

발간등록번호

11-1543000-001721-01

# 생강유래 불포화케톤의 생물전환을 통한 뇌질환 개선 활성 대사체 생산 기술 개발 최종보고서

2017. 03. 24.

주관연구기관 / 한국식품연구원  
협동연구기관 / 경희대학교  
(주)네오크레마  
위탁연구기관 / 한양대학교

농림축산식품부

농생명산업기술개발사업 R&D Report



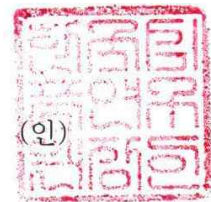
# 제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

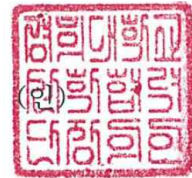
본 보고서를 “생강유래 불포화케톤의 생물전환을 통한 뇌질환 개선 활성 대사체 생산 기술 개발”(개발기간 : 2012.12.21~2016.12.20)과제의 최종보고서로 제출합니다.

2017. 03. 24.

주관연구기관명 : 한국식품연구원 (대표자) 박용곤



협동연구기관명 : 경희대학교 산학협력단 (대표자) 홍충선



협동연구기관명 : (주) 네오크레마 (대표자) 김재환



위탁연구기관명 : 한양대학교 산학협력단 (대표자) 좌용호



주관연구책임자 : 하상근

협동연구책임자 : 허영범

협동연구책임자 : 이왕희

위탁연구책임자 : 유혜현

국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제18조에 따라 보고서 열람에 동의합니다.



## 보고서 요약서

|                                                                             |                    |                                             |                              |                       |                                                  |
|-----------------------------------------------------------------------------|--------------------|---------------------------------------------|------------------------------|-----------------------|--------------------------------------------------|
| 과제고유번호                                                                      | 112136-4           | 해당 단계<br>연구 기간                              | 2012.12.21~2016.12.20        | 단계 구분                 | 4/4                                              |
| 연구사업명                                                                       | 중사업명               | 농식품기술개발사업                                   |                              |                       |                                                  |
|                                                                             | 세부사업명              | 농생명산업기술개발사업                                 |                              |                       |                                                  |
| 연구과제명                                                                       | 대과제명               | “해당없음”                                      |                              |                       |                                                  |
|                                                                             | 세부과제명              | 생강유래 불포화케톤의 생물전환을 통한 뇌질환 개선 활성 대사체 생산 기술 개발 |                              |                       |                                                  |
| 연구책임자                                                                       | 하상근                | 해당단계<br>참여<br>연구원 수                         | 총: 12명<br>내부: 7명<br>외부: 5명   | 해당단계<br>연구개발비         | 정부: 210,000천원<br>민간: 70,000 천원<br>계: 280,000천원   |
|                                                                             |                    | 총 연구기간<br>참여<br>연구원 수                       | 총: 64명<br>내부: 28명<br>외부: 46명 | 총 연구개발비               | 정부:840,000 천원<br>민간:280,000 천원<br>계:1,120,000 천원 |
| 연구기관명 및<br>소속부서명                                                            | 한국식품연구원<br>대사질환연구단 |                                             |                              | 참여(협동)기업명<br>(주)네오크레마 |                                                  |
| 위탁연구                                                                        | 연구기관명: 한양대학교       |                                             |                              | 연구책임자: 유혜현            |                                                  |
| 요약                                                                          |                    |                                             |                              | 보고서 면수                |                                                  |
| ○ 뇌질환 개선 효능이 우수한 생강유래 생물전환 최적 활성 대사체 조성물 생산 표준화 기술을 개발 및 대사체의 체내 작용 기전을 구명함 |                    |                                             |                              | 187p                  |                                                  |
| ○ 뇌질환 개선 효능이 우수한 생물전환 최적 활성 대사체 조성물의 안전성, 임상적용시험 평가를 통한 신소재화                |                    |                                             |                              |                       |                                                  |



## 요 약 문

|                           |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     | 코드번호    | D-01          |                    |      |
|---------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------|---------------|--------------------|------|
| 연구의<br>목적 및 내용            | <ul style="list-style-type: none"> <li>○ 뇌질환 개선 효능이 우수한 생강유래 생물전환 최적 활성 대사체 조성물 생산 표준화 기술개발</li> <li>○ 임상적용시험 평가 등을 통하여 고부가가치 기능성을 가진 개별인정형 건강기능식품을 개발하여 인지기능개선 소재의 신소재화를 구축하고자 함</li> </ul>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |         |               |                    |      |
| 연구개발성과                    | <ul style="list-style-type: none"> <li>○ 생강조직 내 선도화합물(불포화케톤/쇼가올) 증폭 표준화 공정 기술 개발</li> <li>○ 생물전환 대사체 유도 미생물 선별 및 생물전환 대사체 유도 우수 균주 선별 성공</li> <li>○ 뇌질환 개선 효능이 우수한 생물전환 대사체 소재의 효능검증 및 작용기전 구명</li> <li>○ 생물전환 대사체(생강발효추출물)소재의 생산조건 확립</li> <li>○ 생강발효추출물의 효능검증 완료</li> <li>○ 생강발효추출물의 생산 표준화 공정 검토 및 대량생산 시스템 구축과 시생산 완료</li> <li>○ 생강발효추출물의 생산조건, 공정설정 완료</li> <li>○ 생강발효추출물의 품질관리 기준규격 설정</li> <li>○ 생강발효추출물의 안전성, 유효성 평가를 위한 임상적용 시험 완료</li> <li>○ 생강발효추출물의 개별인정 신청 기반 연구</li> <li>○ 특허출원 4건, 특허등록 4건</li> <li>○ 논문 게재 10편 (SCI 9편, 비SCI 1편)</li> <li>○ 과제 종료 후 기술이전 1건과 언론홍보 7건을 수행</li> </ul> |         |               |                    |      |
| 연구개발성과의<br>활용계획<br>(기대효과) | <ul style="list-style-type: none"> <li>○ 효능물질의 작용기전 구명을 통한 국제적인 경쟁력을 확보함으로써 국내외 건강기능성 식품 업계의 기초연구자료 제공</li> <li>○ 글로벌 경쟁력을 가질 수 있는 고부가가치 건강기능성 식품 개발을 위한 기반 기술 확보</li> <li>○ 노령화 시대로 접어든 한국의 실정과 지속적으로 증가하는 퇴행성 신경계질환으로 인한 사회적, 경제적 측면에서 국민 보건 복지에 직접적으로 기여</li> </ul>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |         |               |                    |      |
| 중심어<br>(5개 이내)            | Ginger                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              | Paradol | Bioconversion | Cognitive disorder | food |





## < SUMMARY >

|                          |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | 코드번호    | D-02          |                       |      |  |
|--------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------|---------------|-----------------------|------|--|
| Purpose&<br>Contents     | <ul style="list-style-type: none"> <li>○ The final goal of this research is to develop health-functional food for cognitive improvement using fermented ginger extract and to establish a mass production and safety assessment of functional ingredient. This research was performed to be acquired for individual health-functional food ingredients by proving the scientific evidence and efficacy evaluation of domestic agricultural resources. In addition, this research was intended for industrialization of personalized health-functional food.</li> </ul>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |         |               |                       |      |  |
| Results                  | <ul style="list-style-type: none"> <li>○ Development of standardization technology for amplification of lead compound (unsaturated ketone / shogaol) in ginger</li> <li>○ Establishment of optimum strain for bioconversion</li> <li>○ Efficacy verification and mechanism investigation of fermented ginger extract for improvement of neurodegenerative disorder</li> <li>○ Establishment of production condition of bioconversion metabolite (fermented ginger extract)</li> <li>○ Completion of production process setting of fermented ginger extract</li> <li>○ Establishment of standard for quality control of fermented ginger extract</li> <li>○ Construction of mass production system of fermented ginger extract</li> <li>○ Completion of clinical test for evaluation of efficacy and safety of fermented ginger extract</li> <li>○ Patent application 4case, patent registration 4case</li> <li>○ Paper publication 10 case</li> </ul> |         |               |                       |      |  |
| Expected<br>Contribution | <ul style="list-style-type: none"> <li>○ Our results collectively suggest that fermented ginger extract is bioactive functional food for cognitive improvement in neurodegenerative disorder via preventing neurotoxicity</li> <li>○ These findings suggested global competitiveness of health-functional food by presenting international and domestic journals and conferences, which has promoted the utilization and export possibility of functional foods made in Korea. Also, This research has contributed to industrial development by human resource development for future growth.</li> </ul>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |         |               |                       |      |  |
| Keywords                 | Ginger                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                | Paradol | Bioconversion | Cognitive<br>disorder | food |  |



## **<Contents>**

|                                                                                            |     |
|--------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 1. Introduction .....                                                                      | 13  |
| 2. Present status of related R&D in domestic and<br>foreign countries .....                | 19  |
| 3. Contents and results of the research .....                                              | 24  |
| 4. Degree of achievement against research goal and impact<br>on other research areas ..... | 177 |
| 5. Plan for utilization of results of the research .....                                   | 182 |
| 6. Information of science and technology of foreign countries .....                        | 183 |
| 7. Security level of R&D achievement .....                                                 | 183 |
| 8. Equipments and facilities to be registered .....                                        | 183 |
| 9. Performance result for laboratory safety .....                                          | 183 |
| 10. Primary research achievement .....                                                     | 184 |
| 11. Etc .....                                                                              | 185 |
| 12. References .....                                                                       | 186 |



## 〈 목 차 〉

|                                         |     |
|-----------------------------------------|-----|
| 1. 연구개발과제의개요 .....                      | 13  |
| 2. 국내외 기술개발 현황 .....                    | 19  |
| 3. 연구수행 내용 및 결과 .....                   | 24  |
| 4. 목표달성도 및 관련분야에의 기여도 .....             | 177 |
| 5. 연구결과의 활용계획 등 .....                   | 182 |
| 6. 연구과정에서 수집한 해외과학기술정보 .....            | 183 |
| 7. 연구개발성과의 보안등급 .....                   | 183 |
| 8. 국가과학기술종합정보시스템에 등록된 연구시설 · 장비현황 ..... | 183 |
| 9. 연구개발과제 수행에 따른 연구실 등의 안전조치 이행실적 ..... | 183 |
| 10. 연구개발과제의 대표적 연구실적 .....              | 184 |
| 11. 기타사항 .....                          | 185 |
| 12. 참고문헌 .....                          | 186 |



# 1. 연구개발과제의 개요

|      |      |
|------|------|
| 코드번호 | D-03 |
|------|------|

## 제 1절 연구개발 목적

### 1. 연구개발의 최종목표

- 가. 뇌질환 개선 효능이 우수한 생강유래 생물전환 최적 활성 대사체 조성물 생산 표준화 기술을 개발하고 대사체의 체내 작용 기전을 구명함
- 나. 뇌질환 개선 효능이 우수한 생물전환 최적 활성 대사체 조성물의 안전성, 임상적용시험 평가 등을 통한 신소재화

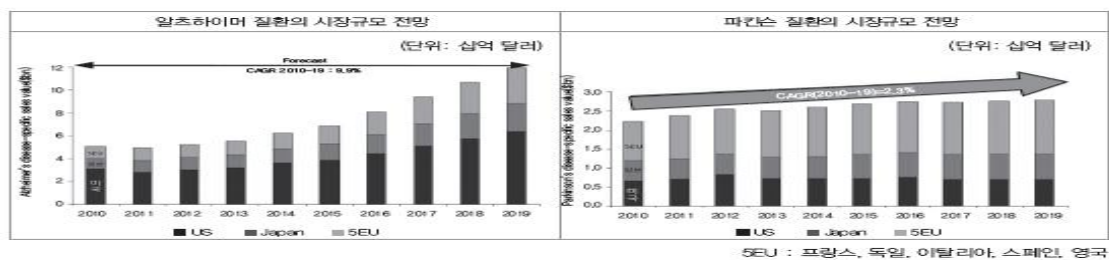
### 2. 연구개발의 주요내용

- 가. 뇌질환 개선 효능이 우수한 생물전환 대사체 소재의 생산 표준화 기술 개발
  - (1) 생강 조직내 선도화합물(불포화케톤/쇼가올) 증폭 표준화 공정 기술 개발
  - (2) 생물전환 대사체 유도 최적 미생물 선별 및 대사체 구성물 분석, 동정
  - (3) 다변량통계분석기법을 이용한 생물전환 대사체 최적 조성비율 예측
  - (4) 예측 최적 대사체 조성비율에 근접하는 생물전환 대사체 생산, 선정
  - (5) 생물전환 대사체 소재의 생산조건 확립 및 생산 표준화 공정 개발
  - (6) 생물전환 대사체 소재의 대량생산 시스템 구축 및 제품 시생산
  - (7) 생물전환 대사체 소재를 유효성분으로 함유하는 제품 개발
- 나. 뇌질환 개선 효능이 우수한 생물전환 대사체 소재의 효능 검증 및 작용 기전 구명
  - (1) 생물전환 대사체 소재의 세포모델 활용 인지기능 효능 검증
  - (2) 생물전환 대사체 소재의 동물모델을 이용한 인지기능 개선 효능 검증
  - (3) 생물전환 대사체 소재의 작용 기전 연구
- 다. 뇌질환 개선 효능이 우수한 생물전환 대사체 조성물의 신소재화 기반 연구
  - (1) 생물전환 대사체 소재의 안전성, 유효성 평가를 위한 임상적용 시험
  - (2) 생물전환 대사체 소재의 지표성분 기준 및 규격 설정
  - (3) 생물전환 대사체 소재의 개별인정형 원료 신청을 위한 행정 자료 작성, 제출

## 제 2절 연구개발의 필요성

### 1. 건강기능식품 산업의 특성

- 가. 웰빙트렌드에 따른 소비자의 니즈 증가 및 가속화되는 고령화 등의 이유로 질병예방과 건강증진 상품에 대한 수요는 지속적으로 증가하고 있으며, 이에 따라 성장 잠재력이 풍부한 시장으로 인식되고 있음
- 나. 2012년 NBJ (Nutrition Business Journal)의 보고에 따르면 전 세계 건강기능성 식품의 시장 규모는 2000년 약 1,435억불에서 2012년 약 3,014억불로 높은 성장률을 보이고 있음. 국내의 경우 기능성 식품의 시장규모는 2011년 기준 1조 3천억원이며 최근 들어 10%이상의 꾸준한 성장을 지속하고 있음 (식품의약품안전처, 2012)
- 다. 2020년 이후 노인 인구가 전체의 20% 이상이 되면 전 세계적으로 퇴행성 뇌질환이 심각한 사회문제로 부상하게 될 것으로 전망되고 있음. 국내 치매 환자 수는 2010년 47만명 (65세 이상인구의 8.8%)이며, 2020년 75만명 (9.7%)이 될 것으로 추정되고 있음 (보건복지부, 2010)
- 라. 특히 알츠하이머성 치매의 경우 2019년까지 연평균 9.9%의 높은 성장이 지속될 것으로 예상되고 있으며 신경성 장애로 인한 치사율은 전세계 사망인구의 12%를 차지하므로 건강, 보건 부문에서 향후 트렌드에 대한 대비가 필요함



출처: Datamonitor

<그림 1. 주요국(미국, 일본, EU)의 뇌질환 시장규모 전망>

- 바. 국내 인지기능과 관련된 기억력 및 인지능력 개선 효능을 갖는 개별인정된 원료는 기억력 개선 원료로 녹차추출물/테아닌복합물, 은행잎추출물 등 11종과 인지능력 향상 원료로 참당귀 추출분말, 참당귀뿌리추출물, 포스파티딜세린, *Lactobacillus Helveticus* 발효물, 도라지 추출 등이 있음.



표 1. 인지기능과 관련된 개별인정된 원료

| 기능성                                 |             | 원료 또는 성분        | 건수 |
|-------------------------------------|-------------|-----------------|----|
| 기억력 개선                              | 기억력 개선에 도움  | 구기자추출물          | 11 |
|                                     |             | 녹차추출물/테아닌복합물    |    |
|                                     |             | 당귀등추출복합물        |    |
|                                     |             | 비파엽추출물          |    |
|                                     |             | 오메가-3지방산 함유유지   |    |
|                                     |             | 원지추출분말          |    |
|                                     |             | 은행잎추출물          |    |
|                                     |             | 인삼가시오갈피 등 혼합추출물 |    |
|                                     |             | 네아닌등복합추출물       |    |
|                                     |             | 피브로인가수분해물       |    |
|                                     |             | 홍삼(홍삼농축액)       |    |
|                                     |             | 참당귀 뿌리추출물       |    |
| 참당귀 추출분말                            |             |                 |    |
| 포스파티딜세린                             |             |                 |    |
| <i>Lactobacillus Helveticus</i> 발효물 |             |                 |    |
| 인지능력 향상                             | 인지능력 개선에 도움 | 도라지 추출물         |    |

(식품의약품안전처)

- 바. 기존 인지능력 개선 개별인정 소재인 *Lactobacillus Helveticus* 발효물, 도라지 추출물, 참당귀 추출분말, 참당귀뿌리추출물과 포스파티딜세린은 원료에 대한 소비자 인지도가 낮아 시장 진입에 어려움을 겪고 있음
- 사. 국내 기능성 식품 소재의 경우 원료 의존도가 70% 이상으로 높고, 홍삼 등의 베스트 셀러 제품은 대부분 해외수출이 부진하고 내수 매출이 주를 이루고 있음. 따라서 국내산 농산물 유래 기능성 소재 개발에 많은 관심이 모아지고 있음 (식품의약품안전처, 2012)
- 아. 개별인정 원료의 대부분이 단순 혹은 복합추출물 형태의 1차 가공품임. 건강기능식품 산업을 고부가가치화하기 위해서는 융복합 공정기술 도입으로 시너지 효과 극대화 및 기능성 신소재의 효용성 증대방안이 요구됨
- 자. 퇴행성 신경계 질환 의약품의 경우 근원적인 치료가 아닌 일시적으로 증세를 경감하는 효능을 갖는 물질이 대부분이고 상당부분이 질환이 많이 진행된 심각한 상태에서 치료하는 것이 일반적임. 알츠하이머병은 choline의 전구물질인 lecithin이나 cholinestrase inhibitor 등의 약물이 이용되고 있으나 현재 Cognex(Tacrine)와 Exelon 및 Aricept를 제외하고는 아직 뚜렷한 신약이 없으며 Tacrine은 심각한 간독성과 같은 부작용이 있음

차. 21세기 식의약산업이 치료형에서 예방형으로 바뀌면서 앞으로는 치매와 같이 퇴행성 질환을 사후에 치료하는 차원이 아니라 보다 근본적으로 뇌의 인지능력을 증대시킬 수 있는 예방 측면의 의약품이 각광받을 것으로 보임. 그러므로 장기간 복용이 가능하고 부작용이 적은 천연물 유래 인지기능 개선 물질을 찾아내고 효과를 입증하여 신소재로 개발하는 노력이 실질히 요구됨

## 2. 연구개발 방향: 인지기능개선 건강기능식품 소재개발

가. 생강은 <타임지> 선정 세계 10대 향약식물이며 전 세계적으로 식품 및 의약품, 향신료 등으로 널리 이용되고 있음. 또한, 식의약 소재로서 소비자들에게 인지도가 높고 향염증, 항암, 인지기능 개선 등 다양한 기능성이 알려져 있음

나. 생강은 1~3%의 휘발성 오일과 많은 신미성분을 가지고 있음. 진저롤은 신선 생강에 가장 풍부하게 존재하는 매운 맛 성분이며 side chain의 길이에 따라 n-6, 8, 10의 형태가 있음. 쇼가올은 진저롤의 탈수화된 형태로서 신선 생강에는 소량 존재하나 생강을 건조 혹은 열처리 했을 때 그 함량이 증가되는 것으로 알려져 있음 (Jolad SF, Phytochemistry, 2004)

다. 생강의 주요 성분인 진저롤과 쇼가올 등의 물질들은 구조적으로 소수성이 높고 경구 흡수율이 낮으며 자극적인 향미를 가짐. 이러한 특성으로 인하여 생강을 직접 섭취하거나 다양한 가공식품의 소재로 사용하기에는 제한적임

라. 파라돌은 생강내 비방으로 존재하는 유효성분이며 우수한 항산화 및 항암효과를 가진 파라돌은 쇼가올로부터 간세포조직의 cytosol fraction 중의 효소에 의해 생성되는 체내대사체이며 장내 미생물에 의해 생물전환됨으로써 생성되는 대사체임. 파라돌은 쇼가올 대비 체내이용성이 높으며 매운맛이 없고 수용성이 높은 특성이 있어 식의약 소재로서 이용되기에 적합한 강점을 갖고 있음

마. 그러나 천연 상태의 생강 조직에 존재하는 유효성분은 함량이 극히 낮아 질병의 예방과 치료 효과를 기대하기 어려우므로 고부가가치의 식의약 소재 개발을 위해서는 파라돌 등 활성물질의 활성 최적화, 체내이용성 증진 및 대량생산 기술 개발이 필수적임

바. 생물을 활용하여 천연물 소재를 생물전환하면 원료의 화학적 프로파일에 큰 영향을 미쳐 궁극적으로 생리활성에도 큰 변화를 일으킨. 생물전환 기술 적용 시 천연물 소재로부터 다양한 형태의 대사산물이 생성되므로 적정 미생물의 선택과 생물전환 대사체 성분의 분석 및 동정, 유효성분의 생산 표준화 공정, 효능 검증은 통한 활성 대사체의 최적 구성비율 설정 등의 연구가 함께 진행되어야 함

사. 생물전환을 통해 생강의 유효 활성성분인 파라돌 대사체 생성 최적화 모델, 생산 표준화 기술 개발은 생강유래 유효성분의 체내 흡수와 체내이용성을 증진시켜 원료상태의 생강보다 뛰어난 생리활성을 갖는 신소재를 창출할 수 있을 것으로 판단됨

아. 따라서 본 연구과제에서는 뇌질환 개선 효능이 우수한 생강유래 생물전환 대사체인 파라돌 및 관련 대사체의 구성비율이 이상적인 조성물의 생산을 위한 표준화 기술을 개발하고 이들 생물전환 최적 활성 대사체 조성물의 효능 검증 및 임상시험을 통해 개별인정형 신소재와 응용 상품화 기술을 개발하고자 함

### 제 3절 연구개발 범위

#### 1. 생강유래 생물전환 대사체 소재의 생산 기술 개발 및 신소재의 임상적용 시험

가. 생강조직 내 선도화합물 증폭 표준화 공정 기술 개발

- (1) 열처리, 건조 등 물리적 처리방법 조건 확립 및 선도화합물 등 성분 분석
- (2) 생강조직 내 선도화합물 증폭 표준화 공정 기술 개발

나. 생강유래 생물전환 대사체 유도 미생물 선별 및 최적 대사체 조성비율 예측

- (1) 생물전환 대사체 유도 미생물 스크리닝, 우수 균주 선별  
: 다양한 종의 효모, 곰팡이 활용
- (2) 균주, 반응조건별 생물전환 대사체 구성물의 프로파일 분석, 동정(위탁)
- (3) 다변량통계분석기법을 이용한 생물전환 대사체 최적 조성비율 예측  
: 표준물질을 이용한 효능 평가를 통한 최적 대사체 조성비율 예측

다. 예측 최적 대사체 조성비율에 근접한 생물전환 대사체 후보물질군 생산, 선별

- (1) 예측 최적 대사체 조성비율에 근접한 생물전환 대사체 생산  
: 1차 후보물질군 5~10종 생산, 선정(세포모델 대상)  
: 2차 후보물질군 2~3종 생산, 선정(동물모델 대상)
- (2) 생물전환 대사체 구성물의 프로파일 분석, 동정(위탁)

라. 생물전환 대사체 소재의 생산조건 확립

- (1) 선별 미생물, 반응조건 등 생물전환 대사체 최적 반응조건 확립
- (2) 생물전환 대사체 구성물 프로파일 분석, 동정(위탁)
- (3) 생물전환 대사체 소재 생산조건 확립

- 나. 생물전환 대사체 소재 생산 표준화 공정 검토 및 대량생산 시스템 구축과 제품 시생산
  - (1) 생물전환 대사체 소재 생산조건, 공정 등 재검증
  - (2) 생물전환 대사체 소재 생산 표준화 공정 실정을 위한 test bed형 공정 설계 검토
  - (3) 생물전환 대사체 소재의 품질관리 기준규격 설정 지원
  - (4) 생물전환 대사체 소재의 양산화 시스템 구축
  - (5) 생물전환 대사체 소재 시생산

- 나. 생물전환 대사체 소재를 유효성분으로 함유하는 제품 개발
  - (1) 인지기능 개선 상승효과 조성물 배합비 설정
  - (2) 제형화 기술
  - (3) 시제품 제조

- 사. 생물전환 대사체 소재의 안전성, 유효성 평가를 위한 임상적용 시험
  - (1) 생물전환 대사체 소재의 유효성 평가
  - (2) 생물전환 대사체 소재의 안전성 평가

## 2. 생강유래 생물전환 대사체 소재의 효능 검증 및 작용 기전 연구

- 가. *In vitro*에서 생물전환 대사체 조성물의 인지기능 보호 효능 평가를 통한 최적 생물전환 대사체 소재 도출

- 나. *In vivo*에서 생물전환 대사체 소재의 단기 인지장애 개선 효능 평가

- 다. *In vitro*에서 1차년도 도출 효능 소재의 알츠하이머성 인지장애 개선 효능 평가를 통한 최적 생물전환 활성 대사체 조성물 검증

- 라. *In vivo*에서 1차년도 도출 효능 소재의 알츠하이머성 인지장애 개선 효능 평가를 통한 최적 생물전환 대사체 소재 검증

- 마. 전환 대사체 조성물 최적화 소재의 뇌행성 뇌질환 개선 효능 기전 연구

## 3. 생강유래 생물전환 대사체 소재의 생산 표준화공정 개발 및 신소재의 개별인정 신청 기반 연구

- 가. 생물전환 대사체 소재의 생산 표준화 공정 기술 개발 및 제품 시생산 지원

- 나. 생물전환 대사체 소재 개별인정 신청 기반 연구

## 2. 국내외 기술개발 현황

코드번호

D-04

### 제 1절 국내·외 기술개발 현황

#### 1. 국내 기술개발현황

가. 식품의약품안전처는 지난 해 건강기능식품 생산실적은 1조 8,230억원으로 '14년(1조 6,310억원)에 비해 11.8% 증가하였으며, 건강기능식품 생산은 '11년 이후 연평균 성장률 7.4%를 기록하며 지속적으로 성장하고 있다고 밝힘(식품의약품안전처)

#### 표 2. 건강기능식품 생산실적 현황('11~'15)

( '15.12.31. 기준, 출처: 식약처)

| 구 분         | 총 생산액(억원) | 총 생산량(톤) | 내수용     |        | 수출용     |        |
|-------------|-----------|----------|---------|--------|---------|--------|
|             |           |          | 생산액(억원) | 생산량(톤) | 생산액(억원) | 생산량(톤) |
| 2011        | 13,682    | 40,258   | 13,126  | 39,611 | 556     | 647    |
| 2012        | 14,091    | 34,599   | 13,507  | 33,735 | 584     | 864    |
| 2013        | 14,820    | 31,446   | 14,066  | 30,490 | 754     | 956    |
| 2014        | 16,310    | 30,545   | 15,640  | 29,500 | 670     | 1,045  |
| 2015        | 18,230    | 34,568   | 17,326  | 33,016 | 904     | 1,551  |
| 전년대비 성장률(%) | 11.8      | 13.2     | 10.8    | 11.9   | 34.9    | 48.4   |

나. 15년 국내 제조업 GDP의 전년 대비 성장률은 2.3%인데 비해 건강기능식품 생산은 11.8% 증가하여 고속 성장 중인 것으로 나타남(한국은행 경제통계시스템, 2016.7)

다. 15년 국내 건강기능식품 시장규모는 2조 3,291억원으로'14년(2조 52억원)에 비해 16.2%가 증가하였으며,'11년 이후 지속적으로 성장하고 함.

표 3. 건강기능식품 국내 시장규모('11~'15)

( '15.12.31. 기준, 출처: 식약처)

| 구분                        |             | 2011   | 2012   | 2013   | 2014   | 2015   |
|---------------------------|-------------|--------|--------|--------|--------|--------|
| 생산실적 (억원)                 |             | 13,682 | 14,091 | 14,820 | 16,310 | 18,230 |
|                           | 전년대비 성장률(%) | 28.2   | 3.0    | 5.2    | 10.1   | 11.8   |
| 내수용 (억원)                  |             | 13,126 | 13,507 | 14,066 | 15,640 | 17,326 |
|                           | 전년대비 성장률(%) | 28.5   | 2.9    | 4.1    | 11.2   | 10.8   |
| 수출용                       | 원화 기준 (억원)  | 556    | 584    | 754    | 670    | 904    |
|                           | 전년대비 성장률(%) | 20.9   | 5.0    | 29.1   | -11.1  | 34.9   |
|                           | 달러 기준 (만달러) | 5,021  | 5,189  | 6,888  | 6,361  | 7,989  |
|                           | 전년대비 성장률(%) | 26.3   | 3.3    | 32.7   | -7.7   | 25.6   |
| 수입 <sup>1)</sup>          | 원화 기준 (억원)  | 3,729  | 3,532  | 3,854  | 4,412  | 5,965  |
|                           | 전년대비 성장률(%) | 43.8   | -5.3   | 9.1    | 14.5   | 35.2   |
|                           | 달러 기준 (만달러) | 33,654 | 31,372 | 35,192 | 41,900 | 52,719 |
|                           | 전년대비 성장률(%) | 50.1   | -6.8   | 12.2   | 19.1   | 25.8   |
| 국내시장규모 <sup>2)</sup> (억원) |             | 16,855 | 17,039 | 17,920 | 20,052 | 23,291 |
|                           | 전년대비 성장률(%) | 31.6   | 1.1    | 5.2    | 11.9   | 16.2   |

라. 15년 건강기능식품 생산실적을 분석한 결과 주요 특징은 ▲건강기능식품 생산 지속적인 증가 ▲면역기능 개선 제품과 비타민 및 무기질 제품의 생산 큰 폭 상승 ▲다양해지는 개별인정형 제품 판매 등 임.

마. 15년 국내 제조업 GDP의 전년 대비 성장률은 2.3%인데 비해 건강기능식품 생산은 11.8% 증가하여 고속 성장 중인 것으로 나타남.

바. 품목별로는 홍삼제품의 생산실적이 6,943억원으로 전체 생산실적(1조 8,230억원)의 38.1%를 차지하여 가장 높은 점유율을 보였으나, '11년 이래 점유율이 점차 감소하고 있음.

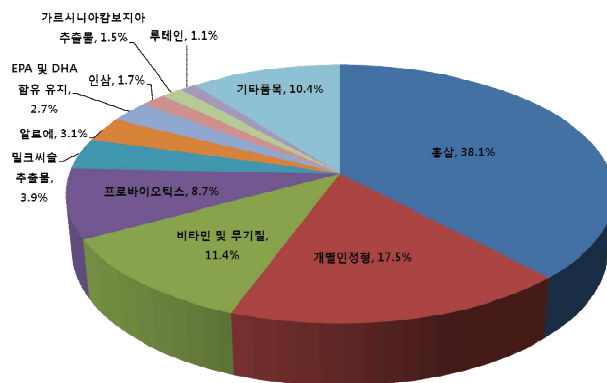


그림 2. 2015년 품목별 점유율

( '15.12.31. 기준, 출처: 식약처)

사. 지난 해 생산 실적 중 개별인정형 건강기능식품은 당귀혼합추출물(면역기능)이 714억 원으로 1위(22.3%)를 차지하였으며, 백수오등복합추출물(갱년기 여성건강) 380억(11.9%), 황기추출물등복합물(키 성장)266억원(8.3%), 헛개나무과병추출분말(간 건강) 255억원(8.0%), 미역 등 복합추출물(체지방 감소) 183억(5.7%) 등의 순임.

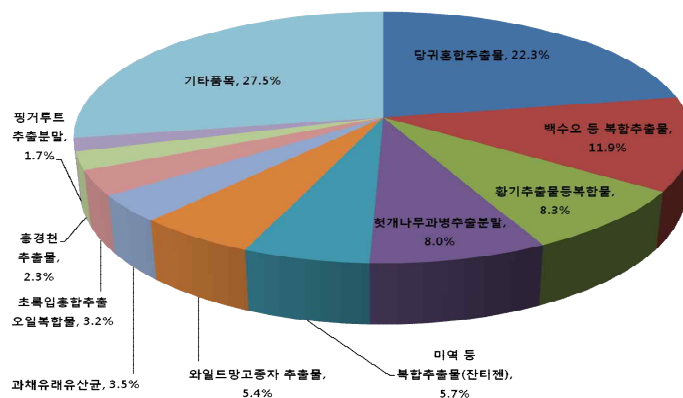


그림 3. 2015년 개별인정형 품목별 점유율

( '15.12.31. 기준, 출처: 식약처)

자. 건강기능식품 중 인지기능 관련 개별인정형 제품은 2016년 현재 생리활성기능 2등급으로 찬당귀추출분말과 대두포스파티딜세린 2종, 생리활성기능 3등급으로 도라지추출물, *L. helveticus* 발효물 2종이 등재되어있으며, 대두포스파티딜세린의 경우 (주)두산 글로벳 BI 외 3개 업체가 ‘인지능력 개선’을 통한 건강기능식품 개별인정을 획득하였으며 한국 외에 미국과 일본 등의 국가에서도 뇌기능 관련 기능성식품으로 등재되어 전세계적으로 5,000억달러가 넘는 시장을 형성하고 있어 국내에서 아직 시장이 확대되지 않은 ‘인지능력’ 개선 관련 식의약 소재의 가능성을 모인.

차. 인지기능 개선 기능성을 충족하는 개별인정형 건강기능식품 개발에도 불구하고 참당귀와 포스파티딜세린이라는 소재의 이미지가 소비자의 니즈(needs)를 충족시키지 못하고 있어 인지기능관련 새로운 신소재 개발 필요성이 요구됨.

카. 기능성관련 제품에서 이용되는 생강은 주성분으로써의 이용이 아닌 천가불의 형태로 다이어트 또는 관절건강을 보조하는 보령제약의 “제감환”이나 히벌라이프의 “히바플렉스 글루코사민”이 생산되고 있음. 국외현황 역시 건강보조제의 역할도써 장건강이나 염증과 관련하여 구성소재의 하나로 이용되는 실정임.

다. 또한 한미 및 한EU-FTA 체결에 따른 국내 농업의 산업적 보호를 위하여 1차 농산물 생산 외에 식의약 신소재 개발을 통하여 안정적 재매와 더불어 2차 산업을 활성화 시킬 수 있는 농산물유래 신소재 개발과 마케팅 강화가 절실히 요구되고 있음.

## 2. 국외 기술개발 현황

가. 세계적인 웰빙트렌드의 확산과 고령화의 영향으로 건강기능식품이 포함된 Nutrition industry의 시장규모는 최근 5년간 연평균 6% 수준의 고성장세를 지속하고 있음(보건산업브리프, 한국보건산업진흥원, 2012).

나. DataMonitor의 자료(2011년)에서 글로벌 식품산업의 최근 5년간 연평균 성장률이 3.7%임을 감안할 때, 건강기능식품 시장의 성장세는 상당히 높은 것이며, 이는 중국, 인도, 라틴아메리카 등 신흥 개발국의 수요가 크게 증가하는 추세이기 때문에 이들 국가들의 경제성장과 함께 높은 잠재력을 지닌 시장으로 평가됨.

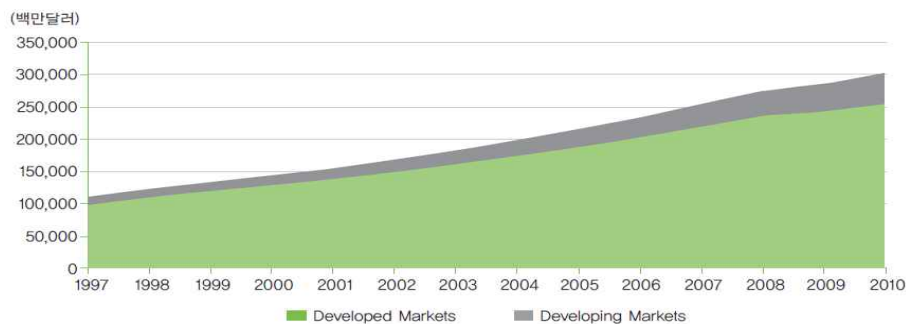


그림 4. 선진국(Developed markets)과 개발도상국(Developing markets)의 시장규모 추이 (Nutrition Business Journal, 2011. 선진국: 미국, 캐나다, 서유럽, 일본, 호주, 뉴질랜드)

다. 세계 건강기능식품시장은 2007~2011년 연평균 5.5%의 지속적인 성장을 하고 있으며, 2016년 세계 건강기능식품 시장 규모는 1200억 달러에 미칠 것으로 예상됨(보건산업브리프, 한국보건산업진흥원, 2012).

라. Datamonitor(2011)의 조사에 의하면, 소비자의 약 60%는 평소에 건강에 대한 관심이 매우 높았으며, 미국의 Food Marketing Institute의 조사에서는 소비자의 65%가 음식 섭취를 통해 건강 상태를 조절하는 특성이 있는 것으로 나타나고 있기 때문에 건강기능식품시장의 높은 성장세는 '건강지향적소비자'의 증가에 따라 지속·확대될 것으로 예상됨.

마. 미국의 경우 식이보충 건강 및 교육(The Dietary Supplement Health & Education Act)을 통하여 대두에 함유된 포스파티딜세린의 뇌기능 관련 노인의 치매(dementia)와 인지장애(Cognitive dysfunction)를 개선할 수 있다고 기능성을 인정하였으며 관련 제품이 시판중임.

바. 기능성식품시장의 기능성 유형별 분류를 보면 2006년 기준으로 소화기능성증진 제품



군이 가장 큰 시장을 형성하였으며, 심혈관기능 개선과 뇌질환 기능개선 제품군이 뒤를 있고 있음. 지역별 뇌기능개선제품군이 차지하는 비율은 아시아와 북미, 아프리카에서 상대적인 비율이 높게 나타남을 확인할 수 있었으며, 향후 이들 지역이 개발소재의 주요 다겟으로 예상됨.

표 4. 세계 기능성식품 시장(2004-2006년)

(억만불)

|                                     | 2004         | 2005         | 2006         | Total        |
|-------------------------------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| Functional - Digestive              | 166          | 252          | 656          | 1,074        |
| Functional - Cardiovascular         | 115          | 156          | 268          | 539          |
| Functional - Brain & Nervous System | 33           | 68           | 92           | 193          |
| Functional - Immune System          | 44           | 53           | 78           | 175          |
| Functional - Bone Health            | 17           | 23           | 89           | 129          |
| Functional - Beauty Benefits        | 16           | 24           | 46           | 86           |
| Functional - Other                  | 833          | 840          | 1,059        | 2,732        |
| <b>Total</b>                        | <b>1,224</b> | <b>1,416</b> | <b>2,288</b> | <b>4,928</b> |

(Global New Products Database, 2007)

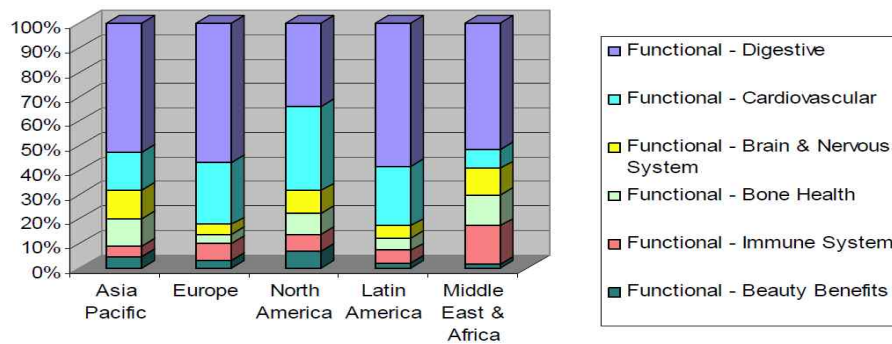


그림 5. 지역에 따른 기능성제품 유형(Future of functional food, IUFOST, 2008)

사. 인지기능 개선 소재에 대한 최근 동향

표 5. 2020년까지 주요 질환의 시장 전망(출처:FDA 분석 보고서)

(단위 : 백 만원)

| 구분    | 2005<br>(최근년도) | 2006<br>~2010 | 2011<br>~2015 | 2016<br>~2020 | 연평균 증가율       |               |
|-------|----------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|
|       |                |               |               |               | 2005<br>~2010 | 2010<br>~2020 |
| 노인성질환 | 6,073,084      | 11,530,128    | 22,430,473    | 36,756,493    | 32.5%         | 31.4%         |
| 뇌혈관질환 | 450,906        | 566,782       | 721,709       | 788,057       | 7.2%          | 0.5%          |
| 암질환   | 1,560,810      | 1,995,166     | 2,705,052     | 3,327,007     | 7.9%          | 3.6%          |
| 심혈관질환 | 892,365        | 1,164,824     | 1,630,641     | 2,078,124     | 8.6%          | 4.4%          |

### 3. 연구수행 내용 및 결과

|      |      |
|------|------|
| 코드번호 | D-05 |
|------|------|

#### 제 1절 생물전환을 위한 생강 조직내 선평화합물(6-shogaol) 증폭 화공정과 생물전환 대사체 유도 미생물 선별

##### 1. 재료

##### 가. 생물전환을 위한 생강조직 내 선평화합물 증폭화 공정방법

###### (1) 재료 및 시약

본 실험에 사용한 생강(*Zingiber officinale* Roscoe)은 2012년 충남 서산지역에서 재배, 생산된 생강을 서울 가락동 농수산물시장에서 구입하여 표면의 흙을 수세, 완전히 제거하여 사용하였다. 추출 및 분석에 사용된 시약은 모두 특급시약을 사용하였으며, 표준물질인 6-, 8-, 10-gingerol과 6-, 8-, 10-shogaol은 Chromadex사(USA)제품을 사용하였다.

###### (2) 가열처리를 통한 선평화합물 증폭 생강 제조

###### (가) 가열온도별 생강 전처리 시료

생강 조직내 선평화합물(6-shogaol) 함량을 높이기 위한 한가지 방법으로 가열온도를 달리하여 생강 시료를 제조하였다. 수세한 생강을 1 cm 이하로 세절하여 부직포망에 담아 85, 100, 120, 140℃의 온도도 정해진 시간동안 열을 가하였다. 85℃ 처리군은 85℃로 조성된 열풍건조기에서 24시간 열처리하였다. 100℃ 처리군은 세절 생강을 부직포망에 담아 찜통에 넣고 2시간 스팀으로 가열처리하였다. 120℃, 140℃ 처리군은 세절 생강을 부직포망에 담아 autoclave에 넣고 가열하여 해당온도에 도달 후 2시간 동안 가열처리하였다. 일정 시간동안 가열처리된 후 각각의 생강 시료는 25℃ 열풍건조기에서 냉각 및 건조하여 무게 변동이 없을 때까지 보관 후 100메쉬(149 μm) 크기로 분쇄하여 냉암소에 저장, 사용하였다.

###### (나) 가열시간별 생강 전처리 시료

가열하는 시간이 선평화합물 증폭에 미치는 영향을 파악하고자 세절 생강을 부직포망에 담아 120℃ 일정 온도에서 30, 90, 120, 240분간 각각의 시간별로 가열 후 25℃ 열풍건조기에서 냉각 및 건조하고 분쇄하여 사용하였다.

###### (다) 개방·밀폐식 가열 생강 전처리 시료

스팀을 이용한 가열 시 생강 조직과 수증기와의 접촉이 6 shogaol의 증폭에 미치는 영향을 파악하고자 개방식과 밀폐식 조건으로 나누어 시료를 가열처리하였다. 개방식은 세절 생강을 부직포망에 담아 120℃에서 4시간 스팀 처리하였고, 밀폐식은 외부 수증기가 생강조직에 침투하지 못하도록 수증기차단성을 가진 레도드트파우치 포장지에 생강을 담아 밀봉하

고 120°C에서 4시간 스티븐 처리한 다음 25°C 열풍건조기에서 각각 건조, 분쇄시켜 분석시료로 사용하였다.

한편 가열처리 시 원료 생강의 수분 상태에 따라 차이를 파악하고자 열풍건조한 분말 생강을 레도드드파우치 포장지에 담아 밀봉 후 120°C에서 4시간 가열처리 후 열풍건조, 분쇄시켜 비교하였다.

(라) 상압·진공 가열 생강 전처리 시료(공기 유·무 가열 생강 전처리 시료)

생강 가열 처리 시 밀폐용기 내부 조건에 따른 차이를 파악하고자 세질 생강을 25°C 열풍건조기에서 생강무게가 일정할 때까지 건조시킨 후 100 배위로 분쇄한 생강분말을 수증기 차단성을 가진 레도드드파우치 포장지에 담고 한 처리군은 상압상태, 다른 처리군은 진공상태로 각각 밀봉, 포장하여 85°C 열풍건조기에서 24시간 가열처리 후 분석시료로 사용하였다.

(3) 선도화합물 증폭 전처리 생강의 6-gingerol, 6-shogaol 분석

(가) 추출액 제조

가열처리 후 건조, 분쇄한 생강분말 시료의 6 gingerol, 6 shogaol 한량 분석을 위한 추출액은 초음파 추출기(Sonics & Materials Inc.)를 이용하여 추출하였다. 즉, 생강분말에 메탄올 100 ml를 가하여 추출기의 probe가 시료 혼합물에 잠기게 설치한 후 pulse (on:off) 20 : 10 초 간격으로 45°C 이하의 온도에서 20분 동안 70% 진폭(amplitude), 20 kHz 진동(frequency)으로 초음파 추출한 다음 Watman No.1로 걸압 여과하여 분석에 이용하였다.

(나) HPLC를 이용한 6 gingerol과 6 shogaol 한량 분석

앞서 추출한 추출액 중 생강의 지표성분인 6-gingerol과 6-shogaol을 정량분석하기 위하여 고성능 액체크로마토그래피(HPLC, High performance Liquid Chromatography, Jasco)을 이용하였다. 분석은 역상컬럼 Eclipse XDB-C<sub>18</sub>을 이용하였고 상세한 분석조건은 다음 표 6와 같다. 정량분석을 위하여 6-, 8-, 10-gingerol, 6-, 8-, 10-shogaol를 각각 10, 25, 50, 100, 250 µl 농도로 희석하여 표준곡선을 작성하였으며, 상관계수(R<sup>2</sup>) 0.99이상의 분석값을 채택하였다.

표 6. 생강추출액의 6-gingerol, 6-shogaol 분석을 위한 HPLC 조건

| Parameters | Conditions                               |    |    |    |    |    |
|------------|------------------------------------------|----|----|----|----|----|
| 컬럼         | Eclipse XDB C <sub>18</sub> (4.6×250 mm) |    |    |    |    |    |
| 흡광도 측정값    | 225 nm                                   |    |    |    |    |    |
| 주입 용량      | 20 µl                                    |    |    |    |    |    |
| 유속         | 1.0 ml/min                               |    |    |    |    |    |
| 이동상 조건     | 시간(분)                                    | 12 | 18 | 25 | 27 | 30 |
|            | Water(A)                                 | 35 | 20 | 20 | 55 | 55 |
|            | Acetonitrile(B)                          | 65 | 80 | 80 | 45 | 45 |

## 나. 생물전환 대사체 유도 미생물 선별 방법

### (1) 균주

미생물을 활용한 생강 구성성분 중  $\alpha$ ,  $\beta$ -불포화케톤(6-shogaol)의 환원(지방족수산화)을 통한 6-paradol 대사체 생성에 사용한 균주는 식약처 식품원재료 데이터베이스에 등록된 식용 가능한 균주를 대상으로 총 20종의 미생물을 실험에 사용하였다. 효모류는 *Saccharomyces* 속 3종, *Schizosaccharomyces pombe* 1종, *Candida utilis* 2종, 곰팡이류로는 *Aspergillus niger* 2종, *Aspergillus oryzae* 1종, 세균은 *Bacillus subtilis* 2종, *Bacillus coagulans* 1종, 유산균은 *Lactobacillus* 속 6종, *Streptococcus thermophilus* 1종, *Weissella korcensis* 1종을 사용하였다(표 7).

### (2) 미생물 배양조건

생육배지로 효모는 YEA(0.3% yeast extract, 0.3% malt extract, 0.5% peptone, 1% dextrose, 2% agar) 매지에 도달하여 26°C에서 2일, 곰팡이는 PDA(0.4% potato starch, 2% dextrose, 2% agar) 매지에서 26°C~30°C에서 3~5일, 세균은 TSA(pancreatin digest of casein 1.7%, papaic digest of soybean 0.3%, dextrose 0.25%, sodium chloride 0.5%, dipotassium phosphate 0.25%, 1.5% agar) 매지에서 30°C, 37°C에서 1일, 유산균은 MRS(proteose peptone No. 3 1%, beef extract 1%, yeast extract 0.5%, dextrose 2%, agar 1.5%) 매지에서 37°C, 2일 병판 배양하였다. 모든 균주는 실험에 사용하기 전 3회 이상 계대 배양하여 활성화시킨 후 사용하였다.

### (3) 생강추출액 제조

생강 조직 내 선폨화합물(6-shogaol) 증폭을 위해 신선생강을 120°C에서 4시간 가열처리 후 45°C에서 얼풍건조하고 분쇄한 생강분말 100 g에 중량대비 20배(w/w)의 70% EtOH을 첨가하여 초음파 추출구는 20 kHz에서 20분간 추출하였고, 열수 추출구는 환류냉각기를 부착하여 80°C에서 8시간 추출한 것을 각각 Watman No.1로 여과한 뒤 일정량으로 정용하였다. 이들 여과액을 회전식 진공 증발기(Rotary vacuum evaporator, cycla, Japan)를 사용하여 회전속도를 60rpm, 37°C에서 용매를 증발, 제거시켜 기질용 생강 추출액(7.5°brix)을 제조하였다.

### (4) 6-Paradol 합성 및 구조 동정

표준품 6-shogaol 150 mg(0.543 mmol)을 네탄올 5 ml에 녹인 후 10% palladium on charcoal 29 mg(0.027 mmol)을 넣고, 수소풍선을 이용한 수소기류하에서 1시간 교반하였다. TLC를 이용하여 반응의 완결을 확인한 후 반응용액을 celite 패드를 통과시켜 palladium을 제거하고 여액을 간압농축하였다. 남은 오일상의 불질을 실리카겔 컬럼 크로마토그래피를 통해서 분리, 정제하여 합성 6-paradol(142 mg, 94%) 표준품을 제조하였다. 합성된 6-paradol은 <sup>1</sup>H-NMR과 <sup>13</sup>C-NMR (Bruker, 600 MHz)을 이용하여 구조를 확인하였다.

표 7. 생물전환 대사체 유도 미생물 선발을 위한 효모, 곰팡이, 세균 종류

| Entry | 유산균                                                   | 효모                                               | 곰팡이                                      | 세균                                      |
|-------|-------------------------------------------------------|--------------------------------------------------|------------------------------------------|-----------------------------------------|
| 1     | <i>Lactobacillus plantarum</i><br>KCCM 11322          | <i>Candida utilis</i><br>KFRI 00911              | <i>Aspergillus oryzae</i><br>KCCM 12698  | <i>Bacillus subtilis</i><br>KCCM 11314  |
| 2     | <i>Lactobacillus casei</i><br>KCCM 12452              | <i>Candida utilis</i><br>KCCM 11245              | <i>Aspergillus niger</i><br>KFRI (01227) | <i>Bacillus subtilis</i><br>KFRI 00294  |
| 3     | <i>Lactobacillus acidophilus</i><br>KCCM 32820        | <i>Saccharomyces cerevisiae</i><br>KFRI 00147    | <i>Aspergillus niger</i><br>KCCM 60332   | <i>Bacillus coagulans</i><br>KCCM 11715 |
| 4     | <i>Lactobacillus brevis</i><br>KCCM 35464             | <i>Saccharomyces cerevisiae</i><br>KCCM 50757    |                                          |                                         |
| 5     | <i>Streptococcus thermophilus</i><br>KCCM 35496       | <i>Saccharomyces calshbergensis</i><br>KCTC 7233 |                                          |                                         |
| 6     | <i>Lactobacillus pentosus</i><br>KCCM 40997           | <i>Schizosaccharomyces pombe</i><br>KCCM 11527   |                                          |                                         |
| 7     | <i>Weissella korocensis</i><br>KCCM 41517             |                                                  |                                          |                                         |
| 8     | <i>Lactococcus lactis subsp. lactis</i><br>KCCM 41572 |                                                  |                                          |                                         |

(5) 생강유래 생물전환 대사체 6-*paradol* 생성 유도 미생물 선발

(가) 종 배양 및 본 배양액 제조

효모는 Y배지 5~10mL에 colony 1개를 접종한 다음 100 rpm shaking incubator (JSSI-100T, JSR, Korea)에서 26°C에서 24시간 진탕 배양하여 종 배양액을 제조하였다. 종 배양액 1mL당 10<sup>7</sup>개에 해당하도록 희석하여 test tube에 넣고 26°C에서 24시간 100 rpm 속도로 진탕 배양하여 본 배양액을 얻었다.

곰팡이는 0.85% 멸균 생리식염수를 이용하여 plate 표면에서 spore를 회수하고, 기즈를 이용하여 여과한 현탁액(5×10<sup>7</sup> spores/mL) 10 mL를 40 mL PDB 배지가 들어 있는 250 mL Erlenmeyer flask에 넣고 30°C, 100 rpm shaking incubator (JSSI-100T, JSR, Korea)에서 24시간 preincubation 시켜 종 배양액을 제조하였다. 종 배양액 10 mL을 피펫으로 취해 PDB 배지 90 mL가 들어 있는 250 mL Erlenmeyer flask에 재접종하여 동일조건으로 24시간 더 진탕 배양시켜 본 배양액을 제조하였다.

세균은 10 mL TSB배지에 colony 1개를 접종하고 37°C에서 100 rpm으로 24시간 진탕 배양한 뒤 10 mL을 피펫으로 취해 TSB배지 90 mL에 재접종하여 24시간 더 진탕 배양시켜 본

배양액을 얻었다. 유산균은 MRS 배지 10 mL에 colony 1개를 접종한 뒤 100 rpm shaking incubator에서 37°C에서 24시간 진탕 배양하여 종 배양액을 제조하였다. 종 배양액 mL 당 10<sup>6</sup>개 해당하도록 희석하여 test tube에 넣고 37°C에서 24시간 100 rpm 속도로 진탕 배양하여 본 배양액을 얻었다.

#### (나) 표준물질 6 Shogaol의 생물전환

100 mL Erlenmeyer flask에 4. *niger* 본 배양액 10 mL( $1 \times 10^6$  spores/mL)을 취하고 여기에 MeOH로 용해한 6 shogaol 표준물질(100 mg/mL) 10  $\mu$ L(1 mg shogaol)를 첨가하여 30°C에서 100 rpm 속도로 shaking incubator에서 진탕 배양하며 배양시간 경과에 따른 미생물 유도 대사체 생성을 조사하였다.

#### (다) 생강 추출액의 생물전환을 통한 우수 미생물 선정

곰팡이, 효모, 세균, 유산균 종류별로 각각의 본 배양액 8 mL씩을 Erlenmeyer flask에 취하여 넣고 앞서 배양 기질로 사용하고자 제조한 생강 추출액 2 mL(6-shogaol 농도 : 1.40 mg)을 첨가하여 효모류는 26°C 100 rpm, 곰팡이류는 30°C 100 rpm, 세균류는 37°C 100rpm, 유산균류는 37°C 100rpm 속도로 shaking incubator에서 24시간 진탕 배양하여 생강 추출액 내 6-shogaol로부터 유도되는 생물전환 대사체를 생성시켜 미생물을 선별하였다.

#### 다. 미생물 배양액내 생강유래 생물전환 대사체 분석

##### (1) 생물전환 대사체 6-paradol 추출

전체 배양액 10 mL에 동일한 양의 ethyl acetate를 넣고 강렬히 vortex 하고 8,000 rpm에서 15분 원심분리시킨 후 상등액은 취하고 침전부에는 다시 10 mL ethyl acetate를 넣고 동일조작으로 재추출하여 모은 상등액을 Centrifugal Evaporator(ScanSpeed 32, Alex Red Ltd, USA)를 이용하여 감압, 농축하였다.

##### (2) 생물전환 대사체 6-paradol 분석

상기 추출물에 3 mL methanol를 첨가, 완전히 용해시킨 다음 microfilter kit(0.45  $\mu$ m Watman)을 이용, 여과하여 vial에 담아 검액으로 사용하였다. HPLC 분석은 검액 20  $\mu$ L를 주입, 앞의 선도화합물 중독 생강의 6 shogaol 분석 조건에 따라 실시하였다. Standard 기준 물질인 6-shogaol은 각각 1  $\mu$ g/mL, 5  $\mu$ g/mL, 10  $\mu$ g/mL, 100  $\mu$ g/mL 농도, 6-paradol은 1  $\mu$ g/mL, 10  $\mu$ g/mL, 50  $\mu$ g/mL, 100  $\mu$ g/mL 농도로 표준곡선을 작성하였으며 상관계수( $R^2$ )는 모두 0.99이상의 수준이었다.

##### (3) 생물전환 대사체 프로파일 분석

생강 지표성분과 그 대사체를 분석하기 위해서 HPLC를 이용하였다. HPLC system은 electrospray ionization Q-TOF analyzer가 장착된 mass spectrometer를 사용하였다. 역상 컬럼은 pharoshell C<sub>18</sub> (2.1  $\times$  50 mm, 2.7  $\mu$ m, Agilent, USA)을 사용하였으며, 이동상은 0.1%

formic acid(용매 A)와 90% acetonitrile in 0.1% formic acid (용매 B)를 사용하여 유속은 0.2 mL/min로 다음과 같은 gradient 조건에서 분석하였다(표 8).

표 8. HPLC 분석을 위한 이동상 조성

| Time(min) | Solvent B (%) | Flow (mL/min) |
|-----------|---------------|---------------|
| 0         | 40            | 0.2           |
| 17        | 100           | 0.2           |
| 21        | 100           | 0.2           |
| 21.1      | 40            | 0.2           |
| 29        | 40            | 0.2           |

Mass spectrometry 조건으로 ionization은 electrospray ionization 방법을 이용하였으며 polarity mode는 positive mode 그리고 nebulizing gas 또는 nitrogen gas를 20 psi로 nebulizing 하였으며, drying gas는 10 L/min으로 dry temperature는 300°C를 사용하였다. 각 성분에 대한 precursor ion과 그에 대한 fragmentor 값은 다음의 표 9과 같다.

표 9. 6, 8, 10 Gingerol 및 6, 8, 10 shogaol의 precursorion과 fragmentor 값

| Compound    | Precursor ion | Fragmentor(V) |
|-------------|---------------|---------------|
| 6-Gingerol  | 277.1782      | 125           |
| 8-Gingerol  | 305.2093      | 125           |
| 10-Gingerol | 333.2421      | 125           |
| 6-Shogaol   | 277.1779      | 140           |
| 8-Shogaol   | 305.2089      | 140           |
| 10-Shogaol  | 333.2392      | 140           |

라. 다변량통계분석기법을 이용한 6-Paradol 생성 미생물 반응조건 설정

(1) 6-Paradol 생성 유도 최적화 실험설계

미생물 중 *Candida utilis*를 이용한 생강유래 생물전환 대사체 6-paradol의 최적 생성조건을 설정하고자 반응표면분석법(RSM)을 적용하였다. 기질농도( $\mu\text{g/ml}$ ,  $X_1$ ), 반응시간(min,  $X_2$ ), 균농도(CFU/g,  $X_3$ )을 독립변수로 설정하여 이를 각각 5단계(-1.68, -1, 0, 1, 1.68)로 부호화하여 중심합성계획(central composite design, CCD)에 따라 실험을 진행하였다(표 10). 실험군의 수는 3개의 요인변수가 5 수준을 갖도록 중심합성계획에 의해 17구간으로 설정하였고 종속변수는 6-shogaol( $Y_1$ )과 6-paradol( $Y_2$ )로 설정하였다.

*C. utilis*를 YM배지 20 ml에 colony 2개를 접종한 다음 100 rpm shaking incubator에서 26°C에서 24시간 진탕 배양하여 종 배양액을 제조하였다. 이를 각각 생리식염수를 이용하여 농도별로 희석하여 효모수를 측정하고 새로운 YM 배지에  $10^1$ ,  $10^2$ ,  $10^3$ ,  $10^4$ ,  $10^5$  CFU/g

이 되게 본 매양액을 만들어 24시간 매양하였다. 이를 test tube에 4 ml씩 분주하고 생강추출액을 각각 72.8, 100, 140, 180, 207.2 µg/ml 농도로 첨가하여 매양시간 60, 400, 900, 1400, 1740분에 각각 시료를 채취하였다. 매양액의 6-shogaol과 6-paradol 분석을 위한 전처리와 분석 방법은 앞과 동일한 방법으로 실시하였다.

표 10. 6-Paradol 생성 최적화를 위한 중앙복합계획에서의 독립변수의 값 및 실험구간

| Independent variables | Symbol | Levels |        |        |        |        |
|-----------------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
|                       |        | -1.68  | -1     | 0      | 1      | 1.68   |
| 기질농도(µg/ml)           | $V_1$  | 72.8   | 100    | 140    | 180    | 207.2  |
| 반응시간(min)             | $V_2$  | 60     | 400    | 900    | 1400   | 1740   |
| 균농도(CFU/g)            | $V_3$  | $10^1$ | $10^5$ | $10^9$ | $10^7$ | $10^8$ |

## (2) 통계분석

기질농도, 반응시간, 균농도에 따른 6-shogaol, 6-paradol의 특성은 Minitab program을 사용하여 반응표면회귀분석으로 앞서 언급한 것과 동일한 방법으로 통계처리하였다.

## 2. 실험결과

### 가. 가열처리 조건별 생강조직 내 6 gingerol, 6 shogaol 함량변화

그림 6은 순도 95%의 6-gingerol과 6-shogaol의 표준물질을 HPLC로 분석한 결과이다. 그림에서와 같이 6종의 표준품 모두 분리도(resolution)가 확보되었으며 retention time(RT) 6.77분대에서 6-gingerol peak가, retention time 12.73분대에서 6-shogaol의 peak가 각각 분리, 확인되었다. 그 외 gingerol 화합물 중 8-, 10-gingerol은 RT 11.48, 16.89분대에서, 8-, 10-shogaol은 18.25, 23.65분대에서 각각 분리되었다.

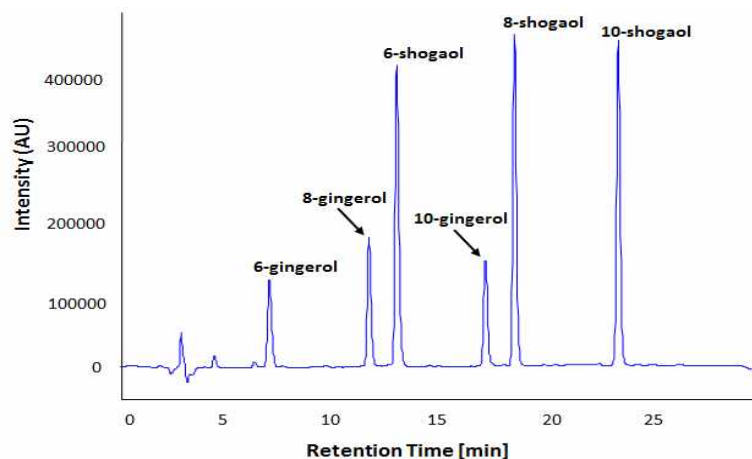


그림 6. 6-, 8-, 10-gingerol 및 6-, 8-, 10-shogaol 표준품의 크로마토그램



Gingerol은 신선생강에 있어서 가장 많은 신미성분이며 체인길이가 다른 몇 가지 gingerol이 생강에 존재하며 6-gingerol이 대표적이다. 그러나 gingerol은 구조상  $\beta$ -hydroxy keto group의 존재로 인해 열에 불안정하여 생강을 건조, 가열처리할 경우 탈수반응에 의해 gingerol의 hydroxyl기가 제거되며 4, 5 위치에 이중결합을 가지는 shogaol로 전환되며 6-shogaol이 가장 대표적인 것으로 알려져 있다.

(1) 가열온도별 6 gingerol, 6 shogaol 함량

그림 7은 신선생강을 온도를 달리하여 가열처리하여 6-gingerol과 6-shogaol의 함량 변화를 측정된 결과이다. 25°C에서 열풍건조한 생강(대조군)은 6 gingerol이 4.25 mg/g로 높은 함량을 보인 반면 6-shogaol 함량은 0.08 mg/g으로 함량이 낮았으며 이들 2 가지 성분의 합을 총량으로 하여 구성비를 살펴보면 6-gingerol이 98.2%, 6-shogaol은 1.8%였다. 그러나 신선생강을 가열처리할 경우 생강 조직 내 이들 구성성분의 함량은 큰 차이를 나타내어 가열 온도가 100, 120, 140°C로 상승함에 따라 대조군에서 높은 함량을 보인 6-gingerol은 2.95, 2.65, 1.23 mg/g으로 감소한 반면 6 shogaol 함량은 0.75 mg/g, 1.66 mg/g, 2.83 mg/g으로 증가하여 가열처리로 인해 생강 조직 내 gingerol이 shogaol로 전환됨을 알 수 있었다. 이들 결과를 바탕으로 가열온도별 6-shogaol의 증가폭을 대조군과 비교해 보면 85°C에서 24시간 열처리한 시료는 약 20배, 100, 120°C에서 2시간 열처리한 시료는 각각 8, 20 배, 140°C에서 90분 열처리한 생강은 35배 증가하는 것으로 나타나 6 gingerol의 6 shogaol로의 전환은 가열시 온도에 영향을 받으며 보다 높은 온도에서의 열처리는 shogaol로의 전환을 위해 유리함을 알 수 있었다(그림 8).

한편, 8, 10-gingerol은 생강분말에 1.1 mg/g, 1.7 mg/g 존재하였으며 120°C로 2시간 동안 열처리 시 8 gingerol의 경우 0.55 mg/g, 10 gingerol의 경우 1.22 mg/g으로 감소하였다. 8, 10-shogaol은 가열처리 후에 각각 0.04 mg/g, 0 mg/g에서 0.25 mg/g, 0.31 mg/g으로 증가하였다.

이는 100~140°C 실험조건에서 온도가 높을수록 생강 내 6, 8, 10-gingerol 성분이 각각 6, 8, 10-shogaol로 전환됨을 보여준다. 그러나, 고온에서는 shogaol의 polymerization 현상으로 인해 shogaol 양이 감소하는 것으로 알려져 있으므로 6-shogaol 증폭에 적합한 온도를 120°C로 설정하고 가열시간에 따른 영향을 평가하였다.

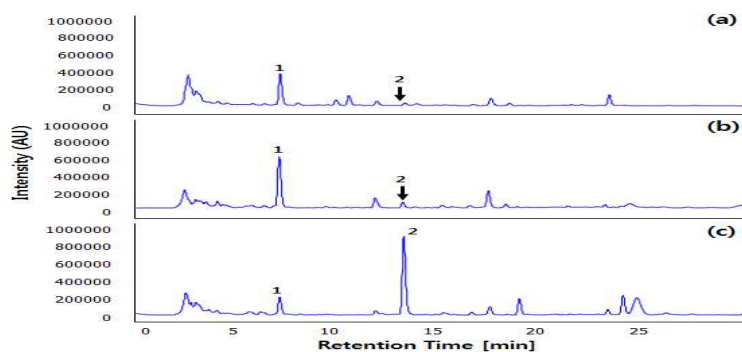


그림 7. 가열처리 생강의 6-gingerol, 6-shogaol의 크로마토그램  
(a) 신선생강 대조군, (b) 25°C 열풍건조군, (c) 120°C 가열군.

1: 6-gingerol, 2: 6-shogaol

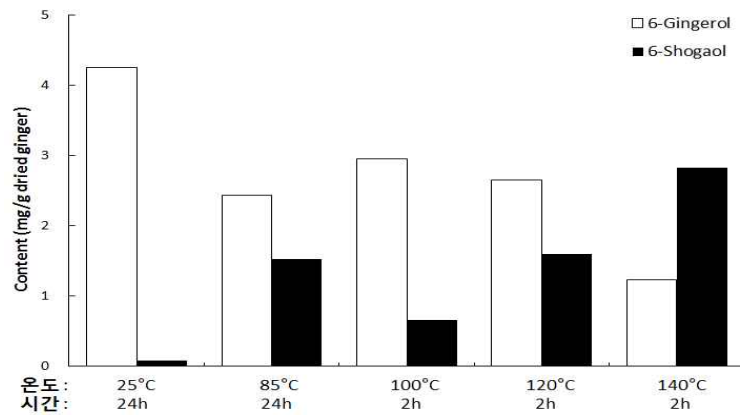


그림 8. 식용 온도와 시간을 달리한 생강의 6-gingerol, 6-shogaol의 함량 변화

(2) 가열시간별 6 gingerol, 6 shogaol 함량

가열처리 시간에 따른 생강 조직 내 6 gingerol, 6 shogaol 함량을 분석하여 시료 생강 건물 당 함량으로 환산하여 나타낸 결과는 그림 9와 같다. 120°C에서 생강을 30, 90, 120, 240 가열처리할 경우 6-gingerol 함량은 3.56, 2.87, 2.65, 1.37 mg/g으로 감소하였고, 반면 6-shogaol 함량은 0.62, 1.27, 1.60, 2.18 mg/g으로 증가하여 신선 세질생강을 120°C에서 240분 가열하면 생강 성분 중 6-gingerol의 약 68% 정도가 6-shogaol로 전환되고 그 함량은 27배 정도 증가하는 것으로 나타났다. 그러나 6 gingerol과 6 shogaol 2 가지 성분의 총량은 가열처리 2시간까지는 4.14~4.25 mg/g으로 비슷하나 240분 가열처리할 경우 3.55 mg/g으로 다른 처리구보다 낮았다. Gingerol은 retro-aldol reaction(zinzerone과 aliphatic aldehyde로 전환)과 dehydration(shogaol로 전환) 반응에 의해 구조변환 될 수 있으며 shogaol은 고온에서 polymerization 되는 것으로 알려져 있다. 그리므로 생강을 240분 가열처리할 경우 gingerol이 shogaol 외에 zinzerone 등의 물질도 전환되었거나 6 shogaol의 polymerization으로 인해 6 gingerol과 6 shogaol 총량이 감소된 것으로 생각된다.

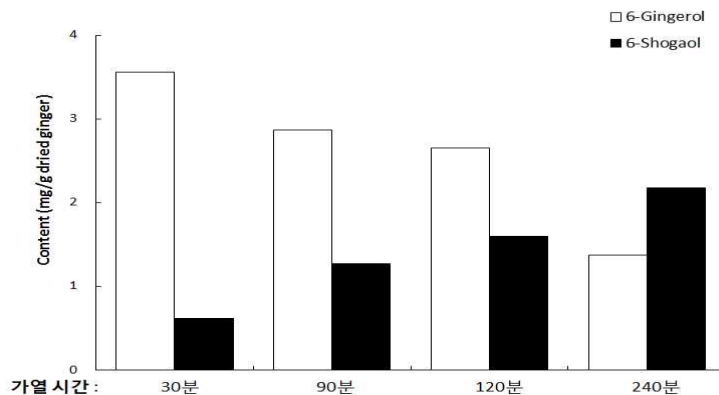


그림 9. 일정온도(120°C)에서 가열처리 시간에 따른 6 gingerol, 6 shogaol의 함량 변화

(3) 개방·밀폐식 가열 생강별 6-gingerol, 6-shogaol 함량

가열 처리시 생강의 밀폐용기 내 공기 유·무 조건에 따른 6-gingerol과 6-shogaol의 함량 차이를 조사하고자 25℃, 열풍건조 후 100네쉬로 분쇄한 생강분말을 수증기차단성을 가지는 테도르트파우치 포장지에 상압 및 감압(진공)상태로 밀봉, 포장하여 85℃에서 24시간 가열처리한 시료의 분석 결과는 그림 10와 같다. 6-Gingerol 함량이 2.39, 2.41 mg/g, 6-shogaol 함량이 1.34, 1.47 mg/g으로 용기내부의 상태에 따른 열처리 후 차이는 없는 것으로 나타났다.

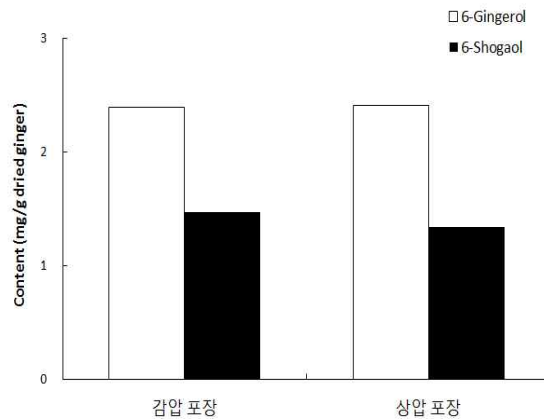


그림 10. 공기포출여부 포장에 따른 6-gingerol, 6-shogaol의 함량 변화

(4) 공기 유·무 가열 생강별 6 gingerol, 6 shogaol 함량

열처리시 가열기구 내에서 발생하는 수증기와 생강 조식과의 접촉에 따른 변화를 조사하고자 신선 세절생강을 채망에 담아 가열기구안에 넣고 120℃에서 4시간 열처리 중 발생하는 수증기와 접촉되게 처리한 개방식 생강과 외부 수증기차단성을 가지는 테도르트파우치로 포장하여 수증기와의 접촉을 차단한 밀폐식 생강의 6-gingerol과 6-shogaol 함량을 분석하여 시료 생강 건물 당 함량으로 환산하여 나타낸 결과는 그림 11과 같다. 120℃ 스티프로 생강을 가열처리할 경우 가열기구내에서 발생하는 수증기가 생강조식과 접촉하는 개방식 가열처리 방법이 수증기가 접촉하지 않는 밀폐식에 비해 6-gingerol과 6-shogaol 함량이 1.71, 2.49 mg/g으로 높았고 이들 2 가지 성분의 총 함량도 높았다. 열처리 직용시 생강의 수분 차이에 따른 변화를 조사하고자 생강 분말(수분 함량 89.29%)과 수분이 다량 존재하는 신선 세절생강을 시료로 사용하여 열처리 후 비교한 결과 생강분말을 사용한 것이 2.25 mg/g으로 6 shogaol 전환이 더 높은 것으로 나타났다.

