Cho HY, Yang HC. 2002. Purified polysaccharide activating the complement system from leaves of *Diospyos kaki* L. *Kor J Food Sci Technol* 34: 879-884.
26. Aramwit, P., & Wirotsaengthong, S. Overview of commonly used Chinese herbs.
27. Broeder, C., Percival, R., Quindry, J., Panton, L., Wills, T., Browder, K., Earnest, C.,

- Almada, A., Haines, S., & Suttie, J. (2004). The effects of New Zealand deer antler velvet supplementation on body composition, strength, and maximal aerobic and anaerobic performance. *Age*, 28(7.4), 25.24-24.24.
28. Brooke, M. H., & Kaiser, K. K. (1970). Muscle fiber types: How many and what kind? *Archives of Neurology*, 23(4), 369.
29. Carro, E., Nuñez, A., Busiguina, S., & Torres-Aleman, I. (2000). Circulating insulin-like growth factor I mediates effects of exercise on the brain. *The Journal of Neuroscience*, 20(8), 2926-2933.
30. Clarkson, P. M., & Hubal, M. J. (2002). Exercise-induced muscle damage in humans. *American journal of physical medicine & rehabilitation*, 81(11), S52-S69.
31. Gandevia, S. (1992). Some central and peripheral factors affecting human motoneuronal output in neuromuscular fatigue. *Sports medicine (Auckland, NZ)*, 13(2), 93.
32. GREENHAFF, P. L., & TIMMONS, J. A. (1998). 1 Interaction Between Aerobic and Anaerobic Metabolism During Intense Muscle Contraction. *Exercise and sport sciences reviews*, 26(1), 1-30.
33. Hagberg, M. (1981). Muscular endurance and surface electromyogram in isometric and dynamic exercise. *Journal of Applied Physiology*, 51(1), 1-7.
34. Hemmings, S. J., & Song, X. (2004). The effects of elk velvet antler consumption on the rat: development, behavior, toxicity and the activity of liver  $\gamma$ -glutamyltranspeptidase. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 138(1), 105-112.
35. Ikeuchi, M., Koyama, T., Takahashi, J., & Yazawa, K. (2006). Effects of astaxanthin supplementation on exercise-induced fatigue in mice. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 29(10), 2106-2110.
36. Kim, M., Jung, E., Lee, H., Shin, K., Kim, Y., Ra, K., Park, C., Woo, M., Lee, S., & Kim, J. (2009). Isolation of strain for the preparation of the fermented antler and its physiological activities. *Journal of The Korean Society of Food Science and Nutrition*, 38.
37. Lee, H. S., Kim, M. K., Kim, Y. K., Jung, E. Y., Park, C. S., Woo, M. J., Lee, S. H., Kim, J. S., & Suh, H. J. (2011). Stimulation of osteoblastic differentiation and mineralization in MC3T3-E1 cells by antler and fermented antler using *Cordyceps militaris*. *Journal of Ethnopharmacology*, 133(2), 710-717.

38. Lee, S. H., Suh, H. J., Lee, H. S., Park, Y., Park, J. W., & Jung, E. Y. (2012). Hematopoietic Effect of *Bacillus subtilis*-Fermented Antler Extract on Phenylhydrazine-Induced Hemolytic Anemia in Sprague-Dawley Rats. *Journal of Medicinal Food*.
39. MARKLUND, S., & MARKLUND, G. (2005). Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *European Journal of Biochemistry*, 47(3), 469-474.
40. Montesinos, E. (2003). Development, registration and commercialization of microbial pesticides for plant protection. *International Microbiology*, 6(4), 245-252.
41. Paglia, D. E., & Valentine, W. N. (1967). Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *The Journal of laboratory and clinical medicine*, 70(1), 158.
42. Pedersen, T. H., Nielsen, O. B., Lamb, G. D., & Stephenson, D. G. (2004). Intracellular acidosis enhances the excitability of working muscle. *Science*, 305(5687), 1144-1147.
43. Shin, K., Lee, E., Kim, J., Chung, M., & Cho, S. (1989). Pharmacological studies on powdered whole part of unossified antler. *Kor J Pharmacogn*, 20(3), 180-187.
44. Suttie, J. M., & Harris, P. (2000). Clinical properties of deer velvet. *Positive Health*, 32-38.
45. Trejo, J. L., Carro, E., & Torres-Alemán, I. (2001). Circulating insulin-like growth factor I mediates exercise-induced increases in the number of new neurons in the adult hippocampus. *The Journal of Neuroscience*, 21(5), 1628-1634.
46. Wang, L., Pei, Y., Chen, J., Zhao, X., Cui, H., & Cui, H. (2010). Feature selection and prediction of sub-health state using SVM-RFE. In *Artificial Intelligence and Computational Intelligence (AICI), 2010 International Conference on*, vol. 3 (pp. 199-202): IEEE.
47. ZHANG, R., ZHAO, Y., & WANG, Z. (2011). Anti-fatigue effects of antler velvet water extract in mice [J]. *Science and Technology of Food Industry*, 4, 106.
48. 녹용을 아십니까. 유한문화사, 건국대녹용연구센터
49. 녹용의 기원동물 및 원산지에 대한 설명자료(식약처, 2012)