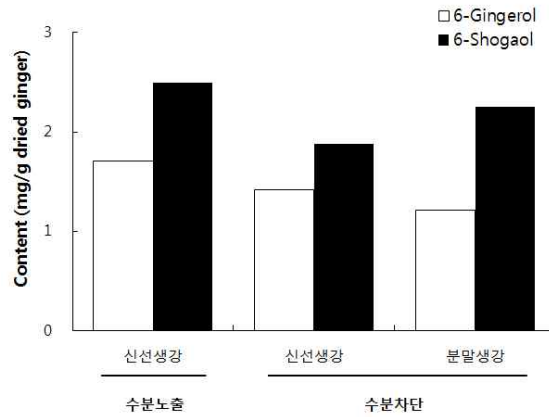


그림 11. 열처리시 외부 수분접촉유무에 따른 6-gingerol, 6-shogaol의 함량 변화

이상의 적용 온도, 시간 및 가열처리 횟수에 따른 6-shogaol 생성 결과를 종합하여 보면 적용 온도와 시간이 생강 조직 내 6-shogaol의 함량을 증폭시키는데 핵심적인 인자로 보이며 6 gingerol과 6 shogaol 총량과 6 shogaol 증폭율, 공정 단순화 및 에너지 비용 등을 감안하여 120°C에서 4시간 열처리를 6-shogaol 함량 증진의 최적조건으로 설정하였다.

#### 나. 생강유래 생물전환 대사체 6-paradol 생성 유도 미생물 선발

##### (1) 합성 6-paradol 표준품의 구조 동정

합성한 6 paradol의 <sup>1</sup>H NMR(그림 12)과 <sup>13</sup>C NMR(그림 13)을 이용한 구조 동정 결과는 다음과 같다. <sup>1</sup>H NMR (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 6.83 (d, J=8.4, 1H), 0.69 - 0.63 (m, 2H), 5.50 (s, 1H), 3.87 (s, 3H), 2.82 (t, J = 7.2, 2H), 2.69 (t, J = 7.2, 2H), 2.37 (t, J = 7.8, 2H) 1.58 - 1.53 (m, 2H), 1.30 - 1.28 (m, 8H) 0.88 (t, J = 7.2, 3H) MS (ESI) m/z 277 [M]<sup>+</sup>였다.

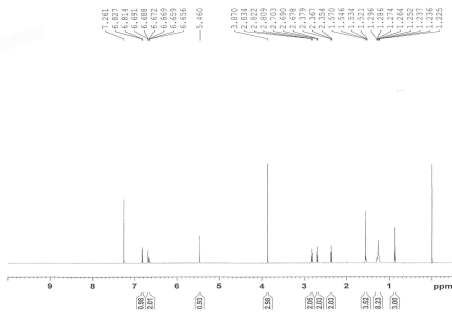


그림 12. 6-Paradol의 <sup>1</sup>H-NMR spectrum

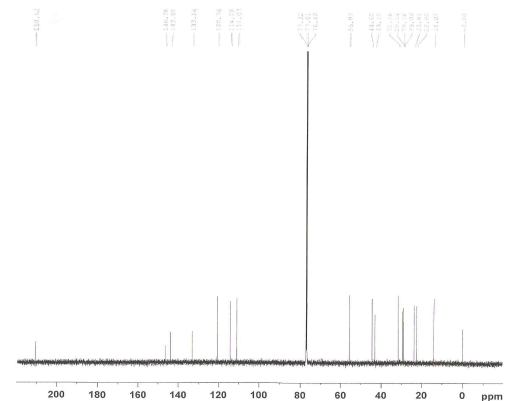


그림 13. 6-Paradol의 <sup>13</sup>C-NMR spectrum

합성 6 paradol 표준물질(순도 94%)을 HPLC로 분석한 결과는 그림 14와 같다. 6 shogaol side chain의  $\alpha$ ,  $\beta$  불포화케톤이 포화케톤으로 환원된 대사체인 6 paradol은 retention time 15.07분에서 분리되었다.

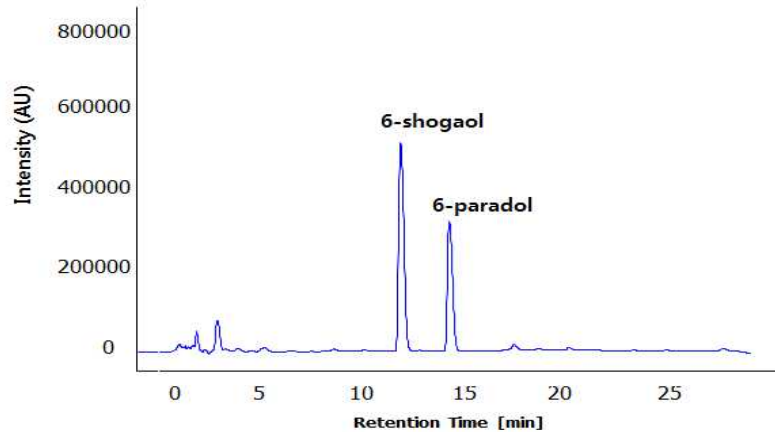


그림 14. 표준 6-paradol의 HPLC 크로마토그램

(2) 표준물질 6-shogaol 이용 예비 생물전환

(가) 표준물질 6-shogaol 생물전환

6-Shogaol은 혐기성 곰팡이류에 의해 대사되어 side chain의  $\alpha$ ,  $\beta$ -불포화케톤 부위가 환원되어 6-paradol과 관련 대사체로 전환된다. 또한, 흑곡균인 *A. niger*에 의한 6-shogaol 생물전환 대사체 (6-shogaol side chain의  $\omega$ -oxidation된 대사체와 carbonyl 환원된 대사체) 생성이 알려져 있다. 따라서 *A. niger*에 의해 6-shogaol 대사의 중간 형태로 6-paradol이 존재할 것으로 예상되어 생강의 생물전환 실험에 앞서 표준물질 6-shogaol를 기질로 하여 미생물 *A. niger*에 의한 생물전환 실험을 수행하였다.

표준물질 6-shogaol이 미생물적 생물전환 대사체로 전환되는지를 알아보기 위해 대조구는 곰팡이 본 배양액 10 ml에 1 mg 농도의 6-shogaol 표준물질만 넣고, 실험구는 같은 배지로 *A. niger*를 배양시킨 본 배양액 10 ml에 동일농도의 표준물질을 첨가, 일정시간 배양시킨 후 배양액내에 생성된 대사체 6-paradol을 분석하였다.

대조구(a)는 24시간 배양 후에도 6 shogaol peak만 분리되었고 6 shogaol의 함량도 초기와 동일하였다. 실험구(b)의 경우 1시간 incubation 후 배양액에 축적되는 대사산물을 확인한 결과 앞서 6-paradol로 확인된 15.7min에서 새로운 peak가 분리, 확인되었다. 배양시간이 2, 4시간으로 경과함에 따라 새로 형성된 peak의 크기가 증가하는 반면 6-shogaol peak는 감소하여 배양 6시간 경과시 새로 형성된 6-paradol peak가 가장 높았다. 생물전환을 통한 6 shogaol peak의 변화추이는 배양 후 10시간 까지 계속해서 감소하는 경향을 보였고 6 paradol peak는 6시간 배양액에서 생성된 것을 확인하였으나 10시간 배양액에서는 함량이 오히려 감소하였다(그림 15).

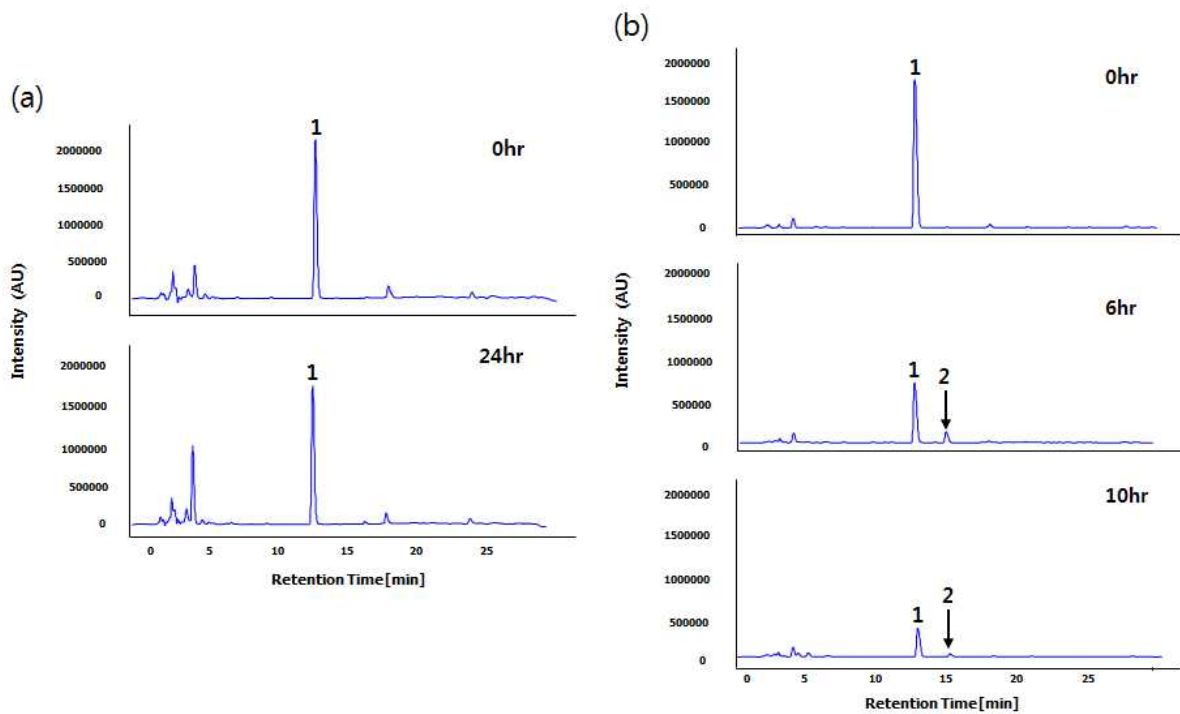


그림 15. 표준물 6 shogaol을 이용한 배양액 내 생물전환 대사체 생산 및 조성물 분석  
(a) 대조군, (b) 1. *niger* 생물전환군, 1: 6-shogaol, 2: 6-paradol

6-Shogaol의 미생물에 의한 생물전환 time course를 알아보기 위해 표준 6-shogaol을 1. *niger*로 10시간 배양시키며 시간별로 생성되는 6-paradol 함량을 측정 한 결과는 표 11와 같다. 먼저 0시간 배양액의 6 shogaol 함량을 측정 한 결과 82  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 실험 초기 본 배양액에 첨가한 농도(1000  $\mu\text{g}$ ) 대비 82% 정도가 본 실험에서 배양액 내 6-paradol 추출을 위해 사용한 ethyl acetate 2회 추출공정에 의해 회수되는 것으로 나타났다. 그 후 배양액 내 6-shogaol 함량은 배양시간이 경과함에 따라 지속적으로 감소하여 배양 6시간 경과시 59%, 배양 10시간에는 18%가 잔존하였다. 반면 1. *niger*에 의한 대사도 6-shogaol에서 전환된 6-paradol 함량은 서서히 증가하여 배양 6시간에 22  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 가장 함량이 높아 배양액 내 6-paradol 구성비는 41%였다. 그러나 10시간으로 배양시간이 길어질 경우 6-shogaol과 6-paradol 모두 함량이 감소하여 2가지 성분의 합이 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 가장 낮았다. 이는 미생물에 의한 6-shogaol의 생물전환으로 생성되는 대사체 중 6-paradol의 경우 일정 배양시간까지는 생성 양이 지속적으로 증가하나 배양시간이 일정 시간 이상으로 길어질 경우 새로이 생성된 6-paradol 또한 다른 대사체로 전환됨에 따라 그 함량이 감소하는 것으로 보인다.

6 Shogaol은 구조상으로 볼 때 미생물에 의해 대사 가능한 부위가 세 곳(vanillyl ring moiety의 산화, side chain 말단의  $\omega$ -oxidation,  $\alpha$ ,  $\beta$  unsaturated ketone의 환원)이 존재하며 미생물에 노출 시 이중결합의 환원이 carbonyl 환원을 우선하는 것으로 알려져 있다. 또한, 1. *niger*에 의한 6-shogaol의 생물전환 대사체는 33시간 배양 시 1-(4'-hydroxy-3'-methoxyphenyl)-decan-10-ol-3-one과 1-(4'-hydroxy-3'-methoxyphenyl)-decan-3,

10-diol이 생성되며 7일간 배양 시 side chain의  $\beta$ -oxidation을 통해 더 분해되어 6-(4'-Hydroxy 3'-methoxyphenyl) 4 hydroxy hexanoic acid와 homo vanillic acid가 생성되는 것으로 알려져 있다. 따라서, 생장을 이용한 생물전환 실험에서 6-shogaol의 6-paradol로의 생물전환은 side chain의 환원(double bond hydrogenation)반응에 적합한 미생물 선정 및 미생물에 의한 적정 반응시간을 설정하는 것이 중요할 것으로 결론지었다.

표 11. 표준품 6 shogaol의 반응시간별 생물전환 대사체 6 paradol 생성 변화 ( $\mu\text{g/mL}$ )

| 구성성분      | 반응시간(시간) |    |    |    |    |    |
|-----------|----------|----|----|----|----|----|
|           | 0        | 1  | 2  | 4  | 6  | 10 |
| 6-Shogaol | 82       | 59 | 54 | 40 | 32 | 15 |
| 6-Paradol | -        | 10 | 12 | 17 | 22 | 7  |
| Total     | 82       | 69 | 66 | 57 | 54 | 22 |

(나) 표준품 6-shogaol 생물전환 대사체 프로파일 분석

표준물질 6 shogaol를 기질로 하여 미생물 4. *niger*로 배양시킨 배양액의 생물전환 대사체 프로파일을 분석한 결과는 그림 16과 같다. 6 Paradol을 포함하여 총 4가지의 대사체가 생성되었다. 6 Shogaol에서 reduction된 대사체인 6 paradol과 SM-1의 대사체가 생성되었고 이 reduction 대사체에서 hydroxylation이 되면서 생성된 대사체(SM-2)와 reduction이 두 군데에서 일어나며 hydroxylation 된 대사체인 SM-3가 생성되는 것을 관찰하였다. 6-Shogaol 표준품을 이용한 대사체 프로파일의 주요 대사 경로는 reduction과 hydroxylation인 것으로 예상된다.

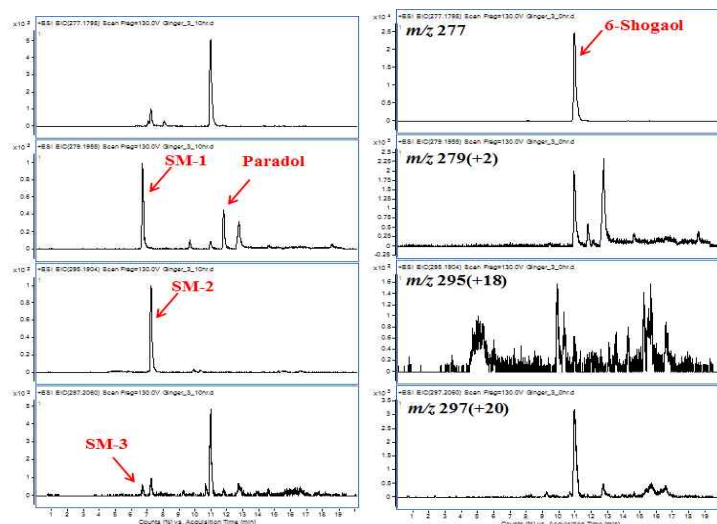


그림 16. 6-Shogaol 표준품의 *Aspergillus niger*에 의한 생물전환 대사체 프로파일

6 Shogaol은 reduction이 되면서 6 paradol이나 SM 1의 형태로 대사된 후 hydroxylation된 것을 관찰하였다.

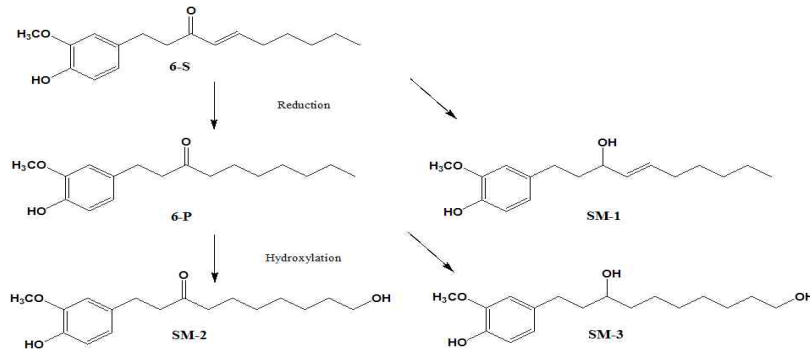


그림 17. 6-Shogaol 표준물의 *Aspergillus niger*에 의한 생물전환 대사 예상 pathway

### (3) 생강유래 생물전환 대사체 6-paradol 생성 유도 미생물 선발

미생물에 의한 생물전환시 매양액내에 축적되는 대사체 중 6-paradol 대사체 생성이 우수한 균주를 선발하고자 식품에 이용 가능한 유산균 8 종, 효모 6종, 세균 3종, 곰팡이 3종 등 총 20여종의 미생물을 대상으로 균주별 종 매양액에 생강추출액을 기질로 첨가하여 각각 24시간 배양 후 축적되는 6-paradol의 함량을 HPLC로 분석하였다(표 12).

유산균의 경우 8종의 균주 중 *Lactobacillus plantarum*과 *Lactobacillus pentosus* 2종만이 배양 24시간 후에 6-paradol이 각각 19.9 µg/ml, 14.1 µg/ml 생성되었다. 나머지 6종의 유산균에서는 6-shogaol에서 6-paradol로 전환되지 않았다. *Lactobacillus plantarum*과 *Lactobacillus pentosus*의 경우도 24시간 시간 배양 후 6-shogaol 대비 6-paradol 비율이 각각 19%, 13% 정도도 6-paradol 생성 유도 균주로서는 적합하지 않은 것으로 보인다.

한편, *Lactobacillus brevis*와 *Streptococcus thermophilus* 균주의 경우 배양 24시간 후 6-paradol이 생성되지 않았음에도 6-shogaol 함량은 초기 첨가 농도에 비해 크게 감소하는 것으로 나타났다. 본 결과에는 나타내지 않았으나 capsaicin을 internal standard로 이용한 결과에 따르면 각 균주별 FA 추출과정에 따른 생강 유효성분의 변화는 크지 않았으므로 *Lactobacillus brevis*와 *Streptococcus thermophilus* 두 균주에서 6 shogaol의 감소는 균주 내에 6 shogaol이 일정부분 존재하고 있거나 다른 종류의 대사체로 전환되었기 때문으로 생각된다.

효모류의 경우 테스트한 6종의 균주 중 *Saccharomyces cerevisiac* KCCM50757을 제외한 5종의 균주에서 6-shogaol 함량은 감소하고 6-paradol 함량은 증가하는 경향을 보였다. *Candida utilis* KCCM11245, *Candida utilis* KFR100911, *Saccharomyces cerevisiac* KFR100147, *Saccharomyces carlsbergensis*, *Schizosaccharomyces pombe* 균주는 24시간 배양 후 각각 71.5, 85.0, 29.5, 55.1, 27.5 µg/mL의 6 paradol을 생성하였다. 특히, *Candida utilis* KFR100911의 경우 배양 24시간 시점에서 6-shogaol 대비 6-paradol 비율이 약 99%로써 6-shogaol 환원능이 우수한 균주로 생각되었다.



세균은 *Bacillus subtilis* 2종과 *Bacillus coagulans* 두 종의 균주를 이용하여 생강 생물전환 실험을 수행하였다. 그 결과 *Bacillus subtilis* KCCM11314, *Bacillus subtilis* KFRI00294만이 24시간 배양 후에 51.4, 25.1 µg/ml의 6-paradol을 생성하였다.

곰팡이의 경우 *Aspergillus oryzae* (KCCM 12698)와 *Aspergillus niger* (KCCM 60332), *Aspergillus niger* (KFRI 01227) 3 종의 균주 중 *Aspergillus niger* (KCCM 60332), *Aspergillus niger* (KFRI 01227)에서만 6-paradol 전환이 확인되었다. *Aspergillus niger* (KCCM 60332)와 *Aspergillus niger* (KFRI 01227)는 24시간 배양 후 19.2, 73.8 µg/ml의 6-paradol이 생성되었다.

위의 결과를 토대로 식물원재료로 등록되어 식분에 이용 가능한 유산균 8종, 효모 6종, 세균 3종, 곰팡이 3종 등 총 20종의 미생물로부터 6종 [*Candida utilis* (KFRI 00911), *Saccharomyces cerevisiae* (KFRI 00147), *Saccharomyces carlsbergensis* (KCTC 7233), *Schizosaccharomyces pombe* (KCTC 11527), *Bacillus subtilis* (KCCM 11314), *Aspergillus niger* (KFRI01227)]의 6-paradol 생물전환 유도 우수 균주를 선발하였다.

표 12. 생강유래 생물전환 대사체 6 paradol 생성 유도 미생물 선발

| 미생물                                                 | 6-Shogaol<br>(µg/ml.) | 6-Paradol<br>(µg/ml.) |
|-----------------------------------------------------|-----------------------|-----------------------|
| <i>Lactobacillus plantarum</i> (KCCM 11322)         | 86.9                  | 19.9                  |
| <i>Lactobacillus casei</i> (KCCM 12452)             | 106.1                 | 0                     |
| <i>Lactobacillus pentosus</i> (KCCM 40997)          | 97.8                  | 14.1                  |
| <i>Lactococcus lactis subs. Lactis</i> (KCCM 41572) | 97.4                  | 0                     |
| <i>Weissella koreensis</i> (KCCM 41517)             | 94.4                  | 0                     |
| <i>Lactobacillus acidophilus</i> (KCCM 32820)       | 112.8                 | 0                     |
| <i>Lactobacillus brevis</i> (KCCM 35464)            | 41.1                  | 0                     |
| <i>Streptococcus thermophilus</i> (KCCM 35496)      | 38.6                  | 0                     |
| <i>Candida utilis</i> (KCCM 11245)                  | 1.5                   | 71.5                  |
| <i>Candida utilis</i> (KFRI 00911)                  | 0.7                   | 85.0                  |
| <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (KCCM 50757)        | 70.2                  | 5.4                   |
| <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (KFRI 00147)        | 36.9                  | 29.5                  |
| <i>Saccharomyces carlsbergensis</i> (KCTC 7233)     | 20.5                  | 55.1                  |
| <i>Schizosaccharomyces pombe</i> (KCCM 11527)       | 54.0                  | 27.5                  |
| <i>Bacillus subtilis</i> (KCCM 11314)               | 109.2                 | 51.4                  |
| <i>Bacillus subtilis</i> (KFRI 00294)               | 55.5                  | 25.1                  |
| <i>Bacillus coagulans</i> (KCCM 11715)              | 75.3                  | 0                     |
| <i>Aspergillus oryzae</i> (KCCM 12698)              | 54.0                  | 0                     |
| <i>Aspergillus niger</i> (KFRI 01227)               | 22.6                  | 73.8                  |
| <i>Aspergillus niger</i> (KCCM 60332)               | 29.1                  | 19.2                  |

(4) 반응시간별 생강유래 생물전환 대사체 6-paradol 조성비율 분석

*C. utilis*, *S. carlsbergensis*, *S. pombe*, *A. niger*, *B. subtilis*를 대상으로 생강 추출물을 기질로 생물전환에 의한 6-paradol 대사체 생성능이 우수한 균주를 선발하고자 반응 시간별 6-paradol 생성량을 모니터링하였다.

(가) *C. utilis*에 의한 배양액내 생물전환 대사체 6 paradol 생성 변화

먼저 *C. utilis* 본 배양액에 기질용 생강추출물을 첨가한 직후 배양액을 ethyl acetate로 추출 처리하여 분석한 결과 6-shogaol 함량은 108.9 µg/ml이었다. 반응 12시간 경과 후 배양액내 6-shogaol 함량은 5.5 µg/ml로 감소한 반면 초기 배양액에서는 검출되지 않았으나 기질로 사용한 생강추출물에 존재하는 6 shogaol의 α, β 불포화케톤 부위가 환원되어 생성된 6 paradol이 97.8 µg/ml이었다. 이는 반응초기 배양액내 6 shogaol 측정치를 기준으로 할 때 배양액내 6 shogaol의 약 90% 생물전환된 것으로 나타나 *C. utilis*는 생강 유래 6-shogaol을 빠르게 6-paradol로 생물전환 시키는 환원능이 우수한 균주로 예상되었다. 또한 12시간 배양액에서 측정된 6-shogaol과 6-paradol 2가지 성분의 함량을 합한 값을 총량으로 하면 *C. utilis*로 12시간 배양한 배양액에는 6-paradol이 95% 정도를 차지하는 것으로 추측할 수 있다. 48시간 반응 배양액의 6 paradol 함량이 99.0 µg/ml로 나타나 *C. utilis*는 6 shogaol을 6 paradol로 100% 생물전환 후 다른 대사체로 더 이상 전환되지 않고 유지됨을 확인하였다.

한편 *C. utilis*의 경우 생강유래 6-shogaol을 반응 12시간에 90% 정도 6-paradol로 전환시키는 것으로 나타나 본 결과에는 나타나지 않았으나 반응초기 6-paradol의 변화를 재확인한 결과, 3시간 반응시 배양액내 6-paradol 비율이 34%, 6시간에 60%, 9시간에는 81%까지 전환됨을 확인하였다(그림 18).

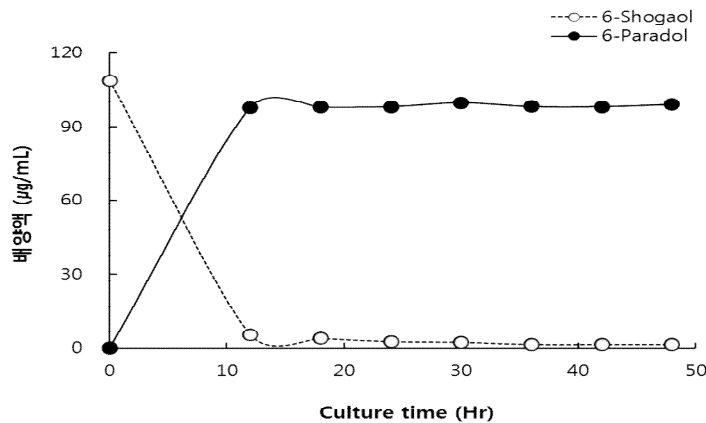


그림 18. *C. utilis*의 반응시간별 생물전환 대사체 6-paradol 변화.

(나) *S. carlsbergensis*에 의한 배양액내 생물전환 대사체 6-paradol 생성 변화

*S. carlsbergensis*의 경우 12시간 반응 후 6-shogaol 함량이 33.2 µg/ml로 감소하고 6 paradol 함량이 63.7 µg/ml로 증가하여 반응 0시간 배양액에서 측정된 초기 6 shogaol 함량(102.5 µg/ml)을 기준으로 하면 6-paradol로의 전환율이 66%였다. 반응시간 30시간에는

6-paradol 생성량이 92.0  $\mu\text{g/ml}$ 까지 증가하여 초기 배양액내 6-shogaol 측정치 대비 90% 정도 생분전환되었다. *S. carlsbergensis* 또한 *C. utilis*와 같이 초기 배양액에 첨가된 생강 유래 6-shogaol을 거의 100% 생분전환 대사체 6-paradol로 전환시키며 반응 48시간 경과 후 까지 전환된 6-paradol 함량을 그대로 유지시키는 것으로 나타났다(그림 19).

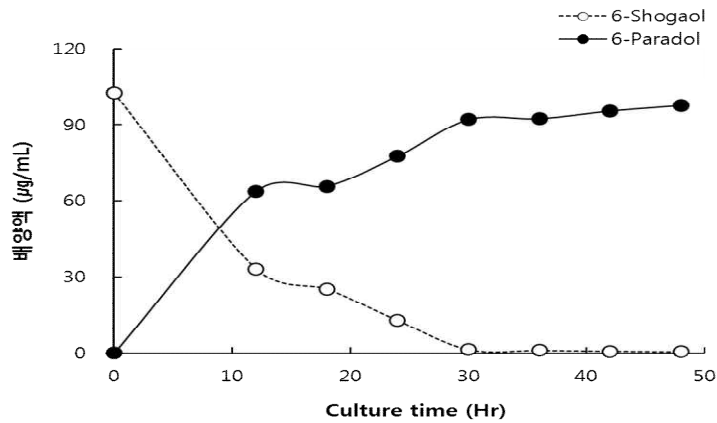


그림 19. *S. carlsbergensis*의 반응시간별 생분전환 대사체 6-paradol 변화.

(다) *S. pombe*에 의한 반응시간별 생분전환 대사체 6-paradol 생성 변화

*S. pombe*의 경우 앞의 2가지 균주에 비해 훨씬 느리게 6-paradol이 생성되어 반응 12시간에 6-shogaol이 75.2  $\mu\text{g/ml}$ , 6-paradol이 27.9  $\mu\text{g/ml}$ 로 초기 배양액내 6-shogaol 측정치(110.5  $\mu\text{g/ml}$ ) 대비 30% 정도가 생분전환되었다. 그 후 배양시간이 경과함에 따라 배양액내 6-paradol 함량이 서서히 증가하여 반응 42시간에 6-paradol 함량이 69.2  $\mu\text{g/ml}$ 까지 상승하여 초기 배양액내 6-shogaol 측정치 대비 63% 정도가 생분전환되었다. 이때 42시간 배양된 배양액에서 측정된 6-shogaol과 6-paradol 성분의 함량만을 합한 값(92.5  $\mu\text{g/ml}$ )을 총량으로 할 경우 배양액내 6-paradol 구성비는 75% 정도였다. *S. pombe*의 경우 반응시간이 48시간보다 더 길어질 경우 배양액내 초기 6-shogaol이 완전히 생분전환될 것으로 예상된다(그림 20).

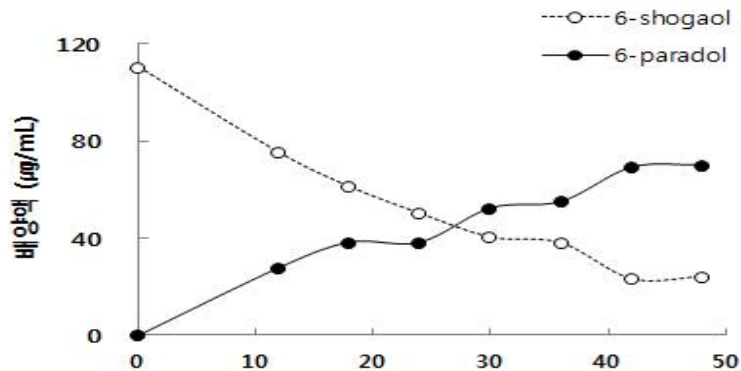


그림 20. *S. pombe*의 반응시간별 생분전환 대사체 6-paradol 변화.

(라) *A. niger*에 의한 반응시간별 생물전환 대사체 6-paradol 생성 변화

그림 21은 반응 12시간에 6-paradol이 8.3  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 낮으나 그 후부터 증가하여 반응 36시간에는 6-paradol 함량이 110.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 초기 배양액에서 측정된 6-shogaol 함량(110.7  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 대비 97% 생물전환된 것을 확인하였다. 그러나 *A. niger* 균주의 경우에 있어서도 반응 시간이 42, 48시간으로 경과함에 따라 6-paradol 함량이 77, 66.3  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 계속 감소하여 생물전환된 6-paradol의 60% 정도만이 잔존하였다.

*A. niger* 또한 일정 배양시간까지는 6-shogaol의 생물전환으로 6-paradol의 생성량을 지속적으로 증가시키나 배양시간이 일정시간 이상으로 길어질 경우 6-paradol이 다른 대사체로의 전환이 이루어지는 특징을 가지는 균주임을 알 수 있었다. *A. niger* 균주는 반응시간이 길어질 경우 6 paradol이 생성되는 반응인  $\alpha$ ,  $\beta$  unsaturated ketone 환원 외에  $\omega$ -oxidation, carbonyl 환원반응도 일어날 수 있는 것으로 보고되어 있다.

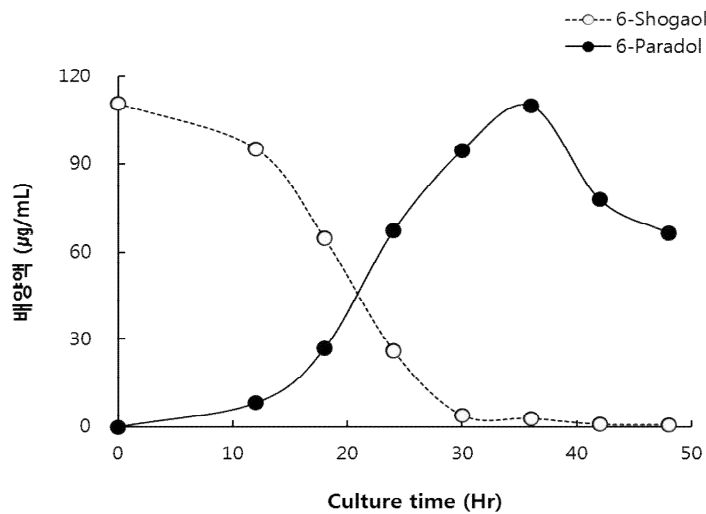


그림 21. *A. niger*의 반응시간별 생물전환 대사체 6-paradol 변화.

(마) *B. subtilis*에 의한 반응시간별 생물전환 대사체 6 paradol 생성 변화

*B. subtilis*는 반응 12시간에 6 paradol 함량이 23.4  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 증가하여 반응 0시간 배양액의 6-shogaol 측정치(109.8  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 대비 20% 정도 생물전환된 후 배양시간이 경과하여도 더 이상 6-paradol로의 생물전환이 이루어지지 않고 그 함량을 유지하는 것으로 나타나 *B. subtilis*는 본 연구에 적합하지 않은 균으로 판단되었다(그림 22).

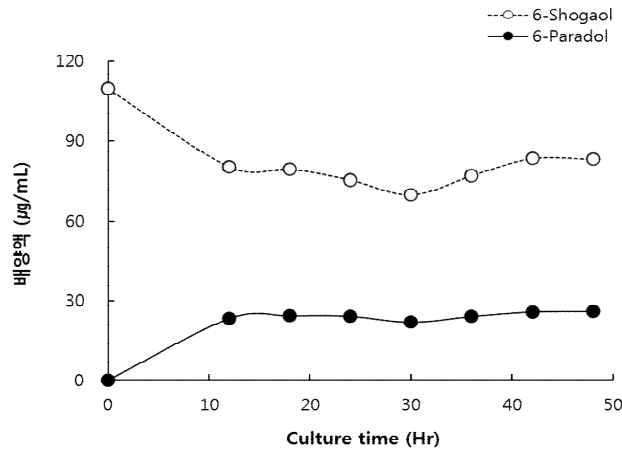


그림 22. *B. subtilis*의 반응시간별 생물전환 대사체 6-paradol 변화.

이상의 5종의 미생물을 이용한 생강유래 6-paradol 대사체 생성량 변화 결과를 살펴보면 *C. utilis*, *S. carlsbergensis*, *S. pombe*는 반응액내의 6-shogaol을 빠른 시간에 6-paradol로 생물전환시키고 생물전환된 6-paradol을 지속적으로 유지할 수 있는 균주로 예상되었다. 그러나 *A. niger*는 6-shogaol을 6-paradol로 생물전환시키나 반응시간이 길어지면 그 함량이 감소하므로 미생물 종류별 최적 균 농도, 반응시간, 기질농도 등에 대한 반응 조건 재검증 실험을 통한 소재화 공정 설정이 필요한 것으로 판단되었다.

#### 다. 다변량통계분석기법을 이용한 6-Paradol 생성 우수 미생물 최적 반응조건 설정

기존 보고에 따르면 미생물에 의한  $\alpha$ ,  $\beta$ -unsaturated ketone의 환원과  $\omega$ -oxidation은 배양시간과 밀접한 연관이 있다. 따라서, 생강 내 6 shogaol 성분이 6 paradol로 전환을 위해서는 미생물의 최적 균농도, 기질농도, 배양시간 설정이 중요한 요소로 생각되어 6-paradol 생성능이 우수한 *C. utilis*을 대상으로 균주 농도, 기질농도, 반응시간을 변수로 하여 반응표면분석법을 통해 6-paradol 전환을 위한 최적 반응조건 설정 실험을 수행하였다.

##### (1) *C. utilis*를 이용한 6 paradol 생성 최적 조건 설정

기질농도( $\mu\text{g/mL}$ ,  $X_1$ )와 반응시간(분,  $X_2$ ), 균농도(CFU/g) 세가지 요인을 독립변수로 설정하고 *C. utilis*에 적용하여 미생물적 생물전환시 요인에 영향을 받는 종속변수  $Y_1$ (6-shogaol)와  $Y_2$ (6-paradol)의 값을 표 13에 나타내었다. 초기 균농도  $10^6$  CFU/g, 기질농도 140  $\mu\text{g/mL}$ . 배양액의 6-paradol 생성량을 살펴보면 배양시간 60분에서는 생성되지 않았으나 900분에서는 68.8  $\mu\text{g/mL}$ , 1740분일 때는 92.8  $\mu\text{g/mL}$ 이 생성되어 배양시간이 길어질수록 6 paradol 생성량이 증가하였다. 반면 기질농도(140  $\mu\text{g/mL}$ )와 배양시간(900분)을 고정하고 균농도를 달리하여 배양할 경우 6-paradol 생성량은  $10^1$  CFU/g일 때 29.8  $\mu\text{g/mL}$ ,  $10^4$  CFU/g일 때 92.8  $\mu\text{g/mL}$ 으로 균농도가 높을수록 생성량이 높았다. 초기 균농도를  $10^6$  CFU/g으로 동일하게 적용하고 기질농도를 72.8, 140, 207.2  $\mu\text{g/mL}$ 로 달리하여 900분 배양할 경우 생성 6 paradol 함량은 각각 54.9, 68.8, 16.9  $\mu\text{g/mL}$ 로 나타났다.

표 13. 독립변수에 대한 조건 최적화에 있어서의 종속변수의 반응 및 중앙 복합 계획

| Exp. No. | Coded levels of variable |          |          | Responses |       |
|----------|--------------------------|----------|----------|-----------|-------|
|          | X1                       | X2       | X3       | Y1        | Y2    |
| 1        | -1                       | -1       | -1       | 65.8      | 19.2  |
| 2        | 1                        | -1       | -1       | 136.4     | 0     |
| 3        | -1                       | 1        | -1       | 0.7       | 76.1  |
| 4        | 1                        | 1        | -1       | 39.7      | 94.4  |
| 5        | -1                       | -1       | 1        | 25.9      | 50.4  |
| 6        | 1                        | -1       | 1        | 120.1     | 9.2   |
| 7        | -1                       | 1        | 1        | 0         | 33.9  |
| 8        | 1                        | 1        | 1        | 6.8       | 121.2 |
| 9        | -1.68179                 | 0        | 0        | 0         | 54.9  |
| 10       | 1.68179                  | 0        | 0        | 144.2     | 16.9  |
| 11       | 0                        | -1.68179 | 0        | 118.3     | 0     |
| 12       | 0                        | 1.68179  | 0        | 7.8       | 92.8  |
| 13       | 0                        | 0        | -1.68179 | 82.4      | 29.8  |
| 14       | 0                        | 0        | 1.68179  | 0         | 102.6 |
| 15       | 0                        | 0        | 0        | 43.7      | 58.7  |
| 16       | 0                        | 0        | 0        | 39.3      | 72.7  |
| 17       | 0                        | 0        | 0        | 35.2      | 68.8  |

X<sub>1</sub>: 기질농도(μg/ml), X<sub>2</sub>: 반응시간(min), X<sub>3</sub>: 균농도(CFU/g), Y<sub>1</sub>: 6-shogaol(μg/ml), Y<sub>2</sub>: 6-paradol(μg/ml.)

표 14는 Y<sub>1</sub>(6-shogaol 함량)와 Y<sub>2</sub>(6-paradol 함량)에 대한 반응표면모델식(response surface model equation)을 나타낸 것으로 결정계수(R<sup>2</sup>)가 각각 0.996, 0.998으로 유의성은 1% 이내에서 인정되었다.

표 14. 6-Paradol 생성 최적화를 위한 반응표면 모델

| Responses      | Quadratic polynomial model                                                                                                                                                                                                                                                                                                 | R <sup>2</sup> | p-value |
|----------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------|---------|
| Y <sub>1</sub> | Y <sub>1</sub> =40.0789+33.1785X <sub>1</sub> -35.6479X <sub>2</sub> -16.7227X <sub>3</sub> -9.2226X <sub>1</sub> <sup>2</sup> -6.0229X <sub>2</sub> <sup>2</sup><br>-1.7022X <sub>3</sub> <sup>2</sup> - 14.8750X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> -1.0750 X <sub>1</sub> X <sub>3</sub> + 2.8250X <sub>2</sub> X <sub>3</sub> | 0.996          | 0.001   |
| Y <sub>2</sub> | Y <sub>2</sub> =66.5983 + 1.3699X <sub>1</sub> -29.4995X <sub>2</sub> -10.7956X <sub>3</sub> + 10.4360X <sub>1</sub> <sup>2</sup> + 6.7237X <sub>2</sub> <sup>2</sup><br>-0.2766X <sub>3</sub> <sup>2</sup> -0.75X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> -5.875X <sub>1</sub> X <sub>3</sub> -6.975X <sub>2</sub> X <sub>3</sub>     | 0.998          | 0.001   |

Y<sub>1</sub> : 6-shogaol μg/ml., Y<sub>2</sub> : 6-paradol μg/ml.,

그림 23은 기질농도( $\mu\text{g/ml}$ ,  $X_1$ ), 반응시간(min,  $X_2$ ), 균농도(CFU/g)에 따른 6-paradol 생성량을 그래프로 나타낸 결과이다. 기질농도( $X_1$ )와 반응시간( $X_2$ )의 상관관계를 살펴보면 기질농도가 높고 반응시간이 길어질수록 6 paradol 함량은 증가하나 기질농도 207  $\mu\text{g/mL}$  이상에서는 감소하는 경향을 보였다. 기질농도( $X_1$ )와 균농도( $X_3$ )의 상관관계에서는 동일 기질농도에서 균농도가 증가할수록 6-paradol이 증가하였다. 반응시간( $X_2$ )과 균농도( $X_3$ )의 상관관계를 살펴보면 균농도가 증가하고 반응시간이 길어질수록 6-paradol 생성량은 증가되었다.

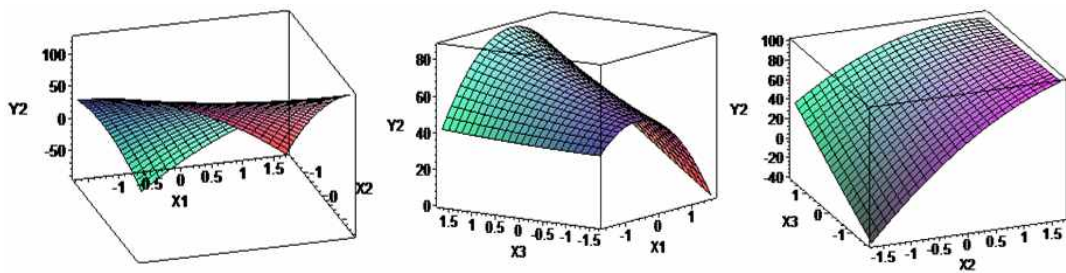


그림 23. 생물전환을 위한 생강 기질농도, 반응시간, *Candida utilis* 균 농도 변화에 따른 6-Paradol 함량 변화 반응표면그래프

$X_1$ : 기질농도( $\mu\text{g/ml}$ ),  $X_2$ : 반응시간(분),  $X_3$ : 균농도(CFU/g),  $Y_2$ : 6-paradol( $\mu\text{g/ml}$ )

## (2) 최적 생물전환 조건 예측

표 14의 결과 값을 기준으로 중심합성법을 실시하여 그림 24에 나타내었다. 6-paradol로의 생물전환을 위한 반응변수 최적 값의 경우 기질농도( $X_1$ )는 204  $\mu\text{g/ml}$ , 반응시간( $X_2$ ) 1653분, 균농도( $X_3$ )  $10^{7.1}$  CFU/g 일 때 종속변수  $Y_2$ (6-paradol  $\mu\text{g/ml}$ )의 값은 124.77  $\mu\text{g/ml}$ 을 나타내었으며 만족도는 0.99이었다. 이상의 결과로써 6-shogaol의 6-paradol로의 생물전환율은 0%에서 100%까지 가능하며 이를 토대로 향후 인지기능 개선을 위한 6 shogaol과 6-paradol의 생물전환 대사계 최적비 설정을 위한 기초자료로써 활용하였다.

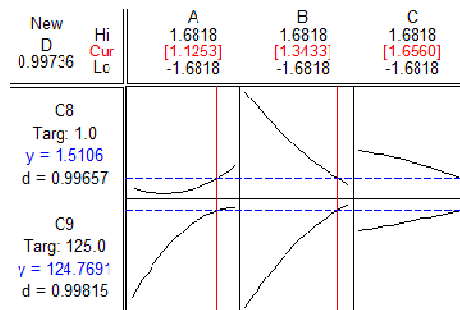


그림 24. MINITAB을 이용한 최적 생물전환 조건 도출

## 제 2절 생물전환 대사체 최적 조성비율 예측 및 최적 대사체 조성 비율에 근접하는 후보물질군 생산

### 1. 재료 및 방법

#### 가. 미생물 배양조건

생육매지도 효모는 YM(0.3% yeast extract, 0.3% malt extract, 0.5% peptone, 1% dextrose, 2% agar) 배지에 도달하여 26°C에서 2일, 곰팡이는 PDA(0.4% potato starch, 2% dextrose, 2% agar) 배지에서 26°C~30°C에서 3~5 병판 배양하였다. 모든 균주는 실험에 사용하기 전 3회 이상 계대 배양하여 활성화시킨 후 사용하였다.

#### 나. 생강추출액 제조

생강 조식 내 선도화합물(6-shogaol) 증폭을 위해 신선생강을 120°C에서 4시간 가열처리 후 45°C에서 열풍건조하고 분쇄한 생강분말 100 g에 중량대미 20배(w/v)의 70% EtOH을 첨가하여 초음파 추출구는 20 kHz에서 20분간 추출하였고, 열수 추출구는 환류냉각기를 부착하여 80°C에서 8시간 추출한 것을 각각 Watman No.1로 여과한 뒤 일정량으로 정용하였다. 이들 여과액을 회전식 진공 증발기(Rotary vacuum evaporator, eyela, Japan)를 사용하여 회전속도를 60rpm, 37°C에서 용매를 증발, 제기시커 기질용 생강 추출액(7.5°brix)을 제조하였다.

#### 다. 예측 대사체 조성비 근접 생물전환 대사체 후보물질군 생산

효모는 YM배지 5~10ml에 colony 1개를 접종한 다음 100 rpm shaking incubator (JSSI-100T, JSR, Korea)에서 26°C에서 24시간 진탕 배양하여 종 배양액을 제조하였다. 종 배양액 ml당 107개에 해당하도록 희석하여 test tube에 넣고 26°C에서 24시간 100 rpm 속도로 진탕 배양하여 본 배양액을 얻었다.

곰팡이는 0.85% 멸균 생리식염수를 이용하여 plate 표면에서 spore를 회수하고, 기즈를 이용하여 여과한 현탁액( $5 \times 10^7$  spores/ml) 10 ml를 40 ml PDB 배지가 들어 있는 250 ml Erlenmeyer flask에 넣고 30°C, 100 rpm shaking incubator (JSSI-100T, JSR, Korea)에서 24시간 preincubation시켜 종 배양액을 제조하였다. 종 배양액 10 ml을 피펫으로 취해 PDB 배지 90 ml가 들어 있는 250 ml Erlenmeyer flask에 재접종하여 동일조건으로 24시간 더 진탕 배양시켜 본 배양액을 제조하였다.

#### (1) 예측 대사체 조성비 근접 생물전환 대사체 후보물질군 배양액제조

효모와 곰팡이류 모두 본 배양액 28 ml에 생강추출물(6-shogaol 농도 12.64 mg/g) 7 ml을 넣고 생물전환 배양액 제조와 동일한 조건으로 진탕배양 하였다. 진탕배양 12시간 이후부터 배양액의 6-shogaol과 6-paradol 함량을 측정하여 예측 대사체 조성비율(6-shogaol:6-paradol=4:6~2:8)에 근접하는 생물전환 후보물질군 배양액을 얻었다. 이때



매양액의 6-paradol 함량을 측정을 위해 사용한 간이 분석방법은 매양액 700  $\mu$ l에 700  $\mu$ l의 ethyl acetate를 넣고 1분간 vortexing하고 원심분리기(Mero-12, Hanil, Korea)로 1분 동안 원심분리한 뒤 회전감압농축기를 이용하여 30분간 감압 농축하여 200  $\mu$ l 메탄올에 녹인 후 HPLC로 6-shogaol과 6-paradol 대사체 함량을 측정하였다.

(2) 예측 대사체 조성비 근접 생물전환 후보물질군 소재 제조

예측 대사체 조성비에 근접하는 생물전환 후보물질군 매양액 24 ml에 100% 주성 56 ml을 넣고 5분간 vortexing하고 다시 10분간 sonication 추출 후 8,000 rpm에서 15분간 원심 분리하였다. 상등액을 취해 0.2  $\mu$ m syringe도 여과하고 완전 농축한 후 증류수를 첨가하여 현탁시키고 다시 농축, 동결건조하여 예측 대사체 조성비 근접 생물전환 대사체 후보물질군 소재를 제조하였다. 이들 시료는 HPLC를 이용하여 대사체 조성비를 재확인한 다음 협동기관에 *in vitro* 실험을 위한 시료로 제공하였다.

(3) 예측 대사체 조성비 근접 생물전환 후보물질군의 프로파일 분석

(가) 생물전환 대사체 추출을 위한 전처리

생물전환 후보물질군 소재를 100 mg/mL 농도로 methanol에 용해시킨 후, 5분 동안 vortex 하고 10분간 초음파 추출한 후, 1 mg/mL의 농도로 희석하였다. 5분 동안 13,200 rpm으로 원심분리하여 상등액을 취하여 500  $\mu$ g/mL의 농도로 희석 후 HPLC에 5  $\mu$ l 주입하여 분석하였다.

(나) 생물전환 후보물질군의 프로파일 분석

생물전환 후보물질군 소재의 주요성분과 생성된 대사체를 분석하기 위해서 LC/Q-TOF/MS를 이용하였다. LC/MS system은 Agilent 1260 HPLC system이 장착된 Agilent 6530 electrospray ionization Q-TOF mass spectrometer를 사용하였다. 역상 컬럼은 pharoshell C<sub>18</sub> (2.1  $\times$ 150 mm, 2.7 $\mu$ m, Agilent, USA)을 사용하였으며, 이동상은 0.1% formic acid(용매 A)와 90% acetonitrile in 0.1% formic acid (용매 B)를 사용하여 유속은 0.3 mL/min로 다음과 같은 gradient 조건에서 분석하였다(표 15).

표 15. HPLC 분석을 위한 이동상 조성

| Time(min) | Solvent B (%) | Flow (ml/min) |
|-----------|---------------|---------------|
| 0         | 10            | 0.3           |
| 15        | 100           | 0.3           |
| 17        | 100           | 0.3           |
| 17.1      | 10            | 0.3           |
| 25        | 10            | 0.3           |

Mass spectrometry 조건으로 ionization은 electrospray ionization 방법을 이용하였으며 polarity mode는 positive mode 그리고 nebulizing gas 또는 nitrogen gas를 20 psi로 nebulizing 하였으며, drying gas는 10 L/min으로 dry temperature는 300°C를 사용하였다.

(다) 생물전환 대사체 정량 분석

생물전환 후보물질군 소재의 대사체 함량을 분석하기 위해 LC/MS를 이용하였다. LC/MS system은 Waters Acquity UPLC에 장착된 waters acquity TQD을 사용하였다. 역상 컬럼은 BEH C<sub>18</sub> (2.1 ×100 mm, 1.7 μm, Waters, Ireland)을 사용하였으며, 이동상은 0.1% formic acid(용매 A)와 90% acetonitrile in 0.1% formic acid (용매 B)를 사용하여 유속은 0.3 mL/min로 다음과 같은 gradient 조건에서 분석하였다(표 16).

표 16. UPLC 분석을 위한 이동상 조성

| Time(min) | Solvent B (%) | Flow (mL/min) |
|-----------|---------------|---------------|
| 0         | 90            | 0.3           |
| 1         | 10            | 0.3           |
| 4         | 10            | 0.3           |
| 4.1       | 90            | 0.3           |
| 6         | 90            | 0.3           |

표준품 6, 8, 10-gingerol과 6, 8, 10-shogaol 그리고 6-paradol을 다음과 같은 MS 조건으로 분석하여 정량하였고 각 성분에 대한 MS 조건은 표 17과 같다.

표 17. UPLC 분석을 위한 MS 조건

| Compound    | Precursor ion / product ion | Collision(V) |
|-------------|-----------------------------|--------------|
| 6-gingerol  | 295.3 / 277.2               | 3            |
| 6-shogaol   | 277.3 / 137.1               | 8            |
| 6-paradol   | 279.3 / 137.0               | 6            |
| 8-gingerol  | 323.3 / 305.2               | 4            |
| 8-shogaol   | 305.3 / 137.0               | 9            |
| 8-paradol   | 307.4 / 137.0               | 6            |
| 10-gingerol | 351.3 / 333.3               | 4            |
| 10-shogaol  | 333.3 / 137.1               | 9            |
| 10-paradol  | 335.0 / 137.0               | 6            |

(라) 주성분 분석

생물전환 후보물질군 소재의 생물전환 대사체 프로파일 패턴은 다변량 통계분석법인 주성분 분석을 이용하여 분석하였다. 통계적 검정은 IBM SPSS Statistics 21.0 통계 프로그램

텐의 주성분 분석(Principal Component Analysis)을 통하여 수행하였다. 통계분석을 위하여 gingerol, shogaol, paradol을 포함하여 LC-QTOF-MS 분석을 통해 검출된 총 46개의 대사체를 변수로 선정하여 미생물 및 반응처리 시간이 각기 다른 총 12개의 시료에 대하여 대사체 프로파일 패턴을 분석하였다. 선정된 46개의 대사체 피크에 대하여 피크면적을 산출한 후 이를 log 변환하여 주성분 분석을 위한 dataset으로 사용하였다. 추출된 주성분의 고유값이 0.7이상이고, 누적값이 75% 이상일 때 성분 요인으로서 유효한 것으로 간주하였다.

라. 예측 대사체 조성비에 근접하는 생물전환 대사체 후보물질군의 *in vitro* 효능평가

(1) 생물전환 후보물질군의 amyloid beta ( $A\beta$ ) oligomer와 plaque 독성에 대한 보호 효능 평가

PLL이 코팅된 96 well plates에 rat primary hippocampal cell을  $1 \times 10^5$  cells/mL 농도로 분주하였다. 분주된 cell들은 5%  $CO_2$ , 섭씨 37°C, Neurobasal media에서 배양시켰다. 배양한지 7일 쯤에 생물전환 후보물질군 12종을 각각 25, 50  $\mu\text{g/ml}$  농도로 분주된 cell에 처리하였다.  $A\beta_{1-42}$  oligomer와 plaque 독성에 대한 생물전환 후보물질군의 신경세포 보호 효능을 평가하기 위해, 독성 처리 1시간 전에 시료를 처리하였다. 독성을 처리하고 18시간 후에 media를 제거하고, MTT 시약을 처리하였다. MTT 처리 후 3시간 뒤에 제거한 뒤, DMSO를 100  $\mu\text{l}$  첨가하여 595 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다.

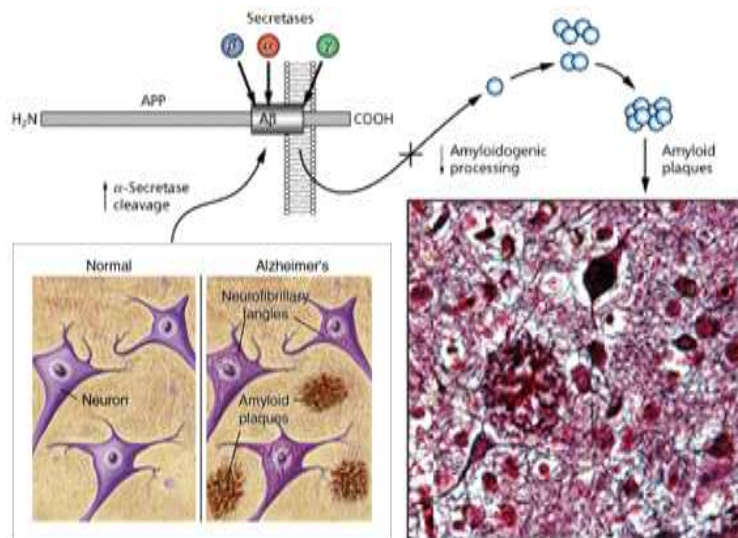


그림 25. 알츠하이머병에서의  $A\beta$  독성.

(2) 생물전환 후보물질군의 acetylcholinesterase (AChE) 억제 효능 평가

생물전환 후보물질군 12종의 시료를 각각 500  $\mu\text{g/ml}$  농도로 만든 후, 샘플 10  $\mu\text{l}$ 와 Ellman's reagent(10 ml DTNB - 15 ml sodium bicarbonate) 25  $\mu\text{l}$ , 0.1 M phosphate buffer 670  $\mu\text{l}$ , AChE(from electrophorus electricus) 25  $\mu\text{l}$ 를 E.P tube에 넣고, 30분 동안 반응시켰다. 반응이 끝난 샘플을 절반 덜어서 다른 tube에 담고, 7.5 ml acetylthiocholine

iodide 25  $\mu\text{L}$ 을 넣고 20분 동안 반응시켜 20분 경과 후 10  $\mu\text{L}$  neostigmine 10  $\mu\text{L}$ 를 넣어 반응을 정지시켰다. 완성된 샘플들을 96 well plate에 넣어 412 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다.

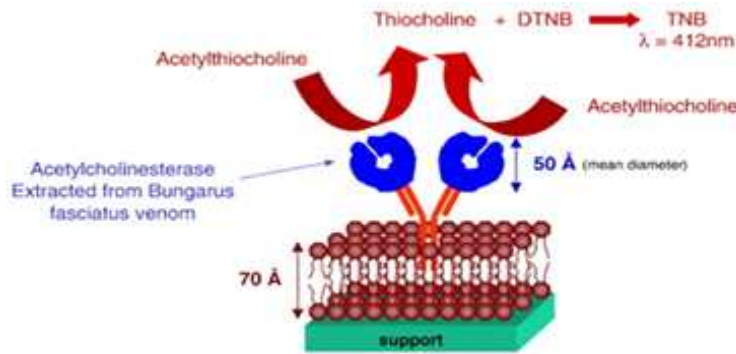


그림 26. Ellman's reagent 반응 원리.

### (3) 생물전환 후보물질군의 $\text{A}\beta$ aggregation 억제 효능 평가

생물전환 후보물질군 12종 각 시료를 농도별로 100% DMSO에 녹인 다음, black 96-well에 5  $\mu\text{L}$  monomeric  $\text{A}\beta_{1-42}$ (100  $\mu\text{M}$ )와 약물 5  $\mu\text{L}$ 를 넣고, 40  $\mu\text{L}$  pH 7.4 PRS를 넣은 후, 24시간 동안 37°C에서 반응시켰다. 반응시킨 샘플에 150  $\mu\text{L}$  thioflavin T(ThT) solution(5  $\mu\text{M}$ )을 넣은 뒤, 10분 정도 반응시킨 후, excitation 470 nm, emission 520 nm 파장에서 형광 발현을 측정하였다.

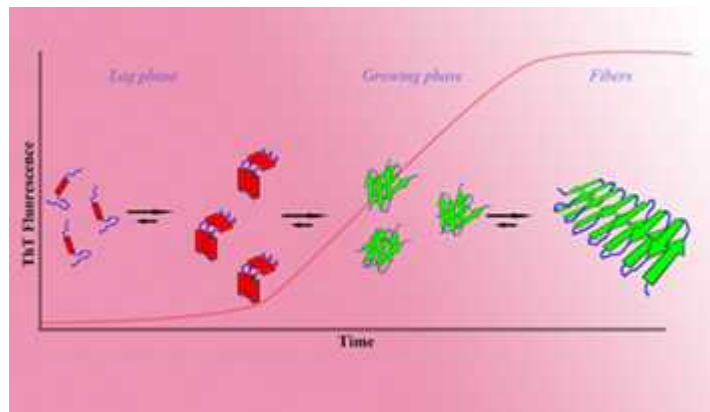


그림 27.  $\text{A}\beta$ 의 응집에 따른 ThT의 형광 발현 증가.

### (4) 통계 처리

모든 측정값의 분석은 GraphPad Prism 5.0 software를 사용하였고, 모든 측정값은 평균 값  $\pm$  표준오차로 표시하였다. 통계분석은 one way ANOVA로 처리했으며, 유의성 한계는  $p < 0.05$  수준에서 Tukey's post hoc test에 의한 사후분석을 수행하였다.

나. 생물전환 대사체 후보물질군 생성 우수 미생물의 최적 반응조건 설정

예측 대사체 조성비에 근접하는 생물전환 대사체 후보물질군 소재를 제조하여 *in vitro* 효능 평가를 통해 인지기능 개선 효능이 확인된 3종(*S. carlsbergensis*, *S. pombe*, *A. niger*)의 미생물을 대상으로 최적 반응 조건 설정을 위한 실험을 실시하였다.

(1) 최적 균 농도

(가) 초기 균 농도별 본 배양액 제조

본 배양액 ml 당  $10^6$ ,  $10^7$ ,  $10^8$ 개에 해당하도록 *S. carlsbergensis* 균 농도를 YMB 매지로 희석하여 반쪽 삼각플라스크에 넣고 26°C에서 24시간 100 rpm 속도로 진탕배양하여 본 배양액을 얻었다.

*S. pombe*는 본 배양액의 초기 균 흡광도(600 nm) 값이 0.08, 0.5, 1.2에 해당되게 YMB 매지로 희석하여 반쪽 삼각플라스크에 넣고 26°C에서 24시간 100 rpm 속도로 진탕 배양하여 본 배양액을 얻었다.

*A. niger*는 0.85% 멸균 생리식염수를 이용하여 plate 표면에 spore를 회수하고, 기스를 이용하여 여과한 현탁액 ( $7 \times 10^7$  spores/ml.) 10 ml을 40 ml PDB 매지가 들어있는 250 ml 삼각플라스크에 넣고 30°C, 100 rpm shaking incubator에서 24시간 preincubation시켜 종 배양액을 제조하였다. 종 배양액을 각각 5 ml ( $0.7 \times 10^6$  spores/ml.), 10 ml ( $1.5 \times 10^6$  spores/ml.), 20 ml ( $3 \times 10^6$  spores/ml.)을 피펫으로 취해 PDB매지 95, 90, 80 ml가 들어있는 250 ml 삼각플라스크에 재집중하여 동일조건으로 24시간 더 진탕배양시켜 본 배양액을 제조하였다.

(나) 초기 균 농도별 생물전환 배양액 제조

효모류는 초기 균 농도를 달리하여 제조한 본 배양액을 test tube에 각각 4 ml씩 분주하고 여기에 미리 증류수에 현탁시킨 생강추출물 기질을 1 ml씩 첨가하였고, 곰팡이는 100 ml 삼각플라스크에 초기 균 농도를 달리하여 배양한 본 배양액 8 ml을 각각 넣고 기질을 2 ml씩 첨가하여 72시간 동안 진탕배양시켜 생물전환 배양액을 제조하였다. 이때 생강추출물 기질은 초기 6-shogaol의 농도가 240 µg/ml 되게 생강 추출물 동결건조 분말(6-shogaol 함량 12.64 mg/g)을 40 ml의 증류수에 용해시킨 것을 사용하였다.

(다) 초기 균 농도별 생물전환 배양액의 대사체 분석

초기 균 농도를 달리한 배양시간별 배양액에 동일한 양의 ethyl acetate를 넣고 강렬히 vortexing하고 8,000 rpm, 15분 원심분리시킨 후 상등액은 취하고 침전부는 다시 ethyl acetate를 넣고 동일조작으로 재추출하여 모은 상등액을 감압 농축한 시료를 HPLC로 분석하였다.

(2) 적정 기질 농도

(가) 본 배양액

*S. carlsbergensis*는 본 배양액 mL당  $10^7$ 개, *S. pombe*는 초기 균 흡광도(600 nm) 값이 1.2, *A. niger*는 본 배양액 mL당  $1.5 \times 10^6$ 개가 되게 초기 균 농도를 조정하여 24시간 진탕배양시킨 후 본 배양액으로 사용하였다.

(나) 초기 기질 농도별 생물전환 배양액 제조

본 배양액 mL당 초기 6-shogaol의 농도가 140, 240, 500 µg/ml가 되도록 생강추출물 동결건조 분말을 증류수에 용해시켜 넣고 반응시간별 생물전환 배양액을 제조하였고, 초기 기질농도를 달리한 생물전환 배양액의 대사체 조성비는 앞의 균 농도별 배양액과 동일방법으로 분석하였다.

바. 생강유래 적정 대사체 조성비를 가지는 생물전환 소재 생산조건 확립

(1) 반응기질용 생강 추출물 시료

(가) 적정 생강 추출물 제조 조건

생강 조직내 6-shogaol 성분의 증폭을 위해 신선생강을 120°C에서 4시간 열처리 후 45°C에서 열풍 건조시키고 분쇄한 분말(수분 함량 9.70%, 이하 전처리 생강분말)에 중량대비 20배의 농도(30~95%)를 달리한 주정을 첨가하여 80°C에서 24시간 환류추출한 후 Whatman No. 1 여과지도 여과한 다음 정용하여 6-shogaol의 함량을 분석하였다.

전처리 생강분말에 75% 주정을 첨가하여 80°C에서 추출시간(1~24시간)별 생강 추출액을 제조하였고, 또한 추출회수에 따른 6-shogaol 추출정도를 조사하고자 전처리 생강분말에 75% 주정을 첨가하여 80°C에서 3시간 추출하고 여과, 정용한 다음 잔사에 다시 75% 주정을 첨가하여 동일조건으로 2회 추출하여 분석하였다. 또한, 생강 추출액 제조시 추출용매의 적정 첨가비율을 설정하고자 전처리 생강분말에 75% 에탄올을 중량대비 5, 10, 15, 20배 첨가하여 80°C에서 3시간씩 각각 추출하였다.

6-shogaol 함량 증폭 방법의 하나로 생강 추출액 제조시 사용되는 75% 주정의 pH 변화에 따른 추출액의 6-shogaol 함량을 분석하였다. 즉, pH 1, 3, 5, 7로 조정된 75% 주정을 전처리 생강분말에 첨가하여 80°C에서 3시간씩 추출하여 비교하였다.

(나) 생강 추출물 농축액 및 분말 제조

앞서 최적 조건에서 제조한 생강 추출액을 여과하고 회전식농축기도 용매를 제거하며 가용성 고형분 함량이 각기 다른 생강 추출물 농축액(7.5, 30, 60°brix)과 생강 추출액을 완전 농축한 후 일정량의 증류수를 넣어 용해시키고 동결건조한 생강추출물 동결건조분말을 제조하였다.

나. 생물전환 대사체 후보물질군 생성 우수 미생물의 적정 반응조건 설정

예측 대사체 조성비에 근접하는 생물전환 대사체 후보물질군 소재를 제조하여 *in vitro* 효능 평가를 통해 인지기능 개선 효능이 확인된 3종(*S. carlsbergensis*, *S. pombe*, *I. niger*)의 미생물을 대상으로 적정 반응 조건 설정을 위한 실험을 실시하였다.

(1) 적정 균 농도

(가) 초기 균 농도별 본 매양액 제조

본 매양액 ml 당  $10^6$ ,  $10^7$ ,  $10^8$ 개에 해당하도록 *S. carlsbergensis* 균 농도를 YMB 매지로 희석하여 반쪽 삼각플라스크에 넣고 26°C에서 24시간 100 rpm 속도로 진탕배양하여 본 매양액을 얻었다.

*S. pombe*는 본 매양액의 초기 균 흡광도(600 nm) 값이 0.08, 0.5, 1.2에 해당되게 YMB 매지도 희석하여 반쪽 삼각플라스크에 넣고 26°C에서 24시간 100 rpm 속도로 진탕 배양하여 본 매양액을 얻었다.

*I. niger*는 0.85% 멸균 생리식염수를 이용하여 plate 표면에 spore를 회수하고, 기스를 이용하여 여과한 현탁액 ( $7 \times 10^7$  spores/ml.) 10 ml을 40 ml PDB 매지가 들어있는 250 ml 삼각플라스크에 넣고 30°C, 100 rpm shaking incubator에서 24시간 preincubation시켜 종 매양액을 제조하였다. 종 매양액을 각각 5 ml ( $0.7 \times 10^6$  spores/ml.), 10 ml ( $1.5 \times 10^6$  spores/ml.), 20 ml ( $3 \times 10^6$  spores/ml.)을 피펫으로 취해 PDB매지 95, 90, 80 ml가 들어있는 250 ml 삼각플라스크에 재집중하여 동일조건으로 24시간 더 진탕배양시켜 본 매양액을 제조하였다.

(나) 초기 균 농도별 생물전환 매양액 제조

효모류는 초기 균 농도를 달리하여 제조한 본 매양액을 test tube에 각각 4 ml씩 분주하고 여기에 미리 증류수에 현탁시킨 생강추출물 기질을 1 ml씩 첨가하였고, 곰팡이는 100 ml 삼각플라스크에 초기 균 농도를 달리하여 배양한 본 매양액 8 ml을 각각 넣고 기질을 2 ml씩 첨가하여 72시간 동안 진탕배양시켜 생물전환 매양액을 제조하였다. 이때 생강추출물 기질은 초기 6-shogaol의 농도가 240 µg/ml 되게 생강 추출물 동결건조 분말(6-shogaol 함량 12.64 mg/g)을 40 ml의 증류수에 용해시킨 것을 사용하였다.

(다) 초기 균 농도별 생물전환 매양액의 대사체 분석

초기 균 농도를 달리한 배양시간별 매양액에 동일한 양의 ethyl acetate를 넣고 강렬히 vortexing하고 8,000 rpm, 15분 원심분리시킨 후 상등액은 취하고 침전부는 다시 ethyl acetate를 넣고 동일조작으로 재추출하여 모은 상등액을 감압 농축한 시료를 HPLC로 분석하였다.

(2) 적정 기질 농도

(가) 본 배양액

*S. carlsbergensis*는 본 배양액 mL당  $10^7$ 개, *S. pombe*는 초기 균 흡광도(600 nm) 값이 1.2, 4. *niger*는 본 배양액 mL당  $1.5 \times 10^6$ 개가 되게 초기 균 농도를 조정하여 24시간 진탕배양시킨 후 본 배양액으로 사용하였다.

(나) 초기 기질 농도별 생물전환 배양액 제조

본 배양액 mL당 초기 6-shogaol의 농도가 140, 240, 500  $\mu\text{g/mL}$ 가 되도록 생강추출물 동결건조 분말을 증류수에 용해시켜 넣고 반응시간별 생물전환 배양액을 제조하였고, 초기 기질농도를 달리한 생물전환 배양액의 대사체 조성비는 앞의 균 농도별 배양액과 동일방법으로 분석하였다.

바. 생강유래 적정 대사체 조성비를 가지는 생물전환 소재 생산 조건 확립

(1) 생물전환 배양액내 지표성분 회수율 비교

배양액내 생성된 생물전환 대사체 추출, 분리를 위한 공정에서 사용되는 추출 용매와 전처리방법에 따른 지표성분의 회수율을 비교하고자 초기 6-shogaol 농도를 320  $\mu\text{g/mL}$ 로 조정하여 *S. carlsbergensis*도 32시간 배양시킨 배양액을 제조하였다.

한 처리구는 기존 사용하는 방법과 같이 배양액에 동일한 양의 ethyl acetate를 넣고 5분간 vortexing 하고 원심분리한 뒤 상등액만 취해 완전히 농축시킨 뒤 메탄올로 녹여 0.45  $\mu\text{m}$  membran filter로 여과한 뒤 LC를 분석하였다. 다른 처리구는 배양액에 100% 주정을 첨가, 최종농도를 75%로 조정하고 5분간 sonication한 다음 바로 0.45  $\mu\text{m}$  membran filter로 여과한 뒤 LC로 분석하여 6-shogaol과 6-paradol 함량을 비교하였다.

(2) 적정 대사체 조성비를 가지는 생강유래 생물전환 대사체 배양액 제조

(가) 본 배양액

*S. carlsbergensis*, *S. pombe*, 4. *niger*의 초기 균 농도를 각각  $10^7$  spores/mL, 1.2abs,  $1.5 \times 10^6$  spores/mL로 조정하여 본 배양액을 제조하였다.

(나) 적정 대사체 조성비를 가지는 생물전환 대사체 배양액 제조

전체 배양액내 초기 6 shogaol의 농도가 500  $\mu\text{g/mL}$ 이 되도록 생강 추출물 동결건조 분말을 본 배양액이 들어 있는 반팔 플라스크에 넣고 진탕배양하였다. 배양 중 배양액내 6-shogaol과 6-paradol의 조성비를 간이분석법을 통해 확인하면서 적정 대사체 조성비율 (10:0, 6:4, 4:6, 2:8, 0:10)에 근접하는 생강유래 생물전환 대사체 배양액 시료를 제조하였다.

(3) 적정 대사체 조성비를 가지는 생강유래 생물전환 대사체 소재 제조

적정 대사체 조성비의 생물전환 배양액에 순수 주정을 넣어 최종 농도를 70%로 조정



후 5분간 vortexing하고 10분간 초음파처리한 다음 8,000 rpm에서 15분간 원심분리하였다. 상등액을 취해 0.2 µm syringe로 여과하고 농축한 후 동결건조하여 적정 대사체 조성비를 가지는 생물전환 대사체 소재를 제조하였다.

#### (4) 생강유래 생물전환 대사체 프로파일 분석

##### (가) 생물전환 대사체 추출을 위한 전처리

시료를 희석한 후 HPLC에 5 µl 주입하여 분석하였다.

##### (나) 생물전환 대사체 프로파일 분석

LC/Q-TOF/MS를 이용하였다. LC/MS system은 Agilent 1260 HPLC system이 장착된 Agilent 6530 electrospray ionization Q-TOF mass spectrometer를 사용하였다. 역상 컬럼은 pharoshell C<sub>18</sub> (2.1 ×150 mm, 2.7µm, Agilent, USA)을 사용하였으며, 이동상은 0.1% formic acid(용매 A)와 90% acetonitrile in 0.1% formic acid (용매 B)를 사용하여 유속은 0.3 mL/min로 다음과 같은 gradient 조건에서 분석하였다.

##### (다) 주성분 분석

각 소재에 따른 생강의 생물 전환 대사체 프로파일의 변화를 분석하기 위하여 다변량 통계분석법인 주성분 분석을 이용하여 대사체 프로파일의 패턴 변화를 분석하였다. 통계적 검증은 IBM SPSS Statistics 21.0 통계 프로그램의 주성분 분석(Principal Component Analysis)을 통하여 수행하였다. 통계분석을 위하여 gingerol, shogaol, paradol을 포함하여 LC-QTOF-MS 분석을 통해 검출된 총 39개의 대사체를 변수로 선정하여 비생물 및 반응처리 시간이 각기 다른 총 10개의 시료에 대하여 대사체 프로파일의 패턴을 분석하였다. 선정된 39개의 대사체 피크에 대하여 피크면적을 산출한 후 이를 log-변환하여 주성분 분석을 위한 dataset으로 사용하였다. 추출된 주성분의 고유값이 0.8이상이고, 누적값이 84.4% 이상일 때 성분 요인으로서 유효한 것으로 간주하였다.

#### (5) 생강유래 생물전환 대사체 소재의 *in vivo* 효능 평가 및 검증

##### (가) 실험동물

본 실험에서 사용된 실험동물들은 오리엔트사에서 구입하였다. Male ICR mice(6 주령, 21-23g)을 분양받아 온도 23±1°C, 습도 60±10% 및 밤, 낮을 12 시간씩 조절하고 물과 일반 식이를 충분히 공급하면서 7일간 동물실에서 적응시킨 후 실험에 사용하였다.

(나) 적정 대사체 조성비를 가지는 생물전환 소재의 scopolamine으로 유도된 기억력 저하에 대한 인지기능 개선 효능 평가

##### ① 실험동물의 scopolamine에 의한 기억력 손상 유발

실험동물들은 cage당 6 마리씩 나누어서 사육하였고, 2개의 cage를 1 group으로 사용

하여 group당 12 마리의 실험동물을 사용하였다. 각 그룹은 (1) control group (경구투여: vehicle), (2) scopolamine group (경구투여: vehicle), (3) donepezil group (경구투여: donepezil 2 mg/kg), (4) 생물전환 소재 투여군 (경구투여: SC4, 6, 7, SP478, AX4, 6, 8 100 mg/kg)으로 분배하였다. 본 실험 진행 1시간 전에 경구투여 하였고, 30분 전에 control group을 제외한 모든 그룹에 scopolamine을 복강투여 하였다.

② 직접 대사체 조성비를 가지는 생물전환 소재의 학습능력 개선 효능 평가

직접 대사체 조성비를 가지는 소재의 학습능력 개선 효능 평가를 위하여, 인지 및 학습 능력 평가 실험인 novel object recognition test (NORT)를 진행하였다. NORT는 후모물질의 학습 및 기억력 개선 효과를 측정하기 위한 행동실험모델로서, 30×30×60 cm 크기의 정사각형 박스에 두 가지 다른 물체를 배치시킨 후, training 과정에서 습득시킨 물체에 비해 새로운 물체를 탐색하는 시간이 증가되는 경향을 파악하여 결과를 도출한다. 결과 값은 % memory index = (exploring time of novel object)/(total exploring time)로 하여 측정한다.

③ 직접 대사체 조성비를 가지는 생물전환 소재의 공간기억력 개선 효능 평가

직접 대사체 조성비를 가지는 소재의 공간기억력 개선 효능 평가를 위하여, 인지 및 공간기억력 평가 실험인 Y maze task를 진행하였다. Y maze task는 후모물질의 단기 기억 및 공간 기억력 개선 효과를 측정하기 위한 행동실험모델로서, Y자 형 통로에 실험동물을 투입 후 실험동물이 움직인 경도를 8분 동안 관찰, 기록하여 spontaneous alternation을 구한다. Spontaneous alternation = 교차 횟수/(총 이동 횟수 - 2) × 100.

④ 직접 대사체 조성비를 가지는 생물전환 소재의 공포기억력 개선 효능 평가

직접 대사체 조성비를 가지는 소재의 공포기억력 개선 효능 평가를 위하여, 공포기억력 평가 실험인 passive avoidance test (PAT)를 진행하였다. PAT는 후모물질의 인지능력 향상 정도를 평가할 수 있는 행동실험모델의 하나이다. 이 장치는 2개의 구획으로 나뉘어져 있으며, 중간에 guillotine door가 있는 칸막이로 구성되어 있다. 두 구획 중 한 쪽은 강도 10의 조명을 비추어 밝게 하고 나머지 한 쪽은 차광하여 어둡게 하고, 바닥은 전기 쇼크를 줄 수 있는 grid로 구성되어 있다. 첫째 날 가운데에 문을 사이에 두고 한 쪽은 불을 켜놓고 다른 한쪽은 어두운 상태에서 밝은 쪽에서 먼저 10초간 비무르게 한 후 사이의 문을 열어주고 실험동물이 어두운 공간으로 이동할 때 발바닥에 0.6 mA의 전기 자극을 준다. 24시간 후 같은 방법으로 수동 회피 시험을 진행하고 이때 밝은 곳에서 비무르는 시간을 측정한다.

(다) 생강유래 생물전환 대사체 소재의 Aβ plaque도 유도된 기억력 저하에 대한 인지기능 개선 효능 평가

① 실험동물의 Aβ plaque에 의한 기억력 손상 유발

실험동물들은 cage당 8마리씩 나누어서 사육하였고, 1개의 cage를 1 group으로 사용하

여 group당 8마리의 실험동물을 사용하였다. 각 그룹은 (1) sham group (경구투여: vehicle), (2) A $\beta$  group (경구투여: vehicle), (3) donepezil group (경구투여: donepezil 2 mg/kg/day), (4) phosphatidylserine group (경구투여: phosphatidylserine 100 mg/kg/day), (5) 생물전환 소재 투여군 (경구투여: SC8-1 100 mg/kg/day, SP8-1 50, 100, 200 mg/kg/day)으로 분배하였다. 실험동물은 surgery 후, 총 14일간 매일 17:00-19:00 사이에 각각의 시료를 1회 경구투여 하였고, stereotaxic surgery는 control group을 제외한 모든 그룹에 진행하여, A $\beta_{1\pm}$  plaque을 쥐의 뇌에 있는 해마 부위에 주입하였다.

## ② 생물전환 대사체 소재의 인지기능 개선 효능 평가

Scopolamine model을 통한 기억력 개선 효능 평가를 통해 선정된 SC8-1, SP8-1 시료의 A $\beta$  plaque으로 유도된 기억력 저하에 대한 인지기능 개선 효능 평가를 진행하였다. 생물전환 대사체 소재의 학습능력, 공간기억력 개선 효능평가는 위와 동일한 방법으로 실시하였다.

## 2. 결과

가. 예측 대사체 조성비에 근접하는 생물전환 대사체 후보물질군의 프로파일 분석 (위탁 기관)

### (1) 예측 대사체 조성비에 근접하는 생물전환 대사체 후보물질군의 프로파일 분석

예측 대사체 조성비에 근접하는 생물전환 대사체 후보물질군의 프로파일을 분석해 본 결과 6-, 8-, 10- gingerol, shogaol, paradol과 관련된 총 37개의 대사체가 검출되었다. 이들 대사체 중 6-series(6-gingerol, 6-shogaol, 6-paradol)와 관련된 대사체는 15개, 8-series(8-gingerol, 8-shogaol, 8-paradol)과 관련된 대사체는 13개, 10-series(10-gingerol, 10-shogaol, 10-paradol)과 관련된 대사체는 9개가 검출되었다. 그 중 6-paradol, 8-paradol 등이 미생물 매양을 통해 생성된 주요 대사체로 관찰되었고, 그 외에 주로 hydroxylation 이나 reduction된 형태의 대사체가 minor한 대사체로 관찰되었다. 생성된 대사체 peak에 대해서는 Q-TOF/MS를 이용한 분석을 통하여 collision-induced dissociation에 의한 fragmentation pattern을 해석하여 각 구조를 확인하였다.

### (가) C1 시료의 생물전환 대사체 프로파일 분석

C1 시료에서는 총 29개의 대사체가 확인되었다. C1 시료의 생물전환 대사체 프로파일을 분석한 결과는 그림 28-30과 같다. C1시료에 비하여 C2, C3시료에는 6-, 8-, 10-gingerol, shogaol이 감소하는 경향을 보였으며 특히 6-shogaol의 경우 가장 크게 감소하였다. 6-, 8-, 10-shogaol로부터 reduction된 대사체인 6-, 8-, 10-paradol의 경우 C1 시료에는 미량 존재하였으나 C2, C3에서 한량이 현저하게 증가하였다. 따라서, C1 시료의 주요 대사체는 6, 8, 10 paradol로 확인되었다. 6 shogaol 다운으로 뚜렷한 peak를 보이는 대사체(6EM-277-3)은 6-gingerol이 MS source에서 깨져서 나타나는 peak로 이것으로 6-gingerol의 변화를 예측할 수 있었다. C1에 비해 C2, C3시료에는 7 가지 대사체

(6EM-277-2, 6-paradol, 6EM-279-3, 6EM-293-5, 8EM-305-1, 8-paradol, 10EM-333-1)가 새롭게 생성되었다. 6EM-277-2, 8EM-305-1, 10EM-333-1은 각각 6-, 8-, 10- shogaol과 같은 분자량을 가진 대사체로 각각 6, 8, 10 gingerol로부터 탈수 반응을 통해 생성되거나 paradol로부터 hydroxylation된 후 탈수 반응을 통해 생성되는 것으로 예상되었다. 또한, 6-shogaol은 reduction을 통해 6-paradol, 6EM-279-3( $m/z$  279) 대사체와 hydroxylation을 통해 6EM-293-5( $m/z$  293)의 대사체가 생성되었다. 8-shogaol의 경우 reduction 반응을 통해 8-paradol( $m/z$  307) 대사체가 생성되었다. 그 외 CU1에서 존재하던 24가지의 물질도 CU2, 3 시료에서 변화되는 경향을 보였는데, 대체적으로 CU2시료에서 양이 증가되었다가 CU3에서는 감소하는 경향을 보였다. Hydroxylation된 대사체의 경우 6, 8, 10 series에서의 대사 패턴에 차이를 보였다. 특히, 8-shogaol에 hydroxylation된 대사체는 반응시간에 따라 감소하는 경향을 보여 이 대사체로부터 또 다른 대사체가 생성될 수 있음을 암시하였다. CU소재에 의한 주요 대사는 reduction과 hydroxylation으로 관찰되며, 각 대사체들의 크로마토그램적인 특징들을 표 6에 정리하였다. 각 대사체들의 elemental composition에 따른 이론값과 실측값의 차이가 10 ppm을 넘지 않는 것으로 관찰되는 것으로 모아 제시한 지성식에 맞는 대사체임을 확인하였다.

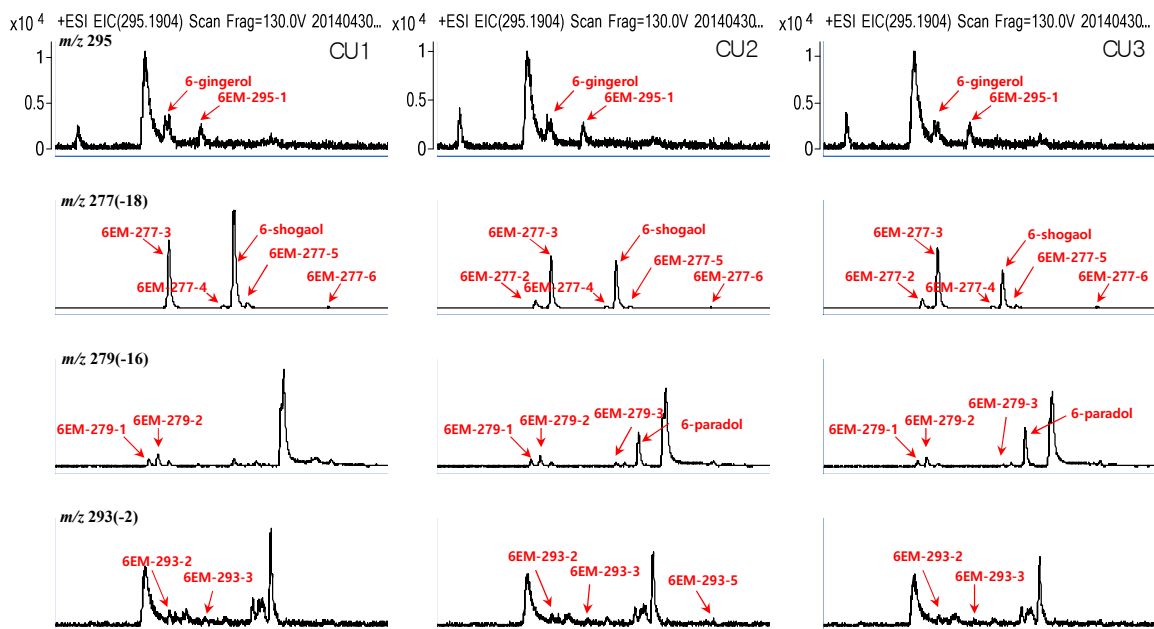


그림 28. CU1-3 시료의 생분전환 대사체(6-series) EIC.

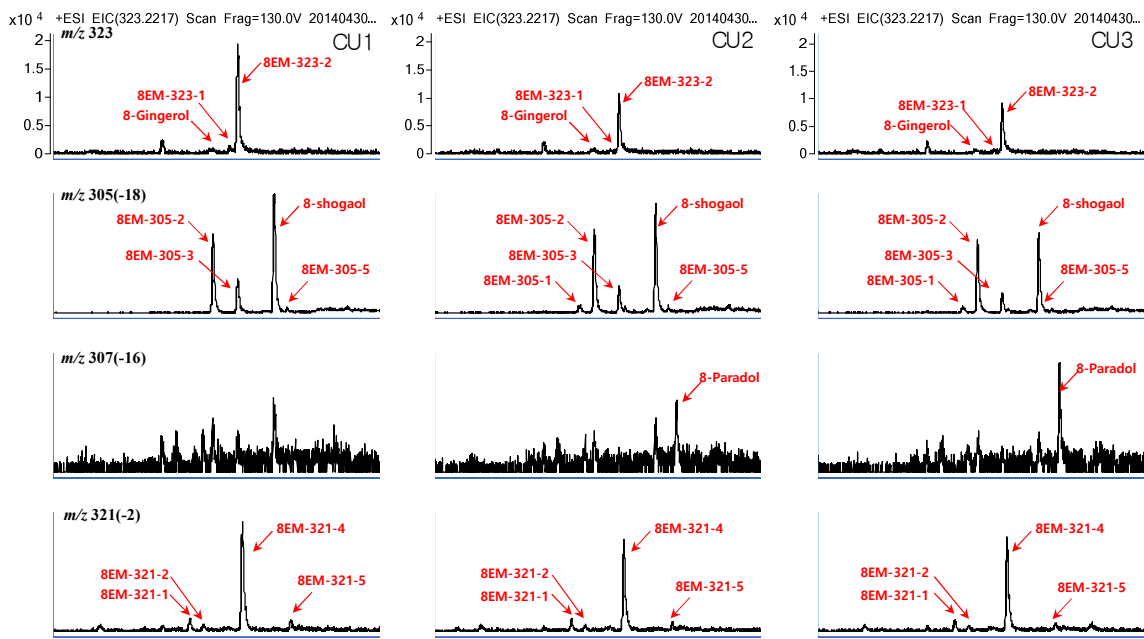


그림 29. CU1-3 시료의 생물전환 대사체(8-series) EIC.

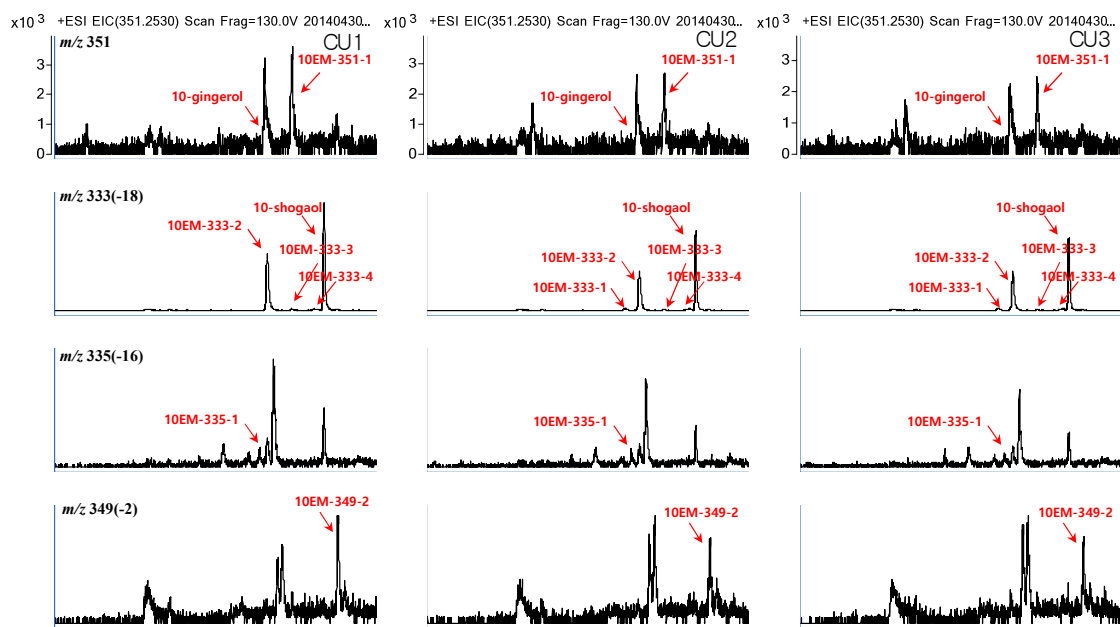


그림 30. CU1-3 시료의 생물전환 대사체(10-series) EIC.

표 18. C1-3 시료의 생분전환 대사체 accurate mass 측정

| <i>C. utilis</i> |      |                       |                  |               |       |               |
|------------------|------|-----------------------|------------------|---------------|-------|---------------|
| Name             | RT   | Elemental composition | Theoretical mass | Measured mass | Error | Remark        |
| 6-Gingerol       | 11.1 | C17H26O1              | 295.1904         | 295.1879      | 8.5   | C11, C12, C13 |
| 6E4-295-1        | 12.3 | C17H26O1              | 295.1904         | 295.1877      | 9.1   | C11, C12, C13 |
| 6-Shogaol        | 13.6 | C17H24O3              | 277.1798         | 277.1793      | 1.8   | C11, C12, C13 |
| 6E4-277-2        | 10.5 | C17H24O3              | 277.1798         | 277.1782      | 5.8   | C12, C13      |
| 6E4-277-3        | 11.1 | C17H24O3              | 277.1798         | 277.1788      | 3.6   | C11, C12, C13 |
| 6F4 277 4        | 13.2 | C17H24O3              | 277.1798         | 277.1783      | 5.4   | C11, C12, C13 |
| 6F4 277 5        | 14.1 | C17H24O3              | 277.1798         | 277.1778      | 7.2   | C11, C12, C13 |
| 6F4 277 6        | 17.2 | C17H24O3              | 277.1798         | 277.1787      | 4.0   | C11, C12, C13 |
| 6-Paradol        | 14.4 | C17H26O3              | 279.1955         | 279.1944      | 3.9   | C12, C13      |
| 6E4-279-1        | 10.3 | C17H26O3              | 279.1955         | 279.1934      | 7.5   | C11, C12, C13 |
| 6E4-279-2        | 10.7 | C17H26O3              | 279.1955         | 279.1938      | 6.1   | C11, C12, C13 |
| 6E4-279-3        | 13.9 | C17H26O3              | 279.1955         | 279.1929      | 9.3   | C12, C13      |
| 6E4-293-2        | 11.1 | C17H24O4              | 293.1747         | 293.1724      | 7.8   | C11, C12, C13 |
| 6F4 293 3        | 12.4 | C17H24O4              | 293.1747         | 293.1730      | 5.8   | C11, C12, C13 |
| 6F4 293 5        | 17.3 | C17H24O4              | 293.1747         | 293.1754      | 2.4   | C12           |
| 8-Gingerol       | 13.1 | C19H30O4              | 323.2217         | 323.2206      | 3.4   | C11, C12, C13 |
| 8F4 323 1        | 13.8 | C19H30O4              | 323.2217         | 323.2198      | 5.8   | C11, C12, C13 |
| 8E4-323-2        | 14.1 | C19H30O4              | 323.2217         | 323.2198      | 5.9   | C11, C12, C13 |
| 8-Shogaol        | 15.6 | C19H28O3              | 305.2111         | 305.2097      | 4.6   | C11, C12, C13 |
| 8E4-305-1        | 12.5 | C19H28O3              | 305.2111         | 305.2089      | 7.2   | C12, C13      |
| 8E4-305-2        | 13.1 | C19H28O3              | 305.2111         | 305.2095      | 5.2   | C11, C12, C13 |
| 8E4-305-3        | 14.1 | C19H28O3              | 305.2111         | 305.2091      | 6.6   | C11, C12, C13 |
| 8F4 305 5        | 16.1 | C19H28O3              | 305.2111         | 305.2096      | 4.9   | C11, C12, C13 |
| 8-Paradol        | 16.4 | C19H30O3              | 307.2268         | 307.2249      | 6.2   | C12, C13      |
| 8F4 321 1        | 12.2 | C19H28O4              | 321.2060         | 321.2048      | 3.7   | C11, C12, C13 |
| 8E4-321-2        | 12.7 | C19H28O4              | 321.2060         | 321.2032      | 8.7   | C11, C12, C13 |
| 8E4-321-4        | 14.3 | C19H28O4              | 321.2060         | 321.2043      | 5.3   | C11, C12, C13 |
| 8E4-321-5        | 16.2 | C19H28O4              | 321.2060         | 321.2065      | 1.6   | C11, C12, C13 |
| 10-Gingerol      | 15.0 | C21H34O4              | 351.2530         | 351.2506      | 6.8   | C11, C12, C13 |
| 10E4-351-1       | 16.1 | C21H34O4              | 351.2530         | 351.2523      | 2.0   | C11, C12, C13 |
| 10-Shogaol       | 17.4 | C21H32O3              | 333.2424         | 333.2411      | 3.9   | C11, C12, C13 |
| 10E4-333-1       | 14.5 | C21H32O3              | 333.2424         | 333.2402      | 6.6   | C12, C13      |
| 10E4-333-2       | 15.1 | C21H32O3              | 333.2424         | 333.2407      | 5.1   | C11, C12, C13 |
| 10E4-333-3       | 16.1 | C21H32O3              | 333.2424         | 333.2403      | 6.3   | C11, C12, C13 |
| 10F4 333 4       | 17.0 | C21H32O3              | 333.2424         | 333.2411      | 3.9   | C11, C12, C13 |
| 10F4 335 1       | 14.8 | C21H34O3              | 335.2581         | 335.2580      | 0.3   | C11, C12, C13 |
| 10F4 349 2       | 17.9 | C21H32O4              | 349.2373         | 349.2345      | 8.0   | C11, C12, C13 |

(나) SC 시료의 생물전환 대사체 프로파일 분석

SC 시료에서는 총 27개의 대사체가 확인되었다. SC 시료의 생물전환 대사체 프로파일을 분석한 결과는 그림 31-33와 같다. SC1에 비하여 SC2, 3 시료에는 6가지 대사체(6EM-277-1, 2, 6-paradol, 8EM-305-1, 8EM-305-4, 8-paradol)가 새롭게 생성되었다. 6-shogaol과 8-shogaol은 reduction을 통해 각각 6-paradol( $m/z$  279), 8-paradol( $m/z$  307)로 대사되었다. 6EM-277-1, 2과 8EM-305-1, 8EM-305-4은 shogaol과 같은 분자량을 가진 대사체로 gingerol로부터 탈수 반응을 통해 생성되거나 paradol로부터 hydroxylation된 후 탈수 반응을 통해 생성되는 것으로 예상되었다. SC 시료와 마찬가지로 SC2, 3의 주요 생물전환 대사체는 6-, 8-, 10- paradol로 확인되었다.

SC2, SC3 시료에서는 6-shogaol로부터 reduction된 대사체( $m/z$  279)와 hydroxylation된 대사체( $m/z$  293)가 발견되었다. 동일한 분자량을 나타내는 여러 가지 peak(대사체)가 확인되었는데, 이는 hydroxylation과 reduction이 각각 여러 위치에서 일어난 결과 생성된 isobaric 대사체로 사료된다. 6-, 8-, 10-series별로 분류하였을 때, 6-series, 10-series에서는 shogaol과 같은 분자량을 가진 성분이 다양하게 발견되었고, 8-series에서는 shogaol과 같은 분자량을 갖는 대사체 외에도 탈수 반응과 hydroxylation 대사가 일어난 대사체가 다양하게 발견되었다. Shogaol로부터 생성된 생물전환 대사체의 주요 대사 경로는 주로 shogaol에서 reduction되는 반응인 것으로 관찰되었다. 각 대사체들의 크로마토그램적인 특징들을 표 7에 정리하였다. 각 대사체들의 elemental composition에 따른 이론값과 실측값의 차이가 10 ppm을 넘지 않는 것으로 관찰되는 것으로 보아 제시한 시정식에 맞는 대사체임을 확인하였다.

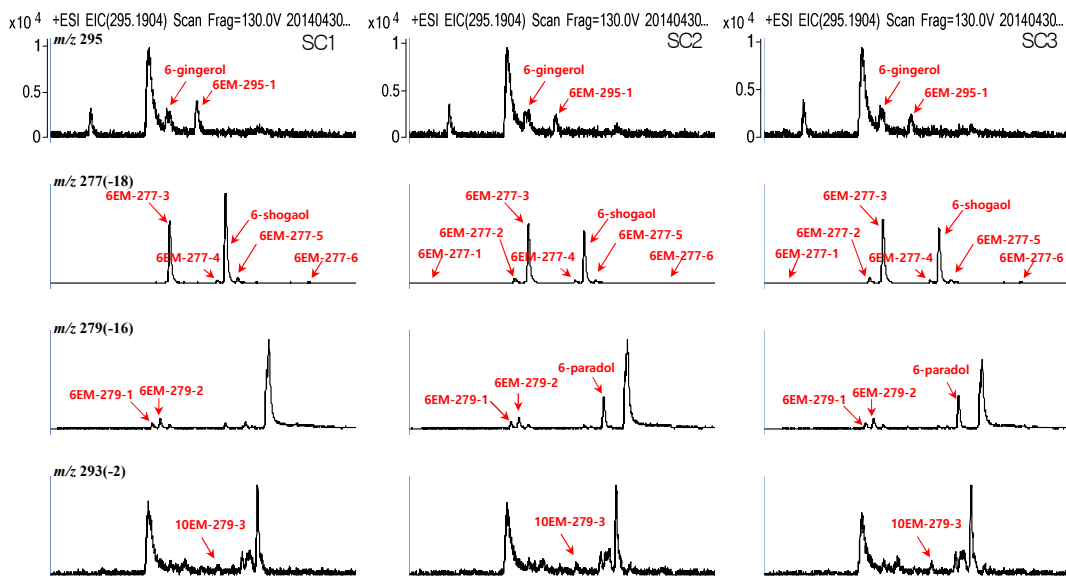


그림 31. SC1-3 시료의 생물전환 대사체(6-series) EIC.

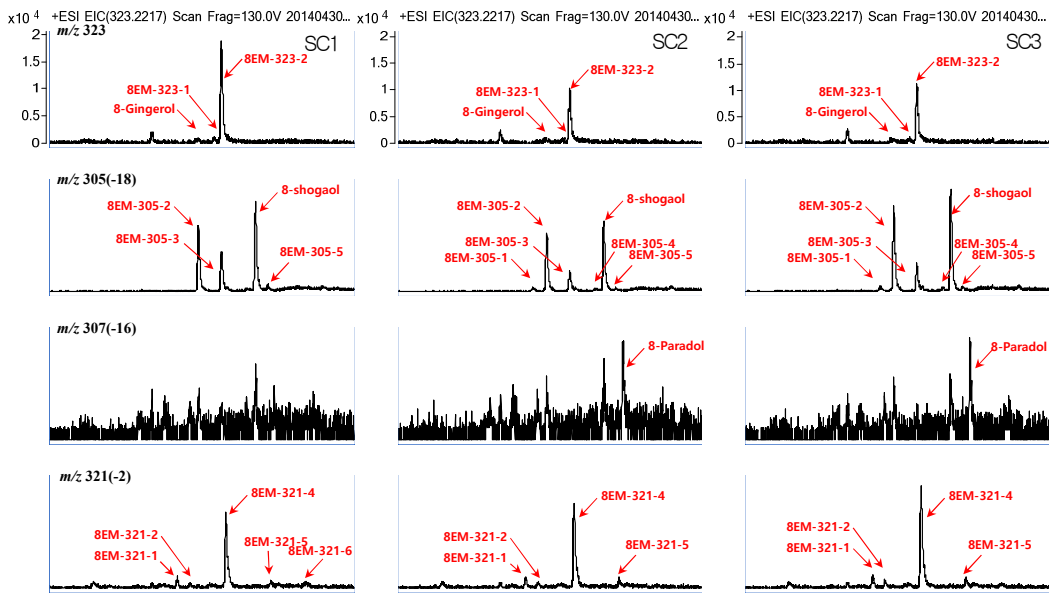


그림 32. SC1-3 시료의 생물전환 대사체(8-series) EIC.

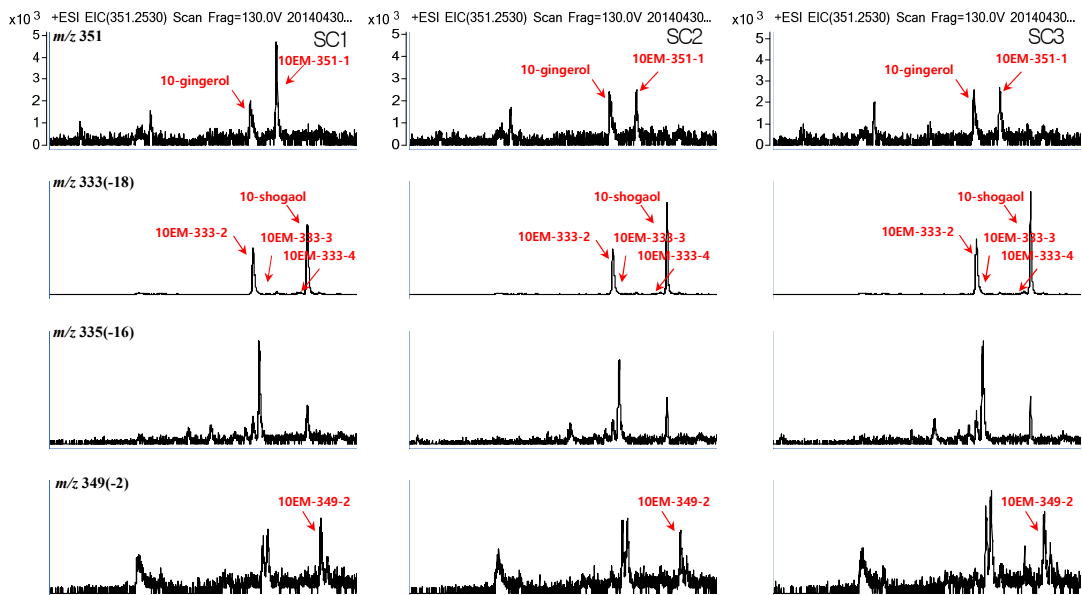


그림 33. SC1-3 시료의 생물전환 대사체(10-series) EIC.



19. SC 시료의 생물전환 대사체 accurate mass 측정

| <i>S. carlsbergensis</i> |      |                       |                  |               |       |               |
|--------------------------|------|-----------------------|------------------|---------------|-------|---------------|
| Name                     | RT   | Elemental composition | Theoretical mass | Measured mass | Error | Remark        |
| 6-Gingerol               | 11.0 | C17H26O4              | 295.1904         | 295.1876      | 9.5   | SC1, SC2, SC3 |
| 6EM-295-1                | 12.3 | C17H26O4              | 295.1904         | 295.1892      | 4.1   | SC1, SC2, SC3 |
| 6-Shogaol                | 13.6 | C17H24O3              | 277.1798         | 277.1783      | 5.4   | SC1, SC2, SC3 |
| 6EM-277-1                | 6.7  | C17H24O3              | 277.1798         | 277.1772      | 9.4   | SC2, SC3      |
| 6EM-277-2                | 10.5 | C17H24O3              | 277.1798         | 277.1776      | 7.9   | SC2, SC3      |
| 6EM-277-3                | 11.1 | C17H24O3              | 277.1798         | 277.1780      | 6.5   | SC1, SC2, SC3 |
| 6EM-277-4                | 13.2 | C17H24O3              | 277.1798         | 277.1780      | 6.5   | SC1, SC2, SC3 |
| 6EM-277-5                | 14.1 | C17H24O3              | 277.1798         | 277.1776      | 7.9   | SC1, SC2, SC3 |
| 6EM-277-6                | 17.2 | C17H24O3              | 277.1798         | 277.1780      | 6.5   | SC1, SC2, SC3 |
| 6-Paradolol              | 14.5 | C17H26O3              | 279.1955         | 279.1939      | 5.7   | SC2, SC3      |
| 6EM-279-1                | 10.3 | C17H26O3              | 279.1955         | 279.1931      | 8.6   | SC1, SC2, SC3 |
| 6EM-279-2                | 10.7 | C17H26O3              | 279.1955         | 279.1930      | 9.0   | SC1, SC2, SC3 |
| 6EM-293-3                | 12.5 | C17H24O4              | 293.1747         | 293.1720      | 9.2   | SC1, SC2, SC3 |
| 8-Gingerol               | 13.0 | C19H30O4              | 323.2217         | 323.2193      | 7.4   | SC1, SC2, SC3 |
| 8EM-323-1                | 13.8 | C19H30O4              | 323.2217         | 323.2236      | 5.9   | SC1, SC2, SC3 |
| 8EM-323-2                | 14.1 | C19H30O4              | 323.2217         | 323.2195      | 6.8   | SC1, SC2, SC3 |
| 8-Shogaol                | 15.5 | C19H28O3              | 305.2111         | 305.2093      | 5.9   | SC1, SC2, SC3 |
| 8EM-305-1                | 12.5 | C19H28O3              | 305.2111         | 305.2086      | 8.2   | SC2, SC3      |
| 8EM-305-2                | 13.1 | C19H28O3              | 305.2111         | 305.2092      | 6.2   | SC1, SC2, SC3 |
| 8EM-305-3                | 14.1 | C19H28O3              | 305.2111         | 305.2091      | 6.6   | SC1, SC2, SC3 |
| 8EM-305-4                | 15.2 | C19H28O3              | 305.2111         | 305.2084      | 8.8   | SC2, SC3      |
| 8EM-305-5                | 16.1 | C19H28O3              | 305.2111         | 305.2091      | 6.6   | SC1, SC2, SC3 |
| 8-Paradolol              | 16.4 | C19H30O3              | 307.2268         | 307.2242      | 8.5   | SC2, SC3      |
| 8EM-321-1                | 12.2 | C19H28O4              | 321.2060         | 321.2042      | 5.6   | SC1, SC2, SC3 |
| 8EM-321-2                | 12.7 | C19H28O4              | 321.2060         | 321.2043      | 5.3   | SC1, SC2, SC3 |
| 8EM-321-4                | 14.3 | C19H28O4              | 321.2060         | 321.2040      | 6.2   | SC1, SC2, SC3 |
| 8EM-321-5                | 16.2 | C19H28O4              | 321.2060         | 321.2084      | 7.5   | SC1, SC2, SC3 |
| 8EM-321-6                | 17.7 | C19H28O4              | 321.2060         | 321.2043      | 5.3   | SC1           |
| 10-Gingerol              | 14.9 | C21H34O4              | 351.2530         | 351.2499      | 8.8   | SC1, SC2, SC3 |
| 10EM-351-1               | 16.1 | C21H34O4              | 351.2530         | 351.2516      | 4.0   | SC1, SC2, SC3 |
| 10-Shogaol               | 17.4 | C21H32O3              | 333.2424         | 333.2409      | 4.5   | SC1, SC2, SC3 |
| 10EM-333-2               | 15.1 | C21H32O3              | 333.2424         | 333.2401      | 6.0   | SC1, SC2, SC3 |
| 10EM-333-3               | 16.1 | C21H32O3              | 333.2424         | 333.2397      | 8.1   | SC1, SC2, SC3 |
| 10EM-333-4               | 17.1 | C21H32O3              | 333.2424         | 333.2407      | 5.1   | SC1, SC2, SC3 |
| 10EM-349-2               | 18.0 | C21H32O4              | 349.2373         | 349.2344      | 8.3   | SC1, SC2, SC3 |

표

(다) SP 시료의 생물전환 대사체 프로파일 분석

SP 시료에서는 총 25개의 대사체가 확인되었다. SP 시료의 생물전환 대사체 프로파일을 분석한 결과는 그림 34-36과 같다. SP1에 미하여 SP2,3 시료에는 5가지 대사체(6EM-277-2, 6-paradol, 6EM-279-3, 8EM-305-1, 8-paradol)가 새롭게 생성되었다. 6-shogaol은 reduction을 통해 6-paradol, 6EM-279-3(m/z 279)로 대사되었고, 8-shogaol은 reduction을 통해 8-paradol(m/z 307)로 대사되었다. 6EM-277-2와 8EM-305-1은 shogaol과 같은 분자량을 가진 대사체로 gingerol로부터 탈수 반응을 통해 생성되거나 paradol로부터

hydroxylation된 후 탈수 반응을 통해 생성되거나 paradol로부터 hydroxylation된 후 탈수 반응을 통해 생성되는 것으로 예상되었다. SP1시료에서는 gingerol, shogaol이 주요 성분이며 SP2, SP3시료에서는 6, 8, 10 shogaol의 양이 줄어들면서 6, 8, 10 paradol 양이 증가하는 패턴을 보였다. 그 밖에, paradol과 같은 분자량을 갖는 대사체도 새로 발견되었지만 그 양은 미미하였다.

6-gingerol을 확인할 수 있는  $m/z$  295에서 gingerol peak(11.1분)가 작게 보이지만 6-gingerol은 MS source에서 깨지기 때문에  $m/z$  277(6EM-277-3, 11.1분)로 6-gingerol의 양을 예측하였다. *S. pombe*에 의한 생물전환 대사체는 다른 미생물에 의한 대사체보다 탈수 반응 후 hydroxylation되는 반응이 덜 일어나는 것을 확인할 수 있었다. SP1시료와 비교하여 SP2, SP3시료에서 5 종류의 새로운 대사체가 생성되었다. 이들 대사체의 생성 mechanism은 gingerol에서 탈수 반응(shogaol) 후 reduction되는 반응으로 사료되었다. 또한, 다른 미생물 매양시료에 비하여 reduction에 의해 생성된 것으로 예측되는 대사체의 종류가 더 다양하게 검출되었다. 6, 8, 10 series별로 분류하였을 때, 6 series, 10 series에서는 shogaol과 같은 분자량을 갖는 대사체가 다양하게 발견되었고, 8 series에서는 shogaol과 같은 분자량을 갖는 대사체 외에 탈수 반응과 hydroxylation 반응을 거친 대사체가 다양하게 발견되었다. 각 대사체들의 크로마토그램적인 특징들을 표 8에 정리하였다. 각 대사체들의 elemental composition에 따른 이론값과 실측값의 차이가 10 ppm을 넘지 않는 것으로 관찰되는 것으로 보아 제시한 시정식에 맞는 대사체임을 확인하였다.

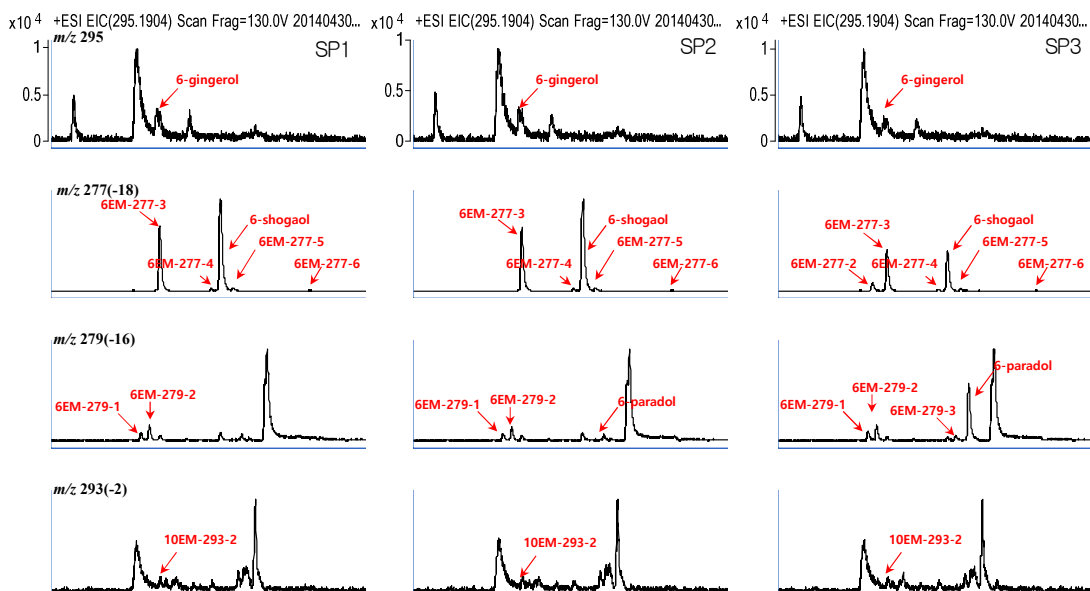


그림 34. SP1-3 시료의 생물전환 대사체(6-series) EIC

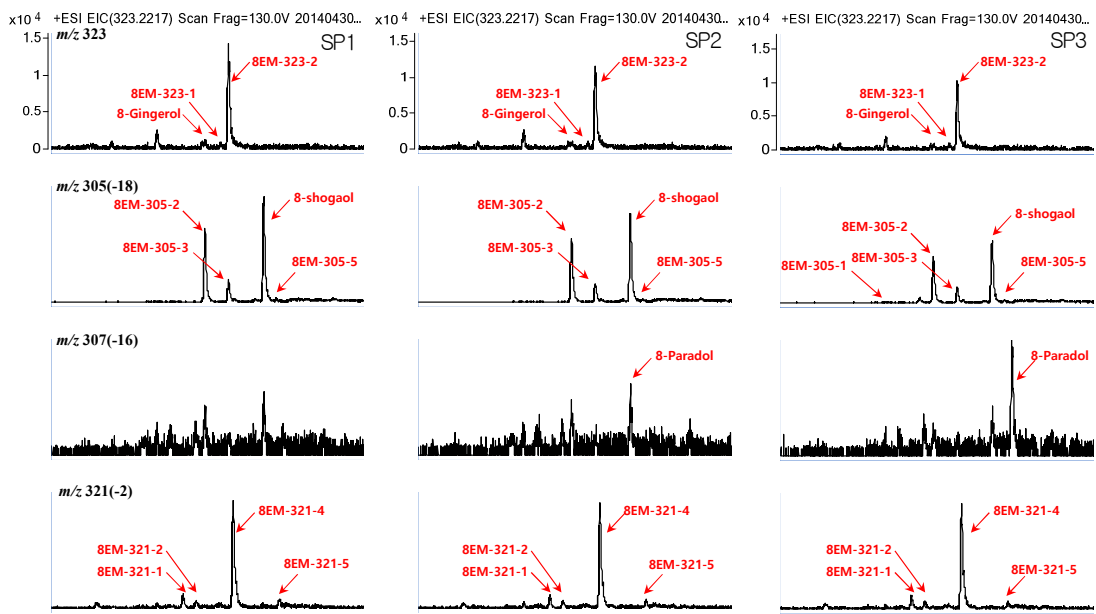


그림 35. SP1-3 시료의 생분전환 대사체(8-series) EIC

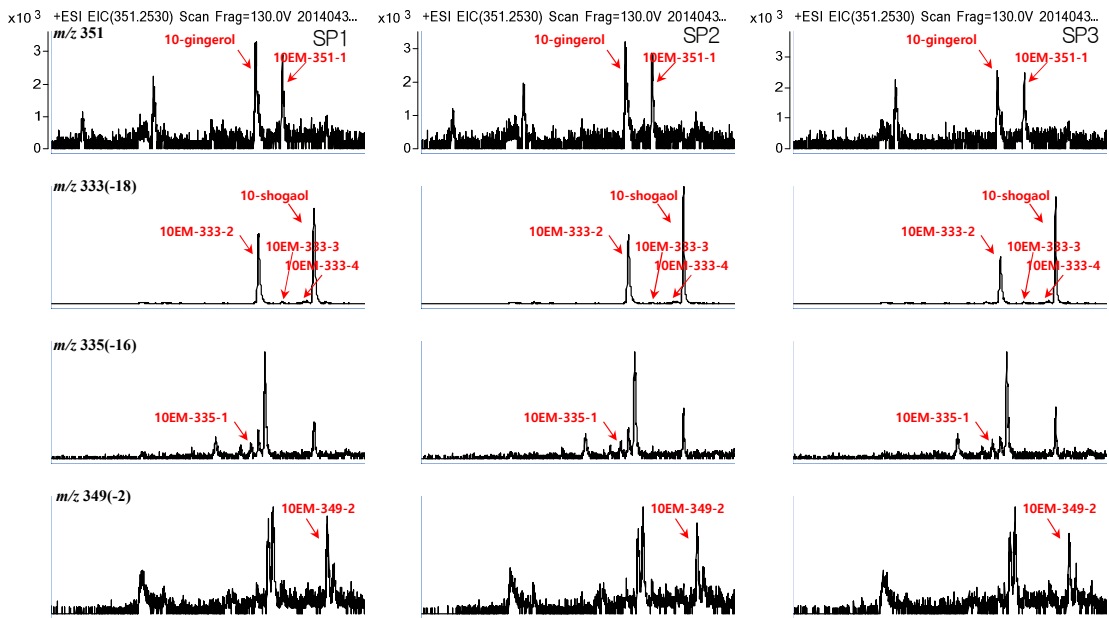


그림 36. SP1 3 시료의 생분전환 대사체(10 series) EIC

표 20. SP 시료의 생물전환 대사체 accurate mass 측정

| <i>S. pombe</i> |      |                       |                  |               |       |               |
|-----------------|------|-----------------------|------------------|---------------|-------|---------------|
| Name            | RT   | Elemental composition | Theoretical mass | Measured mass | Error | Remark        |
| 6-Gingerol      | 11.0 | C17H26O4              | 295.1904         | 295.1879      | 8.5   | SP1, SP2, SP3 |
| 6-Shogaol       | 13.6 | C17H24O3              | 277.1798         | 277.1783      | 5.4   | SP1, SP2, SP3 |
| 6EM-277-2       | 10.5 | C17H24O3              | 277.1798         | 277.1774      | 8.7   | SF3           |
| 6EM-277-3       | 11.1 | C17H24O3              | 277.1798         | 277.1777      | 7.6   | SP1, SP2, SP3 |
| 6FM-277-4       | 13.2 | C17H24O3              | 277.1798         | 277.1777      | 7.6   | SP1, SP2, SP3 |
| 6EM-277-5       | 14.1 | C17H24O3              | 277.1798         | 277.1773      | 9.0   | SP1, SP2, SP3 |
| 6FM-277-6       | 17.2 | C17H24O3              | 277.1798         | 277.1782      | 5.8   | SP1, SP2, SP3 |
| 6-Paradol       | 14.4 | C17H26O3              | 279.1955         | 279.1936      | 6.8   | SP2, SP3      |
| 6FM-279-1       | 10.3 | C17H26O3              | 279.1955         | 279.1932      | 8.2   | SP1, SP2, SP3 |
| 6EM-279-2       | 10.7 | C17H26O3              | 279.1955         | 279.1930      | 9.0   | SP1, SP2, SP3 |
| 6EM-279-3       | 13.9 | C17H26O3              | 279.1955         | 279.1929      | 9.3   | SF3           |
| 6EM-293-2       | 11.2 | C17H24O4              | 293.1747         | 293.1719      | 9.6   | SP1, SP2, SP3 |
| 8-Gingerol      | 13.1 | C19H30O4              | 323.2217         | 323.2193      | 7.4   | SP1, SP2, SP3 |
| 8EM-323-1       | 13.8 | C19H30O4              | 323.2217         | 323.2205      | 3.7   | SP1, SP2, SP3 |
| 8FM-323-2       | 14.1 | C19H30O4              | 323.2217         | 323.2188      | 9.0   | SP1, SP2, SP3 |
| 8-Shogaol       | 15.6 | C19H28O3              | 305.2111         | 305.2089      | 7.2   | SP1, SP2, SP3 |
| 8EM-305-1       | 12.5 | C19H28O3              | 305.2111         | 305.2081      | 9.8   | SF3           |
| 8EM-305-2       | 13.1 | C19H28O3              | 305.2111         | 305.2086      | 8.2   | SP1, SP2, SP3 |
| 8FM-305-3       | 14.1 | C19H28O3              | 305.2111         | 305.2085      | 8.5   | SP1, SP2, SP3 |
| 8EM-305-5       | 16.1 | C19H28O3              | 305.2111         | 305.2087      | 7.8   | SP1, SP2, SP3 |
| 8-Paradol       | 16.4 | C19H30O3              | 307.2268         | 307.2241      | 8.8   | SP2, SP3      |
| 8EM-321-1       | 12.2 | C19H28O4              | 321.2060         | 321.2034      | 8.1   | SP1, SP2, SP3 |
| 8FM-321-2       | 12.7 | C19H28O4              | 321.2060         | 321.2036      | 7.5   | SP1, SP2, SP3 |
| 8EM-321-4       | 14.3 | C19H28O4              | 321.2060         | 321.2035      | 7.8   | SP1, SP2, SP3 |
| 8FM-321-5       | 16.2 | C19H28O4              | 321.2060         | 321.2076      | 5.0   | SP1, SP2, SP3 |
| 10-Gingerol     | 15.0 | C21H34O4              | 351.2530         | 351.2508      | 6.3   | SP1, SP2, SP3 |
| 10EM-351-1      | 16.1 | C21H34O4              | 351.2530         | 351.2501      | 8.3   | SP1, SP2, SP3 |
| 10-Shogaol      | 17.4 | C21H32O3              | 333.2424         | 333.2403      | 6.3   | SP1, SP2, SP3 |
| 10FM-333-2      | 15.1 | C21H32O3              | 333.2424         | 333.2400      | 7.2   | SP1, SP2, SP3 |
| 10EM-333-3      | 16.0 | C21H32O3              | 333.2424         | 333.2395      | 8.7   | SP1, SP2, SP3 |
| 10EM-333-4      | 17.1 | C21H32O3              | 333.2424         | 333.2403      | 6.3   | SP1, SP2, SP3 |
| 10EM-335-1      | 14.7 | C21H34O3              | 335.2581         | 335.2551      | 8.9   | SP1, SP2, SP3 |
| 10FM-349-2      | 18.0 | C21H32O4              | 349.2373         | 349.2341      | 9.2   | SP1, SP2, SP3 |

(라) V 시료의 생물전환 대사체 프로파일 분석

V 시료에서는 총 27개의 대사체가 확인되었다. V 시료의 생물전환 대사체 프로파일을 분석한 결과는 그림 37-39과 같다. V1에 비하여 V2, 3 시료에는 7가지 대사체 (6EM-295-2, 6EM-277-2, 6-paradol, 6EM-293-1, 8EM-305-1, 8-paradol, 10EM-333-1)가 새롭

게 생성되었다. 6-shogaol은 reduction을 통해 6-paradol( $m/z$  279) 대사체와 hydroxylation을 통해 6EM-293-1( $m/z$  293)의 대사체가 생성되고, reduction과 hydroxylation 반응이 일어나 6EM-295-2( $m/z$  295)의 대사체가 되었다. 8-shogaol은 reduction 반응을 통해 8-paradol( $m/z$  307) 대사체가 생성되었으며, 6EM-277-2, 8EM-305-1, 10EM-333-1은 shogaol과 같은 분자량을 가진 대사체로 gingerol로부터 탈수 반응을 통해 생성되거나 paradol로부터 hydroxylation된 후 탈수 반응을 통해 생성되는 것으로 예상되었다. AN1 시료와 비교할 때, AN2, AN3 시료에서 6-, 8-, 10- gingerol이 반응 시간에 따라 감소하였다가 다시 증가하는 경향을 보였고, 6-shogaol은 점차 감소하였다. 다른 미생물 반응 시료와 유사하게 AN2, AN3 시료에서는 6-paradol, 8-paradol의 생성이 현저히 증가하였으나, 8-, 10-shogaol은 반응 시간에 따라 감소하였다가 증가하는 경향을 보여, 다른 미생물 시료와는 다른 독특한 대사 패턴이 관찰되었다. AN2, AN3시료에서는 AN1시료에 비하여 4 종류의 새로운 대사체가 생겨났으며, 새로 생겨난 대사체들의 주요 대사 mechanism은 shogaol에서 reduction되거나 hydroxylation된 반응이었다.

특히, 1. *niger*에 의한 생물전환 대사체는 다른 미생물 시료와 달리 반응 시간이 지남에 따라 6-, 8-, 10-shogaol과 분자량이 같은 대사체가 증가하는 경향을 보였다. 6-, 8-, 10 series별로 분류하였을 때, 6 series에서는 shogaol과 같은 분자량을 갖는 대사체와 shogaol에서 reduction된 paradol관련 대사체가 다양하게 발견되었고, 8-series 뿐만 아니라 10-series에서도 shogaol과 같은 분자량을 갖는 대사체와 shogaol에서 hydroxylation된 대사체가 다양하게 발견되었다. 각각의 대사체들의 크로마토그램적인 특징들을 표 9에 정리하였다. 각 대사체들의 elemental composition에 따른 이론값과 실측값의 차이가 10 ppm을 넘지 않는 것으로 관찰되는 것으로 보아 제시한 시정식에 맞는 대사체임을 확인하였다.

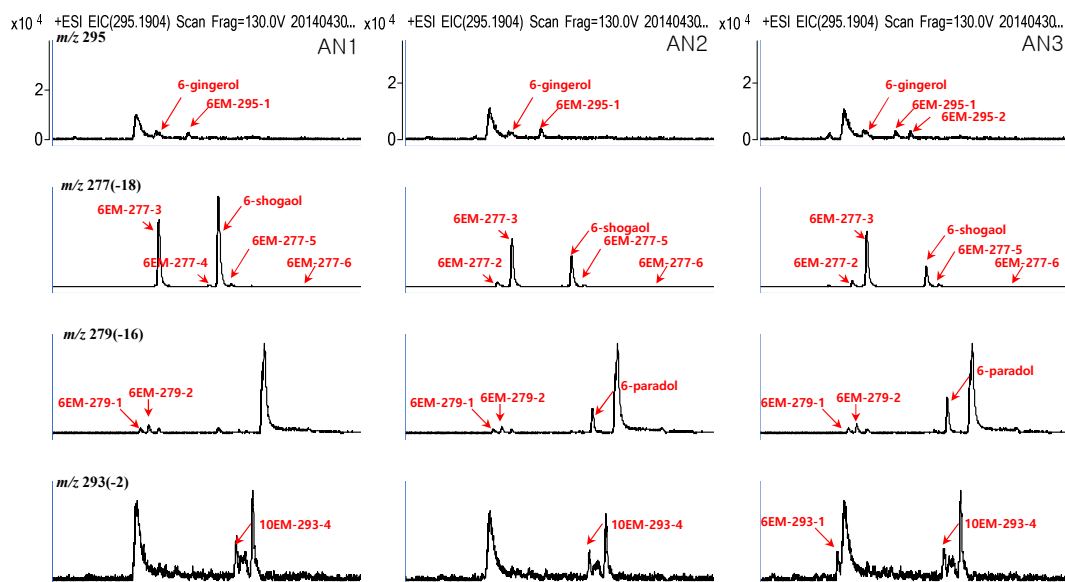


그림 37. AN1~3 시료의 생물전환 대사체(6 series) EIC.

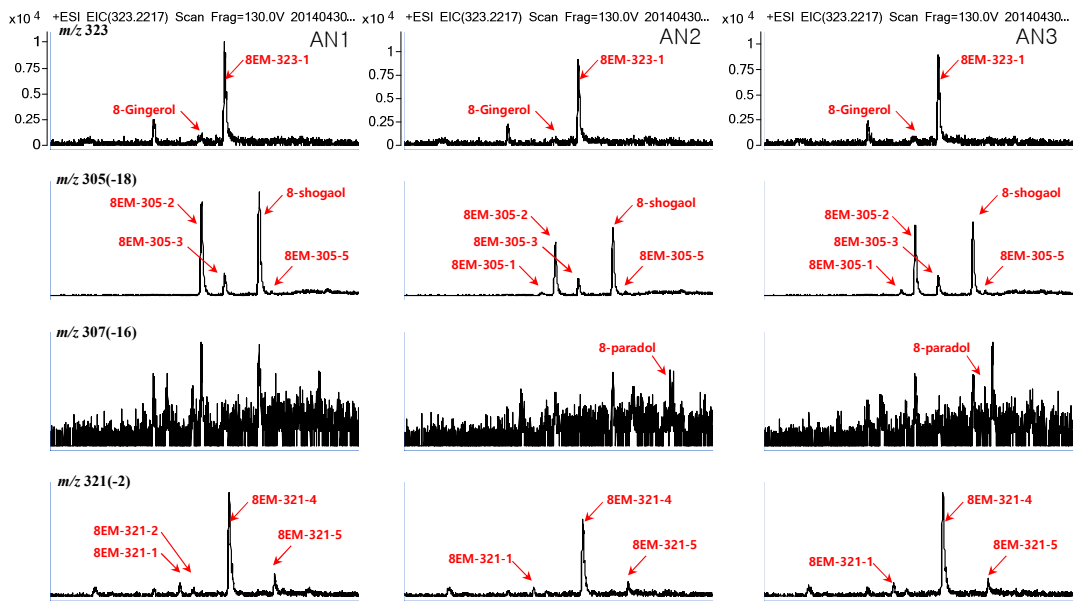


그림 38. N1-3 시료의 생분전환 대사체(8-series) EIC.

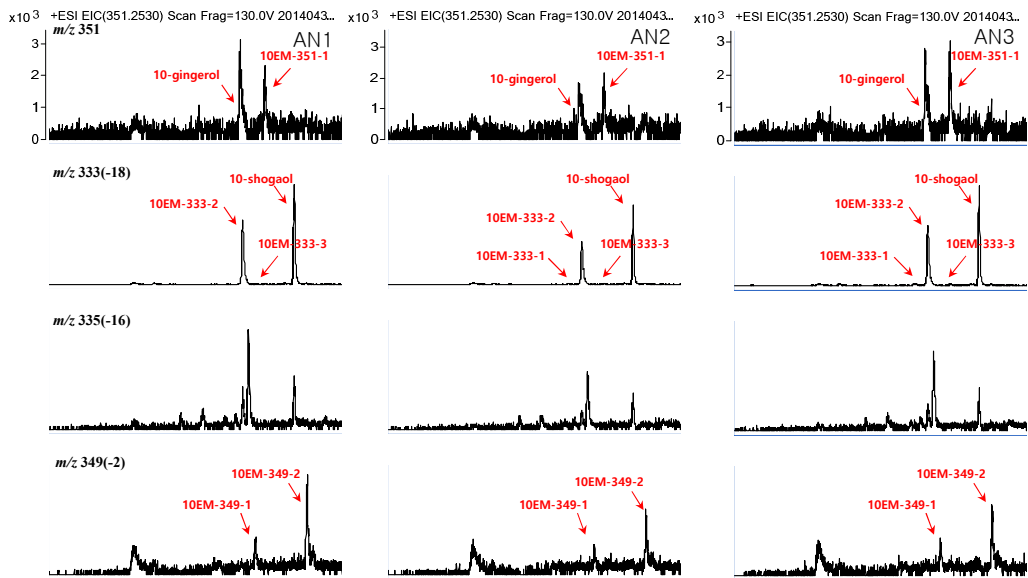


그림 38. N1-3 시료의 생분전환 대사체(10-series) EIC

표 21. *A. niger* 시료의 생물 전환 대사체 accurate mass 측정

| <i>A. niger</i> |      |                       |                  |               |       |               |
|-----------------|------|-----------------------|------------------|---------------|-------|---------------|
| Name            | RT   | Elemental composition | Theoretical mass | Measured mass | Yield | Remark        |
| 6-Gingerol      | 11.0 | C17H26O4              | 295.1904         | 295.1875      | 9.8   | AN1, AN2, AN3 |
| 6E-I-295-1      | 12.3 | C17H26O4              | 295.1904         | 295.1889      | 5.1   | AN1, AN2, AN3 |
| 6E-I-295-2      | 12.9 | C17H26O4              | 295.1904         | 295.1883      | 7.1   | AN3           |
| 6-Shogaol       | 13.6 | C17H24O3              | 277.1798         | 277.1779      | 6.9   | AN1, AN2, AN3 |
| 6E-I-277-2      | 10.5 | C17H24O3              | 277.1798         | 277.1775      | 8.3   | AN2, AN3      |
| 6E-I-277-3      | 11.1 | C17H24O3              | 277.1798         | 277.1778      | 7.2   | AN1, AN2, AN3 |
| 6E-I-277-4      | 13.2 | C17H24O3              | 277.1798         | 277.1777      | 7.5   | AN1           |
| 6E-I-277-5      | 14.1 | C17H24O3              | 277.1798         | 277.1778      | 7.2   | AN1, AN2, AN3 |
| 6E-I-277-6      | 17.2 | C17H24O3              | 277.1798         | 277.1782      | 5.8   | AN1, AN2, AN3 |
| 6-Paradol       | 14.4 | C17H26O3              | 279.1955         | 279.1937      | 6.4   | AN2, AN3      |
| 6E-I-279-1      | 10.3 | C17H26O3              | 279.1955         | 279.1931      | 8.6   | AN1, AN2, AN3 |
| 6E-I-279-2      | 10.7 | C17H26O3              | 279.1955         | 279.1933      | 7.9   | AN1, AN2, AN3 |
| 6E-I-293-1      | 9.9  | C17H24O1              | 293.1747         | 293.1720      | 9.2   | AN3           |
| 6E-I-293-4      | 14.3 | C17H24O1              | 293.1747         | 293.1765      | 6.1   | AN1, AN2, AN3 |
| 8-Gingerol      | 13.0 | C19H30O4              | 323.2217         | 323.2197      | 6.6   | AN1, AN2, AN3 |
| 8E-I-323-1      | 13.8 | C19H30O4              | 323.2217         | 323.2190      | 8.3   | AN1, AN2, AN3 |
| 8E-I-323-2      | 14.1 | C19H30O4              | 323.2217         | 323.2197      | 6.2   | AN1, AN2, AN3 |
| 8-Shogaol       | 15.6 | C19H28O3              | 305.2111         | 305.2093      | 5.9   | AN1, AN2, AN3 |
| 8E-I-305-1      | 12.5 | C19H28O3              | 305.2111         | 305.2082      | 9.5   | AN2, AN3      |
| 8E-I-305-2      | 13.1 | C19H28O3              | 305.2111         | 305.2091      | 6.6   | AN1, AN2, AN3 |
| 8E-I-305-3      | 14.1 | C19H28O3              | 306.2111         | 305.2092      | 6.2   | AN1, AN2, AN3 |
| 8E-I-305-5      | 16.1 | C19H28O3              | 307.2111         | 305.2090      | 6.8   | AN1, AN2, AN3 |
| 8-Paradol       | 16.4 | C19H30O3              | 307.2268         | 307.2244      | 7.8   | AN2, AN3      |
| 8E-I-321-1      | 12.2 | C19H28O1              | 321.2060         | 321.2045      | 4.6   | AN1, AN2, AN3 |
| 8E-I-321-2      | 12.8 | C19H28O1              | 321.2060         | 321.2032      | 8.7   | AN1           |
| 8E-I-321-4      | 14.3 | C19H28O4              | 321.2060         | 321.2042      | 5.6   | AN1, AN2, AN3 |
| 8E-I-321-5      | 16.2 | C19H28O1              | 321.2060         | 321.2067      | 2.2   | AN1, AN2, AN3 |
| 10-Gingerol     | 15.0 | C21H34O4              | 351.2530         | 351.2502      | 8.0   | AN1, AN2, AN3 |
| 10E-I-351-1     | 16.1 | C21H34O4              | 351.2530         | 351.2516      | 4.0   | AN1, AN2, AN3 |
| 10-Shogaol      | 17.4 | C21H32O3              | 333.2424         | 333.2406      | 5.4   | AN1, AN2, AN3 |
| 10E-I-333-1     | 14.5 | C21H32O3              | 333.2424         | 333.2401      | 6.9   | AN2, AN3      |
| 10E-I-333-2     | 15.1 | C21H32O3              | 333.2424         | 333.2406      | 5.4   | AN1, AN2, AN3 |
| 10E-I-333-3     | 16.0 | C21H32O3              | 333.2424         | 333.2398      | 7.8   | AN1, AN2, AN3 |
| 10E-I-349-1     | 15.7 | C21H32O4              | 349.2373         | 349.2382      | 2.6   | AN1, AN2, AN3 |
| 10E-I-349-2     | 18.0 | C21H32O4              | 349.2373         | 349.2345      | 8.0   | AN1, AN2, AN3 |

(2) 생물전환 대사체 함량 분석

CU1 시료에서 6-gingerol은 5.85 mg/g으로 함량이 100%로 나타났고, CU2 시료에는 4.50 mg/g(77.0%), CU3 시료에는 5.25 mg/g(89.8%)이며, 8-gingerol도 CU3 시료에 함량이 0 시간에 비해 79.1%, 10-gingerol의 함량도 77.0%로 나타났다. 6-shogaol은 CU1 시료에 4.77 mg/g으로 함량이 100%으로 CU2 시료에는 1.78 mg/g로 37.3% 감소하였고, CU3 시료에는 1.36 mg/g으로 28.5% 감소하였다. 8-shogaol은 CU1 시료에 0.99 mg/g로 함량이 100%이고 CU2, CU3 시료에는 0.61 mg/g(61.5%)로 감소하였고, 10-shogaol은 CU1 시료에는 1.05 mg/g(100%)로 나타났고, CU2,3시료에는 함량이 각각 0.75mg/g(71.3%), 0.84mg/g(79.5%)로 감소하였다. 전체적으로 gingerol과 shogaol은 감소하는 경향을 보이지만 그 폭이 크지 않으나, 6-shogaol의 감소폭은 큰 것으로 관찰되어 주로 6-shogaol에 의한 생물전환 대사가 일어나는 것으로 생각할 수 있었다. CU 시료의 생물전환 대사체 함량 및 조성은 표 22에 나타났다.

표 22. CU 시료의 대사체 함량 및 조성비율

| 생강대사체       | 함량 (mg/g)        |                  |                   |
|-------------|------------------|------------------|-------------------|
|             | CU1              | CU2              | CU3               |
| 6-Gingerol  | 5.85<br>(100.0%) | 4.50<br>(77.0%)  | 5.25<br>(89.8%)   |
| 8-Gingerol  | 0.88<br>(100.0%) | 0.60<br>(68.2%)  | 0.70<br>(79.1%)   |
| 10-Gingerol | 1.95<br>(100.0%) | 1.29<br>(66.2%)  | 1.50<br>(77.0%)   |
| 6-Shogaol   | 4.77<br>(100.0%) | 1.78<br>(37.3%)  | 1.36<br>(28.5%)   |
| 8-Shogaol   | 0.99<br>(100.0%) | 0.61<br>(61.5%)  | 0.61<br>(61.2%)   |
| 10-Shogaol  | 1.05<br>(100.0%) | 0.75<br>(71.3%)  | 0.84<br>(79.5%)   |
| 6-Paradol   | 0.41<br>(100.0%) | 3.39<br>(826.6%) | 4.81<br>(1172.9%) |
| 8-Paradol*  | 0.41<br>(100.0%) | 3.39<br>(827.6%) | 4.81<br>(1174.1%) |
| 10-Paradol* | 0.10<br>(100.0%) | 0.79<br>(783.4%) | 1.48<br>(1456.0%) |

SC1 시료에는 6-gingerol 함량이 4.46 mg/g(100%)로 나타났으며 SC2, 3 시료에는 4.64(104.2%), 5.69(127.8%)로 나타났고, SC3 시료에는 8-gingerol과 10-gingerol의 함량은 SC1 시료에 비해 조성이 129.9, 129.3%로 증가하였다. 반면, SC1 시료에 6-shogaol 함량이 3.25 mg/g(100%)로 나타났고, SC2 시료에는 1.80 mg/g(55.3%), SC3 시료에는 2.16 mg/g(66.5%)로, 그 양이 감소하는 경향을 보였다. 6-Paradol의 함량은 SC1 시료에 0.56 mg/g(100%)에서 SC2 시료에는 2.91 mg/g(523.0%)로 5배 증가하였고, SC3 시료에는 4.64 mg/g(832.7%)로 8배 이상 증가하였다. SC 시료의 생물전환 대사체 함량 및 조성은 표 23에 나타났다.



표 23. SC 시료의 대사체 함량 및 조성비율

| 생강대사체       | 함량(mg/g)         |                  |                  |
|-------------|------------------|------------------|------------------|
|             | SC1              | SC2              | SC3              |
| 6-Gingerol  | 4.46<br>(100.0%) | 4.64<br>(104.2%) | 5.69<br>(127.8%) |
| 8-Gingerol  | 0.57<br>(100.0%) | 0.58<br>(101.2%) | 0.74<br>(129.9%) |
| 10-Gingerol | 1.23<br>(100.0%) | 1.28<br>(103.7%) | 1.59<br>(129.3%) |
| 6-Shogaol   | 3.25<br>(100.0%) | 1.80<br>(55.3%)  | 2.16<br>(66.5%)  |
| 8 Shogaol   | 0.63<br>(100.0%) | 0.56<br>(89.9%)  | 0.71<br>(113.4%) |
| 10-Shogaol  | 0.66<br>(100.0%) | 0.73<br>(110.7%) | 0.87<br>(130.7%) |
| 6-Paradol   | 0.56<br>(100.0%) | 2.91<br>(523.0%) | 4.64<br>(832.7%) |
| 8 Paradol   | 0.56<br>(100.0%) | 2.91<br>(523.1%) | 4.64<br>(832.9%) |
| 10-Paradol  | 0.09<br>(100.0%) | 0.66<br>(718.7%) | 0.80<br>(871.1%) |

SP1 시료에는 6-gingerol 함량이 6.17 mg/g(100%)이고, SP2, 3 시료에는 5.82 mg/g(94.3%), 3.61 mg/g(58.5%)로 감소하였고, 8-gingerol의 함량도 SP1 시료에는 0.94 mg/g(100%)으로 관찰되었고, SP2, 3시료에는 0.88 mg/g(94.3%), 0.58 mg/g(62.5%)으로 6-gingerol과 마찬가지로 감소하는 경향을 보였다. 10-gingerol의 함량은 SP1 시료 2.12 mg/g(100%), SP2 시료 2.07 mg/g(97.85%), SP3 시료에는 1.37 mg/g(64.4%)로 반응시간의 지남에 따라 감소하는 경향을 보였다. 6-shogaol의 함량은 SP1 시료에는 5.07 mg/g(100%), SP2 시료에는 2.07 mg/g(40.8%), SP3 시료에는 1.80 mg/g(35.5%)로 감소하는 경향이 나타났고, 8 shogaol과 10 shogaol의 함량은 SP2 시료에서 감소하여 SP3 시료에 각각 0.71 mg/g(66.3%), 1.04 mg/g(92.2%)로 점차 감소하였다. 6 paradol의 함량을 살펴보면, SP1 시료에는 0.55 mg/g(100%), SP2, 3 시료에는 3.39 mg/g(616.4%), 6.92 mg/g(1253.1%)로 반응시간이 지날수록 점차 증가되는 결과를 얻었고, 8-paradol과 10-paradol의 경우에도 SP3 시료 내의 함량이 SP1 시료에 비해 12배 이상 증가하는 결과를 보였다. SP 시료의 6-paradol의 함량은 다른 시료와 비교하여 가장 높은 것을 확인할 수 있었다. SP 시료의 생분 전환 대사체의 함량 및 조성은 표 24에 나타났다.

표 24. SP 시료의 대사체 함량 및 조성비율

| 생강대사체       | 함량(mg/g)         |                  |                   |
|-------------|------------------|------------------|-------------------|
|             | SP1              | SP2              | SP3               |
| 6-Gingerol  | 6.17<br>(100.0%) | 5.82<br>(94.3%)  | 3.61<br>(58.5%)   |
| 8-Gingerol  | 0.94<br>(100.0%) | 0.88<br>(94.3%)  | 0.58<br>(62.5%)   |
| 10-Gingerol | 2.12<br>(100.0%) | 2.07<br>(97.8%)  | 1.37<br>(64.4%)   |
| 6-Shogaol   | 5.07<br>(100.0%) | 2.07<br>(40.8%)  | 1.80<br>(35.5%)   |
| 8 Shogaol   | 1.06<br>(100.0%) | 0.91<br>(85.8%)  | 0.71<br>(66.3%)   |
| 10-Shogaol  | 1.13<br>(100.0%) | 1.01<br>(89.4%)  | 1.04<br>(92.2%)   |
| 6-Paradol   | 0.55<br>(100.0%) | 3.39<br>(616.4%) | 6.92<br>(1253.1%) |
| 8 Paradol   | 0.55<br>(100.0%) | 2.48<br>(450.9%) | 6.92<br>(1252.8%) |
| 10-Paradol  | 0.10<br>(100.0%) | 0.78<br>(780.0%) | 1.59<br>(1537.6%) |

\N1 시료에는 6-gingerol의 함량이 5.47 mg/g(100%)이고, \N2, 3 시료에는 각각 3.83 mg/g(70.1%), 4.68 mg/g(85.6%)으로 나타났으며 8-gingerol과 10-gingerol은 \N3 시료에 함량이 0.64 mg/g(83.3%), 1.31 mg/g(80.1%)으로 다소 감소 비율이 낮은 것을 관찰하였다. \N1 시료에는 6-shogaol의 함량은 3.98 mg/g(100%)로 나타났으며, \N2 시료에는 1.12 mg/g(28.2%)로 대폭 감소하였으며, \N3 시료에는 0.69 mg/g(17.4%)로 3시간만에 더 감소한 것이 관찰되어, 8-shogaol이나 10-shogaol의 \N3 시료에서 70% 조성으로 나타나는 것을 참고하여 볼 때, 6-shogaol이 주로 생물전환 대사에 관여하는 것으로 생각할 수 있다. \N1 시료에는 6 paradol의 함량이 0.24 mg/g(100%)로 나타났다가 \N2 시료에는 3.16 mg/g(1338.6%), \N3 시료에는 3.94 mg/g(1667.8%)로 18시간에 13배가 증가하고 이후로 꾸준히 증가하는 것으로 관찰되었다. 8-paradol과 10-paradol의 함량도 \N3 시료에 3.94 mg/g(1670.3%), 0.54 mg/g(1079.3%)로 \N1 시료에 비하여 증가하는 것을 관찰하였다. 6-shogaol이 대폭 감소한 것에 비해 생성된 6-paradol의 함량이 높지 않는 것으로 보아 6 shogaol이 paradol 뿐 아니라 다른 대사체로 전환되는 것으로 보인다. \N 시료의 생물전환 대사체 함량 및 조성은 표 25에 나타났다.

표 25. AX 시료의 대사체 함량 및 조성비율

| 생강대사체       | 함량(mg/g)         |                   |                   |
|-------------|------------------|-------------------|-------------------|
|             | AX1              | AX2               | AX3               |
| 6-Gingerol  | 5.47<br>(100.0%) | 3.83<br>(70.1%)   | 4.68<br>(85.6%)   |
| 8-Gingerol  | 0.77<br>(100.0%) | 0.54<br>(70.7%)   | 0.64<br>(83.3%)   |
| 10-Gingerol | 1.64<br>(100.0%) | 1.10<br>(67.1%)   | 1.31<br>(80.1%)   |
| 6-Shogaol   | 3.98<br>(100.0%) | 1.12<br>(28.2%)   | 0.69<br>(17.4%)   |
| 8 Shogaol   | 0.67<br>(100.0%) | 0.48<br>(71.3%)   | 0.50<br>(74.3%)   |
| 10-Shogaol  | 0.68<br>(100.0%) | 0.53<br>(77.5%)   | 0.63<br>(91.9%)   |
| 6-Paradol   | 0.24<br>(100.0%) | 3.16<br>(1338.6%) | 3.94<br>(1667.8%) |
| 8 Paradol   | 0.24<br>(100.0%) | 3.15<br>(1336.8%) | 3.94<br>(1670.3%) |
| 10-Paradol  | 0.05<br>(100.0%) | 0.24<br>(473.6%)  | 0.54<br>(1079.3%) |

(3) 예측대사체 조성비에 근접하는 생물전환 대사체 후보물질군의 주성분 분석

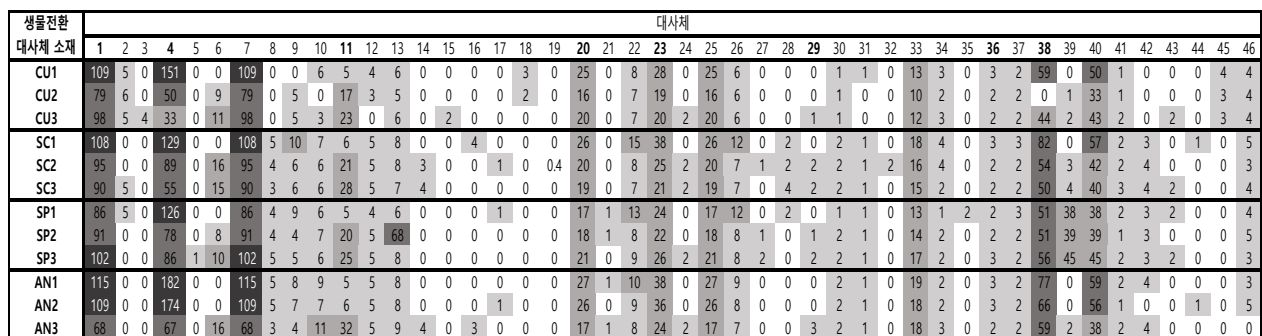
생물전환 대사체 후보물질군의 대사체 프로파일의 변화를 분석하기 위하여 다변량 통계 분석법인 주성분 분석을 이용하였다. 통계분석을 위하여 gingerol, shogaol, paradol을 포함하여 LC/QTOF-MS 분석을 통해 검출된 총 46개의 대사체를 변수로 선정하여 미생물 및 반응처리 시간이 각기 다른 총 12개의 시료에 대하여 대사체 프로파일의 패턴을 분석하였다. 주성분 분석에 사용된 총 46개의 생강 대사체에 대한 정보는 표 26에 정리하였다. 각 시료에서 검출된 46종의 대사체의 피크면적 패턴은 그림 40에 나타내었다. CU, 2, 3의 경우 40-43의 대사체의 양이 다른 미생물 배양액의 대사체에 비하여 많은 것을 확인할 수 있었고, SC1, 2, 3의 경우 gingerol의 양이 증가하고, shogaol의 경우 다른 시료에 비해 감소율이 적은 것을 확인하였고, paradol(11) 생성량이 적은 수준에 미치는 것을 확인하였다. SP1, SP2, SP3의 경우, gingerol과 shogaol이 점차 감소하며 이에 따라 paradol의 양이 점차 늘어가는 것을 확인하였으며, 차이가 미비하지만 다른 시료에 비하여 가장 많은 paradol이 생성된 것을 확인할 수 있었다. AX1, AX2, AX3의 경우, gingerol(1, 7)의 감소폭이 다소 미미하고, shogaol의 감소폭이 다른 시료에 비하여 큰 것을 관찰하였고, 이와 더불어 paradol이 생성되지 않고 다른 대사체(15, 18, 45)가 동시에 생성되는 것을 확인할 수 있었다. 생물전환 후보물질군 총 12개의 시료에 대하여 총 46개의 대사체를 변수로 하여 주성분 분석을 수행하였으며 그 결과 그림 41와 같은 주성분 score plot이 도출되었다. 12개 시료를 총 3가지 요인, 즉 3 가지의 잠재변수에 의하여 분류할 수 있었는데, 성분 1 요인에 의해서는 모두 같은 부류로 묶여지지만, 성분2 요인에 의해서는 CU, SC, SP와 AX이 구분이 되

어 다르게 대사되는 것을 확인할 수 있었다. 이는 그림 42을 보면, 각 미생물 종의 배양 전 시료 (시료1)는 성분1의 오른쪽에 주로 분포하였으나, 각 미생물에 의한 생물전환에 의하여 성분1에 대하여 음의 방향으로 이동하는 것을 알 수 있다. 성분2에 대해서는 SP, SC, CU의 경우는 배양시간이 증가함에 따라 양의 방향으로 이동하였으나, \N의 경우 큰 변화를 보이지 않는 것으로 관찰되어, CU, SP, SC의 경우와 차이를 보였다.

표 26. 생물전환 대사체의 패턴 분석에 사용된 대사체 정보

| 번호 | 대사체        | 번호 | 대사체        | 번호 | 대사체       | 번호 | 대사체           | 번호 | 대사체        |
|----|------------|----|------------|----|-----------|----|---------------|----|------------|
| 1  | 6-Gingerol | 11 | 6-Paradol  | 21 | 8EM-323-1 | 31 | 8EM-321-2     | 41 | 10EM-333-3 |
| 2  | 6EM 295 1  | 12 | 6EM 279 1  | 22 | 8EM 323 2 | 32 | 8EM 321 3     | 42 | 10EM 333 4 |
| 3  | 6EM 295 2  | 13 | 6EM 279 2  | 23 | 8 Shogaol | 33 | 8EM 321 4     | 43 | 10EM 333 5 |
| 4  | 6 Shogaol  | 14 | 6EM 279 3  | 24 | 8EM 305 1 | 34 | 8EM 321 5     | 44 | 10EM 335 1 |
| 5  | 6EM-277-1  | 15 | 6EM-293-1  | 25 | 8EM-305-2 | 35 | 8EM-321-6     | 45 | 10EM-349-1 |
| 6  | 6EM-277-2  | 16 | 6EM-293-2  | 26 | 8EM-305-3 | 36 | 10-Gingogogol | 46 | 10EM-349-2 |
| 7  | 6EM-277-3  | 17 | 6EM-293-3  | 27 | 8EM-305-4 | 37 | 10EM-351-1    |    |            |
| 8  | 6EM-277-4  | 18 | 6EM-293-4  | 28 | 8EM-305-5 | 38 | 10-Shogaol    |    |            |
| 9  | 6EM-277-5  | 19 | 6EM-293-5  | 29 | 8-Paradol | 39 | 10EM-333-1    |    |            |
| 10 | 6EM-277-6  | 20 | 8-Gingerol | 30 | 8EM-321-1 | 40 | 10EM-333-2    |    |            |

(단위: 10,000)



Area = 0 ; □, 1 ≤ Area < 10 ; ■, 10 ≤ Area < 50 ; ■, 50 ≤ Area < 100 ; ■, Area ≥ 100 ; ■

그림 40. 각 시료에 의한 생물전환 대사체 생성패턴

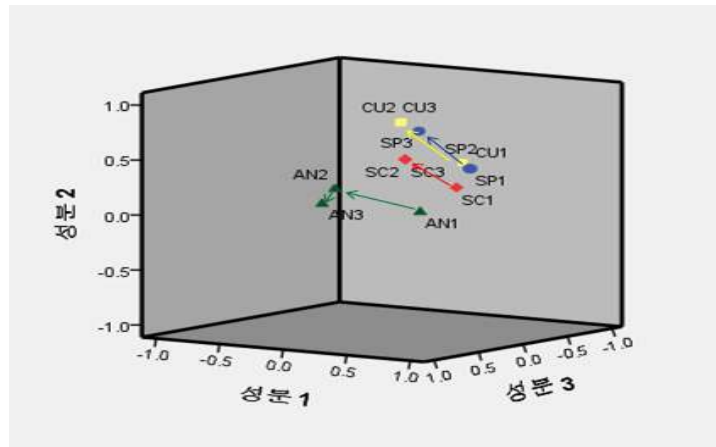


그림 41. 생물전환 대사체의 주성분 score plot

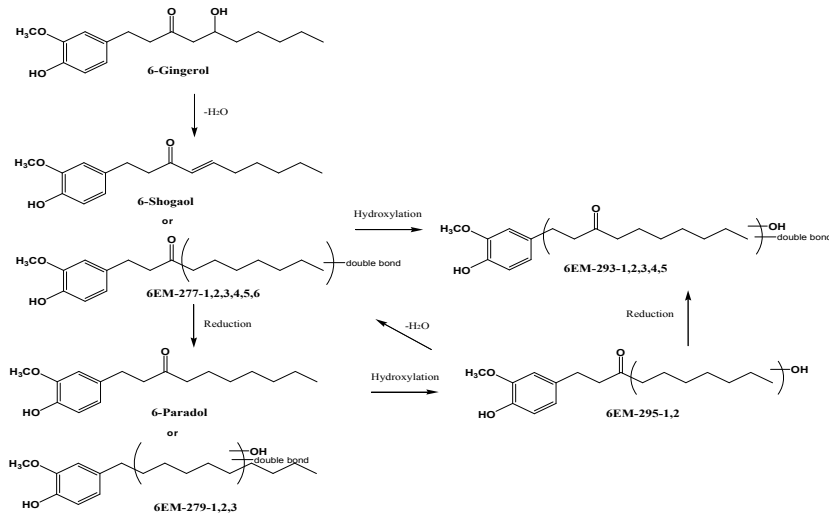


그림 42. Proposed metabolism pathway of 6-gingerol, 6-shogaol

나. 예측 대사체 조성비에 근접하는 생물전환 후보물질군의 *in vitro* 효능평가

(1) 생물전환 후보물질군의  $\text{A}\beta$  oligomer와 plaque 독성에 대한 보호 효능 평가

$\text{A}\beta$  plaques는 주로 amyloid precursor protein (APP)의 분해로 생긴 39-43 아미노산의 extracellular deposit에 degenerative neurons과 reactive glial cells, 그리고 다른 여러 가지 단백질 구성(ApoE,  $\alpha$ -synuclein fragment 등)으로 이루어진다. 그 중  $\text{A}\beta$ 1-42가 쉽게 fibril을 만들며 축적되는 형상으로서 독성을 발휘한다. 알츠하이머병에서 뇌세포사멸의 일차적인 원인이  $\text{A}\beta$ 1<sub>2</sub> fragment로 밝혀짐에 따라 이 질환의 치료제 개발 전략이 여러 가지로 제시되고 있다. 뇌에서 생성된 잠복염증으로 인해 아밀로이드-베타가 생성되고 이것이  $\text{A}\beta$  plaques로 전환되면서 염증반응이 일어난다.  $\text{A}\beta$  plaques는 면역 글로블린을 만드는 아미노산 사슬 가운데 하나와 동일하여 염증과 면역계를 과도하게 흥분시킨다. 그러므로  $\text{A}\beta$  plaques가 제거되지 못하고 축적이 되면 염증을 발생시키며 정상적인 세포의 대사를 방해하는 독성으로 작용하여 자유라디칼의 생성과 함께 세포를 사멸시킨다.

$\text{A}\beta$  oligomer 독성에 대한 세포보호효능 평가 모델에서, 독성 처리군은 control군 대비 72.56 $\pm$ 3.60%, 69.98 $\pm$ 3.52%의 세포생존율을 보였다(그림 43). 생물전환 대사체 후보물질 처리군과  $\text{A}\beta$  oligomer 독성 처리군을 비교하였을 때, SP2 시료 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ (95.52 $\pm$ 2.99%), SP3 시료 25, 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ (88.25 $\pm$ 3.39%, 89.37 $\pm$ 1.65%)에서 세포 생존율이 통계적으로 유의하게 증가하였다.

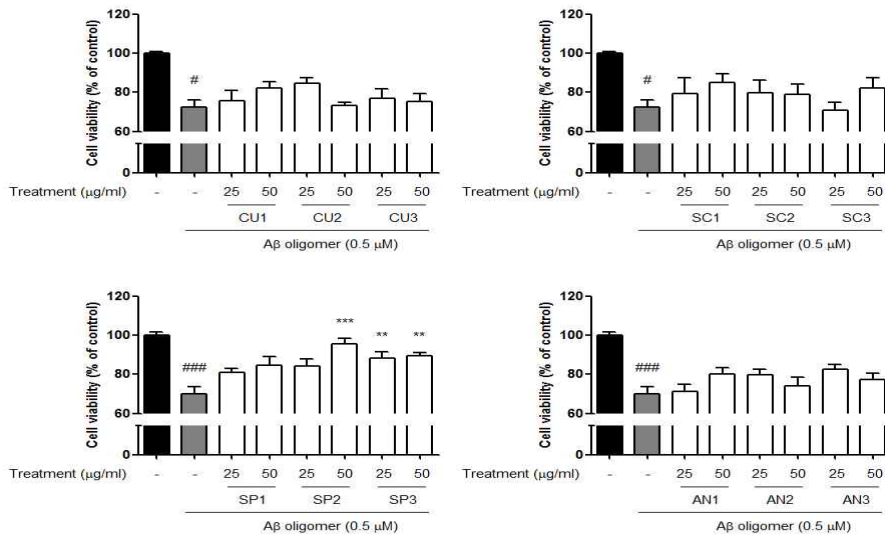


그림 43. 생물전환 후보물질군(CU1-3, SC1-3, SP1-3, AN1-3)의  $\text{A}\beta$  oligomer 독성에 대한 세포 보호 효능.

$\text{A}\beta$  plaque 독성에 대한 세포보호효능 평가 결과, 독성 처리군은 control군 대비 74.20  $\pm$  3.21%, 71.51  $\pm$  2.05%의 세포생존율을 보였다(그림 44). 생물전환 대사체 후보물질 처리군과  $\text{A}\beta$  oligomer 독성 처리군을 비교하였을 때, SP2 시료 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ (98.62 $\pm$ 3.51%), SP3 시료 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ (91.17 $\pm$  2.22%)에서 세포 생존율이 유의적으로 증가하였다.

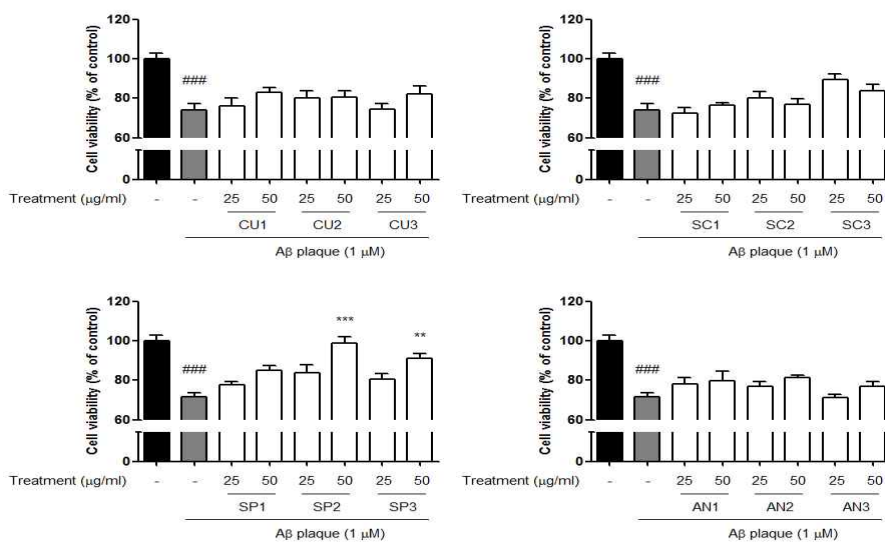


그림 44. 생물전환 후보물질군(CU1-3, SC1-3, SP1-3, AN1-3)의  $\text{A}\beta$  plaque 독성에 대한 세포 보호 효능.

(2) 생물전환 후보물질군의 AChE 억제 효능 평가

AChE는 대뇌의 사고 및 기억 작용에서 주요한 역할을 하는 neurotransmitter인 acetylcholine (ACh)을 가수분해하는 효소이며, 현재까지 AChE를 억제하여 뇌 내 ACh 농도를 증가시키는 방법은 알츠하이머를 포함한 치매 치료제의 주요한 기전이 되고 있다. AChE inhibition assay는 Ellman, G. L.의 방법에 기초하여 샘플이 ACh을 분해하는 효소인 AChE의 활성을 억제하는 능력을 평가하는 assay이다. ACh을 분해하는 효소인 AChE에 의하여 ACh이 분해되는데, 이로 인하여 생성되는 물질인 thiocholine과 DTNB가 반응하여 생성되는 TNB가 412 nm 파장의 광선을 흡수한다. 412 nm에서의 흡광도를 비교하여 샘플의 AChE 억제 효능을 평가한다.

예측 대사체 조성비에 근접하는 생물전환 후보물질군 12종을 대상으로 AChE inhibition assay를 통하여 AChE 억제 효능을 평가하였다(그림 45). AChE 억제제인 tacrine(T, 0.1 µM)은 양성 대조군으로 사용되었다. 그 결과, 각 생물전환 후보물질군 1번 시료(CU1, SC1, SP1, AN1)보다 AChE 억제 효능이 증가한 시료는 SC2 시료 50 µg/ml(31.84±1.17%), AN2 시료 25, 50 µg/ml(19.29±3.34%, 28.09±0.57%)로 나타났다.

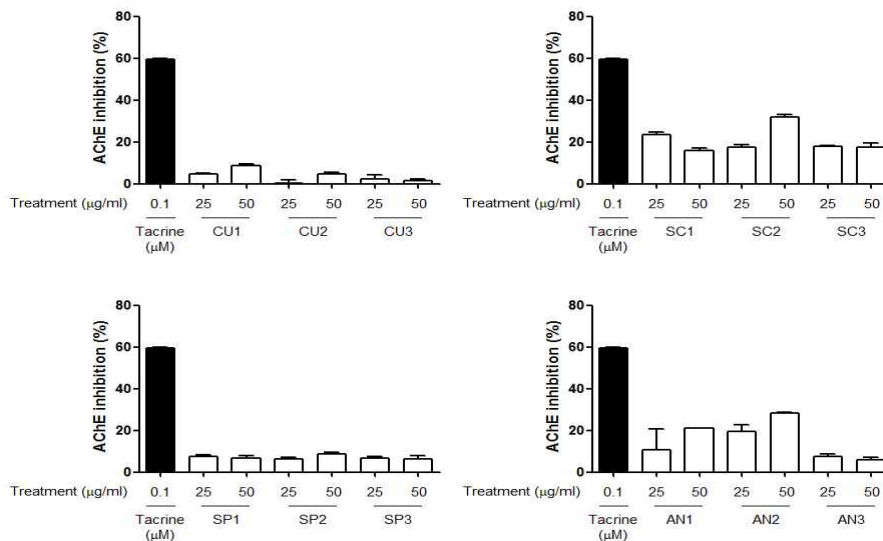


그림 45. 생물전환 후보물질군(CU1-3, SC1-3, SP1-3, AN1-3)의 AChE 억제 효능.

(3) 생물전환 후보물질군의 Aβ 응집 억제 효능 평가

ThT는 응집한 Aβ와 반응하여 형광 발현을 하는 성질을 가진다. 응집되는 Aβ량의 증가에 따라 형광의 발현 강도가 커지고, 이를 통하여 응집되는 Aβ의 양을 형광 측정을 통하여 정량적으로 평가할 수 있다.

본 실험에서는 기존 문헌들에서 Aβ 응집 억제 효능이 밝혀진 curcumin(10 µM)을 양성 대조군으로 사용하였다. 실험 결과, 각 생물전환 후보물질군 1번 시료(CU1, SC1, SP1, AN1)보다 Aβ 응집 억제 효능이 증가한 시료는 없었고, control군과의 형광 발현 정도를 비교하였을 때, SP1, 2 시료(66.01± 5.09%, 66.13±1.54%)에서 Aβ 응집 억제 효능이 가장 좋은 것으로 나타났다(그림 46).

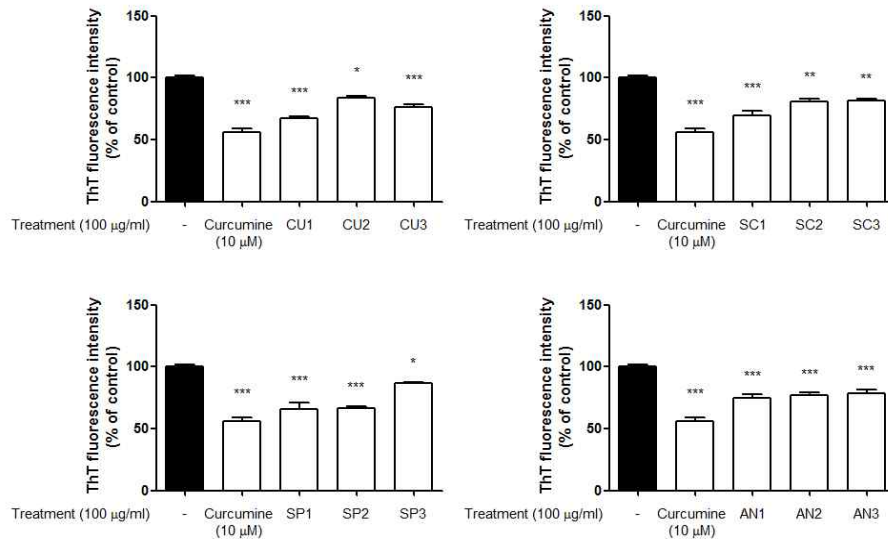


그림 46. 생물전환 후보물질군(CU 3, SC 3, SP 3, AN 3)의 Aβ 응집 억제 효능

표 27에 총 3가지의 *in vitro* 실험을 통해서 예측 대사체 후보물질군의 알츠하이머병과 관련한 효능 평가 결과를 정리하였다. 총 4가지의 미생물 군주 중 *S. carlsbergensis*, *S. pombe*, *A. niger*를 이용하여 생산된 생물전환 후보물질군(SC, SP, AN)이 알츠하이머병 연관 *in vitro* 모델에서 우수한 효능을 보였다. 따라서, *in vitro* 효능평가를 통해 인지기능 개선효능이 확인된 *S. carlsbergensis*, *S. pombe*, *A. niger* 등의 미생물을 대상으로 반응조건 설정, 생물전환 소재 생산 조건 확립 및 *in vivo* 효능 평가 실험을 진행하였다.

표 27. *in vitro* 실험을 통한 인지기능 개선효능 평가

| 소재명 | 세포 보호 효능    |           | AChE 억제 효능 | Aβ 응집 억제 효능 |
|-----|-------------|-----------|------------|-------------|
|     | Aβ oligomer | Aβ plaque |            |             |
| CU  |             |           |            |             |
| SC  |             |           | -          |             |
| SP  | +           | -         |            | +           |
| AN  |             |           | -          |             |

다. 생물전환 후보물질군 소재 생성 우수 미생물의 적정 반응조건 설정

예측 대사체 조성비에 근접하는 생물전환 대사체 후보물질군 소재를 제조하여 인지기능 개선과 관련된 *in vitro* 효능 평가 결과, 인지기능 개선 효능을 나타낸 *S. carlsbergensis*, *S. pombe*, *A. niger*를 대상으로 주요 변수로 도출된 균 농도, 반응시간, 기질농도 등 적정 반응조건 설정을 위한 실험을 진행하였다.

(1) 초기 균 농도별 생물전환 대사체 6 paradol 생성 속도 변화



*S. carlsbergensis*를 이용하여 반응액내 초기 6-shogaol 농도를 240 µg/ml.으로 고정하고 최적 균 농도를 찾기 위해 초기 균 농도를 배양액 ml. 당  $1 \times 10^6$ ,  $1 \times 10^7$ ,  $1 \times 10^8$ 개의 조건으로 조정하여 배양액을 진탕배양하며 반응 72시간까지 6-paradol 생성량을 측정하였다(그림 47).

반응 0시간 배양액에 ethyl acetate를 첨가, 추출공정을 거친 후 6-shogaol 함량을 측정하는 결과 초기 균 농도( $1 \times 10^6$ ,  $1 \times 10^7$ ,  $1 \times 10^8$ 개)에 관계없이 약 142 µg/ml. 정도를 나타내어 배양액내 대사체 분석을 위해 ethyl acetate 추출처리공정을 적용할 경우 실제 첨가한 농도(240 µg/ml.) 대비 약 60%에 해당되는 함량이 추출, 분석되는 것으로 나타났다. 따라서 실제 측정값인 142 µg/ml.을 기준으로 하여 반응시간별 생물전환에 의해 생성되는 6-paradol의 전환율을 나타내었다.

반응 6시간 경과 후 6-paradol 생성량은 24, 33, 41 µg/ml.으로 초기 균 농도가 높을수록 약간 빠르게 증가하나 반응 24시간 경과시점에서 볼 때  $1 \times 10^8$ 개 처리구는 6-paradol 생성량이 65 µg/ml.으로  $1 \times 10^6$ 개 처리구보다 1.5배 빠르게 6-shogaol이 6-paradol로 생물전환되는 것을 알 수 있었다.

반응 24시간 이후부터 6-paradol 생성량은 급격히 증가하여 반응 48시간에는 98, 132, 148 µg/ml.이 생성되었으며 특히 초기 *S. carlsbergensis* 균 농도  $1 \times 10^8$ 개처리구의 경우 6-paradol 생성량이 반응액 초기 측정된 6-shogaol 함량(142 µg/ml.)과 비슷한 수치를 나타내어 초기 기질로 첨가한 6-shogaol이 6-paradol 생물전환 대사체로 거의 대부분 전환되었음을 알 수 있었다. 그러나 초기 균 농도  $1 \times 10^6$ 개 처리구는 반응 56, 72시간 후에도 6-paradol 생성량이 98, 103 µg/ml.로 지속적으로 증가하나 100% 생물전환이 되지 않았다. 반응 56, 72시간 배양액의 6-paradol 함량을 측정하는 결과 *S. carlsbergensis*에 의해 생물전환된 6-paradol은 그 함량을 유지하는 것으로 나타났다.

*S. carlsbergensis*의 경우 생물전환 대사체 6-paradol의 전환율만 고려하면 초기 배양액 ml.당 균 농도가  $1 \times 10^8$ 개 처리구가 가장 효율성이 높으나 실제 생물전환 대사체 소재를 대량 생산할 경우 ml.당  $1 \times 10^6$ 개는 현실적으로 적용하기에 균 농도가 높은 것으로 판단되어 본 실험 결과 ml.당  $1 \times 10^7$ 개 처리구를 최적 농도로 설정하였다.

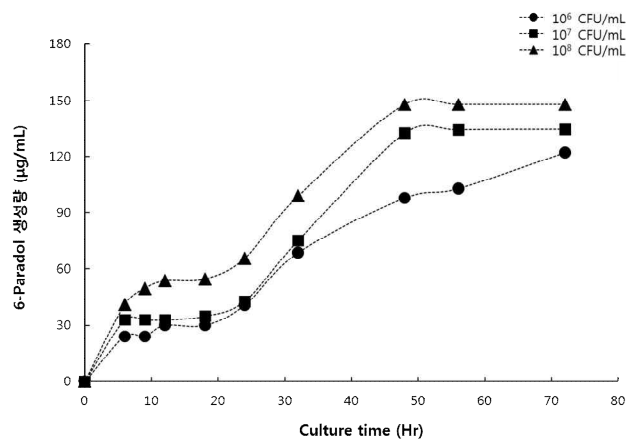


그림 47. *S. carlsbergensis* 배양 시 균 농도 차이가 배양시간 별 6-paradol 생성에 미치는 영향.

4. *niger*를 이용하여 6 shogaol 농도를 240  $\mu\text{g/mL}$ 으로 고정하고 초기 균 농도를 mL 당  $3.0 \times 10^6$ ,  $1.5 \times 10^6$ ,  $0.7 \times 10^6$ 개 처리구로 하여 반응시간별 배양액의 6 paradol의 생성량을 측정하였다(그림 48).

1. *niger*는 반응초기 6-paradol 생성이 *S. carlsbergensis*보다 훨씬 빠르게 증가하여 반응 12시간 경과 후 59, 31, 22.9  $\mu\text{g/mL}$ 였고,  $3.0 \times 10^6$ 개,  $1.5 \times 10^6$ 개 처리구는 반응 24시간 경과 후 6 paradol 생성량이 120  $\mu\text{g/mL}$ 로 증가하여 반응 0 시간 배양액에 ethyl acetate를 첨가, 추출공정을 거친 후 측정한 6 shogaol 함량 122  $\mu\text{g/mL}$ 을 기준으로 하면 거의 100% 생물전환되는 것으로 나타났다. 그러나  $3.0 \times 10^6$ 개,  $1.5 \times 10^6$ 개 처리구는 반응 24시간을 기점으로 반응시간이 경과함에 따라 반응액내의 6-paradol 함량이 급격히 감소하는 경향을 보여 반응 56시간에 각각 19.5, 35.0  $\mu\text{g/mL}$ 을 나타내어 반응 24시간 때에 생성된 6-paradol의 84, 71%가 소실되는 것으로 나타났다.

초기 균 농도가 가장 낮은  $0.7 \times 10^6$ 개 처리구는 반응 32시간에 6 paradol 생성량이 102  $\mu\text{g/mL}$ 까지 증가한 다음 서서히 감소하여 반응 56시간에는 생성된 6 paradol의 50% 정도가 잔존하는 것으로 나타나 초기 균 농도가 높을수록 생물전환된 6-paradol 함량이 빠르게 감소하는 경향을 보여주었다. 따라서 1. *niger*는 초기 균 농도  $3.0 \times 10^6$ 개 처리구가 생물전환 속도는 빠르나 일정 반응시점 후 생물전환된 6-paradol이 급격히 감소되는 점을 고려하여  $1.5 \times 10^6$ 개 처리구를 선택하였다.

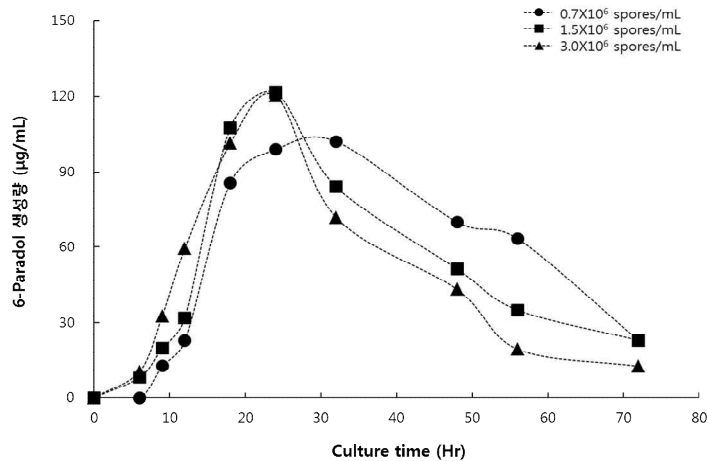


그림 48. 1. *niger* 배양 시 균 농도 차이가 배양시간 별 6-paradol 생성에 미치는 영향.

*S. pombe*는 진담배양시 단일 colony나 포자를 형성하지 않고 뭉쳐 자라기 때문에 counting이 불가능한 균 중 하나로 본 실험에서는 초기 균 농도를 흡광도(600 nm) 값으로 산정하였다. 종 배양액을 YNB배지를 이용, 희석하여 흡광도 값을 1.2, 0.5, 0.08로 조정하여 첨가하였다(그림 49).

초기 균 농도  $A_{600}$  1.2 처리구는 반응 12시간 경과시 47.2  $\mu\text{g/mL}$ 의 6-paradol이 생성되

었고, 반응시간이 경과할수록 지속적으로 증가하는 경향을 보여 반응 72시간에는 140  $\mu\text{g}/\text{mL}$  생성되어 초기 균 농도를 달리한 반응액의 6-shogaol 함량(132  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 기준 100% 생물전환되었다. 초기 균 농도 0.5 Abs. 처리구는 반응 32시간까지는 배양액내 6-paradol이 전혀 생성되지 않았으나 반응 48시간 경에는 46.7  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 6-paradol이 생성되었고 반응 72시간에는 90.2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 까지 증가되어 초기 측정된 6 shogaol 함량 대비 70% 생물전환되었다. 이는 초기 균 흡광도 값 1.2 처리구에 비해 2배 이상 느리게 생물전환 대사체로 전환됨을 알 수 있다. 한편  $A_{600}$  0.08 처리구는 반응 56시간까지 6 paradol이 생성되지 않았고 반응 72시간 경과시 48.4  $\mu\text{g}/\text{mL}$  생성되어 초기 6-shogaol 측정치 대비 31% 정도만 6-paradol로 생물전환되는 것으로 나타났다.

*S. pombe*를 이용한 생물전환 대사체로의 전환에 있어서 초기 균 흡광도 값이 0.08, 0.5일 경우 생물전환을 위한 배양시간이 장시간 필요하고 전환율이 낮은 점을 고려하여 *S. pombe*의 초기 균 농도는 흡광도 값으로 1.2를 선정하였다.

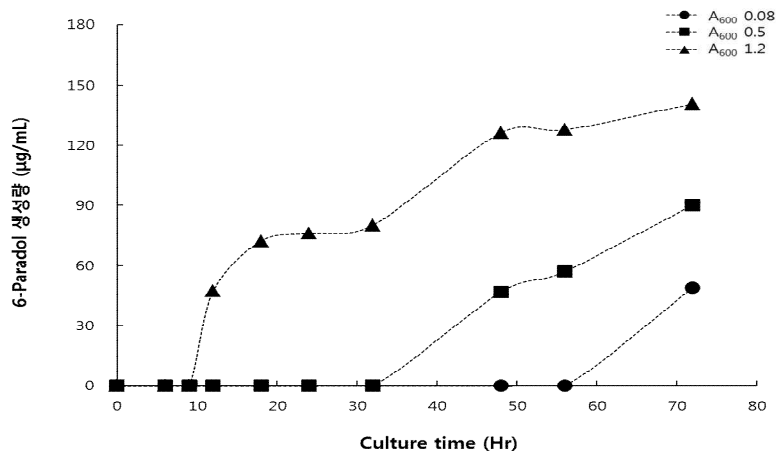


그림 49. *S. pombe* 배양 시 균 농도 차이가 배양시간 별 6-paradol 생성에 미치는 영향.

## (2) 생물전환 대사체 6-paradol 생성 속도 변화

*S. carlsbergensis*, *S. pombe*, *I. niger*의 초기 균 첨가농도에 따른 생물전환 대사체 6-paradol 생성 변화 실험 결과 선정된 미생물별 적정 초기 균 농도를 기준으로 본 실험에서는 반응액 내 초기 6-shogaol 농도(140, 240, 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )을 독립변수로 설정하여 생물전환 대사체 생성 변화를 검토하였다.

*S. carlsbergensis*의 초기 균 농도를  $\text{mL}$  당  $1 \times 10^7$  조건으로 고정하고 반응기질인 생강 추출물 동결건조분말을 6-shogaol 농도 기준으로 140, 240, 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 이 되게 배양액에 첨가 후 진탕배양하여 반응 72시간까지 6-paradol 생성량을 살펴보았다(그림 50). 이때 반응 0시간 배양액을 ethyl acetate로 2회 추출 처리하여 측정된 6-shogaol 함량(102, 152, 350  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )를 기준으로 6 paradol 전환율을 산출하였다.

6 Shogaol 140, 240  $\mu\text{g}/\text{mL}$  농도 처리구를 비교하면 반응 36시간까지는 140  $\mu\text{g}/\text{mL}$  농도 처리구가 6-paradol 생성량이 높아 반응 0시간 배양액의 6-shogaol 함량 측정치 대비 88%가

생물전환되어 반응 72시간까지 그 함량을 유지하였다. 반면 240  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . 농도 처리구는 반응 36시간에 60% 정도 전환되었으나 그 후 서서히 증가하여 72시간 배양액의 경우 6-paradol 함량이 152  $\mu\text{g}/\text{ml}$ .로 초기 6-shogaol 측정치 대비 100% 생물전환되었다.

6-Shogaol 농도 500  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . 처리구는 반응 48시간까지 6-paradol 생성량이 계속 증가하여 반응 24시간에 209  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ., 반응 48시간에는 350  $\mu\text{g}/\text{ml}$ .로 초기 반응액에서 측정된 6-shogaol 함량(350  $\mu\text{g}/\text{ml}$ .) 기준으로 100% 6-paradol로 생물전환 되었으며 반응 72시간까지 생성된 6-paradol 양이 감소하지 않고 유지되는 것으로 나타났다.

*S. carlsbergensis*의 초기 반응액에 첨가된 6-shogaol 농도별 생물전환이 완료되는 시점을 기준으로 단위시간 당 6-paradol 생성량을 분석해 본 결과, 반응액 내 초기 6-shogaol 농도가 140  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 일 때 단위 시간당 6-paradol이 2.0  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . 생성되었고, 초기 기질농도 240, 500  $\mu\text{g}/\text{ml}$ .는 각각 2.1, 7.3  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . 생성되는 것으로 나타나 배양액내 초기 기질농도 500  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 일 때가 가장 6-paradol로의 생물전환이 효율적으로 일어나는 것을 확인하였다.

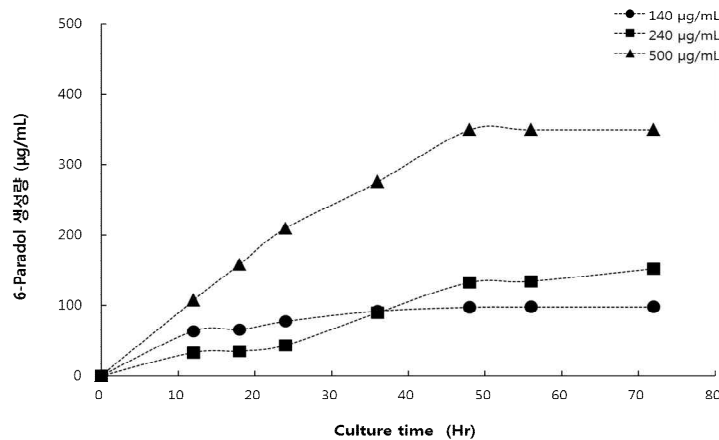


그림 50. *S. carlsbergensis* 배양 시 초기 6 shogaol 농도가 배양시간 별 6 paradol 생성에 미치는 영향.

*S. pombe*의 균 농도를 흡광도(600 nm)값으로 1.2로 조정하고 초기 6-shogaol을 140, 240, 500  $\mu\text{g}/\text{ml}$ .이 되도록 첨가하여 반응시간에 따른 6-paradol 생성량을 측정하였다(그림 51). 이때 기질농도별 배양액을 ethyl acetate 처리하여 측정한 초기 6-shogaol 함량은 각각 110, 166, 350  $\mu\text{g}/\text{ml}$ .으로 나타났다.

6 shogaol 140  $\mu\text{g}/\text{ml}$  농도 처리구는 배양시간이 경과할수록 6 paradol 생성량이 지속적으로 증가하여 반응 36시간에 101.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ .의 6-paradol을 생성하여 초기 배양액의 6-shogaol 측정치 대비 92%가 생물전환되었으며 그 후부터는 배양시간이 경과함에 따라 배양액내 6-paradol 함량이 감소하여 반응 72시간에는 36시간 배양시 생성된 6-paradol의 63% 정도가 잔존하였다.

240  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . 농도 처리구도 반응시간이 경과함에 따라 배양액내의 6-paradol 생성량이 계속 증가하여 반응 48시간 경과시 150  $\mu\text{g}/\text{ml}$ .로 증가하여 초기 반응액의 6-shogaol 함량을

기준(166 µg/ml.)으로 할 때 91%가 생물전환되었고, 72시간 후에는 167 µg/ml.로 100% 전환되었다.

500 µg/ml. 농도 처리구는 반응 12시간까지는 6-paradol이 생성되지 않았으나 그 이후부터 빠르게 증가하기 시작하여 반응 36시간 경에 133 µg/ml.이 생성되었고, 반응 56시간에 270 µg/ml., 72시간에는 318 µg/ml.까지 상승하여 초기 반응액 6-shogaol 함량 기준(350 µg/ml.)으로 77. 91%가 생물전환되는 것으로 나타났다.

*S. pombe* 또한 기질농도별로 생물전환이 완료되는 시점을 기준으로 단위시간당 6-paradol 생성량을 살펴보면 초기 6-shogaol 농도가 140 µg/ml.일 때는 2.8 µg/ml.이고, 240, 500 µg/ml. 농도에서는 2.3, 4.4 µg/ml.이 생성되므로 *S. pombe*의 경우에 있어서도 *S. carlsbergensis*와 마찬가지로 반응액 내 초기 6-shogaol 농도가 500 µg/ml.일 때 단위시간당 6 paradol 생성량이 가장 적합한 것으로 판단되었다.

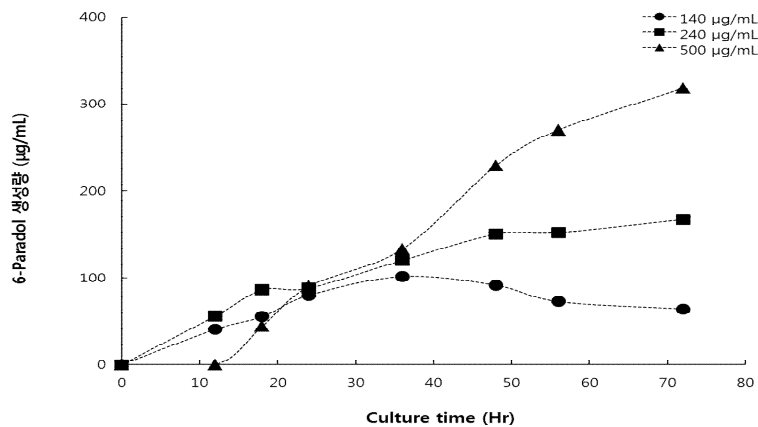


그림 51. *S. pombe* 배양 시 초기 6-shogaol 농도가 배양시간 별 6 paradol 생성에 미치는 영향.

4. *niger*를 최적 초기 균 농도인 배양액 mL 당  $1.5 \times 10^6$ 개 조건에서 초기 6 shogaol 농도를 140, 240, 500 µg/ml.로 조정하여 6-paradol 생성량을 측정하였다(그림 52). 이때 0시간 반응액을 ethyl acetate처리, 6-shogaol 함량을 측정한 결과 110, 121, 302 µg/ml.로 나타났다. 140, 240 µg/ml. 처리구는 반응 24시간에 6-paradol 110, 121 µg/ml. 생성되어 초기 배양액 6 shogaol 함량 측정치와 대비하여 거의 100% 6 paradol로 전환되었으나 반응 24시간 이후부터는 반응액내 6 paradol 함량이 계속 감소하여 72시간에는 21 µg/ml.만이 유지되어 반응 24시간에 생성된 6 paradol의 약 20%만이 유지되었다.

6-Shogaol 농도 500 µg/ml. 처리구는 반응 24시간 경과 시 6-paradol이 183 µg/ml. 생성되었고, 48시간에는 233 µg/ml.이 생성되어 초기 배양액내 6-shogaol 함량 측정치(302 µg/ml.) 대비 77% 정도가 생물전환되는 것으로 나타났다. 초기 6-shogaol 농도 500 µg/ml. 처리구 또한 반응 48시간 이후부터 배양액내 6 paradol함량이 서서히 감소하는 경향을 보였으나 140, 240 µg/ml. 처리구보다는 느린 것으로 나타났다.

생물전환 대사체도 전환율이 가장 높은 시점을 기준으로 단위시간 당 생성되는

6-paradol 생성량을 살펴보면 초기 6-shogaol 농도 140, 240, 500 µg/ml에서 각각 4.6, 5.0, 4.9 µg/ml 생성되는 것으로 나타났다. 따라서 초기 6-shogaol 농도 240 µg/ml에서 단위 시간당 6 paradol 생성률이 가장 높지만 240 µg/ml 처리구의 경우 6 paradol로 전환 후 배양시간 경과와 함께 생성된 6 paradol이 급격히 감소하는 점을 고려할 때 생물전환 6 paradol의 양적 안정성을 감안하여 500 µg/ml을 적정 농도로 선정하였다.

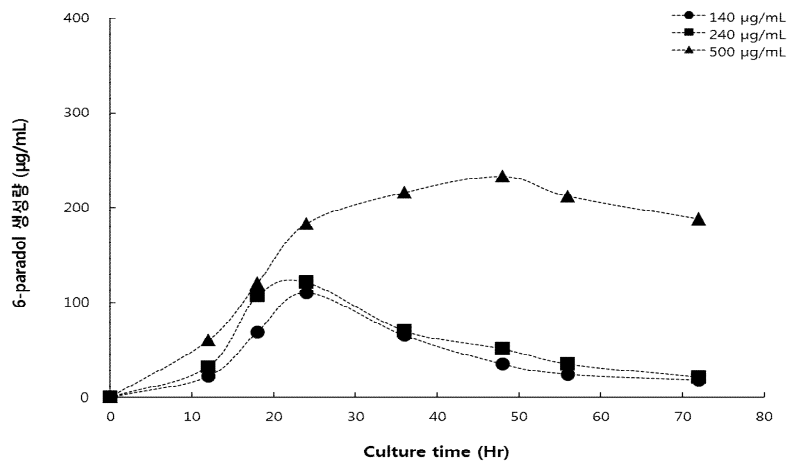


그림 52. *A. niger* 배양 시 초기 6-shogaol 농도가 배양시간 별 6-paradol 생성에 미치는 영향.

라. 생강유래 식징 대사체 조성비를 가지는 생물전환 소재 제조

*In vitro* 실험을 통해 인지기능 효능이 예상되는 *S. carlsbergensis*, *S. pombe*, *A. niger* 3종의 균주를 선정하였다. 선정된 3종의 균주를 대상으로 6-shogaol과 6-paradol 비율별 생물전환 소재의 효능 재검증을 통한 식징 대사체 조성비 설정 및 인지기능 개선 효능이 우수한 소재를 선발하기 위해 균주별 식징 대사체 조성비율(6-shogaol:6-paradol=10:0, 6:4, 4:6, 2:8, 0:10)에 근접한 생물전환 대사체 소재를 제조하였다. 이들 대사체 소재는 *in vivo* 평가용, 대사체 프로파일 분석용 시료도 각각 제공하였다.

#### (1) 생물전환 배양액내 지표성분 회수율 증진

생물전환 배양액의 처리 용매에 따른 반응물의 6-shogaol과 6-paradol의 추출함량을 살펴보면 표 29와 같다. *S. carlsbergensis* 반응액 내 초기 6-shogaol 농도 320 µg/ml로 32 시간 반응시킨 배양액을 75% 주정으로 추출한 배양액은 6-shogaol과 6-paradol 함량이 각각 142.8, 136.1 µg/ml로 총 함량이 278.0 µg/ml 나타났고, ethyl acetate로 추출한 배양액은 105.5, 90.2 µg/ml로 총 함량이 195.7 µg/ml로 나타났다. 추출용매 75% 주정과 ethyl acetate의 6-shogaol과 6-paradol 비율이 각각 5.1:4.9, 5.4:4.6로 추출용매에 따른 구성비율 차이는 거의 나타나지 않았으나 첨가된 6-shogaol 농도 기준 대비 추출 회수율이 87, 61%로 큰 차이를 보였다. 따라서 생물전환 배양액에 최종농도가 75% 되게 순수 주정을 첨가하여 추출하는 공정이 배양액내 지표성분의 추출 회수율을 높이는 좋은 방법으로 판단되었다.

표 28. 생물전환 배양액의 추출용매에 따른 6-shogaol과 6-paradol 함량.

| 용매            | 수율(%) <sup>a</sup> | 함량(μg/ml.) |           |       |
|---------------|--------------------|------------|-----------|-------|
|               |                    | 6-Shogaol  | 6-Paradol | 합계    |
| 주정(EtOH)      | 87                 | 142.8      | 136.1     | 278.0 |
| ethyl acetate | 61                 | 105.5      | 90.2      | 195.7 |

\*초기 배양액에 첨가된 초기 6-shogaol 농도 대비 용매별 처리 배양액의 6-shogaol, 6-paradol 측정치 합.

(2) 생강유래 식물 대사체 조성비를 가지는 생물전환 소재 특성 분석

*S. pombe*의 초기 균 흡광도 값을 1.2로 하고 초기 6-shogaol의 농도가 500 μg/ml가 되게 본 배양액을 제조하여 생강유래 식물 대사체 조성비를 가지는 생물전환 소재를 제조하였다. 반응 중 배양액내 6-shogaol과 6-paradol 함량을 간이분석법으로 측정하여 식물 대사체 조성비에 근접하는 배양액을 취하여 순수 주정으로 전처리 후 동결건조분말 소재를 제조하였다.

표 29는 *S. pombe* 이용, 식물 대사체 조성비에 근접하는 생강유래 생물전환 대사체 소재의 수율과 6 shogaol, 6 paradol 지표성분의 함량을 측정한 결과이다. 소재 수율은 초기 배양액에 첨가된 생강추출물 동결건조 분말의 양을 100으로 하여 얻어진 소재 분말의 중량을 측정, 산출하였다. SP4 소재는 6-shogaol 함량이 9.3 mg/g, 6-paradol 함량은 0.0 mg/g으로 소재 회수율은 초기 배양액에 첨가한 생강추출액 동결건조 분말 중량을 기준으로 할 때 88%였다. 반응 41시간에 채취한 SP5 소재는 6-shogaol이 6.81 mg/g, 6-paradol은 4.81 mg/g으로 6 shogaol과 6 paradol 비율은 5.9:4.1로 나타났다. SP6 소재는 6 shogaol, 6 paradol 함량이 각각 4.69, 5.60 mg/g으로 4.6:5.4의 구성비를 나타냈다. SP7(63시간 배양)는 6 shogaol과 6 paradol 함량은 2.47, 6.96 mg/g, 구성비율은 2.6:7.4였고, SP8 소재는 6-shogaol:6-paradol 구성비율이 1.2:8.8로 나타났다. 소재의 수율은 6-paradol 구성비율이 높아질수록 감소하였고 구성비율 50% 이상부터는 변화가 없었다.

표 29. *S. pombe* 이용 생물전환 대사체 소재의 수율 및 6 shogaol, 6 paradol 함량 변화.

| 생물전환 대사체 소재 | 수율(%) | 함량(mg/g, 비율) |            |           |
|-------------|-------|--------------|------------|-----------|
|             |       | 6 Shogaol    | 6 Paradol  | 합계        |
| SP4         | 88    | 9.30(10)     | 0.00(0)    | 9.30(10)  |
| SP5         | 82    | 6.81(5.9)    | 4.81(4.1)  | 11.62(10) |
| SP6         | 74    | 4.69(4.6)    | 5.60(5.4)  | 10.29(10) |
| SP7         | 74    | 2.47(2.6)    | 6.96(7.4)  | 9.43(10)  |
| SP8         | 75    | 1.40(1.2)    | 10.00(8.8) | 11.40(10) |

*S. carlsbergensis*도 초기 균 농도를 ml 당  $1 \times 10^6$ 개, 반응액내 초기 6-shogaol 농도를 500  $\mu\text{g/ml}$ 로 조정하고 배양하여 제조한 생물전환 대사체 소재의 수율과 6 shogaol, 6 paradol 함량을 측정된 결과는 표 30과 같다. SC4 소재의 6 shogaol 함량은 8.2 mg/g, 6-paradol 함량은 0 mg/g으로 SC4 소재는 100% 6-shogaol로 구성되었고 소재 회수율은 90% 정도였다. SC5~8 소재의 6-shogaol 함량은 각각 7.0, 3.8, 2.6, 1.0 mg/g이었고 6-paradol 함량은 4.7, 7.9, 9.3, 9.9 mg/g을 나타내어 SC5~8 소재의 6-shogaol과 6-paradol 구성비율은 각각 6:4, 3.2:6.8, 2.2:7.8, 0.9:9.1로 나타났다. 또한 이들 소재의 동결건조분말 회수율은 77, 86, 74, 74%로 소재간 차이는 있으나 뚜렷한 경향은 없었다.

표 30. *S. carlsbergensis* 이용 생물전환 대사체 소재의 수율 및 6-shogaol, 6-paradol 함량 변화.

| 생물전환 대사체 소재 | 수율(%) | 함량(mg/g, 비율) |           |           |
|-------------|-------|--------------|-----------|-----------|
|             |       | 6-Shogaol    | 6-Paradol | 합계        |
| SC4         | 89    | 8.20(10)     | 0.00(0)   | 8.20(10)  |
| SC5         | 77    | 7.00(6.0)    | 4.68(4.0) | 11.68(10) |
| SC6         | 86    | 3.80(3.2)    | 7.90(6.8) | 11.70(10) |
| SC7         | 74    | 2.60(2.2)    | 9.30(7.8) | 11.90(10) |
| SC8         | 74    | 1.00(0.9)    | 9.90(9.1) | 10.90(10) |

1. *niger*는 초기 균 농도를 ml 당  $1.5 \times 10^6$ 개로 진탕 배양하여 본 배양액을 제조하고 반응액 내 초기 6-shogaol 농도가 500  $\mu\text{g/ml}$ 가 되게 위와 동일한 방법으로 생물전환 대사체 소재를 제조하였다.

1. *niger* 이용, 생물전환 대사체 소재의 수율 및 6-shogaol, 6-paradol의 함량을 측정된 결과는 표 31와 같다. W4 시료는 6-shogaol 함량이 5.79 mg/g, 6-paradol은 검출되지 않아 100% 6-shogaol 비율을 나타내었고 초기 첨가한 기질용 생강 동결건조분말 대비 생물전환 배양액 분말의 회수율은 92%였다. W5, W6 소재는 6-shogaol이 2.58, 1.71 mg/g, 6-paradol이 2.64, 2.87 mg/g으로 6-shogaol과 6-paradol 비율이 각각 5:5, 3.7:6.3을 나타내었고 이때 소재 회수율은 85%, 78%로 전차 감소하였다. W7 소재의 경우 6 shogaol 0.99 mg/g, 6-paradol 2.83 mg/g으로 6-paradol 비율이 7.6으로 나타났다. W8은 6-shogaol, 6-paradol 함량이 각각 0.84 mg/g, 3.4 mg/g으로, 구성비는 1.9:8.1%였다.

1. *niger* 이용, 생물전환 대사체 소재의 경우 수율은 다른 균주 소재와 차이가 없으나 각 소재별 6-shogaol과 6-paradol 함량을 합산한 총량이 3.8~5.8 mg/g 정도로 다른 균주로 제조한 비슷한 조성비 소재 1/2 정도로 함량이 낮아 향후 4. *niger* 균주 이용 생물전환 대사체 배양액으로부터 생물전환 대사체회수율을 높이는 방안 검토가 필요하였다.



표 31. 4. *niger*의 생물전환 대사체 소재의 수율 및 6 shogaol, 6 paradol 함량 변화.

| 생물전환 대사체 소재 | 수율(%) | 함량(mg/g, 비율) |           |         |
|-------------|-------|--------------|-----------|---------|
|             |       | 6-Shogaol    | 6-Paradol | 합계      |
| V4          | 92    | 5.79(10)     | 0(0)      | 5.8(10) |
| V5          | 84    | 2.58(5.0)    | 2.64(5.0) | 5.2(10) |
| V6          | 78    | 1.71(3.7)    | 2.87(6.3) | 4.6(10) |
| V7          | 72    | 0.99(2.4)    | 2.83(7.6) | 3.8(10) |
| V8          | 72    | 0.84(1.9)    | 3.41(8.1) | 4.3(10) |

나. 생강유래 직접 대사체 조성비를 가지는 생물전환 소재의 대사체 프로파일 분석

(1) 생물전환 소재의 주요 대사체 분석

생물전환 소재별 반응시간에 따라 증가되는 대사체를 아래의 그래프(그림 53-55)로 나타내었다. SC, SP 소재에서 양이 증가되는 대사체는 1종 (6EM-279-5)이었다. 이 대사체는 6-shogaol에서 reduction반응이 일어나 생성되는 대사체로서 SC4와 SP4에서는 관찰되지 않다가 이후 5, 6, 7, 8 시료에서 점차 증가하는 양상이 관찰되었다. V 시료에서 생물전환에 의해 생성되어 양이 증가한 대사체는 총 3종 (6EM-279-5, 6EM-293-0, 6EM-311-1)으로 관찰되었다. 6EM-293-0과 6EM-311-1은 각각 shogaol과 gingerol에서 hydroxylation 반응이 일어나 생성된 대사체이다. 이러한 결과는 V 시료에서는 다른 미생물에 비해 shogaol로부터 paradol이외의 대사체로의 생물 전환이 높음을 나타낸다. 즉, V 시료는 SC, SP에 비해 paradol의 생성 효율이 낮은 것을 의미하며, 이것은 SC, SP 시료에 비해 V 시료의 효율이 낮은 주요한 원인이 될 것으로 사료된다.

**Saccromyces carlsbergensis**

**6EM-279-5**

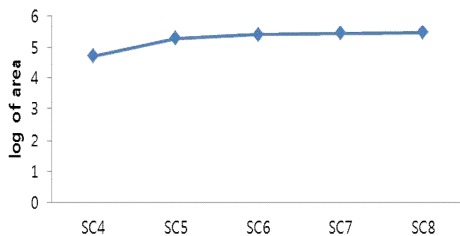


그림 53. SC소재별 생물전환 대사체.

**Schizosaccaromyces pombe**

**6EM-279-5**

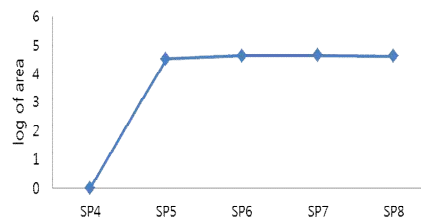


그림 54. SP소재별 생물전환 대사체.

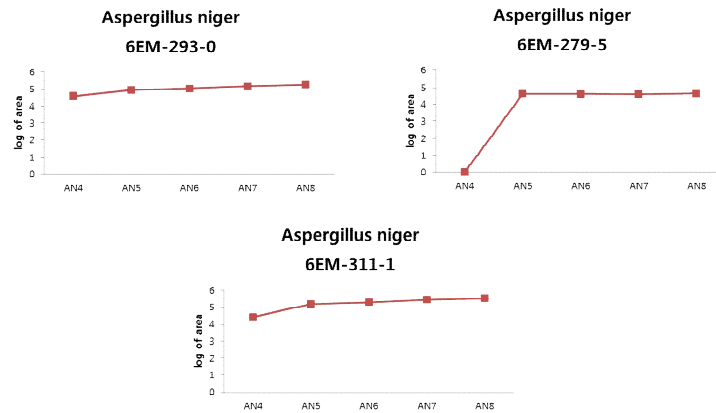


그림 55. \소재별 생물전환 대사체.

## (2) 생물전환 소재의 대사체 프로파일 분석

SC 시료의 생물전환 대사체 프로파일을 분석한 결과는 그림 56-58와 같다. SC4에 비하여 SC5, 6, 7, 8, 9시료에는 5가지의 대사체(6-paradol, 6EM-279-1, 5, 8EM-305-1, 8-paradol)가 새롭게 생성되었다. 6-shogaol과 8-shogaol은 reduction을 통해 각각 6-paradol, 6EM-279-1, 5( $m/z$  279), 8-paradol( $m/z$  307)로 대사되었고, 8EM-305-1는 shogaol과 같은 분자량을 가진 대사체로 gingerol로부터 탈수 반응을 통해 생성되거나 paradol로부터 hydroxylation된 후 탈수 반응을 통해 생성되는 것으로 예상되었다. SC4시료에서는 gingerol, shogaol의 함량이 대부분을 이루다가 SC5, 6, 7, 8시료에서는 gingerol과 shogaol의 양이 점차 줄어들고, paradol 분자량을 갖는 대사체 2종류가 증가하는 것을 관찰할 수 있었다. 또한 시료 SC4, 5, 6, 7, 8시료에서는 8-shogaol과 같은 분자량을 갖는 대사체가 상대적으로 많이 발견되어 다른 소재들에 비해 8-paradol로의 전환이 효율적으로 일어나지 않는 것으로 예측된다. 각각의 대사체들의 크로마토그램적인 특징들을 표 32에 정리하였다. 각 대사체들의 elemental composition에 따른 이론값과 실측값의 차이가 10 ppm을 넘지 않는 것으로 관찰되는 것으로 보아 제시한 시정식에 맞는 대사체임을 확인하였다.

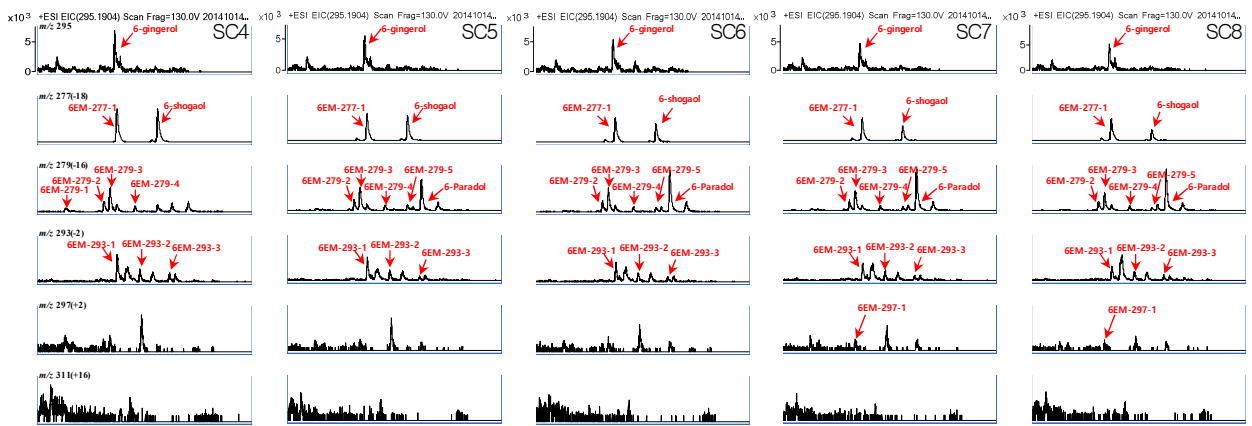


그림 56. SC4-SC8 시료의 생물전환 대사체(6-series) EIC.

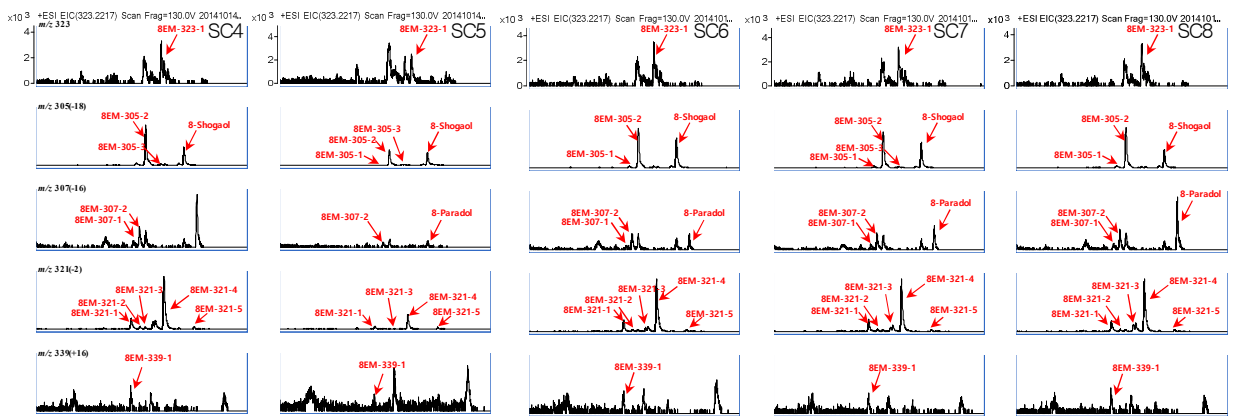


그림 57. SC4-SC8 시료의 생물전환 대사체(8-series) EIC.

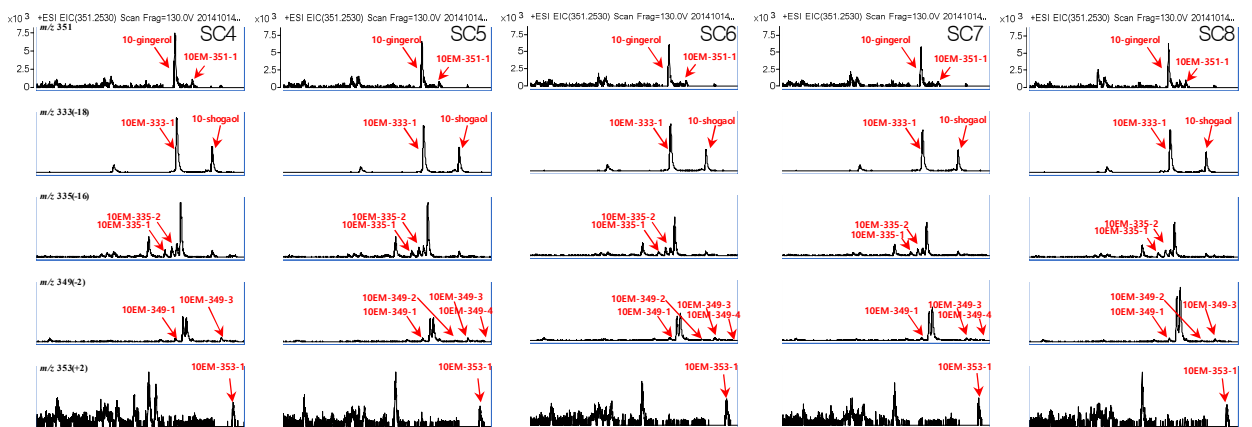


그림 58. SC4-SC8 시료의 생물전환 대사체(10-series) EIC.

표 32. SC 시료의 생분전환 대사체 accurate mass 측정

| Name        | RT   | Elemental composition | S. carlsbergensis |               | Error | Remark                  |
|-------------|------|-----------------------|-------------------|---------------|-------|-------------------------|
|             |      |                       | Theoretical mass  | Measured mass |       |                         |
| 6-Gingerol  | 11.2 | C17H26O1              | 295.1904          | 295.1875      | 9.8   | SC4, SC5, SC6, SC7, SC8 |
| 6-Shogaol   | 13.8 | C17H24O3              | 277.1798          | 277.1772      | 9.4   | SC4, SC5, SC6, SC7, SC8 |
| 674-277-1   | 11.3 | C17H24O3              | 277.1798          | 277.1773      | 9.0   | SC4, SC5, SC6, SC7, SC8 |
| 6-Paradol   | 14.7 | C17H26O3              | 279.1955          | 279.1929      | 9.3   | SC5, SC6, SC7, SC8      |
| 6E4-279-1   | 8.2  | C17H26O3              | 279.1955          | 279.1928      | 9.7   | SC5, SC6, SC7, SC8      |
| 6E4-279-2   | 10.6 | C17H26O3              | 279.1955          | 279.1928      | 9.7   | SC4, SC5, SC6, SC7, SC8 |
| 6E4-279-3   | 10.9 | C17H26O3              | 279.1955          | 279.1929      | 9.3   | SC4, SC5, SC6, SC7, SC8 |
| 674-279-4   | 12.5 | C17H26O3              | 279.1955          | 279.1930      | 9.0   | SC4, SC5, SC6, SC7, SC8 |
| 6E4-279-5   | 14.2 | C17H26O3              | 279.1955          | 279.1928      | 9.7   | SC5, SC6, SC7, SC8      |
| 6E4-293-2   | 11.4 | C17H24O1              | 293.1747          | 293.1719      | 9.6   | SC4, SC5, SC6, SC7, SC8 |
| 674-293-3   | 12.8 | C17H24O4              | 293.1747          | 293.1720      | 9.2   | SC4, SC5, SC6, SC7, SC8 |
| 6E4-293-4   | 14.6 | C17H24O1              | 293.1747          | 293.1719      | 9.6   | SC4, SC5, SC6, SC7, SC8 |
| 6E4-311-1   | 7.3  | C17H26O5              | 311.1853          | 311.1836      | 5.5   | SC4, SC5, SC6, SC7, SC8 |
| 874-323-1   | 14.5 | C19H30O4              | 323.2217          | 323.2206      | 3.4   | SC4, SC5, SC6, SC7, SC8 |
| 8-Shogaol   | 16.0 | C19H28O3              | 305.2111          | 305.2081      | 9.8   | SC4, SC5, SC6, SC7, SC8 |
| 8E4-305-1   | 12.8 | C19H28O3              | 305.2111          | 305.2081      | 9.8   | SC5, SC6, SC7, SC8      |
| 874-305-2   | 13.5 | C19H28O3              | 305.2111          | 305.2081      | 9.8   | SC4, SC5, SC6, SC7, SC8 |
| 8E4-305-3   | 14.5 | C19H28O3              | 305.2111          | 305.2086      | 8.2   | SC4, SC5, SC6, SC7, SC8 |
| 8-Paradol   | 16.6 | C19H30O3              | 307.2268          | 307.2239      | 9.4   | SC5, SC6, SC7, SC8      |
| 8E4-307-1   | 12.8 | C19H30O3              | 307.2268          | 307.2240      | 9.1   | SC4, SC5, SC6, SC7, SC8 |
| 8E4-307-2   | 13.2 | C19H30O3              | 307.2268          | 307.2239      | 9.4   | SC4, SC5, SC6, SC7, SC8 |
| 874-321-1   | 12.6 | C19H28O4              | 321.2060          | 321.2030      | 9.3   | SC4, SC5, SC6, SC7, SC8 |
| 8E4-321-2   | 13.1 | C19H28O4              | 321.2060          | 321.2030      | 9.3   | SC4, SC5, SC6, SC7, SC8 |
| 874-321-3   | 13.4 | C19H28O4              | 321.2060          | 321.2038      | 6.8   | SC4, SC5, SC6, SC7, SC8 |
| 8E4-321-4   | 14.6 | C19H28O4              | 321.2060          | 321.2029      | 9.7   | SC4, SC5, SC6, SC7, SC8 |
| 8E4-321-5   | 16.5 | C19H28O4              | 321.2060          | 321.2032      | 8.7   | SC4, SC5, SC6, SC7, SC8 |
| 874-339-1   | 12.5 | C19H30O5              | 339.2166          | 339.2135      | 9.1   | SC4, SC5, SC6, SC7, SC8 |
| 10-Gingerol | 15.3 | C21H34O1              | 351.2530          | 351.2497      | 9.4   | SC4, SC5, SC6, SC7, SC8 |
| 10E4-351-1  | 16.4 | C21H34O1              | 351.2530          | 351.2499      | 8.8   | SC4, SC5, SC6, SC7, SC8 |
| 10-Shogaol  | 17.6 | C21H32O3              | 333.2424          | 333.2398      | 7.8   | SC4, SC5, SC6, SC7, SC8 |
| 10E4-333-1  | 15.4 | C21H32O3              | 333.2424          | 333.2396      | 8.4   | SC4, SC5, SC6, SC7, SC8 |
| 1074-333-2  | 17.4 | C21H32O3              | 333.2424          | 333.2395      | 8.7   | SC4, SC5, SC6, SC7, SC8 |
| 10E4-335-1  | 14.7 | C21H34O3              | 335.2581          | 335.2549      | 9.5   | SC4, SC5, SC6, SC7, SC8 |
| 10E4-335-2  | 15.1 | C21H34O3              | 335.2581          | 335.2549      | 9.5   | SC4, SC5, SC6, SC7, SC8 |
| 1074-349-1  | 15.3 | C21H32O4              | 349.2373          | 349.2343      | 8.6   | SC4, SC5, SC6, SC7, SC8 |
| 10E4-349-2  | 18.3 | C21H32O4              | 349.2373          | 349.2339      | 9.7   | SC4, SC5, SC6, SC7, SC8 |
| 1074-353-1  | 19.0 | C21H36O4              | 353.2686          | 353.2651      | 9.9   | SC4, SC5, SC6, SC7, SC8 |

SP 시료의 생물전환 대사체 프로파일을 분석한 결과는 그림 59 61와 같다. SP4에 비하여 SP5, 6, 7, 8 시료에는 4가지 대사체(6-paradol, 6EM-279-5, 8EM-305-3, 8-paradol)가 새롭게 생성되었다. 6-shogaol은 reduction을 통해 6-paradol, 6EM-279-5(m/z 279)로 대사되었고, 8-shogaol은 reduction을 통해 8-paradol(m/z 307)로 대사되었다. 8EM-305-3은 shogaol과 같은 분자량을 가진 대사체로 gingerol로부터 탈수 반응을 통해 생성되거나 paradol로부터 hydroxylation된 후 탈수 반응을 통해 생성되는 것으로 예상되었다. SP4 시료에서 6-shogaol과 6-gingerol의 함량이 주요 성분을 이루었고, SP5, 6, 7, 8시료에서는 shogaol이 reduction되어 나타나는 paradol 분자량 대사체가 상대적으로 많이 생성되었다. 반응 시간이 지남에 따라 6-, 8-, 10-shogaol의 감소가 다른 미생물에 비하여 상대적으로 낮으나 paradol 생성율은 상대적으로 높은 것을 관찰하였고, paradol과 분자량이 같은 대사체들도 상대적으로 많이 관찰되어 SP 시료에서는 shogaol에서 reduction이 일어나는 paradol 생성 대사가 활발하게 일어날 것으로 예측되었다. 각 대사체들의 크로마토그램적인 특징들을 표 33에 정리하였다. 각 대사체들의 elemental composition에 따른 이론값과 실험값의 차이가 10 ppm을 넘지 않는 것으로 관찰되는 것으로 보아 제시한 시정식에 맞는 대사체임을 확인하였다.

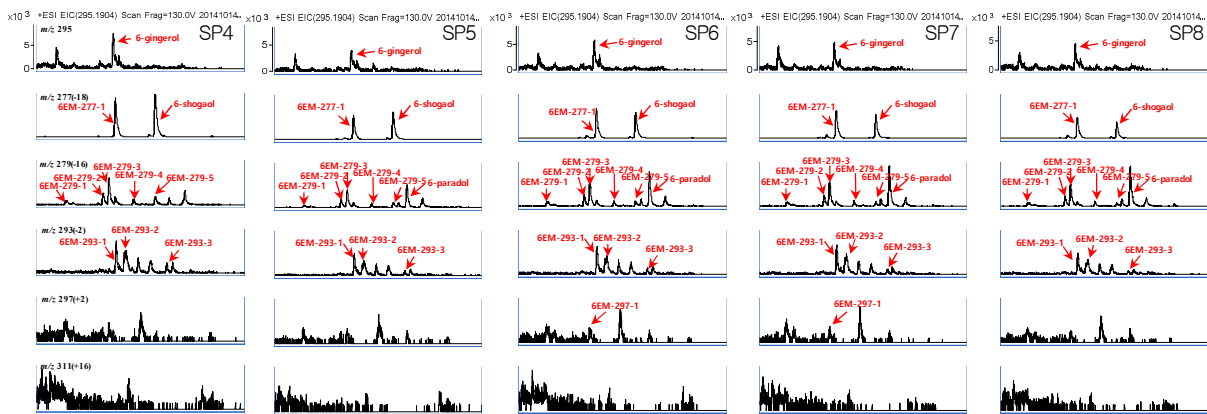


그림 59. SP4-SP8 시료의 생물전환 대사체(6-series) EIC.

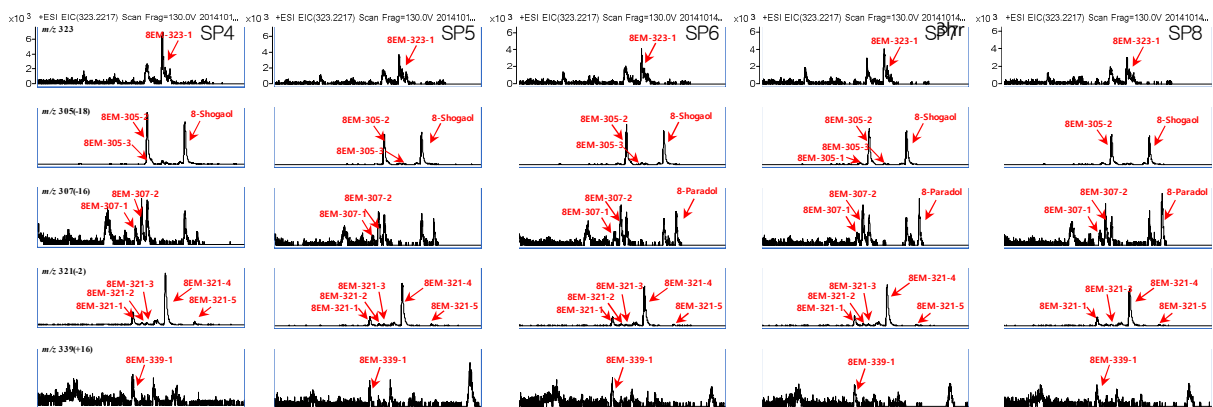


그림 60. SP4-SP8 시료의 생물전환 대사체(8-series) EIC.

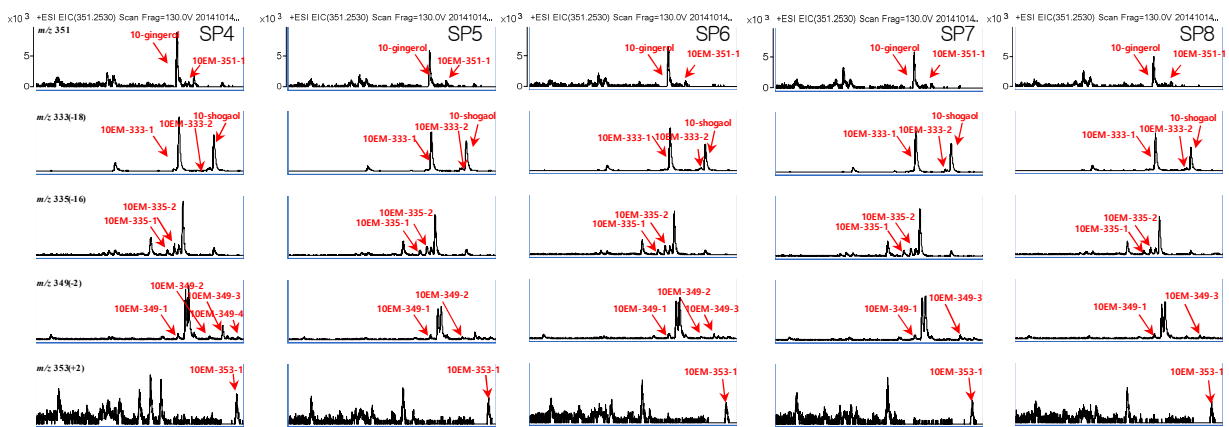


그림 61. SP4 SP8 시료의 생분전환 대사체(10 series) EIC.

표 33. SP 시료의 생분전환 대사체의 accurate mass 측정

| <i>S. pombe</i> |      |                       |                  |               |       |                         |
|-----------------|------|-----------------------|------------------|---------------|-------|-------------------------|
| Name            | RT   | Elemental composition | Theoretical mass | Measured mass | Error | Remark                  |
| 6-Gingerol      | 11.2 | C17H26O4              | 295.1904         | 295.1880      | 8.1   | SP4, SP5, SP6, SP7, SP8 |
| 6-Shogaol       | 13.8 | C17H24O3              | 277.1798         | 277.1775      | 8.3   | SP4, SP5, SP6, SP7, SP8 |
| 6E1-277-1       | 11.3 | C17H24O3              | 277.1798         | 277.1777      | 7.6   | SP4, SP5, SP6, SP7, SP8 |
| 6-Paradolol     | 14.7 | C17H26O3              | 279.1955         | 279.1932      | 8.2   | SP5, SP6, SP7, SP8      |
| 6E1-279-1       | 8.2  | C17H26O3              | 279.1955         | 279.1928      | 9.7   | SP4, SP5, SP6, SP7, SP8 |
| 6E1-279-2       | 10.6 | C17H26O3              | 279.1955         | 279.1928      | 9.7   | SP4, SP5, SP6, SP7, SP8 |
| 6E1-279-3       | 10.9 | C17H26O3              | 279.1955         | 279.1930      | 9.0   | SP4, SP5, SP6, SP7, SP8 |
| 6F1-279-4       | 12.5 | C17H26O3              | 279.1955         | 279.1931      | 8.6   | SP4, SP5, SP6, SP7, SP8 |
| 6F1-279-5       | 14.2 | C17H26O3              | 279.1955         | 279.1930      | 9.0   | SP5, SP6, SP7, SP8      |
| 6E1-293-2       | 11.4 | C17H24O4              | 293.1747         | 293.1721      | 8.9   | SP4, SP5, SP6, SP7, SP8 |
| 6E1-293-3       | 12.8 | C17H24O4              | 293.1747         | 293.1721      | 8.9   | SP4, SP5, SP6, SP7, SP8 |
| 6E1-293-4       | 14.6 | C17H24O4              | 293.1747         | 293.1724      | 7.8   | SP4, SP5, SP6, SP7, SP8 |
| 6E1-297-1       | 10.9 | C17H28O4              | 297.2060         | 297.2032      | 9.4   | SP4, SP5, SP6, SP7, SP8 |
| 6E1-311-1       | 7.3  | C17H26O5              | 311.1853         | 311.1845      | 2.6   | SP4, SP5, SP6, SP7, SP8 |
| 8E1-323-1       | 14.5 | C19H30O4              | 323.2217         | 323.2206      | 3.4   | SP4, SP5, SP6, SP7, SP8 |
| 8-Shogaol       | 16.0 | C19H28O3              | 305.2111         | 305.2093      | 5.9   | SP4, SP5, SP6, SP7, SP8 |
| 8E1-305-1       | 12.8 | C19H28O3              | 305.2111         | 305.2088      | 7.5   | SP4, SP5, SP6, SP7, SP8 |
| 8E1-305-2       | 13.5 | C19H28O3              | 305.2111         | 305.2091      | 6.6   | SP4, SP5, SP6, SP7, SP8 |
| 8E1-305-3       | 14.5 | C19H28O3              | 305.2111         | 305.2082      | 9.5   | SP5, SP6, SP7, SP8      |
| 8-Paradolol     | 16.6 | C19H30O3              | 307.2268         | 307.2249      | 6.2   | SP5, SP6, SP7, SP8      |
| 8F1-307-1       | 12.8 | C19H30O3              | 307.2268         | 307.2255      | 4.2   | SP4, SP5, SP6, SP7, SP8 |
| 8E1-307-2       | 13.2 | C19H30O3              | 307.2268         | 307.2242      | 8.5   | SP4, SP5, SP6, SP7, SP8 |
| 8F1-321-1       | 12.6 | C19H28O4              | 321.2060         | 321.2038      | 6.8   | SP4, SP5, SP6, SP7, SP8 |
| 8E1-321-2       | 13.1 | C19H28O4              | 321.2060         | 321.2040      | 6.2   | SP4, SP5, SP6, SP7, SP8 |
| 8E1-321-3       | 13.4 | C19H28O4              | 321.2060         | 321.2041      | 5.9   | SP4, SP5, SP6, SP7, SP8 |
| 8E1-321-4       | 14.6 | C19H28O4              | 321.2060         | 321.2041      | 5.9   | SP4, SP5, SP6, SP7, SP8 |
| 8E1-321-5       | 16.5 | C19H28O4              | 321.2060         | 321.2039      | 6.5   | SP4, SP5, SP6, SP7, SP8 |

*S. pombe*

| Name        | RT   | Elemental composition | Theoretical mass | Measured mass | Error | Remark                  |
|-------------|------|-----------------------|------------------|---------------|-------|-------------------------|
| 8EM-339-1   | 12.5 | C19H30O5              | 339.2166         | 339.2133      | 9.7   | SF4, SF5, SF6, SF7, SP8 |
| 10 Gingerol | 15.3 | C21H34O4              | 351.2530         | 351.2518      | 3.4   | SF4, SF5, SF6, SF7, SP8 |
| 10EM-351-1  | 16.4 | C21H34O4              | 351.2530         | 351.2518      | 3.4   | SF4, SF5, SF6, SF7, SP8 |
| 10 Shogaol  | 17.6 | C21H32O3              | 333.2424         | 333.2415      | 2.7   | SF4, SF5, SF6, SF7, SP8 |
| 10EM-333-1  | 15.4 | C21H32O3              | 333.2424         | 333.2416      | 2.4   | SF4, SF5, SF6, SF7, SP8 |
| 10EM-333-2  | 17.4 | C21H32O3              | 333.2424         | 333.2411      | 3.9   | SF4, SF5, SF6, SF7, SP8 |
| 10EM-335-1  | 14.7 | C21H34O3              | 335.2581         | 335.2560      | 6.3   | SF4, SF5, SF6, SF7, SP8 |
| 10EM-335-2  | 15.1 | C21H34O3              | 335.2581         | 335.2567      | 4.2   | SF4, SF5, SF6, SF7, SP8 |
| 10EM-349-1  | 15.3 | C21H32O4              | 349.2373         | 349.2360      | 3.7   | SF4, SF5, SF6, SF7, SP8 |
| 10EM-349-2  | 18.3 | C21H32O4              | 349.2373         | 349.2361      | 3.4   | SF4, SF5, SF6, SF7, SP8 |
| 10EM-349-3  | 19.3 | C21H32O4              | 349.2373         | 349.2353      | 5.7   | SF4, SF5, SF7,          |
| 10EM-353-1  | 19.0 | C21H36O4              | 353.2686         | 353.2652      | 9.6   | SF4, SF5, SF6, SF7, SP8 |

AN 시료의 생물전환 대사체 프로파일을 분석한 결과는 그림 62-64와 같다. AN4에 미하여 AN5, 6, 7, 8 시료에서는 3 가지 대사체(6-paradol, 6EM-279-5, 8EM-305-1)가 새롭게 생성되었다. 6-shogaol은 reduction을 통해 6-paradol, 6EM-279-5(m/z 279) 대사체가 되었고, 8EM-305-1은 shogaol과 같은 분자량을 가진 대사체로 gingerol로부터 탈수 반응을 통해 생성되거나 paradol로부터 hydroxylation된 후 탈수 반응을 통해 생성되는 것으로 예상되었다. AN5, 6, 7, 8 시료에서는 gingerol과 shogaol의 감소량이 다른 시료에 미하여 적고, paradol의 생성율도 상대적으로 낮은 것을 관찰할 수 있었다. 또한 shogaol에서 paradol의 생성은 reduction 반응에 의해 전환이 되는데, AN시료에서는 주로 hydroxylation 반응에 의한 대사체가 증가하는 경향을 보여, 이는 paradol 위주의 생물전환 유도 미생물로 적합하지 않는 것으로 판단된다. 각 대사체들의 크로마토그램적인 특징들을 표 34에 정리하였다. 각 대사체들의 elemental composition에 따른 이론값과 실측값의 차이가 10 ppm을 넘지 않는 것으로 관찰되는 것으로 보아 제시한 시정식에 맞는 대사체임을 확인하였다.

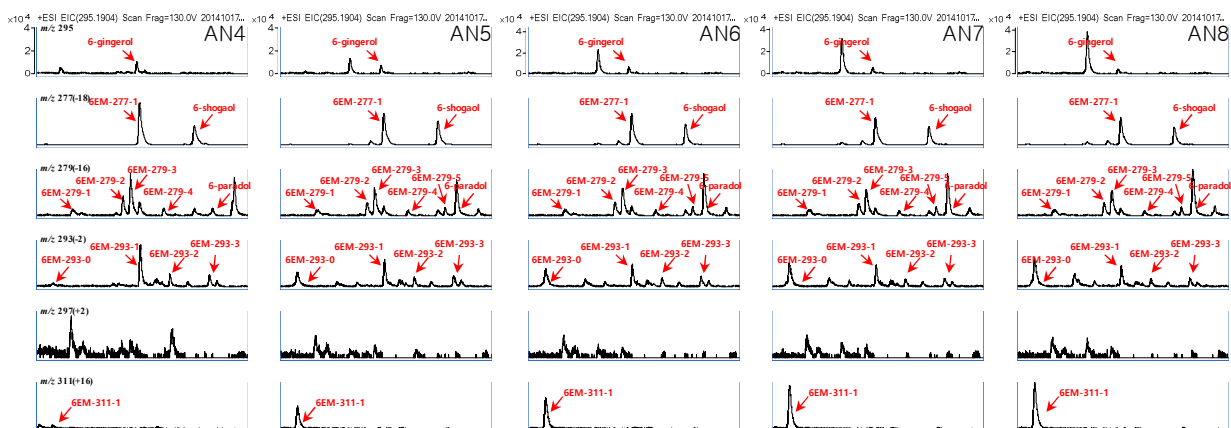


그림 62. AN4-8 시료의 생물전환 대사체(6-series) EIC.

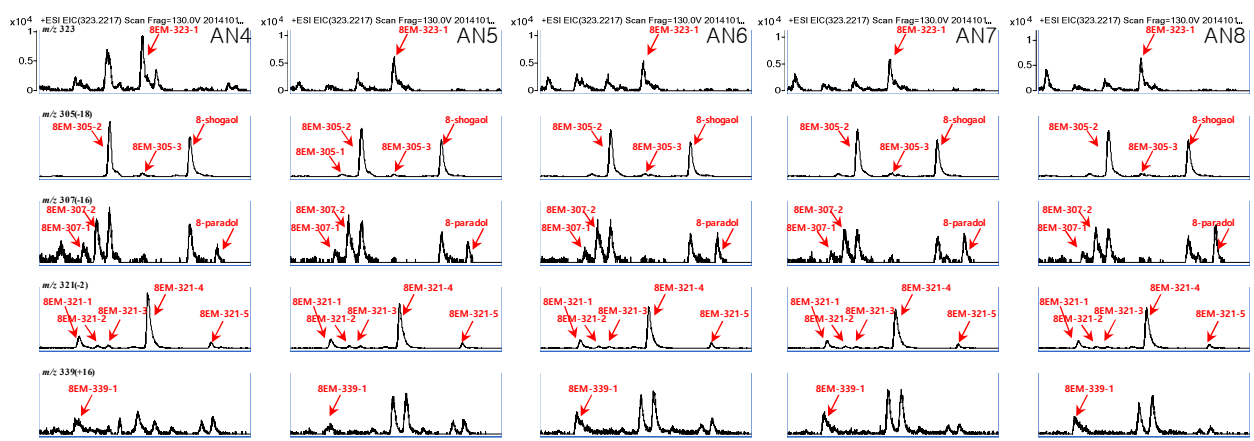


그림 63. AN4~AN8 시료의 생분전환 대사체(8-series) EIC.

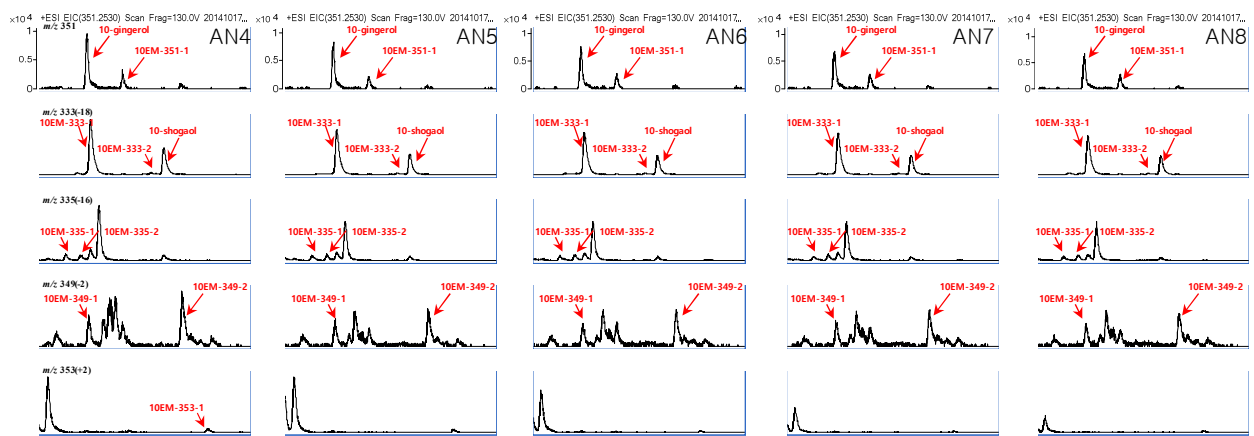


그림 64. AN4~AN8 시료의 생분전환 대사체(10 series) EIC.

표 34. AN 시료의 생분전환 대사체 accurate mass 측정

| <i>A. niger</i> |      |                       |                  |               |       |                         |
|-----------------|------|-----------------------|------------------|---------------|-------|-------------------------|
| Name            | RT   | Elemental composition | Theoretical mass | Measured mass | Error | Remark                  |
| 6-Gingerol      | 11.2 | C17H26O4              | 295.1904         | 295.1916      | 1.1   | AN4, AN5, AN6, AN7, AN8 |
| 6-Shogaol       | 13.8 | C17H24O3              | 277.1798         | 277.1805      | 2.5   | AN4, AN5, AN6, AN7, AN8 |
| 6E-I-277-1      | 11.3 | C17H24O3              | 277.1798         | 277.1790      | 2.9   | AN4, AN5, AN6, AN7, AN8 |
| 6-Paradol       | 14.7 | C17H26O3              | 279.1955         | 279.1977      | 7.9   | AN5, AN6, AN7, AN8      |
| 6E-I-279-1      | 8.2  | C17H26O3              | 279.1955         | 279.1955      | 0.0   | AN4, AN5, AN6, AN7, AN8 |
| 6E-I-279-2      | 10.6 | C17H26O3              | 279.1955         | 279.1964      | 3.2   | AN4, AN5, AN6, AN7, AN8 |
| 6E-I-279-3      | 10.9 | C17H26O3              | 279.1955         | 279.1965      | 3.6   | AN4, AN5, AN6, AN7, AN8 |
| 6E-I-279-4      | 12.5 | C17H26O3              | 279.1955         | 279.1957      | 0.7   | AN4, AN5, AN6, AN7, AN8 |
| 6E-I-279-5      | 14.2 | C17H26O3              | 279.1955         | 279.1935      | 7.2   | AN5, AN6, AN7, AN8      |



| <i>A. niger</i> |      |                       |                  |               |       |                         |
|-----------------|------|-----------------------|------------------|---------------|-------|-------------------------|
| Name            | RT   | Elemental composition | Theoretical mass | Measured mass | Error | Remarks                 |
| 6FII-293-0      | 7.5  | C17H24O4              | 293.1747         | 293.1770      | 7.8   | IV4, IV5, IV6, IV7, IV8 |
| 6EII-293-1      | 11.4 | C17H24O1              | 293.1747         | 293.1737      | 3.4   | IV4, IV5, IV6, IV7, IV8 |
| 6FII-293-2      | 12.8 | C17H24O4              | 293.1747         | 293.1765      | 6.1   | IV4, IV5, IV6, IV7, IV8 |
| 6EII-293-3      | 14.6 | C17H24O1              | 293.1747         | 293.1738      | 3.1   | IV4, IV5, IV6, IV7, IV8 |
| 6EII-297-1      | 10.9 | C17H28O1              | 297.2060         | 297.2045      | 5.0   | IV4, IV5, IV6, IV7, IV8 |
| 6EII-311-1      | 7.3  | C17H26O5              | 311.1853         | 311.1840      | 4.2   | IV4, IV5, IV6, IV7, IV8 |
| 8FII-323-1      | 14.5 | C19H30O4              | 323.2217         | 323.2206      | 3.4   | IV4, IV5, IV6, IV7, IV8 |
| 8-Shogaol       | 16.0 | C19H28O3              | 305.2111         | 305.2093      | 5.9   | IV4, IV5, IV6, IV7, IV8 |
| 8EII-305-1      | 12.8 | C19H28O3              | 305.2111         | 305.2091      | 6.6   | IV5, IV6, IV7, IV8      |
| 8EII-305-2      | 13.5 | C19H28O3              | 305.2111         | 305.2093      | 5.9   | IV4, IV5, IV6, IV7, IV8 |
| 8EII-305-3      | 14.5 | C19H28O3              | 305.2111         | 305.2096      | 4.9   | IV4, IV5, IV6, IV7, IV8 |
| 8-Paradol       | 16.6 | C19H30O3              | 307.2268         | 307.2271      | 1.0   | IV4, IV5, IV6, IV7, IV8 |
| 8FII-307-1      | 12.8 | C19H30O3              | 307.2268         | 307.2273      | 1.6   | IV4, IV5, IV6, IV7, IV8 |
| 8EII-307-2      | 13.2 | C19H30O3              | 307.2268         | 307.2276      | 2.6   | IV4, IV5, IV6, IV7, IV8 |
| 8EII-321-1      | 12.6 | C19H28O1              | 321.2060         | 321.2070      | 3.1   | IV4, IV5, IV6, IV7, IV8 |
| 8EII-321-2      | 13.1 | C19H28O1              | 321.2060         | 321.2066      | 1.9   | IV4, IV5, IV6, IV7, IV8 |
| 8EII-321-3      | 13.4 | C19H28O1              | 321.2060         | 321.2077      | 5.3   | IV4, IV5, IV6, IV7, IV8 |
| 8FII-321-4      | 14.6 | C19H28O4              | 321.2060         | 321.2072      | 3.7   | IV4, IV5, IV6, IV7, IV8 |
| 8FII-321-5      | 16.5 | C19H28O4              | 321.2060         | 321.2074      | 4.4   | IV4, IV5, IV6, IV7, IV8 |
| 8EII-339-1      | 12.5 | C19H30O5              | 339.2166         | 339.2187      | 6.2   | IV4, IV5, IV6, IV7, IV8 |
| 10-Gingegerol   | 15.3 | C21H34O1              | 351.2530         | 351.2539      | 2.6   | IV4, IV5, IV6, IV7, IV8 |
| 10EII-351-1     | 16.4 | C21H34O1              | 351.2530         | 351.2532      | 0.6   | IV4, IV5, IV6, IV7, IV8 |
| 10-Shogaol      | 17.6 | C21H32O3              | 333.2424         | 333.2432      | 2.4   | IV4, IV5, IV6, IV7, IV8 |
| 10FI-333-1      | 15.4 | C21H32O3              | 333.2424         | 333.2437      | 3.9   | IV4, IV5, IV6, IV7, IV8 |
| 10FI-333-2      | 17.4 | C21H32O3              | 333.2424         | 333.2433      | 2.7   | IV4, IV5, IV6, IV7, IV8 |
| 10EII-335-1     | 14.7 | C21H34O3              | 335.2581         | 335.2590      | 2.7   | IV4, IV5, IV6, IV7, IV8 |
| 10EII-335-2     | 15.1 | C21H34O3              | 335.2581         | 335.2589      | 2.4   | IV4, IV5, IV6, IV7, IV8 |
| 10EII-349-1     | 15.3 | C21H32O1              | 349.2373         | 349.2380      | 2.0   | IV4, IV5, IV6, IV7, IV8 |
| 10EII-349-2     | 18.3 | C21H32O1              | 349.2373         | 349.2376      | 0.9   | IV4, IV5, IV6, IV7, IV8 |
| 10FI-353-1      | 19.0 | C21H36O4              | 353.2686         | 353.2687      | 0.3   | IV4                     |

### (3) 적정 대사체 조성비를 가지는 생물전환 소재의 대사체 주성분 분석

각 시료 (SP4~8, SC4~8, AX4~8)의 생물 전환 대사체 프로파일의 변화를 분석하기 위하여 다변량 통계분석법인 주성분 분석을 이용하여 패턴분석을 수행하였다. 생강의 생물전환 추출물에서 발견된 총 40종의 대사체를 패턴분석을 위한 변수로 사용하였다. 주성분 분석에 사용된 총 40개의 대사체에 대한 정보는 표 35에 정리하였다. 각 시료에서 검출된 40종의 대사체의 피크면적 패턴은 그림 65에 나타내었다.

패턴분석을 위하여 선택된 40종의 대사체에 대하여 SP, SC, AX소재에서의 대사체의 생성의 증가 또는 감소 패턴을 비교하여 보았을 때, 각각의 5, 6, 7, 8시료에서 paradol의 생성율은 AX이 가장 저조하고, SC와 SP에 의한 paradol이 가장 많이 높은 것을 확인하였다. SC의 경우 6-shogaol에서 reduction 반응에 의해 생성되는 paradol 외에 6-shogaol의 hydroxylation 반응에 의해 생성되는 대사체들이 발견되었다. 반면, SP4 시료에서 다소 높은 gingerol, shogaol의 구성을 보이다가 SP5, 6, 7, 8시료에서 paradol로 대사되는 reduction 반응이 상대적으로 많이 발견되는 것을 관찰할 수 있었다. 이로써 shogaol에서 paradol로의 생물전환에는 SP가 적합한 것으로 예측된다.

통계분석을 위하여 gingerol, shogaol, paradol을 포함하여 LC/QTOF-MS 분석을 통해 검출된 총 40개의 대사체를 변수로 선정하여 미생물 및 반응처리 시간이 각기 다른 총 15개의 시료에 대하여 대사체 프로파일의 패턴을 분석하였다. 미생물 및 반응시간에 따른 총 15개의 시료에 대하여 총 40개의 대사체를 변수로 하여 주성분 분석을 수행하였으며 그 결과 그림 57과 같은 주성분 score plot이 도출되었다. 그림 66의 A는 주성분1과 주성분2에 대한 score plot으로 반응 전 (SC4, SP4, AX4)에 비하여, 반응 후 각 미생물에 따라 특징적으로 군집을 형성하여 분포하는 것을 알 수 있다. 특히, SP와 SC 배양시료는 주성분1의 양의 방향에 주로 분포하는 반면 AX 배양시료는 주성분1에 대하여 음의 방향쪽에 분포하여 주성분 1에 대하여 확연한 차이를 나타내었으며, 주성분 2의 경우도 SP와 SC는 근접하게 분포하였으나 AX은 두 시료와 약간의 차이를 나타내었다. 그림 66의 B는 주성분2와 주성분3에 대한 score plot으로, 각 미생물 배양 시료에서 주성분 3에 대한 차이는 거의 나타나지 않았다. 이를 종합할 때, 생강 추출물은 미생물에 의한 생물변환에 의하여 성분 패턴이 변화함을 알 수 있으며, 특히 SP와 SC는 미생물 배양 후 유사한 패턴을 나타내는 반면 AX은 이들 두 그룹과 현저한 차이를 보임을 알 수 있다. 이러한 미생물 간 대사체 프로파일 패턴의 차이는 in vivo에서의 효능 차이에 대한 근거가 될 수 있을 것으로 사료된다.

표 35. 생물전환 대사체의 패턴 분석에 사용된 대사체 정보

| 번호 | 대사체        | 번호 | 대사체       | 번호 | 대사체         | 번호 | 대사체        |
|----|------------|----|-----------|----|-------------|----|------------|
| 1  | 6-Gingerol | 11 | 6E4-293-1 | 21 | 8-Paradol   | 31 | 10F4-351-1 |
| 2  | 6-Shogaol  | 12 | 6E4-293-2 | 22 | 8E4-307-1   | 32 | 10-Shogaol |
| 3  | 6E4-277-1  | 13 | 6E4-293-3 | 23 | 8E4-307-2   | 33 | 10E4-333-1 |
| 4  | 6-Paradol  | 14 | 6E4-297-1 | 24 | 8F4-321-1   | 34 | 10F4-333-2 |
| 5  | 6E4-279-1  | 15 | 6E4-311-1 | 25 | 8E4-321-2   | 35 | 10E4-335-1 |
| 6  | 6E4-279-2  | 16 | 8E4-323-1 | 26 | 8E4-321-3   | 36 | 10E4-335-2 |
| 7  | 6E4-279-3  | 17 | 8-Shogaol | 27 | 8E4-321-4   | 37 | 10E4-349-1 |
| 8  | 6E4-279-4  | 18 | 8E4-305-1 | 28 | 8E4-321-5   | 38 | 10E4-349-3 |
| 9  | 6E4-279-5  | 19 | 8E4-305-2 | 29 | 8F4-339-1   | 39 | 10F4-349-4 |
| 10 | 6E4-293-0  | 20 | 8E4-305-3 | 30 | 10-Gingerol | 40 | 10E4-353-1 |

(단위: 10,000)

| 생물전환 대사체 소재 | 대사체 |     |     |    |   |    |    |   |   |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |     |    |    |    |    |    |    |    |
|-------------|-----|-----|-----|----|---|----|----|---|---|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|-----|----|----|----|----|----|----|----|
|             | 1   | 2   | 3   | 4  | 5 | 6  | 7  | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 | 20 | 21 | 22 | 23 | 24 | 25 | 26 | 27 | 28 | 29 | 30 | 31 | 32 | 33  | 34 | 35 | 36 | 37 | 38 | 39 | 40 |
| SC4         | 6   | 230 | 220 | 5  | 4 | 7  | 15 | 3 | 0 | 0  | 7  | 3  | 2  | 0  | 1  | 2  | 65 | 0  | 79 | 3  | 0  | 1  | 2  | 9  | 2  | 1  | 42 | 2  | 1  | 5  | 0  | 49 | 112 | 9  | 1  | 2  | 2  | 4  | 0  | 1  |
| SC5         | 6   | 168 | 177 | 19 | 1 | 6  | 14 | 3 | 2 | 0  | 7  | 3  | 1  | 0  | 0  | 2  | 57 | 3  | 67 | 3  | 1  | 1  | 2  | 9  | 2  | 1  | 42 | 1  | 1  | 4  | 0  | 46 | 94  | 8  | 2  | 3  | 2  | 2  | 0  | 1  |
| SC6         | 5   | 121 | 174 | 25 | 1 | 6  | 14 | 2 | 2 | 0  | 6  | 2  | 1  | 0  | 1  | 2  | 50 | 4  | 66 | 3  | 2  | 0  | 2  | 7  | 2  | 1  | 38 | 1  | 1  | 4  | 0  | 38 | 91  | 6  | 1  | 2  | 2  | 1  | 0  | 1  |
| SC7         | 5   | 101 | 155 | 27 | 1 | 6  | 13 | 2 | 3 | 0  | 5  | 2  | 1  | 0  | 1  | 2  | 41 | 4  | 58 | 2  | 2  | 0  | 2  | 8  | 2  | 2  | 36 | 1  | 1  | 4  | 0  | 38 | 79  | 7  | 1  | 2  | 2  | 1  | 0  | 1  |
| SC8         | 5   | 70  | 161 | 29 | 0 | 6  | 13 | 3 | 4 | 0  | 5  | 2  | 1  | 0  | 1  | 3  | 28 | 5  | 62 | 2  | 5  | 0  | 2  | 8  | 2  | 1  | 37 | 1  | 1  | 4  | 0  | 37 | 86  | 7  | 2  | 2  | 2  | 1  | 0  | 0  |
| SP4         | 8   | 276 | 243 | 4  | 6 | 8  | 18 | 4 | 0 | 0  | 8  | 4  | 2  | 1  | 4  | 73 | 0  | 81 | 81 | 5  | 0  | 1  | 2  | 11 | 2  | 2  | 49 | 2  | 1  | 6  | 1  | 81 | 114 | 11 | 2  | 3  | 2  | 4  | 1  | 1  |
| SP5         | 5   | 174 | 149 | 16 | 2 | 5  | 13 | 3 | 3 | 0  | 6  | 3  | 1  | 0  | 2  | 60 | 3  | 55 | 55 | 3  | 1  | 0  | 2  | 8  | 2  | 1  | 41 | 1  | 1  | 4  | 0  | 65 | 81  | 5  | 2  | 3  | 2  | 3  | 1  | 1  |
| SP6         | 7   | 163 | 185 | 23 | 6 | 8  | 17 | 3 | 4 | 0  | 8  | 3  | 1  | 1  | 4  | 60 | 4  | 65 | 65 | 3  | 2  | 1  | 2  | 10 | 2  | 2  | 44 | 1  | 1  | 4  | 0  | 55 | 90  | 8  | 2  | 3  | 2  | 1  | 0  | 1  |
| SP7         | 5   | 145 | 164 | 27 | 6 | 7  | 17 | 3 | 4 | 0  | 8  | 3  | 1  | 1  | 2  | 59 | 5  | 64 | 64 | 2  | 2  | 1  | 2  | 10 | 2  | 1  | 44 | 1  | 1  | 4  | 0  | 53 | 82  | 6  | 2  | 3  | 3  | 2  | 1  | 1  |
| SP8         | 5   | 106 | 142 | 30 | 5 | 7  | 16 | 3 | 4 | 0  | 6  | 3  | 1  | 1  | 2  | 48 | 5  | 48 | 48 | 3  | 2  | 1  | 2  | 8  | 2  | 1  | 39 | 1  | 1  | 3  | 0  | 43 | 70  | 8  | 2  | 2  | 2  | 1  | 0  | 1  |
| AN4         | 8   | 178 | 336 | 4  | 7 | 10 | 22 | 4 | 0 | 4  | 15 | 5  | 5  | 0  | 3  | 8  | 83 | 0  | 98 | 9  | 1  | 1  | 3  | 11 | 2  | 2  | 51 | 5  | 3  | 6  | 1  | 71 | 148 | 6  | 2  | 2  | 3  | 7  | 0  | 1  |
| AN5         | 6   | 180 | 238 | 20 | 7 | 7  | 17 | 3 | 4 | 8  | 10 | 4  | 4  | 0  | 16 | 5  | 67 | 6  | 93 | 9  | 1  | 1  | 3  | 9  | 2  | 2  | 44 | 4  | 1  | 5  | 1  | 52 | 119 | 5  | 2  | 2  | 2  | 4  | 0  | 0  |
| AN6         | 5   | 144 | 219 | 22 | 7 | 7  | 16 | 3 | 4 | 11 | 9  | 3  | 4  | 0  | 20 | 5  | 61 | 6  | 85 | 5  | 1  | 1  | 2  | 8  | 2  | 1  | 41 | 4  | 4  | 5  | 1  | 48 | 114 | 5  | 2  | 2  | 2  | 4  | 0  | 0  |
| AN7         | 5   | 126 | 198 | 22 | 7 | 7  | 16 | 2 | 4 | 14 | 9  | 3  | 4  | 0  | 29 | 5  | 60 | 6  | 80 | 6  | 1  | 0  | 2  | 8  | 2  | 2  | 43 | 3  | 3  | 5  | 1  | 47 | 109 | 6  | 2  | 2  | 2  | 4  | 0  | 0  |
| AN8         | 4   | 119 | 179 | 26 | 7 | 7  | 14 | 3 | 5 | 18 | 9  | 3  | 4  | 0  | 35 | 5  | 58 | 6  | 74 | 5  | 2  | 0  | 2  | 8  | 2  | 1  | 43 | 4  | 3  | 4  | 1  | 45 | 100 | 6  | 2  | 2  | 2  | 4  | 0  | 0  |

Area = 0 ; □, 1 ≤ Area 값 < 10 ; ■, 10 ≤ Area 값 < 50 ; ■, 50 ≤ Area 값 < 100 ; ■, Area 값 ≥ 100 ; ■

그림 65. 각 시료별 생물전환 대사체의 생성패턴.

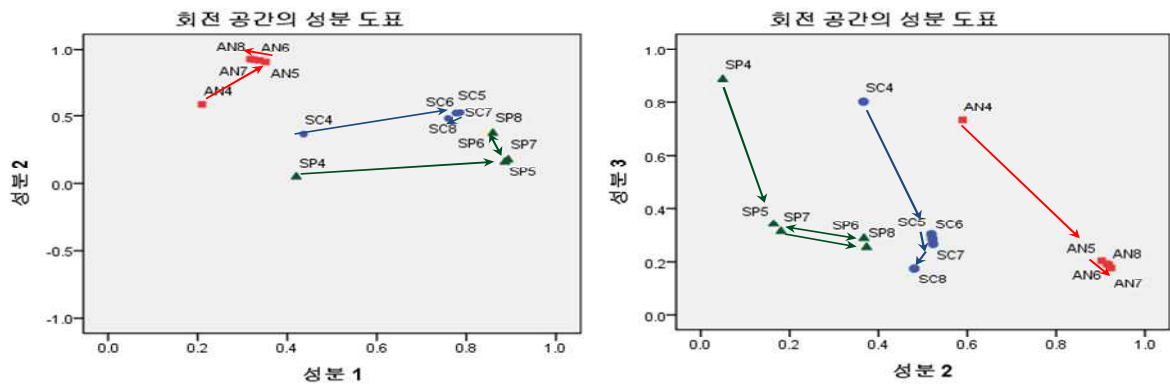


그림 66. 생물전환 대사체의 주성분 score plot.

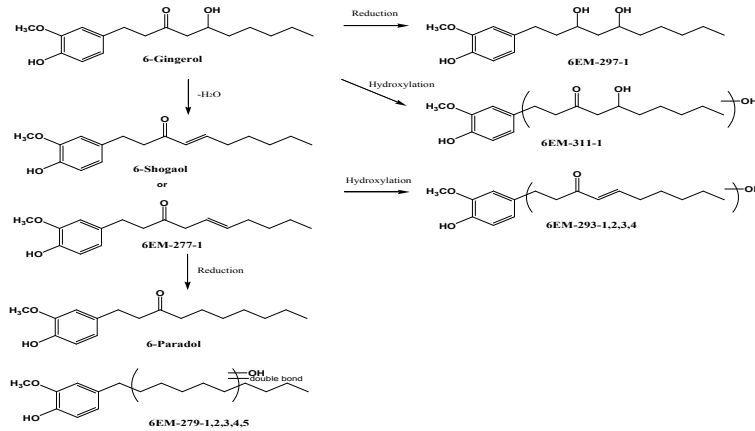


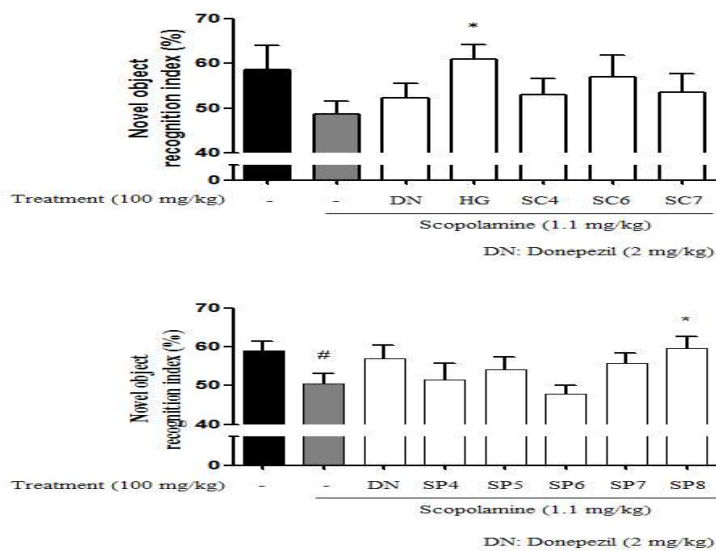
그림 67. Proposed metabolism pathway of 6 gingerol and 6 shogaol.

바. 생강유래 생물전환 대사체 소재의 *in vivo* 효능 평가 및 검증

(1) 식정 대사체 조성비를 가지는 생물전환 소재의 scopolamine으로 유도된 기억력 저하에 대한 인지기능 개선 효능 평가

(가) 식정 대사체 조성비를 가지는 생물전환 소재의 학습능력 개선 효능 평가

*In vitro* 효능 평가에서 인지기능 개선 효능이 확인된 SC, SP, VX 시료들의 학습능력 개선 효능을 scopolamine 유도 기억력 저하 동물모델에서 평가하였다. 실험 결과, SP 시료에서는 SP4 시료(51.57±4.24%)보다 6-paradol 비율이 높은 SP7, SP8 시료(55.80±2.55%, 59.66±3.01%)에서 더 좋은 학습능력 개선 효능을 보였다. 하지만, SC, VX 시료에서는 SC6, SC7, VX6, VX8 시료에서 학습능력 개선 효능을 보이지 못하였다(그림 68).



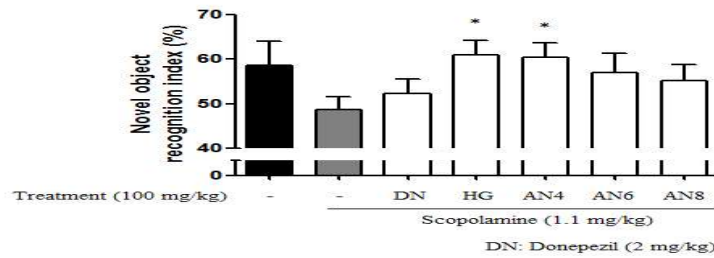


그림 68. 식장 대사체 조성비 생물전환 소재(SC4, 6, 7, SP4~8, \N4, 6, 8)의 학습능력 개선 효능.

(나) 식장 대사체 조성비를 가지는 생물전환 소재의 공간기억력 개선 효능 평가

SC, SP, \N 시료들의 공간기억력 개선 효능을 scopolamine 유도 기억력 저하 동물모델에서 평가하였다. 실험 결과, SC 시료에서는 SC7 시료(61.93±3.94%)에서 공간기억력 개선 효능이 증가하는 경향성을 보였고, SP 시료에서는 SP4 시료(54.45±4.14%)보다 6-paradol 비율이 높은 SP7, SP8 시료(58.72±2.52%, 58.93±3.77%)에서 더 좋은 공간기억력 개선 효능을 보였다. 하지만, \N 시료에서는 \N6, \N8 시료에서 공간기억력 개선 효능을 보이지 못하였다(그림 69).

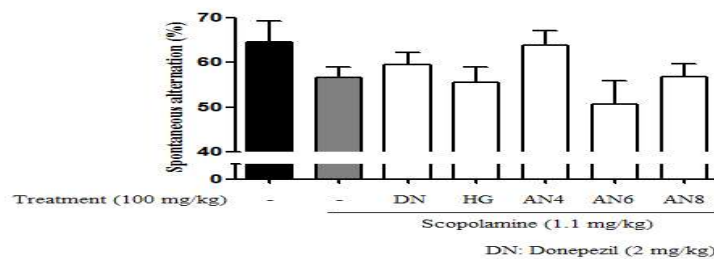
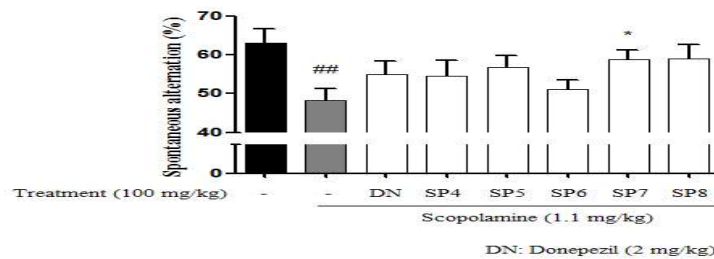
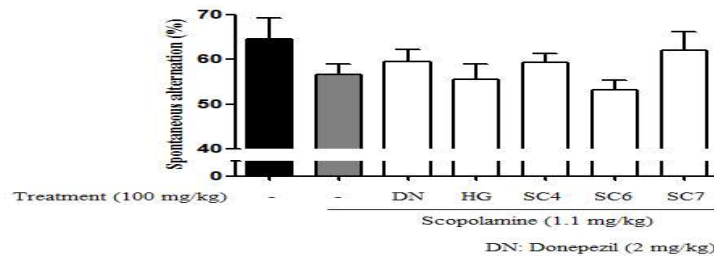


그림 69. 식장 대사체 조성비 생물전환 소재(SC4, 6, 7, SP4~8, \N4, 6, 8)의 공간기억력 개선 효능.

(다) 직접 대사체 조성비를 가지는 생물전환 소재의 공포기억력 개선 효능 평가

SC, SP, V 시료들의 공포기억력 개선 효능을 scopolamine 유도 기억력 저하 동물모델에서 평가하였다. 실험 결과, SP 시료에서는 SP4 시료(33.47±11.59초)보다 6 paradol 비율이 높은 SP6, SP8 시료(57.76±19.14초, 53.90±16.02초)에서 더 좋은 공포기억력 개선 효능을 보였다. SC6, V6 시료(45.90±17.22초, 55.48±20.96초)에서 공통적으로 공포기억력 개선 효능의 경향성을 보였고, SC4, 7, V4, 8 시료에서는 공포기억력 개선 효능을 보이지 못하였다(그림 70).

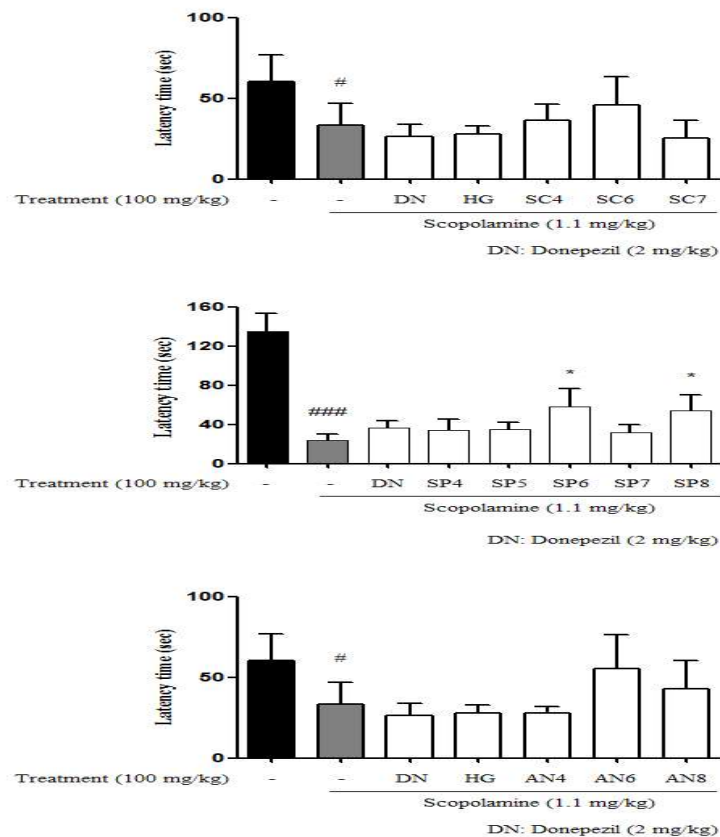


그림 70. 직접 대사체 조성비 생물전환 소재(SC4, 6, 7, SP4~8, V4, 6, 8)의 공포기억력 개선 효능.

(라) 직접 대사체 조성비를 가지는 생물전환 소재의 *in vivo* 효능 종합 정리

직접 대사체 조성비를 가지는 생물전환 소재(SC, SP, V)들의 기억력 개선 효능을 scopolamine 유도 기억력 저하 동물모델에서 평가한 결과, SC 시료는 학습능력, 공간기억력, 공포기억력 개선효능 등 3가지의 실험에서 기억력 개선 효능을 보였고, SP 시료도 scopolamine 군과 비교하였을 때, 유의적인 기억력 개선 효능을 보였다. 반면 V 시료는 scopolamine model에서 다른 시료들에 비하여 기억력 개선 효능을 보이지 못하였다. 최종 생물전환 대사체 소재 도출을 위해 기억력 개선 효능이 나타난 SC 시료와 SP 시료를 Aβ plaque 독성으로 유도된 기억력 저하 동물모델에서의 비교실험을 진행하였다(표 36).

표 36. 직경 대사체 조성비 생물전환 소재(SC4, 6, 7, SP4~8, W4, 6, 8)의 scopolamine model에서의 기억력 개선 효능 정리.

| 소재명 | 학습능력 개선 효능 | 공간기억력 개선 효능 | 공포기억력 개선 효능 |
|-----|------------|-------------|-------------|
| SC  | +          | +           | +           |
| SP  | ++         | ++          | ++          |
| W   |            |             | +           |

(2) 생강유래 생물전환 대사체 소재의 A $\beta$  plaque으로 유도된 기억력 저하에 대한 인지 기능 개선 효능 평가

(가) 생물전환 대사체 소재의 학습능력 개선 효능 평가

Scopolamine 유도 기억력 저하 동물모델에서 기억력 개선 효능을 보인 2종의 미생물 (*S. carlsbergensis*, *S. pombe*)을 이용하여 만든 SC8-1(6-shogaol:6-paradol 구성비율 0.5:9.5), SP8-1(6-shogaol:6-paradol 구성비율 0.8:9.2) 시료들의 A $\beta$  plaque으로 유도된 기억력 저하에 대한 학습능력 개선 효능을 평가하였다. 본 실험에서는 donepezil (DN)과 포스파티딜세린(PS)을 대조군으로 사용하였다.

실험 결과, SC8-1 시료(57.0 $\pm$ 2.6%)와 SP8-1 시료(56.9 $\pm$ 4.6%) 모두에서 A $\beta$  plaque 독성군(47.3 $\pm$ 5.4%)과 비교하였을 때, 학습능력 개선 효능이 있음을 보였고, 인지기능 관련 건강 기능식품 원료인 포스파티딜세린(51.4 $\pm$ 3.5%)보다 좋은 학습능력 개선 효능을 보였다(그림 71).

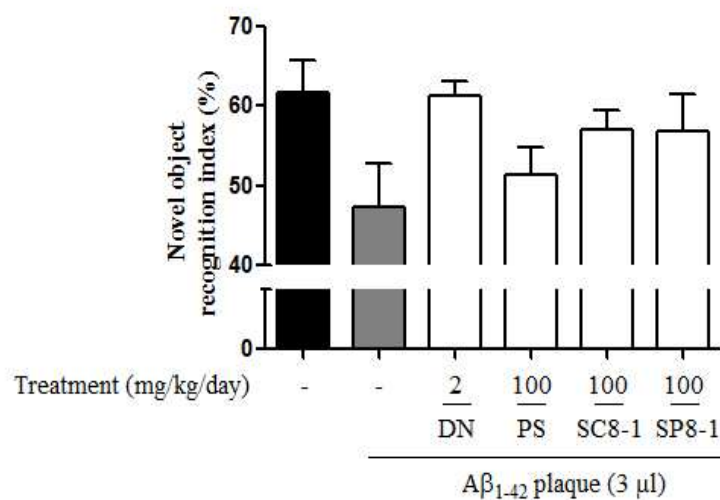


그림 71. 생강유래 생물전환 대사체 소재(SC8-1, SP8-1)의 학습능력 개선 효능 평가.

(나) 생물전환 대사체 소재의 공간기억력 개선 효능 평가

Scopolamine 유도 기억력 저하 동물모델에서 기억력 개선 효능을 보인 2종의 미생물 (*S. carlsbergensis*, *S. pombe*)을 이용하여 만든 SC8-1(6-shogaol:6-paradol 구성비율 0.5:9.5), SP8-1(6-shogaol:6-paradol 구성비율 0.8:9.2) 시료들의 A $\beta$  plaque으로 유도된 기억력 저하에 대한 공간기억력 개선 효능을 평가하였다.

실험 결과, SC8-1 시료(62.3±2.3%)와 SP8-1 시료(70.2±2.4%) 모두에서 Aβ plaque 독성군(60.6±2.6%)과 비교하였을 때, 공간기억력 개선 효능이 있음을 보였고, 포스파디딜세린(60.4±2.8%)보다 좋은 공간기억력 개선 효능을 보였다. SC8-1 시료와 SP8-1 시료를 비교했을 때, SP8-1 시료에서 더 좋은 공간기억력 개선 효능을 보였다.

따라서, 최종 후보 소재로 SP8-1 시료를 선정하여, 최적 농도를 도출하기 위한 실험을 진행하기로 계획하였다(그림 72).

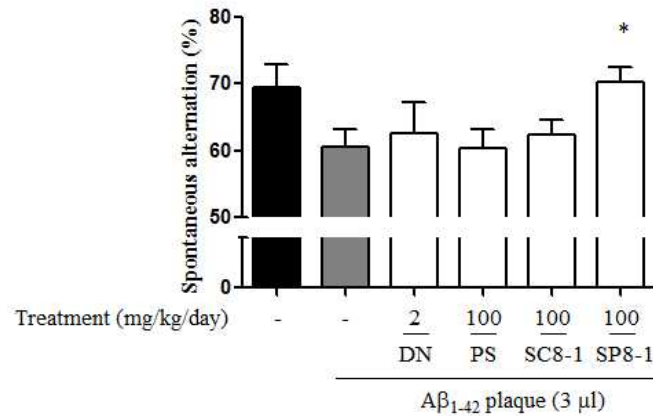


그림 72. 생강유래 생물전환 대사체 소재(SC8-1, SP8-1)의 공간기억력 개선 효능 평가.

### (3) 최종 선정 생강유래 생물전환 대사체 소재의 최적 효능 농도 도출

#### (가) 생물전환 대사체 소재의 학습능력 개선 효능 평가

Aβ plaque으로 유도된 기억력 저하에 대한 공간기억력 개선 효능 평가에서 최종 후보 대사체로 선정된 SP8-1(6-shogaol:6-paradol 구성비율 0.8:9.2) 시료의 최적 농도 도출을 위하여, 농도에 따른 Aβ plaque으로 유도된 기억력 저하에 대한 학습능력 개선 효능을 평가하였다.

실험 결과, SP8-1 시료 50, 100, 200 mg/kg/day 투여군(55.1±5.1%, 56.9±4.6%, 59.7±5.1%) 모두에서 100% 6-shogaol 비율인 SP4-1 시료(48.9±4.3%)보다 더 좋은 학습능력 개선 효능을 보였고, 시료의 농도가 증가함에 따라 학습능력 개선 효능이 증가하였다(그림 73).

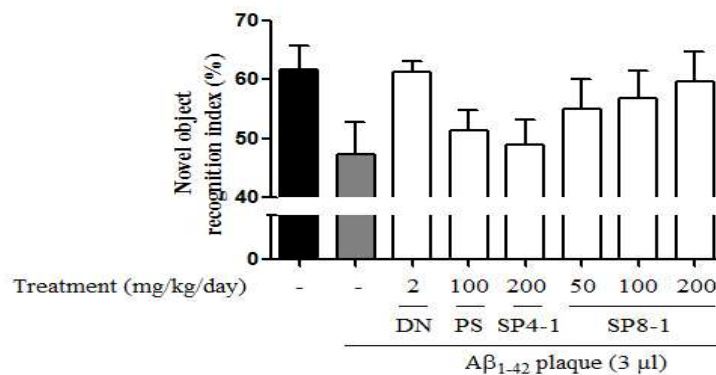


그림 73. 생강유래 생물전환 대사체 소재(SP8-1)의 농도에 따른 학습능력 개선 효능 평가.



(나) 생물전환 대사체 소재의 공간기억력 개선 효능 평가

$A\beta$  plaque으로 유도된 기억력 저하에 대한 공간기억력 개선 효능 평가에서 최종 후보 대사체로 선정된 SP8-1(6-shogaol:6-paradol 구성비율 0.8:9.2)시료의 최적 농도 도출을 위하여, 농도에 따른  $A\beta$  plaque으로 유도된 기억력 저하에 대한 공간기억력 개선 효능을 평가하였다.

실험 결과, SP8-1 시료 50, 100, 200 mg/kg/day 투여군(60.7±3.2%, 70.2±2.4%, 66.2±2.6%) 모두에서 6-shogaol 비율이 100%인 SP4-1 시료(58.2±3.6%)보다 더 좋은 학습능력 개선 효능을 보였고, 100 mg/kg/day 농도에서 학습능력 개선 효능이 t-test를 통한 유의성 검사에서 유의적인 효능이 있음을 보였다(그림 74).

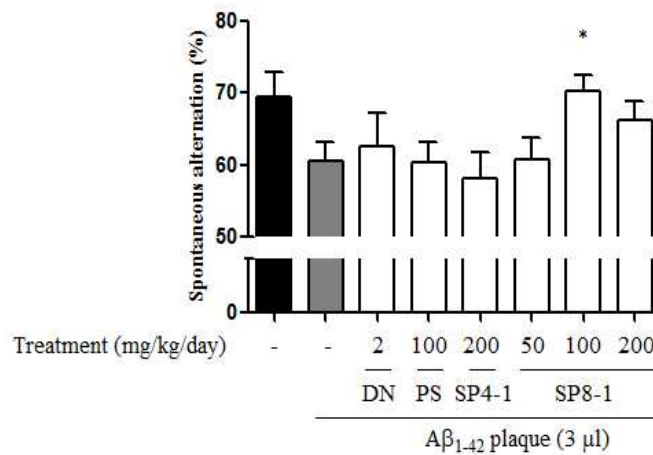


그림 74. 생강유래 생물전환 대사체 소재(SP8-1)의 농도에 따른 공간기억력 개선 효능 평가.

### 제 3절 생물전환 대사체 소재 생산(lab scale) 및 표준화 공정 검토

#### 1. 실험재료 및 방법

##### 가. 균주 선정 및 배양

최종 생물전환 대사체로 선정된 SP8-1소재는 *Schizosaccharomyces pombe* (KCCM 11527) 균주로 생육매지 YMA(0.3% yeast extract, 0.3% malt extract, 0.5% peptone, 1% dextrose, 2% agar) 매지에 도말하여 26°C에서 3일 동안 병판 배양하였다. 이 균주는 실험에 사용하기 전 3회 이상 계대 배양하여 활성화시킨 후 사용하였다.

##### 나. 원재료(생강)의 표준화 공정 설정

##### (1) 산지별 생강의 6-gingerol, 6-shogaol 함량

생강 주요 원산지인 영주, 서산, 안동, 완주, 남원산 생강을 구매하여 생강 조직 내

6 gingerol과 6 shogaol 함량을 산지별로 비교하였다. 생 생강을 분쇄하여 25°C에서 건조시킨 생강과 120°C에서 4시간 열처리한 생강을 70% 주정을 첨가하여 환류추출 한 후 Whatman No. 1 여과지도 여과한 다음 정용하여 6-shogaol의 함량을 분석하였다.

(2) EtOH 함량에 따른 생강의 6-gingerol, 6-shogaol 함량

생강 조직내 6 shogaol 성분의 증폭을 위해 신선생강을 120°C에서 4시간 열처리 후 45°C에서 열풍 건조시키고 분쇄한 분말(수분 함량 9.70%, 이하 전처리 생강분말)에 중량대비 20배의 농도(30~95%)를 달리한 주정을 첨가하여 80°C에서 24시간 환류추출한 후 Whatman No. 1 여과지도 여과한 다음 정용하여 6-shogaol의 함량을 분석하였다.

(3) 추출시간과 추출횟수에 따른 6-gingerol, 6-shogaol 함량

전처리 생강분말에 70% 주정을 첨가하여 80°C에서 추출시간(1~24시간)별 생강 추출액을 제조하였고, 또한 추출회수에 따른 6 shogaol 추출정도를 조사하고자 전처리 생강분말에 70% 주정을 첨가하여 80°C에서 3시간 추출하고 여과, 정용한 다음 잔사에 다시 70% 주정을 첨가하여 동일조건으로 2회 추출하여 분석하였다. 또한, 생강 추출액 제조시 추출용매의 식정 첨가비용을 설정하고자 전처리 생강분말에 70% 에탄올을 중량대비 5, 10, 15, 20배 첨가하여 80°C에서 3시간씩 각각 추출하였다.

다. 생물전환 대사체 소재의 표준화 공정확립을 위한 실정연구

(1) 생물전환 공정을 위한 최적매지 관련연구

*S. pombe*의 최적배양조건을 확립하고 산업화를 위해 식약처 품목제조보고서에 신고되어 있는 식품원료를 사용하였다. 발육인자, 성장촉진인자로 사용되는 질소원으로 yeast extract, malt extract, peptone을 사용하였고, 탄소원으로 dextrose를 사용하였다.

(가) 매지조성별 균 성장과 생물전환율 비교

*S. pombe*를 이용하여 매지조성별 균 성장활성 비교 실험을 진행하였다. 고체매지에 활성화된 *S. pombe*를 loop로 긁어서 대조구 YNB (yeast extract 0.3%, malt extract 0.3%, peptone 0.5%, dextrose 1%)매지 50 ml에 접종하여 진탕배양기에서 26°C, 120 rpm으로 24시간 배양하여 1차 배양액을 얻었다. 이 배양액을 5,000 rpm, 15분간 원심분리한 뒤 상등액은 제거하고 침전된 균체는 멸균된 증류수를 이용하여 재 회석하였다. 2차 배양액은 표 1와 같은 조성비로 만들어진 배양액 100 ml에 재회석된 균체를 각각 3%(v/v)을 접종하여 26°C, 120 rpm에서 재 진탕배양 시킨 뒤 24, 48, 72, 96, 120 시간마다 샘플을 채취하였다. 이 배양액을 위와 동일한 방법으로 원심분리 한 뒤 상등액을 제거하고 동일량의 증류수를 이용하여 2회 수세 한 뒤 동결건조시켜 건조 균체량(dry cell weight, DCW)을 측정하였다. 생물전환율은 채취한 샘플에 95% 주정을 첨가하여 최종농도를 70%로 조정하고 5분간 sonication 한 다음 바로 0.45 µm membrane filter로 여과한 뒤 매지조성별 6-paradol 생물전환율을 LC 분석을 통하여 비교하였다.

표 37. 생물전환 대사체 소재의 표준화 공정을 위한 *S. pombe* 매지 조성 비율(%)

| 매지조성          | YMB(대조구) | YPD | YD1  | YD2 | YD3 |
|---------------|----------|-----|------|-----|-----|
| Yeast extract | 0.3%     | 1%  | 0.5% | 1%  | 2%  |
| Malt extract  | 0.3%     | -   | -    | -   | -   |
| Peptone       | 0.5%     | 1%  | -    | -   | -   |
| Dextrose      | 1%       | 2%  | 1%   | 2%  | 4%  |

(나) 매지조성별 제조방법에 따른 수율 비교

생물전환 대사체 소재의 매지 조성별 제조방법에 따른 수율을 측정하기 위해 다음과 같은 실험을 실시하였다. 생물전환 대사체 소재에 사용된 매지는 질소원과 탄소원의 원가가 격을 고려하여 표 37에 나타나 있는 YMB, YD1, YD2, YD3 매지를 사용하였다. *S. pombe*를 YMB 매지 100 ml에 colony 1개를 접종한 다음 26°C에서 24시간 100 rpm 속도로 진탕배양하여 종 배양액을 얻은 뒤 이 배양액을 5,000 rpm, 15분간 원심분리한 뒤 상등액은 제거하고 침전된 균체는 멸균된 증류수를 이용하여 재 회식하였다. 본 배양은 위 매지조성으로 구성된 매지에 종 배양액 10% (v/v)를 첨가하여 6-paradol 생성률이 90% 이상 되는 시점을 IC로 분석 한 뒤 생물전환 배양액을 회수하였다. 대조군으로 생물전환 배양액에 95% EtOH을 첨가하여 최종 70% EtOH을 만든 뒤 30분간 vortexing하여 추출 후 8,000rpm에서 15분간 원심분리 하였다. 상등액을 취해 0.2 µm syringe로 여과하고 완전히 농축한 후 증류수를 첨가하여 현탁 시키고 다시 농축, 동결 건조하였고 실험군으로는 생물전환 배양액을 그대로 동결 건조하여 반응초기 첨가한 생강 추출물 중량대비 동결 건조한 생물전환 대사체 소재의 수율을 측정하였다.

(다) 매지첨가 비율에 따른 생물전환 대사체 비교

*S. pombe*의 colony 1개를 YD2 (yeast extract 1%, dextrose 2%) 매지 100 ml에 접종한 다음 26°C에서 24시간 100 rpm 속도로 진탕 배양하여 종 배양액을 얻은 뒤 새로운 YD2 매지 90 ml에 종 배양액 10% (v/v)를 첨가하여 24시간 추가 배양시켜 본 배양액을 얻었다. 본 배양액과 불에 용해한 생강 추출물의 비율을 4:1, 3.5:1, 3:1, 2:1로 생물전환 배양액의 6-shogaol 최종농도가 500 µg/ml로 제조 한 뒤 20, 44, 65, 72시간 마다 시료를 채취해 IC로 분석하였다.

(라) 본 배양시간에 따른 배양액 비율별 생물전환 대사체 비교

본 배양 시간이 다른 *S. pombe*의 배양액과 불에 용해된 생강 추출물을 비율별로 제조하였다. *S. pombe*의 colony 1개를 YD2 (yeast extract 1%, dextrose 2%) 매지 100 ml에 접종한 다음 26°C에서 24시간 100 rpm 속도로 진탕 배양하여 종 배양액을 얻었다. 이를 새로

운 배지에 10% (v/v)를 첨가하여 각각 24, 48, 72시간 추가 배양시켜 각각의 본 배양액을 얻었다. 각각의 본 배양액과 물에 용해된 생강 추출물의 비율을 4:1, 2:3으로 배양액의 최종농도가 500 µg/ml가 되게 생물전환 대사체 배양액을 제조한 뒤 48, 72, 96시간 마다 시료를 채취해 LC로 분석하였다.

(마) 산업화를 위한 계대배양의 안정화

*S. pombe* 균주의 산업화를 위해 적절한 배지의 조성과 6-paradol 생물전환 대사체 전환율을 알아보았다. 이를 보다 효율적으로 배양하기 위해 *S. pombe*의 growth curve를 측정하여 계대의 안정성을 확인하였다. Main culture는 *S. pombe* colony 1개를 배지에 접종하여 26°C에서 24시간 100 rpm 속도로 진탕 배양하여 배양액을 얻었다. 이를 새로운 YD2 배지에 10%(v/v) 첨가하여 0시간부터 168시간까지 흡광도 600값에서 optimal density를 측정하여 성장곡선을 그렸다.

(바) 생물전환 배양액의 6-paradol 대사체 분석

상기 배양액 1 ml에 100% EtOH을 3 ml 첨가하여 10분간 sonication시킨 뒤 microfilter (0.45 µm Watman)을 이용하여 필터하였다. HPLC 분석은 각액 20 µl를 주입하였고, 6 shogaol과 6 paradol 분석 조건은 표 38와 같다. 정량분석을 위한 표준분의 농도는 6-shogaol과 6-paradol 모두 1, 5, 10, 100 µg/ml를 이용하여 표준곡선을 작성하였으며 상관계수( $r^2$ )는 0.99이상을 유지하였다.

표 38. 생물전환 배양액의 6-shogaol, 6-paradol 분석을 위한 HPLC 조건.

| 항목     | 조건                                       |    |    |    |    |    |
|--------|------------------------------------------|----|----|----|----|----|
| 컬럼     | Eclipse XDB-C <sub>18</sub> (4.6×250 mm) |    |    |    |    |    |
| 흡광도    | 225 nm                                   |    |    |    |    |    |
| 주입 용량  | 20 µl                                    |    |    |    |    |    |
| 유속     | 1.0 ml/min                               |    |    |    |    |    |
| 이동상 조건 | 시간(min.)                                 | 12 | 18 | 25 | 27 | 30 |
|        | Water(A)                                 | 35 | 20 | 20 | 55 | 55 |
|        | Acetonitrile(B)                          | 65 | 80 | 80 | 45 | 45 |

라. 생강조직 내 선도화합물 (6-shogaol) 증폭 표준화 공정개발

1) 표준화 공정을 위한 생강 전처리 조건연구

(가) 공정 단순화를 위한 연구

생강 조직 내 선도화합물(6 shogaol) 함량을 높이고 반응기질의 공정 단순화를 위해 시중에 판매하는 성질이 다른 3가지 생강(Olecorosin, 생강 농축액, 생강분말)을 구매하여 실험을 실시하였다.

Oleoresin의 주된 성분은 6 gingerol로 선도 화합물인 6 shogaol을 증폭시키기 위해 외부 수증기가 oleoresin내에 천투 하지 못하도록 수증기 차단성을 가진 레도르트 파우치 포장지에 담아 밀봉하고 120°C에서 4시간 스팀처리한 뒤 70% EtOH로 추출한 뒤 6-shogaol 함량을 분석하였다.

생강 농축액은 신선생강을 분쇄 하지 않고 추출 용매과정을 거치지 않아도 6-gingerol 함량이 높으므로 국내산 생강 농축액 33.75°Brix을 구매하여 유리용기에 담고 95°C oil bath에서 각각 1, 2, 3, 4시간 중탕시켜 가열 처리 한 뒤 70% EtOH로 희석하여 각각을 추출 하였다.

건조된 생강분말은 구매가 쉽고 수분이 포함되지 않아 대용량 열처리가 가능하므로 95°C 열풍건조기에서 24, 48, 72시간 건조 시킨 뒤 70% EtOH로 추출하여 6-shogaol함량을 비교하였다.

#### (나) 대량 생산을 위한 연구

앞서 생강 추출물 제조 시 생강 조직 내 선도화합물(6-shogaol) 함량을 높이기 위한 한 가지 방법으로 세질 생강을 부직포망에 담아 auto clave를 사용하여 120°C에서 4시간 열을 가하였다. 이 방법이 6-gingerol과 6-shogaol 총량, 6-shogaol 증폭율, 공정 단순화 및 에너지 비용 등을 감안한 최적 조건이었다. 이 6-shogaol을 증폭시키는 방법이 대량생산 공정 개발과 산업화에 가능한지 여부를 pilot scale의 레도르트 살균기를 사용하여 실험을 진행하였다. 실험방법을 자세히 기술하면 1 cm이하로 세질된 생강 500 g을 일회용 알루미늄용기(18.5×13.8×3 cm)에 담고 뚜껑을 닫고 autoclave와 살균기의 상반부, 중반부, 하반부에 각각 넣고 120°C에서 4시간 열을 가하였다. 각각 위치별 열 처리된 생강은 바닥 면과의 밀착을 방지하기 위한 그물 망(sieve) 위에 고르게 퍼서 분산 시킨 뒤 45°C 열풍건조기에서 수분함량이 2%이하가 될 때 까지 건조시켰다. 건조 시킨 후 100메쉬 (149 μm)로 분쇄하여 70% EtOH로 추출하여 autoclave와 살균기의 6-shogaol 전환 비율을 비교하였다.

#### 나. 생강 조직 내 선도 화합물 (6-shogaol) 증폭된 시료의 추출 조건 최적화 연구

##### (1) 전처리 생강의 추출방법 비교

앞서 생강 조직 내 6-shogaol 성분이 증폭된 전처리 생강을 70% EtOH을 사용하여 80°C에서 3시간 환류 추출한 추출액을 Whatman No. 1여과지로 여과한 뒤 완전히 농축한 후 일정량 증류수에 용해시켜 생강 추출물 제조 하였다. 환류 추출 공정은 대량 생산 공정에서 사용하기 힘든 공정이며 고온 추출 시 장비설계가 산업화에 부적합하다고 판단되어 생산 공정을 최소화하고 생강의 유효성분을 추출 할 수 있는 최적방법을 찾고자 하였다.

전 처리 생강분말에 중량대비 10배의 70% 주정을 첨가하고 15, 30, 60분간 sonication 추출하였고 다른 한 가지 방법으로 70% 주정을 첨가하여 상온에서 0, 3, 6, 9, 12, 24시간 shaking 추출 한 뒤 microfilter(0.45 μm Watman)을 이용하여 필터하고 LC분석하였다.

##### (2) 전처리 후 추출방법이 선도화합물에 미치는 영향 비교

생강 조직 내 6-shogaol 증폭을 위해 살균기를 이용하여 120°C에서 4시간 열처리 한 후 건조 유무와 분쇄 유무에 따른 6-gingerol, 6-shogaol 추출 수율을 알고자 실험을 진행하였다. 전 처리된 생강을 수분함량(92%)을 측정하여 최종 70% 주정이 되게 만들고 실온에서 6시간 shaking 추출하고 여과 한 후 다시 잔사에 70% 주정을 첨가하여 동일조건으로 2회 추출 분석하였다. 전 처리된 생강을 45°C에서 열풍 건조시켜 분쇄한 생강분말 (수분함량 5% 이하 전처리 생강분말), 다른 하나는 열풍건조 시킨 생강을 70% 주정을 첨가하여 위와 동일한 조건으로 추출하고 여과 한 후 LC로 분석하여 6 gingerol과 6 shogaol 추출수율을 비교하였다

#### 마. 생물전환 대사체 소재의 제조공정 간소화를 위한 연구

##### (1) 선도화합물 증폭 후 처리방법에 따른 조건 설정

표준화 공정에서 동결건조는 실비비뿐만 아니라 에너지 소모가 크기 때문에 대량생산 공정에서 기피하는 공정 중 하나이다. 반응기질용으로 사용되는 생강추출물을 동결건조하지 않고 전처리 생강을 추출 후 주정을 모두 제거하고 농축하여 사용하는 방법을 진행하였다.

위 공정을 모두 적용하여 분쇄된 생강을 일회용 알루미늄용기(18.5×13.8×3 cm)에 담아 뚜껑을 닫고 살균기 120°C에서 4시간 열을 가하였다. 열처리된 생강의 수분함량 (92%)을 측정하고 주정 95%를 사용하여 최종 70% 주정으로도 만들어 실온에서 6시간 shaking 추출한 다음 Whatman NO.1 여과지도 여과한 추출액을 회전식 농축기도 용매를 제거하여 가용성 고형분 함량이 각기 다른 생강 농축액을 당도계(ATAGO, 일본) 5, 10, 15, 20%를 기준으로 만들고 수분함량 측정과 고형분 함량 (OHAUS, 일본)을 동시에 측정하였다. 생강 농축액 1 mL을 LC용 MeOH 3 mL에 넣고 최종농도를 MeOH 75%로 한 다음 10분간 sonication한 다음 바로 0.45 µm membrane filter로 여과한 뒤 LC로 분석하여 6-gingerol과 6-shogaol 함량을 비교하였다.

##### (2) 반응기질별 생물전환 대사체 비교

생물전환 대사체 소재는 반응기질별 (열처리된 생강분말, 생강 추출물, 생강 농축액)을 사용하여 생물전환 대사체로 전환되는지 여부를 확인하였다. 반응기질용으로 사용된 생강 모두 살균기 120°C에서 4시간 열을 가하였다. 열 처리된 생강은 45°C에서 열풍건조하고 1 mm이하로 분쇄하여 열처리된 생강분말을 제조하였고 생강 농축액과 생강 추출물은 열처리된 생강분말의 중량 대비 10배 (w/v)의 70% 주정을 첨가하여 실온에서 3시간 shaking 추출한 뒤 Watman No.1로 여과한 뒤 여과액을 회전식 진공농축기를 사용하여 에탄올을 완전히 제거하였다. 생강 농축액은 고형분 20%로 조질하고 생강 추출물은 생강 농축액을 물로 재희석하여 동결 건조시켜 사용하였다.

*S. pombe*는 YD2(yeast extract 1%, dextrose 2%)매지 100 mL에 접종한 다음 26°C에서 24시간 100 rpm 속도로 진탕 배양하여 종 배양액을 얻었다. 이를 새로운 매지에 10% (v/v)를 첨가하여 본 배양액을 얻었다. 생물전환 배양액은 본 배양액에 반응기질 별 6 shogaol 최종농도가 500 µg/mL이 되게 제조한 뒤 0, 24, 48, 72, 96, 120, 144시간 마다 시료를 채취해 LC로 분석하였다.

사. 표준화 공정으로 생물전환 대사체 (생강발효추출물)제조 (lab scale)

(1) 생강 농축액 제조

앞서 실험한 생물전환 대사체 소재의 표준화 공정 연구를 바탕으로 생강 농축액을 그림 75와 같이 제조 하였다. 생 생강은 전기 육질기(MGB-32, FUJEE(주))를 사용하여 분쇄하였다. 이를 알루미늄용기(18.5×13.8×3 cm)에 담고 두껍을 담아 고온고압 조리 및 멸균(살균)장치(PRS 03-VG, KYUNGHAN CO., LTD.)를 이용하여 120℃에서 4시간 열을 가하였다. 이를 45℃ 열풍건조기 (HK-D01000F, 한국종합기기제작소)에서 12시간 마다 뒤집어 가며 건조시켜 2 mm이하로 분쇄하여 열처리 된 생강분말을 제조하였다. 추출용매는 순도 95% 주정을 DW로 희석 하여 최종 70% 주정을 만든 뒤 전 처리된 생강분말 500 g 중량대비 10배(w/v)를 첨가하여 실온에서 3시간 shaking 추출하였다. 이 추출액은 Whatman No.1로 여과한 뒤 여과액을 회전식 진공농축기를 사용하여 에탄올을 완전히 제거하여 고형분 20%인 생강 농축액을 제조 하였다.

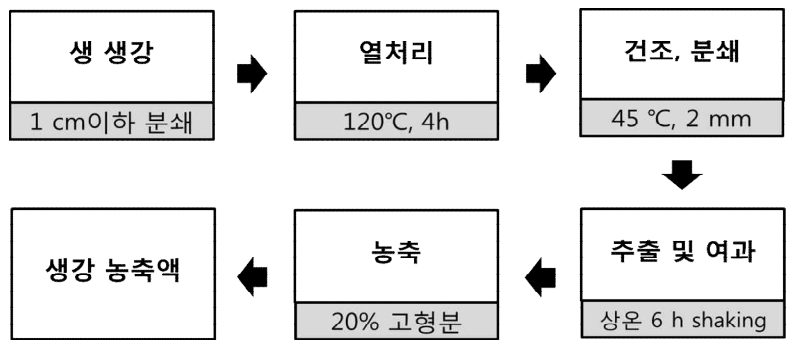


그림 75. Lab scale의 생강 농축액 제조 공정도.

(2) 생강발효추출물 제조

앞서 생물전환 대사체 소재의 최적화를 위한 발효매지 반응조건 검토 및 분석을 통해 얻어진 결과를 바탕으로 생강발효추출물을 제조하였다. 본 배양에 사용된 매지는 질소원인 yeast extract 1%, 탄소원인 dextrose 2%를 표준화 공정 매지로 사용하였다. 상기방법으로 중량 %로 제조한 50 mL flask를 120℃에서 15분 멸균한 다음 온도가 30℃로 떨어질 때 비리 계대배양 되어진 *S. pombe* 균주를 접종하여 100 rpm shaking incubator (JSSI-100T, JSR, Korea)에서 30℃, 24시간 종 배양하였다. 배양된 균주는 위와 같은 조건의 새로운 500 mL flask에 10% (v/v) 농도로 접종하여 추가 24시간 배양하여 전 배양액을 얻었다. 본 실험에 사용한 본 배양 매지는 5 L Fermentor (Fermentec, Korea)에 working volume 2 L로 한 새로운 매지에 전 배양액 10% (v/v) 농도로 접종하여 온도 26℃, 교반속도 200 rpm 24시간 배양하여 얻었다. 본 배양액 1.36 L와 앞서 반응 기질용으로 제조한 생강 농축액 0.34 L를 넣고 위와 동일한 조건으로 진탕배양 하였다(그림 76). 배양 0시간부터 24시간 반응시간별 생물전환 대사체 생성량을 IC 분석으로 모니터링 하면서 6-shogaol이 6-paradol로 90%이상 전환되는 시점에 배양액을 모두 취한 다음 동결 건조하여 최종 생산물인 생강발효추출물을 제조하였다.

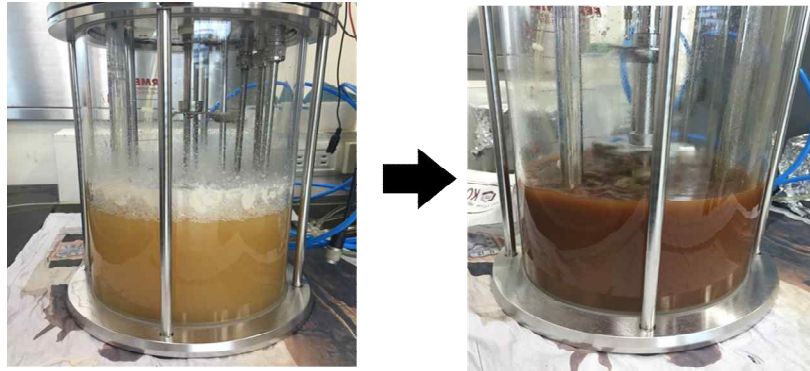


그림 76. 생강발효추출액의 1.7 l. 발효과정.

## 2. 실험결과

### 가. 원재료(생강)의 표준화 공정 설정

#### (1) 산지별 생강의 6-gingerol, 6-shogaol 함량변화

산지에 따른 생강 조직내 6-gingerol, 6-shogaol 함량을 분석하여 생강 건물당 함량으로 환산하여 나타 낸 결과는 그림 77과 같다. 25℃에서 열풍건조 시킨 생강은 6-gingerol 함량은 서산 생강이 5.2 mg/g으로 가장 높았으며 6-shogaol은 각 산지 모두 0.1 mg/g으로 나타났다. 이 생강을 120℃에서 4시간 열처리 하였을 때 6-gingerol이 6-shogaol로 전환되었으며 영주산, 서산 생강의 6-shogaol 함량은 2.6 mg/g, 2.4mg/g으로 각각 나타났다. 총 함량을 살펴본 결과, 영주산 생강과 서산 생강의 함량 차이가 비슷하므로 두 산지 모두 생강원료로 사용하기 적합하였다.

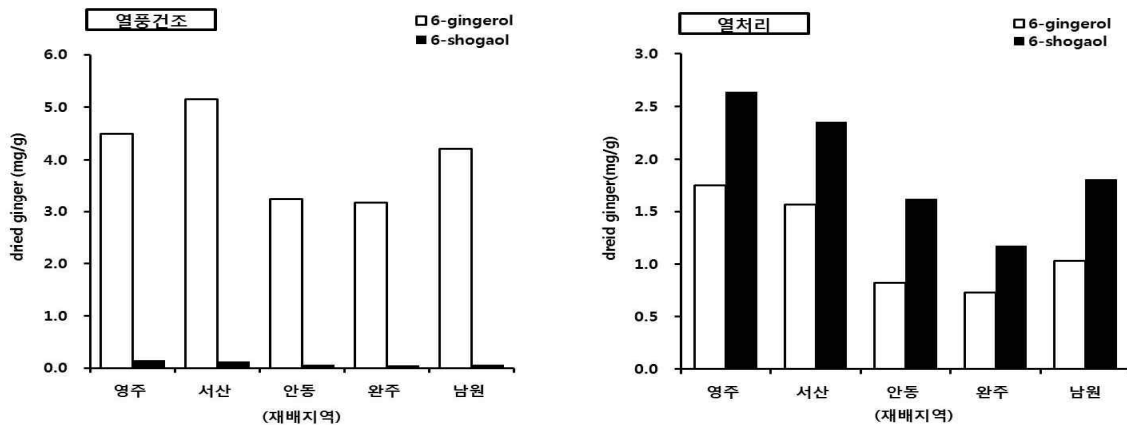


그림 77. 산지에 따른 생강추출액의 6 gingerol과 6 shogaol 함량 변화

#### (2) EtOH 함량에 따른 6 gingerol, 6 shogaol 함량

비생물 생물전환 기질도 첨가되는 생강 추출물 제조 용매로 사용되는 에탄올 농도에 따른 생강 추출액의 6-shogaol 추출 함량을 측정한 결과는 그림 78과 같다. 120℃ 가열 전처리 생강분말로부터 추출액으로 추출되는 6-shogaol 함량은 30, 50% 주정으로 추출할 경우 낮았으나 70% 이상부터는 농도간의 차이가 없었다.



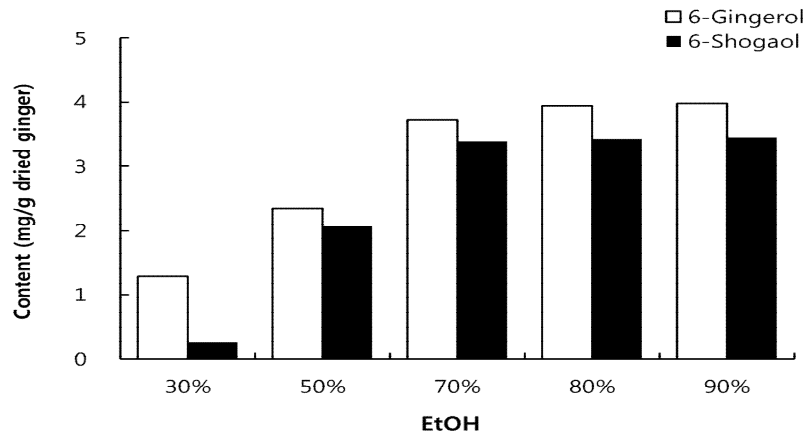


그림 78. 생강추출액 제조 시 추출용매인 에탄올 농도 변화가 6-gingerol 및 6-shogaol 함량에 미치는 영향.

(3) 추출시간과 추출횟수에 따른 6-gingerol, 6-shogaol 함량

70% 에탄올을 추출용매로 하여 전처리 생강분말을 80℃에서 추출시간을 달리한 결과 6 shogaol 함량은 추출 1시간 이후부터 차이가 없는 것으로 나타나 120℃ 가열처리 후 건조한 전처리 생강분말을 1 mm 이하 입자로 분쇄하여 추출할 경우 조직내 6 shogaol 성분은 단 시간에 추출 가능하여 최대 3 12시간 추출시간별 큰 차이는 없었다(그림 79).

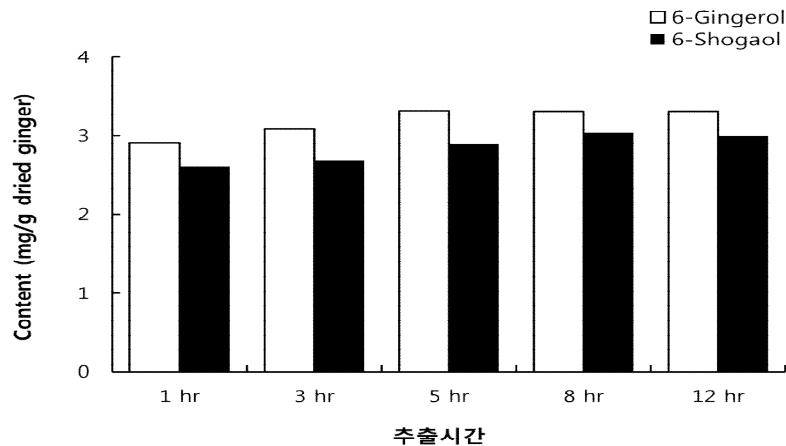


그림 79. 70% 에탄올을 이용한 생강추출액 제조시 추출시간 변화가 6-gingerol 및 6-shogaol 함량에 미치는 영향.

표 39은 전처리 생강분말에 70% 에탄올을 용매로 하여 80℃에서 3시간 반복 추출할 경우 추출회수에 따른 추출액의 6-shogaol 함량을 측정한 결과이다. 1회 추출에서 생강 조직내 6-shogaol 성분의 약 90% 이상이 추출되었고, 2회 반복 추출 시 5% 정도가 더 추출되는 것으로 나타났다.

표 39. 추출 횟수에 따른 생강추출액의 6-shogaol 함량 변화

| 추출 횟수 | (mg/g dried ginger) |        |        |        |        |        | Total |
|-------|---------------------|--------|--------|--------|--------|--------|-------|
|       | 6 G                 | 8 G    | 6 S    | 10 G   | 8 S    | 10 S   |       |
| 1회    | 2.88                | 0.63   | 3.35   | 1.26   | 0.50   | 0.76   | 9.38  |
|       | (96.6)              | (92.6) | (95.2) | (95.5) | (94.3) | (93.8) | (95)  |
| 2회    | 0.10                | 0.05   | 0.17   | 0.06   | 0.03   | 0.05   | 0.46  |
|       | (3.4)               | (7.4)  | (4.8)  | (4.5)  | (5.7)  | (6.2)  | (5)   |
| Total | 2.98                | 0.68   | 3.52   | 1.32   | 0.53   | 0.81   | 9.84  |
|       | (100)               | (100)  | (100)  | (100)  | (100)  | (100)  | (100) |

6, 8, 10-G: 6, 8, 10-gingerol, 6, 8, 10-S: 6, 8, 10-shogaol.

( ): 1, 2회 추출액 측정치 합계에 대한 각 회수별 측정치 구성비율(%)

이상의 반응용 기질로 이용하기 위한 생강추출액 제조 조건 실험 결과를 종합하면 6 shogaol 증폭 전처리 생강분말에 70% 주정을 중량대비 10배 정도 첨가하고 80°C에서 3시간, 1회 추출하는 조건이 적당한 것으로 판단되었다

#### 나. 생물전환 대사체 소재의 표준화 공정을 위한 미생물 반응 조건 최적화

미생물을 이용한 발효공업에서 배지조성의 결정은 균주와 발효공정에 따라 결정되며, 배지는 cell growth, 대사산물의 생성, 에너지 공급 및 생명유지의 역할 등 매우 중요하면 시도 기본이 되는 공정이다. 주로 고려되는 배지조성으로 기본원소인 탄소원, 질소원, 무기염류, vitamin이 고려되는데 최종 대량생산의 산업적인 규모의 경우는 값싼 원료를 이용해야하므로 매우 복잡해질 수 있다. 이에 본 연구는 산업규모에 앞서 톱목제조보고서에 신고되어 있는 성분의 식물인 탄소원 및 질소원을 사용하여 균체 및 목식산물인 6-paradol의 생산효율을 높이하고자 하였다. 그 중 탄소원은 균체증식을 위한 에너지원으로 생장 다량의 기질이 되는 가장 중요한 성분으로 수율과 직결되는 요소이다. 따라서 원료 단가 및 수율을 고려한 경제성면에서 탄소원은 매우 중요하므로 배지 원료비용 및 기질보소도 예측에 있어 dextrose를 선정하였다. 질소원은 균류의 세포막과 세포벽을 구성하는 당단백질, chitin, 효소, nucleic acid 및 대사물질들을 합성하는데 중요한 기질로 이용되므로 yeast extract, malt extract, peptone을 사용하였다.

#### (1) 배지조성 변화가 *S. pombe* 성장에 미치는 영향

*S. pombe*의 균체생성에 관한 최적 배지의 성장조건을 관찰하고자 YMB(yeast extract 0.3%, malt extract 0.3%, peptone 0.5%, dextrose 1%)기본 배지를 이용하여 문헌들을 근거로 임의의 배양조건(26°C, 100 rpm)에서 24시간 총 배양한 배양액을 각각의 YPD (yeast extract 1%, peptone 1%, dextrose 2%), YD1 (yeast extract 0.5%, dextrose 1%), YD2 (yeast extract 1%, dextrose 2%), YD3 (yeast extract 2%, dextrose 4%)에 계대배양 한 뒤

5일 동안 균체량의 경시변화를 관찰하였다 (그림 80). 배양 1일차 배지조성 비율에 따른 균체 생성량은 5군 모두 0.1-0.2 g/100 mL로 차이가 없었지만 시간이 증가할수록 YD3군의 균체 생성량은 급격히 증가하여 배양 5일차 0.69 g/100 mL로 대조군으로 사용한 YMB군 보다 2배 많은 균체 생성량을 나타내었다. 반면 탄소원, 질소원 비율이 가장 낮은 YE1군은 4일차까지 균체 생성량이 증가하다가 5일차에 균체량이 감소하였다. 위 결과로 미루어보면 탄소원과 질소원의 비율이 점점 증가할수록 균체의 생성량도 증가하였다.

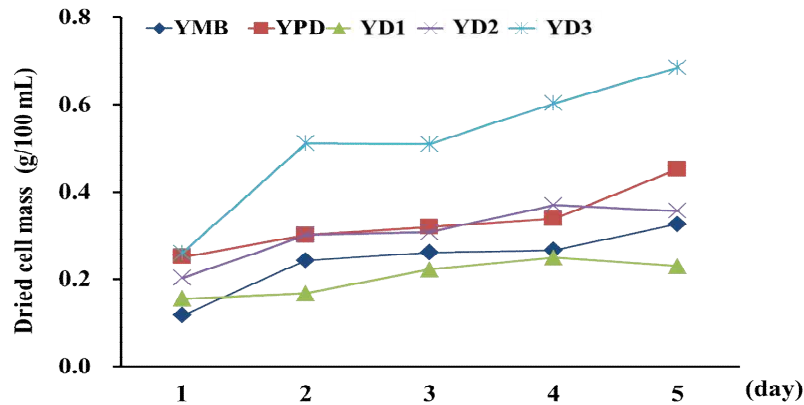


그림 80. 배지조성에 따른 *S. pombe*의 균체 생성량

## (2) 배지조성 변화가 6 paradol 생성에 미치는 영향

배지 조성에 따른 *S. pombe*의 균체 생성량은 탄소원 dextrose, 질소원 yeast extract의 비율이 증가할수록 높았다. 우리의 목적산품인 6-paradol 생성량도 탄소원인 dextrose와 질소원인 yeast extract와 malt extract, peptone의 비율에 영향을 미치는지를 알아보았다 (그림 81). 각각의 배양액을 70% EtOH로 추출 후 초기 첨가한 6 shogaol을 기준으로 생분전환에 의해 생성되는 6 paradol 전환비율을 나타내었다. 대조군으로 사용한 YMB와 YPD군은 6 paradol 생분전환 비율은 배양 2일차 각각 42, 43%로 비슷하였고 배양 4일차까지 80, 79%로 차이가 없었다. 반면 dextrose와 yeast extract의 비율을 달리한 YD1, YD2, YD3군은 뚜렷한 차이를 나타냈다. 균체의 생성량이 가장 높았던 yeast extract 2%, dextrose 4% 첨가한 YD3군은 배양 2일차에 생분전환 대사체인 6-paradol로 47% 전환되었고 yeast extract 1% dextrose 2% 첨가한 YD2군은 62% 전환되었다. 이는 균체 생성량과 6 paradol 생분전환 비율은 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다. 배양 5일차 YMB, YPD, YE1, YE2, YE3군 모두 초기 기질로 첨가한 6-shogaol이 6-paradol 생분전환 대사체로 전환되어 배지조성 비율에 관계없이 배양시간이 경과하면 100% 생분전환 되는 것을 알 수 있었다. 6-paradol로의 대사체 전환 속도가 가장 빠른 YD2 배지가 산업적으로 단가를 절감시키므로 가장 효율적인 배지로 판단되었다.

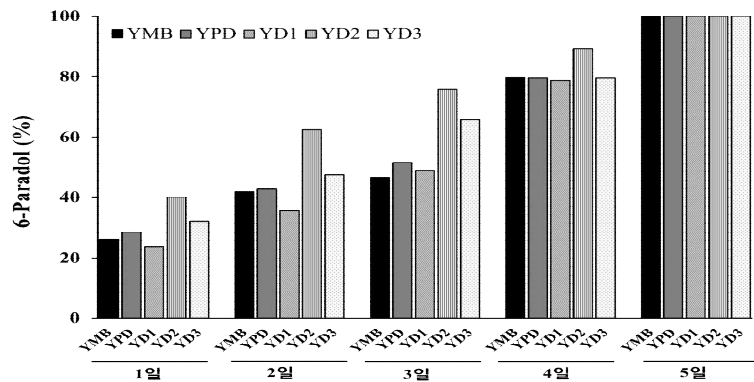


그림 81. 매지 조성에 따른 *S. pombe*의 6-paradol 생합성률

(3) 매지첨가 비율이 6-paradol 생성에 미치는 영향

생강 추출물은 제조공정단계에 동결건조 공정이 들어가므로 대량생산 표준화 공정에 부적합하다고 판단되었다. 생합성 전환 대사체 소재는 매지와 물에 용해된 생강추출물의 혼합 비율이 4:1로 구성되어 배양액내의 6-shogaol 농도가 500 µg/ml 있었다. 공정 최소화를 위해 동결건조를 기치지 않고 생강 농축액(고형분10-30%)과 매지의 혼합비율을 4:1로 배합하면 생합성 전환 배양액의 최종 6-shogaol 농도가 500 µg/ml 이하가 될 수 있으므로 매지의 비율을 줄여야 한다고 판단되었다. 생합성 전환 배양액의 생강 추출물 농도를 500 µg/ml로 고정하고 본 배양액 혼합비율을 4:1, 3.5:1, 3:1, 2:1로 변경하여 6-paradol 생합성 전환 대사체로 전환되는지 여부를 확인하였다 (그림 82). 본 배양액과 생강 추출물의 혼합 배합비율(4:1, 3.5:1, 3:1, 2:1) 모두 배양 72시간까지 생합성 전환 대사체 6 paradol로 전환되지 않았다. 배양 96시간 대조군으로 사용한 배양액과 생강 추출물 혼합비율 4:1인 (A)군은 초기 6-shogaol 함량 (500 µg/ml) 기준 69.7% 생합성 전환 되었다. 또한 3.1:1, 3:1, 2:1 혼합비율 (B, C, D)군 모두 각각 71.5, 83, 71% 생합성 전환 되었으므로 배양액의 양은 생합성 전환 대사체에 영향을 미치지 않는 것으로 나타나 생강 농축액을 활용하여 생합성 전환 대사체를 제조할 수 있을 것으로 예상된다.

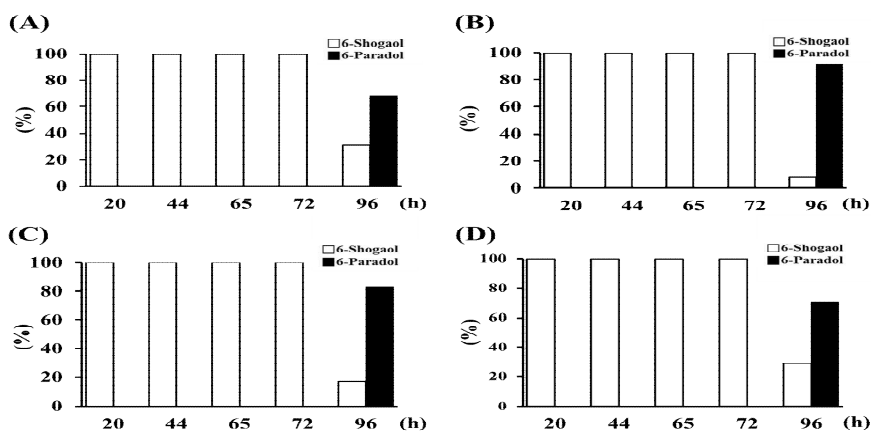


그림 82. 배양액과 생강 추출물의 혼합비율을 달리한 생합성 전환 대사체 전환비율 (A) 4:1 (B) 3.5:1 (C) 3:1 (D) 2:1

(4) 본 배양시간과 배지혼합 비율이 6-paradol 생성에 미치는 영향

생물전환 대사체 생성이 본 배양시간(24, 48, 72시간)에 따라 영향을 미치는지 본 배양액과 생강 추출물의 혼합비율을 4:1, 2:3으로 조절하여 6 paradol 생성비율을 살펴본다. 본 배양액과 생강 추출물의 혼합비율을 4:1 배양한 그림 83. (A)는 본 배양 (24, 48, 72)시간에 관계없이 반응(120, 96, 72)시간에 100% 6-paradol 생물전환 대사체도 전환 되었으므로 본 배양액 시간에 따른 6-paradol로 전환속도는 관계가 없는 것으로 나타났다. 본 배양(24, 48, 72)시간 배양액과 생강 추출물의 혼합비율을 2:3 배양한 결과는 그림83. (B)과 같다. 본 배양액 (24, 48, 72)시간 배양액을 생강 추출물을 넣고 반응시켰을 때 반응 (120, 96, 72)시간 6 paradol 생성량이 각각 100, 96, 69% 생성되었으므로 (A)보다 생물전환율이 느린 것으로 나타났으므로 본 배양액과 생강 추출물의 적정 혼합비율을 4:1로 결정하였다.

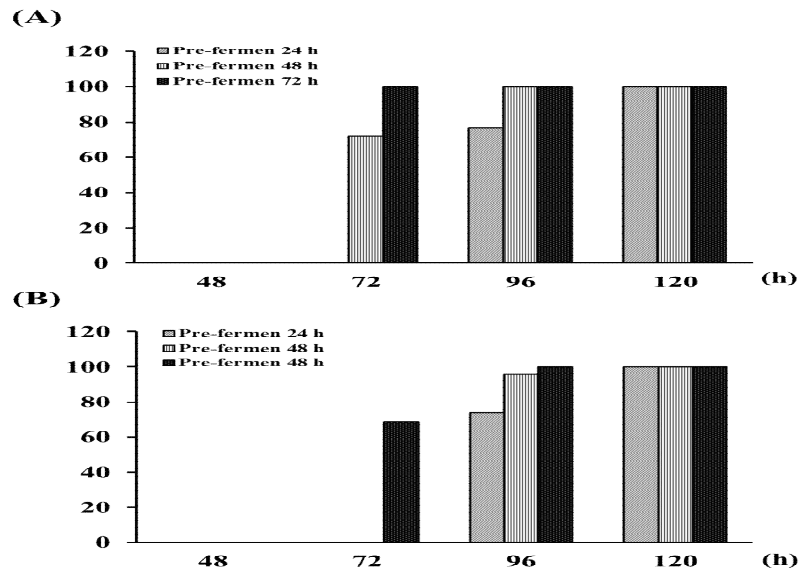


그림 83. 본 배양 시간과 배양액의 혼합 비율 (본 배양액: 생강 추출물)에 따른 6-paradol 전환률 (A) 4:1 (B) 2:3

(5) 균 성장을 위한 계대배양의 안정화

*S. pombe*의 산업화를 위해 YD2매지를 사용한 배양액을 계대 배양하여 균 성장의 최고조에 이르는 시간을 확인하였다 (그림 84). 선발된 매지조성으로 *S. pombe*를 배양한 결과 24시간에 대수 증식기를 거쳐 48시간째 정지기에 도달하는 것을 확인할 수 있어 계대배양주기를 24시간으로 정하였고 이는 생물전환 대사체 생성속도와도 유사한 양상을 나타내는 것을 확인할 수 있었다. 반면 배양 120시간 이후에는 균의 활성이 감소되었으므로 빠른 계대 배양시간은 오염 및 생산단가 측면에서 유리할 것으로 판단되었다.

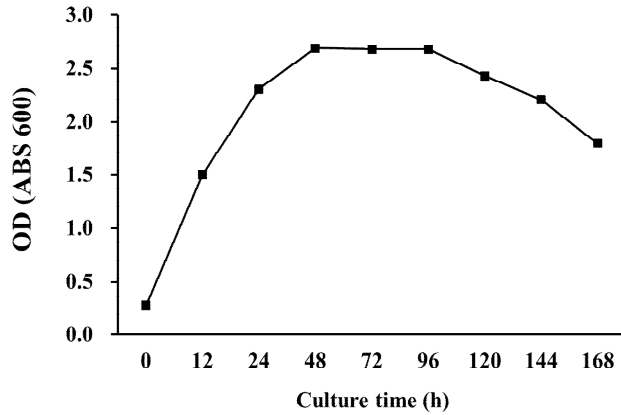


그림 84. *S. pombe*의 성장곡선

다. 생물전환 대사체 소재의 표준화 공정을 위한 생강 조직 내 선평화합물(6-shogaol) 증폭 최적화

(1) 선평화합물(6-shogaol) 증폭 공정 검증

생강 조직 내 선평 화합물(6 shogaol) 함량을 증폭시키는 보다 효율적인 표준화 공정 기술을 개발하기 위해 생강 조직 내 6-shogaol 함량을 증폭시키는 핵심인자인 온도와 시간을 조절하여 공정 단순화 및 에너지 비용 등을 감안한 최적조건을 찾고자 한다.

(가) 공정 간소화를 위한 생강 전처리 설정

Oleoresin은 분쇄, 추출 용매제거의 과정이 거쳐서 생산되므로 품질 균일화가 가능한 제품으로 원료보다 취급과 보관이 용이하므로 장기간 보관할 수 있는 장점을 가지고 있으므로 선정되었다. Oleoresin을 수증기 차단성을 가지는 레도트브 파우치로 포장하여 수증기와 접촉을 차단하여 120°C에서 4시간 열을 가한 후 6-gingerol과 6-shogaol 함량을 분석한 결과는 그림 85와 같다. 6-Gingerol 함량이 6.38 mg/g에서 5.4 mg/g으로 감소하였고 6-shogaol 함량은 3.25 mg/g에서 4.24 mg/g으로 증가하였지만 열처리에 의한 6-shogaol 증폭이 큰 차이를 나타내지 않았다.

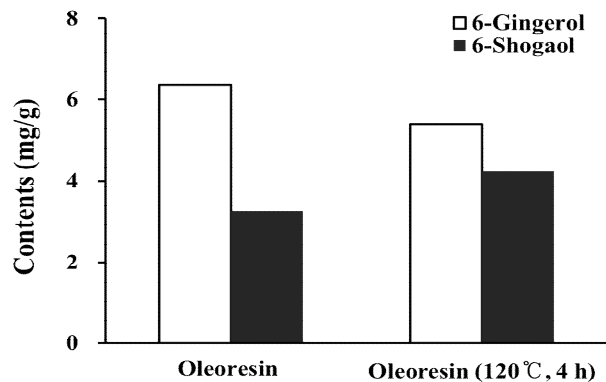


그림 85. Oleoresin의 열처리에 따른 6-gingerol, 6-shogaol 함량 변화

시판되고 있는 생강 농축액은 신선생강을 분쇄 하지 않고 용매 추출과정을 거치지 않아도 33.75°Brix이므로 생강 전처리 단계를 최소화 할 수 있다고 판단되었다. 120°C에서 4시간 열처리하는 것은 6-gingerol을 6-shogaol로 증폭시키기 가장 효율적인 방법이지만 공정 단순화 및 에너지 비용 등을 최소화시키는 또 다른 방법으로 실험을 진행하였다. 생강 농축액 33.75°Brix를 95°C oil bath를 이용하여 1, 2, 3, 4시간 별도 중탕 가열한 생강 농축액의 6-gingerol과 6-shogaol 함량을 분석한 결과는 그림 86와 같다. 생강 농축액 33°Brix은 6-gingerol 함량이 0.037 mg/g으로 기존 실험에 사용했던 생강 분말 6-gingerol 4.5 mg/g 보다 10배 이상 적은 수치로 나타났다. 생강 농축액 75°Brix은 6-gingerol과 6-shogaol은 각각 0.092 mg/g, 0.064 mg/g으로 함량이 낮았으며, 95°C에서 4시간 이상 중탕 가열처리 후에도 6-shogaol 함량이 0.081 mg/g 밖에 되지 않았다. 시판되고 생강 농축액은 6-gingerol 함량이 낮아 반응기질용으로 선정하기에 부적합하며 95°C oil bath에서 중탕 처리하는 것 또한 6-shogaol 증폭시키기에 부적합하였다.

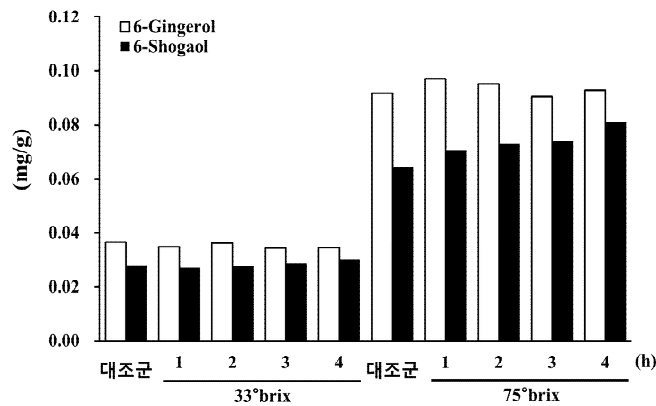


그림 86. 생강 농축액의 oil bath(95°C) 중탕 처리 시간에 따른 6-gingerol, 6-shogaol 함량 변화.

건조된 생강분말은 구매가 쉽고 수분이 포함되지 않아 건물의 대량 열처리가 가능하다. 생강분말(수분함량 5%이하)을 95°C 열풍건조기에서 24, 48, 72시간 건조 시킨 뒤 생강 건물 당 함량으로 환산하여 나타낸 결과는 그림 87과 같다. 대조군인 생강분말의 6-gingerol 함량은 3.02 mg/g, 6-shogaol 함량은 0.91 mg/g으로 나타났다. 생강분말을 95°C에서 24시간 건조 시켰을 때 6-gingerol의 함량은 대조군 대비 47% 감소되어 1.62 mg/g, 6-shogaol은 28% 증가되어 1.27 mg/g으로 나타났다. 48, 72시간 건조 시킨 후 6-gingerol 함량은 각각 1.07 mg/g, 0.81 mg/g으로 감소하였고 6-shogaol 함량 또한 1.25, 1.15 mg/g으로 감소하였다. 6-Shogaol 함량은 고온에서 수분을 포함하지 않고 장시간 건조시키는 것은 gingerol이 shogaol외에 zingerone등의 물질로 전환되었거나 6-shogaol이 polymerization으로 인해 6-gingerol과 6-shogaol 총량이 감소되는 것으로 생각되므로 건조생강의 수분공급과 고온처리가 동시에 이루어져야 한다고 판단되므로 위 3가지 방법 모두 생강 전처리의 공정 간소화를 하기위한 방법으로 부적합 하였으므로 120도에서 4시간 열처리를 통해 선평화합물(6-shogaol)을 증폭시키기로 하였다.

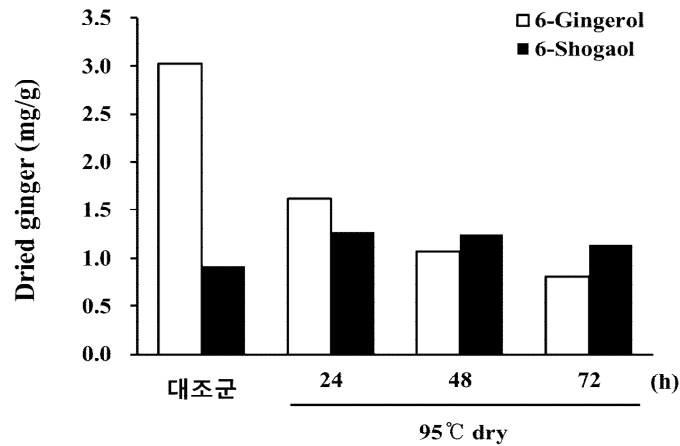


그림 87. 건조시간에 따른 6-gingerol, 6-shogaol의 함량 변화.

(나) 대량생산을 위한 생강 전처리 설정

위 표준화 공정으로 설정된 6 shogaol 증폭방법을 종합해 보면 앞서 120°C에서 4시간 열처리(autoclave)를 하는 것이 6 shogaol 함량증진의 최적 조건으로 나타났다. 생강의 6-shogaol 증폭을 대규모로 하면서 최대 효율을 확보하기 위한 조건을 최적화 하기 위한 방안으로 pilot scale 규모의 실험을 진행하였다. Pilot scale의 열처리 기기 (살균기)를 이용하여 신선생강을 상반부, 중반부, 하반부에 넣고 120°C가 되는 시점을 기준으로 4시간 열을 가하고 건조하여 조직 내 6 shogaol 전환 비율을 위치별로 측정된 결과이다 (그림 88). 대조군으로 lab scale규모의 autoclave를 이용하여 열처리를 가한 생강 모두 54% 6 shogaol로 전환되었고 pilot scale의 살균기를 이용하여 열처리한 생강 또한 넣는 위치에 관계없이 62% 6-shogaol로 전환되었다. 살균기를 이용하여 120°C에서 4시간 열처리를 하는 방법은 대량생산에도 바람직한 온도와 시간으로 판단되며 기기의 운영에도 무리가 없을 것으로 예상되어 6-shogaol 증폭 표준화 공정으로 선정되었다.

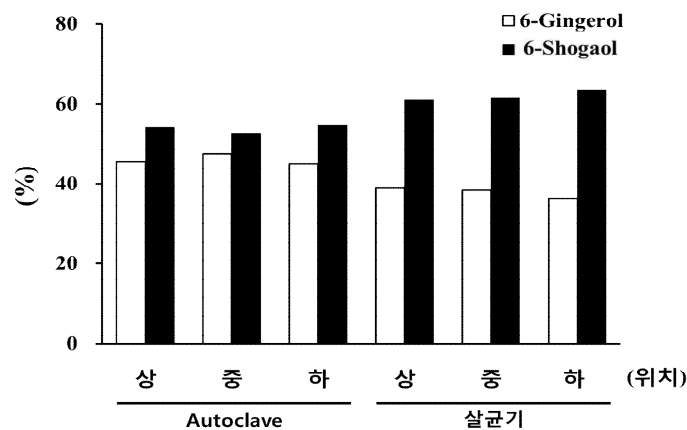


그림 88. Lab scale과 pilot scale의 열처리 위치에 따른 6-shogaol 함량 비율.



라. 생분 전환 대사체 소재의 대량 생산을 위한 생강추출 공정 최적화

(1) 추출방법이 생강 추출액 제조에 미치는 영향

표준화 공정을 통해 6-shogaol이 증폭된 전처리 생강을 이용하여 대량생산에 적합한 최적 추출공정을 찾고자 한다. 이전 생강추출물 제조방법으로 사용하였던 열수추출은 고온추출이라 추출 시간은 단축시킬 수 있으나 에너지 소모가 크기 때문에 대량생산에 위한 생강추출공정에 부적합하다.

초음파 추출은 천연물의 변형 없이 저온에서 추출하는 방법으로 열수 추출법보다 원재료의 결간이 있으며 다른 추출법보다 비용이 저렴해서 대량생산에 많이 사용되는 추출방법이다. 표준화 공정을 통해 6-shogaol이 증폭된 전처리 생강을 중량대비 70% 주정을 10배 첨가하여 80℃에서 3시간 열수추출(대조군)한 시료와 15, 30, 60분 소니케이션 추출한 시료의 6-gingerol과 6-shogaol 함량을 분석한 결과이다 (그림 89). 80℃에서 3시간 열수추출한 대조군은 6-gingerol 함량이 3.44 mg/g, 6-shogaol 함량이 2.91 mg/g으로 2가지 유효성분의 총량은 6.35 mg/g으로 나타났다. 그러나 소니케이션 15, 30, 60분 추출한 시료의 6-gingerol과 6-shogaol 유효성분의 총량은 각각 4.4, 4.7, 4.72 mg/g으로 추출 효율이 낮았다.

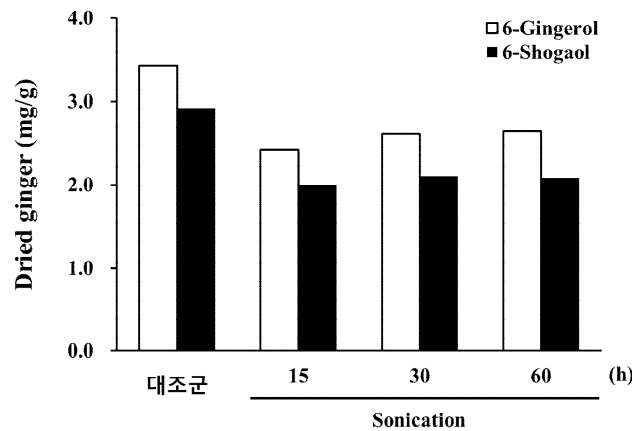


그림 89. Sonication 추출 시간에 따른 6-gingerol과 6-shogaol 함량 변화.

상온 추출의 경우 단가절감 및 에너지 비용이 가장 낮은 추출방법 중 하나이다. 전처리 생강분말을 비커에 담고 70% 주정을 사용하여 shaker에서 0시간부터 24시간까지의 6-gingerol과 6-shogaol 함량을 분석하였다(그림 90). 대조군으로 사용한 생강의 6-gingerol과 6-shogaol의 2가지 유효성분의 합은 6.35 mg/g으로 나타났다. 전처리 생강에 70% 추출용매 첨가와 동시에 6-gingerol과 6-shogaol 유효성분이 2.46 mg/g 추출되었고 추출 3시간 경과 후 2 가지 유효성분이 6.21 mg/g 추출되어 최대 3시간 이상 추출할 필요가 없었으므로 생강 추출액 제조 시 상온 3시간 추출방법을 선택하였다

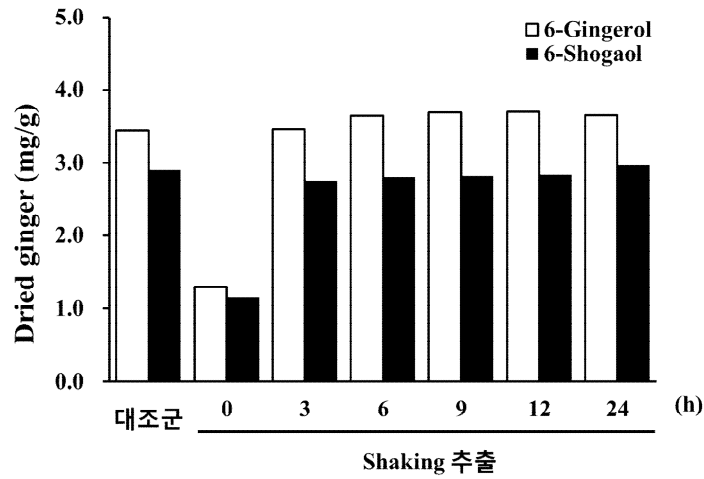


그림 90. 상온추출 시간에 따른 6-gingerol과 6-shogaol 함량 변화.

(2) 선도화합물 증폭 후 처리방법에 따른 효율

표 40은 120°C에서 4시간 열처리 가한 전처리 생강의 건조 유무와 분쇄 유무에 따른 6 gingerol, 6 shogaol 추출 효율을 알아보고자 실험을 진행하였다. 수분함량이 91%인 전처리 생강, 전처리 생강을 건조 시킨 전처리 건조생강, 전처리 생강을 건조 시킨 뒤 분쇄시킨 전처리 건조분쇄 생강으로 구분하여 추출용매가 70%가 되게 용매를 첨가하여 상온 2회 추출하였다. 3가지 시료 모두 1회 추출에서 6-gingerol과 6-shogaol 유효성분이 80% 이상 추출되었으며 추출효율은 전 처리 생강이 가장 효율적이다. 수분 함량이 91%인 전 처리 생강을 이용하면 생강 조직 내 유효성분의 추출효율이 높고 건조의 공정단계를 줄일 수 장점이 있으나 건조된 전처리 생강에 비해 95% 주정이 40배 이상 첨가해야하는 비용적 측면을 고려하여 전 처리 생강을 건조 후 분쇄시켜 70% 주정으로 1회 추출하는 방법이 효율적으로 나타났다.

표 40. 전처리 생강의 건조유무와 분쇄 유무에 따른 6-shogaol 함량변화 (mg/g)

| 시료                    | 추출 횟수 | 함량 (mg/g, 비율) |           | Total |
|-----------------------|-------|---------------|-----------|-------|
|                       |       | 6 Gingerol    | 6 Shogaol |       |
| 생강<br>(건조\, 분쇄\)      | 1회    | 1.70 (35)     | 3.23 (65) | 4.93  |
|                       | 2회    | 0.30 (33)     | 0.60 (67) | 0.90  |
|                       | total | 2.03          | 3.83      | 5.83  |
| 건조생강<br>(건조\, 분쇄\)    | 1회    | 1.49 (36)     | 2.66 (64) | 4.14  |
|                       | 2회    | 0.30 (33)     | 0.62 (67) | 0.92  |
|                       | total | 1.79          | 3.28      | 5.06  |
| 건조분쇄 생강<br>(건조\, 분쇄\) | 1회    | 1.51 (34)     | 2.95 (66) | 4.47  |
|                       | 2회    | 0.16 (35)     | 0.40 (72) | 0.56  |
|                       | total | 1.67          | 3.35      | 5.03  |

나. 생물전환 대사체 소재의 표준화 공정을 위한 간소화

(1) 반응기질의 공정 간소화

반응기질용으로 사용되는 생강 추출물(동결건조분말)의 동결건조 공정을 사용하지 않고 생강 농축액을 사용하면 공정을 간소화 시킬 수 있다. 전처리 건조분쇄 생강을 이용하여 생물전환 대사체 배양액의 6-shogaol 농도가 500 µg/ml이 되기 위한 생강 농축액의 농도(°Brix)를 설정하고자 한다. 5, 10, 15, 20°Brix 생강 농축액의 수분함량, 고형분 함량, 6-shogaol의 함량을 분석한 결과는 표 41와 같다. 당도계 (5, 10, 15, 20°Brix)를 이용하여 측정된 생강 농축액과 고형분 함량의 실제 측정치는 각각 3.42, 6.23, 14.83, 21.25%로 다른 수치를 나타냈다. °Brix 측정은 온도 변화에 민감하므로 고형분 함량(%)을 생강 농축액 기준으로 정하였다. 고형분 15.21% 생강 농축액은 6-shogaol의 함량이 2.35 mg/g이므로 생물전환 대사체 소재의 반응 기질용으로 적합하였다.

표 41. 생강 농축액(°Brix)의 고형분 함량 및 6-gingerol, 6-shogaol 함량 (mg/g, %).

| 생강 농축액<br>(°Brix) | (%)   |       | (mg/g)     |           | Total |
|-------------------|-------|-------|------------|-----------|-------|
|                   | 수분    | 고형분   | 6 Gingerol | 6 Shogaol |       |
| 5                 | 96.58 | 3.42  | 0.24       | 0.50      | 0.74  |
| 10                | 93.77 | 6.23  | 0.42       | 0.88      | 1.3   |
| 15                | 85.17 | 14.83 | 1.44       | 2.35      | 3.79  |
| 20                | 78.75 | 21.25 | 2.09       | 3.00      | 5.09  |

(2) 반응기질의 특성에 따른 생물전환 대사체 전환비율

생물전환 대사체 소재의 개발에 앞서 반응기질용으로 사용되는 생강의 기질별 특성에 따라 생물전환 대사체의 전환비율을 살펴보았다. 대조군은 생강 추출물을 사용하였고 실험군은 생강분말을 이용하였다. 생강분말과 생강추출물은 배양 24시간 각각 24.2%, 7.4% 6-paradol 생물전환 대사체로 전환되었다. 생강 추출물은 배양 48시간에서 72시간 사이 32.3%에서 85.5%로 급속히 6-paradol 생물전환 대사체로 전환 되었지만 생강분말은 37.6%에서 51% 밖에 되지 않았으므로 생강분말은 단 시간에 6-paradol 생물전환 대사체로 전환시키기에는 효율적이나 6-paradol 생성비율이 55% 이상 되지 않아 반응기질용으로 부적합하였다.

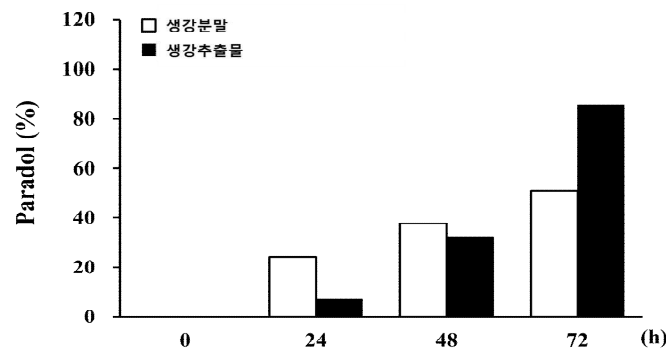


그림 91. 생강 분말과 생강 추출물의 시간의 경과에 따른 6-paradol 생물전환 대사체 전환비율.

반응기실용으로 사용했던 생강 추출물은 동결건조 공정의 어려움 때문에 대량생산에 부적합하다. 공정을 간소화 시킨 생강 농축액을 이용하여 생물전환 대사체 6-paradol로 100% 전환 가능한지를 확인하였다. 생물전환 대사체 배양액의 배양 0시간 초기 6 shogaol 농도는 500 µg/ml로 나타났다. 생강 추출물과 생강 농축액은 배양 0시간부터 72시까지 생물전환 대사체로 전환되지 않았으나 생강 추출물은 배양 120시간 100% 6-paradol 생물전환 대사체로 전환되었다. 생강 농축액 또한 배양 120시간, 144시간에 6-paradol 생물전환 대사체로 각각 61%, 100% 전환되었다. 이 결과에 따르면 생물전환 대사체 소재의 반응기실용으로 생강 농축액을 해도 6 paradol 생물전환 대사체로 100% 전환되었으므로 시 생산 소재를 제조 할 때 생강 농축액을 사용하여 공정을 간소화 시킬 예정이다.

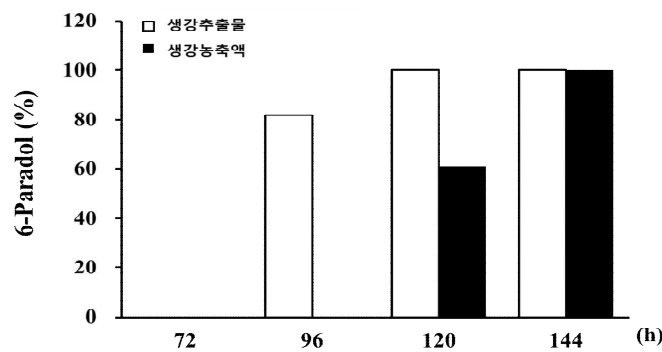


그림 92. 생강 추출물과 생강 농축액을 사용한 생물전환 대사체 전환비율

바. 생물전환 대사체(생강발효추출물) 소재 제조 (lab scale)

본 연구는 lab scale 생강발효추출물 생산과정을 통해 대량 생산 공정의 최적화 방법을 확립하고 산업화의 소재로 적용가능성 여부를 확인하고자 하는 것으로 앞서 실험한 최적 조건들을 적용하여 산업화에 적합한 시설에서 대량생산 공정 scale up이 가능한지 여부를 확인하였다.

#### (1) 생강발효추출물 소재의 생산 공정 최적화

○ 생강발효추출물의 lab scale 공정도는 그림 93과 같이 나타내었다. 생 생강 10 kg (수분함량 91%)을 1 cm 이하로 분쇄하여 120°C에서 4시간 열을 가한 후 전 45°C에서 건조시켜 1 mm이하로 분쇄한 전처리 생강의 생산수율은 910 g이었다. 전처리 생강 500 g을 70% 주정 5 L을 넣고 상온 6시간 shaker 추출하여 여과한 후 고형분 20%인 생강 농축액이 380 mL 생산되어 전처리 생강 대비 생강 농축액의 수율은 76%로 나타났다. *S. pombe* 배양액과 생강 농축액을 혼합하여 생물전환 대사체로 전환 시킨 뒤 동결 건조한 최종산물은 갈색의 분말로 생강발효추출물 57.5 g이 생산되어 전처리 생강 대비 수율은 11.5%였다.

○ *S. pombe* 배양액 1.360 ml과 고형분 20%인 생강 농축액 (6-shogaol 2.66 mg/g) 340 mL을 혼합하여 배양한 생물전환 대사체의 변화율 그림 94에 나타내었다. 배양액내 반응 초기 6-shogaol 농도는 450 µg/ml로 나타났으며 배양 144시간 경과 후 최종목적 지표물질인 6-paradol 함량이 445 µg/ml로 100% 생물전환 대사체로 전환되었다. 이를 동결건조 한 후 지표물질인 6-paradol 함량은 8.9 mg/g으로 나타났다.

○ 생강발효추출물의 제조 공정 중 문제점은 다음과 같다. 생강분말을 추출 후 필터를 시행하면 대량생산 시 공정이 복잡해지고 많은 시간이 소요된다. 생물전환 배양액을 동결시켜 건조시킨 최종생산품인 생강발효추출물은 흡습성이 강하여 녹는 현상이 나타났으며 이 문제점 때문에 분쇄의 어려움이 있다.

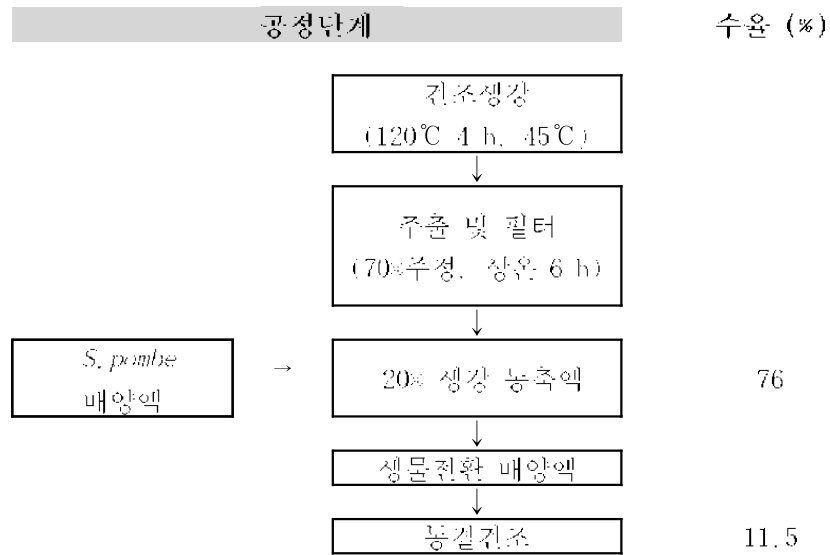


그림 93. Lab scale의 생강발효추출물 공정도.

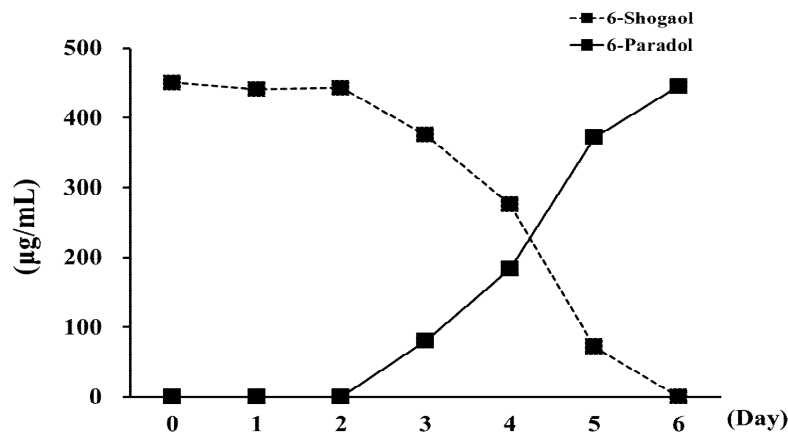


그림 94. 생물전환 배양액의 대사체 변화.

## 제 4절 생강발효추출물 (생물전환 대사체)시생산과 품질관리 기준 설정 및 효능검증

### 1. 재료

본 실험에 사용한 생강은 2015년 충남 서산지역에서 재배, 생산된 생강을 서울 가락동 농수산물 시장에서 구입하여 표면의 흙을 수세, 완전히 제거하여 사용하였다. 생강유래 생물전환 대사체 6-paradol 생성에 사용한 균주는 식약처 식품원재료 데이터베이스에 등록된 식용 가능한 미생물 *Schizosaccharomyces pombe* (KCC11527)를 사용하였고 생육배지 또한 식품첨가물도 등록된 yeast extract와 dextrose를 합동이관인 (주)네오크레마로부터 제공받아 사용하였다 (그림 95, 96). 95% 발효주정은 (주)대한주징라이프로부터 구매하였다.

The screenshot shows a search interface for '식품 원재료명 검색' (Food Ingredient Name Search). The search criteria are: 이름구분: 전체, 식용여부: 전체, 공전등록여부: 전체, and the search term is 'schizo'. The results table is as follows:

| 원재료                       | 이명                               | 학명                        | 생약명 | 식용가능여부 |     |     |
|---------------------------|----------------------------------|---------------------------|-----|--------|-----|-----|
|                           |                                  |                           |     | 가능     | 제한적 | 불가능 |
| Schizosaccharomyces pombe | Schizosaccharomyces malidevorans | Schizosaccharomyces pombe |     | O      |     |     |

그림 95. 식품의약품안전처에 히가된 식용 가능한 균주(*Schizosaccharomyces pombe*).

The screenshot shows a '식품(제조) 품목제조보고서' (Food Product Registration Report) for 'Schizosaccharomyces pombe'. The report includes details such as the manufacturer (Sungshin Food & Drug Co., Ltd.), the product name, and the registration date (2015.08.04). It also contains a list of ingredients and their quantities, and a section for '주요사항' (Key Information) where the manufacturer's name and address are listed.

The screenshot shows an '수입신고필증' (Import Declaration Certificate) for 'Schizosaccharomyces pombe'. The certificate includes details such as the importer (Sungshin Food & Drug Co., Ltd.), the product name, and the registration date (2015.08.04). It also contains a list of ingredients and their quantities, and a section for '주요사항' (Key Information) where the manufacturer's name and address are listed.

그림 96. 생강발효추출물 제조에 사용한 식분천가블 허가증.

### 2. 실험방법

#### 가. 생강발효추출물 대량생산

생강발효추출물의 lab scale로 확립된 방법을 pilot 수준에서 scale up 하여 그림 97과 같은 장비와 시설을 이용하여 생강발효추출물을 제조하였다.

(1) 생강 농축액 제조

Pilot scale에서의 생강발효추출물의 생강 농축액 생산 공정은 그림 98과 같다.

(가) 생 생강: 생강 150 kg을 모두 전기 육절기를 사용하여 1 cm이하로 분쇄하였다.

(나) 열처리: 분쇄된 생강을 알루미늄 용기에 500 g씩 담아 두껍을 닫고 30 kg씩 고온 고압 조리 및 멸균(살균) 장치를 이용하여 온도가 120°C에 도달하는 시점을 기준으로 4시간 동안 열을 가하는 공정을 5회 반복하였다.

(다) 건조 및 분쇄: 45°C 열풍건조기를 이용하여 건조 시키며 골고루 뒤집으면서 완전히 건조된 후 믹서기를 이용하여 2 mm이하로 분쇄하였다.

(라) 추출: 50 L 대용량 추출기를 이용하여 전 처리된 생강을 부식포에 소분하여 담은 뒤 중량대비 10배(w/v)의 70% 주정을 첨가하여 50°C에서 80 rpm으로 12시간 추출하는 공정을 3회 반복하였다

(마) 농축: 50 L 대용량 농축기를 이용하여 60-70°C에서 생강 농축액을 고형분 10%로 하는 과정을 3번 반복하고 시료들을 보았다. 생강 지표성분 중 하나인 6 shogaol을 LC로 분석 한 뒤 6 shogaol 함량이 2.5 mg/mL (고형분 15%)이 될 때까지 농축하였다.

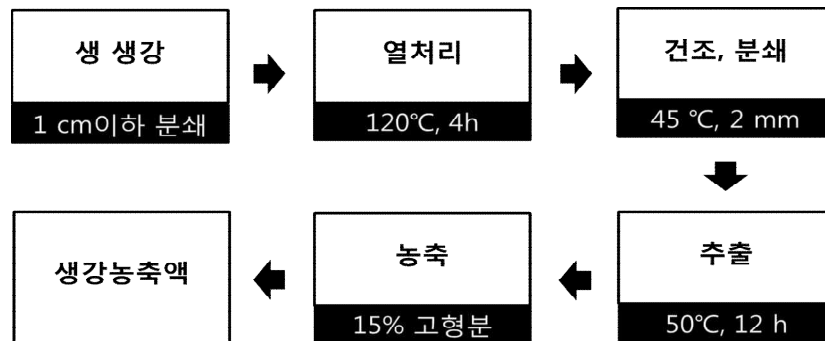


그림 97. Pilot scale의 생강 농축액 제조

(2) 생강발효추출물 제조

(가) 균주 및 보존

*S. pombe*를 생육매질로 Y1 agar (0.3% yeast extract, 0.3% malt extract, 0.5% peptone, 1% dextrose, 2% agar) 배지에 도말하여 26°C에서 3일 병판배양하였다

나) 배지

배양에 사용된 매지들은 yeast extract 1%, dextrose 2%를 기본 매지로 사용하였다.

다) 배양

① 플라스크 배양: *S. pombe*를 활성화시키기 위해 colony 1개를 멸균시킨 매지 50 mL에 접종하여 shaking incubator에서 26°C에서 100 rpm, 24시간 배양하여 전 배양액을 얻었다. 전 배양액을 새로운 배지에 10%(v/v) 접종하여 추가 계대 배양하여 500 mL 종 배양액을 얻었다.

② 회분 배양: 5 L 생물반응기에서 종배양액 10%(v/v) 접종하여 working volume 4 L로 하였고 온도 26°C, 공기의 주입속도는 0.5~1.5 vvm, 교반속도는 200 rpm, pH는 조절하지 않은 상태로 24시간 배양을 실시하였다.

㉓) 본 배양: 전단력을 최소화하고 산소전달능력을 높일 수 있는 공기순환 및 airlift type 배양기를 전체용적 50 L, 유효용적 40 L 규모의 시스템으로 scale up하여 구축한 배양기를 사용하였다. 50 L 발효조에 36 L 배지를 120℃에서 5분간 살균시킨 후 25℃로 냉각시킨 후 4 L 배양액을 새로운 배지에 접종하여 24시간 배양하여 26℃, 200 rpm, 공기 주입량을 1 vvm으로 본 배양액을 얻었다.

라) 생물전환배양액

본 실험에서는 50 L 발효조에 working volume 40 L로 하여 6 shogaol을 6 paradol 생물 전환 대사체로 전환시켜 생물전환 배양액을 제조하였다. 위 본 배양액 32 L와 앞서 기질로 제조한 고형분 15%인 생강 농축액 8 L를 혼합하여 온도 26℃, 공기의 주입속도는 0.5~1.5 vvm, 교반속도는 200 rpm, pH는 조절하지 않은 상태로 진탕배양하면서 생강유래 생물대사체인 6-paradol 생성량을 IC로 모니터링 하였다.

마) 생강발효추출물 제조

초기 첨가한 6-shogaol 농도 대비 6-paradol 생성량이 80% 이상 된 생물전환 배양액을 동결건조 시켜 1호 캡셀에 250 mg씩 충전에 담아 소재를 제조 하였다.

| 공정순서   | 공정 기기 및 방법                                                                           |                                                                                      |
|--------|--------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------|
| 1. 건수  |  |                                                                                      |
|        | 생강 건수 및 수세                                                                           |                                                                                      |
| 2. 분쇄  |   |  |
|        | 전기 육질기를 이용하여 분쇄                                                                      |                                                                                      |
| 3. 열처리 |   |  |
|        | 분쇄한 생강을 알루미늄 호일에 담고 120℃ 4시간 열처리                                                     |                                                                                      |



| 공정순서                                   | 공정 기기 및 방법                                                                                                                                                           |                                           |
|----------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------|
| 4. 건조                                  |                                                                                     | 열풍건조기사용<br>(HK-D01000F,<br>한국종합기기제작<br>소) |
| 열풍 건조기를 이용하여 열처리된 생강을 45℃에서 건조         |                                                                                                                                                                      |                                           |
| 5. 추출 및 농축                             |   | 초고속 진공<br>지온 농축기<br>(COSMOS<br>660)       |
| 50℃에서 12시간 추출(80rpm), 60-70℃에서 고형분 15% |                                                                                                                                                                      |                                           |
| 6. 매양                                  |                                                                                    | 주)에스피이                                    |
| 26℃, 200 rpm, 1 vvm                    |                                                                                                                                                                      |                                           |
| 7. 동결건조                                |                                                                                   | 동결건조기<br>(H shin)                         |
| 4일                                     |                                                                                                                                                                      |                                           |

그림 98. 생강발효추출물 제조 공정

나. 시생산된 생강발효추출물의 인지기능관련 생리활성검증

(1) 생강발효추출물의 *in vivo* 효능평가 및 검증

(가) 실험동물

본 실험에서 사용된 실험동물들은 (주)오리엔트사에서 구입하였다. Male ICR mice(6 주령, 21-23g)을 분양받아 온도 23±1℃, 습도 60±10% 및 밤, 낮을 12 시간씩 조절하고 물과 일반식을 충분히 공급하면서 7일간 동등실에서 적응시킨 후 실험에 사용하였다.

(2)  $\text{A}\beta$  plaque로 유도된 기억력 저하에 대한 인지기능 개선 효능 평가

(가) 실험동물의  $\text{A}\beta$  plaque에 의한 기억력 손상 유발

실험동물들은 cage당 8마리씩 나누어서 사용하였고, 1개의 cage를 1 group으로 사용하

여 group당 8마리의 실험동물을 사용하였다. 각 그룹은 (1) sham group (경구투여: vehicle), (2) Aβ group (경구투여: vehicle), (3) donepezil group (경구투여: donepezil 2 mg/kg/day), (4) 포스파티딜세린 group (경구투여: phosphatidylserine 100 mg/kg/day), (5) 생강추출물(NG) 100 mg/kg/day, 생강발효추출물(FGE) 50, 100, 200 mg/kg/day으로 분배하였다. 실험동물은 surgery 후, 총 14일간 매일 17:00~19:00 사이에 각각의 소재를 1회 경구투여 하였고, stereotaxic surgery는 control group을 제외한 모든 그룹에 진행하여, Aβ<sub>1-42</sub> plaque을 쥐의 뇌에 있는 해마 부위에 주입하였다

#### (나) 학습능력 개선 효능 평가

FGE의 학습능력 개선 효능 평가를 위하여, 인지 및 학습능력 평가 실험인 novel object recognition test (NORT)를 진행하였다. NORT는 후보물질의 학습 및 기억력 개선 효과를 측정하기 위한 행동실험모델로서, 30×30×60 cm 크기의 정사각형 박스에 두 가지 다른 물체를 배치시킨 후, training 과정에서 습득시킨 물체에 비해 새로운 물체를 탐색하는 시간이 증가되는 경향을 파악하여 결과를 도출한다. 결과 값은 % memory index = (exploring time of novel object)/(total exploring time)로 하여 측정한다.

#### (다) 공간기억력 개선 효능 평가

식성 대사제 조성비를 가지는 소재의 공간기억력 개선 효능 평가를 위하여, 인지 및 공간기억력 평가 실험인 Y-maze task를 진행하였다. Y-maze task는 후보물질의 단기 기억 및 공간 기억력 개선 효과를 측정하기 위한 행동실험모델로서, Y자 형 통로에 실험동물을 투입 후 실험동물이 움직인 경도를 8분 동안 관찰, 기록하여 spontaneous alternation을 구한다. Spontaneous alternation = 교차 횟수/(총 이동 횟수 - 2) × 100.

#### (라) 신경세포 사멸에 대한 보호 효능평가

FGE 소재의 Aβ plaque으로 유도된 신경세포 사멸에 대한 보호 효능 평가를 cresyl violet 염색을 통하여 진행하였다. 고정된 뇌 조직의 해마 부분을 골라 PBS로 3회 세척한 후 gelatin coated slide에 마운팅하였다. 슬라이드를 cresyl violet 시약과 반응시켜 염색시킨 후 염색된 조직의 탈수 및 투명화 과정을 거친 후 현미경으로 관찰하였다. 뇌 조직의 해마는 optical light microscope (Olympus Microscope System BX51; Olympus, Tokyo, Japan)를 사용하여 100, 400 배율에서 ImageJ software (Bethesda, MD, USA)를 사용하여 광학밀도(optical density)를 측정하였으며, background를 제외한 결과 값을 사용하였다. 결과값은 sham group대비 %값으로 환산하여 나타내었다. 이미지는 optical light microscope를 이용해 촬영하였다.

#### (마) pre synaptic loss에 대한 보호 효능 평가

FGE 소재의 Aβ plaque으로 유도된 pre-synaptic loss에 대한 보호 효능 평가를 synaptophysin 면역 염색을 통하여 진행하였다. 고정된 뇌 조직의 해마 부분을 골라 PBS로

3 회 세척한 후 세척한 조직을 가지고 내인성 peroxidase를 제거하기 위하여 과산화수소로 처리하여, 1차 항체 mouse anti synaptophysin (1:200 dilution)을 하룻밤 반응시켰다. 2차 항체 biotinylated anti-mouse (1:200 dilution)을 사용하고, ABC 반응을 거쳐 DAB를 이용하여 3분간 발색시켰다. 각 과정 사이에 PBS로 3회 세척을 행하였다. 염색반응을 완료시킨 후, 뇌 조직은 gelatin coated slide에 마운팅 후 70-100% 에탄올과 자일렌의 과정을 거치고 커머슬라이드로 조직을 덮어 보관하였다. 뇌 조직의 해마는 optical light microscope (Olympus Microscope System BX51; Olympus, Tokyo, Japan)를 사용하여 100 배율에서 ImageJ software (Bethesda, MD, USA)를 사용하여 광학밀도(optical density)를 측정하였으며, background를 제외한 결과 값을 사용하였다. 결과값은 sham group대비 % 값으로 환산하여 나타내었다. 이미지는 optical light microscope를 이용해 촬영하였다.

#### (마) 소재의 post synaptic loss에 대한 보호 효능 평가

Scopolamine model을 통한 기억력 개선 효능 평가를 통해 선정된 SC8-1, SP8-1 소재의 A $\beta$  plaque으로 유도된 post-synaptic loss에 대한 보호 효능 평가를 western blot 분석을 통하여 진행하였다. 실험 동물의 뇌 조직 중 해마 부위를 식출하여, lysis buffer로 용해하였다. 전체 용해물을 원심분리(12,000 rpm, 20 min)하여 상층액을 얻었다. 표준 단백질량과 비교하여 단백을 정량화한 후 40  $\mu$ g의 단백을 10% SDS-PAGE에서 전기영동으로 분리하고 polyvinylidene difluoride (PVDF) membrane으로 옮겼다. 5% skim milk를 처리하여 비특이 단백질이 붙는 것을 방지한 후 단백질 각 사이즈 별로 1차 항체(anti-PSD95: 1:1000, anti- $\beta$ -actin: 1:2000)를 처리하였다. 이어 horseradish peroxidase가 붙어있는 2차 항체를 처리하고 ECL 용액으로 단백질의 발현정도를 측정하였다. PVDF membrane으로 옮긴 이후의 각 과정 중간에 TBS-T로 적당히 수세하여 불필요한 불순물을 제거하였다. 결과값은 PSD95/ $\beta$ -actin 정량값으로 나타내었다.

### 3. 결과

#### 가. 생강발효추출물 대량생산 및 분석결과

○ 생강발효추출물 소재의 생산 공정 최적화 방법을 검토한 결과 분쇄한 생강을 추출한 뒤 필드 공정을 제외하는 방법은 그림 99과 같이 실시하였다. 부식포에 500 g씩 담고 추출한 뒤 여과 공정을 거치지 않고 온도를 50°C 이상으로 12시간 추출을 실행하는 공정을 3 반복 실시한 후 생강 추출액의 함량을 측정한 결과는 표 42과 같이 나타났다. 6-Gingerol과 6-shogaol의 비율을 살펴보면 6-shogaol이 증폭되었음을 알 수 있었고, 생산 공정 최적화 실험(상온추출)과 6 shogaol 함량이 3.0 mg/g 내외로 생강 추출액의 반복 간에 함량차이가 없었다.



그림 99. 대량생산 시 생강추출액 제조 방법

표 42. 생강 추출액 제조 공정 중 6-shogaol의 함량변화 (mg/g, %)

| 생강 추출액 | (mg/g, %)  |           | Total |
|--------|------------|-----------|-------|
|        | 6-Gingerol | 6-Shogaol |       |
| 1차     | 1.77 (36)  | 3.08 (64) | 4.85  |
| 2차     | 1.51 (34)  | 2.95 (66) | 4.46  |
| 3차     | 1.62 (35)  | 3.02 (65) | 4.64  |
| 상온주출   | 1.51 (34)  | 2.95 (66) | 4.46  |

○ 생강발효추출물의 대량 생산을 그림 100과 같이 수행하였다. 생강발효추출물은 생강 160 kg (수분함량 91%)을 준비하여 1 cm 이하로 분쇄하고 120 °C에서 4시간 열을 가하고 45°C에서 건조 이하로 분쇄한 전처리 생강의 생산수율은 15 kg이었다. 전처리 생강의 5 kg씩 50°C에서 12시간 추출하는 과정을 3번 반복하고 고형분 함량이 15% (6-shogaol 함량 2.5 mg/g)일 때 생강 농축액이 10 L 생산 되어 전처리생강 대비 66% 수율로 나타났다. *S. pombe* 배양액 32 l와 15% 생강 농축액 8 l을 혼합하여 생물전환 대사제로 전환 시킨 뒤 동결 건조한 최종산물은 갈색의 분말로 생강발효추출물 1.2 kg이 생산되어 전처리 생강(12 kg) 대비 10% 수율도 나타났다

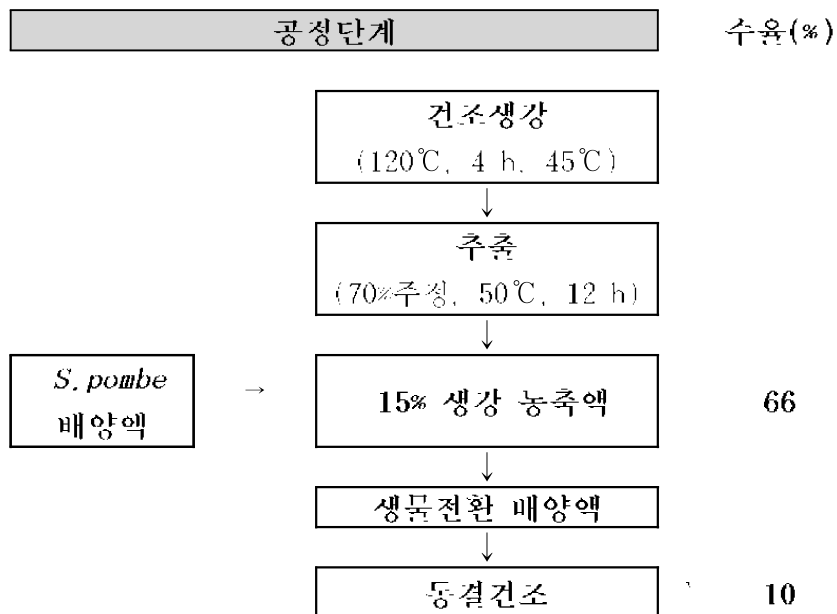


그림 100. 생강발효추출물의 대량생산 공정도

○ *S. pombe* 배양액 32 l과 15% 고형분인 생강 농축액 (6-shogaol 2.66 mg/g) 8 l을 혼합하여 72시간 배양시켰을 때 80%이상 6 paradol 생분전환 대사체로 전환되었다. 이를 동결건조 분말로 제조하였을 때 성상은 갈색의 분말 (그림 101)로 최종 지표물질인 6-shogaol 함량이 1.1 mg/g, 6 paradol 함량은 7.5 mg/g로 나타났다.



그림 101. 최종 생산된 생강발효추출물

○ 상기의 공정으로 제조한 생강발효추출물은 1호 캡셀에 250 mg씩 충전하였다. 또한 인체적용시험에서 대조군에서 사용할 위약은 말토덱스트린과 미세결정셀룰로오스 혼합분말에 카카오색소와 생강향을 혼합하여 제조한 분말을 시험약과 마찬가지로 1호 캡셀에 250 mg씩 충전하였다. 충전한 시험약과 위약은 각각 병에 담아 무작위배정을 위한 코드명과 매칭 번호를 기재한 라벨 그림 102과 같이 부착한 후 인체적용시험기관에 전달하였다.

- Placebo: 카카오색소 1%, 생강 향 0.5%, 결정셀룰로오스 98.5%
- 생강발효추출물: 결정셀룰로오스 48%, 이산화규소 1.9%, 생강발효추출물 50%

**제품 CODE 명 : FGE (NO.12-a)**

1. 제조원: ㈜
2. 내용량: 250 mg x 170 캡셀 (84일 분량)
3. 섭취량: 1일 1회, 1일 2캡셀을 식 후 물과 함께 섭취하십시오
4. 섭취 시 주의사항: 섭취 시 충분한 물과 함께 섭취하시기 바랍니다.
5. 보존: 개봉 후 습기가 적고 직사광선을 받지 않는 서늘한 곳에 보관하시기 바랍니다.

이 제품은 건강기능식품 인체적용시험용입니다.

그림 102. 인체적용시험용 시료라벨



그림 103. 임상실험용 생강발효추출물

○ 생강발효추출물은 흡습성이 높아서 다루기 불편하고 caking 현상이 나타나서 저장성이 낮은 것으로 나타났다. 따라서 생강발효추출물은 동결건조물 상태가 원료로서 다루기가 부적합하므로 부형제와 함께 캡슐도 제형의 공정을 확립하였다.

#### 나. 생강발효추출물의 품질관리 기준설정

##### (1) 지표성분 결정 및 표준화

건강기능식품을 개발하기 위해서 가장 먼저 이루어져야 하는 부분이 표준화이다. 즉 제조 공정을 확립하여 지표성분을 결정하고 이 지표성분의 함량을 결정해야한다. Gingerol은 신선생강에 있어서 가장 많은 신비성분이며 체인길이 다른 몇 가지 gingerol이 생강에 존재하며 6-gingerol이 대표적이다. 그러나 gingerol은 구조상  $\beta$ -hydroxy keto group의 존재로 인해 열에 불안정하여 생강을 건조, 가열처리할 경우 탈수반응에 의해 gingerol의 hydroxyl기가 제거되며 4-, 5-위치에 이중결합을 가지는 shogaol로 전환되며 6-shogaol이 가장 대표적인 것으로 알려져 있다. 6-Shogaol은 미생물에 의해 대사되어 side chain의  $\alpha$ ,  $\beta$ -불포화케톤 부위가 환원되어 6-paradol 생물전환 대사체로 전환된다. 본 실험은 생강 조식 내 선도화합물(6-shogaol)을 열처리를 통하여 증폭시킨 뒤 미생물과 반응시켜 6-paradol 대사체로 전환시켜 인지기능개선에 효능을 주는 건강기능식품을 개발하고자한다. 생강발효추출물의 지표물질은 6-shogaol과 6-paradol의 총 함량이 8 mg/g 이상 그 중 6-paradol의 함량이 7 mg/g 이상으로 정하였다.

##### (가) 6-Paradol 합성 및 구조 동정

합성한 6 paradol의  $^1\text{H}$  NMR(그림 104)과  $^{13}\text{C}$  NMR(그림 105)을 이용한 구조 동정 결과는 다음과 같다.  $^1\text{H}$  NMR (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  6.83 (d, J=8.4, 1H), 0.69 - 0.63 (m, 2H), 5.50 (s, 1H), 3.87 (s, 3H), 2.82 (t, J = 7.2, 2H), 2.69 (t, J = 7.2, 2H), 2.37 (t, J = 7.8, 2H) 1.58 - 1.53 (m, 2H), 1.30 - 1.28 (m, 8H) 0.88 (t, J = 7.2, 3H) MS (ESI) m/z 277 [M]<sup>+</sup>였다.

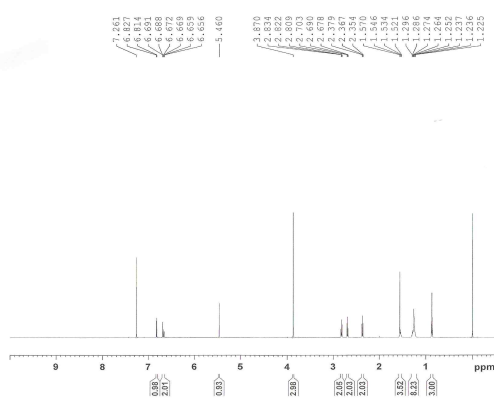


그림 104. 6-Paradol의  $^1\text{H}$ -NMR spectrum

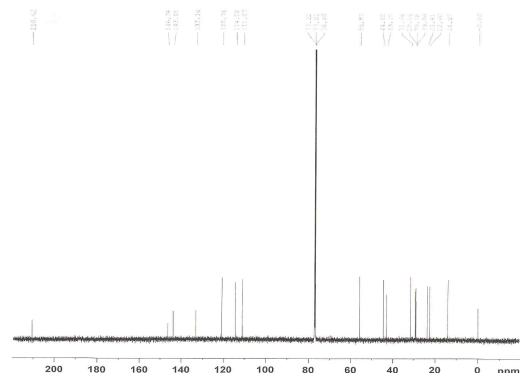


그림 105. 6-Paradol의  $^{13}\text{C}$ -NMR spectrum

(나) 지표성분 6-shogaol과 6-paradol의 분석 결과

생강의 추출물의 지표물질인 6-shogaol과 6-paradol을 정량하기 위하여 표준물질의 검량곡선을 작성한 결과는 표 43, 44과 같다. 6-shogaol 검량선의 회귀방정식은  $y(\text{area})=23948x+70200$  ( $R^2=0.999$ )이었고 6-paradol은  $y(\text{area})=213513x+49587$  ( $R^2=0.999$ )로 고도의 유의적인 정의 상관관계가 있었다. 검량곡선의  $R^2$  값은 0.999로 매우 신뢰성이 높은 검량곡선을 확보하였으며, 앞으로 이 검량곡선을 이용하여 생강발효추출물의 지표물질인 6-shogaol과 6-paradol 함량이 계산이 가능하다.

표 43. 지표물질 6 shogaol의 검량곡선 결과

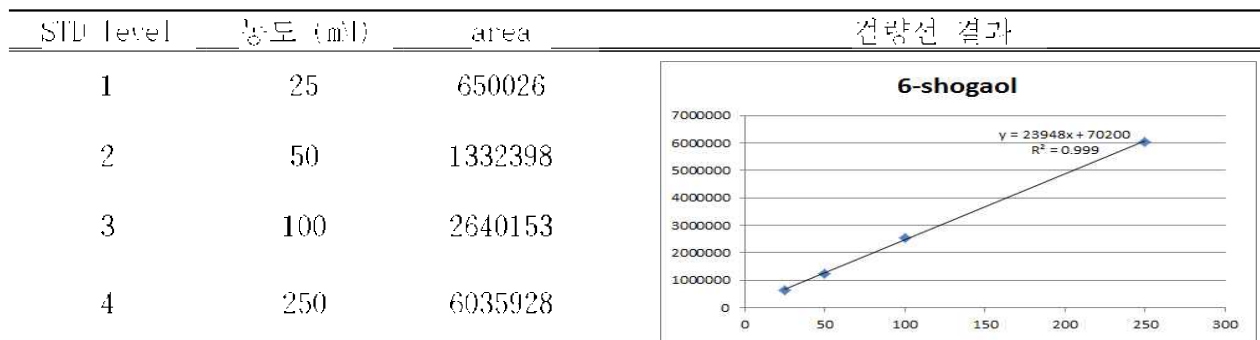
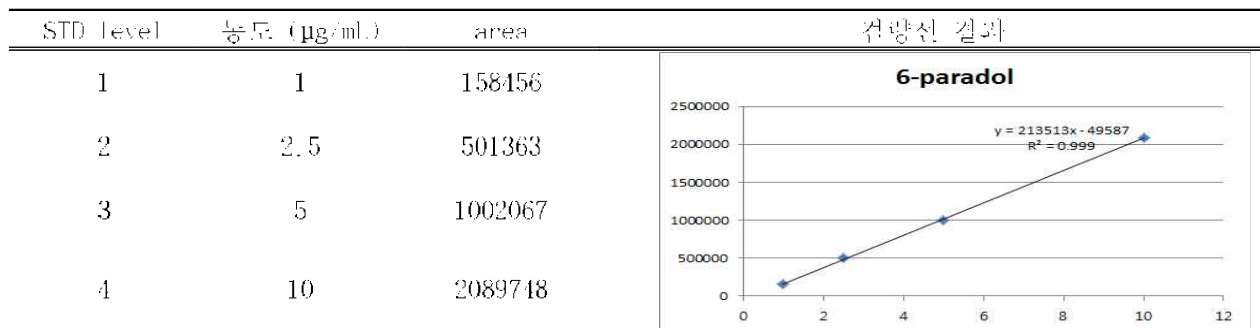


표 44. 지표물질 6-paradol의 검량곡선 결과



(다) 생강발효추출물의 6 shogaol과 6 paradol 함량 및 표준편차 (mg/g, %)

본 연구에서는 생강발효추출물의 건강기능식품원료(또는 식품원료)로 산업화시 식분원료에 대한 품질관리를 목적으로 생강발효추출물에 대한 지표성분을 설정하는 표준화작업이다. 생강발효추출물을 각각 3회 반복 제조하여 지표물질을 분석한 6-shogaol과 6-paradol의 크로마토그램은 그림 106과 같다. 6-shogaol과 6-paradol의 총 함량은 3회 모두 8.5-12.5 mg/g 범위였고 6 shogaol 대비 6 paradol로 80%이상 생분전환 대사체로 전환되었다. 이 결과를 토대로 생강발효추출물의 지표물질은 6 shogaol과 6 paradol 총 함량이 8 mg/g이상이며 그 중 6-paradol 함량이 6 mg/g 이상으로 정하였다.

표 45. 생강발효추출물의 지표성분 함량

| Sample number | 함량, 비율 (mg/g, %) |             | Total |
|---------------|------------------|-------------|-------|
|               | 6-Shogaol        | 6-Paradol   |       |
| 1             | 0.6 (6.3)        | 8.9 (93.7)  | 9.5   |
| 2             | 2.3 (18.4)       | 10.2 (81.6) | 12.5  |
| 3             | 1.1 (12.8)       | 7.5 (87.2)  | 8.6   |

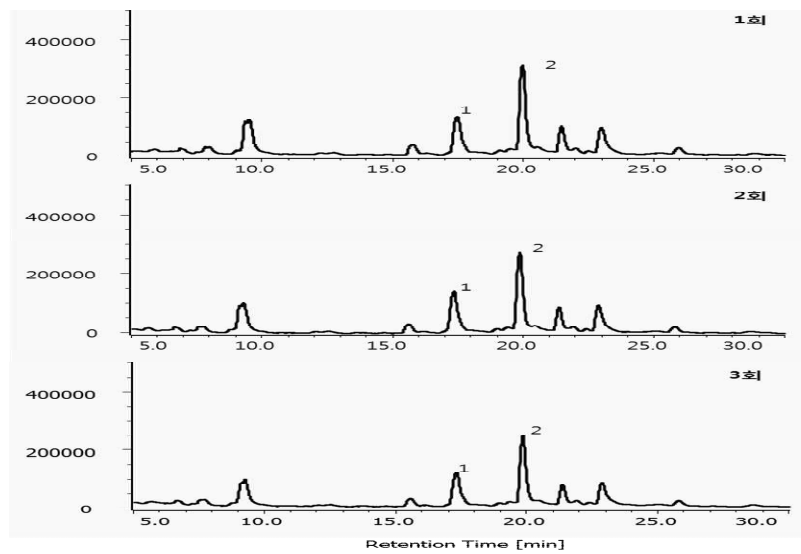


그림 106. 생강발효추출물의 지표물질 LC분석 (1: 6 shogaol, 2: 6 paradol)

다. 생강발효추출물의 품질검사 결과

본 연구에서는 생강발효추출물의 제조를 위한 공정을 확립하고 인지기능개선에 도움을 줄 수 있는 기능성을 가진 개별 인증형 건강기능식품 소재로 등록하기 위한 조건을 확립하고자 하였다.

(1) 유해물질 규격 설정에 관한 안정성자료

○ 생강발효추출물의 유해물질 규격은 원재료 또는 제조과정 중 유해물질의 오염 또는 잔류 가능성을 막고 안전성을 확보할 수 있도록 건강기능식품 기능성 원료 인증에 관한 규정 중 유해물질 규격설정항목(제 14조 제6호 가목관련)표 46에 준하여 설정하였다. 인체적용 시험용 소재인 생강발효추출물은 정상, 수분, 대장균의 일반식품 기준검사를 식품 공전법에 따라 실시한 결과 표 47에 보는 것과 같이 정상, 수분 일반세균, 대장균 군 모두 적합한 것으로 판정되었고 중금속 납, 총 비소, 카드뮴, 총 수은 또한 검출되지 않았다.



표 46. 유해물질 규격실정항목(식품의약품안전청고시 제 14조 제6호 가목관련)

| 원료                                   | 항목     |                                                                                | 규격                | 비고       |  |
|--------------------------------------|--------|--------------------------------------------------------------------------------|-------------------|----------|--|
| 모든 원료                                | 중금속    | 납                                                                              | < 10.8 µg/일       |          |  |
|                                      |        | 총비소                                                                            | < 150 µg/일        |          |  |
|                                      |        | 카드뮴                                                                            | < 3.0 µg/일        |          |  |
|                                      |        | 총수은                                                                            | < 2.1 µg/일        |          |  |
|                                      | 미생물    | 대장균군                                                                           | 음성                |          |  |
|                                      |        | 세균수                                                                            | ≤ 100/g           | 액상제품에 한함 |  |
| 용매를 사용한 원료                           | 잔류용매   | 헥산                                                                             | < 0.005 g/kg      |          |  |
|                                      |        | 이소프로필알콜                                                                        | ≤ 0.05 g/kg       |          |  |
|                                      |        | 초산에틸                                                                           |                   |          |  |
|                                      |        | 메틸알콜                                                                           | ≤ 0.03 g/kg       |          |  |
|                                      |        | 아세톤                                                                            |                   |          |  |
| 해당 기준이 「식품의 기준 및 규격」에 설정되어 있는 원료     | 동물용의약품 |                                                                                | [식품의 기준 및 규격]에 따른 |          |  |
|                                      | 곰팡이 독소 | 총아플라톡신 (B <sub>1</sub> , B <sub>2</sub> , G <sub>1</sub> 및 G <sub>2</sub> 의 합) |                   |          |  |
|                                      |        | 파티린                                                                            |                   |          |  |
|                                      |        | 오크라톡신                                                                          |                   |          |  |
|                                      |        | 기타곰팡이독소                                                                        |                   |          |  |
|                                      | 방사능 오염 | <sup>131</sup> I                                                               |                   |          |  |
| <sup>134</sup> Cs, <sup>137</sup> Cs |        |                                                                                |                   |          |  |

표 47. 생강발효추출물의 일반 식품 기준 검사 결과

| 검사 항목       | 규격                      | 결과             | 적부  |    |
|-------------|-------------------------|----------------|-----|----|
| 성상          | 고유의 색택과 향미를 가지는 황갈색의 분말 | 적합             | 적합  |    |
| 수분          | 5% 이하                   | 5% 이하          | 적합  |    |
| 중금속 (mg/kg) | 납 (ppm)                 | 1.0 이하         | 불검출 | 적합 |
|             | 카드뮴                     | 0.9 이하         | 불검출 | 적합 |
|             | 총수은                     | 0.6 이하         | 불검출 | 적합 |
|             | 총 비소(ppm)               | 1.0 이하         | 불검출 | 적합 |
| 미생물         | 일반세균(cfu/g)             | 1,000 cfu/g 이하 | 음성  | 적합 |
|             | 대장균군                    | 음성             | 음성  | 적합 |

(2) 유해물질 규격 미 설정에 관한 자료

잔류농약은 건강기능식품 기능성 원료를 인증에 관한 규정에 의거하여 규격으로 설정하지는 않지만 시험결과를 제출하여야 하는 항목으로 「식품의 기준 및 규격」에 원재료에 대한 농약의 잔류허용기준이 있는 경우에는 「수입식품등검사에 관한 규정」(식품의약품안전처 고시 2014.2.12. 개정) 별표 3, 정밀검사대상 잔류농약 검사항목에 대하여 59종에 대하여 분석하여야 한다. 또한 식품으로 섭취 이력이 있거나 잔류농약이 오염될 수 있다고 판단되면 원재료에 대한 잔류 허용기준이 없다 하여도 정밀검사 항목 59종을 분석하여야 한다. 생강의 경우 원재료에 대한 기준이 없지만 표 48와 같은 정밀검사 항목 59종을 분석하여야 한다.

표 48. 유해물질 규격 미설정 항목(잔류농약)의 시험항목

**[별표 3] 정밀검사 대상 잔류농약 검사항목**

1. 동시다분석 검사대상 : 59종

다이아지논(Diazinon), 디디티(DDT), 디코폴(Dicofol), 디클로포스(Dichlorvos), 말라치온(Malathion), 메소밀(Methomyl), 메톡시페노자이드(Methoxyfenozide), 메티다치온(Methidathion), 보스칼리드(Boscalid), 비에치씨(BHC), 비펜스린(Bifenthrin), 싸이퍼메쓰린(Cypermethrin), 싸이프로디닐(Cyprodinil), 싸이할로쓰린(Cyhalothrin), 아세다미프리트(Acetamiprid), 아зок시스트로빈(Azoxystrobin), 아트라진(Atrazine), 에치온(Ethion), 엔도설판(Endosulfan), 이마자릴(Imazalil), 이소프로치오란(Isoprothiolane), 이프로디온(Iprodione), 이프로발리카르(Improvalicarb), 카바릴(Carbaryl), 카보후란(Carbofuran), 캡탄(Captan), 킨토젠(Quintozene), 클로로타로닐(Chlorothalonil), 클로르피리포스(Chlorpyrifos), 클로르피리포스-메틸(Chlorpyrifos-methyl), 클로르헨나피르(Chlorfenapyr), 톨클로포스-메틸(Tolclofos-methyl), 트리아디메폰(Triadimefon), 트리아조포스(Triazophos), 트리플루미졸(Triflumizole), 트리플루무론(Triflumuron), 티아메톡산(Thiamethoxam), 파라치온(Parathion), 파라티온 메틸(Parathion Methyl), 파클로부트라졸(Paclubutrazol), 페메쓰린(Permethrin), 페나리몰(Fenarimol), 페니트로치온(Fenitrothion), 펜발리레이트(Fenvalerate), 펜토에이트(Phenthoate), 펜프로파스린(Fenpropathrin), 펜헥사미드(Fenhexamid), 포스메트(Phosmet), 프로시미돈(Procymidone), 프로클로라즈(Prochloraz), 프로페노포스(Profenofos), 플루벤디아마이드(Flubendiamide), 플루페녹수론(Flufenoxuron), 피라클로스트로빈(Pyraclostrobin), 피리메타닐(Pyrimethanil), 피리미카르브(Pirimicarb), 피리미포스-메틸(Pirimiphos-methyl), 헥사플루무론(Hexaflumuron), 후루디옥소닐(Fludioxonil)

라. 생산된 생강발효추출물의 인지기능관련 생리활성 검증

(1) A $\beta$  plaque으로 유도된 기억력 저하에 대한 인지기능 개선 효능 평가

(가) 학습능력 개선 효능 평가

생강발효추출물(FGE), 생강추출물(GE)시료들의 A $\beta$  plaque으로 유도된 기억력 저하에 대한 학습능력 개선 효능을 평가하였다. 본 실험에서는 그림 107와 같이 Donepezil (DN)과 포스파티딜세린(PS)을 대조군으로 사용하였다.

실험 결과, GE시료(57.0 $\pm$ 2.6%)와 FGE 시료(56.9 $\pm$ 4.6%) 모두에서 A $\beta$  plaque 독성군(47.3 $\pm$ 5.4%)과 비교하였을 때, 학습능력 개선 효능이 있음을 보였고, 인지기능 관련 건강기능식품 원료인 포스파티딜세린(51.4 $\pm$ 3.5%)보다 좋은 학습능력 개선 효능을 보였다.

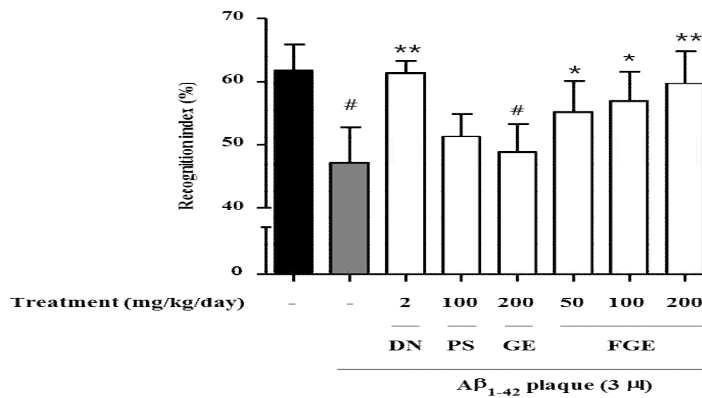


그림 107. FGE의 학습능력 개선 효능평가

(나) 공간기억력 개선 효능 평가

FGE, GE시료들의 A $\beta$  plaque으로 유도된 기억력 저하에 대한 공간기억력 개선 효능을 평가하였다 (그림108). 실험 결과, GE시료(62.3 $\pm$ 2.3%)와 FGE시료(70.2 $\pm$ 2.4%) 모두에서 A $\beta$  plaque 독성군(60.6 $\pm$ 2.6%)과 비교하였을 때, 공간기억력 개선 효능이 있음을 보였고, 포스파티딜세린 (60.4 $\pm$ 2.8%)보다 좋은 공간기억력 개선 효능을 보였다. GE시료와 FGE시료를 비교했을 때, FGE시료에서 더 좋은 공간기억력 개선 효능을 보였다.

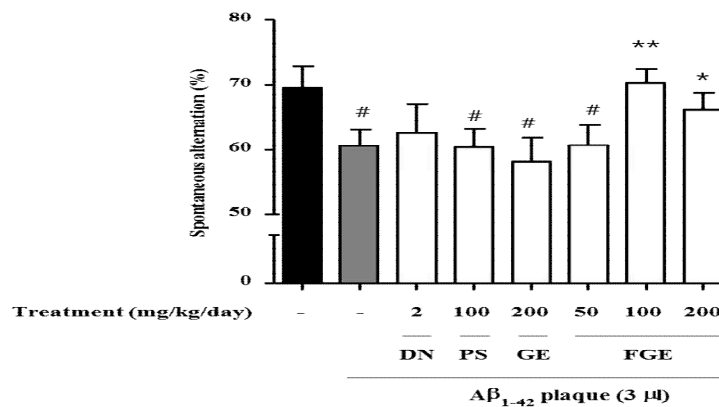


그림 108. FGE의 공간기억력 개선 효능평가

(2) A $\beta$  plaque으로 유도된 기억력 저하에 대한 생리활성 검증

(가) 신경세포 보호 효능 평가

FGF의 최적 농도 도출을 위하여, 농도에 따른 A $\beta$  plaque으로 유도된 신경세포사멸에 대한 보호 효능을 평가하였다. 그림 109과 같은 실험 결과, FGE 50, 100, 200 mg/kg/day 투여군(91.4 $\pm$ 4.5%, 93.5 $\pm$ 6.8%, 93.9 $\pm$ 5.9%) GE (84.9 $\pm$ 9.5%)보다 더 좋은 신경세포 보호 효능을 보였다.

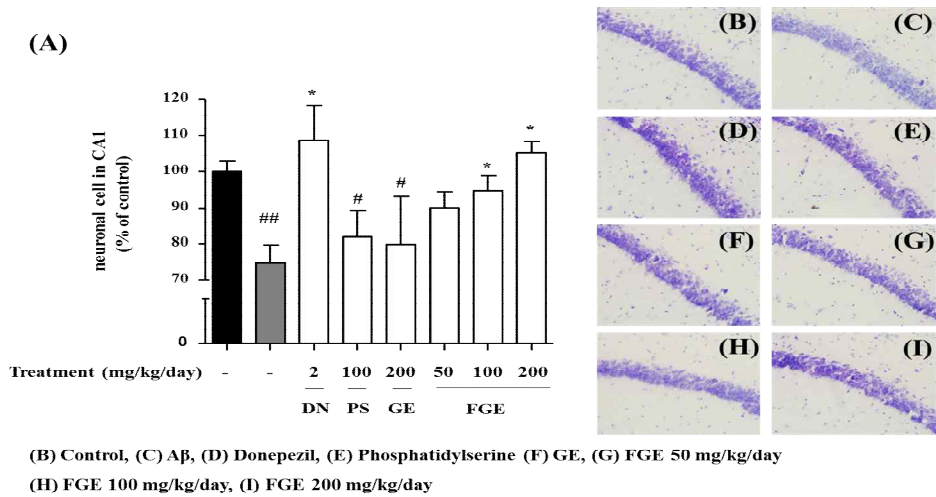


그림 109. FGF의 신경세포 보호 효능 평가.

(나) pre-synaptic loss 보호 효능 평가

FGF의 최적 농도 도출을 위하여, 농도에 따른 A $\beta$  plaque으로 유도된 pre synaptic loss에 대한 보호 효능을 평가하였다(그림 110). 실험 결과, FGE 50, 100, 200 mg/kg/day 투여군(99.4 $\pm$ 5.2%, 107.8 $\pm$ 9.4%, 110.9 $\pm$ 6.7%) 모두에서 GE (81.2 $\pm$ 12.1%)보다 더 좋은 pre-synaptic loss에 대한 보호 효능을 보였고, 50, 100, 200 mg/kg/day 농도에서 pre-synaptic loss에 대한 보호 효능이 t-test를 통한 유의성 검사에서 유의적인 효능이 있음을 보였다.

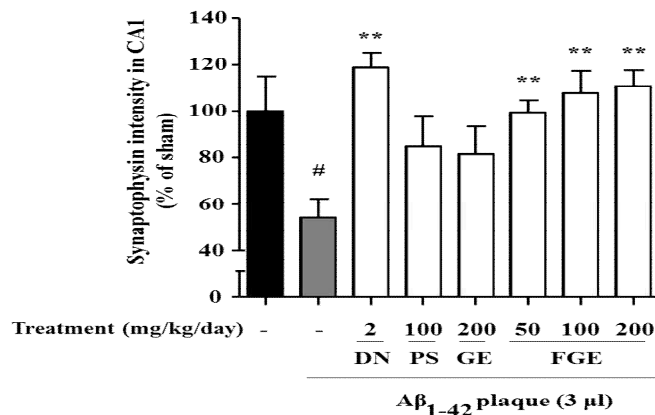


그림 110. FGF의 pre-synaptic loss 보호 효능 평가.

(다) post synaptic loss 보호 효능 평가

FGE의 최적 농도 도출을 위하여, 농도에 따른 Aβ plaque으로 유도된 post synaptic loss에 대한 보호 효능을 그림 111과 같이 평가하였다. 실험결과, FGE 50, 100, 200 mg/kg/day 투여군(1.06±0.11, 1.18±0.14, 1.29±0.08) 모두에서 GE (0.97±0.06)보다 더 좋은 post-synaptic loss에 대한 보호 효능을 보였고, 200 mg/kg/day 농도에서 post-synaptic loss에 대한 보호 효능이 t test를 통한 유의성 검사에서 유의적인 효능이 있음을 보였다. 인체적용 시험에 앞서 위와 같은 분자생물학적 분석을 통한 기전연구를 통하여 인지기능관련 생리활성을 검증하였다.

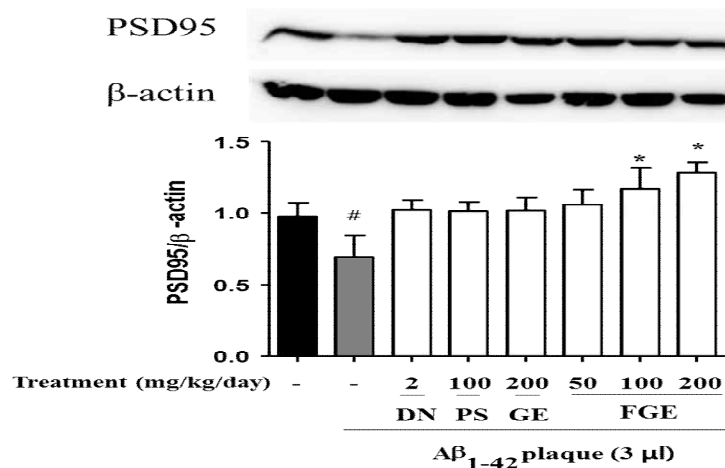


그림 111. FGE 농도에 따른 post-synaptic loss 보호 효능 평가.

## 제 4절 생강발효추출물의 인지기능에 대한 인체적용시험

### 1. 인체적용시험 수행을 위한 수행기관 IRB 심사자료 제출

임상시험 위탁기관인 전북대학교 기능성식품 임상시험 지원센터의 IRB 승인을 위한 생강발효추출물의 선행연구 및 현황자료를 수집하여 ‘인체적용시험 자료집’을 작성하였고 이를 2015년 9월 1일에 전북대학교 기능성식품 임상시험 지원센터에 제출하였다.

# 인체적용시험자료집

## 1. 제출자료 전체의 총괄 요약본

### 1-1. 품목명

- 생강발효추출물

### 1-2. 목표기능

- 인지능력 개선에 도움

### 1-3. 섭취량

- 생강발효추출물로 500 mg/day

### 1-4. 원료의 성분

- 지표성분 : 6-shogaol, 6-paradol

### 1-5. 기준 규격

- 생강발효추출물로 500 mg/day

## 2. 기원, 개발경위, 국내·외에서의 인정 및 사용현황 등에 관한 자료

### 2-1. 기원

- 생강은 먼 옛날부터 열대 아시아 지역에서 재배되었으며 원산지는 인도 또는 말레이시아 등 고온다습한 동남아시아로 됨. 생강이 유럽으로 전해진 것은 1세기경으로 처음에는 약용이었으나 9세기경에 향신료로 프랑스와 독일 등에 소개됨.
- 13세기에는 아랍 상인들에 의해서 인도에서 동아프리카에, 16세기에는 포르투갈인에 의해 서아프리카에 도입되어 서아프리카의 산토메에서 생강이 생산되었고, 신대륙 발견 후 멕시코와 자메이카에 전해짐. 이 때부터 자메이카는 '생강의 고장'

'이란 별명을 얻게 되었으며 세계 시장을 장악하게 됨. 중국에서도 질이 좋은 생강이 생산되는데 공자도 생강을 애용했다는 기록이 남아 있음.

- 생강은 여러해살이풀로 땅 속의 두툼한 다육질로 된 줄기가 매운 맛과 특유한 향미를 가지고 있음. 꽃은 귤색인데 더운 나라에서는 이따금 꽃이 핀다고 하나 우리나라에서는 거의 꽃을 볼 수 없고, 개화해도 열매는 익지 않아 생강 재배는 땅속줄기를 쪼개서 하고 있음.
- 20℃ 가량의 온도가 알맞으며 추위에 대한 저항성이 약해 햇볕이 잘 쬐이는 곳에서 재배하는 것이 좋고 생강뿌리는 야채로서 날것이나 식초와 소금에 절여서 먹고 수프나 여러 가지 요리를 만들 때 향기를 우려내기 위해 쓰이고 있음.
- 말레이시아에서는 물에 담갔다 다진 것을 시럽에 절인 마니산을 만들어 먹으며, 인도네시아의 자바에서는 두부를 만들 때 이용하고 인도를 비롯한 열대 지방에서는 어느 시장에서나 팔고 있는데 카레를 만들 때 꼭 쓰이는 향신료임.
- 생강은 방향성 건위약(芳香性 健胃藥) 또는 비린내 등 좋지 않은 맛을 없애 주는 물질로 널리 쓰여왔다. 구역질 치료용으로도 쓰여 왔고 말린 생강은 신진대사기능이 떨어졌을 때 이용되거나 기침, 현기증, 손발이 찬 경우, 요통, 설사, 구토 등의 치료제로 활용되고 말린 생강은 생강 재배가 안 되는 서양에서 더 많이 이용됨.
- 기원, 학명, 원산지, 사용부위<sup>1)</sup>



| 원재료명 | 생강                                |
|------|-----------------------------------|
| 학명   | <i>Zingiber officinale</i> Roscoe |
| 원산지  | 인도, 말레이시아 등 고온다습한 동남아시아로 추정       |
| 사용부위 | 뿌리/뿌리줄기                           |

|                     |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
|---------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 특성/분포 <sup>2)</sup> | <ul style="list-style-type: none"> <li>○ 생강과(Zingiberaceae)의 여러해살이풀. 생강의 뿌리줄기. 생 또는 새양이라고 함.</li> <li>○ 향신료로 널리 쓰고 한방에서는 건위제로 씀.</li> <li>○ 매운맛 성분은 진저올임.</li> </ul>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |
| 주요성분<br>(부위별)       | <ul style="list-style-type: none"> <li>○ 알파-피넨, 베타-카로텐, 베타-요논, 베타-시토스테롤, 커피산, 캄퍼, 캅사이신, 카리오필렌, 클로로겐산, 시트랄, 쿠르쿠민, 파르네솔, 페룰릭산, 게라니올, 진저롤, 레시틴, 1,9-시네올, 진저론, 아미노산, 칼슘, 필수지방산, 철, 마그네슘, 망간, 인, 칼륨, 셀렌, 아연, 비타민 B1, B2, B3, B6, C.</li> <li>○ 생강피, 생강즙: Acetaldehyde · Acetic acid · Acetone· (+)-Borneol · Borneol acetate · Caffeic acid · (-)-Calamenene · Capsaicin · 3-Carene · Ethyl acetate · 4-Eudesmen-11-ol; 7beta-form · Furanogermenone · Furfural · Galanolactone · gamma-Bisabolene</li> </ul>                                                                                                                                                                                                                                                        |
| 식용 외 용도<br>(이용부위)   | <ul style="list-style-type: none"> <li>○ 약용(뿌리줄기, 껍질, 즙)</li> </ul>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |
| 안전성/독성              | <ul style="list-style-type: none"> <li>○ 생강은 향신료로 사용되기 때문에 일반적으로 ‘안전하다’고 여겨집니다 (생강은 미국 FDA에서도 generally recognized as safe (GRAS)).</li> <li>○ 임신부의 사용에도 안전하다고 보고됨<sup>3,4)</sup>.</li> <li>○ 그러나 복용 시 생강특유의 맛과 향이 문제가 될 수 있으며, 환자에 따라 빈속에 복용하면 속쓰림을 유발할 수 있음<sup>5)</sup>.</li> <li>○ 생강의 부작용으로 특유의 맛을 꼽았으며, 다양한 형태의 복통과 연관된다고 보고함. 그러나 장기 복용에 의한 손상 등의 심각한 부작용은 없음<sup>6)</sup>.</li> </ul>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |
| 기타                  | <ul style="list-style-type: none"> <li>○ 생강은 향신료로서 널리 쓰이고 얇게 저며서 꿀이나 설탕에 재인 편강이나 생강 차로 만들어 마시기도 한다. 그밖에 약용, 커리가루, 소스, 생생강주 등의 원료가 되기도 한다.</li> </ul>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |
| 근거자료                | <ul style="list-style-type: none"> <li>○ 한국과학식품회. 식품과학사전. (주)교문사. 2012.</li> <li>○ 김창민, 원색한약도감, 16p, 아카데미서적(2001)</li> <li>○ 안덕균, 원색한국본초도감, 교학사, 432, (2000)</li> <li>○ ww.tradimed.co.kr</li> <li>○ 지형준 외, 한약(생약)규격집 주해서, 한국메디칼인텍스사, 73p(1998)</li> <li>○ 원색한국식물도감, 교학사(1996)</li> <li>○ 이우철, 원색한국기준식물도감, 아카데미서적, (1996)</li> <li>○ 이창복, 대한식물도감, 향문사, (1997)</li> <li>○ 정태현, 한국식물도감, 신지사, (1958)</li> <li>○ 두산세계대백과 엔사이버</li> <li>○ 가공식품의 원료로 사용할 수 있는 동식물범위에 관한 연구, 한국식품공업협회 한국식품연구소, 14p(1994)</li> <li>○ Udaya Rajapaksha, Traditional Food Plants in Sri Lanka, Hector Kobbekaduwa Agrarian Research and Training Institute, (1998)</li> <li>○ Phyllis Balch Balch, 「Prescription For Nutritional Healing 3rd Edition」, Avery Publishing (2000)</li> </ul> |



## 2-2. 개발 경위

- 생강은 <타임지> 선정 세계 10대 향암식품이며 전 세계적으로 식품 및 의약품, 향신료 등으로 널리 이용되고 있으며 또한, 식의약 소재로서 소비자들에게 인지도가 높고 항염증, 항암, 인지기능 개선 등 다양한 기능성이 알려져 있음. 생강의 기능성 중에서 퇴행성 뇌질환의 기능성은 여러 차례 보고된 바 있는데 Musthafa et al(2012)<sup>7)</sup> 등에 따르면 생강 내 생리활성물질들은 아세틸콜린에스테레이즈를 저해한다는 보고가 있으며 이는 시냅스에서 아세틸콜린의 축적을 억제함으로 인지능 개선의 기능성을 나타낸다는 보고가 있다. 또한 생강의 생리활성 물질들은 기억력 관련 신경전달물질인 비 N-메틸-D-아스파르트산의 수용체의 과도한 자극은 예방하여 FREE 라디칼의 형성을 억제한다는 보고가 있음.
- 신청원료의 주성분인 파라돌은 생강내 미량으로 존재하는 유효성분이며 우수한 항산화 및 항암효과를 가짐. 파라돌은 쇼가올로부터 간세포조직의 cytosol fraction 중의 효소에 의해 생성되는 체내대사체이며 장내 미생물에 의해 생물전환됨으로써 생성되는 대사체로 쇼가올 대비 체내이용성이 높으며 매운맛이 없고 수용성이 높은 특성이 있어 식의약 소재로서 이용되기에 적합한 강점을 갖고 있음. Gaire 등(2015)<sup>8)</sup>에 따르면 6-파라돌은 신경염증성의 중추신경계장애를 개선할 수 있다는 연구결과를 보고한바 있는데 *in vitro* 실험에서 6-파라돌의 염증 개선 효과를 확인하였으며 향후 진저롤과는 달리 관능적으로 자극적이지 않은 치료제로 사용 가능성이 있다고 보고한바 있음.
- 본 개발 소재는 오랫동안 인류에 의해 이용된 생강을 원료로 하여 선행 연구 결과로 알려진 생강의 다양한 생리 기능성 중 ‘인지능력 개선’ 기능성을 강화하여 개발한 소재로서 2013년부터 생강 내 생리활성 물질의 증폭 및 효능 검증 연구 등을 통해 ICR 마우스를 이용한 동물 실험을 수행한바 있으며 2015년에는 임상 실험을 통한 인지능력 개선 여부를 확인하였음.

## 2-3. 국내·외 인정·허가 현황

### 2-3-1. 국내

- 원재료 ‘생강’은 식품의 원료로 사용 가능(식약처, 식품원재료 데이터베이스)
- 신청원료
  - 「식품공전: 등재되어 있지 않으나, 식품원재료 DB검색결과 ‘생강’으로 등재
  - 「식품첨가물공전」: 미등재
  - 「대한약전외한약(생약)규격집」: ‘생강’으로 등재  
생강 *Zingiber officinale* Roscoe (생강과 Zingiberaceae)의 신선한 뿌리줄기
- 건강기능식품 기능성원료 개별 인정(OO 90% 이상 함유 원료): ○ 건

※ 참고

- 식품공전, 식품첨가물공전, 건강기능식품공전
- 식품원재료 DB(<http://fse.foodnara.go.kr/origin/dbindex.jsp>) 참조



2-3-2. 국외 사용현황

- 중국약전(Pharmacopoeia of the People's Republic of china)에 등재

|        |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |
|--------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 품목명    | <i>Zingiberis rhizoma</i> / ginger rhizome                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |
| 기능성    | dyspepsia and prevention of motion sickness.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |
| 일일 섭취량 | <ul style="list-style-type: none"> <li>○ Unless otherwise prescribed: 2-4 g per day cut rhizome or dried extract.</li> <li>○ Powdered rhizome: 0.25-1.0 g, three times daily.</li> <li>○ Infusion or decoction: 0.25-1.0 g in 150 mL boiled water, three times daily.</li> <li>○ Fluidextract 1:1 (g/mL): 0.25-1.0 mL, three times daily.</li> <li>○ Tincture 1:5 (g/mL): 1.25-5.0 mL, three times daily. [Note: A standardized ginger extract (Zintona®) is dosed in 250 mg capsules, recommended at two capsules 30 minutes before expected onset of symptoms, then two capsules every four hours "to ease discomfort of digestive upset (or motion sickness)" (Tenne, 1999).]</li> </ul> |

- 중국 보건식품으로 “체력피로 완화” 카테고리 인정(국식건자 GSJZ 20060189: 2006.02.13, 만료: 2010.07.22)
- Mycelium of Paecilomyces hepali powder
- 유사원료 함유제품(제품명: Nuskin Pharmanex brand JUN-Pei capsule)
- 일일 섭취량 : 3.18 g/일
- 승인 기능성 : 육체적 피로 완화(Alleviating physical fatigue)
- 제조사 : Najing Potomak Beauty and Health prodcut Co., Ltd
- 미국 FDA ‘GRAS’ 등재(Code of Federal Regulations Title 21)
- EFSA / JECFA에 COSMETIC AND FLAVORING AGENT 등재
- EU SANCO FOOD FLAVORINGS에 등재




2-4. 국내외 사용 현황

2-4-1. 국내

<유통 판매 현황 표>

| 제품사진                                                                                | 제품명             | 제조사             | 일일 섭취량      | 표시 내용  | 섭취시 주의사항                                                            | 섭취 용도    | 기타 |
|-------------------------------------------------------------------------------------|-----------------|-----------------|-------------|--------|---------------------------------------------------------------------|----------|----|
|    | 생강 36.5°C 유자    | 천호식품            | 1일 2~3회     | 액상차    | 특정환자, 특이체질, 알러지체질 및 질환치료 중인 사람, 임산부의 경우에는 간혹 개인에 따라 과민반응이 나타날 수 있음. | 액상차      |    |
|    | 잡내를 잡아주는 서산생강소스 | cj 제일제당         | 조리 중 적당량 사용 | 소스류    |                                                                     |          |    |
|   | 봉동편강            | 영농조합법인 완주봉상생강조합 |             | 당절임 제품 | 냉동보관                                                                | 간식, 양념 등 |    |
|  | 오뚜기 꿀생강차        | 오뚜기             |             | 액상차    |                                                                     |          |    |

2-4-2. 국외

| 유통국    | 제품사진                                                                                | 제품명        | 제조사            | 일일섭취량        | 표시내용     | 섭취시 주의사항                                                                                        | 섭취용도     |
|--------|-------------------------------------------------------------------------------------|------------|----------------|--------------|----------|-------------------------------------------------------------------------------------------------|----------|
| CANADA |  | COBRA 6P   | BLACSTONE LABS | 1-2cap/Day   | Fat loss | Do not exceed four capsules daily.                                                              | Fat loss |
| USA    |  | PARADOXINE | GENABOLIX      | 40mg/serving | Fat loss |                                                                                                 | Fat loss |
| USA    |  | DIABLO     | ANS            | 2.5g         |          | 1. Not intended for use by persons under 18.<br>2. Do not exceed 3 scoops in any 24-hour period |          |

### 3. 제조방법 및 그에 관한 자료

#### 3-1. 원재료

- 생강, *Schizosaccaromyces pombe*, Yeast extract, Dextrose, 정제수

#### 3-2. 원재료 조성비

- 생강발효추출물 100%

#### 3-3. 개요

- 생강을 120도에서 4시간 열처리하고 열풍 건조 시킨 뒤 이를 분쇄하여 70%주정을 사용하여 추출한 뒤 주정을 제거하여 생강 농축액을 제조
- Yeast extract, dextrose 배지를 사용하여 *S. pombe*를 배양
- *S. pombe*와 생강농축액을 발효시켜 6-paradol을 생산 한 뒤 이를 동결건조하여 생강발효추출물 제조

#### 3-4. 제조공정표

- 1) 원재료: 생강은(*Zingiber officinale* Roscoe)은 충남 서산지역에서 생산된 생강의 표면의 흙을 수세, 완전히 제거하여 사용.
  - 2) 분쇄: 전기육절기사용 (MGB-32, FUJEE(주))
  - 3) 열처리: 고온고압 조리 및 멸균(살균)장치 (PRS 03-VG, KYUNGHAN CO., LTD.)
  - 4) 건조 및 분쇄: 열풍건조기 사용(HK-DO1000F, 한국종합기기제작소)
  - 5) 추출: 사용용매는 대한주정라이프로부터 순도 95% 주정을 구매하여 DW로 희석하여 final 70%로 만든 뒤 사용.
  - 6) 농축: 초고속 저온 농축 추출기 (COSMOS-660, 경서기계산업)
  - 7) ○ *S. pombe*는 식약처 식품원재료 데이터베이스에 등록된 식용 가능한 균주임을 확인
- 식품 첨가물: Yeast extract, dextrose는 식용가능 (식품품목제조보고서)
  - 배양방법: 고체배양 된 *S. pombe*를 1% yeast extract와 2% dextrose가 첨가된 배양액에 넣고 24시간 incubation 시킨 뒤 10%를 새로운 배양액에 옮기는 과정을 3번 반복



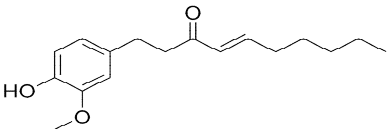
에서 주로 생산함. 생강은 지하경이 비대하여 만들어지는데 고온다습한 기후를 좋아하며 성장기에 물이 부족하면 생육이 나빠지므로 10~11월에 수확하여 12-15℃, 상대습도 65-75%에서 저장하여 연중 유통됨.

2) 성분 : Gingerol, shogaol 및 zingerone

3) 사용 : 독특한 향기와 매운맛으로 세계적으로 널리 애용되고 있는 기호성이 좋은 향신료로 날 생강, 건 생강, 추출물 및 정유등이 생강제품을 위한 소재로 널리 쓰임.

#### 4-2. 기능성분

○ 6-Shogaol

| 일반명     | 6-Shogaol                                                                          |
|---------|------------------------------------------------------------------------------------|
| 구조      |  |
| 분자식     | C <sub>17</sub> H <sub>24</sub> O <sub>3</sub>                                     |
| CAS NO. | 555-66-8                                                                           |
| 분자량     | 276.37                                                                             |
| 밀도      | 1.033 g/cm <sup>3</sup>                                                            |
| 끓는점     | 427.5℃ at 760 mmHg                                                                 |
| 인화점     | 150.3℃                                                                             |

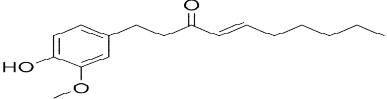
#### 5. 기능성분(또는 지표성분)에 대한 규격 및 시험방법에 관한 자료

##### 5-1. 기능성분(또는 지표성분)의 규격 및 근거

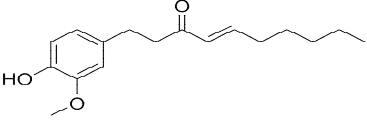
- 규격: 6-shogaol과 6-paradol의 총 함량이 8 mg/g 이상으로 그 중 6-paradol 함량이 6 mg/g 이상
- 설정근거: 생강발효추출물에는 6-shogaol과 6-paradol이 함유되어있다.

##### 5-2. 기능성분(또는 지표성분) 표준품 정보

○ 6-Shogaol 표준품

| 표준품 | 표준품명          | 6-Shogaol                                                                          |
|-----|---------------|------------------------------------------------------------------------------------|
|     | 구조식           |  |
| 자사  | CAS No.       | 555-66-8                                                                           |
|     | 순도            | 95% 이상                                                                             |
|     | 유통기한          |                                                                                    |
|     | 제공여부 확인서 제출여부 | <input type="checkbox"/> 아니오                                                       |

○ 6-Paradol 표준품

| 표준품 | 표준품명          | 6-Paradol                                                                           |
|-----|---------------|-------------------------------------------------------------------------------------|
|     | 구조식           |  |
| 자사  | CAS No.       | 27113-22-0                                                                          |
|     | 순도            | 95% 이상                                                                              |
|     | 유통기한          |                                                                                     |
|     | 제공여부 확인서 제출여부 | <input type="checkbox"/> 아니오                                                        |

○ 6-Paradol의 합성 및 구조 동정 방법

- 1) 표준품 6-shogaol 150 mg(0.543 mmol)을 메탄올 5 mL에 녹인 후 10% palladium on charcoal 29 mg(0.027 mmol)을 넣고, 수소풍선을 이용한 수소 기류하에서 1시간 교반함.
- 2) TLC를 이용하여 반응의 완결을 확인한 후 반응용액을 celite 패드를 통과시켜 palladium을 제거하고 여액을 감압농축함. 남은 오일상의 물질을 실리카겔 컬럼 크로마토그래피를 통해서 분리, 정제하여 합성 6-paradol(142 mg, 94%) 표준품을 제조함.
- 3) 합성된 6-paradol은 <sup>1</sup>H-NMR과 <sup>13</sup>C-NMR (Bruker, 600 MHz)을 이용하여 구조를 확인함.

○ 합성 6-Paradol 표준품의 구조 동정 결과

- 1) 합성한 6-paradol의  $^1\text{H-NMR}$ (그림 1)과  $^{13}\text{C-NMR}$ (그림 2)을 이용한 구조 동정 결과
- 2)  $^1\text{H-NMR}$  (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  6.83 (d,  $J=8.4$ , 1H), 0.69 - 0.63 (m, 2H), 5.50 (s, 1H), 3.87 (s, 3H), 2.82 (t,  $J = 7.2$ , 2H), 2.69 (t,  $J = 7.2$ , 2H), 2.37 (t,  $J = 7.8$ , 2H) 1.58 - 1.53 (m, 2H), 1.30 - 1.28 (m, 8H) 0.88 (t,  $J = 7.2$ , 3H) MS (ESI)  $m/z$  277  $[\text{M}]^+$  임.

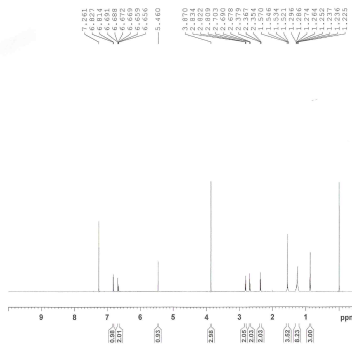


그림 1. 6-Paradol의  $^1\text{H-NMR}$  spectrum

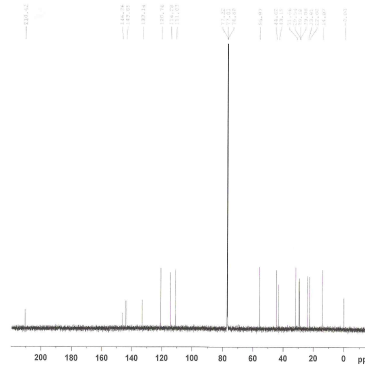


그림 2. 6-Paradol의  $^{13}\text{C-NMR}$  spectrum

### 5-3 기능성분(또는 지표성분) 시험방법

#### 5-3-1. 장비와 재료

- 진탕기, HPLC용 유리병, 일회용 실린지, 여과용 멤브레인필터(PTFE, 0.45  $\mu\text{m}$ ), 초음파 진탕기

#### 5-3-2. 분석장비

- HPLC

#### 5-3-3. 표준물질 및 일반시약

- 표준물질 : 6-Shogaol (분자식 :  $\text{C}_{17}\text{H}_{24}\text{O}_3$  분자량 : 276.37, CAS No. : 555-66-98)과 6-paradol (6-paradol 분자식:  $\text{C}_{17}\text{H}_{26}\text{O}_3$  분자량: 278.39, CAS No. : 27113-22-0)
- 일반시약 : 증류수, 아세토나이트릴, 메탄올

#### 5-3-4. 실험과정

- 표준용액 제조: 표준물질 적정량을 HPLC grade급의 Methanol로 1.0 mg/mL가 되게 녹여 표준원액으로 한다.
- 상기 용액을 진탕하여 녹인 후 methanol로 희석하여 표준용액으로 한다.(예:



0.01, 0.025, 0.05, 0.1, 0.25 mg/mL)

5-3-5. 시험용액 제조

- 검체 1 g을 (동결건조분말 1 g)을 취한 후 HPLC 급 methanol 10 mL을 넣는다. (100 mg/mL)
- 초음파 진탕기에서 충분히 녹인다.
- Methanol 9 mL에 잘 녹여진 검체 1 mL을 넣고 충분히 진탕시킨다.
- 잘 녹여진 검체 1 mL을 멤브레인 필터로 여과하여 시험용액으로 한다.

■ 자사시험방법

<시험방법>

1. 장비와 재료

1-1. 실험실 장비 및 소모품

진탕기(Voltex), HPLC용 유리병, 용매용 일회용 실린지, 여과용 필터(PTFE, 0.45 μm), 초음파진탕기

1-2. 분석장비

고속액체크로마토그래프, 자외부흡광광도검출기(UV Detector), Eclipse XDB-C<sub>18</sub>(4.6mm × 250 mm, 5μm) 또는 이와 동등한 것

2. 표준물질 및 일반시약

2-1. 표준물질

- 6-shogaol 분자식 : C<sub>17</sub>H<sub>24</sub>O<sub>3</sub> 분자량 : 276.37, CAS No. : 555-66-98
- 6-paradol 분자식: C<sub>17</sub>H<sub>26</sub>O<sub>3</sub> 분자량 : 278.39, CAS No. : 27113-22-0

2-2. 일반시약

증류수(Water, HPLC grade), 아세토니트릴(Acetonitrile, HPLC grade), 메탄올(Methanol, HPLC grade)

3. 시험과정

3-1. 표준용액 제조

- 3-1-1. 표준물질 적정량을 HPLC grade급의 Methanol로 1.0 mg/mL가 되게 녹여 표준원액으로 한다.
- 3-1-2. 상기 용액을 진탕하여 녹인 후 methanol로 희석하여 표준용액으로 한다.(예: 0.01, 0.025, 0.05, 0.1, 0.25 mg/mL)

3-2 시험용액 제조

- 3-2-1. 검체 1 g을 (동결건조분말 1 g)을 취한 후 HPLC 급 methanol 10 mL을 넣는다. (100 mg/mL)
- 3-2-2. 초음파 진탕기에서 충분히 녹인다.
- 3-2-3. Methanol 9 mL에 잘 녹여진 검체 1 mL을 넣고 충분히 진탕시킨다.
- 3-2-4. 잘 녹여진 검체 1 mL을 멤브레인 필터로 여과하여 시험용액으로 한다.

#### 4. 분석 및 계산

##### 4-1. 기기분석

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

표 1. 고속액체크로마토그래프 조건

| Parameters | Conditions                               |
|------------|------------------------------------------|
| 컬럼         | Eclipse XDB-C <sub>18</sub> (4.6×250 mm) |
| 흡광도 측정값    | 225 nm                                   |
| 주입 용량      | 20 µL                                    |
| 유속         | 1.0 mL/min                               |

표 2. 이동상 조건

| 시간 (분) | 용매    |       |
|--------|-------|-------|
|        | A (%) | B (%) |
| 12     | 35    | 65    |
| 18     | 20    | 80    |
| 32     | 20    | 80    |
| 33     | 55    | 45    |
| 35     | 55    | 45    |

##### 4-2. 계산

6-paradol 함량(mg/g) = 표준곡선을 작성하였으며, 상관계수(R<sup>2</sup>) 0.99이상의 분석값을 채택

#### 6. 안전성에 관한 자료

##### 6-1. 섭취근거 정보

- 근거내용 : HED= animal dos in mg/kg (animal weight in kg/human weight in kg)<sup>0.33</sup> - July 2005 Pharmacology and Toxicology의 Guidance for Industry 근거로 *in vivo*에서 효능이 우수한 100 mg/kg을 기준으로 섭취량 계산
- 섭취량 계산 : 100 mg/kg × (0.03/60)<sup>0.33</sup> = 8.140 mg/kg  
60 kg체중 기준 : 488.4 mg

## 6-2. 기능성분 및 관련물질의 안전성(부작용·독성 등) DB 검색 정보

| 검색 데이터베이스                              | 검색어                               | 검색결과 | 안전성 관련 정보 여부 | 첨부번호 |
|----------------------------------------|-----------------------------------|------|--------------|------|
| Toxnet                                 | (6-paradol) and (safety or toxic) | X    | X            |      |
| Pubmed                                 | (6-paradol) and (safety or toxic) | X    | X            |      |
| Pdr health                             | (6-paradol) and (safety or toxic) | X    | X            |      |
| Isi citation indexes at web of science | (6-paradol) and (safety or toxic) | X    | X            |      |

## 6-3. 섭취량 평가 정보

- 제시한 일일섭취량 : ‘생강발효추출물’로 500 mg/일
- 발효식품 특허분석 보고서(농림수산물교육문화정보원, 2014)에 따르면 우리나라 연간 김치 총 소비량은 140~150만톤으로 김치에 사용되는 생물자원으로서 생강이 있음. 그 중에서 생강은 배추 다음으로 2번째로 김치에 많이 이용되는 생물자원으로 보고되고 있으며, 평균적으로 배추 2포기당 생강 5g이 들어가는 것으로 알려져 있으며(대상 에프앤에프), 2포기에 약 3 kg 이므로, 김치 3 kg 당 생강 5 g 이 포함되는 것으로 알려져 있음.

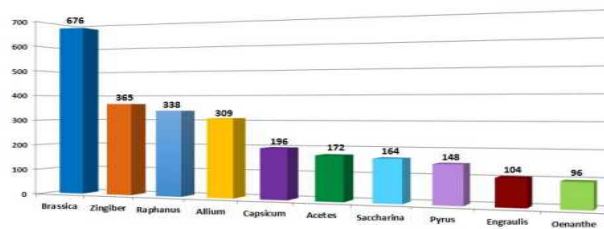


그림 4-2. 김치류와 관련한 특허의 생물자원종 이용 현황

- 보건복지부 자료에 따르면 2011년 국민 1인당 1일 김치 소비량은 68.6 g으로 생강원물로 환산하면 1일당 114 mg의 생강을 김치로 섭취함<sup>9)</sup>.
- 농촌진흥청에 의하면 국내에서 생강은 2013년까지 연간 16,000 ~18,000톤 정도의 생산량을 가지고 있으며 현재 인구 5022만명을 기준으로 국민1인당 358g을 소비하며, 국민 1인당 1일 소비량은 0.98g으로 계산할 수 있음.
- 전통적 사용량과의 비교

| 문헌 및 자료 | 복용방법 | 복용량      |
|---------|------|----------|
| 중약대사전   | 말린생강 | 1.9~6g/일 |

- 과학적 문헌에 의한 비교 결과 임신부의 오심 및 구토증상 개선을 위한 생강건조 분말의 섭취량은 1일 1.0~2.5 g으로 3~7일간 섭취한 9건의 연구결과에서 유의적으로 생강 섭취군의 오심 및 구토증상이 개선됨<sup>10)</sup>.
- Chittumma 등의 연구에서는 재태기간 16주 미만의 오심 증상이 있는 태국인 임산부 126명에게 생강 건조분말 1.95 g을 4일간 섭취시킨 결과 생강 섭취 그룹에서 유의하게 개선되었음<sup>11)</sup>.

Table 1. Characteristics of studies included for systematic review

| Ref                                              | Study type <sup>1)</sup> | Target                 | Subject no. | Population relevance | Dose (g) | Duration or time | Result <sup>2)</sup> | Quality score |
|--------------------------------------------------|--------------------------|------------------------|-------------|----------------------|----------|------------------|----------------------|---------------|
| Sripromote M, et al., 2003 <sup>11)</sup>        | RCT                      | Pregnant               | 138         | Thai                 | 1.5      | 3 days           | +                    | 3             |
| Ensiyeh J, et al., 2009 <sup>10)</sup>           | RCT                      | Pregnant               | 70          | Iranian              | 1        | 4 days           | +                    | 3             |
| Chittumma P, et al., 2007 <sup>12)</sup>         | RCT                      | Pregnant               | 126         | Thai                 | 1.95     | 4 days           | +                    | 3             |
| Pongrojipaw D, et al., 2009 <sup>13)</sup>       | RCT                      | Pregnant               | 170         | Thai                 | 1        | 7 days           | +                    | -2            |
| Vulyovaniich T, et al., 2001 <sup>14)</sup>      | RCT                      | Pregnant               | 70          | Thai                 | 1        | 4 days           | +                    | 4             |
| Vutyavanich T, et al., 2001 <sup>15)</sup>       | RCT                      | Pregnant               | 70          | Thai                 | 1        | 4 days           | +                    | -1            |
| Basrat Z, et al., 2009 <sup>16)</sup>            | RCT                      | Pregnant               | 65          | Iranian              | 2.5      | 4 days           | +                    | 1             |
| Ozgul G, et al., 2009 <sup>17)</sup>             | RCT                      | Pregnant               | 70          | Iranian              | 1        | 4 days           | +                    | 2             |
| Fischer-Rasmussen W, et al., 1991 <sup>18)</sup> | RCT                      | Pregnant               | 30          | Danish               | 1        | 4 days           | +                    | 2             |
| Weimer K, et al., 2012 <sup>19)</sup>            | RCT                      | Healthy                | 64          | German               | 1        | 1 time           | ∅                    | -2            |
| Grontved A, et al., 1988 <sup>20)</sup>          | RCT                      | Healthy (naval cadets) | 80          | Danish               | 1        | 1 time           | +                    | -3            |
| Schmid R, et al., 1994 <sup>21)</sup>            | RCT                      | Healthy (tourist)      | 1,741       | Norwegian            | 0.25     | 2 times          | +                    | -1            |

1) RCT: randomized clinical trial 2) +: significant improvement in nausea or vomiting, ∅: no significant improvement in nausea or vomiting

- 생 생강 (1 kg) → 건조생강 (90 g) → 생강 농축액 (60 mL) → 생강발효추출물 (9 g) → 하루 섭취량 500 mg
- 원재료 (생강)로서 1일 50 g 이상 섭취하는 것에 해당 됨.

※ 신청원료의 제안 섭취량

- 일일 섭취량 : 500 mg/일
- 생강 원물로 환산 시 :40-60 g/일 (수율 0.9 %)

6-4. 영양평가, 생물학적 유용성, 인체적용시험 정보

- 영양평가 정보
  - 많은 양을 복용하면 위장 장애를 일으킬 수 있음
  - 혈액 응고를 방해하는 약을 복용한 환자는 전문의와 상담이 필요함
- 생물학적 유용성 정보
  - 생강 섭취 후 생강 성분 중 진저롤, 갈라노락톤이 세로토닌 수용체(3-HT3 receptor)의 작용을 억제하여 멀미와 오심 등의 증상을 유의적으로 완화하는 것이 확인되었음<sup>12,13)</sup>
  - 생강 추출물이 기니아픽의 심장에서 심근의 수축력을 증가시킴<sup>14)</sup>
  - 생강의 신미성분인 6-shogaol이 자발성 운동 활성의 저해, 해열진통효과, hexobarbital에 의한 수면 시간 연장 등의 효과가 있음을 보고한바 있고, in situ 에서 위 수축을 억제하고 낮은 용량에서 혈압강하 작용을 나타냄<sup>15)</sup>.

## 7. 섭취량, 섭취 시 주의사항 및 그 설정에 관한 자료

### 7-1. 섭취근거정보

- 섭취량 : 500 mg
- 근거내용 : HED= animal dos in mg/kg (animal weight in kg/human weight in kg)<sup>0.33</sup> - July 2005 Pharmacology and Toxicology의 Guidance for Industry 근거로 *in vivo*에서 효능이 우수한 100 mg/kg을 기준으로 섭취량 계산
- 섭취량 계산 :  $100 \text{ mg/kg} \times (0.03/60)^{0.33} = 8.140 \text{ mg/kg}$   
60 kg체중 기준 : 488.4 mg

### 7-2. 섭취 방법

- 인체임상 섭취방법에 따라 식사 전 섭취.

### 7-3. 섭취 시 주의사항

- 임산부와 수유기 여성의 섭취는 피하는 것이 좋습니다.
- 간장, 신장, 심장 등의 기능에 이상이 있는 경우 섭취 시 주의하시기 바랍니다.

## 8. 의약품과 같거나 유사하지 않음을 확인하는 자료

### 8-1. 의약품과 같거나 유사한 건강기능식품 여부

- 「건강기능식품의 기준 및 규격(식약처 고시 제2013-207호, '13.08.16)」 제 2.1-1 '건강기능식품 제조에 사용할 수 없는 원료'에 해당하지 않음

### 8-2. 의약품과 같거나 유사한 건강기능식품 여부

- 「건강기능식품의 기준 및 규격(식약처 고시 제2013-207호, '13.08.16)」 제 2.1-1 '건강기능식품 제조에 사용할 수 없는 원료' 2)의약품의 용도로만 사용되는 원료 등 섭취방법 또는 섭취량에 대해 의·약학적 전문 지식을 필요로 하는 것에 해당하지 않음

### ※ 참조

- 보건복지부 홈페이지(<http://www.mw.go.kr>) > 법령자료 참조
- EZ drug : <http://ezdrug.mfds.go.kr>

2. 인체적용시험계획서 [첨부]

## 인 체 적 용 시 험 계 획 서

생강발효추출물의 인지기능에 대한 유효성 및 안전성을 평가하기 위한 12 주간  
무작위배정, 이중눈가림, 위약 대조 인체적용시험

|           |                              |
|-----------|------------------------------|
| 인체적용시험용제품 | 생강발효추출물, 위약                  |
| 시험계획서번호   | CTCF2_2015_FGE (Version 1.0) |
| 시험단계      | 인체적용시험                       |
| 시험계획서작성일  | 2015. 09. 15                 |
| 시험기관      | 전북대학교병원 기능성식품임상시험지원센터        |

본 인체적용시험계획서에 포함되어 있는 모든 정보는 시험책임자 및 시험담당자, 심사위원회, 보건당국을 위해 제공된 것으로서, 인체적용시험용제품을 제공받은 사람에게 시험참가에 대한 서면동의를 받기 위한 경우를 제외하고는 한국식품연구원 사전서면동의 없이 제 3 자에게 공개될 수 없습니다.

기 밀 문 서

❖ 인체적용시험계획서 개요

|         |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |
|---------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 제 목     | <p>생강발효추출물 섭취 시 인지기능에 대한 유효성 및 안전성을 평가하기 위한 12 주간 무작위배정, 이중눈가림, 위약 대조 인체적용시험</p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |
| 목 적     | <p>생강발효추출물 또는 위약을 1 일 3 회 섭취할 때 나타나는 다음 평가항목의 변화를 관찰함으로써 그 유효성 및 안전성을 비교 평가한다.</p> <p>■ 1차 목적</p> <p>객관적 신경인지검사(Computerized neurocognitive function test: CNT)와 과거회상기억 및 미래예측기억(Prospective and Retrospective Memory Questionnaire; PRMQ)으로 평가되는 생강발효추출물의 인지기능 개선에 대한 유효성을 위약 섭취와 비교 평가 한다.</p> <p>■ 2차 목적</p> <p>혈중 뇌유래신경영양인자(Brain-Derived Neurotrophic Factor; BDNF), C-Reactive Protein (C-반응성 단백질), 스트레스검사 (Perceived Stress Scale; PSS)로 평가되는 생강발효추출물의 인지기능 개선에 대한 유효성 및 안전성을 위약 섭취와 비교 평가하고자 한다. 또한 BDNF 에 대한 영향이 각 개인의 BDNF 에 관련된 유전적 다형성(BDNF Val66Met polymorphism)과 관련이 있는지 조사하고자 한다.</p> |
| 시 험 기 관 | <p>전북대학교병원 기능성식품임상시험지원센터</p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |
| 의 퇴 자   | <p>한국식품연구원</p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |
| 연구대상자   | <p>선정기준</p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |

|                           |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |
|---------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <p><b>선 정 기 준</b></p>     | <ol style="list-style-type: none"> <li>1) 스크리닝 검사 당시 연령이 만 50~64 세이며 중졸 이상의 학력을 가진 연구대상자(가능하다면 컴퓨터를 다루어 본 경험이 있는 자)</li> <li>2) 간이정신상태검사(Mini-Mental Status Examination-Korean; MMSE-K) 를 통한 인지기능이 정상범위인 자(MMSE-K; ≥24 점)</li> <li>3) 이상체중(ideal body weight)±30% 이내 체중인 자<br/>       ⇨ 이상체중(ideal body weight) = (신장 cm - 100)× 0.9</li> <li>4) 본 인체적용시험에 대한 자세한 설명을 듣고 완전히 이해한 후, 자의로 참여를 결정하고 주의사항을 준수하기로 서면 동의한 자</li> </ol>                                                                                                                                                                                              |
| <p><b>연구대상자 제외 기준</b></p> | <p><b>제외기준</b></p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1) 스크리닝 시 시행되는 정신장애의 진단 및 통계 편람의 구조화된 임상면담인 SCID (Structured Clinical Interview for DSM-IV) 에서 축 1 장애로 현재 치료를 받거나 최근 3 년 이내에 치료받은 과거력이 있는 자</li> <li>2) 최근 3 개월 이내에 알코올 남용이나 의존이 있는 자</li> <li>3) 인체적용시험용제품의 흡수에 영향을 줄 수 있는 위장관계 질환(예: 크론씨병)이나 위장관계수술(단, 단순충수돌기절제술이나 탈장수술은 제외) 과거력이 있는 자</li> <li>4) 임상적으로 유의한 다음과 같은 만성 질병이 있는 자 (간질, 정신지체, 뇌신경계 질환, 내분비계 질환, 혈액·악성종양, 심혈관계 질환 등. 단, 시험책임자의 판단에 따라 연구대상자의 상태를 고려하여 본 연구에 참여 할 수 있다.)</li> <li>5) 진단검사의학검사에서 다음에 해당하는 결과를 보이는 자<br/>       ⇨ AST, ALT &gt; 정상범위 상한치의 2 배<br/>       ⇨ 기타 유의한 진단검사의학검사 소견</li> </ol> |



|                |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |
|----------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|                | <p>6) 인체적용시험용제품에 대한 과민반응 혹은 임상적으로 유의한 과민반응 병력이 있는 자</p> <p>7) 최근 한 달 이내에 인지기능 개선 관련 건강기능식품을 복용한 경우(단, 시험자의 판단에 따라 다른 조건이 합당한 경우는 인체적용시험에 참여할 수 있다.)</p> <p>8) 첫 섭취일 전 2 주 이내에 어떠한 전문의약품이나 한약을 복용하였거나, 1 주 이내에 어떠한 일반의약품(OTC) 또는 비타민 제제를 복용한 자(단, 시험자의 판단에 따라 다른 조건이 합당한 경우는 인체적용시험에 참여할 수 있다.)</p> <p>9) 첫 섭취일 전 2 개월 이내에 타 인체적용시험에 참여한 자</p> <p>10) 첫 섭취일 전 1 개월 이내에 전혈 헌혈을 하였거나, 2 주 이내에 성분헌혈을 한 자</p>               |
| <p>연구대상자 수</p> | <p>군별 30 명씩 총 60 명</p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
| <p>시험방법</p>    | <p>생강발효추출물 및 위약 섭취</p> <p>생강발효추출물 섭취군: 1 일 1 회, 아침, 저녁 식후 섭취<br/>(생강발효추출물로서 500 mg/day)</p> <p>위약 섭취군: 1 일 1 회, 아침 저녁 식후 섭취</p> <p>시험방법</p> <p>A randomized double-blind, parallel, placebo-controlled study</p> <p>본 인체적용시험은 12 주간 무작위배정, 이중눈가림, 위약 대조로 진행한다.</p> <p>[제-28 일 ~ 제 0 일] 자원자에 한하여 인체적용시험 예정일(제 1 일)로부터 4 주 이내(제-28 일 ~ 제 0 일)에 정신건강의학과적 면담, 신체검진, 진단검사의학검사, MMSE-K 등 스크리닝 검사를 시행하여 본 인체적용시험에 연구대상자로서</p> |

적합하다고 판단되는 자를 선정한다.

[1 차 방문] 연구대상자는 제 1 일(0 주) 전북대학교병원 기능성식품임상시험지원센터에 방문하여 정해진 검사를 수행한다. 연구대상자는 randomly permuted blocks 방법을 통해 생강발효추출물 섭취군과 위약 섭취군에 각 30 명씩 무작위배정되며 6 주 분량의 인체적용시험용제품(생강발효추출물, 위약)을 제공받는다. 이후 6 주 간 하루 2 회 아침, 저녁 식후 인체적용시험용제품을 복용하며 일상생활을 한다.

[2 차 방문] 연구대상자는 제 43 일(6 주) 전북대학교병원 기능성식품임상시험지원센터에 방문하여 정해진 검사를 실시한다. 지난 6 주간 복용하고 남은 인체적용시험용제품을 포장용기와 함께 반납하고 다시 6 주 분량의 인체적용시험용제품(생강발효추출물, 위약)을 제공받는다. 이후 6 주 간 하루 2 회 아침, 저녁 식후 인체적용시험용제품을 복용하며 일상생활을 한다.

[3 차 방문] 연구대상자는 제 85 일(12 주) 전북대학교병원 기능성식품임상시험지원센터에 방문하여 정해진 검사를 받는다. 지난 6 주간 복용하고 남은 인체적용시험용제품을 포장용기와 함께 반납하고 총 12 주간의 인체적용시험을 마친다.



평가 방법

1) 안전성 평가

- 자-타각 증상 등 이상반응(Adverse Events) 모니터링
- 진단검사의학검사

- 활력징후 및 신체검진

## 2) 유효성 평가

정해진 일정에 따라 다음 항목들을 평가한다.

### 1) 1 차 유효성 평가변수

- 객관적 인지검사(Computerized neurocognitive function test; CNT)
- 과거회상기억 및 미래예측기억(Prospective and retrospective memory questionnaire; PRMQ)

### 2) 2 차 유효성 평가변수

- 혈중 뇌유래신경영양인자 (Brain-derived neurotrophic factor; BDNF)
- 혈중 C- 반응성 단백 (C-Reactive Protein; CRP)
- BDNF 유전자 다형성 (BDNF Val66 Met polymorphism) 검사
- 스트레스 검사(Perceived stress scale; PSS)
- 삶의 질 설문지 검사(WHOQOL-BREF)

❖ 일정요약

| 일정<br>항목                                   | 스크리닝                      | 투여기간       |             |              |
|--------------------------------------------|---------------------------|------------|-------------|--------------|
|                                            | -4 주 이내                   | 1 차 방문     | 2 차 방문      | 3 차 방문       |
|                                            | 제-28 일~ -1 일              | 0 주(제 1 일) | 6 주(제 43 일) | 12 주(제 85 일) |
| 서면동의서, 인구학적 조사 <sup>1)</sup> , 병력 조사       | ●                         |            |             |              |
| 정신건강의학과적 면담 및 MMSE-K                       | ●                         |            |             |              |
| 선형/재외기준 확인                                 | ●                         | ●          |             |              |
| 무작위배정                                      |                           | ●          |             |              |
| 약물투여력 조사                                   | ●                         | ●          | ●           | ●            |
| 신체검진                                       | ●                         |            |             | ●            |
| 의학적 상태 변화 조사                               |                           | ●          | ●           | ●            |
| 활력징후 <sup>2)</sup>                         | ●                         | ●          | ●           | ●            |
| 신체계측 <sup>3)</sup>                         | ●                         |            |             | ●            |
| 심전도 <sup>4)</sup> 및 진단검사의학검사 <sup>4)</sup> | ●                         |            |             | ●            |
| 임신반응검사 <sup>5)</sup>                       | ●                         |            |             | ●            |
| 인지기능검사                                     | 신경인지검사(CNT) <sup>6)</sup> | ●          |             | ●            |
|                                            | PRMQ                      | ●          | ●           | ●            |
| BDNF <sup>7)</sup>                         | ●                         |            |             | ●            |
| BDNF polymorphism <sup>7)</sup>            | ●                         |            |             |              |
| C-Reactive Protein <sup>7)</sup>           | ●                         |            |             | ●            |
| PSS, 삶의 질 설문지(WHOQOL-BREF) 검사              |                           | ●          | ●           | ●            |
| 식이기록지 배부                                   | ●                         |            | ●           |              |
| 식이섭취조사 <sup>8)</sup>                       |                           | ●          |             | ●            |
| 인체적용시험용제품 제공                               |                           | ●          | ●           |              |
| 반납제품 회수, 순응도 평가, 이상반응 확인                   |                           |            | ●           | ●            |

1) 인구학적 조사: 연구대상자의 연령, 체중, 키 등을 조사한다.  
 2) 활력징후(활압, 맥박수)를 측정한다.  
 3) 신체계측: 신장(스크리닝시에만 측정), 체중, 체질량지수(BMI, kg/m<sup>2</sup>)  
 4) 진단검사의학검사항목  
 ■ 혈액학적 검사: WBC, RBC, Hemoglobin, Hematocrit, Platelets counts  
 ■ 혈액생화학적 검사: total bilirubin, alkaline phosphatase, AST, ALT, gamma-GT, total-protein, albumin, BUN, creatinine, uric acid, cholesterol, triglyceride, LDL-cholesterol, HDL-cholesterol, Glucose,  
 ■ 뇨 검사: specific gravity, pH, protein, ketone, glucose, bilirubin, urobilinogen, nitrite, microscopic(RBC, WBC)  
 ■ 연구대상자는 매 방문 마다 공복상태에서 각 검사를 진행  
 5) 임신반응검사: 가임 여성에 한해 실시한다.  
 6) 인지기능 검사: 1차 방문 검사는 스크리닝 기간에 시행하는 것을 허용함. 동일한 순서로 하루에 검사를 시행해야 함.  
 7) BDNF, BDNF polymorphism, C-Reactive Protein: 공복상태에서 검사를 시행하고, 인지기능 검사 전에 stress 없는 상태에서 진행한다.  
 8) 식사기록지 작성법: 1차, 3차 방문 전 3일(평일 2일, 주말 1일)동안 섭취한 모든 음식, 음료수를 기록한다.  
 \* 스크리닝 전 2개월 이내의 검사결과로 대체할 수 있다.

### 3. 생강발효추출물 인체적용시험을 위한 인체시험윤리위원회 승인 [현부]

#### 통지서 (신속심사)

※ 본 과제의 문서보존기간은 3 년입니다.

|              |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |
|--------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 수신           | 의뢰기관 한국식품연구원                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |
|              | 연구책임자 정신과 정영철                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |
| IRB File No. | CUH 2015-12-016-002                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |
| 심사내용         | 시정계획서                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |
| 통지일자         | 2016년 02월 03일                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |
| 연구<br>과제명    | <p>국문: 생강발효추출물의 인지기능 개선에 대한 유효성 및 안전성을 평가하기 위한 12주, 무작위배정, 이중눈가림, 위약 대조 인체적용시험</p> <p>영문: A 12-week, randomized, double-blind, placebo-controlled human trial to evaluate the efficacy and safety of ginger fermented extract on improvement of Cognitive Function</p>                                                                             |
| 임상시험코드       | Study Nick Name                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |
| 분류1          | <input type="checkbox"/> 약물 <input type="checkbox"/> 생물학적 제제 <input type="checkbox"/> 세포치료제 <input checked="" type="checkbox"/> 건강기능식품 <input type="checkbox"/> 의료기술<br><input type="checkbox"/> 의료기기 ( <input type="radio"/> 1등급 <input type="radio"/> 2등급 <input type="radio"/> 3등급 <input type="radio"/> 4등급 ) <input type="checkbox"/> 해당사항 없음 |
| 연구<br>분류     | <input checked="" type="checkbox"/> 인간대상연구 <input checked="" type="checkbox"/> 인체유래물(검체)연구 <input type="checkbox"/> 의무기록 연구 <input checked="" type="checkbox"/> 유전자 연구 <input type="checkbox"/> 유전자 치료<br><input type="checkbox"/> 배아 연구 <input type="checkbox"/> 체세포복제배아연구 <input type="checkbox"/> 줄기세포주연구 <input type="checkbox"/> 기타           |
| 분류3          | <input checked="" type="radio"/> 전향적 연구 <input type="radio"/> 후향적 연구 <input type="radio"/> 전향적 & 후향적 병행연구                                                                                                                                                                                                                                          |
| 분류4          | <input checked="" type="checkbox"/> 중재연구 <input type="checkbox"/> 설문조사 <input type="checkbox"/> 자료분석 및 분석연구 <input type="checkbox"/> 기타<br><input type="checkbox"/> 관찰연구 ( <input type="checkbox"/> 단면연구 <input type="checkbox"/> 환자대조군연구 <input type="checkbox"/> 코호트 연구 )                                                                        |
| 분류5          | <input type="checkbox"/> 인간을 대상으로 하지 않는 연구 Non-clinical study (in vitro, in vivo preclinical study)                                                                                                                                                                                                                                                |
| 일반명          | 상품명                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |
| 시험자중례수       | 전체 60 명 국내 60 명 본원 60 명                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |
| 연구승인기간       | 2016년 02월 02일 ~ 2017년 02월 01일                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |
| 지원(의뢰)기관     | 기관명 한국식품연구원 대표 윤석후 직위                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |
| 제목           | CTCF2_2015_GFE_심사_답변서_final<br>CTCF2_2015_GFE_ver.1.1_final                                                                                                                                                                                                                                                                                        |
| 제출<br>서류     | 추가기술                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |
| 관련근거         | 평가일자 2016.02.02                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |
| 중간보고시기       | 2016년 12월 01일까지 비교                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
| 심사결과         | <input checked="" type="radio"/> 승인 <input type="radio"/> 시정승인<br><p>시정 요청 사항이 적절하게 반영된 것으로 판단하여 본 연구를 승인합니다.</p>                                                                                                                                                                                                                                  |
| 첨부파일         | 추가기술                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |

- ☒ 본 위원회는 국제 임상시험 통일안(ICH) 및 임상시험관리기준(GCP)을 준수합니다.
- ☒ 생명의학연구윤리심의위원회(정식회의)에서 재평가하여 변경이나 보약을 요청할 수 있습니다.
- ☒ 본 위원회에서 지정한 중간보고시기에 중간보고를, 연구종료 시 종료 및 결과보고서를 작성하여 제출해 주시기 바랍니다.
- ☒ 연구 중 중대한 이상반응(Adverse Event)이 발생할 경우 연구책임자는 본 위원회에 즉시 보고해야 합니다.
- ☒ 임상시험실시기관의 사전 서면동의 없이는 어떤 경우라도(학술목적 제외) 실시기관명을 사용할 수 없습니다.
- ☒ 본 통지서는 KQCP 제 13조 ①항에 따른 심사 통보서로 사용할 수 있습니다.

전북대학교병원 생명의학연구윤리심의위원회위원장

4. 생강발효추출물의 인체적용시험 결과 보고서 [첨부]

|          |                |
|----------|----------------|
| 계획서번호    | CTCF2_2015_GFE |
| 인체적용시험품명 | 생강발효추출물<br>위약  |

## 인 체 적 용 시 험 결 과 보 고 서

생강발효추출물의 인지기능 개선에 대한 유효성 및 안전성을 평가하기 위한  
12 주, 무작위배정, 이중눈가림, 위약 대조 인체적용시험

2016 년 12 월

본 인체적용시험계획서에 포함되어 있는 모든 정보는 시험책임자 및 시험담당자, 심사위원회, 보건당국을 위해 제공된 것으로서, 인체적용시험용제품을 제공받은 사람에게 시험참가에 대한 서면동의를 받기 위한 경우를 제외하고는 한국식품연구원 사전서면동의 없이 제 3 자에게 공개될 수 없습니다.

기 밀 문 서

## ■ 인 체 적 용 시 험 결 과 보 고 서

|            |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |
|------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 인체적용시험제목   | 생강발효추출물의 인지기능 개선에 대한 유효성 및 안전성을 평가하기 위한 12 주, 무작위배정, 이중눈가림, 위약 대조 인체적용시험                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |
| 단계         | 인체적용시험                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |
| 인체적용시험실시기관 | : 전북대학교병원 기능성식품임상시험지원센터                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
| 시험책임자      | : 전북대학교 의학전문대학원 정신건강의학교실<br>정 영 철 MD, PhD<br>전북대학교 의학전문대학원 약리학교실 교수<br>채 수 완 MD, PhD                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |
| 공동연구책임자    | : 전북대학교병원 기능성식품임상시험지원센터 연구교수<br>최 은 경 MD, PhD                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |
| 시험담당자      | : 전북대학교병원 기능성식품임상시험지원센터<br>정은수, 황지현, 김우림, 박미현, 노순옥, 최재순<br>전북대학교병원 정신건강의학교실 윤선아, 신혜선                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |
| 의뢰자        | : 한국식품연구원                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |
| 인체적용시험용제품명 | : 인체적용시험용제품 - 생강발효추출물<br>대조제품 - 위약                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |
| 시험방법       | : <b>[Screening]</b> 시험자는 자원자에 한하여 인체적용시험 예정일(제 1일)로부터 3주 이내(제 -28일~-1일)에 문진, 신체검진, 진단검사의학 검사 등 스크리닝 검사를 시행하였고 본 인체적용시험에 연구대상자로서 적합하다고 판단되는 자를 선정하였다.<br><br><b>A randomized double-blind, parallel, placebo-controlled study</b><br><br>본 인체적용시험은 12주, 무작위배정, 이중눈가림, 위약 대조로 진행하였다.<br><br><b>[제-28일 ~ 제0일]</b> 자원자에 한하여 인체적용시험 예정일(제1일)로부터 4주 이내(제-28일 ~ 제0 일)에 정신건강의학과적 면담, 신체검진, 진단검사의학검사, MMSE-K 등 스크리닝 검사를 시행하여 본 인체적용시험에 연구대상자로서 적합하다고 판단되는 자를 선정하였다.<br><br><b>[1차 방문]</b> 연구대상자는 제1일(0주) 전북대학교병원 임상연구지원센터에 방문하여 정해진 검사를 수행하였다. 연구대상자는 생강발효추출물 섭취군과 위약 섭취군에 각 30명씩 무작위배정 되며 6주 분 |

량의 인체적용시험용제품(생강발효추출물 또는 위약)을 제공하였다. 이후 6주 간 하루 2회 아침, 저녁 식후 인체적용시험용제품을 복용하며 일상생활을 하였다.

**[2차 방문]** 연구대상자는 제43일(6주) 전북대학교병원 임상연구지원센터에 방문하여 정해진 검사를 실시하였다. 지난 6주간 복용하고 남은 인체적용시험용제품을 포장용기와 함께 반납하고 다시 6주 분량의 인체적용시험용제품(생강발효추출물 또는 위약)을 제공하였다. 이후 6주 간 하루 2회 아침, 저녁 식후 인체적용시험용제품을 복용하며 일상생활을 하였다.

**[3차 방문]** 연구대상자는 제85일(12주) 전북대학교병원 임상연구지원센터에 방문하여 정해진 검사를 받았다. 지난 6주간 복용하고 남은 인체적용시험용제품을 포장용기와 함께 반납하고 총 12주간의 인체적용시험을 마쳤다.

인체적용시험 계획서 번호 : CTCF2\_2015\_GFE  
 인체적용시험 시작일 : 2016. 03. 07 (최초 연구대상자 등록일)  
 인체적용시험 종료일 : 2016. 09. 21 (연구대상자 최종 방문일)  
 결과보고서 작성일 : 2016. 12

■ 요약 (Synopsis)

|            |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |
|------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>제 목</b> | 생강발효추출물의 인지기능 개선에 대한 유효성 및 안전성을 평가하기 위한 12주, 무작위배정, 이중눈가림, 위약 대조 인체적용시험                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |
| <b>목 적</b> | <p>생강발효추출물 또는 위약을 1일 2회 섭취할 때 나타나는 다음 평가항목의 변화를 관찰함으로써 그 유효성 및 안전성을 비교 평가하였다.</p> <p>■ 1차 목적<br/>                 Digit span (숫자따라하기검사), Auditory Continuous Performance Test (청각 연속수행 검사), Verbal learning test (언어기억검사), N-back test, Novel Object Recognition test (새로운 물체 인식 검사), Story recall test (이야기 회상검사)와 과거회상기억 및 미래예측기억(Prospective and Retrospective Memory Questionnaire; PRMQ)으로 평가되는 생강발효추출물의 인지기능 개선에 대한 유효성을 위약 섭취와 비교 평가하였다.</p> <p>■ 2차 목적<br/>                 혈중 뇌유래신경영양인자(Brain-Derived Neurotrophic Factor; BDNF), 스트</p> |



|               |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |
|---------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|               | 레스검사 (Perceived Stress Scale; PSS)로 평가되는 생강발효추출물의 인지 기능 개선에 대한 유효성 및 안전성을 위약 섭취와 비교 평가하였다. 또한 BDNF에 대한 영향이 각 개인의 BDNF에 관련된 유전적 다형성(BDNF Val66Met polymorphism)과 관련이 있는지 조사하였다.                                                                                                                                                                                        |
| 인체적용시험 계획서 번호 | CTCF2_2015_GFE                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |
| 시험 단계         | 인체적용시험                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |
| 시험 기간         | IRB 승인일로부터 12개월                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |
| 시험 디자인        | 12주, 무작위배정, 이중눈가림, 위약 대조 인체적용시험                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |
| 실시 기관         | 전북대학교병원 기능성식품임상시험지원센터                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
| 시험 책임자        | 전북대학교 의학전문대학원 정신건강의학교실<br>정영철 MD, PhD                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
| 공동 연구자        | 전북대학교 의학전문대학원 약리학교실<br>채수완 MD, PhD<br>전북대학교병원 기능성식품임상시험지원센터<br>최은경 MD                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
| 시험 담당자        | 전북대학교병원 기능성식품임상시험지원센터<br>정은수, 황지현, 김우림, 박미현, 노순옥, 최재순<br>전북대학교병원 정신건강의학교실<br>윤선아, 신혜선                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
| 의뢰자           | 한국식품연구원                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |
| 연구대상자수        | 총60명(생강발효추출물군 30명, 위약군 30명)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |
| 연구대상자 선정 기준   | 1) 스크리닝 검사 당시 연령이 만55~69세이며 중졸 이상의 학력을 가진 연구대상자(가능하다면 컴퓨터를 다루어 본 경험이 있는 자)<br>1. 간이정신상태검사(Mini-Mental Status Examination-Korean; MMSE-K)를 통한 인지기능이 정상범위인 자(MMSE-K; $\geq 24$ 점)<br>2. 이상체중(ideal body weight) $\pm 30\%$ 이내 체중인 자<br>☞ 이상체중(ideal body weight) = (신장cm - 100) $\times$ 0.9<br>3. 본 인체적용시험에 대한 자세한 설명을 듣고 완전히 이해한 후, 자의로 참여를 결정하고 주의사항을 준수하기로 서면 동의한 자 |
| 연구대상자         | 1) 스크리닝 시 시행되는 정신장애의 진단 및 통계 편람의 구조화된 임상 면담인 SCID (Structured Clinical Interview for DSM-IV) 에서 축 1장애                                                                                                                                                                                                                                                                 |

|                |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |
|----------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>제 외 기 준</b> | <p>로 현재 치료를 받거나 최근 3년 이내에 치료받은 과거력이 있는 자</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>4. 최근 3개월 이내에 알코올 남용이나 의존이 있는 자</li> <li>5. 인체적용시험용제품의 흡수에 영향을 줄 수 있는 위장관계질환(예: 크론씨병)이나 위장관계수술(단, 단순총수돌기절제술이나 탈장수술은 제외) 과거력이 있는 자</li> <li>6. 임상적으로 유의한 다음과 같은 만성 질병이 있는 자</li> <li>7. (간질, 정신지체, 뇌신경계 질환, 내분비계 질환, 혈액·약성종양, 심혈관계 질환 등. 단, 시험책임자의 판단에 따라 연구대상자의 상태를 고려하여 본 연구에 참여하였다.)</li> <li>8. 진단검사의학검사에서 다음에 해당하는 결과를 보이는 자 <ul style="list-style-type: none"> <li>☞ AST, ALT &gt; 정상범위 상한치의 2배</li> <li>☞ 기타 유의한 진단검사의학검사 소견</li> </ul> </li> <li>9. 인체적용시험용제품에 대한 과민반응 혹은 임상적으로 유의한 과민반응 병력이 있는 자</li> <li>10. 최근 한 달 이내에 인지기능 개선 관련 건강기능식품을 복용한 경우(단, 시험자의 판단에 따라 다른 조건이 합당한 경우는 인체적용시험에 참여하였다.)</li> <li>11. 첫 섭취일 전 2주 이내에 어떠한 전문의약품이나 한약을 복용하였거나, 1주 이내에 어떠한 일반의약품(OTC) 또는 비타민 제제를 복용한 자 (단, 시험자의 판단에 따라 다른 조건이 합당한 경우는 인체적용시험에 참여하였다.)</li> <li>12. 첫 섭취일 전 2개월 이내에 타 인체적용시험에 참여한 자</li> <li>13. 첫 섭취일 전 1개월 이내에 전혈 헌혈을 하였거나, 2주 이내에 성분헌혈을 한 자</li> </ol> |
|----------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|

|                |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |
|----------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>시 험 방 법</b> | <p><b>· 시험방법</b><br/> <b>A randomized double-blind, parallel, placebo-controlled study</b></p> <p>본 인체적용시험은 12주, 무작위배정, 이중눈가림, 위약대조로 진행하였다.</p> <p><b>[제-28일 ~ 제0일]</b> 자원자에 한하여 인체적용시험 예정일(제1일)로부터 4주 이내(제-28일~제0일)에 정신건강의학과적 면담, 신체검진, 진단검사의학검사, MMSE-K 등 스크리닝 검사를 시행하여 본 인체적용시험에 연구대상자로서 적합하다고 판단되는 자를 선정하였다.</p> <p><b>[1차 방문]</b> 연구대상자는 제1일(0주) 전북대학교병원 임상연구지원센터에 방문하여 정해진 검사를 수행하였다. 연구대상자는 생강발효추출물 섭취군</p> |
|----------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|

과 위약 섭취군에 각 30명씩 무작위배정되며 6주 분량의 인체적용시험용 제품(생강발효추출물 또는 위약)을 제공하였다. 이후 6주간 하루 2회 아침, 저녁 식후 인체적용시험용제품을 복용하며 일상생활을 하였다.

**[2차 방문]** 연구대상자는 제43일(6주) 전북대학교병원 임상연구지원센터에 방문하여 정해진 검사를 실시하였다. 지난 6주간 복용하고 남은 인체적용 시험용제품을 포장용기와 함께 반납하고 다시 6주 분량의 인체적용시험용 제품(생강발효추출물 또는 위약)을 제공하였다. 이후 6주 간 하루 2회 아침, 저녁식후 인체적용시험용제품을 복용하며 일상생활을 하였다.

**[3차 방문]** 연구대상자는 제85일(12주) 전북대학교병원 임상연구지원센터에 방문하여 정해진 검사를 받았다. 지난 6주간 복용하고 남은 인체적용 시험용제품을 포장용기와 함께 반납하고 총 12주간의 인체적용시험을 마쳤다.

**섭 취 방 법**

- 생강발효추출물군
  - 1일 2회, 1회 2캡슐, 아침, 저녁 식후 섭취  
(1,000mg/day, 생강발효추출물로써 500 mg/day)
- 위약군
  - 1일 2회, 1회 1캡슐, 아침, 저녁 식후 섭취  
(1,000mg/day, 생강발효추출물로써 500 mg/day)

**평 가 방 법**

- 1. 유효성 평가**
- 정해진 일정에 따라 다음 항목들을 평가하였다.
- 1)1차 유효성 평가변수
- 집중력 검사: 숫자 따라하기 검사(Digit span test) & 청각 연속수행검사(Auditory Continuous Performance Test)
  - 단기기억력 검사: N-back test
  - 장기기억력 검사
    - 시각 장기기억: 새로운 물체 인식 검사(Novel Object Recognition test; NOR)
    - 언어 장기기억: 언어기억검사(Verbal learning test) & 이야기 회상검사(Story recall test)
  - 자가검사: 과거회상기억 및 미래예측기억(Prospective and retrospective memory questionnaire; PRMQ)
- 14.2차 유효성 평가변수
- 혈중 뇌유래신경영양인자 (Brain-derived neurotrophic factor; BDNF)

|                       |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |
|-----------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|                       | <ul style="list-style-type: none"> <li>➢ BDNF 유전자 다형성 (BDNF Val66 Met polymorphism) 검사</li> <li>➢ 스트레스 검사(Perceived stress scale; PSS)</li> </ul> <p><b>2. 안전성 평가</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>➢ 자·타각 증상 등 이상반응(Adverse Events) 모니터링</li> <li>➢ 진단검사의학검사</li> <li>➢ 활력징후 및 신체검진</li> </ul>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |
| <p><b>통 계 분 석</b></p> | <ul style="list-style-type: none"> <li>➢ 인구학적 자료는 평균과 표준편차 등에 대하여 기술통계학적 분석을 시행하였다.</li> <li>➢ 안전성 평가를 위해 이상반응의 발생 등을 분석하였다.</li> <li>➢ 유효성 평가를 위해 인체적용시험용제품 섭취 전·후의 평가변수를 비교하였다. 군 내 변화의 비교는 paired <i>t</i>-test를 그리고 군 간 비교는 two-way repeated measure ANOVA 혹은 two sample <i>t</i>-test(차이값 비교)를 적용하여 분석하였다.</li> <li>➢ 또한 BDNF 유전자 다형성 (BDNF Val66 Met polymorphism) 검사 결과에 따라 인체적용시험용제품 섭취 전·후의 평가변수를 비교하였다. 군 내 변화의 비교는 paired <i>t</i>-test를 그리고 군 간 비교는 two-way repeated measure ANOVA 혹은 two sample <i>t</i>-test(차이값 비교)를 적용하여 분석하였다.</li> </ul>                                                                                                                                                                                                                                                         |
| <p><b>결 론</b></p>     | <ul style="list-style-type: none"> <li>· 본 인체적용시험은 생강발효추출물 섭취가 인지기능개선에 미치는 효과와 안전성을 평가하기 위한 12주, 무작위배정, 이중눈가림, 위약대조 연구이다. 본 인체적용시험의 등록 목표 연구 대상자 수는 60명, 중도탈락률 30%를 고려한 종료목표 연구대상자 수는 46명으로서, 총 65명의 자원자가 서면동의를 자발적으로 작성한 후 스크리닝 검사를 받았고, 연구대상자 적합성평가를 통해 총 60명이 적격 연구대상자로 선정되었다. 선정된 연구대상자는 이중눈가림 방법을 통해 생강발효추출물군과 위약군에 무작위배정 되어 본 인체적용시험에 참여하였다.</li> <li>· 시험자는 모든 연구대상자를 대상으로 시험계획서에 정해진 바에 따라, 객관적 인지기능검사, 주관적인지기능검사(PRMQ), 스트레스검사(PSS), 혈중 BDNF 등 유효성 평가와 진단검사의학 검사를 비롯한 안전성 평가를 시행하였다. 유효성 평가를 위한 주분석군은 계획서순응연구대상자군(Per protocol Set)으로써, 중도탈락자 5명(생강발효추출물군 5명), 시험용제품 섭취 순응도 미달인 연구대상자 1명(위약군1명), 병용금지약물 복용 1명(위약군 1명), 인지기능에 영향을 미칠 수 있는 병력을 가진 연구대상자1명(생강발효추출물군 1명)이 분석에서 제외됨에 따라, 총 52명의 연구대상자를 대상으로 유효성 평가 분석을 시행하였다. 안전성 평가를 위한 주분석군은 인체적용 시험에 참여하여 최소 1회 이상 시험용제품을 섭취한 연구대상자군(Safety)이었다.</li> </ul> |

· 전체 연구대상자의 자세한 인구학적 정보를 Table 1에 요약하였다. 스크리닝 당시 전체 연구대상자 60명의 평균 연령은 61.68±4.08세이고, 성별은 남성이 8명, 여성이 52명으로 섭취군 간 평균 연령 및 성별 분포에 통계적으로 유의한 차이가 없었다( $p>0.05$ ).

전체 연구대상자의 음주량은 0.86±2.74 unit/주, 평균 흡연량은 하루 0.02±0.13 개피로 두 섭취군 간 음주 및 흡연량에 통계적으로 유의한 차이가 없었다( $p>0.05$ ).

이상의 결과를 종합할 때 전체 연구대상자의 무작위배정이 비교적 잘 이루어졌다고 판단하였다.

**Table 1. 연구대상자의 인구학적 특성**

|            | 전체<br>(N=60)     | 생강발효추출물군<br>(N=30) | 위약군<br>(N=30)    | p-value <sup>1)</sup> |
|------------|------------------|--------------------|------------------|-----------------------|
| 성별(남/여)    | 8(13.3)/52(86.7) | 5(16.7)/25(83.3)   | 3(11.1)/27(88.9) | 0.448                 |
| 학력(년)      | 12.08±2.31       | 11.97±0.09         | 12.20±2.54       | 0.699                 |
| 나이(세)      | 61.68±4.08       | 62.57±4.05         | 60.80±3.99       | 0.094                 |
| 음주(unit/주) | 0.86±2.74        | 0.21±0.66          | 1.50±3.73        | 0.072                 |
| 흡연(개피/일)   | 0.02±0.13        | 0.00±0.00          | 0.03±0.18        | 0.326                 |
| 카페인(잔/주)   | 5.02±5.44        | 3.92±4.79          | 6.11±5.89        | 0.118                 |

Values are presented as mean±SD or number (percentage).

<sup>1)</sup>Analyzed by Independent t test or Chi-square test or Fisher's exact test.

인체적용시험용제품의 섭취상황에 대하여 매 방문마다 연구대상자가 반납한 인체적용시험용제품 잔여분을 수거하여 순응도를 확인하였다. 평가방법은 아래와 같다.

$$\text{순응도}(\%) = \frac{\text{실제 섭취한 제품 수}}{\text{섭취하여야 할 제품 수}} \times 100$$

제품의 총 순응도(compliance)는 약 94%였으며, 순응도 미달로 인한 탈락자는 1명(위약군 1명)이었다. 섭취군 간의 순응도는 생강발효추출물군과 위약군에서 차이가 없었다.

**Table 2. 연구대상자의 순응도(Compliance)**

|                            | 생강발효추출물군<br>(n=24) | 위약군<br>(n=28) | 전체<br>(n=52) | p-value <sup>1)</sup> |
|----------------------------|--------------------|---------------|--------------|-----------------------|
| 섭취해야 할 제품 수(Prescriptions) | 341.0±12.0         | 338.0±7.8     | 339.4±10.0   | 0.300                 |

|                             |            |            |            |       |
|-----------------------------|------------|------------|------------|-------|
| 섭취한 제품 수<br>(Total intakes) | 321.5±13.5 | 316.5±23.1 | 318.8±19.2 | 0.334 |
| 순응도(%)                      | 94.3±4.2   | 93.6±6.6   | 94.0±5.6   | 0.640 |

가. Compliance was calculated by total intakes by prescriptions. Values are presented as mean±SD

나. <sup>1)</sup> Analyzed by Independent t test

· 1차 유효성 평가결과, 장기기억력을 평가하는 이야기회상검사에서 생강발효추출물군의 이야기점수가 섭취 전에 비해 섭취 12주 후 유의하게 증가하였으며( $p=0.001$ ), 위약군에 비해 통계적으로 유의하게 향상되는 경향이었다( $p=0.086$ ).

· 언어기억검사(verbal learning test) 결과, 생강발효추출물군 및 위약군에서 섭취 전에 비해 섭취 12주 후 유의하게 향상되었으나, 두 섭취군 간 통계적으로 유의한 차이가 없었다( $p>0.05$ ).

집중력을 평가하는 숫자 따라하기검사(digit span test)의 역방향 정반응수는 생강발효추출물군에서 섭취 전에 비해 섭취 12주 통계적으로 유의하게 증가하였으나( $p=0.014$ ), 섭취군 간 유의한 차이는 없었다( $p<0.05$ ).

· 청각연속수행검사(AuditoryCPT)의 누락수를 분석한 결과, 위약군의 누락수가 생강발효추출물군에 비해 통계적으로 유의하게 감소하였으나( $p=0.039$ ), 이는 섭취 전 기저치에서 위약군의 누락수가 생강발효추출물군에 비해 높았으므로( $p=0.031$ ), 인지기능 개선에 의미 있는 결과는 아니라고 판단하였다.

**Table 3. 섭취 전 · 12주 후 인지기능검사 결과**

|                                    |          |          |                 |          |          |              |       |
|------------------------------------|----------|----------|-----------------|----------|----------|--------------|-------|
| VLT A1                             | 6.0±2.0  | 7.4±1.9  | <b>0.005</b>    | 6.4±1.7  | 7.6±2.1  | <b>0.010</b> | 0.797 |
| VLTA2                              | 8.3±1.8  | 9.4±2.0  | <b>0.020</b>    | 8.8±2.1  | 9.9±1.9  | <b>0.007</b> | 0.932 |
| VLT A3                             | 9.6±2.0  | 10.8±1.9 | <b>0.003</b>    | 10.1±2.2 | 10.8±1.9 | 0.099        | 0.421 |
| VLT A4                             | 10.6±2.0 | 11.1±1.9 | 0.117           | 11.4±2.1 | 11.7±2.0 | 0.326        | 0.692 |
| VLT A5                             | 11.0±2.1 | 12.0±2.5 | <b>0.038</b>    | 11.3±2.1 | 12.3±2.0 | <b>0.004</b> | 0.822 |
| VLT B                              | 5.2±1.4  | 5.0±1.8  | 0.616           | 5.6±1.8  | 5.4±1.7  | 0.483        | 0.915 |
| VLT A6                             | 9.0±2.9  | 10.5±2.8 | <b>0.011</b>    | 9.7±2.6  | 10.9±2.1 | <b>0.003</b> | 0.571 |
| VLT A20(지연회상)                      | 9.5±2.8  | 10.7±2.2 | <b>0.026</b>    | 9.9±2.6  | 10.9±2.6 | <b>0.021</b> | 0.888 |
| VLT REC(지연재인)                      | 12.7±1.5 | 13.4±1.5 | <b>0.031</b>    | 12.9±1.7 | 13.6±1.4 | 0.053        | 0.816 |
| VLT_A1A5총합_학습시행                    | 45.6±7.8 | 50.7±8.6 | <b>&lt;.000</b> | 47.9±7.5 | 52.3±8.8 | <b>0.001</b> | 0.651 |
| VLT_A1A5총합_평균                      | 9.1±1.6  | 10.1±1.7 | <b>&lt;.000</b> | 9.6±1.5  | 10.5±1.8 | <b>0.001</b> | 0.651 |
| VLT_learningSlope A5_A1_학습지표       | 5.0±2.2  | 4.5±2.1  | 0.428           | 4.9±2.9  | 4.7±1.7  | 0.741        | 0.752 |
| VLT_A5_A20_기억유지도                   | 1.5±2.2  | 1.3±1.7  | 0.746           | 1.4±2.9  | 1.4±1.7  | >.999        | 0.815 |
| Digitspan_forward_correct_response | 10.4±2.9 | 10.9±3.1 | 0.173           | 10.8±3.3 | 11.5±3.8 | 0.103        | 0.767 |
| Digitspan_forward_정답수              | 6.3±1.1  | 6.4±1.1  | 0.747           | 6.5±1.4  | 6.8±1.4  | 0.223        | 0.378 |

|                                     |           |           |              |           |           |              |              |
|-------------------------------------|-----------|-----------|--------------|-----------|-----------|--------------|--------------|
| Digitspan_backward_correct_response | 8.1±2.8   | 9.1±3.1   | <b>0.014</b> | 8.6±2.9   | 9.5±3.3   | 0.097        | 0.870        |
| Digitspan_backward_정답수              | 4.4±1.1   | 4.8±1.1   | <b>0.015</b> | 4.6±1.3   | 5.1±1.4   | <b>0.028</b> | 0.763        |
| AuditoryCPT_correct_response        | 133.8±2.3 | 133.4±2.2 | 0.350        | 130.5±7.2 | 132.4±3.5 | 0.106        | 0.085        |
| AuditoryCPT_commission_error        | 2.5±2.6   | 2.5±2.1   | >.999        | 3.9±3.6   | 3.2±2.9   | 0.190        | 0.332        |
| AuditoryCPT_누락수                     | 1.3±2.3   | 1.6±2.2   | 0.350        | 6.0±10.8  | 2.6±3.5   | 0.043        | <b>0.039</b> |
| AuditoryCPT_반응시간                    | 0.7±0.0   | 0.7±0.1   | 0.028        | 0.7±0.1   | 0.7±0.1   | 0.553        | 0.052        |
| AuditoryCPT_HR                      | 99.1±1.7  | 98.8±1.6  | 0.350        | 96.7±5.3  | 98.1±2.6  | 0.106        | 0.085        |
| AuditoryCPT_FAR                     | 0.6±0.6   | 0.6±0.5   | >.999        | 1.0±0.9   | 0.8±0.7   | 0.190        | 0.332        |
| 0back_HR                            | 99.6±1.3  | 99.6±1.3  | >.999        | 98.5±6.5  | 99.7±1.8  | 0.363        | 0.413        |
| 0back_FAR                           | 0.5±1.0   | 0.0±0.0   | 0.031        | 0.6±1.3   | 0.1±0.5   | 0.110        | >.999        |
| 1back_HR                            | 88.1±21.7 | 92.1±12.9 | 0.335        | 90.3±18.2 | 96.3±6.9  | 0.117        | 0.717        |
| 1back_FAR                           | 1.9±4.9   | 2.4±5.7   | 0.485        | 1.6±3.6   | 0.7±1.5   | 0.218        | 0.170        |
| 2back_HR                            | 57.5±18.2 | 66.9±17.4 | 0.015        | 67.9±21.5 | 75.3±17.6 | 0.017        | 0.688        |
| 2back_FAR                           | 6.9±8.7   | 5.7±6.5   | 0.562        | 6.1±5.5   | 4.6±5.5   | 0.239        | 0.874        |
| NORT 정반응수                           | 27.0±2.3  | 27.0±2.3  | 0.934        | 27.5±3.0  | 28.6±1.9  | 0.056        | 0.139        |
| Storyrecall_즉각회상_이야기점수              | 12.4±3.2  | 15.0±4.3  | <b>0.001</b> | 13.8±4.2  | 14.8±3.6  | 0.078        | <b>0.086</b> |
| Storyrecall_즉각회상_주제점수               | 4.1±0.9   | 4.8±1.4   | <b>0.032</b> | 4.4±1.4   | 4.7±1.2   | 0.107        | 0.383        |
| Storyrecall_즉각회상_총점                 | 16.5±3.9  | 19.8±5.6  | <b>0.001</b> | 18.1±5.5  | 19.5±4.5  | 0.072        | 0.118        |
| Storyrecall_지연회상_이야기점수              | 11.4±4.0  | 13.9±4.0  | <b>0.002</b> | 12.7±4.3  | 13.7±4.3  | 0.174        | 0.154        |
| Storyrecall_지연회상_주제점수               | 4.0±1.2   | 4.5±1.3   | 0.078        | 4.5±1.4   | 4.5±1.3   | 0.942        | 0.189        |
| Storyrecall_지연회상_총점                 | 15.5±5.0  | 18.5±5.0  | <b>0.003</b> | 17.2±5.5  | 18.3±5.4  | 0.275        | 0.139        |

VLT; verbal learning test, TMT; Trail making test, NORT; Novel Object Recognition test

Values are presented as mean ± SD

<sup>1)</sup> Analyzed by pairedt-test in within group

<sup>2)</sup> Analyzed by linear mixed effect model for repeated measure data in between groups

2차 유효성 평가 지표인 혈중 BDNF는 생강발효추출물군에서 섭취 전에 비해 섭취 12주 후, 통계적으로 유의하게 증가하였으나( $p=0.042$ ), 두 섭취군 간에는 차이가 없었다.

주관적인지기능검사(PRMQ), 스트레스검사(PSS)는 섭취군 내 및 섭취군 간 통계적으로 유의한 차이가 없었다( $p>0.05$ ).

**Table 4. 섭취 전 · 12주 후 BDNF 변화**

|            | 생강발효추출물군 (n=24) |       |                          | 위약군 (n=28) |       |                          | $p$ -value <sup>2)</sup> |
|------------|-----------------|-------|--------------------------|------------|-------|--------------------------|--------------------------|
|            | 기저치             | 12주   | $p$ -value <sup>1)</sup> | 기저치        | 12주   | $p$ -value <sup>1)</sup> |                          |
| 다. BDNF    | 28557.14        | .86±6 | <b>0.042</b>             | 28225.0    | 28759 | 0.538                    | 0.423                    |
| 라. (pg/ml) | ±6412.74        | 951.0 |                          | 8±6764.40  | 880.7 |                          |                          |
|            |                 | 4     |                          | 8          |       |                          |                          |

BDNF, Brain-derived neurotrophic factor.

Values are presented as mean ± SD

<sup>1)</sup> Analyzed by paired t-test in within group

<sup>2)</sup> Analyzed by linear mixed effect model for repeated measure data in between groups

· 인체적용시험 참여기간에 연구대상자들의 생활습관을 평가하기 위해 식이섭취조사를 하였으며, 계획서순응연구대상자군(Per Protocol Set) 52명을 대상으로 분석 시, 생강발효추출물군 및 위약군의 열량, 거대영양소 및 식이섬유 섭취량에 있어서 섭취군 내 및 섭취군 간 통계적으로 유의한 차이가 없어서, 연구대상자들이 인체적용시험에 참여하는 동안 일상생활을 일정하게 유지하였음을 알 수 있었고, 식이섭취가 본 시험결과에 미치는 영향이 거의 없을 것으로 판단하였다.

**Table 5. 섭취 전 · 섭취 12주 후 식이분석 결과**

|             | 생강발효추출물군 (n=24) |              |                       | 플라세보군 (n=28) |              |                       | p-value <sup>2)</sup> |
|-------------|-----------------|--------------|-----------------------|--------------|--------------|-----------------------|-----------------------|
|             | 기저치             | 12주          | p-value <sup>1)</sup> | 기저치          | 12주          | p-value <sup>1)</sup> |                       |
| 마. 열량(kcal) | 1501.0±381.2    | 1407.9±367.1 | 바. 0.211              | 1678.6±473.8 | 1622.7±413.9 | 사. 0.618              | 아. 0.787              |
| 자. 탄수화물(g)  | 239.4±7.48      | 215.1±58.4   | 차. 0.081              | 255.3±87.2   | 249.3±64.7   | 카. 0.777              | 타. 0.476              |
| 파. 지방(g)    | 36.3±19.6       | 37.3±18.7    | 하. 0.875              | 44.0±28.8    | 42.5±18.2    | 거. 0.816              | 너. 0.783              |
| 더. 단백질(g)   | 61.2±19.8       | 59.0±20.6    | 러. 0.621              | 67.1±20.7    | 68.1±21.4    | 머. 0.821              | 버. 0.611              |
| 서. 식이섬유(g)  | 24.7±7.9        | 21.3±7.7     | 여. 0.042              | 23.6±9.7     | 24.9±7.9     | 저. 0.580              | 처. 0.108              |

Values are presented as mean ± SD

커. <sup>1)</sup> Analyzed by paired t-test in within group

터. <sup>2)</sup> Analyzed by linear mixed effect model for repeated measure data in between groups

· 안전성 평가를 위해 인체적용시험에 참여하여 최소 1회 이상 시험용제품을 섭취한 연구대상자 60명(Safety군)을 대상으로 이상반응, 진단검사의학 검사(혈액학적 검사, 혈액생화학적 검사, 소변 검사), 활력징후 등의 측정 결과를 분석한 결과, 총 60명의 연구대상자 중 9명의 연구대상자에서 총 10건의 경도 또는 중등도 이상반응이 발생하였다. 섭취군 간 이상반응 발생 수에 차이가 없었으며(p>0.05), 인체적용시험용제품 섭취와 인과관계가 없는 이상반



응으로 임상적 의미가 없다고 판단하였다. 진단검사의학 검사와 활력징후 결과에서도 두 섭취군 간에 의미 있는 변화 또는 차이가 없었다( $p>0.05$ ).

**Table 6. 이상반응 발생 빈도**

|                 | 생강발효추출물군<br>(N=30) | 위약<br>(N=30) | 전체<br>(N=60) | $p$ -value <sup>1)</sup> |
|-----------------|--------------------|--------------|--------------|--------------------------|
| 이상반응<br>발생 수(명) | 7(23.3%)           | 2(6.7%)      | 9(15.0%)     | 0.071                    |

Values are presented as number (percentage).

1) Analyzed by Fisher's exact test, Chi-test

**Table 7. 인체적용시험용제품 섭취 전 · 섭취 12주 후 진단검사의학 검사 결과**

|                                                                         | 생강발효추출물군 (n=30) |                |                          | 플라세보군 (n=30)   |                |                          | $p$ -value <sup>2)</sup> |
|-------------------------------------------------------------------------|-----------------|----------------|--------------------------|----------------|----------------|--------------------------|--------------------------|
|                                                                         | 0주              | 12주            | $p$ -value <sup>1)</sup> | 0주             | 12주            | $p$ -value <sup>1)</sup> |                          |
| WBC<br>(4.8~10.8×10 <sup>3</sup> /μL)                                   | 5.5±1.3         | 5.3±1.4        | 0.352                    | 5.5±2.0        | 5.0±0.9        | 0.166                    | 0.557                    |
| RBC (M:<br>4.7~6.1×10 <sup>3</sup> , F:4.2~5<br>.4×10 <sup>3</sup> /μL) | 4.4±0.3         | 4.4±0.3        | 0.406                    | 4.5±0.3        | 4.5±0.3        | 0.674                    | 0.345                    |
| Hemoglobin<br>(M: 13~18 g/dL,<br>F: 12~16 g/dL)                         | 13.5±0.<br>9    | 13.3±0.<br>8   | 0.061                    | 13.9±0.<br>9   | 13.9±1.<br>0   | 0.948                    | 0.148                    |
| Hematocrit<br>(M: 42~52%, F:<br>37~47%)                                 | 40.0±2.<br>4    | 39.9±2.<br>1   | 0.650                    | 41.1±2.<br>6   | 41.5±2.<br>5   | 0.262                    | 0.257                    |
| Platelet(130~450×10 <sup>3</sup><br>/μL)                                | 247.7±<br>56.0  | 244.1±<br>53.4 | 0.665                    | 235.0±<br>42.4 | 240.1±<br>46.9 | 0.299                    | 0.336                    |
| ALP(45~129<br>IU/L)                                                     | 75.7±1<br>8.6   | 71.2±1<br>6.1  | 0.082                    | 78.7±2<br>3.3  | 77.2±1<br>9.1  | 0.425                    | 0.473                    |
| GGT (M: 12~73<br>IU/L, F: 8~48 IU/L)                                    | 19.7±1<br>4.2   | 18.8±1<br>2.6  | 0.979                    | 17.9±8.<br>6   | 24.2±3<br>4.7  | 0.312                    | 0.326                    |
| AST (12~33<br>IU/L)                                                     | 23.2±5.<br>6    | 22.3±4.<br>6   | 0.103                    | 23.1±4.<br>5   | 26.7±1<br>5.5  | 0.203                    | 0.131                    |
| ALT (5~35<br>IU/L)                                                      | 21.4±7.<br>0    | 18.9±5.<br>4   | 0.037                    | 20.0±5.<br>9   | 25.4±2<br>6.9  | 0.277                    | 0.135                    |
| Bilirubin<br>(0.2~1.2 mg/dl)                                            | 0.8±0.2         | 0.7±0.2        | 0.067                    | 0.9±0.3        | 0.9±0.2        | 0.247                    | 0.464                    |
| Total protein<br>(6.7~8.3 g/dL)                                         | 7.3±0.4         | 7.3±0.3        | 0.873                    | 7.4±0.4        | 7.5±0.4        | 0.206                    | 0.451                    |
| Albumin<br>(3.5~5.3 g/dL)                                               | 4.3±0.2         | 4.2±0.2        | 0.274                    | 4.3±0.2        | 4.3±0.2        | 0.884                    | 0.330                    |
| BUN<br>(8~23 mg/dL)                                                     | 14.2±2.<br>6    | 14.6±2.<br>5   | 0.455                    | 15.0±2.<br>9   | 16.9±4.<br>2   | 0.003                    | 0.070                    |
| Creatinine<br>(0.7~1.7 mg/dL)                                           | 0.6±0.1         | 0.6±0.1        | 0.095                    | 0.6±0.1        | 0.6±0.1        | 0.424                    | 0.678                    |
| Uric acid                                                               | 4.3±1.1         | 4.5±1.2        | 0.275                    | 4.8±1.0        | 4.9±1.0        | 0.312                    | 0.987                    |
| Total cholesterol<br>(~200mg/dL)                                        | 203.9±<br>37.3  | 206.8±<br>42.5 | 0.852                    | 198.5±<br>32.9 | 208.6±<br>37.9 | 0.068                    | 0.221                    |
| Triglyceride<br>(~200 mg/dL)                                            | 142.8±<br>67.9  | 144.8±<br>97.8 | 0.986                    | 128.5±<br>53.9 | 127.8±<br>71.4 | 0.954                    | 0.957                    |

|                                                         |                |                |       |                |                |       |       |
|---------------------------------------------------------|----------------|----------------|-------|----------------|----------------|-------|-------|
| HDL-cholesterol<br>(M: 41.5~67.3,F:<br>48.9~73.5 mg/dL) | 53.1±1<br>4.9  | 52.2±1<br>7.1  | 0.635 | 52.5±1<br>3.1  | 54.2±1<br>6.8  | 0.278 | 0.267 |
| LDL-cholesterol<br>(~140 mg/dL)                         | 121.5±<br>32.0 | 122.4±<br>35.5 | 0.950 | 119.4±<br>33.9 | 124.3±<br>33.0 | 0.254 | 0.407 |
| Glucose<br>(74~105 mg/dl)                               | 89.0±9.<br>0   | 92.2±1<br>7.4  | 0.362 | 86.5±9.<br>0   | 86.1±9.<br>7   | 0.711 | 0.328 |
| SG (1.005~1.030)                                        | 1.0±0.0        | 1.0±0.0        | 0.976 | 1.0±0.0        | 1.0±0.0        | 0.078 | 0.196 |
| pH(4.5~9.0)                                             | 6.3±1.0        | 6.6±0.9        | 0.134 | 6.1±0.9        | 6.1±0.8        | 0.816 | 0.270 |

Values are presented as mean ± SD

<sup>1)</sup> Analyzed by pairedt-test in within group

<sup>2)</sup> Analyzed by linear mixed effect model for repeated measure data in between groups

· 요약하면, 본 인체적용시험을 통해 노장층 연구대상자에서 12주간 생강발효 추출물 섭취로 장기기억력 등 일부 인지기능이 위약군에 비해 개선되는 경향이 있었으며, 혈중 뇌유래신경영양인자(BDNF)가 섭취 전에 비해 섭취 12후 통계적으로 유의하게 증가하였으나 위약군에 비해 유의한 차이는 확인할 수 없었다. 또한 본 연구가 진행되는 동안 임상적으로 의미 있는 이상반응이나 신체 변화가 관찰되지 않아서 생강발효추출물 섭취가 인체에 안전하다고 판단하였다.

#### 4. 목표달성도 및 관련분야 기여도

|      |      |
|------|------|
| 코드번호 | D-06 |
|------|------|

##### 제 1절 연구개발의 목표 달성도

###### 1. 연구성과 목표

(단위)

| 구분   | 특허 |    | 유전자원<br>등록 | 논문  |       | 기타 |
|------|----|----|------------|-----|-------|----|
|      | 출원 | 등록 |            | SCI | 비/SCI |    |
| 1차년도 | 1  | -  |            | -   | -     |    |
| 2차년도 | 1  | 1  |            | 1   | 1     |    |
| 3차년도 | 2  | 1  |            | 2   | 1     |    |
| 4차년도 |    | 1  |            | 3   | 1     |    |
| 계    | 4  | 3  |            | 6   | 3     |    |

###### 2. 연구성과 목표의 달성도

(단위)

| 구분   | 특허 |    | 유전자원<br>등록 | 논문  |       | 기타 |
|------|----|----|------------|-----|-------|----|
|      | 출원 | 등록 |            | SCI | 비/SCI |    |
| 1차년도 | 1  | -  |            | 1   | -     |    |
| 2차년도 | 2  | -  |            | 2   | 1     |    |
| 3차년도 | 1  | 3  |            |     |       |    |
| 4차년도 |    | 1  |            | 6   |       |    |
| 계    | 4  | 4  |            | 9   | 1     |    |

###### 가. 논문

- (1) 6-Shogaol, an active compound of ginger, protects dopaminergic neurons in Parkinson's disease models via anti neuroinflammation (2013) Acta, Pharmacol, Sin.
- (2) 6-Shogaol, an active constituent of ginger, attenuates neuroinflammation and cognitive deficits in animal models of dementia (2014) Biochem, Biophys, Res, Commun.
- (3) Ginger improves cognitive function via NGF induced ERK/CREB activation in the hippocampus of the mouse (2014) J, Nutr, Biochem,
- (4) Optimization Study for the Production of 6-Shogaol-rich Ginger(*Zingiber officinale* Roscoe) under Conditions of Mild Pressure and High Temperature (2014) KOREAN J. Food Sci. Technol.

- (5) Characterization of metabolites produced from the biotransformation of 6-shogaol formed by *Aspergillus niger* (2016) *Euro. Food Res. and Tech.*
- (6) Fermentation enhances the neuroprotective effect of shogaol enriched ginger extract via an increase in 6-paradol content (2016) *J. funct. food*
- (7) Endothelium-Dependent Vasorelaxant Effects of Dealccoholized Wine Powder of Wild Grape (*Vitis coignetiae*) in the Rat Thoracic Aorta (2016) *Evid-Based Compl. Alt.*
- (8) Fucofuroeckol A from *Eisenia bicyclis* Inhibits Inflammation in Lipopolysaccharide Induced Mouse Macrophages via Downregulation of the MAPK/NF- $\kappa$ B Signaling Pathway (2016) *Evid Based Compl. Alt.*
- (9) *Oryza sativa* (Rice) Hull Extract Inhibits Lipopolysaccharide-Induced Inflammatory Response in RAW264.7 Macrophages by Suppressing Extracellular Signal-regulated Kinase, c-Jun N-terminal Kinase, and Nuclear Factor- $\kappa$ B Activation(2016) *Pharmacog. Mag.*
- (10) Neuroprotective effect of 6-paradol enriched ginger extract by fermentation using *Schizosaccharomyces pombe* (2017, Accept) *J. funct. food*

나. 특허출원 및 등록

- (1) 6-쇼가올 함량이 증가된 생강의 제조방법(등록 10-1582197호)
- (2) 칸디다 유틸리스를 이용하여 파라돌 함량을 증가시키는 방법(등록 10-1582188호)
- (3) 미생물을 이용하여 파라돌 함량을 증가시키는 방법(등록 10-1523203호)
- (4) *Schizosaccharomyces pombe*를 이용한 생강 발효물 및 이의 용도(등록 10-1713095호)
- (5) 쇼가올 함량이 증가된 생강의 제조방법(출원 10-2013-0153704)
- (6) 칸디다 유틸리스를 이용하여 파라돌 함량을 증가시키는 방법(출원 10-2014-0006516)
- (7) 미생물을 이용하여 파라돌 함량을 증가시키는 방법(출원 10-2014-0022365)
- (8) *Schizosaccharomyces pombe*를 이용한 생강 발효물 및 이의 용도  
(출원10-2015-0108656 )

3. 연차별 목표달성도

| 구분<br>(연도)      | 세부연구목표                                                                              | 평가의 착안점 및 기준                                                                                                                                                                               | 목표의<br>달성도 |
|-----------------|-------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| 1차년도<br>(2013년) | 생물전환을 위한 선도 화합물(6-shogaol)증폭 표준화 공정과 생물전환대사체 유도 미생물 선별 및 최적 대사체 조성비율에 근접하는 후보물진군 도출 | <ul style="list-style-type: none"> <li>○ 생강조직내 선도화합물 증폭 표준화 공정 설정</li> <li>○ 생강유래 생물전환대사체 유도 미생물 선별 및 대사체 분석</li> <li>○ 생물전환대사체 최적 조성비율 예측 및 최적 대사체 조성비율에 근접하는 생물전환대사체 후보물진군 생산</li> </ul> | 100%       |

|              |                                                                                   |                                                                                                                                                                                                                                                                         |      |
|--------------|-----------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
|              | <i>In vitro</i> 에서 생물전환 대사체 후보 물질군의 효능 검증                                         | <ul style="list-style-type: none"> <li>○ 생물전환대사체 AChE inhibition 능력 평가</li> <li>○ 생물전환대사체의 Aβ aggregation 억제 효능 및 Aβ plaque 독성에 대한 신경세포 보호 효능 검증</li> </ul>                                                                                                             | 100% |
| 2차년도         | 예측 대사체 조성비율에 근접하는 생물전환 대사체 후보물질군 생산                                               | <ul style="list-style-type: none"> <li>○ 효능 검증 최적 대사체 조성비율에 근접하는 후보물질군 생산, 미생물 선정(2-3종)</li> <li>○ 선발 미생물, 반응조건 재검증</li> <li>○ 생물전환 대사체 소재 생산조건 확립</li> </ul>                                                                                                           | 100% |
|              | 생물전환 대사체 소재의 생산조건 확립                                                              | <ul style="list-style-type: none"> <li>○ 선발 미생물, 반응조건 재검증</li> <li>○ 생물전환 대사체 소재 생산조건 확립</li> </ul>                                                                                                                                                                     | 100% |
|              | 생물전환 대사체 조성물의 프로파일 비교 분석                                                          | ○ 생물전환 대사체 조성물의 프로파일 비교 분석 및 구조 규명                                                                                                                                                                                                                                      | 100% |
|              | <i>In vitro</i> 에서 생물전환대사체 후보 물질군의 효능 평가                                          | ○ 생물전환 대사체 소재의 aggregated Aβ 독성에 대한 신경세포 보호 효능, acetylcholinesterase (AChE) 억제 능력, Aβ aggregation 억제 효능 평가                                                                                                                                                              | 100% |
|              | Scopolamine과 Amyloid β (Aβ) plaque 신경독성에 의한 인지기능 저하 동물 모델에서 생물전환 대사체 소재의 보호 효능 평가 | <ul style="list-style-type: none"> <li>○ 생물전환 대사체 소재의 scopolamine 모델에서 NORT/Y-maze/PAT 3종 행동실험을 통한 인지능력 개선 효능 평가(양성대조군: 도네페실)</li> <li>○ 생물전환 대사체 소재의 Aβ plaque 모델에서 NORT/Y maze 2종 행동실험을 통한 인지능력 개선 효능 평가(양성대조군-도네페실, 푸스파티딜세린)</li> </ul>                              | 100% |
| 3차년도 (2015년) | 생물전환 대사체 소재의 scale up을 위한 생산조건, 공정 등 재검증 및 양산화 검토                                 | <ul style="list-style-type: none"> <li>○ 생물전환 대사체 소재의 표준화 공정을 위한 미생물 반응조건 검토</li> <li>○ 소재의 표준화 공정을 위한 생장 조식내 선택도화합물(6-shogaol) 증폭조건 검토</li> <li>○ 소재의 표준화 공정을 위한 생장 추출 공정 검토</li> <li>○ 소재의 생산 표준화 공정 최적화 검토</li> <li>○ 표준화된 공정으로 lab scale의 생물전환 대사체 소재 제조</li> </ul> | 100% |
|              | 생물전환 대사체 소재의 인체적용 시험                                                              | ○ 생산 소재의 Aβ plaque 모델에서 인지능력 개선 효능평가 및 생리활성 검증                                                                                                                                                                                                                          | 100% |
|              | Pilot scale에서의 시생산을 통한 표준화공정 검토 및 개선과 지                                           | <ul style="list-style-type: none"> <li>○ 생물전환 대사체 소재의 대량생산</li> <li>○ 소재의 지표물질 함량 및 기준 설정</li> </ul>                                                                                                                                                                    | 100% |

|      |                                                       |                                                                                                                                                          |      |
|------|-------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
|      | 표물질 함량 및 기준규격 설정                                      |                                                                                                                                                          |      |
| 4차년도 | 생물전환 대사체 소재의 양산화 공정 재검증, 시생산 및 신소재를 유효성분으로 함유하는 제품 개발 | <ul style="list-style-type: none"> <li>○ 원료 확보 및 대량 추출공정 확립</li> <li>○ 생물전환 대사체 소재 대량생산 시스템 구축 및 양산</li> <li>○ 생물전환 대사체 소재를 유효성분으로 함유하는 제품 개발</li> </ul> | 90%  |
|      | 생물전환 대사체 소재의 유효성 평가를 위한 임상적용 시험                       | <ul style="list-style-type: none"> <li>○ 생물전환 대사체 소재의 유효성 평가</li> </ul>                                                                                  | 100% |
|      | 생물전환 대사체 소재의 양산화 지원 및 신소재 개별인정 신청 기반 연구               | <ul style="list-style-type: none"> <li>○ 생물전환 대사체 소재의 대량생산 시스템 구축 지원</li> <li>○ 생물전환 대사체 소재의 시생산 지원</li> <li>○ 생물전환 대사체 소재의 개별인정신청</li> </ul>            | 90%  |

## 제 2절 관련분야 기여도

### 1. 기술이전 및 언론홍보

(단위)

| 구분   |    | 기술실시(이전) | 상분화 | 정책자료 | 교육지도 | 언론홍보 | 기타 |
|------|----|----------|-----|------|------|------|----|
| 활용건수 | 목표 | 1        | 1   |      |      | 1    | -  |
|      | 달성 | 1        | -   |      |      | 7    | -  |

#### 가. 기술이전

본 과제를 통한 연구결과는 주관기관인 한국식품연구원이 건강기능성 식품 분야 중 인지 기능 개선 분야를 기능개선 분야를 사업방향으로 설정하면서 본 연구결과는 기술이전 하게 되었음. 따라서 주된 사업화는 본 과제의 연구결과를 바탕으로 기술을 인수한 주)케이네디 콤플에서 향후 지속적인 연구를 진행하기로 함.

#### 나. 언론홍보

(1) YTV 사이언스 뉴스 방송 2017.1.15

(2) 식품음료신문 “생강 발효추출물 인기기능 개선에 효과” 2016.12.13

- (3) 농축산신문 “생강 발효추출물 인지기능 개선 효능” 2016.12.19
- (4) 대한금식신문 “기억력 높이고 싶다면 발효생강” 2016.12.27
- (5) 메디컬 투데이 “기억력 높이고 싶다면 발효생강 드세요” 2016.12.13.
- (6) 전업농업신문 “발효생강 기억력 향상 도움” 2017.1.19.
- (7) 한국농업신문 “생강발효추출물 인지기능개선 효능 입증” 2016.12.14

다. 관련 기여도

- (1) 효모, 곰팡이 미생물의 종(species)에 따른 생강유래 6-shogaol의 대사체 전환 트렌드, 생성물질, 생물전환용 적정 미생물 및 생물전환 대사체 구성물의 조성 비율에 따른 세포, 동물모델에서의 뇌질환 개선 효능, 작용 기전 등에 대한 연구결과는 국내외 식의약 소재 관련 SCI 저널에 투고함.
- (2) 본 연구를 통하여 개발되는 뇌질환 개선 효과가 우수한 생강유래 생물전환 대사체 신소재 원료 및 이들 유효성분을 함유하는 기능성 식품 개발 관련 원천기술은 특허출원(PCT 포함)하여 산업재산권을 확보함.
- (3) 생물전환 대사체 신소재 개발 및 생산 기술과 이들을 유효성분으로 함유하는 조성물 개발 기술은 과제종료 이후 (주)케이네디쿱에 기술이전 하였음.
- (4) 생강유래 6-shogaol에 생물전환기술을 응용하여 개발된 효능물질과 연구과정에서 밝혀진 효능물질의 체내 기전을 기반 기술로 활용하여 향후 뇌행성 뇌질환 예방을 위한 천연물 유래 신약 소재를 개발함.
- (5) 대중에게 인지도가 높은 생강 원료를 사용함으로써 소비자의 수용도 및 신뢰를 높이고 국내산 소재를 주 원료로 하는 과학적 근거를 갖춘 고품질의 건강기능식품으로의 개발 가능성을 높임.
- (6) 인지기능 개선기능을 국제 저널에 게재하고 발표함으로써 국내산 기능성 소재의 가능성을 제시하고 기능성 원료개발을 통해 국내 식품관련 기술력을 인정받을 수 있는 계기를 마련하였음.
- (7) 국내 천연물 연구는 아직 생리활성 물질의 일차적 탐색에 머물러 있어 선진국 대비 기술적인 격차가 현저한 바, 본 연구가 성공적으로 종료될 경우 국내의 기술수준을 혁신시킬 것으로 생각됨.
- (8) 핵심기술인 천연물의 유효소재 탐색, 천연물의 대량생산 등의 단위기술 수준이 혁신될 것임.
- (9) 천연물 유래 기능성 생물소재의 개발기술은 건강기능식품의 개발뿐 아니라, 천연물 신약 개발 등 응용되는 기초적인 개발 도구임 따라서 성공적 수행은 향후 식의약 개발에 필요한 기초적인 자원으로 활용.

## 5. 연구결과의 활용계획

코드번호

D-07

- 본 과제를 통한 연구결과는 인지기능 개선 효능을 동물실험을 통해 그 효과를 확인하였다. 이는 본 기능성 식품 인증에 중요한 진전을 이루었음 뿐만 아니라 기능성 원료의 인지기능 개선에 대한 한 예를 보여줌으로써 해당 기능성 식품의 개발에도 촉진제 역할을 할 것이다.
- 생강발효추출물은 향후 기술 이전한 (주)케이메디쿰과 함께 다양한 제형연구 및 안정성 연구를 실시하여 제품을 상용화할 예정이다.
- 생강발효추출물은 향후 기술 이전한 (주)케이메디쿰에서 식품의약품안전처에 인지기능 개선 개별인정형 신청을 할 예정이다.



## 6. 연구과정에서 수집한 해외과학기술정보

|          |      |      |
|----------|------|------|
|          | 코드번호 | D-08 |
| ○ 해당사항없음 |      |      |

## 7. 연구개발결과의 보안등급

|          |      |      |
|----------|------|------|
|          | 코드번호 | D-09 |
| ○ 해당사항없음 |      |      |

## 8. 국가과학기술종합정보시스템에 등록된 연구시설·장비 현황

|       |                |             |    |        | 코드번호          | D-10          |                  |                |
|-------|----------------|-------------|----|--------|---------------|---------------|------------------|----------------|
| 구입 기관 | 연구시설/<br>연구장비명 | 규격<br>(모델명) | 수량 | 구입 연월일 | 구입 가격<br>(천원) | 구입처<br>(전화번호) | 비고<br>(설치<br>장소) | NTIS장비<br>등록번호 |
|       |                |             |    |        |               |               |                  |                |

## 9. 연구개발과제 수행에 따른 연구실 등의 안전조치 이행실적

|          |      |      |
|----------|------|------|
|          | 코드번호 | D-11 |
| ○ 해당사항없음 |      |      |

## 10. 연구개발과제의 대표적 연구실적

| 번호 | 구분<br>(논문<br>/특히<br>/기타) | 논문명/특히명/기<br>타                                                                                                               | 소속<br>기관명              | 역할                        | 논문게재지/<br>특히등록국가                                                | 코드번호             |                     | D-12                         |                               |
|----|--------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------|---------------------------|-----------------------------------------------------------------|------------------|---------------------|------------------------------|-------------------------------|
|    |                          |                                                                                                                              |                        |                           |                                                                 | Impact<br>Factor | 논문게재일<br>/특히등록<br>일 | 사사여부<br>(단독사사<br>또는<br>중복사사) | 특기사항<br>(SCI여부<br>/인용횟수<br>등) |
| 1  | 논문                       | 6-Shogaol, an active constituent of ginger, attenuates neuroinflammation and cognitive deficits in animal models of dementia | 경희대<br>한국식<br>품연구<br>원 | 참여<br>저자                  | Biochemical<br>and<br>Biophysical<br>Research<br>Communications | 2.37             | 2015.06             | 중복사사                         | SCI/21                        |
| 2  | 논문                       | Fermentation enhances the neuroprotective effect of shogaol-enriched ginger extract via an increase in 6-paradol content     | 한국식<br>품연구<br>원        | 제1<br>지자<br>,<br>교신<br>지자 | Journal of<br>Functional<br>Food                                | 3.97             | 2016. 03            | 단독사사                         | SCI/1                         |
| 3  | 논문                       | Neuroprotective effect of 6-paradol enriched ginger extract by fermentation using Schizosaccharomyces pombe                  | 한국식<br>품연구<br>원        | 제1<br>지자<br>,<br>교신<br>저자 | Journal of<br>Functional<br>Food                                | 3.97             | 2017<br>(Accept)    | 단독사사                         | -                             |
| 4  | 특히<br>(등록)               | 미생물을 이용하여 파라돌 함량을 증가시키는 방법                                                                                                   | 한국식<br>품연구<br>원        |                           | 대한민국                                                            |                  | 2015.05.20          |                              |                               |
| 5  | 특히<br>(중복)               | Schizosaccharomyces pombe를 이용한 생강발효불미의 용도                                                                                    | 한국식<br>품연구<br>원        |                           | 대한민국                                                            |                  | 2017.02.28          |                              |                               |

## 11. 기타사항

| 코드번호     | D-13 |
|----------|------|
| ○ 해당사항없음 |      |

## 12. 참고문헌

| 코드번호 | D-14                                                                                                                                                                                                                   |
|------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1.   | 식품약품안전처 식품원재료                                                                                                                                                                                                          |
| 2.   | 국과학식물회. 식품과학사전. (주)교문사. 2012.                                                                                                                                                                                          |
| 3.   | Matthews A et al. Interventions for nausea and vomiting in early pregnancy. The Cochrane Database Syst Rev (2014)                                                                                                      |
| 4.   | Viljoen E et al. A systematic review and meta analysis of the effect and safety of ginger in the treatment of pregnancy-associated nausea and vomiting. Nutrition Journal (2014)                                       |
| 5.   | Kashefi F et al. Comparison of the effect of ginger and zinc sulfate on primary dysmenorrhea: a placebo controlled randomized trial. Pain Manag Nurs (2014)                                                            |
| 6.   | Bartels EM et al. Efficacy and safety of ginger in osteoarthritis patients: A meta-analysis of randomized placebo-controlled trials. Osteoarthritis and Cartilage. (2015)                                              |
| 7.   | Musthafa ME et al. Neuroprotective Effect of Natural Products Against Alzheimer's Disease. Neurochem Res. (2012)                                                                                                       |
| 8.   | Gaire BP et al. Neuroprotective Effect of 6-Paradol in FocalCerebral Ischemia Involves the Attenuation of Neuroinflammatory Responses in Activated Microglia. PLOS ONE. (2015)                                         |
| 9.   | 국민건강영양조사. 보건복지부, 2013.12                                                                                                                                                                                               |
| 10.  | Kwak JS et al. Systematic review of the effect of dried ginger powder on improvement of nausea and vomiting associated with early pregnancy or motion sickness* Journal of Nutrition and Health, J Nutr Health. (2014) |
| 11.  | Chittumma P et al. Comparison of the effectiveness of ginger and vitamin B6 for treatment of nausea and vomiting in early pregnancy: a randomized double-blind controlled trial. J Med Assoc Thai (2007)               |

12. Yamahara J et al. Active components of ginger exhibiting anti-serotonergic action. *Phytother Res.* (1989)
13. Huang Q et al. Anti-5-hydroxytryptamine<sub>3</sub> effect of galanolactone, diterpenoid isolated from ginger. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*. (1991)
14. Shoji N et al. Cardiotoxic principles of ginger (*Zingiber officinale* Roscoe). *J Pharm Sci.* (1982)
15. Suckawa M et al. Pharmacological Studies on ginger I. Pharmacological actions of pungent constituents. (6)-gingerol and (6)-shogaol. *J Pharmacobiodyn* 836-848 (1984)



